

## 肾病综合征大鼠体内钠离子分布研究

倪良厚<sup>1,2</sup> 杨沫<sup>1,2</sup> 李曼曼<sup>1,2</sup> 王运来<sup>1,2</sup> 宣自华<sup>1,2</sup> 许钊<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨阿霉素肾病综合征模型大鼠的潴留钠存储位置及其发生机制。方法 采用两次尾静脉注射阿霉素(第1周4 mg/kg、第2周2 mg/kg)方法建立肾病综合征模型。检测尿液及血液生化指标;干燥法检测大鼠皮肤含水量;原子吸收光谱法检测皮肤钠含量;ELISA法检测糖胺聚糖含量;Western blot检测肾皮质张力反应性增强因子结合蛋白(TonEBP)、血管内皮生长因子C(VEGFC)、血管内皮生长因子受体3(VEGFR3)、淋巴管内皮细胞受体-1(LYVE-1)表达;免疫荧光法检测肾皮质淋巴管分布。结果 模型组大鼠尿蛋白排泄增高( $P < 0.05$ 或 $0.01$ ),且肾功能、血脂指标异常,提示模型建立成功。尿 $\text{Na}^+$ 排泄下降( $P < 0.05$ 或 $0.01$ ),皮肤钠含量( $P < 0.01$ )、糖胺聚糖含量升高( $P < 0.01$ ),肾皮质TonEBP、VEGFC、VEGFR3、LYVE-1蛋白表达升高( $P < 0.05$ 或 $0.01$ ),肾皮质淋巴管密度增加( $P < 0.01$ )。结论 肾病综合征大鼠机体发生钠潴留,且潴留的钠存储在皮肤的机制可能与TonEBP/VEGFC/VEGFR3有关。

**关键词** 肾病综合征;钠潴留;淋巴;皮肤;钠离子

中图分类号 R 692

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1054-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07

钠水潴留是肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)水肿发生的主要因素<sup>[1]</sup>。目前在NS中,对于水钠潴留的研究主要基于血液及尿液,表现为尿液 $\text{Na}^+$ 排泄降低,血液 $\text{Na}^+$ 基本不变,体内潴留 $\text{Na}^+$ 分布不明<sup>[2-3]</sup>。进一步研究<sup>[4]</sup>表明,在皮肤中有大量的 $\text{Na}^+$ 储存,表明皮肤可以作为 $\text{Na}^+$ 的储存库。糖胺聚糖(Glycosaminoglycan, GAGs)在皮肤组织间质中大量存在,在生理pH值下,每个GAGs二糖单位具有1~3个阴离子位点,可与 $\text{Na}^+$ 等阳离子通过静电作用相互结合<sup>[5]</sup>。毛细淋巴管在肾脏中的重

要生理功能是单向输送大分子物质、电解质等至静脉。LYVE-1是淋巴内皮细胞上的主要透明质酸受体,是区分血液和淋巴网络的标志物<sup>[6]</sup>。相关研究<sup>[7-8]</sup>表明,高渗环境可以诱导巨噬细胞分泌TonEBP,促使巨噬细胞分泌VEGFC,与毛细淋巴管上的VEGFR3结合,从而诱导毛细淋巴管网络扩张,以清除组织间质高渗物质。因此,推测NS潴留的 $\text{Na}^+$ 可能通过毛细淋巴管与静脉的交互作用,运输至皮肤,与皮肤中GAGs结合,达到存储目的。综上所述,本实验旨在对NS大鼠体内 $\text{Na}^+$ 分布及其机制进行初步探索。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 雄性SPF级Sprague-Dawley(SD)大鼠16只,体质量( $200 \pm 20$ )g,购于邳州市东方养殖公司,许可证号SCXK(苏)2017-0003,合格证编号:202107564。实验方案由安徽中医药大学实验动物伦理委员会审核通过。动物伦理编号:AHUCM-rats-2021068。实验动物在温度( $23 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度50%~60%的环境下进行饲养,饲养期间给予标准颗粒饲料,12 h光照黑暗交替,所有大鼠进行两次尿蛋白定性实验(尿蛋白试纸法)均为阴性。

**1.2 主要试剂** 注射用盐酸多柔比星(阿霉素, Adriamycin, ADR)(批号:21014711),杭州瀚晖制药有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(批号:0508A21),肌酐(Creatinine, Cr)检测试剂盒(批号:0508A21),北京雷根生物技术有限公司;Na试剂盒(批号:20210420),南京建成生物工程研究所;总蛋白(total protein, TP)测定试剂盒(批号:AUZ8665),白蛋白(albumin, ALB)测定试剂盒(批号:AUZ8692),胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒(批号:AUZ8183),三酰甘油(triGlyceride, TG)测定试剂盒(批号:AUZ8611),尿素氮(urea nitrogen, BuN)测定试剂盒(批号:AUZ8995),肌酐测定试剂盒(批号:AUZ2490),美国贝克曼库尔特公司;大鼠糖胺聚糖ELISA试剂盒(批号:10/2021),上海将来实业股份有限公司;兔抗GAPDH抗体(批号:GR3316865-1),英国Abcam公司;兔抗TonEBP抗体(批号:

2022-05-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81974536、81573720)

作者单位:<sup>1</sup>安徽中医药大学药学院,合肥 230012

<sup>2</sup>中药复方安徽省重点实验室,合肥 230012

作者信息:倪良厚 男,硕士研究生;

许钊 男,博士,教授,博士生导师,责任作者, E-mail:

845570851@qq.com

KK1108) ,成都正能生物科技有限公司; 兔抗 LYVE-1 抗体(批号: 1901R01-2) ,兔抗 VEGFC 抗体(批号: 2020091002) ,美国 Novus 公司; 兔抗 VEGFR3 (批号: VJ3101245) ,美国 Thermo Fisher 公司; 山羊抗兔 IgG(HRP) (批号: GR335516-1) ,英国 Abcam 公司; ECL 发光液(批号: P10100) ,苏州新赛美生物科技有限公司; 甲醛(批号: 10010018) ,上海国药集团化学试剂有限公司; Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG(H + L) (批号: A0428) ,DAPI 染色液(批号: C1002) ,防淬灭封片剂(批号: P0126) ,上海碧云天生物技术有限公司。

**1.3 主要仪器** SOLAAR AA 原子吸收光谱仪 ,美国 Thermo Corporation 公司; BeckmanAU-5800 全自动生化分析仪 ,美国贝克曼库尔特公司; Multiskan-MK2 酶标仪 ,美国 Thermo Lab systems 公司; BHWY-100BC 型恒温振荡培养箱 ,常州杰博仪器有限公司; Eppendorf Centrifuge 5810R 型离心机 ,德国 Eppendorf 公司; FA2004 型电子天平 ,上海精科仪器有限公司; ECLIPSE Ni 荧光显微镜 ,日本 NIKON 公司; DHG-9023A 恒温烘箱 ,上海恒一科学仪器有限公司; CM1850 冷冻切片机 ,PPTHK-21B 摊片机 ,德国 Leica 公司; AMERSHAM IMAGER 600 超灵敏多功能成像仪 ,美国通用电气公司。

**1.4 模型建立及分组** 雄性 SD 大鼠 16 只 ,分为正常组和模型组 ,每组 8 只 ,模型组通过两次(第 1 周 4 mg/kg ,第 2 周 2 mg/kg) 尾静脉注射 ADR 建立 NS 大鼠模型 ,正常组给予等量 0.9% 氯化钠溶液。BCA 蛋白测定试剂盒检测 12 h 尿蛋白含量。自大鼠造模起每周称量体重 1 次。

**1.5 尿生化指标检测** 自大鼠造模第 0 天起 ,每天将大鼠置于代谢笼 12 h ,收集大鼠 12 h 尿液 ,连续收集造模第 0 ~ 14 天及第 21 天大鼠尿液。收集的尿液 ,在离心机上离心 ,调整转速为 3 500 r/min 时间为 10 min ,温度为 4 °C ,移液枪取 3 ml 上清液置于 5 ml EP 管中。利用试剂盒检测大鼠尿蛋白、肌酐以及尿 Na<sup>+</sup> 水平。

**1.6 血浆 Na<sup>+</sup> 水平及血清生化指标检测** 第 0、7、14 天 ,采用眼眶取血 ,收集大鼠血液 0.5 ml ,室温放置 30 min ,3 500 r/min ,离心 10 min ,分离血浆。第 21 天收集 12 h 尿液后 ,腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg) 麻醉大鼠 ,大鼠麻醉后 ,剃除大鼠全身毛发 ,以 10 ml 注射器从腹主动脉进行取血 ,分别加入非抗凝管 5 ml、肝素抗凝管 5 ml ,室温放置 30 min ,3 500 r/min ,离心 10 min ,分离血清及血浆。利用试

剂盒及全自动生化分析仪检测血浆 Na<sup>+</sup> 及血清总蛋白、白蛋白、总胆固醇、三酰甘油、尿素氮、肌酐。

**1.7 大鼠皮肤 GAGs 含量检测** 腹主动脉取血处死大鼠后 ,自大鼠耳根部开始 ,剥离大鼠完整皮肤 ,剔除皮肤上多余的肌肉、脂肪以及结缔组织。精密称取 100 mg 背部皮肤组织 ,加入 2 ml PBS pH 7.4 ,充分研磨。2 500 r/min 离心 20 min ,收集上清液 ,按照酶联免疫分析(ELISA) 试剂盒操作步骤检测皮肤 GAGs 含量。剩余的皮肤组织用作大鼠皮肤含水量及钠含量检测。

**1.8 大鼠皮肤含水量及钠含量检测** 将剥离的大鼠皮肤置于 90 °C 烘箱中干燥 72 h 至恒重 ,称重 ,计算皮肤含水量; 2 次质量差值不大于 3 mg ,即认为质量恒定。皮肤含水量 = 湿重 - 干重<sup>[9]</sup> ,皮肤含水量百分比 = (湿重 - 干重) / 湿重。将干燥后的皮肤再次在 190 °C、450 °C 下各干燥 24 h ,将分离的组织捣碎 ,在 600 °C 下干燥 48 h ,之后溶解于 10 % 硝酸中 ,采用原子吸收光谱法检测 Na<sup>+</sup> 浓度<sup>[9]</sup>。

**1.9 肾皮质 TonEBP、VEGFC、VEGFR3、LYVE-1 蛋白的表达检测** 采用蛋白免疫印迹法(Western blot) 检测肾皮质蛋白表达。精密称取 100 mg 肾皮质 ,研磨并裂解。根据 BCA 蛋白定量试剂盒检测组织总蛋白浓度; 制备分离胶、浓缩胶后上样 ,电泳、转膜。封闭后分别按比例加入相应的一抗 TonEBP(1 : 1 000)、VEGFC(1 : 1 000)、VEGFR3(1 : 1 000)、LYVE-1(1 : 1 000)、内参 GAPDH(1 : 10 000) 孵育 4 °C 过夜 ,加入 IgG-HRP(1 : 10 000) 室温孵育 1.5 h ,加 ECL 发光液显影 ,使用 ImageJ 软件分析相关蛋白表达。

**1.10 肾皮质淋巴管密度检测** 利用免疫荧光法检测肾皮质淋巴管密度。切片前将组织样本于 -80 °C 冰箱取出 ,置于 -20 °C 冰箱内复温 30 min ,使用 OTC 包埋组织 , -20 °C 静置 15 min ,使组织固定在样品托上 ,切片 ,厚度为 5 ~ 7 μm ,将切片置于 4% 多聚甲醛溶液中固定; 将固定好的组织加入含有 LYVE-1(1 : 100) 的孵育盒中 ,4 °C 孵育过夜 ,0.02 mol/L PBS 冲洗 3 min × 3 次。加入荧光二抗(1 : 200) ,湿盒孵育 ,室温下放置 1 h。0.02 mol/L PBS 冲洗 3 min × 3 次。防淬灭封片剂与 DAPI(1 : 400) 稀释封片 , -20 °C 冰箱保存 ,荧光显微镜拍片。根据 Weidner 经典计数方法<sup>[10]</sup> ,即先在低倍镜(×100) 下观察 LYVE-1 阳性染色的淋巴管 ,选择染色最多的区域 ,然后在高倍镜(×200) 下进行观察 ,任何被 LYVE-1 抗体染成绿色的淋巴内皮细胞

或淋巴内皮细胞簇,均作为一个淋巴管计数,15个视野取平均值即为此张切片淋巴管密度。

1.11 统计学处理 实验数据使用统计学软件SPSS 23.0 进行分析,结果以表示,两组均数比较采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体重、造模后尿蛋白含量以及尿蛋白/肌酐 与正常组相比,造模后模型组大鼠体重下降,差异有统计学意义(t<sub>1</sub> = 6.77, t<sub>2</sub> = 9.61, t<sub>3</sub> = 11.72, P<0.01);大鼠12 h尿蛋白含量第14天升高,差异有统计学意义(t = 4.22, P<0.01),提示造模成功,第21天检测尿蛋白含量,未发现模型恢复现象;尿蛋白/肌酐于第10天升高,差异有统计学意义(t = 4.18, P<0.01),并持续升高。见图1。

2.2 血清生化指标 与正常组相比,模型组大鼠血清TC、TG、BuN、Scr升高,差异有统计学意义(t<sub>TC</sub> =

5.01, t<sub>TG</sub> = 4.97, t<sub>BuN</sub> = 4.81, t<sub>Scr</sub> = 3.87, P<0.01), TP和ALB下降,差异有统计学意义(t<sub>ALB</sub> = 9.08, t<sub>TP</sub> = 11.34, P<0.01)。见表1。

2.3 尿钠排泄量及血浆钠浓度 与正常组相比,模型组大鼠尿Na<sup>+</sup>排泄从首次造模后第2天开始下降(t<sub>2</sub> = 7.44, P<0.01),并于第5~11天降至最低(t<sub>5</sub> = 6.34, t<sub>6</sub> = 4.63, t<sub>7</sub> = 7.21, t<sub>8</sub> = 3.81, t<sub>9</sub> = 8.15, t<sub>10</sub> = 7.18, t<sub>11</sub> = 5.54, P<0.01),第21天模型组尿Na<sup>+</sup>排泄,但仍低于正常组,差异有统计学意义(t<sub>21</sub> = 2.25, P<0.05)。与尿Na<sup>+</sup>排泄趋势不同的是第21天模型组大鼠血浆Na<sup>+</sup>水平较正常组略有上升,但差异无统计学意义(t = 0.46)。见图2。

2.4 大鼠皮肤湿重、干重及含水量百分比 与正常组相比,模型组的湿重和干重低于正常组,差异有统计学意义(t<sub>湿</sub> = 9.33, t<sub>干</sub> = 7.59, P<0.01);干燥法检测两组大鼠皮肤含水量百分比,差异无统计学意义(t = 0.84)。见图3。

表1 ADR模型组和正常组大鼠血清生化指标(x±s, n=8)

组别	ALB(g/L)	TP(g/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	BuN(mmol/L)	Scr(umol/L)
正常	24.88±0.72	65.15±0.66	1.53±0.08	0.43±0.02	7.31±0.36	33.24±1.40
模型	17.20±0.45**	48.46±1.31**	3.09±0.30**	1.29±0.22**	9.78±0.37**	43.04±2.11**

与正常组比较: \*\*P<0.01

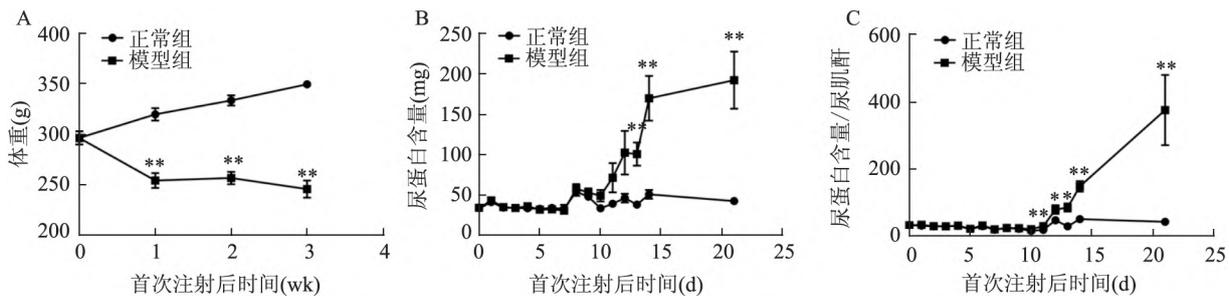


图1 ADR模型组和正常组大鼠的体重、尿蛋白含量和尿蛋白含量/肌酐

A: 首次造模后大鼠体重; B: 首次造模后大鼠尿蛋白含量; C: 首次造模后大鼠尿蛋白含量/肌酐; 与正常对照组比较: \*P<0.05, \*\*P<0.01

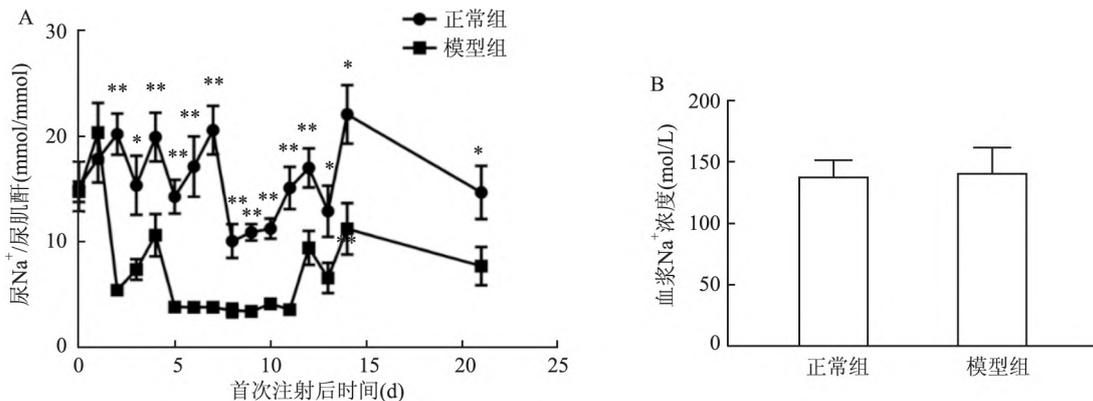


图2 ADR模型组和正常组大鼠的尿钠排泄量和血浆钠浓度

A: 各组大鼠尿钠排泄情况; B: 各组大鼠血浆Na<sup>+</sup>浓度; 与正常对照组比较: \*P<0.05, \*\*P<0.01

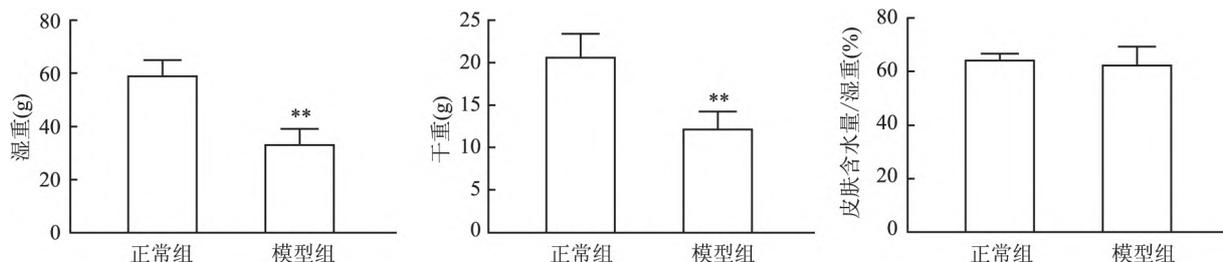


图3 ADR模型组和正常组大鼠皮肤的湿重、干重、含水量百分比

A: 各组大鼠皮肤湿重; B: 各组大鼠皮肤干重; C: 各组大鼠皮肤含水量百分比; 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

2.5 模型组大鼠尿液  $\text{Na}^+$  与血浆  $\text{Na}^+$  水平 与第0天相比,模型组大鼠尿  $\text{Na}^+$  排泄持续降低,差异有统计学意义 ( $t_7 = 7.21, P < 0.01; t_{14} = 2.95, t_{21} = 2.25, P < 0.05$ ); 而血浆  $\text{Na}^+$  水平基本不变 ( $t_7 = 0.03, t_{14} = 0.07, t_{21} = 0.46$ )。见图4。

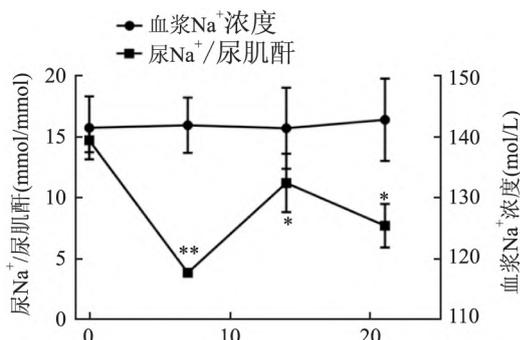


图4 ADR模型组大鼠尿钠排泄与血浆  $\text{Na}^+$  水平分析

与第0天比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

2.6 大鼠皮肤钠含量、皮肤钠含量/湿重和皮肤钠含量/干重 与正常组相比,模型组大鼠皮肤钠含量、皮肤钠含量/湿重和皮肤钠含量/干重升高,差异有统计学意义 ( $t_{\text{含量}} = 8.89, t_{\text{含量/湿重}} = 6.32, t_{\text{含量/干重}} = 9.70, P < 0.01$ )。见图5。

2.7 皮肤 GAGs 含量 与正常组相比,模型组大鼠皮肤 GAGs 含量升高,差异有统计学意义 ( $t = 8.314, P < 0.01$ )。见图6。

2.8 肾皮质中 TonEBP、VEGFC、VEGFR3、LYVE-1 蛋白的表达情况 与正常组相比,模型组大鼠肾皮质中 TonEBP、VEGFC、VEGFR3、LYVE-1 蛋白表达升高,差异有统计学意义 ( $t_{\text{TonEBP}} = 4.12, t_{\text{VEGFC}} = 7.25, t_{\text{VEGFR3}} = 8.38, t_{\text{LYVE-1}} = 7.05, P < 0.05$  或  $0.01$ )。见图7。

2.9 肾皮质淋巴管密度变化情况 与正常组相比,模型组 LYVE-1 淋巴管密度升高,差异有统计学意义 ( $t = 10.61, P < 0.01$ )。见图8。

### 3 讨论

水肿作为 NS 临床主要表现之一,钠水潴留是其发生的主要因素<sup>[1]</sup>。本实验结果表明,NS 模型大鼠尿蛋白升高,血清生化指标显示 NS 大鼠肾功能下降,尿钠排泄下降,血浆  $\text{Na}^+$  含量无明显变化,提示从首次造模后的第2天开始,机体处于钠蓄积状态,并且这一状态在其成模之后依然保持。

$\text{Na}^+$  是人体中一种主要的电解质,在维持生理稳态(包括神经活动、肌肉功能和代谢调节)方面有着重要的作用。由于  $\text{Na}^+$  及配对阴离子是细胞外主要的渗透压调节物质,能够对细胞内外的水分进行调节,所以  $\text{Na}^+$  的最重要的功能之一是体液容量调节<sup>[11]</sup>。在一项长期研究<sup>[12]</sup>中,观察到的  $\text{Na}^+$  的规律性释放和储存导致身体  $\text{Na}^+$  含量的变化,大量  $\text{Na}^+$  被储存在体内而没有相应的液体保留,说明体

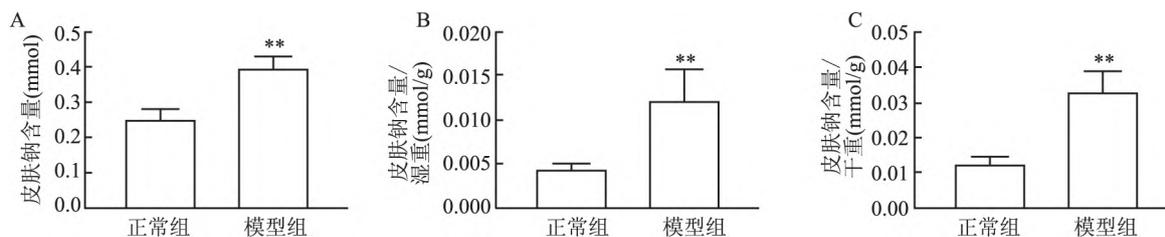


图5 ADR模型组和正常组大鼠皮肤钠含量、皮肤钠含量/湿重和皮肤钠含量/干重

A: 各组大鼠皮肤钠含量; B: 各组大鼠皮肤钠含量/湿重; C: 各组大鼠皮肤钠含量/干重; 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

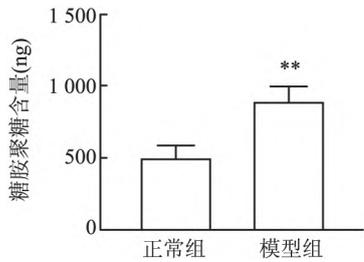


图6 ADR模型组和正常组大鼠皮肤GAG含量与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

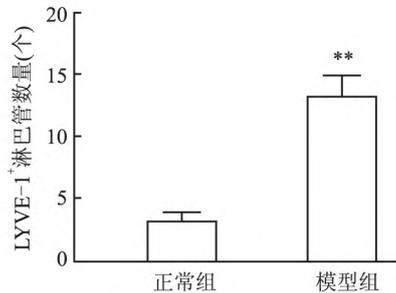
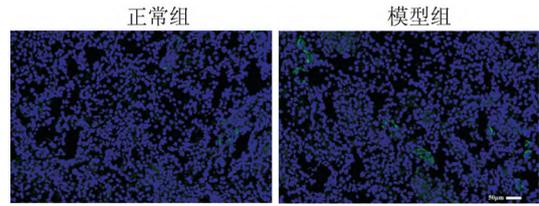


图8 ADR模型组和正常组大鼠肾皮质淋巴管密度检测 ×200 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

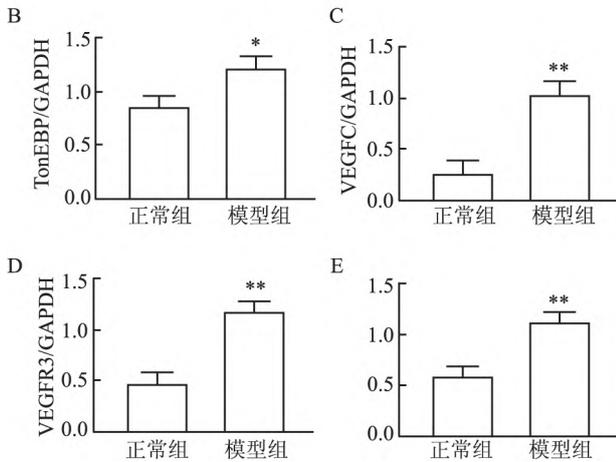
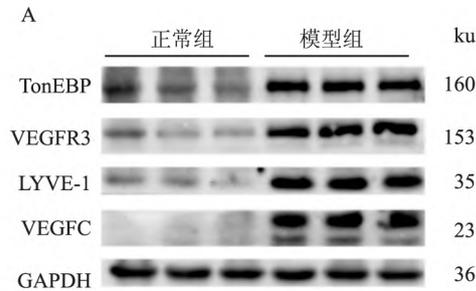


图7 ADR模型组和正常组大鼠肾皮质中TonEBP、VEGFC、VEGFR3、LYVE-1蛋白的表达情况

A: 各组大鼠肾皮质蛋白表达; B: TonEBP蛋白表达; C: VEGFC蛋白表达; D: VEGFR3蛋白表达; E: LYVE-1蛋白表达; 与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

内有一个位置可以储存和释放Na<sup>+</sup>。另有研究<sup>[13]</sup>表明,高血压大鼠皮肤钠含量增加,一定程度上提示了皮肤作为钠存储的可能位置。

低盐饮食导致大鼠皮肤GAGs含量下降,组织间质的电荷密度及Na<sup>+</sup>结合位点下降,而高盐饮食可以刺激皮肤GAGs含量增加,以此增加与Na<sup>+</sup>结合的能力<sup>[14]</sup>。本实验结果显示模型组与对照组之间皮肤钠含量升高,皮肤含水量百分比差异无统计学意义,GAGs含量升高,提示Na<sup>+</sup>在皮肤中可能是与GAGs相结合,达到钠存储的目的,并且皮肤中增加的钠是以一种不引起渗透压改变的形式存在,不引起皮肤组织的含水量等相关变化。

相关研究<sup>[15]</sup>表明在鼠尾淋巴水肿模型中,VEGFC表达升高,VEGFC的过度表达导致淋巴水肿加重,增加可溶性VEGFR3可以阻断VEGFC表达,以此减轻水肿的发展。本实验结果表明模型组大鼠肾皮质TonEBP、VEGFC、VEGFR3、LYVE-1蛋白表达升高,同时免疫荧光结果表明,模型组大鼠淋巴管密度升高。因此,推测NS过度重吸收Na<sup>+</sup>造成肾脏组织间质高渗微环境,激活TonEBP/VEGFC/VEGFR3调节机制,将肾脏组织间质过多的Na<sup>+</sup>通过淋巴管回流至血液循环,通过血液循环,进而存储于皮肤组织间质GAGs网络中。此外,盐敏感性高血压小鼠给予VEGFC激动剂后,其肾脏和皮肤淋巴扩张,可以减轻盐敏感性高血压导致的肾脏损伤<sup>[8]</sup>,即皮肤中的Na<sup>+</sup>储存可能是生物体在高盐饮食或面对高盐环境胁迫时的一种保护机制。

本研究结果指出NS大鼠Na<sup>+</sup>主要分布在血液、尿液和皮肤,初步证实了皮肤可能是Na<sup>+</sup>存储的位置。后期将对Na<sup>+</sup>在NS中如何进入并存储于皮肤中,皮肤中存储的Na<sup>+</sup>是否进入循环开展进一步的研究。

### 参考文献

[1] Ray E C, Rondon-Berrios H, Boyd C R, et al. Sodium retention and volume expansion in nephrotic syndrome: implications for hypertension[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2015, 22( 3): 179 - 84.

[2] Svenningsen P, Bistrup C, Friis U G, et al. Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20( 2): 299 - 310.

- [3] Ydegaard R, Svenningsen P, Bistrup C, et al. Nephrotic syndrome is associated with increased plasma  $K^+$  concentration, intestinal  $K^+$  losses, and attenuated urinary  $K^+$  excretion: a study in rats and humans[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019, 317(6): F1549–62.
- [4] Titze J, Luft F C, Bauer K, et al. Extrarenal  $Na^+$  balance, volume, and blood pressure homeostasis in intact and ovariectomized deoxycorticosterone-acetate salt rats[J]. *Hypertension*, 2006, 47(6): 1101–7.
- [5] Nijst P, Verbrugge F H, Grieten L, et al. The pathophysiological role of interstitial sodium in heart failure[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(4): 378–88.
- [6] Jafree D J, Long D A. Beyond a passive conduit: implications of lymphatic biology for kidney diseases[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(6): 1178–90.
- [7] Chachaj A, Szuba A. Skin lymphatic system in the pathogenesis of arterial hypertension – review and critique [J]. *Lymphology*, 2020, 53(3): 99–108.
- [8] Beaini S, Saliba Y, Hajal J, et al. VEGF-C attenuates renal damage in salt-sensitive hypertension[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9616–30.
- [9] Wiig H, Schröder A, Neuhofer W, et al. Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 2803–15.
- [10] Weidner N, Semple J P, Welch W R, et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1–8.
- [11] Minegishi S, Luft F C, Titze J, et al. Sodium handling and interaction in numerous organs[J]. *Am J Hypertens*, 2020, 33(8): 687–94.
- [12] Rakova N, Jüttner K, Dahlmann A, et al. Long-term space flight simulation reveals infradian rhythmicity in human  $Na^+$  balance [J]. *Cell Metab*, 2013, 17(1): 125–31.
- [13] Karlsten T V, Nikpey E, Han J, et al. High-salt diet causes expansion of the lymphatic network and increased lymph flow in skin and muscle of rats[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(9): 2054–64.
- [14] Fischereder M, Michalke B, Schmelzer E, et al. Sodium storage in human tissues is mediated by glycosaminoglycan expression[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(2): F319–25.
- [15] Gousopoulos E, Proulx S T, Bachmann S B, et al. An important role of VEGF-C in promoting lymphedema development[J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(9): 1995–2004.

## Study of sodium distribution in rats with nephrotic syndrome

Ni Lianghou<sup>1,2</sup>, Yang Mo<sup>1,2</sup>, Li Manman<sup>1,2</sup>, Wang Yunlai<sup>1,2</sup>, Xuan Zihua<sup>1,2</sup>, Xu Fan<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; <sup>2</sup>Key Laboratory of Chinese Medicine Formula of Anhui Province, Hefei 230012)

**Abstract Objective** To investigate the locations of sodium retention and the mechanism of its occurrence in the rat model of adriamycin nephrotic syndrome. **Methods** The nephrotic syndrome model was established by tail vein injections of adriamycin twice two weeks (4 mg/kg in first week and 2 mg/kg in second week). Urine and blood biochemical parameters were detected; the contents of water and sodium in rat skin were detected respectively by desiccation and atomic absorption spectrometry; the content of glycosaminoglycan was analyzed by ELISA; the expression of tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP), vascular endothelial growth factor C (VEGFC), vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) and lymphatic vessel hyaluronan receptor-1 (LYVE-1) in the renal cortical was detected by Western blot; the lymphatic vessels distribution in the renal cortex was measured by immunofluorescence. **Results** the model rats had increased urinary protein excretion, and abnormal renal function and lipid, which suggested the model was successfully established. The excretion of  $Na^+$  in urine decreased, the content of skin sodium and glycosaminoglycan in skin obviously increased, the expression of TonEBP, VEGFC, VEGFR3, LYVE-1 in renal cortical markedly increased, and density of lymphatic vessels in renal cortical notably increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Sodium retained in nephrotic syndrome rats may be stored in the skin, which is related to the TonEBP/VEGFC/VEGFR3 pathway.

**Key words** nephrotic syndrome; sodium retention; lymphatic; skin; sodium