

• 论 著 •

黄芪消渴汤调控 VEGF/PI3K/AKT 信号通路对糖尿病肾病小鼠肾小管间质纤维化的保护作用研究^{*}

谢 鑫¹, 崔 燕¹, 吴 萍^{2△}

1. 安康市中医医院内分泌科, 陕西安康 725000; 2. 安康市中心医院药剂科, 陕西安康 725000

摘要:目的 探讨黄芪消渴汤调控血管内皮生长因子(VEGF)/磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (AKT) 信号通路对糖尿病肾病(DN)小鼠肾小管间质纤维化(TIF)的保护作用。方法 采用高脂饮食联合腹腔注射链脲佐菌素构建小鼠 DN 模型, 随机分为对照组、DN 组、黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组, 各 8 只。造模成功后每日灌胃相应药物或溶剂 1 次, 持续 10 周, 给药结束后用试剂盒检测血尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)和 24 h 尿蛋白(UP)水平, 自动分析仪测量总甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL-C), 计算肾脏指数。采用苏木精和伊红、过碘酸希夫及马松三色染色, 检测肾脏结构病理学改变、糖原沉积和 TIF。透射电子显微镜检测肾小管超微结构。免疫组化检测肾皮质细胞外基质沉积。免疫荧光检测肾皮质 VEGF 表达和定位。蛋白质印迹检测肾皮质上皮细胞-间质细胞转化和 VEGF/PI3K/AKT 通路相关蛋白表达。结果 与 DN 组比较, 黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠 FBG 和肾脏指数降低($P < 0.05$), 呈浓度依赖性。与 DN 组比较, 黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠 BUN、Scr、TC、LDL-C、TG 和 UP 水平均降低, 呈浓度依赖性($P < 0.05$)。与 DN 组比较, 黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠肾脏病理损伤程度逐渐减轻, 肾小管损伤指数、纤维化面积占比、糖原沉积区域占比降低($P < 0.05$)。与 DN 组比较, 黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠肾组织中 α -平滑肌肌动蛋白、波形蛋白和扭曲蛋白表达降低, E-钙黏蛋白表达升高, 呈浓度依赖性($P < 0.05$)。与 DN 组比较, 黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠肾皮质中 VEGF 荧光强度和 VEGF 蛋白表达及磷酸化 PI3K/PI3K 和磷酸化 AKT/AKT 均升高, 呈浓度依赖性, 且 VEGF 荧光强度表达变化主要发生于肾小管上皮细胞。结论 黄芪消渴汤可能部分通过激活 VEGF/PI3K/AKT 信号通路对 DN 小鼠 TIF 发挥保护作用。

关键词: 黄芪消渴汤; 血管内皮生长因子/磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路; 糖尿病肾病; 肾小管间质纤维化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2025.24.003

中图法分类号: R692.9

文章编号: 1673-4130(2025)24-2957-08

文献标志码: A

Study on the protective effect of Huangqi Xiaoke Decoction in regulating the VEGF/PI3K/AKT signaling pathway on tubulointerstitial fibrosis in mice with diabetic nephropathy^{*}

XIE Xin¹, CUI Yan¹, WU Ping^{2△}

1. Department of Endocrinology, Ankang Traditional Chinese Medicine Hospital, Ankang, Shaanxi 725000, China; 2. Department of Pharmacy, Ankang Central Hospital, Ankang, Shaanxi 725000, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of Huangqi Xiaoke Decoction in regulating the vascular endothelial growth factor (VEGF)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway on tubulointerstitial fibrosis (TIF) in mice with diabetic nephropathy (DN). **Methods** A mouse DN model was established by a high-fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin. The mice were randomly divided into the control group, the DN group, the low-dose Huangqi Xiaoke Decoction group, the medium-dose Huangqi Xiaoke Decoction group, and the high-dose Huangqi Xiaoke Decoction group, with 8 mice in each group. After successful modeling, the corresponding drugs or solvents were administered by intragastric administration once a day for 10 weeks. After the administration ended, the levels of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), and 24-hour urine protein (UP) were detected using a

^{*} 基金项目: 全国中医学术流派第二轮建设项目(国中医药人教函[2019]62号); 陕西省中医药管理局科研项目(2019-ZZ-LC006)。

作者简介: 谢鑫, 男, 副主任医师, 主要从事内分泌风湿免疫研究。△ 通信作者, E-mail: 58312909@qq.com。

kit. Total triglycerides (TG), total cholesterol (TC), and low-density lipoprotein (LDL-C) were measured by an automatic analyzer, and the renal index was calculated. Hematoxylin and Eosin, periodic acid-Schiff, and masson staining were used to detect the structural pathological changes of the kidneys, glycogen deposition and TIF. The ultrastructure of renal tubules was detected by transmission electron microscopy. Immunohistochemical detection of extracellular matrix deposition in the renal cortex. Immunofluorescence was used to detect the expression and localization of VEGF in the renal cortex. Western blotting was used to detect the epithelial-mesenchymal transition of the renal cortex and the expression of proteins related to the VEGF/PI3K/AKT pathway. **Results** Compared with the DN group, the FBG and renal index of mice in the low-dose Huangqi Xiaoke Decoction group, medium-dose Huangqi Xiaoke Decoction group and high-dose Huangqi Xiaoke Decoction group decreased in a concentration-dependent manner ($P<0.05$). Compared with the DN group, the levels of BUN, Scr, TC, LDL-C, TG and UP in mice of the low-dose Huangqi Xiaoke Decoction group, medium-dose Huangqi Xiaoke Decoction group and high-dose Huangqi Xiaoke Decoction group were all decreased in a concentration-dependent manner ($P<0.05$). Compared with the DN group, the degree of renal pathological damage in the low-dose Huangqi Xiaoke Decoction group, medium-dose Huangqi Xiaoke Decoction group and high-dose Huangqi Xiaoke Decoction group gradually decreased, and the renal tubular injury index, the proportion of fibrotic area and the proportion of glycogen deposition area decreased ($P<0.05$). Compared with the DN group, the expressions of α -smooth muscle actin, Vimentin and Twist in the renal tissues of mice in the low-dose, medium-dose and high-dose Huangqi Xiaoke Decoction groups decreased, while the expression of E-cadherin increased in a concentration-dependent manner ($P<0.05$). Compared with the DN group, the fluorescence intensity of VEGF, the expression of VEGF protein, and the phosphorylated PI3K/PI3K and phosphorylated AKT/AKT in the renal cortex of mice in the low-dose, medium-dose and high-dose groups of Huangqi Xiaoke Decoction were all increased in a concentration-dependent manner, and the changes in the expression of VEGF fluorescence intensity mainly occurred in the renal tubular epithelial cells. **Conclusion** Huangqi Xiaoke Decoction may exert a protective effect on TIF in DN mice partially by activating the VEGF/PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Huangqi Xiaoke Decoction; vascular endothelial growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway; diabetic nephropathy; tubulointerstitial fibrosis

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最严重的微血管并发症之一,已成为导致终末期肾病的主要原因^[1]。肾小管间质占肾实质的 90% 以上,在肾功能中起着重要作用。近年来,越来越多的研究表明,肾小管间质纤维化(TIF)是糖尿病肾纤维化的关键病理因素,甚至是 DN 的启动程序^[2]。因此,抑制 TIF 可能是一种有前景的 DN 治疗策略。中医药在提高生活质量和治疗 DN 方面发挥了重要作用^[3]。中医将 DN 归属于“尿浊”“消渴”等范畴,多因津液阴亏致生化乏源,且阴虚燥热耗气伤津所致,应以生津止渴、益气养阴为治则^[3]。黄芪消渴汤具有滋阴润燥、清热生津之功效,临床研究已明确其对 DN 的疗效,并且预后较好^[4]。但其抗 DN 的作用机制尚不清楚。血管内皮生长因子(VEGF)是一种内皮特异性生长因子,促进内皮细胞增殖、分化和存活,介导内皮依赖性血管舒张,诱导微血管高通透性,参与间质基质重塑^[5]。肾脏中,VEGF 在肾小管上皮细胞中的表达最为显著^[6]。此外,VEGF 已被证明可通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)通路诱导小管生成,并可防止过氧化氢诱导的肾小管上皮细胞凋亡和坏死^[7]。

本研究探讨黄芪消渴汤调控 VEGF/PI3K/AKT 信号通路对 DN 小鼠 TIF 的保护作用,旨在基于 VEGF/PI3K/AKT 通路探索黄芪消渴汤治疗 DN 的作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 40 只雄性 C57BL/6J 小鼠,8 周龄,体重 20~25 g,由南京大学模型动物研究中心提供。所有小鼠均安置在一个特定的无病原体、温度和湿度控制的环境中[(22±2)℃, (50±5)% 湿度],标准 12 h 光/暗循环。所有实验方案均经安康市中医医院动物护理与使用委员会批准(编号:201907024),并按照《实验动物护理与使用指南》进行。

1.2 仪器与试剂 全自动生化分析仪由贝克曼库尔特公司提供;透射电子显微镜由日本电子株式会社提供。黄芪消渴汤剂由江苏省中药药理与安全性评价重点实验室生产,由黄芪 30 g,天花粉 20 g,干地黄 30 g,怀山药 20 g,女贞子 20 g,枸杞 10 g,三七 6 g,丹参 6 克 g,陈皮 6 g,生姜 3 片,大枣 3 枚组成。苏木精和伊红(HE)染色试剂盒购自 Solarbio(中国北京,产品目录号 G1120)。一抗 VEGFA 抗体购自 ABclonal

(中国武汉, 目录号 A12303、A5609)。二抗山羊抗兔 IgG (H+L) Alexa Fluor 594 购自 Abcam (英国剑桥, 目录号 ab150080)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型构建及分组处理 根据先前的报道方法建立小鼠 DN 模型^[8]。适应性喂养 2 周后, 将 40 只小鼠随机分为对照组、DN 组、黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组, 各 8 只。除对照组外, 其余小鼠均给予腹腔注射链脲佐菌素 (STZ, 50 mg/kg, 溶于 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液, pH 4.5), 连续 4 d。7 d 后使用血糖仪检测小鼠空腹血糖 (FBG), 以 FBG > 13.9 mmol/L 代表糖尿病建立成功。之后喂养高脂饮食 8 周, 诱导 DN 模型。参考文献^[9]中的人和动物临床药物等效剂量换算公式 (每千克小鼠体重每日剂量 = 成人药剂量 / 70 kg × 9.1), 确定黄芪消渴汤的最高剂量为 220 g/70 kg × 9.1 = 28.60 g/kg, 设置浓度梯度为 7.15、14.30 和 28.60 g/kg, 分别于模型构建成功后给予相应剂量黄芪消渴汤灌胃, 每日 1 次, 连续 10 周。对照组和 DN 组小鼠给予的等量生理盐水。

1.3.2 肾功能和血尿生化指标测量 用药结束后, 将所有小鼠安置在代谢笼中, 禁食但自由饮水 24 h 收集尿液样本。腹腔注射 2.5% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉后, 尾静脉采血并使用血糖仪测量 FBG。摘眼球取血, 室温静置 1 h, 4 °C、2 500 r/min 离心 20 min 收集上层血清。采用试剂盒检测血尿素氮 (BUN)、血肌酐 (Scr)、24 h 尿蛋白 (UP) 水平, 自动分析仪测量血清总甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 和低密度脂蛋白 (LDL-C) 水平。肾脏指数 (mg/g) 为两个肾脏的质量与小鼠体重的比值。

1.3.3 肾脏组织病理学分析 钝性分离各组小鼠肾脏组织, 行冠状面横切为两半, 一半放入 -80 °C 冰箱备用, 另一半用 4% 多聚甲醛固定 48 h, 石蜡包埋后行 4 μm 厚切片。随后按照试剂盒说明书, 分别进行 HE、过碘酸希夫 (PAS) 和马松三色染色, 检测肾脏结构的病理改变、糖原沉积情况及 TIF 程度, 并进一步评估肾小管损伤指数、纤维化面积占比及糖原沉积区域占比, 以量化和比较不同组别小鼠肾脏病理变化的严重程度。

1.3.4 透射电子显微镜检测肾小管超微结构 取 1 mm³ 小块肾皮质, 浸入 2.5% 戊二醛固定 24 h, 再用 1% 锇酸固定 2 h。将肾皮质在丙酮和梯度乙醇中脱水, 环氧树脂包埋, 用超微刀切成超薄切片。依次用醋酸铀和柠檬酸铅染色, 透射电子显微镜下观察肾小管超微结构。

1.3.5 免疫组化检测肾皮质细胞外基质 (ECM) 沉积 将肾脏石蜡切片用二甲苯脱蜡, 分级乙醇水合。在 95 °C、10 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中, 微

波加热 5 min 进行热诱导抗原修复。然后用 3% H₂O₂ 封闭 15 min, 加入胶原蛋白 IV 和层粘连蛋白抗体 (1 : 300 稀释), 4 °C 孵育过夜。次日, 切片在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中洗涤 3 次, 与二抗孵育 45 min; 随后, 用二氨基联苯胺试剂盒显色, 并用苏木精进行复染。光学显微镜下随机选取 10 个皮质切片进行盲法检查。采用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件进行半定量分析评分, 计算胶原蛋白 IV 和层粘连蛋白阳性区域占比。

1.3.6 免疫荧光检测肾皮质 VEGF 表达和定位 切片抗原修复后, 10% 牛血清白蛋白封闭液封闭 30 min, 用抗 VEGF 一抗 (1 : 200) 在 4 °C 孵育过夜。次日, 加入对应红色荧光标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 100) 孵育 50 min。待切片干燥后, 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染料孵育 10 min 标记细胞核, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。干燥后, 用抗荧光淬灭剂密封。在荧光显微镜下观察并收集图像。采用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件进行半定量分析评分, 计算红色荧光强度。

1.3.7 蛋白质印迹 (Western blot) 检测肾皮质上皮细胞-间质转化 (EMT) 和 VEGF/PI3K/AKT 通路相关蛋白表达 用添加磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀法裂解缓冲液裂解小鼠肾组织。二喹啉甲酸蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度后, 加入适量上样缓冲液, 取 40 μg 蛋白经十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上。将膜浸入 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 以 β-肌动蛋白 (β-actin) 为内参, 分别加入 α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA)、波形蛋白 (Vimentin)、扭曲蛋白 (Twist)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、VEGF、磷酸化 PI3K (p-PI3K)、PI3K、磷酸化 AKT (p-AKT)、AKT 和 β-actin 一抗 4 °C 孵育过夜。次日, 含吐温 20 的 Tris 缓冲盐水洗膜 3 次, 加入二抗在室温下孵育 1 h。采用增强化学发光法显色, Image J 软件定量蛋白条带灰度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 Tukey's post hoc 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪消渴汤对 DN 小鼠一般情况的影响 与对照组相比, DN 组小鼠 FBG 和肾脏指数升高 (P < 0.05)。与 DN 组比较, 黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠 FBG 和肾脏指数降低 (P < 0.05), 呈浓度依赖性。见表 1。

2.2 黄芪消渴汤对 DN 小鼠血尿生化指标的影响 与对照组比较, DN 组小鼠 BUN、Scr、TC、LDL-C、TG 和 UP 水平均升高 (P < 0.05)。与 DN 组比较, 黄芪

消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠 BUN、Scr、TC、LDL-C、TG 和 UP 水平均降低,呈浓度依赖性($P<0.05$)。见表 2。

2.3 黄芪消渴汤对 DN 小鼠肾脏病理结构损伤的影响 对照组小鼠肾小球和肾小管结构清晰,上皮细胞形态正常,间质无明显胶原纤维沉淀。与对照组相比, DN 小鼠肾脏表现为肾小球系膜细胞增生、系膜外基质增多、基底膜增厚、肾小管空泡化,且肾小管损伤指数、纤维化面积占比及糖原沉积区域占比均显著升高($P<0.05$)。与 DN 组比较,黄芪消渴汤低、中、高剂量组小鼠肾脏病理损伤程度逐渐减轻,肾小管损伤

指数、纤维化面积占比及糖原沉积区域占比均呈浓度依赖性降低($P<0.05$)。见图 1、表 3。

表 1 各组小鼠一般情况比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

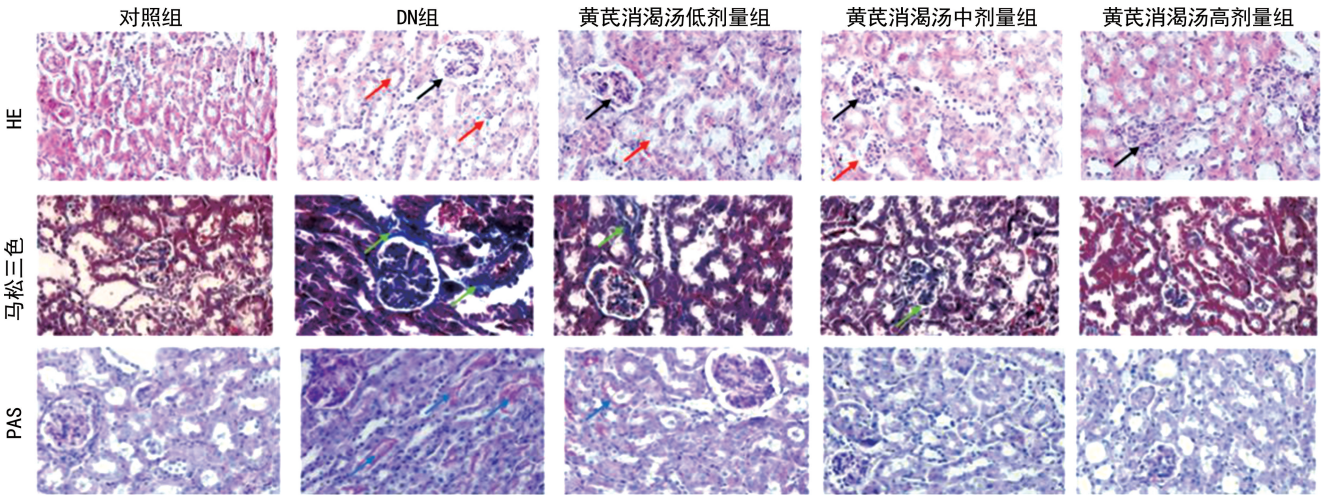
组别	FBG(mmol/L)	肾脏指数(mg/g)
对照组	7.35±0.96	10.72±1.08
DN 组	23.51±6.73 [*]	16.73±1.36 [*]
黄芪消渴汤低剂量组	14.37±4.63 [#]	14.37±1.20 [#]
黄芪消渴汤中剂量组	10.27±4.32 [#]	12.97±1.13 [#]
黄芪消渴汤高剂量组	8.37±2.41 [#]	11.05±1.21 [#]

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 DN 组比较,[#] $P<0.05$ 。

表 2 各组小鼠血尿生化指标比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	BUN (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	Scr (μmol/L)	TG (mmol/L)	UP (mg/24 h)
对照组	5.34±0.85	4.11±0.94	0.57±0.11	50.34±6.72	0.81±0.12	0.97±0.07
DN 组	11.23±1.87 [*]	7.59±1.26 [*]	1.68±0.26 [*]	118.23±17.36 [*]	1.84±0.18 [*]	2.68±0.14 [*]
黄芪消渴汤低剂量组	8.37±1.57 [#]	6.13±1.18 [#]	1.28±0.23 [#]	84.55±14.43 [#]	1.42±0.11 [#]	1.67±0.13 [#]
黄芪消渴汤中剂量组	7.11±1.48 [#]	5.22±1.26 [#]	1.03±0.18 [#]	68.19±15.46 [#]	1.18±0.13 [#]	1.33±0.15 [#]
黄芪消渴汤高剂量组	6.09±1.32 [#]	4.68±0.83 [#]	0.75±0.14 [#]	59.13±10.33 [#]	0.93±0.08 [#]	1.03±0.09 [#]

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 DN 组比较,[#] $P<0.05$ 。



注:黑色箭头表示肾小球系膜增生,红色箭头表示肾小管空泡化,绿色箭头表示蓝色胶原沉淀,蓝色箭头表示红色糖原沉积。

图 1 黄芪消渴汤对 DN 小鼠各组肾脏病理变化的影响(HE、马松三色、PAS 染色, $n=8, \times 200$)。

表 3 各组小鼠肾脏病理结构损伤程度比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	肾小管损伤指数	纤维化面积 占比(%)	糖原沉积区域 占比(%)
对照组	0.75±0.25	7.63±0.78	7.23±1.59
DN 组	2.47±0.32 [*]	34.28±6.93 [*]	22.67±1.62 [*]
黄芪消渴汤低剂量组	1.93±0.21 [#]	21.63±5.93 [#]	18.27±1.48 [#]
黄芪消渴汤中剂量组	1.52±0.24 [#]	16.23±3.27 [#]	14.23±1.29 [#]
黄芪消渴汤高剂量组	1.24±0.12 [#]	12.34±2.14 [#]	7.89±0.96 [#]

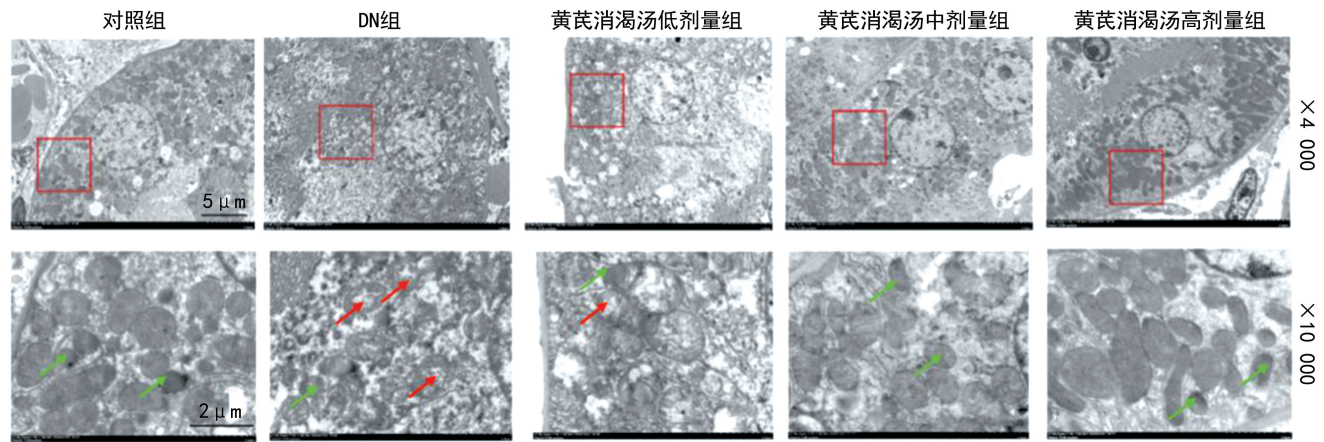
注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 DN 组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.4 黄芪消渴汤对 DN 小鼠肾小管超微结构的影响 对照组小鼠肾小管上皮细胞形态大小正常,微绒毛排列整齐密集,线粒体基底膜完整均匀无明显增厚。与对照组相比, DN 组小鼠肾小管上皮细胞水肿,亚细胞结构异常,线粒体肿胀、嵴溶解、微绒毛减少、基底膜增厚、出现细胞质空泡样改变。与 DN 组比较,黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠肾小管上皮细胞超微结构均有明显改善,仅可见少量细胞线粒体轻度肿胀和空泡样变,呈浓度依赖性。见图 2。

2.5 黄芪消渴汤对 DN 小鼠肾皮质 ECM 沉积的影

响 免疫组化结果显示,与对照组比较,DN 组小鼠肾小管上皮细胞中胶原蛋白Ⅳ和层粘连蛋白阳性区域占比均升高。与 DN 组比较,黄芪消渴汤低剂量组、

黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠肾小管上皮细胞中胶原蛋白Ⅳ和层粘连蛋白阳性区域占比均降低($P<0.05$),呈浓度依赖性。见图 3、表 4。



注:红色正方形标记区域示基底膜增厚,放大区域见其对应的下图;绿色箭头示微绒毛减少,红色箭头示线粒体肿胀。

图 2 黄芪消渴汤对 DN 小鼠各组肾小管超微结构的影响(透射电子显微镜, $n=8$)。

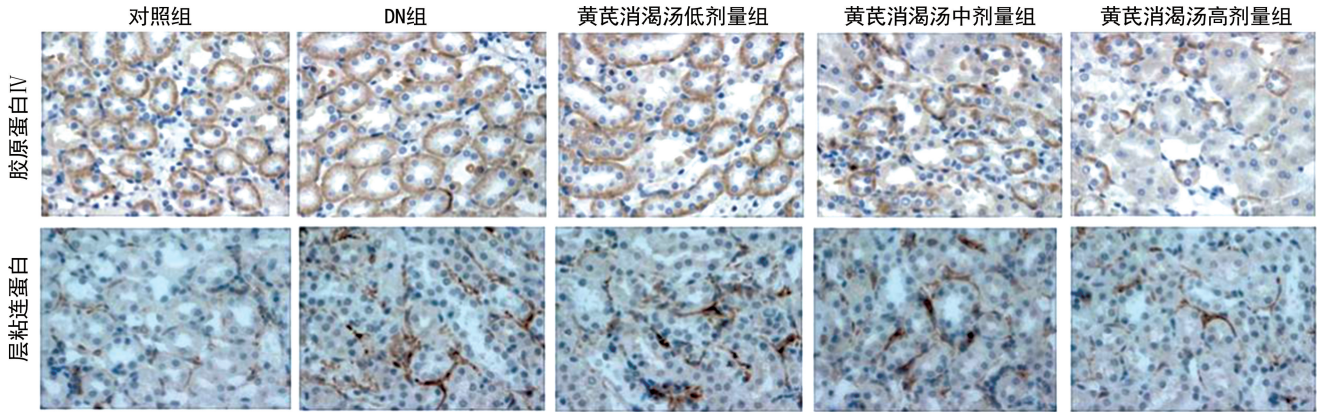


图 3 免疫组化检测各组小鼠肾皮质 ECM 沉积($n=8, \times 200$)

表 4 各组小鼠肾皮质胶原蛋白Ⅳ和层粘连蛋白阳性区域占比比较($n=8, \bar{x} \pm s, \%$)		
组别	胶原蛋白Ⅳ	层粘连蛋白
对照组	31.47 ± 2.37	27.39 ± 3.47
DN 组	$58.29 \pm 3.46^*$	$58.29 \pm 3.44^*$
黄芪消渴汤低剂量组	$43.28 \pm 4.13^\#$	$51.28 \pm 3.27^\#$
黄芪消渴汤中剂量组	$35.28 \pm 2.39^\#$	$42.13 \pm 3.48^\#$
黄芪消渴汤高剂量组	$26.38 \pm 1.36^\#$	$31.23 \pm 4.43^\#$

注:与对照组比较, $^* P<0.05$;与 DN 组比较, $^\# P<0.05$ 。

2.6 黄芪消渴汤对 DN 小鼠肾小管上皮细胞 EMT 的影响 与对照组比较,DN 小鼠肾小管上皮细胞中 α -SMA、Vimentin 和 Twist 表达升高,E-cadherin 表达降低。与 DN 组比较,黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠肾组织中 α -SMA、Vimentin 和 Twist 表达降低,E-cadherin 表达升高($P<0.05$),呈浓度依赖性。见图 4、表 5。

2.7 黄芪消渴汤对 DN 小鼠肾脏中 VEGF 介导的 PI3K/AKT 通路的影响 与对照组比较,DN 小鼠肾

皮质中 VEGF 荧光强度和 VEGF 蛋白表达及 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 均降低。与 DN 组比较,黄芪消渴汤低剂量组、黄芪消渴汤中剂量组和黄芪消渴汤高剂量组小鼠肾皮质中 VEGF 荧光强度和 VEGF 蛋白表达及 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 均升高,呈浓度依赖性,且 VEGF 荧光强度表达变化主要发生于肾小管上皮细胞。见图 5、表 6。

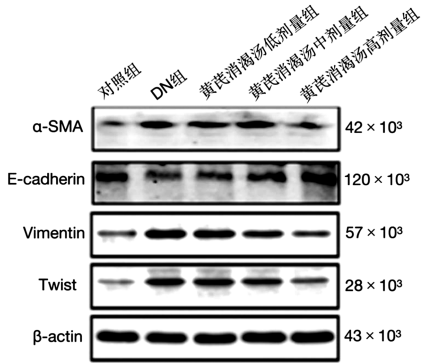
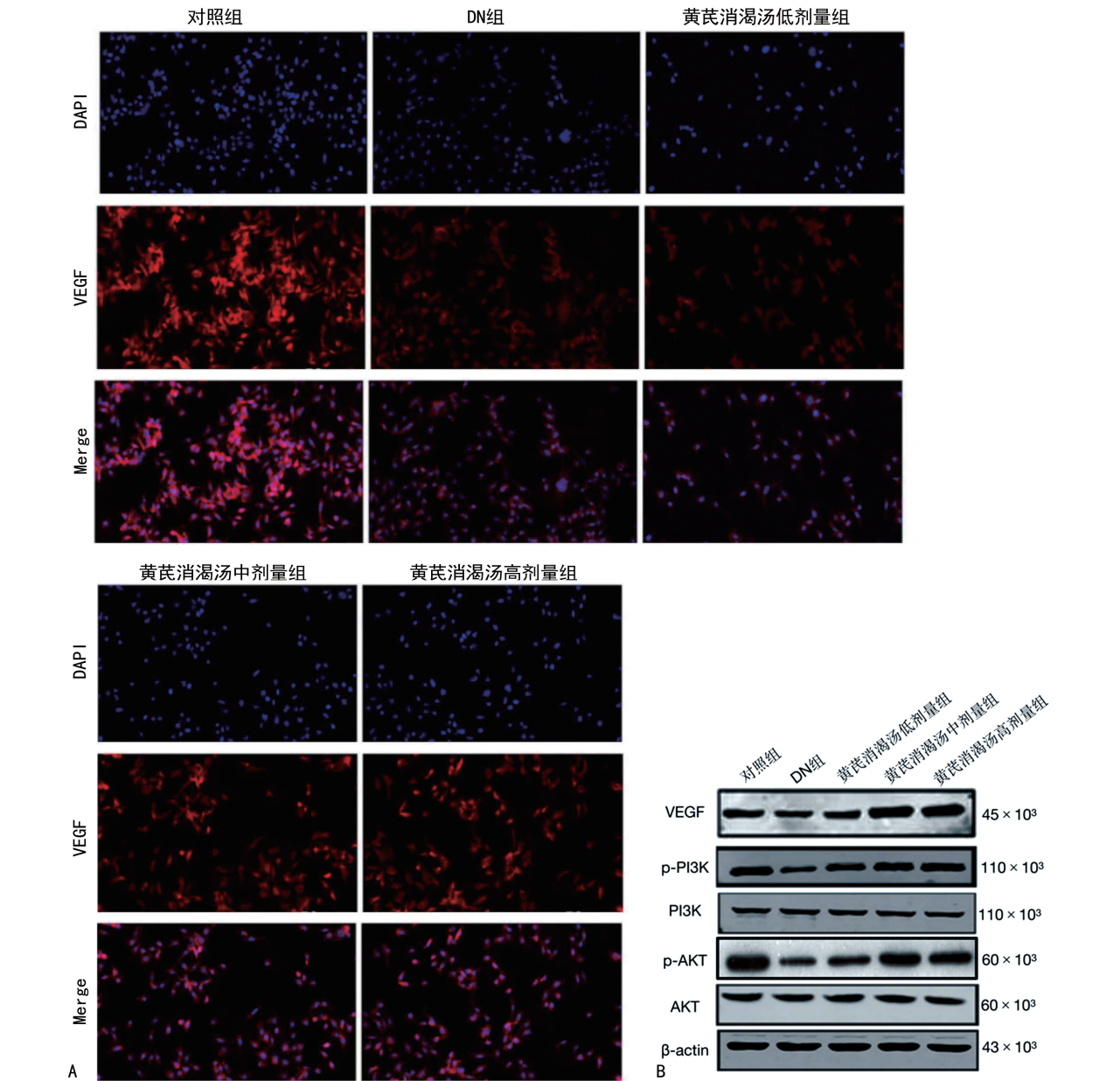


图 4 Western blot 检测各组小鼠肾皮质 EMT 相关蛋白表达($n=8$)

表 5 各组小鼠肾皮质 EMT 相关蛋白表达比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA	E-cadherin	Vimentin	Twist
对照组	1.02±0.02	1.01±0.03	0.99±0.03	1.03±0.02
DN 组	1.69±0.31 [*]	0.61±0.02 [*]	2.47±0.73 [*]	1.61±0.32 [*]
黄芪消渴汤低剂量组	1.48±0.07 [#]	0.82±0.05 [#]	2.13±0.68 [#]	1.31±0.27 [#]
黄芪消渴汤中剂量组	1.34±0.04 [#]	0.94±0.04 [#]	1.62±0.42 [#]	1.22±0.33 [#]
黄芪消渴汤高剂量组	1.16±0.05 [#]	1.05±0.06 [#]	1.32±0.23 [#]	1.05±0.07 [#]

注:与对照组比较,^{*} P<0.05;与 DN 组比较,[#] P<0.05。



注:A 为免疫荧光检测肾皮质 VEGF 表达及定位(DAPI 染色标记细胞核,VEGF 为红色荧光,×200),Merge 代表 DAPI 与 VEGF 荧光染色结果的合并图;B 为 Western blot 检测肾皮质 VEGF/PI3K/AKT 通路相关蛋白表达。

图 5 Western blot 检测各组小鼠肾皮质 VEGF/PI3K/AKT 通路相关蛋白表达 (n=8)

表 6 各组小鼠肾皮质 VEGF/PI3K/AKT 通路相关蛋白表达比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	VEGF 荧光强度(RFU)
对照组	1.04±0.02	2.37±0.34	3.27±0.45	1.02±0.06
DN 组	0.43±0.08 [*]	0.89±0.07 [*]	0.94±0.11 [*]	0.35±0.03 [*]

续表 6 各组小鼠肾皮质 VEGF/PI3K/AKT 通路相关蛋白表达比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	VEGF	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	VEGF 荧光强度(RFU)
黄芪消渴汤低剂量组	0.56±0.04 [#]	1.35±0.21 [#]	1.59±0.31 [#]	0.42±0.04 [#]
黄芪消渴汤中剂量组	0.89±0.12 [#]	1.58±0.13 [#]	2.75±0.45 [#]	0.57±0.07 [#]
黄芪消渴汤高剂量组	1.06±0.23 [#]	1.78±0.27 [#]	3.14±0.64 [#]	0.85±0.12 [#]

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 DN 组比较,[#] $P<0.05$ 。

3 讨 论

长期严重高血糖作为 2 型糖尿病的主要特征,是导致 DN 发生的直接因素。因此,通过胰岛素注射和(或)口服降糖药降低血糖水平是目前 DN 的主要治疗策略^[1]。肾小管位于肾单位中,约占肾脏总体积 80%,负责肾小管重吸收,其中葡萄糖可被肾小管上皮细胞重吸收至血液中。因此,血液中的慢性长期高血糖可能导致基质蛋白在肾小管上皮细胞内持续蓄积,从而导致 TIF 发生^[10]。TIF 一旦发生,在 DN 晚期是不可逆的,并最终导致肾功能不全。因此,在降糖治疗的同时,抗 TIF 策略对于晚期 DN 的治疗至关重要。

中医认为 DN 属于“虚劳”“腰痛”“尿浊”“消渴”等范畴,因先天禀赋不足、后期体质虚弱及饮食不规律导致血液运动不畅,应以生津止渴、益气养阴为治则^[3]。黄芪消渴汤中黄芪为君药,具有益气健脾之功效;生地黄可辅助补肾养阴;沙参与麦冬联用,具有养阴生津的作用;丹参和川芎则有活血化瘀之功效;再加上山药用以健脾益气^[11]。诸药联用则能起到补肾祛湿、清热降糖之效果。血糖控制直接影响糖尿病并发症的发生和靶器官尤其是肾脏损害的严重程度。因此,控制高血糖是 DN 防治的关键措施^[1]。糖尿病患者通常伴有高血糖和高脂血症,后者以高胆固醇血症、高甘油三酯血症、LDL-C 升高和高密度脂蛋白胆固醇降低为特征。据报道,糖尿病患者通过有效的高血糖控制,血脂代谢失调得到明显恢复^[12]。此外,高脂血症在糖尿病条件下肾损伤的发病机制中起协同作用^[13]。研究表明,黄芪在体内还能促进蛋白合成,调节脂代谢^[14]。有研究报道,黄芪消渴汤治疗不仅降低了 DN 小鼠的高血糖和体重,而且改善了高脂血症^[11]。肾功能评价显示黄芪消渴汤具有肾功能保护作用。这些结果提示黄芪消渴汤有可能作为 DN 的一种有效治疗药物。

有研究认为,长期高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤引起的重吸收功能异常是 DN 患者发病的关键病理因素,甚至是 TIF 的启动程序,该损伤发生后可抑制球管反馈机制,引起肾小球超滤过^[2]。肾小管上皮细胞是肾皮质小管间质中最主要的细胞类型,在糖尿病条件下发生 EMT,转化为肌成纤维细胞表型,最终导致肾间质中 ECM 的异常聚集,刺激了肾纤维化的发展^[15]。一方面,肾小管上皮细胞极性消失,细胞间

紧密连接遭到破坏,上皮细胞表性蛋白 E-cadherin 表达下调;另一方面,细胞骨架结构和细胞形态发生变化,间充质细胞表型蛋白 α -SMA 表达上调^[15]。因此,EMT 被认为是 TIF 的关键因素,抑制肾小管 EMT 可以预防 TIF。而肾小管上皮细胞发生 EMT 后能够产生大量促纤维化因子和细胞因子,介导 TIF。本研究通过组织病理学分析,黄芪消渴汤对 DN 小鼠肾小管和肾间质有形态学保护作用,改善肾皮质胶原和细胞外基质沉积,且呈剂量依赖性。这提示黄芪消渴汤能减轻 DN 小鼠肾纤维化程度。本研究发现,与肾小球相比,肾小管在 DN 的破坏性纤维化过程中是脆弱的。透射电镜结果显示,黄芪消渴汤对 DN 诱导的肾小管上皮细胞亚细胞结构紊乱具有明显的保护作用。在此基础上,通过检测纤维化相关标志蛋白的表达,在 DN 小鼠中检测黄芪消渴汤对 TIF 的保护作用,发现 DN 小鼠肾小管间质 α -SMA 表达增加,E-cadherin 表达降低,而黄芪消渴汤可逆转上述变化,提示黄芪消渴汤可阻断 DN 小鼠肾小管间质 EMT。其他与 EMT 相关的蛋白质如 Vimentin 和 Twist 的变化进一步证实了这些发现。

VEGF 是血管内皮细胞的生存因子,在血管内皮的平衡中发挥着重要作用,它还是肾小管上皮细胞的生存因子,参与肾小管的构建^[5]。此外,VEGF 还可通过促进细胞外基质沉积而加重肾小管基底膜增厚、肾小球硬化和肾间质纤维化,导致肾功能损害^[16]。人和小鼠肾脏中 VEGF 的表达仅限于足细胞和肾小管上皮细胞,而肾小管上皮细胞是肾脏中 VEGF 的重要细胞来源^[6]。体内可能存在维持肾小管细胞上皮表型的内在肾保护因子,这些因子的缺失可能会导致 EMT。研究发现,VEGF 可能是这类因子的候选者,因为在 TIF 中已观察到 VEGF 的表达减少^[17]。此外,有研究报道,诱导 VEGF 释放可抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤和大鼠肾纤维化^[18-19]。因此,调节 VEGF 的表达可能是预防进展性肾纤维化的一种治疗方法。免疫组化结果显示, DN 小鼠肾皮质 VEGF 表达降低,黄芪消渴汤干预后其表达呈剂量依赖性升高,且主要分布于肾小管细胞。PI3K/AKT 通路在信号转导中发挥至关重要作用,参与机体多种生物学过程的进展。研究发现,PI3K/AKT 通路激活可增加细胞外基质表达并促进 EMT,进而参与肾脏纤维化病变进程^[20]。此外,沈梦琪等^[21]研究表明,

VEGF 表达增多可作用于 PI3K/AKT 通路并改善 DN 大鼠 TIF。与这些研究结果类似,本研究发现,黄芪消渴汤在升高 VEGF 表达的同时,激活了 PI3K/AKT 通路,提示黄芪消渴汤对 DN 小鼠 TIF 的改善可能与其激活 VEGF/PI3K/AKT 信号通路有关。

但本研究也存在一定局限性,中药复方发挥纤维化抑制作用往往是通过多通路、多靶点实现的,本研究仅对 VEGF/PI3K/AKT 通路进行了探讨,黄芪消渴汤是否可通过其他信号通路发挥功能效果,值得进一步深入研究。

综上所述,黄芪消渴汤可有效改善 DN 小鼠肾功能和 TIF,其机制可能部分与激活 VEGF/PI3K/AKT 信号通路有关。本研究为 DN 相关 TIF 的发病机制提供了一个新的视角,而黄芪消渴汤可能作为 DN 相关 TIF 的一种有前途的佐剂和预防性治疗剂。

参考文献

[1] HU Q, CHEN Y, DENG X, et al. Diabetic nephropathy: focusing on pathological signals, clinical treatment, and dietary regulation[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 159 (1):114252.

[2] GILBERT R E. Proximal tubulopathy: prime mover and key therapeutic target in diabetic kidney disease[J]. Diabetes, 2017, 66(4):791-800.

[3] 李滢,周智涵,杨齐锋,等. 中药治疗糖尿病肾病的伞状系统评价[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2024, 9(18): 1-8.

[4] 丁琳. 黄芪消渴方联合缬沙坦对早期糖尿病肾病气阴两亏证疗效及肾功能和炎症因子的影响[J]. 光明中医, 2021, 36(18):3147-3149.

[5] AHMAD A, NAWAZ M I. Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis[J]. J Cell Biochem, 2022, 123(12):1938-1965.

[6] MAJUMDER S, ADVANI A. VEGF and the diabetic kidney: more than too much of a good thing[J]. J Diabetes Complications, 2017, 31(1):273-279.

[7] LOU Z, LI Q, WANG C, et al. The effects of microRNA-126 reduced inflammation and apoptosis of diabetic nephropathy through PI3K/AKT signalling pathway by VEGF[J]. Arch Physiol Biochem, 2022, 128(5):1265-1274.

[8] 任宇晴,唐堂,李颖,等. 降糖丸抑制 TGF-β1 改善糖尿病肾病小鼠肾损伤及纤维化[J]. 中国药理学通报, 2023, 39 (10):1988-1993.

[9] 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, 2003:79.

[10] RENDE U, GULLER A, GOLDYS E M, et al. Diagnostic and prognostic biomarkers for tubulointerstitial fibrosis [J]. J Physiol, 2023, 601(14):2801-2826.

[11] 马俊萍,张娟. 黄芪消渴汤联合常规降糖治疗对糖尿病肾病的价值[J]. 内蒙古中医药, 2021, 40(1):44-45.

[12] SHOKRPOUR M, FOROOZANFARD F, AFSHAR EBRAHIMI F, et al. Comparison of myo-inositol and metformin on glycemic control, lipid profiles, and gene expression related to insulin and lipid metabolism in women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled clinical trial[J]. Gynecol Endocrinol, 2019, 35(5):406-411.

[13] LIN L, TAN W, PAN X, et al. Metabolic syndrome-related kidney injury: a review and update[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13(1):904001.

[14] 纪新建,张志芳,闫鑫媛,等. 基于肠道微生态探讨黄芪扶正调衡治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2024, 36(8):967-973.

[15] GAO J, WU L, ZHAO Y, et al. Cxcl10 deficiency attenuates renal interstitial fibrosis through regulating epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Exp Cell Res, 2022, 410 (2):112965.

[16] TAN H, CHEN J, LI Y, et al. Glabridin, a bioactive component of licorice, ameliorates diabetic nephropathy by regulating ferroptosis and the VEGF/Akt/ERK pathways [J]. Mol Med, 2022, 28(1):58.

[17] HUANG M J, JI Y W, CHEN J W, et al. Targeted VEGFA therapy in regulating early acute kidney injury and late fibrosis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(9):1815-1825.

[18] WANG M, WANG L, ZHOU L, et al. Shen-Shuai-II-recipe inhibits tubular inflammation by PPARα-mediated fatty acid oxidation to attenuate fibroblast activation in fibrotic kidneys[J]. Phytomedicine, 2024, 126(1):155450.

[19] XIAOMENG G, PANPAN Q, JINGYUE C, et al. Huoxue Jiedu Huayu recipe inhibits macrophage-secreted vascular endothelial growth factor-α on angiogenesis and alleviates renal fibrosis in the contralateral kidneys of unilateral ureteral obstruction rats[J]. J Tradit Chin Med, 2024, 44(3):458-467.

[20] 樊小宝,吴雅岚,王晶,等. 金钗石斛多糖对多柔比星肾病大鼠肾纤维化及 PI3K/Akt/HIF-1α 通路的影响[J]. 中国药师, 2019, 22(10):1835-1840.

[21] 沈梦琪,赵泉霖. 芪归药对基于 VEGF/PI3K/Akt 信号通路干预糖尿病肾病大鼠肾小管间质纤维化的分子机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(11):59-63.