

·药理·

基于RhoA/ROCK通路探讨淫羊藿苷对肾病综合征大鼠的保护机制

王新斌, 戴恩来*, 薛国忠, 吕娟, 陈威辛
(甘肃中医药大学 中西医结合学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:研究淫羊藿苷对肾病综合征(NS)大鼠肾素同源蛋白A(RhoA)/Rho相关激酶(ROCK)通路的影响和保护机制。方法:实验对象为54只清洁级雄性SD大鼠,随机均分为正常组,模型组,RhoA抑制剂组(Rhosin, 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和淫羊藿苷低、中、高剂量组(30, 60, 120 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。模型组大鼠尾静脉注射6.5 mg·kg⁻¹盐酸阿霉素给,诱导大鼠NS发生。造模后腹膜给药,正常组和模型组给予生理盐水2.5 mL·d⁻¹,抑制剂组和各剂量组分别给对应剂量的Rhosin和淫羊藿苷进行干预。试剂盒检测各组大鼠尿总蛋白(Alb),尿肌酐(Cre)水平,计算尿总蛋白/肌酐值(A/C);透射电镜(TEM)鉴定肾脏超微病理;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA水平和蛋白表达。结果:TEM结果显示,正常组基底膜完整,足突规整;模型组基底膜损坏严重,足突出现消失、融合严重;淫羊藿苷低剂量组基底膜损伤减轻,足突的数量和密度改善、融合明显;淫羊藿苷中剂量组和抑制剂组,基底膜增厚情况减轻,足突轻度融合;淫羊藿苷高剂量组基底膜结构较完整,足细胞较长、排列较紧密。与正常组比较,模型组大鼠24 h尿蛋白量、尿液中Cre, A/C, 肾组织RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA和蛋白水平明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,抑制剂组和淫羊藿苷低、中、高剂量组24 h尿蛋白量, A/C和肾组织中RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA和蛋白水平,抑制剂组和淫羊藿苷高剂量组尿液中Cre明显降低($P < 0.05$)。与抑制剂组比较,淫羊藿苷高剂量组24 h尿蛋白量、尿液中Cre和肾组织RhoA蛋白水平明显降低($P < 0.05$);淫羊藿苷低剂量组24 h尿蛋白量、尿液中Cre, A/C和肾组织RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA和蛋白水平,淫羊藿苷中剂量组肾组织RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA水平明显升高($P < 0.05$)。与淫羊藿苷低剂量组比较,淫羊藿苷中、高剂量组尿液中Alb, A/C和肾组织RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA和蛋白水平,淫羊藿苷高剂量组尿液中Cre明显降低($P < 0.05$)。与淫羊藿苷中剂量组比较,淫羊藿苷高剂量组24 h尿蛋白量、尿液中Cre和肾组织RhoA, ROCK1 mRNA和蛋白水平,肾组织ROCK2 mRNA明显降低($P < 0.05$)。结论:在NS大鼠治疗过程中,淫羊藿苷可能通过影响RhoA/ROCK通路,实现肾小球内皮和足细胞保护作用。

[关键词] 淫羊藿苷; 肾病综合征; 大鼠; 肾素同源蛋白A(RhoA); Rho相关激酶1(ROCK1); ROCK2

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0078-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200901

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200117.1127.002.html>

[网络出版日期] 2020-1-17 16:22

Protective Mechanism of Icariin on Nephrotic Syndrome Rats Based on RhoA/ROCK Pathway

WANG Xin-bin, DAI En-lai*, XUE Guo-zhong, LYU Juan, CHEN Wei-xin

(School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of icariin on renin homologous protein A (RhoA)/Rho-related kinase (ROCK) pathway in rats with nephrotic syndrome (NS) and its protective mechanism. **Method:**

[收稿日期] 20190925(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760799);甘肃省自然科学基金项目(1610RJ2A067)

[第一作者] 王新斌, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中药对肺肾疾病的研究, E-mail: wyy986931@163.com

[通信作者] *戴恩来, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药对肺肾疾病研究, E-mail: 442068478@qq.com

Totally 54 clean-grade male SD rats were tested and randomly divided into normal group, model group, RhoA inhibitor group (Rhosin, $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and three doses of icariin groups (low, medium and high corresponding dose, 30, 60, $120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Adriamycin hydrochloride $6.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ was given in tail vein of rats to induce NS model in rats. After the model was established, peritoneal administration was carried out. The normal group and the model group were given saline $2.5 \text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$, and the inhibitor group and all of dose groups were given corresponding doses of Rhosin and icariin for intervention. Total urinary protein (Alb), creatinine (Cre), total urinary protein/creatinine ratio (A/C) kit were detected in rats, ultrastructure of kidney was identified by transmission electron microscopy (TEM), and Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to detect the mRNA and proteins expressions of RhoA, ROCK1, ROCK2. **Result:** TEM showed that the basement membrane was intact and the foot process was regular in the normal group, in model group, basement membrane was damaged seriously, foot process disappeared, and fusion was serious, in the low-dose group, the basement membrane injury was alleviated, the number and density of foot process were improved, and the fusion was obvious, in the middle-dose group and the inhibitor group, the basement membrane thickening was alleviated, and the foot process was slightly fused, in the high-dose group, the basement membrane structure was more complete, and podocytes were longer and arranged tightly. Compared with the normal group, the levels of Alb, Cre and A/C in urine, and RhoA, ROCK1 and ROCK2 mRNA and protein expressions in kidney tissue of rats of the model group were significantly higher ($P<0.05$). Compared with model group, the levels of Alb, A/C in urine and RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA and protein expressions in kidney tissue in the inhibitor group and low, medium and high-dose groups, and Cre in urine in inhibitor group and high-dose group decreased significantly ($P<0.05$). Compared with the inhibitor group, the levels of Alb, Cre in urine and RhoA protein in kidney tissue in the high-dose group were significantly decreased ($P<0.05$), the levels of Alb, Cre, A/C in urine and RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA and protein expressions in kidney tissue of the low-dose group, and the levels of RhoA, ROCK1 and ROCK2 mRNA expressions in kidney tissue of the middle-dose group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the low-dose group, the levels of Alb, A/C in urine, and RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA and protein expressions in kidney tissue in the middle and high-dose groups, Cre in urine of the high-dose group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the middle-dose group, the levels of Alb, Cre in urine, and RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA and protein expressions, ROCK2 mRNA expression in kidney tissue in the high-dose group were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Icariin may protect glomerular endothelium and podocyte by affecting RhoA/ROCK pathway in the treatment of NS rats.

[Key words] icariin; nephrotic syndrome; rats; renin homologous protein A (RhoA); Rho-related kinase 1 (ROCK1); ROCK2

肾病综合征(NS)是常见较为严重的膜性肾病,发生病变时足细胞损坏并释放大量免疫复合物沉积在基底膜上,导致基底膜增厚,其上分子刷及电荷屏障受损,患者出现蛋白尿、血清脂蛋白和组织渗透压异常等情况^[1]。NS早期症状不明显,当患者出现明显症状进行就诊时,病情多已发展到尿毒症期甚至终末期,严重威胁患者生命安全^[2]。糖皮质激素是治疗NS的重要方式,患者在过程中易产生激素抵抗和骨质疏松等副作用,中药在其治疗肾病的长期实践过程中,疗效逐渐被肯定,具有一定优势^[3]。研究发现多种中药提取物具有类皮质激素样

效果且不易产生激素抵抗,如甘草酸苷、雷公藤^[4-5]。CHEN等^[6]发现姜黄素能够减轻糖皮质激素引起的骨质疏松对糖皮质激素产生的副作用有显著改善作用。据报道淫羊藿苷能够拮抗糖皮质激素对骨质吸收促进作用^[7],且多项研究表明,淫羊藿苷能够保护肾脏^[8-10]。因此本研究以雄性SD大鼠为对象制备NS模型,腹腔给予淫羊藿苷和RhoA抑制剂(Rhosin)治疗,通过24 h尿常规检查、肾脏超微病理鉴定和检测人Ras同源基因家族成员A(RhoA),人Rho关联含卷曲螺旋蛋白激酶1(ROCK1),ROCK2水平,探讨淫羊藿苷对NS模型大鼠病理损伤的影

响并初步探讨起保护机制。

1 材料

1.1 动物 雄性清洁级SD大鼠54只,2月龄,体重(280±20)g,购自甘肃中医药大学,实验动物生产合格证号SCXK(甘)2015-0002,使用许可证号SYXK(甘)2015-0005。鼠房灯光模拟昼夜交替(12 h/12 h),温度(22±4)℃,相对湿度(42±4)%。自由进食取水,定期更换垫料,适应2周后实验。本研究经院动物伦理委员会批准(批号L2015012403)。

1.2 药物及试剂 淫羊藿苷(南京广润生物制品有限公司,纯度≥98%,货号GR0808);盐酸阿霉素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号D107159);Rhosin(美国MCE公司,货号HY-12646A);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号C0105);trizol(北京索莱宝科技有限公司,货号15596026);大鼠尿蛋白(Alb),尿肌酐(Cre)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海晶抗生物工程有限公司,货号分别为JLC1363,JLC1357);Ace™实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)SYBR Green Master Mix(南京诺维赞生物科技有限公司,货号Q121-03);兔抗RhoA多克隆抗体,兔抗ROCK1多克隆抗体,兔抗ROCK2单克隆抗体,BCA蛋白测定试剂盒,兔抗β-肌动蛋白(β-actin)多克隆抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(英国Abcam公司,货号分别为ab86297,ab45171,ab45171,ab207002,ab8227,ab7090)。

1.3 仪器 Y-3103型大鼠代谢笼(上海玉研科学仪器有限公司);JEM-1400Flash型透射电子显微镜(日本电子株式会社);DYCZ-20H型电泳仪, DYCZ-40K型电转仪(北京六一生物科技有限公司);AE31 EF-INV型倒置荧光显微镜(上海光学仪器厂);EM UC7型超薄切片机(德国徕卡公司);PHOMO型读板机(郑州安图生物工程股份有限公司);LightCycler 480型Real-time PCR仪(瑞士罗氏公司)。

2 方法

2.1 动物建模 开始造模前12 h将大鼠转移至代谢笼中进行适应性饲养。建模参考ZAN等^[11]方法,通过向SD大鼠尾静脉一次性注射盐酸阿霉素(6.5 mg·kg⁻¹)复制NS模型,以24 h尿蛋白>100 mg为建模成功标准,共成功造模NS大鼠45只。

2.2 分组与给药 将45只NS大鼠随机分为模型

组,RhoA抑制剂组40mg·kg⁻¹·d⁻¹,淫羊藿苷低、中、高剂量组30,60,120 mg·kg⁻¹·d⁻¹,每组9只,给药剂量参考刘岩峰等^[9]研究。另给予9只大鼠腹腔注射2.5 mL生理盐水作为正常组。建模成功后对大鼠进行腹膜给药,正常组和模型组每天给予2.5 mL生理盐水,抑制剂组每天给予Rhosin溶液浓度为40 mg·kg⁻¹·d⁻¹^[12],各组均每日上午给药1次,连续给药4周。

2.3 样本采集 大鼠尿液由粪尿分离式代谢笼收集,实验收集给药结束后第1天24 h内尿液,收集分装到带胶塞玻璃瓶内,加入0.01%叠氮化钠4℃保存用于尿常规检验。收集完大鼠尿液后,每组随机分出3只大鼠用于超微病理鉴定。尾静脉注射3%戊巴比妥钠(25 mg·kg⁻¹)麻醉大鼠。将大鼠仰置在蜡盘上,解剖针固定四肢,剪开胸腔和心包膜暴露出心脏,将灌流针扎入左心室,同时剪开右心房处腔静脉,打开管流泵,先快速灌入0.9%生理盐水,待心房开口处流出透明澄清液体后再缓慢灌入冰浴过的2.5%戊二醛溶液200 mL。灌流完成后将大鼠肾脏摘除,取样遵循“快、小、利、净”原则,先用眼科镊快速撕下部分肾皮质,再用两个锋利手术刀片并排切取1 mm³组织块放入3%戊二醛中4℃前固定1 h用于后续实验。其余6只大鼠断椎处死,迅速摘除双侧肾脏,一侧肾脏用于HE染色观察,另一侧肾脏进行低温匀浆,-80℃保存用于蛋白免疫印迹法(Western blot)和Real-time PCR检测。

2.4 大鼠肾功能评价 尿液样本和试剂盒室温平衡20 min,Alb和Cre含量测定流程基本相似,按照说明书,先加入尿液样本和标准品,再加入工作液,微孔板振荡器混匀,分别在37℃和60℃下孵育1 h,分别在562 nm和570 nm波长下测定吸光度A。通过标准品浓度和相应A绘制标准曲线,在通过标准曲线反推样本浓度。由Alb/Cre得出Alb与Cre比值(A/C)来可靠反映大鼠24 h尿蛋白水平。

2.5 HE染色检测大鼠肾脏组织病理变化 用于HE染色的大鼠肾脏在4%多聚甲醛溶液中充分固定后,0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(PBS)充分冲洗,先后经过梯度乙醇、二甲苯进行脱水,然后石蜡包埋。进行石蜡切片(4 μm)。石蜡切片经二甲苯、梯度无水乙醇水化后进行HE染色,参照说明书,先在苏木素染液,再使用伊红染色,中性树胶封片。倒置显微镜白光明场拍照后进行病理分析。

2.6 大鼠肾脏组织超微病理鉴定 将组织从戊二醛中取出,经0.1 mol·L⁻¹ PBS漂洗后,放入1%锇酸

中4℃后固定3h。4℃环境下30%乙醇,50%乙醇中15min,70%乙醇-醋酸铀过夜染色,80%乙醇,90%乙醇-丙酮(1:1)脱水15min;室温下分别在纯丙酮,丙酮-包埋树脂(1:1),包埋树脂中浸透3h。巴氏吸管将组织块转移至装满包埋树脂的硅胶胶囊模具中,针灸针将组织块调整至胶囊模具尖端位置,60℃下约2d后固化。超薄切片厚度70nm。透射电镜拍照服务由武汉赛维尔生物科技有限公司提供。

2.7 Real-time PCR检测大鼠肾组织RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA水平 取大鼠肾组织0.5g匀浆加入trizol进行提取,振荡后15 000 r·min⁻¹离心30min取上清后,经三氯甲烷、异丙醇、乙醇提纯及260nm/280nm法测总RNA丰度,参照说明书使用cDNA反转录合成cDNA。Real-time PCR反应体系为2×Mix 10 μL,正反引物各0.4 μL,ROX reference Dye II 0.4 μL,无菌水8.8 μL。循环过程为95℃ 10min,第1次循环95℃ 2min,后40次循环95℃ 5s,60℃ 20s。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为参比基因,2^{-ΔΔC_t}法分析mRNA含量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。见表1。

2.8 Western blot检测大鼠肾组织中RhoA, ROCK1, ROCK2蛋白的表达 2.6项剩余组织匀浆取0.5g加蛋白裂解液后置于冰块上静置1h。4℃ 12 000×g离心5min,上清用BCA法检测蛋白含量纯度,变性后取蛋白40 μg进行上样,10% SDS-PAGE凝胶电泳后进行电泳转膜。使用牛血清白蛋白(BSA)封闭1h后,加入RhoA一抗(1:200),ROCK1一抗(1:100),ROCK2一抗(1:100),β-actin一抗(1:200),4℃过夜,洗膜后加入二抗(1:100)孵

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
RhoA	上游 TGATGGCTATTATGGACG	231
	下游 GGAAGGCACAAATGAGAT	
ROCK1	上游 AGATATGGCAAACAGGATT	269
	下游 CTTCACAAGATGAGGCAC	
ROCK2	上游 TGGTTTCTATGGGCGAGAATGT	275
	下游 CAAGTCGTACCTCCCTATCTGTT	
GAPDH	上游 GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	323
	下游 GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	

育1h。ECL显色、凝胶成像仪拍照后,使用Image J 1.8.1软件分析各组蛋白表达量。

2.9 统计学处理 实验数据采用SPSS 21.0软件进行统计分析,采用 $\bar{x} \pm s$ 方式表示数据,组间分析采用单因素方差分析,两两比较采用SNK-*q*检验法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察 假手术组大鼠正常饮食、饮水,未见明显异常;模型大鼠出现厌食、饮水减少、活动减少等情况,淫羊藿苷低、中、高剂量组与抑制剂组大鼠厌食厌水情况逐渐改善,活动逐渐增加。各组大鼠均正常存活。

3.2 对NS大鼠肾功能指标的影响 与正常组比较,模型组尿液中Alb, Cre, A/C明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,抑制剂组和高剂量组尿液中Alb, Cre, A/C,淫羊藿苷低、中剂量组Alb, A/C明显降低($P < 0.05$)。与抑制剂组比较,高剂量组尿液中Alb, Cre明显降低($P < 0.05$);淫羊藿苷低剂量组尿液中Alb, Cre, A/C明显升高($P < 0.05$)。见表2。

表2 淫羊藿苷对NS大鼠Alb, Cre, A/C的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Effect of icariin on Alb, Cre and A/C in rats with nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n=9$)

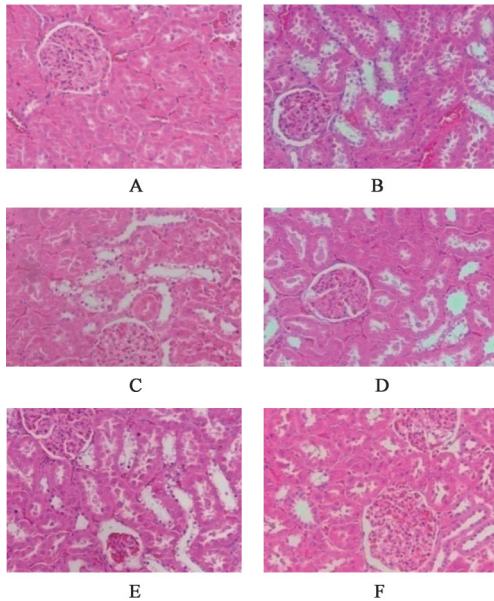
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Alb/mg·dL ⁻¹	Cre/mg·dL ⁻¹	A/C
正常	-	0.60±0.18	12.54±0.43	0.048±0.014
模型	-	2.85±0.13 ¹⁾	13.57±0.54 ¹⁾	0.211±0.015 ¹⁾
抑制剂	40	1.82±0.24 ²⁾	12.91±0.41 ²⁾	0.141±0.020 ²⁾
淫羊藿苷	30	2.50±0.14 ^{2,3)}	13.72±0.47 ³⁾	0.182±0.012 ^{2,3)}
	60	1.93±0.19 ²⁾	13.41±0.17	0.144±0.014 ²⁾
	120	1.51±0.21 ^{2,3)}	10.78±0.71 ^{2,3)}	0.140±0.018 ²⁾

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

3.3 对NS大鼠肾组织肾小管形态的影响 正常组大鼠肾组织肾小管形态正常;模型组大鼠肾组织

肾小管出现严重的蛋白管型;抑制剂组大鼠肾组织肾蛋白管型情况的到明显改善;淫羊藿苷低、中剂

量组大鼠肾组织肾蛋白管型也有所改善;淫羊藿苷高剂量改善情况最显著。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 抑制剂组;D. 淫羊藿苷低剂量组;E. 淫羊藿苷中剂量组;F. 淫羊藿苷高剂量组(图2,3同)

图1 淫羊藿苷对NS大鼠肾脏组织病理学的影响(HE, ×200)
Fig. 1 Effect of icariin on renal histopathology in rats with nephrotic syndrome (HE, ×200)

3.4 对NS大鼠肾小球血管基底膜及足细胞损伤的影响 正常组肾小球基底膜完整,足突细长且排列规整;模型组肾小球基底膜损坏严重,足突短粗出现消失,并且融合严重;抑制剂组基底膜损伤明显改善,足突轻度融合;淫羊藿苷低剂量组相比模型组基底膜损伤减轻,足突数量和密度略有改善,融合现象较明显;淫羊藿苷中剂量组和抑制剂组结果类似,都表现出基底膜改善。足突轻度融合症状;淫羊藿苷高剂量组基底膜结构较清晰完整,足细胞较长、排列较紧密。见图2。

3.5 对NS大鼠肾组织 RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA 水平的影响 与正常组比较,模型组肾组织中 RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA 水平明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,抑制剂组、淫羊藿苷低、中高剂量组肾组织中 RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA 水平明显降低 ($P < 0.05$)。与抑制剂组比较,淫羊藿苷低、中剂量组肾组织中 RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA 水平明显升高 ($P < 0.05$)。见表3。

3.6 对NS大鼠肾组织 RhoA, ROCK1, ROCK2 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组肾组织中 RhoA, ROCK1, ROCK2 蛋白表达量明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,抑制剂组、淫羊藿苷中、高

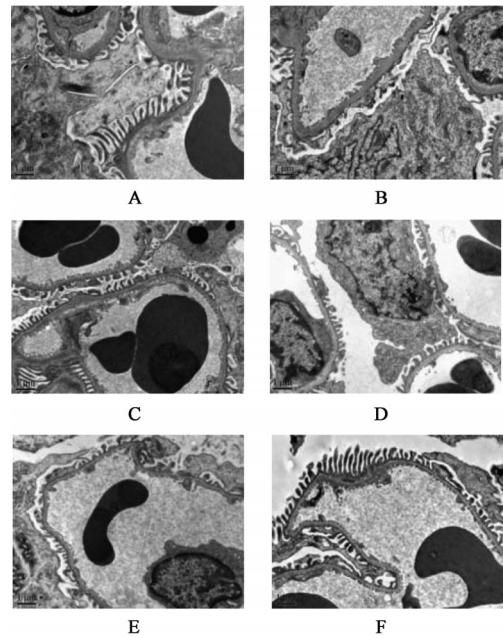


图2 淫羊藿苷对NS大鼠肾小球亚显微结构的影响(电镜扫描, ×15 000)

Fig. 2 Effect of icariin on glomerular submicrostructure in rats with nephrotic syndrome (SEM, ×15 000)

表3 淫羊藿苷对NS大鼠肾组织中 RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of icariin on levels of RhoA, ROCK1 and ROCK2 mRNA in renal tissues of rats with nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	RhoA	ROCK1	ROCK2
正常	-	0.92±0.09	0.74±0.13	0.54±0.12
模型	-	2.13±0.12 ¹⁾	1.48±0.07 ¹⁾	1.53±0.13 ¹⁾
抑制剂	40	1.36±0.10 ²⁾	1.01±0.08 ²⁾	0.76±0.09 ²⁾
淫羊藿苷	30	1.95±0.11 ^{2,3)}	1.31±0.15 ^{2,3)}	1.13±0.12 ^{2,3)}
	60	1.73±0.13 ^{2,3)}	1.12±0.09 ²⁾	0.92±0.06 ^{2,3)}
	120	1.22±0.13 ²⁾	0.97±0.14 ²⁾	0.68±0.08 ²⁾

剂量组肾组织中 RhoA, ROCK1, ROCK2 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$)。与抑制剂组比较,淫羊藿苷高剂量组肾组织中 RhoA 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$);淫羊藿苷低剂量组肾组织中 RhoA, ROCK1, ROCK2 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。见图3,表4。

4 讨论

NS致病机制是肾小球过滤屏障紊乱,其中足细胞在屏障系统中处于核心地位^[13]。足细胞各级分支足突内膜蛋白通过控制肌动蛋白细胞骨架来影响分子透性和细胞形态。研究表明,足细胞还与维持肾小球毛细血管收缩有关,糖皮质激素等可以调节这些过程^[14]。Rho家族都是小分子GTP酶,主要成员有 RhoA, Rac1 和细胞分裂周期蛋白42。Rho

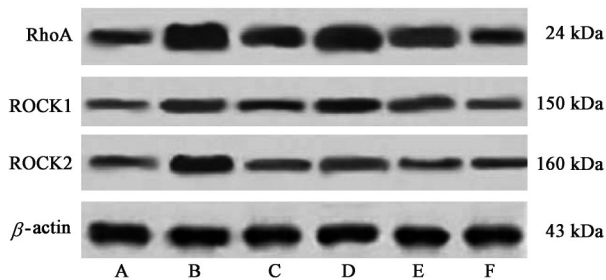


图3 大鼠肾组织 RhoA, ROCK1, ROCK2 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of RhoA, Rock1 and Rock2 protein expression in rat kidney

表4 淫羊藿苷对NS大鼠肾组织中 RhoA, ROCK1, ROCK2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of icariin on expression of RhoA, ROCK1 and ROCK2 protein in kidney of rats with nephrotic syndrome ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	RhoA/ β -actin	ROCK1/ β -actin	ROCK2/ β -actin
正常	-	0.41±0.10	0.32±0.04	0.31±0.02
模型	-	1.25±0.12 ¹⁾	0.79±0.09 ¹⁾	0.68±0.07 ¹⁾
抑制剂	40	0.89±0.08 ²⁾	0.56±0.04 ²⁾	0.46±0.05 ²⁾
淫羊藿苷	30	1.13±0.04 ³⁾	0.71±0.03 ³⁾	0.62±0.02 ³⁾
	60	0.92±0.05 ²⁾	0.64±0.04 ²⁾	0.48±0.04 ²⁾
	120	0.75±0.06 ^{2,3)}	0.48±0.05 ²⁾	0.42±0.05 ²⁾

能够在 Rho-GTP 和 Rho-GDP 两种结合构象间相互转化,该机制在调控细胞骨架和细胞粘附中发挥重要作用,其中 RhoA 在细胞伸展和足突扩展中最先发挥作用,且与新生足突的增强稳定有关^[15]。ZHU 等^[16]研究表明,大量激活 RhoA 会使大鼠 Alb 增加,从而加重肾小球硬化,导致足细胞形态退化、数量减少。ROCK 家族成员都是丝氨酸/苏氨酸蛋白酶激酶,与细胞骨架重构和上皮细胞间质转化有关,有 ROCK1 和 ROCK2 两种亚型,是 RhoA 胞外信号下游靶点^[17]。ROCK 非激活状态时与 Rho 结构域 N 末端相连形成阻尼结构,RhoA 与 Rho 结构域结合后 ROCK 阻尼结构被打开,ROCK 进入激活状态。ROCK 通过对 LIM 激酶、肌球蛋白轻链、肌球蛋白轻链磷酸酶靶亚单位 1 等磷酸化调节肌动蛋白的收缩力^[18]。研究表明抑制 ROCK 能够减轻 NS 小鼠蛋白尿表达,改善内皮细胞分子屏障能力^[19]。此外 RhoA/ROCK 通路还与血管内皮收缩和内皮功能紊乱有关^[20]。因此抑制 RhoA/ROCK 通路有利于肾小球上皮细胞和足细胞的保护。NS 在中医辨证表现为“水毒内闭、肝肾阴虚、脾虚湿困”。而淫羊藿有祛风除湿、补肾壮阳,调节免疫力的功效,临床上常

用于治疗阳痿早泄、女子不孕。从其药性来看,能够解除 NS 诸症。

本研究显示,模型组大鼠相比正常组尿液中 Alb, Cre, A/C, 肾组织中 RhoA 和 ROCK 水平出现病理性升高,超微病理显示肾小球功能受损严重,说明建模成功。YIN 等^[21]指出青藤碱通过抑制 RhoA/ROCK 通路增强肾脏小球内皮细胞屏障作用。抑制剂组相比模型组、淫羊藿苷低剂量组,Alb, Cre, A/C, 肾组织中 RhoA 和 ROCK 水平降低,超微病理显示足细胞和肾小球基膜功能得到保护,这可能是因为 Rhosin 抑制 RhoA/ROCK 通路,起到保护肾功能作用。与模型组比较,淫羊藿苷低剂量组尿液中 Cre, 肾组织中 RhoA 和 ROCK 蛋白表达量变化不显著,肾小球病理损伤无明显改观,说明淫羊藿苷在低剂量时治疗效果并不明显;淫羊藿苷中、高剂量组尿液中 Alb, Cre, A/C 和肾组织中 RhoA 和 ROCK 水平显著降低,肾小球病理损伤得到改善,说明淫羊藿苷中、高剂量治疗效果较明显。淫羊藿苷剂量组尿液中 Alb, Cre, A/C, 肾组织中 RhoA 和 ROCK 降低程度和肾小球病理损伤改善程度与剂量呈正相关。结果显示淫羊藿苷具有抑制 RhoA/ROCK 通路作用,与 YE 等^[22]脂肪干细胞研究结果不一致。而 WANG 等^[23]研究表明淫羊藿苷能够下调 RhoA 同家族成员 Rac-1 水平来抑制人胃癌细胞株的扩增。同样 LI 等^[24]研究也指出淫羊藿苷联合灯盏花素能够降低 RhoA/ROCK 通路改善自发性高血压大鼠勃起反应障碍。YE 等^[22]脂肪干细胞研究显示出不一致的结果可能是因为不同组织细胞对淫羊藿苷敏感度不同。本研究显示淫羊藿苷能够影响 RhoA/ROCK 通路,改善肾小球内皮和足细胞的分子屏障作用。

综上所述,NS 大鼠治疗过程中淫羊藿苷可能通过影响 RhoA/ROCK 通路,实现肾小球内皮和足细胞保护作用。但实验设计没有考虑到淫羊藿苷抑制促炎因子表达的作用,淫羊藿苷剂量组肾小球病理状况的改善不能排除降低促炎因子的作用,这是本研究的不足之处。

[参考文献]

- [1] 张传富,路建饶,陈秀锋,等. 糖肾方联合灌肠方对IV期2型糖尿病肾病炎症因子的影响及临床疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(23):177-182.
- [2] 刘建芳,齐凯敏,刘光珍. 膜性肾病诊断与治疗新进展[J]. 中国医学创新,2019,16(2):164-167.

- [3] 蔡京婉,赵宗江,张新雪,等. 糖肾平胶囊对糖尿病肾病 KKAY 小鼠肾脏保护作用及对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15):96-102.
- [4] WANG C, DUAN X, SUN X, et al. Protective effects of glycyrrhizic acid from edible botanical glycyrrhiza glabra against non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. Food Funct, 2016, 7(9):3716-3723.
- [5] 郭静,李娇,张霖,等. 淫羊藿苷对补体旁路激活诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(7):988-993.
- [6] CHEN Z, XUE J, SHEN T, et al. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(2):329-338.
- [7] 白宛鑫,赵良友,张娜,等. 生淫羊藿与炙淫羊藿对肾阳虚证水肿模型大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5):85-91.
- [8] 朱玲,钱志强,李叶丽,等. 淫羊藿苷对自发性高血压大鼠肾损伤的改善作用及机制研究[J]. 中国药房, 2017, 28(10):1326-1328.
- [9] 刘岩峰,熊韞祎,王东,等. 淫羊藿苷保护脑死亡大鼠肾损伤的作用及机制研究[J]. 中华移植杂志:电子版, 2017, 11(3):143-147.
- [10] 马冬雪,董贤慧,贺小平,等. 淫羊藿、黄芪、葛根有效组分复方对 APPswe/PS1dE9 双转基因 AD 模型小鼠海马 CA3 区 hepcidin 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(11):1523-1527.
- [11] ZAN J F, SHEN C J, ZHANG L P, et al. Effect of Poria cocos hydroethanolic extract on treating adriamycin-induced rat model of nephrotic syndrome [J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(12):916-922.
- [12] FRANCIS T C, GAYNOR A, CHANDRA R, et al. The Selective RhoA inhibitor rhosin promotes stress resiliency through enhancing D1-medium spiny neuron plasticity and reducing hyperexcitability [J]. Biol Psychiatry, 2019, 85(12):1001-1010.
- [13] DING W Y, SALEEM M A. Current concepts of the podocyte in nephrotic syndrome [J]. Kidney Res Clin Pract, 2012, 31(2):87-93.
- [14] FENG D, DUMONTIER C, POLLAK M R. Mechanical challenges and cytoskeletal impairments in focal segmental glomerulosclerosis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2018, 314(5):F921-F925.
- [15] NGUYEN L K, KHOLODENKO B N, VON KRIEGSHEIM A. Rac1 and RhoA: networks, loops and bistability [J]. Small GTPases, 2018, 9(4):316-321.
- [16] ZHU L, JIANG R, AOUDJIT L, et al. Activation of RhoA in podocytes induces focal segmental glomerulosclerosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(9):1621-1630.
- [17] CHU S, MAO X, GUO H, et al. Indoxyl sulfate potentiates endothelial dysfunction via reciprocal role for reactive oxygen species and RhoA/ROCK signaling in 5/6 nephrectomized rats [J]. Free Radic Res, 2017, 51(3):237-252.
- [18] 刘建兵,刘敏丽. RhoA/ROCK 信号通路相关疾病的研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2019, 25(6):472-476.
- [19] TSAI I J, CHOU C H, YANG Y H, et al. Inhibition of Rho-associated kinase relieves C5a-induced proteinuria in murine nephrotic syndrome [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(16):3157-3171.
- [20] STRASSHEIM D, GERASIMOVSKAYA E, IRWIN D, et al. RhoGTPase in vascular disease [J]. Cells Basel, 2019, 8(6):1-21.
- [21] YIN Q, XIA Y, WANG G. Sinomenine alleviates high glucose-induced renal glomerular endothelial hyperpermeability by inhibiting the activation of RhoA/ROCK signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(4):881-886.
- [22] YE Y, JING X, LI N, et al. Icariin promotes proliferation and osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells by activating the RhoA-TAZ signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88(1):384-394.
- [23] WANG Y, DONG H, ZHU M, et al. Icariin exerts negative effects on human gastric cancer cell invasion and migration by vasodilator-stimulated phosphoprotein via Rac1 pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 635(1/3):40-48.
- [24] LI Y, JIANG J, HE Y, et al. Icariin combined with breviscapine improves the erectile function of spontaneously hypertensive rats [J]. J Sex Med, 2014, 11(9):2143-2152.

[责任编辑 周冰冰]