

## · 当归补血汤干预糖尿病肾病大鼠足细胞损伤研究专题 ·

[编者按] 随着肥胖和糖尿病发病率的增加,糖尿病肾病(DKD)已成为我国慢性肾病和终末期肾病的主要病因。微量蛋白尿是早期DKD临床特征,足细胞结构完整和数量保持是维持肾小球滤过功能的基础,足细胞损伤及数量减少直接造成微量蛋白尿的产生,继而进一步导致糖尿病肾损害的进展。然而高糖高脂状态导致足细胞损伤的具体机制尚未明确,近年来多项研究表明肾脏固有细胞的程序性死亡(PCD),如细胞凋亡和新近发现的细胞焦亡、坏死性凋亡、铁死亡等在DKD发病进程中发挥重要作用,其中肾脏固有细胞焦亡及坏死性凋亡通过各自的执行蛋白消皮素D(GSDMD)和混合系激酶区域样蛋白(MLKL)寡聚化并易位到质膜形成膜孔,导致细胞膜破裂、胞内容物释放,引起炎症反应。当归补血汤是李东垣益气活血名方,临床实践中该方为治疗DKD早期气虚血瘀证的经典基础方,前期研究证实,该方通过抗氧化应激、抗炎、改善足细胞损伤等作用延缓DKD的进展。该专题通过高糖高脂喂养结合小剂量链脲佐菌素(STZ)制备2型糖尿病大鼠模型,发现当归补血汤通过改善DKD大鼠足细胞线粒体功能障碍,减少活性氧(ROS)表达,缓解氧化应激;通过抑制ROS的产生,调控硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)/核苷酸结合域样受体蛋白3(NLRP3)/GSDMD信号通路的激活,抑制足细胞焦亡及炎症反应;表明当归补血汤可能通过ROS-TXNIP-NLRP3生物轴缓解氧化应激、抑制炎症反应、改善足细胞损伤。同时发现当归补血汤通过调控受体相互作用蛋白激酶1(RIPK1)/RIPK3/MLKL信号通路减轻DKD大鼠肾组织炎症反应并改善足细胞损伤,为DKD的防治提供了新的治疗策略和靶点。

# 当归补血汤通过改善足细胞线粒体功能障碍减轻糖尿病肾病大鼠氧化应激及炎症反应

靳贺超<sup>1</sup>, 强家维<sup>1</sup>, 张冠文<sup>1</sup>, 梁胜然<sup>1</sup>, 郭登洲<sup>1,2\*</sup>

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 河北省中医院, 石家庄 050011)

[摘要] 目的:探讨当归补血汤通过改善足细胞线粒体功能障碍对糖尿病肾病(DKD)大鼠氧化应激及炎症反应的干预作用。方法:SD大鼠随机分为正常组和造模组,造模组采用高糖高脂喂养联合小剂量链脲佐菌素(STZ)一次性腹腔注射制备2型糖尿病大鼠模型。成模大鼠随机分为模型组、当归补血汤低剂量(0.72 g·kg<sup>-1</sup>)组、当归补血汤高剂量(1.44 g·kg<sup>-1</sup>)组、厄贝沙坦(0.017 g·kg<sup>-1</sup>)组进行灌胃,正常组及模型组予等体积生理盐水灌胃。药物干预20周后检测各组大鼠尿微量白蛋白与尿肌酐比值(UACR),血清丙二醛(MDA)含量,血清锰超氧化物歧化酶(MnSOD)活性;马松(Masson)染色、高碘酸希夫(PAS)染色分别观察肾组织病理形态学变化;透射电镜(TEM)观察足细胞线粒体超微结构变化;二氢乙锭(DHE)荧光探针检测大鼠肾组织活性氧(ROS)表达水平;免疫组化法(IHC)检测大鼠肾组织过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 辅助激活因子-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ ),核苷酸结合域样受体蛋白3(NLRP3),肿瘤蛋白-1(WT-1)蛋白表达水平;免疫荧光(IF)三标法检测NLRP3,白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )与WT-1在足细胞的表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , NLRP3 mRNA表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , MnSOD, NLRP3, IL-1 $\beta$ 蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠UACR, MDA含量显著升高, MnSOD活性显著降低( $P<0.01$ );病理表现为肾小球肥大、基底膜增厚、系膜增生、系膜外基质增多、出现K-W结节、足细胞线粒体肿胀、线粒体嵴走向紊乱、模糊或消失,可见空泡形成;ROS表达量显著增多( $P<0.01$ );NLRP3及IL-1 $\beta$ 在足细胞表达显著升高, WT-1在足细胞表达显著减少;PGC-1 $\alpha$  mRNA表达水平显著降低( $P<0.01$ ), PGC-1 $\alpha$ , MnSOD蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ ), NLRP3 mRNA表达水平显著升高, NLRP3, IL-1 $\beta$ 蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,当归补血汤高剂量组明显降低UACR, MDA含量,升高MnSOD活性( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );明显改善肾组织病理学,改善足细胞线粒体超微结构;减少ROS表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );NLRP3及IL-1 $\beta$ 在足细胞表达减少且WT-1在足细胞表达增多;升高PGC-1 $\alpha$ , MnSOD mRNA及蛋白表达水平,降低NLRP3, IL-1 $\beta$  mRNA及蛋白表达水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:当归补血汤可能通过改善DKD大鼠足细胞线粒体功能障碍,缓解氧化应激,减轻炎症反应,起到明显的肾脏保护及延缓病程进展作用。

[收稿日期] 20210802(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373804);河北省博士研究生创新项目(CXZZBS2021087)

[第一作者] 靳贺超,在读博士,从事中医药治疗肾病的研究,E-mail:jinxiaochi1987@163.com

[通信作者] \*郭登洲,教授,博士生导师,从事中医药治疗肾病的研究,E-mail:guodengzhou@sohu.com

[关键词] 当归补血汤; 糖尿病肾病; 线粒体功能障碍; 足细胞; 氧化应激; 炎症反应

[中图分类号] R2-0;R289;R33;R587.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)03-0031-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212442

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211109.1926.007.html>

[网络出版日期] 2021-11-10 9:50

## Danggui Buxuetang Alleviates Oxidative Stress and Inflammation in Diabetic Kidney Disease Rats by Improving Mitochondrial Dysfunction of Podocytes

JIN He-chao<sup>1</sup>, QIANG Jia-wei<sup>1</sup>, ZHANG Guan-wen<sup>1</sup>, LIANG Sheng-ran<sup>1</sup>, GUO Deng-zhou<sup>1,2\*</sup>

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

2. Hebei Provincial Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the intervention effect of Danggui Buxuetang on oxidative stress and inflammatory response in diabetic kidney disease (DKD) rats from its improvement of podocyte mitochondrial dysfunction. **Method:** SD rats were randomly divided into the control group and modeling group, and the ones in the latter group rats were fed a high-glucose and high-fat diet and then intraperitoneally injected with a small dose of streptozotocin (STZ) for inducing type 2 diabetes. The successfully modeled rats were randomized into the model group, high- and low-dose (1.44 and 0.72 g·kg<sup>-1</sup>) Danggui Buxuetang groups, and irbesartan (0.017 g·kg<sup>-1</sup>) group and gavaged with the corresponding drugs, while those in the normal and model groups with an equal volume of normal saline. After 20 weeks of drug intervention, the urinary microalbumin-to-urine creatinine ratio (UACR) and serum malondialdehyde (MDA) content and manganese superoxide dismutase (MnSOD) activity in each group were measured. The pathological changes in renal tissue were observed by Masson trichrome staining, and periodic acid-silver methenamine (PASM) staining, followed by the observation of ultrastructural changes in podocytes under the transmission electron microscope (TEM). The expression level of reactive oxygen species (ROS) in rat kidney tissue was detected using a fluorescent probe dihydroethidium (DHE). The protein expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  -coactivator -1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), nucleotide-binding domain like receptor protein 3 (NLRP3), and Wilms tumor protein-1 (WT-1) were measured by immunohistochemistry (IHC), and the expression levels of NLRP3, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and WT-1 in podocytes by immunofluorescence (IF) assay. The mRNA expression levels of PGC-1 $\alpha$  and NLRP3 in the renal tissues were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expression levels of PGC-1 $\alpha$ , MnSOD, NLRP3, and IL-1 $\beta$  were assayed by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group exhibited elevated UACR and MDA content, weakened MnSOD activity ( $P<0.01$ ), glomerular hypertrophy, thickened basement membrane, mesangial hyperplasia, increased extracellular matrix, K-W nodules, podocyte mitochondrial swelling, disordered mitochondrial cristae, foot process fusion or loss, vacuolization, increased ROS ( $P<0.01$ ), enhanced NLRP3 and IL-1 $\beta$  but diminished WT-1 expression in podocytes, down-regulated PGC-1 $\alpha$  mRNA expression ( $P<0.01$ ) and PGC-1 $\alpha$  and MnSOD protein expression ( $P<0.01$ ), and up-regulated NLRP3 mRNA expression and NLRP3 and IL-1 $\beta$  protein expression ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, Danggui Buxuetang high-dose group significantly decreased UACR and MDA, enhanced MnSOD activity ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), improved renal histopathology and podocyte mitochondrial ultrastructure, decreased ROS ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and NLRP3 and IL-1 $\beta$  expression in podocytes, enhanced WT-1 expression in podocytes, up-regulated the mRNA and protein levels of PGC-1 $\alpha$  and MnSOD, and down-regulated the mRNA and protein levels of NLRP3 and IL-1 $\beta$  ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Danggui Buxuetang alleviates oxidative stress,

reduces inflammatory response, protects kidney, and delays the progression of DKD possibly by improving the mitochondrial dysfunction in podocytes of DKD rats.

**[Keywords]** Danggui Buxuetang; diabetic kidney disease (DKD); mitochondrial dysfunction; podocytes; oxidative stress; inflammatory response

糖尿病肾病(DKD)是指由糖尿病所致的慢性肾脏疾病,临床表现为尿蛋白升高、预估肾小球滤过率下降,是导致终末期肾病最重要的单一因素。本病发病机制复杂,氧化应激和慢性低度炎症是导致DKD进展的关键因素。根据BROWNLEE教授“统一机制理论”,高糖诱导细胞线粒体呼吸链产生过量活性氧(ROS)是糖尿病并发症发生的启动因素<sup>[1]</sup>。线粒体是ROS的主要细胞内来源,生理状态下肾脏会少量产生ROS,当肾脏固有细胞因高糖不能有效降低葡萄糖转运率以维持细胞内葡萄糖稳态时,这些细胞的线粒体产生过量ROS诱导氧化应激进而导致DKD的发生和进展<sup>[2]</sup>。ROS的产生超过局部抗氧化能力,是DKD线粒体功能障碍的生物标志<sup>[3]</sup>。线粒体功能障碍通过多种机制导致核苷酸结合域样受体蛋白3(NLRP3)激活,其中线粒体活性氧(mtROS)被认为是NLRP3激活的关键,线粒体靶向抗氧化剂MitoTEMPO在体外通过抑制mtROS的过度产生可阻断NLRP3的激活并缓解肾损伤<sup>[4]</sup>。因此,通过改善肾脏固有细胞线粒体功能障碍,减少ROS的产生进而缓解氧化应激,减轻炎症反应是防治DKD的有效策略。

当归补血汤出自李东垣的《内外伤辨惑论》,本方由当归和黄芪组成,或补气生血或益气活血以起到协同增效作用。体内、体外实验及临床试验均证实当归补血汤通过抗氧化应激、抗炎、改善足细胞损伤等作用延缓DKD进展<sup>[5-6]</sup>。研究表明,当归补血汤能调节线粒体膜电位,改善线粒体形态<sup>[7]</sup>。前期实验发现,当归补血汤可抑制NLRP3炎症小体的激活及白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的释放从而发挥肾保护作用<sup>[8]</sup>。在前期研究基础上,本次实验通过观察当归补血汤对DKD大鼠肾组织病理,足细胞线粒体超微结构,线粒体生物合成调节因子,肾组织ROS,氧化应激,炎症反应,足细胞标志蛋白的影响,进一步探讨该方对DKD大鼠肾保护作用及潜在分子机制,以期为DKD的中药治疗提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级健康雄性SD大鼠50只,7周龄,体质量(200 $\pm$ 20)g,由北京维通利华实验动物技术

有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于河北中医学院实验动物中心标准化动物房(相对湿度50%~70%,温度23~25℃,昼夜各半),普通饲料及高糖高脂饲料喂养,自由饮水。本动物实验由河北中医学院动物伦理委员会批准,伦理审查编号DWLL2019018。

**1.2 药物与试剂** 当归补血汤由黄芪30g,当归6g组成(药材均为免煎颗粒剂,由广东一方制药有限公司配制,批号分别为0071093,0061513),其中1g黄芪免煎颗粒相当于5g生药,1g当归相当于3.3g生药,灌胃前以去离子水充分溶解,配置成质量浓度分别为0.72,0.36g·mL<sup>-1</sup>的中药混悬液;厄贝沙坦片(浙江华海药业股份有限公司,批号H20030016,75mg/片);链脲佐菌素(STZ),柠檬酸钠缓冲液(美国Sigma公司,批号分别为S0130,S4641);锰超氧化物歧化酶(MnSOD),丙二醛(MDA),尿微量白蛋白(mAlb)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A001-2-1,A003-2-2,E038-1-1);马松(Masson)三色染液,高碘酸希夫(PAS)染液,ROS染液,DAPI染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1006,G1049,GDP1018,GDP1012);TRIzol试剂(北京Servicebio公司,批号G3013);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(北京HyClone公司,批号SH30538);鼠来源一抗过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )辅助激活因子-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )抗体(美国Santa Cruz公司,批号sc-518025);兔来源一抗NLRP3,MnSOD抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号分别为ET1610-93,ET1701-54);兔来源一抗IL-1 $\beta$ ,肿瘤蛋白-1(WT-1), $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(武汉ABclonal公司,批号分别为A16288,A16319,AC026);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号GB23303)。

**1.3 仪器** One Touch型血糖仪(美国LifeScan公司);RM2016型病理切片仪(德国Leica公司);BX43型荧光显微镜,BX53型光学显微镜(日本Olympus公司);HT7800型透射电子显微镜(日本Hitach公司);1-15K型高速冷冻离心机(美国Sigma

公司); Semi-Day型半干转膜仪(美国Bio-Rad公司); Infinite 200型酶标仪(瑞士Tecan公司); DYCZ-40K型电泳仪(北京六一仪器厂); Clinx ChemiScope荧光及化学发光成像系统(上海Clinx公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、模型制备、给药与取样** 将50只SD大鼠用普通饲料适应性喂养1周,尿蛋白及血糖检测均为阴性。大鼠按随机数字表法分为正常组8只、造模组42只。造模组大鼠予高糖高脂饮食喂养6周结合STZ( $35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )一次性腹腔注射进行模型制备。造模72 h后,各大鼠尾静脉随机血糖 $>16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为2型糖尿病模型制备成功<sup>[9]</sup>。结果显示,2只造模大鼠血糖 $<16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,3只大鼠造模后死亡,均予以剔除。依据人与大鼠药物剂量折算公式<sup>[10]</sup>,将37只2型糖尿病大鼠按随机数字表法分为模型组10只、当归补血汤低剂量( $0.72\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组9只、当归补血汤高剂量( $1.44\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组9只、厄贝沙坦( $0.017\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组9只,药物干预组大鼠每日1次进行灌胃,正常和模型组大鼠予等体积生理盐水灌胃,连续干预20周。给药期间每周检测体质量并调整灌胃剂量,每4周检测1次尿mAlb。干预20周后禁食不禁水12 h,使用异氟烷吸入麻醉,股动脉取血,离心机分离上清用于生化指标检测;左肾沿纵轴切开,取肾皮质组织 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 组织块,置于预冷后的2.5%戊二醛中,并 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存;取 $0.5\text{ cm}$ 厚肾皮质置于4%多聚甲醛中固定;取肾皮质 $3\text{ mm}\times 3\text{ mm}\times 3\text{ mm}$ 组织块置于冻存管,液氮速冻后转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备检。

**2.2 尿mAlb与尿肌酐比值(UACR),血清MDA含量及MnSOD活性的测定** 采用TBA法检测MDA含量,羟胺法检测MnSOD活性,免疫比浊法检测尿mAlb含量,全自动生化分析仪测定大鼠尿肌酐含量。

**2.3 Msaaon, PAS染色及透射电镜观察大鼠肾组织病理学改变** 将固定于4%多聚甲醛的肾组织脱水,包埋,切片,分别进行Masson及PAS染色,光学显微镜下观察肾组织病理学变化;将固定于2.5%戊二醛的肾组织用磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗、固定、脱水、丙酮树脂包埋、切片,透射电子显微镜下观察足细胞线粒体超微结构的改变。

**2.4 二氢乙锭(DHE)染色检测大鼠肾组织ROS表达水平** 切片滴加ROS染液,孵育30 min,滴加DAPI染色液以染核,充分覆盖组织,室温避光5 min后PBS冲洗3次,每次5 min,滴加适量抗荧光淬灭

剂后封片,荧光显微镜下观察肾组织ROS表达。采用Image-Pro Plus 6.0软件对免疫荧光图片进行半定量分析,以积分吸光度 $I A$ /面积作为检测结果。

**2.5 免疫组化法(IHC)检测大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , NLRP3, WT-1蛋白表达水平** 将固定于4%多聚甲醛的肾组织脱水,石蜡包埋,切片脱蜡至水,抗原修复,切片放入3%双氧水溶液,室温孵育25 min,血清封闭,滴加PBS稀释后的PGC-1 $\alpha$ (1:200), NLRP3(1:200), WT-1(1:200),  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入生物素标记的二抗,室温孵育50 min, DBA显色,苏木素复染,脱水封片,电子显微镜观察并拍照。采用Image-Pro Plus 6.0软件对免疫组化图片( $\times 400$ )进行半定量分析,以 $I A$ /面积作为检测结果。

**2.6 免疫荧光(IF)三标法检测NLRP3, IL-1 $\beta$ 与WT-1在足细胞的表达水平** 石蜡切片脱蜡至水,抗原修复,组化笔画圈,双氧水封闭,血清封闭。依次滴加一抗、对应HRP标记的二抗,微波处理, DAPI复染细胞核,淬灭组织自发荧光,封片,荧光显微镜下采集图像。

**2.7 Real-time PCR检测大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , NLRP3 mRNA表达水平** 组织样本液氮研磨,使用TRIzol法提取总RNA, Nanodrop检测RNA纯度及浓度。一步法逆转录扩增,严格按中实基因反转录试剂盒说明书操作。PGC-1 $\alpha$ 上游引物5'-GAGAAGCGGGAGTCTGAAAGG-3',下游引物5'-GTCA CAGGTGTAACGGTAGGTAATG-3',长度219 bp; NLRP3上游引物5'-GGTCAGCTGCTGTCTCACAT-3',下游引物5'-CCCATGTCTCCAAGG GCATT-3',长度282 bp;  $\beta$ -actin上游引物5'-CCCGCGAGTACAACCTTCTT-3',下游引物5'-AGGGTCAGGATG CCTCTCTT-3',长度262 bp;反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火20 s,循环40次。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。引物由中实(天津)检验检测有限公司合成。

**2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , MnSOD, NLRP3, IL-1 $\beta$ 蛋白表达水平** 取肾组织放入离心管,使用RIPA裂解液提取肾组织蛋白,离心取上清用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白溶液按4:1比例加入 $5\times$ Loading buffer缓冲液,沸水浴变性25 min, 10%SDS-PAGE电泳, PVDF转膜30 min,将膜放入TBST孵育槽中,加脱脂牛奶室温下封闭30 min,加入稀释好的一抗PGC-1 $\alpha$ (1:300), MnSOD(1:1 000), NLRP3(1:1 000), IL-1 $\beta$ (1:1 000),  $\beta$ -actin(1:1 000),  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育摇床过夜,

TBST洗脱3次,每次5 min,将二抗用TBST按1:5 000比例稀释,室温孵育30 min,ECL法显色。使用Image J软件分析条带灰度值,目的蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/ $\beta$ -actin灰度值。

**2.9 统计学分析** 数据资料使用SPSS 21.0软件分析处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布及方差齐采用单因素方差分析;不符合采用非参数秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对DKD大鼠UACR, MnSOD活性, MDA水平的影响** 与正常组比较,模型组大鼠UACR,血清中MDA含量显著升高,血清中MnSOD活性显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组大鼠UACR,血清中MDA含量明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组MnSOD活性明显升高( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 当归补血汤对DKD大鼠UACR, MnSOD活性及MDA水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

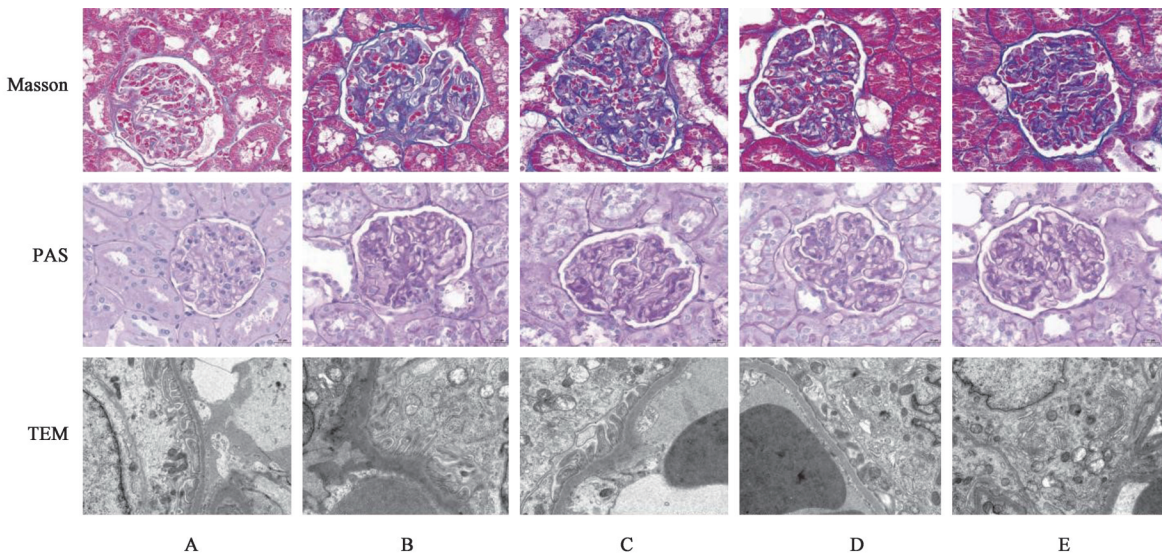
Table 1 Effect of Danggui Buxuetang on UACR, MnSOD, MDA in DKD rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	UACR/ $mg \cdot g^{-1}$	MnSOD/ $U \cdot mL^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
正常		32.60 $\pm$ 2.95	68.49 $\pm$ 7.13	8.02 $\pm$ 1.80
模型		145.67 $\pm$ 7.21 <sup>1)</sup>	49.28 $\pm$ 5.08 <sup>1)</sup>	16.26 $\pm$ 4.25 <sup>1)</sup>
当归补血汤	0.78	135.95 $\pm$ 6.83	57.37 $\pm$ 7.39	13.74 $\pm$ 3.27
	1.56	87.36 $\pm$ 4.92 <sup>3)</sup>	64.92 $\pm$ 8.92 <sup>2)</sup>	8.35 $\pm$ 1.99 <sup>2)</sup>
厄贝沙坦	0.017	116.10 $\pm$ 5.19 <sup>3)</sup>	62.50 $\pm$ 6.91 <sup>2)</sup>	9.63 $\pm$ 2.07 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (表2~5同)。

**3.2 对DKD大鼠肾组织病理学及足细胞线粒体超微结构的影响** 与正常组比较,Masson染色显示模型组大鼠肾小球肥大、系膜增生、系膜外基质增加,PAS染色显示模型组大鼠肾小球肥大、基底膜增厚、

出现K-W结节,透射电镜显示模型组大鼠足细胞线粒体肿胀,线粒体嵴走向紊乱、模糊或消失,可见空泡形成;与模型组比较,各干预组大鼠肾组织病理及足细胞线粒体超微结构均有不同程度改善。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 当归补血汤低剂量组;D. 当归补血汤高剂量组;E. 厄贝沙坦组(图2~6同)

图1 当归补血汤对DKD大鼠肾组织病理形态及足细胞线粒体超微结构的影响(Masson, PAS,  $\times 400$ ;透射电镜 $\times 5 000$ )

Fig. 1 Effect of Danggui Buxuetang on renal morphology and ultrastructure of podocyte mitochondria in DKD rats (Masson, PAS,  $\times 400$ ; TEM,  $\times 5 000$ )

**3.3 对DKD大鼠肾组织ROS表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠肾组织ROS表达显著增多( $P < 0.01$ );与模型组比较,各干预组大鼠肾组织ROS表达明显减少( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图2,表2。

**3.4 对DKD大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , NLRP3, WT-1定位表达的影响** 与正常组比较,模型组PGC-1 $\alpha$ , WT-1蛋白表达显著降低, NLRP3蛋白表达显著升高,差异具有显著统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比

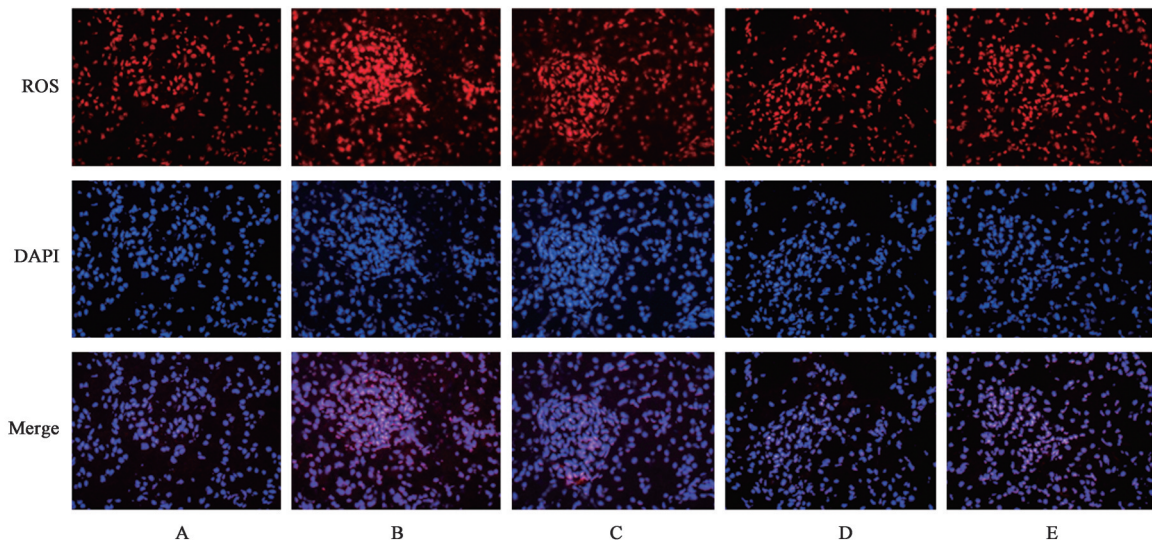


图2 当归补血汤对DKD大鼠肾组织ROS表达的影响(DHE, ×400)

Fig. 2 Effect of Danggui Buxuetang on ROS expression of renal tissue cells in DKD rats (DHE, ×400)

表2 当归补血汤对DKD大鼠肾组织ROS的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of Danggui Buxuetang on ROS of renal tissue in DKD rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ROS
正常		0.024±0.002
模型		0.086±0.006 <sup>1)</sup>
当归补血汤	0.78	0.077±0.009 <sup>2)</sup>
	1.56	0.043±0.005 <sup>3)</sup>
厄贝沙坦	0.017	0.057±0.009 <sup>3)</sup>

较,各干预组大鼠肾组织中PGC-1 $\alpha$ 及WT-1表达明显升高,各干预组大鼠NLRP3表达明显降低,差异具有明显统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ )。见图3,表3。

**3.5** 对DKD大鼠足细胞中NLRP3, IL-1 $\beta$ 表达水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠NLRP3及IL-1 $\beta$ 在足细胞表达显著升高;与模型组比较,各干预组大鼠NLRP3及IL-1 $\beta$ 在足细胞表达均降低。见图4,5。

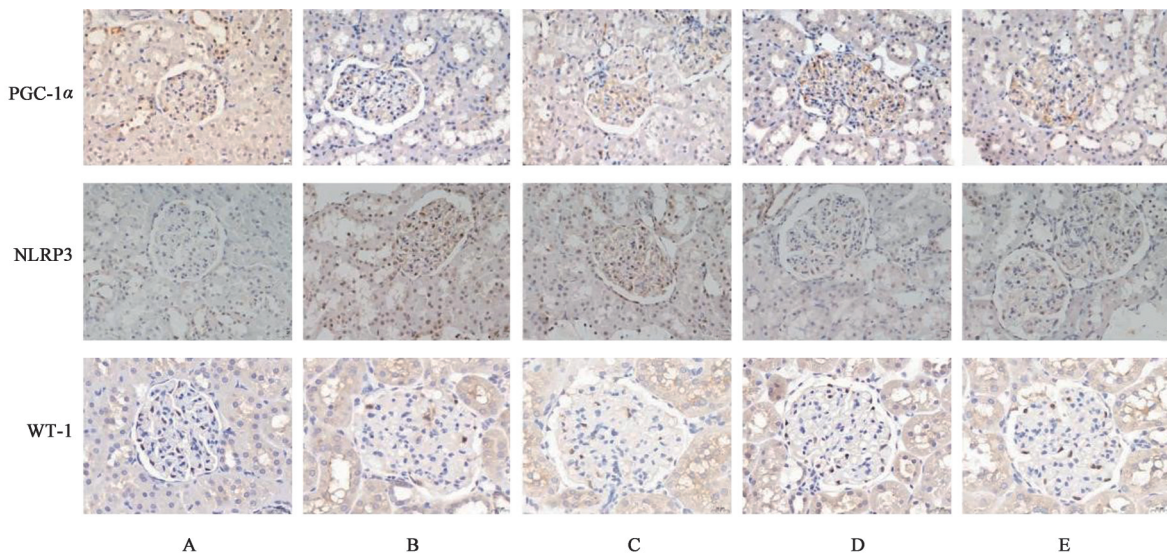


图3 当归补血汤对DKD大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , NLRP3, WT-1蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Danggui Buxuetang on expression of PGC-1 $\alpha$ , NLRP3, WT-1 in DKD rats (IHC, ×400)

**3.6** 对DKD大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , NLRP3 mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠PGC-1 $\alpha$  mRNA表达显著降低, NLRP3 mRNA表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,当归补血汤高剂量组大鼠

PGC-1 $\alpha$  mRNA表达明显升高( $P<0.05$ ), NLRP3 mRNA表达显著降低( $P<0.01$ )。见表4。

**3.7** 对DKD大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , MnSOD, NLRP3, IL-1 $\beta$ 蛋白表达的影响 与正常组比较,模

表3 当归补血汤对DKD大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ ,NLRP3,WT-1定位表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of Danggui Buxuetang on expression of PGC-1 $\alpha$ , NLRP3, WT-1 in DKD rats ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PGC-1 $\alpha$	NLRP3	WT-1
正常		0.255 $\pm$ 0.027	0.149 $\pm$ 0.017	0.421 $\pm$ 0.038
模型		0.110 $\pm$ 0.013 <sup>1)</sup>	0.305 $\pm$ 0.034 <sup>1)</sup>	0.283 $\pm$ 0.019 <sup>1)</sup>
当归补血汤	0.78	0.163 $\pm$ 0.018 <sup>2)</sup>	0.237 $\pm$ 0.029 <sup>2)</sup>	0.327 $\pm$ 0.022
	1.56	0.216 $\pm$ 0.022 <sup>3)</sup>	0.170 $\pm$ 0.019 <sup>3)</sup>	0.401 $\pm$ 0.030 <sup>3)</sup>
厄贝沙坦	0.017	0.186 $\pm$ 0.019 <sup>2)</sup>	0.228 $\pm$ 0.025 <sup>2)</sup>	0.386 $\pm$ 0.025 <sup>2)</sup>

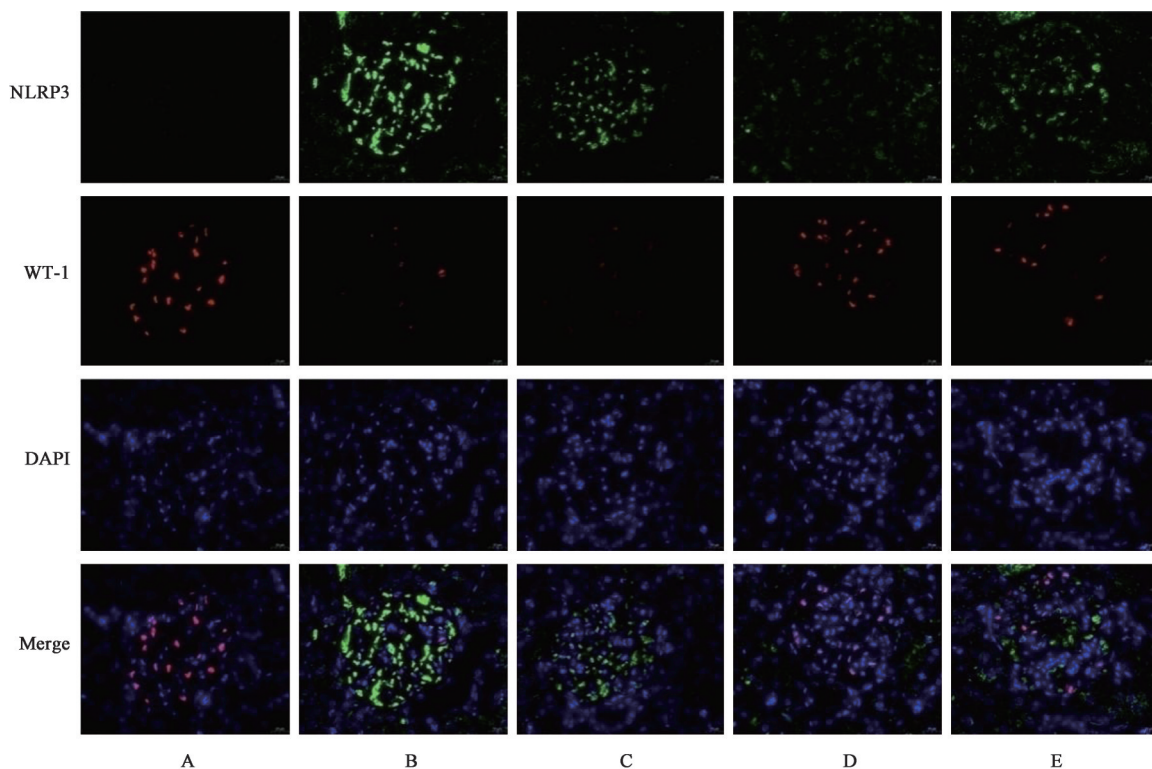


图4 当归补血汤对DKD大鼠足细胞中NLRP3表达水平的影响(免疫荧光,  $\times 400$ )

Fig. 4 Effect of Danggui Buxuetang on expression of NLRP3 in DKD rat podocytes (IF,  $\times 400$ )

型组大鼠NLRP3, IL-1 $\beta$ 蛋白表达显著升高, PGC-1 $\alpha$ , MnSOD蛋白表达显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,当归补血汤低、高剂量组及厄贝沙坦组大鼠PGC-1 $\alpha$ , MnSOD蛋白表达明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组大鼠NLRP3, IL-1 $\beta$ 蛋白表达明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。见图6,表5。

#### 4 讨论

DKD是指由糖尿病所致的慢性肾脏疾病,是糖尿病主要的微血管并发症之一<sup>[11]</sup>。至2040年,全世界糖尿病的患病人数预计将增加到6.42亿人,其中30%~40%将发展为DKD<sup>[12]</sup>。目前尽管肾素-血管紧张素系统或降糖药物可延缓蛋白尿进展,但无证据显示会缓解预估肾小球滤过率下降或延缓终末期肾病(ESRD)进展<sup>[13]</sup>。本病发病机制复杂,氧化

应激和慢性低度炎症是导致DKD发病及进展的关键因素。近年来,中医药治疗DKD理论及临床研究不断取得进展,在缓解氧化应激<sup>[14]</sup>、减轻炎症反应<sup>[15]</sup>、改善足细胞损伤<sup>[16]</sup>方面有独特优势。

DKD中医证候演变是从气阴两虚到阴阳两虚最终发展到气血阴阳俱虚的过程,血瘀证贯穿疾病始终。本病病程绵长,久病多虚,气虚无以推动血行以成瘀血,因此益气活血、保持肾脏络脉气血条达是治疗DKD的关键。当归补血汤为临床经典的补气生血、益气活血名方,多项研究均证实当归补血汤通过抗氧化应激、抗炎、降低24h尿蛋白、改善足细胞损伤等作用改善DKD症状<sup>[5-6]</sup>。本方由黄芪-当归按5:1组成,现代药理研究表明,黄芪有效成分在抗炎、抗氧化方面疗效显著<sup>[17]</sup>;当归及其活性成分具有肾脏保护、抗氧化等疗效<sup>[18]</sup>。本实验

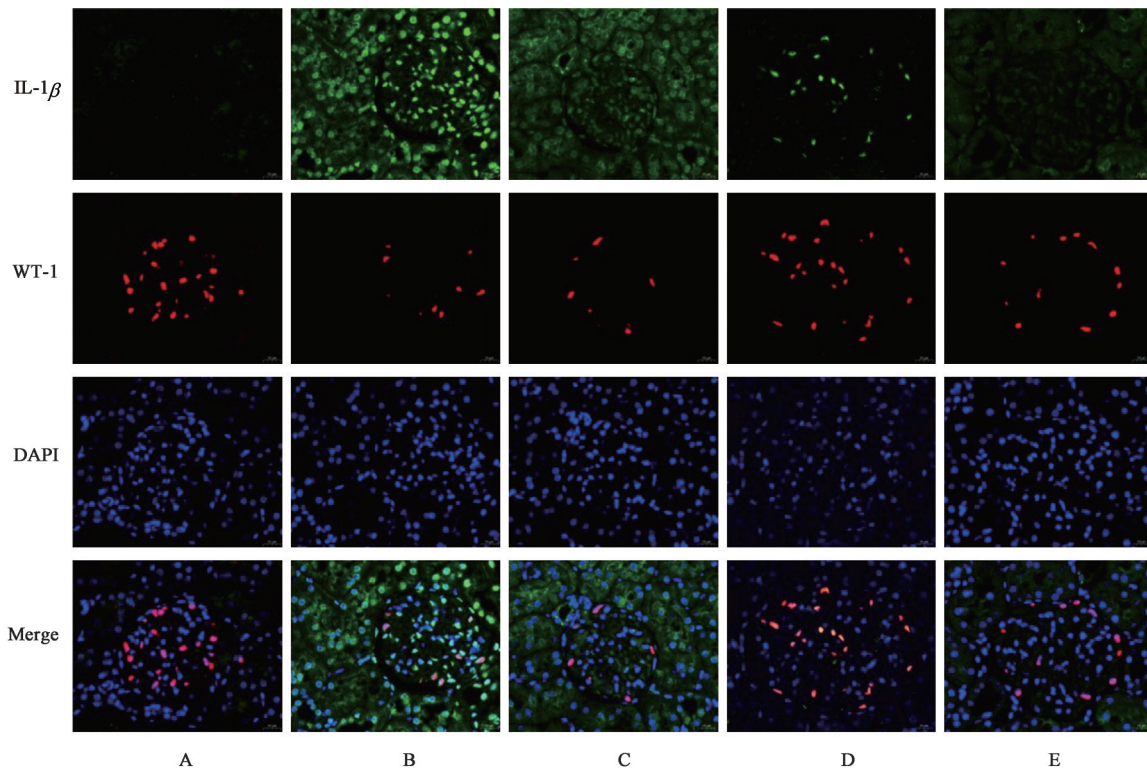


图5 当归补血汤对DKD大鼠足细胞中IL-1 $\beta$ 表达水平的影响(免疫荧光,  $\times 400$ )

Fig. 5 Effect of Danggui Buxuetang on expression of IL-1 $\beta$  in DKD rat podocytes (IF,  $\times 400$ )

表4 当归补血汤对DKD大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , NLRP3 mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 4 Effect of Danggui Buxuetang on gene expression of PGC-1 $\alpha$ , NLRP3 mRNA in DKD rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PGC-1 $\alpha$	NLRP3
模型		0.49 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	3.69 $\pm$ 0.28 <sup>1)</sup>
当归补血汤	0.78	0.57 $\pm$ 0.03	3.13 $\pm$ 0.24
	1.56	0.84 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	1.44 $\pm$ 0.17 <sup>3)</sup>
厄贝沙坦	0.017	0.74 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>	2.51 $\pm$ 0.23 <sup>3)</sup>

注: 设正常组各指标mRNA表达量均为1。

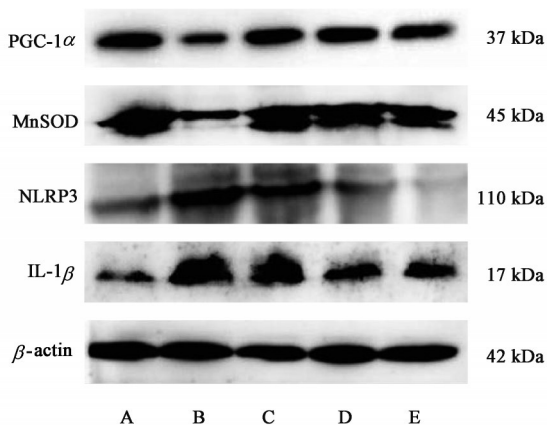


图6 肾组织中PGC-1 $\alpha$ , MnSOD, NLRP3, IL-1 $\beta$ 蛋白电泳

Fig. 6 Electrophoresis of PGC-1 $\alpha$ , MnSOD, NLRP3, IL-1 $\beta$  in renal tissue

中,模型组大鼠尿蛋白升高,肾小球肥大,基底膜增厚,系膜增生,系膜外基质增多,K-W结节,足突融合或消失足细胞标志蛋白表达降低;经当归补血汤干预后,蛋白尿及肾组织病理明显改善,WT-1表达升高,提示当归补血汤对DKD大鼠具有肾保护作用并能改善足细胞损伤。

高糖引起线粒体功能障碍产生过量ROS是DKD发病的启动因素<sup>[19]</sup>。线粒体是存在于真核细胞内的一种细胞器,是产生能量和ROS的主要场所。线粒体电子传递链的转移与细胞内葡萄糖浓度直接相关,在高糖状态下,转移到线粒体内膜上的电子增多,使电子传递链变得饱和,迫使过量电子转移到分子氧上,使ROS的产生增加<sup>[20]</sup>。在氧化应激条件下,线粒体通透性转换孔开放时间延长,允许H<sup>+</sup>顺着电化学梯度进入线粒体基质中而不是产生ATP,进一步导致ROS的生成增加,即ROS诱导的ROS释放(RIRR)<sup>[21]</sup>。线粒体产生超出自身抗氧化能力的ROS,导致肾脏固有细胞细胞中产生过量ROS诱导氧化应激进而导致DKD的发生和进展<sup>[2]</sup>。DKD与线粒体功能障碍有关,表现为显著的线粒体膜电位(MMP)降低和过量ROS的产生<sup>[1]</sup>。PGC-1 $\alpha$ 参与线粒体的生成和功能调节,可反映线粒体功能障碍程度。本实验中,当归补血汤明显改

表5 当归补血汤对DKD大鼠肾组织PGC-1 $\alpha$ , MnSOD, NLRP3, IL-1 $\beta$ 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Danggui Buxuetang on protein expression of PGC-1 $\alpha$ , MnSOD, NLRP3, IL-1 $\beta$  in DKD rats ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PGC-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin	MnSOD/ $\beta$ -actin	NLRP3/ $\beta$ -actin	IL-1 $\beta$ / $\beta$ -actin
正常		0.93 $\pm$ 0.13	1.50 $\pm$ 0.16	0.60 $\pm$ 0.07	0.51 $\pm$ 0.06
模型		0.51 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	0.63 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>	0.94 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>	1.19 $\pm$ 0.15 <sup>1)</sup>
当归补血汤	0.78	0.84 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	1.30 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>	0.89 $\pm$ 0.09	1.11 $\pm$ 0.12
	1.56	0.89 $\pm$ 0.10 <sup>3)</sup>	1.39 $\pm$ 0.13 <sup>3)</sup>	0.67 $\pm$ 0.06 <sup>3)</sup>	0.82 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>
厄贝沙坦	0.017	0.78 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	1.11 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	0.48 $\pm$ 0.11 <sup>3)</sup>	0.74 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>

善足细胞线粒体超微结构,升高PGC-1 $\alpha$  mRNA及蛋白表达,减少ROS表达,降低MDA含量表达,升高MnSOD活性表达,提示当归补血汤可改善足细胞线粒体功能障碍进而减少ROS的表达,缓解DKD大鼠肾组织氧化应激。

过量ROS诱导氧化应激,并通过硫氧还蛋白(TRX)系统导致NLRP3炎症小体激活<sup>[22]</sup>。既往观点认为代谢及血流动力学变化是糖尿病肾损伤的主要原因,目前更多观点认为慢性低度炎症是导致DKD进展的关键因素<sup>[23]</sup>。线粒体功能障碍通过多种机制参与NLRP3激活,其中mtROS被认为是NLRP3激活的关键,线粒体靶向抗氧化剂MitoTEMPO在体外通过抑制mtROS的过度产生阻断NLRP3的激活并缓解肾损伤<sup>[4]</sup>。TRX系统是一种重要的抗氧化系统,通过向过氧还原蛋白提供电子从而有效地去除活性氧和氮来抵抗氧化应激,ROS的过度产生导致硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)与其结合蛋白TRX分离,后与NLRP3结合,导致NLRP3炎症小体激活<sup>[22]</sup>。NLRP3炎症小体的激活导致炎症因子IL-1 $\beta$ 的成熟和分泌,引起炎症反应<sup>[24]</sup>。本实验中,当归补血汤明显减少肾组织ROS表达,降低NLRP3与IL-1 $\beta$ 在足细胞的表达,升高WT-1在足细胞的表达,降低NLRP3 mRNA及蛋白在肾组织的表达,提示当归补血汤可能通过减少ROS的表达,减轻DKD大鼠足细胞炎症反应,进而改善足细胞损伤。

综上,当归补血汤可能通过改善DKD大鼠足细胞线粒体功能障碍,减少ROS表达,缓解氧化应激,减轻足细胞炎症反应进而降低蛋白尿,起到明显的肾脏保护及延缓病程进展作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] COUGHLAN M T, SHARMA K. Challenging the dogma of mitochondrial reactive oxygen species overproduction in diabetic kidney disease[J]. *Kidney*

*Int*, 2016, 90(2):272-279.

[2] DU N, XU Z, GAO M, et al. Combination of Ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Astragaloside IV reduces oxidative stress and inhibits TGF-beta1/Smads signaling cascade on renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy[J]. *Drug Des Dev Ther*, 2018, 12: 3517-3524.

[3] WEI P Z, SZETO C C. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 496: 108-116.

[4] WEN Y, LIU Y R, TANG T T, et al. mROS-TXNIP axis activates NLRP3 inflammasome to mediate renal injury during ischemic AKI[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 98:43-53.

[5] KE H L, ZHANG Y W, ZHOU B F, et al. Effects of Danggui Buxue Tang, a traditional Chinese herbal decoction, on high glucose-induced proliferation and expression of extracellular matrix proteins in glomerular mesangial cells[J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(11):1022-1026.

[6] YE T S, ZHANG Y W, ZHANG X M. Protective effects of Danggui Buxue Tang on renal function, renal glomerular mesangium and heparanase expression in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(6):2477-2483.

[7] KWAN K K L, HUANG Y, LEUNG K W, et al. Danggui Buxue Tang, a Chinese herbal decoction containing Astragali Radix and Angelicae Sinensis Radix, modulates mitochondrial bioenergetics in cultured cardiomyoblasts[J]. *Front*, 2019, 10:614.

[8] WANG L, MA J, GUO C, et al. Danggui Buxue Tang attenuates tubulointerstitial fibrosis via suppressing NLRP3 inflammasome in a rat model of unilateral ureteral obstruction[J]. *Biomed Res Int*, 2016, doi: 10.1155/2016/9368483.

[9] KE R, WANG Y, HONG S, et al. Endoplasmic reticulum stress related factor IRE1 $\alpha$  regulates TXNIP/NLRP3-mediated pyroptosis in diabetic nephropathy[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 396(2):112293.

- [10] 靳贺超,于文涛,刘晓,等. 补肾活血方对血管性痴呆大鼠脑海马细胞凋亡及ERK2,CREB表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(12):129-135.
- [11] FORBES J M, THORBURN D R. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol,2018,14(5):291-312.
- [12] TANG S C W, YIU W H. Innate immunity in diabetic kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16 (4) : 206-222.
- [13] GILBERT R E. Diabetic kidney disease 2.0: the treatment paradigm shifts [J]. Lancet Diabetes Endocrinol,2019,7(11):820-821.
- [14] 孙晓泽,谭高峰,刘爱华. 消渴方加减对气阴两虚夹瘀型糖尿病肾病的内皮损伤、氧化应激及生化指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(9):43-48.
- [15] 陈勇,张捷平,余文珍,等. 石斛合剂对糖尿病肾病小鼠TNF- $\alpha$ 及IL-6表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(18):107-112.
- [16] 尹江宁,汪华君,卢国元,等. 熊果酸对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(17):132-138.
- [17] LEI X, ZHANG B D, REN J G, et al. Astragaloside suppresses apoptosis of the podocytes in rats with diabetic nephropathy via miR-378/TRAF5 signaling pathway[J]. Life Sci,2018,206:77-83.
- [18] WEN W C, BI F L, LIU X, et al. Bioactivities of major constituents isolated from *Angelica sinensis* [J]. Chinese Med,2011,6:29.
- [19] JEFFERSON J A, SHANKLAND S J, PICHLER R H. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint[J]. Kidney Int,2008,74(1):22-36.
- [20] MARTIN S D, MCGEE S L. The role of mitochondria in the aetiology of insulin resistance and type 2 diabetes [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840 (4) : 1303-1312.
- [21] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. Physiol Rev, 2014, 6 (3):909-950.
- [22] AN X, ZHANG Y, CAO Y, et al. Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway [J]. Nutrients, 2020, 12 (5) : 1516.
- [23] ZHANG C, ZHU X, LI L, et al. A small molecule inhibitor MCC950 ameliorates kidney injury in diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Diabet Metab Syndob, 2019,12:1297-1309.
- [24] MANGAN M S J, OLHAVA E J, ROUSH W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. Nat Rev Drug Discov,2018,17(9):688.

[责任编辑 孙丛丛]