

雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠肾组织 NFAT2/COX-2表达的影响

段凤阳^{1,2}, 宋纯东^{1*}, 宋丹², 丁樱^{1,2*}, 任献青¹, 张霞¹, 翟文生¹, 郭婷¹, 王耀献³

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000;

2. 河南中医药大学, 郑州 450006;

3. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 基于活化T细胞核因子2(NFAT2)/环氧化酶-2(COX-2)通路探讨雷公藤多苷片(TWPT)防治糖尿病肾病(DN)肾脏损伤的可能作用机制。方法: 选取雄性清洁级SD大鼠42只, 适应性喂养1周后随机分为正常组8只, 造模组34只。正常组予以正常饲养, 造模组采用高脂高糖饮食喂养1周后予腹腔注射链脲佐菌素(STZ)法建立DN大鼠模型, 除去造模过程中死亡及失败, 选取造模成功的24只随机分为模型组、缬沙坦(8.33 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组、TWPT(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组。正常组和模型组均予等体积生理盐水灌胃, 6周后测量体质量, 收集大鼠尿液, 腹主动脉取血后处死取材, 生化检测血清中的尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血脂血糖及尿液中的24 h尿蛋白总量(24 h UTP), 苏木素-伊红(HE)及马松(Masson)染色观察肾脏病理, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中的NFAT2、COX-2表达水平, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾组织中NFAT2、COX-2蛋白表达, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肾组织中NFAT2、COX-2 mRNA表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠24 h UTP、BUN、SCr、CHO、TG、FBG及血清NFAT2、COX-2表达显著升高($P<0.01$), 肾组织中的NFAT2、COX-2蛋白及mRNA表达显著升高($P<0.01$), 肾脏病理示肾小球体积增大, 系膜细胞轻度增生, 系膜基质增宽; 与模型组比较, TWPT组大鼠24 h UTP、BUN、SCr、CHO、TG、FBG均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$); 肾脏病理示肾小球形态基本正常, 血清中NFAT2、COX-2表达显著降低($P<0.01$), 肾组织中的NFAT2、COX-2 mRNA和蛋白表达显著下降($P<0.01$)。结论: TWPT可减轻DN大鼠24 h UTP、保护肾功能、改善肾脏病理, 其作用机制可能与下调血清及肾组织NFAT2/COX-2表达相关。

[关键词] 雷公藤多苷; 糖尿病肾病; 活化T细胞核因子2(NFAT2)/环氧化酶-2(COX-2)通路; 实验研究

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)05-0016-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222445

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.r.20221223.1138.003.html>

[网络出版日期] 2022-12-27 09:09:31

Effect of *Tripterygium wilfordii* Polyglycoside on Expression of NFAT2/COX-2 in Kidney Tissues of Rats with Diabetic Nephropathy

DUAN Fengyang^{1,2}, SONG Chundong^{1*}, SONG Dan², DING Ying^{1,2*},

REN Xianqing¹, ZHANG Xia¹, ZHAI Wensheng¹,

GUO Ting¹, WANG Yaoxian³

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

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450006, China;

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

[收稿日期] 2022-04-24

[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] 段凤阳, 在读博士, 主治医师, 从事中西医结合治疗肾脏病研究, E-mail: duanfengyang2013@sina.com

[通信作者] * 宋纯东, 博士, 主任医师, 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;

* 丁樱, 主任医师, 国医大师, 博士生导师, 从事中医药防治儿童肾脏疾病研究, E-mail: dingying3236@sina.com

[Abstract] **Objective:** To explore the underlying mechanism of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets (TWPT) in the prevention and treatment of kidney injury in diabetic nephropathy (DN) through the nuclear factor of activated T-cells 2(NFAT2)/cyclooxygenase-2(COX-2) pathway. **Method:** Forty-two male SD rats of SPF grade were selected and randomly divided into a normal group ($n=8$) and an experimental group ($n=34$) after one week of adaptive feeding. The rats in the normal group were fed conventionally. The DN model was established in rats of the experimental group by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) following one week of feeding on a high-fat and high-glucose diet. After the death and failure cases during modeling were eliminated, the remaining 24 model rats were randomly divided into model group, valsartan ($8.33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) group, and TWPT ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) group. Rats in normal group and model group were given equal amounts of normal saline by gavage. After six weeks, body weight was measured and urine samples were collected. Blood samples were collected from the abdominal aorta, and then the rats were sacrificed for sampling. Biochemical indicators, such as serum blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), alanine aminotransferase (ALT), blood lipid, blood glucose, and 24-hour urine total protein (24 h UTP), were determined. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were used to observe the pathology of the kidney. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect NFAT2 and COX-2 expression levels in the serum. Western blot and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were adopted to detect NFAT2, COX-2 protein and mRNA expression in kidney tissues, respectively. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed elevated 24 h UTP, BUN, SCr, CHO, TG, and FBG, increased serum NFAT2 and COX-2 production and expression ($P<0.01$), and elevated protein and mRNA expression of NFAT2 and COX-2 in kidney tissues ($P<0.01$). In addition, the pathology of the kidney showed enlarged glomeruli, mild proliferation of mesangial cells, and widened mesangial stroma. Compared with the model group, the TWPT group showed decreased 24 h UTP, BUN, SCr, CHO, TG, and FBG ($P<0.05, P<0.01$), basically normal glomerular morphology, decreased expression of serum NFAT2 and COX-2 ($P<0.01$), and down-regulated protein and mRNA expression of NFAT2 and COX-2 in kidney tissues ($P<0.01$). **Conclusion:** TWPT can alleviate 24 h UTP in DN model rats, protect renal function, and improve renal pathology, and its mechanism of action may be related to the down-regulation of NFAT2/COX-2 expression in the serum and kidney tissues.

[Keywords] *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets; diabetic nephropathy; nuclear factor of activated T-cells 2(NFAT2)/cyclooxygenase-2(COX-2) pathway; experimental study

糖尿病肾病(DN)是终末期肾脏疾病的主要原因,严重影响糖尿病患者的生存和预后^[1]。目前有关DN的确切发病机制尚未明确,但最新的研究显示肾纤维化是DN进展为终末期肾脏病的主要病理因素^[2]。因此,深入研究DN肾纤维化的发病机制及有效治疗药物的作用靶点是DN治疗的新策略。环氧酶-2(COX-2)高度定位于间质成纤维细胞,是DN肾脏损伤的重要枢纽基因。在肾髓质中,COX-2蛋白表达的增加与蛋白尿的水平、肾脏损伤程度、肾小球硬化及纤维化的进展具有显著的相关性^[3-4]。活化T细胞核因子2(NFAT2)是细胞信号通路的主要调节点,主要在肾脏及心血管系统中表达。DN高糖可以通过活化NFAT2诱导肾脏足细胞及系膜细胞损伤^[5-6]。近年来研究证实,作为肾脏中

COX-2表达的转录驱动因子,NFAT2转录可以调控肾髓质中COX-2的表达而加重肾脏损伤^[7]。因此,NFAT2/COX-2信号通路可能是防治DN肾脏损伤及肾纤维化的新途径和新靶点。

雷公藤多苷(TWPT)是从天然抗炎植物雷公藤根茎中提取的一种稳定的糖苷,目前广泛用于各种自身免疫和炎症疾病^[8-10]。在DN的治疗和药物研发中,TWPT可通过抗氧化、抗炎、延缓肾纤维化等多种机制发挥降低蛋白尿、保护肾功能的作用,逐渐成为近年来临床及实验研究的热点^[11-12]。本课题组前期研究亦证实TWPT可降低DN蛋白尿,修复肾脏病理损伤,改善肾功能^[13-14]。为进一步探讨TWPT治疗DN的作用机制,本研究拟采用高脂高糖饮食+腹腔注射链脲佐菌素法建立DN大鼠模型,

旨在探明 TWPT 能否通过调节 NFAT2/COX-2 信号通路,改善肾脏损伤,从而延缓 DN 肾脏纤维化进程。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠,42只,体质量180~200 g,购自郑州大学动物实验中心,合格证号SCXK(豫)2019-0002。实验动物饲料购自郑州大学动物实验中心,动物饲料批号GZSL-01;大鼠饲养于河南中医药大学第一附属医院中心实验室。动物实验经河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理委员会审查,批准编号YFYDW2021013。

1.2 药品与试剂 TWPT(江苏美通制药有限公司,批号Z32021007,规格10 mg/片);缬沙坦(代文)胶囊(北京诺华制药公司,国药准字H20040217,规格80 mg/粒);链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号S1030);NFAT2、COX-2酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号分别为MM-71169R2、MM-70227R2);苏木素-伊红(HE)、马松(Masson)染色液(碧云天生物技术有限公司,批号分别为C0105、C0165);RNA提取液、BCA蛋白定量检测试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、兔来源一抗COX-2抗体、鼠来源一抗 β -肌动蛋白(β -actin);山羊抗小鼠、抗兔二抗(武汉Servicebio公司,批号分别为G3013、G2026、G2003、GB111037、GB15001、GB25301、GB25303);鼠来源一抗NFAT2抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号66963-1-Ig)。

1.3 仪器 NanoDrop2000型超微量分光光度计(美国Thermo公司);D3024R型台式高速冷冻型微量离心机(大龙兴创实验仪器北京有限公司);CFX型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);FBZ2001-up-p型标准试剂型纯水仪(青岛富勒姆科技有限公司);Rt2100c型酶标检测仪(深圳Rayto公司);DYCZ-24DN型双垂直电泳仪、DYCZ-40D型转印电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 模型制作及分组 参考并改良石光等^[15]的造模方法,将购买的SD大鼠适应性喂养1周,期间监测血糖及尿检均无异常。随机抽取8只作为正常组,将余34只给予高脂高糖饮食(57%大小鼠维持饲料+10%猪油+20%蔗糖+10%酪蛋白+2.5%胆固醇+0.5%胆酸钠)喂养1周后,用0.1% STZ按

55 mg·kg⁻¹的剂量一次性腹腔注射,72 h后尾静脉采血,监测血糖(0、1、2 h)均 ≥ 16.6 mmol·L⁻¹,24 h尿糖强阳性,24 h尿蛋白排泄 >30 mg·(24 h)⁻¹,提示DN模型制备成功。在造模过程中,大鼠死亡5只,造模失败5只,余24只随机平均分为模型组、TWPT组及代文组。

2.2 给药方法及剂量设置 造模成功后各组大鼠开始灌胃治疗6周,TWPT组按照5 mg·kg⁻¹·d⁻¹(折合成人剂量1 mg·kg⁻¹·d⁻¹),用前以蒸馏水配制为每1 mL含生药0.5 mg混悬液,每次10 mL·kg⁻¹灌胃,1次/d,期间根据体质量调整灌胃剂量;代文组按8.33 mg·kg⁻¹(折合成人剂量80 mg·d⁻¹),余模型组、正常组给予等体积生理盐水灌胃^[16]。

2.3 血液及尿液指标检测 第6周末,将所有大鼠置于代谢笼中,禁食不禁水,留取24 h尿液,测量体质量,使用全自动蛋白分析仪检测24 h UTP。24 h尿液留取后,所有大鼠麻醉后腹主动脉取血,使用全自动生化分析仪检测血清尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、血糖(FBG)及体质量变化情况。

2.4 肾脏组织HE染色、Masson染色观察组织学病变 取少许DN大鼠肾组织固定后经梯度脱水、透明、包埋、切片等常规处理后,予HE染色及Masson染色,光镜下放大252倍观察肾脏组织病理形态改变,包括肾小球形态、系膜细胞数量、系膜基质等。

2.5 ELISA检测血清中的NFAT2、COX-2水平 将稀释后的样品加入各孔中,加入酶标试剂后置于37℃温育60 min后弃去,反复冲洗5次,拍干后分别加入显色剂,混匀后37℃避光显色15 min,每孔加入终止液,测定血清NFAT2、COX-2水平。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测NFAT2、COX-2蛋白表达 称取留存的DN大鼠肾脏组织100 mg,去除血污,剪碎,彻底匀浆,冰浴,收集上清,用BCA蛋白定量检测试剂盒检测目标蛋白浓度(具体参见操作说明书),进行蛋白变性,SDS-PAGE电泳、转膜和封闭,加入NFAT2、COX-2(1:1 000)一抗,以及 β -actin(1:2 000)抗体,4℃孵育摇床过夜,二抗(1:5 000)室温孵育30 min,ECL进行显影和定影,使用Alpha软件处理系统分析灰度值。

2.7 Real-time PCR检测NFAT2、COX-2 mRNA表达 仍称取DN大鼠肾脏组织100 mg,充分研磨,取上清,按操作步骤提取总RNA,使用Nanodrop 2000检测RNA浓度及纯度,进行反转录。扩增条件为95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃延伸30 s,

40个循环;65℃到95℃每升温0.5℃,采集1次荧光信号。生物序列由武汉赛维尔生物科技有限公司提供,引物序列见表1。

2.8 统计学分析 使用SPSS 25.0软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,任意两组间比较采用SNK-*q*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠肾功能、ALT、24 h UTP含量的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清BUN、SCr、ALT、24 h UTP水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,代

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
NFAT2	上游 AGTTCGCCTTCCAGCACCTT	230
	下游 GCTGCCTTCCGTCTCATAGTG	
COX-2	上游 CTGATGACTGCCAACTCCC	143
	下游 CTGGGCAAAGAATGCGAACA	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

文组、TWPT组BUN、SCr、ALT、24 h UTP水平显著降低($P < 0.01$)。见表2。

表2 雷公藤多苷(TWPT)对DN大鼠肾功能、ALT、24 h UTP白定量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside tablets(TWPT) on renal function, ALT, and 24 h UTP in DN rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/μmol·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	24 hUTP/mg
正常组		8.27±0.67	26.66±2.77	67.67±26.28	17.95±4.11
模型组		26.87±1.72 ¹⁾	39.15±2.15 ¹⁾	124.07±19.25 ¹⁾	34.06±2.70 ¹⁾
代文组	8.33	16.60±1.69 ²⁾	27.59±1.58 ²⁾	68.67±16.30 ²⁾	22.71±1.95 ²⁾
TWPT组	5	15.81±1.41 ²⁾	28.01±1.20 ²⁾	72.63±9.90 ²⁾	24.40±4.45 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表5和表6同)

3.2 对大鼠血脂、血糖、体质量的影响 与正常组比较,模型组大鼠CHO、TG、FBG水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,代文组、TWPT组CHO、FBG

水平显著降低($P < 0.01$),TWPT组TG水平明显降低($P < 0.05$),代文组TG水平差异无统计学意义;各组大鼠体质量比较差异无统计学意义。见表3。

表3 TWPT对DN大鼠血脂血糖、体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of TWPT on triglycerides, cholesterol, fasting blood glucose and weight in DN rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹	CHO/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	体质量/g
正常组		10.60±4.52	1.15±0.30	0.53±0.11	272.00±13.79
模型组		38.00±4.05 ¹⁾	2.83±0.40 ¹⁾	2.56±0.63 ¹⁾	263.75±11.11
代文组	8.33	24.43±4.50 ³⁾	1.82±0.35 ³⁾	1.75±0.30	275.62±21.97
TWPT组	5	24.80±3.97 ³⁾	1.73±0.25 ³⁾	1.58±0.37 ²⁾	267.75±25.68

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

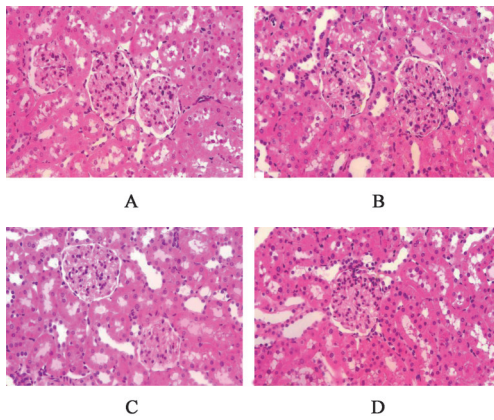
3.3 对大鼠肾脏组织病理学变化的影响 光镜结果显示,正常组大鼠肾小球及肾小管结构及体积正常,无系膜细胞增生,系膜基质增宽;与正常组比较,模型组大鼠表现为肾小球体积增大,系膜细胞轻度增生,系膜基质增宽,符合DN早期肾脏病理变化;与模型组比较,各组大鼠肾脏组织病理学均有不同程度好转,其中代文组大鼠轻度系膜增生,系膜基质增宽;TWPT组大鼠系膜基质增宽。见图1和图2。

3.4 对大鼠血清NFAT2、COX-2水平的影响 与正常组比较,模型组血清中的NFAT2、COX-2表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,代文组、

TWPT组血清中的NFAT2、COX-2表达水平显著降低($P < 0.01$);与代文组比较,TWPT组血清中NFAT2表达水平显著降低($P < 0.01$)。见表4。

3.5 对大鼠肾组织NFAT2、COX-2蛋白表达水平影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中的NFAT2、COX-2蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,代文组、TWPT组肾组织中NFAT2、COX-2蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。见图3、表5。

3.6 对大鼠肾组织NFAT2、COX-2 mRNA表达水平影响 与正常组比较,模型组肾组织中NFAT2、COX-2 mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,代文组、TWPT组NFAT2、COX-2 mRNA水



注:A.正常组;B.模型组;C.TWPT组;D.代文组(图2和图3同)
图1 TWPT对DN大鼠肾组织病理的影响(HE,×400)
Fig. 1 Effect of TWPT on renal histopathology in DN rats (HE,×400)

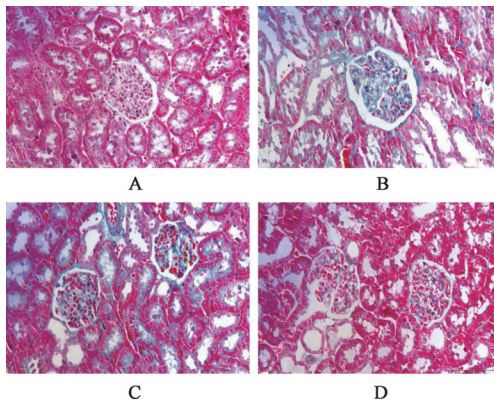


图2 TWPT对DN大鼠肾组织病理的影响(Masson,×400)
Fig. 2 Effect of TWPT on renal histopathology in DN rats (Masson,×400)

表4 TWPT对DN大鼠血清中NFAT2、COX-2水平的影响($\bar{x}\pm s$, n=8)

Table 4 Effect of TWPT on serum levels of NFAT2 and COX-2 in DN rats ($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NFAT2	COX-2
正常组		3.01±0.41	35.81±2.14
模型组		7.76±0.27 ¹⁾	81.14±7.20 ¹⁾
代文组	8.33	4.33±0.27 ²⁾	46.53±6.15 ²⁾
TWPT组	5	3.65±0.25 ^{2,3)}	42.79±4.47 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01;与代文组比较³⁾P<0.01

平显著降低(P<0.01)。见表6。

4 讨论

DN起病隐匿,进展迅速,部分患者最终进展至终末期肾脏病后需要肾脏替代治疗,预后不佳^[17]。因此探明DN的发病机制及药物治疗靶点成为目前研究热点。近年来有关DN的发病机制主要集中在代谢异常、炎症、免疫调节和遗传易感性等方面^[18]。

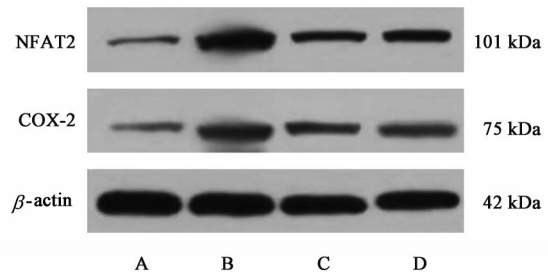


图3 各组DN大鼠肾组织中NFAT2、COX-2蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of NFAT2 and COX-2 in kidney tissue of DN rats in each group

表5 TWPT对DN大鼠肾组织中的NFAT2、COX-2蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)

Table 5 Effect of TWPT on expression of NFAT2 and COX-2 proteins in kidney tissue of DN rats ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NFAT2/ β -actin	COX-2/ β -actin
正常组		0.16±0.01	0.17±0.03
模型组		0.77±0.02 ¹⁾	0.93±0.04 ¹⁾
代文组	8.33	0.47±0.01 ²⁾	0.41±0.01 ²⁾
TWPT组	5	0.47±0.01 ²⁾	0.40±0.01 ²⁾

表6 TWPT对大鼠肾组织中的NFAT2、COX-2 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$, n=3)

Table 6 Effect of TWPT on expression of NFAT2 and COX-2 mRNA in rat kidney tissue ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NFAT2	COX-2
模型组		6.24±1.16 ¹⁾	3.73±0.67 ¹⁾
代文组	8.33	2.30±1.60 ²⁾	1.61±0.25 ²⁾
TWPT组	5	1.70±1.07 ²⁾	1.85±0.72 ²⁾

注:设正常组各mRNA表达量为1

肾纤维化是肾脏病理损伤的主要临床表现,目前研究证实,肾纤维化是导致DN患者肾功能下降的重要原因,也是DN进展至终末期肾脏病的主要病理因素^[19]。因此,深入研究DN肾纤维化的发病机制及有效治疗药物作用靶点是亟待解决的关键问题。

DN中医虽无特定的对应名称,但认识历史悠久,早在《黄帝内经》便有“消瘴”的记载,后世医家多将其归属于“渴利”“肾劳”“水肿”范畴^[20]。《诸病源候论》中记载:“消渴其久病变,或成水疾”;《太平圣惠方》中云:“饮水随饮随小便,味甘而白浊,腰腿消瘦者消肾也,皆五脏精液枯竭,经络血涩,荣卫不行,热气留滞遂成斯疾也”,指出脾肾亏虚、虚实夹杂是本病的主要病机。TWPT是卫矛科植物雷公藤去皮根部提取的总苷,具有祛风通络、除湿解毒、截疟止痛的功效,尽管有报道指出雷公藤制剂存在肝肾及生殖毒性,但更多的研究表明其可通过中药予

以拮抗^[21-23]。目前雷公藤制剂临床中广泛用于治疗类风湿性关节炎、糖尿病肾病、紫癜性肾炎、膜性肾病等自身免疫及肾脏疾病^[24-25]。研究表明, TWPT不仅可改善肾小球滤过膜的通透性、降低蛋白尿, 还可以减轻DN大鼠模型的肾小球硬化^[26]。

NFAT2是活化T细胞核因子家族一员, 具有调节免疫系统和炎性反应的作用, 在肾脏足细胞、系膜细胞和肾小管上皮细胞中广泛表达, 参与细胞的分化、生长和凋亡。最新的研究表明, 在DN中高糖可通过瞬时受体电位阳离子通道6(TRPC6)激活NFAT2信号通路诱导肾小球足细胞损伤及肾小管上皮细胞的增殖和凋亡, 引起系膜细胞纤维化^[27-29]。COX-2是一种内源性的前列腺素限速酶, 存在于细胞核膜和微粒体膜上, 能将花生四烯酸代谢成PG产物, 主要参与细胞的增殖与凋亡过程、炎症反应、脂多糖反应及氧化应激反应等。研究显示, 肾脏足细胞COX-2的表达与足细胞损伤及蛋白尿程度成正相关, 且随着COX的高表达, 肾功能逐渐下降^[30-31]; 实验动物短期应用选择性COX-2抑制剂可预防和延缓DM肾脏损伤及肾功能的进展^[32]。另外, DN COX-2的高表达还与血流动力学有关, 在5/6肾切除大鼠中直接输注血管紧张肽II(Ang II)制剂可增加COX-2的表达, 从而引起高血压、肾功能衰竭^[33]。COX-2基因的转录是由多条途径驱动的, 在启动子区域有多个转录因子复合物的结合位点, 其中最主要就是NF- κ B和NFAT^[34-35]。目前有关NFAT2转录启动COX-2高表达的研究主要集中于肿瘤、骨发育、血管再生和重塑等方面, 在慢性肾脏病领域相对较少^[36-38]。因此, 探讨NFAT2被激活后由细胞质易位到细胞核中, 在启动子区域与COX-2转录因子复合物的结合位点相结合, 启动COX-2的基因转录, 从而引起肾脏足细胞、系膜细胞及肾小管上皮细胞的损伤、基质增生, 是DN肾纤维化新的研究思路及药物治疗靶点。本研究结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清NFAT2、COX-2水平, 肾组织NFAT2、COX-2蛋白及mRNA表达水平均显著升高, 肾脏病理表现为肾小球体积增大, 系膜细胞增生, 系膜基质增宽; 生化结果显示大鼠血清尿素氮、肌酐及24 h UTP显著升高, 提示DN生化及肾脏病理改变可能与NFAT2/COX-2激活有关; 与模型组比较, 经TWPT治疗后实验动物血清NFAT2、COX-2水平, 肾组织NFAT2、COX-2蛋白及mRNA表达水平均显著降低, 肾脏病理减轻, 血清尿素氮、肌酐及24 h UTP显著降低, 提示TWPT可能通过影响DN

肾组织NFAT2、COX-2的表达, 发挥修复肾脏损伤、防治肾间质纤维化的作用。此外, 针对TWPT量效关系问题, 有报道指出, 对于不同剂量的TWPT的临床报道中给药剂量为1~1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹时不良反应最低^[39]。本课题组既往研究过程中以5 mg·kg⁻¹·d⁻¹(折合成成人剂量1 mg·kg⁻¹·d⁻¹)给药, 未见明显不良反应^[40]。本研究结果显示, 模型组大鼠ALT明显升高, 此与既往文献报道一致^[41], 但TWPT组与正常组、代文组比较差异无统计学意义, 提示TWPT剂量安全可靠。结合实验结果亦发现, TWPT对DN模型大鼠FBG、CHO、TG有明显改善作用, 这可能与糖尿病胰腺-细胞功能障碍及TWPT特殊抗炎抑制肥胖作用有关^[42-43]。

综上所述, TWPT具有减轻蛋白尿, 保护肾功能, 延缓肾脏纤维化的作用, 其机制可能与影响DN血清及肾组织NFAT2、COX-2的产生和表达有关, 这可能是TWPT防治DN有效机制之一, 但实验过程中未对激活NFAT2调控COX-2转录进行体外实验干预, 需要在将来的工作中进一步完善。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ZHOU H, NI W J, MENG X M, et al. MicroRNAs as regulators of immune and inflammatory responses: Potential therapeutic targets in diabetic nephropathy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 1837.
- [2] WEI J, DENG X, LI Y, et al. PP2 ameliorates renal fibrosis by regulating the NF- κ B/COX-2 and PPAR γ /UCP2 pathway in diabetic mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, doi:10.1155/2021/7394344
- [3] GUAN Y, DAVIS L, BREYER M D, et al. Cyclooxygenase-2 contributes to diabetic nephropathy through glomerular EP4 receptor [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2022, 159: 106621.
- [4] ABDALLAH M S, KENNEDY C R J, STEPHAN J S, et al. Transforming growth factor- β_1 and phosphatases modulate COX-2 protein expression and TAU phosphorylation in cultured immortalized podocytes [J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(2): 191-201.
- [5] SONNEVELD R, VAN DER VLAY J, BALTISSEN M P, et al. Glucose specifically regulates TRPC6 expression in the podocyte in an Ang II -dependent manner [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(6): 1715-1726.
- [6] 余剑. TRPC6/NFAT2通路在高糖诱导的肾小球系膜细胞损伤中的作用及机制探讨[D]. 芜湖: 皖南医学院, 2021.

- [7] KIRKBY N S, CHAN M V, ZAISS A K, et al. Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF- κ B and NFAT transcriptional pathways[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(2):434-439.
- [8] WU X, HUANG Y, ZHANG Y, et al. Efficacy of tripterygium glycosides combined with ARB on diabetic nephropathy: A Meta-analysis[J]. Biosci Rep, 2020, doi:10. 1042/BSR20202391.
- [9] 杨超,胡智星,明瑞蕊,等. 雷公藤多苷片联用甲氨蝶呤和/或来氟米特对类风湿关节炎自身抗体影响的Meta分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 39-48.
- [10] 王晓月,张依,陈文佳,等. 从临床多组学整合调控网络探究雷公藤多苷片治疗类风湿关节炎的“效-毒”关联机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 49-57.
- [11] WANG W. Different doses of *Tripterygium glycosides* in the treatment of diabetic nephropathy: Effects on blood lipids[J]. Kidney Blood Press Res, 2018, 43(3): 931-937.
- [12] 黄燕如,万毅刚,孙伟,等. 雷公藤多苷调节肾组织 p38 MAPK 信号通路改善糖尿病肾病肾小球炎症性损伤的作用和机制[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21):4102-4109.
- [13] 宋纯东,侯小静,薛黎明,等. 雷公藤多苷片对糖尿病肾病大鼠肾组织 WT1 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(12):4472-4474.
- [14] 宋纯东,杨晓丽,薛黎明,等. 雷公藤多苷对早期糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF- β_1 /p38 MAPK 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(12): 1348-1350.
- [15] 石光,石岩,孙晓波,等. 糖尿病肾病大鼠模型制备方法与模型建立标准研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(7):171-173.
- [16] 徐叔云,卞如濂,陈修,等. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002.
- [17] ABDEL-LATIF R G, AHMED A F, HEEBA G H. Low-dose lixisenatide protects against early-onset nephropathy induced in diabetic rats[J]. Life Sci, 2020, 263:118592.
- [18] COLON S, LUAN H, LIU Y, et al. Peroxidase and eosinophil peroxidase, but not myeloperoxidase, contribute to renal fibrosis in the murine unilateral ureteral obstruction model[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316(2):F360-F371.
- [19] JIANG Z H, TANG Y Z, SONG H N, et al. miRNA-342 suppresses renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy by targeting SOX6[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(1):45-52.
- [20] 李艳春,李嘉鑫,杨宇峰,等. 基于“五行相生相克”理论论治糖尿病肾病[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11):240-245.
- [21] 张依,王晓月,丁子禾,等. 中药配伍雷公藤制剂治疗类风湿关节炎的安全性系统评价及其增效减毒网络调控机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 1-8.
- [22] 赵明洪,卢天明,刘莉,等. 甘草减轻雷公藤多苷片所致肝损伤的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5):24-31.
- [23] 杨一博,徐颖,王璐,等. 基于 Notch 信号通路探索菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷对生理小鼠卵巢生殖干细胞的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5):9-15.
- [24] 李晶芳,韩蕊,殷宏庆,等. 雷公藤治疗肾脏疾病及其不良反应的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14):229-234.
- [25] 朱子衡,万磊,刘健,等. 基于 Apriori 关联规则和随机行走模型研究复方雷公藤制剂(新风胶囊)改善类风湿关节炎脾虚湿盛证免疫炎症的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5):32-38.
- [26] MA R, XU Y, JIANG W, et al. Combination of *Tripterygium wilfordii* Hook F and angiotensin receptor blocker synergistically reduces excretion of urinary podocytes in patients with type 2 diabetic kidney disease[J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2015, 29(1): 139-146.
- [27] FU Y, WANG C, ZHANG D, et al. Increased TRPC6 expression is associated with tubular epithelial cell proliferation and inflammation in diabetic nephropathy[J]. Mol Immunol, 2018, 94:75-81.
- [28] SU Y, CHEN Q, JU Y, et al. Palmitate induces human glomerular mesangial cells fibrosis through CD36-mediated transient receptor potential canonical channel 6/nuclear factor of activated T cell 2 activation[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2020, 1865(12):158793.
- [29] SU Y, CHEN Q, JU Y, et al. Palmitate induces human glomerular mesangial cells fibrosis through CD36-mediated transient receptor potential canonical channel 6/nuclear factor of activated T cell 2 activation[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2020, 1865(12):158793.
- [30] CHENG H, FAN X, GUAN Y, et al. Distinct roles for basal and induced COX-2 in podocyte injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(9):1953-1962.

- [31] POP-BUSUI R, KELLOGG A P, CHENG H T. Cyclooxygenase-2 pathway as a potential therapeutic target in diabetic peripheral neuropathy [J]. *Curr Drug Targets*, 2008, 9(1):68-76.
- [32] GUAN Y, DAVIS L, BREYER M D, et al. Cyclooxygenase-2 contributes to diabetic nephropathy through glomerular EP4 receptor [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2022, 159: 106621.
- [33] HERNANDEZ, ASTUDILLO H, ESCALANTE B. Angiotensin II stimulates cyclooxygenase-2 mRNA expression in renal tissue from rats with kidney failure [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 282 (4) : 592-598.
- [34] KANG Y J, MBONYE U R, DELONG C J, et al. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation [J]. *Prog Lipid Res*, 2007, 46(2):108-125.
- [35] SUGIMOTO T, HANEDA M, SAWANO H, et al. Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(7):1359-1368.
- [36] WANG J, ZHANG Y, LIU L, et al. NFAT2 overexpression suppresses the malignancy of hepatocellular carcinoma through inducing Egr2 expression [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1):966.
- [37] CELIL AYDEMIR A B, MINEMATSU H, GARDNER T R, et al. Nuclear factor of activated T cells mediates fluid shear stress- and tensile strain-induced COX2 in human and murine bone cells [J]. *Bone*, 2010, 46(1) : 167-175.
- [38] MENA M P, PAPIEWSKA-PAJAK I, PRZYGODZKA P, et al. NFAT2 regulates COX-2 expression and modulates the integrin repertoire in endothelial cells at the crossroads of angiogenesis and inflammation [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 324(2):124-136.
- [39] RU Y, LUO Y, ZHOU Y, et al. Adverse events associated with treatment of *Tripterygium wilfordii* Hook F: A quantitative evidence synthesis [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1250.
- [40] 宋纯东, 宋丹, 任献青, 等. 雷公藤多苷片对糖尿病肾病大鼠肾组织 RhoA/ROCK1 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(8):166-169, 280.
- [41] 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.
- [42] 高歌, 傅红兴, 徐福远, 等. 雷公藤多苷在小鼠胰岛移植中的抗排斥作用 [J]. *医药导报*, 2017, 36(7) : 757-761.
- [43] FANG W, PENG F, YI T, et al. Biological activity and safety of *Tripterygium* extract prepared by sodium carbonate extraction [J]. *Molecules*, 2012, 17 (9) : 11113-11123.

[责任编辑 孙丛丛]