

六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠线粒体凋亡途径的影响

胡爽¹, 何泽云^{2*}, 李旭华², 唐群¹, 董翔¹

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

[摘要] 目的:观察六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠线粒体凋亡途径的影响。方法:将45只雄性SD大鼠随机分为正常组(10只)、假手术组(10只)及手术组(25只),手术组进行5/6肾切除造模,造模成功后再随机分为模型组及治疗组。治疗组予以6.75 g·kg⁻¹六味地黄汤灌胃,其余3组予以等体积蒸馏水灌胃,各组均给药8周。检测各组大鼠血肌酐、尿素氮及尿蛋白定量水平;苏木素-伊红(HE),马松(Masson)染色观察肾组织形态学变化;电镜观察肾小管上皮细胞中线粒体超微结构变化;原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡;蛋白免疫印迹法(Western blot)及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分别检测肾组织B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),细胞色素C(Cyt C),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白及mRNA的表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠血肌酐、尿素氮及尿蛋白定量水平显著升高($P<0.01$),治疗组较模型组上述指标得到改善($P<0.05$);正常组及假手术组大鼠肾脏未观察到明显病理变化及线粒体结构破坏,模型组存在不同程度的肾小管萎缩和扩张,间质性炎性细胞浸润和胶原沉积,以及线粒体肿胀和断裂,治疗组较模型组上述病灶明显减轻;与正常组比较,模型组细胞凋亡显著增多($P<0.01$),Bax,Caspase-3表达显著升高($P<0.01$),Bcl-2表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,治疗组细胞凋亡显著减少($P<0.01$),Bax,Caspase-3表达显著降低($P<0.01$),Bcl-2表达显著升高($P<0.01$);正常组及假手术组Cyt C主要定位在线粒体,模型组细胞质中Cyt C表达显著增加($P<0.01$),治疗组较模型组细胞质中Cyt C表达显著减少($P<0.01$)。结论:六味地黄汤可减轻肾纤维化,延缓肾功能进展,其机制可能是通过保护线粒体结构及调控线粒体凋亡途径相关蛋白的表达减少细胞凋亡。

[关键词] 六味地黄汤;慢性肾脏病;肾纤维化;线粒体;细胞凋亡

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)22-0026-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201875

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200727.1009.005.html>

[网络出版日期] 2020-7-27 10:11

Effect of Liuwei Dihuangtang on Mitochondrial Apoptotic Pathway in Rats with Chronic Renal Failure

HU Shuang¹, HE Ze-yun^{2*}, LI Xu-hua², TANG Qun¹, DONG Xiang¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Liuwei Dihuangtang on the mitochondrial apoptotic pathway in rats with chronic renal failure. **Method:** The 45 male SD rats were randomly divided into normal group ($n=10$), sham group ($n=10$) and operation group ($n=25$). The operation group received 5/6 nephrectomy, and the rats in operation group were randomly divided into the model group and the treatment group after successful modeling. The treatment group received Liuwei Dihuangtang by gavage administration, while the rest of the three groups received equal volume of distilled water by gavage administration, with a treatment course of 8 weeks. The quantitative levels of serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN) and

[收稿日期] 20200403(029)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81503442);研究生创新课题项目(2019CX13)

[第一作者] 胡爽,在读博士,从事慢性肾脏病的防治研究,E-mail:229633726@qq.com

[通信作者] *何泽云,博士,主任医师,博士生导师,从事慢性肾脏病的中西医防治研究,E-mail:hzy2005@zju.edu.cn

urine protein in each group were determined. Hematoxylin eosin (HE) staining and Masson staining were used to observe the histopathological changes of rat kidney. The structural changes of mitochondria in renal tubular epithelial cells were observed under electron microscope. The apoptotic rate was detected by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL). The expression of B cell lymphoma -2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cytochrome C (Cyt C) and cysteine aspartic acid protease -3 (Caspase-3) were analyzed by Western blot and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** As compared with the normal group, the quantitative levels of SCr, BUN and urinary protein in the model group were significantly increased ($P<0.01$), and the above indicators were improved in the treatment group as compared with the model group ($P<0.05$). No significant pathological changes and damage of mitochondrial structure were observed in the kidney tissues of the control group and the sham group. In the model group, there were different degrees of renal tubular atrophy and dilatation, interstitial inflammatory cell infiltration and collagen deposition, and mitochondria swelling and breaking, but such lesions were significantly alleviated in the treatment group. As compared with the normal group, apoptotic rate was increased significantly in model group ($P<0.01$), the expression of Bax and Caspase-3 was significantly increased ($P<0.01$), and the expression of Bcl-2 was significantly decreased ($P<0.01$). As compared with the model group, apoptotic rate was significantly reduced in the treatment group ($P<0.01$), the expression of Bax and Caspase-3 was significantly decreased ($P<0.01$), and the expression of Bcl-2 was significantly increased ($P<0.01$). In the normal group and sham group, Cyt C was mainly located in mitochondria. The expression of Cyt C in the cytoplasm of the model group was increased significantly ($P<0.01$), while that of the treatment group was decreased ($P<0.01$). **Conclusion:** Liuwei Dihuangtang can alleviate renal fibrosis and delay the progression of renal function. The mechanism of reducing apoptosis may be associated with protecting mitochondrial structure and regulating the expression of proteins related to mitochondrial apoptotic pathway.

[Key words] Liuwei Dihuangtang; chronic kidney disease(CKD); renal fibrosis; mitochondria; cell apoptosis

最新流行病学结果显示,2017年全球慢性肾脏病(CKD)患者高达6.975亿,占全球人口9.1%,其中几乎1/3的患者在中国(1.323亿)和印度(1.151亿)^[1]。肾纤维化是所有慢性肾脏疾病进展至终末期不可避免的结果,其发生机制复杂,受到多种细胞因子和复杂的信号通路之间相互作用的影响,目前没有有效的方法来预防肾纤维化的发生与发展,因此有必要提高对肾纤维化进展的细胞和分子机制的认识,以实现肾纤维化的逆转或消除。已经报道的3种细胞凋亡信号转导途径,即死亡受体途径、线粒体途径、内质网途径,均参与了肾纤维化的发生与发展,其中线粒体介导的细胞凋亡已经在多种动物模型(如5/6肾切除、单侧输尿管梗阻等)中得到证实,抑制该途径可明显缓解肾小管上皮细胞损伤和肾间质纤维化^[2-3]。

中药已被证实可有效减轻肾纤维化程度^[4],六味地黄汤是临床运用最广的治疗CKD的经典方剂之一,前期研究发现其可多靶点抗肾纤维化,如抗氧化应激^[5]、抗炎症反应^[6]等。目前,基于线粒体调

亡途径的深入研究较少,推测六味地黄汤可能通过调控线粒体凋亡途径缓解肾小管损伤,延缓肾纤维化。基于此,本研究以5/6肾切除大鼠为研究平台,观察线粒体凋亡途径的动态变化及六味地黄汤的干预作用,阐述六味地黄汤通过抑制线粒体凋亡途径发挥其抗肾纤维化的分子机制,为六味地黄汤的临床运用提供更全面的理论支撑。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠45只,体质量130~170 g,全部购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号SYXK(湘)2013-0005。动物饲养在湖南中医药大学实验动物中心(SPF级),适应性喂养1周,自由进食进水,环境温度(23±2)℃,相对湿度45%~55%,人工12 h明暗循环。该研究获得湖南中医药大学伦理委员会批准。

1.2 药品制备 六味地黄汤的组方药物(熟地黄24 g,山药12 g,山茱萸12 g,牡丹皮9 g,茯苓9 g,泽泻9 g)全部购于湖南中医药大学第一附属医院门诊中药房,并由该院制剂中心主任左亚杰教授鉴定为

正品。每1剂含生药75 g,先用药材总质量5倍量的蒸馏水将药材浸泡2 h,然后武火煮沸改文火煎煮30 min,收集1煎液;再向药渣中加入适量蒸馏水煎煮第2次,收集2煎液,将2次煎液混匀在水浴恒温器上浓缩至含生药 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3 试剂 B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),细胞色素C(Cyt C),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),细胞色素C氧化酶IV(COX IV)多克隆抗体,兔二抗(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为CSB-PA000983,CSB-PA000976,CSB-PA209356,CSB-PA001231,CSB-PA00509A0Rb,CSB-PA564648); β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体,苏木素染色液,伊红染色液,BCA试剂盒(北京白鲨易科技有限公司,批号分别为BL005B,BL702A,BL703A,BL521A);马松(Masson)三色染色液(北京雷根生物科技有限公司,批号DC0032);原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(美国Roche Life Science公司,批号11684817910);trizol,cDNA逆转录试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为15596026,K1622);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本Takara公司,批号RR820A)。

1.4 仪器 RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司);BA410型生物显微镜(中国Motic公司);Eppendorf5810R/5424R型高速冷冻离心机,Realplex 2型Real-time PCR仪(德国Eppendorf公司);Spectra Max 12型GENios plate-reader酶标仪(美国Tecan公司);Mini-Protean型电泳仪,Criterion型转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及干预 将45只大鼠随机分为正常组(10只)、假手术组(10只)及手术组(25只)。手术组进行5/6肾切除造模^[7],假手术组仅同步打开腹腔、暴露肾脏,但不行切除术。造模过程中手术组死亡1只大鼠(腹腔感染,大量腹水)。造模后2周,手术组大鼠眼眶内眦采血测血肌酐水平,根据血肌酐水平将造模成功的所有存活大鼠随机分为模型组(12只)及治疗组(12只)。治疗组予以六味地黄汤灌胃,根据成人临床推荐剂量(60 kg成人每天75 g),按体表面积折算,每只大鼠每日给药剂量为 $6.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,因为没有明确对慢性肾衰竭细胞凋亡有干预作用的阳性药物,因此本实验未设阳性药物;其余3组用等体积的蒸馏水灌胃。各组

连续灌胃8周。干预过程中模型组死亡1只大鼠(死亡原因不明)。

2.2 标本处理及收集 收集24 h尿液及腹主动脉采血用于血肌酐(SCr),血清尿素氮(BUN),白蛋白(ALB),24 h尿蛋白生化指标检测,全部指标于湖南中医药大学第一附属医院检验科完成检测。收集每只大鼠肾脏组织,每个肾脏冠状切为2部分,一部分固定于4%多聚甲醛中,用于病理染色及凋亡检测;一部分放入冷冻管中,放入液氮中迅速冻存后保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,用于蛋白免疫印迹法(Western blot)和Real-time PCR检测;取少部分组织固定于2.5%戊二醛中用于电镜观察。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色及Masson三色染色 观察肾脏组织病理变化 取大小约 $4\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ 的肾脏组织,脱水、透明后石蜡包埋制成蜡块,使用轮转石蜡切片机切成厚度约 $3\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ 的切片,HE及Masson染色后在200倍光学显微镜下观察肾脏组织的超微结构变化并摄取图片。

2.4 电镜观察肾小管上皮细胞线粒体超微结构变化 从固定液中取体积约 1 mm^3 的组织用磷酸盐缓冲液(PBS)溶液漂洗30 min,再用1%锇酸固定1~2 h后再次漂洗30 min,用不同浓度的乙醇进行脱水后包埋,切成 $50\sim 70\text{ nm}$ 的超薄切片,用醋酸铀和枸橼酸铅对切片进行双重染色,最后在透射电镜下观察和摄片。

2.5 TUNEL检测肾组织细胞凋亡率 采用TUNEL法检测肾组织细胞凋亡率,凋亡细胞核固缩呈绿色,为圆形、新月形或不规则形,Image-Pro Plus 6.0软件对每张照片进行分析得出每张照片阳性细胞的比率(阳性细胞数/总细胞数)即为凋亡率。

2.6 Western blot检测Bax,Bcl-2,Cyt C,Caspase-3蛋白表达 分别提取肾组织总蛋白、细胞质蛋白及线粒体蛋白,BCA法测各部分蛋白浓度,配制SDS-PAGE凝胶(12%分离胶及5%浓缩胶),上样完毕后开始电泳、转膜、封闭,加入一抗(Bcl-2,Bax,Caspase-3,Cyt C, β -actin均为1:1 000,COX IV 1:4 000),放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱摇床上过夜,室温摇床上复温30 min后加入二抗(1:4 000)孵育1 h,最后用PBST溶液清洗(3次,每次15 min)后进行显影。用Image J软件进行灰度分析,计算目标蛋白的相对灰度值=目标蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

2.7 Real-time PCR检测Bax,Bcl-2,Cyt C,Caspase-3 mRNA表达 参考trizol试剂说明书提取肾组织肾皮质的总RNA,测定RNA的浓度和纯

度。然后将RNA反转录为cDNA,反应体系为20 μL,反应条件为42 °C 1 h, 25 °C 5 min, 70 °C 5 min。再以cDNA作为模板进行PCR扩增,反应条件为预变性95 °C 3 min; 95 °C变性10 s, 58 °C退火30 s, 68 °C延伸20 s,共40个循环。每个样品独立检验,重复3个复孔,用 $\Delta\Delta C_t$ 法分析数据。以 β -actin作为内参基因,引物序列见表1,基因序列从Genebank中查阅,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.8 统计学分析 全部数据采用SPSS 22.0软件进行分析,均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料采用单因素方差分析检验,计量资料采用t检验或秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对慢性肾衰竭大鼠SCr, BUN, 24 h尿蛋白, ALB含量的影响 与正常组及假手术组比较,模型组SCr, BUN及24 h尿蛋白定量水平显著升高($P<$

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

| 引物 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|----------------|----------------------------|-------|
| β -actin | 上游 AGGCCCTCTGAACCCTAAG | 118 |
| | 下游 CCAGAGGCATACAGGGACAAC | |
| Bax | 上游 GTTTCATCCAGGATCGAGC | 155 |
| | 下游 AATCATCTCTGCAGCTCC | |
| Bcl-2 | 上游 GGGCTACGAGTGGGATACTGGAG | 94 |
| | 下游 TCGGTTGCTCTCAGGCTGGAAG | |
| Cyt C | 上游 ACCCGTGCTTCAGTGTGTG | 139 |
| | 下游 CAGTAAATGCCTTTCAGTGGTG | |
| Caspase-3 | 上游 GCACCCGGTTACTATTCCTG | 150 |
| | 下游 GGA CTCAAATTCGGTGGC | |

0.01), ALB水平显著下降($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄汤组SCr, BUN及24 h尿蛋白定量水平下降($P<0.05$), ALB水平升高($P<0.05$)。见表2。

表2 六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠SCr, BUN, 24 h尿蛋白, ALB含量的影响($\bar{x}\pm s$)

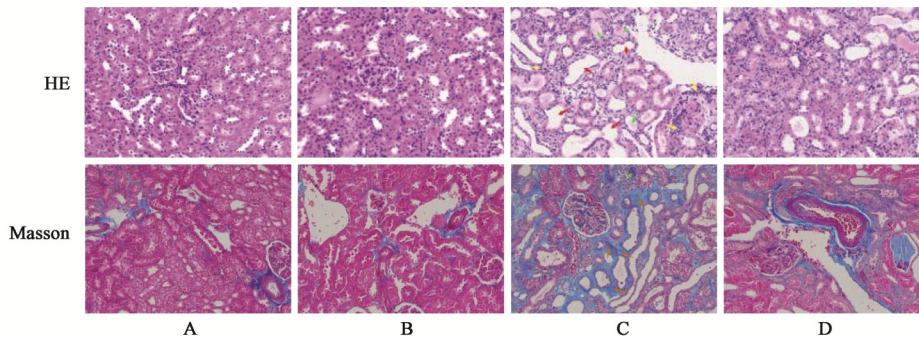
Table 2 Effect of Liuwei Dihuangtang on SCr, BUN, 24 h urinary protein, ALB content in rats with chronic kidney failure(CKF) ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 24 h尿蛋白/ $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ | ALB/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|-------|-----------------------|----|--|--------------------------------------|--|-----------------------------------|
| 正常 | - | 10 | 27.10 \pm 3.18 | 3.71 \pm 0.27 | 4.79 \pm 0.46 | 40.32 \pm 1.29 |
| 假手术 | - | 10 | 27.20 \pm 3.01 | 3.84 \pm 0.34 | 4.89 \pm 0.50 | 40.38 \pm 1.53 |
| 模型 | - | 11 | 73.36 \pm 5.10 ¹⁾ | 12.71 \pm 0.57 ¹⁾ | 23.10 \pm 0.60 ¹⁾ | 33.59 \pm 0.88 ¹⁾ |
| 六味地黄汤 | 6.75 | 12 | 49.75 \pm 6.12 ²⁾ | 8.55 \pm 0.53 ²⁾ | 20.62 \pm 0.53 ²⁾ | 37.11 \pm 1.17 ²⁾ |

注:与正常组及假手术组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表3~6同)。

3.2 对慢性肾衰竭大鼠肾组织病理学的影响 正常组及假手术组未见到明显病理学改变;模型组可见到明显肾小管空泡样变性,部分小管微绒毛脱

落,可见蛋白管型,肾间质可见到明显炎性细胞浸润和胶原沉积;与模型组比较,治疗组上述病变明显减轻。见图1。



A. 正常组; B. 假手术组; C. 模型组; D. 六味地黄汤(图2~5同)

图1 六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠肾组织病理学的影响($\times 200$)

Fig. 1 Effect of Liuwei Dihuangtang on renal histopathology in rats with CKF($\times 200$)

3.3 对慢性肾衰竭大鼠肾小管上皮细胞中线粒体结构的影响 电镜下观察到正常组及假手术组未见到明显异常,模型组肾小管上皮细胞中线粒体出现明显肿胀和片段化(图中红色箭头标记处);与模

型组比较,六味地黄汤组肾小管上皮细胞中线粒体结构损伤得到改善。见图2。

3.4 对慢性肾衰竭大鼠肾组织细胞凋亡的影响 与正常组及假手术组比较,模型组大鼠肾组织细

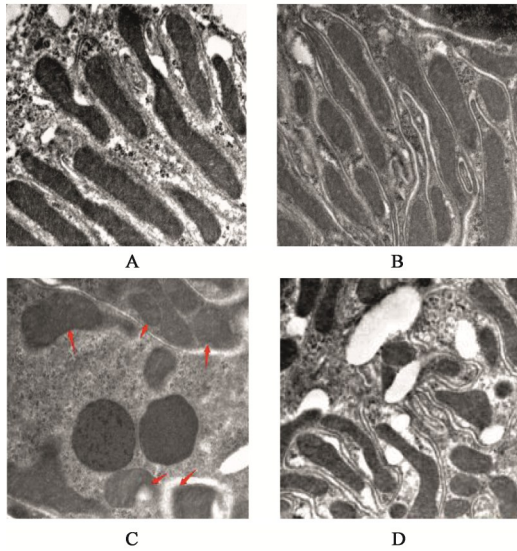


图2 六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠肾小管上皮细胞中线粒体结构的影响(电镜扫描, ×20 000)

Fig. 2 Effect of Liuwei Dihuangtang on mitochondrial structure in renal tubular epithelial cells in rats with CKF(SEM, ×20 000)

胞凋亡显著升高($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄汤组较模型组细胞凋亡显著降低($P<0.01$)。见图3,表3。

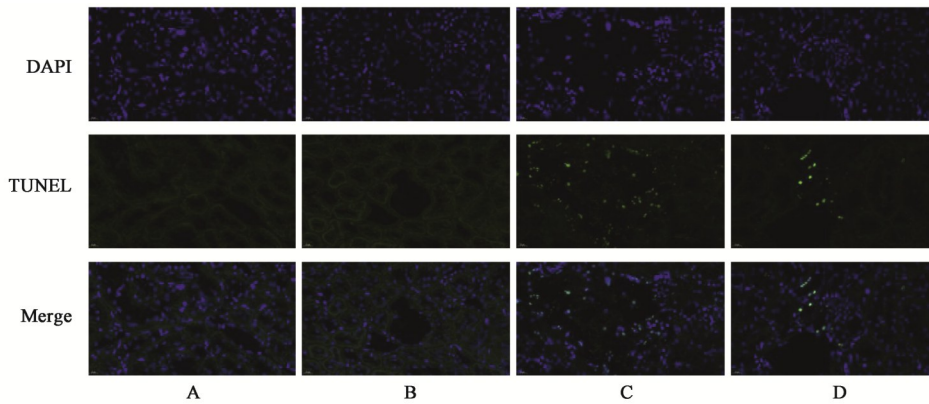


图3 六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠肾组织细胞凋亡的影响(TUNEL, ×400)

Fig. 3 Effect of Liuwei Dihuangtang on apoptosis in rats with CKF(TUNEL, ×400)

表4 六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠肾脏中 Bcl-2, Bax, Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of Liuwei Dihuangtang on protein expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in rats with CKF ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | Bcl-2/ β -actin | Bax/ β -actin | Caspase-3/ β -actin |
|-------|-----------------------|----|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 10 | 1.16±0.11 | 0.85±0.06 | 0.78±0.04 |
| 假手术 | - | 10 | 1.16±0.07 | 0.87±0.06 | 0.76±0.03 |
| 模型 | - | 11 | 0.44±0.02 ¹⁾ | 1.41±0.07 ¹⁾ | 1.18±0.07 ¹⁾ |
| 六味地黄汤 | 6.75 | 12 | 0.91±0.03 ³⁾ | 1.10±0.06 ³⁾ | 0.96±0.03 ³⁾ |

3.6 对慢性肾衰竭大鼠 Bax, Bcl-2, Cyt C 及 Caspase-3 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组 Bax, Cyt C, Caspase-3 mRNA 表达水平显著升

表3 六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠肾组织细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Effects of Liuwei Dihuangtang on apoptosis in rats with CKF ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | 细胞凋亡率/% |
|-------|-----------------------|----|--------------------------|
| 正常 | - | 10 | 0.41±0.29 |
| 假手术 | - | 10 | 0.59±0.37 |
| 模型 | - | 11 | 17.71±1.15 ¹⁾ |
| 六味地黄汤 | 6.75 | 12 | 4.06±1.30 ³⁾ |

3.5 对慢性肾衰竭大鼠肾脏中 Bcl-2, Bax, Caspase-3 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达显著升高($P<0.01$), Bcl-2 蛋白的表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,治疗组 Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达显著降低($P<0.01$), Bcl-2 蛋白的表达显著升高($P<0.01$)。见表4,图4。与正常组比较,模型组细胞质内 Cyt C 蛋白表达显著升高($P<0.01$),线粒体内 Cyt C 蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄汤组细胞质内 Cyt C 蛋白表达显著下降($P<0.01$),线粒体内 Cyt C 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。见表5,图5。

高($P<0.01$), Bcl-2 mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄汤组 Bax, Cyt C 及 Caspase-3 mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$),

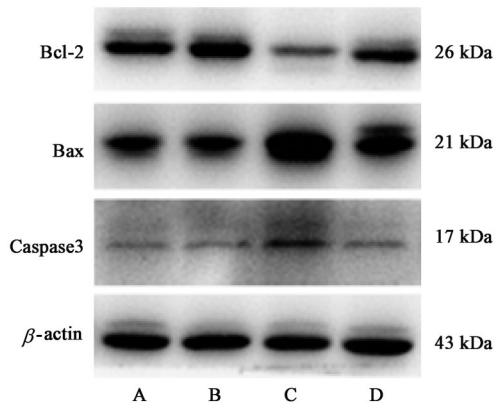


图 4 大鼠肾脏中 Bcl-2, Bax, Caspase-3 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein expression

表 5 六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠线粒体和细胞质中 Cyt C 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of Liuwei Dihuangtang on expression of Cyt C protein in mitochondria and cytoplasm in rats with CKF ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | 细胞质 Cyt C /β-actin | 线粒体 Cyt C /COXIV |
|-------|-----------------------|----|-------------------------|-------------------------|
| 正常 | - | 10 | 0.45±0.03 | 1.18±0.04 |
| 假手术 | - | 10 | 0.43±0.03 | 1.16±0.08 |
| 模型 | - | 11 | 0.89±0.08 ¹⁾ | 0.65±0.04 ¹⁾ |
| 六味地黄汤 | 6.75 | 12 | 0.63±0.06 ³⁾ | 1.01±0.05 ³⁾ |

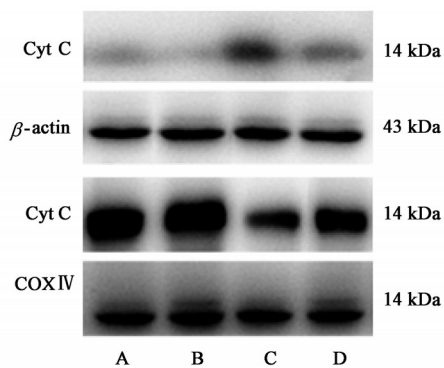


图 5 线粒体和细胞质中 Cyt C 蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of Cyt C protein expression in mitochondria and cytoplasm

Bcl-2 mRNA 表达水平显著升高, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 6。

表 6 六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠 Bax, Bcl-2, Cyt C 及 Caspase-3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of Liuwei Dihuangtang on mRNA expression of Bax, Bcl-2, Cyt C and Caspase-3 in rats with CKF ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | n | Bcl-2 | Bax | Caspase-3 | Cyt C |
|-------|-----------------------|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常 | - | 10 | 1.01±0.02 | 1.01±0.02 | 1.03±0.02 | 1.01±0.02 |
| 假手术 | - | 10 | 1.02±0.03 | 1.02±0.03 | 1.02±0.03 | 1.01±0.02 |
| 模型 | - | 11 | 0.27±0.03 ¹⁾ | 3.83±0.14 ¹⁾ | 3.42±0.13 ¹⁾ | 3.29±0.11 ¹⁾ |
| 六味地黄汤 | 6.75 | 12 | 0.64±0.04 ³⁾ | 2.58±0.10 ³⁾ | 1.57±0.09 ³⁾ | 1.55±0.08 ³⁾ |

4 讨论

线粒体是细胞内通过氧化磷酸化合成三磷酸腺苷(ATP)的主要场所,为细胞活动提供了95%的能量,并参与细胞分化、细胞信息传递和细胞凋亡等过程,拥有调控细胞生长和细胞周期的能力。氧化应激, Ca²⁺超载、基因表达异常等因素均可刺激线粒体使其发生功能障碍,引起线粒体膜电位下降,通透性在短时间内迅速增高,导致线粒体内凋亡相关因子释放至胞浆,最终引起细胞凋亡。研究表明诱导线粒体发生功能障碍,可促进肾纤维化的发生和细胞凋亡^[7]。在不同的肾脏疾病模型中,干预线粒体凋亡途径均显示出明显的肾脏保护作用^[8-10]。目前,基于线粒体凋亡途径深入探讨六味地黄汤抗肾纤维化机制的研究较少,本研究在前期研究基础上,丰富了六味地黄汤抗肾纤维化的机制,为临床运用六味地黄汤提供了更加全面的理论依据。

Bcl-2 家族是目前公认的线粒体凋亡途径的主要调节剂^[11],主要通过与其他调节线粒体外膜(MOM)通透性的相关蛋白结合而起作用。在生理情况下,以 Bax 为代表的促凋亡和以 Bcl-2 为代表的抗凋亡 Bcl-2 家族成员之间保持着微妙的动态平衡以决定细胞的存活或死亡^[12]。当细胞受到某些因素(如缺氧,癌基因激活, DNA 损伤等)刺激后,促凋亡效应蛋白激活并转移至线粒体外膜上导致其膜电位下降、通透性升高,线粒体内 Cyt C 等凋亡因子释放至细胞质中,引起 Caspase 家族的级联反应,最终导致细胞凋亡。研究表明诱导 Bcl-2 的表达可减少线粒体去极化,降低线粒体外膜通透性,从而减少 Cyt C 的释放,减少细胞凋亡^[13]。无论是在急性肾损伤模型^[14]还是慢性肾衰竭模型^[15]中,敲除近端肾小管上皮细胞中 Bax 和 Bak 基因,同样可以减少 Cyt C 的释放,减少肾小管上皮细胞凋亡,从而减少肾小管损伤。

5/6 肾切除大鼠或小鼠是目前广泛使用的肾衰竭模型,可有效模拟 CKD 肾功能不全和肾纤维化的特征^[16]。研究证实 5/6 肾切除术后 8~12 周模型动物

即可出现肾衰竭,表现为尿肌酐浓度降低,SCr, BUN水平升高,以及残存肾组织出现肾小管损伤、间质纤维化和炎症、血管周纤维化和血管增厚等病理改变^[17-19]。

慢性肾脏病可归纳为中医“虚劳”“腰痛”“水肿”“关格”“隆闭”等范畴,其病机多属“正虚邪实”,“正虚”以肾虚为主,被认为是肾纤维化发生的发病基础;“邪实”包括湿、浊、瘀、毒等,被认为是肾纤维化的病理基础。目前虚劳“正虚邪实”的病机特点已被大多数医家认可,并且形成共识,认为肾虚是肾纤维化形成的根本,贯穿于肾纤维化的始终^[20]。线粒体作为细胞的动力源以及多种细胞活动的枢纽,其发生功能障碍引起细胞凋亡时,即是“正气虚”时;缺血、缺氧、炎症反应等因素进一步引起肾脏细胞损伤、失用,导致肾纤维化,即是“邪气盛”时。

基于虚劳“正虚邪实”的病机特点,肾纤维化的中医治疗以“扶正祛邪”为原则,以达到祛邪不伤正,扶正不助邪。陈香美等^[21]采用多中心前瞻性研究方法,观察了286例IgA肾病中医证型分布规律及其与临床病理的关系,结果显示肝肾阴虚证病理变化较重。六味地黄汤是补肾滋阴的经典方剂,《医方论》曰:“有熟地之赋补肾水,既有泽泻之宣肾浊以济之;有萸肉之温涩肝经,既有丹皮之清泄肝火以佐之;有山药之收摄脾经,既有茯苓淡渗脾湿以和之。”6味中药合而成方共奏补中有泻,寓泻于补,为通补开合之剂,符合虚劳病“正虚邪实”需要扶正祛邪寓泻于补的病机特点。目前六味地黄汤是临床广泛用于治疗慢性肾脏病的有效药物,最近一项前瞻性队列研究结果表明使用中药治疗的CKD患者在12年的随访期内表现出更高的长期生存率,而六味地黄汤是治疗CKD最常用处方^[22],在慢性肾脏病中起到改善症状、延缓肾功能进展的功效^[23]。

研究发现模型组大鼠肾脏出现不同程度的肾小管萎缩和扩张、蛋白管型、肾间质炎性细胞浸润及胶原沉积,以及肾间质纤维化等病理变化,六味地黄汤干预后上述病变明显减轻。模型组大鼠肾组织中Bax及Caspase-3的表达明显升高,Bcl-2的表达明显降低。正常组及假手术组大鼠肾组织中Cyt C主要位于线粒体中,5/6肾切除损伤后显著增加了Cyt C从线粒体内向细胞质中转移,六味地黄汤干预8周后明显抑制了Cyt C向细胞质中释放。综上所述,六味地黄汤可有效缓解5/6肾切除大鼠

肾小管损伤和肾纤维化,其机制可能是通过抑制Bax表达,增强Bcl-2表达,减少Cyt C向细胞质中释放和Caspase-3活性,从而抑制线粒体凋亡途径。

[参考文献]

- [1] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 709-733.
- [2] HASSAN A, BEHJAT S, MEHRI K, et al. Protective effects of hydrogen sulfide on chronic kidney disease by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Excli J*, 2018, 17: 14-23.
- [3] XU Y, RUAN S, WU X, et al. Autophagy and apoptosis in tubular cells following unilateral ureteral obstruction are associated with mitochondrial oxidative stress [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31: 628-636.
- [4] MARTÍNEZ-KLIMOVA E, APARICIO-TREJO O E, TAPIA E, et al. Unilateral ureteral obstruction as a model to investigate fibrosis-attenuating treatments [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(4): 141.
- [5] 李岩岩,何泽云,吴凡,等. 六味地黄汤对5/6肾切除大鼠NF- κ B、MCP-1、Col-III表达的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(5): 18-22.
- [6] 唐群,何泽云,徐文峰,等. 六味地黄丸对5/6肾切除大鼠肾组织中HIF-1 α 、PAI-1和TIMP-1表达的影响 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2012, 13(9): 777-780, 851-852.
- [7] LI C X, MATAVELLI L C, AKHTAR S. (Pro) renin receptor contributes to renal mitochondria dysfunction, apoptosis and fibrosis in diabetic mice [J]. *Sci Rep*, 2019, doi:10.1038/s41598-019-47055-1.
- [8] WANG M, YANG J, WANG C. Shen Shuai II recipe attenuates apoptosis in 5/6 renal ablation/infarction rats by inhibiting p53 and the mitochondrial pathway of apoptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, doi: 10.1155/2020/7083575.
- [9] LIU H T, WANG T E, HSU Y T, et al. Nanoparticulated honokiol mitigates cisplatin-induced chronic kidney injury by maintaining mitochondria antioxidant capacity and reducing Caspase 3-associated cellular apoptosis [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(10): 466.
- [10] LIN Q S, LI S, JIANG N, et al. PINK1-parkin pathway of mitophagy protects against contrast-induced acute kidney injury via decreasing mitochondrial ROS and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Redox Biol*,

- 2019, doi:10.1016/j.ekir.2020.02.027.
- [11] SURESH B, CHATHURA D S, MARK G H, et al. The Bcl-2 family: ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1):128.
- [12] SHAMAS-DIN A, KALE J, LEBER B, et al. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(4):a008714.
- [13] SOLA-RIERA C, GARCIA M, LJUNGGREN H G, et al. Hantavirus inhibits apoptosis by preventing mitochondrial membrane potential loss through up-regulation of the pro-survival factor Bcl-2 [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(2):e1008297.
- [14] WEI Q, DONG G, CHEN J K, et al. Bax and Bak have critical roles in ischemic acute kidney injury in global and proximal tubule-specific knockout mouse models [J]. *Kidney Int*, 2013, 84:138-148.
- [15] MEI S Q, LI L, WEI Q Q, et al. Double knockout of Bax and Bak from kidney proximal tubules reduces unilateral urethral obstruction associated apoptosis and renal interstitial fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/srep44892.
- [16] TAN R Z, ZHONG X, LI J C, et al. An optimized 5/6 nephrectomy mouse model based on unilateral kidney ligation and its application in renal fibrosis research [J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1):555-566.
- [17] KATARZYNA C, AGNIESZKA C J, LONGIN N, et al. Effect of chronic kidney disease on changes in vasopressin system expression in the kidney cortex in rats with nephrectomy [J]. *Biomed Res Int*, 2018, doi: 10.1155/2018/2607928.
- [18] MOUAD H, ZOUBIR D, VALERY B, et al. 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6J mice [J]. *Sci Rep*, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-58393-w.
- [19] YU J, MAO S O, ZHANG Y, et al. MnTBAP therapy attenuates renal fibrosis in mice with 5/6 nephrectomy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, doi: 10.1155/2016/7496930.
- [20] 戴芹, 王怡. 中医对肾纤维化的研究概况 [J]. *江苏中医药*, 2005, 26(11):77-78.
- [21] 陈香美, 陈以平, 谌贻璞, 等. 286例IgA肾病中医辨证与肾脏病理关系的多中心前瞻性研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24(2):101-105.
- [22] HUANG K C, SU Y C, SUN M F, et al. Chinese herbal medicine improves the long-term survival rate of patients with chronic kidney disease in taiwan: a nationwide retrospective population-based cohort study [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1117.
- [23] 崔俊. 六味地黄丸对肾阴亏虚型早期糖尿病肾病患者UAER及血清Cyc C的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2020, 27(1):126-127.

[责任编辑 周冰冰]