

益肾化湿颗粒对 MsPGN 大鼠肾组织 TGF- β 1 信号通路和 ERK1/2 磷酸化的影响

许晓刚, 张春江, 付彦杰, 董王钰, 杨晓萍*
(石河子大学医学院第一附属医院, 新疆 石河子 832000)

摘要: **目的** 探究益肾化湿颗粒对系膜增生性肾小球肾炎 (MsPGN) 大鼠的肾保护作用及机制。**方法** 30 只雄性 SD 大鼠行单肾切除手术, 随机选取其中 6 只作为对照组, 其余大鼠经尾静脉注射兔抗 Thy-1 抗体 (2.5 mg/kg) 复制 MsPGN 模型, 分为模型组、缬沙坦组 (8.5 mg/kg) 和益肾化湿颗粒低、高剂量组 (3.125、6.25 g/kg), 每组 6 只。造模后实验组灌胃给予相应剂量药物, 对照组和模型组灌胃给予生理盐水, 连续 6 周, 期间观察大鼠一般情况, 分时段检测 24 h 尿蛋白水平。给药结束后, 腹主动脉采血, 检测血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (Scr) 水平; 取肾脏, HE、Masson 染色观察肾组织病理形态学, 免疫组化法检测肾组织 TGF- β ₁ 的分布及表达强度, Western blot 法检测肾组织 TGF- β ₁、Smad2/3、p-Smad2/3、FN、ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达, RT-qPCR 法检测肾组织 TGF- β ₁、FN mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 益肾化湿颗粒各剂量组大鼠体质量增速升高 ($P < 0.05$), 24 h 尿蛋白定量、BUN、Scr 水平、肾小球内核计数、肾组织纤维化评分、肾组织 TGF- β ₁ AOD 值、TGF- β ₁、FN mRNA 表达和 TGF- β ₁、p-Smad2/3、FN、p-ERK1/2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 益肾化湿颗粒高剂量组和缬沙坦组较益肾化湿颗粒低剂量组更具优势 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 益肾化湿颗粒可减轻 MsPGN 大鼠蛋白尿、病理损伤, 延缓疾病进展, 其机制可能与下调 TGF- β ₁/Smad2/3 信号通路, 抑制 ERK1/2 磷酸化相关。

关键词: 益肾化湿颗粒; 系膜增生性肾小球肾炎; TGF- β 1; Smad; ERK

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)12-4137-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.12.048

在我国, 肾小球肾炎仍是引起慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 的主要原因^[1]。系膜增生性肾小球肾炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN) 为原发性肾小球肾炎最常见的类型^[2-3], 其以肾小球系膜细胞增生和细胞外基质积累为主要病理特征, 随着病情发展可出现肾小球硬化以及肾间质纤维化, 并进一步进展至 CKD 乃至终末期肾病^[4]。

目前, 有关于 MsPGN 的发病原因及进展机制尚未完全阐明, 有研究指出, 在 MsPGN 大鼠肾组织中, TGF- β ₁、p-Smad2/3 及 p-ERK1/2 表达升高^[5-6]。TGF- β /Smads 信号通路在多种类型肾脏疾病中被认为是驱动肾小球硬化和小管间质纤维化的关键, 是 CKD 进展的核心^[7]。ERK 作为 MAPK 的家族成员之一, 参与细胞的增殖、分化、迁移^[8], 有学者认为活化的 ERK1/2 是出现蛋白尿和肾小球硬化的主要上游中介^[9]。因此, 靶向 TGF- β /Smads 和 ERK 信号通路延缓肾脏病进展是 MsPGN 的主要治疗策略。

多项研究表明, 益肾化湿颗粒可减轻慢性肾小球肾炎患者尿蛋白, 具有消肿及延缓肾功能恶化功效, 然而

其分子机制尚未阐明^[10-11]。课题组前期研究发现, 益肾化湿颗粒可下调 PI3K/Akt 信号通路降低 MsPGN 大鼠蛋白尿, 同时可延缓肾小球硬化及肾间质纤维化的进展, 具体机制有待进一步阐明^[12]。本研究旨在建立大鼠慢性抗 Thy-1 肾炎模型探究益肾化湿颗粒是否介导 TGF- β /Smads/ERK 通路活化参与 MsPGN 的肾保护作用。

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级别 SD 大鼠 30 只, 8 周龄, 体质量 200~250 g, 购自新疆医科大学动物实验中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (新) 2018-0002], 饲养环境为室内温度 22~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 自由饮水摄食。本实验相关操作均通过石河子大学医学院第一附属医院实验动物伦理委员会批准 [伦理号 2022 伦审 (151) 号]。

1.2 药物与试剂 益肾化湿颗粒 (规格 10g/袋, 国药准字 Z20090250, 广州康臣药业有限公司); 缬沙坦分散片 (规格 80 mg/片, 国药准字 H20090092, 鲁南贝特制药有限公司)。兔抗大鼠 Thy-1 多克隆抗体 (货号 bs-0778R, 北京博奥森生物技术有限公司); 尿蛋白定量测试盒 (货号

收稿日期: 2023-07-19

基金项目: “益肾化湿颗粒”临床应用研究和基础研究开放课题 (康药合字 2020385)

作者简介: 许晓刚 (1990—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为内科学肾脏病诊疗。Tel: 15001630628, E-mail: 529171026@qq.com

* 通信作者: 杨晓萍 (1965—), 女, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为临床内科肾脏病诊疗。Tel: 13579458071, E-mail: sbkyp@163.com

C035-2-1, 南京建成生物工程研究所有限公司); TGF-β1 抗体 (货号 ab215715, 英国 Abcam 公司); 兔抗 p-Smad2/3 [货号 abs130992, 爱必信 (上海) 生物科技有限公司]; Smad2/3 抗体、ERK1/2 抗体、p-ERK1/2 抗体、Fibronectin 抗体、GAPDH 多克隆抗体、HRP-山羊抗兔二抗 (货号 BA1395、BM4326、BM4156、M00564-3、A00227-1、BM3894, 武汉博士德生物工程技术有限公司); 二氨基联苯胺 (DAB)、牛血清白蛋白 (BAS)、ECL 发光液、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂及磷酸化蛋白酶抑制剂 (武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.3 仪器 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 高速冷冻离心机、NanoDrop2000 核酸蛋白定量仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); 酶标仪、电泳仪、PCR 扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 所有大鼠适应性饲养 1 周后在麻醉下行左肾摘除术, 术前禁食不禁水 10 h, 术后自由摄食水。单肾摘除 1 周后随机选取 6 只大鼠经尾静脉注射生理盐水作为对照组, 其余 24 只大鼠参考文献 [13] 报道, 经尾静脉注射 2.5 mg/kg 的 Thy-1 抗体复制慢性不可逆型大鼠肾炎模型。将抗 Thy-1 肾炎大鼠随机分为模型组、缬沙坦 (8.5 mg/kg) 组和益肾化湿颗粒低、高剂量组 (3.125、6.25 g/kg), 每组 6 只分笼饲养。益肾化湿颗粒溶于 40 °C 生理盐水配制质量浓度为 0.5 g/mL 的溶液; 缬沙坦分散片溶于 40 °C 生理盐水配制质量浓度为 2.0 mg/mL 的溶液。各给药组灌胃给予相应药物, 对照组和模型组灌胃给予等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 6 周。

2.2 一般情况观察 观察大鼠精神、活动度、饮水摄食情况、皮毛光泽度及体质量变化。计算大鼠体质量增速, 公式为体质量增速 = (处死前体质量 - 造模前体质量) / 42。

2.3 尿蛋白定量检测 造模后第 7、14、28、42 天, 采用代谢笼分别收集各组大鼠 24 h 尿液, 采用考马斯亮蓝法 (CBB) 测定尿蛋白水平。

2.4 血清肌酐、尿素氮水平检测 给药结束后, 腹腔采血, 离心取血清, 于 -80 °C 冰箱中保存, 采用全自动生化分析仪检测血清肌酐、尿素氮水平。

2.5 肾组织病理学检测 给药结束后处死大鼠, 取右肾称量湿重, 部分肾组织置于 -80 °C 冰箱冰冻保存; 其余部分肾组织于 4% 多聚甲醛中固定, 脱水、透明后浸蜡, 石蜡包埋并切片 (厚度 3.0 μm)。分别对切片进行 HE、Masson 染色, 于显微镜下观察并拍照; 采用 Image J 软件对采集的图像进行半定量分析, 估计肾小球内细胞核数, 计算蓝色染色面积并赋分评估肾组织纤维化程度 (蓝染面积 ≤ 5% 记为 0 分, 5% < 蓝染面积 ≤ 25% 记为 1 分, 25% < 蓝染面积 ≤ 50% 记为 2 分, 50% ≤ 蓝染面积 < 75% 记为 3 分, 蓝染面积 ≥ 75% 记为 4 分), 每只大鼠至少评估 10 个肾小球。

2.6 免疫组化 (IHC) 染色检测肾组织 TGF-β1 的分布及表达强度 石蜡切片常规脱蜡至水, EDTA 微波抗原修复

后磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗, 3% 过氧化氢 (H₂O₂) 室温孵育 10 min 清除内源性过氧化物酶活性, PBS 冲洗, BSA 室温封闭 20 min, 加入 TGF-β1 一抗 (1 : 500), 4 °C 孵育过夜, PBST 冲洗后加入二抗 (1 : 500), 室温孵育 30 min, PBST 冲洗后 DAB 显色, 自来水冲洗, 复染细胞核, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封片, 于光镜下观察细胞浆或细胞膜出现棕色颗粒沉积为阳性。将采集图片参考文献 [14] 报道方法, 应用 Image J 软件计算平均光密度值 (AOD), 以此评估 TGF-β1 染色面积及强度。

2.7 Western blot 法检测肾组织 TGF-β1、Smad2/3、FN 及 ERK1/2 蛋白表达 取于 -80 °C 冰箱中保存肾组织, 剪取约 50 mg 放入无酶 EP 管中, 加入 RIPA 裂解液并在预冷研磨机中充分研磨至悬混液, 12 000 r/min 离心 30 min 后取上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度后统一配平为 2 μg/μL 的蛋白样品, 水浴锅中煮沸 10 min 使蛋白充分变性。取 5 μL 样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离目的蛋白, 转至 PVDF 膜, 加入脱脂奶粉或 BSA 封闭, 加入 TGF-β1 (1 : 1 000)、Smad2/3 (1 : 500)、p-Smad2/3 (1 : 500)、FN (1 : 1 000)、ERK1/2 (1 : 500)、p-ERK1/2 (1 : 500) 及 GAPDH (1 : 1 000) 一抗于 4 °C 冰箱中摇床孵育过夜, TBST 溶液洗涤 3 次, 每次 10 min, 室温下孵育二抗 (1 : 5 000) 2 h, 清洗后加入 ECL 发光液并于暗室曝光。以 GAPDH 为内参, 应用 Image J 软件分析各组蛋白相对表达量。

2.8 RT-qPCR 法检测肾组织 TGF-β1、FN mRNA 表达 取于 -80 °C 冰箱中保存肾组织, 采用 TRIzol 法提取总 RNA, 通过 Nanodrop 仪器测定 RNA 浓度, 将其反转录为 cDNA, 按照试剂盒说明书配制 25 μL 反应体系, 进行 PCR 扩增, 反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 共循环 40 次。以 GAPDH 为内参计算各组 C_T 值, 以 2^{-ΔΔCT} 法计算 TGF-β1、FN mRNA 表达。根据美国国家生物信息中心 (NCBI) Primer-BLAST 设计引物, 由美国 Thermo Fisher Scientific 公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列 (5'→3')
TGF-β ₁	正向 TGGGATCAGTCCCAAACGTC
	反向 GGATCCACTTCCAACCCAGG
FN	正向 AACCTGTTGGCACTGACGAA
	反向 ACGATCCCACCTTCTCTCCGA
GAPDH	正向 GCATCTTCTTGTGCAGTGCC
	反向 GATGGTGATGGGTTTCCCGT

2.9 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 实验过程中无大鼠死亡。对照组大鼠精神状态、活动性、皮毛光泽度、饮食情况以及大小便方面表现均良好; 模型组大鼠有不同程度的精神状态不佳, 食量、活动度及皮毛光泽度下降等情况, 总体体质量增长率较

对照组稍偏低；而益肾化湿颗粒各剂量组大鼠随着药物干预进程，精神状态、摄食积极性较前有明显好转，食量、活动度增加。如表2所示，益肾化湿颗粒各剂量组体质量增长速率较模型组和缬沙坦组均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

表2 各组大鼠体质量增速比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	体质量增速/g
对照组	0.82±0.19
模型组	0.74±0.31
益肾化湿颗粒低剂量组	1.60±0.35**&
益肾化湿颗粒高剂量组	1.56±0.31**&
缬沙坦组	1.11±0.33

注：与模型组比较，** $P<0.01$ ；与缬沙坦组比较，& $P<0.05$ 。

表3 各组大鼠24 h尿蛋白定量比较 (mg, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	7 d	14 d	28 d	42 d
对照组	226.33±81.83	225.40±78.35	239.87±59.41	227.27±74.11
模型组	573.04±89.80 $\Delta\Delta$	523.45±84.13 $\Delta\Delta$	570.63±127.18 $\Delta\Delta$	578.42±93.07 $\Delta\Delta$
益肾化湿颗粒低剂量组	542.05±98.07	399.57±40.74*	350.52±77.93**	320.91±65.2**
益肾化湿颗粒高剂量组	505.13±56.22	339.99±31.20**#	306.80±57.96***	282.25±70.63***
缬沙坦组	445.05±148.4*	338.70±55.84**#	269.58±65.87***	266.96±75.99***

注：与对照组比较， $\Delta\Delta$ $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$, ** $P<0.01$ ；与益肾化湿颗粒低剂量组比较，# $P<0.05$ 。

表4 各组大鼠肾功能比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	肌酐/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	尿素氮/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照组	29.45±2.33	6.96±1.18
模型组	37.98±1.45 Δ	9.12±1.46 Δ
益肾化湿颗粒低剂量组	32.15±3.21*	7.10±0.70*
益肾化湿颗粒高剂量组	31.87±2.69*	7.61±0.88*
缬沙坦组	31.02±2.52*	7.12±0.78*

注：与对照组比较， Δ $P<0.05$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ 。

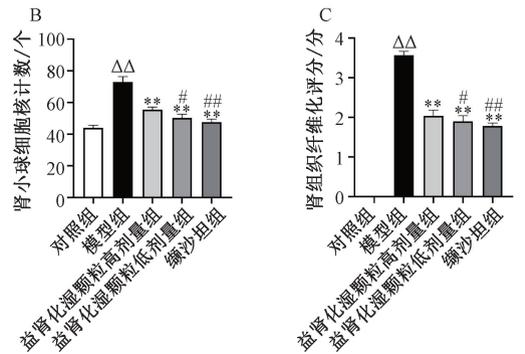
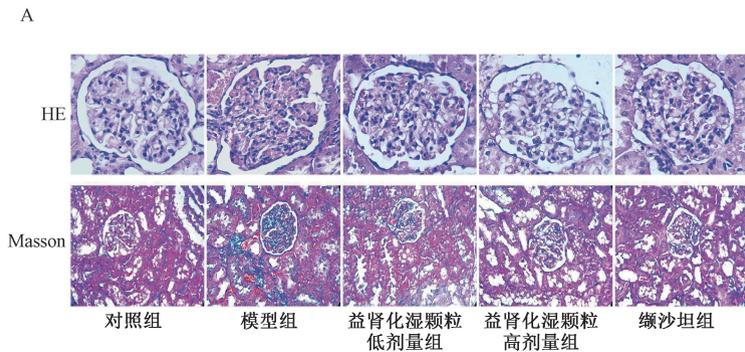
3.4 益肾化湿颗粒对慢性MsPGN大鼠肾组织病理变化的影响 如图1A所示，对照组大鼠肾小球结构基本正常；而模型组大鼠肾组织主要呈现出不同程度且不可逆的系膜细胞增生及细胞外基质弥漫性增多的病理改变，部分肾小球

3.2 益肾化湿颗粒对慢性MsPGN大鼠24 h尿蛋白定量的影响 如表3所示，与对照组比较，模型组大鼠各时间点24 h尿蛋白水平平均升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，益肾化湿颗粒各剂量组和缬沙坦组随着给药时间推移，24 h尿蛋白水平降低更明显 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与益肾化湿颗粒低剂量组比较，益肾化湿颗粒高剂量组和缬沙坦组大鼠24 h尿蛋白水平降低更明显 ($P<0.05$)。

3.3 益肾化湿颗粒对慢性MsPGN大鼠肾功能的影响 与对照组比较，模型组大鼠血清肌酐、尿素氮水平升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，益肾化湿颗粒各剂量组和缬沙坦组大鼠血清肌酐、尿素氮水平降低 ($P<0.05$)，见表4。

内毛细血管受压、管腔狭窄，出现广泛胶原蛋白沉积，结合尿蛋白定量结果，提示本实验慢性MsPGN动物模型复制成功；益肾化湿颗粒各剂量组和缬沙坦组大鼠肾组织系膜细胞及系膜基质异常增殖情况有一定程度的改善。

如图1B~1C所示，与对照组比较，模型组大鼠肾小球内核计数增加 ($P<0.01$)，纤维化程度加重 ($P<0.01$)；与模型组比较，益肾化湿颗粒各剂量组和缬沙坦组肾小球内核计数减少 ($P<0.01$)，纤维化程度减轻 ($P<0.01$)；与益肾化湿颗粒低剂量组比较，益肾化湿颗粒高剂量组和缬沙坦组肾组织病理损伤缓解效果更佳 ($P<0.05$, $P<0.01$)。



注：与对照组比较， $\Delta\Delta$ $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ ；与益肾化湿颗粒低剂量组比较，# $P<0.05$, ### $P<0.01$ 。

图1 益肾化湿颗粒对慢性MsPGN大鼠肾组织病理变化的影响 ($\times 400$, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.5 益肾化湿颗粒对慢性MsPGN大鼠肾组织TGF- β_1 分布及表达强度的影响 如图2、表5所示，与对照组比较，模型组大鼠肾小管上皮细胞胞浆及肾小球系膜区呈现不同程度的棕色颗粒沉积，AOD值较高 ($P<0.01$)；与模型组比较，益肾化湿颗粒各剂量组和缬沙坦组大鼠肾组织TGF- β_1 表达强度降低 ($P<0.01$)；与益肾化湿颗粒低剂量组比较，

益肾化湿颗粒高剂量组和缬沙坦组大鼠AOD值较低 ($P<0.05$)。

3.6 益肾化湿颗粒对慢性MsPGN大鼠肾组织TGF- β_1 、Smad2/3、FN及ERK1/2蛋白表达的影响 如图3所示，与对照组比较，模型组大鼠肾组织TGF- β_1 、p-Smad2/3、FN及p-ERK1/2蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，

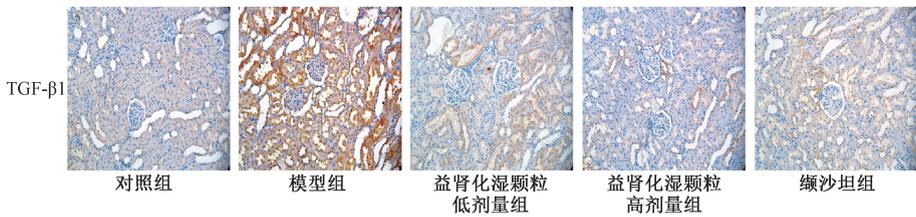
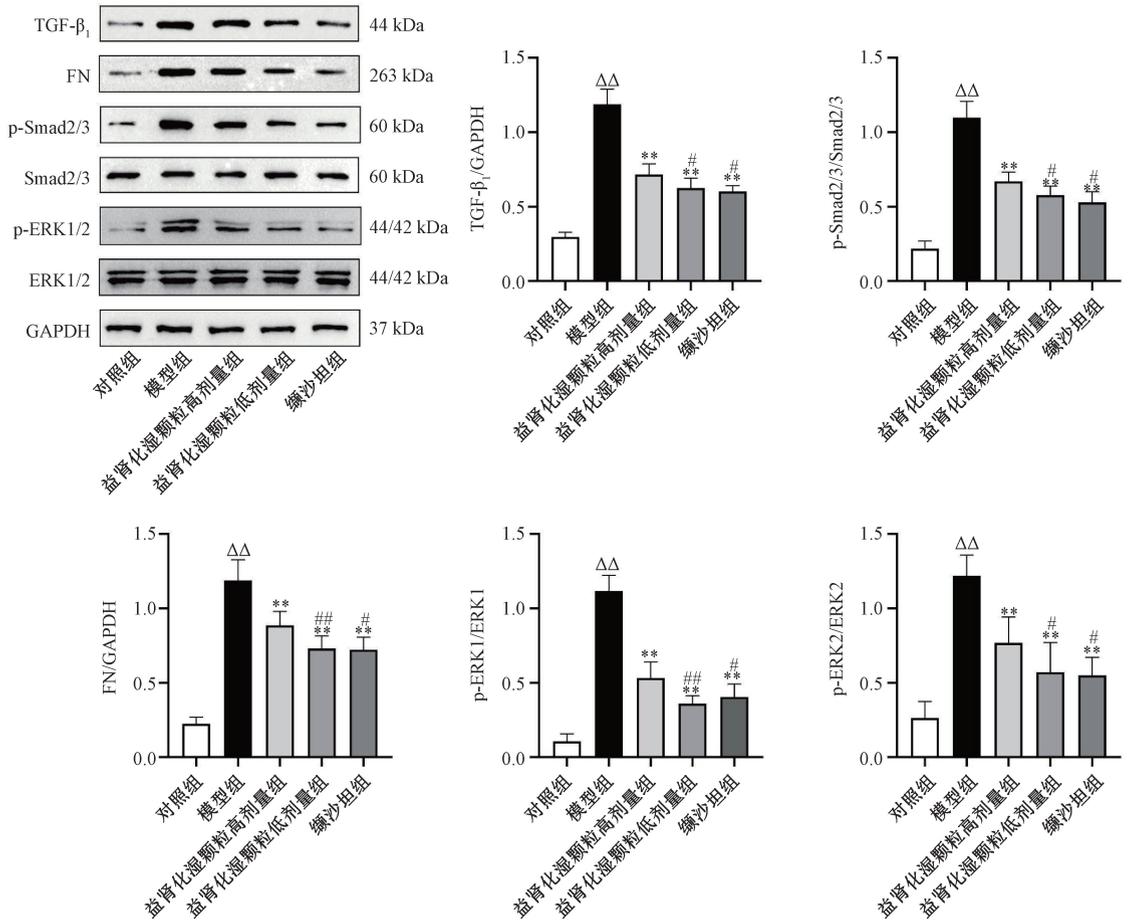


图2 各组大鼠肾组织 TGF-β₁ 免疫组化染色 (×200)



注：与对照组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与模型组比较， $** P < 0.01$ ；与益肾化湿颗粒低剂量组比较， $\# P < 0.05$ ， $\#\# P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠肾组织 TGF-β₁、FN、p-Smad2/3 及 p-ERK1/2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

缬沙坦组和益肾化湿颗粒各剂量组大鼠肾组织 TGF-β₁、p-Smad2/3、FN 及 p-ERK1/2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)；与益肾化湿颗粒低剂量组比较，益肾化湿颗粒高剂量组和缬沙坦组大鼠肾组织 TGF-β₁、p-Smad2/3、FN 及 p-ERK1/2 蛋白表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

表5 各组大鼠肾组织 TGF-β₁ AOD 值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TGF-β ₁ AOD 值
对照组	0.196 ± 0.012
模型组	0.408 ± 0.117 ^{ΔΔ}
益肾化湿颗粒低剂量组	0.287 ± 0.015 ^{**}
益肾化湿颗粒高剂量组	0.227 ± 0.013 ^{##}
缬沙坦组	0.222 ± 0.014 ^{##}

注：与对照组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与模型组比较， $** P < 0.01$ ；与益肾化湿颗粒低剂量组比较， $\# P < 0.05$ 。

3.7 益肾化湿颗粒对慢性 MsPGN 大鼠肾组织 TGF-β₁、FN mRNA 表达的影响 如表 6 所示，与对照组比较，模型组大鼠肾组织 TGF-β₁、FN mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，缬沙坦组和益肾化湿颗粒各剂量组大鼠肾组织 TGF-β₁、FN mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)；与益肾化湿颗粒低剂量组比较，益肾化湿颗粒高剂量组和缬沙坦组大鼠肾组织 TGF-β₁、FN mRNA 表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

4 讨论

随着肾脏病学及肾脏病理学的发展，MsPGN 的病因机制越来越明确，非特异性情况下不再被描述为一种特定的肾小球疾病，而是许多肾小球疾病（如 IgA 肾病、II 型狼疮肾炎、感染后肾小球肾炎、IgM 肾病等）共通的病理损伤模式^[15]。因此，对 MsPGN 治疗策略的研究可为一众肾

表 6 各组大鼠肾组织 TGF-β₁、FN mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	TGF-β ₁	FN
对照组	0.179±0.019	0.153±0.018
模型组	1.008±0.115 ^{△△}	0.997±0.103 ^{△△}
益肾化湿颗粒低剂量组	0.575±0.058 ^{**}	0.576±0.092 ^{**}
益肾化湿颗粒高剂量组	0.494±0.056 ^{***}	0.407±0.045 ^{***}
缬沙坦组	0.464±0.068 ^{***}	0.405±0.072 ^{***}

注：与对照组比较，^{△△}P<0.01；与模型组比较，^{**}P<0.01；与益肾化湿颗粒低剂量组比较，[#]P<0.05，^{###}P<0.01。

小球疾病的治疗提供参考和依据。

临床上，MsPGN 的基线治疗主要是血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素受体拮抗剂，有 CKD 进展风险时加用糖皮质激素、免疫抑制剂等^[16]，考虑到上述药物的局限性，越来越多的学者提倡中西医结合治疗慢性肾小球疾病。本研究结果显示，益肾化湿颗粒可降低抗 Thy-1 肾炎大鼠蛋白尿，减轻肾小球系膜细胞增殖、ECM 积累、肾小球硬化和肾间质纤维化等病理改变，表明益肾化湿颗粒对 MsPGN 大鼠具有保护作用。

蛋白质能量消耗在 CKD 患者中很常见，会随着肾小球滤过率的降低而逐渐明显^[17]。同时，肾脏病营养指南表明低水平的身体质量指数是 CKD1-5 期非透析者及 CKD5D 期维持性血透患者死亡率升高的因素之一^[18]。益肾化湿颗粒在临床应用中表现出具有改善患者食欲的作用^[19]。本研究发现，益肾化湿颗粒低、高剂量组大鼠体质量增长趋势较缬沙坦组、模型组明显，推测这与其降低大鼠蛋白尿、改善肾功并增加大鼠食欲相关，而增加体质量或许在一定程度上有助于延缓疾病进程。

越来越多的研究证实 TGF-β₁ 与肾脏纤维化关系密切^[20]。在肾脏疾病中，TGF-β₁ 激活经典的 Smads 信号通路，在细胞核内调控促纤维分子的转录和翻译，诱导肌成纤维细胞激活和 ECM 蛋白合成^[21]。本研究发现，模型组大鼠肾组织 TGF-β₁ 表达升高，下游 p-Smad2/3 亦呈上调趋势，免疫组化显示 TGF-β₁ 集中表达在肾小管上皮细胞和系膜区，提示 TGF-β₁/Smads 信号通路参与了慢性 MsPGN 纤维化进程。从蛋白和基因层面发现，益肾化湿颗粒可抑制抗 Thy-1 肾炎大鼠肾组织 TGF-β₁、p-Smad2/3、FN 的表达。此外，TGF-β₁ 还可调控非经典信号通路，如磷脂酰肌醇-3 激酶，丝裂原活化蛋白激酶家族等^[22]，后者主要包括 ERK1/2、p-38 和 JNK^[23]。ERK 信号通路的活化参与肾小球系膜细胞的增殖及 ECM 沉积^[24]，与肾脏纤维化密切相关^[25]。有研究指出 ERK 可磷酸化 Smad2 和 Smad3 连接子区域残基，调控 Smad3 依赖的基因转录^[26]，提示 TGF-β₁/Smads 与 ERK1/2 之间存在环形信号交互。本研究发现，抗 Thy-1 肾炎大鼠肾组织 p-ERK1/2 表达升高，益肾化湿颗粒可抑制 ERK 活化，提示益肾化湿颗粒可下调 TGF-β₁/Smads 信号通路，抑制 ERK1/2 磷酸化。

综上所述，益肾化湿颗粒可改善慢性抗 Thy-1 肾炎大

鼠蛋白尿，减轻系膜细胞增殖及细胞外基质积累，增加大鼠体质量，延缓肾功能进展，发挥肾保护作用，该作用可能与抑制 TGF-β₁/Smad2/3/ERK1/2 信号通路的活化相关。

参考文献：

[1] Zhang L X, Long J Y, Jiang W S, et al. Trends in chronic kidney disease in China[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(9): 905-906.

[2] Yin X L, Zou M S, Zhang Y, et al. Twenty-three-year review of disease patterns from renal biopsies: an experience from a pediatric renal center[J]. *J Nephrol*, 2013, 26(4): 699-707.

[3] O'shaughnessy M M, Hogan S L, Thompson B D, et al. Glomerular disease frequencies by race, sex and region: results from the International Kidney Biopsy Survey[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2018, 33(4): 661-669.

[4] Jin M L, Yin Z, Wei K, et al. Metanephric mesenchyme-derived Foxd1⁺ mesangial precursor cells alleviate mesangial proliferative glomerulonephritis[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(4): 553-561.

[5] Chen W B, Zhang F, Hou X L, et al. Ameliorating role of microRNA-378 carried by umbilical cord mesenchymal stem cells-released extracellular vesicles in mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 28.

[6] Geng W J, Wei R B, Liu S W, et al. Shenhua Tablet inhibits mesangial cell proliferation in rats with chronic anti-Thy-1 nephritis[J]. *Biol Res*, 2016, 49: 17.

[7] Ma T T, Meng X M. TGF-β/Smad and renal fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 347-364.

[8] Sun Y, Liu W Z, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.

[9] Das R, Kim S J, Nguyen N T, et al. Inhibition of the ERK1/2-mTORC1 axis ameliorates proteinuria and the fibrogenic action of transforming growth factor-β in Adriamycin-induced glomerulosclerosis[J]. *Kidney Int*, 2019, 96(4): 927-941.

[10] 王 雁, 周 乐, 李 伟. 益肾化湿颗粒治疗慢性肾小球肾炎脾虚湿盛证的临床疗效[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(16): 2749-2751.

[11] 罗进辉, 张 慧. 益肾化湿颗粒联合氯沙坦钾片治疗慢性肾小球肾炎的临床观察[J]. *中国药房*, 2017, 28(29): 4123-4126.

[12] 董王钰, 杨 锐, 张春江, 等. 益肾化湿颗粒对抗 Thy-1 型肾炎大鼠肾组织中 PCNA、Akt 表达的影响[J]. *中成药*, 2022, 44(9): 2799-2804.

[13] Tsuji M, Monkawa T, Yoshino J, et al. Microarray analysis of a reversible model and an irreversible model of anti-Thy-1 nephritis [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(6): 996-1004.

[14] Li S S, Kang N, Li X L, et al. LianXia Formula Granule attenuates cardiac sympathetic remodeling in rats with myocardial infarction via the NGF/TrKA/PI3K/Akt signaling pathway [J].

- Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5536406.
- [15] Arias L F, Taborda-Murillo A. Mesangial proliferative glomerulonephritis: A glomerular disease or a non-specific morphological change? [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2017, 22(7): 575.
- [16] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerular Diseases Work Group. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases [J]. *Kidney Int*, 2021, 100(4S): S1-S276.
- [17] Kopple J D, Greene T, Chumlea W C, et al. Relationship between nutritional status and the glomerular filtration rate: results from the MDRD study [J]. *Kidney Int*, 2000, 57(4): 1688-1703.
- [18] Ikizler T A, Burrowes J D, Byham-Gray L D, et al. KDOQI Clinical Practice Guideline for Nutrition in CKD: 2020 Update [J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76(3 Suppl 1): S1-S107.
- [19] 刘翠兰, 王琳琳, 杨文, 等. 骨化三醇联合益肾化湿颗粒对糖尿病肾病微炎症及氧化应激的影响[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(23): 3994-3997.
- [20] Isaka Y. Targeting TGF- β signaling in kidney fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2532.
- [21] Meng X M, Nikolic-Paterson D J, Lan H Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.
- [22] Heldin C H, Moustakas A. Signaling receptors for TGF- β family members [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(8): a022053.
- [23] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83.
- [24] Xie M X, Wu Z J, Ying S, et al. Sublytic C5b-9 induces glomerular mesangial cell proliferation via ERK1/2-dependent SOX9 phosphorylation and acetylation by enhancing Cyclin D1 in rat Thy-1 nephritis [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(4): 572-590.
- [25] Ma F Y, Sachechithanathan M, Flanc R S, et al. Mitogen activated protein kinases in renal fibrosis [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2009, 1(1): 171-187.
- [26] Kamato D, Burch M L, Piva T J, et al. Transforming growth factor- β signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(10): 2017-2024.

滋肾育胎丸水提液通过调控 TGF- β 通路对 DOR 秀丽隐杆线虫卵巢储备功能的影响

许云, 陶丛珊, 刘泉, 姜孙旻, 姚荧*
(无锡市妇幼保健院, 江苏无锡 214000)

摘要: 目的 探讨滋肾育胎丸水提液对雷公藤甲素诱导的卵巢储备功能下降 (DOR) 秀丽隐杆线虫生育力的作用及其机制。方法 将年轻成虫期秀丽隐杆线虫随机分为空白对照组、雷公藤甲素组 (0.1 mg/mL) 和滋肾育胎丸水提液组 (5、10、20 mg/mL)。雷公藤甲素诱导构建秀丽隐杆线虫 DOR 模型, 滋肾育胎丸水提液处理 24、48 和 72 h 后, 统计后代数目、DTC 细胞荧光强度、凋亡细胞和卵母细胞数目, RT-qPCR 测定卵子发生相关通路基因的 mRNA 表达。结果 与空白对照组比较, 雷公藤甲素组秀丽隐杆线虫后代数目、DTC 细胞荧光强度和卵母细胞数目均减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 凋亡细胞数目升高 ($P < 0.05$), *ced-3*、*ced-4* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), *daf-4* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与雷公藤甲素组比较, 滋肾育胎丸水提液 10 mg/mL 组线虫后代数目、DTC 细胞荧光强度、卵母细胞数目均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 凋亡细胞数目降低 ($P < 0.01$), *ced-3*、*ced-4* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), *daf-4*、*sma-2*、*sma-3* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。结论 滋肾育胎丸水提液对雷公藤甲素致秀丽隐杆线虫卵巢储备功能下降有改善作用, 其可能通过 TGF- β 信号通路抑制细胞凋亡, 促进卵母细胞的发育而提高生育力。

关键词: 滋肾育胎丸水提液; 卵巢储备功能下降; 雷公藤甲素; 秀丽隐杆线虫; TGF- β

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)12-4142-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.12.049

收稿日期: 2022-04-20

基金项目: 无锡市卫生计生委中医药科研项目 (ZYKJ201916)

作者简介: 许云 (1992—), 女, 硕士, 主管中药师, 从事中药药理研究与临床药学工作。Tel: 13915332850, E-mail: xy13915332850@163.com

*通信作者: 姚荧 (1974—), 女, 硕士, 主任药师, 从事临床合理用药研究。Tel: (0510) 82725161, E-mail: mary_yy@163.com