

益气养阴活血方对糖尿病肾病大鼠 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 细胞焦亡通路的影响

贾评评¹, 宋纯东^{1*}, 段凤阳¹, 王宁丽¹, 丁樱¹, 王耀献², 任献青¹, 翟文生¹

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 儿科医学院, 郑州 450000;

2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 基于NOD样受体蛋白3(NLRP3)/胱天蛋白酶-1(Caspase-1)/消皮素D(GSDMD)细胞焦亡通路, 探讨益气养阴活血方防治糖尿病肾病(DKD)肾脏损伤的可能作用机制。方法: 随机将50只雄性SD大鼠分为正常组8只、造模组42只。造模组高糖高脂饮食6周后予一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导建立DKD大鼠模型。造模成功后随机分为模型组、缬沙坦组(8.33 mg·kg⁻¹)、益气养阴活血方低、高剂量组(11、22 g·kg⁻¹)。连续灌胃6周后检测各组大鼠空腹血糖(FBG)、总胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)及24 h尿蛋白定量(24 h-UTP); 苏木素-伊红(HE)染色观察肾脏组织病理形态学变化; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)水平; 蛋白免疫印迹法(Western blot)、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组大鼠肾脏组织NLRP3/Caspase-1/GSDMD蛋白及其mRNA表达水平。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠FBG、CHO、TG、BUN、Scr、24 h-UTP及血清IL-1 β 、IL-18水平均显著升高($P < 0.01$), 肾脏组织病变程度严重, 且肾脏组织NLRP3/Caspase-1/GSDMD蛋白及其mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 各药物组FBG、CHO、TG、BUN、Scr、24 h-UTP及血清IL-1 β 、IL-18水平均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), 肾脏组织病变程度得到改善, 且肾脏组织NLRP3/Caspase-1/GSDMD蛋白及其mRNA表达水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 以益气养阴活血方高剂量组效果最佳。结论: 益气养阴活血方可通过调控NLRP3/Caspase-1/GSDMD通路抑制细胞焦亡, 缓解DKD大鼠炎症反应, 减轻肾脏病理损伤。

[关键词] 益气养阴活血方; 糖尿病肾病; 细胞焦亡; NOD样受体蛋白3(NLRP3); 胱天蛋白酶-1(Caspase-1); 消皮素D(GSDMD)

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R587.1; R692 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)01-0075-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221945

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220805.0859.001.html>

[网络出版日期] 2022-08-05 13:02

Effect of Yiqi Yangyin Huoxue Prescription on NLRP3/Caspase-1/GSDMD Pyroptosis Pathway in Diabetic Kidney Disease Rats

JIA Pingping¹, SONG Chundong^{1*}, DUAN Fengyang¹, WANG Ningli¹, DING Ying¹, WANG Yaoxian², REN Xianqing¹, ZHAI Wensheng¹

(1. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanism of Yiqi Yangyin Huoxue prescription in the prevention and treatment of kidney injury of diabetic kidney disease (DKD) rats based on NOD-like receptor

[收稿日期] 2022-05-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074493); 河南省自然科学基金项目(202300410266); 河南省中医药学科领军人才项目(豫卫中医函(2021)8号); 河南省卫生健康委员会中医药青苗人才项目(豫卫中医函[2021]16号)

[第一作者] 贾评评, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合防治肾脏病的研究, E-mail: 374751170@qq.com

[通信作者] * 宋纯东, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事肾小球疾病的中西医诊治机制研究, E-mail: scd670918@126.com

protein 3(NLRP3)/cysteine protease-1(Caspase-1)/gasdermin D(GSDMD)pyroptosis pathway. **Method:** Fifty male SD rats were randomly divided into normal group ($n=8$) and modeling group ($n=42$). The modeling group was given a one-time intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) after high-sugar and high-fat diet for 6 weeks to induce the establishment of a DKD rat model. After successful modeling, the rats were randomly divided into model group, valsartan group ($8.33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and Yiqi Yangyin Huoxue prescription low-dose and high-dose group ($11, 22 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). After continuous gavage for 6 weeks, the fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (CHO), triglyceride (TG), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr) and 24-hour urine protein quantification (24 h-UTP) were detected in each group of rats. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of kidney tissue. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum interleukin- 1β (IL- 1β) and interleukin-18 (IL-18) levels. The protein and mRNA expression levels of NLRP3/Caspase-1/GSDMD in kidney tissue of rats in each group were determined by Western blot and real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with the conditions in normal group, the levels of FBG, CHO, TG, BUN, SCr, 24 h-UTP and serum IL- 1β and IL-18 as well as the protein and mRNA expression levels of NLRP3/Caspase-1/GSDMD in kidney tissue in model group were increased ($P<0.01$), and the kidney tissue lesions were severe. Compared with the conditions in model group, the levels of FBG, CHO, TG, BUN, SCr, 24 h-UTP and serum IL- 1β and IL-18 as well as the protein and mRNA expression levels of NLRP3/Caspase-1/GSDMD in kidney tissue in each intervention group were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the degree of kidney tissue lesions was improved, with Yiqi Yangyin Huoxue prescription high-dose group showing the optimal effect. **Conclusion:** Yiqi Yangyin Huoxue prescription could inhibit pyroptosis by regulating the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway, and thus relieve the inflammatory response of DKD rats and alleviate the pathological damage of the kidneys.

[Keywords] Yiqi Yangyin Huoxue prescription; diabetic kidney disease; pyroptosis; NOD-like receptor protein 3(NLRP3); cysteine protease-1(Caspase-1); gasdermin D(GSDMD)

糖尿病肾病(DKD)是糖尿病最常见、最严重的慢性微血管并发症之一,已发展为全球导致终末期肾脏病(ESRD)的首位病因^[1]。近10年DKD患者的发病率呈现逐渐升高趋势,严重危害人类健康。因此,有效预防控制DKD的发展是目前研究的重点及难点。DKD发病机制复杂,其中炎症反应是目前DKD发病机制及防治机制研究的重点领域^[2],并贯穿疾病全程。细胞焦亡是新近发现的一种促炎性、程序性细胞死亡形式^[3],其发生伴随瀑布式炎症级联反应,可作为机体的自我保护反应参与各种有害物质的清除,但过度的细胞焦亡亦会导致机体紊乱,诱发多种疾病。在DKD发病过程中,以NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体形成、胱天蛋白酶-1(Caspase-1)激活、消皮素D(GSDMD)切割为特征的经典细胞焦亡途径发挥重要作用^[4]。近年来研究证实,细胞焦亡可以通过诱导炎症加重DKD肾脏损伤^[5-6]。因此,调控细胞焦亡通路可能成为防治DKD的新策略和新靶点。

中医药具有多途径、多靶点及不良反应小等特点,在防治早期DKD中占据独特优势,本课题组对

中医药治疗DKD的疗效及机制进行了系列研究,发现自拟益气养阴活血方可明显降低蛋白尿,改善肾脏病理,进而延缓DKD发展进程^[7-9]。但对其作用机制尚不明确,因此本实验拟基于NLRP3/Caspase-1/GSDMD细胞焦亡信号通路探讨益气养阴活血方防治DKD肾脏损伤的可能作用机制,为临床应用提供新的实验依据。

1 材料

1.1 动物 50只SPF级SD雄性大鼠,鼠龄8周,体重(200±20)g,购自河南省郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,实验动物许可证号SYXK(豫)2019-0002。大鼠饲养于河南中医药大学第一附属医院动物实验中心,温度(23±2)℃,相对湿度(60±10)%,12 h光/暗周期,自由饮水,普通饲料及高糖高脂饲料喂养。本实验经河南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(伦理审查编号YFYDW2021013)。

1.2 药物与试剂 益气养阴活血方颗粒购自河南中医药大学第一附属医院中药房,组成:生黄芪30 g、生地黄10 g、菟丝子30 g、积雪草30 g、制大黄

4 g、水蛭3 g(江阴天江药业有限公司,批号分别为21041961、22030302、21101731、21077284、21096874、21096864);缬沙坦(代文)胶囊(北京诺华制药有限公司,国药准字H 20040217,80 mg/粒);链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号S1030);柠檬酸钠缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号C1013);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号C0105);血糖、总胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、血尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)含量试剂盒(上海纪宁生物技术有限公司,批号JN24558、JN24807、JN24805、JN24231、JN2793);白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒、兔来源一抗GSDMD抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab214025、ab215539、ab219800);兔来源一抗NLRP3抗体(美国Affinity公司,批号df7502);兔来源一抗Caspase-1抗体、鼠来源一抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、兔二抗(武汉Servicebio公司,批号分别为GB11383、GB15001、GB23303);TRIzol试剂(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号262305)。

1.3 仪器 AU 5821型全自动生化分析仪(美国Beckman公司);D3024R型高速冷冻离心机(大龙兴创实验仪器北京有限公司);RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);BX53型光学显微镜(日本Olympus公司);BV-2型电泳仪及转膜仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);RT-6100酶标分析仪(美国Rayto公司);CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物分组、模型制备、给药及取样 50只SD大鼠普通饲料适应性喂养1周后,按随机数字表法分为正常组8只、造模组42只。造模组大鼠高糖高脂饲料喂养6周后,予一次性腹腔注射STZ 35 mg \cdot kg⁻¹诱导建立DKD大鼠模型^[10]。正常组喂养普通饲料,予同等剂量柠檬酸钠缓冲液单次腹腔注射。STZ注射72 h后,连续监测血糖 \geq 16.7 mmol \cdot L⁻¹ 3次,尿糖强阳性,24 h尿蛋白定量 $>$ 30 mg,为DKD造模成功^[10]。5只造模大鼠血糖 $<$ 16.7 mmol \cdot L⁻¹,5只大鼠造模过程中死亡,予以剔除。将32只造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组、益气养阴活血方低、高剂量组(11、22 g \cdot kg⁻¹,依据人与大鼠等效剂量换算法计算)及缬沙坦组(8.33 mg \cdot kg⁻¹),每组8只,用上述药物及剂量进行灌胃,正常组和模型组予以等体积生理盐水,每日1次,连续6周。每周称

体质量并调整灌胃剂量。所有大鼠灌胃第6周末,称体质量后置于代谢笼中(禁食不禁水)收集24 h尿液。第2天组各大鼠腹腔注射3%戊巴比妥钠(1.6 mL \cdot kg⁻¹)麻醉后,腹主动脉取血2 mL,4 $^{\circ}$ C、3 000 r \cdot min⁻¹离心10 min(离心半径10 cm,下同),分离血清用于生化指标检测;取血后迅速剥离肾脏,经右肾肾门冠状面切下1 cm \times 1 cm \times 1 cm大小的皮质标本,置于4%多聚甲醛中固定,余下部分分装入冻存管,置液氮速冻后转移至-80 $^{\circ}$ C冰箱暂存。

2.2 肾脏组织病理学观察 肾脏组织于4%多聚甲醛固定48 h后,石蜡包埋后切片,脱蜡,水洗后进行HE染色,光镜下观察各组肾脏组织病理学改变。

2.3 生化指标检测 使用AU 5821全自动生化分析仪对大鼠血清空腹血糖(FBG)、CHO、TG、BUN、SCr进行检测;使用双缩脲法检测大鼠24 h尿蛋白(24 h-UTP)定量。

2.4 ELISA检测血清IL-1 β 、IL-18水平 取出保存的-80 $^{\circ}$ C血清样本,于4 $^{\circ}$ C冰箱解冻,ELISA试剂盒检测大鼠血清标本中IL-1 β 、IL-18水平,实验步骤严格按照试剂盒说明书执行。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾组织NLRP3、Caspase-1及GSDMD蛋白表达水平 采用RIPA裂解液提取大鼠肾组织总蛋白,12 000 r \cdot min⁻¹离心5 min,取上清用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白溶液按照4:1的比例加入5 \times Loading buffer缓冲液,沸水浴变性,10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,PVDF转膜,封闭,加入对应的NLRP3、Caspase-1、GSDMD、 β -actin(1:1 000)一抗,4 $^{\circ}$ C孵育摇床过夜,将二抗用TBST按1:5 000比例稀释,室温孵育,ECL法显色。使用AlphaEase FC软件分析条带灰度值,以目的蛋白灰度值与内参 β -actin灰度值比值做为最终结果。

2.6 Real-time PCR检测肾组织NLRP3、Caspase-1及GSDMD mRNA表达水平 取适量肾组织,加予TRIzol试剂置于冰上充分裂解,抽提总RNA。用Nanodrop检测总RNA的浓度及纯度,配制PCR反应体系,进行PCR扩增。反应扩增条件为95 $^{\circ}$ C预变性10 min,95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,40个循环。引物序列由武汉赛维尔生物科技有限公司设计合成。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参基因,采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算mRNA的相对表达量。引物序列见表1。

2.7 统计学分析 采用SPSS 25.0对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
NLRP3	上游 GATTTCCTCCACAACCTACCCAA	112
	下游 AGTCTGGAAGAACAGGCAACAT	
Caspase-1	上游 TGCCTGGTCTTGTGACTTGGAG	132
	下游 TGTCTGGGAAGAGGTAGAAACG	
GSDMD	上游 GAGTCTCAAGTCAGATGGAACCAAT	269
	下游 CGAGCACCAGACTCAAGGAT	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

差异性检验采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对各组大鼠FBG、血脂、肾功及24 h-UTP水平变化的影响 与正常组比较,模型组大鼠FBG、CHO、TG、BUN、SCr、24 h-UTP水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,缬沙坦组、益气养阴活血方低、高剂量组FBG、CHO、TG、BUN、SCr、24 h-UTP水平均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表2。

表2 益气养阴活血方对DKD大鼠空腹血糖、血脂、肾功及24 h-UTP的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Yiqi Yangyin Huoxue prescription on fasting blood glucose, blood lipids, renal function and 24 h-UTP in DKD rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹	CHO/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/ μ mol·L ⁻¹	24 h-UTP/mg
正常组		5.90±1.45	1.15±0.30	0.53±0.11	8.27±0.67	26.66±2.77	17.95±4.11
模型组		38.00±4.05 ¹⁾	2.83±0.40 ¹⁾	2.56±0.64 ¹⁾	26.87±1.72 ¹⁾	39.15±2.15 ¹⁾	34.06±2.70 ¹⁾
缬沙坦组	8.33×10 ⁻³	24.44±4.50 ²⁾	1.82±0.35 ²⁾	1.76±0.30 ³⁾	16.60±1.69 ²⁾	27.59±1.58 ²⁾	22.71±1.96 ²⁾
益气养阴活血方低剂量组	11	27.27±3.89 ²⁾	1.74±0.33 ²⁾	1.69±0.47 ²⁾	15.08±1.79 ²⁾	27.93±1.52 ²⁾	23.15±2.45 ²⁾
益气养阴活血方高剂量组	22	25.25±3.54 ²⁾	1.76±0.38 ²⁾	1.69±0.41 ²⁾	15.07±1.06 ²⁾	28.01±1.12 ²⁾	21.37±1.64 ²⁾

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

表3 益气养阴活血方对DKD大鼠血清IL-1 β 、IL-18水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Yiqi Yangyin Huoxue prescription on serum IL-1 β and IL-18 levels in DKD rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

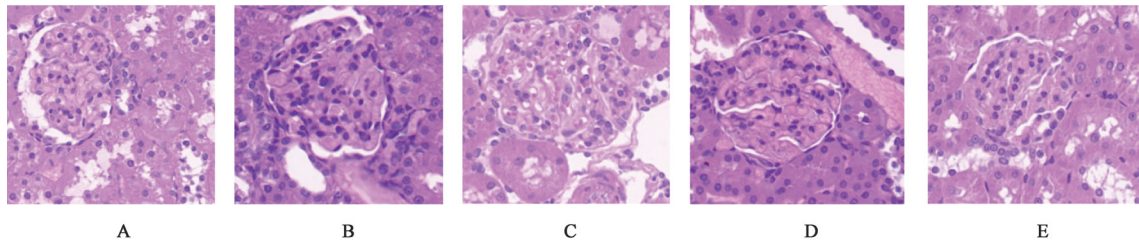
组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-18
正常组		25.16±2.94	58.96±12.54
模型组		47.94±4.84 ¹⁾	129.45±8.94 ¹⁾
缬沙坦组	8.33×10 ⁻³	31.93±2.82 ²⁾	80.10±7.59 ²⁾
益气养阴活血方低剂量组	11	37.09±2.89 ³⁾	98.75±6.65 ³⁾
益气养阴活血方高剂量组	22	30.13±2.83 ²⁾	79.11±9.30 ²⁾

3.4 对各组大鼠肾组织NLRP3、Caspase-1及GSDMD蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织NLRP3、Caspase-1及GSDMD蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,缬沙坦组、益气养阴活血方高剂量组大鼠肾组织NLRP3、Caspase-1

及GSDMD蛋白表达显著降低($P < 0.01$),益气养阴活血方低剂量组NLRP3蛋白表达显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$),Caspase-1及GSDMD蛋白表达明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图2、表4。

3.2 对各组大鼠血清IL-1 β 、IL-18水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清IL-1 β 、IL-18水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,缬沙坦组、益气养阴活血方高剂量组大鼠血清IL-1 β 、IL-18水平显著降低($P < 0.01$),益气养阴活血方低剂量组大鼠血清IL-1 β 、IL-18水平明显降低($P < 0.05$)。见表3。

3.3 对各组大鼠肾脏组织病理学变化的影响 光镜下,正常组大鼠肾小球及肾小管形态结构清晰、完整,系膜基质无增多,无炎性细胞浸润;与正常组比较,模型组大鼠肾小球体积增大,系膜区增宽,系膜细胞增生,系膜基质增多,肾小管上皮细胞空泡变性,间质伴有炎性细胞浸润,多见血管瘀血、扩张;与模型组比较,各干预组大鼠肾脏组织上述病理均有不同程度好转,其中益气养阴活血方高剂量组改善较明显,可见肾小球系膜细胞轻度增生,肾小管结构接近正常,间质仅见少量炎性细胞浸润;缬沙坦组和益气养阴活血方低剂量组病理情况较模型组也稍有改善,但没有益气养阴活血方高剂量组改善明显。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.缬沙坦组;D.益气养阴活血方低剂量组;E.益气养阴活血方高剂量组(图2同)

图1 益气养阴活血方对DKD大鼠肾脏组织病理形态的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Yiqi Yangyin Huoxue prescription on pathological morphology of kidney in DKD rats (HE, ×400)

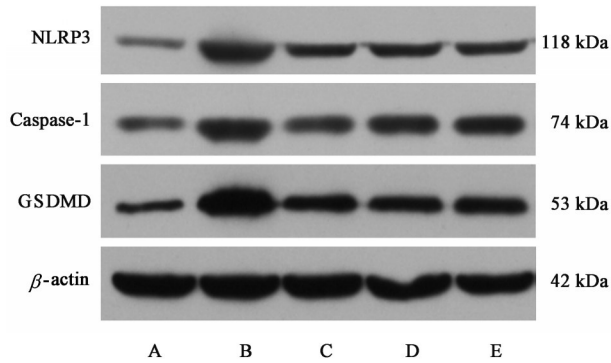


图2 DKD大鼠肾组织NLRP3、Caspase-1及GSDMD蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD protein expression in kidney tissue of DKD rats

3.5 对各组大鼠肾组织NLRP3、Caspase-1及GSDMD mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠NLRP3、Caspase-1及GSDMD mRNA表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,缬沙坦组、益气养

阴活血方高剂量组大鼠NLRP3、Caspase-1及GSDMD mRNA表达显著降低($P<0.01$),益气养阴活血方低剂量组NLRP3、Caspase-1及GSDMD mRNA表达明显降低($P<0.05$)。见表5。

4 讨论

随着糖尿病发病率的逐年提高,DKD作为糖尿病患者致残和致死的重要因素之一,其发病机制和早期诊治已经成为目前研究的热点。近年来,除了氧化应激、胰岛素抵抗、内质网应激、自噬以及表观遗传修饰等致病机制^[11-12]，“慢性微炎症”学说在DKD进展的病理机制中得到越来越多的关注和认定。研究表明,慢性炎症反应可以直接诱导肾脏固有细胞形态和功能的改变,引发炎症性肾脏损害,不仅是导致DKD进展的关键因素,也是药物干预的作用靶点^[13]。目前,现代医学对于DKD的治疗虽然取得了一系列成果,尤其是钠-葡萄糖共转运蛋白2(SGLT2)抑制剂、胰高血糖素样多肽-1(GLP-1)激

表4 益气养阴活血方对DKD大鼠肾组织NLRP3、Caspase-1及GSDMD蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Yiqi Yangyin Huoxue prescription on expression of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD protein in kidney tissue of DKD rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	NLRP3/ β -actin	Caspase-1/ β -actin	GSDMD/ β -actin
正常组		0.12±0.05	0.22±0.03	0.22±0.06
模型组		0.67±0.04 ¹⁾	0.59±0.05 ¹⁾	0.78±0.18 ¹⁾
缬沙坦组	8.33×10^{-3}	0.37±0.06 ²⁾	0.45±0.01 ²⁾	0.45±0.09 ²⁾
益气养阴活血方低剂量组	11	0.36±0.06 ²⁾	0.49±0.02 ³⁾	0.53±0.10 ³⁾
益气养阴活血方高剂量组	22	0.33±0.06 ²⁾	0.42±0.02 ²⁾	0.42±0.10 ²⁾

表5 益气养阴活血方对DKD大鼠肾组织NLRP3、Caspase-1及GSDMD mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Yiqi Yangyin Huoxue prescription on mRNA expression of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD in kidney tissue of DKD rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	NLRP3	Caspase-1	GSDMD
模型组		4.73±1.03 ¹⁾	3.43±0.53 ¹⁾	3.75±0.73 ¹⁾
缬沙坦组	8.33×10^{-3}	2.29±0.62 ²⁾	1.80±0.55 ²⁾	2.22±0.16 ²⁾
益气养阴活血方低剂量组	11	2.71±0.47 ³⁾	1.95±0.45 ³⁾	2.49±0.98 ³⁾
益气养阴活血方高剂量组	22	1.53±0.54 ²⁾	1.40±0.33 ²⁾	1.98±0.56 ²⁾

注:设正常组各指标mRNA表达量均为1

动剂和内皮素受体拮抗剂等新药逐渐应用到临床^[14-15],但进展为ESRD的风险仍然很高。而中医治疗具有整体调节和多通道、多靶点的优势。

随着中医药对防治DKD理论和临床研究的不断深入,中药在DKD防治中的优势逐渐突出。传统中医依据“久病必虚”“久病必瘀”“久病入络”理论^[16-17],认为DKD的主要病机为气阴两虚兼血瘀^[18-19],当以益气养阴、活血化瘀为治疗要法,据此课题组自拟了“益气养阴活血方”,临床及动物实验均发现可以有效治疗DKD^[7-9]。该方由生黄芪、菟丝子、生地黄、积雪草、制大黄、水蛭等组成,方中生黄芪益气健脾、补中气益肾气,菟丝子填精益髓、补益肝肾之阴,共为君药;生地黄养阴生津、补肾清热,积雪草活血化瘀、利湿清热,共为臣药;制大黄凉血祛瘀、攻积泻火,水蛭破血、逐瘀、通经,共为佐使。诸药成方,标本兼顾,寒温并用,补泻兼施,正中DKD之病机。本研究结果显示,模型组大鼠FBG、CHO、TG、BUN、SCr及24 h-UTP较正常组均显著升高,光镜下肾小球肥大,系膜区增宽,系膜细胞增生、基质增多,肾小管上皮细胞空泡变性,间质伴有炎性细胞浸润;经药物干预后,血糖、血脂、肾功能、尿蛋白及肾脏病理均明显改善,提示益气养阴活血方可减轻DKD大鼠肾脏病理损伤,降低蛋白尿,保护肾功能,与前期研究结果类似^[7-9]。

细胞焦亡是一种伴随着炎症反应的新型细胞程序性死亡,兼具凋亡和坏死的细胞特征^[20]。当机体受到外源性、内源性等病原微生物攻击时,细胞可通过程序性死亡方式清除受感染细胞^[21-22],在DKD发生、发展进程中发挥重要作用。细胞焦亡信号通路分为依赖Caspase-1的经典焦亡途径和依赖Caspase-4、Caspase-5、Caspase-11的非经典焦亡途径^[23]。在Caspase-1介导的经典焦亡信号途径中,NLRP3作为NOD样受体家族中的重要成员,是炎症反应的核心^[24],能识别非微生物危险信号,通过与接头蛋白凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和效应蛋白前体Caspase-1(pro-Caspase-1)相互作用^[25-26],形成具有最广泛激活剂的NLRP3炎症小体,最终导致Caspase-1的剪切活化。活化的Caspase-1导致无活性的IL-1 β 、IL-18前体的成熟和分泌,通过切割蛋白GSDMD,暴露其N端活性结构域,GSDMD-N易位到质膜上打孔而致细胞膜孔洞形成,导致细胞渗透性肿胀、质膜破裂以及IL-1和IL-18等炎症因子大量释放^[27-28],扩大炎症反应。近年研究发现,GSDMD是焦亡的执行蛋白,GSDMD诱导的焦亡

在自身炎症性疾病中起着重要作用,是细胞焦亡通路发挥效应的关键下游因子^[29]。TENG等^[30]研究证实,NLRP3、Caspase-1、ASC及GSDMD等标志分子的高表达是细胞焦亡的重要特征。本研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠血清IL-1 β 、IL-18水平,肾组织NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白及其mRNA表达水平均显著升高;与模型组比较,各药物组大鼠血清IL-1 β 、IL-18水平,肾组织NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白及其mRNA表达水平均明显降低。以上结果可以看出,益气养阴活血方可通过抑制NLRP3蛋白表达,减少NLRP3炎症小体合成,进而抑制细胞焦亡通路相关标志分子的表达及炎症因子的释放,减轻DKD大鼠肾脏损伤,与上述文献报道一致。本研究亦发现,虽然益气养阴活血方低剂量组也可不同程度地降低肾组织NLRP3/Caspase-1/GSDMD蛋白及其mRNA表达水平,但其作用却低于益气养阴活血方高剂量组对细胞焦亡通路相关蛋白的表达及炎症因子的释放。因此,本次实验研究结果表明,益气养阴活血方组对抑制DKD细胞焦亡效果呈剂量依赖性。

综上所述,益气养阴活血方可能通过降低NLRP3炎症小体活性,抑制细胞焦亡通路NLRP3、Caspase-1、GSDMD标志蛋白表达及IL-1 β 、IL-18炎症因子释放,改善DKD大鼠肾脏炎症状态,减轻肾脏病理损伤,降低蛋白尿,保护肾功能,进而延缓DKD进展。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] TSAI J L, CHEN C H, WU M J, et al. New approaches to diabetic nephropathy from bed to bench [J]. *Biomedicine*, 2022, 10(4): 876-890.
- [2] JUNG S W, MOON J Y. The role of inflammation in diabetic kidney disease [J]. *Korean J Intern Med*, 2021, 36(4): 753-766.
- [3] CAO Z, HUANG D, TANG C, et al. Pyroptosis in diabetes and diabetic nephropathy [J]. *Clin Chim Acta*, 2022, 531: 188-196.
- [4] 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): 7057-7070.
- [5] AL MAMUN A, ARA MIMI A, WU Y, et al. Pyroptosis in diabetic nephropathy [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 523: 131-143.
- [6] 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): 1516-1530.
- [7] 宋纯东, 喻青, 吴晨晨. 益气养阴活血方对糖尿病肾病大鼠肾组织 TRPC6、RhoA 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(11): 2738-2740.
- [8] 宋纯东, 张霞, 宋丹丹, 等. 益气养阴活血方对糖尿病肾病大鼠肾组织 WT1 影响的实验研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(5): 626-627, 629.
- [9] 贾评评, 宋丹, 宋纯东. 益气养阴活血方对糖尿病肾病大鼠肾组织 Nestin 的影响 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2019, 20(3): 196-199.
- [10] 李启航, 陈文斌, 孙珑昱, 等. 常用糖尿病肾病动物模型研究概述 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2020, 36(3): 257-262.
- [11] JUNG C Y, YOO T H. Pathophysiologic mechanisms and potential biomarkers in diabetic kidney disease [J]. *Diabetes Metab J*, 2022, 46(2): 181-197.
- [12] THOMAS M C. Targeting the pathobiology of diabetic kidney disease [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2021, 28(4): 282-289.
- [13] NICHOLAS S B. Novel anti-inflammatory and anti-fibrotic agents for diabetic kidney disease—from bench to bedside [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2021, 28(4): 378-390.
- [14] WINIARSKA A, KNYSAK M, NABRDALIK K, et al. Inflammation and oxidative stress in diabetic kidney disease: The targets for SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists [J]. *Int J Mol Sci*. 2021, 22(19): 108-122.
- [15] PRATTICHIZZO F, DE CANDIA P, CERIELLO A. Diabetes and kidney disease: Emphasis on treatment with SGLT-2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists [J]. *Metabolism*, 2021, 120: 154799.
- [16] 张雅歌, 韩佳瑞, 窦荣浩, 等. 养阴活血法在糖尿病肾病中的应用体会 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(10): 1564-1566.
- [17] 靳贺超, 张冠文, 梁胜然, 等. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(3): 41-48.
- [18] 孙卫卫, 滕福斌, 刘忠杰, 等. 王耀献从辨机理论论治糖尿病肾病 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8): 3394-3396.
- [19] 陈彦旭, 金彩云, 金智生, 等. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨红芪多糖对糖尿病肾病 db/db 小鼠作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(21): 74-80.
- [20] JIN H, XIE W, HE M, et al. Pyroptosis and sarcopenia: Frontier perspective of disease mechanism [J]. *Cells*, 2022, 11(7): 1078-1095.
- [21] JIANG A, SONG A, ZHANG C. Modes of podocyte death in diabetic kidney disease: An update [J]. *J Nephrol*, 2022, 35(6): 1571-1584.
- [22] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: Mechanisms and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 128-140.
- [23] ARAKELIAN T, OOSTERHUIS K, TONDINI E, et al. Pyroptosis-inducing active Caspase-1 as a genetic adjuvant in anti-cancer DNA vaccination [J]. *Vaccine*, 2022, 40(13): 2087-2098.
- [24] MO G, LIU X, ZHONG Y, et al. IP3R1 regulates Ca^{2+} transport and pyroptosis through the NLRP3/Caspase-1 pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 31-49.
- [25] ZHANG C, ZHAO C, CHEN X, et al. Induction of ASC pyroptosis requires gasdermin D or Caspase-1/11-dependent mediators and IFN β from pyroptotic macrophages [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 470-488.
- [26] ZHENG J, HU Q, ZOU X, et al. Uranium induces kidney cells pyroptosis in culture involved in ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling [J]. *Free Radic Res*, 2022, 56(1): 40-52.
- [27] AIZAWA E, KARASAWA T, WATANABE S, et al. GSDME-dependent incomplete pyroptosis permits selective IL-1 α release under Caspase-1 inhibition [J]. *iScience*, 2020, 23(5): 101-120.
- [28] WANG Y, ZHU X, YUAN S, et al. TLR4/NF- κ B signaling induces GSDMD-related pyroptosis in tubular cells in diabetic kidney disease [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 19(10): 603-629.
- [29] GU G, HUO Y, XU G, et al. MicroRNA-204-GSDMD interaction regulates pyroptosis of fibroblast-like synoviocytes in ankylosing spondylitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 91(1): 107-127.
- [30] TENG J F, MEI Q B, ZHOU X G, et al. Polyphyllin VI induces Caspase-1-mediated pyroptosis via the induction of ROS/NF- κ B/NLRP3/GSDMD signal axis in non-small cell lung cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12(1): 193-210.

[责任编辑 孙丛丛]