

益肾通络方对膜性肾病大鼠的肾保护作用及足细胞骨架相关蛋白的影响

陈素枝¹, 臧倩男², 张 卓³, 宋瑞婧³, 檀金川^{4*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 河北医科大学, 河北 石家庄 050011

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** 探讨益肾通络方对膜性肾病大鼠的肾脏保护作用及可能的机制。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 60 只随机分为对照组 10 只和造模组 50 只, 造模组采用尾 iv 阳离子化牛血清白蛋白 (C-BSA) 的方法复制膜性肾病大鼠模型。造模成功后再随机分为模型组、盐酸贝那普利组和益肾通络方低、中、高剂量 (6.61、13.22、26.44 g/kg) 组, 各组按照相应剂量 ig 给药, 每天 1 次, 连续给药 4 周。给药结束后检测大鼠 24 h 尿蛋白定量 (UTP)、血清总胆固醇 (TC)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (Scr) 水平; 免疫荧光检测各组大鼠肾组织 IgG 免疫复合物沉积情况, 电镜下观察肾小球基底膜及足细胞形态结构; 免疫组化及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测各组大鼠肾足细胞骨架相关蛋白 ezrin、synaptopodin 的表达。**结果** 与模型组比较, 各治疗组大鼠 UTP、TC 水平均显著下降 ($P<0.01$), TP、ALB 水平均显著上升 ($P<0.01$); 益肾通络方中、高剂量组与盐酸贝那普利组疗效相当, 效果优于益肾通络方低剂量组; 各组大鼠 BUN、Scr 相比无明显差异。与对照组比较, 模型组大鼠肾足细胞骨架相关蛋白 ezrin、synaptopodin mRNA 表达显著减少 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠肾足细胞相关蛋白 ezrin、synaptopodin mRNA 表达均有不同程度增加 ($P<0.01$); 益肾通络方中、高剂量组大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin mRNA 表达量与盐酸贝那普利组相当, 均高于益肾通络方低剂量组。**结论** 益肾通络方对膜性肾病大鼠具有治疗作用, 其机制可能与防止足细胞骨架相关蛋白 ezrin、synaptopodin 降解、维持足细胞骨架及足突结构完整性相关。

关键词: 益肾通络方; 膜性肾病; 足细胞骨架相关蛋白; ezrin; synaptopodin

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)20-4857-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.023

Effect of Yishen Tongluo Formula on kidney protection and podocyte skeleton related proteins in rats with membranous nephropathy

CHEN Su-zhi¹, ZANG Qian-nan², ZHANG Zhuo³, SONG Rui-jing³, TAN Jin-chuan⁴

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

2. Hebei Medicine University, Shijiazhuang 050011, China

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

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

Abstract: **Objective** To explore the kidney protection and possible mechanism of Yishen Tongluo Formula (YTF) in rats with membranous nephropathy (MN). **Methods** A total of 60 SD healthy male rats were randomly divided into 10 for normal group and 50 for MN rat model group. The MN rat model was established by tail iv cationic bovine serum albumin (C-BSA). After successful modeling, they were randomly divided into model group, benazepril group, and YTF groups at low, medium, and high doses (6.61, 13.22, and 26.44 g/kg). Rats in each group were ig administrated once daily for continuous four weeks according to the corresponding dose. At the end of administration, the 24 h urine total protein (UTP), total cholesterol (TC), total protein (TP), albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (Scr) levels were measured. Immunofluorescence was used to detect the deposition of IgG immune complexes in renal tissue. The glomerular basement membrane and podocyte morphology were observed under electron microscope. Immunohistochemistry and qRT-PCR were used to detect the expression of cytoskeleton-related proteins ezrin and

收稿日期: 2018-05-07

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。

synaptopodin in rat kidneys. **Results** Compared with the model group, the UTP and TC levels in the rats in each treatment group decreased significantly ($P < 0.01$), and the TP and ALB levels increased significantly ($P < 0.01$). The middle and high dose groups of YTF were similar to the benazepril group, and the effect was better than the low dose group of YTF. There was no significant difference in the BUN and Scr among the groups. Compared with the control group, the expression of ezrin and synaptopodin mRNA in the kidney of the model group was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of ezrin and synaptopodin mRNA in the podocytes of different treatment groups was increased in different degrees ($P < 0.01$). The expression levels of ezrin and synaptopodin mRNA in the kidney of rats in the middle and high dose groups of YTF were similar to those in the benazepril group, which were higher than that in the low dose group of YTF. **Conclusion** YTF has a therapeutic effect on membranous nephropathy in rats. The mechanism may be related to the inhibition of the degradation of podocyte skeleton related proteins ezrin and synaptopodin and the maintenance of the integrity of the podocyte skeleton and foot process.

Key words: Yishen Tongluo Formula; membranous nephropathy; podocyte cytoskeleton-associated proteins; ezrin; synaptopodin

膜性肾病 (MN) 是一种免疫复合物介导的引起肾病综合征的常见病因, 可能发生在所有年龄段人群中^[1], 大约有 40%~75% 的 MN 患者表现为肾病综合征^[2]。在 MN 中, 可通过检测蛋白尿水平和肾脏排泄功能判断疾病的进程和预后情况, 在蛋白尿减少的情况下, 肾脏衰退的风险下降^[3-5]。因此, 不管是否使用免疫抑制剂, MN 治疗效果的关键标志是控制蛋白尿的生成^[6]。临床上常用的免疫抑制剂最初为甲基强的松龙和苯丁酸氮芥, 后来改为甲基强的松龙和环磷酰胺^[7-8], 尽管治疗成功, 但改良的 Ponticelli 方案具有显著的副作用, 感染、骨质疏松症、糖尿病、体质量增加、出血性膀胱炎、不孕和恶性肿瘤的风险增加^[9]。许多研究人员寻找 MN 的其他疗法, 如中西医结合治疗等。益肾通络方是治疗 MN 的中药组方, 理法严谨、切中病机, 临床治疗膜性肾病已取得较好的疗效^[10-11], 本实验探讨益肾通络方对 MN 大鼠的肾脏保护作用及可能的机制, 为其推广应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

健康雄性清洁级 SD 大鼠 60 只, 体质量 (180±20) g, 由河北医科大学动物实验中心提供, 动物合格证号 1509116。实验动物许可证号 SYXK (冀) 2008-0026。

1.2 药物

盐酸贝那普利 (信达怡, 批号 FA20150902), 深圳信立泰药业股份有限公司; 益肾通络方 (组成为黄芪 20 g、党参 15 g、炒白术 15 g、仙灵脾 15 g、绞股蓝 15 g、当归 15 g、莪术 12 g、地龙 12 g、水蛭 9 g, 由河北省中医院制剂室提供)。以上中药均为饮片剂量, 实验所用中药为经相当量换算关系

换算后的配方颗粒 (黄芪批号 5063231、党参批号 5060421、炒白术批号 505207T、仙灵脾批号 411420T、绞股蓝批号 407347T、当归批号 5061851、莪术批号 5061671、地龙批号 5062171、水蛭批号 504432T, 广东一方制药有限公司)。

1.3 试剂

阳离子化牛血清白蛋白 (C-BSA)、弗氏不完全佐剂, 美国 Sigma 公司; 山羊抗大鼠 IgG、FITC 标记兔抗山羊 IgG, 美国 KPL 公司; 兔抗大鼠 ezrin 单克隆抗体、兔抗大鼠 synaptopodin 单克隆抗体, 北京博奥森生物技术有限公司; TRNzol 总 RNA 提取试剂, 北京天根生化科技有限公司; 逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒、核酸共沉剂, TaKaRa 公司; ezrin、synaptopodin、GAPDH 引物由北京 Invitrogen 公司合成。

1.4 仪器

7170A 型全自动生化分析仪, 日本日立公司; 721 型尿蛋白 (24 h) 分光光度计, 上海第三分析仪器厂; BX51T-PHD-J11 显微镜, 日本奥林巴斯公司; RM2015 切片机, 德国莱卡公司; Image-Pro Plus 多功能真彩色细胞图象分析管理系统, 美国 Media Cybernetics 公司。

2 方法

2.1 模型制备、分组及给药

60 只健康雄性清洁级 SD 大鼠适应性饲养 1 周, 尿蛋白试纸检测尿蛋白均为阴性后随机分对照组 10 只和造模组 50 只。按照 Border 法^[12]采用尾 iv C-BSA 的方法复制 MN 大鼠模型。将 1 mg C-BSA 加入到 0.5 mL PBS 中, 并与等量弗氏不完全佐剂混合充分乳化, 于大鼠双前肢腋下及双腹股沟 sc 1 mL 乳化液, 隔日 1 次, 一周 3 次, 预免疫 1 周。然后

每只大鼠尾 iv C-BSA 16 mg/kg 进行正式免疫,每周 3 次,连续 4 周。造模完成后,尿蛋白试纸测尿蛋白阳性为造模成功。

造模成功的大鼠随机分为模型组、盐酸贝那普利组和益肾通络方低、中、高剂量(6.61、13.22、26.44 g/kg)组,每组 10 只。盐酸贝那普利组大鼠每天 ig 给予盐酸贝那普利 10 mg/kg。根据成人临床等效剂量折算系数,以成人剂量的 6.2 倍为中剂量,益肾通络方各剂量组分别 ig 给药 6.61、13.22、26.44 g/kg。模型组和对照组 ig 等容量(10 mL/kg)蒸馏水。每天给药 1 次,连续给药 4 周。

2.2 24 h 尿蛋白定量(UTP)及血清生化指标检测

治疗结束后代谢笼内留取大鼠 24 h 尿液,记录尿量,离心并取上清液,测 UTP。留尿结束后,大鼠以 10%水合氯醛 ip 麻醉后开腹,腹主动脉取血约 5 mL,离心后取血清,测量血清各生化指标,包括血清总胆固醇(TC)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)水平。

2.3 免疫荧光检测大鼠肾皮质 IgG 表达

取大鼠新鲜肾皮质,在冰上制成 5 μm 切片后经冷丙酮固定,采用间接免疫荧光法检测 IgG 水平,分别滴加 FITC 标记的一抗和二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,甘油磷酸缓冲液封片,荧光显微镜下观察标本的荧光强度并拍照记录。

2.4 电镜观察大鼠肾脏足细胞结构

取大鼠肾皮质 1 mm^3 , 1%锇酸固定,酒精梯度逐级脱水,常规包埋、聚合、切片,以醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,透射电子显微镜观察、拍照。

2.5 免疫组化法检测大鼠肾脏足细胞 ezrin、synaptopodin 蛋白表达

取适当大小大鼠肾皮质,4%的多聚甲醛溶液固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋切片,分别滴加兔抗大鼠 ezrin 抗体、兔抗大鼠 synaptopodin 抗体。DAB 显色,苏木素复染,中性树脂封片,显微镜下观察,染色呈棕黄色或棕褐色为阳性结果。

2.6 qRT-PCR 法检测大鼠肾脏足细胞 ezrin、synaptopodin mRNA 表达

取大鼠新鲜肾皮质匀浆样品,采用 Trizol 法提取总 RNA,进行 RNA 的浓度测定,然后经逆转录合成 cDNA,将所得 cDNA 样品分别配置 qRT-PCR 反应体系。引物序列为 ezrin: 上游 5'-TGGGG-AACCACGAGCTGT-3', 下游 5'-GGTTTCCAAGTGTGCTCGCT-3', 122 bp; synaptopodin: 上游 5'-CA-

GCCAGATAGAGCAAAGTCC-3', 下游 5'-ACTCCT-ATCCGCCATACTGC-3', 91 bp; GAPDH: 上游 5'-TT-CCTACCCCAATGTATCCG-3', 下游 5'-CCACCC-TGTTGCTGTAGCCATA-3', 270 bp。反应体系: 2 $\times$ Master Mix 10 mL、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PCR 引物 F 0.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PCR 引物 R 0.5 μL , 加水至总体积为 18 μL 。将 18 μL 混合液加到 PCR 板对应的每个孔中,再加入对应的 2 μL cDNA。结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行数据的相对定量分析。

2.7 统计方法

数据用 SPSS 17.0 统计处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有计量数据均先经过正态性和方差齐性检验,正态且方差齐用两样本 t 检验,方差不齐时采用秩和检验。

3 结果

3.1 益肾通络方对 MN 大鼠 UTP 及血清 TC、TP、ALB、BUN、Scr 水平的影响

与模型组比较,各治疗组大鼠 UTP、TC 均显著下降($P < 0.01$),TP、ALB 均显著上升($P < 0.01$);益肾通络方中、高剂量组与盐酸贝那普利组疗效相当($P > 0.05$),效果均优于益肾通络方低剂量组($P < 0.05$ 、0.01);各组大鼠 BUN、Scr 相比无显著差异(表 1)。

3.2 益肾通络方对 MN 大鼠肾组织 IgG 沉积的影响

对照组大鼠肾组织未见 IgG 荧光沉积。模型组及各治疗组大鼠肾组织均可见 IgG 荧光沿肾小球毛细血管基底膜不同程度沉积,模型组荧光强度最强,益肾通络方低剂量组次之,盐酸贝那普利及益肾通络方中、高剂量组荧光强度最弱(图 1)。

3.3 益肾通络方对 MN 大鼠肾脏病理形态的影响

通过电镜观察各组大鼠肾小球基底膜及足细胞足突排列情况。对照组大鼠肾小球足细胞足突清晰、排列整齐,肾小球基底膜均匀无增厚。模型组大鼠肾组织可见足细胞足突广泛融合消失,肾小球基底膜明显增厚,上皮大量电子致密物沉积。与模型组比较,各治疗组大鼠肾小球基底膜及足细胞病理结构均有不同程度的改善(图 2)。

3.4 益肾通络方对 MN 大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin 蛋白表达的影响

正常情况下 ezrin、synaptopodin 主要表达于肾小球,沿毛细血管呈点线状分布,ezrin 少量表达于肾小管中。与对照组比较,模型组大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin 的阳性表达均明显减少。与模

表 1 益肾通络方对 MN 大鼠 UTP 及血清 TC、TP、ALB、BUN、Scr 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 1 Effects of Yishen Tongluo Formula on UTP and serum levels of TC, TP, ALB, BUN, and Scr in rats with membranous nephropathy ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	UTP/(mg·24 h ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	7.73±0.64	1.38±0.32	60.15±1.53	30.81±1.21	5.34±0.56	42.96±2.82
模型	—	41.94±1.44**	3.98±0.44**	35.66±1.69**	20.70±1.14**	6.37±0.45	43.83±2.71
盐酸贝那普利	0.01	26.53±1.73 ^{##}	2.20±0.49 ^{##}	45.87±1.66 ^{##}	26.69±1.04 ^{##}	6.53±0.37	44.27±2.68
益肾通络方	6.61	28.43±1.66 ^{##△}	2.73±0.44 ^{##△}	43.65±1.46 ^{##△△}	25.36±1.34 ^{##△}	6.46±0.42	42.49±2.17
	13.22	26.75±1.64 ^{##▲}	2.13±0.44 ^{##▲▲}	46.75±1.48 ^{##▲▲}	26.86±0.89 ^{##▲▲}	6.63±0.47	43.73±2.59
	26.44	26.30±1.78 ^{##▲▲}	2.12±0.44 ^{##▲▲}	47.02±1.20 ^{##▲▲}	26.99±0.81 ^{##▲▲}	6.46±0.48	43.66±2.40

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与盐酸贝那普利组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与益肾通络方 6.61 g·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$, 表 2 同

** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs benazepril group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs Yishen Tongluo Formula 6.61 g·kg⁻¹ group, same as table 2

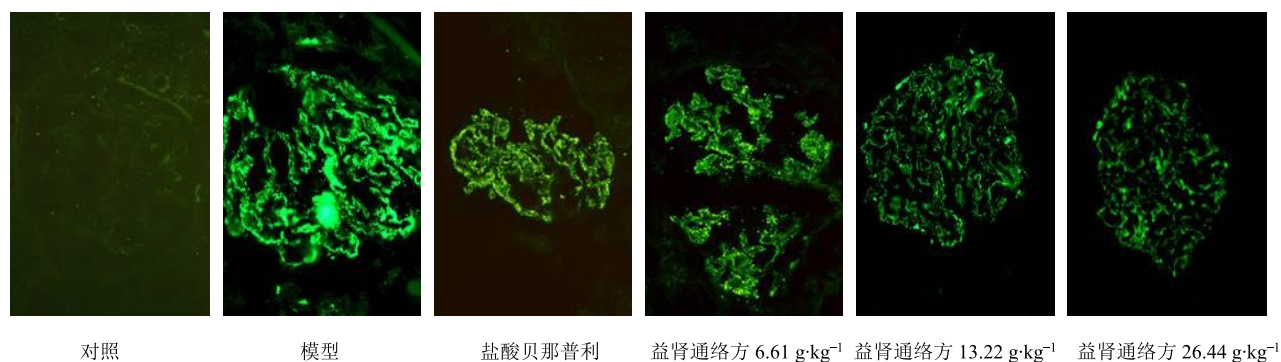


图 1 益肾通络方对 MN 大鼠肾组织 IgG 沉积的影响

Fig. 1 Effect of Yishen Tongluo Formula on IgG deposition in rats with membranous nephropathy

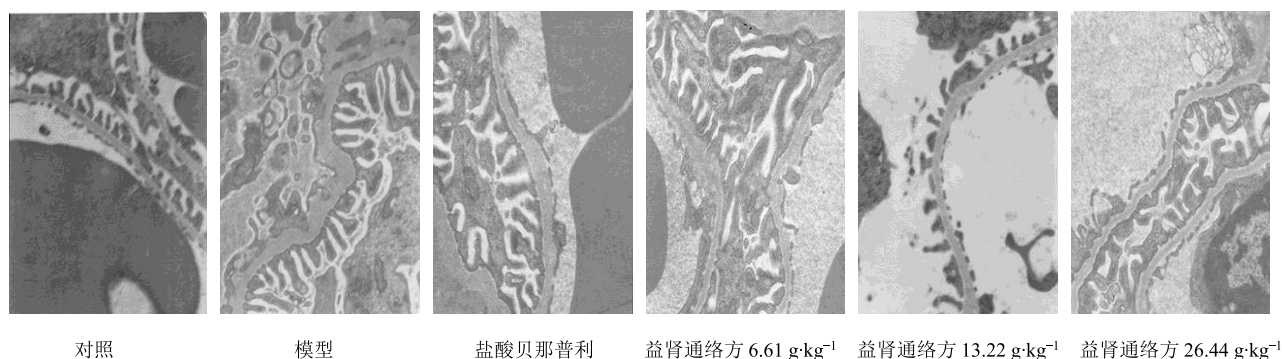


图 2 益肾通络方对 MN 大鼠肾脏病理形态的影响 (电镜, ×20 000)

Fig. 2 Effects of Yishen Tongluo Formula on kidney pathological morphology of rats with membranous nephropathy (electron microscopy, ×20 000)

型组比较, 各治疗组大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin 阳性表达均有不同程度增加, 益肾通络方低剂量组大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin 阳性表达较益肾通络方中、高剂量组及盐酸贝那普利组少 (图 3)。

3.5 益肾通络方对 MN 大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin mRNA 表达的影响

结果表明 (表 2), 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin mRNA 表达均显著减少

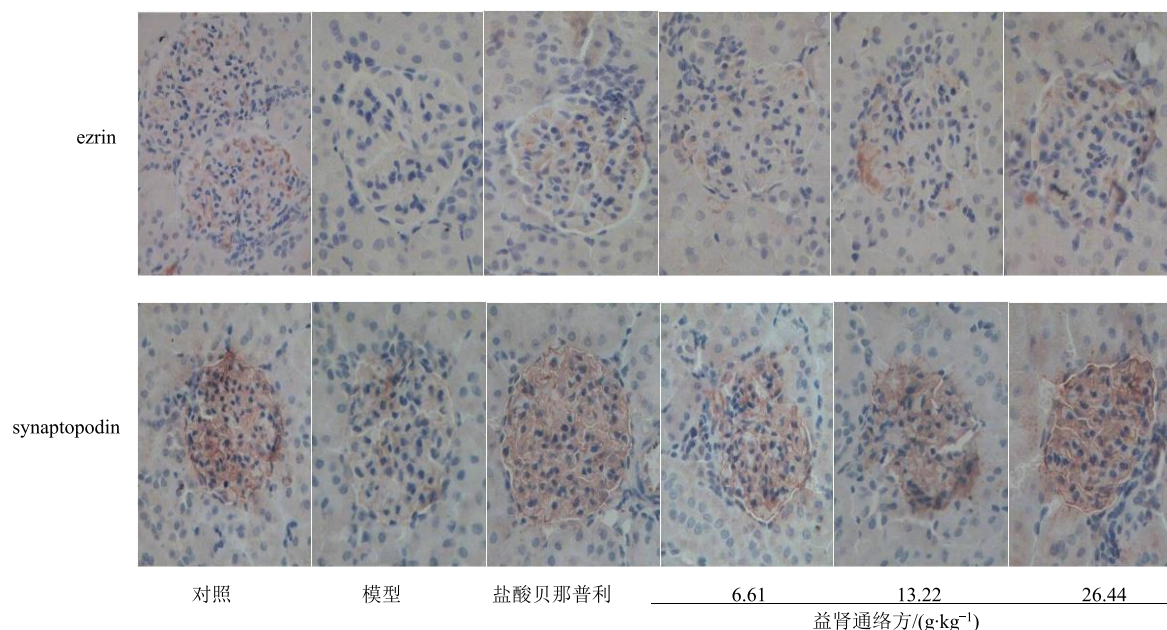


图 3 益肾通络方对 MN 大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Yishen Tongluo Formula on renal ezrin and synaptopodin protein expression in rats with membranous nephropathy

表 2 益肾通络方对 MN 大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Yishen Tongluo Formula on expression of ezrin and synaptopodin mRNA in renal tissue of rats with membranous nephropathy ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量	
		ezrin	synaptopodin
对照	—	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
模型	—	0.281 ± 0.046**	0.292 ± 0.033**
盐酸贝那普利	0.01	0.796 ± 0.103 ^{##}	0.800 ± 0.075 ^{##}
益肾通络方	6.61	0.692 ± 0.060 ^{##△}	0.694 ± 0.070 ^{##△△}
	13.22	0.790 ± 0.085 ^{###▲}	0.799 ± 0.077 ^{###▲}
	26.44	0.797 ± 0.082 ^{###▲}	0.797 ± 0.068 ^{###▲}

($P < 0.01$)。与模型组比较, 各治疗组大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin mRNA 表达水平均不同程度增加 ($P < 0.01$)。益肾通络方中、高剂量组大鼠肾组织 ezrin、synaptopodin mRNA 表达量与盐酸贝那普利组相当, 均高于益肾通络方 6.61 g/kg 组 ($P < 0.01$)。

4 讨论

2004—2014 年间我国 MN 的发病率有明显增加的趋势, 而其他主要肾小球病的发病率保持稳定^[13]。高风险及中高风险 MN 一般均需采用激素及免疫抑制剂, 但这些免疫抑制剂会带来感染、肝损伤、类固醇糖尿病等潜在的风险。因此, 有必要寻找新的治疗方法来改善这一状况。益肾通络方是课题组

探索出的临床中西医结合治疗 MN 的常用组方, 疗效确切^[10-11], 近年来一直致力于寻找其治疗 MN 可能的作用机制^[14-16]。益肾通络方由黄芪、党参、炒白术、淫羊藿、绞股蓝、当归、莪术、地龙、水蛭组成。黄芪能降低尿蛋白, 研究显示高剂量黄芪注射液可使阿霉素肾病大鼠尿蛋白降低达 52.4%^[17]。黄芪、当归合用可减少尿蛋白、提高血清白蛋白水平。黄芪当归合剂能通过提高蛋白净合成率、提高肾病综合征动物肝细胞核酸-蛋白翻译水平来提高血浆白蛋白表达水平, 改善低蛋白血症^[18]。黄芪、党参、炒白术、淫羊藿合用可益气健脾、升清秘精, 改善肾病患者纳少、水肿、倦怠、乏力等虚弱症候, 提高机体免疫功能, 减少雷公藤多苷片胃肠道不良反应。绞股蓝能够除痰、化瘀、调脂, 已有研究显示绞股蓝可以减轻足细胞超微结构改变, 从而保护足细胞、降低尿蛋白、延缓肾小球硬化^[19]。莪术、地龙、水蛭可活血、化瘀、通络, 改善肾病高凝状态, 三者无论是单用还是合用均能减少肾病尿蛋白排出、提高血浆白蛋白水平、调节血脂, 改善肾病综合征高凝状态^[20-22]。益肾通络方的方药组成针对 MN 患者低蛋白血症的虚弱状态及高脂、高黏状态进行合理组方, 能改善患者一般状态。

足细胞异常是许多蛋白尿性肾小球疾病的基础。足细胞丢失和交错足细胞足突的消失是导致过滤屏

障和发展至终末期肾病(ESRD)的主要原因,足细胞的复杂三维形态依赖于肌动蛋白细胞骨架^[23],在嘌呤霉素所致的肾病综合征模型中,肌动蛋白细胞骨架结构随着蛋白尿的发生而分解,在蛋白尿消失时完全恢复^[24]。并且足细胞在肾小球毛细血管周围延伸依靠初级和次级突起(足突)的肌动蛋白提供抗拉强度^[25]。

Ezrin 是肌动蛋白细胞骨架和质膜之间的分子连接体,参与维持细胞黏附和细胞运动,是成人肾脏和肾小球损伤中的肾小球上皮细胞(GEC)标志物^[26]。Ezrin 特异性表达于成熟的及发育中的 GEC 和培养的 GEC 中,并且 ezrin 可能是介导 GEC 损伤过程中细胞骨架排列的重要结构和/或信号蛋白^[26]。Ezrin 与肌动蛋白细胞骨架连接,还通过 Na^+ , H^+ -交换调节因子 2 (NHERF2) 与 podocalyxin 连接^[27]。Podocalyxin 是 GEC 的主要唾液蛋白,有助于维持足突的特征性结构和过滤缝隙的通畅性。Ezrin-NHERF2-podocalyxin 复合物位于足细胞足突的顶端,与肌动蛋白细胞骨架相互作用,这种相互作用在嘌呤霉素氨基核苷、硫酸鱼精蛋白或唾液酸酶处理的大鼠 GEC 被破坏,表现出显著的足突消失与肾病综合征^[27]。因此,ezrin-NHERF2-podocalyxin 复合物似乎对维持足细胞的极性和结构很重要。

Synaptopodin 富含脯氨酸,也正由于其脯氨酸含量高,均匀分布在整个分子上,所以 synaptopodin 蛋白看起来像线性蛋白质,没有任何球状结构域结构^[28]。Synaptopodin 表达于足细胞足突,在完全分化成熟的足细胞中表达,未分化成熟的足细胞不表达,是足细胞分化和成熟的标记^[29]。肾足细胞中, synaptopodin 与肌动蛋白共定位^[28],调节肌动蛋白和足细胞足突的运动。Synaptopodin 的基因沉默导致应力纤维的损失和异常非极化丝状伪足的形成以及细胞迁移的损害,表明 synaptopodin 对于足细胞肌动蛋白细胞骨架的完整性和对足细胞细胞迁移的调节至关重要^[30]。Synaptopodin 缺陷小鼠显示突触可塑性缺陷和尿蛋白丢失恢复受损。另有研究显示, synaptopodin 似乎不是特发性肾病综合征主要病理生理机制的一部分,而是反映损伤程度的次级现象,可作为研究足细胞改变的标志物,并可用于预测特发性肾病综合征患者对类固醇治疗的反应^[31]。恢复 synaptopodin 水平一直被认为是改善肾小球功能的潜在方法。

本实验采用尾 iv C-BSA 的方法复制 MN 大鼠模型,造模后大鼠尿蛋白阳性,UTP 明显高于对照

组;光镜下可见肾小球基底膜增厚、钉突形成;免疫荧光下可见 IgG 沿毛细血管袢大量沉积;电镜下肾小球基底膜弥漫增厚,大量电子致密物沉积于上皮细胞下,足细胞足突融合或消失,提示造模成功。BUN、Scr 是衡量肾功能正常与否的重要指标,MN 大鼠模型从 MN 发展至肾衰需要很长时间,本实验造模时间短,4 周内肾脏仍处于功能代偿期,故 BUN、Scr 波动于正常范围。选用盐酸贝那普利作为阳性对照药物是因其具有独立于降压作用之外的减少蛋白尿的作用,改善全球肾脏病预后组织(KDIGO)指出伴有蛋白尿的多种肾小球疾病,非免疫抑制治疗均应当首选血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)或血管紧张素 II 受体阻滞剂(ARB)类药物^[6]。

Ezrin、synaptopodin 免疫组织化学是研究肾小球足细胞生理学的有效方法。本研究采用免疫组化的方法,能大面积地显示 ezrin、synaptopodin 在肾小球毛细血管基底膜、肾小管基底膜周围的分布情况;采用 qRT-PCR 的方法能更明确地对蛋白表达进行定量。足细胞异常是许多蛋白尿性肾小球疾病的基础。与对照组比较,模型组大鼠肾组织尿蛋白明显增多、血浆白蛋白降低,ezrin 和 synaptopodin 的表达明显减少,由于 ezrin 与肌动蛋白细胞骨架连接,并且 ezrin 通过 NHERF2 与 podocalyxin 相互作用与肌动蛋白骨架结合,而 synaptopodin 则与肌动蛋白共定位。由此推测,其中一种蛋白的变化均可导致足细胞及足突中相关蛋白的级联改变,导致 ezrin 和 synaptopodin 表达水平降低。经盐酸贝那普利和益肾通络方干预后,大鼠肾组织尿蛋白明显减少、血浆白蛋白升高,ezrin 和 synaptopodin 的表达也随之增多,肾脏病理表现也不同程度改善。表明益肾通络方可恢复 ezrin、synaptopodin 表达水平,改善肾小球功能。另外,本实验结果显示,益肾通络方中、高剂量组与盐酸贝那普利组效果相当,均优于益肾通络方低剂量组,提示中、高剂量的益肾通络方治疗膜性肾病疗效更佳,临床在用药安全的情况下可酌情增加药物剂量以提高疗效。

参考文献

- [1] Ayalon R, Beck L H. Membranous nephropathy: Not just a disease for adults [J]. *Pediatr Nephrol*, 2015, 30(1): 31-39.
- [2] Menon S, Valentini R P. Membranous nephropathy in children: Clinical presentation and therapeutic approach [J]. *Pediatr Nephrol*, 2010, 25(8): 1419-1428.
- [3] Kanigicherla D, Gummadova J, McKenzie E A, et al.

- Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2013, 83(5): 940-948.
- [4] Bech A P, Hofstra J M, Brenchley P E, *et al.* Association of anti-PLA2R antibodies with outcomes after immunosuppressive therapy in idiopathic membranous nephropathy [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2014, 9(8): 1386-1392.
- [5] Hoxha E, Thiele I, Zahner G, *et al.* Phospholipase A2 Receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(6): 1357-1366.
- [6] Eknayan G, Eckardt K U, Kasiske B L. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis [J]. *Kidney Int*, 2012, 2(Suppl 2): 186-197.
- [7] Ponticelli C, Zucchelli P, Imbasciati E, *et al.* Controlled trial of methylprednisolone and chlorambucil in idiopathic membranous nephropathy [J]. *N Engl J Med*, 1984, doi: 10.1056/NEJM198404123101503.
- [8] Jha V, Ganguli A, Saha T K, *et al.* A randomized, controlled trial of steroids and cyclophosphamide in adults with nephrotic syndrome caused by idiopathic membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(6): 1899-1904.
- [9] Ponticelli C, Zucchelli P, Passerini P, *et al.* A 10-year follow-up of a randomized study with methylprednisolone and chlorambucil in membranous nephropathy [J]. *Kidney Int*, 1995, 48(5): 1600-1604.
- [10] 魏晓娜, 杨凤文, 檀金川. 益肾通络方治疗对原发性膜性肾病患者血液生化检查结果及临床症状积分的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(23): 3006-3007.
- [11] 陈文军, 靳晓华, 陈素枝, 等. 益肾通络方联合西药治疗原发性膜性肾病脾肾亏虚证 30 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2016, 57(5): 409-412.
- [12] 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, doi: 10.1172/JCI110469.
- [13] Xu X, Wang G, Chen N, *et al.* Long-term exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in China [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(12): 3739-3746.
- [14] 秦 聪, 范华平, 张秀侠, 等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织中转化生长因子- β 1、IV 型胶原 mRNA 表达的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(6): 928-931.
- [15] 靳晓华, 任美芳, 郭晓玲, 等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织 Nephlin、Podocin mRNA 表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(11): 955-958.
- [16] 张 倩, 范华平, 张秀侠, 等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织中乙酰肝素酶、转化生长因子 β 1 表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(3): 228-229.
- [17] 任俊龙. 黄芪注射液对大鼠实验性肾病尿蛋白的作用 [J]. 中国药物与临床, 2005, 5(10): 767-769.
- [18] 王海燕, 李惊子, 潘缉圣, 等. 中药黄芪当归合剂对肾病综合征肾损伤的保护作用及对代谢紊乱的影响 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2002, 35(5): 542-550.
- [19] 黄 平, 王雁秋. 绞股蓝总皂苷对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的影响及机制 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(3): 723-726.
- [20] 傅晓骏, 熊荣兵. 黄芪水蛭制剂对糖尿病肾病大鼠肾组织中 C-IV、FN 及 IL-1 β 表达的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 305-308.
- [21] 宋立群, 张宜默. 疏血通注射液治疗原发性肾病综合征临床观察 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(1): 29-31.
- [22] 胡婉素, 刘 帆, 王 杰. 莪术对糖尿病肾病大鼠的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 163-166.
- [23] Artelt N, Ludwig T A, Rogge H, *et al.* The role of palladin in podocytes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, doi: 10.1681/ASN.2017091039.
- [24] Whiteside C I, Cameron R, Munk S, *et al.* Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis [J]. *Am J Pathol*, 1993, 142(5): 1641-1653.
- [25] Endlich N, Endlich K. The challenge and response of podocytes to glomerular hypertension [J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(4): 327-341.
- [26] Hugo C, Nangaku M, Shankland S J, *et al.* The plasma membrane-actin linking protein, ezrin, is a glomerular epithelial cell marker in glomerulogenesis, in the adult kidney and in glomerular injury [J]. *Kidney Int*, 1998, 54(6): 1934-1944.
- [27] Takeda T, McQuistan T, Robert A, *et al.* Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(8): 1589-1598.
- [28] Mundel P, Heid H W, Mundel T M, *et al.* Synaptopodin: An actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes [J]. *J Cell Biol*, 1997, 139(1): 193-204.
- [29] Yu H, Kistler A, Faridi M H, *et al.* Synaptopodin limits TRPC6 podocyte surface expression and attenuates proteinuria [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(11): 3308-3319.
- [30] Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, *et al.* Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signaling [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(5): 485-491.
- [31] Srivastava T, Garola R E, Whiting J M, *et al.* Synaptopodin expression in idiopathic nephrotic syndrome of childhood [J]. *Kidney Int*, 2001, 59(1): 118-125.