

地黄多糖调节 Wnt/β-catenin 信号通路对慢性肾衰竭大鼠的影响

刘五梅^{1,2}, 刘永飞^{1,2}, 黄志英³, 饶斌^{1,2}, 涂艳^{1,2}, 张晓丹^{1,2}

(1. 南昌医学院药学院, 江西南昌 330052; 2. 江西卫生职业技术学院药学系, 江西南昌 330052;
3. 南昌大学第二附属医院药剂科, 江西南昌 330008)

摘要: 目的 探究地黄多糖对慢性肾衰竭(CRF)大鼠的影响。方法 80只大鼠采用5/6肾切除术建立CRF模型, 随机分为模型组、肾衰丸组(3.13 g/kg)和地黄多糖低、中、高剂量组(10、20、30 mg/kg), 每组16只;另取16只大鼠, 仅切开暴露肾脏而不切除肾组织, 作为假手术组, 各组每天灌胃给药1次, 连续8周。HE染色观察大鼠肾组织病理变化, Masson染色观察大鼠肾组织纤维化程度, TUNEL法检测大鼠肾组织细胞凋亡率, ELISA法检测大鼠血清肾功能指标(BUN、Scr、UA)、炎症因子(IL-1β、IL-6、TNF-α)水平, Western blot法检测大鼠肾组织Wnt/β-catenin信号通路蛋白表达。结果 与模型组比较, 地黄多糖各剂量组及肾衰丸组大鼠肾组织结构改善, 纤维化面积占比减少($P<0.05$), BUN、Scr、UA水平及肾组织细胞凋亡率降低($P<0.05$), 血清IL-1β、IL-6、TNF-α水平降低($P<0.05$), 肾组织Wnt3α、β-catenin蛋白表达降低($P<0.05$)。结论 地黄多糖能减轻CRF大鼠肾损伤程度, 提高肾功能, 可能与激活Wnt/β-catenin信号通路相关。

关键词: 地黄多糖; 慢性肾衰竭; 炎症; 纤维化; Wnt/β-catenin信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)04-1341-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.04.046

慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)是一类继发性肾脏功能或结构改变的临床综合征, 涉及多种疾病的病理过程, 患者肾脏会出现严重的组织学改变, 包括肾小球损伤、肾小管坏死和炎症细胞浸润, 并伴有肾功能丧失, 表现为血尿素氮、肌酐、尿酸水平升高, 能诱发多种重症和并发症, 发展至晚期患者肾功能完全丧失, 甚至死亡^[1-2]。目前, CRF临床治疗主要以西药、血液透析为主, 严重者必须通过肾脏移植才能改善病征^[3]。近期研究表明, CRF早期有部分肾单位处在炎症可逆性阶段, 其中整合位点家族成员(wingless-type MMTV integration site family, Wnt)/β连环蛋白(β-catenin)通路的异常激活与CRF的发展是近年来的研究热点^[4-5], 因此, 基于Wnt/β-catenin通路寻找CRF的新疗法值得探索。

地黄多糖作为玄参科植物地黄根茎中的主要成分, 已被证明具有免疫调节、神经调节、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、治疗糖尿病等多种药理功能^[6-8], 在治疗肾病方面也具有良好疗效, 对于糖尿病肾病大鼠具有一定改善作用, 并能减少肾小管上皮细胞凋亡和氧化损伤^[9-10], 但目前关于地黄多糖与CRF的关系尚未明确。因此, 本研究探索地黄多糖对CRF大鼠的影响及其作用机制, 以期为相关治疗提供新思路。

1 材料

1.1 动物 96只6周龄雄性无特定病原体级别SD大鼠,

体质量210~220 g, 购自上海南方模式生物科技股份有限公司[实验动物生产许可证号SCXK(沪)2024-0007]。本研究经南昌医学院实验动物伦理委员会审批通过。

1.2 试剂与药物 地黄多糖(20 mg/瓶, 纯度≥90%, 批号JKB0540)购自上海经科化学科技有限公司。肾衰丸(50 mg/颗, 批号20231108-2157)购自华中科技大学同济医学院附属协和医院。原位末端标记(TUNEL)染色试剂盒(上海信裕生物科技有限公司, 批号ZY120026-10);苏木素-伊红(HE)染色试剂(上海翌圣生物科技有限公司, 批号60527ES08);动物组织蛋白裂解液(北京百奥莱博科技有限公司, 批号HR0259-ANE);Wnt3α单克隆抗体(美国GeneTex公司, 批号128101GTX);β-catenin单克隆抗体(美国CST公司, 批号9587T);GAPDH单克隆抗体(武汉华美生物工程有限公司, 批号PA009232HA01CH);血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(serum creatinine, Scr)检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号BC1535、BC4910);白细胞介素(interleukin, IL)-1β、IL-6、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)检测试剂盒(武汉吉立德生物科技有限公司, 批号J22380、J22434、J23792);戊巴比妥钠(美国Sigma公司, 批号57-33-0)。

1.3 仪器 ChemiDoc™ MP全能型成像系统(美国Bio-Rad公司); CLARIOstar® PLUS全功能多功能酶标仪(德

收稿日期: 2024-08-14

基金项目: 江西省卫生健康委科技计划项目(202410114); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ2208214)

作者简介: 刘五梅(1986—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为药理学、中药药理学

国BMG LABTECH公司);8KY型倒置生物显微镜(上海玉研科学仪器有限公司);HM355S型全自动轮转式石蜡切片机(上海聚慕医疗器械有限公司)。

2 方法

2.1 造模 参照文献[2]报道,采用5/6肾切除术建立CRF模型。随机选择80只大鼠,腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,固定于手术台上,解剖工具消毒后沿左脊骨切口,暴露左肾,迅速切除约2/3的组织,止血后缝合复位,1周后同法切除整个右肾;另取16只大鼠,仅切开暴露肾脏而不切除肾组织,作为假手术组。继续饲养2周后,大鼠目内眦取血,检测Scr、UA、BUN水平。若造模后大鼠上述指标显著高于假手术组,提示模型建立成功。

2.2 分组及给药 将造模成功的大鼠随机分为模型组、肾衰丸组和地黄多糖低、中、高剂量组,假手术组和模型组大鼠灌胃给予生理盐水,地黄多糖低、中、高剂量组大鼠分别灌胃给予相应药物(10、20、30 mg/kg),肾衰丸组大鼠灌胃给予相应药物(3.13 g/kg),每天1次,连续8周。最后1次给药24 h后,大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,取腹主动脉血和肾组织。

2.3 ELISA法检测大鼠血清炎症因子、肾功能指标 取大鼠腹主动脉血,于4℃、3 000 r/min条件下离心,收集上清液,按试剂盒说明书检测血清炎症因子(IL-1β、IL-6、TNF-α)、肾功能指标(BUN、UA、Scr)水平。

2.4 HE染色观察大鼠肾组织病理变化 将大鼠部分肾组织固定在10%福尔马林中,脱水后包埋在石蜡中,切片4~5 μm,按照试剂盒说明书进行染色,中性树胶封片,于显微镜下观察并拍摄。

2.5 Masson染色观察大鼠肾组织纤维化程度 大鼠肾组织石蜡切片脱蜡后,根据试剂盒说明书用R1核染料溶液染色60 s,R2浆染料溶液染色30~60 s,R3黄色分离液分离6~8 min,R4蓝色复染液染色5 min,中性树脂封片,于显微镜下观察。

2.6 TUNEL法检测大鼠肾组织细胞凋亡率 大鼠肾组织石蜡切片在65℃烘箱中放置1 min后脱蜡、水化,蛋白酶37℃消化30 min,磷酸缓冲液洗涤3次,每次5 min,加入TUNEL试剂反应,磷酸缓冲液洗涤,二氨基苯基吲哚染色20 min,漂洗切片,中性树脂封片,于显微镜下观察。

2.7 Western blot法检测大鼠肾组织Wnt3α、β-catenin蛋白表达 大鼠肾组织用动物组织蛋白裂解液分离总蛋白,12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移到聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉封闭,阻断非特异性结合,洗涤3次,分别孵育一抗和二抗,化学发光试剂盒显色,采用ImageJ软件检测蛋白表达。

2.8 统计学分析 通过SPSS 20.0软件进行处理,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,2组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 地黄多糖对CRF大鼠肾组织结构的影响

假手术组

大鼠肾组织未见病理损伤;模型组大鼠肾组织炎性细胞浸润,肾小球萎缩,肾小管囊腔扩张,内腔及大小不等的上皮萎缩;地黄多糖各剂量组及肾衰丸组大鼠肾组织结构、肾组织细胞损伤改善,见图1。

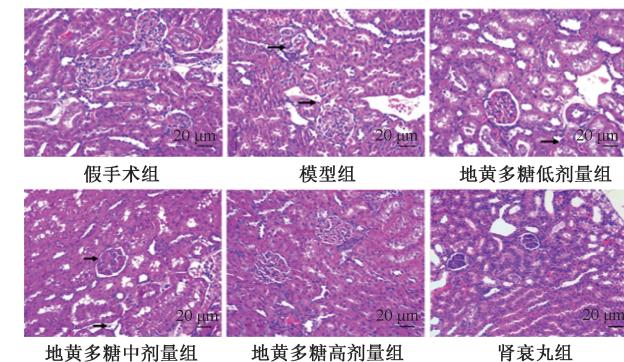


图1 各组大鼠肾组织结构(HE染色, $\times 200$)

3.2 地黄多糖对CRF大鼠肾组织纤维化的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肾组织纤维化面积增加($P<0.05$);与模型组比较,地黄多糖各剂量组及肾衰丸组大鼠肾组织纤维化面积减少($P<0.05$),见图2、表1。

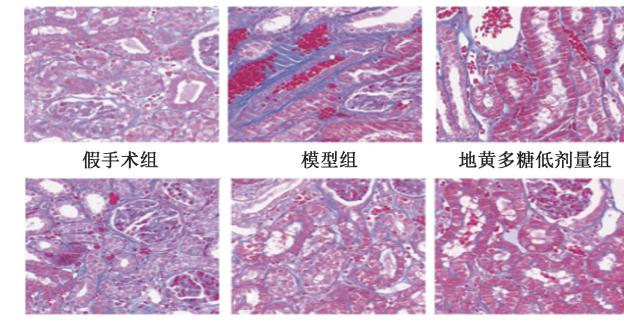


图2 各组大鼠肾纤维化情况(Masson染色, $\times 400$)

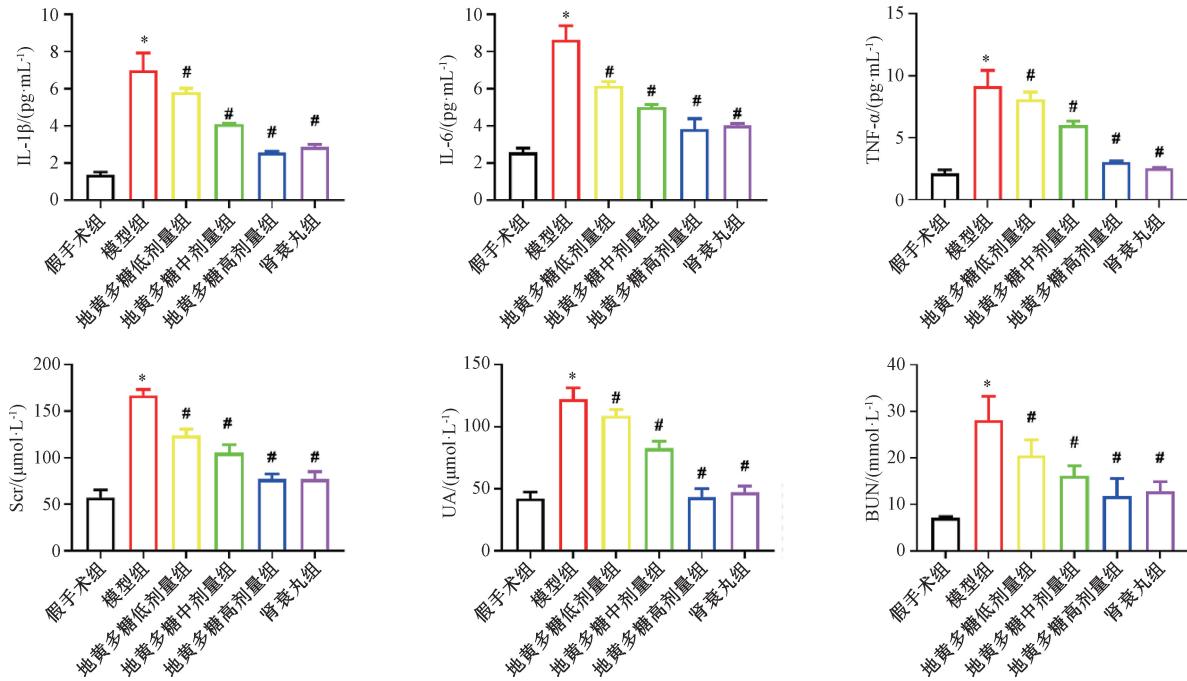
表1 各组大鼠肾纤维化面积比较($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	纤维化面积/%
假手术组	0.59 ± 0.08
模型组	$33.04\pm 2.36^*$
地黄多糖低剂量组	$27.13\pm 2.82^{\#}$
地黄多糖中剂量组	$20.21\pm 3.26^{\#}$
地黄多糖高剂量组	$13.27\pm 1.68^{\#}$
肾衰丸组	$12.57\pm 1.66^{\#}$

注:与假手术组比较, $^*P<0.05$;与模型组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

3.3 地黄多糖对CRF大鼠血清炎症因子、肾功能指标水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清IL-1β、IL-6、TNF-α、Scr、UA、BUN水平升高($P<0.05$);与模型组比较,地黄多糖各剂量组及肾衰丸组大鼠血清IL-1β、IL-6、TNF-α、Scr、UA、BUN水平降低($P<0.05$),见图3。

3.4 地黄多糖对CRF大鼠肾组织细胞凋亡的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肾组织细胞凋亡率升高($P<0.05$);与模型组比较,地黄多糖各剂量组及肾衰丸组大鼠肾组织细胞凋亡率降低($P<0.05$),见图4、表2。



注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、Scr、UA、BUN 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=16$)

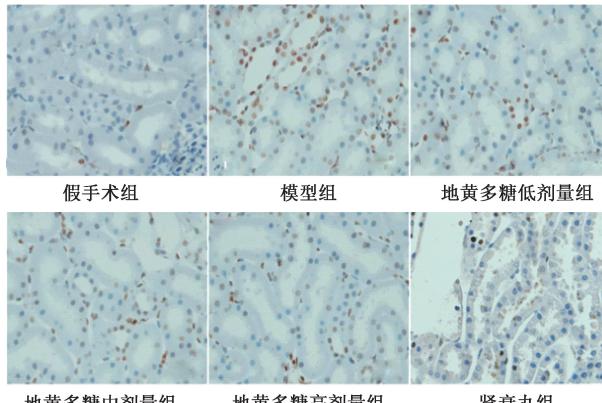


图4 各组大鼠肾组织细胞凋亡情况 (TUNEL 染色, $\times 400$)

表2 各组大鼠肾组织细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	凋亡率/%
假手术组	1.53±0.07
模型组	32.16±2.25*
地黄多糖低剂量组	21.23±1.36#
地黄多糖中剂量组	13.55±1.16#
地黄多糖高剂量组	7.52±0.59#
肾衰丸组	8.03±0.17#

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

3.5 地黄多糖对CRF大鼠肾组织Wnt3 α 、 β -catenin蛋白表达的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠肾组织Wnt3 α 、 β -catenin蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 地黄多糖各剂量组及肾衰丸组大鼠肾组织Wnt3 α 、 β -catenin蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 见图5、表3。

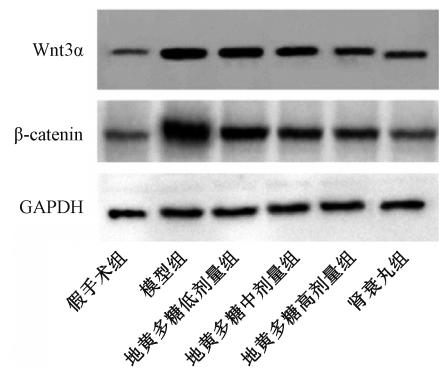


图5 各组大鼠肾组织Wnt3 α 、 β -catenin蛋白条带

表3 各组大鼠肾组织Wnt3 α 、 β -catenin蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	Wnt3 α	β -catenin
假手术组	0.12±0.05	0.17±0.03
模型组	1.19±0.03*	1.28±0.07*
地黄多糖低剂量组	1.08±0.09#	1.13±0.02#
地黄多糖中剂量组	0.92±0.08#	1.02±0.03#
地黄多糖高剂量组	0.65±0.07#	0.61±0.08#
肾衰丸组	0.59±0.08#	0.58±0.03#

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

4 讨论

近年来研究发现, CRF伴随着破坏性炎症反应, 炎症因子在其发生发展中具有重要作用, 患者体内多种炎性细胞因子水平升高(如TNF- α 、IL-6、IL-1 β), 高水平时会加重肾功能不全^[11-12], 因此, 抑制CRF的炎症反应可能是新的治疗思路。本研究发现, 地黄多糖可减轻CRF大鼠肾组

织病理损伤(如肾小管损伤、炎性细胞浸润),改善肾小球结构,降低尿素氮、肌酐、尿酸、血清炎性因子水平,减少肾纤维化面积,降低肾组织细胞凋亡率,对CRF具有改善作用。

研究发现,与发育相关的Wnt信号通路在与慢性器官衰竭相关的进行性损伤中发挥重要作用^[4],最初被认为是早期发育的重要组成部分,通过至少3条信号通路来帮助控制细胞分化和极性^[13-14]。既往研究表明,β-catenin是Wnt信号通路的关键成员,具有转录调控活性,被认为是Wnt通路激活的标志,在3条Wnt通路中,通过激活β-catenin发挥作用的经典Wnt通路已被广泛认可。在缺乏Wnt3α的情况下,β-catenin被蛋白酶体降解^[15],如果Wnt蛋白与卷曲蛋白受体结合,所产生的信号级联会抑制β-catenin降解,导致β-catenin在细胞内累积,随后β-catenin的细胞特异性转录因子复合物激活Wnt靶基因转录^[16-17]。Wnt信号通路可能在慢性器官衰竭相关的进行性损伤中重现,Wnt/β-catenin信号通路的异常激活可提升CRF发展过程中的炎性因子水平,促进肾足细胞损伤、凋亡,加快肾组织纤维化过程^[5]。本研究结果显示,CRF大鼠经地黄多糖处理后肾组织Wnt/β-catenin信号通路受到抑制,可能与调控Wnt/β-catenin信号通路相关。

综上所述,地黄多糖能改善CRF大鼠肾组织结构,减少纤维化面积,降低肾组织细胞凋亡率和炎性因子水平,从而改善肾功能,可能与调控Wnt/β-catenin信号通路相关。

参考文献:

[1] Li X, Lindholm B. Cardiovascular risk prediction in chronic kidney disease[J]. *Am J Nephrol*, 2022, 53(10): 730-739.

[2] 雷 蕾, 骆 言, 任 静, 等. 基于数据挖掘对中医治疗慢性肾衰竭组方规律的分析[J]. 中成药, 2019, 41(12): 3079-3082.

[3] 叶莉莹, 潘广辉, 赵 平, 等. 黑地黄丸通过调控IGF-1表达对慢性肾衰竭大鼠肾纤维化的抑制作用[J]. 中成药, 2024, 46(3): 788-794.

[4] 朱为坤, 张喜奎, 宋昱娇, 等. 基于NLRP3/Caspase-1和Wnt/β-catenin信号通路探讨桃核承气汤延缓慢性肾衰竭大鼠肾纤维化的机制[J]. 福建中医药, 2023, 54(11): 20-24.

[5] Dong Q, Jie Y, Ma J, et al. Wnt/β-catenin signaling pathway promotes renal ischemia-reperfusion injury through inducing oxidative stress and inflammation response[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(1): 15-18.

[6] 罗丽丹, 李达佑, 钟 华, 等. 地黄多糖对过氧化氢诱导的人晶状体上皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 眼科新进展, 2022, 42(8): 612-616.

[7] 马媛媛, 姚晓英, 谈卓臣, 等. 地黄多糖对东莨菪碱诱导小鼠学习记忆能力障碍的改善作用及其机制[J]. 中成药, 2021, 43(6): 1462-1466.

[8] 王清泉, 宋 景, 李亚男, 等. 地黄多糖的提取纯化及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(11): 3734-3744.

[9] 康 伟, 徐燕颖. 地黄多糖对糖尿病肾病大鼠模型的治疗作用及对RAGE/NF-κB信号通路的影响[J]. 天津中医药, 2015, 32(6): 364-367.

[10] 其其格, 夏丽华, 任 睿. 地黄多糖上调miR-216a表达对缺氧/复氧诱导的肾小管上皮细胞氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(11): 1466-1472; 1576.

[11] 周 颖, 陈 伟, 甘 翔, 等. 六味地黄汤加减对慢性肾衰竭患者微炎症指标及肾功能的影响[J]. 中国医学创新, 2024, 21(8): 29-32.

[12] 黄 芳. 血液灌流联合血液透析治疗对慢性肾衰竭患者临床疗效、炎性因子及钙磷代谢的影响研究[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2024, 8(9): 4-6.

[13] Peng J, Qin C, Tian S Y, et al. MiR-93 inhibits the vascular calcification of chronic renal failure by suppression of Wnt/β-catenin pathway[J]. *Int Urol Nephrol*, 2022, 54(1): 225-235.

[14] Soni H. Canonical Wnt/β-catenin signaling network as emerging signaling cascade for therapeutic intervention in chronic renal disease[J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22(16): 1825-1831.

[15] Chen X, Tan H, Xu J, et al. Klotho-derived peptide 6 ameliorates diabetic kidney disease by targeting Wnt/β-catenin signaling[J]. *Kidney Int*, 2022, 102(3): 506-520.

[16] Al-Hakeim H K, Asad H N, Maes M. Wnt/β-catenin pathway proteins in end-stage renal disease[J]. *Biomark Med*, 2021, 15(15): 1423-1434.

[17] 尤 云, 洪丽萍, 张宏涛. 基于Wnt/β-catenin信号通路探讨黄芪甲苷对慢性肾衰竭大鼠钙磷代谢紊乱的改善作用及机制[J]. 浙江中医药大学学报, 2021, 45(2): 124-130.