

劳筱清,陈晨,张宏民,等. 芪石肾舒胶囊对早期糖尿病肾病小鼠肾纤维化的作用机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 56-65.

Lao XQ, Chen C, Zhang HM, et al. Effect and mechanism of Qishishenshu Capsule on renal fibrosis in mouse early diabetic nephropathy [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 56-65.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.007

芪石肾舒胶囊对早期糖尿病肾病小鼠肾纤维化的作用机制研究

劳筱清¹, 陈晨², 张宏民¹, 杨秀¹, 史姜珊¹, 粟宏伟², 沈宏萍², 王丽²,
游蔓芮³, 李晓斌², 赵长英^{2*}

(1.西南医科大学中西医结合学院,四川 泸州 646000;2.西南医科大学附属医院中医医院,四川 泸州 646000;
3.乐山市中医医院,四川 乐山 614000)

【摘要】目的 探讨芪石肾舒胶囊对早期糖尿病肾病小鼠肾纤维化的治疗作用和机制。**方法** 采用多次注射链脲佐菌素建立糖尿病肾病小鼠模型。小鼠随机分为正常组、模型组和给药组(0.9 g/(kg·d)),每组8只,连续灌胃4周,监测每周空腹血糖。4周后,检测尿微量白蛋白肌酐比、血肌酐和血尿素氮含量;苏木精-伊红染色、过碘酸雪夫染色和天狼星红染色观察肾病理变化情况;实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应检测纤维连接蛋白、I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 及 α -平滑肌肌动蛋白的mRNA表达水平;免疫组化和免疫蛋白印迹法检测纤维连接蛋白、I型胶原蛋白、III型胶原蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、足突蛋白、肾病蛋白及转化生长因子- $\beta 1$ /SMAD家族成员2/3(TGF- $\beta 1$ /Smad2/3)通路相关蛋白含量。**结果** 与正常组相比,模型组小鼠空腹血糖和尿微量白蛋白肌酐比水平升高($P < 0.001$);肾组织出现系膜增生、基底膜增厚和胶原沉积;纤维连接蛋白、I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 及 α -平滑肌肌动蛋白的mRNA水平升高($P < 0.05$);足突蛋白和肾病蛋白水平下降($P < 0.05$),纤维连接蛋白、I型胶原蛋白、III型胶原蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白、足突蛋白、肾病蛋白及TGF- $\beta 1$ /Smad2/3通路蛋白水平升高($P < 0.05$);与模型组相比,给药组尿微量白蛋白肌酐比水平降低($P < 0.05$),肾病理损伤有所缓解;纤维连接蛋白、I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 及 α -平滑肌肌动蛋白的mRNA水平下降($P < 0.05$),足突蛋白和肾病蛋白水平升高($P < 0.05$),纤维连接蛋白、I型胶原蛋白、III型胶原蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白及TGF- $\beta 1$ /Smad2/3通路蛋白水平均降低($P < 0.05$)。**结论** 芪石肾舒胶囊可改善糖尿病肾病小鼠肾纤维化,其机制可能与抑制TGF- $\beta 1$ /Smad2/3信号通路有关。

【关键词】 芪石肾舒胶囊;糖尿病肾病;肾纤维化;足细胞;TGF- $\beta 1$ /Smad2/3

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 09-0056-10

Effect and mechanism of Qishishenshu Capsule on renal fibrosis in mouse early diabetic nephropathy

LAO Xiaqing¹, CHEN Chen², ZHANG Hongmin¹, YANG Xiu¹, SHI Jiangshan¹, SU Hongwei², SHEN Hongping²,
WANG Li², YOU Manrui³, LI Xiaobin², ZHAO Changying^{2*}

(1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.
2. Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000. 3. Leshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Leshan 614000)

【基金项目】 四川省科技计划资助(2022YFS0407,2022YFS0621);四川省中医药管理局(2021MS426)。

【作者简介】 劳筱清(1999—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治内分泌代谢疾病基础。E-mail:15048248608@163.com

【通信作者】 赵长英(1973—),女,教授,硕士生导师,研究方向:中西医结合防治内分泌代谢疾病基础与临床。E-mail:zhaocy540@163.com

[Abstract] Objective To investigate the therapeutic effect and underlying mechanism of Qishishenshu Capsule on renal fibrosis in mice with early diabetic nephropathy (DN). **Methods** A DN mouse model was established by multiple injections of streptozotocin. The mice were randomly divided into a normal group (NC), model group (DN), and Qishi group (QS) (0.9 g/(kg · d)), with eight mice in each group. Mice were gavaged continuously for 4 weeks, and fasting blood glucose (FBG) was measured weekly. Four weeks later, urinary albumin/creatinine (UACR), serum creatinine, and blood urea nitrogen were measured. Hematoxylin-eosin, periodicacid-Schiff, and Sirius red staining were used to analyze renal pathological changes. Real-time fluorescence quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction was used to detect the mRNA levels of fibronectin (FN), collagen type I alpha 1 (Col1a1), and α -smooth muscle actin (α -SMA). Immunohistochemistry and Western blot were performed to detect FN, collagen type I (Collagen I), collagen type III (Collagen III), α -SMA, Podocin, Nephlin, and transforming growth factor- β 1/SMAD family member2/3 (TGF- β 1/Smad2/3) pathway-related proteins. **Results** Compared with mice in the NC group, those in the DN group showed significantly higher levels of FBG and UACR ($P < 0.001$), and mesangial hyperplasia, basement membrane thickening, and collagen deposition in the renal tissue. The mRNA levels of FN, Col1a1, and α -SMA were increased ($P < 0.05$). Protein levels of Podocin and Nephlin were decreased ($P < 0.05$). The levels of FN, Collagen I, Collagen III, α -SMA, and TGF- β 1/Smad2/3 pathway proteins were increased ($P < 0.05$). Compared with the DN group, the QS group's level of UACR was decreased ($P < 0.05$), their renal pathological injury was alleviated, and mRNA levels of FN, Collagen I, and α -SMA were attenuated ($P < 0.05$); whereas their protein levels of Podocin and Nephlin were elevated ($P < 0.05$). The levels of FN, Collagen I, Collagen III, α -SMA, and TGF- β 1/Smad2/3 pathway proteins were also decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Qishishenshu Capsule improved renal fibrosis in DN mice, probably through the inhibition of the TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway.

[Keywords] Qishishenshu Capsule; diabetic nephropathy; renal fibrosis; podocyte; TGF- β 1/Smad2/3

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病是全球重大的公共卫生挑战,其发病率和患病率急剧上升,其中高达 35% 的患者会发生肾疾病^[1-2],根据我国肾病数据报告显示,慢性肾疾病中糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)占 26.7%^[3]。DN 是糖尿病最常见的并发症之一,通常由 I 型糖尿病引起,偶由 II 型糖尿病引起^[4-6]。DN 的病理改变包括肾小球基底膜增厚、系膜基质增生、足细胞损伤和肾纤维化,主要特征是肾小球滤过屏障异常引起的蛋白尿^[5,7-8]。在 DN 进展为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)的过程中,肾小球和肾小管间质出现进展性纤维化样变^[9],可见纤维化改变是疾病进展的重要环节^[10]。作为被广泛研究的成纤维细胞因子,转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)通过刺激细胞外基质的产生增加和诱导细胞向肌成纤维细胞转化从而介导肾纤维化,SMAD 家族成员 2(SMAD family member 2, Smad2)和 SMAD 家族成员 3(SMAD family member 3, Smad3)是 TGF- β 1 生物学效应的两个关键下游转录因子,在 DN 患者和动物模型中, TGF- β 配体、受体及下游信号分子 Smad2 和 Smad3 被上调或激活,从而调节促纤维化基因的表达^[11-13]。

DN 进展与成本协同增加,早期确诊和干预可大大减轻家庭和社会负担^[14-15]。目前, I 型 DN 的治疗以改善生活方式和注射胰岛素为主,当患者合并高压、高脂和心血管事件时,合并口服药物。然而这些药物存在一定的副作用和局限性,因此近年来人们从天然产物中寻找副作用低且潜力大的替代疗法^[16]。

芪石肾舒胶囊是西南医科大学附属中医医院院内制剂,由黄芪、生地、益母草、水蛭、石韦、蜈蚣等多种中药组成,具有清热利湿、舒络活血、益气固肾的功效,对多种肾病具有良好疗效^[17-20]。本课题组前期研究表明,芪石肾舒胶囊通过抑制自噬改善糖尿病肾病的早期损害^[21],也可通过干预炎症通路的激活保护肾^[22]。然而,尚不清楚芪石肾舒胶囊是否可以改善糖尿病肾病纤维化病变。因此,本研究通过建立 DN 小鼠模型,探讨芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠肾纤维化的改善作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只,8 周龄,体重 22~25 g,购自成都药康生物科技有限公司[SCXK

(川)2020-0034]。小鼠分笼饲养于西南医科大学城北校区 SPF 级动物房[SYXK(川)2020-230],温度(24±2)℃,湿度 45%~55%,12 h/12 h 昼夜交替。实验动物伦理由西南医科大学实验动物伦理委员会审批通过(20220616-001)。实验中坚持 3R 原则:给予舒适的居住环境、足够营养的饲料、清洁的饮用水;操作时给予必要的麻醉剂和体外消毒;温和抚慰、减少应激、实施安乐死;在优化实验方法和步骤的前提下,以较小量的小鼠完成动物研究。

1.2 主要试剂与仪器

芪肾舒胶囊购自西南医科大学附属中医医院第一中药房。制剂许可证号:川 20160039HZ;备案号:川字制备字 Z20200161000;产品批号:20220707;配制单位及提供单位:西南医科大学附属医院中医医院。

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国 Sigma 公司,批号 S0130-1G;柠檬酸和柠檬酸三钠购自中国 Macklin 公司,批号 C805019、C824131;小鼠尿微量白蛋白 ELISA 试剂盒购自美国 Crystal Chem 公司,批号 80630;戊巴比妥钠购自中国山东西化工科技有限公司,批号 F0749;尿素氮试剂盒和肌酐试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所,批号 C013-2-1、C011-2-1;4%多聚甲醛购自中国 Biosharp 公司,批号 BL539A;DAB 显色试剂盒购自中国北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZLI-9018;逆转录试剂盒和 qPCR 试剂盒购自中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号 R323、Q711;PCR 引物购于中国上海生工生物工程股份有限公司;β-actin 抗体购自美国 Affinity 公司,批号 AF7018;纤维连接蛋白(fibronectin, FN)抗体购自中国 Abways 公司,批号 CY9537;I 型胶原(collagen type I, Collagen I)抗体和Ⅲ型胶原(Collagen type Ⅲ, Collagen Ⅲ)抗体购自美国 Southern Biotech 公司,批号 1310-01、1330-01;α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)抗体购自美国博士德公司,批号 BM0002;足突蛋白(Podocin)抗体购自美国 Invitrogen 公司,批号 PA5-79757;肾病蛋白(Nephrin)抗体购自中国上海生工生物工程股份有限公司,批号 D260661;TGF-β1 抗体购自中国 Abways 公司,批号 BY0105;Smad2、Smad3、p-Smad2、p-Smad3 抗体购自美国 CST 公司,批号 3122S、9523S、3108S、9520S。

血糖仪和血糖试纸购自中国江苏鱼跃医疗设

备股份有限公司,型号 695,批号 Y330;Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra 小型垂直电泳转印系统购自美国伯乐公司,货号 1658033;多功能酶标仪购自美国 Bio Tek 公司,型号 SYNEGY 2;实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司,型号 Light Cycler 480 II。

1.3 实验方法

1.3.1 动物的分组、建模和干预

适应性喂养 1 周后,除正常组(Normal group, NC)8 只外,造模组小鼠连续 5 d 小剂量腹腔注射 STZ(50 mg/kg,溶于 10 mmol/L 柠檬酸钠, pH = 4.5),正常组小鼠注射同等体积(5 μL/g)柠檬酸钠,注射结束 1 周后,测定尾尖随机血糖(random blood glucose, RBG),RBG ≥ 16.7 mmol/L 即为造模成功^[23],造模组小鼠随机分为模型组(Model group, DN)和给药组(Qishi group, QS),每组 8 只。QS 组灌胃剂量为 0.9 g/kg,NC 组和 DN 组给予同等体积(10 μL/g)生理盐水,连续灌胃 28 d。

1.3.2 用药剂量换算

芪肾舒胶囊购于西南医科大学第一中药房,根据说明书及临床用药经验得知:胶囊每粒 0.4 g,70 kg 成人每次服用 6 粒,每天 3 次,则 70 kg 成人每天服用 7.2 g 药物,可转化为 102.86 mg/kg。根据徐叔云教授主编的《药理实验方法学》中人和动物体表面积比值剂量换算,可知小鼠与人的等效剂量比值系数是 9.1(剂量以 mg/kg 换算),则小鼠的灌胃剂量为 0.936 g/kg。

1.3.3 样本采集

末次给药后,收集小鼠随机尿,腹腔注射 1%戊巴比妥钠(0.01 mL/10 g)进行麻醉,心脏取血,全血于 37℃静置 30 min,4℃静置过夜后分离血清,用于检测生化指标。取血处死后取肾组织,部分肾组织采用 4%多聚甲醛固定 24 h 后进行石蜡包埋,其余部分去髓质留皮质,冻存于-80℃,用于检测相关 RNA 和蛋白的表达。

1.3.4 空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)

药物干预过程中,每周测定 1 次尾尖末梢 FBG,测定时间固定在 10:00 am。

1.3.5 生化检测

取小鼠随机尿,采用 ELSIA 试剂盒测定尿蛋白浓度,采用试剂盒测定尿肌酐,并计算尿微量白蛋白肌酐比(urinary albumin/creatinine, UACR)。血清肌酐(serum creatinine, Scr)和尿素氮(blood urea

nitrogen, BUN) 水平分别采用试剂盒测定。

1.3.6 肾组织病理学染色

肾组织采用 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后, 进行石蜡包埋切片, 切片经过二甲苯脱蜡和梯度乙醇复水后, 按照试剂盒说明书分别进行苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE)、过碘酸雪夫染色 (periodicacid-Schiff staining, PAS) 和天狼星红染色 (sirius red staining, sirius red), 通过光学显微镜观察肾组织病理学改变、肾小球系膜增生和纤维化情况。

1.3.7 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (Real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)

取“1.3.3”项下液氮中适量肾组织进行匀浆, 通过 TRIzol 法提取 RNA。取 1 μg 总 RNA 利用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒进行逆转录合成 cDNA, 再使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 扩增。FN 正向引物为: CCCCAACTGTTACC CTTCC, 反向引物为: TGTCCGCCTAAAGC CATGTT; α-SMA 正向引物为: CCTTCGTGACTACTGCCGAG, 反向引物为: ATAGGTGTTTCGTGGATGC; I 型胶原蛋白 α1 (collagen type I alpha 1, Col1a1) 正向引物为: TTCTCCTGGCAAAGACGGAC, 反向引物为: CTCAAGGTCACGGTCACGAA。PCR 反应体系 (10 μL) 为 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μL, 10 μmol/L 正向引物 0.2 μL, 10 μmol/L 反向引物 0.2 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 3.6 μL。PCR 反应程序为 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 共 40 个循环。以 β-actin 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因 mRNA 相对表达情况。

1.3.8 免疫组化 (immunohistochemistry, IHC)

取“1.3.6”项下石蜡切片, 梯度乙醇脱蜡复水后进行抗原修复和阻断, 5% BSA 室温下孵育 1 h, 再分别加入 FN、Collagen I、Collagen III、α-SMA、TGF-β1 和 p-Smad3 抗体 4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗涤后室温孵育二抗 1 h, 进行 DAB 显色、苏木素复染和中性树胶封片, 通过光学显微镜采集图片, 由 Image J 软件分析阳性表达情况。

1.3.9 免疫蛋白印记法 (Western blot)

取“1.3.3”项下液氮中适量肾组织, 以 RIPA 裂解缓冲液充分裂解, 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 以 BCA 法检测蛋白浓度。取 30 μg 蛋白与上样缓冲液混合, 于 100 ℃ 加温变性 10 min, 以 10%

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离蛋白 (80 V, 30 min; 120 V, 90 min), 后通过湿转法将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (100 V, 90 min), 5% BSA 室温下封闭 1 h, 而后分别加入内参和各目的蛋白进行孵育: β-actin 抗体 (1 : 3000)、FN 抗体 (1 : 2000)、α-SMA 抗体 (1 : 1000)、Collagen I 抗体 (1 : 1000)、Podocin 抗体 (1 : 1000)、Nephrin 抗体 (1 : 1000)、TGF-β1 抗体 (1 : 1000)、Smad2 抗体 (1 : 1000)、Smad3 抗体 (1 : 1000)、p-Smad2 抗体 (1 : 1000) 和 p-Smad3 抗体 (1 : 1000), 4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 10 min, 加入 HRP 标记的山羊抗兔/鼠二抗 (1 : 10 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜后加入 ECL 发光液显影拍照, 由 Image J 软件分析各蛋白条带灰度值。

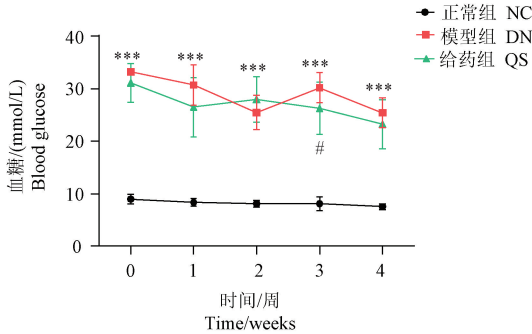
1.4 统计学方法

采用采用 SPSS Statistics 17.0 进行统计分析, GraphPad Prism 9.4.1 进行绘图, 所有数据结果均表示为“平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$)”, 符合正态分布且等方差, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way, ANOVA); 不符合正态分布, 采用非参数 Kruskal-Wallis 检验; 组间多重比较均采用 Dunnett 检验; 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠空腹血糖的影响

如图 1 所示, 与 NC 组相比, DN 组小鼠 FBG 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与 DN 组相比, QS 组小鼠 FBG 水平影响无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示芪石肾



注: 与正常组相比, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 1 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠空腹血糖的影响

Note. Compared with NC group, *** $P < 0.001$. Compared with DN group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Effect of Qishishenshu Capsule on fasting blood glucose in DN mice

舒胶囊对空腹血糖水平影响不大。

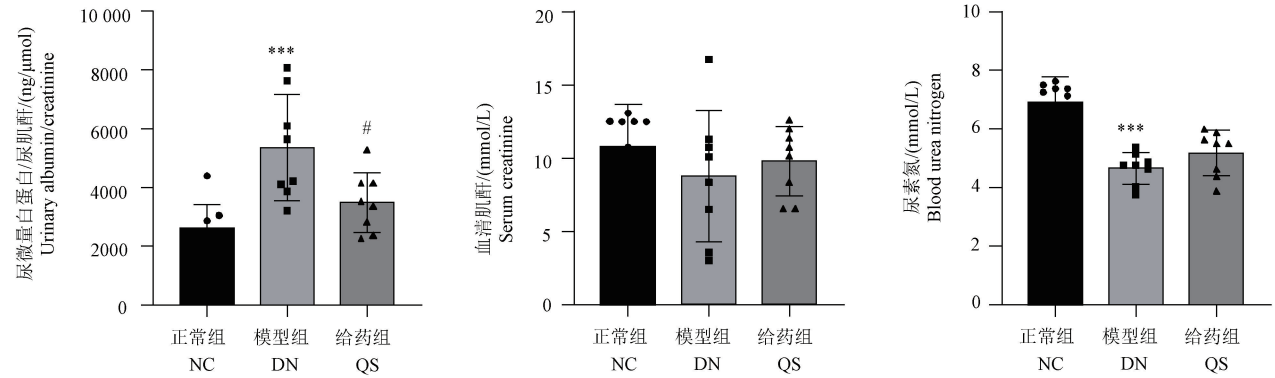
2.2 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠生化指标的影响

如图 2 所示,与 NC 组相比,DN 组小鼠 UACR 水平显著升高 ($P<0.001$);与 DN 组相比,QS 组 UACR 表达水平下降 ($P<0.05$)。与 NC 组相比,DN 组小鼠 Scr 呈降低趋势 ($P=0.3946$);与 DN 组相比,QS 组 Scr 略有回升趋势 ($P=0.7785$),但其差异

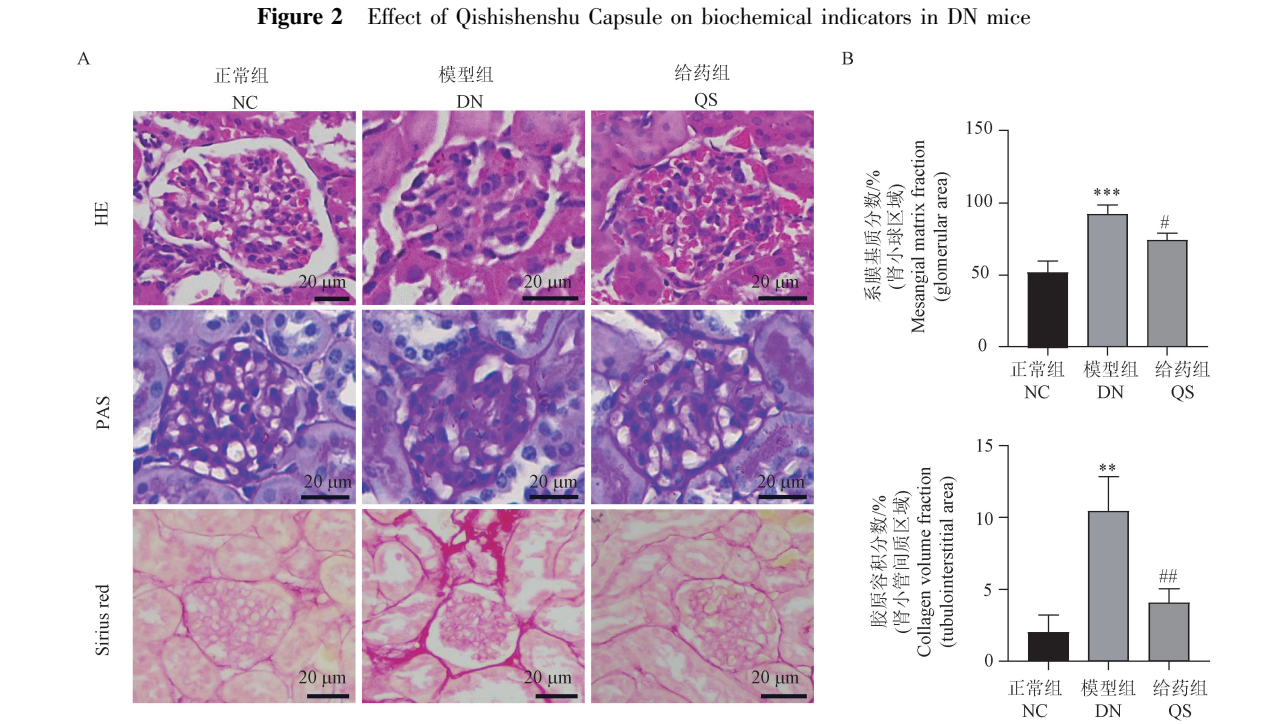
均无统计学意义 ($P>0.05$)。与 NC 组相比,DN 组小鼠 BUN 水平显著降低 ($P<0.001$);与 DN 组相比,QS 组 BUN 水平影响无统计学意义 ($P=0.3$)。

2.3 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠肾组织结构的影响

如图 3 所示,NC 组小鼠肾组织结构完整,形态正常,肾小球形态规则,肾小管排列紧密,肾间质无异常;与 NC 组相比,DN 组小鼠组织结构紊乱,系膜



注:与正常组相比, *** $P<0.001$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。
Figure 2 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠生化指标的影响
Note. Compared with NC group, *** $P<0.001$. Compared with DN group, # $P<0.05$.



注:A:HE、PAS 和 Sirius red 染色;B:肾小球系膜扩张面积和胶原沉积面积。与正常组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
Figure 3 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠肾组织结构的影响
Note. A, HE, PAS and Sirius red staining. B, Area of glomerular mesangial dilatation and collagen deposition. Compared with NC group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with DN group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Effect of Qishishenshu Capsule on renal tissue structure in DN mice

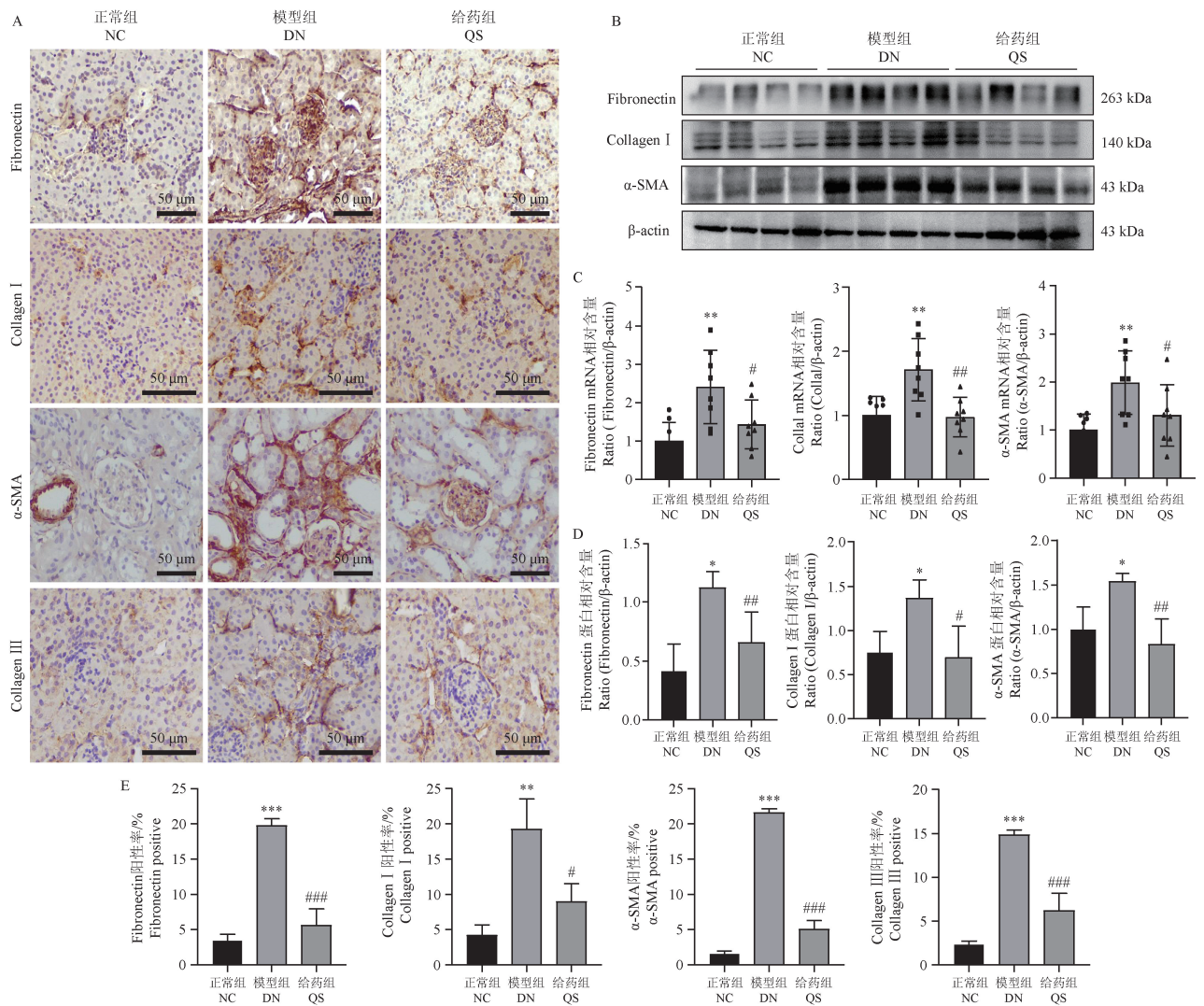
基质弥漫性增生,肾小球和肾小管基底膜增厚,肾间质可见明显胶原纤维红色染色;与 DN 组相比, QS 组小鼠肾组织病理学变化、系膜增生及纤维化沉积均有所改善。

PAS 染色结果显示,与 NC 组相比, DN 组肾小球系膜扩张面积增加 ($P<0.001$);与 DN 组相比, QS 组肾小球系膜扩张面积减少 ($P<0.05$);sirius red 染色结果显示,与 NC 组相比, DN 组小鼠胶原红染面积增加 ($P<0.01$);与 DN 组相比, QS 组胶原红染面

积减少 ($P<0.01$)。

2.4 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠肾纤维化的影响

如图 4 所示,与 NC 组相比, DN 组小鼠肾组织 FN、Col1a1、 α -SMA 的 mRNA 表达显著增加 ($P<0.01$);与 DN 组相比, QS 组小鼠肾组织 FN、Col1a1、 α -SMA 的 mRNA 表达显著下降 ($P<0.05, P<0.01$)。与 NC 组相比, DN 组小鼠肾组织 FN、Collagen I、 α -SMA 蛋白表达显著增加 ($P<0.05$);与 DN 组相比, QS 组小鼠肾组织 FN、Collagen I、 α -SMA 蛋白表达显



注: A、E: Fibronectin、Collagen I、 α -SMA、Collagen III 的免疫组化结果及定量分析; B、D: Fibronectin、Collagen I、 α -SMA 的 Western blot 结果及定量分析; C: Fibronectin、Collagen I 和 α -SMA 的 RT-qPCR 结果。与正常组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$; 与模型组比较, $#P<0.05$, $##P<0.01$, $###P<0.001$ 。

图 4 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠肾纤维化的影响

Note. A/E, Immunohistochemical results and quantitative analysis of fibronectin, Collagen I, α -SMA and Collagen III. B/D, Western blot results and quantitative analysis of fibronectin, Collagen I and α -SMA. C, RT-qPCR results of fibronectin, Collagen I and α -SMA. Compared with NC group, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$. Compared with DN group, $#P<0.05$, $##P<0.01$, $###P<0.001$.

Figure 4 Effect of Qishishenshu Capsule on renal fibrosis in DN mice

著下降($P<0.01,P<0.05$)。与 NC 组相比,DN 组小鼠肾组织 FN、Collagen I、 α -SMA、Collagen III 在肾小球、肾小管间质和细胞外基质的阳性表达显著增加($P<0.01,P<0.001$);与 DN 组相比,QS 组小鼠肾组织 FN、Collagen I、 α -SMA、Collagen III 的阳性表达显著下降($P<0.05,P<0.001$)。

2.5 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠足细胞的影响

如图 5 结果所示,与 NC 组相比,DN 组小鼠 Nephrin 和 Podocin 蛋白表达量下降($P<0.05$);与 DN 组相比,QS 组足细胞标志物蛋白表达升高($P<0.05$)。

2.6 芪石肾舒胶囊对 TGF- β /Smad 信号通路的影响

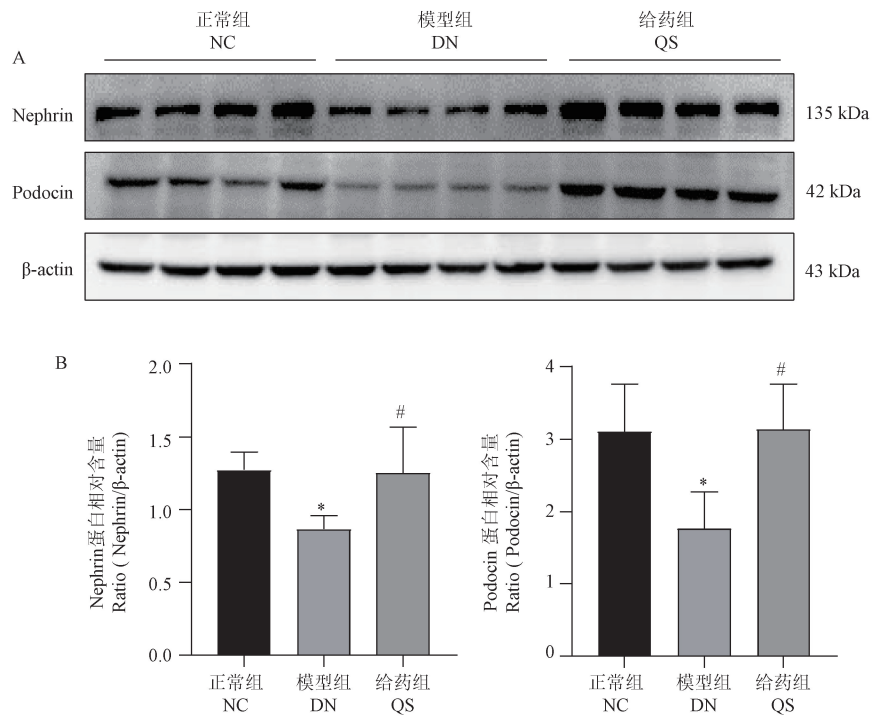
如图 6A、6B 结果提示,与 NC 组相比,DN 组 TGF- β 1 在肾小球和肾小管上皮细胞的阳性表达增强,p-Smad3 的核易位亦增强($P<0.01,P<0.001$);与 DN 组相比,QS 组 TGF- β 1 和 p-Smad3 的表达明显减弱($P<0.05,P<0.01$)。如图 6C、6D 结果所示,与 NC 组相比,DN 组 TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达量显著增加($P<0.001$);与 DN 组相比,QS 组小鼠肾组织 TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达显著下降($P<$

0.001)。

3 讨论

本研究采用多次小剂量注射 STZ 建立 DN 小鼠模型。该方法使小鼠在 2 周内出现高血糖,5 周内出现白蛋白尿,同时伴随高滤过和系膜扩张,与人类早期 DN 的病理特点相符合,因此被广泛使用^[24-26]。

实验过程中,注射 STZ 后 9 d,测量尾尖血糖,选择 RBG ≥ 16.7 mmol/L 的 10 周龄小鼠进行灌胃干预,随后每周测量小鼠 FBG。作为 DN 早期诊断的敏感指标,尿微量白蛋白容易受到摄水量影响导致检测不准确;尿肌酐的代谢相对平稳,摄水量也会影响其浓度;而二者的比值能抵消这种稀释或浓缩效应,客观地评估尿白蛋白的排泄量,因此以 UACR 作为首选评价指标^[27]。BUN 是蛋白质的最终产物,Scr 是肌肉内磷酸肌酸的代谢产物,二者主要由肾小球滤过,是衡量肾功能的经典指标。实验结果表明,STZ 诱导 6 周的 DN 组小鼠血糖始终维持在高水平,UACR 显著升高,病理染色可见肾小球和肾小管基底膜增厚、系膜基质增生、出现少量局部节段硬化以及胶原纤维沉积增加,而由于早期

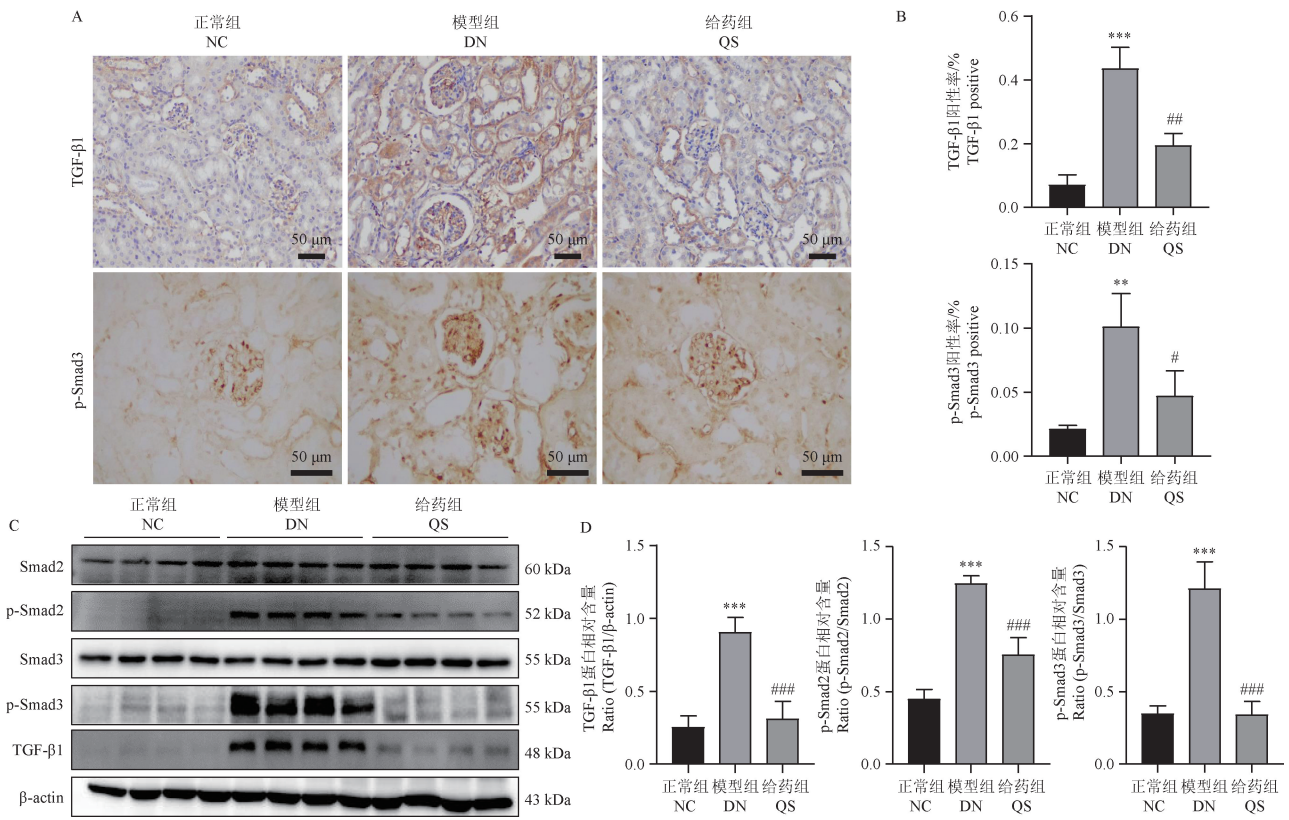


注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图5 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠足细胞的影响

Note. Compared with NC group, * $P<0.05$. Compared with DN group, # $P<0.05$.

Figure 5 Effect of Qishishenshu Capsule on podocyte of DN mice



注:A、B:TGF-β1 和 p-Smad3 的免疫组化结果及定量分析;C、D:TGF-β/Smad 信号通路的 Western blot 结果及定量分析。与正常组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

图 6 芪石肾舒胶囊对 TGF-β/Smad 信号通路的影响

Note. A/B, Immunohistochemical results and quantitative analysis of TGF-β1 and p-Smad3. C/D, Western blot results and quantitative analysis of TGF-β/Smad signaling pathway. Compared with NC group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with DN group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 6 Effect of Qishishenshu Capsule on TGF-β/Smad signaling pathway

DN 存在高滤过状态,BUN 和 Scr 水平出现不同程度的降低;治疗 4 周后,QS 组小鼠的血糖并未改善,BUN 和 Scr 水平也未恢复正常,但其 UACR 水平明显下降,系膜基质分数和胶原容积分数降低,其他肾病理损伤也有所缓解。提示在 I 型 DN 中,芪石肾舒胶囊具有独立于血糖调控的肾保护作用。在其他研究中也出现过类似情况^[28-29]。

在 DN 进展为 ESRD 的过程中,肾小球逐渐形成不可避免的瘢痕,随后在肾小管间质区域出现类似的纤维化过程^[30]。在高糖条件下,各种肾上皮细胞长期受损,它们可以释放多种细胞因子,参与成纤维细胞的发病机制并分泌过多的细胞外基质^[31]。其中最常检测的的基质蛋白是 Collagen I、Collagen III 和 FN^[32]。α-SMA 作为纤维化的标志物,主要表达于血管平滑肌,发生病理时,在肾小球和肾小管间质呈现高表达^[33]。根据 RT-qPCR 结果可见,DN 组 FN、Col1a1 和 α-SMA 的 mRNA 表达水平升高,

QS 组 FN、Col1a1 和 α-SMA 的 mRNA 表达水平均显著降低;Western blot 和 IHC 结果可见,DN 组 FN、Collagen I、Collagen III 和 α-SMA 的表达升高,系膜基质和小管间质中细胞外基质的阳性面积增加,在 QS 组,这些情况均被缓解。

足细胞丢失是 DN 的必要早期事件,这与蛋白尿的产生和肾小球硬化的发生密切相关^[34-36]。足细胞标志蛋白是维持肾小球滤过屏障结构和功能的重要角色:由 NPHS2 编码的 Podocin 和由 NPSH1 编码的 Nephrin 是定位于足突裂孔隔膜的跨膜蛋白,Nephrin 起黏附及信号转导作用,Podocin 可激活并增强 Nephrin 诱导的信号转导;在 DN 中,Podocin 的表达随着足细胞损伤和基底膜破坏的程度而减少^[37]。Western blot 结果显示,在 STZ 诱导的 DN 中,足细胞特异性标志物 Podocin 和 Nephrin 表达下降,说明肾小球结构受损且足细胞骨架已被破坏;芪石肾舒胶囊治疗后,其蛋白表达增强。提示芪石

肾舒胶囊可减轻足细胞损伤。

DN 的发病与多种因素相关,他们均可通过依赖和独立于 TGF-β 的机制激活 TGF-β 信号^[38]。TGF-β 有 3 种亚型,即 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3,虽然三者及其受体均在肾中广泛表达,但 TGF-β1 是 DN 发病的关键介质;TGF-β1 与 TGF-β 受体 II 结合后,激活 TGF-β 受体 I 激酶,导致 Smad2 和 Smad3 磷酸化,激活后的 Smad2 和 Smad3 与 Smad4 形成 Smad 复合物,该寡聚复合物易位到细胞核内与转录因子一起介导靶基因的表达^[39-40];在 UUO 和 DN 引起的肾纤维化中 Smad3 均起致病作用;而与 UUO 中发挥肾保护作用的 Smad2 不同,在 DN 中 Smad2 起致病作用^[38,41]。Western blot 和 IHC 结果表明,DN 组 TGF-β1、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白水平显著升高,p-Smad3 的核易位增强,QS 组 TGF-β1、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白水平明显下降,p-Smad3 的核易位减弱。提示芪石肾舒胶囊可能通过 TGF-β1/Smad2/3 通路改善糖尿病肾病肾纤维化。

综上所述,本研究证明芪石肾舒胶囊可以减轻糖尿病肾病肾纤维化的病理改变,其机制可能与抑制 TGF-β1/Smad2/3 通路的表达有关。但本研究存在一些局限性,需要探索芪石肾舒胶囊治疗糖尿病肾病纤维化的具体分子机制,以提供更准确的干预手段。

参考文献:

[1] GUPTA S, DOMINGUEZ M, GOLESTANEH L. Diabetic kidney disease; an update [J]. Med Clin North Am, 2023, 107(4): 689-705.

[2] REUTENS A T. Epidemiology of diabetic kidney disease [J]. Med Clin North Am, 2013, 97(1): 1-18.

[3] YANG C, GAO B, ZHAO X, et al. Executive summary for China kidney disease network (CK-NET) 2016 annual data report [J]. Kidney Int, 2020, 98(6): 1419-1423.

[4] WENG W, GE T, WANG Y, et al. Therapeutic effects of fibroblast growth factor-21 on diabetic nephropathy and the possible mechanism in type 1 diabetes mellitus mice [J]. Diabetes Metab J, 2020, 44(4): 566-580.

[5] SELBY N M, TAAL M W. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines [J]. Diabetes Obes Metab, 2020, 22(Suppl 1): 3-15.

[6] MOHANDES S, DOKE T, HU H, et al. Molecular pathways that drive diabetic kidney disease [J]. J Clin Invest, 2023, 133(4): e165654.

[7] PILLAI A, FULMALI D. A narrative review of new treatment options for diabetic nephropathy [J]. Cureus, 2023, 15

(1): e33235.

[8] KOSTOVSKA I, TRAJKOVSKA K T, TOPUZOVSKA S, et al. Nephriuria and podocytopathies [J]. Adv Clin Chem, 2022, 108: 1-36.

[9] BROSIUS F C 3rd. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2008, 9(4): 245-254.

[10] SAMSU N. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 1497449.

[11] HATHAWAY C K, GASIM A M H, GRANT R, et al. Low TGFβ1 expression prevents and high expression exacerbates diabetic nephropathy in mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(18): 5815-5820.

[12] ZENG L F, XIAO Y, SUN L. A glimpse of the mechanisms related to renal fibrosis in diabetic nephropathy [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 49-79.

[13] LAN H Y. Diverse roles of TGF-β/Smads in renal fibrosis and inflammation [J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(7): 1056-1067.

[14] JIN B, LIU J, ZHU Y, et al. Kunxian capsule alleviates podocyte injury and proteinuria by inactivating β-catenin in db/db mice [J]. Front Med, 2023, 10: 1213191.

[15] LIU S, YUAN Y, XUE Y, et al. Podocyte injury in diabetic kidney disease; a focus on mitochondrial dysfunction [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 832887.

[16] TANG G, LI S, ZHANG C, et al. Clinical efficacies, underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(9): 2749-2767.

[17] 黄淑芬, 张琼, 张茂萍, 等. 肾舒胶囊治疗肾性蛋白尿 69 例临床观察 [J]. 泸州医学院学报, 1997, 25(4): 264-266.

[18] HUANG S F, ZHANG Q, ZHANG M P, et al. Clinical observation on 69 cases of renal proteinuria treated with Renshu capsule [J]. J Luzhou Med Coll, 1997, 25(4): 264-266.

[18] 黄淑芬, 张茂萍, 张军, 等. 肾舒胶囊与卡托普利治疗轻中度肾性蛋白尿疗效观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(8): 466-468.

[18] HUANG S F, ZHANG M P, ZHANG J, et al. Clinical observation of Shenshu capsule and captopril in the treatment of mild to moderate renal proteinuria [J]. Chin J Integr Tradit West Nephrol, 2003, 4(8): 466-468.

[19] 黄淑芬. 肾舒胶囊治疗肾性蛋白尿的临床与实验研究 [R]. 四川: 泸州, 2001.

[19] HUANG S F. Clinical and experimental study of Shenshu capsule on renal proteinuria [R]. Sichuan: Luzhou, 2001.

[20] 黄淑芬, 张琼, 张茂萍, 等. 肾舒胶囊配合激素治疗重度肾性蛋白尿疗效观察 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(6): 16-17.

[20] HUANG S F, ZHANG Q, ZHANG M P, et al. Clinical observation on the effect of Shenshu capsule match hormone in treatment of heavy kidney albuminuria [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2003, 10(6): 16-17.

- [21] 赵长英, 孙楠, 杨洁珂, 等. 肾舒胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏 mTOR、beclin-1 自噬通路的表达及意义 [J]. 广西中医药, 2019, 42(6): 55-58.
ZHAO C Y, SUN N, YANG J K, et al. Expression and significance of renal Shu capsule on renal mTOR and beclin-1 autophagy pathway in rats with diabetic nephropathy [J]. Guangxi J Tradit Chin Med, 2019, 42(6): 55-58.
- [22] 赵长英, 杨洁珂, 孙楠, 等. 肾舒胶囊通过 AKT/NF- κ B 信号通路改善大鼠糖尿病肾病纤维化作用研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2020, 34(10): 70-74.
ZHAO C Y, YANG J K, SUN N, et al. Therapeutic effect of Shenshu capsule on kidney of diabetic nephropathy rats and its effect on AKT/NF- κ B signaling pathway [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2020, 34(10): 70-74.
- [23] LI A, YI B, HAN H, et al. Vitamin D-VDR (vitamin D receptor) regulates defective autophagy in renal tubular epithelial cell in streptozotocin-induced diabetic mice via the AMPK pathway [J]. Autophagy, 2022, 18(4): 877-890.
- [24] THIBODEAU J F, HOLTERMAN C E, BURGER D, et al. A novel mouse model of advanced diabetic kidney disease [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e113459.
- [25] NOSHAHR Z S, SALMANI H, KHAJAVI RAD A, et al. Animal models of diabetes-associated renal injury [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 9416419.
- [26] LI F, MA Z, CAI Y, et al. Optimizing diabetic kidney disease animal models: Insights from a meta-analytic approach [J]. Animal Model Exp Med, 2023, 6(5): 433-451.
- [27] MARIAT C, DELANAYE P, BASTARD J P, et al. Urinary protein or albumin/creatinin ratio for reporting measurements results [J]. Ann Biol Clin, 2018, 76(6): 643-650.
- [28] SEO E, KANG H, OH Y S, et al. *Psoralea corylifolia* L. seed extract attenuates diabetic nephropathy by inhibiting renal fibrosis and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Nutrients, 2017, 9(8): 828.
- [29] SUN N, YANG N, ZHOU J, et al. Yiqi Qingre Xiaozheng formula protects against diabetic nephropathy by restoring autophagy in mice [J]. J Tradit Chin Med Sci, 2023, 10(3): 310-320.
- [30] HE X, ZHANG T, TOLOSA M, et al. A new, easily generated mouse model of diabetic kidney fibrosis [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 12549.
- [31] CANAUD G, BONVENTRE J V. Cell cycle arrest and the evolution of chronic kidney disease from acute kidney injury [J]. Nephrol Dial Transplant, 2015, 30(4): 575-583.
- [32] MASON R M, WAHAB N A. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(5): 1358-1373.
- [33] DING H, CHEN J, QIN J, et al. TGF- β -induced α -SMA expression is mediated by C/EBP β acetylation in human alveolar epithelial cells [J]. Mol Med, 2021, 27(1): 22.
- [34] HERMAN-EDELSTEIN M, THOMAS M C, THALLAS-BONKE V, et al. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor- β : a model for diabetic podocytopathy [J]. Diabetes, 2011, 60(6): 1779-1788.
- [35] YASUDA-YAMAHARA M, KUME S, TAGAWA A, et al. Emerging role of podocyte autophagy in the progression of diabetic nephropathy [J]. Autophagy, 2015, 11(12): 2385-2386.
- [36] KLAUSEN K, BORCH-JOHNSSEN K, FELDT-RASMUSSEN B, et al. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes [J]. Circulation, 2004, 110(1): 32-35.
- [37] HU Y, YE S, XING Y, et al. Saxagliptin attenuates glomerular podocyte injury by increasing the expression of renal nephrin and podocin in type 2 diabetic rats [J]. Acta Diabetol, 2020, 57(3): 279-286.
- [38] WANG L, WANG H L, LIU T T, et al. TGF- β as a master regulator of diabetic nephropathy [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 7881.
- [39] LAN H Y. Transforming growth factor- β /Smad signalling in diabetic nephropathy [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(8): 731-738.
- [40] WU W, WANG Y, LI H, et al. Buyang Huanwu Decoction protects against STZ-induced diabetic nephropathy by inhibiting TGF- β /Smad3 signaling-mediated renal fibrosis and inflammation [J]. Chin Med, 2021, 16(1): 118.
- [41] LOEFFLER I, LIEBISCH M, ALLERT S, et al. FSP1-specific SMAD2 knockout in renal tubular, endothelial, and interstitial cells reduces fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition in murine STZ-induced diabetic nephropathy [J]. Cell Tissue Res, 2018, 372(1): 115-133.

[收稿日期]2024-01-15