

益气活血解毒中药对梗阻性肾病细胞自噬的调控作用

柴亚男¹, 郝娟¹, 马雪莲^{1,2}, 闫翠环¹, 王香婷^{1,2}, 许庆友^{1,2}

1. 河北中医学院研究生学院, 河北 石家庄 050091

2. 河北省肝肾病证研究重点实验室, 河北 石家庄 050091

[摘要] 目的: 观察益气活血解毒中药对梗阻性肾病中细胞自噬的作用。方法: 将48只雄性Wistar大鼠随机分为假手术组、模型组、缬沙坦组和中药组, 除假手术组外, 其余各组结扎大鼠单侧输尿管复制梗阻性肾病的动物模型。缬沙坦组和中药组分别给予10 mg/(kg·d)缬沙坦和14 g/(kg·d)益气活血解毒中药, 10天后摘取梗阻侧肾脏。通过Western blot和免疫组化检测血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶(Serum and glucocorticoid induced kinase, SGK-1)、自噬相关基因5(Autophagy associated gene 5, Atg5)、自噬相关基因Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3(Microtubular-associated protein 1 light chain 3, LC3)、磷酸化细胞外信号调节激酶1/2(Phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase, P-ERK1/2)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Phosphorylated target of rapamycin, P-mTOR)的表达。结果: 与假手术组比较, 模型组自噬蛋白Atg5、Beclin-1、LC3 II/I、SGK-1与P-ERK1/2表达增强, P-mTOR表达减弱, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 缬沙坦组和中药组自噬蛋白Atg5、Beclin-1、LC3 II/I、SGK-1及P-ERK1/2表达降低, P-mTOR表达增强, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 益气活血解毒中药可以通过调控SGK-1、P-ERK1/2和P-mTOR通路, 抑制盐皮质激素受体(Mineralocorticoid receptor, MR)的活化, 从而纠正梗阻性肾病中细胞自噬的异常。

[关键词] 梗阻性肾病; 益气活血解毒; 盐皮质激素受体(MR); 细胞自噬; 血清糖皮质激素诱导蛋白激酶-1(SGK-1); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] 0256-7415(2018)12-0008-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.12.003

Chinese Medicine of Yiqi Huoxue Jiedu Has Regulatory Effect on Cells Autophagy of Obstructive Nephropathy

CHAI Ya'nan, HAO Juan, MA Xuelian, YAN Cuihuan, WANG Xiangting, XU Qingyou

Abstract: Objective: To observed the effect of Chinese medicine of Yiqi Huoxue Jiedu on cells autophagy of obstructive nephropathy. Methods: Randomly divided 48 male Wistar rats into the sham operation group, the model group, the valsartan group and the Chinese medicine group. Except the sham operation group, the other groups received unilateral ureteral obstruction to copy the animal model of obstructive nephropathy. The valsartan group and the Chinese medicine group were given 10 mg/(kg·d) of valsartan and 14 g/(kg·d) of Chinese medicine of Yiqi Huoxue Jiedu, and obstructed kidney of rats were taken after 10 d. Detected the expressions of serum and glucocorticoid induced kinase(SGK-1), Autophagy associated gene 5 (Atg5), Beclin-1, microtubular-associated protein 1 light chain 3(LC3), phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase(PERK1/2) and phosphorylated target of rapamycin(P-mTOR) by Western blot and immunohistochemistry. Results: Compared with those in the sham operation group, the expressions of Atg5, Beclin-1, LC3 II/I, SGK-1 and P-ERK1/2 in the model group were increased, while the expression of P-mToR was decreased, differences being significant($P < 0.01$). Compared with those in the model group, the expressions of Atg5, Beclin-1, LC3 II/I, SGK-1 and P-ERK1/2 in the valsartan group and the Chinese medicine group were decreased, while the expression of P-mToR was increased, differences being significant($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion: Chinese medicine of Yiqi Huoxue Jiedu can inhibit the activation of mineralocorticoid receptor(MR) by regulating the pathways of SGK-1, ERK1/2 and P-mTOR, so as to correct the abnormal of cells autophagy of obstructive nephropathy.

Keywords: Obstructive nephropathy; Yiqi Huoxue Jiedu; Mineralocorticoid receptor(MR); Autophagy; Serum and glucocorticoid induced kinase(SGK-1); Animal experiment; Rats

[收稿日期] 2018-07-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473652); 河北省科技支撑项目(15277746D)

[作者简介] 柴亚男(1992-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗肾脏病。

[通信作者] 许庆友, E-mail: qingyouxu@sohu.com; 王香婷, E-mail: hbwangxiangting@163.com。

梗阻性肾病是指因尿流障碍导致肾脏实质性损害的疾病, 肾素-血管紧张素-醛固酮系统(Renin-angiotensin aldosterone system, RAAS)在其发病过程中发挥了重要作用, 尤其是醛固酮, 可以激活盐皮质激素受体(Mineralocorticoid receptor, MR), 诱导细胞增殖、表型转化、凋亡、炎性坏死以及自噬等, 进而发展为肾间质纤维化。细胞增殖等已有较多的研究, 而细胞自噬在其中的作用尚需深入观察。细胞自噬是真核细胞在溶酶体的介导下降解受损的细胞器和异常大分子蛋白, 从而维持细胞内环境的稳定及形态功能完好的过程。Kim WY等^[1]在单侧输尿管结扎(Unilateral ureteral obstruction, UUO)所致梗阻性肾病的早期阶段检测到了自噬的发生, 并证实其早于细胞凋亡和肾小管纤维化。本实验采用UUO建立梗阻性肾病的大鼠模型, 诱导MR活化, 给予益气活血解毒中药治疗, 并采用血管紧张素II(Angiotensin II, AngII)受体拮抗剂缬沙坦作为阳性对照, 通过检测自噬蛋白及相关通路的表达, 探讨益气活血解毒中药对梗阻性肾病中细胞自噬的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组 选用清洁级雄性Wistar大鼠48只, 体重(180±20)g, 购自河北医科大学动物实验中心, 动物许可证号: SCXK(冀)2013-1003, 随机分为假手术组(Sham组)、模型组(UUO组)、缬沙坦组(Val组)和中药组(TCM组), 每组12只。

1.2 实验药物 缬沙坦购自诺华公司; 益气活血解毒中药选用广东一方制药有限公司免煎颗粒(黄芪15g, 僵蚕、地龙、蝉蜕、乌蛇、丹参、鳖甲、赤芍、金银花、野菊花、蒲公英、当归各10g, 大黄6g), 按比例混匀煎煮15min, 水煎液含生药4kg/L, 参照徐叔云《药理实验方法学》折合大鼠用量为14g/(kg·d)给药。

1.3 试剂和仪器 糖皮质激素诱导蛋白激酶(Serum and glucocorticoid induced kinase, SGK-1)抗体选用Affibotech产品, 磷酸化细胞外信号调节激酶(Phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase, P-ERK)和GAPDH抗体选用Bioworld Technology产品, mTOR、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Phosphorylated target of rapamycin, P-mTOR)和微管相关蛋白1轻链3(Microtubular-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体选用Cell Signaling Technology产品, 自噬相关基因5(Autophagy associated gene 5, Atg5)和Beclin-1抗体选用Proteintech产品, 免疫组化试剂盒选用北京中杉金桥生物技术有限公司产品。电泳仪及电泳槽(北京六一公司), OLYMPUS VANOX PM-10AD型显微照相仪(OLYMPUS公司), LEICARM 2245型石蜡切片仪(LEICA上海分公司), ODY-3059扫描仪(Li-cor公司)。

1.4 模型制备及给药方法 实验大鼠适应性喂养1周后, 通过UUO建立梗阻性肾病的动物模型, 用10%的水合氯醛以3mL/kg的剂量通过腹腔注射麻醉动物, Sham组于左侧中腹部

切开皮肤, 仅将输尿管游离但不结扎不切断, 逐层缝合皮肤; UUO组于左侧中腹部切开皮肤, 游离左侧输尿管, 分别在输尿管上1/3及下1/3处用丝线结扎后切断输尿管, 逐层缝合皮肤; Val组和TCM组造模同UUO组。各组分别于造模前1天开始给药, 造模当天不给药, 缬沙坦组给予缬沙坦10mg/(kg·d)灌胃; 中药组给予中药煎剂14g/(kg·d)灌胃; UUO组及Sham组均给予与治疗组等量的生理盐水灌胃。10天后处死动物, 摘取梗阻侧的肾脏, 一部分组织放入4%多聚甲醛中固定, 石蜡包埋后切片行免疫组化染色; 剩余组织-70℃保存, 用于Western blot检测蛋白表达。

1.5 检测指标及方法 每组选取4只大鼠检测指标。采用SABC法检测LC3、Beclin-1、Atg5、P-mTOR的表达, 一抗浓度均为1:100。Western blot检测自噬蛋白、MR的激活及相关通路的表达。取冰冻肾脏组织100mg加裂解液(含蛋白酶抑制剂)0.4mL, 提取蛋白并测定含量, 配制相应浓度的浓缩胶和分离胶, 加入上样蛋白适量, 电泳后转膜, 5%脱脂牛奶封闭, 加入一抗Atg5、Beclin-1、LC3II/I、SGK-1、P-ERK1/2、P-mTOR抗体(1:1000), 4℃过夜, 次日TBS清洗3次, 加入相应二抗(1:20000)孵育后TBS清洗3次, 显影, 与所得内参进行校正后比较。

1.6 统计学方法 数据资料采用SPSS21.0统计软件进行分析, 结果满足正态性分布, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 数值变量以($\bar{x} \pm s$)表示, 两两比较采用LSD检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾组织LC3、Beclin-1、Atg5和P-mTOR表达结果比较 见图1。Sham组的LC3、Beclin-1和Atg5呈弱表达, 见于肾小管上皮细胞的细胞浆和细胞膜, 而UUO组表达明显增强, 主要见于肾小管上皮细胞的细胞膜; 与UUO组比较, Val组和TCM组LC3、Beclin-1和Atg5表达均明显减弱。Sham组P-mTOR呈阳性表达, 见于肾小管上皮细胞的细胞核, UUO组表达减弱; 与UUO组比较, Val组和TCM组P-mTOR表达增强。

2.2 各组大鼠肾组织Atg5、Beclin-1和LC3II/I表达结果比较 见表1。与Sham组比较, UUO组大鼠Atg5、Beclin-1、LC3II/I表达明显增强($P < 0.01$); 与UUO组比较, Val组和TCM组大鼠Atg5、Beclin-1、LC3II/I表达明显减弱($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠肾组织SGK-1、P-ERK1/2和P-mTOR/mTOR表达结果比较 见表2。与Sham组比较, UUO组SGK-1、P-ERK1/2表达明显增强($P < 0.01$); 与UUO组比较, Val组和TCM组SGK-1、P-ERK1/2表达明显减弱($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与Sham组比较, UUO组P-mTOR/mTOR表达减弱($P < 0.01$), 与UUO组比较, Val组和TCM组P-mTOR/mTOR表达增强($P < 0.01$)。

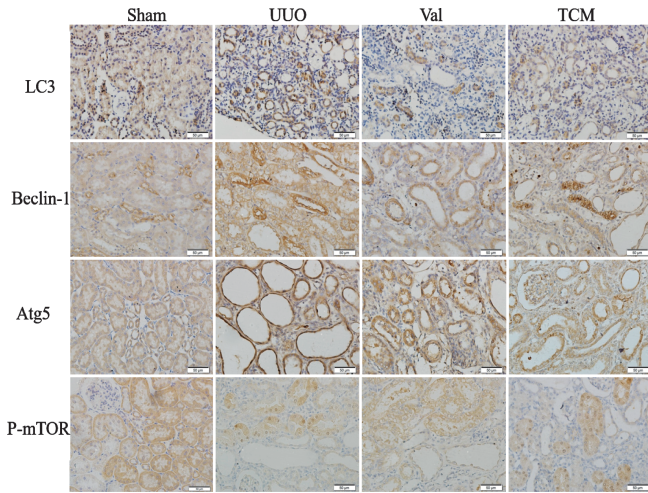


图1 各组大鼠肾组织 LC3、Beclin-1、Atg5 和 P-mTOR 表达结果比较 (×400)

表1 各组大鼠肾组织 Atg5、Beclin-1 和

组别	n	LC3II/I 表达结果比较($\bar{x} \pm s$)		
		Atg5	Beclin-1	LC3II/I
Sham 组	4	0.165 ± 0.102	0.195 ± 0.086	1.375 ± 0.262
UUO 组	4	2.270 ± 0.864 ^①	0.365 ± 0.040 ^①	4.780 ± 1.167 ^①
Val 组	4	0.695 ± 0.276 ^③	0.260 ± 0.090 ^②	3.438 ± 0.252 ^②
TCM 组	4	0.832 ± 0.333 ^③	0.270 ± 0.092 ^②	3.608 ± 0.458 ^②

与 Sham 组比较, ① $P < 0.01$; 与 UUO 组比较, ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$

表2 各组大鼠肾组织 SGK-1、P-ERK1/2 和

组别	n	P-mTOR/mTOR 表达结果比较($\bar{x} \pm s$)		
		SGK-1	P-ERK1/2	P-mTOR/mTOR
Sham 组	4	0.483 ± 0.532	0.400 ± 0.137	1.613 ± 0.257
UUO 组	4	1.240 ± 0.198 ^①	0.795 ± 0.947 ^①	0.445 ± 0.254 ^①
Val 组	4	0.860 ± 0.105 ^②	0.553 ± 0.922 ^③	1.472 ± 0.079 ^③
TCM 组	4	0.990 ± 0.108 ^②	0.558 ± 0.419 ^③	1.377 ± 0.241 ^③

与 Sham 组比较, ① $P < 0.01$; 与 UUO 组比较, ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$

3 讨论

UUO 模型是研究肾间质纤维化的常用模型。有研究证实 UUO 可以促进醛固酮的分泌, 醛固酮不仅可以调节钠离子及水分子的再吸收, 还参与了炎症损伤和氧化应激等病理反应^[2], 在 UUO 大鼠的肾脏中, 富含线粒体和氧化酶的近端小管更容易受损^[3]; 我们之前通过检测 UUO 大鼠的血清及尿液中 8-羟脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)含量, 也证实了醛固酮很可能通过氧化应激加重肾脏损伤^[4]。SGK-1 是一种丝氨酸转移酶, 参与了醛固酮诱导的氧化应激、炎症损伤和肾脏纤维化等病理过程, 是反映醛固酮诱导脏器损伤的重要介质^[5]。本实验采用 Western blot 检测 SGK-1 蛋白的表达, 结果

显示与 Sham 组比较, UUO 组 SGK-1 的表达明显增强, 证实醛固酮通过 SGK-1 通路诱导肾脏的损伤。

氧化应激不仅与醛固酮有密切的联系, 也是影响自噬发展的重要因素。Chen Y 等^[6]提出在葡萄糖或血清等营养物质缺乏的情况下, 活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)最初产物超氧阴离子自由基(O₂⁻)参与了自噬的发生, 当细胞处于饥饿状态时, H₂O₂ 分子会立即激活延伸进而诱导自噬的发生。LC3 是自噬的标志性蛋白^[7], 以 LC3I 和 LC3II 2 种形式存在于细胞中, 当自噬发生时存在于细胞质中的 LC3I 经过泛素修饰过程与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺(PE)结合, 即转化为分子量较小的 LC3II, 并聚集形成自噬体膜, 所以通常采用 Western blot 检测 LC3II/I 来评价自噬的活性^[8]。Beclin-1 是自噬基因 Atg6/Vps30 的同源基因^[9], 通过与 III 型磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)结合形成 Beclin-1-PI3K 复合物, 引导相关蛋白形成蛋白复合体, 促进自噬体膜的形成^[10]。本实验通过 Western blot 和免疫组化检测 LC3 和 Beclin-1 的表达证实了在 UUO 所致的梗阻性肾病中自噬的发生。

P-ERK1/2 通路在营养缺乏或氧化损伤的条件下很容易被激活, 有研究表明醛固酮与胞浆内受体结合, 可快速诱导 P-ERK1/2 激酶的磷酸化^[11], 通过 P-ERK1/2 磷酸化将信号从表面受体传导至细胞核, 促进其与自噬相关基因的转录与表达。自噬过程主要受自噬相关基因(Atg)调控, 其中 Atg5 在促进自噬的发展和减缓肾脏损伤的过程中起到了重要作用。在自噬体的延伸阶段, 有 Atg12-Atg5-Atg16 复合物于其外膜结合^[12], 该复合物的形成对自噬过程至关重要, 因为其中任何成分的突变都会导致自噬缺陷^[13]; Li HY 等^[14]用免疫荧光法分别检测敲除 Atg5 小鼠与未敲除 Atg5 小鼠中 LC3II 的阳性表达发现, 与未敲除 Atg5 的小鼠相比, 敲除 Atg5 小鼠中的细胞自噬明显受到抑制, 且肾脏纤维化更严重。本实验中 UUO 组大鼠 LC3、Beclin-1 和 Atg5 的表达较 Sham 组明显增强, 且与 SGK-1、P-ERK1/2 的表达增强相一致, 说明 MR 活化后通过 SGK-1 通路和 P-ERK1/2 通路促进了梗阻性肾病中自噬的发生。

P-ERK1/2 下游的 P-mTOR 通路也是调控自噬的 1 条重要通路, P-mTOR 是 1 种存在于哺乳动物中的非典型的丝氨酸激酶, 是自噬的负调控分子。梗阻性肾病早期生物体内的调节机制反应可以抑制 P-mTOR 的表达, 激活细胞自噬, 从而清除细胞内因输尿管梗阻产生的异常蛋白分子和过氧化物等物质^[15]。本实验结果表明在 UUO 术后早期 P-mTOR 通路被抑制, 自噬表达增强, 当给予缬沙坦和益气活血解毒中药治疗后 P-mTOR 表达增强, 自噬受到抑制。

RAAS 激活后, AngII 在胆固醇转化为孕烯酮环节发挥了重要作用, 从而促进醛固酮的合成。缬沙坦是 AngII 受体拮抗剂, 可以通过抑制 AngII 的作用阻断醛固酮的合成, 所以选用缬沙坦作为阳性对照药物。

梗阻性肾病发病与中医学中的肾着、癃闭等疾病相似, 其

病因以脾肾亏虚为本，气血瘀滞，痰湿阻塞尿道为标，总属“虚、瘀、毒”范畴。气虚则卫外不固，邪气侵袭脏腑而发病；脾肾亏虚则气血津液运化失常，痰浊、水湿聚而成“瘀”；气血运行不畅，浊邪壅阻于内，日久成“毒”，治疗当“益气、活血、解毒”。方中黄芪益气扶正；丹参、赤芍活血散瘀；地龙、乌梢蛇、僵蚕、醋鳖甲通络散结；大黄、黄芩、金银花、蒲公英清热解毒。前期研究发现，益气活血解毒中药可下调炎症因子表达，减轻炎症损伤，减缓梗阻性肾病的进展^[5]。本实验结果表明给予中药治疗后，UUO 大鼠肾脏内醛固酮的活性降低，自噬的表达明显受到了抑制。

本实验观察益气活血解毒中药对梗阻性肾病中细胞自噬的影响，结果显示 UUO 组细胞自噬的表达与 MR 的活化程度均明显高于 Sham 组，而 Val 组和 TCM 组均受到抑制。可见益气活血解毒中药可以通过调控 SGK-1、P-ERK1/2 和 P-mTOR 通路抑制 MR 的活化，减缓梗阻性肾病中细胞自噬的发生，从而减轻肾脏损伤。

[参考文献]

- [1] Kim WY, Nam SA, Song HC, et al. The role of autophagy in unilateral ureteral obstruction rat model[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2012, 17(2): 148-159.
- [2] 崔艳, 陈晓, 安惠霞, 等. 醛固酮与肾脏炎症的研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2012, 13(10): 932-934.
- [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]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013, 31(3): 628-636.
- [4] 王箏, 常奕, 熊云昭, 等. 活血解毒中药下调 8-OhdG 表达抑制梗阻性肾病大鼠细胞凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(9): 1324-1329.
- [5] Martín-Fernández B, Heras NDL, Miana M, et al. Spironolactone prevents alterations associated with cardiac hypertrophy produced by isoproterenol in rats: involvement of serum and glucocorticoid-regulated kinase type [J]. *Exp Physiol*, 2012, 97(6): 710-718.
- [6] Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2009, 16(7): 1040-1052.
- [7] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. *Cell*, 2010, 140(3): 313-326.
- [8] Liu B, Sun J, Zhang JX, et al. Autophagy-related protein expression in the substantia nigra and eldepryl intervention in rat models of Parkinson's disease[J]. *Brain Research*, 2015, 1625(4): 180-188.
- [9] Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress[J]. *Autophagy*, 2007, 3(1): 28-31.
- [10] McKnight NC, Yue Z. Beclin 1, an Essential Component and Master Regulator of PI3K-III in Health and Disease[J]. *Current Pathobiology Reports*, 2013, 1(4): 231-238.
- [11] Zhu CJ, Wang QQ, Zhou JL, et al. The mineralocorticoid receptor-p38 MAPK-NF κ B or ERK-Sp1 signal pathways mediate aldosterone-stimulated inflammatory and profibrotic responses in rat vascular smooth muscle cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(7): 873-878.
- [12] 陈兰芳, 肖亮, 杨军平. 细胞自噬的分子机制及其功能[J]. *实验与检验医学*, 2014, 32(2): 157-163.
- [13] Liu N, Shi YF, Zhuang SG. Autophagy in Chronic Kidney Diseases[J]. *Kidney Diseases*, 2016, 2(1): 37-45.
- [14] Li HY, Peng X, Wang YT, et al. Atg5-mediated autophagy deficiency in proximal tubules promotes cell cycle G2/M arrest and renal fibrosis[J]. *Autophagy*, 2016, 12(9): 1472-1486.
- [15] 梁文杰, 马雪莲, 王萱, 等. 化瘀解毒方对梗阻性肾病大鼠肾脏 NLRP3、Caspase 1、IL-1β 表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(4): 470-475.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)