

# 益肾化湿颗粒通过 p38 MAPK 信号通路对 db/db 小鼠肾脏保护机制

周楷栋<sup>1</sup>, 王思童<sup>1</sup>, 靳鸽<sup>1</sup>, 蔡炎沫<sup>1</sup>, 周鑫<sup>1</sup>, 刘运华<sup>1</sup>, 张新雪<sup>1</sup>, 张敏<sup>2</sup>, 赵宗江<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029;  
2. 首都医科大学附属北京朝阳医院, 北京 100020)

**[摘要]** 目的:观察益肾化湿颗粒对丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的影响,减轻肾小管上皮细胞损伤,延缓糖尿病肾病的作用机制。方法:12周龄 db/db 小鼠随机分为模型组、达格列净组(1.6 mg·kg<sup>-1</sup>)和益肾化湿颗粒组(4.7 g·kg<sup>-1</sup>),db/m 小鼠为正常组。观察小鼠一般状况,给药前和第12周检测空腹血糖、24 h 尿蛋白定量和尿白蛋白/尿肌酐(ACR);给药12周后取材,收集血清检测血肌酐(SCr)、血尿素(UREA)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)指标;采用苏木素-伊红(HE)染色法、过碘酸雪夫(PAS)染色法、马洛里(Mallory)三色染色法和透射电镜观察肾组织病理形态;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠肾组织单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、CC 基序趋化因子受体2(CCR2) mRNA 水平;免疫组化检测小鼠肾组织 p38 蛋白激酶(p38)、磷酸化(p)-p38、MCP-1、CCR2 蛋白表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肾组织 p38、p-p38、MCP-1、CCR2 蛋白水平。体外培养 HK-2 细胞分为空白组、高糖组(30 mmol·L<sup>-1</sup>)、益肾化湿含药血清组及 SB203580 组,各组细胞培养 48 h 后,提取细胞 RNA 和蛋白,通过 Real-time PCR 检测 MCP-1、CCR2 mRNA 水平,通过 Western blot 检测 p38、p-p38、MCP-1、CCR2 蛋白水平。结果:体内实验中,给药前与正常组比较,各组 db/db 小鼠体质量显著升高、血糖、24 h 尿蛋白定量、ACR 均显著升高( $P<0.01$ );给药 12 周后,与模型组比较,益肾化湿颗粒组一般状态明显改善,体质量有下降趋势,血糖、24 h 尿蛋白定量、ACR 均明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),SCr 和 UREA 显著降低( $P<0.01$ ),TC、TG、LDL 水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与模型组比较,益肾化湿颗粒组病理染色显示肾组织损伤及肾间质纤维化水平明显改善,电镜观察发现肾小球足突融合、基底膜增厚情况减轻,PCR 显示肾组织 MCP-1、CCR2 mRNA 表达显著降低( $P<0.01$ ),Western blot 显示肾组织 p-p38、MCP-1、CCR2 蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),肾组织 p-p38/p38、MCP-1、CCR2 表达明显降低( $P<0.05$ )。体外实验中,与高糖组比较,益肾化湿颗粒含药血清组 MCP-1、CCR2 mRNA 表达显著降低( $P<0.01$ ),p-p38/p38、MCP-1、CCR2 蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:益肾化湿颗粒可以调节 db/db 小鼠糖脂代谢,降低 24 h 尿蛋白和尿 ACR,改善肾功能,并能减轻高糖导致的肾小管损伤,对肾小管上皮细胞有保护作用,其机制可能是通过 p38 MAPK 信号通路,减少 MCP-1/CCR2 激活而实现的。

**[关键词]** 糖尿病肾病; 益肾化湿颗粒; db/db 小鼠; p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路; 肾痿

**[中图分类号]** R285;R256;R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2025)03-0058-11

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20241221

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240423.1225.003>

**[网络出版日期]** 2024-04-23 19:42:26

## Yishen Huashi Granules Protect Kidneys of db/db Mice via p38 MAPK Signaling Pathway

ZHOU Kaidong<sup>1</sup>, WANG Sitong<sup>1</sup>, JIN Ge<sup>1</sup>, CAI Yanmo<sup>1</sup>, ZHOU Xin<sup>1</sup>, LIU Yunhua<sup>1</sup>,  
ZHANG Xinxue<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>2</sup>, ZHAO Zongjiang<sup>1\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China)

**[收稿日期]** 2024-02-11

**[基金项目]** 北京市医院管理中心临床医学发展专项(ZLRK202308);国家自然科学基金面上项目(81373831);国家自然科学基金青年科学基金项目(82104826)

**[第一作者]** 周楷栋,在读硕士,从事中医药防治糖尿病肾病的机制研究,E-mail:kaidongz15@foxmail.com

**[通信作者]** \* 赵宗江,教授,博士生导师,从事中医药防治糖尿病肾病的机制研究,E-mail:zongjiangz@sina.com

**[Abstract] Objective:** To explore the mechanism of Yishen Huashi granules in alleviating renal tubular epithelial cell injury and relieving diabetic kidney disease by regulating the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Methods:** The db/db mice of 12 weeks old were randomly assigned into model, dapagliflozin ( $1.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and Yishen Huashi granules ( $4.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and db/m mice were used as the control group. The general conditions of mice were observed, and fasting blood glucose and 24-h urinary protein and albumin-to-creatinine ratio (ACR) were measured at weeks 0 and 12 of administration. After 12 weeks of treatment, the levels of serum creatinine (SCr), blood urea (UREA), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), and low density lipoprotein (LDL) were measured. The pathological changes in the renal tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, Periodic acid-Schiff (PAS) staining, Mallory staining, and transmission electron microscopy. Real-time PCR was employed to determine the mRNA levels of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and CC chemokine receptor-2 (CCR2) in the renal tissue of mice. The immunohistochemical assay was employed to examine the expression of p38, phospho-p38 (p-p38), MCP-1, and CCR2 in the renal tissue of mice. Western blotting was employed to measure the protein levels of p-p38, p38, MCP-1, and CCR2 in the renal tissue of mice. HK-2 cells cultured *in vitro* were grouped as follows: negative control, high glucose ( $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), Yishen Huashi granule-containing serum, and SB203580. After 48 h of cell culture in each group, RNA were extracted and the levels of MCP-1, and CCR2 mRNA were determined by Real-time PCR, proteins were extracted and the levels of p38, p-p38, MCP-1, and CCR2 were determined by Western blot. **Results:** The *in vivo* experiments showed that before treatment, other groups had higher body weight, blood glucose level, 24 h urinary protein, and ACR than the control group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). After 12 weeks of treatment, compared with the model group, the Yishen Huashi granules group showed improved general conditions, a decreasing trend in body weight, lowered levels of blood glucose, 24-h urinary protein, and ACR ( $P < 0.01$ ), reduced SCr and UREA ( $P < 0.01$ ), and declined levels of TC, TG, and LDL ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the Yishen Huashi granules group showed alleviated damage and interstitial fibrosis in the renal tissue as well as reductions in glomerular foot process fusion and basement membrane thickening. Moreover, the Yishen Huashi granules group showed down-regulated mRNA levels of MCP-1 and CCR2 ( $P < 0.01$ ), reduced positive expression of p-p38, MCP-1, and CCR2 ( $P < 0.01$ ), and down-regulated protein levels of p-p38/p38, MCP-1, and CCR2 ( $P < 0.05$ ) in the renal tissue. The cell experiment showed that compared with the high glucose group, the Yishen Huashi granule-containing serum group showcased down-regulated mRNA levels of MCP-1 and CCR2 ( $P < 0.01$ ) and down-regulated protein levels of p-p38/p38, MCP-1, and CCR2 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Yishen Huashi granules can regulate glucose-lipid metabolism, reduce 24 h urinary protein and ACR, improve the renal function, alleviate the renal tubule injury caused by high glucose, and protect renal tubule epithelial cells in db/db mice by reducing MCP-1/CCR2 activation via the p38 MAPK signaling pathway.

**[Keywords]** diabetic kidney disease; Yishen Huashi granules; db/db mice; p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway; kidney flaccidity

糖尿病肾病(DKD)是糖尿病最常见的并发症之一,据统计,30%~40%的糖尿病患者可发展为DKD<sup>[1]</sup>。DKD的临床治疗一般以控制血糖、血压及血脂为主,减少蛋白尿及其并发症以维持或延缓DKD进展至终末期肾病(ESKD),西医治疗一般以肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂及一些已被证明能有效降低糖尿病及DKD进展的降糖药物<sup>[2-3]</sup>,但以上药物多用于DKD早期,有一定的局限性。近年来,大量临床试验表明中医药防治DKD具有很好的临床效果<sup>[4]</sup>,因此深入研究中医药治疗DKD的作用机制具有重要意义。p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)属于MAPK家族中的一员。MAPKs信号通路在多种方面如炎症、细胞增殖与发育、凋亡、分化及肿瘤方面有重要影响<sup>[5]</sup>。在DKD的发生发展中p38 MAPK信号通路起着重要作用。有研究发现,db/db小鼠模型中抑制p38 MAPK信号通路能减少白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的表达,表明p38在DKD中能介导炎症反应<sup>[6]</sup>。使用p38磷酸化

抑制剂SB203580能有效改善由高糖诱导的肾小球内皮细胞损伤及炎症反应<sup>[7]</sup>。

益肾化湿颗粒由《脾胃论》中的“升阳益胃汤”化裁而来,多项研究表明,益肾化湿颗粒可改善DKD患者肾功能,减少炎症因子如IL-6、超敏C反应蛋白(hs-CRP)等,具有一定的临床疗效<sup>[8-10]</sup>。有研究表明,益肾化湿颗粒能通过RAS同源基因家族成员A(RhoA)/Rho相关螺旋卷曲蛋白激酶1(ROCK1)信号通路改善DKD大鼠炎症,下调核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平<sup>[11]</sup>,并能减少肾组织中巨噬细胞浸润,减少足细胞凋亡<sup>[12]</sup>,延缓DKD的发展。然而益肾化湿颗粒调控p38信号通路及对肾小管的保护作用尚不明确,本研究旨在通过体内实验和体外实验,观察益肾化湿颗粒在DKD中对p38 MAPK信号通路的影响,探究益肾化湿颗粒治疗DKD的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 36只7周龄SPF级雄性db/db小鼠,体质量( $39.40 \pm 1.73$ )g;10只db/m小鼠,体质量( $29.48 \pm$

1.33) g,购自常州卡文斯实验动物有限公司,动物合格证编号 202247475,许可证编号 SCXK(苏)2021-0013,实验动物饲养于北京中医药大学动物房内,室温 24~26 °C,相对湿度 50%~60%,自由饮水、摄食。本实验已通过北京中医药大学实验动物伦理委员会伦理要求(伦理编号 BUCM-2022082403-3181)。

**1.2 细胞** HK-2 细胞(ATCC 公司,编号 CRL-2190TM),含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基中培养,加入 1%青-链霉素,置于 5% CO<sub>2</sub>的 37 °C 恒温培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。

**1.3 药品与试剂** 益肾化湿颗粒(广州康臣药业有限公司,国药准字 Z20090250,批号 20210802,药物组成:人参、黄芪、白术、茯苓、泽泻、清半夏、羌活、独活、防风、柴胡、黄连、白芍、陈皮、炙甘草、生姜、大枣,规格 10 g/袋),达格列净片(阿斯利康制药有限公司,国药准字 J20170040,批号 NH3205,规格 10 mg/片),戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号 020402)。尿微量白蛋白测定试剂盒(北京华英生物技术研究所,货号 HY-G0002);甘油三酯(TG)测定试剂盒、低密度脂蛋白(LDL)测定试剂盒、总胆固醇(TC)测定试剂盒、肌酐(SCr)测定试剂盒、尿素(UREA)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,货号分别为 HY-N0030、HY-N0032、HY-N0029、HY-N0017、HY-N0015),液体样本总蛋白提取试剂(北京普利莱基因技术有限公司,货号 P1255);BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 Cocktail、磷酸酶抑制剂 Cocktail、TRIzol(北京兰博利德商贸有限公司,货号分别为 B5001、R1091、C0101、C0104、R1000);苏木素染色液、伊红染色液、Mallory 三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为 G1080、G1100、G1355);糖原染色(PAS)液(北京雷根生物技术有限公司,货号 DG0005);电镜固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号 G1102);cDNA 逆转录试剂盒、Go Taq® Green Master Mix(北京普洛麦格生物技术有限公司,货号分别为 A3500、M7122);p38、β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号分别为 #4511、#4970);磷酸化(p)-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)抗体(美国 Immunoway Biotechnology 公司,货号 YP0338);MCP-1 抗体(美国 Thermo Fisher 公司,货号 MA5-17040);CC 基序趋化因子受体 2(CCR2)(武汉三鹰生物技术有限公司,货号 16153-1-AP);山羊抗兔 IgG H&L(HRP)、

山羊抗小鼠免疫球蛋白 G(IgG) H&L(HRP)(英国 Abcam 公司,货号分别为 ab672、ab67891)。DMEM 培养基(美国 Invitrogen 公司,货号 C11885500BT);FBS、青-链霉素混合液(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号分别为 G8003、G4003);SB203580(中国 Selleck 公司,货号 S1076-25mg)。

**1.4 仪器** H-7650 型透射电镜(日本日立公司),OneTouch Verio Flex 型血糖仪(美国强生公司);BS-420 型全自动生化仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),800TS 型酶标分析仪(美国 BioTek 公司);153B 型转膜仪、552B 型电泳仪、CFX Opus96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司),G:BOX 型凝胶成像系统(美国 Syngene 公司),ECLIPSE 50i 普通型光学显微镜(日本 Nikon 公司),B5060EK 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),TH4-200 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物实验

**2.1.1 动物模型的建立及分组给药** 小鼠进食普通饲料,适应性喂养 5 周后测量尾尖空腹血糖,以空腹血糖 ≥11.1 mmol·L<sup>-1</sup> 为糖尿病模型<sup>[13]</sup>,经检测所有小鼠均符合糖尿病模型标准,使用小鼠专用代谢笼采集 24 h 尿液,全自动生化仪检测尿微量白蛋白和尿肌酐,计算尿微量白蛋白/尿肌酐(ACR)水平,当 ACR ≥26.5 mg·g<sup>-1</sup> 时,确认为 DKD 动物模型<sup>[14]</sup>。db/m 小鼠作为正常组,db/db 小鼠根据体质量随机分为模型组、达格列净组和益肾化湿颗粒组,每组 12 只。

益肾化湿颗粒按照体表面积换算,益肾化湿颗粒和达格列净按照人临床用药剂量 9.4 倍换算,分别为 4.7 g·kg<sup>-1</sup> 和 1.6 mg·kg<sup>-1</sup>,对小鼠进行灌胃;正常组 db/m 小鼠和模型组 db/db 小鼠用等体积去离子水灌胃,按照 0.1 mL·(10 g)<sup>-1</sup> 体质量计算灌胃体积,每日 1 次,连续给药 12 周。在实验过程中 db/db 小鼠意外死亡 5 只。

**2.1.2 样品制备** 给药 12 周后,各组小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液(50 mg·kg<sup>-1</sup>)麻醉,采用摘眼球取血,静置 2 h 后 4 °C,2 500 r·min<sup>-1</sup>,离心 15 min,离心半径 8.4 cm(下同),分离血清。取出两侧肾脏,用镊子小心去除脂肪组织及被膜,生理盐水清洗,取部分肾组织做扇形纵切,在 10% 甲醛中固定,取各组 1 mm<sup>3</sup> 肾皮质于 2.5% 戊二醛锇酸固定液中制作电镜样本。

**2.1.3 一般状况和体质量的变化** 观察小鼠一般状态,包括活动情况、毛色、进食饮水量等,每3周记录小鼠的体质量。

**2.1.4 小鼠血糖水平检测** 分别在给药前及给药12周后测量小鼠尾尖空腹血糖,小鼠禁食后使用一次性采血针刺小鼠尾尖,使用血糖仪检测小鼠尾尖血糖。

**2.1.5 小鼠尿液检测** 使用小鼠代谢笼在给药前及给药12周后收集小鼠尿液,记录24 h总尿量,尿液蛋白由液体蛋白抽提试剂盒提取,蛋白浓度通过BCA法测定,计算小鼠24 h尿蛋白含量。全自动生化仪检测尿肌酐、微量白蛋白含量,计算ACR。

**2.1.6 血生化指标检测** 血清通过全自动生化仪检测SCr、UREA、TG、LDL和TC的含量。

**2.1.7 肾组织病理学分析** 10%中性福尔马林固定小鼠肾脏24 h,常规脱水、石蜡包埋,切片(4  $\mu\text{m}$ ),进行苏木素-伊红(HE)、PAS和Mallory染色,观察肾组织结构病理改变。利用透射电子显微镜(TEM)观察肾组织超微结构。

**2.1.8 免疫组化检测相关蛋白表达** 小鼠肾脏固定切片步骤同2.1.7项,常规脱蜡至水;磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后入0.01% Triton,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min;PBS冲洗3次,每次3 min;入 $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{CH}_3\text{OH}$ 室温孵育10 min,微波抗原修复(98  $^{\circ}\text{C}$ ),封闭,滴加一抗p38(1:100)、p-p38(1:500)、MCP-1(1:200)、CCR2(1:200)4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日PBS冲洗后,二抗37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,DAB显色,苏木素染核,乙醇梯度脱水,二甲苯透明后中性树胶封片。光学显微镜下拍照,每组随机选取6个视野应用Image J图像分析软件,测定棕黄色颗粒阳性表达面积。

**2.1.9 Real-time PCR检测肾组织mRNA表达** 取小鼠肾组织100 mg于冰上剪碎,加入预冷的TRIzol裂解液1 mL,电动匀浆后冰上静置10 min;加三氯甲烷,4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心15 min,取上层液体加入等体积异丙醇,再次离心,吸弃上层液体,乙醇洗涤沉淀;测量RNA浓度及纯度。按照逆转录试剂盒说明书配置逆转录体系,逆转录条件:42  $^{\circ}\text{C}$ 、15 min,95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,72  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。逆转录后按反应体系扩增:预变性95  $^{\circ}\text{C}$ 、2 min;热循环95  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s;60  $^{\circ}\text{C}$ 退火40 s,重复40个循环,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成纯化,见表1。

**2.1.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾组织蛋白表达** 蛋白免疫印迹法检测p38、p-p38、

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
MCP-1	上游 CACTCACCTGCTGCTACTCA	280
	下游 TCAGATTACGGGTCAACTTCAC	
CCR2	上游 GTTACCTCAGTTCATCCA	117
	下游 CAAGGCTCACCATCATCGTAGTC	
$\beta$ -actin	上游 TCCTGTGGCATCCACGAAACT	315
	下游 GAAGCATTGCGGTGGACGAT	

MCP-1、CCR2蛋白的表达。取出冻存于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱的小鼠肾组织,剪下肾组织约100 mg,剪碎,生理盐水清洗后,加入裂解液进行匀浆,冰上裂解后低温4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心15 min,取上层蛋白清液,蛋白浓度通过BCA法测定,加入上样缓冲液100  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。制备10% SDS-PAGE胶,蛋白上样量30  $\mu\text{g}$ ,电泳,恒压电转,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入稀释后的抗体p38(1:2 000)、p-p38(1:5 000)、CCR2(1:1 000)、MCP-1(1:2 000),4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入对应种属二抗(1:2 000)室温2 h,滴加ECL发光液,于成像系统曝光,Image J图像分析系统对条带灰度值进行分析。

## 2.2 细胞实验

**2.2.1 含药血清制备** SPF级雄性SD大鼠6只,6~8周龄,体质量(200 $\pm$ 20)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证编号SCXK(京)2019-0010。大鼠随机分为正常组和含药血清组,每组3只,含药血清组每日按人临床用药剂量的7倍,即3.5  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量予益肾化湿颗粒灌胃,正常组以去离子水灌胃。连续给药1周后取血,灭活过滤后含药血清于-80  $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

**2.2.2 细胞分组与给药** 将HK-2细胞接种于100 mm培养皿中,每个皿种植 $5\times 10^5$ 个细胞,待细胞生长融合至50%左右时,更换无血清培养基同步24 h,随机分为空白组、高糖组、SB203580组、益肾化湿颗粒含药血清组。空白组更换含8%无药大鼠血清DMEM培养基培养,其余各组更换为高糖DMEM培养基(葡萄糖30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )培养,其中高糖组以8%无药大鼠血清培养,益肾化湿颗粒含药血清组以8%益肾化湿颗粒大鼠血清培养,SB203580组以p38抑制剂SB203580和8%无药大鼠血清培养,根据文献[15],SB203580 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,在给药前2 h加入进行预刺激。各组干预48 h后提取细胞RNA和蛋白。

**2.2.3 Real-time PCR检测细胞mRNA表达** 细胞培养48 h,加入TRIzol裂解液1 mL,将细胞刮下收集,提取RNA操作、逆转录体系及Real-time PCR步骤同2.1.9项,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成纯化,见表2。

表2 引物序列

Table 2 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
MCP-1	上游 AAAGTCTCTGCCGCCCTTC	171
	下游 CTTGCTGCTGGTGATTCTTCTAT	
CCR2	上游 TGGCTGTGTTTGCTTCTGTC	230
	下游 TCTCACTGCCCTATGCCTCT	
$\beta$ -actin	上游 CGGGACCTGACTGACTACC	292
	下游 TGAAGGTAGTTTCGTGGATGC	

**2.2.4 Western blot检测细胞蛋白表达** 细胞分组培养48 h后,加入RIPA蛋白裂解液,将细胞刮下收集,提取蛋白及Western blot操作同2.1.10项。

表3 益肾化湿颗粒对db/db小鼠体质量的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of Yishen Huashi granules on body weight in db/db mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	给药前	3周	6周	9周	12周
正常组		29.70±1.32	31.78±1.29	33.08±1.53	34.72±2.14	33.32±1.75
模型组		45.67±2.86 <sup>1)</sup>	48.25±4.78 <sup>1)</sup>	47.47±4.93 <sup>1)</sup>	48.62±6.50 <sup>1)</sup>	44.98±7.89 <sup>1)</sup>
达格列净组	0.001 6	44.63±2.28 <sup>1)</sup>	45.43±1.87 <sup>1)</sup>	45.20±1.98 <sup>1)</sup>	45.85±1.50 <sup>1)</sup>	42.35±3.04 <sup>1)</sup>
益肾化湿颗粒组	4.7	45.77±3.56 <sup>1)</sup>	46.95±5.25 <sup>1)</sup>	45.22±5.80 <sup>1)</sup>	45.35±6.42 <sup>1)</sup>	39.93±3.74 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01

**3.2 益肾化湿颗粒对db/db小鼠血糖的影响** 给药前,与正常组比较,模型组、达格列净组及益肾化湿颗粒组小鼠空腹血糖指标均显著升高(P<0.01)。给药12周后,与模型组比较,达格列净组及益肾化湿颗粒组小鼠空腹血糖指标均显著下降(P<0.01)。见表4。

表4 益肾化湿颗粒对db/db小鼠空腹血糖的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Yishen Huashi granules on blood glucose in db/db mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	给药前	12周
正常组		8.68±0.96	8.88±0.93
模型组		28.20±1.90 <sup>1)</sup>	28.18±3.09 <sup>1)</sup>
达格列净组	0.001 6	27.70±3.88 <sup>1)</sup>	21.11±3.49 <sup>2)</sup>
益肾化湿颗粒组	4.7	28.52±2.83 <sup>1)</sup>	23.81±2.28 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.01(表7、表8、表10同)

**2.3 统计学方法** SPSS 26.0统计软件进行统计分析,对符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行比较,方差齐用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐时选用Dunnett's T3法统计检验,以P<0.05表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 益肾化湿颗粒对db/db小鼠一般状况及体质量的影响** 给药前,与正常组比较,模型组小鼠出现精神萎靡,毛发失去光泽,毛色暗淡,活动量明显下降,腹股沟和腋下出现脂肪堆积,进食量、饮水量较正常组明显增加,与正常组比较,各组小鼠体质量显著上升(P<0.01),模型组、达格列净组和益肾化湿颗粒组之间差异无统计学意义。经达格列净和益肾化湿颗粒干预12周后,小鼠一般状况均有一定的改善,体质量从给药3周后开始出现下降的趋势。与正常组比较,模型组、达格列净组和益肾化湿颗粒组体质量均显著上升(P<0.01)。与模型组比较,各用药组之间体质量差异无统计学意义。见表3。

**3.3 益肾化湿颗粒对db/db小鼠24 h尿蛋白定量及尿ACR的影响** 给药前,与正常组比较,模型组、达格列净组及益肾化湿颗粒组小鼠24 h尿蛋白定量和尿ACR均显著升高(P<0.01)。给药12周后,与模型组比较,达格列净组及益肾化湿颗粒组小鼠24 h尿蛋白定量和尿ACR明显下降(P<0.05, P<0.01)。见表5。

**3.4 益肾化湿颗粒对db/db小鼠肾功能、血脂的影响** 肾功能方面,给药12周后,与正常组比较,模型组小鼠SCr、UREA显著上升(P<0.01)。与模型组比较,达格列净组与益肾化湿颗粒组小鼠均显著下降(P<0.01)。血脂方面,给药12周后,与正常组比较,模型组TC、TG、LDL显著上升(P<0.01),与模型组比较,达格列净组与益肾化湿颗粒组均明显下降(P<0.05, P<0.01)。见表6。

**3.5 益肾化湿颗粒对db/db小鼠肾脏病理的影响** HE染色显示,正常组肾小球、肾小管及间质结构

表5 益肾化湿颗粒对db/db小鼠24 h尿蛋白定量及ACR的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of Yishen Huashi granules on 24-hour urinary protein and ACR in db/db mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	24 h尿蛋白定量/mg		尿ACR/mg·g <sup>-1</sup>	
		给药前	12周	给药前	12周
正常组		0.89±0.30	1.14±0.48	13.07±2.45	28.82±5.76
模型组		5.11±0.49 <sup>1)</sup>	12.01±1.42 <sup>1)</sup>	68.47±10.99 <sup>1)</sup>	135.83±15.98 <sup>1)</sup>
达格列净组	0.001 6	5.06±0.60 <sup>1)</sup>	8.24±3.73 <sup>2)</sup>	71.92±15.44 <sup>1)</sup>	113.43±12.91 <sup>3)</sup>
益肾化湿颗粒组	4.7	4.89±0.65 <sup>1)</sup>	8.77±3.10 <sup>2)</sup>	73.89±7.02 <sup>1)</sup>	112.58±15.72 <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6、表9、表11同)

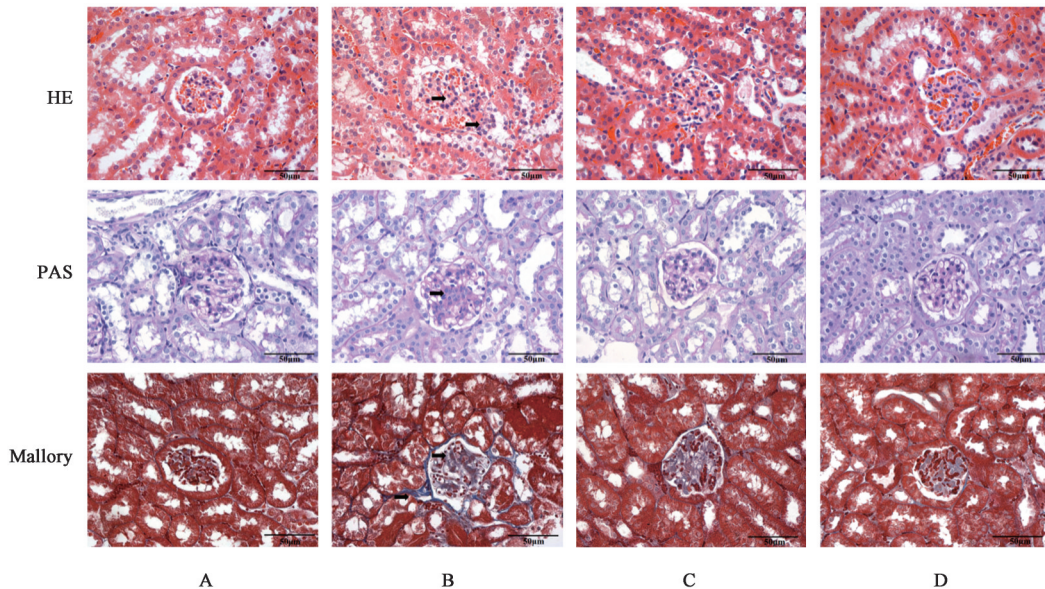
表6 益肾化湿颗粒对db/db小鼠血脂、肾功能的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 6 Effect of Yishen Huashi granules on blood lipid and renal function in db/db mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Scr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	UREA/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TC/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	LDL/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常组		39.01±5.43	6.57±0.53	2.17±0.25	0.68±0.05	0.08±0.01
模型组		59.17±5.62 <sup>1)</sup>	9.97±1.86 <sup>1)</sup>	3.53±0.52 <sup>1)</sup>	1.71±0.34 <sup>1)</sup>	0.24±0.03 <sup>1)</sup>
达格列净组	0.001 6	46.60±8.98 <sup>3)</sup>	7.55±1.29 <sup>3)</sup>	2.76±0.61 <sup>2)</sup>	1.17±0.20 <sup>3)</sup>	0.13±0.03 <sup>3)</sup>
益肾化湿颗粒组	4.7	48.34±4.32 <sup>3)</sup>	6.90±0.83 <sup>3)</sup>	2.78±0.37 <sup>2)</sup>	1.29±0.23 <sup>3)</sup>	0.15±0.07 <sup>3)</sup>

正常,模型组中可见肾小球系膜细胞及基质中度增生,肾小管萎缩,肾小球肥大,肾间质炎症细胞浸润等病理改变;益肾化湿颗粒组和达格列净组中病理改变有一定改善。PAS染色显示,正常组肾小球系膜区正常;模型组肾小球系膜基质可见明显增生,益肾化湿颗粒组和达格列净组中系膜基质增生明

显改善。Mallory染色显示,正常组肾小球、肾小管及间质结构正常;模型组小鼠肾小管间质、肾小球系膜区可见大量蓝色胶原纤维沉积,益肾化湿颗粒组及达格列净组小鼠肾组织染色结果显示胶原纤维增生明显减少,肾脏纤维化程度明显改善。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.达格列净组;D.益肾化湿颗粒组(图2-图4同)

图1 益肾化湿颗粒对db/db小鼠肾脏病理损伤的影响( $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Yishen Huashi granules on renal pathological injury in db/db mice ( $\times 400$ )

TEM观察小鼠肾小球超微结构发现,正常组小鼠基底膜厚度较为均一,无增厚,足细胞足突形状规则,排列整齐;模型组小鼠肾小球出现明显病理

改变,基底膜节段性增厚,足突出现广泛融合、消失;与模型组比较,达格列净组和益肾化湿颗粒组小鼠肾小球病理变化有不同程度的改善。见图2。

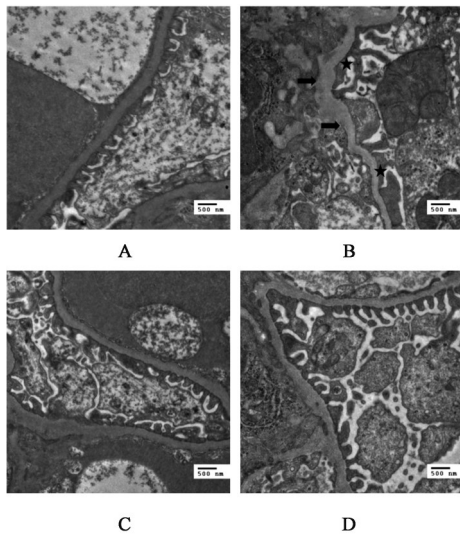


图2 益肾化湿颗粒对db/db小鼠肾小球足细胞超微结构的影响(透射电镜, ×15 000)

Fig. 2 Effect of Yishen Huashi granules on ultrastructure of glomerular podocytes in db/db mice (TEM, ×15 000)

**3.6 益肾化湿颗粒对db/db小鼠肾组织MCP-1、CCR2 mRNA表达的影响** 与正常组比较,在模型组小鼠肾组织中MCP-1、CCR2 mRNA表达显著上升( $P<0.01$ )。与模型组比较,达格列净组和益肾化湿颗粒组小鼠MCP-1、CCR2 mRNA表达量显著减

少( $P<0.01$ )。见表7。

表7 益肾化湿颗粒对db/db小鼠MCP-1、CCR2 mRNA表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Yishen Huashi granules on expression of MCP-1 and CCR2 mRNA in db/db mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MCP-1	CCR2
正常组		1.00±0.08	1.00±0.06
模型组		4.38±0.18 <sup>1)</sup>	7.77±1.39 <sup>1)</sup>
达格列净组	0.001 6	1.80±0.19 <sup>2)</sup>	2.58±1.11 <sup>2)</sup>
益肾化湿颗粒组	4.7	1.56±0.31 <sup>2)</sup>	1.71±0.54 <sup>2)</sup>

**3.7 益肾化湿颗粒对db/db小鼠肾组织p38 MAPK、MCP-1、CCR2蛋白表达的影响** 免疫组化结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肾组织肾小球和肾小管细胞质中MCP-1、CCR2蛋白表达水平显著增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,达格列净组和益肾化湿颗粒组db/db小鼠肾组织中MCP-1、CCR2表达量显著下降( $P<0.01$ )。与正常组比较,模型组小鼠肾小球及肾小管细胞质和细胞核中p-p38蛋白表达显著增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,达格列净组和益肾化湿颗粒组p-p38蛋白表达量显著下降( $P<0.01$ )。各组间p38蛋白表达差异无统计学意义。见图3、表8。

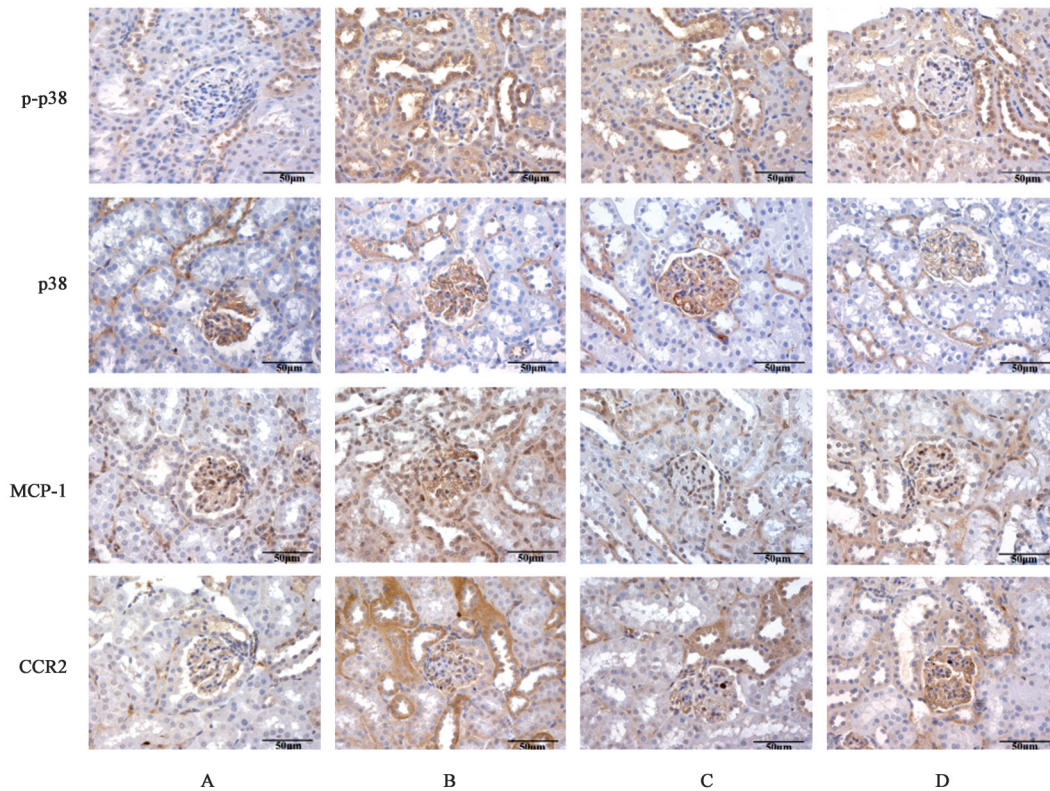


图3 益肾化湿颗粒对db/db小鼠p38、p-p38、MCP-1、CCR2蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Yishen Huashi granules on protein expression of p38, p-p38, MCP-1 and CCR2 in db/db mice (IHC, ×400)

表8 益肾化湿颗粒对db/db小鼠p-p38、p38、MCP-1、CCR2蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 8 Effect of Yishen Huashi granules on protein expression of p38, p-p38, MCP-1 and CCR2 in db/db mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ ) %

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-p38	p38	MCP-1	CCR2
正常组		13.38±1.76	11.83±1.86	6.94±0.92	12.26±0.81
模型组		26.15±3.05 <sup>1)</sup>	12.41±1.00	25.48±2.56 <sup>1)</sup>	23.91±4.02 <sup>1)</sup>
达格列净组	0.001 6	17.84±1.55 <sup>2)</sup>	12.10±3.13	11.70±3.34 <sup>2)</sup>	16.44±2.00 <sup>2)</sup>
益肾化湿颗粒组	4.7	16.47±2.51 <sup>2)</sup>	12.08±2.03	13.36±2.03 <sup>2)</sup>	14.68±2.61 <sup>2)</sup>

3.8 益肾化湿颗粒对db/db小鼠肾组织p38 MAPK信号通路相关蛋白表达的影响 Western blot结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肾组织p-p38/p38、MCP-1和CCR2蛋白表达显著增加,差异有统计学

意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,达格列净组p-p38/p38、MCP-1和CCR2蛋白表达明显减少( $P<0.05, P<0.01$ ),益肾化湿颗粒组p-p38/p38、MCP-1和CCR2蛋白表达明显减少( $P<0.05$ )。见表9、图4。

表9 益肾化湿颗粒对db/db小鼠p-p38、MCP-1、CCR2蛋白相对表达量的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 9 Effect of Yishen Huashi granules on relative expression of p38, MCP-1 and CCR2 proteins in kidney of db/db mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-p38/p38	MCP-1/ $\beta$ -actin	CCR2/ $\beta$ -actin
正常组		1.00±0.20	1.00±0.12	1.00±0.30
模型组		1.59±0.07 <sup>1)</sup>	2.10±0.08 <sup>1)</sup>	1.64±0.07 <sup>1)</sup>
达格列净组	0.001 6	1.13±0.24 <sup>3)</sup>	1.27±0.38 <sup>2)</sup>	1.20±0.15 <sup>2)</sup>
益肾化湿颗粒组	4.7	1.21±0.10 <sup>2)</sup>	1.48±0.45 <sup>2)</sup>	1.22±0.07 <sup>2)</sup>

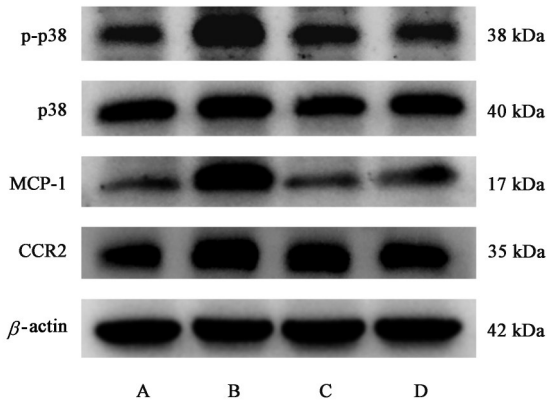


图4 db/db小鼠肾脏P38、p-p38、MCP-1、CCR2蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of expression of p38, p-p38, MCP-1 and CCR2 proteins in kidney of db/db mice

3.9 益肾化湿颗粒对高糖培养的HK-2细胞MCP-1、CCR2 mRNA表达的影响 Real-time PCR结果显示,与空白组比较,高糖组中MCP-1、CCR2 mRNA表达量显著增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。与高糖组比较,抑制剂SB203580组和益肾化湿颗粒含药血清组HK-2细胞MCP-1、CCR2 mRNA表达量显著减少,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。见表10。

3.10 益肾化湿颗粒对高糖培养的HK-2细胞p38 MAPK、MCP-1、CCR2蛋白表达的影响 与空白组比较,高糖组中p-p38/p38、MCP-1和CCR2蛋白表达显著增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。与HG

表10 益肾化湿颗粒对HK-2细胞MCP-1、CCR2 mRNA相对表达量的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 10 Effect of Yishen Huashi granules on relative expression of p38, MCP-1 and CCR2 mRNA in HK-2 cell ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	MCP-1/ $\beta$ -actin	CCR2/ $\beta$ -actin
空白组		1.01±0.10	1.00±0.13
高糖组		6.25±0.63 <sup>1)</sup>	4.53±0.90 <sup>1)</sup>
SB203580组	10 <sup>3)</sup>	2.39±0.34 <sup>2)</sup>	2.57±0.19 <sup>2)</sup>
益肾化湿颗粒含药血清组	8	2.19±0.19 <sup>2)</sup>	2.00±0.33 <sup>2)</sup>

注:<sup>3)</sup>表示浓度单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

组比较,SB203580组p-p38/p38、MCP-1和CCR2蛋白表达量明显减少,差异有统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ ),益肾化湿颗粒含药血清组p-p38/p38、MCP-1和CCR2蛋白表达量明显减少,差异有统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ )。见表11、图5。

#### 4 讨论

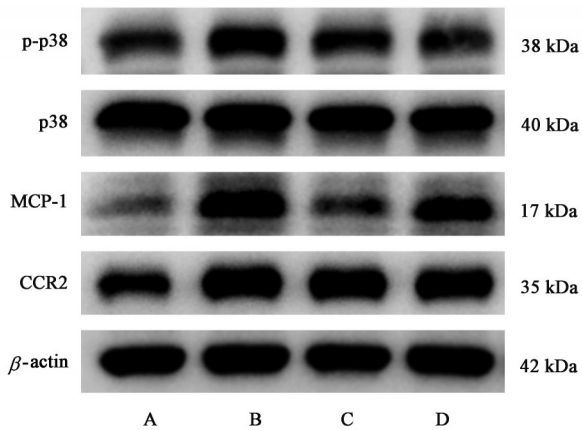
DKD属于中医学“消渴肾病”的病症范畴,根据临床症状分为“水肿”“下消”及“肾痿”等。中医认为“本虚”“标实”是DKD基本病机,“本虚”指DKD患者气阴两虚证、脾肾两虚等证;“标实”指DKD日久,湿、瘀、毒、痰阻于肾络,肾络瘀阻,最终毒损肾络<sup>[16]</sup>。脾肾关系密切,DKD久病伤脾,脾运化失司,气机升降失调,加之肾气亏虚,发为脾肾两虚证<sup>[17]</sup>。现代中医提出DKD水肿、蛋白尿与脾运化失调、肾

表11 益肾化湿颗粒对HK-2细胞p38、MCP-1、CCR2蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 11 Effect of Yishen Huashi granules on relative expression of p38, MCP-1 and CCR2 proteins in HK-2 cell ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	p-p38/p38	MCP-1/ $\beta$ -actin	CCR2/ $\beta$ -actin
正常组		1.00±0.04	1.00±0.18	1.00±0.08
高糖组		1.18±0.04 <sup>1)</sup>	2.18±0.10 <sup>1)</sup>	1.56±0.06 <sup>1)</sup>
SB203580组	10 <sup>4)</sup>	1.06±0.05 <sup>2)</sup>	1.54±0.34 <sup>3)</sup>	1.13±0.19 <sup>3)</sup>
益肾化湿颗粒含药血清组	8	1.01±0.11 <sup>2)</sup>	1.67±0.22 <sup>2)</sup>	1.08±0.19 <sup>3)</sup>

注:<sup>4)</sup>表示浓度单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



注:A.空白组;B.高糖组;C.SB203580组;D.益肾化湿颗粒含药血清组

图5 HK-2细胞p-p38、p38、MCP-1、CCR2蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of expression of p38, p-p38, MCP-1 and CCR2 proteins in HK-2 cell

气亏虚有关<sup>[18]</sup>。赵宗江教授经过多年临床实践和研究工作提出“肾痿”理论,认为DKD中热邪、瘀毒、痰湿等病理产物在肾脏中相互胶结,气血运行被病理产物阻滞,肾脏结构损伤,“肾体”受损,而肾脏结构的损坏导致肾脏生理机能下降,导致“肾用”失常,最终导致“肾痿”<sup>[19]</sup>。

益肾化湿颗粒由“从脾论治”经典方“升阳益胃汤”化裁而来,升阳益胃汤主治脾胃虚弱,湿热滞留证,临床上可见体重节痛、四肢倦怠、口干、纳差、小便频数、便秘等<sup>[20]</sup>。临床上DKD患者常可见口干、小便频数、蛋白尿等,而中医认为蛋白尿与脾不散精,清阳不升,清气下陷有关<sup>[21]</sup>。因此,以升阳益胃汤化裁而来的益肾化湿颗粒,可用于治疗脾虚湿盛证DKD患者出现的蛋白尿、水肿等。益肾化湿颗粒由人参、黄芪、白术、茯苓、泽泻、半夏、羌活、独活、防风、柴胡、黄连、白芍、陈皮、炙甘草、生姜、大枣组成。方中以人参和黄芪为君药,二者大补元气,黄芪另可升阳利水,柴胡升举清阳,防风、羌活、独活祛风除湿,白术、茯苓、泽泻健脾利水渗湿;黄连清热燥湿,半夏、陈皮理气燥湿,白芍养血敛阴,炙甘

草、生姜、大枣补气温中、调和诸药。全方共奏升阳补脾,益肾化湿,利水消肿之功。有研究表明,益肾化湿颗粒能有效改善DKD大鼠模型肾功能,减少血清及肾脏炎症因子水平<sup>[11]</sup>。

MAPK信号通路是广泛存在于哺乳动物细胞内且可被多种细胞外刺激激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,是参与炎症、增殖、凋亡、衰老等的重要通路之一,能传导炎症信号,促进炎症因子表达<sup>[22]</sup>。p38属于MAPK家族中的一员,MAPK家族包括c-Jun氨基末端激酶(JNK1、JNK2和JNK3)、p38 MAPK(p38 $\alpha$ 、p38 $\beta$ 、p38 $\gamma$ 和p38 $\delta$ )和细胞外信号调节激酶(ERK1和ERK2)<sup>[23]</sup>。已知p38能被广泛的细胞外刺激激活,例如紫外线照射、细胞外应激、高血糖及氧化应激等<sup>[24]</sup>。p38 MAPK被激活后会从细胞质转移到细胞核中,激活下游靶点例如信号转导与转录激活因子1(STAT1)、环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)和激活转录因子1(ATF1)等以调节细胞功能<sup>[25]</sup>。研究表明,激活的p38 MAPK在肾脏中能上调包括MCP-1、单核细胞趋化蛋白-3(MCP-3)、IL-1 $\beta$ 及TNF- $\alpha$ 在内的多种趋化因子及炎症因子,引发局部炎症,促进肾脏损伤<sup>[26-28]</sup>。

趋化因子包括MCP-1、C-X3-C基序趋化因子配体1(CX3CL1)和CC基序趋化因子配体5(CCL5)等,趋化因子在募集和活化血液及组织中的单核细胞及巨噬细胞,并在细胞黏附、分化和组织损伤中发挥重要作用<sup>[29]</sup>,MCP-1能通过激活其受体CCR2,发挥募集作用。有研究发现,DKD患者血清和尿液中MCP-1水平显著高于健康人群<sup>[30-31]</sup>。研究表明,血管紧张素II能诱导MCP-1表达升高,阻断肾素-血管紧张素系统(RAS)能减少尿液中的MCP-1水平<sup>[32]</sup>。高血糖能促进肾脏中MCP-1的产生<sup>[33]</sup>,细胞激酶如ERK1、ERK2、JNK和p38等也参与MCP-1的信号传导<sup>[34]</sup>。研究表明,MCP-1能加重DKD微炎症状态,加重肾脏细胞纤维化进展<sup>[35]</sup>。研究发现,MCP-1能激活肾脏细胞中的CCR2受体,募集和活化的巨噬细胞等免疫细胞浸润肾组织,释放溶酶

体,产生活性氧(ROS)、一氧化氮(NO)及丙二醛(MDA)等,导致肾脏氧化应激加重,上调多种促纤维化因子和炎症因子,促进细胞外基质沉积,加重肾脏纤维化水平<sup>[34,36]</sup>。

本实验发现在DKD小鼠模型中p38 MAPK的磷酸化激活与MCP-1/CCR2的升高有关,这与相关研究结果一致<sup>[37]</sup>。而细胞实验显示使用p38抑制剂SB203580能通过抑制高糖诱导的HK-2细胞p38磷酸化水平,显著下调MCP-1/CCR2的水平,有研究也发现p38的激活与MCP-1/CCR2的上调有关<sup>[26]</sup>。在动物实验中使用益肾化湿颗粒干预db/db小鼠,发现益肾化湿颗粒能显著改善db/db小鼠的肾功能、糖脂代谢水平,保护高血糖导致的肾脏损伤。通过病理染色发现,益肾化湿颗粒显著改善了小鼠的肾脏纤维化,减轻肾小球系膜增生及肾小管空泡样变、炎性细胞浸润。通过透射电镜发现益肾化湿颗粒显著改善了db/db小鼠基底膜增厚和足突融合现象,动物实验和细胞实验结果显示,益肾化湿颗粒能够显著下调肾脏及肾小管上皮细胞的p-p38/p38、MCP-1及CCR2水平。

综上所述,本研究表明益肾化湿颗粒可以改善db/db小鼠一般情况,调节糖脂代谢,降低24 h尿蛋白和ACR,减轻高糖导致的肾小管损伤,保护肾功能。其机制可能是通过调控p38 MAPK,抑制MCP-1/CCR2激活而实现的。

**[利益冲突]** 赵宗江为《中国实验方剂学杂志》编委,但未参与审校的任何环节。

#### [参考文献]

- [1] GHEITH O, FAROUK N, NAMPOORY N, et al. Diabetic kidney disease: World wide difference of prevalence and risk factors[J]. *J Nephroarmacol*, 2016,5(1):49-56.
- [2] 中华医学会肾脏病学分会专家组. 糖尿病肾脏疾病临床诊疗中国指南[J]. *中华肾脏病杂志*, 2021,37(3):255-304. Expert Group of Chinese Society of Nephrology. Chinese guidelines for diagnosis and treatment of diabetic kidney disease[J]. *Chin J Nephrol*, 2021,37(3):255-304
- [3] A/L B VASANTH RAO V R, TAN S H, CANDASAMY M, et al. Diabetic nephropathy: An update on pathogenesis and drug development[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019,13(1):754-762.
- [4] TANG G, LI S, ZHANG C, et al. Clinical efficacies, underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021,11(9):2749-2767.
- [5] ONO K, HAN J. The p38 signal transduction pathway: Activation and function[J]. *Cell Signal*, 2000,12(1):1-13.

- [6] MA L, WU F, SHAO Q, et al. Baicalin alleviates oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy via Nrf2 and MAPK signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021,15:3207-3221.
- [7] SHANG J, WANG L, ZHANG Y, et al. Chemerin/ChemR23 axis promotes inflammation of glomerular endothelial cells in diabetic nephropathy [J]. *J Cell Mol Med*, 2019,23(5):3417-3428.
- [8] 刘丹利,张东辉,蒿黎. 益肾化湿颗粒联合常规西药对早期糖尿病肾病患者血糖控制、肾功能、炎症损伤因子的影响[J]. *河南医学研究*, 2023,32(13):2430-2434. LIU D L, ZHANG D H, HAO L. Effect of Yishen Huashi granule and conventional western medicine on blood glucose control, renal function and inflammatory damage factors in patients with early diabetes nephropathy[J]. *Henan Med Res*, 2023,32(13):2430-2434.
- [9] 张小林. 益肾化湿颗粒治疗早期2型糖尿病肾病的临床效果[J]. *临床合理用药*, 2023,16(32):79-81,85. ZHANG X L. Clinical effect of Yishen Huashi granule in the treatment of early type 2 diabetic nephropathy [J]. *Chin J Clin Ration Drug Use*, 2023,16(32):79-81,85.
- [10] 薛松,李旦,江渊远,等. 益肾化湿颗粒联合达格列净治疗糖尿病肾病临床观察[J]. *光明中医*, 2023,38(1):129-133. XUE S, LI D, JIANG Y Y, et al. The clinical effect of Yishen Huashi granules combined with dapagliflozin and its influence on quality of life of diabetic nephropathy [J]. *Guangming J Chin Med*, 2023,38(1):129-133.
- [11] 陈艳霞,涂卫平,房向东,等. 益肾化湿颗粒通过RhoA/ROCK1信号通路对糖尿病肾病炎症的影响[J]. *重庆医学*, 2022,51(18):3074-3078. CHEN Y X, TU W P, FANG X D, et al. Effect of Yi-Shen-Hua-Shi granule on inflammation of diabetic nephropathy through RhoA/ROCK1 signal pathway[J]. *Chongqing Med J*, 2022,51(18):3074-3078.
- [12] LIANG M, ZHU X, ZHANG D, et al. Yi-Shen-Hua-Shi granules inhibit diabetic nephropathy by ameliorating podocyte injury induced by macrophage-derived exosomes [J]. *Front Pharmacol*, 2022,13:962606.
- [13] WANG H, YANG Y, WANG S, et al. Polysaccharides of *floccularia luteovirens* alleviate oxidative damage and inflammatory parameters of diabetic nephropathy in db/db mice[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023,28(4):82.
- [14] MA T, LI X, ZHU Y, et al. Excessive activation of Notch signaling in macrophages promote kidney inflammation, fibrosis, and necroptosis [J]. *Front Immunol*, 2022,13:835879.
- [15] WU H, SHI Y, DENG X, et al. Inhibition of c-Src/p38 MAPK pathway ameliorates renal tubular epithelial cells apoptosis in db/db mice[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015,417:27-35.
- [16] 赵宗江,豆小妮,张新雪. 糖尿病肾病“肾痿”假说探讨[J]. *中医杂志*, 2011,52(S1):8-10.

- ZHAO Z J, DOU X N, ZHANG X X. Discussion on the hypothesis of "kidney flaccidity" in diabetic kidney disease [J]. *J Tradit Chin Med*, 2011, 52(S1): 8-10.
- [17] 司廷林. 从“脾不散精”谈糖尿病肾病的治疗[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2014, 12(24): 9-10.
- SI T L. The treatment of diabetic kidney disease from "Dysfunction of Spleen Transforming Essences" [J]. *Chin Med Mod Dis Edu China*, 2014, 12(24): 9-10.
- [18] 卫雅婧, 王世荣. 王世荣从“脾”论治糖尿病肾病[J]. *光明中医*, 2017, 32(19): 2765-2767.
- WEI Y J, WANG S R. Treatment of diabetic kidney disease from spleen theory by Wang Shirong [J]. *Guangming J Chin Med*, 2017, 32(19): 2765-2767.
- [19] 苗永辉, 赵宗江, 张新雪, 等. 糖尿病肾病“肾痿”学说的建立与阐释[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2017, 19(6): 1031-1037.
- MIAO Y H, ZHAO Z J, ZHANG X X, et al. The establishment and interpretation of the theory of "kidney flaccidity" in diabetic kidney disease [J]. *World Sci Technol Modern Tradit Chin Med Mater Med*, 2017, 19(6): 1031-1037.
- [20] 王小文, 白建英, 芦迪, 等. 经典名方升阳益胃汤的历史沿革与现代临床应用研究概况[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(19): 173-184.
- WANG X W, BAI J Y, LU D, et al. Historical evolution and modern clinical application of Shengyang Yiweitang [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(19): 173-184.
- [21] 柳思明, 吕静. 蛋白尿雏形的中医探究[J]. *中国处方药*, 2021, 19(2): 126-128.
- LIU S M, LV J. Traditional chinese medicine exploration on the embryonic form of proteinuria [J]. *J China Pres Drug*, 2021, 19(2): 126-128.
- [22] CARGNELLO M, ROUX P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83.
- [23] WANG J, LIU Y, GUO Y, et al. Function and inhibition of p38 MAP kinase signaling: Targeting multiple inflammation diseases [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 220: 115973.
- [24] ZOU X, BLANK M. Targeting p38 MAP kinase signaling in cancer through post-translational modifications [J]. *Cancer Lett*, 2017, 384: 19-26.
- [25] PUA L, MAI C W, CHUNG F F, et al. Functional roles of JNK and p38 MAPK signaling in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1108.
- [26] WANG D, WARNER G M, YIN P, et al. Inhibition of p38 MAPK attenuates renal atrophy and fibrosis in a murine renal artery stenosis model [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(7): 938-947.
- [27] HAGIWARA S, MAKITA Y, GU L, et al. Eicosapentaenoic acid ameliorates diabetic nephropathy of type 2 diabetic KKAY/Ta mice: Involvement of MCP-1 suppression and decreased ERK1/2 and p38 phosphorylation [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(3): 605-615.
- [28] LUO M, LUO P, ZHANG Z, et al. Zinc delays the progression of obesity-related glomerulopathy in mice via down-regulating p38 MAPK-mediated inflammation [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2016, 24(6): 1244-1256.
- [29] TESCH G H. MCP-1/CCL2: A new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(4): 697-701.
- [30] SCURT F G, MENNE J, BRANDT S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 predicts the development of diabetic nephropathy [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2022, 38(2): e3497.
- [31] WU L, LI X Q, CHANG D Y, et al. Associations of urinary epidermal growth factor and monocyte chemotactic protein-1 with kidney involvement in patients with diabetic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2020, 35(2): 291-297.
- [32] MORATAL C, LAURAIN A, NAÏMI M, et al. Regulation of monocytes/macrophages by the renin-angiotensin system in diabetic nephropathy: State of the art and results of a pilot study [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 6009.
- [33] GUO Y, RAN Z, ZHANG Y, et al. Marein ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting renal sodium glucose transporter 2 and activating the AMPK signaling pathway in db/db mice and high glucose-treated HK-2 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110684.
- [34] HALLER H, BERTRAM A, NADROWITZ F, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and the kidney [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2016, 25(1): 42-49.
- [35] AMANN B, TINZMANN R, ANGELKORT B. ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1 [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(8): 2421-2425.
- [36] GIUNTI S, TESCH G H, PINACH S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 has prosclerotic effects both in a mouse model of experimental diabetes and *in vitro* in human mesangial cells [J]. *Diabetologia*, 2008, 51(1): 198-207.
- [37] WANG H Y, ZHAO J G, WEI Z G, et al. The renal protection of flavonoid-rich ethanolic extract from silkworm green cocoon involves in inhibiting TNF- $\alpha$ -p38 MAP kinase signalling pathway in type 2 diabetic mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109379.

[责任编辑 张丰丰]