

马雪莉,魏锦慧,马鸿斌. 萆薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠足细胞 podocalyxin、 α -actinin-4 的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 49-56.

Ma XL, Wei JH, Ma HB. Effect of Bixie Fenqing granules on podocalyxin and α -actinin-4 in podocytes in rats with adriamycin-induced nephropathy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 49-56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.007

萆薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠足细胞 podocalyxin、 α -actinin-4 的影响

马雪莉,魏锦慧,马鸿斌*

(甘肃中医药大学附属医院,兰州 730000)

【摘要】 目的 探讨萆薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠蛋白尿及肾组织足细胞足糖萼蛋白(podocalyxin)、 α -辅肌动蛋白-4(α -actinin-4)的影响。**方法** 将 60 只 SPF 级 SD 大鼠,随机分为空白组 12 只和造模组 48 只,造模组大鼠采用分两次尾静脉注射的方法建立阿霉素肾病大鼠模型。造模成功后随机分为模型组、萆薢分清颗粒(6.56 mL/kg)组(中药组)、泼尼松组(6.3 mL/kg)、萆薢分清颗粒+泼尼松组(结合组)进行灌胃,空白组及模型组予以同等量生理盐水灌胃,每日 1 次,连续灌胃 4 周。给药结束后检测大鼠 24 h 尿蛋白定量(24 h-UTP)、血清总胆固醇(TC)、白蛋白(ALB)水平;采用苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色观察肾组织病理形态学变化,应用免疫组化法(IHC)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织中足细胞相关蛋白 podocalyxin、 α -actinin-4 表达水平。**结果** 空白组比较,模型组大鼠 24 h-UTP、血清中 TC 显著升高($P<0.05$);ALB 显著降低($P<0.05$);肾小球可见局灶节段性瘢痕形成,系膜细胞及系膜基质增生,肾小管空泡变性,管腔内可见蛋白管型,间质纤维细胞增生伴炎性细胞浸润;podocalyxin 阳性表达明显减弱, α -actinin-4 呈强阳性表达($P<0.05$);podocalyxin 蛋白表达量显著下降($P<0.05$), α -actinin-4 蛋白表达量显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,各治疗组 24 h-UTP、血清 TC 水平均有不同程度的下降,ALB 升高($P<0.05$);肾小球及小管间质病变较轻,少许肾间质水肿、纤维化,伴有少量炎性细胞浸润;podocalyxin 阳性表达增强, α -actinin-4 阳性表达减弱($P<0.05$);podocalyxin 蛋白表达量显著升高($P<0.05$), α -actinin-4 蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。**结论** 萆薢分清颗粒可通过上调 podocalyxin、下调 α -actinin-4 表达水平,从多靶点修复受损的足细胞,减少尿蛋白排泄量,保护肾。

【关键词】 阿霉素肾病大鼠;萆薢分清颗粒;足细胞;podocalyxin; α -actinin-4

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0049-08

Effect of Bixie Fenqing granules on podocalyxin and α -actinin-4 in podocytes in rats with adriamycin-induced nephropathy

MA Xueli, WEI Jinhui, MA Hongbin*

(Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

【Abstract】 Objective To explore the effects of Bixie Fenqing granules on proteinuria and podocyte podocalyxin and α -actinin-4 expression in renal tissues of rats with adriamycin-induced nephropathy. **Methods** Sixty specific-pathogen-free SD rats were divided randomly into a blank group ($n=12$) and model group ($n=48$). A rat model of

[基金项目] 甘肃中医药大学附属医院院内创新基金项目(gzfy-2018-02, gzfy-2020-12)。

[作者简介] 马雪莉(1994—),女,硕士,研究方向:中医药防治肾小球疾病。E-mail:1729784163@qq.com

[通信作者] 魏锦慧(1978—),男,副主任医师,研究方向:中西医结合防治肾脏疾病。E-mail:wjh780cool@163.com

adriamycin-induced nephropathy was established by two injections of adriamycin into the tail vein. After successful establishment of the model, the rats were divided randomly into a model group, Bixie Fenqing granules group (6.56 mL/kg) (Chinese medicine group), prednisone group (6.3 mL/kg), and Bixie Fenqing granules + prednisone group (combination group). Treatments were administered once a day for 4 weeks and the blank and model groups were given the same amount of normal saline. Levels of 24 h urinary protein (24 h-UTP), serum total cholesterol (TC), and albumin were measured and pathomorphological changes in renal tissue were observed by hematoxylin and eosin and Masson staining. Expression levels of the podocyte-associated protein podocalyxin and α -actinin-4 in rat kidney tissues were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Serum TC and 24 h-UTP were significantly increased and albumin was significantly decreased in the model group compared with the blank group ($P < 0.05$). Renal tissues in model rats showed focal segmental scar formation, proliferation of mesangial cells and mesangial matrix, vacuolar degeneration of renal tubules and protein tubules in the lumen, and interstitial fibrous cell proliferation with inflammatory cell infiltration. Podocalyxin expression was significantly decreased and α -actinin-4 expression was increased ($P < 0.05$) in the model group compared with the control group. Conversely, compared with the model group, 24 h-UTP and serum TC were decreased and albumin was increased to different degrees in each treatment group ($P < 0.05$), glomerular and tubulointerstitial lesions were mild, with little renal interstitial edema and fibrosis, accompanied by a small amount of inflammatory cell infiltration, and podocalyxin expression was increased and α -actinin-4 expression was decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Bixie Fenqing granules can repair damaged podocytes via multiple targets, reduce UTP excretion, and protect the kidney by up-regulating podocalyxin and down-regulating the expression of α -actinin-4.

【Keywords】 adriamycin nephropathy rats; Bixie Fenqing granules; podocyte; podocalyxin; α -actinin-4

肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)是临床常见的肾疾病之一,病理变化表现为肾小球基底膜通透性增高,电荷屏障受损,以大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症和不同程度的水肿为主要临床表现。由于NS与基因突变、免疫功能紊乱、细胞因子表达异常及足细胞受损等多种因素有关,其发病机制复杂且具体的细胞分子生物学免疫机制尚不明确,故目前临床上针对NS的一线用药方案多以抑制免疫炎症反应为主,即给予糖皮质激素、细胞毒性药物及生物制剂等基础用药。然而,近年来的临床实践证实,免疫抑制剂在带来疗效的同时,尤其糖皮质激素亦会使部分患者产生激素依赖及激素抵抗等问题,加之激素的副作用,严重影响患者后期生活质量^[1-2]。中医以“整体调节、辨证施治”为方向,在慢性肾脏病的治疗上发挥着独特的诊疗优势,故进一步探索中医药对本病的作用机制具有极为重要的临床意义。

草薢分清颗粒是导师马鸿斌教授继承刘宝厚教授肾病“湿热不除,蛋白难消”的学术思想,结合现代医学研究及自身临床体会,在清代医学大家程钟龄所撰《医学心悟》之古方程氏草薢分清饮的基础上加减化裁而来,方由丹参 12 g、车前草 30 g、茯苓 15 g、关黄柏 12 g、绵草薢 12 g、续断 12 g、槲寄生 12 g、石菖蒲 10 g、甘草 10 g 组成。全方共奏健脾益肾、清热利湿之效,使气虚得复,瘀祛湿利,精微封

藏。导师临床运用此方治疗肾虚湿热之肾疾病均屡获良效,临床证实其能减少NS患者尿蛋白的排泄率,为其常用之验方。而其具体作用机制尚不明确。因此本研究拟通过观察草薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠足细胞相关蛋白 podocalyxin、 α -actinin-4 表达的影响,探讨其治疗肾病综合征蛋白尿的具体作用机制,为客观评价此药疗效提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠60只,SPF级,6周龄,体重(200±20)g,购自甘肃中医药大学实验动物中心[SCXK(甘)2020-0001],饲养于甘肃中医药大学实验动物中心[SYXK(甘)2020-0009],光照明暗各12h,每日予以新鲜水及饲料。经由甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(2021-234;2021-235),实验操作遵循3R原则。

1.2 主要试剂与仪器

草薢分清颗粒(绵草薢 12 g、续断 12 g、槲寄生 12 g、茯苓 15 g、关黄柏 12 g、丹参 12 g、车前草 30 g、石菖蒲 10 g、甘草 10 g,以上均选用中药配方颗粒剂):购于甘肃中医药大学附属医院制剂中心。醋酸泼尼松片(prednisone acetate, PRE),购自山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司,规格:每片5mg,国药准字:H20033023,生产批号:210122;注射用盐酸

多柔比星(阿霉素 Adriamycin, ADR); 酷儿化学科技(北京)有限公司, 规格: 每支 25 mg, 国药准字 RE294501, 生产批号: HY613701。

α -actinin-4 抗体(美国 Genetex 公司, 批号 402205); podocalyxin 抗体(美国 Genetex 公司, 批号 822102958); β -actin 抗体(美国 Immunoway 公司, 批号 B2804); PVDF 膜(Millipore 公司, 批号 IRVH00010); ECL 发光液(上海翊圣生物科技有限公司, 批号 36208-A/B); 蛋白电泳 Marker(上海翊圣生物科技有限公司, 批号 26616); BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司, 批号 20210419); RIPA 蛋白裂解液(北京索莱宝生物科技有限公司, 批号 20210911)。MiniChemi 610 型全自动化学发光成像系统(北京六一生物科技有限公司); 5424R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf); KD-P 组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); RM2016 病理切片机(上海莱卡仪器有限公司); JB-P5 石蜡包埋机(俊杰电子有限公司); DW-HL528 超低温冰箱(中科美菱低温科技公司); iMark 酶标仪(美国 Bio Rad 公司); Cobasc701 全自动生化分析仪(瑞士 Roche 公司); SK-O180-E 摇床(SCILOGEX 公司); BX43+sc50 显微拍照系统(奥林巴斯有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备模型、动物分组、给药与取样

SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机选取 12 只作为空白组, 余 48 只大鼠为造模组。造模组采用分 2 次隔周尾静脉注射阿霉素(0.4 ± 0.1) mg/100 g 的方法建立阿霉素肾病大鼠模型^[3], 空白组大鼠注射同等剂量的生理盐水, 以尿蛋白定量 ≥ 100 mg/24 h 提示模型复制成功。

按随机数字表法将造模成功的大鼠分为模型组、中药组、泼尼松组、结合组, 每组 12 只, 进行灌胃。依据大鼠的等效剂量相当于人的 6.3 倍, 中药组: 草薢分清颗粒成人每天服用 125 g/60 (kg·d)。大鼠的等效剂量为 $125 \text{ g/60 (kg·d)} \times 6.3 = 13.125 \text{ g/(kg·d)}$ 。制备为 2 g/mL 溶液, 则需要 6.56 mL/kg。泼尼松组: 泼尼松成人用量为 1 mg/(kg·d), 换算后大鼠等效剂量为 6.3 mL/(kg·d), 配置为浓度 1 mg/mL 的药液, 需要 6.3 mL/kg。结合组给予中药量 6.56 mL/kg 和泼尼松溶液 6.3 mL/kg 灌胃。空白组及模型组予等体积生理盐水灌胃。每日灌胃 1 次, 连续 4 周。给药期间每天测体重并调整灌

胃剂量, 每 2 周检测 1 次 24 h-UTP。

干预 4 周后, 大鼠禁食水 12 h 后, 麻醉大鼠, 心脏采血, 静置 30 min 后转速离心 10 min, 取上层血清, 放于 -80°C 冰箱保存。取血完毕后, 打开腹腔, 剥离肾周围组织, 摘取大鼠双侧肾, 用 0.9% 生理盐水冲洗干净后, 剔除肾被膜, 一侧置于装有 4% 多聚甲醛固定液的小离心管中进行固定, 用于 HE、Masson 染色观察。另一侧置于冻存管中, 液氮速冻后移至 -80°C 冰箱, 用于免疫组化和 Western blot 检测。

1.3.2 检测 24 h-UTP 水平

取收集的 24 h 尿液, 送至甘肃中医药大学附属医院检验科, 使用比浊法测定 24 h 尿蛋白定量。

1.3.3 生化指标检测

血 TC、ALB, 使用全自动生化分析仪, 由甘肃中医药大学附属医院检验科生化实验室检测。

1.3.4 HE、Masson 染色观察大鼠肾组织病理学改变

4% 多聚甲醛固定肾组织, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋、切片($4 \mu\text{m}$)、烤片后分别进行 HE、Masson 染色处理, 光镜下观察肾组织病理学变化。

1.3.5 免疫组织化学法(IHC)法检测大鼠肾组织 podocalyxin、 α -actinin-4 蛋白表达

取出 4% 多聚甲醛固定的肾组织, 梯度乙醇洗脱切片, 滴加 3% H_2O_2 冲洗, 配制 0.01 mol/L 柠檬酸钠缓冲溶液($\text{pH}=6.0$) 90°C 进行抗原修复。加入一抗(podocalyxin, 1:100; α -actinin-4, 1:100), 4°C 孵育过夜, PBS 液洗 3 次, 每次 5 min, 37°C 孵育二抗 1 h, PBS 液洗 5 次。DAB 显色, 苏木素复染、梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。染色结果呈棕黄色颗粒为阳性。使用 Image J 计算各张片子灰度值, 最终平均光密度值以 $\text{AOD} = \text{IOD}/\text{Area}$ (即 $\text{intDen}/\text{area}$) 表示。

1.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织 podocalyxin、 α -actinin-4 蛋白表达水平

取 100 mg 冷冻组织, 剪碎, 加入 1 mL 预冷的生理盐水, 冲洗两遍, 置于低温匀浆仪中充分匀浆, 4°C 12000 r/min 离心 15 min, 留上清备用。根据 BCA 蛋白定量试剂盒检测组织总蛋白浓度; 上样、电泳、转膜。用 5% 脱脂牛奶封闭后分别用 podocalyxin (1:1000), α -actinin-4 (1:1500), 内参 β -actin (1:5000) 加入相应的一抗 4°C 孵育过

夜,使用封闭液按 1 : 5000 稀释二抗,室温孵育 1 h,洗脱,置于化学发光仪中曝光,使用 Image 软件分析相关蛋白表达。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计量资料进行正态性及方差齐性检验,满足正态性和方差齐性时,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析,方差齐时,用 LSD 检验;方差不齐时,用 Games-Howell 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态改变

实验过程中,空白组大鼠一般状态良好,精神佳,反应灵敏,皮毛有光泽,进食量正常;模型组大鼠精神差,活动量减少,毛发干枯,反应迟钝,时有大便质稀,阴囊水肿,部分烂尾,体重增加缓慢;各药物干预组初期和模型组有相同表现,随着用药,后期诸症逐渐改善,活动量增多,进食量增加,大便形质正常。

2.2 萆薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白定量的影响

造模 2 周末,与空白组比,造模组大鼠 24 h 尿蛋白定量升高($P<0.05$),提示成功复制模型;灌胃 2、4 周时,模型组 24 h 尿蛋白水平进一步升高,各药物干预组比同期模型组不同程度减少($P<0.05$),结合组降低趋势最为显著($P<0.05$),见表 1。

2.3 萆薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠血清 TC、ALB 的影响

灌胃 4 周末,与空白组比较,模型组大鼠 TC 值升高,ALB 下降($P<0.05$);与模型组比较,各药物干预组大鼠 TC 值均有不同程度下降,ALB 不同程度

升高($P<0.05$);与中药组和泼尼松组比较,结合组大鼠血清 TC 值明显降低,ALB 明显升高($P<0.05$),见表 2。

2.4 光镜下 HE、Masson 染色后阿霉素肾病大鼠肾组织的病理变化

经 HE、Masson 染色后,使用 200 倍光镜观察,结果显示:空白组大鼠肾小球形态结构清晰,基质部未见增生、坏死,小管及间质无明显病理学改变;模型组肾小球可见局灶节段性瘢痕形成,系膜细胞及系膜基质增生,肾小管空泡变性,管腔内可见蛋白管型,间质纤维细胞增生伴炎性细胞浸润;各药物干预组间肾小球及肾小管病变均有所改善,结合组改善最为明显。见图 1、图 2。

2.5 免疫组化法检测肾组织 podocalyxin、 α -actinin-4 的表达

肾组织 podocalyxin、 α -actinin-4 蛋白结果显示,与空白组相比,模型组和各药物干预组大鼠 podocalyxin 表达均明显降低, α -actinin-4 表达明显升高($P<0.05$);与模型组相比,各药物干预组 podocalyxin 表达均升高, α -actinin-4 表达均有所下降($P<0.05$);且结合组 podocalyxin 表达高于中药组、泼尼松组, α -actinin-4 表达低于中药组、泼尼松组($P<0.05$),见表 3、图 3、图 4。

2.6 Western blot 检测 podocalyxin、 α -actinin-4 蛋白的相对表达量

与空白组相比,模型组和各药物干预组大鼠 podocalyxin 表达强度降低, α -actinin-4 表达强度升高($P<0.05$);与各模型组相比,各药物干预组 podocalyxin、组有达强度均升高, α -actinin-4 表达强度均降低($P<0.05$);且结合组 podocalyxin、表达优于中药组、泼尼松组, α -actinin-4 表达弱于中药组、泼尼松组($P<0.05$),见表 4、图 5。

表 1 不同时间各组大鼠 24 h 尿蛋白定量($\bar{x}\pm s$,mg/24 h)

Table 1 24 h urinary protein in each group at different time

组别 Groups	造模 2 周 Building 2 weeks	给药 2 周 Treatment for 2 weeks	给药 4 周 Treatment for 4 weeks
空白组 Blank group	12.82 $\pm$ 2.66	13.34 $\pm$ 2.75	12.89 $\pm$ 2.23
模型组 Model group	121.53 $\pm$ 2.77 $^{\Delta}$	162.94 $\pm$ 6.13 $^{\Delta}$	173.49 $\pm$ 4.25 $^{\Delta}$
中药组 Chinese medicine group	120.90 $\pm$ 4.38 $^{\Delta}$	156.14 $\pm$ 4.44 $^{\Delta\#}$	152.70 $\pm$ 2.68 $^{\Delta\#}$
泼尼松组 Prednisone group	119.19 $\pm$ 4.95 $^{\Delta}$	153.78 $\pm$ 5.75 $^{\Delta\#}$	144.98 $\pm$ 3.40 $^{\Delta\#}$
结合组 Combination group	120.69 $\pm$ 4.24 $^{\Delta}$	149.32 $\pm$ 6.58 $^{\Delta\#}$	139.98 $\pm$ 4.98 $^{\Delta\#}$

注:与空白组相比, $^{\Delta}P<0.05$;与模型组相比, $^{\#}P<0.05$ 。

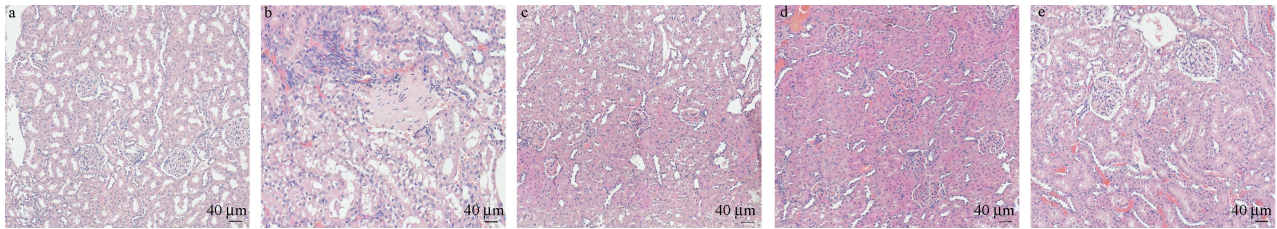
Note. Compared with the blank group, $^{\Delta}P<0.05$. Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$.

表 2 各组大鼠 TC、ALB 水平($\bar{x}\pm s$)
Table 2 TC and ALB levels of rats in each group

组别 Groups	<i>n</i>	血清总 胆固醇 (mmol/L) TC	血清 白蛋白 (g/L) ALB
空白组 Blank group	12	1.66±0.59	33.91±2.46
模型组 Model group	12	6.46±1.24 [△]	21.27±2.37 [△]
中药组 Chinese medicine group	10	3.88±1.14 ^{△#}	25.69±5.39 ^{△#}
泼尼松组 Prednisone group	12	4.09±1.08 ^{△#}	26.07±2.89 ^{△#}
结合组 Combination group	11	2.61±0.67 ^{△#}	30.51±2.32 ^{△#}

注:与空白组相比, [△] $P<0.05$;与模型组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, [△] $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$.

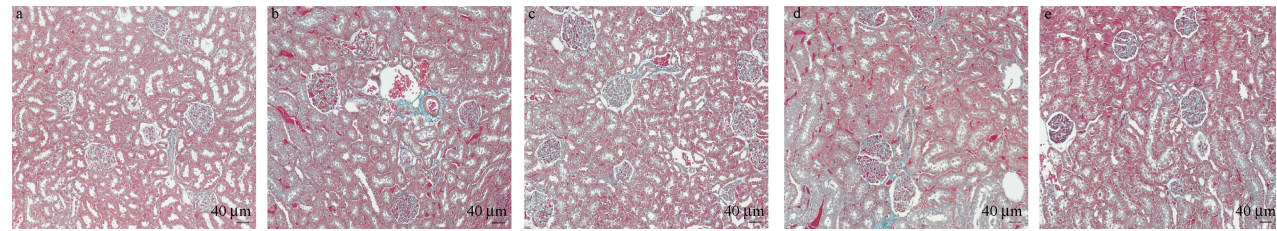


注:a:空白组;b:模型组;c:中药组;d:泼尼松组;e:结合组。

图 1 各组大鼠 HE 染色

Note. a, Blank group. b, Model group. c, Chinese medicine group. d, Prednisone group. e, Combination group.

Figure 1 HE staining of rats in each group



注:a:空白组;b:模型组;c:中药组;d:泼尼松组;e:结合组。

图 2 各组大鼠 Masson 染色

Note. a, Blank group. b, Model group. c, Chinese medicine group. d, Prednisone group. e, Combination group.

Figure 2 Masson staining of rats in each group

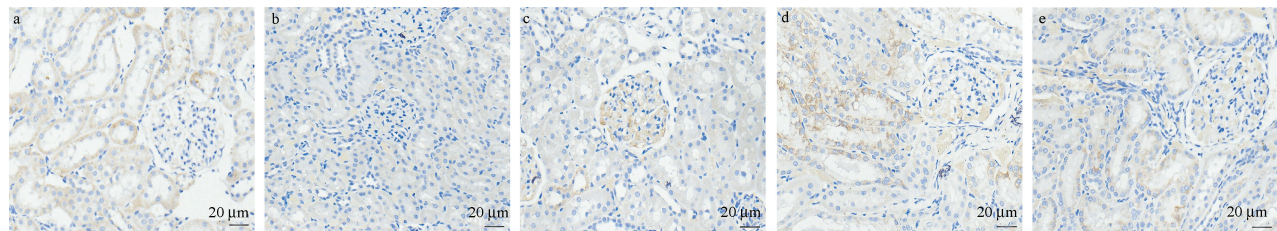
表 3 各组大鼠肾组织 podocalyxin、 α -actinin-4 蛋白表达比较(平均光密度, $\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of podocalyxin and α -actinin-4 protein expression in kidney tissues of rats in each group(Mean optical density)

组别 Groups	<i>n</i>	足萼糖蛋白 Podocalyxin	α -actinin-4
空白组 Blank group	12	0.072±0.001	0.061±0.001
模型组 Model group	12	0.047±0.001 [△]	0.088±0.002 [△]
中药组 Chinese medicine group	10	0.051±0.001 ^{△#}	0.069±0.001 ^{△#}
泼尼松组 Prednisone group	12	0.066±0.001 ^{△#}	0.067±0.002 ^{△#}
结合组 Combination group	11	0.069±0.001 ^{△#}	0.064±0.001 ^{△#}

注:与空白组相比, [△] $P<0.05$;与模型组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, [△] $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$.

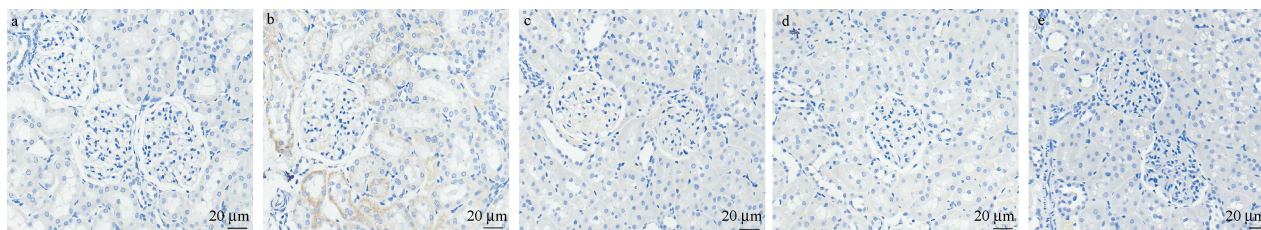


注:a:空白组;b:模型组;c:中药组;d:泼尼松组;e:结合组。

图 3 免疫组化法测肾组织 podocalyxin 的表达

Note. a, Blank group. b, Model group. c, Chinese medicine group. d, Prednisone group. e, Combination group.

Figure 3 Immunohistochemical staining of renal tissue expression of podocalyxin



注:a:空白组;b:模型组;c:中药组;d:泼尼松组;e:结合组。

图 4 免疫组化法测肾组织 α-actinin-4 的表达

Note. a, Blank group. b, Model group. c, Chinese medicine group. d, Prednisone group. e, Combination group.

Figure 4 Immunohistochemical staining of renal tissue expression of α-actinin-4

表 4 各组大鼠肾组织 podocalyxin、α-actinin-4 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Podocalyxin and α-actinin-4 protein expression intensity in renal tissues of rats in each group

组别 Groups	n	足萼糖蛋白 Podocalyxin	α-actinin-4
空白组 Blank group	12	1.305±0.007	0.583±0.066
模型组 Model group	12	0.558±0.002 [△]	1.213±0.009 [△]
中药组 Chinese medicine group	10	0.922±0.002 ^{△#}	1.016±0.027 ^{△#}
泼尼松组 Prednisone group	12	0.929±0.006 ^{△#}	0.998±0.007 ^{△#}
结合组 Combination group	11	1.161±0.005 ^{△#}	0.719±0.059 ^{△#}

注:与空白组相比, [△] $P < 0.05$;与模型组相比, [#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the blank group, [△] $P < 0.05$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$.

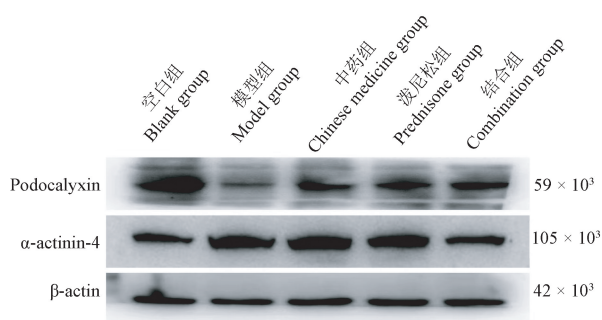


图 5 各组大鼠肾组织 podocalyxin、α-actinin-4 蛋白表达

Figure 5 podocalyxin and α-actinin-4 protein expression in renal tissue of rats in each group

3 讨论

根据病理表现,阿霉素肾病模型可分为急性阿霉素肾病模型与慢性阿霉素肾病模型,急性阿霉素肾病模型病理改变与人类微小病变肾病相似^[4]。本实验根据文献报道^[3]采用分 2 次隔周尾静脉注射阿霉素(0.4+0.1) mg/100 g 的方法制备阿霉素肾病模型。模型组动物在造模后第 15 天 24 h 尿蛋白定量显著上升,第 28 天出现明显的组织病理学改变,与空白组比较有统计学意义,表明本次实验复制阿霉素肾病模型较为理想。

NS 临床表现为持续大量蛋白尿,而足细胞结构及功能的改变是导致蛋白尿及 NS 发病和进展的关键环节。长期持续大量蛋白尿可造成肾小球硬化、

肾小管损伤和肾间质炎症细胞浸润及纤维化,导致足细胞病变,最终肾功能下降,从慢性肾病发展为终末期肾病^[5-6]。因此,开展对 podocalyxin、α-actinin-4 等足细胞蛋白的研究,寻找安全有效降低尿蛋白的方法,防止肾病理损伤的恶化,延迟肾替代治疗的时间,逐渐成为治疗肾病综合征蛋白尿的新靶点。

NS 属于中医“水肿”、“关格”等范畴。本病病机为本虚标实,虚以肺、脾、肾三脏气血阴阳亏虚为主,邪实则以湿、热、瘀为甚,三者相互胶结,致疾病反复迁延难愈。本研究采用临床经验方草薢分清颗粒进行干预,方中绵草薢利湿通淋,分清去浊为君药;车前草通利小便,清膀胱湿热;续断补肝肾,强筋骨。二药合用,补肾清热利湿,达标本兼治之功,共为臣药;茯苓利水渗湿健脾;黄柏清泻下焦湿热;加用槲寄生以增强续断补肾之力;石菖蒲交通心肾,化湿通窍;丹参通心窍、清血热;五药合用,加强补肾清热利湿之力,共为佐药;生甘草一味以调和诸药亦增清热解毒之力为使药;诸药合而成方,使得此方配伍严谨,疗效显著。共奏健脾益肾、清热利湿之效,使气虚得复,瘀祛湿利,精微封藏,以调节脏腑阴阳动态的平衡。现代药理研究表明,草薢水提物可通过减少肾组织中 TNF-α、MCP-1 和 ICAM-1 的表达及血清 MCP-1 蛋白合成水平,起到保护肾的作用^[7]。车前草有抗氧化和免疫调节作

用^[8];续断可增强小鼠非特异性免疫功能^[9];茯苓多糖可通过激活 PPAR- γ 表达,抑制 p38 MAPK 磷酸化,从而延缓 db/db 小鼠肾小球硬化,保护肾损伤^[10];黄柏中的主要成分黄柏碱可明显降低大鼠血清中 Scr、BUN 含量,抑制炎症因子的释放,减轻肾的病理损伤,改善肾功能^[11]。丹参多酚酸盐可通过抑制糖尿病肾病小鼠体内氧化应激反应及调控 TGF- β 1/Smad 信号通路的活化状态,减轻肾纤维化,延缓肾组织病理学改变^[12]。本实验中,模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量升高,肾小球可见局灶节段性瘢痕形成,系膜细胞及系膜基质增生,肾小管空泡变性,管腔内可见蛋白管型,间质纤维细胞增生伴炎性细胞浸润;经草薢分清颗粒干预后,24 h 尿蛋白、血清 TC 明显下降、ALB 升高,肾组织病理明显改善,提示草薢分清颗粒能降低阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白量、血清 TC 值,升高 ALB 及减轻肾病理变化进而延缓疾病进展的作用,并且中西医结合用药效果显著。

足细胞是一种附着在基底膜上的高度终末分化上皮细胞,位于肾小球毛细血管壁最外层,由胞体、主突和足突构成。足细胞之所以能在基底膜上稳定附着并发挥其正常功能,主要依赖于足细胞相关蛋白的维持。目前研究较多的是顶膜区蛋白 podocalyxin 和骨架区蛋白 α -actinin-4。足细胞 podocalyxin、 α -actinin-4 与裂孔膜一起构成滤过屏障,共同维持足细胞的形态结构以及足细胞与 GBM 的功能完整,podocalyxin 的缺失及 α -actinin-4 表达改变可引起足突融合,引发蛋白尿。podocalyxin 是一种带有大量负电荷的 CD34 家族的唾液酸蛋白,位于足细胞的胞膜顶端,也是维持肾小球滤过屏障结构和功能正常发挥的最主要物质基础^[13]。临床研究发现微小病变、IgA 肾病等各种肾小球疾病患者,其肾组织穿刺病理活检中肾小球足细胞 podocalyxin 表达明显降低,并与蛋白尿严重程度相关^[14]。实验研究表明 podocalyxin 蛋白与肾小球足细胞关系密切,podocalyxin 的表达减少可引起足突融合,并与蛋白尿产生关系密切^[15]。骨架蛋白 α -actinin-4 是收缩蛋白超家族成员,是维持足细胞骨架和裂隙隔膜功能的重要肌动蛋白相关分子,可将松散的肌动蛋白纤维交联成可收缩束状结构^[16]。 α -actinin-4 特异表达于肾小球脏层上皮细胞即足细胞^[17], α -actinin-4 能将细胞骨架与裂孔隔膜分子连接起来,在保持足细胞生理结构中起核心作用。其

中,肌动蛋白细胞骨架的改变与 α -actinin-4 分子表达和分布的异常密切相关。近年的许多实验证实足细胞功能及结构的异常,滤过膜的损伤及蛋白尿的出现是由 α -actinin-4 的异常表达所导致^[18]。本实验中,模型组大鼠免疫组化结果显示 podocalyxin 阳性表达明显减弱, α -actinin-4 呈强阳性表达;免疫印迹结果显示 podocalyxin 表达强度降低, α -actinin-4 表达强度升高;药物干预后,各治疗组 podocalyxin 阳性表达增强, α -actinin-4 阳性表达减弱,podocalyxin 表达强度升高, α -actinin-4 表达强度下降。且结合组表现出明显的优势。这提示草薢分清颗粒能通过下调大鼠肾组织足细胞骨架 α -actinin-4 及上调足细胞顶膜区 podocalyxin 表达,修复受损的足细胞,稳定足细胞结构与功能,减少尿蛋白的排泄,延缓慢性肾病的发展。

综上,草薢分清颗粒可能通过上调阿霉素肾病大鼠肾组织中足细胞 podocalyxin 表达,下调 α -actinin-4 表达,修复受损的足细胞,减轻大鼠肾病理损伤,减少尿蛋白排泄,延缓肾病综合征大鼠病情进展。

参考文献:

- [1] 马天娇. 细胞因子与原发肾病综合征发病机制研究进展 [J]. 国际儿科学杂志, 2019, 46(11): 815-818.
- [2] 侯玲, 傅桐, 何学慧, 等. 地氯雷他定辅助糖皮质激素治疗儿童肾病综合征疗效观察 [J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(12): 1082-1084, 1090.
- [3] 李爱平, 张王宁, 秦雪梅. 阿霉素肾病大鼠模型的优化 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 151-159.
- [4] 刘练, 张高福, 李秋, 等. 阿霉素肾病小鼠的肾脏病理转变过程 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 13-16.
- [5] Liu D, Lv LL. New understanding on the role of proteinuria in progression of chronic kidney disease [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 487-500.
- [6] Erkan E. Proteinuria and progression of glomerular diseases [J]. Pediatr Nephrol, 2013, 28(7): 1049-1058.
- [7] 苏筠霞, 李建华, 刘天喜, 等. 草薢水提物对尿酸性肾病大鼠 TNF- α 、MCP-1 和 ICAM-1 表达的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(5): 1088-1091.
- [8] 李冲冲, 龚苏晓, 许浚, 等. 车前子化学成分与药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1233-1246.
- [9] 周炳鑫, 张雷, 李颜桃, 等. 川续断水煎液对小鼠非特异性免疫功能的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 2021, 48(5): 796-800.
- [10] 李佳丹, 周迪夷. 茯苓多糖对 db/db 小鼠肾脏保护作用及其对 p38 MAPK/PPAR- γ 信号通路的影响 [J]. 中国中医药科技, 2019, 26(3): 346-350.

- [11] 姜盈盈, 林岳. 黄柏碱改善脓毒症大鼠急性肾损伤的作用及机制研究 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2019, 25(6): 882-887.
- [12] 杨冰, 高飞, 刘令今, 等. 丹参多酚酸盐减轻糖尿病肾病小鼠肾纤维化的机制研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(5): 1018-1024.
- [13] Ling L, Chen L, Zhang C, et al. High glucose induces podocyte epithelial-to-mesenchymal transition by demethylation-mediated enhancement of MMP9 expression [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5642-5651.
- [14] Kavoura E, Gakiopoulou H, Paraskevaki H, et al. Immunohistochemical evaluation of podocalyxin expression in glomerulopathies associated with nephrotic syndrome [J]. Hum Pathol, 2011, 42(2): 227-235.
- [15] 查冬青, 陈铖, 张静静, 等. Podocalyxin 在大鼠嘌呤霉素肾病模型中的表达及其意义 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2012, 33(2): 154-157.
- [16] Perico L, Conti S, Benigni A, et al. Podocyte-actin dynamics in health and disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(11): 692-710.
- [17] 陶花, 顾乐怡. 足细胞骨架相关蛋白的调节及其在细胞生物学中的作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(7): 641-645.
- [18] 何泽云, 熊志胜, 李旭华, 等. 禾肾丸对阿霉素肾病大鼠肾脏 podocalyxin 及 α -actinin-4 蛋白表达的影响 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(10): 140-144.

[收稿日期] 2022-04-28

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgxydw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!