水陆二仙丹合抵挡汤加减方对糖尿病肾病小鼠线粒体自噬信号通路的影响

张 园[1] 祁 彤[1] 高 飞[2] 刘 慧[1] 纪品川[3] 张亚超[1] 高占华[1] 孔令娟[1] 常 柏[4] 郭建恩[1]

(1 承德医学院,承德,067000; 2 北京市朝阳区中医医院,北京,100020; 3 承德市中医院,承德,067000; 4 天津医科大学朱宪彝纪念医院,天津,300134)

摘要 **目的:** 探讨水陆二仙丹合抵挡汤加减方对糖尿病肾病小鼠线粒体自噬信号通路的影响。**方法:** 将 50 只 db/db 小鼠通过简单随机化分为模型组、厄贝沙坦组(0.026 g/kg)、中药低、中、高剂量组(低剂量 6.27 g/kg,中剂量为 12.74 g/kg,高剂量 25.48 g/kg),db/m 小鼠 10 只为正常组,连续灌胃 8 周。检测各组小鼠血糖(BG)、尿白蛋白/肌酐比值(UACR)、细胞活性氧、肾损伤分子 1(KIM-1)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、微管相关轻链蛋白 1 轻链 3(LC3)、PTEN 诱导假定激酶 1(Pink1)、E3 泛素连接酶(Parkin)、沉默信息调节因子 1(Sirt1)、过氧化物酶体增殖受体 γ 辅激活因子 α(PGC-1α)以及线粒体融合蛋白(MFN2)表达。**结果:** 与正常组比较,模型组小鼠 BG、UACR、KIM-1、NGAL 蛋白水平明显升高($P<0.05$),Pink1、Parkin、LC3、Sirt1、PGC-1α 以及 MFN2 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$),线粒体活性氧水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,中药低、中、高剂量组和厄贝沙坦组小鼠 BG、UACR、KIM-1、NGAL 蛋白水平均有不同程度的下降($P<0.05$),Pink1、Parkin、LC3、Sirt1、PGC-1α 以及 MFN2 表达水平有不同程度的上升($P<0.05$),小鼠线粒体活性氧水平有不同程度的下降($P<0.05$)。**结论:** 水陆二仙丹合抵挡汤加减方能够减轻 db/db 小鼠肾损伤,其机制可能与上调肾脏 Sirt1、PGC-1α 以及 MFN2 的表达水平,恢复肾脏线粒体自噬有关。

关键词 糖尿病肾脏疾病;水陆二仙丹;抵挡汤;线粒体自噬;肾间质纤维化;肾小管;沉默信息调节因子 1/线粒体融合蛋白信号通路;过氧化物酶体增殖受体 γ 辅激活因子 α

Effects of Shuilu Erxian Pills Combined with Modified Didang Decoction on Mitochondrial Autophagy Signaling Pathway in Diabetic Nephropathy Mice

ZHANG Yuan[1], QI Tong[1], GAO Fei[2], LIU Hui[1], JI Pinchuan[3], ZHANG Yachao[1], GAO Zhanhua[1], KONG Lingjuan[1], CHANG Bai[4], GUO Jian'en[1]

(1 *Chengde Medical University, Chengde* 067000, *China*; 2 *Chaoyang District Traditional Chinese Medicine Hospital, Beijing* 100020, *China*; 3 *Chengde Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chengde* 067000, *China*; 4 *Tianjin Medical University Chu Hsien-I Memorial Hospital, Tianjin* 300134, *China*)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of Shuilu Erxian Pills combined with Didang Decoction with modifications on the mitochondrial autophagy signaling pathway in diabetic nephropathy (DN) mice. **Methods:** Fifty db/db mice were randomly divided into a model group, an irbesartan group (0.026 g/kg), and low-, medium-, and high-dose Chinese medicine groups (6.27, 12.74, and 25.48 g/kg). An additional 10 db/m mice served as the normal control group. All groups received continuous intragastric administration for 8 weeks. Blood glucose (BG), urinary albumin-to-creatinine ratio (UACR), reactive oxygen species (ROS), kidney injury molecule-1 (KIM-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), and expression levels of LC3, PTEN-induced putative kinase 1 (Pink1), E3 ubiquitin ligase (Parkin), sirtuin 1 (Sirt1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α), and mitofusin 2 (MFN2) were measured. **Results:** Compared with the normal group, the model group showed significantly increased BG, UACR, KIM-1, and NGAL protein levels ($P<0.05$), decreased expression of Pink1, Parkin, LC3, Sirt1, PGC-1α, and MFN2 proteins ($P<0.05$), and increased mitochondrial reactive oxygen species level ($P<0.05$). Compared with the model group, the low-, medium-, and high-dose Chinese medicine groups and the irbesartan group showed decreased BG, UACR, KIM-1, and NGAL protein levels to varying degrees ($P<0.05$), increased expression of Pink1, Parkin, LC3, Sirt1, PGC-1α, and MFN2 proteins ($P<0.05$), and reduced mitochondrial ROS levels ($P<0.05$). **Conclusion:** Shuilu Erxian Pills combined with Didang Decoction with modifications alleviates kidney injury in db/db mice, possibly by upregulating the expression of Sirt1, PGC-1α,

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973614);河北省自然科学基金资助项目(H2022406069);2024 年河北省硕士在读研究生创新能力培养资助项目(CXZZSS2024124)

作者简介: 张园(1997.03—),女,硕士研究生在读,研究方向:中西医结合治疗糖尿病及其并发症,E-mail: zy152483@126.com

通信作者: 郭建恩(1982.04—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合治疗糖尿病及其并发症,E-mail: 751934217@qq.com

中国知网 https://www.cnki.net

and MFN2 in renal tissue and restoring mitochondrial autophagy.

Keywords Diabetic nephropathy; Shuilu Erxian Pills; Didang Decoction; Mitochondrial autophagy; Renal interstitial fibrosis; Renal tubule; Sirt1/MFN2 pathway; Peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1673-7202.2025.06.005

糖尿病肾脏疾病(Diabetic Kidney Disease,DKD)属于临床常见的糖尿病微血管并发症[1],也是引起晚期肾脏疾病和终末期肾病(End Stage Renal Disease,ESRD)的主要原因[2]。DKD 是多因素、多途径以及介质参与的结果,其发病机制复杂,涉及持续的高血糖、异常信号通路的转导等多个方面[3-7]。其中,长期高糖刺激使肾小管上皮细胞稳态和细胞器受到损伤,细胞线粒体自噬功能异常,最终导致肾脏功能异常[8]。目前,DKD 的治疗主要依靠严格的血糖控制、降血压、纠正脂质代谢紊乱等,但无法阻止其发展为 ESRD[9-10]。

DKD 属于中医学"尿浊""肾消"范畴,肾虚络痹是其基本病机,补肾通络是其治疗大法[11]。水陆二仙丹出自《洪氏集验方》,是补肾固精之名方。抵挡汤出自《金匮要略》,为破血化瘀代表方,两方均被用于糖尿病及其并发症的治疗。课题组前期研究发现,水陆二仙丹合抵挡汤加减方可显著降低糖尿病患者尿蛋白,改善患者中医证候,降低血脂,保护肾功能[12]。实验研究发现,其肾保护作用与其减轻 db/db 小鼠肾小管间质纤维化,抑制糖原合成酶激酶-3β(Glycogen Synthase Kinase 3 β,GSK-3β)/环磷腺苷效应原件(cAMP-response Element Binding Protein,CREB)信号通路有关[13]。进一步研究显示,提高肾脏线粒体自噬活性是其减轻肾间质纤维化的重要机制。沉默信息调节因子 1(Silent Information Regulator 1,Sirt1)/线粒体融合蛋白(Mitofusin 2,MFN2)信号通路是调控线粒体自噬中的关键信号通路,参与介导肾间质纤维化的发生发展[14]。为此,本研究通过体内实验,观察水陆二仙丹合抵挡汤加减方提高 db/db 小鼠肾脏线粒体自噬的作用机制及对 Sirt1/MFN2 信号通路影响,阐明其治疗 DKD 的作用机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 无特定病原体(Specific Pathogen Free,SPF)级雄性 db/db 小鼠 50 只,db/m 小鼠 10 只,鼠龄 8 周,体质量(20±5)g,饲养于承德医学院动物实验中心,温度 20~25 ℃,湿度 40%~70%[江苏华创信诺公司,许可证号 SCXK(苏)2020-009]。小鼠维持饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号:1103222300106140)。本研究通过伦理委员会审批(伦理审批号:CDMULAC-20230905-023)。

1.1.2 药物 厄贝沙坦片(浙江华海药业股份有限公司,批号:H20030016,规格:75 mg/片),水陆二仙丹合抵挡汤加减方颗粒由金樱子 30 g、黄芪 30 g、芡实 30 g、水蛭 3 g、大黄 5 g 组成(神威药业集团有限公司,批号分别为 21092481、21102611、21052971、21080971、21102821)。

1.1.3 试剂与仪器 苏木精-伊红染色液(Hematoxylin and Eosin,HE)、马松(Masson)染色试剂盒、糖原染色试剂盒(Periodic Acid-schiff,PAS)(珠海贝索生物公司,货号:BA4025、BA4079B、BA4080B)。组织线粒体分离试剂盒、活性氧检测试剂盒、线粒体膜电位 JC-1 染色试剂盒(上海碧云天生物公司,货号:C3606、S0033S、C2003S);小鼠尿蛋白定量测试盒、肌酐测定试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,货号:C035-2-1、C011-2-1);免疫组化通用型试剂盒(北京中杉金桥公司,货号:PV-6000);β-肌动蛋白(β-actin)抗体、微管相关轻链蛋白 1 轻链 3(Light Chain 3,LC3)抗体、PTEN 诱导假定激酶 1(PTEN Induced Putative Kinase 1,PINK1)抗体、E3 泛素连接酶(Parkinson Protein 2,Parkin)抗体(ImmunoWay 生物公司,美国,货号:YT0099、YT7936、YN2037、YT3593);肾损伤分子 1(Kidney Injury Molecule 1,KIM-1)抗体、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin,NGAL)抗体、Sirt1 抗体、过氧化物酶体增殖受体 γ 辅激活因子 α(Peroxisome Proliferators-activated Receptor γ Coactivator 1 Alpha,PGC-1α)抗体、MFN2 抗体(Affinity 公司,美国,货号:DF14567、DF6816、DF6033、AF5395、DF8106);山羊血清封闭液、DAB 显色剂、ECL 化学发光试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 抗体(上海碧云天生物公司,货号:C0265、P0202、P0018AS、A0208)。三诺快速血糖测定仪(三诺生物传感股份有限公司,型号:SXT-1);恒冷箱冷冻切片机(LEICA 公司,德国,型号:CM1900-1-1);全自动生化分析仪(贝克曼库尔特公司,美国,型号:AU5800);高速冷冻离心机(赛默飞

中国知网 https://www.cnki.net

世尔科技有限公司，型号：D-37520）；全自动酶标检测仪（贝克曼库尔特公司，美国，型号：ELX800）；电泳仪（北京六一仪器厂，型号：DYY-6C）；全能型凝胶成像系统（Bio-Rad 公司，美国，型号：Chemi Doc MP）；正置/倒置 Hybrid 显微镜（Discover ECHO 公司，美国，型号：REBEL 2 IN 1）；120 kV 透射电镜（日立公司，日本，型号：HT7800）。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 小鼠适应性喂养 1 周后，将 db/db 小鼠通过简单随机化分为模型组、对照组（厄贝沙坦组）、观察组（水陆二仙丹合抵挡汤加减方低、中、高剂量组），每组 10 只。db/m 小鼠 10 只为正常组。db/db 小鼠是国际公认的 2 型糖尿病肾病模型鼠，其出生 6 周后可出现明显肥胖，空腹血糖、饮水量、尿量逐渐增加，12～16 周时最明显，8 周后即可出现早期 DKD。以 db/db 小鼠尿中微量蛋白尿含量显著高于 db/m 小鼠，空腹血糖≥11.1 mmol/L，且肾小球肥大，基底膜增厚，判定为模型成功。

1.2.2 给药方法 根据人与小鼠的体表面积折算等效剂量，70 kg 的成人每天服用水陆二仙丹合抵挡汤加减方中药 98 g，根据人与小鼠间体表面积折算的等效剂量 0.002 6，可以计算出小鼠的中剂量为 12.74 g/kg、低剂量 6.27 g/kg、高剂量 25.48 g/kg。观察组给予水陆二仙丹合抵挡汤加减方中药颗粒剂混悬液，对照组给予厄贝沙坦混悬液 0.026 g/kg，各组按上述剂量灌胃给药，给药体积 20 mL/kg；正常组和模型组灌胃等体积蒸馏水，1 次/d。连续灌胃 8 周。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 取材与保护 给药干预 8 周后尾静脉取血测血糖（Blood Glucose，BG），使用代谢笼收集小鼠 24 h 尿液检测尿白蛋白，尿肌酐，计算尿白蛋白/肌酐比值（Urinary Albumin Creatinine Ratio，UACR）。最后一次给药后 24 h，称重后 3% 戊巴比妥钠麻醉小鼠，眼球取血，2 500 r/min 离心半径 16 cm，离心 15 min 后留取血清置于 -20 ℃冰箱保存备用。取血后暴露腹腔，剖取肾脏后称重，生理盐水冲洗，冰上切取小鼠肾脏皮质于 -80 ℃液氮、4% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛保存备用。

1.2.3.2 血液生化指标检测和尿蛋白定量检测 使用血糖仪检测小鼠血糖浓度；使用生化分析仪检测尿白蛋白、尿肌酐含量，计算 UACR。

1.2.3.3 肾脏病理学检查 取肾组织切 4 μm 薄片，脱蜡至水，蒸馏水冲洗，移至苏木素溶液中染色 5 min，蒸馏水冲洗，滴加体积分数为 1% 的盐酸乙醇分化，经碳酸氢钠溶液漂洗、伊红溶液二次染色，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，滴加中性树脂封片，于光镜下观察肾组织病理变化并拍照记录。

1.2.3.4 肾损伤分子 KIM-1、NGAL 和线粒体自噬相关蛋白 LC3、Pink1、Parkin 表达检测 小鼠肾组织石蜡切片脱蜡水化，柠檬酸盐缓冲液修复抗原，3% H_2O_2 室温孵育 15 min，37 ℃山羊血清封闭 30 min，滴加一抗（KIM-1、NGAL、LC3、Pink1、Parkin，1∶300）4 ℃过夜。滴加二抗（1∶1 000）37 ℃孵育 30 min，HRP 标记链霉卵白素室温孵育 30 min，DAB 显色，苏木精复染，电子显微镜观察并拍照。每张切片随机选取 6 个视野（×400），使用 Image J 软件计算每个视野下阳性结果的积分吸光度 IA 和面积，以 IA/面积作为检测指标的半定量结果。

1.2.3.5 线粒体损伤检测 按照线粒体分离试剂盒说明书步骤操作，分离各组小鼠肾组织线粒体，将线粒体置于重悬液中。采用 JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位情况，弃上清，磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffered Saline，PBS）清洗细胞，避光加入 10 mg/L JC-1 线粒体荧光探针 1 mL，培养箱孵育 20 min，使用正置荧光显微镜和透射电镜观察。采用细胞活性氧（Reactive Oxygen Species，ROS）试剂盒检测细胞 ROS 情况，避光加入无血清培养液稀释的 10 mg/L DCFH-DA 荧光探针 1 mL，培养箱孵育 20 min，用无血清培养液 1 mL 洗涤细胞，使用正置荧光显微镜观察。

1.2.3.6 Sirt1/MFN2 信号通路关键蛋白的检测 使用组织匀浆机研碎小鼠肾组织，加入适量预冷的放射免疫沉淀法（Radio Immunoprecipitation Assay，RIPA）组织裂解液裂解肾组织，离心（同“1.2.3.1”项）取上清，二喹啉甲酸（Bicinchoninic Acid，BCA）法测定蛋白浓度。总蛋白与 5× 加载缓冲液混合后 100 ℃变性 10 min，10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-polyacrylamide Gel Electeophoresis，SDS-PAGE）2 h，PVDF 转膜 120 min。5% 牛血清白蛋白（Bovine Serum Albumin，BSA）孵育 PVDF 膜 1.5 h，一抗 Sirt1（1∶850）、PGC-1α（1∶1 000）、MFN2（1∶1 000）、β-actin（1∶5 000）孵育过夜。洗膜后二抗（1∶3 000）孵育 1 h。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 条带灰度值作为蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析，计量资料以均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，各

中国知网 https://www.cnki.net

样本均数进行单因素方差检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　对 db/db 小鼠血糖、UACR 水平的影响　与正常组比较，模型组小鼠血糖、UACR 水平明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，水陆二仙丹合抵挡汤加减方高、中、低剂量组和厄贝沙坦组小鼠血糖、UACR 水平有不同程度的下降，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1　水陆二仙丹合抵挡汤加减方对 db/db 小鼠血糖、UACR 的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	剂量（g/kg）	血糖（mmol/L）	尿白蛋白/肌酐
正常组	0	3.42±0.36	18.44±2.08
模型组	0	18.06±2.13*	51.08±4.81*
中药低剂量	6.27	14.34±1.62△	40.41±4.03△
中药中剂量	12.74	12.17±1.33△	34.65±4.20△
中药高剂量	25.48	11.29±1.48△	31.04±3.87△
厄贝沙坦组	0.026	17.57±2.11△	42.62±4.57△

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，△ $P<0.05$

2.2　对 db/db 小鼠肾脏病理改变的影响　正常组 db/m 小鼠肾小球、肾小管及肾间质形态无异常；模型组 db/db 小鼠肾小球肥大，肾小管空泡变性，基底膜增厚，系膜间质增生，肾间质纤维化明显。与正常组比较，模型组小鼠肾脏病理损伤严重。与模型组比较，水陆二仙丹合抵挡汤加减方高、中、低剂量组和厄贝沙坦组小鼠的肾脏病理损伤均有不同程度的减轻。见图 1。

2.3　对 db/db 小鼠肾脏肾小管损伤的影响　与正常组比较，模型组小鼠肾脏中肾小管损伤标志物 KIM-1 和 NGAL 蛋白表达水平显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$），免疫组化阳性产物表达明显增强，细胞质呈深棕黄色；与模型组比较，水陆二仙丹合抵挡汤加减方高、中、低剂量组和厄贝沙坦组小鼠肾脏中 KIM-1 和 NGAL 蛋白表达水平均降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），免疫组化阳性产物表达均有不同程度的减弱。见图 2，表 2。

表 2　水陆二仙丹合抵挡汤加减方对 db/db 小鼠肾脏肾小管损伤的影响（$\bar{x}\pm s$，积分光密度/面积，$n=8$）

组别	剂量（g/kg）	KIM-1	NGAL
正常组	0	0.05±0.03	0.08±0.03
模型组	0	0.64±0.09*	0.48±0.07*
中药低剂量	6.27	0.43±0.06△	0.33±0.07△
中药中剂量	12.74	0.40±0.07△	0.36±0.06△
中药高剂量	25.48	0.23±0.04△	0.22±0.05△
厄贝沙坦组	0.026	0.46±0.08△	0.37±0.07△

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，△ $P<0.05$

2.4　对 db/db 小鼠肾脏线粒体损伤的影响　与正常组比较，模型组小鼠肾脏组织线粒体膜电位水平显著降低，线粒体 ROS 水平显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$），正常组小鼠肾脏线粒体形态饱满，数量丰富，线粒体嵴清晰可见，模型组小鼠线粒体密度降低，肿胀，数量减少，部分嵴结构不完整；与模型组比较，水陆二仙丹合抵挡汤加减方高、中、低剂量组和厄贝沙坦组小鼠肾脏组织线粒体膜电位水平均显著升高，线粒体 ROS 水平均显著下降，差异有统计学意义（$P<0.05$），且小鼠肾脏组织线粒体形态均有不同程度的明显改善。见图 3，表 3。

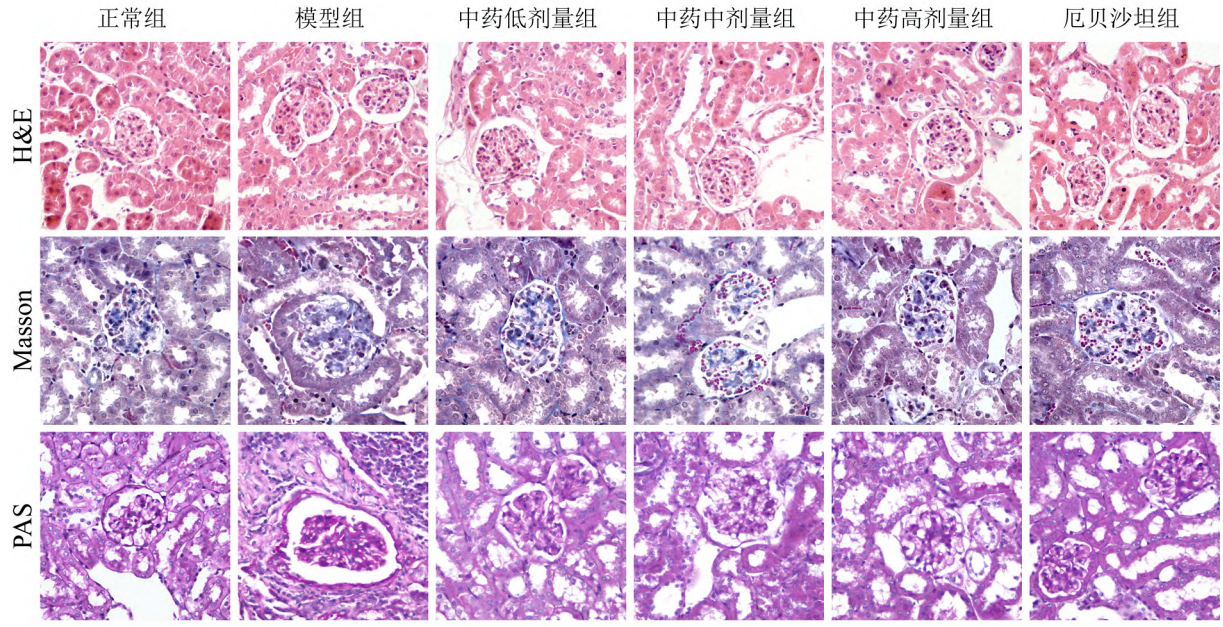


图 1　水陆二仙丹合抵挡汤加减方对 db/db 小鼠肾脏病理改变的影响（HE 染色，Masson 染色，PAS 染色，×400）

中国知网　https://www.cnki.net

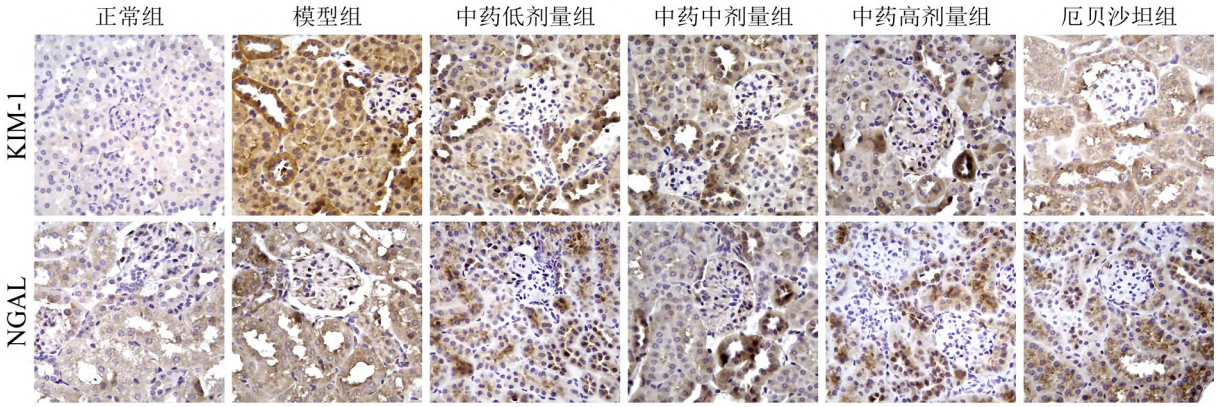


图 2 水陆二仙丹合抵挡汤加减方对 db/db 小鼠肾脏肾小管损伤的影响(免疫组织化学法,×400)

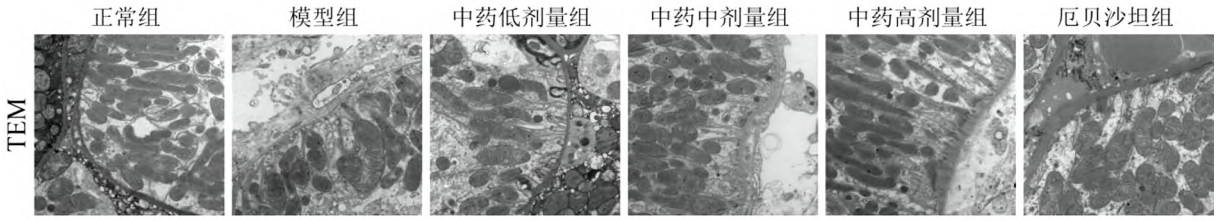


图 3 水陆二仙丹合抵挡汤加减方对 db/db 小鼠肾脏线粒体损伤的影响(透射电镜,×10 000)

表 3 水陆二仙丹合抵挡汤加减方对 db/db 小鼠肾脏线粒体损伤的影响($\bar{x} \pm s$,%,$n = 8$)

组别	剂量(g/kg)	线粒体膜电位	线粒体 ROS
正常组	0	83.08 ± 10.93	18.09 ± 3.18
模型组	0	42.51 ± 6.72*	53.82 ± 6.14*
中药低剂量	6.27	54.42 ± 8.03△	40.41 ± 5.53△
中药中剂量	12.74	62.83 ± 8.17△	36.25 ± 4.28)△
中药高剂量	25.48	67.56 ± 8.66△	32.87 ± 3.61△
厄贝沙坦组	0.026	58.70 ± 7.72△	44.50 ± 4.12△

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,△ $P < 0.05$

2.5 **对 db/db 小鼠肾脏中线粒体自噬蛋白 PINK1、Parkin 以及 LC3 定位表达的影响** 与正常组比较,模型组小鼠肾脏中 PINK1、Parkin 以及 LC3 蛋白表达水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),免疫组化结果模型组小鼠肾脏中 PINK1、Parkin 以及 LC3 仅少量沉积,阳性表达为棕黄色颗粒;与模型组比较,水陆二仙丹合抵挡汤加减方高、中、低剂量组和厄贝沙坦组小鼠肾脏中 PINK1、Parkin 以及 LC3 蛋白的表达量显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),免疫组化结果水陆二仙丹合抵挡汤加减方高、中、低剂量组和厄贝沙坦组小鼠肾组织中 PINK1、Parkin 以及 LC3 沉积明显增多。见图 4,表 4。

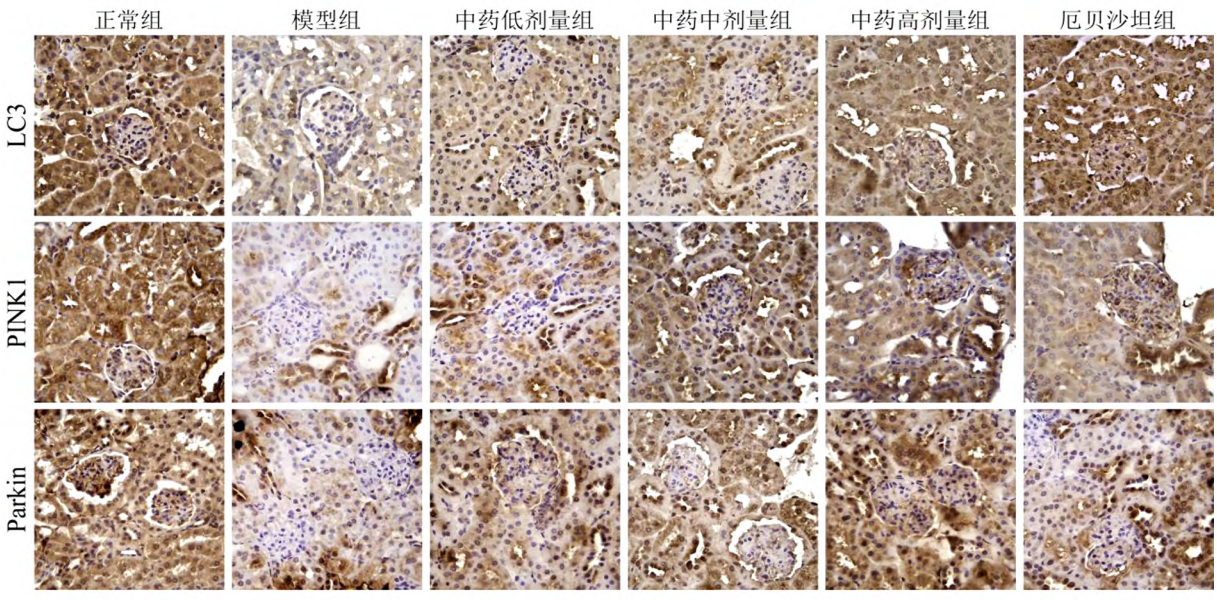


图 4 水陆二仙丹合抵挡汤加减方对 db/db 小鼠肾脏中线粒体自噬蛋白 PINK1、Parkin 及 LC3 定位表达的影响(免疫组织化学法,×400)

中国知网 https://www.cnki.net

表 4　水陆二仙丹合抵挡汤加减方对 db/db 小鼠肾脏中线粒体自噬蛋白 PINK1、Parkin 及 LC3 表达的影响（$\bar{x} \pm s$，积分光密度/面积，$n=8$）

组别	剂量（g/kg）	LC3	PINK1	Parkin
正常组	0	0.69 ± 0.09	0.63 ± 0.08	0.74 ± 0.10
模型组	0	0.13 ± 0.04*	0.08 ± 0.03*	0.18 ± 0.04*
中药低剂量	6.27	0.30 ± 0.05△	0.22 ± 0.05△	0.38 ± 0.06△
中药中剂量	12.74	0.39 ± 0.06△	0.37 ± 0.06△	0.47 ± 0.08△
中药高剂量	25.48	0.61 ± 0.11△	0.48 ± 0.08△	0.52 ± 0.09△
厄贝沙坦组	0.026	0.47 ± 0.07△	0.31 ± 0.05△	0.35 ± 0.06△

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，△ $P<0.05$

2.6　对 db/db 小鼠肾脏中 Sirt1/MFN2 信号通路蛋白表达的影响　与正常组比较，模型组小鼠肾脏中 Sirt1、PGC-1α 以及 MFN2 蛋白表达水平明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，水陆二仙丹合抵挡汤加减方高、中、低剂量组和厄贝沙坦组小鼠肾脏中 Sirt1、PGC-1α 以及 MFN2 蛋白表达水平有不同程度的升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见图 5，表 5。

表 5　水陆二仙丹合抵挡汤加减方对 db/db 小鼠肾脏中 Sirt1/MFN2 信号通路蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n=8$）

组别	剂量（g/kg）	Sirt1/β-actin	PGC-1α/β-actin	MFN2/β-actin
正常组	0	0.82 ± 0.11	0.67 ± 0.09	0.84 ± 0.09
模型组	0	0.26 ± 0.05*	0.06 ± 0.08*	0.11 ± 0.03*
中药低剂量	6.27	0.37 ± 0.06△	0.16 ± 0.04△	0.23 ± 0.05△
中药中剂量	12.74	0.45 ± 0.06△	0.38 ± 0.06△	0.46 ± 0.07△
中药高剂量	25.48	0.53 ± 0.08△	0.52 ± 0.08△	0.53 ± 0.08△
厄贝沙坦组	0.026	0.42 ± 0.07△	0.33 ± 0.06△	0.35 ± 0.07△

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，△ $P<0.05$

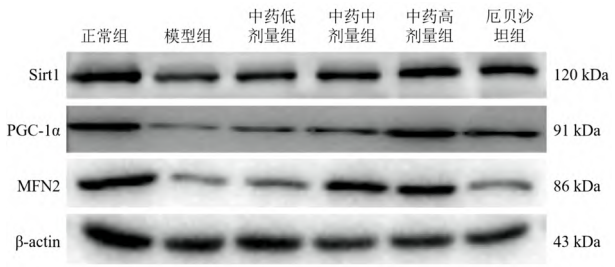


图 5　各组小鼠肾脏中 Sirt1/MFN2 信号通路蛋白表达电泳图

3　讨论

DKD 是糖尿病最常见、最严重的并发症之一，患病率增长迅速，同时，DKD 患者发生不良心血管病、感染和死亡的风险也明显升高，给患者和家庭带来巨大的经济负担和精神压力[15-18]。DKD 发病过程中所出现的水肿、蛋白尿、肾功能损伤与消渴病后期水肿、尿浊等症状高度一致，故中医学将其纳入“肾消”等范畴[19]。尽管吕仁和教授、陈以平教授等多位肾病专家针对 DKD 提出了不同病机和方药，但都认为肾虚络瘀为基本病机[20-23]。肾虚为发病之本，瘀血为发病之标，在病理状态下，肾气亏虚，机体正气不足，正向自噬减弱，影响肾脏调节功能，肾虚使体内污浊之物无法宣泄，最终肾脏纤维化，形成瘀证，可见“肾虚络瘀”是 DKD 的根本病机，也是肾脏自噬失衡的体现[24]。水陆二仙丹合抵挡汤加减方是基于“肾虚络痹”“肾络瘀阻”等理论基础[25]，通过大量临床实践总结得出的治疗 DKD 的经验方，方中重用黄芪，发挥其大补元气、益气固脱的功效，配合金樱子、芡实，二者相须为用，具有平补脾肾、收敛固涩之效，再加大黄、水蛭，大黄凉血祛瘀、清热导滞，水蛭可破血通经、逐瘀消癥[26]，共奏补肾填精、化瘀通络的功效，可有效减轻 DKD 临床症状，改善肾功能。课题组前期研究发现，水陆二仙丹合抵挡汤加减可明显缓解早中期 DKD 患者临床症状，调节免疫炎症反应，抑制肾间质纤维化，改善肾功能[27-28]。

肾间质纤维化是 DKD 的基本病理表现，初起肾脏亏损，进而导致阴阳气血俱虚，五脏六腑均有不同程度的受损，有研究证明，在肾间质纤维化（Unilateral Uretera Obsyruction，UUO）模型中，肾小管损伤加重与肾间质纤维化明显相关，抑制肾小管上皮细胞凋亡可改善肾间质纤维化病变[29]。高糖诱导肾小管上皮细胞的主要损伤机制是线粒体功能障碍，肾脏是一个高耗能器官，肾小管重吸收和分泌功能均依赖线粒体供能，肾小管上皮细胞富含线粒体，促纤维化细胞因子的合成和分泌也是在持续受损的肾小管上皮细胞中开始的，线粒体自噬可以通过处理受损的线粒体来恢复受损肾小管细胞的功能，减轻肾间质纤维化[30-31]。线粒体自噬在诱导细胞凋亡、激活炎症反应、调节 ROS 的生成以及脂质代谢等方面发挥着重要作用，促进线粒体自噬，可以减轻肾小管上皮细胞损伤，延缓肾间质纤维化的进展[32-33]。

PINK1 是线粒体损伤的探针器，能够调控蛋白降解和信号转导，作用于 Parkin 上游，Parkin 是一种泛素蛋白连接酶，通过泛素化线粒体外膜蛋白来介导线粒体自噬的发生[34-36]。PINK1 在线粒体损伤时在线粒体外膜聚集，自身磷酸化并招募 Parkin，造成线粒体的泛素化，泛素化的线粒体可被 LC3 识别，使受损线粒体被溶酶体中的蛋白水解酶降解[37]。DKD 的 PINK1/Parkin 信号通路失衡，肾小管上皮细胞线粒体自噬能力缺陷，导致肾功能异常。本研究发现，db/db 小鼠中，Pink1、Parkin 以及 LC3 蛋白表达明显降低，提示在 DKD 进程中，PINK1/Parkin 信

中国知网　https://www.cnki.net

号通路活性及其介导的线粒体自噬活性是降低的。

线粒体自噬介导的线粒体质量控制是调节肾脏细胞稳态极其关键的机制。目前对于线粒体自噬的途径有许多研究，Sirt1/MFN2 信号通路是 DKD 相关的经典通路，且对自噬过程具有重要调节作用，被广泛用于评估线粒体自噬水平[38]。Sirt1 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性脱乙酰酶，广泛表达于体内多种组织细胞中，具有调控细胞凋亡的功能，它的上调可以改善 DKD 带来的肾组织病理损伤[39-40]。Sirt1 通过去乙酰化激活 PGC-1α，进而激活 MFN2，调节细胞代谢和自噬，抗炎、抗凋亡和氧化应激，改善线粒体质量，维持线粒体稳态[41-43]。MFN2 属于线粒体融合蛋白家族，广泛分布于线粒体外膜和线粒体与内质网结合膜上，负责参与调控线粒体形态和功能，是高度保守的跨膜 GTP 酶，其下调可显著降低线粒体融合效率，诱导线粒体分裂，并导致细胞凋亡增加[44-45]。在其他肾脏疾病的研究中也证实，在 DKD 中通过抑制 Sirt1 介导的线粒体自噬，能够加重肾纤维化进程[46]。因此，恢复线粒体自噬平衡作为治疗 DKD 的药理学靶点的可能性，为延缓 DKD 进展提供新思路。

本研究结果显示，与正常组比较，模型组小鼠 BG、UACR、USP30、肾小管损伤标志物 KIM-1、NGAL 蛋白表达水平明显升高，Pink1、Parkin、LC3、Sirt1、PGC-1α 以及 MFN2 蛋白表达水平明显下降，模型组小鼠肾脏组织线粒体膜电位水平显著降低，线粒体 ROS 水平显著升高，肾小球肥大，肾小管空泡变性，基底膜增厚，系膜间质增生，肾间质纤维化明显，肾脏病理损伤严重。给予水陆二仙丹合抵挡汤加减方高、中、低剂量组和厄贝沙坦组干预后小鼠 BG、UACR、肾小管损伤标志物 KIM-1、NGAL 蛋白表达水平和线粒体 ROS 水平明显降低，小鼠 Pink1、Parkin、LC3、Sirt1、PGC-1α 以及 MFN2 蛋白表达水平和肾脏组织线粒体膜电位水平明显升高，肾脏病理损伤也有不同程度的减轻，提示水陆二仙丹合抵挡汤加减方可以减轻 DKD 小鼠的蛋白尿，减轻肾脏纤维化，保护肾功能，其作用机制可能与调节 Sirt1/MFN2 信号通路蛋白的表达密切相关。

综上所述，本研究从小鼠血糖、尿蛋白、肾功能、Sirt1/MFN2 信号通路蛋白的表达、肾脏组织病理分析证实了水陆二仙丹合抵挡汤加减方对 DKD 小鼠有良好的治疗效果，可以恢复 DKD 引起的自噬抑制，上调肾脏 Sirt1、PGC-1α 以及 MFN2 蛋白的表达水平，改善 db/db 小鼠线粒体损伤，减轻肾小管损伤和肾间质纤维化。本研究部分揭示了水陆二仙丹合抵挡汤加减方治疗 DKD 的作用机制，为临床应用水陆二仙丹合抵挡汤加减方治疗 DKD 提供实验依据。

利益冲突声明：无。

参考文献

[1] ZHANG X X, KONG J, YUN K. Prevalence of diabetic nephropathy among patients with type 2 diabetes mellitus in China: a meta-analysis of observational studies [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 2315607.

[2] 代圣洁，张巧云，蓝青，等. PK2/PKR1 信号参与京尼平苷对小鼠糖尿病肾病的保护作用 [J]. 中国中药杂志，2022，47(6)：1611-1617.

[3] 杨超茅，张顺宵，李园园，等. 六味地黄汤加减联合氯沙坦钾对糖尿病肾病大鼠 ACE1/Ang Ⅱ/AT1R 轴及肠道菌群的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2024，30(6)：1-9.

[4] SAMSU N. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 1497449.

[5] WYSOCKI J, YE M, KHATTAB A M, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 amplification limited to the circulation does not protect mice from development of diabetic nephropathy [J]. Kidney Int, 2017, 91(6)：1336-1346.

[6] 王汉，王敦方，宋红新，等. 肠道菌群失调在糖尿病肾病发病机制中的作用研究进展 [J]. 海南医学院学报，2022，28(8)：626-634.

[7] 辛彩虹，李峥，苏麒麟，等. 益气解毒活络方对糖尿病肾病大鼠 Sirt1-FoxO 通路及自噬的影响 [J]. 中华中医药学刊，2023，41(10)：30-33，262.

[8] 樊俐慧，杨霞，王志刚. 线粒体自噬在糖尿病及其并发症中的作用与中药干预进展 [J]. 中国中药杂志，2024，49(1)：46-54.

[9] CIVANTOS E, BOSCH E, RAMIREZ E, et al. Sitagliptin ameliorates oxidative stress in experimental diabetic nephropathy by diminishing the miR-200a/Keap-1/Nrf2 antioxidant pathway [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2017, 10: 207-222.

[10] DRAGOŞ D, MANEA M M, TIMOFTE D, et al. Mechanisms of Herbal Nephroprotection in diabetes mellitus [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 5710513.

[11] 刘梦超，王明哲，肖遥，等. 基于“肾络瘀痕”理论探讨肾炎防衰液治疗肾间质纤维化的药效物质基础与机制 [J]. 中医药导报，2021，27(7)：158-164.

[12] 任秋月，常柏. 水陆二仙丹合抵挡汤加减治疗早期糖尿病肾病的前瞻性研究 [J]. 西部中医药，2021，34(7)：9-12.

[13] 张佳华，宁洪悦，安丽萍，等. 基于 GSK-3β/CREB 信号通路探讨加味肾气丸减轻糖尿病小鼠肾间质纤维化的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(16)：162-169.

[14] LI A, GAO M, LIU B, et al. Mitochondrial autophagy: molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(5)：444.

[15] VALENCIA W M, FLOREZ H. How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control [J]. BMJ, 2017, 356: i6505.

[16] XUE R, GUI D, ZHENG L, et al. Mechanistic insight and management of diabetic nephropathy: recent progress and future perspective [J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 1839809.

中国知网 https://www.cnki.net

[17] ZHANG L,LONG J,JIANG W,et al. Trends in Chronic Kidney Disease in China [J]. N Engl J Med,2016,375(9):905-906.
[18] TUTTLE KR,BROSIUS FC 3RD,CAVENDER M A,et al. SGLT2 Inhibition for CKD and cardiovascular disease in type 2 diabetes: report of a scientific workshop sponsored by the national kidney foundation [J]. Diabetes,2021,70(1):1-16.
[19] 靳玉秋,陈光顺,白敏,等. 真武汤调控 ROCK/IKK/NF-κB 通路关键分子表达改善脾肾阳虚型 DN 小鼠肾脏炎症损伤的机制研究 [J]. 中国中药杂志,2023,48(18):5041-5048.
[20] 魏聪,吴以岭,贾振华,等. 通肾络胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏蛋白激酶 C 通路及细胞外基质成分的影响 [J]. 中华中医药学刊,2008,26(2):271-273.
[21] 吕仁和,赵进喜. 糖尿病及其并发症中西医诊治学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社,2009:458-470.
[22] 徐旻,姜威,陈以平. 陈以平中西汇通辨治糖尿病肾脏病经验 [J]. 山西中医,2021,37(9):7-9.
[23] 孙健,南征. 南征运用消渴肾安汤治疗糖尿病肾病经验 [J]. 中国中医基础医学杂志,2020,26(6):847-849.
[24] 纪柯伊,李根林,吴宿慧,等. 基于“肾虚络瘀”理论探讨糖尿病肾脏疾病自噬机制及中药干预进展 [J]. 中药材,2023,46(11):2895-2900.
[25] 黄小洪,陈海燕,李芳婵,等. 三方益子方与 3 种不同补肾方对肾阳虚多尿模型大鼠的药效学研究 [J]. 中国医院药学杂志,2023,43(19):2154-2160,2178.
[26] 杨帆,曹晨,方敬,等. 水蛭冻干粉对糖尿病肾病大鼠肾组织损伤的保护作用 [J]. 中草药,2021,53(4):1020-1025.
[27] 郭建恩,高志旭,张佳华,等. 水陆二仙丹合抵挡汤加减方对早中期糖尿病肾病患者血管内皮功能的影响 [J]. 承德医学院学报,2024,41(3):213-217.
[28] 郭建恩,张佳华,张园,等. 水陆二仙丹联合抵挡汤加减方对早中期糖尿病肾病患者的临床疗效 [J]. 中成药,2024,46(5):1514-1519.
[29] XIE Y,LAN F,ZHAO J,et al. Hirudin improves renal interstitial fibrosis by reducing renal tubule injury and inflammation in unilateral ureteral obstruction(UUO) mice [J]. Int Immunopharmacol,2020,81:106249.
[30] 赵艺璇,彭薇,田蓓晨,等. 鸢尾素通过激活 AMPK 抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞线粒体损伤 [J]. 华中科技大学学报: 医学版,2023,52(3):340-344.
[31] 王欣茹,郭兆安. 线粒体自噬对肾小管间质纤维化的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志,2024,25(2):156-158.
[32] 陆晓华,金桂芳,余河汉,等. 基于 PINK1/Parkin 信号通路研究细叶远志皂苷对 AD 模型小鼠脑组织线粒体自噬的影响 [J]. 中国药房,2021,32(22):2748-2754.
[33] 王颖超,陈晔欣,张华,等. 糖尿病肾脏疾病与“肠-肾轴”研究进展 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志,1-16 [2025-05-15]. https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20251125.
[34] 王香香,凌江红,王煜姣,等. Pink1/Parkin 信号通路调控线粒体自噬的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学,2022,41(4):919-926.
[35] KIM Y,PARK J,KIM S,et al. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation [J]. Biochem Biophys Res Commun,2008,377(3):975-980.
[36] TANAKA K. The PINK1-Parkin axis: An Overview [J]. Neurosci Res,2020,159:9-15.
[37] 金华,张叶青,呼琴,等. 清肾颗粒对大鼠 NRK-52E 细胞转分化模型 miR-23b 和 PINK1/Parkin 通路的影响 [J]. 中国药理学通报,2024,40(1):162-170.
[38] WANG W,SUN W,CHENG Y,et al. Role of sirtuin-1 in diabetic nephropathy [J]. J Mol Med(Berl),2019,97(3):291-309.
[39] YANG N,LIU C,WANG D W,et al. Metformin alleviates nerve injury in stroke rats by regulating SIRT1/PGC-1α pathway through miR-29c [J]. Chinese Journal of Patho physiology,2021,37(1):78-83.
[40] 杨帆,张晓云,高俊侠,等. 加减补阳还五汤通过 SIRT1 途径激活自噬改善糖尿病肾病小鼠肾组织损伤 [J]. 天津中医药,2024,41(4):495-502.
[41] KOH J H,KIM J Y. Role of PGC-1α in the mitochondrial NAD + pool in metabolic diseases [J]. Int J Mol Sci,2021,22(9):4558.
[42] GARNIER A,FORTIN D,ZOLL J,et al. Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle [J]. FASEB J,2005,19(1):43-52.
[43] CARTONI R,LÉGER B,HOCK M B,et al. Mitofusins 1/2 and ER-Ralpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise [J]. J Physiol,2005,567(Pt 1):349-358.
[44] CAO Y,CHEN Z,HU J,et al. Mfn2 regulates high glucose-induced MAMs dysfunction and apoptosis in podocytes via PERK pathway [J]. Front Cell Dev Biol,2021,9:769213.
[45] 顾悦,郑琳琳,郭登洲. 基于 AKAP1/Drp1 信号通路探讨当归补血汤对糖尿病肾病大鼠足细胞线粒体分裂及凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(15):38-45.
[46] 张晴,王俭勤. 肠道菌群及其代谢产物在糖尿病肾病中的研究进展 [J]. 中国医药,2024,19(6):951-955.

(2024-07-10 收稿　本文编辑: 张晓辉,芮莉莉)

中国知网 https://www.cnki.net