

化瘀通络中药对糖尿病肾病大鼠肾脏足细胞裂孔膜蛋白 podocin、CD2AP 的调节作用

方敬 陈志强 郭倩 陈春宇 王春宁 谢田 孙汝 刘利飞 张肖

摘要 **目的** 探讨化瘀通络中药对糖尿病肾病大鼠肾脏足细胞裂孔膜蛋白 podocin、CD2AP 的调节作用。**方法** 40 只大鼠采用高糖高脂饲料联合 1% 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 35 mg/kg 腹腔注射复制糖尿病大鼠模型, 将造模成功的 36 只大鼠按随机数字表法分为模型组、化瘀通络组和厄贝沙坦组, 每组 12 只。另取 10 只正常大鼠作为正常组。化瘀通络组和厄贝沙坦组分别给予化瘀通络中药和厄贝沙坦灌胃, 同时正常组和模型组等量蒸馏水灌胃。采用 ELISA 法检测不同时间点各组大鼠 24 h 尿蛋白定量; 连续干预 16 周后分别检测各组大鼠体重 (body weight, BW)、肾重 (kidney weight, KW)、肾脏指数 (kidney index, KI)、空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、血肌酐 (serum creatinine, SCr)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和尿酸 (uric acid, UA); 光镜和电镜下观察肾组织病理形态学变化; 采用 Western blot 和 Real-time PCR 法检测肾脏足细胞裂孔膜蛋白 podocin、CD2AP 蛋白和 mRNA 表达。**结果** (1) 与正常组比较, 模型组大鼠第 4、8、12、16 周 24 h 尿蛋白定量明显升高 ($P < 0.01$), 造模后大鼠 BW 减轻, KI、FBG、SCr、BUN 和 UA 水平均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 化瘀通络组和厄贝沙坦组第 4、8、12、16 周 24 h 尿蛋白定量明显降低, 且化瘀通络组 24 h 尿蛋白定量较厄贝沙坦组减少更明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 造模后化瘀通络组和厄贝沙坦组 BUN 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 (2) 肾脏病理显示: 模型组肾脏结构紊乱, 基底膜明显增厚, 系膜重度增生, 足突广泛融合; 化瘀通络组和厄贝沙坦组肾脏病理改变均有不同程度减轻。 (3) Western blot 和 Real-Time PCR 显示: 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织 podocin、CD2AP 蛋白和 mRNA 表达水平均降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 化瘀通络组和厄贝沙坦组 podocin、CD2AP 蛋白和 mRNA 表达水平均升高 ($P < 0.01$); 化瘀通络组 podocin、CD2AP 蛋白和 CD2AP mRNA 表达均明显高于厄贝沙坦组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 化瘀通络中药可以降低糖尿病肾病大鼠尿蛋白, 保护肾功能, 改善肾脏病理改变, 其机制可能与上调裂孔膜蛋白 podocin、CD2AP 表达有关。

关键词 糖尿病肾病; 化瘀通络中药; podocin; CD2AP

Regulatory Effect of Chinese Drugs for Stasis Removing and Collaterals Dredging on the Expressions of podocin and CD2AP in Podocyte Slit Diaphragm of Diabetic Nephropathy Rats FANG Jing, CHEN Zhi-qiang, GUO Qian, CHEN Chun-yu, WANG Chun-ning, XIE Tian, SUN Ru, LIU Li-fei, and ZHANG Xiao Faculty of Integrated Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017)

ABSTRACT **Objective** To observe the regulatory effect of Chinese drugs for stasis removing and collaterals dredging (CDSRCD) on the expressions of podocin and CD2AP in podocyte slit diaphragm (SD) of diabetic nephropathy (DN) rats. **Methods** DN rat model was duplicated in 40 male Sprague-Dawley rats by feeding high fat high glucose diet combined with intraperitoneally injecting 1% streptozotocin (STZ, 35 mg/kg). Totally 36 successfully modeled rats were divided into the model group, the CDSRCD group, and the irbesartan group according to random digit table, 12 in each group. Besides, another 10 normal rats were recruited as a normal group. Rats in the CDSRCD group and the irbesartan group

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81373804)

作者单位: 河北医科大学中西医结合教研室 (石家庄 050017)

通讯作者: 陈志强, Tel: 0311-69095003, E-mail: fangjing1102@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.07.0835

were intragastrically fed with CDSRCD and irbesartan respectively. Rats in the normal group and the model group were fed with equal volume of distilled water at the same time. 24 h urine protein quantitation was detected using ELISA at various time points. Body weight (BW), kidney weight (KW), kidney index (KI), fasting blood glucose (FBG), serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), and uric acid (UA) in each group were detected after 16 weeks of intervention. The pathomorphological changes of renal tissue were observed under light microscope and electron microscope respectively. The protein and mRNA expressions of podocin and CD2AP were detected by Western blot and Real-time PCR respectively. Results (1) Compared with the normal group, 24 h urine protein quantitation significantly increased at week 4, 8, 12, and 16, respectively ($P < 0.01$). BW was decreased; KI and levels of FBG, SCr, BUN, and UA all increased after modeling ($P < 0.01$). Compared with the model group, 24 h urine protein quantitation significantly decreased in the CDSRCD group and the irbesartan group at week 4, 8, 12, and 16, respectively ($P < 0.01$). Besides, it was more obviously reduced in the CDSRCD group than in the irbesartan group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). BUN level obviously decreased both in the CDSRCD group and the irbesartan group after modeling ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (2) Results of renal pathology showed that disarranged renal structure, obviously thickened basement membrane, severely proliferated mesenteria, widely fused foot processes in the model group. All these pathological changes were attenuated in the CDSRCD group and the irbesartan group to some degree. (3) Results of Western blot and Real-time PCR showed, compared with the normal group, protein and mRNA expressions of podocin and CD2AP decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, protein and mRNA expressions of podocin and CD2AP increased in the CDSRCD group and the irbesartan group ($P < 0.01$). Protein and mRNA expressions of podocin and CD2AP increased more in the CDSRCD group than in the irbesartan group ($P < 0.05$). Conclusions CDSRCD could protect renal function by lowering urinary protein in DN rats, improve renal pathological changes. Its mechanism might be related to up-regulating mRNA and protein expressions of podocin and CD2AP.

KEYWORDS diabetic nephropathy; Chinese drugs for stasis removing and collaterals dredging; podocin; CD2AP

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)又称糖尿病肾小球硬化症,是糖尿病引起的严重和危害性最大的一种慢性并发症,我国糖尿病患者已高达 9 240 万人,居世界首位,目前 DN 已成为导致终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)的主要原因,位居第一位^[1]。迄今为止,尚无理想的方法控制 DN 的进展。近年来中医学对 DN 病机有了更深层次的认识,认为血瘀为其主要病机,贯穿于 DN 始终,有临床报道, DN 患者多存在瘀血阻络的病理状态^[2],故化瘀通络中药也成为 DN 的基础用药。化瘀通络中药的疗效及作用机制还有待进一步明确。陈志强教授根据中医学理论并结合多年临床用药经验,严格筛选,以化瘀通络中药丹参、川芎、地龙、水蛭、全蝎组方为研究对象,并且本课题组在前期临床和实验研究中均已证实化瘀通络中药可有效地减少或控制 DN 的蛋白尿,改善肾功能^[3,4]。本研究旨在通过化瘀通络中药对 DN 大鼠模型的干预,并与目前临床公认有效治疗 DN 的西药厄贝沙坦对照,观察其对肾脏足细胞裂孔膜蛋白

的影响,探讨化瘀通络中药减少尿蛋白、保护肾脏的作用靶点和机制,为临床优化 DN 的治疗用药提供理论基础。

材料与方法

1 动物 50 只健康雄性 SD 大鼠,4~5 周龄,体重 140~160 g,河北医科大学动物中心提供,动物许可证号:SCXK(冀)2013-1-003。

2 药物 化瘀通络中药颗粒由广东一方制药有限公司生产。药物组成:丹参(1.8 g/袋,批号:402300T,相当于饮片 10 g),川芎(1.3 g/袋,批号:401235T,相当于饮片 6 g),地龙(1.0 g/袋,批号:402044T,相当于饮片 10 g),水蛭(1.5 g/袋,批号:408244T,相当于饮片 3 g),全蝎(1.0 g/袋,批号:406498T,相当于饮片 3 g)。厄贝沙坦片(0.15 g/片,赛诺菲制药有限公司,批号:2A368)。

3 试剂和仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,美国 Enzo Life Sciences,批号:07301302);兔

抗大鼠 podocin 多克隆抗体(购自美国 Abcam 公司, ab93650);兔抗大鼠 CD2AP 多克隆抗体(购自北京博奥森生物技术有限公司, bs-0512R); TRIZOL Reagent (Life Technologies 公司, 批号: 66218); M-MLV 反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司, 批号: 8213241); Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG(美国 Invitrogen 公司, 批号: 8213233); 引物(上海生工生物工程有限公司); 其余试剂均为国产分析纯半自动生化仪(德国豪迈公司); 倒置相差显微镜(日本 Olympus); GeneGeniusBOX 全自动凝胶成像系统(英国 Syngene 公司); Eco 实时定量 PCR 仪(美国 Illumina 公司)。

4 动物造模与分组 50 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 检测尿蛋白、尿糖及尿红细胞全部阴性。采用高脂饲料联合小剂量 STZ 复制 DN 大鼠模型^[5], 将 40 只大鼠给予高糖高脂饲料喂养(配方: 基础饲料 59%, 蔗糖 20%, 猪油 18%, 蛋黄 3%, 总热量为 4.43 kcal/g) 喂养 4 周, 4 周末禁食 12 h 后, 按 35 mg/kg 体重一次性腹腔注射 1% STZ, 72 h 后尾静脉测血糖, 血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为糖尿病造模成功。造模过程中 2 只大鼠死亡, 2 只大鼠血糖不达标予以剔除。将 36 只成模大鼠随机分为模型组、化瘀通络中药组(简称化瘀通络组)及厄贝沙坦组, 每组 12 只。另取 10 只作为正常组。

5 给药方法 糖尿病大鼠造模成功 1 周后, 根据动物体表面积计算药物剂量^[6], 化瘀通络中药组给予化瘀通络颗粒剂: 丹参 1.35 g/(kg·d), 川芎 1.08 g/(kg·d), 地龙 0.9 g/(kg·d), 水蛭 0.54 g/(kg·d), 全蝎 0.54 g/(kg·d), 给药剂量相当于临床成人用量的 6.4 倍, 各种颗粒剂完全溶解后定容至 1 mL/100 mg 体重进行灌胃。厄贝沙坦组给予厄贝沙坦片 13.5 mg/(kg·d)。药物浓度为 2 mg/mL, 每日灌胃 1 次, 连续灌胃 16 周, 同时正常组和模型组大鼠灌以相应体积的蒸馏水。

6 标本采集 分别于造模前(0 周)、造模第 4、8、12、16 周末, 各组大鼠分别放入代谢笼, 自由饮食, 留取 24 h 尿液, 记录尿量; 于第 16 周末大鼠禁食 12 h 后称重, 根据 0.35 mL/100 g 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 检测血生化指标。快速取出大鼠右肾, 剥去被膜, 称重, 在预冷的电镜固定液中切成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小后迅速放入固定液中, 4 $^{\circ}$ C 保存, 透射电镜备用。留取部分肾皮质放置于 FAA 固定液中, 以备光镜病理学检查。切取部分肾皮质, 存放入冻存管内, 迅速投放到液氮中, 短暂冷却

后转入 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存, 待行 Western blot、Real-Time PCR 检测。

7 检测指标及方法

7.1 一般情况 观察各组大鼠毛色、饮食、体重、体态、灵敏度、精神状况等。

7.2 24 h 尿蛋白定量 将各时间点收集到的 24 h 尿液, 3 500 r/min, 离心 10 min, 取上清, 采用 ELISA 法检测 24 h 尿蛋白定量。

7.3 大鼠体重(body weight, BW)、肾重(kidney weight, KW)和肾脏指数(kidney index, KI)检测 16 周末, 称取各组大鼠体重, 10% 水合氯醛麻醉后, 剖开腹腔, 在肾门处剪断肾蒂, 快速剥离肾脏被膜, 称重, 根据公式 $KI = \text{双肾重量(g)} / \text{体重(kg)}$, 计算肾脏指数。

7.4 大鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)及肾功能检测 采用 Humalyzer 2 000 半自动生化分析仪由专人检测空腹血糖 FBG、肌酐(serum creatinine, SCr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和尿酸(uric acid, UA)水平。

7.5 肾组织病理变化 肾组织于 FAA 固定液中固定 24 h 后, 流水冲洗, 用 70%、80%、90%、95%、100% 的乙醇梯度依次脱水各 30 min, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋。按常规病理切片, 厚度约为 2 μ m, 行 HE、PAS 染色, 光镜下观察肾组织病理改变; 取肾下极皮质 1 mm \times 1 mm \times 1 mm, 迅速放入 4 $^{\circ}$ C 预冷后的 2.5% 戊二醛固定液中, 1% 的锇酸固定 2 h, 乙醇梯度脱水, 100% 丙酮脱水、浸泡, 包埋, 切片, 染色, 应用电镜观察。

7.6 肾皮质 podocin、CD2AP 蛋白表达 采用 Western blot 法。取 50 mg 大鼠肾组织, 采用 RIPA 蛋白裂解液提取 RNA, 并用 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度。各样品取 30 μ g 加入相应体积的总蛋白样品与 5 \times 蛋白质凝胶电泳上样缓冲液, 轻轻混合, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 立即插入冰中待用。将 30 μ g 样品轻轻加入凝胶孔中, 电泳仪设置成稳压状态, 接通电源, 将电压调至 80 V 使样品通过浓缩胶与分离胶(电压约 8 V/cm)。电泳使染料至分离胶适当位置, 结束电泳, 立即冰上转膜, 将转有蛋白的 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭, 分别加入兔抗大鼠 podocin 一抗(1:1 000)、兔抗大鼠 CD2AP 一抗(1:300), 用 TBST 洗涤, 将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液(1:5 000)中, 室温、避光缓慢摇动作用 60 min, 洗膜, TMB 显色, 曝光洗片, 以目的蛋白/ β -actin 的灰度比值表示目的蛋白的相对含量。

7.7 肾皮质 podocin、CD2AP mRNA 表达 采用 Real-Time PCR 法。取各组大鼠 -80 ℃ 冻存的肾组织 30 mg, 用 TRIzol 提取 RNA, 并通过 NanoDrop 2 000C 检测其浓度及纯度, OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间 RNA 样品, 表示其纯度较好, 按 M-MLV 反转录试剂盒说明, 将 RNA 反转录成 cDNA。引物序列: β -actin 上游: 5'-CGTGGCCT-GACATTA-AAGAG-3', 下游: 5'-TTGCCGATAGTGATGACCT-3', 产物长度 132 bp; podocin 上游: 5'-AGCGAAT-CAGCACCTACGGACTT-3', 下游: 5'-GGTTC-CACTCCACCAGCCTT-CTT-3', 产物长度 200 bp; CD2AP 上游: 5'-AGGTA GAAGAAGGCTGGTG-GAGTG-3', 下游 5'-CGGAGATGGCATAGGTGAG-GTAGG-3', 产物长度 164 bp。Real-Time PCR 反应体系: SYBR Green qPCR SuperMix 5 μ L, 上下游引物(2 μ mol/L)各 1 μ L, cDNA 1 μ L, DEPC 水 2 μ L。Real-Time PCR 反应条件: UDG Incubation 50 ℃ 2 min, Polymerase Activation 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 10s, 60 ℃ 30 s, 40 个循环; 熔解曲线条件: 95 ℃ 15 s, 55 ℃ 15 s, 95 ℃ 15 s。采用 $\Delta\Delta$ Ct 法分析 mRNA 的相对表达量。

8 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 所有数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据先进行正态性和方差齐性检验, 符合条件数据选择单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 法, 各组间不同观察点大鼠 24 h 尿蛋白定量采用重复测量设计的单变量方差分析进行比较, 不符合条件数据选择非参数检验方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般情况 正常组大鼠毛色润泽柔

顺, 反应敏捷, 体重逐渐增加。造模后大鼠均出现明显的多饮、多食、多尿症状, 精神萎靡, 毛色晦暗无泽, 反应迟钝, 体重减轻, 弓背消瘦, 少动抱团, 上述症状以模型组明显, 经药物干预后, 化瘀通络组和厄贝沙坦组各种症状均有不同程度改善。实验过程中, 模型组死亡 3 只, 化瘀通络组和厄贝沙坦组各死亡 2 只。死亡原因可能是高血糖诱发代谢紊乱, 导致脏器衰竭。

2 各组大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白定量比较(表 1) 与正常组比较, 模型组第 4、8、12、16 周 24 h 尿蛋白定量明显升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 化瘀通络组和厄贝沙坦组第 4、8、12、16 周 24 h 尿蛋白定量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 16 周末化瘀通络组减少明显优于厄贝沙坦组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 各组大鼠 BW、KW 和 KI 比较(表 2) 与正常组比较, 模型组 BW 明显减轻, KI 明显升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 化瘀通络组和厄贝沙坦组上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。化瘀通络组和厄贝沙坦组差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。

4 各组大鼠 FBG、肾功能比较(表 3) 与正常组比较, 模型组大鼠 FBG、SCr、BUN、UA 水平均明显升高($P < 0.01$); 与模型组大鼠比较, 化瘀通络组和厄贝沙坦组 BUN 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), FBG、SCr、UA 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。化瘀通络组和厄贝沙坦组差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。

5 各组大鼠肾组织病理学改变(图 1-3) 光镜: 正常组大鼠肾脏结构清晰, 毛细血管腔未见扩张, 肾小球无肥大或萎缩, 基底膜未见增厚, 系膜无增生; 模型组大鼠肾小球体积增大, 基底膜明显增厚, 系膜重度增生; 化瘀通络组和厄贝沙坦组病理改变均有一定程度减轻, 可见基底膜部分增厚, 系膜轻度增生。

表 1 各组大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白定量比较 (mg/24 h, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 第 0 周 | 第 4 周 | 第 8 周 | 第 12 周 | 第 16 周 |
|------|----|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| 正常 | 10 | 7.64 \pm 1.70 | 6.95 \pm 1.29 | 6.92 \pm 1.74 | 6.21 \pm 1.00 | 6.20 \pm 0.97 |
| 模型 | 9 | 7.18 \pm 1.30 | 25.38 \pm 6.51* | 26.99 \pm 5.94* | 28.46 \pm 6.61* | 31.25 \pm 6.34* |
| 化瘀通络 | 10 | 6.96 \pm 1.82 | 21.40 \pm 4.06 Δ | 21.32 \pm 3.60 $\Delta\Delta$ | 21.30 \pm 4.35 $\Delta\Delta$ | 22.34 \pm 4.93 $\Delta\Delta\Delta$ |
| 厄贝沙坦 | 10 | 6.79 \pm 1.07 | 20.96 \pm 3.56 $\Delta\Delta$ | 22.13 \pm 4.18 $\Delta\Delta$ | 23.41 \pm 5.93 Δ | 27.15 \pm 3.68 Δ |

注: 与正常组同期比较, * $P < 0.01$; 与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与厄贝沙坦组同期比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组大鼠 BW、KW 和 KI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | BW(g) | KW(g) | KI |
|------|----|---------------------|-----------------|----------------------|
| 正常 | 10 | 720.50 \pm 89.34 | 1.62 \pm 0.27 | 0.0024 \pm 0.0002 |
| 模型 | 9 | 345.57 \pm 89.48* | 1.64 \pm 0.20 | 0.0050 \pm 0.0004* |
| 化瘀通络 | 10 | 357.81 \pm 78.66 | 1.65 \pm 0.18 | 0.0047 \pm 0.0008 |
| 厄贝沙坦 | 10 | 326.80 \pm 44.64 | 1.60 \pm 0.24 | 0.0049 \pm 0.0007 |

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$

电镜:正常组大鼠可见肾小球基底膜均匀无增厚,足突排列较整齐。模型组大鼠可见基底膜均匀弥漫增厚,足突增宽或广泛融合。化瘀通络组和厄贝沙坦组均有不同程度改善,肾小球基底膜节段性增厚,足突部分融合。

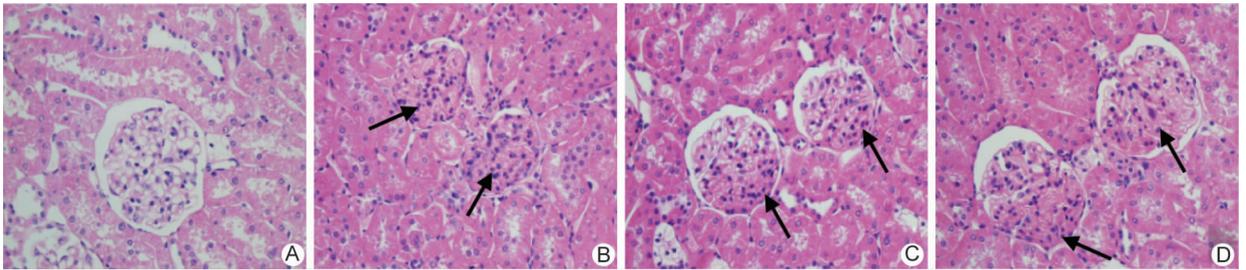
(表 4, 图 4) 与正常组比较,模型组大鼠肾组织 podocin、CD2AP 蛋白表达水平均降低($P < 0.01$);与模型组比较,化瘀通络组和厄贝沙坦组肾组织 podocin、CD2AP 蛋白表达水平均升高($P < 0.01$);化瘀通络组两种蛋白表达均明显高于厄贝沙坦组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

6 各组大鼠肾组织 podocin、CD2AP 蛋白表达

表 3 各组大鼠 FBG、SCr、BUN 和 UA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

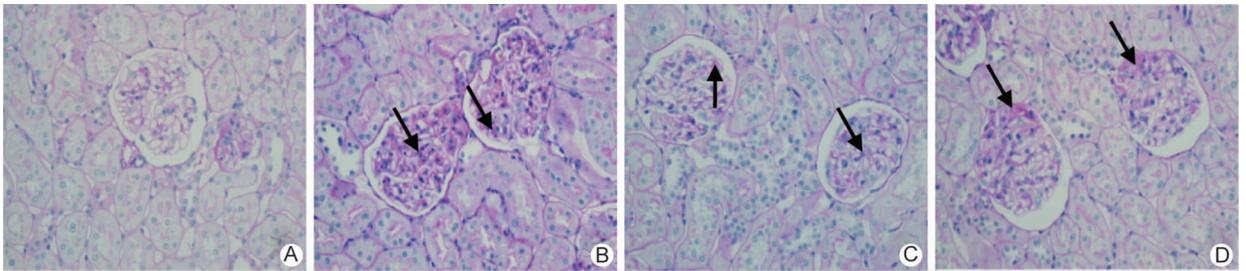
| 组别 | n | FBG(mmol/L) | SCr(μ mol/L) | BUN(mmol/L) | UA(μ mol/L) |
|------|----|-------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|
| 正常 | 10 | 6.44 \pm 2.45 | 68.98 \pm 2.67 | 5.93 \pm 1.14 | 40.07 \pm 14.04 |
| 模型 | 9 | 23.35 \pm 1.61* | 118.28 \pm 3.08* | 32.96 \pm 5.16* | 85.50 \pm 35.08* |
| 化瘀通络 | 10 | 24.76 \pm 3.45 | 112.19 \pm 7.28 | 25.85 \pm 4.98 $\Delta\Delta$ | 78.43 \pm 34.44 |
| 厄贝沙坦 | 10 | 24.24 \pm 2.12 | 113.02 \pm 10.88 | 27.89 \pm 4.01 Δ | 75.86 \pm 36.05 |

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$



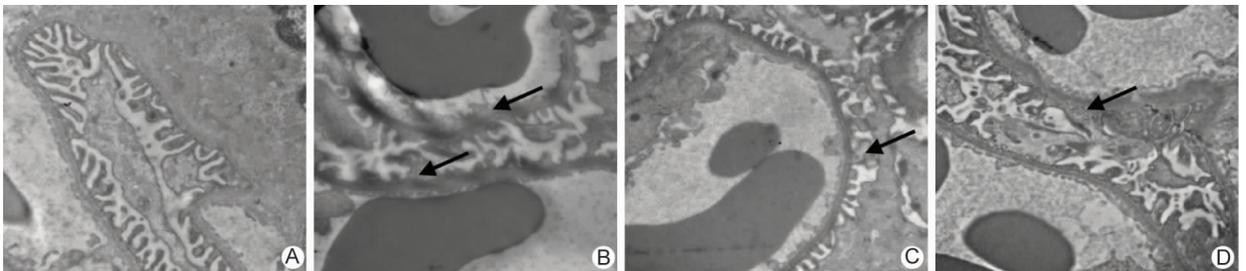
注:A 为正常组;B 为模型组;C 为化瘀通络组;D 为厄贝沙坦组;箭头表示病理改变

图 1 各组大鼠肾组织光镜下病理变化 (HE, $\times 400$)



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为化瘀通络组;D 为厄贝沙坦组;箭头表示病理改变

图 2 各组大鼠肾组织光镜下病理形态 (PAS, $\times 400$)



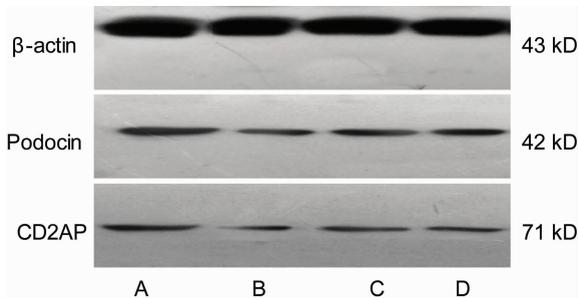
注:A 为正常组;B 为模型组;C 为化瘀通络组;D 为厄贝沙坦组;箭头表示病理改变

图 3 各组大鼠肾组织电镜下病理变化 ($\times 20\ 000$)

表 4 各组大鼠 podocin、CD2AP 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | Podocin/ β -actin | CD2AP/ β -actin |
|------|----|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 正常 | 10 | 0.545 \pm 0.080 | 0.559 \pm 0.083 |
| 模型 | 9 | 0.194 \pm 0.021 * | 0.101 \pm 0.028 * |
| 化痰通络 | 10 | 0.408 \pm 0.025 Δ Δ | 0.431 \pm 0.042 Δ Δ |
| 厄贝沙坦 | 10 | 0.323 \pm 0.034 Δ | 0.314 \pm 0.252 Δ |

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与厄贝沙坦组比较, $\Delta P < 0.05$



注:A为正常组;B为模型组;C为化痰通络组;D为厄贝沙坦组

图 4 各组大鼠 podocin、CD2AP 蛋白表达电泳图

7 各组大鼠肾组织 podocin、CD2AP mRNA 表达(表 5) 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中 Podocin、CD2AP mRNA 表达减少($P < 0.01$);与模型组比较,化痰通络组和厄贝沙坦组肾组织 podocin、CD2AP mRNA 表达增多($P < 0.01$);化痰通络组 CD2AP mRNA 表达高于厄贝沙坦组,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组间 podocin mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 5 各组大鼠 podocin、CD2AP mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | Podocin | CD2AP |
|------|----|----------------------------|-------------------------------------|
| 正常 | 10 | 1 | 1 |
| 模型 | 9 | 0.640 \pm 0.036 * | 0.517 \pm 0.067 * |
| 化痰通络 | 10 | 0.768 \pm 0.042 Δ | 0.811 \pm 0.037 Δ Δ |
| 厄贝沙坦 | 10 | 0.734 \pm 0.039 Δ | 0.761 \pm 0.026 Δ |

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与厄贝沙坦组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

蛋白尿不仅是 DN 的主要临床特征,也是肾损害的独立危险因素^[7]。蛋白尿的产生主要与肾小球滤过屏障有关,足细胞是附着在肾小球基底膜外的高度分化的上皮细胞,是肾小球滤过屏障的主要组成部分,足细胞裂孔膜(slit diaphragm, SD)作为肾小球滤过的最后一道屏障,对蛋白尿的发生起着重要作用^[8]。有研究表明,nephrin-CD2AP-podocin 复合物是构成裂孔膜的关键功能单位,是维持肾小球滤过功能的必

要条件^[9]。

podocin 是一个完整膜蛋白,定位于足突裂孔膜插入足突膜的部位,具有离子通道、信号转导功能,对维持裂孔膜的结构和功能发挥着重要作用。podocin 还可以通过其 C 末端与 CD2AP 的胞内段相互作用,形成脂筏样结构发挥功能复合体的作用^[10]。podocin 除了作为正常足细胞 SD 的一种重要的结构蛋白,也有研究发现 podocin 集中位于足突之间的紧密连接位点上,将紧密连接蛋白与足细胞的肌动蛋白相连,发挥支架作用^[11]。podocin 的多种突变(G92C、V180M、R238S)可干扰 nephrin 在结构上的连接,从而导致足突细胞病变和大量蛋白尿^[12]。CD2AP 是维持 SD 复合体结构及功能的另一种重要蛋白,除直接与 podocin 等多种 SD 蛋白发生作用外,同时还可作为桥接蛋白与细胞骨架蛋白 a-actinin-4 发生联系^[13],以保持足突处于正常状态。CD2AP 可激活磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 蛋白通路而发挥抗足细胞凋亡作用^[14]。CD2AP 蛋白表达失调、功能异常、定位改变均可引起足细胞骨架蛋白异常聚集和分布,与蛋白尿的发生与发展、肾小球的病变有着密切关系^[15]。国外研究报道,CD2AP 基因敲除(CD2AP^{-/-})的小鼠会引起肾脏足细胞足突缺陷、广泛融合、大量蛋白尿,还可以增加肾小球受伤的易感性,从而导致肾小球硬化^[16,17]。CD2AP 的缺陷还可以通过系膜基质的沉积,引起足突融合,导致蛋白尿^[18,19]。

肾小球是多次分支的毛细血管弯曲盘绕构成的毛细血管球,血流阻力大,血管压力高,在高糖、高脂、高黏病理状态下极易形成瘀血阻滞,肾络不通,最终导致肾小球硬化、肾小管萎缩、肾间质纤维化等,故“肾络瘀阻”成为 DN 的基本病机,并贯穿于疾病始终。本实验化痰通络药由川芎、丹参、地龙、全蝎、水蛭组成,该方也是本研究通过长期临床实践和大量动物实验筛选而成。川芎、丹参活血祛瘀,药理研究表明具有降血脂、抑制血栓、抑制血小板聚集、抗血小板活化,改善血液流变学、改善肾脏局部的高凝状态,增强机体抗氧化能力,减轻脂质过氧化损伤,保护肾功能,延缓肾脏纤维化^[20-24]。然久病之邪当属陈积,又居于络。叶天士谓“久则邪正混处其间,草木不能见效,当以虫蚁疏逐”,故加用通络药地龙、水蛭、全蝎以通经达络,剔出邪毒,直达病所,药理研究亦表明虫类通络药在抗凝、改善微循环、保护肾功能等方面具有较好疗效^[25,26]。

本实验结果显示,化痰通络中药可以有效减轻 DN 大鼠尿蛋白,且比厄贝沙坦作用更稳定、更持久;

明显改善 DN 大鼠 BUN 水平,但未表现出明显降糖作用,提示化瘀通络中药并非依赖改善糖代谢紊乱产生治疗效应;化瘀通络中药可以上调 DN 大鼠肾组织裂孔膜 podocin、CD2AP 蛋白和基因的表达,提示化瘀通络中药对 DN 大鼠的肾脏保护机制可能与上调 podocin、CD2AP 的表达有关。综上所述,化瘀通络中药可以降低蛋白尿,保护肾功能,延缓肾脏病理损害的作用,肾脏足细胞裂孔膜蛋白 podocin、CD2AP 可能为其作用靶点之一。当然该实验还存在不足之处,由于实验经费及条件所限,该研究在样本量、检测指标等方面还须进一步完善,以对化瘀通络中药进行更严谨、更科学的全方位研究。

参 考 文 献

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [2] 刘玉宁,陈以平. 糖尿病肾病肾小球硬化症的中医病机探讨[J]. *新中医*, 2003, 35(7): 8-9.
- [3] 徐晶,马二卫,白璐,等. 化瘀通络中药对糖尿病肾病大鼠肾皮质血管紧张素转化酶 2-血管紧张素(1-7)-Mas 轴的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(6): 714-721.
- [4] 潘永梅,陈志强,马贇,等. 活血化瘀通络方对糖尿病肾病大鼠肾脏骨形态蛋白 7 表达的影响[J]. *中医杂志*, 2013, 54(19): 1672-1676.
- [5] Danda RS, Habiba NM, Hernan RC, et al. Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes[J]. *Kidney Int*, 2005, 68(13): 2562-2571.
- [6] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 第 3 版,北京:人民卫生出版社, 2011:1261-1263.
- [7] Keane WF, Lyle PA. Recent advances in management of type 2 diabetes and nephropathy lessons from the RENAAL study[J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41(3): S22-S25.
- [8] Huby AC, Rastaldi MP, Caron K, et al. Restoration of podocyte structure and improvement of chronic renal disease in transgenic mice over-expressing renin[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6721.
- [9] Chiraz El-aouni, Nadja Herbach, Simone M. Blattner, et al. Podocyte biology and response to injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 3005-3015.
- [10] Barison L, Kopp JB. Update in podocyte biology: putting one's best foot forward[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003, 12(3): 251-258.
- [11] Shono A, Tsukaquchi H, Yaoita E, et al. Podocin participates in the assembly of tight junctions between foot processes in nephrotic podocytes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(9): 2525-2533.
- [12] Caridi G, Perfumo F, Ghiggeri GM. NPHS2 (Podocin) mutations in nephrotic syndrome. Clinical spectrum and fine mechanisms[J]. *Pediatrics*, 2005, 115(5 Pt 2): 54R-61R.
- [13] Shaw AS, Miner JH. CD2-associated protein and the kidney[J]. *Curr Nephrol Hypertens*, 2001, 10(1): 19-22.
- [14] Huber TB, Hartleben B, Kim J, et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(14): 4917-4928.
- [15] Löwik MM, Groenen PJ, Pronk I, et al. Focal segmental glomerulosclerosis in a patient homozygous for a CD2AP mutation[J]. *Kidney Int*, 2007, 72(10): 1198-1203.
- [16] Lu C, Ren W, Su XM, et al. CREB and Sp1 regulate the human CD2AP gene promoter activity in renal tubular epithelial cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 474(1): 143-149.
- [17] Kato T, Mizuno-Horikawa Y, Mizuno S. Decreases in podocin, CD2-associated protein (CD2AP) and tensin may be involved in albuminuria during septic acute renal failure[J]. *J Vet Med Sci*, 2011, 73(12): 1579-1584.
- [18] Palmén T, Lehtonen S, Ora A, et al. Interaction of endogenous nephrin and CD2-associated protein in mouse epithelial M-1 cell line[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(7): 1766-1772.
- [19] Shaw AS, Miner JH. CD2-associated protein and the kidney[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001, 10(10): 19-22.
- [20] 司富春,李建省. 中医药治疗糖尿病肾病证型方药分析[J]. *中医研究*, 2010, 23(8): 26-28.
- [21] 杨涓,董江川,李大主,等. 丹参酮 II A 磺酸钠对冠心病患者血小板功能的影响[J]. *中医杂志*, 2013, 54(15): 1294-1296.
- [22] 陆海英,张悦,刘煜敏,等. 丹参酚酸 B 对肾纤维化大鼠肾组织 MMP-2 表达的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2009, 23(2): 55-58.
- [23] 孙伟刚,罗中翔. 丹参多酚酸盐治疗早中期慢性肾衰的临床观察[J]. *甘肃医药*, 2012, 31(6): 443-444.
- [24] 胡英,查艳,颜晓勇. 丹参多酚酸盐治疗早期慢性肾衰竭及对血浆 ET-1 和 CGRP 水平的影响[J]. *贵州医学杂志*, 2011, 35(6): 502-504.
- [25] 陈笛,远方. 虫类药在慢性肾脏病中的治疗[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(7): 167-168.
- [26] 毕礼明,马济佩. 虫类药在糖尿病肾病中的应用[J]. *中医杂志*, 2010, 51(11): 1051-1053.

(收稿:2015-08-23 修回:2016-03-11)