

基于SIRT1/HIF-1 α /VLDLr信号通路探讨当归芍药散 改善db/db小鼠肾小球硬化的作用机制

李睿嘉^{1,2}, 王子轩^{1,2}, 郭世龙^{1,2}, 李静², 张倩倩², 董雯³, 郭登洲^{2*}

(1. 河北中医药大学研究生学院, 石家庄 050200;

2. 河北省中医院, 石家庄 050000;

3. 河北医科大学第一医院, 石家庄 050000)

[摘要] 目的:探讨当归芍药散(DSS)改善db/db小鼠肾损伤的可能作用机制。方法:8周龄的SPF级雄性db/db小鼠30只、db/m小鼠6只,适应性喂养1周后,每周检测db/db小鼠、db/m小鼠尿微量白蛋白及血糖,以db/db小鼠尿中微量蛋白尿含量显著高于db/m小鼠,且空腹血糖 ≥ 16.7 mmol \cdot L⁻¹判定为模型成功,随机将30只db/db小鼠随机分为模型组,厄贝沙坦(IBN)组,DSS低、中、高剂量组(16.77、33.54、67.08 g \cdot kg⁻¹),6只db/m小鼠作为正常组。IBN组给予IBN 0.025 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹灌胃,DSS低、中、高剂量组分别给予DSS 16.77、33.54、67.08 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹灌胃,正常组及模型组给予等体积生理盐水灌胃,均连续灌胃8周。干预结束后,检测血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、尿总蛋白(UTP)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)评价药物作用效果,并采用苏木素-伊红(HE)染色观察肾脏组织病理学变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测沉默信息调节因子1(SIRT1)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、极低密度脂蛋白受体(VLDLr)、分化簇31(CD31)蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测HIF-1 α 、VLDLr mRNA水平,免疫组化法观察HIF-1 α 及胱天蛋白酶-3(Caspase-3)的表达及分布。结果:与正常组比较,模型组小鼠SCr、BUN、UTP、TG、LDL-C明显升高;HE染色可见肾小球硬化,系膜基质增生,毛细血管祥扭曲、增厚,并存在大量炎症细胞浸润;SIRT1、CD31蛋白表达明显降低($P < 0.05$),HIF-1 α 、VLDLr蛋白及mRNA水平明显上升($P < 0.05$),免疫组化可见HIF-1 α 、Caspase-3表达明显增多($P < 0.05$),提示肾脏细胞缺氧、凋亡。与模型组比较,各给药组SCr、BUN、TG、LDL-C明显下降($P < 0.05$),DSS中剂量组UTP明显改善($P < 0.05$);肾组织结构及形态改善,炎症细胞减少,血管未见透明变性,SIRT1、CD31蛋白表达明显提升($P < 0.05$),HIF-1 α 、VLDLr蛋白及mRNA水平下降($P < 0.05$),免疫组化提示各给药组HIF-1 α 、Caspase-3表达明显减少($P < 0.05$),其中IBN组及DSS中剂量组改善趋势最为明显($P < 0.05$)。结论:DSS可以有效改善db/db小鼠肾小球硬化及脂质沉积,其机制可能与SIRT1/HIF-1 α /VLDLr信号通路有关。

[关键词] 糖尿病肾病; db/db小鼠; 当归芍药散; 糖脂代谢

[中图分类号] R692;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)06-0011-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260115

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260109.1416.002>

[网络出版日期] 2026-01-09 16:03:15



Mechanism of Danggui Shaoyaoan in Improving Glomerulosclerosis in db/db Mice via SIRT1/HIF-1 α /VLDLr Signaling Pathway

LI Ruijia^{1,2}, WANG Zixuan^{1,2}, GUO Shilong^{1,2}, LI Jing², ZHANG Qianqian²,
DONG Wen³, GUO Dengzhou^{2*}

(1. Graduate School, Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000, China;

3. The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

[收稿日期] 2025-11-26

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2025285);河北省自然科学基金项目(H2022423367);河北省研究生创新资助项目(XCXZZBS2025015)

[第一作者] 李睿嘉,在读博士,医师,从事中西医结合肾脏病的防治研究,E-mail:liliuyou1995@163.com

[通信作者] *郭登洲,博士,主任医师,从事中西医结合肾脏病的防治研究,E-mail:hbgudengzhou@163.com

[Abstract] Objective: To investigate the potential mechanism of Danggui Shaoyaoan (DSS) in ameliorating renal injury in db/db mice. **Methods:** Thirty 8-week-old specific pathogen-free (SPF)-grade male db/db mice and six db/m mice were acclimated for one week. Urinary microalbumin and blood glucose levels were measured weekly in both db/db and db/m mice. Successful modeling was determined by significantly higher microalbuminuria in db/db mice compared to db/m mice and a fasting blood glucose ≥ 16.7 mmol·L⁻¹. The 30 db/db mice were randomly divided into five groups: the model group, the irbesartan (IBN) group, and three DSS dose groups (low-, medium-, and high-dose DSS groups, administered at 16.77, 33.54, 67.08 g·kg⁻¹·d⁻¹, respectively). Additionally, the six db/m mice served as the normal control group. The IBN group received irbesartan at 0.025 g·kg⁻¹·d⁻¹ by gavage, while the three DSS groups received DSS at 16.77, 33.54, and 67.08 g·kg⁻¹·d⁻¹ by gavage, respectively. The normal and model groups were administered with an equivalent volume of normal saline by gavage. All interventions lasted for 8 consecutive weeks. After intervention, serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), urinary total protein (UTP), triglyceride (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were measured to evaluate the therapeutic efficacy of the treatments. Renal histopathological changes were observed with hematoxylin-eosin (HE) staining. Western blot was used to detect the protein expression of silencing information regulator 1 (SIRT1), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), very low-density lipoprotein receptor (VLDLr), and cluster of differentiation 31 (CD31). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA levels of HIF-1 α and VLDLr. Immunohistochemistry was used to observe the expression and distribution of HIF-1 α and Caspase-3. **Results:** Compared to the normal group, the model group showed significantly increased SCr, BUN, UTP, TG, and LDL-C. HE staining revealed glomerulosclerosis, mesangial matrix hyperplasia, capillary loop distortion and thickening, with extensive inflammatory cell infiltration. Protein expression of SIRT1 and CD31 significantly decreased ($P < 0.05$), while HIF-1 α and VLDLr protein and mRNA levels increased ($P < 0.05$). Immunohistochemistry showed increased expression of HIF-1 α and Caspase-3 ($P < 0.05$), indicating hypoxia and apoptosis in renal cells. In all treatment groups, SCr, BUN, TG, and LDL-C were significantly reduced compared to the model group ($P < 0.05$), and UTP was significantly improved in the medium-dose DSS group ($P < 0.05$). Renal tissue structure and morphology were improved, inflammatory cells were reduced, and no vascular hyaline degeneration was observed. SIRT1 and CD31 protein expression was elevated to varying degrees compared to the model group ($P < 0.05$), while HIF-1 α and VLDLr protein and mRNA levels decreased ($P < 0.05$). Immunohistochemistry showed reduced expression of HIF-1 α and Caspase-3 in all treatment groups ($P < 0.05$), with the most significant improvement observed in the IBN group and medium-dose DSS group ($P < 0.05$). **Conclusion:** DSS can effectively ameliorate glomerulosclerosis and lipid deposition in db/db mice, and its mechanism may involve the SIRT1/HIF-1 α /VLDLr signaling pathway.

[Keywords] diabetic kidney disease; db/db mice; Danggui Shaoyaoan; glucose and lipid metabolism

糖尿病肾病(DKD)作为糖尿病最严重的微血管并发症之一,已成为全球终末期肾病(ESRD)的主要病因,严重威胁患者生命质量^[1]。现有临床治疗手段主要集中于血糖控制、降压及减少肾脏蛋白尿,但对于脂代谢异常驱动的DKD进展仍缺乏有效干预措施,因此亟需开发新的综合防治策略。现代研究提示,脂质代谢紊乱在DKD发生和进展中占据重要地位^[2]。多项临床和动物研究发现,DKD患者具有显著的血脂水平升高,包括总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、极低密度脂蛋白(VLDL)^[3]。机制上,沉默信息调节因子1(SIRT1)/缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)信号通路失衡导致脂代谢重编程,SIRT1活性降低使HIF-1 α 持续激活,引起氧化应激反应,并进一步促进脂质累积,导致肾脏细胞的脂毒性损伤^[4-5],这一通路成为潜在的干预靶点。

DKD在中医学属“消渴”“水肿”“关格”等范畴,其病机核心为本虚(肝脾肾亏虚)与标实(湿浊瘀阻)并存。当归芍药散(DSS)出自东汉张仲景所著

《金匮要略》,该方由当归、白芍、川芎、茯苓、白术、泽泻6味药组成,符合DSS“补肝脾、化湿浊、活血瘀”的治法特点。因此,将DSS应用于DKD治疗,既体现了中医“病证结合”的辨治优势,又有望通过综合调节多条致病通路,提高防治效果。本课题组前期研究表明,DSS可抑制缺氧高糖条件诱导的肾小球内皮细胞凋亡,其作用机制可能与靶向SIRT1调节HIF-1 α 活性有关^[6]。本研究拟探讨DSS是否能够通过调节此通路,改善db/db小鼠的脂毒性肾损伤,从而为DSS临床应用于DKD提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 8周龄的SPF级雄性db/db小鼠30只,体质量(36 \pm 2)g;db/m小鼠6只,体质量(22 \pm 2)g,均由江苏华创信诺医药科技有限公司提供,合格证号B202402290007。饲养在河北省中医院实验动物中心的SPF级动物房内,相对湿度(60 \pm 5)%,环境温度(20 \pm 2)℃,自由饮食、喝水。

1.2 伦理 所有动物饲养、实验程序均根据河北省中医院动物保护与使用委员会相关文件执行,所有

动物实验均经伦理委员会批准(批件号 IACUC-HPHCM-2024024)。

1.3 药物 DSS 处方组成为当归 9 g(河北祁新中药颗粒饮片有限公司,批号 240201),白芍 48 g(河北美威药业股份有限公司,批号 240302),茯苓 12 g(承德奇滦中药饮片加工有限公司,批号 240302),白术 12 g(河北药兴药业有限公司,批号 240105),川芎 24 g(国药乐仁堂河北中药有限公司,批号 24010810),泽泻 24 g(河北药兴药业有限公司,批号 240301)。饮片均购自河北省中医院中药房,并经河北中医药大学第一附属医院药学部副主任相聪坤鉴定均为正品。由煎药室统一煎煮,将上述药材按比例混合后,置于煎药机内,加入 8 倍体积的纯水浸泡 1 h,随后煎煮 2 次,将 2 次所得药液合并浓缩,经无菌过滤后,于 4 °C 条件下保存。

1.4 试剂与仪器 4% 多聚甲醛固定液(兰杰柯科技有限公司,货号 BL5391);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司,货号 C0105S);95% 乙醇、氨水、二甲苯、盐酸(天津市永大化学试剂有限公司,货号分别为 1001-0043、1001-1320、1001-0220、101502-0116);中性树胶(北京索莱宝科技有限公司,货号 G8590);RNA 酶抑制剂、微小 RNA(miRNA)实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(生工生物技术有限公司,货号分别为 R8061、B532461);VLDL 受体(VLDLr)抗体、HIF-1 α 抗体(美国 Affinity Biosciences 公司,货号分别为 DF13667、AF1009); β -肌动蛋白(β -actin)、SIRT1、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)多克隆抗体(华安生物科技有限公司,货号分别为 EM21002、ER130811、HA1001);TRIzol 裂解液(赛默飞世尔科技有限责任公司,货号 15596026);尿蛋白(UTP)检测试剂盒(石家庄长江生物实验科技开发有限公司,货号 240225);FastKing One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(天根生化科技有限公司,货号 KR118);TG 检测试剂盒、尿素氮(BUN)测试盒、LDL-C 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为 A1102、C013-2-1、A113-1-1);血肌酐(SCr)测定试剂盒(贝克曼库尔特商贸有限公司,货号 OSR61204);CD31 抗体(武汉普罗汀泰克生物科技有限公司,货号 28083-1-AP);厄贝沙坦片(浙江华海药业股份有限公司,国药准字 H20030016,规格 75 mg/片)。

YP-B 型电子天平(上海力辰仪器科技有限公

司);TGL-16c 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂号);BS-200 型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);HM32 型切片机(赛默飞世尔科技有限公司);E0990 型摊片机(碧云天生物技术有限公司号);Tissue-Tek® TEC 6 型包埋机(樱花医疗科技有限公司);HP300 型脱水机(达科为生物技术股份有限公司);Eclipse Ci-L 型正置白光拍照显微镜(日本 Nikon 公司);TC1000-G 型 PCR 基因梯度扩增仪、D1524R 型高速冷冻离心机(大龙医疗科技有限公司);DYCZ-40D 型转膜仪、DYY-6C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 适应性喂养 1 周后,每周检测 db/db 小鼠、db/m 小鼠尿微量白蛋白及血糖,以 db/db 小鼠尿中微量蛋白尿含量显著高于 db/m 小鼠,且空腹血糖 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹ 判定为模型成功^[7]。随机将 30 只 db/db 小鼠随机分为模型组,厄贝沙坦组(IBN 组),DSS 低、中、高剂量组,每组 6 只,6 只 db/m 小鼠作为正常组。根据小鼠与人(70 kg)体质量的剂量换算法,确定小鼠的灌胃剂量,以 DSS 的低剂量作为临床等效剂量,中剂量和高剂量组分别为等效剂量的 2 倍和 4 倍。最终,DSS 低、中、高剂量组的给药量分别为 16.77、33.54、67.08 g·kg⁻¹。IBN 组给予 0.025 g·kg⁻¹·d⁻¹ IBN 灌胃,DSS 各剂量组分别给予 16.77、33.54、67.08 g·kg⁻¹·d⁻¹ DSS 灌胃,正常组及模型组给予等体积生理盐水灌胃,均连续灌胃 8 周。

2.2 样本采集 给药 8 周后,各组小鼠经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液(40 mg·kg⁻¹)实施麻醉,随后通过眼球采血获取样本。血液静置 2 h,在 4 °C 条件下以 3 000 r·min⁻¹(离心半径 10 cm,下同)离心 15 min,分离血清后收集上清液,置于 -80 °C 冷冻保存。随后摘取双侧肾脏,精细剥离周围脂肪与筋膜组织,用生理盐水冲洗后以滤纸吸干表面水分,记录肾脏质量。将肾沿纵轴切开,一部分肾皮质组织置于 4% 多聚甲醛中固定,用于组织病理学光镜观察及免疫组化检测,其余置于冻存管中放入液氮迅速冻存后再转移至 -80 °C 冰箱保存,用于 Real-time PCR 及蛋白免疫印迹法(Western blot)等检测。

2.3 一般情况 观察小鼠的行为活动、体态特征、精神状况及毛发状态。

2.4 生化指标检测 给药 8 周后,使用小鼠代谢笼收集 24 h 尿液,离心后使用磺基水杨酸法检测 UTP。取材后收集各组小鼠血清使用全自动生化仪

检测SCr、BUN、LDL-C,甘油磷酸氧化-过氧化物酶(GPO-POD)法检测TG。

2.5 肾脏组织病理学观察 肾脏组织经石蜡包埋后切片,经脱蜡及水化处理,分别进行HE染色。随后在光学显微镜下观察各组肾脏组织的病理学变化,拍摄图像并详细记录观察结果。

2.6 Western blot检测小鼠肾组织中SIRT1、HIF-1 α 、VLDLr、分化簇31(CD31)蛋白水平 取-80℃保存的肾组织,加入裂解液充分匀浆,4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min后取上清,蛋白定量法(BCA)测定蛋白浓度。配制适当浓度分离胶,上样总蛋白20 μ g,80 V电泳35 min(浓缩胶),120 V电泳60 min(分离胶)。电泳结束后,切除多余胶块,将凝胶与预活化的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜按“海绵-滤纸-膜-胶-滤纸-海绵”顺序组装转膜夹。转膜后5%脱脂牛奶封闭2 h, β -actin(1:50 000)、SIRT1(1:1 000)、HIF-1 α (1:1 000)、VLDLr(1:1 000)、CD31(1:10 000)一抗4℃孵育,TBST洗3次后孵育HRP标记二抗(1:50 000)室温1 h,TBST洗涤3次,每次45 min。显影后用Image J分析条带灰度值,以 β -actin为内参计算目标蛋白相对表达量。

2.7 Real-time PCR检测HIF-1 α 、VLDLr mRNA水平 取各组肾脏组织50 mg,加入TRIzol试剂充分匀浆后,加入三氯甲烷离心分层,收集上清液。随后加入无水乙醇洗涤RNA沉淀,最后用无菌无酶水溶解RNA,测定其浓度和纯度。RNA加入逆转录试剂,按标准反应体系将RNA逆转录为cDNA。Real-time PCR检测:以cDNA为模板,配制反应体系,置于PCR仪中按照设定程序进行扩增:反应参数包括95℃预变性5 min,随后进行40个循环的退火延伸(95℃15 s,60℃30 s),最后进行熔解曲线分析。以 β -actin作为内参基因,检测HIF-1 α 、VLDLr mRNA的表达水平,将数据归一化后进行统计学分析。所用引物(HIF-1 α 、VLDLr)均由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列见表1。

2.8 免疫组织化学法检测HIF-1 α 、胱天蛋白酶(Caspase)-3 取肾组织经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋并切片(4 μ m),脱蜡水化后进行热诱导抗原修复。灭活内源酶活性后封闭非特异性位点,甩掉封闭液,滴加一抗盖住组织放入湿盒内4℃过夜。阻断内源性过氧化物酶后,用5%牛血清白蛋白(BSA)封闭30 min,分别孵育HIF-1 α (1:100)和Caspase-3(1:100)一抗4℃过夜,HRP(1:500)二抗室温孵育1 h,二氨基联苯胺(DAB)显色控制反应

表1 引物序列

Table 1 Primer Sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
HIF-1 α	上游 ACCTTCATCGAAACTCCAAAG	228
	下游 CTGTTAGGCTGGGAAAAGTTAGG	
VLDLr	上游 GGCAGCAGGCAATGCAATG	177
	下游 GGGCTCGTCACTCCAGTCT	
β -actin	上游 GGCTGTATTCCCCTCCATCG	154
	下游 CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	

时间,染色合适即可终止染色,自来水冲洗。苏木素复染细胞核1~2 min。最后脱水透明、中性树脂封片,显微镜下观察HIF-1 α 和Caspase-3表达,并拍照记录,导入Image J软件分析,将数据归一化后进行统计学分析。

2.9 统计学方法 采用SPSS 26.0、GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。对符合正态分布的计量资料,结果以 $\bar{x} \pm s$ 呈现;当满足方差齐性时,组间差异采用单因素及重复测量方差分析,多组均数的两两比较使用最小显著性差异法(LSD)检验;若方差不齐,进行Welch's方差分析。不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 描述,组间差异比较选用Kruskal-Wallis H 检验;在总体差异达到统计学显著性后,进一步采用Bonferroni法校正进行事后两两分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DSS对db/db小鼠一般情况的影响 给药8周后,与正常组比较,模型组小鼠活动度显著降低,聚集蜷缩,精神萎靡,警觉性差,毛发失去正常光泽。给药后各组小鼠昼夜节律性活动正常,灵活好动,运动协调性良好,毛发呈现均匀分布、富有光泽且紧贴体表,触感柔顺光滑,无肉眼可见的断毛或脱落区域。

3.2 DSS对db/db小鼠TG、LDL-C指标水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清TG、LDL-C水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组TG、LDL-C水平明显下降($P < 0.05$)。提示IBN与DSS均可有效改善db/db小鼠脂代谢紊乱。见表2。

3.3 DSS对db/db小鼠SCr、BUN、UTP的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清SCr、BUN、UTP水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组SCr、BUN明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),DSS中剂量组UTP明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

表 2 DSS 对 db/db 小鼠 TG、LDL-C 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of DSS on TG and LDL-C levels in db/db mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TG	LDL-C
正常组		1.87±0.51	2.09±0.98
模型组		3.84±0.66 ¹⁾	10.80±1.97 ¹⁾
IBN 组	0.025	2.15±0.50 ²⁾	7.12±2.24 ²⁾
DSS 低剂量组	16.77	2.72±0.39 ²⁾	8.94±0.88 ²⁾
DSS 中剂量组	33.54	2.11±0.30 ²⁾	7.43±1.31 ²⁾
DSS 高剂量组	67.08	2.79±0.61 ²⁾	8.30±1.50 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05(表 3 同)

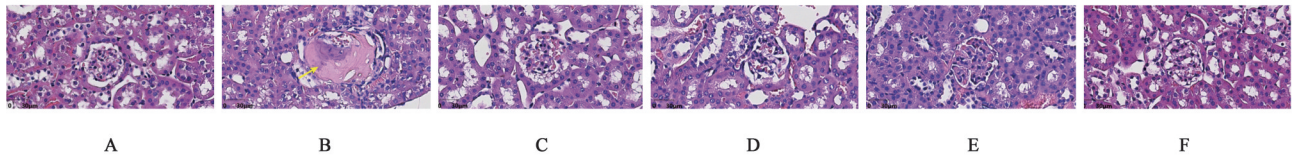
3.4 DSS 对 db/db 小鼠肾组织的病理改变 HE 染色结果显示,正常组小鼠肾小球结构完整,毛细血管祥开放良好,系膜区无扩张,肾小管上皮细胞排列整齐。模型组肾脏肾小球硬化明显,可见体积显著增大,系膜基质弥漫性增生,部分毛细血管祥受压闭塞,间质有大量淋巴细胞和单核细胞浸润。各

表 3 DSS 对 db/db 小鼠 SCr、BUN、UTP 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of DSS on SCr, BUN, and UTP levels in db/db mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{dL}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	UTP/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
正常组		8.54±0.84	7.41±1.17	0.53±0.33
模型组		18.19±2.14 ¹⁾	15.31±2.89 ¹⁾	1.37±0.66 ¹⁾
IBN 组	0.025	13.37±0.84 ²⁾	8.23±1.08 ²⁾	0.79±0.28
DSS 低剂量组	16.77	14.49±1.01 ²⁾	9.15±1.99 ²⁾	1.09±0.35
DSS 中剂量组	33.54	13.66±0.99 ²⁾	9.72±2.68 ²⁾	0.60±0.21 ²⁾
DSS 高剂量组	67.08	13.88±1.41 ²⁾	10.03±2.14 ²⁾	0.93±0.37

个给药组肾脏肾小球体积正常,系膜基质弥漫性增生减轻,间质炎症细胞浸润有所缓解,未见明显的肾小球硬化。DSS 对 db/db 小鼠肾组织肾小球硬化的影响见图 1。



注:A.正常组;B.模型组;C.IBN 组;D-F.DSS 低、中、高剂量组(图 2-图 4 同)。黄色箭头:肾小球系膜基质扩张及邻近毛细血管基底膜局部硬化增厚,形成嗜酸性层状结节,称为 Kimmelstiel-Wilson 结节,是 DKD 的特征性病理改变

图 1 DSS 对 db/db 小鼠肾组织肾小球硬化的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of DSS in glomerulosclerosis in renal tissue of db/db mice (HE, ×400)

3.5 DSS 对 db/db 小鼠肾组织 SIRT1、HIF-1 α 、VLDLr、CD31 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠 HIF-1 α 、VLDLr 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$),SIRT1、CD31 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$);与模型组比较,各给药组 HIF-1 α 、VLDLr 蛋白表达明

显降低 ($P<0.05$),SIRT1 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$),除 DSS 低剂量组,其他给药组的 CD31 蛋白表达水平明显升高,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),其中 IBN 组、DSS 中剂量组改善更为明显。见表 4、图 2。

表 4 DSS 对 db/db 小鼠肾组织 SIRT1、HIF-1 α 、VLDLr、CD31 蛋白的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of DSS on SIRT1, HIF-1 α , VLDLr, and CD31 protein expression in renal tissue of db/db mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SIRT1/ β -actin	HIF-1 α / β -actin	VLDLr/ β -actin	CD31/ β -actin
正常组		1.01±0.15	0.18±0.02	0.16±0.02	0.97±0.13
模型组		0.17±0.02 ¹⁾	0.98±0.13 ¹⁾	1.02±0.12 ¹⁾	0.28±0.02 ¹⁾
IBN 组	0.025	0.86±0.12 ²⁾	0.40±0.06 ²⁾	0.33±0.03 ²⁾	0.81±0.10 ²⁾
DSS 低剂量组	16.77	0.39±0.10 ^{2,3)}	0.80±0.10 ^{2,3)}	0.68±0.08 ^{2,3)}	0.41±0.08 ³⁾
DSS 中剂量组	33.54	0.78±0.12 ^{2,4)}	0.38±0.05 ^{2,4)}	0.33±0.03 ²⁾	0.80±0.13 ^{2,4)}
DSS 高剂量组	67.08	0.46±0.07 ^{2,3,5)}	0.66±0.07 ^{2,3)}	0.56±0.04 ²⁾	0.52±0.09 ^{2,3,5)}

注:与正常组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05;与 IBN 组比较³⁾P<0.05;与 DSS 低剂量组比较⁴⁾P<0.05;与 DSS 中剂量组比较⁵⁾P<0.05(表 5、表 6 同)

3.6 DSS 对 db/db 小鼠肾组织 HIF-1 α 、VLDLr mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠

HIF-1 α 、VLDLr mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$);与模型组比较,各给药组 HIF-1 α mRNA 表达明显降低

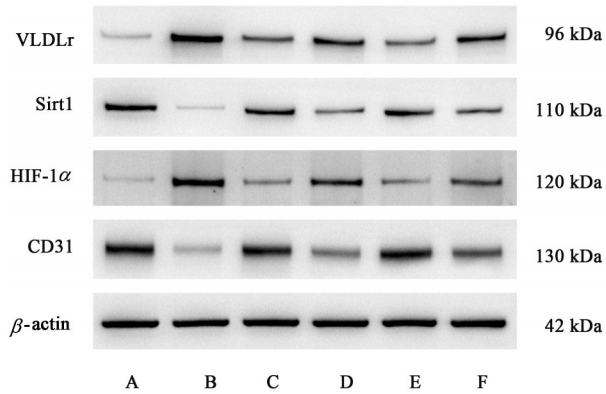


图2 各组小鼠肾组织SIRT1、HIF-1α、VLDLr、CD31蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of SIRT1, HIF-1α, VLDLr, and CD31 protein expression in renal tissue of db/db mice

($P < 0.05$), IBN组和DSS中、高剂量组VLDLr mRNA表达明显降低($P < 0.05$),其中IBN组、DSS中剂量组HIF-1α、VLDLr mRNA表达明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但二者之间差异无统计学意义。见表5。

3.7 DSS对db/db小鼠肾组织HIF-1α、Caspase-3的表达及分布的影响 免疫组化染色显示,HIF-1α在正常组小鼠肾组织中表达极低,仅背景染色。与正常组比较,模型组小鼠肾组织中HIF-1α表达明显增强($P < 0.05$),阳性信号主要分布于肾小球及肾小管上皮细胞细胞质及细胞核,给药干预后,与模型组比较,各组渗染减少,HIF-1α表达明显降低($P < 0.05$),IBN组减弱最明显($P < 0.05$)。见表6、图3。活性Caspase-3在模型组肾组织中的表达主要集中于胞质和核周,呈颗粒状或弥漫性染色。与模型组比较,各给药组阳性信号强度减弱,HIF-1α表达明

表5 DSS对db/db小鼠肾组织HIF-1α、VLDLr mRNA表达的影响 [$M(P_{25}, P_{75}), n=3$]

Table 5 Effect of DSS in HIF-1α and VLDLr mRNA expression in renal tissue of db/db mice [$M(P_{25}, P_{75}), n=3$]

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	HIF-1α	VLDLr
正常组		1.14(0.88, 1.19)	1.07(0.96, 1.08)
模型组		58.69(58.35, 61.83) ¹⁾	283.66(279.14, 290.02) ¹⁾
IBN组	0.025	4.52(3.46, 4.55) ²⁾	20.55(17.26, 24.91) ²⁾
DSS低剂量组	16.77	12.89(12.05, 14.80) ^{2,3)}	268.35(263.18, 282.37) ³⁾
DSS中剂量组	33.54	3.72(3.59, 4.12) ^{2,4)}	25.90(22.78, 28.34) ^{2,4)}
DSS高剂量组	67.08	10.79(10.50, 11.15) ^{2,3,5)}	79.23(77.53, 81.98) ^{2,3,5)}

显降低($P < 0.05$),DSS中、高剂量组减弱最明显($P < 0.05$)。见表6、图4。

表6 DSS对db/db小鼠肾组织HIF-1α、Caspase-3表达的影响 [$M(P_{25}, P_{75}), n=3$]

Table 6 Effect of DSS on expression of HIF-1α and Caspase-3 in renal tissue of db/db mice [$M(P_{25}, P_{75}), n=3$]

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	HIF-1α	Caspase-3
正常组		0.99(0.98, 1.02)	0.97(0.92, 1.06)
模型组		8.83(8.44, 9.24) ¹⁾	13.41(13.11, 13.64) ¹⁾
IBN组	0.025	0.78(0.72, 0.81) ²⁾	1.40(1.38, 1.55) ²⁾
DSS低剂量组	16.77	2.01(1.94, 2.10) ^{2,3)}	3.90(3.84, 4.05) ^{2,3)}
DSS中剂量组	33.54	1.11(1.08, 1.12) ^{2,3,4)}	0.56(0.53, 0.59) ^{2,3,4)}
DSS高剂量组	67.08	1.46(1.42, 1.50) ^{2,3,4)}	0.69(0.68, 0.73) ^{2,3,4)}

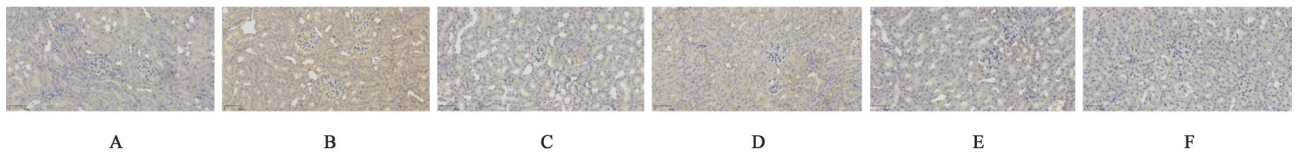


图3 DSS对db/db小鼠肾组织HIF-1α的表达及分布的影响(免疫组化,×200)

Fig. 3 Effect of DSS on expression and distribution of HIF-1α in renal tissue of db/db mice (IHC, ×200)

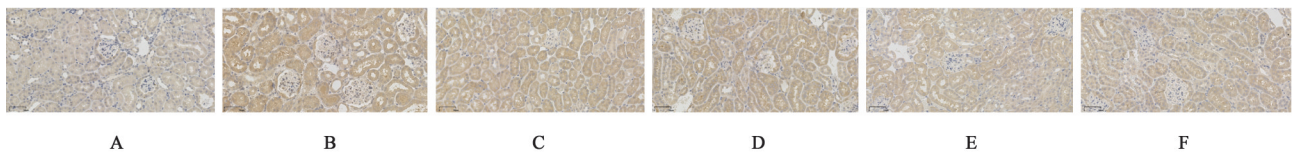


图4 DSS对db/db小鼠肾组织Caspase-3的表达及分布的影响(免疫组化,×200)

Fig. 4 Effect of DSS on expression and distribution of Caspase-3 in renal tissue of db/db mice (IHC, ×200)

4 讨论

DKD是糖尿病最常见的微血管并发症之一,以

进行性肾功能减退、蛋白尿和肾小球硬化为主要特征^[8]。DKD的发病机制涉及多因素相互作用,其中

高血糖环境是核心驱动因素。近年研究发现,脂代谢紊乱在DKD进展中扮演关键角色,表现为肾脏局部脂质异常沉积(如TC、TG等)及其衍生的脂毒性损伤^[9-11]。DKD中脂毒性肾损害的特点主要表现为脂质代谢紊乱引发的肾脏多种细胞损伤、炎症反应及纤维化进程加速。

SIRT1/HIF-1 α /VLDLr信号通路的失调被证实与DKD脂毒性密切相关,SIRT1表达下调导致HIF-1 α 乙酰化水平升高,进而激活VLDLr介导的脂蛋白摄取,加剧肾内脂质蓄积^[12-14]。此外,该通路还通过调控缺氧反应、线粒体功能及炎症因子释放,进一步放大脂代谢紊乱对肾脏的损害^[15]。本研究采用db/db小鼠作为实验对象,旨在探究经方DSS对DKD的治疗机制。该模型因瘦素受体基因突变而自发形成2型糖尿病。其病理发展过程与人类2型糖尿病高度相似,db/db小鼠通常在8~11周龄时自然进展为DKD。由于这些特征,db/db小鼠已成为DKD研究的理想动物模型。研究结果显示,DSS能够显著改善db/db小鼠的活动度,调节脂代谢异常,保护肾小球滤过屏障功能,减少尿蛋白排泄,并促进肾脏病理损伤的修复。

《糖尿病肾脏疾病中西医结合诊疗指南(2024版)》,总结本病早期、中期中医证候表现均可出现气虚血瘀^[16]。多项研究采用益气活血、利湿化浊法治疗糖尿病血管病变取得显著疗效^[17-18]。现代药理学研究表明,DSS可改善DKD病理进程,其机制可能通过调控腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、Notch、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad等多条信号通路、抑制肾小管上皮-间质转化(EMT)、减轻氧化应激与炎症反应等相关^[19-21]。其活性成分如芍药苷、阿魏酸等具有抗纤维化、调节脂代谢等多重功效^[22]。

高糖状态,SIRT1表达下调,解除其对缺氧诱导因子HIF-1 α 的抑制作用,促使HIF-1 α 核转位并激活下游靶基因,引发脂质代谢重编程^[23]。SIRT1作为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)依赖性去乙酰化酶,在肾脏生理功能中发挥多重调控作用,调节能量代谢和氧化应激途径维持肾小球及肾小管上皮细胞的稳态。通过HIF-1 α 的乙酰化水平,降低其转录活性,从而减轻高糖环境下的肾小管上皮EMT和细胞外基质沉积^[12,24-26]。本次研究中,模型组小鼠SCr、BUN、TG、LDL-C显著升高,肾功能受损的同时存在脂代谢紊乱,同时病理切片中出现典型的DKD病理学特征:Kimmelstiel-Wilson结节,并可见肾小球广泛肥

大,系膜基质大量增生,毛细血管祥扭曲、增厚,并存在大量炎症细胞浸润,这与DKD伴随脂代谢异常的既往研究相一致。通过对其机制的研究可发现,模型组小鼠肾脏组织中SIRT1蛋白表达水平显著降低,同时血管内皮标志物CD31的表达量也呈现下降趋势,提示这种变化与HIF-1 α 和VLDLr表达量的异常升高形成鲜明对比,提示肾组织存在明显的缺氧应激反应和脂质代谢异常引起的内皮细胞的损伤与凋亡,促凋亡因子Caspase-3在模型组中的过度激活,进一步证实了上述结论。经IBN及DSS干预后,上述指标均有不同程度的缓解,SIRT1、CD31蛋白表达较模型组有不同程度提升,HIF-1 α 、VLDLr蛋白及mRNA水平下降,免疫组化提示各给药组HIF-1 α 、Caspase-3表达减少,其中IBN组及DSS中剂量组改善趋势最为明显。本次研究与既往研究呈现一致性,表明DSS可能通过SIRT1/HIF-1 α /VLDLr信号通路,改善DKD小鼠脂代谢紊乱,减轻肾组织脂毒性,缓解肾小球硬化等病理损害。

综上,DSS被证实对db/db小鼠肾脏具有保护作用,可缓解肾小球硬化,可能与SIRT1/HIF-1 α /VLDLr信号通路相关,为DKD防治提供了新策略。未来可结合代谢组学分析DSS对肾脏脂质代谢谱的影响,并深入探索其与SIRT1通路的交互作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WANG G, OUYANG J, LI S, et al. The analysis of risk factors for diabetic nephropathy progression and the construction of a prognostic database for chronic kidney diseases[J]. *Transl Med*, 2019, 17(1):264.
- [2] ZHANG J, XIAO X, WU Y, et al. Prognostic nutritional index as a predictor of diabetic nephropathy progression[J]. *Nutrients*, 2022, 14(17):3634.
- [3] CHEN Y, SONG X, LUO Y, et al. Network pharmacology approach to investigate the mechanism of Danggui-Shaoyao-San against diabetic kidney disease [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2023, 2023:9208017.
- [4] XIANG J, ZHANG H, HOU X, et al. Atorvastatin restores PPAR α inhibition of lipid metabolism disorders by downregulating miR-21 expression to improve mitochondrial function and alleviate diabetic nephropathy progression [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:819787.
- [5] ZHANG Y, ZHANG Z, HUANG L, et al. Augmenter of liver regeneration knockout aggravates tubular ferroptosis and macrophage activation by regulating carnitine palmitoyltransferase-1A-induced lipid metabolism in diabetic nephropathy [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2024, 240(7):e14159.
- [6] 李睿嘉,张倩倩,李静,等. 当归芍药散对缺氧高糖诱导肾小

- 球内皮细胞脂毒性损伤的影响[J]. 中医杂志, 2025, 66(21):2249-2258.
- LI R J, ZHANG Q Q, LI J, et al. Effect of Danggui Shaoyao powder on lipotoxicity injury in hypoxia and high glucose-induced glomerular endothelial cells [J]. *Tradit Chin Med*, 2025, 66(21): 2249-2258.
- [7] 蔡炎沫,王思童,周鑫,等. 基于内质网应激探讨肾康注射液对糖尿病肾病db/db小鼠足细胞凋亡及GRP78/CHOP信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(12):81-90.
- CAI Y M, WANG S T, ZHOU X, et al. Effect of Shenkang injection on podocyte apoptosis and the GRP78/CHOP signaling pathway in db/db mice with diabetic nephropathy based on endoplasmic reticulum stress[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(12): 81-90.
- [8] CHANG J, ZHENG J, GAO X, et al. TangShenWeiNing formula prevents diabetic nephropathy by protecting podocytes through the SIRT1/HIF-1 α pathway [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 888611.
- [9] FU Y, SUN Y, WANG M, et al. Elevation of JAML promotes diabetic kidney disease by modulating podocyte lipid metabolism[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(6): 1052-1062.
- [10] JAGDALE A D, ANGAL M M, PATIL R S, et al. Exploring the glycation association with dyslipidaemia: Novel approach for diabetic nephropathy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 229: 116513.
- [11] ZHANG Y, YAO H, LI C, et al. Gandi capsule improved podocyte lipid metabolism of diabetic nephropathy mice through SIRT1/AMPK/HNF4A pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6275505.
- [12] PEYMAN M, BABIN-EBELL A, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ R, et al. SIRT1 regulates hepatic VLDLr levels [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1):297.
- [13] HU Z, ZHU Q, WANG Y, et al. Lipid nephrotoxicity mediated by Hif-1 α activation accelerates tubular injury in diabetic nephropathy[J]. *Ren Fail*, 2024, 46(1):2347446.
- [14] WANG Y, ZHOU M, ZHU Q, et al. Hif-1 α activation induces cholesterol homeostasis dysfunction to accelerate progression of diabetic nephropathy in rats[J]. *J South Med Univ*, 2023, 43(10):1782-1788.
- [15] WANG X X, EDELSTEIN M H, GAFTER U, et al. G protein-coupled bile acid receptor TGR5 activation inhibits kidney disease in obesity and diabetes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 27(5): 1362-1378.
- [16] 中华中医药学会,北京中医药大学东直门医院,北京中医药大学. 糖尿病肾脏疾病中西医结合诊疗指南[J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(4): 580-592.
- China Association of Chinese Medicine, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine. Diagnosis and treatment guideline of integrated traditional Chinese and western medicine for diabetic kidney disease[J]. *J Beijing Univ Chin Med*, 2024, 47(4): 580-592.
- [17] 胡艳红,杨静,修成奎,等. 人参-三七-川芎提取物延缓高糖诱导的小鼠血管钙化的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8):13-20.
- HU Y H, YANG J, XIU C K, et al. Mechanism of Ginseng, Notoginseng, and Chuanxiong extracts in delaying high glucose-induced vascular calcification in mice[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(8): 13-20.
- [18] 吴文静,傅强,王世东,等. 益气活血方对糖尿病肾病大鼠肾组织中糖基化终末产物、转化生长因子 β 表达的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(24):2126-2132.
- WU W J, FU Q, WANG S D, et al. Effects of Yiqi Huoxue decoction (Yiqi Huoxue fang) on the expression of advanced glycation end products and transforming growth factor- β in renal tissue of diabetic nephropathy model rats[J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 59(24): 2126-2132.
- [19] LIANG X B, NIU C L, CHEN W Y, et al. Effect of Danggui-Shaoyao-San-containing serum on the renal tubular epithelial-mesenchymal transition of diabetic nephropathy [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2020, 21(12): 1204-1212.
- [20] 夏振忠,宋恩峰. 基于NF- κ B信号通路研究当归芍药散对糖尿病肾脏疾病大鼠肾脏的保护作用及其机制[J]. 医药导报, 2024, 43(8): 1205-1211.
- XIA Z Z, SONG E F. Protective effect and mechanism of Danggui Shaoyao powder on the kidneys of diabetic nephropathy rats based on the NF- κ B signaling pathway[J]. *Drug Eval Res*, 2024, 43(8): 1205-1211.
- [21] LU J, LI X Q, CHEN P P, et al. Acetyl-CoA synthetase 2 promotes diabetic renal tubular injury in mice by rewiring fatty acid metabolism through SIRT1/ChREBP pathway [J]. *Acta Pharm Sin*, 2023, 45(2): 366-377.
- [22] 郑丰富,程丰,李伟,等. 当归芍药散药理研究及临床应用进展[J]. 中医学报, 2024, 3(5): 980-985.
- ZHENG F F, CHENG F, LI W, et al. Research progress on the pharmacological effects and clinical applications of Danggui Shaoyao powder[J]. *J Tradit Chin Med Sci*, 2024, 3(5): 980-985.
- [23] CAI T, KE Q, FANG Y, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition suppresses Hif-1 α -mediated metabolic switch from lipid oxidation to glycolysis in kidney tubule cells of diabetic mice[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 390.
- [24] SUN X H, HUANG K P, XIAO M M, et al. Connexin 43 prevents the progression of diabetic renal tubulointerstitial fibrosis by regulating the SIRT1-Hif-1 α signaling pathway [J]. *Clin Sci*, 2020, 134(13): 1573-1592.
- [25] YANG Y P, HUANG J Y, XIE L J, et al. Nicotinamide protects against diabetic kidney disease through regulation of SIRT1[J]. *Endocrine*, 2024, 85(2): 638-648.
- [26] LIU J, REN J, ZHOU L, et al. Proteomic and lipidomic analysis of the mechanism underlying astragaloside IV in mitigating ferroptosis through hypoxia-inducible factor 1 α /heme oxygenase 1 pathway in renal tubular epithelial cells in diabetic kidney disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 334: 118517.
- [责任编辑 顾雪竹]