

丹参多酚酸盐对阳离子化牛血清白蛋白致膜性肾病大鼠的影响

陈素枝¹, 陈文军², 张 卓³, 宋瑞婧³, 檀金川^{4*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 衡水市中医院, 河北 衡水 053000

3. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200

4. 河北省中医院, 河北 石家庄 050011

摘要: **目的** 观察丹参多酚酸盐对阳离子化牛血清白蛋白致膜性肾病大鼠血液生化指标、肾组织病理形态及足细胞裂孔隔膜蛋白 CD2 相关蛋白 (CD2AP)、结蛋白 (Desmin) 表达的影响, 探讨丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠的肾保护作用及其可能机制。 **方法** 健康雄性 SD 大鼠随机分为对照组和造模组, 采用尾 iv 阳离子化牛血清白蛋白的方法复制膜性肾病大鼠模型。造模成功的大鼠随机分为模型组、盐酸贝那普利组和丹参多酚酸盐低、中、高剂量 (16.7、33.3、66.7 mg/kg) 组。每组按相应剂量给药, 给药结束后检测大鼠 24 h 尿蛋白定量 (UTP) 和血清总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (Scr) 水平; 免疫荧光、光镜、电镜下观察大鼠肾脏病理形态; 免疫组化及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测各组大鼠肾组织 CD2AP、Desmin mRNA 的表达情况。 **结果** 与对照组比较, 模型组大鼠 UTP 显著增加 ($P<0.01$), 血清 TC、TG 水平显著升高 ($P<0.01$), 血清 TP、ALB 水平显著降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各治疗组大鼠 UTP、TC、TG 水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), TP、ALB 水平均显著升高 ($P<0.01$); 丹参多酚酸盐各剂量组与盐酸贝那普利组大鼠 UTP、TC、TG、TP、ALB 比较无显著差异; 丹参多酚酸盐各剂量组内比较亦无明显差异。各组大鼠 BUN、Scr 相比无明显差异。与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 CD2AP 蛋白及 mRNA 表达量均显著减少, Desmin 蛋白及 mRNA 表达量显著增多 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠 CD2AP 蛋白及 mRNA 表达量显著增多, Desmin 蛋白及 mRNA 表达量显著减少 ($P<0.01$); 各治疗组之间相比无显著差异。 **结论** 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠的肾保护作用可能与上调 CD2AP 表达、下调 Desmin 表达, 抑制足细胞损伤, 保护肾小球滤过屏障的完整性有关。

关键词: 丹参多酚酸盐; 膜性肾病; 足细胞裂孔隔膜蛋白 CD2 相关蛋白; 结蛋白; 24 h 尿蛋白定量

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)08-1877-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.022

Effect of salvianolate on podocyte of membranous nephropathy rats induced by cationic bovine serum albumin

CHEN Su-zhi¹, CHEN Wen-jun², ZHANG Zhuo³, SONG Rui-jing³, TAN Jin-chuan⁴

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Hengshui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hengshui 053000, China

3. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

4. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China

Abstract: Objective To observe the effects of salvianolate on blood biochemical indexes, pathological changes of renal tissue and expression of CD2AP and Desmin protein in membranous nephropathy rats induced by cationic bovine serum albumin. And to explore the renal protective effect of salvianolate on membranous nephropathy rats and its possible mechanism. **Methods** Healthy male SD rats were randomly divided into normal group and model group. Rat models of membranous nephropathy were reproduced by injection of cationized bovine serum albumin through tail vein. Model successful rats were randomly divided into model group, benazepril group, and salvianolate groups (16.7, 33.3, and 66.7 mg/kg). Each group was given the dose of the corresponding drugs. After treatment, the level of 24 h urine total protein (UTP), serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), total protein (TP), albumin (ALB), urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (Scr) were detected. Immunofluorescence, light microscope, and electron microscope were

收稿日期: 2018-01-09

作者简介: 陈素枝 (1989—), 女, 天津中医药大学在读博士, 研究方向为中医内科肾病。Tel: 18033897822

*通信作者 檀金川 (1964—), 男, 博士生导师, 教授, 河北省中医院肾病科主任。

used to observe the pathological changes of rat kidney. Immunohistochemistry and real-time PCR were used to detect the expression of CD2AP and Desmin. **Results** Compared with the control group, levels of UTP, TC, and TG increased significantly ($P < 0.01$), levels of serum TP and ALB decreased significantly ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, the UTP, TC, and TG of each treatment group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), while the TP and ALB were significantly increased ($P < 0.01$). There was no significant difference in the UTP, TC, TG, TP, and ALB among each dosage of salvianolate and benazepril group. And there was no significant difference among each dose group of salvianolate. There was no significant difference among each groups in the level of BUN and Scr. Compared with the normal group, the expression of CD2AP in model group was significantly decreased and Desmin was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of CD2AP increased and Desmin decreased in each treatment group ($P < 0.01$), but there was no difference among the treatment groups. **Conclusion** Salvianolate has kidney protective effect on membranous nephropathy rats. The mechanism may be related to up-regulating the expression of CD2AP, down-regulating the expression of Desmin, inhibiting podocyte injury and protecting the integrity of the glomerular filtration barrier.

Key words: salvianolate; membranous nephropathy; CD2AP; Desmin; 24 h urine total protein

目前普遍认为膜性肾病是一种自身免疫性足细胞病^[1], 肾小球以足细胞损伤为主, 足细胞骨架结构破坏将导致足细胞损伤甚至脱落, 最终引起大量蛋白尿。膜性肾病患者血液存在高凝状态, 丹参多酚酸盐常作为活血抗凝药物应用于膜性肾病的治疗, 临床发现常规治疗配合丹参多酚酸盐疗效较佳。既往研究显示丹参多酚酸盐能有效降低早期糖尿病肾病患者炎症反应, 减轻血管内皮细胞损伤, 并改善肾血管内皮功能^[2-3], 从而显示出肾脏保护作用。在治疗慢性肾功能衰竭方面, 丹参多酚酸盐能改善肾功能相关指标和肾组织纤维化, 延缓慢性肾脏疾病的进展^[4-5]。丹参多酚酸盐具有改善微循环、增加微血管血流速度以及抗凝、抗氧化、保护肾脏血管内皮细胞功能等作用, 其有望改善膜性肾病患者病情。但目前并没有查阅到关于丹参多酚酸盐治疗膜性肾病的临床及实验研究。本实验用阳离子化牛血清白蛋白复制膜性肾病大鼠模型, 研究肾小球足细胞损伤后, 足细胞裂孔隔膜蛋白 CD2 相关蛋白 (CD2AP) 及结蛋白 (Desmin) 的表达, 观察丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠的影响及足细胞内 CD2AP、Desmin 蛋白表达的变化。

1 材料

1.1 药物

盐酸贝那普利 (洛汀新), 北京诺华制药有限公司, 批号 X1902; 丹参多酚酸盐注射液, 上海绿谷制药有限公司, 批号 Z20050246。

1.2 动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 62 只, 体质量 (180 ± 20) g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 生产合格证号 1509116。

1.3 试剂

牛血清白蛋白第 5 组分 (BSA-V), 北京索莱

宝科技有限公司; 无水乙二胺 (EDA)、碳化二亚胺 (EDC), 上海阿拉丁试剂有限公司; 弗氏不完全佐剂, 美国 Sigma 公司; 总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG) 测定试剂盒, 北京中生北控生物科技股份有限公司; 血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 山羊抗大鼠 IgG、FITC 标记兔抗山羊 IgG、FITC 标记山羊抗兔 IgG, 美国 KPL 公司; 兔抗大鼠 C3, 美国 Santa Cruz 公司; 兔两步法免疫组化试剂盒, 北京中杉金桥公司; 兔抗大鼠 CD2AP 多克隆抗体, 美国 GeneTex 公司; 兔抗大鼠 Desmin 多克隆抗体, 武汉博士德生物公司; PCR 引物合成, Invitrogen 公司; TRNzol 总 RNA 提取试剂, 天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.4 仪器

透析袋, 北京索莱宝科技有限公司; 真空冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TDL-5-A 高速离心机, 上海安亭科技仪器厂; 7170A 型全自动生化分析仪 Hitachi, 日本日立公司; 712 型尿蛋白 (24 h) 分光光度计, 上海第三分析仪器厂; 显微镜, 日本奥林巴斯公司; ABI7500 荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司; ND-1000 核酸定量仪, 美国 Thermo 公司。

2 方法

2.1 模型制备及给药

62 只健康雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 试纸测尿蛋白均为阴性, 24 h 尿蛋白定量 (UTP) 均在 5 mg 以下。随机分为对照组 10 只、造模组 52 只。按照改良 Border 法^[6]制备阳离子化牛血清白蛋白 (C-BSA), 将 1 mg C-BSA 加入 0.5 mL 生理盐水, 再加入等体积的弗氏不完全佐剂混匀使其充分

乳化。按照 Border 法^[6]进行预免疫,造模组大鼠在双前肢腋下及双腹股沟 sc 1 mL 乳化液,隔日 1 次,每周 3 次,预免疫 1 周。预免疫 1 周后,每只大鼠隔日 1 次尾 iv C-BSA 16 mg/kg 进行正式免疫,每周 3 次,连续 4 周。造模结束后造模组 52 只大鼠死亡 1 只,尿蛋白试纸检测存活的造模组大鼠尿蛋白均阳性,随机抽取 2 只造模大鼠,进行肾组织免疫荧光、光镜、电镜检查,观察到免疫复合物沉积伴基底膜弥漫性增厚,证实膜性肾病造模成功。随后将造模成功大鼠随机分为 5 组,模型组 9 只、盐酸贝那普利组 10 只和丹参多酚酸盐低、中、高剂量组各 10 只。盐酸贝那普利组按 10.0 mg/kg ig 给药(用 3 mL 蒸馏水配成混悬液),并 ip 1.5 mL 生理盐水。丹参多酚酸盐低、中、高剂量组分别按照 16.7、33.3、66.7 mg/kg ip 给药(用 1.5 mL 生理盐水配成溶液),并 ig 3 mL 蒸馏水。模型组及对照组均 ig 蒸馏水 3 mL 并 ip 生理盐水 1.5 mL。每日 1 次,连续 4 周。

2.2 大鼠 UTP 及血液生化指标检测

实验结束后,大鼠禁食不禁水,留取 24 h 尿液测 UTP。大鼠禁食 12 h 后,麻醉,腹主动脉取血,以全自动生化分析仪检测生化指标血清 TC、TG、TP、ALB、BUN、Scr。

2.3 免疫荧光检测大鼠肾组织 IgG 和补体 C3 沉积

采用冰冻切片间接免疫荧光法检测 IgG 和补体 C3 沉积情况。取大米粒样新鲜肾皮质,在冰上制成切片后经冷丙酮固定,分别滴加一抗(1:50),37 °C 孵育 30 min,滴加 FITC 标记的二抗(1:50),37 °C 孵育 30 min,甘油磷酸缓冲液封片,荧光显微镜下观察。

2.4 光镜、电镜观察大鼠肾组织病理形态

光镜标本(取 2 mm×2 mm×10 mm 大小肾皮质)用 FAA 固定液固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋切片,PAS、Masson 染色,光镜下观察。

电镜标本(取 1 mm×1 mm×1 mm 大小肾皮质)采用 2.5%戊二醛固定液固定,乙醇梯度脱水,环氧树脂包埋切片,醋酸铀、柠檬酸铅双重染色,透射电镜下观察。

2.5 免疫组化法检测大鼠肾组织 CD2AP、Desmin 蛋白表达

取适当大小肾皮质用 10%中性甲醛固定液固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋切片,DAB 显色,苏木素复染,图像采用半定量分析,进行免疫组化评分($IHS=A \times B^{[7]}$,A 为阳性细胞数,B 为阳性

细胞显色强度分级)。

2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测大鼠肾组织 CD2AP、Desmin mRNA 表达

采用新鲜肾皮质,提取样本总 RNA,测其纯度,逆转录合成 cDNA。引物序列:CD2AP 上游 5'-AG-AGTCCACAGATGATGGTGAAATG-3',下游 5'-AT-GTCTCCAAATCCAACCTCCTCG-3',大小 162 bp;Desmin 上游 5'-CAGGGACATCCGTGCTCAGTAT-3',下游 5'-GCATCAATCTCGCAGGTGTAGG-3',大小 189 bp;GAPDH 上游 5'-CCTTCCGTGTTCTTAC-CCC-3',下游 5'-GCCCAGGATGCCCTTTAGTG-3',大小 131 bp。反应体系为 PCR mix 10 μL、上下游引物各 0.5 μL、cDNA 2 μL,加灭菌蒸馏水至 20 μL。扩增程序为 95 °C、30 s,95 °C、5 s,60 °C、40 s,扩增 45 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

2.7 统计方法

用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有定量数据均经过正态性和方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多重比较采用 LSD 检验,方差不齐时采用秩和检验。

3 结果

3.1 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠 UTP 及血清 TC、TG、TP、ALB、BUN、Scr 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠 UTP 显著增加($P<0.01$),血清 TC、TG 水平显著升高($P<0.01$),血清 TP、ALB 水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,各治疗组大鼠 UTP、TC、TG 水平均显著下降($P<0.05$ 、 0.01),TP、ALB 水平均显著上升($P<0.05$)。丹参多酚酸盐各剂量组与盐酸贝那普利组大鼠 UTP、TC、TG、TP、ALB 比较无显著差异。丹参多酚酸盐各剂量组间各指标比较无显著差异。各组大鼠 BUN、Scr 水平无显著差异(表 1)。

3.2 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾组织 IgG 和补体 C3 沉积的影响

对照组大鼠肾组织未见 IgG 及补体 C3 沉积,荧光强度为阴性。模型组大鼠肾组织明显可见 IgG 及补体 C3 荧光沿肾小球毛细血管基底膜弥漫性沉积,荧光染色为强阳性。各治疗组大鼠可见肾小球 IgG 沿肾小球毛细血管基底膜少量、颗粒样沉积,较模型组明显减轻,荧光染色强度较模型组弱(图 1)。C3 的荧光强度及沉积部位与 IgG 基本一致(图略)。

表 1 丹参多酚酸盐对大鼠 UTP 及血清 TC、TG、TP、ALB、BUN、Scr 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Effects of salvianolate on UTP and serum levels of TC, TG, TP, ALB, BUN, and Scr of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n	UTP/mg	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	10	4.66±0.55	1.21±0.25	0.52±0.15	63.89±4.40	32.35±3.06	6.82±1.00	30.67±2.34
模型	—	9	34.73±3.52 ^{##}	1.99±0.30 ^{##}	0.96±0.21 ^{##}	49.51±4.01 ^{##}	25.20±1.53 ^{##}	6.14±1.61	32.16±6.43
盐酸贝那普利	10.0	10	13.86±1.27 ^{**}	1.59±0.14 ^{**}	0.75±0.08 ^{**}	58.43±2.49 ^{**}	28.51±1.73 ^{**}	6.93±0.66	30.56±2.92
丹参多酚酸盐	16.7	10	13.88±1.63 ^{**}	1.50±0.16 ^{**}	0.77±0.05 [*]	57.60±3.89 ^{**}	28.71±2.27 ^{**}	6.69±0.85	31.21±3.02
	33.3	10	13.18±1.66 ^{**}	1.49±0.11 ^{**}	0.70±0.17 ^{**}	59.78±3.01 ^{**}	29.71±2.27 ^{**}	6.30±0.36	28.18±6.02
	66.7	10	12.72±1.93 ^{**}	1.47±0.13 ^{**}	0.64±0.08 ^{**}	60.43±2.02 ^{**}	30.00±1.66 ^{**}	6.25±0.47	30.23±3.05

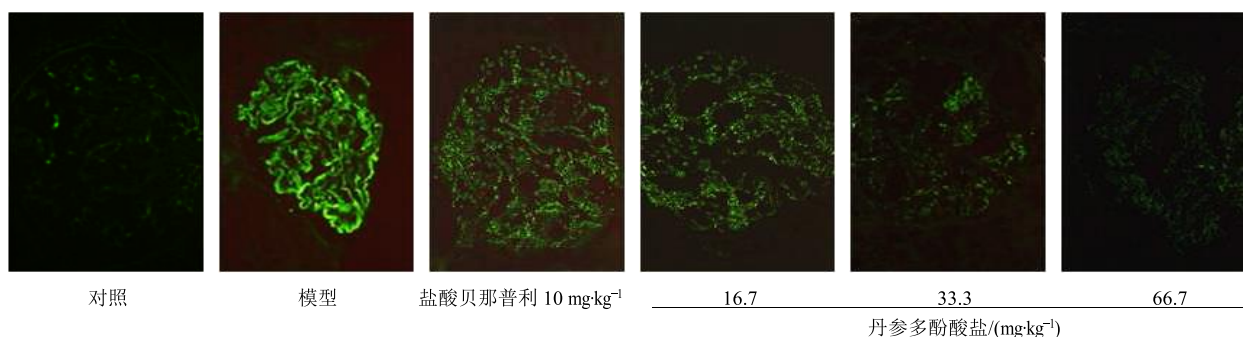
与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下同^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 1 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾组织 IgG 沉积的影响

Fig. 1 Effects of salvianolate on the deposition of IgG in renal tissue of membranous nephropathy rats

3.3 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾组织病理形态的影响

光镜下观察, 对照组大鼠肾小球形态无明显改变。模型组大鼠可见肾小球毛细血管基底膜明显增厚, 上皮细胞下免疫复合物沉积, 甚至可见“钉突”形成。各治疗组大鼠肾小球毛细血管基底膜增厚较轻, 上皮细胞下少量颗粒样免疫复合物沉积, 病理

改变均较模型组明显减轻 (图 2)。

电镜结果显示, 对照组大鼠肾小球足细胞结构清晰, 基底膜均匀, 无异常改变。模型组大鼠肾小球毛细血管基底膜明显增厚, 上皮细胞下大量电子致密物沉积, 足突广泛融合或消失。各治疗组大鼠肾小球毛细血管基底膜增厚较轻, 上皮细胞下少量电子致密物沉积, 足突部分融合, 病理改变均较模型组减轻 (图 3)。

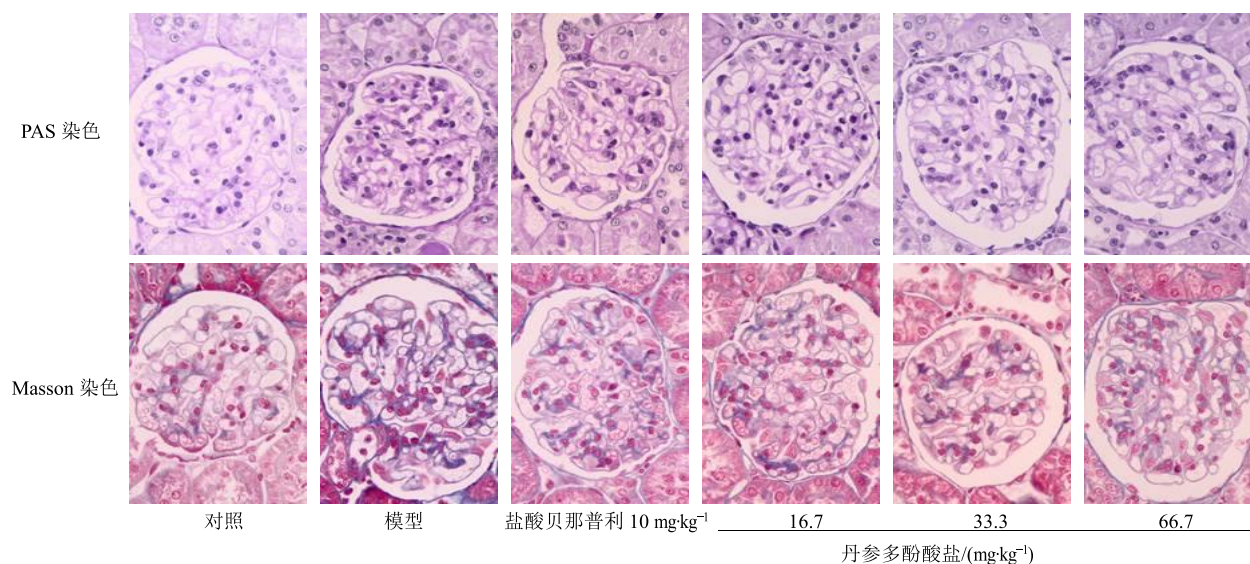


图 2 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾组织病理形态的影响 (光镜, ×400)

Fig. 2 Effects of salvianolate on pathomorphology of renal tissue in rats with membranous nephropathy (light microscope, ×400)

3.4 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾组织 CD2AP、Desmin 蛋白表达的影响

CD2AP 蛋白在对照组大鼠肾小球沿毛细血管袢呈线样分布,大量表达。模型组大鼠可见 CD2AP 蛋白沿着毛细血管袢呈颗粒样或斑片状分布,较对照组表达量明显减少 ($P<0.01$)。各治疗组可见 CD2AP 沿着毛细血管袢不连续性线状呈斑片状分布,与模型组比较其表达量显著增多 ($P<0.01$)。各治疗组之间

CD2AP 蛋白表达量无显著差异 (图 4 和表 2)。

Desmin 蛋白在对照组大鼠肾小球上微弱表达。模型组大鼠可见 Desmin 蛋白在毛细血管壁沿基底膜出现了较强的阳性表达,呈线性分布,较对照组表达量显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较,各治疗组大鼠肾小球 Desmin 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)。各治疗组之间 Desmin 蛋白表达水平无显著差异 (图 4 和表 2)。

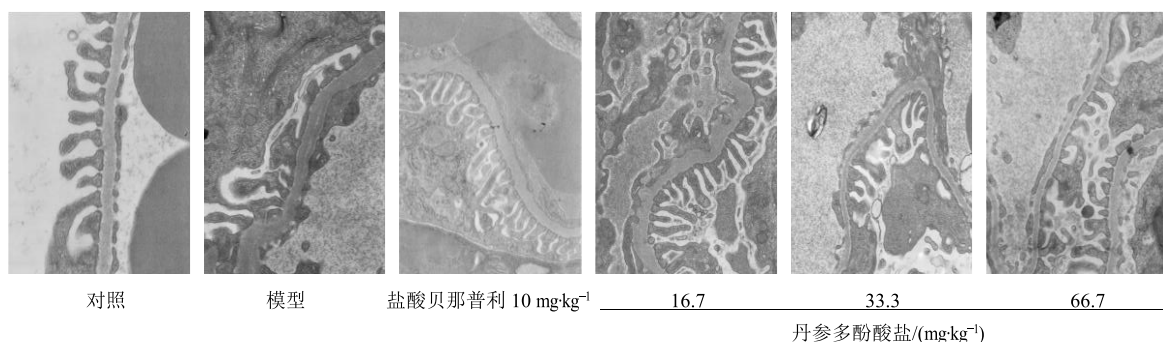


图 3 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾组织病理形态的影响 (电镜, $\times 20\ 000$)

Fig. 3 Effects of salvianolate on pathomorphology of renal tissue in rats with membranous nephropathy (Electron microscopy, $\times 20\ 000$)

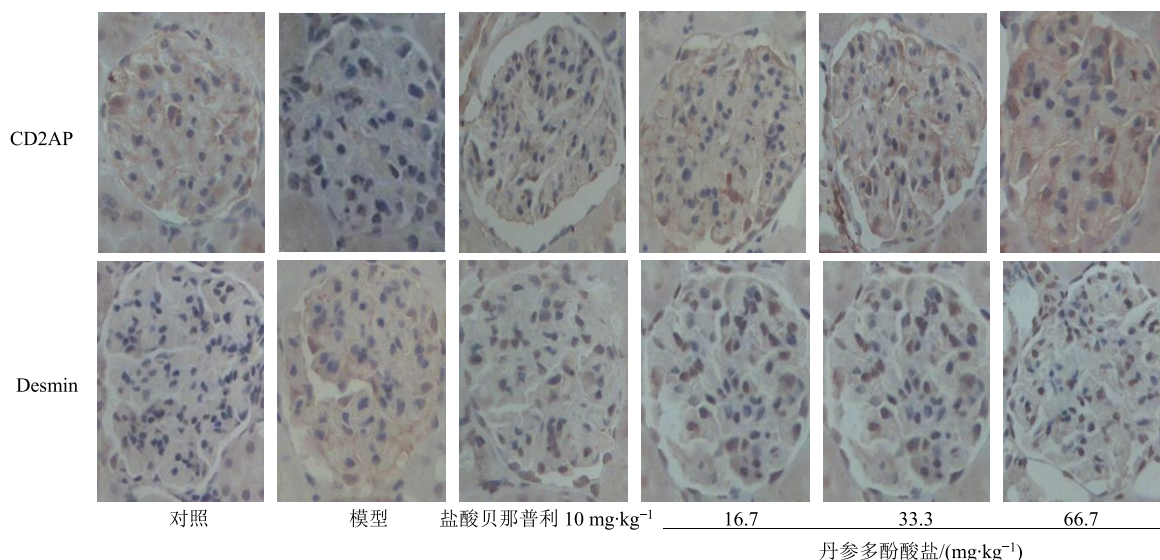


图 4 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾组织 CD2AP、Desmin 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of salvianolate on expression of CD2AP and Desmin in renal tissue of membranous nephropathy rats

3.5 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾组织 CD2AP、Desmin mRNA 表达的影响

与对照组比较,模型组 CD2AP mRNA 的表达明显减少 ($P<0.01$)。与模型组比较,各治疗组 CD2AP mRNA 的表达明显增多 ($P<0.01$)。各治疗组组间比较无明显差异 (表 3)。

4 讨论

膜性肾病以大量蛋白尿为临床特点,以肾小球

脏层上皮细胞下免疫复合物沉积、基底膜增厚伴钉突形成为病理特征,各种原因所致的补体活化,继而形成 C5b-9 膜攻击复合物,引起足细胞损伤。细胞骨架结构破坏是各种损伤因素作用于足细胞引起足突融合的“共同的最后道路”^[8]。足细胞的足突分为 3 个膜性结构域,即顶膜区、裂孔隔膜 (SD) 和与肾小球基底膜 (GBM) 相连的基膜区。CD2AP 位于裂孔隔膜 (SD) 上,对于维持足细胞骨架及形

表 2 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾组织 CD2AP、Desmin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of salvianolate on expression of CD2AP and Desmin in renal tissue of membranous nephropathy rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n	IHS	
			CD2AP	Desmin
对照		10	11.40±1.26	1.40±0.55
模型		9	5.40±1.65 ^{###}	8.40±1.34 ^{###}
盐酸贝那普利	10.0	10	9.70±1.64 ^{**}	4.00±1.41 ^{**}
丹参多酚酸盐	16.7	10	9.50±1.78 ^{**}	4.40±0.89 ^{**}
	33.3	10	9.90±1.85 ^{**}	3.60±0.89 ^{**}
	66.7	10	9.90±1.45 ^{**}	3.20±1.10 ^{**}

表 3 丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾组织 CD2AP、Desmin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of salvianolate on expression of CD2AP and Desmin mRNA in renal tissue of membranous nephropathy rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n	mRNA 相对表达量	
			CD2AP	Desmin
对照	—	10	1.000±0.000	1.000±0.000
模型	—	9	0.360±0.007 ^{###}	2.092±0.118 ^{###}
盐酸贝那普利	10.0	10	0.682±0.031 ^{**}	1.484±0.091 ^{**}
丹参多酚酸盐	16.7	10	0.694±0.019 ^{**}	1.492±0.063 ^{**}
	33.3	10	0.712±0.014 ^{**}	1.381±0.101 ^{**}
	66.7	10	0.720±0.031 ^{**}	1.370±0.124 ^{**}

态完整性起重要作用^[9], CD2AP 表达水平下调可导致细胞骨架断裂^[10]。研究显示 CD2AP 基因突变可导致散发型肾病综合征及原发局灶性节段性肾小球硬化^[11-12]。CD2AP^{-/-}小鼠出生后 1 周即出现蛋白尿, 2 周出现肾病综合征, 6~7 周死于肾功能衰竭, 病理显示足突广泛融合、消失, 甚至出现节段性肾小球硬化^[13]; CD2AP^{+/-}小鼠肾小球损伤的易感性增加, 并逐步发展为足细胞损伤、蛋白尿和肾功能不全^[14]。Desmin 属于细胞骨架的中间丝蛋白, 在正常足细胞无明显表达, 当足细胞因各种原因发生损伤时, 可大量表达而发生表型转化。Maruyama 等^[15]研究提示, Desmin 可作为原发膜性肾病早期足细胞损伤的标志。

本实验采用尾 iv C-BSA 的方法复制膜性肾病动物模型, 通过注射外源性抗原或抗体, 诱导机体自身免疫反应, 使其与人类膜性肾病发病机制更为相似。研究显示 16 mg/kg 的 C-BSA 诱导模型成模

效果更好, 模型稳定, 临床表现典型^[16]。免疫周期为 4 周, 无论是从病理特点还是临床特征都更接近于人类膜性肾病。

本实验结果显示, 造模完成后大鼠出现肾小球毛细血管基底膜增厚、钉突形成、免疫复合物沉积等膜性肾病病理特征, 及明显蛋白尿、血清蛋白降低、血脂升高等膜性肾病临床特征。丹参多酚酸盐各剂量可有效减少膜性肾病大鼠蛋白尿量, 降低血清 TC、TG 水平, 升高血清 TP、ALB 水平, 疗效与盐酸贝那普利相当。丹参多酚酸盐各剂量组之间各指标比较无显著差异。各组大鼠血清 BUN、Scr 水平无明显变化, 是因为造模后大鼠肾功能无明显受损, 处于代偿期, 与造模剂量和造模时间较短有关。病理结果亦显示各治疗组大鼠肾小球毛细血管基底膜增厚较轻、免疫复合物沉积较少、足细胞损伤较轻, 病理改变较模型组减轻, 提示丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠肾小球的病理形态有改善作用。目的蛋白的检测结果表明, 膜性肾病大鼠肾组织 CD2AP 蛋白表达量减少、Desmin 蛋白表达量增多, 说明足细胞有明显的损伤。应用丹参多酚酸盐干预后大鼠肾组织 CD2AP 蛋白表达水平上调, Desmin 蛋白表达水平下调, 说明丹参多酚酸盐对膜性肾病大鼠的治疗作用伴随着足细胞骨架相关蛋白基因表达的改变, 进而改善足细胞结构损伤, 这可能是其作用机制之一。

综上所述, 丹参多酚酸盐对膜性肾病具有治疗作用, 能改变膜性肾病大鼠肾组织 CD2AP 及 Desmin 蛋白的表达水平, 进而改善足细胞损伤、维持足细胞功能、减少蛋白尿。这可能是其除了改善膜性肾病高凝状态之外的其他作用机制之一。

参考文献

- [1] Glasscock R J. The pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy: A 50 year odyssey [J]. *Am J Kidney Dis*, 2010, 56(1): 157-167.
- [2] 卢伟波, 杨丕坚, 李舒敏, 等. 丹参多酚酸盐对早期糖尿病肾病患者炎症细胞因子及肾血管内皮功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(2): 184-187.
- [3] 赵琪, 冯春玲, 孙玉珍, 等. 丹参多酚酸盐治疗老年糖尿病肾病的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2015, 30(4): 441-444.
- [4] 姚冲, 刘兵兵, 黄馥菡, 等. 丹参多酚酸盐治疗慢性肾功能衰竭有效性及安全性的系统评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(14): 203-208.
- [5] 邵命海, 王琛, 杨婧, 等. 丹参多酚酸盐对慢性肾

- 功能衰竭大鼠肾功能和肾内氧耗的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2012, 26(3): 666-669.
- [6] Border W A, Ward H J, Kamil E S, *et al.* Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen [J]. *J Clin Invest*, 1982, 69(2): 4514-4561.
- [7] Soslow R A, Dannenberg A J, Rush D, *et al.* Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. *Cancer*, 2000, 89(12): 2637-2645.
- [8] Oh J, Reiser J, Mundel P. Dynamic(re) organization of the podocy teactin cytoskeleton in the nephritic syndrome [J]. *Pediatr Nephrol*, 2004, 19(2): 130-137.
- [9] 范青锋, 邢 燕, 丁 洁. 足细胞裂孔隔膜与信号传导 [J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 22(5): 312-314.
- [10] Zhang C, Jiang H J, Chang Y, *et al.* Downregulation of CD2-associated protein impaired the physiological functions of podocytes [J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33(6): 632-639.
- [11] 孟大川, 余自华, 王道静, 等. 中国汉族儿童散发性激素耐药型肾病综合征 CD2AP 基因突变分析 [J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(7): 641-645.
- [12] Gigante M, Pontrelli P, Montemurno E, *et al.* CD2AP mutations are associated with sporadic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(6): 1858-1864.
- [13] Zhang A, Huang S. Progress in pathogenesis of proteinuria international [J]. *Int J Nephrology*, 2012, doi: 10.1155/2012/314251.
- [14] Asanuma K, Campbell K N, Kim K, *et al.* Nuclear relocation of the nephrin and CD2AP-binding protein dendrin promotes apoptosis of podocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10134-10139.
- [15] Maruyama M, Sugiyama H, Sada K, *et al.* Desmin as a marker of protein uria in early stages of membranous nephropathy in elderly patients [J]. *Clin Nephrol*, 2007, 68(2): 73-80.
- [16] 梁 静, 孙兴旺, 曹 灵, 等. 不同剂量阳离子化牛血清白蛋白对膜性肾病大鼠造模的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(37): 7322-7325.