

• 药理与临床 •

黄芪甲苷通过调控 TPL2-CTGF 信号通路抑制小鼠肾缺血再灌注损伤诱导的肾纤维化

徐静鸽¹, 武佳慧¹, 李星怡¹, 张之钰¹, 董媛睿¹, 王 丹¹, 吴昱铮¹, 王 涛^{2*}, 陈 倩^{1,2*}

1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 301617

2. 天津中医药大学 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 301617

摘要: 目的 探讨黄芪甲苷 IV 通过调控肿瘤进展位点 2 (tumor progression locus 2, TPL2)-结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 信号通路减轻肾缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 后的纤维化损伤, 并阐明其对急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 向慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 进展的干预作用。方法 采用单侧肾动脉夹闭法建立小鼠 IRI 模型, 设置假手术组、模型组和黄芪甲苷 IV 低、高剂量 (40、80 mg/kg) 组。分别于术后 1、28 d 取材, 考察黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注急性期和肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠的影响。通过检测血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 评估肾功能; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色、过碘酸雪夫 (periodic acid-schiff, PAS) 染色、Masson 染色、天狼星红 (Sirius red) 染色观察肾脏组织病理损伤及纤维化程度。建立转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导的人肾皮质近曲小管上皮细胞 (human kidney-2, HK-2) 体外损伤模型, 采用 TPL2 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 转染 HK-2 细胞进行分子机制研究; 采用 Western blotting 检测小鼠肾脏和 HK-2 细胞纤维化标志物 [α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白 (collagen I, COL1)、TGF- β 1] 及 TPL2、CTGF 和下游炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的蛋白表达。结果 在 IRI 后的肾脏急性损伤期, 黄芪甲苷 IV 显著降低 Scr 和 BUN 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 缓解肾小管扩张及刷状缘脱落。在肾脏纤维化进展期, 黄芪甲苷 IV 持续抑制 Scr 和 BUN 的升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 同时减少肾间质胶原纤维沉积 ($P < 0.001$)。Western blotting 结果显示, 黄芪甲苷 IV 呈剂量相关性地下调 TPL2 蛋白表达及其下游效应分子 CTGF 表达水平 ($P < 0.001$), 并显著抑制肾间质纤维化相关蛋白的表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。体外实验结果显示, 加入黄芪甲苷 IV 后, TGF- β 1 诱导的 TPL2、CTGF、 α -SMA 以及 TNF- α 高表达水平均被显著抑制 ($P < 0.01$ 、 0.001); 转染 si-TPL2, 继续给予黄芪甲苷 IV 处理后 TPL2、CTGF、 α -SMA、TNF- α 表达水平较黄芪甲苷 IV 单独处理组无显著差异。结论 黄芪甲苷 IV 通过抑制 TPL2-CTGF 通路, 减轻 IRI 后肾脏炎症反应与纤维化进程, 阻断 AKI 向 CKD 转化, 为临床防治缺血性肾损伤提供潜在治疗策略。

关键词: 黄芪甲苷; TPL2; CTGF; 肾缺血再灌注; 肾纤维化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)14-5049-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.011

Astragaloside IV inhibits renal fibrosis induced by renal ischemia-reperfusion injury in mice through modulation of TPL2-CTGF signaling pathway

XU Jingge¹, WU Jiahui¹, LI Xingyi¹, ZHANG Zhiyu¹, DONG Yuanrui¹, WANG Dan¹, WU Yuzheng¹, WANG Tao², CHEN Qian^{1,2}

1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin Key Laboratory of TCM Chemistry and Analysis, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

收稿日期: 2025-04-07

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82304809)

作者简介: 徐静鸽, 女, 博士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: x15753349541@163.com

*通信作者: 王 涛, 男, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: wangtao@tjutcm.edu.cn

陈 倩, 女, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药内分泌及代谢药理研究。E-mail: qianchen89@tjutcm.edu.cn

Abstract: Objective To investigate astragaloside IV (AS-IV) alleviates renal fibrosis following ischemia-reperfusion injury (IRI) by modulating tumor progression locus 2 (TPL2)-connective tissue growth factor (CTGF) signaling pathway and elucidate its intervention in preventing the progression from acute kidney injury (AKI) to chronic kidney disease (CKD). **Methods** A IRI mice model was established via unilateral renal artery clamping. Sham group, model group, AS-IV low- and high-dose (40, 80 mg/kg) groups were set up. Samples were collected on postoperative days 1 and 28 to investigate the effect of AS-IV on acute renal ischemia-reperfusion injury and fibrosis in mice after renal ischemia-reperfusion injury. Renal function was assessed by measuring serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN). Renal histopathological injury and fibrosis were evaluated using hematoxylin-eosin (HE) staining, periodic acid-schiff (PAS) staining, Masson staining and Sirius red staining. An *in vitro* injury model was established using human kidney-2 (HK-2) cells induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), and molecular mechanisms were explored by transfecting HK-2 cells with small interfering RNA (siRNA) targeting TPL2. Western blotting was used to detect the protein expression levels of fibrosis markers including α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen I (COL1), TGF- β 1, as well as TPL2, CTGF, and the downstream inflammatory factor tumor necrosis factor- α (TNF- α) in kidney of mice and HK-2 cells. **Results** In the acute phase of renal injury post-IRI, AS-IV significantly reduced Scr and BUN levels ($P < 0.001$), alleviated tubular dilation and brush border loss. During the fibrotic progression phase, AS-IV persistently suppressed the elevation of Scr and BUN ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while reduced collagen fiber deposition in the renal interstitium ($P < 0.001$). Western blotting results showed that AS-IV dose-dependently down-regulated the protein expressions of TPL2 and its downstream effector CTGF ($P < 0.001$), and significantly inhibited the expression levels of renal interstitial fibrosis related proteins ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). *In vitro* experiments results showed that AS-IV markedly inhibited the TGF- β 1-induced overexpressions of TPL2, CTGF, α -SMA and TNF- α ($P < 0.01, 0.001$). After transfection with si-TPL2 and continued treatment with AS-IV, there was no significant difference in the expression levels of TPL2, CTGF, α -SMA and TNF- α compared to AS-IV treated group alone. **Conclusion** AS-IV attenuates post-IRI renal inflammation and fibrosis by inhibiting the TPL2-CTGF pathway, thereby preventing AKI-to-CKD progression, which provide a potential therapeutic strategy for the clinical management of ischemic kidney injury.

Key words: astragaloside IV; TPL2; CTGF; renal ischemia-reperfusion; renal fibrosis

肾缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 是急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 的主要诱因之一^[1-2]。小鼠肾缺血再灌注后 24 h 为急性期, 以快速发生的炎症反应为主要特征。若急性损伤未能完全修复, 28 d 左右肾脏完全进入纤维化阶段, 表现为肾小管萎缩、间质胶原纤维沉积^[3]。研究发现, 约 29% 的 AKI 患者发展为慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD)^[4]。肾纤维化的核心特征包括细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积、肌成纤维细胞活化及肾小管上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 最终导致肾功能的不可逆丧失^[5-6]。目前, 在临床上透析和非特异性药是主要的干预选择, 但这些都不能改变肾纤维化或阻止死亡率的持续增长^[7-8]。与此同时, 正在进行抗肾纤维化试验的药物在减缓疾病进展方面的疗效有限, 并带来相当大的不良反应^[9]。如抗纤维化“明星药物”吡非尼酮在 II 期临床试验中显示出对肾功能的短暂益处, 但在 4 个月内, 14% 的参与者因频繁的不良事件而停药, 包括皮疹 (10%) 和胃肠道疾病 (47%)^[10]。因此, 探索新型肾脏抗纤维化药物及干预策略至关重要。

近年来, 天然药物活性成分因其多靶点调控特性成为抗纤维化研究的热点。黄芪甲苷 IV 是从黄芪 *Astragali Radix* 中提取的主要活性成分之一, 为黄酮苷类化合物。许多动物、细胞模型研究表明黄芪甲苷 IV 通过抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 或 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 介导的炎症、抑制转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 激活介导的纤维化、抑制蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) -活性转录因子 4 (active transcription factor 4, ATF4) -C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 信号通路改善足细胞凋亡、激活 p53 上调的凋亡调节因子、诱导核因子 E2 相关因子 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 表达改善氧化应激等方面缓解 AKI^[11-17], 表明黄芪甲苷 IV 在急慢性肾损伤中均发挥较好的药效。然而, 黄芪甲苷 IV 在肾脏 IRI 后纤维化中的作用机制, 尤其是对关键信号轴的调控尚未完全阐明, 这也限制了其临床转化潜力。

纤维化进程受多条信号通路协同调控,其中肿瘤进展位点 2 (tumor progression locus 2, TPL2) 作为一种丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAP3K), 通过激活下游细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK) 通路参与炎症及纤维化反应^[18]。已有的研究表明黄芪甲苷 IV 可以通过抑制 Gpr97-TPL2 信号通路来缓解同型半胱氨酸加重的脓毒性急性肾损伤^[19]。结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 作为转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 的下游效应分子, 促进 EMT 和 ECM 合成。临床数据显示, 肾纤维化患者组织中 CTGF 水平显著升高, 提示其可以作为治疗靶点的潜在价值^[20-21]。然而, TPL2-CTGF 信号轴在肾脏 IRI 后纤维化中的具体作用及其能否被黄芪甲苷 IV 调控仍有待深入探究。本研究结合体内小鼠肾脏 IRI 模型与体外细胞模型, 系统评估黄芪甲苷 IV 对肾纤维化的干预效果并聚焦于 TPL2-CTGF 轴的调控机制。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 7 周龄, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 购自北京维通利华实验动物有限公司, 合格证号 SCXK (津) 2021-0006。小鼠饲养于天津中医药大学动物中心屏障饲养间, 温度 25 $^{\circ}$ C, 相对湿度 45%~65%。自由进食饮水。所有实验均获得天津中医药大学学术委员会批准, 动物实验伦理审查批准号 TCM-LAEC2024164x1435。

人肾皮质近曲小管上皮细胞 (human kidney-2, HK-2, 批号 CL-0109) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

黄芪甲苷 IV (质量分数为 98%, 批号 88687-43-4) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 试剂盒 (批号 20241126)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 试剂盒 (批号 20241104) 购自南京建成生物科技股份有限公司; α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白 (collagen 1, COL1)、TGF- β 1、CTGF、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 β -actin 抗体 (批号分别为 19245、72026、49728、3418、11948、4970, 稀释倍数分别为 1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、

1:10 000) 购自美国 CST 公司; TPL2 抗体 (批号 sc-373677, 稀释倍数 1:800) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; HRP 标记的山羊抗兔多克隆抗体 (批号 20210315, 稀释倍数 1:10 000)、HRP 标记的山羊抗鼠多克隆抗体 (批号 20230515, 稀释倍数 1:10 000)、聚山梨酯 20 (批号 1440527601)、RIPA 裂解液 (批号 240007013)、蛋白上样缓冲液 (批号 240011007) 购自北京索莱宝科技有限公司; PVDF 膜 (批号 0000331789)、ECL 发光液 (批号 2120b02) 购自美国 Merck Millipore 公司; Pierce[®] BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 23227) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 异氟烷 (批号 R510-22-10) 购自深圳市瑞沃德生物科技有限公司; DMEM 高糖培养基 (批号 2443407)、胎牛血清 (批号 2094466RP)、胰蛋白酶 (批号 2868000)、OPTI-MEM (批号 A4124801) 购自美国 Gibco 公司; siRNA (si-TPL2-716 正向引物序列 5'-GCUGACGUACAGGAGCAUUT-3', 反向引物序列 5'-AAUGCUCUGUACGUCAGCTT-3', 批号 A10001) 购自苏州吉玛基因股份有限公司; 重组 TGF- β 1 蛋白 (批号 HY-P7118) 购自美国 MedChemExpress 公司。

1.3 仪器

ME204 型万分之一天平 (德国 Sartorius 公司); MS105/A 型十万分之一天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q 超纯水制备仪 (美国 Millipore 公司); SORVALLST16R 型低温高速离心机、MuATiskanMK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 221BR 46516 型垂直板电泳槽、电泳仪、转印槽、ChemiDoc^{MP} System 全能型成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); BX43 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

2.1.1 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注急性期小鼠的影响 雄性 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周, 随机分为假手术组、模型组和黄芪甲苷 IV 低、高剂量组 (40、80 mg/kg)^[19], 每组 10 只。假手术组仅接受双侧肾脏暴露后原位复位; 模型组和给药组实施单侧肾缺血 30 min (无创动脉夹闭左肾蒂) 联合对侧肾切除术; 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg)。于术后 1 d, 取血、肾脏、脾脏与肝脏。

2.1.2 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤

小鼠的影响 雄性 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周, 随机分为假手术组、模型组和黄芪甲苷 IV 低、高剂量 (40、80 mg/kg) 组, 每组 10 只。按“2.1.1”项下方法进行造模和给药, 于术后 14 d, 取血、肾脏、脾脏与肝脏。

2.2 肾功能相关指标的检测

采集小鼠禁食 (不禁水) 12 h 后的血样, 室温静置 2 h 后, 4 ℃、3 500 r/min 离心 20 min, 分离血清, 置于-80 ℃保存。按照试剂盒说明书检测 Scr、BUN 水平。

2.3 脏器系数的测定

取血后, 麻醉小鼠, 剥离肾脏、脾脏、肝脏组织, 用生理盐水冲洗表面直至无残留血液, 吸水纸去除水分, 剔除组织表面的脂肪和结缔组织, 用电子天平称量各组织的质量, 计算脏器系数。

脏器系数=脏器质量/体质量

2.4 肾脏组织病理学观察

肾脏组织沿冠状面纵剖为 2 等份, 一部分置于 4%多聚甲醛 (pH 7.4) 中固定 24 h, 梯度脱水, 石蜡包埋备用; 另一部分迅速投入液氮速冻, 转移至-80 ℃超低温冰箱保存, 用于 Western blotting 检测。

2.4.1 苏木素-伊红 (HE) 染色 取石蜡包埋固定后的肾脏, 将包埋好的组织切成 4~5 μm 切片, 将脱蜡的组织切片依次浸入苏木素、伊红溶液中染色, 之后进行洗脱、脱水、封片。切片脱脂和水化, 浸入过碘酸溶液中于室温氧化 20 min, 蒸馏水漂洗, 浸入染色液中染色 60 min, 漂洗、脱水后, 将切片放入透明介质中透明化, 封片。于光学显微镜下观察并拍照。

2.4.2 PAS 染色 石蜡切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇水化后, 蒸馏水冲洗; 0.5%过碘酸溶液氧化 10 min; 蒸馏水充分冲洗后, 避光条件下与 Schiff 试剂反应 15 min, 醛基与无色品红结合形成紫红色沉淀; 0.5%亚硫酸氢钠溶液分色 2 min, 去除非特异性染色; 苏木素复染细胞核, 盐酸乙醇分化后流水返蓝; 常规脱水透明, 中性树胶封片。于光学显微镜下观察并拍照。

2.4.3 Masson 染色 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后, 蒸馏水冲洗; Weigert 铁苏木素染液染色 10 min, 充分水洗返蓝, 使细胞核呈深蓝色; 酸性红染液染色 5 min, 肌纤维及胞质呈红色; 1%磷钨酸溶液分化 2 min, 去除非特异性染色; 苯胺蓝或亮绿染液染色 5 min, 使胶原纤维呈蓝色; 1%冰醋

酸短暂漂洗, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 中性树胶封片。于光学显微镜下观察并拍照。

2.4.4 天狼星红染色 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化, 蒸馏水冲洗; 0.1%天狼星红染液染色 60 min, 室温避光进行; 0.01 mol/L 盐酸溶液快速分化, 去除非特异性染色; 流水冲洗 5 min 终止反应; 苏木素复染细胞核, 盐酸乙醇分化后流水返蓝; 常规脱水透明, 中性树胶封片。于光学显微镜下观察并拍照。

2.5 细胞培养及给药

2.5.1 细胞培养 HK-2 细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基, 于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 取 4~10 代细胞进行实验。

2.5.2 si-TPL2 转染混合物的配制 将 GP-transfect-Mate 转染试剂与 OPTI-MEM 按照 1:50 的比例混合均匀, 室温静置 5 min; OPTI-MEM 中加入 si-TPL2-Rat-716, 混匀, 室温静置 5 min; 将转染试剂混合物滴至 RNA oligo 混合物中, 混合均匀, 室温静置 20 min。

2.5.3 细胞分组及给药 待细胞融合至 80%左右时, 胰酶消化, 加入培养基终止消化, 4 ℃、1 000 r/min 离心 4 min, 以 5×10⁶ 个/mL 接种于 6 孔板中。设置 NC 组 (转染阴性对照 siRNA)、TGF-β1 (10 ng/mL) 组、TGF-β1 (10 ng/mL) + si-TPL2 组、TGF-β1 (10 ng/mL) + 黄芪甲苷 IV (80 μmol/L) 组、TGF-β1 (10 ng/mL) + si-TPL2 + 黄芪甲苷 IV (80 μmol/L) 组。加入预热的培养液, 将 400 μL 转染混合物加入孔中, 最终体系为 2 mL, 轻轻晃动 6 孔板使之分布均匀, 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 6 h。NC 组更换为基础培养基, TGF-β1 组更换为含 TGF-β1 的培养基, 给药组更换为含 TGF-β1 和黄芪甲苷 IV 的培养基, 孵育 24 h。

2.6 Western blotting 检测肾脏组织和 HK-2 细胞 COL1、α-SMA、TGF-β1、TNF-α、TPL2、CTGF 蛋白表达

取“2.4”项下肾脏组织 20 mg, 加入 200 μL 含 1%蛋白酶抑制剂及 1%磷酸酶抑制剂的组织裂解液, 用组织捣碎机研磨成肾脏匀浆液, 低温裂解 60 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液。采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液, 100 ℃金属浴加热 5 min 使蛋白变性, 室温放凉后置于-20 ℃保存。

取“2.5.3”项下细胞，弃去培养液，PBS 洗涤 2 遍，加 RIPA 裂解液，细胞刮刀剥离细胞，低温裂解 60 min，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，吸取上清。采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度，加入蛋白上样缓冲液，100 ℃金属浴加热 5 min 使蛋白变性，室温放凉后置于-20 ℃保存。

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，封闭后加入相应一抗，4 ℃孵育过夜；PBST 洗涤 3 次，每次 10 min，加入二抗，室温孵育 1 h，PBST 洗涤 3 次，每次 10 min。PVDF 膜均匀浸泡 ECL 化学发光液，使用 ChemiDoc™ MP 成像系统成像，采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.7 统计学分析

实验结果采用 IBM SPSS Statistics Version 26.0 统计学软件分析，采用 Prism GraphPad 8.0 软件进行数据统计。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，所有数据先进行正态分布及方差齐性分析后，样本间比较采用单

因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注急性期小鼠脏器系数的影响

如图 1 所示，与假手术组比较，模型组小鼠肾脏系数显著增加 ($P < 0.001$)；与模型组比较，黄芪甲苷 IV 各剂量组小鼠肾脏系数明显降低 ($P < 0.001$)，表明黄芪甲苷 IV 对 IRI 诱导的肾脏损伤具有保护作用。各组脾脏系数和肝脏系数变化均无统计学差异。

3.2 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注急性期小鼠 Scr、BUN 水平的影响

如图 2 所示，与假手术组比较，模型组小鼠 Scr 和 BUN 水平均显著升高 ($P < 0.001$)，表明小鼠出现肾功能损伤；经黄芪甲苷 IV 干预后，小鼠 Scr 和 BUN 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)，且呈剂量相关性。表明黄芪甲苷 IV 能够有效改善 IRI 诱导的肾功能障碍。

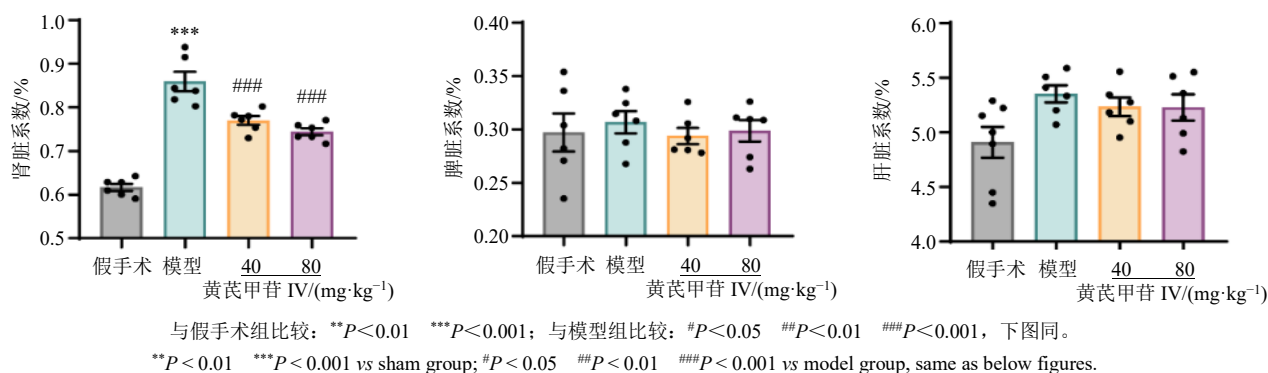


图 1 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注急性期小鼠肾脏指数、脾脏系数和肝脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of astragaloside IV on kidney coefficient, spleen coefficient and liver coefficient of mice in acute phase of renal ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

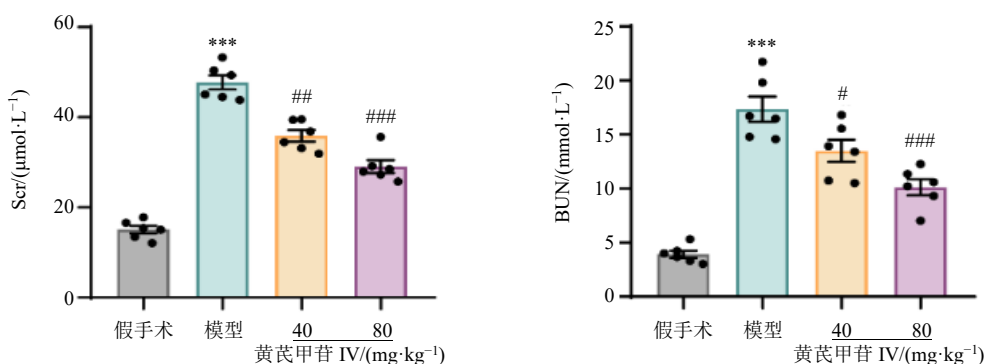


图 2 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注急性期小鼠 Scr、BUN 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Effect of astragaloside IV on levels of Scr and BUN of mice in acute phase of renal ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

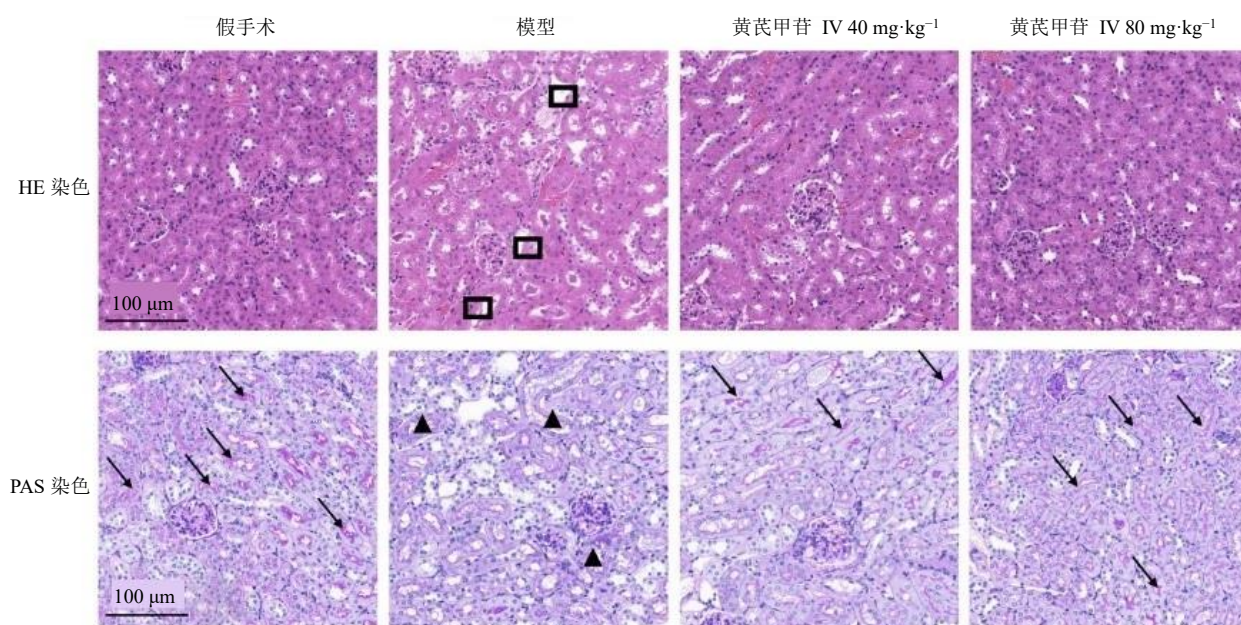
3.3 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注急性期小鼠肾脏病理变化的影响

为了系统评估肾缺血再灌注急性期小鼠肾脏的病理学改变及黄芪甲苷 IV 的干预效果,采用 HE 染色和 PAS 染色这 2 种经典的肾脏组织学检测方法,对各组小鼠肾小管病理变化进行比较分析。如图 3 所示,组织学观察显示,与假手术组相比,模型组小鼠肾脏呈现典型的急性肾小管损伤特征,表现为显著的肾小管上皮细胞刷状缘脱落、管腔扩张等病理变化。与模型组相比,黄芪甲苷 IV 低、高剂量组小鼠肾脏组织学表现明显改善,具体表现为肾小管上皮细胞刷状缘结构基本恢复、管腔形态趋于

正常。以上结果表明,黄芪甲苷 IV 能够有效减轻 IRI 诱导的肾小管上皮细胞损伤,促进肾脏组织结构的修复,且呈剂量相关性。

3.4 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠脏器系数的影响

如图 4 所示,与假手术组比较,模型组小鼠肾脏系数和脾脏系数显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001);与模型组比较,黄芪甲苷 IV 各剂量组小鼠肾脏系数显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),且呈剂量相关性,脾脏系数呈降低趋势,提示黄芪甲苷 IV 对 IRI 诱导的肾脏肿大具有改善作用。各组肝脏系数变化均无统计学差异。



长方形表示管腔扩张;箭头表示刷状缘;三角形表示腔内碎片。

Rectangle represents dilation of lumen; Arrows indicate brush like edges; Triangles represent fragments inside cavity.

图 3 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注急性期小鼠肾脏组织病理变化的影响 ($\times 200$)

Fig. 3 Effect of astragaloside IV on pathological changes in kidney tissue of mice in acute phase of renal ischemia-reperfusion ($\times 200$)

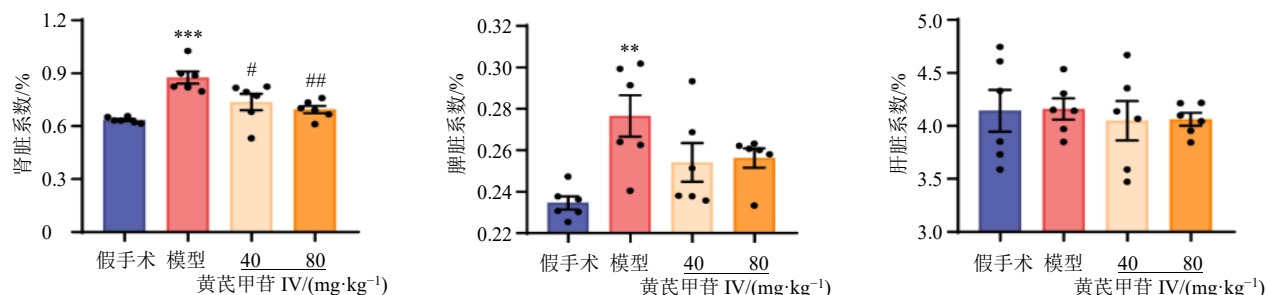


图 4 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠肾脏系数、脾脏系数和肝脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Effect of astragaloside IV on kidney coefficient, spleen coefficient and liver coefficient of mice with fibrotic injury after renal ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.5 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠 Scr、BUN 水平的影响

如图 5 所示,与假手术组比较,模型组小鼠 Scr 和 BUN 水平显著升高 ($P<0.001$),表明小鼠存在持续性肾功能损伤;经黄芪甲苷 IV 干预 28 d 后,小鼠 Scr 和 BUN 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),表明黄芪甲苷 IV 不仅能有效缓解 IRI 后的急性肾功能损伤,也能促进急性肾损伤后的肾功能恢复,且黄芪甲苷 IV 高剂量组显示出更优的长期肾脏保护作用。

3.6 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠肾脏病理变化的影响

如图 6 所示,与假手术组相比,模型组小鼠肾

组织表现为肾小管管腔扩张、刷状缘广泛脱落以及管型形成;与模型组比较,黄芪甲苷 IV 各剂量组均显示出不同程度的肾脏病理改善,主要表现为肾小管上皮细胞刷状缘结构重建、管型形成显著减少。提示黄芪甲苷 IV 可以有效减轻 IRI 诱导的肾脏组织结构损伤,并促进肾小管上皮细胞的修复与再生,且呈一定的剂量相关性。

3.7 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠肾脏胶原沉积的影响

通过 Masson 染色(胶原纤维呈蓝色)和天狼猩红染色(胶原纤维呈猩红色)评估各组小鼠肾脏纤维化程度。如图 7 所示,与假手术组相比,模型组小鼠肾脏呈现显著的纤维化病理改变,表现为肾

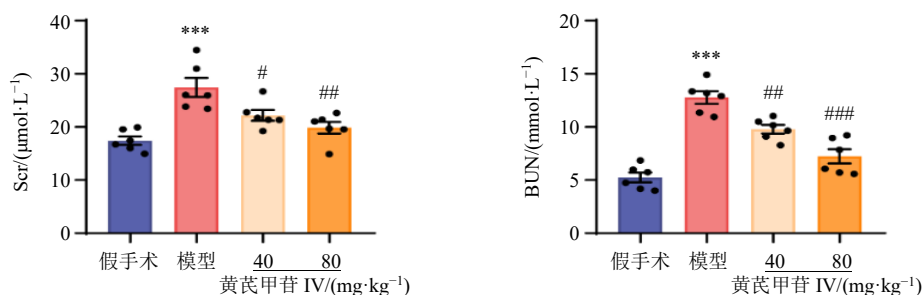
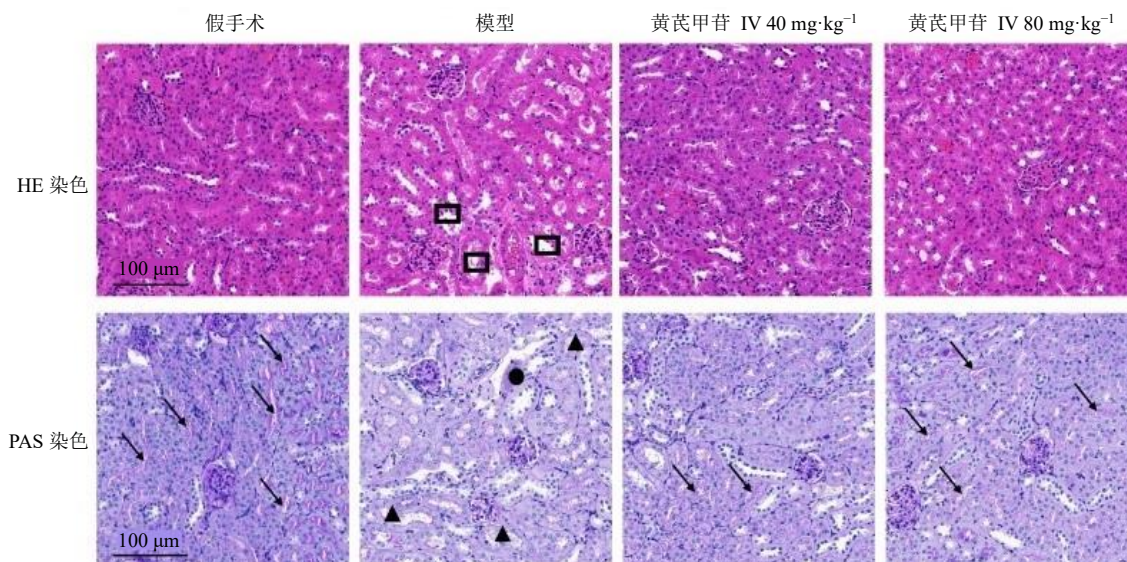


图 5 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠 Scr、BUN 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of astragaloside IV on levels of Scr and BUN of mice with fibrotic injury after renal ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



长方形表示管腔扩张;箭头表示刷状缘;三角形表示腔内碎片;圆形表示管型形成。

Rectangle represents dilation of lumen; Arrows indicate brush like edges; Triangles represent fragments inside cavity; Circles represent formation of a tube shape.

图 6 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠肾脏组织病理变化的影响 ($\times 200$)

Fig. 6 Effect of astragaloside IV on pathological changes in kidney tissue of mice with fibrotic injury after renal ischemia-reperfusion ($\times 200$)

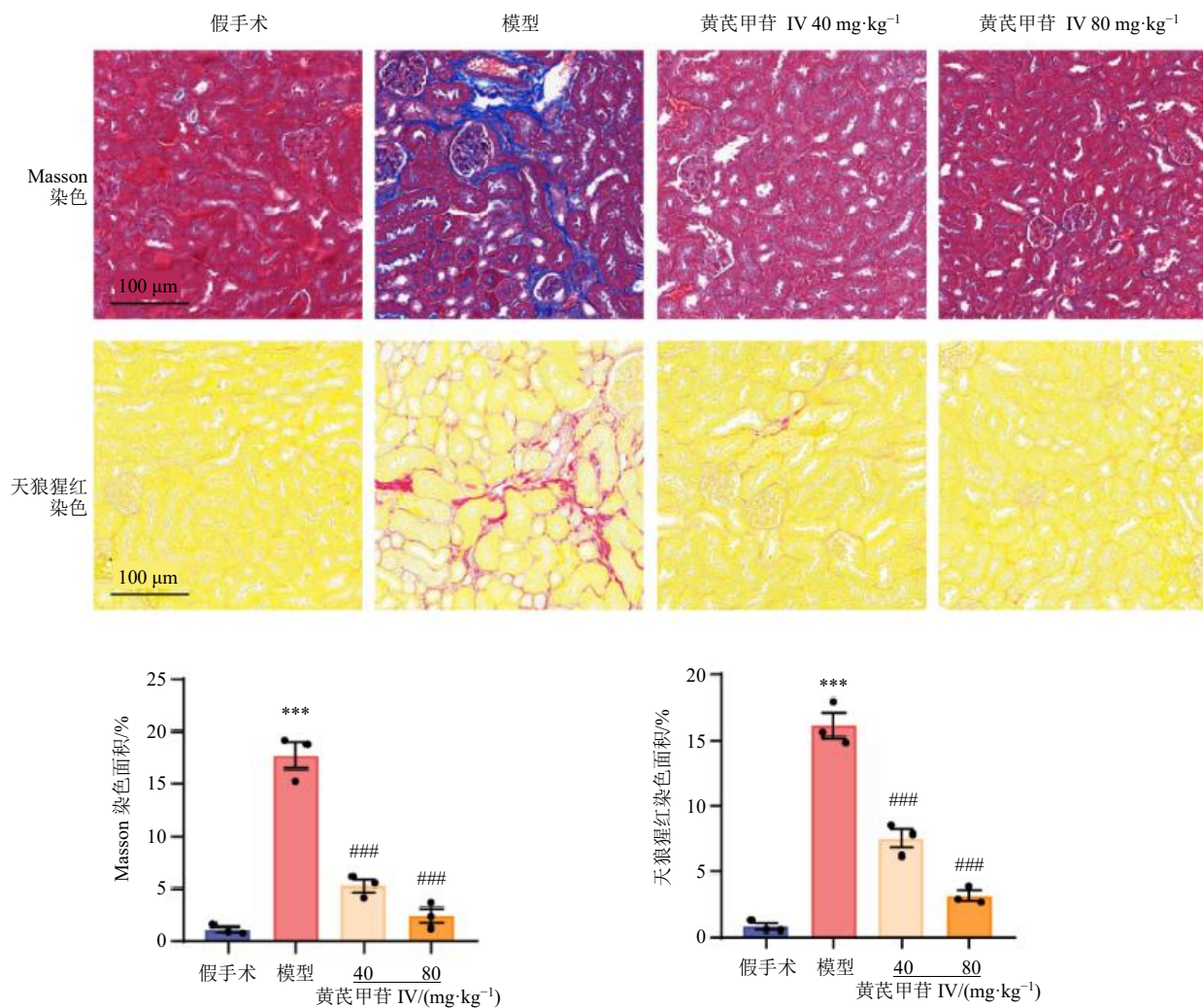


图 7 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠肾脏胶原沉积的影响 (×200)

Fig. 7 Effect of astragaloside IV on collagen deposition in kidney tissue of mice with fibrosis injury after renal ischemia-reperfusion (× 200)

间质胶原沉积显著增多 ($P < 0.001$), 提示 IRI 促进 AKI 向 CKD 进展。经黄芪甲苷 IV 干预后, 小鼠肾间质纤维化程度均较模型组显著减轻, 表现为胶原纤维沉积显著减少 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性。表明黄芪甲苷 IV 有效抑制 IRI 诱导的肾脏纤维化进程, 其机制可能与减少 ECM 沉积或调控纤维化相关信号通路有关。

3.8 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠肾脏纤维化相关蛋白表达的影响

采用 Western blotting 检测各组小鼠肾脏组织中纤维化关键蛋白 COL1、 α -SMA 以及 TGF- β 1 表达水平, 如图 8 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肾脏 COL1、 α -SMA 和 TGF- β 1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 黄芪甲苷 IV 各

剂量组小鼠肾脏 COL1、 α -SMA 和 TGF- β 1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且呈剂量相关性。表明黄芪甲苷 IV 可有效抑制肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠肾间质纤维化相关蛋白的表达水平, 且 80 mg/kg 黄芪甲苷 IV 抑制作用更为突出。

3.9 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠肾脏 TPL2、CTGF 蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肾脏 TPL2、CTGF 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 黄芪甲苷 IV 各剂量组 TPL2、CTGF 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。表明黄芪甲苷 IV 可能通过调控 TPL2/CTGF 信号通路, 影响肾脏纤维化进程。

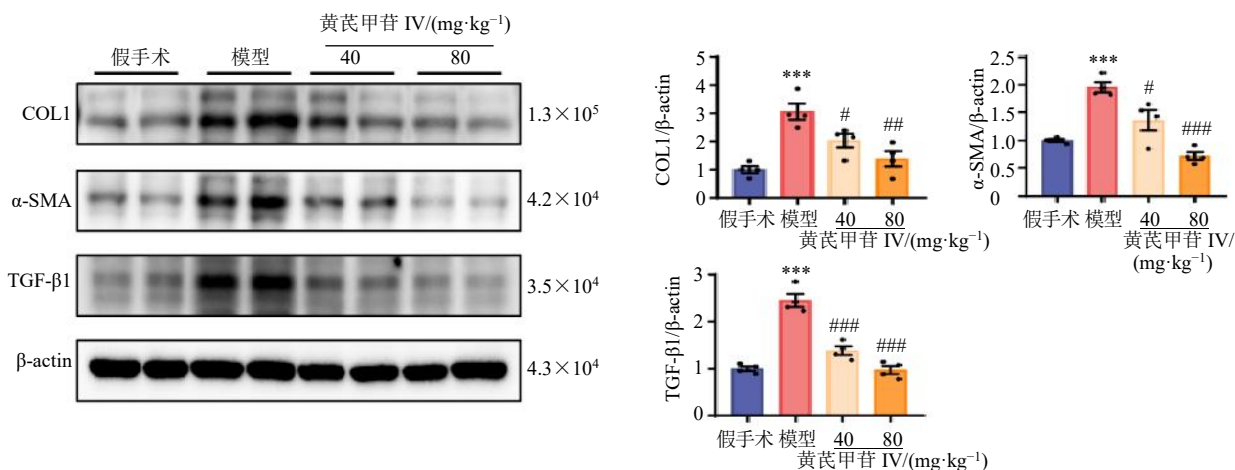


图 8 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠肾脏纤维化相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 8 Effect of astragaloside IV on expressions of fibrosis-related proteins in kidney tissue of mice with fibrosis injury after renal ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

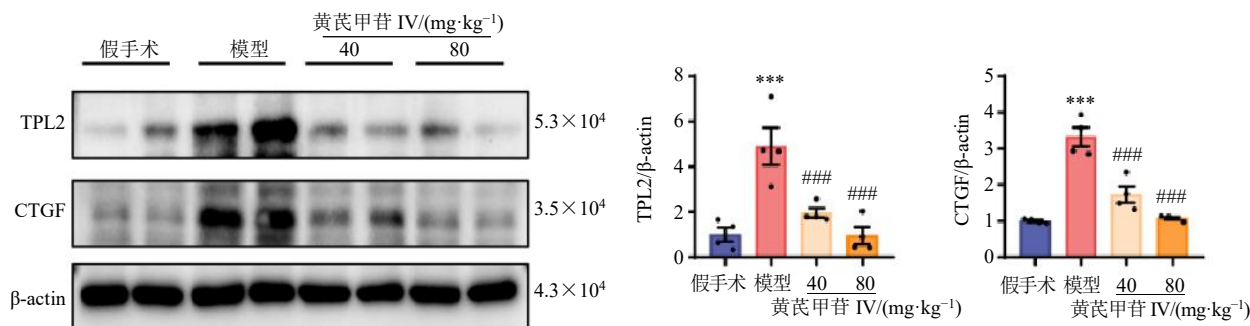


图 9 黄芪甲苷 IV 对肾缺血再灌注后纤维化损伤小鼠肾脏 TPL2、CTGF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 9 Effect of astragaloside IV on expressions of TPL2 and CTGF proteins in kidney tissue of mice with fibrosis injury after renal ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.10 si-TPL2 对 HK-2 细胞中 CTGF、 α -SMA、TNF- α 表达的调控作用

如图 10 所示,与 NC 组比较,TGF- β 1 组 TPL2、CTGF、 α -SMA、TNF- α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001);与 TGF- β 1 组比较,给予黄芪甲苷 IV 干预或转染 si-TPL2 后,TPL2、CTGF、 α -SMA、TNF- α 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001);与单独给予黄芪甲苷 IV 相比,转染 si-TPL2 后给予黄芪甲苷 IV 干预,TPL2、CTGF、 α -SMA、TNF- α 蛋白表达水平无显著差异。表明黄芪甲苷 IV 对 HK-2 细胞中 CTGF、 α -SMA、TNF- α 表达的调控作用依赖于 TPL2,即黄芪甲苷 IV 通过 TPL2 发挥药效,进而影响细胞纤维化及炎症相关因子的表达水平。

4 讨论

黄芪甲苷 IV 作为黄芪的主要活性成分,在肾

纤维化防治中的作用已被广泛关注,现有研究证实其可通过调控 TGF- β 1/Smad、NF- κ B、腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 等多条信号通路发挥抗纤维化效应,涉及抑制肾间质成纤维细胞活化、减少 ECM 沉积、减轻氧化应激与炎症反应等多个病理环节。现有靶点研究在小鼠缺血再灌注后肾纤维化防治中存在一定局限性,针对经典纤维化通路如 TGF- β 1/Smad 的研究,虽能抑制肾间质成纤维细胞活化及 ECM 沉积,但长期抑制该通路可能影响正常细胞的生长和修复,且单一通路调控难以完全阻断复杂的纤维化进程,易出现代偿性激活其他促纤维化途径的问题。聚焦能量代谢调控的 AMPK 通路研究,虽在减轻氧化应激方面有一定效果,但仅依赖能量代谢调节,对炎症反应和纤维化核心环节的干

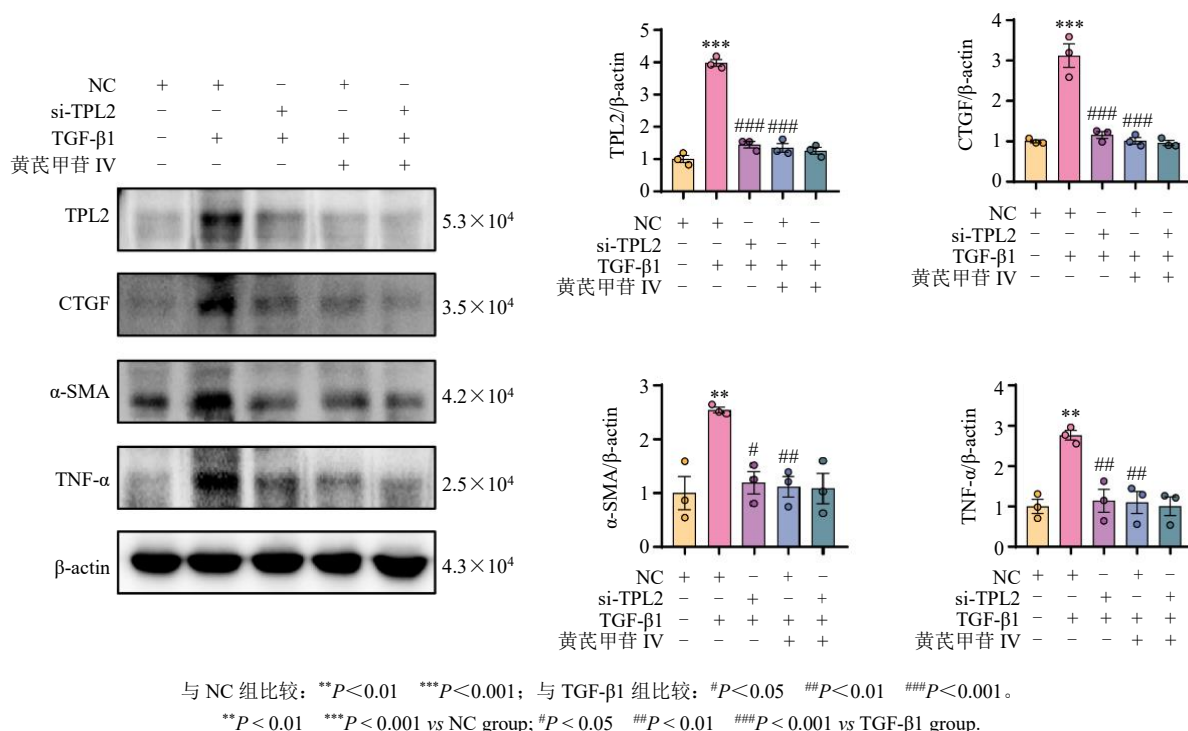


图 10 si-TPL2 对 HK-2 细胞中 CTGF、 α -SMA、TNF- α 表达的调控作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Regulatory effect of si-TPL2 on expressions of CTGF, α -SMA and TNF- α in HK-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

预不够全面。而针对 NF- κ B、TLR4 等炎症相关通路的研究,虽可减轻炎症反应,但过度抑制炎症可能导致免疫抑制等不良反应,且炎症与纤维化的复杂交互作用使得单纯抗炎难以彻底遏制肾纤维化的发展。这些靶点研究往往局限于单一病理环节或信号通路,未能充分考虑肾纤维化过程中多通路、多环节的相互作用,导致在实际应用中疗效有限,部分研究在临床转化中面临瓶颈。TPL2 在黄芪甲苷 IV 改善肾脏缺血再灌注后肾纤维化中的作用机制尚未明确,从机制上看,TPL2 可参与调控多种细胞信号转导,在炎症反应和细胞增殖、分化等过程中发挥重要作用。肾纤维化涉及成纤维细胞活化、炎症细胞浸润、氧化应激等多个病理环节。此外,现有研究表明黄芪甲苷 IV 可通过多条信号通路发挥抗纤维化效应,TPL2 可能成为其作用的新靶点。同时对 TPL2 在黄芪甲苷 IV 改善肾脏 IRI 后肾纤维化中的作用机制进行研究,有望揭示新的分子靶点和作用通路,为肾纤维化的防治提供更全面、更有效的策略,具有科学意义和潜在的应用价值。

本研究证实,黄芪甲苷 IV 通过 TPL2-CTGF 信号通路减轻肾脏 IRI 后 AKI 向 CKD 的病理进程。结果显示,黄芪甲苷 IV 显著降低 IRI 后急、慢性小鼠 Scr 和 BUN 水平,能够明显改善小鼠肾脏肾小

管坏死及间质纤维化程度,提示其对肾功能具有双重保护作用。机制研究表明,黄芪甲苷 IV 通过抑制 TPL2,下调其下游效应分子 CTGF 的表达,进而减少促炎因子 TNF- α 及纤维化标志物 α -SMA 的释放。此发现与既往研究中 CTGF 在肾纤维化中的核心调控作用一致,且进一步揭示了 TPL2 作为上游靶点的潜在价值。黄芪甲苷 IV 对 TPL2-CTGF 通路的双重调控可能形成“抗炎-抗纤维化”协同效应,为其改善 AKI 向 CKD 转化的药效提供了分子基础。相较于已报道的黄芪甲苷 IV 抗肾纤维化机制,本研究发现 TPL2-CTGF 轴作为连接炎症反应与纤维化进程的关键桥梁,为诠释“炎症-纤维化级联反应”提供了新结果;并将 CTGF 的上游调控因子从 TGF- β 1 等传统促纤维化细胞因子,探索至 MAP3K 家族成员 TPL2,丰富了 CTGF 转录调控的分子机制。这种对“非经典纤维化通路”的挖掘,既体现了黄芪甲苷 IV 多靶点干预的优势,也为筛选新型抗纤维化药物靶点提供了新思路。

AKI 向 CKD 的进展与持续炎症反应及失控的纤维化修复密切相关^[22-23]。本研究发现,肾脏 IRI 后 TPL2-CTGF 通路持续激活,这一过程与临床 AKI 患者继发 CKD 的病理特征吻合^[24-26]。本研究发现 TPL2-CTGF 通路与黄芪甲苷 IV 已知的抗炎作用可

能存在协同效应, 黄芪甲苷 IV 通过阻断 TPL2-CTGF 轴, 不仅抑制了早期 AKI 阶段的炎症风暴, 还阻断了后期促纤维化信号的级联放大, 提示该通路可能是连接 AKI 与 CKD 的关键枢纽, 可能为延缓 AKI-CKD 进展提供新思路。

尽管目前关于黄芪甲苷 IV 的研究尚处于实验阶段, 但本研究的发现为其转化应用提供了重要依据。现有临床数据显示, IRI 后 AKI 患者中约 29% 会进展为 CKD, 而当前缺乏特异性阻断该进程的药物。黄芪甲苷 IV 通过多靶点调控抑制纤维化进程, 为阻止 AKI 进展为 CKD 提供一定疗效。目前已有文献报道性别在 AKI 与 CKD 的发生、发展中存在差异, 性别因素通过激素-受体互作、细胞信号调控及器官微环境重塑等途径, 对 AKI 与 CKD 的病理进程产生显著影响, 其作用呈现疾病阶段和临床情境依赖性特征^[27-29]。本研究主要基于雄性动物模型, 未来可能仍需进一步开展以下工作: 通过雌性动物实验及性别对比研究进一步验证黄芪甲苷 IV 的普适性, 同时探讨雌激素信号通路 TPL2-CTGF 轴的可能交互作用; 进一步夯实黄芪甲苷肾保护作用的药效物质基础研究, 通过生物合成或剂型优化形成更适合成药的小分子化合物或靶向制剂, 以期与现有单一靶点抑制剂等药物的联合使用, 降低 AKI 后的 CKD 发生率。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang Y T, Li H Y, Jiang S M, *et al.* The glycolytic enzyme PFKFB3 drives kidney fibrosis through promoting histone lactylation-mediated NF- κ B family activation [J]. *Kidney Int*, 2024, 106(2): 226-240.
- [2] Livingston M J, Shu S Q, Fan Y, *et al.* Tubular cells produce FGF2 via autophagy after acute kidney injury leading to fibroblast activation and renal fibrosis [J]. *Autophagy*, 2023, 19(1): 256-277.
- [3] Xu C, Hong Q, Zhuang K T, *et al.* Regulation of pericyte metabolic reprogramming restricts the AKI to CKD transition [J]. *Metabolism*, 2023, 145: 155592.
- [4] Hu X R, Gan L, Tang Z W, *et al.* A natural small molecule mitigates kidney fibrosis by targeting Cdc42-mediated GSK-3 β / β -catenin signaling [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(13): e2307850.
- [5] Li X M, Xu R, Zhang D, *et al.* Baicalin: A potential therapeutic agent for acute kidney injury and renal fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1511083.
- [6] Rius-Gordillo N, Ferré N, González J D, *et al.* Dexamethasone to prevent kidney scarring in acute pyelonephritis: A randomized clinical trial [J]. *Pediatr Nephrol*, 2022, 37(9): 2109-2118.
- [7] Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, *et al.* Targeting the progression of chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(5): 269-288.
- [8] Vaara S T, Ostermann M, Bitker L, *et al.* Restrictive fluid management versus usual care in acute kidney injury (REVERSE-AKI): A pilot randomized controlled feasibility trial [J]. *Intensive Care Med*, 2021, 47(6): 665-673.
- [9] Ruiz-Ortega M, Lamas S, Ortiz A. Antifibrotic agents for the management of CKD: A review [J]. *Am J Kidney Dis*, 2022, 80(2): 251-263.
- [10] Sharma K, Ix J H, Mathew A V, *et al.* Pirfenidone for diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(6): 1144-1151.
- [11] Zhang X Q, Qu H Y, Yang T, *et al.* Astragaloside IV attenuate MI-induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling by inhibiting ROS/caspase-1/GSDMD signaling pathway [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(21): 2309-2322.
- [12] Shi H, Zhou P, Gao G, *et al.* Astragaloside IV prevents acute myocardial infarction by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(7): e13757.
- [13] Feng M X, Lv J, Zhang C X, *et al.* Astragaloside IV protects sepsis-induced acute kidney injury by attenuating mitochondrial dysfunction and apoptosis in renal tubular epithelial cells [J]. *Curr Pharm Des*, 2022, 28(34): 2825-2834.
- [14] Su Y Y, Xu J Q, Chen S Q, *et al.* Astragaloside IV protects against ischemia/reperfusion (I/R)-induced kidney injury based on the Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Transl Androl Urol*, 2022, 11(8): 1177-1188.
- [15] Xiao L, Dai Z W, Tang W J, *et al.* Astragaloside IV alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury through NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis inhibition via activating Nrf2 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9925561.
- [16] Yu X X, Dong H, Gao B H. Astragaloside IV ameliorates podocyte apoptosis via inhibiting the PERK-ATF4-CHOP signaling axis [J]. *Asian J Surg*, 2024, 47(1): 776-777.
- [17] Lian Y H, Li C Q, Li J C, *et al.* Astragaloside IV attenuated TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells via connexin 43 and Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Tissue Cell*, 2022, 77: 101831.
- [18] Zarrin A A, Bao K, Lupardus P, *et al.* Kinase inhibition in

- autoimmunity and inflammation [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(1): 39-63.
- [19] Xu J G, Zhang Z Y, Ren D W, *et al.* Astragaloside IV negatively regulates Gpr97-TPL2 signaling to protect against hyperhomocysteine-exacerbated sepsis associated acute kidney injury [J]. *Phytomedicine*, 2024, 125: 155346.
- [20] Sun Y Y, Ge J, Shao F, *et al.* Long noncoding RNA AI662270 promotes kidney fibrosis through enhancing METTL3-mediated m⁶A modification of CTGF mRNA [J]. *FASEB J*, 2023, 37(8): e23071.
- [21] Li L, Fu H Y, Liu Y H. The fibrogenic niche in kidney fibrosis: Components and mechanisms [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(9): 545-557.
- [22] Zhang L J, Chen F, Dong J, *et al.* HDAC3 aberration-incurred GPX4 suppression drives renal ferroptosis and AKI-CKD progression [J]. *Redox Biol*, 2023, 68: 102939.
- [23] Zhao Z B, Marschner J A, Iwakura T, *et al.* Tubular epithelial cell HMGB1 promotes AKI-CKD transition by sensitizing cycling tubular cells to oxidative stress: A rationale for targeting HMGB1 during AKI recovery [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2023, 34(3): 394-411.
- [24] Su Y, Tu G W, Luo Z. Timing of initiation of renal-replacement therapy in acute kidney injury [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(18): 1797.
- [25] Dees C, Pötter S, Zhang Y, *et al.* TGF- β -induced epigenetic deregulation of SOCS3 facilitates STAT3 signaling to promote fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(5): 2347-2363.
- [26] Pan Z Y, El Sharkway R, Bayoumi A, *et al.* Inhibition of MERTK reduces organ fibrosis in mouse models of fibrotic disease [J]. *Sci Transl Med*, 2024, 16(741): eadj0133.
- [27] van Eeghen S A, Nokoff N J, Vosters T G, *et al.* Unraveling sex differences in kidney health and CKD: A review of the effect of sex hormones [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2024, 20(2): 301-310.
- [28] Steiger S, Li L, Bruchfeld A, *et al.* Sex dimorphism in kidney health and disease: Mechanistic insights and clinical implication [J]. *Kidney Int*, 2025, 107(1): 51-67.
- [29] Soranno D E, Awdishu L, Bagshaw S M, *et al.* The role of sex and gender in acute kidney injury-consensus statements from the 33rd Acute Disease Quality Initiative [J]. *Kidney Int*, 2025, 107(4): 606-616.

[责任编辑 李亚楠]