

基于 IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路研究复方仙草颗粒抑制糖尿病肾病足细胞上皮-间充质转化的作用机制

刘丹宁¹, 黄国东^{2*}, 杨鑫勇¹, 周嫦艳¹, 王亚南¹

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530000

2. 广西中医药大学附属国际壮医医院, 广西 南宁 530000

摘要: 目的 基于胰岛素受体底物 2 (insulin receptor substrate 2, IRS2)/磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/叉头框蛋白 O4 (forkhead box O4, FOXO4) 信号通路探讨复方仙草颗粒抑制糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 大鼠肾足细胞上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的作用机制。方法 采用单侧肾切除、高糖高脂饲料喂养及一次性 ip 链脲佐菌素制备 DN 模型大鼠, 另设置对照组和假手术组, 将造模成功的大鼠随机分为模型组、厄贝沙坦 (15.75 mg/kg) 组和复方仙草颗粒组低、中、高剂量 (315.0、472.5、945.0 mg/kg) 组, 各给药组 ig 相应药物, 连续 6 周。检测各组大鼠空腹血糖、肾脏指数 (kidney index, KI)、尿微量白蛋白/肌酐比值 (urinary albumin-to-creatinine ratio, UACR)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肾组织病理变化; 采用透射电镜 (TEM) 观察肾足细胞超微结构变化; 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测大鼠肾组织足细胞裂孔膜蛋白 (nephrin)、P-钙黏蛋白 (P-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、Desmin、成纤维细胞特异蛋白-1 (fibroblast specific protein-1, FSP-1) 及 IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路相关因子 mRNA 和蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠 KI、UACR、BUN 水平均显著升高 ($P<0.05$), 肾小球肥大, 肾小管广泛扩张, 上皮细胞变性脱落, 足突融合或丢失; 肾组织 nephrin、P-cadherin 表达显著降低 ($P<0.05$), α -SMA、Desmin、FSP-1 表达显著升高 ($P<0.05$), IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路相关因子 mRNA 和蛋白表达均显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 复方仙草颗粒组大鼠 KI、UACR、BUN 水平显著降低 ($P<0.05$), 肾脏病理结构和足细胞超微结构明显改善; 肾组织 nephrin、P-cadherin 表达显著升高 ($P<0.05$), α -SMA、Desmin、FSP-1 表达显著降低 ($P<0.05$), IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路相关因子 mRNA 和蛋白表达均显著升高 ($P<0.05$)。结论 复方仙草颗粒能够通过调节 IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路改善 DN 大鼠肾功能, 抑制 DN 大鼠足细胞 EMT, 减轻足细胞损伤。

关键词: 复方仙草颗粒; 糖尿病肾病; 足细胞; 上皮-间充质转化; 胰岛素受体底物 2/磷脂酰肌醇-3-激酶/叉头框蛋白 O4 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)21-6795-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.017

Mechanism of Compound Xianchao Granules on inhibiting epithelial mesenchymal transformation in diabetic nephropathy podocytes based on IRS2/PI3K/FOXO4 signaling pathway

LIU Dan-ning¹, HUANG Guo-dong², YANG Xin-yong¹, ZHOU Chang-yan¹, WANG Ya-nan¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China

2. Guangxi International Zhuang Medicine Hospital, Nanning 530000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Compound Xianchao Granules (复方仙草颗粒) on inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal podocytes in diabetic nephropathy (DN) rats based on insulin receptor substrate 2 (IRS2)/phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/forkhead box O4 (FOXO4) signaling pathway. **Methods** DN model rats were prepared by unilateral nephrectomy, high sugar and high fat diet and one-time ip streptozocin, control group and sham-operated group were set up.

收稿日期: 2022-07-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81960913); 广西中医药大学 2021 年研究生教育创新计划项目区级课题 (YCSW2021235)

作者简介: 刘丹宁, 硕士, 从事中西医结合治疗肾脏疾病研究。Tel: 15878778767 E-mail: 353580454@qq.com

*通信作者: 黄国东, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合治疗肾脏疾病研究。Tel: 13768372258 E-mail: 644781538@qq.com

Successfully modeled rats were randomly divided into model group, irbesartan (15.75 mg/kg) group, Compound Xiancao Granules low-, medium- and high-dose (315, 472.5, 945 mg/kg) groups, and each administration group was given corresponding drugs for six weeks. Fasting blood glucose, kidney index (KI), urinary albumin-to-creatinine ratio (UACR) and blood urea nitrogen (BUN) of rats in each group were measured; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe histopathology changes in renal; Transmission electron microscopy was used to observe ultrastructural changes in renal pedicle cells; qRT-PCR and Western blotting were used to detect mRNA and protein expressions of *nephrin*, *P-cadherin*, α -smooth muscle actin (α -SMA), *Desmin*, fibroblast specific protein-1 (*FSP-1*) and IRS2/PI3K/FOXO4 signaling pathway related factors. **Results** Compared with control group, KI, UACR and BUN in model group were significantly increased ($P < 0.05$); Glomerular hypertrophy, extensive tubular dilatation, epithelial cell degeneration and shedding, fusion or loss of peduncle were observed; *Nephrin* and *P-cadherin* expressions in renal were significantly decreased ($P < 0.05$), α -SMA, *Desmin* and *FSP-1* expressions were significantly increased ($P < 0.05$), mRNA and protein expressions of IRS2/PI3K/FOXO4 signaling pathway related factors were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, KI, UACR and BUN in Compound Xiancao Granules groups were significantly decreased ($P < 0.05$), renal pathological structure and podocyte ultrastructure were significantly improved; *Nephrin* and *P-cadherin* expressions in renal were significantly increased ($P < 0.05$), α -SMA, *Desmin* and *FSP-1* expressions were significantly decreased ($P < 0.05$), mRNA and protein expressions of IRS2/PI3K/FOXO4 signaling pathway related factors were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Compound Xiancao Granules can improve kidney function in DN rats by regulating IRS2/PI3K/FOXO4 signaling pathway, inhibit EMT of podocytes in DN rats and reduce podocyte injury.

Key words: Compound Xiancao Granules; diabetic nephropathy; podocytes; epithelial-mesenchymal transformation; insulin receptor substrate 2/phosphatidylinositol-3-kinase/forkhead box O4 signaling pathway

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 作为糖尿病的严重并发症之一, 已成为一个日趋严重的全球性健康问题, 目前我国糖尿病患者大约为 9500 万, 还有约 1.5 亿患者处于糖尿病前期阶段^[1]。1 型和 2 型糖尿病均可发展为 DN, DN 主要由微血管病变引起, 是导致糖尿病患者终末期肾功能衰竭甚至死亡的重要因素, 但现代医学针对 DN 缺乏特异性有效的治疗方法^[2]。因此, 寻找预防和治疗的新靶点已成为治疗 DN 急需解决的问题。

高糖诱导的氧化应激、线粒体损伤等导致肾足细胞凋亡和功能损伤, 是推进 DN 发生发展的重要因素。足细胞是肾小球滤过膜的最后一道屏障, 蛋白尿是肾小球滤过屏障受损的标志, DN 的进展与足细胞功能障碍密切相关, 但其作用机制尚未明确^[3-4]。上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是 DN 中足细胞功能障碍和足细胞减少的潜在机制, 当受到损伤时, 足细胞会发生一系列的表型改变, 其高度特化的足细胞标志物如足细胞裂孔膜蛋白 (*nephrin*)、P-钙黏蛋白 (*P-cadherin*) 停止表达, 而纤维细胞特异蛋白-1 (fibroblast specific protein-1, *FSP-1*)、*Desmin*、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 等开始表达^[5]。

复方仙草颗粒由八仙草、三七、黄芪、(制) 大黄、薏苡仁、甘草组成, 有健脾益肾、清热利湿、活血解毒之功效, 是壮医有效验方, 临床应用证实该方能够改善早期 DN 患者的肾功能、内皮功能、

血液流变学及免疫功能^[6], 并对 IgA 肾病起到有效的治疗作用^[7]; 能够影响肾脏线粒体自噬从而保护肾功能, 抑制肾损伤^[8]。毒理研究显示该方安全无毒^[9], 并制定了行业质量标准 (以人参皂苷 Rb_1 计)^[10]。本研究拟从分子细胞水平、基因水平阐述复方仙草颗粒对 DN 大鼠与 EMT 相关指标的影响, 为复方仙草颗粒的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 6 周龄, 体质量 (180 ± 20) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证号 No.430727211100630627。动物饲养于广西中医药大学 SPF 级屏障环境内, 相对湿度 50%~70%, 温度 23~26 °C, 自然昼夜节律。动物实验经广西中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 DW20210321-056)。

1.2 药品与试剂

复方仙草颗粒 (批号 201202, 人参皂苷 Rb_1 质量分数为 5.89 mg/g, 10 g/包) 由广西国际壮医医院壮瑶药研发中心生产; 厄贝沙坦 (150 mg/片, 批号 210329JT) 购自江苏恒瑞医药股份有限公司; 链脲佐菌素 (streptozocin, STZ, 批号 S8050) 购自北京索莱宝科技有限公司; 大鼠尿微量白蛋白 ELISA 试剂盒 (批号 RR7B2Q48AG)、胰岛素 ELISA 试剂盒 (批号 FTNR2NC6Z9) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)

试剂盒(批号 C013-2-1)、肌酐试剂盒(批号 C011-2-1)购自南京建成生物工程研究所;叉头框蛋白 O4 (forkhead box O4, FOXO4) 抗体(批号 BC106761)、P-cadherin 抗体(批号 BC041846)、 α -SMA 抗体(批号 BC017554)、Desmin 抗体(批号 BC032116)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 BC00100134)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)抗体(批号 BC030815)、FSP-1 抗体(批号 BC016300)购自武汉 Proteintech 公司;胰岛素受体底物 2 (insulin receptor substrate 2, IRS2) 抗体(批号 ab134101)购自英国 Abcam 公司;提取总 RNA 试剂盒(批号 A6010)购自普洛麦格生物技术有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 C31430100)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(批号 C31430101)、nephrin 抗体(批号 AB-11153994)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K) 抗体(批号 bs-3332R)、磷酸化 IRS2 (phosphorylated IRS2, p-IRS2) 抗体(批号 bs-5397R)购自北京博奥森生物有限公司。

1.3 仪器

HT7700 型透射电子显微镜(TEM, 日本 HITACHI 公司);GA-3 型血糖仪(三诺生物传感股份有限公司);732BR2019 型化学发光成像仪、4100624 型高通量酶标仪筛选系统(美国 Bio Rad 公司);2809152 型 PCR 仪(Biometer 公司);UC7 型超薄切片机(德国 Leica 公司);58595 型超微量紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);05815916001 型 qRT-PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 DN 模型的制备

SD 雄性大鼠适应性喂养 5 d 后,取 40 只大鼠制备 DN 模型^[11-14]。大鼠喂食高糖高脂饲料,以右侧卧位固定于鼠板上,在大鼠耳尖与尾巴连线和右肋弓下缘交点处做 1 cm 左右的横行切口,切口后将右肾从切口中推挤出体外,充分暴露右肾,切除右肾,缝合后消毒切口;术后 1 个月,大鼠禁食不禁水 12 h,一次性 ip STZ (40 mg/kg),3 d 后,连续 3 d 尾静脉采血测得血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为 DN 大鼠。同时连续 2 次留取 24 h 尿,测尿微量白蛋白、24 h 尿蛋白定量。当 24 h 尿蛋白定量 ≥ 30 mg 或尿微量白蛋白与肌酐比值(urinary albumin-to-creatinine ratio, UACR) > 30 mg/g,则认定 DN 模

型成立。另取 10 只大鼠作为对照组,10 只大鼠作为假手术组,对照组不做任何处理,自由进食饮水,用普通饲料喂养;假手术组切口后行暴露左肾缝合切口,并 ip 0.1 mmol/L 柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液。实验过程中,2 只大鼠因术中失血过多死亡,4 只大鼠因无法耐受 STZ 毒性死亡,4 只未达 DN 成模标准予以剔除。

2.2 分组及给药

根据随机数表法,将 DN 大鼠分为模型组、厄贝沙坦(15.75 mg/kg)组和复方仙草颗粒低、中、高剂量(315、472.5、945 mg/kg)组,每组 6 只。各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水,1 次/d,连续 6 周。每周测定 1 次空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),给药结束后,留取 24 h 尿,禁食不禁水 12 h,腹主动脉取血;取肾脏,称定质量,随后立刻取肾皮质(2 mm $\times$ 2 mm),置于电镜固定液中常温固定 2 h 后,4 $^{\circ}$ C 固定 24 h;沿肾脏纵轴切开,一半置于 4%多聚甲醛溶液中,另一半取肾皮质部分于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3 大鼠一般情况、肾脏指数(kidney index, KI)及肾功能指标的检测

观察给药前后大鼠的精神状态、饮食、饮水以及皮毛色泽变化等情况,计算 KI;按试剂盒说明书测定血清中 BUN 和肌酐含量,按 ELISA 试剂盒说明书测定尿微量白蛋白含量。

$KI = \text{肾脏质量} / \text{体质量}$

2.4 FBG、FINS 及 HOMA-IR 的检测

末次给药后,于大鼠进食 6~8 h 后测量大鼠 FBG;按 ELISA 试剂盒说明书测定空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)后,计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment, HOMA-IR)。

$HOMA-IR = FINS \times FBG / 22.5$

2.5 肾组织病理及足细胞超微结构的检测

将固定于 4%多聚甲醛溶液的肾组织修剪至合适大小,梯度脱水,石蜡包埋,将蜡块切成 4 μ m 厚度,置于载玻片上,烤片,进行苏木素-伊红(HE)染色观察肾组织病理形态结构。

将固定于电镜固定液的组织进行梯度脱水,使用丙酮-812 包埋剂(1:1)包埋,丙酮-812 包埋剂(1:2)渗透过夜,37 $^{\circ}$ C 烤箱过夜,60 $^{\circ}$ C 烤箱聚合 48 h;超薄切片机切片,铀铅双染色,切片室温干燥过夜,于 TEM 下观察足细胞结构,采集图像后用 Image pro plus 6.0 软件进行数据分析。

2.6 免疫组化法检测肾组织足细胞标志物和 EMT 标志物蛋白表达

将肾组织切片脱蜡,梯度乙醇水化后,PBS 冲洗 3 次;95 ℃微波抗原修复 10 min,PBS 冲洗 3 次;加入山羊血清封闭 20 min,分别滴加 α -SMA 抗体(1:200)、nephrin 抗体(1:500)、P-cadherin 抗体(1:500)、Desmin 抗体(1:200)、FSP-1 抗体(1:500),4 ℃孵育过夜;漂洗后,滴加二抗,孵育后冲洗,加入 DAB 显色液,二甲苯透明,中性树脂封片,于显微镜下观察蛋白阳性表达,用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析平均吸光度(A)值。

2.7 qRT-PCR 检测肾组织足细胞标志物、EMT 标志物和 IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路相关因子 mRNA 表达

取低温保存的肾组织 5~10 mg,放入钢珠,用冷冻研磨仪将组织研磨成匀浆,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

2.8 Western blotting 检测肾组织足细胞标志物、EMT 标志物和 IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路相关蛋白表达

取低温保存的肾组织 20 mg,置于装有 RIPA 裂解液的离心管,放入钢珠,用冷冻研磨仪将组织匀浆(10 000 r/min、5 min),取出钢珠,冰上裂解 20 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度,将上清液与

5×上样缓冲液混匀煮沸,得到变性蛋白。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,用 5%脱脂牛奶封闭;分别加入 p-IRS2 抗体(1:10 000)、IRS2 抗体(1:3000)、p-PI3K 抗体(1:10 000)、PI3K 抗体(1:10 000)、FOXO4 抗体(1:3000)、 α -SMA 抗体(1:6000)、nephrin 抗体(1:2000)、P-cadherin 抗体(1:2000)、Desmin 抗体(1:50 000)和 GAPDH 抗体(1:20 000),4 ℃孵育过夜;TBST 洗涤 5 次,加入相应二抗,常温孵育 1 h,TBST 洗涤 5 次,加入 ECL 发光试剂显色,使用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行数据处理及统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据符合正态性和方差齐性时,多组间采用 ANOVA 方差分析,否则采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。组间前后比较采用配对 *t* 检验(数据符合正态性/方差齐性)或符合秩和检验(数据不符合正态性/方差齐性),计数资料的组间比较采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 复方仙草颗粒对 DN 大鼠一般情况和肾脏外观的影响

对照组和假手术组大鼠毛发顺滑,反应灵敏,一般情况较好;模型组大鼠精神欠佳,反应迟钝,毛发枯黄杂乱,掉毛严重,身上出现斑秃现象,进食量和饮水量与日剧增,但体质量减轻,尿量增多。各给药组大鼠相较于模型组大鼠精神稍好,反应稍迟钝,进食量和饮水量相较于对照组大鼠增加,但少于模型组大鼠,体质量变化起伏不大。

如图 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠由于单侧肾切除术后仅有 1 个肾脏进行全身的代谢活动并且无药物干预,因此肾脏明显大于对照组大鼠肾脏;与模型组比较,各给药组肾脏略小于模型组大鼠肾脏,且各组间基本无差别。

3.2 复方仙草颗粒对 DN 大鼠 KI 及肾功能的影响

如表 2 所示,与对照组比较,假手术组大鼠 KI、UACR、BUN 无统计学差异,模型组大鼠 KI、UACR 和 BUN 水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠 KI、UACR 和 BUN 水平均显著降低($P<0.05$)。

3.3 复方仙草颗粒对 DN 大鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 的影响

如表 3 所示,与对照组比较,假手术组大鼠

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列
<i>Nephrin</i>	F: 5'-GGCTCTGACCACACCAACATCC-3' R: 5'-GAGTGAGGGCTTATGCTGACAAC-3'
α -SMA	F: 5'-GGCTATGCTCTGCCTCAT-3' R: 5'-GGACGATCTCACGCTCA-3'
<i>Desmin</i>	F: 5'-CAGCAACAGGGACAATGA-3' R: 5'-CACAGCCAACATGGAAGA-3'
<i>P-cadherin</i>	F: 5'-TGTCTTGCCTCGGAACA-3' R: 5'-TAAGCACCACCCATT-3'
<i>IRS2</i>	F: 5'-CCACTGCTGGCTCCTCA-3' R: 5'-GTCACCTCGGGACCTTCT-3'
<i>PI3K</i>	F: 5'-TGTCTTGCCTCGGAACA-3' R: 5'-CAAACCTCCAGCCACACATT-3'
<i>FOXO4</i>	F: 5'-CTGTACCCCTTGTCTTGA-3' R: 5'-TGCAGAACTCATCAGCCA-3'
<i>FSP-1</i>	F: 5'-CAGCAACAGGGACAATGA-3' R: 5'-CACAGCCAACATGGAAGA-3'
β -actin	F: 5'-ATCATTGCTCCTCTGAGCG-3' R: 5'-CAGCTCAGTAAGAGTCCGCC-3'

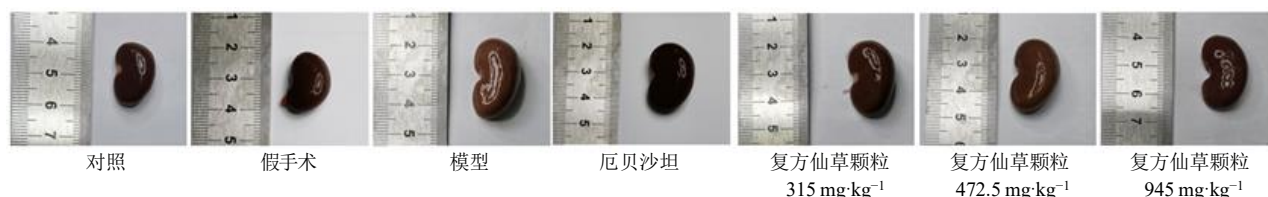


图 1 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾脏外观的影响

Fig. 1 Effect of Compound Xiancao Granules on renal appearance in DN rats

表 2 复方仙草颗粒对 DN 大鼠 KI 及肾功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effectsof Compound Xiancao Granules on KI and kidney function index in DN rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	KI/(g·kg ⁻¹)	UACR/(mg·g ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	10	2.42±0.34	8.36±0.52	5.96±0.42
假手术	—	10	2.55±0.28	6.55±0.38	5.89±0.22
模型	—	6	13.58±1.04*	76.58±1.52*	8.23±1.32*
厄贝沙坦	15.75	6	10.16±0.48 [#]	48.16±1.48 [#]	7.54±1.08 [#]
复方仙草颗粒	315.0	6	10.78±1.08 [#]	52.34±1.25 [#]	7.35±1.21 [#]
	472.5	6	9.74±1.18 [#]	59.74±1.08 [#]	7.04±1.08 [#]
	945.0	6	7.50±1.24 [#]	47.50±1.01 [#]	6.96±1.03 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, 下表同

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group, same as below tables

表 3 复方仙草颗粒对 DN 大鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Compound Xiancao Granules on FBG, FINS and HOMA-IR in DN rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	FBG/(mmol·L ⁻¹)	FINS/(mIU·L ⁻¹)	HOMA-IR
对照	—	10	5.68±0.18	109.49±6.47	22.38±1.32
假手术	—	10	5.91±0.28	102.53±25.74	20.49±4.40
模型	—	6	30.67±1.04*	80.26±5.13*	96.62±2.14*
厄贝沙坦	15.75	6	23.57±1.29 [#]	96.26±4.32 [#]	76.86±4.24 [#]
复方仙草颗粒	315.0	6	25.78±1.57 [#]	93.67±4.97 [#]	88.38±2.12 [#]
	472.5	6	24.74±1.18 [#]	94.90±6.22 [#]	86.40±3.60 [#]
	945.0	6	22.90±1.47 [#]	97.21±5.77 [#]	81.82±3.57 [#]

FBG、FINS 及 HOMA-IR 无统计学差异, 模型组大鼠 FBG、HOMA-IR 均显著升高 ($P < 0.05$), FINS 显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠 FBG、HOMA-IR 均显著降低 ($P < 0.05$), FINS 显著升高 ($P < 0.05$)。

3.4 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织病理及足细胞超微结构的影响

如图 2 所示, HE 染色结果显示, 对照组和假手术组大鼠肾组织结构正常, 肾小管上皮细胞未见明显变性, 肾小球结构正常, 系膜细胞未见增生, 组织未见明显炎症细胞浸润; 与对照组比较, 模型组大鼠肾组织结构重度异常, 肾小管广泛扩张, 上皮细胞变性脱落, 部分上皮细胞气球样变, 胞质完整消失, 间质可见少量炎症细胞浸润, 肾小球肥大, 毛细血管祥扩张; 与模型组比较, 各给药组肾组织各种损伤较轻, 部分肾小管扩张, 个别肾小管上皮细胞数量减少并可见气球样变, 肾小球轻度肥大,

未见炎症细胞浸润。

TEM 结果显示, 假手术组大鼠肾皮质与对照组无明显差异; 模型组大鼠足突约有 80% 融合, 部分足突变宽, 基底膜局部增宽, 厚薄不均匀, 线粒体可见轻度肿胀, 大小不均, 部分嵴减少, 基质溶解空泡变。与模型组比较, 厄贝沙坦组和复方仙草颗粒高剂量组足突融合 40% 左右, 基底膜厚薄较均匀; 复方仙草颗粒低剂量组足突融合程度 70% 左右, 基底膜局部增宽, 线粒体未见肿胀; 复方仙草颗粒中剂量组足突融合程度 60% 左右, 基底膜局部增宽, 线粒体未见肿胀。

3.5 免疫组化法检测肾组织足细胞标志物和 EMT 标志物蛋白表达

如图 3 和表 4 所示, 与对照组比较, 假手术组大鼠 EMT 标志物 (Desmin、 α -SMA、FSP-1) 和足细胞标志物 (nephrin、P-cadherin) 蛋白表达无统计学差异意义, 模型组大鼠肾组织 Desmin、 α -SMA、

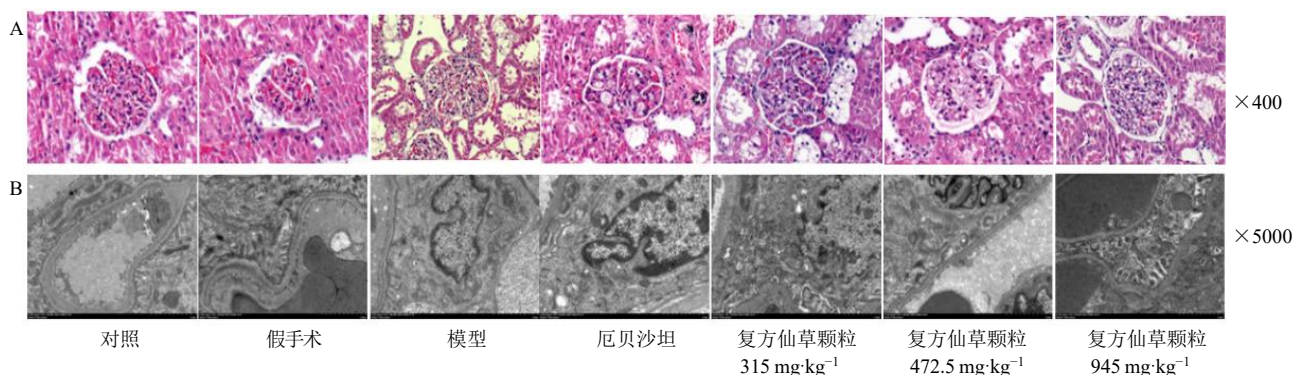


图 2 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织病理 (A) 及足细胞超微结构 (B) 的影响

Fig. 2 Effect of Compound Xiancao Granules on renal histopathology (A) and podocyte ultrastructure (B) in DN rats

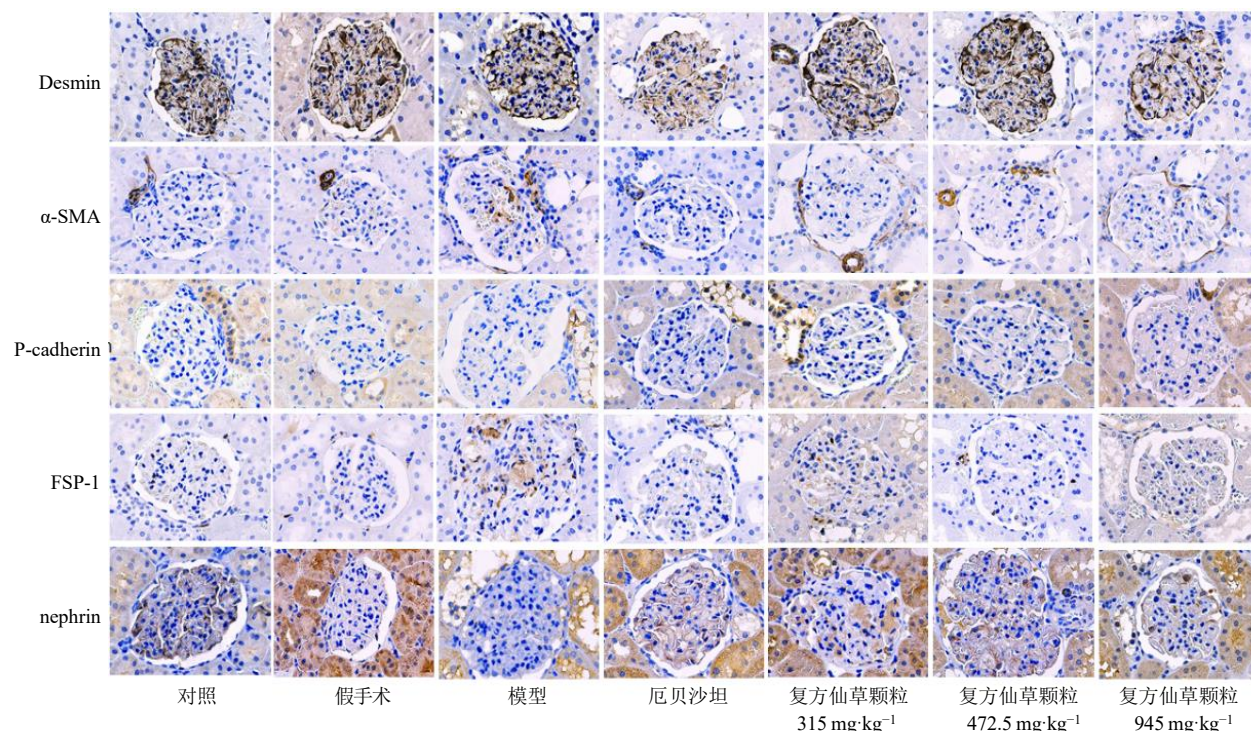


图 3 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 α -SMA、nephrin、P-cadherin、Desmin 和 FSP-1 蛋白表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)
Fig. 3 Effect of Compound Xiancao Granules on α -SMA, nephrin, P-cadherin, Desmin and FSP-1 protein expressions in renal of DN rats (immunohistochemical, $\times 400$)

表 4 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 α -SMA、nephrin、P-cadherin、Desmin 和 FSP-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Compound Xiancao Granules on α -SMA, nephrin, P-cadherin, Desmin and FSP-1 protein expressions in renal of DN rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n/只	平均 A 值				
			Desmin	nephrin	P-cadherin	α -SMA	FSP-1
对照	—	10	0.001 8 $\pm$ 0.000 8	0.018 1 $\pm$ 0.006 3	0.001 6 $\pm$ 0.000 4	0.000 3 $\pm$ 0.000 3	0.000 3 $\pm$ 0.000 3
假手术	—	10	0.004 9 $\pm$ 0.001 4	0.014 5 $\pm$ 0.002 6	0.000 9 $\pm$ 0.000 3	0.000 6 $\pm$ 0.000 4	0.000 9 $\pm$ 0.000 3
模型	—	6	0.007 5 $\pm$ 0.002 1*	0.002 6 $\pm$ 0.001 1*	0.000 2 $\pm$ 0.000 3*	0.002 5 $\pm$ 0.001 1*	0.001 8 $\pm$ 0.000 4*
厄贝沙坦	15.75	6	0.002 4 $\pm$ 0.000 7 [#]	0.007 3 $\pm$ 0.001 1 [#]	0.001 2 $\pm$ 0.000 3 [#]	0.000 7 $\pm$ 0.000 8 [#]	0.000 8 $\pm$ 0.000 4 [#]
复方仙草颗粒	315.0	6	0.006 0 $\pm$ 0.001 2	0.007 1 $\pm$ 0.001 2 [#]	0.000 5 $\pm$ 0.000 2	0.000 5 $\pm$ 0.000 3 [#]	0.001 5 $\pm$ 0.000 4
	472.5	6	0.004 9 $\pm$ 0.001 4 [#]	0.008 5 $\pm$ 0.003 5 [#]	0.000 8 $\pm$ 0.000 2 [#]	0.000 6 $\pm$ 0.000 4 [#]	0.001 1 $\pm$ 0.000 4 [#]
	945.0	6	0.003 7 $\pm$ 0.001 4 [#]	0.009 6 $\pm$ 0.003 3 [#]	0.001 1 $\pm$ 0.000 2 [#]	0.000 7 $\pm$ 0.000 3 [#]	0.000 8 $\pm$ 0.000 2 [#]

FSP-1 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$), nephrin、P-cadherin 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组 α -SMA 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), nephrin 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$); 厄贝沙坦组和复方仙草颗粒中、高剂量组 Desmin、FSP-1 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), P-cadherin 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)。

3.6 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 α -SMA、Desmin、FSP-1、nephrin 和 P-cadherin mRNA 表达的影响

如表 5 所示, 与对照组比较, 假手术组大鼠肾组织 α -SMA、Desmin、FSP-1、nephrin 和 P-cadherin mRNA 表达无统计学差异, 模型组大鼠肾组织 α -SMA、Desmin、FSP-1 mRNA 表达水平均显著升高

($P<0.05$), nephrin、P-cadherin mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织 α -SMA、Desmin、FSP-1 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$), nephrin、P-cadherin mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

3.7 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 IRS2、PI3K 和 FOXO4 mRNA 表达的影响

如表 6 所示, 与对照组比较, 假手术组大鼠肾组织 IRS2、PI3K 和 FOXO4 mRNA 表达无统计学差异, 模型组大鼠肾组织 IRS2、FOXO4 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$), PI3K mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织 IRS2 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$), PI3K、FOXO4 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

表 5 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 α -SMA、Desmin、FSP-1、nephrin 和 P-cadherin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 5 Effect of Compound Xiancao Granules on α -SMA, Desmin, FSP-1, nephrin and P-cadherin mRNA expressions in renal of DN rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量				
		α -SMA	Desmin	FSP-1	nephrin	P-cadherin
对照	—	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
假手术	—	0.82±0.18	0.80±0.14	0.86±0.12	1.01±0.02	1.06±0.06
模型	—	4.48±0.25*	3.41±0.11*	3.51±0.12*	0.45±0.09*	0.63±0.06*
厄贝沙坦	15.75	2.95±0.49 [#]	2.43±0.12 [#]	2.73±0.55 [#]	0.93±0.05 [#]	0.93±0.07 [#]
复方仙草颗粒	315.0	3.07±0.13 [#]	2.95±0.08 [#]	2.78±0.25 [#]	0.75±0.12 [#]	0.79±0.03 [#]
	427.5	2.79±0.23 [#]	2.80±0.32 [#]	2.73±0.15 [#]	0.88±0.02 [#]	0.88±0.02 [#]
	945.0	2.48±0.49 [#]	2.48±0.27 [#]	2.44±0.24 [#]	0.93±0.02 [#]	0.91±0.03 [#]

表 6 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 IRS2、PI3K 和 FOXO4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 6 Effect of Compound Xiancao Granules on IRS2, PI3K and FOXO4 mRNA expressions in renal of DN rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		
		IRS2	PI3K	FOXO4
对照	—	1.00	1.00	1.00
假手术	—	1.14±0.06	0.99±0.05	1.04±0.08
模型	—	7.44±0.41*	0.37±0.08*	1.53±0.15*
厄贝沙坦	15.75	3.21±0.19 [#]	2.01±0.14 [#]	2.32±0.20 [#]
复方仙草颗粒	315.0	5.64±0.47 [#]	1.93±0.12 [#]	1.65±0.07 [#]
	427.5	3.96±0.78 [#]	2.04±0.05 [#]	2.05±0.17 [#]
	945.0	2.74±0.54 [#]	2.31±0.46 [#]	2.08±0.15 [#]

3.8 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 α -SMA、nephrin、P-cadherin 和 Desmin 蛋白表达的影响

如图 4 和表 7 所示, 与对照组比较, 假手术组大鼠肾组织 α -SMA、Desmin 蛋白表达无统计学差异, 模型组大鼠肾组织 α -SMA、Desmin 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), nephrin、P-cadherin 蛋白

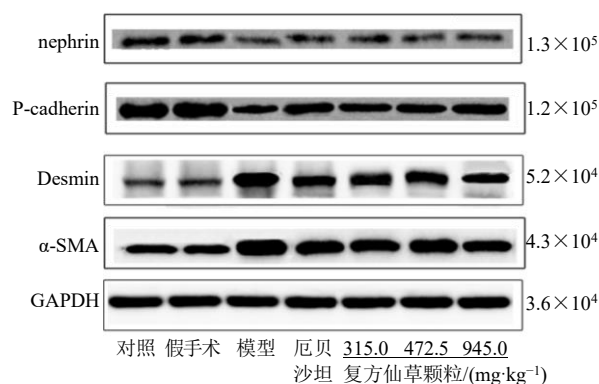


图 4 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 α -SMA、nephrin、Desmin 和 P-cadherin 蛋白表达的影响
Fig. 4 Effect of Compound Xiancao Granules on α -SMA, nephrin, Desmin and P-cadherin protein expressions in renal of DN rats

表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织 α -SMA、Desmin 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), nephrin、P-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

表 7 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 α -SMA、nephrin、Desmin 和 P-cadherin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 7 Effect of compound Xiancao Granules on α -SMA, nephrin, Desmin and P-cadherin protein expressions in renal of DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量			
		α -SMA	Desmin	nephrin	P-cadherin
对照	—	0.88±0.08	0.81±0.03	1.22±0.08	1.14±0.08
假手术	—	0.89±0.08	0.82±0.04	1.08±0.10	1.05±0.06
模型	—	1.36±0.25*	1.13±0.03*	0.71±0.05*	0.64±0.11*
厄贝沙坦	15.75	0.88±0.02 [#]	0.87±0.04 [#]	1.15±0.14 [#]	0.88±0.03 [#]
复方仙草颗粒	315.0	1.01±0.02 [#]	0.91±0.07 [#]	0.83±0.06 [#]	0.89±0.05 [#]
	427.5	0.96±0.05 [#]	0.86±0.03 [#]	1.09±0.06 [#]	0.99±0.04 [#]
	945.0	0.90±0.06 [#]	0.83±0.03 [#]	1.21±0.02 [#]	0.99±0.02 [#]

3.9 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 5 和表 8 所示,与对照组比较,假手术组大鼠肾组织 IRS2、p-IRS2、PI3K、p-PI3K、FOXO4 蛋白表达无统计学差异,模型组大鼠肾组织 p-IRS2、p-PI3K 和 FOXO4 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠肾组织 p-IRS2、p-PI3K 和 FOXO4 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。

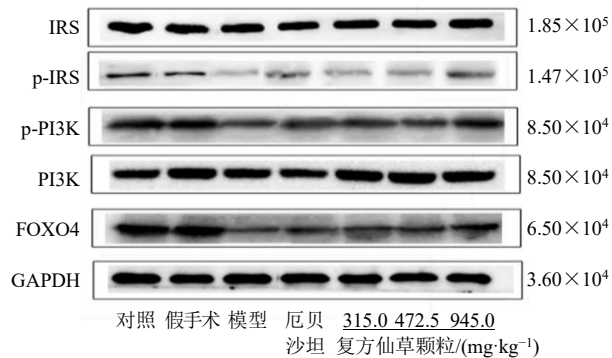


图 5 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of Compound Xiancao Granules on IRS2/PI3K/FOXO4 signaling pathway related protein expressions in renal of DN rats

表 8 复方仙草颗粒对 DN 大鼠肾组织 IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 8 Effect of Compound Xiancao Granules on IRS2/PI3K/FOXO4 signaling pathway related protein expressions in renal of DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量				
		IRS2	p-IRS2	PI3K	p-PI3K	FOXO4
对照	—	1.01±0.03	1.28±0.14	1.08±0.06	1.01±0.05	1.14±0.07
假手术	—	1.03±0.04	1.15±0.06	1.04±0.11	1.05±0.03	1.02±0.05
模型	—	0.95±0.13	0.37±0.05*	0.95±0.20	0.79±0.05*	0.64±0.05*
厄贝沙坦	15.75	0.98±0.1	0.84±0.17 [#]	1.18±0.10	0.92±0.04 [#]	1.11±0.06 [#]
复方仙草颗粒	315.0	1.06±0.03	0.80±0.07 [#]	1.06±0.12	0.81±0.06 [#]	0.90±0.06 [#]
	427.5	0.84±0.11	1.03±0.14 [#]	0.79±0.02	0.88±0.04 [#]	0.95±0.07 [#]
	945.0	0.76±0.19	1.13±0.16 [#]	0.86±0.17	0.95±0.13 [#]	1.12±0.05 [#]

4 讨论

糖尿病是由于胰岛素分泌相对或绝对不足、靶细胞胰岛素敏感性下降或胰岛素自身结构缺陷而导致代谢紊乱的慢性疾病^[15-16]。持续性高血糖、胰岛素抵抗和脂代谢紊乱可导致 DN、糖尿病足和神经病变等一系列并发症。肾足细胞是黏附于肾小球基底膜外侧高度分化的细胞,与肾小球血管内皮细胞、基底膜共同构成肾小球滤过屏障^[17]。EMT 是上皮细胞通过特定程序转化为具有特定表型细胞的生物学过程,是肾间质纤维化和肾功能丧失的主要机制之一^[18]。研究表明,当足细胞出现 EMT 时,可促使足细胞具有运动性,导致足细胞三维结构及表型破坏,进而使其骨架改变^[19],是肾足细胞脱落和凋亡前的一个过程^[17]。本研究发现复方仙草颗粒干预后, DN 大鼠肾组织病理形态改善,足细胞足突融合减少,基底膜厚度相对均一,线粒体未见肿胀,高度特化的足细胞标志物 nephrin、P-cadherin 蛋白表达显著增加,而 EMT 标志蛋白 α -SMA、Desmin、FSP-1 等表达则显著降低。表明复方仙草颗粒能够改善 DN 足细胞损伤,抑制肾足细胞 EMT,改善肾功能。

厄贝沙坦为血管紧张素 II 受体拮抗剂,能够选

择性切断血管紧张素转换酶 I 和受体血管紧张素 II 结合,减少醛固酮分泌从而控制血管收缩,减轻肾脏损害^[20],具有降血压、减少蛋白尿、组织相容性好、脂溶性高等特点,能选择性对出球小动脉进行扩张^[21],从而降低肾小球内高压情况,改善肾小球的高滤过^[22];并且能够明显改善肾足细胞相关标志蛋白表达,保护肾足细胞,改善肾功能^[23-24];对肾组织的炎症因子有抑制作用^[25],能够延缓肾间质的纤维化^[26]。研究已证实,厄贝沙坦能够激活 PI3K/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)^[27-28]、IRS2/PI3K/葡萄糖转运蛋白 (glucose transporter, GLUT)^[29-30] 等信号通路,因此选用厄贝沙坦作为阳性对照药物。

胰岛 β 细胞功能受损引发胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗是引起 2 型糖尿病的重要发病机制^[31]。IRS2 是有丝分裂发生的主要介质^[32],能够调节胰岛素、胰岛素样生长因子 1 等细胞因子; p-IRS2 可以激活 PI3K/Akt 通路^[33-36],从而介导 FOXO4 活性。FOXO 因子可与多种靶基因的启动子结合,并控制细胞内环境稳定的几个关键过程^[3],大量研究证明,FOXO 作为调节下游靶基因以抵消细胞压力的转录因子,调控体内的氧化应激、代谢、免疫以及细胞凋亡等生物过程^[32-33]。研究表明,IRS2 与肾皮质纤维化有关^[37-38],PI3K 能够改善 DN 大鼠肾脏细胞的葡萄糖代谢和水盐代谢紊乱^[38],也可通过 Akt 途径上调 FOXO3、FOXO3a、FOXO4^[39-41]。FOXO4 与糖尿病及其并发症的发生发展起关键性作用,且具有促进细胞增殖^[42]、抗肿瘤细胞转移的作用^[43]。本研究结果表明复方仙草颗粒能够改善 DN 大鼠胰岛素功能,从而分泌胰岛素,与胰岛素受体结合,导致胰岛素磷酸化和 IRS2 酪氨酸位点磷酸化, p-IRS2 可以激活 PI3K 及其下游分子^[33-35],促进葡萄糖转运及糖原合成。酪氨酸磷酸化后的 IRS2 与 PI3K 的调节亚基 p85 结合,进而激活 PI3K。活化的 PI3K 将磷脂酰肌醇一磷酸转化为磷脂酰肌醇二磷酸和磷脂酰肌醇三磷酸,并作为其第二信使激活 Akt^[36,44-45],从而介导 FOXO 家族的活性。

综上所述,复方仙草颗粒能够改善 DN 大鼠足细胞 EMT,减轻足细胞损伤,具有较好的保护肾脏的作用,其作用机制可能与调控 IRS2/PI3K/FOXO4 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Cellesi F, Li M, Rastaldi M P. Podocyte injury and repair

mechanisms [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2015, 24(3): 239-244.

- [2] 陆世龙, 王龙龙, 黄国东. 中医药治疗早期糖尿病肾病的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(5): 1101-1103.
- [3] Link W. Introduction to FOXO biology [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1890: 1-9.
- [4] 周骅, 曹新生, 胡泽兵, 等. FOXOs 转录因子生物学功能的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(1): 185-188.
- [5] Herman-Edelstein M, Thomas M C, Thallas-Bonke V, et al. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor- β : A model for diabetic podocytopathy [J]. *Diabetes*, 2011, 60(6): 1779-1788.
- [6] 黄雅兰, 黄国东, 蔡林坤, 等. 壮药复方仙草颗粒治疗早期糖尿病肾病的临床疗效及对患者内皮功能、血流变学、免疫功能的影响 [J]. 中国全科医学, 2020, 23(24): 3086-3093.
- [7] 李燕珍, 吴强, 芦万华. 复方仙草颗粒治疗 IgA 肾病的临床效果研究 [J]. 人人健康, 2016(23): 58.
- [8] 吕建珍, 淮国丽, 黄国东, 等. 复方仙草颗粒通过线粒体途径抑制肾足细胞凋亡的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(6): 2730-2735.
- [9] 陈少锋, 梁丽清, 王河, 等. 复方仙草颗粒的急性毒性研究 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(7): 17-19.
- [10] 黄国东, 顾敬文, 莫宇凤, 等. 复方仙草颗粒的质量标准研究 [J]. 广西中医药, 2019, 42(5): 67-71.
- [11] 郭丛丛, 焦明文, 张亚芹, 等. 单侧肾切除联合链脲佐菌素诱导糖尿病肾病大鼠建模方法改进与评价 [J]. 动物医学进展, 2019, 40(2): 135-139.
- [12] Mori Y, Ajay A K, Chang J H, et al. KIM-1 mediates fatty acid uptake by renal tubular cells to promote progressive diabetic kidney disease [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(5): 1042-1061.e7.
- [13] Sugano M, Yamato H, Hayashi T, et al. High-fat diet in low-dose-streptozotocin-treated heminephrectomized rats induces all features of human type 2 diabetic nephropathy: A new rat model of diabetic nephropathy [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006, 16(7): 477-484.
- [14] 王康, 李平, 张浩军, 等. 2 型糖尿病肾病中晚期病变大鼠模型的研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(1): 14-17.
- [15] Liu Y F, Huang H, Gao R, et al. Dynamic phenotypes and molecular mechanisms to understand the pathogenesis of diabetic nephropathy in two widely used animal models of type 2 diabetes mellitus [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 172.
- [16] Victor P, Umapathy D, George L, et al. Crosstalk between endoplasmic Reticulum stress and oxidative stress in the progression of diabetic nephropathy [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2021, 26(2): 311-321.
- [17] 查冬青, 高苹, 吴小燕. N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖

- 氨酰-脯氨酸对高糖诱导足细胞损伤的保护作用及机制[J]. 临床肾脏病杂志, 2018, 18(9): 574-578.
- [18] Cruz-Solbes A S, Youker K. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and endothelial to mesenchymal transition (EndMT): Role and implications in kidney fibrosis [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2017, 60: 345-372.
- [19] 赵敬, 赵宗江. 足细胞上皮-间充质转分化的分子机制及中药干预的研究进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(12): 1119-1122.
- [20] 陈娇月, 山秀杰, 刘敏, 等. 骨化三醇联合二甲双胍对腹型肥胖 2 型糖尿病早期肾病的影响 [J]. 河北医学, 2020, 26(4): 602-605.
- [21] 孙冠媛, 于辉田, 宁宁, 等. 不同剂量阿托伐他汀对糖尿病肾病患者免疫及全身微炎症状态的影响 [J]. 实用药物与临床, 2019, 22(7): 693-696.
- [22] 孙霄龙, 张蕾. 厄贝沙坦联合阿托伐他汀治疗早期糖尿病肾病对患者内皮素水平的影响 [J]. 山西医药杂志, 2022, 51(6): 661-664.
- [23] 应帅兵, 张伊娜, 邱华锋, 等. 益气养阴活血方对糖尿病肾病大鼠肾功能及足细胞的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(4): 354-359.
- [24] 王颖超, 王婷, 于眉, 等. 糖肾平对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及对足细胞标志蛋白 Podocalyxin 影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(4): 39-43.
- [25] 王岚, 朱国双, 王小琴. 基于 Klotho 调控的 TGF- β 1/Egr1 信号通路探讨肾元颗粒对 db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏保护作用 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(8): 5033-5036.
- [26] 胡秀, 李海燕, 宋斌, 等. 阿托伐他汀对糖尿病肾病患者肾纤维化程度、氧化应激及相关因子水平的影响 [J]. 海南医学院学报, 2019, 25(9): 662-665.
- [27] 高航, 田明慧. 厄贝沙坦对大鼠心肌缺血再灌注 PI3K/Akt 通路与细胞凋亡的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(30): 3746-3749.
- [28] Mohamed E A, Ahmed H I, Zaky H S. Protective effect of irbesartan against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats: Implication of AMPK, PI3K/Akt, and mTOR signaling pathways [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(12): 1209-1217.
- [29] 刘莉, 罗鹏, 周田田, 等. 厄贝沙坦对高血压合并 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗 IRS-1/PI3K/GLUT4 信号通路的影响 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2021, 39(5): 563-568.
- [30] Xuan C, Xi Y M, Zhang Y D, *et al.* Yiqi Jiedu Huayu Decoction alleviates renal injury in rats with diabetic nephropathy by promoting autophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 624404.
- [31] 朱菲, 吴梅, 孔向军, 等. 金线莲干预 2 型糖尿病的“关键成分-潜在靶标-核心通路”网络挖掘及实验验证 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3720-3729.
- [32] 杨洁, 王宝西. IRS-2 siRNA 对肾母细胞瘤 G401 细胞增殖的影响及其分子机制 [J]. 山西医科大学学报, 2016, 47(9): 813-817.
- [33] Zhang C T, Huang C C, Yang P P, *et al.* Eldecalcitol induces apoptosis and autophagy in human osteosarcoma MG-63 cells by accumulating ROS to suppress the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2021, 78: 109841.
- [34] Yang L, Lv Q, Liu J, *et al.* miR-431 regulates granulosa cell function through the IRS2/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Reprod Dev*, 2020, 66(3): 231-239.
- [35] Mao N H, Gao D, Hu W H, *et al.* Oncogenic ERG represses PI3K signaling through downregulation of IRS2 [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(7): 1428-1437.
- [36] 姚风云, 张蓉, 左铮云, 等. 加味温胆汤调控 INSR/PI3K/Akt/GLUT4 信号通路抗雄性幼鼠营养性肥胖机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(9): 1-4.
- [37] Lee H J, Feliers D, Barnes J L, *et al.* Hydrogen sulfide ameliorates aging-associated changes in the kidney [J]. *GeroScience*, 2018, 40(2): 163-176.
- [38] Gao L Y, Yuan P P, Zhang Q, *et al.* Taxifolin improves disorders of glucose metabolism and water-salt metabolism in kidney via PI3K/AKT signaling pathway in metabolic syndrome rats [J]. *Life Sci*, 2020, 263: 118713.
- [39] Lin F M. Molecular regulation and function of FoxO3 in chronic kidney disease [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2020, 29(4): 439-445.
- [40] Zhao C M, Gu Y B, Chen L Y, *et al.* Upregulation of FoxO3a expression through PI3K/Akt pathway attenuates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(Pt A): 107027.
- [41] Chen C, Tan H, Bi J, *et al.* LncRNA-SULT1C2A regulates Foxo4 in congenital scoliosis by targeting rno-miR-466c-5p through PI3K-ATK signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(7): 4582-4591.
- [42] Lin S J, Chiang M C, Shih H Y, *et al.* Spatiotemporal expression of foxo4, foxo6a, and foxo6b in the developing brain and retina are transcriptionally regulated by PI3K signaling in zebrafish [J]. *Dev Genes Evol*, 2017, 227(3): 219-230.
- [43] Su B, Gao L Q, Baranowski C, *et al.* A genome-wide RNAi screen identifies FOXO4 as a metastasis-suppressor through counteracting PI3K/AKT signal pathway in prostate cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101411.
- [44] 周琦, 朱向东, 仝小林, 等. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛细胞 IRS-2/PI3K-Akt 通路的影响 [J]. 中医杂志, 2018, 59(11): 973-977.
- [45] 陆梓华, 吕雄, 曹明满, 等. 舒正颗粒对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢异常 PI3K/AKT 信号通路的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(1): 128-134.

[责任编辑 李亚楠]