

加味升降散对糖尿病大鼠足细胞 nephrin、podocin 蛋白表达的影响

张社峰¹, 杨辰华¹, 王沛人²

1. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004; 2. 河南省中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450003

[摘要] 目的: 加味升降散对糖尿病大鼠足细胞肾小球细胞黏附分子受体抗原(nephrin)、肾小球足细胞跨膜蛋白(podocin)表达的影响, 探讨其肾脏保护机制。方法: 60只雄性成年SD大鼠随机分为空白组、模型组、培哚普利组、低剂量中药组和高剂量中药组。采用大鼠左侧切除左肾手术+高脂高糖饲料+链脲佐菌素(Streptozocin, STZ)法制备糖尿病大鼠模型。高剂量中药组大鼠给予27 g/(kg·d)加味升降散灌胃, 低剂量中药组大鼠给予9 g/(kg·d)加味升降散灌胃, 培哚普利组大鼠给予0.48 mg/(kg·d)(溶于2 mL的CMC-Na溶液)培哚普利灌胃。空白组和模型组给予等体积生理盐水灌胃。观察大鼠一般状况, 应用考马斯亮蓝法监测24 h尿蛋白定量, 应用全自动生化分析仪检测肾功能、血糖。光镜下观察大鼠肾脏病理学变化, 免疫组织化学法观察nephrin、podocin蛋白在肾脏组织的分布及表达情况。结果: 与空白组比较, 模型组血糖、血肌酐(Serum creatinine, SCr)、血尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)、24 h尿蛋白均升高($P < 0.01$), nephrin、podocin蛋白表达均下降($P < 0.01$); 与模型组比较, 培哚普利组及低、高剂量加味升降散血糖、SCr、BUN、24 h尿蛋白均下降($P < 0.01$); 培哚普利组、低剂量中药组、高剂量中药组nephrin、podocin蛋白表达水平均有不同程度上调($P < 0.05$), 其中高剂量中药组nephrin、podocin蛋白表达水平上调最为显著。结论: 加味升降散能有效改善糖尿病大鼠肾功能, 减少蛋白尿, 改善肾小球硬化等, 其途径可能与加味升降散上调大鼠足细胞nephrin、podocin蛋白表达水平, 减轻大鼠足细胞损伤有关。

[关键词] 糖尿病; 加味升降散; 足细胞; nephrin; podocin; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 03-0071-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.03.022

Modified Shengjiang Powder Has Effect on Protein Expression of Nephrin and Podocin in Podocytes of Diabetic Rats

ZHANG Shefeng, YANG Chenhua, WANG Peiren

Abstract: **Objective:** To discuss the effect of modified Shengjiang powder on the expression of glomerular cell adhesion molecule receptor antigen(nephrin) and glomerular podocyte transmembrane protein(podocin) in podocytes of diabetic rats, and to investigate its protection mechanism for kidney. **Methods:** Sixty male adult SD rats were randomly divided into the blank group, the model group, the perindopril group, the low-dose Chinese medicine group and the high-dose Chinese medicine group. Diabetic rat models were established through the nephrectomy on the left kidney, high-fat and high-sugar diets and Streptozotocin(STZ). The high-dose Chinese medicine group was treated with 27 g/(kg·d) modified Shengjiang powder; the low-dose Chinese medicine group was treated with 9 g/(kg·d) modified Shengjiang powder; the perindopril group was given 0.48 mg/(kg·d)(dissolved in 2 mL CMC-Na solution) perindopril by gavage; the blank group and the model group were administered with the same volume of saline by gavage. The general situation of rats were observed, the 24-hour urine protein was monitored by Coomassie Brilliant Blue Method, and the kidney function and blood glucose were detected by automatic biochemistry analyzer. The pathological changes in kidneys of rats under light microscope and the distribution and expression of nephrin and podocin in kidney tissues by immunohistochemistry were observed. **Results:** Compared with those in the blank group, the blood glucose, the serum creatinine(SCr), the blood urea nitrogen(BUN) and the 24-hour urinary protein in the model group were increased($P < 0.01$), the protein expression levels of nephrin and podocin were all decreased($P < 0.01$). Compared with those in the model group, the blood glucose, SCr, BUN and 24-hour urinary protein in the perindopril group and the low-dose and high-dose Chinese medicine groups were decreased($P < 0.01$). The

[收稿日期] 2018-08-24

[基金项目] 河南省科技厅科技攻关项目(162102310374); 河南省省属科研机构预研专项(201704570)

[作者简介] 张社峰(1979-), 男, 副主任医师, 研究方向: 中医药防治糖尿病及其并发症。

protein expression levels of nephrin and podocin in the perindopril group and in the low-dose and high-dose Chinese medicine groups were all increased to some extent ($P < 0.05$), and those in the high-dose Chinese medicine group were increased most significantly. **Conclusion:** Modified Shengjiang powder can effectively improve the kidney function, reduce proteinuria and improve glomerulosclerosis in diabetic rats, whose mechanism may be by increasing the expression levels of nephrin and podocin in podocytes and alleviating podocyte injury in rats.

Keywords: Diabetes; Modified Shengjiang powder; Podocytes; Nephrin; Podocin; Animal experiments; Rats

糖尿病肾病是指由糖尿病所致的慢性肾脏病(Chronic kidney disease, CKD)。我国 20%~40%的糖尿病患者合并糖尿病肾病,糖尿病现已成为 CKD 和终末期肾病的主要原因^[1]。CKD 的特征表现是蛋白尿。已有研究显示足细胞功能和结构损伤是引起 CKD 蛋白尿的重要原因^[2],裂孔隔膜是肾小球滤过屏障中最主要的部位,可以阻断绝大部分蛋白质漏出到原尿中,与蛋白尿密切相关,足细胞损伤的重要标志是裂孔隔膜蛋白分子减少,肾小球细胞黏附分子受体抗原(nephrin)、肾小球足细胞跨膜蛋白(podocin)是足细胞裂孔隔膜的标志蛋白,这 2 种蛋白表达水平的降低是足细胞损伤的重要标志,其异常表达与糖尿病肾病的发生发展密切相关^[3-6]。升降散首见于明代医家张鹤腾的《伤暑全书》,后经清代医家杨栗山在《伤寒瘟疫条辨》发挥运用,成温病名方。全方主要由僵蚕、蝉蜕、姜黄、大黄等 4 味药组成,经后世医家灵活化裁,广泛应用于各种内伤外感杂病的治疗。回顾近年研究成果发现,升降散对急、慢性肾小球肾炎,紫癜性肾炎,肾病综合征,糖尿病肾病,慢性肾功能衰竭的治疗均有一定的疗效^[7]。本实验通过链脲佐菌素(Streptozocin, STZ)致糖尿病大鼠肾病模型,研究加味升降散对糖尿病大鼠肾脏足细胞的保护作用并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性健康大鼠 60 只,体质量 200~220 g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,动物合格证号:SCXK(鲁)2014-0007。动物饲养期间自由摄食、饮水。动物饲养房温度为(25±2)℃,湿度(60±5)% ,室内光线充足并通风。

1.2 试验药物 加味升降散所用中药材均由河南省中医药研究院制剂室提供,主要药物有黄芪 60 g,红花、蝉蜕、姜黄各 24 g,僵蚕 30 g,酒大黄 20 g,经生药化学鉴定均为正品。取上述中药材,常规水煎煮 3 次后将药液合并过滤,60℃水浴浓缩得到总生药浓度为 1.5 g/mL 药液,4℃保存备用。

1.3 主要仪器与试剂 兔抗鼠多克隆 podocin 抗体、兔抗鼠多克隆 nephrin 抗体、光学显微镜(郑州博奥森生物科技有限公司);Nephrin 抗体稀释液(南昌博奥森生物科技有限公司);显微镜(日本奥林巴斯公司);STZ(美国 SIGMA 公司,批号:100K2016523);培哌普利片(天津施维雅制药有限公司);血糖仪、血糖试纸(中国强生有限公司)。

1.4 动物分组、模型制备及给药方法 60 只雄性成年 SD 大鼠适应性饲养 1 周,随机分为空白组、模型组、培哌普利组、低剂量中药组和高剂量中药组,每组 12 只。空白组不进行任何操作,其余各组行左侧肾切除术+高脂高糖饲料+STZ 法造模^[8]。具体方法为用高脂高糖饲料喂养大鼠 4 周后开始造模,造模前大鼠禁食 12 h,进行切除左肾手术,术后立即腹腔注射青霉素 20 万单位,连续腹腔给药 3 天,并酌情处理,腹腔内一次性注射小剂量 30 mg/kg STZ。造模 72 h 后测空腹血糖,以后每隔 3 天测 1 次血糖,随机血糖不到 16.7 mol/L 者予以剔除,2 周后测定造模大鼠 24 h 尿蛋白量,其值高出造模前 150%即为造模成功。术中及术后 5 只大鼠因感染致死。模型组、培哌普利组、低剂量中药组、高剂量中药组大鼠数量分别为 11、11、10、11。高剂量中药组大鼠给予 27 g/(kg·d)加味升降散灌胃,低量中药组大鼠给予 9 g/(kg·d)加味升降散灌胃,培哌普利组大鼠给予 0.48 mg/(kg·d)(溶于 2 mL 的 CMC-Na 溶液)培哌普利灌胃。空白组和模型组给予等体积生理盐水灌胃。连续 4 周。

1.5 观察指标与方法 ①用考马斯亮蓝法监测 24 h 尿蛋白定量。②水合氯醛麻醉大鼠,腹腔静脉取血,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,应用全自动生化分析仪检测肾功能、血糖。③组织学测定,每只大鼠取肾脏(右侧肾脏)后,4%多聚甲醛溶液甲醛固定,24 h 更换 1 次多聚甲醛溶液,按照病理技术规范要求脱水、石蜡包埋并制成蜡块,HE 染色后,置光镜下观察病理变化。④免疫组织化学法观察 nephrin、podocin 蛋白在肾脏组织的分布及表达情况。

1.6 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件对数据结果进行统计学处理,数据结果均用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况及体质量结果比较 空白组大鼠精神状态良好,毛色有光泽,反应敏捷,有活力;模型组大鼠精神萎靡,反应迟钝,形体消瘦,拱背蜷缩,毛发枯暗,多尿;与模型组比较,培哌普利组、低剂量中药组、高剂量中药组大鼠精神状态、毛色、反应及活力均改善,其中高、低剂量中药组改善较明显。见表 1。与空白组比较,模型组大鼠体质量明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,培哌普利组及高、低剂量中药组大鼠体质量均明显增加($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠血糖、SCr、BUN及24h尿蛋白水平比较 见表1。与空白组比较,模型组大鼠血糖、SCr、BUN、24h尿蛋白均显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,高、低剂量中

药组,培哌普利组大鼠血糖、SCr、BUN、24h尿蛋白均下降($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠体质量、血糖、SCr、BUN及24h尿蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量(g)	血糖(mmol/L)	SCr($\mu\text{mol/L}$)	BUN(mmol/L)	24h尿蛋白(mg)
空白组	12	452.75 ± 29.91	5.43 ± 0.45	38.00 ± 6.64	6.42 ± 1.16	6.83 ± 1.34
模型组	11	306.78 ± 26.80 ^①	22.42 ± 3.04 ^①	78.12 ± 7.38 ^①	12.90 ± 6.10 ^①	26.35 ± 1.71 ^①
培哌普利组	11	358.62 ± 24.69 ^②	17.27 ± 4.37 ^②	57.36 ± 6.25 ^②	12.45 ± 3.80 ^②	19.31 ± 2.51 ^②
低剂量中药组	10	379.36 ± 27.37 ^②	19.04 ± 3.25 ^②	54.58 ± 6.18 ^②	10.44 ± 2.64 ^②	17.25 ± 2.96 ^②
高剂量中药组	11	388.43 ± 23.33 ^②	18.68 ± 3.17 ^②	49.78 ± 6.92 ^②	11.98 ± 4.58 ^②	14.83 ± 2.12 ^②

与空白组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.01$

2.3 各组大鼠肾脏病理改变结果比较 见图1。空白组大鼠肾脏组织细胞基本正常,模型组大鼠可见肾小球增大,肾小球基底膜增厚,肾小球硬化,肾小管肿胀,管腔变窄,肾间质可

见结缔组织增生,炎性细胞浸润。培哌普利组和低、高剂量中药组大鼠肾组织病理改变较模型组有不同程度的改善,其中高剂量中药组改善较明显。

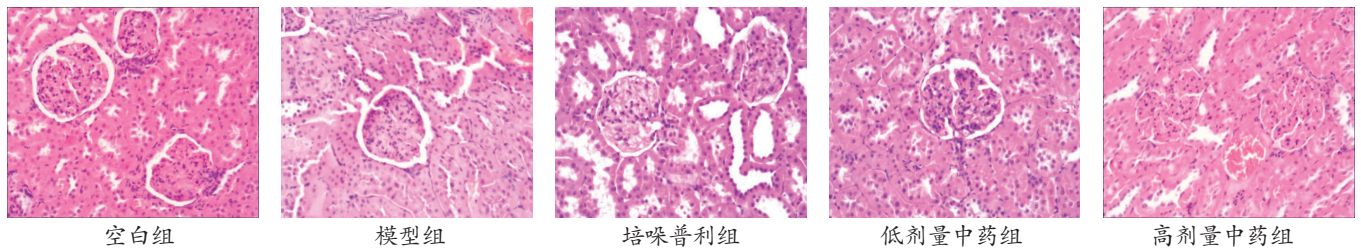


图1 各组大鼠肾脏病理改变结果比较(HE染色, ×200)

2.4 空白组大鼠肾脏nephrin、podocin蛋白表达分布 见图2。油镜下空白组大鼠肾组织可见nephrin蛋白的染色呈棕褐色,线状分布于基底膜的足细胞裂空隔膜与足突之间;podocin蛋白染色呈棕褐色,均匀分布于肾小球基底膜足细胞的胞膜上。

表2 各组大鼠肾脏nephrin、podocin蛋白表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	nephrin	podocin
空白组	12	3.43 ± 0.18	4.22 ± 0.43
模型组	11	2.23 ± 0.21 ^①	3.43 ± 0.32 ^①
培哌普利组	11	2.69 ± 0.17 ^②	3.92 ± 0.37 ^②
低剂量中药组	10	2.78 ± 0.21 ^②	4.03 ± 0.31 ^②
高剂量中药组	11	2.94 ± 0.18 ^②	4.07 ± 0.33 ^②

与空白组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.05$

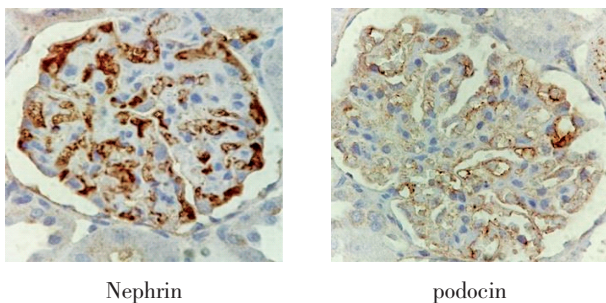


图2 空白组大鼠肾脏nephrin、podocin蛋白表达分布(×1000)

2.5 各组大鼠肾脏nephrin、podocin蛋白表达结果比较 见表2。与空白组比较,模型组nephrin、podocin蛋白表达下调($P < 0.01$);与模型组比较,培哌普利组、低剂量中药组、高剂量中药组nephrin、podocin蛋白表达均有不同程度上调($P < 0.05$),其中高剂量中药组上调最为显著。

3 讨论

糖尿病肾病的主要临床表现是蛋白尿、高血压、进行性肾功能损伤,发病机制至今尚未完全阐明,病因复杂,治疗尚无理想药物。目前认为CKD主要与糖脂代谢紊乱、肾小球血流动力学改变、氧化应激、炎症及遗传等多因素相关,涉及多种细胞因子和信号传导通路,通过各自作用及相互交叉作用共同导致糖尿病肾病的发生、发展^[9]。Shakeel M^[10]发现足细胞损伤是糖尿病肾病进展的核心事件,在糖尿病肾病的发生发展过程中足细胞损伤是重要原因,在糖尿病肾病早期,就会出现足细胞足突消失、融合,随着糖尿病病程进展,足细胞的叠加损伤可导致足细胞凋亡与脱落、肾小球滤过屏障功能障碍、大量蛋白尿、肾功能进行性恶化^[11]。已有研究表明,糖尿病肾病足细

胞损伤的相关因素主要有高糖刺激下氧化应激导致足细胞功能紊乱, 线粒体功能障碍导致的足细胞减少、足细胞收缩和足突融合, 白细胞介素-1 β 炎症因子的表达上调参与足细胞损伤, 足细胞线粒体自噬受到抑制加重足细胞损伤^[12-15]。综上, 足细胞结构和功能的稳定与糖尿病肾病紧密相关, 足细胞损伤是发生糖尿病肾病蛋白尿的始动因素, 也是糖尿病肾病进展恶化的关键因素。因此, 修复足细胞损伤是修复肾小球滤过屏障的关键环节、有助于减轻糖尿病肾脏损伤, 从而成为治疗糖尿病肾病的靶点。足细胞损伤的重要标志是裂孔隔膜蛋白分子减少, nephrin 蛋白和 podocin 蛋白的表达水平可反应足细胞损伤程度。

糖尿病肾病属中医学“肾消”“水肿”“关格”“癃闭”“尿浊”等范畴, 主要病机是郁、热、虚、损, 治疗多从散郁、解毒、扶正、修损治疗。近年来一些随机对照试验分析结果显示, 中医药治疗糖尿病肾病有一定优势^[16]。临床实践证实, 中医学补气、化痰、解毒法是治疗糖尿病肾病的有效补充, 对于降低尿蛋白、空腹血糖、改善胰岛素抵抗作用尤其明显, 这些临床研究为中医药治疗糖尿病肾病的理论和实践提供了依据^[17-18]。受刘完素“玄府气液理论”启发, 我们认为糖尿病肾病是在郁、热、虚、损复杂因素下导致的玄府开阖失司, 气液失宣, 清气不升, 浊气不降, 治疗关键在于恢复玄府开阖功能, 顺畅气液流通, 则疾病自愈。刘完素主张辛味药“开发郁结, 宣通气液”, 十分注重辛味药的运用, 临证治疗糖尿病肾病时加用辛味药往往能取得满意的功效^[19]。升降散方中僵蚕咸性平, 气味俱薄, 轻浮而升, 善能升清散火, 祛风除湿, 清热解郁, 为阳中之阳。蝉蜕甘咸性寒, 升浮宣透, 可清热解表, 宣毒透达, 为阳中之阴。姜黄气辛味苦性寒, 善能行气活血解郁, 畅达气机; 大黄苦寒降泄, 通腑逐瘀, 擅降浊阴, 推陈致新。本方取僵蚕、蝉蜕, 以升阳中之清阳; 姜黄、大黄, 以降阴中之阴, 一升一降, 内外通和, 而杂气流毒顿消。近年来有关升降散治疗肾脏疾病的报道逐年增多, 已从单例疗效逐渐走向多病例大样本临床观察^[20-21]。升降散的作用机制研究结果提示抗炎活性可能是其临床疗效的药理学基础之一^[22]。我们结合糖尿病肾病“郁、热、虚、损”4大因素, 以升降散为祖方, 组方加味升降散(由黄芪、红花、僵蚕、蝉蜕、姜黄、酒大黄组成)治疗糖尿病肾病, 有补气开郁、化痰解毒、宣通气液、升清降浊之功。

本研究发现加味升降散可以有效降低模型大鼠的血糖、SCr、BUN、24 h 尿蛋白排泄; 镜下可见肾小球基底膜、肾小球硬化、肾小管肿胀、肾间质结缔组织增生、炎性细胞浸润等病理学改变有明显改善, 其中高剂量加味升降散组疗效最佳。同时, 本研究结果提示, 造模后各组大鼠足细胞 nephrin、podocin 蛋白表达明显下调, 培哌普利及低、高剂量加味升降散均能显著上调大鼠足细胞 nephrin、podocin 蛋白表达, 减轻糖尿病大鼠足细胞损伤, 高剂量加味升降散组效果更为显著。

可见加味升降散能有效改善糖尿病大鼠肾功能, 减少蛋白尿, 改善肾小球硬化等, 其药效途径可能与加味升降散上调足细胞 nephrin、podocin 蛋白表达水平, 减轻足细胞损伤有关, 但其具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南[J]. 中国实用内科学杂志, 2018, 38(4): 318-320.
- [2] 曹延萍, 王莎, 刘杰, 等. 线粒体凋亡途径在高糖刺激的小鼠足细胞凋亡中的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2013, 29(3): 244-246.
- [3] Cooper ME, Mundel P, Boner G. Role of nephrin in renal disease including diabetic nephropathy[J]. Semin Nephrol, 2002, 22(5): 393-398.
- [4] Akhtar MA, Mana H. Molecular basis of proteinuria[J]. Adv Anat Pathol, 2004, 11(6): 304-309.
- [5] White KE, Bilous RW. Diabiopsies Study Group Structural alterations to the podocyte are related to proteinuria in type 2 diabetic patients[J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(6): 1437-1440.
- [6] 李志杰, 张悦. 黄芪多糖对早期糖尿病肾病大鼠足细胞 nephrin 和 podocin 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(9): 1772-1776.
- [7] 刘蕊, 于俊生. 升降散治疗肾脏病的研究进展[J]. 新疆中医药, 2016, 34(2): 72-74.
- [8] 高苹, 贾汝汉. 2型糖尿病肾病大鼠模型的建立[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(6): 316-319.
- [9] 关欣, 郑红光. 细胞因子在糖尿病肾病发病中的作用[J]. 中国实用内科杂志, 2005, 25(3): 268.
- [10] Shakeel M. Recent advances in understanding the role of oxidative stress in diabetic neuropathy[J]. Diabetes Metab Syndr, 2015, 9(4): 373-378.
- [11] Denhez B, Geraldine P. Regulation of nephrin phosphorylation in diabetes and chronic kidney injury[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 966(22): 149-161.
- [12] Bhatti AB, Usman M. Drug targets for oxidative podocyte injury in diabetic nephropathy[J]. Cureus, 2015, 7(12): 393.
- [13] Wan J, Li P, Liu DW, et al. GSK-3 β inhibitor attenuates urinary albumin excretion in type 2 diabetic db/db mice, and delays epithelial-to-mesenchymal transition in mouse kidneys and podocytes[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(2): 1771-1784.
- [14] Betteieb A, Koike S, Chahed S, et al. Podocyte-specific soluble epoxide hydrolase deficiency in mice attenuates

- acute kidney injury[J]. FEBS J, 2017, 284(13): 1970–1986.
- [15] Li W, Du M, Wang Q, et al. FoxO1 promotes mitophagy in the podocytes of diabetic male mice via the PINK1/Parkin pathway[J]. Endocrinology, 2017, 158(7): 2155–2167.
- [16] Liu X, Liu L, Chen P, et al. Clinical trials of traditional Chinese medicine in the treatment of diabetic nephropathy—a systematic review based on a subgroup analysis[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(2): 810–819.
- [17] 段昱方, 蔡朕, 赵文景, 等. 改良保肾方 II 号治疗糖尿病肾病临床观察[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(6): 66–68.
- [18] 庄严, 刘敏, 罗春艳, 等. 温阳益气活血化痰治疗糖尿病肾病 IV 期临床研究[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(19): 182–183.
- [19] 张社峰, 杨辰华. 辛味通玄对糖尿病肾病 24h 尿微量白蛋白及超敏 C 反应蛋白的影响[J]. 中医药临床杂志, 2016, 28(3): 366–368.
- [20] 刘翠豹. 加味升降散联合西药治疗糖尿病肾病对照观察[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(9): 46–47.
- [21] 李雪梅, 马秀琴, 张守来, 等. 补阳还五汤合升降散对糖尿病肾病的疗效观察[J]. 四川中医, 2011, 29(12): 58–59.
- [22] 刘文军, 薛燕星. 升降散的现代药理机制研究进展[J]. 北京中医药, 2012, 31(12): 939–943.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)