

本文引用: 徐文峰, 何泽云, 李旭华, 孙 丽, 唐 群, 彭亚军, 陈海莺. 六味地黄汤对阿霉素肾病小鼠尿蛋白及肾小球 p-p38 MAPK、 α -actinin-4、synaptopodin 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(7): 1152-1159.

六味地黄汤对阿霉素肾病小鼠尿蛋白及肾小球 p-p38 MAPK、 α -actinin-4、synaptopodin 的影响

徐文峰^{1*}, 何泽云¹, 李旭华¹, 孙 丽³, 唐 群², 彭亚军¹, 陈海莺¹

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208;

3. 银川市中医医院, 宁夏 银川 750000

【摘要】目的 探讨六味地黄汤对阿霉素肾病(adriamycin nephropathy, ADRN)小鼠尿蛋白的干预作用及可能机制。方法 30只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠随机选取 5 只为空白组, 余下小鼠以单次尾静脉注射阿霉素(0.01 g·kg⁻¹)复制 ADRN 模型, 2 周后将造模成功的小鼠随机分为模型组、贝那普利组及低、中、高剂量六味地黄汤组, 每组 5 只。空白组、模型组予等体积注射用水灌胃, 贝那普利组予 0.0013 g·kg⁻¹ 贝那普利灌胃, 低、中、高剂量六味地黄汤组分别予 9.75、19.5、39 g·kg⁻¹ 六味地黄汤灌胃, 每日 1 次, 连续 8 周。自动生化仪检测小鼠 24 h 尿蛋白定量、血清白蛋白、血清肌酐、血清钾; HE 染色法、电镜观察小鼠肾脏病理改变及足突形态; 免疫组织化学法、Western bolt 检测小鼠肾脏磷酸化 p38 MAPK(phosphorylated p38 MAPK, p-p38 MAPK)、 α -辅肌动蛋白-4(α -actinin-4)、突触孔蛋白(synaptopodin)的表达; RT-PCR 检测小鼠肾脏 α -actinin-4, synaptopodin mRNA 表达。结果 与空白组比较, 模型组小鼠体质量、24 h 尿量、血清白蛋白降低, 24 h 尿蛋白定量升高($P<0.05$); 肾小球系膜细胞增生, 部分系膜区扩大、肾小管管型, 间质可见炎性细胞浸润, 足突广泛融合; α -actinin-4 蛋白及 mRNA、p-p38 MAPK 蛋白表达升高($P<0.05$), synaptopodin 蛋白及 mRNA 表达降低($P<0.05$)。与模型组比较, 各干预组病理改变及足突融合均得到不同程度改善, 贝那普利组及中、高剂量六味地黄汤组 24 h 尿蛋白定量减少, 高剂量六味地黄汤组 p-p38 MAPK 蛋白表达降低($P<0.05$), 低、中、高剂量六味地黄汤组 synaptopodin 蛋白及 mRNA 表达均升高($P<0.05$)。贝那普利组及低、中、高剂量六味地黄汤组间比较, 各指标差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 六味地黄汤可能通过抑制 p38 MAPK 通路活化和上调 α -actinin-4, synaptopodin 蛋白及 mRNA 表达, 改善肾脏病理及足突融合, 减轻足细胞损伤, 减少 ADRN 小鼠尿蛋白。

【关键词】 阿霉素肾病; 六味地黄汤; 尿蛋白; p-p38 MAPK; α -辅肌动蛋白-4; 突触孔蛋白

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.07.002

Effects of Liuwei Dihuang Decoction on urine protein and glomerular p-p38 MAPK, α -actinin-4, and synaptopodin in mice with adriamycin nephropathy

XU Wenfeng^{1*}, HE Zeyun¹, LI Xuhua¹, SUN Li³, TANG Qun², PENG Yajun¹, CHEN Haiying¹

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Yinchuan Traditional Chinese Medicine Hospital, Yinchuan, Ningxia 750000, China

【Abstract】 Objective To investigate the intervention effects of Liuwei Dihuang Decoction (LWDHD) on urine protein in mice with adriamycin nephropathy (ADRN) and its possible mechanism. Methods Five of 30 SPF-grade male C57BL/6 mice were randomly

【收稿日期】2023-11-08

【基金项目】湖南省中医重点专科项目(czxm-sbk-2023001); 湖南省教育厅优秀项目(20B432); 湖南省卫生健康委科研计划资助项目(202103050979); 长沙市自然科学基金项目(kq2014220); 湖南中医药大学校级科研基金(2018XJJ36)。

【通信作者】* 徐文峰, 男, 博士, 副主任医师, E-mail: yzmango@163.com。

selected as the blank group, and the remaining mice were injected with adriamycin ($0.01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) via the tail vein to replicate the ADRN model. Two weeks later, the successfully modeled mice were randomized into the model group, the benazepril group, and the low-, medium-, and high-dose LWDHD groups, with 5 mice in each group. The blank and model groups were given an equal volume of water for injection by gavage. The benazepril group was given $0.001 \text{ 3 g}\cdot\text{kg}^{-1}$ benazepril by gavage, while the low-, medium-, and high-dose LWDHD groups were given 9.75, 19.5, and $39 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LWDHD by gavage respectively, once a day for 8 consecutive weeks. Automatic biochemical analyzer was used to check the 24-hour urine protein quantification, and the serum levels of albumin, creatinine, and potassium in mice. HE staining and electron microscopy were used to observe renal pathological changes and foot process morphology. Immunohistochemistry and Western blot were used to examine the expressions of phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK), α -actin-4, and synaptopodin proteins in mice kidneys. RT-PCR was used to examine the expressions of α -actin-4 and synaptopodin mRNA in mice kidneys. **Results** Compared with the blank group, the body weight, 24-hour urine volume, and serum albumin level of the model group decreased, while the 24-hour urine protein quantification increased ($P<0.05$); hyperplasia of glomerular mesangial cells, partial mesangial area expansion, renal tubular protein casts, and interstitial inflammatory cell infiltration were observed, with extensive fusion of foot processes; the expressions of α -actin-4 protein and mRNA, and p-p38 MAPK protein increased ($P<0.05$), while the expressions of synaptopodin protein and mRNA decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the pathological changes and foot process fusion in each intervention group were improved to varying degrees. The quantitative reduction of 24-hour urine protein was observed in the benazepril group as well as the medium- and high-dose LWDHD groups. The expression of p-p38 MAPK protein decreased in the high-dose LWDHD group ($P<0.05$), while the expressions of synaptopodin protein and mRNA increased in the low-, medium-, and high-dose LWDHD groups ($P<0.05$). There was no statistically significant difference in various indicators among benazepril group and the low-, medium-, and high-dose LWDHD groups ($P>0.05$). **Conclusion** LWDHD may relieve renal pathological changes and foot process fusion, alleviate foot cell damage, and reduce urine protein in mice with ADRN, by inhibiting the activation of the p38 MAPK pathway and upregulating the protein and mRNA expressions of α -actin-4 and synaptopodin.

[**Keywords**] Liuwei Dihuang Decoction; proteinuria; p-p38 MAPK; α -actin-4; synaptopodin

世界卫生组织《2019年全球卫生估计报告》,全球十大死亡原因排序,肾脏疾病已从2000年世界第13位上升至第10位,预计2040年肾脏疾病将成为全球第五大死因。蛋白尿是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的常见临床表现,也是CKD进展的独立危险因素之一,足细胞损伤是其发生的核心环节^[1-2]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)亚家族p38 MAPK通路的活化与足细胞损伤、足突融合和蛋白尿的发生相关^[3],磷酸化p38 MAPK (phosphorylated p38 MAPK, p-p38 MAPK)是p38 MAPK信号通路中的关键分子。 α -辅肌动蛋白-4(α -actinin-4)、突触孔蛋白(synaptopodin)是重要的足细胞骨架蛋白,两者表达异常参与足突融合介导的足细胞损伤。

中医学无“蛋白尿”论述,多数学者认为蛋白质属精微物质,“肾主封藏”理论源于《素问·六节藏象论》,其中载:“肾者,主蛰,封藏之本,精之处也,故肾主藏精,宜藏不宜泄”。足细胞损伤与肾失封藏均可见蛋白尿,本课题组认为足细胞是“肾失封藏、精微外泄”的微观结构基础。六味地黄汤滋阴补肾,是临床治疗慢性肾脏病的有效方剂,课题组前期研究显示其可降低肾病模型大鼠蛋白尿水平。目

前,从p38 MAPK通路活化及足细胞骨架蛋白角度研究六味地黄汤减轻尿蛋白的研究相对较少,本研究拟从足突融合角度观察六味地黄汤对足细胞损伤的干预作用,初步探讨六味地黄汤减少阿霉素肾病(adriamycin nephropathy, ADRN)小鼠尿蛋白的分子机制。

1 材料

1.1 动物

30只SPF级雄性C57BL/6小鼠,4~6周,体重27~35g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0004,饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心SPF级小鼠动物房,每笼5只,普通饲料喂养,自由饮水,隔日更换垫料。本实验经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(编号:ZYFY20180616-07),符合实验动物福利与伦理原则。

1.2 主要药物与试剂

六味地黄汤超微颗粒(熟地黄24g,山药12g,山茱萸12g,泽泻9g,茯苓9g,牡丹皮9g)购于湖南中医药大学第一附属医院门诊中药房。注射

用水加热后溶解中药超微颗粒,水浴恒温器浓缩 $1.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (每毫升药液含生药 1.5 g),离心后高压灭菌, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。注射用盐酸多柔比星(阿霉素,深圳万乐药业有限公司, $10\text{ mg}/\text{支}$)购自湖南中医药大学第一附属医院门诊西药房, 1 支 溶解于注射用水 5 mL 中,每毫升药液含 2 mg 阿霉素。贝那普利片剂(上海新亚药业闵行有限公司, $10\text{ mg}/\text{片}$)购自湖南中医药大学第一附属医院门诊西药房。苏木精(货号:H8070,北京索莱宝科技有限公司);曙红 Y[醇溶,货号:A600190,生工生物工程(上海)股份有限公司];p-p38 MAPK(货号:WL03428,沈阳万类生物科技有限公司); α -actinin-4(货号:Bs-1741R,北京博奥森生物技术有限公司);synaptopodin(货号:WL04397,沈阳万类生物科技有限公司);HRP 标记山羊抗兔 IgG(货号:#31460,赛默飞世尔科技公司);DAB 显色液(货号:DAB-1031,福州市迈新生物技术开发公司);全蛋白提取试剂盒(货号:WLA019,沈阳万类生物科技有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:WLA004,沈阳万类生物科技有限公司); β -actin(货号:WL01372,沈阳万类生物科技有限公司)等。

1.3 主要仪器

QH01-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);RM22354 型石蜡切片机(德国莱卡公司);7170 型自动化分析仪、H-600 型透射电镜(日本日立公司);NW10LVF 型超纯水系统(力康生物医疗科技控股有限公司);H-2050R 型超速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Exicycler 96 型荧光定量 PCR 仪(韩国 BIONEER 公司);DYY-7C 型电泳仪、DYCZ-40D 型电泳槽、WD-9413B 型凝胶成像系统(北京六一生物科技有限公司);ELX-800 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);BX53 型显微镜、DP73 型显微镜拍照系统(日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模

30 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周,弃去尿蛋白试纸阳性小鼠,以体质量编号,采用随机数字表法分为空白组(5 只,不做处理)、造模组(25 只,尾静脉注射阿霉素)。2 周后将造模成功小鼠分为模型组、贝那普利组、低剂量六味地黄汤组(低六味组)、中剂量六味地黄汤组(中六味组)及高剂量六味地黄汤组(高六味组),每组 5 只。

ADRN 小鼠模型的制备参考前期工作基础^[4]:以温水纱布包裹造模组小鼠的鼠尾 45 s ,再以 75%乙醇反复擦拭小鼠尾静脉,消毒并使其充盈,以 $0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量一次性尾静脉注射阿霉素,注射后快速抽出针头,无菌纱布按压针孔少许,防止药液外渗,2 周后小鼠尿蛋白试纸阳性为模型复制成功。

2.2 动物给药

参照《中药药理研究方法学》^[5]中动物与人体表面积等效剂量比值表,根据 60 kg 成人的用量,结合“小鼠药量=成人剂量 $\times 0.0026$ ”、临床药量及预实验结果换算出小鼠等效剂量,贝那普利组($0.001\text{ 3}\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)及低、中、高六味组(9.75 、 19.5 、 $39\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),空白组、模型组以等体积注射用水灌胃,每日 1 次,连续灌胃 8 周。8 周末将小鼠放入代谢笼,收集 24 h 尿液,称重,以 3%戊巴比妥钠麻醉小鼠后心脏取血,分离血清 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存,肾脏标本 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

2.3 指标检测及方法

2.3.1 观察小鼠的一般情况 观察小鼠精神状态、活动度、体质量、尿量、粪便性状、背毛色泽等。

2.3.2 检测小鼠血、尿生化指标 小鼠血液、尿液标本以自动化分析仪检测 24 h 尿蛋白定量、血清白蛋白、肾功能、血钾等。

2.3.3 HE 染色法观察小鼠肾组织形态学改变 肾组织以 4%多聚甲醛固定 24 h ,石蜡包埋,肾组织切片脱蜡至水,依次进行苏木精染色、伊红染色、脱水封片,光镜下观察拍照,选择视野观察肾小球、肾小管、肾间质等形态及肾间质有无炎性细胞浸润。

2.3.4 透射电镜观察小鼠足细胞足突超微结构 取新鲜肾皮质组织剪成 1 mm^3 的组织块, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2.5%戊二醛固定 2 h , $0.1\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 磷酸缓冲液 PBS ($\text{pH}=7.4$)漂洗 3 次,1%锇酸室温固定 2 h ,然后依次脱水、渗透、包埋、切片、染色后透镜下观察足细胞足突超微结构。

2.3.5 免疫组织化学法检测肾脏 p-p38 MAPK、 α -actinin-4、synaptopodin 蛋白阳性表达 肾组织蜡块切片,厚度约 $4\text{ }\mu\text{m}$,依次脱蜡至水,抗原热修复、3%过氧化氢孵育后滴加 1% BSA,室温孵育 15 min ,一抗以 1% PBS 按 1:100 稀释,湿盒内 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,HRP 标记二抗以 1% PBS 按 1:500 稀释,湿盒内 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min ,DAB 显色、苏木素复染,中性树脂胶封片后显微镜下观察、拍照,Image J 软件分析积分光密度值(IOD),计算面积(Area),以 IOD/Area 表示蛋白阳性表达情况。

2.3.6 RT-PCR 法检测肾脏 α -actinin-4、synap-

topodin mRNA 表达 按照试剂盒说明抽提肾组织总 RNA,紫外分光光度计 NANO 2000 测定各样本中 RNA 的浓度,按照试剂盒说明将总 RNA 反转录为 cDNA,将 cDNA 模板加入反应体系,反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 15 s,共 40 个循环,Exicycler™ 96 荧光定量仪进行荧光定量分析,本实验分析方法利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer Sequence

基因	引物序列(5'→3')	长度/bp
α-actinin-4	正向 CTACCACGCAGCGAACC	239
	反向 GCCCATCCCTGAAGTCC	
synaptopodin	正向 GGGAAGACGACAGTTTGAG	232
	反向 GGGAGACCTAACCCGAGAA	
β-actin	正向 CATCCGTAAGACCTCTATGCC	171
	反向 ATGGAGCCACCGATCCACA	

2.3.7 Western blot 法检测肾脏 p-p38 MAPK、α-actinin-4、synaptopodin 蛋白表达水平 肾皮质剪碎后放入匀浆器,加入组织蛋白裂解液,冰上匀浆 5 min,转入离心管,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 得到蛋白提取液,BCA 法测定蛋白浓度,取 40 μg 蛋白,根据目的蛋白分子量大小选用对应浓度的聚丙烯酰胺凝胶,本次实验浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 8%、12%,将蛋白转移至 PVDF 膜上,TBST 缓冲液配制 5%(M/V)脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入稀释后的一抗[p-p38 MAPK(1:500)、synaptopodin(1:500)、α-actinin-4(1:1 000)、β-actin(1:1 000)],4 °C 孵育过夜,次日孵育一抗后的 PVDF 膜从杂交袋中取出,浸入 TBST 中,摇床摇动 5 min,重复 4 次,加入二

抗(羊抗兔 IgG-HRP,1:5 000)37 °C 孵育 45 min,孵育二抗后的 PVDF 膜从杂交袋中取出,浸入 TBST 中,摇床摇动 5 min,重复 6 次,ECL 底物发光,将胶片进行扫描,凝胶图象处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带的光密度值,以 β-actin 为内参对照,计算目的蛋白相对表达,统计分析。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计处理。计量资料符合正态分布和方差齐性者,用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较用单因素方差分析,组间比较用 LSD 检验,不符合正态性和方差齐性者用 Tamhane's T2 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠一般情况比较

尾静脉注射阿霉素 2 d 后,小鼠相继出现团缩、腹泻、脱毛、烂尾、饮食饮水减少等,1 周后逐渐改善,2 周后可见部分 ADRN 小鼠阴囊水肿,空白组未出现上述情况。灌胃 4 周,ADRN 小鼠活跃度减低,喜团缩、拱背,垫料气味秽浊,脱毛明显,饮食饮水减少;灌胃 8 周,ADRN 小鼠倦怠,形体消瘦,扎堆团缩。

3.2 各组小鼠体质量、24 h 尿量及血、尿生化指标比较

与空白组比较,模型组、贝那普利组、低六味组、中六味组及高六味组小鼠体质量、24 h 尿量、血清白蛋白均降低($P < 0.05$),24 h 尿蛋白定量升高($P < 0.05$);与模型组比较,贝那普利组、中六味组及高六味组 24 h 尿蛋白定量降低($P < 0.05$);贝那普利组及低六味组、中六味组、高六味组组间比较,体质量、24 h 尿量、血清白蛋白及 24 h 尿蛋白定量差异均无统计学意义($P > 0.05$);各组间血钾、血肌酐差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 2。

表 2 各组小鼠体质量、24 h 尿量及血、尿生化指标比较($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 2 Comparison of body weight, 24-hour urine output, blood and urine biochemical indicators among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	体质量/g	24 h 尿量/mL	24 h 尿蛋白定量/(mg/24 h)	血清白蛋白/(g/L)	血钾/(mmol/L)	血肌酐/(μmol/L)
空白组	31.0±4.53	5.16±0.78	0.46±0.16	29.48±2.36	4.37±0.54	15.21±1.03
模型组	22.0±2.45 [#]	2.22±0.47 [#]	1.97±0.51 [#]	23.42±1.97 [#]	4.01±0.50	16.33±1.65
贝那普利组	22.0±3.67 [#]	1.98±0.38 [#]	1.36±0.53 ^{#*}	23.20±3.21 [#]	4.33±0.70	16.74±1.56
低六味组	23.6±1.52 [#]	1.90±0.51 [#]	1.49±0.42 [#]	23.38±2.67 [#]	4.06±0.87	16.62±1.67
中六味组	25.4±1.82 [#]	2.00±0.45 [#]	1.41±0.39 ^{#*}	25.98±2.08 [#]	4.55±0.62	16.51±1.51
高六味组	22.6±1.14 [#]	2.24±0.58 [#]	1.43±0.22 ^{#*}	24.10±2.80 [#]	4.46±0.55	16.60±1.56

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

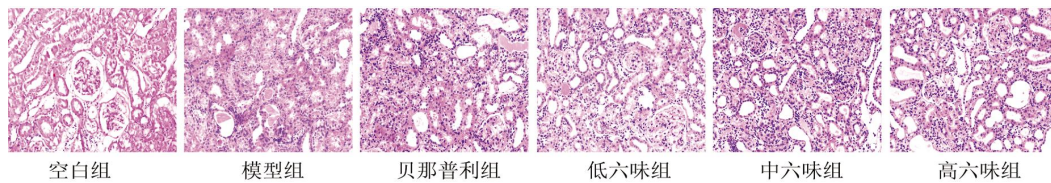


图1 各组小鼠肾脏病理改变(HE,×400)

Fig.1 Pathological changes in the kidneys of mice in each group (HE staining, ×400)

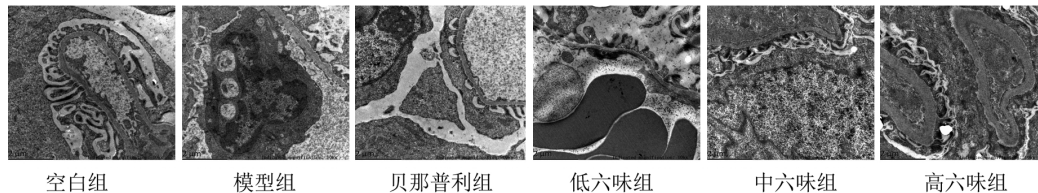


图2 各组小鼠足细胞足突微结构(电镜图,2 μm)

Fig.2 Ultrastructure of foot processes in mice foot cells of each group (electron microscope, 2 μm)

3.3 各组小鼠肾组织病理形态改变

空白组小鼠肾小球、肾小管、肾间质形态基本正常,其余五组 ADRN 小鼠肾脏病理见不同程度的肾小球系膜细胞增生,部分系膜区扩大、肾小管蛋白管型,间质可见炎性细胞浸润。详见图 1。

3.4 各组小鼠足细胞足突超微结构改变

电镜下空白组小鼠足突结构整齐清晰,基底膜结构完整。模型组可见足细胞足突增宽、回缩、融合甚至消失。灌胃 8 周,与模型组比较,各干预组上述结构改变均得到不同程度改善。详见图 2。

3.5 各组小鼠肾脏 p-p38 MAPK、α-actinin-4、synaptopodin 蛋白阳性表达水平的影响

与空白组比较,模型组及各药物干预组小鼠肾脏 p-p38 MAPK、α-actinin-4 蛋白表达升高($P<0.05$), synaptopodin 蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组比较,贝那普利组、高六味组 p-p38 MAPK 蛋白表达降低($P<0.05$),贝那普利组、中六味组及高六味组 synaptopodin 蛋白表达升高($P<0.05$)。贝那普利组及低六味组、中六味组、高六味组组间比较,p-p38 MAPK、α-actinin-4、synaptopodin 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 3、表 3。

3.6 各组小鼠肾脏 α-actinin-4、synaptopodin mRNA 表达比较

与空白组比较,模型组及各药物干预组小鼠肾脏 α-actinin-4 mRNA 表达升高($P<0.05$),synaptopodin mRNA 表达降低($P<0.05$);与模型组比较,贝那普利

表3 各组小鼠肾脏 p-p38 MAPK、α-actinin-4、synaptopodin 蛋白阳性表达水平(IOD/AREA, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)Table 3 Positive expression levels of p-p38 MAPK, alpha-actinin-4, and synaptopodin proteins in the kidneys of mice in each group (IOD/AREA, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	p-p38 MAPK	α-actinin-4	synaptopodin
空白组	21.56±2.48	27.87±2.10	48.95±4.58
模型组	40.31±3.46 [#]	40.30±2.13 [#]	29.43±2.55 [#]
贝那普利组	35.48±3.25 ^{*#}	40.74±3.22 [#]	33.84±1.89 ^{*#}
低六味组	38.08±4.60 [#]	39.83±1.96 [#]	32.03±3.31 [#]
中六味组	37.00±3.64 [#]	41.59±3.11 [#]	34.77±3.25 ^{*#}
高六味组	35.26±3.23 ^{*#}	42.63±2.82 [#]	35.57±3.47 ^{*#}

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

组、中六味组及高六味组 synaptopodin mRNA 表达升高($P<0.05$)。贝那普利组及低六味组、中六味组、高六味组组间比较,α-actinin-4、synaptopodin mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 4。

3.7 各组小鼠肾脏 p-p38 MAPK、α-actinin-4、synaptopodin 蛋白表达比较

与空白组比较,模型组及各药物干预组小鼠肾脏 p-p38 MAPK、α-actinin-4 蛋白表达升高($P<0.05$), synaptopodin 蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组比较,贝那普利组、高六味组 p-p38 MAPK 表达降低($P<0.05$),贝那普利组、低六味组、中六味组及高六味组 synaptopodin 蛋白表达升高($P<0.05$);贝那普利组及低六味组、中六味组、高六味组组间比较,p-p38 MAPK、α-actinin-4、synaptopodin 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 4、表 5。

表4 各组小鼠肾脏 α -actinin-4、synaptopodin mRNA 比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Comparison of alpha-actin-4 and synaptopodin mRNA in the kidneys of mice in each group

组别	α -actinin-4	synaptopodin
空白组	0.486±0.068	1.228±0.202
模型组	0.980±0.095 [#]	0.580±0.066 [#]
贝那普利组	0.984±0.156 [#]	0.712±0.052 ^{*#}
低六味组	0.970±0.168 [#]	0.680±0.038 [#]
中六味组	0.992±0.201 [#]	0.710±0.057 ^{*#}
高六味组	1.082±0.213 [#]	0.724±0.067 ^{*#}

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

表5 各组小鼠肾脏 p-p38 MAPK、 α -actinin-4、synaptopodin 蛋白表达比较(条带相对灰度值, $\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Comparison of renal p-p38 MAPK, alpha-actin-4, and synaptopodin protein expression in different groups of mice (relative grayscale value of stripes, $\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	p-p38 MAPK	α -actinin-4	synaptopodin
空白组	0.150±0.039	0.416±0.038	0.768±0.055
模型组	0.848±0.129 [#]	0.814±0.056 [#]	0.328±0.029 [#]
贝那普利组	0.734±0.044 ^{*#}	0.826±0.038 [#]	0.412±0.030 ^{*#}
低六味组	0.790±0.039 [#]	0.856±0.052 [#]	0.406±0.039 ^{*#}
中六味组	0.768±0.053 [#]	0.874±0.070 [#]	0.434±0.038 ^{*#}
高六味组	0.728±0.045 ^{*#}	0.884±0.062 [#]	0.474±0.044 ^{*#}

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

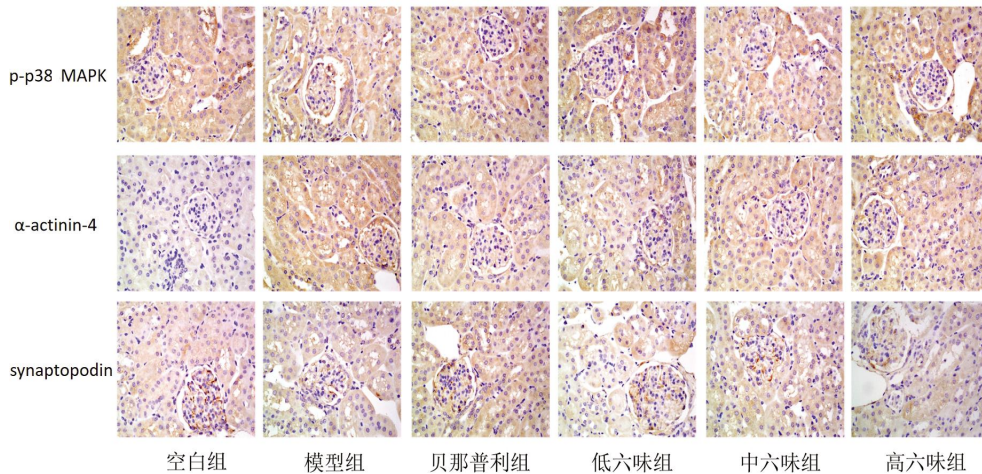


图3 各组小鼠肾脏 p-p38 MAPK、 α -actinin-4、synaptopodin 蛋白免疫组织化学图(DAB, $\times 400$)

Fig.3 Immunohistochemical maps of p-p38 MAPK, alpha-actin-4, and synaptopodin proteins in the kidneys of mice in each group (DAB, $\times 400$)

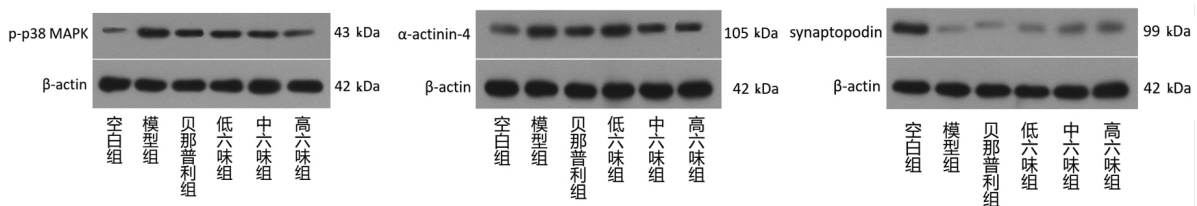


图4 各组小鼠肾脏 p-p38 MAPK、 α -actinin-4、synaptopodin 蛋白电泳条带图

Fig.4 Electrophoretic bands of p-p38 MAPK, alpha-actin-4, and synaptopodin proteins in the kidneys of mice in each group

4 讨论

1994年,Williams指出蛋白尿是判断CKD病情进展的关键指标之一^[6]。此后多项研究均表明蛋白尿是CKD进展的独立危险因素之一,可促进肾小管间质纤维化、肾小球硬化^[7]。大量蛋白尿的持续存

在也是导致肾组织损伤进行性加重的重要因素^[1]。因此,蛋白尿成为肾脏病治疗和疗效判断的重要指标之一。足细胞损伤是导致蛋白尿及肾功能受损的关键^[8-9],随着对足细胞损伤相关疾病发病机制的了解,“保护足细胞”是当前肾脏病领域研究热点之一。足突融合是足细胞损伤最主要的改变,可引起肾

小球对大分子物质通透性的增加,蛋白大量漏出,融合的足突与肾小球基膜(glomerular basement membrane, GBM)粘连,足突下间隙面积减小,肾小球滤过率下降^[10-11]。足细胞特殊结构的维持依赖于肌动蛋白为主的细胞骨架系统,最重要的肌动蛋白调控蛋白是 α -actinin-4与synaptopodin^[12]。 α -actinin-4是细胞骨架F-肌动蛋白(actin)交联蛋白,保持足突的形态、赋予足细胞韧性和强度,维持足细胞细胞骨架稳定^[13-16],编码 α -actinin-4的基因ACTN4突变可导致常染色体显性家族遗传性局灶阶段性肾小球硬化^[17]。synaptopodin蛋白表达于成熟的足细胞足突,调节足突形状和足突运动,在微小病变、局灶阶段性肾小球硬化和膜性肾病患者,肾小球足细胞synaptopodin的表达明显减少^[18-20]。MAPK通路参与调节足细胞细胞骨架聚合及稳定性,其异常活化与足细胞损伤、足突融合和蛋白尿的发生密切相关^[21]。在伴有足细胞损伤的临床肾小球疾病、嘌呤霉素氨基核苷(puromycin aminonucleoside, PAN)肾病大鼠、ADRN小鼠,均发现肾脏p-p38 MAPK表达增加,伴随有肌动蛋白重组,使用p38 MAPK抑制剂可改善PAN肾病、ADRN模型动物肾脏足细胞损伤,减轻蛋白尿及肾小球硬化^[22]。

中医学无“蛋白尿”论述,《素问·金匱真言论篇》曰:“夫精者身之本也。”中医之“精”与西医之“蛋白质”均是构成人体和维持机体生命活动的物质基础。《素问·六节藏象论篇》曰:“肾者,主蛰,封藏之本,精之处也。”《素问·上古天真论篇》曰:“肾者主水,受五脏六腑之精而藏之。”故肾主藏精,宜藏不宜泄。《诸病源候论·虚劳病诸候》指出:“劳伤肾虚,不能藏于精,故因小便而精微出也。”因此,足细胞是“肾失封藏、精微外泄”的微观结构基础,足细胞损伤导致蛋白“精”泄而不藏。六味地黄丸记载于宋代钱乙《小儿药证直诀》,亦可为汤剂,由熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓6味中药组成,方中熟地黄滋肾阴、益精髓,山茱萸滋肾、益肝、涩精,山药滋肾、补脾,是为“三补”;泽泻利湿泄浊,茯苓淡渗脾湿,牡丹皮清泻相火,是为“三泻”。应用数据挖掘技术研究当代中医治疗慢性肾炎蛋白尿的证治方药规律,结果显示核心中药主要为补气健脾药与补肾涩精药,六味地黄汤是临床使用频率较高的方剂^[23]。六味地

黄汤联合来氟米特、泼尼松能明显减低IgA模型大鼠尿蛋白,减轻肾组织病理损害,与上调足细胞裂孔膜蛋白nephrin、podocin的表达有关^[24-25]。

本研究采用的ADRN小鼠模型为局灶节段性肾小球硬化的一个经典动物模型,主要是对肾小球足细胞的损伤,亦是目前公认的能较好的模拟肾小球疾病的模型之一^[26]。本研究结果显示,与空白组对比,模型组小鼠血清白蛋白降低,24 h尿蛋白定量升高;HE染色可见肾小球系膜细胞增生,部分系膜区扩大、肾小管蛋白管型,间质可见炎性细胞浸润;透射电镜可见明显的足突融合,足细胞骨架蛋白 α -actinin-4 mRNA及蛋白表达增加,synaptopodin mRNA及蛋白表达降低,提示ADRN小鼠足突融合与骨架蛋白 α -actinin-4、synaptopodin表达异常相关,而p-p38 MAPK蛋白表达增加,提示p38 MAPK通路活化参与足突融合。六味地黄汤干预8周后,ADRN小鼠24 h尿蛋白定量下降,足突融合改善,上调 α -actinin-4、synaptopodin蛋白及mRNA的表达,下调p-p38 MAPK蛋白表达,表明六味地黄汤可能通过抑制p38 MAPK通路活化,稳定足细胞骨架蛋白,干预足突融合,减轻足细胞损伤,减少尿蛋白漏出。

综上所述,六味地黄汤是临床治疗慢性肾脏病的有效方剂,本课题组前期研究显示六味地黄汤可减轻5/6肾切除大鼠蛋白尿^[27],与调控凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)的表达,减轻肾脏固有细胞凋亡有关^[28],亦可通过降低转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1),促进补体受体1(complement receptor, CR1)的表达,减少IgA肾病大鼠蛋白尿^[29]。本研究探究了六味地黄汤对ADRN小鼠尿蛋白的作用及调控机制。结果显示,六味地黄汤可有效抑制p38 MAPK通路活化,上调 α -actinin-4、synaptopodin蛋白及mRNA的表达,改善足突融合,减轻足细胞损伤,发挥减少尿蛋白的作用。其具体调控机制及关键分子有待进一步研究。

参考文献

- [1] LE W B, LIANG S S, HU Y L, et al. Long-term renal survival and related risk factors in patients with IgA nephropathy: Results from a cohort of 1155 cases in a Chinese adult population[J].

- Nephrology, Dialysis, Transplantation, 2012, 27(4): 1479-1485.
- [2] FENG D. Phosphorylation of key podocyte proteins and the association with proteinuric kidney disease[J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2020, 319(2): F284-F291.
- [3] 应 蓓, 杨 勤, 邵晓珊, 等. SB203580 抑制 p38 MAPK 信号通路对阿霉素干预大鼠足细胞损伤及凋亡的影响[J]. 贵州医药, 2019, 43(3): 342-344.
- [4] 徐文峰, 何泽云, 唐 群, 等. 猪苓汤对阿霉素肾病大鼠血清 AVP 及肾脏 γ -ENaC 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 280-284.
- [5] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 28.
- [6] WILLIAMS J D, COLES G A. Proteinuria: A direct cause of renal morbidity?[J]. Kidney International, 1994, 45(2): 443-450.
- [7] 李 丹, 丁 洁. 蛋白尿加速慢性肾脏病进展的分子机制[J]. 北京大学学报(医学版), 2010, 42(5): 608-611.
- [8] POLLAK M R. Inherited podocytopathies: FSGS and nephrotic syndrome from a genetic viewpoint[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2002, 13(12): 3016-3023.
- [9] JIANG H, SHEN Z R, ZHUANG J, et al. Understanding the podocyte immune responses in proteinuric kidney diseases: From pathogenesis to therapy[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1335936.
- [10] CELLESI F, LI M, RASTALDI M P. Podocyte injury and repair mechanisms[J]. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2015, 24(3): 239-244.
- [11] WHARRAM B L, GOYAL M, WIGGINS J E, et al. Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: Diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2005, 16(10): 2941-2952.
- [12] KANNAN N, TANG V W. Synaptopodin couples epithelial contractility to α -actinin-4-dependent junction maturation[J]. The Journal of Cell Biology, 2015, 211(2): 407-434.
- [13] MARTIN C E, PHIPPEN N J, KEYVANI CHAHI A, et al. Complementary Nck1/2 signaling in podocytes controls α actinin-4-mediated actin organization, adhesion, and basement membrane composition[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2022, 33(8): 1546-1567.
- [14] FENG D, KUMAR M, MUNTEL J, et al. Phosphorylation of ACTN4 leads to podocyte vulnerability and proteinuric glomerulosclerosis[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2020, 31(7): 1479-1495.
- [15] ODENTHAL J, DITTRICH S, LUDWIG V, et al. Modeling of ACTN4-based podocytopathy using *Drosophila* nephrocytes[J]. Kidney International Reports, 2023, 8(2): 317-329.
- [16] TSENG C C, ZHENG R H, LIN T W, et al. α -Actinin-4 recruits Shp2 into focal adhesions to potentiate ROCK2 activation in podocytes[J]. Life Science Alliance, 2022, 5(11): e202201557.
- [17] SHAO H S, WINGERT B, WEINS A, et al. Focal segmental glomerulosclerosis ACTN4 mutants binding to actin: Regulation by phosphomimetic mutations[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 15517.
- [18] ZENG L F, SZETO C C. Urinary podocyte markers in kidney diseases[J]. Clinica Chimica Acta, 2021, 523: 315-324.
- [19] 苏彩霞, 嵇雅茹, 虞 飞, 等. 阿霉素诱导的局灶节段性肾小球硬化小鼠足细胞损伤的机制研究[J]. 国际泌尿系统杂志, 2023, 43(1): 125-129.
- [20] WANG X K, QI D, FU F H, et al. Therapeutic and antiproteinuric effects of salvianolic acid A in combined with low-dose prednisone in minimal change disease rats: Involvement of PPAR γ /Angptl4 and Nrf2/HO-1 pathways[J]. European Journal of Pharmacology, 2019, 858: 172342.
- [21] NI Y L, WANG X, YIN X X, et al. Plectin protects podocytes from adriamycin-induced apoptosis and F-actin cytoskeletal disruption through the integrin α 6 β 4/FAK/p38 MAPK pathway[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2018, 22(11): 5450-5467.
- [22] KOSHIKAWA M, MUKOYAMA M, MORI K, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2005, 16(9): 2690-2701.
- [23] 王 健, 王耀光. 基于数据挖掘的当代中医治疗慢性肾炎蛋白尿证治方药规律研究[J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(4): 17-21.
- [24] 贾利宁, 杨 阳, 高 明, 等. 六味地黄汤联合来氟米特、泼尼松治疗大鼠 IgA 肾病的研究[J]. 陕西中医, 2016, 37(3): 372-375.
- [25] 张瑞义, 舒 适, 李志杰, 等. 六味地黄丸对阿霉素肾病小鼠足细胞 nephrin 和 podocin 表达的影响[J]. 数理医药学杂志, 2017, 30(6): 795-798.
- [26] LEE V W S, HARRIS D C H. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis[J]. Nephrology, 2011, 16(1): 30-38.
- [27] 陈 丽, 周忠志, 何泽云, 等. 六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠致慢性肾衰竭模型的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(12): 2869-2871.
- [28] 胡 爽, 何泽云, 徐文峰, 等. 六味地黄汤对慢性肾衰竭大鼠 Bax 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2020, 29(9): 1524-1527, 1564.
- [29] 何泽云, 何雅琴, 廖春来, 等. 六味地黄汤对 IgA 肾病模型大鼠转化生长因子- β 1 和补体调节蛋白 CR1 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(11): 54-57.