

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.09.002

❖ 基础研究 ❖

加味大黄附子汤调节 Wnt/ β -catenin 信号通路保护慢性肾脏病小鼠认知功能的机制

孔文文¹, 巴元明²

(1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430070; 2. 湖北省中医院肾病科, 湖北 武汉 430060)

【摘要】目的: 探究加味大黄附子汤保护慢性肾脏病小鼠的认知功能及其机制。**方法:** 采用 0.2% 腺嘌呤饲料喂养 5 周建立慢性肾脏病模型, 成功建模后将小鼠随机分为模型组, 加味大黄附子汤低、中、高剂量组 (低、中、高剂量组), 加味大黄附子汤高剂量 + Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 (IWR-I) 组 (高剂量 + IWR-I 组), 每组各 10 只, 另取 10 只正常 C57BL/6 小鼠作对照组。低、中、高剂量组分别灌胃 8、16、24 g/kg 加味大黄附子汤, 高剂量 + IWR-I 组灌胃 24 g/kg 加味大黄附子汤 + 腹腔注射 5 mg/kg IWR-I。采用 Morris 水迷宫实验评价小鼠认知功能, 眼眶取血检测血清肌酐、尿素氮、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 水平, HE 染色观察肾脏及脑组织病理学变化, Western blot 法检测脑组织 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达。**结果:** 与模型组比较, 中、高剂量组第 3~5 天逃避潜伏期、血清肌酐、尿素氮、AChE 水平均降低, 穿越平台次数、ChAT、脑组织中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$); 与高剂量组比较, 高剂量 + IWR-I 组第 2~5 天逃避潜伏期、肌酐、尿素氮、AChE 水平均升高, 穿越平台次数、ChAT、脑组织中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$)。**结论:** 加味大黄附子汤可改善慢性肾脏病小鼠认知功能, 其作用可能与激活 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

【关键词】 慢性肾脏病; 加味大黄附子汤; 认知功能; Wnt/ β -catenin 信号通路

【中图分类号】 R692 **【文献标志码】** A

Protection mechanism of modified Dahuang Fuzi Decoction on cognitive function in mice with chronic kidney disease by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathways

KONG Wen-wen¹, BA Yuan-ming²

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430070; 2. Department of Nephrology, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】Objective: To explore the effect and mechanism of modified Dahuang Fuzi Decoction on protecting cognitive function in mice with chronic kidney disease (CKD). **Methods:** The mice were fed with 0.2% adenine diet for 5 weeks to construct CKD models. After successful modeling, mice were randomly divided into model group, low-dose, medium-dose and high-dose modified Dahuang Fuzi Decoction groups (low-dose, medium-dose and high-dose groups), and high-dose modified Dahuang Fuzi Decoction + Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitor (IWR-I) group (high-dose + IWR-I group), 10 cases in each group. Another 10 normal C57BL/6 mice were selected as control group (no treatment). low-dose, medium-dose and high-dose groups were given intragastric administration of modified Dahuang Fuzi Decoction (8, 16, 24 g/kg), and high-dose + IWR-I group was given intragastric administration of modified Dahuang Fuzi Decoction (24 g/kg) and intraperitoneal injection of IWR-I (5 mg/kg). The cognitive function of mice was evaluated by Morris water maze test. The orbital blood was collected to detect levels of serum creatinine, blood urea nitrogen, acetylcholin esterase (AChE) and choline acetyltransferase (ChAT). The pathological changes of kidney and brain tissues were observed by HE staining. The expressions of Wnt3a and β -catenin in brain tissues were detected by Western blot. **Results:** Compared with model group, escape latency on 3~5 day, serum creatinine, blood urea nitrogen and AChE were decreased, while times of crossing the platform, ChAT and expressions of Wnt3a and β -catenin in brain tissues were increased in medium-dose and high-dose groups ($P < 0.05$). Compared with high-dose group, escape latency on 3~5 day, serum creatinine, blood urea nitrogen and AChE were increased, while times of crossing the platform, ChAT and expressions of Wnt3a and β -catenin in brain tissues were decreased in high-dose + IWR-I group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Modified Dahuang Fuzi Decoction can improve cognitive function of CKD mice, which may be related to activating Wnt/ β -

基金项目: 湖北省科技重大专项项目 (2021ACA004-03)

作者简介: 孔文文 (1994 -), 女, 硕士。E-mail: hxhkww9478@163.com

通讯作者: 巴元明。E-mail: 1723426138@qq.com

catenin signaling pathways.

【Key words】 Chronic kidney disease; Modified Dahuang Fuzi Decoction; Cognitive function; Wnt/ β -catenin signaling pathway

慢性肾脏病已成为全球性公共健康问题,其发病率和病死率均较高,且大多难以根治,临床治疗以控制并发症和延缓疾病进展为旨^[1]。研究^[2-3]发现,部分慢性肾脏病患者进入透析前已出现不同程度的认知功能障碍。目前,慢性肾脏病发生认知功能障碍的机制尚未阐明,临床治疗药物也处于探索阶段。中医相关研究^[4]认为,慢性肾脏病病程漫长,气血运转异常形成痰湿、血瘀、浊毒等,从而引起脑损伤、神经侵犯、认知功能障碍等病理产物。加味大黄附子汤由《金匮要略》中记载的大黄附子汤演变而来,具有健脾温肾、通腑泄浊之效,临床用于慢性肾脏病可有效改善患者肾功能^[5-6]。Gu 等^[7]研究显示,慢性肾脏病-认知障碍模型中,加味大黄附子汤可改善小鼠认知功能,可能与抑制 AhR/NF- κ B/JNK 信号通路有关。相关研究^[8]表明,Wnt/ β -catenin 信号通路与神经退行性疾病的发病关系密切。加味大黄附子汤改善慢性肾脏病-认知障碍的作用机制仍有待深入分析。本研究拟从 Wnt/ β -catenin 信号通路角度,分析加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠的认知功能的保护作用。

1 材料与方

1.1 实验动物

65 只雄性 C57BL/6 小鼠,SPF 级别,体质量 18 ~ 22 g,8 ~ 12 周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验生产动物合格证号:SCXK(京)2020-0006。小鼠均分笼饲养,动物房内设置温度 23 ~ 25 $^{\circ}$ C,相对湿度 40% ~ 60%,自由摄食饮水,适应性喂养 1 周后进入后续实验。

1.2 药物与主要试剂

加味大黄附子汤:附子 10 g,大黄 30 g,牡蛎 40 g,苦参、蒲公英、山参各 30 g,准确称取各味药,水浸泡 30 min,大火煮开,再小火煎煮 30 min,过滤收集滤液 170 mL(生药浓度为 1 g/mL),调节 pH 至 7.0,过滤除菌后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用^[7]。0.2% 腺嘌呤饲料及普通饲料(南通特洛菲饲料科技公司),Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂(IWR-I,美国 MCE 公司),苏木精-伊红染液(北京索莱宝科技公司),肌酐、尿素氮、乙酰胆碱酯酶(AChE)和胆碱乙酰转移酶(ChAT)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),Wnt3a、 β -catenin、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Abcam)。

1.3 动物分组及模型构建

65 只小鼠随机选取 10 只作对照组(普通饲料

喂养),剩余 55 只采用 0.2% 腺嘌呤饲料喂养 5 周建立慢性肾脏病模型,随机取 2 只小鼠处死,取出肾脏组织,可观察到肾脏体积缩小、色泽苍白、表面有颗粒物,可见肾小球萎缩、间质纤维化等典型病理学改变,即可判定建模成功,剩余建模成功小鼠随机分为模型组、加味大黄附子汤低、中、高剂量组、加味大黄附子汤高剂量 + Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂(IWR-I)组,每组各 10 只。造模 36 d,所有组小鼠均给予普通饲料,加味大黄附子汤低、中、高剂量组分别灌胃 8、16、24 g/kg 加味大黄附子汤^[7],加味大黄附子汤 + IWR-I 组灌胃 24 g/kg 加味大黄附子汤 + 腹腔注射 5 mg/kg IWR-I,对照组和模型组予以同剂量生理盐水。见图 1。

1.4 Morris 水迷宫试验

给药结束后,采用 Morris 水迷宫实验系统(上海吉量软件科技公司)评估小鼠认知功能,包括定位航行实验(第 1 ~ 5 天)和空间探索实验(第 6 天),定位航行实验:直径 120 mm 的圆柱体内倒入 22 $^{\circ}$ C 无毒白色颜料,水池顺时针分为 4 个象限,将平台放置于第二象限中央位置,池水没过台面,将小鼠面朝池壁方向任一象限放入,记录小鼠自下水至找到平台所需时间,即为逃避潜伏期,若 60 s 内仍未找到平台,则逃避潜伏期记录为 60 s,连续训练 5 d。空间探索实验:第 6 天撤去平台,将小鼠面朝池壁方向任一象限放入,记录小鼠 60 d 内穿越原平台处的次数。

1.5 血清肌酐、尿素氮、乙酰胆碱酯酶(AChE)和胆碱乙酰转移酶(ChAT)水平检测

完成 Morris 水迷宫试验后,夜间禁食,次日眼眶取血,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。参照试剂盒说明书操作,检测血清肌酐、尿素氮、AChE 和 ChAT 水平。

1.6 HE 染色

眼眶取血后以颈椎脱臼法处死小鼠,快速取出肾脏和脑组织,肾脏组织和部分脑组织浸于 4% 多聚甲醛溶液中固定过夜,制备厚度为 4 μ m 石蜡组织切片,行常规 HE 染色,光镜下进行病理学观察,剩余脑组织置于液氮冻存待测。

1.7 Western blot 法检测脑组织 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达

取出冻存脑组织,RIPA 裂解液匀浆,12 000 r/min 离心 10 min,提取总蛋白,测定蛋白浓度后,各组取等量(30 ~ 50 μ g)蛋白进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,再将蛋白条带电转至 PVDF 膜,封闭 2 h,分别浸

于稀释比 1:1 000 的 Wnt3a、 β -catenin、 β -actin 抗体, 4 °C 下孵育过夜,次日浸于稀释比 1:8 000 的蛋白二抗,室温下孵育 1 h,最后滴加 ECL 发光试剂,用 X 光胶片暗盒(北京吉田生物科技公司)曝光、显影,应用 Image J v1.8.0 软件测定目标条带灰度值。

1.8 统计学分析

应用软件 SPSS 23.0 进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠认知功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	逃避潜伏期(s)					穿越平台次数(次)
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	
对照组($n = 10$)	57.40 \pm 2.55	44.70 \pm 5.31	33.90 \pm 3.48	29.30 \pm 2.75	21.70 \pm 2.36	5.10 \pm 0.74
模型组($n = 10$)	58.80 \pm 1.40	54.10 \pm 3.14*	50.60 \pm 3.57*	46.80 \pm 3.43*	39.80 \pm 3.82*	1.90 \pm 0.74*
低剂量组($n = 10$)	58.40 \pm 1.84	53.00 \pm 3.43	48.00 \pm 2.87	44.30 \pm 2.58	37.00 \pm 3.94	2.20 \pm 0.63
中剂量组($n = 10$)	58.00 \pm 2.67	51.10 \pm 3.07	45.50 \pm 5.08#	40.50 \pm 5.44#	32.20 \pm 3.88#	2.80 \pm 0.63#
高剂量组($n = 10$)	57.90 \pm 2.02	48.40 \pm 4.12#	41.30 \pm 4.40#	36.60 \pm 3.78#	29.60 \pm 3.53#	3.80 \pm 0.79#
高剂量 + IWR-I 组($n = 10$)	58.50 \pm 1.43	52.30 \pm 2.45 Δ	47.50 \pm 2.80 Δ	43.30 \pm 3.27# Δ	36.90 \pm 4.23 Δ	2.60 \pm 0.52# Δ

* $P < 0.05$,与对照组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较; $\Delta P < 0.05$,与高剂量组比较。

2.2 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠血清肌酐和尿素氮水平的影响

与对照组比较,模型组小鼠血清肌酐和尿素氮水平升高($P < 0.05$);与模型组比较,中、高剂量组肌酐和尿素氮水平均降低($P < 0.05$);与高剂量组比较,高剂量 + IWR-I 组肌酐和尿素氮水平均升高($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠血清肌酐和尿素氮水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	肌酐(nmol/L)	尿素氮(μ g/mL)
对照组($n = 10$)	11.68 \pm 1.51	16.50 \pm 2.46
模型组($n = 10$)	30.74 \pm 4.50*	49.72 \pm 3.42*
低剂量组($n = 10$)	28.14 \pm 3.20	47.26 \pm 2.10
中剂量组($n = 10$)	23.80 \pm 4.09#	38.12 \pm 1.56#
高剂量组($n = 10$)	19.74 \pm 2.57#	28.50 \pm 4.35#
高剂量 + IWR-I 组($n = 10$)	24.86 \pm 3.88# Δ	43.00 \pm 6.21# Δ

* $P < 0.05$,与对照组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较; $\Delta P < 0.05$,与高剂量组比较。

2.3 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠血清 AChE 和 ChAT 水平的影响

与对照组比较,模型组小鼠血清 AChE 水平升高,ChAT 水平降低($P < 0.05$);与模型组比较,中、高剂量组 AChE 水平均降低,ChAT 水平均升高($P < 0.05$);与高剂量组比较,高剂量 + IWR-I 组

2 结果

2.1 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠认知功能的影响

与对照组比较,模型组小鼠第 2~5 天逃避潜伏期升高,穿越平台次数减少($P < 0.05$);与模型组比较,中、高剂量组第 3~5 天逃避潜伏期降低,穿越平台次数增加($P < 0.05$);与高剂量组比较,高剂量 + IWR-I 组第 2~5 天逃避潜伏期升高,穿越平台次数减少($P < 0.05$)。见表 1。

AChE 水平升高,ChAT 水平降低($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠血清 AChE 和 ChAT 水平的影响($\bar{x} \pm s, U/L$)

组别	AChE	ChAT
对照组($n = 10$)	170.66 \pm 10.61	261.28 \pm 12.14
模型组($n = 10$)	253.92 \pm 11.49*	198.48 \pm 9.42*
低剂量组($n = 10$)	248.08 \pm 11.84	203.92 \pm 8.66
中剂量组($n = 10$)	230.58 \pm 10.75#	217.92 \pm 10.01#
高剂量组($n = 10$)	199.92 \pm 15.72#	232.96 \pm 11.84#
高剂量 + IWR-I 组($n = 10$)	239.84 \pm 13.06 Δ	215.62 \pm 11.68# Δ

* $P < 0.05$,与对照组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较; $\Delta P < 0.05$,与高剂量组比较。

2.4 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠肾脏及脑组织病理学形态的影响

与对照组比较,模型组小鼠肾组织出现明显的肾小球结构紊乱,肾小管管腔增大,间质纤维化、炎性细胞浸润显著,脑组织海马 CA1 区细胞排列不规则且稀疏,细胞层次减少;与模型组比较,中、高剂量组上述病理损伤有所减轻;与高剂量组比较,高剂量 + IWR-I 组病理损伤加重。见图 1。

2.5 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠脑组织中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达水平降低($P < 0.05$);与模型组比

较,中、高剂量组 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$);与高剂量组比较,高剂量 + IWR-I 组

Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图 2 及表 4。

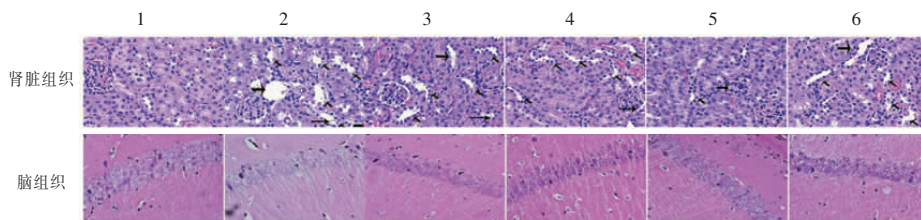


图 1 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠肾脏及脑组织病理学形态的影响

1. 对照组;2. 模型组;3. 低剂量组;4. 中剂量组;5. 加高剂量组;6. 高剂量+IWR-I 组。箭头示血管病变。

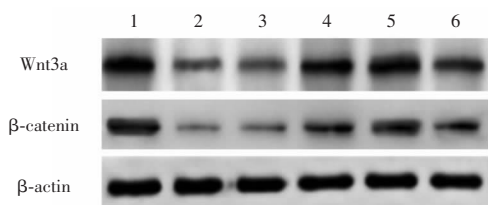


图 2 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路表达的影响

1. 对照组;2. 模型组;3. 低剂量组;4. 中剂量组;5. 加高剂量组;6. 高剂量+IWR-I 组。

表 4 加味大黄附子汤对慢性肾脏病小鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Wnt3a	β -catenin
对照组 ($n = 10$)	1.49 \pm 0.21	0.93 \pm 0.12
模型组 ($n = 10$)	0.37 \pm 0.10 *	0.17 \pm 0.03 *
低剂量组 ($n = 10$)	0.40 \pm 0.08	0.21 \pm 0.07
中剂量组 ($n = 10$)	0.83 \pm 0.12 #	0.48 \pm 0.13 #
高剂量组 ($n = 10$)	1.26 \pm 0.10 #	0.77 \pm 0.15 #
高剂量 + IWR-I 组 ($n = 10$)	0.75 \pm 0.15 # Δ	0.33 \pm 0.12 # Δ

* $P < 0.05$,与对照组比较;# $P < 0.05$,与模型组比较; $\Delta P < 0.05$,与高剂量组比较。

3 讨论

近年来,中医药防治慢性肾脏病及认知功能障碍方面的研究已成为热点。中医并没有认知功能障碍这一病名,可归为“呆病”“脑病”“髓消”等范畴,其发病与肾精不足、浊瘀阻窍有关;而慢性肾脏病在中医中属于“虚劳”“水肿”等病,病机为脾肾虚亏、湿停瘀阻;可见慢性肾脏病与认知功能障碍的病机均与肾精关系密切^[9-10]。加味大黄附子汤方中附子可回阳救逆、补火助阳,大黄性寒,具有清热泻火、攻逐积滞、祛瘀活血之效,牡蛎可净化瘀血、收敛解毒,苦参、蒲公英具有清热解毒、燥湿利尿的功效,山参大补元气、生津安神,诸药合用攻补兼施,切中病机^[11-12]。

目前,慢性肾脏病动物模型的制备方法较多,均存在一定的局限性,其中手术操作稍复杂,容易出现术后感染、死亡;尾静脉注射阿霉素,破坏肾小球结构,引起肾功能进行恶化,但与中医病因病机学说相符^[13-14]。本研究采用 0.2% 腺嘌呤饲料诱导慢性肾脏病动物模型,腺嘌呤进入动物体内后,其代谢产物达到肾脏造成肾损伤,造成肾功能减退,更符合人类慢性肾脏病的发生发展过程。结果显示,与对照组比较,模型组小鼠肾组织肾小球结构紊乱,肾功能指标升高,同时伴有认知功能减弱,脑组织海马 CA1 区细胞排列不规则且稀疏,细胞层次减少,胆碱能神经功能减弱。加味大黄附子汤在改善模型小鼠肾功能和认知功能方面发挥了良好效果,与既往研究^[7]结果相符。

Wnt 信号广泛存在于各生物体,与多种疾病发病相关,其中 Wnt/ β -catenin 信号通路是 Wnt 信号中的经典通路,通路激活时,Wnt 蛋白被分泌至细胞外,与细胞膜上的跨膜受体结合引起 Wnt/ β -catenin 通路的活化, β -catenin 进入细胞核影响下游基因表达^[15-16]。大量研究^[17-18]表明,Wnt/ β -catenin 信号通路在认知功能障碍中发挥至关重要的作用: Mohamed 等^[17]报道,调节 Wnt/ β -catenin 信号通路活性,可改善慢性应激诱导的认知缺陷。Wang 等^[18]研究发现,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路可缓解淀粉样蛋白 β 引起的血脑屏障功能障碍,可能是治疗阿尔茨海默症的潜在靶向通路。本研究显示,慢性肾脏病小鼠脑组织 Wnt/ β -catenin 信号通路处于“沉默”状态,加味大黄附子汤可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,改善中枢胆碱能系统反应,提升小鼠认知水平,而且添加 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 IWR-I 后可逆转加味大黄附子汤效果,反向验证 Wnt/ β -catenin 信号通路是加味大黄附子汤改善慢性肾脏病小鼠认知功能的作用机制。

(下转第 1168 页)