

· 基础研究 ·

基于活性氧簇-自噬通路调控的加味黄芪赤风汤对肾小球足细胞的保护机制研究

赵明明¹ 李 澎² 杨 斌³ 张 昱¹ 司 远¹ 李刘生¹
张丽敏¹ 张瀚文⁴ 许勇钢⁵ 郝 伟² 赵晋宁²

摘要 **目的** 观察加味黄芪赤风汤基于活性氧簇(ROS)-自噬通路对 Ang II 诱导肾小球足细胞损伤的保护机制。**方法** 制备低、中、高剂量加味黄芪赤风汤(分别应用生药浓度为 0.57、1.15、2.29 g/mL 的加味黄芪赤风汤灌胃小鼠)含药血清及替米沙坦(0.83 mg/mL 灌胃小鼠)含药血清,采用 Ang II (1×10^{-7} mol/L)诱导足细胞损伤模型,分为空白组,模型组,加味黄芪赤风汤低、中、高剂量组以及替米沙坦组;为验证自噬与模型的关系,设置 3MA 与氯喹组。采用 Western Blot 检测足细胞损伤相关蛋白 nephrin、podocin 及自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1、P62 表达,溶酶体荧光探针检测自噬流活性,透射电镜观察足细胞内自噬体的形成,流式细胞仪检测细胞内 ROS 平均荧光强度(MFI)。**结果** 与空白组比较,模型组足细胞 nephrin、podocin、P62 表达下调($P < 0.01$),LC3 II/LC3 I、Beclin-1 表达上调($P < 0.01$),ROS 的 MFI 增强($P < 0.01$)。透射电镜及溶酶体荧光探针结果显示模型组自噬体数量增多,溶酶体表达增强。与模型组比较,加味黄芪赤风汤中、高剂量组及替米沙坦组 nephrin、podocin、P62 表达上调($P < 0.01$, $P < 0.05$),LC3 II/LC3 I、Beclin-1 表达下调($P < 0.01$, $P < 0.05$);3MA 及氯喹组足细胞 nephrin、podocin 表达下调($P < 0.01$, $P < 0.05$);加味黄芪赤风汤低剂量组 Beclin-1 表达下调($P < 0.05$);各给药组 ROS MFI 减弱($P < 0.01$, $P < 0.05$)。透射电镜及溶酶体荧光探针结果显示加味黄芪赤风汤组及替米沙坦组自噬体数量减少,溶酶体表达减弱。**结论** Ang II 通过下调 nephrin、podocin 表达损伤足细胞;加味黄芪赤风汤可上调 Ang II 诱导的 nephrin、podocin 表达,缓解足细胞损伤;加味黄芪赤风汤可能基于 ROS-自噬通路,下调 Ang II 诱导的自噬流,拮抗肾小球足细胞损伤。

关键词 加味黄芪赤风汤;血管紧张素 II;足细胞;活性氧簇;自噬流

Study on the Protective Mechanism of Modified Huangqi Chifeng Decoction Based on the Regulation of ROS-Autophagy Pathway on Glomerular Podocytes ZHAO Ming-ming¹, LI Peng², YANG Bin³, ZHANG Yu¹, SI Yuan¹, LI Liu-sheng¹, ZHANG Li-min¹, ZHANG Han-wen⁴, XU Yong-gang⁵, HAO Wei², and ZHAO Jin-ning² 1 Department of Nephropathy, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091); 2 Basic Experimental Center, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091); 3 Department of Pathology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091); 4 Department of Statistics, Purdue University, America (47907); 5 Laboratory of Hematology Department, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)

ABSTRACT Objective To observe the mechanism of Modified Huangqi Chifeng Decoction (MHCD) alleviating the injury of glomerular podocytes induced by angiotensin II (Ang II) based on the regulation of reactive oxygen species (ROS)-autophagy pathway. **Methods** The low, middle, high dosage drug-contain-

基金项目:中国中医科学院基本科研业务费自主选题自主项目(No. ZZ0708105)

作者单位:1. 中国中医科学院西苑医院肾病科(北京 100091); 2. 中国中医科学院西苑医院基础实验中心(北京 100091); 3. 中国中医科学院西苑医院病理科(北京 100091); 4. 美国普渡大学统计学系(美国 47907); 5. 中国中医科学院西苑医院血液病科实验室(北京 100091)

通讯作者:张 昱, Tel: 010-62835369, E-mail: zhangyu8225@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20190514. 013

ning serum of MHCD (0.57 g/mL, 1.15 g/mL, 2.29 g/mL, respectively) and telmisartan (0.83 mg/mL) was prepared, the injury model of podocytes was induced by Ang II (1×10^{-7} mol/L). Podocytes were divided into control group, model group, low, middle and high dosage MHCD group and telmisartan group. To verify the relationship between autophagy and the model, the 3MA and chloroquine groups were set up. The expressions of nephrin, podocin, LC3, Beclin-1 and P62 were analyzed by Western Blot; the activity of autophagy was analysed by lysosomes fluorescent probe; the formation of autophagosomes were observed by transmission electron microscope (TEM); intracellular ROS levels were determined by flow cytometer. **Results** Compared with the control group, the expressions of nephrin, podocin and P62 of podocytes were decreased ($P < 0.01$), the expressions of LC3 II/LC3 I and Beclin-1 were increased ($P < 0.01$), MFI of ROS was increased ($P < 0.01$) in the model group. The results of TEM and lysozyme fluorescence probe showed that the expressions of autophagosomes and lysosomes increased in the model group. Compared with the model group, the expressions of nephrin, podocin and P62 of podocytes were increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the expressions of LC3 II/LC3 I and Beclin-1 were decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in the middle dose MHCD group, high dose MHCD group and telmisartan group; the expressions of nephrin, podocin were decreased in the 3MA and chloroquine group ($P < 0.01$, $P < 0.05$); the expressions of Beclin-1 was decreased ($P < 0.05$) in the low dose MHCD group; MFI of ROS were decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in the MHCD groups and telmisartan group. The results of TEM and lysozyme fluorescence probe showed that the expressions of autophagosomes and lysosomes decreased in the intervention groups. **Conclusions** Ang II induced injury of podocytes by decreasing the expressions of nephrin and podocin of podocytes; MHCD alleviates injury of podocytes by increasing the expressions of nephrin and podocin of podocytes. Based on the regulation of ROS-autophagy pathway, MHCD could alleviate the injury of glomerular podocytes by downregulating autophagy flux induced by Ang II.

KEYWORDS Modified Huangqi Chifeng Decoction; angiotensin II; podocytes; reactive oxygen species; autophagy flux

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 是指各种原因导致的肾脏损伤和 (或) 肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 下降, 包括各类肾小球疾病、肾小管间质疾病以及肾血管疾病^[1]。据统计, 全世界大约有 5 亿成年人患有 CKD, 78% 集中在中、低收入国家^[2]。Zhang L 等^[3]对 47 204 名中国成年人 (18~95 岁) 进行横断面研究, 其中 CKD 患者约占 10.8%, 相当于全国有约 1.2 亿成年人患有不同程度的 CKD。目前, CKD 已成为世界性的公共健康问题。

CKD 以肾小球病变为主, 肾小球主要由内皮细胞、系膜细胞以及足细胞构成; 足细胞的足突及足突间的裂孔隔膜是肾小球滤过屏障的重要组成部分, 因此, 足细胞的损伤与蛋白尿的出现密切相关^[4]。研究表明, 足细胞能够产生肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的组分并且表达 RAS 相关受体, 包括血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)、盐皮质激素及其蛋白受体等, 足细胞的收缩、凋亡、自噬以及细胞骨架的形成都受到 Ang II 1 型受体的调控^[5,6]。Ang II 能够提高活性氧簇 (reactive oxygen

species, ROS) 的表达, 通过氧化应激诱导足细胞自噬^[7]。

本课题组前期研究结果显示, 加味黄芪赤风汤可抑制阿霉素诱导的足细胞过度自噬^[8], 同时改善阿霉素肾病大鼠肾脏氧化应激损伤^[9]。鉴于 RAS 在肾脏病变中的重要作用, 本研究建立 Ang II 刺激足细胞损伤模型, 观察加味黄芪赤风汤通过调控 ROS-自噬通路保护足细胞的作用。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 大鼠 64 只, 3 月龄, 雄性, 220~260 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2016-0011。饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级动物房, 适应性喂养 3 日。本实验符合动物实验伦理学要求, 已通过中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批 (No. 2014 XL057-1)。

2 细胞 小鼠肾小球足细胞 (资源编号: 3111C0001CCC000230), 购自国家实验细胞资源共享平台。

3 药物 加味黄芪赤风汤组成: 生黄芪 30 g

赤芍 10 g 防风 10 g 芡实 20 g 金樱子 10 g 穿山龙 10 g 地龙 10 g 白花蛇舌草 10 g。中药饮片来自中国中医科学院西苑医院中药房,由中国中医科学院西苑医院制剂室鉴定并煎制,其高、中、低剂量含生药量分别为 2.29、1.15、0.57 g/mL。替米沙坦(美卡素):80 mg/片,勃林格殷格翰(德国)生产,批号:704347,配置成 0.83 mg/mL 混悬液。

4 试剂及仪器 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,货号:C11995500BT);优级胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号:16000-044);青霉素-链霉素双抗(北京索莱宝科技有限公司,货号:P1400-100);重组小鼠 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ , 美国 Peprotech 公司,货号:96-315-05-100);Ang II(美国 Sigma 公司,货号:A9525);氯喹(美国 Sigma 公司,货号:C6628);3-甲基腺嘌呤(3-MA, 美国 Sigma 公司,货号:M9281);溶酶体荧光探针(美国 Molecular probes 公司,货号:L7528);nephrin 抗体、podocin 抗体、LC-3 抗体、Beclin-1 抗体、P62 抗体、2',7'-Dichlorofluorescein diacetate 均购自英国 Abcam 公司(货号:ab136894, ab181143, ab192890, ab207612, ab109012, D6883)。二氧化碳培养箱(型号:MCO-175, 日本 SANYO 公司);多功能酶标仪(型号:Mu-WSkanS, 美国 Thermo 公司);流式细胞仪(型号:EPICS ELITE, 美国 Beckman 公司)。

5 含药血清制备 将大鼠随机分为空白组,加味黄芪赤风汤低、中、高剂量组以及替米沙坦组,每组 12 只。各组大鼠按体重每 100 g 灌胃 1 mL 计算,空白组大鼠予超纯水灌胃,其余各组分别予低、中、高剂量加味黄芪赤风汤煎剂及替米沙坦混悬液灌胃。加味黄芪赤风汤低、中、高剂量分别相当于临床成人用药剂量 0.5、1、2 倍^[10]。于每日上午 10:00 灌胃 1 次,持续灌胃 1 周。末次灌胃 2 h 后,4 % 水合氯醛腹腔麻醉大鼠,经腹主动脉取血,分组分装含药血清。

6 细胞培养 增殖阶段:足细胞置于 33 °C 5 % CO₂ 培养箱中培养,增殖阶段培养基为 DMEM 培养基+10 % 胎牛血清+青霉素-链霉素双抗+10 U/mL IFN- γ 。

分化阶段:足细胞置于 37 °C 5 % CO₂ 培养箱中分化,分化阶段培养基为 DMEM 培养基+10 % 胎牛血清+青霉素-链霉素双抗。

7 分组、模型制备及干预方法 应用 1×10^{-7} mol/L AngII 建立足细胞损伤模型^[11]。根据实验目的,

实验分组分为两种情况:(1)验证 Ang II 足细胞损伤模型自噬水平及抑制自噬对足细胞损伤的影响,分组为:空白组、模型组、自噬抑制剂 3MA 及氯喹组;(2)验证加味黄芪赤风汤以及替米沙坦对足细胞的保护作用及其对自噬的影响,分组为:空白组,模型组,中药低、中、高剂量组以及替米沙坦组。空白组及 3MA、氯喹组用空白组血清培养,余用含药血清培养,与 Ang II 共同干预足细胞 24 h,每组 3 个样本。

8 检测指标及方法

8.1 Western Blot 检测 nephrin、podocin、LC3、Beclin-1、P62 蛋白表达 取分组培养好的足细胞,弃去培养基,预冷 PBS 冲洗 1 遍,每孔加入 RIPA 裂解液 50 μ L,取上清液,应用 BCA 试剂盒测定各组足细胞的蛋白浓度。根据目的蛋白,分别配制分离胶,采用半干式转印。配置一抗孵育转印膜,4 °C 过夜后,二抗室温孵育 1 h,在凝胶成像系统中成像,应用 Image J 软件对扫描图象的目的条带进行灰度值分析。

8.2 透射电镜观察自噬结构 分组干预足细胞,后弃培养基,PBS 冲洗,将细胞分组收集到装有 2.5 % 戊二醛的 EP 管中固定。1 % 锇酸固定细胞,乙醇梯度脱水,包埋,将足细胞团块切片(70~90 nm),透射电镜下观察足细胞超微结构以及足细胞自噬体。

8.3 溶酶体荧光探针检测足细胞自噬现象 分组干预足细胞后,将溶酶体荧光探针以 60 nmol/L 浓度干预足细胞 1 h,后应用荧光显微镜观察、对比细胞溶酶体荧光改变。

8.4 流式细胞仪检测足细胞 ROS 表达 分组干预足细胞后,采用 DCFDA(10 μ mol/L)干预足细胞 30 min。流式细胞仪检测各组足细胞 ROS 的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)。

9 统计学方法 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 23.0 进行分析。多组间进行比较先检验数据正态性及方差齐性,若数据同时满足正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析,反之,则应用非参数检验进行统计分析。双侧检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

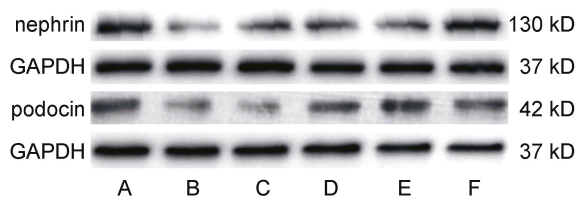
结 果

1 各组 nephrin、podocin 蛋白表达比较(表 1, 图 1) 与空白组比较,模型组 nephrin、podocin 表达下调($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组 nephrin、podocin 表达上调($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

表 1 各组 nephrin、podocin 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	nephrin	podocin
空白	3	1	1
模型	3	0.730±0.048*	0.719±0.075*
中药低剂量	3	0.808±0.057	0.811±0.057
中剂量	3	0.850±0.088 [△]	0.844±0.096 [△]
高剂量	3	0.910±0.060 ^{△△}	0.886±0.050 ^{△△}
替米沙坦	3	0.971±0.084 ^{△△}	0.898±0.077 ^{△△}

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为中药低剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药高剂量组;F 为替米沙坦组

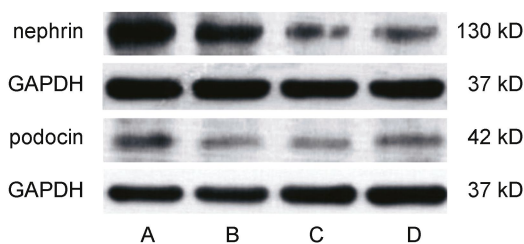
图 1 各组 nephrin、podocin 蛋白表达

2 3MA、氯喹对 Ang II 损伤足细胞 nephrin、podocin 的影响(表 2,图 2) 与空白组比较,模型组 nephrin、podocin 表达下调($P<0.01$)。与模型组比较,3MA 及氯喹组 nephrin、podocin 表达下调($P<0.01$, $P<0.05$)。

表 2 3MA、氯喹对 Ang II 损伤足细胞 nephrin、podocin 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	nephrin	podocin
空白	3	1	1
模型	3	0.763±0.054*	0.796±0.039*
3MA	3	0.609±0.080 [△]	0.688±0.013 ^{△△}
氯喹	3	0.590±0.061 ^{△△}	0.725±0.423 [△]

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为 3MA 组;D 为氯喹组

图 2 3MA、氯喹对 Ang II 损伤足细胞 nephrin、podocin 的影响

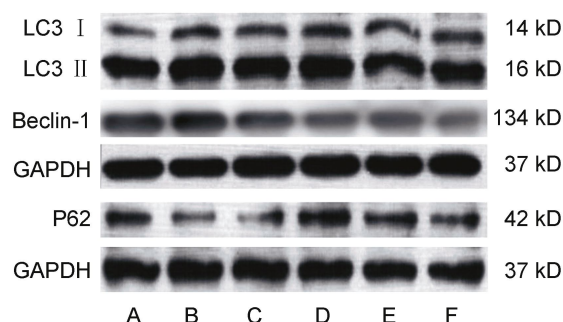
3 各组 LC3、Beclin-1、P62 蛋白表达比较(表 3,图 3) 与空白组比较,模型组 LC3 II/LC3 I、Beclin-1 蛋白表达上调,P62 表达下调($P<0.01$)。与模型组比较,中药低剂量组 Beclin-1 表达下调($P<$

0.05),中药中、高剂量组及替米沙坦组 LC3 II/LC3 I、Beclin-1 表达下调,P62 表达上调($P<0.01$, $P<0.05$)。

表 3 各组 LC3 II/LC3 I、Beclin-1、P62 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LC3 II / LC3 I	Beclin-1	P62
空白	3	1	1	1
模型	3	1.331±0.106*	1.242±0.053*	0.806±0.029*
中药低剂量	3	1.140±0.077	1.087±0.178 [△]	0.828±0.059
中剂量	3	1.081±0.152 [△]	1.073±0.022 [△]	0.976±0.053 ^{△△}
高剂量	3	0.930±0.093 ^{△△}	0.988±0.045 ^{△△}	0.951±0.072 ^{△△}
替米沙坦	3	1.073±0.184 [△]	0.912±0.072 ^{△△}	0.942±0.045 ^{△△}

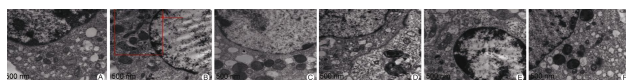
注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为中药低剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药高剂量组;F 为替米沙坦组

图 3 各组 LC3 II/I、Beclin-1、P62 蛋白表达

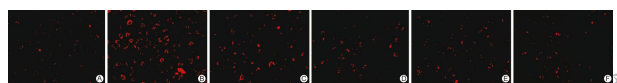
4 各组足细胞结构比较(图 4) 空白组足细胞结构完好,核膜、核仁清晰,细胞器结构正常。模型组可见双层膜结构的自噬体数量增多,体积增大,自噬体内可包裹有细胞器;各给药组足细胞内自噬体数量减少。



注:框内箭头所指为已形成或正在形成的双层膜结构自噬体;A 为空白组;B 为模型组;C 为中药低剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药高剂量组;F 为替米沙坦组

图 4 各组足细胞结构 ($\times 20\ 000$)

5 各组足细胞溶酶体荧光探针结果比较(图 5) 模型组溶酶体功能表达增强,各给药组溶酶体表达减弱。



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为中药低剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药高剂量组;F 为替米沙坦组

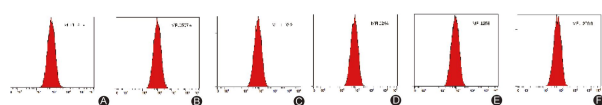
图 5 各组足细胞溶酶体荧光探针结果 ($\times 200$)

6 各组 ROS MFI 比较(表 4,图 6) 与空白组比较,模型组 MFI 增强($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组 MFI 减弱($P<0.01$, $P<0.05$)。

表 4 各组 ROS MFI 比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MFI
空白	3	1
模型	3	1.253±0.077*
中药低剂量	3	1.081±0.142 [△]
中剂量	3	1.048±0.086 [△]
高剂量	3	1.018±0.046 ^{△△}
替米沙坦	3	1.036±0.075 ^{△△}

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为中药低剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药高剂量组;F 为替米沙坦组

图 6 各组 ROS 表达流式细胞图

讨 论

加味黄芪赤风汤是张昱教授基于 CKD“虚—风—瘀—毒”基本病机^[12],由清代医家王清任所著《医林改错》中的黄芪赤风汤(黄芪、赤芍、防风)加味化裁而成。其中,生黄芪益气补虚,金樱子、芡实益肾收涩,防风、穿山龙、地龙祛风通络,赤芍活血化瘀,白花蛇舌草清热解毒,共奏益气活血、祛风解毒之功。

Ang II 在肾脏疾病的发生发展中起着重要作用,可通过上调促纤维化因子、诱导上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的累积,导致肾脏纤维化^[13]。本实验结果显示,Ang II 可通过下调 nephrin、podocin 的表达损伤足细胞,加味黄芪赤风汤则能够上调 nephrin、podocin 的表达,保护足细胞。

细胞自噬与多种疾病密切相关,自噬水平下降及过度激活均会导致细胞损伤^[14,15]。生理情况下,自噬在维持肾脏稳态方面也发挥着重要作用,足细胞内具有较高的自噬水平^[16],在某些条件下,增强或维持自噬的活性对足细胞具有保护作用,然而过度自噬则可能导致足细胞自噬性程序性死亡^[17,18]。在自噬过程中,各种刺激诱导形成自噬体双层膜结构,并包裹需要降解的底物;自噬体将其包裹物运送至溶酶体;自噬体与溶酶体融合,自噬体内膜及其内容物被溶酶体中多种蛋白水解酶降解,完成自噬过程^[19];自噬流的任一环

节出现异常均将影响自噬发挥其生物学功能^[20]。LC3 是自噬的重要标志物,LC3 I 向 LC3 II 转化增多是自噬增强的标志,然而,自噬流的异常导致自噬体累积,也可导致 LC3 II/LC3 I 比值升高,因此,评价细胞自噬水平须考虑自噬流的整个过程,同时应用自噬抑制剂及激活剂对自噬过程进行干预。Beclin-1 与 P62 也是自噬重要的标志物,P62 能够反映自噬溶酶体的活性以及自噬流的水平,自噬水平提高时,P62 表达下降^[21]。实验结果显示,Ang II 能够上调 LC3、Beclin-1 的表达,下调 P62 的表达,激活足细胞自噬。自噬过程中,自噬体需与溶酶体结合才能完成底物的降解,溶酶体与自噬体结合,由初级溶酶体转化为次级溶酶体,酸度升高,从而具有降解内容物的功能^[22],溶酶体荧光探针能够标记酸性溶酶体,反映溶酶体的功能。本实验结果显示,Ang II 不仅能够诱导足细胞自噬的启动,而且能够促进自噬体与溶酶体的结合,上调自噬流的水平;相反,加味黄芪赤风汤及替米沙坦则抑制自噬流的水平。本实验中应用自噬抑制剂 3MA、氯喹干预足细胞,结果显示,nephrin、podocin 表达减少,表明自噬在 Ang II 诱导的足细胞损伤中具有保护作用。

ROS 的累积可导致氧化应激,造成细胞蛋白、DNA 及脂质的氧化及损伤。细胞具有多种酶或非酶抗氧化物质抑制氧化应激及 ROS 的表达,包括谷胱甘肽、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶等,同时也存在多种抗氧化应激机制。ROS 可通过调节 mTOR 信号通路参与自噬的启动及结局过程,呈时间、剂量依赖性对自噬进行双向调节,小剂量的 ROS 激活 mTOR,大剂量的 ROS 抑制 mTOR^[23]。自噬的激活能够清除损伤的线粒体以及氧化蛋白,是对 ROS 造成细胞损伤的重要保护机制,能够缓解细胞损伤^[24],抑制氧化应激作用的药物能够抑制细胞自噬^[25]。

本实验结果显示,加味黄芪赤风汤可下调 Ang II 诱导的自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1 的表达以及上调 P62 的表达,下调足细胞的自噬活性;足细胞溶酶体荧光探针结果也显示,加味黄芪赤风汤能够抑制足细胞自噬。本实验结果提示,自噬在 Ang II 诱导的足细胞损伤中具有保护作用,自噬水平下降可导致足细胞相关蛋白表达的异常。进一步流式细胞仪检测结果表明,加味黄芪赤风汤能够下调 ROS 的表达,本课题组前期研究结果也显示,加味黄芪赤风汤能够明显减少阿霉素肾病大鼠尿蛋白,改善肾脏氧化应激损伤,增加肾皮质中 SOD 的含量,同时减少肾皮质中丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量^[9],因此,加味黄芪赤风汤可能是基于

ROS-自噬通路,抑制 Ang II 诱导的足细胞氧化应激,去除造成足细胞损伤的因素,从而下调自噬水平,发挥足细胞保护作用。

虽然 Ang II 诱导的足细胞自噬具有保护作用,但是该作用并不能扭转足细胞的损伤,并且,如果病理因素持续存在,导致自噬水平持续升高,也可能打破足细胞自噬的平衡状态而出现过度自噬,最终导致足细胞自噬程序性死亡。加味黄芪赤风汤可通过调控足细胞 ROS 的表达,使足细胞的自噬水平趋向回复至正常状态,改善 Ang II 诱导的足细胞损伤。

本研究初步探讨了加味黄芪赤风汤基于 ROS-自噬通路对 Ang II 诱导足细胞损伤的保护作用,然而,自噬是一个复杂的过程,受多种机制的调控,加味黄芪赤风汤在足细胞自噬中的机制还值得进一步研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 王海燕主编. 慢性肾脏病及透析的临床实践指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 13-14.
- [2] Mills KT, Xu Y, Zhang WD, et al. A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010 [J]. *Kidney Int*, 2015, 88(5): 950-957.
- [3] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. *Lancet*, 2012, 379(9818): 815-822.
- [4] Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes[J]. *Annu Rev Physiol*, 2012, 74: 299-323.
- [5] Tsai WC, Wu HY, Peng YS, et al. Risk factors for development and progression of chronic kidney disease: a systematic review and exploratory meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(11): e3013.
- [6] Wennmann DO, Hsu HH, Pavenstadt H. The renin-angiotensin-aldosterone system in podocytes [J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(4): 377-384.
- [7] Gao N, Wang H, Yin H, et al. Angiotensin II induces calcium-mediated autophagy in podocytes through enhancing reactive oxygen species levels [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 277: 110-118.
- [8] 李双, 李澎, 张昱, 等. 从自噬机制探讨加味黄芪赤风汤含药血清对阿霉素诱导的肾小球足细胞损伤的保护作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(1): 97-101.
- [9] 王允亮, 张昱, 王洪霞, 等. 加味黄芪赤风汤对阿霉素肾病大鼠蛋白尿及肾脏皮质 SOD 和 MDA 的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(5): 505-506, 524.
- [10] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1168-1170.
- [11] Wang W, Cai J, Tang S, et al. Sinomenine attenuates angiotensin II induced autophagy via inhibition of P47-Phox translocation to the membrane and influences reactive oxygen species generation in podocytes [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2016, 41(2): 158-167.
- [12] 李刘生, 赵明明, 张昱. 张昱基于“虚—风—瘀—毒”复杂病机网络诊治 IgA 肾病的经验 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2017, 12(4): 450-455, 472.
- [13] Lan HY, Chung AC. TGF- β /Smad signaling in kidney disease [J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(3): 236-243.
- [14] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [15] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [16] Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(4): 1084-1096.
- [17] De Zeeuw D, Decuyper JP, Ivanova E, et al. Autophagy in renal diseases [J]. *Pediatr Nephrol*, 2016, 31(5): 737-752.
- [18] Tharaux PL, Huber TB. How many ways can a podocyte die? [J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(4): 394-404.
- [19] Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation [J]. *Microb Cell*, 2016, 3(12): 588-596.
- [20] Zhang XJ, Chen S, Huang KX, et al. Why should autophagic flux be assessed? [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(5): 595-599.
- [21] Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death [J]. *J Cell Biol*, 2005, 171(4): 603-614.
- [22] Zhang X, Xu R, Zhang C, et al. Trifluoperazine, a novel autophagy inhibitor, increases radiosensitivity in glioblastoma by impairing homologous recombination [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 118.
- [23] 张军, 谷翔, 黄问银, 等. ROS 调节 mTOR 信号通路参与自噬的研究进展 [J]. *临床心血管病杂志*, 2016, 32(12): 1266-1270.
- [24] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology [J]. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36(1): 30-38.
- [25] Lv W, Booz GW, Fan F, et al. Oxidative stress and renal fibrosis: recent insights for the development of novel therapeutic strategies [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 105.

(收稿: 2018-07-22 在线: 2019-06-04)

责任编辑: 赵芳芳