

## 加味升降散对膜性肾病大鼠 Notch 信号通路及足细胞凋亡的影响

高飞<sup>1,2</sup>, 王泽泽<sup>1,2</sup>, 杨冰<sup>1,2</sup>, 杨凤文<sup>2</sup>, 檀金川<sup>2\*</sup>

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 河北省中医院, 石家庄 050011)

**[摘要]** **目的:**通过研究加味升降散对膜性肾病(MN)模型大鼠 Notch 通路信号分子及下游凋亡相关基因的影响,探讨其抑制足细胞凋亡的分子机制。**方法:**将大鼠随机分为正常组,模型组,加味升降散组和贝那普利组,每组 10 只。采用尾静脉注射阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)建立 MN 大鼠模型,加味升降散组和贝那普利组分别以 27.3, 0.001 g·kg<sup>-1</sup> 灌胃(ig),正常组、模型组 ig 等体积生理盐水,连续干预 4 周。采用双缩脲法检测大鼠 24 小时尿蛋白(UTP)水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和免疫组化(IHC)检测大鼠肾组织中足萼蛋白(Podocalyxin),足细胞裂孔膜蛋白(Nephrin),膜蛋白(Podocin),突触足蛋白(Synaptopodin)mRNA 及蛋白水平,原位末端标记法(TUNEL)检测大鼠肾组织细胞凋亡率,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织中 Notch1, Hes1, B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax), Bcl-2 蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠 UTP 水平显著升高,肾组织细胞凋亡明显增多,足细胞标志蛋白 Podocalyxin, Nephrin, Podocin, Synaptopodin mRNA 和蛋白表达水平明显下降,Notch1, Hes1, Bax 蛋白表达量明显增多, Bcl-2 蛋白表达量明显减少( $P < 0.05$ );与模型组比较,加味升降散和贝那普利组大鼠 UTP 水平明显下降,肾组织细胞凋亡明显减少,足细胞标志蛋白 Podocalyxin, Nephrin, Podocin, Synaptopodin mRNA 和蛋白表达水平明显升高,Notch1, Hes1, Bax 蛋白表达量明显减少, Bcl-2 蛋白表达量明显升高( $P < 0.05$ )。**结论:**加味升降散可通过抑制 Notch 信号通路,减少大鼠肾组织足细胞凋亡,减轻 MN 大鼠肾损伤。

**[关键词]** 加味升降散; 膜性肾病; 足细胞; 足细胞标志物; 凋亡; Notch 信号通路

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0030-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202408

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201105.1724.007.html>

**[网络出版日期]** 2020-11-6 14:59

### Effect of Modified Shengjiangsans on Notch Signal Pathway and Podocyte Apoptosis in MN Rats

GAO Fei<sup>1,2</sup>, WANG Ze-ze<sup>1,2</sup>, YANG Bing<sup>1,2</sup>, YANG Feng-wen<sup>2</sup>, TAN Jin-chuan<sup>2\*</sup>

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Hebei Provincial Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China)

**[Abstract]** **Objective:** The purpose of this article was to observe the effect of modified Shengjiangsans on podocyte apoptosis in membranous nephropathy (MN) rats, to explore the molecular mechanism of its treatment of MN and to provide experimental basis for its clinical application. **Method:** The MN rat model was established by injection of cationic bovine serum albumin into the tail vein of rats. The successfully modeled rats were then randomly divided into model group (equal volume of normal saline), modified Shengjiangsans group (27.3 g·kg<sup>-1</sup>) and benazepril group (10 mg·kg<sup>-1</sup>), with corresponding drug dosage once a day for 4 weeks of continuous intervention. After drug administration, the 24-hour urine protein (UTP) was detected. Real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and immunohistochemical (IHC) methods

**[收稿日期]** 20200921(011)

**[基金项目]** 河北省自然科学基金项目(2019423037);河北省中医药管理局项目(2018024)

**[第一作者]** 高飞,在读博士,从事中西医结合肾病研究, E-mail: 595363137@qq.com

**[通信作者]** \* 檀金川,教授,博士生导师,从事中西医结合肾病研究, E-mail: 1955981973@qq.com

were used to detect Podocalyxin, Nephtrin, Podocin, Synaptopodin mRNA and protein expression levels in rat kidney tissue. terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick and labeling (TUNEL) method was used to detect cell apoptosis rate in rat kidney tissue, and Western blot was used to detect Notch1, Hes1, B lymphoblastoma-2 (Bcl-2) associated X protein (Bax), and Bcl-2 protein expression levels in rat kidney tissue. **Result:** Compared with the normal group, UTP in the model group increased significantly, renal tissue cell apoptosis increased significantly, podocyte marker proteins podocalyxin, Nephtrin, Podocin, Synaptopodin mRNA and protein expression levels decreased significantly, and Notch1, Hes1, Bax protein expression increased significantly, and Bcl-2 protein expression was significantly reduced ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, UTP levels in MN rats were significantly reduced in modified Shengjiangsans and benazepril groups, with reduced rate of renal cell apoptosis, increased mRNA and protein expression levels of podocalyxin, Nephtrin, Podocin, and Synaptopodin in renal tissue, decreased Notch1, Hes1, Bax protein expression, and increased Bcl-2 protein expression ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Modified Shengjiangsans can inhibit the Notch signaling pathway, reduce the apoptosis of rat kidney tissue podocytes, and reduce the kidney injury of MN rats.

[Key words] modified Shengjiangsans; membranous nephropathy; podocyte; podocyte marker; apoptosis; notch signal pathway

膜性肾病(MN)是非糖尿病成年人特发性肾病综合征最常见的病因,临床表现为肾病综合征或无症状蛋白尿,据报道其发病风险每年增加13%<sup>[1]</sup>。膜性肾病的发病机制涉及补体激活后基底膜(GBM)及其上皮细胞(足细胞)的损伤,导致大量蛋白尿<sup>[2]</sup>。足细胞结构和数量的完整是实现肾小球滤过功能的基础,足细胞损伤将导致蛋白尿和足细胞丢失<sup>[3]</sup>,足细胞损伤程度是决定MN预后的重要因素<sup>[4]</sup>。凋亡是足细胞减少的一个重要原因,也是膜性肾病发展的关键过程,而干预肾小球足细胞凋亡有利于延缓和治疗MN<sup>[5]</sup>。

升降散出自于清朝杨栗山《伤寒瘟疫条辨》,由僵蚕、蝉蜕、姜黄、大黄4味中药组成,被广泛应用于流感、肾病、癌症、鼻渊等多种疾病的治疗。课题组前期研究发现,升降散加味黄芪、淫羊藿、土茯苓治疗MN效果突出,可显著降低患者尿蛋白水平,改善临床症状<sup>[6]</sup>。实验研究显示,加味升降散可通过下调MN大鼠肾组织线粒体活性氧(ROS) mRNA表达,抑制足细胞凋亡、修复受损足细胞,初步揭示了其抑制足细胞凋亡的机制<sup>[6]</sup>。本研究在此基础上,观察加味升降散对MN大鼠肾小球足细胞相关生物标志物以及凋亡相关蛋白的影响,进一步探讨其治疗MN的分子机制,为临床应用提供实验依据,为足细胞损伤和MN的药物治疗提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 8周龄,体质量(150±20)g,SPF级雄性SD大鼠60只,购自河北医科大学实验动物中心,合格证号SCXK(冀)2018-004。在河北中医学院实验

动物中心以普通饲料、自由饮水和进食条件饲养大鼠。本动物实验经由河北中医学院动物伦理委员会批准。

**1.2 药品与试剂** 盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司,批号H20030514);加味升降散(大黄10g,僵蚕10g,姜黄12g,蝉蜕5g,土茯苓20g,黄芪30g,淫羊藿10g,药材均为颗粒剂,广东一方制药有限公司,批号分别为9065783,9060603,9040873,9052093,9075843,9080283,9055023);阳离子化牛血清白蛋白(Cationic Bovine Serum Albumin, C-BSA,美国Chondrex公司,批号190203);弗氏不完全佐剂,蛋白酶K(德国Sigma公司,批号分别为SLCB8385, P6556);尿蛋白浓度测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20180706);ApopTag®原位末端标记法(TUNEL)检测试剂盒(美国Chemicon公司,批号S7100);trizol,多克隆抗体一抗Notch1,足萼蛋白(Podocalyxin)(美国Thermo Fisher公司,批号分别为15596026, PA5-23181, PA5-95527);兔来源一抗足细胞裂孔膜蛋白(Nephtrin),膜蛋白(Podocin),突触足蛋白(Synaptopodin), Hes1, B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax), Bcl-2(美国Affinity公司,批号分别为DF7501, DF8593, DF12173, DF7569, AF0120, AF6139); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(中杉金桥生物有限公司,批号16AF0207);二抗(美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号sc-2357)。

**1.3 仪器** 721型可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);RM2015型切片机,CM1950型冰冻切片机

(德国 Leica 公司); BX53 型显微镜(日本奥林巴斯公司); H-7650 型透射电镜(日本日立公司); Mx 3000P 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Agilent 公司); Mini-PROTEAN 型电泳系统, Mini Trans-Blot 转移系统(美国伯乐公司); Kodak Image Station 2000MM 成像系统(美国 Kodak 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、模型制备、给药及取样** 60 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 将大鼠随机分为造模组 45 只, 正常组 15 只。参照改良 Border 法制备 MN 大鼠模型<sup>[7]</sup>。预免疫将 C-BSA 与等体积弗氏不完全佐剂混匀后于大鼠腋下、腹股沟多点皮下注射 0.1 mL, 隔日 1 次, 共 3 次。正式免疫则将 C-BSA 与等体积磷酸盐缓冲液(PBS)混匀后于大鼠尾静脉注射 0.5 mL, 每周 3 次, 连续 4 周。以大鼠 24 h 尿蛋白(UTP)≥20 mg 作为模型制备成功的标准, 同时随机处死造模组和正常组大鼠各 2 只, 观察大鼠肾脏组织病理学改变确认造模成功<sup>[6-7]</sup>。将造模组大鼠随机分为模型组、贝那普利组、加味升降散组, 每组均保留 10 只。根据人与大鼠的体表面积折算等效剂量<sup>[8]</sup>。贝那普利组及加味升降散组分别给予盐酸贝那普利 10 mg·kg<sup>-1</sup>、加味升降散 27.3 g·kg<sup>-1</sup> 灌胃, 正常组和模型组给予等体积生理盐水灌服。每日 1 次, 连续干预 4 周。使用代谢笼留取大鼠 24 h 尿液, 离心取上清液, 4 °C 冰箱保存备用。大鼠禁食水 12 h 后使用异氟烷吸入麻醉, 腹主动脉取血, 留取血清及肾组织, -80 °C 冰箱保存备用。

**2.2 双缩脲法检测大鼠 UTP 含量水平** 取大鼠尿液(上清液), 按照试剂盒说明书步骤进行检测。

**2.3 TUNEL 检测大鼠肾脏足细胞凋亡率** 使用组织切片机将石蜡包埋肾组织切成 4~5 μm 的薄片, 放置于粘附载玻片上, 二甲苯脱蜡, 乙醇水化, 蛋白酶 K 修复, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 淬灭过氧化物酶, TdT 酶孵育 30 min, 辣根酶标记链霉卵白素孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水透明, 中性树脂封片, 电子显微镜观察并拍照。半定量分析: 每张切片随机选取 5 个视野(×400), 使用 Image Pro Plus 6.0 软件计算每个视野下 TUNEL 阳性细胞数和有核细胞总数, 以 TUNEL 阳性细胞数/有核细胞总数为肾小球凋亡指数<sup>[9]</sup>。

**2.4 Real-time PCR 检测大鼠肾脏中 Podocalyxin, Nephtrin, Podocin, Synaptopodin mRNA 表达水平** 使用 trizol 法从肾组织中提取总 RNA, 将 RNA 反

转录为 cDNA。加入特异性引物, 配制反应体系后进行 PCR 扩增, 扩增条件为 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 循环 40 次。使用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算 mRNA 表达水平。引物由北京 Servicebio 公司设计合成, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Podocalyxin	上游 TCGGTGCCTACGACCGAAGA	149
	下游 AGGAGTTCCTCGTGGGGCTT	
Nephtrin	上游 GTTCCAAGCCTGGGGATGAGC	132
	下游 TGCAGAGCTGGAATGACAGTGA	
Podocin	上游 TCTGGATTAGGGCCTGCGA	173
	下游 AACAGGCCAGGTCCTTTGGC	
Synaptopodin	上游 AGCCCCACCTACAGCAGTGA	128
	下游 GGTTTCCACACCTGGGCCTC	

**2.5 免疫组化(IHC)检测大鼠肾脏 Podocalyxin, Nephtrin, Podocin, Synaptopodin 蛋白表达水平** 肾组织石蜡包埋后切片, 二甲苯脱蜡, 乙醇水化, 双氧水淬灭过氧化物酶, 乙二胺四乙酸(EDTA)修复抗原, 山羊血清封闭, 一抗 Nephtrin(1:200), Podocin(1:200), Synaptopodin(1:200), Podocalyxin(1:100)孵育过夜, 二抗孵育 30 min, 辣根酶标记链霉卵白素孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树脂封片, 电子显微镜观察并拍照。免疫组化半定量分析, 每张切片随机选取 5 个视野(×400), 使用 Image Pro Plus 6.0 软件计算每个视野下阳性结果的积分吸光度和面积, 以积分吸光度/面积作为检测指标的半定量结果<sup>[12]</sup>。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾脏 Notch1, Hes1, Bax, Bcl-2 蛋白表达水平** 使用 RIPA 裂解液提取肾组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。总蛋白与 5×Loading buffer 混合后 100 °C 变性 5 min, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳 2 h, PVDF 转膜 60 min。5% BSA 孵育 PVDF 膜 1.5 h, 一抗 Notch1(1:2 000), Hes1(1:2 000), Bax(1:2 000), Bcl-2(1:2 000), β-actin(1:5 000)孵育过夜。洗膜后二抗(1:5 000)孵育 1 h。ECL 法显色, 用 Image J 软件分析条带的灰度值, 以目的蛋白条带/β-actin 条带灰度值作为蛋白相对表达量。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 Tukey 法, P<0.05 表示差异有统计

学意义。

### 3 结果

**3.1 对MN大鼠UTP的影响** 与正常组比较,模型组大鼠UTP明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,贝那普利组和加味升降散组大鼠UTP明显降低( $P<0.05$ )。见表2。

**3.2 对MN大鼠肾组织中Nephrin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin mRNA表达水平的影响** 与正常组比较,模型组Nephrin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin mRNA表达水平明显降低( $P<0.05$ );与模型组比较,加味升降散和贝那普利

表2 加味升降散对MN大鼠UTP的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of modified Shengjiangsans (MS) on UTP in MN rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	UTP/mg
正常		7.42±0.89
模型		63.41±12.63 <sup>1)</sup>
加味升降散	27.3	23.27±6.17 <sup>2)</sup>
贝那普利	0.001	26.45±6.56 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ (表3~6同)。

组Nephrin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin mRNA表达水平均明显升高( $P<0.05$ )。见表3。

表3 加味升降散对MN大鼠肾组织中Nephrin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin mRNA表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of MS on gene expression of Nephrin, Podocin, Synaptopodin and Podocalyxin in kidney tissues of MN rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Nephrin	Podocin	Synaptopodin	Podocalyxin
模型		0.26±0.03 <sup>1)</sup>	0.06±0.13 <sup>1)</sup>	0.11±0.01 <sup>1)</sup>	0.09±0.01 <sup>1)</sup>
加味升降散	27.3	0.76±0.03 <sup>2)</sup>	0.58±0.04 <sup>2)</sup>	0.53±0.04 <sup>2)</sup>	0.44±0.03 <sup>2)</sup>
贝那普利	0.001	0.67±0.04 <sup>2)</sup>	0.43±0.03 <sup>2)</sup>	0.41±0.03 <sup>2)</sup>	0.35±0.03 <sup>2)</sup>

注:设正常组各指标mRNA相对表达量为1。

**3.3 对MN大鼠肾组织中Nephrin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中Nephrin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin表达明显降低( $P<0.05$ );

与模型组比较,加味升降散和贝那普利组大鼠肾组织中Nephrin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin蛋白表达均有不同程度升高( $P<0.05$ ),差异有显著统计学意义。见表4,图1。

表4 加味升降散对MN大鼠肾组织中Nephrin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin定位表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of MS on expression of Nephrin, Podocin, Synaptopodin and Podocalyxin in kidney tissues of MN rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Nephrin	Podocin	Synaptopodin	Podocalyxin
正常		0.323±0.014	0.280±0.015	0.334±0.017	0.301±0.007
模型		0.024±0.003 <sup>1)</sup>	0.051±0.003 <sup>1)</sup>	0.046±0.003 <sup>1)</sup>	0.031±0.002 <sup>1)</sup>
加味升降散	27.3	0.121±0.011 <sup>2)</sup>	0.184±0.007 <sup>2)</sup>	0.151±0.011 <sup>2)</sup>	0.165±0.003 <sup>2)</sup>
贝那普利	0.001	0.112±0.013 <sup>2)</sup>	0.182±0.006 <sup>2)</sup>	0.147±0.014 <sup>2)</sup>	0.171±0.003 <sup>2)</sup>

**3.4 对MN大鼠肾组织细胞凋亡的影响** 与正常组比较,模型组凋亡细胞明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,加味升降散和贝那普利组凋亡细胞明显降低( $P<0.05$ )。见表5,图2。

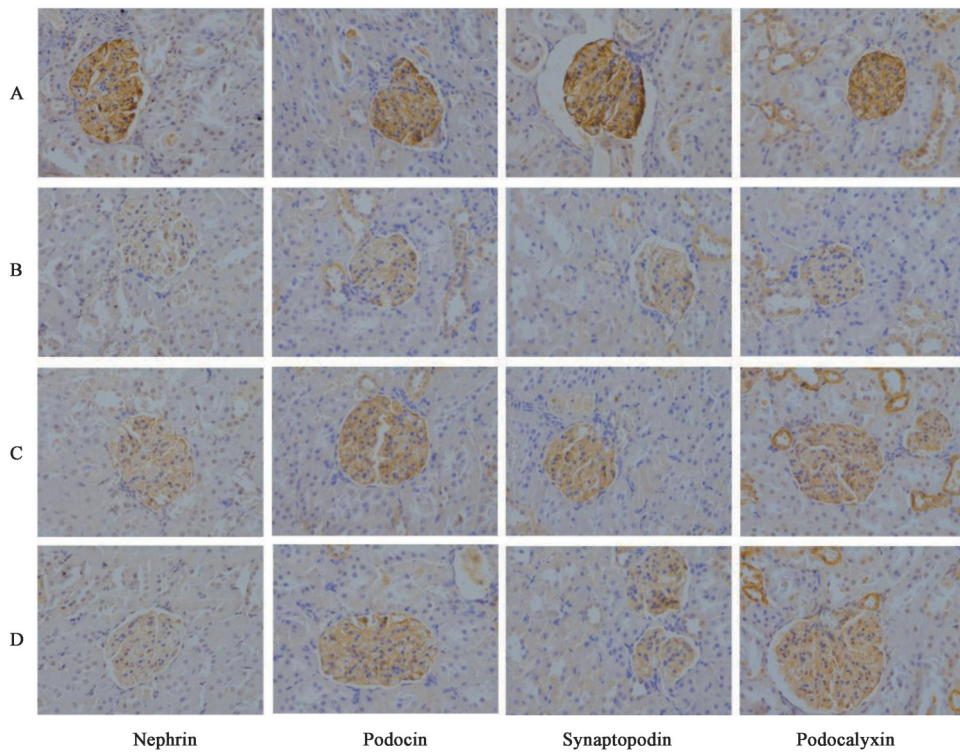
**3.5 对MN大鼠肾组织Notch信号通路蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组Notch1, Hes1, Bax蛋白表达量明显增加, Bcl-2蛋白表达量明显降低, Bcl-2/Bax明显下降( $P<0.05$ );与模型组比较,加味升降散和贝那普利组Notch1, Hes1, Bax蛋白表达量显著降低, Bcl-2蛋白表达量显著增加, Bcl-2/Bax明显升高( $P<0.05$ )。见表6,图3。

### 4 讨论

MN是一种常见的原发性肾小球疾病,占成人

肾病综合征(NS)的22%~33%<sup>[10]</sup>。临床上MN进展缓慢,病程较长,预后不同<sup>[11]</sup>。KDIGO临床实践指南推荐的治疗特发性MN的主要方法是激素联合环磷酰胺(CTX)或钙调神经磷酸酶抑制剂(CNIs)<sup>[12]</sup>。然而面临着临床反应率低、复发率高、感染和肾功能损害等副作用<sup>[8]</sup>。近年来,随着中医药治疗MN的理论和临床研究的不断进展,中药治疗MN的优势逐渐被发现。与西药比较,中药能更快地提高血清白蛋白水平,从而更好地缓解水肿、疲劳等症状,且不良反应发生率更低<sup>[9]</sup>。

加味升降散是导师檀金川教授在经方升降散的基础上,根据MN“脾肾两虚,浊毒内蕴”的病机特点,加味黄芪、淫羊藿、土茯苓,以加强健脾益肾,化



A. 正常组; B. 模型组; C. 加味升降散组; D. 贝那普利组(图2, 3同)

图1 加味升降散对MN大鼠肾组织中Nephrin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin定位表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 1 Effect of MS on expression of Nephrin, Podocin, Synaptopodin and Podocalyxin in kidney tissues of MN rats (IHC, ×400)

表5 加味升降散对MN大鼠肾组织细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of MS on apoptosis of renal tissue in MN rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	凋亡指数
正常		18.34±2.41
模型		53.50±4.82 <sup>1)</sup>
加味升降散	27.3	33.45±4.76 <sup>2)</sup>
贝那普利	0.001	34.96±4.345 <sup>2)</sup>

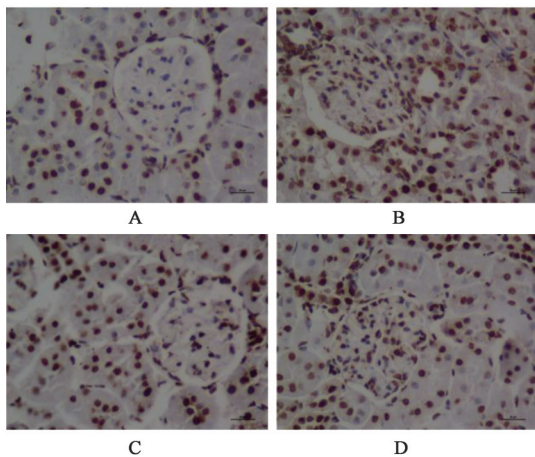


图2 加味升降散对MN大鼠肾组织细胞凋亡的影响(TUNEL, ×400)

Fig. 2 Effect of MS on apoptosis of renal tissue in MN rats (TUNEL, ×400)

毒解毒之功<sup>[13]</sup>。临床研究显示,其可显著改善MN患者倦怠乏力、下肢水肿等症状,降低尿蛋白等<sup>[14]</sup>。现代药理学研究显示,黄芪甲苷通过抑制蛋白激酶样内质网激酶(PERK)信号通路的激活,改善MN大鼠肾组织细胞内质网应激状态<sup>[15]</sup>。淫羊藿苷可通过抑制炎症反应、抗氧化应激,抑制肾组织细胞凋亡<sup>[16]</sup>。姜黄素可提高MN大鼠足细胞自噬活性,抑制肾组织细胞凋亡<sup>[17]</sup>。加味升降散有效成分或有效部位的研究间接证实了加味升降散延缓MN的作用机制,但有关其复方的研究较少,需要大量展开。

MN的发病机制复杂,涉及多种基因和信号通路的调控异常<sup>[18]</sup>。足细胞损伤被认为是促进MN发生和发展的重要因素,足细胞数量减少是导致包括MN在内的大多数NS形成的关键事件<sup>[18]</sup>。在进行性MN中,足细胞的丢失导致肾小球滤过功能受损,进而增加肾小球细胞因子、系膜基质和细胞外基质的合成,并促进MN的进展<sup>[19]</sup>。MN患者肾小球足细胞肥大变性、足突融合或消失,这是足细胞损伤的形态学改变。而非形态学表现为足细胞特异蛋白及细胞骨架成分变化,如Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin和Nephrin都是足细胞骨架的组成成分,在维持肾小球滤过屏障的完整性方面起着关键作用<sup>[20]</sup>。多项研究表明,Podocin, Synaptopodin等

表 6 加味升降散对 MN 大鼠肾组织 Notch1, Hes1, Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of MS on protein expression of Notch1, Hes1, Bcl-2 and Bax in MN rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Notch1/ $\beta$ -actin	Hes1/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/Bax
正常		1.04±0.17	0.74±0.06	2.92±0.19	0.63±0.06	4.34±0.52
模型		2.36±0.13 <sup>1)</sup>	2.41±0.19 <sup>1)</sup>	0.59±0.09 <sup>1)</sup>	2.45±0.11 <sup>1)</sup>	0.29±0.05 <sup>1)</sup>
加味升降散	27.3	1.07±0.08 <sup>2)</sup>	0.98±0.14 <sup>2)</sup>	1.24±0.08 <sup>2)</sup>	1.23±0.14 <sup>2)</sup>	1.26±0.18 <sup>2)</sup>
贝那普利	0.001	1.25±0.11 <sup>2)</sup>	1.05±0.14 <sup>2)</sup>	1.11±0.09 <sup>2)</sup>	1.10±0.11 <sup>2)</sup>	1.45±0.21 <sup>2)</sup>

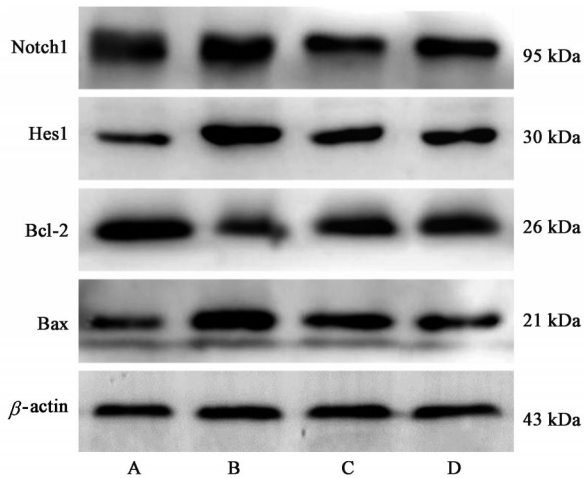


图 3 各组大鼠肾组织 Notch1, Hes1, Bcl-2, Bax 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Notch1, Hes1, Bcl-2 and Bax protein expression in renal tissue of rats in each group

在包括 MN 在内的多种特发性 NS 中低表达, 缺失将导致隔膜裂开或足细胞脱落, 进而发生尿蛋白和肾功能进行性丧失<sup>[21]</sup>。本研究结果显示, 加味升降散可以通过促进足细胞标志蛋白 Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin, Nephlin 的表达, 保护足细胞, 维持肾小球滤过屏障, 降低尿蛋白。

越来越多的证据表明, 中草药对细胞凋亡有抑制作用。GUI 等<sup>[22]</sup>研究表明, 黄芪甲苷 IV 可通过增加 Bcl-2 的表达, 降低 Bax 的表达, 阻止葡萄糖诱导的足细胞凋亡。课题组前期研究发现, 加味升降散可以通过激活肾脏自噬减轻 MN 大鼠足细胞损伤, 延缓疾病进展<sup>[23]</sup>。细胞自噬和凋亡都是细胞程序性死亡的重要机制, 自噬与凋亡及其交互作用在多种疾病的发生发展中发挥重要作用<sup>[24-25]</sup>。有研究表明, MN 患者肾组织中足细胞自噬体数量减少, 自噬相关蛋白表达降低<sup>[26]</sup>。MN 大鼠肾组织细胞凋亡数量增加, 凋亡相关蛋白表达增强<sup>[6]</sup>。自噬-凋亡失衡加重足细胞损伤, 促进 MN 的发生和发展。而作为自噬-凋亡平衡的另一边, 加味升降散也可能通过抑制凋亡减轻 MN 大鼠足细胞损伤, 维持自噬-凋亡平衡。本研究结果显示, MN 大鼠肾组织足细胞凋亡明显, 足细胞数目明显减少, 而加味升降散可以减

轻这一过程, 抑制足细胞凋亡。

目前, 有关足细胞凋亡的研究大多围绕足细胞骨架、高血糖、肾素-血管紧张素-醛固酮系统、转化生长因子- $\beta_1$  等展开研究, 相关调控机制尚不完全清楚, 特别是信号通路的调控<sup>[27]</sup>。为此, 本研究进一步探寻加味升降散抑制足细胞凋亡的机制, 发现 Notch 信号通路参与 MN 足细胞的凋亡-存活调节。有研究报道 Notch 信号通路与糖尿病肾病(DN)密切相关, DN 大鼠和高糖诱导的足细胞中 Notch 信号通路上调, 同时伴有 Bcl-2 蛋白和足细胞裂孔膜相关蛋白表达下降, 提示 Notch 信号通路可通过 Bcl-2 途径抑制足细胞凋亡<sup>[28]</sup>。Bcl-2 和 Bax 均为 Bcl-2 家族成员, 其中 Bcl-2 是重要的凋亡抑制基因, Bax 是重要的凋亡促进基因, 可与 Bcl-2 形成二聚体, 调控细胞凋亡。Bcl-2/Bax 是衡量细胞凋亡的重要指标, 其比值越高, 则凋亡率越低。抑制 Notch 信号通路可减少肾脏足细胞凋亡, 但其在 MN 的研究中未见报道。本研究结果显示, MN 大鼠肾组织中 Notch1, Hes1, Bax 蛋白表达上调, Bcl-2 表达水平下调, Bcl-2/Bax 下降, 肾组织细胞凋亡显著。而经过加味升降散干预后, Notch 信号通路被抑制, Bcl-2/Bax 升高, 细胞凋亡明显减少。

综上所述, 本研究揭示了加味升降散抑制 MN 大鼠足细胞凋亡的作用机制, 通过调控 Notch 信号通路, 下调 Hes1, Bax 蛋白水平表达, 上调 Bcl-2 蛋白水平表达, 促进足细胞标志蛋白 Nephlin, Podocin, Synaptopodin, Podocalyxin 的表达, 减少肾组织细胞, 特别是足细胞的凋亡。本研究为临床干预足细胞凋亡提供了一些证据, 为 MN 的治疗提供方法, 为加味升降散的临床推广提供数据支撑。

[参考文献]

- [1] XU X, WANG G, CHEN N, et al. Long-term exposure to air pollution and increased risk of membranous nephropathy in China[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(12):3739-3746.
- [2] LU H, LUO Y, SU B, et al. Wenyang lishui decoction

- ameliorates podocyte injury in membranous nephropathy rat and cell models by regulating p53 and Bcl-2 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, doi:10.1155/2020/6813760.
- [ 3 ] LIU B, LU R, LI H, et al. Zhen-wu-tang ameliorates membranous nephropathy rats through inhibiting NF-kappaB pathway and NLRP3 inflammasome [J]. *Phytomedicine*, 2019, 59(59):1-12.
- [ 4 ] PONTICELLI C. Membranous nephropathy [J]. *J Nephrol*, 2007, 20(3):268-287.
- [ 5 ] JIN L W, PAN M, YE H Y, et al. Down-regulation of the long non-coding RNA XIST ameliorates podocyte apoptosis in membranous nephropathy via the miR-217-TLR4 pathway [J]. *Exp Physiol*, 2019, 104(2):220-230.
- [ 6 ] 杜昕, 刘明, 檀金川. 加味升降散治疗膜性肾病的临床观察 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(10):2413-2415.
- [ 7 ] BORDER W A, WARD H J, KAMIL E S, et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen [J]. *J Clin Invest*, 1982, 69(2):451-461.
- [ 8 ] 薛丕良, 牛雯颖, 李丽琦, 等. 雷公藤多苷联合小剂量激素治疗特发性膜性肾病的前瞻性对照研究 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(3):666-669.
- [ 9 ] LANG R, WANG X, LIANG Y, et al. Research progress in the treatment of idiopathic membranous nephropathy using traditional Chinese medicine [J]. *J Transl Int Med*, 2020, 8(1):3-8.
- [ 10 ] LI J, LIU B, XUE H, et al. miR-217 is a useful diagnostic biomarker and regulates human podocyte cells apoptosis via targeting TNFSF11 in membranous nephropathy [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 32(14):1-9.
- [ 11 ] LU W, GONG S, LI J, et al. Clinicopathological features and prognosis in patients with idiopathic membranous nephropathy with hypertension [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(4):2615-2621.
- [ 12 ] FLOEGE J, BARBOUR S J, CATTRAN D C, et al. Management and treatment of glomerular diseases (part 1): conclusions from a kidney disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference [J]. *Kidney Int*, 2019, 95(2):268-280.
- [ 13 ] 王涛, 檀金川. 檀金川论治特发性膜性肾病经验 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2017, 24(10):105-108.
- [ 14 ] 陈文军, 檀金川, 陈素枝, 等. 加味升降散治疗原发性膜性肾病临床研究 [J]. *河北中医药学报*, 2016, 31(1):44-47.
- [ 15 ] 项协隆, 邵思思, 陈宇, 等. 黄芪甲苷对被动型 Heymann 肾炎大鼠 PERK 通路的影响 [J]. *新中医*, 2018, 50(4):10-14.
- [ 16 ] 赵锦, 陈玮, 魏杰, 等. 淫羊藿苷对糖尿病肾病大鼠肾功能保护作用及相关机制 [J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(1):74-79.
- [ 17 ] 屠秋娣. 自噬在特发性膜性肾病中的作用及姜黄素的体外干预研究 [C]//中国中西医结合学会肾脏病专业委员会 2018 年学术年会, 重庆:2018.
- [ 18 ] ROZA M, JALAL E, HOUMAN K, et al. Immune system-mediated cellular and molecular mechanisms in idiopathic membranous nephropathy pathogenesis and possible therapeutic targets [J]. Elsevier Inc, 2019, 19(9):1-33.
- [ 19 ] JIN J, HU K, YE M, et al. Rapamycin reduces podocyte apoptosis and is involved in autophagy and mTOR/ P70S6K/4EBP1 signaling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(2):765-772.
- [ 20 ] SALEEM M A, O'HARE M J, REISER J, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(3):630-638.
- [ 21 ] AKANKWASA G, JIANHUA L, GUIXUE C, et al. Urine markers of podocyte dysfunction: a review of podocalyxin and nephrin in selected glomerular diseases [J]. *Biomark Med*, 2018, 12(8):927-935.
- [ 22 ] GUI D, GUO Y, WANG F, et al. Astragaloside IV, a novel antioxidant, prevents glucose-induced podocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):1-11.
- [ 23 ] 高飞, 王泽泽, 杨冰, 等. 加味升降散对膜性肾病大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及自噬的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20):25-31.
- [ 24 ] 辛高杰, 付建华, 韩笑, 等. 丹酚酸 B 调控 NIX 介导的线粒体自噬保护 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(12):2960-2965.
- [ 25 ] 饶江燕, 王倩, 王钰淳, 等.  $\beta$ -石竹烯通过激活自噬减轻小鼠脑缺血/再灌注损伤的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(4):932-936.
- [ 26 ] 陈生晓, 林晓明, 甘艳, 等. 膜性肾病组织中足细胞自噬体数量、自噬相关蛋白表达变化及其意义 [J]. *山东医药*, 2019, 59(8):73-75.
- [ 27 ] 雷静, 何平. 膜性肾病足细胞损伤机制及治疗进展 [J]. *中国医师进修杂志*, 2019, 42(6):567-572.
- [ 28 ] EMPITU M A, KADARISWANTININGSIH I N, AIZAWA M, et al. MAGI-2 and scaffold proteins in glomerulopathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(5):1336-1344.

[责任编辑 周冰冰]