

加味升降散对膜性肾病大鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路及自噬的影响

高飞^{1,2}, 王泽泽^{1,2}, 杨冰^{1,2}, 檀金川^{1,2*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 河北省中医院, 石家庄 050011)

[摘要] 目的:探讨加味升降散对膜性肾病(MN)大鼠的干预作用及相关作用机制。方法:采用大鼠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。设正常组、模型组、加味升降散组(27.3 g·kg⁻¹)和贝那普利组(10 mg·kg⁻¹),分别给予相应剂量药物灌胃,每日1次,连续干预4周。给药结束后检测大鼠24 h尿蛋白(UTP)水平,血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),总蛋白(TP),白蛋白(Alb),肌酐(SCr),尿素氮(BUN)水平;马松(Masson)染色、碘酸六胺银(PASM)染色及透射电镜观察大鼠肾脏病理学变化;免疫荧光观察大鼠肾脏免疫球蛋白(Ig)G沉积;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B/雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路相关分子及自噬相关指标LC3和Beclin1的表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠UTP,血清中TC, TG水平均升高, TP, Alb水平明显降低($P<0.05$);肾小球增大,基底膜出现不同程度的增厚和空泡变性,嗜复红蛋白沉积,肾小球毛细血管袢IgG弥漫性沉积,上皮下可见大小不等的电子致密物沉积,足细胞足突广泛融合;磷酸化(p)-PI3K, p-Akt和p-mTOR蛋白表达均明显增加($P<0.05$),自噬标志蛋白LC3和Beclin1蛋白表达量均明显下降($P<0.05$);与模型组比较,加味升降散组和贝那普利组大鼠UTP,血清中TC, TG水平均有不同程度的下降, TP, Alb水平有不同程度的升高($P<0.05$);大鼠肾组织病理损伤均有所减轻; p-PI3K, p-Akt和p-mTOR蛋白表达量明显下降($P<0.05$);自噬标志蛋白LC3和Beclin1蛋白表达量明显升高($P<0.05$)。结论:加味升降散可通过减少尿蛋白,减轻肾脏病理损伤,延缓疾病进展,其作用与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路和激活肾脏自噬有关。

[关键词] 加味升降散; 膜性肾病; 磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B/雷帕霉素靶蛋白信号通路; 自噬

[中图分类号] R2-0;R289;R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0025-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202040

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200813.1105.004.html>

[网络出版日期] 2020-8-13 14:03

Effect of Modified Shengjiangsan Influences on PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Autophagy in Rats with Membranous Nephropathy

GAO Fei^{1,2}, WANG Ze-ze^{1,2}, YANG Bing^{1,2}, TAN Jin-chuan^{1,2*}

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

2. Hebei Provincial Hospital of TCM, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the intervention effect of modified Shengjiangsan in rats with membranous nephropathy (MN) and its related mechanism. **Method:** Rats were injected with cationized bovine serum Albumin (C-BSA) in the tail vein to establish a rat model of membranous nephropathy. The normal group, model group, modified Shengjiangsan group (27.3 g·kg⁻¹) and benazepril group (10 mg·kg⁻¹) were established in this study. Each group was given corresponding dosage of the drug once a day for 4 weeks of continuous intervention. After the administration, the levels of 24-hour urine protein (UTP), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), total protein (TP), Albumin (Alb), creatinine (SCr), urea nitrogen (BUN) level

[收稿日期] 20200514(003)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(2019423037);河北省中医药管理局资助项目(2018024)

[第一作者] 高飞,在读博士,从事中西医结合肾病研究, E-mail: 595363137@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, E-mail: 1955981973@qq.com

was detected. we observed the pathological changes of rat kidneys by the technology of Masson staining, silver hexylamine iodate (PASM) staining and transmission electron microscopy. immunofluorescence technology was used to detect immunoglobulin (Ig)G deposition in rat kidneys. Western blot was used to detect the expression levels of key proteins in phosphatidylinositol 3-kinase/proline protein kinase B/rapamycin target protein (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway and autophagy marker proteins LC3 and Beclin1. **Result:** Compared with normal group, the UTP, serum TC and TG levels were significantly increased, TP and Alb levels were significantly reduced in model group ($P<0.05$). We detected the kidney pathological changes include of glomerulus enlargement, basement membrane thickening, vacuolar degeneration, pheotropin deposition, glomerular capillary loop IgG diffuse deposition, electron dense deposits of varying sizes and podocytes under the epithelium extensive integration of foot processes, the expression of p-PI3K, p-Akt and p-mTOR protein was significantly increased ($P<0.05$). The expression of autophagy marker proteins LC3 and Beclin1 protein decreased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the UTP, serum TC and TG levels were decreased in the benazepril group and modified Shengjiangsan group, and the TP and Alb levels were increased ($P<0.05$), the histopathological changes of rat kidney were all reduced, the expression of p-PI3K, p-Akt and p-mTOR protein was significantly reduced ($P<0.05$), autophagy marker proteins LC3 and Beclin1 protein expression were significantly increased. **Conclusion:** Modified Shengjiangsan can reduce urinary protein, reduce kidney pathological damage and delay disease progression, which is related to its inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and activation of renal autophagy.

[Key words] modified Shengjiangsan; membranous nephropathy; phosphatidylinositol-3kinase/proline protein kinase B/rapamycin target protein (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway; autophagy

膜性肾病(MN)是一种常见的肾小球疾病,是成年人肾病综合征最常见的原因之一^[1]。MN的发病率约占全球原发性肾小球肾炎的10%,在西方国家甚至超过30%^[2-3]。在过去的十年中,我国MN的发病率呈明显上升趋势,MN将会超过免疫球蛋白(Ig)A肾病成为我国发病率最高的原发性肾小球疾病^[4-5],由此引发的慢性肾脏病对社会和家庭造成严重负担。目前,治疗MN尚无特效药物。降血压和减轻水肿是MN管理的核心,激素和免疫抑制的使用可能会对患者造成不必要的伤害^[6]。因此,寻求更加安全、有效的治疗药物或方法势在必行。

自噬是一种极其保守的细胞过程,当细胞处在饥饿、缺氧、氧化应激等条件下,自噬机制被激活以维持细胞内稳态^[7]。有研究表明,MN患者的自噬水平异常,MN大鼠足细胞自噬处于高水平,特发性MN所致的足细胞损伤与自噬相关,多项研究证实自噬参与了MN的发生和发展^[8-10]。雷帕霉素靶蛋白(mTOR)作为自噬的主要负调控因子,受到越来越多的关注^[11]。mTOR是磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)相关激酶家族中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可控制细胞的生长、存活和代谢,受到PI3K/蛋白激酶B(Akt)信号通路的调控^[11]。而抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路,可以减轻MN大鼠足细胞损伤,升

高肾脏自噬水平,保护MN大鼠肾功能^[12]。

升降散加味黄芪、淫羊藿、土茯苓在治疗MN方面有较为突出的作用,可改善MN患者的临床症状,降低尿蛋白水平^[13]。实验研究证实其可抑制足细胞凋亡,修复受损足细胞,发挥肾保护作用^[14]。前期预实验结果显示其可抑制MN肾组织细胞自噬活性,延缓MN进展,故本研究以PI3K/Akt/mTOR信号通路为靶向,进一步深入探讨加味升降散治疗MN的机制,为MN的防治提供更多的科学证据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠60只,8周龄,体质量(150±20)g,购自河北医科大学实验动物中心,合格证号SCXK(冀)2018-004。所有大鼠均在河北中医学科学院SPF级实验动物中心环境中饲养,普通饲料喂养,自由进食及饮水。本动物实验经由河北中医学科学院动物伦理委员会批准。

1.2 药物 盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司生产,批号H20030514);加味升降散由大黄10g,僵蚕10g,姜黄12g,蝉蜕5g,土茯苓20g,黄芪30g,淫羊藿10g组成,由河北省中医院药剂科进行相当量换算后改为相应颗粒制剂:大黄批号9065783,炒僵蚕批号9060603,姜黄批号9040873,蝉蜕批号9052093,土茯苓批号9075843,黄芪批号

9080283, 炙淫羊藿批号 9055023, 由广东一方制药有限公司提供。

1.3 试剂 阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA, 美国 Chondrex 公司, 货号 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), 总蛋白(TP), 白蛋白(Alb), 肌酐(SCr), 尿素氮(BUN), 24 h 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, 20180902, 20180614, 20181003, 20190515, 20180706); 兔抗免疫球蛋白(Ig)G(H+L)FITC 抗体(美国 Invitrogen 公司, 批号 A18746); 兔来源一抗 PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR(美国 CST 公司, 批号分别为 4257S, D0615, 4685S, 4060S, 2983S, 5536P); 兔来源一抗 LC3, Beclin1(英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab192890, ab62557); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(中杉金桥生物有限公司, 批号 16AF0207); 二抗(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号 sc-2357); 冷冻包埋剂(OCT, 德国莱卡公司, 批号 03812609); 马松(Masson)染色液, 碘酸六胺银(PASM)染色液(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 G1345, G1790); 锇酸(成都贝斯特公司, 批号 B00427002)。

1.4 仪器 7170A 型全自动生化仪, H-7650 型透射电镜(日本日立公司); Multiskan FC 型酶标仪, NanoDrop 2000 型紫外-可见分光光度计(美国 Thermo 公司); RM2015 型切片机, CM3050 冷冻切片机(德国徕卡公司); BX53 显微镜(日本奥林巴斯公司); Mini-PROTEAN 型电泳系统(美国伯乐公司); Mini Trans-Blot 转移系统(美国伯乐公司); Kodak Image Station 2000MM 成像系统(美国 Kodak 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 SD 大鼠 60 只适应性喂养 1 周后, 将大鼠随机分为造模组 45 只, 正常组 15 只。大鼠模型制备方法参照改良 Border 法^[15]。将 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ C-BSA 与等量弗氏不完全佐剂混匀, 于大鼠腋下、腹股沟多点皮下注射 0.1 mL 乳液进行预免疫, 隔日 1 次, 共 3 次。正式免疫将 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ C-BSA 与等体积磷酸盐缓冲液(PBS)混匀后于大鼠尾静脉注射, 每次 0.5 mL , 每周 3 次, 连续 4 周。正常组大鼠则在对应时间点尾静脉注射等体积的生理盐水。测量每只大鼠 UTP 水平, 以大鼠 $\text{UTP}\geq 20\text{ mg}$ 作为模型制备成功的标准, 同时随机选取造模组和正常组大鼠各 2 只, 包埋、固定, 光镜和电镜下观察肾脏组织病理

学确认造模成功^[14]。

2.2 分组及干预 将模型复制成功的大鼠随机分为模型组、贝那普利组、加味升降散组, 每组均保留 10 只。根据人与大鼠的体表面积折算等效剂量^[16]。贝那普利组及加味升降散组分别给予盐酸贝那普利 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 加味升降散 $27.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃, 正常组和模型组给予等体积生理盐水灌服。每日 1 次, 连续干预 4 周。使用代谢笼留取大鼠 24 h 尿液, 离心取上清液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。大鼠禁食水 12 h 后使用异氟烷吸入麻醉, 快速打开腹腔后腹主动脉取血, 离心后分离出血清, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用; 分离大鼠肾脏, 在冰袋上切取一部分肾皮质放于冻存管, 先存放于液氮罐, 快速转移到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用; 取一部分肾组织放于 4% 多聚甲醛中保存备用; 取一部分肾组织放于生理盐水中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用; 一部分肾组织放于 2.5% 的戊二醛溶液中保存备用。

2.3 血液生化指标检测及尿蛋白定量检测 使用全自动生化分析仪测定血液生化指标 TC, TG, TP, Alb, SCr, BUN 的含量, 采用双缩脲法进行 UTP 定量检测, 实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2.4 Masson, PASM 染色及透射电镜观察大鼠肾脏病理学变化 4% 多聚甲醛固定肾组织 48 h 后, 乙醇梯度浓度脱水, 使用二甲苯将组织透明、浸蜡、最后进行石蜡包埋。切成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 左右的薄片进行 Masson, PASM 染色; 将固定于 2.5% 的戊二醛溶液中的肾组织取出, 放于 PBS 中浸洗 3 次, 1% 锇酸固定, 丙酮逐级脱水, 丙酮树脂浸透包埋, 聚合、超薄切片, 乙酸双氧铀和酸铅双重染色, 透射电镜下观察并拍照。

2.5 免疫荧光法检测大鼠肾脏 IgG 沉积 将浸泡于生理盐水中的肾组织取出, 使用 OCT 包埋组织, 放于冰冻切片机中 $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 速冻 5~10 min, 切 $4\text{ }\mu\text{m}$ 薄片, 丙酮固定 5 min, PBS 浸洗 2 次, 在暗室中封闭免疫球蛋白(Ig)G 抗体(1:200), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 浸泡切片, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关分子及自噬相关指标 LC3 和 Beclin1 蛋白表达 研碎组织, 将其转移到无菌离心管中并做好标记。在离心管中加入 RIPA 裂解液, 按照试剂盒步骤提取组织总蛋白, 测定各组蛋白浓度, 取总蛋白 $50\text{ }\mu\text{g}$ 与 Loading buffer 混合后 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 使用 10% SDS-PAGE 凝胶 90 V 恒压电泳 2 h, 之后进行 250 mA 恒流 PVDF 转膜 60 min。将 PVDF 膜放在 5% BSA $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h, 加入稀释

好的一抗PI3K(1:2 000), p-PI3K(1:2 000), Akt(1:2 000), p-Akt(1:1 000), mTOR(1:2 000), p-mTOR(1:3 000), LC3(1:2 000), Beclin1(1:2 000), β -actin(1:5 000), 4 °C孵育过夜。洗膜后加入稀释过的二抗(1:5 000), 37 °C孵育1 h。洗膜后使用ECL法显色, 用Image J软件分析条带的灰度值, 以目的蛋白条带/ β -actin条带灰度比值作为最终结果。

2.7 统计学处理 采用SPSS 13.0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, 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24 h尿蛋白水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠UTP水平明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 加味升降散和盐酸贝那普利组大鼠UTP水平明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表2 加味升降散对膜性肾病大鼠血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of modified Shengjiangsan on serum biochemical parameters in rats with membranous nephropathy($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	Alb/g·L ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/ μ mol·L ⁻¹
正常	-	1.49±0.21	0.52±0.09	61.79±3.51	33.25±2.64	6.23±0.54	33.89±2.34
模型	-	2.83±0.43 ¹⁾	1.43±0.45 ¹⁾	45.37±4.14 ¹⁾	23.97±3.13 ¹⁾	6.47±1.45	35.16±2.76
加味升降散	27.3	1.93±0.23 ²⁾	0.71±0.13 ²⁾	57.68±4.71 ²⁾	29.49±2.27 ²⁾	6.54±0.68	33.67±2.62
贝那普利	0.001	2.02±0.26 ²⁾	0.78±0.11 ²⁾	56.68±4.56 ²⁾	28.61±2.62 ²⁾	6.61±0.73	33.52±2.56

3.3 对MN大鼠肾脏病理学改变的影响 正常组大鼠肾小球结构完整, 基底膜未见异常, 未见嗜复红蛋白沉积, 未见IgG和电子致密物沉积; 模型组大鼠肾小球增大, 基底膜出现不同程度的增厚和空泡变性, 嗜复红蛋白沉积, 肾小球毛细血管袢IgG弥漫性沉积, 上皮下可见大小不等的电子致密物沉积, 足细胞足突广泛融合。与正常组比较, 模型组大鼠肾脏病理学改变明显, 提示MN造模成功。经加味升降散和盐酸贝那普利干预后, 大鼠肾组织病理学改变均有所减轻。见图1~4。

3.4 对PI3K/Akt/mTOR信号通路蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织中 p-PI3K, p-Akt, p-mTOR蛋白表达量显著增加, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt和 p-mTOR/mTOR明显增大($P < 0.05$); 与模型组比较, 加味升降散和贝那普利组大鼠肾组织中 p-PI3K, p-Akt和 p-mTOR蛋白表达量明显降低, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt和 p-mTOR/mTOR明显减少($P < 0.05$)。见图5, 表3。

3.5 对自噬相关蛋白LC3和Beclin1蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织中自噬相关

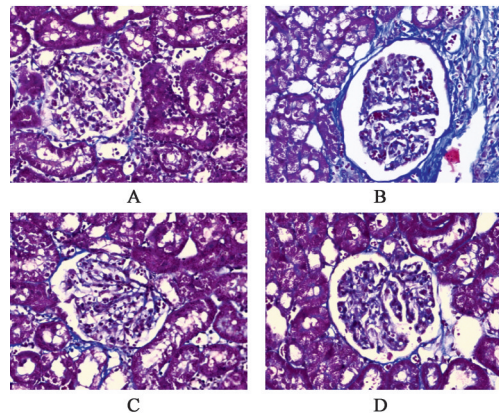
表1 加味升降散对MN大鼠24 h尿蛋白定量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of modified Shengjiangsan on quantitation of urinary protein in MN rats for 24 hours($\bar{x} \pm s, n=10$) mg

组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前	造模后	给药后
正常	-	6.44±0.79	6.87±0.78	7.42±0.89
模型	-	6.38±0.77	54.80±11.41 ¹⁾	63.41±12.63 ¹⁾
加味升降散	27.3	6.01±0.85	57.31±11.22	23.27±6.17 ²⁾
贝那普利	0.001	6.96±0.73	56.64±10.86	26.45±6.56 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表2~4同)。

3.2 对膜性肾病大鼠血清生化指标的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清中TC, TG水平明显升高, TP, Alb水平明显降低($P < 0.05$), BUN, SCr水平无明显改变; 与模型组比较, 贝那普利组和加味升降散组大鼠血清中TC, TG水平有不同程度的下降, TP, Alb水平有不同程度的升高($P < 0.05$), BUN, SCr水平无明显改变。见表2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 加味升降散组; D. 盐酸贝那普利组 (图2~6同)

图1 加味升降散对MN大鼠肾脏病理学改变的影响(Masson, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of modified Shengjiangsan on renal pathological changes in MN rats (Masson, $\times 200$)

蛋白LC3-II和Beclin1蛋白表达显著降低, LC3-II/LC3-I明显减小($P < 0.05$); 与模型组比较, 加味升降散组和盐酸贝那普利组大鼠肾组织中自噬相关蛋白LC3和Beclin1蛋白表达量显著升高, LC3-II/LC3-I明显增大($P < 0.05$)。见图6, 表4。

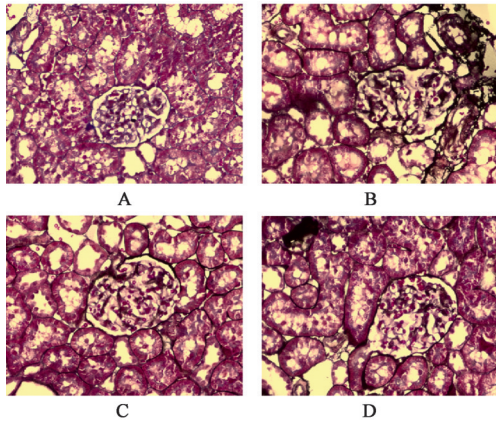


图2 加味升降散对MN大鼠肾脏病理学改变的影响(PASM, ×200)
Fig. 2 Effect of modified Shengjiangsansan on renal pathological changes in MN rats (PASM, ×200)

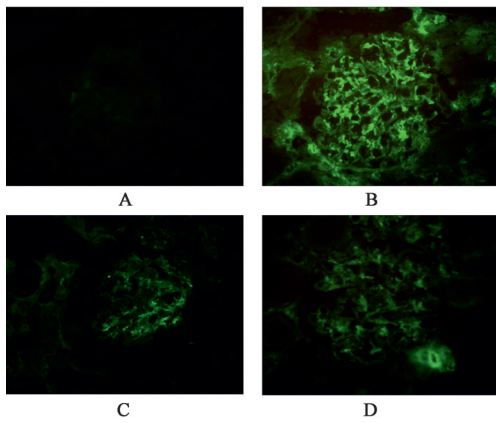


图3 加味升降散对MN大鼠肾脏病理学改变的影响(免疫荧光, ×200)
Fig. 3 Effect of modified Shengjiangsansan on renal pathological changes in MN rats (IF, ×200)

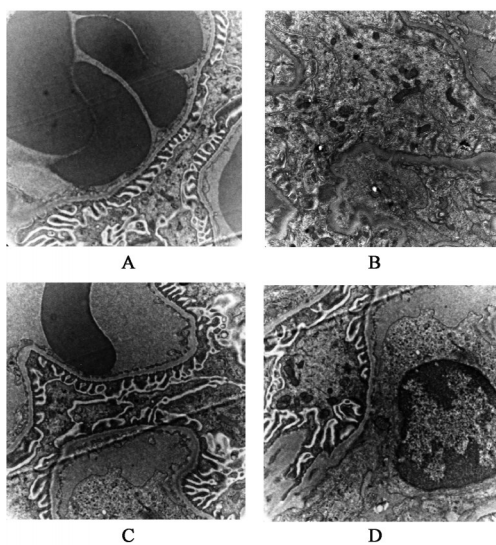


图4 加味升降散对MN大鼠肾脏病理学改变的影响(透射电镜, ×20 000)
Fig. 4 Effect of modified Shengjiangsansan on renal pathological changes in MN rats (TEM, ×20 000)

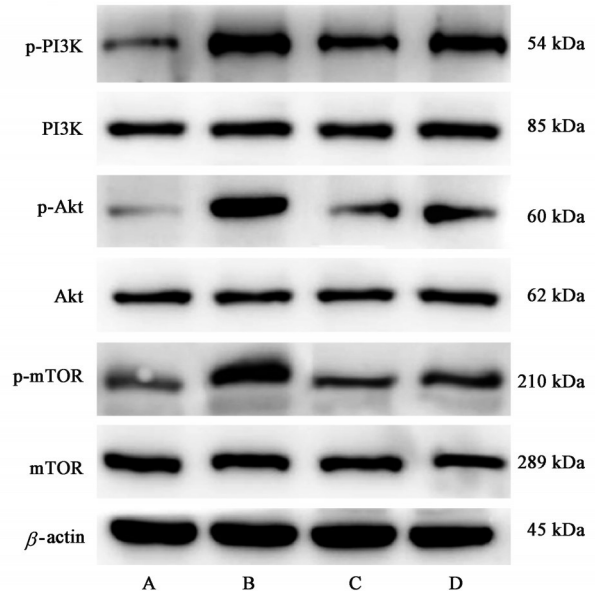


图5 大鼠PI3K/Akt/mTOR信号蛋白的表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of expression of PI3K/Akt/mTOR Signal protein in rats

表3 加味升降散对PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 3 Effect of modified Shengjiangsansan on PI3K/Akt/mTOR signal pathway($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
正常	-	0.36±0.02	0.14±0.01	0.47±0.04
模型	-	1.13±0.10 ¹⁾	1.47±0.13 ¹⁾	1.04±0.08 ¹⁾
加味升降散	27.3	0.78±0.07 ²⁾	0.63±0.07 ²⁾	0.55±0.06 ²⁾
贝那普利	0.001	0.88±0.08 ²⁾	0.84±0.06 ²⁾	0.85±0.08 ²⁾

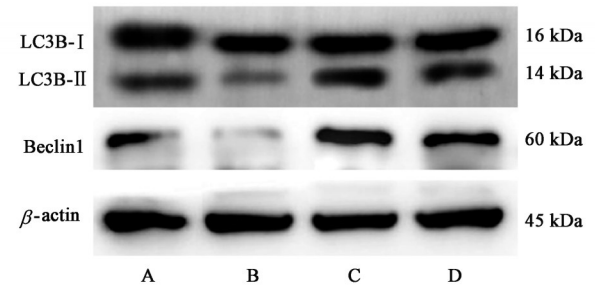


图6 大鼠自噬相关蛋白LC3和Beclin1的表达电泳
Fig. 6 Electrophoresis of expression of LC3 and Beclin1 in rats

表4 加味升降散对LC3和Beclin1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 4 Effect of modified modified Shengjiangsansan on protein expression of LC3 and Beclin1($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LC3- II /LC3- I	Beclin1 /beta-actin
正常	-	0.44±0.03	0.34±0.02
模型	-	0.22±0.01 ¹⁾	0.05±0.01 ¹⁾
加味升降散	27.3	0.57±0.05 ²⁾	0.58±0.05 ²⁾
贝那普利	0.001	0.51±0.04 ²⁾	0.50±0.04 ²⁾

4 讨论

MN是成年人肾病综合征的主要病因,其发病率呈逐年增高趋势,对患者的生活产生了严重影响,亟待有效药物来改善预后,提高生活质量^[1-2]。对于MN的治疗,雷公藤、他克莫司、环孢素等免疫抑制剂在一定程度上可降低患者尿蛋白水平,缓解临床症状,但在劳累、停药后易复发,而且长期用药,容易导致感染、骨髓移植等不良反应的发生。使用近年来,越来越多的证据表明,中医药可显著提高MN的临床疗效,减少长期使用西药带来的副作用,受到越来越多医师的青睐。

MN属于中医“水肿”“尿浊”等范畴^[14,17]。MN多因脾肾亏虚,脾不运湿,肾不主水,湿浊内生;加之外感湿浊,内外相合,湿浊不化,阻遏气机,气滞血瘀,以致肾络瘀阻。湿浊瘀血等病理产物堆积,表现为肾小球基底膜增厚、上皮下免疫复合物沉积;湿浊瘀血等病理产物损害正常组织结构,表现为足细胞损伤、细胞数量减少;疾病进一步发展则瘢痕形成,表现为肾小球硬化、肾间质纤维化^[13]。根据MN“脾肾亏虚、肾络瘀阻”的病机特点,檀金川教授使用升降散加味加味黄芪、淫羊藿、土茯苓治疗MN,临床疗效显著^[13]。方中黄芪、淫羊藿健脾补肾以治本。僵蚕、蝉蜕、姜黄、大黄升清降浊,行气活血以治标。同时使用土茯苓加强化浊解毒之功,诸药合用,补脾健运消水肿,补肾固精止尿浊,行气活血化瘀滞。

MN的病理特征是免疫复合物沿肾小球基底膜沉积、毛细血管基底膜增厚、“钉突”形成,其临床主要表现为肾病综合征或无症状性蛋白尿^[18]。C-BSA通过静电作用与肾小球上皮阴离子结构结合,并作为一种植入抗原,随后在原位形成免疫复合物,模拟了MN的病理表现^[19]。本研究结果显示,大鼠尾静脉注射C-BSA会导致明显的蛋白尿和低蛋白血症。病理学分析显示,模型组大鼠肾小球增大,毛细血管壁不规则增厚,嗜复红蛋白沉积。为了进一步观察肾小球超微结构,研究者进行透射电镜检查,这也是临床诊断MN的金标准。结果显示模型组大鼠肾小球上皮可见大小不等的电子致密物沉积,足细胞足突广泛融合,基底膜明显增厚。而经加味升降散干预后,MN大鼠肾组织病理损伤均有不同程度的改善。

研究表明,自噬在MN及糖尿病肾病等多种慢性肾脏病的发生和发展中起着核心作用^[20-21]。正常的肾功能需要自噬,其可作为为肾小管上皮细胞和

足细胞的内源性保护机制,肾脏中的细胞自噬可以防止肾脏细胞损伤^[22]。相反,缺失关键自噬调节蛋白基因的小鼠会出现足细胞和肾小管功能障碍,肾小球和肾小管间质损伤。研究发现,I期或II期MN患者肾脏足细胞内自噬体数量均较健康人肾组织明显减少,且与病理分期呈正相关,同时自噬标志蛋白Beclin1,LC3表达下调,提示MN疾病进展与细胞自噬水平存在相关性^[8,23]。鲍丽等^[24]研究发现MN疾病早期足细胞自噬处于较高水平,后期自噬水平下降,细胞凋亡明显。杨凤杰^[25]研究发现,雷帕霉素可通过增强细胞自噬水平,减轻MN大鼠肾脏病理损伤,减少足细胞凋亡,减轻大鼠蛋白尿。相反,自噬抑制剂6-氨基-3-甲基嘌呤(3-MA)可逆转这一过程。因此,深入研究自噬对MN调控机制,挖掘具有调控自噬作用的药物可为疾病的防治提供新方法或新靶点。

自噬的代谢调控需要mTOR途径^[20]。作为该途径中的主要调节蛋白,mTOR与G蛋白 β 亚基样蛋白(G β L/mLST8),40 kDa大小的富含Akt底物蛋白(PRAS40),mTOR调节相关蛋白(Raptor)共同构成mTOR复合体1(mTORC1),参与自噬的负向调控^[22]。mTORC1作为自噬起始的主要调节子,受多种上游信号通路调节,其中PI3K/Akt信号通路发挥十分重要的作用。PI3K通过合成磷脂酰肌醇-3,4-二磷酸(PI-3,4-P2)和磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PI-3,4,5-P3),招募含有PH结构域的蛋白如3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(PDK1)或其下游靶标Akt,反过来激活mTORC1,抑制细胞自噬,发挥负向调节自噬过程的作用^[26]。此外,Akt也能直接磷酸化PRAS40激活mTORC1^[27]。MN大鼠肾脏中PI3K/Akt/mTOR信号通路被激活,进而抑制mTORC1,降低大鼠肾脏自噬水平,可引起大鼠肾脏系膜细胞增殖、胞外基质积聚等多种肾脏病理损伤。此外,PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活可促进MN大鼠肾纤维化的发生和发展^[19]。本研究结果显示:模型组大鼠肾组织p-PI3K,p-Akt,p-mTOR的表达与正常对照组比较显著增加,而LC3,Beclin1较正常对照组明显降低。而经加味升降散干预后,MN大鼠肾组织p-PI3K,p-Akt,p-mTOR表达显著减少,而LC3,Beclin1蛋白表达明显增加,提示加味升降散可抑制MN大鼠肾组织PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活,提高肾脏自噬标志蛋白水平。

综上所述,加味升降散通过减少尿蛋白,减轻肾小球基底膜免疫复合物沉积和基底膜增厚等肾

脏损伤,延缓MN的进展,这与其抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路和激活肾脏自噬有关。

[参考文献]

- [1] 向玲,邓跃毅,刘旺意,等. 邓跃毅教授活血化痰法治疗膜性肾病经验荟萃[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(3): 189-191.
- [2] CATTRAN D C, BRENCHLEY P E. Membranous nephropathy: integrating basic science into improved clinical management [J]. *Kidney Int*, 2017, 91 (3) : 566-574.
- [3] TIAN R, WANG L, CHEN A, et al. Sanqi oral solution ameliorates renal damage and restores podocyte injury in experimental membranous nephropathy via suppression of NF- κ B [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 1-8.
- [4] 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.
- [5] MCQUARRIE E P, STIRLING C M, GEDDES C C. Idiopathic membranous nephropathy and nephrotic syndrome: outcome in the era of evidence-based therapy [J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2012, 27 (1) : 235-242.
- [6] BECK L, BOMBACK A S, CHOI M J, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2013, 62(3): 403-441.
- [7] WU L, FENG Z, CUI S, et al. Rapamycin upregulates autophagy by inhibiting the mTOR-ULK1 pathway, resulting in reduced podocyte injury [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): 1-10.
- [8] LIANG S, JIN J, GONG J, et al. How many podocyte autophagosomes are there in immunoglobulin A nephropathy and idiopathic membranous nephropathy [J]. *Int Urol Nephrol*, 2016, 48(12): 1-6.
- [9] JIN J, HU K, YE M, et al. Rapamycin reduces podocyte apoptosis and is involved in autophagy and mTOR/P70S6K/4EBP1 signaling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(2): 765-772.
- [10] 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.
- [11] SAXTON R A, SABATINI D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease [J]. *Cell*, 2017, 168 (6): 960-976.
- [12] 林劲, 欧阳辉, 梁春玲, 等. 白芍总苷对膜性肾病大鼠肾脏保护作用及自噬的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(9): 1025-1031.
- [13] 杜昕, 刘明, 檀金川. 加味升降散治疗膜性肾病的临床观察 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(10): 115-117.
- [14] 刘欣. 加味升降散对膜性肾病大鼠的肾保护作用及对肾组织CXCL16、FcRn表达的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [15] 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.
- [16] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 202-203.
- [17] 骆琳, 刘建华, 吴丽娜. 特发性膜性肾病预后影响因素的研究进展 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2019, 35(1): 70-76.
- [18] LIN T, WU V C, WANG C. Autophagy in chronic kidney diseases [J]. *Cells*, 2019, 8(1): 1-20.
- [19] CHOI M E. Autophagy in kidney disease [J]. *Annu Rev Physiol*, 2020, 82(1): 297-322.
- [20] YANG D, LIVINGSTON M J, LIU Z, et al. Autophagy in diabetic kidney disease: regulation, pathological role and therapeutic potential [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(4): 669-688.
- [21] 张筠, 丁婷, 唐东兴, 等. 雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠肾脏细胞自噬的影响及相关机制 [J]. *解剖学报*, 2020, 51(3): 373-377.
- [22] LAHIRI V, HAWKINS W D, KLIONSKY D J. Watch what you (Self-) eat: autophagic mechanisms that modulate metabolism [J]. *Cell Metab*, 2019, 29 (4) : 803-826.
- [23] 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.
- [24] 鲍丽, 么冬爱. 足细胞自噬在膜性肾病经典动物模型中的作用及其激活可能的细胞内机制研究 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2019, 22(3): 291-295.
- [25] 杨凤杰. 自噬保护被动Heymann肾炎大鼠足细胞的机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
- [26] 张新颖, 毛景东, 杨晓燕, 等. AMPK/mTOR信号通路的研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2019, 39 (3) : 109-116.
- [27] 舒婷, 万福生. PI3K/Akt/mTOR信号通路与自噬及肿瘤的关系 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(11): 1192-1196.

[责任编辑 孙丛丛]