

# 基于线粒体质量控制系统探讨肾必宁颗粒对IgA肾病大鼠的肾脏保护作用机制<sup>△</sup>

樊艳敏<sup>1,2\*</sup>, 宋纯东<sup>1,2#</sup>, 史慧远<sup>1,2</sup>, 宋珂<sup>1,2</sup>, 陈晨晨<sup>1,2</sup>, 张霞<sup>1,2</sup>, 任献青<sup>1,2</sup>, 丁樱<sup>1,2</sup>, 王墨<sup>3</sup>(1.河南中医药大学第一附属医院儿科医院肾病紫癜二病区, 郑州 450000; 2.河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450046; 3.重庆医科大学附属儿童医院肾脏免疫科, 重庆 401122)

中图分类号 R965;R692 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)24-2984-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.24.04



**摘要** 目的 基于线粒体质量控制系统,探讨肾必宁颗粒对免疫球蛋白A(IgA)肾病大鼠的肾脏保护作用机制。方法 采用“牛血清白蛋白+四氯化碳+脂多糖”法建立IgA肾病模型,将模型大鼠随机分为模型组、醋酸泼尼松组(6.25 mg/kg)、肾必宁等剂量组(4.1 g/kg)和肾必宁高剂量组(20.5 g/kg),另取正常大鼠作为正常对照组,每组12只。各组大鼠灌胃相应药物或蒸馏水,每天1次,连续4周。末次给药后,检测大鼠24 h尿蛋白总量(24 h-UTP)和尿液中红细胞计数,以及血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、白蛋白(ALB)、丙氨酸转氨酶(ALT)水平;观察肾组织病理变化和肾脏系膜区IgA沉积改变;检测肾组织中PTEN诱导假定激酶1(PINK1)、E<sub>3</sub>泛素连接酶(Parkin)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、动力相关蛋白1(Drp1)、线粒体融合蛋白2(Mfn2) mRNA及蛋白表达水平。结果 与模型组比较,醋酸泼尼松组、肾必宁等剂量组和肾必宁高剂量组大鼠24 h-UTP,尿红细胞计数,ALT、BUN、Scr水平,LC3- II/LC3- I mRNA比值和Drp1 mRNA及蛋白表达水平均显著降低( $P<0.05$ );ALB水平,LC3- II/LC3- I蛋白比值和PINK1、Parkin、Mfn2 mRNA及蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ );大鼠肾组织病理形态均明显改善,IgA沉积均明显减少。结论 肾必宁颗粒可能通过激活PINK1/Parkin通路、增强线粒体自噬、纠正线粒体动力学紊乱来减轻IgA肾病大鼠肾损伤,从而保护肾功能。

**关键词** 肾必宁颗粒;IgA肾病;线粒体质量控制系统;线粒体稳态;自噬

## Protective effect of Shenbining granule on renal tissue of IgA nephropathy rats based on mitochondrial quality control system

FAN Yanmin<sup>1,2</sup>, SONG Chundong<sup>1,2</sup>, SHI Huiyuan<sup>1,2</sup>, SONG Ke<sup>1,2</sup>, CHEN Chenchen<sup>1,2</sup>, ZHANG Xia<sup>1,2</sup>, REN Xianqing<sup>1,2</sup>, DING Ying<sup>1,2</sup>, WANG Mo<sup>3</sup>(1. Second Ward of Nephropathy Purpura, Pediatric Hospital, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 2. School of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. Dept. of Renal Immunology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401122, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the renal protective mechanism of Shenbining granules on IgA nephropathy (IgAN) rats based on mitochondrial quality control system. **METHODS** IgAN rat model was established by the method of “bovine serum albumin+carbon tetrachloride+lipopolysaccharide”. The model rats were randomly divided into model group, prednisone acetate group (6.25 mg/kg), Shenbining equal-dose group (4.1 g/kg) and Shenbining high-dose group (20.5 g/kg). The normal rats were taken as the normal control group, with 12 rats in each group. Rats were given corresponding drugs or distilled water intragastrically in each group, once a day, for 4 consecutive weeks. After the last medication, the 24 h total urinary protein (24 h-UTP) and erythrocyte count in urine were determined, and the levels of serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), albumin (ALB) and alanine transaminase (ALT) were also detected. The histopathological changes in the kidneys and changes in

<sup>△</sup>基金项目 国家自然科学基金面上项目(No.82074493);河南省中医药科学研究专项(No.2022JDZX003);河南省中医药科学研究重大专项(No.2023ZYD02);河南省中医学“双一流”创建科学研究专项(No.HSRP-DFCTCM-2023-3-07)

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向:儿童肾脏病及风湿免疫性疾病。E-mail:fl3838273641@163.com

# 通信作者 教授,主任医师,博士生导师,博士。研究方向:儿童肾脏病及风湿免疫性疾病。E-mail:scd670918@126.com

IgA deposition in the mesangial area of the kidney were observed. mRNA and protein expression levels of PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), E<sub>3</sub> ubiquitin ligase (Parkin), microtubule-associated protein 1 light chain-3 (LC3), dynamin-related protein 1 (Drp1) and mitofusin 2 (Mfn2) were detected in the kidney tissues of rats. **RESULTS** Compared with model group, 24 h-UTP, urinary erythrocyte

count, ALT, BUN and Scr levels, LC3- II/LC3- I mRNA ratio, mRNA and protein expressions of Drp1 were reduced significantly in prednisone acetate group, Shenbining equal-dose group and Shenbining high-dose group ( $P<0.05$ ); ALB level, LC3- II/LC3- I protein ratio, mRNA and protein expressions of PINK1, Parkin and Mfn2 were increased significantly ( $P<0.05$ ); the pathological morphology of kidney tissue in rats was significantly improved, and IgA deposition was significantly reduced. **CONCLUSIONS** Shenbining granule may reduce renal pathological injury in IgAN rats and protect renal function by activating the PINK1/Parkin pathway, enhancing mitochondrial autophagy, and correcting mitochondrial kinetic disorders.

**KEYWORDS** Shenbining granule; IgA nephropathy; mitochondrial quality control system; mitochondrial homeostasis; autophagy

免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 肾病 (IgA nephropathy, IgAN) 是全球发病率最高的原发性肾小球疾病<sup>[1]</sup>, 早期常表现为无症状血尿或伴不同程度蛋白尿, 病情呈渐进性、不可逆性, 30%~45% 的患者在确诊后 20~25 年内发展为终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD)<sup>[2]</sup>。IgAN 的发病机制尚不明确, 近年来有研究表明, 线粒体内稳态失衡会影响多种肾脏疾病的发生发展<sup>[3]</sup>。

线粒体质量控制系统是机体监测和维持线粒体内环境稳态及功能, 反映线粒体质量的一个网络系统, 其中包括线粒体的生物合成、分裂与融合及线粒体自噬<sup>[4]</sup>。若上述过程出现任何异常均可能造成线粒体功能紊乱, 进而导致细胞的损伤或凋亡。动力相关蛋白 1 (dynamitin-related protein 1, Drp1) 作为调控线粒体分裂的关键蛋白<sup>[5]</sup>, 可促进受损线粒体的降解<sup>[5]</sup>; 线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2) 是一种定位于线粒体外膜的跨膜蛋白, 通过与其同系物 Mfn1 结合形成高分子复合物, 共同介导线粒体外膜融合, 修复受损线粒体; 当线粒体分裂和融合失衡, 机体会诱导线粒体自噬, PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/E<sub>3</sub> 泛素连接酶 (E<sub>3</sub> ubiquitin ligase, Parkin) 通路是介导线粒体自噬的经典途径, 两者在病理条件下发生磷酸化而活化, 促使线粒体移位, 激活线粒体自噬; 微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain-3, LC3) 是检测自噬的常用指标, LC3- I 型转变为 LC3- II 是反映自噬发生的标志<sup>[6]</sup>。上述蛋白在调控线粒体功能完整性中均发挥重要作用。

肾脏作为高代谢器官, 需要线粒体提供大量腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 以满足肾小管主动转运营养物质及机体能量需求, 维持水-电解质平衡; 若线粒体功能受损势必导致肾小管上皮细胞供能不足, 产生过量线粒体活性氧并促进近端肾小管细胞的炎症反应<sup>[3]</sup>, 累积的活性氧进一步损伤线粒体, 进而诱发其自噬和细胞凋亡<sup>[7]</sup>, 加重肾损伤。目前针对恢复线粒体稳态的干预措施已成为预防和治疗肾损伤的新兴治疗策略。肾必宁颗粒是由河南中医药大学儿科医学院国医大师

丁樱教授拟定, 经河南中医药大学第一附属医院多年临床实践证实, 其能够降低多种肾病引起的蛋白尿, 具有健脾固肾、益气养阴、清热化痰的功效, 切合 IgAN “气阴两虚、湿热瘀血” 的核心病机。本课题组前期已证实, 肾必宁颗粒可以降低 IgAN 大鼠尿蛋白, 减轻血尿并改善肾功能, 从而起到保护肾脏、防治肾损伤的作用<sup>[8]</sup>, 但其治疗机制尚不明确。本研究基于线粒体质量控制系统, 探讨肾必宁颗粒对 IgAN 大鼠的肾脏保护作用机制, 旨在为阐明肾必宁颗粒治疗 IgAN 的作用机制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 RT-6100 型全自动酶标仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司)、KZ- III -FP 型低温研磨仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司)、D3024R 型台式高速冷冻离心机 [大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司]、6100 系列化学发光成像仪 (上海勤翔科学仪器有限公司)、Eclipse Ci-L 型正置显微镜 (日本 Nikon 公司)、AlphaEaseFC 型灰度分析软件 (美国 ProteinSimple 公司)、CFX Connect 型荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 仪 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司]、BS-2000 型全自动生化分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)、ETC821 型 PCR 仪 (北京东胜创新生物科技有限公司)、NanoDrop OneC 型微量紫外-可见分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 等。

### 1.2 主要药品与试剂

肾必宁颗粒 [豫药制字 Z20120721 (郑), 批号 0064771793, 规格 10 g/袋] 由河南中医药大学第一附属医院提供; 醋酸泼尼松片 (批号 2211192, 规格 5 mg/片) 购自安徽金太阳生化药业有限公司; 牛血清白蛋白 (批号 B2064)、脂多糖 (批号 0000223032) 均购自美国 Sigma 公司; 四氯化碳、蓖麻油 (批号分别为 C14404678、C14854610) 均购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 兔源 PINK1 一抗 (批号 a7131) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 兔源 Mfn2 一抗 (批号 ab205236) 购自英国 Abcam 公司; 鼠源 IgA 一抗 (批号 PAA546Ra01) 购自武汉云克隆科技股份有限公司; 异硫氰酸荧光素标记的山

羊抗兔IgG二抗(批号SA00003-2)购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔源Parkin、LC3、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、Drp1一抗(批号分别为GB113802、GB11124、GB15001、GB115659)和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(批号GB23303)、RIPA裂解液(批号G2002)、BCA蛋白定量检测试剂盒(批号G2026)、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)高清恒染试剂盒(批号G1076)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色试剂(批号G1012)均购自武汉塞维尔生物科技有限公司。

### 1.3 实验动物

清洁级雄性SD大鼠64只,6周龄,体重180~200 g,购自河南省实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK(豫)2022-0001。大鼠在河南中医药大学实验中心动物房中常规饲养。本实验由河南中医药大学实验动物福利伦理委员会审核批准,批准编号为IACUC-202306014。

## 2 方法

### 2.1 大鼠建模、分组与给药

64只大鼠适应性喂养7 d后,随机分为正常对照组( $n=14$ )和造模组( $n=50$ )。造模组大鼠参照文献方法<sup>[9]</sup>建立IgAN模型:将牛血清白蛋白用蒸馏水配制成质量浓度为100 g/L的溶液,每只大鼠按800 mg/kg隔日灌胃1次,连续12周;将四氯化碳与蓖麻油以1:3的体积比混匀,每只大鼠皮下注射0.4 mL,每周1次,连续12周;将脂多糖用生理盐水配制成质量浓度为0.25 g/L的溶液,每只大鼠分别于第6、8、10周尾静脉注射0.2 mL。正常对照组大鼠分别于同时段、同频次灌胃等量蒸馏水,皮下注射及尾静脉注射等量生理盐水。12周末,收集各组大鼠24 h尿液,检测24 h尿蛋白总量(24 h total urinary protein, 24 h-UTP),并从正常对照组、造模组中各随机取2只大鼠,对比观察肾脏系膜区是否有IgA沉积,有沉积即判定造模成功<sup>[9]</sup>。将造模成功的大鼠随机分为模型组、醋酸泼尼松组(阳性对照,6.25 mg/kg,按照成人用药剂量折算<sup>[10]</sup>)、肾必宁等剂量组(4.1 g/kg,按照成人用药剂量折算<sup>[10]</sup>)、肾必宁高剂量组(20.5 g/kg,按照5倍成人用药剂量折算<sup>[10]</sup>),每组12只。从第13周起,各给药组大鼠灌胃相应药物,正常对照组和模型组大鼠灌胃蒸馏水,每天1次,给药体积均为5 mL/kg,连续4周。

### 2.2 样本收集

末次给药后,大鼠禁食不禁水,收集24 h尿液;以2%戊巴比妥钠溶液2.5 mL/kg腹腔注射麻醉大鼠后,腹主动脉取血,离心,取血清;处死大鼠,摘取双侧肾脏,部分肾脏置于4%中性多聚甲醛中固定;部分肾脏用液氮快速冷冻后,置于-80 °C下保存。

### 2.3 大鼠尿常规和肝肾功能检测

取“2.2”项下各组大鼠24 h尿液,送医院检验科检测24 h-UTP;取大鼠新鲜尿液1 mL,镜下检测尿红细胞并计数;取大鼠血清,送检验科检测血清肌酐(serum creatinine, Scr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、白蛋白(albumin, ALB)、丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)水平。

### 2.4 大鼠肾组织病理观察

取“2.2”项下中性多聚甲醛固定的部分大鼠肾组织,以乙醇脱水及二甲苯透明后,用石蜡包埋并切片,行HE染色,用光镜观察肾组织病理变化。

### 2.5 大鼠肾脏系膜区IgA沉积情况观察

取“2.2”项下中性多聚甲醛固定的部分大鼠肾组织,用石蜡包埋并切片,脱蜡至水,予以抗原修复、血清封闭30 min,加入IgA一抗(稀释比例1:10),在4 °C下孵育过夜;用磷酸盐缓冲液漂洗5 min $\times$ 3次,再加入IgA二抗(稀释比例1:200),在室温下避光孵育50 min;用DAPI染色试剂复染细胞核,在室温下避光孵育10 min,淬灭组织自发荧光,封片,采集图像,观察肾脏系膜区IgA沉积情况,绿色荧光表示强阳性。

### 2.6 大鼠肾组织中PINK1、Parkin、LC3、Drp1、Mfn2 mRNA表达检测

采用实时定量PCR法检测。取“2.2”项下液氮冷冻保存的各组3只大鼠的部分肾组织,测定总RNA浓度和纯度;以RNA单链为模板,逆转录得到cDNA并进行扩增。反应条件为95 °C预变性30 s;95 °C变性15 s,60 °C退火/延伸30 s,共40个循环。反应体系为扩增预混合溶液7.5  $\mu$ L、无酶水4.0  $\mu$ L、正向和反向引物共1.5  $\mu$ L、cDNA 2.0  $\mu$ L。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析肾组织中PINK1、Parkin、LC3- II、LC3- I、Drp1、Mfn2 mRNA表达水平,并计算LC3- II/LC3- I mRNA比值,再以正常对照组为参照进行归一化处理。引物由武汉塞维尔生物科技有限公司提供,序列及片段大小见表1。

### 2.7 大鼠肾组织中PINK1、Parkin、LC3、Drp1、Mfn2蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.2”项下液氮冷冻保存的各组3只大鼠的部分肾组织,粉碎匀浆后提取蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度,加热变性5 min。取变性后的蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转膜,加入PINK1、Parkin、LC3、Drp1、Mfn2、 $\beta$ -actin一抗(稀释比例均为1:1 000),在4 °C下孵育过夜;加入二抗(稀释比例为1:3 000),在室温下孵育30 min;于化学发光成像仪中显影,使用AIWBwell<sup>TM</sup>软件分析,以目的蛋白与内参蛋

表1 引物序列及片段大小

基因	引物序列	片段大小/bp
PINK1	正向:5'-TGCAATGCCGCTGTATGA-3'	113
	反向:3'-TCTGTCCTCTTTGAGACGAC-5'	
Parkin	正向:5'-GGAAGTGGTTGTAAGCGACAG-3'	173
	反向:3'-TCTGTCCTCTTTGAGACGAC-5'	
LC3-I	正向:5'-TTCGCCGACCGCTGTAAG-3'	124
	反向:3'-TGGTCTTATCCAGACAGCGAG-5'	
LC3-II	正向:5'-TCCGAGAAGACCTTCAAACAGC-3'	233
	反向:3'-TCCGAGAAGACCTTCAAACAGC-5'	
Drp1	正向:5'-AAITTTCTAGATGTCCAGTTCC-3'	303
	反向:3'-ACTGGCTCTTGTAAATGCCTTCA-5'	
Mfn2	正向:5'-CACCGTCAAGAAGGATAAGCG-3'	127
	反向:3'-CAGTTCTGTATTCCTGTGGGTGC-5'	
GAPDH	正向:5'-CTCGAGAAGACCTGCCAAGTATG-3'	138
	反向:3'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCT-5'	

白( $\beta$ -actin)的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平,以LC3-II/LC3-I蛋白比值表示LC3蛋白的表达水平。

### 2.8 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性时多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Tukey检验;方差不齐时采用非参数检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 大鼠24 h-UTP、尿红细胞计数及肝肾功能指标变化

与正常对照组比较,模型组大鼠24 h-UTP、尿红细胞计数及ALT、BUN、Scr水平均显著升高,ALB水平显著降低( $P<0.05$ );与模型组比较,醋酸泼尼松组、肾必宁等剂量组和肾必宁高剂量组大鼠24 h-UTP、尿红细胞计数及ALT、BUN、Scr水平均显著降低,ALB水平均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表2。

表2 各组大鼠24 h-UTP、尿红细胞计数及肝肾功能指标比较( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	24 h-UTP/ mg	尿红细胞计数/ $\mu\text{L}^{-1}$	ALB/ (g/L)	ALT/ (U/L)	BUN/ (mmol/L)	Scr/ ( $\mu\text{mol/L}$ )
正常对照组	6.74 $\pm$ 1.62	7.27 $\pm$ 0.88	33.28 $\pm$ 2.27	33.21 $\pm$ 2.83	5.10 $\pm$ 0.37	55.10 $\pm$ 5.10
模型组	18.31 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>	20.58 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	22.08 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	54.22 $\pm$ 5.75 <sup>a</sup>	7.81 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	79.18 $\pm$ 3.28 <sup>a</sup>
醋酸泼尼松组	11.13 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup>	10.43 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	27.24 $\pm$ 2.62 <sup>b</sup>	43.10 $\pm$ 3.54 <sup>b</sup>	6.06 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	64.57 $\pm$ 4.63 <sup>b</sup>
肾必宁等剂量组	11.44 $\pm$ 1.95 <sup>b</sup>	11.35 $\pm$ 1.29 <sup>b</sup>	26.45 $\pm$ 2.46 <sup>b</sup>	44.75 $\pm$ 4.69 <sup>b</sup>	6.31 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	66.54 $\pm$ 2.98 <sup>b</sup>
肾必宁高剂量组	11.34 $\pm$ 1.82 <sup>b</sup>	11.01 $\pm$ 1.25 <sup>b</sup>	25.63 $\pm$ 1.80 <sup>b</sup>	42.22 $\pm$ 2.94 <sup>b</sup>	5.91 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	62.57 $\pm$ 2.50 <sup>b</sup>

a:与正常对照组比较, $P<0.05$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

### 3.2 大鼠肾组织病理变化

正常对照组大鼠肾小球内细胞及基质均匀分布,肾小管上皮细胞圆润、饱满,细胞结构正常;模型组大鼠可见系膜基质增多,肾小球炎症细胞浸润,伴少量肾小管萎缩、肾小管上皮细胞坏死,细胞结构消失,伴少量淋巴细胞灶性浸润;与模型组比较,醋酸泼尼松组、肾必宁等剂量组和肾必宁高剂量组大鼠肾小管上皮细胞圆润、饱满,刷状缘排列整齐、规则,病理形态均明显改善。结果见图1。

### 3.3 大鼠肾脏系膜区IgA沉积变化

正常对照组大鼠肾脏系膜区未见明显IgA沉积;模型组大鼠肾脏系膜区IgA沉积呈强阳性(绿色荧光);与模型组比较,醋酸泼尼松组、肾必宁等剂量组和肾必宁高剂量组大鼠肾脏系膜区IgA沉积均明显减少。结果见图2。

### 3.4 大鼠肾组织中PINK1、Parkin、LC3、Drp1、Mfn2 mRNA表达水平比较

与正常对照组比较,模型组大鼠肾组织中PINK1、Parkin、Mfn2 mRNA表达水平均显著降低,LC3-II/LC3-I mRNA比值和Drp1 mRNA表达水平均显著升高( $P<0.05$ );与模型组比较,醋酸泼尼松组、肾必宁等剂量组和

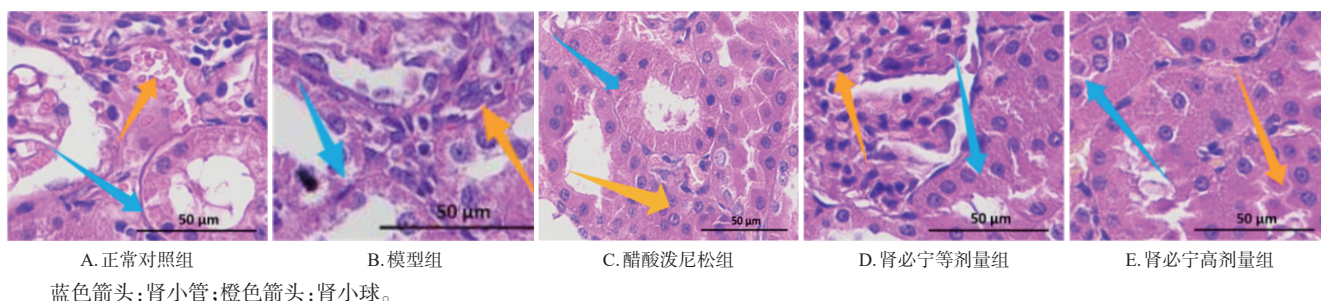


图1 各组大鼠肾组织病理图(HE染色)

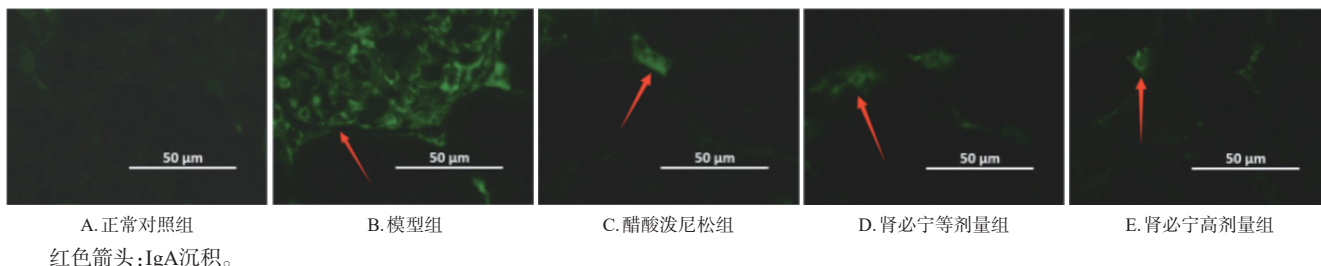


图2 各组大鼠肾脏系膜区IgA沉积的显微图

肾必宁高剂量组大鼠肾组织中 PINK1、Parkin、Mfn2 mRNA 表达水平均显著升高, LC3- II /LC3- I mRNA 比值和 Drp1 mRNA 表达水平均显著降低( $P < 0.05$ )。结果见表 3。

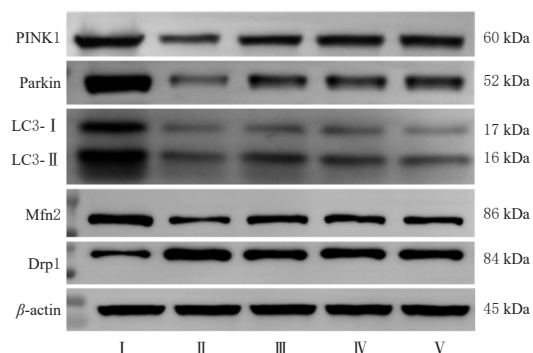
表 3 各组大鼠肾组织中 PINK1、Parkin、LC3、Drp1、Mfn2 mRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	PINK1	Parkin	LC3- II /LC3- I	Drp1	Mfn2
正常对照组	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
模型组	0.57 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.44 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.10 <sup>a</sup>
醋酸泼尼松组	0.84 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.35 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.04 <sup>b</sup>
肾必宁等剂量组	0.85 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.20 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.29 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.84 ± 0.07 <sup>b</sup>
肾必宁高剂量组	0.85 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.88 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.33 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.33 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.86 ± 0.08 <sup>b</sup>

a: 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.5 各组大鼠肾组织中 PINK1、Parkin、LC3、Drp1、Mfn2 蛋白表达水平比较

与正常对照组比较, 模型组大鼠肾组织中 PINK1、Parkin、Mfn2 蛋白表达水平和 LC3- II /LC3- I 蛋白比值均显著降低, Drp1 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 醋酸泼尼松组、肾必宁等剂量组和肾必宁高剂量组大鼠肾组织中 PINK1、Parkin、Mfn2 蛋白表达水平和 LC3- II /LC3- I 蛋白比值均显著升高, Drp1 蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ )。结果见图 3 和表 4。



I: 正常对照组; II: 模型组; III: 醋酸泼尼松组; IV: 肾必宁等剂量组; V: 肾必宁高剂量组。

图 3 各组大鼠肾组织中 PINK1、Parkin、LC3、Drp1、Mfn2 蛋白表达的电泳图

表 4 各组大鼠肾组织中 PINK1、Parkin、LC3、Drp1、Mfn2 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	PINK1	Parkin	LC3- II /LC3- I	Drp1	Mfn2
正常对照组	0.90 ± 0.03	1.08 ± 0.04	14.49 ± 2.02	0.42 ± 0.03	0.75 ± 0.03
模型组	0.37 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.02 <sup>a</sup>
醋酸泼尼松组	0.61 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.30 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.04 <sup>b</sup>
肾必宁等剂量组	0.60 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.02 <sup>b</sup>	3.09 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.02 <sup>b</sup>
肾必宁高剂量组	0.62 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.04 <sup>b</sup>	3.05 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.03 <sup>b</sup>

a: 与正常对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

## 4 讨论

IgAN 是以 IgA 沉积于肾小球系膜区为主要特征的原发性慢性肾小球疾病, 其进展期预后不佳。本研究结果显示, 与模型组比较, 肾必宁等剂量组和肾必宁高剂

量组大鼠 24 h-UTP、尿红细胞计数及 ALT、BUN、Scr 水平均显著降低, ALB 水平均显著升高, 病理形态均明显改善, 肾脏系膜区 IgA 沉积均明显减少, 可见肾必宁颗粒能有效改善 IgAN 大鼠的肾损伤。

近年来, 肾小管损伤和线粒体紊乱在慢性肾脏病中的重要性逐渐引起关注<sup>[11]</sup>。肾脏作为人体第二大耗氧器官, 肾小管细胞中含有丰富的线粒体, 源源不断产生大量 ATP 以驱动葡萄糖、离子和其他营养物质的转运, 因此维持线粒体的稳态对于肾脏正常细胞功能至关重要。线粒体是一类高度可塑的动态细胞器, 具有自身完备的质量控制系统以维持稳态, 即线粒体动力学和线粒体自噬<sup>[12]</sup>。前者通过在融合和分裂之间不断转换以维持线粒体数量、形态和分布<sup>[11]</sup>, 当线粒体受到外界刺激发生过度分裂或融合时, 受损的线粒体又可经自噬途径被清除或转化为能量及基础物质为机体所用, 这种双重调控的过程, 共同维持线粒体功能正常发挥<sup>[13]</sup>。张旭等<sup>[14]</sup>研究发现, IgAN 小鼠肾组织中 Drp1 mRNA 表达水平明显升高, 而 Mfn2 mRNA 表达水平明显降低。小鼠特异性敲除 Drp1 基因后线粒体自噬减少<sup>[15]</sup>, 若敲除或突变 Parkin 基因, 线粒体中 Drp1 增多, 线粒体过度分裂产生的活性氧显著增加, 从而促进细胞凋亡<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, 与模型组比较, 肾必宁等剂量组和肾必宁高剂量组大鼠肾组织中 PINK1、Parkin、Mfn2 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高, Drp1 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低。由此可见, 调控线粒体质量平衡有可能作为治疗 IgAN 的作用靶点, 为延缓肾脏疾病发展提供新思路。

自噬是一种细胞自我降解和循环利用胞内组分的过程。当自噬发生时, LC3 蛋白合成后立即在其羧基端被 Atg4 所剪切, 产生 LC3- I, 同时 LC3- I 会被 Atg7 及其他在内的泛素样体系所修饰和加工, 产生 LC3- II, 并定位到自噬小体中, 故 LC3- II /LC3- I 比值的大小可进一步反映自噬水平的高低<sup>[17]</sup>。本研究结果显示, 与模型组比较, 肾必宁等剂量组和肾必宁高剂量组大鼠肾组织中 LC3- II /LC3- I mRNA 比值均显著降低, LC3- II /LC3- I 蛋白比值均显著升高。LC3- II /LC3- I 的 mRNA 和蛋白水平变化趋势不一致, 与真核基因表达的转录、翻译、加工及修饰、检测的时间点等多个层面有关, 然而机体发挥作用的是目的蛋白, 因此本研究最终以 LC3- II /LC3- I 蛋白比值为准, 提示自噬活性程度。由此得出, 肾必宁颗粒可能通过调控肾脏线粒体质量平衡、纠正线粒体紊乱、激活 PINK1/Parkin 通路、增强线粒体自噬, 从而发挥肾脏保护作用。泼尼松是治疗 IgAN 的一线用药, 该药作为本研究的阳性对照, 肾必宁等/高剂量组与其比较差异均无统计学意义, 但肾必宁颗粒能有效避免

激素造成的不良反应。本研究还发现,肾必宁等剂量组与肾必宁高剂量组比较,24 h-UTP、尿红细胞计数、ALT等指标水平差异均无统计学意义,提示肾必宁颗粒治疗IgAN的最佳剂量仍需进一步探究。

综上所述,肾必宁颗粒可能通过激活PINK1/Parkin通路、增强线粒体自噬、纠正线粒体动力学紊乱来减轻IgAN大鼠肾损伤,从而保护肾功能。本研究因实验条件有限,未在电镜下观察线粒体结构以进一步明确肾组织内线粒体病理变化;同时,基于中医药多途径、多靶点的治疗特点,该方中各成分是否通过其他途径减轻IgAN大鼠肾损伤有待进一步探讨。

## 参考文献

[1] TIAN Z Y, LI Z, CHU L, et al. Iron metabolism and chronic inflammation in IgA nephropathy[J]. *Ren Fail*, 2023, 45(1):2195012.

[2] SALVADÈ V, TETA D, GUZZO G. IgA nephropathy: the beginning of a new therapeutic era[J]. *Rev Med Suisse*, 2024, 20(863):445-450.

[3] 谭子璇, 朱武政. 线粒体动力学调控机制及其在肾脏病理生理学中的作用[J]. *生理学报*, 2024, 76(1):148-160.

TAN Z X, ZHU W Z. Regulatory mechanisms of mitochondrial dynamics and its emerging role in renal pathophysiology[J]. *Acta Physiol Sin*, 2024, 76(1):148-160.

[4] 张梦婷, 李昱颖, 张兰. 中医药调控线粒体质量控制治疗糖尿病肾病研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(4):236-245.

ZHANG M T, LI Y Y, ZHANG L. Regulation of mitochondrial quality control in treatment of diabetic kidney disease by traditional Chinese medicine: a review[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2023, 29(4):236-245.

[5] ZHOU H, REN J, TOAN S, et al. Role of mitochondrial quality surveillance in myocardial infarction: from bench to bedside[J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 66:101250.

[6] DONG Y M, ZHANG X. Targeting cellular mitophagy as a strategy for human cancers[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12:1431968.

[7] CUI Y L, SONG M, XIAO B N, et al. ROS-mediated mitophagy and apoptosis are involved in aluminum-induced femoral impairment in mice[J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 349:109663.

[8] 姜浩然, 宋纯东, 段凤阳, 等. 基于SphK1/S1PR2通路探讨肾必宁颗粒对IgA肾病大鼠肾组织的保护作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44(11):1246-1252.

JIANG H R, SONG C D, DUAN F Y, et al. Protective effect of Shenbining granule on renal tissue of IgA nephropathy rats based upon SphK1/S1PR2 pathway[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2024, 44(11):1246-1252.

[9] 汤颖, 姜探奇, 成彩联, 等. 实验性IgA肾病模型的改进

[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2006, 27(2):184-187.

TANG Y, LOU T Q, CHENG C L, et al. Improvement of experimental IgA nephropathy model[J]. *J Sun Yat Sen Univ Med Sci*, 2006, 27(2):184-187.

[10] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069-1072.

HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2004, 9(9):1069-1072.

[11] 张栩铭, 周嘉宝, 杨枫, 等. 线粒体功能障碍调控慢性肾脏病机制及中药治疗的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(3):198-202.

ZHANG X M, ZHOU J B, YANG F, et al. Research progress of mitochondrial dysfunction regulating mechanism of chronic kidney disease and traditional Chinese medicine treatment[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2024, 42(3):198-202.

[12] LIU Y, GUO Y F, LIU Z Y, et al. Augmented temperature fluctuation aggravates muscular atrophy through the gut microbiota[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):3494.

[13] 顾雪彤, 李晓宁. 线粒体动力学和线粒体自噬在缺血性脑卒中中的作用及机制研究进展[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2023, 23(5):328-333.

GU X T, LI X N. Research progress on the role and mechanism of mitochondrial dynamics and mitophagy in ischemic stroke[J]. *J Neurosci Ment Health*, 2023, 23(5):328-333.

[14] 张旭, 刘乃萌, 马娇艳, 等. 线粒体分裂融合蛋白表达失衡在IgA肾病小鼠肾脏病理学变化中的作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021, 47(2):284-291.

ZHANG X, LIU N M, MA J Y, et al. Effect of mitochondrial fission/fusion protein expression imbalance in pathological changes of kidney tissue in IgA nephropathy mice[J]. *J Jilin Univ(Med Ed)*, 2021, 47(2):284-291.

[15] SULKSHANE P, RAM J, THAKUR A, et al. Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia[J]. *Redox Biol*, 2021, 45:102047.

[16] QI Z H, HUANG Z, XIE F, et al. Dynamin-related protein 1: a critical protein in the pathogenesis of neural system dysfunctions and neurodegenerative diseases[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):10032-10046.

[17] CHEN X, SU Q, GONG R Z, et al. LC3-associated phagocytosis and human diseases: insights from mechanisms to therapeutic potential[J]. *FASEB J*, 2024, 38(20):e70130.

(收稿日期:2024-07-08 修回日期:2024-11-26)

(编辑:邹丽娟)