

基于 Ang II /TRPC6 通路探讨当归芍药散对肾病综合征大鼠足细胞的保护机制

李曼曼¹, 许钺^{2*}, 付士平³, 侯静¹, 冯焯¹, 许在平¹, 倪良厚¹, 王运来¹, 宣自华^{1*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012;
3. 上海市第八人民医院, 上海 200235)

【摘要】 目的:探究当归芍药散(DSS)对肾病综合征(NS)大鼠血管紧张素 II (Ang II) 和瞬时受体电位阳离子通道 6 (TRPC6) 通路的影响和保护作用。方法:动物实验, 160 只 SD 大鼠通过 2 次尾静脉注射阿霉素(第 1 周 4 mg·kg⁻¹, 第 2 周 2 mg·kg⁻¹) 诱导 NS 模型, 分为模型组(给予生理盐水), 氯沙坦组(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹), DSS 低、中、高剂量组(4.3, 8.6, 17.2 g·kg⁻¹·d⁻¹), 同时设置正常组。给药 4 周干预后, 透射电镜观察肾脏超微病理改变, 试剂盒检测 24 h 尿蛋白; 同时用放射免疫法检测血浆中 Ang II, 钙调神经磷酸酶(CaN)含量的变化, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾皮质中 TRPC6, 血管紧张素 II 1 型受体(AT1R), 足细胞裂孔隔膜特异蛋白(Nephrin), 天冬氨酸半胱氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)蛋白表达, 免疫组化检测狭缝隔膜中 TRPC6, AT1R 的表达分布情况。细胞实验, 通过 Ang II 刺激 MPC5 足细胞, 随机分为正常组, Ang II 组, Ang II +TRPC6 特异性抑制剂 SAR7334 组, Ang II +5%DSS 组, Ang II +10%DSS 组, Ang II +15%DSS 组, Western blot 检测细胞 TRPC6, AT1R, Nephrin, Caspase-3 蛋白表达。结果:与正常组比较, 模型组大鼠 24 h 尿蛋白含量显著升高(P<0.01), 血浆 Ang II, CaN 含量显著升高(P<0.01), 肾小球结构不完整, 足突广泛融合, 足突融合率显著增加(P<0.01), 肾皮质中 AT1R, TRPC6 表达分布增多, 肾组织中 AT1R, TRPC6, Caspase-3 蛋白水平显著增高(P<0.01), Nephrin 蛋白水平显著降低(P<0.01); 与模型组比较, 氯沙坦组和 DSS 高剂量组 24 h 尿蛋白含量显著降低(P<0.01), 血浆 Ang II, CaN 含量显著降低(P<0.01), 肾小球结构改善, 足突融合率显著降低(P<0.01), TRPC6, AT1R 在肾皮质中的表达分布减少, 肾组织 AT1R, TRPC6, Caspase-3 蛋白水平显著降低(P<0.01), Nephrin 蛋白水平显著升高(P<0.01); 同时与正常足细胞比较, Ang II 刺激后足细胞 AT1R, TRPC6, Caspase-3 的蛋白表达水平显著增加(P<0.01), Nephrin 表达水平下降(P<0.01); 而与 Ang II 组足细胞比较, SAR7334 组足细胞 AT1R, TRPC6, Caspase-3 蛋白水平显著降低(P<0.01), Nephrin 蛋白水平升高(P<0.01)。结论:DSS 可以改善 NS 病理特征, 可能是通过抑制足细胞内 Ang II 与 TRPC6 的相互作用, 进而改善足细胞结构完整性, 修复肾小球分子屏障损伤, 减缓 NS 蛋白尿的发展进程。

【关键词】 肾病综合征; 当归芍药散; 足细胞; 血管紧张素 II (Ang II); 瞬时受体电位阳离子通道 6 (TRPC6)

【中图分类号】 R2-0; R692; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2021)19-0009-10

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20211936

【网络出版地址】 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210809.0844.001.html>

【网络出版日期】 2021-08-09 13:54

Protective Mechanism of Danggui Shaoyaoan on Podocytes of Nephrotic Syndrome Rats Based on Ang II -TRPC6 Pathway

LI Man-man¹, XU Fan^{2*}, FU Shi-ping³, HOU Jing¹, FENG Ye¹, XU Zai-ping¹,
NI Liang-hou¹, WANG Yun-lai¹, XUAN Zi-hua^{1*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012, China;

3. Shanghai Eighth People's Hospital, Shanghai 200235, China)

【收稿日期】 20210616(008)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81573720, 81974536)

【第一作者】 李曼曼, 在读硕士, 从事中药复方药理作用机制研究, E-mail: 1304010160@qq.com

【通信作者】 * 许钺, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药复方药理作用机制研究, Tel: 0551-68129295, E-mail: 845570851@qq.com;

* 宣自华, 硕士, 讲师, 从事中药复方药理作用机制研究, Tel: 0551-68129182, E-mail: 35736511@qq.com

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect and the mechanism of Danggui Shaoyaoan (DSS) on angiotensin II (Ang II)/transient receptor potential cation channel 6 (TRPC6) pathway in nephrotic syndrome (NS) rats. **Method:** In animal experiments, doxorubicin ($4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for the 1st week and $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for the 2nd week) was injected twice to the tail vein of rats to induce NS model in 160 rats, which were then randomly divided into model group (normal saline), losartan group ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and low- ($4.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), medium- ($8.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and high-dose ($17.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) DSS groups. Besides, a normal group was also set. After intervention for four weeks, ultrastructure changes of the kidney were identified by transmission electron microscopy (TEM). The 24-hour urine protein was detected by kits. Radioimmunoassay was used to detect the content of Ang II and Calcineurin (CaN) in plasma. Western blot was used to detect the protein expression of TRPC6, angiotensin II type 1 receptor (AT1R), podocyte slit diaphragm-specific protein (Nephrin), and cysteine-aspartic acid protease-3 (Caspase-3) in the renal cortex. Immunohistochemistry was used to detect the expression of TRPC6 and AT1R in the slit diaphragm. In cell experiments, Ang II stimulated MPC5 podocytes. The cells were randomly divided into a normal group, an Ang II group, an Ang II +SAR7334 (TRPC6-specific inhibitor) group, an Ang II +5%DSS group, an Ang II +10%DSS group, and an Ang II +15%DSS group. Western blot was used to detect the protein expression of TRPC6, AT1R, Nephrin, and Caspase-3 in podocytes. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased 24-hour urine protein content ($P<0.01$) and Ang II and CaN in plasma ($P<0.01$), incomplete glomerular structure, the extensive fusion of podocyte process with elevated fusion rate ($P<0.01$), increased expression distribution of AT1R and TRPC6 in the renal cortex, and up-regulated protein expression of AT1R, TRPC6, and Caspase-3 in renal tissues ($P<0.01$), and reduced Nephrin protein expression ($P<0.01$). Compared with model group, the losartan group and the high-dose DSS group exhibited decreased 24-hour urine protein content ($P<0.01$) and the content of Ang II and CaN in plasma ($P<0.01$), improved glomerular structure, reduced fusion rate of podocyte process ($P<0.01$), diminished expression distribution of TRPC6 and AT1R in the renal cortex, declining protein expression of AT1R, TRPC6 and Caspase-3 in renal tissues ($P<0.01$), and elevated Nephrin protein expression ($P<0.01$). Additionally, compared with the normal podocytes, Ang II-stimulated podocytes showed increased protein expression of AT1R, TRPC6 and Caspase-3 ($P<0.01$), and decreased expression of Nephrin ($P<0.01$). Compared with the Ang II group, the Ang II +SAR7334 group displayed reduced protein expression of AT1R, TRPC6, and Caspase-3 ($P<0.01$) and increased protein expression of Nephrin ($P<0.01$). **Conclusion:** DSS can improve the pathological characteristics of NS presumably by inhibiting the interaction between Ang II and TRPC6 in podocytes and improving the structural integrity of podocytes to repair the damage of glomerular molecular barrier and slow down the progression of NS-induced proteinuria.

[Keywords] nephrotic syndrome; Danggui Shaoyaoan; podocytes; angiotensin II (Ang II); transient receptor potential cation channel 6 (TRPC6)

肾病综合征(NS)是临床常见的肾小球疾病,大量蛋白尿是其主要临床指征^[1]。中医认为NS是本虚标实之证,以脾肾阳虚为本、血瘀水停为标。现代临床治疗以抑制免疫为主,但这种治疗副作用大,伴有高复发率和高依赖性^[2-3]。足细胞是高度特化的上皮细胞,位于肾小球滤过屏障的最外层^[4-5],是阻止蛋白质进入尿液的最后一道屏障,作为不同形式下肾脏损伤的靶细胞,贯穿NS发生发展的全过程,是近年来研究肾小球疾病的热点。

经典名方当归芍药散源自《金匮要略》,由当

归、白芍、川芎、白术、茯苓、泽泻6味药组成。当归芍药散全方具养血调肝、健脾利湿之功效,是活血利水的代表方剂,契合NS脾虚血瘀水停病机。近年临床以及药理实验研究表明,当归芍药散通过改善小儿24h蛋白尿,血清白蛋白(A1b),水肿等临床指征,对水肿脾虚湿盛型的NS有显著治疗作用^[6]。课题组前期通过当归芍药散对NS动物实验研究发现,当归芍药散可改善NS各个阶段中出现的不同程度蛋白尿症状,并且可能通过抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAS)的激活,改善血生化指标,降

低血管活性物质水平^[7-9]。另外课题组运用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-Q/TOF-MS)表征了NS大鼠尿液中当归芍药散的潜在生物标记,构建了在草药成分-目标代谢物-途径网络的靶点PPI网络,显示血管紧张素转换酶(ACE)在当归芍药散治疗的氨基酸代谢途径中匹配程度较高^[10],这表明血管系统可能是当归芍药散治疗NS中的一个重要突破点。

血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)是RAS系统中的一种强收缩血管活性因子,可引发血管收缩、钠水潴留以及促炎、促纤维化等病理反应^[11-12]。研究表明,肾小球病变患者肾组织中AngⅡ水平升高^[13]。瞬时受体电位阳离子通道6(TRPC6)分布于肾小球足细胞中,是参与维持足细胞骨架稳定性的通道蛋白^[14],参与调节胞内钙信号^[15]。无论从临床还是实验研究结果来看,在肾小球疾病中均发现了TRPC6表达异常的情况^[2,16-18],有学者通过膜片钳电生理学方法证实,AngⅡ可以通过显著增强TRPC6通道的电流,诱导Ca²⁺过度内流^[14,18]。SHENG等^[19]用AngⅡ体外刺激足细胞,导致TRPC6蛋白和mRNA水平升高,而当给予TRPC6拮抗剂时,AngⅡ对足细胞的损伤则明显降低^[20]。因此,AngⅡ/TRPC6途径可能是现代治疗的新思路,但两者之间在NS足细胞损伤中的相互作用尚不完全明确。故本研究旨在通过动物和细胞实验探讨当归芍药散能否通过调节AngⅡ/TRPC6通路来改善NS足细胞分子屏障损伤,进而改善蛋白尿,从而阐述可能存在的分子作用机制。

1 材料

1.1 动物 本实验采用SPF级雄性SD大鼠180只,体质量(200±20)g,10周龄,由济南彭悦实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(鲁)20190003,饲养于室温(20±1)℃,相对湿度50%~60%的环境下,饲养期间给予标准饲料,所有大鼠进行2次尿蛋白定性实验(尿蛋白试纸法)均为阴性,本研究经过安徽中医药大学动物伦理委员会批准。

1.2 细胞 本实验采用永生小鼠MPC5足细胞,细胞株购于北京北纳创联生物技术研究院,批号BNCC337685。将足细胞置于RPMI 1640完全培养基中培养,于37℃,5%CO₂培养箱中诱导分化至成熟,细胞传至第6代。其中完全培养基由10%胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素-链霉素和RPMI 1640基础培养液组成。

1.3 药物 当归芍药散由当归9g,白芍48g,川芎

10g,白术12g,茯苓12g,泽泻24g组成,饮片购自安徽协和成药业饮片有限公司,批号分别为200613,200825,200523,200518,200817,201010,并经安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》项下规定。按《金匱要略》原方配比精确称量药材后,加10倍量75%乙醇浸泡药材1h后,水浴回流提取1.5h,收集滤液;残渣再加8倍量75%乙醇继续回流提取1h,合并两次滤液,用旋转蒸发器浓缩至质量浓度为1.72g·mL⁻¹的当归芍药散全方药液,临用时配制成生药质量浓度为43g·L⁻¹的药液过0.22μm微孔滤膜,取续滤液即得。

1.4 试剂 阿霉素(注射用盐酸多柔比星,浙江海正药业股份有限公司,批号130704);氯沙坦钾片(英国MSD公司,批号T000046);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号C0105S);AngⅡ(上海江莱生物技术有限公司,批号JL11637);BCA,Alb,尿素氮(BUN),肌酐(SCr),总蛋白(TP)试剂盒(北京雷根生物技术有限公司,批号分别为1026A20,TC0567,TC0565,TC0543,TC0547);总胆固醇(TC),甘油三酯(TG)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为201023,201109);血管紧张素Ⅱ1型受体(AT1R),足细胞裂孔隔膜特异蛋白(Nephrin)抗体,β-肌动蛋白(β-actin)抗体(成都正能生物技术有限责任公司,批号分别为R22571,503048,700068);TRPC6抗体,天冬氨酸半胱氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab233413,ab32351);山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物有限公司,批号EF0002);ECL超敏发光试剂盒(美国Thermo公司,批号ED0015-B);细胞增殖毒性检测试剂盒(CCK-8,山东思科捷生物技术有限公司,批号CT0001);钙调神经磷酸酶(CaN)试剂盒(上海江莱生物技术有限公司,批号JL12083)。

1.5 仪器 CL-8000型全自动生化分析仪(日本Shimadzu公司);MultiskanMK2型酶标仪(美国Thermo公司);XH6080型放免仪(西安核仪器厂);CX33型光学显微镜(日本Olympus公司);LE-80K型低温高速离心机(德国Beckman公司);DYY-8C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);VE-186型转膜仪(上海天能科技有限公司);JS-1070P型自动曝光仪(上海培清科技有限公司);JEM1400Flash型透射电镜(日本电子株式会社);UC-7型超薄切片仪(德国Leica公司);HH-S2型数显恒温水浴锅(金华

市晶波实验仪器厂)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 160只SD大鼠适应性饲养1周后,通过(第1周 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,第2周 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)2次(每周的第1天)尾静脉注射阿霉素复制NS大鼠模型,正常组给予等体积生理盐水。2周后将大鼠置于代谢笼中,禁食不禁水收集24 h尿液,采用BCA蛋白测定试剂盒测24 h尿蛋白含量,若模型组大鼠24 h尿蛋白含量 $\geq 100\text{ mg}$,视为造模成功。根据前期课题组研究基础^[8],将造模成功大鼠随机分为模型组(给予生理盐水),氯沙坦组($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),当归芍药散低、中、高剂量组($4.3, 8.6, 17.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),给药4周,期间各组动物自由进食、饮水。

2.2 生化指标检测 末次给药后,收集各组大鼠24 h尿液,于次日麻醉,取材。水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径13.5 cm,下同),分离血浆,全自动生化分析仪检测各组大鼠尿液中Alb, BUN, SCr, TC, TG, TP含量。

2.3 肾组织病理学检测

2.3.1 HE染色观察肾脏病理学变化 4%多聚甲醛固定各组肾组织,经梯度乙醇脱水、石蜡浸泡后包埋烤片,苏木素及伊红染色,脱水封片,显微镜下观察并采集图像。

2.3.2 透射电镜观察肾脏亚显微结构 取新鲜肾脏皮质标本 $1\sim 2\text{ mm}^3$ 放入2.5%戊二醛,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗2次,梯度脱水、置换和浸透,于包埋后染色。切 $40\sim 60\text{ nm}$ 的超薄切片并用饱和醋酸铀染色,漂洗、干燥后置于电镜下观察。观察足细胞足突超微结构形态并计算足突融合率。

2.4 采用放射免疫法检测大鼠血浆中Ang II和CaN含量 用记号笔标记,各管分别加入缓冲液、标准品、质控、待测样品,每管均加入标记物,抗体孵育24 h,加驴抗兔免疫分离剂,室温放置15 min, $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,弃上清液,测Ang II和CaN含量。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾皮质中TRPC6, AT1R, Nephlin, Caspase-3蛋白表达 精密称取肾皮质100 mg,研磨并裂解。根据BCA蛋白定量试剂盒检测组织总蛋白浓度;制备分离胶、浓缩胶后上样,电泳、转膜。用脱脂奶粉封闭后分别用TRPC6($1:1\ 000$), AT1R($1:1\ 000$), Nephlin($1:1\ 000$), Caspase-3($1:1\ 000$), 内参 β -actin($1:2\ 000$)加入相应的一抗孵育 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入IgG($1:2\ 000$)

室温孵育2 h,加ECL发光液显影,使用Image J 1.48 V软件分析相关蛋白表达。

2.6 免疫组化法检测肾组织中TRPC6, AT1R的表达 取出4%多聚甲醛固定的肾组织,浓度梯度乙醇洗脱切片。配制柠檬酸盐修复液,将切片煮沸,热修复。标记,滴加 $3\%\text{H}_2\text{O}$,加入一抗(AT1R, $1:400$; TRPC6, $1:200$),室温孵育1 h, PBS洗脱3遍加二抗孵育。DAB显色剂终止显色,苏木素染色、盐酸乙醇分化、碳酸锂蓝化、脱水、透明、封片,显影。

2.7 当归芍药散含药血清的制备 根据动物实验高剂量组治疗效果最佳,为了同等模拟整体实验中的血药浓度,采取制备含药血清法,进行细胞实验。选用雄性SD大鼠20只,随机分成正常组(10只)和给药组(10只),给药组用上述配置好的当归芍药散药液($1.72\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)灌胃7 d($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),正常组大鼠给予等体积生理盐水,末次给药2 h后麻醉,腹主动脉取血, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,收集上清, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活30 min, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

2.8 足细胞培养与分组 复苏细胞,待成熟足细胞长至培养瓶内充满约50%时,分别用不同浓度的Ang II干预24 h($1\times 10^{-4}, 1\times 10^{-5}, 1\times 10^{-6}, 1\times 10^{-7}, 1\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$),每孔避光加入10%体积的CCK-8溶液,避光恒温孵育2 h。在450 nm波长处检测吸光度(A),按照“细胞存活率=(给药组A-空白组A)/(正常组A-空白组A) $\times 100\%$ ”和“细胞增殖抑制率=(正常组A-给药组A)/(正常组A-空白组A)”公式计算,得出Ang II对足细胞活性的最佳刺激浓度。用 $1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Ang II刺激细胞24 h,将刺激后的细胞随机分为Ang II组, Ang II+TRPC6特异性抑制剂SAR7334组($1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 30 min), Ang II+5%当归芍药散组, Ang II+10%当归芍药散组, Ang II+15%当归芍药散组。将细胞与各组药物共培养24 h,进行后续检测。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中TRPC6, AT1R, Nephlin, Caspase-3蛋白表达 弃去培养液,用D-PBS冲洗细胞3次, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心8 min,弃上清,冰上裂解30 min, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,取上清加入蛋白上样缓冲液,灭活10 min,按照2.5项下进行相同Western blot步骤。

2.10 统计学分析 采用SPSS 23.0软件对实验结果进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行正态检验及方差齐性检验。若方差齐,采用单因素方

差分析,组间采用最小显著性差异法(LSD)比较;若方差不齐,采用非参数秩和检验比较总的差异及组间比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠24 h尿蛋白含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠给药2周后24 h尿蛋白含量显著升高($P<0.01$),提示造模成功;给药4周后,与模型组比较,氯沙坦组和当归芍药散高剂量组大鼠尿蛋白含量显著降低($P<0.01$)。见表1。

3.2 对大鼠肾功能指标的影响 与正常组比较,模型组血清BUN, SCr, TG, TC含量显著升高($P<0.01$), TP和Alb含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,氯沙坦组和当归芍药散高剂量组大鼠血清

表2 当归芍药散对NS大鼠肾功能指标的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Danggui Shaoyaoan on renal function of NS rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	Alb/g·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹
正常		4.87±0.53	53.21±8.41	1.19±0.32	2.21±0.19	23.17±1.25	59.67±5.67
模型		8.77±1.07 ¹⁾	129.94±11.98 ¹⁾	2.63±0.38 ¹⁾	3.73±0.20 ¹⁾	13.68±1.48 ¹⁾	36.58±4.14 ¹⁾
当归芍药散	4.30	6.95±0.82	108.06±7.61	1.94±0.54	3.06±0.41	16.49±1.91	43.34±3.86
	8.60	6.18±0.64 ²⁾	100.57±8.37 ²⁾	1.92±0.90	3.01±0.28 ²⁾	17.37±2.21 ²⁾	45.69±3.92
	17.20	5.83±0.72 ³⁾	88.98±7.69 ³⁾	1.67±0.90 ³⁾	2.99±0.25 ³⁾	18.08±2.15 ³⁾	49.53±5.22 ³⁾
氯沙坦	0.03	5.51±0.89 ³⁾	74.13±7.26 ³⁾	1.49±0.19 ³⁾	2.65±0.09 ³⁾	20.82±4.03 ³⁾	52.72±7.87 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表4同)。

3.3 对大鼠血浆Ang II, CaN含量的影响 放射免疫结果显示,与正常组比较,模型组大鼠Ang II, CaN含量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,氯沙坦组和当归芍药散各给药组干预后大鼠Ang II, CaN含量均有降低趋势,其中以当归芍药散高剂量组效果最佳($P<0.01$)。见表3。

表3 当归芍药散对NS大鼠血浆Ang II, CaN含量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Danggui Shaoyaoan on contents of Ang II and CaN in plasma of NS rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ang II	CaN
正常		220.83±21.07	4.03±0.45
模型		520.75±32.37 ¹⁾	6.70±0.62 ¹⁾
当归芍药散	4.30	461.49±20.54	6.62±1.06
	8.60	433.10±24.59	5.78±0.98
	17.20	394.07±29.94 ²⁾	5.20±0.91 ²⁾
氯沙坦	0.03	303.97±39.98 ²⁾	5.09±0.88 ²⁾

3.4 对大鼠肾组织病理改变的影响

3.4.1 光学显微镜观察 正常组大鼠肾小球结构清晰,无肾小球肥大、萎缩,基底膜厚薄均匀;与正

表1 当归芍药散对大鼠24 h尿蛋白含量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Danggui Shaoyaoan on 24 h urinary protein content of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药2周	给药4周
正常		84.37±10.04	82.45±9.65
模型		355.47±13.26 ¹⁾	360.84±15.57 ¹⁾
当归芍药散	4.30	248.03±14.78 ²⁾	210.20±15.80 ²⁾
	8.60	230.58±14.57 ²⁾	191.22±13.72 ²⁾
	17.20	224.27±15.94 ²⁾	174.34±13.09 ²⁾
氯沙坦	0.03	194.45±17.89 ²⁾	163.60±5.95 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表3,5同)。

BUN, SCr, TG, TC含量显著降低($P<0.01$), TP和Alb含量显著升高($P<0.01$)。见表2。

常组比较,模型组大鼠肾组织病理改变明显,肾小球系膜基质增生,毛细血管祥折叠,基底膜增厚,系膜区大量免疫复合物沉积并伴有炎性浸润,且肾小管细胞广泛蛋白样变性;与模型组比较,氯沙坦组和当归芍药散给药组大鼠肾组织病理损伤上述症状较模型组明显减轻,其中以当归芍药散高剂量组效果最佳。见图1。

3.4.2 对大鼠足细胞超微结构变化的影响 电子显微镜下,正常组大鼠足细胞结构完整,足突排列清晰整齐有规则,未有明显足细胞融合,基底膜及内皮细胞均匀一致;与正常组比较,模型组大鼠足细胞出现明显的结构紊乱,足突融合率较空白组显著升高($P<0.01$);与模型组比较,氯沙坦组和当归芍药散给药组上述病理表现减轻,足突融合率也明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见图2,表4。

3.5 对大鼠肾皮质TRPC6, AT1R表达分布的影响

免疫组化结果显示,正常组大鼠肾皮质中TRPC6, AT1R仅在肾小球中有微量表达;与正常组比较,模型组大鼠肾皮质中TRPC6为连续颗粒状分布于整个肾小球狭缝隔膜上,尤其在毛细血管祥外

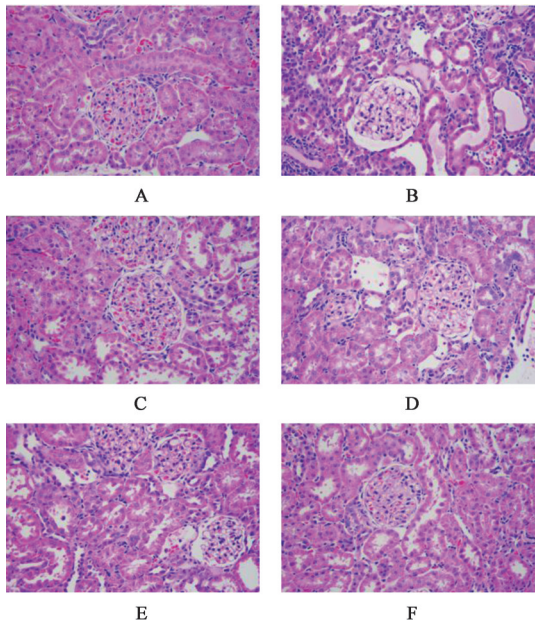


图1 当归芍药散对NS大鼠肾组织病理学的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Danggui Shaoyaosan on renal histopathology in NS rats (HE, ×400)

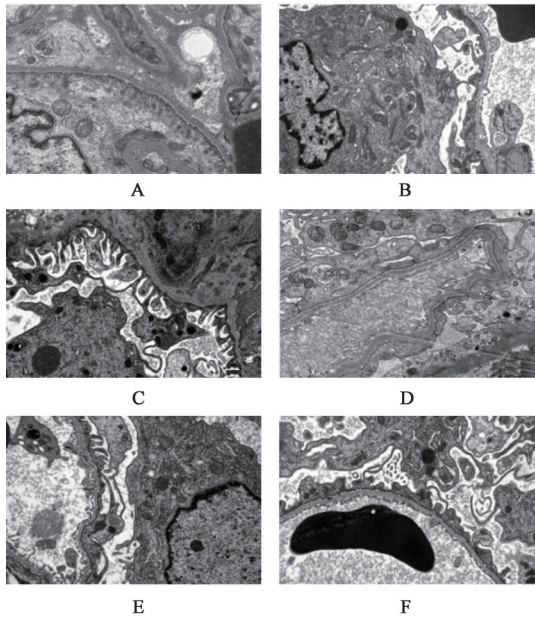


图2 当归芍药散对NS大鼠肾脏亚显微结构的影响(电镜, ×20 000)

Fig. 2 Effect of Danggui Shaoyaosan on renal submicrostructure of NS rats (TEM, ×20 000)

周表达更强;同时肾皮质中AT1R表达也显著增加,分布于肾脏皮质、髓质及两者交界处,且在肾脏皮质近端肾小管的细胞质中高表达;与模型组比较,氯沙坦组和当归芍药散各给药组大鼠上述病变较模型组明显减轻,其中当归芍药散高剂量组改善效

表4 当归芍药散对NS大鼠足突融合率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Danggui Shaoyaosan on foot process fusion rate in NS rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	足突融合率/%
正常		8.56±4.21
模型		80.04±7.98 ¹⁾
当归芍药散	4.30	66.83±6.57
	8.60	55.42±6.02
	17.20	50.16±5.68 ²⁾
氯沙坦	0.03	44.89±6.23 ³⁾

果最佳。见图3,4。

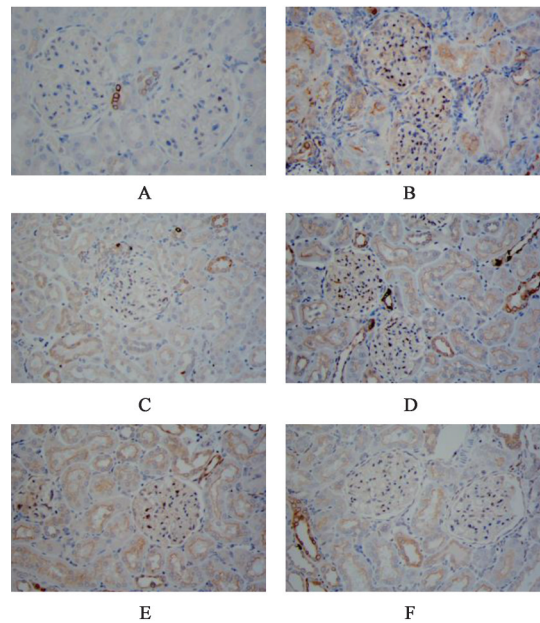


图3 当归芍药散对NS大鼠肾皮质TRPC6表达分布的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Danggui Shaoyaosan on expression and distribution of TRPC6 in renal cortex of NS rats (IHC, ×400)

3.6 对大鼠肾组织AT1R, TRPC6, Caspase-3蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠AT1R, TRPC6, Caspase-3蛋白表达量显著增加, Nephryn蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,氯沙坦组和当归芍药散各给药组大鼠AT1R, TRPC6, Caspase-3蛋白表达量显著降低, Nephryn蛋白表达显著升高,其中当归芍药散给药组以高剂量组效果最佳($P<0.01$)。见图5,表5。

3.7 对大鼠足细胞活性的影响 与正常组比较, Ang II对足细胞干预的浓度越高,对细胞增殖抑制率越高,而细胞的活性也越低,因此结合不同浓度的Ang II对细胞活性和增殖抑制的双重影响,最终将 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 设为干预浓度。见表6。

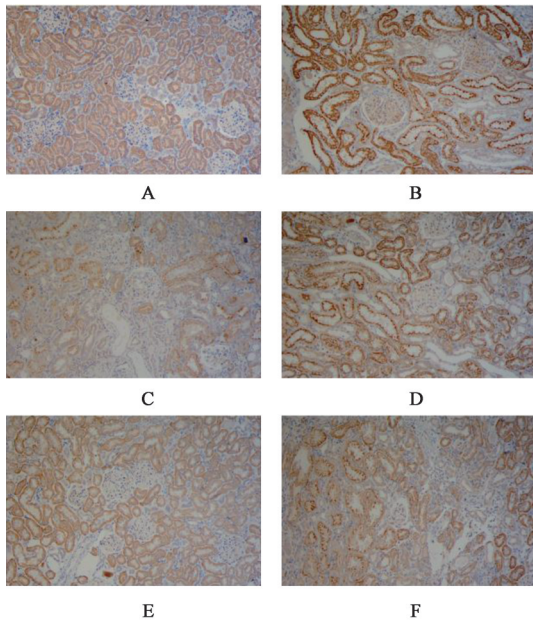


图4 当归芍药散对NS大鼠肾皮质AT1R表达分布的影响(免疫组化,×200)

Fig. 4 Effect of Danggui Shaoyaosan on expression and distribution of AT1R in renal cortex of NS rats(IHC,×200)

3.8 细胞形态学观察 正常状态下的足细胞具有绵长的足突,足突之间相互交融联系,而Ang II干预后足突出现明显的回缩,胞间联系明显变少。与正常组比较,Ang II干预后12 h足突开始出现回缩,

表5 当归芍药散对NS大鼠肾组织AT1R,TRPC6,Caspase-3及Nephrin蛋白相对表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Danggui Shaoyaosan on relative expression levels of AT1R, TRPC6, Caspase-3, Nephrin in renal tissue of NS rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Caspase-3/ β -actin	AT1R/ β -actin	TRPC6/ β -actin	Nephrin/ β -actin
正常		0.59±0.16	0.53±0.06	0.55±0.12	1.53±0.13
模型		1.45±0.09 ¹⁾	1.48±0.18 ¹⁾	1.47±0.18 ¹⁾	0.85±0.17 ¹⁾
当归芍药散	4.30	1.33±0.07	1.22±0.16	1.26±0.14	0.89±0.21
	8.60	1.10±0.18	1.10±0.24	1.12±0.99	0.94±0.15
	17.20	0.90±0.14 ²⁾	0.91±0.12 ²⁾	0.91±1.12 ²⁾	1.18±0.25 ²⁾
氯沙坦	0.03	0.89±0.21 ²⁾	0.85±0.15 ²⁾	0.88±0.79 ²⁾	1.22±0.14 ²⁾

表6 不同浓度的Ang II对足细胞活性的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of different concentrations of Ang II on podocyte activity ($\bar{x}\pm s, n=6$) %

组别	剂量/mol·L ⁻¹	细胞存活率	细胞增殖抑制率
正常		98.03±1.20	8.29±4.31
Ang II	1×10 ⁻⁴	25.36±4.78	89.37±5.43
	1×10 ⁻⁵	40.23±6.72	75.46±7.24
	1×10 ⁻⁶	67.85±4.31	64.98±5.63
	1×10 ⁻⁷	83.48±6.05	49.07±8.77
	1×10 ⁻⁸	95.29±4.22	30.75±6.98

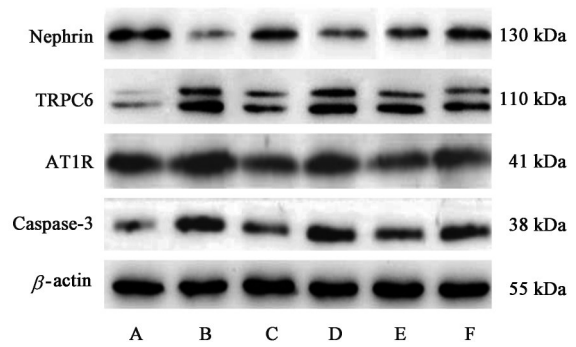


图5 大鼠肾组织AT1R,TRPC6,Caspase-3,Nephrin的蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of AT1R, TRPC6, Caspase-3 and Nephrin protein expression in renal tissue of rats in each group

24 h出现大范围回缩,48 h后足突几乎全部融合或消失,因此Ang II的干预时间设为24 h。见图6。

3.9 对大鼠足细胞AT1R,TRPC6,Caspase-3蛋白表达的影响 与正常组大鼠足细胞比较,Ang II组细胞AT1R,TRPC6,Caspase-3蛋白表达量显著增加($P<0.01$),Nephrin蛋白表达量显著降低($P<0.01$);与Ang II组比较,Ang II+SAR7334组与当归芍药散各含药血清组细胞AT1R,TRPC6,Caspase-3蛋白表达量显著降低,Nephrin蛋白表达量显著升高($P<0.01$),其中当归芍药散给药组以15%含药血清组效果最佳。见图7,表7。

4 讨论

本研究采用两次尾静脉注射阿霉素法可以很好的复制NS大鼠模型^[21],本实验研究结果显示,NS大鼠肾功能明显下降,蛋白尿显著,血生化指标失衡,肾脏病理结果进一步显示,NS大鼠肾组织病理改变明显,肾小球结构紊乱,足细胞大量融合,足突融合率升高。

蛋白尿的形成主要是由于肾小球滤过屏障受损^[22]。足细胞位于滤过屏障的最外层,其胞体具有向外延伸、相互交错的足突,相邻足突之间桥接形

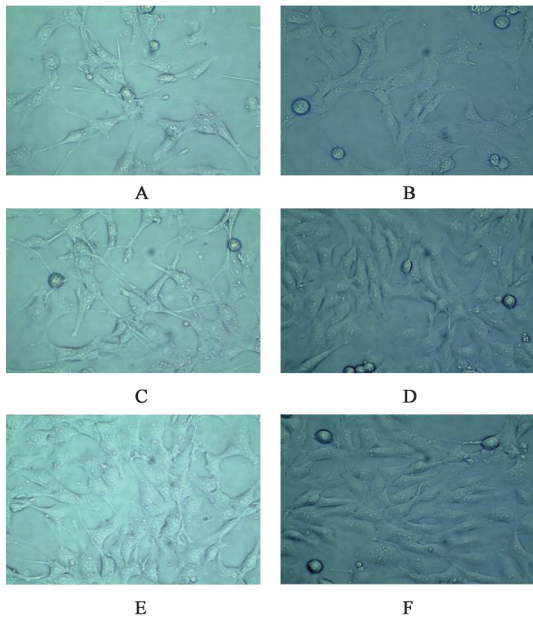


图6 Ang II刺激下的足细胞形态学观察(倒置显微镜, ×400)
Fig. 6 Morphological observation of podocyte stimulated by Ang II (inverted microscope e, ×400)

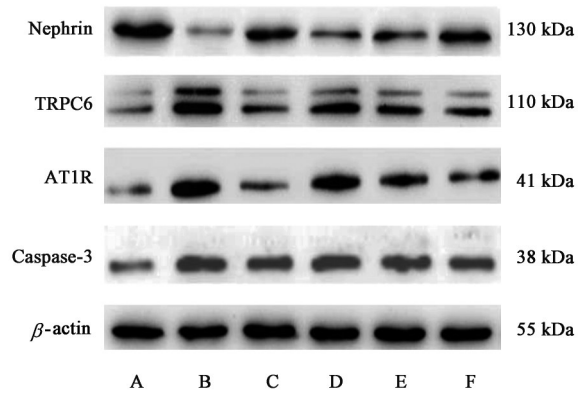


图7 各组足细胞AT1R, TRPC6, Caspase-3, Nephrin的蛋白表达电泳
A. 正常组; B. Ang II组; C. Ang II+SAR7334组; D. Ang II+5% 当归芍药散组; E. Ang II+10% 当归芍药散组; F. Ang II+15% 当归芍药散组

Fig. 7 Electrophoresis of AT1R, TRPC6, Caspase-3 and Nephrin protein expression podocytes of each group

表7 当归芍药散含药血清对各组足细胞AT1R, TRPC6, Caspase-3及Nephrin蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Danggui Shaoyaoan medicated serum on relative expression levels of AT1R, TRPC6, Caspase-3 and Nephrin in podocellular cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/mol·L ⁻¹	Caspase-3/ β -actin	AT1R/ β -actin	TRPC6/ β -actin	Nephrin/ β -actin
正常		0.24±0.02	0.29±0.03	0.18±0.02	0.75±0.04
Ang II	1×10 ⁻⁶	0.79±0.09 ¹⁾	0.73±0.09 ¹⁾	0.58±0.06 ¹⁾	0.32±0.11 ¹⁾
Ang II+SAR7334	1×10 ⁻⁶ +1×10 ⁻⁶	0.42±0.07 ²⁾	0.43±0.08 ²⁾	0.28±0.08 ²⁾	0.59±0.09 ²⁾
Ang II+当归芍药散	1×10 ⁻⁶ +4.30 ³⁾	0.65±0.05	0.62±0.07	0.45±0.05	0.45±0.15
	1×10 ⁻⁶ +8.60 ³⁾	0.57±0.04	0.56±0.04	0.39±0.07	0.48±0.14
	1×10 ⁻⁶ +17.20 ³⁾	0.49±0.09 ²⁾	0.49±0.05 ²⁾	0.32±0.07 ²⁾	0.58±0.06 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01;³⁾表示剂量单位为g·kg⁻¹。

和足突消失有关^[26],另一方面认为与胞内钙超载有关^[27]。在本研究中,选取最具有标志性的足细胞结构蛋白Nephrin进行研究,显示NS大鼠肾皮质中Nephrin蛋白表达水平显著降低,而当归芍药散可显著诱导Nephrin表达增加,推测蛋白尿的发生与足细胞结构崩塌骨架重排具有直接相关性^[28],电镜结果显示,当归芍药散具有修复足细胞结构骨架作用。

NS的中医病机为脾虚血瘀水停,当归芍药散具通畅血脉,运化脾湿,调节水电解质失衡之效。目前通过网络药理学对当归芍药散进行基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析等肾小球疾病靶点的评估,发现当归芍药散的

主要成分包括儿茶素、芍药苷、谷甾醇等^[29],儿茶素可以通过抑制大鼠肾脏血管内皮生长因子的分泌而降低蛋白尿,同时有效阻滞肾脏微血管密度的减少,抑制RAS系统的激活,上调血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)的活性,延缓肾小球硬化^[30]。本研究结果显示,当归芍药散可降低肾足细胞局部Ang II的含量,减少蛋白尿,推测当归芍药散可能是通过作用于氨基酸途径调节ACE,从而干扰代谢物影响肾素-血管紧张素-醛固酮系统^[10],逆转Ang II表达的升高,作为经典复方,与机体对氯沙坦的高依赖性比较,当归芍药散对NS的治疗作用更多的在于损伤后整体性的修复和调节,从而阻断NS病理发展进程。

Ang II 是RAS系统中最具生物活性的物质,参与调节全身的血流动力学^[11,31]。Ang II 可与受体AT1R结合引发系膜细胞肥大并启动凋亡^[22];并通过诱导转化生长因子- β (TGF- β)的增加,引起肾小球高血压、缺血缺氧,激发蛋白尿^[32]。TRPC6是位于足突上参与调节胞内钙信号的通道蛋白^[14-15,33], SAR7334是目前临床上TRPC6通道的特异性拮抗剂,可有效抑制TRPC6通道活性^[34]。在体实验中NS大鼠中出现了Ang II 和其受体AT1R, TRPC6表达及分布的异常上调,用Ang II 作为刺激因子体外直接刺激MPC5足细胞,形态学观察发现Ang II 干预可引起足突融合,同时诱导TRPC6, Caspase-3蛋白表达增加;而当给予SAR7334或当归芍药散后,可逆转上述蛋白诱导的升高,同时修复足细胞骨架。

KANG等^[28]研究发现Ang II 水平的升高,可使足细胞中的钙离子从动态稳定转变为自迁徙状态,导致钙失衡^[35]。因此笔者猜测NS大鼠肾局部出现了钙离子失衡。CaN是一种参与钙信号转导的丝氨酸蛋白磷酸酶,介导Ca²⁺内流^[20,36]。本实验结果显示,NS大鼠血浆CaN过表达,而当归芍药散可以减少其表达。基于此推测NS足细胞损伤的可能机制为:当肾脏出现缺血,交感神经兴奋激活RAS系统^[37],以Ang II 为主的RAS分子在肾局部过表达,与受体结合激活TRPC6^[15,36],刺激CaN表达增多,导致钙离子过度内流,同时胞内钙离子瞬时超载^[13],激活凋亡程序,凋亡蛋白表达增多,足细胞结构崩塌骨架重排,引发损伤^[20,29,33]。而当归芍药散可以通过拮抗Ang II /TRPC6通路引起的钙信号异常,逆转诱导凋亡的升高和足细胞结构异常,修复滤过^[28]。

本课题实验结果表明,当归芍药散可以通过抑制Ang II 和TRPC6表达上调,通过改善足细胞结构完整性,修复肾小球滤过分子屏障,降低NS足细胞损伤。但TRPC6通道的激活具体是如何导致钙超载引起足细胞损伤的,需要进一步探究,因此课题组下一步计划结合流式细胞术和共聚焦显微镜聚焦于MPC5足细胞,探究TRPC6具体的分子机制,为临床研究慢性肾小球疾病提供新的思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SINGH R, BHALLA K, NANDA S, et al. Correlation of spot urinary protein: creatinine ratio and quantitative

proteinuria in pediatric patients with nephrotic syndrome[J]. J Family Med Prim Care, 2019, 8(7): 2343-2346.

[2] SAMUEL S, BITZAN M, ZAPPITELLI M, et al. Canadian society of nephrology commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis: management of nephrotic syndrome in children[J]. Am J Kidney Dis, 2014, 63(3):354-362.

[3] YAMAZAKI M, FUKUSUMI Y, KAYABA M, et al. Possible role for glomerular-derived angiotensinogen in nephrotic syndrome[J]. JAAS, 2016, doi: 10.1177/1470320316681223.

[4] ABRAHAMSON D R. Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane[J]. Am J Physiol, 1987, 253(5/2):F783-F794.

[5] 王新斌,戴恩来,薛国忠,等. 基于RhoA/ROCK通路探讨淫羊藿苷对肾病综合征大鼠的保护机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(11):78-84.

[6] NIELSEN S, FRØKIAER J, MARPLES D, et al. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine[J]. Physiol Rev, 2002, 82(1):205-244.

[7] 方庆. 当归芍药散对肾病综合征大鼠一氧化氮和水通道蛋白2表达的影响及机制研究[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2017.

[8] 周敏,王运来,方庆,等. 当归芍药散对阿霉素肾病综合征大鼠一氧化氮及其合酶表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(1):44-47.

[9] 宏斌. 当归芍药散对肾病综合征幼鼠CTGF表达的影响[D]. 哈尔滨:黑龙江省中医药科学院, 2019.

[10] WANG Y, FAN S, YANG M, et al. Evaluation of the mechanism of Danggui-Shaoyao-San in regulating the metabolome of nephrotic syndrome based on urinary metabolomics and bioinformatics approaches[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 261:113020.

[11] FORRESTER S J, BOOZ G W, SIGMUND C D, et al. Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology[J]. Physiol Rev, 2018, 98(3):1627-1738.

[12] KALLURI R. Proteinuria with and without renal glomerular podocyte effacement[J]. JASN, 2006, 17(9):2383-2389.

[13] MUÑOZ M, RINCÓN J, PEDREAÑEZ A, et al. Proinflammatory role of angiotensin II in a rat nephrosis model induced by Adriamycin[J]. JAAS, 2011, 12(4):404-412.

[14] MAIER T, FOLLMANN M, HESSLER G, et al. Discovery and pharmacological characterization of a

- novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(14):3650-3660.
- [15] ASGHAR M Y, TÖRNQUIST K. Transient receptor potential canonical (TRPC) channels as modulators of migration and invasion[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1739.
- [16] DRYER S E, ROSHANRAVAN H, KIM E Y. TRPC channels: regulation, dysregulation and contributions to chronic kidney disease[J]. *BBA-Mol Basis Dis*, 2019, 1865(6): 1041-1066.
- [17] CHI X G, HU B, YU S Y, et al. Losartan treating podocyte injury induced by Ang II via downregulation of TRPC6 in podocytes[J]. *JAAS*, 2015, 16(4): 1118-1124.
- [18] ZHANG H, DING J, FAN Q, et al. TRPC6 up-regulation in Ang II -induced podocyte apoptosis might result from ERK activation and NF-kappaB translocation[J]. *Exp Biol Med*, 2009, 234(9): 1029-1036.
- [19] SHENG Y, LI Y, ZHI H, et al. Influence of tacrolimus on podocyte injury induced by angiotensin II [J]. *JAAS*, 2015, 16(2):260-266.
- [20] ILATOVSKAYA D V, PALYGIN O, LEVCHENKO V, et al. The role of angiotensin II in glomerular volume dynamics and podocyte calcium handling[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):299.
- [21] GUO J, ZOU Y, WU Z, et al. Protective effects of mesenchymal stromal cells on adriamycin-induced minimal change nephrotic syndrome in rats and possible mechanisms [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(4): 471-484.
- [22] ZHU Y, ZUO N, LI B, et al. The expressional disorder of the renal RAS mediates nephrotic syndrome of male rat offspring induced by prenatal ethanol exposure[J]. *Toxicology*, 2018, doi:10.1016/j.tox.2018.03.004.
- [23] HU Y, YE S, XING Y, et al. Saxagliptin attenuates glomerular podocyte injury by increasing the expression of renal Nephhrin and podocin in type 2 diabetic rats[J]. *Acta Diabetol*, 2020, 57(3):279-286.
- [24] COWARD R J, FOSTER R R, PATTON D, et al. Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(3):629-637.
- [25] KAWACHI H, FUKUSUMI Y. New insight into podocyte slit diaphragm, a therapeutic target of proteinuria [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2020, 24(3): 193-204.
- [26] CASTROP H, SCHIEBL I M. Novel routes of albumin passage across the glomerular filtration barrier [J]. *Acta Physiol*, 2017, 219(3):544-553.
- [27] GREKA A, MUNDEL P. Balancing calcium signals through TRPC5 and TRPC6 in podocytes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(11):1969-1980.
- [28] KANG J S, LEE S J, LEE J H, et al. Angiotensin II -mediated MYH9 downregulation causes structural and functional podocyte injury in diabetic kidney disease [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):7679.
- [29] 顾鸣佳, 陆丽丹, 朱莺, 等. 基于网络药理学探讨当归芍药散治疗特发性膜性肾病的机制[J]. *中国中医药导报*, 2020, 26(6):77-83.
- [30] 曹艳, 何小解, 向伟, 等. 儿茶素对5/6肾切除大鼠肾脏微血管的保护作用及其机制[J]. *中国中西医结合学报*, 2009, 7(6):557-562.
- [31] 岳晓莉, 王成业, 姚瑶, 等. 当归芍药散对肝硬化腹水大鼠血管紧张素 II、内皮素-1的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2015, 34(1):59-61.
- [32] GAO N, WANG H, YIN H, et al. Angiotensin II induces calcium-mediated autophagy in podocytes through enhancing reactive oxygen species levels [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, doi: 10.1016/j.cbi.2017.09.010.
- [33] CARDOSO V G, GONÇALVES G L, COSTA-PESSOA J M, et al. Angiotensin II -induced podocyte apoptosis is mediated by endoplasmic reticulum stress/PKC- δ /p38 MAPK pathway activation and trough increased Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 activity [J]. *BMC Nephrol*, 2018, 19(1):179.
- [34] STARUSCHENKO A, SPIRES D, PALYGIN O. Role of TRPC6 in progression of diabetic kidney disease [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2019, 21(7):48.
- [35] 黄超贤, 张萃. TRPC6与疾病研究进展[J]. *国际医药卫生导报*, 2011, 17(6):765-767.
- [36] YU Y, ZHANG L, XU G, et al. Angiotensin II type I receptor agonistic autoantibody induces podocyte injury via activation of the TRPC6-Calcium/Calcineurin pathway in pre-eclampsia [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2018, 43(5):1666-1676.
- [37] 周敏, 姚瑶, 王运来, 等. 当归芍药散对妊娠高血压大鼠的干预作用及血管活性物质的影响[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(11):2561-2563.

[责任编辑 孙丛丛]