

滋肾丸对糖尿病肾病小鼠肾小管上皮细胞焦亡及 上皮-间充质转化的影响

郭晓媛¹, 张程斐², 吴悠², 吴丽丽³, 秦玲玲⁴, 刘铜华^{3*}

(1. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 2. 北京中医药大学第二临床医学院, 北京 100078;
3. 北京中医药大学教育部中医养生学重点实验室, 北京 100029; 4. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:研究滋肾丸(ZSW)对糖尿病肾病(DN)小鼠肾小管上皮细胞焦亡及上皮-间充质转化(EMT)的作用及机制,为ZSW治疗DN提供科学依据。方法:自发性糖尿病 db/db 小鼠随机分为模型组、达格列净组($1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)及ZSW高、中、低剂量($6.0, 3.0, 1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,非糖尿病 db/m 小鼠为正常组。模型组和正常组给予等体积去离子水灌胃,其余各组使用相应药物干预12周。每2周检测尾静脉空腹血糖(FBG);每4周检测尿白蛋白/肌酐(ACR), N -乙酰 β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)和胱抑素C(CysC);给药12周后摘眼球取血,血清检测尿素氮(BUN)和肌酐(SCr);光镜及电镜观察肾组织病理学改变;免疫组化法观察分析肾小管上皮EMT标志物表达强度;原位末端标记法(TUNEL)染色观察分析肾小管上皮细胞的核损伤水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测EMT标志物、核苷酸寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体相关蛋白及焦亡相关炎症因子的蛋白表达水平。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测上述蛋白的mRNA表达水平。结果:与正常组比较,模型组FBG,BUN,血SCr及尿ACR,NAG酶,CysC显著升高,肾组织出现病理损伤,肾小管上皮细胞EMT标志物表达强度、蛋白及mRNA表达显著改变,肾小管上皮细胞TUNEL染色阳性率、肾组织焦亡相关炎症因子和NLRP3炎症小体相关蛋白及mRNA表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,ZSW及达格列净组FBG,BUN,血SCr及尿ACR,NAG酶,CysC显著降低($P<0.01$),肾组织病理损伤不同程度减轻,肾小管上皮细胞EMT标志物表达强度显著改变($P<0.01$),蛋白及mRNA表达不同程度改变($P<0.05, P<0.01$),肾小管上皮细胞TUNEL染色阳性率及肾组织焦亡相关炎症因子的蛋白及mRNA表达显著降低($P<0.01$),NLRP3炎症小体相关蛋白及mRNA表达不同程度降低($P<0.05, P<0.01$)。结论:ZSW抑制肾小管上皮细胞焦亡及EMT,可能是其治疗DN的作用机制。

[关键词] 滋肾丸;糖尿病肾病;焦亡;上皮-间充质转分化;核苷酸寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)21-0027-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212003

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210918.0606.001.html>

[网络出版日期] 2021-09-22 17:20

Effect of Zishenwan on Pyroptosis and Epithelial-Mesenchymal Transition of Renal Tubular Epithelial Cells in Diabetic Nephropathy Mice

GUO Xiao-yuan¹, ZHANG Cheng-fei², WU You², WU Li-li³, QIN Ling-ling⁴, LIU Tong-hua^{3*}

(1. Dongfang Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

2. Second Clinical Medical College Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

3. Key Laboratory of Health Cultivation of the Ministry of Education,
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

4. Technology Department, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the efficacy and mechanism of Zishenwan (ZSW) against pyroptosis

[收稿日期] 20210611(001)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药防治慢性病国际合作项目(GZYYGJ2019034)

[第一作者] 郭晓媛, 硕士, 主治医师, 从事肾脏病中医疗效及机制研究, Tel: 010-67689739, E-mail: jackieg@sina.com

[通信作者] * 刘铜华, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事内分泌代谢疾病的中医药防治研究, Tel: 010-64286426, E-mail: thliu@vip.163.com

and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy (DN) mice, so as to provide evidence for the treatment of DN with ZSW. **Method:** The *db/db* mice with spontaneous diabetes were randomly divided into the model group, dapagliflozin ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and high-, medium-, and low-dose ($6.0, 3.0, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) ZSW groups. The non-diabetic *db/m* mice were classified into the normal group. The ones in the model and normal groups were given an equal volume of deionized water by gavage, while those in the other groups were intervened with the corresponding drugs for 12 weeks. The fasting blood glucose (FBG) level was tested at tail vein once every two weeks. The levels of urine albumin-creatinine ratio (ACR), β -N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG), and cystatin C (CysC) were detected once every four weeks. After 12 weeks of administration, the blood sampled from eyeballs was used for measuring the blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr). The pathological changes in renal tissues were observed by light microscopy and transmission electron microscopy. The expression of EMT markers in the renal tubular epithelium was analyzed by immunohistochemistry (IHC). The in situ terminal end-labeling (TUNEL) staining was conducted to analyze the nuclear damage of renal tubular epithelial cells. The protein and mRNA expression levels of EMT markers, nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome and pyroptosis-related inflammatory cytokines in renal tissues were separately assayed by Western blot and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the normal group, the model group displayed significantly increased FBG, BUN, serum SCr, ACR, NAG, and CysC ($P < 0.01$), impaired renal tissues, altered EMT marker expression intensities and levels ($P < 0.01$), and elevated TUNEL-positive rate and protein and mRNA expression levels of pyroptosis-related inflammatory cytokines and NLRP3 inflammasome ($P < 0.01$). Compared with the model group, ZSW and dapagliflozin significantly decreased the levels of FBG, BUN, serum SCr, ACR, NAG, and CysC ($P < 0.01$), relieved the pathological injuries in renal tissues, changed the EMT marker expression intensities ($P < 0.01$) and protein and mRNA expression levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and down-regulated the TUNEL-positive rate ($P < 0.01$) of renal tubular epithelial cells as well as the protein and mRNA expression levels of pyroptosis-related inflammatory cytokines ($P < 0.01$) and NLRP3 inflammasome ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** ZSW alleviates DN possibly by inhibiting pyroptosis and EMT in renal tubular epithelial cells.

[Keywords] Zishenwan (ZSW); diabetic nephropathy (DN); pyroptosis; epithelial-mesenchymal transition (EMT); nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome

糖尿病肾病(DN)是目前我国慢性肾脏病(CKD)住院患者的最主要病因^[1],发病率持续攀升^[2],较其他类型肾脏病更早进入替代治疗阶段,是增加糖尿病患者死亡风险的重要因素。DN早期的治疗方法较为局限。尽管循证研究证实了新型降糖药物的肾脏保护作用^[3],其长期预后及安全性尚待进一步考察,药物不良反应也有所报道^[4]。炎症反应是目前DN发病机制及防治机制研究的重点领域,贯穿DN全程^[5],肾小管上皮细胞的上皮-间充质转化(EMT)与炎症反应密切相关,在DN早期进展过程中起到关键作用^[6]。焦亡(pyroptosis)是一种具有炎症反应特点的细胞程序性死亡,以核苷酸寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体活化、炎症因子释放及细胞结构损伤为主要形式,与DN的发生发展密切相关^[7]。已有研究证实通过抑制半

胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)依赖性焦亡可抑制肾恶性肿瘤细胞的EMT^[8],抑制NLRP3炎症小体活化可抑制高渗葡萄糖诱导的人近端肾小管上皮细胞EMT^[9],从一定程度上反映了焦亡相关生物学过程与EMT的密切联系。

中医药对DN疗效确切,近年来研究表明中医药能干预DN炎症反应,通过抑制EMT等多种机制发挥治疗作用^[10]。滋肾丸(ZSW)由金元时期著名医家李杲创制,记载于其著作《兰室秘藏》,由黄柏、知母、肉桂组成^[11]。近代名医施今墨以药对形式将其应用于糖尿病之“下消”,证见小便混浊、如膏如脂者^[12]。临床观察发现以该方为主联合缬沙坦胶囊口服显著降低早期DN患者24h尿蛋白定量、尿微量白蛋白,提高血浆白蛋白水平,总有效率明显优于单用缬沙坦胶囊患者^[13]。实验研究证实该方

能显著降低 *db/db* 小鼠的空腹血糖和糖化血红蛋白水平,提高糖耐量^[14],能抑制肾盂肾炎大鼠肾脏及尿路组织 Toll 样受体和核转录因子- κ B(NF- κ B)的表达,降低炎症因子白细胞介素(IL)-4, IL-6 和 IL-10 的水平,证实 ZSW 具有明确的抗炎反应作用^[15]。然而, ZSW 对早期 DN 的作用机制尚不明确。本实验以自发性糖尿病 *db/db* 小鼠作为 DN 模型,在药效学及组织病理学评价基础上,观察 ZSW 对肾小管上皮细胞焦亡及 EMT 的影响,探讨 ZSW 治疗 DN 的作用及机制,为中医药防治 DN 提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 C57BLKS/J-*lepr^{db}/lepr^{db}* (*db/db*) 小鼠 50 只,6 周龄,体质量 28~32 g;非糖尿病雄性同窝 C57BLKS/J-*lepr^{db/+}* (*db/m*) 小鼠 10 只,体质量 18~22 g,均购于南京大学模式动物研究所,合格证号 SCXK(苏)2018-0008,饲养于北京中医药大学东方医院实验中心标准化洁净动物房(温度 22~25 °C,相对湿度 50%~60%,昼夜各半),普通饲料喂养,自由饮水。本研究经北京中医药大学东方医院实验动物伦理委员会批准(DF202039),实验过程符合动物伦理相关指导原则。

1.2 药物 ZSW 乙醇提取物:参考既往文献[14, 16],按 20:20:3 比例称取黄柏、知母、肉桂(北京中医药大学东方医院草药房,批号分别为 19092802, 18102005, 19061905,经北京中医药大学东方医院曹俊岭教授鉴定)。黄柏与知母混合,8 倍量 50% 乙醇浸泡 30 min,回流提取 1 h 共 2 次,获得提取液。滤渣中加入肉桂,8 倍量的 50% 乙醇回流提取 1 h 共 2 次,获得提取液。合并 4 次滤液,旋转蒸发器浓缩至浸膏,冷冻减压干燥获得冻干粉,计算制备率为 11%;达格列净片(阿斯利康制药有限公司,批号 J20170040)。

1.3 试剂 尿微量白蛋白试剂盒(上海丹施生物科技有限公司,批号 F15072-A);尿肌酐试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号 JL20488);N-乙酰 β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)试剂盒,胱抑素 C(CysC)试剂盒(美国 Elabscience 公司,批号分别为 E-EL-M0812c, E-EL-M3024);原位末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号 KGA7053);苏木素,水溶性伊红(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 150916, 150917);4% 多聚甲醛,糖原过碘酸-雪夫(PAS)染液,2.5% 戊二醛固定液,BCA 蛋白浓度测定试剂盒,

ECL 超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20151211, G1280, P1126, PC0020, PE0010);0.45 μ m PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号 IPVH00010);RIPA 裂解液(上海 Beyotime 公司,批号 P0013B);细胞凋亡相关斑点样蛋白(ASC)抗体(美国 CST 公司,批号 67824s); α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体, E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体, NLRP3 抗体, Caspase-1 抗体, IL-1 β 抗体, IL-18 抗体,山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 抗体,山羊抗鼠 IgG 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab5694, ab76055, ab214185, ab138483, ab9722, ab71495, ab6721, ab6789);剪切 IL-1 β (cleaved IL-1 β)抗体(美国 Affinity 公司,批号 AF4006);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(上海易汇生物科技有限公司,批号 0037);TRIzol, SuperScript III RT 逆转录试剂盒, Sybr 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) mix 试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号分别为 10296028, 11752050, 4472920);动物组织总 RNA 提取试剂盒, TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号分别为 DP431, KR104]。

1.4 仪器 R-215 型旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司);DLSB Series 型低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司);3K15 型台式高速离心机(德国 Sigma 公司);ALPHA1-2LD 型冷冻干燥机(德国 Christ 公司);GT-1941 型快速血糖仪[爱科来国际贸易(上海)有限公司];DXL-XS 型小鼠代谢笼(苏州市冯氏智能科技有限公司);XR220 Plus 型全自动生化分析仪(广东新锐科技有限公司);IX71 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Tecnai G2 Spirit 型透射电子显微镜(美国 FEI 公司);PROTEAN165-8000 型小型垂直电泳仪, ChemiDoc XRS2500 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);Step One Software 型 Real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 分组给药 适应性喂养 2 周后, *db/db* 小鼠 50 只按体质量随机分为模型组,达格列净组, ZSW 高、中、低剂量组,每组 10 只。 *db/m* 小鼠 10 只为正常组。根据文献[17],按人和小鼠体质量比例 1:12.33 换算得出等效剂量为 ZSW 中剂量(3.0 g·kg⁻¹),高剂量为中剂量的 2 倍(6.0 g·kg⁻¹),低剂量为中剂量 0.5 倍(1.5 g·kg⁻¹), ZSW 各剂量组每日给予相应剂量 ZSW 乙醇提取物去离子水溶液灌胃;达格列净组给予达格列净(1.0 mg·kg⁻¹)去离子

水溶液灌胃;正常组和模型组各组给予等体积去离子水灌胃。每周根据体质量调整给药剂量,每日1次,连续12周。

2.2 标本采取 各组小鼠每2周采取尾静脉血以检测空腹血糖(FBG);每4周于代谢笼中收集尿液以检测尿白蛋白、尿肌酐及肾小管早期损伤指标;给药12周结束时摘取眼球取血以检测生化指标;取血结束后剖取肾脏,生理盐水冲净,冰上剥去包膜纵切,保留皮、髓质,制备切片用肾组织分别固定于4%多聚甲醛和2.5%戊二醛4℃,分子指标检测用肾组织入液氮后转至-80℃冰箱保存。

2.3 指标检测

2.3.1 血液指标检测 快速血糖仪测定尾静脉血FBG;眼球取血经1 000 r·min⁻¹(离心半径12 cm),4℃离心10 min,分离血清,全自动生化分析仪测定尿素氮(BUN)和血肌酐(SCr)。

2.3.2 尿液指标检测 尿液按试剂盒说明书测定NAG酶,CysC,尿白蛋白及尿肌酐,计算得出尿白蛋白/肌酐(ACR)。

2.3.3 病理学观察肾组织病理变化 固定于4%多聚甲醛的肾组织制备石蜡切片,分别予苏木素-伊红(HE),PAS染色后光镜观察;固定于2.5%戊二醛的肾组织制备超薄切片,透射电镜观察。

2.3.4 免疫组织化学(IHC)染色肾小管上皮EMT标志物分布情况 石蜡切片常规脱蜡至水,滴加3% H₂O₂室温孵育,滴加山羊血清室温封闭,滴加一抗(α-SMA 1:4 000, E-cadherin 1:1 000)4℃过夜。滴加二抗(1:1 000)室温孵育。滴加DAB室温显色,苏木素复染,光镜下观察、拍照。胞浆或胞膜出现棕染颗粒为阳性。计算IHC染色阳性率(%)=IHC染色阳性细胞数/细胞总数×100%。

2.3.5 TUNEL染色观察肾小管上皮细胞焦亡情况

按说明书配制工作液。石蜡切片常规脱蜡至水,滴加Protein K工作液,37℃,30 min,滴加3% H₂O₂室温封闭,滴加DNase I反应液,37℃,20 min,滴加TdT酶反应液,37℃湿盒内避光1 h,滴加Streptavidin-FITC标记工作液,37℃湿盒内避光30 min,滴加POD-conjugated Anti-FITC工作液,37℃湿盒内避光30 min,滴加DAB室温显色,苏木素复染,光镜下观察、拍照。细胞核显棕色为阳性。计算TUNEL染色阳性率(%)=TUNEL染色阳性细胞数/细胞总数×100%。

2.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾组织相关蛋白表达 冻存于-80℃的肾组织加RIPA冰

上裂解,12 000 r·min⁻¹(离心半径7cm),4℃离心20 min,取上清液。BCA蛋白定量试剂盒测定调整组间蛋白浓度。样品与5×上样缓冲液混合,100℃,5 min,100 μg/孔上样。配制12%分离胶,加入5%浓缩胶,100 V/100 mA,4℃转膜。5%脱脂奶粉-TBST室温封闭2 h。一抗(α-SMA 1:100; E-cadherin, NLRP3, Caspase-1, IL-1β, cleaved IL-1β, IL-18 1:500, ASC 1:1 000, GAPDH 1:5 000)孵育液4℃过夜。TBST洗膜,二抗(1:1 000)孵育液37℃,2 h。TBST洗膜,滴加ECL,胶片曝光,显影,定影,扫描图片,分析灰度,蛋白相对表达量=目标蛋白灰度值/GAPDH灰度值。

2.3.7 Real-time PCR检测肾组织mRNA表达的影响 冻存于-80℃的肾组织加TRIzol液提取总RNA,以β-肌动蛋白(β-actin)为内参,由北京迈德康纳生物技术有限公司根据美国国家生物信息中心(NCBI)Primer-BLAST设计并合成引物,见表1,逆转录合成cDNA,建立Real-time PCR反应体系于Real-time PCR仪按条件进行PCR扩增,95℃预变性5 min,95℃变性10 s,40循环;58℃退火20 s,40循环;72℃延伸20 s,40循环。通过循环阈值(C_t)计算2^{-ΔΔC_t},计算mRNA相对表达量。

2.4 统计学分析 采用SPSS 22.0进行统计分析,所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),如方差相等进行最小显著性差异法(LSD)检验。如方差不等进行Dunnett's T3检验,以P<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对DN小鼠血糖的影响 与正常组小鼠比较,模型组小鼠8周龄时FBG显著升高(P<0.01)。给药4周后,与模型组比较,达格列净组及ZSW各剂量组FBG有所降低(P<0.05)。给药6周及后续各时间点,与模型组比较,达格列净组及ZSW各剂量组FBG显著降低(P<0.01)。见表2。

3.2 对DN小鼠尿ACR和肾功能的影响 与正常组小鼠比较,模型组小鼠8周龄时尿ACR显著升高(P<0.01);给药4周及后续各时间点,与模型组比较,达格列净组及ZSW各剂量组尿ACR均显著降低(P<0.01)。与正常组比较,模型组BUN和SCr显著升高(P<0.01);给药12周后,与模型组比较,达格列净组及ZSW各剂量组BUN和SCr显著降低(P<0.01)。见表3。

3.3 对DN小鼠肾小管早期损伤指标的影响 与正

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTC	91
α -SMA	GGAAAAGATCTGGCACCCTC	TTTCTCCCGTTGGCCTT	109
E-cadherin	TCCTCTATTCTCATGCCGTGT	GTAAACTCTGGCCTGTTGTCA	103
NLRP3	TGTGCTCAAAAACCAACCAGA	GGCTGCAGTTGTCTAATTCCA	140
ASC	GCAGAACCCAATGATAGAGC	TTTCTTGCATATTCGAGT	138
Caspase-1	AAGGTGATCATTATTCAGGC	GCATCCGTTAAGAAATCCTC	98
IL-1 β	GTGAAATGCCACCTTTTGACA	GATTGAAGCTGGATGCTCT	128
IL-18	ATACGGAATATAAATGACCAAG	ATATCAGTCATATCCTCGAAC	71

表2 ZSW对DN小鼠不同时间节点FGB的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of ZSW on FBG in DN mice at different time points ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0周	2周	4周	6周	8周	10周	12周
正常		6.50±0.36	6.43±0.21	6.16±0.35	6.20±0.20	6.10±0.26	5.90±0.40	5.77±0.67
模型		29.03±3.56 ¹⁾	29.63±0.45 ¹⁾	32.63±1.24 ¹⁾	29.27±0.50 ¹⁾	28.97±0.47 ¹⁾	29.27±0.06 ¹⁾	29.97±0.49 ¹⁾
达格列净	0.001	29.80±1.97 ¹⁾	29.13±0.83	27.40±1.06 ²⁾	24.53±0.42 ³⁾	21.30±1.15 ³⁾	18.00±0.20 ³⁾	15.50±0.30 ³⁾
ZSW	6.0	28.37±3.89	27.83±4.30	26.40±0.40 ²⁾	24.07±0.31 ³⁾	21.10±0.89 ³⁾	18.17±0.15 ³⁾	15.83±0.15 ³⁾
	3.0	28.70±1.25	28.00±1.37	26.53±0.31 ²⁾	24.17±0.25 ³⁾	22.53±0.31 ³⁾	21.00±0.20 ³⁾	17.80±0.20 ³⁾
	1.5	30.20±1.68	29.00±0.85	27.80±0.20 ²⁾	26.20±0.40 ³⁾	24.73±0.31 ³⁾	22.20±0.20 ³⁾	18.60±0.40 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01。

表3 ZSW对DN小鼠尿ACR和肾功能的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of ZSW on levels of urine ACR and renal function in DN mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	尿ACR/mg·g ⁻¹				肾功能	
		0周	4周	8周	12周	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/ μ mol·L ⁻¹
正常		45.60±2.42	45.57±1.78	45.62±1.50	45.60±2.07	6.32±0.13	23.61±1.61
模型		365.54±12.06 ¹⁾	367.69±10.29 ¹⁾	372.78±6.05 ¹⁾	371.57±5.24 ¹⁾	9.99±0.30 ¹⁾	37.46±1.57 ¹⁾
达格列净	0.001	365.12±11.00	257.94±7.65 ²⁾	147.27±5.00 ²⁾	51.18±1.53 ²⁾	6.50±0.23 ²⁾	24.66±1.48 ²⁾
ZSW	6.0	368.44±10.67	254.89±5.93 ²⁾	143.95±3.25 ²⁾	50.22±1.18 ²⁾	6.46±0.19 ²⁾	24.36±1.93 ²⁾
	3.0	366.49±6.30	285.43±5.59 ²⁾	185.84±2.34 ²⁾	81.74±5.13 ²⁾	7.71±0.28 ²⁾	29.55±0.97 ²⁾
	1.5	368.02±9.14	308.92±1.53 ²⁾	209.38±2.27 ²⁾	108.45±6.63 ²⁾	8.42±0.26 ²⁾	31.83±1.30 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01。

常组小鼠比较,模型组小鼠8周龄时尿NAG、尿CysC均显著升高(P<0.01);给药4周及后续各时间点,与模型组比较,达格列净组及ZSW各剂量组尿NAG,尿CysC均显著降低(P<0.01)。见表4。

3.4 对DN小鼠肾组织病理学的影响 正常组光镜下HE染色示肾小球结构清晰,大小正常,肾小管上皮细胞排列规则有序,PAS染色未见明显紫红色糖原沉积,电镜下肾小球基底膜均匀无增厚;模型组光镜下HE染色示肾小球体积明显增大,部分肾小管上皮细胞空泡变性,PAS染色示部分肾小球系膜内可见紫红色糖原明显沉积,电镜下肾小球基底膜

弥漫不均增厚,系膜基质增生,如图中黄色箭头所示;给药12周后,与模型组比较,达格列净组及ZSW各剂量组光镜下HE染色示肾小球体积增大和肾小管空泡变性程度均有所减轻,PAS染色示肾小球系膜内紫红色糖原沉积不同程度减少,电镜下肾小球基底膜增厚程度有所减轻。见图1。

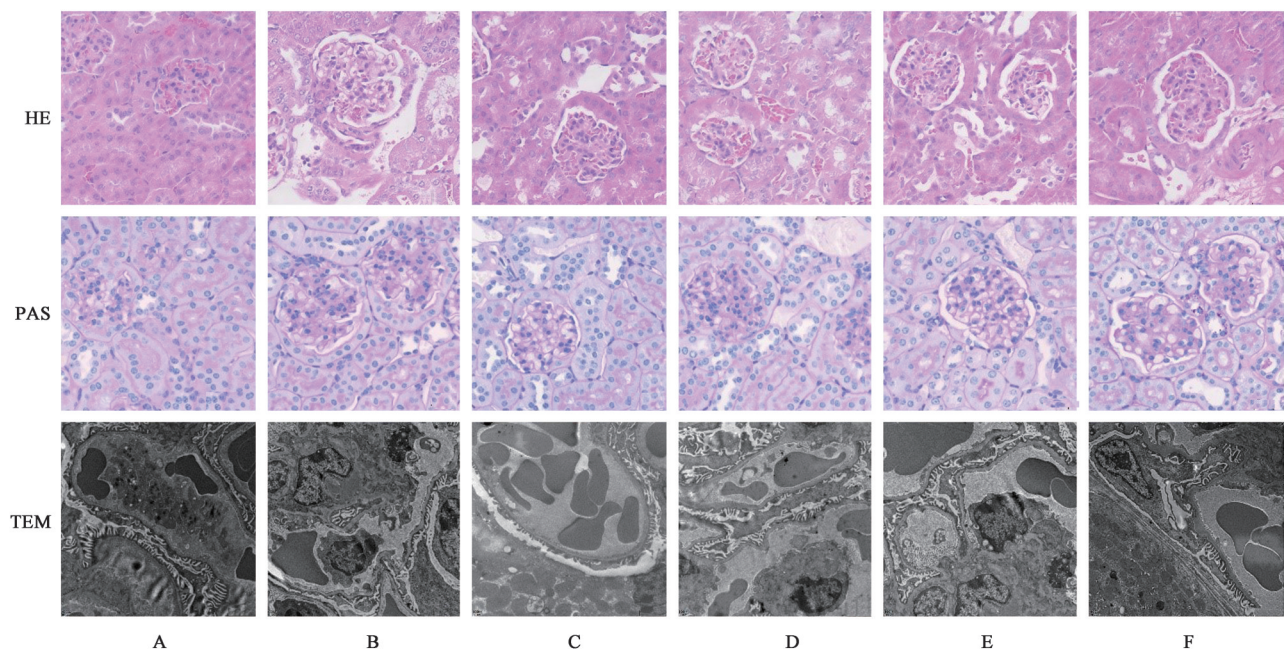
3.5 对DN小鼠肾小管上皮EMT标志物分布与表达的影响 与正常组比较,模型组肾小管上皮细胞 α -SMA棕染颗粒明显增多,阳性染色率显著升高(P<0.01),肾组织内蛋白及mRNA表达均显著增加(P<0.01);E-cadherin棕染颗粒明显减少,阳性染色

表4 ZSW对DN小鼠尿NAG酶和尿CysC的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of ZSW on levels of urine NAGase and urine CysC in DN mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	尿NAG/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$				尿CysC/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$			
		0周	4周	8周	12周	0周	4周	8周	12周
正常		45.60±2.42	45.57±1.78	45.62±1.50	45.60±2.07	253.08±3.51	253.54±5.01	254.88±3.53	253.88±3.91
模型		365.54±12.06 ¹⁾	367.69±10.29 ¹⁾	372.78±6.05 ¹⁾	371.57±5.24 ¹⁾	427.65±4.45 ²⁾	427.81±4.83 ²⁾	427.92±3.52 ²⁾	427.62±4.02 ²⁾
达格列净	0.001	365.12±11.00	257.94±7.65	147.27±5.00	51.18±1.53	429.38±4.28	347.96±7.67 ³⁾	292.48±6.34 ³⁾	258.08±8.06 ³⁾
ZSW	6.0	368.44±10.67	254.89±5.93	143.95±3.25	50.22±1.18	427.04±5.30	350.23±2.82 ³⁾	293.72±2.03 ³⁾	260.58±3.69 ³⁾
	3.0	366.49±6.30	285.43±5.59	185.84±2.34	81.74±5.13	426.15±4.00	399.35±3.28 ³⁾	353.24±5.81 ³⁾	292.80±3.64 ³⁾
	1.5	368.02±9.14	308.92±1.53	209.38±2.27	108.45±6.63	428.11±2.95	404.81±3.08 ³⁾	377.72±5.18 ³⁾	325.12±3.11 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.01$ 。



A. 正常组;B. 模型组;C. 达格列净组;D. ZSW高剂量组;E. ZSW中剂量组;F. ZSW低剂量组(图2~6同)

图1 ZSW对DN小鼠肾组织病理学变化的影响(HE和PAS,×400;透射电镜,×6000)

Fig. 1 Effect of ZSW on renal histological changes of DN mice by light microscope (HE and PAS, ×400; TEM, ×6000)

率显著降低($P<0.01$),肾组织内蛋白及mRNA表达显著减少($P<0.01$)。给药12周后,与模型组比较,达格列净组及ZSW各剂量组肾小管上皮细胞 α -SMA棕染颗粒明显减少,阳性染色率显著降低($P<0.01$),肾组织内蛋白表达显著减少($P<0.01$),达格列净组及ZSW高、中剂量组 α -SMA mRNA表达水平显著降低($P<0.01$);达格列净组及ZSW各剂量组肾小管上皮细胞E-cadherin棕染颗粒明显增加,阳性染色率显著升高($P<0.01$),ZSW高、中剂量组肾组织内蛋白表达显著增加($P<0.01$),ZSW低剂量组蛋白表达有所增加($P<0.05$);达格列净组mRNA表达显著增加($P<0.01$),ZSW高剂量组mRNA表达水平有所增加($P<0.05$)。见图2,3,表5。

3.6 对DN小鼠肾小管上皮细胞焦亡的影响 与正

常组比较,模型组肾小管上皮细胞棕染细胞核数量增加,TUNEL染色阳性率显著升高($P<0.01$),肾组织IL-1 β ,cleaved IL-1 β ,IL-18蛋白及mRNA表达显著增加($P<0.01$)。给药12周后,与模型组比较,达格列净组及ZSW各剂量组肾小管上皮细胞棕染细胞核数量不同程度减少,TUNEL染色阳性率显著降低($P<0.01$),肾组织IL-1 β ,cleaved IL-1 β ,IL-18蛋白表达IL-18 mRNA及显著减少($P<0.01$),达格列净组及ZSW高、中剂量组IL-1 β mRNA表达水平显著降低($P<0.01$),ZSW低剂量组mRNA表达水平有所降低($P<0.05$)。见表6,图4,5。

3.7 对DN小鼠肾组织NLRP3炎症小体表达的影响

与正常组比较,模型组NLRP3,ASC和Caspase-1的蛋白及mRNA表达显著增加($P<0.01$)。

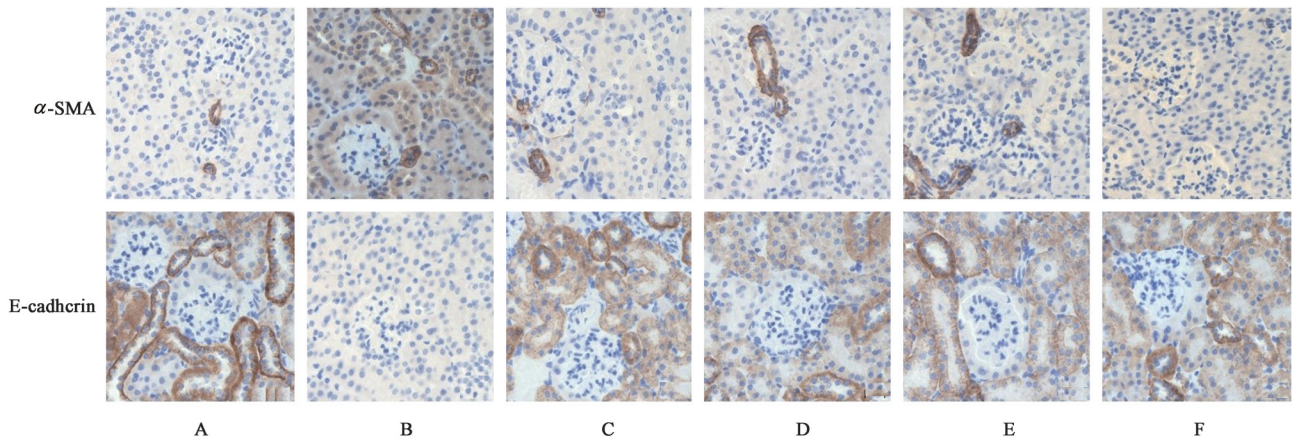


图2 ZSW对DN小鼠肾小管上皮细胞EMT标志物分布及表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 2 Effect of ZSW on distribution and expression of EMT markers in renal tubular cells of DN mice (IHC, ×400)

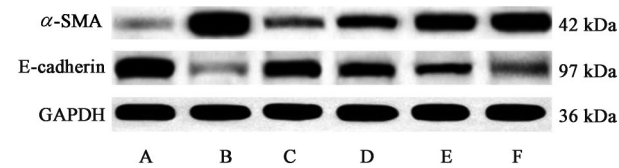


图3 各组小鼠肾组织EMT标志物蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression levels of EMT markers in renal tissues of each group mice

高、中剂量组 NLRP3 的蛋白及 mRNA 表达显著减少 ($P < 0.01$), ZSW 低剂量组 NLRP3 的蛋白表达有所减少 ($P < 0.05$), mRNA 表达显著减少 ($P < 0.01$); 达格列净组及 ZSW 各剂量组 ASC 的蛋白及 mRNA 表达显著减少 ($P < 0.01$); 达格列净组及 ZSW 高剂量组 Caspase-1 的蛋白及 mRNA 表达显著减少 ($P < 0.01$), ZSW 中、低剂量组 Caspase-1 的蛋白表达明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 6, 表 7。

给药 12 周后, 与模型组比较, 达格列净组及 ZSW

表 5 ZSW 对 DN 小鼠肾小管上皮细胞 EMT 标志物 IHC 阳性染色率及肾组织 EMT 标志物蛋白及 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effect of ZSW on IHC positive rate in renal tubular, protein, and mRNA expression levels of EMT markers in renal tissues of DN mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IHC 阳性染色率/%		蛋白相对表达量		mRNA 相对表达量	
		α -SMA	E-cadherin	α -SMA/GAPDH	E-cadherin/GAPDH	α -SMA	E-cadherin
正常		0.23±0.11	11.69±0.23	0.34±0.35	0.94±0.06	1.03±0.27	1.56±0.58
模型		3.61±0.13 ²⁾	2.85±0.59 ²⁾	1.00±0.08 ²⁾	0.33±0.04 ²⁾	13.56±4.40 ²⁾	0.51±0.08 ²⁾
达格列净	0.001	0.67±0.06 ⁴⁾	9.16±0.15 ⁴⁾	0.43±0.05 ⁴⁾	0.84±0.04 ⁴⁾	2.62±0.28 ⁴⁾	1.58±0.18 ⁴⁾
ZSW	6.0	1.20±0.01 ⁴⁾	7.15±0.28 ⁴⁾	0.56±0.08 ⁴⁾	0.66±0.06 ⁴⁾	4.17±1.05 ⁴⁾	1.15±0.11 ³⁾
	3.0	1.78±0.23 ⁴⁾	6.16±0.29 ⁴⁾	0.68±0.06 ⁴⁾	0.57±0.06 ⁴⁾	6.90±1.50 ⁴⁾	0.85±0.11
	1.5	2.80±0.19 ⁴⁾	4.93±0.18 ⁴⁾	0.81±0.04 ⁴⁾	0.43±0.03 ³⁾	10.06±3.61	0.60±0.24

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 6, 7 同)。

表 6 ZSW 对 DN 小鼠肾小管上皮细胞核 TUNEL 阳性染色率、肾组织焦亡相关炎症因子蛋白及 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of ZSW on TUNEL positive rate of renal tubular nucleus, protein and mRNA expression levels of pyroptosis-related inflammatory cytokines in renal tissues of DN mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TUNEL 染色 阳性率/%	蛋白相对表达量			mRNA 相对表达量	
			IL-1 β /GAPDH	cleaved IL-1 β /GAPDH	IL-18/GAPDH	IL-1 β	IL-18
正常		1.88±1.03	0.34±0.03	0.31±0.04	0.22±0.03	0.76±0.22	1.45±0.90
模型		28.20±2.10 ²⁾	0.96±0.04 ²⁾	0.94±0.03 ²⁾	0.93±0.04 ²⁾	13.13±2.29 ²⁾	17.18±4.45 ²⁾
达格列净	0.001	5.40±1.97 ⁴⁾	0.47±0.05 ⁴⁾	0.38±0.04 ⁴⁾	0.40±0.03 ⁴⁾	1.88±0.58 ⁴⁾	4.21±0.37 ⁴⁾
ZSW	6.0	8.96±0.78 ⁴⁾	0.56±0.03 ⁴⁾	0.56±0.06 ⁴⁾	0.56±0.07 ⁴⁾	1.67±0.46 ⁴⁾	3.85±1.05 ⁴⁾
	3.0	11.28±1.55 ⁴⁾	0.66±0.05 ⁴⁾	0.70±0.04 ⁴⁾	0.67±0.02 ⁴⁾	4.97±0.38 ⁴⁾	6.76±0.82 ⁴⁾
	1.5	14.21±0.95 ⁴⁾	0.77±0.08 ⁴⁾	0.81±0.24 ⁴⁾	0.81±0.01 ⁴⁾	9.12±1.43 ³⁾	9.50±2.85 ⁴⁾

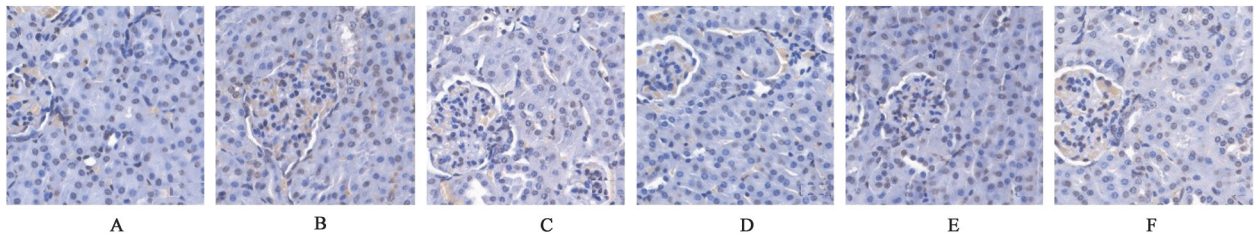


图4 ZSW对DN小鼠肾小管上皮细胞核损伤的影响(TUENL,×400)

Fig. 4 Effect of ZSW on renal tubular nucleus injuries of DN mice (TUENL,×400)

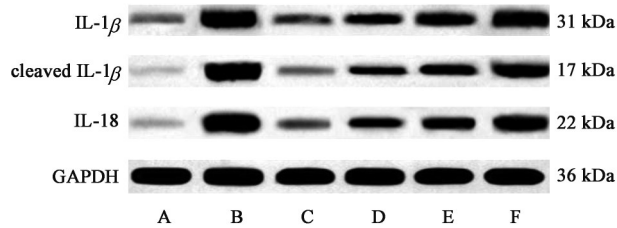


图5 各组小鼠肾组织焦亡相关炎症因子蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of protein expression levels of pyroptosis-related inflammatory cytokines in renal tissues of each group mice

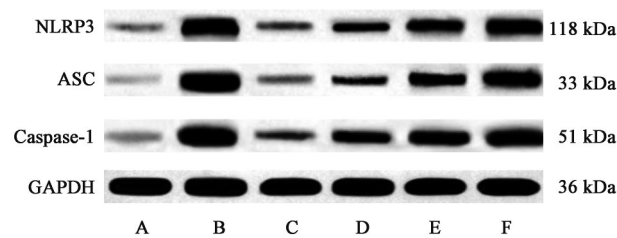


图6 各组小鼠肾组织NLRP3炎症小体蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of protein expression levels of NLRP3 inflammasome in renal tissues of each group mice

4 讨论

DN的发病机制复杂,炎症反应是公认的主要机制之一,在DN早期即发挥着重要作用。葡萄糖代谢紊乱是导致氧化应激、诱发炎症反应的主要因素^[5]。*db/db*小鼠是最早于C57BLKS/J品系中发现的瘦素受体基因突变小鼠,属自发性DM模型^[18]。ZSW显著降低*db/db*小鼠FBG水平,证实了ZSW具有改善糖代谢的作用,与既往实验研究结果一

致^[14]。*db/db*小鼠较好地模拟了人类早期DN的病理特点,因此广泛用于DN早期机制及疗效研究^[19]。本研究中*db/db*小鼠8周龄时尿ACR显著升高,20周龄时肾功能下降,肾小球体积增大,基底膜增厚,系膜基质增生,肾小管上皮细胞空泡变性,间质少量炎性细胞浸润,与既往文献相符^[21]。ZSW显著降低*db/db*小鼠尿ACR,血SCr及BUN,不同程度减轻肾组织病理改变,提示ZSW减少DN蛋白尿,改善肾小球滤过功能,减轻肾损伤。

肾小管损伤是慢性肾脏病进展的重要因素^[20-21]。已有研究证实,在DN进程中,肾小管病变和肾间质纤维化的程度较肾小球损伤的程度与肾功能进展的关系更为密切^[22]。本研究发现ZSW显著降低*db/db*小鼠尿液NAG,NGAL和CysC水平,提示ZSW减轻DN早期肾小管损伤。作为肾小管间质纤维化的重要机制,肾小管上皮细胞的EMT是早期DN最重要的启动子之一,也是DN肾单位丢失的关键因素^[6]。肾小管上皮细胞发生EMT时,以 α -SMA为代表的间充质表型标志物和以E-cadherin为代表的上皮表型标志物表达异常。 α -SMA是肌成纤维细胞的标志蛋白,肌成纤维细胞分泌的胶原蛋白是ECM的重要来源^[23],在EMT时表达增加,导致ECM蛋白沉积增多;E-cadherin具有维持上皮细胞形态及黏附功能的作用^[24],在EMT时表达减少,导致上皮细胞黏附性消失。ZSW有效下调*db/db*小鼠肾小管上皮细胞 α -SMA,上调E-cadherin的蛋白

表7 ZSW对DN小鼠肾组织NLRP3炎症小体蛋白及mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of ZSW on protein and mRNA expression levels of NLRP3 inflammasome in renal tissues of DN mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	蛋白相对表达量			mRNA相对表达量		
		NLRP3/GAPDH	ASC/GAPDH	Caspase-1/GAPDH	NLRP3	ASC	Caspase-1
正常		0.25±0.02	0.23±0.01	0.34±0.10	0.93±0.02	1.06±0.34	1.22±0.09
模型		0.96±0.04 ²⁾	0.96±0.02 ²⁾	0.95±0.04 ²⁾	8.38±2.23 ²⁾	11.76±1.70 ²⁾	7.36±0.64 ²⁾
达格列净	0.001	0.40±0.07 ^{2,4)}	0.38±0.03 ⁴⁾	0.44±0.07 ⁴⁾	1.27±0.03 ⁴⁾	1.54±0.60 ⁴⁾	3.94±1.06 ⁴⁾
ZSW	6.0	0.57±0.04 ⁴⁾	0.45±0.04 ⁴⁾	0.59±0.04 ⁴⁾	1.26±0.26 ⁴⁾	1.82±0.36 ⁴⁾	2.06±0.80 ⁴⁾
	3.0	0.72±0.05 ⁴⁾	0.68±0.07 ⁴⁾	0.72±0.04 ⁴⁾	3.59±0.32 ⁴⁾	2.77±0.58 ⁴⁾	6.66±2.36
	1.5	0.88±0.02 ³⁾	0.86±0.05 ⁴⁾	0.81±0.02 ³⁾	5.10±1.60 ⁴⁾	7.48±1.15 ⁴⁾	7.80±1.13

及mRNA表达,提示ZSW抑制DN肾小管上皮细胞EMT。

EMT的发生与炎症反应密切相关^[25]。作为具有炎症性特点的细胞死亡形式,焦亡被证实参与多种疾病发病过程中的EMT^[8-9]。在DN发病过程中细胞焦亡以经典途径形式发生。炎症小体在细胞焦亡过程中起到分子开关作用。NLRP3是NLRP3炎症小体的核心蛋白,识别招募ASC并激活炎症小体生物效应^[26]。ASC将激活的炎症小体传感器连接到效应分子Caspase-1前体,促进Caspase-1的激活^[27]。高血糖可激活NLRP3炎症小体,把无活性的IL-1 β 剪切为成熟的IL-1 β (cleaved IL-1 β),成熟的IL-1 β 与IL-18诱导其他炎性细胞因子并激活免疫细胞并促进其募集,加速炎症反应;发生焦亡的细胞内出现DNA裂解,核缩合,溶酶体胞吐作用和膜孔形成,随后出现细胞肿胀破裂,Gasdermin-D在细胞膜上聚合,形成孔道,IL-1 β 和IL-18外排,发生炎症反应^[28]。通过TUNEL染色观察显示ZSW显著降低db/db小鼠肾小管上皮细胞的TUNEL染色率,提示ZSW减轻DN肾小管上皮细胞核损伤,但由于TUNEL染色是细胞凋亡的主要评价方法,无法特异性评价焦亡情况,因此通过焦亡相关炎症因子进一步评价。ZSW下调db/db小鼠肾组织IL-1 β 与IL-18的表达,提示ZSW对DN焦亡相关炎症因子的抑制作用。ZSW下调db/db小鼠肾组织NLRP3炎症小体主要成分NLRP3,ASC和Caspase-1的表达,提示ZSW抑制NLRP3炎症小体活化,可能是其实现抑制DN肾小管上皮细胞焦亡及EMT作用的主要机制。

随着对炎症反应在DN发病机制中的认识逐步深入,干预炎症反应成为研究中医药治疗DN作用和机制的重要靶点。近年来临床医家针对DN的炎症反应探讨其病机特点。部分医家认为热邪与DN早期炎症反应密切相关,如肾小球血流量大、流速快、滤过功能亢进与中医“阳热亢进、热迫血行”表现相符合^[29];结合微观辨证理论分析DN早期为肾络癥瘕形成的早期,热入肾络,邪正相争于肾之脉络,热伤气阴,肾络受损,炎症通路和炎症因子被激活^[30]。ZSW原方主治“不渴而小便闭,热在下焦血分”^[11],其主证与DN早期炎症反应的中医病机相符。方中黄柏色黄味苦,入肾经血分,泻下焦火;知母性寒,滋肾水以泻热;肉桂辛热,色赤入血,用以反佐,取寒因热用之意。在药物制备方面,ZSW原方黄柏、知母以酒洗^[11];既往ZSW的药效学专题研

究通过抗炎、免疫两项药理指标对ZSW的水提取物和不同浓度乙醇提取物进行药效评估。本实验参考该研究结果,选择50%乙醇为提取溶剂^[16]。本研究在既往明确ZSW降低血糖、减少尿蛋白及抗炎症反应作用的前提下,进一步探究不同剂量ZSW对早期DN的治疗作用及机制。结果显示高剂量组ZSW在降糖、降尿蛋白、改善肾功能、减轻肾小管损伤以及抗炎症反应作用等方面作用最为显著,提示了清热在DN早期治疗中的重要地位,为临床应用提供了一定的依据和思路。

综上所述,滋肾丸能够改善糖代谢,减轻糖尿病肾病肾小管早期损伤,减少蛋白尿,减轻肾组织病理损伤,改善肾功能。滋肾丸能够通过抑制NLRP3炎症小体活化减轻细胞核损伤、抑制炎症因子IL-1 β 与IL-18,调控EMT标志物 α -SMA和E-cadherin表达,从而抑制肾小管上皮细胞焦亡和EMT,可能是其治疗早期糖尿病肾病的作用机制。然而,滋肾丸对肾小管上皮细胞EMT和焦亡的直接作用有待通过体外实验进一步明确,滋肾丸对细胞焦亡及EMT过程中涉及的其他指标及上游调控基因的作用有待通过今后的研究进一步探讨。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ZHANG L, LONG J, JIANG W, et al. Trends in chronic kidney disease in China [J]. N Engl J Med, 2016,375(9):905-906.
- [2] HOU J H, ZHU H X, ZHOU M L, et al. Changes in the spectrum of kidney diseases: an analysis of 40, 759 biopsy-proven cases from 2003 to 2014 in China [J]. Kidney Dis, 2018,4(1):10-19.
- [3] FIORETTO P, DEL PRATO S, BUSE J B, et al. Efficacy and safety of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes and moderate renal impairment (chronic kidney disease stage 3A): the DERIVE study [J]. Diabetes Obes Metab, 2018,20(11):2532-2540.
- [4] FITCHETT D. A safety update on sodium glucose co-transporter 2 inhibitors [J]. Diabetes Obes Metab, 2019,21(Suppl 2):34-42.
- [5] ZOU L X, SUN L. Global diabetic kidney disease research from 2000 to 2017: a bibliometric analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2019,98(6):e14394.
- [6] ZENG L F, XIAO Y, SUN L. A glimpse of the mechanisms related to renal fibrosis in diabetic nephropathy [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 49-79.

- [7] LIN J, CHENG A, CHENG K, et al. New insights into the mechanisms of pyroptosis and implications for diabetic kidney disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (19):7057.
- [8] TAN Y F, WANG M, CHEN Z Y, et al. Inhibition of BRD4 prevents proliferation and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma via NLRP3 inflammasome-induced pyroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4):239.
- [9] SONG S, QIUI D, LUO F, et al. Knockdown of NLRP3 alleviates high glucose or TGFβ1-induced EMT in human renal tubular cells [J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 61(3):101-113.
- [10] HAN W, MA Q, LIU Y, et al. Huangkui capsule alleviates renal tubular epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and TLR4/NF-κB signaling[J]. *Phytomedicine*, 2019, 57:203-214.
- [11] 李东垣. 兰室秘藏[M]. 文魁, 丁国华, 整理. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 109.
- [12] 李智, 齐铮. 从施今墨药对浅析消渴病病机[J]. *北京中医药*, 2012, 31(1):28-29, 72.
- [13] 周玉莲. 运用施今墨药对治疗早期糖尿病肾病的治疗观察[J]. *世界中医药*, 2014, 9(5):574-576.
- [14] TANG Y H, SUN Z L, FAN M S, et al. Anti-diabetic effects of TongGuanWan, a Chinese traditional herbal formula, in C57BL/KsJ-db/db mice [J]. *Planta Med*, 2012, 78(1):18-23.
- [15] LIANG G, TANG H, NI D, et al. Zishenwan decreases kidney damage in recurrent urinary tract infection through the inhibition of Toll-like receptor 4 signal[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 5968657.
- [16] 戴荣华. 滋肾丸药效物质基础研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004: 17.
- [17] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069-1072.
- [18] GUEST P C, RAHMOUNE H. Characterization of the db/db mouse model of type 2 diabetes [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916:195-201.
- [19] KIM N H, HYEON J S, KIM N H, et al. Metabolic changes in urine and serum during progression of diabetic kidney disease in a mouse model [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 646:90-97.
- [20] LIU B C, TANG T T, LV L L. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(3):568-579.
- [21] 李俊, 左沙沙, 邱小萱, 等. 白头翁皂苷 B4 对结扎大鼠肾动静脉所致缺血再灌注损伤的治疗作用及相关机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(3):617-622.
- [22] TANG S C, LAI K N. The pathogenic role of the renal proximal tubular cell in diabetic nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(8):3049-3056.
- [23] 李红, 张哲, 翁红雷, 等. 糖尿病大鼠肾脏α平滑肌肌动蛋白的表达[J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2005, 34(2):61-65.
- [24] KOZIOLEK M, MUELLER G A, DIHAZI G H, et al. Urine E-cadherin: a marker for early detection of kidney injury in diabetic patients [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(3):639.
- [25] HICKSON L J, ABEDALQADER T, BEN-BERNARD G. A systematic review and meta-analysis of cell-based interventions in experimental diabetic kidney disease [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, doi: 10.1002/setm.19-0419.
- [26] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13):3328.
- [27] RIAZ M, REHMAN A U, SHAH S A, et al. Predicting multi-interfacial binding mechanisms of NLRP3 and ASC pyrin domains in inflammasome activation [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(4):603-612.
- [28] ZHANG K J, WU Q, JIANG S M, et al. Pyroptosis: a new frontier in kidney diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:6686617.
- [29] 吴宏辉, 郭晓媛, 谢璇, 等. 王暴魁教授糖尿病肾病“消渴热”病机理论初探[J]. *环球中医药*, 2019, 12(2):210-213.
- [30] 闫润泽, 孙卫卫, 王珍, 等. 糖尿病肾病内热证与肾功能及炎症因子的相关性研究[J]. *中医学报*, 2020, 35(2):393-397.

[责任编辑 周冰冰]