

温阳活血方对大鼠肾间质 TIMP-1、MMP-3、FN 的影响

曹 微¹ 师晶丽² 李 均³

(贵州省省长基金资助项目, 课题编号 C-263, 遵义医学院博士启动基金资助项目; 1 中山大学 2004 级硕士, 广东省珠海市香洲区梅华东路 52 号, 519000; 2 中山大学附属第五医院中医科; 3 遵义医院第五附属医院中医科)

摘要 目的: 观察温阳活血方对实验大鼠肾间质纤维化的保护作用并探讨其作用机理。方法: 实验采用单侧输尿管梗阻 (UUO) 大鼠模型, 将其随机分为温阳活血组、福辛普利组、模型组, 并设假手术组。观察梗阻侧肾脏组织形态学改变, 免疫组化半定量分析各组的基质金属蛋白酶-3 (MMP-3)、基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1)、纤维连接蛋白 (FN) 的表达水平并与假手术组比较。结果: 模型组及各治疗组与假手术组相比均呈不同程度的病理损害。模型组的 MMP-3、TIMP-1、FN 表达水平均高于假手术组 ($P < 0.05$), 且 TIMP-1 的表达明显高于 MMP-3 的表达。两个治疗组与模型组相比, MMP-3 的表达水平高于模型组 ($P < 0.05$); 但 TIMP-1、FN 的表达水平低于模型组 ($P < 0.05$); MMP-3、TIMP-1、FN 在两个治疗组间的表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 温阳活血方可能通过抑制 TIMP-1 的表达, 恢复 MMP-3 表达, 以此来调节 MMP-3/TIMP-1 的比例, 从而保护肾小管功能, 减轻间质纤维化的进展。

关键词 肾间质纤维化/中医药疗法; @ 温阳活血方

Effect of Warming Yang and Activating Blood Formula on TIMP-1, MMP-3, FN in Rats with Renal Interstitial Fibrosis

Cao Wei, Shi Jingli, Li Jun

(Zhongshan University, Zhuhai, 519000)

Abstract **Objective:** to observe the protection of Warming Yang and Activating Blood Formula on renal interstitial fibrosis in rats and try to find the mechanism. **Methods:** The model of renal obstruction was established by unilateral ureteral obstruction (UUO) in rats, and then randomly divided into four groups, i. e. UUOW group (treated with the formula), UUOF group (treated with Fosinopril), UUO group and the sham-operation group. The morphological changes in obstructing renal tissue and the protein expressions of MMP-3, TIMP-1, FN were observed and compared. **Results:** Different degrees of kidney lesion were shown in UUO, UUOW, UUOF groups as compared with the SH group. The expressions of MMP-3, FN of UUO were higher than those of the SH group ($P < 0.05$), and TIMP-1 was higher than MMP-3. Expressions of MMP-3 of both UUOF and UUOW had higher MMP-3 expression ($P < 0.05$) and lower TIMP-1, FN expression than the UUO group ($P < 0.05$). However, there were no significant difference among two treatment groups in all parameters ($P > 0.05$). **Conclusion:** the formula may regulate the ratio between MMP-3/TIMP-1 by decreasing the expression of TIMP-1 and increasing MMP-3, in that way protect renal tubule and delay the progression of renal interstitial fibrosis.

Key Words Renal interstitial fibrosis/Chinese medical therapy; @ Formula of Warming Yang and Activating Blood

肾间质纤维化是各种原因所致的肾脏疾病发展至终末期的突出表现, 是直接导致或加重慢性肾功能衰竭的重要原因之一^[1]。大量临床和试验研究表明, 肾功能受损与小管间质损伤密切相关。其影响程度大于肾小球病变程度的影响^[2~3], 细胞外基质 (ECM) 合成降解失衡导致 ECM 在肾间质的过度沉积是引起肾间质纤维化的主要原因。基质金属蛋白酶 (MMPs) 是 ECM 蛋白降解酶的一种, 是调节 ECM 的重要酶类, 金属蛋白酶组织抑制物 (TIMPs) 为其特异性抑制因子, MMPs/TIMPs 比例失衡导致小管间质 ECM 转换失衡, 最终导致肾间质纤维化的形成。纤维连接蛋白 (FN) 也是肾间质纤维化的一个重要标志, 并直接参与了细胞外基质的形成。温阳活血方具有温补肾阳和活血化瘀作用, 该方可以防止肾小管纤维化, 保护肾功能。本实验将探讨温阳活血方对肾间质基质金属蛋白酶-3

(MMP-3)、金属蛋白酶组织抑制物-1 (TIMP-1) 和 FN 表达的影响。

1 材料

1.1 实验动物: 雄性 Wistar 大鼠 32 只, 体重为 (180 ± 20) g, 由中山大学动物实验中心提供。

1.2 主要药物与试剂: 温阳活血方由桃仁、红花、肉苁蓉、淫羊藿、牡丹皮等组成, 中药配方颗粒剂, 由大江药业有限公司生产; 福辛普利胶囊由中美上海施贵宝制药有限公司生产, 每粒 10 mg; MMP-3、TIMP-1 及 FN 抗体及免疫组化 SABC 试剂盒均购自武汉博士德公司。

2 方法

2.1 动物模型和分组: 随机将实验动物分为假手术组和 UUO 模型组、温阳活血治疗组 (32 g/kg · d)、福辛普利治疗组 (10 mg/kg · d), 每组 8 只。采用左侧输尿管

结扎手术制备 UUO 模型。假手术组开腹后不结扎输尿管,直接缝合。造模成功后第 2 天开始灌胃,连续给药 14 天。各治疗组用药剂量相当于人用剂量的 20 倍。于实验第 14 天大鼠取左侧肾脏,经脱水、透明、包埋制成肾组织石蜡块。

2.2 观察指标及检测方法

2.2.1 肾脏病理检查:HE 染色,双盲法显微镜观察,按 Banff 分级^[4]进行肾间质损伤半定量计分。Masson 染色,随机选择 10 个不同的视野,光镜放大 400 倍,应用 Image-Pro Plus5.1 图象分析系统计算每个视野下胶原纤维染为蓝色的面积,取其平均值来评价肾小管间质纤维化程度。

2.2.2 肾组织中的 MMP-3、TIMP-1、FN 表达采用免疫组织化学法检测,免疫组化步骤严格按照试剂盒说明书进行。每张切片随机选择 10 个不同的视野,光镜放大 400 倍,用 Image-Pro Plus5.1 图象分析系统进行分析,计算每个视野下阳性染色的面积,取其平均值。

2.3 统计学方法:采用 SPSS13.0 统计软件分析所得数据,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料间比较采用单因素方差分析,LSD 法多重比较组间差异。

3 结果

3.1 肾脏病理改变:假手术组肾脏未见病理改变,模型组可见肾小管上皮细胞大量萎缩、空泡变性,皮质和近髓萎缩肾小管较多,间质内大量炎性细胞浸润,并出现明显间质纤维化。而福辛普利治疗组、温阳活血治疗组间质内炎细胞浸润、肾小管上皮细胞变性、萎缩程度及间质纤维化范围比 UUO 模型组轻($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠肾间质损伤评分结果及肾间质胶原纤维面积($\bar{x} \pm s$)

组别	N	肾间质损伤评分	肾间质胶原纤维面积
温阳活血组	8	2.23 ± 0.13 ^{△*}	8817.11 ± 1230.48 ^{△*}
福辛普利组	7	2.22 ± 0.21 ^{△*}	9119.28 ± 1671.99 ^{△*}
UUO 模型组	7	2.62 ± 0.23 [△]	13375.74 ± 1541.53 [△]
假手术组	7	0	5453.97 ± 1520.26

注:与假手术组相比有明显差异,[△] $P < 0.05$;与模型组相比有明显差异,* $P < 0.05$ 。

3.2 MMP-3、TIMP-1、FN 的免疫组化结果:假手术组

表 2 MMP-3、TIMP-1 在大鼠肾间质的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	N	MMP-3	TIMP-1	FN
温阳活血组	8	23675.28 ± 4010.77 ^{△*}	20681.16 ± 6718.65 ^{△*}	18833.28 ± 2984.06 ^{△*}
福辛普利组	7	25292.61 ± 3513.86 ^{△*}	18884.59 ± 5623.71 ^{△*}	17015.76 ± 3977.24 ^{△*}
UUO 模型组	7	17140.03 ± 7090.52 [△]	27074.77 ± 5864.65 [△]	24515.47 ± 3471.01 [△]
假手术组	7	8274.81 ± 2432.48	5267.33 ± 1662.00	1852.30 ± 1696.72

注:与假手术组相比有明显差异,[△] $P < 0.05$;与模型组相比有明显差异,* $P < 0.05$ 。

MMP-3、TIMP-1、FN 均有少量表达。UUO 模型组与假手术组相比,MMP-3、TIMP-1、FN 的表达水平均有显著增高($P < 0.05$),并且 TIMP-1 表达明显高于 MMP-3 表达,提示大鼠梗阻侧肾脏内存在明显的 MMP-3/TIMP-1 失衡。温阳活血治疗组和福辛普利治疗组的 MMP-3 表达水平明显高于模型组($P < 0.05$),TIMP-1、FN 的表达水平明显低于模型组($P < 0.05$)。而温阳活血治疗组与福辛普利治疗组间 MMP-3、TIMP-1、FN 表达无明显差异($P > 0.05$)。

4 讨论

各种慢性肾脏疾病迁延不愈,最终均导致慢性肾功能衰竭,肾间质纤维化是慢性肾功能衰竭的主要病理特征之一。根据中医“久病多虚、多伤阳气”、“病久多瘀”的理论,肾间质纤维化既有正气虚损,又有实邪蕴积,其病机为阳虚血瘀。“阳虚”为本,“血瘀”为标,且“血瘀”病机贯穿本病始终。我们曾研究观察 90 例慢性肾衰小管间质病变患者中,辨证有血瘀证者 66 例,占 73.3%。在疾病进行性发展过程中,随着肾功能衰竭,血瘀兼证率进行性上升,衰竭期及尿毒症期血瘀兼证率显著高于代偿期和失代偿期,验证了“久病入络为血瘀”的中医观点,慢性肾小管间质病变患者大多病程长,常反复发作,临床表现常以腰膝酸软,畏寒肢冷,神疲乏力,夜尿增多,面色晦暗,腰部冷痛或刺痛,舌边瘀点或瘀斑或舌淡胖,脉沉细为主,正如《素问·痹论》所谓:“病久入深,营卫之行涩,经络时疏,故不通”。辨证多属肾阳亏虚、气滞血瘀,而且阳虚血瘀越严重,则肾小管间质病变患者的疗效越差,耐药性越强,恶化的可能性越大。温阳活血方是以肉苁蓉、淫羊藿、红花、桃仁、牡丹皮等组成,诸药合用,标本兼顾,针对阳虚血瘀的中医病机,使脉络瘀阻可消,阳气亏虚可益,故以该方为基础,辨证防治肾间质纤维化的发生,延缓肾脏疾病发展进程是可行的。

肾间质纤维化的形成是一个缓慢的动态过程,涉及细胞、细胞因子、ECM、MMPs/TIMPs 等因素间复杂的相互作用,其中任何一个环节的不平衡都将会出现相应的病理状态,若能在这些环节中加以干预(如调节 MMPs/TIMPs 比例失衡,使 MMPs 表达增加或活性增

· 中医成才经验 ·

张琪的成才之路

黑龙江省中医研究院“张琪学术思想及临证经验研究”课题组撰写,

张佩青 李淑菊执笔

(国家“十五”科技攻关计划“名老中医学术思想、经验传承研究”课题)

关键词 名老中医; @ 张琪

张琪教授是国家中医药管理局“十五”中医肾病重点专科学术带头人,首批享受国务院特殊津贴,全国继承老中医药专家学术经验指导教师,博士研究生导师,中华中医药学会终身理事。临证擅治肾病及多种疑难重症,在肾病的治疗研究方面尤具特色,其中对急性慢性肾小球肾炎、IgA 肾病、慢性肾功能衰竭、肾病综合征、过敏性紫癜性肾炎、糖尿病肾病、肾盂肾炎等肾病有较深造诣。他主持完成多项临床研究课题,获得国家、省部级科技进步奖多项。

1 勤奋学习,成功之母

张琪教授在《张琪临证经验荟要》一书中讲:“试观古今中外有成就的科学家、文学家,包括医学家,都是焚膏继晷地勤奋学习。学习中医也不例外。没有这种勤奋好学、锲而不舍的精神,要想学而有成是不可能的。”在其所撰医论中曾云:“‘医者意也’,此‘意’字寓意深刻,即言为医者必须思路广阔,善于运用思维分析病情,探微索隐。”学中医首先要学会辨证,只有辨证准确,用药得当才能看好病。这是要靠勤奋获得的。

张琪教授主张多阅读。既要阅读古代经典文献著作,又要阅读现代书籍。几十年来他养成每天读书的习惯,几乎订全了国内发行的中医杂志,一有闲暇便广泛浏览,细心阅读,坚持不懈。如今年过八旬仍每周写读书笔记和心得体会。他常说:“在技术上精益求精,不断攀高峰,是一个医生的职责。”几十年来他就是这样刻苦钻研,勤奋学习,锲而不舍,使技术精益求精,突

破了医疗和科研中一个又一个难关。

2 注重实践,成功的关键

理论联系实际是张琪教授取得成功的关键。他认为中医学的形成是从实践到理论,由理论指导实践,只有不断实践才能证实理论而发展理论。中医要不断地临床,光看书,不临床,就成了本本先生。只有理论与实际相结合,深厚的中医功底与不断的临床治疗相结合,才会有所成就。勤于实践是中医临床医生提高学术水平,丰富经验最重要的方法。他自从医以来从未离开临床,如今仍坚持工作在临床科研第一线。经多年临床实践,总结出慢性肾衰竭病机复杂,多呈正虚邪实,正虚为本,邪实为标,虚实夹杂、寒热互见之证,其中由于脾肾衰败,酿成湿浊水毒,瘀血滞留。正虚邪实是病机的关键。治当攻补兼施,正邪两顾,确立补脾肾、泻湿浊、解毒活血的治疗大法。多读书、多临床、多总结,是他毕生的治学格言。

3 热爱专业,矢志不渝

张琪教授曾祖父和祖父都是当地的名中医,叮咛其仔细研读医书。他7岁开始读《黄帝内经》、《伤寒论》,但学而不知其味,背而不知其意,不能理解其中的深奥理论和用法的奥妙之处,体会较浅。但是,他亲眼目睹他们治好许多疑难疾病,认识到中医能够为人民大众解除疾苦。受家庭的影响,他矢志不渝,坚持学习中医。1938年汪精卫投降日本以后,整个中医面临取缔,不少亲朋好友奉劝其不要学习中医。但因其对中医的爱好,对中医的疗效坚信不疑,故仍坚持学习中医。张琪教授认为只有热爱自己的专业,才能深入学

强或使TIMPs表达减少)则有望能延缓甚至逆转肾纤维化的进程。本实验结果表明温阳活血方可能通过抑制TIMP-1、FN的表达,恢复MMP-3表达,以此来调节MMP-3/TIMP-1的比例,从而起到保护肾小管功能,延缓间质纤维化的进展。

参考文献

- 1 Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y, et al. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. Am J Pathol, 2001, 159: 1313 ~ 1321.

- 2 Kostadinova-Kunovska S, Petrusenska G, et al. Histomorphometric analysis of fibrosis in the renal interstitial compartment. Prilozi, 2005, 26(1): 51 ~ 59.
- 3 Rocha KB, Soares VA, Viero RM. The role of myofibroblasts and interstitial fibrosis in the progression of membranous nephropathy. Ren Fail, 2004 Jul; 26(4): 445 ~ 451.
- 4 Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology[J]. Kidney Int, 1999, 55(2): 713 ~ 723.

(2007-06-11 收稿)