茯苓酸对慢性肾衰竭大鼠肾功能及纤维化的影响机制Δ

彭 斌*,冯 雪,冯 立,熊 玮,胡 溪,朱双益,肖 阳,陈 芳,高 智#(武汉市中医医院肾病科,武汉 430049)

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408(2024)12-1489-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.12.13

摘 要 目的 基于Ras同源基因家族成员A(RhoA)/Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(ROCK)信号通路探讨茯苓酸(PA)对慢性肾衰竭(CRF)大鼠肾功能、纤维化的影响及潜在机制。**方法** 以雄性SD大鼠为对象,以5/6肾切除术建立CRF大鼠模型,将造模成功的大鼠分为模型组,PA低、中、高剂量组(5、10、20 mg/kg PA)和PA高剂量+ROCK通路激活剂溶血磷脂酸(LPA)组(20 mg/kg PA+1 mg/kg LPA),每组15只;另取15只大鼠仅切口暴露肾脏但不切除,作为假手术组。各药物组大鼠灌胃和/或尾静脉注射相应药液,每天1次,连续12周。实验期间,观察各组大鼠一般情况;末次给药后,检测各组大鼠的血清肾功能指标(血尿素氮、血清肌酐、尿酸)水平,观察其肾组织病理学改变,并进行肾小管损伤评分和肾纤维化区域面积量化,检测其肾组织中氧化应激指标[丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)]、炎症因子(肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β、白细胞介素6)水平,结缔组织生长因子(CTGF)、Ⅰ型胶原(collagen Ⅰ)阳性表达率,以及通路相关蛋白(RhoA、ROCK1)、纤维化相关蛋白(转化生长因子β_1、裸角质层同源物2、α-平滑肌肌动蛋白)表达水平。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠饮食减少,体型瘦小,精神萎靡且反应迟钝,肾小球减少、萎缩,肾小管扩张且结构杂乱,间质可见大量炎症细胞浸润;其血清肾功能指标水平,肾小管损伤评分、肾纤维化面积占比、肾组织MDA和炎症因子水平、CTGF和collagen Ⅰ阳性表达率、通路相关蛋白和纤维化相关蛋白的表达水平均显著升高,SOD水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,PA各剂量组大鼠的一般情况和肾组织病理损伤均有不同程度好转,上述各定量指标均显著改善,且呈剂量依赖性($P<0.05$)。LPA可显著逆转PA对上述指标的改善作用($P<0.05$)。**结论** PA能改善CRF大鼠肾功能并减轻肾组织纤维化,上述作用可能与抑制RhoA/ROCK信号通路的激活有关。

关键词 茯苓酸;慢性肾衰竭;肾功能;纤维化;RhoA/ROCK信号通路

Effect and mechanism of pachymic acid on renal function and fibrosis in rats with chronic renal failure

PENG Bin, FENG Xue, FENG Li, XIONG Wei, HU Xi, ZHU Shuangyi, XIAO Yang, CHEN Fang, GAO Zhi (Dept. of Nephrology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430049, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the effect of pachymic acid (PA) on renal function and fibrosis in chronic renal failure (CRF) rats and its potential mechanism based on the Ras homolog gene family member A (RhoA)/Rho-associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK) signaling pathway. **METHODS** Using male SD rats as subjects, the CRF model was established by 5/6 nephrectomy; the successfully modeled rats were divided into model group, PA low-dose, medium-dose and high-dose groups (5, 10, 20 mg/kg PA), high-dose PA+ROCK pathway activator lysophosphatidic acid (LPA) group (20 mg/kg PA+1 mg/kg LPA), with 15 rats in each group. Another 15 rats were selected as the sham operation group with only the kidney exposed but not excised. The rats in each drug group were gavaged and/or injected with the corresponding liquid via the caudal vein, once a day, for 12 consecutive weeks. During the experiment, the general condition of rats was observed in each group. After the last administration, the serum renal function indexes (blood urea nitrogen, serum creatinine, uric acid) of rats in each group were detected, the renal histopathological changes were observed; the renal tubule injury score and the area of renal fibrosis were quantified. The levels of oxidative stress indexes [malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD)] and inflammatory factors (tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, interleukin-6), the positive expression rates of connective tissue growth factor (CTGF) and collagen Ⅰ were detected as well as the expression levels of pathway-related proteins (RhoA, ROCK1) and fibrosis-related proteins (transforming growth factor-β_1, bare corneum homologs 2, α-smooth muscle actin) were determined. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the rats in model group had reduced diet, smaller body size, listless spirit and sluggish response, reduced and atrophied glomeruli, dilated renal tubules with chaotic structure, and a large number of inflammatory cells infiltrated interstitium; the serum levels of renal function indexes, renal tubule injury score, renal fibrosis area proportion, the levels of MDA and inflammatory factors, the positive expression rates of CTGF and collagen Ⅰ, and the expression levels of pathway-related proteins and fibrosis-related proteins in renal tissues were significantly increased, while SOD level was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the general condition and pathological injuries of kidney tissue of rats in PA groups were improved to varying degrees,

Δ**基金项目** 武汉市医学科研项目(No.WZ21C25)

＊**第一作者** 主治医师,硕士。研究方向:肾病的中医治疗。E-mail:peng1012@163.com

\# **通信作者** 主任医师,硕士。研究方向:肾病的中医治疗。E-mail:qiaoqianzab01@163.com

and the above quantitative indexes were significantly improved in a dose-dependent manner ($P<0.05$). LPA could significantly reverse the improvement effect of PA on the above indicators ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** PA can improve renal function and alleviate renal fibrosis in CRF rats, which may be related to inhibiting the activation of RhoA/ROCK signaling pathway.
KEYWORDS pachymic acid; chronic renal failure; renal function; fibrosis; RhoA/ROCK signaling pathway

慢性肾衰竭（chronic renal failure，CRF）是由多种因素引发的慢性进行性肾实质损害，以代谢物、水、电解质、酸碱紊乱和肾萎缩为主要特征，是世界范围内的重要公共卫生问题[1]。茯苓酸（pachymic acid，PA）是中药茯苓中主要的羊毛甾烷型三萜类化合物，可通过降低肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）和白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）水平来抑制肾脏炎症，改善慢性肾脏病大鼠的肾损伤[2]。文献报道，以PA为主要活性成分的二黄方可通过抑制炎症和纤维化来改善腺嘌呤诱导的CRF大鼠肾损伤[3]。Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶（Rho-associated coiled-coil forming protein kinase，ROCK）属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族，是Ras同源基因家族成员A（Ras homolog gene family member A，RhoA）的下游激酶，RhoA/ROCK信号通路已被证实与动脉高血压、心血管-肾脏重塑和高血压肾病密切相关，且激活RhoA/ROCK1信号通路是加速肾纤维化的潜在机制之一[4-5]。还有研究报道，与PA同为茯苓活性物质的茯苓多糖，可通过抑制RhoA/ROCK1信号通路来减轻心肌缺血再灌注损伤[6]。基于此，本研究拟初步探讨PA对RhoA/ROCK信号通路的作用及对CRF大鼠肾功能及纤维化的影响，以期为该病的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

BX43型光学显微镜购自日本Olympus公司；CLSM600型共聚焦显微镜购自舜宇光学科技（集团）有限公司；CLARIOstar® Plus型酶标仪购自德国BMG LABTECH公司；ChemiDoc XRS+型凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司。

1.2 主要药品与试剂

PA对照品（货号SP8010，纯度≥98%）购自北京索莱宝科技有限公司；溶血磷脂酸（lysophosphatidic acid，LPA；货号L7260）购自美国Merck公司；Masson染色试剂（货号MM1007）购自上海懋康生物科技有限公司；血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、血清肌酐（serum creatinine，Scr）、尿酸（uric acid，UA）、TNF-α、IL-1β、IL-6酶联免疫吸附测定（ELISA）检测试剂盒（货号分别为CB10659-Ra、CB11246-Ra、CB10660-Ra、CB11057-Ra、CB10205-Ra、CB10218-Ra）均购自上海科艾博生物技术有限公司；丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）ELISA检测试剂盒（货号分别为ml077384、ml059387）均购自上海酶联生物科技有限公司；RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒（货号分别为89901、23225）均购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；兔源Ⅰ型胶原（collagen Ⅰ）、RhoA、ROCK1、结缔组织生长因子（connective tissue growth factor，CTGF）、转化生长因子β_1（transforming growth factor-β_1，TGF-β_1）、α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）一抗和辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（货号ab260043、ab86297、ab97592、ab6992、ab215715、ab7817、ab9485、ab6721）均购自英国Abcam公司；兔源裸角质层同源物2（naked cuticle homolog 2，NKD2）一抗（货号2073S）购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠，体重（200±25）g，购自武汉大学动物实验中心，生产许可证号为SCXK（鄂）2019-0004。所有动物均饲养于特定的无病原体动物室[室温（25±2）℃，每12 h光照/黑暗循环]，自由摄食、饮水。本研究方案获得武汉华联科生物技术有限公司动物伦理委员会审批，批准号为HLK-2022107495。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

根据参考文献[7]方法，采用5/6肾切除术建立CRF大鼠模型，具体操作如下：无菌环境下，大鼠经麻醉后，沿左脊骨切口，暴露左肾，迅速切除约2/3的肾组织，止血后缝合复位；1周后，同法切除整个右肾。另取15只大鼠仅切口暴露肾脏，但不切除肾组织，作为假手术组（Sham组）。

切除右肾后14 d，于大鼠目内眦取血，离心后分离血清，检测Scr、BUN水平（具体方法见“2.2”项），若造模组大鼠上述指标的平均水平均显著高于Sham组则认为造模成功[7]。将造模成功的大鼠分为模型组（CRF组）、PA低剂量组（PA-L组）、PA中剂量组（PA-M组）、PA高剂量组（PA-H组）和PA高剂量+ROCK通路激活剂LPA组（PA-H+LPA组），每组15只。PA-L组、PA-M组、PA-H组大鼠分别灌胃5、10、20 mg/kg的PA药液（以二甲基亚砜为溶剂，剂量参考相关文献[2,8]及预实验结果）并尾静脉注射与LPA药液等体积的磷酸盐缓冲液（PBS）；PA-H+LPA组大鼠灌胃20 mg/kg的PA药液并尾静脉注射1 mg/kg的LPA药液（以PBS为溶剂）；CRF组和Sham组大鼠灌胃与PA药液等体积的二甲基亚砜并尾静脉注射与LPA药液等体积的PBS。PA（二甲基亚砜）和LPA（PBS）的先后给药间隔时间为1 h。每天1次，连续12周。

2.2 大鼠一般情况观察及血清肾功能指标检测

实验期间，观察各组大鼠饮食、排便、毛发密集程度及光泽度、精神状态等一般情况。末次给药次日，采集各组大鼠眶静脉血，于4 ℃下离心10 min，收集上层血清，根据相应ELISA试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测其BUN、Scr、UA水平。

2.3 大鼠肾组织病理学检查

采血后，随机选取各组5只大鼠，麻醉后处死，分离肾脏，取肾组织适量用4%多聚甲醛固定，经石蜡包埋、切片、苏木精-伊红（HE）染色后，置于光学显微镜下观察其肾组织病理学变化并拍照。

2.4 大鼠肾小管损伤和肾纤维化观察

取“2.3”项下各组大鼠的肾组织切片，经乙醇梯度脱水后，进行Masson染色，置于光学显微镜下观察其肾小管损伤和肾纤维化情况。根据肾小管扩张和坏死程度进行肾小管损伤评分，具体标准为：无扩张或坏死，记0分；肾皮质-肾髓质区损伤百分比＜25%，记1分；肾皮质-肾髓质区损伤百分比为25%～＜50%，记2分；肾皮质-髓质区损伤百分比为50%～75%，记3分；肾皮质-髓质区损伤百分比＞75%，记4分[9]。同时，使用Image Pro Plus 6.0软件量化纤维化区域（呈蓝色）面积与组织切片总面积的百分比（简称“肾纤维化面积占比”）。

2.5 大鼠肾组织氧化应激及炎症指标检测

采血后，随机选取各组另5只大鼠，麻醉后处死，分离肾脏，取肾组织适量制备匀浆，离心后分离上清，根据相应ELISA试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测其MDA、SOD、TNF-α、IL-1β、IL-6水平。

2.6 大鼠肾组织中CTGF、collagen Ⅰ表达检测

采用免疫荧光法检测。采血后，随机选取各组剩余5只大鼠，麻醉后处死，分离肾脏，取肾组织适量以液氮快速冷冻、固定后，使用3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶，然后用牛血清白蛋白封闭、孵育；加入CTGF、collagen Ⅰ一抗（稀释比例均为1∶200），于4 ℃下孵育过夜；加入相应二抗（稀释比例为1∶600），于室温下孵育1 h；以4′,6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）复染，置于共聚焦显微镜下观察并拍照，按下式计算CTGF、collagen Ⅰ阳性表达率：阳性表达率＝阳性表达细胞（呈绿色）数/细胞总数×100%。

2.7 大鼠肾组织中信号通路及纤维化相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.6”项下各组大鼠剩余的肾组织，以RIPA缓冲液裂解以提取总蛋白，以BCA法进行蛋白定量后加热变性。取变性蛋白适量，进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上，用5%脱脂牛奶封闭1 h；洗膜后，加入通路相关蛋白（RhoA、ROCK1）、纤维化相关蛋白（TGF-β_1、NKD2、α-SMA）、内参蛋白（GAPDH）一抗（稀释比例均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释比例为1∶200），于室温下孵育1 h；以ECL发光试剂显影后，置于凝胶成像系统下成像。使用Image J软件分析蛋白条带的灰度值，以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 PA对CRF大鼠一般情况的影响

Sham组大鼠饮食、排便正常，毛发密集且鲜亮，体型丰满，精神状态良好；与Sham组比较，CRF组大鼠饮食减少，尿少、便稀，毛发枯乱，体型瘦小，精神萎靡且反应迟钝；与CRF组比较，PA各剂量组大鼠的上述情况均有所改善，但仍不如Sham组；与PA-H组比较，PA-H+LPA组大鼠的上述情况加重，但较CRF组有所减轻。

3.2 PA对CRF大鼠肾功能指标的影响

与Sham组比较，CRF组大鼠血清BUN、Scr、UA水平均显著升高（$P<0.05$）；与CRF组比较，PA各剂量组大鼠血清BUN、Scr、UA水平均显著降低，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；与PA-H组比较，PA-H+LPA组大鼠血清上述指标水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 PA对CRF大鼠血清肾功能指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

组别	BUN/（mmol/L）	Scr/（μmol/L）	UA/（μmol/L）
Sham组	7.82±0.92	54.91±7.67	47.43±6.02
CRF组	26.78±2.86^{a}	164.23±19.59^{a}	121.42±11.43^{a}
PA-L组	23.21±3.14^{b}	135.76±17.28^{b}	106.39±9.46^{b}
PA-M组	17.92±2.18^{bc}	104.38±12.61^{bc}	83.42±6.74^{bc}
PA-H组	13.43±1.52^{bcd}	77.62±6.67^{bcd}	54.26±3.89^{bcd}
PA-H+LPA组	15.69±1.94^{e}	94.83±10.71^{e}	76.13±5.64^{e}

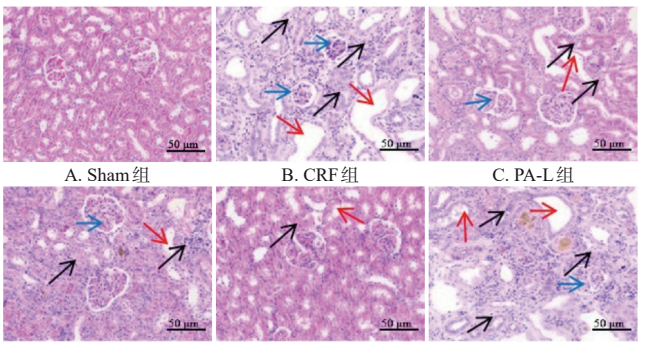
a：与Sham组比较，$P<0.05$；b：与CRF组比较，$P<0.05$；c：与PA-L组比较，$P<0.05$；d：与PA-M组比较，$P<0.05$；e：与PA-H组比较，$P<0.05$。

3.3 PA对CRF大鼠肾组织病理学变化的影响

与Sham组比较，CRF组大鼠的肾小球数量减少，囊腔扩大，肾小管扩张且结构杂乱不清晰，间质内有大量炎症细胞浸润；与CRF组比较，PA各剂量组大鼠肾小球病变和肾小管扩张程度均有所减轻，管状结构清晰且排列整齐，间质内炎症细胞浸润减少；与PA-H组比较，PA-H+LPA组大鼠肾组织病变加重。结果见图1。

3.4 PA对CRF大鼠肾小管损伤和肾纤维化的影响

与Sham组比较，CRF组大鼠肾小管损伤评分和肾纤维化面积占比均显著升高或增大（$P<0.05$）；与CRF组比较，PA各剂量组大鼠肾小管损伤评分和肾纤维化面积占比均显著降低，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；与PA-H组比较，PA-H+LPA组大鼠上述指标均显著升高（$P<0.05$）。结果见图2、表2。

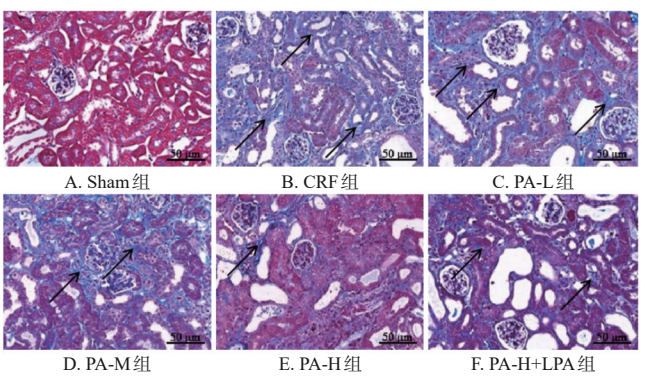


A. Sham组　B. CRF组　C. PA-L组

D. PA-M组　E. PA-H组　F. PA-H+LPA组

黑色箭头：炎症细胞；红色箭头：扩张的肾小管；蓝色箭头：扩大的肾小球囊腔。

图1　PA对CRF大鼠肾组织病理学变化影响的显微图（HE染色）



A. Sham组　B. CRF组　C. PA-L组

D. PA-M组　E. PA-H组　F. PA-H+LPA组

黑色箭头：肾小球纤维化。

图2　PA对CRF大鼠肾纤维化影响的显微图（Masson染色）

表2　PA对CRF大鼠肾小管损伤评分和肾纤维化面积占比的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	肾小管损伤评分/分	肾纤维化面积占比/%	组别	肾小管损伤评分/分	肾纤维化面积占比/%
Sham组	0.12±0.20	13.46±0.96	PA-M组	1.74±0.14^{bc}	48.72±3.67^{bc}
CRF组	3.27±0.29^{a}	63.87±5.72^{a}	PA-H组	0.52±0.09^{bcd}	25.42±3.01^{bcd}
PA-L组	2.33±0.27^{b}	56.43±5.04^{b}	PA-H+LPA组	1.05±0.11^{e}	32.54±2.89^{e}

a：与Sham组比较，$P<0.05$；b：与CRF组比较，$P<0.05$；c：与PA-L组比较，$P<0.05$；d：与PA-M组比较，$P<0.05$；e：与PA-H组比较，$P<0.05$。

3.5　PA对CRF大鼠肾组织炎症及氧化应激指标的影响

与Sham组比较，CRF组大鼠肾组织中TNF-α、IL-1β、IL-6、MDA水平均显著升高，SOD水平显著降低（$P<0.05$）；与CRF组比较，PA各剂量组大鼠肾组织中TNF-α、IL-1β、IL-6、MDA水平均显著降低，SOD水平均显著升高，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；与PA-H组比较，PA-H+LPA组大鼠肾组织中TNF-α、IL-1β、IL-6、MDA水平均显著升高，SOD水平显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

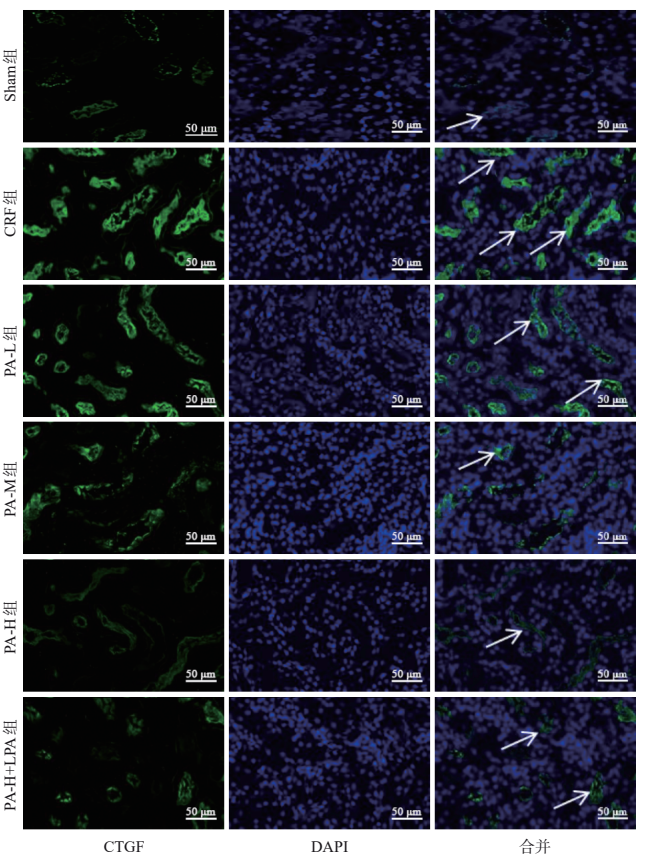
3.6　PA对CRF大鼠肾组织中CTGF和collagen Ⅰ表达的影响

与Sham组比较，CRF组大鼠肾组织中CTGF、collagen Ⅰ的阳性表达率均显著升高（$P<0.05$）；与CRF组比较，PA各剂量组大鼠肾组织中上述蛋白的阳性表达率均显著降低，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；与PA-H组比较，PA-H+LPA组大鼠肾组织中上述蛋白的阳性表达率均显著升高（$P<0.05$）。结果见图3（以CTGF为例）、表4。

表3　PA对CRF大鼠肾组织炎症及氧化应激指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	TNF-α/（pg/mL）	IL-1β/（pg/mL）	IL-6/（pg/mL）	MDA/（μmol/L）	SOD/（μmol/L）
Sham组	106.79±10.53	58.34±3.03	33.48±2.62	6.04±0.71	111.89±6.62
CRF组	338.46±24.96^{a}	113.86±7.42^{a}	75.92±5.06^{a}	23.17±1.13^{a}	54.25±3.47^{a}
PA-L组	284.21±23.04^{b}	92.73±4.71^{b}	63.84±4.41^{b}	20.34±1.95^{b}	63.92±4.86^{b}
PA-M组	228.62±22.67^{bc}	78.26±3.34^{bc}	52.47±3.83^{bc}	17.65±1.34^{bc}	76.57±2.34^{bc}
PA-H组	149.71±12.53^{bcd}	57.85±2.17^{bcd}	34.69±2.02^{bcd}	10.82±0.98^{bcd}	94.68±5.12^{bcd}
PA-H+LPA组	184.35±15.82^{e}	71.42±4.82^{e}	43.12±3.46^{e}	13.46±0.87^{e}	85.43±3.02^{e}

a：与Sham组比较，$P<0.05$；b：与CRF组比较，$P<0.05$；c：与PA-L组比较，$P<0.05$；d：与PA-M组比较，$P<0.05$；e：与PA-H组比较，$P<0.05$。



白色箭头：CTGF阳性表达。

图3　PA对CRF大鼠肾组织中CTGF表达影响的显微图

表4　PA对CRF大鼠肾组织中CTGF和collagen Ⅰ阳性表达率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	CTGF阳性表达率/%	collagen Ⅰ阳性表达率/%	组别	CTGF阳性表达率/%	collagen Ⅰ阳性表达率/%
Sham组	21.47±1.03	12.56±0.86	PA-M组	41.52±3.52^{bc}	28.45±1.73^{bc}
CRF组	63.28±4.65^{a}	41.37±3.21^{a}	PA-H组	28.63±1.84^{bcd}	18.74±1.22^{bcd}
PA-L组	54.81±5.12^{b}	34.62±2.45^{b}	PA-H+LPA组	34.75±2.37^{e}	23.19±1.34^{e}

a：与Sham组比较，$P<0.05$；b：与CRF组比较，$P<0.05$；c：与PA-L组比较，$P<0.05$；d：与PA-M组比较，$P<0.05$；e：与PA-H组比较，$P<0.05$。

3.7 PA对CRF大鼠肾组织中相关蛋白表达的影响

与Sham组比较，CRF组大鼠肾组织中RhoA、ROCK1、TGF-β_1、NKD2、α-SMA蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与CRF组比较，PA各剂量组大鼠肾组织中上述蛋白的表达水平均显著降低，且呈剂量依赖性（$P<0.05$）；与PA-H组比较，PA-H+LPA组大鼠肾组织中上述蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图4、图5。

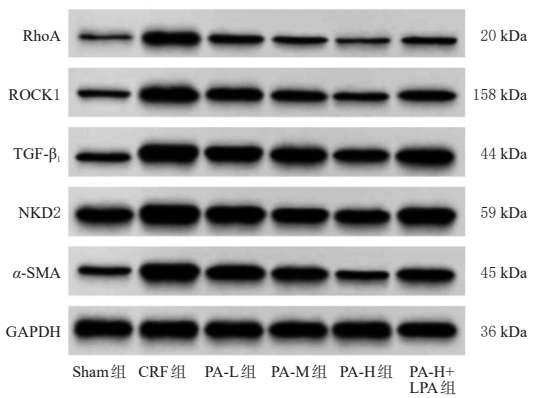
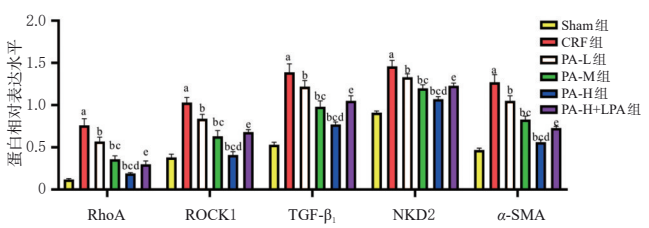


图4 PA对CRF大鼠肾组织中相关蛋白表达影响的电泳图



a：与Sham组比较，$P<0.05$；b：与CRF组比较，$P<0.05$；c：与PA-L组比较，$P<0.05$；d：与PA-M组比较，$P<0.05$；e：与PA-H组比较，$P<0.05$。

图5 PA对CRF大鼠肾组织中相关蛋白表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

4 讨论

肾小管间质病变是慢性肾脏病进展的重要环节。研究表明，PA可通过抗炎和抗氧化应激而改善急、慢性肾损伤[10]。Jiang等[11]研究显示，PA可通过降低Scr和BUN水平，改善缺血再灌注急性肾损伤小鼠的肾组织病理损伤。本研究结果显示，与Sham组比较，CRF大鼠饮食减少，体型瘦小，精神萎靡且反应迟钝，肾组织病变明显，肾小管损伤评分和血清BUN、Scr、UA、TNF-α、IL-1β、IL-6、MDA水平均显著升高，SOD水平显著降低；经不同剂量PA干预后，CRF大鼠的一般情况好转，肾组织病变均有所减轻，肾小管损伤评分和血清BUN、Scr、UA、TNF-α、IL-1β、IL-6、MDA水平均显著降低，SOD水平均显著升高，且呈剂量依赖性，表明PA能通过抗炎、抗氧化应激来改善CRF大鼠的肾功能，减轻肾损伤，且高剂量PA（20 mg/kg）的效果更好。

肾纤维化是慢性肾脏病进展至终末期肾衰竭的最终途径，被认为是CKD进展的不良预后指标；同时，肾纤维化也是导致肾结构紊乱和肾功能不可逆丧失的主要病理因素[9]。上皮-间质转化是引发肾纤维化的重要原因，肌成纤维细胞是负责胶原合成、沉积的主要细胞，其表达的α-SMA可作为组织纤维化发生的标志蛋白之一，并可介导多种炎症介质的分泌和释放[12-13]。多功能细胞因子TGF-β_1表达的增加与多种因素致损伤所引发的肾纤维化进展密切相关，是促纤维化的重要介质[14]。CTGF在各种肾脏疾病中均呈高表达，可直接促进肾纤维化的进展，也可作为TGF-β_1的下游因子在肾小球和肾小管间质纤维化的发展中发挥重要作用[15]。肾纤维化依赖于肌成纤维细胞的形成，该细胞表达的标志蛋白NKD2可直接靶向作用于collagen Ⅰ的α1链，加速肾纤维化形成[16-17]。本研究结果显示，与Sham组比较，CRF组大鼠肾纤维化面积占比和肾组织中CTGF、collagen Ⅰ、TGF-β_1、NKD2、α-SMA蛋白表达均显著升高或上调；经不同剂量PA干预后，CRF大鼠肾纤维化面积占比和肾组织中上述蛋白表达均显著降低或下调，且呈剂量依赖性，提示PA可通过抑制胶原蛋白沉积和CTGF、collagen Ⅰ、TGF-β_1、NKD2、α-SMA蛋白的表达，进而抑制炎症因子的表达及肾小管上皮细胞的上皮-间质转化，改善CRF大鼠的肾纤维化。

RhoA是TGF-β_1的下游信号分子，其主要的下游效应器是ROCK1，RhoA/ROCK信号通路对多种生物学过程具有调控作用[18-19]。RhoA/ROCK信号通路活化后，可通过激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4而诱导肾组织中大量活性氧释放，导致α-SMA和collagen Ⅳ等多种纤维化蛋白表达，进而导致肾纤维化的发生[20]。有研究指出，抑制RhoA/ROCK途径能减轻肾纤维化，抑制RhoA/ROCK信号通路相关蛋白的表达可改善脓毒症大鼠的急性肺肾损伤症状[20-21]。本研究结果显示，与Sham组比较，CRF组大鼠肾组织中RhoA、ROCK1蛋白的表达均显著上调；经不同剂量PA干预后，CRF大鼠肾组织中RhoA、ROCK蛋白的表达均显著下调，且血清炎症因子水平显著降低，肾纤维化明显减轻，提示RhoA/ROCK信号通路的过度激活加速了CRF的进展，而PA可能通过抑制该信号通路的过度激活而减轻CRF的肾纤维化，进而保护大鼠肾功能。为验证以上推测，本研究以PA联合通路激活剂LPA干预CRF大鼠，结果显示，大鼠肾组织中RhoA、ROCK和纤维化标志物CTGF、collagen Ⅰ、TGF-β_1、NKD2、α-SMA蛋白的表达均显著上调，肾纤维化面积占比明显增加，提示LPA逆转了PA对CRF大鼠肾纤维化的改善作用。

综上所述，PA能减轻CRF大鼠肾组织的病理损伤，改善其肾功能，减轻其肾组织纤维化、炎症和氧化应激，上述作用可能与抑制RhoA/ROCK信号通路的激活有关。然而，CRF的发病机制复杂多变，可能还涉及其他信号通路，加之PA在CRF大鼠肾组织中的具体作用部位和靶点尚未明确，故后续本课题组将结合生物信息学手段进一步分析PA的作用靶点和作用机制。

参考文献

[1] DAI P P, CHANG W F, XIN Z R, et al. Retrospective study on the influencing factors and prediction of hospitalization expenses for chronic renal failure in China based on random forest and LASSO regression[J]. Front Public Health, 2021, 9: 678276.

[2] YOUNIS N N, MOHAMED H E, SHAHEEN M A, et al. Potential therapeutic efficacy of pachymic acid in chronic kidney disease induced in rats: role of Wnt/β-catenin/renin-angiotensin axis[J]. J Pharm Pharmacol, 2022, 74(1): 112-123.

[3] ZHANG C Y, ZHU J Y, YE Y, et al. Erhuang formula ameliorates renal damage in adenine-induced chronic renal failure rats via inhibiting inflammatory and fibrotic responses[J]. Biomedecine Pharmacother, 2017, 95: 520-528.

[4] SECCIA T M, RIGATO M, RAVAROTTO V, et al. ROCK (RhoA/Rho kinase) in cardiovascular-renal pathophysiology: a review of new advancements[J]. J Clin Med, 2020, 9(5): 1328.

[5] CHEN Y, HUANG C, DUAN Z B, et al. LncRNA NEAT1 accelerates renal fibrosis progression via targeting miR-31 and modulating RhoA/ROCK signal pathway[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2023, 324(2): C292-C306.

[6] 谢骏, 王媛媛, 李聚鑫, 等. 茯苓多糖调控Rho-ROCK信号通路对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响和机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(23): 6434-6441.
XIE J, WANG Y Y, LI J X, et al. Effect and mechanism of *Poria cocos* polysaccharides on myocardial cell apoptosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating Rho-ROCK signaling pathway[J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(23): 6434-6441.

[7] 朱晓婷, 陈志强. 益气化湿通络方对实验性肾功能衰竭大鼠肾脏氧化应激损伤及纤维化的改善作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(1): 67-72, 97-98.
ZHU X T, CHEN Z Q. The improvement effects of Yiqi huashi tongluo formula on oxidative stress and renal fibrosis of experimental CRF rats[J]. Chin J Appl Physiol, 2020, 36(1): 67-72, 97-98.

[8] 李宏亮. mTOR/P70S6K信号通路在肾功能不全大鼠对比剂急性肾损伤中的作用研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2016.
LI H L. Role of mTOR/P70S6K signaling pathway in contrast-induced acute renal injury in rats with renal insufficiency[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2016.

[9] YANG K, LI W, BAI T, et al. Mindin deficiency alleviates renal fibrosis through inhibiting NF-κB and TGF-β/Smad pathways[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(10): 5740-5750.

[10] CHEN D Q, FENG Y L, CHEN L, et al. Poricoic acid A enhances melatonin inhibition of AKI-to-CKD transition by regulating Gas6/AxlNFκB/Nrf2 axis[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 134: 484-497.

[11] JIANG G P, LIAO Y J, HUANG L L, et al. Effects and molecular mechanism of pachymic acid on ferroptosis in renal ischemia reperfusion injury[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(1): 63.

[12] LI R, GUO Y J, ZHANG Y M, et al. Salidroside ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting the TLR4/NF-κB and MAPK signaling pathways[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(5): 1103.

[13] TANG P M, ZHANG Y Y, XIAO J, et al. Neural transcription factor Pou4f1 promotes renal fibrosis via macrophage-myofibroblast transition[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(34): 20741-20752.

[14] GIFFORD C C, TANG J Q, COSTELLO A, et al. Negative regulators of TGF-β_1 signaling in renal fibrosis; pathological mechanisms and novel therapeutic opportunities [J]. Clin Sci, 2021, 135(2): 275-303.

[15] YIN Q, LIU H. Connective tissue growth factor and renal fibrosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 365-380.

[16] KUPPE C, IBRAHIM M M, KRANZ J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis[J]. Nature, 2021, 589(7841): 281-286.

[17] RUIZ-ORTEGA M, LAMAS S, ORTIZ A. Antifibrotic agents for the management of CKD: a review[J]. Am J Kidney Dis, 2022, 80(2): 251-263.

[18] CHEN J H, CHEN C, BAO X B, et al. Effects of dexmedetomidine on the RhoA/ROCK/Nox4 signaling pathway in renal fibrosis of diabetic rats[J]. Open Med, 2019, 14: 890-898.

[19] 张波涛, 王雅蓉, 张婷, 等. 甜菜碱调控RhoA/ROCK抑制野百合碱致大鼠肺动脉高压[J]. 实用医学杂志, 2023, 39(15): 1876-1880.
ZHANG B T, WANG Y R, ZHANG T, et al. Betaine inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats by regulating RhoA/ROCK protein expression[J]. J Pract Med, 2023, 39(15): 1876-1880.

[20] SHI Z Z, WANG Q, ZHANG Y B, et al. Extracellular vesicles produced by bone marrow mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis, in part by inhibiting the RhoA/ROCK pathway, in a UUO rat model[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 253.

[21] YAN X X, ZHENG A D, ZHANG Z N, et al. Protective effect of pantoprazole against sepsis-induced acute lung and kidney injury in rats[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(8): 5197-5211.

（收稿日期：2023-12-15　修回日期：2024-05-07）
（编辑：张元媛）