

基于RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路探讨当归补血汤对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的影响

靳贺超¹, 张冠文¹, 梁胜然¹, 强家维¹, 郭登洲^{1,2*}

(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:观察当归补血汤对糖尿病肾病(DKD)大鼠足细胞损伤及受体相互作用蛋白激酶1/受体相互作用蛋白激酶3/混合系激酶区域样蛋白(RIPK1/RIPK3/MLKL)信号通路的影响,探讨其治疗DKD的可能作用机制。方法:50只SD大鼠随机选取8只设为正常组,其余大鼠6周高糖高脂饮食结合一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)0.035 g·kg⁻¹制备2型糖尿病大鼠模型。模型制备成功后随机分为模型组,当归补血汤高、低剂量(1.44, 0.72 g·kg⁻¹)组,厄贝沙坦(0.017 g·kg⁻¹)组。药物干预20周后检测各组大鼠空腹血糖(FBG),肾重指数(KI),尿微量白蛋白与尿肌酐比值(UACR);苏木素-伊红(HE)染色观察肾组织病理形态学变化;透射电镜观察足细胞超微结构变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠肾组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)水平;免疫组化法检测大鼠肾组织RIPK1, RIPK3, MLKL蛋白表达;原位末端标记法(TUNEL)检测大鼠肾脏足细胞凋亡率;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠肾组织RIPK1, RIPK3, MLKL mRNA表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织RIPK1, RIPK3, MLKL蛋白及足细胞标志蛋白肿瘤蛋白-1(WT-1)表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠FBG, UACR, KI显著升高($P<0.01$),肾小球肥大,基底膜增厚,系膜外基质增多,系膜增生,足突融合或丢失,肾组织凋亡细胞明显增多, TNF- α 及IL-6水平显著升高($P<0.01$), WT-1蛋白表达水平显著降低, RIPK1/RIPK3/MLKL mRNA及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FBG, UACR, KI水平,明显改善肾组织病理学,减少足细胞的丢失,减少肾组织细胞凋亡,降低TNF- α 及IL-6水平,升高WT-1蛋白表达水平,降低RIPK1/RIPK3/MLKL 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调控RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路,改善足细胞损伤,从而延缓DKD的发展进程。

[关键词] 当归补血汤; 糖尿病肾病; 足细胞; 受体相互作用蛋白激酶; 混合系激酶区域样蛋白

[中图分类号] R2-0; R289; R33; R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0041-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212440

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211102.0959.002.html>

[网络出版日期] 2021-11-03 9:46

Effect of Danggui Buxuetang on Podocyte Injury in Diabetic Kidney Disease Rats: An Exploration Based on RIPK1/RIPK3/MLKL Signaling Pathway

JIN He-chao¹, ZHANG Guan-wen¹, LIANG Sheng-ran¹, QIANG Jia-wei¹, GUO Deng-zhou^{1,2*}

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

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

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Danggui Buxuetang on the podocyte injury and receptor-interacting protein kinase 1/receptor-interacting protein kinase3/mixed lineage kinase domain-like protein (RIPK1/RIPK3/MLKL) signaling pathway in diabetic kidney disease (DKD) rats and to explore its possible mechanism against DKD. **Method:** Eight of the 50 SD rats were randomly classified into a normal group, and the remaining were fed a high-glucose and high-fat diet for six weeks and then intraperitoneally injected with

[收稿日期] 20210630(005)

[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

0.035 g·kg⁻¹streptozotocin (STZ) for inducing type 2 diabetes. After successful modeling, they were randomized into the model group, high- and low-dose (1.44, 0.72 g·kg⁻¹) Danggui Buxuetang groups, and irbesartan (0.017 g·kg⁻¹) group. After 20 weeks of drug intervention, the fasting blood glucose (FBG), kidney index (KI), and urinary microalbumin-to-urine creatinine ratio (UACR) were detected in each group. The pathological changes in renal tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, followed by the observation of ultrastructural changes in podocytes under the transmission electron microscope. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in renal tissue of rats were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the protein expression levels of RIPK1, RIPK3, and MLKL in rat kidney tissue by immunohistochemistry. The apoptosis rate of podocytes was detected by in situ nick end-labeling (TUNEL) assay. The mRNA expression levels of RIPK1, RIPK3, and MLKL in kidney tissue of rats were measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expression levels of RIPK, RIPK3, and MLKL and podocyte marker Wilms tumor protein-1 (WT-1) in rat kidney tissue were assayed by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group exhibited elevated FBG, UACR, and KI ($P<0.01$), glomerular hypertrophy, thickened basement membrane, increased extracellular matrix, mesangial hyperplasia, foot process fusion or loss, enhanced apoptosis in renal tissue, up-regulated TNF- α and IL-6 levels ($P<0.01$) and RIPK1/RIPK3/MLKL mRNA and protein expression ($P<0.01$), and down-regulated WT-1 protein expression. Compared with the model group, Danggui Buxuetang high-dose group significantly reduced the levels of FBG, UACR, and KI, improved renal histopathology, podocyte loss, and apoptosis in renal tissue, down-regulated TNF- α and IL-6 levels and RIPK1/RIPK3/MLKL mRNA and protein expression ($P<0.05$, $P<0.01$), and up-regulated WT-1 protein expression. **Conclusion:** Danggui Buxuetang alleviates podocyte injury and delays the development of DKD possibly by regulating the RIPK1/RIPK3/MLKL signaling pathway.

[Keywords] Danggui Buxuetang; diabetic kidney disease (DKD); podocytes; receptor-interacting protein kinase(RIPK); mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL)

糖尿病肾病(DKD)是指由糖尿病所致的慢性肾脏疾病,是一种以尿蛋白升高、预估肾小球滤过率下降、心血管疾病风险增加为特征的综合征,是糖尿病主要的微血管并发症之一^[1]。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^[2]。蛋白尿是DKD的标志,是肾病进展和心血管疾病的独立危险因素。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,足细胞数量减少直接导致DKD中的蛋白尿形成^[3]。坏死性凋亡是细胞程序性死亡的一种新形式,同时具有坏死和凋亡的特征,其途径主要由肿瘤坏死因子- α (TNF- α)激活,受体相互作用蛋白激酶1(RIPK1)去泛素化从而招募受体相互作用蛋白激酶3(RIPK3),RIPK1/RIPK3复合体招募并磷酸化混合系激酶区域样蛋白(MLKL),最终细胞膨胀和膜溶解导致坏死性细胞死亡^[4]。坏死性凋亡是足细胞减少的重要原因之一,实验证明干预足细胞坏死性凋亡能延缓和治疗DKD^[5]。

当归补血汤出自金元大家李东垣的《内外伤辨

惑论》,为临床经典的补气生血、益气活血名方。当归和黄芪相须为用,或补气生血或益气活血以起到协同增效作用。一项Meta分析表明当归补血汤联合ACEI/ARB类药物治疗DKD具有更好的疗效^[6]。动物实验表明,当归补血汤能降低24 h尿蛋白,改善足细胞损伤,减少DKD大鼠肾组织细胞凋亡^[7]。前期实验结果证实,DKD足细胞损伤过程中同时发生凋亡和坏死性凋亡,并且RIPK1/RIPK3的泛素化以及MLKL的磷酸化在足细胞坏死性凋亡中起主要作用^[5]。目前对于当归补血汤治疗DKD的机制尚未完全清楚,且凋亡与坏死性凋亡不易区分,既往研究可能多把坏死性凋亡归于凋亡,本次实验通过观察当归补血汤对DKD大鼠肾组织病理、足细胞损伤及RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路的影响,进一步探讨当归补血汤对DKD大鼠足细胞损伤的影响及潜在分子机制,以期为DKD的中药治疗提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠50只,7周龄,体质

量(200±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。本动物实验经由河北中医学院动物伦理委员会批准(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提供,批号分别为0071093,0061513),其中1g黄芪免煎颗粒相当于5g生药,1g当归免煎颗粒相当于3.3g生药,灌胃前以去离子水充分溶解为质量浓度0.36,0.72g·mL⁻¹的中药混悬液;厄贝沙坦片(浙江华海药业股份有限公司,75mg/片,批号H20030016,);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);微量白蛋白(mAlb)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号E038-1-1);苏木素-伊红(HE)染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1003);原位末端标记法(TUNEL)检测试剂盒(美国Millipore公司,批号S7100);高纯RNA提取试剂盒,Supersmart cDNA合成试剂盒,Supersmart SYBR Green试剂盒(天津中实基因公司,批号分别为ZS-M11005,ZS-M14003,ZS-M13001);RIPK1,RIPK3,MLKL,肿瘤蛋白-1(WT-1)兔多克隆抗体, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉ABclonal公司,批号分别为A7414,A5431,A13451,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);JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2255型全自动轮转式切片机(德国Leica公司);1-15K型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);HEMIX-180型全自动生化分析仪(日本Sysmex公司);BX53型光学显微镜(日本Olympus公司);HT7800型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);Infinite 200型酶标仪(瑞士Tecan公司);DYCZ-40K型电泳仪及转膜仪(北京六一仪器厂);7500fast实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)系统(美国ABI公司);Clinx ChemiScope荧光及化学发光成像系统(上海Clinx公司)。

2 方法

2.1 造模及分组 50只SD大鼠普通饲料适应性喂养1周,尾静脉检测空腹血糖均在正常范围。按随

机数字表法分为正常组8只和造模组42只,正常组普通饲料喂养,造模组高糖高脂饲料(北京博泰宏达生物技术有限公司,批号HD001)喂养。参照文献[8]方法,造模组大鼠高糖高脂饮食喂养6周后禁食不禁水12h,将STZ(0.1mmol·L⁻¹)溶于柠檬酸钠缓冲液(pH4.5)中,按0.035g·kg⁻¹剂量一次性腹腔注射,STZ注射后立即予高糖水灌胃。72h后尾静脉随机血糖>16.7mmol·L⁻¹则视为造模成功^[9],3只大鼠造模后死亡,2只大鼠血糖<16.7mmol·L⁻¹予以剔除。37只大鼠模型制备成功后按随机数字表法分为模型组10只、当归补血汤低剂量组9只、当归补血汤高剂量组9只、厄贝沙坦组9只。

2.2 给药及标本采集 按照人(70kg)与大鼠等效剂量折算系数确定大鼠灌胃剂量^[10],厄贝沙坦组灌服厄贝沙坦水溶液0.017g·kg⁻¹;当归补血汤低剂量组灌服当归补血汤溶液0.72g·kg⁻¹;当归补血汤高剂量组灌服当归补血汤水溶液1.44g·kg⁻¹;正常组及模型组予等体积生理盐水灌胃。1次/d,连续干预20周,各组大鼠每周监测体质量,根据体质量调整给药剂量。取材前各组大鼠分置于代谢笼中收集24h尿液以检测24h-mAlb,期间尾静脉测量空腹血糖(FBG)。药物干预20周后禁食不禁水12h后使用异氟烷吸入麻醉,股动脉采血,离心机分离上清用于生化指标检测;取左肾生理盐水冲洗,用滤纸吸干后称质量并计算肾重指数(KI),KI=肾脏质量/大鼠体质量×100%;左肾沿纵轴切开,取0.5cm厚肾皮质组织置于4%多聚甲醛固定;取肾皮质组织并切为1mm×1mm×1mm组织块,置于预冷后的2.5%戊二醛并4℃冰箱保存;取肾皮质切成3mm×3mm×3mm组织块置于冻存管,液氮速冻后转移至-80℃冰箱备检。

2.3 FBG,尿mAlb与尿肌酐(Cr)比值(UACR)检测 按照试剂盒要求使用全自动生化分析仪测定大鼠尿液中Cr含量;使用罗氏血糖仪尾静脉检测大鼠FBG;按照酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒要求测定24h-mAlb。

2.4 HE染色及透射电镜观察大鼠肾组织病理学改变 肾脏组织于4%多聚甲醛固定48h后石蜡包埋、切片(4 μ m),采用HE染色观察肾组织病理学变化;肾脏组织于2.5%戊二醛固定后,磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗、固定、脱水、丙酮树脂包埋、切片,使用透射电子显微镜观察足细胞超微结构的改变。

2.5 TUNEL检测大鼠肾组织细胞凋亡指数 组织切片机将肾皮质切为4 μ m薄片并置于载玻片上,脱

蜡脱水, PBS漂洗后加3% H₂O₂, 置37℃温箱40 min后PBS漂洗, 加蛋白酶K后孵育10 min, PBS漂洗。配置TUNEL反应混合物放于切片上, 放置37℃温箱1 h, PBS漂洗, 添加转化剂, 置温箱30 min后清洗, DAB显色, 苏木素轻度复染。脱水透明、中性树脂封片。光学显微镜拍照(×400), 每张切片随机选5个视野, 使用Image-Pro Plus软件统计每个视野中阳性细胞数及有核细胞总数, 以阳性细胞数/有核细胞总数为肾小球凋亡指数^[11]。

2.6 免疫组化法(IHC)检测大鼠肾组织 RIPK1, RIPK3, MLKL蛋白表达水平 肾组织切片脱蜡, 梯度乙醇水化, 抗原修复, 5%山羊血清封闭30 min, 滴加PBS稀释好的一抗(RIPK1, 1:200; RIPK3, 1:200; MLKL, 1:200)4℃孵育过夜, PBS洗涤3次后滴加稀释的二抗, 37℃孵育30 min, DAB显色, 脱水, 透明, 中性树脂封片。采用Image-Pro Plus 6.0软件对免疫组化图片(×400)进行半定量分析, 以积分吸光度IA/面积作为检测结果。

2.7 ELISA检测大鼠肾组织 TNF-α, IL-6含量 取出-80℃冰箱中的肾脏组织, 将肾组织研磨均匀, TNF-α, IL-6含量依据说明书使用ELISA试剂盒进行测定。

2.8 Real-time PCR检测大鼠肾组织 RIPK1, RIPK3, MLKL mRNA表达水平 肾组织液氮研磨, 采用高纯RNA提取试剂盒提取肾组织总RNA, 检测RNA纯度, Supersmart cDNA合成试剂盒反转录, 用Supersmart SYBR Green试剂盒进行Real-time PCR检测。以β-actin作为内参基因。反应条件为95℃预变性10 min, 95℃变性15 s, 60℃退火20 s, 循环40次。结果采用2^{-ΔΔC_t}法进行分析, 引物由中实(天津)检验检测有限公司合成, 序列见表1。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾脏 RIPK1, RIPK3, MLKL, WT-1蛋白表达 按照试剂

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
RIPK1	上游 TTCATGGTGCACAAACCCCT	240
	下游 TGACACAAGCGCAACAAAGG	
RIPK3	上游 CATCGATCTCTCTCGTGGGC	234
	下游 CGTACACGTAGTCCCCTCG	
MLKL	上游 GGGAACACTCCACGGAAACA	179
	下游 GATCTTGACAGTCTCTCGGGG	
β-actin	上游 CCCGCGAGTACAACCTTCTT	262
	下游 AGGGTCAGGATGCCTCTCTT	

盒说明提取大鼠肾脏组织蛋白, 采用BCA法测定蛋白浓度, 每管上清液中分别加入5×Loading buffer 50 μL, 100℃煮沸15 min, 使蛋白变性。按照SDS-RAGE凝胶电泳说明书进行电泳, PVDF转膜90 min。5%脱脂奶粉溶液封闭2 h, TBST清洗3次, 各一抗及内参β-actin均用TBST按1:1 000稀释, 37℃孵育24 h; 二抗使用TBST按1:5 000稀释并与膜接触, 37℃孵育1 h, 化学发光显影。使用Image J软件分析条带灰度值, 用目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度比值表示目的蛋白相对表达量。

2.10 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One-way ANOVA; 不符合采用非参数秩和检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对DKD大鼠FBG, UACR, KI的影响 与正常组比较, 模型组大鼠FBG, UACR, KI显著升高, 差异具有显著统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 当归补血汤高剂量组FBG明显降低($P < 0.05$), UACR, KI显著降低($P < 0.01$), 厄贝沙坦组UACR, KI明显降低, 差异具有明显统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 当归补血汤对DKD大鼠FBG, UACR及KI的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

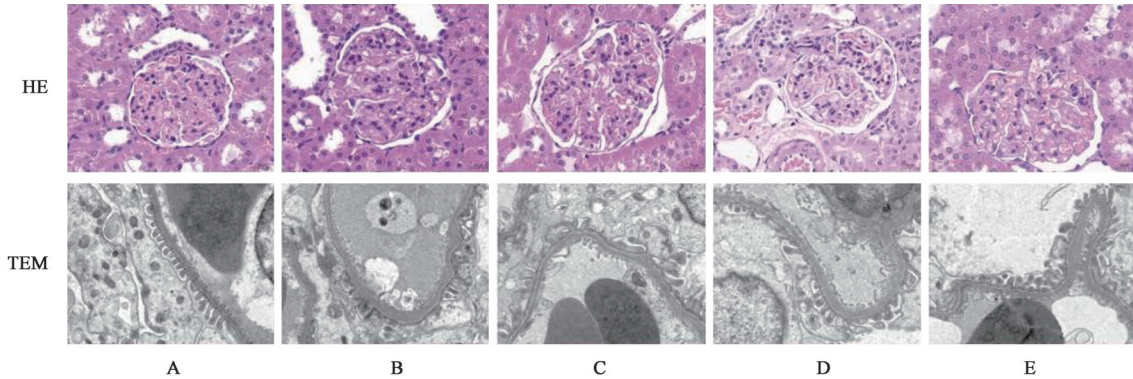
Table 2 Effect of Danggui Buxuetang on FBG, UACR, KI in DKD rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	UACR/mg·g ⁻¹	KI/g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹	
				给药前	20周
正常		32.57±2.93	5.81±0.86	6.40±0.73	6.50±0.75
模型		146.37±7.31 ¹⁾	17.01±1.27 ¹⁾	30.40±2.09 ¹⁾	28.70±2.60 ¹⁾
当归补血汤	0.72	137.41±6.97	15.94±1.12	29.60±2.20 ¹⁾	25.70±1.81
	1.44	81.28±4.77 ³⁾	13.67±0.95 ³⁾	30.50±2.07 ¹⁾	22.30±1.73 ²⁾
厄贝沙坦	0.017	115.43±6.29 ²⁾	15.10±1.07 ²⁾	30.00±1.93 ¹⁾	26.10±1.82

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3~7同)。

3.2 对DKD大鼠肾组织病理形态的影响 光镜下观察,与正常组比较,模型组大鼠肾小球肥大,系膜增生,系膜外基质增加,基底膜增厚;与模型组比较,各干预组大鼠肾组织病理均有不同程度的改

善。透射电镜下观察足细胞及基底膜超微结构,与正常组比较,模型组大鼠足细胞足突融合或消失,基底膜增厚;与模型组比较,当归补血汤各组大鼠肾组织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2~4同)

图1 当归补血汤对DKD大鼠肾组织病理形态的影响(HE,×400;TEM,×7000)

Fig. 1 Effect of Danggui Buxuetang on renal morphology in DKD rats (HE,×400;TEM,×7000)

3.3 对DKD大鼠肾组织TNF- α , IL-6水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠TNF- α , IL-6水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,当归补血汤高剂量组大鼠TNF- α , IL-6水平明显降低($P<0.05$)。见表3。

表3 当归补血汤对DKD大鼠肾组织TNF- α , IL-6水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Danggui Buxuetang on TNF- α , IL-6 in serum of DKD rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	TNF- α	IL-6
正常		22.18 \pm 3.27	20.14 \pm 2.13
模型		36.85 \pm 4.56 ¹⁾	41.10 \pm 3.72 ¹⁾
当归补血汤	0.72	30.36 \pm 3.15	32.50 \pm 2.87
	1.44	27.39 \pm 3.61 ²⁾	29.83 \pm 2.35 ²⁾
厄贝沙坦	0.017	29.01 \pm 3.10	33.43 \pm 2.92 ²⁾

3.4 对DKD大鼠肾组织RIPK1, RIPK3, MLKL蛋白定位表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠足细胞中RIPK1, RIPK3, MLKL表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组大鼠足细胞中RIPK1, RIPK3, MLKL表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见图2,表4。

较,当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组凋亡细胞均明显降低($P<0.05$)。见图3,表5。

3.5 对DKD大鼠肾组织凋亡的影响 与正常组比较,模型组凋亡细胞显著升高($P<0.01$);与模型组比

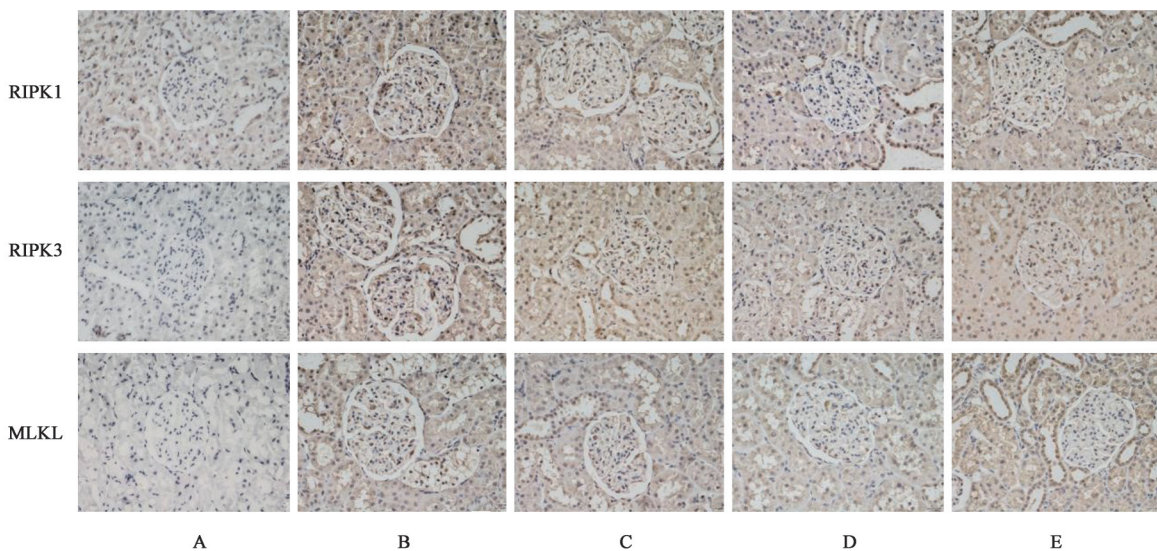


图2 当归补血汤对DKD大鼠肾组织RIPK1, RIPK3, MLKL定位表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 2 Effect of Danggui Buxuetang on expression of RIPK1, RIPK3, MLKL in DKD rats (IHC,×400)

表4 当归补血汤对DKD大鼠肾组织RIPK1,RIPK3,MLKL定位表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Danggui Buxuetang on expression of RIPK1,RIPK3,MLKL in DKD rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RIPK1	RIPK3	MLKL
正常		0.208±0.019	0.261±0.031	0.380±0.086
模型		0.337±0.032 ¹⁾	0.448±0.057 ¹⁾	0.579±0.103 ¹⁾
当归补血汤	0.72	0.331±0.029	0.423±0.063	0.541±0.095
	1.44	0.257±0.018 ³⁾	0.319±0.037 ³⁾	0.437±0.053 ³⁾
厄贝沙坦	0.017	0.316±0.028 ²⁾	0.395±0.049 ²⁾	0.479±0.061 ²⁾

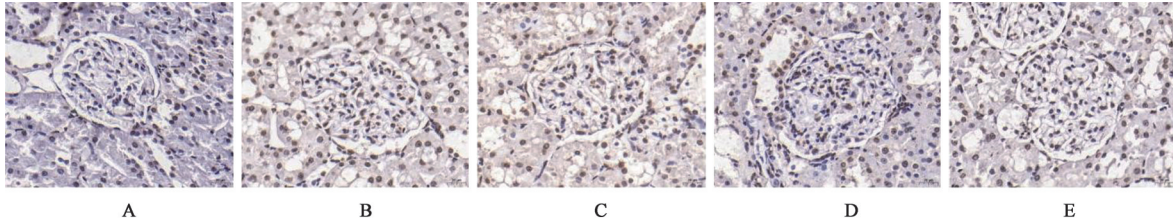


图3 当归补血汤对DKD大鼠肾组织细胞凋亡的影响(TUNEL,×400)

Fig. 3 Effect of Danggui Buxuetang on apoptosis of renal tissue in DKD rats (TUNEL,×400)

表5 当归补血汤对DKD大鼠肾组织细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Danggui Buxuetang on apoptosis of renal tissue in DKD rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡指数
正常		11.26±2.14
模型		58.47±4.52 ¹⁾
当归补血汤	0.72	49.54±4.10
	1.44	33.76±3.87 ²⁾
厄贝沙坦	0.017	40.69±4.34 ²⁾

表6 当归补血汤对DKD大鼠肾组织RIPK1,RIPK3,MLKL mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 6 Effect of Danggui Buxuetang on mRNA expression of RIPK1/RIPK3/MLKL in DKD rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RIPK1	RIPK3	MLKL
模型		1.83±0.14 ¹⁾	1.67±0.11 ¹⁾	1.79±0.13 ¹⁾
当归补血汤	0.72	1.68±0.12	1.59±0.05	1.65±0.08
	1.44	1.18±0.03 ²⁾	1.13±0.02 ²⁾	1.37±0.04 ²⁾
厄贝沙坦	0.017	1.47±0.09 ²⁾	1.42±0.03 ²⁾	1.66±0.05 ²⁾

注:设正常组各指标mRNA相对表达量为1。

3.6 对DKD大鼠肾组织RIPK1,RIPK3,MLKL mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠RIPK1,RIPK3,MLKL 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及厄贝沙坦组大鼠RIPK1,RIPK3,MLKL mRNA表达明显降低($P<0.05$)。见表6。

3.7 对DKD大鼠肾组织RIPK1,RIPK3,MLKL,WT-1蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠RIPK1,RIPK3,MLKL蛋白表达显著升高,模型组大鼠WT-1蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组

比较,当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组大鼠RIPK1,RIPK3,MLKL蛋白表达明显降低,当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组大鼠WT-1蛋白表达明显升高($P<0.05$)。见表7,图4。

4 讨论

DKD是慢性肾脏疾病的主要病因,也是导致终末期肾病(ESRD)最重要的单一因素。目前DKD的防治措施包括一般治疗、控制血糖、控制血压、纠正脂质代谢紊乱等,尽管肾素-血管紧张素系统(RAS)或降糖药物可延缓蛋白尿进展,但无证据显

表7 当归补血汤对DKD大鼠肾组织RIPK1,RIPK3,MLKL,WT-1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Danggui Buxuetang on protein expression of RIPK1/RIPK3/MLKL/WT-1 in DKD rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	RIPK1/ β -actin	RIPK3/ β -actin	MLKL/ β -actin	WT-1/ β -actin
正常		0.53±0.04	0.39±0.03	0.23±0.02	0.95±0.11
模型		0.82±0.09 ¹⁾	0.67±0.11 ¹⁾	0.43±0.08 ¹⁾	0.46±0.03 ¹⁾
当归补血汤	0.72	0.79±0.05	0.57±0.07	0.41±0.06	0.52±0.05
	1.44	0.66±0.07 ²⁾	0.46±0.04 ²⁾	0.35±0.05 ²⁾	0.74±0.09 ²⁾
厄贝沙坦	0.017	0.62±0.08 ²⁾	0.43±0.06 ²⁾	0.30±0.07 ²⁾	0.65±0.08 ²⁾

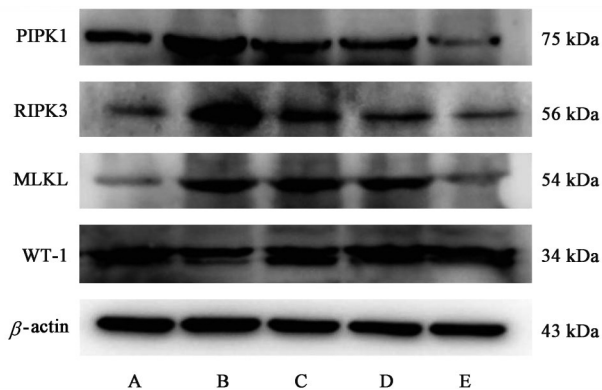


图4 肾组织中RIPK1, RPK3, MLKL, WT-1蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of RIPK1, RPK3, MLKL protein expression in renal tissue

示会缓解eGFR下降或延缓ESRD进展^[12]。近年来几种新型抗糖尿病药物如钠-葡萄糖协同转运蛋白2(SGLT2)抑制剂、胰高血糖素样肽1(GLP1)激动剂和内皮素受体拮抗剂在临床试验中显示出一定的肾保护作用,但肾脏疾病进展和并发症的风险仍然很高^[13]。随着中医药防治DKD理论和临床研究的不断进展,中医药在早期DKD防治中的优势逐渐显现^[14]。

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^[15]。因此益气活血法是治疗DKD早中期的关键。多项研究在辨证论治基础上,采用益气活血法治疗糖尿病血管病变取得显著疗效^[16-17]。当归补血汤为临床经典的补气生血、益气活血名方,由当归黄芪按1:5剂量组成。对DKD用药规律的数据挖掘发现^[18],有大量经验方都应用了黄芪,且与许多药味均存在有很强的关联度,表明具有益气固表、利尿作用的黄芪是DKD中医治疗的核心用药。现代药理研究发现,黄芪有效成分在抗炎、抗氧化、激活自噬抑制凋亡等方面体现出较好疗效^[19]。当归及其活性成分具有血管保护、免疫调节、抗氧化、抗炎等疗效^[20]。本实验中,模型组大鼠FBG, UACR, KI显著升高,光镜结果显示肾小球肥大、系膜增生、可见K-W结节、肾小管上皮细胞空泡变性,电镜结果显示基底膜增厚、足突融合或消失;经当归补血汤干预后,蛋白尿、血糖及肾组织病理明显改善,提示当归补血汤对DKD大鼠具有肾保护作用。

足细胞损伤在DKD的发生发展中起重要作用^[21]。DKD主要临床特点为特征性的组织形态变化、蛋白尿增加及进展性的肾功能减退,其中蛋白尿是肾脏损伤的临床标志,也是肾病进展的独立危

险因素。蛋白尿主要是由肾小球滤过屏障损伤导致的,该屏障由毛细血管内皮细胞、肾小球基底膜、足细胞构成,研究证明足细胞损伤直接导致DKD中的蛋白尿^[22]。足细胞是一种终末分化细胞,损伤后不易增殖和再生,足细胞数量反映足细胞丢失和增殖之间的平衡,足细胞焦亡/凋亡/坏死性凋亡均可导致足细胞数量减少。当各种原因导致足细胞数量减少(podocytopenia)时肾小球滤过屏障受损引起蛋白尿的发生^[1]。WT-1表达于足细胞核,可作为足细胞特异性标志以反映足细胞损伤程度及数量。本实验中,模型组大鼠UACR显著升高,足细胞超微结构显示足突融合或消失,足细胞数目减少,足细胞标志蛋白WT-1蛋白表达降低,而当归补血汤可改善这一过程,提示当归补血汤可通过改善足细胞损伤以降低蛋白尿进而延缓DKD进展。

DKD的发生和进展与足细胞损伤密切相关,而坏死性凋亡是足细胞损伤与数量减少的原因之一^[23]。研究发现坏死性凋亡为糖尿病肾损伤的一种重要细胞死亡模式,不依赖Caspase激活且具有典型坏死样形态,其通过RIPK1/RIPK3/MLKL途径进行调节^[5]。研究表明, TNF- α 激活肿瘤坏死因子受体(TNFR1)诱导RIPK1的表达^[24]。Caspase-8的激活与否是凋亡或坏死性凋亡的关键,当Caspase-8的激活受抑制时, RIPK1去泛素化从而招募RIPK3, RIPK1/RIPK3复合体招募并磷酸化MLKL,最终MLKL孔通过允许离子流入、细胞膨胀和膜溶解导致坏死性细胞死亡并诱发炎症,因此RIPK1与RIPK3形成复合体以及MLKL的磷酸化是坏死性凋亡的特异标志^[25]。其中MLKL为坏死性凋亡的“执行器”^[26], MLKL的N-端直接诱导膜破裂。本实验中,模型组大鼠肾组织中TNF- α , IL-6水平明显升高,免疫组化结果显示RIPK1/RIPK3/MLKL在模型组大鼠足细胞中高表达,肾组织中RIPK1/RIPK3/MLKL mRNA及蛋白表达均升高;当归补血汤干预后TNF- α , IL-6水平降低, RIPK1/RIPK3/MLKL在足细胞中表达降低,肾组织中RIPK1/RIPK3/MLKL mRNA及蛋白表达均降低,提示当归补血汤可能通过调控RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路进而改善足细胞损伤。

综上所述,予当归补血汤干预后,DKD大鼠蛋白尿减少,肾脏病理损伤减轻,足细胞损伤缓解,其机制可能与调控RIPK1/RIPK3/MLKL信号通路相关蛋白表达,改善足细胞损伤有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突

[参考文献]

- [1] FORBES J M, THORBURN D R. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(5):291-312.
- [2] TANG S C W, YIU W H. Innate immunity in diabetic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(4):206-222.
- [3] 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.
- [4] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5):1106-1121.
- [5] XU Y, GAO H, HU Y, et al. High glucose-induced apoptosis and necroptosis in podocytes is regulated by UCHL1 via RIPK1/RIPK3 pathway [J]. *Exp Cell Res* 2019, 382(2):111463.
- [6] 万亚琴,王小琴. 当归补血汤加减联合 ACEI/ARB 类药物治疗 III 期和 IV 期糖尿病肾病的 Meta 分析 [J]. *广东药科大学学报*, 2021, 37(2):78-84.
- [7] 张思泉,张莹雯,帅瑜,等. 当归补血汤对糖尿病肾病大鼠肾组织 ATF6、CHOP、Caspase-3 表达的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2018, 52(4):91-95.
- [8] 杨帆,曹晨,方敬,等. 水蛭冻干粉对糖尿病肾病大鼠肾组织损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2021, 52(4):1020-1025.
- [9] 田春雨,薄海美,林飞武,等. 双益方改善 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗的药效及作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(22):137-142.
- [10] 靳贺超,于文涛,刘晓,等. 补肾活血方对血管性痴呆大鼠海马细胞凋亡及 ERK2、CREB 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12):129-135.
- [11] 高飞,王泽泽,杨冰,等. 加味升降散对膜性肾病大鼠 Notch 信号通路及足细胞凋亡的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(4):30-36.
- [12] GILBERT R E. Diabetic kidney disease 2.0: the treatment paradigm shifts [J]. *Lancet Diabetes Endo*, 2019, 7(11):820-821.
- [13] TUTTLE K R. The landscape of diabetic kidney disease transformed [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(2):67-68.
- [14] 刘敏,何清湖,莫小书. 糖肾康胶囊治疗气阴两虚夹瘀型早期糖尿病肾病临床疗效观察 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(10):5316-5319.
- [15] 高彦彬,刘铜华,李平. 糖尿病肾病中医防治指南 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2011, 9(4):151-153.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 文玉敏,董兴鲁,李平. 糖尿病肾病证候及用药规律的数据挖掘研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(10):3665-3370.
- [19] WANG E, WANG L, DING R, et al. Astragaloside IV acts through multi-scale mechanisms to effectively reduce diabetic nephropathy [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157:104831.
- [20] WEN W C, BI F L. Bioactivities of major constituents isolated from *Angelica sinensis* [J]. *Chin Med*, 2011, 6:29.
- [21] WOLF G, ZIYADEH F N. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy [J]. *Nephron Physiology*, 2007, 106(2):26-31.
- [22] LI J J, KWAK S J, JUNG D S, et al. Podocyte biology in diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2007, (106):S36-S42.
- [23] DAI H, LIU Q, LIU B. Research progress on mechanism of podocyte depletion in diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2017, doi: 10.1155/2017/2615286.
- [24] GUNTHER C, MARTINI E, WITTKOPF N, et al. Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis [J]. *Nature*, 2011, 477(7364):335-339.
- [25] NEWTON K, DUGGER D L, MALTZMAN A, et al. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(9):1565-1576.
- [26] MURPHY J M, CZABOTAR P E, HILDEBRAND J M, et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism [J]. *Immunity*, 2013, 39(3):443-453.

[责任编辑 孙丛丛]