

# 黄芪散微丸对糖尿病肾病大鼠肾脏PI3K/Akt/mTOR通路及自噬的影响

列倍锋<sup>1</sup>, 程芳<sup>1\*</sup>, 段婷婷<sup>2</sup>, 李敏仪<sup>2</sup>, 陈德琪<sup>2</sup>

(1. 中山大学药学院, 广东 深圳 518107;

2. 广州康臣药物研究有限公司, 广州 510530)

**[摘要]** 目的:研究黄芪散微丸(HQS)对糖尿病肾病(DN)大鼠肾脏磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路的影响,探讨其对自噬的影响。方法:采用高脂饲料喂养联合腹腔注射链脲佐菌素(35 mg·kg<sup>-1</sup>)建立DN大鼠模型。DN大鼠随机分为模型组、厄贝沙坦(0.027 g·kg<sup>-1</sup>)组、HQS低剂量(0.54 g·kg<sup>-1</sup>)组和HQS高剂量(1.08 g·kg<sup>-1</sup>)组。连续给药12周后检测各组大鼠24 h尿蛋白定量(UTP),血清白蛋白(Alb),血肌酐(SCr),尿素氮(BUN),甘油三酯(TG),总胆固醇(TC)含量;苏木素-伊红(HE)染色观察肾脏组织病理形态学变化;免疫组化检测肾脏组织足细胞裂孔膜蛋白(Nephrin)、膜蛋白(Podocin)蛋白表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾脏组织PI3K/Akt/mTOR信号蛋白表达及其磷酸化水平,以及自噬关键分子酵母Atg6同系物1(Beclin1)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠24 h UTP,血清中SCr、BUN、TG、TC水平均显著升高,Alb水平显著下降( $P<0.01$ );肾皮质中肾小管上皮细胞发生明显的颗粒样变性,毛细血管基底膜明显增厚,系膜细胞增生明显,肾小球发生硬化性改变;足细胞标志蛋白Nephrin、Podocin蛋白表达显著下降( $P<0.01$ );肾组织中磷酸化(p)-PI3K、p-Akt、p-mTOR及自噬标志物LC3、Beclin1蛋白表达显著下降( $P<0.01$ )。与模型组比较,厄贝沙坦组和HQS各剂量组大鼠24 h UTP,血清中SCr、BUN、TG、TC水平不同程度降低,Alb水平明显升高;肾脏病理损害不同程度减轻;肾小球的足细胞裂孔隔膜蛋白Nephrin、Podocin蛋白表达不同程度升高;肾组织中p-PI3K/p-Akt/p-mTOR及自噬标志物LC3、Beclin1蛋白表达不同程度升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结论:HQS可能通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路,增强足细胞自噬,保护肾小球,减缓了DN的发展进程。

**[关键词]** 黄芪散微丸;糖尿病肾病;磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路;自噬

**[中图分类号]** R2-0;R285;R33;R587.1;R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0011-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220641

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220125.1120.002.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-27 10:17

## Effect of Huangqisan Pellets on PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Autophagy in Kidney of Diabetic Nephropathy Rats

LIE Bei-feng<sup>1</sup>, CHENG Fang<sup>1\*</sup>, DUAN Ting-ting<sup>2</sup>, LI Min-yi<sup>2</sup>, CHEN De-qi<sup>2</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China;

2. Guangzhou Consun Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510530, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Huangqisan pellets (HQS) on the phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway and autophagy in the kidney of diabetic nephropathy (DN) rats. **Method:** DN rat model was established through high-fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (35 mg·kg<sup>-1</sup>). DN rats were randomly assigned into model group, irbesartan (0.027 g·kg<sup>-1</sup>) group, low-dose HQS (0.54 g·kg<sup>-1</sup>) group

**[收稿日期]** 2021-08-04

**[基金项目]** 广东省科学技术厅项目(2020A050515013)

**[第一作者]** 列倍锋,在读硕士,从事中医药防治肾病的研究工作,E-mail:952461342@qq.com

**[通信作者]** \*程芳,副教授,硕士生导师,从事慢性溃疡及相关肿瘤发生发展机制研究及新药研发,E-mail:chengf9@mail.sysu.edu.cn

and high-dose HQS ( $1.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group. The levels of 24 h urinary total protein (UTP), serum albumin (Alb), serum creatinine (SCr), urea nitrogen (BUN), triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were measured after 12 weeks of continuous administration. The pathological changes of renal tissue were observed via hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of podocyte split diaphragm proteins nephrin and podocin in the renal tissue were detected by immunohistochemistry. The protein levels and phosphorylation of key proteins in PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, as well as the expression of yeast Atg6 homolog (Beclin1) and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in the renal tissue were analyzed by Western blot. **Result:** Compared with the control group, the model group showcased increased 24 h UTP, SCr, BUN, TG, and TC levels and decreased Alb level ( $P < 0.01$ ). After modeling, the rats showed granulosity of epithelial cells of renal tubules, thickening of capillary basement membrane, proliferation of mesangial cells, and sclerosis of glomerulus. Furthermore, modeling down-regulated the expression of nephrin and podocin in the podocyte hiatus of glomerulus ( $P < 0.01$ ) as well as the protein levels of p-PI3K, p-Akt, and p-mTOR and the autophagy markers LC3 and Beclin1 in renal tissue ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, irbesartan and HQS decreased the 24 h UTP, Cr, BUN, TG, and TC levels, increased the Alb level, and alleviated the pathological damage of kidney. Moreover, they up-regulated the expression of Nephrin and Podocin in the podocyte hiatus of glomerulus, as well as the protein levels of p-PI3K, p-Akt, p-mTOR, LC3, and Beclin1 in renal tissue ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** HQS may inhibit the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway to enhance podocyte autophagy and protect the glomerulus, thus slowing down the development of DN.

**[Keywords]** Huangqisan pellets; diabetic nephropathy; phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway; autophagy

糖尿病肾病(DN)是一种严重的糖尿病微血管并发症,为慢性进行性疾病,是终末期肾病(ESRD)的常见病因,发病率和死亡率都很高<sup>[1-2]</sup>。因此,防治DN,提高患者生活质量,降低ESRD的死亡率,是目前亟待解决的问题。尿蛋白是DN患者的典型症状之一,与肾小球基底膜增厚有关<sup>[3]</sup>。足细胞完整性是维持肾小球正常功能的基础,足细胞损伤是导致DN的蛋白尿的直接原因<sup>[4]</sup>。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路为糖尿病肾病中重要信号转导途径,该信号通路的过度激活会影响DN的进程<sup>[5]</sup>。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是调控自噬的关键激酶,其活性依赖于调节PI3K/Akt通路。PI3K/Akt/mTOR是自噬的负调控通路,在维持足细胞稳态中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。

前人研究表明,黄芪散能有效调节肥胖大鼠的糖脂代谢<sup>[7]</sup>;能减少脂质合成,改善糖尿病大鼠肝脏胰岛素抵抗<sup>[8]</sup>;临床研究发现黄芪散能有效降低DN患者蛋白尿<sup>[9]</sup>,从而保护肾脏,但机制尚未阐明,需进一步研究揭示。黄芪散微丸(HQS)为广州康臣药业有限公司在经典古方黄芪散基础上,采用现代生产工艺添加辅料以达到提高黄芪散浸膏的稳定性而研制的中药新药,本品制成包衣微丸既可提高载药量,又可发挥其抗湿、抗氧化等特点,目前已获

得临床试验许可。本研究以PI3K/Akt/mTOR信号通路为研究方向,探讨HQS对DN大鼠肾组织自噬的影响及潜在的分子机制,为DN的防治提供更多的选择。

## 1 材料

**1.1 动物** 8周龄,体质量( $200 \pm 20$ ) g, SPF级雄性SD大鼠70只,购自南方医科大学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2016-0041。在中山大学以普通饲料、自由饮水和进食条件饲养,室内温度( $24 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,湿度55%~60%。本动物实验经由中山大学动物伦理委员会批准,伦理审查编号SYSU-IACUC-2021-000006。普通饲料购自南方医科大学实验动物中心,饲料生产合格证号京饲证(2018)06073;40%高脂饲料购自上海普路腾生物科技有限公司,饲料生产合格证号沪饲证(2018)04001。

**1.2 药品与试剂** HQS(广州康臣药业有限公司,批号2007027),由黄芪10 g、葛根20 g、桑白皮10 g组成,均购自亳州惠康中药饮片有限公司,所有饮片经广州康臣药物研究有限公司王汝上高级工程师鉴定符合2015年版《中华人民共和国药典》相关规定。HQS制备方法为参考文献[10]方法制备黄芪散浸膏,后加适量微晶纤维素、滑石粉混匀,加适量水制软材,挤出滚圆成微丸,干燥,包薄膜衣,干

燥,过筛,质检,包装,即得。厄贝沙坦片(翰晖制药有限公司,批号19001011);链脲佐菌素(STZ,广州捷倍斯生物科技有限公司,批号2004STR012);弗氏不完全佐剂(CFA,美国Sigma公司,批号SLBF2619V);24 h尿蛋白定量(UTP)、肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、白蛋白(Alb)、胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20190920、20190911、20190917、20191227、20200507、20200507);磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、磷酸化(p)-PI3K、蛋白激酶B(Akt)、p-Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-mTOR抗体(美国CST公司,批号分别为4257S、4228S、9272S、9271S、2983S、5536S); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、足细胞裂孔膜蛋白(Nephrin)、膜蛋白(Podocin)、自噬关键分子酵母Atg6同系物1(Beclin1)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、山羊抗小鼠IgG(英国Abcam公司,批号分别为ab8227、ab58968、ab50339、ab62557、ab48394、ab6721、ab6789);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、兔/鼠IgG-两步法免疫组化试剂盒(博士德生物工程有限公司,批号分别为15E20C80、16A05G2904);RIPA裂解液、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、增强化学发光法(ECL)超敏发光液(碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0013B、P0012A、P0018S)。

**1.3 仪器** 5424型离心机(德国Eppendorf公司);spectraMax 190型酶标仪(美国Molecular Devices公司);1658033型蛋白凝胶转印系统(美国Bio-Rad公司);BX51WI型显微镜(日本Olympus公司);Tanon-5200Multi型全自动化学发光荧光成像系统(上海天能科技有限公司);Matrx™ VIP 3000型小动物麻醉机(美国Midmark公司);安稳型血糖仪(深圳三诺生物传感股份有限公司);MB100-4P型微孔板恒温振荡器(杭州奥盛仪器有限公司);TS-8型转移脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模、分组** 70只SD大鼠适应性观察7 d后,选取8只尿蛋白、血糖均阴性大鼠作为正常组,给予普通饲料。剩余动物作为造模组,实验期间均给予高脂饲料饲养。造模组大鼠,腹腔注射STZ(30 mg·kg<sup>-1</sup>),次日腹腔注射CFA 0.1 mL/只,正常组大鼠注射相应体积的枸橼酸缓冲液,每周1次,连续3周。3周后,尾静脉取血检测血糖,收集24 h尿液,

检测尿24 h UTP,血糖 $\geq 16.7$  mmol·L<sup>-1</sup>且24 h UTP $\geq 30$  mg为造模成功的动物。将造模成功的大鼠随机分为模型组、厄贝沙坦组、HQS低、高剂量组,每组8只。

**2.2 给药及采样** HQS临床拟用量为12 g·d<sup>-1</sup>,厄贝沙坦临床最大剂量为0.3 g·d<sup>-1</sup>,根据人和动物体表面积折算等效剂量比率表计算<sup>[11]</sup>,HQS低、高剂量分别为0.54、1.08 g·kg<sup>-1</sup>,厄贝沙坦27 mg·kg<sup>-1</sup>,各给药组按10 mL·kg<sup>-1</sup>体质量灌胃,正常组和模型组给予等体积生理盐水,每日1次,连续给药12周。给药干预次日,收集大鼠24 h的尿液,大鼠在禁食12 h后麻醉,腹主动脉取血,4℃,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径8.4 cm,下同)制备血清,-80℃保存备用;快速分离两侧肾脏,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,左肾放于4%多聚甲醛中,室温固定48 h备用,右肾置于冰上,取部分皮质置于冻存管,先放于液氮,再转存于-80℃冰箱备用。

**2.3 生化指标检测** 严格按照试剂盒的说明书操作步骤使用酶标仪检测大鼠24 h UTP及血清中的SCr、BUN、Alb、TC、TG的含量。

**2.4 肾脏组织病理学变化** 取出4%多聚甲醛固定液中的左肾,石蜡包埋,切片后进行HE染色,光学显微镜观察肾组织变化。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PI3K/Akt/mTOR信号通路相关分子及自噬标志物LC3、Beclin1的蛋白表达** 取研碎的肾皮质组织100 mg,加入RIPA蛋白裂解液,组织研磨机低温高速研磨。充分裂解后,4℃,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清液,检测总蛋白浓度,按4:1加入蛋白上样缓冲液,100℃变性10 min备用。制备10%SDS-PAGE胶后,于电泳槽中加入蛋白样品35  $\mu$ g,先80 V恒压电泳30 min,再120 V恒压电泳60 min;200 mA恒流下PVDF转膜120 min,5%脱脂牛奶封闭120 min。加入稀释好的一抗PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、LC3、Beclin1(稀释倍数均为1:1 000), $\beta$ -actin(1:1万),4℃孵育过夜。PBS洗膜后,加入稀释好的二抗(1:6 000),室温孵育60 min,PBS再次洗膜,增强化学发光法(ECL)显色,用Image Pro Plus 6.0软件分析条带的灰度值。

**2.6 免疫组化(IHC)检测大鼠肾组织白Nephrin、Podocin的表达** 肾组织石蜡切片常规脱蜡、柠檬酸缓冲液修复抗原、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消除内源性过氧化物酶,Nephrin、Podocin一抗(1:100)4℃孵育过夜,37℃复温后,加二抗(1:1 000),37℃孵育1 h,DAB染

色,苏木素复染,中性树脂封片。每张切片随机选取5个视野( $\times 200$ )。Image Pro Plus 6图像分析软件进行半定量分析。

**2.7 统计学分析** 数据结果采用SPSS 17.0进行统计分析,当数据符合正态和方差齐时,各组间比较采用单因素方差分析,所有数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对DN大鼠症状及体征的影响** 实验期间,正常组大鼠饮食量正常,自主活动正常,皮毛光亮顺滑,反应灵敏。模型大鼠多饮,多食,多尿,体质量下降明显,皮毛凌乱发黄且易脱落,有蜷缩懒动,嗜

睡,肢体发冷等现象。给药后,各给药组大鼠的症状和体征较模型组均有一定改善,自主活动增加,皮毛光泽度好转。其中,以黄芪散高剂量组大鼠的症状和体征恢复最佳。

**3.2 对DN大鼠肾功能及血脂的影响** 与正常组比较,模型组大鼠UTP、SCr、BUN、TC、TG水平均显著升高( $P < 0.01$ ),Alb水平显著下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,HQS高剂量组UTP水平明显下降( $P < 0.05$ ),各给药组SCr、BUN、TG水平均有不同程度下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ),HQS各剂量组TC水平显著下降( $P < 0.01$ ),HQS高剂量组和厄贝沙坦组的Alb水平明显上升( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表1。

表1 HQS对DN大鼠肾功能及血脂含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

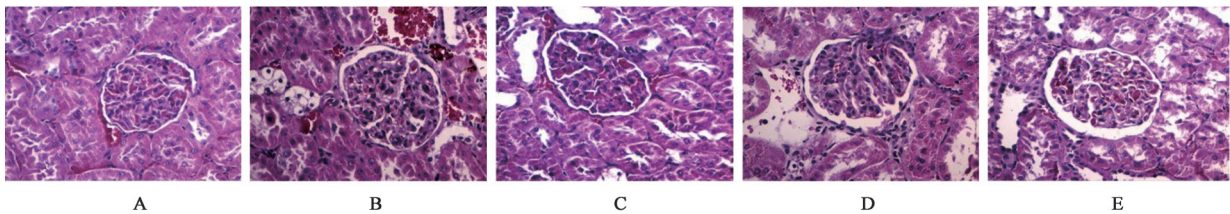
Table 1 Effect of HQS pellets on renal function and blood lipid content in DN rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	UTP/mg	Alb/ $g \cdot L^{-1}$	SCr/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	BUN/ $mmol \cdot L^{-1}$	TC/ $mmol \cdot L^{-1}$	TG/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
正常组		8.38 $\pm$ 4.79	36.74 $\pm$ 1.56	135.58 $\pm$ 7.58	5.03 $\pm$ 0.72	2.33 $\pm$ 0.32	0.75 $\pm$ 0.19
模型组		37.96 $\pm$ 16.08 <sup>1)</sup>	26.82 $\pm$ 2.28 <sup>1)</sup>	223.76 $\pm$ 16.61 <sup>1)</sup>	22.23 $\pm$ 2.15 <sup>1)</sup>	4.56 $\pm$ 0.69 <sup>1)</sup>	4.32 $\pm$ 1.48 <sup>1)</sup>
厄贝沙坦组	0.027	30.61 $\pm$ 8.93	29.09 $\pm$ 2.73 <sup>2)</sup>	191.94 $\pm$ 10.16 <sup>3)</sup>	12.99 $\pm$ 3.58 <sup>3)</sup>	4.42 $\pm$ 0.29	1.64 $\pm$ 0.40 <sup>3)</sup>
HQS低剂量组	0.54	30.08 $\pm$ 16.01	25.47 $\pm$ 1.18	196.43 $\pm$ 17.25 <sup>3)</sup>	17.67 $\pm$ 3.27 <sup>3)</sup>	3.60 $\pm$ 0.24 <sup>3)</sup>	3.44 $\pm$ 0.66 <sup>2)</sup>
HQS高剂量组	1.08	24.77 $\pm$ 7.86 <sup>2)</sup>	32.32 $\pm$ 1.34 <sup>3)</sup>	158.85 $\pm$ 17.84 <sup>3)</sup>	10.47 $\pm$ 1.04 <sup>3)</sup>	3.58 $\pm$ 0.25 <sup>3)</sup>	1.51 $\pm$ 0.42 <sup>3)</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-表4同)

**3.3 对DN大鼠肾脏病理学改变的影响** 正常组动物肾皮质部结构完整肾小球未见硬化性改变,肾小囊中毛细血管上皮细胞未见损伤,基底膜未见增厚,系膜未见增生,肾小管上皮细胞未见颗粒和空泡样变性,肾小管上皮细胞未见萎缩。模型组动物

肾皮质中肾小管上皮细胞发生明显的颗粒样变性,肾小球囊腔明显变窄,毛细血管基底膜明显增厚,系膜细胞增生明显,肾小球发生硬化性改变。与模型组比较,厄贝沙坦组和HQS各剂量组能明显改善肾皮质组织的病理改变。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.厄贝沙坦组;D~E.HQS低、高剂量组(图2-图5同)

图1 HQS对DN大鼠肾组织病理形态学的影响(HE, $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of HQS on renal pathophysiology in DN rats (HE,  $\times 400$ )

**3.4 对DN大鼠肾组织PI3K/Akt/mTOR信号通路蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠肾组织的p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,HQS各剂量组的p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR均有不同程度下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ),厄贝沙坦组p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR均显著下降( $P < 0.01$ ),p-PI3K/PI3K下降不明显。见图2,表2。

**3.5 对DN大鼠肾组织足细胞的裂孔隔膜蛋白Nephrin、Podocin蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠Nephrin和Podocin的蛋白表达均显著下降( $P < 0.01$ );与正常组比较,HQS高剂量组Nephrin蛋白表达明显上升( $P < 0.05$ ),HQS低剂量组和厄贝沙坦组Nephrin蛋白表达上升不明显;与正常组比较,HQS各剂量组和厄贝沙坦组Podocin蛋白表达显著上升( $P < 0.01$ )。见图3和图4、表3。

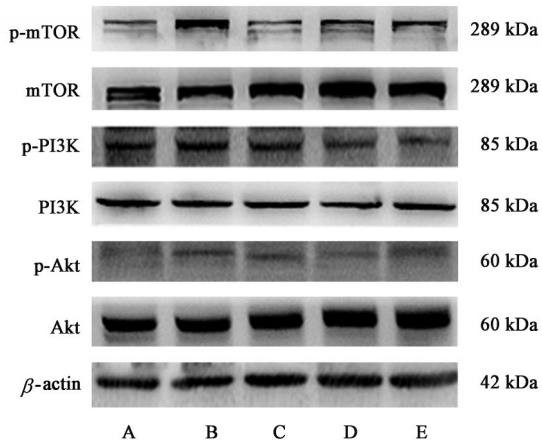


图2 DN大鼠肾组织PI3K/Akt/mTOR蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of PI3K/Akt/mTOR protein expression in kidney

**3.6 对DN大鼠肾组织凋亡因子LC3, Beclin1蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠LC3 II/LC3 I与Beclin1的蛋白表达均显著下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,HQS高剂量组LC3 II/LC3 I明显上升( $P < 0.05$ ),HQS低剂量组和厄贝沙坦组LC3 II/LC3 I上升不明显。见图5、表4。

#### 4 讨论

进行性DN不仅与血流动力学和代谢紊乱有

关,还与氧化应激和炎症所致,这些异常都会引起蛋白尿,临床上也将蛋白尿作为评估DN进展的重要指标<sup>[12]</sup>。肾小球对原尿蛋白质进行滤过,近曲小管负责对90%滤过后的蛋白进行重吸收,肾小球和(或)肾小管功能异常往往会引起尿蛋白。本研究的造模方法,使大鼠肾小球毛细血管基底膜明显增厚,系膜细胞增生明显,足细胞发生不同程度的损伤,肾小球囊腔明显变窄,肾小球发生硬化性改变,大鼠的肾功能和血脂均发生恶劣的变化。经HQS干预后,大鼠的血脂、蛋白尿及肾脏病理损伤得到明显的改善。

足细胞是一种独特的高分化的肾小球末梢上皮细胞,作为组成肾小球的核心细胞之一,能通过合成肾小球基底膜(GBM)的成分<sup>[13]</sup>、形成裂隙膜<sup>[14]</sup>和确保内皮细胞活力<sup>[15]</sup>等途径来维持肾小球过滤屏障。DN损伤后足细胞形态学改变包括足细胞肥大、上皮-间充质转化(EMT)、足细胞脱离和凋亡<sup>[16]</sup>。在足细胞间连接的裂孔隔膜蛋白在协调足细胞间连接动力学和细胞骨架动力学中起着关键性作用,分子遗传学研究表明,Nephrin-Neph1-Podocin受体复合物对于建立和维持选择性肾小球滤过是必要的<sup>[17]</sup>。研究证明,DN的裂孔隔膜蛋白

表2 黄芪散微丸对DN大鼠PI3K/Akt/mTOR信号通路蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of HQS on expression of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway protein in DN rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
正常组		0.58±0.06	0.38±0.01	0.56±0.10
模型组		0.76±0.04 <sup>1)</sup>	0.69±0.14 <sup>1)</sup>	1.21±0.22 <sup>1)</sup>
厄贝沙坦组	0.027	0.67±0.06	0.44±0.01 <sup>3)</sup>	0.48±0.15 <sup>3)</sup>
HQS低剂量组	0.54	0.61±0.06 <sup>2)</sup>	0.29±0.02 <sup>3)</sup>	0.67±0.10 <sup>3)</sup>
HQS高剂量组	1.08	0.45±0.07 <sup>3)</sup>	0.36±0.02 <sup>3)</sup>	0.75±0.11 <sup>3)</sup>

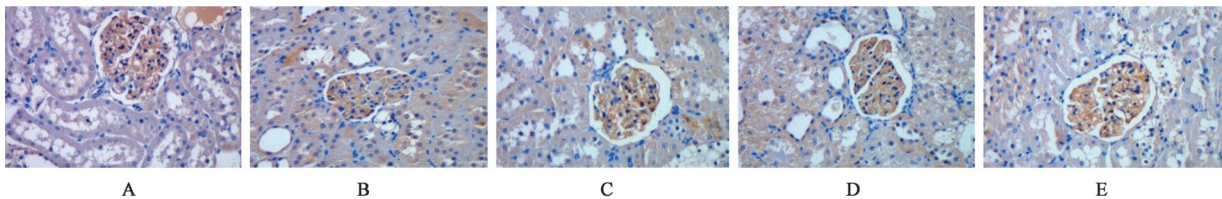


图3 黄芪散微丸对DN大鼠Nephrin表达影响(免疫组化,×400)

Fig. 3 Effect of HQS on expression of Nephrin in DN rats (IHC, ×400)

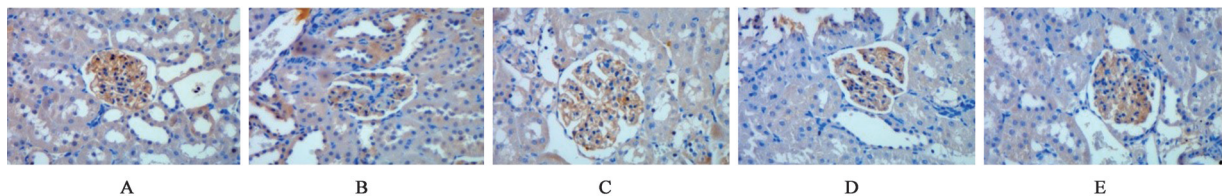


图4 黄芪散微丸对DN大鼠Podocin表达影响(免疫组化,×400)

Fig. 4 Effect of HQS on expression of Podocin in DN rats (IHC, ×400)

表 3 HQS 对 DN 大鼠肾组织中 Nephryn、Podocin 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of HQS on expression of Nephryn and Podocin in kidney tissues of D rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Nephryn	Podocin
正常组		0.016 9±0.004 6	0.029 3±0.002 9
模型组		0.000 3±0.000 1 <sup>1)</sup>	0.001 2±0.000 2 <sup>1)</sup>
厄贝沙坦组	0.027	0.002 1±0.001 5	0.016 7±0.003 0 <sup>3)</sup>
HQS 低剂量组	0.54	0.002 9±0.001 9	0.011 4±0.001 5 <sup>3)</sup>
HQS 高剂量组	1.08	0.005 7±0.001 7 <sup>2)</sup>	0.017 8±0.001 9 <sup>3)</sup>

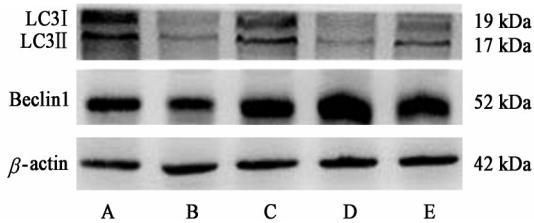


图 5 DN 大鼠肾组织 LC3、Beclin1 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of LC3, Beclin1 protein expression in kidney of DN rats

表 4 HQS 对 DN 大鼠肾组织中 LC3、Beclin1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of HQS on expression of LC3 and Beclin1 in kidney tissues of D rats ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LC3 II /LC3 I	Beclin1/β-actin
正常组		0.563±0.105	0.710±0.089
模型组		0.320±0.075 <sup>1)</sup>	0.360±0.108 <sup>1)</sup>
厄贝沙坦	0.027	0.463±0.093	0.743±0.148 <sup>3)</sup>
HQS 低剂量组	0.54	0.413±0.086	0.590±0.123 <sup>2)</sup>
HQS 高剂量组	1.08	0.507±0.076 <sup>2)</sup>	1.130±0.106 <sup>3)</sup>

会明显下调<sup>[18]</sup>。本研究中,免疫组化结果显示, HQS 能明显上调足细胞连接处的 Nephryn、Podocin 表达,从而维持足细胞间的链接,稳定 GBM,进一步保护肾小球过滤屏障。

有研究表明足细胞的自噬在 DN 中被抑制,从而加速 DN 不可修复的进展<sup>[19]</sup>。HARTLEBEN 等<sup>[20]</sup>认为,诱导自噬是防止足细胞老化和肾小球损伤的主要保护机制,是改善人类肾小球疾病和衰老相关肾功能丧失的一个假定靶点。据报道,PI3K/Akt/mTOR 信号通路是参与足细胞自噬调节的众多机制之一。PI3K/Akt 通路被认为介导了肾细胞的存活,而 mTOR 已被证实在 Akt 介导的细胞存活中发挥关键作用,其还通过影响许多细胞过程在调节细胞增殖和器官生长中发挥重要作用。受胞外信息刺激,PI3K 被磷酸化后, Akt 通过磷酸化而激活,进而 mTOR 被磷酸化,激活 mTOR 复合物,进一步调控下游的效应因子来影响自噬相关基因的转录和翻

译<sup>[21]</sup>。本研究中,与模型组比较,经 HQS 治疗的动物,肾组织的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的表达明显下降,自噬标志物蛋白 LC3, Beclin1 的表达明显增加,表明 HQS 可能通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来调控足细胞的自噬,进一步保护肾小球,减少蛋白尿。

DN 为中医消渴症中的“下消”,根据中医古籍的记载并结合临床表现,可将 DN 归属于“虚劳”“关格”“水肿”等范畴。因此,从补肾健脾、养阴活血、化痰解毒角度立法是中医论治 DN 的关键<sup>[22]</sup>。考察黄芪散全方,葛根解肌退热,透疹,生津止渴,升阳止泻,其含有的葛根素能有效改善 DN 患者的肾功能及血脂<sup>[23]</sup>;黄芪补气固表,托毒排脓,利尿,生肌,其含有的黄芪甲苷及黄芪多糖能调节糖脂代谢,保护肾组织<sup>[24]</sup>;桑白皮泻肺平喘,行水消肿,有研究表明桑白皮的提取物能改善 DN 的蛋白尿症状<sup>[25]</sup>。黄芪散全方,三药相伍,有益气健脾、滋阴清热、生津止渴、三消并治,标本兼顾之效。本研究中,经过 HQS 的干预治疗后,大鼠的 UTP 明显减少,肾脏病理与肾功能损伤有所改善。

综上所述,黄芪散微丸能有效改善 DN 的症状,保护肾小球,减轻 DN 肾组织的损伤,延缓 DN 进程,其机制可能与抑制肾组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的表达,增强足细胞自噬有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[ 1 ] WEBSTER A C, NAGLER E V, MORTON R L, et al. Chronic kidney disease[J]. Lancet, 2017, 389(10075): 1238-1252.  
[ 2 ] UMANATH K, LEWIS J B. Update on diabetic nephropathy: Core curriculum 2018 [J]. Am J Kidney Dis, 2018, 71(6): 884-895.  
[ 3 ] PAPAPOULOU-MARKETOU N, KANAKAGANTENBEIN C, MARKETOS N, et al. Biomarkers of diabetic nephropathy: A 2017 update [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2017, 54(5): 326-342.

- [ 4 ] PARVEEN A, JIN M, KIM S Y. Bioactive phytochemicals that regulate the cellular processes involved in diabetic nephropathy [J]. *Phytomedicine*, 2018, 39: 146-159.
- [ 5 ] SONG Z, GUO Y, ZHOU M, et al. The PI3K/p-Akt signaling pathway participates in calcitriol ameliorating podocyte injury in DN rats [J]. *Metabolism*, 2014, 63(10): 1324-1333.
- [ 6 ] ZHENG D, TAO M, LIANG X, et al. p66Shc regulates podocyte autophagy in high glucose environment through the Notch-PTEN-PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Histol Histopathol*, 2020, 35(4): 405-415.
- [ 7 ] 李艳, 曹美群, 陶文聪, 等. 黄芪散对高脂饮食诱导肥胖大鼠肝脏内质网应激信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(21): 6-11.
- [ 8 ] 王春怡, 郝梦娇, 胡方利, 等. 黄芪散有效部位群对Ⅱ型糖尿病大鼠肝脏 AMPK/SREBP-1c 通路的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(6): 679-686.
- [ 9 ] 马强, 程庆砾, 闫双通, 等. 古方黄芪散治疗糖尿病肾病的临床疗效观察 [J]. *中国医药导刊*, 2018, 20(1): 20-23.
- [ 10 ] 罗娇艳, 王芳, 张娟, 等. 黄芪散对糖脂代谢和骨生物力学指标影响的实验研究 [J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(1): 75-79.
- [ 11 ] 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.
- [ 12 ] CHIN M P, BAKRIS G L, BLOCK G A, et al. Bardoxolone methyl improves kidney function in patients with chronic kidney disease stage 4 and type 2 diabetes: Post-hoc analyses from bardoxolone methyl evaluation in patients with chronic kidney disease and type 2 diabetes study [J]. *Am J Nephrol*, 2018, 47(1): 40-47.
- [ 13 ] PAVENSTÄDT H, KRIZ W, KRETZLER M. Cell biology of the glomerular podocyte [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(1): 253-307.
- [ 14 ] SALEEM M A, O'HARE M J, REISER J, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(3): 630-638.
- [ 15 ] SCOTT R P, QUAGGIN S E. Review series: The cell biology of renal filtration [J]. *J Cell Biol*, 2015, 209(2): 199-210.
- [ 16 ] MAEZAWA Y, TAKEMOTO M, YOKOTE K. Cell biology of diabetic nephropathy: Roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes [J]. *J Diabetes Investig*, 2015, 6(1): 3-15.
- [ 17 ] GARG P, VERMA R, HOLZMAN L B. Slit diaphragm junctional complex and regulation of the cytoskeleton [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2007, 106(2): e67-72.
- [ 18 ] XU H Z, WANG W N, ZHANG Y Y, et al. Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on 12-lipoxygenase activity and slit diaphragm protein expression in type 2 diabetic rat glomeruli [J]. *J Nephrol*, 2016, 29(6): 775-782.
- [ 19 ] FANG L, ZHOU Y, CAO H, et al. Autophagy attenuates diabetic glomerular damage through protection of hyperglycemia-induced podocyte injury [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60546.
- [ 20 ] HARTLEBEN B, GÖDEL M, MEYER-SCHWESINGER C, et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(4): 1084-1096.
- [ 21 ] LIU H B, MENG Q H, HUANG C, et al. Nephroprotective effects of polydatin against ischemia/reperfusion injury: A role for the PI3K/Akt signal pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 362158.
- [ 22 ] 张艳, 华川, 李思思, 等. 基于网络药理学的中医药治疗糖尿病肾病研究进展 [J]. *中西医结合研究*, 2021, 13(3): 200-202.
- [ 23 ] 刘瑶, 李伟. 葛根素治疗糖尿病肾病的研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(4): 981-986.
- [ 24 ] 季天娇, 王中元, 朱云峰, 等. 黄芪甲苷调节 PI3K/Akt/FoxO1 通路抑制糖尿病大鼠肝糖异生 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(1): 78-86.
- [ 25 ] MENG Q, QI X, FU Y, et al. Flavonoids extracted from mulberry (*Morus alba* L.) leaf improve skeletal muscle mitochondrial function by activating AMPK in type 2 diabetes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 248: 112326.

[责任编辑 孙丛丛]