

降脂通络软胶囊调控SIRT1/FoxO3通路对膜性肾病大鼠 细胞凋亡的影响

赵方^{1,2}, 高飞^{1,2}, 李绍慧^{1,2}, 张冠文^{1,2}, 檀森³, 杨凤文², 任美芳², 檀金川^{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:通过观察降脂通络软胶囊对膜性肾病(MN)大鼠肾组织中沉默信息调节因子2相关酶1(SIRT1)/叉头转录因子O3(FoxO3)蛋白表达及足细胞凋亡的影响,探讨其治疗MN的可能分子机制。方法:将60只雄性SD大鼠随机分为6组,每组10只,随机选取1组作为正常组,其余5组分别为模型组、盐酸贝那普利(西药)组(10 mg·kg⁻¹)和降脂通络软胶囊低、中、高剂量(中药低、中、高剂量)组(25、50、100 mg·kg⁻¹),并通过尾静脉注射阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)的方法造模。造模成功后,各组按照相应比例剂量连续4周灌胃给药,并在第4周末留取肾组织,采用电镜、免疫荧光观察肾脏病理学变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾脏SIRT1、FoxO3蛋白的表达情况,免疫组化(IHC)检测B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、死亡启动子重组蛋白(Bad)、足细胞裂孔膜蛋白(Nephrin)、膜蛋白(Podocin)的蛋白表达情况。结果:与正常组比较,模型组大鼠肾组织中促凋亡因子Bax、Bad、FoxO3蛋白表达均明显增加($P<0.05$),抗凋亡因子Bcl-2、SIRT1、Nephrin、Podocin蛋白表达均降低($P<0.05$);与模型组比较,各治疗组肾组织中Bax、Bad、FoxO3蛋白表达明显减少($P<0.05$),Bcl-2、SIRT1、Nephrin、Podocin表达明显升高($P<0.05$)。结论:降脂通络软胶囊对MN的肾保护作用可能与其调控SIRT1/FoxO3通路,减少足细胞凋亡,维护足细胞结构稳定有关。

[关键词] 降脂通络软胶囊; 沉默信息调节因子2相关酶1(SIRT1); 叉头转录因子O3(FoxO3); 膜性肾病; 足细胞凋亡; 姜黄素提取物

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0113-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220739

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220214.1526.001.html>

[网络出版日期] 2022-02-14 15:40

Jiangzhi Tongluo Soft Capsules Regulate SIRT1/FoxO3 Pathway to Affect Cell Apoptosis in Rats with Membranous Nephropathy

ZHAO Fang^{1,2}, GAO Fei^{1,2}, LI Shao-hui^{1,2}, ZHANG Guan-wen^{1,2}, TAN Miao³, YANG Feng-wen², REN Mei-fang², TAN Jin-chuan^{2*}

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

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

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

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Jiangzhi Tongluo soft capsule on the protein levels of silent mating-type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) and forkhead transcription factor FoxO3 and podocyte apoptosis in the renal tissue of rats with membranous nephropathy and to reveal the underlying molecular mechanisms for the treatment of MN. **Method:** Sixty male SD rats were randomly assigned into 6 groups with 10 rats each. The six groups included a normal group, a model group, benazepril hydrochloride

[收稿日期] 2021-07-28

[基金项目] 河北省中医药管理局项目(2017027)

[第一作者] 赵方,在读硕士,从事中西医结合肾病研究,E-mail:923469779@qq.com

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

group, and Jiangzhi Tongluo soft capsule groups of low, medium and high doses (25, 50, 100 mg·kg⁻¹, respectively). The model rats were established by injection with cationized bovine serum albumin into the tail vein. After modeling, the rats were administrated with corresponding agents by gavage for 4 weeks. At the end of the 4th week, an electron microscope was used to observe the pathological changes in the kidney. Western blot was employed to detect the protein levels of SIRT1 and FoxO3 protein in rat kidney, and immunohistochemistry to detect the expression of B lymphocytoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), Bcl-2-associated death promoter (Bad), and podocyte split diaphragm proteins nephrin and podocin. **Result:** Compared with normal group, the expression of pro-apoptotic factors Bax, Bad, and FoxO3 in the kidney was up-regulated ($P < 0.05$), while that of anti-apoptotic factors Bcl-2, SIRT1, nephrin, and podocin was down-regulated ($P < 0.05$) after modeling. Compared with the model group, the treatments down-regulated the expression of Bax, Bad, and FoxO3 ($P < 0.05$) and up-regulated that of Bcl-2, SIRT1, nephrin, and podocin ($P < 0.05$). **Conclusion:** Jiangzhi Tongluo soft capsule may regulate the SIRT1/FoxO3 pathway to reduce podocyte apoptosis and maintain podocyte structure stability, thereby exerting the renal protection effect.

[Keywords] Jiangzhi Tongluo soft capsule; silent mating-type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1); forkhead transcription factor O3(FoxO3); membranous nephropathy; podocyte apoptosis; curcumin extract

膜性肾病(MN)是一种最常见的由免疫复合物介导的非炎性慢性肾小球疾病,临床上多数患者表现为无症状大量蛋白尿或肾病综合征^[1]。病理上,光镜下可见肾小球基底膜(GBM)呈广泛弥漫性增厚,并伴有钉突形成,电镜下可以检测出大量电子致密物沉积,并有足突融合。随着现代医学的快速发展,越来越多的证据表明,足细胞凋亡贯穿了MN的发生、发展的始终,是造成肾小球硬化、最终导致慢性肾衰竭的重要病理因素之一^[2-3]。MN的治疗上,尚无特效药物,西医起始多采用糖皮质激素治疗,或激素联合细胞毒药物,但存在效果个体差异明显,药物昂贵,副作用大的缺点。因此,迫切寻求安全、有效的中药在MN的治疗中至关重要。

关于MN的病因病机,不同医家提出了不同见解。韩东彦等^[4]提出“血瘀”这一证型,认为治疗膜性肾病的关键在于“活血祛瘀”。宋立群教授认为MN患者病机多为脾肾亏虚为本,痰湿瘀血为标,治疗上采用“补脾益肾,活血化瘀”的治则^[5]。降脂通络软胶囊有效成分是姜黄提取物,具有活血化瘀、行气通络、化浊降脂的作用,可以改善血流,降低血液粘稠度,在临床上主要用于治疗冠心病、高脂血症等疾病^[6-7]。相关研究表明,姜黄素在治疗糖尿病肾病、肾纤维化方面有一定疗效,但是尚无关于使用降脂通络软胶囊治疗膜性肾病的先例。故此,本实验通过降脂通络软胶囊对MN大鼠的干预治疗,观察其肾组织中沉默信息调节因子2相关酶1/叉头转录因子O3(SIRT1/FoxO3)蛋白表达及对足细胞凋亡的影响,探讨降脂通络软胶囊对于膜性肾病大

鼠的肾组织保护作用及其机制,为中医药治疗MN的发展提供参考。

1 材料

1.1 动物 于河北医科大学动物实验中心购买8周龄健康状况良好的雄性SD大鼠60只,体质量160~180 g,合格证号SCXK(冀)2018-004,经河北中医学院动物伦理委员会批准,批号DWLL2017106。

1.2 药品与试剂 降脂通络软胶囊(神威药业集团有限公司,批号Z20040032);盐酸贝那普利片(深圳信立泰药业,批号H20043648);弗氏不完全佐剂(FIA,美国Sigma公司,批号SLCB8385);阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA,美国Chondrex公司,批号190203);兔来源SIRT1抗体、FoxO3抗体、膜蛋白(Podocin)抗体、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体、死亡启动子重组蛋白(Bad)抗体、足细胞裂孔膜蛋白(Nephrin)抗体(美国Affinity公司,批号分别为DF6033、AF7624、DF8593、AF6139、AF0120、AF7427、DF7501); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号16AF0207);二抗(美国圣克鲁斯生物公司,批号SC2357);六胺银(PASM)染液、苏木素-伊红(HE)染液(北京Solarbio公司,批号分别为G1790、G1120)。

1.3 仪器 CM1950型切片仪(德国Leica公司);ND-2000型超微分光光度计(美国Thermo公司);BX53型生物倒置显微镜(日本Olympus公司);H-7650型透射超微电镜、7170A型全自动生化仪(日本Hitachi公司);Image Station 2000型成像系统

(美国Kodak公司);Mini-PROTEAN型电泳系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 模型制备、分组及给药 将大鼠适应性喂养1周后,随机分为6组,任意选取1组作为正常组(10只)、其余5组为造模组(50只),制备MN大鼠动物病理模型,在正式造模前,首先进行预免疫,将C-BSA 1 mg加入磷酸盐缓冲液(PBS)0.5 mL稀释,与等体积FIA混匀后于大鼠躯干皮下注射0.1 mL,隔日注射1次,共3次。正式免疫将C-BSA 2.5 mg与PBS 1 mL调配、振荡、超声混合后,使用1 mL注射器于尾静脉进行注射,每周注射3次,每次0.5 mL。注射12次后测量大鼠24 h蛋白尿容量(UTP),当24 h UTP \geq 20 mg即为造模成功。将50只成模大鼠随机均分为5组,分别是模型组、降脂通络软胶囊低、中、高剂量组(中药低、中、高剂量组),盐酸贝那普利组(西药组)。根据前期实验^[8],正常组和模型组使用等体积生理盐水灌胃,西药组及中药低、中、高剂量组分别给予盐酸贝那普利10 mg \cdot kg⁻¹、降脂通络软胶囊25、50、100 mg \cdot kg⁻¹溶液灌胃,每日1次,持续4周。

2.2 HE染色、PASM染色及透射电镜下观察大鼠肾脏组织病理学改变 用4%多聚甲醛将新鲜肾组织固定12 h,经乙醇由低到高浓度脱水,石蜡浸埋、切片。分别使用HE、PASM溶液染色15 min,冲洗、乙醇脱水、树脂胶封后待光镜检测。肾组织在4℃中,2.5%戊二醛固定2 h后,使用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,放置1%锇酸液固定,乙醇、丙酮脱水后包埋、染色、制备切片,待电镜观察。

2.3 免疫荧光检测大鼠肾脏免疫球蛋白(Ig)G沉积 将肾组织冷冻成形后切片,厚度约5 μ m,丙酮固定,PBS冲洗2次后,滴入IgG抗体(1:200),37℃孵育30 min,PBS冲洗2次,甘油磷酸封片备用。

2.4 免疫组化(IHC)检测大鼠肾脏Podocin、Nephrin、Bax、Bcl-2、Bad蛋白表达 将新鲜肾脏组织用石蜡包埋、切片,常规脱水脱蜡,滴入H₂O₂冲洗,EDTA修复抗原后,切片加入BSA封闭,室温放置30 min,加入一抗Nephrin(1:200)、Podocin(1:200)、Bax(1:200)、Bcl-2(1:200)、Bad(1:200),4℃孵育过夜。使用PBS冲洗2~3次,每次10 min后,滴入二抗孵育30 min,PBS冲洗。滴入链霉卵白素孵育,DAB显色,苏木素复染,盐酸乙醇分化后冲洗,脱水,封片,光镜下观察并拍照,染色表现棕褐色的颗粒为阳性。半定量分析测量:每张切片任选5个

高倍视野(\times 400),使用Image Pro plus 6.0软件按步骤测量、保存数据。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织SIRT1、FoxO3蛋白表达 将肾组织加入到含有Cooktail、磷酸酶抑制剂和PMSF中预冷,4℃,RIPA裂解液充分匀浆,12 000 r \cdot min⁻¹离心15 min(离心半径7 cm),取上清液,BCA法检测目标蛋白浓度,通过电泳分离蛋白,一抗SIRT1(1:2 000)、FoxO3(1:2 000)、 β -actin(1:5 000),37℃孵育1 h。滴加二抗(1:1万)恒温孵育,ECL法染色, β -actin作为内参,使用Image J软件按步骤操作,测量各蛋白灰度值。

2.6 统计学分析 采用SPSS 23.0软件对实验结果进行统计、分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

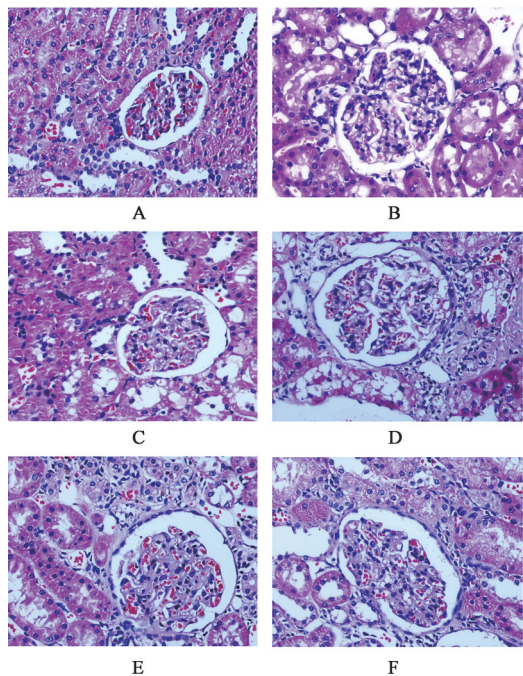
3.1 对MN大鼠肾脏病理学改变的影响 HE染色结果显示,正常组大鼠肾组织基底膜完整,未见系膜细胞增生,细胞外观正常;与正常组比较,模型组大鼠基底膜弥漫性增厚,系膜细胞大量增生,肥大变性;与模型组比较,各治疗组肾小球基底膜较模型组大鼠变薄,但比正常组大鼠略厚,可见少量系膜细胞增生,病理学改变不明显。见图1。

PASM染色结果显示,正常组肾小球体积大小正常,呈卵圆形,细胞结构形态完整;与正常组比较,模型组肾小球扩张,肿胀,基底膜弥漫增厚,部分呈缎带状空泡变性,钉突形成;与模型组比较,各治疗组肾小球体积较模型组明显缩小,肾脏组织破坏相对较轻。见图2。

免疫荧光结果显示,正常组大鼠肾组织免疫荧光弱,未见IgG沉积,与正常组比较,模型组荧光强度高,系膜区可见大量IgG弥漫;与模型组比较,各治疗组大鼠免疫荧光强度相对减弱,随着降脂通络软胶囊干预剂量上升,荧光强度越弱。见图3。

电镜结果显示,正常组大鼠肾小球形态完整;与正常组比较,模型组大鼠肾小球上皮可见电子致密物沉积,部分足突融合、缺失;与模型组比较,各治疗组大鼠肾小球电子致密物沉积减少,基底膜增厚、足突融合情况较模型组相对减轻。见图4。

3.2 对MN大鼠肾组织中Nephrin、Podocin蛋白表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠Nephrin、Podocin蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与模型组相比较,各治疗组大鼠Nephrin、Podocin蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。见图5和图6、表1。



注:A. 正常组;B. 模型组;C-E. 中药低、中、高剂量组;F. 西药组(图2-图10同)

图1 降脂通络软胶囊对MN大鼠肾脏病理学的影响(HE,×400)
Fig. 1 Effect of Jiangzhi Tongluo soft capsule (JZTL) on pathological in kidney of MN rats (HE,×400)

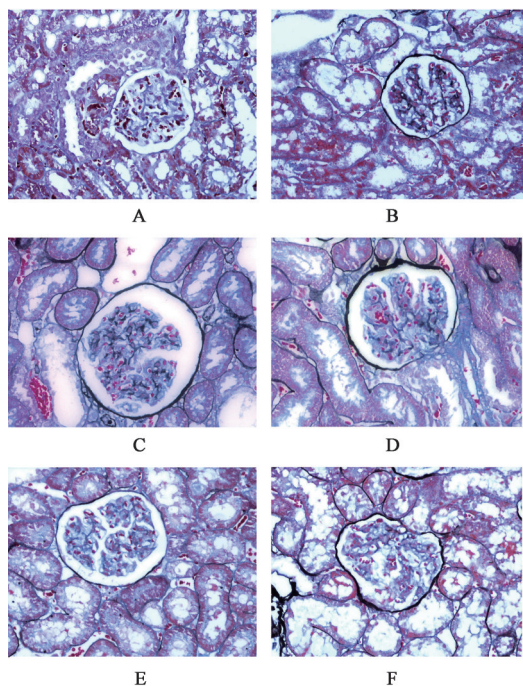


图2 降脂通络软胶囊对MN大鼠病理学的影响(PASM,×400)
Fig. 2 Effect of JZTL on pathological in kidney of MN rats (PASM,×400)

3.3 对MN大鼠肾组织中Bax、Bcl-2、Bad蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中Bax、Bad的表达明显增加($P<0.05$),大量棕褐色颗粒在

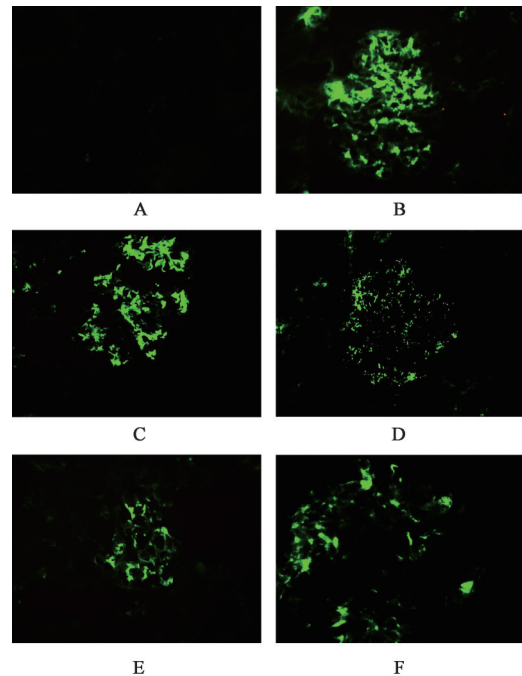


图3 降脂通络软胶囊对MN大鼠肾脏病理学的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of JZTL on pathological in kidney of MN rats (IF,×400)

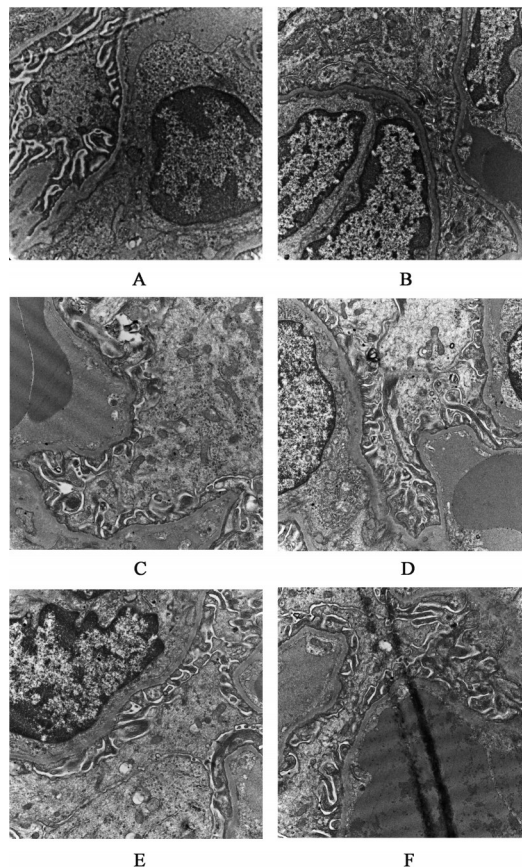


图4 降脂通络软胶囊对MN大鼠病理学的影响(电镜,×2000)
Fig. 4 Effect of JZTL on pathological in kidney of MN rats (TEM,×2000)

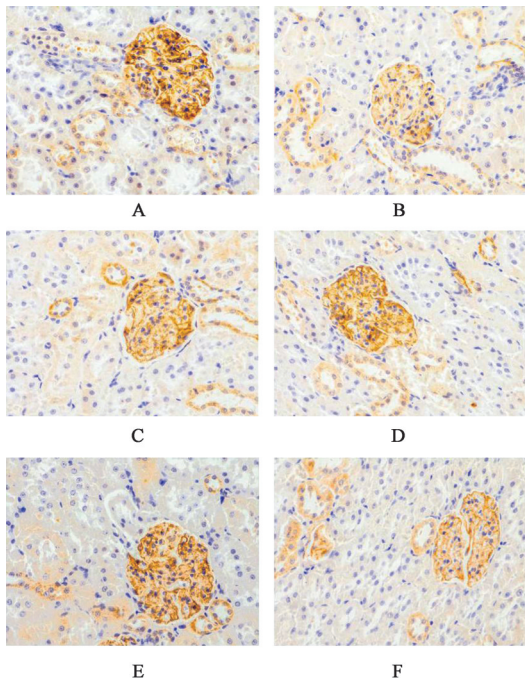


图5 降脂通络软胶囊对MN大鼠肾脏中Nephryn表达水平的影响(IHC, ×400)

Fig. 5 Effect of JZTL on expression of Nephryn in kidney of MN rats (IHC, ×400)

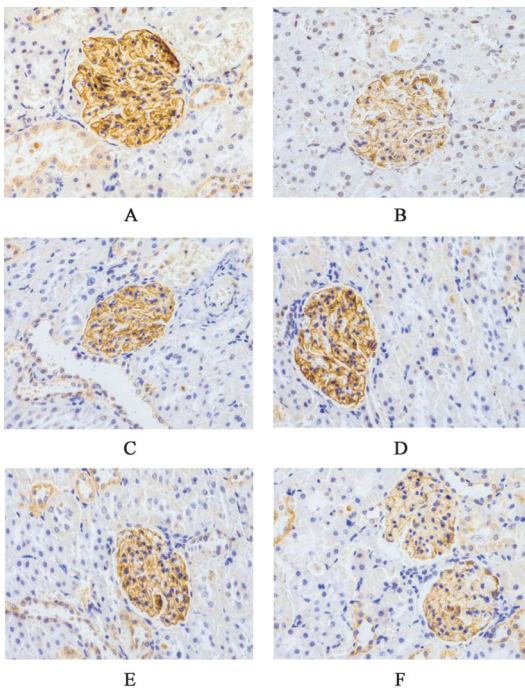


图6 降脂通络软胶囊对MN大鼠肾脏中Podocin表达水平的影响(IHC, ×400)

Fig. 6 Effect of JZTL on expression of Podocin in kidney of MN rats (IHC, ×400)

肾小球区域广泛沉积,染色呈强阳性,模型组Bcl-2的表达降低($P < 0.05$),部分棕褐色染色颗粒沉积于肾小球脏层上皮细胞区域、肾小球系膜区、肾小管

表1 降脂通络软胶囊对MN大鼠肾组织Nephryn, Podocin含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of JZTL on contents of Nephryn and Podocin in kidney tissue of MN rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Nephryn	Podocin
正常组		0.269±0.047	0.252±0.024
模型组		0.104±0.012 ¹⁾	0.089±0.008 ¹⁾
中药低剂量组	25	0.143±0.011 ²⁾	0.164±0.013 ²⁾
中药中剂量组	50	0.149±0.014 ²⁾	0.199±0.017 ²⁾
中药高剂量组	100	0.181±0.023 ²⁾	0.203±0.025 ²⁾
西药组	10	0.131±0.011 ²⁾	0.151±0.012 ²⁾

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

上皮细胞浆内,染色呈弱阳性;与模型组相对比,各治疗组的Bax、Bad的表达相对降低($P < 0.05$),Bcl-2的表达相对升高($P < 0.05$),染色强度较正常组弱,但强于模型组。见图7-图9、表2。

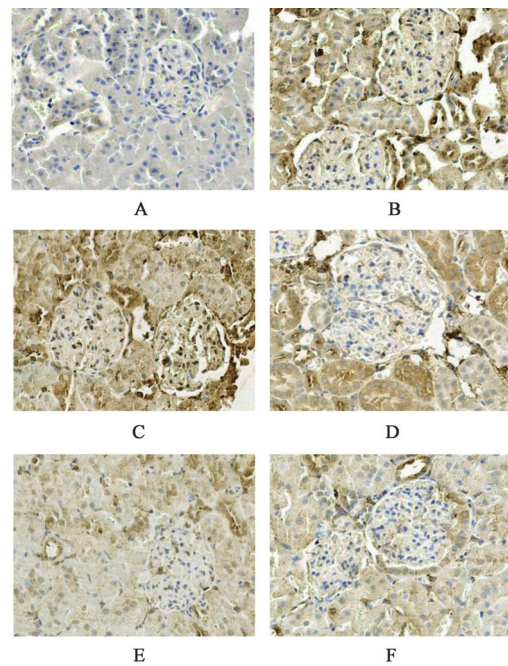


图7 降脂通络软胶囊对MN大鼠肾脏中Bax蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 7 Effect of JZTL on expression of Bax in kidney of MN rats (IHC, ×400)

3.4 对MN大鼠肾组织中SIRT1、FoxO3蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中SIRT1蛋白表达明显降低($P < 0.05$),FoxO3蛋白表达明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,各治疗组大鼠肾组织中SIRT1蛋白表达升高($P < 0.05$),FoxO3蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。见图10、表3。

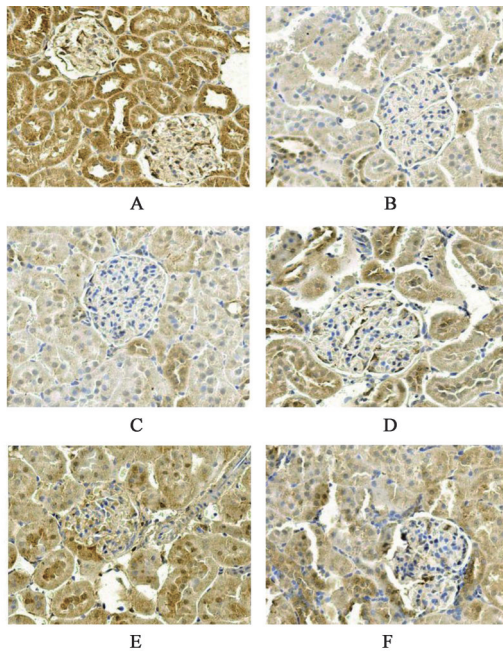


图8 JZTL对MN大鼠肾脏中Bcl-2蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 8 Effect of JZTL on expression of Bcl-2 in kidney of MN rats (IHC, ×400)

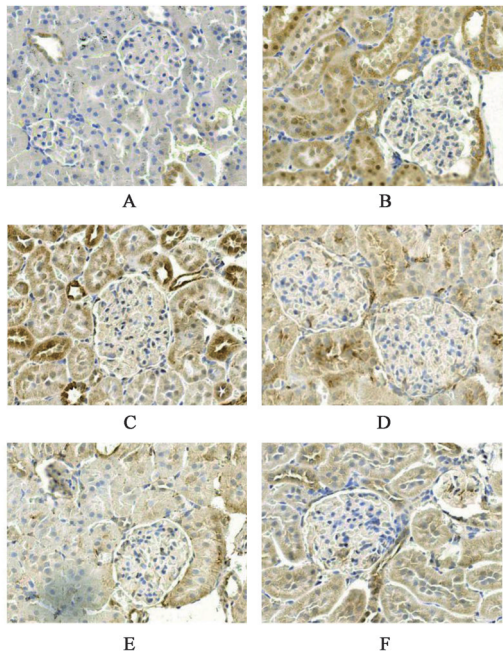


图9 降脂通络软胶囊对MN大鼠肾脏中Bad蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 9 Effect of JZTL on expression of Bad in kidney of MN rats (IHC, ×400)

4 讨论

MN是我国肾病综合征患者肾穿刺活检中最常见的病理类型,多由自身免疫因素引起。电镜下可以观察大量免疫复合物沉积在肾脏,引起肾小球基底膜病理性改变,足突广泛消融,导致肾小球通透

表2 降脂通络软胶囊对MN大鼠肾组织Bax、Bcl-2、Bad含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of JZTL on contents of Bax, Bcl-2, Bad in kidney tissue of MN rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	Bax	Bcl-2	Bad
正常组		0.036±0.008	0.274±0.033	0.031±0.004
模型组		0.164±0.025 ¹⁾	0.083±0.012 ¹⁾	0.147±0.023 ¹⁾
中药低剂量组	25	0.157±0.026 ²⁾	0.092±0.014 ²⁾	0.139±0.019 ²⁾
中药中剂量组	50	0.136±0.023 ²⁾	0.140±0.021 ²⁾	0.113±0.015 ²⁾
中药高剂量组	100	0.089±0.011 ²⁾	0.243±0.033 ²⁾	0.082±0.011 ²⁾
西药组	10	0.083±0.012 ²⁾	0.137±0.026 ²⁾	0.104±0.016 ²⁾

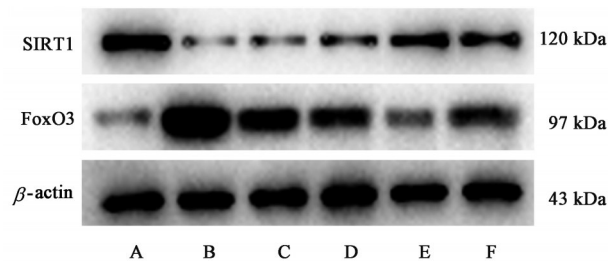


图10 肾组织中SIRT1、FoxO3蛋白表达电泳

Fig. 10 Electrophoresis of SIRT1 and FoxO3 in kidney tissue

表3 降脂通络软胶囊对MN大鼠肾组织SIRT1、FoxO3蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of JZTL on protein expression of SIRT1 and FoxO3 in kidney tissue of MN rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SIRT1/ β -actin	FoxO3/ β -actin
正常组		1.247±0.002	0.299±0.004
模型组		0.283±0.007 ¹⁾	1.479±0.004 ¹⁾
中药低剂量组	25	0.319±0.006 ²⁾	0.913±0.002 ²⁾
中药中剂量组	50	0.426±0.005 ²⁾	0.671±0.003 ²⁾
中药高剂量组	100	1.063±0.009 ²⁾	0.436±0.008 ²⁾
西药组	10	0.898±0.009 ²⁾	0.804±0.002 ²⁾

性增加,使大量的蛋白从肾小球滤出,从而形成蛋白尿^[9-11]。近年来,越来越多学者提出MN患者的临床症状、病理改变与足细胞凋亡程度密切相关^[12-13]。MN进展缓慢或可自行缓解,但40%的患者进展为终末期肾病。治疗上,西医多采用烷化剂联合皮质类固醇,或与基于钙调神经蛋白抑制剂方案进行免疫调节^[14],无论是哪种治疗方案,均存在全身毒副作用大、药物昂贵、停药易复发等缺点,因此亟需研发新药物、探索新机制、完善新的治疗方案。

内皮细胞、基底膜及足细胞3层结构共同组成的具有半透膜性质的肾小球滤过屏障,足细胞裂孔膜(SD)对于保持滤过膜结构完整、减少血浆蛋白流

失具有重要作用^[15]。足细胞相关蛋白 Nephrin、Podocin 是 SD 的关键组成成分,当 Nephrin 与其他膜蛋白相互作用,与相邻足突间形成 SD,防止大分子量蛋白漏出^[16]。在 MN 患者中 Nephrin、Podocin 蛋白表达显著降低,足细胞结构被破坏,足细胞裂孔膜间隙增加,蛋白尿产生^[15]。而在阿奇霉素肾病大鼠中,使用禾肾丸上调 Nephrin 蛋白表达,可抑制足细胞损伤,减轻肾脏组织病变,减少蛋白尿^[17]。Podocin 作为足细胞裂孔膜蛋白具有特异性,以“发夹式”插入足细胞膜,并与 Nephrin 和 CD2 相关蛋白相连,保持 SD 稳定,当其表达降低时,滤过膜通透性增加,大量蛋白漏出^[18-19]。细胞凋亡是机体维护内外环境稳定而发生的主动死亡的过程,由多种因子或蛋白参与,其中促凋亡因子 Bax、Bad 和抗凋亡因子 Bcl-2 的变化对凋亡的发生具有重要作用,病理情况下, Bax、Bad 表达增加, Bcl-2 表达受抑制, Bcl-2/Bax 降低,凋亡通路激活引起细胞凋亡^[20]。本团队在前期实验中已证实,在膜性肾病大鼠中,通过抑制 Hes1、Bax 蛋白表达,提高 Bcl-2 蛋白表达,可以有效缓解足细胞凋亡程度,恢复肾小球滤过率,减少尿蛋白排泄^[21]。丹酚酸 B 可以降低系膜增生性肾炎大鼠中 Bax/Bcl-2 的表达,有效缓解大鼠的肾小球细胞的凋亡程度,从而保护肾组织^[22]。SIRT1 是一种去乙酰化酶,多在肾小球足细胞和髓间质细胞,通过去乙酰化影响转录因子活性,调节多种蛋白转录,具有抗炎、抗肿瘤、抗凋亡的作用^[23-25]。有研究证实,在 MI 大鼠中 SIRT1 与 Bcl-2 蛋白表达呈正相关,与 FoxO3a、Bax 蛋白表达呈负相关^[26]。当 SIRT1 表达被抑制时,细胞凋亡增加,反之则凋亡作用被拮抗。FoxO3 是作用最为广泛的叉头蛋白转录因子,其转录活性受 SIRT1 乙酰化/去乙酰化调节,参与细胞修复、代谢,凋亡过程^[27]。FoxO3a 受 SIRT1 的调节,而 FoxO3a 具有促进细胞凋亡的作用^[28]。通过 H₂O₂ 处理的细胞中, FoxO3a 被 SIRT1 去乙酰化从而活性被拮抗,细胞凋亡程度得到抑制^[29]。

檀金川教授根据 MN 的发病特点以及病理特征,提出“脾肾两虚,瘀血阻络”的观点,并遵循“补肾健脾,逐瘀通络”治则,在膜性肾病临床治疗上取得显著疗效。中医药学研究中,姜黄具有活血化瘀,通络止痛的功效,姜黄素是从中发现的最具有药理活性的多酚类提取物,具有抗炎,抗氧化的功效,降低超敏 C 反应蛋白(hs-CRP),改变微炎症状态的作用^[30]。降脂通络软胶囊中含有大量姜黄提

取物。本实验前期研究中发现,降脂通络软胶囊通过调控 Bcl-2/Bad 基因表达水平,可以抑制足细胞凋亡,改善 MN 大鼠生化指标的功效率^[31]。而在其他实验中也证实,姜黄素通过降低脓毒症小鼠海马组织中炎症因子及 Ac-FoxO1 的表达,增加 SIRT1 的表达,抑制神经细胞凋亡,而注射 SIRT1 拮抗剂后,氧化应激加剧,细胞凋亡增加^[32]。魏毅君等^[33]在一项缺血再灌注小鼠脑组织实验中,证明了姜黄素可以激活 SIRT1/FoxO1 通路,提高 SIRT1 的表达,从而抑制凋亡,而注射 SIRT1 抑制剂 EX527 后, SIRT1 表达降低, Bax 和胱天蛋白酶-3(Caspase-3)的表达量明显上升,而抑凋亡因子 Bcl-2 蛋白表达降低,姜黄素保护作用失效。

本实验结果发现,降脂通络软胶囊可以改善膜肾大鼠肾小球病理形态,有保护肾功能的作用。与正常组对比,模型组中促凋亡因子 Bax、Bad、FoxO3 表达增加,抗凋亡因子 Bcl-2、SIRT1 表达降低,细胞凋亡通路激活, Nephrin、Podocin 蛋白表达下降,足细胞骨架及足突结构稳定性被破坏。与模型组对比,治疗组中, Bcl-2、SIRT1、Nephrin、Podocin 表达上升, Bax、Bad、FoxO3 表达明显下降,膜性肾病大鼠病理组织改善,减轻基底膜增厚程度、缓解足突融合,减少肾功能损害,表明足细胞凋亡被抑制。

综上所述,降脂通络软胶囊对于特发性 MN 大鼠肾组织有保护作用,这可能与激活 SIRT1/FoxO3 通路有关。通过上调肾组织中 SIRT1 表达,下调 FoxO3 表达,从而诱导 Bcl-2/Bax 上升,抑制足细胞凋亡,维护足细胞形态稳定,使 MN 大鼠肾脏病理组织得以缓解、修复,延缓了疾病的发展,为降脂通络软胶囊在临床治疗 MN 提供了有利的理论依据,但其具体作用机制还不十分明确,需更深层次的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LI Y Q, LIU Z Z, LIN K X, et al. Relationship between the status of phospholipase A2 receptor and prognosis of idiopathic membranous nephropathy [J]. *Nephrology*, 2020, 25(2): 144-149.
- [2] JIN J, ZHAN H, LIN B, et al. Association of podocyte autophagosome numbers with idiopathic membranous nephropathy and secondary membranous nephropathy [J]. *Int Urol Nephrol*, 2017, 49(6): 1025-1031.
- [3] JALALAH S M. Podocytes Intracytoplasmic dense inclusions: Are they associated with subepithelial dense deposits? An ultrastructural study [J]. *J*

- Microsc Ultrastruct, 2020, 8(3): 121-125.
- [4] 韩东彦, 刘宇, 占永立, 等. 特发性膜性肾病中医证候特点及其在预后判断中的作用[J]. 北京中医药, 2010, 29(4): 246-249.
- [5] 陈洪琳, 宋立群. 宋立群治疗膜性肾病用药分析[J]. 中医学报, 2021, 36(4): 787-792.
- [6] 张霞, 李海兵, 曹菊林, 等. 降脂通络软胶囊临床应用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(24): 66-68.
- [7] 孙永, 彭明利. 姜黄素及其衍生物在肝脏相关疾病中防治作用的研究进展[J]. 药学学报, 2014, 49(11): 1483-1490.
- [8] 郝文霞, 高飞, 赵方, 等. 降脂通络软胶囊调控 AMPK/mTOR 信号通路对膜性肾病大鼠自噬的影响[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 148-153.
- [9] LIU W, GAO C, LIU Z, et al. Idiopathic membranous nephropathy: Glomerular pathological pattern caused by extrarenal immunity activity [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1846.
- [10] 陈宏, 远方. 基于真实世界回顾性分析特发性膜性肾病中西医结合临床研究[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(12): 162-165.
- [11] 杨妮, 吴洁琼, 相祎, 等. 中西医结合治疗膜性肾病的疗效及机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(22): 4361-4364, 4302.
- [12] LI J, CHEN Y, SHEN L, et al. Improvement of membranous nephropathy by inhibition of miR-193a to affect podocytosis via targeting WT1 [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 3438-3446.
- [13] JIN L W, PAN M, YE H Y, et al. Down-regulation of lncRNA XIST ameliorates podocytes apoptosis in membranous nephropathy via miR-217/TLR4 pathway [J]. Exp Physiol, 2019, 104: 220-230.
- [14] ALSHARHAN L, BECK L J. Membranous nephropathy: core curriculum 2021 [J]. Am J Kidney Dis, 2021, 77(3): 440-453.
- [15] 刘海泉, 范亚平, 达展云, 等. 膜性肾病肾活检组织中 Nephrlin 和 Podocin 表达改变及其意义[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2009, 18(4): 318-321, 328.
- [16] 冯喆, 雷根平, 王婷, 等. 芪地固肾片对膜性肾病大鼠的肾保护作用[J]. 中成药, 2021, 43(11): 3166-3171.
- [17] 杨芳, 何泽云. 禾肾丸对阿霉素肾病大鼠蛋白尿及肾组织 Nephrlin 蛋白表达影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9): 158-163.
- [18] 王瑞石, 刘志红. 膜性肾病的发病机制[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2006, 15(2): 161-166.
- [19] 达展云, 范亚平, 沈良兰, 等. Nephrlin 和 Podocin 在 3 种膜性肾病表达中的差异及其意义[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 15: 2381-2385.
- [20] 吴胜斌, 王应灯. 人参皂甙 Rg3 对糖尿病肾病大鼠肾组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达及肾细胞凋亡的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2020, 34(1): 5-8.
- [21] 高飞, 王泽泽, 杨冰, 等. 加味升降散对膜性肾病大鼠 Notch 信号通路及足细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 30-36.
- [22] 庞欣, 张建伟, 韩佳瑞, 等. 丹酚酸 B 调节 Bax/Bcl-2 的表达对系膜增生性肾炎大鼠肾脏保护作用及机制[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(8): 1221-1226.
- [23] 范燕琴, 丁国华. Sirtuins 在肾脏疾病中的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(6): 168-172.
- [24] 赵芳, 李碧侠, 任守文, 等. 去乙酰化酶 SIRT1 及其对细胞凋亡调控的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 13(2): 101-105.
- [25] 李知, 侯庆, 陈朝红, 等. 组蛋白去乙酰化酶与足细胞损伤[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2019, 28(2): 156-160.
- [26] 林琴琴, 王湘怡, 耿元文, 等. 间歇运动调控 miR-155/SIRT1/FoxO3a 通路抑制脑梗大鼠肾脏细胞凋亡[J]. 天津体育学院学报, 2021, 36(3): 360-365.
- [27] 王锁刚, 王光策. 肾缺血再灌注损伤与线粒体自噬 SIRT1-FoxO3-PINK1-Parkin 调节轴的研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(35): 31-35.
- [28] 刘璇, 何继瑞. SIRT1 功能的研究进展[J]. 西北国防医学杂志, 2018, 39(1): 64-67.
- [29] ALZAID F, PATEL V B, PREEDY V R. Cardiovascular disease in aging and the role of oxidative stress [J]. Aging, 2014: 23-38.
- [30] KAR F, HACIOGLU C, SENTURK H, et al. Curcumin and LOXblock-1 ameliorate ischemia-reperfusion induced inflammation and acute kidney injury by suppressing the semaphorin-plexin pathway [J]. Life Sci, 2020, doi: 10. 1016/j. lfs. 2020. 118016.
- [31] 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, 18: 3263-3268.
- [32] 曹佳, 杨华英, 何艺, 等. 姜黄素通过激活 SIRT1 调节脓毒症小鼠模型的认知功能障碍研究[J]. 陕西中医, 2020, 3: 301-307.
- [33] 魏毅君, 翟蒙恩, 王晓武, 等. 姜黄素后处理通过 SIRT1/FoxO1 信号通路拮抗小鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(17): 3216-3219.

[责任编辑 孙丛丛]