

糖肾平胶囊通过 PI3K/Akt 信号通路干预高糖 + LPS 诱导足细胞凋亡的机制

王颖超¹, 赵敬², 赵宗江², 杜磊², 田晨², 李玲^{1*}

(1. 北京航天总医院, 北京 100007; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:观察糖肾平对高糖环境下脂多糖(LPS)对足细胞凋亡的影响,并探讨其作用机制。方法:利用雄性 Wistar 大鼠,分别用糖肾平小、中、大剂量(0.525,1.05,2.1 g·kg⁻¹),厄贝沙坦(17.5 mg·kg⁻¹)灌胃给药,制备相应药物血清。采用高糖,LPS 体外刺激大鼠足细胞建立模型。并分为正常组(5%正常大鼠血清),高糖组(5%模型大鼠血清+4.5%葡萄糖),高糖+LPS组(5%模型大鼠血清+4.5%葡萄糖+LPS 1 mg·L⁻¹),厄贝沙坦组(5%厄贝沙坦组大鼠血清+4.5%葡萄糖+LPS 1 mg·L⁻¹),糖肾平小剂量组(5%糖肾平小剂量大鼠血清+4.5%葡萄糖+LPS 1 mg·L⁻¹),中剂量组(5%糖肾平中剂量大鼠血清+4.5%葡萄糖+LPS 1 mg·L⁻¹),大剂量组(5%糖肾平大剂量大鼠血清+4.5%葡萄糖+LPS 1 mg·L⁻¹)。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)及逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测足细胞中 CD2 相关蛋白(CD2AP),nephrin 和磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号转导通路中关键因子的蛋白和 mRNA 的表达水平。结果:与正常组比较,高糖组和高糖+LPS 组足细胞 nephrin,CD2AP,PI3K,Akt 蛋白及 mRNA 表达明显减少($P < 0.05, P < 0.01$);B 淋巴细胞瘤-2 相关凋亡蛋白(Bad 蛋白)及 mRNA 表达明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。与高糖+LPS 组比较,厄贝沙坦组足细胞 CD2AP,PI3K,Akt 蛋白及 mRNA 表达明显增加($P < 0.05, P < 0.01$);nephrin mRNA 表达增加;Bad 蛋白及 mRNA 蛋白表达减少。糖肾平各组足细胞 CD2AP,PI3K,Akt 蛋白及 mRNA 表达明显增加($P < 0.05, P < 0.01$);Bad 蛋白及 mRNA 蛋白表达减少($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:糖肾平维持足细胞裂孔隔膜蛋白稳定表达,保护肾小球滤过屏障,同时进一步激活 PI3K/Akt 信号通路,抑制足细胞凋亡;是其多靶点防治糖尿病肾病的作用机制之一。

[关键词] 糖尿病肾病;足细胞;糖肾平胶囊;磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5;R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0105-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190421

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181101.1309.010.html>

[网络出版时间] 2018-11-05 09:51

Molecular Mechanism of Tangshenping Capsule in Intervening Apoptosis of Podocytes Induced by High Glucose + LPS Through PI3K/Akt Signaling Pathway

WANG Ying-chao¹, ZHAO Jing², ZHAO Zong-jiang², DU Lei², TIAN Chen², LI Ling^{1*}

(1. Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100007, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of Tangshenping capsule on lipopolysaccharide (LPS) - stimulated podocytes apoptosis under high glucose conditions of podocyte in rats with diabetic nephropathy (DN), and discuss possible mechanism. **Method:** With cultured rat podocytes as object of study, the podocytes model was established with high glucose and LPS, and divided into 7 groups: control group, high glucose group, high glucose plus LPS group, irbesartan group, and low, moderate and high-dose Tangshenping capsule groups. Protein and mRNA expressions of CD2-associated protein (CD2AP), nephrin, phosphatidylinositol 3-kinase

[收稿日期] 20180704(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973831,81373831)

[第一作者] 王颖超,硕士,主治医师,从事中医内科学研究,Tel:010-63472524,E-mail:wangyingchaobear@sina.com

[通信作者] *李玲,硕士,副主任医师,从事中医内科学研究,Tel:010-63472524,E-mail:yj_zhi@126.com

(PI3K), protein kinase B (Akt) and B-cell lymphoma-2 associated death protein (Bad protein) of podocyte in each group were detected by Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** Compared with control group, the protein and mRNA expressions of podocyte CD2AP, nephrin, PI3K, Akt decreased definitely ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while Bad protein and mRNA expressions increased definitely ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with high glucose plus LPS group, the protein and mRNA expressions of podocyte CD2AP, PI3K, Akt increased definitely ($P < 0.05$, $P < 0.01$), whereas Bad protein and mRNA expressions decreased definitely ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in irbesartan group. The protein and mRNA expressions of podocyte nephrin, CD2AP, PI3K, Akt increased definitely ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and Bad protein and mRNA expressions decreased definitely ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in three Tangshenping capsule groups. **Conclusion:** Tangshenping capsule can maintain a stable protein expression of Slit diaphragm (SD) in podocyte, inhibit podocyte apoptosis by activating PI3K/Akt signaling pathway. This is one of mechanisms for preventing and treating diabetic nephropathy.

[**Key words**] diabetic nephropathy; podocyte; Tangshenping capsule; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway

足细胞是肾小球脏层上皮细胞,具有高度分化特性,受到损伤后表现为足突融合、去分化或凋亡^[1-2]。足细胞裂空隔膜蛋白(SD)是肾小球滤过屏障的重要组成部分,足细胞 SD 蛋白表达降低、足细胞数量减少,进一步损伤肾小球滤过屏障,导致蛋白随尿液排出体外。越来越多研究表明足细胞损伤、凋亡参与了糖尿病肾病(DN)发生发展过程,是引起蛋白尿和肾小球硬化的关键因素^[3-5]。磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号转导通路是存在于各种真核细胞中的抑制细胞凋亡通路^[6]。已有研究证明足细胞 SD 蛋白 nephrin-podocin 复合体与 PI3K p85 亚基结合,参与 PI3K/Akt 信号转导通路激活^[7]。由此可见 PI3K/Akt 信号转导通路在 DN 发病机制中起重要作用。

导师赵宗江教授总结研究文献资料并在大量临床、基础上提出 DN“肾痿”假说,并组方糖肾平胶囊(简称糖肾平)^[8],在临床 DN 的防治中显示出良好的疗效。实验组经过前期研究证明糖肾平明显改善 DN 大鼠氧化应激状态,通过不同途径减轻足细胞的损伤,保护肾小球滤过屏障,延缓 DN 大鼠的病程进展^[9-12]。本实验在高糖环境下加脂多糖(LPS)刺激足细胞模拟 DN 体内环境,观察糖肾平对足细胞凋亡的影响,并观察其对 PI3K/Akt 抗凋亡通路中关键因子的影响,探讨其作用机制。

1 材料

1.1 细胞 大鼠肾小球足细胞,由首都医科大学张玉祥教授赠送。

1.2 药物和试剂 厄贝沙坦片(杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司,国药准字 J20080061);糖肾

平(组成:生黄芪 6 g,熟地黄 3 g,山萸肉 2 g,牡丹皮 3 g,地骨皮 3 g,水蛭 2 g。制备工艺:水蛭粉碎过筛备用,余药煎煮提取 3 次,合并煎液,浓缩成膏状;加入水蛭粉,干燥后粉碎成细末,制粒,装胶囊,生药含量 1.0 g/粒,由北京中医药大学中药学院制剂室制备^[10],批号 2006008); RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 663264);胎牛血清(FBS,杭州四季青有限公司,批号 061024);二甲基亚砜(美国 Amresco 公司,批号 0231);链脲佐菌素,大鼠重组 γ -干扰素, LPS (美国 Sigma 公司,批号分别为 S0130,36785.11, DH183-10); β -肌动蛋白(β -actin), PI3K, Akt, 磷酸化 Akt (p-Akt) 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 4970S, 2382072, 4691, 4060); nephrin, CD2 相关蛋白 (CD2AP) 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 SC-28192, SC-9137); B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 相关凋亡蛋白 (Bad 蛋白) 单克隆抗体(英国 Abcam Technology 公司,批号 ab62465);羊抗兔二抗,逆转录试剂盒,PCR 试剂盒(美国 Promega 公司,批号分别为 W40B,00000541604,00000541604)。

1.3 仪器 B5060EK/CO₂ 型恒温 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司); TS-100 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司); BV-2 型电泳槽, Trans-Blot Plus 型电转槽, T100 型 PCR 仪, Gel Doc XR⁺ 型凝胶成像系统, XRS⁺ 型曝光成像系统(美国 Bio-Rad 公司); UY-2000 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 实验血清制备 雄性清洁级 Wistar 大鼠, 体重(200 ± 20) g, 购自北京华阜康生物股份有限责任

公司,合格证号 SCXK(京)2009-0007,经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准。大鼠随机分为糖肾平小、中、大剂量组,依据人临床用药剂量^[13],分别按人临床用量 3.5 倍(0.525 g·kg⁻¹),7 倍(1.05 g·kg⁻¹),14 倍(2.1 g·kg⁻¹)灌胃给药;厄贝沙坦组按临床用量 7 倍(17.5 mg·kg⁻¹)灌胃给药,1 次/d。于第 7 天灌胃后 30 min 经大鼠股动脉取血 10 mL,制备血清,56 °C 灭活,-20 °C 保存。

2.2 足细胞培养、分化与分组 大鼠肾小球足细胞复苏后,置于含有 10% 胎牛血清,100 mg·L⁻¹链霉素,10 万 U·L⁻¹青霉素和 1 万 U·L⁻¹γ-干扰素的 RPMI 1640 培养液培养 5 mL 内,采用 25 cm² 细胞培养瓶置于 33 °C 5% CO₂ 细胞培养箱内传代培养^[10]。培养 12 代后转入不含 γ-干扰素的培养液,在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中分化培养 10~15 d,隔天换液。待分化成熟后用于相关实验。通过高糖、高糖 + LPS 模拟 DN 大鼠体内细胞生存环境,将处于 G₀ 期足细胞随机分为正常组,5% 正常大鼠血清 + 3% FBS

RPMI 1640 培养基;高糖组,4.5%葡萄糖(GLU) + 5% 大鼠血清 + 3% FBS RPMI 1640 培养基;高糖 + LPS 组,LPS 1 mg·L⁻¹ + 4.5%GLU + 5% 大鼠血清 + 3% FBS RPMI 1640 培养基;厄贝沙坦组,5% 厄贝沙坦组大鼠血清 + 4.5%GLU + LPS 1 mg·L⁻¹ + 3% FBS RPMI 1640 培养基;糖肾平小、中、大剂量组,5% 糖肾平小、中、大剂量组大鼠血清 + 4.5% GLU + LPS 1 mg·L⁻¹ + 3% FBS RPMI 1640 培养基。

2.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测相关 mRNA 表达 培养 48 h 后加裂解液,提取足细胞 mRNA,按照 RT 试剂盒操作说明于 PCR 仪中进行 RT 反应;逆转录完成后,按照说明进行 PCR 扩增反应,PCR 反应条件:预变性 95 °C 2 min;变性 95 °C 50 s;退火 57 °C 50 s;延伸 72 °C 1 min,以上共 38 个循环;终延伸 72 °C 2 min。反应结束后制备琼脂糖凝胶进行电泳。取出凝胶,紫外灯下观察并照相,计算靶条带与 β-actin 的比值。引物序列合成于赛百胜基因有限公司,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence primers

名称	序列	退火温度/°C	扩增产物长度/bp
β-actin	上游 5'-TGGGTCAGAAGGACTCCTACG-3'	57	591
	下游 5'-CAGGCAGCTCATAGCTCTTCT-3'		
nephrin	上游 5'-CGGAGAAGACTGAGGCCG-3'	57	459 ^[18]
	下游 5'-TCACACAGATGTCCCTCAG-3'		
CD2AP	上游 5'-CCAGCTCCAAAACCTGACC-3'	57	496 ^[19]
	下游 5'-GGGTTGGAGAATGTCCACC-3'		
PI3K	上游 5'-GAAGGCAACGAGAAGGA-3'	56	213 ^[20]
	下游 5'-CGTCAGCCACATCAAGTA-3'		
Akt	上游 5'-TCGGCTCCTGAAACCTC-3'	57	386 ^[21]
	下游 5'-CCCCTGCCCTTGGCTTAT-3'		
Bad	上游 5'-GAGGAAGATGAAGGGATGGA-3'	57	400 ^[22]
	下游 5'-TCAACGCTGTACGTCAGTC-3'		
β-actin	上游 5'-TGGAGAAGGACTCCTACG-3'	57	500
	下游 5'-CAGGCTCATAGCTCTTCT-3'		

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 培养 48 h 后加裂解液,提取足细胞蛋白,进行蛋白变性。制胶并上样后进行电泳、恒压转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭,TBS 冲洗后,分别加 CD2AP(1:1 000),PI3K(1:2 000),Akt(1:3 000),p-Akt

(1:3 000),Bad(1:3 000)4 °C 冰箱过夜。4 °C 过夜。洗净后加羊抗兔及羊抗鼠二抗,滴加 ECL 化学发光液显影。应用曝光成像系统拍照,计算靶蛋白条带与 β-actin 蛋白的比值。

2.5 统计学方法 所有统计均采用 SPSS 18.0 软

件进行数据处理,数据符合正态分布采用单因素 ANOVA 方差分析,非正态分布计量资料采用多个相关样本非参数检验比较,组间疗效比较用检验、非参数秩和检验比较。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对足细胞培养、分化及形态的影响 倒置显微镜下可见不含 γ -干扰素培养的足细胞出现细胞生长速度减慢、体积增大,向四周伸出足突,表明此时足细胞分化成熟。分组后继续观察,可见正常组足细胞形态不规则,呈分叉状,突起较多。高糖 + LPS 作用足细胞 48 h 后,可见贴壁大量细胞突起消失,胞体变大,似鹅卵石状。药物干预后足细胞形态均改善,胞体变小,突起增多,见图 1。

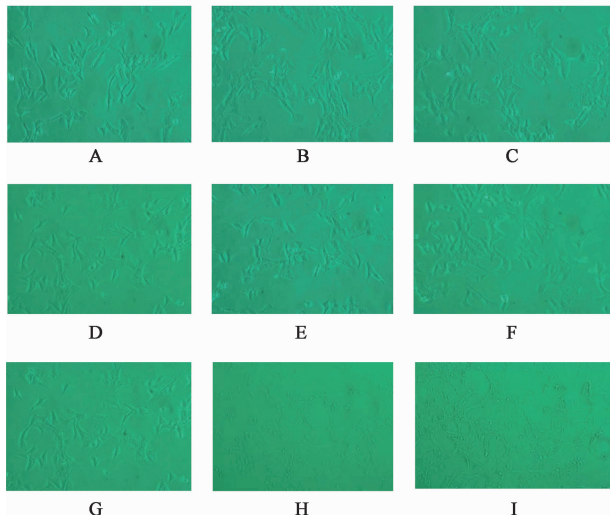


图 1 高糖 + LPS 刺激足细胞形态变化和足细胞增殖及分化(倒置显微镜)

Fig. 1 Morphologic changes of podocyte and proliferation and differentiation of podocyte (inverted microscope)

3.2 对各组足细胞中 CD2AP, nephrin, PI3K, Akt, Bad mRNA 表达的影响 正常组足细胞中 CD2AP, nephrin, PI3K, Akt mRNA 呈高表达, Bad mRNA 少量表达;高糖、高糖 + LPS 作用 48 h 后,足细胞 CD2AP, nephrin, PI3K, Akt mRNA 表达明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$), Bad mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$);与高糖组、高糖 + LPS 组比较,厄贝沙坦组,糖肾平小、中、大剂量组足细胞 CD2AP mRNA 表达明显增多 ($P < 0.05, P < 0.01$);糖肾平小、大剂量组足细胞 nephrin mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与高糖组比较,厄贝沙坦组、糖肾平大剂量组 PI3K,

Akt mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$);与高糖 + LPS 组比较,厄贝沙坦组,糖肾平小、中、大剂量组足细胞 PI3K mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$);糖肾平大剂量组 Akt mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$)。与高糖组比较,糖肾平大剂量组 Bad mRNA 降低 ($P < 0.05$);与高糖 + LPS 组比较,糖肾平大剂量组、厄贝沙坦组 Bad mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$);糖肾平中剂量组 Bad mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$),见图 2,表 2。

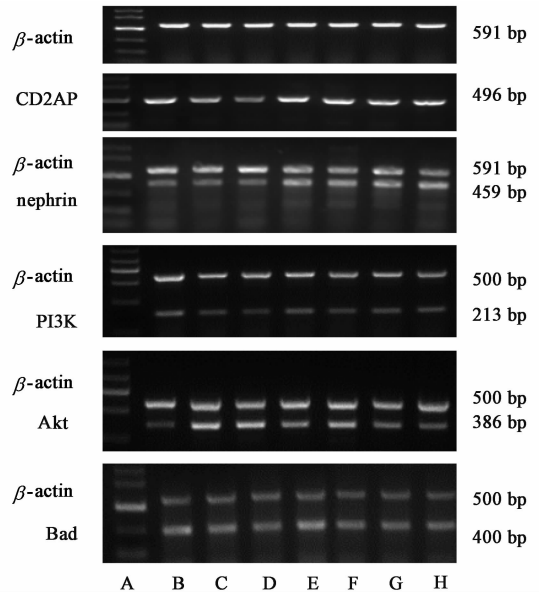


图 2 各组足细胞 CD2AP, nephrin, PI3K, Akt, Bad mRNA 电泳

Fig. 2 Electrophoresis of mRNA expressions of CD2AP, nephrin, PI3K, Akt and Bad of podocyte

3.3 对足细胞中 CD2AP, PI3K, Bad 蛋白表达的影响 正常足细胞中 CD2AP, PI3K 蛋白高表达, Bad 蛋白少量表达,经高糖、高糖 + LPS 作用 48 h 后,与正常组比较,高糖组、高糖 + LPS 组足细胞 CD2AP, PI3K 蛋白表达明显减少, Bad 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。与高糖组、高糖 + LPS 组比较,各治疗组 CD2AP 蛋白显著升高 ($P < 0.01$), PI3K 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$),各治疗组足细胞中 Bad 蛋白表达降低,但差异无统计学意义,见图 3,表 3。

3.4 对足细胞中 p-Akt, Akt 蛋白表达的影响 以总的 Akt 为参照,与正常组比较,高糖作用 48 h 后,足细胞 p-Akt 表达明显减少 ($P < 0.05$),高糖 + LPS 作用 48 h 后, p-Akt 表达降低最显著 ($P < 0.01$)。厄贝沙坦和糖肾平含药血清干预后,可明显抑制高糖 + LPS 的上述作用,高糖 + LPS 组比较,厄贝沙坦

表 2 糖肾平对 DN 大鼠足细胞 CD2AP, nephrin, PI3K, Akt, Bad mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Tangshenping on expressions of CD2AP, nephrin, PI3K, Akt and Bad of podocyte ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CD2AP/ β -actin	nephrin/ β -actin	PI3K/ β -actin	Akt/ β -actin	Bad/ β -actin
正常	-	0.610 ± 0.042	1.02 ± 0.134	0.80 ± 0.043	0.80 ± 0.046	0.65 ± 0.063
高糖	-	0.422 ± 0.034 ²⁾	0.70 ± 0.006 ²⁾	0.60 ± 0.044 ¹⁾	0.59 ± 0.065 ¹⁾	1.11 ± 0.030 ²⁾
高糖 + LPS	1 mg·L ⁻¹	0.327 ± 0.035 ²⁾	0.69 ± 0.034 ²⁾	0.47 ± 0.038 ²⁾	0.54 ± 0.069 ²⁾	1.35 ± 0.150 ²⁾
厄贝沙坦	0.017 5	0.517 ± 0.054 ⁶⁾	0.94 ± 0.014	0.76 ± 0.036 ^{3,6)}	0.75 ± 0.047 ⁵⁾	0.86 ± 0.104 ⁶⁾
糖肾平	0.525	0.504 ± 0.018 ⁶⁾	0.98 ± 0.111 ^{3,5)}	0.70 ± 0.050 ⁶⁾	0.67 ± 0.069	1.10 ± 0.088
	1.05	0.569 ± 0.014 ^{3,6)}	0.85 ± 0.038	0.76 ± 0.084 ^{3,6)}	0.71 ± 0.059	0.98 ± 0.109 ⁵⁾
	2.1	0.563 ± 0.056 ^{3,6)}	1.01 ± 0.089 ^{3,5)}	0.78 ± 0.072 ^{3,6)}	0.74 ± 0.053 ⁵⁾	0.76 ± 0.102 ^{3,6)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与高糖组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与高糖 + LPS 组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

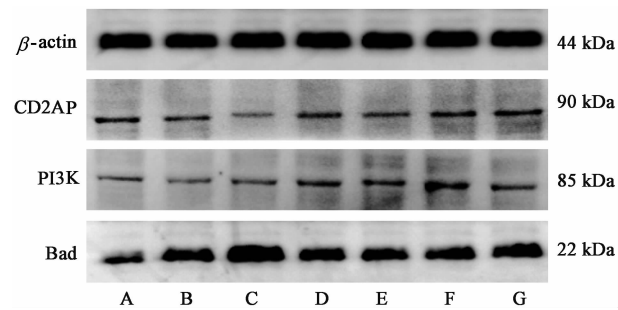


图 3 体外培养各组肾小球足细胞中 CD2AP, PI3K, Bad 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expressions of CD2AP, PI3K, Bad of podocyte

表 3 糖肾平含药血清对 DN 足细胞 CD2AP, PI3K, Bad 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Tangshenping on relative protein expressions of CD2AP, PI3K, Bad of podocyte ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CD2AP/ β -actin	PI3K/ β -actin	Bad/ β -actin
正常	-	0.66 ± 0.032	0.91 ± 0.106	0.65 ± 0.123
高糖	-	0.55 ± 0.008 ¹⁾	0.64 ± 0.071 ¹⁾	0.93 ± 0.130 ¹⁾
高糖 + LPS	1 mg·L ⁻¹	0.47 ± 0.022 ²⁾	0.62 ± 0.048 ¹⁾	1.03 ± 0.024 ²⁾
厄贝沙坦	0.017 5	0.69 ± 0.017 ^{4,6)}	0.90 ± 0.017 ^{3,5)}	0.76 ± 0.101
糖肾平	0.525	0.65 ± 0.049 ^{3,6)}	0.91 ± 0.055 ^{3,5)}	0.94 ± 0.031
	1.05	0.74 ± 0.063 ^{4,6)}	0.91 ± 0.056 ^{3,5)}	0.86 ± 0.062
	2.1	0.76 ± 0.025 ^{4,6)}	0.94 ± 0.034 ^{3,6)}	0.81 ± 0.109

重要作用,一致认为是引起 DN 蛋白尿和肾小球硬化的关键因素^[15]。

PI3K/Akt 通路在足细胞生长、分化、凋亡中发挥重要作用^[16],已有学者证明足细胞裂孔蛋白 CD2AP 和 nephrin 可启动 PI3K/Akt 依赖的信号转导途径而参与信号传导,抑制足细胞凋亡^[17-19]。PI3K 具有磷脂酰肌醇激酶和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的双重活性,可以将其分为 I 型, II 型, III 型^[20],

和糖肾平大剂量组明显增加 p-Akt 的表达 ($P < 0.05$),见图 4,表 4。

4 讨论

在糖尿病(DM)并发症中 DN 是最主要的微血管并发症,是导致 DM 患者死亡的主要原因^[12],DN 最终发展为肾功能衰竭,是我国透析患者的第二大原因^[14]。因此 DN 成为当今世界医学领域研究的热点和难点之一。足细胞参与肾小球血液滤过屏障的形成,主要维持肾小球的滤过膜结构和正常功能。当足细胞受到损伤时,形态会发生明显变化,严重时 会从基底膜脱落,随尿液排出,在 DN 发病中起着

依据活化受体的不同 I 型 PI3K 又分为 I A, I B 型,此二型可分别被受体酪氨酸激酶,G 蛋白偶联受体活化^[21],催化磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP2)生成第二信使 PIP3,进而激活下游信号通路,抑制细胞凋亡;因此,PI3K 的催化亚基被认为是基因治疗的潜在药物靶点。Akt 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,PI3K 活化后生成第二信使 PIP3 进一步磷酸化和激活 Akt 为 p-Akt^[22]。所以 Akt 是 3-磷酸肌醇依赖性

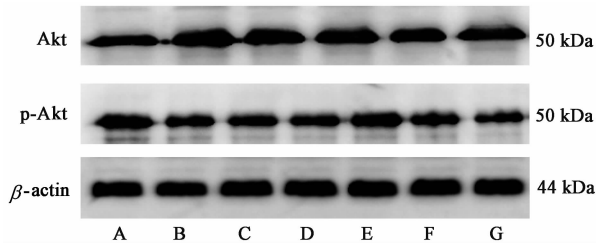


图 4 体外培养各组肾小球足细胞中 Akt, p-Akt 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of Tangshenping on p-Akt and Akt protein expressions of podocyte

表 4 糖肾平含药血清对 DN 足细胞 p-Akt/Akt 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4 Effect of Tangshenping on ratio of p-Akt/Akt of podocyte ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-Akt/Akt
正常	-	0.88 ± 0.02
高糖	-	0.76 ± 0.013 ¹⁾
高糖 + LPS	1 mg·L ⁻¹	0.72 ± 0.015 ²⁾
厄贝沙坦	0.017 5	0.82 ± 0.020 ⁵⁾
糖肾平	0.525	0.70 ± 0.025
	1.05	0.78 ± 0.006
	2.1	0.84 ± 0.019 ⁵⁾

蛋白激酶 1(PDK) 的主要下游效应分子之一可调节足细胞内的多种靶蛋白磷酸化,抑制细胞凋亡。其中靶蛋白 Bad 是一种凋亡前蛋白 Bcl-2 家族成员, p-Akt 可阻断 Bad 与 Bcl-2/Bcl-xl 的结合,避免细胞凋亡的发生^[23]。靶蛋白半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-9 是凋亡过程中重要的启动因子,而 Caspase-3 为细胞凋亡过程中的执行分子, p-Akt 可使凋亡复合体的 Caspase-9 灭活^[24],可直接抵抗足细胞凋亡。核转录因子(NF)-κB 在细胞凋亡中起着决定性的作用^[25],其磷酸化灭活后也可抵抗足细胞凋亡。综上,PI3K/Akt 信号通路的活化在抗细胞凋亡过程中发挥至关重要的作用。

按照 DN 患者水肿、蛋白尿等常见临床表现, DN 属于中医“水肿”“尿浊”“关格”“腰痛”“肾消”和“消渴肾病”等。导师根据临床经验,并在现代药理学基础上,提出 DN“肾痿”假说^[26]。导师认为 DN 日久,则郁、热、瘀血、痰湿、毒邪相互胶结于肾脏,阻滞气血运行,使肾脏结构破坏,“肾体”受损,最终导致肾脏正常功能受损甚至丧失,即“肾用”失常,“肾体”和“肾用”均受到损害,长此以往,肾脏痿废不用,即发生“肾痿”;DM 日久不愈,耗损机体气血津液;“久病多虚”可见 DN 的发病是以虚为本。消渴病日久,痰湿、瘀血、浊毒互相搏结,在肾脏积聚

阻滞肾脏气血的运行,大量有害物质的积聚损伤肾脏内细胞、组织,导致肾小球硬化痿废失用。因此 DN 的基本病机是本虚标实。DN 临床多虚实并见,以气阴两虚、精气亏耗、阴阳两虚为本虚,以燥热内生、水湿滞留、湿浊瘀毒为标实。病位在肾可累及肝、脾。因此在“肾痿”指导下组方的糖肾平,方中黄芪补中益气、利尿消肿、固摄精微为君药,山萸肉、熟地黄补肝滋肾,益气生津为臣药,牡丹皮、地骨皮活血化痰、清退虚热以养阴为佐药,水蛭活血破瘀消积,直达肾络为使药。全方以滋补肝肾、益气固精为主,兼以活血化瘀通肾络,其特点为补而不滞,祛瘀而不伤正,瘀去浊降除宿根,助脾气、肾精的化生,使气阴充养,治疗 DN 之气阴两伤、瘀血阻络、精微下泄者尤为适宜。实验组前期研究发现,糖肾平能够降低 DN 大鼠 24 h 尿蛋白定量,改善 DN 大鼠氧化应激状态减轻 DN 大鼠肾脏病理改变,减少足细胞损伤、凋亡^[8-11]。

本实验是在前期实验的基础上进一步设计体外足细胞培养实验,通过高糖 + LPS 刺激足细胞模拟 DN 体内环境。充分发掘中医药多环节、多靶点治疗 DN 的优势,探讨糖肾平是否通过调控 PI3K/Akt 信号转到通路达到抑制足细胞凋亡的目的。本实验观察到高糖组和高糖 + LPS 组足细胞 CD2AP, nephrin, PI3K 蛋白和 mRNA 表达减少,且 Akt 磷酸化减少,而凋亡蛋白 Bad 表达升高。高糖和 LPS 可能通过破坏足细胞 SD 蛋白(CD2AP, nephrin)表达,从而抑制 PI3K/Akt 信号转导通路活化,足细胞凋亡增加。糖肾平干预 48 h 后,足细胞内 CD2AP 与 nephrin 蛋白和 mRNA 表达明显升高, Bad 蛋白和 mRNA 表达下降, p-Akt 表达增多。糖肾平可能通过保护足细胞 SD 蛋白,维持足细胞形态功能的稳定性,进而保证肾小球滤过屏障的完整性,减少蛋白尿的发生,并进一步激活 PI3K/Akt 信号转导通路,从而抑制了高糖环境下 LPS 诱导的足细胞凋亡,减轻肾脏损伤、减轻肾纤维化,也是其多靶点防治 DN 的作用机制证明。

[参考文献]

[1] Briasoni L, SchnPaer H W, Kopp J B. Advances in the biology and genetics of the podocytopathies: implications for diagnosis and therapy [J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133(2):201-216.
[2] CHUANG P Y, HE J C. Signaling in regulation of podocyte phenotypes [J]. Nephron Physiol, 2009, 111(2):9-15.

- [3] 李敏州,高彦彬,马鸣飞,等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 344-349.
- [4] Vezrola D, Gandolof M T, Ferrario F, et al. Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2007, 72 (10): 1262-1272.
- [5] 石格,毛志敏,万毅刚,等. 糖尿病肾病足细胞损伤的病理机制及中药的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2416-2421.
- [6] ZHANG Z, PENG H, CHEN J, et al. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(12): 2009-2014.
- [7] 朱海慧,叶学锋. 中医药防治糖尿病肾病足细胞损伤研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(1): 109-111.
- [8] LI X Z, CHUANG P Y, D'Agati V D, et al. Nephin preserves podocyte viability and glomerular structure and function in adult kidneys [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(10): 2361-2377.
- [9] 赵宗江,王颖超,杜磊,等. 健脾益肾化痰通络方对糖尿病肾病大鼠氧化应激的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(3): 161-165, 218.
- [10] 杜磊,赵敬,赵宗江,等. 糖肾平对高糖 + LPS 刺激足细胞 TGF- β_1 /Smad7 信号转导通路影响的研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(2): 107-110.
- [11] 王颖超,赵宗江,赵敬,等. 糖肾平对糖尿病肾病大鼠足细胞 nephin 与 CD2AP 蛋白及其 mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(2): 107-109.
- [12] 王颖超,于眉,杨敏,等. 糖肾平对糖尿病肾病大鼠 α -actinin-4 表达及足细胞数目的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(4): 31-35.
- [13] 王婷,赵宗江,张新雪,等. 糖肾宁含药血清对高糖刺激肾小管上皮细胞增殖作用及 RhoA/ROCK 信号通路影响的实验研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(6): 1066-1071.
- [14] Boddana P, Caskey F, Casula A, et al. UK renal registry 11th annual report (December 2008); chapter 14 UK renal registry and international comparisons [J]. *Nephron Clin Pract*, 2009, 111 (Supp11): 269-276.
- [15] Scherthner G. Kidney disease in diabetology: lessons from 2010 [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(2): 454-457.
- [16] 刘臻,张铭倩,朱虹. 栝楼瞿麦汤对糖尿病肾病大鼠脂肪因子和足细胞 nephin 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(23): 134-139.
- [17] Kelly J C. China faces massive wave of diabetes-linked chronic diseases [J]. *JAMA*, 2013, 310: 916-917, 948-958.
- [18] Huber T B, Harfleben B, Kim J, et al. Nephin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate Akt-dependent signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(14): 4917-4928.
- [19] LIX Z, HE J C. An update: the role of nephin inside and outside the kidney [J]. *Sci China: Life Sci*, 2015, 58(7): 649-657.
- [20] Beck J T, Ismail A, Tolomeo C. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / Akt / mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: an emerging treatment strategy for squamous cell lung carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(8): 980-989.
- [21] Theodoropoulou M, Stalla G K. Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2013, 34(3): 228-252.
- [22] Lopiccolo J, Blumenthal G M, Bernstein W B, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations [J]. *Drug Resist Update*, 2007, 11(1/2): 32-50.
- [23] WANG L S, GAI P Z, XU R G, et al. Shikonin protects chondrocytes from interleukin-1 beta-induced apoptosis by regulating PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 298-308.
- [24] Tokuhira N, Kitagishi Y, Suzuki M, et al. PI3K/Akt/PTEN pathway as a target for Crohn's disease therapy (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(1): 10-16.
- [25] 贾鹏,陈盛业,甘宇,等. 中医药治疗糖尿病肾病研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(7): 125-126.
- [26] 赵宗江,豆小妮,张新雪. 糖尿病肾病“肾痿”假说探讨 [J]. 中医杂志, 2011, 52(S1): 8-10.

[责任编辑 张丰丰]