

四君子汤对慢性肾脏病-蛋白质能量消耗模型小鼠的改善作用及机制研究[△]

许 焯*,李志明,远 方[#](辽宁中医药大学附属医院肾内科,沈阳 110032)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)19-2358-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.19.10

摘要 目的:研究四君子汤对慢性肾脏病-蛋白质能量消耗(CKD-PEW)模型小鼠骨骼肌萎缩的改善作用,并探讨其可能的作用机制。方法:将80只小鼠随机分为假手术组($n=10$)和造模组($n=70$)。造模组小鼠采用切除5/6肾联合低蛋白(4%酪蛋白)饮食法建立CKD-PEW模型。将造模成功的50只小鼠随机分为模型组,四君子汤低、中、高剂量组[2.34、4.68、9.36 g/(kg·d),以生药量计]和复方 α -酮酸片组[阳性对照,1 g/(kg·d)],每组10只。各给药组小鼠灌胃相应药物,假手术组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续灌胃14 d。末次给药后,称定小鼠体质量、左侧胫骨前肌(TA)湿质量,并测定TA横截面积;检测小鼠TA蛋白合成与分解代谢情况;采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法检测小鼠TA中B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)及胱天蛋白酶3(Caspase-3) mRNA表达水平;采用Western blotting法检测小鼠TA中肌萎缩蛋白Fbox-1(Atrogin-1)、肌环指蛋白1(MuRF-1)、Rho相关蛋白激酶1(ROCK1)、磷酸化肿瘤抑制基因(p-PTEN)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)及磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)蛋白的表达水平。结果:与假手术组比较,模型组小鼠的体质量、TA湿质量、TA蛋白合成代谢能力以及PI3K、p-Akt蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),TA横截面积显著减小($P<0.05$),TA蛋白分解代谢能力、Bax/Bcl-2比值、Caspase-3 mRNA表达水平和Atrogin-1、MuRF-1、ROCK1、p-PTEN蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠上述指标均显著改善($P<0.05$)。结论:四君子汤能够增加CKD-PEW模型小鼠体质量,抑制其骨骼肌萎缩;其机制可能与调控ROCK1/PTEN/Akt信号通路,抑制Atrogin-1和MuRF-1表达有关。

关键词 四君子汤;慢性肾脏病;蛋白质能量消耗;Rho相关蛋白激酶1;磷酸化肿瘤抑制基因;磷脂酰肌醇-3-激酶;蛋白激酶B;小鼠

Study on the Improvement Effects of Sijunzi Decoction on Chronic Kidney Disease-protein Energy Wasting Model Mice and Its Mechanism

XU Ye, LI Zhiming, YUAN Fang (Dept. of Nephrology, the Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effects of Sijunzi decoction on skeletal muscle atrophy in chronic kidney disease-protein energy wasting (CKD-PEW) model mice, and to explore its potential mechanism. METHODS: A total of 80 mice were randomly divided into sham operation group ($n=10$) and modeling group ($n=70$). CKD-PEW model was established by removing 5/6 kidneys and giving a low-protein diet (4% casein) for mice in modeling group. Totally 50 modeled mice were randomly divided into model group, Sijunzi decoction low-dose, medium-dose and high-dose groups [2.34, 4.68, 9.36 g/(kg·d), by crude drug], Compound α -ketoacid tablets group [positive control, 1 g/(kg·d)], with 10 mice in each group. Administration groups were given relevant medicine intragastrically; sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 14 d. After last medication, body weight of mice and wet mass of left tibialis

[25] OWEN JL, ZHANG Y, BAE SH, et al. Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70S6-kinase[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, 109(40):16184-16189.

[26] SHI J, LI R, LIU Y, et al. Shuangyu tiaozhi granule atten-

uates hypercholesterolemia through the reduction of cholesterol synthesis in rat fed a high cholesterol diet[J]. *Biomed Res Int*, 2019. DOI:10.1155/2019/4805926.

[27] ZHU J, JIN J, DING J, et al. Ganoderic acid A improves high fat diet-induced obesity, lipid accumulation and insulin sensitivity through regulating SREBP pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.05.014.

(收稿日期:2019-12-26 修回日期:2020-05-17)

(编辑:张元媛)

[△] 基金项目:辽宁省科学技术计划项目(No.20170540607)

* 主治医师,硕士。研究方向:慢性肾脏疾病的中医药治疗。电话:024-31207298。E-mail:yeats13@163.com

[#] 通信作者:主任医师。研究方向:慢性肾脏疾病的中医药理论及基础。电话:024-31207028。E-mail:18102456268@163.com

anterior muscle (TA) were weighed; TA cross-sectional area was determined; protein synthesis and decomposition metabolism ability of TA were detected; mRNA expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in TA were detected by Real-time PCR; protein expressions of muscular dystrophin Fbox-1 (Atrogin-1), myofloin-1 (MuRF-1), Rho-related protein kinase 1 (ROCK1), phosphorylated PTEN (p-PTEN), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and phosphorylated Akt (p-Akt) in TA were detected by Western blotting. RESULTS: Compared with the sham operation group, the body weight, TA wet weight, protein synthesis metabolism ability of TA as well as protein expressions of PI3K and p-Akt were decreased significantly in model group ($P < 0.05$); the cross-sectional area of TA decreased significantly ($P < 0.05$); protein decomposition metabolism ability of TA, Bax/Bcl-2 ratio, Caspase-3 mRNA expression, protein expressions of Atrogin-1, MuRF-1, ROCK1 and p-PTEN were increased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, above indexes of mice were all improved significantly in Sijunzi decoction medium-dose, high-dose groups and Compound α -ketoacid tablets group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Sijunzi decoction can increase the body weight of CKD-PEW model mice and alleviate the skeletal atrophy; the mechanism may be related to regulating ROCK1/PTEN/Akt signaling pathway activity, inhibiting the expression of Atrogin-1 and MuRF-1.

KEYWORDS Sijunzi decoction; Chronic kidney disease; Protein energy wasting; Rho-related protein kinase 1; PTEN; Phosphatidylinositol-3-kinase; Akt; Mice

慢性肾脏病(Chronic kidney disease, CKD)是一个严重的公共健康问题,其发病率逐年增高,且有年轻化的趋势^[1]。CKD常伴有多种代谢性紊乱,其中将近50%的患者会出现营养不良,导致蛋白质能量消耗(Protein energy wasting, PEW),主要表现为肌肉萎缩、体质量下降、血清白蛋白水平降低等,这不仅影响了患者的生存质量、降低了其治疗耐受性,而且还是造成CKD患者死亡的主要诱因之一^[2]。中医学认为,CKD归属“水肿”“慢肾风”“尿血”“腰痛”等范畴,病机主要与脾、肾、肺有关^[3]。有研究认为,CKD以脾、肾亏虚为主,脾虚导致阳气不升、谷气下流,因此CKD的中医治疗多以健脾为主^[4]。

四君子汤是益气健脾的代表方剂,出自《太平惠民和剂局方》,由人参、茯苓、白术和甘草4味中药组成。本课题组前期将四君子汤应用于脾肾两虚型CKD患者的治疗,发现其可明显改善CKD患者PEW状态^[5],但是其作用机制尚未阐明。近年来的研究发现,Rho相关蛋白激酶1(ROCK1)/人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)/蛋白激酶B(Akt)信号通路具有调节CKD-PEW模型骨骼肌发育与蛋白质代谢的能力,其主要组成蛋白ROCK1、PTEN、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)及Akt的活性变化对CKD-PEW疾病进展具有重要影响,是CKD患者PEW状态的潜在干预靶点^[6-7]。鉴于此,本课题组拟通过研究四君子汤对CKD-PEW模型小鼠骨骼肌ROCK1/PTEN/Akt信号通路及其下游蛋白的影响,探讨其改善CKD相关PEW的可能作用机制,为四君子汤用于CKD-PEW患者的治疗提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Triathler型液体闪烁及发光测定仪(京乐自然基因生命科学有限公司);Ti-S型荧光倒置显微镜(日本Nikon公司);RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司);7500型实时荧光定量-聚合酶链式反应(PCR)仪(美国

ABI公司);Mini-Sub Cell GT Cell型电泳仪和转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

四君子汤(由辽宁中医药大学附属医院药剂科提供,批号:201801014,规格:每1 mL含生药量为0.5 g);复方 α -酮酸片(北京费森尤斯卡比医药有限公司,批号:U1430,规格:0.63 g/片);酪蛋白(广东捷倍斯生物科技公司,批号:201803214);Masson染色试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司,批号:20190623);B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)、 β -肌动蛋白(β -actin)引物购于上海生工生物技术有限公司;HiFiScript cDNA第一链合成试剂盒、Ultra-SYBR Mix(北京康为世纪生物技术有限公司,批号:201712135-01、201801012-03);兔源肌萎缩蛋白Fbox-1(Atrogin-1)、肌环指蛋白1(MuRF-1)、ROCK1、PTEN、磷酸化PTEN(p-PTEN)、PI3K、Akt、磷酸化Akt(p-Akt)、 β -actin抗体(美国CST公司,批号:CST4041T、CST6367T、CST4035T、CST9188S、CST9551S、CST4249S、CST582-95S、CST9614S、CST4970S);总蛋白提取试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(北京碧云天生物技术有限公司,批号:121017200621、0106201700628);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:2018001005);酪氨酸标准品(美国Sigma公司,批号:209-113-1,纯度:99%);¹⁴C-苯丙氨酸(中国原子能科学研究院);其他试剂均为国产分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级C57BL/6雌性小鼠80只,6~8周龄,体质量18~20 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[生产许可证号:SCXK(湘)2016-0002]。小鼠饲养于辽宁中医药大学实验动物中心实验室[恒温(22±4)℃、恒湿(60±5)%、明暗时间各12 h],自由饮食。本研究实验方

案得到了辽宁中医药大学实验动物福利伦理委员会批准。

2 方法

2.1 造模

采用切除5/6肾联合低蛋白饮食法建立CKD-PEW模型。利用3.5%水合氯醛麻醉小鼠后,将其背部左侧毛发剃除,用碘伏进行消毒处理。用干净纱布将剃毛处四周遮住,露出手术区域,并用剪刀剪开一个小口,逐层剥离,暴露肾脏,挤出左侧肾脏并剥离肾脏两极组织,分离肾蒂周围及结缔组织,完全游离左肾;从上至肾门约0.4 cm、下至肾门约0.4 cm预置缝合线,勒紧缝合线并切除两极肾脏组织;7 d后暴露右侧肾脏,止血钳夹紧肾门处并紧靠血管夹下方放置缝合线,在血管夹上方切除肾脏,缝合并消毒手术切口,以复制CKD模型。假手术组小鼠同期进行手术,仅剥离肾包膜,不切除肾组织。术后,用棉签压迫止血,缝合伤口并涂上碘伏消毒,将小鼠放入鼠笼饲养。手术1周后对CKD造模小鼠分别给予4%酪蛋白饮食饲养至实验结束,以建立CKD-PEW模型;假手术组给予正常饮食。通过比较各组小鼠体质量、肌酐、尿素氮、白蛋白及24 h尿蛋白水平判断模型制备是否成功^[8]。

2.2 分组与给药

将80只小鼠分为假手术组($n=10$)和造模组($n=70$),分别按照“2.1”项下方法进行假手术或者CKD-PEW造模。将造模成功的50只小鼠随机分为模型组,四君子汤低、中、高剂量组[2.34、4.68、9.36 g/(kg·d)],以生药量计;根据成人(60 kg)临床等效剂量的1、2、4倍换算]和复方 α -酮酸片组[阳性对照,1 g/(kg·d);根据成人(60 kg)临床等效剂量换算],每组10只。小鼠灌胃给药,每天给药1次,连续给药14 d;假手术组和模型组小鼠同法灌胃等体积生理盐水。

2.3 样本采集及处理

在末次给药1 h后,称定小鼠体质量;然后利用3.5%水合氯醛麻醉小鼠后,剪开小鼠皮肤,迅速分离出完整的左侧胫骨前肌(Tibialis anterior, TA),称量并记录TA湿质量。将一半TA样本量($n=5$)用4%多聚甲醛固定,用于测量TA横截面积。另一半TA样本量($n=5$)取部分新鲜组织立即用于蛋白合成和分解代谢检测;剩余组织置于 -80 °C冰箱中保存,用于凋亡相关基因mRNA表达和Atrogin-1、MuRF-1及ROCK1/PTEN/Akt信号通路相关蛋白表达的检测。

2.4 TA横截面积测定

取出4%多聚甲醛固定的TA,流水冲洗数小时后,分别经70%、80%、90%、100%乙醇脱水,二甲苯I、II各透明15 min,再放入石蜡I、II、III中分别浸蜡60 min,并进行连续切片(5 μ m)。切片脱蜡水化,Weigert

铁苏木素染色液染色5~10 min,酸性乙醇分化5~15 s,流水洗3 min;Masson 蓝化液返蓝3~5 min,流水洗3 min;水洗1 min,丽春红酸性品红染色液染色5~10 min;弱酸工作液洗1 min,磷酸酸溶液洗1~2 min,弱酸工作液洗1 min,放入苯胺蓝染色液中染色1~2 min;弱酸工作液洗1 min,95%乙醇快速脱水,无水乙醇分别脱水10 s \times 3次,二甲苯透明5 min \times 3次,中性树胶封片。将切片置于倒置显微镜下观察,并利用Image pro plus 6.0软件计算TA横截面积。

2.5 TA蛋白合成代谢能力检测

将新鲜的TA置于DMEM培养基(5 mL)中,37 °C下充氧孵育30 min,然后在含放射性同位素 14 C-苯丙氨酸的DMEM培养基中继续孵育1 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗5 min \times 3次,随后制备50% TA匀浆液,加入10%三氯乙酸(TCA)沉淀蛋白质;吸弃上清,加入0.5 mol/L NaOH溶液溶解沉淀的蛋白。取1.8 mL该蛋白溶液加入闪烁液进行液闪计数,取0.2 mL该蛋白溶液利用BCA试剂盒进行蛋白浓度检测,检测单位时间内(1 h)掺入的 14 C-苯丙氨酸的放射性含量,分析蛋白合成代谢能力^[8]。

2.6 TA蛋白分解代谢能力检测

将新鲜的TA置于KRB缓冲液中,37 °C下充氧孵育2 h,取该孵育液用10% TCA沉淀,取上清0.5 mL与1.0 mL 5% TCA混合均匀,依次加入0.75 mL硝酸、0.75 mL 一氧化二氮,混合均匀,55 °C下孵育30 min;随后加入2 mL 双氯乙烷萃取,吸取上清液200 μ L至96孔板中,利用酶标仪在450 nm波长处读取吸光度值,根据前期绘制的标准曲线[以不同浓度(0~1 nmol/L)酪氨酸为横坐标,吸光度值为纵坐标],计算TA蛋白分解代谢能力^[8]。

2.7 TA中凋亡相关基因mRNA表达检测

采用实时荧光定量-PCR法检测TA中Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA表达水平。采用Trizol法提取小鼠TA中总RNA,根据逆转录试剂盒说明书操作合成cDNA,然后以cDNA为模板采用两步法进行PCR扩增。反应体系(共20 μ L):cDNA 2 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各0.4 μ L,2 \times Top Green qPCR SuperMix 10 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。反应条件:95 °C预变性5 min;95 °C变性10 s,55 °C退火30 s,共40个循环。以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法测定目的基因mRNA的表达水平(式中Ct表示目标扩增产物达到设定阈值所经历的循环数),并计算Bax、Bcl-2 mRNA表达水平的比值(Bax/Bcl-2)。引物序列及扩增产物长度见表1。

2.8 TA中Atrogin-1、MuRF-1及ROCK1/PTEN/Akt信号通路相关蛋白表达的检测

采用Western blotting法进行检测。利用总蛋白提取试剂盒提取小鼠TA中总蛋白,根据BCA试剂盒测定

表1 引物序列及扩增产物长度

Tab 1 Primary sequence and amplified product length

基因名称		序列	扩增产物长度, bp
Bax	上游	5'-CTGACATGTTTTCTGACGGC-3'	189
	下游	5'-TCAGCCCATCTTCTCCAGA-3'	
Bcl-2	上游	5'-CGCTGGGAGAACAGGGTA-3'	151
	下游	5'-GGGCTGGGAGGAGAAGAT-3'	
Caspase-3	上游	5'-AGATACCGGTGGAGGCTGACT-3'	159
	下游	5'-TCTTCGTGAGCATGGACACA-3'	
β -actin	上游	5'-TGATGGGTGAACCACGAG-3'	126
	下游	5'-GCCCTTCCACAATGCCAAAG-3'	

蛋白浓度。加入蛋白上样缓冲液,进行蛋白变性,然后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳(100 V、1.5 h),湿法转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上(250 mA、90 min);TBST缓冲液洗膜5 min×3次,5%脱脂牛奶封闭1 h;分别加入Atrogin-1、MuRF-1、ROCK1、PTEN、p-PTEN、PI3K、Akt、p-Akt及 β -actin一抗(稀释度均为1:1 000),4℃孵育过夜;次日,TBST缓冲液洗膜5 min×3次,加入二抗(稀释度为1:1 000),室温孵育1 h;经ECL化学发光显色后,使用凝胶成像系统采集图像。采用Image J 1.8.0软件对图像光密度进行分析,以目的蛋白条带与内参 β -actin条带的光密度比值表示目的蛋白的相对表达水平,以p-PTEN/PTEN、p-Akt/Akt的光密度比值表示PTEN、Akt蛋白的磷酸化水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠体质量和TA湿质量测定结果

与假手术组比较,模型组小鼠体质量、TA湿质量显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠体质量、TA湿质量均显著升高($P < 0.05$),且均显著高于四君子汤低剂量组($P < 0.05$);四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组之间小鼠体质量、TA湿质量差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组小鼠体质量、TA湿质量测定结果见表2。

3.2 小鼠TA横截面积测定结果

与假手术组比较,模型组小鼠TA明显萎缩,肌纤维变细,横截面积显著减小($P < 0.05$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠TA肌纤维变粗,横截面积显著增大($P < 0.05$),且四君子汤高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠TA横截面积显著大于四君子汤低剂量组($P < 0.05$);四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组之间小鼠TA横截面积差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组小鼠的TA横截面显微图见图1,横截面积测定结果见表3。

表2 各组小鼠体质量、TA湿质量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Body weight and TA wet weight of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体质量, g	TA湿质量, mg
假手术组	22.81 ± 2.05	57.52 ± 7.13
模型组	16.98 ± 2.42*	35.97 ± 5.21 [#]
四君子汤低剂量组	17.39 ± 1.16	38.85 ± 3.52
四君子汤中剂量组	19.92 ± 2.09 ^Δ	43.09 ± 4.36 ^Δ
四君子汤高剂量组	21.06 ± 1.04 ^Δ	44.76 ± 6.07 ^Δ
复方 α -酮酸片组	21.36 ± 2.51 ^Δ	46.75 ± 7.30 ^Δ

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与四君子汤低剂量组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. Sijunzi decoction low-dose group, ^Δ $P < 0.05$

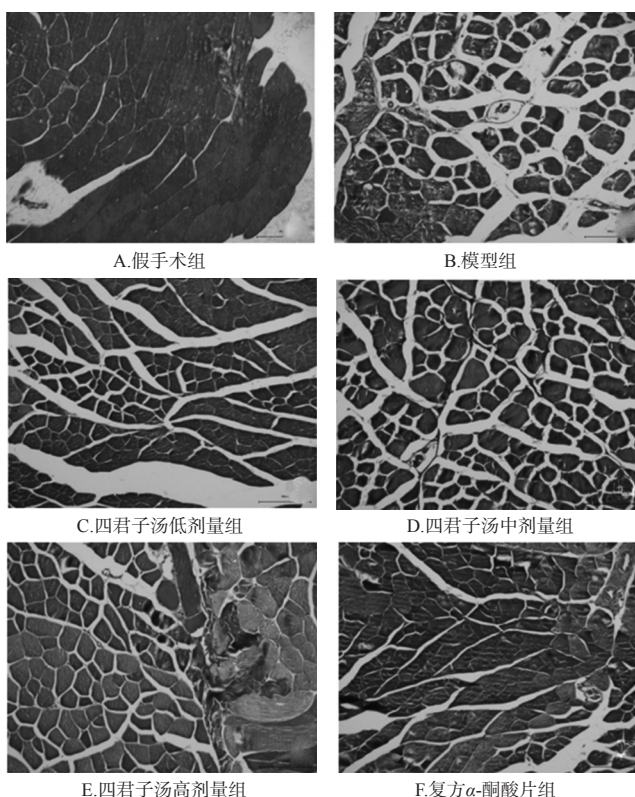


图1 各组小鼠TA横截面显微图(×200)

Fig 1 Micrographs of TA cross-sectional area of mice in each group(×200)

3.3 小鼠TA蛋白合成与分解代谢能力测定结果

与假手术组比较,模型组小鼠TA单位时间内蛋白质合成代谢能力显著减弱、分解代谢能力显著增强($P < 0.05$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠TA单位时间内蛋白质合成代谢能力显著增强、分解代谢显著减弱($P < 0.05$);与四君子汤低剂量组比较,四君子汤高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠单位时间内蛋白质合成代谢能力显著增强、分解代谢显著减弱($P < 0.05$);四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组之间小鼠TA单位时间内蛋白质合成与分解代谢能力差异均

无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠单位时间内蛋白合成与分解代谢能力测定结果见表4。

表3 各组小鼠TA横截面积测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)
Tab 3 TA cross-sectional area of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	TA横截面积, μm^2
假手术组	376.72 ± 59.91
模型组	186.37 ± 45.18*
四君子汤低剂量组	202.61 ± 64.66
四君子汤中剂量组	275.98 ± 74.14 ^Δ
四君子汤高剂量组	288.51 ± 49.02 ^Δ
复方 α -酮酸片组	315.65 ± 43.63 ^Δ

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,^Δ $P<0.05$;与四君子汤低剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, * $P<0.05$; vs. Sijunzi decoction low-dose group, ^Δ $P<0.05$

表4 各组小鼠单位时间内TA蛋白合成与分解代谢能力测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 4 Protein synthesis and decomposition metabolism ability of TA in unit time of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	蛋白合成代谢能力, pmol/mg	蛋白分解代谢能力, pmol/mg
假手术组	94.39 ± 5.27	126.57 ± 18.69
模型组	40.61 ± 8.43*	254.85 ± 26.61*
四君子汤低剂量组	46.78 ± 7.92	239.62 ± 38.22
四君子汤中剂量组	54.60 ± 5.07 ^Δ	206.67 ± 18.33 ^Δ
四君子汤高剂量组	62.72 ± 9.63 ^Δ	186.58 ± 19.05 ^Δ
复方 α -酮酸片组	69.03 ± 7.55 ^Δ	195.64 ± 31.27 ^Δ

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与四君子汤低剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, * $P<0.05$; vs. Sijunzi decoction low-dose group, ^Δ $P<0.05$

3.4 小鼠TA中凋亡相关基因mRNA表达水平测定结果

与假手术组比较,模型组小鼠TA中Bax/Bcl-2比值和Caspase-3 mRNA表达水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠TA中Bax/Bcl-2比值和Caspase-3 mRNA表达水平显著降低($P<0.05$);与四君子汤低剂量组比较,四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠TA中Bax/Bcl-2比值和Caspase-3 mRNA表达水平显著降低($P<0.05$);四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组之间小鼠TA中Bax/Bcl-2比值和Caspase-3 mRNA表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠TA中Bax/Bcl-2比值和Caspase-3 mRNA表达水平测定结果见表5。

3.5 小鼠TA中Atrogin-1、MuRF-1蛋白表达水平测定结果

与假手术组比较,模型组小鼠TA中Atrogin-1、MuRF-1蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠TA中

表5 各组小鼠TA中Bax/Bcl-2比值和Caspase-3 mRNA表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 5 Bax/Bcl-2 ratio and mRNA expression of Caspase-3 in TA of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	Bax/Bcl-2	Caspase-3
假手术组	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.15
模型组	2.43 ± 0.14*	2.04 ± 0.13*
四君子汤低剂量组	2.45 ± 0.17	1.94 ± 0.21
四君子汤中剂量组	2.02 ± 0.13 ^Δ	1.55 ± 0.09 ^Δ
四君子汤高剂量组	2.15 ± 0.17 ^Δ	1.68 ± 0.10 ^Δ
复方 α -酮酸片组	1.74 ± 0.11 ^Δ	1.64 ± 0.06 ^Δ

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与四君子汤低剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, * $P<0.05$; vs. Sijunzi decoction low-dose group, ^Δ $P<0.05$

Atrogin-1、MuRF-1蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与四君子汤低剂量组比较,四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠TA中Atrogin-1、MuRF-1蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组之间小鼠TA中Atrogin-1、MuRF-1蛋白表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠TA中Atrogin-1、MuRF-1蛋白表达电泳图见图2,蛋白表达水平测定结果见表6。

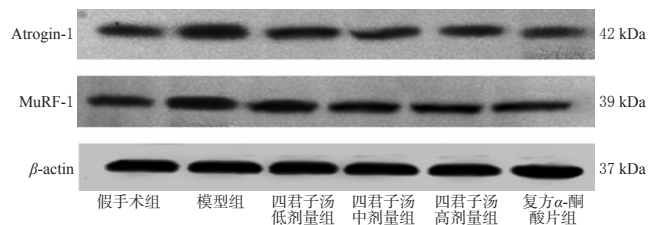


图2 各组小鼠TA中Atrogin-1、MuRF-1蛋白表达电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of protein expression of Atrogin-1 and MuRF-1 in TA of mice in each group

表6 各组小鼠TA中Atrogin-1、MuRF-1蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 6 Protein expressions of Atrogin-1 and MuRF-1 in TA of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	Atrogin-1	MuRF-1
假手术组	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.13
模型组	2.16 ± 0.18*	2.26 ± 0.12*
四君子汤低剂量组	1.97 ± 0.15	2.02 ± 0.17
四君子汤中剂量组	1.68 ± 0.13 ^Δ	1.74 ± 0.19 ^Δ
四君子汤高剂量组	1.73 ± 0.10 ^Δ	1.67 ± 0.11 ^Δ
复方 α -酮酸片组	1.58 ± 0.15 ^Δ	1.71 ± 0.08 ^Δ

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与四君子汤低剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, * $P<0.05$; vs. Sijunzi decoction low-dose group, ^Δ $P<0.05$

3.6 小鼠TA中ROCK1/PTEN/Akt信号通路相关蛋白表达水平测定结果

与假手术组比较,模型组小鼠TA中ROCK1蛋白表达水平、p-PTEN/PTEN比值显著升高($P<0.05$),PI3K蛋白表达水平、p-Akt/Akt比值显著降低($P<0.05$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠TA中ROCK1蛋白表达水平、p-PTEN/PTEN比值显著降低($P<0.05$),PI3K蛋白表达水平、p-Akt/Akt比值显著升高($P<0.05$);与四君子汤低剂量组比较,四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组小鼠TA中ROCK1蛋白表达水平、p-PTEN/PTEN比值显著降低($P<0.05$),PI3K蛋白表达水平、p-Akt/Akt比值显著升高($P<0.05$);四君子汤中、高剂量组和复方 α -酮酸片组之间小鼠TA中上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠TA中ROCK1/PTEN/Akt信号通路相关蛋白表达电泳图见图3,蛋白表达水平测定结果见表7。

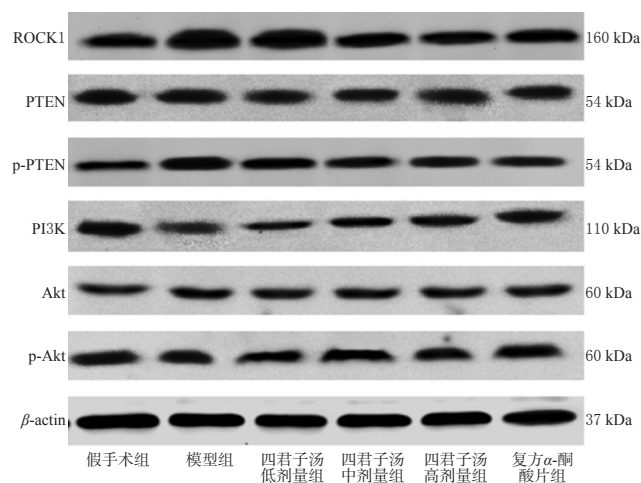


图3 各组小鼠TA中ROCK1/PTEN/Akt信号通路相关蛋白表达电泳图

Fig 3 Electrophoretograms of ROCK1/PTEN/Akt signaling pathway-related proteins expression in TA of mice in each group

表7 各组小鼠TA中ROCK1/PTEN/Akt信号通路相关蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 7 Protein expressions of ROCK1/PTEN/Akt signaling pathway-related proteins in TA of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	ROCK1/ β -actin	p-PTEN/PTEN	PI3K/ β -actin	p-Akt/Akt
假手术组	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.09
模型组	2.35 \pm 0.21*	1.98 \pm 0.15*	0.38 \pm 0.09 [△]	0.36 \pm 0.07 [△]
四君子汤低剂量组	2.19 \pm 0.18	2.05 \pm 0.28	0.46 \pm 0.09	0.37 \pm 0.13
四君子汤中剂量组	1.69 \pm 0.21 [△]	1.58 \pm 0.09 [△]	0.62 \pm 0.04 [△]	0.64 \pm 0.09 [△]
四君子汤高剂量组	1.79 \pm 0.16 [△]	1.57 \pm 0.16 [△]	0.80 \pm 0.12 [△]	0.57 \pm 0.06 [△]
复方 α -酮酸片组	1.44 \pm 0.12 [△]	1.46 \pm 0.07 [△]	0.77 \pm 0.10 [△]	0.71 \pm 0.13 [△]

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$;与四君子汤低剂量组比较,[△] $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, [△] $P<0.05$; vs. Sijunzi decoction low-dose group, [△] $P<0.05$

4 讨论

肌肉萎缩是伴随着CKD的治疗同步发生的一种并发症。有研究表明,超过半数的血液透析CKD患者存在PEW状态^[9]。而肌肉萎缩是CKD患者PEW的主要表现形式,也可作为预测CKD患者预后的重要指标之一。CKD-PEW患者大多会缺乏必需氨基酸,复方 α -酮酸片不仅可以直接补充必需氨基酸,并且可与体内的氨基结合生成必需氨基酸,使体内蛋白质合成代谢增加,改善营养状况^[10],故本研究选用复方 α -酮酸片作为阳性对照药。四君子汤具有补气、益气健脾之功效,杜红莲等^[11]的研究结果证实了四君子汤能够改善脾肾两虚型CKD患者的肾功能。为了探讨四君子汤对CKD患者PEW的作用,本课题组通过5/6肾切除法构建CKD小鼠模型,同时根据CKD患者PEW的临床特点,给予4%酪蛋白饮食建立了CKD-PEW小鼠模型^[12]。结果显示,四君子汤给药14 d后,CKD-PEW模型小鼠体质量和TA湿质量减轻、TA横截面积减小的情况有不同程度改善,且四君子汤还能够升高模型小鼠TA蛋白合成代谢、降低其蛋白分解代谢,这说明四君子汤对CKD-PEW模型小鼠的骨骼肌萎缩具有一定的缓解作用。

CKD-PEW引起的代谢性酸中毒、胰岛素抵抗、炎症反应、血管紧张素II分泌增多等因素均可激活Caspase-3及泛素蛋白酶体系统(Ubiquitin proteasome system, UPS),导致肌肉萎缩^[13]。有研究表明,在CKD-PEW模型大鼠中骨骼肌严重萎缩,同时肌纤维中促凋亡基因Bax、Caspase-3表达上调,而抗凋亡基因Bcl-2表达显著下调,说明线粒体凋亡途径在骨骼肌蛋白能量消耗过程中具有重要作用^[14]。本研究结果显示,给予四君子汤治疗14 d后,CKD-PEW模型小鼠TA中Bax/Bcl-2比值和Caspase-3 mRNA表达水平显著降低,说明四君子汤可抑制骨骼肌细胞凋亡,从而缓解肌肉萎缩。在CKD中,PI3K/Akt信号通路受损是引起骨骼肌蛋白质丢失的主要原因。该信号通路受损后继发UPS激活,继而引起Atrogin-1和MuRF-1的表达升高,这是骨骼肌萎缩的经典机制^[15-16]。因此,骨骼肌组织中的Atrogin-1和MuRF-1的表达量可作为衡量肌肉蛋白质分解代谢情况的生物学标志^[17]。本研究结果显示,四君子汤治疗14 d后,CKD-PEW模型小鼠TA中Atrogin-1和MuRF-1的蛋白表达水平均显著降低,说明四君子汤可通过抑制UPS的激活来减轻CKD-PEW小鼠的骨骼肌萎缩。

Caspase-3也是参与蛋白降解的蛋白酶,可切割肌球蛋白和肌原纤维蛋白,并切割特定的19S蛋白酶体亚基,加速26S蛋白酶体的降解,而且Caspase-3能够切除ROCK1的C端半胱氨酸结构域而使其活化^[18]。活化的ROCK1能够增强PTEN磷酸化,而活化的PTEN又可抑制PI3K/Akt的活性,从而促进蛋白降解,引起肌肉萎

缩^[9]。有研究发现,敲低 ROCK1 水平可抑制 PTEN 活性,从而负调控 PI3K 与 p-Akt 蛋白的表达,并通过下调 Atrogin-1 和 MuRF-1 表达来调控肌肉蛋白质代谢^[20]。另有研究运用 ROCK1 的抑制剂法舒地尔干预 CKD 模型小鼠后发现,法舒地尔可使 CKD 模型小鼠的肌肉质量显著提升、体质量显著增长,故推测其是通过抑制 ROCK1 来降低 PTEN 活性、激活 Akt 来降低 Atrogin-1 和 MuRF-1 表达,从而抑制蛋白质分解代谢、延缓肌肉萎缩^[21]。可见,ROCK1/PTEN/Akt 途径在骨骼肌萎缩的发生发展中具有重要意义。本研究发现,四君子汤治疗 14 d 后,CKD-PEW 模型小鼠 TA 中 ROCK1、p-PTEN 蛋白表达水平显著降低,而 PI3K 与 p-Akt 蛋白表达水平显著升高,说明四君子汤也可通过调控 ROCK1/PTEN/Akt 信号通路,抑制 Atrogin-1 和 MuRF-1 表达,来改善 CKD-PEW 模型小鼠的骨骼肌萎缩。

综上所述,四君子汤可增加 CKD-PEW 模型小鼠体质量,抑制骨骼肌萎缩,这可能是通过调控 ROCK1/PTEN/Akt 信号通路、抑制 Atrogin-1 和 MuRF-1 表达实现的。但本研究只是初步探讨了四君子汤改善 CKD-PEW 模型小鼠骨骼肌萎缩的作用机制,具体分子学机制仍需进一步研究。

参考文献

[1] MIKHAIL A, BROWN C, WILLIAMS JA, et al. Renal association clinical practice guideline on anaemia of chronic kidney disease[J]. *BMC Nephrol*, 2017. DOI: 10.1186/s12882-017-0688-1.

[2] OBI Y, QADER H, KOVESDY CP, et al. Latest consensus and update on protein-energy wasting in chronic kidney disease[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2015, 18(3):254-262.

[3] 孙蓓蓓,何立群.何立群教授运用中医药治疗慢性肾脏病经验集锦[J].*世界中医药*, 2019, 14(5):1102-1105.

[4] 麻志恒,彭文,倪兆慧,等.健脾清化方治疗慢性肾脏病(3期)脾虚湿热型患者的临床疗效观察[J].*中华中医药杂志*, 2016, 31(10):4333-4337.

[5] 许焯.四君子汤改善慢性肾功能衰竭患者蛋白质能量消耗状态的临床观察[C]//中国中西医结合学会肾脏病专业委员会 2015 年学术年会资料汇编.北京:中国中西医结合学会肾脏病专业委员会, 2015:1441-1442.

[6] PENG H, CAO J, YU R, et al. CKD stimulates muscle protein loss via Rho-associated protein kinase 1 activation[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(2):509-519.

[7] WANG XH, MITCH WE. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2014, 10(9):504-516.

[8] 王明,汪东涛,尹懿,等. Wnt7a-Akt/mTORa 信号通路在肾衰营养胶囊改善慢性肾衰竭大鼠骨骼肌萎缩中的作用[J].*南方医科大学学报*, 2015, 35(8):1170-1174.

[9] 许焯,远方,岳媛.脾肾两虚型慢性肾脏病患者蛋白质能

量消耗症候分析[J].*辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(12):137-140.

[10] 孟庆红,李晟琰,吴秀玲.低蛋白饮食加复方 α -酮酸片治疗慢性肾脏病的临床观察[J].*中国药房*, 2013, 24(40):3793-3794.

[11] 杜红莲,王蕾,邹蒙.四君子汤加减对脾肾两虚型慢性肾脏病患者尿蛋白/肌酐比值、24h 尿蛋白定量及肾功能指标的影响[J].*湖北中医药大学学报*, 2019, 21(5):23-27.

[12] 邓聪,魏连波,汪东涛,等.肾衰养真胶囊对慢性肾衰竭营养不良大鼠 UPP 通路的影响[J].*中国中西医结合杂志*, 2018, 38(3):356-360.

[13] WANG XH, MITCH WE. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2014, 10(9):504-516.

[14] WANG DT, LU L, SHI Y, et al. Supplementation of ketoacids contributes to the up-regulation of the Wnt7a/Akt/p70S6K pathway and the down-regulation of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems in the muscle of 5/6 nephrectomised rats[J]. *Br J Nutr*, 2014, 111(9):1536-1548.

[15] MEHRTASH AB, HOCHSTRASSER M. Ubiquitin-dependent protein degradation at the endoplasmic reticulum and nuclear envelope[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019. DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.09.013.

[16] HONG Y, LEE JH, JEONG KW, et al. Amelioration of muscle wasting by glucagon-like peptide-1 receptor agonist in muscle atrophy[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2019, 10(4):903-918.

[17] YU R, CHENJA, XU J, et al. Suppression of muscle wasting by the plant-derived compound ursolic acid in a model of chronic kidney disease[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2017, 8(2):327-341.

[18] WANG GH, MA KL, ZHANG Y, et al. Caspase 3/ROCK1 pathway mediates high glucose-induced platelet microparticles shedding[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(2):596-602.

[19] CHANG J, XIE M, SHAH VR, et al. Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(39):14495-14500.

[20] XU J, LI R, WORKENEH B, et al. Transcription factor FoxO1, the dominant mediator of muscle wasting in chronic kidney disease, is inhibited by microRNA-486[J]. *Kidney Int*, 2012, 82(4):401-411.

[21] 余日臻,许静.法舒地尔对小鼠慢性肾功能衰竭所致肌肉萎缩的抑制作用[J].*中华航海医学与高气压医学杂志*, 2016, 23(2):120-124.

(收稿日期:2020-05-30 修回日期:2020-08-09)

(编辑:林 静)