

参芪地黄汤对 IgA 肾病大鼠肾组织 nephrin、podocin 蛋白及其 mRNA 表达的影响

陈红波^{1,2} 庄英² 马红珍^{1*} 范永升²

(1. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江省杭州市邮电路 54 号, 310006; 2. 浙江中医药大学第一临床医学院)

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2007BAI10B01-034);浙江省科技厅公益技术项目(2011C33G2120070)

* 通讯作者: mahongzhen0515@163.com, (0571)86620256

[摘要] 目的 探讨参芪地黄汤治疗 IgA 肾病的可能作用机制。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、雷公藤组、中药低剂量组、中药高剂量组, 每组 12 只, 采用“白蛋白+脂多糖+四氯化碳”联合法建立 IgA 肾病大鼠模型。中药低、高剂量组分别给予参芪地黄汤 1.4、2.8 g/100 g 灌胃, 雷公藤组给予雷公藤多甙片 0.625 mg/100 g 灌胃, 模型组、正常组给予等量生理盐水灌胃, 每日 1 次。12 周末处死大鼠, 检测各组血肌酐、尿蛋白定量、血清白蛋白水平; 免疫组化和 Western-blot 法检测肾组织 nephrin、podocin 蛋白表达; RT-PCR 法检测肾组织 nephrin mRNA、podocin mRNA 表达。结果 与正常组比较, 其余各组尿蛋白定量均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组尿蛋白定量均明显下降 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 其余各组大鼠肾组织 nephrin、podocin 蛋白及 mRNA 表达均明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织 nephrin、podocin 蛋白及 mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$)。结论 参芪地黄汤能有效降低 IgA 肾病大鼠尿蛋白定量, 其机制可能是通过上调肾组织 nephrin 和 podocin 表达。

[关键词] IgA 肾病; 参芪地黄汤; 蛋白尿; nephrin; podocin

Effects of Shenqi Dihuang Decoction on Nephrin, Podocin, Nephrin mRNA and Podocin mRNA in Renal Tissue of IgA Nephropathy Rats

CHEN Hongbo^{1,2}, ZHUANG Ying², MA Hongzhen¹, FAN Yongsheng²

(1. First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Province 310006; 2. First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University)

ABSTRACT Objective To observe the effect and possible mechanism of Shenqi Dihuang Decoction [decoction of Dangshen (*Radix Codonopsis*), Huangqi (*Radix Astragali*) and Dihuang (*Radix Rehmanniae Recens*)] on IgA nephropathy. **Methods**

Sixty SD rats were randomized into normal group, model group, tripterygium group, low-dose Chinese medication group and high-dose Chinese medication group, with 12 in each. The IgA nephropathy rat models were established with combined method [bovine serum albumin (BSA) + lipopolysaccharide (LPS) + CCl₄]. The low-dose Chinese medication group and high-dose Chinese medication group was given 1.4 g/100 g and 2.8 g/100 g Shenqi Dihuang Decoction intragastrically. The tripterygium group was given 0.625 mg/100 g tripterygium wilfordii tablets intragastrically. The model group and normal group were given normal saline intragastrically once daily. The rats were killed at the end of 12 weeks. The serum creatinine (Scr), urinary protein excretions (UPEs) and serum albumin levels were detected. The expressions of Nephrin and Podocin in renal tissues were detected with immunohistochemistry and Western-blot method. The expressions of Nephrin mRNA and Podocin mRNA in renal tissues were detected with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Comparing with the normal group, the UPEs in other groups were significantly increased ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the UPEs in three administration groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Comparing with the normal group, the expressions of Nephrin, Podocin, Nephrin mRNA and Podocin mRNA in renal tissues in other groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the expressions of Nephrin, Podocin, Nephrin mRNA and Podocin mRNA in renal tissues in three administration groups were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Shenqi Dihuang decoction can effectively decrease the urine protein of IgA nephropathy rats, which may be relevant to up-regulating the expressions of Nephrin and Podocin in the kidney tissue.

Keywords IgA nephropathy; Shenqi Dihuang Decoction; proteinuria; Nephrin; Podocin

IgA 肾病是一种以肾小球系膜区 IgA 沉积的系膜增生性肾小球肾炎, 30%~40% IgA 肾病患者有蛋白尿, 而蛋白尿是 IgA 肾病独立的最危险预后因

素^[1-2]。参芪地黄汤是名老中医李学铭治疗 IgA 肾病的经验方, 前期研究表明参芪地黄汤可以明显减少 IgA 肾病患者蛋白尿, 延缓病情进展^[3]。本文通

过观察参芪地黄汤对 IgA 肾病大鼠肾组织 nephrin、podocin 表达的影响,探讨其治疗 IgA 肾病的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级 SD 大鼠 60 只,体重(200±20)g,雌雄各半,由浙江中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(沪)2008-0016,生产单位:上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

1.2 药物及试剂

参芪地黄汤组成:党参 15 g(批号:1211137)、黄芪 20 g(批号:1211114)、生地黄 15 g(批号:121113)、山药 15 g(批号:1212009)、山萸肉 12 g(批号:1211035)、茯苓 10 g(批号:1212125),中药颗粒剂购自江阴天江药业有限公司。雷公藤多甙片由浙江普洛康裕天然药物有限公司生产(批号:100701)。牛血清白蛋白(BSA,Roche);脂多糖(LPS,Sigma);四氯化碳(CCl₄ 色谱纯,批号 081014101,天津四友精细化学品有限公司);兔抗大鼠 nephrin 抗体、兔抗大鼠 podocin 抗体、羊抗小鼠 IgG-HRP 均为美国 Pierce 公司产品。

1.3 模型建立及给药

将 60 只 SD 大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、雷公藤组、中药低剂量组、中药高剂量组,每组各 12 只。参考文献[4-5],采用 BSA+LPS+CCl₄ 联合法建立 IgA 肾病大鼠模型。除正常组外,其余各组予 BSA 溶液(400 mg/kg)隔日灌胃,连续 10 周;同时腹部皮下注射 CCl₄ 溶液(0.6 ml/只)每周 1 次,连续 8 周;第 8、10 周尾静脉注射 LPS 溶液(0.05 mg/只)。正常组予生理盐水(1 ml/100 g)隔日灌胃,腹部皮下注射和尾静脉注射等量生理盐水,时间及用量同模型组。免疫荧光镜下可见正常组大鼠肾系膜区无 IgA 沉积,其他各组大鼠肾小球系膜区有强度不等的绿色团块状 IgA 荧光,表明模型成功建立。

中药低、高剂量组分别按成人剂量的 10 倍和 20 倍进行换算,用生理盐水配成含生药量 1.4、2.8 g/ml 溶液,造模后按 1 ml/100 g 进行灌胃;雷公藤组用生理盐水配成雷公藤多甙片 0.625 mg/ml 溶液,造模后按 1 ml/100 g 进行灌胃;模型组和正常组造模后给予等量生理盐水灌胃。各组每天灌胃 1 次,连续 12 周。12 周末,正常组死亡 1 只。模型组死亡 2 只,雷公藤组死亡 3 只,中药高剂量组死亡 2

只,中药低剂量组死亡 3 只。

1.4 观察指标与方法

1.4.1 血肌酐(Scr)、尿蛋白定量、血清白蛋白(ALB)检测 尿蛋白定量检测采用 Beckman DXC800 全自动生化分析仪检测,ALB、Scr 采用 Olympus AU640 全自动生化分析仪检测。

1.4.2 肾组织 nephrin、podocin 蛋白及其 mRNA 检测 免疫组化技术检测肾组织 nephrin、podocin 蛋白表达:石蜡包埋肾组织,常规切片、脱水,血清封闭,依次加入兔抗鼠 nephrin 抗体(一抗)、podocin 抗体(一抗)和生物素标记的二抗,显色、复染、固封。采用 Lecia 光学显微镜(型号:DM4000)进行拍照分析,然后采用 Image pro plus 5.0 (IPP5)图像分析系统对棕黄色信号强度进行半定量分析,每张切片取 5 个视野,计算光密度平均值,即为 nephrin 和 podocin 蛋白阳性表达量。

RT-PCR 检测肾组织 nephrin mRNA、podocin mRNA 表达:采用 Trizol 提取总 RNA,紫外分光光度计测定浓度。逆转录为 c-DNA:取 3 μg 总 RNA,利用 SuperScript™ II RTase(Invitrogen 公司)逆转录试剂盒逆转录为 c-DNA,逆转录条件 37℃,60 min;95℃,5 min 后迅速置于冰上备用。引物由上海生物工程有限公司负责合成,nephrin 引物序列,上游:5'-GCACTGACACGCAAACAGGAACA-3',下游:5'-GGTCCCTAAGCTACGCCCATAA-3',扩增长度 96 bp;podocin 引物序列:5'-GGCCAAAGT-GCGGGTGATTGC-3',下游:5'-CACGGTGGACG-GCTTGTCTGT-3',扩增长度 154 bp。按照 SYBR (r) Premix Ex Taq™ (TaKaRa 公司, No. DRR041A)试剂盒说明书配置 PCR 反应液,进行 PCR 溶解曲线检测和相对定量,采用两步法扩增标准程序:①预变性:95℃,1 min;②PCR 反应:45 个循环,检测荧光信号。每个样品做 3 个平行管。各个基因的相对表达水平以 2^{-Ct}内参基因-Ct目的基因 进行统计分析。

Western-blot 检测肾组织 nephrin、podocin 蛋白表达:采用 T-PER 组织蛋白提取试剂盒(美国 Pierce 公司)提取总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司)进行蛋白定量,10% SDS-PAGE 电泳,转移蛋白至 PVDF 膜,用 T-TBS(含 5%脱脂奶粉)室温封闭 1 h,兔抗大鼠 nephrin(一抗)、podocin 抗体(一抗)以 1:200 比例溶于 T-TBS,4℃孵育过夜,羊抗小鼠 IgG-HRP(二抗)以

1:10000 稀释,室温封闭 1h。化学发光法发光成像。以 β -actin 内参,进行半定量分析,蛋白相对表达量=目的蛋白/内参 β -actin $\times 10$ 进行表示。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件进行处理,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠尿蛋白定量、ALB、Scr 水平比较

表 1 示,各组大鼠 Scr、ALB 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);与正常组比较,其余各组尿蛋白定量均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组尿蛋白定量均明显下降($P<0.05$);中药低剂量组尿蛋白定量高于雷公藤组($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠尿蛋白定量、ALB、Scr 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	尿蛋白定量 (mg/24h)	ALB(g/L)	Scr(μ mol/l)
正常组	11	25.62 $\pm$ 3.07	29.31 $\pm$ 7.22	22.46 $\pm$ 14.51
模型组	10	71.21 $\pm$ 3.71*	27.82 $\pm$ 6.95	23.09 $\pm$ 15.33
雷公藤组	9	53.25 $\pm$ 4.05*▲	28.98 $\pm$ 7.03	21.77 $\pm$ 15.92
中药低剂量组	10	60.34 $\pm$ 3.98*▲	30.55 $\pm$ 7.57	23.85 $\pm$ 14.38
中药高剂量组	9	55.05 $\pm$ 3.65*▲	30.76 $\pm$ 6.09	22.76 $\pm$ 6.09

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$;与雷公藤组比较,# $P<0.05$

2.2 各组大鼠肾组织 nephrin、podocin 平均光密度值比较

表 2 示,与正常组比较,其余各组大鼠肾组织 nephrin、podocin 平均光密度值均明显下降($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠肾组织 nephrin、podocin 平均光密度值均显著升高($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠肾组织 nephrin、podocin 平均光密度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	nephrin	podocin
正常组	11	169.22 $\pm$ 17.88	132.96 $\pm$ 14.62
模型组	10	50.66 $\pm$ 5.33*	55.85 $\pm$ 6.10*
雷公藤组	9	103.54 $\pm$ 12.56*▲	104.66 $\pm$ 11.56*▲
中药低剂量组	10	87.20 $\pm$ 9.87*▲	82.12 $\pm$ 8.23*▲
中药高剂量组	9	93.22 $\pm$ 10.63*▲	106.54 $\pm$ 11.87*▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$

2.3 各组大鼠肾组织 nephrin mRNA、podocin mRNA 表达比较

表 3 示,与正常组比较,其余各组大鼠肾组织 nephrin mRNA、podocin mRNA 的相对表达量均降低($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠肾组织 nephrin mRNA、podocin mRNA 的相对表达量均显著升高($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠肾组织 nephrin、podocin 蛋白相对表达量比较

表 4 示,与正常组比较,其余各组大鼠肾组织 nephrin、podocin 蛋白相对表达量均明显下降($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠肾组织 nephrin、podocin 蛋白相对表达量均显著升高($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠肾组织 nephrin mRNA、podocin mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	nephrin mRNA	podocin mRNA
正常组	11	39.69 $\pm$ 6.12	53.82 $\pm$ 8.25
模型组	10	15.26 $\pm$ 2.26*	21.91 $\pm$ 5.14*
雷公藤组	9	29.51 $\pm$ 4.42*▲	37.66 $\pm$ 7.62*▲
中药低剂量组	10	26.47 $\pm$ 4.98*▲	35.41 $\pm$ 10.09*▲
中药高剂量组	9	28.79 $\pm$ 5.77*▲	34.81 $\pm$ 11.43*▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$

表 4 各组大鼠肾组织 nephrin、podocin 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	nephrin	podocin
正常组	11	49.2 $\pm$ 4.0	66.2 $\pm$ 4.5
模型组	10	18.2 $\pm$ 2.1*	31.4 $\pm$ 2.0*
雷公藤组	9	33.8 $\pm$ 2.5*▲	45.2 $\pm$ 3.2*▲
中药低剂量组	10	31.4 $\pm$ 3.6*▲	40.3 $\pm$ 2.7*▲
中药高剂量组	9	32.7 $\pm$ 3.4*▲	44.5 $\pm$ 3.8*▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$

3 讨论

研究发现,IgA 肾病患者足细胞的缺失程度与病情进展相关,认为足细胞损伤缺失是 IgA 肾病病情加重的征兆^[6]。nephrin 是足细胞裂孔膜上发现的第一个跨膜蛋白,通过影响肾小球基底膜的通透性和基质的沉积,对维持足突的完整性及裂孔膜功能非常重要^[7]。podocin 是近年来研究的一个热点,它可通过其 COOH 末端与 nephrin、CD2AP 相互作用形成 nephrin 复合体,对裂隙隔膜的正常滤过功能发挥关键作用^[8]。

IgA 肾病的中医病机早期多以气虚为主,迁延不愈,病损及阳,则为脾肾阳虚;病损及阴,则为肝肾阴虚;终至气阴两虚,阴阳两虚。陈香美等^[2]采用多中心流行病学现场调查的方法,研究 1016 例 IgA 肾病患者中医证候的分布规律,发现原发性肾小球肾炎中气阴两虚证最多(41.5%)。参芪地黄汤基本方由党参、黄芪、生地黄、山药、山萸肉、茯苓 6 味药组成,功效为益气养阴、健脾补肾。党参、黄芪、生地

黄共为君药,黄芪补气,与党参相伍,益气生津。生地黄与党参、黄芪合用,健脾补中而不温燥,益肾养阴而不滋腻,山萸肉、山药、茯苓共为臣药。山萸肉酸温,功专补益肝肾,敛精益阴,与生地黄共用,补肾中之水。山药为补脾肾之常品,茯苓淡而平,健脾助运而力缓,与山药相须为用,茯苓得山药则利湿而不伤阴,山药得茯苓则补脾不留湿,共助君药健脾补肾,益气养阴。

本研究结果显示,参芪地黄汤高、低剂量组及雷公藤组均可降低 IgA 肾病大鼠尿蛋白定量,但中药低剂量组尿蛋白定量仍高于雷公藤组($P<0.05$),而中药高剂量组差异无统计学意义($P>0.05$),说明中药低剂量的药效稍差。与模型组比较,中药高、低剂量组和雷公藤组大鼠肾组织 nephrin、podocin 蛋白及其 mRNA 均明显升高($P<0.05$),而 3 个给药组之间差异无统计学意义($P>0.05$),说明参芪地黄汤在提高 IgA 肾病大鼠肾组织 nephrin、podocin 方面与雷公藤组疗效相等。

综上所述,参芪地黄汤能有效降低 IgA 肾病模型大鼠尿蛋白定量,其机制可能通过抑制足细胞相关分 nephrin 和 podocin 表达的减少,稳定肾小球裂孔隔膜分子屏障及电荷屏障,维持足细胞形态及功能完整,减少尿蛋白的漏出。

参考文献

- [1] Lai KN. Pathogenesis of IgA nephropathy[J]. Nat Rev Nephrol, 2012, 8(5):275-283.
- [2] 陈香美,陈以平,李平,等. 1016 例 IgA 肾病患者中医证候的多中心流行病学调查及相关因素分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(3):197-201.
- [3] 马红珍,陈红波,何灵芝,等. 加减参芪地黄汤治疗 IgA 肾病“气阴两虚证”临床疗效观察因素分析[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(5):491-493, 496.
- [4] Woodroffe AJ, Gormly AA, Clarkson AR, et al. Experimental cirrhosis and deposition of glomerular IgA immune complexes[J]. Contrid Nephrol, 1984, 40: 51-54.
- [5] 汤颖,姜探奇,成彩联,等. 实验性 IgA 肾病模型的改进[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2006, 27(2):183-187.
- [6] Lemley KV, Lafayette RA, Ssfai M, et al. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy[J]. Kidney Int, 2002, 61(4):1475-1478.
- [7] Patrakka J, Tryggvason K. Nephrin-a unique structural and signaling protein of the kidney filter[J]. Trends Mol Med, 2007, 13(9):396-403.
- [8] Sun D, Zhao X, Meng L. Relationship between urinary podocytes and kidney diseases[J]. Ren Fail, 2012, 34(3):403-407.
- (收稿日期:2012-08-20;修回日期:2013-01-20)
- [编辑:洪涛]
- (上接第 600 页)
- [8] Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis[J]. Trends Endocrinol Metab, 2000, 11(5): 193-198.
- [9] Moore RK, Shimasaki S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15[J]. Mol Cell Endocrinol, 2005, 234(1-2):67-73.
- [10] McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9[J]. Mol Endocrinol, 1995, 9(1):131-136.
- [11] Hayashi M, McGee EA, Min G, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles[J]. Endocrinology, 1999, 140(3):1236-1244.
- [12] Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(8):2744-2750.
- [13] Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, et al. Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries[J]. Biol Reprod, 1999, 60(2): 381-386.
- [14] 罗亚萍,马惠荣,杜惠兰,等. 逍遥丸对雄激素致无排卵大鼠卵巢功能的影响[J]. 河北中医药学报, 2009, 24(3): 33-34.
- [15] 杜惠兰,段彦苍,宋翠森. 补肾调经方对雄激素诱导无排卵大鼠血清生殖激素及子宫、卵巢性激素受体水平的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(4): 24-26.
- [16] 宋翠森,杜惠兰,马惠荣,等. 补肾调经方对雄激素致无排卵大鼠卵巢转化生长因子 β_1 及其受体表达的影响[J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(6): 600-605.
- [17] 杜惠兰,宋翠森,马惠荣,等. 补肾调经方对雄激素致不孕大鼠子宫一氧化氮、血清睾酮的影响[J]. 中成药, 2007, 29(2): 284-285.
- (收稿日期:2012-11-14;修回日期:2013-01-14)
- [编辑:邓媛]