

· 中药药理与质量 ·

温阳利水方对阳离子化牛血清白蛋白致膜性肾病大鼠足细胞的保护作用

鲁欢, 张礼财, 宋超, 肖珊珊, 汤水福, 陈刚毅, 吴兴波, 罗月中

(广州中医药大学第一附属医院, 广东广州 510405)

摘要:【目的】探讨温阳利水方对阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)致膜性肾病(MN)模型大鼠的治疗作用及对足细胞的保护作用机制。【方法】应用细胞计数试剂盒8(CCK-8)筛选温阳利水方水提物灌胃浓度和时间。将SD大鼠分为4组,分别为对照组、模型组、温阳利水方组、贝那普利组,每组6只。模型组、温阳利水方组、贝那普利组大鼠以C-BSA尾静脉注射法构建MN模型,对照组大鼠则给予等量生理盐水尾静脉注射。造模结束后,对照组和模型组给予双蒸水灌胃,温阳利水方组给予 $16.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 温阳利水方水提物灌胃,贝那普利组给予 $10.00\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 贝那普利混悬液灌胃,连续4周。给药结束后,观察大鼠的一般情况,检测血生化指标、24 h尿蛋白定量(UTP),对肾组织分别行苏木素-伊红(HE)、马松(Masson)、过碘酸六胺银(PASM)染色光镜检查和电镜检查,实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测肾皮质nephrin mRNA表达水平,酶联免疫吸附法(ELISA)检测尿液nephrin蛋白含量。【结果】与对照组比较,模型组大鼠血肌酐、球蛋白、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、UTP水平明显升高,白蛋白水平明显下降(均 $P<0.05$)。灌胃4周,温阳利水方组和贝那普利组水肿减轻,UTP水平下降($P<0.05$),肾小球基底膜增厚减轻,蛋白管型减少,肾间质炎症细胞浸润减轻,肾皮质nephrin mRNA表达水平下降,尿nephrin蛋白含量减少。【结论】温阳利水方可改善MN大鼠水肿、降低尿蛋白、减轻肾组织病理损害,其机制可能是通过降低肾皮质nephrin mRNA异常表达、减少尿nephrin蛋白排泄,稳定足突结构发挥了足细胞保护作用。

关键词: 温阳利水方; 膜性肾病; 足突; 足细胞; nephrin; 大鼠**中图分类号:** R285.5**文献标志码:** A**文章编号:** 1007-3213(2021)01-0116-07**DOI:** 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.01.022

Protective Effect on Yang-Warming and Diuresis-Inducing Recipe on Podocytes in Cationic Bovine Serum Albumin-Induced Membranous Nephropathy Rats

LU Huan, ZHANG Li-Cai, SONG Chao, XIAO Shan-Shan, TANG Shui-Fu,
CHEN Gang-Yi, WU Xing-Bo, LUO Yue-Zhong

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the therapeutic effect of Yang-Warming and Diuresis-Inducing Recipe (YDR) for membranous nephropathy (MN) model rat induced by cationic bovine serum albumin (C-BSA) and the protective mechanism for podocytes. **Methods** The dosage and treatment time of intragastric administration were determined by cell count kit 8 (CCK-8). The SD rats were divided into control group, model group, YDR group and benazepril group, 6 rats in each group. The rats in model group, YDR group and benazepril group were induced into MN model by tail vein injection of C-BSA, and rats in control group were given tail vein injection of the same volume of normal saline. After modeling, the control group and model group were given intragastric administration of distilled water, YDR group was given intragastric administration of aqueous extract of YDR of $16.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, and benazepril group was given intragastric administration of benazepril suspension of $10.00\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, the treatment lasting 4 weeks. After medication, the rat general state was observed, blood

收稿日期: 2020-10-19**作者简介:** 鲁欢(1988-),女,博士,主治医师;E-mail: 591930157@qq.com**通讯作者:** 罗月中,女,主任中医师,教授,博士研究生导师;E-mail: luoyuezhong@126.com**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(编号: 81373568);广东省科技计划项目(编号: 2017A020215057)

biochemical indexes and 24 h urine total protein (UTP) were measured, pathological features of kidney tissue were observed by light microscopy using hematoxylin-eosin (HE), Masson, periodic acid-silver methenamine (PASM) staining methods and by electron microscopy, mRNA expression level of nephrin in renal cortex was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), and content of nephrin protein in urine was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the control group, the levels of serum creatinine, globulin, total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol and UTP were increased, and albumin level was decreased significantly in the model group. After 4 weeks of intragastric administration, compared with the model group, edema was alleviated, UTP level was declined ($P < 0.05$), thickness of glomerular basement membrane was ameliorated, protein casts in the tubules were reduced, inflammatory cell infiltration in renal interstitium was relieved, expression level of nephrin mRNA in renal cortex was decreased, and nephrin protein content in urine was reduced in YDR group and benazepril group. **Conclusion** YDR has effects on ameliorating edema in MN rats, reducing proteinuria and relieving kidney histological damage, the mechanism is related with that it plays a role in protecting podocytes through decreasing the abnormal expression of nephrin mRNA, reducing the excretion of nephrin protein from urine contributing to stabilizing podocytic foot process.

Keywords: Yang-Warming and Diuresis-Inducing Recipe; membranous nephropathy; podocytic foot process; podocytes; nephrin; rats

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是一类自身免疫性疾病^[1],其中,原发性膜性肾病(primary membranous nephropathy, pMN)是成人肾病综合征最常见的病理类型^[2]。近10余年来,pMN的发病机制研究获得重大突破,M型磷脂酶A2受体(M-type phospholipase A2 receptor, PLA2R)和I型血小板反应蛋白相关域7A作为pMN的主要靶抗原,广泛应用于临床,对应的抗体检测不仅有助于与继发性MN相鉴别,还能预测疾病的发展趋势和治疗转归。然而,由于靶抗原的致病机制仍未完全阐明,治疗方案较前并无明显变化。近年来自全国范围的MN流行病学研究发现,我国MN患病率呈明显上升趋势,且在我国北方和东北,MN的患病率在2014年以后已经超过了IgA肾病,位居原发性肾小球病的首位^[3-4]。因此,探索预防和治疗MN的有效手段具有重要意义。本课题组前期研究结果提示MN与脾肾阳虚相关,临床上使用温阳利水方疗效确切,离体实验证实温阳利水方水提物可改善脾肾阳虚特发性膜性肾病(IMN)患者血清致小鼠足细胞骨架蛋白F-actin重排,调节p53和Bcl-2的表达,缓解足细胞损伤^[5-7]。

本研究拟构建阳离子化牛血清白蛋白(cationic bovine serum albumin, C-BSA)MN大鼠模型,用温

阳利水方灌胃干预,进一步验证和探索温阳利水方的在体疗效和机制,现将研究结果报道如下。

1 材料

1.1 **实验动物** 雄性SD大鼠(180 ± 20)g,购自广州中医药大学实验动物中心[合格证号:SCXK(粤)2013-0034]。7d检疫期后,转入饲养间,开始实验。动物实验方案已通过广州中医药大学第一附属医院伦理委员会审核(ZYYECK【2018】047),并遵循《赫尔辛基宣言》。

1.2 **实验细胞** MPC5小鼠足细胞系,由美国Baylor医学院Danesh教授惠赠,广东省人民医院史伟教授转赠。

1.3 **药物** 温阳利水方组成:制附子15g,黄芪30g,白术45g,白芍30g,茯苓30g,生姜15g。贝那普利(诺华集团,批号:X2606)。以上药物均购自广州中医药大学第一附属医院。

1.4 **试剂与仪器** RPMI-1640培养基、I型鼠尾胶原(美国Corning公司);澳洲胎牛血清、0.5g/L胰蛋白酶(美国Gibco公司);重组小鼠干扰素 γ (IFN- γ)(以色列ProSpec公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、青-链霉素溶液(美国Hyclone公司);细胞计数试剂盒8(CCK-8)(日本Dojindo公司);肾

足蛋白(nephrin)检测试剂盒(酶联免疫吸附法)(武汉优尔生商贸有限公司, 货号: SEA937Ra); PCR Forward Prime、PCR Reverse Prime(美国 Invitrogen 公司); RNA Extraction Kit、Prime Script™ RT Master Mix、SYBR® Premix Ex Taq™ II(日本 TaKaRa 公司)。CO₂培养箱(美国 Shellab 公司); 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); 多功能酶标仪、微量检测板(美国 Thermo Scientific 公司); 电子细胞计数仪、计数板、T-100 regular PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); 自动生化分析仪(瑞典 Roche 公司); 光学显微镜(日本 Olympus 公司); 倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司); JEM-1400 PLUS 电子透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 细胞培养 MPC5 小鼠足细胞复苏后, 在体积分数 5% CO₂、33 ℃ 培养箱中诱导增殖 4~5 d。待细胞生长融合至 80%~85%, 使用 0.5 g/L 胰蛋白酶消化后, 传代至包被 I 型鼠尾胶原的培养皿中, 再转入体积分数 5% CO₂、37 ℃ 培养箱, 诱导分化 8~14 d, 分化成熟后可进行后续实验。具体步骤参见文献[8]。

2.2 温阳利水方水提物的制备 加 6 倍量超纯水分别浸泡制附子及其余药物 30 min, 制附子先煎 1 h, 再加入其余药物及浸泡液共煎, 收集滤液。加 4 倍量超纯水再次煎煮, 收集滤液。合并 2 次滤液, 反复过滤除渣, 以 8 000 r/min 离心 5 min, 过滤, 以 80 ℃ 减压, 滤液浓缩至浸膏, 超纯水定容至 165 mL。过针头滤器, 除颗粒杂质、灭菌。于 -20 ℃ 保存备用。具体步骤参见文献[6]。

2.3 温阳利水方含药血清的制备 将 SD 大鼠 48 只随机分为 4 组, 即对照组和温阳利水方低、中、高浓度组。其中, 每组大鼠再随机分为 3 组, 分别命名为 3 d、5 d 和 7 d 组。根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”, 以临床剂量换算大鼠用药剂量, 折算系数为 6.3, 温阳利水方低、中、高浓度组分别按剂量 8.25、16.50、33.00 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃。对照组则给予等体积蒸馏水灌胃。各组将每日剂量等分, 于 9:00 和 16:00 分别灌胃 1 次, 按照时间组别依次连续灌胃 3 d、5 d 和 7 d。灌胃结束后, 以 100 g/L 水合氯醛麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 以 3 000 r/min, 4 ℃ 离心 15 min 分离血清, 混

合同组血清。以 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 56 ℃ 恒温水浴灭活 30 min, 于 -80 ℃ 冰箱存储备用。

2.4 CCK-8 筛选温阳利水方水提物灌胃浓度和时间 取分化成熟的 P22 足细胞, 同步化 24 h 后, 以 0.5 g/L 胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 以 8 000 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板, 加含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基至 100 μL。培养 24 h 后, 换液。分别设对照组, 温阳利水方低、中、高浓度组, 每组内再设 3 d、5 d 和 7 d 组。按照分组, 每孔加入提前配制的含体积分数 10% 对照组大鼠血清或温阳利水方含药血清的培养基 100 μL, 每组设 5 个复孔。培养 20 h 后, 每孔加 CCK-8 10 μL, 共孵育 4 h, 使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(OD)。将不含细胞的完全培养基空白孔调零。

2.5 MN 大鼠模型构建、分组和干预 经过检疫期后, 将大鼠置于代谢笼内, 留取尿液测定 24 h 尿蛋白定量(UTP), 符合标准者, 进入正式实验。实验分为 4 组, 分别为对照组、模型组、温阳利水方组、贝那普利组, 每组 6 只大鼠。模型组、温阳利水方组、贝那普利组大鼠采用 C-BSA 尾静脉注射 4 周构建 MN 模型^[9], 同期, 对照组大鼠给予等量生理盐水尾静脉注射。造模成功后, 对照组和模型组: 给予双蒸水灌胃, 2.5 mL/次, 每日 2 次, 连续 4 周; 温阳利水方组: 根据 CCK-8 筛选结果, 按照 16.50 g·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量灌胃, 双蒸水稀释, 2.5 mL/次, 每日 2 次, 连续 4 周; 贝那普利组: 按照 10.00 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量灌胃, 双蒸水稀释, 2.5 mL/次, 每日 2 次, 连续 4 周。

2.6 指标检测

2.6.1 一般情况观察 在开始灌胃后, 观察大鼠进食量、对灌胃的接纳情况、毛发光泽度、小便量、大便质地。

2.6.2 血生化指标检测 干预结束后, 代谢笼收取 24 h 尿液后, 以 100 g/L 水合氯醛麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 分离血清。应用 Cobas6000 自动生化分析仪检测尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)、总胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 采用溴甲酚绿法检测血清白蛋白(ALB), 采用计算法测定血清球蛋白(GLO)。

2.6.3 UTP 检测 在造模结束、灌胃第 2 周和灌胃第 4 周, 均使用代谢笼收取大鼠 24 h 尿液, 采用化学比浊法检测 UTP 水平。

2.6.4 肾脏病理检测 干预结束后, 以 100 g/L 水

合氯醛麻醉大鼠,剖腹取右侧肾脏,剥离肾包膜和非肾组织,生理盐水冲洗,切块,分别保存于光镜固定液、电镜固定液。光镜标本:梯度脱水、浸蜡包埋,常规切片,分别行苏木素-伊红(HE)、马松(Masson)、过碘酸六胺银(PASM)染色后,在光镜下观察。电镜标本:清洗、1%锇酸固定、清洗、梯度脱水、树脂渗透包埋、固化、切片、铀铅双染色,电镜下观察。

2.6.5 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测肾皮质nephrin mRNA表达 干预结束后,以100 g/L水合氯醛麻醉大鼠,剖腹取右侧肾脏,剥离肾包膜和非肾组织,生理盐水冲洗,切块,分离肾皮质,保存于液氮罐中。按照试剂盒操作说明提取肾皮质总RNA,测定其在230、260、280、320 nm处的OD值,并计算浓度。取适量总RNA行变性琼脂糖凝胶电泳,检测总RNA的完整性。取符合条件的总RNA溶液,按照操作说明,配制20 μ L体系行逆转录,配制25 μ L体系行扩增。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性30 min、95 $^{\circ}$ C变性5 s、60 $^{\circ}$ C退火30 min,共进行40个循环。内参基因GAPDH上游引物序列为5'-CTCTACCCACGCCAAGTTCAA-3',下游引物序列为5'-GGATGACCTTGCCACACAGC-3';nephrin上游引物序列为5'-CTGACTGGGCTGAAGCCTTCT-3',下游引物序列为5'-AAGAGCA CAGGCAGCAGGGG-3'^[10]。实验重复3次,每个样本、每个基因均采用3个复孔,采用双 Δ Ct的方法计算目的基因表达量,结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

2.6.6 酶联免疫吸附法检测尿液nephrin蛋白含量 干预结束后,代谢笼收取大鼠24 h尿液。以2 000 $\times g$ 离心15 min后收集上清液,置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。使用nephrin检测试剂盒(酶联免疫吸附法)检测大鼠尿液nephrin蛋白含量。按照试剂盒说明书,逐步操作。

2.7 统计方法 采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)或中位数表示,计数资料以相对数表示。2组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以

$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CCK-8法筛选温阳利水方水提物灌胃浓度和时间的结果 对照组与温阳利水方低、中、高浓度组对应时间组比较,3 d组差异均有统计学意义($P<0.05$),且对照组OD值均较含药血清组高,提示3 d含药血清可能抑制足细胞增殖;5 d组中,中浓度组OD值较对照组高,差异有统计学意义($P<0.05$),其余2组与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示5 d中浓度组含药血清可能促进足细胞增殖;7 d组中,对照组OD值均较含药血清组高,且低、高浓度组与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),提示7 d含药血清可能抑制足细胞增殖。故选取中浓度作为灌胃浓度,5 d作为灌胃时间,用于后续实验。具体结果见表1。

表1 不同浓度温阳利水方含药血清处理不同时间对足细胞增殖的影响(CCK-8法)

Table 1 Effects of different contents of serum-containing YDR treatment for different times on proliferation of podocytes (by CCK-8) ($\bar{x}\pm s$)

组别	OD值(450 nm)		
	灌胃3 d	灌胃5 d	灌胃7 d
对照组	1.46 \pm 0.09	1.46 \pm 0.10	1.45 \pm 0.08
低浓度组	1.31 \pm 0.04 ^①	1.36 \pm 0.03	1.15 \pm 0.02 ^①
中浓度组	0.99 \pm 0.05 ^①	1.65 \pm 0.09 ^①	1.42 \pm 0.06
高浓度组	1.34 \pm 0.05 ^①	1.47 \pm 0.02	1.19 \pm 0.06 ^①

① $P<0.05$,与对照组比较

3.2 MN大鼠与对照组大鼠血生化指标比较 造模结束后,MN大鼠血清SCr、GLO、CHOL、TG、LDL-C水平均明显升高,除TG外,与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);血清ALB明显下降,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。具体结果见表2。

3.3 温阳利水方对MN大鼠一般情况的影响 与

表2 造模后膜性肾病(MN)模型组与对照组大鼠血生化指标比较

Table 2 Comparison of the biochemical indexes between MN model group and control group after modeling ($\bar{x}\pm s$)

组别	BUN(mmol \cdot L ⁻¹)	SCr(μ mol \cdot L ⁻¹)	ALB(g \cdot L ⁻¹)	GLO(g \cdot L ⁻¹)	CHOL(mmol \cdot L ⁻¹)	TG(mmol \cdot L ⁻¹)	LDL-C(mmol \cdot L ⁻¹)
对照组	6.94 \pm 0.92	34.33 \pm 3.51	43.83 \pm 1.95	15.90 \pm 0.95	1.65 \pm 0.22	0.61 \pm 0.12	0.32 \pm 0.04
模型组	6.60 \pm 1.71	55.67 \pm 12.50 ^①	19.83 \pm 3.61 ^①	34.20 \pm 2.66 ^①	10.41 \pm 3.18 ^①	8.13 \pm 5.82	4.81 \pm 1.69 ^①

① $P<0.05$,与对照组比较

模型组比较,在4周的灌胃过程中,温阳利水方组大鼠食欲增加、不抗拒灌胃、毛发有光泽且脱毛减少、小便量多、大便成形、水肿减轻。

3.4 温阳利水方对MN大鼠UTP的影响 在造模结束后、灌胃2周和灌胃4周,分别检测各组大鼠UTP水平。结果显示:灌胃2周,温阳利水方组和贝那普利组大鼠UTP均明显下降,但组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);灌胃4周,温阳利水方组和贝那普利组大鼠UTP继续下降,组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1。

3.5 温阳利水方对MN大鼠肾组织病理的影响 灌胃4周后,与模型组比较,温阳利水方组和贝那普利组大鼠肾小球基底膜增厚减轻,嗜复红蛋白沉积减少,足突变形和融合缓解,肾小管上皮细胞水肿改善,蛋白管型减少,肾间质炎症细胞浸润减轻。见图2和图3。

3.6 温阳利水方对MN大鼠肾皮质nephin mRNA表达和尿液nephin蛋白含量的影响 灌胃4周后,模型组大鼠肾皮质nephin mRNA相对表达量较对照组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);温阳利水方组大鼠nephin mRNA相对表达量较模型

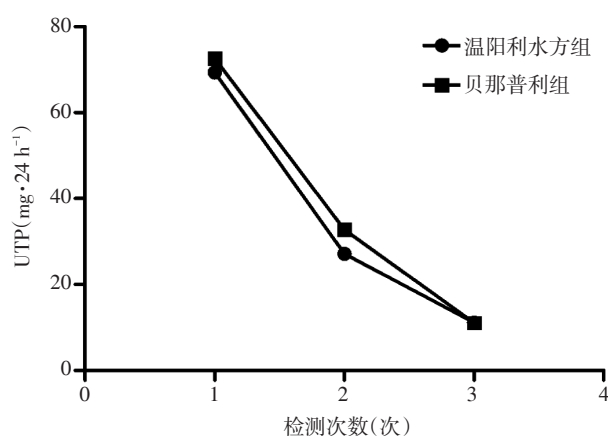


图1 温阳利水方组和贝那普利组大鼠UTP变化折线图

Figure 1 The line chart for UTP in YDR group and benazepril group

组减少,差异无统计学意义($P > 0.05$);贝那普利组大鼠nephin mRNA相对表达量较模型组减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组大鼠尿液nephin蛋白含量较对照组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);温阳利水方组和贝那普利组大鼠尿液nephin蛋白含量均较模型组减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且2个治疗组比较,差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。具体结果见表3。

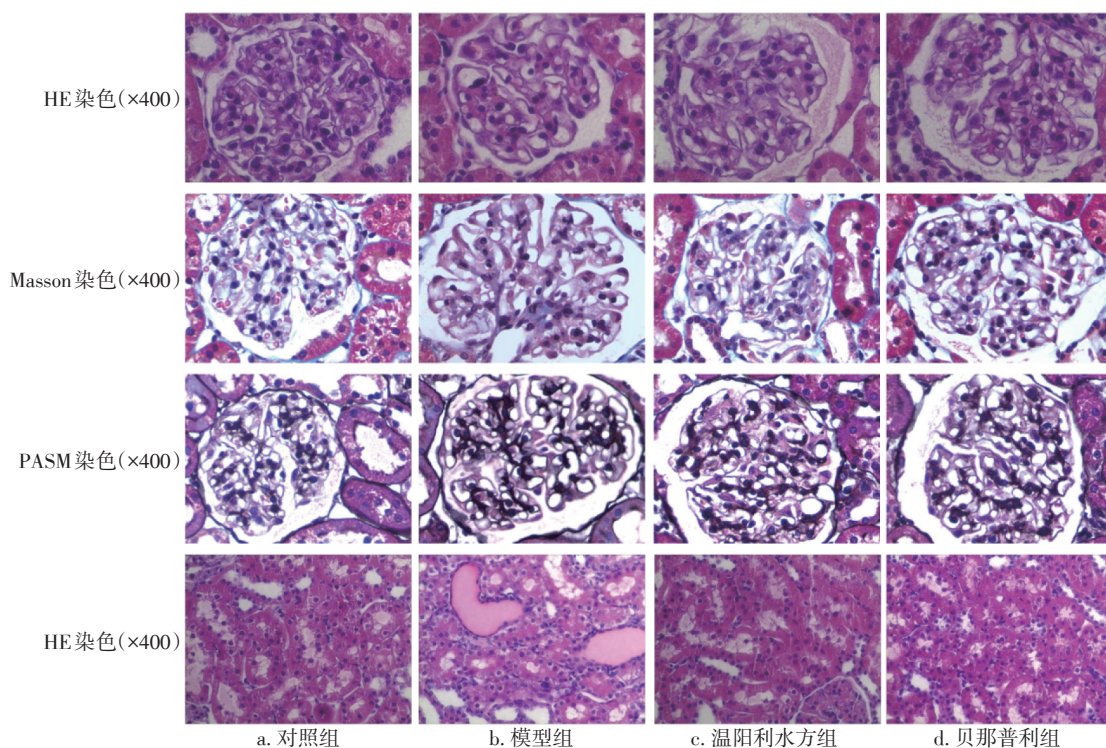


图2 灌胃4周后各组大鼠肾组织病理光镜图

Figure 2 Comparison of the renal histopathological features under light microscope in various groups after 4 weeks of intragastric administration

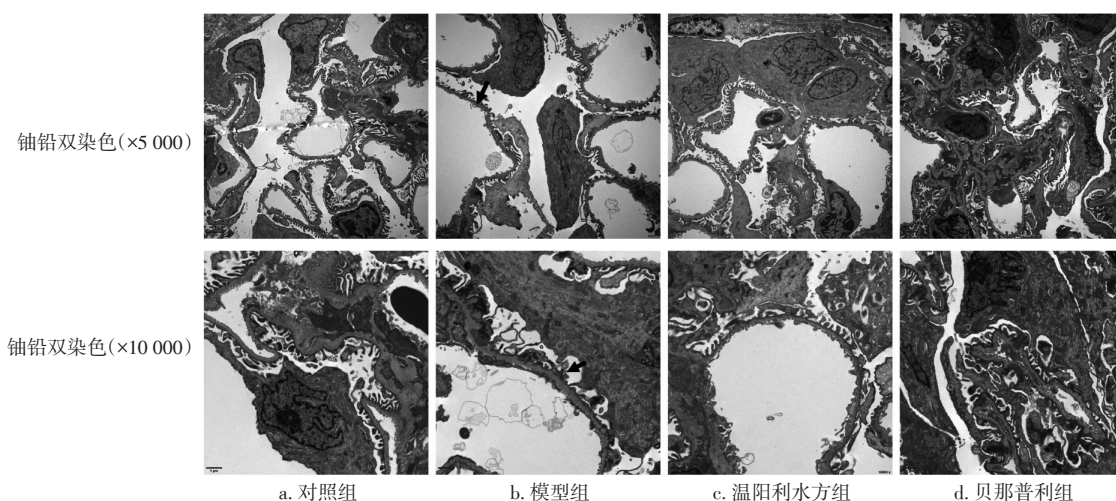


图3 灌胃4周后各组大鼠肾组织病理电镜图

Figure 3 Comparison of the renal histopathological features under electron microscope in various groups after 4 weeks of intragastric administration

表3 灌胃4周后各组大鼠肾皮质nephrin mRNA和尿液nephrin蛋白检测结果

Table 3 Comparison of the expression levels of nephrin mRNA in renal cortex and nephrin protein in urine from rats in various groups after 4 weeks of intragastric administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	肾皮质nephrin mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	尿液nephrin蛋白 含量($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照组	6	$1.007 0 \pm 0.155 1$	$0.048 7 \pm 0.007 7$
模型组	6	$2.107 8 \pm 0.078 3^{①}$	$0.213 0 \pm 0.008 0^{①}$
温阳利水方组	6	$1.926 7 \pm 0.262 6$	$0.144 4 \pm 0.009 2^{②③}$
贝那普利组	6	$1.581 9 \pm 0.203 7^{②}$	$0.100 2 \pm 0.005 4^{②}$

① $P < 0.05$, 与对照组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较; ③ $P < 0.05$, 与贝那普利组比较

4 讨论

膜性肾病(MN), 常见的主要临床表现是大量蛋白尿、全身重度水肿。部分患者在起病初期或疾病复发时伴有急性肾损伤, 少尿, 可加重全身水肿, 尤其是胃肠道水肿, 可导致患者纳差、呕吐, 影响药物吸收, 推迟免疫抑制剂起效时间; 药物无法缓解的重度水肿, 随着患者SCr逐步上升, 或者出现心力衰竭的并发症, 需要行血液透析治疗; MN患者的高凝状态, 使得临时血液透析通路的建立, 进一步增加了深静脉血栓的患病率, 加重了治疗难度和患者的经济负担。因此, 对于MN初期或复发期, 在现有治疗手段的基础上, 探索更有效的干预措施, 减少并发症的发

生, 仍然具有重大的临床意义。本课题组的罗月中教授在30余年的临床实践中发现IMN初期或复发期中医辨证以脾肾阳虚证为主^[7], 与多数研究^[11-13]结论一致, 配合使用温阳利水方, 不仅可以改善患者纳差易吐的症状、增加尿量, 还能减少患者上呼吸道感染的机率, 促进患者平稳进入缓解期。在前期体外研究^[6]基础上, 继续探索温阳利水方体内疗效和机制, 具有一定的临床意义。

本研究采用C-BSA尾静脉注射法构建MN大鼠模型, 结果显示, 造模结束后, MN大鼠的SCr、GLO、CHOL、TG、LDL-C、UTP水平均明显升高, ALB水平明显下降, 与对照组比较, 差异有统计学意义(TG除外), 又见电镜下基底膜增厚、足突融合^[5], 提示造模成功。既往对IMN患者的临床观察研究发现, 脾肾阳虚组患者血清GLO和抗PLA2R水平均较高, 且二者呈正相关, 提示脾肾阳虚组患者免疫活动和炎症状态明显^[14-16]。本研究结果显示: 造模后MN大鼠GLO较对照组亦显著升高。使用温阳利水方干预后, 与模型组比较, 温阳利水方组大鼠食欲增加、不抗拒灌胃、脱毛减少、小便量多、大便成形、完全存活, 灌胃2周末和4周末UTP均呈下降趋势(且与贝那普利组比较, 差异无统计学意义), 肾组织病理学结果可见肾间质炎症细胞浸润亦明显减轻, 提示温阳利水方可调节MN的免疫活动和炎症状态。

足细胞损伤、肾小球滤过屏障受损, 出现蛋白尿, 是MN典型的病理改变。温阳利水方是否可

调节足细胞相关基因和蛋白的表达? Park等^[17]对小鼠肾脏细胞分类后,行单细胞测序分析,证实与人类蛋白尿单基因遗传病相关的基因,尤其是nephrin和podocin,仅在足细胞表达。nephrin是足细胞裂孔隔膜(SD)蛋白复合物的主要分子,通过CD2相关蛋白(CD2AP)、podocin与细胞骨架蛋白actin连接。因此,检测nephrin可较直观地反映药物对足细胞的影响。本研究中,模型组大鼠肾组织nephrin mRNA表达水平增加,肾组织病理损伤明显,使用温阳利水方和贝那普利干预后,肾组织nephrin mRNA表达水平均下降,肾组织病理损伤减轻、尿蛋白减少。结合前期体外研究^[6],温阳利水方水提物可改善脾肾阳虚IMN患者血清致小鼠足细胞骨架蛋白F-actin重排,提示增多的nephrin可能扰乱了actin正常结构,导致足突功能失常,出现蛋白尿等病理改变。既往已有研究^[18-20]发现,损伤因素作用下,nephrin在足细胞分布改变,但增加的nephrin并不能发挥保护足细胞的作用。

综上所述,温阳利水方可改善MN模型大鼠水肿,减少尿蛋白,抑制肾小球免疫复合物的沉积和基底膜的增厚,减轻肾间质炎症细胞浸润。温阳利水方可能是通过降低nephrin mRNA的异常表达从而维持足突生理功能、减少尿nephrin的排泄发挥足细胞保护作用,从而有效治疗MN。

(致谢:感谢中山大学附属第一医院病理科董愉教授!感谢广东省人民医院史伟教授、章斌教授和张丽主治医师!)

参考文献:

- [1] MEYER-SCHWESINGER C, TOMAS N M, DEHDE S, et al. A novel mouse model of phospholipase A2 receptor 1-associated membranous nephropathy mimics podocyte injury in patients [J]. *Kidney Int*, 2020, 97(5): 913-919.
- [2] RONCO P, DEBIEC H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care [J]. *Lancet*, 2015, 385(9981): 1983-1992.
- [3] LI J, CUI Z, LONG J, et al. Primary glomerular nephropathy among hospitalized patients in a national database in China [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2018, 33(12): 2173-2181.
- [4] 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.
- [5] LU H, LUO Y, SU B, et al. Wenyang Lishui Decoction ameliorates podocyte injury in membranous nephropathy rat and cell models by regulating p53 and Bcl-2 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, DOI: 10.1155/2020/6813760.
- [6] 鲁欢, 汤水福, 陈刚毅, 等. 温阳利水方水提物缓解脾肾阳虚特发性膜性肾病患者血清致小鼠足细胞损伤的机制研究 [J]. *中国全科医学*, 2018, 21(15): 1862-1868.
- [7] 罗月中, 苏式兵, 郎建英, 等. 成人特发性膜性肾病遗传易感性与中医证型的关联性研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2012, 13(1): 30-33.
- [8] 涂海涛, 鲁欢, 罗月中, 等. 温阳利水方含药血清对脾肾阳虚IMN患者血清致小鼠足细胞凋亡的作用 [J]. *广东医学*, 2017, 38(18): 2745-2749.
- [9] 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): 451-461.
- [10] ENATSU N, MIYAKE H, CHIBA K, et al. Candesartan mediated amelioration of cisplatin-induced testicular damage is associated with alterations in expression patterns of nephrin and podocin [J]. *Biomed Res Int*, 2015, DOI: 10.1155/2015/273784.
- [11] 陈以平. 益气活血化湿方案治疗膜性肾病之研究 [J]. *上海中医药大学学报*, 2009, 23(1): 1-3.
- [12] 李秋芬. 补阳还五汤为主治疗原发性膜性肾病32例 [J]. *浙江中医杂志*, 2006(12): 709.
- [13] 文平凡, 尹晟. 中西医结合治疗原发性膜性肾病疗效观察 [J]. *实用中医药杂志*, 2011, 27(6): 392-393.
- [14] HOFSTRA J M, DEBIEC H, SHORT C D, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(10): 1735-1743.
- [15] 鲁欢, 涂海涛, 苏保林, 等. 血清抗M型磷脂酶A2受体抗体与特发性膜性肾病脾肾阳虚证的关联探讨 [J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(5): 905-909.
- [16] 陈文彬. 诊断学 [M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [17] PARK J, SHRESTHA R, QIU C, et al. Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease [J]. *Science*, 2018, 360(6390): 758-763.
- [18] KAWACHI H, KOIKE H, KURIHARA H, et al. Cloning of rat homologue of podocin: expression in proteinuric states and in developing glomeruli [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(1): 46-56.
- [19] SUN W, HE Y, YU J, et al. Effect of yiqiyangyin recipe on heparanase and nephrin in rats with adriamycin-induced nephropathy [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(3): 334-342.
- [20] 彭亚琴, 莫樱, 蒋小云, 等. 阿霉素肾病大鼠肾组织中nephrin和CD2AP的表达及意义 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2009, 30(1): 15-20, 25.

【责任编辑: 侯丽颖】