

【药效学评价】

复肾汤对糖尿病肾病大鼠足细胞Nephrin和Podocin的影响

张浩文¹, 陈雯琳², 李璇³, 张卫华², 罗斌², 冯鸣², 刘华东^{1*}

1. 南京中医药大学 第二临床医学院, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学 基础医学院, 江苏 南京 210023

3. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 观察复肾汤(FST)对糖尿病肾病(DN)大鼠足细胞nephrin和podocin表达的影响,并探讨其可能的作用机制。方法 正常对照组为雄性Wistar大鼠8只,常规饲养。雄性Wistar大鼠24只,正常饲养1周后大鼠ip链脲佐菌素(STZ)和弗氏完全佐剂(CFA)建立糖尿病模型。造模成功后分为模型组、FST大剂量组(L1)、FST小剂量组(L2)。L1、L2组分别给予复肾汤32、8 g/kg;模型组给予生理盐水。每天ig给药1次,给药体积1 mL/100 g,连续8周,定期测血糖。实验结束后,收集24 h尿液,采集血清,检测胰岛素(INS)、肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、尿蛋白(UP)等生化指标;轻取肾脏,光镜下观察肾脏组织病理变化;免疫荧光法检测肾组织nephrin和podocin的表达,RT-qPCR法检测肾组织nephrin、podocin的基因表达。结果 与模型组比较,L1、L2组的INS、SCr、BUN、MDA、UP明显降低($P < 0.05$ 、 0.01),SOD明显升高($P < 0.05$),病理学评分明显降低($P < 0.05$),nephrin、podocin的免疫荧光表达明显上调,RT-qPCR基因表达明显上调。结论 复肾汤可以有效改善DN大鼠足细胞nephrin和podocin的表达,对DN的发展具有一定的延缓作用。

关键词: 复肾汤;糖尿病肾病;nephrin;podocin

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)12-2354-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.12.012

Effects of Fushentang on nephrin and podocin in podocytes of diabetic nephropathy rats

ZHANG Haowen¹, CHEN Wenlin², LI Xuan³, ZHANG Weihua², LUO Bin², FENG Ming², LIU Huadong¹

1. Second Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. The Basic Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of Fushentang on nephrin and podocin in podocytes of diabetic nephropathy rats and discuss the possible mechanism. **Methods** The normal control group was eight male Wistar rats with conventional feeding. A total of 24 male Wistar rats were treated with intraperitoneal injection of STZ + CFA to establish diabetic model after normal feeding for 1 weeks. After successful modeling, the rats were divided into model group, FST supernatant group (L1), FST sediment group (L2). L1, L2 group were treated with FST supernatant and sediment. The model group was given normal saline. Rats were administered ig for once daily with a volume of 1 mL/100 g, and blood glucose was measured regularly for 8 weeks. After the experiment, 24 h urine, the serum were collected, and the biochemical parameters, like INS, SCr, BUN, SOD, MDA, UP were detected. The kidney was removed and the pathological changes were observed under light microscope, the expressions of nephrin and podocin in renal tissues were detected by immunofluorescence, and the gene expressions of nephrin and podocin in renal tissues were detected by RT-qPCR. **Results** Compared with the model group, the INS, SCr, BUN, MDA, UP of L1 and L2 groups were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), and SOD was increased significantly ($P < 0.05$), the pathology score decreased significantly ($P < 0.05$).

收稿日期: 2019-04-08

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20180827)

第一作者: 张浩文, 博士, 讲师, 主要从事中西医结合临床工作。Tel: 025-85811722 E-mail: zhwdoctor@njucm.edu.cn

*通信作者: 刘华东, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中医方剂学研究。Tel: (025)85811722 E-mail: hd9705@126.com

Immunofluorescence expressions of nephrin and podocin were significantly up-regulated, and gene expressions of RT-qPCR were significantly up-regulated. **Conclusion** Fushentang can significantly improve the expression of nephrin and podocin in podocytes of DN rats, and delay the development of diabetic nephropathy.

Key words: Fushentang; diabetic nephropathy; nephrin; podocin

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的一种慢性并发症,也是2型糖尿病最严重的并发症之一。近年来对DN发病机制的研究层出不穷,越来越多的学者认为足细胞损伤在DN的病程中起到至关重要的作用,其损伤程度与DN患者临床蛋白尿增加、肾小球滤过率(GFR)下降及肾小球的硬化程度密切相关。足细胞nephrin和podocin的丢失可致使肾小球滤过屏障减弱,从而出现蛋白尿,加速DN的发生及发展^[1]。前期研究已经证实,复肾汤(FST)对DN大鼠的肾脏具有保护作用,并且能够有效改善db/db小鼠DN的病理进程^[2]。本实验给治疗组DN大鼠分别以FST大剂量与小剂量,观察其对DN大鼠肾组织足细胞nephrin和podocin的表达情况的影响,以进一步探究FST治疗DN的效果差异以及可能的有效机制。

1 实验材料

1.1 动物

雄性Wistar大鼠32只,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物许可证号为SCXK(沪)2012-0002。体质量(250±30)g适应性饲养1周,健康状况良好。

1.2 药品与试剂

FST方中药材(黄芪、水蛭、地龙、大黄)购自江苏省医药公司,经南京中医药大学药学院李璇副研究员鉴定合格;链脲佐菌素(STZ)、弗氏完全佐剂(CFA)由美国Sigma公司出品;兔抗大鼠Nephrin一抗、兔抗大鼠Podocin一抗、HRP标记的羊抗兔IgG二抗、Bradford蛋白含量检测试剂盒均购自中国江苏凯基生物技术股份有限公司;TRIzol(美国Invitrogen 15596-026),cDNA第一链合成试剂盒(美国Thermo Fisher K1622),Real time PCR Master Mix(SYBR Green)(日本TOYOBO)。

1.3 仪器

Accu-Chek Advantage血糖仪(美国罗氏诊断公司);AU 2700型自动生化分析仪(日本OLYMPUS);SPECTRAMax190, SpectraMAX GEMINIXS(美国Molecular Devices Corporation);台式恒温振荡器(中国上海精宏实验设备有限公司);酶标仪(美国MD SpectraMax M3)。普通梯度PCR仪(美国

Labnet MultiGene Gradient TC9600-G);荧光定量PCR循环仪(美国ABI Step one plus Real time-PCR system)。

2 方法与结果

2.1 药液制备

FST药液中黄芪、水蛭、地龙、大黄根据临床剂量比例为4:1:2:2称取黄芪200 g,水蛭50 g、地龙100 g、大黄100 g混合,药材中加10倍水浸泡1 h后煎煮1次,过滤,第2次加8倍量水,每次提取1 h,提取液合并减压浓缩至含生药量1 g/mL,4℃冰箱保存备用。

2.2 模型建立和分组

大鼠自由进食、进水,保持垫料干燥,正常饲养1周后大鼠ip STZ+CFA建立糖尿病模型。具体方法:新鲜制备STZ按30 mg/kg ip给药,第2天大鼠ip CFA 0.1 mL/只。每周1次,连续3周。正常对照组给予等量枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。3周后经大鼠尾尖采血测血糖,血糖在16.7~30 mmol/L为造模成功,血糖稳定1周后纳入实验。将造模成功大鼠随机分成3组,分别为模型组、FST大剂量组(L1)、FST小剂量组(L2),每组7~8只,对照组8只。

2.3 给药方法

正常对照组常规饲养;模型组每日ig生理盐水1 mL/100 g;L1、L2组大鼠每日ig FST 3.2、0.8 g生药/mL(分别相当于人临床用药量6、24倍),给药体积1 mL/100 g,连续给药8周,定期测血糖。

2.4 样本采集

8周后,用代谢笼收集24 h尿液,称体质量,用毛细玻璃管眶后静脉丛取血至大鼠死亡。眼眶取血收集至离心管,后离心去上清。然后将大鼠用棉线固定在鼠板上,迅速剥取双侧肾脏,去除包膜,称质量,收集到冻存管中于液氮罐中冻存。

2.5 指标检测

2.5.1 血、尿生化指标检测 每个样本各取20 μL血清和尿液,用AU 2700型自动生化分析仪测定胰岛素(INS)、肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、尿蛋白(UP)。

2.5.2 HE法检测病理变化 将肾组织冰冻切片浸入4%的多聚甲醛固定液,室温固定20 min,水洗3 min×3;染苏木素3~5 min,水洗30~60 s;0.5%盐

酸分色 20 s, 水洗 30~60 s; 0.4% 氨水蓝化约 40 s, 水洗 30~60 s; 醇溶性伊红染色 3 min, 梯度酒精快速脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片镜检。

2.5.3 免疫荧光(IF)法检测蛋白表达 先将组织进行冰冻切片待用, 0.3% H_2O_2 甲醇处理切片 20 min, 蒸馏水、PBS 各洗 5 min; 灭活酶: 每张切片滴加 2 滴 3% H_2O_2 -甲醇溶液, 室温(15~25 °C)封闭 10 min, PBS 浸洗 3 次。封闭: 滴加即用型山羊血清 50~100 μ L, 室温孵育 20 min。抗原-抗体反应: 滴加一抗 50~100 μ L (1:50 稀释), 37 °C, 湿盒孵育 2 h。PBS 浸洗 3 次。一抗二抗反应: 滴加二抗 50~100 μ L (1:100 稀释), 37 °C, 避光孵育 1 h, PBS 浸洗 3 次。复染: 每张片子滴加配制 DAPI 染液 50~100 μ L, 室温避光放置 5 min。封片: 用防萃灭封片胶封片。观察: 高内涵下观察细胞中蛋白的表达情况, 拍照保存 3 个高表达区域。用 Image J 软件对免疫荧光图片进行半定量分析。

2.5.4 RT-qPCR 法检测 nephrin、podocin 基因表达

取肾脏样本(3 mm×3 mm×3 mm), 按照 TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 15596-026)说明提取肾组织总 RNA, 并测定 RNA 浓度和纯度。

合成 cDNA 第一链(20 μ L 体系): 于 0.2 mL PCR 管, 依次加入 RNA (2 μ g) 5 μ L、Oligo dT(18)(50 μ mol/L) 2 μ L, 无核酸酶的双蒸水至总体积 12.5 μ L。65 °C 保温 5 min, 然后冰浴 5 min; 再加入 RNase 抑制剂 (40 U/ μ L) 0.5 μ L、5×Reaction Buffer 4.0 μ L、dNTPs (10 mmol/L) 2.0 μ L、M-MuLV 1.0 μ L。2 000 r/min 离心 20 s; 42 °C 保温 1 h, 70 °C 保温 10 min, 置于冰上 5 min。

Real time-PCR 正式实验: 按照顺序, 将一个样本基因做 3 个复孔; 往 0.2 mL PCR 管各依次加入 2X Real time PCR Master Mix (SYBR Green) 10 μ L、模板(cDNA 稀释 10 倍) 1 μ L、引物 MIX (F/R 各为 10 μ mol/L) 2 μ L、0.1% DEPC 水 7 μ L, Total volume 20 μ L。用荧光定量 PCR 循环仪进行分析(美国 ABI Step one plus Real time-PCR system)。

表 1 用于检测 nephrin、podocin 基因的 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequences for detection of nephrin and podocin genes

引物名称	引物序列(5'-3')
qr GAPDH (103bp) Forward	GGCCTTCCGTGTTCTTACC
qr GAPDH (103bp) Reverse	CGCCTGCTTCACCACCTTC
qr nephrin (135bp) Forward	TTCCAAGCCTGGGGATGAGC
qr nephrin (135bp) Reverse	TTCTTGCAGAGCTGGAATGAC
qr podocin (131bp) Forward	AAGAAGTCAAAGGCCGGGAG
qr podocin (131bp) Reverse	TCCACATTCACTACCGTGGC

3 统计学处理

数据用均数±标准差表示, 应用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析, 计量资料采用单因素方差分析并做两两比较。

4 结果

4.1 血糖指标

从图 1 可见, 模型组血糖较对照组升高; L1、L2 的血糖较对照组升高, 与模型组差异不明显。

4.2 血、尿生化指标

由表 2 可见, 与对照组比较, 模型组大鼠的 INS、SCr、BUN、MDA、UP 含量明显较高, SOD 含量明显偏低($P<0.05$ 、 0.01); 与模型组相比较, L1 组的 SCr、BUN、UP 明显降低($P<0.05$ 、 0.01), SOD 含量明显增高($P<0.05$ 、 0.01); L2 组 BUN、UP 明显偏低($P<0.05$ 、 0.01), SOD 含量明显增高($P<0.05$ 、 0.01)。

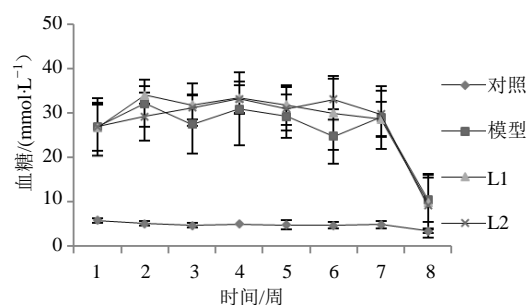


图 1 不同剂量 FST 对 DN 大鼠血糖的影响

Fig. 1 Effects of different doses of FST on blood glucose in DN rats

4.3 肾脏病理组织形态学的变化

根据 Bilous 分级方法, 依次将肾组织病变程度定量轻度或少量“1 分”, 中度或较多“2 分”, 重度或多量“3 分”, 极重度或大量“4 分”, 正常“0 分”。累加每组每只动物的所有分数, 计算出均分($\bar{x} \pm s$)。

由图2可见,对照组肾小球基底膜完整,间质中少见炎症细胞浸润、纤维组织增生等病理改变。模型组出现的肾小管上皮细胞水肿变性,管腔内可见少量管型;间质炎症细胞浸润、纤维组织增生;肾小球

系膜基底膜增生,部分肾小球萎缩。L1、L2同样出现上述病理表现,但程度较轻。由图3可见,模型组的病理学评分明显高于对照组($P<0.05, 0.01$),L1、L2的病理学评分明显低于模型组($P<0.05, 0.01$)。

表2 不同剂量FST对DN大鼠INS、SCr、BUN、SOD、MDA、UP水平的影响

Table 2 Effects of different doses of FST on INS, SCr, BUN, SOD, MDA and UP levels in DN rats

组别	INS/(mIU·L ⁻¹)	SCr/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	UP/(μg·24h ⁻¹)
对照	7.46±0.41	29.5±5.28	7.57±0.30	47.5±5.68	9.1±1.67	4.45±1.98
模型	8.16±1.30 [#]	31.8±2.61 [#]	9.28±1.67 [#]	42.9±23.9 [#]	11.99±1.08 [#]	10.55±3.01 ^{##}
L1	8.87±2.78	30.5±13.4 [*]	9.03±1.66 ^{**}	70.13±0.7 ^{**}	12.39±0.16	9.88±4.56 [*]
L2	8.14±1.9	31.5±9.78	9.16±0.53 ^{**}	71.52±0.2 ^{**}	13.23±0.12	10.09±3.35 [*]

与对照组比较:[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$;与模型组比较:^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

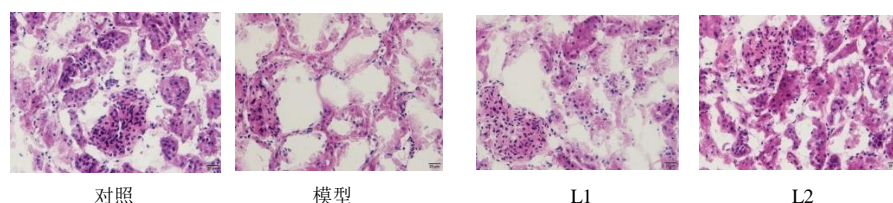
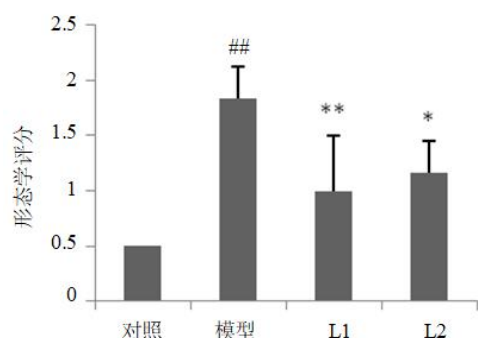


图2 FST对DN大鼠肾脏组织形态学的影响

Fig. 2 Effects of FST on renal histomorphology in DN rats



与对照组比较:^{##} $P<0.01$;与模型组比较:^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

图3 不同剂量FST对DN大鼠肾组织病理学评分的影响

Fig. 3 Effects of different doses of FST on renal histopathological score in DN rats

4.4 免疫荧光变化

由图4、5可见,模型组的nephrin和podocin表达明显低于对照组($P<0.01$),而L1、L2的nephrin和podocin表达明显高于模型组($P<0.01$)。

4.5 Real time PCR法检测基因表达

由图6可见,模型组的nephrin和podocin的基因表达明显低于对照组($P<0.05$),而L1、L2的nephrin和podocin的基因表达明显高于模型组($P<0.05, 0.01$)。

5 讨论

足细胞是终末分化细胞的一种,一旦损伤病变将几乎无法逆转,所以关于足细胞损伤的机制研究以及如何预防和治疗足细胞损伤显得尤为重要^[3]。足细胞作为一种独特的上皮细胞,它是形成肾小球滤过屏障的一个主要部分。肾小球滤过屏障由外向内分别由足细胞及足突间的裂孔隔膜、肾小球基底膜(GBM)和有窗孔的内皮细胞这3层组成。滤过屏障的3层中任一层结构和电荷屏障功能受损,均可导致肾小球滤过功能障碍,产生蛋白尿,并加快DN的进展。nephrin和podocin则是肾小球滤过屏障中裂孔隔膜上的重要蛋白成分。

Nephrin是由1 241个氨基酸组成的一种跨膜蛋白^[4]。其主要功能有:维持SD结构的完整性;与足细胞内细胞骨架及紧密连接相关蛋白相互作用,维持足细胞正常的形态及功能;参与细胞信号转导^[5]。Podocin是继nephrin和CD2相关蛋白(CD2AP)等之后发现的一种蛋白因子^[6],它是由383个氨基酸组成的整合膜蛋白,研究表明其具有连接足细胞骨架,维持SD结构完整性^[7];介导离子通道及SD压力滤过屏障;参与并改变SD总滤过面积以及滤过筛孔的大小,从而调整足突动力学的改变,以起到调控SD的滤过通透性的作用。

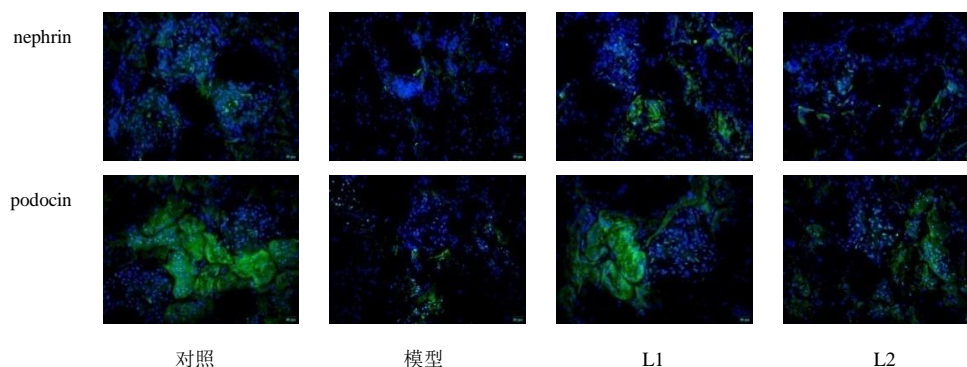


图4 不同剂量FST对DN大鼠肾脏nephrin、podocin表达的影响

Fig. 4 Effects of different doses of FST on nephrin and podocin expression in kidneys of DN rats

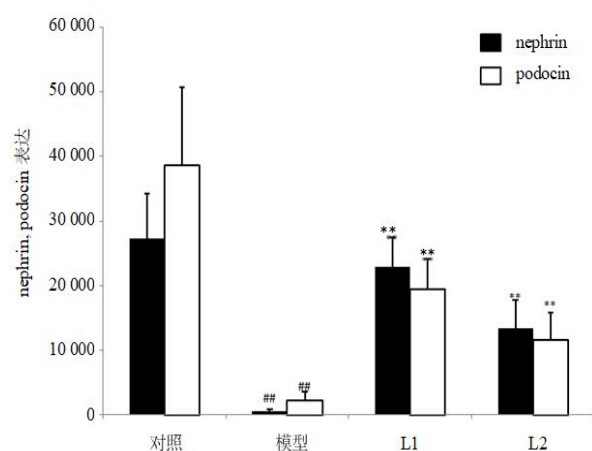
与对照组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较:** $P < 0.01$ ## $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

图5 不同剂量FST对DN大鼠肾脏nephrin、podocin表达的影响

Fig. 5 Effects of different doses of FST on nephrin and podocin expression in kidneys of DN rats

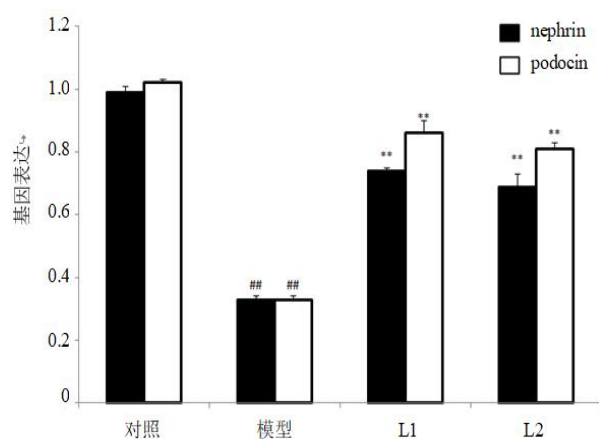
与对照组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较:** $P < 0.01$ ## $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

图6 不同剂量FST对DN大鼠肾脏nephrin、podocin表达的影响

Fig. 6 Effects of different doses of FST on nephrin and podocin expression in kidneys of DN rats

由此可见nephrin和podocin表达的减少将导致直接裂孔隔膜的完整性被破坏,致使足细胞凋亡、脱落和融合,从而使得滤过屏障受损并出现蛋白尿。因此采取有效措施减少nephrin和podocin丢失,减轻足细胞的损伤,将为DN的治疗开辟新思路^[8]。近年来氧化应激与足细胞损伤之间的关系受到越来越多的关注。有学者研究表明,足细胞损伤和细胞外基质的积累可能激活了氧化应激状态,从而进一步导致肾小球的硬化加重^[9-10]。Susztak等^[11]通过体外实验观察到,肾小球足细胞受到ROS的直接攻击,致使足细胞中还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶被激活,产生过多的ROS,如此便形成一个恶性循环。

本研究发现,DN模型大鼠MDA明显升高,SOD明显降低,nephrin和podocin的蛋白表达明显下调,24 h蛋白尿明显增加。由此可见,氧化应激与足细胞的损伤之间可能存在着密切的关系。本研究显示治疗组的nephrin和podocin的蛋白表达明显高于DN模型组,且相关血、尿生化指标得到一定改善。由此可见,FST能够改善DN大鼠的足细胞损伤,有助于修复肾小球滤过屏障,减轻DN大鼠的肾脏损害,其可能机制应该与改善DN大鼠肾脏nephrin和podocin的蛋白表达密切相关。综合各项结果表明,L1组即FST大剂量组比L2组即FST小剂量组略好,这也提示FST大剂量治疗作用发挥更好,其有效成分有待进一步探究。

参考文献

- [1] Bhattacharjee N, Barma S, Konwar N, et al. Mechanistic insight of diabetic nephropathy and its pharmacotherapeutic targets:Anupdate[J].EurJPharmacol,2016,791:8-24.
- [2] Yuan F, Kolb R, Pandey G, et al. Involvement of the NLRC4-inflammasome in diabetic nephropathy [J]. Plos One, 2016, 11(10): e0164135.

- [3] Mahfoz A M, El-Latif H A A, Ahmed L A, et al. Anti-diabetic and renoprotective effects of aliskiren in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in female rats [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2016, 389(12): 1315-1324.
- [4] 刘华东, 李 璇, 张卫华, 等. 复肾汤对db/db小鼠肾脏病变的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31(6): 546-550.
- [5] Gupta S, Chough E, Daley J, et al. Hyperglycemia increases endothelial superoxide that impairs smooth muscle cell Na⁺-K⁺-ATPase activity [J]. Am J Physiol - Cell Physiol, 2002, 282(3): C560-C566.
- [6] Yang W Y, Lu J M, Weng J P, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [7] Xu Y. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310(9): 948.
- [8] Kim B H, Lee E S, Choi R, et al. Protective effects of curcumin on renal oxidative stress and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetic nephropathy [J]. Yonsei Med J, 2016, 57(3): 664.
- [9] Ji Z Z, Xu Y C. Melatonin protects podocytes from angiotensin II-induced injury in an *in vitro* diabetic nephropathy model [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 920-926.
- [10] Ohigashi M, Imai N, Toba H, et al. Pitavastatin exhibits protective effects on podocytes accompanied by BMP-7 up-regulation and rho suppression [J]. Pharmacology, 2016, 97(5/6): 265-276.
- [11] Susztak K, Raff A C, Schiffer M, et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 2006, 55(1): 225-233.