

三焦祛湿方对C-BSA诱导膜性肾病小鼠肾脏保护作用及其对Nrf2/HO-1信号通路的影响

赵亚云^{1,2}, 方敬¹, 陈静洁¹, 刘海平¹, 陈志强^{2*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050091; 2. 河北省中医院, 石家庄 050011)

[摘要] 目的:探索三焦祛湿方对阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)诱导膜性肾病(MN)小鼠肾脏保护作用及其对核因子E₂相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路影响。方法:雌性BALB/c小鼠60只,随机分为正常组10只,模型组50只。模型组小鼠尾静脉注射C-BSA(6.5 mg·kg⁻¹),造模成功小鼠按体质量随机分为模型组、三焦祛湿方低剂量(3.71 g·kg⁻¹)组,三焦祛湿方高剂量(7.42 g·kg⁻¹)组及盐酸贝那普利(1.3 mg·kg⁻¹)组,分别给予各组相应剂量的药物灌胃,1次/d,连续4周。分别于造模前、造模后及治疗后检测24 h尿蛋白定量。给药后,腹主动脉取血检测血尿素氮(BUN),血清肌酐(SCr),甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),总蛋白(TP),白蛋白(Alb)水平,肾组织行苏木素-伊红(HE),马松(Masson),过碘酸-六胺银(PASM)染色,光镜下观察小鼠肾组织病理形态变化,免疫荧光检测肾组织免疫球蛋白G(IgG)沉积情况,采用免疫荧光法检测肾组织中活性氧(ROS)表达情况。蛋白免疫印迹法(Western blot)观察肾组织Nrf2蛋白在细胞质和细胞核的表达情况,以及其下游因子血红素氧合酶-1(HO-1),酮还原型辅酶I(NADH)脱氢酶1(NQO1)蛋白表达水平。结果:模型组小鼠24 h尿蛋白水平显著升高($P<0.01$),血清TG,TC水平显著升高($P<0.01$),TP,Alb水平显著降低($P<0.01$);光镜下观察肾脏病理改变,可见肾小球体积增大,基底膜增厚,嗜复红蛋白沉积,“钉突”形成;荧光显微镜下可见IgG沿毛细血管襻弥漫性沉积;肾组织ROS表达水平显著升高($P<0.01$);肾组织细胞核内Nrf2蛋白表达显著升高($P<0.01$),细胞质Nrf2蛋白表达显著降低($P<0.01$),HO-1和NQO1蛋白表达显著升高($P<0.01$);给药后,各治疗组小鼠24 h尿蛋白水平显著降低($P<0.01$),血清TG,TC水平显著降低($P<0.01$),TP,Alb水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);各治疗组肾组织病理损害明显改善;肾组织ROS表达水平显著降低($P<0.01$);肾组织细胞核内Nrf2蛋白表达显著降低($P<0.01$),细胞质Nrf2蛋白表达不同程度升高($P<0.05$, $P<0.01$),HO-1和NQO1蛋白表达显著升高($P<0.01$)。结论:三焦祛湿方可能通过调控膜性肾病肾组织Nrf2/HO-1信号表达,缓解肾组织氧化应激,进而降低24 h尿蛋白定量,降低血脂水平,提高血清蛋白含量,减轻肾脏病理损害,起到明显的肾脏保护及延缓病程进展的作用。

[关键词] 膜性肾病;核因子E₂相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路;三焦祛湿方

[中图分类号] R2-0;R334+.1;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)18-0058-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211839

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210728.1145.002.html>

[网络出版日期] 2021-07-28 14:46

Renoprotective Effect of Sanjiao Qushi Prescription Against Cationic Bovine Serum Albumin Induced Membranous Nephropathy Mice Model and Its Influence on Nrf2/HO-1 Signaling Pathway

ZHAO Ya-yun^{1,2}, FANG Jing¹, CHEN Jing-jie¹, LIU Hai-ping¹, CHEN Zhi-qiang^{2*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China;

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the renoprotective effects that Sanjiao Qushi prescription ameliorates cationic bovine serum albumin (C-BSA) induced membranous nephropathy (MN) in mice model

[收稿日期] 20210628(013)

[基金项目] 河北省政府资助省级临床医学优秀人才项目(2016034829);河北省中医药管理局科研计划项目(2021039)

[第一作者] 赵亚云,在读博士,主治医师,从事慢性肾脏病的中医药治疗及机制研究,E-mail:DoctorCindy2020@126.com

[通信作者] *陈志强,博士,教授,博士生导师,从事慢性肾脏病的中医药治疗及机制研究,E-mail:chenzhiqiang2011@163.com

and its influence on nuclear factor erythroid-2-related factor-2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **Method:** Sixty female BALB/c mice were randomly divided into the normal group ($n=10$) and the model group ($n=50$). The mice in the model group received C-BSA injection via tail vein ($6.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The mice that were successfully modeled were randomized into the model group, the low dose Sanjiao Qushi prescription group ($3.71 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), the high dose Sanjiao Qushi prescription group ($7.42 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and benazepril hydrochloride group ($1.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). And they were administered with the corresponding medicine by gavage once a day for four consecutive weeks. 24 hour-urine protein quantitation were performed before C-BSA injection and after C-BSA injection as well as the medicine gavage. When the treatment was finished, all of the mice were sacrificed and the biochemical indicators such as serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), total protein (TP) and albumin (Alb) were measured. And the renal pathological morphology changes were observed by light microscope with hematoxylineosin (HE), Masson and periodic acid-silver methenamine (PASM) staining. The deposition of immunoglobulin G (IgG) in the glomerulus was detected by fluorescence microscope. The expression of reactive oxygen species (ROS) of kidney was detected by fluorescence immunoassay. The protein expression levels of Nrf2 in cell nucleus and cytoplasm and the downstream protein factors HO-1 and NADH quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1) were detected by Western blot. **Result:** Compare to normal group, the levels of 24 hour-urine protein quantitation, TG and TC significantly increased in model group ($P<0.01$), while TP and Alb levels significantly decreased ($P<0.01$). The model group exhibited enlarged volume of glomerular, significantly thickened glomerular basement membrane (GBM), fuchsinophilic protein deposition and spike formation through light microscope. Immunofluorescence staining for the model group exhibited granular deposition of IgG along the capillary wall. The expression of ROS in kidney significantly increased ($P<0.01$). The protein expression levels of Nrf2 in cell nucleus significantly increased ($P<0.01$), while Nrf2 in cytoplasm significantly decreased ($P<0.01$). The protein expression levels of HO-1 and NQO1 significantly increased ($P<0.01$). Compared to model group, the levels of 24 hour-urine protein quantitation, TG and TC significantly decreased in each treated group ($P<0.01$), TP and Alb levels significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The pathological damages alleviated obviously. The expression of ROS in kidney significantly decreased ($P<0.01$). The protein expression levels of Nrf2 in cell nucleus significantly decreased ($P<0.01$), while Nrf2 in cytoplasm significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expression levels of HO-1 and NQO1 significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion:** Sanjiao Qushi prescription worked on MN mice possibly by regulating related proteins in the Nrf2/HO-1 signaling pathway and relieving oxidative stress, thus decreasing 24 hour-urine protein and blood lipid, increasing serum protein, and alleviating the pathological damages to protect renal function and delay progress of the disease.

[Keywords] membranous nephropathy; nuclear factor erythroid-2-related factor-2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway; Sanjiao Qushi prescription

膜性肾病(MN)是肾病综合征最常见的病理类型之一,临床表现为不同程度的蛋白尿,并伴有低蛋白血症、高脂血症,病情反复发作,部分患者可进展至终末期肾病(ESRD)^[1]。其典型的病理特征表现为基底膜弥漫性增厚,免疫荧光显示免疫复合物沿毛细血管襻颗粒样沉积,电镜下可见上皮下电子致密物沉积。随着肾脏病理活检数增加,MN检出率也随之升高^[2]。根据其发病原因可分为特发性膜性肾病(IMN)和继发性膜性肾病(SMN)。

目前,IMN发病机制尚未完全明确,研究表明,

氧化应激参与MN发病过程^[3]。机体处于氧化应激状态时,可产生大量活性氧(ROS),ROS经过一系列反应,可刺激核因子E₂相关因子2(Nrf2)磷酸化并发生核转移,进入细胞核的Nrf2与抗氧化反应元件(ARE)结合并启动下游血红素氧合酶-1(HO-1),醌NADH脱氢酶1(NQO1)等抗氧化应激蛋白的基因转录以保护机体免受氧化损伤^[4]。

MN治疗以激素联合烷化剂方案为主,部分患者用药后可出现严重的不良反应,有5%~10%的患者使用多种免疫抑制方案后仍然不能缓解甚至迅

速进入ESRD。中医药治疗IMN已经取得较大的进展,研究者从足细胞裂孔膜蛋白^[5]、细胞凋亡^[6]、改善高凝状态^[7]、改善细胞外基质^[8]及抗炎^[9]等方面对中药干预MN动物模型进行了探索,收效显著。有学者认为本病基本病机为脾肾阳虚为本,水湿痰瘀为标,病机关键在于三焦气化,故用三焦祛湿法治疗的MN,临床应用疗效确切^[10]。本实验拟建立MN小鼠病理模型,以探讨三焦祛湿方对MN小鼠肾脏保护及其对Nrf2/HO-1信号通路作用的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雌性BALB/c小鼠60只,6~8周龄,体质量16~19 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于河北中医学院实验动物中心标准化洁净动物房(温度23~25℃,相对湿度50%~70%,昼夜各半),普通饲料喂养,自由饮水。本研究所涉及的动物实验操作均由河北中医学院动物伦理委员会批准(编号DWLL2019020)。

1.2 药物与试剂 三焦祛湿方颗粒剂组成:黄芪30 g,淫羊藿15 g,丹参15 g,川芎12 g,红花10 g,水蛭6 g,广藿香10 g,陈皮15 g,白豆蔻10 g,积雪草30 g,炒白术15 g,茯苓15 g(广东一方制药有限公司,批号分别为012263,010049,101123,101149,101149,012028,004636,012165,009644,011590,011271,012347),将三焦祛湿方颗粒加入煮沸的蒸馏水中,配成含生药质量浓度分别为2.379,4.758 g·mL⁻¹的中药混悬液,4℃备用;盐酸贝那普利片(深圳信立泰药业股份有限公司,批准文号H20054771);阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA,美国Chondrex公司,批号9058);弗氏完全佐剂,ROS染液(美国Sigma公司,批号分别为F5881,D7008);总蛋白(TP),白蛋白(Alb)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号分别为200941,200923);尿素氮(BUN),血清肌酐(SCr),甘油三酯(TG),总胆固醇(TC)测定试剂盒(贝克曼库尔特实验系统有限公司,批号分别为AUZ3625, AUZ3592, AUZ3562, AUZ3611);Nrf2抗体,NQO1抗体(美国Proteintech公司,批号分别为16396-1-AP,67240-1-Ig);HO-1抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB12104,GB12002,GB23303);组蛋白H3(Histone H3)(上海泊湾生物科技有限公司,批号CY6587),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠IgG(美国KPL

公司,批号02-18-06);伊红染色液,苏木素染色液,马松(Masson)三色染色液,六胺银(PASM)染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号分别为BA-4022,BA-4097,BA4079B,BA4094)。

1.3 仪器 7170A型全自动生化分析仪(日本Hitachi公司);BX43型免疫荧光显微镜,BX51型光学显微镜(日本Olympus公司);Semi-Day型半干转膜仪,PowerPac型电泳仪(美国Bio-Rad公司);Image Quant LAS4000型化学发光成像分析仪(美国GE Healthcare公司);1-15K型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);NanoDrop2000C型紫外分光光度计(美国Thermo公司);UC7型超薄切片机(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 模型制备 小鼠适应性喂养1周后,测定24 h尿蛋白定量<22 μg,按体质量随机分为正常组10只,造模组50只。依据文献[11]方法及预实验结果,给予模型组等体积的完全弗氏佐剂充分乳化(0.2 mg C-BSA,2 g·L⁻¹)后皮下注射,而正常组仅用相同体积的完全弗氏佐剂皮下注射,预免疫2周后,模型组每隔1 d尾静脉注射C-BSA正式免疫,每周3次(6.5 mg·kg⁻¹),同时给予正常组尾静脉注射生理盐水,持续6周。正式免疫结束后,测定24 h尿蛋白定量>60 μg,提示出现异常范围蛋白尿^[12],随机取造模组4只小鼠行肾脏病理免疫荧光检查,均出现IgG沿毛细血管壁颗粒样沉积,进一步证实了MN模型的建立。造模过程中,模型组有3只小鼠死亡,3只小鼠尿蛋白正常,将剩余40只模型复制成功小鼠随机分为模型组,三焦祛湿方低、高剂量组及盐酸贝那普利组。

2.2 分组与给药 造模成功后,正常组和模型组小鼠每日给予蒸馏水0.2 mL灌胃,三焦祛湿方低、高剂量组分别给予相应剂量的中药溶液灌胃,按照小鼠与人等效剂量方法折算,即人服用剂量的9.1倍,根据体质量低剂量三焦祛湿方剂量为3.71 g·kg⁻¹,高剂量组为低剂量组的2倍^[13],将盐酸贝那普利溶于羧甲基纤维素钠中,根据体质量给予1.3 mg·kg⁻¹,折算方法同上。每只小鼠灌胃体积均为0.2 mL,共给药4周,于实验第12周末取材。

2.3 标本采集 各组小鼠分别于造模前、后及给药后经代谢笼收集24 h尿液,记录尿量。给药结束后,异氟烷吸入麻醉小鼠,暴露腹腔,腹主动脉取血,后迅速离心取血清;迅速剖取左肾,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后迅速投入预冷的冻存管中,先放入

液氮中,后转移至-80℃冰箱中;剖取右肾,PBS冲洗后置于冰上,切取约大米粒大小肾皮质,用生理盐水浸湿的纱布包裹后放入离心管中,4℃备用;剩余肾组织放入4%多聚甲醛中,固定24h备用。

2.4 指标检测

2.4.1 化学法检测生化指标,双缩脲法检测24h尿蛋白定量 全自动生化分析仪检测TP,Alb,TC,TG,SCr,BUN水平,尿蛋白定量检测试剂盒检测24h尿蛋白水平。

2.4.2 苏木素-伊红(HE),Masson,PASM检测肾脏组织病理学改变 将固定于4%多聚甲醛的肾组织脱水,石蜡包埋,切片,分别予HE,Masson,PASM染色,光学显微镜下观察肾脏组织形态学改变。

2.4.3 免疫荧光法检测小鼠肾脏IgG的沉积 将新鲜肾组织从4℃冰箱取出,用OCT包埋剂包埋,并迅速放入-20℃冷冻切片机中,切片,厚4μm,丙酮固定5min,再用PBS溶液浸洗3次,避光封闭IgG抗体,室温下孵育1h,PBS再次浸洗,于荧光显微镜下观察并拍照。荧光显示的强度:可分为(-),高、低倍镜均不显示;(±),高倍镜隐约有显示:(+),低倍镜隐约可见,高倍镜下可见;(++),低倍镜下可见,高倍镜下清晰:(+++),低倍镜下清晰,高倍镜下耀眼;(++++),低倍镜下耀眼,高倍镜下刺眼^[14]。

2.4.4 免疫荧光法检测肾组织ROS的表达 将部分肾组织制成冰冻切片,室温复温,将组化笔于组织周围画圈,并加入自发荧光淬灭剂。将ROS染液滴入圈内,室温孵育30min,DAPI复染细胞核,封片,于荧光显微镜下观察图像。

2.4.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾组织中细胞核Nrf2,细胞质Nrf2,HO-1,NQO1蛋白的表达 取肾组织约100mg放入离心管中,置于冰上,

加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液(RIPA Lysis Buffer),用组织匀浆器裂解组织。检测细胞核蛋白表达时使用核质分离试剂盒提取肾皮质的核蛋白。4℃,1万r·min⁻¹离心10min,离心半径10cm,提取上清液,采用BCA法检测组织上清液蛋白浓度,沸水浴5min使蛋白变性。蛋白样品经凝胶电泳,转至PVDF膜,用5%脱脂奶粉封闭2h,分别加入Nrf2抗体(1:1000),HO-1抗体(1:700),NQO1抗体(1:5000),4℃孵育过夜,加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:2000),室温摇床孵育1h,加入化学发光试剂显影,并用ImageQuant LAS4000成像系统拍照。

2.5 统计学分析 采用SPSS 25.0进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,若数据呈正态分布且方差齐,则组间均数比较用单因素方差分析,若数据不符合正态分布,则选用非参数秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对MN小鼠一般情况的影响 与正常组小鼠比较,模型组小鼠逐渐表现为精神萎靡,活动迟缓,毛发干枯,饮食减少,治疗后,与模型组小鼠比较,治疗组小鼠饮食渐增,活动渐多,精神状态有所改善,毛发逐渐有光泽,三焦祛湿方高剂量组小鼠改善最为明显。

3.2 对MN小鼠24h尿蛋白定量的影响 造模前,各组24h尿蛋白水平比较,差异无统计学意义;造模后,与正常组比较,模型组小鼠24h尿蛋白水平显著升高($P<0.01$);给药后,与模型组比较,三焦祛湿方低、高剂量组及盐酸贝那普利组24h尿蛋白水平显著降低($P<0.01$),三焦祛湿方高剂量组尿蛋白定量降低最显著。见表1。

表1 三焦祛湿方对MN小鼠24h尿蛋白定量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前	造模后	给药后
正常		11.14±2.67	13.06±3.34	13.71±3.11
模型		10.75±1.73	105.60±15.43 ¹⁾	114.69±16.14 ¹⁾
三焦祛湿方	3.71	10.95±1.59	104.45±12.16 ¹⁾	74.80±10.41 ²⁾
	7.42	11.66±1.77	111.09±16.46 ¹⁾	67.78±7.53 ²⁾
盐酸贝那普利	0.0013	11.21±1.93	108.79±20.88 ¹⁾	68.26±11.51 ²⁾

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

3.3 对MN小鼠血清BUN,SCr,TG,TC,Alb,TP水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清TG,TC含量显著增高($P<0.01$),TP,Alb含量显著降低($P<$

0.01);治疗后,各给药组与模型组比较,血清TG,TC含量显著降低($P<0.01$),TP,Alb含量明显增高,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。各组小鼠

血清 SCr, BUN 水平比较, 差异无统计学意义。 见表2。

表2 三焦祛湿方对MN小鼠血清TP, Alb, TC, TG, SCr, BUN水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

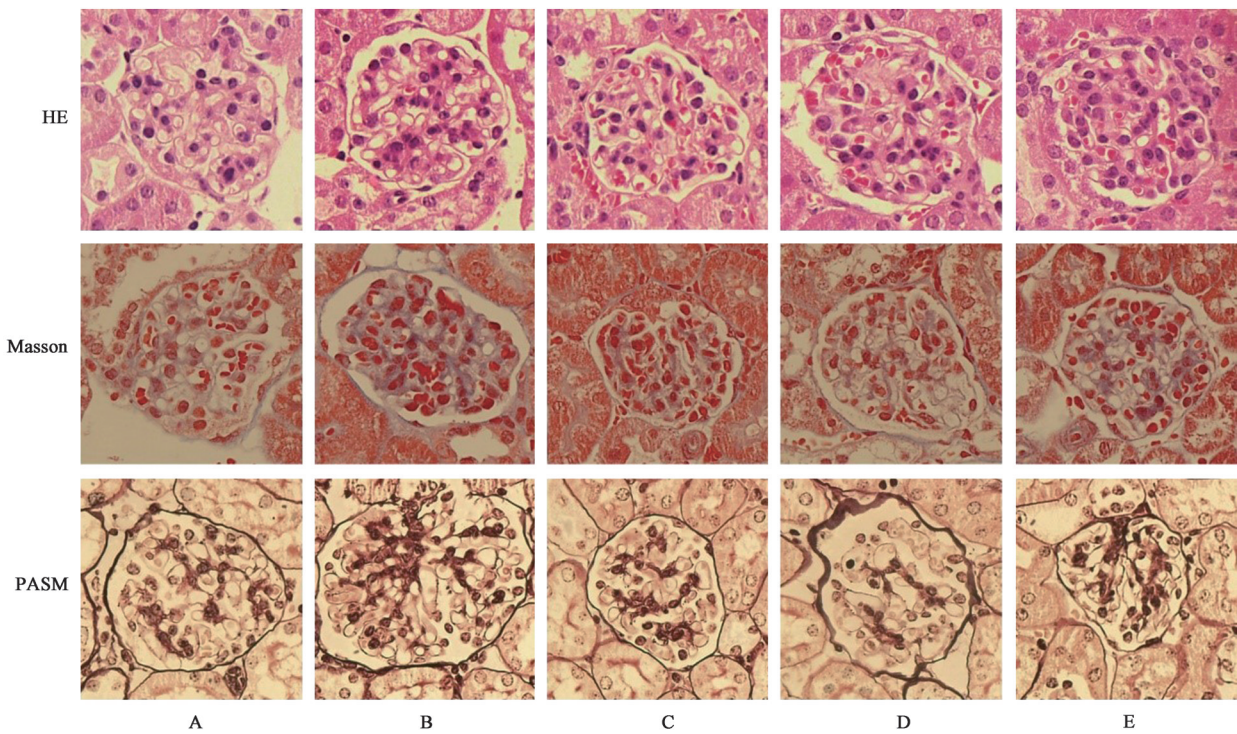
Table 2 Effect of Sanjiao Qushi prescription on serum TP, Alb, TC, TG, SCr, BUN levels in MN mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	Alb/g·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	SCr/ μ mol·L ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹
正常		54.75 \pm 3.18	31.31 \pm 2.71	2.42 \pm 0.28	1.30 \pm 0.26	14.37 \pm 1.45	6.57 \pm 1.03
模型		41.58 \pm 3.45 ¹⁾	20.73 \pm 2.99 ¹⁾	4.93 \pm 0.40 ¹⁾	2.92 \pm 0.31 ¹⁾	15.95 \pm 2.29	7.17 \pm 1.70
三焦祛湿方	3.71	46.91 \pm 3.43 ³⁾	25.66 \pm 3.54 ³⁾	3.61 \pm 0.60 ³⁾	2.39 \pm 0.35 ³⁾	15.14 \pm 1.20	6.86 \pm 0.90
	7.42	48.18 \pm 2.65 ³⁾	27.07 \pm 2.64 ³⁾	3.54 \pm 0.43 ³⁾	2.32 \pm 0.35 ³⁾	15.08 \pm 1.14	6.71 \pm 0.51
盐酸贝那普利	0.001 3	46.66 \pm 3.59 ²⁾	26.17 \pm 3.44 ³⁾	3.62 \pm 0.40 ³⁾	2.34 \pm 0.36 ³⁾	15.24 \pm 2.61	6.92 \pm 0.88

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4同)。

3.4 对MN小鼠肾组织病理学改变的影响 正常组小鼠HE染色可见肾小球结构完整,囊腔大小正常,Masson染色未见上皮下嗜复红蛋白沉积,PASM染色基底膜未见异常;模型组小鼠HE染色可见肾小球体积增大,Masson染色可见嗜复红蛋白沉积,

PASM染色基底膜出现不同程度的增厚,可见“钉突”形成。与模型组比较,经三焦祛湿方及盐酸贝那普利治疗后,各组小鼠HE染色肾小球体积增大有所减轻,Masson染色偶见嗜复红蛋白,PASM染色基底膜增厚程度减轻,“钉突”较少见。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 三焦祛湿方低剂量组;D. 三焦祛湿方高剂量组;E. 盐酸贝那普利组(图2~4同)

图1 三焦祛湿方对MN小鼠肾组织病理学改变的影响($\times 400$)

Fig. 1 Effect of Sanjiao Qushi prescription on renal histopathological changes in MN mice ($\times 400$)

3.5 对MN小鼠肾组织IgG沉积的影响 正常组小鼠肾小球未见免疫复合物沉积,荧光强度为“-”,模型组小鼠肾小球可见IgG沿毛细血管襻弥漫性沉积,荧光强度为“卅~卅卅”,经三焦祛湿方及盐酸贝那普利干预后,治疗组小鼠肾小球可见IgG沿毛细血管襻少量沉积,荧光强度为“+~++”。见图2。

3.6 对MN小鼠肾组织ROS水平的影响 与正常

组比较,模型组小鼠肾组织ROS表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各治疗组小鼠肾组织ROS表达水平显著降低($P<0.01$)。见图3,表3。

3.7 对MN小鼠肾组织Nrf2/HO-1通路蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组肾组织细胞核内Nrf2蛋白表达显著升高($P<0.01$),细胞质Nrf2蛋白表达显著降低($P<0.01$),HO-1和NQO1蛋白表达显

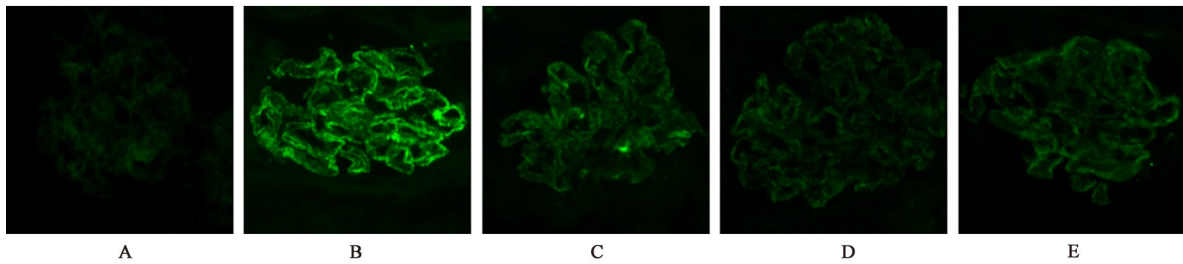


图2 三焦祛湿方对MN小鼠肾组织IgG沉积的影响(荧光显微镜,×400)

Fig. 2 Effect of Sanjiao Qushi prescription on IgG deposition in kidney tissue of MN mice (fluorescence microscope, ×400)

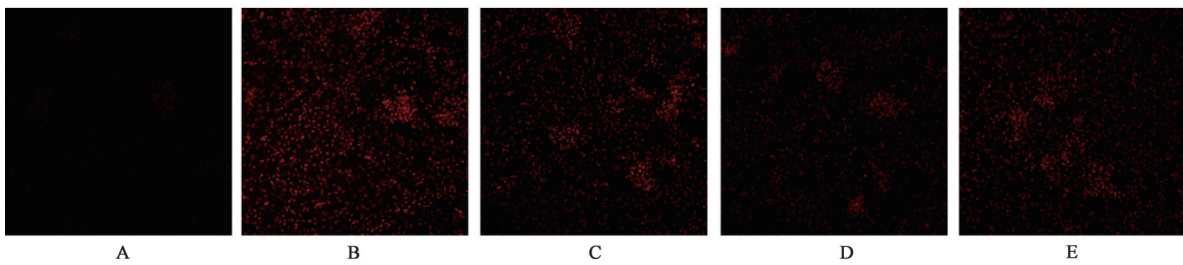


图3 三焦祛湿方对MN小鼠肾组织ROS表达的影响(荧光显微镜,×200)

Fig. 3 Effect of Sanjiao Qushi prescription on ROS expression in kidney tissue of MN mice (fluorescence micrographs, ×200)

表3 三焦祛湿方对MN小鼠肾组织ROS水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Sanjiao Qushi prescription on ROS level in renal tissue of MN mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ROS
正常		0.02±0.01
模型		1.60±0.34 ¹⁾
三焦祛湿方	3.71	0.84±0.10 ²⁾
	7.42	0.55±0.09 ²⁾
盐酸贝那普利	0.001 3	0.86±0.08 ²⁾

著升高($P<0.01$);给药后,与模型组比较,各治疗组肾组织细胞核内Nrf2蛋白表达显著降低($P<0.01$),三焦祛湿方低剂量组、盐酸贝那普利组细胞质Nrf2蛋白表达明显升高($P<0.05$),三焦祛湿方高剂量组细胞质Nrf2蛋白表达显著升高($P<0.01$),HO-1和NQO1蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图4,表4。

4 讨论

近10年来,我国MN患者数量逐年增加,调查

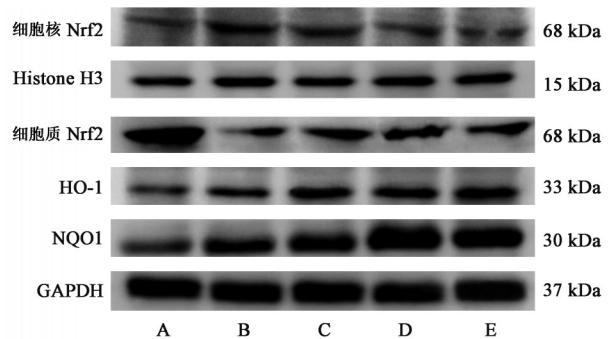


图4 Nrf2/HO-1通路蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Nrf2/HO-1 pathway protein expression

显示,在其他肾小球病占比相对稳定情况下,MN占比从2004年的12.2%增至2014年的24.9%,其患病率平均每年增加13%^[15]。MN以肾病综合征为主要临床表现,MN发生时,肾小球滤过屏障受损,大量蛋白质随尿排出,血清Alb,TP水平降低,进而使肝脏代偿性合成白蛋白及脂蛋白等,脂蛋白增加引起高脂血症产生。低蛋白血症可引发机体免疫力低下、感染风险增加。高脂血症不仅增加血栓栓塞风

表4 三焦祛湿方对MN小鼠Nrf2/HO-1通路蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Sanjiao Qushi prescription on Nrf2/HO-1 pathway protein expression in MN mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	细胞核 Nrf2/Histone H3	细胞质 Nrf2/GAPDH	HO-1/GAPDH	NQO1/GAPDH
正常		0.34±0.01	1.20±0.10	0.25±0.01	0.47±0.02
模型		0.76±0.02 ¹⁾	0.49±0.07 ¹⁾	0.37±0.01 ¹⁾	0.67±0.07 ¹⁾
三焦祛湿方	3.71	0.62±0.01 ³⁾	0.78±0.06 ²⁾	0.44±0.01 ³⁾	0.91±0.05 ³⁾
	7.42	0.55±0.01 ³⁾	0.83±0.13 ³⁾	0.47±0.01 ³⁾	1.16±0.03 ³⁾
盐酸贝那普利	0.001 3	0.50±0.01 ³⁾	0.74±0.07 ²⁾	0.49±0.01 ³⁾	1.07±0.04 ³⁾

险,还可加重肾小球硬化、肾小管-间质损伤等,从而加重肾脏结构损伤。本研究采用C-BSA尾静脉注射建立MN小鼠模型^[11],实验结果显示模型组小鼠较正常组血清Alb,TP明显减少,血清TC,TG水平明显升高,并出现大量蛋白尿,肾脏病理表现为IgG沿毛细血管襻颗粒样沉积,说明MN小鼠模型复制成功。给予三焦祛湿方治疗后,MN小鼠血清TP,Alb明显增加,血清TC,TG水平明显降低,蛋白尿水平降低,肾脏病理损伤程度有所改善,表明三焦祛湿方可以改善MN的临床症状,延缓肾脏病理损伤。

MN发病机制尚未明确,多数学者认为MN是由自身抗体与肾脏足细胞抗原结合形成原位免疫复合物致病。研究发现,免疫复合物沉积和随后的反应,包括补体激活、氧化应激等,似乎是MN的核心发病机制^[3]。氧化应激是指机体受到各种有害刺激损伤时,活性氧生成和抗氧化防御系统失去平衡后机体所处的一种状态。免疫复合物在上皮下沉积,随后激活补体,形成膜攻击复合物C5b-9,C5b-9促使足细胞释放花生四烯酸,NADPH氧化酶上调,进一步产生大量ROS,ROS过量可导致足细胞的损伤^[16],而足细胞高度分化不可再生,损伤后引起肾小球基底膜的破坏^[17];另一方面,当机体不饱和脂肪酸受到ROS攻击时,会产生一系列脂质过氧化反应,使肾小球基底膜IV型胶原降解而导致基底膜损伤^[18]。

ROS大量产生会破坏细胞内氧化还原稳态并改变正常的细胞过程^[19],为了限制这种有害作用,细胞中许多保护性转录因子被激活,其中包括Nrf2。Nrf2由Nfe2l2基因编码,属于cap-ncollar(CNC)亮氨酸拉链转录激活因子家族成员,相对分子质量约为68 kDa,是细胞防御多种应激损伤的关键因子^[20]。在正常的生理状态下,转录因子Nrf2与其抑制蛋白Keap1样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)以特殊结构结合于细胞质,并通过Keap1-Cul3-Rbx依赖的泛素化过程保持平衡而处于惰性状态。当机体处于氧化应激状态时,Keap1蛋白发生空间构象变化,泛素化过程受到抑制,Nrf2与Keap1蛋白解离,并发生核转移,进入细胞核后,与小肌腱膜纤维肉瘤蛋白(Maf)蛋白形成异二聚体,再与ARE结合而启动HO-1,NQO1等基因的转录^[21]。当氧化还原平衡恢复后,Nrf2从细胞核转移到细胞质,在细胞质中被泛素化降解^[22]。

HO-1是一种重要的抗氧化剂酶,不仅能够阻止

游离血红素参与氧化反应,还与胆红素、一氧化碳(CO)共同发挥着抗氧化、抗炎、抑制细胞凋亡等作用^[23]。NQO1属于II相代谢酶,可以催化醌还原成氢醌并抑制ROS产生,防止DNA氧化损伤^[24]。有研究表明,新月体性肾小球肾炎小鼠模型应用绿茶多酚后,其Nrf2水平恢复,并增加了HO-1,NQO1蛋白的表达,表明已启动保护氧化应激过程^[25]。本次研究结果发现,MN小鼠肾组织ROS表达水平升高,细胞内发生了Nrf2的核转移,表明体内发生氧化应激,经过三焦祛湿方治疗后,ROS水平降低,Nrf2核转移有所恢复,并上调其下游靶基因HO-1,NQO1的表达,表明体内已启动抗氧化应激过程。因此,Nrf2/HO-1信号通路可能是三焦祛湿方改善MN小鼠肾脏氧化应激的靶点之一。

膜性肾病并无对应中医病名,常将其归为“水肿”范畴。《景岳全书·肿胀》指出:“凡水肿等证,乃肺脾肾三脏相干之病,盖水为至阴,故其本在肾;水化于气,故其标在肺;水唯畏土,故其制在脾。”其基本病机以脾肾亏虚为本,水湿痰瘀为标。故方含黄芪、仙灵脾健脾温肾,川芎、丹参、红花、水蛭活血化瘀通络。《黄帝内经·灵枢·邪气脏腑病形篇》:“三焦病者,腹气满。小腹尤坠,不得小便。窘急,溢则水留即为胀”。三焦为机体水液代谢升降出入的通道,三焦气机壅滞,水道不通,决渎失司,泛滥肌肤,发为水肿,故其病机关键在于三焦气化。本病以水肿为主要症状,湿为主要致病因素,治当以化湿利水消肿,而化湿利水赖于气化作用;本病除水泛致肿,又有湿痰内停,湿性黏滞,不易祛之,若与热结或郁而化热形成湿热或热毒则更难祛除,若要祛之,亦赖气化作用,故用药配以宣通三焦、促进气化之品。本方含藿香芳香化湿以宣通上焦,白术、豆蔻、陈皮苦温燥湿以转运中焦,茯苓、积雪草淡渗利水以通利下焦。在本团队前期研究中,应用三焦祛湿方治疗MN,临床疗效显著^[10],本实验中,三焦祛湿方可明显改善MN小鼠生化指标,缓解肾脏病理损伤,并在分子层面表现出肾脏保护作用,三焦祛湿方高剂量组较低剂量组作用略胜一筹,但差异尚无统计学意义,后期将进一步研究其量效关系。

综上所述,三焦祛湿方可显著减少MN小鼠的尿蛋白,降低血脂,提高血清蛋白水平,改善受损的肾脏组织形态,降低ROS水平,减少Nrf2核转移,并使HO-1,NQO1蛋白表达上调,由此可见,三焦祛湿方可能通过调节Nrf2/HO-1信号通路以改善肾组织氧化应激,保护肾组织,延缓病程进展。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] THOMPSON A, CATTRAN D C, BLANK M, et al. Complete and partial remission as surrogate end points in membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(12):2930-2937.
- [2] HOU J H, ZHU H X, ZHOU M L, et al. Changes in the spectrum of kidney diseases: an analysis of 40759 biopsy-proven cases from 2003 to 2014 in China [J]. *Kidney Dis*, 2018, 4(1):10-19.
- [3] NANGAKU M, SHANKLAND S J, COUSER W G. Cellular response to injury in membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(5):1195-204.
- [4] KEUM Y S, YU S, CHANG P P, et al. Mechanism of action of sul-foraphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17):8804-8813.
- [5] 秦卫松, 刘志红, 曾彩虹, 等. 雷公藤甲素对 Heymann 肾炎模型足细胞病变的影响 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2007, 6(2):101-109.
- [6] 陈文军, 陈素枝, 靳晓华, 等. 降脂通络软胶囊对膜性肾病大鼠肾保护作用及对肾组织 Bcl-2 和 Bad 表达的影响 [J]. *中草药*, 2016, 47(18):3263-3268.
- [7] 汪保和, 皮亦华, 黄畅, 等. 补肾通络方对阳离子化牛血清白蛋白致膜性肾病大鼠高凝状态的影响 [J]. *中草药*, 2009, 40(7):1095-1098.
- [8] 黄谷香, 刘瑞洪. 重楼对膜性肾病大鼠肾脏的保护作用 [J]. *广东医学*, 2007, 28(4):521-529.
- [9] 尼日特, 杨巧芳, 薛昕, 等. 加味过敏煎拆方组分对膜性肾病大鼠白细胞介素-4、白细胞介素-10 等细胞因子的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(12):5277-5280.
- [10] 张芬芳, 艾雨, 陈志强, 等. 宣通三焦、活血通络方治疗特发性膜性肾病的临床疗效观察 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(3):1596-1598.
- [11] WU C C, CHEN J S, LIN S H, et al. Experimental model of membranous nephropathy in mice: sequence of histological and biochemical events [J]. *Lab Anim*, 2008, 42(3):350-359.
- [12] 秦川. *实验动物学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010:419.
- [13] 刘璐. 宣通三焦、活血通络方对膜性肾病大鼠肾脏的保护作用及对肾组织中 CD2AP 和 Podocin 的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [14] 邹万忠. 肾活检病理诊断标准指导意见 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2001(4):270-275.
- [15] XU X, WANG G, CHEN N, et al. Long-term exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in China [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(12):3739-3746.
- [16] TAKANO T, ELIMAM H, CYBULSKY A V. Complement-mediated cellular injury [J]. *Semin Nephrol*, 2013, 33(6):586-601.
- [17] WHITE K E, BILOUS R W, MARSHALL S M, et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria [J]. *Diabetes*, 2002, 51(10):3083-3089.
- [18] KERJASCHKI D, NEALE T J. Molecular mechanisms of glomerular injury in rat experimental membranous nephropathy (Heymann nephritis) [J]. *Am Soc Nephrol*, 1996, 7(12):2518-2526.
- [19] ZHANG J, WANG X, VIKASH V, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:4350965.
- [20] KOBAYASHI A, OHTA T, YAMAMOTO M. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes [J]. *Methods Enzymol*, 2004, 378:273-286.
- [21] MCCUBREY J A, LAHAIR M M, FRANKLIN R A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9/10):17-89.
- [22] CAMP N D, JAMES R G, DAWSON D W, et al. Wilms tumor gene on X chromosome (WTX) inhibits degradation of NRF2 protein through competitive binding to KEAP1 protein [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(9):6539-6550.
- [23] SO H, KIM H, KIM Y, et al. Evidence that cisplatin-induced auditory damage is attenuated by downregulation of pro-inflammatory cytokines via Nrf2/HO-1 [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2008, 9(3):290-306.
- [24] KENSLER T W, WAKABAYASHI N, BISWAL S, et al. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway [J]. *Annu Rev Pharmacol*, 2007, 47(1):89-116.
- [25] YE T, ZHEN J, DU Y, et al. Green tea polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate restores Nrf2 activity and ameliorates crescentic glomerulonephritis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0119543.

[责任编辑 孙丛丛]