

化痰通络中药对糖尿病肾病大鼠肾脏和 AMPK/Nox4 信号通路的作用研究

李雅纯¹, 方敬¹, 杨帆¹, 郭帅¹, 陈志强^{1,2*}

1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050000

2. 河北省中医院, 河北 石家庄 050000

摘要: **目的** 探讨化痰通络中药对糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 大鼠肾脏的保护作用以及对腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase oxidase 4, Nox4) 信号通路的干预作用。**方法** 随机选取 7 只 SD 大鼠作为对照组, 其余大鼠采用高糖高脂饲料喂养联合 ip 链脲佐菌素 (35 mg/kg) 建立 DN 模型, DN 大鼠随机分为模型组、化痰通络中药 (4.41 g/kg) 组和厄贝沙坦 (13.5 mg/kg) 组。给予化痰通络中药 16 周后, 取尿液检测大鼠 24 h 尿蛋白 (urine total protein, UTP) 和 8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG) 水平; 考察各组大鼠肾组织病理变化; 考察各组大鼠肾组织超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性和丙二醛水平; 采用免疫组化法检测各组大鼠肾组织 8-OHdG 和纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 蛋白表达; 采用 qRT-PCR 法检测肾组织转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, *TGF- β 1*) mRNA 表达; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠肾组织 TGF- β 1、AMPK α 、磷酸化 AMPK α (p-AMPK α)、Nox4 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 化痰通络中药组大鼠尿液 24 h UTP 和 8-OHdG 水平明显降低 ($P < 0.01$); 肾脏病理损伤缓解, 肾组织细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 堆积减少, 肾组织胶原面积明显降低 ($P < 0.01$); 肾组织 SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$), 肾组织丙二醛水平显著下降 ($P < 0.01$); 肾组织 8-OHdG 和 FN 表达减少; 肾组织 *TGF- β 1* mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$, 0.01); 肾组织 p-AMPK/AMPK 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), Nox4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** 化痰通络中药能够通过作用于 AMPK/Nox4 信号通路, 从而抑制 DN 大鼠氧化应激、减少 ECM 大量堆积、降低 UTP 排泄、保护肾脏。

关键词: 糖尿病肾病; 化痰通络中药; 肾脏纤维化; 氧化应激; AMPK/Nox4 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)11-3278-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.015

Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on kidney and AMPK/Nox4 signaling pathway of rats with diabetic nephropathy

LI Ya-chun¹, FANG Jing¹, YANG Fan¹, GUO Shuai¹, CHEN Zhi-qiang^{1,2}

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000, China

2. Hebei Provincial Hospital of TCM, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on kidneys of diabetic nephropathy (DN) rats and intervention on AMP-activated protein kinase (AMPK)/nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase oxidase 4 (Nox4) signaling pathway. **Methods** Seven SD rats were randomly selected as control group, rest rats were fed with high-sugar and high-fat diet combined with ip streptozotocin (35 mg/kg) to establish DN model. DN rats were randomly divided into model group, Huayu Tongluo Chinese medicines (4.41 g/kg) group and irbesartan (13.5 mg/kg) group. After ig Huayu Tongluo Chinese medicines for 16 weeks, urine was collected to test levels of 24 h urine total protein (UTP) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) in rats; Pathological changes in kidney tissue of rats in each group was investigated. Superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde level in kidney of rats in each group were investigated; Immunohistochemistry was used to detect the expression of 8-OHdG and fibronectin (FN) in kidney of rats in each group. *TGF- β 1* mRNA level in kidney was detected by qRT-PCR.

收稿日期: 2021-01-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373804)

作者简介: 李雅纯 (1993—), 女, 博士研究生, 从事中医内科学肾病方面基础及临床研究。E-mail: sjz13832322160@163.com

*通信作者: 陈志强 (1963—), 男, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 从事中医内科学肾病方面基础及临床研究。

E-mail: chenzhiqiang2011@163.com

Expressions of TGF- β 1, AMPK α , p-AMPK α , and Nox4 in kidney of rats in each group were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, 24 h UTP and 8-OHdG levels in urine of rats in Huayu Tongluo Chinese medicines group were significantly reduced ($P < 0.01$); Kidney pathological damage was relieved, extracellular matrix (ECM) accumulation in kidney was reduced, kidney collagen area was significantly reduced ($P < 0.01$); SOD activity in kidney was significantly increased ($P < 0.05$), malondialdehyde level was significantly decreased ($P < 0.01$); 8-OHdG and FN expression were decreased in kidney; TGF- β 1 mRNA and protein expression in kidney were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$); p-AMPK α /AMPK α expression was significantly increased ($P < 0.05$), Nox4 expression was significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Huayu Tongluo Chinese medicines can inhibit oxidative stress of DN rats, reduce the accumulation of ECM, reduce UTP excretion, and protect kidneys by acting on AMPK/Nox4 signaling pathway.

Key words: diabetic nephropathy; Huayu Tongluo Chinese medicines; renal fibrosis; oxidative stress; AMPK/Nox4 signaling pathway

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是导致慢性肾功能衰竭的主要原因之一, 为肾脏透析和移植的主要适应证^[1-2]。中医药对改善 DN 临床症状、提高患者生存质量有良好效果。课题组以中医理论为基础并结合多年临床实践, 认为瘀血阻络证是贯穿 DN 病程始终的独立病机^[3-4]。化瘀通络中药为临床治疗 DN 的复方中必不可少的一部分, 课题组前期研究发现, 化瘀通络中药配伍应用能够显著降低 DN 大鼠尿蛋白, 延缓肾脏病理损伤^[5-7]。

氧化应激在 DN 的疾病进展中起着重要作用^[8]。过量的活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 通过促进细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的积累参与 DN 的发病, 最终导致肾脏纤维化^[1]。ROS 主要由还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamideadenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶介导产生^[9]。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 能够抑制烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase oxidase 4, Nox4) 过表达^[10], 改善高脂饮食和糖尿病引起的氧化应激^[11-12], 抑制转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 介导的纤维化^[13]。因此, 本研究探究化瘀通络中药能否通过作用于 AMPK/Nox4 信号通路, 从而抑制 DN 大鼠氧化应激、延缓肾脏纤维化。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 体质量 60~80 g, 21~34 日龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2016-0006。动物饲养于温度 23~25 °C、湿度 50%~70% 的环境中, 自由进食饮水。动物实验经河北中医学院伦理委员会批准 (批准号 DWLL2015002)。

1.2 药品与试剂

化瘀通络中药配方颗粒由丹参 (批号 8080971)、川芎 (批号 8122561)、地龙 (批号 7125701)、水蛭 (批号 8081351) 和全蝎 (批号 8050111) 组成, 均由广东一方制药有限公司惠赠; 厄贝沙坦分散片 (150 mg/片, 批号 1904238) 购自华润双鹤利民药业有限公司; 链脲佐菌素 (批号 07171414) 购自瑞士 Alexis 公司; 丙二醛检测试剂盒 (批号 A003-1-2) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (批号 A001-3-2) 购自南京建成生物研究所; Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit (批号 G3330)、2 \times SYBR Green qPCR Master Mix (High ROX) (批号 G3321)、引物、HRP 标记的山羊抗兔抗体 (批号 GB23303) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; AMPK α 抗体 (批号 5831)、磷酸化 AMPK α (p-AMPK α) 抗体 (批号 2535) 购自美国 CST 公司; Nox4 抗体 (批号 133303)、TGF- β 1 抗体 (批号 215715) 和纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 抗体 (批号 89443) 购自英国 Abcam 公司; 8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG) 抗体 (批号 MOG-020P) 购自日本老化制御研究所; β -actin 小鼠单克隆抗体 (批号 AF0003) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器

BX63 + DP72 正置研究级显微镜 (日本 Olympus 公司); NanoDrop 2000C 紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Stepone plus 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Infinite 200 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); LI-COR 红外激光扫描仪 (美国 Odyssey 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

40 只雄性 SD 大鼠给予普通饲料适应性喂养 1

周,检测其血糖和尿蛋白均为阴性。随机选取7只SD大鼠作为对照组,予以普通饲料喂养;其余大鼠用高糖高脂饲料喂养6周后,ip链脲佐菌素溶液,(35 mg/kg),72 h后尾静脉取血3次,检测大鼠随机血糖均 ≥ 16.7 mmol/L, DN模型制备成功。2只大鼠血糖不达标予以剔除,3只大鼠ip链脲佐菌素溶液72 h内死亡。DN大鼠随机分为模型组、化瘀通络中药(4.41 g/kg)组和厄贝沙坦(13.5 mg/kg)组。化瘀通络中药组丹参、川芎、地龙、水蛭、全蝎剂量分别为1.35、1.08、0.9、0.54、0.54 g/kg(以中药饮片量计),相当于临床等效剂量,以上5种颗粒按剂量配比混匀,溶于纯净水配制成质量浓度为0.49 g/mL的溶液;厄贝沙坦分散片溶于纯净水配制成质量浓度为1.5 mg/mL的混悬液。各给药组ig相应药物(9 mL/kg),对照组和模型组ig等体积纯净水,1次/d,连续16周。

2.2 化瘀通络中药对DN大鼠24 h尿蛋白(urine total protein, UTP)和8-OHdG水平的影响

给药结束后,大鼠置于代谢笼中,收集24 h尿液,测量尿量,混匀并留取1 mL,终点法检测UTP和8-OHdG水平。

2.3 化瘀通络中药对DN大鼠肾组织病理变化的影响

大鼠脱颈椎处死,取肾组织于福尔马林-醋酸-酒精(FAA)固定液中固定24 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋后切片,进行PAS和Masson染色,于显微镜下观察肾组织病理变化,并采用Image-Pro Plus 6.0分析软件对Masson染色的病理切片进行分析,计算胶原面积。

2.4 化瘀通络中药对DN大鼠肾组织SOD活性和丙二醛水平的影响

取各组大鼠肾组织匀浆,按试剂盒说明书检测各组大鼠肾组织SOD活性和丙二醛水平。

2.5 化瘀通络中药对DN大鼠肾组织8-OHdG和FN蛋白表达的影响

取各组大鼠肾组织石蜡切片,使用微波进行抗原修复,加入3% H₂O₂用来阻断内源性过氧化物酶,滴加血清封闭,加入8-OHdG、FN抗体(1:200)孵育过夜,滴加HRP标记的山羊抗兔抗体,使用DAB显色、复染后封片,于显微镜下观察并拍照。

2.6 化瘀通络中药对DN大鼠肾组织TGF- β 1 mRNA表达的影响

按照试剂盒说明书提取各组大鼠肾组织总RNA并合成cDNA,进行qRT-PCR分析。引物序

列:TGF- β 1上游引物5'-ATGGTGGACCGCAAC-AAC-3',下游引物5'-TGAGCACTGAAGCGAA-AGC-3';GAPDH上游引物5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3',下游引物5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCT-3'。

2.7 化瘀通络中药对DN大鼠肾组织AMPK α 、p-AMPK α 、Nox4和TGF- β 1蛋白表达的影响

取各组大鼠肾组织,加入RIPA裂解液匀浆,提取总蛋白,采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白质质量浓度,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,加入脱脂牛奶于室温封闭,分别加入AMPK α 抗体(1:800)、p-AMPK α 抗体(1:1000)、Nox4抗体(1:1000)、TGF- β 1抗体(1:600)和 β -actin抗体(1:1000),4℃孵育过夜;加入HRP标记的山羊抗兔抗体(1:3000),室温孵育30 min,加入ECL试剂显影,采用Quantity one软件分析目标条带的灰度值。

2.8 统计学分析

采用SPSS 21.0软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用One-way ANOVA。

3 结果

3.1 各组大鼠的一般情况

对照组大鼠活泼灵敏,模型组和各给药组大鼠精神萎靡、反应迟钝,其中模型组大鼠表现最为明显。给药过程中,模型组死亡3只大鼠,化瘀通络中药组和厄贝沙坦组各死亡2只大鼠。

3.2 化瘀通络中药对DN大鼠24 h UTP的影响

如表1所示,与对照组比较,模型组大鼠24 h UTP明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠24 h UTP显著降低($P < 0.05$ 、0.01)。

表1 化瘀通络中药对DN大鼠24 h UTP水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on 24 h UTP of DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	24 h UTP/mg
对照	—	4.53 ± 2.08
模型	—	35.54 ± 4.05 ^{##}
化瘀通络中药	4.41	29.06 ± 4.29 [*]
厄贝沙坦	0.0135	30.71 ± 4.08 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$, 下表同

^{##} $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

3.3 化瘀通络中药对 DN 大鼠肾组织病理变化的影响

如图 1 所示, 对照组大鼠肾脏结构清晰; 模型组大鼠肾小球肥大、囊腔变窄, 部分出现球囊粘连, 肾小球基底膜明显增厚, 系膜基质重度增生, 小管

间质 ECM 明显沉积; 各给药组大鼠肾脏病理损伤均有不同程度好转, 且肾组织 ECM 堆积减少。与对照组比较, 模型组大鼠肾组织胶原面积占比明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织胶原面积占比明显降低 ($P < 0.01$)。

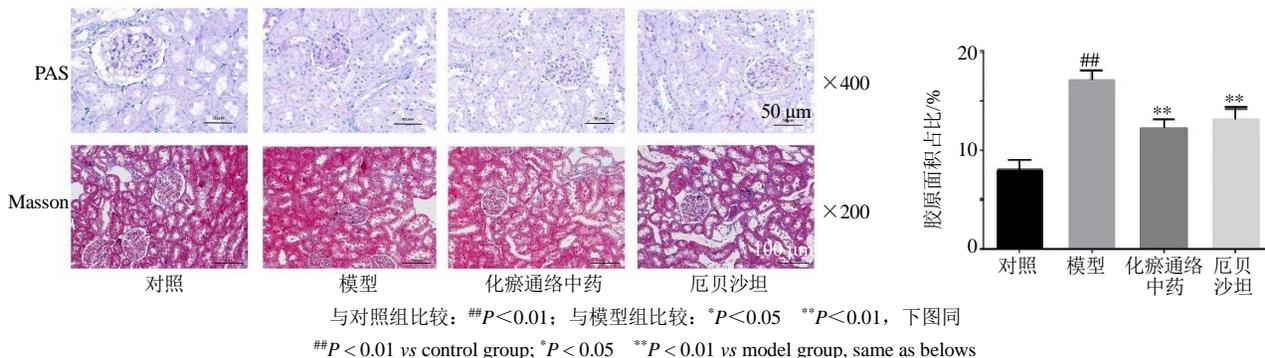


图 1 化瘀通络中药对 DN 大鼠肾组织病理变化的影响

Fig. 1 Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on pathological changes of rat kidney in DN rats

3.4 化瘀通络中药对 DN 大鼠肾组织 SOD 活性和丙二醛水平的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 SOD 活性明显下降 ($P < 0.01$), 丙二醛水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 化瘀通络中药组大鼠肾组织 SOD 活性和丙二醛水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 厄贝沙坦组大鼠肾组织 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$)。

性组织损伤的标记物^[14]。糖尿病患者尿液中 8-OHdG 水平与 DN 疾病进展密切相关^[15]。如图 2 所示, 8-OHdG 主要在肾小球和小管的细胞核表达, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 8-OHdG 表达增加, 尿液 8-OHdG 水平明显增多 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织 8-OHdG 表达减少, 尿液 8-OHdG 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.5 化瘀通络中药对 DN 大鼠肾组织 8-OHdG 蛋白表达和尿液 8-OHdG 水平的影响

3.6 化瘀通络中药对 DN 大鼠肾组织 FN 蛋白表达的影响

8-OHdG 是 DNA 的一种氧化嘌呤残基, 是氧化

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 FN 表达增加; 与模型组比较, 各给药组大鼠肾

表 2 化瘀通络中药对 DN 大鼠肾组织 SOD 活性和丙二醛水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on SOD activity and malondialdehyde level of rat kidney in DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD 活性/(U·mg ⁻¹)	丙二醛水平/(nmol·mg ⁻¹)
对照	—	528.98 ± 32.71	0.82 ± 0.23
模型	—	423.96 ± 39.93 ^{##}	2.25 ± 0.36 ^{##}
化瘀通络中药	4.41	468.51 ± 34.87 [*]	1.54 ± 0.36 ^{**}
厄贝沙坦	0.0135	475.44 ± 47.11 [*]	1.91 ± 0.32

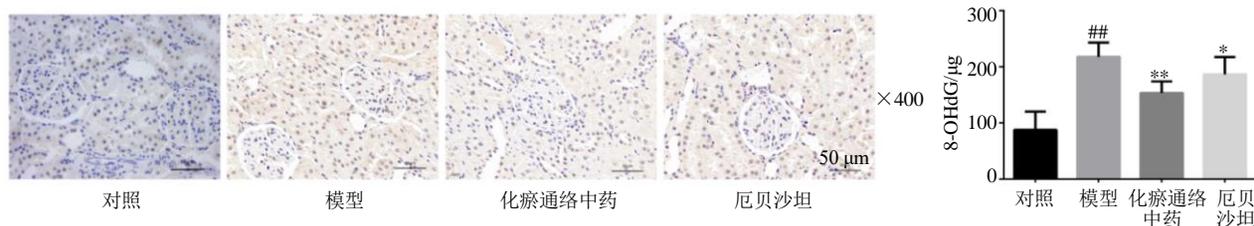


图 2 化瘀通络中药对 DN 大鼠肾组织 8-OHdG 蛋白表达和尿液 8-OHdG 水平的影响

Fig. 2 Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on 8-OHdG expression in kidney and 8-OHdG level in urine of DN rats

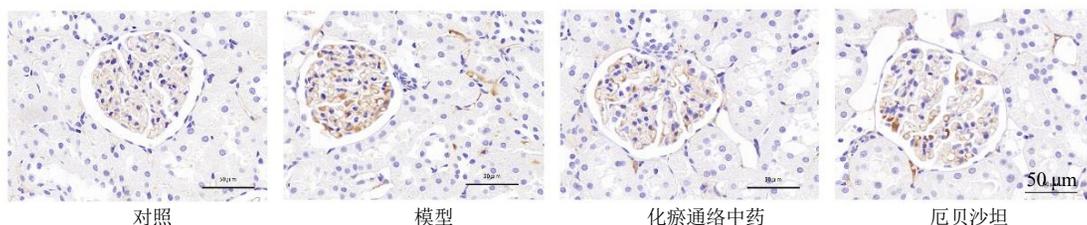


图3 化痰通络中药对 DN 大鼠肾组织 FN 蛋白表达的影响 (×400)

Fig. 3 Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on FN expression in kidney of DN rats (× 400)

组织 FN 表达减少。

3.7 化痰通络中药对 DN 大鼠肾组织 TGF-β1 mRNA 和蛋白表达的影响

如图 4 和表 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 TGF-β1 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组肾组织 TGF-β1 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。



图4 化痰通络中药对 DN 大鼠肾组织 TGF-β1 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on TGF-β1 expression in kidney of DN rats

表 3 化痰通络中药对 DN 大鼠肾组织 TGF-β1 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 3 Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on TGF-β1 mRNA and protein expression in kidney of DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TGF-β1 mRNA 相对表达量	TGF-β1 蛋白相对表达量
对照	—	1.01 ± 0.13	0.530 ± 0.025
模型	—	1.66 ± 0.08 ^{##}	0.829 ± 0.039 ^{##}
化痰通络中药	4.41	1.31 ± 0.20 [*]	0.687 ± 0.052 ^{**}
厄贝沙坦	0.0135	1.38 ± 0.08 [*]	0.605 ± 0.054 ^{**}

3.8 化痰通络中药对 DN 大鼠肾组织 AMPKα、p-AMPKα 和 Nox4 蛋白表达的影响

如图 5 和表 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 p-AMPKα/AMPKα 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Nox4 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 p-AMPKα/AMPKα 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Nox4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

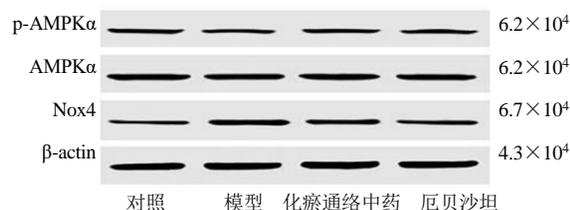


图5 化痰通络中药对 DN 大鼠肾组织 AMPKα、p-AMPKα 和 Nox4 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on AMPKα, p-AMPKα and Nox4 expression in kidney of DN rats

4 讨论

本研究采用高糖高脂饲料喂养联合 ip 链脲佐

表 4 化痰通络中药对 DN 大鼠肾组织 AMPKα、p-AMPKα 和 Nox4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 4 Effect of Huayu Tongluo Chinese medicines on AMPKα, p-AMPKα, and Nox4 expression in kidney of DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		p-AMPKα/AMPKα	Nox4
对照	—	0.672 ± 0.068	0.473 ± 0.054
模型	—	0.507 ± 0.072 [#]	0.740 ± 0.044 ^{##}
化痰通络中药	4.41	0.641 ± 0.055 [*]	0.614 ± 0.076 [*]
厄贝沙坦	0.0135	0.654 ± 0.066 [*]	0.569 ± 0.085 [*]

菌素溶液建立 DN 模型,发现造模大鼠血糖升高,并出现了 UTP 升高和肾脏病理损伤。目前针对 DN 的现代医学治疗手段主要为严格控制血糖与血压。厄贝沙坦作为血管紧张素受体拮抗剂类的降压药物,大量临床随机对照试验表明厄贝沙坦具有肾脏保护作用,能够减少早期和中晚期 DN 患者 UTP,延缓肾脏病变^[16-17]。因此,本研究选用厄贝沙坦作为阳性对照药物,研究化癥通络中药对 DN 大鼠的保护作用。DN 作为糖尿病的严重微血管并发症,其主要临床表现为大量蛋白尿,主要病理表现为 ECM 增生,ECM 积聚导致肾小球和肾小管基底膜增厚,最终发展为肾小球硬化和小管间质纤维化。TGF- β 1 是糖尿病中导致肾脏 ECM 积累的关键细胞因子^[18],过度表达的 TGF- β 1 使 ECM 如 I、III、IV 型胶原及 FN 和层黏连蛋白(laminin, LN)等大量积聚,同时刺激蛋白酶抑制剂、纤溶酶原活化抑制剂合成,使 ECM 降解减少,最终导致肾脏纤维化^[19-20]。研究发现,由于 ROS 产生过多引起的肾脏氧化应激是导致 TGF- β 1 高表达和 ECM 增生的主要原因之一^[21];由 Nox4 衍生的 ROS 为引起糖尿病早期阶段氧化应激的主要原因,能够导致糖尿病肾脏肥大和 ECM 表达增加^[22];在高糖环境下暴露的系膜细胞和小管细胞中, Nox4 的上调与 TGF- β 1、FN 的升高有关^[23]。

AMPK 为细胞的能量传感器,负责调节并维持机体的糖脂代谢和能量代谢平衡^[24]。AMPK 作为与肥胖、糖尿病和代谢综合征相关疾病的治疗靶点,受到广泛关注^[25]。研究发现,糖尿病小鼠肾脏中 AMPK 表达降低, DN 患者肾组织 p-AMPK 蛋白表达明显减少; AMPK 激活剂可以改善 DN 相关的临床与病理改变,降低 UTP,下调 TGF- β 1 表达,减少 ECM 积聚,从而改善 DN 肾脏纤维化^[12]。AMPK 不仅是细胞的主能量传感器,也是细胞内的主 ROS 传感器^[26]。AMPK 激活后可以阻断 Nox4,减少 ROS 生成,降低 UTP 排泄和基质蛋白表达^[27-28]。AMPK 是 1 种异源三聚体蛋白,由催化亚基 α 和调节亚基 β 、 γ 组成,其中 α 亚基在哺乳动物肾脏中广泛表达,且 AMPK 的激活需要 α 亚基上的苏氨酸残基(Thr 172)参与^[29]。因此,本研究通过检测大鼠肾组织 AMPK α 和 Nox4 蛋白表达情况,来评估 AMPK/Nox4 信号通路对 DN 肾脏纤维化的影响。

糖尿病属于中医消渴的范畴,其基本病机为气阴两虚、消渴日久、气虚无力推动血行而致瘀;阴

虚生热、热灼津液、津亏血少、脉道充养不足同样致瘀,瘀血不仅是病理产物,同时也是致病因素,其阻于肾络,发为 DN。因此,课题组认为瘀血阻络是 DN 的基本病机。现代药理学研究表明 ECM 增生作为 DN 的主要病理改变与血瘀证有明显的相关性^[30],经过化癥通络治疗可以显著降低肾络瘀阻患者血清 TGF- β 1、LN 和 IV 型胶原水平^[31]。课题组前期研究表明,化癥通络中药可以明显改善 DN 大鼠的肾脏病理表现,下调 ECM 蛋白表达,延缓肾脏纤维化^[32-33]。化癥通络中药可以改善 DN 患者临床症状,且疗效可靠^[34-35]。活血化癥类中药复方制剂一丹参川芎嗪注射液可以明显改善血液流变学异常^[36];消癥通络类中药一地龙与水蛭合用具有改善微循环、增加肾血流量、促进纤维蛋白溶解、抑制血小板聚集的作用^[37];全蝎可以促进纤溶系统的激活,从而抗栓、溶栓^[38]。因此,本研究选用活血化癥之草本代表药物丹参、川芎和消癥通络之虫类代表药物地龙、水蛭、全蝎,5 药合用,共奏化癥通络之功。本研究结果显示,化癥通络中药能够明显降低 DN 大鼠的 UTP,下调 TGF- β 1 和 FN 的表达,减少 ECM 堆积,延缓肾脏纤维化进程;增加 SOD 活性,减少丙二醛水平,降低尿液 8-OHdG 排泄及其肾脏表达,抑制氧化应激;上调 p-AMPK α 蛋白表达水平,下调 Nox4 蛋白表达水平。

综上所述,AMPK/Nox4 信号通路可能是化癥通络中药减轻肾脏氧化损伤、减少 ECM 增生、延缓肾脏纤维化、保护 DN 肾脏的作用靶点之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Forbes J M, Cooper M E. Mechanisms of diabetic complications [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1): 137-188.
- [2] Shaw J E, Sicree R A, Zimmet P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(1): 4-14.
- [3] 丁英钧,魏聪,常丽萍. 糖尿病肾病脉络病变阐述 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(2): 355-357.
- [4] 张海力,李靖,王世长,等. 中医药治疗糖尿病肾病最新进展 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2019, 20(9): 831-833.
- [5] 刘利飞,李雅纯,国芳,等. Notch 通路在糖尿病肾病大鼠的表达及化癥通络中药的干预作用 [J]. *中草药*, 2018, 49(8): 1866-1870.
- [6] 潘永梅,陈志强,贾蕊,等. 活血化癥通络中药对糖尿病肾病大鼠肾小管间质纤维化的影响 [J]. *中华中医药*

- 学刊, 2017, 35(8): 2105-2108.
- [7] 郭帅, 方敬, 杨帆, 等. 化瘀通络中药通过抑制 TGF- β 1/ERK 通路减轻糖尿病肾病大鼠肾纤维化研究 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 2996-3001.
- [8] Schnackenberg C G. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2002, 2(2): 121-125.
- [9] Lee H B, Yu M R, Yang Y Q, *et al*. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(8 Suppl 3): S241-S245.
- [10] Zhang B B, Guo X D, Li Y L, *et al*. D-Chiro inositol ameliorates endothelial dysfunction via inhibition of oxidative stress and mitochondrial fission [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, doi: 10.1002/mnfr.201600710.
- [11] Declèves A E, Mathew A V, Cunard R, *et al*. AMPK mediates the initiation of kidney disease induced by a high-fat diet [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(10): 1846-1855.
- [12] Dugan L L, You Y H, Ali S S, *et al*. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(11): 4888-4899.
- [13] Zhao J H, Miyamoto S, You Y H, *et al*. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation inhibits nuclear translocation of Smad4 in mesangial cells and diabetic kidneys [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 308(10): 1167-1177.
- [14] Kasai H, Nishimura S, Kurokawa Y, *et al*. Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA [J]. *Carcinogenesis*, 1987, 8(12): 1959-1961.
- [15] Hinokio Y, Suzuki S, Hirai M, *et al*. Urinary excretion of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a predictor of the development of diabetic nephropathy [J]. *Diabetologia*, 2002, 45(6): 877-882.
- [16] Hellemons M E, Persson F, Bakker S J, *et al*. Initial angiotensin receptor blockade-induced decrease in albuminuria is associated with long-term renal outcome in type 2 diabetic patients with microalbuminuria: A post hoc analysis of the IRMA-2 trial [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(9): 2078-2083.
- [17] Lambers Heerspink H J, Weldegiorgis M, Inker L A, *et al*. Estimated GFR decline as a surrogate end point for kidney failure: A post hoc analysis from the reduction of end points in non-insulin-dependent diabetes with the angiotensin II antagonist losartan (RENAAL) study and irbesartan diabetic nephropathy trial (IDNT) [J]. *Am J Kidney Dis*, 2014, 63(2): 244-250.
- [18] Chen S, Hong S W, Iglesias-de la Cruz M C, *et al*. The key role of the transforming growth factor-beta system in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Ren Fail*, 2001, 23(3/4): 471-481.
- [19] Valladares-Salgado A, Angeles-Martínez J, Rosas M, *et al*. Association of polymorphisms within the transforming growth factor- β 1 gene with diabetic nephropathy and serum cholesterol and triglyceride concentrations [J]. *Nephrology*, 2010, 15(6): 644-648.
- [20] Zhu Y Q, Usui H K, Sharma K. Regulation of transforming growth factor beta in diabetic nephropathy: Implications for treatment [J]. *Semin Nephrol*, 2007, 27(2): 153-160.
- [21] Jha J C, Banal C, Chow B S, *et al*. Diabetes and kidney disease: Role of oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(12): 657-684.
- [22] Gorin Y, Block K, Hernandez J, *et al*. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(47): 39616-39626.
- [23] Sedeek M, Callera G, Montezano A, *et al*. Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: Implications in type 2 diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299(6): 1348-1358.
- [24] Declèves A E, Zolkipli Z, Satriano J, *et al*. Regulation of lipid accumulation by AMP-activated kinase [corrected] in high fat diet-induced kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2014, 85(3): 611-623.
- [25] Viollet B, Mounier R, Leclerc J, *et al*. Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders [J]. *Diabetes Metab*, 2007, 33(6): 395-402.
- [26] Bondeva T, Wolf G. Reactive oxygen species in diabetic nephropathy: Friend or foe? [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(11): 1998-2003.
- [27] Eid A A, Lee D Y, Roman L J, *et al*. Sestrin 2 and AMPK connect hyperglycemia to Nox4-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling and matrix protein expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(17): 3439-3460.
- [28] Eid A A, Ford B M, Block K, *et al*. AMP-activated protein kinase (AMPK) negatively regulates Nox4-dependent activation of p53 and epithelial cell apoptosis in diabetes [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(48): 37503-37512.
- [29] Hallows K R, Mount P F, Pastor-Soler N M, *et al*. Role of

- the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298(5): 1067-1077.
- [30] 赵瑞宝. 慢性肾小球肾炎中医证型与肾间质纤维化相关指标的关系 [J]. 中医杂志, 2011, 52(7): 582-584.
- [31] 张史昭, 潘达亮, 于伟, 等. 肾络瘀阻与肾纤维化关系的临床研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(8): 458-459.
- [32] 王月华, 郭登洲, 王彦凯, 等. 活血化痰消癥通络中药对糖尿病肾病的干预作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(4): 345-347.
- [33] 陈春宇, 陈志强, 方敬, 等. 化痰通络中药对糖尿病肾病大鼠肾组织纤维连接蛋白和层粘连蛋白的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(12): 2134-2137.
- [34] 陈志强, 王春宁, 王月华, 等. 益气养阴消癥通络中药对 III 期和 IV 期糖尿病肾病的临床疗效观察 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(2): 1018-1021.
- [35] 李黎莉, 王凤丽, 李林林, 等. 陈志强治疗糖尿病肾病临床经验 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(9): 1743-1744.
- [36] 张玉淼, 王红莲, 周宏斌, 等. 丹参川芎嗪注射液对缺血性脑卒中患者血流变及外周血 BCL-2、BAX、Caspase-3 蛋白水平的影响 [J]. 中药材, 2015, 38(9): 2003-2005.
- [37] 李玉和, 李军. 虫类对药治疗难治性肾病探析 [J]. 四川中医, 2006, 24(12): 25-26.
- [38] 张静, 李晶峰, 杜延佳, 等. 近 5 年动物药药理研究新进展 [J]. 吉林中医药, 2016, 36(11): 1136-1137.

[责任编辑 李亚楠]