

益肾通络方对膜性肾病大鼠的肾保护作用及对AMPK/mTOR/ULK1信号通路的影响

张欣欣^{1,2}, 高飞^{1,2}, 陈素枝², 杨凤文², 檀森³, 檀金川^{1,2*}
(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 河北省中医院, 石家庄 050011;
3. 河北医科大学第四医院, 石家庄 050000)

[摘要] 目的:通过观察益肾通络方对膜性肾病大鼠自噬相关蛋白的影响,探讨其对膜性肾病大鼠肾脏保护作用的可能分子机制。方法:80只SD大鼠随机抽取20只设为正常组,其余大鼠均采用预免疫和尾静脉注射阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)的方法制作膜性肾病大鼠模型。将模型复制成功的SD大鼠随机分为模型组,盐酸贝那普利组(10 mg·kg⁻¹)及益肾通络方低、中、高剂量组(6.61, 13.22, 26.44 g·kg⁻¹),给予相应剂量的药物灌胃,每天1次,连续灌胃4周。灌胃结束后,检测大鼠血浆白蛋白(ALB),甘油三酯(TG),胆固醇(TC),血肌酐(SCr),尿素氮(BUN),24 h尿蛋白(UTP)定量指标的变化;苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色、碘酸六胺银(PASM)染色及透射电镜下观测肾脏病理形态改变;免疫荧光法检测肾小球中免疫球蛋白(Ig)G和补体C3的沉积;免疫组化(IHC)法观察自噬标志蛋白Beclin-1,微管相关蛋白轻链3 II(LC3 II),p62蛋白的表达情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测腺苷酸活化蛋白激酶/雷帕霉素靶蛋白/Unc-51样激酶1(AMPK/mTOR/ULK1)信号通路相关蛋白的表达情况。结果:与正常组比较,模型组大鼠UTP水平显著升高($P<0.01$),血清中TG,TC水平显著升高($P<0.01$),ALB水平显著下降($P<0.01$);肾小球结构紊乱,体积增大,基底膜可见不同程度增厚和部分肾小管空泡样变性,大量胶原纤维和嗜复红蛋白沉积,足细胞足突广泛融合,肾小球毛细血管襻IgG和补体C3弥漫性沉积;自噬标志蛋白Beclin-1,LC3 II表达显著降低($P<0.01$),p62蛋白表达显著升高($P<0.01$);磷酸化-腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)蛋白表达显著降低($P<0.01$),磷酸化-雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR),磷酸化-Unc-51样激酶1(p-ULK1)蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,益肾通络方各剂量组、盐酸贝那普利组大鼠TG,TC,UTP水平均有不同程度降低($P<0.05$, $P<0.01$),ALB水平显著升高($P<0.01$),血清SCr,BUN水平均差异无统计学意义;肾脏病理损害不同程度减轻;自噬标志蛋白Beclin-1,LC3 II表达水平不同程度升高($P<0.05$, $P<0.01$),p62蛋白表达不同程度降低($P<0.05$, $P<0.01$);p-AMPK蛋白表达水平不同程度升高($P<0.05$, $P<0.01$),p-mTOR,p-ULK1蛋白表达水平不同程度降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:益肾通络方对膜性肾病大鼠具有肾脏保护作用,其机制可能与调控AMPK/mTOR/ULK1信号通路相关蛋白的表达,激活自噬有关。

[关键词] 益肾通络方;膜性肾病(MN);自噬;腺苷酸活化蛋白激酶/雷帕霉素靶蛋白/Unc-51样激酶1(AMPK/mTOR/ULK1)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)12-0057-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211101

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210407.1610.005.html>

[网络出版日期] 2021-4-7 16:33

Renal Protection of Yishen Tongluo Prescription in Rats with Membranous Nephropathy and Its Influence on AMPK/mTOR/ULK1 Signaling Pathway

ZHANG Xin-xin^{1,2}, GAO Fei^{1,2}, CHEN Su-zhi², YANG Feng-wen², TAN Miao³, TAN Jin-chuan^{1,2*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China;

3. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

[收稿日期] 20210107(004)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(H2019423037);河北省重点研发计划项目(203777400)

[第一作者] 张欣欣,在读博士,从事中西医结合肾病研究,E-mail:1028342820@qq.com

[通信作者] *檀金川,教授,博士生导师,从事中西医结合肾病研究,E-mail:1955981973@qq.com

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Yishen Tongluo prescription (YTP) on autophagy-related proteins in rats with membranous nephropathy (MN) and explore its possible molecular mechanism in protecting the kidney. **Method:** Twenty of 80 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly selected as the normal control, and the rest rats were pre-immunized and injected with cationized bovine serum albumin (C-BSA) through the tail vein to induce MN. The SD rats that were successfully modeled were randomized into the model group, benazepril hydrochloride group ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and low- ($6.61 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), medium- ($13.22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and high-dose ($26.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) YTP groups, and administered with the corresponding drugs by gavage, once a day, for four consecutive weeks. Then the changes in such quantitative indicators as plasma albumin (ALB), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), and 24-hour urinary total protein (UTP) were detected, followed by hematoxylin and eosin (HE) staining, Masson's trichrome staining, and periodic Schiff-methenamine (PASM) staining for observing the pathological changes in kidney under the transmission electron microscope (TEM). The deposition of immunoglobulin G (IgG) and complement 3 (C3) in the glomerulus was detected by fluorescence immunoassay. The expression levels of autophagy marker proteins Beclin-1, microtubule-associated protein light chain 3 II (LC3 II), and p62 were measured by immunohistochemistry (IHC), and those of related proteins in the adenosine monophosphate-activated protein kinase / mechanistic target of rapamycin/Unc-51-like kinase 1 (AMPK/mTOR/ULK1) signaling pathway were determined by Western blot assay. **Result:** Compared with the normal group, the model group exhibited significantly increased UTP ($P < 0.01$) and serum TG and TC ($P < 0.01$), decreased ALB ($P < 0.01$), disordered glomerular structure, enlarged volume, thickened basement membrane, vacuolated renal tubules, excessively deposited collagen fibers and fuchsinophilic proteins, extensively fused podocyte foot processes, and diffusely deposited IgG and C3 in glomerular capillary loops. Besides, the expression levels of Beclin-1, LC3II, and phosphorylated AMPK (p-AMPK) decreased ($P < 0.01$), while those of p62, phosphorylated mTOR (p-mTOR), and phosphorylated ULK1 (p-ULK1) increased ($P < 0.01$). The comparison with the model group revealed that the TG, TC, and UTP levels in the low-, medium-, and high-dose YTP groups and the benazepril hydrochloride group were reduced to varying degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$), whereas the ALB level was increased ($P < 0.01$). There was no statistically significant difference in SCr or BUN level. The pathological damages were alleviated. The expression levels of Beclin-1, LC3 II, and p-AMPK were up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while those of p62, p-mTOR, and p-ULK1 were down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** YTP protects the kidney of rats with MN possibly by regulating related proteins in the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway and activating the autophagy.

[Key words] Yishen Tongluo prescription; membranous nephropathy (MN); autophagy; adenosine monophosphate-activated protein kinase /target of rapamycin/Unc-51-like kinase 1 (AMPK/mTOR/ULK1) signaling pathway

膜性肾病(MN)是肾小球的一种非炎性自身免疫性疾病,主要的病理表现为免疫复合物在肾小球毛细血管壁的上皮下沉积并伴有基底膜弥漫性增厚^[1]。流行病学显示,MN的发病率为每年1/10万,其高峰出现在生命的第4~5个10年^[2]。MN病程长,病情迁延难愈,尽管约1/3的患者会自发缓解,但仍有30%~40%的患者会在5~15年内发展为终末期肾脏疾病^[3]。有关MN的治疗,目前尚无特效药,激素、免疫抑制剂及细胞毒类药仍是临床上常用的药物,这些药物往往伴随着一些不良反应,药物的

远期疗效尚有待于评估。因此,寻求更多安全有效的治疗药物是十分必要的。

自噬是一种普遍存在于真核细胞中高度保守且复杂的分解代谢过程,在饥饿、感染、缺血缺氧等因素刺激下被激活促使溶酶体吞噬受损细胞器或胞质成分,以维持细胞内外环境稳态。正常情况下,足细胞保持较高的基础自噬水平。研究发现自噬异常参与了MN的发生发展^[4]。临床肾组织活检表明MN患者体内自噬小体数目明显减少,同样MN大鼠足细胞自噬活性减弱加速了细胞结构损伤

和蛋白尿的发生^[5-6]。自噬的调控机制十分复杂,目前普遍认为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是自噬调控的关键负性调节因子,可通过磷酸化Unc-51样激酶1(ULK1)复合物影响自噬发生^[7]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)是mTOR的重要上游调控因子,AMPK可通过降低mTOR活性促进自噬^[8]。AMPK/mTOR/ULK1信号通路,可升高肾脏自噬水平,减轻肾脏损伤。

近年来多项研究表明中医药治疗MN具有较好的疗效。一项Meta分析表明中药复方联合西医激素及免疫抑制剂规范治疗,可有效缓解MN病情,提高临床疗效,减少西药不良反应的发生^[9]。益肾通络方是檀金川教授总结30余年的临床实践经验,根据MN的发病特点,提出“正虚邪伏,邪伏肾络”的新观点,在此病机指导下提出扶正祛邪、化瘀通络的治则,创立益肾通络方,主要由黄芪,炙淫羊藿,土茯苓,积雪草,当归,莪术,地龙,穿山龙,全蝎,水蛭组成,具有补脾益肾、化瘀通络的功效,治疗MN已经取得较好的临床疗效^[10-11]。动物实验表明,益肾通络方能维持MN大鼠足细胞结构的完整性,显著降低尿蛋白排泄率,缓解肾脏损伤^[12-13]。前期预实验结果证实益肾通络方可调控MN大鼠细胞自噬水平,保护肾功能。本研究以AMPK/mTOR/ULK1信号通路为研究方向,进一步探讨益肾通络方对MN肾脏自噬的影响及潜在的分子机制,以期防治MN提供更多的科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级的雄性SD大鼠80只,8周龄,体重(180±20)g,由河北医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(冀)2018-004,饲养于河北中医学院实验动物中心SPF级动物实验室,经由河北中医学院动物伦理委员会批准,伦理审查编号为DWLL2020046。

1.2 药品及试剂 益肾通络方(黄芪20g,炙淫羊藿20g,土茯苓15g,积雪草15g,当归12g,莪术12g,地龙12g,穿山龙15g,全蝎6g,水蛭9g),由广东一方制药有限公司按比例配制,提供中药配方颗粒(批号分别为5063231,5052073,5060451,4073481,4114238,4114217,5044321,5062171,5061852,5061675),配成生药量分别为0.661,1.322,2.644g·mL⁻¹的中药混悬液,用蒸馏水充分溶解,收集在无菌的玻璃瓶中,4℃冰箱保存备用。盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司,批号H20030514);阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA,美国

Chondrex公司,批号190203);弗氏不完全佐剂(美国Sigma公司,批号SLCB8385);总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),白蛋白(ALB),肌酐(SCr),尿素氮(BUN),24h尿蛋白(UTP)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20180807,20180810,20180614,20181003,20190515,20180706);兔抗免疫球蛋白(Ig)G(H+L)异硫氰酸荧光素(FITC)抗体(美国Invitrogen公司,批号A18746);兔来源一抗磷酸化(p)-AMPK,p-mTOR,p-ULK1,微管相关蛋白轻链3Ⅱ(LC3Ⅱ),Beclin-1,p62(美国Affinity公司,批号分别为AF3423,AF33008,AF3642,AF5402,AF5128,AF5384);β-肌动蛋白(β-actin)抗体(中杉金桥生物有限公司,批号16AF0207);二抗(美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号SC2357);苏木素-伊红(HE)染色液,马松(Masson)染色液,碘酸六胺银(PASM)染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120,G1345,G1790);钼酸(成都贝斯特试剂有限公司,批号B00427002)。

1.3 仪器 7170A型全自动生化仪,H-7650型透射电镜(日本日立公司);721型尿蛋白(24h)分光光度计(上海第三分析仪器厂);Multiskan FC型全波长酶标分析仪(美国Thermo公司);CM3050型冷冻切片仪(德国莱卡公司);BX53型显微镜(日本奥林巴斯公司);Mini-PROTEAN型电泳系统,Mini Trans-Blot转移系统(美国伯乐公司);Kodak Image Station 2000MM成像系统(美国Kodak公司)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备 健康的80只雄性SD大鼠适应性喂养1周,尿蛋白试纸测试阴性,按照系统随机法分为正常组20只和造模组60只,参照改良BORDER等^[14]预免疫与尾静脉注射C-BSA的方法制备MN大鼠模型。预免疫时,将0.5mL的质量浓度为2mg·L⁻¹的C-BSA与等体积的弗氏不完全佐剂充分混匀,使之充分乳化,于大鼠的双腋下、双腹股沟进行多点皮下注射,每次0.3mL,隔日1次,注射3次,预免疫1周。正式免疫时,将质量浓度为2mg·L⁻¹的C-BSA与等量的磷酸盐缓冲液(PBS)完全混匀后进行尾静脉注射,每次0.5mL,每周3次,隔日1次,连续注射4周。正常组大鼠在注射的相同时间点注射同等体积的生理盐水。注射结束后,检测每只大鼠的UTP水平,UTP≥20mg作为模型制备成功标准,并随机抽取造模组和正常组SD大鼠各2只,于光镜、电镜下观察肾脏病理学改变,免疫荧光显示IgG和补体C3沿肾小球毛细血管襻沉

积以确保造模成功^[15]。将模型复制成功的SD大鼠按照随机数字表法分为模型组、益肾通络方高中低剂量组、盐酸贝那普利组,每组均保留10只。

2.2 给药方法及标本采集 造模成功后,正常组及模型组均按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体积给予蒸馏水灌胃;益肾通络方低、中、高剂量组分别给予相应剂量的中药溶液灌胃,按照成人等效剂量折算系数,以成人剂量的6.25倍为中剂量,益肾通络方低、中、高各给药剂量为 $6.61, 13.22, 26.44\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药前均用蒸馏水制备成不同浓度的中药混悬液,按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体积灌胃;盐酸贝那普利组给药剂量为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药前将研磨成细末的药物溶于蒸馏水,按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体积灌胃;每日1次,连续4周。灌胃结束后,代谢笼内留取大鼠24 h尿液,记录尿量, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min(离心半径6 cm,下同),取上清液分装离心管保存备用;禁食水12 h后予异氟烷吸入麻醉后迅速开腹,腹主动脉取血, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离血清,分装冻存管置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用;迅速分离大鼠双肾脏,用PBS冲洗2次置于冰袋上,右肾切取一部分肾皮质置于冻存管,先放于液氮中,再转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用;左肾切取一部分肾皮质放于4%多聚甲醛中,室温固定48 h备用;一部分肾皮质放于被生理盐水湿润的无菌纱布上, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用;一部分肾皮质放于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的2.5%戊二醛中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。

2.3 指标检测及检测方法

2.3.1 血液生化指标及UTP定量的检测 严格按照试剂盒要求使用全自动生化分析仪检测大鼠血清中BUN, SCr, ALB, TC, TG的含量,采用双缩脲比色法检测UTP定量。

2.3.2 HE, Masson, PASM染色及透射电镜下观察肾脏组织病理学改变 4%的多聚甲醛固定肾皮质48 h后,石蜡包埋切片,分别进行HE染色, PASM染色, Masson染色,光学显微镜下观察肾脏组织形态学改变。2.5%的戊二醛溶液固定肾组织后,放于PBS中浸洗3次,1%锇酸固定,丙酮逐级脱水,丙酮树脂浸透包埋,聚合、超薄切片,乙酸双氧铀和酸铅双重染色,透射电镜下观察并拍照。

2.3.3 免疫荧光法检测肾脏IgG和补体C3的沉积 将肾组织从湿润的纱布上取出, OCT包埋,冰冻切片机 $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 速冻10 min,切成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 的薄片,丙酮固定5 min, PBS浸洗3遍,滴加免疫球蛋白IgG抗体(1:200), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, PBS浸洗,甘油封片,荧光显微镜下观察并拍照。将包埋好的肾组织取出,

脱蜡至水,抗原修复,血清封闭,加入稀释好的C3一抗(1:200), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS冲洗,暗室滴加FITC标记的二抗(1:200), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育120 min, PBS浸洗,甘油封片,荧光显微镜下观察并拍照。

2.3.4 免疫组化(IHC)法检测自噬标志蛋白Beclin-1, LC3 II, p62的表达情况 将固定于4%多聚甲醛中的适当大小的肾皮质取出,常规脱水,石蜡包埋切片;乙醇脱蜡至水,抗原修复,5%的山羊血清室温封闭30 min,加入稀释好的Beclin-1(1:200), LC3 II(1:200), p62(1:200), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS洗涤3次后滴加稀释好的二抗 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。PBS清洗3次后, DAB避光显色,镜下观察直到棕褐色阳性结果出现,水洗、苏木素复染、脱水、透明、中性树脂胶封片。每张切片随机选取5个视野($\times 400$),使用Image Pro Plus 6.0软件计算每个视野下阳性结果的积分吸光度和面积,以积分吸光度/面积作为检测指标的半定量结果^[16]。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾组织中p-AMPK, p-mTOR, p-ULK1蛋白的表达 将组织100 mg研碎置于离心管,加入RIPA蛋白裂解液,低温高速组织研磨仪辅助研磨,研磨条件为60 Hz,研磨60 s,暂停10 s,循环3次,随后放置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱摇床继续裂解20 min使之充分裂解,然后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,离心取上清按照试剂盒要求检测总蛋白浓度。使用SDS-PAGE凝胶将制备好的 $50\text{ }\mu\text{g}$ 的蛋白样品进行电泳分离,之后转移到PVDF膜上,5%的BSA $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭60 min,然后加入稀释好的一抗p-AMPK(1:2 000), p-mTOR(1:2 000), p-ULK1(1:3 000), β -actin(1:5 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜3次后滴加稀释好的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:5 000),室温孵育60 min,洗膜后然后增强化学发光法(ECL)显色,用Image Pro Plus 6.0软件分析条带的灰度值。

2.4 统计学分析 所有数据均用SPSS 23.0进行分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。数据均进行正态性和方差齐性检验,若满足,组间比较用单因素的方差分析,组间的多重比较采用SNK法;若不符合则用非参数的秩和检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对MN大鼠UTP的影响 造模后,与正常组比较,各组大鼠UTP水平显著升高($P<0.01$),模型组和各药物干预组各组间UTP增高水平相当,差异无统计学意义,具有可比性。给药后,与正常组比较,

模型组大鼠UTP水平仍显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各药物干预组大鼠的UTP水平均显著降低($P<0.01$)。见表1。

表1 益肾通络方对MN大鼠UTP水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

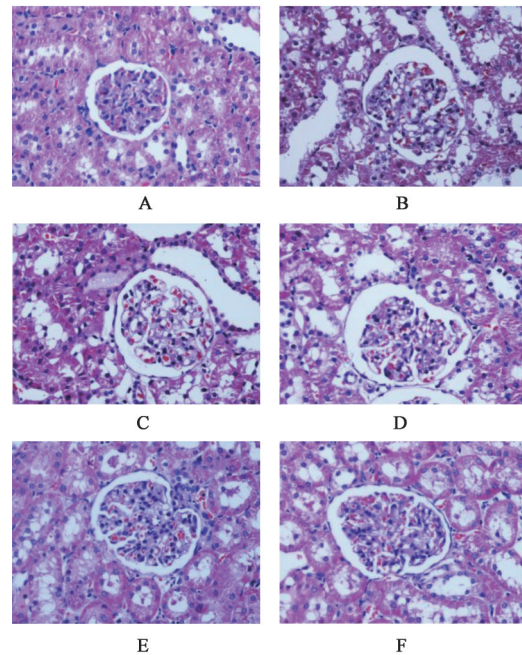
Table 1 Effect of Yishen Tongluo prescription (YTP) on UTP level of MN rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模后	给药后
正常		4.79±0.55	4.35±0.65
模型		40.81±1.78 ¹⁾	41.84±1.95 ¹⁾
益肾通络	6.61	39.42±1.37 ¹⁾	33.30±1.26 ³⁾
	13.22	39.47±1.35 ¹⁾	28.34±1.22 ³⁾
	26.44	39.97±1.49 ¹⁾	27.85±1.55 ³⁾
盐酸贝那普利	0.01	39.42±1.40 ¹⁾	26.51±1.14 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表2~4同)。

3.2 对MN大鼠血清TC, TG, ALB, SCr, BUN的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清TC, TG水平显著增高($P<0.01$), ALB水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各药物干预组大鼠血清TC, TG水平均有不同程度的下降($P<0.05, P<0.01$), ALB水平均有显著增高($P<0.01$),其中益肾通络方中、高剂量组和盐酸贝那普利组大鼠血清TC, TG下降水平和ALB增高水平相当,差异无统计学意义。各组大鼠的SCr, BUN水平差异无统计学意义。见表2。

3.3 对MN大鼠肾脏病理形态改变的影响 光镜下,与正常组比较,模型组大鼠肾小球结构紊乱,体积增大,球囊毛细血管基底膜增厚,肾小球上皮下可见嗜复红蛋白和胶原纤维沉积,肾小管上皮细胞数量减少,可见胶原纤维沉积,部分可见空泡样变性;与模型比较,各药物干预组大鼠的肾小球和肾小管结构均有不同程度的改善。见图1~3。透射电镜下,与正常组比较,模型组大鼠基底膜增厚,足突排列紊乱,足突部分消失或融合;与模型组比较,各药物干预组大鼠足突排列形态均有不同程度改善,



A. 正常组; B. 模型组; C. 益肾通络方低剂量组; D. 益肾通络方中剂量组; E. 益肾通络方高剂量组; F. 盐酸贝那普利组(图2~10同)

图1 益肾通络方对MN大鼠肾脏病理形态改变的影响(HE, ×400)
Fig. 1 Effect of YTP on pathological changes in kidney of MN rats (HE, ×400)

基底膜增厚和足细胞融合有不同程度减轻。见图4。免疫荧光,正常组大鼠肾小球未见IgG和补体C3沉积,荧光强度为阴性;模型组大鼠肾小球可见IgG和补体C3沿毛细血管襻弥漫性沉积,荧光强度为强阳性;各药物干预组大鼠肾小球可见IgG和补体C3沿毛细血管襻呈现不同程度沉积,荧光强度较模型组均有不同程度减弱。见图5,6。

3.4 对MN大鼠肾组织中自噬相关蛋白LC3 II, p62, Beclin-1的影响 正常情况下LC3 II, Beclin-1在肾小球和肾小管中均有一定程度表达,以维持肾组织较高的基础自噬活性。与正常组比较,模型组大鼠肾组织中LC3 II, Beclin-1蛋白表达均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各药物干预组大鼠肾组织中LC3 II, Beclin-1蛋白表达均有不同程度的增

表2 益肾通络方对MN大鼠血清中TC, TG, ALB, SCr, BUN水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of YTP on levels of TC, TG, ALB, SCr and BUN in serum of MN rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	SCr/μmol·L ⁻¹	BUN/μmol·L ⁻¹
正常		1.46±0.15	0.40±0.13	33.17±1.04	37.80±2.42	6.12±0.63
模型		3.79±0.62 ¹⁾	1.21±0.12 ¹⁾	23.12±1.27 ¹⁾	39.60±2.73	6.44±0.49
益肾通络方	6.61	3.12±0.65 ²⁾	0.85±0.24 ²⁾	27.30±1.25 ³⁾	38.57±1.86	6.33±0.51
	13.22	2.22±0.60 ³⁾	0.68±0.16 ³⁾	29.15±1.21 ³⁾	38.17±2.14	6.71±0.45
	26.44	2.18±0.69 ³⁾	0.63±0.09 ³⁾	29.91±1.19 ³⁾	37.65±2.71	6.60±0.43
盐酸贝那普利	0.01	2.21±1.20 ³⁾	0.67±0.13 ³⁾	28.64±1.54 ³⁾	38.72±2.45	6.49±0.60

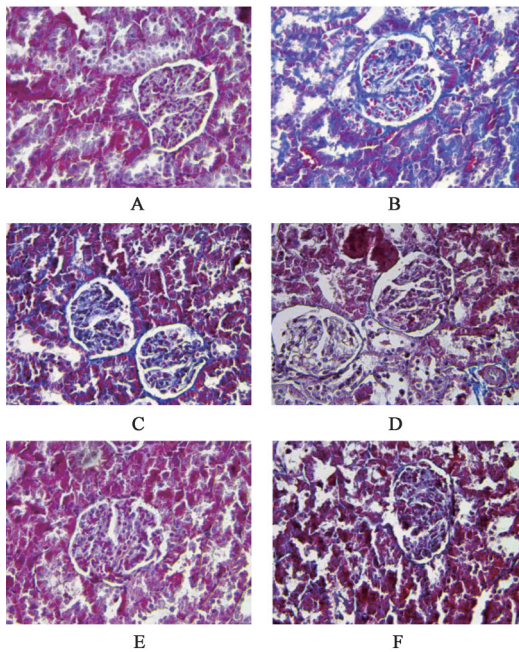


图2 益肾通络方对MN大鼠肾脏病理形态改变的影响(Masson, ×400)

Fig. 2 Effect of YTP on pathological changes in kidney of MN rats (Masson, ×400)

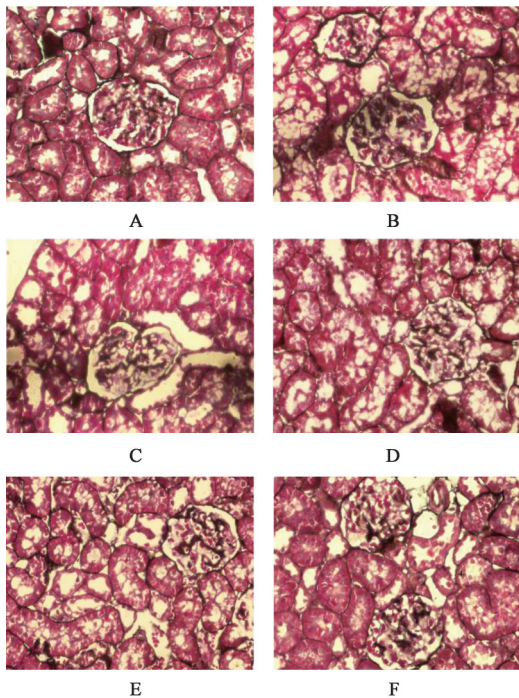


图3 益肾通络方对MN大鼠肾脏病理形态改变的影响(PASM, ×400)

Fig. 3 Effect of YTP on pathological changes in kidney of MN rats (PASM, ×400)

加($P<0.05$, $P<0.01$)。p62作为自噬降解的底物,正常情况下在肾组织中呈现低表达状态,与正常组比较,模型组大鼠肾组织中p62蛋白表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,各药物干预组大鼠肾组织中

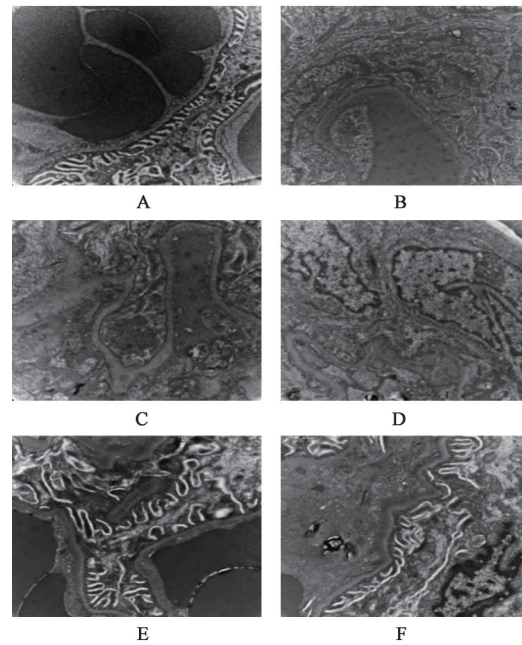


图4 益肾通络方对MN大鼠肾脏病理形态改变的影响(透射电镜, ×2000)

Fig. 4 Effect of YTP on pathological changes in kidney of MN rats (TEM, ×2000)

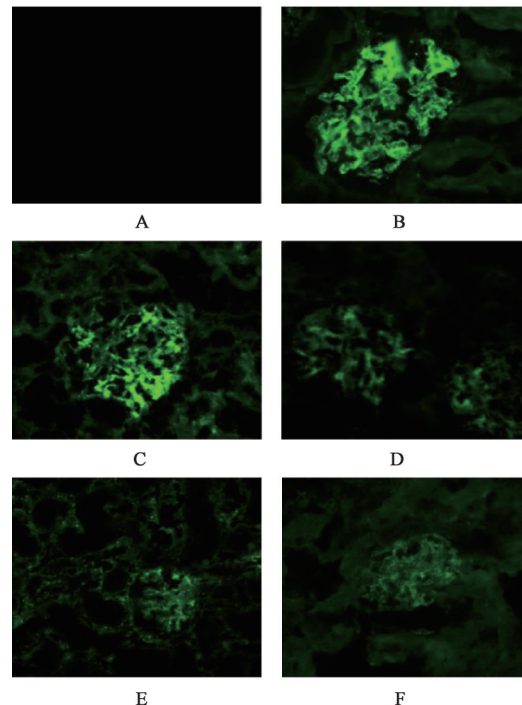


图5 益肾通络方对MN大鼠肾脏IgG沉积的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 5 Effect of YTP on IgG deposition in kidney of MN rats (IF, ×400)

p62蛋白表达均有不同程度的减少($P<0.05$, $P<0.01$)。见图7~9,表3。

3.5 对MN大鼠肾组织中p-AMPK, p-mTOR, p-ULK1蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组

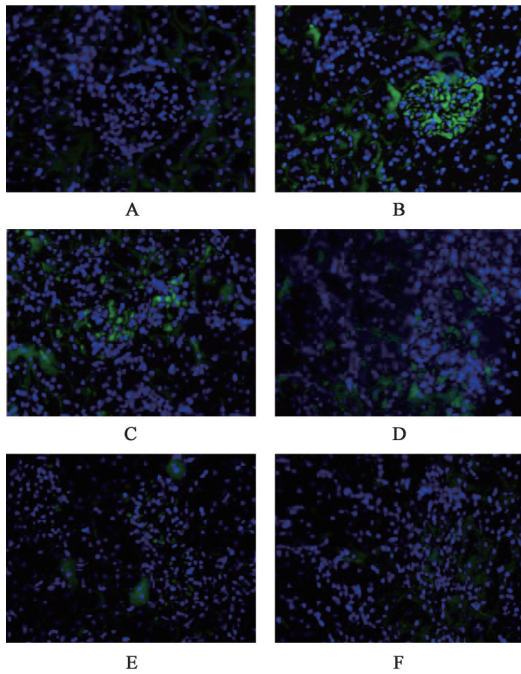


图6 益肾通络方对MN大鼠肾脏C3沉积的影响(免疫荧光,×400)
Fig. 6 Effect of YTP on C3 deposition in kidney of MN rats (IF, ×400)

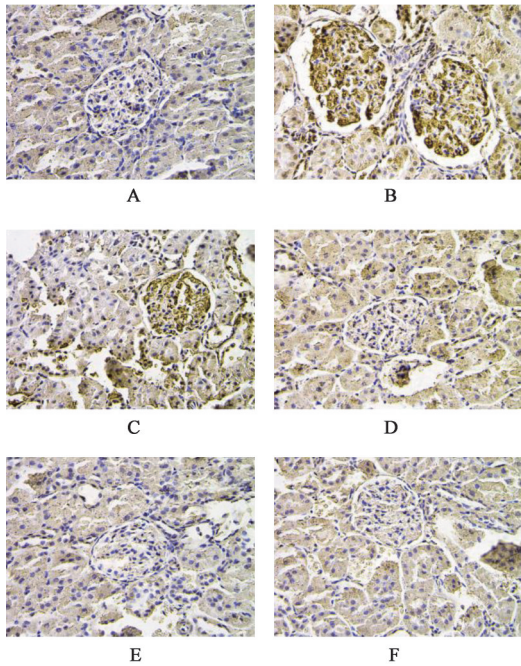


图7 益肾通络方对MN大鼠肾组织自噬相关蛋白p62蛋白表达的影响(免疫组化,×400)
Fig. 7 Effect of YTP on expression of autophagy-related proteins p62 in kidney tissue of MN rats (IHC, ×400)

大鼠肾组织中p-AMPK表达量显著降低($P<0.01$), p-mTOR, p-ULK1表达量显著增加($P<0.01$);与模型组比较,各药物干预组大鼠肾组织中的p-AMPK表达量均有不同程度的增加($P<0.05$, $P<0.01$),

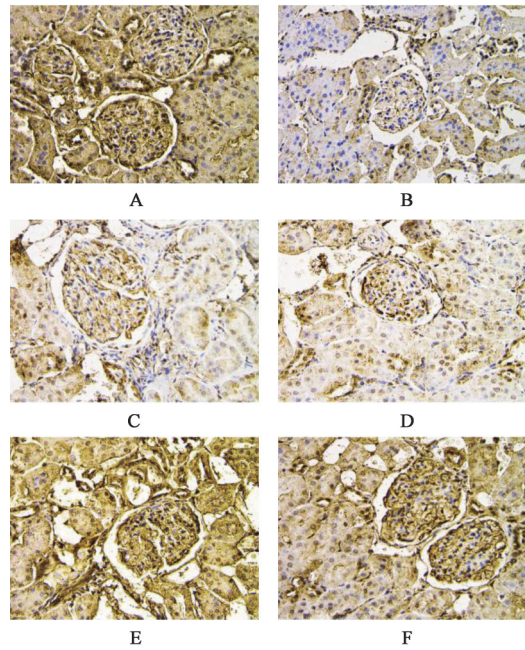


图8 益肾通络方对MN大鼠肾组织自噬相关蛋白LC3 II蛋白表达的影响(免疫组化,×400)
Fig. 8 Effect of YTP on expression of autophagy-related proteins LC3 II in kidney tissue of MN rats (IHC, ×400)

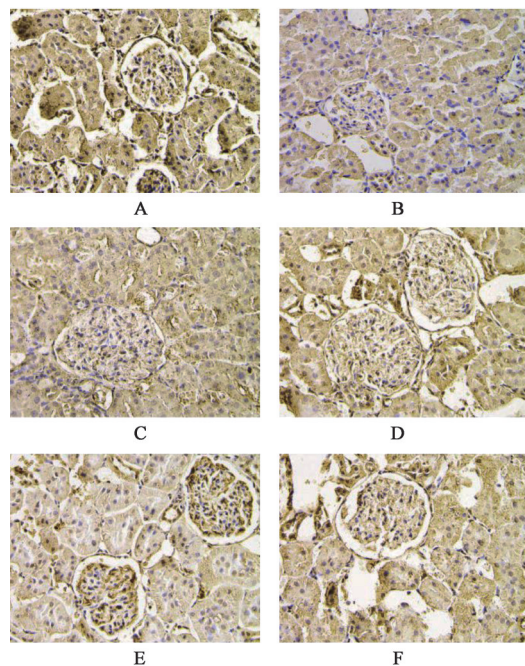


图9 益肾通络方对MN大鼠肾组织自噬相关蛋白Beclin-1蛋白表达的影响(免疫组化,×400)
Fig. 9 Effect of YTP on expression of autophagy-related proteins Beclin-1 in kidney tissue of MN rats (IHC, ×400)

p-mTOR, p-ULK1蛋白表达量均有不同程度的降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见表4,图10。

4 讨论

近年来中国部分地区MN发病率明显增加,

表3 益肾通络方对MN大鼠肾组织中p62, Beclin-1, LC3 II蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of YTP on expression of p62, Beclin-1 and LC3 II protein in kidney tissue of MN rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p62	Beclin-1	LC3 II
正常		0.187±0.024	0.332±0.065	0.374±0.012
模型		0.359±0.041 ¹⁾	0.172±0.053 ¹⁾	0.168±0.015 ¹⁾
益肾通络方	6.61	0.272±0.065 ²⁾	0.263±0.056 ²⁾	0.241±0.024 ²⁾
	13.22	0.232±0.053 ³⁾	0.278±0.089 ²⁾	0.315±0.026 ³⁾
	26.44	0.241±0.019 ³⁾	0.282±0.051 ²⁾	0.327±0.019 ³⁾
盐酸贝那普利	0.01	0.248±0.047 ³⁾	0.286±0.080 ²⁾	0.329±0.021 ³⁾

表4 益肾通络方对MN大鼠肾组织中p-AMPK, p-mTOR, p-ULK1蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of YTP on expression of p-AMPK, p-mTOR and p-ULK1 protein in kidney tissue of MN rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-AMPK/ β -actin	p-mTOR/ β -actin	p-ULK1/ β -actin
正常		0.94±0.08	0.41±0.01	0.31±0.05
模型		0.21±0.01 ¹⁾	0.94±0.13 ¹⁾	0.73±0.11 ¹⁾
益肾通络方	6.61	0.32±0.05 ²⁾	0.68±0.04 ²⁾	0.56±0.02 ²⁾
	13.22	0.46±0.05 ³⁾	0.59±0.06 ³⁾	0.39±0.10 ³⁾
	26.44	0.85±0.06 ³⁾	0.62±0.03 ²⁾	0.37±0.03 ³⁾
盐酸贝那普利	0.01	0.73±0.06 ³⁾	0.66±0.04 ²⁾	0.43±0.06 ²⁾

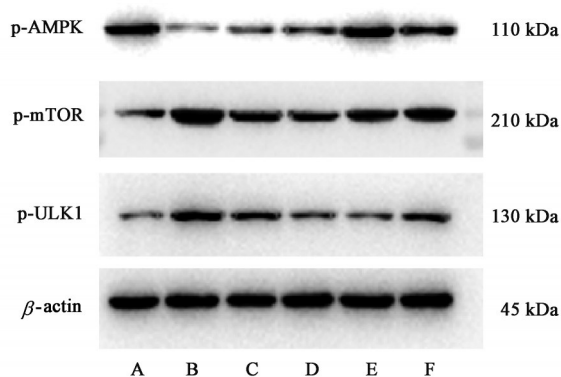


图10 各组大鼠肾组织中p-AMPK, p-mTOR, p-ULK1蛋白电泳
Fig. 10 Electrophoresis of p-AMPK, p-mTOR, p-ULK1 protein in rat renal tissue of each groups

2004至2014年间其患病风险每年增加13%,将超过IgA肾病成为中国发病率最高的1种肾小球疾病^[3]。激素及免疫抑制剂一直是MN治疗的主要手段,但随之而来的一些潜在的风险,因此寻求一种更安全有效的治疗措施势在必行。益肾通络方(由黄芪、炙淫羊藿、土茯苓、积雪草、当归、莪术、穿山龙、地龙、全蝎、水蛭组成)是檀金川教授临床治疗MN常用中药组方,临床疗效显著^[10-11]。檀教授认为MN迁延难愈,病程长,根据MN的发病特点,提出“正虚邪伏,邪伏肾络”的新观点。MN病性多属本虚标实之证,脾肾气虚、阳虚为本,水湿、瘀血为标。其中瘀血为主要标实之证贯穿疾病始终,瘀血日久入络

损伤肾络,甚则癥瘕,进一步加重肾脏结构损害和蛋白尿产生。所以治疗时不能单纯健脾益肾,更应重视活血化瘀、活血通络。方中黄芪为君药,补肾健脾、利水消肿,标本兼顾。炙淫羊藿温肾阳健脾气,土茯苓、积雪草除湿化浊,共为臣药以助君药补益脾肾,祛湿化浊。地龙、穿山龙、全蝎、水蛭等虫类药,善行走窜,通肾络、清除久积之邪。当归、莪术活血祛瘀,同时当归补血,使瘀血得散、活血不伤正。现代药理研究发现,黄芪甲苷具有抗炎、抗氧化、调节免疫等作用,通过抑制转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad, Janus激酶(JAK)/信号传导及转录激活因子(STAT),丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等信号通路的活化减轻肾间质纤维化、改善肾脏微循环、保护肾功能^[17]。积雪草苷能降低TGF- β_1 的表达,上调Smad7蛋白因子表达,具有抗炎和抑制成纤维细胞增殖的作用,进而缓解糖尿病肾病肾脏间质纤维化的病理改变^[18]。淫羊藿苷在温阳利尿的同时还具有抗氧化、抗炎、抑制细胞外基质的增生延缓肾小球硬化的作用^[19]。水蛭、穿山龙、地龙、莪术、全蝎等药均可直接调节纤溶系统,改善肾血流,参与脂质代谢,减轻肾间质纤维化及肾小球硬化^[20]。当归具有抑制血小板聚集、改善微循环、清除氧自由基抗氧化、降脂作用,临床实验证实当归黄芪合用能提高改善肾病综合征患者的低蛋白血症、调节机体免疫功能^[21]。纵观全方,标本兼顾,具

有补肾泄浊、化痰通络之功效。

MN是成人肾小球疾病最常见的病理类型之一,主要的病理表现为肾小球基底膜增厚、钉突形成,足细胞足突弥漫性融合或消失和IgG沿毛细血管襻颗粒样沉积^[1]。蛋白尿和低蛋白血症是MN最主要的临床表现^[3],血浆中蛋白质因肾小球滤过屏障通透性增加而被大量滤过且超过肾小管重吸收能力,从而形成大量蛋白尿,进一步加重足细胞损伤。同时蛋白大量丢失导致低蛋白血症,随之而来的是感染、免疫功能低下等潜在的风险。脂质代谢紊乱普遍存在于MN和IgA肾病中,血脂升高已经成为诱发蛋白尿、加剧病情进展的独立危险因素。越来越多的研究证实,持续性高脂血症会导致肾小球细胞内或系膜基质中脂质沉积,加剧足细胞或肾小管间质损伤,导致肾间质纤维化而进一步发生肾小球硬化^[22]。研究表明,纠正脂质代谢紊乱可以降低肾脏炎症因子表达,从而减轻肾间质纤维化,缓解肾脏病理损伤^[22]。

自噬是一种在真核生物中高度保守的分解代谢过程,在不同应激条件下促使溶酶体吞噬细胞器或胞质成分,广泛参与机体的生理及病理过程^[4]。自噬在MN发病中扮有重要角色。生理状态下,足细胞维持着较高的自噬活性。足细胞自噬的抑制与蛋白尿的发生密切相关^[4]。临床研究证实在电镜检测中,MN患者体内较正常组足细胞自噬体数目减少,与病理分期从I期到II期呈现出正相关^[23]。在自噬体膜形成过程中,LC3 I通过泛素化反应与磷脂酰乙醇胺(PE)偶联形成LC3 II,LC3 II作为自噬体膜上的重要标志蛋白,其表达水平的高低与自噬活性呈正相关^[24]。p62也称SQSTM1,可连接LC3和泛素化的底物,被整合到自噬体中,并在自噬溶酶体中被降解,作为自噬降解的底物标志物,其水平高低与自噬活性呈负相关。LAMARK等^[25]报道了MN患者肾活检中足细胞LC3 II点状形成增加,但p62/SQSTM1的积累增加,这表明自噬途径被阻断,自噬活性受到抑制。Beclin-1作为自噬的重要标志蛋白,其表达量增高提示自噬被激活^[26]。林劲等^[27]研究发现在MN大鼠肾组织中Beclin-1,LC3 II蛋白表达量明显降低,提示在MN疾病过程中自噬活性受到抑制。深入探讨自噬在MN的调控作用,将有可能成为延缓疾病进展的新靶点。

自噬调控机制十分复杂,AMPK和mTOR在调节自噬中发挥着重要作用,均可以通过蛋白激酶ULK1的协同磷酸化来调节自噬。目前普遍认为

mTOR是自噬调控的关键靶点,通过磷酸化ULK1进而激活自噬^[7]。mTOR是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可以感受营养信号,调节细胞生长与增殖。AMPK是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,具有调节细胞能量代谢的作用,AMPK作为自噬调控的正向调控因子,其磷酸化水平增高可以抑制mTOR的活化,进而诱导自噬^[8]。研究发现AMPK/mTOR/ULK1信号通路调控自噬在多种肾病的发生发展中扮有重要角色,在慢性肾衰竭大鼠残余肾脏模型中,利拉鲁肽可通过调节AMPK/mTOR途径促进自噬进而发挥肾脏保护作用^[28];在顺帕诱导的急性肾损伤模型中,虫草素可以通过提高AMPK水平增强自噬相关蛋白的表达减缓肾脏损伤^[29];在糖尿病肾病中,芒果苷可显著降低糖尿病大鼠的白蛋白尿,抑制肾小球细胞外基质扩张并恢复nephrin的表达,这种潜在的机制与p-AMPK的上调,p-mTOR的下调及p-ULK1的上调相关^[30]。AMPK/mTOR/ULK1是促进自噬的重要信号通路,在肾脏保护方面发挥着重要作用。

本研究采用预免疫和尾静脉注射C-BSA的方法复制MN大鼠模型。模型复制成功后,模型组大鼠表现出大量蛋白尿、低蛋白血症及高脂血症。肾脏病理检测发现,大鼠肾小球结构紊乱,基底膜增厚,足突弥漫性融合或消失,IgG和补体C3沿肾小球毛细血管襻沉积。进一步研究发现,MN大鼠肾脏中LC3 II,Beclin-1蛋白表达减少,p62蛋白表达增高,提示自噬活性降低,p-AMPK蛋白表达减少,p-mTOR,p-ULK1蛋白表达增加,提示AMPK磷酸化水平下调,减弱了对mTOR的抑制,活化的mTOR进一步磷酸化ULK1进而抑制了自噬。研究证实给予益肾通络方治疗后,MN大鼠低蛋白血症、高脂血症得以缓解,UTP定量减少,肾脏病理损伤减轻,其机制可能与调控AMPK/mTOR/ULK1信号通路相关蛋白表达,提高肾脏中自噬水平有关。

[参考文献]

- [1] RONCO P, DEBIEC H. Molecular pathogenesis of membranous nephropathy[J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15(7):287-313.
- [2] LAI WL, YE H T, CHEN P M, et al. Membranous nephropathy: a review on the pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. J Formos Med Assoc, 2015, 114(2): 102-111.
- [3] TANG L, YAO J, KONG X, et al. Increasing prevalence of membranous nephropathy in patients

- with primary glomerular diseases: a cross-sectional study in China[J]. *Nephrology*, 2017, 22(2):168-173.
- [4] BHATIA D, CHOI M E. Autophagy in kidney disease: advances and therapeutic potential[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2020, 172(08):107-133.
- [5] OGAWA-AKIYAMA A, SUGIYAMA H, KITAGAWA M, et al. Podocyte autophagy is associated with foot process effacement and proteinuria in patients with minimal change nephrotic syndrome [J]. *PLoS One*, 2020, 15(1):e228337.
- [6] 鲍丽, 么冬爱. 足细胞自噬在膜性肾病经典动物模型中的作用及其激活可能的细胞内机制研究[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2019, 22(3):291-295.
- [7] ATWOOD D J, POKHREL D, BROWN C N, et al. Increased mTOR and suppressed autophagic flux in the heart of a hypomorphic Pkd1 mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *Cell Signal*, 2020, 74(15):109-113.
- [8] ROGACKA D, AUDZEYENKA I, PIWKOWSKA A. Regulation of podocytes function by AMP-activated protein kinase[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 692(10):108-116.
- [9] 高飞, 王泽泽, 杨冰, 等. 中药复方联合激素免疫抑制剂治疗膜性肾病的系统评价和Meta分析[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(22):1705-1716.
- [10] 董兆理, 刘宝利. 中医药治疗特发性膜性肾病研究进展[J]. *世界中医药*, 2018, 13(6):1332-1336, 1341.
- [11] 陈文军, 靳晓华, 陈素枝, 等. 益肾通络方联合西药治疗原发性膜性肾病脾肾亏虚证30例临床观察[J]. *中医杂志*, 2016, 57(5):409-412.
- [12] 陈素枝, 臧倩男, 张卓, 等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠的肾保护作用及足细胞骨架相关蛋白的影响[J]. *中草药*, 2018, 49(20):4857-4863.
- [13] 孔怡然, 杨凤文, 任美芳, 等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠足细胞表型转化的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(4):233-236.
- [14] BORDER W A, WARD H J, KAMIL E S, et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen[J]. *J Clin Invest*, 1982, 69(2):451-461.
- [15] 臧倩男. 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾保护作用及对Ezrin和Synaptopodin蛋白表达的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2018.
- [16] LANG R, WANG X, LIANG Y, et al. Research progress in the treatment of idiopathic membranous nephropathy using traditional Chinese medicine[J]. *J Transl Int Med*, 2020, 8(1):3-8.
- [17] 陈素枝, 檀金川. 黄芪甲苷保护肾脏的分子机制研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(24):5973-5979.
- [18] 马继伟, 王宏天, 刘浩飞, 等. 积雪草对早期糖尿病肾病大鼠TGF β 表达及相关下游信号的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2018, 34(1):69-73.
- [19] 李威, 杨文龙, 夏汉庭, 等. 肾阳虚大鼠血清对OB-OC共育体系中 β -catenin/OPG/RANKL表达的影响及淫羊藿苷的调控作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(13):118-124.
- [20] 顾叶云, 胡莹杰, 徐蕾, 等. 黄芪、水蛭有效组分对经脂多糖诱导增生的大鼠肾小球系膜细胞I κ B、NF- κ B、PDGF-BB表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(2):866-868.
- [21] 肖琼. 黄芪当归汤对33例肾病综合征患者肾功能及总体蛋白质代谢的影响[J]. *上海医药*, 2019, 40(23):44-46.
- [22] 潘玲, 廖蕴华, 尹瑞兴. 血脂异常在慢性肾脏病中的作用及机制研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2020, 21(2):184-186.
- [23] 陈生晓, 林晓明, 甘艳, 等. 膜性肾病组织中足细胞自噬体数量、自噬相关蛋白表达变化及其意义[J]. *山东医药*, 2019, 59(8):73-75.
- [24] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 and autophagy [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445(6):77-88.
- [25] LAMARK T, SVENNING S, JOHANSEN T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6):609-624.
- [26] XU H D, QIN Z H. Beclin 1, Bcl-2 and autophagy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 12(6):109-126.
- [27] 林劲, 欧阳辉, 梁春玲, 等. 白芍总苷对膜性肾病大鼠肾脏保护作用及自噬的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(9):1025-1031.
- [28] XUE L, PAN Z, YIN Q, et al. Liraglutide promotes autophagy by regulating the AMPK/mTOR pathway in a rat remnant kidney model of chronic renal failure[J]. *Int Urol Nephrol*, 2019, 51(12):2305-2313.
- [29] DENG J S, JIANG W P, CHEN C C, et al. *Cordyceps cicadae* mycelia ameliorate cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing the TLR4/NF- κ B/MAPK and activating the HO-1/Nrf2 and Sirt-1/AMPK pathways in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 791(27):63-67.
- [30] WANG X, GAO L, LIN H, et al. Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression and protects podocyte function via autophagy in diabetic rat glomeruli[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 82(4):170-178.

[责任编辑 周冰冰]