

益气养阴活血通络方抑制 JAK2/STAT3 信号通路减轻 糖尿病肾病大鼠肾组织细胞凋亡

杨凤文¹, 高飞^{1,2}, 陈素枝¹, 袁国栋¹, 张倩¹, 檀金川^{1,2*}

(1. 河北省中医院, 石家庄 050011; 2. 河北中医学院, 石家庄 050200)

[摘要] **目的:**观察益气养阴活血通络方对糖尿病肾病(DN)大鼠 Janus 酪氨酸蛋白激酶2(JAK2)/信号传导及转录激活因子3(STAT3)信号通路及细胞凋亡的影响,探讨其干预DN的作用机制。**方法:**SD大鼠100只随机分为造模组80只,正常组20只,高糖高脂饮食联合一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)建立糖尿病肾病大鼠模型。造模结束后每组随机处死3只大鼠,光镜和电镜下观察肾脏组织病理学变化确认造模成功。将造模成功的大鼠随机分为模型组(生理盐水,等体积)、益气养阴活血通络方低中高剂量组(益气养阴活血通络方,5.775,11.550,23.100 g·kg⁻¹)和厄贝沙坦组(厄贝沙坦片,0.016 g·kg⁻¹),各组分别给予相应剂量药物灌胃,每日1次,连续干预16周。给药结束后检测大鼠24 h尿蛋白(UTP)水平,血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),肌酐(SCr),尿素氮(BUN)水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 JAK2/STAT3 信号通路关键蛋白的表达水平;免疫组化法(IHC)检测大鼠肾组织中B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),紧密连接相关蛋白-1(ZO-1),肌动蛋白4(actinin-4)蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠UTP,血清中TC,TG,BUN,SCr水平均有明显升高($P<0.05$);大鼠肾组织病理损伤严重;磷酸化JAK2(p-JAK2),磷酸化STAT3(p-STAT3),Bax蛋白表达水平明显上调;肾组织细胞凋亡明显增多;Bcl-2,ZO-1,actinin-4蛋白表达水平下调($P<0.05$)。与模型组比较,益气养阴活血通络方和厄贝沙坦组大鼠UTP,血清中TC,TG,BUN,SCr水平均有不同程度的下降($P<0.05$);大鼠肾组织病理损伤有所减轻;p-JAK2,p-STAT3,Bax蛋白表达水平不同程度的下降;肾组织细胞凋亡减轻;Bcl-2,ZO-1,actinin-4蛋白表达水平不同程度的升高($P<0.05$)。**结论:**益气养阴活血通络方可通过抑制JAK2/STAT3信号通路的激活,减轻肾脏细胞凋亡,改善DN的预后。

[关键词] 益气养阴活血通络方;糖尿病肾病(DN);Janus酪氨酸蛋白激酶2(JAK2)/信号传导及转录激活因子3信号通路(STAT3);细胞凋亡

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)11-0089-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211004

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210330.1647.003.html>

[网络出版日期] 2021-3-31 10:23

Yiqiyangyin Huoxuetongluo Prescription Reduces Renal Cell Apoptosis in Rats with Diabetic Nephropathy by Inhibiting JAK2/STAT3 Signaling Pathway

YANG Feng-wen¹, GAO Fei^{1,2}, CHEN Su-zhi¹, YUAN Guo-dong¹, ZHANG Qian¹, TAN Jin-chuan^{1,2*}

(1. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China;

2. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Yiqiyangyin Huoxuetongluo prescription on janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway and cell apoptosis in rats with diabetic nephropathy (DN), and to explore the mechanism of its intervention in DN. **Method:** A total of 100 SD rats were randomly divided into an experimental group ($n=80$) and a normal group ($n=20$). The DN model was induced by high-sugar and high-fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin

[收稿日期] 20210116(002)

[基金项目] 河北省中医药管理局项目(2015013,2016025)

[第一作者] 杨凤文,硕士,副主任医师,硕士生导师,从事中西医结合肾病研究,Tel:0311-85990176,E-mail:yfwen1021@163.com

[通信作者] *檀金川,博士,教授,博士生导师,从事中西医结合肾病研究,Tel:0311-69095199,E-mail:1955981973@qq.com

(STZ) in the experimental group, and confirmed by the pathological changes of kidney tissues in rats (three in each group) observed under light and electron microscopes. The model rats were randomly divided into a model group (normal saline, equal volume), low-, medium-, and high-dose (5.775, 11.550, and 23.100 g·kg⁻¹) Yiqiyangyin Huoxuetongluo prescription groups, and an irbesartan group (irbesartan tablets, 0.016 g·kg⁻¹). After drug intervention (*i.g.*, once a day for 16 consecutive weeks), the 24-hour urine total protein (UTP), serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), creatinine (SCr), and blood urea nitrogen (BUN) levels of the rats were measured. Western blot was used to detect the protein expression of JAK2/STAT3 signaling pathway. Immunohistochemistry was used to determine the protein expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), zonula occludens-1 (ZO-1), and actinin-4 in rat kidney tissues. **Result:** Compared with the normal group, the model group exhibited elevated UTP, serum TC, TG, BUN, and SCr levels ($P<0.05$), severe pathological damage of rat kidney tissues, up-regulated expression of phospho-JAK2 (p-JAK2), phospho-STAT3 (p-STAT3), and Bax, increased renal cell apoptosis, and diminished expression of Bcl-2, ZO-1, and actinin-4 ($P<0.05$). Compared with the model group, the Yiqiyangyin Huoxuetongluo prescription group and the irbesartan group showed dwindled UTP, serum TC, TG, BUN, and SCr levels ($P<0.05$), relieved pathological damage of rat kidney tissues, down-regulated p-JAK2, p-STAT3, and Bax expression, and up-regulated expression of Bcl-2, ZO-1, and actinin-4 ($P<0.05$). **Conclusion:** Yiqiyangyin Huoxuetongluo prescription can reduce renal cell apoptosis and improve the prognosis of DN by inhibiting the activation of JAK2/STAT3 signaling pathway.

[Key words] Yiqiyangyin Huoxuetongluo prescription; diabetic nephropathy (DN); Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway (JAK2/STAT3); apoptosis

糖尿病(DM)是世界范围内日益严重的健康问题,其发病率不断上升,可导致糖尿病肾病(DN),糖尿病神经病变,糖尿病足等多种并发症^[1]。随着DM患病率的逐年增加,DM引发的慢性肾脏疾病比肾小球肾炎相关的慢性肾脏疾病更为常见,已成为我国终末期肾病(ESRD)的首位病因^[2]。DN的发病与代谢和血流动力学改变、氧化应激、炎症、肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活等因素的相互作用有关,其中,细胞凋亡在DN的发生和发展中起关键作用^[3]。目前,对于DN的治疗,严格控制血压、血糖、血脂水平及生活方式干预可延缓DN进展,但仍不能阻止其进展为终末期肾病^[4]。因此,迫切需要寻找预防DN的新的治疗靶点和手段。

目前,越来越多的证据表明中医药在延缓DN进展方面效果突出,可为DN的预防提供新思路和新方法^[5-6]。例如,益肾化湿颗粒、补阳还五汤等中药可显著提高DN临床效果,延缓DN的进展^[7-8]。本课题研究根据消渴日久,气阴亏虚,痰湿、瘀血蕴结,以益气养阴、活血通络为基本治疗法治疗DN临床疗效显著^[9]。益气养阴活血通络方(YYHT)是檀金川教授基于归肾丸加减而成,实验研究显示益气养阴方药可以通过调控基质金属蛋白酶9(MMP-9)/基质金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP-1)的表

达,减少细胞外基质,减轻肾脏慢性损伤,延缓DN进展^[10]。有研究表明,MMP-9的异常表达与DN足细胞上皮间充质转化(EMT)相关,而EMT是DN足细胞损伤的重要形式,导致足细胞数量减少,功能缺失,间充质细胞增生,肾间质纤维化^[11]。Janus激酶(JAK)/信号转导和转录激活因子(STAT)信号通路在许多急、慢性肾脏疾病中都被激活,而且JAK2和STAT3是在DN的发生和发展中发挥关键作用,抑制JAK2/STAT3信号通路的激活可延缓DN的进展^[12-13]。有文献报道,JAK2/STAT3信号通路调控MMP-9/TIMP-1表达,不仅参与机体炎症反应过程,也参与细胞增殖、分化和凋亡的调控^[14]。因此,益气养阴中药方对DN的肾保护作用是否通过JAK2/STAT3信号通路介导肾组织细胞凋亡,还有待进一步研究。故本研究探究以益气养阴、活血通络为基本治疗法创立的YYHT治疗DN的分子机制,为临床治疗DN提供了新思路及新靶点。

1 材料

1.1 动物及饲料 8周龄、体质量(150±20)g,雄性SD大鼠100只,购自河北医科大学实验动物中心,动物合格证号SCXK(冀)2018-004。在河北中医学院实验动物中心饲养大鼠。动物实验经由河北中医学院动物伦理委员会批准(批准号

DWLL2018067)。普通饲料购自河北医科大学动物实验中心,饲料生产合格证号SCXK(冀)2018-003。高糖高脂饲料(蔗糖34.1%,脂肪21.0%,蛋白质19.5%,玉米淀粉5.0%,麦芽糊精10.0%,纤维素5.0%,胆固醇0.15%),批号20180819,购自吉林赛诺生物有限公司。

1.2 药物 厄贝沙坦片(批号J20171089,杭州赛诺菲制药有限公司分装)。YYHT颗粒剂由黄芪10g,白芍10g,茯苓10g,白术10g,山茱萸6g,熟地黄6g,麦冬6g,知母6g,玄参6g,当归6g,川牛膝10g,川芎5g,红花5g,蒲黄5g,木香6g,僵蚕3g组成(批号分别为0093163,0085633,0100213,0092373,0072493,0100413,0076463,0081453,0081093,0090273,0091733,0096173,0100193,0081963,0091293,0090403),由广东一方制药有限公司生产。根据人与大鼠的体表面积折算等效剂量^[15],按照60kg成人每日用YYHT110g计算,大鼠给药剂量是成人的6.3倍,大鼠给药量=(110/60)×6.3=11.55g·kg⁻¹,此为中剂量,低、高剂量则为中剂量的0.5,2倍。同理,厄贝沙坦的给药量为0.016g·kg⁻¹。临用前分别称取中药颗粒冲剂和厄贝沙坦片粉末5.775,11.55,23.10,0.016g溶于10mL生理盐水中,按10mL·kg⁻¹体质量给药。

1.3 试剂 链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号040M1367);甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),尿素氮(BUN),肌酐(SCr)(南京建成生物工程研究所有限公司,批号分别为20170801,20170412,20170806,20170613);Apoptosis检测试剂盒(日本Chemicon公司,批号S7100);一抗磷酸化(p)-JAK2, JAK2, p-STAT3, STAT3, β -肌动蛋白(β -actin),B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),紧密连接相关蛋白-1(ZO-1),肌动蛋白4(actinin-4)(美国Affinity公司,批号分别为AF3024, AF6022, AF3293, AF6294, AF7018, AF0120, AF6139, AF5145, DF8000);蛋白酶K(德国Sigma公司,批号P6556);trizol总RNA提取试剂(北京天根生化科技有限公司,批号DP405);反转录试剂盒,聚合酶链式反应(PCR)检测试剂盒(日本Takara公司,批号分别为RR047A, RR820A);卓越精采血糖试纸(美国罗氏公司,批号475532);苏木素-伊红(HE),六胺银(PASM)染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120, G1790);二抗(美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号sc-2357)。

1.4 仪器 7170A型全自动生化仪(日本日立公

司);721型可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);RM2015型切片机(德国徕卡公司);BX53型显微镜(日本奥林巴斯公司);Stepone plus实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);Mini-PROTEAN3型电泳系统,Mini Trans-Blot型转移系统(美国伯乐公司);Kodak Image Station 2000MM型成像系统(美国Kodak公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 100只SD大鼠适应性饲养1周。分别检测血糖、尿糖和尿蛋白均为阴性者用于实验。按体质量随机分为正常组20只,给予普通饲料。造模组80只,给予高糖高脂饲料。4周后,造模组大鼠禁食不禁水,一次性腹腔注射STZ(35mg·kg⁻¹)。正常组大鼠注射相应体积的枸橼酸缓冲液。72h后尾静脉取血测血糖,血糖 \geq 16.7mmo·L⁻¹为DM造模成功。此后每周监测大鼠血糖和24h尿蛋白(UTP)水平,UTP>30mg为DN模型成功标准,同时每组随机处死3只大鼠,病理学检查确认模型成功^[16]。

2.2 分组、干预、取材及固定 将模型复制成功的大鼠随机分为模型组,厄贝沙坦组,YYHT低、中、高剂量组,每组均保留10只。各给药组按10mL·kg⁻¹体质量给予厄贝沙坦水溶液(0.016g·kg⁻¹),YYHT水溶液(5.775,11.550,23.100g·kg⁻¹)灌胃。正常组和模型组给予等体积生理盐水灌服。每1次,连续干预16周。在此期间每周使用代谢笼收集大鼠24h尿液检测尿蛋白水平,大鼠尾巴末梢取血监测血糖(Glu)。大鼠禁食水12h后使用异氟烷吸入麻醉,快速打开腹腔后腹主动脉取血,收集大鼠血清、肾组织保存备用。

2.3 TG, TC, SCr, BUN及尿蛋白水平检测 使用全自动生化分析仪检测大鼠血清中TG, TC, SCr, BUN水平。使用双缩脲法检测大鼠UTP含量水平。

2.4 Tunnel法检测大鼠肾组织细胞凋亡水平 石蜡切片经二甲苯脱蜡,乙醇水化,蛋白酶K修复, H₂O₂,末端脱氧核苷酸转移酶(TdT酶),辣根酶标记链霉卵白素孵育,DAB显色,苏木素复染,脱水透明封片,电子显微镜观察并拍照。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测JAK2/STAT3信号通路蛋白的表达水平 将大鼠肾组织研碎,加入RIPA裂解液提取组织总蛋白,考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白浓度。使用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶分离目的蛋白,PVDF转膜,5%BSA孵育1.5h,加入稀释好的一抗p-JAK2

(1:2 000), JAK2(1:2 000), p-STAT3(1:2 000), STAT3(1:2 000), β -actin(1:5 000), 4 °C 孵育过夜。洗膜后加入二抗(1:5 000), 37 °C 孵育 1 h。洗膜后使用 ECL 法显色。用 Image J 软件分析条带的灰度值, 以目的蛋白条带/ β -actin 条带灰度比值作为最终结果。

2.6 Real-time PCR 检测大鼠肾脏中 Bax, Bcl-2, ZO-1, actinin-4 mRNA 的相对表达量 使用 trizol 抽提总 RNA, Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度。配制 PCR 反应体系, 进行 PCR 扩增, 最后使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 相对表达量。引物由北京 Servicebio 公司设计合成, Bax 引物上游 5'-ACGTCTGCGGGGAGTCAC-3', 下游 5'-AGGCCCTGTCTTCATGATCT-3', 扩增长度 147 bp; Bcl-2 引物上游 5'-TCGCGACTTTGCAGAGATGT-3', 下游 5'-CAATCCTC CCCAGTTCACC-3', 扩增长度 116 bp; ZO-1 引物上游 5'-AAACTCTGCTGAGCCCCCTA-3', 下游 5'-TCACAGTGTGGCAAGCGTAG-3', 扩增长度 85 bp; actinin-4 引物上游 5'-GGCACAGACCTGAGCTGATT-3', 下游 5'-GGCTGTGTTTCACGATGTCCT-3', 扩增长度 140 bp; β -actin 上游 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'; 下游 5'-TTTAATGTCACGCACGAT TTC-3', 扩增长度 150 bp。反应扩增条件为 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 循环 40 次。

2.7 免疫组化法检测大鼠肾脏中 Bax, Bcl-2, ZO-1, actinin-4 蛋白表达水平 组织石蜡切片脱蜡, 水化, 淬灭过氧化物酶, 抗原修复, 山羊血清封闭, 一抗 Bax(1:500), Bcl-2(1:500), ZO-1(1:200), actinin-4(1:500) 孵育过夜, 二抗孵育 30 min, 辣根酶标记链霉卵白素孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染, 封片, 电子显微镜观察并拍照。使用 Image Pro Plus 6.0 软件对免疫组化结果进行半定量分析, 计算每个

视野下阳性结果的积分吸光度和面积, 以积分吸光度/面积作为检测指标的半定量结果。

2.8 统计学处理 使用 SPSS 21.0 统计软件, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析法对实验结果进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 DN 大鼠 UTP 定量的影响 给药 4 周后, 模型组大鼠 UTP < 30 mg, DM 大鼠尚未进展到 DN, 而在给药 8 周后, 模型组大鼠 UTP > 30 mg, 同时结合病理学检查结果, 证实 DM 大鼠进展为 DN。与正常组比较, 模型组大鼠 UTP 水平显著升高, 且随着时间推移, UTP 水平逐渐升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, YYHT 不同剂量组和厄贝沙坦组大鼠 UTP 水平均有不同程度降低, 其中 YYHT 高剂量组降低最明显 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 YYHT 对 DN 大鼠 UTP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	4周	8周	12周	16周
正常		9.32±0.73	9.04±0.87	9.15±0.62	9.54±0.57
模型		26.47±1.80 ²⁾	37.54±2.56 ²⁾	48.52±2.64 ²⁾	56.17±2.66 ²⁾
YYHT	5.775	20.54±1.06 ⁴⁾	29.47±1.35 ⁴⁾	37.84±1.21 ⁴⁾	44.37±1.96 ⁴⁾
	11.550	16.15±1.13 ⁴⁾	24.57±1.25 ⁴⁾	33.32±1.44 ⁴⁾	38.45±1.80 ⁴⁾
	23.100	13.29±1.07 ⁴⁾	21.42±1.04 ⁴⁾	28.34±1.26 ⁴⁾	32.19±1.47 ⁴⁾
厄贝沙坦	0.016	14.69±1.43 ⁴⁾	22.10±1.21 ⁴⁾	30.87±1.07 ⁴⁾	35.45±1.21 ⁴⁾

注: 与正常组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

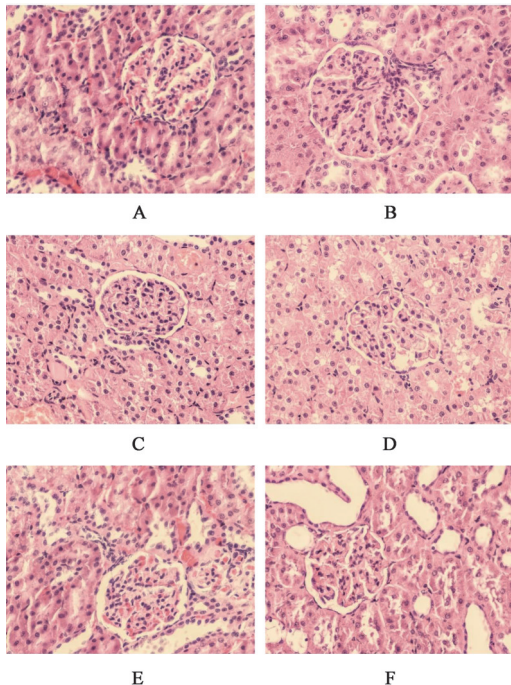
3.2 对 DN 大鼠血清中 Glu, TC, TG, BUN, SCr 的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清中 Glu, TC, TG, BUN, SCr 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, YYHT 不同剂量组和厄贝沙坦组大鼠血清中 Glu, TC, TG, BUN, SCr 含量水平明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 YYHT 对 DN 大鼠血清中 Glu, TC, TG, BUN 和 SCr 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of YYHT on Glu, TC, TG, BUN and SCr in serum of DN rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Glu/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/ μ mol·L ⁻¹
正常		5.41±0.75	1.26±0.34	0.41±0.60	6.61±0.53	53.56±4.24
模型		23.43±1.82 ²⁾	3.56±0.49 ²⁾	2.83±0.13 ²⁾	9.23±0.36 ²⁾	67.04±5.61 ²⁾
YYHT	5.775	18.65±1.84 ⁴⁾	2.15±0.19 ⁴⁾	2.23±0.10 ⁴⁾	8.64±0.35 ³⁾	62.09±4.83 ³⁾
	11.550	15.51±1.65 ⁴⁾	1.93±0.16 ⁴⁾	1.75±0.11 ⁴⁾	7.58±0.46 ⁴⁾	58.37±4.07 ⁴⁾
	23.100	13.45±1.51 ⁴⁾	1.83±0.21 ⁴⁾	1.36±0.09 ⁴⁾	7.21±0.23 ⁴⁾	56.82±4.38 ⁴⁾
厄贝沙坦	0.016	19.62±1.87 ³⁾	2.58±0.14 ⁴⁾	2.35±0.16 ³⁾	8.57±0.38 ³⁾	62.60±4.64 ³⁾

3.3 对DN大鼠肾组织病理学改变的影响 HE染色显示,与正常组比较,模型组大鼠肾小球肥大,系膜弥漫性增厚,肾小管上皮细胞空泡变性,肾间质纤维增生。与模型组比较,YYHT不同剂量组和厄贝沙坦组大鼠肾脏系膜增生,肾纤维化程度减轻。PASM染色显示,与正常组比较,模型组大鼠肾小球体积增大,系膜基质增生,基底膜增厚,肾间质纤维增生。与模型组比较,YYHT不同剂量组和厄贝沙坦组大鼠肾脏系膜基质增生、基底膜增厚、间质纤维化程度减轻。见图1,2。



A. 正常组; B. 模型组; C. YYHT 低剂量组; D. YYHT 中剂量组; E. YYHT 高剂量组; F. 厄贝沙坦组(图2~8同)

图1 YYHT对DN大鼠肾脏病理学改变的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of YYHT on renal pathological changes in DN rats (HE, ×400)

3.4 对DN大鼠肾组织JAK2/STAT3信号通路的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中p-JAK2, p-STAT3蛋白表达水平明显升高, p-JAK2/JAK2和p-STAT3/STAT3值升高($P < 0.01$);与模型组比较, YYHT不同剂量组和厄贝沙坦组大鼠肾组织中p-JAK2, p-STAT3蛋白表达水平均有不同程度的降低, p-JAK2/JAK2和p-STAT3/STAT3值下降,其中YYHT高剂量组降低最明显($P < 0.01$)。见表3,图3。

3.5 对DN大鼠肾组织细胞凋亡的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏细胞凋亡显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较, YYHT不同剂量组和厄贝沙坦组大

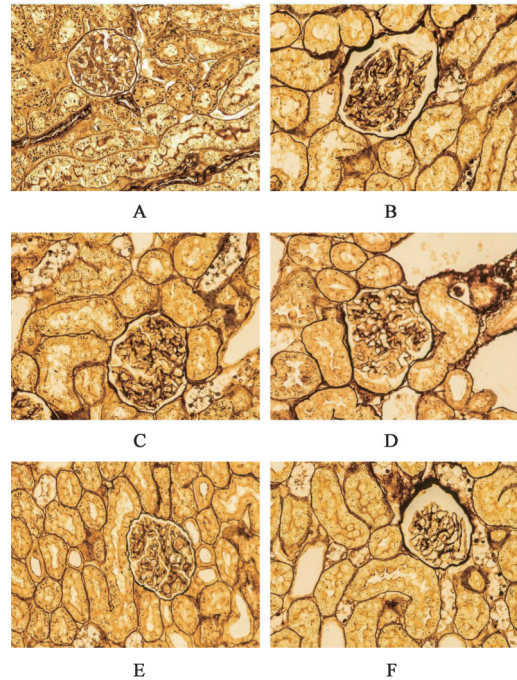


图2 YYHT对DN大鼠肾脏病理学改变的影响(PASM, ×400)

Fig. 2 Effect of YYHT on renal pathological changes in DN rats (PASM, ×400)

表3 YYHT对DN大鼠肾组织中p-JAK2, JAK2, p-STAT3, STAT3蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of YYHT on protein expression of p-JAK2, JAK2, p-STAT3 and STAT3 in DN rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
正常		0.03±0.01	0.02±0.01
模型		0.44±0.08 ²⁾	0.29±0.03 ²⁾
YYHT	5.775	0.32±0.04 ⁴⁾	0.20±0.03 ³⁾
	11.550	0.28±0.03 ⁴⁾	0.16±0.03 ⁴⁾
	23.100	0.13±0.02 ⁴⁾	0.09±0.14 ⁴⁾
厄贝沙坦	0.016	0.15±0.02 ⁴⁾	0.13±0.14 ⁴⁾

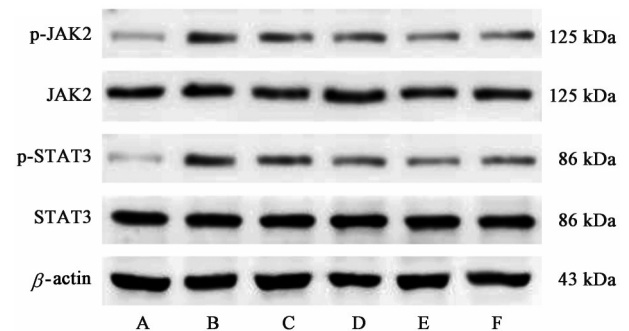


图3 各组大鼠肾组织p-JAK2, JAK2, p-STAT3, STAT3蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of p-JAK2, JAK2, p-STAT3, STAT3 protein expression in kidney tissues of rats

鼠肾脏细胞凋亡均有不同程度减轻,其中YYHT高剂量组细胞凋亡减轻最显著($P < 0.01$)。见表

4, 图4。

表4 YYHT对DN大鼠肾组织细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of YYHT on apoptosis of renal tissue in DN rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡指数
正常		9.04±1.31
模型		45.76±3.69 ²⁾
YYHT	5.775	38.52±3.27 ⁴⁾
	11.550	31.87±3.93 ⁴⁾
	23.100	22.50±3.34 ⁴⁾
厄贝沙坦	0.016	24.41±3.11 ⁴⁾

3.6 对DN大鼠肾组织中Bax, Bcl-2, ZO-1, actinin-4 mRNA表达水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肾脏中Bax mRNA表达水平升高, Bcl-2, ZO-1, actinin-4 mRNA表达水平降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, YYHT不同剂量组和厄贝沙坦组大鼠肾脏中Bax mRNA表达水平不同程度的下降, Bcl-2, ZO-1, actinin-4 mRNA表达水平不同程度的升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表5。

3.7 对DN大鼠肾组织中Bax, Bcl-2, ZO-1, actinin-4蛋白表达水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肾脏中Bax蛋白表达水平显著升高, Bcl-2, ZO-1, actinin-4蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型

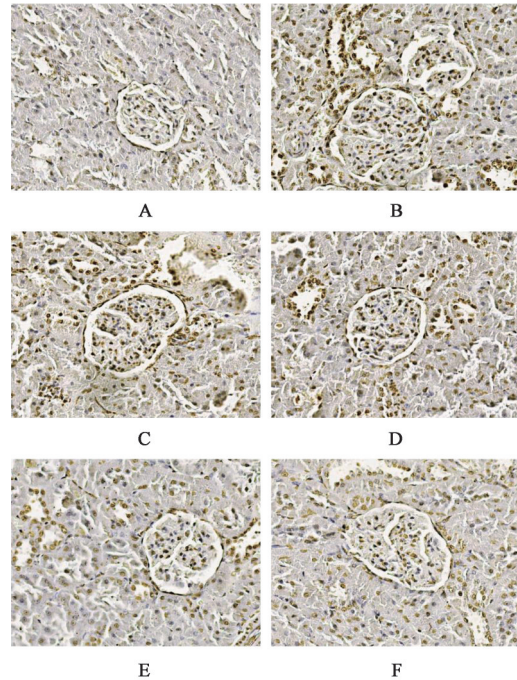


图4 YYHT对DN大鼠肾组织细胞凋亡的影响 (Tunnel, ×400)

Fig. 4 Effect of YYHT on apoptosis of renal tissue in MN rats (Tunnel, ×400)

组比较, YYHT不同剂量组和厄贝沙坦组大鼠肾脏中Bax蛋白表达水平不同程度的下降, Bcl-2, ZO-1, actinin-4蛋白表达水平不同程度的升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表6, 图5~8。

表5 YYHT对DN大鼠肾组织Bax, Bcl-2, ZO-1, actinin-4 mRNA表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of YYHT on mRNA expression levels of Bax, Bcl-2, ZO-1 and actinin-4 in kidney tissues of DN rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bax	Bcl-2	ZO-1	actinin-4
正常		1.03±0.03	1.02±0.03	1.01±0.02	1.03±0.02
模型		3.59±0.43 ²⁾	0.13±0.02 ²⁾	0.08±0.02 ²⁾	0.10±0.02 ²⁾
YYHT	5.775	2.83±0.34 ⁴⁾	0.19±0.03 ³⁾	0.16±0.02 ⁴⁾	0.21±0.03 ³⁾
	11.550	2.12±0.28 ⁴⁾	0.42±0.06 ⁴⁾	0.22±0.02 ⁴⁾	0.32±0.04 ⁴⁾
	23.100	1.79±0.20 ⁴⁾	0.69±0.09 ⁴⁾	0.36±0.03 ⁴⁾	0.58±0.04 ⁴⁾
厄贝沙坦	0.016	2.04±0.25 ⁴⁾	0.52±0.08 ⁴⁾	0.29±0.02 ⁴⁾	0.40±0.04 ⁴⁾

表6 YYHT对DN大鼠肾组织中Bax, Bcl-2, ZO-1, actinin-4定位表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of YYHT on expression of Bax, Bcl-2, ZO-1 and actinin-4 in kidney tissues of DN rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bax	Bcl-2	ZO-1	actinin-4
正常		0.138±0.021	0.483±0.055	0.009±0.017	0.008±0.007
模型		0.393±0.047 ²⁾	0.121±0.020 ²⁾	0.002±0.001 ²⁾	0.002±0.001 ²⁾
YYHT	5.775	0.322±0.034 ³⁾	0.192±0.026 ³⁾	0.004±0.001 ³⁾	0.005±0.001 ³⁾
	11.550	0.221±0.029 ⁴⁾	0.244±0.031 ⁴⁾	0.006±0.001 ⁴⁾	0.006±0.001 ⁴⁾
	23.100	0.163±0.023 ⁴⁾	0.397±0.043 ⁴⁾	0.007±0.001 ⁴⁾	0.009±0.001 ⁴⁾
厄贝沙坦	0.016	0.194±0.022 ⁴⁾	0.355±0.034 ⁴⁾	0.005±0.001 ³⁾	0.008±0.001 ⁴⁾

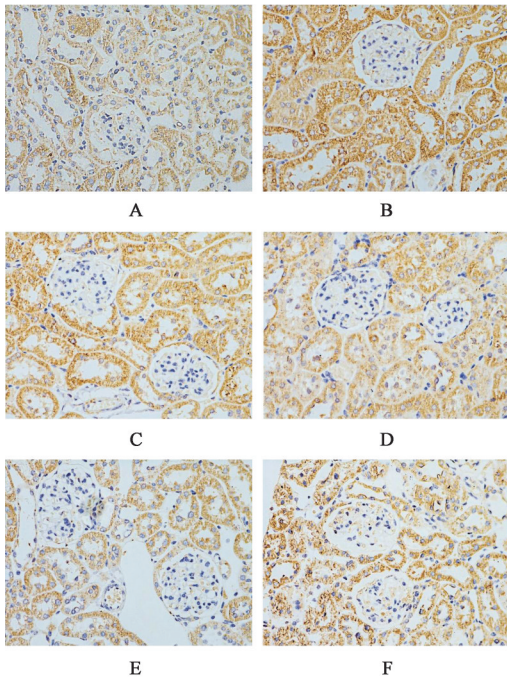


图5 YYHT对DN大鼠肾脏中Bax蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 5 Effect of YYHT on Bax protein expression in kidney of DN rats (IHC, ×400)

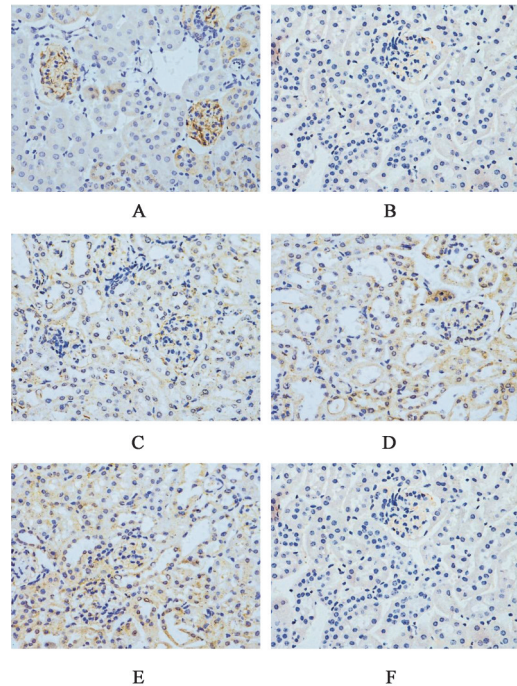


图7 YYHT对DN大鼠肾脏中ZO-1蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 7 Effect of YYHT on ZO-1 protein expression in kidney of DN rats (IHC, ×400)

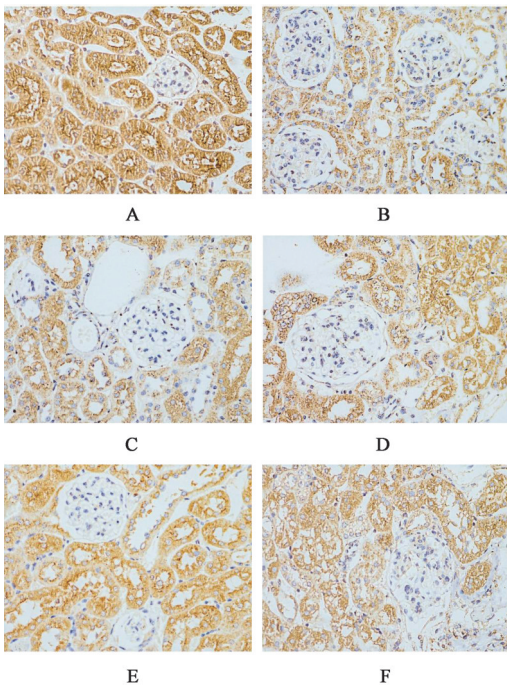


图6 YYHT对DN大鼠肾脏中Bcl-2蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 6 Effect of YYHT on Bcl-2 protein expression in kidney of DN rats (IHC, ×400)

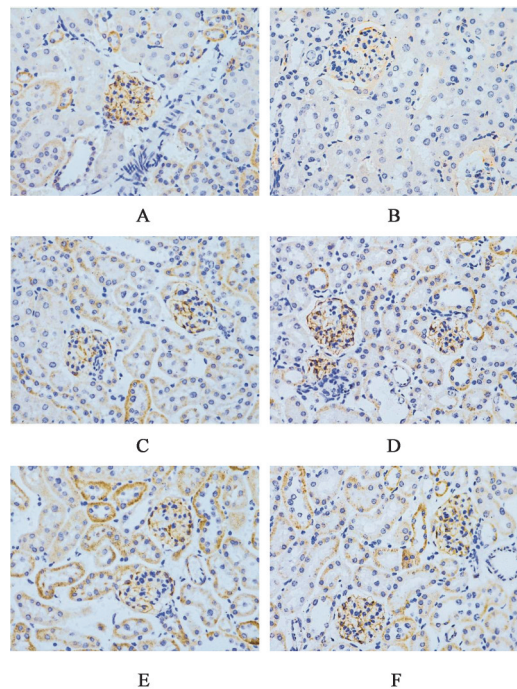


图8 YYHT对DN大鼠肾脏中actinin-4蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 8 Effect of YYHT on actinin-4 protein expression in kidney of DN rats (IHC, ×400)

4 讨论

DN是DM发病率和死亡率的主要原因,也是蛋白尿性和非蛋白尿性ESRD最常见的原因,有超过

50%的受试者需要透析和/或移植治疗^[17]。DN的主要病理改变包括肾小球基底膜增厚、系膜基质积聚、肾小球硬化、肾小管间质炎症和纤维化,最终导

致蛋白尿和肾功能衰竭^[18]。有研究表明, DN患者尿蛋白含量增加可能与足细胞功能和形态学改变有关, 如足细胞肥大、上皮间充质转分化(EMT), 足细胞脱离和足细胞凋亡^[19]。本实验模型组大鼠UTP显著增多, 肾小球肥大, 系膜弥漫性增厚, 肾小管上皮细胞空泡变性, 肾间质纤维增生明显。经过YYHT中药干预后, UTP减少, 肾脏病理损伤减轻, 提示YYHT中药可能通过减轻足细胞损伤保护DN大鼠肾脏功能。

据报道, DM肾损害包括内脏上皮细胞和支持细胞功能障碍。尽管有研究表明足细胞损伤与DN的发生关系密切, 但这种关联的机制仍未完全清楚^[3]。肾小球上皮细胞, 又称足细胞, 是一种高度专业化的细胞, 由围绕GBM细胞骨架结构、关节连接和分支足突组成。足细胞作为终末分化细胞, 是肾小球中重要的功能细胞, 在损伤时不能再生。在DN早期, 足细胞就会发生病理性改变, 其损伤和凋亡可导致肾小球滤过膜的破坏, 继而出现微量白蛋白尿, 随后出现大量蛋白尿, 直至进展为ESRD^[3, 20]。足细胞从胞体伸出的不规则足突, 两相邻足突之间有裂孔, 其上覆有由Nephrin, Podocin及CD2相关蛋白(CD2AP)等构成的裂孔隔膜, 而裂孔隔膜的完整性对维持足细胞正常生理功能非常重要^[20]。actinin-4是一种细胞骨架交联蛋白, 对于维持足细胞与基底膜的黏附以及细胞内外信号传递至关重要, 其表达异常导致足突融合, 足细胞脱落^[21]。ZO-1则作为膜相关结合蛋白, 将裂孔隔膜上相关蛋白与细胞骨架紧密连接, 以维持足突结构的完整性, 其表达量与足细胞数目呈正相关^[22]。本实验中DM大鼠肾脏细胞凋亡明显增多, 足细胞相关蛋白actinin-4, ZO-1蛋白表达明显降低, 而经YYHT中药干预后, 肾脏细胞凋亡减弱, actinin-4, ZO-1蛋白表达增强, 提示该方药可以通过减少肾脏细胞, 特别是足细胞的凋亡, 延缓DN进展。

在DN的发病机制中, 代谢紊乱、炎症、自噬等因素均可引起足细胞脱落或凋亡, 导致肾小球滤过屏障破坏, 尿蛋白及ESRD的发生^[3]。越来越多的研究表明, 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt), JAK/STAT, Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin), 内质网应激, 雷帕霉素靶体蛋白(mTOR)等多种信号通路参与足细胞凋亡的调控^[11]。JAK/STAT信号通路调节广泛的生物学效应, 如细胞增殖、分化、炎症和凋亡, 其中JAK2和STAT3是在DN的发生和发展中发挥关键作用^[23]。在DN中, JAK2/STAT3信号通

路可被高血糖、活性氧和糖基化终末产物等多种物质激活。这些物质不断促进JAK和STAT3的磷酸化进而进入细胞核, 作用于Bax, Bcl-2等下游靶基因, 调节细胞的增殖、分化和凋亡, 最终加速DN的发生和发展^[24]。相反地, 抑制JAK2/STAT3信号通路的激活可延缓DN的进展^[13]。本实验结果表明, DM大鼠肾脏中p-JAK2, p-STAT3蛋白表达水平明显升高, p-JAK2/JAK2和p-STAT3/STAT3值升高, Bax蛋白表达水平增加, Bcl-2表达降低, 而经YYHT中药干预后, p-JAK2, p-STAT3蛋白表达水平降低, Bax蛋白表达水平减低, Bcl-2表达升高, 提示该方可以通过抑制JAK2/STAT3信号通路减轻DN肾脏组织细胞凋亡。

近年来研究发现, 许多中药和中成药, 如白芍、黄芪、藕节、益肾胶囊等, 可以通过抑制JAK/STAT等信号通路的激活, 减少下游凋亡因子、炎症因子和纤维化因子的表达, 从而延缓DN的发生发展^[13, 17, 25]。文献报道的中药大多都能在本团队所用YYHT中找到, 这也间接证实了本方药的治疗效果。YYHT是本研究团队根据DN的病证特点及临床表现, 并结合长期临床用药规律及疗效分析后所创立的, 由黄芪、白芍、茯苓、白术、山茱萸、熟地黄、麦冬、知母、玄参、当归、川牛膝等多味中药组成^[26]。方中黄芪益气、白芍滋阴敛阴, 二者共为君药; 茯苓、白术健脾补气, 既增强黄芪益气之功, 又可利湿泄浊, 山茱萸、熟地黄益肾精, 知母、玄参、麦冬助白芍滋阴, 共为臣药; 佐以川芎、红花、蒲黄活血, 僵蚕通络, 木香行气; 当归滋阴补血兼加活血, 川牛膝益肾同时又可引水下行利于湿浊排出, 共为使药。全方攻补兼施, 共奏益气养阴、化痰通络之功。临床试验研究显示益气养阴方药治疗DN疗效显著, 可以明显改善DN患者的肾功能, 延缓疾病进展, 在治疗DN中有广阔的应用前景^[9]。

综上所述, 本研究证实YYHT药可能通过抑制JAK2/STAT3信号通路的激活, 减轻肾脏细胞凋亡, 改善DN的预后。其可以作为一种新的、可行的治疗策略来阻止DN的发生和发展。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CHEN Y J, KONG L, TANG Z Z, et al. Hesperetin ameliorates diabetic nephropathy in rats by activating Nrf2/ARE/glyoxalase 1 pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111(19):1166-1175.

- [2] AL H A, ABUKHALIL M H, ALGHONMEEN R D, et al. Ginger alleviates hyperglycemia-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis and protects rats against diabetic nephropathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106(18):381-389.
- [3] DAI H, LIU Q, LIU B. Research progress on mechanism of podocyte depletion in diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017(16):1-10.
- [4] LI X, WANG Y, WANG K, et al. Renal protective effect of paeoniflorin by inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway in diabetic mice [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(2):168-176.
- [5] 刘瑾,沈婷婷,蒋洁莹,等. 姜黄素类似物对糖尿病肾病小鼠肾纤维化的影响及机制探讨 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(4):559-562.
- [6] 王楠,刘阳. 中药通过足细胞保护作用治疗糖尿病肾病 Meta 分析 [J]. *实用中医内科杂志*, 2020, 34(6):94-99.
- [7] 涂元宝,李传平,高磊. 益肾化湿颗粒辅助治疗早期糖尿病肾病的疗效及安全性分析 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(7):1042-1046.
- [8] 赵洁,莫超,孟立锋,等. 补阳还五汤治疗早期糖尿病肾病的疗效及安全性的 Meta 分析 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(8):1660-1667.
- [9] 王刚,陈志强,郭晓玲,等. 糖肾合剂治疗早期糖尿病肾病 38 例疗效观察 [J]. *河北中医*, 2008, 30(5):462-464.
- [10] 刘兰英,檀金川. 泄浊解毒、活血通络中药对糖尿病肾病大鼠肾脏 MMP-9/TIMP-1 表达的调节作用 [J]. *医学动物防制*, 2014, 30(9):992-994.
- [11] WARREN A M, KNUDSEN S T, COOPER M E. Diabetic nephropathy: an insight into molecular mechanisms and emerging therapies [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(7):579-591.
- [12] 张宗金,王悦芬,赵文景,等. 基于轴探讨糖尿病肾病中医发病机制及治疗靶点 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(23):3704-3709.
- [13] ZHU M, WANG H, CHEN J, et al. Sinomenine improve diabetic nephropathy by inhibiting fibrosis and regulating the JAK2/STAT3/SOCS1 pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Life Sci*, 2021, 265(21):1-26.
- [14] ZHANG J, LI S, ZHAO Y, et al. Cancer-associated fibroblasts promote the migration and invasion of gastric cancer cells via activating IL-17a/JAK2/STAT3 signaling [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(14):1-16.
- [15] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2003:202-203.
- [16] 黄倩,林佩璜,王梅爱,等. 黄连素对糖尿病肾病大鼠晚期糖基化终末产物及其受体信号传导通路的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(6):632-635.
- [17] LEI X, ZHANG L, LI Z, et al. Astragaloside IV/lncRNA-TUG1/TRAF5 signaling pathway participates in podocyte apoptosis of diabetic nephropathy rats [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12(18):2785-2793.
- [18] BONNER R, ALBAJRAMI O, HUDSPETH J, et al. Diabetic kidney disease [J]. *Prim Care*, 2020, 47(4):645-659.
- [19] ZHANG L, WEN Z, HAN L, et al. Research progress on the pathological mechanisms of podocytes in diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020(1):1-15.
- [20] 石秀杰,庞欣欣,韩佳瑞,等. 中药治疗糖尿病肾病足细胞损伤的药理研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(9):1138-1142.
- [21] FENG D, DUMONTIER C, POLLAK M R. The role of alpha-actinin-4 in human kidney disease [J]. *Cell Biosci*, 2015, 5(44):1-7.
- [22] FENG D. Phosphorylation of key podocyte proteins and the association with proteinuric kidney disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 319(2):284-291.
- [23] ASHRAFIZADEH M, RAFIEI H, MOHAMMADINEJAD R, et al. Potential therapeutic effects of curcumin mediated by JAK/STAT signaling pathway: a review [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(8):1745-1760.
- [24] YU J, WU H, LIU Z Y, et al. Advanced glycation end products induce the apoptosis of and inflammation in mouse podocytes through CXCL9-mediated JAK2/STAT3 pathway activation [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(4):1185-1193.
- [25] 刘宇翔,刘文媛,胡雅玲,等. 益肾胶囊对高糖环境下小鼠足细胞 SOCS3、p-JAK2 和 p-STAT3 表达的影响 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2019, 20(10):854-858.
- [26] 秦聪,檀金川. 从“瘀”论治糖尿病肾病 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15(9):836-837.

[责任编辑 周冰冰]