

基于 AMPK/SIRT1/SREBP1 信号通路探究膜肾颗粒对膜性肾病大鼠蛋白尿的治疗作用

王含香¹, 林 威², 崔师妍¹, 徐荣佳¹, 徐鹏昊¹, 黄诗琦¹, 李雨琛¹, 戴欣晴¹, 姜 晨^{1*}

1. 天津中医药大学第一附属医院, 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300381

2. 厦门市中医院, 福建 厦门 361001

摘要: 目的 基于单磷酸腺苷活化的蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) /沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) /固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element-binding protein 1, SREBP1) 信号通路观察膜肾颗粒对膜性肾病大鼠蛋白尿的影响及作用机制。方法 80 只 SD 大鼠随机挑选 15 只为空白组, 其余大鼠利用改良 Border 法建立膜性肾病大鼠模型, 造模大鼠随机分为模型组、环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 组和膜肾颗粒低、高剂量 (1.85、7.38 g/kg) 组。观察大鼠一般状态, 采用双缩脲比色法检测大鼠造模前、造模后、给药结束后 24 h 尿蛋白定量 (urinary protein quantity, UTP); 使用全自动生化仪检测大鼠尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐 (serum creatinine, Scr)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG) 水平; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE)、基底膜六胺银染色 (periodic acid-silver methenamine, PASM) 染色观察肾脏病理学变化; 采用 Western blotting 检测大鼠肾组织 Nephlin、AMPK/SIRT1/SREBP1 通路相关蛋白表达。结果 各组 BUN、Scr 水平无明显差异。与空白组比较, 模型组大鼠 24 h-UTP、TC、TG 水平明显升高 ($P < 0.01$), 肾组织病理改变明显, 肾组织 Nephlin、p-AMPK α /AMPK α 和 SIRT1 表达显著降低 ($P < 0.01$), SREBP1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组 24 h-UTP、TC、TG 水平明显降低 ($P < 0.01$), 肾组织病理改变减轻, Nephlin、p-AMPK α /AMPK α 、SIRT1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), SREBP1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。结论 膜肾颗粒可以显著减少膜性肾病大鼠蛋白尿水平, 可能与上调肾组织 AMPK α /SIRT1 信号通路表达, 减少 SREBP1 合成, 改善脂代谢重编程有关。

关键词: 膜性肾病; 脂代谢; 膜肾方; 膜肾颗粒; AMPK/SIRT1/SREBP1 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)02-0509-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.016

Therapeutic effect of Moshen Granules on proteinuria in rats with membranous nephropathy based on AMPK/SIRT1/SREBP1 signaling pathway

WANG Hanxiang¹, LIN Wei², CUI Shiyan¹, XU Rongjia¹, XU Penghao¹, HUANG Shiqi¹, LI Yuchen¹, DAI Xinqing¹, JIANG Chen¹

1. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

2. Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiamen 361001, China

Abstract: Objective To observe the effect and mechanism of Moshen Granules (膜肾颗粒) on proteinuria in rats with membranous nephropathy based on adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/silent information regulator 1 (SIRT1)/sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) signal pathway. **Methods** Fifteen of 80 SD rats were randomly selected as the blank group, and the rest rats were used to establish the model with membranous nephropathy by the improved Border method. The rats were randomly divided into model group, cyclosporin A (CsA) group and low-, high-dose Moshen Granules (1.85, 7.38 g/kg) groups. The general state of rats was observed, and the urinary protein quantity (UTP) for 24 h was detected by biuret colorimetry before modeling, after modeling and after

收稿日期: 2023-09-25

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1709401); 天津市卫生健康委员会天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题 (2021012)

作者简介: 王含香 (1998—), 女, 博士研究生, 研究方向为中医治疗肾脏病。Tel: 13163056525 E-mail: whx4020@163.com

*通信作者: 姜 晨 (1982—), 女, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为中西医结合治疗肾脏病。

Tel: 18622662919 E-mail: jdoctor_tcm@163.com

drug administration. The levels of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) in rats were detected by automatic biochemical analyzer. Hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid-silver methenamine (PASM) staining were used to observe the pathological changes of kidney. The expressions of Nephlin, AMPK/SIRT1/SREBP1 pathway-related proteins in rat kidney were detected by Western blotting. **Results** There was no significant difference in BUN and Scr levels among the groups. Compared with blank group, the levels of 24 h-UTP, TC and TG in model group were significantly increased ($P < 0.01$), the pathological changes of renal tissue were obvious, the expressions of Nephlin, p-AMPK α /AMPK α and SIRT1 in renal tissue were significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression level of SREBP1 protein was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the levels of 24 h-UTP, TC and TG in each treatment group were significantly decreased ($P < 0.01$), the pathological changes of renal tissue were alleviated, the expression levels of Nephlin, p-AMPK α /AMPK α and SIRT1 proteins were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), and the expression level of SREBP1 protein was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Moshen Granules can significantly reduce the proteinuria level in rats with membranous nephropathy, which may be related to up-regulating the expression of AMPK α /SIRT1 signal pathway in renal tissue, reducing the synthesis of SREBP1 and improving lipid metabolism reprogramming.

Key words: membranous nephropathy; lipid metabolism; Moshen Formula; Moshen Granules; AMPK/SIRT1/SREBP1 pathway

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是一种非炎症性自身免疫性疾病,其特征是免疫复合物沉积于肾小球基底膜上皮细胞下,最终导致足细胞损伤,产生大量蛋白尿,进一步可发展为肾衰竭^[1]。据调查研究显示,近年来我国各地区 MN 的发病率均显著增加^[2-4],截止到 2018 年,华中地区 MN 发病率高达 24.09%,已超过免疫球蛋白 A 肾病(immunoglobulin A nephropathy, IgAN)成为成人最常见的原发性肾小球肾炎^[4]。

慢性肾脏疾病中普遍存在脂质代谢异常,脂质积累是导致肾脏病快速进展的重要因素^[5]。沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)可通过过氧化物酶体增生激活受体 γ 辅激活子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)的去乙酰化参与控制能量代谢,是肝脏脂质和胆固醇稳态的重要因素^[6],SIRT1 还可以通过激活单磷酸腺苷活化的蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)抑制脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)的表达和脂质积累^[7]。研究显示,可以通过抑制 SIRT1 介导的甾醇调节元件结合蛋白 1(sterol regulatory element-binding protein 1, SREBP1)信号通路调节足细胞脂质代谢^[8]。SIRT1 是 AMPK/SREBP1 信号传导连接的关键介质^[9]。研究表明,通过抑制 AMPK 和 SIRT1 表达,介导 SREBP1 信号传导可以调节足细胞脂质合成^[10]。

膜肾方是天津中医药大学第一附属医院杨洪涛教授创制出治疗 MN 的经验方剂,由生黄芪、炒白术、枸杞、杜仲、蝉衣、青风藤、鬼箭羽、穿山龙、败酱草、金樱子、车前子、五味子、土元、当归 14

味药组成,具有健脾益肾、祛风通络之效,据此研制的膜肾颗粒使临床用药更加方便快捷。前期研究发现膜肾方联合基础治疗可有效降低患者蛋白尿水平,并且对调节血脂有辅助疗效,膜肾颗粒不仅可以减轻 MN 大鼠肾小球足细胞损伤,还可有效调节 MN 大鼠血脂水平。故本研究将基于 AMPK/SIRT1/SREBP1 信号通路观察膜肾颗粒对 MN 大鼠蛋白尿的影响,进一步揭示膜肾颗粒治疗 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

80 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于天津市中西医结合医院动物实验室,动物实验方案经过天津市南开医院实验动物伦理委员会审查,伦理编号为 NKYY-DWLL-2021-001。

1.2 药品与试剂

膜肾颗粒(批号 20220603, 20.5 g/袋)按 GMP 标准由江苏九旭药业有限公司生产,方药采用免煎颗粒剂,每克膜肾颗粒含生药 5.75 g;环孢素(cyclosporin A, CsA)软胶囊(国药准字 H10960122)购自杭州中美华东制药有限公司;阳离子化牛血清白蛋白(cationic bovine serum albumin, C-BSA, 批号 10711454001)购自德国默克公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号 G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;基底膜六胺银染色液(periodic acid-silver methenamine, PASM, 批号 DG0090)购自北京雷根生物技术有限公司;尿蛋白定量(urinary protein quantity, UTP)测试盒(批号 C035-2-1)、胆固醇(total

cholesterol, TC) 试剂盒(批号 A111-1-1)、三酰甘油(triglyceride, TG) 试剂盒(批号 A100-1-1)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN) 试剂盒(批号 C013-2-1)、血肌酐(serum creatinine, Scr) 试剂盒(批号 C011-2-1) 购自南京建成生物有限公司; AMPK α 兔抗(批号 2532)、p-AMPK α 兔抗(批号 50081) 购自美国 CST 公司; Nephrin 兔抗(批号 ab216692)、SREBP1 兔抗(批号 ab28481) 购自英国 Abcam 公司; SIRT1 兔抗(批号 MA5-27217) 购自美国 Invitrogen 公司; β -actin 鼠抗(批号 UM4001) 购自天津优抗生物技术有限公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(批号 bs-0295G-HRP)、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗(批号 bs-0296G-HRP) 购自 Bioss 公司。

1.3 仪器

Micro17 型低温高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 全自动生化分析仪(日本 Olympus 公司); E100 型正置光学显微镜(日本 Nikon 公司); PowerPac HC 型电泳仪、Trans-Blot SD 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); SpectraMaxM5 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); TS-200 型脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Tanon 5200 型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

80 只大鼠适应性喂养 1 周后, 收集 24 h 尿液测定 24 h-UTP, 蛋白尿阴性, 随机分为空白组 15 只和造模组 65 只。按照改良 Border 法^[1]采用尾 iv C-BSA 制备 MN 大鼠模型。预免疫 1 周后正式免疫, 将质量浓度为 2 mg/L 的 C-BSA 与等量 PBS 充分混匀后进行尾 iv, 每次 0.5 mL, 空白组注射等体积生理盐水, 隔日 1 次, 连续 4 周。注射结束后, 随机抽取造模组大鼠 2 只, 于光镜下观察肾脏病理学改变, 同时以 24 h-UTP ≥ 20 mg 确认造模成功。造模成功的大鼠随机分为模型组、CsA (9 mg/kg) 组和膜肾颗粒低、高剂量 (1.85、7.38 g/kg, 分别相当于临床剂量的 0.5、2 倍) 组, 每组 15 只, 给药前将研磨成细粉的药物溶于蒸馏水, 按 10 mL/kg ig 给药, 空白组及模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续给药 4 周。

2.2 标本采集

造模前、造模后、给药结束后分别收取大鼠 24 h 尿液。末次留取尿液后, 以 2% 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 取腹主动脉采血约 5 mL, 离心后取血清置于

-80 °C 冰箱保存; 摘取右肾置于冻存管中, -80 °C 保存; 将左肾置于 10% 中性缓冲福尔马林中固定。

2.3 24 h-UTP 及血清生化指标检测

严格按照试剂盒要求使用全自动生化分析仪检测血清各指标, 包括 BUN、Scr、TC、TG; 采用双缩脲比色法检测 24 h-UTP。

2.4 肾组织病理形态学观察

将固定在 10% 中性缓冲福尔马林的大鼠肾脏组织取出, 乙醇梯度脱水, 经石蜡包埋后制成 4 μ m 的切片, 进行 HE 染色及 PASM 染色, 光学显微镜观察肾小球变化。

2.5 Western blotting 检测大鼠肾脏相关蛋白表达

在无菌离心管中将肾组织研磨均匀后加入 RIPA 裂解液, 提取肾组织总蛋白, BCA 法进行蛋白定量。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 室温封闭 2 h, 分别加入 Nephrin (1:1 000)、AMPK α (1:1 000)、p-AMPK α (1:500)、SIRT1 (1:1 000)、SREBP1 (1:1 000)、 β -actin (1:2 000) 抗体, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜; 加入二抗 (1:3 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 扫描条带, 用 Image Pro Plus 6.0 软件分析条带灰度值。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布及方差齐时, 多组间比较采用单因素方差分析-邦弗伦尼法; 若不符合则采用非参数检验, 利用 Graphpad Prism 9.5.1 软件制图。

3 结果

3.1 大鼠一般情况

造模开始前, 大鼠各方面情况良好; 造模结束后, 空白组大鼠精神状态及活动性良好, 皮毛有光泽, 进食如常; 造模组大鼠死亡 3 只, 其余大鼠出现不同程度精神不佳、倦怠懒动、皮毛颜色发黄且光泽度下降、进食减少等情况。经药物干预后, 各治疗组大鼠精神状态、毛色、活动性、饮食情况均有所改善。

3.2 膜肾颗粒对 MN 大鼠 24 h-UTP 的影响

如表 1 所示, 造模前各组大鼠 24 h-UTP 无明显差异, 造模后大鼠 24 h-UTP 均明显升高 ($P < 0.01$), 提示造模成功。给药结束后, 与模型组比较, 各给药组大鼠 24 h-UTP 均明显降低 ($P < 0.01$); 与膜肾颗粒低剂量组比较, 膜肾颗粒高剂量组和 CsA 组 24 h-UTP 均明显降低 ($P < 0.01$); 与 CsA 组比较, 膜肾颗粒高剂量组 24 h-UTP 有明显差异 ($P < 0.01$)。

表 1 膜肾颗粒对 MN 大鼠 24 h-UTP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)
Table 1 Effect of Moshen Granules on 24 h-UTP of MN rats ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	24 h-UTP/(mg·24 h ⁻¹)		
		造模前	造模后	给药结束后
空白	—	6.27±0.57	6.60±0.64	8.08±0.81
模型	—	6.66±0.50	84.30±0.53**	92.02±1.59**
CsA	0.009	6.42±0.68	84.08±0.91**	53.02±1.17 ^{△△▲▲}
膜肾颗粒	1.85	6.28±0.66	84.24±0.51**	65.18±1.17 ^{△△}
	7.38	6.37±0.63	84.38±0.46**	55.16±1.22 ^{△△▲▲##}

与空白组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与膜肾颗粒低剂量组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与 CsA 组比较: ^{##} $P < 0.01$, 下表同。
** $P < 0.01$ vs blank group; ^{△△} $P < 0.01$ vs model group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs Moshen Granules low-dose group; ^{##} $P < 0.01$ vs CsA group, same as below tables.

3.3 膜肾颗粒对 MN 大鼠肾功能的影响

如表 2 所示, 各组大鼠 BUN、Scr 水平无明显差异。

表 2 膜肾颗粒对 MN 大鼠肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)
Table 2 Effect of Moshen Granules on kidney function of MN rats ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)
空白	—	6.44±0.11	38.84±1.93
模型	—	6.54±0.09	39.44±1.30
CsA	0.009	6.49±0.11	38.77±1.40
膜肾颗粒	1.85	6.49±0.08	39.55±1.56
	7.38	6.47±0.11	38.75±1.56

3.4 膜肾颗粒对 MN 大鼠肾脏病理变化的影响

如图 1 所示, 空白组大鼠肾小球的形态未见明显改变; 模型组大鼠肾小球体积明显增大, 肾小球毛细血管基底膜弥漫性增厚, 可见空泡样变性形成; 与模型组比较, 各给药组大鼠肾小球体积增大不明显, 肾小球毛细血管基底膜增厚不显著, 仅有少量空泡样变性形成, 病理改变均较模型组明显减轻。

3.5 膜肾颗粒对 MN 大鼠血脂的影响

如表 3 所示, 与空白组比较, 模型组 TC、TG 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 TC、TG 水平均明显降低 ($P < 0.01$); 与 CsA 组

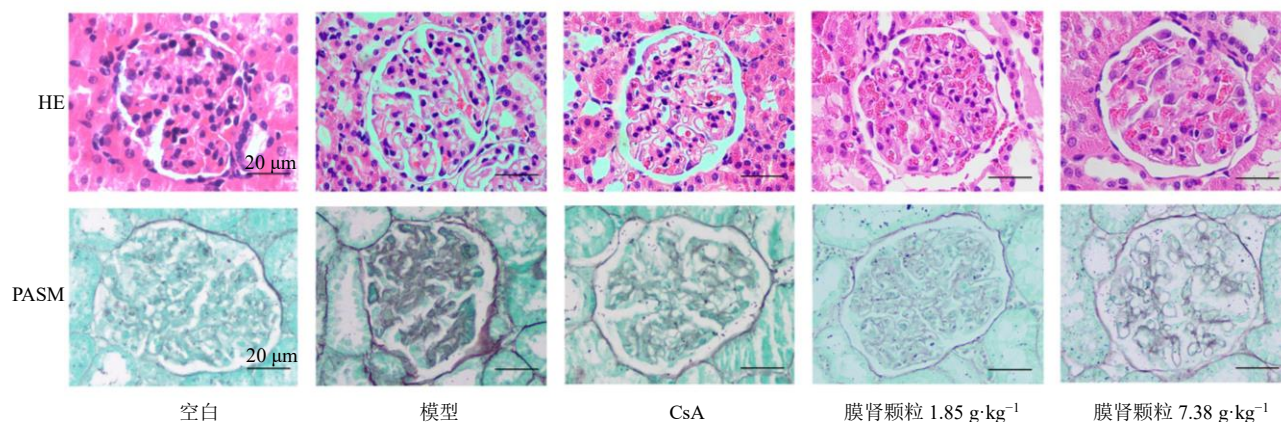


图 1 各组大鼠肾组织病理变化 (×400)

Fig. 1 Pathological changes of kidney tissue of rats in each group (×400)

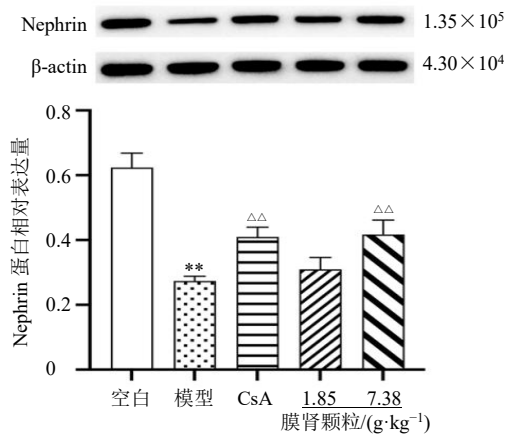
表 3 膜肾颗粒对 MN 大鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)
Table 3 Effect of Moshen Granules on blood fat of MN rats ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
空白	—	1.19±0.03	0.50±0.03
模型	—	2.00±0.03**	1.02±0.05**
CsA	0.009	1.60±0.02 ^{△△}	0.70±0.03 ^{△△}
膜肾颗粒	1.85	1.81±0.05 ^{△△##}	0.76±0.04 ^{△△##}
	7.38	1.59±0.03 ^{△△}	0.69±0.05 ^{△△}

比较, 膜肾颗粒低剂量组 TC、TG 水平有明显差异 ($P < 0.01$)。

3.6 膜肾颗粒对 MN 大鼠肾组织 Nephin 蛋白表达的影响

如图 2 所示, 与空白组比较, 模型组肾组织 Nephin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 膜肾颗粒高剂量组和 CsA 组 Nephin 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。



与空白组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;
与膜肾颗粒低剂量组比较: $^{\Delta}P < 0.05$; 与 CsA 组比较: $^{\#}P < 0.05$,
图 3 同。

** $P < 0.01$ vs blank group; $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs model group;
 $^{\Delta}P < 0.05$ vs Moshen Granules low-dose group; $^{\#}P < 0.05$ vs CsA
group, same as fig. 3.

图 2 膜肾颗粒对 MN 大鼠肾组织 Nephrin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Moshen Granules on Nephrin protein expression in renal tissue of MN rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

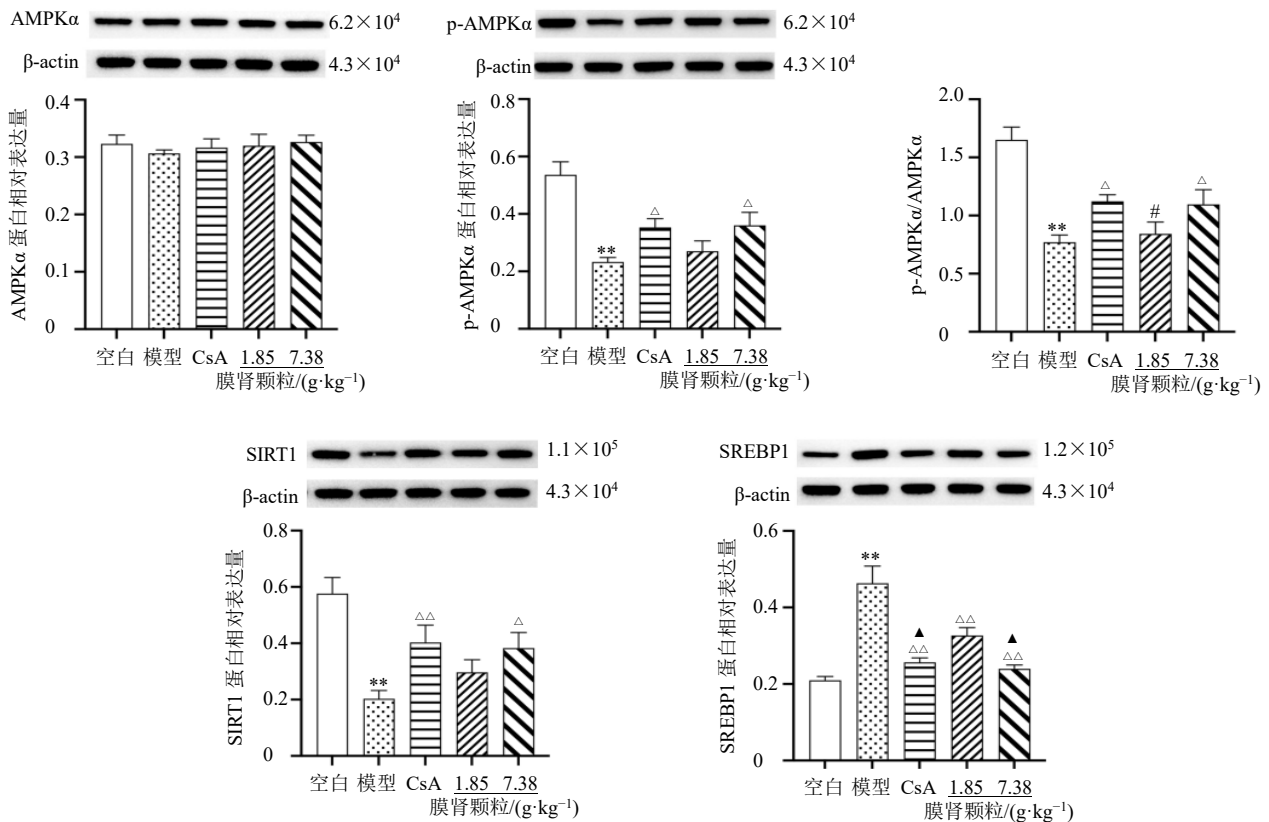


图 3 膜肾颗粒对 MN 大鼠肾组织 AMPK/SIRT1/SREBP1 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Moshen Granules on AMPK/SIRT1/SREBP1 pathway-related protein expressions in renal tissue of MN rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 膜肾颗粒对 MN 大鼠肾组织 AMPK/SIRT1/SREBP1 通路相关蛋白表达的影响

如图 3 所示, 各组肾组织 AMPKα 蛋白表达水平无显著差异。与空白组比较, 模型组肾组织 p-AMPKα、p-AMPKα/AMPKα 和 SIRT1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), SREBP1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, CsA 组和膜肾颗粒高剂量组 p-AMPKα、p-AMPKα/AMPKα 和 SIRT1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 各给药组 SREBP1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 与 CsA 组比较, 膜肾颗粒低剂量组 p-AMPKα/AMPKα 有明显差异 ($P < 0.05$); 与膜肾颗粒低剂量组比较, CsA 组和膜肾颗粒高剂量组 SREBP1 蛋白表达水平有明显差异 ($P < 0.05$)。

4 讨论

MN 属中医学“水肿”“尿浊”范畴, 杨洪涛教授将 MN 的病机归为脾肾亏虚、风湿瘀毒。脾虚则运化升清失调, 痰浊内生, 加之风邪扰动, 水湿瘀阻肾络, 导致肾脏功能损伤, 故创立膜肾方治以健脾益肾、祛风通络。膜肾颗粒原方中生黄芪、炒白

术健脾益气，枸杞、杜仲滋补肝肾，4 药共为君药，以补为固，填精固精，兼利水饮，故能降尿蛋白水平、利尿消肿；蝉蜕、青风藤祛风通络除湿，当归、鬼箭羽、土鳖虫、穿山龙活血养血、祛瘀通络，六味共为臣药；金樱子与五味子收敛固涩，车前子利水消肿，此“三子”可助芪术增强固精利水之功，共为佐药；败酱草以其清热祛瘀兼解药毒为使药；诸药合用共奏健脾益肾、祛风通络之效。现代医学研究结果显示黄芪甲苷可以调节细胞骨架和丝裂原活化蛋白激酶减轻补体膜攻击复合物诱导的足细胞损伤^[12]；枸杞多糖可升高 2 型糖尿病患者高密度脂蛋白胆固醇水平^[13]；当归主要有效成分之一阿魏酸可以通过调节 MN 大鼠氧化应激、血管生成、免疫反应减轻足细胞损伤^[14]；五味子苷 B 可减轻氯化汞诱导的肾小管损伤和线粒体氧化应激^[15]；车前子提取液可调节大鼠脂代谢紊乱^[16]。本研究结果显示膜肾颗粒可以减轻 MN 大鼠肾脏病理学变化，减少蛋白尿，降低 MN 大鼠血清 TC、TG 水平。

慢性肾脏病中普遍存在的脂质积累是造成肾小球损伤重要原因^[5]。足细胞损伤是 MN 主要病理表现，而脂质代谢异常导致肾组织内胆固醇积累或细胞内游离脂肪酸水平升高，促使足细胞线粒体功能障碍诱导损伤^[17]。本研究发现膜肾颗粒能促进足细胞特异性蛋白 Nephron 表达，减轻足细胞损伤，维持滤过屏障稳定，减少蛋白尿。AMPK 和 SIRT1 是在真核细胞中共同存在的燃料感应分子^[18]。当细胞能量状态降低，AMPK 通过促进脂肪酸氧化，抑制 TG 和蛋白质合成及细胞增殖来恢复能量平衡^[19]。当能量过剩，下调的 AMPK 导致脂肪酸氧化减少以及脂质和蛋白质合成增加^[20]。SIRT1 亦可对能量增加或减少做出反应^[21-22]，同时 SIRT1 和 AMPK 可以相互正向调节^[7,23]。研究发现钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (sodium-dependent glucose transporters 2, SGLT2) 抑制剂在脂肪细胞中诱导 AMPK 和 SIRT1 表达升高，可改善脂质代谢和脂肪酸氧化^[24]。本研究模型组大鼠较空白组肾脏组织 p-AMPK α /AMPK α 降低，SIRT1 表达显著减少，提示 MN 大鼠肾脏中存在脂质代谢紊乱；经膜肾颗粒高剂量治疗后大鼠肾脏 p-AMPK α /AMPK α 、SIRT1 表达升高，提示膜肾颗粒可能诱导 AMPK 和 SIRT1 表达升高改善 MN 大鼠肾脏脂质代谢及脂肪酸氧化。SREBP1 是重要的脂代谢转录因子，上调其水平可优先激活下游脂肪酸合成相关基因^[25]，使脂质合成增加，其

中乙酰辅酶 A 羧化酶 1 (acetyl-CoA carboxylase 1, ACC1)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN) 为脂肪酸合成的关键限速酶，硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 (stearyl-CoA desaturase promoter, SCD) 为单不饱和脂肪酸合成的限速酶。研究发现，SIRT1 能够去乙酰化 SREBP1^[26]，降低其脂化活性，p-AMPK 亦可抑制 SREBP1 蛋白水解成熟^[27]，从而抑制 SREBP1 依赖性脂肪生成。本研究结果显示模型组大鼠较空白组肾脏组织 SREBP1 表达显著升高，提示在 MN 大鼠肾脏中 SREBP1 介导的脂质合成增多；经高剂量膜肾颗粒治疗后大鼠肾脏 SREBP1 表达降低，提示其介导的脂质合成也减少。研究结果提示膜肾颗粒可能通过上调 AMPK/ SIRT1 抑制 SREBP1 对脂肪酸合成的促进作用，影响足细胞脂代谢重编程，减轻足细胞损伤，从而达到降低蛋白尿水平、治疗 MN 的目的。

综上，膜肾颗粒对 MN 具有显著治疗效果，可减少 MN 大鼠蛋白尿，减少足细胞脂质合成，减轻足细胞损伤，维持肾小球滤过功能，这可能与 AMPK/SIRT1/SREBP1 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ronco P, Debiec H. Molecular pathogenesis of membranous nephropathy [J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 287-313.
- [2] Li H X, Yu X Y, Lan P, et al. Spectrum of biopsy-proven kidney diseases in northwest China: A review of 30 years of experiences [J]. *Int Urol Nephrol*, 2022, 54(10): 2609-2616.
- [3] Chen L M, Luodelete M, Dong C Q, et al. Pathological spectrum of glomerular disease in patients with renal insufficiency: A single-center study in Northeastern China [J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1): 473-480.
- [4] Hu R M, Quan S X, Wang Y Z, et al. Spectrum of biopsy proven renal diseases in Central China: A 10-year retrospective study based on 34, 630 cases [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10994.
- [5] Merscher S, Pedigo C E, Mendez A J. Metabolism, energetics, and lipid biology in the podocyte—Cellular cholesterol-mediated glomerular injury [J]. *Front Endocrinol*, 2014, 5: 169.
- [6] Rodgers J T, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(31): 12861-12866.
- [7] Hou X Y, Xu S Q, Maitland-Toolan K A, et al. SIRT1

- regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20015-20026.
- [8] Lin P H, Duann P. Dyslipidemia in kidney disorders: Perspectives on mitochondria homeostasis and therapeutic opportunities [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 1050.
- [9] Rahman K, Desai C, Iyer S S, *et al.* Loss of junctional adhesion molecule A promotes severe steatohepatitis in mice on a diet high in saturated fat, fructose, and cholesterol [J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(4): 733-746.
- [10] Fornoni A, Merscher S. Lipid metabolism gets in a JAML during kidney disease [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(6): 903-905.
- [11] 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.
- [12] Zheng R, Deng Y Y, Chen Y P, *et al.* Astragaloside IV attenuates complement membranous attack complex induced podocyte injury through the MAPK pathway [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(6): 892-898.
- [13] Cai H Z, Liu F K, Zuo P G, *et al.* Practical application of antidiabetic efficacy of *Lycium barbarum* polysaccharide in patients with type 2 diabetes [J]. *Med Chem*, 2015, 11(4): 383-390.
- [14] Cheng C W, Chang W L, Chang L C, *et al.* Ferulic acid, an *Angelica sinensis*-derived polyphenol, slows the progression of membranous nephropathy in a mouse model [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 161235.
- [15] Stacchiotti A, Volti G L, Lavazza A, *et al.* Different role of schisandrin B on mercury-induced renal damage *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicology*, 2011, 286(1/2/3): 48-57.
- [16] Yang F, Shi W J, Wang L T, *et al.* Lipidomics study of the therapeutic mechanism of *Plantaginis Semen* in potassium oxonate-induced hyperuricemia rat [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 175.
- [17] Ducasa G M, Mitrofanova A, Mallela S K, *et al.* ATP-binding cassette A1 deficiency causes cardiolipin-driven mitochondrial dysfunction in podocytes [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(8): 3387-3400.
- [18] Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20(2): 98-105.
- [19] Kahn B B, Alquier T, Carling D, *et al.* AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism [J]. *Cell Metab*, 2005, 1(1): 15-25.
- [20] Richter E A, Ruderman N B. AMPK and the biochemistry of exercise: Implications for human health and disease [J]. *Biochem J*, 2009, 418(2): 261-275.
- [21] Chen D, Bruno J, Easlson E, *et al.* Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(13): 1753-1757.
- [22] Suwa M, Nakano H, Radak Z, *et al.* Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α protein expressions in rat skeletal muscle [J]. *Metabolism*, 2008, 57(7): 986-998.
- [23] Fulco M, Cen Y N, Zhao P, *et al.* Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt [J]. *Dev Cell*, 2008, 14(5): 661-673.
- [24] Yang X P, Liu Q H, Li Y P, *et al.* The diabetes medication canagliflozin promotes mitochondrial remodelling of adipocyte via the AMPK-Sirt1-Pgc-1 α signalling pathway [J]. *Adipocyte*, 2020, 9(1): 484-494.
- [25] Bertolio R, Napoletano F, Mano M, *et al.* Sterol regulatory element binding protein 1 couples mechanical cues and lipid metabolism [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1326.
- [26] Ponugoti B, Kim D H, Xiao Z, *et al.* SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(44): 33959-33970.
- [27] Li Y, Xu S, Mihaylova M M, *et al.* AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(4): 376-388.

[责任编辑 李亚楠]