

天花粉蛋白通过调节芳香烃受体介导的色氨酸代谢治疗糖尿病肾病

陈晓雪¹, 神梓婷¹, 张晨雨¹, 辛杰¹, 薛涛¹, 刘言娟¹, 王晓², 张波^{1*}, 李新朋^{1*}

1. 临沂大学医学院, 山东 临沂 276000

2. 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省分析测试中心, 山东省大型精密分析仪器应用技术重点实验室, 山东 济南 250014

摘要:目的 探究天花粉蛋白(trichosanthin, TCS)治疗糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)的作用及机制。方法 将 30 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和 TCS (20 $\mu\text{g/kg}$) 组, 造模后给予 TCS 干预 9 周。实验过程中监测大鼠血糖和体质量变化; 给药结束后, 通过苏木素-伊红(HE)和 Masson 染色观察肾脏结构改变; 检测血清胰岛素和血脂水平; 检测尿液白蛋白和血清肌酐、尿素氮水平以评价肾脏功能; 通过非靶向代谢组学分析对照组、模型组和 TCS 组大鼠尿液代谢物差异; 采用 Western blotting 检测大鼠肾组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、p-AMPK 和芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AHR)的蛋白表达。体外以高糖诱导的 HK-2 细胞为研究对象, 通过免疫荧光分析 TCS 对高糖诱导的 HK-2 细胞内 ROS 水平及凋亡的影响, 通过 Western blotting 分析 TCS 对高糖诱导的 HK-2 细胞 α -SMA、Bcl-2、AMPK、p-AMPK 和 AhR 蛋白表达的影响。结果 与模型组比较, TCS 组大鼠肾脏中空泡明显减少, 炎症减轻, 胶原沉积显著减少; TCS 可显著降低 DKD 大鼠血糖($P<0.05$ 、 0.001), 增加体质量($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 调控胰岛素、血脂和肾功能相关指标水平($P<0.001$), 保护肾脏滤过功能。大鼠尿液非靶向代谢组学分析结果显示, 色氨酸代谢为 TCS 治疗 DKD 的主要作用途径。细胞实验结果显示, 高糖诱导后细胞凋亡增加, 而 25 $\mu\text{g/mL}$ TCS 能够明显抑制细胞内 ROS 水平和细胞凋亡。Western blotting 结果显示, TCS 显著下调 DKD 大鼠肾组织和高糖诱导的 HK-2 细胞 α -SMA、AhR 和 p-AMPK/AMPK 表达($P<0.01$ 、 0.001), 显著上调 Bcl-2 蛋白表达($P<0.05$ 、 0.001)。结论 TCS 可以通过调节 AhR 介导的色氨酸代谢途径改善凋亡, 从而治疗 DKD。

关键词: 天花粉蛋白; 糖尿病肾病; 色氨酸代谢; 芳香烃受体; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)14-5074-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.013

Trichosanthin treats diabetic kidney disease by regulating aryl hydrocarbon receptor mediated tryptophan metabolism

CHEN Xiaoxue¹, SHEN Ziting¹, ZHANG Chenyu¹, XIN Jie¹, XUE Tao¹, LIU Yanjuan¹, WANG Xiao², ZHANG Bo¹, LI Xinpeng¹

1. College of Medicine, Linyi University, Linyi 276000, China

2. Key Laboratory for Applied Technology of Sophisticated Analytical Instruments of Shandong Province, Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of trichosanthin (TCS) in treatment of diabetic kidney disease (DKD).

Methods A total of 30 SD rats were randomly divided into control group, model group and TCS (20 $\mu\text{g/kg}$) group. After modeling, TCS intervention was given for nine weeks. The changes in blood glucose and body weight of rats were monitored during the experimental process. After administration, changes in renal structure were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Levels of insulin and lipid in serum were detected. Levels of albumin in urine, serum creatinine and blood urea nitrogen were detected

收稿日期: 2025-03-23

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目(2021CXGC010508); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2021LZY030)

作者简介: 陈晓雪, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源开发与利用。E-mail: chenxiaoxue0325@163.com

*通信作者: 张波, 男, 副教授, 研究方向为中药质量控制与品质评价。E-mail: zhangboyxy@lyu.edu.cn

李新朋, 男, 副教授, 研究方向为中药资源开发与利用。Tel: (0539)7258639 E-mail: lixinpeng@lyu.edu.cn

to evaluate renal function. The differences in urinary metabolites among control group, model group and TCS group rats were analyzed through non-targeted metabolomics analysis. Western blotting was used to detect the protein expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), adenosine 5'-pyrophosphate activated protein kinase (AMPK), p-AMPK and aryl hydrocarbon receptor (AHR) in kidney tissue of rats. High glucose-induced HK-2 cells were used as the research object *in vitro*, the effect of TCS on ROS level and apoptosis in high glucose-induced HK-2 cells was analyzed by immunofluorescence, and the effect of TCS on expressions of α -SMA, Bcl-2, AMPK, p-AMPK and AhR proteins in high glucose-induced HK-2 cells was analyzed by Western blotting. **Results** Compared with model group, TCS group showed a significant reduction in renal vacuoles, inflammation and collagen deposition in rats. TCS could significantly reduce blood glucose ($P < 0.05, 0.001$), increase body weight ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), regulate insulin, blood lipids and renal function related indicators ($P < 0.001$), and protect renal filtration function in DKD rats. The non-targeted metabolomics analysis of rat urine showed that tryptophan metabolism was the main pathway of TCS in treatment of DKD. The cell experiment results showed that high glucose induced cell apoptosis increased, while 25 $\mu\text{g/mL}$ TCS could significantly inhibit intracellular ROS level and cell apoptosis. Western blotting results showed that TCS significantly down-regulated the expressions of α -SMA, AhR and p-AMPK/AMPK in kidney tissue of DKD rats and high glucose-induced HK-2 cells ($P < 0.01, 0.001$), and significantly up-regulated the expression of Bcl-2 protein ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** TCS can improve apoptosis and treat DKD by regulating AhR mediated tryptophan metabolism pathway.

Key words: trichosanthin; diabetic kidney disease; tryptophan metabolism; aryl hydrocarbon receptor; apoptosis

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是糖尿病最常见的并发症之一。根据国际糖尿病联盟提供的数据显示, 全球糖尿病患者约 4.2 亿, 其中 30%~40% 的糖尿病患者会进展为 DKD, 该疾病已被证实对患者的生活质量和寿命产生严重影响^[1]。在中国, 糖尿病患病率已达到总人口的 10.9%, 其中以 2 型糖尿病为主。这些患者中, 20%~40% 已进展为 DKD。DKD 已超越慢性肾小球肾炎成为中国慢性肾脏病的首要病因, 并成为终末期肾病的最主要来源^[2]。中国肾脏病科学报告强调, 为防范未来 10~20 年因 DKD 导致的尿毒症病例激增, 有必要对特定人群实施针对性干预措施。这一紧迫性因该疾病对国家医疗体系造成的预期负担而更加凸显^[3]。然而, 由于受多种因素影响及 DKD 复杂的发病机制, 治疗药物的研发进展愈发艰难。临床数据分析表明, 严格控制血糖可降低发生 DKD 的风险, 此外, 血压管理已被证实能延缓 DKD 的进展^[4-5]。因此, 在过去 30 年间, 肾素-血管紧张素系统抑制剂 (renin-angiotensin system inhibitors, RASi) 始终作为 DKD 治疗的基石。然而, 接受 RASi 治疗的患者仍面临较高的肾功能衰竭残余风险^[6]。因此, 迫切需要探索新的作用途径及相应治疗药物以抑制 DKD 的发生与进展。

色氨酸作为一种必需氨基酸, 其代谢产物在免疫调节、能量代谢和神经信号传导中发挥重要作用。研究发现, 色氨酸代谢紊乱与 DKD 的发生发展密切相关^[7]。色氨酸代谢主要通过犬尿氨酸途径、

5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 途径和肠道菌群介导的途径进行^[8-9]。研究表明, 在糖尿病状态下, 炎症因子如 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等可诱导肾脏吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 表达及活性上调, 促使色氨酸代谢向犬尿氨酸途径倾斜^[10]。喹啉酸、犬尿酸等代谢产物通过促进氧化应激、足细胞凋亡等机制加重肾损伤^[11]。此外, 在高糖环境中, 肾脏合成 5-HT 增加会激活 5-HT_{2A} 受体, 进而导致系膜细胞增殖及纤维化形成^[12]。同时, 肠道菌群代谢色氨酸产生的硫酸吲哚酚 (indoxyl sulfate, IS) 因肾功能受损在糖尿病患者体内蓄积, 随后通过核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 和转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 信号通路促进肾小管间质纤维化及氧化应激^[13-14]。

中医认为 DKD 属于消渴兼胀满、水肿、虚劳、淋病、关格等症, 与古之“消肾”类似, 如《圣济总录》中记载: “消肾之病名, 消渴病久, 肾气受伤, 肾主水, 肾气虚衰……能为水肿”。中医通过辨证论治将 DKD 分为了不同类型并通过药物、饮食及锻炼等多种方式予以治疗和控制, 中药治疗是中医最主要的治疗方式, 且具有成本低、不良反应少、辨证施治等诸多优势。在中药选用过程中, 抗血糖药物仍是主要用药选择之一。天花粉为葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 或双边栝楼 *T. rosthornii* Harms 的干燥根, 属于药食同源, 具有清热

泻火、生津止渴、排脓消肿之功效。《本草纲目》记载天花粉为“消渴之要药”，且本课题组前期研究发现天花粉提取物可以有效降低糖尿病大鼠血糖^[15]。天花粉主含天花粉蛋白(trichosanthin, TCS)、凝集素、多糖、葫芦素 B、氨基酸等化学成分，且有研究证实 TCS 可显著降低非肥胖糖尿病小鼠的糖尿病发病率，同时减轻胰岛炎症，具有治疗糖尿病的潜力。因此，本研究以 TCS 为研究对象，探讨 TCS 对 DKD 的治疗作用及其作用机制，为 DKD 的治疗提供更多中医智慧。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只，体质量(180±20) g，购自济南中楚生物科技有限公司，动物合格证号 NO.110324220102218017。大鼠饲养于室温 20~25 °C、相对湿度 40%~60%的环境中，自由进食饮水，昼夜明暗交替时间为 12 h。本研究符合动物伦理相关要求，动物实验获得临沂大学动物伦理审查委员会批准(批准号 LYU20210108)。

HK-2 细胞购自上海富衡生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

天花粉(批号 2023181)购自安徽普仁中药饮片有限公司；TCS 采用氯化钠溶液搅拌提取，经饱和硫酸铵沉淀后透析制备，质量分数>95%；三酰甘油(triglycerides, TG)检测试剂盒(批号 20220822)、总胆固醇(total cholesterol, TC)检测试剂盒(批号 20230921)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)检测试剂盒(批号 20230703)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)检测试剂盒(批号 20221025)、血清肌酐(serum creatinine, Scr)检测试剂盒(批号 20240408)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)检测试剂盒(批号 20240109)购自长春汇力生物技术有限公司；白蛋白(albumin, ALB)试剂盒(批号 20230911)、胰岛素试剂盒(批号 JYM0408Ra)购自武汉基因美生物科技有限公司；F12K 培养基(批号 L240880)购自上海富衡生物科技有限公司；活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号 240003002)购自北京索莱宝科技有限公司；CKK-8 试剂盒(批号 240003002)、凋亡试剂盒(批号 K200313133A132)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(批号 Ac241218173)、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)

抗体(批号 11c4512)、p-AMPK 抗体(批号 11c4513)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(批号 N27DE8P)、芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AHR)抗体(批号 3c52548)、链脲佐菌素(批号 G26J9B53763)、 β -actin 抗体(批号 Ls194001)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 56j9958)购自美国 Affinity 公司。

1.3 仪器

GA-3 型血糖仪(三诺生物传感股份有限公司)；Multiskan FC 型多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；KZ-III-96 型多样品组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司)；5425R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)；041BR325717 型凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)；5200 型全自动化学发光成像仪(上海天能仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

30 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后，随机分为对照组、模型组和 TCS(20 μ g/kg)组^[16]，每组 10 只。对照组大鼠给予普通饲料喂养 4 周，其余大鼠给予高糖高脂饲料(含 10%猪油和 37%蔗糖)喂养 4 周以产生胰岛素抵抗，然后模型组与 TCS 组继续喂养高糖高脂饲料^[17]。第 5 周，模型组和 TCS 组大鼠连续 5 d ip 1% STZ 溶液(40 mg/kg)构建 DKD 模型，第 6 周给药组 ip TCS(以生理盐水配制，给药体积为 1 mL)，对照组和模型组 ip 等体积的生理盐水，1 次/d，连续给药 9 周。饲养期间大鼠自由进食饮水，观察大鼠饮食、活动、精神情况，每周测量大鼠体质量并记录。当连续 2 周空腹血糖值持续稳定在 16.7 mmol/L 以上(给药后第 2 天检测空腹血糖)，认为造模成功，随后第 6 周开始给药，其中每周检测 1 次大鼠的血糖水平并记录。

2.2 血糖、胰岛素、血脂水平的测定

实验结束前 12 h 内大鼠禁食，取大鼠尾静脉血，使用血糖仪测定血糖水平。大鼠摘眼球取血，血液在室温静置 30 min 后，3500 r/min 离心 15 min，分离血清，按试剂盒说明书检测胰岛素、TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平，计算胰岛素抵抗指数。

胰岛素抵抗指数=空腹胰岛素 $\times$ 空腹血糖/22.5

2.3 肾功能相关指标的检测

取大鼠血清，按照试剂盒说明书检测 Scr、BUN 水平；取大鼠尿液，按照试剂盒说明书检测 ALB 水平。

2.4 肾组织形态学观察

取大鼠肾脏,在 4%多聚甲醛中固定 24 h,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋后,进行切片(厚度 4 μm)。切片经脱蜡后,分别进行苏木素-伊红(HE)和 Masson 染色,于光学显微镜下观察肾组织的形态变化。

2.5 代谢组学分析

2.5.1 血清样品的处理 精密吸取大鼠尿液 100 μL ,加入预冷的甲醇 400 μL ,涡旋 1 min 混匀,冰浴中超声 20 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、16 000 r/min 离心 20 min,取上清液,经 0.22 μm 滤膜,滤液供 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析。

2.5.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μm),柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,体积流量 0.4 mL/min,进样量 4 μL 。流动相为 0.1%甲酸乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~2 min, 1%~30% A; 2~5 min, 30%~60% A; 5~7 min, 60%~80% A; 7~10 min, 80%~99% A; 10~11 min, 99% A。

2.5.3 质谱条件 电喷雾电离(ESI)离子源;正、负离子模式下,毛细管电压为 2.8 kV,锥孔电压为 40 V,源温度为 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$,去溶剂气体积流量为 800 L/h,锥孔反吹气体积流量为 50 L/h。亮氨酸-脑啡肽($[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 556.277 1、 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 554.277 1)锁定质量,数据采集间隔为 0.2 s,扫描延迟为 0.1 s,数据采集范围 m/z 50~1 500,以 Centriod MSE 模式进行数据采集,碰撞能量动态范围 10~30 V。委托上海拜谱生物科技有限公司进行代谢组学检测。

2.5.4 数据处理 UPLC-Q/TOF-MS 数据利用 MSDIAL 软件进行峰识别、峰提取及标准化处理后,利用 EZinfo 3.0 软件对所有离子进行非监督的主成分分析(principal component analysis, PCA)和有监督的正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA),变量投影重要性(variable importance in projection, VIP) >1 且组间 t 检验 $P<0.05$ 的离子作为潜在生物标记物离子。对潜在生物标记物离子一级质谱精准分子质量数据计算分子式,综合 HMDB 等数据库和 MS/MS 二级质谱碎片离子解析进行鉴定。最后,结合 MetaboAnalyst 5.0 与京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库,对已鉴定的生物标记物代谢通路进行分析。

2.6 细胞培养

HK-2 细胞用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 F12K 培养基,于 5% CO_2 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养。

2.7 CCK-8 检测细胞活力

取对数生长期的 HK-2 细胞,以 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,分别加入 3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000、400.000、800.000 $\mu\text{g/mL}$ 的 TCS 处理 24 h,另设置对照组加入不含药物的培养基,以及不接种细胞的空白孔。采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。

设置对照组、模型组和 TCS(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g/mL}$)给药组,模型组和给药组加入 30 mmol/L 葡萄糖诱导糖尿病模型,给药组另加入不同质量浓度的 TCS 处理 24 h,对照组加入不含药物的培养基,另设置不接种细胞的空白孔。采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.8 ROS 水平的检测

设置对照组、模型组和 TCS(6.25、12.50、25.00 $\mu\text{g/mL}$)组,按“2.7”项下方法给药后,弃去培养基,加入 ROS 荧光探针工作液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,用无血清培养基洗涤 3 次,于荧光显微镜下观察并拍照。

2.9 细胞凋亡水平的检测

按“2.8”项下方法进行分组和给药后,弃去培养基,消化后重悬于缓冲液中,加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(propidium iodide, PI),避光孵育 25 min,于荧光显微镜下观察并拍照。

2.10 Western blotting 检测 HK-2 细胞和大鼠肾组织 α -SMA、AMPK、p-AMPK、Bcl-2 和 AhR 蛋白表达

设置对照组、模型组和 TCS(25.00 $\mu\text{g/mL}$)组,按“2.7”项下方法给药后,收集细胞,加入裂解液裂解后,离心,取上清备用。取各组大鼠肾组织,加入裂解液,使用组织研磨仪研磨,离心,取上清备用。采用 BCA 法测定蛋白浓度,加入 Loading buffer 煮沸使蛋白变性。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,封闭后,加入一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;洗涤后,加入二抗,室温孵育 2 h,加入 ECL 化学发光试剂显影,采用全自动化学发光成像仪曝光并拍照。

2.11 统计学分析

所有定量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,采用单因素方差分

析 (ANOVA) 及 Dunnett 检验评估组间差异。

3 结果

3.1 TCS 对 DKD 大鼠血糖和体质量的影响

对照组大鼠饮食、活动、精神表现正常;模型组大鼠饮食和活动减少,神疲倦怠,在实验第 14 周死亡 2 只;TCS 组大鼠精神状态优于模型组,在实验第 14 周死亡 1 只。如图 1-A 所示,与对照组比较,模型组大鼠血糖明显升高 ($P<0.001$);与模型组比较,TCS 组大鼠血糖显著下降 ($P<0.05$ 、 0.001)。如图 1-B 所示,与对照组比较,模型组大鼠体质量显著降低 ($P<0.001$);与模型组比较,TCS

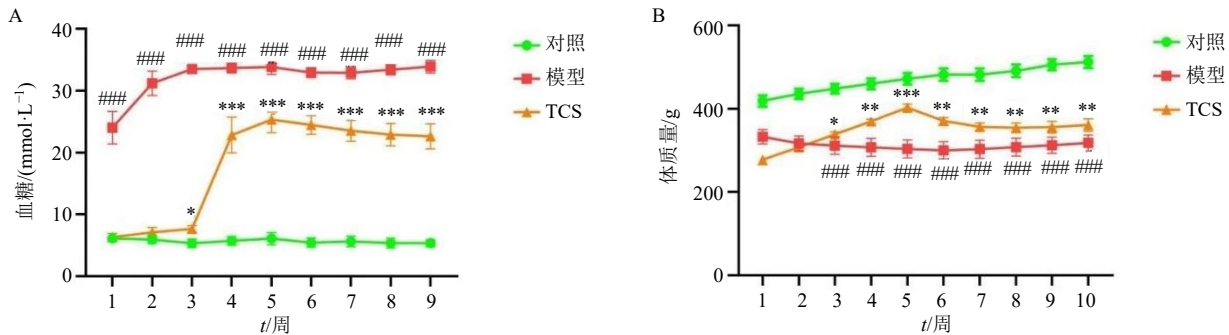
组大鼠体质量显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.2 TCS 对 DKD 大鼠胰岛素和血脂水平的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中胰岛素、空腹胰岛素、TC、TG、LDL-C 水平显著升高 ($P<0.001$),HDL-C 水平显著降低 ($P<0.001$);与模型组比较,TCS 组大鼠血清中胰岛素、空腹胰岛素、TC、TG、LDL-C 水平显著降低 ($P<0.001$),HDL-C 水平显著升高 ($P<0.001$)。

3.3 TCS 对 DKD 大鼠肾组织病理变化的影响

如图 3-A 所示,肾组织 HE 染色结果显示,模型组大鼠肾脏肾小球内小空泡增多,肾小球毛细血



与对照组比较: * $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 下图同。
$P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 TCS 对 DKD 大鼠血糖 (A) 和体质量 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effect of TCS on blood glucose (A) and body weight (B) in DKD rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

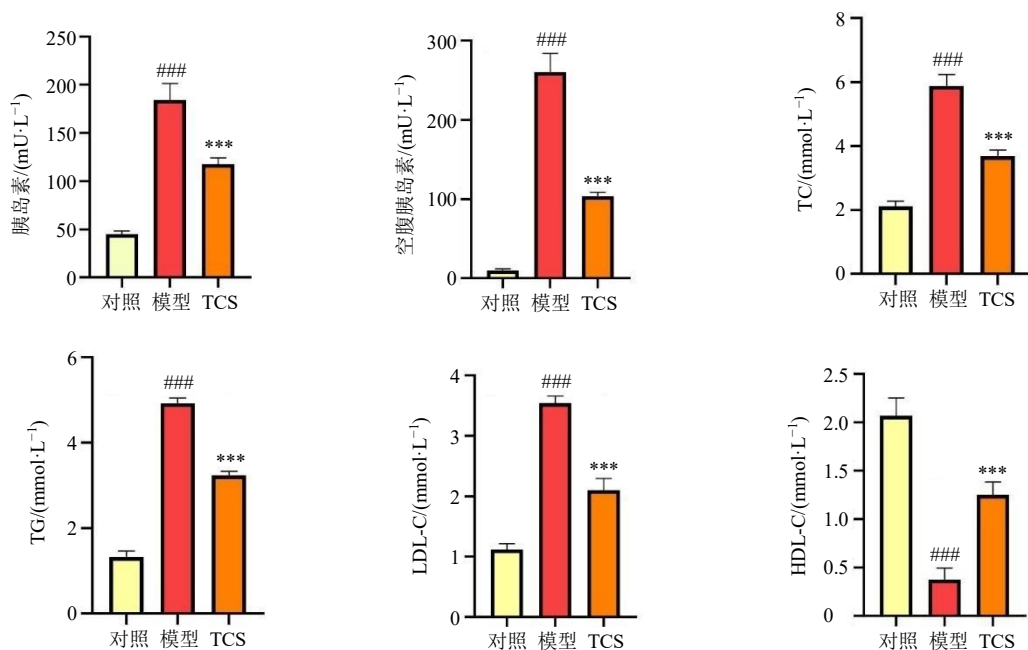
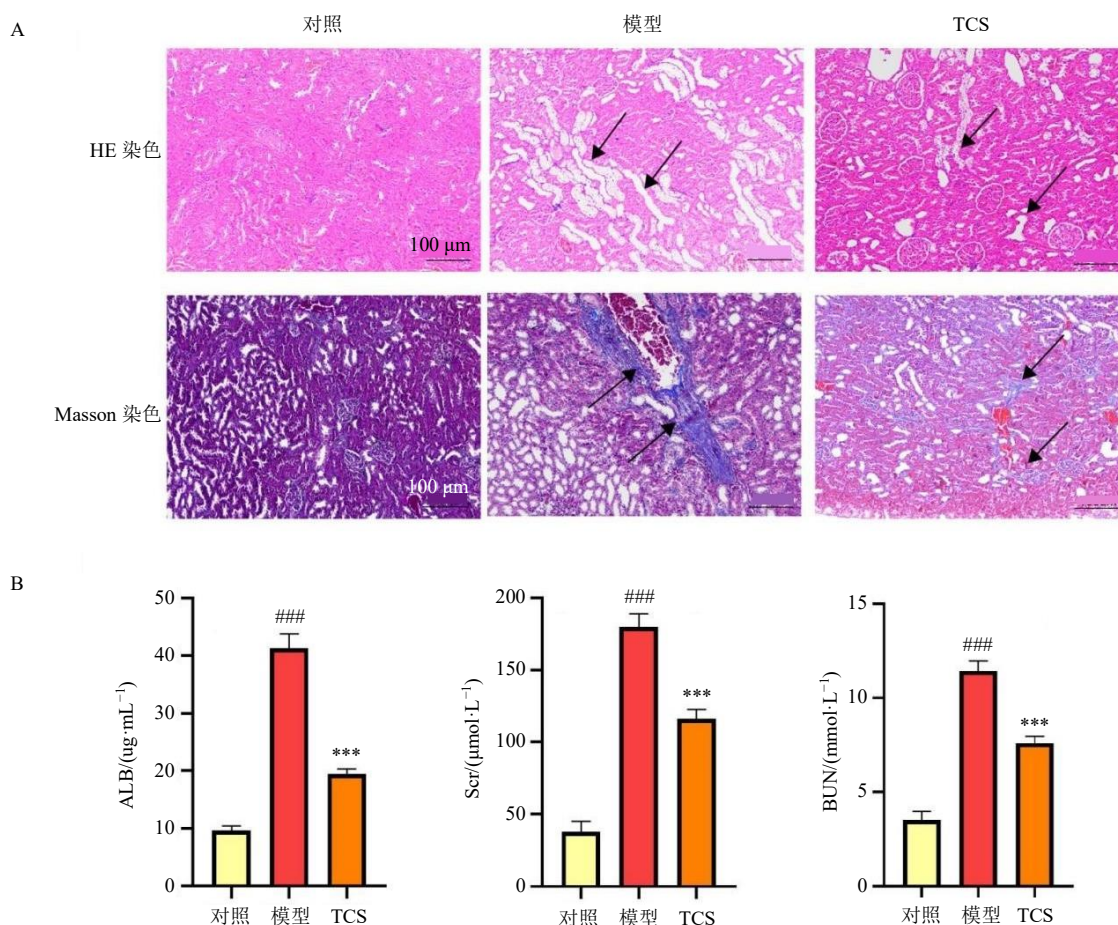


图 2 TCS 对 DKD 大鼠胰岛素和血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of TCS on levels of insulin and blood lipid in DKD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)



HE 染色中箭头表示肾小球内空泡；Masson 染色中箭头表示胶原沉积。

Arrows in HE staining indicate vacuoles in glomerulus; Arrows in Masson staining indicate collagen deposition.

图 3 TCS 对 DKD 大鼠肾组织病理变化 (A, $\times 200$) 和肾功能 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of TCS on pathological changes of kidney tissue (A, $\times 200$) and kidney function (B) in DKD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

管样，肾间质大量炎症细胞浸润；Masson 染色结果显示，模型组大鼠肾脏胶原沉积增多，出现纤维化。TCS 组大鼠肾脏中空泡明显减少，炎症减轻，胶原沉积明显轻于模型组。

3.4 TCS 对 DKD 大鼠肾功能相关指标的影响

如图 3-B 所示，与对照组比较，模型组大鼠尿液中 ALB 及血清中 BUN、Scr 水平明显升高 ($P < 0.001$)，表明模型组大鼠肾功能减退；与模型组比较，TCS 组大鼠尿液中 ALB 及血清中 BUN、Scr 水平明显降低 ($P < 0.001$)，表明 TCS 对 DKD 大鼠肾脏具有保护作用。

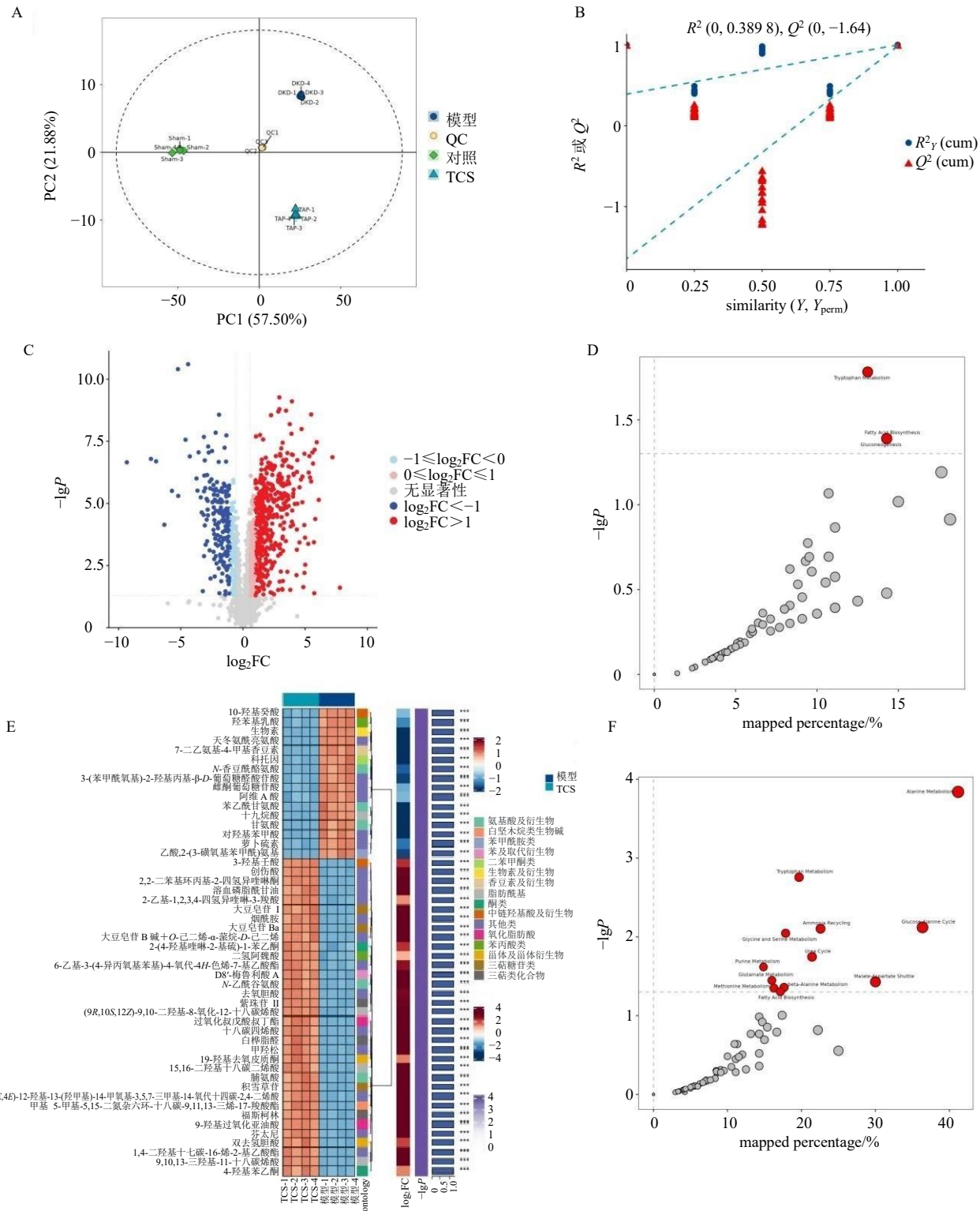
3.5 代谢组学分析

为了阐明 TCS 治疗 DKD 的作用机制，取大鼠尿液进行非靶向代谢组学分析。PCA 结果显示，对照组、模型组和 TCS 组样本均有一定分离趋势，提

示 3 组间代谢物存在一定差异 (图 4-A)。进一步进行 PLS-DA，相应的排列试验结果显示，纵轴上的截距为负值，提示所建模型并未过度拟合，模型成立 (图 4-B)。火山图显示差异代谢物，统计显示差异代谢共 783 个 (图 4-C)。热图展示了最具有差异性的 50 个代谢物如 10-羟基癸酸酯、羟基苯乳酸、生物素以及天冬氨酸等，主要涉及氨基酸、生物碱、香豆素、黄酮类以及类固醇类化合物 (图 4-D)。KEGG 分析结果显示，对照组 vs 模型组以及模型组 vs TCS 组吡啶及其衍生物、犬尿氨酸等色氨酸相关代谢产物异常 (图 4-E、F)，色氨酸代谢为主要作用途径，是 TCS 治疗 DKD 的潜在机制。

3.6 色氨酸代谢分析

非靶向代谢组学分析发现吡啶及其衍生物、犬尿氨酸等色氨酸相关代谢产物异常，色氨酸代谢是



A-PCA; B-PLS-DA; C-差异代谢物的火山图; D-前 50 名最具显著性的差异代谢物; E-对照组 vs 模型组差异代谢物的 KEGG 分析; F-TCS 组 vs 模型组差异代谢物的 KEGG 分析。

A-PCA; B-PLS-DA; C-volcano map of differential metabolites; D-top 50 most significant differential metabolites; E-KEGG analysis of differential metabolites between control group and model group; F-KEGG analysis of differential metabolites between TCS group and model group.

图 4 非靶向代谢组学分析

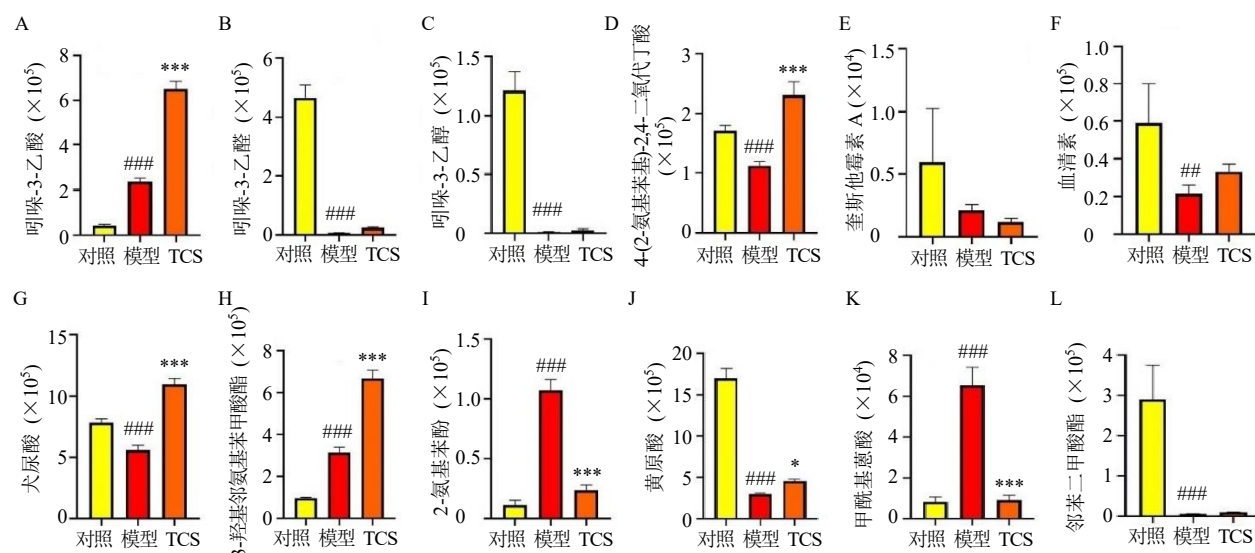
Fig. 4 Non-targeted metabolomics analysis

最主要的调节途径。取大鼠尿液，检测色氨酸代谢中主要的 3 条途径（吲哚代谢途径、血清素途径、犬尿氨酸途径）相关代谢物含量，结果如图 5 所示，与模型组比较，TCS 组吲哚-3-乙酸、4-(2-氨基苯基)-2,4-二氧代丁酸、犬尿酸、3-羟基邻氨基苯甲酸酯、黄原酸含量显著升高 ($P<0.05$ 、 0.001)，2-氨基苯

酚、甲酰基蒽酸含量显著降低 ($P<0.001$)，表明 TCS 对吲哚代谢途径和犬尿氨酸途径具有调控作用。

3.7 TCS 对 DKD 大鼠肾组织 α -SMA、AMPK、p-AMPK、Bcl-2 和 AhR 蛋白表达的影响

如图 6 所示，与对照组比较，模型组大鼠肾组织 α -SMA、AhR 蛋白表达水平及 p-AMPK/AMPK



A~D-吲哚代谢途径相关代谢物；E、F-血清素途径相关代谢物；G~L-犬尿氨酸途径相关代谢物。

A—D-metabolites related to indole metabolic pathway; E, f-metabolites related to serotonin metabolic pathway; G—L-metabolites related to kynurenine pathway.

图 5 各组色氨酸代谢途径主要代谢物相对含量变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Changes in relative contents of main metabolites involved in tryptophan metabolism pathway in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

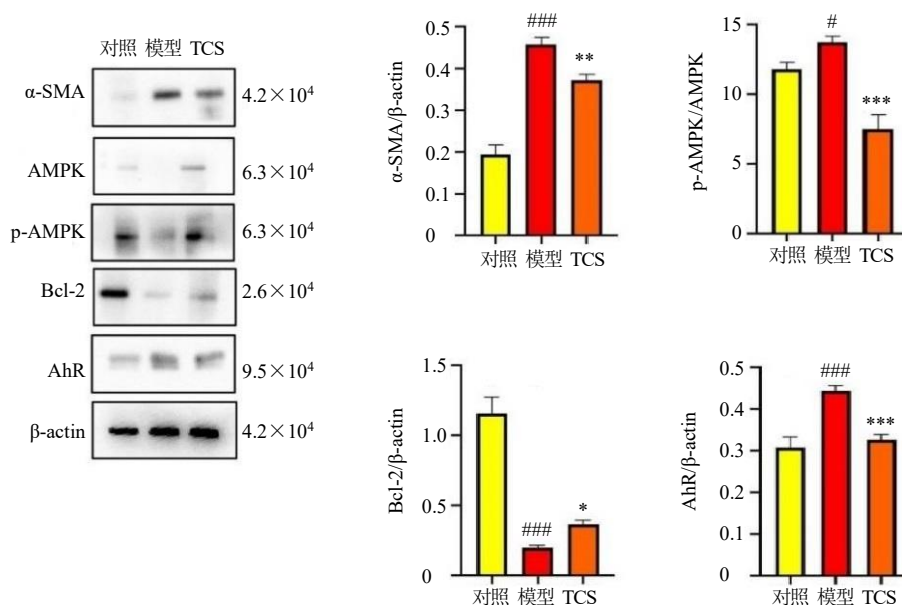


图 6 TCS 对 DKD 大鼠肾组织 α -SMA、AMPK、p-AMPK、Bcl-2 和 AhR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of TCS on expressions of α -SMA, AMPK, p-AMPK, Bcl-2 and AhR proteins in kidney tissue of DKD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

值显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, TCS 组大鼠肾组织 α -SMA、AhR 蛋白表达水平及 p-AMPK/AMPK 值显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 表明 TCS 可以有效抑制纤维化进展, 减少细胞凋亡, 同时下调 AhR 表达, 调控色氨酸代谢。

3.8 TCS 对 HK-2 细胞以及高糖诱导的 HK-2 细胞活力的影响

如图 7-A 所示, $3.125 \sim 100.000 \mu\text{g/mL}$ 的 TCS 对 HK-2 细胞活力无明显影响, $200.000 \sim 800.00 \mu\text{g/mL}$ 的 TCS 显著抑制 HK-2 细胞活力 ($P < 0.001$)。

使用高糖诱导 HK-2 细胞, 同时给予 TCS 干预, 如图 7-B 所示, 与模型组比较, 6.25 、 $25.00 \mu\text{g/mL}$ 的 TCS 显著上调高糖诱导的 HK-2 细胞活力 ($P < 0.05$ 、 0.01)。因此, 选择 6.25 、 12.50 、 $25.00 \mu\text{g/mL}$ 的 TCS 进行后续实验。

3.9 TCS 对高糖诱导的 HK-2 细胞 ROS 和凋亡水平的影响

如图 8-A 所示, 与对照组比较, 模型组细胞内 ROS 荧光强度增强; 与模型组比较, TCS 各剂量组细胞内 ROS 荧光强度减弱。通过 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡, 如图 8-B 所示, 高糖诱导后细胞凋亡增加, 而高剂量的 TCS 明显抑制细胞凋亡。

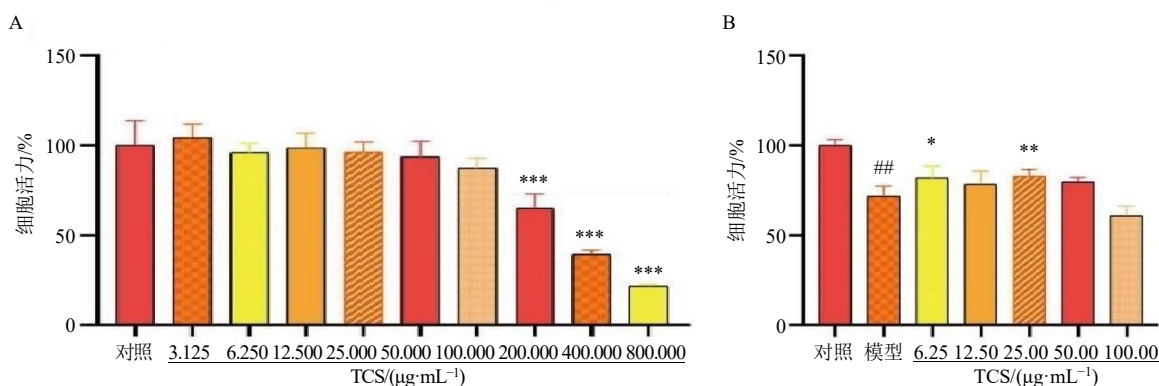


图 7 TCS 对 HK-2 细胞 (A) 以及高糖诱导的 HK-2 细胞 (B) 活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 7 Effect of TCS on viability of HK-2 cells (A) and high glucose-induced HK-2 cells (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

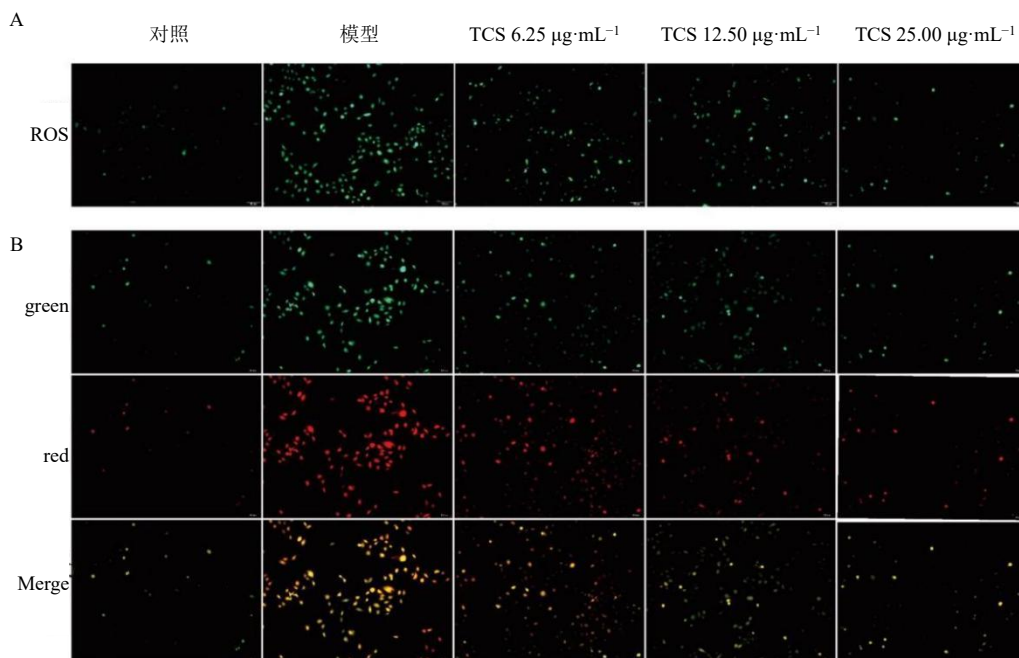


图 8 TCS 对高糖诱导的 HK-2 细胞 ROS (A) 和凋亡 (B) 水平的影响 ($\times 10$)

Fig. 8 Effect of TCS on levels of ROS (A) and apoptosis (B) in high glucose-induced HK-2 cells ($\times 10$)

3.10 TCS 对高糖诱导的 HK-2 细胞 α -SMA、AMPK、p-AMPK、Bcl-2 和 AhR 蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组 HK-2 细胞 α -SMA、AhR 蛋白表达水平及 p-AMPK/AMPK 值显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001), Bcl-2 蛋白表达水平显著降

低 ($P<0.001$); 与模型组比较, TCS 组 α -SMA、AhR 蛋白表达水平及 p-AMPK/AMPK 值显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$), 表明 TCS 可以降低纤维化标志物表达, 抑制 HK-2 细胞的转分化进程, 同时抑制凋亡保护细胞。

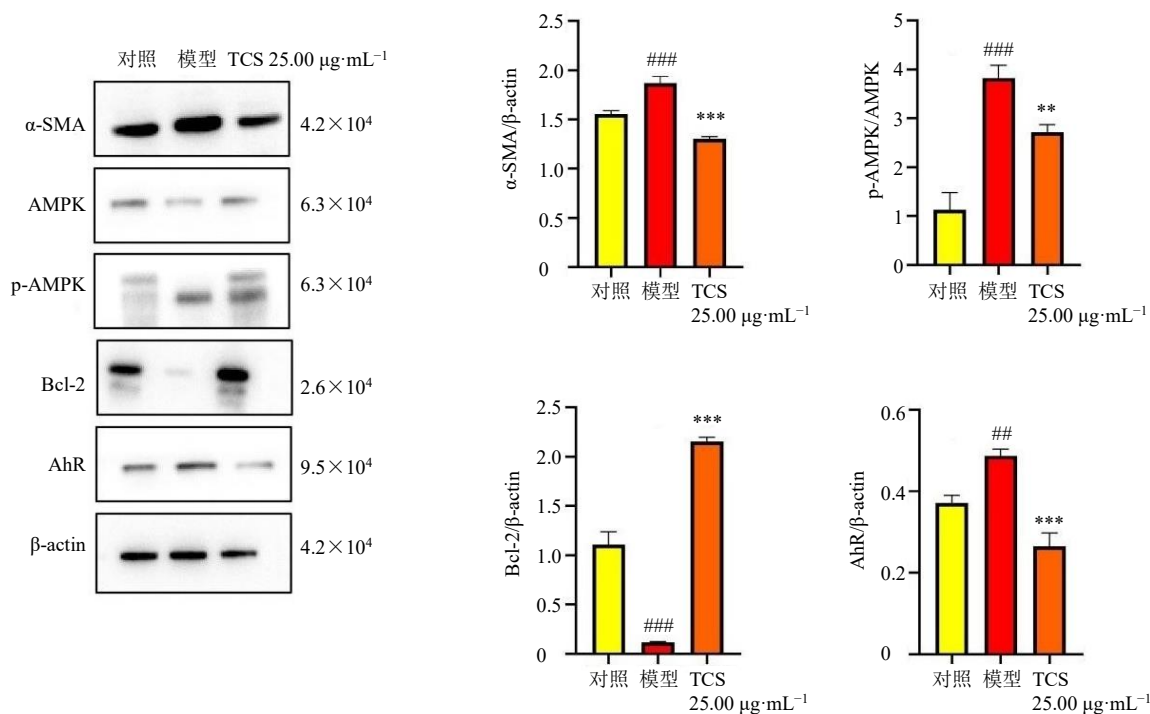


图 9 TCS 对高糖诱导的 HK-2 细胞 α -SMA、AMPK、p-AMPK、Bcl-2 和 AhR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effect of TCS on expressions of α -SMA, AMPK, p-AMPK, Bcl-2 and AhR proteins in HK-2 cells induced by high glucose ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

研究表明, 天花粉具有降糖、调血脂的作用^[18-19], 但其对 DKD 的治疗作用尚不明确。本研究以天花粉的主要活性成分 TCS 为研究对象, 探讨其治疗 DKD 的疗效及机制。实验过程中持续监测大鼠血糖及体质量, 发现 TCS 可有效降低 DKD 大鼠血糖水平, 增加体质量, 改善糖尿病症状。肾组织病理学观察显示, TCS 可改善糖尿病引发的肾脏结构改变, 缓解纤维化。模型组大鼠尿液中 ALB 水平显著升高, 说明肾功能受损, 肾小球滤过率降低, 导致蛋白质渗漏^[20]。TCS 组尿液中 ALB 水平显著下降, 说明大鼠肾小球滤过功能得到改善。此外, TCS 组 Scr、BUN 水平明显降低。上述结果表明 TCS 具有治疗 DKD 的效果。

为进一步阐明 TCS 治疗 DKD 的作用机制, 对大鼠尿液进行非靶向代谢组学分析, 结果发现色氨

酸代谢是 TCS 发挥作用的主要通路。进一步对色氨酸 3 条主要代谢通路的代谢物分析发现, DKD 大鼠尿液中犬尿酸、黄原酸、吡啶等相关代谢物水平显著降低^[21-23], 而 TCS 治疗可显著升高其水平, 提示 TCS 具有调控犬尿酸和吡啶代谢通路的作用。目前, 中医药治疗 DKD 的机制主要包括调节自噬、控制炎症、调节氧化应激和调节糖代谢等^[24]。但也有研究表明, DKD 与色氨酸代谢密切相关^[25]。色氨酸在人类健康和疾病中起着至关重要的作用^[23]。作为一种芳香族氨基酸, 同时也是人类和动物 8 种必需氨基酸之一, 色氨酸是众多微生物和宿主代谢物的生物合成前体, 在生物体的代谢过程中占有重要地位。色氨酸可通过犬尿酸途径、吡啶途径和血清素途径生成多种衍生物, 从而发挥生物学效应^[25]。研究表明, 犬尿酸途径参与免疫激活和炎症调节, 并与肥胖、胰岛素抵抗及 DKD 的发生发展相关^[26]。

临床研究显示,与健康人群比较,DKD 患者血清中 L-色氨酸、血清素水平显著降低,而 5-羟基吲哚乙酸、犬尿氨酸和 3-吲哚丙酸水平升高,这些变化与 Scr 呈正相关、与肾小球滤过率呈负相关,相关结论在动物实验中得到验证。AhR 可有效调控色氨酸代谢,后续检测大鼠肾脏 AhR 发现其表达明显增加。为阐明 TCS 治疗 DKD 的作用机制,采用高糖诱导 HK-2 细胞建立体外模型,并给予 TCS 进行干预,结果显示 TCS 可有效降低高糖诱导的 ROS 水平,抑制细胞凋亡,延缓纤维化进程。进一步研究表明,TCS 可以通过调控 AMPK 和 p-AMPK 表达、抑制细胞凋亡,从而治疗 DKD。综上,TCS 可能通过调控 AhR 介导的色氨酸-犬尿氨酸代谢途径、抑制氧化应激和细胞凋亡等机制,对 DKD 发挥显著的治疗效果。本研究为中医药治疗 DKD 的机制提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 10th edition* [M]. Brussels: International Diabetes Federation, 2021.
- [2] Collaboration G C K D. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990 — 2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 709-733.
- [3] 赵明辉, 张路霞. 中国肾脏疾病科学报告 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2021.
- [4] Defronzo R A, Reeves W B, Awad A S. Pathophysiology of diabetic kidney disease: Impact of SGLT2 inhibitors [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(5): 319-334.
- [5] Zhao J, Tostivint I, Xu L, *et al.* Efficacy of combined abelmoschus manihot and irbesartan for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes and diabetic kidney disease: A multicenter randomized double-blind parallel controlled clinical trial [J]. *Diabetes Care*, 2022, 45(7): e113-e115.
- [6] van Raalte D H, Bjornstad P, Cherney D Z I, *et al.* Combination therapy for kidney disease in people with diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2024, 20(7): 433-446.
- [7] Debnath S, Thomas N, Saliba A, *et al.* Tryptophan metabolites and anemia in patients with diabetic kidney disease [J]. *J Nephrol*, 2023, 36(4): 1083-1085.
- [8] Luo Z Z, Liu Y Q, Wang X, *et al.* Exploring tryptophan metabolism: The transition from disturbed balance to diagnostic and therapeutic potential in metabolic diseases [J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 230(Pt 1): 116554.
- [9] Cervenka I, Agudelo L Z, Ruas J L. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health [J]. *Science*, 2017, 357(6349): eaaf9794.
- [10] da Silva Dias I C, Carabelli B, Ishii D K, *et al.* Indoleamine-2,3-dioxygenase/kynurenine pathway as a potential pharmacological target to treat depression associated with diabetes [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(10): 6997-7009.
- [11] Zakrocka I, Kocki T, Urbańska E, *et al.* Effects of fenofibrate and gemfibrozil on kynurenine acid production in rat kidneys *in vitro*: Old drugs, new properties [J]. *Life*, 2023, 13(11): 2154.
- [12] Kaur G, Krishan P. Serotonin 5HT_{2A} receptor antagonism mediated anti-inflammatory and anti-fibrotic effect in adriamycin-induced CKD in rats [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2020, 393(7): 1269-1279.
- [13] Lv J, Chen J, Wang M J, *et al.* Klotho alleviates indoxyl sulfate-induced heart failure and kidney damage by promoting M2 macrophage polarization [J]. *Aging*, 2020, 12(10): 9139-9150.
- [14] Jia M, Lin L H, Xun K, *et al.* Indoxyl sulfate aggravates podocyte damage through the TGF- β 1/Smad/ROS signalling pathway [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2024, 49(1): 385-396.
- [15] Shu J, Wang K F, Liu Y T, *et al.* Trichosanthin alleviates streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in mice by regulating the balance between bone marrow-derived IL6⁺ and IL10⁺ MDSCs [J]. *Heliyon*, 2023, 10(1): e22907.
- [16] 卢建东, 贺良平, 卢春键, 等. 浅谈天花粉在糖尿病肾病中的临床应用 [J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(20): 52-53.
- [17] Xu J G, Wang Y, Wang Z, *et al.* Fucoidan mitigated diabetic nephropathy through the downregulation of PKC and modulation of NF- κ B signaling pathway: *In vitro* and *in vivo* investigations [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(4): 2133-2144.
- [18] 刘旭昭, 马丽然. 天花粉降糖方治疗糖尿病对血糖水平的改善效果 [J]. 糖尿病新世界, 2025, 28(6): 12-15.
- [19] 李晓芳, 叶小利, 李平, 等. 天花粉降糖活性成分的分离及活性观察 [J]. 中成药, 2011, 33(12): 2175-2178.

- [20] Chicas R, Mix J, Mac V, *et al.* Chronic kidney disease among workers: A review of the literature [J]. *Workplace Health Saf*, 2019, 67(9): 481-490.
- [21] Liu G, Chen S, Zhong J, *et al.* Crosstalk between tryptophan metabolism and cardiovascular disease, mechanisms, and therapeutic implications [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1602074.
- [22] Gao J, Xu K, Liu H, *et al.* Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 13.
- [23] Xue C, Li G L, Zheng Q X, *et al.* Tryptophan metabolism in health and disease [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(8): 1304-1326.
- [24] Shen S, Zhong H, Zhou X, *et al.* Advances in traditional Chinese medicine research in diabetic kidney disease treatment [J]. *Pharm Biol*, 2024, 62(1): 222-232.
- [25] Liu L, Xu J, Zhang Z, *et al.* Metabolic homeostasis of amino acids and diabetic kidney disease [J]. *Nutrients*, 2022, 15(1): 184.
- [26] Wrzosek L, Ciocan D, Hugot C, *et al.* Microbiota tryptophan metabolism induces aryl hydrocarbon receptor activation and improves alcohol-induced liver injury [J]. *Gut*, 2021, 70(7): 1299-1308.
- [27] Koziel K, Urbanska E M. Kynurenine pathway in diabetes mellitus-novel pharmacological target [J]. *Cells*, 2023, 12(3): 460.

[责任编辑 李亚楠]