

实验研究

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20251229003

抗纤灵方调控 Nrf2/GPX4 通路改善慢性肾脏病肾纤维化的机制

姚卫国¹, 张漫影², 何立群³, 严湘磊¹, 刘 琨¹, 吉 晶²

1. 上海市第六人民医院金山分院肾病科(上海 201500); 2. 上海中医药大学附属市中医医院急诊科(上海 200040); 3. 上海中医药大学附属曙光医院肾病科(上海 200021)

【摘要】 目的 研究抗纤灵方(KXL)对 5/6 肾切除大鼠及爱拉斯汀(Erastin)诱导的人近端肾小管上皮细胞(HK-2)的保护作用。**方法** ①体内实验:采用 SPF 级雄性 SD 大鼠构建 5/6 肾切除模型,造模成功后将大鼠分为假手术组,模型组,抗纤灵方低、高剂量(KXL-L、KXL-H)组及铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1(Fer-1)组。其中 KXL-L、KXL-H 组每天分别以 10.5 g/kg KXL、21 g/kg KXL 灌胃,假手术组和模型组大鼠每天以等体积 0.9% 氯化钠溶液灌胃, Fer-1 组每天以 1 mg/kg 剂量 Fer-1 腹腔注射 1 次,共干预 6 周。干预结束后,检测大鼠肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)水平,收集大鼠 24 h 尿液检测 24 h 尿蛋白(24 h-UPro),检测大鼠肾组织亚铁离子(Fe^{2+})水平。HE 染色、马松(Masson)染色观察肾组织病变及纤维化程度。免疫荧光检测核转录因子红系 2 相关因子 2(Nrf2)及谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)蛋白表达。②体外实验:噻唑蓝(MTT)法测细胞活力,选出最佳 KXL 浓度。HK-2 细胞分为正常组、Erastin 组、Erastin+KXL 组、Erastin+Fer-1 组。检测各组谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、 Fe^{2+} 水平。Western blot 法检测各组 I 型胶原蛋白(Col-I)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、Nrf2、GPX4 蛋白表达。**结果** ①体内实验:与模型组相比,KXL-L、KXL-H 组 SCr、BUN、24 h-UPro 及 Fe^{2+} 水平降低,Nrf2、GPX4 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。②体外实验:与 Erastin 组相比,Erastin+KXL 组 Nrf2、GPX4 蛋白表达水平升高,Col-I、 α -SMA 蛋白表达水平降低,MDA、 Fe^{2+} 水平降低,GSH 水平升高($P<0.01$)。Fer-1 的作用效果与 KXL 一致。**结论** KXL 减轻肾纤维化,可能与调控 Nrf2/GPX4 信号通路抑制铁死亡有关。

【关键词】 慢性肾脏病;抗纤灵方;肾纤维化;铁死亡;Nrf2/GPX4 通路;大鼠模型;中药研究

Mechanism of Kangxianling Formula in improving renal fibrosis of chronic kidney disease through Nrf2/GPX4 pathway

Yao Weiguo¹, Zhang Manying², He Liqun³, Yan Xianglei¹, Liu Kun¹, Ji Jing²

1. Department of Nephrology, Jinshan Branch of Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 201500, China; 2. Department of Emergency, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200040, China; 3. Department of Nephrology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of Kangxianling Formula (KXL) on 5/6 nephrectomized rats and Erastin-induced

human renal tubular epithelial (HK-2) cells. **Methods** ① *In vivo* experiment: A 5/6 nephrectomy model was established using male SPF-grade SD rats. Successfully modeled rats were randomly assigned into five groups: sham, model, low-dose KXL, high-dose KXL, and Ferrostatin-1 (Fer-1). The KXL low-dose and high-dose groups received 10.5 g/kg or 21 g/kg of KXL via oral gavage, respectively; the sham and model groups received equal volumes of 0.9% sodium chloride solution; the Fer-1 group

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82405251);上海市金山区第七周期医学重点专科建设项目(JSZK2023H04);上海区级综合(专科)医院中西医结合专科能力提升项目(QJZXJK-202408)

[作者简介] 姚卫国,男,副主任医师,主要从事中医药防治慢性肾脏疾病的研究工作

[通信作者] 吉晶,主治医师;E-mail: jj664758895@qq.com

received 1 mg/kg of Fer-1 via daily intraperitoneal injection. After 6 weeks, serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), and 24-hour urinary protein (24 h-UPro) were measured. Ferrous ion (Fe^{2+}) levels in renal tissues were assessed. HE and Masson staining were used to observe pathological changes and the degree fibrosis of kidney tissue. Protein expressions of nuclear factor-related factor 2 (Nrf2) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were detected by immunofluorescence. ② *In vitro* experiment: Cell viability was measured by MTT assay to determine the optimal KXL concentration. HK-2 cells were divided into Normal, Erastin, Erastin+KXL, and Erastin+Fer-1 groups. Levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and Fe^{2+} were measured. Protein expressions of collagen I (Col-I), α -smooth muscle actin (α -SMA), Nrf2, and GPX4 were detected via Western blot. **Results** ① *In vivo* experiment: Compared with the model group, KXL significantly reduced SCr, BUN, 24 h-UPro, and Fe^{2+} levels, while increasing the protein expression of Nrf2 and GPX4 ($P < 0.01$). ② *In vitro* experiment: Compared with the erastin group, the erastin+KXL group exhibited increased Nrf2 and GPX4 expression and decreased Col-I and α -SMA expression. Furthermore, KXL treatment reduced MDA and Fe^{2+} levels and increased GSH level ($P < 0.01$). The effects of Fer-1 were consistent with those of KXL. **Conclusion** KXL alleviates renal fibrosis, potentially by inhibiting ferroptosis through the regulation of the Nrf2/GPX4 signaling pathway.

Keywords: chronic kidney disease; Kangxianling Formula; renal fibrosis; ferroptosis; nuclear factor-related factor 2/glutathione peroxidase pathway; rat model; Chinese materia medica research

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 是一种以肾脏结构损伤和功能障碍为主要特征的慢性疾病^[1]。肾纤维化 (renal fibrosis, RF) 的特征为肾小球硬化、肾小管萎缩以及肾脏间质纤维化。铁代谢异常在 RF 的机制中主要涉及铁稳态失衡、铁死亡诱导及促纤维化信号激活 3 个层面。转铁蛋白受体 (TFR1) 表达水平升高, 铁摄入增加; 5/6 肾切除 CKD 模型中, 铁转运蛋白 (FPN) 表达水平下降, 铁输出, 导致肾组织铁沉积; 细胞内不稳定铁池 (LIP) 显著增加, 为后续氧化反应提供催化底物^[2]。亚铁离子 (Fe^{2+}) 与过氧化氢 (H_2O_2) 反应生成高活性的羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 引发脂质、蛋白质和二十二碳六烯酸 (DHA) 的氧化损伤。多不饱和脂肪酸 (PUFA) 被氧化生成脂质氢过氧化物 (PUFA-OOH), 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 失活, 无法清除 PUFA-OOH。肾小管上皮细胞 (TECs) 发生铁死亡, 通过旁分泌机制释放多种促纤维化因子 [如转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 等]^[3]。成纤维细胞被激活成肌成纤维细胞, 巨噬细胞浸润加剧炎症反应, 两者共同促进胶原蛋白等细胞外基质过度沉积, 最终导致肾脏间质结构破坏, 肾脏功能丧失^[4]。

GPX4/谷胱甘肽 (GSH) 轴是铁死亡的核心靶点体系, 作为抗氧化防御系统, 抑制铁死亡。GPX4 是铁死亡最关键的负调控因子, 利用 GSH 将磷脂氢过氧化物 (L-OOH) 还原为无毒的磷脂醇 (L-OH), 阻断脂质过氧化链式反应。GSH 是 GPX4 发挥抗氧化功能的唯一底物, 其耗竭直接导致 GPX4 失活, 脂质过氧化失控, TECs 铁死亡则肾纤维化进展^[5]。抗氧化应激主开关核转录因子红系 2 相关因子 2 (Nrf2) 的

转录激活抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 减轻铁死亡^[6-7]。Nrf2 在糖尿病肾病、急性肾损伤等多种肾脏疾病中发挥重要作用^[8]。上海市名中医何立群教授基于多年临床经验, 针对 CKD 3~4 期患者“气虚血瘀、肾络瘀阻”的特点开发了益气活血、祛瘀通络的抗纤灵方 (KXL), 早期研究^[9-10]结果显示, 其可有效降低 CKD 患者的蛋白尿水平并延缓肾功能衰退, 但作用机制还需要进一步探究。因此, 本研究将从体内外探索 KXL 对 CKD 大鼠及人近端肾小管上皮细胞 (HK-2) 中 Nrf2/GPX4 信号通路的影响, 深入了解其延缓 CKD 的作用机制, 为临床转化与应用奠定更坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只, 6 周龄, 体质量 (200 ± 20) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司。动物生产许可证号: SCXK (沪) 2022-0004。动物使用合格证号: 20220004083357。适应性饲养 1 周后开始实验, 室内温度 $22 \sim 24^\circ\text{C}$, 每日 12 h/12 h 明暗交替, 早 7 点至晚 7 点予以光照, 大鼠自由进食。本实验方案获得上海中医药大学附属上海市中医医院伦理委员会审批通过 (伦理审批号: 2024142)。

HK-2 细胞, 湖南丰晖生物科技有限公司。

1.1.2 药物与试剂 KXL 药物组成: 丹参 15 g (河南, 批号: 16022001); 制大黄 9 g (河南, 批号: 16016114); 桃仁 12 g (云南, 批号: 160132021); 当归 12 g (甘肃, 批号: 160212135); 怀牛膝 15 g (河南, 批

号:160215126)。所有药物由上海中医药大学附属上海市中医医院中药房提供。将以上药物混匀后加入 10 倍蒸馏水浸泡 30 min,大火煮沸后保持微沸 30 min,倒出头煎液,再加 8 倍蒸馏水同法煎煮 30 min;两次煎出的药液合并浓缩至 100 mL,用冻干机处理成冻干粉;用完整培养基配制成 10 g/L 浓度,完全溶解后过滤分装保存于-80℃冰箱备用。

舒泰(Zoletil) 50(批号:3380220977),法国 Virbac 有限公司;铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1(Fer-1,批号:HY-100579)、爱拉斯汀(Erastin,批号:HY-15763),美国 MCE 公司;蛋白上样缓冲液(批号:G2075)、蛋白酶抑制剂(批号:G2006)、苯甲基磺酰氟(PMSF,批号:G2008)、放射免疫沉淀分析法(RIPA)裂解液(批号:G2002)、最低必需培养基(MEM,批号:G4556)、胎牛血清(FBS,批号:G8002)、胰酶(批号:G4001)、噻唑蓝(MTT)试剂盒(批号:G4101)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒(批号:G2037)、电泳液(批号:G2149)、转膜液(批号:G2173)、脱脂奶粉(批号:GC310001)、蛋白分子量标准(Marker,批号:G2091)、超敏增强化学发光(ECL)试剂检测盒(批号:G2161)、含吐温-20 的三羟甲基氨基甲烷(TBST)缓冲液(批号:G0004)、牛血清白蛋白(BSA,批号:GC305006)、亚铁离子(Fe^{2+})含量测定试剂盒(批号:G4323)、抗荧光淬灭封片剂(批号:G1407)、I 型胶原蛋白(Col-I,批号:GB-11022,1:1 000)、Nrf2(批号:GB113808,1:1 000)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA,批号:GB111364,1:1 000)、GPX4(批号:GB115275,1:1 000)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,批号:GB15004,1:5 000)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(免疫球蛋白 G,批号:GB3303,1:5 000)、Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG(批号:GB28301,1:400),武汉塞维尔生物科技有限公司;HE 染色试剂盒(批号:C0105S)、马松(Masson)染色试剂盒(批号:C0189S)、普鲁士蓝(Prussian Blue)染色试剂盒(批号:C0127S)、二辛可酸(BCA)定量试剂盒(批号:P0009),上海碧云天生物技术股份有限公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(批号:IPVH00010),美国 Millipore 公司;血肌酐(SCr)试剂盒(批号:C011-2-1)、血尿素氮(BUN)试剂盒(批号:C013-2-1)、尿蛋白试剂盒(批号:C035-2-1)、GSH 试剂盒(批号:A006-2-1)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号:A003-1-2),南京建成生物研究所。

1.1.3 主要仪器 CO_2 培养箱(型号:CBG-80S),浙江力辰仪器科技有限公司;酶标仪(型号:Synergy 2),美国 BioTek 公司;石蜡切片机(型号:RM2255),德国 Leica 公司;光学显微镜(型号:BH200M),浙江余姚舜宇光学科技有限公司;电泳仪(型号:1658001)、转膜仪(型号:1703935),美国 Bio-Rad 公司;激光共聚焦显微镜(型号:LEXT OLS5100),日本 Olympus 公司;化学发光成像仪(型号:YP-HFG),山东优云谱光电科技有限公司;超速离心机(型号:Optima XPN-100),美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 体内实验

1.2.1 分组与造模 按照 Platt 法建立 CKD 大鼠模型^[11]。50 只 SD 大鼠,分成假手术组 10 只,造模组 40 只。造模组通过手术切除左侧肾脏的 2/3,1 周后再完全切除右侧肾脏,保留约 1/6 肾功能。假手术(Sham)组仅拨开肾区包膜,暴露肾脏,不切除肾脏组织。2 周后大鼠目内眦取血测 SCr,若造模组与 Sham 组存在统计学差异,说明造模成功。将造模成功的大鼠随机分为模型(Model)组、抗纤灵方低剂量(KXL-L)组、抗纤灵方高剂量(KXL-H)组、Fer-1 组,每组 10 只。

1.2.2 干预 按照 60 kg 成人的 10 倍、20 倍换算,KXL-L、KXL-H 组每天分别以 10.5 g/kg KXL、21 g/kg KXL 灌胃。Sham 组和 Model 组大鼠每天以等体积的 0.9% 氯化钠溶液灌胃,Fer-1 组每天以 1 mg/kg 剂量 Fer-1 腹腔注射 1 次,共干预 6 周。干预结束后以 0.1 mg/kg Zoletil 50 麻醉大鼠后取材(取材前 1 天禁食 8 h),腹主动脉取血,4℃条件下,3 000 r/min 离心 15 min 取血清检测肾功能,同时快速解剖取出大鼠左侧残余肾脏,将一半的左肾组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中,石蜡包埋,用于 HE、Masson、Prussian Blue 染色及免疫荧光染色;另一半左肾组织置于冻存管后,扔进液氮罐速冻,待进行 Western blot 检测。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 大鼠一般情况 观察大鼠被毛及精神状态、体质量变化、活动量,这是评估 5/6 肾切除模型成功与否的重要指标。

1.2.3.2 大鼠肾功能及 Fe^{2+} 水平 取大鼠血清检测肾功能(SCr、BUN),具体检测步骤按照试剂说明书。收集 24 h 尿液检测 24 h 尿蛋白(24 h-UPro)。取大鼠肾组织样本,按照质量(g):体积(mL)为 1:9 比例加入 9 倍体积的提取液,冰水浴条件下制备成 10% 的匀浆,10 000 × g,离心 10 min,收集上清液用于后

续检测,BCA 法测定蛋白浓度,标准品制备及浓度梯度稀释。 Fe^{2+} 在 593 nm 处有吸收峰,测定该波长吸光度,计算含量。

1.2.3.3 大鼠肾组织病理观察 HE 染色:肾组织经固定、脱水、石蜡包埋后修块,用切片机切成 3~4 μm 薄片,展片、烤片黏附牢固。脱蜡入水,苏木精染核,盐酸乙醇分化,氨水返蓝,伊红染胞质,梯度脱水透明,中性树胶封片。光学显微镜下,细胞核被苏木精染成蓝色,细胞质、基底膜等被伊红染成红色。

Masson 染色:肾组织石蜡切片脱蜡至水,苏木精染核 5 min,水洗分化返蓝。再经磷钼酸处理,丽春红染色,水洗后用苯胺蓝染胶原,1%冰醋酸分化,梯度脱水、二甲苯透明,中性树胶封片。镜下细胞核蓝色,胞质肌纤维红色,胶原纤维蓝色。

Prussian Blue 染色:肾脏组织石蜡切片脱蜡至水,蒸馏水漂洗。浸入染液(亚铁氰化钾+盐酸)孵育,水洗后核固红复染细胞核。梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。镜下含铁血黄素呈蓝色,细胞核红色,背景浅粉。

免疫荧光分析:肾脏蜡块切片后脱蜡水化,抗原修复,画圈加荧光淬灭剂 A 液,圈内用 BSA 封闭 30 min。Nrf2(1:1 000)和 GPX4(1:1 000)一抗孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒过夜,对应的荧光二抗室温避光 1 h 孵育后,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)复染细胞核,圈内加入组织自发荧光淬灭剂 B 液,封片并在显微镜下采集图像,并用 ImageJ 软件计算荧光强度。

1.3 体外实验

1.3.1 HK-2 细胞培养及分组 用 MEM+10% FBS 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 HK-2 细胞,细胞密度达到 80% 后消化细胞。Erastin 诱导 HK-2 细胞的造模方法基于课题组的预先实验数据和参考文献^[12]中的 10 $\mu\text{mol/L}$ Erastin 进行干预。选择对数生长期的细胞,胰酶消化后接种在 96 孔板上,当细胞融合程度到 60%~70% 时,用 KXL、Erastin 处理 24 h,正常组(NG)、Erastin 组、Erastin+KXL 组、Erastin+5 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1 组分别进行相应干预。

1.3.2 药液制备 各加药组 pH 值采用 pH 计检测,检测前用标准缓冲液校准仪器,取加药后平衡至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养基,插入电极待读数稳定后记录,每个样本至少检测 3 次取平均值,需确保检测结果处于 HK-2 细胞培养基适宜 pH 范围(7.2~7.4);渗透压使用渗透压仪检测,仪器提前校准后,吸取适量培养

基加入检测池,按说明操作并记录数值(单位: mOsm/kg),重复检测 3 次控制误差,需确保检测结果处于 HK-2 细胞培养基正常渗透压范围(280~320 mOsm/kg),最适范围为(300 $\pm$ 10)mOsm/kg;内毒素采用鲎试剂法(凝胶法或动态浊度法),严格遵循试剂说明书,取无菌处理后的加药培养基与鲎试剂反应,设置阴阳性对照确保结果可靠,需确保检测结果符合细胞实验内毒素控制要求(通常 $\leq$ 0.5 EU/mL),并详细记录具体检测数值。最终采用的 KXL 药液培养基 pH 值为 7.4,渗透压 305 mOsm/kg,内毒素 0.3 EU/mL。

1.3.3 检测指标与方法

1.3.3.1 MTT 筛选 KXL 最佳干预浓度 将对数生长期的 HK-2 细胞以 5×10^4 个/孔接种到 96 孔板,待细胞贴壁后,加入不同浓度的 KXL(0.1 g/L、0.2 g/L、0.4 g/L、0.8 g/L、1.6 g/L、3.2 g/L)培养 24 h。吸去上清液,每个浓度设置 3 个复孔,加入新鲜培养基及 MTT 进行孵育,4 h 后丢弃上清液,在培养皿中加入二甲基亚砷(DMSO)后混合并摇床震荡 10 min 混匀,酶标仪 490 nm 读取吸光度(A)。细胞存活率%=[(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)] $\times$ 100%。确定 KXL 对 HK-2 细胞无毒性且干预效果最优的浓度,用于后续实验。

1.3.3.2 HK-2 细胞 GSH、 Fe^{2+} 、MDA 水平测定 6 孔板培养 HK-2 细胞,24 h 分组干预,NG 组、Erastin 组(10 $\mu\text{mol/L}$ Erastin)、Erastin+KXL 组(10 $\mu\text{mol/L}$ Erastin + KXL 最佳浓度)、Erastin+5 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1 组(10 $\mu\text{mol/L}$ Erastin + 5 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1)分别进行相应干预 24 h。完成后吸弃培养基,无血清培养基洗涤 3 次后,按说明书测定 GSH、 Fe^{2+} 、MDA。HK-2 细胞收集后,大约每 1×10^6 个细胞加 300~500 μL 提取液进行匀浆;匀浆处理后,10 000 $\times$ g 离心 10~15 min,去上清液用于后续检测,按照不同的波长分别测定 GSH、 Fe^{2+} 、MDA 水平。

1.3.3.3 Western blot 检测铁死亡及纤维化相关蛋白 收集“1.3.3.2”细胞后,吸除培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞 2 次,加入裂解液提取总蛋白,BCA 定量。采用 SDS-PAGE 分离等量蛋白,恒流转膜至 PVDF 膜,室温下 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,将其与一抗 Col-I(1:1 000)、Nrf2(1:1 000)、 α -SMA(1:1 000)、GPX4(1:1 000)、GAPDH(1:5 000)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱摇床过夜。第 2 天,TBST 洗膜 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3

次,加入 ECL 显色液曝光成像,ImageJ 软件计算目的蛋白/内参的比值。

1.4 统计学方法 采用 GraphPad Prism 10.5.0 软件统计分析,计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。若符合正态分布,两组间比较采用 LSD 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);不符合正态分布则采用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体内实验结果

2.1.1 对大鼠一般情况的影响 Sham 组大鼠精神良好,活动佳,被毛整齐,体质量增加。Model 组、

KXL-L 组、KXL-H 组、Fer-1 组精神状态欠佳,被毛杂乱,活动量减少,体质量出现不同程度的减轻。实验过程中,因肾功能急剧恶化、肾小球硬化与间质纤维化加速,大鼠死亡 6 只,最终纳入统计的大鼠分别为 Sham 组 10 只、Model 组 8 只、KXL-L 组 8 只、KXL-H 组 9 只、Fer-1 组 9 只。

2.1.2 对大鼠肾功能及肾组织 Fe^{2+} 水平的影响 与 Sham 组比较,Model 组大鼠 SCr、BUN、24 h-UPro 及肾组织 Fe^{2+} 水平明显升高 ($P<0.01$)。与 Model 组比较, KXL-L、KXL-H、Fer-1 组大鼠 SCr、BUN、24 h-UPro 及肾组织 Fe^{2+} 水平均显著下降($P<0.01$)。KXL-L 组与 KXL-H 组相比较,各指标差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠生化指标及肾组织 Fe^{2+} 水平比较($\bar{x}\pm s$)

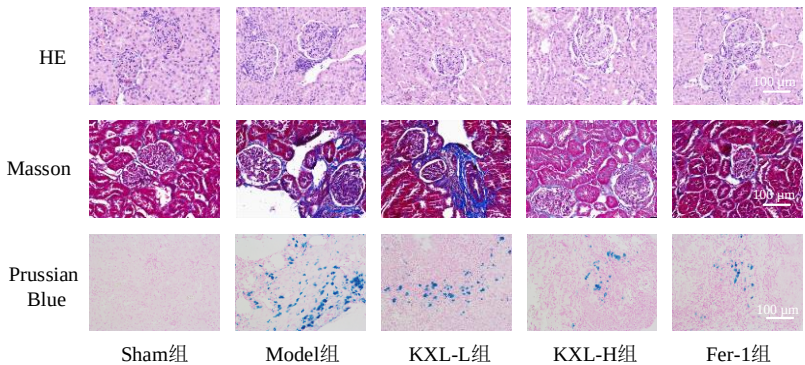
组别	n	SCr/($\mu\text{mol/L}$)	BUN/(mmol/L)	24 h-UPro/(mg/L)	Fe^{2+} /($\mu\text{mol/L}$)
Sham 组	10	12.41 $\pm$ 1.29	5.76 $\pm$ 0.23	11.29 $\pm$ 1.12	12.45 $\pm$ 0.83
Model 组	8	48.45 $\pm$ 2.98**	17.24 $\pm$ 2.21**	29.38 $\pm$ 3.37**	38.79 $\pm$ 3.06**
KXL-L 组	8	32.12 $\pm$ 2.35##	13.18 $\pm$ 2.03##	24.43 $\pm$ 3.03##	29.18 $\pm$ 2.56##
KXL-H 组	9	26.64 $\pm$ 2.26##	10.35 $\pm$ 1.65##	20.54 $\pm$ 2.06##	26.24 $\pm$ 2.14##
Fer-1 组	9	23.83 $\pm$ 1.74##	11.91 $\pm$ 1.71##	22.94 $\pm$ 2.79##	25.43 $\pm$ 1.89##

注:Sham 为假手术,Model 为模型,KXL-L 为抗纤灵方低剂量,KXL-H 为抗纤灵方高剂量,Fer-1 为铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1,SCr 为血肌酐,BUN 为尿素氮,24 h-UPro 为 24 h 尿蛋白, Fe^{2+} 为亚铁离子。与 Sham 组比较,** $P<0.01$;与 Model 组比较,## $P<0.01$ 。

2.1.3 对大鼠肾组织病理形态的影响 HE 染色结果显示:Sham 组无肾小管萎缩,管腔大小均匀,无炎症细胞浸润;Model 组小管上皮细胞空泡样变性,刷状缘脱落,管腔扩张,多灶性受累,间质增宽,球囊纤维化表现为包囊壁增厚、局灶性萎缩,散在慢性炎症细胞浸润;而 KXL-L 组、KXL-H 组、Fer-1 组肾组织病理损伤范围与病变程度均显著减轻,肾间质炎

症细胞浸润水平明显降低($P<0.01$)。见图 1、表 2。

Masson 染色结果显示:Sham 组结构完整,肾小管、肾小球结构清晰,无纤维化改变;Model 组胶原纤维蓄积程度显著升高,肾小球系膜区纤维化病理改变突出;而 KXL-L 组、KXL-H 组、Fer-1 组肾组织胶原纤维沉积量较 Model 组明显减少,纤维化病理损伤得到有效改善($P<0.01$)。见图 1、表 2。



注:Sham 为假手术,Model 为模型,KXL-L 为抗纤灵方低剂量,KXL-H 为抗纤灵方高剂量,Fer-1 为铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1。Masson 为马松染色,Prussian Blue 为普鲁士蓝染色。标尺为 100 μm 。

图 1 各组大鼠肾组织病理形态学比较($\times 200$)

Prussian Blue 染色结果显示:Sham 组未见明显阳性染色,无铁离子沉积;Model 组弥漫性肾小管铁

沉积,蓝色阳性染色范围广、表达强度高;而 KXL-L 组、KXL-H 组、Fer-1 组可见肾组织铁离子沉积含量

较 Model 组显著下降,肾脏铁过载状态得到明显缓解。见图 1、表 2。

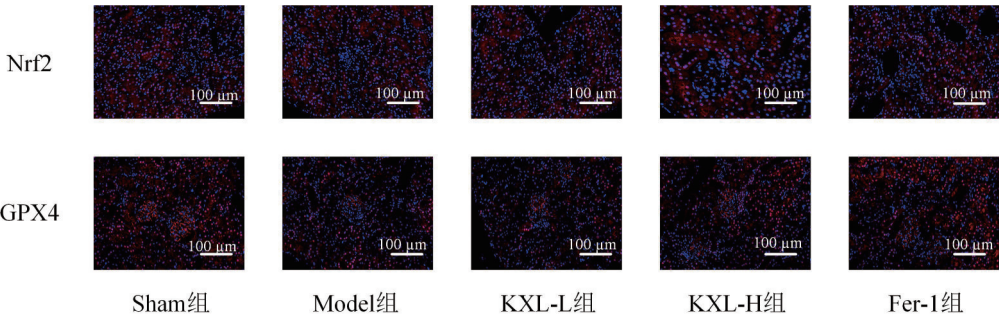
表 2 各组大鼠肾组织损伤和阳性染色面积比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	肾小球损伤 评分/分	肾小管损伤 评分/分	HE 阳性染色 面积/%	Masson 阳性 染色面积/%
Sham 组	10	1.21±0.05	1.53±0.04	1.89±0.04	1.29±0.06
Model 组	8	4.18±0.29**	6.21±0.24**	4.72±0.31**	3.98±0.28**
KXL-L 组	8	3.04±0.21##	4.57±0.16##	2.53±0.14##	3.46±0.21##
KXL-H 组	9	2.21±0.12##	2.29±0.11##	1.98±0.11##	2.83±0.12##
Fer-1 组	9	2.53±0.16##	3.12±0.13##	3.26±0.25##	3.03±0.16##

注:Sham 为假手术,Model 为模型,KXL-L 为抗纤灵方低剂量,KXL-H 为抗纤灵方高剂量,Fer-1 为铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1。Masson 为马松染色。与 Sham 组比较,***P*<0.01;与 Model 组比较,##*P*<0.01。

2.1.4 对大鼠肾脏 Nrf2、GPX4 蛋白表达的影响 与 Sham 组比较,Model 组大鼠 Nrf2 及 GPX4 蛋白表达水

平明显下降,而 KXL-L、KXL-H、Fer-1 干预后,Nrf2 及 GPX4 蛋白表达水平显著上升(*P*<0.01)。见图 2、表 3。



注:Sham 为假手术,Model 为模型,KXL-L 为抗纤灵方低剂量,KXL-H 为抗纤灵方高剂量,Fer-1 为铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1。Nrf2 为核转录因子红系 2 相关因子 2,GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4。标尺为 100 μm。

图 2 各组大鼠肾脏 Nrf2、GPX4 蛋白表达比较(免疫荧光染色,×200)

表 3 各组大鼠肾脏组织 Nrf2、GPX4 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Nrf2	GPX4
Sham 组	10	0.67±0.16	0.82±0.14
Model 组	8	0.16±0.02**	0.14±0.01**
KXL-L 组	8	0.39±0.08##	0.22±0.03##
KXL-H 组	9	0.47±0.12##	0.29±0.07##
Fer-1 组	9	0.35±0.05##	0.41±0.11##

注:Sham 为假手术,Model 为模型,KXL-L 为抗纤灵方低剂量,KXL-H 为抗纤灵方高剂量,Fer-1 为铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1,Nrf2 为核转录因子红系 2 相关因子 2,GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4。与 Sham 组比较,***P*<0.01;与 Model 组比较,##*P*<0.01。

2.2 体外实验

2.2.1 不同浓度 KXL 对 HK-2 细胞活力影响 与空白血清组比较,KXL 浓度为 3.2 g/L 时 HK-2 细胞活力显著下降(*P*<0.01),故选择 HK-2 细胞未明显下降时 KXL 的最高浓度 1.6 g/L 作为药物干预浓度。见表 4。

2.2.2 对 HK-2 细胞 GSH、MDA 及 Fe²⁺ 水平的影响 与 NG 组比较,Erastin 组细胞 MDA 及 Fe²⁺ 水平明显

表 4 不同浓度 KXL 对 HK-2 细胞活力影响

组别	浓度/(g/L)	细胞存活率/%
空白血清组	0	100.00±0.00
KXL 组	0.1	98.35±0.59
	0.2	98.76±0.71
	0.4	97.43±0.62
	0.8	97.59±0.81
	1.6	97.52±0.78
	3.2	48.65±0.53**

注:KXL 为抗纤灵方。与空白血清组比较,***P*<0.01。

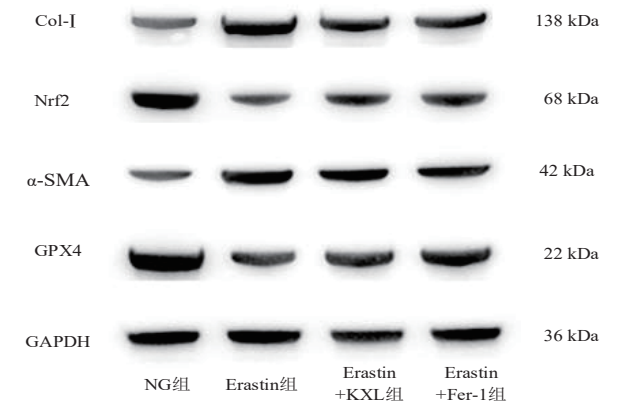
升高,而 GSH 水平明显下降(*P*<0.01);与 Erastin 组比较,Erastin+KXL 组、Erastin+Fer-1 组 MDA 及 Fe²⁺ 水平明显下降,而 GSH 水平明显上升(*P*<0.01)。见表 5。

2.2.3 对 HK-2 细胞蛋白表达的影响 与 NG 组细胞比较,Erastin 组 Col-I、α-SMA 蛋白表达水平显著升高,而 Nrf2、GPX4 蛋白水平显著下降(*P*<0.01)。与 Erastin 组比较,Erastin+KXL 组、Erastin+Fer-1 组 Col-I、α-SMA 蛋白表达水平明显下降,而 Nrf2、GPX4 蛋白表达水平显著上升(*P*<0.01)。见图 3、图 4。

表5 各组细胞 GSH、MDA、Fe²⁺水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	GSH/($\mu\text{mol/g}$)	MDA/($\mu\text{mol/L}$)	Fe ²⁺ /($\mu\text{mol/L}$)
NG 组	7.23 $\pm$ 0.36	1.35 $\pm$ 0.06	1.12 $\pm$ 0.11
Erastin 组	2.56 $\pm$ 0.12**	3.83 $\pm$ 0.29**	2.98 $\pm$ 0.38**
Erastin+KXL 组	4.89 $\pm$ 0.24##	1.98 $\pm$ 0.12##	1.35 $\pm$ 0.23##
Erastin+Fer-1 组	4.65 $\pm$ 0.17##	2.21 $\pm$ 0.15##	1.67 $\pm$ 0.33##

注:GSH为谷胱甘肽,MDA为丙二醛,Fe²⁺为亚铁离子。NG为正常,Erastin为铁死亡诱导剂,KXL为抗纤灵方,Fer-1为铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1。与NG组比较,** $P<0.01$;与Erastin组比较,## $P<0.01$ 。



注:Col-I 为 I 型胶原蛋白, α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白,Nrf2 为核转录因子红系 2 相关因子 2,GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4,GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。NG 为正常,Erastin 为铁死亡诱导剂,KXL 为抗纤灵方,Fer-1 为铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1。

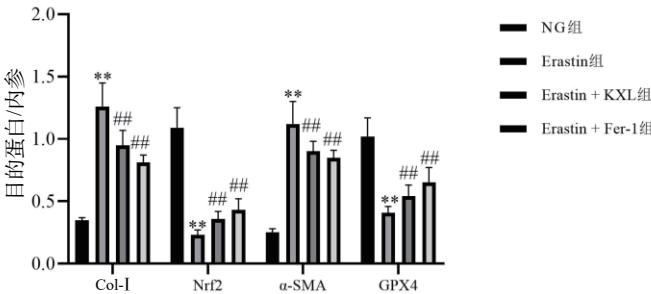
图3 各组细胞 Nrf2/GPX4 通路、肾纤维化相关蛋白 Western blot 条带图

3 讨论

KXL多药物协同降低SCr、BUN及24 h-UPro,延缓CKD进展。其可精准靶向恶性循环的多个节点——能够激活Nrf2通路,促进GSH生成,提高GPX4活性,降低Fe²⁺水平,从而抑制铁死亡、减少脂

质过氧化损伤;同时可直接抑制肌成纤维细胞活化,减少Col-I和 α -SMA表达,直接阻断肾纤维化进程。本研究证实了KXL具有多成分、整体调节的特点,能够有效缓解RF,可能与调控Nrf2/GPX4信号通路有关。实验通过Erastin诱导HK-2细胞铁死亡、5/6肾切除构建CKD模型,同时设置铁死亡抑制剂Fer-1,证实KXL与Fer-1作用效果一致,验证了“KXL通过抑制铁死亡发挥抗纤维化作用”的核心机制。

铁死亡存在于多种肾脏疾病,是铁依赖性、脂质过氧化物驱动的程序性细胞死亡,不同于凋亡性的细胞死亡^[13-15]。铁离子依赖的脂质过氧化是发生铁死亡的关键因素,铁代谢失衡则细胞内游离Fe²⁺上升,脂质过氧化物MDA沉积^[16-17]。抗氧化系统与GPX4的生成路径密切相关,而GPX4被看作铁死亡的核心调控元素^[18-19]。KXL作为中药复方,其中药物均为临床常用中药,经长期临床实践验证安全性较高,且本研究体外实验中未出现明显细胞毒性,为其长期临床应用提供了更充分的实验依据,也体现了中药复方“多靶点、低毒性”的独特优势。中医认为“瘀血”贯穿整个肾纤维化的过程,KXL活血化痰、扶正泻浊,脉道通畅则津行不滞。铁死亡及Nrf2/GPX4轴失衡是驱动肾纤维化进展的关键上游环节。这种“上游抑制铁死亡、下游阻断纤维化”的双重调控作用,是KXL能够减轻CKD肾纤维化的核心原因。CKD进程中,肾组织氧化应激失衡会导致Nrf2激活不足,进而抑制SLC7A11生成、减少GSH合成,最终降低GPX4活性^[20-22];GPX4活性下降则无法有效清除脂质过氧化物(L-OOH、MDA),导致Fe²⁺依赖的脂质过氧化加剧,触发HK-2细胞铁死亡^[23-25]。铁死亡进一步诱导HK-2细胞向肌成纤维细胞转分化,促进Col-I、 α -SMA表达,加速肾间质纤



注:Col-I 为 I 型胶原蛋白, α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白,Nrf2 为核因子红细胞系 2 相关因子 2,GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4。NG 为正常,Erastin 为铁死亡诱导剂,KXL 为抗纤灵方,Fer-1 为铁死亡抑制剂。与NG组比较,** $P<0.01$;与Erastin组比较,## $P<0.01$;n=3, $\bar{x}\pm s$ 。

图4 各组细胞 Nrf2/GPX4 通路、肾纤维化相关蛋白水平比较

维化,形成“氧化应激→Nrf2/GPX4 轴失衡→铁死亡→肾纤维化”的恶性循环。

5/6 肾切除模型是研究肾小管间质纤维化的最为广泛的经典动物模型,评估肾功能恶化方面,模型通过手术切除约 5/6 肾组织,模拟人类慢性肾病中肾单位大量减少的病理状态,造模后可呈现与临床 CKD 高度一致的进行性肾功能恶化进程。具体而言,造模后随着病程进展,模型动物会出现血清 SCr、BUN 水平升高,24 h-UPro 增加,肾小球滤过率下降等肾功能损伤指标的异常改变,动态地评估肾功能恶化的程度与速度,为研究 HK-2 细胞铁死亡、间质纤维化与肾功能恶化的关联性提供依据,且该模型的肾功能恶化进程稳定、可重复性强,相比其他仅能呈现局部损伤的模型,更能全面反映肾功能恶化的整体特征。评估纤维化方面,模型实现肾小球纤维化与肾小管间质纤维化的同步评估,与临床 CKD 中整体纤维化的发病特点高度契合。造模后,除了可观察到肾小管萎缩、肾间质纤维组织增生、细胞外基质沉积等肾小管间质纤维化典型改变外,还能清晰观察到肾小球硬化、系膜基质增生等肾小球纤维化表现,通过 HE、Masson 染色等常规病理检测方法,可精准量化肾脏整体纤维化程度,明确肾小球纤维化与肾小管间质纤维化的相互作用关系,进而全面评估肾脏整体纤维化的进展状态。此外,该模型的整体纤维化改变与肾功能恶化呈现明确的相关性,可同步检测肾功能指标与纤维化相关指标(如 α -SMA、Col-I、TGF- β 1 等),能够清晰揭示 HK-2 细胞铁死亡在肾功能恶化与整体纤维化进程中的调控作用。

CKD 在中医学中归属“水肿”“虚劳”“关格”等范畴,属于本虚标实之证^[26]。本虚在于脾肾两虚,标实在于水湿、湿热、浊毒、瘀血互结,虚实夹杂,贯穿病程始终^[27-29]。瘀血是本病的病理因素。CKD 患者一般表现为气短懒言、肌肤甲错及耳廓黧黑的气虚瘀血证临床表现,病情周期长,最终演变为终末期肾病。患者饮食不节,嗜食肥甘厚腻,导致脾失健运,胃失和降,肾失气化,人体水液运化失常,血液运行不畅,瘀血内生,滞留血脉,致肾气不足,肾络痹阻。KXL 健脾益气、清化湿热、活血化瘀、扶正泻浊,丹参活血化瘀、制大黄通腑泄浊、桃仁活血通络、当归补血活血、怀牛膝益肾通络^[30-32]。血瘀发生时, HK-2 细胞中 Fe²⁺ 过载,通过芬顿反应产生大量活性氧,诱发氧化应激,促进细胞铁死亡。而 KXL

的活血化瘀作用调节肾脏代谢功能,减轻 HK-2 细胞因代谢异常导致的铁过载和活性氧堆积,进而降低铁死亡风险。

但 KXL 如何作用于 Nrf2/GPX4 信号通路,具体机制尚不明确,未来我们将采用大鼠灌胃后取血的含药血清来培养 HK-2 细胞,中药组、模型组大鼠同 Fer-1 组都采用腹腔注射保持统一性,需要更多实验直接验证 KXL 是否通过调控 GSH 代谢和 GPX4 活性来抑制 HK-2 细胞铁死亡,为其临床应用提供实验依据。

参考文献:

- [1] Johnson H N, Prasad-Reddy L. Updates in chronic kidney disease [J]. J Pharm Pract, 2024, 37(6): 1380-1390.
- [2] Zhang J Q, Li Y Y, Zhang XY, et al. Cellular senescence of renal tubular epithelial cells in renal fibrosis[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1085605.
- [3] Zhao X, Li Y, Yu J, et al. Role of mitochondria in pathogenesis and therapy of renal fibrosis[J]. Metabolism, 2024, 155: 155913.
- [4] Chen Y, Dai Y, Huang Y, et al. Inhibition of tubular epithelial cells ferroptosis alleviates renal interstitial fibrosis by reducing lipid hydroperoxides and TGF- β /Smad signaling [J]. Cell Commun Signal, 2025, 23(1): 81.
- [5] Li X, Ma T K, Wang P, et al. HOXD10 attenuates renal fibrosis by inhibiting NOX4-induced ferroptosis [J]. Cell Death Dis, 2024, 15(6): 398.
- [6] Yang R, Gao W, Wang Z, et al. Polyphyllin I induced ferroptosis to suppress the progression of hepatocellular carcinoma through activation of the mitochondrial dysfunction via Nrf2/HO-1/GPX4 axis[J]. Phytomedicine, 2024, 122: 155135.
- [7] Wen R J, Dong X, Zhuang H W, et al. Baicalin induces ferroptosis in osteosarcomas through a novel Nrf2/xCT/GPX4 regulatory axis[J]. Phytomedicine, 2023, 116: 154881.
- [8] Bondi C D, Hartman H L, Tan R J. NRF2 in kidney physiology and disease[J]. Physiol Rep, 2024, 12(5): e15961.
- [9] Ji J, Tao P, He L. Kangxianling decoction prevents renal fibrosis in rats with 5/6 nephrectomy and inhibits Ang II-induced ECM production in glomerular mesangial cells [J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(4): 367-372.
- [10] 吉晶, 何立群. 抗纤灵方对 5/6 肾切除大鼠肾纤维化及 ACE-Ang II-AT1R 轴的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 57-62.
- [11] Ma S K, Joo S Y, Kim C S, et al. Increased phosphorylation of PI3K/Akt/mTOR in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral obstruction [J]. Chonnam Med J, 2013, 11 (3): 108-112.
- [12] Lu Q, Yang L, Xiao J J, et al. Empagliflozin attenuates the renal tubular ferroptosis in diabetic kidney disease through AMPK/NRF2 pathway[J]. Free Radical Bio Med, 2023, 195: 89-102.

- [13] Liu M, Fan Y, Li D, et al. Ferroptosis inducer erastin sensitizes NSCLC cells to celastrol through activation of the ROS-mitochondrial fission-mitophagy axis [J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(8): 2084-2105.
- [14] Bao Z, Hua L, Ye Y, et al. MEF2C silencing downregulates NF2 and E-cadherin and enhances Erastin-induced ferroptosis in meningioma[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(12): 2014-2027.
- [15] Hu H, Li W, Hao Y, et al. The SGLT2 inhibitor dapagliflozin ameliorates renal fibrosis in hyperuricemic nephropathy [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(8): 101690.
- [16] Song J, Wang H, Sheng J, et al. Vitexin attenuates chronic kidney disease by inhibiting renal tubular epithelial cell ferroptosis via NRF2 activation[J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 147.
- [17] Li T, Wang N, Yi D, et al. ROS-mediated ferroptosis and pyroptosis in cardiomyocytes: An update [J]. *Life Sci*, 2025, 370: 123565.
- [18] Liu L, Wen T, Xiao Y, et al. Sea buckthorn extract mitigates chronic obstructive pulmonary disease by suppression of ferroptosis via scavenging ROS and blocking p53/MAPK pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 336: 118726.
- [19] Yang J D, Lin S C, Kuo H L, et al. Imperatorin ameliorates ferroptotic cell death, inflammation, and renal fibrosis in a unilateral ureteral obstruction mouse model [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156066.
- [20] Jin X, He R, Lin Y, et al. Shenshuaifu Granule attenuates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis mediated by p53/SLC7A11/GPX4 pathway[J]. *Drug Des Dev Ther*, 2023, 17: 3363-3383.
- [21] Yuan Y, Zhai Y, Chen J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 923.
- [22] Pan M, Wang Z, Wang Y, et al. Celastrol alleviated acute kidney injury by inhibition of ferroptosis through Nrf2/GPX4 pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 166: 115333.
- [23] Xu P, Lin B, Deng X, et al. VDR activation attenuates osteoblastic ferroptosis and senescence by stimulating the Nrf2/GPX4 pathway in age-related osteoporosis[J]. *Free Radical Biol Med*, 2022, 193(Pt 2): 720-735.
- [24] Deng Y, Zeng L, Liu H, et al. Silibinin attenuates ferroptosis in acute kidney injury by targeting FTH1 [J]. *Redox Biol*, 2024, 77: 103360.
- [25] Cui M, Xu Q, Duan L, et al. Vaccarin ameliorates renal fibrosis by inhibiting ferroptosis via Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway[J]. *Drug Des Dev Ther*, 2025, 19: 1609-1626.
- [26] 张迪, 郭玲. 慢性肾脏病 3~5 期(非透析患者)脾肾亏虚证与湿浊证舌象特征研究[J]. *实用中医内科杂志*, 2025, 39(1): 130-132.
- [27] 潘峰, 李静, 吴若曦, 等. 杨洪涛教授从虚、瘀、浊、风辨证治疗慢性肾脏病经验[J]. *世界中西医结合杂志*, 2025, 20(7): 1312-1316.
- [28] 李自波, 郑亚秋. 丹参及其有效成分调控血管内皮细胞功能的药理作用机制研究进展[J]. *中草药*, 2025, 56(14): 5324-5332.
- [29] 曾耀莹, 陈少丽, 都广礼. 当归补血汤补气与补血之辨[J]. *环球中医药*, 2025, 18(3): 537-539.
- [30] 晏露婷, 宋永贵, 艾志福, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合多元统计分析比较不同品种牛膝药材化学成分的差异[J]. *中草药*, 2024, 55(7): 2160-2174.
- [31] Wu Z, Shi J, Zhou S, et al. Traditional Chinese medicine prescription Mailuoning alleviated liver fibrosis through inhibiting the TGFβ/Smad-mediated extracellular matrix production [J]. *J Ethnopharmacol*, 2026, 358: 120962.
- [32] 郝健, 许丽萍, 吕铁钢. 制大黄-川芎药对通过 TLR4/Myd88/NF-κB 信号对造影剂诱导大鼠肾小管上皮细胞凋亡及肾组织炎症因子 IL-6、IL-1β 的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(23): 5772-5775.

编辑:季春来

收稿日期:2025-12-29

