

黄连碱对慢性肾功能衰竭大鼠的治疗作用及其机制研究

张玲^a, 熊维建^a, 张太君^{b*} (重庆市中医院, a.肾病科, b.科教处, 重庆 400021)

摘要: 目的 探讨黄连碱对慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)大鼠的治疗作用及其机制。方法 60只健康SD大鼠, ♂, 随机分为空白组、模型组、尿毒清组、黄连碱200, 100和50 mg·kg⁻¹剂量组, 每组10只。除空白组外, 各组大鼠灌胃腺嘌呤, 连续28 d, 制成CRF模型。造模同时, 黄连碱200, 100和50 mg·kg⁻¹剂量组每日分别灌胃200, 100和50 mg·kg⁻¹黄连碱。治疗后, 观察各组大鼠体质量的变化、检测24 h尿量及尿蛋白含量, Elisa法检测各组大鼠血清尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)、TGF-β₁及PAI-1的含量水平、Western blot法检测大鼠肾组织TGF-β₁及PAI-1蛋白的表达。结果 与模型组比较, 200, 100和50 mg·kg⁻¹剂量的黄连碱干预后, 大鼠体质量及24 h尿量显著增加($P < 0.05$), 尿蛋白显著降低($P < 0.05$), 且血清中BUN、SCr、TGF-β₁及PAI-1含量和肾组织TGF-β₁和PAI-1表达均显著降低($P < 0.05$)。结论 黄连碱对CRF大鼠的肾功有一定的改善作用, 其机制与降低血清及肾组织中TGF-β₁和PAI-1表达有关。

关键词: 黄连碱; 肾功能衰竭; TGF-β₁; PAI-1

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)01-0030-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.008

Effect and Mechanism of Coptisine on the Rat Model of Chronic Renal Failure

ZHANG Ling^a, XIONG Weijian^a, ZHANG Taijun^{b*} (Hospital of Traditional Chinese Medicine of Chongqing City, a.Nephrology, b.Scientific Research and Education Department, Chongqing 400021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect and mechanism of coptisine on the rat model of chronic renal failure(CRF). **METHODS** The 60 male SD rats were divided into 6 groups: the blank group, model group, positive control group and the 200, 100 and 50 mg·kg⁻¹ dose of coptisine groups. Rats were gavaged adenine 28 d, except the blank group. The high, middle, low dose of coptisine group rats were gavaged 200, 100 and 50 mg·kg⁻¹ coptisine each day. After therapy, weight, urinary production and urinary protein in 24 h was detected, urea nitrogen(BUN), creatinine(SCr), TGF-β₁ and PAI-1 in serum was detected by Elisa; the expression of TGF-β₁ and PAI-1 in kidney tissue was detected by Western blot. **RESULTS** Compared with model group, in 200, 100 and 50 mg·kg⁻¹ dose of coptisine groups, weight and urinary production of 24 h were increased($P < 0.05$) and urinary protein in 24 h was decreased($P < 0.05$); BUN, SCr, TGF-β₁ and PAI-1 level in serum and the expression of TGF-β₁ and PAI-1 protein was decreased($P < 0.05$). **CONCLUSION** Coptisine has a certain effect on the renal function of CRF rats and its mechanism is related to the expression of TGF-β₁ and PAI-1 in serum and renal tissue.

KEY WORDS: coptisine; chronic renal failure; TGF-β₁; PAI-1

慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)是一种慢性进行性的肾实质损害, 使得肾脏功能减退, 引起代谢物和毒物潴留、水电解质紊乱、酸碱失衡, 从而导致全身各组织脏器受损。目前, 临床上对CRF的治疗手段主要是血液透析或肾脏移植, 极大地加重了患者的经济负担。黄连碱是毛茛科多年生草本植物黄连的有效成分, 分子式为C₁₉H₁₄NO₄, 性寒, 味苦, 能清热、燥湿、泻火。目前研究发现, 黄连碱具有多种药理作用, 能抗真菌、保护胃黏膜、保护心肌细胞、抑制细胞增殖等^[1]。国外研究发现, 黄连碱能抵抗过氧亚硝酸盐诱导的肾损伤和纤维化, 但作用机制不明^[2]。本

研究将以CRF大鼠为模型, 观察黄连碱对其影响, 并探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 药物

黄连碱(南京景竹生物科技有限公司, 批号: 20141026, 纯度≥98%)。将黄连碱溶解于生理盐水中, 配成100 mg·mL⁻¹, 备用。腺嘌呤(购自湖北远成赛创科技有限公司, 批号: 20120711, 含量>99%)。尿毒清(康臣药业, 批号: 20150303, 规格: 每袋5 g)。

1.2 动物

60只SPF级健康SD大鼠, ♂, 体质量(250±

基金项目: 重庆市中医特色诊疗工程技术研究中心能力提升项目(CSTC2014PT-GC10003)

作者简介: 张玲, 女, 副主任医师 Tel: (023)67063781 E-mail: 619209887@qq.com *通信作者: 张太君, 男, 博士, 副主任医师 Tel: (023)67063760 E-mail: 1842725016@qq.com

50)g,购自重庆医科大学实验动物中心,许可证号:SYXK(渝)2012-0001。

1.3 试剂

尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)、TGF-β₁ 和 PAI-1 酶联免疫吸附试剂盒购自 cloud-clone corp, 批号分别为 20140506AP, 20140302GV, 20140801HC, 20140607DA; 羊抗鼠 TGF-β₁ 和 PAI-1 一抗及羊抗鼠 IgG 二抗购均自 Sigma 公司, 批号分别为 2A132, G6H36, 46D89, 35B42。

1.4 仪器

Bio-Red 酶标仪(美国 Gene); 自动凝胶显像仪(美国 Thermo)。

1.5 方法

1.5.1 造模、分组和给药 60 只健康 SD 大鼠随机分为空白组、尿毒清组、模型组、黄连碱 200, 100 和 50 mg·kg⁻¹ 剂量组, 每组 10 只。正常组给予正常饲料, 其余各组给予含有 5%腺嘌呤的饲料, 连续喂养 28 d。造模同时, 尿毒清组每日灌胃尿毒清 6.7 g·kg⁻¹, 黄连碱 200, 100, 和 50 mg·kg⁻¹ 剂量组每日分别灌胃 200, 100 和 50 mg·kg⁻¹ 黄连碱, 空白组和模型组灌胃相应体积的生理盐水。

1.5.2 观察大鼠的一般情况 比较造模前后大鼠的体质量变化, 观察其精神状态、活动及毛发等。

1.5.3 24 h 尿量及尿蛋白检测 第 29 天, 用代谢笼收集大鼠 24 h 的尿液, 比较各组尿量, 并用考马斯亮蓝法检测尿液中蛋白含量。

1.5.4 血清中 BUN、SCr、TGF-β₁ 及 PAI-1 水平检测 第 30 天, 大鼠禁食禁水一夜, 10%水合氯醛腹腔注射麻醉, 断头取血, 4 ℃下静置 1 h, 待上清液析出取上层血清, 严格按照 Elisa 试剂盒说明书进行操作, 对 BUN、SCr、TGF-β₁ 和 PAI-1 水平进行检测。

1.5.5 肾组织 TGF-β₁ 及 PAI-1 蛋白的表达 动物处死后, 迅速取出肾脏, 剪碎, 加入液氮研磨, 再加入细胞裂解液(将 0.242 2 g Tris 溶于 20 mL 蒸馏水中, 调节其 pH 值为 8.0, 然后加入 0.149 g EDTA 和 0.16 g SDS)抽提蛋白, 用 BCA 法对蛋白进行定量。再将生理盐水把组织匀浆上清液稀释 2 000 μg·mL⁻¹ 的浓度, 加入 4×上样缓冲液, 于沸水中水浴 5 min, 在-40 ℃温度下存储; 取 10 μL 蛋白在恒压 80 V 下进行 SDS-PAGE 凝胶(10%)电泳, 电泳时间 30 min, 再换至 120 V, 取下凝胶, 200 mA 下转膜 1 h, 再在室温下用封闭液封闭

PVDF 膜, 过夜。剪下 PVDF 膜, 加入 1:250 的 TGF-β₁、PAI-1 和 GAPDH 一抗, 在室温下孵育 1 h, 再用 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入 1:5 000 的二抗, 室温下孵育 45 min, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 经 ECL 显色, 暗室曝光 2 min, 显影定影。

1.6 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验, 以 *P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况

造模第 29 天, 与模型组相比, 黄连碱 200, 100 和 50 mg·kg⁻¹ 剂量组大鼠的体质量明显增加(*P*<0.05)、活动量正常、毛发光亮、反应灵敏, 结果见表 1。

表 1 黄连碱对 CRF 大鼠体质量的影响(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 The effect of coptisine on weight in rats of CRF (*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

组 别	体质量/g	
	造模前	造模第 29 天
空白组	247.7±25.9	338.7±36.9 ¹⁾
模型组	255.3±27.5	227.8±21.1
尿毒清组	250.1±26.2	343.7±31.5 ¹⁾
黄连碱 200 mg·kg ⁻¹ 组	249.0±25.6	340.6±35.2 ¹⁾
黄连碱 100 mg·kg ⁻¹ 组	251.3±24.4	318.7±28.7 ¹⁾
黄连碱 50 mg·kg ⁻¹ 组	249.6±25.5	324.6±29.8 ¹⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾*P*<0.05。
Note: Compared with model group, ¹⁾*P*<0.05.

2.2 黄连碱对 CRF 大鼠 24 h 尿量及尿蛋白的影响

造模第 29 天, 与模型组比较, 黄连碱 200, 100 和 50 mg·kg⁻¹ 剂量组显著增加大鼠 24 h 尿量, 并显著降低尿蛋白量(*P*<0.05)。尿毒清组与黄连碱 200, 100 和 50 mg·kg⁻¹ 剂量组无显著性差异, 结果见表 2。

表 2 黄连碱对 CRF 大鼠 24 h 尿量及尿蛋白的影响(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 The effect of coptisine on 24 h urine and urine protein in rats of CRF(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

组 别	尿量/mL	尿蛋白/mg
空白组	32.8±11.3 ¹⁾	50.1±4.4 ¹⁾
模型组	21.9±8.6	146.8±16.9
尿毒清组	30.1±10.6 ¹⁾	60.2±5.7 ¹⁾
黄连碱 200 mg·kg ⁻¹ 组	29.4±10.2 ¹⁾	60.0±5.6 ¹⁾
黄连碱 100 mg·kg ⁻¹ 组	29.5±10.4 ¹⁾	60.1±6.0 ¹⁾
黄连碱 50 mg·kg ⁻¹ 组	28.2±10.1 ¹⁾	61.5±6.2 ¹⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾*P*<0.05。
Note: Compared with model group, ¹⁾*P*<0.05.

2.3 黄连碱对 CRF 大鼠血清中 BUN、SCr、TGF-β₁ 及 PAI-1 含量影响

造模第 30 天, 与模型组比较, 黄连碱 200, 100 和 50 mg·kg⁻¹ 剂量组血清中 BUN、SCr、TGF-β₁ 及 PAI-1 含量均显著降低($P<0.05$)。尿毒清组与黄连碱 200, 100 和 50 mg·kg⁻¹ 剂量组无显著性差异, 结果见表 3。

表 3 黄连碱对 CRF 大鼠血清中 BUN, SCr, TGF-β₁, PAI-1 含量和肾组织中 TGF-β₁ 及 PAI-1 蛋白表达影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)
Tab. 3 The effect of coptisine on level of BUN, SCr, TGF-β₁, PAI-1 in serum and expression of TGF-β₁ and PAI-1 protein in kidney in rats of CRF($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/μmol·L ⁻¹	TGF-β ₁ /AU·mL ⁻¹	PAI-1/AU·mL ⁻¹	TGF-β ₁ 蛋白表达	PAI-1 蛋白表达
空白组	6.7±1.0 ¹⁾	114.1±10.3 ¹⁾	56.8±43.9 ¹⁾	10.9±0.1 ¹⁾	2.440±0.2 ¹⁾	1.232±0.1 ¹⁾
模型组	16.1±3.7	216.5±16.6	117.9±63.4	15.6±0.2	10.322±0.5	10.360±0.4
尿毒清组	7.4±2.5 ¹⁾	154.4±14.3 ¹⁾	58.9±44.0 ¹⁾	11.9±0.1 ¹⁾	5.963±0.3 ¹⁾	3.870±0.2 ¹⁾
黄连碱 200 mg·kg ⁻¹ 组	7.3±2.5 ¹⁾	152.2±14.3 ¹⁾	76.6±48.6 ¹⁾	10.9±0.1 ¹⁾	5.875±0.3 ¹⁾	3.776±0.1 ¹⁾
黄连碱 100 mg·kg ⁻¹ 组	7.6±2.2 ¹⁾	167.7±15.0 ¹⁾	79.0±50.0 ¹⁾	11.0±0.1 ¹⁾	6.068±0.2 ¹⁾	3.890±0.2 ¹⁾
黄连碱 50 mg·kg ⁻¹ 组	8.1±2.7 ¹⁾	170.5±15.1 ¹⁾	83.3±51.2 ¹⁾	11.4±0.1 ¹⁾	6.224±0.4 ¹⁾	4.011±0.1 ¹⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$.

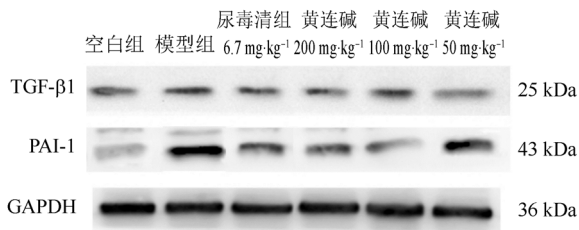


图 1 黄连碱对肾组织 TGF-β₁ 及 PAI-1 蛋白表达的影响

Fig. 1 The influence of coptisine on expression of TGF-β₁ and PAI-1 protein in kidney

3 讨论

CRF 是由于各种原因导致的慢性进行性肾皮质损伤, 使得肾脏失去排泄废物、调节水电解质及酸碱平衡等作用。从中医观点来说, CRF 是由于湿浊瘀邪内阻肾络引起, 因此以泄浊和活血化瘀为主要治疗方向^[3]。黄连是毛茛科多年生草本植物, 具有泄浊清热、活血解毒等作用。黄连的主要有效成分为黄连碱, 黄连碱的 LD₅₀ 为 852.12 mg·kg⁻¹, 属于低毒级(3 级), 现代药理研究发现其具有抗炎、抗肿瘤、调节免疫等作用^[4]。因此, 从中医理论上来看, 黄连碱对 CRF 的治疗有一定的研究意义。在预实验中, 将黄连碱的剂量设置为 400, 200, 100, 50 和 25 mg·kg⁻¹, 发现 400 mg·kg⁻¹ 和 25 mg·kg⁻¹ 这 2 个剂量组大鼠的体质量、24 h 尿量及尿蛋白、血清中 BUN、SCr、

2.4 黄连碱对肾组织 TGF-β₁ 及 PAI-1 蛋白表达的影响

Western blot 条带光密度分析显示, 与模型组比较, 黄连碱 200, 100 和 50 mg·kg⁻¹ 剂量组血清中 TGF-β₁ 及 PAI-1 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。尿毒清组与黄连碱 200, 100 和 50 mg·kg⁻¹ 剂量组无显著性差异, 结果见表 3 和图 1。

TGF-β₁ 及 PAI-1 含量与模型组没有差异, 因此将最终剂量设置为 200, 100 和 50 mg·kg⁻¹。

随着 CRF 病情的发展, 肾脏纤维化是终末期肾脏疾病的病理基础。TGF-β₁ 是最重要的致纤维化因子。最新研究发现, TGF-β₁ 能显著上调 DNA 甲基转移酶 1 的表达, 使得 Rasal 1 基因启动子区域高甲基化, 从而抑制 Rasal 1 基因的表达, 进而引起成纤维细胞的增殖活化^[5]。另外, TGF-β₁ 还能改变基底膜的厚度, 诱导足细胞发生上皮-间充质细胞的分化、凋亡^[6], 促进细胞与基底膜的脱离, 引起肾小球硬化^[7]。纤溶酶原激活物抑制物-1 是 PA 特异性抑制因子, 有研究发现, 在 CRF 大鼠中, PAI-1 的表达上调, 在肾纤维化中发挥着重要的作用^[8]。PAI-1 在组织内表达的增加能显著抑制纤维蛋白的水解, 增加组织内纤维蛋白的沉积, 从而导致组织器官纤维化^[9]。由此可见, TGF-β₁ 及 PAI-1 蛋白的表达与肾组织的纤维化和硬化密切相关。

通过本研究发现, 黄连碱能显著增加 CRF 大鼠的体质量和 24 h 尿量, 降低 24 h 尿蛋白, 并显著降低血清中 BUN、SCr 含量, 说明其对 CRF 有一定的改善作用; 另外黄连碱还能显著降低血清及肾组织中 TGF-β₁ 及 PAI-1 的表达水平, 说明黄连碱可能是通过抑制 TGF-β₁ 及 PAI-1 蛋白表达的机制起到对肾脏的保护作用。

REFERENCES

- [1] YOKOZAWA T, SATOH A, CHO E J, et al. Protective role of Coptidis Rhizoma alkaloids against peroxynitrite-induced damage to renal tubular epithelial cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(3): 367-374.
- [2] ZHANG Z H, DENG A J, YU J Q, et al. Advance in studies on pharmacological activity of coptisine hydrochloride [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2013, 38(17): 2750-2754.
- [3] ZHOU Q R, XIONG J, LI H. Research advancement of the correlation between kidney-collateral blood-stasis and renal fibrosis [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*(上海中医药杂志), 2005, 12(1): 63-65.
- [4] 李峰, 张浩, 华桦, 等. 黄连碱对应激所致小鼠胃黏膜损伤的保护作用[J]. *华西药理学杂志*, 2007, 22(6): 713-716.
- [5] LEE H S. Pathogenic role of TGF-beta in the progression of podocyte disease [J]. *Histol Histopathol*, 2011, 26(1): 107-116.
- [6] ZHAO Y, HU D J, ZHANG X, et al. *In vitro* effects of ginsenoside Rd on proliferation and expression of TGF-β1 in human mesangial cells induced by high glucose [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2014, 31(7): 786-789.
- [7] LIU Y, TAN X, DAI C, et al. Inhibition of integrin-linked kinase attenuates renal interstitial fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(9): 1907-1918.
- [8] HAGIWARA H, KAIZU K, URIU K, et al. Expression of type-1 plasminogen activator inhibitor in the kidney of diabetic rat model [J]. *Thromb Res*, 2003, 111(4-5): 301-309.
- [9] FOGO A B, EDDY A A. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(11): 2999-3012.

收稿日期: 2016-05-31

本刊 2016 年度特邀审稿专家名单

本刊 2016 年特邀请以下医药专家 99 人(以姓名拼音为序)审定稿件。各位审稿专家以严谨的科学作风、高超的学术造诣、对作者负责的高尚精神认真审稿, 并提出修改意见, 保证和提高了杂志的质量。编辑部全体同仁并代表广大作者、读者, 在此表示衷心的感谢!

陈碧莲	陈金亮	陈枢青	陈悦	陈志卫	程国华	戴海斌	狄斌	杜光
范灵灵	范骁辉	方红梅	傅旭春	高建青	葛卫红	郭建军	郭瑞臣	韩峰
韩旻	何俏军	洪利娅	胡巧红	胡永洲	黄永焯	黄真	贾飞	管凌燕
江波	蒋惠娣	金银秀	匡荣	李范珠	李功华	李焕德	梁文权	刘丽娟
刘滔	楼洪刚	卢晓阳	吕圭源	吕良忠	马忠俊	苗明三	倪韶青	秦玉花
邱利焱	瞿海斌	茹仁萍	申屠建中	沈水杰	盛荣	孙德清	陶巧凤	王长连
王建	王金朝	王珏	王梦	王溶溶	王胜浩	王书芳	王向军	王选铤
王泽民	王知坚	王志安	王志强	吴耀东	吴永江	谢升阳	徐云根	许东航
杨波	杨劲	杨明华	杨伟峰	叶益萍	应美丹	余露山	俞佳	俞旭平
袁弘	袁洪	曾苏	詹金彪	张波	张健	张信岳	张幸国	张志清
赵梦丹	赵瑞芝	赵维良	郑彩虹	郑高利	周长新	周萍	周权	朱全红