

加味当归补血汤对细胞骨架蛋白在阿霉素 肾病大鼠表达的影响

魏明刚^{1*}, 何伟明², 陆迅¹, 倪莉¹, 刘蔚¹, 顾冬梅¹, 李凤玲¹, 费梅¹, 张新苹¹

(1. 苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:利用阿霉素肾病模型(daunomycin-induce nephropathy, DMN)研究加味当归补血汤通过干预细胞骨架蛋白的表达对肾小球滤过作用所产生的影响。方法:SD大鼠分为正常组、模型组、贝那普利组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和加味当归补血汤组($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。其中模型组、贝那普利组和加味当归补血汤组使用阿霉素一次性尾静脉注射 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。造模后第2天分别ig给予贝那普利组和加味当归补血汤组相应的药物,每日1次,共8周。分别在造模第7,28,42,56天留取尿液标本,观察尿蛋白白蛋白含量的动态变化;取肾组织进行光镜、免疫组织化学对nephryn,巢蛋白(nestin)和vimentin的表达情况进行分析。结果:尿蛋白:在28,42,56d模型组与正常组比较尿蛋白增加均非常明显,差异有统计学意义($P<0.05$);各治疗组与模型组比较明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),且加味当归补血汤更显著。肾脏组织:光镜和免疫组织化学结果显示,加味当归补血汤治疗组与贝那普利治疗组和模型组比较系膜细胞增生、肾小管-间质病变情况和肾组织nephryn, nestin和vimentin蛋白的表达情况均减轻,尿蛋白含量比模型组明显减少,说明肾脏病变程度相比模型组减轻;治疗56d后肾组织RT-PCR及Western blot检测nephryn, nestin和vimentin表达之间存在线性关系;治疗组与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:加味当归补血汤对于阿霉素肾病模型的作用表现为保护足细胞裂孔膜结构的完整性的同时抑制系膜细胞增生和减轻肾小管-间质损伤,上述作用与改善细胞骨架蛋白的表达呈正相关。

[关键词] 加味当归补血汤; 阿霉素肾病; 细胞骨架蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0133-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220133

[收稿日期] 20140112(015)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273723,81373604);江苏省中医药管理局项目(LZ13235,LZ11094);苏州市科学技术局应用基础研究计划(SYS201016)

[通讯作者] *魏明刚,博士,副教授,从事中医药防治肾脏病的基础与临床,Tel:13813791993, E-mail:weimg@sina.com

- [7] 谢文英,景晓平.爱罗咳喘宁口服液治疗支气管哮喘42例[J].中国中医药信息杂志,2005,12(2):82.
- [8] 谢文英,常学辉,张良芝.爱罗咳喘宁汤治疗咳嗽变异性哮喘30例[J].中医研究,2007,20(5):35.
- [9] 谢文英,常学辉,张良芝.爱罗咳喘宁口服液对支气管哮喘患者白细胞介素2及白细胞介素13的影响[J].中医杂志,2007,48(7):614.
- [10] 谢文英,张良芝,刘霖,等.爱罗咳喘宁口服液对慢性支气管炎大鼠白细胞介素-13和肿瘤坏死因子- α 含量的影响[J].中国新药杂志,2012,21(5):551.
- [11] Mahadeva R, Shapiro S D. Chronic obstructive pulmonary disease: experimental animal models of pulmonary emphysema[J]. Thorax, 2002, 57(10):908.
- [12] 宋小莲,王昌惠,白冲.脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺病大鼠模型的比较[J].第二军医大学学报,2010,31(3):246.
- [13] 宋一平,崔德健,茅培英,等.慢性阻塞性肺病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J].中华内科杂志,2000,39(8):556.
- [14] 尚立芝,谢文英,张良芝,等.爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠白三烯 B4、白细胞介素-6及肺组织病理形态的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(12):170.
- [15] 谢文英,尚立芝,张良芝,等.爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-8和白细胞介素-18及炎细胞的影响[J].中国中医基础医学杂志,2014,20(4):448.
- [16] 尚立芝,王付,苗小玲,等.四逆散加味抗大鼠肝纤维化的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(18):194.
- [17] 尚立芝,王付,苗小玲,等.四逆散加味抗肝纤维化的作用及机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):207.
- [18] Verlman A S. Physiological importance of aquaporin water channels[J]. Ann Med, 2002,4(3):192.
- [19] Towne J E, Krane C M, Bachurski C J, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells[J]. J Bio Chemistry, 2001, 276(22):18657.

[责任编辑 聂淑琴]

Therapeutic Effect of Jiawei Danggui Buxue Tang on Podocyte in Daunomycin-induced Nephropathy

WEI Ming-gang^{1*}, HE Wei-ming², LU Xun¹, NI Li¹, LIU Wei¹,
GU Dong-mei¹, LI Feng-ling¹, FEI Mei¹, ZHANG Xin-ping¹

(1. The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China;
2. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Jiawei Danggui Buxue Tang (JWDGBXT) on daunomycin-induced nephropathy (DN) by in rats. **Method:** SD rats were divided into four groups, including normal controls, model group, benazeprilgroup (1 mg·kg⁻¹) JWDGBXT (10 g·kg⁻¹). The adriamycin atdose of 6 mg·kg⁻¹ was used to establish the model. The benepril or JWDGBXT was given by intragastric administration. 7, 28, 42 and 56 days after the treatment, the levels of microdosis proteinuria were tested. The renal tissue was processed for the examinations of light microscopy and immunohistochemistry. Then the renal tissue was assayed by the way of RT-PCR and Western blot to observe the level of nephrin, nestin and vimentin. **Result:** Compared with the normal group, model group had obvious changes at the 24 h urine protein ($P < 0.05$). Moreover, JWDGBXT could significantly reduce protein uria in rats with daunomycin-induce nephropathy than model group and benepril group ($P < 0.05$). The intercapillary cells had different hyperplasy of the SD rats. The pathological changes of renal tissue at renal tubular and renal interstitial were analyzed. Then, the level of nephrin, nestin and vimentin of the renal tissue was detected by the way of RT-PCR and Western blot. The level of nephrin, nestin and vimentin wa improved. **Conclusion:** JWDGBXT could decrease the level of proteinuria, protecte the podocytes and suppress the hyperplasy of the intercapillary cells. All of the actions may be associated with the cytoskeletal protein: nestin and vimentin.

[Key words] Jiawei Danggui Buxue Tang; daunomycin-induce nephropathy; podocytes

足细胞足突之间的裂孔隙膜(SD)由多种穿膜蛋白组成的拉链状结构是肾小球滤过膜的基础。相邻足细胞足突的SD蛋白以nephrin为代表构成拉链样连接防止血浆蛋白质滤过的主要屏障。研究证实nephrin表达异常与足突融合、蛋白尿产生和肾小球硬化密切相关。伴有大量蛋白尿的阿霉素肾病动物模型中足突融合是最常见的形态改变,在足突融合的过程中足突与基底膜的相互作用和足突的细胞骨架改变可能与足突融合相关。细胞骨架是各种损伤因素作用于足细胞引起足突融合的“共同的最后道路”。巢蛋白(nestin)是一种中间丝的细胞骨架蛋白。巢蛋白首先被发现于胚胎神经干细胞,且在干细胞中的表达为一过性,当组织分化成熟巢蛋白的表达即消失。为此,巢蛋白被广泛用作干细胞的标志蛋白。最近的研究发现在小鼠肾脏的足细胞中有大量巢蛋白表达。巢蛋白含有多个可与其他结构蛋白结合的区域,因此很可能在足细胞结构蛋白

的组装中起桥梁作用。然而巢蛋白在大鼠表达情况与足细胞之间的关系尚未可知。笔者观察了巢蛋白在大鼠肾脏的表达情况,并就足细胞与巢蛋白相互作用的其他结构蛋白进行了研究。

1 材料

1.1 动物 SFP级健康雄性SD大鼠,体重180~200g,由上海斯莱克实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(沪)2012-0002。

1.2 药物 中药黄芪、当归等药物购自苏州市天灵中药饮片有限公司。盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司,批号x1553)。注射用盐酸多柔比星(阿霉素,深圳万乐药业股份有限公司生产,批号1207E2),加味当归补血汤制备:将黄芪、当归等药物按照1:1的比例制备成混悬液1g·mL⁻¹。

1.3 试剂及仪器 尿微量白蛋白检测试剂盒购自上海太阳生物技术有限公司(批号653022)。RT-PCR试剂盒(批号A3500),dNTPs(批号

CBF4901A), $MgCl_2$ (批号 AB401A), *rTaq* PCR 聚合酶 (批号 DR100AM), PCR DL2000 Marker (批号 D501A) 均为 Takara 产品。焦碳酸二乙酯 (DEPC, Amresco 分装, 批号 E174)。Tris-base (Amresco 分装, 批号 D0194)。nephin, nestin, vimentin 一抗 (批号 ab-58968, ab-93157, ab-92547), 二抗 goat anti-rat IgG, 批号 ab-6741), 均为 Abcam 公司。BIO-RAD550 型酶联免疫检测仪 (伯乐生命医学产品有限公司), 核酸蛋白定量仪 (德国 Eppendore 公司), PCR 扩增仪 (Hybaid Express, 英国 Hybaid 公司), EC250-90 型电泳仪 (美国 EC 公司), DYY-III 30 型电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司), Alpha Imager 2000 凝胶图像系统 (美国 Alpha 公司)。

2 方法

2.1 模型制备及分组 大鼠适应性喂养 1 周后, 然后按照采用随机数字表法分为对照组、模型组、贝那普利组和加味当归补血汤组。阿霉素肾病模型的制备: 模型组、贝那普利组和加味当归补血汤组大鼠尾静脉注射阿霉素注射液 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [1-2], 根据文献和相关研究基础 [3], 造模 1 周后测定大鼠尿白蛋白定量型试验 > “++” 为造模成功。

2.2 给药各组药物按照人类常用剂量与大鼠剂量的换算关系 [4] 制备混悬液。结合相关实验结果及文献确定药物剂量 [3-5]: 盐酸贝那普利片混悬液为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 剂量 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$, 共 8 周。加味当归补血汤组: 制备中药方剂的质量浓度为含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 剂量 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$, 共 8 周; 模型组: 每天 *ig* 生理盐水溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 共 8 周; 正常组: 注射与模型组等剂量的生理盐水。分别在第 7, 28, 42, 56 天应用代谢笼留取大鼠 24 h 尿液; 第 56 天大鼠处死留取肾组织。

2.3 检测指标

2.3.1 24 h 尿蛋白变化 金属代谢笼收集 24 h 尿液后应用 BIO-RAD550 型酶联免疫检测仪计算 24 h 尿蛋白排泄量。

2.3.2 肾组织的病理变化 根据 1982 年世界卫生组织拟定的疾病形态学分类标准进行光镜观察记录, 进行肾小管间质病变半定量评分。

2.3.3 免疫组织化学 应用计算机医学病理图像分析系统对肾脏组织切片的免疫组织化学染色的结果进行分析, 棕色或者棕褐色着色面积作为阳性面积。显微镜下每个组织切片采集 10 个不重叠视野中的阳性染色面积。

2.3.4 肾脏组织 nephin, nestin, vimentin 检测 采用 RT-PCR 和 Western blot 法。肾组织蛋白 nephin, nestin 和 vimentin 的引物序列是根据网上 NCBI 数据库中各自基因序列设计获得, 由上海生工生物技术有限公司合成, 见表 1。

表 1 nephin, nestin 和 vimentin 的引物序列

基因	引物序列	产物长度 /bp
nephin	上游 5'-GCCCAATACACACAGAAGCTC-3'	203
	下游 5'-CATTTCATACTCTGCGTCATCA-3'	
nestin	上游 5'-TACAGCCACTGAGGTATCTG-3'	504
	下游 5'-TCACTGCCATCTGCTC ATTC-3'	
vimentin	上游 5'-CCGCTTTGCCAACTACAT-3'	487
	下游 5'-GCAGCCACGCTTTCATAC-3'	
β -actin	上游 5'-GTTGTCCCTGTATGCCTCTG-3'	548
	下游 5'-GGAGCCAGGCCAGTAATCT-3'	

2.3.4.1 检测肾脏组织 nephin, nestin 和 vimentin 核酸表达 取各组大鼠肾皮质, 采用异硫氰酸胍-酚-三氯甲烷一步法抽提总 RNA, 运用逆转录试剂盒, 逆转录 cDNA。nephin, nestin, vimentin, β -actin 引物由上海生工生物技术有限公司合成。取 PCR 产物 $5 \mu\text{L}$, 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, Alpha Imager 2000 凝胶图像系统对凝胶进行拍照和吸光度数据分析, 结果分别与 β -actin 对照, 数值以两者吸光度比值表示。

2.3.4.2 检测肾皮质 nephin, nestin 和 vimentin 蛋白表达 取各组大鼠肾皮质, 用含蛋白酶抑制剂的组织裂解液在研磨器中研磨, 离心取上清液即为总蛋白。用 ECL 化学发光剂在 X 射线片上曝光, 显影、定影、冲洗晾干后扫描蛋白条带。以 β -actin 为内参, 采用 Cymentre 2000 柯达活体成像仪进行定量分析。

2.3.4.3 统计学方法 采用 SPSS 统计软件处理。各组数据均数采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.01$ 为有统计学意义。相关分析采用 Pearson 相关。

3 结果

3.1 24 h 尿白蛋白定量 造模第 1 周模型组大鼠 24 h 尿白蛋白定量均明显增加, 与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。造模第 8 周贝那普利组和加味当归补血汤组分别与贝那普利组及模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠不同时间 24 h 尿蛋白定量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	24 h 尿蛋白定量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			
		1 周	4 周	6 周	8 周
正常	-	15.76 ± 7.06	16.10 ± 6.13	15.78 ± 5.78	14.31 ± 4.24
模型	-	36.17 ± 6.27 ¹⁾	103.15 ± 20.67 ²⁾	260.14 ± 50.65 ²⁾	502.13 ± 107.24 ²⁾
贝那普利	1×10^{-3}	36.52 ± 7.22	85.12 ± 22.43	188.97 ± 47.29 ³⁾	235.06 ± 67.89 ³⁾
加味当归补血汤	10	35.35 ± 6.76	87.19 ± 26.32	100.13 ± 35.16 ^{3,4)}	76.01 ± 33.16 ^{3,4)}

注:与正常组同期比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组同期比较³⁾ $P < 0.05$;与贝那普利组同期比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 3 ~ 5 同)。

3.2 肾脏病理变化

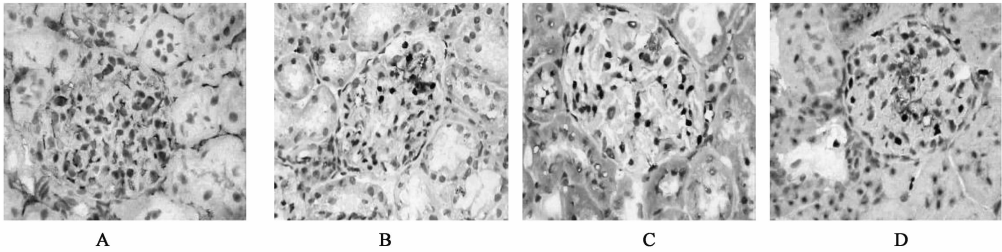
3.2.1 肾脏系膜基质指数(肾小球基质面积/肾小球面积)和肾脏小管-间质病理变化比较 模型组的系膜基质指数及肾小管-间质指数明显高于正常组($P < 0.05$)。加味当归补血汤组与贝那普利组均可以减轻系膜基质的病变程度,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

3.2.2 各组大鼠肾脏免疫组织化学观察 肾组织免疫组化结果(图 1 ~ 3),模型组大鼠肾小球中 nephrin, nestin, vimentin 染色面积明显减少、颜色变

表 3 加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠肾脏系膜基质指数及肾脏小管病变-间质指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	系膜基质指数	肾小管-间质指数
正常	-	0.22 ± 0.071	2.39 ± 0.87
模型	-	0.58 ± 0.129 ¹⁾	9.22 ± 1.13 ¹⁾
贝那普利	1×10^{-3}	0.36 ± 0.092 ³⁾	7.55 ± 0.93 ³⁾
加味当归补血汤	10	0.27 ± 0.068 ^{3,4)}	5.84 ± 1.11 ^{3,4)}

淡。贝那普利组和加味当归补血汤组上述部位染色强度较正常组变淡,染色面积减少,但是比模型组较深。染色强度的吸光度积分值见表 4。



A. 正常组;B. 模型组;C. 贝那普利 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组;D. 加味当归补血汤 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组(图 2 ~ 5 同)

图 1 加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠肾组织 nephrin 表达的影响 (DAB, $\times 400$)

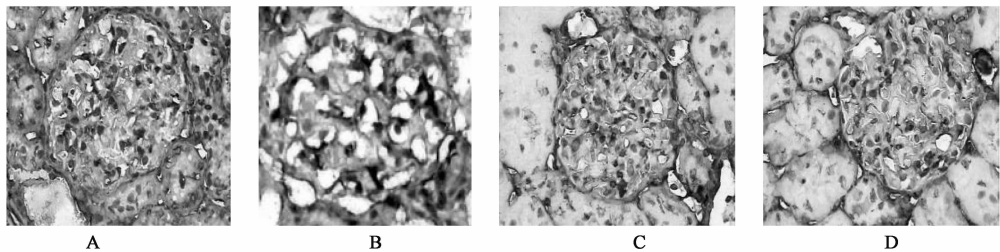


图 2 加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠肾组织 nestin 表达的影响 (DAB, $\times 400$)

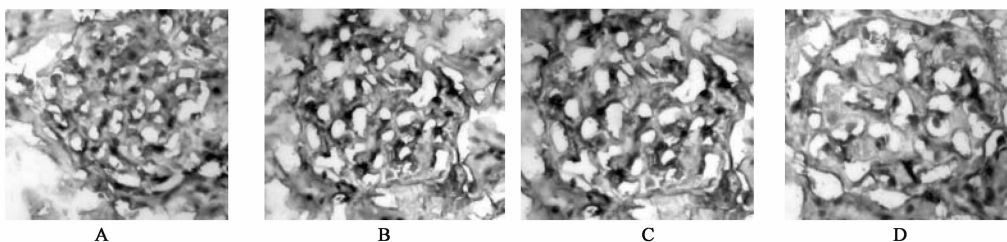


图 3 加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠肾组织 vimentin 表达的影响 (DAB, $\times 400$)

表4 加味当归补血汤对肾小球中 nephrin, nestin 和 vimentin 吸光度积分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	吸光度积分/分		
		nephrin	nestin	vimentin
正常	-	0.457 ± 0.055	0.398 ± 0.065	0.349 ± 0.029
模型	-	0.215 ± 0.042 ¹⁾	0.158 ± 0.033 ¹⁾	0.203 ± 0.018 ¹⁾
贝那普利	1×10^{-3}	0.272 ± 0.043 ³⁾	0.182 ± 0.038 ³⁾	0.239 ± 0.032 ³⁾
加味当归补血汤	10	0.331 ± 0.036 ^{3,4)}	0.261 ± 0.036 ^{3,4)}	0.283 ± 0.032 ^{3,4)}

3.2.3 肾脏皮质 nephrin, nestin 和 vimentin 的表达情况比较及相关分析 模型组 nephrin、nestin 和 vimentin 的蛋白和基因的表达情况明显低于正常组 ($P < 0.05$), 但应用加味当归补血汤组与贝那普利组干预后可以部分上调其表达量, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。相关分析结果显示, nestin 蛋白表达与足细胞功能蛋白 nephrin 之间显著相关 ($r = 0.7021, P < 0.05$); nestin 和 24 h 尿蛋白定量之间也有显著相关性 ($r = 0.7336, P < 0.05$)。见图 4~5, 表 5。

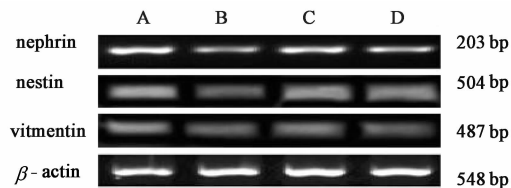


图4 加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠肾脏足细胞 3 种标志蛋白 mRNA 表达的影响 (RT-PCR 法)

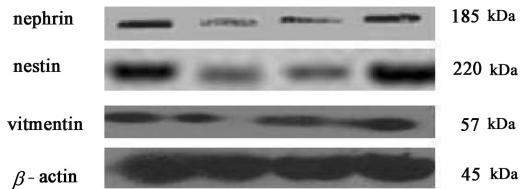


图5 加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠肾脏足细胞 3 种标志蛋白 mRNA 表达的影响 (Western blot 法)

4 讨论

蛋白尿的产生与肾小球滤过屏障密切相关。足细胞的细胞体生出许多伪足覆盖于肾小球基底膜上, 称为足突。足细胞之间的足突通过分子间的相互作用形成裂孔膜 (slit diaphragm, SD)^[6]。参与滤过分子大小的选择性通透, 维持血浆的正常滤过。随着对肾小球滤过膜结构的不断认识, 以 nephrin 为代表的足细胞 SD 蛋白表达异常与蛋白尿的病理联系已得到肯定^[7-8]。因此稳定足细胞分子 nephrin 表达可实现控制蛋白尿的目的。也就是说如何控制

表5 加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠肾脏足细胞标志蛋白 nephrin, nestin 和 vimentin 的 mRNA 及蛋白相对表达情况比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	mRNA			蛋白		
		nephrin	nestin	vimentin	nephrin	nestin	vimentin
		/β-action	/β-action	/β-action	/β-action	/β-action	/β-action
对照	-	0.309 ± 0.019	0.459 ± 0.017	0.357 ± 0.020	0.485 ± 0.025	0.492 ± 0.039	0.397 ± 0.033
模型	-	0.198 ± 0.026 ¹⁾	0.243 ± 0.025 ¹⁾	0.217 ± 0.024 ¹⁾	0.257 ± 0.029 ¹⁾	0.247 ± 0.041 ¹⁾	0.204 ± 0.029 ¹⁾
贝那普利	1×10^{-3}	0.243 ± 0.028 ³⁾	0.311 ± 0.016 ³⁾	0.325 ± 0.019 ³⁾	0.321 ± 0.034 ³⁾	0.312 ± 0.036 ³⁾	0.315 ± 0.031 ³⁾
加味当归补血汤	10	0.281 ± 0.023 ^{3,4)}	0.339 ± 0.018 ^{3,4)}	0.322 ± 0.017 ^{3,4)}	0.406 ± 0.018 ^{3,4)}	0.477 ± 0.042 ^{3,4)}	0.355 ± 0.038 ^{3,4)}

nephrin 表达对保护足细胞, 减轻蛋白尿和治疗肾脏疾病意义重大。巢蛋白首先由 McKay 等发现表达于胚胎神经干细胞, 对巢蛋白的结构研究提示巢蛋白参与足细胞形态与功能的维持。笔者在前期研究中发现肾小球区域有巢蛋白的表达, 而且其表达的强弱与足细胞具有一定的一致性。因此, 巢蛋白的表达可能与足细胞 SD 蛋白表达之间存在线性关系。笔者进一步探讨通过不同药物治疗对巢蛋白表

达改变对足细胞的影响。

阿霉素肾病是最为经典的肾脏病病理模型, 阿霉素肾病大鼠主要病理表现为以足细胞损害及大量蛋白尿为主^[1]。以往研究未见涉及足细胞 SD 蛋白与巢蛋白之间关系以及中药干预对其影响的内容。在以往的实验过程中肯定阿霉素肾病大鼠有典型的足细胞损害和大量蛋白尿, 结合笔者课题组在临床和前期实验研究具有确切疗效的加味当归补血汤中

药方剂(黄芪、当归等)^[5,9-10]对阿霉素肾病大鼠进行进一步的实验研究。通过本研究发现,加味当归补血汤可以明显减轻阿霉素肾病大鼠尿蛋白的漏出、减轻肾小球细胞外基质的堆积和肾小管间质损害的程度。对于由于足细胞是肾小球滤过膜最为重要的环节,而足细胞 SD 蛋白的表达与肾小球滤过功能之间有着十分密切的关系,SD 蛋白的表达情况直接影响肾小球的滤过功能和尿蛋白漏出的情况^[11-12]。中药方剂对于肾脏病的治疗作用和蛋白尿控制的核心问题就是能否保证足细胞的功能和形态是否保持在较好的状态^[13]。其中,足细胞 SD 蛋白的表达是否正常与 nephrin 蛋白密切相关^[14-15],而形态学维持则与中间丝蛋白 vimentin 和巢蛋白 nestin 的表达之间密切相关。通过肾脏组织的免疫组织化学和分子生物学的方法检测不难看出,应用中药方剂当归补血汤对于肾小球足细胞保护作用的确切性,并从组织学、基因和蛋白等多个层次证实了这个观点。

加味当归补血汤源自《内外伤辨惑论》中经典名方“当归补血汤”,方剂的选择是慢性肾脏病变发生的内外因两方面所决定^[16-17]。肾脏病变过程中出现的细胞的功能改变、炎症活化以及肾间质纤维化等病理改变均符合中医理论肾络瘀滞、瘀血阻络的特点。根据发病机制笔者确立了以“健脾益肾、活血通络”为治疗原则的中药方剂“加味当归补血汤”并在实验中可以减少阿霉素肾病大鼠尿蛋白漏出,减轻肾脏的小管-间质损害,部分上调巢蛋白的表达量而提高足细胞 SD 蛋白的表达水平,从而达到保护足细胞、延缓阿霉素肾病大鼠肾脏病变的进程。

[参考文献]

[1] Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats [J]. *Lab Invest*, 1982,46(1):16.

[2] 鲁斌,李新民,马融. 对改造的阿霉素肾病模型的评价[J]. *实验动物科学与管理*,1999,16(3):5.

[3] 魏明刚,孙伟. 雷至胶囊治疗阿霉素肾病大鼠的实验研究[J]. *中国现代医药杂志*, 2009,11(2):7.

[4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:1860.

[5] 魏明刚,张玲,邵家德,等. 加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠治疗作用的实验研究[J]. *中华中医药杂志*,2011,26(5):157.

[6] Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(1):253.

[7] Guan N, Ding J, Zhang J, et al. Expression of nephrin, podocin, alpha-actinin, and WT1 in children with nephrotic syndrome [J]. *Pediatr Nephrol*, 2003, 18(11):1122.

[8] Yuan H, Takeuchi E, Taylor G A, et al. Nephrin dissociates from actin and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002,13(4):946.

[9] 魏明刚,张玲,倪莉,等. 加味当归补血汤对阿霉素肾病大鼠肾脏足细胞保护机制的实验研究 [J] *中国中西医结合杂志*,2012,32(8):1077.

[10] Wei M G, Sun W, Xiong P H, et al. Antifibrotic effect of the Chinese herbs modified Danggui Buxue decoction on adriamycin-induced nephropathy in rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2012,18(8):591.

[11] Nakatsue T, Koike H, Han G D, et al. Nephrin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2005,67(6):2239.

[12] Guan N, Ding J, Zhang J, et al. Expression of nephrin, podocin, alpha-actinin, and WT1 in children with nephritic syndrome [J]. *Pediatr Nephrol*, 2003, 18(11):1122.

[13] 窦晨辉,万毅刚,孙伟,等. 中药延缓慢性肾脏病进展的机制[J]. *中国中药杂志*,2009,34(8):939.

[14] Philippe A, Weber S, E squivel EL, et al. A missense mutation in podocin leads to early and severe renal disease in mice[J]. *Kidney Int*, 2008(73):1038.

[15] Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria [J]. *N Engl J Med*, 2006,354:1387.

[16] 魏明刚,周栋,高坤. 肾脏病的基本病机探讨和益肾清利和络泻浊法应用的分析[J]. *辽宁中医*,2010,37(4):642.

[17] 魏明刚. 肾脏病病机的理论探讨[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011,17(11):1188.

[责任编辑 聂淑琴]