

倪玉芳,张璐娜,晏姝涵,等. 肾纤康调控 Emp3/Tgf- β /Smad3 信号通路改善肾纤维化的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 501-511.

NI Y F, ZHANG L N, YAN S H, et al. ShenXiankang formula modulates the Emp3/Tgf- β /Smad3 signaling pathway to ameliorate renal fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 501-511.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.004

肾纤康调控 Emp3/Tgf- β /Smad3 信号通路 改善肾纤维化的研究

倪玉芳¹, 张璐娜¹, 晏姝涵², 李倩倩¹, 栗宏伟³, 胡琼丹⁴,
张琼⁴, 王丽¹, 李健春^{1*}

(1. 西南医科大学附属中医医院中西医结合研究中心, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学
中西医结合学院, 四川 泸州 646000; 3. 西南医科大学附属中医医院泌尿外科,
四川 泸州 646000; 4. 西南医科大学附属中医医院肾病科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 评估中药复方肾纤康对肾损伤和纤维化的保护作用,并探讨其可能的作用机制。**方法** 采用单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)建立慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)小鼠模型,并随机分为假手术组、模型组及肾纤康低、高剂量组(1500、4500 mg/(kg·d)),每组 8 只。肾纤康各组每天灌胃不同剂量的肾纤康,其余小鼠灌胃等量的生理盐水,持续 7 d。实验结束后,收集肾组织,通过苏木素-伊红(HE)和 Masson 染色评估肾损伤和纤维化。用 Real-time PCR、免疫组化和 Western Blot 检测纤维化标志物、上皮膜蛋白 3(epithelial membrane protein 3, Emp3)及 Tgf- β /Smad 信号通路相关蛋白的表达。细胞实验中,通过 Emp3 回复实验和 Co-IP 分析肾纤康对 Emp3/Tgf- β /Smad3 通路及其与转化生长因子 β 受体 2(TGF- β receptor R2, Tgf β 2)相互作用的影响。**结果** 肾纤康干预显著改善了 UUO 模型组中的免疫细胞浸润和肾小管萎缩,降低了肾损伤分子 1(kidney injury molecule 1, Kim1)和脂质运载蛋白 2(lipocalin 2, Lcn2)的表达,验证了其在减轻肾损伤方面的效果。Masson 染色及纤维化标志物纤连蛋白(fibronectin, Fn)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的检测结果显示,肾纤康能有效抑制 UUO 诱导的纤维化进程。机制研究发现,肾纤康通过特异性下调 Emp3/Tgf- β /Smad3 信号通路的异常活化发挥作用,细胞实验进一步证实了肾纤康通过调节 Emp3 来影响 Tgf- β /Smad3 信号传导。Co-IP 实验结果显示,肾纤康通过调控 Emp3 与 Tgf β 2 的相互作用来发挥作用。**结论** 肾纤康对慢性肾病小鼠模型表现出显著的保护作用,能够有效减轻肾损伤和纤维化。其机制可能与下调 Emp3/Tgf- β /Smad3 信号通路的活化有关,提示肾纤康在肾保护方面具有潜在的治疗价值。

【关键词】 肾纤康;慢性肾病;肾纤维化;Emp3;Tgf- β /Smad3

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0501-11

ShenXiankang formula modulates the Emp3/Tgf- β /Smad3 signaling pathway to ameliorate renal fibrosis

NI Yufang¹, ZHANG Luna¹, YAN Shuhan², LI Qianqian¹, SU Hongwei³,
HU Qiongdan⁴, ZHANG Qiong⁴, WANG Li¹, LI Jianchun^{1*}

【基金项目】 国家自然科学基金(82104665, 82205002), 四川省科技厅项目(2023NSFSC1763, 2022YFS0621)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82104665, 82205002), Sichuan Science and Technology Program (2023NSFSC1763, 2022YFS0621).

【作者简介】 倪玉芳,女,硕士,主管技师,研究方向:中西医结合防治器官纤维化。Email:niyufang@swmu.edu.cn

【通信作者】 李健春,男,博士,高级实验师,研究方向:中西医防治器官纤维化。Email:lijianchun@swmu.edu.cn

- (1. Research Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Department of Urology, Affiliated Chinese Traditional Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000 China; 4. Department of Nephrology, Affiliated Chinese Traditional Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Corresponding author: LI Jianchun. E-mail: lijianchunchina@swmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the protective effects of the traditional Chinese medicine formula Shenxiankang on renal injury and fibrosis, and to explore its potential mechanisms of action. **Methods** Chronic kidney disease (CKD) model was established in mice using unilateral ureteral obstruction (UUO). The mice were randomly divided into four groups: sham, UUO, and Shenxiankang (SXX) Low/High dose groups (1500, 4500 mg/(kg·d)), each comprising eight mice. The each SXX groups received daily oral administration of Shenxiankang, and the remaining mice were gavaged equivalent volumes of saline for 7 d. After the experiment, renal tissues were collected for assessment of renal injury and fibrosis using HE and Masson staining. The expression levels of fibrosis markers and proteins involved in the epithelial membrane protein 3 (Emp3) and Tgf- β /Smad3 signaling pathway were determined by Real-time PCR, immunohistochemistry, and Western Blot. In cell-based experiments, the effects of Shenxiankang on the Emp3/Tgf- β /Smad3 pathway and its interaction with TGF-beta receptor R2 (Tgf β 2) were further analyzed using an Emp3 knockdown and Co-IP assays. **Results** Shenxiankang significantly reduced immune cell infiltration and tubular atrophy in the UUO model group and decreased the expression of kidney injury markers kidney injury molecule 1 (Kim1) and Lipocalin 2 (Lcn2), confirming its efficacy in alleviating renal injury. Masson staining and analysis of fibrosis markers Fibronectin (Fn) and α -smooth muscle actin (α -SMA) indicated that Shenxiankang effectively suppressed fibrosis induced by UUO. Mechanistic studies revealed that Shenxiankang exerted its effects by selectively downregulating the abnormal activation of the Emp3/Tgf- β /Smad3 signaling pathway, a finding further supported by cellular experiments showing that Shenxiankang modulates Tgf- β /Smad3 signaling through Emp3 regulation. Moreover, the Co-IP experiment result indicate that Shenxiankang exerts its effects by regulating the interaction between Emp3 and Tgf β 2. **Conclusions** Shenxiankang exhibits significant protective effects in a mouse model of chronic kidney disease, effectively reducing renal injury and fibrosis. These effects are likely mediated through the downregulation of the Emp3/Tgf- β /Smad3 signaling pathway, suggesting Shenxiankang's potential therapeutic value in renal protection.

【Keywords】 ShenXiankang; chronic kidney disease; renal fibrosis; Emp3; Tgf- β /Smad3

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

慢性肾疾病 (chronic kidney disease, CKD) 是由多种因素引起的肾结构和功能损伤的非传染性疾病,其发病率和死亡率正在稳步上升^[1]。据 2019 年一项调查显示,中国 CKD 的总体患病率已高达 15.9% ~ 16.8%^[2]。肾纤维化 (renal fibrosis, RF) 是 CKD 发展过程中的关键病理特征,其主要表现为结缔组织在肾结构中的异常增生和沉积^[3]。在 CKD 患者中,肾纤维化是导致肾功能丧失的主要原因,并被视为终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD) 的重要病理特征^[4]。

大量研究表明,中医药在 CKD 的治疗中具有独特的优势,能够通过调整阴阳平衡、改善气血

循环及提供针对性治疗,有效延缓肾间质纤维化的进展^[5]。肾纤康是一种基于“肾内微癥积”理论的中药复方,已在临床上被证实对延缓肾纤维化具有显著效果,其作用机制可能与 TGF- β /Smad 信号通路密切相关^[6]。转化生长因子 β 受体 2 (TGF-beta receptor R2, Tgf β 2) 是 TGF- β /Smad 信号通路中启动信号传导的关键因子^[7],在肾纤维化过程中通过调控细胞转化、基质合成和纤维细胞的增生,发挥重要作用。当 TGF- β 与细胞表面的 Tgf β 2 结合后, Tgf β 2 会招募并激活 TGF- β 受体 1 (TGF-beta receptor R1, Tgf β 1),后者进一步磷酸化下游的 Smad3 蛋白。磷酸化的 Smad3 与

Smad4 结合形成复合物,随后转运至细胞核中,调控与纤维化、细胞生长及分化相关的基因表达,从而促进纤维化的发展^[8-9]。此前有研究表明,在肺癌细胞中上皮膜蛋白 3 (epithelial membrane protein 3, Emp3) 通过与 Tgf β 2 相互作用调节 Tgf β /Smad 信号通路活化,影响上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[10]。

基于此发现,本课题假设肾纤康改善 CKD 的潜在机制可能涉及通过调控 Tgf β 2 和 Emp3 相互作用,从而调控 Tgf β /Smad 信号通路的激活有关。为验证此假设,本研究建立了单侧输尿管结扎 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 模型,并检测了肾组织中的病理损伤、纤维化及 Tgf β /Smad 信号通路相关蛋白的变化。此外,本实验利用蛋白质免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 技术检测肾纤康对 Emp3 与 Tgf β 2 相互作用的影响,旨在明确肾纤康改善肾损伤的作用机制,为进一步的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠 32 只,体重质量约为 25 g,由成都药康生物科技有限公司提供【SCXK(川)2022-034】,小鼠饲养于西南医科大学实验动物中心 SPF 级动物房【SYXK(川)2023-0065】。饲养条件为:温度(25 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50% ~ 60%、每天光照 12 h、给予充足的水和饲料。本实验严格遵循西南医科大学动物伦理委员会的指导方针并通过伦理审批(2022-1001-005),确保实验的伦理合规性。

1.1.2 细胞

小鼠肾小管上皮细胞 (transformed C3H mouse kidney-1, TCMK1, Cat#CL0440) 购于丰晖生物,人胚肾细胞 (293FT, Cat#BNCC342056) 购于北纳生物。

1.1.3 主要试剂与仪器

肾纤康购于西南医科大学附属中医医院制剂室(生大黄 9 g,水蛭 3 g,白花蛇舌草 12 g,淫羊藿 15 g,黄芪 30 g,当归 12 g,莪术 12 g);苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (C0105s)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0012) 与 RIPA 裂解液 (P0013C) 购

于 Beyotime; Masson 三色染色液 (BA-4079B) 购于珠海贝索;免疫组化所用通用二步法试剂盒、DAB 显色液 (PV-9000、ZLI-9019) 购于中杉金桥;GFP 磁珠 (KTSM1334) 购于康体生命;Emp3 (Sc-518092) 购于 Santa Cruz; phospho-Smad3 (p-Smad3)、Smad3、phospho-Smad2 (p-Smad2)、Smad2 (AF1759、AF1501、AF2545、AF1300) 均购于 Beyotime; Gapdh (AB0037) 购于 Abways; Fn (T59537) 购于 abmart; α -SMA (23081-1-AP) 购于 proteintech。

实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher 公司);蛋白质电泳转印系统 (Bio-Rad); e-BLOT 化学发光成像系统 (易亨特生命科学); Nikon 正置光学显微镜 (日本尼康);石蜡组织切片机 (德国莱卡);全波长酶标仪 (杭州奥盛);超微量紫外分光光度计 (美国 Therm)。

1.2 方法

1.2.1 肾功能检测

收集 2024 年西南医科大学附属中医医院肾病科确诊 CKD 患者 20 例,在一个周期治疗阶段随机给予 10 例肾纤康干预作为肾纤康组,另外 10 例给予安慰剂 (原方稀释 15 倍的相同性状,气味的药品) 作为对照组。治疗前后收集患者空腹静脉血 5 mL,分离血清后检测肾功能指标 (血清肌酐、尿素氮、肾小球滤过率)。本研究通过西南医科大学附属中医医院伦理委员会批准 (KY2023020-FS01)。

1.2.2 动物造模及给药

小鼠经适应性喂养 1 周后随机分为 4 组:假手术 (Sham) 组、模型 (UUO) 组、肾纤康低、高剂量 (SXK-Low/High dose, 1500/4500 mg/(kg $\cdot$ d)) 组。除假手术组外,其余小鼠按照文献所述造单侧输尿管梗阻建立 CKD 模型^[11-12]。具体操作如下:根据小鼠体质量腹腔注射适量 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠,备皮后切开背部皮肤,暴露左侧肾及输尿管,并用手术线将输尿管两端结扎,随后剪断输尿管中段。假手术组不进行输尿管结扎及剪断,其他操作与模型组一致。造模后,肾纤康低/高剂量组每天灌胃相应剂量的药物,连续 7 d。其余小鼠则灌胃等体积的生理盐水。实验结束后,麻醉并处死小鼠,收集肾组织的 1/4 进行石蜡包埋,而剩下的肾组织经液氮速冻后提取蛋

白和 RNA 进行后续实验分析。

1.2.3 病理染色与免疫组化

组织切片经脱蜡复水后进行病理染色和免疫组化。HE 染色按照试剂盒所述步骤进行,具体染色步骤:将组织浸于苏木素染料中 5 min,经 75%乙醇分色后马上用伊红染料染色 45 s,最后封片并在显微镜下观察肾小管损伤情况并采集具有代表性的图片。Masson 染色主要步骤:铁苏木素浸染 5 min、丽春红 10 min、磷钼酸分色 1 ~ 5 min、然后用甲苯胺蓝染色 1 ~ 5 min,最后用 1%冰醋酸清洗至没有蓝色染料流出为止。待切片风干后封片并在显微镜下观察胶原纤维染色情况,拍摄具有代表性的染色图片并使用 Image J 1.51 软件计算胶原纤维蓝染面积占总面积的百分比。免疫组化首先是将脱蜡复水后的切片放置在加热沸腾后的 pH = 6.0 柠檬酸三钠缓冲液中,并持续加热 10 min 进行抗原修复,冷却后滴加过氧化物酶孵育 20 min 阻断非特异性染色,然后用 5% BSA 封闭 30 min,滴加待测抗体 4 ℃ 孵育过夜。第 2 天根据 DAB 显色试剂盒进行抗体显色,然后经苏木素复染 20 s 后封片。最后在显微镜下观察并拍摄抗体表达位置(200 倍放大倍数),并用 Image J 1.51 软件计算抗体表达面积占总面积的百分比。

1.2.4 Real-time PCR 检测纤维化标志物、Emp3 及 Tgf-β/Smad 信号通路相关 mRNA 的表达

收集约 25 mg 肾组织,提取总 RNA,然后用紫外微量分光光度计测定 RNA 浓度和质量。取 1 μg RNA,逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,结合 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 和相应基因引物,配置 Real-time PCR 反应体系,PCR 设置条件为:95 ℃ 30 s 变性,然后设置(95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 15 s)运行 40 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。以 *Gapdh* 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算靶基因的相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.5 Western Blot 检测纤维化标志物、Emp3 及 Tgf-β/Smad 信号通路相关蛋白的表达

切取适当肾组织提取总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测量蛋白浓度。SDS-PAGE 胶中每孔上样 30 μg 进行蛋白分离,通过湿转的方式将分离的蛋白转移到 PVDF 膜上,然后用 5% BSA

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
<i>Fn</i>	<i>Fn</i> -F	ATGTGGACCCCTCCTGATAGT
	<i>Fn</i> -R	GCCCAGTGATTTCAGCAAAGG
<i>α-SMA</i>	<i>α-SMA</i> -F	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA
	<i>α-SMA</i> -R	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
<i>Gapdh</i>	<i>Gapdh</i> -F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	<i>Gapdh</i> -R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

室温封闭 1 h,随后加入特异性一抗 4 ℃ 孵育过夜。按一抗抗体来源加入抗鼠/兔辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 5000),室温孵育 1 h。最后,使用 e-BLOT 化学发光成像分析系统对结果进行扫描分析,然后用 Image J 1.51 软件读取各条带灰度值,并以假手术组数值化为一做统计学分析。

1.2.6 TCMK1 培养与干预处理

取对数生长期的 TCMK1 细胞(10% FBS 的 DMEM 高糖培养基),经过计数稀释,使 100 μL 培养基中包含 8000 个细胞,每孔接种 100 μL 于 96 孔培养板中,分别加入 25 ~ 400 μg/mL 肾纤康药物处理,24 h 后检测细胞活力。每孔加入总培养基 1/10 体积的 CCK-8 试剂,37 ℃ 孵育 1 ~ 4 h 后,在 450 nm 波长检测 OD 值。此外,将 TCMK1 细胞接种于 6 孔板,并分为 4 组:对照(NC)、过表达(OE-*Emp3*)组、过表达 *Emp3* + 低浓度肾纤康(50(μg/mL))组和高浓度肾纤康(100(μg/mL))组。使用聚乙烯亚胺将 *mCherry-Emp3* 质粒转染至细胞中,转染 6 h 后分别加入不同浓度的肾纤康处理细胞。处理 42 h 后,收集细胞样品,并通过 Western Blot 分析蛋白表达水平,以验证药物干预的效果。

1.2.7 Co-IP 分析肾纤康对 Emp3/Tgf-β/Smad3 通路及其与 Tgfβ2 相互作用的影响

293FT 细胞(10% FBS 的 DMEM 高糖培养基)培养至 6 cm 细胞皿中,当细胞密度达到 60% ~ 70% 时,按照 PEI 转染试剂所述步骤将 *mCherry-Emp3* 和 *GFP-Tgfβ2* 共转染 6 h 后加入不同剂量肾纤康处理 42 h 收样。使用 1 mL Co-IP 裂解液(50 mmol/L Tris,150 mmol/L NaCl,1% Triton,1 mmol/L EDTA,pH = 7.5)于冰上裂解

30 min。离心取上清与 GFP 磁珠在 4 ℃ 下旋转孵育 2 h,用裂解液洗涤 5 次。然后加入 50 μL 蛋白上样缓冲液重悬磁珠,95 ℃ 金属浴 10 min,离心取上清进行免疫印迹分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 对数据进行统计分析,计量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异性的比较,服从正态分布且方差齐则采用非配对 *t* 检验,多组数据采用单因素方差分析方法。各组资料不符合正态分布或方差不齐,采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,若提示组间存在差异,进一步采用独立样本的非参数检验 (Mann-Whitney *U*) 进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 肾纤康对临床 CKD 患者肾功能和小鼠肾病理变化的影响

收集整理本研究纳入病例治疗前后血清肌酐、尿素氮和肾小球滤过率数据发现,肾纤康治疗后患者血清肌酐明显降低,并且其肾小球滤过率也得到明显改善 ($P < 0.001$),见图 1。根据 HE 染色结果显示,假手术组肾小球形态正常,肾小管管腔完整,而模型组肾小管明显扩张且上皮细胞脱落、肾小球皱缩或扩张使形态大小不一 ($P < 0.01$),这些变化符合 CKD 相关的病理特征。经肾纤康治疗后肾小管管腔扩张得到明显改善,且肾小球的形态也较模型均一,该变化具有统计学意义 ($P < 0.05$)。根据免疫组化结果显示,与假手术组相比,模型组肾损伤标志物肾损伤分子-1 (kidney injury molecule-1, Kim1) 和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (lipocalin-2, Lcn2) 的表达显著上升 ($P < 0.001$),且主要表达于扩张的肾小管腔上;肾纤康治疗后,这些标志物的表达明显降低。Western Blot 结果进一步验证了免疫组化的发现。这些结果表明,肾纤康能够有效改善 CKD 小鼠的肾病理损伤,具有潜在的保护作用。

2.2 肾纤康对小鼠肾纤维化程度的影响

假手术组 Masson 染色组织结构清晰,少许蓝色胶原纤维沉积(图 2)。模型组肾间质中胶原纤维沉积显著增加,而肾纤康治疗后,蓝色的胶原纤维面积和强度均显著降低 ($P < 0.001$)。进一步的免疫组化分析显示,治疗组的纤维化标志物

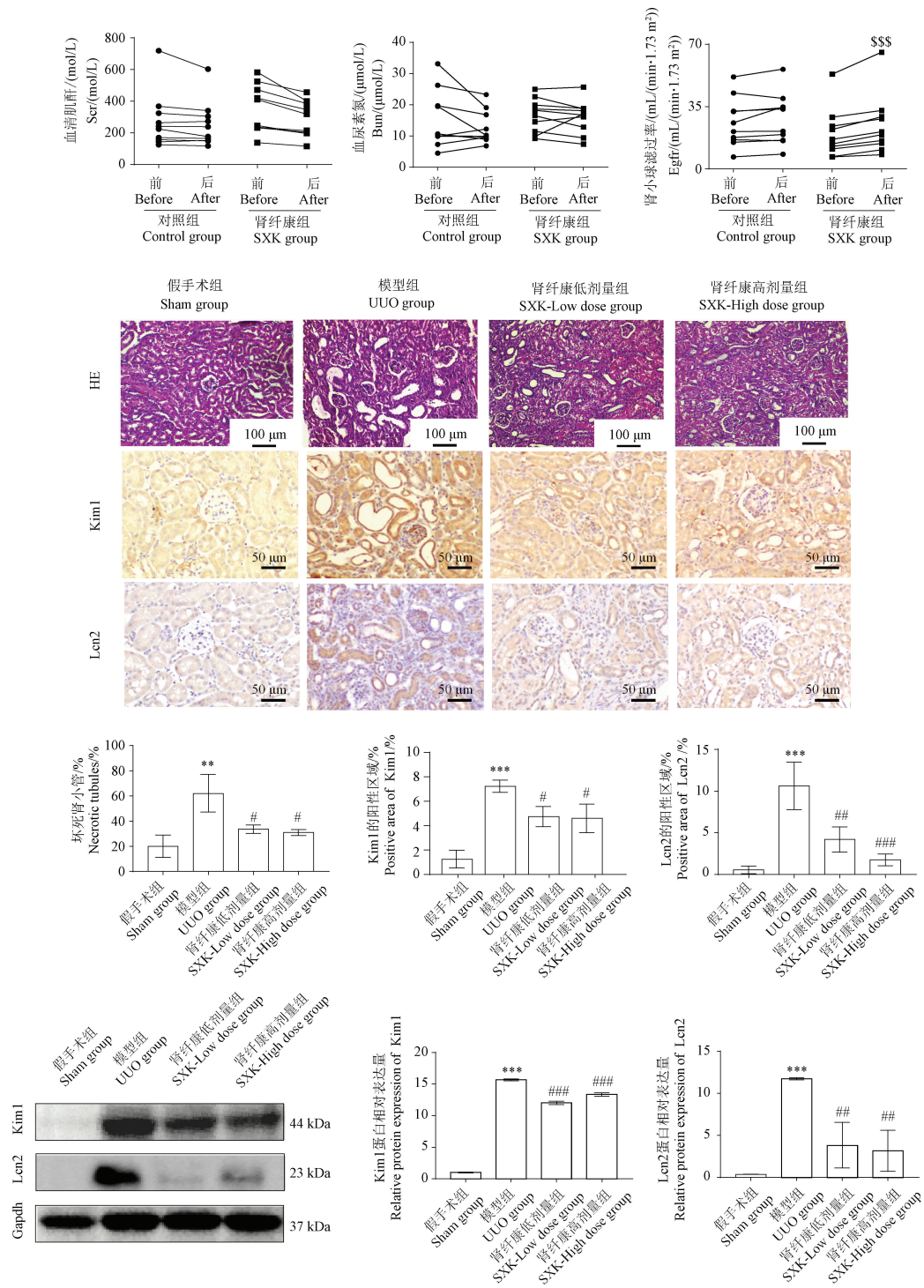
Fn 和 α -SMA 的表达水平也显著低于模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。同时, Real-time PCR 和 Western Blot 结果显示,在 RNA 和蛋白水平上,模型组 Fn 和 α -SMA 均明显高于假手术组,治疗后两个指标明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。以上结果表明,肾纤康处理能够有效减轻 CKD 小鼠的肾间质纤维化程度。

2.3 肾纤康对 CKD 小鼠肾 Emp3/Tgf- β /Smad3 信号通路的影响

Western Blot 结果显示(图 3),模型组 Tgf- β /Smad3 信号通路蛋白中的 Tgf β 2、Smad3 及 Smad2 磷酸化 (p-Tgf β 2、p-Smad3 及 p-Smad2) 水平明显增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。肾纤康干预呈现剂量依赖性降低 p-Tgf β 2 和 p-Smad3 水平的效果,而对 p-Smad2 水平没有显著影响。同时, Real-time PCR 和 Western Blot 结果显示,模型组 Emp3 的 RNA 和蛋白表达量显著高于正常组织,而肾纤康治疗后 Emp3 表达在 RNA 和蛋白水平上显著降低 ($P < 0.001$),在免疫组化水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。免疫组化结果进一步验证了这一发现,并显示 Emp3 主要表达于扩张的肾小管上皮细胞。以上结果表明,肾纤康能够选择性抑制 Tgf- β /Smad3 信号通路的异常激活,并减少 Emp3 的异常表达。

2.4 Emp3 过表达拮抗肾纤康对 Tgf- β /Smad3 信号通路及纤维化的调控作用

为进一步探讨肾纤康延缓 CKD 纤维化的机制是否与 Emp3/Tgf- β /Smad3 信号通路有关,作者在 TCMK1 细胞中过表达 Emp3,并检测肾纤康在 Emp3 过表达情况下的抗纤维化效果。首先,通过 CCK-8 实验确定了适当的药物处理浓度,结果显示肾纤康在 400 μg/mL 的浓度下未引起明显的细胞毒性(图 4)。在此基础上,作者在 TCMK1 细胞中过表达了 Emp3, Real-time PCR 和 Western Blot 结果发现 Emp3 过表达能促进纤维化标志物 Fn 的蛋白水平升高;在 Emp3 过表达的情况下,50、100 μg/mL 的肾纤康药物干预废除了其原有的抗纤维化效果。进一步检测 Emp3 对 Tgf- β /Smad3 信号通路的影响, Western Blot 结果进一步表明, Emp3 过表达显著增强了 p-Tgf β 2 和 p-Smad3 的水平。在 Emp3 过表达的情况下,50、100 μg/mL 的肾纤康干预不能减弱 Emp3 对 p-



注:与肾纤康治疗前相比, $^{***}P < 0.001$;与假手术组相比, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$;与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ 。(下图同)

图 1 肾纤康对临床 CKD 患者肾功能和小鼠肾病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. Compared with before SXX group, $^{***}P < 0.001$. Compared with Sham group, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. Compared with UO group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effects of SXX on renal function in clinical CKD patients and renal pathological changes in CKD mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tgf β 2 和 p-Smad3 水平的抑制作用。综上所述, 肾纤康通过调控 Emp3, 抑制异常激活的 Tgf β 2/

Smad3 信号通路, 进而延缓了 TCMK1 细胞的纤维化进程。

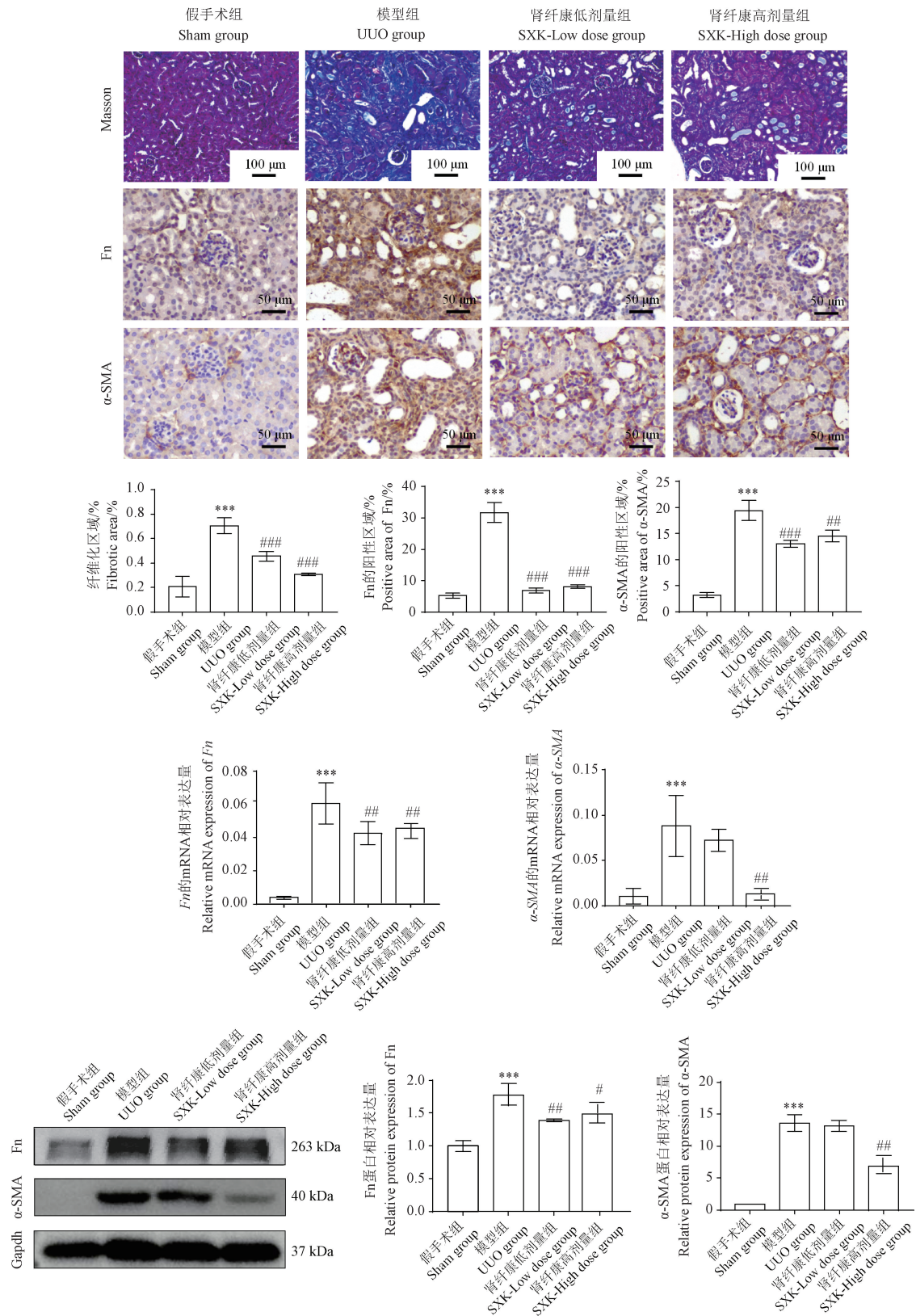


图 2 肾纤康延缓 CKD 小鼠肾纤维化的进程($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Figure 2 SXK delayed the progression of renal fibrosis in CKD mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.5 肾纤康干预调节 Emp3 与 Tgfβ2 相互作用

有研究表明, Emp3 在肺癌细胞中通过与

Tgfβ2 的相互作用调控 Tgf-β/Smad 信号通路的活化,进而影响上皮-间质转化^[10]。基于此,本课题

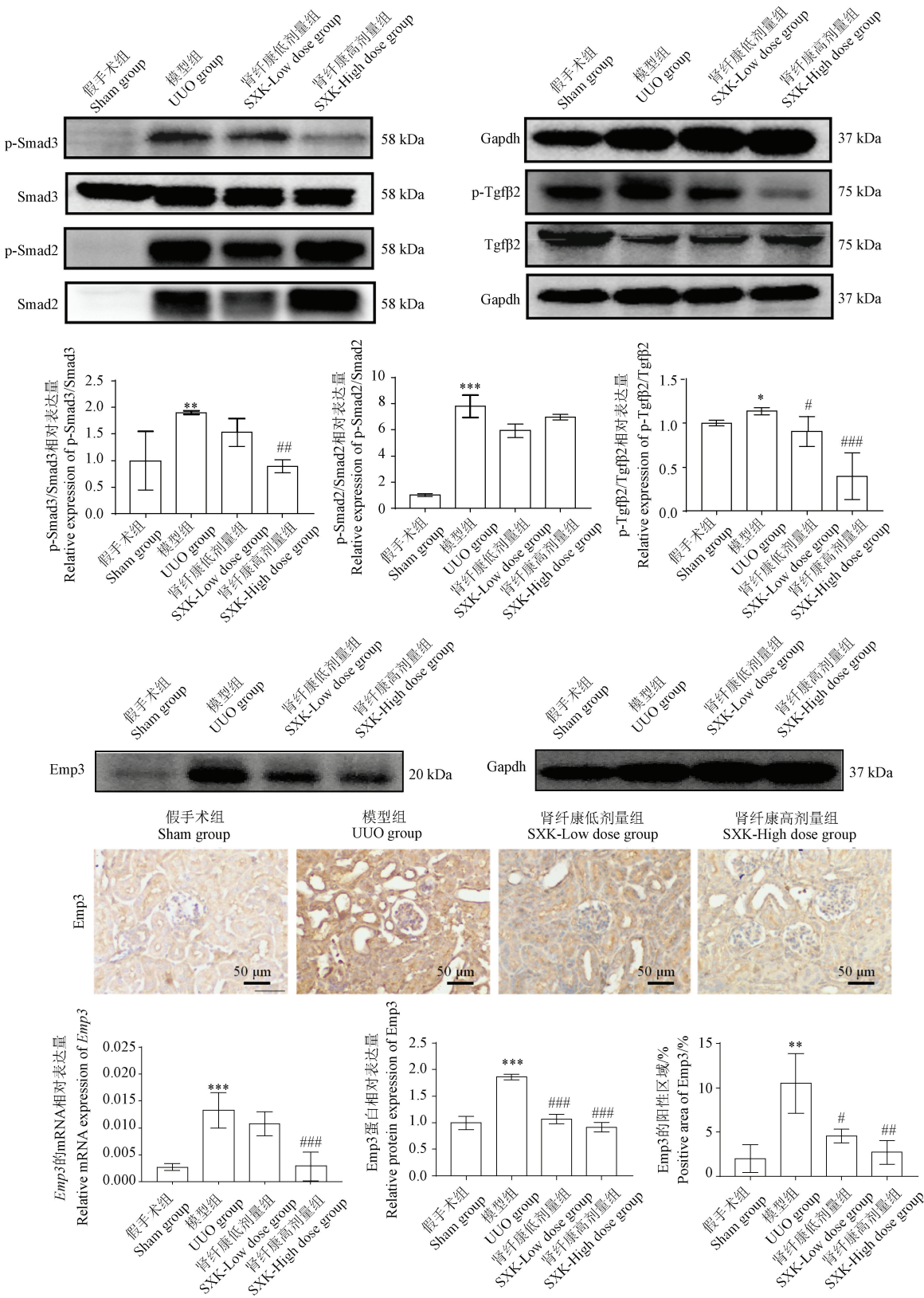
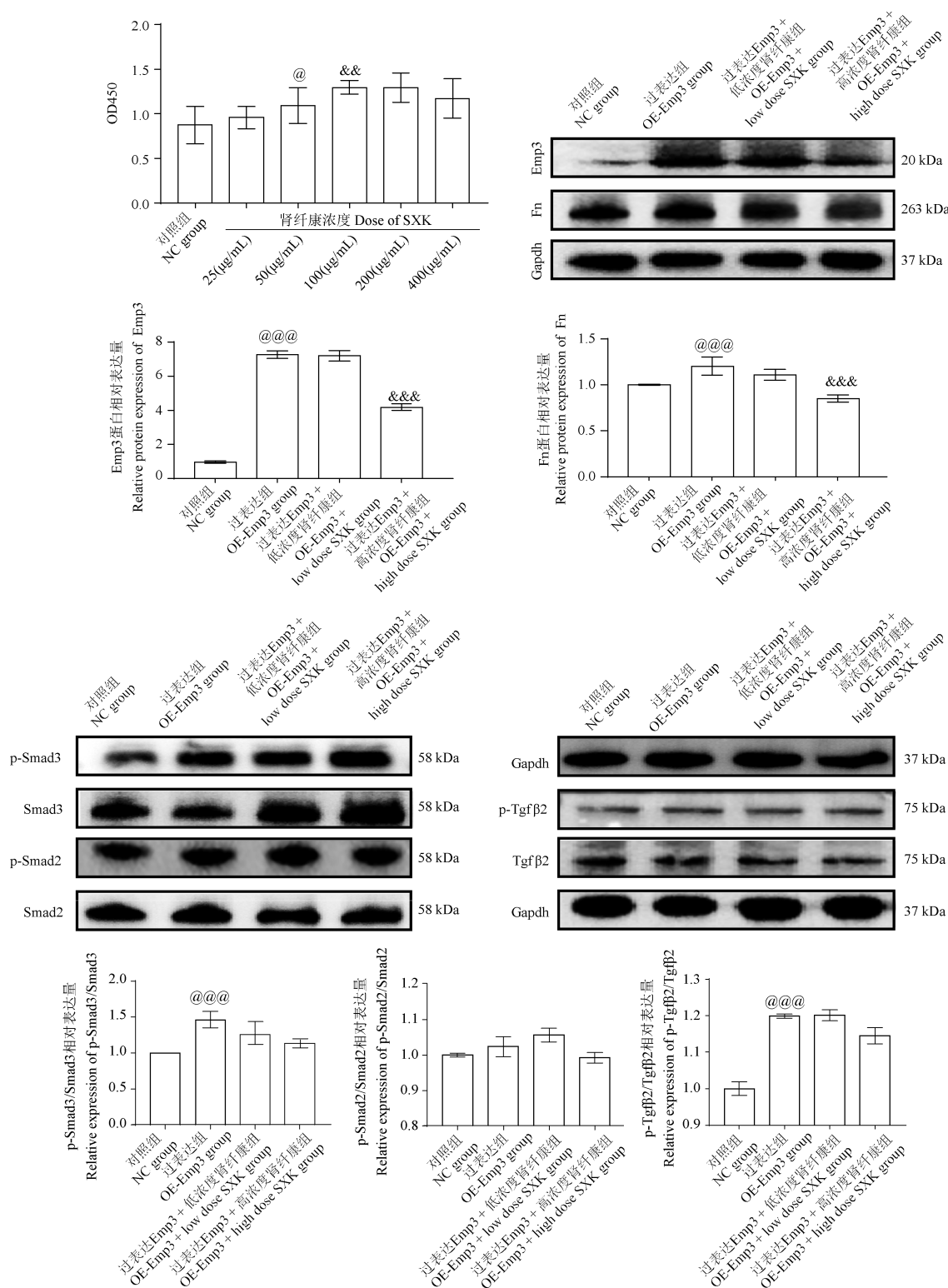


图3 肾纤康抑制CKD小鼠肾Emp3/Tgf-β/Smad3通路蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Figure 3 SXK inhibited the protein expression of Emp3/Tgf-β/Smad3 pathway in kidney of CKD mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)



注:与 NC 组相比, $^* P < 0.05$, $^{***} P < 0.001$;与过表达组相比, $^{\&\&} P < 0.01$, $^{\&\&\&} P < 0.001$ 。(下同)

图 4 肾纤康通过抑制 Emp3/Tgf-β/Smad3 信号激活来抑制细胞纤维化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with NC group, $^* P < 0.05$, $^{***} P < 0.001$. Compared with OE-Emp3 group, $^{\&\&} P < 0.01$, $^{\&\&\&} P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 4 SXX inhibited fibrosis by inhibiting Emp3/Tgf-β/Smad3 signaling activation($\bar{x} \pm s, n = 3$)

通过 Co-IP 实验进一步探讨了肾纤康在调控 Emp3 与 Tgf β 2 相互作用中的作用。实验结果揭示, Emp3 与 Tgf β 2 之间存在显著的相互作用, 且

在肾纤康处理后, 这种相互作用被显著抑制(图 5)。无论是高剂量还是低剂量的肾纤康, 均表现出相似的抑制效果, 表明该作用并未呈现出明显

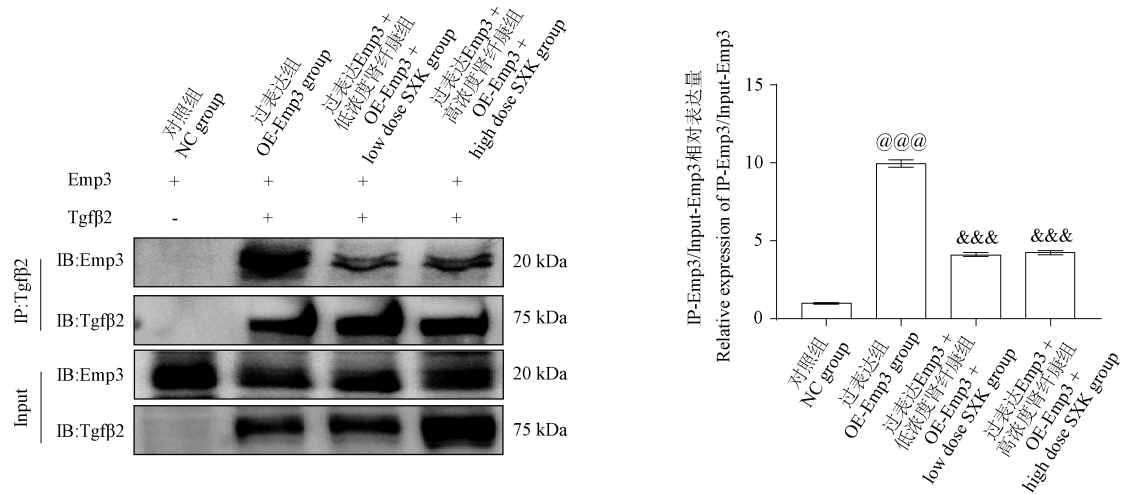


图 5 肾纤康抑制 Emp3 和 Tgf β 2 的相互作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 5 SXK inhibits the interaction between Emp3 and Tgf β 2($\bar{x} \pm s, n = 3$)

的剂量依赖性。这一结果暗示, 肾纤康在达到有效浓度后即可阻断 Emp3 与 Tgf β 2 的相互作用, 且进一步增加药物剂量不会显著增强抑制。

3 讨论

CKD 已成为全球健康的重大负担, 其发病率随着全球人口老龄化及慢性疾病增加而持续上升^[13]。RF 是导致肾功能逐步丧失的关键病理进程, 当肾疾病进展至末期时可能需通过透析或肾移植来维持生命^[14]。因此, 发展能够有效延缓或逆转 RF 的治疗策略对于改善 CKD 患者的生存质量和预后具有至关重要的意义。在此背景下, 由于传统中药的独特治疗优势和较低副作用, 其在 CKD 的治疗中日益受到关注^[15]。特别是肾纤康这一基于中药的复方制剂, 在作者前期的研究中显示了显著的抗纤维化效果。

Tgf- β /Smad 信号通路在胚胎发育、免疫调节和组织修复中起关键作用, 但其异常激活与癌症、纤维化等多种疾病密切相关^[16-17]。Tgf- β 与 Tgf β 2 结合后, 激活 Tgf β r1, 进而磷酸化 Smad 蛋白, 形成 R-Smad/Co-Smad 复合物, 进入细胞核调控基因转录。因此, Tgf β 2 的活化在这一信号通路的启动过程中至关重要。针对 Tgf β 2 的异常活化, 调控其信号传递可能是抑制纤维化进程的关键

靶点之一。已有研究表明, Emp3 通过与 Tgf β 2 的相互作用, 促进了 Tgf- β 信号的激活^[18]。在本研究中, 课题组发现 Emp3 在 UUO 诱导的 CKD 模型中显著上调, 而肾纤康干预能够显著调节 Emp3 的表达。这一发现提示肾纤康可能通过调控 Emp3/Tgf- β /Smad 信号通路发挥其抗纤维化作用。进一步通过 Real-time PCR、免疫组化和 Western Blot 实验, 证实肾纤康在 UUO 模型中显著降低了 Emp3、p-Tgf β 2 和 p-Smad3 的表达, 表明肾纤康有效抑制了异常激活的 Emp3/Tgf- β /Smad 信号通路。为了进一步验证这一机制, 作者在 TCMK1 肾小管上皮细胞中过表达了 Emp3。结果显示, Emp3 过表达显著增加了纤维化标志物的表达, 并上调了 p-Tgf β 2 和 p-Smad3 的水平。然而, 在 Emp3 过表达的 TCMK1 细胞中, 肾纤康的抗纤维化效果被废除。此外, 通过 Co-IP 实验进一步确认, 肾纤康不仅降低了 Emp3 和 Tgf β 2 的蛋白表达水平, 还显著减弱了它们之间的相互作用, 提示肾纤康在一定程度上通过调控 Emp3 与 Tgf β 2 的相互作用来发挥其抗纤维化作用。

总的来说, 本课题的研究表明, 肾纤康通过抑制 Emp3/Tgf β 2 相互作用及 Tgf- β /Smad 信号通路的异常激活, 能够有效减缓肾纤维化。这一发现为肾纤康作为 CKD 治疗的潜在药物提供了新

的机制依据。然而,肾纤康作为一种复方制剂,含有多种生物活性成分,但其中具体作用于 Emp3 调控的机制仍有待进一步阐明。尽管本研究显示肾纤康能够显著降低 Emp3 的表达,并通过调控 Tgf- β /Smad 信号通路抑制肾纤维化,但这些生物活性成分如何具体作用于 Emp3 及其下游信号尚不明确。因此,未来的研究应进一步聚焦于肾纤康的关键成分,探讨它们在调控 Emp3 表达及信号传导中的作用机制,这将为更精准的药物开发提供依据。

参 考 文 献(References)

- [1] KOVESDY C P. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022 [J]. *Kidney Int Suppl* (2011), 2022, 12(1): 7–11.
- [2] DUAN J, WANG C, LIU D, et al. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease and diabetic kidney disease in Chinese rural residents: a cross-sectional survey [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10408.
- [3] HUANG R, FU P, MA L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 129.
- [4] ZHANG Y, JIN D, KANG X, et al. Signaling pathways involved in diabetic renal fibrosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 696542.
- [5] WAN Y, FENG Y, LI M, et al. Traditional Chinese medicine in the treatment of chronic kidney diseases: theories, applications, and mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 917975.
- [6] 倪玉芳, 张璐娜, 张琼, 等. 肾纤康通过调节 Smad3 介导的铁死亡缓解 CKD 小鼠肾纤维化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2024, 40(6): 1097–1104.
- NI Y F, ZHANG L N, ZHANG Q, et al. Shen-Xiankang formula alleviates renal fibrosis in chronic kidney disease mice by regulating Smad3-mediated ferroptosis [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2024, 40(6): 1097–1104.
- [7] ZHOU X, LI X, WANG R, et al. Recruitment of LEF1 by Pontin chromatin modifier amplifies TGF β 2 transcription and activates TGF β /SMAD signalling during gliomagenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(9): 818.
- [8] MASSAGUÉ J, SHEPPARD D. TGF- β signaling in health and disease [J]. *Cell*, 2023, 186(19): 4007–4037.
- [9] FAROOQI A A, PINHEIRO M, GRANJA A, et al. EGCG mediated targeting of deregulated signaling pathways and non-coding RNAs in different cancers: focus on JAK/STAT, Wnt/ β -catenin, TGF/SMAD, NOTCH, SHH/GLI, and TRAIL mediated signaling pathways [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4): 951.
- [10] KAHM Y J, KIM R K, JUNG U, et al. Epithelial membrane protein 3 regulates lung cancer stem cells via the TGF- β signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2021, 59(4): 80.
- [11] LI J, WANG L, TAN R, et al. Nodakenin alleviated obstructive nephropathy through blunting Snail1 induced fibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(17): 9752–9763.
- [12] 庄子锐, 王明亮, 张婷, 等. 肝肾纤维化动物模型的研究进展及评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(6): 845–852.
- ZHUANG Z R, WANG M L, ZHANG T, et al. Research progress and evaluation of animal models of hepatorenal fibrosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(6): 845–852.
- [13] HU J, KE R, TEIXEIRA W, et al. Global, regional, and national burden of CKD due to glomerulonephritis from 1990 to 2019: a systematic analysis from the global burden of disease study 2019 [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2023, 18(1): 60–71.
- [14] SHAO G, ZHU S, YANG B. Applications of herbal medicine to treat autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 629848.
- [15] 段艳华, 陈云祥, 郑高利, 等. 基于 TGF- β 1/Smad 信号通路初步探讨虎杖醇提取物对腺嘌呤诱导小鼠肾间质纤维化的改善作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(1): 10–19.
- DUAN Y H, CHEN Y X, ZHENG G L, et al. Ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* attenuates renal fibrosis in a mouse model of adenine-induced renal injury through inhibiting TGF- β 1/Smad signaling [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(1): 10–19.
- [16] YANG J, WANG M, ZHU F, et al. Putative endothelial progenitor cells do not promote vascular repair but attenuate pericyte-myofibroblast transition in UUO-induced renal fibrosis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 104.
- [17] SHU G, DAI C, YUSUF A, et al. Limonin relieves TGF- β -induced hepatocyte EMT and hepatic stellate cell activation *in vitro* and CCl₄-induced liver fibrosis in mice via upregulating Smad7 and subsequent suppression of TGF- β /Smad cascade [J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 107: 109039.
- [18] JUN F, HONG J, LIU Q, et al. Epithelial membrane protein 3 regulates TGF- β signaling activation in CD44-high glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 14343–14358.

[收稿日期] 2024-09-20