

补阳还五汤合参芪地黄汤化裁对糖尿病肾病小鼠肾小管间质纤维化的作用及机制研究

郭 帅^{1,2}, 白 璐², 潘利敏³, 郭立芳³, 王月华^{1*}

1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050091

2. 河北医科大学第三医院, 河北 石家庄 050051

3. 河北省中医院, 河北 石家庄 050017

摘 要: **目的** 研究补阳还五汤合参芪地黄汤化裁对糖尿病肾病小鼠肾小管间质纤维化的作用及机制。**方法** 取 8 只 db/m 小鼠作为对照组, 16 只 db/db 小鼠随机分为模型组和中药组, 给予补阳还五汤合参芪地黄汤化裁干预 12 周, 留尿, 检测各组小鼠尿白蛋白/肌酐比值 (albumin/creatinine ratio, ACR); 取肾组织, 进行苏木素-伊红 (HE)、高碘酸希夫 (PAS) 和天狼猩红 (Picrosirius-Red) 染色, 检测肾组织病理损伤和纤维化程度; 采用免疫组化法检测肾组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达; 采用 qRT-PCR 法检测肾组织 III 型胶原 (collagen-III, Col-III) 和纤黏蛋白 (fibronectin, FN) mRNA 表达; 采用 Western blotting 法检测肾组织 Col-III、FN、 α -SMA、E-cadherin 及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 中药组小鼠 ACR 水平明显降低 ($P < 0.05$); 肾脏病理损伤和纤维化减轻; α -SMA 蛋白在肾间质的表达减少, E-cadherin 蛋白在肾小管上皮细胞的表达增加; 肾组织 Col-III 和 FN mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 肾组织 Col-III、FN、 α -SMA、Wnt4、磷酸化糖原合酶激酶 3 β (phosphorylated glycogen synthase kinase 3 β , p-GSK3 β)、 β -catenin 和转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 补阳还五汤合参芪地黄汤化裁可以减轻糖尿病肾病小鼠的肾组织病理损伤, 减轻肾小管间质纤维化程度, 其机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路及其介导的肾小管上皮细胞向间充质转化有关。

关键词: 补阳还五汤合参芪地黄汤化裁; 糖尿病肾病; 肾小管间质纤维化; 上皮细胞向间充质转化; Wnt/ β -catenin 信号通路
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)02-0470-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.017

Effect and mechanism of revised Buyang Huanwu Decoction combining with Shenqi Dihuang Decoction on renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy mice

GUO Shuai^{1,2}, BAI Lu², PAN Li-min³, GUO Li-fang³, WANG Yue-hua¹

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China

2. The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

3. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of revised Buyang Huanwu Decoction and Shenqi Dihuang Decoction (补阳还五汤合参芪地黄汤化裁) on renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy (DN) mice. **Methods** Eight db/m mice were used as control group, 16 db/db mice were randomly divided into model group and traditional Chinese medicines (TCM) group, revised Buyang Huanwu Decoction combining with Shenqi Dihuang Decoction was given for intervention for 12 weeks, urine was retained, and albumin/creatinine ratio (ACR) of mice in each group was detected. The renal tissue was taken, degree of pathological injury and fibrosis were detected by HE, PAS and Picrosirius-Red stained method. Expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and E-cadherin in renal tissue were detected by immunohistochemistry. Expressions of collagen-III (Col-III) and fibronectin (FN) mRNA

收稿日期: 2021-09-30

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (H2016206238)

作者简介: 郭 帅 (1985—), 女, 博士, 主治医师, 主要从事中医药防治肾脏病的基础和临床研究。E-mail: sjzguoshuai@163.com

*通信作者: 王月华 (1973—), 女, 博士, 教授, 主要从事中医药防治肾脏病的基础和临床研究。E-mail: wangyuehua2004@163.com

in renal tissue were detected by qRT-PCR. Expression of Col-III, FN, α -SMA, E-cadherin and Wnt/ β -catenin pathway related proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, ACR level of mice in TCM group was significantly decreased ($P < 0.05$), renal pathological injury and fibrosis were alleviated; Expression of α -SMA protein in renal interstitium was decreased, expression of E-cadherin protein in renal tubular epithelial cells was increased; Expression of Col-III and FN mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$), expressions of Col-III, FN, α -SMA, Wnt4, phosphorylated glycogen synthase kinase 3β (p-GSK3 β), β -catenin and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) protein were significantly decreased ($P < 0.05$), expression of E-cadherin protein was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Revised Buyang Huanwu Decoction combining with Shenqi Dihuang Decoction can reduce the renal pathological damage and degree of renal tubulointerstitial fibrosis in DN mice. The mechanism may be related to the inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway and its mediating renal tubular epithelial cell to mesenchymal transition. **Key words:** revised Buyang Huanwu Decoction combining with Shenqi Dihuang Decoction; diabetic nephropathy; renal tubulointerstitial fibrosis; epithelial cell to mesenchymal transition; Wnt/ β -catenin signaling pathway

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病的主要微血管并发症之一, 占糖尿病患者的 30%~40%^[1-2]。DN 已成为全球终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD) 的主要病因, 也是糖尿病患者死亡的主要原因^[3-4]。DN 典型特征是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 在肾小球和肾小管间质过度沉积, 最终导致肾小球硬化和小管间质纤维化^[5]。既往研究表明, 肾小球损伤是 DN 的早期病变, 肾小管间质损伤继发于肾小球损伤。然而, 近年研究发现, 肾小管间质纤维化通常发生在糖尿病肾损伤的早期, 与肾功能下降密切相关^[6-7]。越来越多的证据表明, 肾小管上皮细胞向间充质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 是肾小管间质纤维化的重要机制之一^[8]。Wnt/ β -catenin 信号通路是调节肾小管上皮细胞 EMT 的关键信号通路^[9]。同时, 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是介导肾小管上皮细胞 EMT 的重要分子^[10]。TGF- β 1 可以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 促进 EMT 的发生发展^[11]。因此, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路减轻肾小管上皮细胞 EMT 是缓解 DN 肾小管间质纤维化的重要机制。

补阳还五汤出自清代医家王清任所著《医林改错》, 由黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、红花和桃仁组成, 具有补气、活血、通络之功效^[12]。参芪地黄汤源于清代医家沈金鳌编撰的《沈氏尊生书》, 由人参、黄芪、熟地黄、牡丹皮、茯苓、泽泻、山药、山茱萸组成, 具有益气养阴、补肾健脾的功效。补阳还五汤合参芪地黄汤化裁是在补阳还五汤和参芪地黄汤基础上, 去川芎、红花, 加僵蚕、蝉蜕, 以增强入肾络搜剔之效, 加白术以助黄芪健脾益气之功。本课题组前期研究已经筛选出补阳还五汤合参芪地黄汤化裁治疗 DN 大鼠的最佳剂量, 并证明

其疗效与阳性对照药物厄贝沙坦相当^[13-15]; 还发现补阳还五汤合参芪地黄汤化裁可以通过保护肾小球足细胞来减少蛋白尿^[13-15], 然而该方对肾小管间质纤维化的影响及作用机制尚不清楚。因此, 本研究采用 db/db 小鼠模型模拟 DN 的发病过程, 观察补阳还五汤合参芪地黄汤化裁对肾小管间质纤维化的影响, 并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物

9 周龄 SPF 级雄性 db/db 小鼠 16 只 (体质量 30~35 g)、9 周龄 SPF 级雄性 db/m 小鼠 8 只 (体质量 15~20 g) 购自北京大学医学部 (实验动物科学部), 动物许可证号 SCXK (京) 2016-0010。动物饲养于河北中医学院动物房, 室温 20~26 °C, 湿度 40%~70%, 12 h 光照/12 h 黑暗交替, 通风良好, 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 2015-03)。

1.2 药物

黄芪 (批号 0093253)、当归 (批号 0093103)、赤芍 (批号 0113103)、桃仁 (批号 0096363)、地龙 (批号 0106443)、僵蚕 (批号 0090403)、蝉蜕 (批号 9126463)、太子参 (批号 0111323)、白术 (批号 0113073)、泽兰 (批号 0092583)、熟地黄 (批号 0101963)、山药 (批号 0090453)、牡丹皮 (批号 0113783)、山茱萸 (批号 0102693) 均为广东一方药业有限公司 (佛山) 生产的中药配方颗粒。中药配方颗粒以中药饮片为原料, 采用现代制药技术提取、浓缩、制粒而成, 采用指纹图谱技术定性鉴别和含量测定, 其性味功效与原中药饮片一致。

1.3 试剂

尿微量白蛋白检测试剂盒 (批号 H127-1-2) 购自南京建城生物工程研究所; HRP 标记的山羊抗兔

IgG 抗体 (批号 GB23303)、Trizol 试剂 (批号 G3013)、Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit (批号 G3330)、2×SYBR Green qPCR Master Mix (High ROX) (批号 G3322) 购自武汉赛维尔生物技术有限公司; HyPure TMMolecular Biology Grade Water (批号 SH30538.02) 购自美国 HyClone 公司; Col-III 抗体 (批号 ab7778)、FN 抗体 (批号 ab2413)、TGF-β1 抗体 (批号 AB215715)、Wnt4 抗体 (批号 AB91226) 购自英国 Abcam 公司; E-cadherin 抗体 (批号 bs-1519R)、α-SMA 抗体 (批号 bs-10196R)、GSK3β 抗体 (批号 bs-0023M)、p-GSK3β 抗体 (批号 bs-5368R) 购自北京博奥森生物技术有限公司; β-catenin 抗体 (批号 8480T) 购自美国 CST 公司; β-actin 抗体 (批号 TA-09) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 仪器

RM2016 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司); BX51 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); Odyssey 红外激光扫描仪 (美国 LI-COR 公司); NanoDrop 2000 型分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Stepone plus qRT-PCR 仪 (美国 ABI 公司); 22331 hamburg 蛋白浓度定量仪 (德国 Eppendorf 公司); DYCZ-24DN 型电泳仪 (北京六一公司); WSE-4040 型半干转膜仪系统 (日本 ATTO 公司)。

2 方法

2.1 分组与给药

动物适应性喂养 1 周, 取 8 只 db/m 小鼠作为对照组, 将 db/db 小鼠随机分为模型组和中药组, 每组 8 只。补阳还五汤合参芪地黄汤化裁成人临床使用剂量为: 黄芪 30 g、当归 10 g、赤芍 10 g、桃仁 10 g、地龙 12 g、僵蚕 10 g、蝉蜕 6 g、太子参 15 g、茯苓 15 g、白术 10 g、泽兰 10 g、熟地 15 g、山药 15 g、牡丹皮 10 g、山茱萸 10 g。根据人与小鼠的体表面积折算等效剂量, 按照 70 kg 成人每日用中药 188 g 计算, 小鼠给药剂量为成人的 9.1 倍, 因此小鼠给药剂量为 24.44 g/kg。临用前分别称取中药颗粒冲剂 24.44 g 溶于 10 mL 0.9%氯化钠溶液中, 中药组 ig 药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 相应体积 0.9%氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 12 周。

2.2 样本收集

给药结束后, 所有动物在代谢笼中饲养 24 h 收集尿液, 颈椎脱臼法处死小鼠, 取肾组织, 留取部分

肾组织立即置于 4%中性甲醛, 4 °C 保存, 待行肾组织病理和免疫组化检查; 留取部分肾组织置于冻存管中, 迅速放入液氮, 短暂冷却后移入 -80 °C 超低温冰箱保存, 待行 qRT-PCR 和 Western blotting 检测。

2.3 指标检测

2.3.1 尿白蛋白/肌酐比值 (albumin/creatinine ratio, ACR) 的检测 收集各组小鼠 24 h 尿液, 采用尿微量白蛋白检测试剂盒检测 ACR。

2.3.2 肾组织病理学观察 取固定后的肾组织, 经梯度乙醇脱水、透明、浸蜡后, 石蜡包埋, 切片 (厚 3 μm), 脱蜡至水, 进行苏木素-伊红 (HE)、高碘酸希夫 (PAS) 和天狼猩红 (Pmicrosirius-Red) 染色, 脱水, 中性胶封片, 于光学显微镜下观察肾组织病理变化。

2.3.3 免疫组化法检测肾组织 E-cadherin 和 α-SMA 蛋白表达 取肾组织石蜡切片, 二甲苯常规脱蜡至水, 柠檬酸抗原修复, 加入 3%双氧水, 室温避光孵育 25 min 阻断内源性过氧化物酶; 加入 3%牛血清白蛋白, 室温封闭 30 min; 分别加入 E-cadherin、α-SMA 抗体 (1:100), 4 °C 孵育过夜; 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体, 室温孵育 50 min; 加入 DAB 显色, 水洗, 苏木素复染细胞核, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。于显微镜下观察并拍照。

2.3.4 Western blotting 法检测肾组织 Col-III、FN、E-cadherin、α-SMA、TGF-β1、Wnt4、GSK3β、p-GSK3β 和 β-catenin 蛋白表达 取各组大鼠肾组织, 提取总蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂测定蛋白质量浓度, 加入 5×上样缓冲液, 95 °C 加热 5 min 使蛋白变性。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 5%脱脂奶粉, 室温封闭 1 h; 分别加入 Col-III 抗体 (1:800)、FN 抗体 (1:1000)、E-cadherin 抗体 (1:1000)、α-SMA 抗体 (1:800)、TGF-β1 抗体 (1:1000)、Wnt4 抗体 (1:1000)、GSK3β 抗体 (1:600)、p-GSK3β 抗体 (1:800)、β-catenin 抗体 (1:1000) 和 β-actin 抗体 (1:1000), 4 °C 孵育过夜; 洗膜后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体, 室温孵育 1 h, 洗膜; 使用发光试剂盒反应后, 洗膜; 采用扫描仪扫描, 用 Quantity One 软件分析条带灰度值。

2.3.5 qRT-PCR 法检测肾组织 Col-III 和 FN mRNA 表达 按照试剂盒说明书提取肾组织总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
Col-III	F: CAGGAGCCA GTGGCCATAA	167
	R: TCTCGACCTGGCTGACCATC	
FN	F: ACCACCCAGAACTACGATGC	88
	R: ACACACGTGCACCTCATCAT	
β -actin	F: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	150
	R: ACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	

2.4 统计分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若方差齐, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验; 若方差不齐, 采用 Kruskal-Wallis H 检验。

3 结果

3.1 中药对 DN 小鼠 ACR 的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠 ACR 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组小鼠 ACR 水平明显降低 ($P < 0.05$)。

3.2 中药对 DN 小鼠肾组织病理变化的影响

如图 1 所示, 对照组小鼠肾脏结构正常, 肾小球、肾小管及间质均无异常改变; 模型组小鼠肾小

表2 中药对 DN 小鼠 ACR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 2 Effect of TCM on ACR in DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ACR/(mg·mmol ⁻¹)
对照	—	246.000 ± 87.000
模型	—	954.000 ± 204.000 [#]
中药	24.44	578.000 ± 137.000 [*]

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

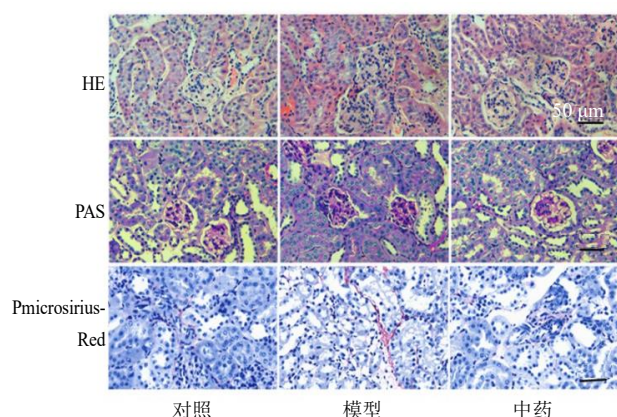


图1 中药对 DN 小鼠肾组织病理变化的影响 (×400)

Fig. 1 Effect of TCM on renal pathological changes in DN mice (× 400)

球毛细血管袢肥大, 炎细胞浸润, 基底膜增厚, 系膜细胞和基质轻中度增生, 肾小管上皮细胞空泡变性, 肾间质有较多的胶原纤维沉积; 与模型组比较, 中药组小鼠肾脏损伤和胶原纤维沉积均有一定程度地减轻。

3.3 中药对 DN 小鼠肾组织 Col-III 和 FN 蛋白及 mRNA 表达的影响

如图 2 和表 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肾组织 Col-III 和 FN 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组小鼠肾组织 Col-III 和 FN 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肾组织 Col-III 和 FN mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组小鼠肾组织 Col-III 和 FN mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。

3.4 中药对 DN 小鼠肾组织 E-cadherin 和 α -SMA 蛋白表达的影响

免疫组化 (图 3) 结果显示, 对照组小鼠肾小管

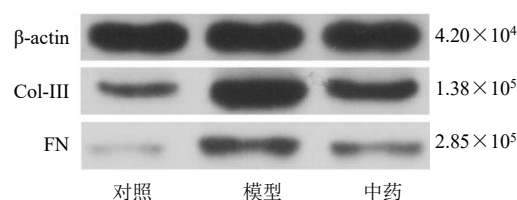


图2 各组小鼠肾组织 Col-III 和 FN 蛋白表达情况

Fig. 2 Col-III and FN protein expressions in kidney tissues of mice in each group

表3 中药对 DN 小鼠肾组织 Col-III 和 FN 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Effect of TCM on Col-III and FN protein expressions in kidney tissue of DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		Col-III	FN
对照	—	0.367 ± 0.063	0.209 ± 0.038
模型	—	0.885 ± 0.115 [#]	0.623 ± 0.056 [#]
中药	24.44	0.556 ± 0.047 [*]	0.435 ± 0.044 [*]

表4 中药对 DN 小鼠肾组织 Col-III 和 FN mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 4 Effect of TCM on Col-III and FN mRNA expressions in kidney tissue of DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量	
		Col-III	FN
对照	—	1.00 ± 0.24	1.00 ± 0.18
模型	—	2.11 ± 0.33 ^{##}	2.76 ± 0.45 ^{##}
中药	24.44	1.05 ± 0.34 [*]	1.87 ± 0.31 [*]

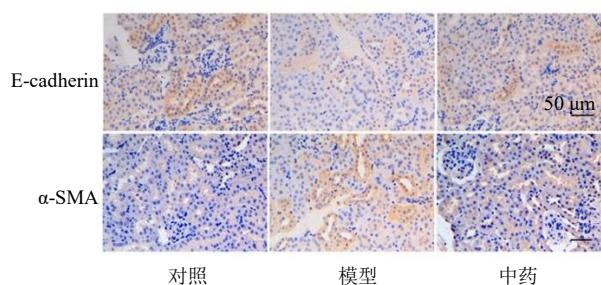


图 3 中药对 DN 小鼠肾组织 E-cadherin 和 α -SMA 蛋白表达的影响 ($\times 400$)

Fig. 3 Effect of TCM on E-cadherin and α -SMA protein expressions in kidney tissues of DN mice ($\times 400$)

上皮细胞有大量 E-cadherin 蛋白表达, 肾间质有少量 α -SMA 蛋白表达; 模型组小鼠肾小管上皮细胞 E-cadherin 蛋白表达减少, 肾间质 α -SMA 蛋白表达增多; 中药组小鼠肾组织 E-cadherin 阳性蛋白表达较模型组增多, α -SMA 蛋白表达较模型组减少。

Western blotting (图 4 和表 5) 结果显示, 与对照比较, 模型组小鼠肾组织 E-cadherin 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), α -SMA 蛋白表达水平明显

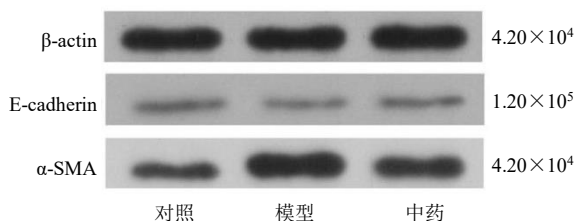


图 4 各组小鼠肾组织 E-cadherin 和 α -SMA 蛋白表达情况

Fig. 4 E-cadherin and α -SMA protein expressions in kidney tissues of mice in each group

表 6 中药对 DN 小鼠肾组织 Wnt4、GSK3 β 、p-GSK3 β 、 β -catenin 及 TGF- β 1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of TCM on Wnt4, GSK3 β , p-GSK3 β , β -catenin and TGF- β 1 protein expressions in kidney tissue of DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量				
		Wnt4	GSK3 β	p-GSK3 β	β -catenin	TGF- β 1
对照	—	0.172 $\pm$ 0.041	1.041 $\pm$ 0.025	0.112 $\pm$ 0.008	0.123 $\pm$ 0.023	0.430 $\pm$ 0.170
模型	—	0.436 $\pm$ 0.085 [#]	1.036 $\pm$ 0.062	0.302 $\pm$ 0.087 [#]	0.332 $\pm$ 0.042 [#]	0.660 $\pm$ 0.230 [#]
中药	24.44	0.231 $\pm$ 0.042 [*]	0.994 $\pm$ 0.016	0.188 $\pm$ 0.048 [*]	0.189 $\pm$ 0.027 [*]	0.420 $\pm$ 0.076 [*]

4 讨论

本课题组基于中医理论对 DN 的认识及全国名老中医赵玉庸教授“肾络瘀阻”学说(其学术思想研究得到国家十一五科技支撑计划项目资助, 编号: 2007BAI10B01-008), 并结合多年临床经验提出以

表 5 中药对 DN 小鼠肾组织 E-cadherin 和 α -SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of TCM on E-cadherin and α -SMA protein expressions in kidney tissue of DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		E-cadherin	α -SMA
对照	—	0.182 $\pm$ 0.017	0.095 $\pm$ 0.021
模型	—	0.076 $\pm$ 0.006 [#]	0.274 $\pm$ 0.035 [#]
中药	24.44	0.125 $\pm$ 0.027 [*]	0.173 $\pm$ 0.026 [*]

升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组小鼠肾组织 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), α -SMA 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.5 中药对 DN 小鼠肾组织 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 5 和表 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肾组织 Wnt4、p-GSK3 β 、 β -catenin 及 TGF- β 1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组小鼠肾组织 Wnt4、p-GSK3 β 、 β -catenin 及 TGF- β 1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

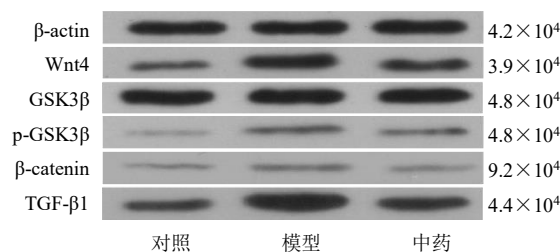


图 5 各组小鼠肾组织 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达情况

Fig. 5 Wnt/ β -catenin signaling pathway related protein expressions in kidney tissues of mice in each group

补阳还五汤合参芪地黄汤化裁治疗 DN。本课题组认为 DN 的基本病机为气阴两虚, 其因气虚无力运血则血行迟缓, 日久可致血瘀; 阴虚火旺, 煎熬津液, 则津亏血少, 血液黏稠不畅, 日久而致痰凝、血瘀, 病久不愈深伏于肾络渐成微小癥积, 致使肾

体受损,肾用失司,肾失封藏,精微渗漏,导致 DN 的发生。以补阳还五合参芪地黄汤化裁治疗 DN 正是谨守病机,抓住主症,行益气、养阴、活血、消癥、通络之功。本课题组首先对该方治疗 DN 进行较为系统的临床疗效观察,证实该方不仅对早期 DN 有肯定的临床疗效,而且对 DN III、IV 期也有较好的效果^[16-17]。然后进行了该方治疗 DN 的基础研究,观察到该方可通过减少足细胞裂孔膜蛋白 nephrin、CD2 相关蛋白(CD2-associated protein, CD2AP)等的丢失使肾小球滤过膜的完整性得到一定程度的恢复,并下调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其信号通路,从而减少蛋白尿,改善肾功能^[13-15,18]。近年研究表明, DN 肾小管间质改变并非继发于肾小球的病变,而是早期病变之一,对肾功能的预后较肾小球病变更为重要^[6]。因此本研究观察了补阳还五合参芪地黄汤化裁对 DN 小鼠肾小管间质纤维化的影响。

本研究采用 db/db 小鼠作为动物模型。db/db 小鼠是目前应用最广泛的 2 型糖尿病模型,出生后 6 周出现明显肥胖,空腹血糖升高,饮水量和尿量增加,8~12 周发生 DN^[19]。本研究发现,在实验结束时,db/db 小鼠的 ACR 显著高于 db/m 小鼠;db/db 小鼠出现了显著的肾组织病理改变,包括肾小球肥大、系膜细胞及基质增生、肾小管上皮细胞空泡变性、肾小管萎缩、炎性细胞浸润和肾间质纤维化等。同时,db/db 小鼠中肾间质纤维化的 2 个典型标志物 Col-III 和 FN 表达明显高于 db/m 小鼠,表明 db/db 小鼠 DN 肾间质纤维化模型建立成功。而补阳还五汤合参芪地黄汤化裁治疗可明显降低 ACR,减轻肾脏病理损伤和肾间质纤维化,表明补阳还五汤合参芪地黄汤化裁对 DN 小鼠肾功能有保护作用。

此外,本研究还探讨了补阳还五汤合参芪地黄汤化裁抑制 DN 小鼠肾间质纤维化的作用机制。在病理条件下激活的肌成纤维细胞是产生 ECM 的主要效应细胞^[20]。而肾小管上皮细胞 EMT 是肌成纤维细胞的重要来源。Iwano 等^[21]研究发现,在肾纤维化过程中有高达 36% 的肌成纤维细胞来源于局部肾小管上皮细胞 EMT。由此可见,肾小管上皮细胞 EMT 是肾小管间质纤维化的重要机制。肾小管上皮细胞 EMT 特征性表现为上皮表型的减少(如 E-cadherin)和间质特征的获得(如 α -SMA),这是一个具有不同中间阶段的可塑性过程^[22-23]。许多研究已经证明,EMT 的进程受多个信号通路和因素的调

控,这些信号通路和因子可以协同启动和完成整个 EMT 反应^[24-26]。Wnt/ β -catenin 信号通路被认为是肾小管上皮细胞 EMT 的主要途径^[27]。生理状态下,Wnt/ β -catenin 信号通路通过下游关键分子如 GSK3 β 和 β -catenin 在细胞分化、增殖、凋亡和迁移中起关键作用^[28]。在 DN 过程中,Wnt 通路被激活,GSK3 β 被直接磷酸化并被抑制, β -catenin 磷酸化被阻断,泛素降解减少,转位到细胞核与转录因子结合,调节靶基因的转录,促进 EMT 的发生^[29-30]。研究表明,E-cadherin、 α -SMA、基质金属蛋白酶等 EMT 相关基因受 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控^[31]。TGF- β 1 是最有效的 EMT 驱动器^[13,32]。TGF- β 1 途径与 Wnt 途径相互作用。同时,TGF- β 1 可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,介导肾小管上皮细胞 EMT^[33]。本研究结果显示,补阳还五汤合参芪地黄汤化裁可提高 DN 小鼠肾组织 E-cadherin、Wnt4、p-GSK3 β 和 β -catenin 蛋白表达水平,降低 α -SMA 蛋白表达水平,表明补阳还五汤合参芪地黄汤化裁可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路改善肾小管上皮细胞 EMT。

综上所述,补阳还五汤合参芪地黄汤化裁可以减轻肾小管间质纤维化,延缓 DN 进展。其机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路及其介导的肾小管上皮细胞 EMT 有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] American Diabetes Association. Microvascular complications and foot care: Standards of medical care in diabetes-2018 [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(Suppl 1): S105-S118.
- [2] Umanath K, Lewis J B. Update on diabetic nephropathy: Core curriculum 2018 [J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71(6): 884-895.
- [3] Gheith O, Farouk N, Nampoory N, et al. Diabetic kidney disease: World wide difference of prevalence and risk factors [J]. *J Nephropharmacol*, 2016, 5(1): 49-56.
- [4] Lv M, Chen Z, Hu G, et al. Therapeutic strategies of diabetic nephropathy: Recent progress and future perspectives [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(3): 332-346.
- [5] Hu C, Sun L, Xiao L, et al. Insights into the mechanisms involved in the expression and regulation of extracellular matrix proteins in diabetic nephropathy [J]. *Curr Med*

- Chem*, 2015, 22(24): 2858-2870.
- [6] Slyne J, Slattery C, McMorro T, *et al.* New developments concerning the proximal tubule in diabetic nephropathy: *In vitro* models and mechanisms [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30(Suppl 4): 60-67.
- [7] Zeni L, Norden A G W, Cancarini G, *et al.* A more tubulocentric view of diabetic kidney disease [J]. *J Nephrol*, 2017, 30(6): 701-717.
- [8] Loeffler I, Wolf G. Epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic nephropathy: Fact or fiction? [J]. *Cells*, 2015, 4(4): 631-652.
- [9] Yook J I, Li X Y, Ota I, *et al.* Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(12): 11740-11748.
- [10] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [11] Guo L, Peng W, Tao J, *et al.* Hydrogen sulfide inhibits transforming growth factor- β 1-induced EMT via Wnt/catenin pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147018.
- [12] 吴万丰, 聂慧芳, 胡立娟, 等. 补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群及其血浆代谢产物的影响 [J]. *中草药*, 2021, 52(1): 118-128.
- [13] 娄菲菲. 益气养阴消癥通络中药对高糖培养足细胞血管内皮生长因子及其受体的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.
- [14] 潘利敏, 方超, 娄菲菲, 等. 肾络通对糖尿病肾病大鼠 podocin、CD2AP 的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(12): 1511-1513.
- [15] 王月华, 潘利敏, 方超, 等. 肾络通对糖尿病肾病大鼠裂孔膜蛋白的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(11): 1496-1498.
- [16] 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.
- [17] 郭倩, 陈志强, 方敬, 等. 益气养阴消癥通络中药治疗 IV 期糖尿病肾病的临床研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(9): 779-782.
- [18] 娄菲菲, 方超, 潘利敏, 等. 肾络通对高糖培养足细胞 VEGF 和 Flt-1 的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(8): 1074-1077.
- [19] 王松月, 依香叫, 李金诚, 等. 自发性 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠生物学特性研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(7): 909-912.
- [20] Loeffler I, Wolf G. Transforming growth factor and the progression of renal disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(Suppl 1): i37-i45.
- [21] Iwano M, Plieth D, Danoff T M, *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(3): 341-350.
- [22] Xie Y, Lan F, Zhao J, *et al.* Hirudin improves renal interstitial fibrosis by reducing renal tubule injury and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106249.
- [23] Singh M, Yelle N, Venugopal C, *et al.* EMT: Mechanisms and therapeutic implications [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 182: 80-94.
- [24] Lee S Y, Jeon H M, Ju M K, *et al.* Dlx-2 is implicated in TGF- β -and Wnt-induced epithelial-mesenchymal, glycolytic switch, and mitochondrial repression by Snail activation [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(4): 1768-1780.
- [25] Kroon J, Veld L, Buijs J T, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β inhibition depletes the population of prostate cancer stem/progenitor-like cells and attenuates metastatic growth [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19): 8986-8994.
- [26] Kumar K J, Vani M G, Chueh P J, *et al.* Antrodin C inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via suppression of Smad2/3 and β -catenin signaling pathways [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117111.
- [27] Zhang X, Fang J, Chen Z, *et al.* Qingshen Buyang Formula attenuates renal fibrosis in 5/6 nephrectomized rats via inhibiting EMT and Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 5370847.
- [28] Zhou L L, Liu Y H. Wnt/ β -catenin signaling and renin-angiotensin system in chronic kidney disease [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2016, 25(2): 100-106.
- [29] Xie L, Zhai R, Chen T, *et al.* *Panax notoginseng* ameliorates podocyte EMT by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in STZ-induced diabetic rats [J]. *Drug*

- Des Devel Ther*, 2020, 14: 527-538.
- [30] Chang B, Chen W, Zhang Y, *et al.* *Tripterygium wilfordii* mitigates hyperglycemia-induced upregulated Wnt/ β -catenin expression and kidney injury in diabetic rats [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(4): 3874-3882.
- [31] Pulkkinen K, Murugan S, Vainio S. Wnt signaling in kidney development and disease [J]. *Organogenesis*, 2008, 4(2): 55-59.
- [32] Tang F, Hao Y, Zhang X, *et al.* Effect of echinacoside on kidney fibrosis by inhibition of TGF- β 1/Smads signaling pathway in the db/db mice model of diabetic nephropathy [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 2813-2826.
- [33] Xiang X, Cai H D, Su S L, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* protects against diabetic nephropathy through metabolome regulation and Wnt/ β -catenin and TGF- β signaling inhibition [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 139: 26-40.

[责任编辑 李亚楠]