

李晓颖,田娅飞,刘畅,等. 苗药地锦草对糖尿病肾病大鼠肾小球足细胞相关蛋白表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(8): 105-113.

Li XY, Tian YF, Liu C, et al. Effect of *Euphorbia humifusa* on expression of glomerular podocyte-related proteins in diabetic kidney disease rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 105-113.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.014

苗药地锦草对糖尿病肾病大鼠肾小球足细胞相关蛋白表达的影响

李晓颖,田娅飞,刘畅,陈松,樊丰夷,张春,吴欣*

(贵阳市第一人民医院肾内科,贵阳 550002)

【摘要】 目的 观察苗药地锦草对糖尿病肾病(diabetic kidney disease,DKD)大鼠肾小球足细胞相关蛋白 Nephrin、Desmin 和 Angptl4 表达的影响,明确其在 DKD 治疗中的作用机制。方法 30 只 8 周龄雄性 SD 大鼠随机分为:正常对照组(Normal,N 组),DKD 组(D 组),DKD 地锦草治疗组(*Euphorbia humifusa*,E 组)。D 组与 E 组大鼠单次尾静脉注射链脲佐菌素(Streptozocin,STZ)(55 mg/kg)复制 DKD 模型,N 组注射溶媒柠檬酸缓冲液,连续 3 次 24 h 尿白蛋白量>5 mg/d 可确定为糖尿病肾病成模,5 周后 D 组 10 只大鼠及 E 组 9 只大鼠 DKD 成模。DKD 模型复制成功后,E 组大鼠灌胃法服用地锦草 300 mg/(kg·d),D 组与 N 组灌胃给予同体积普通双蒸水,各组大鼠灌胃共 16 周。所有大鼠在处死前称重、每周收集大鼠留尿检测 24 h 尿白蛋白、留血检测血清白蛋白、尿素氮、肌酐、胆固醇、白蛋白;苏木素-伊红(HE)染色、马松三色染色(Masson)观察肾病理学结构;透射电镜观察足细胞的形态;WT1 染色定位足细胞并采用 disector/fractionator 方法进行足细胞计数;免疫组化观察 Nephrin、Desmin、Angptl4 的蛋白定位;Western blot 法检测 Nephrin、Desmin、Angptl4、Collagen IV 的蛋白表达量;qPCR 法检测 Nephrin、Desmin、Angptl4、Collagen IV 的 mRNA 含量。结果 D 组较 N 组大鼠血糖、24 h 尿白蛋白、尿素、肌酐、胆固醇均明显升高,白蛋白明显降低($P<0.05$)。E 组大鼠上述各指标均较 D 组明显改善($P<0.05$)。HE 及 Masson 染色可见,N 组大鼠肾小球结构完成,系膜细胞及基质正常。D 组大鼠肾小球系膜细胞增生,系膜区基质沉积较多。E 组大鼠经地锦草灌胃治疗后上述情况得以改善。透射电镜显示 N 组大鼠肾小球足细胞足突正常,D 组大鼠足突融合或消失,E 组大鼠足突较完整。WT1 染色显示 D 组足细胞计数较 N 组减少,E 组较 D 组明显增加($P<0.05$)。免疫组化,Western blot 及 qPCR 结果显示,Desmin、Angptl4 及 Collagen IV 蛋白及 mRNA 在 N 组表达较少,上述指标在 D 组表达明显增多($P<0.05$),E 组大鼠经地锦草治疗后 Desmin、Angptl4 及 Collagen IV 蛋白及 mRNA 的表达较 D 组明显减少($P<0.05$)。D 组 Nephrin 蛋白及 mRNA 表达较 N 组明显减少,E 组较 D 组表达增多($P<0.05$)。结论 地锦草治疗可以明显减少 DKD 大鼠足细胞 Desmin、Angptl4 及 Collagen IV 的表达并增加 Nephrin 的表达,有效保护足细胞的机械屏障及电荷屏障,抑制足细胞发生转分化,减轻 DKD 大鼠的蛋白尿并改善其肾功能。

【关键词】 糖尿病肾病;地锦草;Nephrin;Desmin;Angptl4

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2023)08-0105-09

Effect of *Euphorbia humifusa* on expression of glomerular podocyte-related proteins in diabetic kidney disease rats

LI Xiaoying, TIAN Yafei, LIU Chang, CHEN Song, FAN Fengyi, ZHANG Chun, WU Xin*

(Department of Nephrology, Guiyang First People's Hospital, Guiyang 550002, China)

【基金项目】 贵阳市人才创新创业资助项目(筑人才办合同[2017]第17号);贵州省卫健委科学技术基金项目(gzwbkj2022-058);贵州省科技厅基础研究计划(自然科学,黔科合基础-ZK[2022]一般002号);贵阳市科技局筑科合同([2019]9-8号);贵州省中医药民族医药管理局(QZYY-2021-117)。

【作者简介】 李晓颖(1984—),女,博士,主治医师,研究方向:肾纤维化的防治机制。E-mail:lixiaoying622@163.com

【通信作者】 吴欣(1974—),女,硕士,主任医师,研究方向:肾纤维化的防治机制。E-mail:896813035@qq.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of *Euphorbia humifusa* on expression of nephrin, desmin, and Angptl4 in glomerular podocytes of diabetic kidney disease (DKD) rats, and to clarify the mechanism of its action in DKD treatment. **Methods** Eight-week-old male SD rats were randomly divided into normal (N), DKD group (D) and DKD treated with *Euphorbia humifusa* (E) groups. Rats in D and E groups were treated by a single tail vein injection of 55 mg/kg streptozotocin to induce the DKD model. Rats in the N group were injected with the same volume of citrate buffer. The DKD model was evaluated by 24 h urinary albumin of >5 mg/d for 3 consecutive detection. After 5 weeks, the DKD model was established in 10 D group rats and nine E group rats. After successfully establishing the DKD model, the E group was administered 300 mg/(kg·d) *Euphorbia humifusa* by gavage, and rats in D and N groups were administered the same volume of double distilled water by intragastric administration for 16 weeks. All rats were weighed before death, urine was collected to measure 24 h urinary albumin, and blood was collected for serum albumin, urea nitrogen, creatinine, cholesterol, and albumin measurements. Hematoxylin-eosin and Masson trichromatic staining were used to observe the nephrotic structure. Podocyte morphology was observed by transmission electron microscopy. Podocytes were labeled by WT1 staining and counted by the dissector/fractionator method. Protein localization of nephrin, desmin, Angptl4, and WT1 was observed by immunohistochemistry. Western blot was used to measure the protein expression levels of nephrin, desmin, Angptl4, and collagen IV. Nephrin, desmin, Angptl4, and collagen IV mRNA expression was measured by qPCR. **Results** Compared with the findings in the N group, in the D group, blood glucose, 24-hour urine albumin, urea nitrogen, creatinine, and cholesterol were significantly increased, while albumin was significantly decreased. All indexes in the E group were significantly improved compared with those in the D group ($P < 0.05$). Hematoxylin-eosin and Masson staining showed that the glomerular structure of rats in the N group was complete without obvious mesangial hyperplasia. In the D group, mesangial hyperplasia and mesangial matrix deposition were observed. In E the group, these conditions were improved by intragastric treatment with *Euphorbia humifusa*. Transmission electron microscopy showed that glomerular podocytes of the N group were normal, podocytes of the D group were fused or disappeared, and podocytes of the E group were intact. WT1 staining showed that the number of podocytes in the D group was lower than that in the N group, and the podocytes number in the E group was significantly higher than that in the D group ($P < 0.05$). Immunohistochemistry, western blotting, and qPCR showed that protein and mRNA expression of desmin, Angptl4, and collagen IV in the N group were lower than those in the D group, while protein and mRNA expression of desmin and Angptl4 in the E group were significantly lower than those in the D group ($P < 0.05$). Nephrin protein and mRNA expression in the D group was significantly lower than that in the N group, and nephrin protein and mRNA expression in the E group was higher than that in the D group ($P < 0.05$). **Conclusions** *Euphorbia humifusa* treatment significantly reduces the expression of desmin, Angptl4, and collagen IV, and increases the expression of nephrin in DKD rat podocytes. *Euphorbia humifusa* effectively protected the mechanical and charge barrier of podocytes, inhibits transdifferentiation of podocytes, reduces proteinuria, and improves renal functions.

【Keywords】 diabetic kidney disease; *Euphorbia humifusa*; Nephrin; Desmin; Angptl4

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

国际糖尿病联盟于 2017 年年底公布了第八版全球糖尿病地图^[1],到 2017 年全球成人糖尿病患者(20~79 岁)已达到 4.25 亿,到 2045 年,糖尿病患者预计可能达到 6.42 亿,其中我国糖尿病患者高达 1.144 亿。糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病常见的微血管并发症之一,严重危害人类健康,目前已经成为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)的最主要原因。但 DKD 发病机制非常复杂,目前仍不清楚^[2]。早期 DKD 的表现持续增加的微量白蛋白尿,晚期出现进行性肾功能下降,其中足细胞损伤在 DKD 的进程中起关键作用。

足细胞标志性蛋白的变化可以一定程度上反映其损伤程度,Nephrin 是在足细胞裂孔膜上特异性表达的蛋白质,在肾小球机械和电荷屏障功能中发挥重要作用,其异常表达可以反映肾足细胞损伤情况^[3-4]。血管生成素样蛋白 4 (Angiopoietin-like protein 4, Angptl4) 是血管生成素样蛋白超家族的一种分泌型糖蛋白^[5]。生理状态下足细胞分泌很少,病理状态下,足细胞分泌 Angptl4 增加,它可与肾小球基底膜带负电荷的硫酸类肝素蛋白结合,破坏肾小球基底膜的电荷屏障而加剧蛋白尿引起肾损伤。另在高血糖的诱导下,足细胞可发生上皮细胞向间充质细胞的转分化(epithelial-mesenchymal

transition, EMT), 导致足细胞转换成具有分泌细胞外基质的间充质细胞^[6]。越来越多的研究提示^[7], 足细胞 EMT 可能是足细胞功能缺失、蛋白尿及肾小球硬化的使动因素。足细胞发生 EMT 后, 则上皮细胞标志蛋白 Nephritin 表达减少, 间充质细胞标志蛋白结蛋白 (Desmin) 等表达增加, Desmin 是足细胞发生 EMT 的标志蛋白之一, 足细胞发生 EMT 后细胞外基质蛋白如胶原 IV (Collagen IV) 表达增加^[7]。

目前临床中 DKD 的治疗主要是以控制血糖、血压等手段为主, 但这些西医治疗手段并不能完全阻止其进展, 因此, 中医药在 DKD 的治疗中越来越引起重视。地锦草 (*Euphorbia humifusa*)^[8], 属于大戟科大戟属地锦草种的一种广泛分布于我国各地的双子叶植物, 具有抗炎、抗氧化、降血脂、降血糖等作用, 并且作为中药提取物, 地锦草应用于临床上具有副作用小、价格低廉等优点, 在贵州苗族中常用地锦草来治疗蛋白尿。Hong 等^[9] 研究发现降糖汤 (主要成分为由地锦草、丹参、黄芪、知母、黄连组成的中药合剂) 可以明显改善 DKD 小鼠电镜下足细胞的损伤, 并降低血糖、血脂及尿微量白蛋白/肌酐比值, 为进一步明确地锦草是否在改善足细胞损伤中发挥主要作用, 本研究在大鼠体内复制 DKD 模型, 通过地锦草灌胃治疗, 观察其对 DKD 大鼠足细胞相关蛋白表达的影响, 探讨地锦草治疗 DKD 的疗效及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠 30 只, 8 周龄, 体重 180~220 g, 购自贵州医科大学 [SCXK (黔) 2018-0001], 所有实验动物饲养在贵州医科大学临床技能中心 [SYXK (黔) 2018-0001]。本研究经贵州医科大学动物伦理委员会批准 (1901106), 实验设计及实施过程中严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

链脲佐菌素 (Streptozocin, STZ) (批号: 18883-66-4) 购自美国 Sigma 公司, 以柠檬酸缓冲液 (pH = 4.2~4.5) 溶解, 尾静脉注射现配现用; 地锦草颗粒购自贵州省中医药大学附属医院, 以双蒸水溶解后灌胃; 血糖、肌酐、尿素氮、总胆固醇、白蛋白生化检测试剂盒购自南京建成公司; 尿微量白蛋白免疫比浊法试剂盒购自上海太阳技术公司; Col IV 多克隆抗体 (批号: 01760475)、Desmin 多克隆抗体 (批号: 10007702)、Nephritin 多克隆抗体 (批号:

00087024)、WT1 多克隆抗体 (批号: 00012609) 均购自 Proteintech 公司; Angptl4 多克隆抗体 (批号: 00405531) 购自 Immunoway 公司; β -actin 单克隆抗体 (批号: 00100502) 购自普美公司; TaKaRa 逆转录试剂盒 (批号: RR047A)、TaKaRa Real-time 试剂盒 (批号: RR820A) 均购自日本 TaKaRa 公司。

实时荧光定量 PCR 仪、凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad 公司; 酶标仪购自美国 Thermo 公司; 电泳及电转移装置购自北京六一公司; PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司; 高速低温离心机及移液器购自德国 Eppendorf 公司; 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物造模及给药

购买大鼠后适应性饲养 1 周, 造模前检测大鼠随机血糖波动于 6.5~8.4 mmol/L 之间, 测大鼠 24 h 尿白蛋白定量均 <2 mg/d。将大鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 正常对照组 (N 组)、糖尿病组 (D 组)、地锦草组 (E 组)。用 pH = 4.4 的柠檬酸缓冲液配制 5% 的 STZ 溶液, 大鼠禁食 6 h 后戊巴比妥腹腔注射麻醉, D 组及 E 组大鼠经单次尾静脉注射 STZ (55 mg/kg) 复制 DKD 大鼠模型, N 组大鼠尾静脉注射等体积的柠檬酸缓冲液。STZ 注射 2 d 后大鼠尾静脉取血测血糖, 血糖 ≥ 16.7 mmol/L 则大鼠糖尿病模型造模成功, 本研究中 D 组及 E 组大鼠糖尿病造模均成功。每周收集大鼠尿液测 24 h 尿白蛋白量, 连续 3 次 >5 mg/d 确定为糖尿病肾病成模, 5 周后 D 组 10 只大鼠及 E 组 9 只大鼠糖尿病肾病成模, 大鼠造模过程中血糖浓度及 24 h 尿白蛋白定量值详见表 1。

DKD 模型复制成功后 E 组大鼠灌胃法服用地锦草 300 mg/(kg·d), D 组与 N 组灌胃给予同体积普通双蒸水。各组大鼠灌胃共 16 周。给药结束后, 提前两天收集 24 h 尿液, 记录尿量, 离心后取上清测 24 h 尿蛋白定量。处死大鼠前禁食 6 h, 戊巴比妥钠麻醉, 股动脉取血处死, 4℃ 3000 r/min 离心 5 min 取上清测生化指标。大鼠处死后从腹主动脉处注入生理盐水冲洗器官摘除肾, 剥除外膜, 矢状面将肾切成 2 mm 厚的切片, 两片于 4% 甲醛溶液中固定, 修剪约 1.5 mm³ 皮质于 2.5% 戊二醛固定液固定, 其余做好标记放于 -80℃ 冰箱里。

1.3.2 指标检测

(1) 生化法

收集的血清使用二乙酰-脲法测定尿素氮, 苦

味酸法测定肌酐,氧化酶法测胆固醇,溴甲酚绿法测血清白蛋白,免疫比浊法测尿微量白蛋白,双缩脲法测尿蛋白浓度,24 h 尿量乘以尿蛋白浓度即 24 h 尿蛋白定量。各指标的光密度 OD 值使用 Thermo Scientific 公司 Multiskan GO 酶标仪测定。

(2) 形态学观察

4%甲醛固定的肾,经脱水、透明、包蜡后用切片机制成 3 μm 厚的石蜡切片,显微镜下观察 HE 和 Masson 染色组织形态及拍照保存。

(3) 组织电镜检查

预先准备含 2.5%戊二醛固定液,肾离体后立即取大小约 1.5 mm^3 的肾皮质置于固定液的小培养皿中预固定 1 min,马上转移至新的电镜固定液中,室温固定约 1 h,转 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏固定保存,后经锇酸后固定、乙醇梯度脱水、树脂渗透、包埋,超薄切片后醋酸铀、枸橼酸铅染色,干燥后于透射电镜下观察、拍照。

(4) 免疫组化染色

石蜡切片脱蜡水化后,阻断内源性过氧化物酶,微波抗原修复,滴加一抗过夜 Desmin (1 : 200)、Nephrin (1 : 100)、Angptl4 (1 : 100)、WT1 (1 : 100) 阴性对照组用 PBS 代替一抗。第 2 日二抗孵育 1 h 后 DAB 显色,苏木素复染,脱水透明封片显微镜下

观察、拍照,Image J 图像分析软件分析各指标的阳性染色所占比例。

(5) 足细胞数量检测

Wilms 瘤基因 1 (Wilms' tumor gene 1, WT1) 蛋白为足细胞核的特异性标记蛋白,可用于计数足细胞。足细胞计数采用国际公认的 disector/fractionator 方法,操作方法详见参考文献^[10]。

(6) Western blot 检测

-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的肾组织取肾皮质,蛋白裂解液提取总蛋白,加入 1.5 \times buffer 制成蛋白液,蛋白质经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离再转移至 PVDF 膜上,Col IV (1 : 2000), Desmin (1 : 5000)、Nephrin (1 : 3000)、Angptl4 (1 : 1000)、 β -actin (1 : 5000) 孵育过夜,第二日孵育二抗 1 h,凝胶成像系统成像,Image J 图像分析,指标与同一张凝胶上的 β -actin 条带的灰度值比值即为相对灰度值。

(7) 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的肾组织取肾皮质,提取组织 mRNA, TaKaRa 逆转录试剂盒将提纯的 RNA 逆转录为 cDNA,按照 Real-time PCR 试剂盒 (TaKaRa) 进行实时荧光定量检测荧光信号,所有引物均由上海生物工程技术有限公司合成,各指标的引物序列见表 2。

表 1 各组大鼠造模过程中血糖及尿蛋白数值 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Blood glucose and urinary albumin of rats in each group in the modeling process

组别 Groups	造模前血糖 (mmol/L) (n=10) Blood glucose before molding	造模 2 d 后血糖 (mmol/L) (n=10) Blood glucose 2 days after molding	造模前 24 h 尿蛋白 (mg) (n=10) 24 h urinary albumin before molding	造模 5 周后 24 h 尿蛋白 (mg) 24 h urinary albumin 5 weeks after molding
N 组 N group	7.19 \pm 1.20	6.61 \pm 1.27	1.13 \pm 0.53	1.23 \pm 0.64 (n=10)
D 组 D group	6.94 \pm 0.79	26.78 \pm 6.09 \blacktriangle	1.06 \pm 0.44	11.9 \pm 3.07 \blacktriangle (n=10)
E 组 E group	6.87 \pm 0.83	25.93 \pm 4.47 \blacktriangle	0.98 \pm 0.47	11.50 \pm 3.78 \blacktriangle (n=9)

注:与 N 组相比, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

Note. Compared with N group, $\blacktriangle P < 0.05$.

表 2 RT-qPCR 引物序列

Table 2 Real-time quantitative PCR primer sequence

引物 Primer	序列 Sequence	长度 (bp) Length
Nephrin-rat	F: 5' -CTATGCCCTCTTCAAATGCACG-3' R: 5' -TATGCTGACAACCTTCAGTCCC-3'	135
Desmin-rat	F: 5' -ACTCTTTCAAGAAGGGGAGCG-3' R: 5' -TTCAGGCGTCTCTGAATCACC-3'	152
Collagen IV-rat	F: 5' -TTGGCTTTCCTGGTAGTCGT-3' R: 5' -CCACCTTTCTGCTTCACCC-3'	147
Angptl4-rat	F: 5' -TCCACTCTATTCCACGGCAAC-3' R: 5' -TTCAGGCGTCTCTGAATCACC-3'	126
β -actin-rat	F: 5' -ATTTGGCACCACACTTTCTA-3' R: 5' -TCTGGTCATCATCTTTTCACGG-3'	175

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件分析, 计量资料数据符合正态分布以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间数据差异比较采用单因素 ANOVA 检验, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠一般状况

N 组大鼠饮食、饮水均佳, 体重稳定生长, 毛色光滑, 精力充沛, 大小便正常; D 组大鼠饮水量明显增加, 小便增多, 毛色暗淡无光, 体重增长较慢, 大便稀不成型; E 组大鼠各不良症状有所改善。

2.2 各组生化指标检测结果

给药结束后收集标本测量各指标结果显示, D 组较 N 组大鼠血糖、24 h 尿蛋白、尿素、肌酐、胆固醇均明显升高 ($P<0.05$), 白蛋白明显降低 ($P<0.05$)。E 组大鼠各指标均较 D 组明显改善 ($P<$

0.05)。见表 3。

2.3 肾组织形态学变化

HE 及 Masson 染色可见, N 组大鼠肾小球结构完成, 无明显系膜增生。D 组大鼠肾小球系膜增生, 肾小球内有明显基质沉积。E 组大鼠经地锦草灌胃治疗后上述情况改善。见图 1。

2.4 足细胞的形态学观察和数量分析

透射电镜显示 N 组大鼠肾小球足细胞足突正常, D 组大鼠足突融合或消失, E 组大鼠足突较完整 (图 2A)。肾小球足细胞核 WT1 免疫组化染色阳性, N 组肾小球内 WT1 阳性细胞数较多, D 组足细胞数量较 N 组减少, E 组足细胞数量较 D 组增多 ($P<0.05$), 和 N 组比较无明显差异 (图 2B)。

2.5 免疫组化染色

如图 3 所示, N 组大鼠肾中足细胞的标志蛋白 Nephrin 表达较多, D 组表达明显较少, E 组大鼠肾组织中的 Nephrin 表达较 D 组显著升高 ($P<0.05$);

表 3 各组大鼠生化指标情况 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Biochemical parameters of rats in each group

组别 Groups	血糖 (mmol/L) Blood glucose	24 h 尿白蛋白 (mg) 24 h urinary albumin	尿素 (mmol/L) Urea nitrogen	肌酐 (mmol/L) Creatinine	白蛋白 (g/L) Albumin	胆固醇 (mmol/L) Cholesterol
N 组 N group	7.16 \pm 1.24	7.66 \pm 1.24	6.16 \pm 0.65	95.46 \pm 13.10	27.63 \pm 4.89	4.88 \pm 1.69
D 组 D group	24.67 \pm 3.56 [▲]	43.88 \pm 6.59 [▲]	11.67 \pm 2.16 [▲]	147.22 \pm 22.63 [▲]	16.35 \pm 2.52 [▲]	8.10 \pm 1.54 [▲]
E 组 E group	16.79 \pm 2.57 ^{▲#}	29.02 \pm 6.85 ^{▲#}	8.32 \pm 1.05 [#]	101.51 \pm 23.65 [#]	23.99 \pm 2.45 [▲]	5.39 \pm 1.36 [#]

注: 与 N 组相比, [▲] $P<0.05$; 与 D 组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with N group, [▲] $P<0.05$. Compared with D group, [#] $P<0.05$.

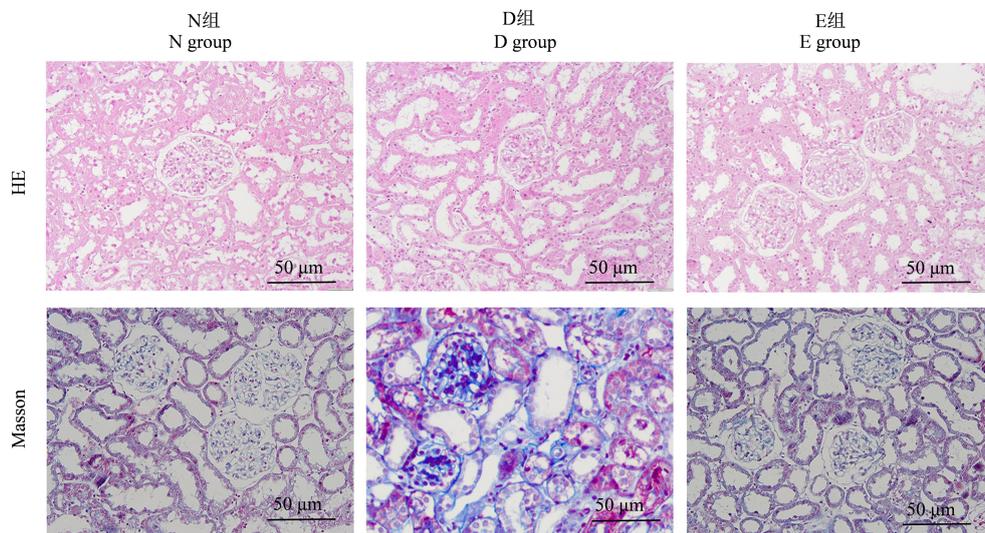
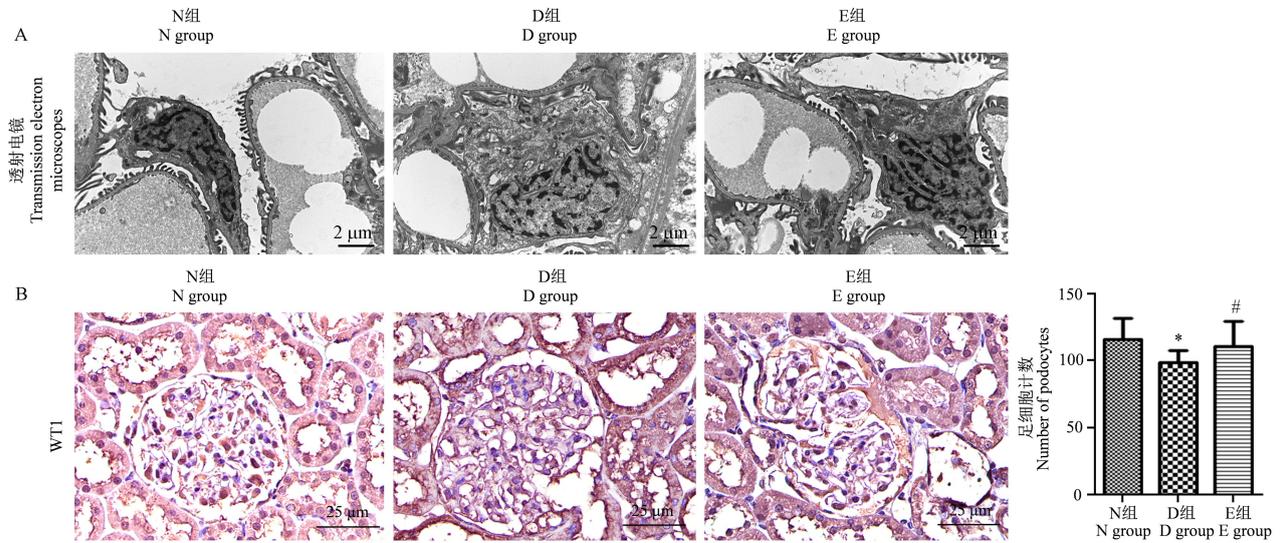


图 1 各组大鼠肾组织 HE 及 Masson 染色

Figure 1 HE and Masson staining of renal tissues of rats in each group

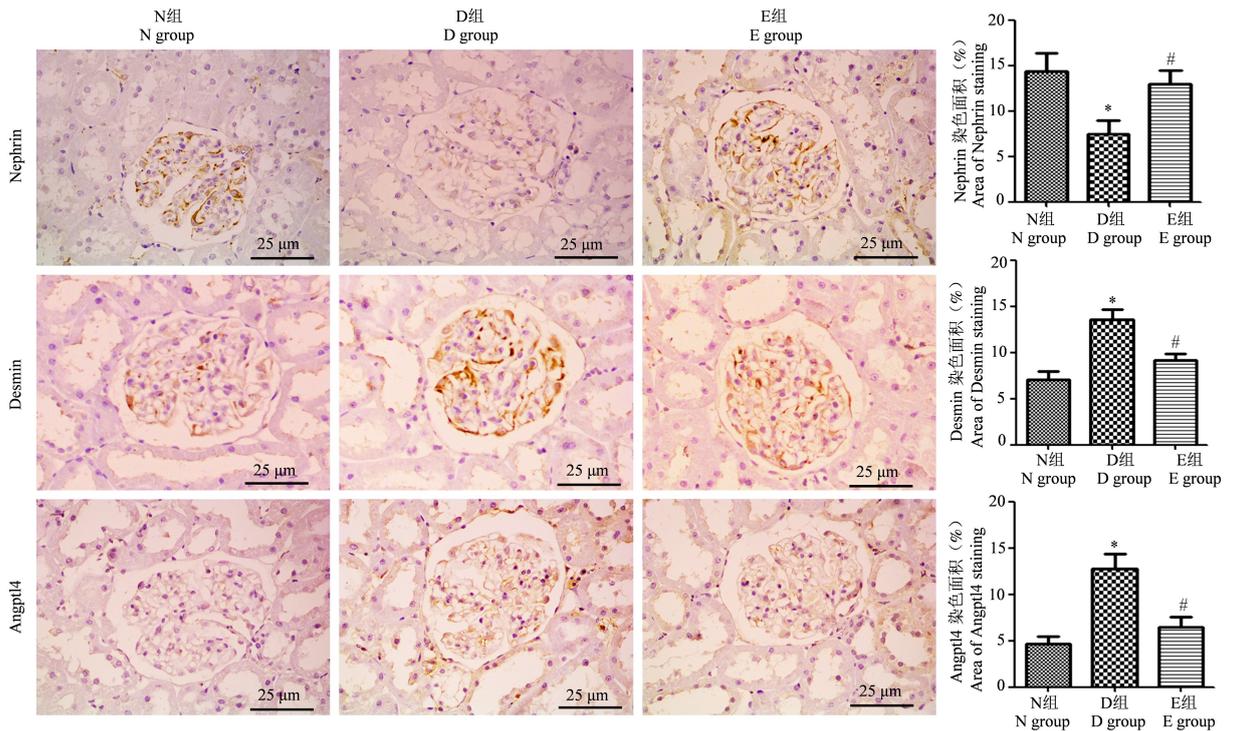


注: A:透射电镜下肾小球足细胞的病理变化;B:免疫组化法检测各组大鼠肾小球足细胞特异性蛋白 WT1 的表达情况及肾小球足细胞数量统计。与 N 组相比, * $P<0.05$;与 D 组相比, # $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠肾足细胞形态及数量检测 ($n=8$)

Note. A, Renal tissues pathological changes of each group by transmission electron microscope. B, Expression of podocyte specific protein WT1 in each group were detected by immunohistochemistry and the statistics of glomerular podocytes. Compared with N group, * $P<0.05$. Compared with D group, # $P<0.05$.

Figure 2 Morphology and quantity of renal podocytes were detected in each group



注:与 N 组相比, * $P<0.05$;与 D 组相比, # $P<0.05$ 。

图 3 免疫组化法检测各组大鼠 Nephrin、Desmin 及 Angptl4 蛋白表达情况及阳性染色率统计 ($n=8$)

Note. Compared with N group, * $P<0.05$. Compared with D group, # $P<0.05$.

Figure 3 Expression of Nephrin, Desmin and Angptl4 proteins in each group were detected by immunohistochemistry and the positive staining rate

N 组大鼠肾小球 Desmin 及 Angptl4 表达较少, D 组表达明显增多, 经地锦草治疗的 E 组大鼠肾组织中这两种蛋白表达较 D 组明显减少 ($P < 0.05$)。

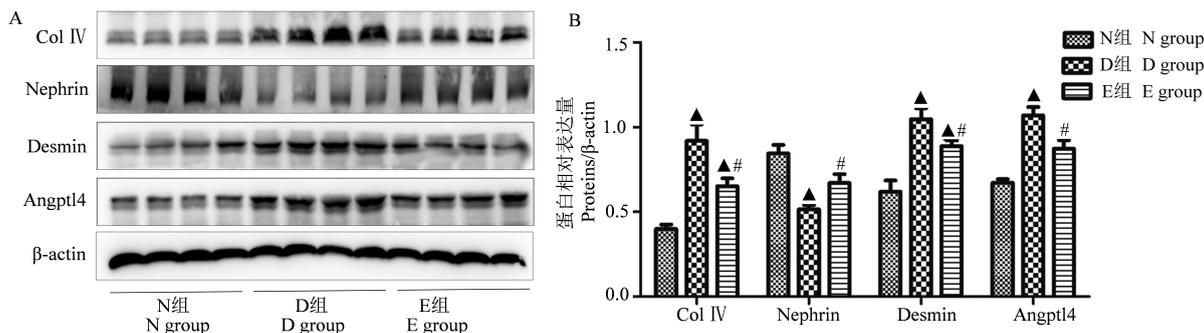
2.6 Western blot 结果

Desmin 及 Angptl4 蛋白在 N 组表达较少, D 组两种蛋白表达明显增多 ($P < 0.05$), E 组大鼠经地锦草治疗后 Desmin 及 Angptl4 蛋白的表达较 D 组明显减少 ($P < 0.05$)。D 组 Nephrin 蛋白表达较 N 组明显减少 ($P < 0.05$), E 组较 D 组表达回升 ($P <$

0.05)。Collagen IV 表达 D 组较 N 组明显增加, 经地锦草治疗后表达明显减少 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.7 RT-qPCR 结果

RT-qPCR 结果显示, 与 N 组相比, D 组的 Angptl4 和 Desmin 的 mRNA 明显升高, E 组表达明显减少 ($P < 0.05$)。纤维化指标 Collagen IV 的 mRNA 变化与 Desmin 和 Angptl4 一致。N 组 Nephrin 的 mRNA 表达较多, D 组表达明显减少 ($P < 0.05$), E 组 Nephrin 增多 ($P < 0.05$) (图 5)。

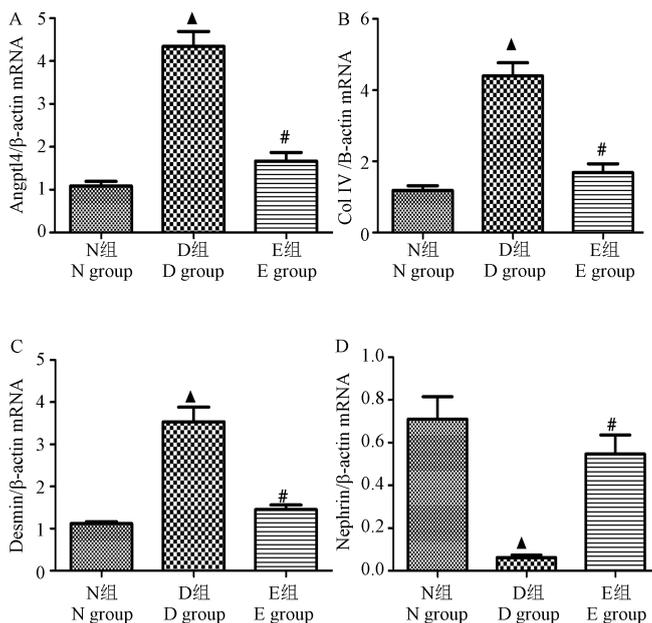


注: A: Western blot 结果显示各组大鼠 Collagen IV、Nephrin、Desmin、Angptl4 蛋白的表达情况; B: A 图蛋白表达的相对灰度统计图。与 N 组相比, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 D 组相比, $\# P < 0.05$ 。

图 4 Western blot 检测各组大鼠肾组织相关蛋白的表达情况 ($n = 8$)

Note. A, Protein expressions of Collagen IV, Nephrin, Desmin and Angptl4 in rats in each group detected by Western blot. B, Relative grayscale statistical graph of protein expression in Figure A. Compared with N group, $\blacktriangle P < 0.05$. Compared with D group, $\# P < 0.05$.

Figure 4 Western blot analysis was performed to detect the expression of related proteins in renal tissue of rats in each group



注: 与 N 组相比, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 D 组相比, $\# P < 0.05$ 。

图 5 RT-qPCR 结果显示 Angptl4、Collagen IV、Desmin、Nephrin 各指标 mRNA 的表达情况 ($n = 8$)

Note. Compared with N group, $\blacktriangle P < 0.05$. Compared with D group, $\# P < 0.05$.

Figure 5 RT-qPCR results showed mRNA expressions of Angptl4, Collagen IV, Desmin and Nephrin

3 讨论

本研究中我们采用 STZ 尾静脉注射复制 1 型糖尿病大鼠模型,这是糖尿病复制常用的经典方法^[11],STZ 可选择性破坏大鼠胰岛 β 细胞引起血糖升高,本实验糖尿病模型复制成功。持续升高的血糖会引起肾损害,出现蛋白尿,本实验结果提示大鼠 DKD 模型复制成功。

目前临床中治疗 DKD 主要是以西药为主的控制血糖、血压以及降低尿蛋白等方法,但并不能完全阻止 DKD 的进展。因此,深入研究 DKD 发病机制并寻找新的天然药物^[8],对于减缓该疾病发生发展具有重要意义。地锦草是中国药典中记载的一种重要药材,可以分离出包括甜菜碱、脱氢罗汉酸甲酯、黄酮苷、芹菜素、单宁、 α -吡咯烷酮类、酚类、倍半萜、羊毛甾烷三萜等多种生物活性化合物,这些化合物具有包括抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、血管舒张、止血、降血糖及抑制肾功能损伤等多种药理作用^[8]。但在临床中地锦草对 DKD 的延缓的作用机制尚不清楚。

足细胞损伤在 DKD 的进程中起关键作用。足细胞是一种终末分化的细胞,又称为肾小球脏层上皮细胞,经分化成熟后一般不可再生,与基底膜及毛细血管内皮细胞构成了肾小球滤过屏障,其损伤与 DKD 发生发展密切相关^[12]。DKD 早期足细胞损伤主要以足突融合、细胞变性肥大、足细胞密度和数量的减少为主要临床表现。本研究结果显示随着糖尿病的进展,随即临床中出现微量白蛋白尿,生化结果显示,D 组大鼠出现明显的尿素氮、肌酐升高及高脂血症。使用地锦草治疗后血糖明显降低,肾功能及高脂血症明显好转。

足细胞从胞体伸出初级突起,初级突起上再分出许多指状的次级突起即足突,覆盖于基底膜上,并在交叉的足突间形成裂孔隔膜(slit diaphragms, SD)。SD 由多种足细胞相关蛋白分子组成,包括足细胞裂隙隔膜分子(nephrin)、膜蛋白(podocin)、CD2 相关蛋白(CD2-associated protein, CD2AP)、钙黏连蛋白超家族(FAT)、周边蛋白(ZO-1)及胎盘钙黏蛋白(P-cadherin)等,它们与足突共同构成肾小球滤过屏障的最关键部分^[6]。本研究结果显示当大鼠 DKD 时,透射电镜检查发现大鼠肾小球足细胞足突融合或消失,WT1 免疫组化染色显示足细胞数量减少,大鼠肾 Nephlin 的 mRNA 及蛋白表达明显

减少,结果与目前研究结果相一致^[13-14]。但使用地锦草后 Nephlin 的表达明显升高,大鼠肾小球足细胞数量增多且电镜显示足突较完整,提示地锦草可以通过保护肾小球足细胞滤过膜的裂缝隔膜维持其结构的完整性而延缓 DKD 的进展。生化结果也提示经地锦草灌胃后 24 h 尿蛋白定量明显减少,及血清白蛋白也明显升高。

有研究表明,足细胞在高血糖的诱导下发生 EMT 可能是足细胞功能缺失、蛋白尿及肾小球硬化的使动因素^[6]。足细胞发生 EMT 后上皮细胞标志蛋白 Nephlin、Podocin、CD2AP、ZO-1、P-cadherin 等表达减少,间充质细胞标志蛋白结蛋白(desmin)、整合素连接激酶(integrin linked kinase, ILK)、纤维连接蛋白(ffibronectin, FN)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase, MMP-9)和成纤维细胞特异蛋白-1(fibroblast specific protein, FSP-1)等表达增加。目前有研究发现^[15-16],在多种肾小球疾病中,Desmin 表达明显上调。本研究发现,DKD 组大鼠肾小球内 Desmin 蛋白及 mRNA 表达明显升高,表明 DKD 大鼠发生明显的足细胞转分化,地锦草治疗后 Desmin 明显减少。表明中成药地锦草可能通过降低肾小球足细胞 Desmin 的表达,抑制 DKD 大鼠足细胞发生 EMT 改变,从而明显减少尿蛋白的发生及 DKD 的进展。

本研究中,DKD 组大鼠肾 Angptl4 表达水平明显高于对照组,结果与其他肾小球疾病,如膜性肾病、微小病变性肾病的研究结果相似^[17-19]。通过转基因技术使小鼠足细胞特异性高表达 Angptl4 后,可使 MCD 小鼠肾小球滤过屏障唾液酸分泌降低,导致静电荷减少,小鼠出现明显蛋白尿,表明肾小球足细胞特异性高表达 Angptl4 在 MCD 蛋白尿形成过程中起重要作用。本研究发现地锦草治疗后可以明显降低 Angptl4 的 mRNA 及蛋白质的表达,明显降低对肾小球基底膜的损伤而减轻蛋白尿,而延缓 DKD 的发生发展。

综上所述,本实验结果显示 DKD 时大鼠肾小球滤过屏障破坏,蛋白尿增加,肾功能下降,使用地锦草治疗后,可能通过促进 Nephlin 蛋白表达上调及 Angptl4 蛋白表达下调,明显改善肾小球滤过膜的机械屏障及电荷屏障,维持肾小球滤过膜的完整性。同时地锦草还可以抑制 Desmin 的表达,抑制足细胞在持续高糖的刺激下 EMT 的发生。由此可见,地锦草可以维持肾小球滤过膜的完整性及足细胞的形

态功能,降低 DKD 患者的蛋白尿抑制其肾功能损害,可能为其治疗糖尿病肾病的机制。

参考文献:

- [1] Unnikrishnan R, Pradeepa R, Joshi SR, et al. Type 2 diabetes: demystifying the global epidemic [J]. *Diabetes*, 2017, 66(6): 1432-1442.
- [2] Liu X, Guo Y, Wu J, et al. Discrimination of chronic kidney disease and diabetic nephropathy and analysis of their related influencing factors [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 5085-5096.
- [3] 吴薇, 刘不悔, 万毅刚, 等. 雷公藤甲素抑制 NLRP3 炎症小体活化改善高糖诱导的足细胞上皮-间充质转分化 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(24): 5457-5464.
- [4] 梁静, 张渊, 曹灵, 等. 纤溶系统对膜性肾病大鼠足细胞损伤的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(3): 283-287.
- [5] Al Shawaf E, Abu-Farha M, Devarajan S, et al. ANGPTL4: a predictive marker for diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 4943191.
- [6] Wang W, Long H, Huang W, et al. Bu-Shen-Huo-Xue Decoction ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting Rac1/PAK1/p38MAPK signaling pathway in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 587663.
- [7] Kang MK, Kim SI, Oh SY, et al. Tangeretin ameliorates glucose-induced podocyte injury through blocking epithelial to mesenchymal transition caused by oxidative stress and hypoxia [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8577.
- [8] 侯静, 黎理, 蔡毅. 地锦草组药用植物的研究进展 [J]. *华西药理学杂志*, 2020, 35(2): 218-224.
- [9] Hong JN, Li WW, Wang LL, et al. Jiangtang Decoction ameliorate diabetic nephropathy through the regulation of PI3K/Akt-mediated NF- κ B pathways in KK-Ay mice [J]. *Chin Med*, 2017, 12: 13.
- [10] White KE, Bilous RW. Estimation of podocyte number: a comparison of methods [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(2): 663-667.
- [11] 雷作熹, 罗仁, 董晓蕾, 等. STZ 诱导糖尿病肾病大鼠模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(3): 163-165.
- [12] Hongbo M, Yanjiao D, Shuo W, et al. Podocyte RNF166 deficiency alleviates diabetic nephropathy by mitigating mitochondria impairment and apoptosis via regulation of CYLD signal [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 545: 46-53.
- [13] Chen Y, Liu Q, Shan Z, et al. Catalpol ameliorates podocyte injury by stabilizing cytoskeleton and enhancing autophagy in diabetic nephropathy [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1477.
- [14] Yang K, Bai Y, Yu N, et al. Huidouba improved podocyte injury by down-regulating Nox4 expression in rats with diabetic nephropathy [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 587995.
- [15] Silverstein DM, Travis BR, Thornhill BA, et al. Altered expression of immune modulator and structural genes in neonatal unilateral ureteral obstruction [J]. *Kidney Int*, 2003, 64(1): 25-35.
- [16] Cui FQ, Gao YB, Wang YF, et al. Effect of Tang-Shen-Ning decoction on podocyte epithelial-enchymal transformation via inhibiting Wnt/ β -catenin pathway in diabetic mice [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(12): 12921-12936.
- [17] Shen X, Zhang Y, Lin C, et al. Calcineurin inhibitors ameliorate PAN-induced podocyte injury through the NFAT-Angptl4 pathway [J]. *J Pathol*, 2020, 252(3): 227-238.
- [18] Cara-Fuentes G, Segarra A, Silva-Sanchez C, et al. Angiopoietin-like-4 and minimal change disease [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0176198.
- [19] Davin JC. The glomerular permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome [J]. *Pediatr Nephrol*, 2016, 31(2): 207-215.

[收稿日期]2022-06-28