

益肾通络方对MN大鼠 miR-514a-5p/TNFSF15 信号通路的影响及机制

毛竞宇¹, 高飞¹, 张欣欣¹, 刘昊¹, 赵美姣², 陈素枝², 杨凤文², 檀森³, 檀金川^{2*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 河北中医学院第一附属医院, 石家庄 050011;

3. 河北医科大学第四医院, 石家庄 050000)

[摘要] 目的: 基于 miR-514a-5p/肿瘤坏死因子超家族成员 15(TNFSF15)信号通路探讨益肾通络方抑制膜性肾病(MN)大鼠肾小球足细胞凋亡的分子机制。方法: 80只SD大鼠采用预免疫和尾静脉注射阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)的方法建立MN大鼠模型, 并使造模成功的MN大鼠随机分为模型组, 益肾通络方高、中、低剂量组(26.44, 13.22, 6.61 g·kg⁻¹)和贝那普利组(10 mg·kg⁻¹), 每组各10只, 取健康大鼠20只作为正常组, 各组分别予对应药物灌胃, 每日1次, 连续干预4周。给药结束后, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠肾组织中 miR-514a-5p 及 TNFSF15 mRNA 表达水平; 免疫组化(IHC)检测大鼠肾组织中足细胞标志蛋白足细胞裂孔膜蛋白(Nephrin), 膜蛋白(Podocin), 足萼蛋白(Podocalyxin), 突触足蛋白(Synaptopodin), TNFSF15 及足细胞凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax), Bcl-2 关联死亡启动子重组蛋白(BAD), 大分子 B 细胞淋巴瘤(Bcl-XL)的表达水平; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织中 TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL 的表达水平; 原位末端标记法(TUNNEL)检测大鼠肾组织细胞凋亡率。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织中 miR-514a-5p 水平明显降低($P<0.05$), TNFSF15 mRNA 水平明显升高($P<0.05$); 足细胞标志蛋白 Nephrin, Podocin, Podocalyxin, Synaptopodin 表达明显降低($P<0.05$); TNFSF15, Bax, BAD 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), Bcl-2, Bcl-XL 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); 凋亡细胞明显增多($P<0.05$)。与模型组比较, 益肾通络方各剂量组和贝那普利大鼠肾组织中 miR-514a-5p 水平明显升高($P<0.05$), TNFSF15 mRNA 水平明显降低($P<0.05$); 足细胞标志蛋白 Nephrin, Podocin, Podocalyxin, Synaptopodin 表达明显升高($P<0.05$); TNFSF15, Bax, BAD 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), Bcl-2, Bcl-XL 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$); 凋亡细胞明显减少($P<0.05$)。结论: 益肾通络方可能通过 miR-514a-5p/TNFSF15 信号通路, 减轻大鼠肾组织足细胞凋亡, 缓解 MN 大鼠肾损伤。

[关键词] 膜性肾病; 益肾通络方; 足细胞; miR-514a-5p; TNFSF15

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0121-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212407

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211029.0921.001.html>

[网络出版日期] 2021-10-29 16:33

Effect and Mechanism of Yishen Tongluo Prescription on miR-514a-5p/TNFSF15 Signaling Pathway in MN Rats

MAO Jing-yu¹, GAO Fei¹, ZHANG Xin-xin¹, LIU Hao¹, ZHAO Mei-jiao², CHEN Su-zhi²,
YANG Feng-wen², TAN Miao³, TAN Jin-chuan^{2*}

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

2. The First Affiliated Hospital of Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China;

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

[Abstract] **Objective:** To explore the molecular mechanism of Yishen Tongluo prescription in inhibiting

[收稿日期] 20210725(017)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(2019423037)

[第一作者] 毛竞宇, 在读博士, 从事中西医结合肾病研究工作, E-mail: 1909628690@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工作, E-mail: 1955981973@qq.com

the apoptosis of glomerular podocytes in rats with membranous nephropathy (MN) based on the miR-514a-5p/tumor necrosis factor superfamily member 15 (TNFSF15) signaling pathway. **Method:** Eighty SD rats were pre-immunized and injected with cationized bovine serum albumin (C-BSA) into the tail vein for inducing MN, and the successfully modeled MN rats were randomly divided into the model group, high-, middle-, and low-dose (26.44, 13.22, 6.61 g·kg⁻¹) Yishen Tongluo prescription groups, and benazepril (10 mg·kg⁻¹) group, with 10 rats in each group, and another 20 healthy rats were classified into the normal group. Rats in each group were gavaged with the corresponding drugs, once a day, for four successive weeks. After the administration, the 24-hour urine total protein (UTP) level, serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), albumin (ALB), creatinine (SCr), and urea nitrogen (BUN) levels were measured. The miR-514a-5p and TNFSF15 mRNA expression levels in the rat kidney tissue were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the expression levels of podocyte marker proteins Nephlin, Podocin, Podocalyxin, Synaptopodin, TNFSF15, and podocyte apoptosis-related proteins B lymphocytoma-2 (Bcl-2)-related X protein (Bax), Bcl-2-associated death promoter (BAD) protein, and B-cell lymphoma-extra large (Bcl-XL) by immunohistochemistry (IHC). Western blot was used to detect the expression levels of TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, and BCL-XL in the rat kidney tissue. The apoptosis rate of rat kidney tissue was measured using the in situ end labeling method (Tunnel). **Result:** Compared with the normal group, the level of miR-514a-5p in the kidney tissue was significantly reduced ($P<0.05$), and the TNFSF15 mRNA expression was significantly increased ($P<0.05$). The expression levels of podocyte marker proteins Nephlin, Podocin, Podocalyxin, and Synaptopodin were down-regulated ($P<0.05$). The protein expression levels of TNFSF15, Bax, and BAD were increased ($P<0.05$), whereas the Bcl-2 and Bcl-XL protein expression levels were decreased ($P<0.05$). The number of apoptotic cells diminished significantly ($P<0.05$). Compared with the model group, the level of miR-514a-5p in the kidney tissue was significantly increased ($P<0.05$), while the level of TNFSF15 mRNA was significantly decreased ($P<0.05$). The expression levels of podocyte marker proteins Nephlin, Podocin, podocalyxin, and Synaptopodin were up-regulated ($P<0.05$), whereas the TNFSF15, Bax, and BAD protein expression levels were down-regulated ($P<0.05$). Bcl-2 and Bcl-XL protein expression levels rose ($P<0.05$). The number of apoptotic cells significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Yishen Tongluo prescription reduces the apoptosis of rat kidney podocytes and alleviates the kidney injury of MN rats through the miR-514a-5p/TNFSF15 signaling pathway.

[Keywords] membranous nephropathy (MN); Yishen Tongluo prescription; podocytes; miR-514a-5p; TNFSF15

膜性肾病(MN)是一种以足细胞受损为核心机制的自身免疫性疾病,是肾病综合征中常见的病理类型,据报道^[1],MN发病率逐年增长13%。足细胞是维持肾小球滤过膜完整性的重要组成部分,足细胞损伤则导致蛋白尿的产生,在MN发展中起重要作用^[2]。足细胞损伤的一个重要因素就是细胞凋亡,也是MN发生、发展的关键^[3]。miRNA可通过对足细胞的调控影响肾小球疾病的进展^[4],miR-514a-5p是一个与细胞凋亡关系密切的miRNA。肿瘤坏死因子(TNF)作为肾损伤发病机理的主要参与者,可促进炎症、细胞凋亡、细胞外基质的积累,降低肾小球血流量等。TNF和TNF受体超家族参与足细胞损伤和凋亡的发病机制,已有研究表明,

miR-217可通过靶向肿瘤坏死因子超家族成员11(TNFSF11)参与MN患者足细胞凋亡^[5];据报道,TNF- α 可下调足细胞标志蛋白足细胞裂孔膜蛋白(Nephlin)的表达,加重足细胞的损伤^[6]。通过生物学信息软件 Targetscan 和 miRDB 预测发现 TNFSF15 是 miR-514a-5p 的潜在靶标。但尚未在动物实验中得以证实。

益肾通络方(组成:黄芪、炙淫羊藿、土茯苓、积雪草、莪术、地龙、穿山龙、全蝎、水蛭)是檀金川教授依据30余年临床经验所创之方,其理法有依、配伍得当、直戳病机,治疗MN疗效显著^[7],前期研究表明,其可抑制足细胞凋亡、修复损伤足细胞,使肾组织中Nephlin,膜蛋白(Podocin)mRNA的表达上

调^[8],但具体分子机制尚有待考证。本研究在此基础上,以miR-514a-5p/TNFSF15通路为研究方向,进一步探讨益肾通络方对MN足细胞的影响及其可能的分子机制,为MN治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠80只,鼠龄8周,体质量(180±20)g,河北医科大学动物实验中心提供,动物合格证号SCXK(冀)2018-004,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 药物与试剂 盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司,批号H20030514);益肾通络方(黄芪20g,炙淫羊藿20g,土茯苓15g,积雪草15g,莪术12g,地龙12g,穿山龙15g,全蝎6g,水蛭9g,均为颗粒剂,广东一方制药公司,批号分别为5063231,5052073,5060451,4073481,4114217,5044321,5062171,5061852,5061675),配成含生药量分别为0.661,1.322,2.644 g·mL⁻¹的中药混悬液,蒸馏水充分溶解后收集,4℃备用。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蛋白尿(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);兔来源Nephrin抗体,兔来源Podocin抗体,兔来源突触足蛋白(Synaptopodin)抗体,兔来源B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)关联死亡启动子重组蛋白(BAD)抗体,兔来源Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体,兔来源大分子B细胞淋巴瘤(Bcl-XL)抗体(美国Affinity公司,批号分别为DF7501,DF8593,DF12173,AF6139,AF6471,AF0120,AF6414);TRIzol(美国Invitrogen公司,批号15596026);兔来源足萼蛋白(Podocalyxin)抗体(美国Thermo Fisher公司,批号PA5-95527);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(北京HyClone公司,批号SH30538.02);cDNA合成试剂盒(德国Thermo公司,批号K1622);兔来源β-肌动蛋白(β-actin)抗体(中杉金桥生物有限公司,批号16AF0207);山羊抗兔二抗(美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号SC2357)。

1.3 仪器 7170A型全自动生化仪,H-7650型投射电镜(日本日立公司);BX53型显微镜(日本奥林巴斯公司);RM2015型切片仪(德国Leica公司);

Mx3000P型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Agilent公司);Mini-PROTEAN型电泳系统,Mini Trans-Blot转移系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 模型制备依据改良Border法^[9]。用2 g·L⁻¹ C-BSA和等量弗氏不完全佐剂混匀,分别在腋下、腹股沟多点皮下注射乳液予以预免疫,2日1次,共3次。正式免疫为向大鼠尾静脉注射2 g·L⁻¹ C-BSA和等量磷酸盐缓冲液(PBS)混匀液0.5 mL,1周3次,共4周。造模完毕后随机处死造模组和健康组老鼠各2只,包埋、固定后在镜下察看肾组织病理情况,确认造模成功。

2.2 分组、干预、取材及固定 将80只SD大鼠随机分为造模组和正常组,其中造模组60只,正常组20只。将造模成功者随机分为模型组、益肾通络方高、中、低剂量组和贝那普利组,各组10只。按成人等效剂量折算系数,以成人剂量6.25倍为中剂量,益肾通络方高、中、低剂量组分别予益肾通络方26.44,13.22,6.61 g·kg⁻¹灌胃,贝那普利组按10 mg·kg⁻¹药剂灌胃,正常组及模型组予等量生理盐水灌服。1次/日,灌胃4周。大鼠24 h尿液由代谢笼留取,1 000 r·min⁻¹离心3 min(离心半径6 cm,下同)取上清液后4℃冰箱备用。大鼠禁食水12 h,麻醉,腹主动脉取血,3 500 r·min⁻¹离心10 min,存于4℃冰箱备用;分离大鼠肾脏,取部分肾皮质于冻存管并转移至-80℃冰箱备用;取部分肾组织分别置于4%多聚甲醛溶液和2.5%戊二醛溶液中备用。

2.3 免疫组化(IHC)检测大鼠肾组织中Nephrin, Podocin, Podocalyxin, Synaptopodin, TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL定位表达的检测 将石蜡包埋的肾组织切片,脱蜡,乙醇水化,抗原修复,山羊血清封闭,加入完成稀释的Nephrin(1:200),Podocin(1:200),Synaptopodin(1:200),Podocalyxin(1:500),TNFSF15(1:200),Bax(1:500),BAD(1:500),Bcl-2(1:500),Bcl-XL(1:500),孵育过夜,二抗孵育30 min,辣根过氧化物酶标记链霉卵白素孵育30 min,DAB显色,苏木素复染,中性树脂封片。每张切片随机选择5个视野(×400),使用Image Pro Plus 6.0软件分析切片染色结果,统计每个视野下阳性结果的积分吸光度IA和面积(Area),以IA/Area为指标测定的半定量结果^[10]。

2.4 Real-time PCR检测大鼠肾组织中miR-514a-5p, TNFSF15 mRNA水平 应用TRIzol法提取肾

组织总RNA,然后将RNA逆转录合成cDNA,后行PCR扩增,反应条件为95℃预变性30s,95℃变性5s,55℃退火30s,72℃延伸30s,40个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算方法分析miR-514a-5p和TNFSF15 mRNA相对表达量。引物由北京Servicebio公司设计合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
miR-514a-5p	上游 GTCTGTGGTACCCTACTCTGG	100
	下游 ACGTGTTCATGCGTACTCTAC	
U6	上游 CTCGCTTCGGCAGCACA	103
	下游 AACGCTTCACGAATTTGCGT	
TNFSF15	上游 CTCACAAAGGGCCGTCTTCA	122
	下游 GGTGTGCCCTTGGCTTATCT	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL 蛋白的表达水平 取出肾组织,加入适量RIPA裂解液,匀浆,12 000 r·min⁻¹离心20 min后取上清液,BCA法测定蛋白浓度,然后制胶,上样,电泳,转膜,BSA封闭,加入稀释好的一抗TNFSF15(1:2 000),Bax(1:2 000),BAD(1:2 000),Bcl-2(1:2 000),Bcl-XL(1:2 000)和 β -actin(1:5 000),4℃孵育过夜,洗膜后加入稀释好的二抗(1:5 000)孵育1 h。ECL显色,使用Image J软件对目的条带进行定量分析。

2.6 双荧光素酶报告实验 TargetScan与miRDB数据库预测TNFSF15为miR-514a-5p的靶基因,miR-514a-5p和TNFSF15的3'UTR端存在互补结合位点。分别构建突变型(MUT)和野生型(WT)TNFSF15-3'-UTR,并连接到psi-Check2载体,构建TNFSF15-3'UTR WT和TNFSF15-3'UTR Mut。人肾足细胞接种到24孔板24 h后,用Lipofectamine 3000将TNFSF15-3'UTR WT, TNFSF15-3'UTR Mut与miR-514a-5p mimics, miR-NC mimics分别转染到足细胞中,继续培养24 h后用Dual-Luciferase®双荧光素酶报告分析系统检测荧光素酶活性,采用海參的荧光素酶荧光强度与萤火虫的比值来评价miR-514a-5p和TNFSF15的结合力。

2.7 统计学处理 采用SPSS 13.0统计软件进行分析,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),多重比较采用Tukey法, $P<$

0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对MN大鼠肾组织中miR-514a-5p及TNFSF15 mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中miR-514a-5p水平明显降低($P<0.05$),TNFSF15 mRNA水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,贝那普利组和益肾通络方各剂量组大鼠肾组织中miR-514a-5p水平明显升高($P<0.05$),TNFSF15 mRNA水平明显降低($P<0.05$),其中益肾通络方高剂量组改变最明显。见表2。

表2 益肾通络方对MN大鼠肾组织中miR-514a-5p及TNFSF15 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Yishen Tongluo prescription on miR-514a-5p and TNFSF15 mRNA levels in MN rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	miR-514a-5p	TNFSF15
正常		1.00±0.00	1.00±0.00
模型		0.29±0.04 ¹⁾	4.33±0.37 ¹⁾
益肾通络方	6.61	0.51±0.06 ²⁾	3.12±0.21 ²⁾
	13.22	0.81±0.09 ²⁾	2.51±0.26 ²⁾
	26.44	0.84±0.11 ²⁾	1.86±0.23 ²⁾
贝那普利	0.01	0.65±0.08 ²⁾	2.61±0.32 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表3~6同)。

3.2 对MN大鼠肾脏Podocin, Nephlin, Podocalyxin, Synaptopodin蛋白定位表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠足细胞标志蛋白Nephlin, Podocin, Podocalyxin, Synaptopodin表达明显降低($P<0.05$);与模型组比较,益肾通络方各剂量组和贝那普利组大鼠足细胞标志蛋白Nephlin, Podocin, Podocalyxin, Synaptopodin蛋白表达均明显升高($P<0.05$)。见图1~4,表3。

3.3 对MN大鼠肾组织细胞凋亡的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中凋亡细胞明显增多($P<0.05$);与模型组比较,益肾通络方各剂量组和贝那普利组大鼠肾组织中凋亡细胞明显降低($P<0.05$),见图5,表4。

3.4 对MN大鼠肾组织中TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL蛋白定位表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏中TNFSF15, Bax, BAD蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),Bcl-2, Bcl-XL蛋白表达明显降低($P<0.05$);与模型组比较,益肾通络方各剂量组和贝那普利组大鼠肾脏中TNFSF15, Bax, BAD蛋白表达明显降低($P<0.05$),Bcl-2, Bcl-XL蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。见图6~10,表5。

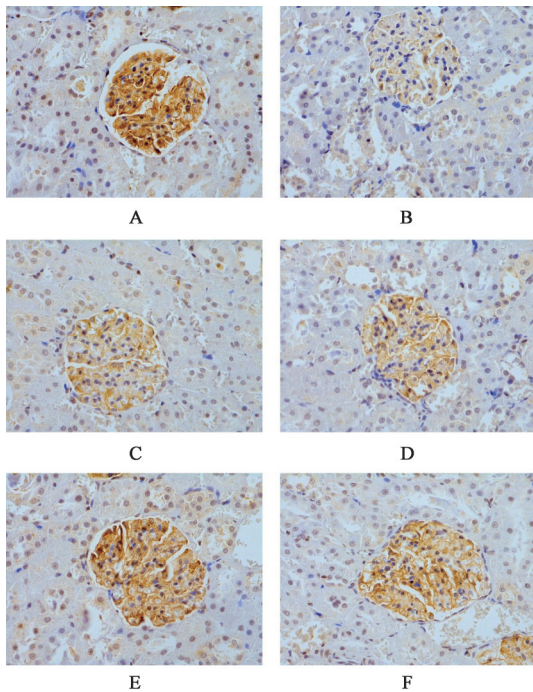


图1 益肾通络方对MN大鼠肾脏中Podocin蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

图1 益肾通络方对MN大鼠肾脏中Podocin蛋白表达的影响(免疫组化,×400)
A. 正常组;B. 模型组;C. 益肾通络方 $6.61\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D. 益肾通络方 $13.22\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 益肾通络方 $26.44\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;F. 盐酸贝那普利组(图2~11同)

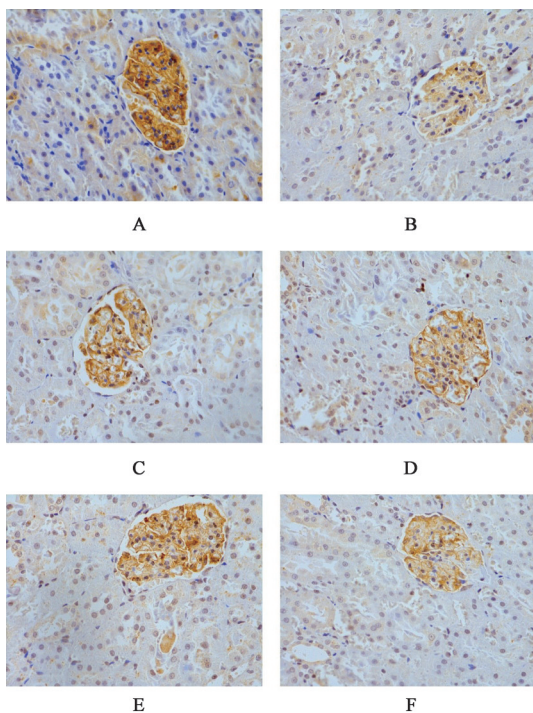


图2 益肾通络方对MN大鼠肾脏中Nephryn蛋白表达的影响(免疫组化,×400)
Fig. 2 Effect of Yishen Tongluo prescription on expression of Nephryn protein in the Kidney of MN rats (IHC, ×400)

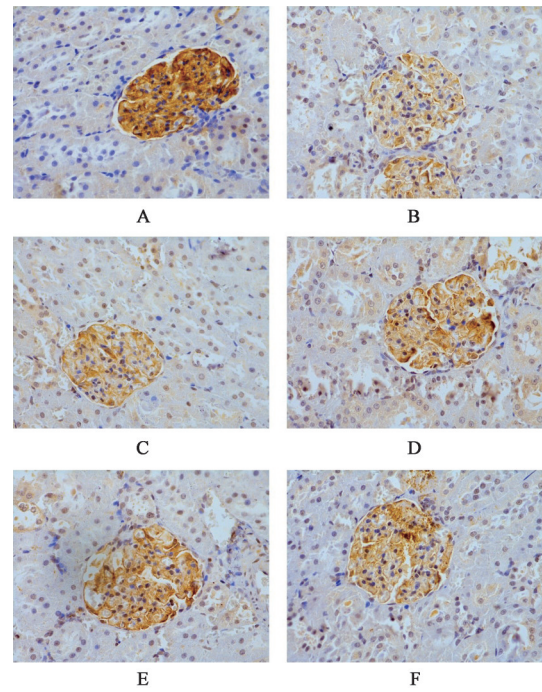


图3 益肾通络方对MN大鼠肾脏中Podocalyxin蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

图3 Effect of Yishen Tongluo prescription on expression of Podocalyxin protein in kidney of MN rats (IHC, ×400)

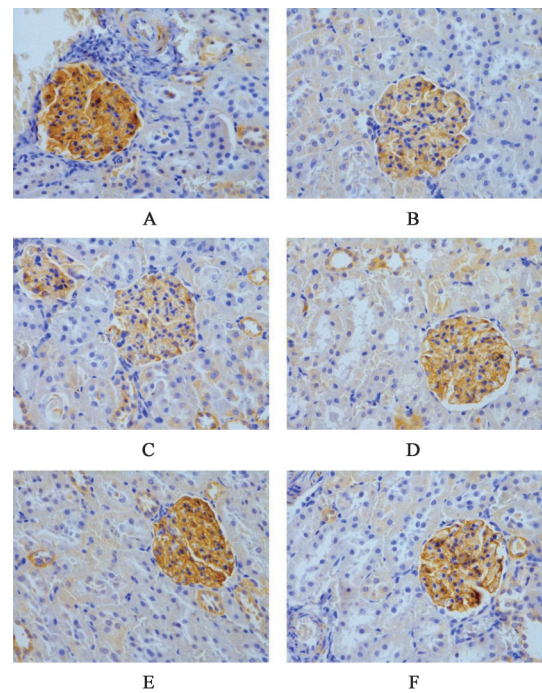


图4 益肾通络方对MN大鼠肾脏中Synaptopodin蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

图4 Effect of Yishen Tongluo prescription on expression of Synaptopodin protein in kidney of MN rats (IHC, ×400)

3.5 对MN大鼠肾组织中TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏中TNFSF15, Bax, BAD蛋白表

表3 益肾通络方对MN大鼠肾脏中Podocin, Nephrin, Podocalyxin, Synaptopodin蛋白定位表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Yishen Tongluo prescription on localization and expression of Podocin, Nephrin, Podocalyxin and Synaptopodin in kidney of MN rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nephrin	Podocin	Podocalyxin	Synaptopodin
正常		0.25±0.05	0.31±0.02	0.36±0.05	0.31±0.03
模型		0.05±0.01 ¹⁾	0.06±0.01 ¹⁾	0.06±0.01 ¹⁾	0.08±0.01 ¹⁾
益肾通络方	6.61	0.15±0.01 ²⁾	0.11±0.01 ²⁾	0.11±0.02 ²⁾	0.11±0.02 ²⁾
	13.22	0.12±0.01 ²⁾	0.12±0.02 ²⁾	0.12±0.02 ²⁾	0.13±0.02 ²⁾
	26.44	0.17±0.02 ²⁾	0.18±0.02 ²⁾	0.22±0.02 ²⁾	0.22±0.02 ²⁾
贝那普利	0.01	0.11±0.02 ²⁾	0.12±0.01 ²⁾	0.17±0.01 ²⁾	0.19±0.01 ²⁾

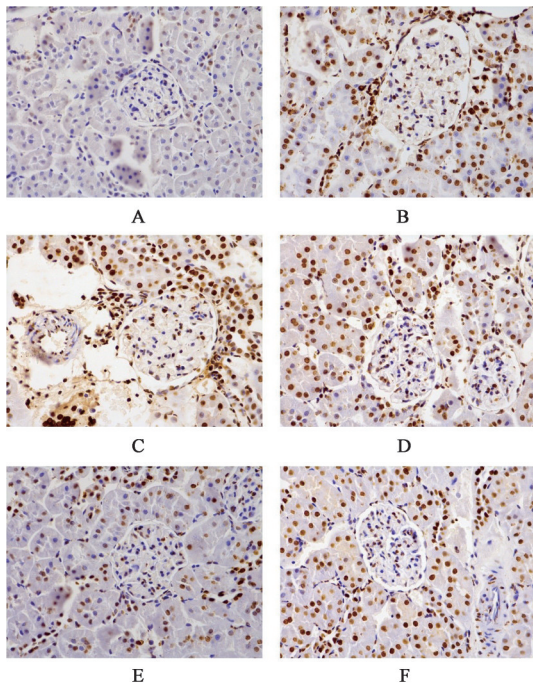


图5 益肾通络方对MN大鼠肾组织细胞凋亡的影响(Tunnel, ×400)

Fig. 5 Effect of Yishen Tongluo prescription on renal cell apoptosis in MN rats (Tunnel, ×400)

表4 益肾通络方对MN大鼠肾组织细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Yishen Tongluo prescription on apoptosis of renal tissue in MN rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡指数
正常		18.34±2.41
模型		53.50±4.82 ¹⁾
益肾通络方	6.61	38.45±4.76 ²⁾
	13.22	36.45±4.08 ²⁾
	26.44	33.45±3.25 ²⁾
贝那普利	0.01	34.96±4.34 ²⁾

达水平明显升高($P<0.05$), Bcl-2, Bcl-XL蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与模型组比较,益肾通络方各剂量组和贝那普利组大鼠肾脏中TNFSF15, Bax,

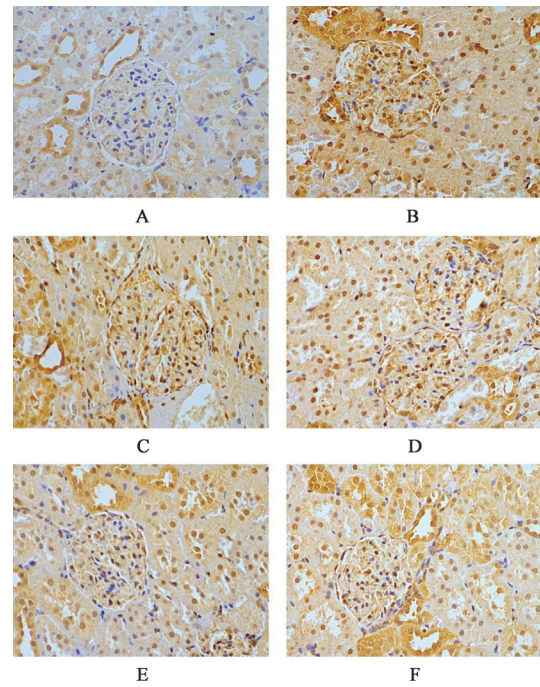


图6 益肾通络方对MN大鼠肾脏中TNFSF15蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 6 Effect of Yishen Tongluo prescription on expression of TNFSF15 protein in kidney of MN rats (IHC, ×400)

BAD蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), Bcl-2, Bcl-XL蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。见图11,表6。

3.6 双荧光素酶报告实验 与miR-NC组比较, miR-514a可明显降低转染TNFSF-3'-UTR wt的足细胞的相对荧光活性($P<0.05$),而对TNFSF-3'-UTR mut的相对荧光活性差异无统计学意义。见图12,表7。

4 讨论

目前,磷脂酶A2抗体和受体的结合破坏了足细胞,进而破坏肾小球滤过屏障并产生蛋白尿是MN的重要发病机制^[11-12]。研究表明, TNF- α 可以通过c-Jun氨基末端激酶1/2(JNK1/2)和p38丝裂原活

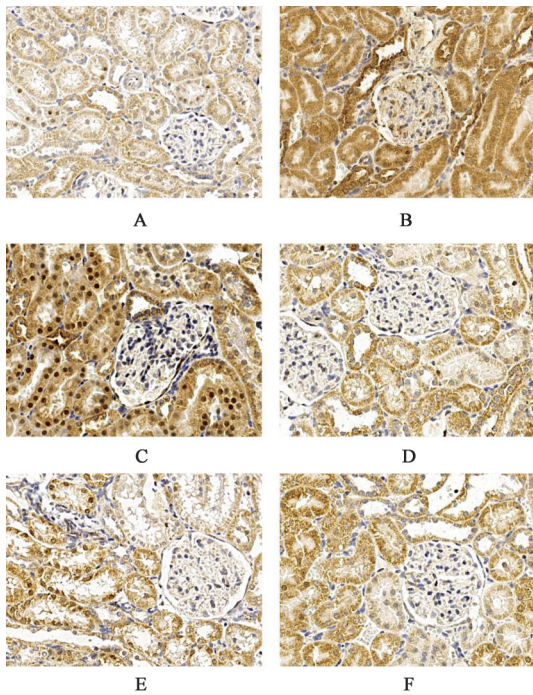


图7 益肾通络方对MN大鼠肾脏中Bax蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 7 Effect of Yishen Tongluo prescription on expression of Bax protein in kidney of MN rats (IHC, ×400)

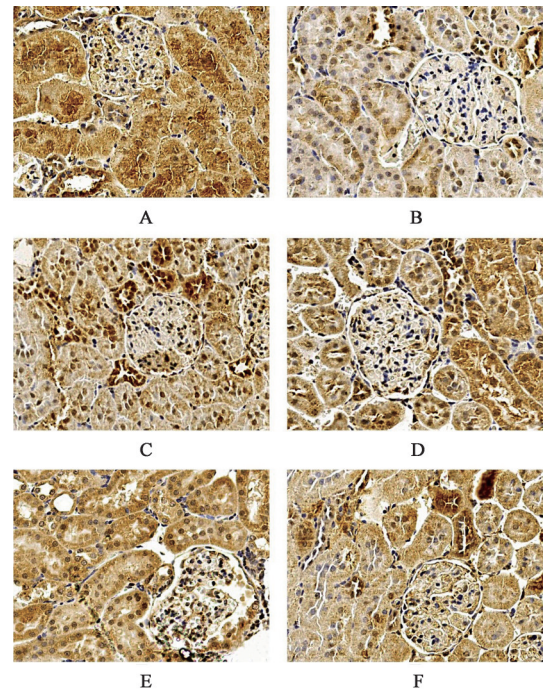


图9 益肾通络方对MN大鼠肾脏中Bcl-2蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 9 Effect of Yishen Tongluo prescription on expression of Bcl-2 protein in kidney of MN rats (IHC ×400)

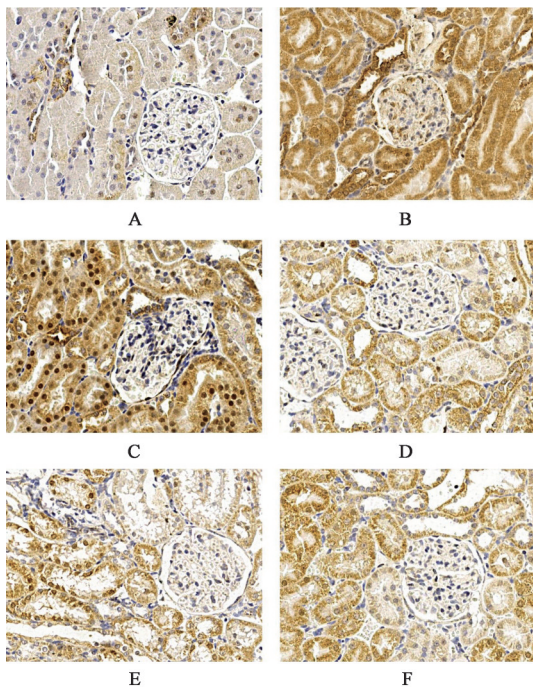


图8 益肾通络方对MN大鼠肾脏中BAD蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 8 Effect of Yishen Tongluo prescription on expression of BAD protein in kidney of MN rats (IHC ×400)

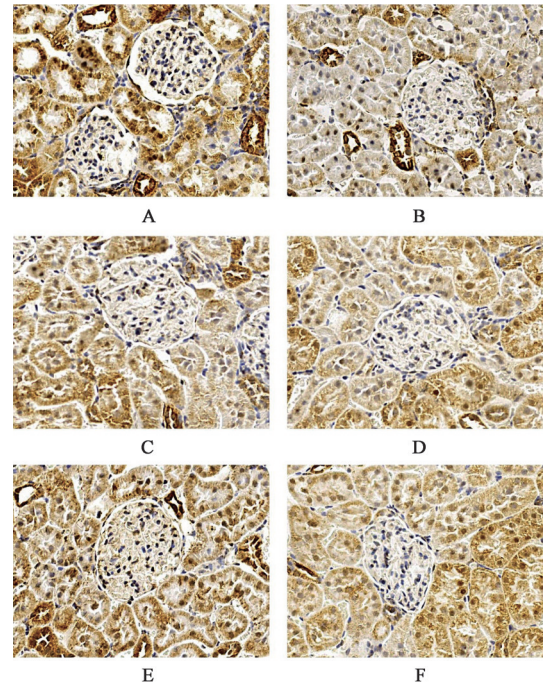


图10 益肾通络方对MN大鼠肾脏中Bcl-XL蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 10 Effect of Yishen Tongluo prescription on expression of Bcl-XL protein in kidney of MN rats (IHC ×400)

化蛋白激酶(MAPK)依赖的转录激活因子-1(AP-1)激活来诱导胞质磷脂酶A2的表达^[13]。TNF- α 还可以通过抑制激活蛋白激酶C α (PKC α)依赖性烟酰胺

腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶/活性氧(ROS)和核转录因子- κ B(NF- κ B)来诱导胞质磷脂酶A2表达^[14]。故TNF可以诱导磷脂酶A2表达。

表5 益肾通络方对MN大鼠肾组织中TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL蛋白定位表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Yishen Tongluo prescription on localization and expression of TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL protein in renal tissue of MN ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNFSF15	Bax	BAD	Bcl-2	Bcl-XL
正常		0.03±0.01	0.12±0.02	0.04±0.01	0.31±0.03	0.21±0.01
模型		0.21±0.01 ¹⁾	0.36±0.02 ¹⁾	0.19±0.02 ¹⁾	0.11±0.02 ¹⁾	0.08±0.02 ¹⁾
益肾通络方	6.61	0.15±0.01 ²⁾	0.19±0.02 ²⁾	0.16±0.02 ²⁾	0.19±0.02 ²⁾	0.13±0.02 ²⁾
	13.22	0.10±0.02 ²⁾	0.18±0.01 ²⁾	0.07±0.02 ²⁾	0.22±0.02 ²⁾	0.14±0.02 ²⁾
	26.44	0.09±0.02 ²⁾	0.11±0.02 ²⁾	0.06±0.01 ²⁾	0.24±0.02 ²⁾	0.19±0.02 ²⁾
贝那普利	0.01	0.10±0.03 ²⁾	0.21±0.03 ²⁾	0.09±0.01 ²⁾	0.21±0.02 ²⁾	0.15±0.03 ²⁾

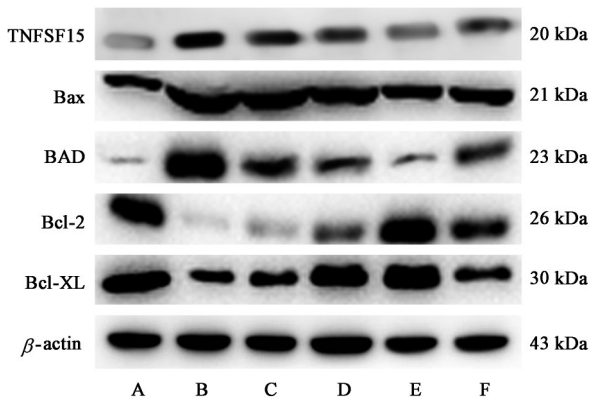


图11 各组大鼠肾组织中TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL蛋白表达电泳

Fig. 11 Electrophoretic expression of TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL protein in renal tissue of rats with each groups

肿瘤坏死因子超家族(TNFSF)成员广泛表达,在免疫反应,炎症,细胞稳态等方面作用重大^[15]。TNFSF大部分为II型跨膜蛋白,有些可分泌具有生物活性的蛋白质^[16]。肿瘤坏死因子受体超家族有两个结构域,一个是配体结合的胞外结构域,另一个是带有信号级联激活的适配蛋白的细胞质尾部结构域。在与相关受体结合后, TNFSF的所有成员均激活NF-κB, JNK, p42/44 MAPK, p38 MAPK和ROS等途径,参与多种生物学过程^[15]。已有研究表

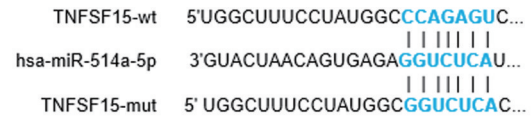


图12 miR-514a-5p调控TNFSF15在足细胞中的表达(miR-514a和TNFSF15的结合位点)

Fig. 12 miR-514a-5p targets regulation of TNFSF15 expression in mouse podocytes(binding site of miR-514a and TNFSF15)

明,在MN中, TNFSF11的过表达增加了肿瘤坏死因子(TNF),诱导了磷脂酶A2的表达,并参与了MN的进展^[5]。此外, TNFSF11还通过涉及SRC激酶和肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF)6的信号复合物激活抗凋亡激酶丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)/蛋白激酶B(PKB),这表明TNFSF11可能在细胞凋亡的调控中发挥作用^[17]。一些研究表明TNF和TNF受体超家族参与足细胞损伤和凋亡的发病机制,但有关TNFSF15的研究未见报道^[18]。

足细胞数量的减少是MN病理机制的关键部分。据报道,在人类中,miRNA可调节超过60%的编码基因,并参与了各种生物学过程,包括细胞增殖,细胞凋亡,发育模式和器官发育^[19]。目前,尚不清楚miR-514a-5p是否调节TNFSF15的表达以及益肾通络方是否可以调控miR-514a-5p/TNFSF15途径。在本研究中,双荧光素酶报告基因测定证实

表6 益肾通络方对MN大鼠肾组织中TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Yishen Tongluo prescription on expression of TNFSF15, Bax, BAD, Bcl-2, Bcl-XL protein in renal tissue of MN rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNFSF15/β-actin	Bax/β-actin	BAD/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bcl-XL/β-actin
正常		0.05±0.01	0.21±0.03	0.02±0.01	1.37±0.17	1.49±0.17
模型		0.92±0.13 ¹⁾	1.22±0.16 ¹⁾	1.42±0.19 ¹⁾	0.02±0.01 ¹⁾	0.32±0.05 ¹⁾
益肾通络方	6.61	0.67±0.08 ²⁾	0.93±0.10 ²⁾	0.56±0.07 ²⁾	0.08±0.02 ²⁾	0.55±0.06 ²⁾
	13.22	0.43±0.05 ²⁾	0.95±0.14 ²⁾	0.31±0.05 ²⁾	0.21±0.03 ²⁾	0.97±0.12 ²⁾
	26.44	0.16±0.03 ²⁾	0.74±0.09 ²⁾	0.14±0.04 ²⁾	0.98±0.13 ²⁾	1.26±0.15 ²⁾
贝那普利	0.01	0.40±0.06 ²⁾	0.86±0.09 ²⁾	0.28±0.05 ²⁾	0.63±0.08 ²⁾	0.47±0.07 ²⁾

表7 双荧光素酶报告实验

Table7 Dual-Luciferase® reports results

组别	miR-NC	miR-514a
TNFSF15wt	1.0	0.48±0.02
TNFSF15mut	1.0	0.96±0.06 ²⁾

注:wt.野生型;mut.变异型;与miR-NC组比较¹⁾P<0.05。

TNFSF15是miR-514a-5p的靶基因。而与正常组相比,MN大鼠肾组织中miR-514a-5p水平下降,TNFSF15的基因和蛋白表达显著上调。而经过益肾通络方干预后,MN大鼠肾组织中miR-514a-5p水平不同程度上调,TNFSF15的基因和蛋白表达显著下调。提示益肾通络方可以通过miR-514a-5p靶向抑制TNFSF15抑制MN进展。

足细胞凋亡是公认的促进MN发生发展的关键部分,其过多凋亡而引起的足细胞数量削减是致使大部分肾病综合征(包含MN)产生的重要过程^[20]。肾小球的滤过屏障由内皮细胞、基底膜及足细胞由里向外按序排列。足细胞裂孔隔膜(SD)作为肾小球滤过膜的重要结构,在阻挠大分子通过、防止蛋白尿出现时发挥至关重要的作用^[21]。Podocin,Nephrin及Synaptopodin作为SD的特异性分子,在稳定其结构及功能方面起关键作用^[22-23]。Podocin是一种跨膜蛋白,呈发夹样嵌入足细胞膜,可支撑足突细胞骨架、加强信号转导、维持滤过膜功能^[24]。Nephrin是发现最早的SD跨膜糖蛋白,结构呈“拉链式”,除防止蛋白质漏出的作用外,还可介导足细胞信号传导^[25]。Synaptopodin是一种主要表达于足突上的细胞骨架蛋白,可促使 α -辅肌动蛋白(α -actinin)的表达,并与之相互作用发挥支撑正常细胞骨架的作用^[26]。Podocalyxin作为足细胞特异性的标志蛋白,位于足细胞足突顶端,因带大量负电荷,不仅可发挥滤过膜电荷屏障的作用,而且可因电荷相斥而避免邻近足突黏附现象的出现^[27]。国内外学者的研究表明,Podocin,Nephrin,Synaptopodin作为SD的重要组成成分,在MN中呈低表达状态,且它们的丢失将致SD通透性增高或足细胞脱落,以致蛋白尿的产生及肾功进行性下降^[28-29]。据报道,在MN中,尿Podocalyxin和Nephrin可作为足细胞功能障碍的早期标记物,反映肾小球滤过膜的完整性^[30]。本研究结果显示,益肾通络方可通过提高足细胞标志蛋白Podocin,Nephrin,Synaptopodin,Podocalyxin的表达,保护足细胞,缓解MN大鼠的肾损伤,减慢MN的发展进程。

研究结果显示,在MN大鼠模型中,足细胞凋亡

现象显著,足细胞数量下降明显,而益肾通络方则有效缓解了这一进程。为更深入探求其减少足细胞凋亡的机制,本实验行进一步探究,发现其抗凋亡作用是通过阻抑BAD,Bax蛋白表达,促使Bcl-2,Bcl-XL蛋白表达来实现的。上述四种蛋白均在足细胞凋亡中发挥重要作用。Bcl-2基因是当前公认的抗细胞凋亡因子,Bax,Bad基因则属于凋亡促进因子,可与Bcl-2形成更加稳固的二聚体,参与细胞凋亡的调控。多项研究指出,MN大鼠模型中,Bcl-2蛋白表达量下降,Bax,BAD蛋白表达量上升,足细胞凋亡显著,而通过对凋亡相关蛋白Bcl-2,Bcl-XL,Bax,BAD表达的调控,可有效减轻肾组织足细胞的凋亡,进而以充分发挥保肾护肾之效^[23,31-32]。

综上所述,益肾通络方抑制MN大鼠足细胞凋亡的作用机制,可能与调控miR-514a-5p/TNFSF15通路有关,为MN的治疗提供新方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] XU X, WANG G B, 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.
- [2] LU H, LUO Y, SU B, et al. Wenyang lishui decoction ameliorates podocyte injury in membranous nephropathy rat and cell models by regulating p53 and Bcl-2 [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, doi: 10. 1155/2020/6813760.
- [3] 雷静,何平. 膜性肾病足细胞损伤机制及治疗进展[J]. 中国医师进修杂志, 2019(6): 567-572.
- [4] 张新鹏,刘建华,吴丽娜. miRNA通过作用于足细胞在肾小球疾病发病机制中的作用的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(24): 3103-3108.
- [5] LI J, LIU B, XUE H, et al. miR-217 is a useful diagnostic biomarker and regulates human podocyte cells apoptosis via targeting TNFSF11 in membranous nephropathy [J]. Biomed Res Int, 2017, doi: 10. 1155/2017/2168767.
- [6] SAITO Y, OKAMURA M, NAKAJIMA S, et al. Suppression of nephrin expression by TNF-alpha via interfering with the cAMP-retinoic acid receptor pathway [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(6): F1436-F1444.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] FLOEGE J, BARBOUR S J, CATTRAN D C, et al. Management and treatment of glomerular diseases(part 1): conclusions from a kidney disease: improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference [J]. *Kidney Int*, 2019, 95(2): 268-280.
- [11] 张欣欣, 高飞, 陈素枝, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 57-66.
- [12] TOMAS N M, HOXHA E, REINICKE A T, et al. Autoantibodies against thrombospondin type 1 domain-containing 7A induce membranous nephropathy [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(7): 2519-2532.
- [13] LEE I T, LIN C C, CHENG S E, et al. TNF-alpha induces cytosolic phospholipase A2 expression in human lung epithelial cells via JNK1/2- and p38 MAPK-dependent AP-1 activation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72783.
- [14] CHI P L, LIU C J, LEE I T, et al. HO-1 induction by CO-RM2 attenuates TNF-alpha-induced cytosolic phospholipase A2 expression via inhibition of PKCalpha-dependent NADPH oxidase/ROS and NF-kappaB [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, doi: 10.1155/2014/279171.
- [15] DOSTERT C, GRUSDAT M, LETELLIER E, et al. The TNF family of ligands and receptors: communication modules in the immune system and beyond[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1): 115-160.
- [16] MARIN I. Tumor necrosis factor superfamily: ancestral functions and remodeling in early vertebrate evolution[J]. *Genome Biol Evol*, 2020, 12(11): 2074-2092.
- [17] SUGATANI T, ALVAREZ U M, HRUSKA K A. Activin A stimulates IkappaB-alpha/NFkappaB and RANK expression for osteoclast differentiation, but not Akt survival pathway in osteoclast precursors [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(1): 59-67.
- [18] SANCHEZ-NINO M D, BENITO-MARTIN A, GONCALVES S, et al. TNF superfamily: a growing saga of kidney injury modulators [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, doi: 10.1155/2010/182958.
- [19] HAMMOUZ R Y, KOLAT D, KALUZINSKA Z, et al. MicroRNAs: their role in metastasis, angiogenesis, and the potential for biomarker utility in bladder carcinomas[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(4): 891.
- [20] MOTAVALLI R, ETEMADI J, KAHROBA H, et al. Immune system-mediated cellular and molecular mechanisms in idiopathic membranous nephropathy pathogenesis and possible therapeutic targets [J]. *Life Sci*, 2019, 238: 116923.
- [21] 刘春燕, 杨胜辉, 朱伟, 等. 金匱肾气汤对糖尿病肾病小鼠足细胞凋亡信号的影响[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(10): 1466-1470.
- [22] SALEEM M A, O'HARE M J, REISER J, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(3): 630-638.
- [23] LIU B, LU R, LI H, et al. Zhen-wu-tang ameliorates membranous nephropathy rats through inhibiting NF-kappaB pathway and NLRP3 inflammasome [J]. *Phytomedicine*, 2019, doi: 10.1016/j.phymed.2019.152913.
- [24] JONNSTONE D B, HOLZMAN L B. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm [J]. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2006, 2(5): 271-282.
- [25] GARG P. A review of podocyte biology [J]. *Am J Nephrol*, 2018, 47(1): 3-13.
- [26] YU SM, NISSAISORAKARN P, HUSAIN I, et al. Proteinuric kidney diseases: a Podocyte's slit diaphragm and cytoskeleton approach [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2018, 5: 221.
- [27] NIELSEN J S, MCNAGNY K M. The role of Podocalyxin in health and disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(8): 1669-1676.
- [28] 何依玲, 胡珏. 白藜芦醇对膜性肾病大鼠的肾保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(6): 707-709.
- [29] AKANKWASA G, JIANHUA L, GUIXUE C, et al. Urine markers of podocyte dysfunction: a review of Podocalyxin and nephrin in selected glomerular diseases[J]. *Biomark Med*, 2018, 12(8): 927-935.
- [30] EMPITU M A, KADARISWANTININGSIH I N, AIZAWA M, et al. MAGI-2 and scaffold proteins in glomerulopathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(5): F1336-F1344.
- [31] 程闰夏, 梁静, 刘刚, 等. 川芎嗪对膜性肾病模型大鼠肾脏的保护作用[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(11): 1730-1737.
- [32] 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.

[责任编辑 周冰冰]