

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.24.004

脉血康胶囊对 UUO 大鼠肾组织 STAT3 和 α -SMA 表达的动态研究*

郭庆喜¹,蒲霞¹,陈凯锋²,杨成万¹,曹灵³,孙兴旺^{1△}

(1. 西南医科大学附属医院病理科,四川泸州 646000;2. 中国人民解放军 42 医院病理科,四川乐山 614100;
3. 西南医科大学附属医院肾病内科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 动态观察脉血康胶囊对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾组织信号转导与转录激活因子-3(STAT3)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的影响,探讨脉血康胶囊对防治肾脏间质纤维化的可能机制。**方法** 将 96 只 SD 雄性大鼠随机分为健康对照组、假手术组、模型对照组及脉血康组 4 个组,各 24 只,前 3 组给予生理盐水灌胃,脉血康治疗组术前 3 天开始给予脉血康溶液灌胃。于造模后第 1、4、7、14 天每组随机处死 6 只大鼠,动态观测肾组织形态学变化、纤维化情况及肾组织 STAT3、 α -SMA 的表达。**结果** 随梗阻时间延长,模型对照组及脉血康组肾小管上皮变性、萎缩,肾小管扩张,肾间质增宽,以模型对照组最明显。模型对照组和脉血康组肾小管上皮 STAT3、 α -SMA 表达逐渐增高,与健康对照组及假手术组比较差异有统计学意义($P<0.01$),脉血康组与模型对照组相比较,STAT3、 α -SMA 表达减少($P<0.05$)。**结论** 脉血康胶囊可能是通过 Janus 蛋白酪氨酸激酶(JAK)/STAT 信号通路调节肾小管上皮细胞转分化,延缓 UUO 大鼠肾间质纤维化进程。

[关键词] 脉血康胶囊;肾间质纤维化;上皮细胞-肌成纤维细胞转分化;信号转导与转录激活因子-3; α -平滑肌肌动蛋白
[中图分类号] R692.3+3;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)24-3323-04

Dynamic observation of Maixuekang capsule on the expression of STAT3 and α -SMA in rats with unilateral ureteral obstruction*

Guo Qingxi¹, Pu Xia¹, Chen Kaifeng², Yang Chengwan¹, Cao Ling³, Sun Xingwang^{1△}

(1. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;
2. Department of Pathology, No. 42 Hospital of People's Liberation Army, Leshan, Sichuan 614100, China;
3. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Maixuekang capsule on the expression of signal transducer and activator of transcription-3(STAT-3) and α -smooth muscle actin(α -SMA) in the occlusion kidney dynamically by unilateral ureteral obstruction (UUO) in rats, and to investigate the effect and the mechanism of Maixuekang capsule on the renal interstitial fibrosis(RIF). **Methods** Ninety-six male sprague dawley(SD) rats were randomly divided into normal control group, sham-surgery group, model control group and Maixuekang group, with 24 rats in each group. The rats were given Maixuekang by gavage once a day started 3 days prior to operation, normal control group, sham-surgery group and model control group were given normal saline (NS). Rats were sacrificed at the 1th, 4th, 7th and 14th day after operation. The levels of expression of STAT3, α -SMA and renal histopathology at each time point were examined in each group. **Results** It's significance of renal change including renal tubular epithelial degeneration and atrophy, renal tubular expansion and renal interstitial thickening of wide in model control group and Maixuekang group with the extension of obstruction time, especially in model control group. The expressions of STAT3 and α -SMA were increased in model control group and Maixuekang group, compared with normal control group and sham-surgery group($P<0.01$). Compared with model control group, the expressions of STAT3 and α -SMA in Maixuekang group were decreased($P<0.05$). **Conclusion** Maixuekang capsule may regulate the epithelial-myofibroblast transdifferentiation of renal tubular epithelium through the JAK/STAT signaling pathway to postpone the proceeding of RIF.

[Key words] Maixuekang capsule; renal interstitial fibrosis; epithelial-myofibroblast transdifferentiation; signal transducer and activator of transcription-3; α -smooth muscle actin

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是各种慢性肾病进展到终末期的共同归路,它是衡量慢性肾脏疾病进展的重要病理指标^[1]。因而阻止或延缓小管间质纤维化是阻止或逆转进行性肾功能恶化的关键。目前认为 RIF 形成涉及细胞、细胞因子和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等多种因素,最终结局是大量 ECM 的过度积聚^[2]。肾间质肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)是 ECM 产生的主要细胞^[3],肾小管上皮细胞-肌成纤维细胞转化(epithelial-myofibroblast trans-differentiation, EMT)是 MFB 主要来源之一^[4]。临床研究发

现脉血康胶囊对慢性肾衰竭具有较好的疗效^[5]。本研究构建大鼠单侧输尿管梗阻(UUO)模型,检测肾组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、信号转导与转录激活因子-3(signal transducer and activator of transcription-3, STAT-3)的表达,探讨脉血康胶囊对 UUO 大鼠 RIF 的防治作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂 普通级雄性 SD 大鼠,生产许可证号:

* 基金项目:四川省科技厅重点项目(2010JY0080);四川省教育厅一般项目(11ZB226)。 作者简介:郭庆喜(1977—),硕士,副教授,主要从事分子病理方面的研究。 △ 通讯作者, Tel:13508035625; E-mail: lzsunxw@163.com。

SCXK(川)2008-1-7,使用许可证号:SYXK(川)2008-065,由泸州医学院实验动物中心提供。所有大鼠饲养于专用的动物房,每笼 1 只,并保持恒温、通风、安静,每日更换垫料,定期消毒。脉血康胶囊购于重庆时珍阁普生药业有限公司(国药准字 Z10970056)。兔抗鼠 STAT3 多克隆抗体、兔抗鼠 α -SMA 多克隆抗体购于北京博奥森生物公司,多聚赖氨酸购于深圳晶美公司,免疫组织化学即用型 SP 试剂盒及二氨基联苯胺(DAB)显色液购于福州迈新生物公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立及分组 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分成 4 组:健康对照组 24 只,假手术组 24 只,模型对照组 24 只,脉血康组 24 只。模型对照组和脉血康组造模方法:实验大鼠用 2%戊巴比妥 50 mg/kg 腹腔注射,待麻醉效果满意后,将大鼠固定于动物手术台上,术区剪毛,常规消毒、铺巾,行下腹正中切口,在膀胱颈处分离出右侧输尿管,4 号丝线结扎 2 次,制作大鼠 UUO 模型^[6]。假手术组只做右侧输尿管游离但不结扎,健康对照组不做手术。健康对照组、假手术组及模型对照组于术前 3 d 起每日 2 mL 氯化钠溶液灌胃。脉血康组手术前 3 d 及手术后每日给予脉血康 0.05 g/kg,以 2 mL 氯化钠溶液稀释灌胃。

1.2.2 标本采集 分别于第 1、4、7、14 天各组随机选取 6 只大鼠,用 2%戊巴比妥 0.5 mL 腹腔注射麻醉后,仰卧固定于手术台,暴露心脏及双肾,用 4%多聚甲醛经左心室灌注固定肾组织,以沿肾周剥离肾包膜后,取右侧肾脏剖剖后置于 4%多聚甲醛固定液中固定。

1.2.3 苏木精-伊红(HE)形态观察及结果评定 肾组织经脱水、透明、浸蜡、包埋制成组织腊块,常规切片,HE 染色,显微镜形态学观察,每张切片随机选择 10 个 400 倍视野,观察肾小管-间质的病理变化。肾小管-间质病变由 3 个参数判定:肾小管上皮细胞变性、坏死及小管扩张程度;炎性细胞的浸润程度;小管间质纤维化的程度。每个参数按 0~3 分评定(0 分判为正常;1 分判为轻度受损,病变范围小于 15%;2 分判为中度受损,病变范围 15%~50%;3 分判为重度受损,病变范围超过

50%),计算其均值,作为该例肾小管-间质损伤指数^[6]。
1.2.4 免疫组织化学及结果评定 常规切片,厚度 3 μ m,烤干备用。免疫组织化学采用 SABC 法,按照试剂盒说明行 STAT3、 α -SMA 免疫组织化学染色。同时以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。采用 Image-pro plus 病理彩色图像分析处理系统进行分析,通过光学显微镜摄取图像,对图像进行灰度转换,使阳性面积与背景分开,进行自动测量。每例切片随机观察 20 个不重叠的 400 倍视野,计算阳性表达部位染色面积总和与视野内肾小管间质总面积(去除肾血管、肾小球及肾小管管腔面积),以两者比值的平均值进行比较^[7]。

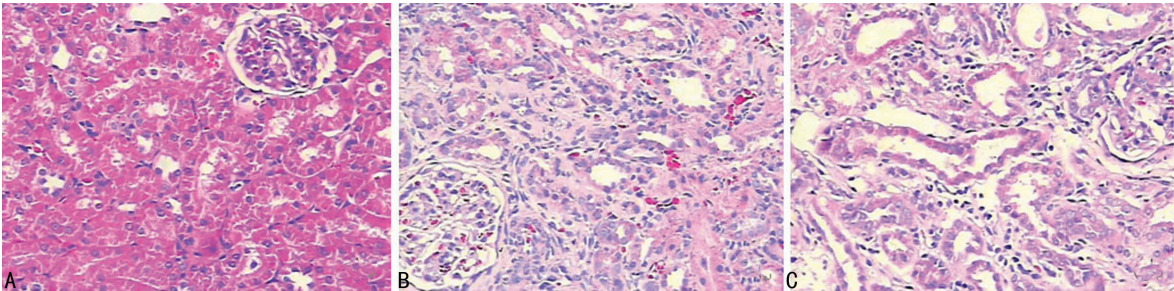
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用 t 检验,各组间差异用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾组织形态学改变 健康对照组、假手术组术后各时间点肾脏大小、形态正常,组织结构清楚。模型对照组术后第 4 天开始肾体积增大,肾小管上皮肿胀,肾间质疏松水肿,部分肾小管上皮细胞变性坏死,肾小管扩张,肾小管间隙增宽,纤维组织增生伴炎性细胞浸润。脉血康组术后第 7 天开始出现早期纤维化的病理改变,肾小管损伤、间质纤维化程度较模型对照组轻,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1、表 1。

2.2 肾小管上皮 α -SMA 动态表达 健康对照组及假手术组大鼠肾小管上皮几乎不表达 α -SMA。模型对照组及脉血康组各时间点肾小管上皮细胞见 α -SMA 表达,与前两组相比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),且随梗阻时间的延长表达呈逐渐上升趋势。与模型对照组比较,脉血康组 α -SMA 表达减少,第 14 天差异有统计学意义($P = 0.018$),见图 2、表 2。

2.3 肾小管上皮 STAT3 动态表达 STAT3 在健康对照组及假手术组表达极少,模型对照组及脉血康组各时间点表达均较前两组强($P < 0.01$),且随梗阻时间的延长表达逐渐上升;与模型对照组相比,脉血康组 STAT3 于第 4、7、14 天降低明显($P < 0.05$),见图 3、表 3。



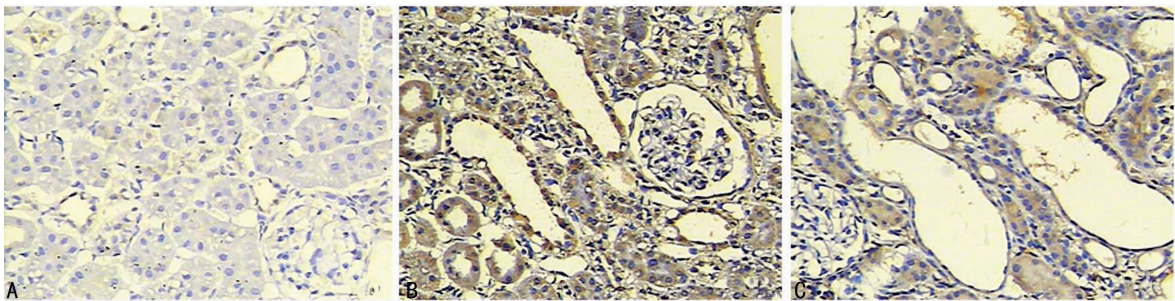
A:健康对照组;B:模型对照组;C:脉血康组。

图 1 各组大鼠第 14 天肾组织形态学观察(HE×200)

表 1 各组大鼠肾小管间质病理学改变($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 14 天
健康对照组	0.17±0.01	0.18±0.03	0.18±0.02	0.19±0.01
假手术组	0.17±0.02	0.19±0.02	0.21±0.03	0.20±0.03
模型对照组	0.83±0.29 ^{ab}	2.95±0.15 ^{ab}	3.80±0.31 ^{ab}	6.48±0.34 ^{ab}
脉血康组	0.67±0.22 ^{ab}	2.65±0.23 ^{ab}	3.22±0.34 ^{abc}	5.84±0.36 ^{abc}

^a: $P < 0.01$,与健康对照组比较;^b: $P < 0.01$,与假手术组相比较;^c: $P < 0.05$,与模型对照组相比较。



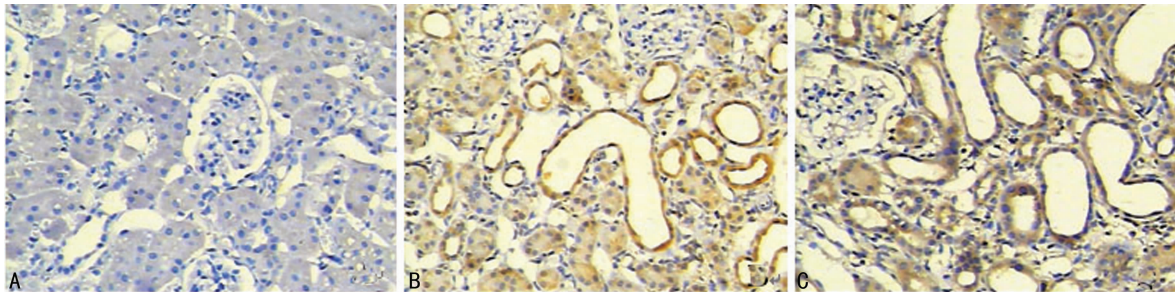
A:健康对照组;B:模型对照组;C:脉血康组。

图 2 各组大鼠肾第 14 天小管上皮 α-SMA 的表达(SABC×200)

表 2 各组大鼠肾小管上皮 α-SMA 的动态表达($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 14 天
健康对照组	0.008±0.002	0.008±0.001	0.007±0.002	0.007±0.001
假手术组	0.008±0.002	0.008±0.002	0.009±0.001	0.008±0.001
模型对照组	0.047±0.013 ^{ab}	0.081±0.018 ^{ab}	0.138±0.013 ^{ab}	0.213±0.021 ^{ab}
脉血康组	0.041±0.009 ^{ab}	0.078±0.015 ^{ab}	0.130±0.022 ^{ab}	0.196±0.018 ^{abc}

^a: $P<0.01$,与健康对照组比较;^b: $P<0.01$,与假手术组比较;^c: $P<0.05$,与模型对照组比较。



A:健康对照组;B:模型对照组;C:脉血康组。

图 3 各组大鼠第 14 天肾小管上皮 STAT3 的表达(SABC×200)

表 3 各组实验大鼠肾小管上皮 STAT3 的动态表达($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 14 天
健康对照组	0.008±0.002	0.010±0.001	0.007±0.002	0.008±0.002
假手术组	0.009±0.002	0.009±0.001	0.008±0.001	0.008±0.002
模型对照组	0.036±0.007 ^{ab}	0.108±0.012 ^{ab}	0.151±0.018 ^{ab}	0.256±0.012 ^{ab}
脉血康组	0.033±0.007 ^{ab}	0.094±0.029 ^{abc}	0.146±0.021 ^{abc}	0.197±0.013 ^{abc}

^a: $P<0.01$,与健康对照组比较;^b: $P<0.01$,与假手术组比较;^c: $P<0.05$,与模型对照组比较。

3 讨 论

脉血康胶囊主要成分是含有生物活性的水蛭素,水蛭素是存在于水蛭唾液中的一种酸性多肽类物质,具有抗凝与抗血栓形成,降低血压和血脂,改善血流动力学和微循环等作用^[8]。研究发现,脉血康胶囊可以改善肾脏血液循环,减少蛋白尿对肾脏起到保护的作用^[9]。临床应用脉血康胶囊联合爱西特治疗慢性肾衰竭患者具有一定的疗效,但作用机制不清楚,本研究通过预实验选定最佳剂量脉血康胶囊治疗 UUO 模型大鼠,研究脉血康胶囊延缓肾间质纤维化的可能机制。

肾间质纤维化是各种慢性肾脏病发展到慢性肾衰竭的共同病理特征,多种调节因子通过多种途径最终引起细胞外基质过多沉积及成纤维细胞过度增生。Janus 蛋白酪氨酸激酶(JAK)/STAT 信号通路广泛参与细胞的活化、增殖、分化、凋亡及免疫调节等过程^[10-12]。在 JAK/STAT 信号途径中,STAT3 是 JAKs 的下游底物^[13],其作用非常广泛,介导多种细胞因子和生长因子的信号向细胞核传导,影响靶基因的转录,调控细胞功能。研究发现在肾间质纤维化的发生机制中,多种

因子可通过激活 JAK/STAT 信号途径发挥作用^[14],JAK/STAT 通路的激活可促使肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转分化,上调 I 型胶原的表达,促进纤维连接蛋白的合成,增加促纤维化因子的转化生长因子-β(TGF-β)及结缔组织生长因子(CTGF)的表达,从而促进肾脏纤维化的发生、发展^[15]。Nightingale 等^[16]发现,肿瘤抑素 M(OSM)可以通过 STAT1、STAT3 的磷酸化而激活 JAK/STAT 通路,从而促使肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转分化。α-SMA 是肾间质纤维化肌成纤维细胞的一种特异性标志蛋白,是肾小管上皮细胞转分化(EMT)的标志。

本实验在 UUO 大鼠模型中观察到随着梗阻时间延长,模型对照组大鼠肾脏出现体积逐渐增大,肾小管上皮变性、萎缩,肾小管扩张,肾间质增宽,纤维组织增生伴炎细胞浸润等表现,脉血康组术后第 7 天开始出现早期纤维化的病理改变,但肾小管损伤、间质纤维化程度较模型对照组轻($P<0.05$)。免疫组织化学结果显示较健康对照组及假手术组,模型对照组及脉血康组术后各时间点 α-SMA 表达增加明显($P<0.01$),且随梗

阻时间延长,表达增高。与模型对照组相比,脉血康组 α -SMA 表达减少,第 14 天差异有统计学意义($P<0.05$)。说明 UUO 可以成功建立肾间质纤维化模型,导致肾小管上皮发生 EMT,而脉血康胶囊可以调节肾小管 EMT,减轻肾间质纤维化程度。同时实验观察到,JAK/STAT 信号通路因子 STAT3 在模型对照组及脉血康组各时间点表达均较健康对照组及假手术组明显增高($P<0.01$),且随梗阻时间的延长表达逐渐上升。运用脉血康治疗后,STAT3 表达减少,第 4 天开始减少明显($P<0.05$)。由此可见,脉血康能降低 STAT3 的表达,调节肾小管上皮 EMT,从而减少肌成纤维细胞生成及 ECM 的堆积,延缓肾间质纤维化进程。

参考文献

[1] Negri AL. Prevention of progressive fibrosis in chronic renal diseases;antifibrotic agents[J]. J Nephrol,2004,17(4):496-503.

[2] Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis;therapeutic potential and mechanism of action[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2004,287(1):7-16.

[3] Meran S,Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis [J]. Int J Exp Path,2011,92(3):158-167.

[4] Kalluri R,Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis [J]. J Clin Invest,2003,112(12):1776-1784.

[5] 邹德平,许志忠,朱再志,等. 脉血康联合爱西特治疗慢性肾功能衰竭疗效观察[J]. 医学信息(上旬刊),2011,24(1):90-91.

[6] 薛痕,樊均明,陈亮,等. 大鼠肾间质纤维化动物模型的实验研究[J]. 四川动物,2004,23(1):16-20.

[7] 张翠薇,谢茂,张旭,等. 威灵仙对单侧输尿管梗阻模型大鼠血液流变学及肾间质纤维化的影响[J]. 实用医学杂志,2012,28(18):3022-3024.

[8] 严永兴,梁丽贞,沈咏慧,等. 脉血康胶囊对脑梗死恢复期

患者疗效及对凝血功能的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(23):3667-3668.

[9] 朱俊江. 疏血通治疗 2 型糖尿病肾病的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志,2012,5(12):75-76.

[10] Misseri R, Rink RC, Meldurm DR, et al. Inflammatory mediators and growth factors in obstructive renal injury [J]. J Surg Res,2004,119(2):149-159.

[11] Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, et al. JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders:Approaches for targeted therapies[J]. Genes Cancer,2010,1(10):979-993.

[12] Fossett N. Signal transduction pathways,intrinsic regulators,and the control of cell fate choice[J]. Biochim Biophys Acta,2013,1830(2):2375-2384.

[13] Swiatek Machado K,Kaminska B. STAT signaling in glioma cells[J]. Adv Exp Med Biol,2013,986:189-208.

[14] Huang JS,Guh JY,Chen HC,et al. Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells[J]. J Cell Biochem,2001,81(1):102-113.

[15] Nakajima H,Takenaka M,Kaimori JY,et al. Activation of the signal transducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin [J]. J Am Soc Nephrol,2004,15(2):276-285.

[16] Nightingale J,Patel S,Suzuki N,et al. Oncostatin M,a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation[J]. J Am Soc Nephrol,2004,15(1):21-32.

(收稿日期:2016-02-04 修回日期:2016-06-28)

(上接第 3322 页)

[2] 李建萍,潘瑞福. 类固醇肌病大鼠模型的建立及其骨骼肌病变的形态学研究[J]. 中国神经精神疾病杂志,2001,27(1):7-9.

[3] 孙伟,汤球,江鹏亮,等. 运用系统论原理复制人类疾病动物模型[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(10):67-69.

[4] Kellenberger S,Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels;a variety of functions for a shared structure[J]. Physiol Rev,2002,82(3):735-767.

[5] Kellenberger S,Gautschi I,Schild L. An external site controls closing of the epithelial Na^+ channel ENaC[J]. J Physiology,2002,543(Pt 2):413-424

[6] Staruschenko A, Adams E, Booth RE, et al. Epithelial Na^+ channel subunit stoichiometry[J]. Biophys J,2005,88(6):3966-3975.

[7] Rich MM,Pinter MJ. Crucial role of sodium channel fast inactivation in muscle fibre inexcitability in a rat model of critical illness myopathy[J]. J Physiol,2003,547(Pt 2):

555-566.

[8] 沈颀飞,王海业,麻颖宜,等. 细胞内渗透压改变对三叉神经电压门控钠离子通道电流的影响[J]. 华西口腔医学杂志,2012,30(4):338-342.

[9] Witkowski S,Lovering RM, Spangenburg EE. High-frequency electrically stimulated skeletal muscle contractions increase p70s6k phosphorylation independent of known IGF-I sensitive signaling pathways [J]. FEBS letters,2010,584(13):2891-2895.

[10] Chen JW,Chen SY,Li HY,et al. Effect of exogenous interferon gamma on the healing of injured skeletal muscle following injury[J]. China J Orthop Traumatol,2008,21(6):434-437.

[11] Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2005,288(6):1423-1431.

(收稿日期:2016-02-22 修回日期:2016-06-29)