

益肾通络方抑制 EGFR 及下游信号途径对膜性肾病大鼠肾脏保护作用的研究

陈素枝¹, 杨凤文¹, 李永章¹, 宋 蕾², 王广建¹, 檀 淼³, 袁国栋¹, 杨 冰⁴, 张 尧⁴, 赵 方⁴, 檀金川^{1*}

1. 河北省中医院, 河北 石家庄 050011

2. 天津中医药大学, 天津 301617

3. 河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050011

4. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200

摘要: **目的** 探究益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 及足细胞和肾小管上皮细胞凋亡的影响。**方法** SD 大鼠尾 iv 阳离子牛血清白蛋白 (cationic bovine serum albumin, C-BSA) 建立膜性肾病大鼠模型, 给予益肾通络方和盐酸贝那普利进行干预, 检测各组大鼠 24 h 尿蛋白 (urine total protein, UTP)、血清中白蛋白 (albumin, ALB) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平; 观察各组大鼠肾组织病理变化; 采用 TUNEL 法检测各组大鼠肾组织足细胞和肾小管上皮细胞凋亡情况; 采用免疫组化法检测各组大鼠肾组织磷酸化 EGFR (p-EGFR) 和剪切型半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3) 的表达情况; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠肾组织 p-EGFR、Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)、c-jun、c-fos、FasL 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠 24 h UTP 以及血清中 TC 水平明显升高 ($P < 0.01$), ALB 水平显著降低 ($P < 0.01$); 肾小球基底膜、足细胞结构发生改变; 肾组织足细胞和肾小管上皮细胞凋亡明显增多 ($P < 0.01$); 肾组织 p-EGFR、Rac1、c-jun、c-fos、FasL 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 益肾通络方中、高剂量组大鼠 24 h UTP 以及血清中 TC 水平明显降低 ($P < 0.01$), ALB 水平明显升高 ($P < 0.01$); 肾组织病理损伤得到改善; 肾组织足细胞和肾小管上皮细胞凋亡明显减少 ($P < 0.05, 0.01$), 肾组织 p-EGFR、Rac1、c-jun、c-fos、FasL 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 益肾通络方可以减轻膜性肾病大鼠肾脏病理损伤, 抑制肾组织足细胞和肾小管上皮细胞凋亡, 其机制可能与抑制 EGFR 及下游 Rac1/c-jun、c-fos/FasL 信号途径有关。

关键词: 益肾通络方; 膜性肾病; 表皮生长因子受体; 足细胞; 肾小管上皮细胞; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)16-4913-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.016

Yishen Tongluo Recipe protects kidney in rats with membranous nephropathy by inhibiting EGFR and downstream signal pathway

CHEN Su-zhi¹, YANG Feng-wen¹, LI Yong-zhang¹, SONG Lei², WANG Guang-jian¹, TAN Miao³, YUAN Guo-dong¹, YANG Bing⁴, ZHANG Yao⁴, ZHAO Fang⁴, TAN Jin-chuan¹

1. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

4. Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

Abstract: Objective To explore the effect of Yishen Tongluo Recipe (益肾通络方) on epidermal growth factor receptor (EGFR), apoptosis of podocytes and renal tubular epithelial cells in renal tissue of rats with membranous nephropathy. **Methods** SD rats were tail iv cationic bovine serum albumin (C-BSA) to establish a rat model of membranous nephropathy. Yishen Tongluo Recipe

收稿日期: 2021-01-30

基金项目: 河北省自然科学基金青年项目 (H2020423049); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2021008)

作者简介: 陈素枝 (1989—), 女, 主治医师, 医学博士, 从事中西医结合治疗慢性肾脏病的研究。Tel: 18830657300 E-mail: 781506436@qq.com

*通信作者: 檀金川 (1964—), 男, 主任医师, 医学博士, 从事中西医结合治疗慢性肾脏病的研究。Tel: 13831187910 E-mail: 781506436@qq.com

and benazepril hydrochloride were given for intervention. The level of 24 h urine total protein (UTP), levels of albumin (ALB) and total cholesterol (TC) in serum of rats in each group were tested; Pathological changes of kidney tissues in rats of each group were observed; TUNEL method was used to detect podocytes and renal tubular epithelial cell apoptosis in kidneys tissue of rats in each group; Immunohistochemical method was used to detect the expressions of phosphorylated EGFR (p-EGFR) and cleaved Caspase-3 in renal tissues of rats in each group; Western blotting was used to detect expressions of p-EGFR, Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), c-jun, c-fos, FasL and cleaved Caspase-3 protein. **Results** Compared with control group, 24 h UTP and TC level in serum of rats in model group were significantly increased ($P < 0.01$), ALB level was significantly reduced ($P < 0.01$); Glomerular basement membrane and podocyte structure were changed; Apoptosis of podocytes and renal tubular epithelial cells in kidney were significantly increased ($P < 0.01$); Expressions of p-EGFR, Rac1, c-jun, c-fos, FasL and cleaved Caspase-3 in renal tissue were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, 24 h UTP and TC level in serum of rats in medium- and high-dose Yishen Tongluo Recipe groups were significantly reduced ($P < 0.01$), and ALB level was significantly increased ($P < 0.01$); Pathological damage of kidney tissue was improved; Podocytes and renal tubular epithelial cell apoptosis in renal tissue were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$); Expressions of p-EGFR, Rac1, c-jun, c-fos, FasL and cleaved Caspase-3 in renal tissue were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Yishen Tongluo Recipe alleviates pathological damage of kidney in rats with membranous nephropathy, inhibit the apoptosis of renal podocytes and renal tubular epithelial cells, mechanism of which may be related to the inhibition of EGFR and downstream Rac1/c-jun, c-fos/FasL signal pathways.

Key words: Yishen Tongluo Recipe; membranous nephropathy; epidermal growth factor receptor; podocytes; renal tubular cells; apoptosis

膜性肾病是成人肾病综合征的最常见原因, 近年来我国膜性肾病的发病率急剧增加^[1], 可能超过 IgA 肾病成为我国发病率最高的一种肾病^[2]。目前研究认为膜性肾病是一种自身免疫性疾病^[3-4], 由免疫攻击形成抗原抗体免疫复合物沉积于肾小球上皮细胞下, 导致足细胞损伤。

本课题组通过前期对膜性肾病病机的深入研究, 结合中医“络病”理论逐渐形成“肾络瘀阻”的病机理论, 并在该病机理论指导下创立益肾通络方。前期研究证实益肾通络方在辅助提高膜性肾病临床疗效、缓解临床症状、减少激素及免疫抑制剂不良反应等方面发挥重要优势^[5], 其作用机制与防止膜性肾病大鼠足细胞骨架相关蛋白 Ezrin、Synaptopodin 降解, 维持足细胞骨架及足突结构的完整性有关^[6]。前期研究发现, 膜性肾病中不仅存在足细胞损伤, 还存在肾小管上皮细胞损伤, 益肾通络方可以同时减少足细胞和肾小管上皮细胞凋亡, 推测膜性肾病中可能存在 1 个同时介导肾小球足细胞和肾小管上皮细胞凋亡的信号途径, 且益肾通络方对该信号途径可能具有调节作用。本研究采用尾 iv 阳离子牛血清白蛋白 (cationic bovine serum albumin, C-BSA) 建立膜性肾病大鼠模型, 探讨益肾通络方对膜性肾病大鼠表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 及下游信号级联反应的作用, 为其临床推广提供依据。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 74 只, 体质量 (180 ± 20) g, 8 周龄, 由河北医科大学动物实验中心提供, 动物许可证号 SYXK (冀) 2008-0026。动物于河北中医学院 SPF 级实验中心环境中适应性饲养 1 周, 自由进食饮水。动物实验经河北中医学院动物伦理委员会批准 (批准号 DWLL2020046)。

1.2 药品与试剂

益肾通络方配方颗粒购自广东一方制药有限公司, 由黄芪 (批号 5063231) 20 g、炒白术 (批号 505207T) 15 g、党参 (批号 5060421) 15 g、仙灵脾 (批号 411420T) 15 g、当归 (批号 5061851) 15 g、莪术 (批号 5061671) 12 g、水蛭 (批号 504432T) 9 g、地龙 (批号 5062171) 12 g、绞股蓝 (批号 407347T) 15 g 组成; 盐酸贝那普利片 (批号 FA20150902, 10 mg/片) 购自深圳信立泰药业股份有限公司; C-BSA (批号 A7906) 购自北京索莱宝科技有限公司; 弗式不完全佐剂 (批号 BJ-012-0392) 购自美国 Sigma 公司; 山羊抗大鼠 IgG 抗体 (批号 20147-1)、FITC 标记的兔抗山羊 IgG 抗体 (批号 111-095-003) 购自美国 KPL 公司; 磷酸化 EGFR (p-EGFR) 抗体 (批号 AF3004)、Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1) 抗体 (批号 AF4200)、c-jun 抗体 (批号 AF6090)、剪切型半胱

氨酸蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3) 抗体 (批号 AF7022)、FasL 抗体 (批号 AF0157)、c-fos 抗体 (批号 AF0132) 和 β -actin 抗体购自美国 Affinity 公司; 兔抗大鼠 p-EGFR 多克隆抗体 (批号 ab40815)、兔抗大鼠 cleaved Caspase-3 多克隆抗体 (批号 ab52072)、TUNEL 试剂盒 (批号 ab206386) 购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的 IgG 抗体 (批号 sc-2357) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.3 仪器

TP 1020 型脱水机、包埋机、RM2016 型切片机 (德国 Leica 公司); 多功能真彩色细胞图象分析管理系统 (美国 Media Cybernetics 公司); 3K30 型高速低温离心机 (美国 Sigma 公司); BX51T-PHD-J11 型显微镜 (日本 Olympus 公司); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 7170A 型全自动生化分析仪 (日本日立公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

随机取 12 只 SD 大鼠作为对照组, 其余大鼠参照 Border 法^[7]制备膜性肾病模型: 1 mg C-BSA 溶于 0.5 mL 0.9%氯化钠溶液, 并与等体积弗氏不完全佐剂充分乳化, 分别于大鼠双前肢腋下及双腹股沟处 sc 1 mL 乳化剂进行预免疫, 隔日 1 次, 每周 3 次, 预免疫 1 周; 预免疫结束后, 大鼠尾 iv 乳化剂 (16 mg/kg) 进行正式免疫^[8], 隔日 1 次, 每周 3 次, 正式免疫 4 周; 对照组大鼠尾 iv 等体积 0.9%氯化钠溶液。造模结束后随机取造模大鼠 2 只进行肾脏病理检查, 确认造模成功。造模期间造模组大鼠死亡 1 只, 将剩余的 59 只造模组大鼠随机分为模型组 11 只、盐酸贝那普利 (10 mg/kg) 组以及益肾通络方低、中、高剂量 (6.61、13.22、26.44 g/kg)^[6]组, 每组 12 只。各给药组 ig 相应药物 (10 mg/kg), 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 4 周。

2.2 益肾通络方对膜性肾病大鼠 24 h 尿蛋白 (urine total protein, UTP)、血清中白蛋白 (albumin, ALB) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平的影响

分别于造模前、造模后、给药后收集各组大鼠 24 h 尿液, 记录尿量, 离心后取上清液, 检测 24 h UTP。实验结束后, 大鼠 ip 10%水合氯醛麻醉, 股动脉采血, 离心取上清, 采用全自动生化分析仪检测血清中 ALB 和 TC 水平。

2.3 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织病理变化的影响

取各组大鼠肾组织, 于 2.5%戊二醛固定液中固定, 梯度乙醇脱水后包埋、固化, 采用超薄切片机切片 (厚 70 nm), 加入 FITC 标记的兔抗山羊 IgG 抗体孵育, 于显微镜下观察 IgG 荧光沉积情况并拍照; 取各组大鼠肾组织切片, 进行 3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色, 于透射电镜下观察并拍照。

2.4 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织足细胞和肾小管上皮细胞凋亡的影响

取各组大鼠肾组织, 按 TUNEL 试剂盒说明书检测足细胞和肾小管上皮细胞凋亡情况。

2.5 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 p-EGFR 和 cleaved Caspase-3 表达的影响

取各组大鼠肾组织, 于 10%中性甲醛固定液中固定, 脱水、二甲苯透明后切片 (厚 4 μ m), 常规脱蜡至水, 抗原修复, 加入 3% H_2O_2 清除过氧化物酶活性, 滴加 50 μ L 山羊血清封闭, 滴加 p-EGFR 和 cleaved Caspase-3 多克隆抗体孵育, 滴加山羊抗大鼠 IgG 抗体, 加入 DAB 染液显色, 苏木素复染 3 min, 封片, 于显微镜下观察各组大鼠肾组织 p-EGFR 和 cleaved Caspase-3 表达情况。

2.6 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 p-EGFR、Rac1、c-jun、c-fos、FasL 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

取各组大鼠肾组织, 加入 RIPA 裂解液提取蛋白, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% BSA 封闭 1.5 h, 加入 p-EGFR、Rac1、c-jun、cleaved Caspase-3、FasL、c-fos 和 β -actin 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 加入 HRP 标记的 IgG 抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 加入 ECL 发光液显影, 采用 Image J 软件分析条带。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有正态且方差齐用单因素方差分析; 非正态或方差不齐时用秩转换的非参数检验。

3 结果

3.1 益肾通络方对膜性肾病大鼠 24 h UTP、血清 ALB 和 TC 水平的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 24 h UTP 以及血清中 TC 水平明显升高 ($P < 0.01$), ALB 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益肾通络方中、高剂量组及盐酸贝那普利组大鼠 24 h UTP

表1 益肾通络方对膜性肾病大鼠24 h UTP及血清ALB、TC水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Effect of Yishen Tongluo Recipe on 24 h UTP and levels of ALB and TC in serum of rats with membranous nephropathy ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	24 h UTP/(mg·24 h ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	12	3.94 ± 0.57	36.88 ± 1.99	1.30 ± 0.30
模型	—	11	38.34 ± 2.43**	27.05 ± 2.53**	2.18 ± 0.36**
盐酸贝那普利	0.01	12	25.82 ± 2.19##	31.12 ± 2.96##	1.61 ± 0.17##
益肾通络方	6.61	12	32.80 ± 2.25 ^{△△}	28.56 ± 1.47 ^{△△}	1.74 ± 0.16
	13.22	12	27.05 ± 2.07##	31.02 ± 2.22##	1.53 ± 0.14##
	26.44	12	26.54 ± 2.44##	32.23 ± 3.13##	1.53 ± 0.15##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与盐酸贝那普利组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$, 下表同

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs benazepril hydrochloride group, same as below tables

以及血清中TC水平明显降低($P < 0.01$), ALB水平明显升高($P < 0.01$)。

3.2 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织病理变化的影响

如图1所示,对照组大鼠肾小球基底膜未见IgG荧光沉积,模型组大鼠肾小球基底膜可见大量IgG荧光沉积,益肾通络方中、高剂量组和盐酸贝那普利组肾小球基底膜可见少量IgG荧光沉积,益肾通络方低剂量组肾小球基底膜IgG荧光沉积较多。

如图2所示,对照组肾小球基底膜、足细胞结构未见异常改变;模型组大鼠肾小球基底膜增厚明显,上皮下大量电子致密物沉积,足突融合严重;益肾通络方中、高剂量组和盐酸贝那普利组肾小球结构均有所改善。

3.3 益肾通络方对膜性肾病大鼠足细胞和肾小管上皮细胞凋亡的影响

如图3和表2所示,对照组大鼠肾小管上皮细胞和肾小球足细胞未见凋亡细胞;与对照组比较,

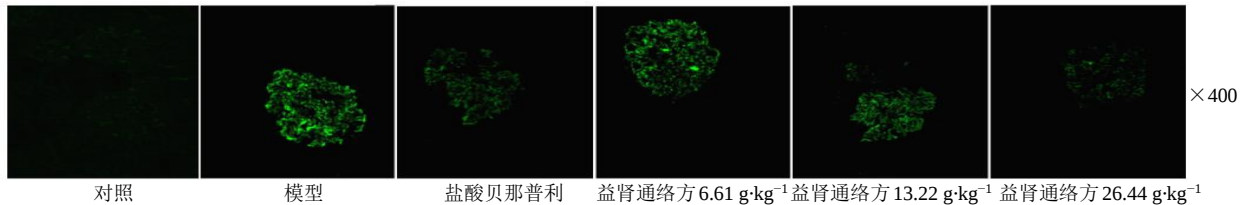


图1 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织IgG荧光沉积的影响

Fig. 1 Effect of Yishen Tongluo Recipe on IgG fluorescence deposition of kidney tissue in rats with membranous nephropathy

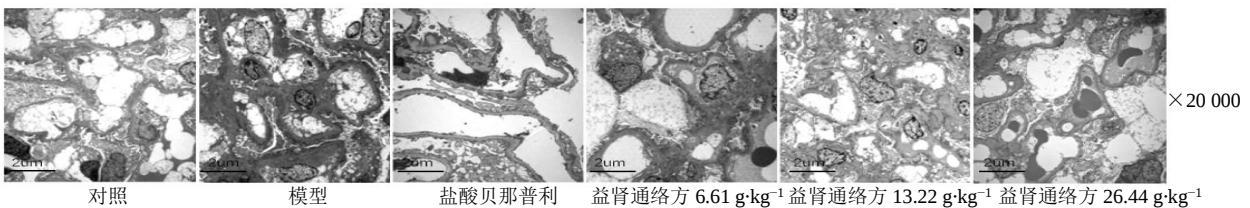


图2 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织超微结构的影响

Fig. 2 Effect of Yishen Tongluo Recipe on ultrastructure of kidney tissues in rats with membranous nephropathy

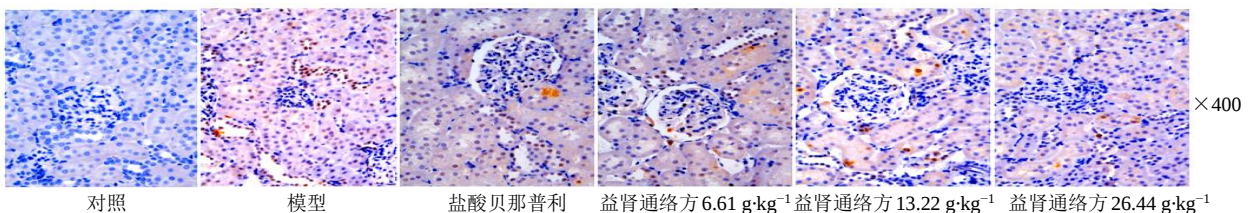


图3 益肾通络方对膜性肾病大鼠足细胞和肾小管上皮细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of Yishen Tongluo Recipe on apoptosis of podocytes and renal tubular epithelial cells in rats with membranous nephropathy

表 2 益肾通络方对膜性肾病大鼠足细胞和肾小管上皮细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Yishen Tongluo Recipe on apoptosis of podocytes and renal tubular epithelial cells in rats with membranous nephropathy ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	肾小管上皮细胞凋亡率/%	肾小球足细胞凋亡数/个
对照	—	12	0.38±0.27	1.2±1.3
模型	—	11	28.64±2.71**	14.8±3.5**
盐酸贝那普利	0.01	12	13.86±1.92##	4.8±1.3 [#]
益肾通络方	6.61	12	25.42±3.17 ^{△△}	12.2±2.6 [△]
	13.22	12	11.56±1.59##	5.4±1.1 [#]
	26.44	12	10.30±1.64##	5.4±2.1 [#]

模型组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$), 每个肾小球切面足细胞凋亡数明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益肾通络方中、高剂量组和盐酸贝那普利组肾小管上皮细胞凋亡率和每个肾小球切面足细胞凋亡数明显减少 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.4 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 p-EGFR 和 cleaved Caspase-3 表达的影响

如图 4 和表 3 所示, 对照组大鼠肾小管和肾小球仅有少量 p-EGFR 和 cleaved Caspase-3 表达; 模型组可见 p-EGFR 和 cleaved Caspase-3 在肾小管和肾小球均有明显表达 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益肾通络方中、高剂量组和盐酸贝那普利组 p-EGFR

和 cleaved Caspase-3 表达明显减少 ($P < 0.01$)。

3.5 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 p-EGFR、Rac1、c-jun、c-fos、FasL 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

如图 5 和表 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 p-EGFR、Rac1、c-jun、c-fos、FasL 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益肾通络方中、高剂量组及盐酸贝那普利组大鼠肾组织 p-EGFR、Rac1、c-jun、c-fos、FasL 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 益肾通络方低剂量组大鼠肾组织 c-jun 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

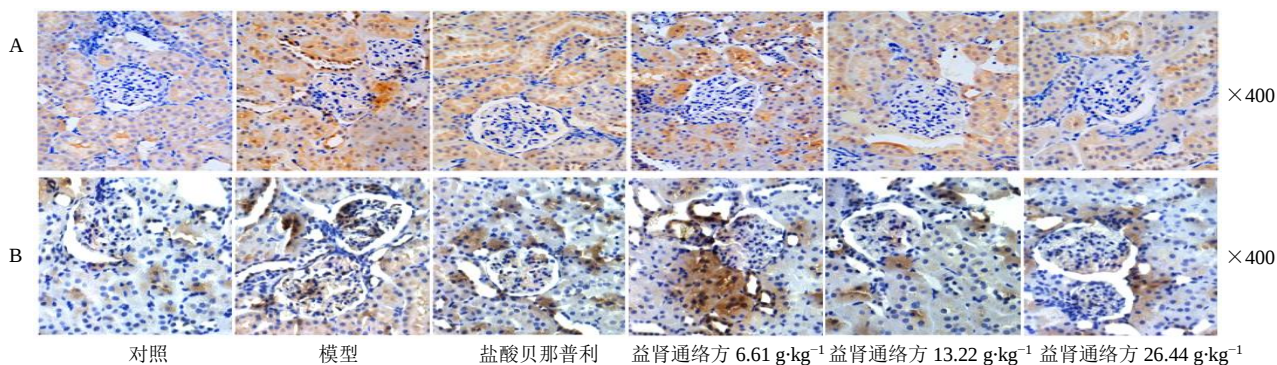


图 4 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 p-EGFR (A) 和 cleaved Caspase-3 (B) 表达的影响

Fig. 4 Effect of Yishen Tongluo Recipe on expressions of p-EGFR (A) and cleaved Caspase-3 (B) in kidney tissue of rats with membranous nephropathy

表 3 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 p-EGFR 和 cleaved Caspase-3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Yishen Tongluo Recipe on expressions of p-EGFR and cleaved Caspase-3 in kidney tissue of rats with membranous nephropathy ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	A 值	
			p-EGFR	cleaved Caspase-3
对照	—	12	1.80±0.84	1.00±0.71
模型	—	11	7.00±1.41**	7.80±1.10**
盐酸贝那普利	0.01	12	4.00±1.22##	4.00±1.22##
益肾通络方	6.61	12	6.80±1.10 ^{△△}	6.40±1.67 ^{△△}
	13.22	12	4.00±1.22##	4.00±1.22##
	26.44	12	3.40±0.55##	4.00±1.22##

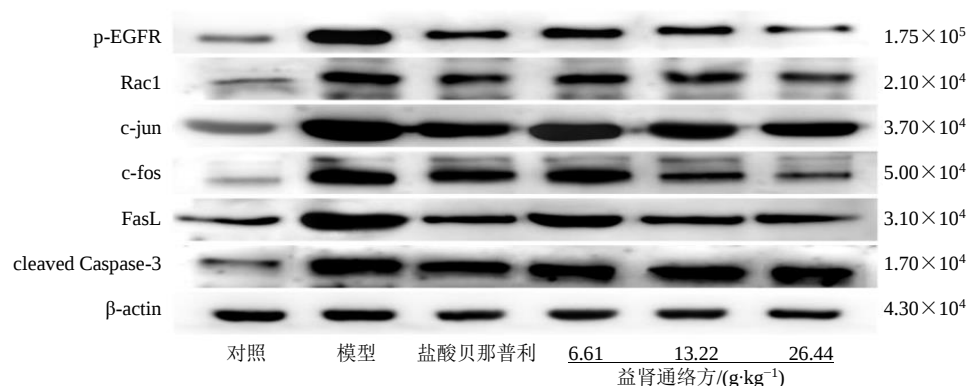


图5 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 p-EGFR、Rac1、c-jun、c-fos、FasL 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of Yishen Tongluo Recipe on expressions of p-EGFR, Rac1, c-jun, c-fos, FasL and cleaved Caspase-3 proteins in kidney tissue of rats with membranous nephropathy

表4 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 p-EGFR、Rac1、c-jun、c-fos、FasL 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Yishen Tongluo Recipe on expressions of p-EGFR, Rac1, c-jun, c-fos, FasL and cleaved Caspase-3 proteins in kidney tissue of rats with membranous nephropathy ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	蛋白相对表达量					
			p-EGFR	Rac1	c-jun	c-fos	FasL	cleaved Caspase-3
对照	—	12	0.41±0.10	0.23±0.07	0.85±0.05	0.28±0.07	0.89±0.03	0.66±0.22
模型	—	11	1.57±0.20**	1.20±0.09**	2.83±0.06**	1.88±0.05**	2.10±0.07**	2.31±0.13**
盐酸贝那普利	0.01	12	1.32±0.04 [#]	0.92±0.17 [#]	2.12±0.21 ^{##}	1.60±0.03 ^{##}	1.65±0.09 ^{##}	1.96±0.10 ^{##}
益肾通络方	6.61	12	1.59±0.19 [△]	1.16±0.07 [△]	2.40±0.11 ^{##△}	1.85±0.12 [△]	2.07±0.07 ^{△△}	2.12±0.16
	13.22	12	1.11±0.07 ^{##}	0.86±0.15 ^{##}	2.14±0.05 ^{##}	1.03±0.21 ^{##}	1.64±0.06 ^{##}	2.06±0.07 [#]
	26.44	12	0.83±0.14 ^{##△△}	0.80±0.14 ^{##}	2.03±0.15 ^{##}	0.89±0.04 ^{##}	1.60±0.05 ^{##}	2.03±0.04 [#]

4 讨论

根据中医“络病”理论，肾小球疾病属于中医肾络之病。肾之络脉是内外之邪侵袭的通路途径，膜性肾病发病时，正邪相争产生湿浊瘀毒等病理产物留伏于肾络，络脉细小，易入难出，易积成形，日久痹阻肾络，致肾络瘀阻。本课题组在“肾络瘀阻”病机指导下创立益肾通络方，临床疗效显著。益肾通络方中黄芪、党参、炒白术健脾益气，补气升提，脾健精微得升，水湿得运，升清降浊同时利湿消肿；仙灵脾温肾阳，固肾气，肾阳得温能行其温阳化气利水之功，肾气得固能行其封藏固摄之本，使精微得固，水湿得化；绞股蓝祛浊化痰，使有形之邪得除，脾阳得振，气机得复，络脉得通；四药配伍应用，扶人体之本虚，祛留伏之浊邪；莪术、当归破血行气、逐瘀消癥，祛肾络有形之瘀滞；地龙、水蛭入络搜剔、松透病根，通经活络，络脉畅通，邪有出路；诸药合用健脾气、补肾气、祛痰邪、化瘀浊、通肾络，扶正不留邪，祛邪不伤正。血浆蛋白为人体精微物质，由后天脾脏运化而成；UTP 由脾肾亏虚，精微下注所致；血脂因痰浊凝聚

而致；气虚络瘀，终致肾脏病理损伤。本研究结果显示，益肾通络方在降低 UTP、升高 ALB 及调节血脂方面有较好的疗效，并能够在一定程度上减少足细胞和肾小管细胞凋亡、改善肾组织病理损伤，表明益肾通络方紧扣病机、遣方得当、组方合理、疗效显著。

EGFR 是酪氨酸激酶 ErbB 受体家族的成员^[9]。EGFR 激活导致其胞质部分中特定的酪氨酸残基自磷酸化，从而引起下游信号传导^[9]。酪氨酸残基充当激活细胞内途径各种信号分子的停靠位点，调节细胞增殖、分化和凋亡^[9]。在各种类型的肾小球肾炎肾活检组织中均观察到 EGFR 表达，且在膜性肾病和局灶节段性肾小球硬化中其表达更为明显，EGFR 可能与早期硬化性病变的形成有关^[10]。在大鼠肾小球上皮细胞中，亚溶解型 C5b-9 诱导 EGFR 的酪氨酸磷酸化，并导致细胞外信号调节激酶 2 (extracellular regulated kinase 2, ERK2) 级联反应^[11]；在糖尿病肾病模型中足细胞 EGFR 的表达和激活是肾脏加速损伤的介质^[12]。以上研究表明肾组织中 EGFR 的异常激活会导致肾脏病变，但其具体致病

机制尚不清楚。

EGFR 酪氨酸激酶被激活后,能够通过启动细胞内信号级联反应,从而导致多种生物化学变化。EGFR介导的主要信号转导涉及c-jun氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK)的激活^[13], Rac1是EGFR介导的JNK激活的上游信号分子^[14-15],EGFR的失调使Rac1活性增加。Rac1是Rho鸟苷三磷酸酶家族成员之一,参与细胞增殖、分化、凋亡的调节。Rac被激活后,可以启动JNK级联反应,使JNKs完全活化;活化的JNK可以通过死亡受体途径介导细胞凋亡,即激活下游转录因子c-jun、c-fos,上调促凋亡蛋白FasL等的表达^[16]。c-jun和c-fos二聚化成活化蛋白-1(activated protein-1, AP-1)^[17], AP-1是细胞内一类转录激活因子,通过调节靶基因的表达,参与调节细胞增殖、死亡、存活和分化^[18]。AP-1成熟的靶标是编码FasL基因^[18], FasL作为细胞外配体与其跨膜受体Fas结合后, Fas受体三聚化而活化,激活的受体与Fas相关死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain protein, FADD)结合,并募集Caspase-8前体使之水解活化成Caspase-8,继而激活凋亡效应因子Caspase-3,启动细胞凋亡^[19]。

本研究结果显示,尾iv C-BSA后大鼠出现低蛋白血症、蛋白尿、肾小球基底膜免疫复合物沉积,并且出现肾小球足细胞和肾小管上皮细胞凋亡,提示造模成功;模型组肾小管细胞及肾小球磷酸化EGFR表达增多,提示EGFR的激活参与了膜性肾病的病理损伤;随着EGFR的激活,其下游的Rac1表达相应升高,引起JNK通路相关蛋白c-jun、c-fos表达升高,进而使编码转录FasL蛋白表达增多,最终引起细胞凋亡,表现为cleaved Caspase-3蛋白表达显著升高,提示EGFR的激活参与膜性肾病发病过程。中、高剂量益肾通络方能够下调EGFR信号途径相关蛋白,减少足细胞和肾小管上皮细胞凋亡,提示益肾通络方对膜性肾病大鼠的治疗作用与抑制EGFR及其下游级联信号反应有关。低剂量益肾通络方对EGFR通路相关蛋白表达无明显影响,高剂量益肾通络方与中剂量益肾通络方无明显差异,这可能与动物摄取、吸收、生物转化等过程受限有关,也可能与组方中某些药材用量及功效不同有关。

综上,本研究发现EGFR信号传导失调与膜性肾病肾脏病理状况有关,干预EGFR途径可能是治疗慢性肾脏疾病的潜在手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhu P, Zhou F D, Wang S X, *et al.* Increasing frequency of idiopathic membranous nephropathy in primary glomerular disease: A 10-year renal biopsy study from a single Chinese nephrology centre [J]. *Nephrology*, 2015, 20(8): 560-566.
- [2] Xu X, Wang G B, Chen N, *et al.* Long-term exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in China [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(12): 3739-3746.
- [3] Degn S E, van der Poel C E, Firl D J, *et al.* Clonal evolution of autoreactive germinal centers [J]. *Cell*, 2017, 170(5): 913-926.
- [4] Ronco P, Debiec H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: Time for a shift in patient's care [J]. *Lancet*, 2015, 385(9981): 1983-1992.
- [5] 陈文军, 靳晓华, 陈素枝, 等. 益肾通络方联合西药治疗原发性膜性肾病脾肾亏虚证 30 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2016, 57(5): 409-412.
- [6] 陈素枝, 臧倩男, 张卓, 等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠的肾保护作用及足细胞骨架相关蛋白的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4857-4863.
- [7] Border W A, Ward H J, Kamil E S, *et al.* Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen [J]. *J Clin Invest*, 1982, 69(2): 451-461.
- [8] 梁静, 孙兴旺, 曹灵, 等. 不同剂量阳离子化牛血清白蛋白对膜性肾病大鼠造模的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(37): 7322-7325.
- [9] Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor [J]. *Cell*, 2002, 110(6): 669-672.
- [10] Nakopoulou L, Stefanaki K, Boletis J, *et al.* Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor (EGFR) in various types of renal injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1994, 9(7): 764-769.
- [11] Cybulsky A V, Takano T, Papillon J, *et al.* Complement C5b-9 induces receptor tyrosine kinase transactivation in glomerular epithelial cells [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(5): 1701-1711.
- [12] Li Y, Pan Y, Cao S R, *et al.* Podocyte EGFR inhibits autophagy through upregulation of Rubicon in type 2 diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2021, 70(2): 562-576.
- [13] Martínez M A, Úbeda A, Trillo M À. Involvement of the EGF receptor in MAPK signaling activation by a 50 Hz magnetic field in human neuroblastoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(4): 893-907.

- [14] Löf-Öhlin Z M, Nyeng P, Bechard M E, *et al.* EGFR signalling controls cellular fate and pancreatic organogenesis by regulating apicobasal polarity [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(11): 1313-1325.
- [15] Slomiany B L, Slomiany A. *Helicobacter pylori*-induced gastric mucosal TGF- α ectodomain shedding and EGFR transactivation involves Rac1/p38 MAPK-dependent TACE activation [J]. *Inflammopharmacology*, 2016, 24(1): 23-31.
- [16] Raman M, Chen W, Cobb M H. Differential regulation and properties of MAPKs [J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3100-3112.
- [17] Goldsmith C, Bond D, Jankowski H, *et al.* The olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol selectively reduce proliferation, influence the cell cycle, and induce apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1937.
- [18] Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(5): E131-E136.
- [19] Riedl S J, Salvesen G S. The apoptosome: Signalling platform of cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(5): 405-413.

[责任编辑 李亚楠]