

补阳还五汤加味通过抑制炎症和纤维化改善糖尿病肾病 小鼠肾脏损伤

杨帆, 张晓云, 张亚京, 刘利飞, 黄家安, 王月华*
(河北中医学院, 石家庄 050091)

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤加味对糖尿病肾病(DKD)小鼠肾组织保护作用及核转录因子- κ B(NF- κ B)通路及纤维化因子的影响。方法:24只11~12周龄db/db小鼠适应性喂养1周并监测尿蛋白均阳性后随机分为模型组、补阳还五汤加味组(16.0 g·kg⁻¹)、厄贝沙坦组(13.5 mg·kg⁻¹),每组8只。11~12周龄db/m小鼠8只作为正常组。给予相应药物治疗,其中补阳还五汤加味组及厄贝沙坦组灌胃相应药液,正常组及模型组灌胃等体积蒸馏水,每天1次,连续治疗8周后收集标本,检测小鼠血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)、尿微量白蛋白(mALB)水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和单核细胞趋化因子-1(MCP-1)的mRNA表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肾组织核转录因子- κ B(NF- κ B),NF- κ B抑制因子 α (I κ B α)、磷酸化I κ B α (p-I κ B α)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、纤连蛋白(FN)的蛋白表达;免疫荧光检测肾组织NF- κ B表达;同时光镜观察肾脏病理形态学变化。结果:与正常组比较,模型组小鼠肾小球肥大,系膜外基质增加,基底膜增厚,囊腔变窄,间质炎性细胞浸润,部分间质明显纤维化($P<0.01$);FBG、mALB、TC、TG、BUN、SCr含量显著升高($P<0.01$);炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1及纤维化相关蛋白TGF- β_1 、 α -SMA、FN表达显著升高($P<0.01$);同时肾组织NF- κ B通路活化程度显著增强($P<0.01$)。与模型组比较,补阳还五汤加味干预后,DKD小鼠肾脏病理损伤程度显著改善($P<0.01$);mALB、TC、TG含量显著下降,BUN、SCr含量显著降低($P<0.01$);TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);同时抑制了肾组织NF- κ B通路活化及纤维化因子表达($P<0.05$, $P<0.01$),但对血糖水平无明显影响。结论:补阳还五汤加味可通过抑制NF- κ B通路活化及纤维化因子表达,对DKD小鼠发挥抗炎和抗纤维化作用,减轻肾脏病理损伤,从而发挥肾脏保护作用。

[关键词] 糖尿病肾脏疾病;补阳还五汤加味;核转录因子- κ B(NF- κ B)通路;炎症;纤维化

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0114-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222238

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220907.1644.004.html>

[网络出版日期] 2022-09-08 11:55

Supplemented Buyang Huanwutang Ameliorates Kidney Injury by Inhibiting Inflammation and Fibrosis in Diabetic Kidney Disease Mice

YANG Fan, ZHANG Xiaoyun, ZHANG Yajing, LIU Lifei, HUANG Jiaan, WANG Yuehua*
(Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of supplemented Buyang Huanwutang on kidney tissue, nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway, and fibrosis factors in diabetic kidney disease (DKD) mice. **Method:** A total of 24 db/db mice (11-12 weeks old) were randomized into the model group (equivalent volume of distilled water, once/day, 8 weeks), supplemented Buyang Huanwutang group (16.0 g·kg⁻¹, once/day, 8 weeks), and irbesartan group (13.5 mg·kg⁻¹, once/day, 8 weeks) after adaptive feeding for 1 week and positive urinary

[收稿日期] 2022-06-23

[基金项目] 河北中医学院博士科研基金项目(BSZ2022003);河北省自然科学基金项目(H2022423320);河北省中医药管理局科研计划项目(2023119)

[第一作者] 杨帆,博士,主治医师,助理研究员,从事中医药防治肾脏病的基础和临床研究,E-mail:xinleshi2022@163.com

[通信作者] *王月华,博士,教授,主任医师,从事中医药防治肾脏病的基础和临床研究,E-mail:wangyuehua2004@163.com

protein monitoring, with 8 in each group. Another 8 db/m mice (11-12 weeks old) were included in the normal group (equivalent volume of distilled water, once/day, 8 weeks). Then samples were collected, and the levels of fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), and urinary microalbumin (mALB) were detected. The mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was determined by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). The expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B), NF- κ B inhibitor α (I κ B α), phosphorylated I κ B α (p-I κ B α), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), α -smooth muscle actin (α -SMA), and fibronectin (FN) in kidney tissue was measured by Western blot. The expression of NF- κ B in renal tissue was detected by immunofluorescence. The pathological changes of kidney were observed under light microscope. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed glomerular hypertrophy, increase in extracellular matrix, thickening of basement membrane, small cystic lumen, interstitial inflammatory cell infiltration, and some interstitial fibrosis ($P<0.01$). Moreover, the model group had higher content of FBG, mALB, TC, TG, BUN, and SCr ($P<0.01$), higher expression of inflammatory factors TNF- α , IL- 1β , and MCP-1, and fibrosis-related proteins TGF- β_1 , α -SMA, and FN ($P<0.01$), and stronger activation of NF- κ B pathway in renal tissue ($P<0.01$) than the normal group. Compared with the model group, supplemented Buyang Huanwutang alleviated the pathological injury in kidney ($P<0.01$), decreased the content of mALB, TC, and TG, the content of BUN and SCr ($P<0.01$), and the content of TNF- α , IL- 1β , and MCP-1 ($P<0.05$, $P<0.01$), and inhibited the activation of NF- κ B pathway and the expression of fibrosis factors in renal tissue ($P<0.05$, $P<0.01$), but had no significant effect on blood glucose level. **Conclusion:** By inhibiting NF- κ B pathway and the expression of fibrosis factors in renal tissue, supplemented Buyang Huanwutang can exert anti-inflammatory and anti-fibrosis effect and alleviate the pathological damage in kidney tissue, thereby protecting the kidney.

[Keywords] diabetic kidney disease; supplemented Buyang Huanwutang; nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway; inflammation; fibrosis

2型糖尿病是临床常见病、多发病,目前在世界范围内呈快速增长趋势。其中,糖尿病肾脏疾病(DKD)是其最严重的微血管并发症之一,也是导致患者终末期肾病的主要原因之一^[1]。目前DKD的治疗手段仍旧十分有限,中医药在糖尿病及其并发症的治疗应用中已具有上千年的历史,疗效确切且具有优势。因此,如何发挥中医药理论特色及优势,筛选延缓DKD疾病进展的治疗药物并探索其有效机制已成为本学科亟待解决的科学问题。

中医学认为气虚血瘀是DKD的主要病机之一^[2-3]。因此益气化瘀通络是治疗DKD之关键。补阳还五汤出自《医林改错》,是益气化瘀通络的经典代表方剂。临床研究表明以补阳还五汤为基础的加减方治疗DKD方面疗效显著^[4-5]。课题组前期临床研究发现应用益气化瘀通络法治疗DKD,临床疗效显著^[6-8]。实验研究发现该方中的化瘀通络中药可显著抑制DKD模型大鼠肾组织氧化应激和巨噬细胞活化,降低DKD大鼠尿蛋白排泄,改善肾小球硬化,延缓肾脏病进展^[9-12],而氧化应激与炎症密切

相关,可以通过多个途径诱发炎症反应^[13]。因此,本研究拟以db/db小鼠模拟DKD的发病过程,探讨补阳还五汤加味对DKD小鼠的肾脏保护作用,并以核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路和炎症及纤维化因子为切入点,探讨补阳还五汤加味治疗DKD的效应机制是否与调控NF- κ B通路有关,为临床应用补阳还五汤加味治疗DKD提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 11~12周龄SPF级健康雄性db/m和db/db小鼠购自江苏常州卡文斯实验动物有限公司,合格证号SCXK(苏)2021-0013。其中db/m小鼠8只,体质量(25 \pm 5)g;db/db小鼠24只,体质量(45 \pm 5)g,所有小鼠在12h光照/黑暗循环,温度(24 \pm 1) $^{\circ}$ C,湿度50%~70%条件下饲养,并可自由进食进水。所有动物实验均在所在机构动物伦理委员会许可的前提下进行(伦理编号DWLL202203117),并遵循动物实验伦理准则。

1.2 药物 中药配方颗粒黄芪(批号0093253)、生地黄(批号0101963)、丹参(批号8080971)、川芎(批

号 8122561)、当归(批号 0093103)、水蛭(批号 8081351)、地龙(批号 7125701)购自广东一方药业有限公司(佛山);厄贝沙坦分散片(规格 150 mg,批号 1904238)购自华润双鹤利民药业有限公司。中药配方颗粒是以中药饮片为原材料,采用现代工艺经过提取、分离、浓缩、干燥、制粒而成,且符合 2021 年版《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》之规定。

1.3 试剂 尿微量白蛋白试剂盒(mALB,南京建成生物工程研究所,批号 H127-1-2);血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)、尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)试剂盒(贝克曼库尔特实验系统有限公司,批号分别为 AUZ3765、AUZ3625、AUZ3592、AUZ3611、AUZ3562);Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit、2×SYBR Green 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix(High ROX)、NF- κ B 抗体、NF- κ B 抑制因子 α (I κ B α)抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗、组蛋白 Histone 抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 G3330、G3321、GB11997、GB111509、GB111364、GB23303、GB11102);纤连蛋白(FN)抗体、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 89443、215715);磷酸化(p)-I κ B α 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs2513R); β -肌动蛋白(β -actin)抗体、ECL 超敏化学发光试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、PAS 染色试剂盒、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 AF0003、P0018S、P0013B、C0142M、C0105S、P0009)。

1.4 仪器 ImagQuant LAS4000 型全自动凝胶成像系统(美国通用 GE 公司);DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂);BX63+DP72 型正置研究级显微镜(日本 Olympus 公司);7600-020 全自动大型生化分析仪(日本 Hitachi 公司);Centrifuge5417R 型低温离心机(德国 Eppendorf 公司);Stepone plus 型 Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 分组及药物干预 24 只 db/db 小鼠适应性喂养 1 周并监测尿蛋白均阳性后随机分为模型组、补阳还五汤加味组、厄贝沙坦组,每组 8 只,db/m 组小鼠 8 只作为正常组。厄贝沙坦作为阳性药物,现代研究已证实厄贝沙坦具有确切的肾脏保护作用,并可抑制 NF- κ B 通路的活化^[14]。各组继续进食小鼠维

持饲料直至实验结束。中药复方补阳还五汤加味(黄芪 30 g、生地黄 30 g、丹参 15 g、川芎 12 g、当归 15 g、水蛭 6 g、地龙 15 g),该药物用量为临床治疗有效之常用量。根据《中药药理研究方法学》,实验药物用量($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) = 临床常用药物剂量(g)/(60 kg) \times 9.1,故补阳还五汤加味组按 16.0 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,厄贝沙坦灌胃量为 13.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。将中药颗粒剂按比例混匀后,溶于蒸馏水中配制成质量浓度为 4 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液;厄贝沙坦分散片配制成质量浓度为 3.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混悬液。每天灌胃 1 次,连续 8 周。db/m 组及模型组每日用等体积的蒸馏水灌胃。实验期间不给予胰岛素或降糖药等其他干预措施。

2.2 标本收集 实验结束时将小鼠放置于代谢笼收集尿液,分装后置-80 °C 冰箱保存待测;将小鼠禁食不禁水 12 h,吸入麻醉(3% 异氟烷)后,股动脉取血,颈椎脱臼处死,迅速剖开腹腔,剪下肾脏并剥离肾包膜,将肾脏分为两部分,一部分固定于 4% 多聚甲醛中,用于病理组织学及免疫组化检测,另一部分冻存于-80 °C 冰箱,用于相关蛋白表达检测。

2.3 观察指标

2.3.1 各组小鼠 mALB 检测 小鼠尿液标本以 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,4 °C 离心 15 min(离心半径 10 cm)取上清,按照尿微量白蛋白试剂盒的说明书操作检测各组小鼠 mALB 浓度。

2.3.2 各组小鼠生化指标检测 小鼠 FB、TC、TG、BUN、SCr 水平采用全自动血生化分析仪测定。

2.3.3 各组小鼠肾组织病理变化 取小鼠肾组织于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋后切片,梯度脱水,二甲苯透明,分别用 HE 和 PAS 染色,于显微镜下观察肾组织病理变化。PAS 染色用于组织学损伤程度分级,如前所述^[15-16],具体为每个切片上观察 10 个随机选择的视野,以评估肾小球硬化指数和肾小管间质损伤指数,肾小球系膜增生指数评分:根据系膜增生面积,按正常、轻度(<25%)、中度(25%~50%)、中重度(50%~75%)、重度(>75%),分别计 0、1、2、3、4 分。肾小管间质损伤指数评分:根据肾小管萎缩与扩张、间质炎症与纤维化严重程度,按正常、轻度(面积<25%)、中度(面积达 25%~50%)、重度(面积>50%),分别计 0、1、2、3 分。计算每片切片肾小球及肾小管间质组织学评分的平均值。

2.3.4 Real-time PCR 检测炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的 mRNA 表达 取肾组织 100 mg 于冰上充分匀浆,加入 TRIzol 提取总 RNA,并使用

Nanodrop 2000C 分光光度计分析其浓度。然后根据制造商的说明,使用逆转录试剂盒将RNA反转录成cDNA。然后以其为模板进行 Real-time PCR,反应条件为 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 10 s, 40 个循环重复,结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,计算各 mRNA 表达。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成,序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 CTGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
IL-1β	上游 CTCACAGCAGCATCTCGACAAGAG	95
	下游 TCCACGGGCAAGACATAGGTAGC	
MCP-1	上游 GTCACCAAGCTCAAGAGAGAGA	190
	下游 GAGTGGATGCATTAGCTTCAGA	
TNF-α	上游 CCAGGTTCTTCAAGGGACAA	80
	下游 GGTATGAAATGGCAAATCGGCT	

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 NF-κB 及纤维化相关蛋白表达 分别取各组小鼠肾组织 100 mg 加入 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min。4 °C、以 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min(离心半径 10 cm)提取总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定其蛋白质量浓度。取适量样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转至 PVDF 膜上,脱脂牛奶封闭洗涤后,分别加入 IκBα(1:800)、p-IκBα(1:600)、NF-κB(1:800)、FN(1:800)、TGF-β₁(1:1 000)、α-SMA(1:800)、β-actin(1:1 000)、Histone(1:1 000)抗体,4 °C 孵育过夜,洗膜后加入 HRP(1:5 000)标记的山羊抗兔抗体室温孵育 1 h,洗膜后加入 ECL 试剂显影,使用 ImageQuant LAS4000 成像系统拍摄并分析条带灰度值。

2.3.6 免疫荧光检测肾组织 NF-κB 表达 取石蜡切片 60 °C 烤片 4 h,室温放置 10 min 后,梯度脱蜡至水,自来水冲洗;抗原修复后加入 NF-κB(1:100)一抗孵育过夜;PBS 冲洗加入 Alexa Fluor[®]594 标记山羊抗兔 IgG 荧光二抗室温孵育 30 min;PBS 冲洗滴加 DAPI 染核,树脂封片,荧光显微镜下观察切片并采集图像。

2.4 统计学分析 数据采用 SPSS 26.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据先进行方差齐性检验,若方差齐选择单因素方差分析(One-way

ANOVA);若方差不齐选择秩和检验,组间比较采用 Mann-Whitney 法。以 P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 DKD 小鼠 FBG、TG、TC 的影响 与正常组比较,模型组小鼠 FBG、TG、TC 含量显著升高,差异具有统计学意义(P<0.01);与模型组比较,补阳还五汤加味组 TG、TC 显著降低(P<0.01),而 FBG 差异无统计学意义,厄贝沙坦组 FBG、TG、TC 差异均无统计学意义。见表 2。

表 2 补阳还五汤加味对 DKD 小鼠 FBG、TG、TC 的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Table 2 Effect of modified Buyang Huanwutang on FBG, TG and TC in DKD mice ($\bar{x} \pm s$, n=8) mmol·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	FBG	TG	TC
正常组		6.38±1.79	1.22±0.18	1.43±0.12
模型组		26.78±3.41 ¹⁾	3.35±0.54 ¹⁾	5.31±0.51 ¹⁾
补阳还五汤加味组	16.0	26.13±4.01	1.96±0.11 ³⁾	3.86±0.14 ³⁾
厄贝沙坦组	0.013 5	27.12±3.17	3.22±0.91	5.19±0.69

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-表 8 同)

3.2 对 DKD 小鼠 mALB 及肾功能影响 与正常组比较,模型组小鼠 BUN、SCr 及 mALB 含量显著升高(P<0.01);与模型组比较,补阳还五汤加味组及厄贝沙坦组 BUN、SCr 及 mALB 均显著降低(P<0.01)。见表 3。

表 3 补阳还五汤加味对 DKD 小鼠 mALB 及肾功能影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

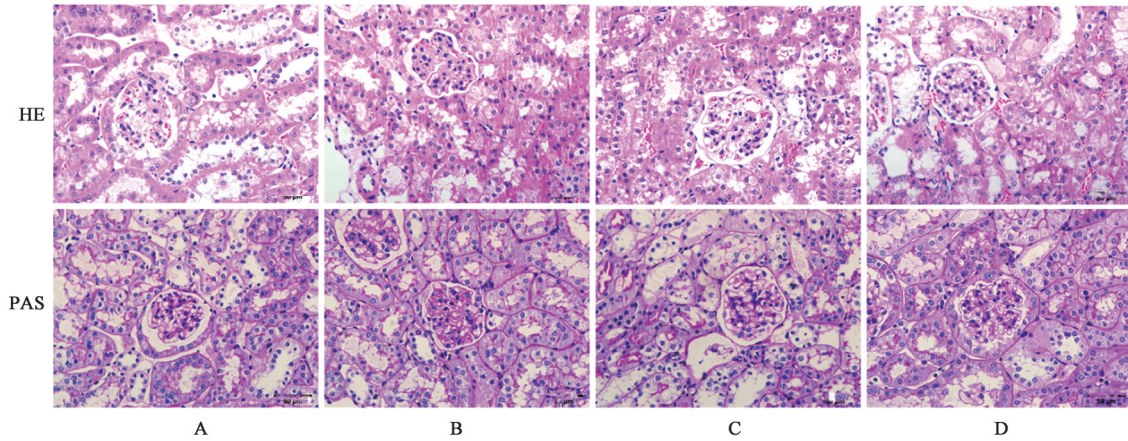
Table 3 Effect of modified Buyang Huanwutang on mALB and renal function in DKD mice ($\bar{x} \pm s$, n=8) mmol·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BUN	SCr	mALB
正常组		4.95±0.97	14.27±1.57	6.54±0.93
模型组		15.12±3.57 ¹⁾	26.92±3.14 ¹⁾	44.72±6.12 ¹⁾
补阳还五汤加味组	16.0	9.04±1.21 ³⁾	19.87±1.26 ³⁾	22.92±3.61 ³⁾
厄贝沙坦组	0.013 5	8.89±1.45 ³⁾	20.16±1.03 ³⁾	25.54±2.31 ³⁾

3.3 对 DKD 小鼠肾组织病理变化的影响 正常组小鼠肾组织结构清晰;与正常组比较,模型组小鼠肾小球肥大,系膜外基质增加,基底膜增厚,囊腔变窄,间质炎性细胞浸润,部分间质纤维化;各给药组小鼠肾组织损伤均有不同程度好转。与模型组比

较,补阳还五汤加味组可显著降低肾小球硬化指数和肾小管间质损伤指数($P<0.01$),厄贝沙坦组肾小

管间质损伤指数差异无统计学意义。见图1、表4。



注:A.正常组;B.模型组;C.补阳还五汤加味组;D.厄贝沙坦组(图2-图4同)

图1 补阳还五汤加味对DKD小鼠肾组织病理变化的影响($\times 400$)

Fig. 1 Effect of modified Buyang Huanwutang on renal histopathology in DKD mice ($\times 400$)

表4 补阳还五汤加味对DKD小鼠肾组织病理变化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Table 4 Effect of modified Buyang Huanwutang on renal histopathology in DKD mice ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	肾小球硬化指数	肾小管损伤指数
正常组		0.34±0.08	0.35±0.12
模型组		2.45±0.38 ¹⁾	2.10±0.28 ¹⁾
补阳还五汤加味组	16.0	1.62±0.24 ³⁾	1.35±0.18 ³⁾
厄贝沙坦组	0.013 5	1.73±0.32 ³⁾	1.99±0.22

3.4 对DKD小鼠肾组织IL-1 β 、TNF- α 及MCP-1的mRNA影响 与正常组比较,模型组小鼠肾组织的IL-1 β 、TNF- α 及MCP-1的mRNA表达均显著增加($P<0.01$);与模型组比较,补阳还五汤加味组及厄贝沙坦组小鼠肾组织IL-1 β 、TNF- α 及MCP-1的mRNA的表达均明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。见表5。

3.5 对DKD小鼠肾组织FN、TGF- β_1 及 α -SMA蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠肾组织

表5 补阳还五汤加味对DKD小鼠肾组织炎症因子的mRNA表达影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of modified Buyang Huanwutang on mRNA expression of inflammatory factors in DKD mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	IL-1 β	TNF- α	MCP-1
正常组		0.97±0.04	0.96±0.07	0.90±0.19
模型组		1.33±0.18 ¹⁾	1.56±0.15 ¹⁾	1.92±0.18 ¹⁾
补阳还五汤加味组	16.0	1.06±0.07 ³⁾	1.20±0.09 ³⁾	1.42±0.14 ³⁾
厄贝沙坦组	0.013 5	1.03±0.06 ³⁾	1.25±0.12 ³⁾	1.61±0.05 ²⁾

FN、TGF- β_1 及 α -SMA的蛋白表达升高($P<0.01$);与模型组比较,补阳还五汤加味组及厄贝沙坦组小鼠肾组织FN、TGF- β_1 及 α -SMA的蛋白表达均降低($P<0.01$)。见图2、表6。

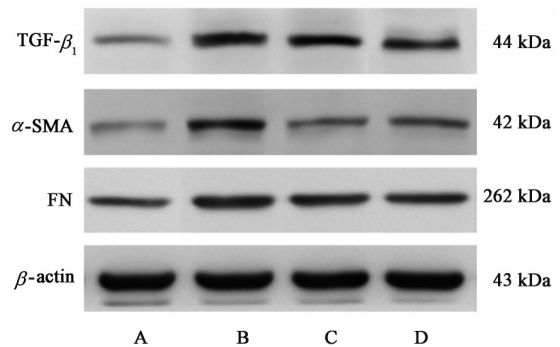


图2 DKD小鼠肾组织纤维化相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of fibrosis-associated proteins in renal tissue of DKD mice

表6 补阳还五汤加味对DKD小鼠肾组织纤维化相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of modified Buyang Huanwutang on fibrosis-associated proteins in renal tissue of DKD mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	TGF- β_1 / β -actin	α -SMA / β -actin	FN / β -actin
正常组		0.17±0.02	0.15±0.01	0.26±0.02
模型组		0.45±0.04 ¹⁾	0.48±0.02 ¹⁾	0.73±0.03 ¹⁾
补阳还五汤加味组	16.0	0.28±0.03 ³⁾	0.34±0.04 ³⁾	0.39±0.04 ³⁾
厄贝沙坦组	0.013 5	0.30±0.05 ³⁾	0.36±0.04 ³⁾	0.41±0.05 ³⁾

3.6 对DKD小鼠肾组织NF- κ B通路相关蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠肾组织p-I κ B α

表达升高, IκBα表达降低, 同时NF-κB核转移增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤加味组及厄贝沙坦组药物干预后可有效降低p-IκBα, 升高IκBα的表达, 抑制NF-κB核转移及总NF-κB的蛋白表达 ($P<0.05, P<0.01$)。与此结果一致, 免疫荧光染色也显示补阳还五汤加味组及厄贝沙坦组药物干预后NF-κB核转移及总NF-κB的表达明显减少。见图3、表7、图4。

4 讨论

中医学认为, 糖尿病并发的肾脏损害, 是由于糖尿病病程日久耗气伤血, 引起瘀血内阻, 深入于络所致, 故瘀血阻滞是DKD发生发展的病理产物和致病因素, 贯穿于DKD病变的始终。鉴于气虚血瘀是DKD的核心病机, 因此在治疗上应以益气化瘀通络法为治疗该病的基本方法。补阳还五汤加味方是全国第六批名老中医药专家学术经验指导老师, 博士生导师陈志强教授的经验方, 该方是以清代河

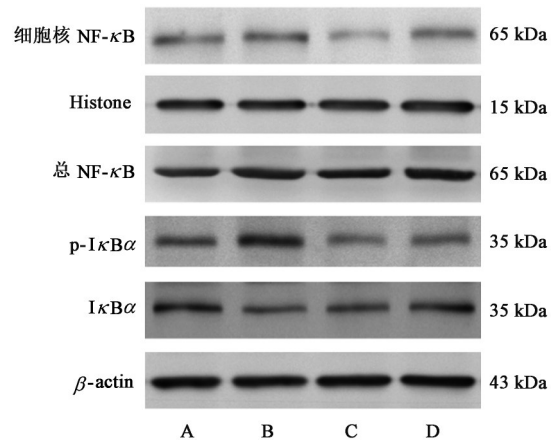


图3 DKD小鼠肾组织NF-κB通路相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of NF-κB pathway related proteins in renal tissue of DKD mice

北玉田名医的经典名方补阳还五汤为基础, 易桃仁、红花、赤芍为水蛭、丹参、生地黄而成。方中以黄芪大补脾胃之元气, 令气旺血行, 瘀去络通, 是为君药; 生地黄滋阴补肾填精, 肾精足肾气生, 肾气化

表7 补阳还五汤加味对DKD小鼠肾组织纤维化相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of modified Buyang Huanwutang on fibrosis-associated proteins in renal tissue of DKD mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	总NF-κB/β-actin	细胞核NF-κB/Histone	p-IκBα/β-actin	IκBα/β-actin
正常组		0.40±0.01	0.22±0.02	0.21±0.03	0.39±0.04
模型组		0.71±0.03 ¹⁾	0.54±0.04 ¹⁾	0.38±0.04 ¹⁾	0.22±0.04 ¹⁾
补阳还五汤加味组	16.0	0.58±0.07 ²⁾	0.35±0.03 ³⁾	0.26±0.05 ³⁾	0.34±0.06 ³⁾
厄贝沙坦组	0.013 5	0.61±0.07 ²⁾	0.46±0.04 ²⁾	0.27±0.04 ³⁾	0.30±0.05 ²⁾

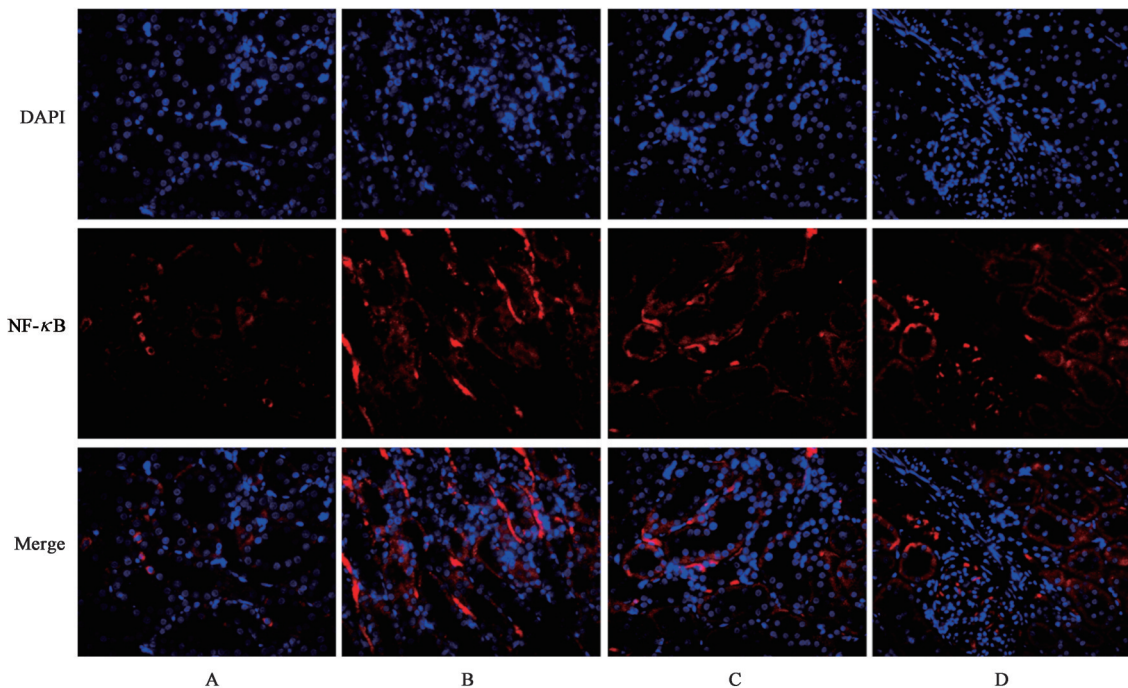


图4 补阳还五汤加味对DKD小鼠肾组织中NF-κB表达的影响 (免疫荧光, ×200)

Fig. 4 Effect of modified Buyang Huanwutang on expression of NF-κB in renal tissues in DKD mice (IF, ×200)

则水湿行,为臣药。丹参、当归甘温质润,养血活血,化瘀而不伤血,同时伍以川芎辛散温通,上行头目,中开郁结,下行血海,旁通络脉,助丹参、当归活血祛瘀;久病入络,然络病之瘀多病根深伏,病情顽缠,属沉痾痼疾,非一般草木之品所能取效,必藉以虫类之品搜邪剔络,因虫类之品为血肉之质,又具有动跃攻冲之性,体阴用阳,能深入隧络,直达病所,攻剔痼结之痰瘀,旋转阳动之气,从而使络痹易开,结邪易去。故去桃仁、红花、赤芍等草木之品,以水蛭、地龙虫类药物逐瘀通络、散结消癥,另外二药味咸寒,尚可清病邪久留之郁热,共为佐使之药。诸药合用补气而不壅滞,活血又不伤正,如此则气旺、瘀消、湿化、络通,诸症向愈,该组方加减配伍较补阳还五汤原方活血之力更强,而无辛散耗气之弊,且可补肾气,滋肾阴,健脾气,正契合了DKD气虚血瘀的基本病机。课题组前期研究发现,临床应用此法治疗DKD,确有疗效,可显著改善DKD患者临床症状、体征,提高证候疗效和总体疗效,调节脂代谢、改善高凝状态、降低尿蛋白排泄率,保护肾功能,并能降低终点事件发生率^[6-8]。现代研究也表明益气活血中药具有改善糖脂代谢及胰岛素抵抗,抑制氧化应激及炎症因子表达,保护血管内皮,促进微循环,恢复纤溶系统及凝血系统平衡的作用^[2]。本研究采用db/db小鼠作为研究对象,db/db小鼠是目前应用最广泛的2型糖尿病模型,出生后6周即出现明显肥胖,空腹血糖升高,饮水量和尿量增加,8~12周发生DKD^[17]。本研究发现,在实验结束时,模型组小鼠尿mALB及血脂水平显著高于db/m小鼠,并且出现了显著的肾组织病理损害。而应用补阳还五汤加味中药干预后显著降低了DKD小鼠mALB水平,其功效与厄贝沙坦相似,并且改善了小鼠脂代谢及肾功能,但对血糖影响较小,说明其具有独立于血糖的肾脏保护机制。

现代研究发现炎症及纤维化是DKD进展中的不归路^[18-19]。随着糖尿病毒性产物(如晚期糖基化终产物)的积累、过量活性氧的产生及肾素-血管紧张素的活化,进而引起炎症相关信号通路的激活,并导致大量炎症因子和生长因子的产生^[20]。然后,该过程会导致肾小球中细胞外基质的沉积、肾小管上皮细胞和间质的转分化及系膜区纤连蛋白的合成增加^[21],从而引起肾脏结构及功能异常。NF- κ B是DKD进展过程中的重要炎症通路,正常情况下其在细胞中处于不活化状态,当细胞受到上述理化因子刺激后被激活^[22]。通过抑制NF- κ B通路可以抑

制炎症因子的表达及氧化应激反应,从而减轻DKD肾损伤^[23]。本研究结果显示,模型组小鼠肾组织p-I κ B α 表达升高,I κ B α 表达降低,同时NF- κ B表达和核转移能力增加,炎症因子的mRNA也上调。而应用中药干预后明显降低NF- κ B蛋白表达及核转移,同时炎症因子的水平也降低,表明补阳还五汤加味可通过作用于NF- κ B通路抑制DKD小鼠肾组织的炎症反应。此外,也再次证明阳性对照药物厄贝沙坦具有抑制NF- κ B通路活化的作用,这与CHEN等^[14]研究结果一致。

肾小球硬化及间质纤维化是DKD的最终结果,其特征是细胞外基质的过度沉积,包括纤连蛋白和胶原蛋白^[24]。这些细胞外基质蛋白的积累最终将糖尿病肾组织中的上皮细胞转化为成纤维细胞,从而导致肾纤维化^[25]。TGF- β_1 被认为是最有效的纤维化分子,其通过增强细胞外基质的合成介导DKD中的肾小球硬化和肾小管间质纤维化^[26]。此外,TGF- β_1 升高可加重炎症反映,并进一步诱导成纤维细胞的聚集和激活^[27]。本研究表明,补阳还五汤加味可以抑制DKD小鼠肾组织中TGF- β_1 的表达,纤连蛋白及 α -SMA表达也降低。同时,肾组织病理损害也明显减轻。总之,补阳还五汤可有效减少DKD小鼠体内TGF- β_1 的产生和细胞外基质的积累。

综上所述,本研究发现,补阳还五汤加味可通过抑制NF- κ B通路及纤维化因子表达,对DKD小鼠发挥抗炎和抗纤维化作用,减轻肾脏病理损伤,从而发挥肾脏保护作用。但是,本研究也存在一定的不足之处,如仅关注于NF- κ B通路,而未对其他炎症通路进行研究,并且对该通路的下游也没有进一步深入的验证,此外,本实验仅做了体内实验,并没有在离体细胞中进行实验研究,因而对该方具体作用于哪种细胞类型进而发挥肾脏保护作用亦未可知,这也将是课题组的下一步研究的方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] KOYE D N, MAGLIANO D J, NELSON R G, et al. The global epidemiology of diabetes and kidney disease[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2018, 25(2): 121-132.
- [2] 胡艳红,杨静,修成奎,等. 益气活血方治疗糖尿病血管病变的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(8): 1-12.
- [3] 韩云鹏,谢春光. 补阳还五汤治疗糖尿病及其并发症的研究进展[J]. *四川中医*, 2021, 39(10): 213-218.

- [4] 费佳,马源,朱辟疆. 朱辟疆辨治糖尿病肾病经验[J]. 山东中医药大学学报,2019,43(2):167-170.
- [5] 肖遥,赵进喜. 赵进喜治疗糖尿病肾病经验[J]. 中华中医药杂志,2018,33(1):159-162.
- [6] 白璐,张江华,张晋升,等. 益气养阴活血通络方对糖尿病肾病患者糖、脂代谢及血流变的影响[J]. 河北中医药学报,2016,31(3):9-11.
- [7] 陈志强,方敬,王月华,等. 益气养阴消癥通络中药治疗早期糖尿病肾病的临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2015,16(11):962-964.
- [8] 王凤丽,陈志强,王月华,等. 益气养阴消癥通络方治疗早期糖尿病肾病临床观察[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(1):35-38.
- [9] BAI L, HUO B, CHEN Z, et al. Effect of Huayu Tongluo herbs on reduction of proteinuria via inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med,2017,2017:3054145.
- [10] 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.
- [11] YANG F, LI Y, GUO S, et al. Hirudo Lyophilized powder ameliorates renal injury in diabetic rats by suppressing oxidative stress and inflammation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6657673.
- [12] LI Y, YANG F, GUO S, et al. Huayu Tongluo recipe attenuates renal oxidative stress and inflammation through the activation of AMPK/Nrf2 signaling pathway in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021:5873007.
- [13] HSU J D, WU C C, HUNG C N, et al. Myrciaria cauliflora extract improves diabetic nephropathy via suppression of oxidative stress and inflammation in streptozotocinnicotinamide mice [J]. J Food Drug Anal,2016,24(4):730-737.
- [14] CHEN X W, DU X Y, WANG Y X, et al. Irbesartan ameliorates diabetic nephropathy by suppressing the RANKL-RANK-NF- κ B pathway in type 2 diabetic db/db mice[J]. Mediators Inflamm,2016,2016:1405924.
- [15] ZHANG H, LI P, BURCZYNSKI F J, et al. Attenuation of diabetic nephropathy in otsuka long-evans tokushima fatty (OLETF) rats with a combination of Chinese herbs (Tangshen formula)[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011, 2011: 613737.
- [16] VENIANT M, HEUDES D, CLOZEL J P, et al. Calcium blockade versus ACE inhibition in clipped and unclipped kidneys of 2K-1C rats[J]. Kidney Int, 1994,46(2):421-429.
- [17] 王松月,依香叫,李金诚,等. 自发性2型糖尿病模型db/db小鼠生物学特性研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2019,25(7):909-912.
- [18] XIANG E, HAN B, ZHANG Q, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells prevent the progression of early diabetic nephropathy through inhibiting inflammation and fibrosis[J]. Stem Cell Res Ther,2020,11(1):336.
- [19] GUO J, ZHENG H J, ZHANG W, et al. Accelerated kidney aging in diabetes mellitus [J]. Oxid Med Cell Longev,2020,2020:1234059.
- [20] STENVINKEL P, LARSSON T E. Chronic kidney disease: A clinical model of premature aging[J]. Am J Kidney Dis,2013,62(2):339-351.
- [21] MORENO J A, GOMEZ-GUERRERO C, MAS S, et al. Targeting inflammation in diabetic nephropathy: A tale of hope[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2018, 27 (11):917-930.
- [22] LUO C, YANG H, TANG C, et al. Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF- κ B signal in type 2 diabetic rats [J]. Int Immunopharmacol,2015,28(1):744-750.
- [23] KOLATI S R, KASALA E R, BODDULURU L N, et al. BAY 11-7082 ameliorates diabetic nephropathy by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammation via NF- κ B pathway [J]. Environ Toxicol Pharmacol,2015,39(2):690-699.
- [24] BROSIUS F C. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy[J]. Rev Endocr Metab Disord,2008,9(4):245-254.
- [25] HU C, SUN L, XIAO L, et al. Insights into the mechanisms involved in the expression and regulation of extracellular matrix proteins in diabetic nephropathy [J]. Curr Med Chem,2015,22(24):2858-2870.
- [26] VOELKER J, BERG P H, SHEETZ M, et al. Anti-TGF- β_1 antibody therapy in patients with diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28 (3) : 953-962.
- [27] KIM T W, KIM Y J, SEO C S, et al. *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hylander attenuates renal inflammation and interstitial fibrosis via regulation of TGF- β and Smad3 expression on unilateral ureteral obstruction rat model [J]. Phytomedicine,2016,23(4):331-339.

[责任编辑 孙丛丛]