

加味升降散对膜性肾病大鼠肾保护作用及 对肾组织线粒体活性氧表达的影响

杜昕, 袁国栋, 刘明*, 檀金川*
(河北省中医院, 石家庄 050011)

[摘要] **目的:**观察加味升降散对膜性肾病(MN)大鼠模型血液生化指标及对肾线粒体活性氧(ROS)表达的影响。**方法:**将 60 只 SD 雄性大鼠,适应性喂养 7 d 后随机分为 4 组,造模成功后西药组给予盐酸贝那普利($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃,中药治疗组给予加味升降散($13.22 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃,模型组和正常组给予同等剂量的生理盐水灌胃。4 周后,生化试剂盒测定各组大鼠 24 h 尿蛋白定量(UTP),血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),总蛋白(TP),白蛋白(ALB),尿素氮(BUN),肌酐(SCr),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定大鼠肾组织线粒体 ROS mRNA 的表达。**结果:**与正常组比较,其余各组造模后 UTP,TC,TG 均升高($P < 0.01$),TP,ALB 显著下降($P < 0.05$);治疗后,加味升降散组、盐酸贝那普利组与正常组比较,血液生化指标及对肾线粒体 ROS 均改善,但未恢复正常水平。治疗结束后,与模型组比较,加味升降散组、盐酸贝那普利组 UTP,TC,TG 均有所降低($P < 0.05$),加味升降散组、盐酸贝那普利组 TP,ALB 均有所升高($P < 0.05$)。加味升降散组与盐酸贝那普利组 UTP,TC,TG,TP,ALB 比较无统计学意义。治疗结束后,与模型组比较,加味升降散组、盐酸贝那普利组大鼠肾组织中足细胞线粒体 ROS mRNA 的表达较模型组明显下调($P < 0.05$);加味升降散组与盐酸贝那普利组线粒体 ROS mRNA 比较差异无统计学意义。**结论:**加味升降散对膜性肾病大鼠的肾保护作用可能与其能够下调肾组织线粒体 ROS mRNA 表达,抑制足细胞凋亡、修复受损足细胞有关。

[关键词] 加味升降散;膜性肾病;肾保护;活性氧;足细胞

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0097-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190805

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190101.1059.009.html>

[网络出版时间] 2019-01-03 13:48

Effect of Modified Shengjiangsans on Renal Protection for Membranous Nephropathy Rats and Expression of ROS

DU Xin, YUAN Guo-dong, LIU Ming*, TAN Jin-chuan*

(Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the effect of modified Shengjiangsans on the expression of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria of renal foot cells of rats, in order to study the mechanism of modified Shengjiangsans. **Method:** After be fed for 7 days, the 60 SD male rats were randomly divided into four groups: blank control group, model group, positive medicine group and traditional Chinese medicine (TCM) treatment group. After establishment of the rat model of membranous nephropathy, model group, positive medicine group and TCM treatment group were treated differently. After 4 weeks, all of the rats were put to death, and the expressions

[收稿日期] 20180827(010)

[基金项目] 河北省科技计划项目(08206115D);河北省科技厅重点专项(2013067796);河北省自然科学基金项目(H2015423064)

[第一作者] 杜昕,博士,主治医师,从事中医内科学的临床、教学工作,E-mail:duxinyan0603@163.com

[通信作者] *刘明,硕士,主治医师,从事中医内科学的临床、教学工作,E-mail:1137993977@qq.com;

*檀金川,博士,主任医师,教授,博士生导师,从事中医肾病的临床、科研工作,E-mail:1134230373@qq.com

of ROS, 24-hour urinary protein quantity, total cholesterol, triglyceride, total protein, albumin, urea nitrogen, creatinine were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction Real-time PCR. **Result:** The expression of 24-hour urinary protein quantity, total cholesterol, triglyceride in positive medicine group and TCM treatment group were reduced, and the expressions of total protein, albumin in positive medicine group and TCM treatment group were reduced compared with those of model group ($P < 0.05$). The expressions of 24-hour urinary protein quantity, total cholesterol, triglyceride, total protein, albumin in TCM treatment group have no difference with those of positive medicine group. After treatment, the expression of ROS mRNA in mitochondria of renal foot cells of rats of positive medicine group and TCM treatment group were increased compared with that of model group ($P < 0.05$), but with no difference in the ROS mRNA expression between positive medicine group and TCM treatment group. **Conclusion:** Modified Shengjiangsan can effectively control the development of ROS in mitochondria of renal foot cells of rats, and repair the renal function of membranous nephropathy rats by recovering foot cells.

[**Key words**] modified Shengjiangsan; membranous nephropathy; renal protection; reactive oxygen species (ROS); foot cell

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)属于慢性肾小球肾炎范畴,是成人肾病综合征常见的病理类型之一^[1],其发病率呈逐年上升趋势^[2]。严重影响患者工作和生活,而且还有向终末期肾功能衰竭(end stage renal failure, ESRF)和尿毒症转归的危险^[3-4],给患者带来巨大的躯体、精神和经济负担。现代医学治疗 MN 主要是通过激素或免疫抑制剂来调节体液和细胞免疫功能,但激素对细胞免疫有显著的抑制作用,长期大剂量激素治疗虽可起到缓解症状的作用,但可导致很多不良反应和并发症^[5-6],不能从根本上解决问题,有复发率高、副作用大、医疗费贵等弊端。所以继续开展膜性肾病发病机制的深入研究及寻找有效而复发率低、毒副作用小、价格低廉的治疗方法是当前亟待解决的重大课题之一。近年来,医学界积极寻找治疗 MN 有效、合理的方案,越来越多地采用中医药治疗 MN。

中医药治疗 MN 的研究取得了令人瞩目的进展,但对该病的研究仍存在很多问题,以往的研究大多停留在临床观察阶段,尚无重大突破,急需进一步深入探讨其发病及治疗机制。导师檀金川教授在长期从医过程中,形成了治疗膜性肾病的特色经验,并经过长期系统的实验证实^[7-9],以健脾补肾、升清降浊为治法在治疗 MN 方面有较突出的作用,可显著降低 MN 大鼠尿蛋白等相关指标,促进 MN 肾组织病理损伤的修复,减轻足细胞融合,从而减轻肾脏损伤,延缓肾脏慢性病理进展。从免疫分子角度阐明了加味升降散治疗膜性肾病作用机制。

膜性肾病发病机制与足细胞息息相关。足细胞

受到刺激后,活性氧(reactive oxygen species, ROS)表达异常,并带来以一系列病理变化。本论文即是在导师檀金川教授指导下,拟以中医“浊毒”理论为基础,结合现代医学实验方法,通过光镜、电镜、免疫荧光观测大鼠肾脏病理变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测膜性肾病大鼠肾组织线粒体 ROS 在肾脏中的表达的变化,从足细胞途径探讨加味升降散对 MN 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 将 60 只雄性健康 SD 大鼠,清洁级,体质量(180 ± 20) g,由河北医科大学动物实验中心提供,动物合格证书编号为 1509116,普通饲料适应性喂养 1 周,自由饮水、进食,温度保持在 25 ℃,湿度保持在 50%。河北省中医院伦理委员会编号为 20140112。

1.2 药物及试剂 西药组药物选取盐酸贝那普利片(洛汀新,由北京诺华制药有限公司生产,批准文号国药准字 H20030514)。中药治疗组药物选取加味升降散,根据《伤寒温疫条辨》升降散原方剂量折算并进行药物加味,由大黄 15 g,僵蚕 10 g,姜黄 12 g,蝉蜕 5 g,土茯苓 20 g,黄芪 10 g,淫羊藿 10 g 组成。将药物浸泡后浓煎,根据人与动物体表面积换算浓缩为 1 mL 药液/100 g 体质量的浓缩液后给予动物灌胃。中药药剂稳定性及质控由河北省中医院药剂科主任中药师控制(药材均由河北省中医院相聪坤主任中药师鉴定)。牛血清白蛋白、碳化二亚胺、弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司,批号分别为 A3912, E6383, F5506);总胆固醇试剂盒(酶比色法)、甘油三酯试剂盒(酶比色法)、白蛋白试剂盒

(溴甲酚绿法,液体 I 型)(北京中生北控生物科技股份有限公司,批号均为 20150501);总蛋白液体试剂盒(北京金豪制药有限公司,批号 201503);血肌酐测定试剂盒和血尿素氮测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号均为 20150315);山羊抗大鼠免疫球蛋白(Ig)G, FITC 标记兔抗山羊 IgG, FITC 标记山羊抗兔 IgG(美国 KPL 公司,货号分别为 20147-1, 111-095-003, 02-15-06);trnzol 总 RNA 提取试剂[天根生化科技(北京)有限公司,货号 DP405-02];PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), ROX plus DL2 000 DNA Marker(日本 TaKaRa 公司,货号分别为 RR047B, RR82LR, 3427Q)。

1.3 仪器 spectrum 系列透析袋(美国 Fisher Scientific 公司);7170A 型全自动生化分析仪(日本日立公司);721 型尿蛋白(24 h)分光光度计(上海第三分析仪器厂);TDL-5-A 型高速离心机(上海安亭科技仪器厂);BX51T-PHD-J11 型显微镜(日本奥林巴斯公司);Image-Pro PlusImage-Pro Plus 型多功能真彩色细胞图象分析管理系统(美国 Media Cybernetics 公司);2000 型分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);7500 型 Real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 60 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,用代谢笼留取大鼠 24 h 尿量,用尿蛋白试纸测定均为阴性,24 h 尿蛋白定量均小于 10 mg。将大鼠随机分为正常组 15 只,造模组 45 只。根据 Border 方法^[10],制成阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA),贮存在 -80 °C 冰箱中备用。将 1 mg 阳离子化牛 C-BSA 溶于 0.5 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中,与等量不完全弗氏佐剂(IFA)充分乳化后,给大鼠多点皮下注射进行预免疫,隔日 1 次,共 3 次;于 1 周后开始致病免疫,即隔日 1 次给予大鼠尾静脉注射阳离子化 C-BSA 2.5 mg,而正常组隔日 1 次尾部静脉注射生理盐水 1 mL,连续 4 周。大鼠 24 h 尿蛋白定量(UTP) ≥ 20 mg 即为造模成功。并随机抽取 2 只造模大鼠,进行肾组织免疫荧光、光镜、电镜检查,观察到免疫复合物沉积伴基底膜弥漫性增厚,证实膜性肾病造模成功^[11]。模型复制成功后,随机分为模型组、盐酸贝那普利片组、加味升降散组,各组除去造模验证后各组均保留为 10 只。

2.2 动物分组及给药 根据大鼠和人的表面积比率换算等效剂量,正常组造模成功后予生理盐水

3 mL 灌胃。模型组造模成功后予生理盐水 3 mL 灌胃。盐酸贝那普利片组造模成功后予盐酸贝那普利 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹溶于 3 mL 蒸馏水中灌胃。加味升降散组造模成功后予加味升降散 27.3 g·kg⁻¹·d⁻¹溶于 3 mL 蒸馏水中灌胃。各组给药均每日 1 次,连续 4 周。

2.3 24 h 尿蛋白定量检测 各组大鼠分别于造模前、造模后与给药后用代谢笼留取 24 h 尿液并记录尿量,离心取上清液,测定 24 h 尿蛋白定量。尿蛋白定量采用双缩脲法测定。

2.4 血液生化指标检测 疗程结束后各组动物处死前,禁食水 12 h,用 10% 水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,常规开腹后,腹主动脉取血,离心后分离出血清,测定血液生化指标血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),总蛋白(TP),白蛋白(ALB),尿素氮(BUN),肌酐(SCr)。血液生化指标采用 7170A 型全自动生化分析仪测定。

2.5 各组大鼠肾脏病理学观察

2.5.1 光镜观察肾小球、肾间质的变化 在 4 °C 恒温室进行,开腹后,用锋利的手术刀片迅速切下麻醉后各组大鼠肾脏,用冰生理盐水漂洗,将肾脏组织迅速放于中性甲醛固定液,脱水,先从低浓度梯度乙醇开始,逐渐递增乙醇的浓度(75%, 85%, 95%, 无水乙醇,每一浓度浸泡 20 min,脱水后,行二甲苯透明过程,时间为 20 min,将立马脱水、透明后的组织移入熔化的石蜡内浸渗。浸蜡一般选用熔点在 58 ~ 62 °C 的石蜡为宜,时间在 1 ~ 1.5 h。浸蜡结束后,即可进行组织包埋。将包埋好组织的蜡块修整后在切片机上切出厚 2 μm 左右的切片,在 30 ~ 35 °C 温水中展开后置于载玻片上,于 70 °C 温箱烤干。脱蜡后行马松(Masson)染色及过碘酸希夫反应(PAS)染色,通过光镜观察肾小球、肾间质的改变情况。

2.5.2 电镜观察肾组织超微结构变化 取肾组织块小于 1 mm³,采用 2.5% 戊二醛, PBS 配制固定 2 h 或更长时间。用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 漂洗 15 min 重复 3 次;1% 锇酸固定液固定 2 ~ 3 h;用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 漂洗 15 min 重复 3 次。在 4 °C 冰箱内进行脱水,依次为 50% 乙醇 15 ~ 20 min, 70% 乙醇 15 ~ 20 min, 90% 乙醇 15 ~ 20 min, 90% 乙醇 90% rAr 酮(1:1) 15 ~ 20 min, 90% 内酮 15 ~ 20 min; 100% 丙酮室温 15 ~ 20 min 重复 3 次。纯丙酮 + 包埋液(2:1) 室温 3 ~ 4 h, 纯丙酮 + 包埋液(1:2) 室温过夜, 纯包埋液 37 °C 2 ~ 3 h。固化条件为 37 °C 烘箱内过夜, 45 °C 烘箱内 12 h, 60 °C 烘箱内 24 h。超薄切片机

切片 50 ~ 60 nm, 并置于铜网火棉薄膜上。3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色。透射电镜观察, 拍片。在电镜下图像放大 2 万倍以观察肾小球基底膜、足细胞、系膜细胞和肾小管上皮细胞损伤情况。

2.5.3 免疫荧光观察 IgG 和 C3 表达 应用间接免疫荧光法观测 IgG 和 C3, 取米粒大小新鲜肾皮质组织, 厚约 5 μm, 在冰上制成切片; 切片用冷丙酮固定 8 ~ 10 min; 切片略晾干, 继而用 PBS 冲洗 5 min, 共冲洗 3 次; 滴加 1 滴 (5 μL) 一抗 (1:50), 置湿盒内于 37 °C 孵育 1 h, PBS 冲洗 5 min, 共 3 次; 滴加 1 滴 (5 μL) FITC 标记二抗 (1:50), 置湿盒内于 37 °C 孵育 30 min, PBS 冲洗 5 min, 共 3 次; 甘油 PBS 封片、镜检及拍照记录。根据显微镜下荧光强度评级观察标本的荧光强度, 一般用“+”表示。其中, (-) 为无荧光; (+) 为极弱的可疑荧光; (++) 为荧光较弱, 但清楚可见; (+++) 为荧光明亮; (####) 为荧光闪亮。

2.6 Real-time PCR 检测足细胞线粒体 ROS 的表达

采用 trnzol 总 RNA 提取试剂进行样本 RNA 提取, 提取总 RNA 及反转录实验操作按产品说明书进行, 采用 Nanodrop2000 紫外分光光度计测量 RNA 纯度及浓度, 冻存于 -80 °C。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录。选取大鼠 β-肌动蛋白 (β-actin) 作为内参照, 应用软件设计引物, 引物均在北京 Invitrogen 公司合成。引物的核苷酸序列, 见表 1。将各组基因同时扩增, 用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), ROXplus 进行扩增, 实验操作按产品说明书进行。反应体系均为 20 μL, 其中 2 × mix 10 μL; 上游引物 (10 μmol · L⁻¹) 0.5 μL; 下游引物 (10 μmol · L⁻¹) 0.5 μL; 模板 2 μL, 加入灭菌蒸馏水至 20 μL。在 Applied Biosystems ABI7500 型实时荧光定量基因检测系统中进行扩增反应。反应条件为 95 °C 30 s, (95 °C 5 s, 60 °C 40 s) × 45 个循环。反应结束后, 由电脑自动得出荧光反应曲线。Real-time PCR 检测进行方差分析 (F 检验), 采用 2^{-ΔΔC_t} 法处理数据。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

名称	序列	长度/bp
ROS	上游 5'-CTTCCAGTCTGATGTATGGTCTT-3'	140
	下游 5'-TTTCTCGGTGGCTCCAGTCTC-3'	
β-actin	上游 5'-CTTCCGTGTTCTACCCC-3'	131
	下游 5'-GCCAGGATGCCCTTTAGTG-3'	

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$, 计量资料先进行正态性检验和方差齐性检验, 方差齐时多组间比较采用单因素方差分析、组间的多重比较采用 LSD 法, 方差不齐时采用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对膜性肾病大鼠 24 h 尿蛋白定量的影响 模型复制成功后, 各造模组 24 h 尿蛋白定量均明显升高 ($P < 0.05$)。灌胃 4 周后, 各治疗组 24 h 尿蛋白定量较模型组明显降低 ($P < 0.05$), 但仍高于造模前 ($P < 0.05$); 盐酸贝那普利片组与加味升降散组比较, 24 h 尿蛋白定量未见明差异。见表 2。

表 2 加味升降散对膜性肾病大鼠 24 h 尿蛋白定量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effect of modified Shengjiangsan on 24-hour urinary protein quantity in membranous nephropathy rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	造模前	造模后	给药后
正常	-	7.19 ± 0.53	7.21 ± 0.52	7.19 ± 0.68
模型	-	7.26 ± 0.34	34.72 ± 1.21 ¹⁾	41.49 ± 2.11 ¹⁾
盐酸贝那普利片	0.001	7.21 ± 0.48	34.53 ± 1.42 ¹⁾	25.97 ± 1.32 ¹⁾
加味升降散	27.3	7.29 ± 0.57	34.86 ± 1.46 ¹⁾	25.43 ± 1.59 ¹⁾

注: 与本组造模前比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对膜性肾病大鼠血清生化指标的影响 大鼠给药 4 周后, 与正常组比较, 模型组血清 TP, ALB 水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 盐酸贝那普利片组、加味升降散组血清 TP, ALB 水平有所升高 ($P < 0.05$); 加味升降散组与盐酸贝那普利片组比较, 血清 TP, ALB 比较无显著性差异。大鼠给药 4 周后, 与正常组比较, 模型组血清 TC, TG 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 盐酸贝那普利片组、加味升降散组血清 TC, TG 水平有所降低 ($P < 0.05$); 加味升降散组与盐酸贝那普利片组比较, 血清 TC, TG 比较无显著性差异。见表 3。

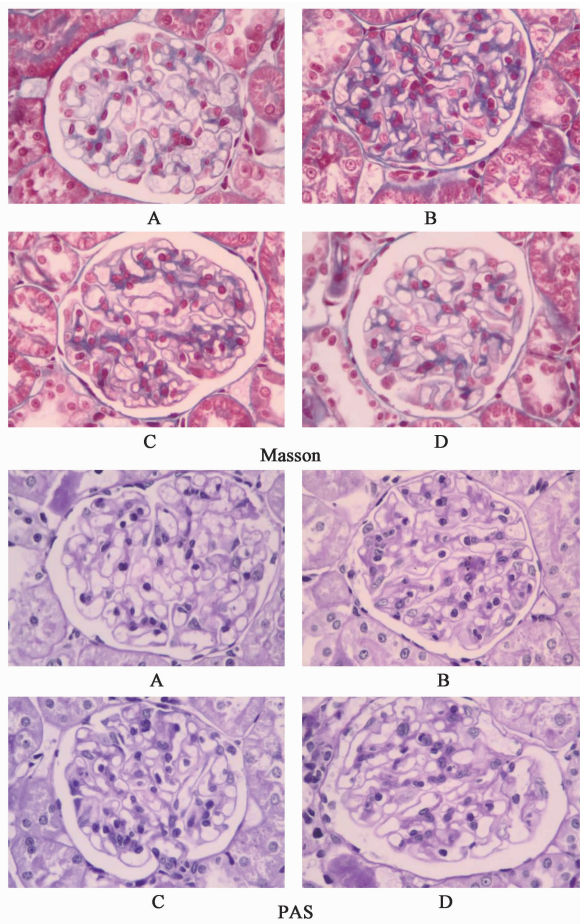
3.3 对膜性肾病大鼠光镜下肾脏病理学的影响 正常组大鼠肾组织无明显改变; 模型组大鼠可见肾小球体积增大, 毛细血管内皮细胞核亦显著增大, 肾小球毛细血管袢基膜可见弥漫性的增厚, 上皮侧形成大量“钉突”; 盐酸贝那普利片组及加味升降散组可见肾小球毛细血管内皮细胞核轻微增大, 肾小球毛细血管袢基膜增厚较模型组减轻, 可见较少量“钉突”形成。见图 1。

表 3 加味升降散对膜性肾病大鼠血清 TP, ALB, TC, TG, BUN, SCr 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of modified Shengjiangsan on TP, ALB, TC, TG, BUN, SCr in membranous nephropathy rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	BUN/μmol·L ⁻¹	SCr/μmol·L ⁻¹
正常	-	64.92 ± 1.44	36.11 ± 1.63	1.42 ± 0.07	0.53 ± 0.16	6.96 ± 1.15	38.63 ± 3.01
模型	-	49.84 ± 2.92 ¹⁾	26.09 ± 1.56 ¹⁾	2.81 ± 0.28 ¹⁾	1.05 ± 0.18 ¹⁾	6.67 ± 0.19	39.31 ± 4.81
盐酸贝那普利片	0.001	57.20 ± 1.90 ²⁾	32.05 ± 1.21 ²⁾	1.98 ± 0.25 ²⁾	0.85 ± 0.14 ²⁾	6.84 ± 0.99	39.52 ± 3.33
加味升降散	27.3	57.04 ± 1.95 ²⁾	31.48 ± 1.10 ²⁾	2.14 ± 0.35 ²⁾	0.91 ± 0.17 ²⁾	6.98 ± 1.24	40.41 ± 1.70

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



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

图 1 加味升降散对膜性肾病大鼠肾组织病理变化的影响 ($\times 400$)

Fig.1 Effect of modified Shengjiangsan on tem ultrastructure of renal tissue in membranous nephropathy rats by light microscope ($\times 400$)

3.4 对膜性肾病大鼠电镜检查的影响 正常组大鼠足细胞结构清楚,未见明显异常;模型组大鼠可见肾小球基底膜增厚,基膜间隙增宽,上皮可见大量电子致密物沉积,上皮细胞足突出现广泛融合或消失,并可见钉突形成;盐酸贝那普利片组、加味升降散组基底膜轻度增厚且不规则,上皮电子致密物可见呈少量沉积,部分出现融合的足突。见图 2。

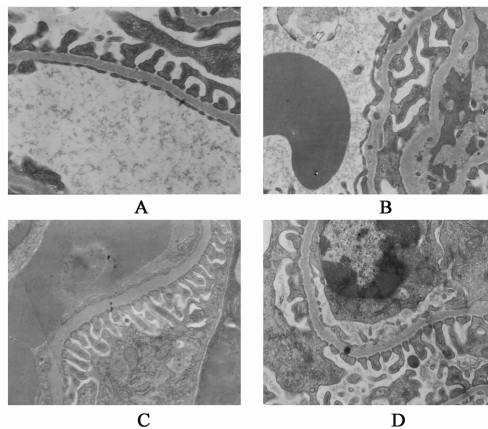


图 2 加味升降散对膜性肾病大鼠肾组织透射电镜超微结构的影响 (电镜扫描, $\times 20\ 000$)

Fig.2 Effect of modified Shengjiangsan on tem ultrastructure of renal tissue in membranous nephropathy rats (SEM, $\times 20\ 000$)

3.5 对膜性肾病大鼠免疫荧光检查的影响 正常组基本无免疫复合物沉积,荧光强度(-);模型组、盐酸贝那普利片组及加味升降散组免疫荧光均可见 IgG 和 C3 呈现为颗粒状沿着毛细血管袢及系膜区呈弥漫性沉积,其中模型组荧光强度较其他组最为明显,约为(卅,卅);而盐酸贝那普利片组和加味升降散组的荧光强度约为(+,++),IgG 和 C3 较模型组沉积明显减少。见图 3。

3.6 对膜性肾病大鼠肾组织足细胞线粒体 ROS mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织足细胞线粒体 ROS 的表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,盐酸贝那普利片组及加味升降散组大鼠肾组织足细胞线粒体 ROS 的表达降低 ($P < 0.05$)。盐酸贝那普利片组与加味升降散组比较,足细胞线粒体 ROS 表达无显著性差异。见表 4。

4 讨论

膜性肾病是指免疫复合物沿肾小球基底膜沉积,造成底膜增厚、“钉突”形成为特征的一种慢性难治性疾病^[12]。膜性肾病发病机制与足细胞息息相关。足细胞是覆盖于肾小球基底膜外壁的一种

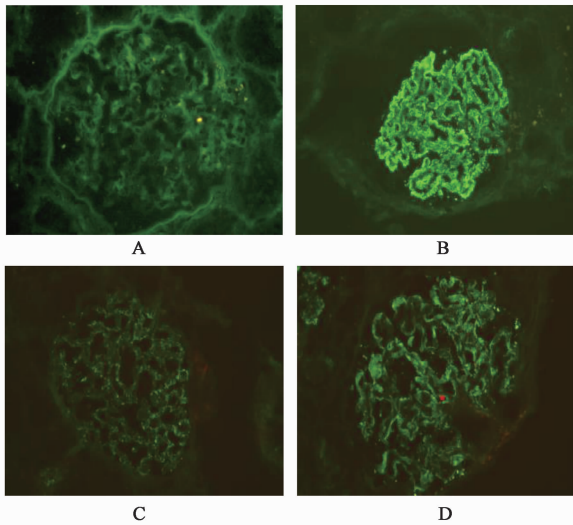


图 3 加味升降散对膜性肾病大鼠肾组织免疫荧光的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 3 Effect of modified Shengjiansan on immunofluorescence of renal tissue in membranous nephropathy rats(IF, ×400)

表 4 加味升降散对膜性肾病大鼠肾组织足细胞线粒体 ROS mRNA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of modified Shengjiansan on ROS mRNA in membranous nephropathy rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ROS
正常	-	1.000
模型	-	1.992 ± 0.074
盐酸贝那普利片	0.001	1.560 ± 0.081 ²⁾
加味升降散	27.3	1.508 ± 0.056 ²⁾

终末分化的细胞,其损伤后导致的滤过膜电荷和孔径屏障的破坏,是蛋白尿形成的主要原因之一。足突之间裂孔膜蛋白的完整性是肾小球滤过屏障的关键,这些蛋白的损伤或表达下降都可引起足细胞结构和功能障碍,从而导致蛋白尿的发生^[13-14]。尿蛋白不仅是肾小球损伤的结果,更是导致肾损伤进展的独立危险因素。大量尿蛋白在肾小管管腔内聚集可使小管上皮细胞受损,并促进炎症物质释放,导致炎症细胞在肾间质内浸润,加剧肾间质纤维化,引起肾功能进行性减退,最终可能发展为终末期肾衰竭。细胞代谢、维持功能正常依赖于自身线粒体功能的正常。线粒体是机体内 ROS 生成的主要来源,细胞内大约 90% 以上的 ROS 由线粒体产生。线粒体功能障碍与细胞损伤密切相关,因此有效阻断线粒体功能障碍可能成为防治足细胞损伤的关键环节之一。当足细胞受到各种刺激后,ROS 生成增多,同时抗氧化能力下降,ROS 在体内积聚,导致膜通透

性转运孔(mPTP)开放,线粒体水肿,细胞内的氧化应激和凋亡增强,细胞凋亡,进而影响到肾小管相关功能等氧化应激反应^[15]。线粒体 ROS 过量生成,在细胞氧化损伤与细胞凋亡等过程中起着关键作用。

中医学无膜性肾病的病名,但依据该病发病时的主证特点,可将其归属于中医“虚劳”“尿浊”“水肿”等范畴。祖国医学认为本病与肾密切相关,亦与脾胃升降浊关系密切。若脾胃功能或全身气化失常,则脾不升清胃不降浊,影响脾胃的斡旋中枢功能,生理代谢失常,水液运化失司;另一方面,肾脏下连膀胱,肾开窍于二阴,两者互为表里,一阴一阳,共司贮藏水液和尿液排泄;肾气不足,气化失司,则膀胱气化不利而成溺停蕴毒。而肾脏作强与脾胃之运化有关,故本病病位在肾与膀胱,与脾胃关系密切。情志不畅、饮食所伤、劳倦过度或久病伤脾均可导致脾肾虚弱,脾肾两虚,脾不分清浊,肾运化失司,生理代谢失常,机体内产生的代谢产物不能及时正常排出,水液运化失司,湿浊内生蕴久或从热化生浊毒。另外一方面,脾肾两虚,固摄无权,封藏失职,精微外泄精漏酿毒,亦可化生浊毒。脾肾功能或全身气化失常,浊毒蕴积体内,停于下焦引发本病,出现小腹胀满、痞块硬肿、尿闭便坚、下肢浮肿等症状。膜性肾病肾脏组织可见电子致密物沿基底膜上皮侧不规则分布;基底膜增生,免疫沉积物间“钉突”伸出,肾小球毛细血管壁增厚,基底膜“钉突”融合,包裹免疫沉积物,形成“链环状”基底膜;毛细血管腔明显受压,这些改变在中医病机上多认为与脾肾虚弱、浊毒内蕴而致的水液代谢紊乱有关。导师檀金川教授结合现代医学实验方法,通过光镜、电镜、免疫荧光观测大鼠肾脏病理变化,Real-time PCR 法检测膜性肾病大鼠肾组织 ROS 在肾脏中的表达的变化,研究以“健脾补肾”“升清降浊”为治法的加味升降散在治疗 MN 方面的疗效及作用机制。

升降散原名赔赝散,出自陈良佐的《二分析义》,具有升清降浊,行气活血,透发郁热之功效。方用白僵蚕、蝉衣、姜黄、生大黄等,诸药相合,升降相因,宣通三焦,条达气血,清升浊降,全方共奏“清升浊降”之功,给浊毒以出路。后世医家对此方的应用发挥甚广,究其组方,凡辨证属清浊升降失常所致之浊毒病症均可随证加减。本实验结果显示,加味升降散在治疗膜性肾病方面有较突出的作用,既能显著降低膜性肾病大鼠尿蛋白,提高血浆蛋白,改善血脂代谢、明显改善肾脏功能,还能够下调膜性肾

病大鼠肾组织足细胞线粒体 ROS 的表达。其作用机制可能为膜性肾病的发生、发展与代谢异常产生的浊毒密切相关,尤其是足细胞结构和成分的改变亦可归属于浊毒范畴,加味升降散可有效促进归属于中医“浊毒”范畴的膜性肾病肾组织病理损伤的修复,减轻融合,从而减轻肾脏损伤,延缓肾脏慢性病理进展;又能甘味补中促进肾脏新陈代谢,逆转肾脏超微结构病变,促进正常细胞新陈代谢,抑制异常细胞增殖,有利于膜性肾病时肾小球功能的改变及逆转,值得探讨。

[参考文献]

[1] 陈惠萍,曾彩虹,胡伟新,等. 10 594 例肾活检病理资料分析[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2000,9(6):501-509.

[2] 刘刚,马序竹,邹万忠,等. 肾活检患者肾脏病构成十年对比分析[J]. 临床内科杂志,2004,21(12):834-838.

[3] Honkanen E, Tornroth T, Gronhagen-Riska C. Natural history, clinical course and morphological evolution of membranous nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant, 1992,7(1):35-41.

[4] Murphy B F, Fairley K F, Kincaid-Smith P S. Idiopathic membranous glomerulonephritis: long-term follow-up in 139 cases[J]. Clin Nephrol,1988,30(4):175-181.

[5] 刘颖斐,王秋红,赵宏,等. 车前子多糖治疗大鼠膜性肾病的实验探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(22):103-107.

[6] 李莲花,陈新昌,张佩青. 张佩青教授治疗膜性肾病用药规律挖掘研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(12):205-208.

[7] 王刚,袁国栋,檀金川. 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾保护作用的研究[J]. 辽宁中医杂志,2012,39(4):742-744.

[8] 檀金川,田力铭. 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织中 NF- κ B, MMP-2 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2010,30(21):3111-3114.

[9] 陈文军,陈素枝,靳晓华,等. 降脂通络软胶囊对膜性肾病大鼠肾保护作用及对肾组织 Bcl-2 和 Bad 表达的影响[J]. 中草药,2016,47(18):3263-3268.

[10] 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.

[11] 梁静,孙兴旺,曹灵,等. 不同剂量阳离子化牛血清白蛋白对膜性肾病大鼠造模的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(37):7322-7325.

[12] 刘玲玲,徐维玮. 环磷酰胺治疗特发性膜性肾病的疗效[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2018,27(2):182-186.

[13] 宋爱凤,杨巧芳,沈敬华,等. 足细胞损伤与膜性肾病的研究进展[J]. 中国医药科学,2013,3(23):49-51.

[14] 杨丽影,杨巧芳,薛昕,等. 加味过敏煎不同拆方组分对膜性肾病大鼠足细胞裂孔膜蛋白 Nephlin 的影响[J]. 中华中医药杂志,2017,32(12):5562-5565.

[15] 皇甫冰,高继萍,杨霞,等. 氧化应激与肾脏细胞凋亡[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(2):54-59.

[责任编辑 周冰冰]