

组分配伍四逆汤抑制 ERK/cPLA2 信号通路改善大鼠膜性肾病

叶文冲, 王瑞忠, 曾桐春, 李国艳, 王 艳, 裴妙荣*

山西中医药大学 中药学院, 山西 晋中 030619

摘要: **目的** 研究组分配伍四逆汤对大鼠膜性肾病的治疗作用及机制。**方法** 将 45 只雄性 SD 大鼠, 随机分为对照组、模型组和组分配伍四逆汤组, 除对照组外, 其余各组尾 iv 兔抗大鼠 Fx1A 抗血清制备大鼠膜性肾病模型。造模成功后, 组分配伍四逆汤组大鼠 ig 9.6 g/kg 组分配伍四逆汤, 模型组和对照组 ig 等量蒸馏水, 连续给药 12 周。试剂盒法检测大鼠血清中肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 以及白蛋白 (Alb) 含量; 取肾脏检测肾指数, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肾组织的病理情况; ELISA 法检测肾组织中转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、纤维连接蛋白 (FN) 以及 IV 型胶原 (Col-IV) 含量; 采用 Western blotting 法检测肾脏中 ERK1/2 和胞浆型磷脂酶 (cPLA2) 蛋白磷酸化水平。**结果** 与对照组比较, 模型组血清中 Scr、BUN 水平以及肾指数明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 血清 Alb 水平明显降低 ($P < 0.01$), 肾组织中 TGF- β 1、FN 和 Col-IV 含量以及 ERK1/2、cPLA2 磷酸化蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 组分配伍四逆汤显著降低血清中 Scr、BUN 水平以及肾指数 ($P < 0.05$ 、 0.01), 升高血清中 Alb 水平 ($P < 0.01$), 降低肾组织中 TGF- β 1、FN、Col-IV 含量, 减少肾组织中 ERK1/2 和 cPLA2 磷酸化蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); HE 染色结果显示, 组分配伍四逆汤可以改善膜性肾病大鼠肾脏的病理变化。**结论** 组分配伍四逆汤对膜性肾病大鼠发挥明显治疗作用, 其作用机制可能与抑制 ERK/cPLA2 信号通路激活相关。

关键词: 膜性肾病; 组分配伍四逆汤; 治疗作用; 转化生长因子- β 1; ERK/cPLA2 信号通路

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 06- 1021 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.014

Therapeutic effect of Component Compatibility Sini Decoction on membranous nephropathy by inhibiting activation of ERK/cPLA2 signaling pathway in rats

YE Wenchong, WANG Ruizhong, ZENG Tongchun, LI Guoyan, WANG Yan, PEI Miaorong

College of Chinese Materia Medica, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: **Objective** To observe therapeutic effect of Component Compatibility Sini Decoction (CCSD) on membranous nephropathy in rats and its mechanisms. **Method** Totally 45 SD male rats were randomly divided into control group, model group and CCSD group, rat models were given into antigen Fx1A antiserum by tail iv injection except control group. After the success of model, the rats in CCSD group were ig administered 9.6 g/kg drugs, meanwhile the rats in control and model group were ig administration with the same dose of distilled water for 12 weeks; At the time points of 12 week, the levels of serum creatine (Scr), blood urea nitrogen (BUN) and serum albumin (Alb) were detected by kits. At the end of 12th week, kidney weight index was detected and renal pathological changes was observed by HE staining; The content of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), fibronectin(FN), and collagen IV (Col-IV) in renal tissue was detected by ELISA; Western blotting was used to test the protein expression of ERK1/2 and cPLA2 in the kidney. **Results** Compared with control group, the levels of serum Scr, BUN and kidney weight index were increased significantly ($P < 0.05$ or 0.01), serum Alb was decreased obviously ($P < 0.05$ or 0.01), the content of TGF- β 1, FN, Col-IV, and the protein expression of p-ERK1/2 and p-cPLA2 were significantly increased in renal tissue ($P < 0.05$ or 0.01). Compared with model group, CCSD could degrade significantly the levels of serum Scr, BUN, and index of kidney weight decreased ($P < 0.05$ or 0.01), increase the level of serum Alb ($P < 0.01$), and reduce the content of TGF- β 1, FN, Col-IV and the protein expression of p-ERK1/2 and p-cPLA2 in renal tissue ($P < 0.05$ or 0.01); HE staining results showed that CCSD could

收稿日期: 2018-03-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373546)

第一作者: 叶文冲 (1992—), 男, 硕士在读, 研究方向为中医方剂化学研究。Tel: 18234047143 E-mail: 572285215@qq.com

*通信作者: 裴妙荣, 女, 博士生导师, 研究方向为中医方剂化学研究。Tel: (0351) 3179901 E-mail: peimr602@163.com

improve renal pathological changes. **Conclusion** CCSD has certain therapeutic effect for rats with membranous nephropathy, its mechanism may be related to the inhibition of activation of ERK/ cPLA2 signaling pathway.

Key words: membranous nephropathy; Component Compatibility Sini Decoction; therapeutic effect; transforming growth factor- β 1; ERK/cPLA2 signaling pathway

膜性肾病是原发性肾小球肾炎的一种常见病理类型之一,以肾小球上皮细胞下免疫复合物沉积伴基底膜弥漫增厚为主要特征^[1]。中医认为膜性肾病发病病机主要为本虚标实,以气阴虚、脾肾两虚为本,湿邪淤血为标,长期患病会耗气伤阴,导致机体气血不足、脾肾阳虚以致湿邪入侵、淤血阻滞^[2]。

四逆汤为《伤寒论》中治疗少阴虚寒证的经典方,由附子、干姜、甘草组成,附子为君具有回阳救逆、补火助阳、逐风寒湿邪之功效;干姜大热无毒,守而不走,具有温中散寒、助阳回阳的作用,两者配伍达到增效减毒效果;佐以甘草补脾益气、调和诸药,三药配伍共俱补肾、补脾益气之功,正和膜性肾病病因病机^[3]。

本课题组前期研究发现,组分配伍形式的四逆汤对甲状腺功能低下(甲减)的脾肾阳虚证动物模型有良好的治疗效果^[4],进一步发现对甲减并发肾损伤亦具有保护作用^[5],而甲减肾损伤的病理类型主要是膜性肾病。因此,本实验建立膜性肾病大鼠模型,应用组分配伍四逆汤干预治疗,观察其治疗作用,并初步探讨作用机制,为临床研究提供一定的实验指导和理论依据。

1 材料

1.1 动物

新西兰大白兔,雄性,体质量 1.5~2.2 kg,由北京维通利华实验动物公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2015-0001; SPF 级 SD 大鼠,雄性,体质量 180~200 g,由中国人民解放军第四军医大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(军)2012-0007。

1.2 药材及主要试剂

组分配伍四逆汤组成:附子炮制品(黑顺片),购自四川省药材市场;干姜,购自安徽谓博中药股份有限公司,批号 170201;甘草购自亳州市京皖中药饮片厂,批号 170301;经山西中医药大学中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定均为正品。完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂(美国 Sigma 公司,批号分别为 076k8905、057k8614);血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、白蛋白(Alb)测定试剂盒(南京建成生

物工程研究所,批号均为 20170510);大鼠转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、纤维连接蛋白(FN)、IV 型胶原(Col-IV)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(Bio-Swamp 公司,批号均为 201712);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒、ECL 检测液、GAPDH 抗体、辣根酶标记羊抗兔 IgG(康为世纪生物科技有限公司);兔抗胞浆型磷脂酶 A2(cPLA2)、兔抗 p-cPLA2、兔抗 p-ERK1/2、兔抗 ERK1/2 单克隆抗体(Cell Signaling 公司)。

1.3 主要仪器

UV-6100S 型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);XHF-DY 型高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司);VERSAmix 型酶标仪(美谷分子仪器有限公司);Heracus Multifuge $\times$ 1R 高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技公司);DYY-6D 型电泳仪电源(北京六一生物科技有限公司);THZ-92B 型气浴恒温振荡器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);DZBS-50 型商用全自动台式碎冰机(江苏白雪电器股份有限公司);ChampChemi Professional 型全自动多色荧光及化学发光凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司)。

2 方法

2.1 组分配伍四逆汤的制备

参考文献方法^[6]制备药液,分别称量 2.4 g 的附子组分(总生物碱质量分数为 0.58%)、3.0 g 甘草组分(甘草酸、甘草苷质量分数分别为 17.93%、8.21%)、8.0 g 干姜水提组分(6-姜辣素质量分数为 0.24%)和 2.4 g 干姜挥发油包合物组分(挥发油质量分数为 8.4%),溶于 200 mL 蒸馏水中得组分配伍四逆汤。

2.2 模型建立

大鼠适应性饲养观察 1 周后开始实验,随机分为对照组(15 只)和造模组(60 只)。参考文献方法^[7],制备肾近曲小管刷状缘(Fx1A)粉末,将 Fx1A 粉末用磷酸盐缓冲液(PBS)配成质量浓度为 10 g/L 的溶液,与等量弗氏佐剂混合乳化,在新西兰兔的颈部、背部、腹部进行皮下多点注射,首次免疫使用完全弗氏佐剂,第 2 次开始使用不完全弗氏佐剂,每周 1 次,共免疫 6 次。从第 3 次免疫开始,兔耳

缘静脉采血,检测血清效价,达1:32 000以上为合格,兔总颈动脉采血,分离血清,置于56℃水浴中灭活补体30 min,即得兔抗 Fx1A 抗血清。

造模组大鼠按10 mL/kg 单次尾 iv 兔抗血清,对照组大鼠注射等量的生理盐水。10 d 后,收集大鼠24 h 尿液,采用尿液分析仪定性测定尿蛋白,以“+++”判定为造模成功。

2.3 分组及给药

选取模型成功大鼠,随机分为模型组和组分配伍四逆汤组,每组15只,另取15只正常大鼠为对照组。测完尿液后次日给药,组分配伍四逆汤给予组分配伍四逆汤(生药剂量9.6 g/kg,剂量设置依据见参考文献^[5]),按10 mL/kg ig 给药,模型组和对照组给予等量蒸馏水,每周测量大鼠体质量调整给药剂量,连续给药12周。

2.4 样品采集及观察指标

2.4.1 肾功能指标 给药12周后,各组大鼠 ip 10%水合氯醛麻醉,腹主动脉采血,离心分离血清,试剂盒法检测血清 Scr、BUN、Alb 水平。

2.4.2 肾指数 采血结束后,摘取双侧肾脏,生理盐水漂洗,称质量,计算肾指数。

肾指数=两侧肾质量/体质量

2.4.3 病理学改变 取各组大鼠左侧肾脏用10%中性福尔马林固定,乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡切片包埋,苏木素-伊红染色,在显微镜下观察肾小球结构。

2.4.4 肾组织指标 取各组大鼠右侧肾组织,按组织质量(g)体积(mL)比1:9加入生理盐水制成匀浆液,采用ELISA法检测肾组织中 TGF-β1、FN 和 COI-IV 的含量。

2.4.5 Western blotting 法检测肾组织中 ERK/cPLA2 信号通路蛋白 取各组大鼠右侧肾组织,按组织质量(g)体积(mL)比1:10加入裂解液,充分裂解30 min,在4℃下12 000×g 离心15 min,取上清液得蛋白提取液,采用BCA法测定提取液中蛋

白浓度,并加入上样缓冲液,煮沸10 min,冷却后即可上样。将蛋白样品等量依次加入10% SDS-PAGE 凝胶中电泳;结束后进行电转,将目的蛋白转于PVDF膜上;5% BSA 室温封闭,加入一抗 p-ERK1/2(1:1 000)、ERK1/2(1:1 000)、p-cPLA2 (1:1 000)、cPLA2 (1:1 000)、GAPDH (1:3 000)置于4℃中孵育过夜,洗涤3次,每次10 min;室温下孵育二抗(1:2 000),洗涤同上;将PVDF膜置于化学发光板上,滴加 ECL 化学发光液发光,条带显影后,保拍照存。采用 Image J 软件进行灰度值分析,以内参蛋白作为参考,结果用磷酸化蛋白与总蛋白的灰度比值表示目的蛋白的相对表达量。

2.5 统计学处理

应用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理,所有实验数据分析结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对膜性肾病大鼠血清中 Scr、BUN 和 Alb 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清中 Scr、BUN 水平显著升高($P<0.05$),血清 Alb 水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,组分配伍四逆汤均可显著降低膜性肾病大鼠血清中 Scr、BUN 水平($P<0.05$),明显升高血清 Alb 含量($P<0.01$)。见表1。

3.2 肾指数

与对照组比较,模型组大鼠肾指数显著升高($P<0.05$);与模型组比较,组分配伍四逆汤显著降低膜性肾病大鼠的肾指数($P<0.05$)。见表2。

3.3 对膜性肾病大鼠病理改变的影响

对照组大鼠肾小球、肾小管形态结构正常,未见炎性细胞浸润、系膜细胞及基质无增殖。模型组大鼠肾小球肿胀,肾小球基底膜增厚,细胞增生且有炎性细胞浸润。与模型组比较,组分配伍四逆汤组肾小球基底膜增厚情况、系膜细胞增生以及炎性细胞浸润情况均有所减轻。见图1。

表1 组分配伍四逆汤对膜性肾病大鼠血清中 Scr、BUN 和 Alb 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 1 Effect of CCSD on serum Scr, BUN, and Alb of membranous nephropathy rats ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Alb/(g·L ⁻¹)
对照	—	40.77±7.82	6.18±0.41	3.16±0.39
模型	—	49.32±6.75*	7.25±0.91*	2.58±0.46*
组分配伍四逆汤	9.6	42.34±4.81 [#]	5.92±0.55 [#]	3.46±0.38 ^{##}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

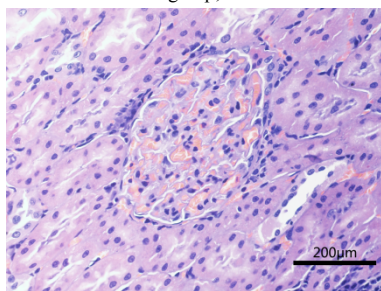
表2 组分配伍四逆汤对膜性肾病大鼠肾指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Effect of CCSD on kidney weight index of membranous nephropathy rats ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

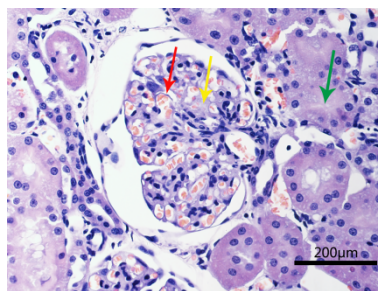
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肾指数/%
对照	—	0.52±0.02
模型	—	0.59±0.06*
组分配伍四逆汤	9.6	0.53±0.02 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

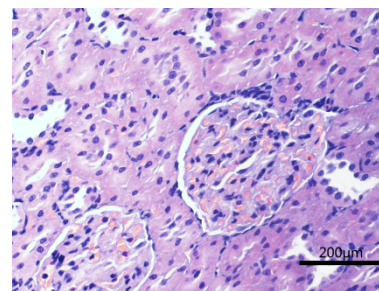
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group



对照



模型



组分配伍四逆汤 9.6 g·kg⁻¹

红色箭头-肾小球基底膜增厚; 绿色箭头-间质水肿, 并伴有炎症细胞浸润; 黄色箭头-系膜增生

Red arrows - thickening of glomerular basement membrane; Green arrows - interstitial edema with inflammatory cell infiltration; Yellow arrow - mesangial hyperplasia

图1 组分配伍四逆汤对膜性肾病大鼠病理改变的影响

Fig. 1 Effect of CCSD on renal pathological changes in rats with membranous nephropathy

表3 组分配伍四逆汤对膜性肾病大鼠肾组织中 TGF-β1、FN、COI-IV 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 3 Effects of CCSD on TGF-β1, FN and COI-IV level of membranous nephropathy rats in renal tissue ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TGF-β1/(μg·L ⁻¹)	FN/(μg·L ⁻¹)	Col-IV/(μg·L ⁻¹)
对照	—	108.90±8.17	244.36±5.13	3.03±0.15
模型	—	126.76±6.68**	255.89±7.52*	3.36±0.15**
组分配伍四逆汤	9.6	109.71±4.06 ^{##}	240.92±7.32 ^{##}	2.95±0.12 ^{##}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group

3.5 组分配伍四逆汤对膜性肾病大鼠肾组织中 ERK/cPLA2 信号通路蛋白的影响

Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织中 ERK1/2 和 cPLA2 磷酸化表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 组分配伍四逆汤能明显降低 ERK1/2 和 cPLA2 磷酸化的水平 ($P < 0.05, 0.01$)。见图 2。

4 讨论

膜性肾病发病机制复杂, 主要通过抗原与抗体交互作用形成免疫复合物, 激活补体系统形成膜攻击复合物 (C5b-9), 刺激各种细胞的生物学活性改变, 包括炎性介质、细胞因子等; 病理改变包括肾小球毛细血管基底膜增厚、炎症细胞浸润、肾小球间质肥大等。研究发现, PLA2 是体内一类与磷脂

3.4 组分配伍四逆汤对膜性肾病大鼠肾组织中 TGF-β1、FN 和 COI-IV 含量的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肾组织中 TGF-β1、FN、COI-IV 含量显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 组分配伍四逆汤能明显降低膜性肾病大鼠肾组织中 TGF-β1、FN、COI-IV 含量, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

代谢有关的酶, 广泛参与机体细胞内外信号的传递及炎症反应或与多种炎症相关疾病的病理反应, cPLA2 是 PLA2 的主要亚型之一, 可水解各类细胞膜, 造成膜通透性降低。C5b-9 主要以激活胞质 cPLA2 的形式起作用, 该作用有赖于 Ca^{2+} 的内流和磷酸化反应。cPLA2 被激活时, 可释放游离的花生四烯酸 (AA), AA 经过环氧化酶和血栓素合成酶的作用转化为前列腺素和血栓素, 两者在肾脏疾病发展过程中能发挥多种病理生理作用, 尤其在膜性肾病中, 可引起足细胞损伤和蛋白尿^[8]。此外, C5b-9 还能反式激活受体型酪氨酸激酶, 使 ERK1/2 的 Ser/Thr 双位点磷酸化从而激活 ERK 信号通路, 激活后的 ERK 信号通路能促进细胞质靶蛋白磷酸化或是调节其他蛋白激酶活性, 其中 cPLA2 就是 ERK

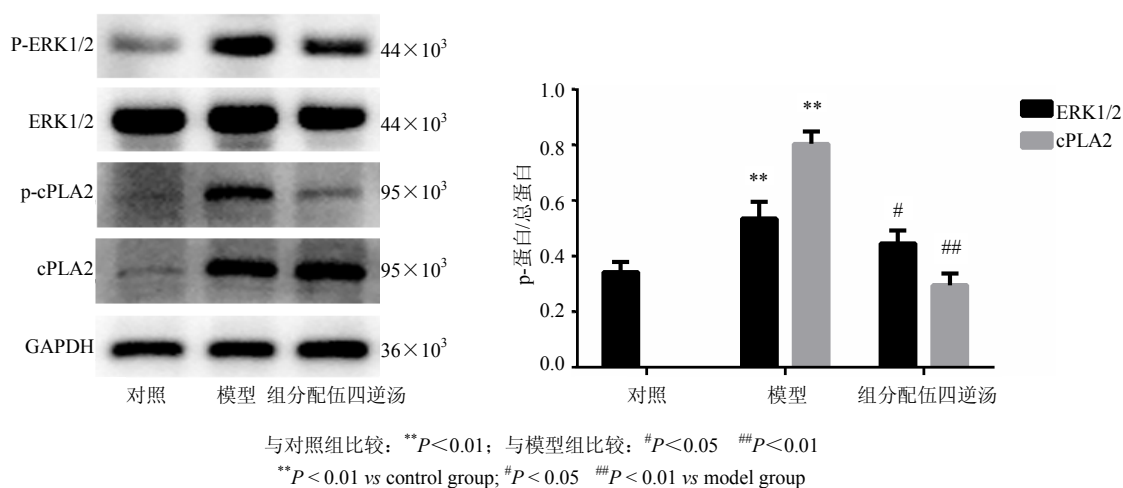


图2 组分配伍四逆汤对膜性肾病大鼠肾组织中 ERK1/2 和 cPLA2 磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 2 Effects of CCSD on phosphorylation levels of ERK1/2 and cPLA2 on membranous nephropathy rats in renal tissue ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

磷酸化的靶点之一,因此 ERK 激活也可引起 cPLA2 的激活^[9]。

细胞外基质 (ECM) 是维持肾脏正常生理功能的重要组成部分,主要包括胶原蛋白、糖蛋白以及蛋白多糖,其中主要以 COI-IV 和 FN 为主,ECM 的积聚是直接导致膜性肾病发生的主要原因。TGF- β 是一类可以调控细胞增殖、分化和凋亡以及对胚胎发育及免疫功能等都具有重要的调节作用的细胞因子,在肾组织中主要由肾小球上皮细胞、系膜细胞以及浸润的单核细胞等分泌,现代研究表明,TGF- β 能够促进 ECM 的形成,使肾小球基底膜增厚,同时能够直接促进 Col-IV 和 FN 的合成,导致 Col-IV 在病变位置积聚,加重肾脏损害^[10]。

本实验研究结果表明,组分配伍四逆汤能显著降低膜性肾病大鼠血清中 Scr、BUN 水平以及肾指数,升高血清 Alb 水平,改善肾小球病变,减少大鼠肾组织中 TGF- β 1、FN 和 COI-IV 含量,降低 ERK1/2 和 cPLA2 磷酸化蛋白表达,说明组分配伍四逆汤通过抑制 ERK/ cPLA2 信号通路激活,减少膜磷脂水解,保护了肾小球和毛细血管完整结构,使肾小球滤过率升高,保护肾脏;同时组分配伍四逆汤还能减少肾细胞过度释放 TGF- β 1,降低肾组织中 COI-IV 和 FN 合成,缓解肾脏损伤。

组分配伍四逆汤可通过抑制 ERK/cPLA2 信号通路激活,保护肾小球滤过率,改善血清中低 Alb、高 Scr、BUN 情况,减少肾组织中 TGF- β 1 过度分泌,阻止 COI-IV 和 FN 合成,从而改善肾小球和毛

细血管结构,保护肾脏正常生理功能。

参考文献

- [1] 刘冉冉, 鄂 静, 郑亚莉. 膜性肾病的临床及病理特点分析 [J]. 宁夏医学杂志, 2017, 39(3): 233-238.
- [2] 华荣祥, 张史昭. 膜性肾病之中医辨治思路概述 [J]. 黑龙江中医药, 2015, 44(3): 74-76.
- [3] 龚志南, 王 娟. 四逆汤组方科学原理分析 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 358-362.
- [4] 王晓英, 苗得雨, 裴妙荣. 四逆汤对甲状腺功能低下脾肾阳虚证动物模型的影响 [J]. 山西中医学院学报, 2013, 14(1): 2-4.
- [5] 王 艳, 裴妙荣. 组分配伍四逆汤对甲状腺功能减退症肾损伤大鼠的保护作用 [J]. 中药材, 2015, 38(2): 350-353.
- [6] 王 艳, 裴妙荣. 组分配伍四逆汤对甲状腺功能减退症大鼠脑神经递质的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 139-141.
- [7] 周本宏, 周 静, 郭咸希, 等. 石榴皮鞣质改善大鼠被动型 Heymann 肾炎作用研究 [J]. 中国药师, 2015, 18(10): 1629-1633.
- [8] Cohen D J, Papillon L, Aoudjit L, et al. Role of calcium-independent phospholipase A2 in complement-mediated glomerular epithelial cell injury [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(3): 469-479.
- [9] 申焕蓉, 曹 灵. 信号传导与膜性肾病 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(10): 936-937.
- [10] 李 静, 柳 斌, 樊均明. TGF- β 在足细胞生理功能及病理损伤中的作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(12): 1120-1122.