

虫草素对补体复合物介导的足细胞损伤的保护作用*

洪涛¹, 崔路可², 文集³, 张明华⁴, 樊均明^{5,6△}

1. 成都市第六人民医院 肾内科(成都 610051); 2. 成都市第三人民医院 肾内科(成都 610031);
3. 四川大学华西医院 肾内科(成都 610041); 4. 第三军医大学第一临床医学院 肾内科(宜昌 443000);
5. 成都医学院第一附属医院 肾内科(成都 610500); 6. 泸州医学院附属医院 肾内科(泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨冬虫夏草的生物活性单体成分——虫草素(3'-脱氧腺苷)对补体介导的足细胞损伤的保护作用及其可能机制。方法 补体复合物 C5b-9 介导的足细胞损伤作为膜性肾病的体外模型。采用永生化的小鼠足细胞株 MPC5 建立细胞损伤模型,虫草素作为干预药物。用电镜观察细胞超微形态结构的变化,用免疫荧光染色观察细胞骨架 F-actin 结构和足细胞特异蛋白 nephrin 的表达,用 Western blot 检测信号通路丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化水平。结果 C5b-9 刺激细胞 3 h 后,细胞二级足突消失,细胞骨架结构明显损伤,F-actin 应力纤维混乱,nephrin 分布由胞膜移至胞浆,并引起 p38、JNK、ERK 磷酸化。虫草素能够保护足细胞的足突和细胞骨架结构,抑制 nephrin 的重分布,并显著抑制补体介导的 p38/JNK 信号通路活化。结论 虫草素能保护足细胞对抗补体介导的损伤,其机制至少部分是通过抑制 p38/JNK 信号通路活化而实现的。

【关键词】 虫草素 足细胞 补体复合物 膜性肾病 MAPK

Cordycepin Protects Podocytes from Injury Mediated by Complements Complex C5b-9 HONG Tao¹, CUI Lu-ke², WEN Ji³, ZHANG Ming-hua⁴, FAN Jun-ming^{5,6△}. 1. Department of Nephrology, the Sixth People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610051, China; 2. Department of Nephrology, the Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610031, China; 3. Department of Nephrology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Department of Nephrology, the First College of Clinical Medical Science of China Three Gorges University, Yichang 443000, China; 5. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 6. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

△ Corresponding author, E-mail: junmingfan@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the protective effect of Cordycepin (3'-deoxyadenosine), a bioactive compound of Cordyceps Sinensis, on injury of podocytes. **Methods** C5b-9-induced podocyte injury was used as a model of membranous nephropathy *in vitro*. This model was established using mouse podocyte cell line—MPC5. Cordycepin was given as an intervention. Ultra-micro morphological changes were observed by electron microscope. F-actin cytoskeleton and expression of nephrin were observed by fluorescence microscope. The phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) was measured by Western blot. **Results** Stimulated by C5b-9 for 3 h, MPC5 showed secondary foot processes, with cytoskeleton structure damaged, nephrin relocated from the cell surface to the cytoplasm, and cell signal pathway-p38, JNK and ERK activated. Cordycepin protected foot processes and cytoskeleton structures of podocytes, suppressed the redistribution of nephrin, and inhibited p38/JNK action. **Conclusion** Cordycepin can protect podocyte from C5b-9-induced injury partly through inhibiting the activation of p38/JNK signaling pathway.

【Key words】 Cordycepin Podocyte Complement complex Membranous nephropathy Mitogen-activated protein kinase

膜性肾病是成人肾病综合征的常见病理类型,也是慢性肾衰的重要原因。膜性肾病的病理形态学特征包括 IgG 和补体的免疫复合物在上皮下沉积,足细胞足突的消失,以及肾小球基底膜增厚。许多实验模型和临床研究证实:在膜性肾病的病理生理

机制中,补体介导的足细胞损伤发挥了重要作用^[1]。大量的补体膜攻击复合物(MAC)会导致有核细胞的损伤并裂解,而低浓度的 MAC 则会产生亚溶破损伤,在体内补体介导的组织损伤多与亚溶破剂量的补体相关^[2]。在足细胞,亚溶量的 MAC 激活特殊的信号通路,包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路^[3,4]、转录因子^[5,6]、蛋白酶^[1]等。最终,激活的信号部分改变细胞的代谢通路^[7],细胞骨架、裂孔隔

* 四川省卫生厅科研基金(No. 120331)资助

△ 通讯作者, E-mail: junmingfan@163.com

膜或者其它部分的结构和功能^[8,9]。尽管近年对膜性肾病的发病机制的研究有了相当的进展,但其治疗仍然主要依赖于非特异性的免疫抑制治疗,目前并没有强有力的循证医学证据证实免疫抑制治疗对患者或肾脏的生存具有长期效果^[10]。

冬虫夏草是传统的名贵中药,虫草素是冬虫夏草的主要生物活性单体成分。研究显示虫草素具有多种生物活性效果,如:促进细胞分化^[11],抗炎症活性^[12,13],抗肿瘤活性^[14],诱导细胞凋亡和细胞周期调控^[15,16]。近年,冬虫夏草还用于多种慢性肾病的治理。许多动物实验和临床研究的证据显示,它能降低慢性肾炎和糖尿病肾病患者的蛋白尿并改善患者的肾功能^[17-20]。膜性肾病和糖尿病肾病都被认为是一种足细胞疾病,因而我们推测冬虫夏草是通过对足细胞的保护作用而对膜性肾病具有治疗作用,为此,我们进行了本研究,探讨虫草素是否具有足细胞保护作用及其保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

虫草素(HPLC纯度>99%)购自贵州迪大生物公司,溶于0.9% PBS制成质量浓度为5 mg/mL的贮备液,分装冻存于-80℃,使用前用细胞培养液稀释。其它试剂包括:RPMI1640培养液(Hyclone Thermo Fisher, UK),胎牛血清(FCS, Grand Island, NY),重组小鼠 γ -干扰素(R&D, US),补体C5b6(Calbiochem, Germany),Nephrin抗体(Santa Cruz, US),罗丹明标记的鬼笔环肽(Sigma-Aldrich, US),Phospho-P38 MAPK、Phospho-P44/42 MAPK、Phospho-JNK抗体(Signalway antibody, US)。除了特别说明,其它试剂均购自Sigma(US)。

1.2 细胞培养及实验分组

MPC5细胞株为热敏感的SV-40转染的永生化小鼠足细胞株(纽约西奈山医学院Peter Mundel教授惠赠)。细胞培养于含10% FCS的RPMI1640,加入100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素。MPC5是条件分化的足细胞株,当培养于33℃,并用10 U/mL的小鼠 γ -干扰素处理,足细胞将会增殖并维持铺路石样的外形和上皮表型。当培养于37℃不含小鼠 γ -干扰素的培养液14 d后,细胞将会分化为多角形具有分支的分化成熟的足细胞^[21]。细胞在分化条件下培养14 d后用于以下所有的实验。

将MPC5细胞分为4组:C5b-9损伤模型组,

C5b-9+虫草素组(细胞经虫草素预处理1 h后再用C5b-9处理),MPC5细胞正常培养组,MPC5细胞+正常人血清对照组。其中虫草素对MPC5细胞作用的浓度由1.3筛选获得。

1.3 虫草素对MPC5细胞活性的影响

虫草素对足细胞MPC5的细胞毒性,此前未有报道。本研究采用MTT实验检测。足细胞以 3×10^3 /孔培养于96孔板,用不同浓度虫草素(0、20、40、60、80、100、150、200 μ mol/L)处理,培养24 h后,每孔加入MTT 20 μ L,37℃孵育4 h。小心弃上清,细胞用RPMI1640洗涤,加入DMSO(150 μ L/孔)并轻柔溶解紫色结晶。用酶标仪检测570 nm波长吸光度(A)。通过MTT实验并参考以往文献^[22]筛选对MPC5细胞作用的虫草素浓度。

1.4 亚容量C5b-9介导的足细胞损伤模型的建立

1.4.1 终末补体膜攻击复合物的组装 新鲜的正常人血清(fresh normal human serum, NHS)作为补体C7~C9的来源。C5b6和NHS用于体外培养的足细胞表面组装补体膜攻击复合物C5b-9,方法参考文献^[23]。MPC5细胞和C5b6(C5b6梯度质量浓度分别为0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 μ g/mL)在37℃孵育15 min,然后加入新鲜NHS(用含0.5 mmol/L EDTA的RPMI1640 1:20稀释)孵育在细胞表面组装C5b-9。细胞培养液中不加入C5b6仅含NHS-RPMI1640-EDTA作为对照组。

1.4.2 C5b-9致足细胞亚溶破损伤模型的最适浓度的筛选 C5b-9导致的足细胞膜完整性的损伤通过检测细胞乳酸脱氢酶(LDH)的释放测定。当MPC5与C5b6和NHS孵育40 min后,收集培养上清检测LDH释放,用LDH检测试剂盒(南京建成)完成。所有实验重复3次。C5b-9的细胞毒性即LDH释放率,按公式计算:LDH释放率(%) = $\frac{\text{实验组 LDH 释放}(\text{OD}_{490}) - \text{背景值}(\text{OD}_{490})}{\text{最大 LDH 释放}(\text{OD}_{490}) - \text{背景值}(\text{OD}_{490})} \times 100\%$ 。OD为光密度。

采用LDH释放率<10%的最大C5b6浓度^[23]作为建立补体致足细胞亚溶破损伤模型的最适浓度,并采用免疫荧光方法检测C5b-9在足细胞表面的沉积。

1.5 虫草素对C5b-9介导的MPC5细胞超微形态学改变的影响

MPC5细胞爬片按1.2所述分组处理后,于4℃用2.5%戊二醛固定超过2 h,用PBS漂洗3次,然后用梯度乙醇(30%、50%、70%、80%、90%、

100%)脱水,每个浓度 20 min。然后细胞转移至乙酸戊酯中 10 min,空气中室温晾干,包被金。在电镜下观察细胞超微结构并摄片。

1.6 虫草素对 C5b-9 介导的 MPC5 细胞骨架 F-actin 改变的影响

足细胞按不同分组予相应处理后,用 PBS 漂洗 3 次然后用 2% 甲醛(体积分数)固定 10 min。固定后再次漂洗,用含 0.1% triton-X-100 的 PBS 通透 7 min 后再漂洗。然后用含 1% BSA 的 TPBS 封闭 30 min。之后细胞用罗丹明标记的鬼笔环肽(2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)暗室中孵育 25 min。PBS 漂洗 3 次,DAPI 染核,最后在荧光显微镜下观察并摄片。

1.7 虫草素对 C5b-9 介导的 MPC5 细胞内 nephrin 重分布的影响

通过免疫荧光检测。Nephrin 是足细胞膜上定位于裂孔隔膜的关键膜蛋白,在正常足细胞内以细线样的方式分布于细胞膜上^[24]。足细胞被亚溶量的 C5b-9 刺激可以使 nephrin 的表达分布由细胞膜位移至胞浆。足细胞分组处理后用含 2% 甲醛和 0.1% triton-X-100 的 PBS 中固定 20 min。然后用 PBS 漂洗细胞,再用含 0.1% triton 和 3% BSA 的 PBS 室温下封闭 60 min。然后细胞在 4 $^{\circ}\text{C}$ 用一抗(1:700)孵育过夜。次日用 Alexa Fluor 488 标记的二抗(1:1 000)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。然后细胞用 DAPI 染核,最后在荧光显微镜下观察摄片。

1.8 虫草素对 C5b-9 激活 MAPK 信号通路的影响

采用 Western blot 检测。足细胞按不同分组予相应处理后,在冰上用含酶抑制剂的细胞裂解液收集细胞蛋白质。裂解液中蛋白质的含量用 BCA 试剂盒检测,以 BSA 作为标准对照。然后 5~40 μg 蛋白样品加入 SDS gel-loading buffer 后 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min,蛋白质样品经电泳在聚氟乙烯膜上印迹后,室温下用含 5% 脱脂牛奶的 T-TBS 封闭 1 h。然后用封闭液稀释的一抗(1:800)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 TBST 漂洗后,用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:6 000)室温孵育 1 h。再次漂洗后,用化学发光底物孵育 1 min,最后曝光于 X-ray 胶片,预染的蛋白分子 markers(MBI)作为相对分子质量标准。图像用 Quantity one-D Analysis software Version 4.5 分析。以 β -actin 作为内参半定量分析。

1.9 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测虫草素对足细胞活性的影响

由图 1 可见,用 $\leq 80 \mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度的虫草素处理足细胞 24 h,没有导致显著的足细胞活性改变,但是当用 $\geq 100 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的虫草素处理 24 h 后,细胞活性下降($P < 0.05$)。因而,本研究中,后续实验采用 80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的虫草素在用 C5b-9 刺激足细胞之前干预足细胞。

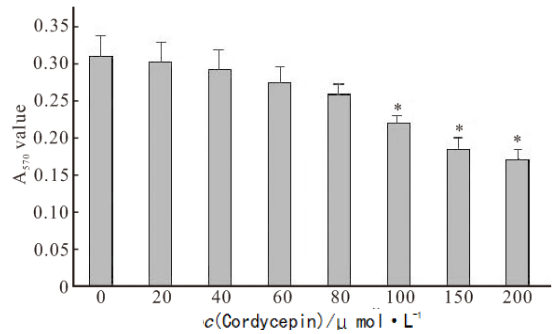


图 1 MTT 法检测虫草素对足细胞 MPC5 细胞活性的影响

Fig 1 The effect of cordycepin on cell viability of MPC5s was assessed using MTT assay

* $P < 0.05$, vs. control group

2.2 亚溶破 C5b-9 介导的足细胞损伤模型的建立

由图 2 可见,当 C5b6 浓度 $< 0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时能够导致轻度的细胞膜损伤(LDH 释放率 $< 10\%$),即培养体系中较少细胞裂解。当 C5b6 浓度 $> 0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,LDH 的释放率 $> 10\%$ 。因此,我们选择 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 C5b6 作为本研究中组装亚溶破剂量 C5b-9 的最适浓度。

当足细胞先后与 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C5b6 和新鲜 NHS 孵育后,用免疫荧光方法检测 C5b-9 在足细胞表面的沉积,结果显示,足细胞表面有 C5b-9 的沉积(图 3)。

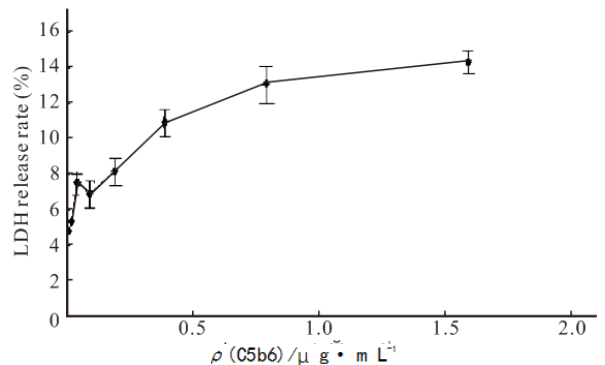


图 2 LDH 释放实验检测 C5b-9 导致的足细胞膜完整性损伤

Fig 2 Alteration of membrane integrity due to C5b-9 was determined by assay release of LDH

2.3 虫草素对 C5b-9 介导的 MPC5 细胞超微形态

学改变的影响

电镜下可见正常分化成熟的 MPC5 足细胞显示分枝状,从细胞体发出一级足突,再从一级足突发出头发样细长的二级足突(图 4A)。当 MPC5 细胞被 C5b-9 刺激 3 h 后,绝大部分细胞二级足突消失(图 4B)。虫草素预处理足细胞可以明显减轻以上的改变(图 4C)。

2.4 虫草素对 C5b-9 诱导的足细胞细胞骨架 F-actin 改变的影响

正常足细胞内 F-actin 应力纤维排列有序,有力绷直地延伸至细胞表面和足突(图 5A)。亚容量 C5b-9 刺激细胞 3 h 后,细胞骨架结构明显损伤,F-actin 应力纤维变得排列混乱、松弛,部分应力纤维消失(图 5B);虫草素预处理 1 h 可以抑制 C5b-9 诱导的足细胞骨架结构的损伤(图 5C)。不含 C5b6 的 MPC5 细胞+正常人血清对照组没有造成细胞骨架损伤(图 5D)。

2.5 虫草素对 C5b-9 诱导的足细胞内 nephrin 重分布的影响

由图 6 可见,当足细胞 MPC5 被亚容量的 C5b-9 刺激 2 h 后,nephrin 的表达和分布没有明显变化(图 6A 和 6B)。但是,随着 C5b-9 刺激时间延长,Nephrin 的表达分布变化明显,当足细胞被亚容量的 C5b-9 刺激 6 h 后,nephrin 在足细胞内由细胞膜表面位移至细胞浆,并且由细线样的分布方式转变为颗粒样簇集样的分布方式(图 6C)。虫草素预处理足细胞可以显著减轻以上由 C5b-9 诱导的 nephrin 分布的改变(图 6D)。

2.6 虫草素对 C5b-9 激活 MAPK 信号通路的影响

由图 7 可见,亚容量的 C5b-9 刺激增强了 p38、JNK 和 ERK 的磷酸化。当足细胞被亚容量 C5b-9 刺激 0.5 h 后,p-ERK、p-JNK 和 p-p38 的水平显著上升(图 7)。刺激 1 h、3 h、6 h 后,p-ERK、p-p38 均较 0.5 h 高峰有所下降,但仍维持较高水平;

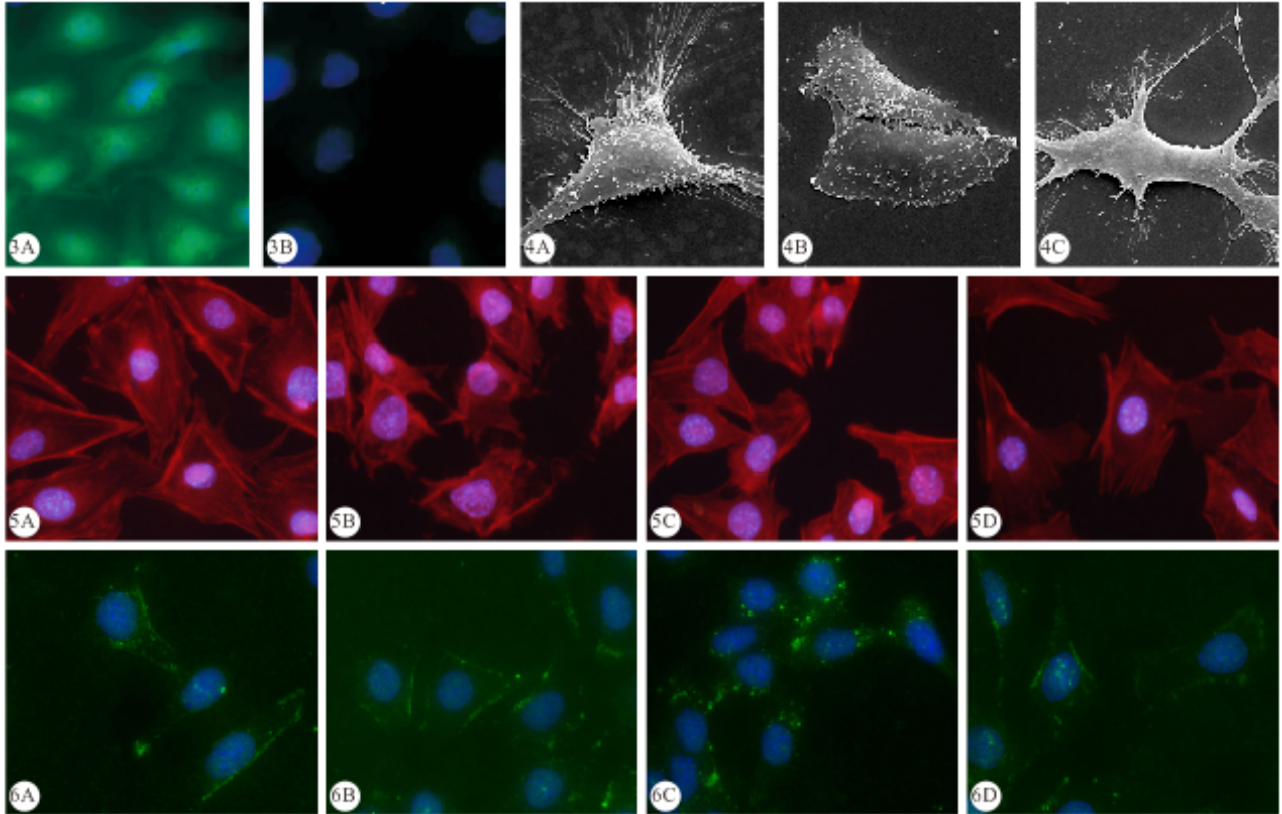


图3 免疫荧光法检测足细胞表面组装的亚容量 C5b-9 的沉积。×400

图4 电镜下虫草素对 C5b-9 诱导的 MPC5 超微形态学改变的影响。×5 000

图5 免疫荧光显示虫草素对 C5b-9 诱导的足细胞细胞骨架 F-actin 改变的影响。×400

图6 免疫荧光显示虫草素对 C5b-9 诱导的足细胞内 nephrin 表达变化的影响。×400

图6 免疫荧光显示虫草素对 C5b-9 诱导的足细胞内 nephrin 表达变化的影响。×400

Fig 3 Assembly of sublytic C5b-9 on membrane of podocytes was assessed by immunofluorescence. ×400

Fig 4 Effect of Cordycepin on C5b-9-induced ultra-micro-morphological changes in MPC-5. ×5 000

Fig 5 Effect of Cordycepin on C5b-9-induced cytoskeleton F-actin changes in MPC5. ×400

Fig 6 Effects of Cordycepin on C5b-9-induced changes of nephrin expression. ×400

Fig 6 Effects of Cordycepin on C5b-9-induced changes of nephrin expression. ×400

3A: C5b-9; 3B: Control; 4A: MPC5; 4B: MPC5 + C5b-9; 4C: MPC5 + C5b-9 + Cordycepin; 5A: MPC5; 5B: MPC5 + C5b-9; 5C: MPC5 + C5b-9 + Cordycepin; 5D: MPC5 + NHS; 6A, 6C: MPC5 + C5b-9 stimulate 2 h, 6 h; 6B, 6D: MPC5 + Cordycepin + C5b-9 stimulate 2 h, 6 h

p-JNK 在刺激 1 h、6 h 下降至对照组水平,但 3 h 呈再次高峰,与 0.5 h 水平相当。虫草素预处理阻滞了 C5b-9 诱导的 p38 和 JNK 的磷酸化($P < 0.05$),但是 p-ERK 水平的下降无统计学意义(图 8)。

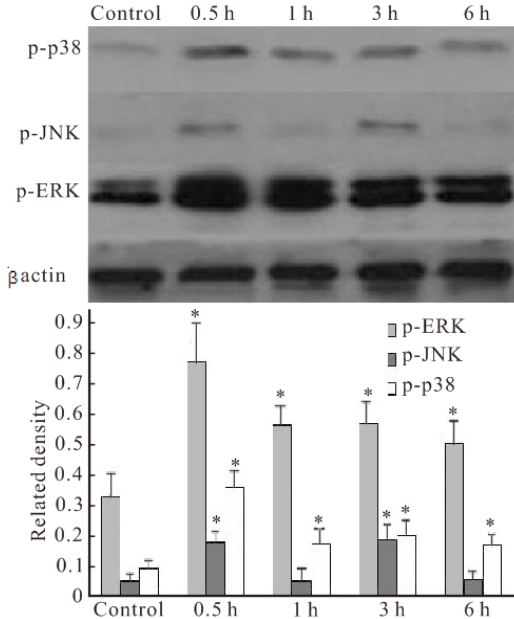


图 7 亚剂量 C5b-9 诱导 MAPK 信号通路的激活

Fig 7 Activation of MAPK signaling pathway by sublytic C5b-9

* $P < 0.05$, vs. control group

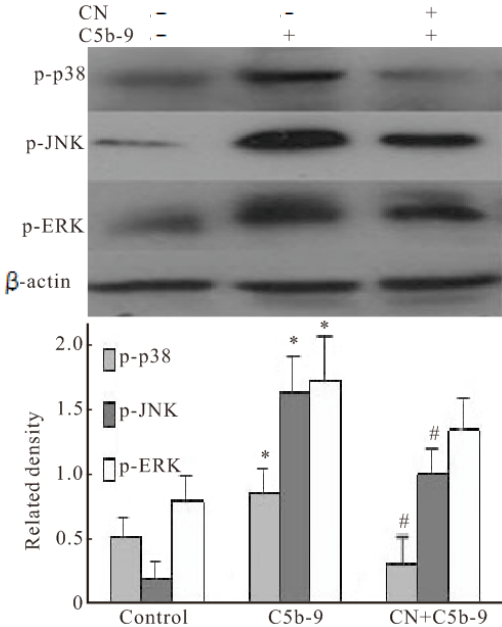


图 8 虫草素对 C5b-9 激活足细胞 MAPK 信号通路的影响

Fig 8 Effects of Cordycepin on the C5b-9 activated MAPK signaling pathway

CN: Cordycepin + NHS; * $P < 0.05$, vs. control group;

$P < 0.05$, vs. C5b-9 group

3 讨论

膜性肾病是成人肾病综合征的常见原因,也是

慢性肾衰的重要原因。尽管对膜性肾病的发病机制了解有所进展,该病的治疗仍然依赖于非特异的免疫抑制治疗^[1]。不幸的是,免疫抑制治疗的效果并不令人满意^[10]。因此,寻找免疫抑制以外的,对补体介导的足细胞损伤具有保护并帮助修复作用的药物具有重要意义。

传统中草药很久以来用于治疗肾脏疾病。这些中药中,冬虫夏草是最重要的单味中药之一^[25]。许多临床研究显示,冬虫夏草对多种慢性肾病有一定效果,包括慢性肾炎、糖尿病肾病、钙神经素抑制剂的肾毒性以及慢性移植性肾病^[18,19,26,27]。这些证据提示冬虫夏草能够保护肾脏对抗各种原因导致的损伤。但是由于缺乏实验数据,对它的肾脏保护作用的机制所知很少。虫草素是冬虫夏草的主要生物活性单体成分。近年被研究较多,并且显示多种生物学效应。在本研究中,我们通过足细胞的补体损伤模型的体外实验试图阐明虫草素是否为足细胞保护成分,并揭示其潜在的机制。

我们用纯化的 C5b6 和新鲜正常人血清作为补体成分的来源在足细胞 MPC5 表面组装 C5b-9,该方法参考了以前的文献^[23,28]。C5b-9 在足细胞表面的沉积用免疫荧光检测,将细胞内酶 LDH 的释放作为细胞膜完整性改变的指标,参考了以往文献^[23,29]。结果显示亚容量的 C5b-9 不会显著影响足细胞膜的完整性,但是会损伤足细胞的超微形态结构和细胞骨架,并且以时间依赖的方式改变 nephrin 的分布。这些体外培养的足细胞的改变与人类膜性肾病和动物膜性肾病模型中的病理改变一致^[1],提示亚容量的 C5b-9 介导的足细胞损伤模型建立成功。

足细胞的功能建立在其复杂的细胞结构基础上,特别是足突结构。足细胞细胞骨架 F-actin 的破坏导致的足突结构改变在膜性肾病的发生和进展中发挥了关键作用^[30]。Nephrin 是足细胞上位于裂孔隔膜的关键膜蛋白。许多研究注意到在肾脏疾病中足细胞内的 Nephrin 分布从细线型方式改变为颗粒样的簇集样方式,并且重分布离开裂孔隔膜向胞浆移动^[31-34]。这些证据支持 nephrin 的错位分布是肾脏疾病中足细胞功能失常的一个关键特征。本研究表明,亚溶破的 C5b-9 能够导致足细胞骨架 F-actin 结构和超微形态结构损伤、nephrin 重分布,虫草素能够减轻补体介导的细胞骨架 F-actin 结构和超微形态结构的损伤,抑制补体介导的 nephrin 重分布,提示虫草素对膜性肾病患者可能具有改善

足细胞功能并缓解蛋白尿、对补体介导的足细胞损伤具有保护作用。

我们进一步探讨了虫草素以上作用的可能机制。MAPK 信号通路参与细胞增殖、凋亡、细胞激酶的表达,以及细胞骨架稳固性等多种基本细胞活动的调控。3 个主要的 MAPK 家族成员:JNK、ERK 和 p38,都表达于培养的足细胞,亚溶破的 C5b-9 可以诱导它们的磷酸化,这在以往的研究中有报道^[23,29,35]。本研究结果显示在 C5b-9 刺激的 MAPK 信号通路中,虫草素可以抑制 MAPK 的活化,特别是 p38 和 JNK 的激活。这些结果和另一研究中,虫草素抑制内风湿关节炎患者滑膜成纤维细胞中 IL-1 诱导的 MAPK 激活的结果一致^[22]。尽管 MAPK 信号通路可以被补体膜攻击复合物激活,但是激活的 MAPK 的作用仍有待进一步探讨。p38 是参与炎症反应调控的重要信号通路。实际上,有报道 p38 特异性抑制剂能够有效地抑制补体介导的体外培养足细胞的损伤^[23],这也提示 p38 的激活在补体介导的足细胞损伤中具有重要作用。p38 的激活,作为一个重要的发病机制的环节也可以在肾脏疾病中观察到,如 FSGS 和间质性炎症^[36],这也提示 p38 激活在人类肾小球肾炎中具有病理生理作用。这些发现提示虫草素通过抑制 p38/JNK 而抑制补体介导的足细胞损伤。

综上,本研究证明虫草素能够保护足细胞对抗补体介导的损伤,至少部分是通过抑制 p38/JNK/MAPK 信号通路的激活。因而,虫草素可能是有希望对膜性肾病患者具有保护足细胞并改善足细胞功能的潜在药物。

参 考 文 献

- Cybulsky AV. Membranous nephropathy. *Contrib Nephrol*, 2011;169:107-125. doi: 10.1159/000313948. Epub 2011 Jan 20.
- Morgan BP. Effects of the membrane attack complex of complement on nucleated cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992;178:115-140.
- Cybulsky AV, Papillon J, McTavish AJ. Complement activates phospholipases and protein kinases in glomerular epithelial cells. *Kidney Int*,1998;54(2):360-372.
- Aoudjit L, Stanciu M, Li H, *et al*. P38 mitogen-activated protein kinase protects glomerular epithelial cells from complement-mediated cell injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003;285(4):F765-F774.
- Tsui CC, Shankland SJ, Pierchala BA. Glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptor ret is a novel ligand-receptor complex critical for survival response during podocyte injury. *J Am Soc Nephrol*,2006;17(6):1543-1552.
- Takano T, Cybulsky AV, Yang X, *et al*. Complement C5b-9 induces cyclooxygenase-2 gene transcription in glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001;281(5):F841-F850.
- Peng H, Takano T, Papillon J, *et al*. Complement activates the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in glomerular epithelial cells. *J Immunol*,2002;169(5):2594-2601.
- Topham PS, Haydar SA, Kuphal R, *et al*. Complement-mediated injury reversibly disrupts glomerular epithelial cell actin micro-filaments and focal adhesions. *Kidney Int*,1999;55(5):1763-1775.
- Saran AM, Yuan H, Takeuchi E, *et al*. Complement mediates nephrin redistribution and actin dissociation in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int*,2003;64(6):2072-2078.
- Schieppati A, Perna A, Zamora J, *et al*. Immunosuppressive treatment for idiopathic membranous nephropathy in adults with nephritic syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*,2004;18(4):CD004293.
- Mathew PA, Ellis LK, Studzinski GP. Enhanced messenger RNA stability and differentiation of HL 60 cells treated with 1, 25 dihydroxyvitamin D3 and cordycepin. *J Cell Physiol*,1989;140(2):212-218.
- Jeong JW, Jin CY, Kim GY, *et al*. Anti-inflammatory effects of cordycepin via suppression of inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *Int Immunopharmacol*, 2010; 10(12): 1580-1586.
- Kim HG, Shrestha B, Lim SY, *et al*. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF-kappa B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol*,2006;18(2-3):192-197.
- Rao YK, Fang SH, Wu WS, *et al*. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation. *J Ethnopharmacol*,2010;131(2):363-367.
- Baik JS, Kwon HY, Kim KS, *et al*. Cordycepin induces apoptosis in human neuroblastoma SK-N-BE(2)-C and melanoma SK-MEL-2 cells. *India J Biochem Biophys*,2012;49(2):86-91.
- Choi S, Lim MH, Kim KM, *et al*. Cordycepin-induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells are independent of the estrogen receptor. *Toxicol Appl Pharmacol*,2011;257(2):165-173.
- 罗琰琨,李学青.百令胶囊对慢性肾炎蛋白尿治疗作用. *实用医技杂志*,2005;12(23):3446-3447.
- 魏冬梅,高山林,张红梅等.百令胶囊治疗慢性肾炎的临床对照研究. *中国综合临床*,2006;22:514-515.
- 杜焯辉,杨锦屏,孙丁美.百令胶囊治疗糖尿病肾病的临床观察. *时珍国医国药*,2006;17:2276-2277. (下转第 227 页)

- naturally occurring and ligature induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implants Res*, 2007; 18(2):161-170.
- 6 Zheng L, Tang T, Deng F, *et al.* The Influence of extraction on the stability of implanted titanium microscrews: a biomechanical and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2009; 24(2):267-274.
- 7 姬洪全, 党耕町, 马庆军等. 骨折愈合过程中转化生长因子 $\beta 1$ 表达的实验研究. *中华外科杂志*, 1998; 36(2):72-73.
- 8 Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, *et al.* Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta 1$) levels in human fracture healing. *Injury*, 2011; 42(8):833-837.
- 9 Li J, Sarosi I, Yan XQ, *et al.* RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97(4):1566-1571.
- 10 Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, *et al.* Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, 2000; 191(2):275-286.
- 11 Zou W, Hakim I, Tschopp K, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *J Cell Biochem*, 2001; 83(1):70-83.
- 12 Sabokbar A, Itonaga I, SG Sun, *et al.* Arthroplasty membrane-derived fibroblasts directly induce osteoclast formation and osteolysis in aseptic loosening. *J Orthop Res*, 2005; 23(3):511-519.
- 13 Baumgrass R, Williamson MK, Price PA. Identification of peptide fragments generated by digestion of bovine and human osteocalcin with the lysosomal proteinases cathepsin. *J Bone Miner Res*, 1997; 12(3):447-455.
- 14 Kamamoto M, Machida J, Miyachi H, *et al.* A novel mutation in the C-terminal region of RUNX2/CBFA1 distal to the DNA-binding runt domain in a Japanese patient with cleidocranial dysplasia. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2011; 40(4):434-437.
- 15 Zhang C, Dai H, de Crombrughe B. Characterization of Dkk1 gene regulation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012; 420(4):782-786.
- (2014-07-22 收稿, 2014-09-27 修回)
- 编辑 沈进
-
- (上接第 178 页)
- 20 黄毅岚, 杨虹, 汪世梅. 百令胶囊治疗早期糖尿病肾病的系统评价. *药物研究*, 2012; 21(20):18-21.
- 21 Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, *et al.* Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res*, 1997; 236(1):248-258.
- 22 Noh EM, Kim JS, Hur H, *et al.* Cordycepin inhibits IL-1 beta-induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology*, 2009; 48(1):45-48.
- 23 陈朝红, 刘志红, 洪亦眉等. 雷公藤甲素干预 C5b-9 诱导足细胞损伤的体外研究. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2009; 18(4):310-314.
- 24 Welsh GL, Saleem MA. Nephrin-signature molecule of the glomerular podocyte? *J Pathol*, 2010; 220(3):328-337.
- 25 邓跃毅, 陈以平, 贺学林等. 冬虫夏草制剂延缓慢性肾衰竭的机理研究. *中国中西医结合肾病杂志*, 2001; 2(7):381-383.
- 26 Ding C, Tian P, Jia L, *et al.* The synergistic effects of C. Sinensis with CsA in preventing allograft rejection. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009; 14:3864-3871.
- 27 Zhang ZH, Wang XW, Zhang YN, *et al.* Effect of Cordyceps sinensis on renal function of patients with chronic allograft nephropathy. *Urologia Internationalis*, 2011; 86(3):298-301.
- 28 罗娜, 白云, 周静然等. 小胶质细胞人补体攻膜复合物亚溶破模型制作及功能鉴定. *第四军医大学学报*, 2006; 27(10):872-874.
- 29 Zhang MH, Fan JM, Xie XS, *et al.* Ginsenoside-Rg1 protects podocytes from complement mediated injury. *J Ethnopharmacol*, 2011; 137(1):99-107.
- 30 Somlo S, Mundel P. Getting a foothold in nephritic syndrome. *Nat Genet*, 2000; 24(4):333-335.
- 31 Doublier S, Ruotsalainen V, Salvio G, *et al.* Nephric redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephritic syndrome. *Am J Pathol*, 2001; 158(5):1723-1731.
- 32 Luimula P, Ahola H, Wang SX, *et al.* Nephric in experimental glomerular disease. *Kidney Int*, 2000; 58(4):1461-1468.
- 33 Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, *et al.* Expression of nephric in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol*, 2001; 12(2):289-296.
- 34 Coward RJ, Foster RR, Patton D, *et al.* Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephric, podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. *J Am Soc Nephrol*, 2005; 16(3):629-637.
- 35 Zheng R, Deng Y, Chen Y, *et al.* Astragaloside IV attenuates complement membranous attack complex induced podocyte injury through the MAPK pathway. *Phytother Res*, 2012; 26(6):892-898.
- 36 Stambe C, Nikolic-Paterson DJ, Hill PA, *et al.* P38 mitogen-activated protein kinase activation and cell localization in human glomerulonephritis: correlation with renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 2004; 15(2):326-336.
- (2014-07-29 收稿, 2014-09-28 修回)
- 编辑 沈进