

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2025.z20241022003

玉蚕颗粒缓解 db/db 小鼠肾纤维化的作用机制

盛广宇¹, 张亚亨¹, 宋 婷¹, 俞菁鉴¹, 阮 伟¹, 杨 涛¹, 杨雪军^{1,2}

1. 上海中医药大学附属曙光医院肾内科(上海 201200); 2. 安徽省中西医结合医院(安徽中医药大学第三附属医院)肾内科(安徽 合肥 230000)

【摘要】 目的 通过 db/db 小鼠探讨玉蚕颗粒缓解糖尿病肾病肾纤维化的作用机制。方法 以 6 周龄雄性 C57BL/BKS-DB 野生型(db/m)小鼠($n=6$)和 C57BL/BKS-DB(db/db)小鼠($n=30$)作为实验对象, db/m 小鼠为正常组, db/db 小鼠随机分为模型组、阳性对照(氯沙坦钾)组(8.6 mg/kg)及玉蚕颗粒低(1.3 g/kg)、中(2.6 g/kg)、高(5.2 g/kg)剂量组, 每组 6 只。各组小鼠每日灌胃给予相应干预, 连续 10 周。干预结束后, 收集血清和肾组织检测小鼠生化指标, 采用苏木精-伊红(HE)、马松(Masson)、过碘酸-希夫(PAS)染色法观察各组小鼠肾组织病理损伤, 采用酶联免疫吸附分析(ELISA)法对肾组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)以及丙二醛(MDA)进行检测分析。原位末端转移酶标记(TUNEL)免疫荧光染色法检测细胞凋亡, 免疫组织化学法检测肾组织 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)。Western blot 法检测肾组织 I 型胶原蛋白(Col-1)、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)。结果 ①与正常组相比, 模型组空腹血糖(FBG)、血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、尿微量白蛋白(mALB)、尿白蛋白/肌酐(UACR)水平均显著升高($P<0.01$, $P<0.001$); 与模型组相比, 玉蚕颗粒各剂量组 FBG、SCr、BUN、mALB、UACR 水平均有不同程度降低($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。②正常组小鼠肾小球完整, 边界清晰明确, 蓝色胶原纤维沉积较少; 模型组小鼠肾脏发生显著形态学变化, 可见间质炎症细胞浸润, 系膜基质增生、肾小球肥大, 大量蓝色胶原纤维沉积, 基底膜均质性增厚, 系膜基质扩张, 侵犯毛细血管管腔。玉蚕颗粒各剂量组胶原纤维阳性面积低于模型组($P<0.01$)。③与正常组相比, 模型组 Col-1、TGF- $\beta 1$ 表达升高($P<0.01$); 各治疗组 Col-1、TGF- $\beta 1$ 表达均低于模型组, 其中玉蚕颗粒中、高剂量组 Col-1 表达与模型组相比有差异($P<0.01$); 玉蚕颗粒高剂量组 TGF- $\beta 1$ 表达与模型组相比有差异($P<0.05$)。与正常组相比, 模型组小鼠肾组织 SOD、GSH-Px 水平降低($P<0.01$, $P<0.001$); 玉蚕颗粒干预后, 各组肾组织 SOD、GSH-Px 水平均升高($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。而模型组小鼠肾组织 MDA 水平较正常组肾组织升高($P<0.01$); 玉蚕颗粒干预后, 小鼠肾脏 MDA 水平降低($P<0.01$, $P<0.001$)。④与正常组相比, 模型组 TUNEL 染色阳性细胞(凋亡细胞)数量明显升高($P<0.01$); 与模型组相比, 玉蚕颗粒各剂量组 TUNEL 染色阳性细胞数量降低($P<0.05$, $P<0.01$)。⑤与正常组相比, 模型组 Bax、Caspase-3 表达水平升高($P<0.01$), 经各剂量玉蚕颗粒干预后降低($P<0.01$); 与正常组相比, 模型组 Bcl-2 表达水平降低($P<0.01$), 经各剂量玉蚕颗粒干预后升高($P<0.01$)。结论 玉蚕颗粒能够降低 db/db 小鼠 FBG, 改善肾功能, 减少蛋白尿, 提高肾脏抗氧化能力, 其作用机制可能与抑制肾脏细胞凋亡有关。

【关键词】 糖尿病肾病; 肾纤维化; 玉蚕颗粒; 细胞凋亡; 氧化应激; 中药研究

Mechanism of Yucan Granules on alleviating renal fibrosis in db/db mice

SHENG Guangyu¹, ZHANG Yaheng¹, SONG Ting¹, YU Jingjian¹, RUAN Wei¹, YANG Tao¹, YANG Xuejun^{1,2}

1. Department of Nephrology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201200, China; 2. Department of Nephrology, Anhui Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital (Third Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine), Hefei, Anhui 230000, China

[基金项目] 上海市科委“科技创新行动计划”医学创新研究专项(22Y31920200); 安徽省高等学校科学研究项目(2023AH040100); 上海市浦东新区卫健委卫生行业专项(PW2021E-02)

[作者简介] 盛广宇, 男, 硕士, 主要从事中医肾病临床研究工作

[通信作者] 杨雪军, 主任医师, 研究员, 博士研究生导师;

E-mail: yangxuejun@shutcm.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Yucan Granules on relieving renal fibrosis (RIF) in diabetic kidney disease (DKD) in db/db mice. **Methods** Six weeks old male C57BL/BKS-DB wild-type (db/m) mice ($n=6$) and C57BL/BKS-DB (db/db) mice ($n=30$) were used as experimental subjects. The db/m mice were set as the normal group, and the db/db mice were randomly divided into a model group, a positive control (losartan potassium) group (8.6 mg/kg),

and Yucan Granules low (1.3 g/kg), medium (2.6 g/kg), and high (5.2 g/kg) dose groups, with 6 mice in each group. The mice in each group were given the corresponding interventions by gavage every day for 10 consecutive weeks. After the intervention, serum and kidney tissues were collected to detect biochemical indicators of mice. Hematoxylin-eosin (HE), Masson and Periodic Acid-Schiff (PAS) stainings were used to observe the pathological damage of renal tissue. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) in renal tissue of each group. Cell apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick end labeling (TUNEL) immunofluorescence staining. Immunohistochemistry was employed to detect B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and caspase-3. Type I collagen (Col-1) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in kidney were detected by Western blot. **Results** ① Compared with the normal group, the levels of fasting blood glucose (FBG), serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), urinary microalbumin (mALB) and urinary albumin/creatinine (UACR) in the model group were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.001$); Compared with the model group, the levels of FBG, SCr, BUN, mALB and UACR in each dose group of Yucan Granules were decreased to varying degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). ② In the normal group, the glomeruli of mice were intact, with clear and distinct boundaries, and there was less deposition of blue collagen fibers; In the model group, significant morphological changes occurred in the kidneys of mice, including interstitial inflammatory cell infiltration, mesangial matrix hyperplasia, glomerular hypertrophy, a large amount of blue collagen fiber deposition, homogeneous thickening of the basement membrane, and expansion of the mesangial matrix, invading the capillary lumen. The positive area of collagen fibers in each dose group of Yucan Granules was lower than that in the model group ($P < 0.01$). ③ Compared with the normal group, the expressions of Col-1 and TGF- β 1 in the model group were increased ($P < 0.01$), and the expressions of Col-1 and TGF- β 1 in each treatment group were lower than those in the model group, while the expressions of Col-1 in the medium and high dose groups of Yucan Granules were different from those in the model group ($P < 0.01$); The expression of TGF- β 1 in the high-dose group of Yucan Granules was different from that in the model group ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the levels of SOD and GSH-Px in the kidney tissues of the model group were decreased ($P < 0.01$, $P < 0.001$); After the intervention of Yucan Granules, the levels of SOD and GSH-Px in the kidney tissues of each group were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). The level of MDA in the kidney tissues of the model group was higher than that in the normal group ($P < 0.01$); After the intervention of Yucan Granules, the level of MDA in the kidneys of mice was decreased ($P < 0.01$, $P < 0.001$). ④ Compared with the normal group, the number of TUNEL-stained positive cells (apoptotic cells) in the model group was significantly increased ($P < 0.01$); Compared with the model group, the number of TUNEL-stained positive cells in each dose group of Yucan Granules was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). ⑤ Compared with the normal group, the expression levels of Bax and caspase-3 in the model group were elevated significantly ($P < 0.01$), and decreased after the intervention of Yucan Granules at each dose ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the expression level of Bcl-2 in the model group was decreased ($P < 0.01$), and increased after the intervention of Yucan Granules at each dose ($P < 0.01$). **Conclusions** Yucan Granules can reduce FBG, improve renal function, reduce proteinuria and improve antioxidant capacity in db/db mice. Its mechanism may be related to inhibiting renal cell apoptosis.

Keywords: diabetic kidney disease; renal fibrosis; Yucan Granules; apoptosis; oxidative stress; Chinese materia medica research

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是指由于长时间患糖尿病而导致的蛋白尿以及肾小球滤过率进行性降低的慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD),是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最常见和危害最大的并发症之一,会演变为不可逆的肾纤维化(renal fibrosis, RIF),发展为终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)^[1-2]。DKD的发病率在我国逐年上升,已成为导致ESRD的第二大原因,仅次于各种急慢性肾小球肾炎^[3]。流行病学调查显示,至2045年全球将有约7.83亿DM患者^[4],其中30%~40%的患者可能并发DKD^[5]。若不进行干预,DKD可能在数年内逐渐进展为尿毒症,届时患者需接受肾脏替代治疗(如透析或器官移植)以维持生命,这将对患者和社会造成沉重的负担。因此,尽早诊断和干预DKD对于减少蛋白尿、缓解RIF、保护患者的肾脏功能和延缓疾病进展具有重要意义。目前,临床上针对DKD的治疗以控制血糖、控制血压、饮食疗法等对症治疗为主,缺乏DKD的特效药物,对延缓疾病进展的作用有限。

DKD是中医内科优势病种,中医药已被广泛应用

于治疗DKD,具有疗效好、安全性高的优点^[6-7]。中药复方玉蚕颗粒由黄芪、川芎、蚕茧壳、玉米须4味中药组成,是杨雪军主任医师根据其多年临床经验,针对DKD脾肾气虚、瘀血阻络、水湿内蕴的病机拟定的中药复方。方中黄芪补气行气,川芎行气活血,蚕茧壳利湿降浊,玉米须消肿利水,共奏益气活血、利湿降浊之效。前期临床^[8]与基础实验^[9]研究表明,玉蚕颗粒可有效降低DKD患者尿蛋白水平和改善机体炎症状态,降低DKD小鼠血糖、减轻肾脏纤维化和保护足细胞损伤。然而,关于玉蚕颗粒在缓解RIF中的作用机制尚不明确,有待进一步探讨。本研究基于玉蚕颗粒对DKD及RIF的缓解作用,采用db/db小鼠模型对玉蚕颗粒治疗DKD的疗效展开验证,深入探究玉蚕颗粒缓解RIF的作用机制,为玉蚕颗粒在临床上的推广应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 6只6周龄健康雄性C57BL/BKS-DB野生

型(db/m)小鼠及 30 只 6 周龄健康雄性 C57BL/BKS-DB (db/db)小鼠, SPF 级, 体质量 20 g 左右, 由江苏集萃药康生物科技有限公司提供, 实验动物生产许可证号: SYXK(苏)2022-0004。所有小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心, 实验动物使用许可证号: SYXK(沪)2020-0009。饲养环境维持在室温 25 ℃ 上下, 湿度保持在 45% 左右, 遵循 12 h 光照与 12 h 黑暗交替的昼夜节律。小鼠在正式实验前, 先进行为期 1 周的适应性喂养。动物实验方案通过上海中医药大学实验动物伦理委员会审批(伦理审批号: PZSHUTCM2302030010)。

1.1.2 药物与试剂 玉蚕颗粒(黄芪 9 g、玉米须 30 g、蚕茧壳 30 g、川芎 15 g)(批号: DBNKL2022111601-G), 由湖南易能生物医药有限公司制备。氯沙坦钾片(科素亚, 批号: W018084), 杭州默沙东制药有限公司。

胱天蛋白酶-3(Caspase-3)抗体, 武汉爱博泰克生物科技有限公司(批号: A25309); B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号分别为 50599-2-Ig、68103-1-Ig、60004-I-Ig), 武汉三鹰生物技术有限公司; 转化生长因子- β 1(TGF- β 1)抗体(批号: HA721143), 杭州华安生物技术有限公司; I 型胶原(Col-1)抗体(批号: sc-293182), 美国 Senta Cruz 公司; 丙二醛(MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)1/(Cu-Zn SOD)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号分别为 ET0001M、ER20725M), 上海威奥生物科技有限公司; 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号: A005-1-1), 南京建成生物工程研究所; 苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、马松(Masson)三色染色试剂盒(批号分别为 7211、M202501), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 过碘酸-希夫(PAS)染色试剂盒(批号: 20241201), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 原位末端转移酶标记(TUNEL)凋亡检测试剂盒(批号: E607178-0020), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 血糖试纸(批号: 1816), 德国 Bayer 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记山羊抗兔 IgG(批号分别为 A0216、A0208), 上海碧云天生物技术股份有限公司; 聚偏氟乙烯(PVDF)膜(批号: IPVH00005), 美国 Millipore 公司。

1.1.3 主要仪器 离心机(型号: Avanti J-E), 美国 Beckman 公司; 生物组织冷冻包埋机(型号: KD-BM), 金华市科迪仪器设备有限公司; 烘片机(型号: KD-H), 金华市科迪仪器设备有限公司; 酶标仪(型号: Synergy 2), 美国 BioTek 公司; 组织匀浆器(型号: JY-24), 上海净信科技有限公司; 显微镜(型号: CX33), 日本 Olympus 公司; 凝胶成像系统(型号: Tanon-5200), 上海天能科技有限公司。

1.2 分组与造模 正常饲养 4 周后, 采用小鼠代谢笼

收集小鼠 24 h 尿液, 检测尿微量白蛋白(mALB)、尿白蛋白/肌酐(UACR), 禁食 6 h 后检测空腹血糖(FBG), 以 db/db 小鼠 mALB 及 UACR 与 db/m 小鼠有差异, FBG>11.1 mmol/L 确定 DKD 模型成功。确认模型成功后, 以 6 只 db/m 小鼠作为正常组, db/db 小鼠依据 UACR 结果随机为模型组、氯沙坦钾组及玉蚕颗粒低、中、高剂量组, 每组 6 只。

1.3 干预方法 玉蚕颗粒提取物委托湖南易能生物医药有限公司制备, 收膏率为 18%, 即每克玉蚕颗粒提取物相当于生药 5.495 g。根据《医学实验动物学》^[10]人和小鼠等效剂量换算, 玉蚕颗粒低、中、高剂量组分别按 1.3 g/kg、2.6 g/kg 和 5.2 g/kg 剂量的等量玉蚕颗粒溶液给药, 即等效剂量的 0.5 倍、1 倍、2 倍浓度; 氯沙坦钾给药剂量根据人与小鼠等效剂量换算为 8.6 mg/kg; 模型组给予等量 0.9% 氯化钠溶液。所有小鼠自由饮食进水, 每日灌胃给药 1 次, 连续给药 10 周。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 生化指标检测 末次给药前 1 天禁食不禁水, 采用代谢笼法收集各组小鼠 24 h 尿液, 室温静置 2 h 后离心取上清液存放于 -80 ℃ 冰箱备用。小鼠麻醉后取血, 3 000 r/min、10 min 离心取上清液, 存放于 -80 ℃ 冰箱备用。血液和尿液样品委托上海中医药大学附属曙光医院检验科检测生化指标[FBG、血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、mALB、UACR]。

1.4.2 肾组织病理染色 剥离肾脏后, 置于 10 倍肾脏体积 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 0.9% 氯化钠溶液冲洗, 石蜡包埋后将蜡块切为 4 μ m 切片, 先后经二甲苯脱蜡, 再依次于体积分数为 100% (两次)、95%、90%、80%、70% 的乙醇各 5 min 水化, 完成染色后通过体积分数为 70%、80%、90%、95%、100% (两次) 的乙醇各 5 min 脱水, 最后用二甲苯透明, 根据试剂盒说明进行 HE、PAS、Masson 病理染色。树胶封片, 置于显微镜下观察, 采用 ImageJ 软件对 Masson 染色切片进行定量分析。

1.4.3 免疫组织化学法检测相关蛋白表达 将 4 μ m 小鼠肾组织石蜡切片进行二甲苯脱蜡处理, 乙醇梯度水化, 加入体积分数为 3% 的过氧化氢, 等待 15 min。磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 5 min, 重复两次。枸橼酸钠缓冲液中加热抗原修复, 室温封闭 30 min, 加入 Caspase-3、Bcl-2、Bax 抗体(1:200)孵育过夜, 滴加二氨基联苯胺(DAB)和核染后脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 显微镜下观察 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白阳性表达。采用 ImageJ 软件进行定量分析。

1.4.4 TUNEL 免疫荧光染色法检测细胞凋亡 肾组织切片按常规方法进行固定、封闭、通透。按照 TUNEL 染色试剂盒说明书操作。荧光显微镜镜下观察各组小鼠肾组织凋亡阳性细胞表达, 采用 ImageJ 软件统计凋

亡阳性细胞数。

1.4.5 ELISA 法检测氧化应激相关指标 称取 200 mg 肾组织,使用低温 0.9% 氯化钠溶液浸泡漂洗,滤纸拭干,置于 5 mL 离心管中,添加 9 倍体积 0.9% 氯化钠溶液。将肾组织捣碎,随后低温匀浆。3 000 r/min 离心 15 min,取上清液待测。二辛可酸(BCA)法测定蛋白浓度。按照试剂盒说明检测相应指标浓度(SOD、MDA、GSH-Px)。

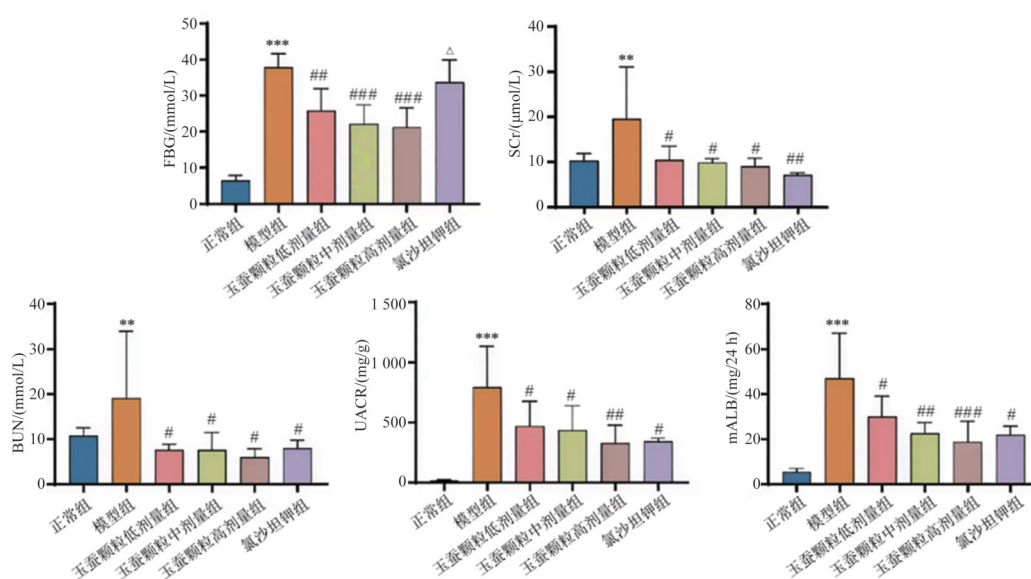
1.4.6 Western blot 法检测相关蛋白表达 称取肾脏组织,加入 10 倍体积裂解液和钢珠,匀浆机低温匀浆,3 000 r/min 离心 15 min,收集上清抽取 3 μ L 加入 117 μ L 0.9% 氯化钠溶液稀释后 BCA 法测量蛋白浓度。蛋白利用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离,电泳条件为 120 V、1 h。待电泳结束,通过湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,转印条件为 300 mA、1 h。完成转印后,使用 5% 脱脂奶粉在室温环境下进行封闭。加入 Col-1、TGF- β 1 抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。然后,加入 HRP 标记的山羊抗兔和抗鼠二抗(1:1 000)室温孵育 1 h。按 1:1 的比例配制显影液,并进行显影,采用 ImageJ 软件对蛋白条带灰度

值进行分析。

1.5 统计学方法 数据采用 SPSS26.0 和 GraphPad Prism 10 软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两独立样本,数据符合正态分布且方差齐者,采用独立样本 t 检验;多组间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;若数据不符合正态分布者,采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对 db/db 小鼠血糖、尿蛋白及肾功能的影响 尿蛋白及肾功能水平是评价 DKD 进展的重要指标。给药 10 周后,检测小鼠尿蛋白、血糖及肾功能水平。结果显示,与正常组相比,模型组 FBG、SCr、BUN、UACR、mALB 水平均显著升高($P < 0.01$, $P < 0.001$);其中,氯沙坦钾组与玉蚕颗粒高剂量组相比,FBG 水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,玉蚕颗粒各剂量组 FBG、SCr、BUN、UACR、mALB 水平均有不同程度降低($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。上述结果表明,db/db 小鼠模型成功建立,小鼠肾功能受损;玉蚕颗粒干预能降低 db/db 小鼠血糖,减轻蛋白尿,改善肾功能,且该作用呈一定量效关系。见图 1。



注:FBG 为空腹血糖,SCr 为肌酐,BUN 为尿素氮,UACR 为尿蛋白/肌酐,mALB 为尿微量白蛋白。与正常组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组比较,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;与玉蚕颗粒高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。 $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ 。

图1 各组小鼠血液和尿液生化指标比较

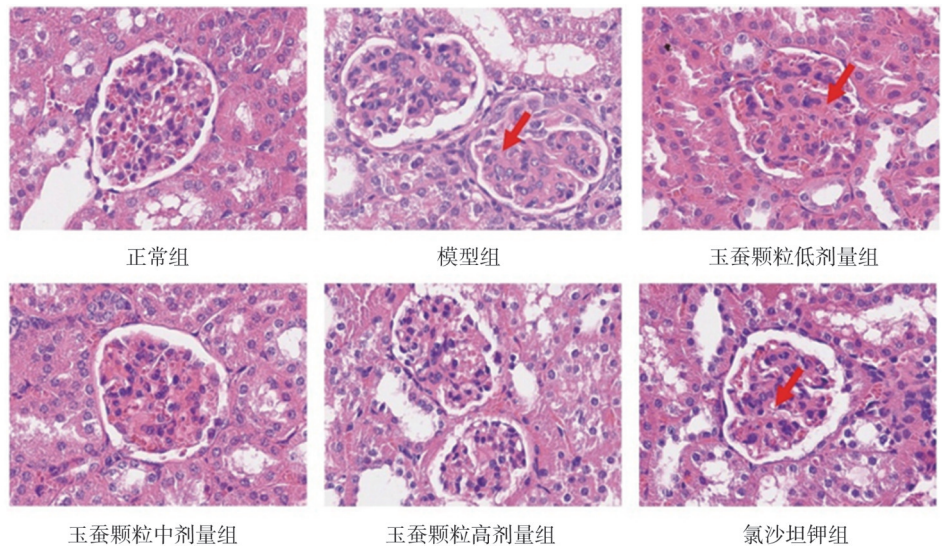
2.2 对 db/db 小鼠肾脏病理及肾脏纤维化的影响 HE 染色(图 2)显示,正常组小鼠肾小球完整,边界清晰明确;模型组小鼠肾脏发生显著形态学变化,可见间质炎症细胞浸润,系膜基质增生、肾小球肥大;Masson 染色(图 3)显示,正常组蓝色胶原纤维沉积较少,模型组见大量蓝色胶原纤维沉积,玉蚕颗粒各剂量组及氯沙坦钾组可见不同程度的蓝色胶原纤维沉积。对胶原纤维沉积面积进行定量分析显示,模型组阳性面积显著高

于正常组($P < 0.01$),玉蚕颗粒各剂量组及氯沙坦钾组阳性面积低于模型组($P < 0.01$)。

采用 Western blot 法检测纤维化相关蛋白的表达,结果(图 4)表明模型组 Col-1、TGF- β 1 表达升高($P < 0.01$),各治疗组表达均低于模型组,其中玉蚕颗粒中、高剂量组及氯沙坦钾组 Col-1 表达与模型组相比有差异($P < 0.01$);玉蚕颗粒高剂量组 TGF- β 1 表达与模型组相比有差异($P < 0.05$);PAS 染色(图 5)见基底膜均质性

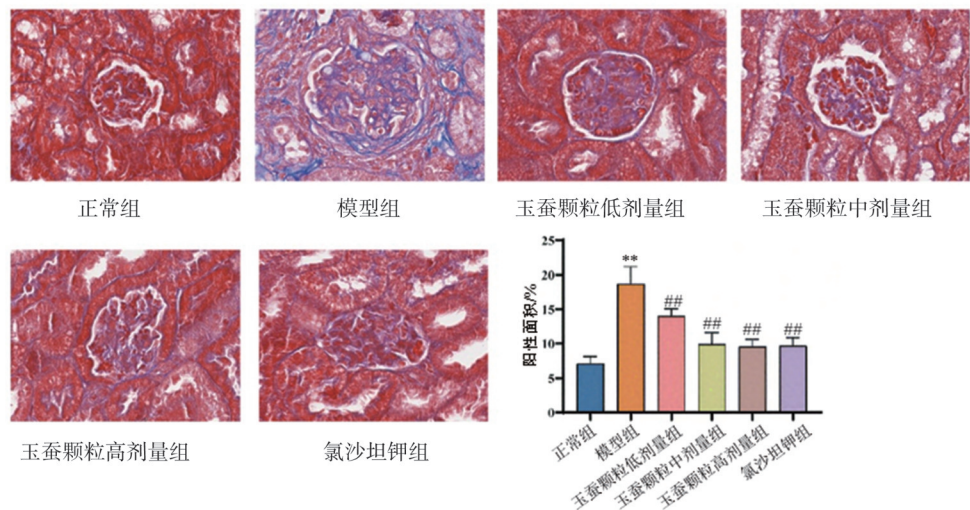
增厚,系膜基质扩张,侵犯毛细血管管腔。这些结果说明,不同剂量玉蚕颗粒处理能降低肾脏 Col-1、TGF- β 1 蛋白表达,减少肾间质蓝色纤维胶原沉积,各用药组小

鼠病理损伤减轻,表明玉蚕颗粒能有效缓解 db/db 小鼠肾脏损伤和肾脏纤维化。



注:红色箭头表示肾间质炎症细胞浸润、肾小管管腔扩张。

图2 各组小鼠肾组织病理形态(苏木精-伊红染色,×400)



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,### $P<0.01$ 。 $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图3 各组小鼠肾组织病理形态(马松染色,×400)

2.3 对 db/db 小鼠肾组织氧化应激的影响 结果显示,模型组小鼠肾组织 SOD、GSH-Px 水平降低($P<0.01, P<0.001$);玉蚕颗粒干预后,各组肾组织 SOD、GSH-Px 水平均升高($P<0.05, P<0.01, P<0.001$),其中玉蚕高剂量组 SOD 水平高于氯沙坦钾组($P<0.01$)。而模型组小鼠肾组织 MDA 水平较正常组肾组织升高($P<0.01$);玉蚕颗粒干预后,小鼠肾脏 MDA 水平降低($P<0.01, P<0.001$)。见图 6。结果表明,玉蚕颗粒可有效改善小鼠肾组织氧化应激水平。

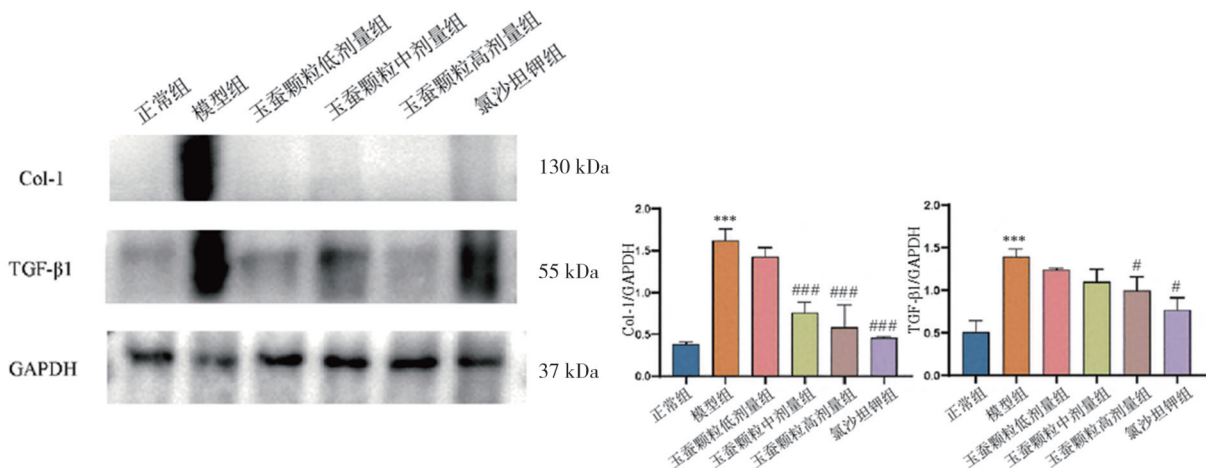
2.4 对 db/db 小鼠肾组织细胞凋亡的影响 结果显示,与正常组相比,模型组 TUNEL 染色阳性细胞(凋亡细胞)数量明显升高($P<0.01$);与模型组相比,玉蚕颗粒

各剂量组 TUNEL 染色阳性细胞数量降低($P<0.05, P<0.01$)。见图 7。

为进一步检测小鼠肾组织细胞凋亡情况,采用免疫组织化学法检测促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平。结果显示,与正常组相比,模型组 Bax、Caspase-3 表达水平升高($P<0.01$),经各剂量玉蚕颗粒干预后降低($P<0.01$);与正常组相比,模型组 Bcl-2 表达水平降低($P<0.01$),经各剂量玉蚕颗粒干预后升高($P<0.01$)。见图 8。上述结果表明,玉蚕颗粒可减轻小鼠肾组织细胞凋亡。

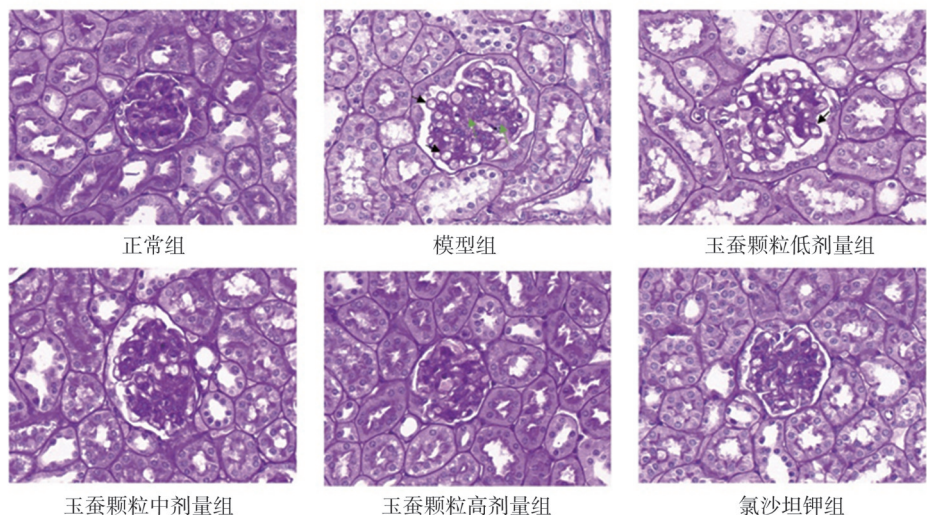
3 讨论

DKD 发病率逐年增加,在早期便会出现微量白蛋白



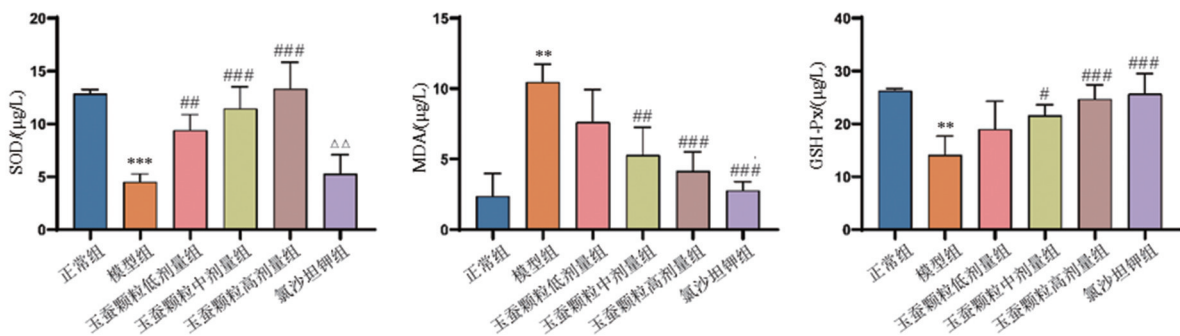
注:Col-1为I型胶原蛋白,TGF-β1为转化生长因子-β1蛋白,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。与正常组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,# $P<0.05$,### $P<0.001$ 。 $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

图4 各组小鼠肾组织Col-1、TGF-β1蛋白表达



注:绿色箭头表示球囊粘连,部分肾小球肥大。黑色箭头表示基底膜均质性增厚,系膜基质扩张。

图5 各组小鼠肾组织病理形态(过碘酸-希夫染色,×400)

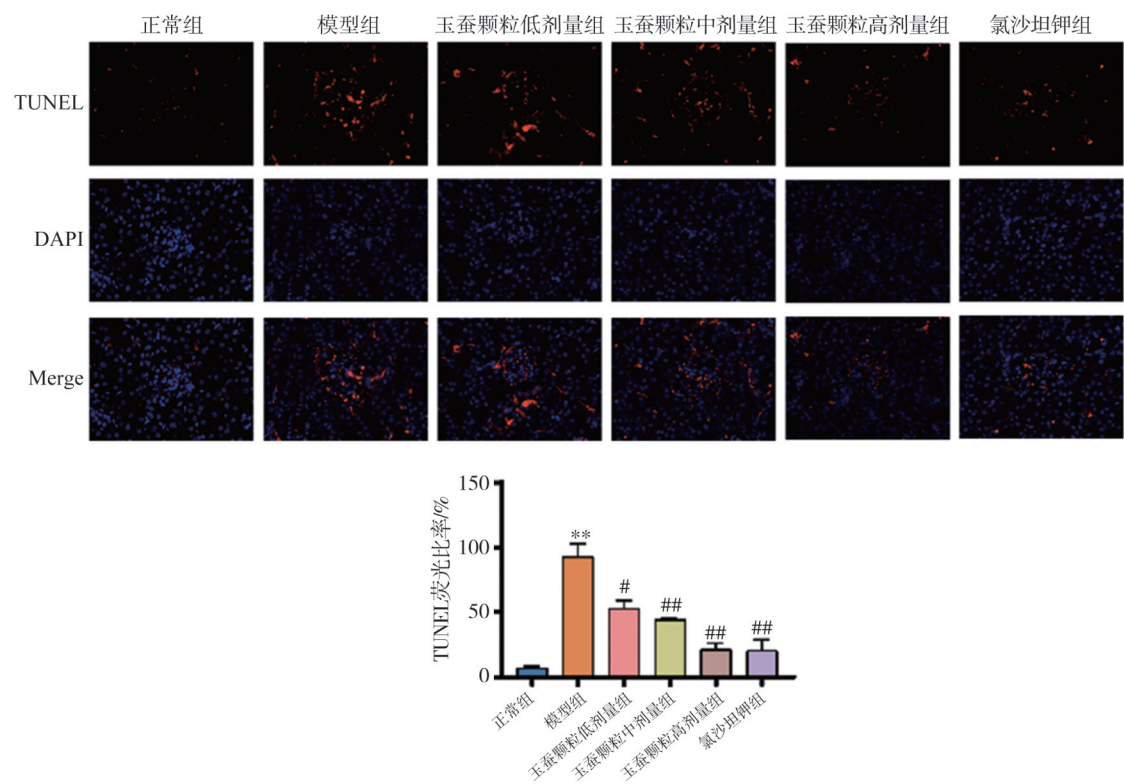


注:SOD为超氧化物歧化酶,MDA为丙二醛,GSH-Px为谷胱甘肽过氧化物酶;与正常组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与玉蚕颗粒高剂量组比较,△△ $P<0.01$ 。 $n=4$, $\bar{x}\pm s$ 。

图6 各组小鼠肾脏组织SOD、MDA、GSH-Px水平比较

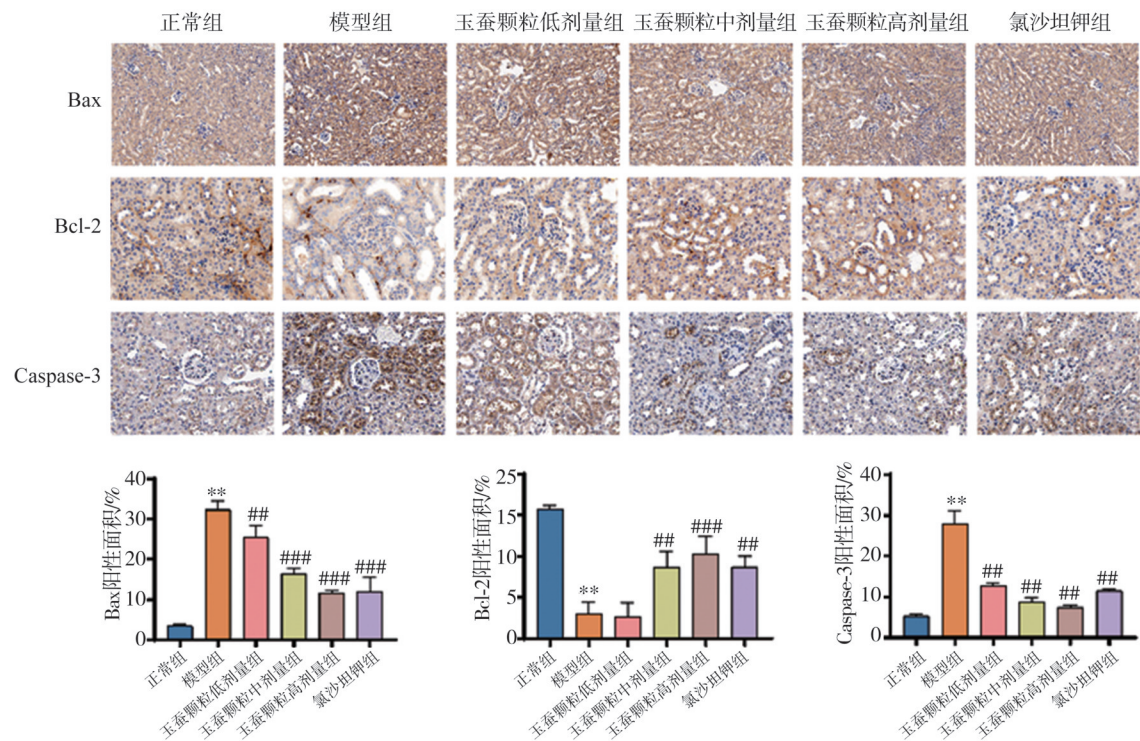
白尿,若不加以控制任其发展,则会发展为大量蛋白尿,进而出现RIF,最终进展为ESRD。玉蚕颗粒由黄芪、川芎、玉米须、蚕茧壳4味中药组成。方中黄芪补气健脾、升阳举陷,为气虚湿瘀型DKD提供正气基础;川

芎行气活血,可改善DKD患者微循环障碍;蚕茧壳利湿降浊,可减轻湿瘀内蕴、清浊不分而出现的蛋白尿症状;玉米须既能助黄芪利水消肿,又能与川芎相伍,清肝利胆,有助于降低DKD患者血脂水平;四药合用共奏



注:TUNEL为原位末端转移酶标记,DAPI为4',6-二脒基-2-苯基吡啶,Merge为合并。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。
 $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图7 各组小鼠肾组织细胞凋亡情况(TUNEL染色法,×400)



注:Bcl-2为B淋巴细胞瘤-2,Bax为Bcl-2相关X蛋白,Caspase-3为胱天蛋白酶-3。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。
 $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图8 各组小鼠肾组织Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达(免疫组织化学法,×200)

益气活血、利湿降浊之效。现代医学研究表明,该方中的成分对DKD有明确的作用靶点和机制,大量研究已证实这些中药对DKD有确切疗效。黄芪是诸多治疗DKD复方中的常用药,主要成分包括黄芪多糖、黄芪皂

昔和黄芪黄酮等,如黄芪多糖能够改善 DKD 小鼠肾组织血管内皮损伤,保护微血管结构与功能,黄芪多糖还具有免疫调节、抗氧化、抗炎等生物活性^[11-12];黄芪皂苷可通过减轻内质网应激保护 DKD 大鼠足细胞损伤^[13]。川芎注射液联合贝那普利治疗能够改善 DKD 患者的血液流变学指标水平,缓解肾功能,联用组效果优于单用贝那普利组^[14];川芎提取物川芎嗪可抑制 DKD 肾组织氧化应激和自噬^[15]。蚕茧壳及其提取物丝胶可降低 DKD 小鼠血糖和蛋白尿^[16-18]。玉米须可调节 DKD 大鼠氨基酸合成代谢,发挥抗氧化应激作用,减缓肾损伤^[19];玉米须多糖能减轻炎症反应,抑制肾小球系膜细胞增殖,缓解 DKD 发生发展^[20]。本课题组前期的基础实验^[9]结果表明玉蚕颗粒可保护 DKD 小鼠足细胞损伤,缓解 RIF。但玉蚕颗粒治疗 DKD 及 RIF 的具体作用机制仍需进一步深入探讨。

由于 db/db 小鼠缺乏瘦素受体,导致其食物摄入量增多且能量消耗下降^[21],作为自发性糖尿病小鼠,其特点为高血糖、肥胖、胰岛素抵抗并见。在 C57BLKS/J 基因背景下,db/db 小鼠更易出现肾脏损伤,使其成为目前 DKD 研究中最接近人体发病过程的动物模型^[22]。因此,本研究选用 db/db 小鼠为研究对象,在确认 db/db 小鼠模型成功建立后,采用玉蚕颗粒干预小鼠 10 周,并检测相应指标,实验结果表明模型组小鼠血糖升高,尿蛋白增加,肾功能受损。Masson 染色显示,模型组肾组织可见肾间质大量胶原沉积,出现 RIF,Western blot 结果显示肾组织 Col-1、TGF- β 1 蛋白表达增加,玉蚕颗粒干预后上述改变减轻,表明玉蚕颗粒能有效缓解 db/db 小鼠肾脏纤维化。为进一步探索其作用机制,我们检测了肾脏组织氧化应激和细胞凋亡指标,结果显示玉蚕颗粒能提高 db/db 小鼠肾脏抗氧化能力,抑制肾脏细胞凋亡,这可能是玉蚕颗粒缓解 DKD 小鼠 RIF 的作用机制。

氧化应激在 DKD 及 RIF 的发生发展中起重要作用,中医药干预氧化应激防治 DKD 已成为研究热点^[23-24]。氧化应激是指细胞内外环境中氧自由基的产生量超过细胞自身清除能力,导致的一种受损状态。在受到内外环境不利因素的刺激后,机体产生大量活性氧和氧自由基,无法被抗氧化防御系统完全清除,导致细胞结构和功能受损^[25],激活下游促纤维化细胞信号通路,加速 DKD 的肾脏损伤进展。抑制氧化应激可减少肾组织胶原纤维产生和肾小球硬化,恢复肾小球屏障功能,持续减少蛋白尿,改善肾功能。因此,改善氧化应激水平对于 DKD 的治疗具有重要意义。SOD 是一种抗氧化物酶,是防止氧化损伤的酶防御系统的一部分,它能将超氧自由基阴离子转化为过氧化氢,是肾损伤发生时调控氧化应激的主要抗氧化物酶^[26-27]。

GSH-Px 是一种含硒酶,在 SOD 将超氧自由基阴离子转化为过氧化氢后,GSH-Px 催化过氧化氢还原成水或相应的醇,以抵抗氧化应激。MDA 作为脂质过氧化的最终分解产物,被视为反映机体氧化损伤程度的生物标志物。本研究采用 ELISA 法检测了肾组织中 SOD、MDA、GSH-Px 的含量,发现玉蚕颗粒可提高肾脏 SOD、GSH-Px 水平,抑制 MDA 生成。这些结果说明玉蚕颗粒可减轻 DKD 动物肾脏氧化应激。肾脏内长期的氧化应激状态诱导了细胞凋亡过程,促使足细胞和小管上皮细胞脱落,这是发生肾脏纤维化的重要原因,因此抑制肾脏细胞凋亡对于延缓 DKD 及 RIF 具有重要意义^[28]。已有研究^[29]证实调节细胞凋亡对于 DKD 的保护作用,而 Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡过程中发挥重要作用。其中 Bcl-2 可起抗凋亡作用。有研究^[30]表明,Bcl-2 缺乏会导致肾功能进行性减退。Bax 可促进线粒体内的细胞色素 C 等蛋白释放到细胞质中,进一步引起 Caspase 酶级联反应,导致细胞凋亡发生。Caspase-3 活化激活细胞死亡的相关通路是细胞凋亡过程中的一个关键步骤。一旦 Caspase-3 被活化,它会开始切割和激活其他一系列蛋白,包括其他 Caspase 家族成员和细胞核蛋白,最终导致细胞结构瓦解和死亡^[31]。本研究采用 TUNEL 染色检测了小鼠肾组织细胞凋亡情况,发现玉蚕颗粒各组的凋亡细胞数量明显低于模型组;为进一步研究玉蚕颗粒对肾组织细胞凋亡的影响,检测了小鼠肾组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的表达,结果显示玉蚕颗粒可促进肾组织 Bcl-2 表达,抑制 Bax 和 Caspase-3 的表达,表明玉蚕颗粒可有效改善肾脏细胞凋亡。

本研究选用最接近人体发病过程的 db/db 小鼠模型,观察玉蚕颗粒对 db/db 小鼠的疗效及抗纤维化作用,探讨其延缓肾脏纤维化的作用机制,结果表明玉蚕颗粒可降低 db/db 小鼠血糖、改善肾功能,减少蛋白尿、延缓肾脏纤维化、减轻氧化应激,其作用机制可能与抑制肾脏细胞凋亡有关,然而关于其深层次作用靶点及通路还有待进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] STEVENS P E, LEVIN A. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group M. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline [J]. Ann Intern Med, 2013, 158 (11): 825-830.
- [2] JEFFERSON J A, SHANKLAND S J, PICHLER R H. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint [J]. Kidney Int, 2008, 74(1): 22-36.
- [3] 王宓,左力.糖尿病肾病诊治专家共识解读[J].临床内科杂志, 2020, 37(9): 675-678.

- [4] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138: 271-281.
- [5] WANG G, OUYANG J, LI S, et al. The analysis of risk factors for diabetic nephropathy progression and the construction of a prognostic database for chronic kidney diseases [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 264.
- [6] 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.
- [7] 牟新, 刘超. 糖尿病中医治疗切入点的探讨与思考[J]. *实用医学杂志*, 2024, 40(16): 2211-2218.
- [8] 余振杰, 李慧, 张亚亨, 等. 玉蚕颗粒联合氯沙坦钾片治疗气虚湿瘀型糖尿病肾病的临床观察[J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(7): 53-57.
- [9] 张亚亨, 盛广宇, 宋婷, 等. 玉蚕颗粒改善足细胞损伤治疗糖尿病肾病的机制研究[J]. *上海中医药杂志*, 2023, 57(11): 77-84.
- [10] 施新猷. 医学实验动物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 10-20.
- [11] 魏瑞贤, 杨丽霞, 崔阳阳, 等. 黄芪多糖对糖尿病肾病小鼠肾组织血管内皮损伤的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(21): 3130-3133.
- [12] 包文奇, 吕美, 王志祥. 黄芪多糖的药理研究进展[J]. *河南农业科学*, 2005, 34(4): 78-79, 90.
- [13] 王蕊花, 孙大林, 王金晶, 等. 黄芪甲苷调控 IRE-1 α 信号通路改善糖尿病肾病足细胞内质网应激[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2023, 24(11): 957-960, 1035.
- [14] 焦林娟. 川芎注射液联合贝那普利治疗糖尿病肾病疗效观察[J]. *航空航天医学杂志*, 2020, 31(5): 587-588.
- [15] LIN J, WANG Q, ZHOU S, et al. Tetramethylpyrazine: A review on its mechanisms and functions[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 150: 113005.
- [16] 宋成军, 郝祥俊, 陈志宏. 丝胶对糖尿病肾病大鼠肾功能和肾脏 TIMP-1 表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(15): 2157-2159.
- [17] 申野, 李坦, 吕刚, 等. 玉米须蚕茧提取物对糖尿病模型小鼠血糖的影响[J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2010, 11(1): 46-48.
- [18] 吕刚, 李坦, 申野, 等. 玉米须、蚕茧提取物对实验性高血糖小鼠血糖水平的影响[J]. *山东医药*, 2008, 48(35): 35-36.
- [19] 赵媛媛, 董文婷, 孙国东, 等. 玉米须对糖尿病肾病大鼠肾组织和尿液代谢组学研究[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(8): 1566-1576.
- [20] 曲萌, 侯勤龙, 翁诗雅, 等. 玉米须多糖对高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖及炎症因子表达的影响[J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2020, 21(4): 461-465.
- [21] FISCHER A W, CANNON B, NEDERGAARD J. Leptin: Is it thermogenic?[J]. *Endocr Rev*, 2020, 41(2): 232-260.
- [22] KLEINERT M, CLEMMENSEN C, HOFMANN S M, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(3): 140-162.
- [23] 张之弘, 李秀娟, 王宇馨, 等. 中药干预氧化应激防治糖尿病肾病的研究进展[J]. *实用中医内科杂志*, 2024, 38(9): 134-136.
- [24] 陈曦, 董凯旋, 周荣, 等. 中药调控 p38 丝裂原活化蛋白激酶/核因子 κ B 通路治疗肾纤维化研究进展[J]. *陕西中医*, 2023, 44(7): 980-982, 986.
- [25] KAO M P, ANG D S, PALL A, et al. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options [J]. *J Hum Hypertens*, 2010, 24(1): 1-8.
- [26] PISOSCHI A M, POP A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review[J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 97: 55-74.
- [27] LEE Y S, CHEON I S, KIM B H, et al. Loss of extracellular superoxide dismutase induces severe IL-23-mediated skin inflammation in mice[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(3): 732-741.
- [28] 陆立煌, 王旭, 朴成玉, 等. 中药干预足细胞凋亡治疗糖尿病肾病研究进展[J]. *中医药学报*, 2023, 51(10): 100-105.
- [29] 顾悦, 申宇航, 丁鑫, 等. 基于 PERK/ATF4/CHOP 途径探讨当归补血汤含药血清抑制糖尿病肾病内质网应激改善足细胞凋亡的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(16): 10-18.
- [30] LOZIC M, MINARIK L, RACETIN A, et al. *CRKL*, *AIFM3*, *AIF*, *BCL2*, and *UBASH3A* during human kidney development [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9183.
- [31] SONG G H, GAO J P, WANG C F, et al. Sodium fluoride induces apoptosis in the kidney of rats through caspase-mediated pathways and DNA damage[J]. *J Physiol Biochem*, 2014, 70(3): 857-868.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2024-10-22