

· 实验研究 ·

基于 calpain 10 的表达探讨固肾泄浊和络方对高糖损伤的足细胞的保护机制[※]吴 进¹ 李晓倩¹ 李 伟¹ 郑艳辉^{2▲}

摘要 目的:基于钙蛋白酶10(calpain 10)的表达研究固肾泄浊和络方(GSXZ)对高糖损伤的足细胞的保护机制。**方法:**选用30 mmol·L⁻¹葡萄糖建立高糖损伤的足细胞模型,将细胞分为正常组、甘露醇组、高糖组、固肾泄浊和络方低剂量组、固肾泄浊和络方中剂量组、固肾泄浊和络方高剂量组。运用CCK-8法检测高糖和GSXZ对足细胞增殖活性的影响;划痕实验检测足细胞的迁移闭合能力;Annexin V-EGFP荧光染色法流式检测细胞凋亡;PCR法检测 calpain 10、nephrin、podocin、CD2AP的mRNA表达;Western blot法检测 calpain 10、nephrin、podocin、CD2AP的蛋白表达。**结果:**高糖导致足细胞的增殖活性被抑制、迁移能力降低、细胞凋亡加速,足细胞内 calpain 10明显上升,足细胞裂孔膜蛋白 nephrin、podocin、CD2AP的mRNA和蛋白表达下降,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);经不同浓度的GSXZ干预后,足细胞的增殖活性上升、迁移能力升高、细胞凋亡下降,足细胞内 calpain 10下降明显, nephrin mRNA表达上升, nephrin、podocin、CD2AP的蛋白表达上升明显,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**GSXZ可改善高糖诱导的足细胞损伤,其机制可能与降低足细胞内 calpain 10的表达有关。

关键词 calpain 10;固肾泄浊和络方;足细胞;糖尿病肾病

足细胞是一种存在于肾小球基膜表面的高度分化细胞,其足突结构为维持肾小球的正常滤过功能发挥重要作用^[1]。糖尿病肾病(DN)早期,足细胞在持续的高糖的刺激下即可出现足突的病变;随着DN的进展,足细胞凋亡数目增多,骨架结构和基底膜被破坏,日久肾小球硬化,快速进展至终末期肾病(ESRD)阶段^[2-3]。近年来,关于钙激活的 calpain 10在足细胞损伤方面的研究备受关注。calpain 10是钙蛋白酶(calpains)家族的一员^[4],与足细胞损伤关系密切^[5]。calpain 10的过度表达会导致线粒体肿胀和自噬,引起细胞线粒体功能障碍,介导足细胞的凋亡^[6]。研究^[7]发现, calpain 10在DN大鼠模型的足细胞中表达上调,

高水平的 calpain 10使大鼠足细胞内 nephrin 蛋白的表达下降,介导足细胞的凋亡。因此,干预足细胞内 calpain 10的表达可作为治疗DN足细胞损伤的潜在靶点。

固肾泄浊和络方是南京市中医院肾病科主任郑艳辉教授的自拟方,具有固肾益气,泄浊和络的功效。前期临床试验证实了固肾泄浊和络方可降低糖尿病肾病患者血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平,降低蛋白尿和尿泛素-52氨基酸融合蛋白(UBA52)、核因子激活的B细胞的 κ -轻链(NF- κ B)、核因子激活的B细胞的 κ -轻链抑制蛋白(I- κ B)和足细胞标记蛋白(PCX)的水平^[8-9]。本实验通过建立高糖损伤的足细胞模型,以 calpain 10为干预靶点,初步探讨固肾泄浊和络方对高糖损伤的足细胞的保护机制,为固肾泄浊和络方的临床应用提供数据支持。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠肾小球足细胞(MPC5细胞),购自北京北纳创联生物技术研究院。

※基金项目 江苏省第四批省名老中医药专家传承工作室建设项目(No.苏中医科教[2021]7号);南通市科技局民生科技计划(No. MSZ21016);南京中医药大学自然科学基金(No. XZR2021049)

▲通信作者 郑艳辉,女,主任中医师。研究方向:中医药治疗肾脏疾病。E-mail:935041519@qq.com

• 作者单位 1.南通市中医院(江苏南通 226000);2.南京市中医院(江苏南京 210000)

1.2 试剂 链霉素(麦克林公司,批号:201424);青霉素(上海思域化工有限公司,批号:ML8010302);0.25%胰酶(BIOFROX公司,批号:EZ6789C118);干扰素- γ (Sigma公司,批号:20202138);roswell park memorial institute(RPMI)-1640培养基(Gibco公司,批号:1970736);CCK8细胞活力检测试剂盒(南京恩晶生物科技有限公司提供,批号:EG20190416);ECL(南京恩晶生物科技有限公司提供,批号:20200708);PBS(南京恩晶生物科技有限公司提供,批号:20200620);BCA试剂盒(南京恩晶生物科技有限公司提供,批号:20200609);蛋白酶抑制剂(南京恩晶生物科技有限公司提供,批号:20200720);PMSF(南京恩晶生物科技有限公司提供,批号:20200808);Annexin V-EGFP细胞凋亡检测试剂盒(南京恩晶生物科技有限公司提供,批号:EG20200701);D-葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司,批号:20100122);甘露醇注射液(四川科伦药业股份有限公司,批号:A19103007B,250 mL:50 g);TRIpure Reagent(Aidlab公司,批号:272026AX);oneScript™ cDNA Synthesis Kit(abm公司,批号:G234);EvaGreen Express 2 \times qPCR MasterMix-ROX(abm公司,lot:0165834951005);calpain 10多克隆抗体(EnoGene公司,批号:E914108);nephrin多克隆抗体(EnoGen公司,批号:E8ER1803-67);podocin多克隆抗体(EnoGene公司,批号:E301260);CD2AP抗体(EnoGene公司,批号:E97788);GAPDH多克隆抗体(EnoGene公司,批号:EOL3012-2);FBS(乌拉圭 Tecno公司,批号:FBSUY09.2018)。

1.3 仪器 生物洁净安全柜(苏州净化设备有限公司,型号:BHC-1300A/B2);二氧化碳培养箱(日本三洋 SANYO,型号:MCO-15AC);酶标仪(美国 Thermo scientific公司,批号:MUTISKAN MK3);荧光倒置生物显微镜(南京江南永新光学有限公司,型号:XD-202);Real time PCR仪(苏州天隆科技,型号:TL998-IV),梯度PCR仪(美国 SCILOGEX公司,型号:TC1000-G);低温离心机(美国 SCILOGEX公司,型号:D3024R);PVDF膜(Millipore公司,批号:R9PA20709);感光胶片(锐柯公司,批号:053103011);DYCZ-24DN型垂直电泳装置(北京市六一仪器厂);TS-1型脱色摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);5415R型离心机(Eppendorf公司);倒置显微镜(OLYMPUS公司);MAX-TL型高速冷冻离心机(美国 BeckMan公司)。

2 方法

2.1 药物与制备 固肾泄浊和络方(简称为“GSXZ”)药物组成:黄芪30 g,党参15 g,泽兰12 g,泽泻10 g,当归12 g,土茯苓40 g,海风藤12 g,穿山龙15 g,天花粉15 g,制山萸肉10 g,莪术10 g,猫爪草30 g。药材购自南京市中医院中草药房,符合2020年版《中华人民共和国药典》规范。水煎制备地点在南京市中医院中心实验室。制备方法如下:将各药材混匀置于适宜大小的容器中,加热煮沸后继续煎煮30 min,分离煎出液,药渣加入适量水再煎2次,将3次煎出液混合搅拌均匀,浓缩至3.9 g \cdot mL⁻¹生药材,过滤残渣,然后稀释至10 mg \cdot mL⁻¹,除菌后将药液置于-40 $^{\circ}$ C制冷24 h,-20 $^{\circ}$ C保存2 h,于冷冻干燥机制成冻干粉,取200 mg的GSXZ冻干粉迅速溶于50 mL无菌磷酸盐缓冲液(PBS),制成浓度为4 mg \cdot mL⁻¹的冻干粉溶液,以22 μ m滤器除菌过滤,分装后于-20 $^{\circ}$ C冷冻以备用。

2.2 足细胞的培养和干预 将冻存的小鼠肾小球足细胞复苏,在含有10 U \cdot mL⁻¹干扰素- γ 、10%胎牛血清、0.25%胰酶和1%青链霉素双抗的RPMI 1640培养液中,在33 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱传代;传代后在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养10~14 d使细胞分化。将细胞分为正常组(Control group)、甘露醇组(Mannite group)、高糖组(high glucose group, HG group)、固肾泄浊和络方低剂量组(the low dose of GSXZ group, L-GSXZ group)、固肾泄浊和络方中剂量组(the medium dose of GSXZ group, M-GSXZ group)、固肾泄浊和络方高剂量组(the high dose of GSXZ group, H-GSXZ group)。各组分别进行不同的干预,即Control组加入5 mmol \cdot L⁻¹的D-葡萄糖(D-glucose, DG),Mannite组加入5 mmol \cdot L⁻¹的DG以及24.5 mmol \cdot L⁻¹的甘露醇, HG组加入高浓度DG(经“2.3”检测后确定造模的葡萄糖浓度为30 mmol \cdot L⁻¹),L-GSXZ组加入30 mmol \cdot L⁻¹的DG以及0.5 mg \cdot mL⁻¹的GSXZ冻干粉溶液, M-GSXZ组加入30 mmol \cdot L⁻¹的DG以及1 mg \cdot mL⁻¹的GSXZ冻干粉溶液, H-GSXZ组加入30 mmol \cdot L⁻¹的DG以及2 mg \cdot mL⁻¹的GSXZ冻干粉溶液。

2.3 CCK-8法检测足细胞的增殖活性 将对数生长期的足细胞接种于96孔板(100 μ L/孔),并将其置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中,先分别加入不同浓度的高浓度葡萄糖(浓度依次为10、30、60 mmol \cdot L⁻¹),同

时,正常组加入 5 mmol·L⁻¹的葡萄糖,甘露醇组加入 5 mmol·L⁻¹的葡萄糖及 24.5 mmol·L⁻¹的甘露醇。将板置于培养箱中分别培养 24 h、48 h、72 h 后,更换培养基后再每孔加入 10 μL 的 CCK8 溶液,在细胞培养箱内继续孵育 2~4 h,450 nm 下测定吸光值,并计算增殖抑制率,通过对比后确定造模的葡萄糖浓度及干预时间。之后,对各组细胞分别进行不同的干预(干预前及干预后的细胞培养步骤同前,干预措施如“2.2”所述),450 nm 下测定吸光值,并计算增殖抑制率。

2.4 划痕实验检测足细胞的迁移 将生长状态良好的足细胞经消化、洗涤后制备成单细胞悬液,并调整细胞密度为 1×10⁶个·mL⁻¹,接种于 6 孔板中,每孔接种 2 mL,使第 2 d 细胞贴壁后融合度达 80% 左右。次日待细胞贴壁后,用移液器枪头均匀划痕,每孔 2~3 道;加入含 2% FBS 的培养基,然后对各组细胞分别进行不同的干预(干预措施如“2.2”所述)。划痕后 0 h、24 h,显微镜下观察划痕变化,PBS 洗净漂浮细胞后拍照,利用 Image J 软件计算划痕面积。

2.5 Annexin V-EGFP 荧光染色法流式检测细胞凋亡 按常规方法胰酶(不含 EDTA)消化并收集细胞,离心(2000 rpm,5 min),收集细胞沉淀,对各组细胞分别进行不同的干预(干预措施如“2.2”所述),并用 PBS 洗涤 1 次;之后加入 500 μL 结合液重悬细胞,加入 5 μL 的 Annexin V-EGFP 以及 5 μL 的 PI,同时设立全阴管及单阳管,充分混匀。室温(20~25 °C)避光孵育 10~30 min 后,流式细胞仪检测细胞凋亡百分率。

2.6 Real time PCR 检测 calpain 10、nephrin、podocin、CD2AP 的 mRNA 表达 将对数生长期的细胞按上述培养及分组进行收集,按照总 RNA 提取试剂盒的说明书提取总 RNA,反应程序为:42 °C 反应 50 min;85 °C,5 min;4 °C 保存。然后再合成 cDNA,按照 real-time PCR 的说明书进行反应,反应条件为:95 °C 预变性,10 min;95 °C 变性,5 s;60 °C 退火、延伸,30 s;重复 40 个循环,60~95 °C 绘制融解曲线。反应体积为 25 μL。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,收集 Ct 值,以 2^{-ΔΔCt}法计算相关目的基因的表达量。引物序列见表 1。

2.7 Western Blot 检测 calpain 10、nephrin、podocin、CD2AP 的蛋白表达 按照上述分组干预法干预,取分组干预后的各组细胞,加入适量的裂解液,

表 1 引物列表

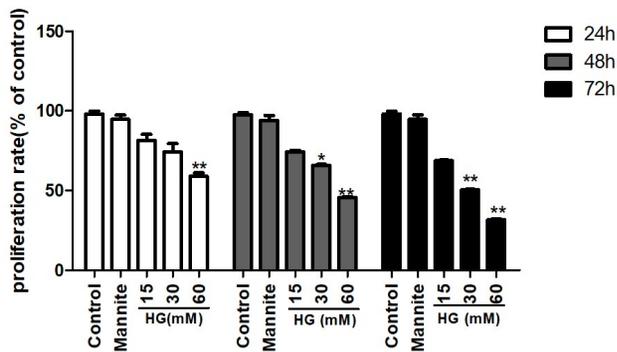
基因名称	引物序列
M-GAPDH-F	5'-GGTTGTCTCCTGGCACTCA-3'
M-GAPDH-R	5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'
M-calpain 10-F	CAGTTGCTTTCCCTGCAACC
M-calpain 10-R	GGGGTCTCTGAAGAACAGCC
M-nephrin-F	ACAGAACTTGCCGCCTGATT
M-nephrin-R	ATTGTGCGACCCTTCCACCAC
M-podocin-F	GGCACAAGACAGGCCAAAG
M-podocin-R	AGCGACTGAAGAGTGTGCAA
M-CD2AP-F	GAAGAAGAGAAGGCCATGCC
M-CD2AP-R	ACAACAGAACAGCTTTCTTCAGC

确定内参蛋白为 GAPDH。裂解细胞取上清液,用 BCA 法进行蛋白定量,并置于-80 °C 保存。将蛋白样品与 5×上样缓冲液混合后,煮沸变性 5 min,冰浴 5 min。取合适量的蛋白样品上样,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)至目的蛋白有效分离后停止电泳。电泳完毕后将凝胶取出后转膜。将膜置于 1×孵育封闭液中,室温摇动封闭 2 h,按蛋白的印迹位置剪开,置于含对应一抗的孵育封闭液中,4 °C,后将膜置于 1×TBST 溶液中,摇动漂洗 5 min,共 4 次;置于含对应二抗孵育封闭液中,室温作用 1.5 h;置于 1×TBST 溶液中,摇动漂洗 5 min,共 4 次;置于 ECL 中 30 s。之后,立即将膜置于曝光盒中,并在暗室中对感光胶片进行曝光 1 min,而后进行显影、定影处理。

2.8 统计学分析 应用 GraphPad Prism 6.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 One-way ANOVA (Dunnett),*P*<0.05 为有统计学意义。

3 结果

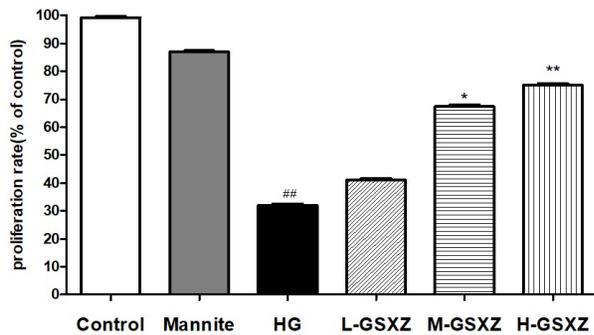
3.1 HG 对足细胞增殖活性的影响 经不同浓度(10、30、60 mmol·L⁻¹)的高浓度 DG 在不同时间点(24、48、72 h)分别进行干预后,足细胞的增殖活性受到不同程度的影响:与 Control 组和 Mannite 组相比,足细胞经 30 mmol·L⁻¹浓度的 DG 干预 72 h 后,其增殖率趋近于 50% (*P*<0.01);而足细胞经 60 mmol·L⁻¹浓度的 DG 干预 48 h 以及 72 h 后,增殖率均小于 50%,其增殖活性均受到明显抑制 (*P*<0.01),因此,笔者选择 30 mmol·L⁻¹浓度的 DG 干预 72 h 来观察高糖对足细胞损伤的影响。见图 1。



与Control组和Mannite组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

图1 不同浓度高糖溶液对足细胞体外增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

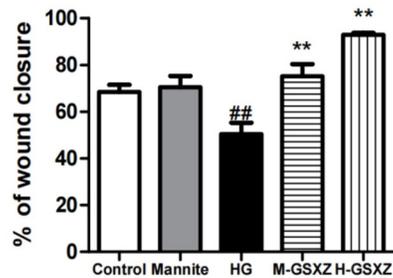
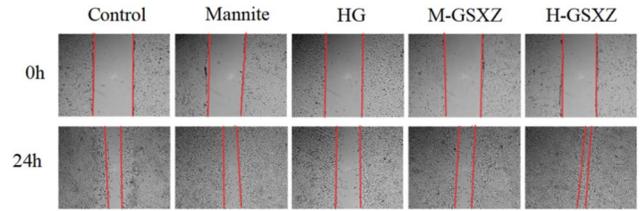
3.2 GSXZ对高糖损伤的足细胞体外增殖活性的影响 与Control组和Mannite组相比, HG组足细胞增殖率下降($P < 0.01$)。相较于HG组, 经不同浓度的GSXZ干预后足细胞增殖率均上升, 其中M-GSXZ组和H-GSXZ组干预后上升明显($P < 0.05, P < 0.01$), 呈浓度依赖性。因此, 笔者以下实验选择M-GSXZ和H-GSXZ来观察其对高糖诱导足细胞损伤的影响。见图2。



与Control组和Mannite组相比, ## $P < 0.01$; 与HG组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图2 GSXZ对高糖诱导下足细胞损伤的体外增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

3.3 GSXZ对足细胞迁移能力的影响 因足细胞经过30 mmol·L⁻¹的DG进行干预48 h和72 h后, 足细胞出现完全的闭合, 故选用30 mmol·L⁻¹的HG对足细胞进行干预24 h后, 观察各个组足细胞的迁移情况和计算细胞的闭合率, 结果显示: 与Control组和Mannite组相比, HG组足细胞迁移能力及闭合程度降低($P < 0.01$); 相较于HG组, M-GSXZ组和H-GSXZ组足细胞迁移能力及闭合程度增高($P < 0.01$), 呈浓度依赖性。见图3。



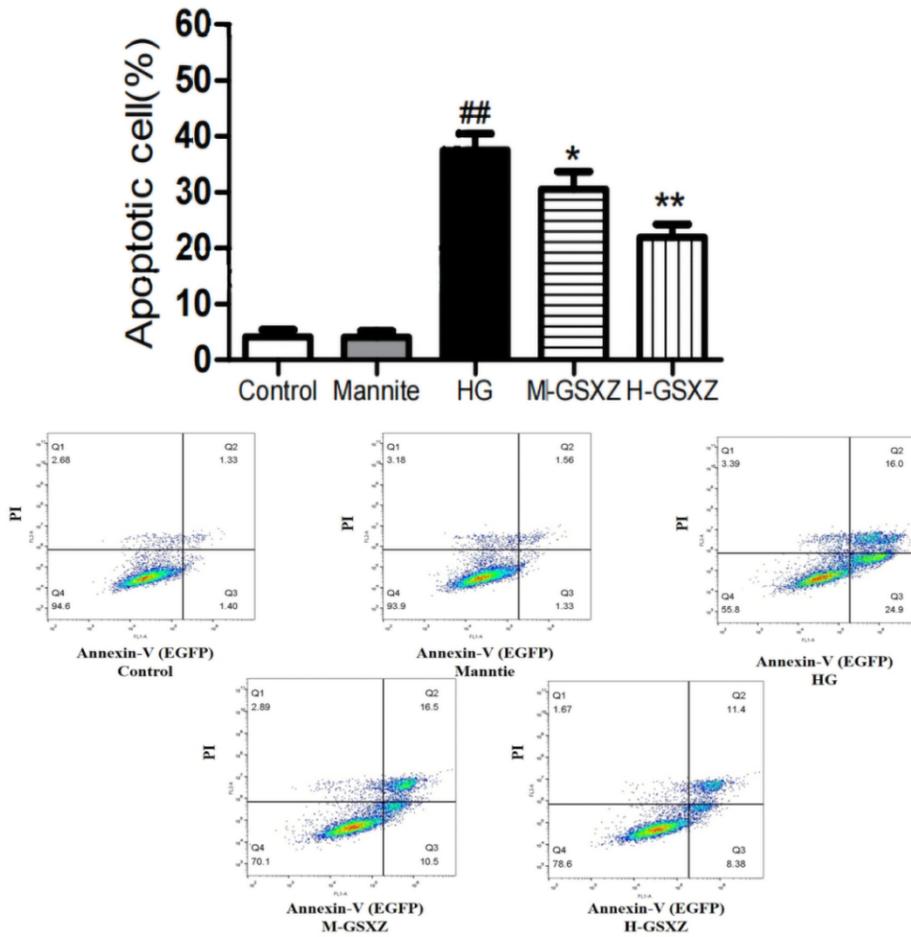
与Control组和Mannite组相比, ## $P < 0.01$; 与HG组相比, ** $P < 0.01$

图3 GSXZ对高糖诱导下足细胞迁移能力的影响 ($\times 100, \bar{x} \pm s, n=4$)

3.4 GSXZ对足细胞凋亡的影响 与Control组和Mannite组相比, HG组足细胞凋亡率上升明显($P < 0.01$)。相较于HG组, M-GSXZ组和H-GSXZ组细胞凋亡率下降($P < 0.01, P < 0.05$), 且呈浓度依赖性。见图4。

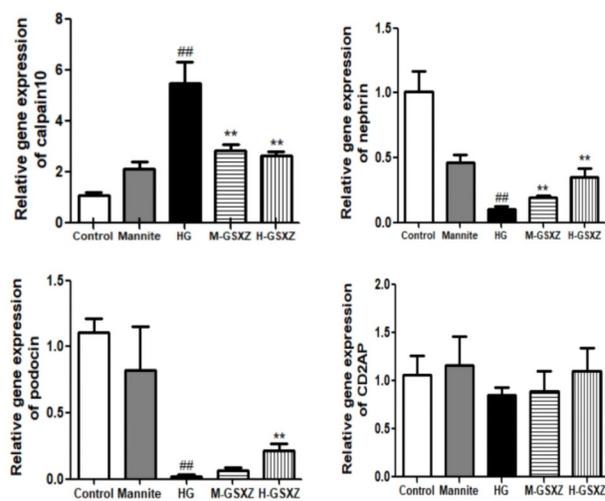
3.5 GSXZ对足细胞 calpain 10、nephrin、podocin、CD2AP的mRNA表达水平的影响 与Control组和Mannite组相比, HG组足细胞中 calpain 10 mRNA表达量增加($P < 0.01$), podocin mRNA、podocin mRNA表达下降($P < 0.01$), CD2AP mRNA表达未表现出明显差异($P > 0.05$)。相较于HG组, M-GSXZ组和H-GSXZ组足细胞内的 calpain 10 mRNA表达下降明显($P < 0.01$), nephrin mRNA表达上升明显($P < 0.01$), 而CD2AP mRNA表达未表现出明显差异($P > 0.05$); H-GSXZ组 podocin mRNA表达上升明显($P < 0.01$)。见图5。

3.6 GSXZ对足细胞 calpain 10、nephrin、podocin、CD2AP蛋白表达的影响 与Control组和Mannite组相比, HG组 calpain 10蛋白表达显著增加($P < 0.01$), 且 nephrin、podocin、CD2AP蛋白表达量均呈现出大幅度的下降($P < 0.01$)。相较于HG组, M-GSXZ组和H-GSXZ组中的 calpain 10蛋白表达量呈不同程度的下降($P < 0.01, P < 0.05$), 呈浓度依赖性; nephrin、podocin、CD2AP蛋白表达均可见明显上升($P < 0.01, P < 0.05$), 其中 nephrin、CD2AP的表达呈浓度依赖性。见图6。



与Control组和Mannite组相比, $^{##}P < 0.01$; 与HG组相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

图4 GSXZ对HG诱导足细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

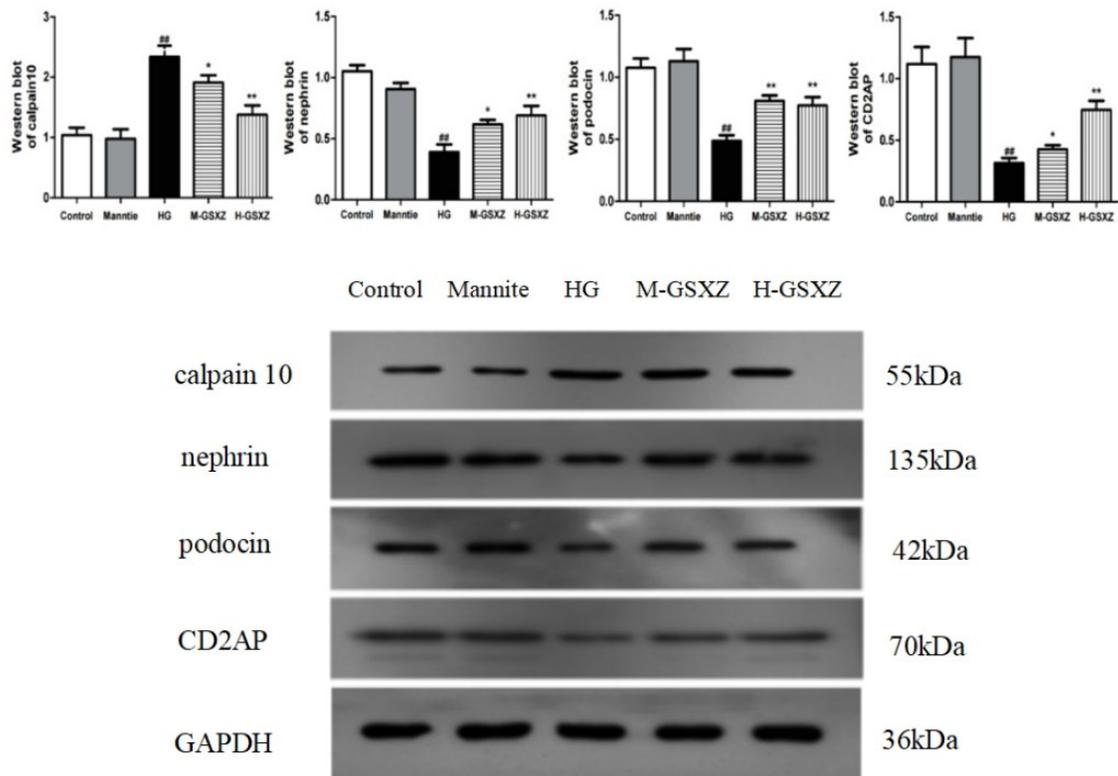


与Control组和Mannite组相比, $^{##}P < 0.01$; 与HG组相比, $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$

图5 GSXZ对高糖诱导下足细胞损伤模型中 calpain 10、nephrin、podocin、CD2AP的 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

4 讨论

中医学将糖尿病肾病归属为“消瘵”“肾消”“水肿”“尿浊”等范畴。《素问病机气宜保命集·消渴论》中指出“肾消者,病在下焦”,其临床表现为“如膏油之状,至病成而面色黧黑,形瘦而耳焦,小便浊而有脂”。郑艳辉教授认为肾消乃本虚标实之病,本虚为肾元亏虚,标实为浊毒、瘀血博结损伤肾络。《寿世保元》中记载:“肾水枯竭,不能运上,作消渴。”肾脏亏虚是本、是始因,肾元不足,无以气化,水液停聚而为水肿,日久浊毒内生,作强之官的功能受损,日久则病入络,络脉气血不得调畅,肾络受损,发为本病。固肾泄浊和络方中生黄芪、制山萸肉、党参补肾益气,泽兰、泽泻、猫爪草、土茯苓利湿泄浊,穿山龙、海风藤祛风通络,当归、莪术补血活血,天花粉生津止渴。诸药合用,益肾气而不滞,祛浊瘀而不伤正,补中有泻,助肾精化生、



与Control组和Mannite组相比,[#] $P < 0.01$;与HG组相比,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$

图6 GSXZ对高糖诱导下足细胞损伤模型中calpain 10、nephrin、podocin、CD2AP蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

祛邪毒外出,共奏固肾益气、泄浊和络之功效。郑艳辉教授团队前期研究证实固肾泄浊和络方可降低高糖诱导的足细胞NLRP3、ASC、caspase-1及IL-1 β 高表达,能有效降低糖尿病肾病大鼠血糖、24 h尿蛋白、Scr及BUN水平,并减少肾脏内wnt4、 β -catenin及IV型胶原蛋白的表达,改善肾小球炎性细胞浸润、肾小管损伤及系膜增厚^[10-11]。

足细胞位于肾小球外层,由细胞间的裂孔隔膜将其连在一起,共同构成肾小球的滤过系统。长期的高糖刺激使大量受损的细胞器及蛋白积聚在足细胞内,对其产生毒性作用,诱导足细胞出现足突融合肥大、细胞数量减少、分子及电荷屏障的受损等病理改变,导致足细胞损伤,介导DN的发生、发展^[12-13]。本研究结果显示,与正常组相比,HG组足细胞的增殖活性被明显抑制、足细胞的凋亡率上升、迁移能力下降;而经过不同浓度的GSXZ干预后,与HG组相比,足细胞的增殖活性提高、足细胞的凋亡率下降以及迁移能力增强,说明GSXZ可以改善高糖诱导的足细胞损伤和凋亡。

calpain 10作为一种钙调酶,位于线粒体的基质内,对细胞线粒体中Ca²⁺具有很高的敏感性,参与了DN足细胞损伤的过程^[14-15]。在高糖等因素的刺激下,细胞线粒体内膜的Ca²⁺通道蛋白(MCU)活性增强,对Ca²⁺摄取过量,使足细胞内Ca²⁺超载,导致足细胞线粒体内calpain 10被过度激活和表达增加,细胞跨膜电位(MMP)水平降低和线粒体透性转换孔(MPTP)异常开放,继而引起细胞色素C的释放,最终导致细胞损伤和凋亡^[16-18]。研究^[7]发现,calpain 10在DN大鼠的足细胞中表达上调,高水平的calpain 10导致大鼠肾功能不全、肾组织破坏、足细胞凋亡,降低肾小球足细胞内nephrin蛋白的表达;通过敲除大鼠肾脏calpain 10基因可以上调nephrin,从而保护足细胞。本研究结果显示,与正常组相比,HG组足细胞内的calpain 10 mRNA和蛋白表达上升明显,足细胞的凋亡率增加,提示calpain 10与DN足细胞损伤密切相关,足细胞内calpain 10的过度表达是足细胞凋亡的驱动因子;而通过不同浓度的GSXZ干预后,足细胞内calpain 10 mRNA和蛋白表达明显下降,细胞凋亡率下降,结

果说明 GSXZ 可降低足细胞内 calpain 10 的表达,减少足细胞的凋亡率,改善高糖诱导的足细胞损伤。

nephrin、podocin、CD2AP 作为足细胞裂孔膜上的特征性蛋白,既是足细胞成熟的标志性分子,又可维持肾小球的滤过屏障功能,三者可能形成脂筏样结构发挥功能复合体的作用以维持裂孔膜结构和功能的完整性^[19-20]。足细胞内 nephrin、podocin、CD2AP 蛋白表达下调后,足细胞裂孔膜结构被破坏,导致蛋白尿的产生和肾功能下降^[21]。李秋月等^[22]研究证实,坎地沙坦可阻止和逆转糖尿病肾病大鼠足细胞内 nephrin、podocin 和 CD2AP 的表达,减少蛋白尿以减轻肾小球硬化及肾脏纤维化进程。为了进一步证实此方对足细胞的保护作用,本研究检测了足细胞裂孔膜上的 nephrin、podocin、CD2AP 的表达水平。研究结果显示,与正常组相比, HG 组足细胞 nephrin、podocin、CD2AP 的 mRNA 和蛋白表达均降低,导致裂孔膜蛋白质复合体的组成发生改变,引起足突融合、消失以及足细胞骨架结构破坏,介导足细胞的损伤;而通过 GSXZ 干预后, nephrin mRNA 表达上升, nephrin、podocin、CD2AP 蛋白表达均上升,提示 GSXZ 可修复足细胞骨架结构,减轻高糖诱导的足细胞损伤,发挥肾脏保护作用。

综上所述,固肾泄浊和络方对高糖损伤的足细胞具有保护作用,其机制可能与降低足细胞中的 calpain 10 表达有关。这可能是 DN 治疗的新靶点,值得进一步研究。

参考文献

[1] KRIZ W, LEMLEY K V. Potential relevance of shear stress for slit diaphragm and podocyte function[J]. *Kidney Int*, 2017, 91(6): 1283-1286.
 [2] DAI H, LIU Q, LIU B. Research progress on mechanism of podocyte depletion in diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 2615286.
 [3] FAKHRUDDIN S, ALANAZI W, JACKSON K E. Diabetes-induced reactive oxygen species: mechanism of their generation and role in renal injury[J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 8379327.
 [4] ARRINGTON D D, VAN VLEET T R, SCHNELLMANN R G. Calpain 10: a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(6): C1159-C1171.
 [5] SMITH M A, SCHNELLMANN R G. Calpains, mitochondria, and apoptosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 96(1): 32-37.
 [6] SMITH M A, COVINGTON M D, SCHNELLMANN R G. Loss of cal-

pain 10 causes mitochondrial dysfunction during chronic hyperglycemia [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 523(2): 161-168.

[7] WANG T, GAO Y, WANG X, et al. Calpain-10 drives podocyte apoptosis and renal injury in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 1811-1820.

[8] 王欢静, 郑艳辉, 朱维娜. 固肾泄浊和络方治疗糖尿病肾病临床疗效及对 UBA52、PCX 影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(3): 133-136.

[9] 李雨潇, 郑艳辉, 乔丽君. 固肾泄浊和络方治疗糖尿病肾病的临床观察及对 NF- κ B 和 I- κ B 含量的影响 [J]. *贵阳中医学院学报*, 2019, 41(2): 54-57.

[10] 吴雪楠. 固肾泄浊和络方通过抑制 NLRP3 炎性小体的激活对高糖诱导足细胞损伤的保护机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.

[11] 陆梦兰. 固肾泄浊和络方对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用及对 Wnt/ β -catenin 通路的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.

[12] 臧赢君, 王利, 曹爱丽, 等. 糖尿病肾病足细胞损伤机制及中药干预研究进展 [J]. *天津中医药*, 2017, 34(11): 785-788.

[13] 洪金妮, 黎巍威, 王学美. 糖尿病肾病中足细胞损伤的信号通路及中药的干预研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(3): 215-219.

[14] GOLL D E, THOMPSON V F, LI H, et al. The calpain system [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(3): 731-801.

[15] PANICO P, SALAZAR A M, BURNS A L, et al. Role of calpain-10 in the development of diabetes mellitus and its complications [J]. *Arch Med Res*, 2014, 45(2): 103-115.

[16] 陈霞. 高糖环境下 MCU 介导线粒体钙摄取异常与心肌细胞凋亡的机制研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2020.

[17] MARTELL J D, DEERINCK T J, SANCAN Y, et al. Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(11): 1143-1148.

[18] SORRENTINO A, BORGHETTI G, ZHOU Y, et al. Hyperglycemia induces defective Ca²⁺ homeostasis in cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 312(1): H150-H161.

[19] LIU Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(2): 212-222.

[20] REIDY K, SUSZTAK K. Epithelial-mesenchymal transition and podocyte loss in diabetic kidney disease [J]. *Am J Kidney Dis*, 2009, 54(4): 590-593.

[21] XAVIER S, NIRANJAN T, KRICK S, et al. TbetRI independently activates Smad- and CD2AP-dependent pathways in podocytes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(10): 2127-2137.

[22] 李秋月, 李六生, 李桂霞, 等. 坎地沙坦对糖尿病肾病大鼠足细胞 Nephrin、Podocin 和 CD2AP 表达的影响 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(3): 310-314.

(收稿日期: 2024-05-28)

(本文编辑: 蒋艺芬)