

- mitochondria-related redox and bioenergetics effects of gastrodin in SH-SY5Y cells exposed to hydrogen peroxide [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64(2): 242-251.

[19] Liu S J, Liu X Y, Li J H, *et al*. Gastrodin attenuates microglia activation through renin-angiotensin system and sirtuin3 pathway [J]. *Neurochem Int*, 2018, 120: 49-63.
- [20] 付红运. 天麻素对体外培养雪旺细胞增殖及其 NGF 表达的影响 [D]. 桂林: 桂林医学院, 2013.

[21] Song C, Fang S, Lu G, *et al*. Gastrodin promotes the secretion of brain-derived neurotrophic factor in the injured spinal cord [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(15): 1383-1389.

芪地固肾片对膜性肾病大鼠的肾保护作用

冯 喆¹, 雷根平^{2*}, 王 婷², 黄亚兰³, 董 盛²

(1. 陕西中医药大学第一临床医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000; 3. 深圳市宝安区中医院, 广州 深圳 518101)

摘要: **目的** 观察芪地固肾片对膜性肾病大鼠的肾保护作用。**方法** 60 只大鼠随机分成空白组 10 只、造模组 50 只, 造模组建立 C-BSA 膜性肾病模型。造模成功后, 将造模组大鼠随机分成模型组、模型抑制组、盐酸贝那普利组及中药低、高剂量组, 连续灌胃 4 周, 观察大鼠给药前后 24 h 尿蛋白定量 (UTP), 以及给药结束后血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)、血清白蛋白 (ALB)、总蛋白 (TP)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 水平。取双肾组织, 在光镜及电镜下观察病理变化, 免疫组化观察肌动蛋白 F-actin、synoptopodin、 α -actinin-4 在肾脏组织中的表达位置和强弱, Western blot 检测裂孔隔膜蛋白 nephrin、podocin、CD2AP 表达, RT-qPCR 法检测肾组织 *IL-1 β* 、*IL-18*、*TNF- α* mRNA 表达。

结果 与模型组比较, 各给药组大鼠 24 h UTP、TC、TG 水平降低, ALB、TP 水平升高, nephrin、podocin、CD2AP、F-actin、synoptopodin 蛋白表达增加, *IL-1 β* 、*IL-18*、*TNF- α* mRNA 表达降低。

结论 芪地固肾片可减少膜性肾病大鼠 24 h UTP, 改善肾功能和肾脏病理损伤, 上调肾脏组织 nephrin、podocin、CD2AP、F-actin、synoptopodin 蛋白表达, 下调 *IL-1 β* 、*IL-18*、*TNF- α* mRNA 表达, 缓解足细胞损害。

关键词: 芪地固肾片; 膜性肾病; 肾保护作用; 足细胞; 结构蛋白; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)11-3166-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.11.045

膜性肾病 (membranous nephropathy, MN) 是晚期肾病 (end-stage kidney disease, ESKD) 的主要可鉴定原因之一^[1]。该病是以肾病综合征为主要临床表现, 以肾小球足细胞下免疫复合物的沉积伴足突融合、基底膜弥漫性增厚为病理特征的一组疾病^[2]。其特点是自身抗体与靶抗原共定位形成免疫复合物, 在肾小球基底膜的上皮下侧积聚, 从而导致补体激活、释放炎症因子, 出现足细胞的损伤和蛋白尿的发展。目前国内外流行病学研究显示膜性肾病的发病率逐年上升。一项国内多中心研究表明该病在近 11 年间以每年 13% 的速度增长^[3]。然而, 数十年来关于膜性肾病的治疗一直是激烈的辩论问题。西医公认的治疗方案为糖皮质激素联合细胞毒药物, 但是存在治疗效果不佳或者

应用禁忌等问题, 因此寻求更为合适的治疗药物对于改进治疗策略至关重要。近些年, 中医药治疗膜性肾病显现出独特的优势, 在改善临床症状、减轻不良反应、预防复发等方面都具有更好的有效性及安全性^[4]。芪地固肾片为陕西中医药大学附属医院治疗膜性肾病的特色院内制剂, 具有健脾补肾、益气养阴、清利活血的功效, 且已临床应用多年, 治疗稳定, 功效确切^[5-6]。为进一步揭示其作用机制, 本研究通过构建阳离子化牛血清白蛋白 (C-BSA) 肾炎模型, 观察芪地固肾片不同剂量对大鼠肾功能、肝功能、血脂、24 h 尿蛋白定量 (UTP)、炎症因子白介素 1 β (IL-1 β)、白介素 18 (IL-18) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达的影响, 进而从足细胞微结构蛋白变化方面探讨该方对

收稿日期: 2020-09-25

基金项目: 国家自然科学基金 (82174335); 陕西省教育厅服务地方科学研究计划项目 (18JC009); 陕西省中医药管理局科研招标课题 (JCPT049); 陕西省名中医雷根平传承工作室建设项目 [陕中医药函 (2019) 82]; 咸阳市科学技术研究计划项目 (2017K02-86); 陕西中医药大学一流学科创新团队项目 (2019-YL04)

作者简介: 冯 喆 (1994—), 女, 硕士生, 从事中医药防治肾脏病的临床与基础研究。E-mail: 834227516@qq.com

*** 通信作者:** 雷根平 (1966—), 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 从事中医药防治肾脏病的临床与基础研究。Tel: (029) 33320882, E-mail: leigenping2006@163.com

膜性肾病足细胞的保护作用, 以期为开发治疗膜性肾病的药物提供实验基础。

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 体质量(180±20) g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (川) 2015-030。

1.2 药物 芪地固肾片组方药材生黄芪、生地黄、丹参、白花蛇舌草、芡实、荆芥, 由陕西中医药大学附属医院制剂中心提供, 按照成人与大鼠体表面积系数换算后, 高剂量组为每天 0.55 g/kg, 低剂量组为每天 0.138 g/kg, 用 19 mL 56 ℃ 双纯水溶解 5.25 g 药物, 置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。盐酸贝那普利片 (北京诺华制药有限公司); NLRP3 炎症小体抑制剂 Bay11-7082 (上海陶素生化科技有限公司)。

1.3 试剂与仪器 牛血清白蛋白 (北京索莱宝科技有限公司); PBS 缓冲液 (北京中杉金桥生物技术有限公司); nephrin 抗体、podocin 抗体、CD2AP 抗体 (英国 Abcam 公司); F-actin 兔多克隆抗体、synoptopodin 兔多克隆抗体、α-actinin-4 兔多克隆抗体、Animal Total RNA Isolation Kit、RT Easy™ II (First-strand cDNA synthesis for Real Time PCR)、Real Time PCR Easy™ (成都福际生物技术有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司); 预染蛋白 Marker (美国 NEB 公司); ECL 发光试剂盒 (美国 Thermo 公司)。光学显微镜 [蔡司光学仪器 (上海) 国际贸易有限公司]; H-600 型透射电子显微镜 (日本日立公司); TB-718EL 型病理切片机 (湖北泰维科技实业股份有限公司); LX20 型全自动生化分析仪 (美国贝克曼库尔特公司); NanoDrop 2000 紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 蛋白质电泳及转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司); 5417 R 型高速台式冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 建模、分组与给药 60 只大鼠适应性喂养 1 周, 检测 24 h UTP<5 mg 后开始造模, 随机分为空白组 10 只、造模组 50 只。造模组参照文献 [7] 报道的方法构建阳离子化牛血清白蛋白 (C-BSA) 膜性肾病模型, 预免疫 1 周后正式免疫, 尾静脉注射 C-BSA (注射前用 PBS 缓冲液配成溶液) 16 mg/kg, 空白组注射等量生理盐水, 隔日 1 次, 共 4 周, 以 24 h UTP>10 mg 为造模成功。造模大鼠随机分为 5 组, 即模型组、模型抑制组、盐酸贝那普利组及中药 (芪地固肾片) 高、低剂量组, 每组 10 只, 模型抑制组腹腔注射 15 μmol/kg Bay11-7082, 空白组、模型组灌胃给予双纯水 3 mL, 盐酸贝那普利组给予盐酸贝那普利片 3.6 mg/kg, 中药高、低剂量组给药剂量分别为 550、138 mg/kg, 各给药组每天给药 1 次, 连续 4 周。

2.2 指标检测

2.2.1 24 h UTP 造模前、造模结束后、给药 2 周和 4 周

后, 收集大鼠 24 h 尿液, 记录尿量, 采用硫酸酸-硫酸钠法计算 24 h UTP。

2.2.2 血液生化指标 给药 4 周后, 10% 水合氯醛以 300 mg/kg 剂量麻醉大鼠, 剖开腹腔, 腹主动脉采血, 静置 30 min 后 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 送至陕西中医药大学附属医院检验科, 全自动生化分析仪检测大鼠血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)、白蛋白 (ALB)、总蛋白 (TP)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 水平。

2.2.3 病理形态学 大鼠采血后摘取肾脏, PBS 缓冲液冲洗, 剥离被膜, 部分肾皮质置于 4% 戊二醛中固定, 进行电镜检查; 剩余组织置于 10% 多聚甲醛中固定, 进行光镜检查。光镜检测方法为肾脏组织经乙醇梯度脱水、石蜡包埋、切片后脱蜡至水, 苏木素染色后水洗, 乙醇分化, 再次冲洗后返蓝, 梯度乙醇脱水, 伊红染色后水洗, 透明, 封片, 最后镜检, 拍照记录; 电镜检测方法为取部分肾上极, 4% 戊二醛、1% 锇酸磷酸钠缓冲液固定, PBS 缓冲液冲洗, 乙醇及丙酮脱水, 环氧树脂包埋, 切片, 醋酸双氧铀、柠檬酸铅双重染色, 在透射电镜下观察肾小球基底膜、足突改变情况, 采集图像。

2.2.4 肾组织 IL-1β、IL-18、TNF-α mRNA 表达 将大鼠新鲜肾组织研磨均匀后, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度仪检测其浓度和纯度, 以 β-actin 为参照反, 转录试剂盒进行实时荧光定量 PCR, 将总 RNA 反转录为 cDNA, 各组基因同时扩增, 反应条件为 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 55 ℃ 30 s, 45 循环。采用 2^{-ΔΔCT} 法处理数据。

2.2.5 肾组织 nephrin、podocin 蛋白表达 提取大鼠肾脏总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白变性后上样、电泳、转膜、封闭, 加入内参 β-actin 一抗 (1 : 5 000)、nephrin 一抗 (1 : 3 000)、podocin 一抗 (1 : 2 000), 在 4 ℃ 下孵育过夜, 二抗 (1 : 5 000) 室温下孵育 2~3 h, 显影, 进行图像分析。

2.2.6 肾组织 F-actin、synoptopodin 和 α-actinin-4 蛋白表达 大鼠肾脏组织脱水后包埋、切片, 放入染色缸, 3% 甲醇双氧水室温 10 min 后 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 将切片浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 高火加热, 冷却后 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 滴加山羊血清封闭液, 一抗 4 ℃ 过夜, 二抗 30 min 后 PBS 缓冲液洗 3 次, DAB 显色试剂混匀后滴加到切片上, 洗涤, 苏木素复染、脱水、透明、树胶封片, 最后镜检。

2.3 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 2 组间比较采用 LSD 或 Dunnett's T 3 法。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态 空白组大鼠精神良好、反应灵敏、毛发有光泽、饮食正常; 模型组大鼠精神萎靡不振、反应迟钝、毛发欠光泽、摄食减少; 各给药组大鼠上述情况均有所好转; 各组大鼠尾巴均有不同程度瘀癍。实验过程中, 共有

5 只大鼠死亡，造模期间，1 只由于注射药物浓度过高致死，2 只由于固定过度压迫致死；给药期间，1 只给药后由于灌胃失误致死；1 只死亡不明。

3.2 24 h UTP 比较 造模结束后，与空白组比较，模型组、各给药组大鼠 24 h UTP 升高 ($P<0.01$)。给药 2 周后，与模型组比较，各给药组大鼠 24 h UTP 无明显变化 ($P>$

0.05)。给药 4 周后，与模型组比较，中药高剂量组、盐酸贝那普利组大鼠 24 h UTP 降低 ($P<0.01$)，模型抑制组高于中药高剂量组 ($P<0.05$)，中药低剂量组无明显变化 ($P>0.05$)；与盐酸贝那普利组比较，中药高剂量组、模型抑制组大鼠 24 h UTP 无明显变化 ($P>0.05$)，中药低剂量组升高 ($P<0.05$)，见表 1。

表 1 各组大鼠 24 h UTP 比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	24 h 尿蛋白定量/mg			
		造模前	造模后	给药 2 周后	给药 4 周后
空白组	10	4.25±1.97	4.89±1.36	5.24±1.44	3.14±0.74
模型组	8	4.05±1.01	60.32±14.53**	52.11±13.75**	28.88±8.34**
模型抑制组	10	4.43±1.41	61.57±12.39**	46.83±8.42**	18.00±8.54** [△]
中药高剂量组	9	3.84±0.33	60.45±12.81**	46.20±7.63**	12.33±4.42** ^{△△}
中药低剂量组	9	3.57±0.74	61.75±18.11**	53.28±11.23**	28.33±8.14** [#]
盐酸贝那普利组	9	5.07±1.51	62.29±13.58**	45.76±6.97**	15.11±6.68** ^{△△}

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[△] $P<0.05$ ，^{△△} $P<0.01$ ；与盐酸贝那普利组比较，[#] $P<0.05$ 。

3.3 血液生化指标 与空白组比较，模型组、中药低剂量组大鼠 TP 水平降低 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠 TP 水平升高，以模型抑制组、中药高剂量组、盐酸贝那普利组更明显 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)。与空白组比较，模型组、中药低剂量组大鼠 ALB 水平降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，中药高剂量组、盐酸贝那普利组大鼠 ALB 水平升高 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)。与空白组比较，模型组、模型抑制组、中药低剂量组大鼠 TC、TG 水平升高

($P<0.05$ ， $P<0.01$)；与模型组比较，中药高剂量组、模型抑制组、盐酸贝那普利组大鼠 TC、TG 水平降低 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)。与空白组比较，模型组大鼠 BUN 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，盐酸贝那普利组、中药高剂量组大鼠 BUN 水平降低 ($P<0.01$)。与空白组比较，模型组、中药低剂量组大鼠 Scr 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，中药高剂量组、模型抑制组、盐酸贝那普利组大鼠 Scr 水平降低 ($P<0.01$)，见表 2。

表 2 各组大鼠血液生化指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	TP/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	ALB/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	TC/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TG/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	BUN/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Scr/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
空白组	10	62.14±4.66	36.63±1.70	1.52±0.23	0.58±0.16	6.23±0.64	45.10±10.92
模型组	8	49.63±6.15**	31.10±1.56**	3.46±0.22**	3.67±0.66**	8.22±1.52**	61.88±5.89**
模型抑制组	10	56.63±2.98 [△]	35.30±2.40	2.34±0.36* ^{△△}	1.81±0.32** [△]	6.55±0.99	39.20±6.72 ^{△△}
中药高剂量组	9	58.14±2.75 ^{△△}	34.30±1.93 [△]	1.33±0.56 ^{△△}	1.15±0.47 ^{△△}	5.73±0.79 ^{△△}	42.22±5.04 ^{△△}
中药低剂量组	9	54.38±1.83*	33.46±1.61**	3.13±0.67**	3.43±0.29**	7.55±1.50	59.11±8.52**
盐酸贝那普利组	9	61.70±5.71 ^{△△}	34.08±3.47 ^{△△}	1.16±0.36 ^{△△}	0.96±0.52 ^{△△}	6.48±1.23 ^{△△}	39.22±7.50 ^{△△}

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[△] $P<0.05$ ，^{△△} $P<0.01$ 。

3.4 肾组织病理变化 图 1 显示，空白组大鼠肾脏组织完整、结构正常、无明显病变；模型组大鼠肾小球结构出现病变，表现为肾小球基底膜增厚、肾小球体积增大、少量的炎细胞浸润；模型抑制组、中药低剂量组、模型组大鼠病变较重，而中药高剂量组、盐酸贝那普利组相对较轻。图 2 显示，空白组大鼠肾小球毛细血管壁内皮细胞结构正常，内皮窗孔排列均匀，基底膜完整，上皮细胞（足细

胞）足突呈杵状、排列规整；模型组大鼠基底膜弥漫性增厚，上皮电子致密物沉积，上皮细胞足突弥漫融合；盐酸贝那普利组大鼠基底膜增厚略轻于模型组；中药高剂量组大鼠基底膜轻度增厚，上皮少数电子致密物沉积，上皮细胞足突部分融合；中药低剂量组、模型抑制组大鼠情况与模型组无明显差异。

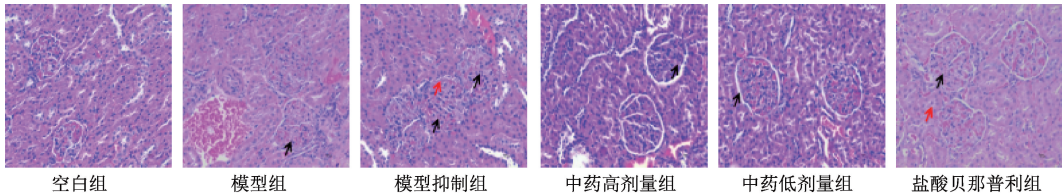


图 1 各组大鼠肾组织光镜图 (HE，×400)

3.5 肾组织 $IL-1\beta$ 、 $IL-18$ 和 $TNF-\alpha$ mRNA 表达 与空白组比较，模型组大鼠肾组织 $IL-1\beta$ 、 $IL-18$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 表达

升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，模型抑制组、中药高剂量组、盐酸贝那普利组大鼠肾组织 $IL-1\beta$ 、 $IL-18$ 、 $TNF-\alpha$

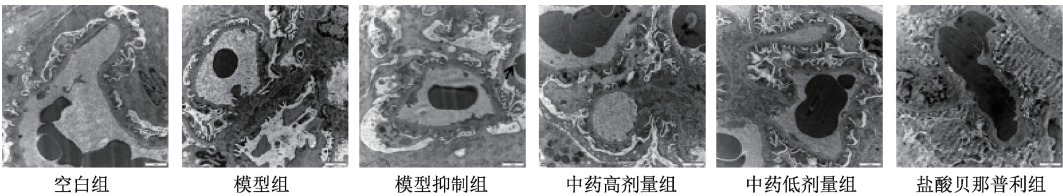


图 2 各组大鼠肾组织电镜图 (×10 000)

mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与盐酸贝那普利组比较, 模型抑制组、中药高剂量组大鼠肾组织 $IL-1\beta$ 、 $IL-18$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 表达无明显变化 ($P>0.05$), 中药低剂量组 $IL-1\beta$ 、 $IL-18$ mRNA 表达升高 ($P<0.05$), $TNF-\alpha$ mRNA 表达无明显变化 ($P>0.05$), 见表 3。

表 3 各组大鼠肾组织 $IL-1\beta$ 、 $IL-18$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	$IL-1\beta$	$IL-18$	$TNF-\alpha$
空白组	1.000±0	1.000±0	1.000±0
模型组	2.367±0.396**	4.300±0.809**	2.370±0.354**
模型抑制组	1.007±0.104 $\Delta\Delta$	1.003±0.084 $\Delta\Delta$	1.067±0.476 Δ
中药高剂量组	0.990±0.279 $\Delta\Delta$	1.857±0.378 $\Delta\Delta$	1.400±0.342 Δ
中药低剂量组	1.727±0.691 [#]	3.703±0.814 ^{##}	2.020±0.799
盐酸贝那普利组	0.983±0.162 $\Delta\Delta$	1.720±0.991 $\Delta\Delta$	1.173±0.405 Δ

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与盐酸贝那普利组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

3.6 肾组织 nephrin、podocin、CD2AP 蛋白表达 与空白组比较, 模型组大鼠肾组织 nephrin、podocin、CD2AP 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 盐酸贝那普利组、中药高剂量组、模型抑制组大鼠肾组织 nephrin、podocin、CD2AP 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 见表 4、图 3。

表 4 各组大鼠肾组织 nephrin、podocin、CD2AP 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	nephrin	podocin	CD2AP
空白组	1.000 0±0	1.000 0±0	1.000 0±0
模型组	0.499 1±0.128 8**	0.411 3±0.149 1**	0.502 7±0.065 6**
模型抑制组	0.881 9±0.059 4 $\Delta\Delta$	0.915 3±0.120 8 $\Delta\Delta$	0.888 9±0.062 4 $\Delta\Delta$
中药高剂量组	0.800 9±0.078 9 $\Delta\Delta$	0.805 8±0.134 4 $\Delta\Delta$	0.872 4±0.076 6 $\Delta\Delta$
中药低剂量组	0.616 2±0.057 8	0.477 3±0.131 2	0.536 9±0.051 0
盐酸贝那普利组	0.869 6±0.060 4 $\Delta\Delta$	0.823 3±0.090 1 $\Delta\Delta$	0.817 1±0.089 7 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

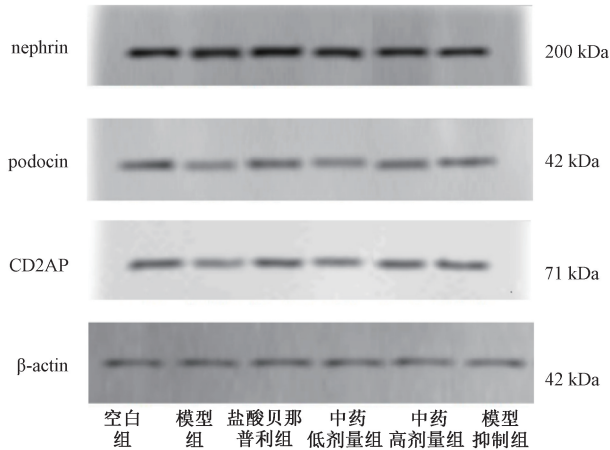


图 3 各组大鼠肾组织 nephrin、podocin、CD2AP 蛋白表达

3.7 肾组织 F-actin、synoptopodin、 α -actinin-4 骨架蛋白表达 与空白组比较, 模型组大鼠肾组织 F-actin、synoptopodin 蛋白表达降低 ($P<0.01$), α -actinin-4 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$); 与模型组比较, 盐酸贝那普利

组、中药高剂量组大鼠肾组织 F-actin、synoptopodin 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 见表 5、图 4。

4 讨论

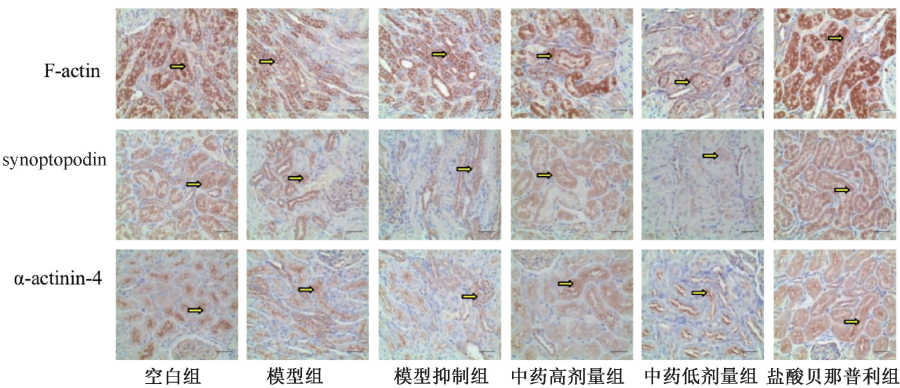
膜性肾病作为一种自身免疫炎症性疾病, 抗原物质在肾小球足细胞膜上表达, 与自身抗体相结合, 形成上皮下的免疫复合物, 刺激基底膜的增厚和足细胞结构蛋白的改变。足细胞结构蛋白中作为中心环节的细胞骨架蛋白, 直接或间接地与裂孔隔膜蛋白、基底膜蛋白、顶膜蛋白连接, 调节足细胞的形状、结构、稳定性以及裂孔隔膜的插入、黏附, 并对环境刺激作出动态响应。F-肌动蛋白 (F-actin)、突触孔蛋白 (synoptopodin) 和 α -辅肌动蛋白 4 (α -actinin-4) 等构成足细胞的基本细胞骨架, 维持着足细胞的形态, 对肾小球的有效滤过及维持肾功的正常至关重要。当足细胞骨架的稳定性被破坏时, 会造成足细胞结构损伤, 进而导致滤过功能障碍, 形成蛋白尿^[8]。

此外, 担任足细胞彼此间连接桥梁的裂孔隔膜横跨于邻近的足突之间, 其不仅可充当复杂的信号枢纽, 将不同的化学和机械信号传到足细胞^[9], 还可以防止血浆蛋白渗入到原尿中^[10]。近年来在裂孔隔膜上发现了多个在足细

表 5 各组大鼠肾组织 F-actin、synoptopodin、α-actinin-4 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	F-actin	synoptopodin	α-actinin-4
空白组	0.322 6±0.010 7	0.246 1±0.013 0	0.223 7±0.005 8
模型组	0.266 4±0.016 9**	0.232 6±0.010 5**	0.229 0±0.002 9
模型抑制组	0.279 7±0.006 0	0.234 0±0.007 7	0.222 1±0.011 3
中药高剂量组	0.315 5±0.004 7 $\triangle\triangle$	0.245 7±0.001 9 $\triangle\triangle$	0.216 6±0.005 9
中药低剂量组	0.259 9±0.006 5	0.224 3±0.062 3	0.223 4±0.011 1
盐酸贝那普利组	0.340 2±0.013 9 $\triangle\triangle$	0.248 6±0.002 9 $\triangle\triangle$	0.213 2±0.009 4

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $\triangle\triangle P<0.01$ 。



注:阴性细胞呈蓝色,底物为白色;阳性细胞呈黄色或棕黄色。

图 4 各组大鼠肾组织免疫组化表达 (×400)

胞表达的裂孔隔膜蛋白,如nephrin、podocin等。当足细胞骨架的失调亦或裂孔隔膜结构完整性的丧失均可导致足细胞受损,而足细胞损伤又是包括膜性肾病在内的肾小球疾病发生和发展的关键因素^[11]。因此,保护足细胞可能对我寻膜性肾病有效的治疗靶点意义非凡。

已有的研究表明特发性膜性肾病患者存在明显的肾脏组织炎性损伤和足细胞损伤^[12],一些炎症因子在发生过程中起着关键作用。如TNF-α作为一种多效性细胞因子,在炎症反应中有广泛的调节联动功能,可导致多种其他促炎性细胞因子和趋化因子的产生^[13],加重肾脏炎性损伤。因此,调控炎症因子进而降低足细胞损伤是防治膜性肾病的关键。

雷根平教授基于长期的临床实践,以沈金鳌《杂病源流犀烛》所载古方参芪地黄汤为基础方,略作调整创立了芪地固肾方及其复方制剂芪地固肾片。该方药物组成有黄芪、生地、芡实、白花蛇舌草、荆芥、丹参;方中黄芪有利尿消肿之效,其升举之力可使下泄之精微回归^[14],此外黄芪还能补气托毒,排脓生肌,有利于肾小球结构与功能的恢复^[15];生地滋阴补肾,与黄芪共为君药以治本;臣以芡实益肾固精,可助黄芪益气培元;白花蛇舌草清热降浊解毒,与黄芪配伍一升清、一降浊;丹参通利血脉,活血化淤,与黄芪相配,体现“气行则血行”,白花蛇舌草与丹参共为佐药;使以荆芥宣发肺气,宣上畅下以利水之下行。诸药相伍,配伍合理,组方严谨,集健脾补肾、益气养阴、清利活血于一身,标本兼顾^[16]。

现代药理研究发现,黄芪甲苷可抑制炎症因子表达,

调节免疫功能。该作用与其可以阻断NF-κB信号通路的激活,从而降低TNF-α^[17]、IL-1β、趋化因子等基因的表达有关;并且可以调节脂代谢、抗细胞凋亡、保护足细胞表型和结构。此外,黄芪甲苷可降低细胞骨架蛋白受损以减轻足细胞的损伤,进而防治膜性肾病^[18]。生地具有类似糖皮质激素的免疫抑制作用^[19],且有研究表明^[20]生地有效成分环烯醚萜苷可下调desmin蛋白表达,上调nephrin蛋白表达,以此改善足细胞损伤。芡实能清除自由基,有较强的抗氧化功能,以此治疗肾病蛋白尿,改善肾脏微循环^[21]。白花蛇舌草可抑制脂多糖诱导的肾脏炎症反应,下调TNF-α、IL-1β的表达^[22]。丹参具有改善血流动力学,纠正血液高凝状态,促进肾脏血管扩张的作用,其有效成分丹参多酚酸盐能够恢复足细胞相关蛋白进而维持足细胞结构和功能的完整性^[23]。荆芥的乙醇提取物能抑制脂多糖诱导的细胞表面分子CD80和CD86的表达和促炎细胞因子如TNF-α、IL-1β、IL-16的产生^[24]。另外,荆芥挥发油的抗炎作用还与抑制NLRP3炎症小体的激活相关^[25]。以上研究为本方保护肾组织微结构蛋白、进而保护足细胞、减少蛋白尿提供了药理学依据。

本研究从足细胞微结构蛋白及炎症因子角度对芪地固肾片治疗膜性肾病的作用机制进行了探索性的研究。经实验观察,给药后可降低膜性肾病大鼠24hUTP、升高ALB,降低血脂,改善肾功能,说明芪地固肾片对膜性肾病大鼠具有明确的治疗作用。进一步研究提示,模型组大鼠肾组织nephrin、podocin、CD2AP、F-actin及synoptopodin蛋白表达降低,炎症因子IL-1β、IL-18和TNF-αmRNA的表达

升高；而芪地固肾片、盐酸贝那普利及 Bay11-7082 均可上调 nephrin、podocin 和 CD2AP 蛋白的表达，降低 *IL-1β*、*IL-18* 和 *TNF-α* mRNA 的表达，同时芪地固肾片亦可上调 F-actin 及 synoptopodin 蛋白的表达，在一定程度上保护足细胞，以高剂量作用显著。此外，该方还可以有效的抑制膜性肾病大鼠肾小球基底膜免疫复合物的沉积以及基底膜的增厚，延缓肾脏病理的进展。综上，芪地固肾片对膜性肾病大鼠的肾保护作用，其机制可能是通过影响 NLRP3 炎症小体合成，下调 *IL-1β*、*IL-18* 炎症因子的释放，降低足细胞损伤，从而减少蛋白尿。

参考文献：

[1] McGrogan A, Franssen C F M, de Vries C S. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26 (2) : 414-430.

[2] 史玉洁, 翁彦菡. 膜性肾病的病理学特点及诊断 [J]. 中国临床医生杂志, 2019, 47(9) : 1020-1023.

[3] Xu X, Wang G B, 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.

[4] 陈以平, 邓跃毅, 倪兆慧, 等. 中医方案治疗特发性膜性肾病肾病综合征的前瞻性、随机、对照、多中心临床研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(6) : 471-474.

[5] 雷根平, 李小会, 高碧峰, 等. 芪地固肾方治疗特发性膜性肾病 65 例临床观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(10) : 913-914.

[6] 雷根平, 朱开然, 胡蓝方, 等. 芪地固肾片对气阴两虚型特发性膜性肾病患者抗 M 型磷脂酶 A2 抗体的影响——一项前瞻性随机对照临床研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(6) : 508-510.

[7] Broder 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.

[8] Siu B, Saha J, Smoyer W E, *et al.* Reduction in podocyte density as a pathologic feature in early diabetic nephropathy in rodents; prevention by lipoic acid treatment [J]. *BMC Nephrol*, 2006, 7: 6.

[9] Grahammer F, Schell C, Huber T B. The podocyte slit diaphragm--from a thin grey line to a complex signalling hub [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2013, 9(10) : 587-598.

[10] Kawachi H, Fukusumi Y. New insight into podocyte slit diaphragm, a therapeutic target of proteinuria [J]. *Clin Exp*

Nephrol, 2020, 24(3) : 193-204.

[11] Huang J, Liu G, Zhang Y M, *et al.* Urinary soluble urokinase receptor levels are elevated and pathogenic in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis [J]. *BMC Med*, 2014, 12: 81.

[12] 高玉伟, 王兴华, 杨洪娟, 等. 补中益气汤合桂枝汤加减治疗特发性膜性肾病临床观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(4) : 343-345.

[13] McAdoo S P, Pusey C D. Is there a role for TNF-α blockade in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis? [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32(Suppl 1) : i80-i88.

[14] 常美莹, 张 昱. 张昱运用加味黄芪赤风汤治疗慢性肾炎经验 [J]. 中医药导报, 2020, 26(8) : 93-96.

[15] 张 燕. 益气养阴方防治肾纤维化的实验研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2013.

[16] 雷根平. 原发性肾病综合征膜性肾病中医病机及治法探讨 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(5) : 443-445.

[17] 杨志霞, 李振彬, 林 谦, 等. 黄芪多糖联合丹参酮阻断慢性心衰大鼠 NF-κB 激活 MIF、TNF-α 及 IL-6 表达的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(12) : 3221-3225.

[18] 桂定坤, 汪年松. 黄芪甲苷肾保护作用机制 [J]. 中华肾病研究电子杂志, 2013, 2(4) : 204-206.

[19] 郭补林, 郭亚平, 张家林, 等. 加味生地六味益肾活血汤治疗慢性肾小球肾炎疗效观察 [J]. 陕西中医, 2016, 37 (8) : 1013-1014.

[20] 吴云皓. 生地、山茱萸环烯醚萜苷类成分干预糖尿病肾病足细胞损伤的机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.

[21] 杨晓曦, 张庆林. 中药芡实的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42(2) : 160-164.

[22] Ye J H, Liu M H, Zhang X L, *et al.* Chemical profiles and protective effect of *Hedyotis diffusa* Willd in lipopolysaccharide-induced renal inflammation mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (11) : 27252-27269.

[23] 陈素枝. 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肾保护作用及对肾组织 CD2AP、Desmin 蛋白表达的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.

[24] Byun M W. Schizonepeta tenuifolia ethanol extract exerts anti-inflammatory activity through the inhibition of TLR4 signaling in lipopolysaccharide-stimulated macrophage cells [J]. *J Med Food*, 2014, 17(3) : 350-356.

[25] 王 凤, 徐 锋, 温桃群, 等. 基于 THP-1 细胞模型荆芥挥发油抗炎作用的 NLRP3 炎症小体调控机制研究 [J]. 中药材, 2017, 40(3) : 689-694.