

## AKT/FoxO3a通路在白藜芦醇抑制大鼠肾脏间质纤维化中的作用

孙荣嵘, 冯小华, 王婷婷, 刘楠, 张瑞城, 钟良宝

海南医学院第一附属医院 肾内风湿免疫科, 海南 海口 570206

**摘要:** 目的 探讨蛋白激酶B (Akt) /FoxO3a通路在白藜芦醇抑制肾脏纤维化中的作用。方法 将55只SD大鼠随机分为假手术组(10只)和造模组(45只),采用单侧输尿管梗阻法构建大鼠肾脏间质纤维化模型,45只造模SD大鼠术后随机分为模型组和白藜芦醇(20、40 mg/kg)干预组,每组15只。干预组大鼠于术后ig白藜芦醇20、40 mg/kg,1次/d,持续2周。模型组大鼠ig等量生理盐水。HE、Masson染色观察肾组织病理变化,免疫组化检测 $\alpha$ -SMA阳性细胞,Western blot检测Akt、p-Akt、FoxO3a、p-FoxO3a蛋白。结果 假手术组、模型组、白藜芦醇20 mg/kg干预组和白藜芦醇40 mg/kg干预组肾小管损伤病理评分分别为(0.36±0.05)、(4.07±0.53)、(3.92±0.48)和(3.21±0.35),其中白藜芦醇20 mg/kg干预组与模型组间无显著性差异,假手术组评分显著低于白藜芦醇干预组( $P<0.05$ ),白藜芦醇40 mg/kg干预组又显著低于造模对照组( $P<0.05$ )。假手术组、模型组和白藜芦醇40 mg/kg干预组 $\alpha$ -SMA阳性细胞比例分别为(3.84±0.62)%、(52.36±14.27)%和(26.15±4.63)%,3组间具有显著性差异( $P<0.01$ )。FoxO3a和Akt蛋白表达三组间无显著性差异,p-Akt和p-FoxO3a蛋白表达在模型组SD大鼠显著减低,但白藜芦醇40 mg/kg干预组p-Akt和p-FoxO3a蛋白表达高于模型组,低于假手术组。结论 白藜芦醇可以减低p-Akt和p-FoxO3a蛋白表达,发挥抗肾脏间质纤维化作用。

**关键词:** 白藜芦醇; AKT/FoxO3a通路; 大鼠; 肾间质纤维化; p-Akt; p-FoxO3a

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)11-2165-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.11.007

## Effect of AKT/FoxO3a pathway in resveratrol inhibiting renal interstitial fibrosis in rats

SUN Rongrong, FENG Xiaohua, WANG Tingting, LIU Nan, ZHANG Ruicheng, ZHONG Liangbao

Department of Rheumatology and Immunology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570206, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of protein kinase B (Akt)/FoxO3a pathway in the inhibition of renal fibrosis by resveratrol. **Methods** 55 SD rats were divided into sham-operated group (10 rats) and model group (45 rats). The rat model of renal interstitial fibrosis was established by unilateral ureteral obstruction. 45 SD rats were randomly divided into model group and resveratrol (20, 40 mg/kg) intervention group, and each group had 15 rats. The rats in the intervention group were ig 20, 40 mg/kg resveratrol, once daily for 2 weeks. The rats in model group received the same amount of normal saline. HE and Masson staining was used to observe renal pathological change.  $\alpha$ -SMA positive cells were detected by immunohistochemical staining. Akt, p-Akt, FoxO3a, and p-FoxO3a were detected by Western blot analysis. **Results** The pathological scores of renal tubular injury in sham-operated group, model group, resveratrol 20 mg/kg intervention group, and resveratrol 40 mg/kg intervention group were (0.36 ± 0.05), (4.07 ± 0.53), (3.92 ± 0.48), and (3.21 ± 0.35), respectively. There was no significant difference between resveratrol 20 mg/kg intervention group and model control group. The scores in sham-operated group was significantly lower than that in the resveratrol intervention group ( $P < 0.05$ ), and resveratrol (40 mg/kg) intervention group was lower than that in model control group ( $P < 0.05$ ). The percentage of  $\alpha$ -SMA positive cells in sham-operated group, model group, and resveratrol 40 mg/kg intervention group was (3.84±0.62)%, (52.36±14.27)%, and (26.15±4.63)%, respectively. There was significant difference among the three groups ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference of FoxO3a and Akt protein expression among the three groups. The p-Akt and p-FoxO3a protein expression in model group SD rats was decreased significantly. However, the expression of p-Akt and p-FoxO3a protein in resveratrol 40 mg/kg intervention group was higher than that in model control group, and lower than that in sham-operated group.

收稿日期: 2019-03-04

基金项目: 海南省自然科学基金(20158333)

第一作者: 孙荣嵘(1984—),女,山东无棣人,本科,主治医师,从事肾脏内科疾病研究。Tel:(0898)66528173 E-mail:13337639490@163.com

**Conclusion** Resveratrol can reduce the expression of p-Akt and p-FoxO3a protein and play an Anti-renal interstitial fibrosis role.

**Key words:** Resveratrol; AKT/FoxO3a pathway; rat; renal interstitial fibrosis; p-Akt; p-FoxO3a

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CDS)的发病率为10%~13%,肾脏纤维化是CDS肾功能逐渐丧失的主要因素<sup>[1]</sup>,其中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的大量产生和在肾间质沉积是肾纤维化的主要因素。如何抑制肾间质纤维化,延缓CDS疾病的进展一直是国际肾脏病领域研究的热点<sup>[2]</sup>。白藜芦醇(resveratrol)是植物中的天然抗氧化剂,为来源于虎杖根茎的一种非黄酮类多酚化合物<sup>[3]</sup>,研究显示白藜芦醇对肾脏损害有明显的保护作用<sup>[4]</sup>,甚至可以发挥抗肾间质纤维化的作用<sup>[5]</sup>。

本研究构建了单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化模型,在此基础上探讨了蛋白激酶B(Akt)/FoxO3a通路在白藜芦醇抑制肾脏纤维化中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

奥林巴斯BX53MRF-S显微镜(Olympus公司),DYCZ-25D型双垂直电泳仪、DYCZ-40G型转印电泳仪(北京市六一仪器厂)。水合氯醛钠(10%,美国sigama公司,批号20180113),白藜芦醇(美国sigama公司产品,批号20180126)。Masson染色试剂盒(购自Solarbio公司,批号20180227), $\alpha$ -SMA免疫组化染色抗体试剂盒(北京中山金桥生物科技有限公司,批号20180411),碱性磷酸酯酶显色试剂盒(美国cell signal公司,批号20180415)。Akt、p-Akt、FoxO3a、p-FoxO3a和GAPDH抗体(美国cell signal公司,批号20180312、20180222、20180119、20180301、20180216),辣根过氧化物酶标记二抗(美国cell signal公司)。清洁级SD雄性大鼠55只,体质量170~220 g,购自海南医学院动物实验中心提供,自由饮食水,适应饲养3 d后,进行造模处理。

### 1.2 造模与给药

55只SD大鼠使用数字表法标号后,随机分为假手术组(10只)和造模组(45只),造模组45只SD大鼠采用单侧输尿管梗阻法构建大鼠肾间质纤维化模型<sup>[6]</sup>,简述如下:ip 0.3 mL/kg水合氯醛钠麻醉大鼠,偏右侧位置手术台上固定后备皮消毒,脊柱左侧1 cm、肋腰点下0.5 cm做1.5 cm切口,开腹后暴露肾脏,分离左侧输尿管,4号无菌丝线双重结扎输尿管后在两结中间剪断输尿管,逐层缝合肌肉及皮肤,消毒,盖无菌纱布。假手术对照组10只SD大

鼠仅分离左侧输尿管,不做结扎,然后缝合腹腔,其余处理同造模组。

45只造模组SD大鼠随机分为模型组、白藜芦醇20 mg/kg干预组和白藜芦醇40 mg/kg干预组,每组15只。白藜芦醇干预组分别于术后当天ig白藜芦醇20、40 mg/kg,1次/d,持续2周。其余SD大鼠每天ig等量生理盐水。所有SD大鼠均自由进食、饮水,采用标准颗粒饲料喂养。

### 1.3 HE、Masson和免疫组化观察肾组织病理变化

实验结束后断颈处死所有SD大鼠,取肾脏组织送病理科制作病理切片,常规HE染色,Masson染色参照试剂盒说明书完成,中性树胶封片,显微镜下观察肾组织病理变化,计算肾小管损伤的病理得分,每个标本光镜下随机选取10个高倍视野( $\times 200$ ),肾小管坏死、空泡变性 $<10\%$ 记为1分, $<25\%$ 记为2分、 $<50\%$ 记为3分、 $<75\%$ 记为4分、 $\geq 75\%$ 记为5分。 $\alpha$ -SMA免疫组化染色参照抗体试剂盒说明书完成,细胞出现棕黄色为阳性,Image多媒体彩色病理图像分析软件分析阳性细胞比例,光镜下每张切片随机选取10个高倍视野( $\times 200$ )取平均值。

### 1.4 AKT/FoxO3a通路的Western blot检测

实验结束后断颈处死所有SD大鼠,取肾脏组织50 mg,液氮下研磨,PBS洗涤2次后,加入蛋白裂解液,取10  $\mu$ g总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,转移蛋白至PVDF膜,按照抗体说明书加入Akt、p-Akt、FoxO3a、p-FoxO3a和GAPDH抗体,12 h孵育过夜后,加入辣根过氧化物酶标记二抗,使用碱性磷酸酯酶显色试剂盒显色目的条带。BandScan 5.0软件扫描图片以内参为对照计算个目的条带的相对灰度值。

### 1.5 统计学处理

选用SPSS 18.0软件进行统计学分析,计量资料采用 $t$ 检验,多组均数比较使用方差分析,组间相互比较使用LSD检验,计数资料采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 肾脏病理组织形态学改变

从图1和图2可见,假手术组大鼠肾组织结构正常,小管基底膜连续完整,模型组肾小管上皮细胞空泡变性、萎缩坏死、管腔扩张,部分可见蛋白管型,间质区域增大,胶原纤维增多,其中白藜芦醇(40 mg/kg)干预组上述肾脏改变较模型组显著减

轻,但白藜芦醇(20 mg/kg)干预组上述肾脏改变与模型组无显著性差异。假手术组、模型组、白藜芦醇(20 mg/kg)干预组和白藜芦醇(40 mg/kg)干预组肾小管损伤病理评分分别为(0.36±0.05)、(4.07±0.53)、(3.92±0.48)和(3.21±0.35),4组间具有显著

性差异( $P<0.05$ ),其中假手术组评分显著低于白藜芦醇干预组( $P<0.05$ ),白藜芦醇(40 mg/kg)干预组又显著低于模型组( $P<0.05$ ),白藜芦醇(20 mg/kg)干预组与模型组间无显著性差异,后续试验选用40 mg/kg白藜芦醇进行干预。

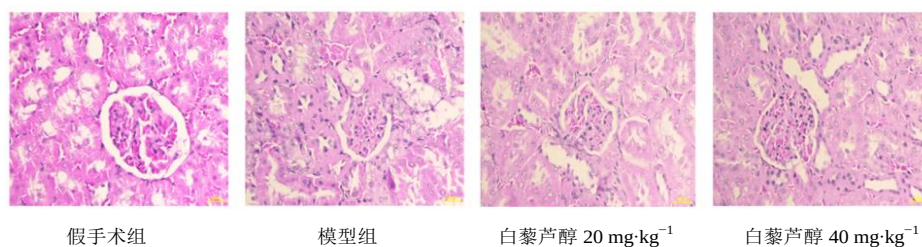


图1 组织学病理切片 HE 染色结果(×200)

Fig. 1 Histological and pathological section HE staining results (×200)

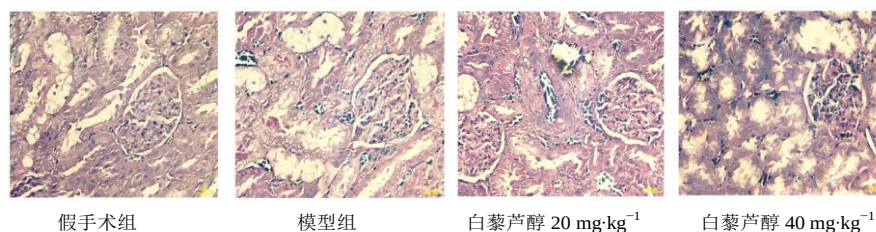


图2 组织学病理切片 Masson 染色结果(×200)

Fig. 2 Histological and pathological sections with Masson staining results (×200)

## 2.2 $\alpha$ -SMA 表达的改变

$\alpha$ -SMA 免疫组化染色结果见图3。假手术组、模型组和白藜芦醇40 mg/kg干预组 $\alpha$ -SMA阳性细胞比例分别为(3.84±0.62)%、(52.36±14.27)%和(26.15±4.63)%,3组间具有显著性差异( $P<0.01$ ),其中假手术组评分显著低于白藜芦醇40 mg/kg干预组( $P<0.01$ ),白藜芦醇40 mg/kg干预组显著低于模型组( $P<0.01$ )。

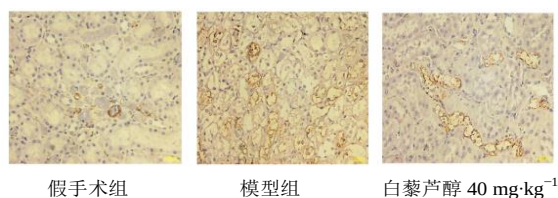


图3  $\alpha$ -SMA 免疫组化染色结果(×200)

Fig. 3 Immunohistochemical staining results of alpha-SMA (×200)

## 2.3 AKT/FoxO3a通路蛋白的改变

经密度扫描可见假手术组、模型组和白藜芦醇40 mg/kg干预组FoxO3a和Akt蛋白表达3组间无显

著性差异。3组间p-Akt、p-FoxO3a蛋白表达具有显著性差异( $P<0.01$ ),其中p-Akt和p-FoxO3a蛋白表达在模型组SD大鼠显著减低( $P<0.01$ ),白藜芦醇40 mg/kg干预组p-Akt和p-FoxO3a蛋白表达显著高于模型组,但低于假手术对照组( $P<0.01$ ),见图4,表1。

## 3 讨论

小管间质纤维化是慢性肾小球肾炎进展到终

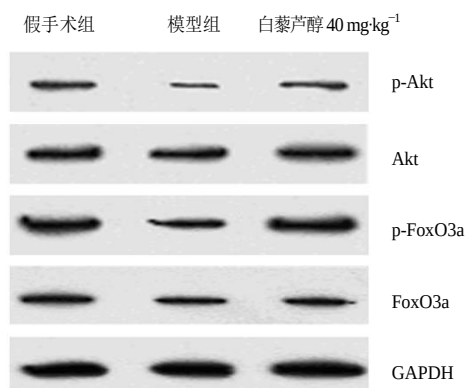


图4 Akt-p-AktFoxO3a和p-FoxO3a蛋白的Western blot检测

Fig. 4 Western blot detection of Akt, p-Akt, FoxO3a and p-FoxO3a proteins



表1 白藜芦醇对Akt、p-Akt、FoxO3a和p-FoxO3a蛋白表达的影响

Table 1 Effects of resveratrol on expression of Akt, p-Akt, FoxO3a and p-FoxO3a proteins

| 组别   | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | n/只 | Akt         | FoxO3a      | p-Akt          | p-FoxO3a       |
|------|---------------------------|-----|-------------|-------------|----------------|----------------|
| 假手术  | —                         | 10  | 0.716±0.042 | 0.872±0.061 | 0.504±0.036    | 0.562±0.041    |
| 模型   | —                         | 15  | 0.721±0.053 | 0.868±0.057 | 0.173±0.012**  | 0.216±0.018**  |
| 白藜芦醇 | 40                        | 15  | 0.718±0.047 | 0.874±0.063 | 0.284±0.025*** | 0.354±0.031*** |

与假手术组比较:\*\*P&lt;0.01;与模型组比较:\*\*\*P&lt;0.05

\*\*P&lt;0.01 vs sham group; \*\*\*P&lt;0.05 vs model group

末期肾衰竭的必经之路,单侧输尿管结扎是目前研究肾脏间质纤维化最常用的大鼠造模方法,其操作简单,1周左右可出现间质纤维化的改变<sup>[6]</sup>,本研究使用该法均发现了造模大鼠出现肾小管损伤、间质胶原的沉积和细胞间质变的标志蛋白 $\alpha$ -SMA表达显著增加,说明了造模成功,可以用于后续的研究。

白藜芦醇是常见的酚类抗氧化剂<sup>[7]</sup>,郑栓<sup>[8]</sup>在慢性肾衰竭大鼠中的研究发现白藜芦醇可以通过增强人骨形态发生蛋白7(BMP-7)和Smad6蛋白的表达,减弱转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)表达,发挥肾脏功能保护,陈薪薪等<sup>[9]</sup>在小鼠肾纤维化模型中也发现白藜芦醇可以调节TGF- $\beta$ 1/Smads信号转导通路,参与到抗肾间质纤维化的过程中。本研究使用白藜芦醇干预模型鼠的肾间质纤维化过程也发现了干预组肾小管损伤病理评分和 $\alpha$ -SMA阳性细胞比例均显著低于模型对照组,说明白藜芦醇具有肾间质纤维化抑制作用。

肾脏纤维化机制复杂,牵涉到多条通路<sup>[10]</sup>,PKB/AKT/FoxO3a是一条重要的调控细胞增殖和凋亡的通路<sup>[11]</sup>,同时PKB/AKT/FoxO3a通路也调控着上皮-间充质细胞转分化(epithelia-mesenchymal transition, EMT)过程<sup>[12]</sup>,FoxO3a是PKB/AKT的下游靶蛋白,属于叉头蛋白forkhead转录因子家族成员,PKB/AKT通路激活时,可以磷酸化FoxO3a, FoxO3a磷酸化后就与其伴侣蛋白14-3-3发生紧密结合,入核减少就不能发挥转录因子的作用,其下游靶蛋白,例如经典的纤维化调控因子TGF $\beta$ 表达减少<sup>[13]</sup>,Yang等<sup>[14]</sup>研究发现抑制PI3K/Akt/FoxO3a通路后可以抑制缺血再灌注肾的纤维化过程。本研究观察到p-Akt和p-FoxO3a蛋白表达在造模组SD大鼠显著减低,说明模型组FoxO3a入核增加,发挥转录因子的作用增加了纤维化基因的表达,但白藜芦醇干预组p-Akt和p-FoxO3a蛋白表达高于模型组,说明白藜芦醇增加了FoxO3a磷酸化,也就阻止FoxO3a蛋白入核发挥转录因子的作用,从而起到了抗纤维化的作用。综上,白藜芦醇可以减低p-Akt和p-FoxO3a蛋白表达,发挥抗肾间质纤维化作用。

## 参考文献

- [1] 袁倩,刘友华.肾脏纤维化的细胞和分子机制研究进展[J].安徽大学学报:自然科学版,2018,42(5):115-124.
- [2] 窦一田,马鸿杰,林燕,等.中医药防治肾间质纤维化相关机制研究进展[J].辽宁中医杂志,2018,45(8):1778-1781.
- [3] Pannu N, Bhatnagar A. Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 2237-2251.
- [4] 张翠,王丹枫,张思琪,等.白藜芦醇对肾纤维化大鼠肾组织ORP150、GRP78、GRP94蛋白表达的影响[J].中草药,2018,49(2):406-413.
- [5] 李迎春,郑义,段燕灵,等.白藜芦醇联合厄贝沙坦对肾间质纤维化大鼠模型的影响[J].中国热带医学,2017,17(1):41-46.
- [6] 宋立群,盛紫阳,张慧杰,等.大鼠肾间质纤维化模型建立与活血药抗肾间质纤维化研究[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(9):5-8.
- [7] Kim S, Shin S, Lee J, et al. Resveratrol induces mitochondrial apoptosis and inhibits epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma cells[J]. Nutr Cancer, 2018, 70(1):125-135.
- [8] 郑栓.白藜芦醇对慢性肾衰竭大鼠肾脏组织BMP-7、TGF- $\beta$ 1、Smads信号通路表达的影响[J].中医学报,2018,33(4):616-619.
- [9] 陈薪薪,全欢,陈宇,等.白藜芦醇对小鼠肾纤维化TGF- $\beta$ 1/Smads信号转导通路的干预研究[J].中华中医药学刊,2016,34(5):1224-1227.
- [10] 李冰,吕海琳,高兆丽,等.肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化与肾间质纤维化的关系研究[J].系统医学,2018(21):196-198.
- [11] Dong P, Zhang X, Zhao J, et al. Anti-microRNA-132 causes sevoflurane induced neuronal apoptosis via the PI3K/AKT/FOXO3a pathway[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(6):3238-3246.
- [12] Liu Z M, Tseng H, Yeh B, et al. TG-interacting factor mediates arsenic-induced malignant transformation of keratinocytes via c-Src/EGFR/AKT/FOXO3A and redox signalings[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(12):2229-2241.
- [13] Sun Y Y, Schaar A, Sukumaran P, et al. TGF $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells is mediated via TRPM7 expression[J]. Mol Carcinog, 2018, 57(6):752-761.
- [14] Yang C, Cao Y, Zhang Y, et al. Cyclic helix B peptide inhibits ischemia reperfusion-induced renal fibrosis via the PI3K/Akt/FoxO3a pathway[J]. J Transl Med, 2015, 13:355.