

· 经典名方 ·

基于细胞自噬探讨左归丸对肾虚仔鼠皮肤发育的影响

曹继刚, 刘颖, 桑红灵, 赵敏*
(湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] 目的:研究左归丸对先天肾虚仔鼠发育过程中皮肤内细胞自噬的影响及其机制,探索补肾填精法在生长发育异常中的应用价值。方法:36只雌雄比例为2:1的大鼠进行配对,复合应激法刺激孕鼠构建先天肾虚仔鼠模型,根据将孕鼠处理方式不同,分为正常组,肾虚组,左归丸低、高剂量组(2,8 g·kg⁻¹)。正常组不造模给予生理盐水灌胃,肾虚组造模给予生理盐水灌胃,左归丸低、高剂量组造模给予左归丸悬浊液灌胃。切取出生后21 d仔鼠的背部皮肤,苏木素-伊红(HE)染色观察仔鼠皮肤显微结构形态,测量真皮层和表皮层厚度,蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分别检测仔鼠皮肤分泌型糖蛋白3a(Wnt3a)和 β -连环蛋白(β -catenin) mRNA和蛋白表达量,免疫双荧光检测皮肤内自噬指标微管相关蛋白轻链3(LC3)和人死骨片1-泛素结合蛋白p62(SQSTM1-p62)的表达。结果:正常组仔鼠皮肤层次清楚,结构正常,肾虚组真皮层胶原排列疏松,左归丸低、高剂量组皮肤组成基本正常;与正常组比较,肾虚组仔鼠在皮肤的表皮层增厚,真皮层变薄($P<0.05$);与肾虚组比较,左归丸低、高剂量组皮肤的表皮层和真皮层厚度的改变明显恢复($P<0.05$)。与正常组比较,肾虚组仔鼠Wnt3a和 β -catenin蛋白和mRNA表达明显下降($P<0.05$);与肾虚组比较,左归丸低、高剂量组Wnt3a和 β -catenin蛋白和mRNA表达升高($P<0.05$)。同时免疫荧光法检测发现与正常组比较,肾虚组的LC3的表达上调,SQSTM1-p62表达下调;与肾虚组比较,左归丸可以逆转SQSTM1-p62和LC3的异常表达($P<0.05$)。结论:左归丸可以通过增加仔鼠皮肤内Wnt3a和 β -catenin蛋白和mRNA的表达,下调皮肤细胞自噬水平,改善先天肾虚仔鼠皮肤异常发育。

[关键词] 自噬;左归丸;皮肤;发育;肾虚;仔鼠

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210502

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210226.1353.001.html>

[网络出版日期] 2021-2-26 14:42

Discussion on Effect of Zuoguiwan on Skin Development of Kidney-deficient Rats Based on Autophagy

CAO Ji-gang, LIU Ying, SANG Hong-ling, ZHAO Min*
(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of Zuoguiwan on the autophagy of cells in the skin during the development of congenital kidney-deficient mice, and to explore the application value of kidney tonifying and essence filling method in abnormal growth and development. **Method:** 36 rats with a 2:1 ratio of male to female were paired, and the pregnant rats were stimulated by combined stress method to build a model of congenital kidney-deficient rats. According to different treatment methods, the pregnant rats were divided into the control group, the kidney-deficient group, and the Zuoguiwan low and high dose groups (2, 8 g·kg⁻¹). The control group was given normal saline without modeling. Kidney deficiency group was modeled before intragastric administration of normal saline. Zuoguiwan small dose and high dose groups received intragastric administration of Zuoguiwan suspension. 21 days after the birth of mice, the back skin was taken to

[收稿日期] 20201127(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81803969)

[第一作者] 曹继刚,博士,教授,从事藏象理论及其应用研究,E-mail:774941339@qq.com

[通信作者] *赵敏,博士,教授,硕士生导师,从事生物技术在中医药研究中的应用研究,E-mail:44592734@qq.com

observe the skin microstructure and morphology of the mice by HE staining and detect the thickness of dermis and epidermis. The gene and protein expression levels of *Wingless3a* and β -catenin in the skin of neonatal rats were measured by Western blot and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). Double immunofluorescence assay was used to detect the skin autophagy indicators Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) and Sequestosome 1 (SQSTM1-p62). **Result:** In the control group, the skin layers were clear and the structure was normal, in the kidney deficiency group, the collagen arrangement in the dermis was loose, the skin composition in Zuoguiwan low and high dose groups was basically normal. Compared with the control group, the epidermal layer of the kidney deficiency group was thickened and the dermis was thinned ($P<0.05$). Compared with the kidney deficiency group, the thickness changes of epidermal layer and dermis layer were significantly restored in Zuoguiwan low and high dose groups ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression of *Wnt3a* and β -catenin protein and gene in the kidney deficiency group significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the kidney deficiency group, *Wnt3a* and β -catenin protein and gene expression increased in Zuoguiwan low and high dose groups ($P<0.05$). At the same time, immunofluorescence assay showed that compared with the control group, the expression of LC3 was up-regulated and the expression of SQSTM1-p62 was down-regulated in the kidney deficiency group, while Zuoguiwan could reverse such abnormal expression ($P<0.05$). **Conclusion:** Zuoguiwan can down-regulate the autophagy level of skin cells and improve the abnormal skin development of congenital renal deficiency by increasing the expression of *Wnt3a* and β -catenin protein and gene in the skin of neonatal rats.

[Key words] autophagy; Zuoguiwan; skin; development; kidney deficient; offspring rat

随着社会的发展生活节奏日益加快,导致很多女性处于高压环境,同时二胎政策的实施使得高龄产妇逐渐增多,高压及高龄的双重因素,使孕龄和孕期妇女容易出现肾虚的各种表现^[1],由此引起新生儿出生后发生感染性疾病的概率也大大提高。皮肤作为人体最大的免疫器官保护着机体内环境,肾主藏精是肾的主要生理功能之一,肾中之精大部分禀受于父母,因此,探讨先天肾虚对仔鼠皮肤发育的影响,并将母体作为干预对象,以改善或避免子代出现皮肤屏障结构的变化及功能的异常,具有重要的现实意义^[2]。

正常人体皮肤表皮层和真皮层的厚度为0.5~4 mm^[3],此项指标能在一定程度反映仔鼠皮肤发育的程度。自噬是一种细胞进行自我更新、分化的正常生命现象,降解清除多余受损的细胞器,其降解产物中的营养物质会被回收利用,通过这样一个“清理”过程促进皮肤正常的发育,维护皮肤的正常结构,保证皮肤发挥正常的生理功能^[4]。研究发现多种皮肤病与自噬关系密切,如光老化、银屑病、红斑狼疮、皮肤肿瘤、白癜风及感染性皮肤病等,基于调控自噬水平开展治疗成为了相关皮肤病研究中的新靶点和临床上的新途径。自噬过程中自噬小体的形成与微管相关蛋白轻链3(LC3)和死骨片1-泛素结合蛋白p62(SQSTM1-p62)两种蛋白密切相

关^[5-7],研究表明在仔鼠的皮肤发育过程中,分泌型糖蛋白3a(*Wnt3a*)/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路发挥着重要的影响作用^[8],*Wnt3a*/ β -catenin通路激活后能够降低LC3的数量,使SQSTM1-p62降解减少,最终抑制自噬小体的形成^[9]。左归丸出自《景岳全书》,是滋阴补肾,填精益髓的名方,课题组前期利用复合应激法建立先天肾虚仔鼠模型,证实了左归丸可以在一定程度上改善模型仔鼠的脑、骨以及胸腺发育^[10],本次实验期望通过研究左归丸对于模型仔鼠皮肤的影响,以进一步探索左归丸补肾填精法的作用内涵。

1 材料

1.1 动物 选用雌雄比例2:1的3月龄SD大鼠共36只,SPF级,体质量(250±15)g,由湖北省疾病预防控制中心提供,实验单位合格证号SCXK(鄂)2017-0067。湖北中医药大学中医药实验中心SPF级动物房适应性喂养1周后进行实验,大鼠常规喂养,自由采食和饮水,光照明暗各12h,动物房温度为(22±2)℃。本实验过程接受湖北中医药大学实验动物伦理委员会的监督。

1.2 药物 左归丸,批准文号国药准字Z41020696,产品批号150401,购于湖北中医药大学国医堂,厂家为河南省宛西制药股份有限公司。生理盐水溶解药丸制备成质量浓度为800,200 g·L⁻¹

的含药混悬液,保存于4℃备用。

1.3 试剂 苏木素、伊红Y(美国Sigma公司,批号分别为H9627,71014544);兔Wnt3a多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,货号BA2628-2);小鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司,货号BM0627);兔 β -catenin多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号51067-2-AP);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠二抗,HRP标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,货号分别为BA1051,BA1054);增强化学(ECL)底物液(美国Thermo公司,货号NCI5079);LC3(美国Abgent公司,货号AP1802a-ev);SQSTM1-p62(美国Abcam公司,货号Ab56416);水溶性花菁染料(cy3)荧光标记羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G,异硫氰酸荧光素(FITC)荧光标记羊抗兔IgG(武汉博士德生物工程有限公司,货号分别为BA1031BA1105);苯基吡啶(DAPI,碧云天生物技术公司,货号C1002)。

1.4 仪器 AB22001型模拟地震振动台(上海鼎盛机械制造厂);201A型光电刺激箱(淮北正华生物仪器设备有限公司);JK-6型组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司);BX53型生物显微镜(日本奥林巴斯公司);RM 2016型病理切片机(德国Leica公司);QuantStudio6型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);CPA型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);DYY-7C型电泳仪电源,DY CZ-24DN型垂直电泳槽,DY CZ-40型电转仪(北京六一仪器厂);m μ ISKANMK3型酶标仪(美国Thermo公司);HI650型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

2 方法

2.1 造模 本次实验采用复合应激法制作先天肾虚的仔鼠模型,通过光电刺激^[11]、仿地震平台震动^[12]以及包天桐的悬吊应激^[13]这3种方法的交替刺激,使孕鼠出现肾虚表现,继而娩出先天肾虚的仔鼠。3种刺激在上午和下午各进行1次,3种刺激进行的时间随机、顺序随机,但是各种刺激的时间间隔至少为30 min。

2.2 分组及给药 按照雌雄2:1比例对实验大鼠进行合笼,按随机取数法分为正常组、肾虚组、左归丸低、高剂量组,每组6只,除正常组外,各组从合笼开始造模,直至取材。每日清晨对母鼠进行阴道涂片,显微镜下看到阴栓即可作为受孕成功。自怀孕第1天起,开始灌胃。肾虚组实验大鼠按照

10 mL·kg⁻¹给予生理盐水灌胃,左归丸根据人与动物换算公式^[14],左归丸低、高剂量组分别按照2, 8 g·kg⁻¹·d⁻¹给予左归丸的含药混悬液灌胃。

2.3 标本采集 21 d龄为仔鼠断奶最佳时间,课题组在断奶当天随机抽取每只孕鼠的仔鼠6只,断头、在冰块上快速切取背部皮肤。各组中每只母鼠的1只仔鼠为一个样本。4%多聚甲醛固定保存,用于苏木素-伊红(HE)染色,免疫荧光检测;-80℃冰箱保存,用于蛋白免疫印迹法(Western blot),Real-time PCR检测。

2.4 标本的处理

2.4.1 仔鼠皮肤形态学检测 取仔鼠背部皮肤,采用4%的中性多聚甲醛溶液固定皮肤组织,脱水,石蜡包埋后切片,烤片脱蜡至水后行HE染色观察,拍片。观察皮肤的结构,并测定皮肤真皮层和表皮层的厚度。

2.4.2 Real-time PCR检测皮肤内Wnt3a和 β -catenin mRNA的表达 trizol法提取TECs RNA,根据吸光度 $A(A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}})$,估测RNA质量,比值在1.8~2.0满足实验要求。逆转录成cDNA。逆转录反应体系wei RNA, 3.196 μ g; Oligo (dT) 18 (10 μ mol·L⁻¹), 2 μ L; dNTP(2.5 mmol·L⁻¹), 4 μ L; 5 \times Hiscript Buffer, 4 μ L; Hiscript Reverse Transcriptase, 1 μ L; Ribonuclease Inhibitor, 0.5 μ L; 反应条件为25℃ 5 min, 50℃ 15 min, 85℃ 5 min, 4℃ 10 min。Real-time PCR反应体系为cDNA, 4 μ L; Forward Primer (10 μ mol·L⁻¹), 0.4 μ L; Reverse Primer (10 μ mol·L⁻¹), 0.4 μ L; SYBR Green Master Mix, 10 μ L; 50 \times ROX Reference Dye 2, 0.4 μ L; 反应条件为50℃ 2 min, 95℃ 10 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 40循环,引物序列见表1。绘制溶解曲线,以 β -actin作为内参基因,最终数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行分析,引物由武汉巴菲尔生物技术服务有限公司合成。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列	长度/bp
β -actin	上游5'-CGTTGACATCCGTAAGAC-3'	110
	下游5'-TAGGAGCCAGGGCAGTA-3'	
Wnt3a	上游5'-GAGTCTCGTGGCTGGGTGGA-3'	108
	下游5'-GGGCTCGCAGAAGTTAGGTG-3'	
β -catenin	上游5'-TTCTTGCTATTACGACAG-3'	165
	下游5'-CAGCACCTTCAGCACTC-3'	

2.4.3 Western blot检测皮肤内Wnt3a,β-catenin蛋白的表达 取出组织样本,提取蛋白,并测定所含蛋白浓度;配置5%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶;将测定好浓度的的蛋白样品和蛋白marker加入凝胶的上样孔,电泳1.5 h,电转移,5%脱脂奶粉的TBST封闭液封闭2 h,将PVDF膜置于Wnt3a(1:500),β-catenin(1:5 000),β-actin(1:500)的一抗中,4℃湿盒孵育过夜;次日用TBST洗膜,再将PVDF膜置于二抗(1:5万),摇床中37℃孵育2 h;TBST洗膜;显色曝光、定影,冲洗胶片晾干;扫描胶片,用BandScan分析胶片灰度值。

2.4.4 免疫双荧光检测皮肤内LC3和SQSTM1-p62蛋白的表达 切取皮肤组织样品,制备石蜡切片;烤片,脱蜡;微波法对组织进行抗原修复;采用5%~10%正常山羊血清封闭,室温下孵育30 min,以减少非特异性染色;滴加LC3一抗(1:100),4℃湿盒孵育15 h;PBST冲洗切片并擦干,滴加荧光(cy3)标记羊抗兔IgG(1:100),37℃湿盒内孵育1 h, PBST冲洗切片;此步骤及后续操作步骤宜避光进行。再次进行血清封闭,滴加另外一抗SQSTM1-p62(1:200),继续于4℃湿盒中避光孵育15 h。PBST冲洗切片、擦干,滴加第二种荧光(FITC)标记羊抗小鼠IgG(1:100),37℃环境下湿盒孵育1 h, PBST洗片。滴加DAPI染细胞核;擦干切片表面液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,荧光显微镜下观察采集图像,并行图像分析。红色为LC3和绿色为SQSTM1-p62,蓝色为细胞核。每张切片选取3个400倍视野,利用IPP 6.0软件对免疫荧光照片做积分吸光度分析,计算出平均积分吸光度。

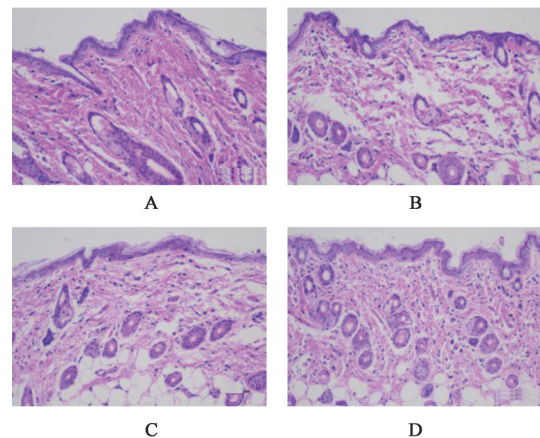
2.5 统计学方法 各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,将数据导入Graphpad Prism 8.0软件进行统计分析,组间比较采用T检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态观察 正常组孕鼠活动自如,摄食饮水未见明显异常,未出现早产、流产和死胎等现象,子代大鼠在出生后21 d能正常断奶,且反应灵敏,能正常啃食大鼠饲料,毛发纯白、柔顺且光亮,皮肤色泽红润。与正常组比较,肾虚组孕鼠表现出易惊善恐、背部蜷缩、倦怠思卧、喜抱团聚集,进食饮水频次及数量明显减少、大便质地稀软甚至不成形等症状,存在流产、早产以及分娩部分死胎的情况,产仔数量明显受到限制,同时发现子代大鼠在生后21 d,体毛明显脱落、稀疏不全,皮肤枯槁

无华、色泽红而晦暗、起皱紧缩而不光整,以中医辨证论治为指导,基于恐伤肾的病因病机,可判断肾虚组孕鼠已出现肾精耗损的症状,孕鼠肾精耗损可波及仔鼠,导致仔鼠同时形成先天肾虚的证型。左归丸低、高剂量组孕鼠未见流产、死胎,生后21 d的仔鼠可见毛发稍有枯槁色黄,但未发现明显的脱毛等异常现象。

3.2 对先天肾虚仔鼠皮肤组织结构的影响 正常组仔鼠皮肤各层解剖结构清晰,表皮层数均匀,真皮层胶原丰富,毛囊以及皮脂腺等附属器官形态、数量及排列正常。肾虚组皮肤表皮层局部轻度增厚,各层结构分界仍清晰可见,但是真皮层胶原排列疏松,可见毛囊以及皮脂腺等附属器官散在排列。左归丸低、高剂量组皮肤显微结构清晰,表皮层数均匀,真皮层胶原较疏松,毛囊以及皮脂腺等附属器官的数量、结构及排列基本正常。见图1。



A 正常组;B. 肾虚组;C. 左归丸低剂量组;D. 左归丸高剂量组(图2,3同)

图1 左归丸对先天肾虚仔鼠皮肤组织结构的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of Zuoguiwan on skin tissue structure of kidney deficiency offspring rats (HE,×200)

3.3 对先天肾虚仔鼠皮肤真皮层和表皮层的影响 与正常组比较,肾虚组仔鼠皮肤的表皮层明显增厚($P<0.05$);与肾虚组比较,左归丸低、高剂量组皮肤的表皮层明显变薄($P<0.05$)。与正常组比较,肾虚组仔鼠皮肤的真皮层明显变薄($P<0.05$);与肾虚组比较,左归丸低、高剂量组皮肤的真皮层厚度差异无统计学意义;与正常组比较,肾虚组仔鼠皮肤的表皮层/真皮层值增加($P<0.05$);与模型组比较,左归丸低、高剂量组与肾虚组比较,表皮层/真皮层比值明显减少($P<0.05$)。见表2。

3.4 对先天肾虚仔鼠皮肤内Wnt3a和β-catenin蛋白的影响 与正常组比较,肾虚组仔鼠皮肤内

表2 左归丸对先天肾虚仔鼠皮肤真皮层和表皮层的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of Zuoguiwan on dermis and epidermis of kidney deficiency offspring rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	表皮厚度 (×10 ⁻²)/mm	真皮厚度 (×10 ⁻²)/mm	表皮/真皮
正常		2.1±0.2	37.5±1.7	5.7±0.7
肾虚		2.6±0.2 ¹⁾	32.3±1.5 ¹⁾	8.1±0.8 ¹⁾
左归丸	2	1.9±0.1 ²⁾	32.4±1.9	6.1±0.4 ²⁾
	8	1.8±0.3 ²⁾	30.0±1.7	5.9±0.6 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与肾虚组比较²⁾ $P<0.05$ (表3~5同)。

Wnt3a和 β -catenin蛋白表达明显下降($P<0.05$);与肾虚组比较,左归丸低、高剂量组Wnt3a和 β -catenin蛋白表达明显升高($P<0.05$)。见图2,表3。

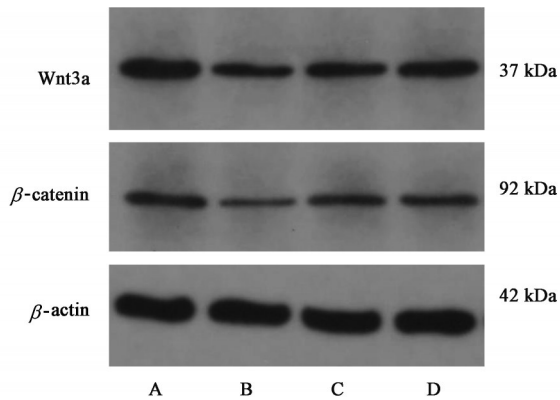


图2 各组仔鼠皮肤内Wnt3a和 β -catenin蛋白表达电泳条带

Fig. 2 Electrophoresis of Wnt3A and β -catenin proteins in skin of offspring rats in each group

表3 左归丸对先天肾虚仔鼠皮肤内Wnt3a和 β -catenin蛋白的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of Zuoguiwan on content of Wnt3a and β -catenin in skin of kidney deficiency offspring rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Wnt3a/ β -actin	β -catenin/ β -actin
正常		92.6±1.2	45.2±2.3
肾虚		47.5±1.0 ¹⁾	30.9±0.6 ¹⁾
左归丸	2	56.0±1.6 ²⁾	39.1±0.9 ²⁾
	8	65.8±5.9 ²⁾	41.3±1.4 ²⁾

3.5 对肾虚仔鼠Wnt3a和 β -catenin mRNA表达的影响 与正常组比较,肾虚组仔鼠皮肤内Wnt3a和 β -catenin mRNA表达明显下降($P<0.05$);与肾虚组比较,左归丸低、高剂量组Wnt3a和 β -catenin mRNA表达升高($P<0.05$)。见表4。

3.6 对肾虚仔鼠皮肤内LC3和SQSTM1-p62表达的影响 与正常组比较,肾虚组仔鼠LC3蛋白表达明显升高($P<0.05$);与肾虚组比较,左归丸低、高剂

表4 左归丸对肾虚仔鼠皮肤内Wnt3a和 β -catenin mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of Zuoguiwan on mRNA of Wnt3a and β -catenin in skin of kidney deficiency offspring rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Wnt3a	β -catenin
正常		1.025±0.017	1.035±0.026
肾虚		0.595±0.049 ¹⁾	0.445±0.046 ¹⁾
左归丸	2	0.781±0.064 ²⁾	0.725±0.026 ²⁾
	8	0.921±0.023 ²⁾	0.910±0.024 ²⁾

量组LC3蛋白表达下降($P<0.05$)。与正常组比较,肾虚组仔鼠SQSTM1-p62蛋白表达明显下降($P<0.05$);与肾虚组比较,左归丸低、高剂量组SQSTM1-p62蛋白表达明显升高($P<0.05$)。见图3,表5。

4 讨论

中医认为人有七情,当情志过极会伤及脏腑功能,从而引起阴阳失衡、气血失调而诱发疾病,恐作为七情之一,过极之时主要损伤肾的功能,《黄帝内经·素问·阴阳应象大论》指出:“恐伤肾”,长期恐惧或短时过度恐惧皆可伤及肾脏的功能,恐则气下,恐则精却,最终导致肾气受损、肾精不足。课题组以“恐伤肾”的理论指导为基础,运用复合应激法达到了惊吓刺激孕鼠的效果,成功建立了先天肾虚仔鼠模型。本实验中,肾虚组孕鼠出现毛发脱落稀疏、皮肤枯槁无华、早产、产仔量减少、畸胎、死胎等现象,表明肾虚组孕鼠皮肤毛发失于濡养,生殖功能明显减退,提示肾精耗损,肾气不足。《医宗必读》曰:“肾为先天之本”,肾的主要功能包括肾藏精,而精能化髓生血,人体的脏腑、形体五官、皮肤毛窍均需要精血的滋润和濡养,肾精还可以化生元气,人体的生长发育、生殖机能均离不开元气的推动作用。肾之阴阳为五脏阴阳之根本,若母代肾气亏虚、肾精耗损,通过“母病及子”对子代发生影响,会导致子代由于先天禀赋不足而出现生长迟缓等表现,后天的发育明显受到不良影响,最终子代和母代均可由肾虚引起一系列生理和病理改变^[13]。

皮肤是机体重要的免疫器官之一,表皮层是直接与外界接触的部位,主要发挥屏障功能,维持人体内环境稳态,防止体内营养物质丢失,防止物理化学及生物等有害因素的刺激;表皮层的吸收、感觉、免疫功能对机体也是非常重要的,表皮层最外层的角质层是皮肤发挥吸收功能的重要路径,同时表皮层中具有免疫活性的细胞,如角质形成细胞、朗格汉斯细胞,其分泌炎症细胞因子、捕获提呈抗

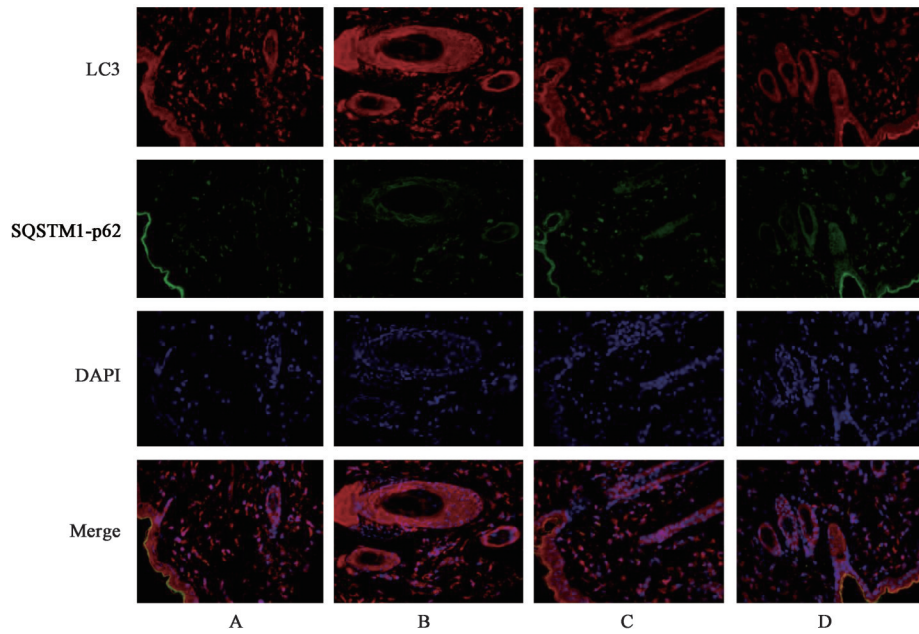


图3 左归丸对肾虚仔鼠皮肤内 LC3 和 SQSTM1-p62 表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of Zuoguiwan on expressions of CL3 and SQSTM1-p62 protein in skin of kidney deficiency offspring rats(IF,×400)

表5 左归丸对肾虚仔鼠皮肤内 CL3 和 SQSTM1-p62 平均积分吸光度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Zuoguiwan on content of CL3 and SQSTM1-p62 in skin of kidney deficiency offspring rats ($\bar{x}\pm s, n=6$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CL3	SQSTM1-p62
正常		44.8±3.6	2.2±0.2
肾虚		54.1±3.3 ¹⁾	1.3±0.2 ¹⁾
左归丸	2	41.5±2.2 ²⁾	1.8±0.3 ²⁾
	8	41.8±2.4 ²⁾	2.8±0.2 ²⁾

原、免疫监视的功能共同决定了皮肤在人体防御系统中的重要作用。本实验显示肾虚组表皮层增厚,此病理现象会影响皮肤的吸收及免疫屏障和分泌等功能。研究显示 Wnt3a 蛋白可以抑制角质细胞的增殖过程^[15],本次实验的肾虚组中 Wnt3a 表达下调,则可促进表皮层增厚,与课题组通过病理形态学观察到表皮层增厚现象一致。真皮层在表皮层与皮下组织之间,富含胶原纤维、弹力纤维、网状纤维、神经、血管和基质等,决定着皮肤是否具有良好的弹性和张力,帮助皮肤锁住水分保持皮肤水润,与皮肤健康状态和衰老速度密切相关。毛囊是上皮和真皮细胞信号交换、诱导分化的结果,研究发现黄芩苷通过 Wnt 激活 Wnt/ β -catenin 信号途径刺激毛乳头细胞数量以及碱性磷酸酶水平,可以改善毛发的状态^[16]。Wnt3a 和 Wnt5a 在系统发育和生化方面也有相似之处,本次实验课题组发现模型仔鼠背部皮肤真皮层变薄,将会影响真皮层对水分、营养

物质的吸收和组织修复功能。

Wnt3a 是促进皮肤发育的重要因子, β -catenin 分布于真皮层成纤维细胞样细胞、腺上皮细胞和浸润淋巴细胞的细胞核内^[17]。研究发现,人脐带间充质干细胞植入糖尿病大鼠,可以激活 Wnt 信号通路加速皮肤创面的愈合^[18];通过对鹅胚胎的羽毛发育过程中的转录组进行测序,证实 Wnt3a 等蛋白在皮肤和羽毛卵泡发展和成长的过程发挥重要作用^[19]。本次实验发现先天肾虚模型仔鼠皮肤内的 Wnt3a 和 β -catenin 蛋白和 mRNA 的表达下降,说明 Wnt3a 通路被抑制,而左归丸可以改善 Wnt3a 和 β -catenin 抑制的状态。Wnt3a 促进 β -catenin 的表达, β -catenin 入核后通过 TCF4 直接抑制 p62 的生成。通常 LC3 II/LC3 I 和 SQSTM1-p62 的蛋白量可以反应细胞自噬的状态,如果 LC3 II/LC3 I 上升,提示细胞内自噬小体的增加;如果 LC3 II/LC3 I 上升, SQSTM1-p62 含量下降,提示自噬活性加强;如果如 LC3 II/LC3 I 和 SQSTM1-p62 同时增加,说明自噬小体降解过程被抑制^[20]。本次实验用免疫双荧光法检测发现肾虚组仔鼠皮肤内 LC3 明显增加,而 SQSTM1-p62 减少,说明肾虚组皮肤细胞的自噬活性增强;左归丸可以抑制 LC3 的表达,增加 SQSTM1-p62 的表达,课题组推测先天肾虚仔鼠皮肤内 Wnt3a 通路的抑制,导致了皮肤细胞自噬过度,补肾填精法可以激活 Wnt3a 通路,抑制皮肤的过度自噬。

综上所述,肾虚母鼠的内分泌变化会影响到仔鼠在胚胎期皮肤的发育,表现为仔鼠皮肤表皮层的增厚和真皮层的变薄等形态变化,Wnt3a和 β -catenin蛋白和mRNA的减少使皮肤内细胞自噬异常增强,破坏了皮肤细胞的正常发育过程可能是先天肾虚仔鼠抑制皮肤正常分化发育的原因之一。而左归丸通过补肾填精可以缓解孕鼠肾虚状态,改善先天肾虚仔鼠皮肤发育异常,激活Wnt3a/ β -catenin途径,减少LC3的表达,增加SQSTM1-p62的聚集从而抑制自噬小体形成,逆转先天肾虚导致的皮肤细胞过度自噬,从而恢复仔鼠皮肤的正常发育。本实验从皮肤内细胞的自噬过程揭示了先天肾虚仔鼠皮肤屏障功能异常的部分机制,同时提示左归丸能通过激活Wnt3a通路抑制先天肾虚仔鼠皮肤组织内细胞过度自噬,从而改善皮肤发育的异常,促进免疫屏障系统的平衡。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 范建霞,杨帅. 单独二胎政策开放高龄产妇面临的临床问题[J]. 中国临床医生杂志, 2015, 43(8): 1-3.
- [2] 陈晓珠. 中医综合干预对备孕二胎肾虚高龄妇女的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [3] 张学军, 郑捷. 皮肤性病学[M]. 9版. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 6.
- [4] ECKHART L, TSCHACHLER E, GRUBER F. Autophagic control of skin aging[J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 143.
- [5] PUGSLEY H R. Assessing autophagic flux by measuring LC3, p62, and LAMP1 co-localization using multispectral imaging flow cytometry[J]. J Vis Exp, 2017(125): e55637.
- [6] 房其军, 刘建璟, 万毅刚, 等. 基于自噬信号通路探究褐藻多糖硫酸酯改善人近端肾小管上皮细胞衰老的分子机制[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(24): 6003-6011.
- [7] 黄丽平, 钟晓琴, 罗青, 等. 胡椒碱对帕金森痴呆模型小鼠小肠部位的自噬作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(21): 5238-5247.
- [8] WANG X, ZHU Y, SUN C, et al. Feedback activation of basic fibroblast growth factor signaling via the Wnt/ β -catenin pathway in skin fibroblasts [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 32.
- [9] COLELLA B, FAIENZA F, CARINCI M, et al.

Autophagy induction impairs Wnt/ β -catenin signalling through β -catenin relocalisation in glioblastoma cells [J]. Cell Signal, 2019, 53: 357-364.

- [10] 冯新玲, 周安方, 周慧芳, 等. 恐伤孕鼠对其仔鼠脑发育的影响及其机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(9): 2063-2065.
- [11] 桑红灵, 章程鹏, 周安方, 等. 恐伤孕鼠对其仔鼠颅骨培养成骨细胞Cx43、BGP表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(11): 2766-2769.
- [12] 萧闵, 桑红灵, 周安方, 等. 恐伤孕鼠对其仔鼠长骨早期发育影响的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(8): 1744-1747.
- [13] 黄敏, 陈会敏, 周艳艳, 等. 补肾填精法对肾精亏虚孕鼠脾脏及TLR4/MyD88/NF- κ Bp65免疫通路的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(6): 1786-1793.
- [14] 黄继汉, 黄晓辉, 陈志阳, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [15] NAM J S, CHAKRABORTY C, SHARMA A R, et al. Effect of Wnt3a on keratinocytes utilizing *in vitro* and bioinformatics analysis[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4): 5472-5495.
- [16] XING F, YI W J, MIAO F, et al. Baicalin increases hair follicle development by increasing canonical Wnt/ β catenin signaling and activating dermal papillar cells in mice[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 2079-2085.
- [17] 刘金娟, 刘彤. Wnt2、Wnt3a和 β -catenin在硬皮病患者皮损中的作用[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(12): 1781-1786.
- [18] HAN Y, SUN T, HAN Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells implantation accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats via the Wnt signaling pathway [J]. Eur J Med Res, 2019, 24(1): 1-9.
- [19] LIU C, SELLO C T, SUN Y, et al. De novo transcriptome sequencing analysis of goose (anser anser) embryonic skin and the identification of genes related to feather follicle morphogenesis at three stages of development[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3170.
- [20] PETHERICK K J, WILLIAMS A C, LANE J D, et al. Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk[J]. EMBO J, 2013, 32(13): 1903-1916.

[责任编辑 周冰冰]