

落新妇苷对慢性肾功能衰竭大鼠肾损伤的影响及机制^Δ

高晓卫^{1*}, 刘迎迎^{2#}, 韩 聪², 郝世飞³(1. 山东中医药大学附属医院急诊科, 济南 250011; 2. 山东中医药大学附属医院肾病科, 济南 250011; 3. 山西省人民医院康复医学科, 太原 030012)

中图分类号 R965; R692.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)04-0434-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.04.08



摘要 目的 基于Jagged-1/Notch-1信号通路探讨落新妇苷(AST)对慢性肾功能衰竭(CRF)大鼠肾损伤的影响及潜在机制。方法 以5/6肾切除术法构建CRF模型,并将造模成功的大鼠随机分为模型组(Model组)、AST低剂量组(AST-L组)、AST高剂量组(AST-H组)、AST高剂量+Notch通路激活剂(Jagged1/FC嵌合蛋白,简称“JFC”)组(AST-H+JFC组),另设开腹不切除的对照组(CK组),每组10只。AST-L组和AST-H组大鼠分别灌胃40、80 mg/kg的AST,AST-H+JFC组大鼠同时灌胃80 mg/kg的AST和0.5 mg/kg的JFC,CK组和Model组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续4周。末次给药后,检测各组大鼠血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(SCr)、24 h尿液尿蛋白(UP)水平以及血清乳酸脱氢酶(LDH)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-10水平;观察其肾组织形态和纤维化情况,检测肾组织线粒体中腺苷三磷酸(ATP)含量和钠钾ATP酶、钙镁ATP酶活性,以及肾组织中转化生长因子 β (TGF- β)、低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、切割型胱天蛋白酶3(cleaved-caspase-3)、Jagged-1、Notch-1蛋白的表达水平。**结果** 与CK组比较,Model组大鼠肾组织损伤明显,肾组织纤维化严重;其血清BUN、SCr和尿液UP水平,血清LDH、TNF- α 、IL-6水平,以及肾组织中TGF- β 、HIF-1 α 、 α -SMA、cleaved-caspase-3、Jagged-1、Notch-1蛋白的表达水平均显著升高,血清IL-10水平以及肾组织线粒体中ATP含量和钠钾ATP酶、钙镁ATP酶活性均显著降低($P < 0.05$)。与Model组比较,AST各剂量组大鼠肾组织损伤和纤维化均有所减轻;其血清BUN、SCr和尿液UP水平,血清LDH、TNF- α 、IL-6水平,以及肾组织中TGF- β 、HIF-1 α 、 α -SMA、cleaved-caspase-3、Jagged-1、Notch-1蛋白的表达水平均显著降低,血清IL-10水平以及肾组织线粒体中ATP含量和钠钾ATP酶、钙镁ATP酶活性均显著升高,且AST-H组上述指标的变化较AST-L组明显($P < 0.05$)。JFC可显著逆转高剂量AST对CRF大鼠肾损伤的改善作用($P < 0.05$)。**结论** AST可减轻CRF大鼠炎症、肾组织损伤和纤维化,改善肾组织线粒体能量代谢,上述作用可能与抑制Jagged-1/Notch-1信号通路有关。

关键词 落新妇苷;慢性肾功能衰竭;肾损伤;肾纤维化;Jagged-1/Notch-1信号通路

Effects and mechanism of astilbin on renal injury in chronic renal failure rats

GAO Xiaowei¹, LIU Yingying², HAN Cong², HAO Shifei³ (1. Dept. of Emergency, the Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China; 2. Dept. of Nephrology, the Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China; 3. Dept. of Rehabilitation Medicine, Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030012, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effect and potential mechanism of astilbin (AST) on renal injury in chronic renal failure (CRF) rats based on the Jagged-1/Notch-1 signaling pathway. **METHODS** CRF model was constructed by 5/6 nephrectomy. The successfully modeled rats were randomly separated into Model group, AST low-dose group (AST-L group), AST high-dose group (AST-H group), high-dose of AST+Notch pathway activator (Jagged-1/FC chimerin, referred to as “JFC”) group (AST-H+JFC group), and control group (CK group) for open surgery without resection was set up, with 10 rats in each group. The rats in the AST-L group and AST-H group were given 40 and 80 mg/kg AST, respectively; the rats in the AST-H+JFC group were simultaneously given 80 mg/kg AST and 0.5 mg/kg JFC, and the rats in the CK group and Model group were given an equal volume of normal saline, once a day, for 4 weeks. After the last administration, the serum levels of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), and the level of 24 h urinary protein (UP) in urine, as well as the serum levels of lactate dehydrogenase (LDH), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-10 in each group were detected. The morphology and fibrosis of renal tissue were observed. The content of adenosine triphosphate (ATP) and the activities of sodium-potassium ATPase and calcium-magnesium ATPase in mitochondria of renal tissue were detected. The protein expressions of transforming growth factor- β (TGF- β), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), α -smooth muscle actin (α -SMA), cleaved-caspase-3, Jagged-1 and Notch-1 in renal tissue were also observed. **RESULTS** Compared with CK group, the renal tissue of rats in the Model group was obviously damaged, renal tissue fibrosis was severe; the serum BUN and SCr levels, urine UP level, serum

^Δ 基金项目 山东省医药卫生科技发展计划项目 (No. 2019WS578)

* 第一作者 主治医师, 硕士。研究方向: 中医内科学、中医药治疗肾系疾病。E-mail: gxw1981g@163.com

通信作者 副主任医师, 硕士。研究方向: 中医药治疗肾系疾病。E-mail: w06mwu@163.com

LDH, TNF- α and IL-6 levels, as well as the protein expressions of TGF- β , HIF-1 α , α -SMA, cleaved-caspase-3, Jagged-1 and Notch-1 in renal tissue were significantly increased, while the serum IL-10 level, ATP content and activities of sodium-potassium ATPase and calcium-magnesium ATPase in mitochondria of renal tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with Model group, the renal tissue damage and fibrosis in the AST groups were reduced, the serum BUN and SCr levels, urine UP level, serum LDH, TNF- α and IL-6 levels, and the protein expressions of TGF- β , HIF-1 α , α -SMA, cleaved-caspase-3, Jagged-1 and Notch-1 were significantly decreased, while the serum IL-10 level, ATP content and the activities of sodium-potassium ATPase and calcium-magnesium ATPase in mitochondria were significantly increased; the changes in the aforementioned indicators in AST-H group were more significant than those in the AST-L group ($P < 0.05$). JFC could significantly reverse the improvement effect of high dose of AST on renal injury in CRF rats ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** AST can reduce inflammation in CRF rats, alleviate renal tissue damage and fibrosis, and improve renal mitochondrial capacity metabolism, possibly by inhibiting the Jagged-1/Notch-1 signaling pathway.

KEYWORDS astilbin; chronic renal failure; renal injury; renal fibrosis; Jagged-1/Notch-1 signaling pathway

慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)是由多种原因造成的慢性进行性肾实质损害,可造成患者肾脏萎缩和肾小球滤过率降低,以代谢物滞留、肾纤维化和水、电解质、酸碱失衡为主要临床表现,同时还伴有高血压、胃肠道疾病等多种并发症^[1]。CRF早期症状不明显,容易被临床忽视,加之患者对该病的认识程度较低,导致很多患者确诊时已进入中晚期。目前,对于早中期CRF患者,临床多进行对症治疗;对于终末期CRF患者,临床则主要采用透析和肾移植,但治疗费用较高,患者预后不佳^[2]。因此,开发安全、有效的新药对CRF的临床治疗具有重要意义。

中药因毒副作用低而在CRF治疗领域具有较大优势。落新妇苷(astilbin, AST)是首次从落新妇根茎中提取到的天然化合物,同时也存在于土茯苓、菝葜等多种药用植物中。该成分具有抗炎、抗氧化等诸多药理作用,可减少高糖诱导的肾小管上皮细胞自噬和凋亡,可通过抑制内质网应激来减少肾组织细胞凋亡,从而改善肾损伤^[3-4],但具体作用机制尚不明确。Jagged-1/Notch-1信号通路可参与调控细胞生长、分化、凋亡等多种生物学过程^[5]。研究显示,抑制Jagged-1/Notch-1信号通路可抑制肾小管上皮细胞上皮间质转化,减少其胶原沉积,从而减轻肾损伤和肾纤维化^[5-6]。由此课题组推测,Jagged-1/Notch-1信号通路可能是药物治疗CRF的潜在靶点。研究显示,土茯苓、乌梅配伍可通过抑制Notch信号通路来改善银屑病小鼠的皮损症状,且效果优于土茯苓单用,这可能与乌梅能增加土茯苓有效成分AST的溶出有关^[7]。基于上述研究,本研究从Jagged-1/Notch-1信号通路出发,拟初步探讨AST对CRF大鼠肾损伤的改善作用及潜在机制,以期对CRF相关药物研发及临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

ReadMax1900型光吸收全波长酶标仪购自上海閃谱生物科技有限公司;VMM4200R型显微镜购自迈格仪器(苏州)有限公司;LD-3060V型组织切片机购自山东安屿生物科技有限公司;120VP型全自动生化分析仪购

自成都斯马特科技股份有限公司;WD-9413D型凝胶成像系统购自北京六一生物科技有限公司。

1.2 主要药品与试剂

AST对照品(批号29838-67-3,纯度 $\geq 98\%$)购自西安汇林生物科技有限公司;Notch-1通路激活剂Jagged-1/FC嵌合蛋白(简称“JFC”;批号HY-P1846A,纯度99.89%)购自美国MCE公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-10酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为P54382、M74281、P54603、P54314)均购自上海传秋生物科技有限公司;腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)、钠钾ATP酶和钙镁ATP酶试剂盒(批号分别为ABP55523、KTB1800-1、KTB1810-1)均购自亚科因(武汉)生物科技有限公司;苏木精-伊红(HE)、Masson染色试剂盒(批号分别为S3507、S4162)均购自上海富衡生物科技有限公司;兔源转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)抗体(批号为3711)购自美国CST公司;兔源低氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)抗体、兔源 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体、兔源切割型胱天蛋白酶3(cleaved-caspase-3)抗体、兔源Jagged-1抗体、鼠源Notch-1抗体、兔源 β -肌动蛋白(β -actin)抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、抗鼠免疫球蛋白G二抗(批号分别为ab179483、ab124964、ab32042、ab109536、ab280898、ab8227、ab6721、ab205719)均购自英国Abcam公司;血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(serum creatinine, SCr)、尿蛋白(urinary protein, UP)生化试剂盒(批号分别为C013-2-1、C011-2-1、C035-2-1)均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验动物

SPF级SD雄性大鼠60只,体重190~210 g,购自山东艾茂达康生命科学有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鲁)2023 0010。所有动物均饲养于温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度(60 \pm 5)%、光照12 h/黑暗12 h循环的环境中,自由摄食、饮水。本实验在烟台蓝纳成生物技术

有限公司进行,实验方案经该公司实验动物伦理委员会审批,审批号为2024-03-232。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

取50只大鼠,采用5/6肾切除术建立CRF模型:将大鼠麻醉后以俯卧位固定,背部剃毛后消毒,于肋脊角左下约1 cm处切一小口,暴露左肾,结扎肾蒂,分别切除左肾上、下1/3,止血后复位,缝合并消毒;7 d后,同法完全摘除右肾。若大鼠BUN、SCr水平较对照组(CK组)大鼠高1倍以上,则表明CRF模型构建成功^[8]。另取10只大鼠,打开腹腔,暴露肾脏,剔除肾筋膜但不进行切除操作,作为CK组。本研究共有42只大鼠造模成功,随机选取其中40只,分为模型组(Model组)、AST低剂量组(AST-L组)、AST高剂量组(AST-H组)、AST高剂量+Notch-1通路激活剂组(AST-H+JFC组),每组10只。AST-L组和AST-H组大鼠分别灌胃40、80 mg/kg的AST(以二甲基亚砷为溶剂)^[9],AST-H+JFC组大鼠同时灌胃80 mg/kg的AST(以二甲基亚砷为溶剂)^[9]和0.5 mg/kg的JFC(以水为溶剂)^[10],CK组和Model组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续4周。

2.2 大鼠血清BUN、SCr及尿液UP水平检测

末次给药后,各组大鼠禁食、不禁水12 h,收集其24 h尿液,并于腹主动脉取血3 mL(血样离心10 min,收集上层血清),使用全自动生化分析仪检测其血清BUN、SCr水平和24 h尿液UP水平。

2.3 大鼠血清LDH、TNF- α 、IL-6、IL-10水平检测

取“2.2”项下各组大鼠血清适量,按相应ELISA试剂盒说明书操作,使用酶标仪检测其血清LDH、TNF- α 、IL-6、IL-10水平。

2.4 大鼠肾组织形态观察

取血后,以颈椎脱臼法将各组大鼠处死,剖取肾脏。随机选择每组5只大鼠的左肾组织,以4%多聚甲醛溶液固定后脱水,以石蜡包埋并切片,根据HE染色试剂盒说明书方法操作,依次进行苏木精、伊红染色后,使用显微镜观察其肾组织形态。

2.5 大鼠肾组织纤维化观察

取“2.4”项下各组大鼠肾组织切片,脱蜡、清洗后,以苏木精染色10 min;清洗,以磷钼酸浸染3 min后,用苯胺蓝染液染色5 min;以1%冰醋酸浸泡后,用无水乙醇脱水,用二甲苯透明,封片,使用显微镜观察其肾组织纤维化情况。

2.6 大鼠肾组织线粒体中ATP含量和钠钾ATP酶、钙镁ATP酶活性检测

取各组剩余5只大鼠的肾组织适量,加入裂解液研磨匀浆,于4℃下离心5 min \times 2次;取上清液,再于4℃下离心10 min,取沉淀(即线粒体),以缓冲液0.3 mL重悬,并于4℃下离心5 min;取上清液,按相应试剂盒说明书方法操作,采用微量法以酶标仪检测其肾组织线粒

体中ATP含量和钠钾ATP酶、钙镁ATP酶活性。

2.7 大鼠肾组织中相关蛋白表达检测

取“2.6”项下各组大鼠的肾组织适量,提取总蛋白并定量检测,随后于热水浴中变性。取变性蛋白适量,经电泳分离、转膜后封闭2 h;洗膜后,加入TGF- β 、HIF-1 α 、 α -SMA、cleaved-caspase-3、Jagged-1、Notch-1、 β -actin一抗(稀释比例均为1:1 500),于4℃下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为1:5 000),于室温下孵育2 h;洗膜后,以ECL显色,置于凝胶成像系统下成像。以 β -actin为内参,使用Image-Pro Plus软件对各目的蛋白的条带灰度值进行分析,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值作为目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0.1软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK- q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 AST对大鼠血清BUN、SCr和尿液UP水平的影响

与CK组比较,Model组大鼠血清BUN、SCr水平和尿液UP水平均显著升高($P<0.05$);与Model组比较,AST-L、AST-H组大鼠血清BUN、SCr水平和尿液UP水平均显著降低,且AST-H组显著低于AST-L组($P<0.05$);与AST-H比较,AST-H+JFC组大鼠血清BUN、SCr水平和尿液UP水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 AST对大鼠血清BUN、SCr和尿液UP水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	血清BUN/(mmol/L)	血清SCr/(μ mol/L)	尿液UP/mg
CK组	6.24 \pm 0.98	48.27 \pm 6.32	6.28 \pm 1.14
Model组	19.53 \pm 2.41 ^a	256.83 \pm 31.76 ^a	34.57 \pm 4.38 ^a
AST-L组	15.36 \pm 1.72 ^b	192.76 \pm 24.91 ^b	26.84 \pm 3.12 ^b
AST-H组	10.68 \pm 1.54 ^{bc}	137.42 \pm 16.58 ^{bc}	15.96 \pm 2.23 ^{bc}
AST-H+JFC组	16.87 \pm 2.13 ^d	213.65 \pm 27.47 ^d	29.43 \pm 3.76 ^d

a:与CK组比较, $P<0.05$;b:与Model组比较, $P<0.05$;c:与AST-L组比较, $P<0.05$;d:与AST-H组比较, $P<0.05$ 。

3.2 AST对大鼠血清LDH、TNF- α 、IL-6、IL-10水平的影响

与CK组比较,Model组大鼠血清LDH、TNF- α 、IL-6水平均显著升高,IL-10水平显著降低($P<0.05$);与Model组比较,AST-L、AST-H组大鼠血清LDH、TNF- α 、IL-6水平均显著降低,IL-10水平均显著升高,且AST-H组上述指标的变化较AST-L组明显($P<0.05$);与AST-H组比较,AST-H+JFC组大鼠血清LDH、TNF- α 、IL-6水平均显著升高,IL-10水平显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

3.3 AST对大鼠肾组织形态的影响

CK组大鼠肾小管和肾小球形态较为完整,没有明显病变;Model组大鼠肾小球基底膜明显增生、系膜扩

表2 AST对大鼠血清LDH、TNF- α 、IL-6、IL-10水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	LDH(U/L)	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)	IL-10(ng/L)
CK组	2.36 \pm 0.38	45.62 \pm 5.93	32.63 \pm 4.18	114.57 \pm 16.24
Model组	9.52 \pm 1.47 ^a	168.73 \pm 21.42 ^a	128.24 \pm 15.76 ^a	21.38 \pm 3.49 ^a
AST-L组	7.21 \pm 1.13 ^b	126.35 \pm 17.56 ^b	95.48 \pm 12.37 ^b	52.67 \pm 7.12 ^b
AST-H组	4.74 \pm 0.65 ^{bc}	81.47 \pm 9.84 ^{bc}	61.32 \pm 8.45 ^{bc}	84.75 \pm 10.38 ^{bc}
AST-H+JFC组	7.85 \pm 1.26 ^d	134.86 \pm 17.39 ^d	103.86 \pm 14.64 ^d	47.92 \pm 6.23 ^d

a: 与CK组比较, $P < 0.05$; b: 与Model组比较, $P < 0.05$; c: 与AST-L组比较, $P < 0.05$; d: 与AST-H组比较, $P < 0.05$ 。

张,小管空泡化且上皮细胞肿胀坏死明显,间质有明显炎症,被膜和周围皮质区有纤维组织增生;AST-L、AST-H组大鼠肾组织上述损伤有所减轻,且AST-H组优于AST-L组;与AST-H组相比,AST-H+JFC组大鼠肾组织上述损伤明显加重。结果见图1。

3.4 AST对大鼠肾组织纤维化的影响

CK组大鼠肾组织无明显纤维化;Model组大鼠肾组织纤维化较为明显;AST-L、AST-H组大鼠肾组织纤维化明显减轻,且AST-H组优于AST-L组;与AST-H组相比,AST-H+JFC组大鼠肾组织纤维化明显加重。结果见图2。

3.5 AST对大鼠肾组织线粒体能量代谢的影响

与CK组比较,Model组大鼠肾组织线粒体中ATP含量和钠钾ATP酶、钙镁ATP酶活性均显著降低($P < 0.05$);与Model组比较,AST-L、AST-H组大鼠肾组织线粒体中ATP含量和钠钾ATP酶、钙镁ATP酶活性均显著升高,且AST-H组显著高于AST-L组($P < 0.05$);与AST-H组比较,AST-H+JFC组大鼠肾组织线粒体中ATP含量和钠钾ATP酶、钙镁ATP酶活性均显著降低($P < 0.05$)。结果见表3。

3.6 AST对大鼠肾组织中相关蛋白表达的影响

与CK组比较,Model组大鼠肾组织中TGF- β 、HIF-1 α 、 α -SMA、cleaved-caspase-3、Jagged-1、Notch-1蛋白的

表3 AST对大鼠肾组织线粒体中ATP含量和钠钾ATP酶、钙镁ATP酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	ATP(mmol/g)	钠钾ATP酶[mol Pi/(mg·h)]	钙镁ATP酶[mol Pi/(mg·h)]
CK组	2.14 \pm 0.19	5.82 \pm 0.37	3.27 \pm 0.15
Model组	0.92 \pm 0.08 ^a	2.61 \pm 0.18 ^a	1.43 \pm 0.19 ^a
AST-L组	1.35 \pm 0.12 ^b	3.47 \pm 0.21 ^b	2.16 \pm 0.18 ^b
AST-H组	1.76 \pm 0.18 ^{bc}	4.56 \pm 0.32 ^{bc}	2.68 \pm 0.24 ^{bc}
AST-H+JFC组	1.27 \pm 0.13 ^d	3.24 \pm 0.26 ^d	1.92 \pm 0.23 ^d

a: 与CK组比较, $P < 0.05$; b: 与Model组比较, $P < 0.05$; c: 与AST-L组比较, $P < 0.05$; d: 与AST-H组比较, $P < 0.05$ 。

表达水平均显著升高($P < 0.05$);与Model组比较,AST-L、AST-H组大鼠肾组织中上述蛋白的表达水平均显著降低,且AST-H组显著低于AST-L组($P < 0.05$);与AST-H组比较,AST-H+JFC组大鼠肾组织中上述蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见图3、表4。

4 讨论

CRF是由各种慢性肾脏疾病引起的进行性疾病,可导致肾组织结构和功能异常,直至最终衰竭,进而发展为终末期肾病。据统计,全球每年新增慢性肾脏疾病患者约2 000万例,是全球发病率和死亡率均较高的疾病之一,对人类健康构成严重威胁^[11]。肾间质纤维化是CRF的组织学特征,是患者肾功能丧失的重要因素,因此如何改善肾间质纤维化、延缓CRF疾病进程、改善患者生活质量是防治慢性肾脏疾病和终末期肾病的关键^[12]。目前,临床尚无针对CRF的特效药物,常规治疗措施只能减缓患者病情恶化,因此开发新的治疗药物具有现实意义。

AST是一种天然黄酮类化合物,可减轻慢性肾损伤大鼠的肾组织纤维化,改善肾脏形态,对肾脏具有一定保护作用^[4]。Zhang等^[13]研究显示,AST可抑制镉诱导的鲤鱼肾淋巴细胞的氧化应激和凋亡,减轻肾损伤。CRF是一种肾功能障碍疾病,可导致肾萎缩和肾小球滤过率降低,造成蛋白渗出,当渗出量超出肾小管重吸收极限

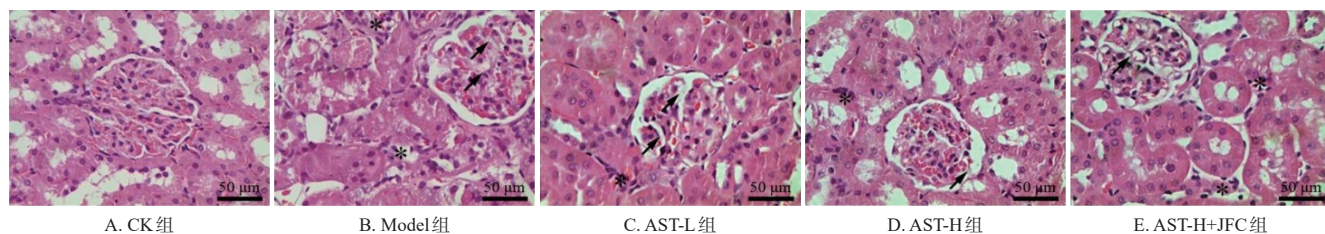


图1 各组大鼠肾组织形态观察的显微图(HE染色)

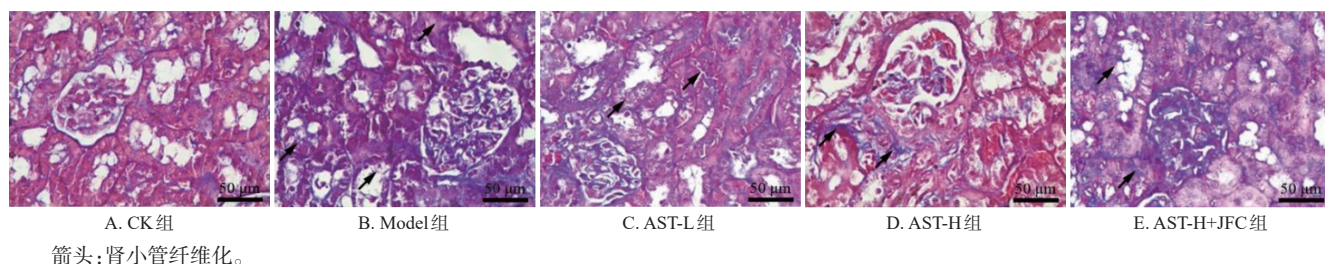
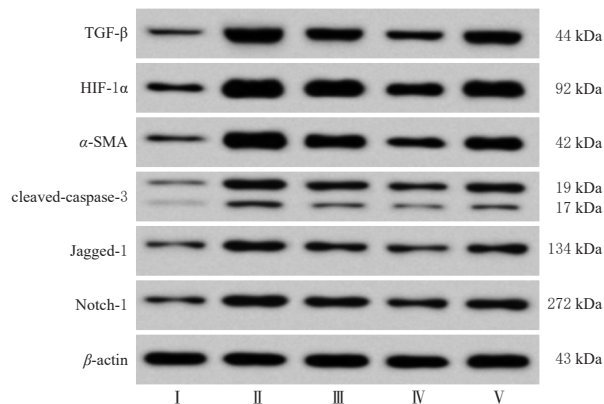


图2 各组大鼠肾组织纤维化观察的显微图(Masson染色)



I : CK组; II : Model组; III : AST-L组; IV : AST-H组; V : AST-H+JFC组。

图3 各组大鼠肾组织中相关蛋白表达的电泳图

表4 AST对大鼠肾组织中相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	TGF-β	HIF-1α	α-SMA	cleaved-caspase-3	Jagged-1	Notch-1
CK组	0.39±0.05	0.45±0.06	0.32±0.05	0.17±0.03	0.26±0.04	0.21±0.03
Model组	1.86±0.21 ^a	2.14±0.25 ^a	1.58±0.17 ^a	0.78±0.11 ^a	0.93±0.12 ^a	0.84±0.11 ^a
AST-L组	1.34±0.16 ^b	1.62±0.19 ^b	1.17±0.14 ^b	0.62±0.08 ^b	0.75±0.09 ^b	0.68±0.08 ^b
AST-H组	0.73±0.10 ^c	0.97±0.12 ^c	0.68±0.09 ^c	0.41±0.06 ^c	0.51±0.07 ^c	0.45±0.06 ^c
AST-H+JFC组	1.45±0.17 ^d	1.73±0.21 ^d	1.26±0.15 ^d	0.67±0.09 ^d	0.81±0.01 ^d	0.73±0.09 ^d

a: 与CK组比较, $P<0.05$; b: 与Model组比较, $P<0.05$; c: 与AST-L组比较, $P<0.05$; d: 与AST-H组比较, $P<0.05$ 。

后,将会形成蛋白尿;另外,肾脏受损后,血液中BUN、SCr排出受阻,使得体内BUN、SCr水平明显增高^[3]。本研究结果显示,Model组大鼠血清BUN、SCr和尿液UP水平均较CK组显著升高,提示其肾功能明显下降,模型构建成功;经AST干预后,大鼠血清BUN、SCr和尿液UP水平均较Model组显著降低,提示其肾功能有所改善。

研究显示,持续的微炎症是引发CRF的重要原因,大量炎症介质(TNF-α、IL-6等)分泌、渗出可激活氧自由基,产生大量的细胞外基质,从而促进肾组织纤维化,加速CRF进展^[14]。本研究结果显示,Model组大鼠血清促炎因子TNF-α、IL-6水平均较CK组显著升高,抗炎因子IL-10水平较CK组显著降低;经AST干预后,大鼠上述促炎因子水平均较Model组显著降低,抗炎因子水平均较Model组显著升高,提示大鼠肾组织炎症性损伤有所改善。

肾间质纤维化是CRF的组织学特征,在此过程中,大量成纤维细胞及肌成纤维细胞增生,细胞外基质堆积,从而导致肾小球硬化,促进肾间质纤维化,加速CRF的发生发展^[15]。TGF-β、α-SMA、HIF-1α是评估纤维化程度的标志蛋白^[8]。本研究结果显示,Model组大鼠肾组织TGF-β、α-SMA、HIF-1α蛋白的表达水平均较CK组显著升高,且Masson染色显示其肾组织纤维化较CK组严重;经AST干预后,大鼠肾组织中TGF-β、α-SMA、HIF-1α蛋白的表达水平均较Model组显著降低,且Masson染色显示其肾组织纤维化较Model组有所减轻,

提示AST可改善CRF大鼠的肾组织纤维化。

肾脏是代谢高度活跃的器官,其正常运行需要消耗大量能量,而线粒体是细胞的动力源泉,能通过氧化磷酸化系统合成ATP,从而产生能量^[16]。研究指出,线粒体功能障碍可引起组织损伤和器官功能受损,与肾组织纤维化的发生发展密切相关^[17]。钠钾ATP酶和钙镁ATP酶可维持细胞内环境稳态,可通过影响线粒体对细胞质钙离子的摄取来减缓呼吸链速率,从而减少ATP的合成^[17]。本研究结果显示,AST可显著提高CRF大鼠肾组织线粒体中ATP含量和钠钾ATP、钙镁ATP酶活性,提示AST可改善其肾组织线粒体功能。

CRF可引起肾组织细胞凋亡,造成肾功能障碍^[18]。cleaved-caspase-3为凋亡蛋白,可诱导细胞凋亡^[19]。LDH主要参与细胞代谢,当细胞损伤或死亡时,LDH从细胞中流出进入血液,是细胞损伤的标志物^[20]。本研究结果显示,AST可显著降低大鼠血清LDH水平,并通过降低肾组织中cleaved caspase-3蛋白的表达水平来减少细胞凋亡,提示AST可减轻CRF大鼠肾组织细胞损伤。

Notch信号通路参与调控细胞的生理代谢过程。Jagged-1是Notch-1的配体,两者结合后可转移至细胞核,发挥相应调控作用,与肾间质纤维化的发生发展有关^[6]。金丽霞等^[21]研究表明,抑制Jagged-1/Notch-1信号通路可延缓CRF大鼠肾间质纤维化,改善肾功能。Ma等^[22]研究表明,Jagged-1/Notch-1信号通路过度激活可引起肾脏炎症、纤维化和细胞凋亡,促进肾损伤和肾功能障碍。本研究结果显示,Model组大鼠肾组织中Jagged-1、Notch-1蛋白的表达均较CK组显著上调;经AST干预后,大鼠肾组织中Jagged-1和Notch-1蛋白的表达均较Model组显著下调,提示Jagged-1/Notch-1信号通路受到抑制。为进一步确认AST的这一作用靶点,本研究在AST的基础上联用Notch-1信号通路激活剂JFC进行干预,结果显示,JFC可显著逆转AST对CRF大鼠肾损伤的改善作用,提示AST的肾保护作用可能是通过抑制Jagged-1/Notch-1信号通路来实现的。

综上所述,AST可减轻CRF大鼠炎症、肾组织损伤和纤维化,改善肾组织线粒体能量代谢,上述作用可能与抑制Jagged-1/Notch-1信号通路有关。但CRF发病机制复杂,AST对CRF大鼠的具体作用机制还需进一步探索。

参考文献

- [1] BLANKESTIJN P J, VERNOOIJ R W M, HOCKHAM C, et al. Effect of hemodiafiltration or hemodialysis on mortality in kidney failure[J]. N Engl J Med, 2023, 389(8):700-709.
- [2] VAN TONDER C B, JOUBERT G, MOODLEY A. Restless legs syndrome in chronic renal failure patients on dialysis[J]. Afr Health Sci, 2023, 23(3):764-777.
- [3] CHEN F, SUN Z Q, ZHU X G, et al. Astilbin inhibits high glucose-induced autophagy and apoptosis through

- the PI3K/Akt pathway in human proximal tubular epithelial cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106:1175-1181.
- [4] LI X Y, GE M, ZHU W F, et al. Protective effects of astilbin against cadmium-induced apoptosis in chicken kidneys via endoplasmic reticulum stress signaling pathway[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022, 200(10):4430-4443.
- [5] HE J, JIANG Y L, WANG Y, et al. Micro-vesicles from mesenchymal stem cells over-expressing miR-34a inhibit transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells *in vitro* [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2020, 133(7):800-807.
- [6] ZHANG H L, XING J M, ZHAO L W. Lysine-specific demethylase 1 induced epithelial-mesenchymal transition and promoted renal fibrosis through Jagged-1/Notch signaling pathway[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40 (Suppl. 12):S203-S214.
- [7] 刘丽娟, 吴亚运, 赵亚, 等. 土茯苓、乌梅及其配伍对银屑病样模型小鼠皮损组织炎症因子及 Notch 信号通路的影响[J]. *中医杂志*, 2022, 63(19):1880-1887.
- LIU L J, WU Y Y, ZHAO Y, et al. Effect of Tu fu ling (Rhizoma Smilacis Glabrae), Wu mei (Fructus Mume) and their compatibility on inflammatory factors and Notch signaling pathway in skin lesions of psoriasis-like model mice[J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 63(19):1880-1887.
- [8] 叶莉莹, 潘广辉, 赵平, 等. 黑地黄丸通过调控 IGF-1 表达对慢性肾衰竭大鼠肾纤维化的抑制作用[J]. *中成药*, 2024, 46(3):788-794.
- YE L Y, PAN G H, ZHAO P, et al. Inhibitory effect of Heidi Huang pills on renal fibrosis in a rat model of chronic renal failure via regulation of IGF-1 expression[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2024, 46(3):788-794.
- [9] 陈兴华, 韩露, 贡鸣, 等. 落新妇苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及机制[J]. *中国药房*, 2023, 34(10):1193-1198, 1203.
- CHEN X H, HAN L, GONG M, et al. Effects and mechanism of astilbin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *China Pharm*, 2023, 34(10):1193-1198, 1203.
- [10] 陈蓓, 连李斌. 丹皮酚抑制 Notch1/Jagged1 信号通路对妊娠糖尿病大鼠糖代谢紊乱的改善作用[J]. *河北医药*, 2023, 45(11):1632-1636.
- CHEN B, LIAN L B. Paeonol alleviates glucose metabolism disorder in gestational diabetes mellitus rats by inhibiting the Notch1/Jagged1 signaling pathway[J]. *Hebei Med J*, 2023, 45(11):1632-1636.
- [11] ZHU X Y, HAN Q, XIA L, et al. Efficacy of two hemodialyses in patients with chronic renal failure complicated by massive intracerebral hemorrhage[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2023, 10(7):1186-1199.
- [12] ZHOU L, WANG X H, ZHANG Y, et al. Renal metabolomics study and critical pathway validation of Shenkang injection in the treatment of chronic renal failure[J]. *Biol Pharm Bull*, 2024, 47(2):499-508.
- [13] ZHANG H R, ZHAO F Q, GAI X X, et al. Astilbin attenuates apoptosis induced by cadmium through oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio* L.) head kidney lymphocyte [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2022, 125:230-237.
- [14] MEMI G, YAZGAN B. Adropin and spexin hormones regulate the systemic inflammation in adenine-induced chronic kidney failure in rat[J]. *Chin J Physiol*, 2021, 64(4):194-201.
- [15] 付会玲, 尹伟男, 贾琳, 等. 白芍总苷通过缓解微炎症状态和减缓纤维化进程延缓慢性肾衰竭[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(6):1345-1348.
- FU H L, YIN W N, JIA L, et al. Total glucosides of paeony can delay chronic renal failure by relieving micro-inflammation and slowing down the process of fibrosis[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2023, 34(6):1345-1348.
- [16] HO H J, SHIRAKAWA H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease[J]. *Cells*, 2022, 12(1):88.
- [17] 刘晓羽, 黄志敏, 邱少彬, 等. 三七调节肾脏 PI3K/Akt/mTORC1-线粒体能量代谢治疗血瘀证慢性肾衰竭大鼠的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(7):1888-1895.
- LIU X Y, HUANG Z M, QIU S B, et al. Mechanism of Notoginseng Radix et Rhizoma in regulating PI3K/Akt/mTORC1-mitochondrial energy metabolism to treat chronic renal failure in rats with blood stasis syndrome[J]. *China J Chin Mater Med*, 2024, 49(7):1888-1895.
- [18] TU H T, MA D H, LUO Y Y, et al. Quercetin alleviates chronic renal failure by targeting the PI3K/Akt pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):6538-6558.
- [19] ASKARIPOUR M, NAJAFIPOUR H, SABERI S, et al. Isoflavone daidzein ameliorates renal dysfunction and fibrosis in a postmenopausal rat model: intermediation of angiotensin AT1 and Mas receptors and microRNAs 33a and 27a[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2022, 25(11):1317-1325.
- [20] HE J X, CUI J L, SHI Y M, et al. Astragaloside IV attenuates high-glucose-induced impairment in diabetic nephropathy by increasing klotho expression via the NF- κ B/NLRP3 axis[J]. *J Diabetes Res*, 2023, 2023:7423661.
- [21] 金丽霞, 张晓东, 潘超, 等. Notch 信号通路在慢性肾衰竭中的表达及芪黄补肾泄浊方的肾保护作用[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(10):2319-2324.
- JIN L X, ZHANG X D, PAN C, et al. Expression of Notch signaling pathway in chronic renal failure and the protective effect of Qihuang bushen xiezhuo formula[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2023, 34(10):2319-2324.
- [22] MA T K, LI X, ZHU Y H, et al. Excessive activation of Notch signaling in macrophages promote kidney inflammation, fibrosis, and necroptosis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:835879.

(收稿日期:2024-06-20 修回日期:2024-11-04)

(编辑:张元媛)