

抗纤灵方通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路 干预肾纤维化机制研究

钟利平, 麻志恒, 余柯娜, 何立群*

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200000)

[摘要] **目的:**研究抗纤灵方对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响及抗肾纤维化作用机制。**方法:**将 60 只 C57 小鼠, 随机分为假手术组 10 只和手术组 50 只, 手术组行 5/6 肾切除术。术后 2 周, 手术组随机分为模型组、抗纤灵低、中、高剂量组及雷帕霉素阳性药组, 各组 10 只。假手术组给予 0.5 mL 生理盐水 *ig*, 抗纤灵方低、中、高剂量组分别给予 0.5 mL 抗纤灵药物 *ig* (0.1, 0.2, 0.4 mg·kg⁻¹), 阳性药组给予 0.5 mL 雷帕霉素 *ig* (0.016 μg·kg⁻¹), *ig* 12 周后处死小鼠, 在处死小鼠前 1 d 收集 24 h 尿液检测 24 h 蛋白定量, 眼眶采血测血肌酐、尿素氮, 取残肾采用 HE 观察肾脏组织形态改变, PCR 法检测肾组织中 PI3K/AKT/mTOR mRNA 表达。**结果:**与假手术组比较, 模型组 24 h 尿蛋白定量, 血肌酐, 尿素氮, PI3K/AKT/mTOR mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$), 肾脏病理形态改变明显; 与模型组比较, 各治疗组 24 h 尿蛋白定量, 血肌酐, 尿素氮, PI3K/AKT/mTOR mRNA 表达均下降 ($P < 0.05$), 肾脏组织学形态改善。**结论:**抗纤灵方能降低小鼠 24 h 尿蛋白定量, 改善肾功能, 延缓肾纤维化发生; 其机制可能与抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路表达相关。

[关键词] 抗纤灵方; 5/6 肾切除; PI3K/AKT/mTOR 信号通路; 肾纤维化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0126-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180126

Mechanism of Kangxianling Docotion in Intervening Renal Fibrosis Through PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway ZHONG Li-ping, MA Zhi-heng, YU Ke-na, HE Li-qun* (Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Kangxianling docotion on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and its mechanism against renal fibrosis. **Method:** Totally 60 C57 mice were randomly divided into sham group ($n = 10$) and operation group ($n = 50$), the surgical group received 5/6 nephrectomy. After two weeks, the surgery group were randomly divided into model group, Kangxianling low, medium and high dose groups and rapamycin positive control group, with 10 in each group. The sham group received 0.5 mL of normal saline, *ig*, Kangxianling docotion low, medium and high dose groups were given 0.5 mL Kangxianling drug orally (0.1, 0.2, 0.4 mg·kg⁻¹), rapamycin group was given 0.5 mL rapamycin gavage (0.016 μg·kg⁻¹). Mice were sacrificed after 12 weeks of gavage. The 24 h urine protein before the mice were sacrificed to detect 24 h protein quantification, the orbital blood was collected to test serum creatinine, blood urea nitrogen; the remnant kidney was collected to observe renal morphology by HE change; PCR was used to detect PI3K/AKT/mTOR mRNA expressions in kidney tissues. **Result:** Compared with sham operation group, model group showed significantly higher 24-hour urinary protein excretion, serum creatinine, blood urea nitrogen, PI3K/AKT/mTOR mRNA expressions ($P < 0.01$), with significantly renal pathological changes. Compared with the model group, all treatment groups showed lower 24-hour urinary protein excretion, serum creatinine, blood urea nitrogen, PI3K/AKT/mTOR mRNA expressions ($P < 0.05$), with improvements in renal histology. **Conclusion:** Kangxianling can decrease 24 h urinary protein quantification in mice, improve renal function and delay the occurrence of renal

[收稿日期] 20141026(003)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373615);上海市高校创新团队建设项目(11DZ1973100)

[第一作者] 钟利平, 博士, 主治医师, 从事中西医防治肾脏病的临床及实验研究, Tel:15316621790, E-mail:15316621790@163.com

[通讯作者] *何立群, 博士, 博士生导师, 主任医师, 从事肾脏病的基础及临床研究, Tel:021-5381650-7100, E-mail:heliqun59@163.com

fibrosis; its mechanism may be related to the inhibition of the expression pathway PI3K/AKT/mTOR signal.

[Key words] Kangxianling decoction; 5/6 nephrectomy; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; renal fibrosis

肾纤维化是过量细胞外基质在肾间质积聚、肾脏组织结构破坏及功能丧失为特征,是多种慢性肾脏疾病最终导致肾功能衰竭的主要病理改变和共同通路,主要包括肾小管、间质纤维化和肾小球硬化。肾纤维化发生是多种因素相互作用结果,涉及到细胞因子、信号通路、炎症、上皮细胞向成纤维细胞转化等。目前对于研究肾纤维化相关信号转导通路较多有 TGF- β /Smad 通路,Wnt 信号通路,ERK 信号通路,Rho-ROCK 通路等。抗纤灵方根据慢性肾脏病“久病多瘀,久病入络”的思想组方而成^[1],该方由丹参、桃仁、当归、牛膝、大黄组成。具有活血化痰作用,方中丹参性微寒,益气补血活血;桃仁性平,祛瘀活血;当归性温,补血活血;牛膝性平,补肾活血;制大黄性寒,清热泻浊活血,纵观全方以活血为主。抗纤灵方前期做过大量临床及实验研究,如抗纤灵冲剂对慢性肾衰竭 60 例疗效观察^[2],抗纤方对单侧输尿管梗阻大鼠 TGF- β_1 /Smad 通路的影响^[3],从血管活性因子角度研究抗纤灵方改善肾功能抑制肾纤维化的作用机制^[4]等。研究显示 PI3K/AKT/mTOR 信号通路也是一条介导纤维信号通路^[5]。最近的数据已经表明,mTOR 信号通路参与肾脏疾病发病机制如急性肾损伤、糖尿病性肾病和多囊肾疾病^[6]。在糖尿病肾病 mTOR 通路激活是与间质纤维化,肾小管萎缩和肾小球滤过率逐渐下降密切相关,阻断 mTOR 信号通路将会延缓糖尿病肾病进展^[7]。因此对该信号通路干预将为治疗肾脏病找到一个新的治疗靶点。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 C57 小鼠 60 只,体重(18±2)g,由上海中医药大学动物房提供,合格证号 SCXK(沪)2008-0016。实验小鼠分笼饲养,自由饮水,进食标准普通饲料。

1.2 药物及试剂 抗纤灵方(丹参 15 g,桃仁 12 g,当归 12 g,牛膝 15 g,制大黄 9 g)由上海曙光医院中药房提供。雷帕霉素(上海市威奥公司,批号 R706203)。肌酐试剂盒(苦味酸法,批号 c011),尿素氮试剂盒(批号 c013-2),尿蛋白定量试剂盒(批号 c035-2),以上试剂盒均由南京建成生物公司提供,Trizol Reagent 总 RNA 抽提试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026),逆转录试剂盒

(日本 TaKaRa 公司,批号 RR037A),实时荧光定量试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号 RR420A),RT-qPCR 引物由上海生物工程技术服务公司合成,序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequences of RT-qPCR

名称	引物序列	产物长度 /bp
GAPDH	上游:5'-GCCTTCCGTGTTCTACC-3'	183
	下游:5'-AGACTGGGAGTTGCTGTTG-3'	
PI3K	上游:5'-AGAAGATGATGAGGATTGCCC-3'	175
	下游:5'-CTTGACTTCGCCGTCTACCAC-3'	
AKT	上游:5'-CTGAGCATCATCCCTGGGTT-3'	172
	下游:5'-GCCGTTCTTGATGCCAATA-3'	
mTOR	上游:5'-ACCTTCTTCTCCAGCAAGTTCA-3'	239
	下游:5'-CGATCATCTCGATTTCATACCCT-3'	

1.3 仪器 CFB-3120 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),5804R 型冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司),keyWrice-DTM C3i multifunction 型高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司),Biophotometerplus 型紫外分光光度计(德国 Eppendorf 公司),STAT FAX 2100 型全自动酶标仪(美国 Awareness Technology Inc 公司),Fv10i 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物造模及给药方法 适应性喂养 1 周后,按 1:5 比例随机分为假手术组(10 只)和手术组(50 只),按照 5/6 肾切除方法制备慢性肾衰模型。以 2% 戊巴比妥钠 0.07 mL 进行小鼠腹腔注射,小鼠麻醉后取右侧卧位充分暴露左肾区,沿左肋脊下缘 1 cm 处消毒做斜向为切口,在腹膜后取出左肾,剥离周围脂肪及肾包膜,再做弧形切口主要切除肾皮质大约 0.05 g,明胶海绵止血,缝合肌层及皮肤。10 d 后再进行右肾全切除。假手术组只进行左右肾包膜剥离保留肾脏及肾上腺,术后 2 周眼眶采血测血肌酐,观察模型是否成功。确认模型成功后假手术组,手术组随机分为手术模型组、抗纤灵方低、中、高剂量组,雷帕霉素组,每组 10 只。术后 2 周末按照下述标准计算药物用量后 ig 治疗:A 组 ig 0.5 mL 生

理盐水,模型组、抗纤灵方低、中剂量组分别灌服抗纤灵 0.5 mL,剂量依次为 0.1,0.2,0.4 mg·kg⁻¹,阳性药组 ig 雷帕霉素 0.5 mL,剂量为 0.016 mg·kg⁻¹,每日 ig 1 次,共 ig 12 周。

2.2 肾组织标本采集及制备 12 周后处死小鼠,取残余肾组织分为 2 份,1 份用 10% 中性福尔马林固定,经脱水、组织用石蜡包埋,切成 2 μm 厚石蜡切片做 HE 染色,另 1 份肾组织于液氮中速冻后 -80 °C 冰箱保存,以备 PCR。

2.3 PCR 检测肾组织中 PI3K/AKT/mTOR mRNA 表达量 总 RNA 抽提:从液氮中取出肾组织,采用 Trizol 一步法提取 RNA;RT(逆转录)反应:取 Total RNA 1~4 μg 加入到 0.2 mL PCR 管中。加入 Oligo dT 1 μL 用 DEPC-water 补充体积至 12 μL。混匀后 70 °C 5 min 后冰浴 3~5 min。在 0.2 mL PCR 管中依次加入:5×Reaction buffer 4 μL,Inhibitor 1 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTP mix 2 μL,Transcriptase 1 μL,最终体积为 20 μL。混匀后 42 °C 60 min,70 °C 10 min。在 PCR 体系中依次加入:RT 产物(或梯度稀释对照品) 1 μL, SybGreen mix 10 μL, Primer 1 (10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL, Primer 2 (10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL, ddH₂O 8.2 μL。用封口膜(荧光定量专用)覆盖 96 孔 PCR 板,瞬时离心后放入荧光定量 PCR 仪内,设定反应条件:94 °C 1 min 预变性后,94 °C 15 s→60 °C 34 s→72 °C 15 s(荧光检测),40 个循环,72 °C 10 min。由溶解曲线判断 PCR 反应的特异性。每个组别做 3 次定量检测,记录 C_t 值。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠 24 h 尿蛋白定量、血清尿素氮、肌酐水平的影响 与假手术组比较,模型组小鼠 24 h 尿蛋白定量、血清尿素氮、肌酐水平均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组小鼠 24 h 尿蛋白定量、血清尿素氮、肌酐水平均下降 ($P < 0.05$)。见表 2。

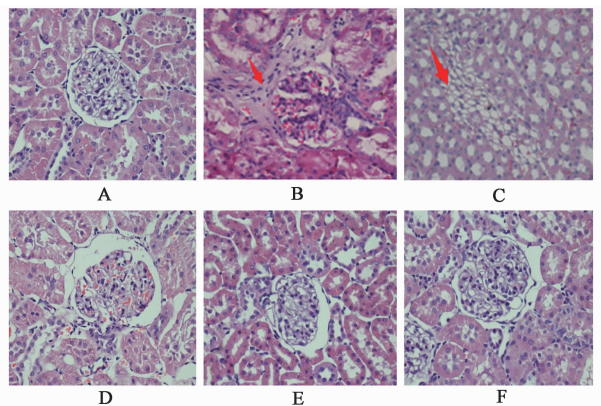
3.2 对小鼠肾脏组织病理学的影响 假手术组肾小球无病变或轻微病变,肾小囊无扩张,系膜细胞及基质无增生,肾小管无萎缩,肾间质无纤维化,无炎性细胞浸润。模型组及抗纤灵低剂量组可见肾小球局灶节段性硬化,肾小囊扩张,球囊黏连,系膜细胞及基质中至重度增生,肾小管萎缩,肾间质可见大量炎性细胞浸润,细胞性纤维化。抗纤灵中、高剂量组

表 2 抗纤灵方对小鼠 24 h 尿蛋白、尿素氮、肌酐影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effects of Kangxianling decoction on 24 h urine protein, blood urea nitrogen, creatinine in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	尿素氮 /mmol·L ⁻¹	肌酐 /μmol·L ⁻¹	24 h 尿蛋白 /mg·L ⁻¹
假手术	-	4.72 ± 0.19	66.77 ± 11.25	13.93 ± 1.70
模型	-	22.25 ± 1.21 ¹⁾	685.28 ± 37.42 ¹⁾	71.32 ± 4.32 ¹⁾
抗纤灵	0.1	18.21 ± 1.32 ²⁾	632.42 ± 14.32 ²⁾	32.47 ± 2.72 ²⁾
	0.2	13.12 ± 1.28 ²⁾	409.42 ± 11.85 ²⁾	26.07 ± 1.90 ²⁾
	0.4	10.10 ± 1.58 ²⁾	350.24 ± 10.78 ²⁾	28.86 ± 2.19 ²⁾
雷帕霉素	0.016	9.11 ± 1.35 ²⁾	240.25 ± 17.60 ²⁾	20.02 ± 1.58 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

可见肾小球轻度变形,肾小囊无扩张,系膜细胞及基质轻度增生,少量肾小管萎缩,肾间质可见炎性细胞浸润。雷帕霉素组肾小球系膜细胞及基质轻度增生,肾间质可见少量炎性细胞浸润。见图 1。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 抗纤灵 0.1 mg·kg⁻¹组;D. 抗纤灵 0.2 mg·kg⁻¹组;E. 抗纤灵 0.4 mg·kg⁻¹组;F. 雷帕霉素组

图 1 抗纤灵方对小鼠肾脏组织病理学的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effects of Kangxianling decoction on pathology of renal tissue in mouse (HE, ×200)

3.3 对小鼠 12 周末肾组织中 PI3K/AKT/mTOR mRNA 表达水平的影响 与假手术组比较,模型组小鼠表达水平显著增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,抗纤灵低、中、高各剂量组和对照组的表达均降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

4 讨论

肾纤维化是慢性肾脏病进展至终末期肾病的表现,肾纤维化不仅是肾脏损伤标志,也可以用来预测肾功能丧失和肾脏损害进展程度,主要包括肾小球硬化和间质小管纤维化^[8]。PI3K/AKT/mTOR 信号通路参与基因表达,细胞生长、增殖和分化,研究表明该信号通路与肾脏纤维化、肾囊肿、糖尿病肾病等

表 3 抗纤灵方对小鼠肾组织 PI3K, AKT, mTOR mRNA 表达水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Kangxianling decoction on renal tissue PI3K, AKT, mTOR mRNA in mouse ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	PI3K /2 ^{-ΔΔC_t}	AKT /2 ^{-ΔΔC_t}	mTOR /2 ^{-ΔΔC_t}
假手术	-	1.00 ± 0.12	1.12 ± 0.11	1.15 ± 0.25
模型	-	1.61 ± 0.11 ¹⁾	1.59 ± 0.21 ¹⁾	1.78 ± 0.15 ¹⁾
抗纤灵	0.1	1.42 ± 0.21 ²⁾	1.41 ± 0.13 ²⁾	1.62 ± 0.13 ²⁾
	0.2	1.23 ± 0.32 ²⁾	1.24 ± 0.11 ²⁾	1.42 ± 0.26 ²⁾
	0.4	1.11 ± 0.12 ²⁾	1.13 ± 0.23 ²⁾	1.21 ± 0.13 ²⁾
雷帕霉素	0.016	1.06 ± 0.22 ²⁾	1.05 ± 0.12 ²⁾	1.10 ± 0.15 ²⁾

发病机制,病理变化密切相关^[9]。

PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶, Akt 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶, 能够磷酸化数种蛋白, mTOR 雷帕霉素靶蛋白是 AKT 下游效应蛋白^[10]。该信号通路是与肾纤维化关系密切, 采用大鼠单侧输尿管结扎 (UO) 模型研究 PI3K, AKT, mTOR 蛋白磷酸化水平, 其结果显示 7 d 后与假手术组相比 PI3K, AKT, mTOR 蛋白磷酸化水平明显升高。因此结论为 PI3K/Akt/mTOR 信号磷酸化水平在单侧输尿管结扎 (UO) 大鼠模型中是明显上升^[11]。笔者实验结果也同时显示 12 周后模型组 PI3K, AKT, mTOR 蛋白表达水平较治疗组均显著升高, 说明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路参与肾纤维化发生发展。如 Yoon H E 等^[12]研究 tempol 一种抗氧化剂是否通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路作用对单侧输尿管梗阻小鼠肾损伤起到保护作用, 分别在梗阻手术后第 3 天和第 7 天观察肾脏纤维化变化。结果与假手术组相比, tempol 处理的小鼠组肾间质纤维化显著降低, 其结论 tempol 药物可能通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路而起到缓解肾纤维化保护肾脏作用。笔者实验研究结果也显示与模型组比较, 抗纤灵各治疗组 24 h 尿蛋白, 尿素氮, 血肌酐均有改善, 各治疗组肾脏组织学形态均有所改善, 其机制可能与抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路表达相关。抗纤灵方对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制作用其机制可能与该方活血化痰作用相关。并有研究证实活血化痰作用越强其对该通路抑制作用也越强, 如贾永森等^[13]采用体外培养食管鳞癌 EC9706 细胞, 给予通幽汤及拆方干预, 观察其对食管癌 EC9706 细胞及 PI3K/AKT 信号通路影响, 结果显示与其他组比较通幽汤加活血行气方药组对食管癌 EC9706 细胞抑制作用最强, PI3K, AKT 蛋白抑制作用也最强。同样笔者实验结果也显示随着抗纤灵剂量加大, 活血化痰作

用加强, 对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制增强, 24 h 尿蛋白及肾脏组织学形态改变更明显。

综上所述, 具有益气活血化痰补肾作用的抗纤灵方具有减少蛋白尿, 改善肾功能, 防止肾纤维化进展, 其机制可能与抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关。

【参考文献】

[1] 何立群, 王怡, 曹和欣, 等. 抗纤灵冲剂对慢性肾衰模型肾组织 TNF-mRNA, PDGF-mRNA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(5): 29-32.

[2] 王怡, 何立群, 郑平东. 抗纤灵冲剂对慢性肾衰 60 例疗效观察[J]. 中医杂志, 2003, 44(12): 923-925.

[3] 刘煜敏, 张悦, 何立群, 等. 抗纤灵方对单侧输尿管梗阻大鼠 TGF-β₁-Smad 通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(12): 2423-2427.

[4] 张长明, 周家俊, 何立群, 等. 从血管活性因子角度研究抗纤灵方改善肾功能抑制肾纤维化的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2): 4005-4007.

[5] 黄成, 李俊, 马陶陶. PI3K/Akt 信号通路与肝纤维化[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(8): 1037-1041.

[6] Lieberthal W, Levine J S. Mammalian target of rapamycin and the kidney I. The signaling pathway[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 7(1): 303:F1-F10.

[7] Mori H, Inoki K, Masutani K, et al. The mTOR pathway is highly activated in diabetic nephropathy and rapamycin has a strong therapeutic potential [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 38(4): 471-475.

[8] 赵静, 刘伟伟, 杨德乾, 等. NSF 干预 5/6 肾切除大鼠模型肾纤维化的实验研究[J]. 成都中医药大学学报, 2014, 37(1): 35-38.

[9] 杜义安, 余鹏飞. mTOR 信号通路与胃癌研究进展[J]. 中国肿瘤杂志, 2014, 23(9): 761-764.

[10] 郑鹏生, 冀静. mTOR 信号通路与肿瘤研究进展[J]. 西安交通大学学报, 2010, 31(1): 27-28.

[11] Ma S K, Joo S Y, Kim C S, et al. Increased Phosphorylation of PI3K/Akt/mTOR in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral obstruction [J]. Chonnam Med J, 2013, 49(3): 108-112.

[12] Yoon H E. Tempol attenuates renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction: the role of PI3K-Akt-FoxO3a signaling[J]. J Korean Med Sci, 2014, 29(2): 230-237.

[13] 贾永森, 吕翠田, 吴范武, 等. 通幽汤及拆方对食管癌 EC9706 细胞 PI3K/AKT 信号通路影响的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(7): 1306-1308.

【责任编辑 周冰冰】