

# 黄芪甲苷对被动型 Heymann 肾炎大鼠 PERK 通路的影响

项协隆<sup>1,2</sup>, 邵思思<sup>1</sup>, 陈宇<sup>1</sup>, 陈春<sup>1</sup>, 董飞侠<sup>1,2</sup>

1. 浙江中医药大学附属温州中医院肾内科, 浙江 温州 325000; 2. 温州老年病医院, 浙江 温州 325000

**【摘要】目的:** 观察黄芪甲苷对被动型 Heymann 肾炎大鼠 PERK 通路的影响。**方法:** 用羊抗大鼠 Fx1A 抗体血清尾静脉注射制备被动型 Heymann 肾炎大鼠模型。40 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、黄芪甲苷低剂量组、黄芪甲苷高剂量组和贝那普利组。造模成功后各治疗组灌胃给药 4 周。定期检测 24 h 尿蛋白定量。4 周后处死所有大鼠, 采血检测血清白蛋白, PASM 染色观察肾组织病理学改变, 免疫组化检测肾组织磷酸化蛋白激酶 R 样内质网激酶 (p-PERK)、磷酸化真核细胞翻译起始因子 2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) 的表达, Western blot 检测肾组织中葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 的表达。**结果:** 模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量较正常对照组显著升高 ( $P < 0.05$ ), 并随着时间推移蛋白尿逐渐增多, 至 4 周后达到高峰。在给药 4 周后, 与正常对照组比较, 模型组大鼠肾组织 p-PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、GRP78 表达明显升高, 血清白蛋白明显降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 黄芪甲苷高剂量组及贝那普利组大鼠 24 h 尿蛋白显著减少, 肾组织 p-PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、GRP78 表达显著减少, 血清白蛋白显著升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 黄芪甲苷可能通过抑制内质网应激 (ERS) 中的 PERK 通路缓解被动型 Heymann 肾炎大鼠肾脏损伤。

**【关键词】** 黄芪甲苷; Heymann 肾炎; 内质网应激 (ERS); 膜性肾病; 动物实验; 大鼠

**【中图分类号】** R692.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 0256-7415 (2018) 04-0010-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.04.003

## Astragaloside IV Has Effect on PERK Pathway in Rats with Passive Heymann Nephritis

XIANG Xielong, SHAO Sisi, CHEN Yu, Chen Chun, Dong Feixia

**Abstract: Objective:** To observe the effect of astragaloside IV on PERK pathway in rats with passive Heymann nephritis. **Methods:** The rat model of passive Heymann nephritis was established by tail intravenous injection of anti-Fx1A serum. Forty SD rats were randomly divided into the normal control group, the model group, the low-dose astragaloside IV group, the high-dose astragaloside IV group and the benazepril group. After the success of model establishment, each treatment group received intragastric administration for 4 weeks. Detected 24-h urinary protein quantification periodically. After 4 weeks, sacrificed all the rats, collected blood to detect serum albumin, observed the renal pathological changes by PASM, detected the expression of phosphorylated protein kinase R-like ER kinase (p-PERK) and phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) in renal tissues by immunohistochemistry, and detected the expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78) in renal tissues by Western blot. **Results:** 24-h urinary protein quantification of rats in the model group was significantly higher than that in the normal control group ( $P < 0.05$ ), and the urine protein was gradually increased as time went by, which reached its peak after 4 weeks. After administration for 4 weeks, comparing with the normal control group, the expression of p-PERK, p-eIF2 $\alpha$  and GRP78 in the renal tissues of rats in the model group was evidently higher, serum albumin was decreased evidently, differences being significant ( $P < 0.05$ ). Comparing with the model group, 24-h urinary protein quantification of rats in the high-dose astragaloside IV group and the benazepril group were significantly decreased, the expression of p-PERK, p-eIF2 $\alpha$  and GRP78 in the renal tissues was significantly decreased, and serum albumin was significantly increased, differences being significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Astragaloside IV may relieve the renal damage resulting from passive Heymann nephritis by inhibiting PERK pathway in endoplasmic reticulum stress (ERS).

**Keywords:** Astragaloside IV; Heymann nephritis; Endoplasmic reticulum stress (ERS); Membranous nephropathy; Animal experiment; Rats

**【收稿日期】** 2017-10-18

**【基金项目】** 温州市科技计划项目 (Y20160308)

**【作者简介】** 项协隆 (1979-), 男, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗肾病。

**【通信作者】** 董飞侠, E-mail: 296519557@qq.com.

膜性肾病(Membranous nephropathy, MN)是成人肾病综合征的主要病理类型之一,在我国约占原发性肾病综合征的20%,近年来发病率逐渐升高<sup>[1]</sup>。足细胞损伤是MN发病的关键,而内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是足细胞发生凋亡的最重要机制之一。黄芪具有益气健脾、补中、利尿等功效,是治疗MN的常用中药,其重要成分黄芪甲苷(astragaloside IV)具有调节机体免疫力、保护组织器官、降低血糖、抗细胞凋亡和抗炎抗病毒等多方面作用<sup>[2]</sup>,体外实验亦证实黄芪甲苷对补体膜攻击复合物诱导的足细胞损伤有保护作用<sup>[3]</sup>,但对MN的具体作用机制尚不清楚。本研究通过观察黄芪甲苷对被动型海曼(Heymann)肾炎大鼠葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)、磷酸化蛋白激酶R样内质网激酶(phosphorylated protein kinase R-like ER kinase, p-PERK)、磷酸化真核细胞翻译起始因子2 $\alpha$ (phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 alpha, p-eIF2 $\alpha$ )等内质网应激相关因子表达的影响,进一步明确黄芪甲苷对被动型Heymann肾炎的保护作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 雄性SPF级SD大鼠40只,体质量170~200 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0002,合格证编号:2015000535634,于温州医科大学实验动物中心SPF级实验室饲养,保持(50 $\pm$ 5)%相对湿度,25 $^{\circ}$ C恒温,人工光照,明暗各12 h,自由饮食饮水。

**1.2 药物与试剂** 盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司,批号:X2445),黄芪甲苷(纯度98%,成都锦泰和医药化学技术有限公司,批号:160802)。羊抗大鼠Fx1A抗体血清(Probetex inc.,批号:169-06G),p-PERK抗体(Santa,货号:sc32577),p-eIF2 $\alpha$ 抗体(Santa,货号:sc101670),GRP78抗体(Santa,货号:sc376768),GAPDH抗体(联科生,货号:MAB5465),兔二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:PV-6001),DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司),ECL Plus发光试剂盒(碧云天公司)。

**1.3 主要仪器** 高速台式冷冻离心机(TGL-16M,湖南湘仪实验仪器开发有限公司),显微镜(BX43型,OLYMPUS公司),隔水式恒温培养箱(PYX-

DHS500BS-II型,上海跃进医疗器械有限公司),酶标仪(SPECTRA max Plus 384, Molecular Devices公司),电泳仪(Mini-Proten Tetra System, Bio-RAD公司),凝胶成像仪(ChemiDoc XRS+ System, Bio-RAD公司)。

**1.4 模型制备及分组给药** 40只雄性SD大鼠适应性饲养1周后开始试验,期间人工光照,明暗各12 h,自由饮水进食。将大鼠随机分为5组,分别为正常对照组、模型组、黄芪甲苷低剂量组、黄芪甲苷高剂量组以及贝那普利组,每组8只。除正常对照组外,其他各组大鼠均尾静脉注射羊抗大鼠Fx1A抗体血清,剂量为6 mL/kg,正常对照组尾静脉注射等量生理盐水。1周后使用代谢笼收集大鼠尿液检测24 h尿蛋白定量,除正常对照组外,其他各组大鼠24 h尿蛋白定量均大于20 mg,用于后续试验。黄芪甲苷低、高剂量组分别按5、10 mg/(kg $\cdot$ d)灌胃给药,贝那普利组按10 mg/(kg $\cdot$ d)予盐酸贝那普利灌胃,正常对照组和模型组给予等量生理盐水灌胃。所有大鼠连续灌胃4周,每周测体质量1次并调整给药量,至实验结束。

**1.5 标本收集处理** 分别于开始灌胃给药后第1周末、第2周末及第4周末应用代谢笼收集尿液检测24 h尿蛋白定量。所有大鼠于灌胃4周结束后以2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后开腹,经下腔静脉采血,分离血清,-20 $^{\circ}$ C保存。留取肾组织,生理盐水冲洗后左肾迅速放入液氮中保存,右肾则于4%多聚甲醛中固定。

**1.6 生化指标检测** 24 h尿蛋白定量及血清白蛋白采用全自动生化分析仪检测。

**1.7 肾组织病理观察及免疫组织化学检查** 取大鼠肾组织按常规方法制作石蜡切片,行PASM染色后光镜观察肾小球基底膜、系膜细胞及系膜基质等。免疫组化检查采用3 $\mu$ m石蜡切片,常规脱蜡水化,柠檬酸盐缓冲液中高压煮沸抗原修复,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育20 min,滴加山羊血清封闭液封闭30 min,分别滴加p-PERK抗体(1:50),p-eIF2 $\alpha$ 抗体(1:50),4 $^{\circ}$ C过夜。滴加聚合辣根过氧化物酶标记的二抗,37 $^{\circ}$ C孵育30 min,二氨基联苯胺显色,蒸馏水洗涤,苏木素轻度复染,脱水、透明、封片。光学显微镜下观察,400倍视野下,每张切片随机取5个非重叠视野拍照;Image Pro Plus 6.0软件分析每张照片中阳性染色

面积的平均积分吸光度值, 取其平均值进行分析。

**1.8 Western Blot 法检测大鼠肾脏 GRP78 蛋白的表达** 取 80 mg 肾组织剪碎后加入 1 mL 组织裂解液, 在冰上匀浆后, 4℃离心机 11 000 rpm 离心 10 min 后取上清液。用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定。配置分离胶及浓缩胶, 以 60 μg 上样, 电泳并转膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 一抗 GRP78 抗体(1 : 500), 4℃孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h 后 ECL 荧光显色。用 GAPDH 作为内参检测 GRP78 蛋白条带扫描灰度变化。

**1.9 统计学方法** 实验数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验。

**2 结果**

**2.1 各组大鼠一般情况** 正常对照组大鼠精神状态良好, 皮毛光泽, 反应灵敏, 进食正常, 无皮下水肿。其他组大鼠在注射羊抗大鼠 Fx1A 抗体血清后即刻出现精神状态萎靡, 反应迟钝, 进食明显减少, 在注射第 2、3 天后缓慢恢复。模型组及黄芪甲苷低剂量组大鼠出现皮毛暗淡及皮下水肿; 而黄芪甲苷高剂量组以及贝那普利组大鼠介于正常对照组和模型组之间。

**2.2 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量及血清白蛋白比较**

见表 1。模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量较正常对照组显著升高( $P < 0.05$ ), 并随着时间推移蛋白尿逐渐增多, 至 4 周后达到高峰。在给药 4 周后, 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清白蛋白明显降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 黄芪甲苷高剂量组及贝那普利组大鼠 24 h 尿蛋白显著减少, 血清白蛋白显著升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量及血清白蛋白比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	24h 尿蛋白定量(mg/24h)			血清白蛋白(g/L)
		给药 1 w	给药 2 w	给药 4 w	
正常对照组	8	14.97±3.37	18.77±4.94	17.02±1.26	48.60±7.35
模型组	8	64.40±10.02 <sup>①</sup>	100.54±11.24 <sup>①</sup>	120.16±17.47 <sup>①</sup>	33.10±2.69 <sup>①</sup>
黄芪甲苷低剂量组	8	62.49±8.58	95.32±8.97	110.17±18.59	34.97±2.14
黄芪甲苷高剂量组	8	68.92±7.18	92.36±8.47	85.94±9.73 <sup>②</sup>	40.93±3.88 <sup>②</sup>
贝那普利组	8	65.74±6.61	89.51±7.56	80.02±8.31 <sup>②</sup>	41.45±4.12 <sup>②</sup>

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

**2.3 各组大鼠肾组织 PASM 染色结果比较** 见图 1。PASM 染色光镜下观察显示, 正常对照组大鼠肾小球结构基本正常, 肾小球基底膜无增厚, 不伴有系膜增生。模型组及黄芪甲苷低剂量组大鼠肾小球基底膜僵硬增厚, 伴有系膜增生。与模型组比较, 黄芪甲苷高剂量组与贝那普利组大鼠病理改变明显减轻。

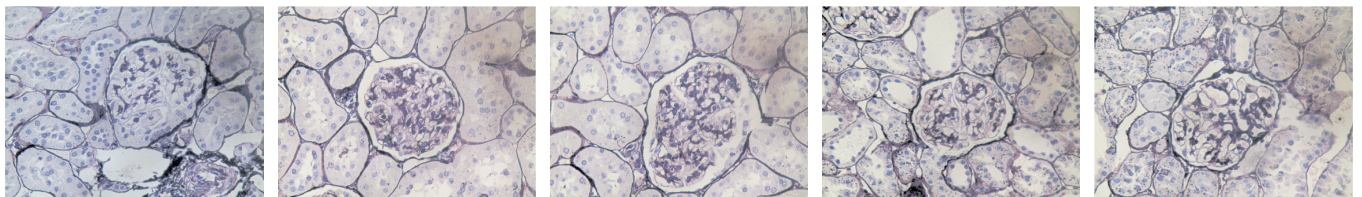


图 1 各组大鼠肾组织 PASM 染色病理结果 (×400)

**2.4 各组大鼠肾组织 p-PERK 及 p-eIF2α 表达比较** 见表 2、图 2。正常对照组大鼠可见 p-PERK、p-eIF2α 在肾小球及肾小管少量表达。与正常对照组比较, 模型组大鼠肾小管及肾小球 p-PERK、p-eIF2α 表达显著升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 黄芪甲苷高剂量组及贝那普利组大鼠 p-PERK、p-eIF2α 表达显著降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.5 各组大鼠肾组织 GRP78 蛋白表达比较** 见表 3、图 3。正常对照组大鼠肾脏组织 GRP78 少量表达。

表 2 各组大鼠肾组织 p-PERK 及 p-eIF2α 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	p-PERK	p-eIF2α
正常对照组	8	25.44±5.13	27.37±4.95
模型组	8	110.15±14.32 <sup>①</sup>	80.81±11.42 <sup>①</sup>
黄芪甲苷低剂量组	8	105.41±12.54	75.64±9.82
黄芪甲苷高剂量组	8	50.87±9.64 <sup>②</sup>	48.14±5.43 <sup>②</sup>
贝那普利组	8	52.63±8.34 <sup>②</sup>	45.34±6.76 <sup>②</sup>

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

与正常对照组比较,模型组大鼠 GRP78 表达明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,黄芪甲苷高剂量组及贝那普利组大鼠 GRP78 表达显著

减少,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );黄芪甲苷低剂量组较模型组 GRP78 表达虽有下降,但无统计学差异( $P > 0.05$ )。

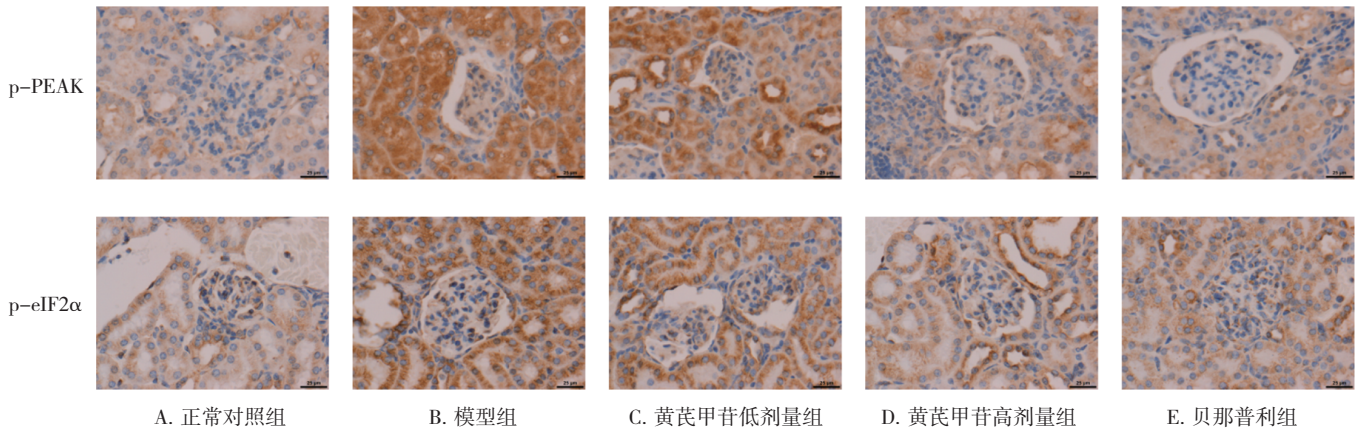


图2 各组大鼠肾组织 p-PERK、p-eIF2α 表达情况 (×400)

表3 各组大鼠肾组织 GRP78 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	GRP78
正常对照组	8	0.38 ± 0.02
模型组	8	0.81 ± 0.26 <sup>①</sup>
黄芪甲苷低剂量组	8	0.68 ± 0.17
黄芪甲苷高剂量组	8	0.52 ± 0.08 <sup>②</sup>
贝那普利组	8	0.45 ± 0.05 <sup>②</sup>

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

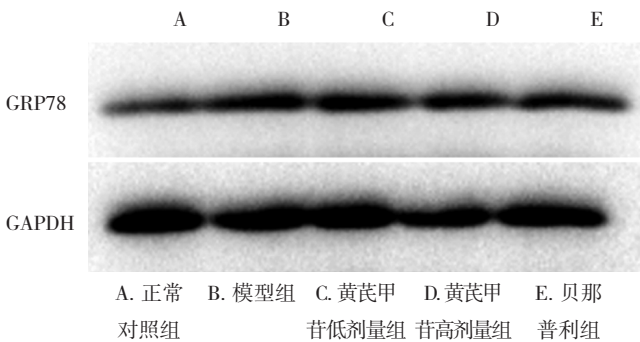


图3 各组大鼠肾组织 GRP78 蛋白表达情况

### 3 讨论

MN 患病率随着人口老龄化、肾活检指征放宽及环境污染的加剧等原因不断升高,其在原发性肾小球疾病中的占比亦逐渐升高<sup>[4]</sup>。被动型 Heymann 肾炎大鼠是研究 MN 的经典模型。MN 患者肾活检标本研究及被动型 Heymann 肾炎大鼠研究均发现 ERS 的标志蛋白 GRP78 表达明显升高,而且进一步明确 ERS 是

膜性肾病发病及足细胞损伤凋亡的重要病理机制<sup>[5-6]</sup>。黄芪是中医学中的常用药物,黄芪甲苷是其活性成分。研究提示,黄芪甲苷具有抗炎、降压、降糖、心肌保护等多种药理作用<sup>[7-8]</sup>。黄芪在膜性肾病患者的使用非常广泛,新近研究也发现黄芪甲苷能够缓解成人原发性肾病综合征的足细胞损伤,减少蛋白尿<sup>[9]</sup>,但黄芪甲苷是否通过影响 PERK 通路中相关蛋白表达而缓解 ERS 减少蛋白尿尚不清楚。本研究首先通过注射羊抗大鼠 Fx1A 抗体血清,建立被动型 Heymann 肾炎模型<sup>[9-10]</sup>,再将黄芪甲苷应用于该模型。本研究发现,模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量明显升高,血清白蛋白降低,肾组织 PASM 染色出现肾小球基底膜僵硬增厚及肾组织 GRP78 蛋白表达增多等,均提示模型组大鼠出现 ERS 且造模成功。黄芪甲苷高剂量组较模型组 24 h 尿蛋白定量明显减少,血清白蛋白上升,肾组织 PASM 染色示病理损害减轻,肾组织 GRP78 蛋白表达下调,均提示高剂量黄芪甲苷能够通过减轻 ERS 而有效缓解肾脏损伤。

缺血缺氧、氧化应激、钙浓度异常等因素导致内质网蛋白负荷过重引发 ERS 时,机体将激活一系列信号途径过程即未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),以减少蛋白质产生或者降解异常折叠蛋白质<sup>[11]</sup>。UPR 由分子伴侣 GRP78 和 3 种 ERS 感受器蛋白介导,这 3 种蛋白分别是 PERK,转录激活因子 6 和肌醇依赖酶 1,它们引导三种不同的信号通

路,其中 PERK/eIF2 $\alpha$  信号通路为主要通路<sup>[12]</sup>。ERS 启动时,PERK 与 GRP78 解离后发生自身磷酸化,成为 p-PERK 并激活下游 eIF2 $\alpha$  使其磷酸化为 p-eIF2 $\alpha$ ,从而下调几乎所有蛋白质的翻译合成,减轻内质网负担<sup>[13]</sup>。适当的 ERS 有助于维持细胞生存,但过度 ERS 会引导组织细胞发生凋亡,引起或加重疾病<sup>[14]</sup>。Chen Y 等<sup>[15]</sup>发现在糖尿病肾病大鼠中,黄芪甲苷可以通过抑制肾组织 ERS 发挥保护足细胞减少蛋白尿的作用,并且进一步了解该作用主要通过 PERK/eIF2 $\alpha$  信号通路实现,而对转录激活因子 6 和肌醇依赖酶 1 没有影响。本研究中同样发现黄芪甲苷高剂量组大鼠 GRP78、p-PERK、p-eIF2 $\alpha$  蛋白表达明显下调,尿蛋白减少而血清白蛋白明显上升,病理损伤减轻,提示黄芪甲苷可能通过抑制 PERK/eIF2 $\alpha$  通路减轻 ERS,缓解蛋白尿,起到保护 Heymann 肾炎大鼠肾脏的作用,为以后黄芪甲苷在膜性肾病中的运用提供新的视角。

#### [参考文献]

- [1] 杨柳,刘东伟,刘章锁.膜性肾病流行病学研究进展[J].中华肾脏病杂志,2016,32(3):229-232.
- [2] 段立军,孙博航.黄芪甲苷的研究进展[J].沈阳药科大学学报,2011,28(5):410-416.
- [3] Zheng R, Deng Y, Chen Y, et al. Astragaloside IV attenuates complement membranous attack complex induced podocyte injury through the MAPK pathway[J]. *Phytother Res*, 2012, 26(6): 892-898.
- [4] Zhu P, Zhou FD, Wang SX, et al. Increasing frequency of idiopathic membranous nephropathy in primary glomerular disease: a 10-year renal biopsy study from a single Chinese nephrology centre [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2015, 20 (8): 560-566.
- [5] Wang L, Hong Q, Lv Y, et al. Autophagy can repair endoplasmic reticulum stress damage of the passive Heymann nephritis model as revealed by proteomics analysis [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(13): 3866-3876.
- [6] Markan S, Kohli HS, Joshi K, et al. Up regulation of the GRP-78 and GADD-153 and down regulation of Bcl-2 proteins in primary glomerular diseases: a possible involvement of the ER stress pathway in glomerulonephritis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 324(1-2): 131-138.
- [7] Gui D, Huang J, Guo Y, et al. Astragaloside IV ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibiting NF-kappaB-mediated inflammatory genes expression[J]. *Cytokine*, 2013, 61(3): 970-977.
- [8] Zhang N, Wang XH, Mao SL, et al. Astragaloside IV improves metabolic syndrome and endothelium dysfunction in fructose-fed rats[J]. *Molecules*, 2011, 16(5): 3896-3907.
- [9] Lindskog A, Ebefors K, Johansson ME, et al. Melanocortin 1 receptor agonists reduce proteinuria[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(8): 1290-1298.
- [10] 杨凤杰,周建华,吕倩影,等.足细胞自噬在被动 Heymann 肾炎发病中的作用[J].中华肾脏病杂志,2014,30(1):41-47.
- [11] 武晓旭,章超群,许坤,等.白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织中内质网应激的影响[J].安徽医科大学学报,2014,49(6):768-772.
- [12] Atkins C, Liu Q, Minthorn E, et al. Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity [J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (6): 1993-2002.
- [13] Cunard R, Sharma K. The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300(5): F1054-F1061.
- [14] Tagawa Y, Hiramatsu N, Kasai A, et al. Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein(CHOP)[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45 (1): 50-59.
- [15] Chen Y, Gui D, Chen J, et al. Down-regulation of PERK-ATF4-CHOP pathway by Astragaloside IV is associated with the inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(6): 1975-1987.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)