

# 真武汤调控 RhoA/ROCK/MLC 信号通路改善系膜增生性肾小球肾炎的作用研究

李俞贤<sup>1</sup>, 黄庆宝<sup>2,3</sup>, 周红祖<sup>2</sup>, 余惠旻<sup>4</sup>, 李万泉<sup>2,3</sup>, 陈越<sup>2,3</sup>, 郑平<sup>2,3</sup>, 梁慧超<sup>2</sup>, 周玖瑶<sup>1\*</sup>, 陈俊麒<sup>2,3\*</sup>

1. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510006
2. 广州中医药大学 第四临床医学院 深圳市中医院, 广东 深圳 518033
3. 深圳市中医院 中药制剂研究重点实验室, 广东 深圳 518033
4. 深圳大学 医学部, 广东 深圳 518060

**摘要:** 目的 评价真武汤对系膜增生性肾小球肾炎 (MsPGN) 的保护作用, 并探讨其抑制系膜细胞异常增殖及炎症反应的作用机制。方法 小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、泼尼松 ( $7.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 组和真武汤低、中、高剂量 ( $3.2$ 、 $6.3$ 、 $12.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 以生药剂量计) 组, 除对照组外, 采用阳离子牛血清白蛋白建立 MsPGN 小鼠模型, 模型建立完成后次日开始 ig 给药, 每天 1 次, 连续 2 周, 对照组及模型组给予等体积 0.9% 氯化钠溶液。通过检测 24 h 尿蛋白、血清肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 及肾小球滤过率 (GFR) 评价肾功能; 苏木素-伊红 (HE)、糖原 (PAS) 染色观察肾组织病理变化, 免疫组化检测 Ki67 及增殖细胞核抗原 (PCNA) 表达, 免疫荧光检测 F4/80 及 Ly6G 阳性炎症细胞浸润。体外采用脂多糖诱导系膜细胞炎症增殖模型, 用 2.5%、5.0%、7.5% 真武汤含药血清干预, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞周期及凋亡, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测炎症因子表达。Western blotting 实验检测 RhoA、Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 (ROCK)、肌球蛋白轻链 (MLC) 及 p-MLC 蛋白表达。通过分子对接及生物膜干涉技术 (BLI) 验证真武汤核心成分与 RhoA 蛋白的相互作用。结果 与模型组比较, 真武汤干预可显著降低 MsPGN 小鼠 24 h 尿蛋白、Cr 及 BUN 水平 ( $P < 0.01$ ), 提高 GFR ( $P < 0.01$ ), 明显改善肾小球系膜增生及肾组织病理损伤。免疫组化结果显示真武汤可显著降低 Ki67 及 PCNA 表达 ( $P < 0.01$ )。免疫荧光结果显示真武汤减少 F4/80<sup>+</sup> 巨噬细胞及 Ly6G<sup>+</sup> 中性粒细胞浸润 ( $P < 0.01$ ), qRT-PCR 结果显示真武汤减少炎症因子表达。体外实验表明真武汤含药血清可显著抑制脂多糖诱导的系膜细胞增殖 ( $P < 0.01$ ), 促进细胞凋亡 ( $P < 0.01$ ), 并降低炎症因子表达 ( $P < 0.01$ )。Western blotting 结果显示真武汤可显著下调 RhoA、ROCK 及 p-MLC 蛋白表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。分子对接及 BLI 结果显示芍药苷及白术内酯 III 与 RhoA 蛋白具有良好的结合活性。结论 真武汤可抑制系膜细胞异常增殖及炎症反应, 从而改善 MsPGN, 其作用可能与芍药苷及白术内酯 III 与 RhoA 蛋白结合, 进而参与 RhoA/ROCK/MLC 信号通路调控相关。

**关键词:** 真武汤; 系膜增生性肾小球肾炎; RhoA/ROCK/MLC 通路; 系膜细胞; 炎症反应

**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)06-1925-13

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.06.006

## Protective effects of Zhenwu Decoction on mesangial proliferative glomerulonephritis via regulation of RhoA/ROCK/MLC signaling pathway

LI Yuxian<sup>1</sup>, HUANG Qingbao<sup>2,3</sup>, ZHOU Hongzu<sup>2</sup>, YU Huimin<sup>4</sup>, LI Wanquan<sup>2,3</sup>, CHEN Yue<sup>2,3</sup>, ZHENG Ping<sup>2,3</sup>, LIANG Huichao<sup>2</sup>, ZHOU Jiuyao<sup>1</sup>, CHEN Junqi<sup>2,3</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China
2. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, the Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese

**收稿日期:** 2026-04-07

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (82505159, 82374130, 82174061); 广东省自然科学基金项目 (2026A1515011996); 广东省科协青年科技人才培养计划 (SKXRC2025155); 全国中药特色技术传承人才培养项目 (国中医药人教函 [2023] 96 号); 深圳市医疗卫生三名工程项目 (SZZYSM202111002); 深圳市基础研究面上项目 (JCYJ20220531102208019)

**作者简介:** 李俞贤 (1999—), 女, 硕士研究生, 主攻中药肾脏药理研究。E-mail: 1445695335@qq.com

**\*通信作者:** 陈俊麒 (1994—), 男, 主管中药师, 医学博士, 主攻中药药理与制剂。E-mail: cj3587@gzucm.edu.cn

周玖瑶 (1965—), 男, 教授, 医学博士, 主攻中药肾脏药理。E-mail: yaoli@gzucm.edu.cn

Medicine, Shenzhen 518033, China

3. Shenzhen Key Laboratory of Chinese Medicine Preparations, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, China
4. Medical School of Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

**Abstract: Objective** To evaluate the protective effects of Zhenwu Decoction on mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN) and to investigate its mechanisms in regulating mesangial cell proliferation and inflammatory responses as well as its material basis. **Methods** After one week of adaptive feeding, the mice were randomly divided into a control group, a model group, a prednisone ( $7.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) group, and low, medium, and high-dose Zhenwu Decoction ( $3.2, 6.3, 12.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , calculated as the raw drug dose) groups. Except for the control group, cationic bovine serum albumin was used to establish a MsPGN mouse model. The ig administration began the day after the model was established, once daily for 2 consecutive weeks. The control group and model group were given equal volumes of 0.9% sodium chloride solution. Renal function was evaluated by measuring 24 h urinary protein, serum creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN), and glomerular filtration rate (GFR). Renal pathological changes were observed by HE and PAS staining. Immunohistochemistry was performed to detect Ki-67 and PCNA expression. Immunofluorescence was used to evaluate infiltration of F4/80 and Ly6G positive inflammatory cells. *In vitro*, lipopolysaccharide (LPS) was used to induce mesangial cell proliferation and inflammation, intervene with 2.5%, 5.0%, and 7.5% Zhenwu Decoction drug-containing serum, cell proliferation was assessed by CCK-8 assay, while cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. Real-time quantitative PCR was used to detect inflammatory cytokines. Western blotting was performed to detect RhoA, ROCK, MLC and phosphorylated MLC (p-MLC). Molecular docking and biolayer interferometry (BLI) were used to verify the interaction between active components of Zhenwu Decoction and RhoA protein. **Results** Compared with the model group, Zhenwu Decoction significantly reduced 24 h urinary protein, Cr and BUN levels ( $P < 0.01$ ), increased GFR ( $P < 0.01$ ), and improved renal pathological injury. Zhenwu Decoction significantly decreased Ki-67 and PCNA expression ( $P < 0.01$ ). Immunofluorescence results showed reduced infiltration of F4/80<sup>+</sup> macrophages and Ly6G<sup>+</sup> neutrophils ( $P < 0.01$ ). *In vitro* experiments showed that Zhenwu Decoction-containing serum significantly inhibited LPS-induced mesangial cell proliferation ( $P < 0.01$ ), promoted apoptosis ( $P < 0.01$ ), and reduced TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and MCP-1 expression ( $P < 0.01$ ). Western blotting results showed that Zhenwu Decoction significantly downregulated RhoA, ROCK and p-MLC protein expression ( $P < 0.05, 0.01$ ). Molecular docking and BLI assays demonstrated good binding activity between paeoniflorin, atractylenolide III and RhoA protein. **Conclusion** Zhenwu Decoction can inhibit abnormal mesangial cell proliferation and inflammatory responses, thereby ameliorating MsPGN. Its effects may be associated with the regulation of the RhoA/ROCK/MLC signaling pathway, potentially through the interaction of paeoniflorin and atractylenolide III with RhoA protein.

**Key words:** Zhenwu Decoction; mesangial proliferative glomerulonephritis; RhoA/ROCK/MLC signaling pathway; mesangial cell; inflammation

系膜增生性肾小球肾炎 (MsPGN) 是多种原发性肾小球疾病常见的病理类型, 其主要特征为系膜细胞异常增殖及系膜基质过度沉积, 可进一步导致肾小球硬化及肾功能进行性下降<sup>[1]</sup>。研究表明, 系膜细胞异常增殖及炎症反应是推动 MsPGN 发生发展的关键环节<sup>[1]</sup>, 因此寻找能够同时调控系膜细胞增殖及炎症反应的干预措施具有重要意义。

近年来研究发现, RhoA/Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 (ROCK) 信号通路在调控细胞骨架重构、细胞收缩、迁移及增殖等过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。该通路激活后可促进肌球蛋白轻链 (MLC) 磷酸化, 增强细胞收缩及增殖能力, 并参与肾脏炎症及纤维化过程<sup>[3]</sup>。已有研究<sup>[4]</sup>表明, RhoA/ROCK 信号通路异常激活与多种肾小球疾病密切相关, 抑制该信号

通路可有效减轻肾脏炎症反应及细胞异常增殖, 因此该通路可能成为 MsPGN 的重要干预靶点。

真武汤为张仲景《伤寒论》经典方剂, 由附子、茯苓、芍药、白术、生姜组成, 具有温阳利水、健脾益肾之效, 临床常用于慢性肾炎、水肿等疾病的治疗<sup>[5]</sup>。现代药理研究表明, 真武汤具有抗炎、抗氧化及改善肾功能等作用<sup>[6]</sup>, 但其是否通过调控系膜细胞异常增殖及 RhoA/ROCK 信号通路发挥肾保护作用尚未完全阐明。此外, 中药复方作用的物质基础及其直接靶点仍是当前研究的重点和难点。

基于此, 本研究采用 MsPGN 小鼠模型及脂多糖 (LPS) 诱导的系膜细胞炎症模型, 系统评价真武汤对肾功能、肾组织病理、系膜细胞异常增殖及炎症反应的影响, 并进一步探讨其对 RhoA/ROCK/

MLC 信号通路的调控作用。同时通过分子对接及生物膜干涉技术 (BLI) 验证真武汤核心活性成分与 RhoA 蛋白的相互作用, 以期从“作用机制-物质基础-直接靶点”层面阐明真武汤治疗 MsPGN 的科学内涵, 为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

无创经皮荧光监测系统 (美国 MediBeacon 公司); CKX53 倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司); LSM 800 激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司); H-7650 透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); NovoCyte Quanteon 流式细胞仪 (美国 Agilent 公司); NanoDrop™ One/OneC 微量紫外-可见光分光光度计和 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, ProFlex™ PCR 系统); CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统 (美国 BIO-RAD 公司); LCMS-8045 液质联用仪 (日本岛津公司); 5200 全自动化学发光分析系统 (上海天能公司); Octet R8 生物层干涉仪 (美国 Sartorius 公司)。

### 1.2 实验动物及细胞

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 6 周龄, 体质量 (20±2) g; SPF 级雄性 SD 大鼠, 6 周龄, 体质量 (180±220) g, 购自广州中医药大学实验动物中心, 动物使用许可证号 SYXK (粤) 2019-0202, 实验方案经广州中医药大学动物伦理委员会批准 (ZYD-2021-273、ZYD-2021-214)。

小鼠系膜细胞系购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

### 1.3 药材及主要试剂

黑顺片、茯苓、白芍、白术中药饮片购自康美药业股份有限公司, 生姜为市售新鲜药材, 经深圳市中医院周红祖主任药师鉴定为正品, 黑顺片为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根加工品, 茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎, 生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎; LPS (美国 Sigma 公司); 醋酸泼尼松片 (山东鲁抗公司, 批号 180911); Ki67 一抗 (美国 Selleck 公司); 增殖细胞核抗原 (PCNA) 一抗 (江苏华奥泰公司); Ly6G、RhoA 和 ROCK 一抗 (英国 Abcam 公司); F4/80、MLC、p-MLC (Ser19) 一抗、Alexa

Fluor 555 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (美国 CST 公司);  $\beta$ -微管蛋白 ( $\beta$ -tubulin) 一抗 (江苏亲科公司); 尿蛋白定量检测试剂盒、血清肌酐 (Cr) 检测试剂盒、血清尿素氮 (BUN) 检测试剂盒 (南京建成公司); 4% 多聚甲醛、2.5% 戊二醛、DAPI 染液、抗荧光淬灭封片剂 (北京索莱宝公司); DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥公司); CCK-8 细胞增殖检测试剂盒 (江苏凯基公司); 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天公司); 实时荧光定量 PCR 用的 RNA 提取试剂、反转录试剂盒、预混荧光定量试剂盒 (湖南艾科瑞公司); 芍药苷和白术内酯 III (成都瑞芬思公司, 质量分数 >98, 批号 RDD-S01002304028、RDD-B03502306029); 重组 RhoA 蛋白 (武汉云克隆公司)。

## 2 方法

### 2.1 真武汤水提液制备

按经典配伍比例<sup>[7]</sup>称取附子 9 g、茯苓 9 g、芍药 9 g、白术 6 g、生姜 9 g, 附子先煎 30 min, 余药加 10 倍量水浸泡 30 min 后加入, 继续煎煮 2 h, 滤过; 药渣加 8 倍量水复煎 1.5 h, 合并 2 次滤液, 浓缩至生药质量浓度 1.68 g·mL<sup>-1</sup> 备用。经 LC-MS 检测, 真武汤水提液中含指标成分芍药苷 13.815 5 mg·mL<sup>-1</sup>、6-姜酚 0.391 6 mg·mL<sup>-1</sup>、白术内酯 III 0.189 8 mg·mL<sup>-1</sup>、苯甲酰新乌头原碱 0.117 0 mg·mL<sup>-1</sup>、苯甲酰乌头原碱 0.006 8 mg·mL<sup>-1</sup>、茯苓酸 0.003 1 mg·mL<sup>-1</sup>。

### 2.2 真武汤含药血清制备

取 50 只雄性 SD 大鼠, 随机分为对照组、真武汤 (8.4 g·kg<sup>-1</sup>, 2 倍临床等效剂量) 组 (对照组 20 只, 真武汤组 30 只), 对照组大鼠 ig 等体积的 0.9% 氯化钠溶液, 每天 ig 给药 1 次, 连续 7 d。第 6 天 24 h 禁食不禁水, 第 7 天 ig 给药 1 h 后, 以 3% 戊巴比妥钠 ip 进行麻醉 (50 mg·kg<sup>-1</sup>), 腹主动脉取血。室温静置 1 h 后, 4 °C、3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 移取上清, 56 °C 水浴 30 min, 使用 0.22  $\mu$ m 滤膜进行滤过, 保存于 -20 °C。

### 2.3 动物模型建立及给药

小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、泼尼松 (7.5 g·kg<sup>-1</sup>) 组和真武汤低、中、高剂量 (3.2、6.3、12.6 g·kg<sup>-1</sup>, 以生药剂量计, 中剂量为临床等效剂量) 组, 每组 6 只。

阳离子化胎牛血清白蛋白 (cBSA) 参照课题组已经报道方法<sup>[8]</sup>研究制备。参照文献报道方法<sup>[9]</sup>建

立 MsPGN 小鼠模型：cBSA 与不完全弗氏佐剂等体积混合，先尾 iv 0.2 mg cBSA 进行预免疫；2 周后以 13 mg·kg<sup>-1</sup> 尾 iv cBSA（溶于 0.9% 氯化钠溶液），隔天 1 次，持续 3 周，对照组注射等体积 0.9% 氯化钠溶液。模型建立完成后次日开始 ig 给药，每天 1 次，连续 2 周，对照组及模型组给予等体积 0.9% 氯化钠溶液。

#### 2.4 肾功能指标检测

末次给药后禁食过夜，代谢笼收集小鼠 24 h 尿液，采用考马斯亮蓝法检测尿蛋白含量；摘眼球取血，离心分离血清，采用试剂盒按说明书步骤检测血清 Cr、BUN 水平。

采用无创经皮荧光监测系统，以 FITC-菊粉为探针，检测小鼠肾小球滤过率（GFR）：异硫氰酸荧光素标记的菊糖（质量浓度 35 mg·mL<sup>-1</sup>）以无菌水配制，全程避光保存。经小鼠尾 iv 该试剂，给药剂量为 50 mg kg<sup>-1</sup>。实验过程中，将监测仪探头通过透明贴膜固定于小鼠脱毛后的皮肤表面；先记录约 3 min 的荧光基线值，随后尾 iv FITC-菊糖，并持续记录 60 min 的荧光信号。将实验数据传输至计算机，采用 MB-LAB 与 MB Studio 2 软件进行分析；通过软件内置算法拟合荧光衰减曲线，并依据 FITC-菊糖的消除动力学特征计算 GFR 值。

#### 2.5 肾组织病理

依据本课题组前期研究<sup>[10]</sup>，小鼠处死后取肾组织，4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，连续切片（厚 4 μm），按常规方法进行苏木素-伊红（HE）、糖原（PAS）染色，光学显微镜（×400）下随机选取 8 个肾小球进行观察，采用 Image J 1.54p 软件进行半定量分析，分别计算系膜基膜面积占肾小球切面面积的比例、每个肾小球切面内总细胞数及肾小球切面面积，并取各肾小球平均值用于统计分析。取部分肾皮质组织，用 2.5% 戊二醛固定，梯度脱水，环氧树脂包埋，超薄切片（厚 70 nm），醋酸铀-柠檬酸铅染色，透射电镜（×2 000）下观察肾小球系膜区超微结构变化。

#### 2.6 免疫组化检测肾组织 Ki67 和 PCNA 表达

肾组织石蜡切片经脱蜡、水化、柠檬酸盐缓冲液抗原修复后，3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻断内源性过氧化物酶，5% 牛血清白蛋白封闭非特异性结合，分别加入 Ki67（1：5 000）、PCNA（1：5 000）一抗，4 °C 孵育过夜；加入辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1 h，DAB 显色，苏木素复染，梯度脱水透明，中性树胶封片。光学显微镜（×400）下随机选取 8

个肾小球，Image J 1.52a 软件计算阳性表达率，以每肾小球切面的阳性细胞数占切面球内细胞核总数进行定量，并取各视野平均值用于统计分析。

#### 2.7 免疫荧光检测肾组织炎症细胞浸润

肾组织石蜡切片脱蜡、水化、抗原修复后，5% 牛血清白蛋白封闭非特异性结合，加入 F4/80（1：300）、Ly6G（1：600）一抗，4 °C 孵育过夜；加入 Alexa Fluor 555/488 荧光二抗（1：100），室温避光孵育 1 h，4', 6-二脒基-2-苯基吡啶（DAPI）染核 10 min，抗荧光淬灭封片剂封片。激光共聚焦显微镜（×400）下随机选取 8 个视野进行观察，采用 Image J 1.52a 软件进行分析，以单位视野内阳性细胞核数占总细胞核数（DAPI 染色）的比例进行定量，并取各视野平均值用于统计分析。

#### 2.8 CCK-8 法测细胞增殖率

取对数生长期小鼠系膜细胞以每孔 1×10<sup>4</sup> 个接种在 96 孔板，培养 12 h 后分为对照（空白大鼠血清）组、模型（40 μg·mL<sup>-1</sup> LPS）组和真武汤（用 2.5%、5.0%、7.5% 含药血清干预）组，每组设 3 个复孔，继续培养 24 h 后，按 CCK-8 试剂盒流程操作，并计算细胞增殖率。

#### 2.9 流式细胞术检测细胞周期和凋亡

细胞以每孔 1×10<sup>5</sup> 个接种于 6 孔板，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后换无血清培养基同步 24 h，分组干预 24 h，操作同“2.8”项。细胞周期检测：无 EDTA 胰酶 37 °C 消化 5 min，1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集细胞，PBS 洗涤 2 次；70% 乙醇 4 °C 固定过夜，PBS 复洗后，按碧云天细胞周期试剂盒说明书加 500 μL PI 工作液，37 °C 避光孵育 30 min。细胞凋亡检测：同步处理细胞同法消化收集，预冷 PBS 洗涤 2 次；按碧云天凋亡试剂盒说明书，195 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞，加 5 μL Annexin V-FITC 与 10 μL PI 染色液，室温避光孵育 15 min。NovoCyte Quanteon™ 流式细胞仪 488 nm 通道检测，勾选 FSC/SSC W、H、A 参数排除黏连体，NovoExpress 1.4.1 软件分析结果。

#### 2.10 肾组织总 RNA 提取及反转录 cDNA

将置于 -80 °C 的肾组织（或细胞）取出，置于冰上缓慢解冻；加入 RNA 提取试剂 1 mL，使用组织研磨仪以 55 Hz 频率研磨 1 min，室温静置 5 min 充分裂解后 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min；取上清并加入 200 μL 预冷氯仿，强烈震荡 15 s，室温静置 5 min 后 4 °C、14 000×g 离心 15 min；取上清加入 500 μL 预

冷异丙醇, 轻轻混匀后, 室温静置 10 min 后 4 °C、14 000×g 离心 15 min, 弃上清留沉淀, 加入用 DEPC 水配制预冷 75%乙醇溶液洗涤 3 次后 4 °C、7 500×g 离心 5 min; 弃去乙醇后室温待乙醇完全挥发后, 加入 DEPC 水溶解, 通过超微量紫外分光光度计检测 RNA 浓度并用 DEPC 水稀释。根据反转录试剂盒说明书操作逆转录为 cDNA 备用。

### 2.11 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

引物由上海生工生物工程有限公司合成, 引

物序列见表 1。根据试剂盒说明书配制反应体系, 在实时荧光定量 PCR 仪上进行检测, 反应程序设置如下: 95 °C 预变性 30 s; PCR 扩增 40 个循环: 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火/延伸 30 s, 60 °C 阶段采集荧光信号。熔解曲线分析: 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 然后以 0.075 °C·s<sup>-1</sup> 的升温速率升至 95 °C, 连续采集荧光信号以分析产物特异性。结果采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法进行半定量统计, 并以对照组进行归一化处理。

表 1 小鼠引物序列

Table 1 Mouse primer sequences

基因	正向引物 (5'→3')	逆向引物 (5'→3')
<i>TNF-α</i>	GGAACACGTCGTGGGATAATG	GGCAGACTTTGGATGCTTCTT
<i>IL-1β</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>MCP-1</i>	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
<i>IL-6</i>	TAGTCCTTCTACCCCAATTTC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>GAPDH</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

### 2.12 Western blotting 实验

取小鼠肾组织或系膜细胞, 加入含蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上充分裂解, 4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清, 采用 BCA 法进行蛋白定量。取适量蛋白样品, 加入上样缓冲液, 沸水浴变性 10 min。配制 10% SDS-PAGE 凝胶, 每泳道上样 20~30 μg 蛋白, 恒压电泳分离蛋白, 湿法转印至 PVDF 膜。转印完毕后, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 弃封闭液, 加入一抗稀释液: RhoA (1:5 000)、ROCK (1:2 000)、MLC (1:1 000)、p-MLC (1:1 000)、β-tubulin (1:10 000), 4 °C 摇床孵育过夜。次日用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入对应二抗稀释液, 室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次后, 采用 ECL 化学发光法显影, 使用凝胶成像系统采集条带, 以 Image J 1.52a 软件分析条带灰度值, 以目的蛋白/内参蛋白灰度比值表示蛋白相对表达水平。进行 3 次独立重复, 并取平均值用于统计分析。

### 2.13 分子对接及生物膜干涉技术 (BLI) 实验

从 PubChem 数据库下载芍药苷、白术内酯 III 等真武汤关键成分<sup>[6-7]</sup>的三维结构, 进行能量最小化处理。RhoA 蛋白晶体结构 (PDB: 1A2B) 从 PDB 数据库获取, 采用 PyMOL 2.6.0 与 AutoDock Tools 1.5.7 进行预处理, 删除结晶水、加氢、分配电荷并定义结合口袋。将配体与受体文件转换为 PDBQT

格式, 使用 AutoDock Vina 1.2.3 进行分子对接计算, 以结合能为评价指标, 分析成分与 RhoA 蛋白的结合模式、氢键及疏水作用。

采用 Octet R8 生物层干涉仪验证成分与 RhoA 蛋白的直接结合能力。将重组 RhoA 蛋白固定于 SA 生物传感器表面, 以 PBS 为缓冲液, 设置梯度浓度的芍药苷、白术内酯 III 待测液。实时记录结合与解离过程的响应单位 (RU), 采用仪器配套软件以 1:1 Langmuir 结合模型计算结合动力学参数, 判断二者是否存在特异性结合。

### 2.14 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 Duncan 法。

## 3 结果

### 3.1 真武汤改善 MsPGN 小鼠肾功能

从图 1 可知, 与对照组比较, 模型组小鼠 24 h 尿蛋白含量显著升高, 血清 Cr、BUN 水平明显上升 ( $P < 0.01$ ), GFR 明显下降 ( $P < 0.01$ ), 表明小鼠肾小球滤过屏障受损; 与模型组比较, 各剂量真武汤和泼尼松可降低 24 h 尿蛋白含量, 降低血清 Cr、BUN 水平 ( $P < 0.01$ ), 明显升高 GFR 水平 ( $P < 0.01$ )。结果表明, 真武汤可有效改善 MsPGN 小鼠的肾功能指标和肾滤过屏障。

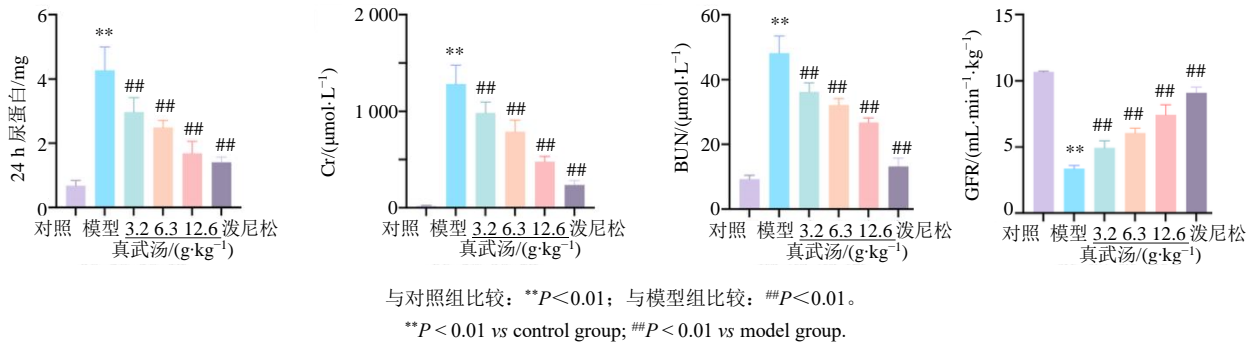


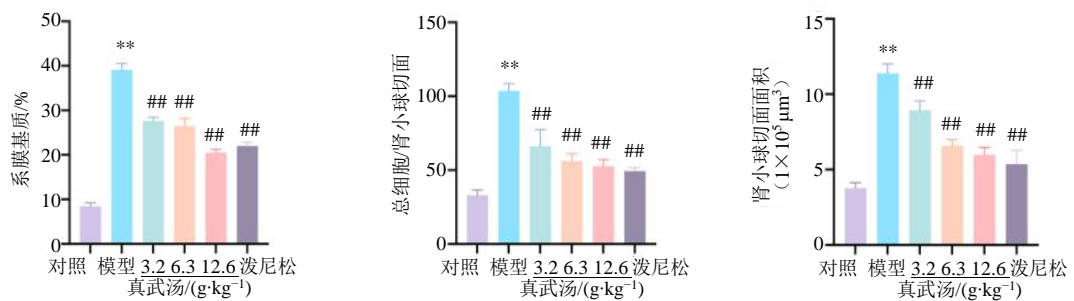
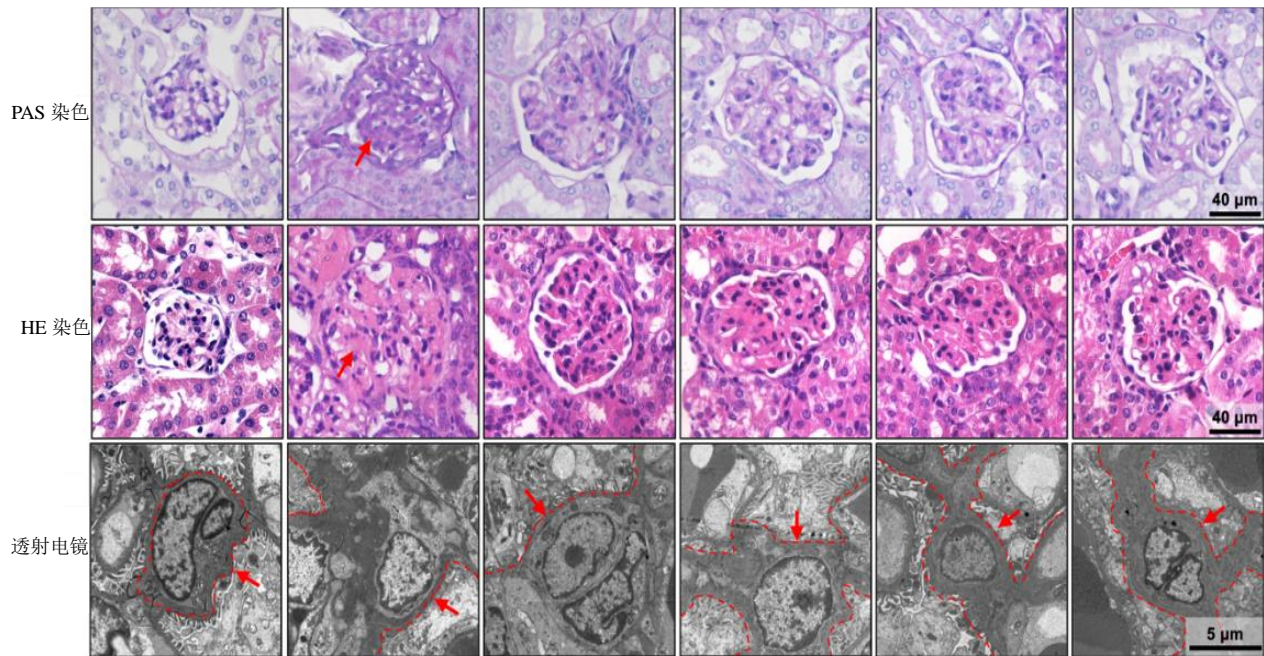
图 1 真武汤对 MsPGN 小鼠肾功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 1 Effects of Zhenwu Decoction on renal function in mice with MsPGN ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 3.2 真武汤减轻 MsPGN 小鼠肾组织病理损伤

从图 2 可知, HE、PAS 染色结果显示, 对照组小鼠肾小球形态规则, 系膜细胞及基质无增生, 肾小球结构完整; 模型组小鼠肾小球明显肥大 ( $P <$

0.01), 球内细胞大量增殖 ( $P < 0.01$ ), 系膜基质显著扩张 ( $P < 0.01$ ), 肾小球结构紊乱; 与模型组比较, 真武汤各剂量组和泼尼松组肾小球病理损伤明显改善, 球内细胞增殖及基质扩张程度显著减轻



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ; 红箭头指示系膜区。  
\*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group; Red arrow indicates mesangial region.

图 2 真武汤对 MsPGN 小鼠肾病理的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 2 Effects of Zhenwu Decoction on renal pathology in mice with MsPGN ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

( $P < 0.01$ )。透射电镜结果显示, 模型组小鼠系膜区增宽 ( $P < 0.01$ ), 细胞器异常增多, 系膜基质电子密度增高。给予真武汤或泼尼松干预后, 系膜区有明显缩小 ( $P < 0.01$ )。结果表明真武汤可以有效改善 MsPGN 小鼠肾病理, 抑制系膜基质异常增生, 减少肾小球球内细胞的异常增殖。

### 3.3 真武汤抑制 MsPGN 小鼠肾组织系膜细胞增殖

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肾小球内系膜区 Ki67、PCNA 阳性表达显著增强, 阳性细胞数明显增多 ( $P < 0.01$ ), 表明系膜细胞增殖活跃。与模型组比较, 真武汤各剂量和泼尼松可显著下调肾组织 Ki67、PCNA 阳性表达率 ( $P < 0.01$ ),

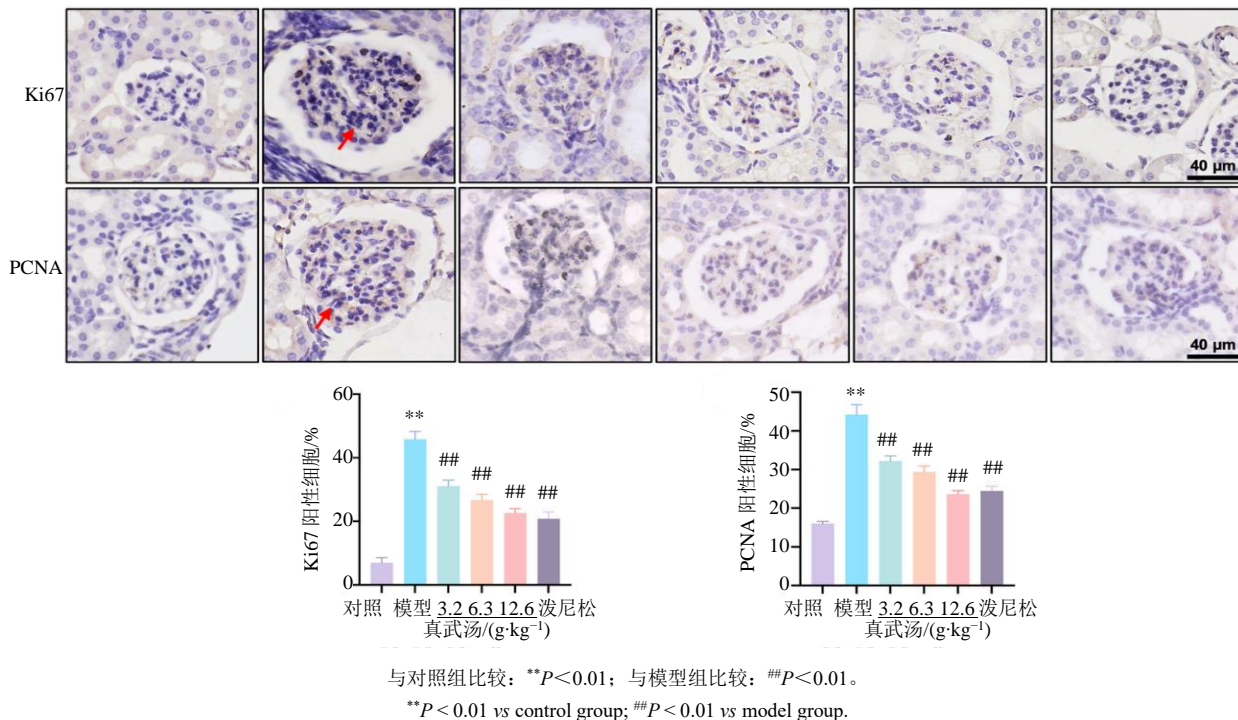


图 3 真武汤对 MsPGN 小鼠系膜细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 3 Effects of Zhenwu Decoction on mesangial proliferation in mice with MsPGN ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

表明真武汤可有效抑制 MsPGN 小鼠系膜细胞的异常增殖。

### 3.4 真武汤减轻 MsPGN 小鼠肾组织炎症反应

如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肾组织 F4/80<sup>+</sup>巨噬细胞、Ly6G<sup>+</sup>中性粒细胞显著增加, 阳性荧光面积占比明显升高 ( $P < 0.01$ ), 炎症因子分泌增多 ( $P < 0.01$ ), 表明模型小鼠肾组织中出现了大量的炎症细胞浸润, 炎症反应增加; 与模型组比较, 各剂量真武汤及泼尼松可显著减少 F4/80<sup>+</sup>、Ly6G<sup>+</sup>炎症细胞在肾组织的浸润 ( $P < 0.01$ ), 减少炎症因子 ( $P < 0.01$ ), 说明真武汤可有效减轻 MsPGN 小鼠肾组织的局部炎症反应。

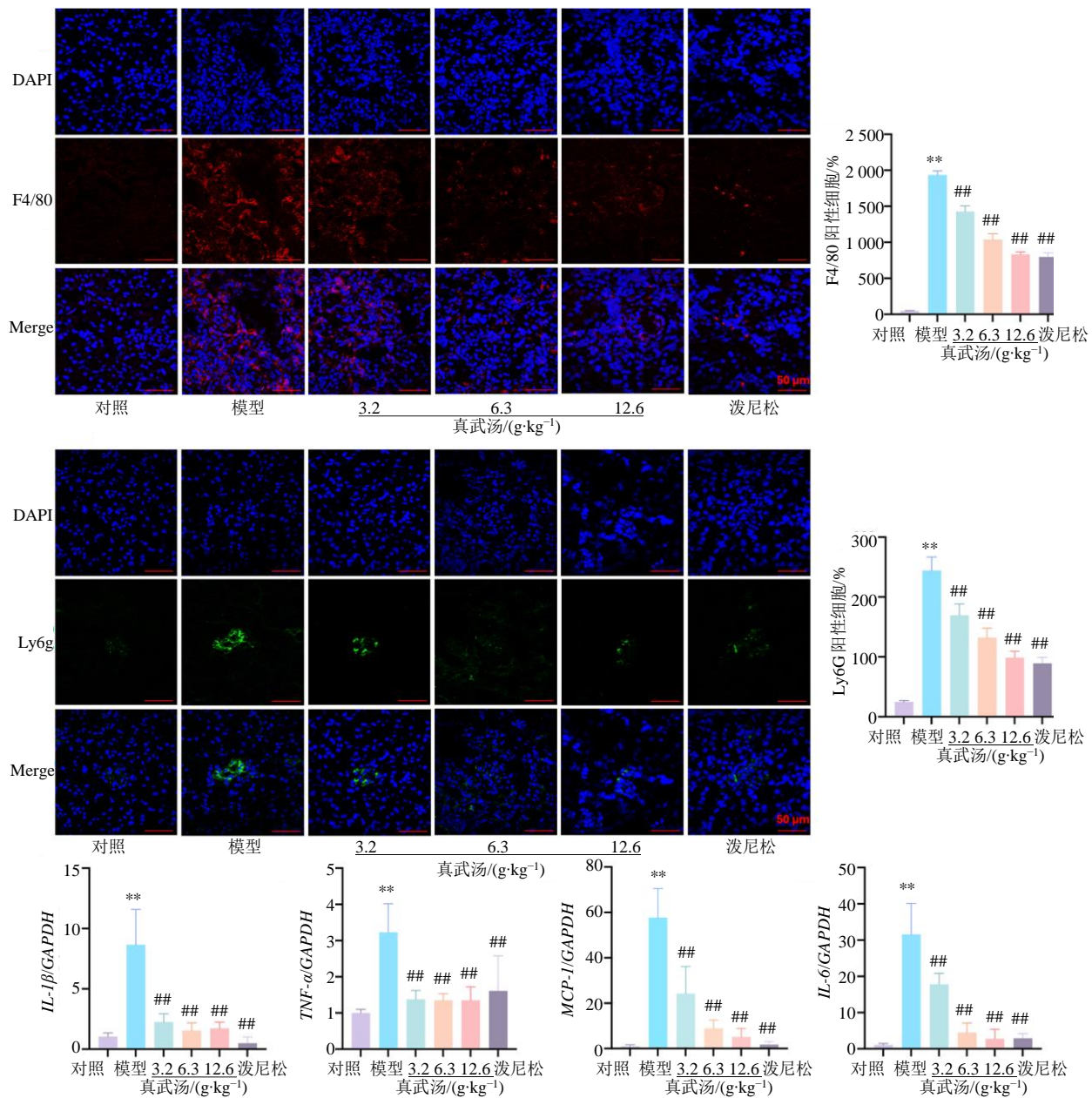
### 3.5 真武汤含药血清抑制 LPS 诱导的系膜细胞增殖和炎症反应

如图 5 所示, 与对照组相比, 10、20、30、40、50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 组细胞的增殖率明显上升 ( $P < 0.01$ ), 但在 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  干预时, 镜下观察到细胞形

态出现异常, 因此选择 40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  作为 LPS 的造模浓度。进一步给予 2.5%、5.0% 和 7.5% 的真武汤含药血清干预, 结果显示细胞的增殖率较模型组明显下降 ( $P < 0.01$ )。通过流式细胞术检测细胞的周期和凋亡情况, 结果显示, 与对照组比较, 在模型组中, 处于 S 期的细胞明显增加 ( $P < 0.01$ ), 但凋亡细胞的比例没有明显变化 ( $P > 0.05$ ), 表明细胞处于活跃的增殖状态。给予真武汤含药血清后, 处于 S 期的细胞明显减少 ( $P < 0.01$ ), 且凋亡细胞的比例明显上调 ( $P < 0.01$ ), 表明真武汤可有效抑制系膜细胞异常增殖, 并促进炎症状态下系膜细胞凋亡。此外, 检测炎症因子发现, 与对照组相比, 模型组的炎症因子明显上升 ( $P < 0.01$ ), 给予真武汤含药血清后炎症因子明显下降 ( $P < 0.01$ ), 表明真武汤可以有效抑制系膜细胞炎症反应。

### 3.6 真武汤抑制 RhoA/ROCK/MLC 通路

如图 6 所示, 动物实验中, 与对照组相比, 模



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group.

图 4 真武汤对 MsPGN 小鼠肾炎症的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 4 Effects of Zhenwu Decoction on renal inflammation in mice with MsPGN ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

型组肾组织中 RhoA、ROCK、p-MLC 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 MLC 总蛋白无明显变化, 提示 RhoA/ROCK/MLC 信号通路被激活; 与模型组相比, 真武汤各剂量组均可显著降低 RhoA、ROCK 及 p-MLC 蛋白表达 ( $P < 0.05、0.01$ ), 并呈一定剂量相关性, 其中高剂量组作用最为明显。

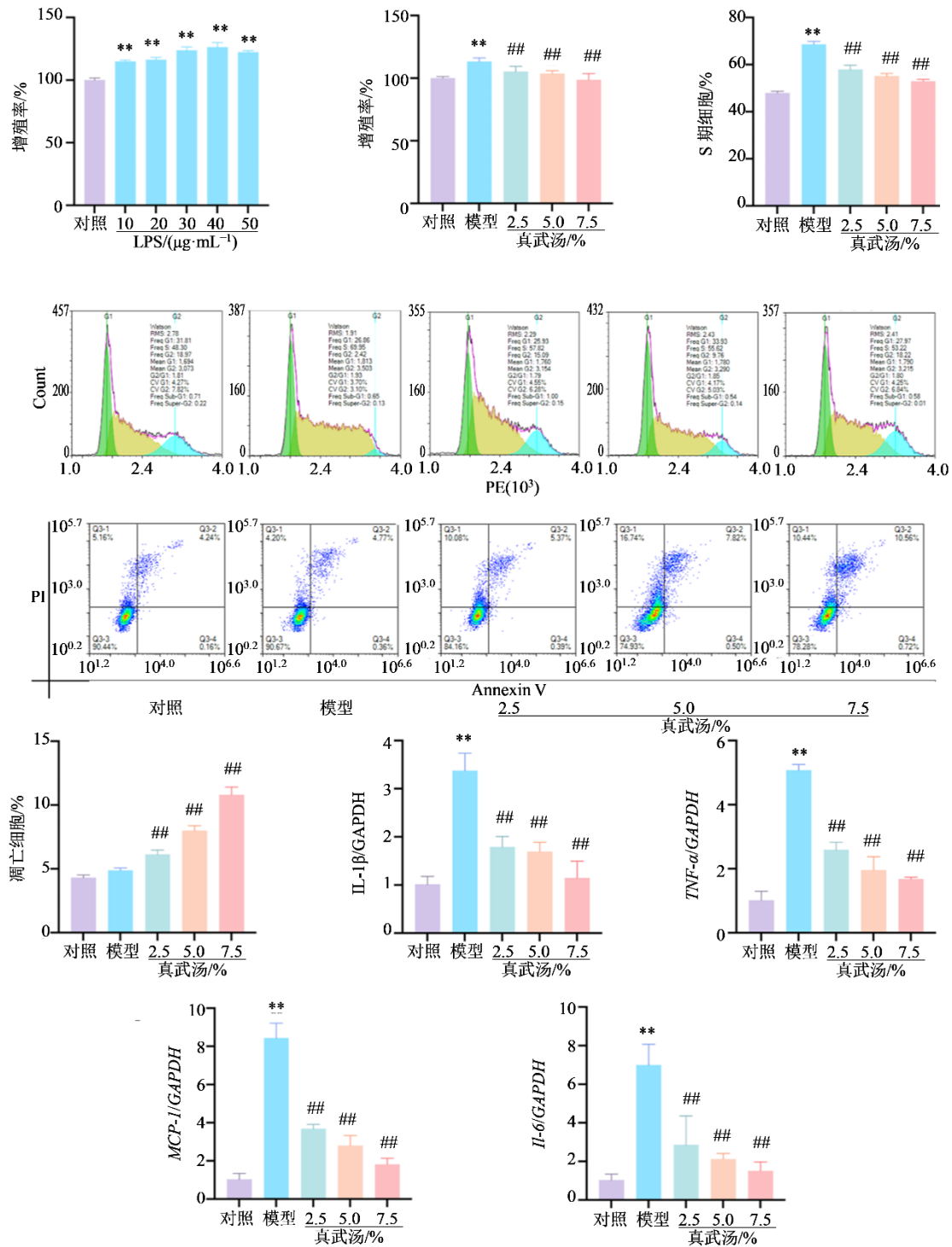
细胞实验中, 与对照组相比, LPS 处理后 RhoA、ROCK 及 p-MLC 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 真武汤含药血清干预后可明

显降低 RhoA 及 ROCK 蛋白表达, 并抑制 MLC 磷酸化水平 ( $P < 0.05、0.01$ )。

结果表明, 真武汤在体内外均可抑制 RhoA/ROCK/MLC 信号通路的异常激活, 可能通过降低 MLC 磷酸化水平发挥对 MsPGN 的保护作用。

### 3.7 真武汤核心成分芍药苷及白术内酯III靶向结合 RhoA 蛋白

如图 7 所示, 分子对接结果显示真武汤中 6 个核心活性成分与 RhoA 蛋白均具有较好的结合活



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

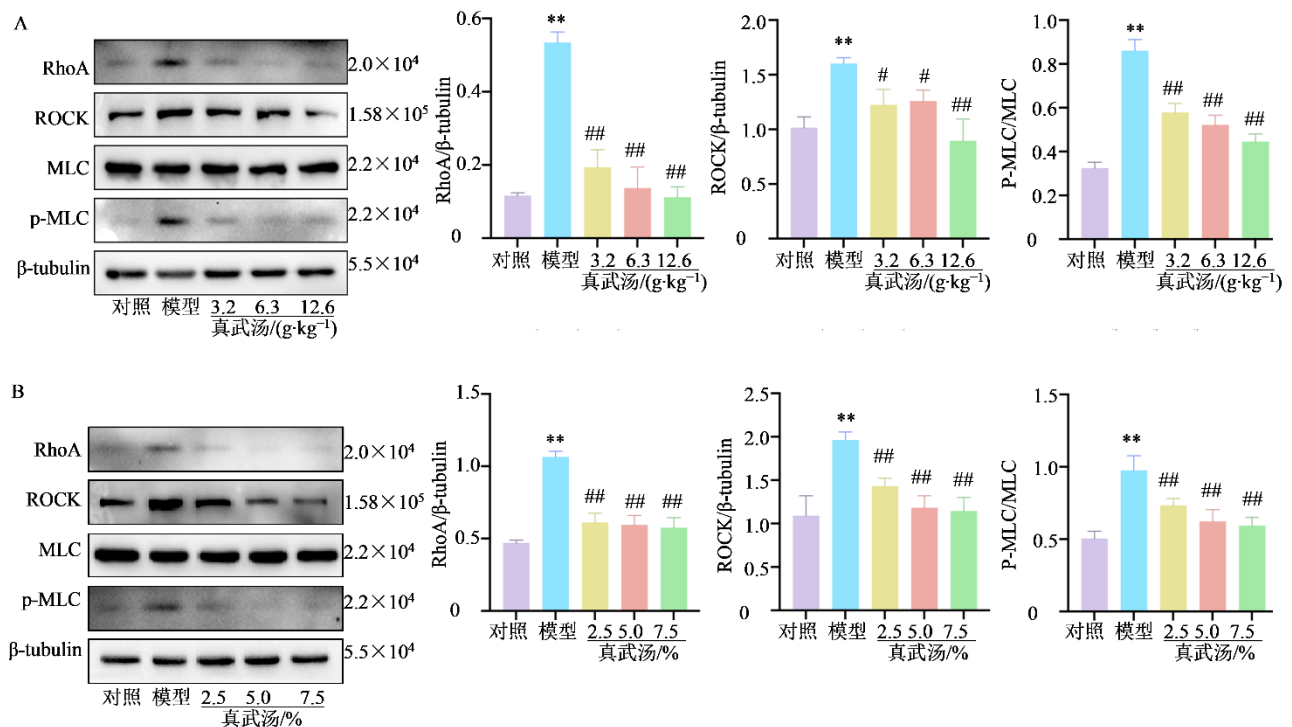
\*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group.

图 5 真武汤含药血清对系膜细胞增殖、凋亡及炎症的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 5 Effects of Zhenwu Decoction drug-containing serum on proliferation, apoptosis and inflammation of mesangial cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

性, 结合能均低于 $-29.28 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 其中芍药苷和白术内酯III结合能力较强。芍药苷和白术内酯III均可

稳定结合于 RhoA 蛋白活性口袋, 并与 ASP59、TYR34、GLY62 及 TYR42 等关键氨基酸残基形成



A-动物实验; B-细胞实验; 与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ 。  
A-animal experiment; B-cell experiment; \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group.

图 6 真武汤对 RhoA/ROCK/MLC 通路的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 6 Inhibitory effect of Zhenwu Decoction on RhoA/ROCK/MLC pathway ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

氢键或疏水相互作用,提示二者可能直接靶向 RhoA 蛋白发挥作用。BLI 实验结果显示,芍药苷和白术内酯 III 均可与 RhoA 蛋白直接结合,且结合信号随浓度升高而增强。动力学分析显示芍药苷的解离速率常数 ( $K_d$ ) 值为  $26.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而白术内酯 III 的  $K_d$  值为  $650 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,表明芍药苷和白术内酯 III 与 RhoA 均有较好结合亲和力。结果表明,芍药苷和白术内酯 III 可能通过直接结合 RhoA 蛋白调控 RhoA/ROCK/MLC 信号通路,从而发挥肾保护作用。

#### 4 讨论

MsPGN 的核心病理环节为系膜细胞异常增殖与肾组织慢性炎症,二者形成“炎症-增殖”的恶性循环,共同推动肾小球硬化及肾功能进行性恶化<sup>[1, 11]</sup>。本研究采用 MsPGN 小鼠模型,模拟临床疾病的核心病理特征,实验结果证实,真武汤改善小鼠肾功能,减少蛋白尿排泄,恢复肾小球滤过功能,同时显著减轻肾小球肥大、系膜基质增生等病理损伤,抑制系膜细胞异常增殖,减少炎症细胞浸润和炎症因子的分泌,明确了真武汤对 MsPGN 的保护作用。

系膜细胞是肾小球内参与病理损伤的核心功能细胞,其异常增殖是 MsPGN 发生发展的始动环节, Ki67、PCNA 作为细胞增殖特异性标志物,其表达水平可直接反映细胞增殖活性<sup>[12]</sup>。本研究中,模型组小鼠肾组织 Ki-67、PCNA 表达显著上调,而真武汤可显著下调其表达,提示真武汤的肾保护作用与直接抑制系膜细胞增殖密切相关;体外细胞实验进一步验证,真武汤含药血清可直接抑制 LPS 诱导的系膜细胞增殖,诱导细胞周期阻滞并促进凋亡,为真武汤抑制系膜增生提供了直接的细胞学证据,也证实了真武汤活性成分可通过血液循环作用于靶细胞发挥药理效应。

慢性炎症反应是系膜增生持续进展的重要驱动力,巨噬细胞、中性粒细胞等炎症细胞在肾组织的浸润是肾脏炎症激活的重要标志,其可释放大量促炎细胞因子和炎症介质,进一步促进系膜细胞增殖、系膜基质合成,加重肾小球结构损伤<sup>[13]</sup>。本研究发现,真武汤可显著减少 MsPGN 小鼠肾组织 F4/80<sup>+</sup>巨噬细胞和 Ly6G<sup>+</sup>中性粒细胞的浸润,并减少系膜细胞炎症因子的分泌,提示真武汤可通过抑制肾脏局部炎症细胞的募集与浸润,阻断“炎症-增

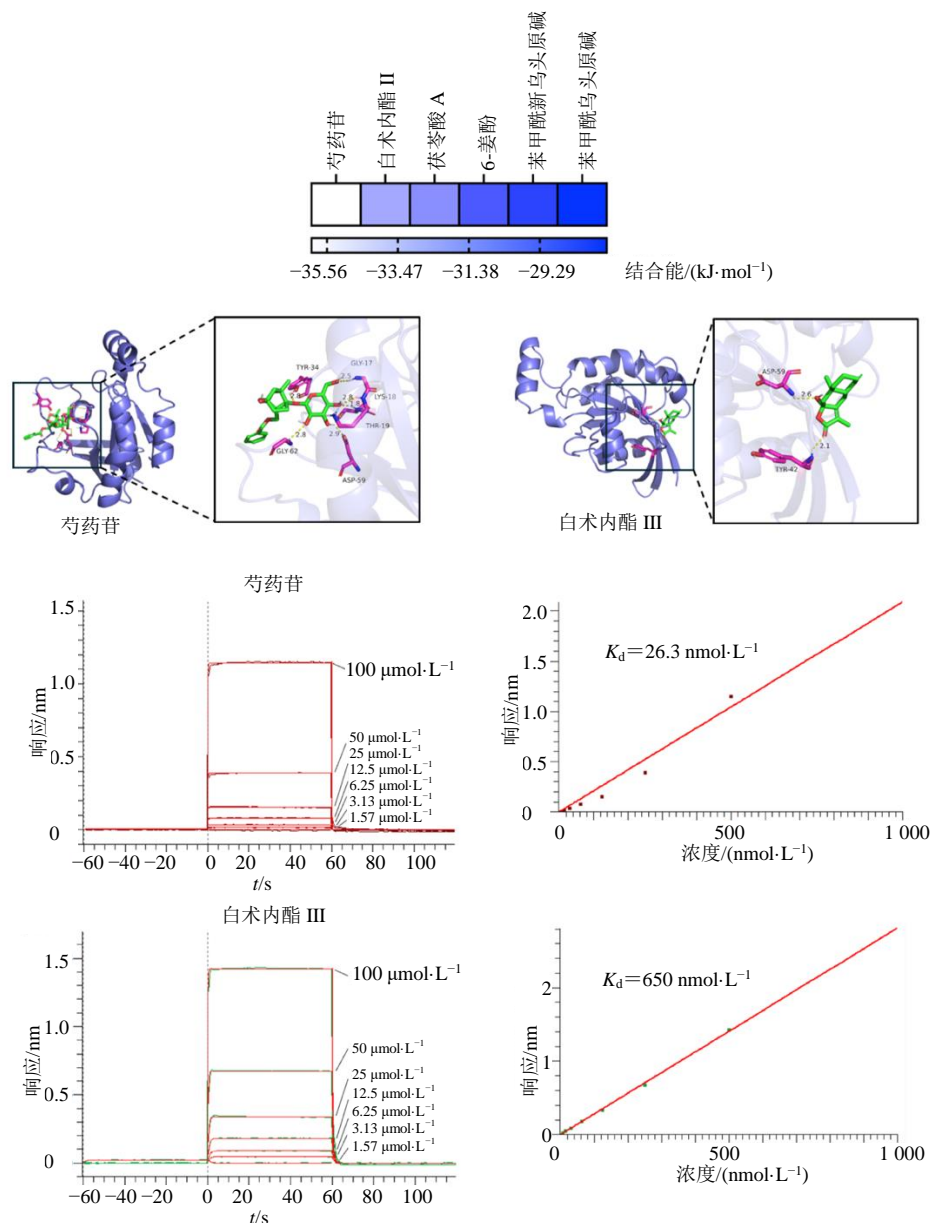


图 7 真武汤靶向 RhoA 蛋白的成分研究

Fig. 7 Components of Zhenwu Decoction targeting RhoA

殖”的恶性循环，从而发挥肾保护作用，这与真武汤在其他肾脏疾病中展现的抗炎作用一致<sup>[14-15]</sup>。

RhoA/ROCK 信号通路是调控细胞骨架重构及细胞增殖的重要通路，其异常激活可通过促进 MLC 磷酸化增强细胞收缩及增殖能力<sup>[3]</sup>。本研究发现，无论在 MsPGN 小鼠肾组织还是 LPS 诱导的系膜细胞中，RhoA、ROCK 及 p-MLC 蛋白表达均显著升高，而真武汤干预后可明显降低上述蛋白表达，且 MLC 总蛋白无明显变化，提示真武汤主要通过抑制 MLC 磷酸化水平发挥作用。结果表明，真武汤可能通过抑制 RhoA/ROCK/MLC 信号通路的异常激活，

从而抑制系膜细胞异常增殖及炎症反应。

为进一步明确真武汤的物质基础，本研究通过分子对接筛选出芍药苷和白术内酯 III 等潜在活性成分，并通过 BLI 实验验证其与 RhoA 蛋白具有较好的结合活性，其中芍药苷与 RhoA 的  $K_d$  值为  $26.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，白术内酯 III 为  $650 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，均显示较好的结合亲和力，提示真武汤可能通过其核心活性成分直接靶向 RhoA 蛋白发挥作用。这一结果从分子水平为真武汤调控 RhoA/ROCK 信号通路提供了直接证据。

此外，本研究仍存在一定局限性。cBSA 模型

主要反映免疫复合物介导的肾小球损伤特征,可继发系膜增生,与经典 MsPGN 模型(如 Thy1 模型)以系膜细胞原发性损伤和增殖为核心在致病机制上存在一定差异,后续可结合更具特异性的模型进一步验证;目前关于 RhoA/ROCK/MLC 通路的证据主要基于表达及磷酸化水平变化,在未来可通过特异性干预手段开展因果性研究;虽然体内 cBSA 模型与体外 LPS 刺激在机制上并不完全一致,但本研究的体外实验主要用于从细胞水平验证系膜细胞增殖及炎症反应环节,后续可进一步优化模型体系以增强一致性;此外,分子对接与 BLI 结果为活性成分与 RhoA 的相互作用提供了支持,未来仍需结合功能实验进一步明确其药效贡献。

综上所述,真武汤可显著减轻炎症反应及系膜细胞异常增殖,从而改善 MsPGN 小鼠肾功能,其作用可能与芍药苷和白术内酯 III 结合 RhoA 蛋白,进而参与调控 RhoA/ROCK/MLC 信号通路调控有关。本研究基于 RhoA/ROCK/MLC 通路探究真武汤改善 MsPGN 的靶点,并从分子结合层面初步揭示其物质基础,为真武汤治疗 MsPGN 提供了可靠的实验依据,也为中医药多成分、多靶点防治肾脏疾病提供了新的研究思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] Hu H T, Li R Z, He K C, et al. Bruceine A protects nuclear receptor 4A1 from ubiquitin-degradation to alleviate mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10: 397.

[2] Gao M Z, Zhou Y F, Xu Z Y, et al. Fasudil targets the RhoA/ROCK-NLRP3 axis to attenuate aristolochic acid-induced renal pyroptosis: Translational validation by in vivo molecular imaging [J]. *Int Immunopharmacol*, 2026, 168: 115888.

[3] Monu M, Kumar L K, Kumar P, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)-CD74 Signaling Pathway Mediates Trabecular Meshwork Dysfunction in Glaucoma [J]. *bioRxiv*, 2026.

[4] Attia H, Badr A, Alshehri O, et al. The protective effects of vitamin B complex on diclofenac sodium-induced nephrotoxicity: The role of NOX4/RhoA/ROCK [J]. *Inflammation*, 2024, 47(5): 1600-1615.

[5] 李文, 胡彦, 王锁刚, 等. 真武汤治疗肾脏疾病的研究进展 [J]. *光明中医*, 2023, 38(4): 771-774.

Li W, Hu Y, Wang S G, et al. Clinical application and experimental research progress of Zhenwu decoction in the treatment of renal disease [J]. *Guangming J Chin Med*, 2023, 38(4): 771-774.

[6] 史磊磊, 曹珊珊, 张雨涵, 等. 真武汤方药解析及临床应用的研究进展 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2024, 47(6): 141-145.

Shi L L, Cao S S, Zhang Y H, et al. Research progress on the drug analysis and clinical application of Zhenwu decoction [J]. *J Shaanxi Coll Tradit Chin Med*, 2024, 47(6): 141-145.

[7] 吴俊标, 贺雨, 梁春玲, 等. 真武汤水提液 HPLC 特征图谱研究及指标成分的测定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(18): 45-49.

Wu J B, He Y, Liang C L, et al. HPLC characteristics of aqueous extract of Zhenwu decoction and determination of markers [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2014, 20(18): 45-49.

[8] Wu J B, Liu B H, Liang C L, et al. Zhen-wu-Tang attenuates cationic bovine serum albumin-induced inflammatory response in membranous glomerulonephritis rat through inhibiting AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B pathway activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 33: 33-41.

[9] Chen J S. Mouse model of membranous nephropathy induced by cationic bovine serum albumin: Antigen dose-response relations and strain differences [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(11): 2721-2728.

[10] Chen J Q, Yuan S L, Zhou J, et al. Danshen injection induces autophagy in podocytes to alleviate nephrotic syndrome via the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 107: 154477.

[11] Lucero C M, Marambio-Ruiz L, Balmazabal J, et al. *TNF- $\alpha$  Plus IL-1 $\beta$  Induces Opposite Regulation Of Cx43 Hemichannels And Gap Junctions In Mesangial Cells Through A RhoA/ROCK-Dependent Pathway* [M]. //Prime Archives in Molecular Sciences: Vide Leaf, Hyderabad, 2022.

[12] Kim J, Lee J H, Jang S H, et al. SBP1 contributes to mesangial proliferation and inflammation through mitochondrial respiration in Glomerulus during IgA nephropathy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 225: 711-725.

[13] Dai R, Zhang L, Jin H, et al. Differential expression profile of urinary exosomal microRNAs in patients with mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *Aging*,

- 2023, 15(3): 866-880.
- [14] Ren X P, Hong M Q, Du L J, et al. ADAMTS16 and TRPV5: New targets of Zhenwu Decoction on renal fibrosis investigated by chemomics and transcriptomics [J]. *J Chromatogr B*, 2025, 1267: 124797.
- [15] 靳玉秋, 陈光顺, 白敏, 等. 真武汤调控 ROCK/IKK/NF- $\kappa$ B 通路关键分子表达改善脾肾虚型 DN 小鼠肾脏炎症损伤的机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(18): 5041-5048.
- Jin Y Q, Chen G S, Bai M, et al. Mechanism of Zhenwu Decoction in improving renal inflammatory injury in mice with DN of spleen-kidney Yang deficiency syndrome by regulating ROCK/IKK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(18): 5041-5048.

[责任编辑 兰新新]