

实验研究

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20251211003

艾灸延缓肾小管间质纤维化的作用与机制初探

陈 昊^{1,2}, 罗 磊², 刘 珊², 王 澳¹, 钟逸斐², 李 屹¹

1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院(上海 200437); 2. 上海中医药大学附属龙华医院(上海 200032)

【摘要】 目的 探讨艾灸干预单侧输尿管结扎(UUO)小鼠肾小管间质纤维化(TIF)的作用机制。**方法** C57BL/6J 小鼠通过 UUO 法建立 TIF 小鼠模型,分为假手术(Sham)组、假手术加艾灸(Sham+Moxa)组、模型(Model)组和模型加艾灸(Moxa)组。通过苏木精-伊红染色、天狼猩红染色、马松染色观察肾组织病理变化,测定胶原容积分数(CVF)并结合免疫组织化学法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I 型胶原蛋白(Col I)以评估 TIF 程度;采用免疫荧光法检测肾小管缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)评估肾小管缺血缺氧状态,检测血小板反应蛋白-1(TSP-1)和血小板内皮细胞黏附分子-1[PECAM-1(又称 CD31)]评估血管损伤,双染法检测延缓衰老蛋白(Klotho)/CD31 以评估肾小管周围毛细血管(PTC)内皮细胞 Klotho 表达;逆转录实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法测定纤维化相关因子蜗牛家族转录抑制因子 1(*Snail1*)、CCAAT 增强子结合蛋白 delta(*Cebpd*) mRNA 表达。**结果** 艾灸可显著改善肾组织肾小管萎缩、管腔狭窄,减少细胞外基质增生与间质胶原纤维表达,降低 CVF。免疫组织化学显示,艾灸能降低肾小管间质 α -SMA、Col I 阳性表达。免疫荧光显示,艾灸能降低肾小管间质 HIF-1 α 、TSP-1 阳性表达,增加 PTC 内皮细胞 CD31 与 Klotho 阳性表达。RT-qPCR 显示,艾灸能降低肾组织 *Snail1*、*Cebpd* 的 mRNA 表达。**结论** 艾灸可通过上调 PTC 内皮细胞 Klotho 表达,改善肾小管上皮细胞缺血缺氧状态,抑制纤维化相关因子表达,从而延缓 TIF 进展。

【关键词】 肾小管间质纤维化;慢性肾脏病;艾灸;内皮细胞;中医药疗法;作用机制

Preliminary study on effect and mechanism of moxibustion in delaying renal tubulointerstitial fibrosis

CHEN Hao^{1,2}, LUO Lei², LIU Shan², WANG Ao¹, ZHONG Yifei², LI Yi¹

1. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of moxibustion intervention on renal tubulointerstitial fibrosis (TIF) in mice with unilateral ureteral obstruction (UUO). **Methods** A TIF mouse model was established using the UUO method in C57BL/6J mice. The mice were divided into Sham operation (Sham) group, Sham operation plus moxibustion (Sham+Moxa) group, Model group, and Model plus moxibustion (Moxa) group. Pathological changes in renal tissue were observed using Hematoxylin-Eosin, Sirius Red and Masson's staining.

Collagen volume fraction (CVF) was measured, and immunohistochemistry was performed to detect α -smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen (Col I), so as to evaluate the degree of TIF. The immunofluorescence method was used to detect hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in renal tubules; Thrombospondin (TSP-1) and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) were detected to evaluate vascular injury; Double staining with the anti-aging protein Klotho/CD31 was detected to assess the Klotho expression in the endothelial cells of peritubular capillaries (PTC) around the renal tubules.

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82374589);上海市科委“科技创新行动计划”临床医学领域项目(18401970603);上海市中医药管理局中医重点病种建设项目(2025年);上海市浦东新区中医药传承创新发展示范试点项目(YC-2023-0901)

[作者简介] 陈昊,女,硕士,医师,主要从事中医药防治肾脏病的基础研究工作

[通信作者] 李屹,主任医师,博士研究生导师;

E-mail: lh1260@shutcm.edu.cn

Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to measure the mRNA expression of fibrosis-related factors Snail family transcriptional repressor 1 (*Snail1*) and CCAAT enhancer binding protein delta (*Cebpd*). **Results** Moxibustion could significantly improve renal tubular atrophy and luminal stenosis, reduce extracellular matrix hyperplasia and interstitial collagen fiber expression, and decrease CVF. Immunohistochemistry showed that moxibustion could reduce the positive expression of α -SMA and Col I in the renal tubulointerstitium. Immunofluorescence revealed that moxibustion could decrease the positive expression of HIF-1 α and TSP-1 in renal tubular epithelial cells and increase the positive expression of CD31 and Klotho in PTC endothelial cells. RT-qPCR demonstrated that moxibustion could downregulate the mRNA expression of *Snail1* and *Cebpd* in renal tissue. **Conclusions** Moxibustion delays the progression of TIF by upregulating Klotho expression in PTC endothelial cells, alleviating ischemia and hypoxia in renal tubular epithelial cells, and inhibiting the expression of fibrosis-related factors.

Keywords: tubulointerstitial fibrosis; chronic kidney disease; moxibustion; endothelial cells; traditional Chinese medicine therapies; mechanism of action

肾小管间质纤维化(tubulointerstitial fibrosis, TIF)是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)进展中的持续病理改变,与肾功能进行性减退及终末期肾病的发生、发展密切相关,是CKD防治的关键^[1]。现有治疗方式如血管紧张素Ⅱ受体阻断剂、钠-葡萄糖协同转运体抑制剂等,虽可延缓疾病进程,但并未针对TIF这一核心病理过程^[2-3]。在中医理论中,CKD所致TIF可归属于“水肿”“尿浊”等范畴,其病机本质在于肾元亏虚,兼夹湿浊、瘀血,形成本虚标实的复杂病理状态。多位国医大师认为需综合运用多种治法,以破除病机之间的“恶性循环”^[4-5],故而临床亟待寻求延缓TIF科学有效的医学方案。

艾灸作为中医外治法之一,课题组前期从艾灸有效治疗CKD患者的临床实践出发,发现加用艾灸治疗可以显著减少CKD患者24 h尿蛋白定量水平、提高肾小球滤过率,进一步实验证实艾灸可改善肾病模型大鼠肾小球毛细血管袢损伤与肾小球硬化,值得注意的是艾灸还延缓了肾病模型大鼠的TIF过程,但是艾灸延缓TIF的确切疗效与机制尚不清楚^[6]。基于以上背景,本研究建立单侧输尿管结扎(UUO)小鼠的经典TIF模型,系统观察艾灸对肾小管周围毛细血管(PTC)内皮细胞损伤、肾组织缺血缺氧相关因子及TIF的作用,从而初步阐明艾灸延缓TIF的效应机制,丰富艾灸治疗CKD的科学内涵,为中医外治法治疗CKD提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级C57BL/6J小鼠30只,8周龄,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2022-0033;实验动

物使用许可证号:SYXK(沪)2020-0009。小鼠饲养于上海中医药大学动物实验中心SPF级实验室,室温22~25℃,相对湿度(55±10)%,12 h/12 h的明/暗交替。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理审批号:PZSHUTC2502240009)。

1.1.2 药物与试剂 艾灸条(批号:AYB-w000),中国南阳上官氏艾绒厂;羊抗兔(Goat anti-Rb)免疫球蛋白G(IgG)抗体(SA00013-4)、苏木精-伊红(HE)染色液(批号:G1005),武汉三鹰生物技术有限公司;肾小管缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)抗体(批号:Ab51968)、血小板内皮细胞黏附分子1[PECAM-1(又称CD31)]抗体(批号:Ab 281583),英国Abcam公司;辣根过氧化物酶(HRP)Goat anti-Rb IgG抗体(批号:abs20040)、4%多聚甲醛(批号:abs9179),上海爱必信生物科技有限公司;羊抗小鼠(Goat anti-Mu)IgG抗体(批号:A11001),美国Thermo Fisher Scientific公司;血小板反应蛋白-1(TSP-1)抗体(批号:sc-59887),美国Santa Cruz Biotechnology公司;羊抗大鼠(Goat anti-Rat)IgG抗体(批号:4416)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(批号:19245)、I型胶原蛋白(Col I)抗体(批号:72026),美国Cell Signaling Technology公司;延缓衰老蛋白(Klotho)抗体(批号:236214),美国R&D Systems公司;二氨基联苯胺(DAB)显色液(批号:P0203),上海碧云天生物科技股份有限公司;马松(Masson)染色液(批号:BA4079A)、天狼猩红(Sirius Red)染色液(批号:BA4356),珠海贝索生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 NanoDropone超微量分光光度计(型号:840-317500)、聚合酶链反应(PCR)基因扩增仪(型号:PROFLEX)、实时荧光定量PCR仪(型号:A7500),美国Thermo Fisher Scientific公司;倒置显

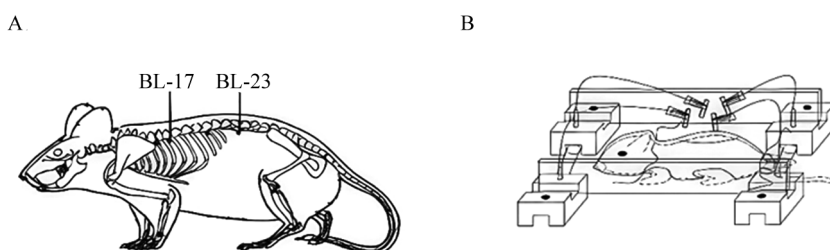
显微镜(型号:TS-100)、倒置荧光显微镜(型号:ECLIPSE Ti2 TI-E),日本Nikon公司;切片机(型号:RM235),德国Leica公司。

1.2 检测指标与方法

1.2.1 造模与干预方法 将30只小鼠适应性喂养1周后随机分为4组:假手术(Sham)组6只,假手术加艾灸(Sham+Moxa)组8只,模型(Model)组8只,模型加艾灸(Moxa)组8只。造模方法:以UUO法建立TIF模型,Model组和Moxa组小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠(100 mg/kg)进行麻醉,打开左侧腹腔,游离并结扎输尿管;Sham组和Sham+Moxa组仅游离输尿

管并关闭腹腔。

干预方法:采用自制实验动物固定装置及实验动物艾灸装置^[7](专利号:ZL 201520785367.9与ZL20150785366.4)进行艾灸干预,将Sham+Moxa组、Moxa组小鼠俯卧固定,取双侧“肾俞”“膈俞”穴^[8],将穴位区被毛剪除、标记颜色、消毒,取穴与装置见图1;取细艾条悬灸于小鼠穴位上,以小鼠无挣扎为度调节艾条与穴位的距离,每次30 min,每日1次,共干预21 d^[9-10];Sham组、Model组固定同样时间,不予干预,3周后颈椎脱位法处死。



注:A为小鼠“肾俞”(BL-23)与“膈俞”(BL-17)位置示意;B为小鼠固定装置及艾灸装置^[7]。

图1 艾灸穴位及小鼠固定实验装置

1.2.2 标本的采集及检测 小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠100 mg/kg进行麻醉,仰卧位固定于手术台,暴露胸腹,常规消毒后打开腹腔,在右心耳上剪一个小口,将0.9%氯化钠溶液从左心尖处灌流,待双肾变苍白后切除左侧肾脏,去除包膜后切取部分皮质用于分子生物学检测,剩下部分放入含足量4%多聚甲醛的试管中,4℃避光保存。

1.2.3 肾组织病理切片及染色 肾组织取材后在4%多聚甲醛中固定48 h,石蜡包埋后进行切片,常规脱蜡水化,切成薄片(3~4 μm),然后进行染色。①HE染色:以苏木精与伊红染色后脱水、透明和封片;②Masson染色:用丽春红酸性品红溶液复染6~10 min后,用2%冰冷的乙酸水溶液冲洗5 s;③Sirius Red染色:用Sirius Red染液滴染8~10 min,流水冲洗掉多余染液,流水冲洗掉多余染液后封片。Masson、Sirius Red染色胶原容积分数(CVF)计算方法:区域面积分数(%)=(Masson或Sirius Red染色区阳性面积/总面积)×100%。

1.2.4 免疫组织化学法检测肾组织α-SMA、Col I阳性表达 将石蜡组织切割成3~4 μm薄片,将包含有完整组织的载玻片置于40℃温水中,捞出后放入37℃干燥箱中烘干;用二甲苯脱蜡并进行抗原修复,血清封闭后,在切片上滴加3%山羊血清配制的

一抗α-SMA(1:400)、Col I(1:100),切片平放于湿盒内4℃孵育过夜;置于磷酸盐缓冲液(PBS)中,在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5 min;在圈内滴加二抗覆盖组织,室温孵育50 min,加DAB显色、复染细胞核后脱水封片。光学显微镜避光观察、拍照,每张切片观察以棕黄色或棕褐色为阳性。

1.2.5 免疫荧光法检测肾组织HIF-1α、TSP-1、CD31、Klotho/CD31阳性表达 石蜡切片经过常规脱蜡、乙醇复水,用柠檬酸盐缓冲液在微波炉中加热进行抗原修复,加入3%山羊血清封闭液室温封闭30 min,切片上滴加用3%山羊血清配置的一抗HIF-1α(1:100)、TSP-1(1:100)、CD31(1:100)、Klotho(1:50)于湿盒中4℃孵育过夜,在避光条件下加入二抗,在室温孵育50 min进行荧光染色后,加入4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液避光孵育复染细胞核,封片后立即在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.6 逆转录实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法检测相关基因表达 在PubMed数据库中查询最近文献中主要TIF相关因子,在NCBI基因数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/)中查询小鼠该基因序列号,在PrimerBank数据库(<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>)中查询基因序列号对应引物序列,

得出常用 TIF 相关基因蜗牛家族转录抑制因子 1 (*Snail1*)、CCAAT 增强子结合蛋白 delta(*Cebpd*)。取 20 mg 肾组织采用柱式法提取总 RNA,再取 1 μ g RNA 进行逆转录反应合成 cDNA,再通过 SYBR 法进行实时荧光定量 PCR 扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司构建,引物序列见表 1。反应条件:95 $^{\circ}$ C, 5 min;95 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对各组基因相对表达量进行分析。

表 1 引物序列

基因	序列	引物长度/bp
<i>Snail1</i>	上游:5'-CACACGCTGCCTTGTGTCT-3'	19
	下游:5'-GGTCAGCAAAAGCACGGTT-3'	19
<i>Cebpd</i>	上游:5'-CGACTTCAGCGCCTACATTGA-3'	21
	下游:5'-CTAGCGACAGACCCACAC-3'	19
<i>GAPDH</i>	上游:5'-TGTCAAGCTCATTTCTGTTAT-3'	22
	下游:5'-GGAGATGCTCACTGTTGGGG-3'	20

注:*Snail1* 为蜗牛家族转录抑制因子 1 基因, *Cebpd* 为 CCAAT 增强子结合蛋白 delta 基因, *GAPDH* 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因。

1.3 统计学方法 数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。数据均采用单因素方差分析,进一步两两比较,方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

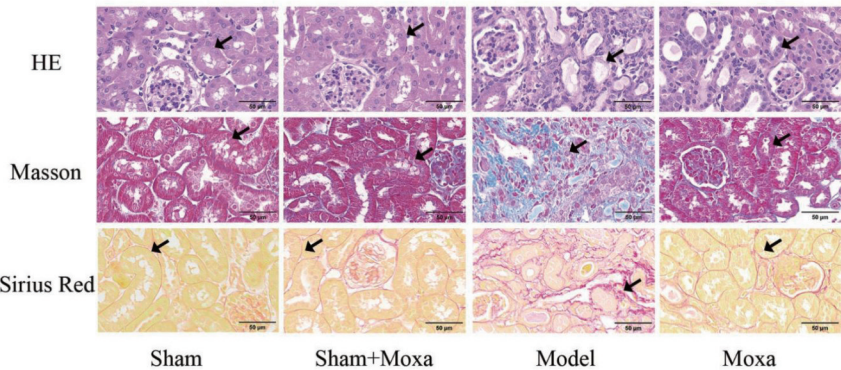
2 结果

2.1 对小鼠肾组织病理的影响 HE 染色显示, Sham 组小鼠肾组织结构层次清晰,肾小管上皮细胞结构完整,刷状缘清晰可见,管腔内未见管型形成;肾间质无增宽,无炎症细胞浸润,未见明显病理学改变。与 Sham 组相比, Sham+Moxa 组肾组织形态

未见明显差异, Model 组小鼠肾组织呈现显著的病理损伤,肾小管萎缩,上皮细胞明显水肿,胞质内出现空泡样变性,间质区域及血管周围出现炎症细胞浸润;与 Model 组相比, Moxa 组肾小管扩张程度明显减轻,上皮细胞空泡变性及坏死数量减少,肾间质增宽程度显著减轻,炎症细胞浸润明显减少。见图 2。

Masson 染色显示, Sham 组小鼠肾组织未见明显蓝染,仅在肾小管基底膜及血管周围可见极微量生理性的胶原分布,染色极淡,肾小管间质区域未见阳性染色,表明正常肾脏无胶原沉积;与 Sham 组相比, Sham+Moxa 组小鼠肾组织差异无统计学意义 ($P>0.05$), Model 组肾组织排列较不规则,肾小管萎缩、管腔狭窄,肾小管间质胶原纤维明显增多,肾组织 CVF 明显增加 ($P<0.01$);与 Model 组相比, Moxa 组肾间质蓝染区域明显减少,肾小管萎缩与管腔狭窄均有所减轻,肾小管间质胶原纤维显著减少,肾组织 CVF 明显降低 ($P<0.01$)。见图 2、表 2。

Sirius Red 染色显示, Sham 组小鼠肾组织结构正常,仅见肾小管基底膜及血管壁周围有极少量纤细的红色线状着色,间质区域无阳性染色;与 Sham 组相比, Sham+Moxa 组肾组织染色无明显差异 ($P>0.05$), Model 组小鼠呈现显著的间质胶原沉积, CVF 显著升高 ($P<0.01$),肾小管间隔明显增宽,正常结构破坏严重;与 Model 组相比, Moxa 组肾间质胶原沉积得到明显抑制,肾间质红色阳性区域明显减少,染色变浅, CVF 明显降低 ($P<0.01$)。以上结果表明,单独给予艾灸对正常肾脏无毒性作用,不诱导胶原沉积;而艾灸可改善肾组织病理损伤、改善肾脏的纤维化,延缓 TIF。见图 2、表 2。



注:HE 为苏木精-伊红染色,箭头表示肾小管间质;Masson 为马松染色, Sirius Red 为天狼猩红染色,箭头表示肾小管间质阳性表达。Sham 为假手术组, Sham+Moxa 为假手术+艾灸组, Model 为模型组, Moxa 为艾灸组。

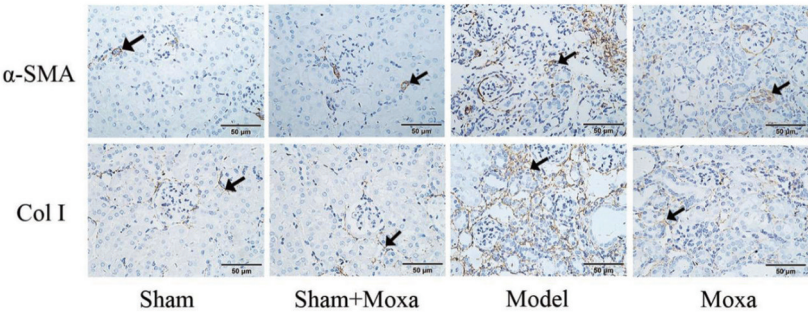
图 2 各组小鼠肾组织病理结果($\times 400$)

表2 各组小鼠肾组织 CVF 统计($\bar{x}\pm s$, %)

组别	n	Masson 染色	Sirius Red 染色
Sham	6	0.92±0.17	1.21±0.19
Sham+Moxa	8	0.99±0.12	1.42±0.10
Model	8	10.00±1.14**	9.03±0.67**
Moxa	8	4.58±1.06##	2.96±0.49##

注: Masson 为马松染色, Sirius Red 为天狼猩红染色, CVF 为胶原容积分数。Sham 为假手术组, Sham+Moxa 为假手术+艾灸组, Model 为模型组, Moxa 为艾灸组。与 Sham 相比, ** $P<0.01$; 与 Model 相比, ## $P<0.01$ 。

2.2 对小鼠肾组织 α -SMA、Col I 表达的影响 免疫组织化学法结果显示, 与 Sham 组相比, Sham+Moxa 组小鼠肾组织 α -SMA、Col I 阳性表达差异无统计学意义($P>0.05$), Model 组肾小管间质 α -SMA、Col I 阳性表达明显增加($P<0.01$); 与 Model 组相比, Moxa 组 α -SMA、Col I 阳性表达明显减少($P<0.01$)。以上结果表明, 单独给予艾灸对正常肾组织无毒性作用, 不增加 α -SMA、Col I 阳性表达; 而艾灸可延缓 TIF 进展。见图 3、表 3。



注: α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白, Col I 为 I 型胶原蛋白。Sham 为假手术组, Sham+Moxa 为假手术+艾灸组, Model 为模型组, Moxa 为艾灸组, 箭头表示肾小管间质胶原纤维。

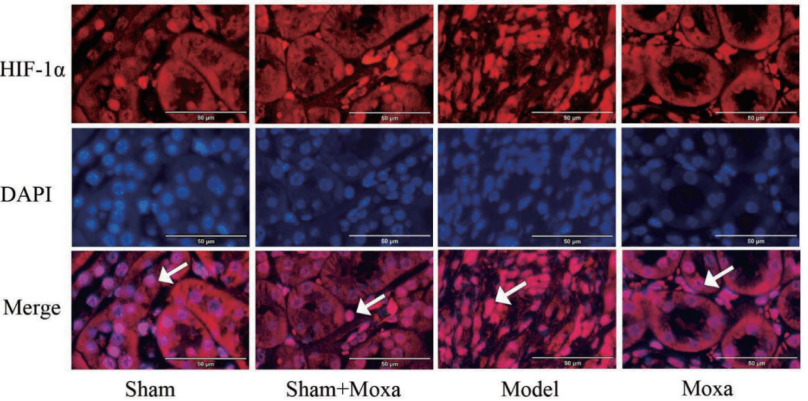
图3 免疫组织化学法检测各组小鼠肾组织 α -SMA、Col I 阳性表达($\times 400$)

表3 各组小鼠肾组织 α -SMA、Col I 阳性表达统计($\bar{x}\pm s$, %)

组别	n	α -SMA	Col I
Sham	6	0.72±0.23	0.63±0.11
Sham+Moxa	8	0.66±0.22	0.60±0.12
Model	8	3.92±0.36**	10.39±0.88**
Moxa	8	1.53±0.33##	3.28±0.37##

注: α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白, Col I 为 I 型胶原蛋白。Sham 为假手术组, Sham+Moxa 为假手术+艾灸组, Model 为模型组, Moxa 为艾灸组。与 Sham 相比, ** $P<0.01$; 与 Model 相比, ## $P<0.01$ 。

2.3 对小鼠肾组织 HIF-1 α 阳性表达的影响 免疫荧光法结果显示, 与 Sham 组相比, Sham+Moxa 组小鼠肾组织 HIF-1 α 阳性表达差异无统计学意义($P>0.05$), Model 组肾小管 HIF-1 α 阳性表达增加($P<0.01$); 与 Model 组相比, 艾灸能减少 HIF-1 α 阳性表达($P<0.01$)。以上结果表明, 单独给予艾灸对正常肾组织无毒性作用, 不增加肾组织 HIF-1 α 阳性表达; 而艾灸能改善肾小管间质缺氧损伤。见图 4、表 4。



注: HIF-1 α 为肾小管缺氧诱导因子-1 α , DAPI 为 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶, Merge 为融合图。Sham 为假手术组, Sham+Moxa 为假手术+艾灸组, Model 为模型组, Moxa 为艾灸组, 箭头表示阳性表达。

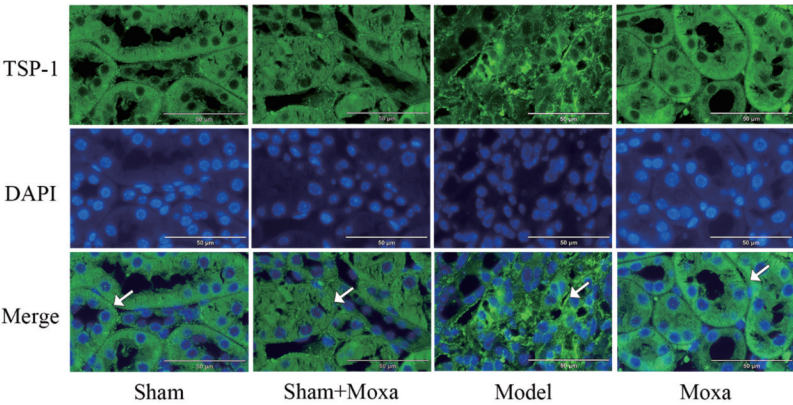
图4 免疫荧光法检测各组小鼠肾组织 HIF-1 α 表达($\times 400$)

表 4 各组小鼠肾组织 HIF-1α 阳性表达面积统计
($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	HIF-1α
Sham	6	8.82±1.33
Sham+Moxa	8	7.61±1.01
Model	8	21.65±1.99**
Moxa	8	12.41±0.52##

注: HIF-1α 为肾小管缺氧诱导因子-1α。Sham 为假手术组, Sham+Moxa 为假手术+艾灸组, Model 为模型组, Moxa 为艾灸组。与 Sham 相比, ** $P<0.01$; 与 Model 相比, ## $P<0.01$ 。

2.4 对小鼠肾组织 TSP-1 阳性表达的影响 免疫荧光结果显示, 与 Sham 组比较, Sham+Moxa 组小鼠肾组织 TSP-1 阳性表达差异无统计学意义($P>0.05$), Model 组 TSP-1 阳性表达增加($P<0.01$); 与 Model 组比较, Moxa 组 TSP-1 阳性表达减少($P<0.01$)。以上结果表明, 单独给予艾灸对正常肾脏无毒性作用, 不增加肾组织 TSP-1 阳性表达; 而艾灸能改善肾小管内皮细胞缺血缺氧。见图 5、表 5。



注: TSP-1 为血小板反应蛋白-1, DAPI 为 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶, Merge 为融合图。Sham 为假手术组, Sham+Moxa 为假手术+艾灸组, Model 为模型组, Moxa 为艾灸组, 箭头表示阳性表达。

图 5 免疫荧光法检测各组小鼠肾组织 TSP-1 表达($\times 400$)

表 5 各组小鼠肾组织免疫荧光 TSP-1 阳性表达面
积统计($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	TSP-1
Sham	6	3.99±0.62
Sham+Moxa	8	3.66±0.96
Model	8	12.21±1.24**
Moxa	8	7.37±2.66##

注: TSP-1 为血小板反应蛋白-1。Sham 为假手术组, Sham+Moxa 为假手术+艾灸组, Model 为模型组, Moxa 为艾灸组。与 Sham 相比, ** $P<0.01$; 与 Model 相比, ## $P<0.01$ 。

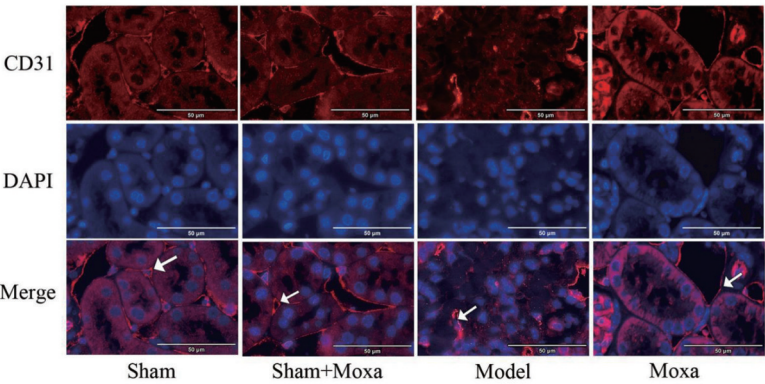
2.5 对小鼠肾组织 CD31 阳性表达的影响 免疫荧光法结果显示, 与 Sham 组比较, Sham+Moxa 组小鼠肾组织 CD31 阳性表达差异无统计学意义($P>0.05$), Model 组 PTC 内皮细胞中 CD31 阳性表达减少($P<0.01$); 与 Model 组相比, Moxa 组 CD31 阳性表达增加($P<0.01$)。以上结果表明, 单独给予艾灸对正常肾组织无毒性作用, 不减少肾组织 CD31 阳性表达; 而艾灸能改善 PTC 内皮细胞损伤。见图 6、表 6。

表 6 各组小鼠肾组织 CD31 阳性表达/组织面积统
计($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	CD31
Sham	6	9.88±1.17
Sham+Moxa	8	10.71±0.40
Model	8	4.41±0.78**
Moxa	8	8.43±0.51##

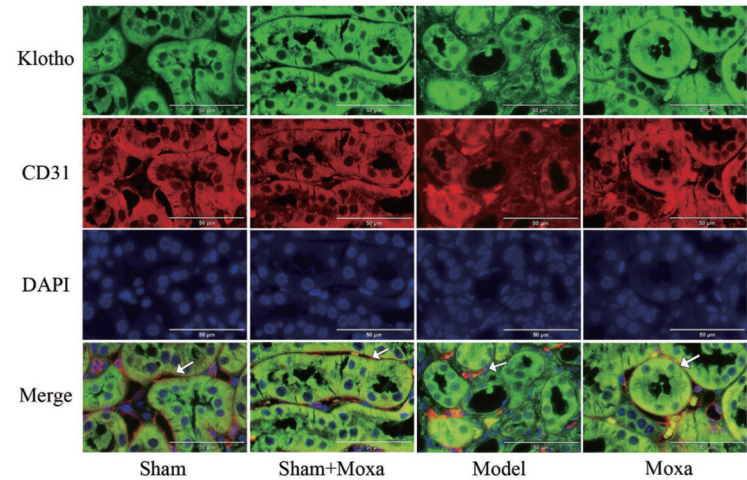
注: CD31 为血小板内皮细胞黏附分子-1。Sham 为假手术组, Sham+Moxa 为假手术+艾灸组, Model 为模型组, Moxa 为艾灸组。与 Sham 相比, ** $P<0.01$; 与 Model 相比, ## $P<0.01$ 。

2.6 对小鼠肾组织 Klotho/CD31 表达的影响 免疫荧光结果显示, 与 Sham 组比较, Sham+Moxa 组小鼠肾组织 Klotho/CD31 阳性表达差异无统计学意义($P>0.05$), Model 组 PTC 内皮细胞 Klotho/CD31 阳性表达减少($P<0.01$); 与 Model 组比较, Moxa 组 Klotho/CD31 阳性表达增加($P<0.01$)。以上结果表明, 单独给予艾灸对正常肾组织无毒性作用, 不减少 Klotho/CD31 阳性表达; 而艾灸能提高 PTC 内皮细胞 Klotho 阳性表达。见图 7、表 7。



注:CD31 为血小板内皮细胞黏附分子-1,DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吲哚,Merge 为融合图。Sham 为假手术组,Sham+Moxa 为假手术+艾灸组,Model 为模型组,Moxa 为艾灸组,箭头表示肾小管周围毛细血管。

图6 免疫荧光法检测各组小鼠肾组织 CD31 阳性表达(×400)



注:Klotho 为延缓衰老蛋白 Klotho,CD31 为血小板内皮细胞黏附分子-1,DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吲哚,Merge 为融合图;Sham 为假手术组,Sham+Moxa 为假手术+艾灸组,Model 为模型组,Moxa 为艾灸组,箭头表示阳性表达。

图7 免疫荧光法检测各组小鼠肾组织 Klotho/CD31 表达(×400)

表7 各组小鼠肾组织 Klotho/CD31 阳性表达/组织面积统计($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Klotho/CD31
Sham	6	2.71±0.30
Sham+Moxa	8	2.97±0.23
Model	8	1.12±0.24**
Moxa	8	2.25±0.26##

注:Klotho 为延缓衰老蛋白 Klotho,CD31 为血小板内皮细胞黏附分子-1;Sham 为假手术组,Sham+Moxa 为假手术+艾灸组,Model 为模型组,Moxa 为艾灸组。与 Sham 相比,** $P<0.01$;与 Model 相比,## $P<0.01$ 。

2.7 对小鼠 *Cebpd*、*Snail1* mRNA 表达的影响

RT-qPCR 结果显示,与 Sham 组相比,Sham+Moxa 组小鼠 *Cebpd* 和 *Snail1* mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$),Model 组肾组织 *Cebpd* 和 *Snail1* mRNA 表达水平升高($P<0.01$);与 Model 组

相比,Moxa 组 *Snail1*、*Cebpd* mRNA 表达水平降低($P<0.01$)。以上结果表明,单独给予艾灸不增加 *Cebpd* 和 *Snail1* mRNA 表达水平;而艾灸能降低肾组织纤维化因子 *Snail1*、*Cebpd* mRNA 表达。见表 8。

表8 各组小鼠 *Cebpd*、*Snail1* mRNA 表达结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	<i>Cebpd</i>	<i>Snail1</i>
Sham	6	0.32±0.10	0.30±0.01
Sham+Moxa	8	0.25±0.05	0.29±0.09
Model	8	5.78±1.87**	4.37±0.99**
Moxa	8	1.65±0.25##	1.32±0.34##

注:*Snail1* 为蜗牛家族转录抑制因子 1 基因,*Cebpd* 为 CCAAT 增强子结合蛋白 delta 基因。Sham 为假手术组,Sham+Moxa 为假手术+艾灸组,Model 为模型组,Moxa 为艾灸组。与 Sham 相比,** $P<0.01$;与 Model 相比,## $P<0.01$ 。

3 讨论

3.1 肾小管周围毛细血管内皮细胞损伤是 TIF 发生发展的关键病理过程 TIF 是肾小管及其间质损伤再修复的过程,以细胞外基质(ECM)过度生成与沉积为特征,进一步导致肾小管间质瘢痕形成、肾实质减少和功能丧失。目前研究认为,TIF 的发生发展涉及多种细胞及分子途径,其中肾小管上皮细胞因对大量液体的广泛重吸收及高效酶促反应需求对损伤尤为敏感,被认为是介导 TIF 的关键靶细胞^[11-12]。肾组织炎性介质、细胞因子、大分子蛋白、脂质过氧化与肾小管酸碱平衡紊乱、补体系统活化、缺血缺氧、间质性肾炎等均可诱导肾小管上皮细胞损伤,导致代谢物异常积累、细胞表观遗传修饰变化和纤维化信号激活,通过上皮间充质转化(EMT)诱导成纤维细胞表达 α -SMA 转分化为肌成纤维细胞,进而重组肌动蛋白细胞骨架,生成并沉积 Col I 等 ECM 导致 TIF 发生发展^[13-14]。PTC 损伤导致肾小管缺血缺氧是 TIF 发生发展的关键病理因素,PTC 作为肾血管系统下游的最细小分支,在生理状态下维持正常的肾血液灌注,保证肾小管供血供氧,从而发挥重吸收和分泌功能,是 CKD 患者终末期肾病进展的强预测因子^[15-17]。TIF 早期就出现内皮细胞缺氧与胞质增厚、管腔窗孔结构丢失,引起炎症细胞黏附及血小板聚集,使毛细血管变窄、稀疏与血液灌注减少,加重肾小管缺血缺氧^[18-19]。本研究也发现,在 UUO 法复制的 TIF 小鼠中,造模结扎 24 h 后即出现内皮细胞胞质增厚、毛细血管窗孔数量减少与稀疏,造模第 5 天进展为肾小管萎缩与 ECM 沉积,提示 TIF 形成。因此,内皮细胞损伤导致的 PTC 病变是 TIF 发生发展的重要始动因素^[20]。

3.2 艾灸促进 PTC 内皮细胞 Klotho 表达、延缓肾小管上皮细胞缺血缺氧抑制 TIF 本研究采用 UUO 法建立经典 TIF 小鼠模型,首先,通过 HE、Sirius Red、Masson 染色观察小鼠肾组织整体形态、基底膜、胶原纤维及肾小管基底膜等的 ECM,通过免疫组织化学法观察肾小管间质肌成纤维细胞标志物 α -SMA 和主要胶原 Col I 的阳性表达,发现艾灸可显著减轻 UUO 模型小鼠肾组织肾小管萎缩及管腔狭窄,减少 ECM 增生沉积与胶原纤维,显著降低肾小管间质 α -SMA 和 Col I 阳性表达面积,初步证明艾灸能抑制肌成纤维细胞的活化、增殖及 ECM 的过度沉积,有效延缓 TIF 进展。

其次,我们在前期艾灸延缓肾小球硬化的研

究^[7]基础上,为探究艾灸延缓 TIF 效应的内在分子机制,进一步优化了艾灸方案,确立同时艾灸双侧“肾俞”“膈俞”、每次 30 min 的方案效果最佳^[7-8,21-22]。PTC 内皮细胞损伤作为 TIF 的关键病理过程,其中,HIF-1 α 是细胞应对缺氧的核心转录因子,其持续高表达是 TIF 的关键始动因素。HIF-1 α 作为 TSP-1 的上游诱导剂,且 HIF-1 α /TSP-1 轴作为一种内源性血管生成抑制因素,可抑制 PTC 血管新生,通过激活转化生长因子- β (TGF- β)导致肾小管上皮细胞钙黏蛋白表达下降,引发肌动蛋白细胞骨架重排,使肾小管上皮细胞黏附力减弱^[23-24],进而引发上皮细胞转分化为肌成纤维细胞,过度分泌胶原蛋白,导致 ECM 大量沉积、TIF 形成^[25]。本研究结果表明,艾灸 UUO 模型小鼠双侧“肾俞”“膈俞”穴可抑制 HIF-1 α /TSP-1 轴,可能会改善肾小管上皮细胞缺血缺氧,延缓 TIF 发生发展。

最后,我们为进一步探究艾灸延缓肾小管上皮细胞缺血缺氧的机制,前期发现延缓衰老因子 Klotho 可能是保护 PTC、改善肾小管上皮细胞缺血缺氧及 TIF 的关键靶点。Klotho 是 1997 年 Makoto Kuro-O 教授发现的延缓衰老基因,2019 年其进一步提出 Klotho 缺乏导致的血管病变与 CKD 的发生发展密切相关^[16,26]。人体中 Klotho 在肾脏中表达最高,主要分布于肾小管上皮细胞与血管内皮细胞,这两种细胞 Klotho 表达都会诱发 TIF 的发生^[16,27]。临床研究^[26]也发现 CKD 患者外周血中 Klotho 水平降低和尿液中 Klotho 水平升高。我们发现用腺相关病毒回补延缓衰老蛋白 Klotho 可改善 Klotho 基因缺陷小鼠 PTC 稀疏程度^[17]。CD31 作为内皮细胞标志物参与血管新生过程^[15,28]。Snail1 属锌指转录因子 Snail 超家族成员,可同时在 PTC 内皮细胞与肾小管上皮细胞中表达,抑制内皮细胞新生与上皮细胞 E-钙黏附素基因表达,促进肾小管上皮细胞 TGF- β 表达、上调成纤维细胞 α -SMA 表达,是调控 EMT 的一个关键因子^[29]。肾小管上皮细胞 Cebpd 蛋白可加重活性氧(ROS)积累和细胞缺氧凋亡从而促进 TIF^[30]。本研究采用免疫荧光法用 CD31 标记血管,结果发现艾灸可显著提高 PTC 内皮细胞 Klotho 表达,降低肾组织纤维化因子 *Snail1*、*Cebpd* mRNA 表达,提示艾灸可能促进 PTC 保护性因子 Klotho 及 CD31 的表达,显著改善 PTC 损伤,改善肾小管上皮细胞缺血缺氧,延缓 TIF 进展。

3.3 艾灸扶正通络延缓 TIF 效应机制初探 艾灸作

为重要中医外治法之一,其延缓 TIF 的中医学内涵值得探究。艾灸用的艾叶本身具有温阳、活血通络的作用,《本草求真》言其“专入肝脾,兼入肾”;加之所选“肾俞”为肾脏背俞穴,“膈俞”为一身之血会,是调节血运的重要枢机,故而艾灸此二穴,正是通过其温通之力与穴位特异性,发挥“扶正通络”之效,从改善肾脏整体气血灌注与微循环的角度干预疾病,体现了中医“辨证论治”与“经络穴位”理论指导下的治疗奥义。本研究发现艾灸扶正通络可促进 PTC 内皮细胞延缓衰老蛋白 Klotho 表达,抑制 HIF-1 α /TSP-1 轴及其下游促纤维化转录因子 Snail1、Cebpd 的表达,改善肾脏微循环,缓解组织缺氧,抑制 α -SMA 和 Col I 表达而延缓 TIF;上述提示艾灸可能主要作用于肾脏微血管系统,通过改善 PTC 内皮细胞功能与局部微环境,缓解肾小管上皮细胞的缺血缺氧损伤,为艾灸扶正通络治疗肾脏疾病提供新的现代研究角度。在机制探讨层面,本研究基于艾灸扶正通络作用,聚焦艾灸对 PTC 的保护作用,初步阐明艾灸可促进 PTC 内皮细胞 Klotho 表达,保护 PTC、改善肾组织缺血缺氧、延缓 TIF 进程。本研究属于现象描述与机制初步探索,目前尚未开展多组学与相关细胞实验;且 Klotho 主要表达于肾小管上皮细胞中,其是否为艾灸干预的另一条重要通路尚未进行进一步探索。未来研究将结合多组学与流式细胞等实验技术,在特定细胞水平上对关键分子的表达变化进行精确定位与验证,并在肾纤维化微循环中探究艾灸的系统性调控机制,以期更深入地揭示艾灸抗肾纤维化的细胞特异性机制。

总之,本研究揭示了艾灸扶正通络法延缓 TIF 的作用机制。艾灸通过上调 PTC 内皮细胞 Klotho 表达,抑制 HIF-1 α /TSP-1 轴及其下游促纤维化转录因子 Snail1、Cebpd 的活化,从而改善肾脏微循环、缓解组织缺氧,减少 α -SMA 及 Col I 沉积,最终延缓 TIF 进程。本研究验证了艾灸通过“激活 Klotho-改善微循环缺氧-抑制纤维化信号”的联动机制保护肾脏微血管系统的机制,为艾灸扶正通络治疗 CKD 提供了微血管生物学层面的实验依据。

参考文献:

- [1] WU L, LIN H, LI S, et al. Macrophage iron dyshomeostasis promotes aging-related renal fibrosis [J]. *Aging Cell*, 2024, 23 (11): e14275.
- [2] KLINKHAMMER B M, BOOR P. Kidney fibrosis: Emerging diagnostic and therapeutic strategies [J]. *Mol Aspects Med*, 2023, 93: 101206.
- [3] RUIZ-ORTEGA M, LAMAS S, ORTIZ A. Antifibrotic agents for the management of CKD: A review [J]. *Am J Kidney Dis*, 2022, 80(2): 251-263.
- [4] 李莲花, 张佩青. 张琪教授调理肾脏阴阳治疗慢性肾脏病的经验 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2018, 19(6): 476-477.
- [5] 詹艳红, 徐卫东, 皮持衡. 国医大师皮持衡辨治慢性肾衰竭经验总结 [J]. *江西中医药大学学报*, 2024, 36(2): 36-38.
- [6] 蔡之幸, 王阳, 李丽, 等. 健脾清化方对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织纤维化的干预作用 [J]. *中成药*, 2022, 44(4): 1307-1310.
- [7] LI Y, SUN Y, ZHANG C, et al. Moxibustion alleviates injury in a rat focal segmental glomerulosclerosis model [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 7169547.
- [8] 余曙光, 徐斌. 实验针灸学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 285-286.
- [9] 孙玉霞, 黄迪, 马家怡, 等. 灸药结合对慢性肾功能衰竭大鼠肾纤维化的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2015, 29(6): 64-69.
- [10] 孙玉霞, 李林, 张春伶, 等. 艾灸对局灶节段性肾小球硬化大鼠肾脏病理的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(9): 1114-1118.
- [11] HUANG R, FU P, MA L. Kidney fibrosis: From mechanisms to therapeutic medicines [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8 (1): 129.
- [12] DOKE T, ABEDINI A, ALDRIDGE D L, et al. Single-cell analysis identifies the interaction of altered renal tubules with basophils orchestrating kidney fibrosis [J]. *Nat Immunol*, 2022, 23(6): 947-959.
- [13] GRAMPP S, KRÜGER R, LAUER V, et al. Hypoxia hits APOL1 in the kidney [J]. *Kidney Int*, 2023, 104(1): 53-60.
- [14] KIM T, SURAPANENI A L, SCHMIDT I M, et al. Plasma proteins associated with chronic histopathologic lesions on kidney biopsy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2024, 35(7): 910-922.
- [15] PENG K, XIE W, WANG T, et al. HIF-1 α promotes kidney organoid vascularization and applications in disease modeling [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 336.
- [16] SHI M, MAIQUE J, CLEAVER O, et al. VEGFR2 insufficiency enhances phosphotoxicity and undermines Klotho's protection against peritubular capillary rarefaction and kidney fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2023, 324(1): F106-F123.
- [17] LUO L, GUO J, LI Y, et al. Klotho promotes AMPK activity and maintains renal vascular integrity by regulating the YAP signaling pathway [J]. *Int J Med Sci*, 2023, 20(2): 194-205.
- [18] ZHANG J Q, LI Y Y, ZHANG X Y, et al. Cellular senescence of renal tubular epithelial cells in renal fibrosis [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1085605.
- [19] GAUPP C, SCHMID B, TRIPAL P, et al. Reconfiguration and loss of peritubular capillaries in chronic kidney disease [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 19660.
- [20] LOCATELLI M, ZOJA C, ZANCHI C, et al. Endothelial

- glycocalyx of peritubular capillaries in experimental diabetic nephropathy: a target of ACE inhibitor-induced kidney microvascular protection [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (22) : 16543.
- [21] 张春伶, 孙玉霞, 李林, 等. 基于血管内皮生长因子及其受体途径的局灶节段性肾小球硬化大鼠的艾灸干预随机对照实验 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(2): 777-781.
- [22] 李林, 孙玉霞, 马家怡, 等. 不同取穴不同灸时温和灸对局灶硬化性肾炎大鼠肾功能的影响 [J]. *针刺研究*, 2016, 41(6) : 521-527.
- [23] FU T, SULLIVAN D P, GONZALEZ A M, et al. Mechanotransduction via endothelial adhesion molecule CD31 initiates transmigration and reveals a role for VEGFR2 in diapedesis [J]. *Immunity*, 2023, 56(10): 2311-2324.
- [24] ZHU X, WANG Y, SOAITA I, et al. Acetate controls endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Cell Metab*, 2023, 35 (7): 1163-1178.
- [25] NJEIM R, BRAYCH K, GHADIEH H E, et al. VEGF-A: A novel mechanistic link between CYP2C-derived EETs and Nox4 in diabetic kidney disease [J]. *Diabetes*, 2023, 72(7) : 947-957.
- [26] EDMONSON D, GRABNER A, WOLF M. FGF23 and Klotho at the intersection of kidney and cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2024, 21(1) : 11-24.
- [27] LI S S, SHENG M J, SUN Z Y, et al. Upstream and downstream regulators of Klotho expression in chronic kidney disease [J]. *Metabolism*, 2023, 142: 155530.
- [28] LIU J, ZHENG B, CUI Q, et al. Single-cell spatial transcriptomics unveils platelet-fueled cycling macrophages for kidney fibrosis [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(29) : e2308505.
- [29] ZHAO X, HE X, WEI W, et al. USP22 aggravated diabetic renal tubulointerstitial fibrosis progression through deubiquitinating and stabilizing Snail1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 947: 175671.
- [30] CHANG S S, CHENG C C, CHEN Y R, et al. Epithelial CEBPD activates fibronectin and enhances macrophage adhesion in renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10 (1): 328.
- 编辑:杨铁舜
- 收稿日期:2025-12-11

编辑:杨轶舜

收稿日期:2025-12-11

(上接第46页)

之,此种辨证思路并不限于奔豚气病。《金匮要略》中所载诸多杂病,以及晋唐典籍中方证纷呈的内伤杂病,皆可依其病位深浅、寒热转化与正邪盛衰,类比如《伤寒论》《金匮要略》组方特征,纳入六经九分法之框架加以统摄与重构。由此可见,六经九分法不仅有助于深化对奔豚气病证治规律的认识,亦为重审《金匮要略》杂病及传统杂病辨治提供了一种具有普遍适用性的理论工具,体现出其在杂病治疗体系中的方法论价值与实践意义。

参考文献:

- [1] 张再良. 六经九分法概述(一)——六经九分法的来龙去脉[J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(9): 47-50.
- [2] 孔繁鑫, 虢周科. 小议《金匮要略》之奔豚病[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5): 1243-1244.
- [3] 刘向亮, 张喜莲, 马融. 再论奔豚疑似病[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(4): 1146-1147.
- [4] 徐凤凯, 陈晓. 奔豚病脉证治探析[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(12): 5829-5831.

- [5] 丁德正. 试析奔豚及其治疗[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(11): 1301-1302, 1316.
- [6] 于莉英, 王旭东, 虞舜, 等. 《金匮要略》载误治后发作奔豚病的方证分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2203-2204.
- [7] 李景荣, 苏礼. 备急千金要方校释[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [8] 沈澍农. 肘后备急方校注[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 121.
- [9] 王焘. 外台秘要方[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011.
- [10] 丹波康赖. 医心方: 上[M]. 北京: 华龄出版社, 2020: 349.
- [11] 陆渊雷. 金匮要略今释[M]. 北京: 学苑出版社, 2008: 142-147.
- [12] 浅田宗伯. 杂病翼方: 一[M]. 广岛: 松崎印刷株式会社, 1969: 117-121.
- [13] 何廉臣. 增订通俗伤寒论[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2004: 26-37.
- [14] 神农氏. 神农本草经[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997: 48.
- [15] 强健. 伤寒直指[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 457.
- [16] 吴谦. 医宗金鉴·中册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 785.

编辑:张立艳

收稿日期:2026-01-08