

肾衰饮调控慢性肾功能衰竭大鼠肾脏细胞凋亡的机制

<https://doi.org/10.12307.2021.038>张亮^{1,2}, 马晓燕², 王佳虹³

投稿日期: 2020-09-05

送审日期: 2020-09-08

采用日期: 2020-10-22

在线日期: 2020-12-30

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)23-03672-06

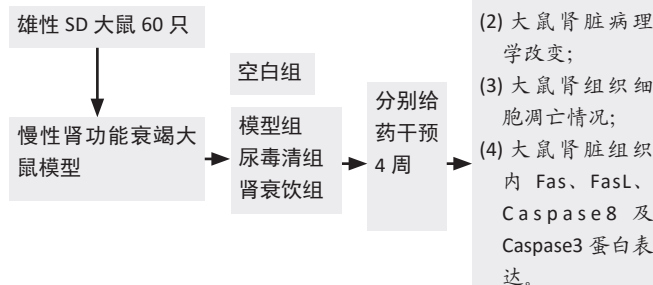
文献标识码: B

文章快速阅读:

研究特点一

△细胞凋亡过程参与了慢性肾功能衰竭大鼠的发病机制;

△肾衰饮通过影响Caspase8、Caspase3蛋白表达,对肾脏细胞凋亡起到抑制作用,改善肾脏功能,其机制可能与Fas/FasL介导的凋亡途径相关。



文题释义:

慢性肾功能衰竭: 是指慢性肾脏病引起的肾小球滤过率(GFR)下降及与此相关的代谢紊乱和临床症状组成的综合征,发生在各种慢性肾脏疾病的基础上,肾实质遭到严重破坏,逐渐出现肾功能减退直至衰竭。临床上以肾功能减退、代谢废物潴留、体内环境失衡为主要表现。

死亡受体介导的凋亡通路: 是诱导细胞凋亡的主要途径之一,又称为外源性细胞凋亡通路,此途径主要通过肿瘤坏死因子受体、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)、Fas/FasL诱导的,各途径主要是通过跨膜受体将信号从胞外传递至胞内,然后衔接蛋白与受体结合,再由衔接蛋白与执行蛋白结合,最终诱导细胞凋亡。

摘要

背景: 前期动物实验已经做过肾衰饮治疗慢性肾功能衰竭在内质网凋亡通路方面的研究,但其有关细胞凋亡其他途径的机制还有待研究。

目的: 从Fas/FasL途径探讨肾衰饮对慢性肾功能衰竭大鼠肾脏细胞凋亡的调控机制。

方法: 选取60只雄性SD大鼠,随机分成空白组、模型组、尿毒清组和肾衰饮组,后3组通过腺嘌呤悬液200 mg/(kg·d)灌胃建立慢性肾功能衰竭大鼠模型;肾衰饮组大鼠给予肾衰饮煎剂33.3 g/(kg·d)灌胃;尿毒清组大鼠给予尿毒清颗粒2.25 g/(kg·d)灌胃;空白组和模型组给予0.9%氯化钠注射液8 mL/kg灌胃;均为1次/d,疗程4周。治疗完成后检测血清肌酐、尿素氮水平;苏木精-伊红染色法观察大鼠肾脏组织病理学变化,原位末端标记法染色评价肾组织细胞凋亡情况;免疫印迹法检测大鼠肾脏组织 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3蛋白表达水平。实验方案经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号为21000092017044)。

结果与结论: ①与空白组比较,模型组、尿毒清组和肾衰饮组大鼠的血清肌酐、尿素氮水平显著升高($P < 0.01$);肾脏细胞凋亡指数明显升高($P < 0.01$);肾脏组织中 Fas、FasL、Caspase3、Caspase8蛋白表达水平均明显升高($P < 0.01$);尿毒清组和肾衰饮组大鼠以上指标均优于模型组($P < 0.01$),尿毒清组和肾衰饮组相比差异无显著性意义($P > 0.05$);②结果说明,肾衰饮能够降低慢性肾功能衰竭大鼠肾脏细胞凋亡,改善肾脏功能,其机制可能与肾衰饮能够抑制Fas/FasL介导的凋亡途径相关。

关键词: 慢性肾功能衰竭;肾衰饮;细胞凋亡;Fas/FasL;大鼠;模型;动物

Regulatory mechanism of *Shenshuai Yin* on cell apoptosis in the kidney of chronic renal failure ratsZhang Liang^{1,2}, Ma Xiaoyan², Wang Jiahong³

¹Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China; ²Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China; ³Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, Liaoning Province, China
Zhang Liang, MD candidate, Attending physician, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China; Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Corresponding author: Ma Xiaoyan, MD, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

¹ 辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市 110032; ² 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁省沈阳市 110032; ³ 沈阳药科大学, 辽宁省沈阳市 110015

第一作者: 张亮, 女, 1986年生, 辽宁省盘锦市人, 主治医师, 辽宁中医药大学在读博士, 主要从事中西医结合治疗慢性肾病研究。

通讯作者: 马晓燕, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁省沈阳市 110032

<https://orcid.org/0000-0003-2112-1568> (张亮)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81803769), 项目负责人: 王佳虹

引用本文: 张亮, 马晓燕, 王佳虹. 肾衰饮调控慢性肾功能衰竭大鼠肾脏细胞凋亡的机制 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(23):3672-3677.



Abstract

BACKGROUND: Previous studies in animals have explored the pathway of apoptosis in the endoplasmic reticulum after treatment with *Shenshuai Yin* for chronic renal failure. However, the mechanism of cell apoptosis through other pathways remains to be studied.

OBJECTIVE: To investigate the regulatory mechanism of renal cell apoptosis of chronic renal failure rats through Fas/FasL pathway.

METHODS: Sixty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a blank group, a model group, a *Niaoduqing* group and a *Shenshuai Yin* group. A rat model of chronic renal failure was established by intragastric administration of adenine suspension 200 mg/kg per day. Rats in the *Shenshuai Yin* group were given *Shenshuai Yin* 33.3 g/kg per day by gavage. Rats in the *Niaoduqing* group were given *Niaoduqing* granule 2.25 g/kg per day by gavage. Rats in the blank group and model group were given 0.9% sodium chloride injection 8 mL/kg by gavage. Treatments in each group were conducted once a day for 4 consecutive weeks. After treatment, serum creatinine and urea nitrogen levels were detected. Renal histopathological changes were observed by hematoxylin-eosin staining. Apoptosis in renal tissues was evaluated by TUNEL staining. The protein levels of Fas, FasL, Caspase8 and Caspase3 were detected by western blot. An approval by the Animal Ethics Committee of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine was given with an approval No. 2100092017044.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared to the blank group, the levels of serum creatinine and urea nitrogen were significantly increased in the model, *Niaoduqing* and *Shenshuai Yin* groups ($P < 0.01$), the apoptotic index of renal cells was significantly increased ($P < 0.01$), and the protein levels of Fas, FasL, Caspase3 and Caspase8 were significantly increased ($P < 0.01$). The above indexes of *Niaoduqing* group and *Shenshuai Yin* group were all significantly improved as compared to the model group ($P < 0.01$), but there was no significant difference between the *Niaoduqing* group and *Shenshuai Yin* group ($P > 0.05$). To conclude, *Shenshuai Yin* can reduce renal cell apoptosis and improve renal function in chronic renal failure rats. The mechanism may be related to the inhibition of Fas/FasL mediated apoptosis pathway by *Shenshuai Yin*.

Key words: chronic renal failure; *Shenshuai Yin*; apoptosis; Fas/FasL; rat; model, animal

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81803769 (to WJH)

How to cite this article: ZHANG L, MA XY, WANG JH. Regulatory mechanism of *Shenshuai Yin* on cell apoptosis in the kidney of chronic renal failure rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(23):3672-3677.

0 引言 Introduction

慢性肾功能衰竭主要是以代谢产物在体内滞留,引起水、电解质及酸碱平衡失调,出现全身各系统症状的一种临床综合征,它是各种慢性肾脏病持续进展的共同结局^[1]。慢性肾功能衰竭的病情发展呈渐进性,病程迁延,病情复杂,常以尿毒症为结局而导致死亡。近年来,慢性肾功能衰竭的发病率有明显增高趋势,该病治疗手段有限,病情易反复,后期肾脏替代治疗费用偏高,对患者的身心健康和生活质量造成严重影响,已经成为严重威胁人类健康和生命的常见病。因此寻找有效的中药防治慢性肾功能衰竭方法具有极为重要的意义。

肾衰饮是马晓燕教授基于慢性肾功能衰竭的发病机制,根据多年临床经验总结的经验方,治疗原则从整体观念出发,方药贯穿了“解毒、排毒、抗毒”的治疗思想。课题组前期研究发现肾衰饮能够改善慢性肾功能衰竭大鼠的肾功能,有可能是通过 ATF6/CHOP 途径减轻内质网应激反应来减少肾脏细胞凋亡实现的^[2]。近年来诸多研究表明, Fas 和 FasL 在许多肾脏疾病中都有不同程度的表达,贺丽蓉等^[3]通过对 25 例原发性肾小球疾病患儿的肾活检组织观察,发现肾组织内 Fas 及 FasL 的表达在局灶节段性肾小球肾炎、系膜增生肾小球肾炎、微小病变型肾病组高于正常对照组,提示 Fas、FasL 参与了肾脏的损害。程丽静等^[4]通过观察具有典型间质纤维化病理特征的大鼠单侧输尿管结扎梗阻肾模型,发现肾间质 Fas 的表达与细胞凋亡数成正相关,提示 Fas/FasL 系统可能介导了肾间质细胞的凋亡。因此,此次实验以 Fas/FasL 细胞凋亡途径为切入点,探讨肾衰饮干预慢性肾功能衰竭大鼠的作用机制,旨在为临床治疗寻找可能的新靶点。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物观察。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 10 月至 2018 年 10 月在辽宁中医药大学实验动物中心及实验动物实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选取 60 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,6 周龄,体质量 (180±20) g,实验动物购自辽宁长生生物技术股份有限公司,生产许可证号: SCXK (辽) 2010-0001。购入后在辽宁中医药大学实验动物中心常规饲养。

1.3.2 实验药物与试剂 肾衰饮由黄芪、太子参、白术、砂仁、菟丝子、法半夏、鳖甲、茯苓、藿香、丹参、大黄、水蛭、莪术等组成(均购自辽宁省中医院中药局),先将药材用 5 倍量水浸泡 2 h 后再文火煎 30 min,过滤后收集药液,原药渣加少量水再次煎煮,取 2 次煎煮药液,将 2 次药液混合均匀,于水浴恒温器上浓缩为 1 mL 药液含生药量 3.36 g,4 °C 冷藏备用。尿毒清颗粒主要成分为大黄、黄芪、白术、茯苓、白芍、丹参、车前草,15 g/袋(由广州康臣药业有限公司生产)。腺嘌呤(美国 Amresco 公司,批号: 1122B051);血清肌酐测定试剂盒(货号: C013-2)、尿素氮测定试剂盒(货号: C011-2)(南京建成生物工程研究所);水合氯醛(批号: T8590)、多聚甲醛(批号: P8430)(北京 Solarbio 有限公司);苏木精-伊红染色液(碧云天生物技术研究所);原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(南京凯基生物科技有限公司);兔抗大鼠 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3 抗体(abcam 公司);HRP 标记的二抗(北京中杉金桥生物科技有限公司);ECL 发光液(thermo 公司)。

1.3.3 实验仪器与设备 酶标仪(thermo 生产, MK3 型);电泳仪(上海天能科技有限公司生产, EPS300);数码显微镜(德国徕卡公司生产, DM2000 型);凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司, SF4000 型)。

1.4 实验方法

1.4.1 模型制备与分组 将 60 只雄性 SD 大鼠随机抽取 12 只为空白组,其余 48 只为造模组,造模组按照参考文献 Yokozawa 法制作大鼠肾衰模型^[5],予腺嘌呤悬浊液 200 mg/(kg·d) 每日 1 次灌胃。空白组予 0.9% NaCl 溶液 8 mL/kg 每日 1 次灌胃,均连续灌胃 21 d。所有大鼠用体积

分数 10% 水合氯醛水溶液 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉，每只大鼠均采集球后静脉血 1.5–2.0 mL，化验血清肌酐、尿素氮水平。同时空白组随机取 2 只，造模组取 6 只，分别处死取肾脏组织，苏木精–伊红染色观察大鼠肾脏病理学改变，验证造模成功。将造模成功大鼠再随机分为模型组 13 只、尿毒清组 12 只、肾衰饮组 12 只。

实验动物造模过程的相关问题

造模目的：	从 Fas/FasL 途径探讨肾衰饮对慢性肾功能衰竭大鼠肾脏细胞凋亡的调控机制
借鉴已有标准实施动物造模：	按照参考文献 Yokozawa 法制作大鼠肾衰模型 ^[5]
动物来源及品系：	SPF 级健康雄性 SD 大鼠，购自辽宁长生生物技术股份有限公司
造模技术描述：	造模组大鼠给予腺嘌呤悬浊液 200 mg/(kg·d) 每日 1 次灌胃 21 d
造模主要诱导用药：	腺嘌呤
动物数量及分组方法：	将 60 只雄性 SD 大鼠随机抽取 12 只为空白组，其余 48 只为造模组，将造模成功大鼠再随机分为模型组 13 只、尿毒清组 12 只、肾衰饮组 12 只
造模成功评价指标：	空白组随机取 2 只，造模组取 6 只进行模型验证。造模组大鼠血清肌酐、尿素氮水平较空白组明显升高，模型组大鼠肾脏行苏木精–伊红染色可见病理学改变，提示造模成功
造模后实验观察指标：	①大鼠血清肌酐、尿素氮水平；②大鼠肾脏病理学改变；③大鼠肾脏细胞凋亡情况；④大鼠肾脏组织内 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3 蛋白表达
造模过程中缺失的动物：	剔除造模不成功的大鼠 5 只
造模后动物处理：	大鼠给药 4 周后，麻醉后采血，并取大鼠双肾，进行相关指标检测
伦理委员会批准：	实验方案经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号为 21000092017044）

1.4.2 分组干预 肾衰饮组大鼠给予肾衰饮煎剂 33.3 g/(kg·d) 灌胃，药液含生药量为 3.36 g/mL；尿毒清组大鼠给予尿毒清颗粒 2.25 g/(kg·d) 灌胃；空白组和模型组予 0.9% 氯化钠注射液 8 mL/kg 灌胃，1 次/d，连续给药 4 周。

1.4.3 标本收集 各组大鼠连续给药 4 周后，用体积分数 10% 的水合氯醛水溶液 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉，仰位固定，剖腹后腹主动脉取血化验肌酐、尿素氮水平。采血后随机选取 6 只大鼠左肾浸泡于 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定，用于检测肾脏组织病理及细胞凋亡，同时将右侧肾脏置于 2 mL 冻存管中，-80 °C 保存，用于 Western blot 检测各蛋白表达水平。

1.4.4 检测各组大鼠血清肌酐、尿素氮水平 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清肌酐、尿素氮水平。

1.4.5 形态学检测 取左侧肾脏组织常规脱水后，浸蜡、包埋，制备 4 μm 切片，烤片 2 h 后，二甲苯脱蜡 2 次，然后梯度乙醇水化，行苏木精–伊红染色，梯度乙醇及二甲苯透明，中性树脂胶封固，数码显微镜下观察病理改变并拍照。

1.4.6 细胞凋亡检测 采用 TUNEL 染色法检测各组大鼠肾组

织中凋亡细胞数。常规制备石蜡切片并脱蜡至水，然后按照 TUNEL 试剂盒中说明书步骤进行。封固后显微镜下观察肾脏细胞凋亡情况，每张图片随机选取互不重叠的 5 个视野并分别计数细胞总数和凋亡细胞数，然后计算凋亡指数（凋亡指数 = 凋亡细胞数 / 细胞总数）。

1.4.7 Western Blot 法检测肾脏组织内 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3 蛋白表达 取各组大鼠冻存的右肾组织，用手术刀切取 100 mg 肾脏组织，剪碎，置于 2 mL 离心管中，并加入 1 mL 含 PMSF 的组织裂解液，高速匀浆机制备匀浆，冰面上裂解 15 min，低温高速离心机 12 000×g 离心 15 min，测定蛋白浓度后，加入 5× 蛋白上样缓冲液，沸水浴 5 min 变性。按照 40 μg/ 孔的上样量进行垂直电泳，湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜，封闭后，一抗（兔抗大鼠 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3 抗体，1 : 400）孵育 PVDF 膜 4 °C 过夜，辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗（1 : 2 000）室温孵育 2 h，洗膜后，将 PVDF 膜置于凝胶成像分析系统中，并滴加 ECL 工作液，采集图像，并以凝胶成像分析系统中自带软件测定各目的蛋白条带灰度值，并以目的蛋白灰度值 / 内参蛋白灰度值的比值作为该蛋白的相对表达水平，进行统计分析。

1.5 主要观察指标 ①大鼠血清肌酐、尿素氮水平；②大鼠肾脏病理学改变；③大鼠肾脏细胞凋亡情况；④大鼠肾脏组织内 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3 蛋白表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行相关数据统计分析，计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间差异性比较用方差分析，当 $P < 0.05$ 时，说明数据差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选取大鼠 60 只，随机分为空白组 12 只、造模组 48 只；造模后随机抽取空白组 2 只和造模组 6 只，进行造模验证。剔除造模不成功的 5 只，将造模成功大鼠随机分为 3 组，给药干预过程中大鼠共死亡 6 只，考虑为灌胃不当引起，共 41 只大鼠进入结果分析。

2.2 各组实验大鼠血清肌酐、尿素氮水平 从图 1 可见：与空白组比较，模型组血清肌酐、尿素氮水平明显升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，尿毒清组和肾衰饮组血清肌酐、尿素氮水平均明显降低 ($P < 0.01$)，差异均有显著性意义；尿毒清组和肾衰饮组相比差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

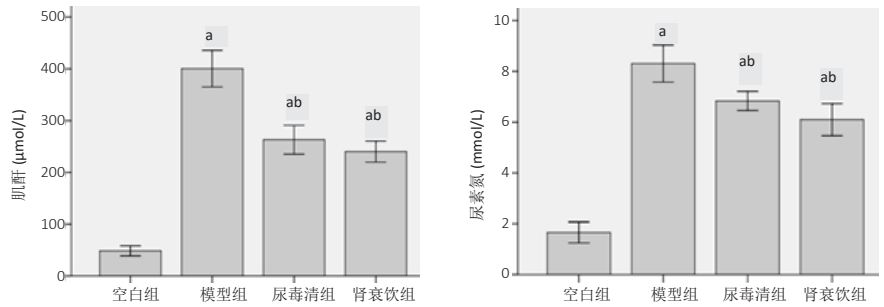
2.3 各组大鼠肾脏病理学改变 苏木精–伊红染色结果：空白组可见肾小球、肾小管、系膜结构正常，间质未见增宽，无炎性细胞浸润；模型组可见肾小球囊腔变大，部分肾小管萎缩，小管的管壁薄厚不匀，肾小管上皮细胞弥漫空泡变性，成纤维细胞增多，系膜细胞增生明显，肾小球周围可见大量炎性细胞浸润；尿毒清组可见肾小管上皮细胞空泡变性减轻，系膜细胞轻度增生，部分区域伴有炎性细胞浸润；肾衰饮组可见成纤维细胞减少，系膜细胞轻度增生，部分区域伴有炎性细胞浸润。肾衰饮组在肾小管上皮细胞空泡变性及系膜细胞增生程度均低于尿毒清组。见图 2。

2.4 TUNEL 染色观察大鼠肾脏细胞凋亡情况 显微镜下观察：空白组大鼠肾脏组织中细胞正常，未见阳性细胞；模型组大鼠肾脏细胞凋亡数量明显增多，且主要分布在皮质区；尿毒清组和肾衰饮组大鼠肾脏细胞凋亡指数较模型组降低 ($P < 0.01$)；尿毒清组和肾衰饮组相比差异无显著性意义。见图 3, 4。

2.5 各组大鼠肾脏组织内 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3 蛋白表达 与空白组相比，模型组大鼠肾脏组织中 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3 蛋白表达水平显著增高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，尿毒清组和肾衰饮组大鼠肾脏组织中 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$)；尿毒清组和肾衰饮组相比差异均无显著性意义。见图 5。

3 讨论 Discussion

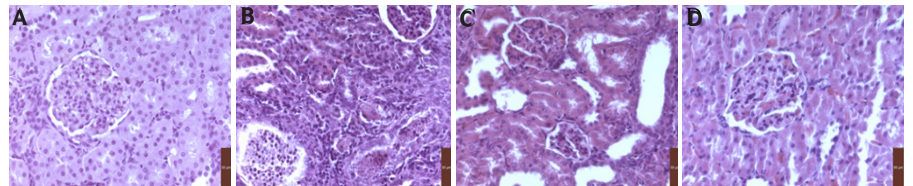
慢性肾功能衰竭是多种原因导致有效肾单位被破坏，引起健存肾单位血流动力学改变、系膜细胞增殖、细胞外基质产生增多、肾小管高代谢（肾脏慢性缺氧、肾脏慢性炎症），多种病理生理过程相互作用、共同发展，肾单位不断损伤，肾功能进行性减退，最终发展为终末期肾功能衰竭^[6]。肾纤维化包括肾小球硬化和肾间质纤维化，而肾小球硬化和肾小管间质损伤是导致慢性肾功能衰竭有效肾单位不断减少、肾功能丧失的主要机制。已经证实肾间质纤维化是肾脏疾病进展到终末期肾功能衰竭的共同病理特征^[7]。细胞凋亡是细胞死亡的一种特殊类型，常被称为生理性或程序性细胞死亡^[8]，是促进器官纤维化的原因之一^[9]，肾脏固有细胞（包括足细胞、系膜细胞、肾小管上皮细胞等）的凋亡诱导了肾纤维化的发生发展^[10]，特别是肾小管细胞凋亡的逐渐增加在慢性肾功能衰竭进展过程中导致了肾小管萎缩和肾纤维化的发生^[11-13]。在急性单侧输尿管梗阻(UUO)^[14-15]、肾缺血再灌注(I/R)损伤和急性肾移植排斥反应中均发生了以肾小管上皮细胞为主的凋亡^[16-18]，分别导致了肾积水、肾小管损伤以及肾小管萎缩，进而导致肾功



图注：与空白组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.01$

图 1 | 各组大鼠血清肌酐、尿素氮水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

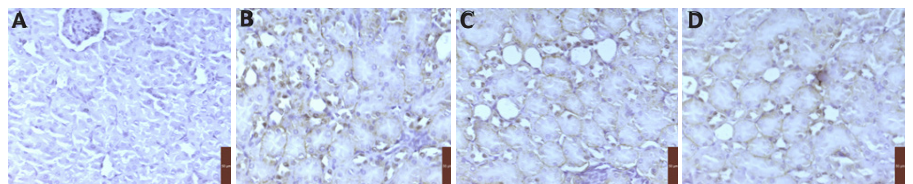
Figure 1 | Levels of serum creatinine and urea nitrogen in rats



图注：A 为空白组；B 为模型组；C 为尿毒清组；D 为肾衰饮组。模型组可见肾小球囊腔变大，部分肾小管萎缩，肾小管上皮细胞弥漫空泡变性，系膜细胞增生明显，肾小球周围可见大量炎性细胞浸润；尿毒清组可见肾小管上皮细胞空泡变性减轻，系膜细胞轻度增生，部分区域伴有炎性细胞浸润；肾衰饮组肾小管上皮细胞空泡变性及系膜细胞增生程度均低于尿毒清组

图 2 | 各组大鼠肾脏组织病理改变 (苏木精-伊红染色, $\times 400$)

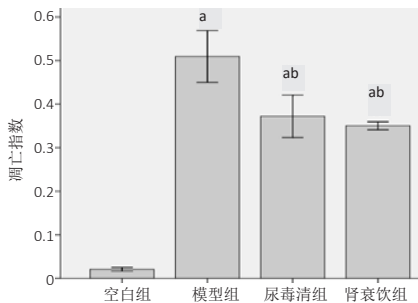
Figure 2 | Pathological changes of rat renal tissue (hematoxylin-eosin staining, $\times 400$)



图注：A 为空白组；B 为模型组；C 为尿毒清组；D 为肾衰饮组。模型组大鼠肾脏细胞凋亡数量明显增多，且主要分布在皮质区；尿毒清组和肾衰饮组大鼠肾脏细胞凋亡指数较模型组降低

图 3 | 各组大鼠肾脏组织 TUNEL 染色 ($\times 400$)

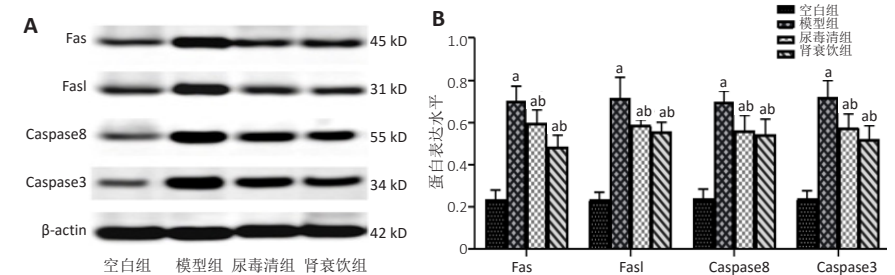
Figure 3 | TUNEL staining of rat renal tissue ($\times 400$)



图注：与空白组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.01$

图 4 | 各组大鼠肾脏细胞凋亡指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Figure 4 | Apoptotic index of rat renal cells



图注：图 A 为 Western Blot 结果；B 为蛋白条带灰度比值统计学分析，与空白组比较，^a $P < 0.01$ ；与模型组比较，^b $P < 0.01$

图 5 | 各组大鼠肾脏组织内 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Figure 5 | Levels of Fas, FasL, Caspase3 and Caspase8 proteins in rat renal tissue

能衰竭的结局。在肾小球肾炎的实验模型和 5/6 肾切除大鼠模型中^[19]，均发现凋亡的肾小球细胞数量随着肾小球硬化的进展而增加，说明肾小球细胞凋亡参与了肾小球硬化的进展。此外，基底膜剥脱和足细胞脱落被证实了与多种肾病综合征(包括局灶性和节段性肾小球硬化、微小病变、肾小球肾炎和糖尿病肾病)有关^[20-23]。凋亡可引起组织的不可逆损伤，结构重塑，已经被证实参与了多种原发和继发性肾病导致的肾纤维化的发生发展过程。此次实验模型组大鼠血清肌酐、尿素氮水平较空白组明显升高，苏木精-伊红染色所见也提示造模成功。TUNEL 染色观察到模型组大鼠肾脏细胞凋亡数量较空白组明显增多，说明慢性肾功能衰竭模型大鼠肾脏细胞凋亡过度。

根据凋亡信号的来源不同可将凋亡信号转导通路主要分为：细胞内(线粒体通路、内质网通路)和细胞外(死亡受体通路)^[24]，这 3 条通路最后都汇集到下游激活凋亡蛋白酶 caspase。活化 caspase 能够切割细胞中 400 多种底物，最终引起重要蛋白质的降解和核酸酶的激活而导致细胞凋亡。参与调控凋亡的主要相关蛋白有 Bcl-2 蛋白家族、Fas/FasL、caspase 家族、p53、热休克蛋白等。作者所在的课题组前期实验已经做过肾衰饮治疗慢性肾功能衰竭有关细胞凋亡方面的研究^[2]，包括肾衰饮可以下调活化转录因子 6(ATF6)(内质网的 II 型跨膜蛋白)、内质网源性转录因子(CHOP)、caspase 3、GRP78(热休克蛋白 70 kD 蛋白家族成员之一)蛋白表达及上调 Bcl-2/Bax 比值，说明肾衰饮可能通过 ATF6/CHOP 途径减轻内质网应激反应，使肾脏细胞凋亡减少，从而达到延缓慢性肾功能衰竭进展的目的。

查阅诸多文献，作者发现在小鼠内毒素血症^[25]、小鼠进行性肾小管萎缩^[12]、小鼠肾脏缺血再灌注和残余肾小球硬化模型中^[26-27]，肾小球和/或肾小管上的 Fas 表达均增加。临床研究也发现增殖性肾小球肾炎患者和肾移植后排斥反应期间肾小管上皮中 Fas 表达也会增加^[28-29]。因此，此次实验从细胞外途径即死亡受体介导(Fas/FasL 介导)的细胞凋亡通路角度探讨肾衰饮干预慢性肾功能衰竭大鼠肾脏细胞凋亡的机制。Fas(CD95 或 Apo1 分子)及其配体 FasL 是细胞凋亡的膜表面分子，是一对促凋亡基因。Fas 为分子质量 45 kD 的跨膜蛋白，由胞外区、跨膜区和胞内区组成，其胞浆区一段 60-70 氨基酸序列的结构域与细胞凋亡信号的传递有关，被称为死亡域^[30]。FasL 是细胞表面的一种 II 型膜蛋白，它主要表达在自然杀伤细胞(NK)、活化的 T 淋巴细胞和部分肿瘤细胞表面。细胞在受到凋亡信号刺激后，促进 FasL 特异性地与 Fas 结合，经死亡域转导死亡信号，将凋亡信号传递给启动因子 caspases(caspase 8 和 9)，使其从非活性的前蛋白酶中被激活，并继续激活执行者 caspases(caspase 3, 6 和 7)，最终诱导细胞凋亡^[31-32]。此次实验结果显示模型组大鼠肾脏组织中 Fas、FasL、Caspase8、Caspase3 蛋白表达水平较空白组显著增高，说明慢性肾功能衰竭大鼠的肾脏组织细胞凋亡过程被启动。

慢性肾功能衰竭根据其不同时期的临床症状可隶属于中医的“水肿”“关格”“癃闭”“溺毒”等范畴。马晓燕教授认为脾肾亏虚，湿浊瘀毒内蕴是慢性肾功能衰竭病机关键，脾肾亏虚是该病发生发展的内在依据，亦为湿毒、痰毒、瘀毒化生之根源，久病邪深伏又是加重病情恶化的重要因素。“久病入络”“因虚致瘀”“瘀毒”贯穿该病之始终，亦为其顽恶难治之关键，属本虚标实，虚实夹杂之证。肾衰饮方药贯穿了“解毒、排毒、抗毒”的治疗思想。“解毒”即化湿祛瘀，方中运用砂仁、白术、茯苓、半夏健脾化痰，运用茯苓、藿香健脾祛湿，运用鳖甲、丹参、莪术、水蛭活血化瘀，祛湿邪、化痰饮、化瘀血，使毒无所依附以解毒；“排毒”即驱毒邪外出，方中运用大黄通腑泻浊使邪有出路；“抗毒”即扶正，方中运用黄芪、太子参、菟丝子益气健脾补肾，扶助正气，以助毒外出；标本同治，补泻兼施。经临床观察发现肾衰饮用于治疗慢性肾功能衰竭早、中期阶段疗效确切^[33]。尿毒清颗粒在临床上用于慢性肾功能衰竭(脾虚湿浊症和脾虚血瘀症)，经多年临床研究均已证实其治疗慢性肾病的可行性，因此选用此药作为此次实验的阳性对照药物。此次实验通过肾衰饮干预后慢性肾功能衰竭大鼠血清肌酐、尿素氮水平较模型组明显降低，说明肾衰饮在改善肾脏功能有显著疗效，并且作用与尿毒清颗粒等同。肾衰饮干预后慢性肾功能衰竭大鼠肾脏组织中 Fas、FasL、Caspase 8、Caspase 3 蛋白表达水平明显降低，说明肾衰饮可以通过降低肾脏细胞凋亡，其作用与尿毒清颗粒一致。肾衰饮干预后慢性肾功能衰竭大鼠肾脏组织中 Fas、FasL 蛋白表达水平的降低与 Caspase8、Caspase3 蛋白水平的降低是同向的，因此，可以推测肾衰饮可能参与 Fas/FasL 介导的肾脏细胞凋亡途径来抑制细胞凋亡。

此次实验研究证实，肾衰饮通过下调 Caspase 8、Caspase 3 蛋白表达水平，对肾脏细胞凋亡起到抑制作用，改善肾脏功能，其机制可能与 Fas/FasL 介导的凋亡途径相关，其具体作用机制仍需更进一步的研究。

作者贡献：实验设计为张亮、马晓燕、王佳虹，实施为张亮、王佳虹，评估为马晓燕、王佳虹，文章审校为马晓燕、王佳虹。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金项目(81803769)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号为 21000092017044)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：该文统计学方法已经辽宁中医药大学统计学专家审核。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 葛均波.“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材·内科学[M].北京：人民卫生出版社，2013.
- [2] 刘焯，马晓燕.肾衰饮对慢性肾功能衰竭大鼠 ATF6/CHOP 通路的作用研究[J].中国中医急症,2017,26(5):768-770,796.
- [3] 贺丽蓉，邵晓珊，李宇红，等.Fas/FasL 在原发性肾小球疾病患儿肾组织中的表达[J].贵州医药,2015,39(3):210-213.
- [4] 程丽静，谌贻璞.实验性肾间质纤维化大鼠模型中 Fas 表达与细胞凋亡[J].中华肾脏病杂志,1999,15(6):340-342.
- [5] YOKOZAWA T, ZHENG PD, OURA H, et al.Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rat. *Nephron*. 1986;44(3):230-234.
- [6] 王建枝，殷莲华.病理生理学[M].8版.北京：人民卫生出版社,2013.
- [7] WOUTERS OJ, O'DONOGHUE DJ, RITCHIE J, et al. Early chronic kidney disease: diagnosis, management and models of care. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(8):491-502.
- [8] WYLLIE AH. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer*. 1993;67(2):205-208.
- [9] PORTILLA D. Apoptosis, fibrosis and senescence. *Nephron Clin Pract*. 2014;127(1-4):65-69.
- [10] TANAKA T. A mechanistic link between renal ischemia and fibrosis. *Mol Morphol*. 2017;50(1):1-8.
- [11] THOMAS GL, YANG B, WAGNER BE, et al. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial. Transplant*. 1998;13:2216-2226.
- [12] SCHELLING JR, NKEMERE N, KOPP JB, et al. Fas-dependent fratricidal apoptosis is a mechanism of tubular epithelial cell deletion in chronic renal failure. *Lab Invest*. 1998;78(7):813-824.
- [13] KHAN S, CLEVELAND RP, KOCH CJ, et al. Hypoxia induces renal tubular epithelial cell apoptosis in chronic renal disease. *Lab Invest*. 1999;79:1089-1099.
- [14] TURAN T, TUNCAY OL, USUBÜTÜN A, et al. Renal tubular apoptosis after partial ureteral obstruction. *J Urol*. 1994;152(2 Pt 2):658-664.
- [15] NILSSON L, MADSEN K, KRAG S, et al. Disruption of cyclooxygenase type 2 exacerbates apoptosis and renal damage during obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;309(12):F1035-F1048
- [16] HAVASI A, BORKAN SC. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int*. 2011;80(1):29-40.
- [17] SCHUMER M, COLOMBEL MC, SAWCZUK IS, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol*. 1992;140(4):831-838.
- [18] BONEGIO R, LIEBERTHAL W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11:301-308.
- [19] SUGIYAMA H, KASHIHARA N, MAKINO H, et al. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int*. 1996;49:103-111.
- [20] COHEN AH, MAMPASO F, ZAMBONI L. Glomerular podocyte degeneration in human renal disease. *Lab Invest*. 1977;37(1):30-42.
- [21] SUSZTAK K, RAFF AC, SCHIFFER M, et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2006;55(1):225-233.
- [22] THARAUX PL, HUBER TB. How Many Ways Can a Podocyte Die? *Semin Nephrol*. 2012;32(4):394-404.
- [23] BURLAKA I, NILSSON LM, SCOTT L, et al. Prevention of apoptosis averts glomerular tubular disconnection and podocyte loss in proteinuric. *Kidney Int*. 2016;90(1):135-148.
- [24] STELLER H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 1995; 267(5203):1445-1449.
- [25] ORTIZ-ARDUAN A, DANOFF TM, KALLURI R, et al. Regulation of Fas and Fas ligand expression in cultured murine renal cells and in the kidney during endotoxemia. *Am J Physiol*. 1996;271(6 Pt 2):F1193-1201.
- [26] ZHU Y, YIN X, LI J, et al. Overexpression of microRNA-204-5p alleviates renal ischemia-reperfusion injury in mice through blockage of Fas/FasL pathway. *Exp Cell Res*. 2019;381(2):208-214.
- [27] HATTORI T, SHINDO S, KAWAMURA H. Apoptosis and expression of Bax protein and Fas antigen in glomeruli of a remnant-kidney model. *Nephron*. 1998;79:186-191.
- [28] TAKEMURA T, MURAKAMI K, MIYAZATO H, et al. Expression of Fas antigen and Bcl-2 in human glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1995;48: 1886-1892
- [29] AKASAKA Y, ISHIKAWA Y, KATO S, et al. Induction of Fas-mediated apoptosis in a human renal epithelial cell line by interferon-gamma: involvement of Fas-mediated apoptosis in acute renal rejection. *Mod Pathol*. 1998;11:1107-1114.
- [30] BARNHART BC, ALAPPRT EC, PETER ME. The CD95 Type I/Type II model. *Semin Immunol*. 2009;15(3):185-193.
- [31] ROY U. Structural characterizations of the Fas receptor and the Fas-associated protein with death domain interactions. *Protein J*. 2016;35(1):51-60.
- [32] CHO HM, SUN W. Control of mitochondrial dynamics by Fas induced caspase-8 activation in hippocampal neurons. *Exp Neurobiol*. 2015; 24(3):219-225.
- [33] 张功. 马晓燕教授运用肾衰饮加减治疗慢性肾脏病 2-4 期临床疗效观察[D]. 沈阳：辽宁中医药大学,2018.

(责任编辑：WZH, ZN, TXY)