

## 益肾通络方下调 ADAM17 介导的 EGFR 表达干预膜性肾病肾小管上皮细胞凋亡研究

陈素枝<sup>1</sup>, 李永章<sup>1</sup>, 杨凤文<sup>1</sup>, 檀 淼<sup>2</sup>, 宋 蕾<sup>3</sup>, 檀金川<sup>1\*</sup>

1. 河北省中医院, 河北 石家庄 050011

2. 河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050011

3. 天津中医药大学, 天津 301617

**摘要:**目的 探讨解整合素金属蛋白酶 17 (a disintegrin and metalloproteinase 17, ADAM17) 介导的表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 激活与膜性肾病 (membranous nephropathy, MN) 肾小管上皮细胞凋亡的关系及益肾通络方的干预作用。方法 尾 iv 阳离子牛血清白蛋白 (cationic bovine serum albumin, C-BSA) 构建 MN 大鼠模型, 给予益肾通络方干预 4 周。实验结束后观察大鼠肾脏病理变化和肾小管上皮细胞凋亡情况; 采用 Western blotting 和 qRT-PCR 法检测肾组织 ADAM17、肝素结合性表皮生长因子 (heparin-binding epidermal growth factor, HB-EGF)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 以及磷酸化表皮生长因子受体 (phosphorylated epidermal growth factor receptor, p-EGFR) 蛋白及 mRNA 表达情况。结果 与对照组比较, 模型组大鼠肾脏病理改变严重, 肾小管上皮细胞凋亡增多 ( $P < 0.01$ ), 肾组织 ADAM17、p-EGFR、HB-EGF、TNF- $\alpha$  蛋白及 mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 益肾通络方组大鼠肾脏病理有所改善, 肾小管细胞凋亡减少 ( $P < 0.01$ ), 肾组织 ADAM17、EGFR、HB-EGF、TNF- $\alpha$  蛋白及 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。结论 MN 大鼠肾组织 ADAM17 表达增多, 释放活化 HB-EGF、TNF- $\alpha$  增多, 进而激活相应受体 EGFR, EGFR 活化进一步诱导肾小管上皮细胞凋亡及肾脏纤维化。益肾通络方可以通过降低 MN 大鼠肾组织剪切酶 ADAM17 表达, 减少 HB-EGF、TNF- $\alpha$  的脱落活化, 从而减少 EGFR 激活, 以达到减少肾小管上皮细胞凋亡、延缓肾脏纤维化的作用。

**关键词:** 膜性肾病; 解整合素金属蛋白酶 17/表皮生长因子受体; 肾小管细胞; 凋亡; 益肾通络方

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)24-7520-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.014

## Yishen Tongluo interferes with renal tubular epithelial cell apoptosis in membranous nephropathy by down-regulating ADAM17-mediated EGFR expression

CHEN Su-zhi<sup>1</sup>, LI Yong-zhang<sup>1</sup>, YANG Feng-wen<sup>1</sup>, TAN Miao<sup>2</sup>, SONG Lei<sup>3</sup>, TAN Jin-chuan<sup>1</sup>

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

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

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

**Abstract: Objective** To explore the relationship between a disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17)-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and membranous nephropathy (MN) renal tubular epithelial cell apoptosis and the intervention effect of Yishen Tongluo Recipe (益肾通络方). **Methods** MN rats model was constructed by tail iv cationic bovine serum albumin (C-BSA), Yishen Tongluo Recipe was given for 4 weeks. After the experiment, the pathological changes of kidney and apoptosis of renal tubular epithelial cells in rats were observed. Western blotting and qRT-PCR were used to detect protein and mRNA expressions of ADAM17, heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and phosphorylation epidermal growth factor receptor (p-EGFR). **Results** Compared with control group, the pathological changes in kidneys of rats in model group were severe, the apoptosis of renal tubular epithelial cells were increased ( $P < 0.01$ ), protein and mRNA expressions of

收稿日期: 2021-04-08

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—), 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

ADAM17, p-EGFR, HB-EGF and TNF- $\alpha$  in renal tissue were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the kidney pathology of rats was improved after the intervention of Yishen Tongluo Recipe, the apoptosis of renal tubular cells was reduced ( $P < 0.01$ ), protein and mRNA expressions of ADAM17, p-EGFR, HB-EGF and TNF- $\alpha$  were decreased in renal tissue ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion** ADAM17 expression in kidney tissue of MN rats is increased, and more HB-EGFR and TNF- $\alpha$  are released and activated, then activate the corresponding receptor EGFR, the activated EGFR further induce apoptosis of renal tubular epithelial cells and renal fibrosis. Yishen Tongluo Recipe can reduce the shedding and activation of HB-EGFR and TNF- $\alpha$  by reducing the expression of cleaving enzyme ADAM17 in kidney tissue of MN rats, thereby reducing the activation of EGFR, so as to reduce the apoptosis of renal tubular epithelial cells and delay renal fibrosis.

**Key words:** membranous nephropathy; ADAM17/EGFR; renal tubular cells; apoptosis; Yishen Tongluo Recipe

膜性肾病 (membranous nephropathy, MN) 是成人肾小球肾炎最常见的病理类型之一, 也是成人特发性肾病综合征的最常见原因。大量蛋白尿是 MN 的特征之一, 疾病严重程度和预后从自发缓解到发展为严重肾病综合征以及进展至终末期肾脏病各不相同<sup>[1]</sup>。关于 MN 目前较多关注的是足细胞的凋亡, 很少有人关注肾小管细胞损伤。本课题组前期研究发现, MN 中除足细胞凋亡外, 还存在大量肾小管上皮细胞的凋亡。蛋白尿是一种有充分证据证明的肾功能逐渐丧失的预测因子, 被认为是肾脏损害和功能丧失的原因, 是导致肾病进展的独立危险因素。细胞凋亡被认为是肾小球硬化过程中实质细胞减少的机制之一。蛋白尿对肾小管细胞的毒性作用是引起肾小管细胞凋亡、肾小管间质炎症和纤维化的主要原因<sup>[2-3]</sup>。

蛋白尿可以通过活化补体、诱导细胞因子释放、诱导小管上皮细胞自噬、激活凋亡相关途径等不同机制诱导肾小管细胞损伤<sup>[4]</sup>。解整合素金属蛋白酶 17 (a disintegrin and metalloproteinase 17, ADAM17) 是释放多种膜锚定底物的主要脱落酶, 主要用于释放膜表面生长因子或细胞因子, 进而极大地调节细胞因子的活性以及通过细胞因子受体的信号转导<sup>[5]</sup>。研究表明, ADAM17 具有促炎和促纤维化作用<sup>[6]</sup>, ADAM17 剪切并释放肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 及肝素结合性表皮生长因子 (heparin-binding epidermal growth factor, HB-EGF), 进而反式激活表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR), 介导肾脏损伤<sup>[5]</sup>。

益肾通络方是河北省中医院治疗 MN 的有效处方, 疗效突出<sup>[7]</sup>, 课题组前期探讨其作用机制时发现益肾通络方不仅可以抑制肾小球足细胞损伤, 还可以减少肾小管上皮细胞凋亡<sup>[8-9]</sup>。故本研究将观察 ADAM17 介导的 EGFR 的激活参与肾小管上皮细胞凋亡的机制及益肾通络方的干预作用, 进一步揭

示益肾通络方治疗 MN 的作用机制, 为 MN 的治疗提供思路和方法。

## 1 材料

### 1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 50 只, 8 周龄, 体质量 (180 $\pm$ 20) g, 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, 动物合格证编号 1509116。大鼠在河北中医学院 SPF 级实验中心饲养, 自由进食饮水。本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, 经课题组前期研究其含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $\geq 0.05\%$ 、黄芪甲苷 $\geq 0.12\%$ 、阿魏酸 $\geq 0.15\%$ 、甘氨酸 $\geq 6.0\%$ 、丙氨酸 $\geq 2.5\%$ 、脯氨酸 $\geq 3.0\%$ 、水蛭胺 B $\geq 0.02\%$ 、水蛭胺 C $\geq 0.04\%$ 、党参炔苷 $\geq 0.008\%$ 、肌苷 $\geq 0.37\%$ 、丹酚酸 B $\geq 2.8\%$ 、茯苓酸 B $\geq 0.01\%$ 、茯苓酸 A $\geq 0.008\%$ ; 盐酸贝那普利 (批号 FA20150902, 10 mg/片) 购自深圳信立泰药业股份有限公司; 阳离子牛血清白蛋白 (cationic bovine serum albumin, 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) 美国 Sigma 公司; 山羊抗大鼠 IgG 抗体、FITC 标记的兔抗山羊 IgG 抗体 (批号分别为 20147-1、111-095-003) 购自美国 KPL 公司; TUNEL 试剂盒 (批号 ab206386)、兔抗大鼠 ADAM17 抗体 (批号 ab28233)、p-EGFR 抗体 (批号 EP774Y)、HB-EGF 抗体 (批号 ab218019)、TNF- $\alpha$  抗体 (批号 ab205587) 购自英国 Abcam 公司; ADAM17、EGFR、

HB-EGF、TNF- $\alpha$  引物购自美国 Invitrogen 公司；TRNzol 总 RNA 提取试剂（批号 DP405-02）购自天根生化科技（北京）有限公司；PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser（批号 RR047B）、SYBR® Premix Ex Taq™ II（Tli RNaseH Plus）ROX plus（批号 RR82LR）；DL2000 DNA Marker（批号 3427Q）购自宝日医生物技术（北京）有限公司。

### 1.3 仪器

ND-1000 型核酸定量仪、分光光度计（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；BX51T-PHD-J11 型显微镜（日本 Olympus 公司）；TP 1020 型包埋机、RM2016 型切片机（德国 Leica 公司）；涡旋振荡仪（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；离心机（德国 Eppendorf 公司）；qRT-PCR 仪（美国 Applied Biosystems 公司）；Tanon 1600 凝胶成像系统（上海天能科技有限公司）。

## 2 方法

### 2.1 模型的制备、分组及给药

SD 大鼠适应性喂养 1 周，随机分为对照组 12 只和造模组 38 只，参照 Border 法<sup>[10]</sup>制备 MN 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 乳化液进行预免疫，隔日 1 次，每周 3 次，预免疫 1 周；大鼠尾 iv 乳化剂（16 mg/kg）进行正式免疫，隔日 1 次，每周 3 次，连续 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组大鼠 2 只行肾脏病理检查，确认造模成功。造模期间造模组大鼠死亡 1 只，将剩余 35 只造模组大鼠随机分为模型组 11 只、盐酸贝那普利（10 mg/kg，相当于临床等效剂量）组 12 只、益肾通络方（13.22 g/kg，相当于临床等效剂量）<sup>[8]</sup>组 12 只。各给药组 ig 药物（10 mL/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 MN 大鼠肾组织 IgG 免疫沉积的影响

实验结束后，大鼠 ip 10%水合氯醛麻醉，取米粒样大小的肾皮质，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。

### 2.3 益肾通络方对 MN 大鼠肾组织病理变化的影响

取各组大鼠肾皮质（2 mm×2 mm×10 mm），

于 10%福尔马林中固定，分别行 PAS、Masson 染色，于显微镜下观察肾组织病理变化。

### 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 ADAM17、EGFR、HB-EGF 和 TNF- $\alpha$ mRNA 表达的影响

取各组大鼠部分肾皮质，按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。引物序列：ADAM17 上游引物 5'-ACATGCTCAGGG-AACAGGTG-3'，下游引物 5'-CTGACAGTCTGTC-CTCAAACG-3'，115 bp；EGFR 上游引物 5'-GGC-TCCCAGTACCTACTCAAC-3'，下游引物 5'-GTA-TTCTTTCTCCTCAGCACCA-3'，173 bp；HB-EGF 上游引物 5'-CACTGGTTCAGGATGGACG-3'，下游引物 5'-CCCCTTTGTCAAGAAGTAGCT-3'，185 bp；TNF- $\alpha$  上游引物 5'-CCACCTCCATCACCA-CTACC-3'，下游引物 5'-CAGAGCCACCAGCAC-CAT-3'，126 bp；GAPDH 上游引物 5'-CCTTCCGT-GTTCTACCCC-3'，下游引物 5'-GCCCAGGATGC-CCTTTAGTG-3'，131 bp。

### 2.6 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 ADAM17、EGFR、HB-EGF 和 TNF- $\alpha$ 蛋白表达的影响

取各组大鼠部分肾皮质，于 10%中性甲醛固定液中固定，脱水、二甲苯透明后切片（厚 4  $\mu$ m），常规脱蜡至水，抗原修复，加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 清除过氧化物酶活性，滴加 50  $\mu$ L 山羊血清封闭，滴加 ADAM17、EGFR、HB-EGF 和 TNF- $\alpha$  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 ADAM17、EGFR、HB-EGF 和 TNF- $\alpha$  表达情况。

### 2.7 统计方法

所有数据用 SPSS 17.0 软件进行分析，所有计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示，正态且方差齐采用单因素方差分析，组间的多重比较采用 LSD 检验；非正态或方差不齐时用非参数检验，多个独立样本的比较用 Kruskal-Wallis H 检验。

## 3 结果

### 3.1 益肾通络方对 MN 大鼠肾组织 IgG 免疫沉积的影响

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

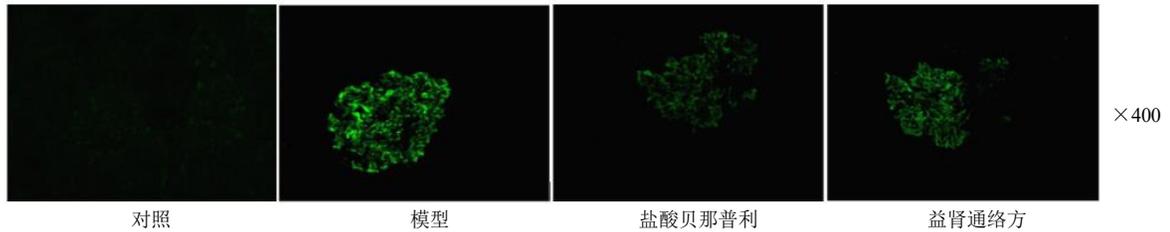


图1 益肾通络方对MN大鼠肾组织IgG免疫沉积的影响

Fig. 1 Effect of Yishen Tongluo Recipe on IgG immune deposition in kidney tissue of MN rats

荧光沉积，益肾通络方和盐酸贝那普利组肾小球基底膜可见少量IgG荧光沉积。

### 3.2 益肾通络方对MN大鼠肾组织病理变化的影响

如图2所示，经PAS和Masson染色发现，对照组大鼠肾小球基底膜正常，无增厚，无钉突形成，肾小管上皮细胞无空泡变性；肾小球结构未见异常，无嗜复红蛋白沉积，未见纤维化改变。模型组大鼠肾组织小球基底膜增厚，肾小管上皮细胞可见空泡变性，肾组织大量嗜复红蛋白沉积，肾间质纤维化改变明显。益肾通络方和盐酸贝那普利组大鼠肾小球光镜下结构有不同程度减轻。

### 3.3 益肾通络方对MN大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响

通过TUNEL法检测肾小管上皮细胞凋亡情况，细胞核呈棕褐色为凋亡细胞。如图3和表1所示，对照组大鼠肾小管上皮未见凋亡细胞；模型组大鼠肾小管上皮可见大量凋亡细胞，肾小管上皮细胞凋亡率明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )；益肾通络方和盐酸贝那普利组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率较模型组明显降低 ( $P < 0.01$ )。

### 3.4 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织ADAM17、EGFR、HB-EGF和TNF- $\alpha$ mRNA表达的影响

如表2所示，与对照组相比，模型组大鼠肾组

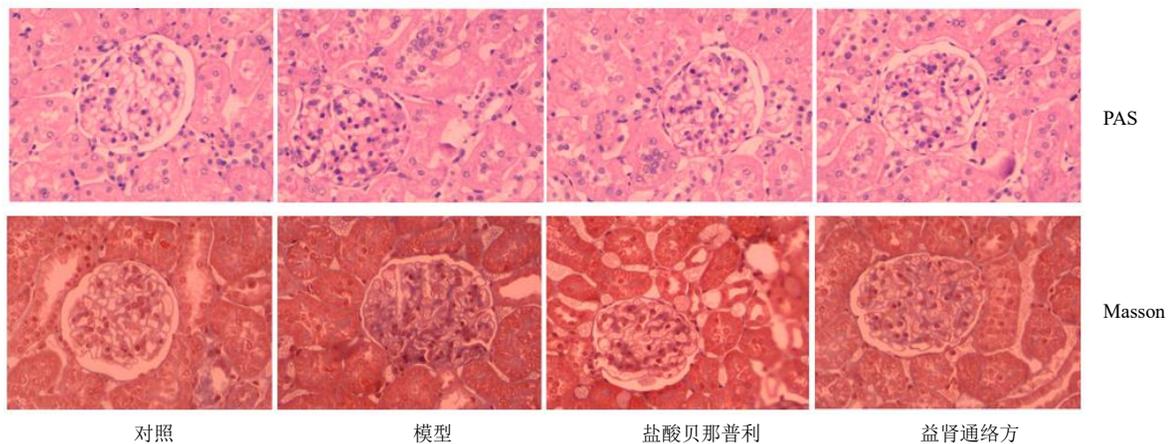


图2 益肾通络方对MN大鼠肾组织病理变化的影响 (×400)

Fig. 2 Effect of Yishen Tongluo Recipe on pathological changes in kidney tissue of MN rats (×400)

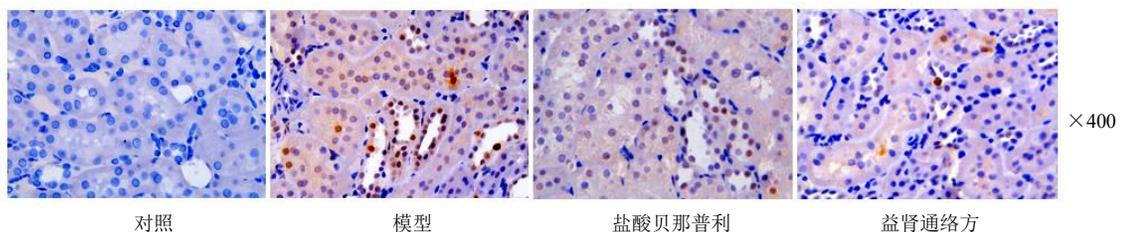


图3 益肾通络方对MN大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of Yishen Tongluo Recipe on apoptosis of renal tubular cells in MN rats

表1 益肾通络方对MN大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of Yishen Tongluo Recipe on apoptosis of renal tubular cells in MN rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	n	肾小管上皮细胞凋亡率/%
对照	—	12	0.38 ± 0.27
模型	—	11	28.64 ± 2.71**
盐酸贝那普利	0.01	12	13.86 ± 1.92##
益肾通络方	13.22	12	11.56 ± 1.59##

与对照组比较: \*\*P<0.01; 与模型组比较: ##P<0.01, 表2同

\*\*P<0.01 vs control group; ##P<0.01 vs model group, same as table 2

表2 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 ADAM17、EGFR、HB-EGF 和 TNF-α mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of Yishen Tongluo Recipe on mRNA expressions of ADAM17, EGFR, HB-EGF and TNF-α in kidney tissues of MN rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	n	mRNA 相对表达量			
			ADAM17	TNF-α	HB-EGF	EGFR
对照	—	12	1.000 ± 0	1.000 ± 0	1.000 ± 0	1.000 ± 0
模型	—	11	2.205 ± 0.316**	2.395 ± 0.273**	3.532 ± 0.294**	4.061 ± 0.378**
盐酸贝那普利	0.01	12	1.585 ± 0.180##	1.568 ± 0.152##	2.325 ± 0.320##	3.283 ± 0.299##
益肾通络方	13.22	12	1.484 ± 0.128##	1.588 ± 0.068##	2.185 ± 0.336##	3.338 ± 0.247##

织 ADAM17、EGFR、HB-EGF 和 TNF-α mRNA 表达明显升高 (P<0.01); 与模型组相比, 各给药组肾组织 ADAM17、EGFR、HB-EGF 和 TNF-α mRNA 表达明显降低 (P<0.01)。

### 3.5 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 ADAM17、EGFR、HB-EGF 和 TNF-α 蛋白表达的影响

如图4所示, ADAM17 在对照组大鼠肾脏近曲

小管、肾小球内皮微弱表达, 在模型组大鼠肾脏近端小管上皮细胞 ADAM17 明显增强, 益肾通络方干预后 ADAM17 表达下降。TNF-α 主要在胞质中表达, 在对照组微弱表达, 在模型组呈高表达, 益肾通络方干预组 TNF-α 表达较模型组下降。肾小管上皮细胞是 HB-EGF 的主要来源, 正常情况下 HB-EGF 在近曲小管少量表达; EGFR 在正常肾小管上

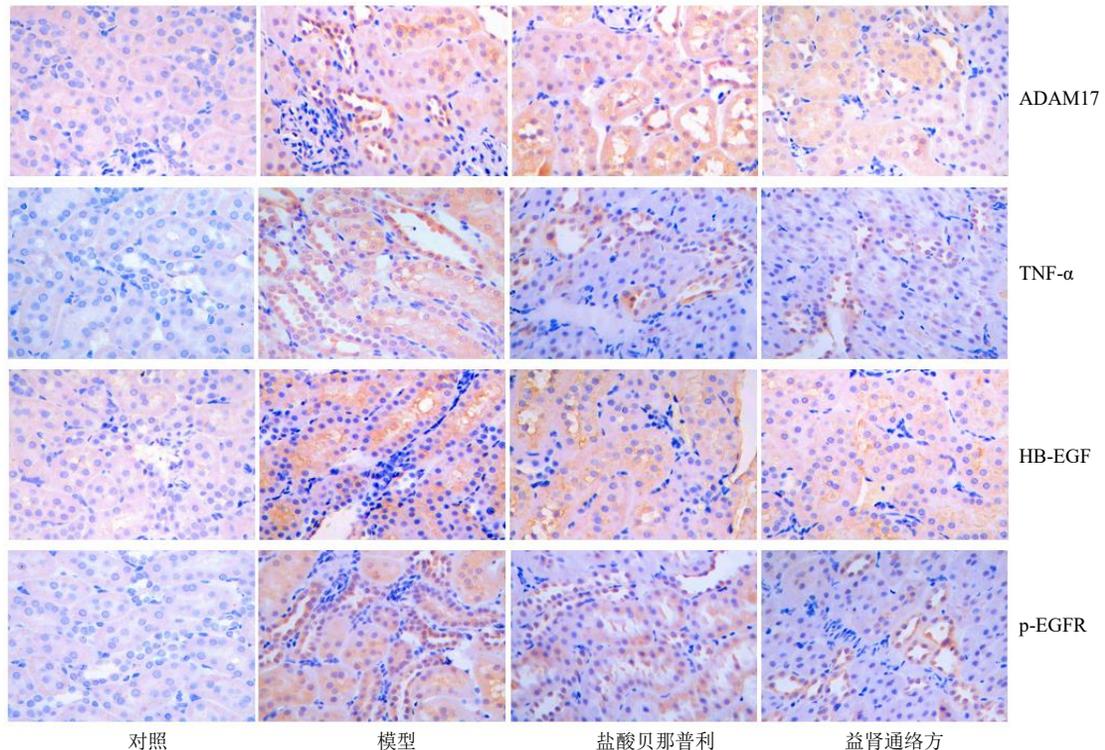


图4 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 ADAM17、EGFR、HB-EGF 和 TNF-α 蛋白表达的影响 (×400)

Fig. 4 Effect of Yishen Tongluo Recipe on protein expressions of ADAM17, EGFR, HB-EGF and TNF-α in kidney tissues of MN rats (× 400)

皮细胞少量表达。对照组大鼠肾小管可见少量 HB-EGF、p-EGFR 表达；模型组大鼠肾组织 HB-EGF 和 p-EGFR 表达较对照组明显增强，p-EGFR 在肾小管细胞表达明显，HB-EGF 除在近曲小管表达外，在远曲小管和集合管也有表达；各给药组 HB-EGF、p-EGFR 表达较模型组有不同程度减弱。

#### 4 讨论

络脉根据其体内分布分为阳络和阴络，阴络又根据其分布的脏腑不同而进一步分为心络、肝络、肾络等。肾络因络体细窄而具有血行缓慢、易虚易滞的特点。络脉是邪气侵犯人体的途径，MN 发病时邪气犯络，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。本课题组从中医“络病”理论出发，结合 MN 的发病特点提出“邪伏肾络、肾络瘀阻”为 MN 的核心病机，在此病机理论指导下提出“疏通肾络”为治疗关键，创立益肾通络方。

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、化痰浊、通肾络，扶正不留邪，祛邪不伤正。本课题组前期研究证实，益肾通络方可以明显改善 MN 患者

临床症状，减轻 MN 大鼠肾脏病理损伤。

ADAM 在质膜上裂解多种跨膜蛋白，这一过程称为胞外域脱落。ADAM17，也称为 TNF- $\alpha$  转化酶，是用于释放多种膜锚定底物的主要脱落酶，已有研究证实 ADAM17 具有促炎和促纤维化作用，表明它可能是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 进展的重要介质。ADAM17 释放的膜锚定底物包括 TNF- $\alpha$  和 EGFR 配体<sup>[11]</sup>，其中 2 种主要的底物 TNF- $\alpha$  和 HB-EGF 是肾脏损害的重要介体<sup>[5]</sup>。TNF- $\alpha$  是一种炎性细胞因子，是肾脏损伤的主要驱动力，可促进炎症、细胞凋亡和肾小球屏障损害<sup>[12]</sup>。HB-EGF 可诱导肾小球纤连蛋白的产生，介导肾小球硬化和肾间质纤维化<sup>[13]</sup>。

肾脏 ADAM17 激活导致促炎和促纤维化因子 TNF- $\alpha$ 、HB-EGF 释放，它们的胞外域脱落与病理因素密切相关，包括炎症、间质纤维化和肾损伤<sup>[5-6]</sup>。胞外域脱落后，这些配体与受体结合，从而导致下游信号传导。HB-EGF 是 EGFR 转录激活的关键介体，HB-EGF 释放后通过自分泌或旁分泌的方式激活 EGFR。另外，脱落活化的 TNF- $\alpha$  通过与其受体 TNFR 结合刺激 c-Src 磷酸化，磷酸化的 c-Src 再反式激活 EGFR<sup>[14]</sup>，TNF- $\alpha$  通路的串扰会强烈增强 EGFR 激活的效果，进一步加重 EGFR 激活诱发的损伤作用。持续性 EGFR 激活足以引发肾小管功能障碍和肾间质纤维化<sup>[15]</sup> (图 5)。

蛋白尿是肾小管损伤的独立危险因素，肾小管细胞长时间暴露于白蛋白会导致细胞凋亡，细胞凋亡促进了纤维化进程<sup>[16]</sup>。益肾通络方是经研究证实的治疗 MN 疗效确切的中药组方，既往动物实验量

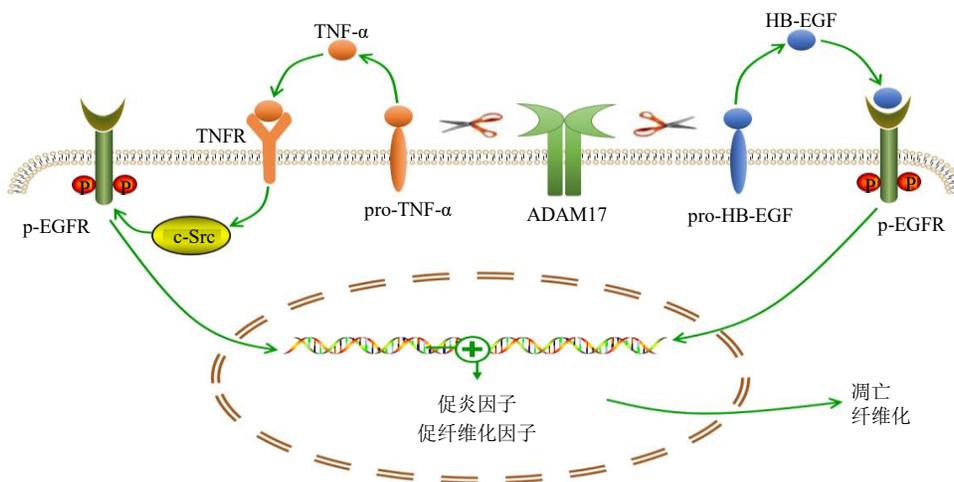


图 5 ADAM17 介导 EGFR 激活诱导肾小管细胞凋亡

Fig. 5 ADAM17 mediates EGFR activation and induces renal tubular cell apoptosis

效关系研究证实中等剂量（临床等效剂量）的益肾通络方足以达到最佳治疗效果，故本研究以益肾通络方中剂量进行进一步研究。研究发现蛋白尿促进了肾小管细胞凋亡的发生，同时肾组织 ADAM17 活性增加，进而脱落释放的 TNF- $\alpha$ 、HB-EGF 增多，活化的 TNF- $\alpha$ 、HB-EGF 进一步激活 EGFR，EGFR 被持续激活，进一步触发促炎和促纤维化因子的合成和释放，导致细胞损伤、凋亡和纤维化。近端小管细胞中 EGFR 的持续活化是 CKD 进行性肾脏纤维化的标志，ADAM17 从受损的近端小管细胞中释放活性可溶性 EGFR 配体胞外域，EGFR 配体通过诱导近端小管中 EGFR 的重新激活来诱导持续的 EGFR 激活<sup>[17]</sup>。与以往研究相似<sup>[18]</sup>，有肾小管间质纤维化的梗阻性肾病、慢性肾小球肾炎和糖尿病肾病患者肾小管和间质 ADAM17 表达显著增加，EGFR 活化的增加，并且所有患者肾组织样本中纤维化标志物的表达量与 ADAM17 呈显著正相关。益肾通络方干预后肾小管细胞凋亡减少，肾脏纤维化减轻，同时 ADAM17 及其底物 TNF- $\alpha$ 、HB-EGF 表达减少，并且 p-EGFR 也相应下降，表明益肾通络方对肾小管细胞凋亡的干预作用可能与抑制上述信号分子有关。

研究表明，ADAM17 通过 EGFR 信号传导途径在纤维化和炎症肾脏疾病中具有重要作用，并证实了 EGFR 配体 HB-EGF 和 TNF- $\alpha$  对 EGFR 激活的重要意义。ADAM17 介导的 HB-EGF/TNF- $\alpha$ -EGFR 途径共同作用以介导损伤后的肾纤维化，并确定 ADAM17 及其依赖性途径是预防或治疗 CKD 肾纤维化的可能新靶标。保护肾小管细胞免受蛋白尿相关的细胞毒性可能是对其他疗法抵抗的肾病患者的下一个治疗靶点。强调 CKD 中关注足细胞损伤同时也要注意肾小管细胞损伤，保护足细胞和肾小管细胞两者结合可能使患者有更大的获益。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Floege J, Barbour S J, Cattran D C, et al. Management and treatment of glomerular diseases (part 1): Conclusions from a kidney disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference [J]. *Kidney Int*, 2019, 95(2): 268-280.
- [2] Zoja C, Abbate M, Remuzzi G. Progression of renal injury toward interstitial inflammation and glomerular sclerosis is dependent on abnormal protein filtration [J]. *Nephrol Dial*

*Transplant*, 2015, 30(5): 706-712.

- [3] Tojo A, Kinugasa S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption [J]. *Int J Nephrol*, 2012, 2012: 481520.
- [4] 徐丹, 张威. 尿蛋白加速肾小管损伤机制研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2016, 47(2): 157-161.
- [5] Qing X P, Chinenov Y, Redecha P, et al. iRhom2 promotes lupus nephritis through TNF- $\alpha$  and EGFR signaling [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(4): 1397-1412.
- [6] Palau V, Pascual J, Soler M J, et al. Role of ADAM17 in kidney disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317(2): F333-F342.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 陈素枝, 杨凤文, 李永章, 等. 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 [J]. *中草药*, 2021, 52(16): 4913-4920.
- [10] 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.
- [11] Al-Salihi M A, Lang P A. iRhom2: An emerging adaptor regulating immunity and disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6570.
- [12] Sanchez-Niño M D, Benito-Martin A, Gonçalves S, et al. TNF superfamily: A growing saga of kidney injury modulators [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 182958.
- [13] Uchiyama-Tanaka Y, Matsubara H, Nozawa Y, et al. Angiotensin II signaling and HB-EGF shedding via metalloproteinase in glomerular mesangial cells [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(6): 2153-2163.
- [14] Lin C C, Pan C S, Wang C Y, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces VCAM-1-mediated inflammation via c-Src-dependent transactivation of EGF receptors in human cardiac fibroblasts [J]. *J Biomed Sci*, 2015, 22: 53.
- [15] Overstreet J M, Wang Y, Wang X, et al. Selective activation of epidermal growth factor receptor in renal proximal tubule induces tubulointerstitial fibrosis [J]. *Faseb J*, 2017, 31(10): 4407-4421.
- [16] Burlaka I, Nilsson L M, Scott L, et al. Prevention of apoptosis averts glomerular tubular disconnection and podocyte loss in proteinuric kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2016, 90(1): 135-148.
- [17] Kefaloyianni E, Keerthi Raja M R, Schumacher J, et al. Proximal tubule-derived amphiregulin amplifies and integrates profibrotic EGF receptor signals in kidney fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(12): 2370-2383.
- [18] Kefaloyianni E, Muthu M L, Kaeppler J, et al. ADAM17 substrate release in proximal tubule drives kidney fibrosis [J]. *JCI Insight*, 2016, 1(13): e87023.

[责任编辑 李亚楠]