

雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠肾损伤的影响[△]

张冲^{1,2*}, 宋纯东^{1,2#}, 王墨³, 梁爽^{1,2}, 郭笑笑^{1,2}, 张晗寒^{1,2}, 李培嘉^{1,2}, 宋珂^{1,2}, 陈晨晨^{1,2}(1. 河南中医药大学第一附属医院儿科医院肾病紫癜二病区, 郑州 450099; 2. 河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450046; 3. 重庆医科大学附属儿童医院肾脏免疫科, 重庆 400042)

中图分类号 R965;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)07-0815-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.07.08



摘要 目的 基于肿瘤蛋白p53/微RNA-214(miR-214)/UNC-51样激酶1(ULK1)轴探讨雷公藤多苷(TWM)对糖尿病肾病(DN)大鼠肾损伤的影响。方法 将雄性SD大鼠分为正常组(6只)和造模组(28只),造模组大鼠以高脂高糖饲料喂养+链脲佐菌素腹腔注射法建立DN模型。将造模成功的大鼠分为模型组、缬沙坦组[8.33 mg/(kg·d)]、TWM组[6.25 mg/(kg·d)],每组8只。各组大鼠灌胃相应药液或生理盐水,每天1次,连续6周。末次给药后,检测各组大鼠尿液/血液中肝肾功能指标[24 h尿蛋白定量(24 h-UTP)、血尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)、白蛋白(ALB)、丙氨酸转氨酶(ALT)]、血脂指标(甘油三酯、总胆固醇)、血糖指标(空腹血糖)水平,观察其肾组织病理改变,并检测其肾组织中p53、ULK1、Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3(LC3)蛋白及mRNA和miR-214的表达情况。结果 与正常组比较,模型组大鼠肾小管上皮水肿明显,细胞肿胀,伴有淋巴细胞浸润;模型组和各药物组大鼠24 h-UTP、BUN、Scr、ALT和糖脂指标水平,p53蛋白及mRNA和miR-214的表达均显著升高或上调,而ALB水平、LC3-II/LC3-I、LC3 mRNA、ULK1、Beclin-1蛋白及mRNA的表达均显著降低或下调($P<0.01$)。与模型组比较,各药物组大鼠肾组织病理学损伤均有所好转;其24 h-UTP、BUN、Scr、ALT和糖脂指标水平,p53蛋白及mRNA和miR-214的表达均显著降低或下调,而ALB水平、LC3-II/LC3-I、LC3 mRNA、ULK1、Beclin-1蛋白及mRNA的表达均显著升高或上调($P<0.01$)。结论 TWM能减轻DN大鼠的肾损伤,改善其肝功能和糖脂水平,上述作用可能与调控p53/miR-214/ULK1轴、恢复细胞自噬有关。
关键词 雷公藤多苷;糖尿病肾病;肾损伤;自噬;p53/miR-214/ULK1轴

Effects of *Tripterygium wilfordii* multiglycoside on renal injury in rats with diabetic nephropathy

ZHANG Chong^{1,2}, SONG Chundong^{1,2}, WANG Mo³, LIANG Shuang^{1,2}, GUO Xiaoxiao^{1,2}, ZHANG Hanhan^{1,2}, LI Peijia^{1,2}, SONG Ke^{1,2}, CHEN Chenchen^{1,2}(1. Second Ward of Nephrotic Purpura, Paediatric Hospital of the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450099, China; 2. College of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. Dept. of Nephrology and Immunology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, 400042, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of *Tripterygium wilfordii* multiglycoside (TWM) on renal injury in diabetic nephropathy (DN) rats through tumor protein p53/microRNA-214 (miR-214)/UNC-51-like kinase 1 (ULK1) axis. **METHODS** Male SD rats were randomly divided into normal group ($n=6$) and modeling group ($n=28$); the modeling group was fed with high fat and high glucose plus intraperitoneal injection of streptozotocin to establish DN model. The modeled rats were randomly divided into model group, valsartan group [8.33 mg/(kg·d)] and TWM group [6.25 mg/(kg·d)], with 8 rats in each group. Rats in each group were gavaged with the corresponding medication or normal saline, once a day, for 6 consecutive weeks. After the last medication, liver and renal function indexes [24 h urinary total protein (24 h-UTP), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), albumin (ALB), alanine transaminase (ALT)], blood lipid indexes (triglycerides, total cholesterol) and blood glucose index (fasting blood glucose) in urine/blood sample of rats were detected in each group. Renal pathologic change was observed, protein and mRNA expressions of p53, ULK1, Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), and expression of miR-214 in renal tissue were also determined. **RESULTS** Compared with the normal group, the renal tubular epithelium of rats in the model group showed obvious edema, cell swelling, accompanied by lymphocyte infiltration; the levels of 24 h-UTP, BUN, Scr, ALT and glycolipid indexes, the expressions of p53 protein and mRNA, as well as the expression of miR-214 in rats in the model group and administration groups were significantly increased or up-regulated, while ALB level, LC3-II/LC3-I, the expressions of LC3 mRNA, the expressions of ULK1, Beclin-1 protein and mRNA were significantly decreased or down-regulated

△基金项目 国家自然科学基金项目(No.82074493);河南省中医药科学研究专项课题(No.2022JDZX003);河南省中医药科学研究重大专项课题(No.2023ZYD02);河南省中医药学科领军人才项目(No.豫卫中医函[2021]8号);河南省“双一流”创建学科中医学科学研究专项(No.HSRP-DFCTCM-2023-3-07)。

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:肾病的中医治疗。E-mail: 814730140@qq.com

通信作者 主任医师,教授,博士生导师,博士。研究方向:肾小球疾病的中西医诊治机制。E-mail: scd670918@126.com

($P < 0.01$). Compared with the model group, the histopathological damage of the kidney in rats was improved in administration groups; the levels of 24 h-UTP, BUN, SCr, ALT and glycolipid indexes, the expressions of p53 protein and mRNA, as well as the expression of miR-214 were all significantly decreased or down-regulated, while ALB level, LC3- II/LC3- I, the expressions of LC3 mRNA, the expressions of ULK1 and Beclin-1 protein and mRNA were significantly increased or up-regulated ($P < 0.01$).

CONCLUSIONS TG can alleviate renal damage in DN rats, and improve their liver and renal function, as well as glucose and lipid levels. These effects may be related to the regulation of the p53/miR-214/ULK1 axis and the restoration of cellular autophagy.

KEYWORDS *Tripterygium wilfordii* multiglycoside; diabetic nephropathy; renal injury; autophagy; p53/miR-214/ULK1 axis

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是以蛋白尿持续和肾小球滤过率下降为主要表现的慢性肾脏病,是引发终末期肾脏病的重要因素之一,严重影响患者的生活质量^[1]。目前, DN的治疗主要是通过控制血糖来延缓病情的发展,但效果甚微^[2]。研究表明,肾小管细胞自噬减少是诱发DN的病理因素之一,调控自噬在维持肾脏稳态方面具有至关重要的作用^[3]。由此推测,调控细胞自噬水平,使其趋于正常、稳定,可能是治疗DN的重要途径之一。

肿瘤蛋白p53是细胞自噬的关键调节因子,存在于近曲小管上皮细胞的细胞核内,可促进自噬相关蛋白Beclin-1的泛素化,从而引发自噬^[4];而微RNA-214(miRNA-214, miR-214)可通过靶向结合p53来抑制下游UNC-51样激酶1(UNC-51-like kinase 1, ULK1)通路,从而抑制细胞自噬^[5-7]。此外,有研究者指出,抑制p53、miR-214活性或恢复ULK1表达,均可能改善自噬受损^[8]。由此可见, p53/miR-214/ULK1轴可能在DN的发生发展过程中发挥了关键作用。

雷公藤多苷(*Tripterygium wilfordii* multiglycoside, TWM)被称为“中草药激素”,是将雷公藤根去皮后精制而成的一种脂溶性混合物,可通过抑制炎症反应、调节自噬、延缓肾纤维化等途径来改善DN^[9-10]。尽管目前尚无直接研究证实TWM与p53/miR-214/ULK1轴有关,但鉴于TWM可调节细胞自噬,且该信号轴在自噬调控中具有关键作用,遂本课题组推测TWM或许能通过调控此信号轴来恢复细胞自噬水平,从而减轻DN大鼠的肾损伤。基于此,本研究拟构建DN大鼠模型,以p53/miR-214/ULK1轴出发,初步探讨TWM对DN大鼠肾组织的保护作用,以期TWM的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括AU5800型全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter公司)、BA400型全自动特定蛋白分析仪(西班牙BioSystems公司)、SCG-W2000型化学发光成像系统(武汉赛维尔生物科技有限公司)、Eclipse Ci-L型正置光学显微镜(日本Nikon公司)、鱼跃悦准I型(710)血糖仪(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司)、CRX Connect型荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司)等。

1.2 主要药品与试剂

TWM片(批号230801,规格10 mg)购自江苏美通制药有限公司;缬沙坦胶囊(批号X3156,规格80 mg)购自北京诺华制药有限公司;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ;批号102651899)购自美国Sigma公司;柠檬酸钠缓冲液(批号2312005)购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)、p53、ULK1、Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗、RNA提取液(货号分别为GB15003、GB15627、29005-1-AP、GB112053、GB113801、GB23303、G3013)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;鱼跃血糖试纸(批号1311065)购自江苏鱼跃医疗设备股份有限公司;血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(serum creatinine, SCr)、白蛋白(albumin, ALB)、丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、葡萄糖测定试剂盒(批号分别为AUZ3094、AUZ2544、AUZ3215、AUZ3165、AUZ3171、AUZ3140、AUZ2287)均购自美国Beckman Coulter公司;PCR所用引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计、合成。

1.3 实验动物与饲料

34只6~8周龄的SPF级雄性SD大鼠,购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,动物生产许可证号为SCXK(豫)2019-0002。所有大鼠均饲养于河南中医药大学第一附属医院动物实验中心[环境温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度40%~70%,昼夜各12 h循环],自由摄食、饮水。本实验方案经河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理委员会审查,批准文号为FYDW2024003。

高糖高脂饲料和普通饲料分别购自北京华阜康生物科技股份有限公司和辽宁长生生物技术股份有限公司。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

34只大鼠以普通饲料适应性喂养7 d,测得其血糖、尿蛋白均正常。按随机数字表法将其分为正常组(6只)和造模组(28只)。造模组大鼠予高糖高脂饲料喂养6周,再按35 mg/kg的剂量单次腹腔注射STZ溶液(以柠檬酸钠缓冲液为溶剂);正常组大鼠予普通饲料喂养6周,再按相同体积单次腹腔注射柠檬酸钠缓冲液。腹腔注射72 h后,采集造模组大鼠尾静脉血,使用血糖仪测

定其随机血糖,若连续3次所测随机血糖均不低于16.7 mmol/L,则表明糖尿病模型复制成功^[11]。继续按上述条件喂养各组大鼠1周,留取其24 h尿液,若造模组大鼠24 h尿蛋白定量(24 h-urinary total protein, 24 h-UTP)水平 ≥ 20 mg,即表明DN模型复制成功^[11]。造模过程中,造模组有4只大鼠死亡,将造模成功的24只大鼠分为模型组、缙沙坦组、TWM组,每组8只。药物灌胃量按每千克体重剂量折算系数换算^[12];缙沙坦成人(体重60 kg)日剂量为80 mg,折算得缙沙坦组大鼠灌胃剂量为8.33 mg/(kg·d);TWM成人(体重60 kg)日剂量为60 mg,折算得TWM组大鼠灌胃剂量为6.25 mg/(kg·d);均以生理盐水作为溶剂。正常组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水。每天1次,连续6周。

2.2 标本采集与生化指标检测

末次给药后,各组大鼠均禁食不禁水24 h,使用代谢笼收集其24 h尿液,以全自动蛋白分析仪检测肾功能指标(24 h-UTP)水平。随后,大鼠以2%戊巴比妥钠麻醉,于腹主动脉取血,取上层血清,使用全自动生化分析仪检测肝肾功能指标(BUN、SCr、ALB、ALT)、血脂指标(TG、TC)、血糖指标[空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)]水平。取血后,大鼠以颈椎脱臼法处死,剥离肾脏,切取部分置于4%多聚甲醛溶液中固定,余下部分于-80℃下冻存,待检。

2.3 肾组织病理学改变观察

取“2.2”项下各组大鼠固定的肾组织适量,经修剪、脱水、石蜡包埋后切片(厚约4 μ m),进行苏木精-伊红染色后,使用光学显微镜观察肾组织病理学改变。

2.4 肾组织中p53/miR-214/ULK1轴相关蛋白及mRNA表达检测

采用Western blot法检测相关蛋白的表达。取“2.2”项下各组大鼠冻存的肾组织适量,加入裂解液研磨,于冰上裂解30 min,在4℃下以12 000 r/min离心10 min,取上层总蛋白溶液,经变性、电泳分离、转膜、封闭后,加入p53、ULK1、Beclin-1、LC3、 β -actin一抗(稀释比分别为1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:3 000),于4℃下孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例为1:3 000),于温室下孵育2 h;以化学发光试剂显影、曝光后成像。使用AIWBwell™软件,以 β -actin为内参,计算各目的蛋白的表达水平。

采用实时荧光PCR(real-time PCR, RT-PCR)法检测相关mRNA的表达。取“2.2”项下各组大鼠冻存的肾组织适量,充分研磨后,在4℃下以12 000 r/min离心10 min,提取总RNA;测定其浓度、纯度后,进行转录,得cDNA;以此cDNA为模板,进行PCR扩增。PCR体系包括cDNA模板2.0 μ L, SYBR Green qPCR预混液(2 \times) 7.5 μ L,正、反向引物(具体序列及产物长度见表1)各0.75 μ L,无酶无菌水4.0 μ L。扩增条件为95℃预变性30 s;95℃变性15 s,60℃退火延伸30 s,共40个循环。

以GAPDH内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的mRNA的表达水平,结果以正常组为参照进行归一化处理。

表1 PCR扩增引物序列及产物长度

目的基因	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
p53	正向:GGAGGATTCACAGTCGGATATG	291
	反向:TGAGAAGGGACGGAAGATGAC	
ULK1	正向:GCTCTTTCTGGACAAGCAACG	278
	反向:TCAGGCATAGACGCCACTCA	
Beclin-1	正向:AATGTCTTCAATGCGACCTTCC	229
	反向:CTGTCAGGGACTCCAGATACGA	
miR-214	正向:ACACTCCAGCTGGGACAGGCACAGAC	65
	反向:TGGTGTCTGGAGTCTG	
LC3	正向:TTGGTCAAGATCATCCGGCG	175
	反向:AGCCGAAGGTTTCTGGGAG	
GAPDH	正向:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	反向:GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	

2.5 统计学方法

使用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析。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LSD-*t*检验(方差齐)或Dunnett's *T*3检验(方差不齐)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 TWM对DN大鼠肝肾功能指标的影响

与正常组比较,模型组和各药物组大鼠体内24 h-UTP、BUN、SCr、ALT水平均显著升高,ALB水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,缙沙坦组、TWM组大鼠体内24 h-UTP、BUN、SCr、ALT水平均显著降低,ALB水平均显著升高($P<0.01$)。结果见表2。

表2 各组大鼠肝肾功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	24 h-UTP/mg	BUN/(mmol/L)	SCr/(μ mol/L)	ALB/(g/L)	ALT/(U/L)
正常组	6	13.12 \pm 2.33	8.17 \pm 1.47	22.68 \pm 1.32	28.28 \pm 0.84	32.87 \pm 1.84
模型组	8	43.00 \pm 6.55 ^a	22.26 \pm 2.32 ^a	51.45 \pm 5.14 ^a	21.44 \pm 1.37 ^a	83.84 \pm 8.57 ^a
缙沙坦组	8	23.70 \pm 2.70 ^b	16.59 \pm 1.11 ^b	35.54 \pm 3.39 ^b	24.10 \pm 2.24 ^b	49.51 \pm 2.80 ^b
TWM组	8	23.88 \pm 5.60 ^b	16.75 \pm 2.44 ^b	36.75 \pm 2.44 ^b	24.13 \pm 1.08 ^b	54.88 \pm 7.07 ^b

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$ 。

3.2 TWM对DN大鼠血糖、血脂指标的影响

与正常组比较,模型组和各药物组大鼠体内TG、TC、FBG水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,缙沙坦组、TWM组大鼠体内上述指标水平均显著降低($P<0.01$)。结果见表3。

表3 各组大鼠血脂、血糖指标比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

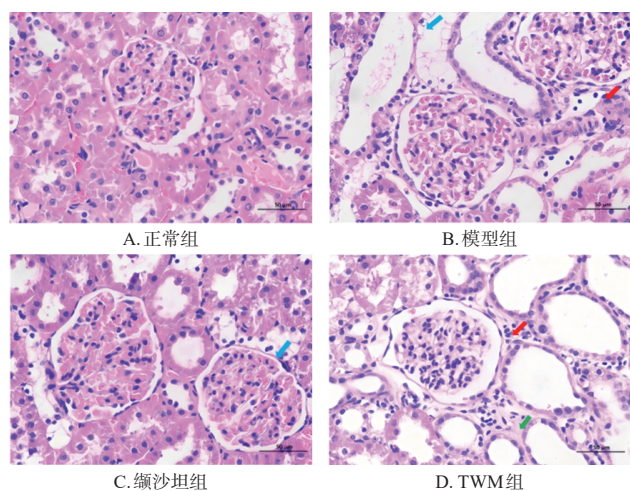
组别	<i>n</i>	TG	TC	FBG
正常组	6	0.63 \pm 0.09	1.12 \pm 0.28	9.56 \pm 1.43
模型组	8	2.32 \pm 0.72 ^a	3.14 \pm 0.89 ^a	34.53 \pm 2.77 ^a
缙沙坦组	8	1.41 \pm 0.47 ^b	2.13 \pm 0.42 ^b	26.00 \pm 4.35 ^b
TWM组	8	1.50 \pm 0.73 ^b	1.95 \pm 0.26 ^b	27.79 \pm 2.44 ^b

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$ 。

3.3 TWM对DN大鼠肾组织病理学改变的影响

正常组大鼠肾组织内肾小球分布均匀,肾小管上皮细胞圆润,未见明显的淋巴细胞浸润;与正常组比较,模型组大鼠肾组织内肾小管上皮呈明显的水肿状态,细胞肿胀,细胞质呈空泡化质,可见结缔组织增生,并伴有淋

巴细胞浸润;与模型组比较,缬沙坦组、TWM组大鼠肾组织病理学损伤明显减轻,肾小管上皮有少许水肿,间质有少量纤维组织增生及淋巴细胞浸润,趋于正常组但未完全恢复。结果见图1。



蓝色箭头:肾小管水肿;红色箭头:淋巴细胞浸润;绿色箭头:纤维组织增生。

图1 各组大鼠肾组织病理学改变的显微图(HE染色, 标尺:50 μm)

3.4 TWM对DN大鼠肾组织中p53/miR-214/ULK1轴相关蛋白及mRNA表达的影响

与正常组比较,模型组和各药物组大鼠肾组织中p53蛋白的表达显著上调,ULK1、Beclin-1蛋白的表达和LC3-II/LC3-I均显著下调或降低($P<0.01$);与模型组比较,缬沙坦组、TWM组大鼠肾组织中p53蛋白的表达均显著下调,ULK1、Beclin-1蛋白的表达和LC3-II/LC3-I均显著上调或升高($P<0.01$)。结果见图2、表4。

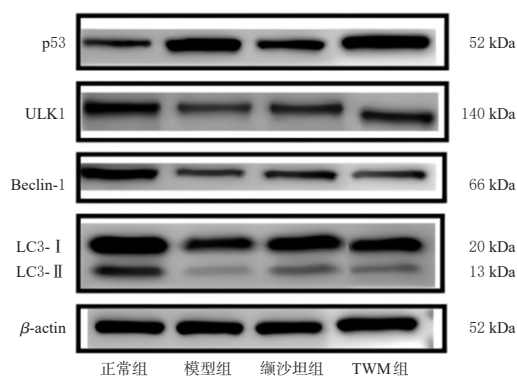


图2 各组大鼠肾组织中p53、ULK1、Beclin-1、LC3蛋白表达的电泳图

表4 各组大鼠肾组织中p53、ULK1、Beclin-1、LC3蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p53/β-actin	ULK1/β-actin	Beclin-1/β-actin	LC3-II/LC3-I
正常组	6	0.34 ± 0.01	0.64 ± 0.01	0.64 ± 0.04	0.58 ± 0.01
模型组	8	0.96 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.31 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.02 ^a
缬沙坦组	8	0.57 ± 0.01 ^{ab}	0.39 ± 0.01 ^{ab}	0.41 ± 0.02 ^{ab}	0.35 ± 0.02 ^{ab}
TWM组	8	0.62 ± 0.01 ^{ab}	0.40 ± 0.02 ^{ab}	0.42 ± 0.01 ^{ab}	0.36 ± 0.01 ^{ab}

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$ 。

与正常组比较,模型组和各药物组大鼠肾组织中p53 mRNA、miR-214的表达均显著上调,ULK1、Beclin-1、LC3 mRNA的表达均显著下调($P<0.01$);与模型组比较,缬沙坦组、TWM组大鼠肾组织中p53 mRNA、miR-214的表达均显著下调,ULK1、Beclin-1、LC3 mRNA的表达均显著上调($P<0.01$)。结果见表5。

表5 各组大鼠肾组织中p53、ULK1、Beclin-1、LC3 mRNA及miR-214表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p53	ULK1	Beclin-1	LC3	miR-214
正常组	6	1	1	1	1	1
模型组	8	5.67 ± 0.26 ^a	0.09 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	2.52 ± 0.02 ^a
缬沙坦组	8	2.34 ± 0.13 ^{ab}	0.39 ± 0.01 ^{ab}	0.49 ± 0.02 ^{ab}	0.49 ± 0.02 ^{ab}	1.62 ± 0.02 ^{ab}
TWM组	8	2.35 ± 0.09 ^{ab}	0.41 ± 0.02 ^{ab}	0.48 ± 0.02 ^{ab}	0.51 ± 0.01 ^{ab}	1.61 ± 0.01 ^{ab}

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$ 。

4 讨论

DN是糖尿病最常见的微血管并发症之一,可对肾脏造成严重损害并引发肾衰竭。DN的临床表现包括蛋白尿、进行性肾功能减退及肾小球滤过率降低^[13]。在中医学中,DN归属于“消瘴”“消渴”范畴,以情志抑郁、愤怒为重要发病因素,即肝气郁结化火伤肝阴,乙癸同源致肾阴不足,虚火灼肾络,使肾失固摄,蛋白随尿流失。本病本虚标实,病机与“虚”“瘀”“毒”密切相关^[14]。

雷公藤,味苦辛,性凉,归肝肾经,具有祛风除湿、活血消肿、通络止痛之功效,可发挥抗炎、抗肿瘤、抑制免疫等药理作用,常被用于治疗慢性肾炎、肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、血小板减少性紫癜等疾病^[15]。研究指出,TWM含有雷公藤甲素、二萜类成分等活性物质,具有抗炎、改善氧化应激、调节免疫等作用,可通过多种途径降低尿蛋白、血尿水平,从而达到保护肾脏的目的^[16]。临床研究显示,缬沙坦可改善DN患者的肾功能指标,减轻相关症状^[17];基础研究显示,该药可缓解DN小鼠的肾功能衰退,改善其肾小管间质纤维化,并可通过上调细胞自噬、减少肾小管损伤,改善相关生化指标来发挥肾保护作用^[18-19]。基于此,本研究选择缬沙坦作为阳性对照药物。

本研究以高糖高脂喂养联合STZ腹腔注射的方法建立DN大鼠模型。结果显示,模型组大鼠体内24 h-UPT、BUN、SCr、ALT、TG、TC、FBG水平均较正常组显著升高,ALB水平较正常组显著降低;肾小管上皮细胞水肿明显,可见肾小球血管扩张、细胞质疏松淡染以及少量结缔组织增生。与模型组比较,TWM组大鼠上述肝肾功能、糖脂指标水平均显著改善,肾组织病理学损伤明显减轻,但均未完全恢复正常,表明TWM对DN大鼠肾脏具有一定的保护作用。

Zhang等^[20]研究发现,自噬在DN的发生发展中具有关键作用。自噬是一种进化上保守的分解代谢机制,可降解自噬溶酶体包裹的内容物,产生新的代谢底物,从而协助细胞适应应激和存活,但过度自噬会造成细胞死亡。自噬的发生通常与Beclin-1、LC3蛋白的表达密切相关。Beclin-1编码基因是酵母自噬相关基因ATG6的

同系物,是参与哺乳动物体内自噬的特异性基因,上调其在哺乳动物细胞中的表达可促进自噬体的形成,从而刺激自噬的发生^[21]。LC3是评价细胞自噬水平的标志物,可参与自噬的各个阶段:LC3包括LC3-I、LC3-II两种形式,当自噬发生时,LC3-I会转变为LC3-II,且后者对于自噬体的形成起决定性作用,故可通过检测LC3-II/LC3-I来评估细胞的自噬水平^[22]。微RNA是一类内源性的、非编码的短RNA分子,其中miR-214可参与调控各种细胞自噬^[23]。当应激发生时,细胞质中的p53蛋白可通过磷酸化作用转移到细胞核内,从而诱导自噬;p53蛋白也是miR-214的上游转录因子,可诱导miR-214的激活^[6]。ULK1是一种蛋白激酶,可在哺乳动物细胞的自噬体膜上广泛表达,是miR-214的直接靶点,参与自噬启动的调控,当ULK1与miR-214结合后,miR-214可下调ULK1在肾脏中的表达,增加对自噬的抑制作用,从而减弱细胞自噬活性,导致肾损伤,最后进展为DN^[24-25]。本研究结果显示,TWM能显著上调/升高DN大鼠肾组织中ULK1、Beclin-1蛋白及mRNA的表达和LC3-II/LC3-I,下调p53蛋白及mRNA、miR-214的表达,恢复细胞自噬。

综上所述,TWM能减轻DN大鼠的肾损伤,改善其肝肾功能和糖脂水平,上述作用可能与调控p53/miRNA-214/ULK1轴、恢复细胞自噬有关。

参考文献

[1] DYBIEC J, FRAK W, KUĆMIERZ J, et al. Liquid biopsy: a new avenue for the diagnosis of kidney disease: diabetic kidney disease, renal cancer, and IgA nephropathy [J]. *Genes (Basel)*, 2024, 15(1): 78.

[2] 徐天华,姚丽. 糖尿病肾病诊断及治疗新进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2022, 42(12): 1002-1006, 1021.

[3] 王群,唐甜甜,韩伟,等. 基于网络药理学和实验验证的黄芪六一汤药效组分促肾小管上皮细胞自噬抗糖尿病肾病的机制研究[J]. *药物评价研究*, 2024, 47(6): 1187-1198.

[4] MAIURI M C, GALLUZZI L, MORSELLI E, et al. Autophagy regulation by p53[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 181-185.

[5] DONG H, YAN J H, HUANG P, et al. miR-214-3p promotes the pathogenesis of Parkinson's disease by inhibiting autophagy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 171: 116123.

[6] 李磊,张秘,李文涛,等. miR-337靶向调节p53表达对结肠癌细胞自噬和迁移能力的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(10): 1791-1797.

[7] 吴伟欣,郑珍萍,顾富城,等. 龟鹿二仙胶对IL-1 β 诱导的AMPK/mTOR/ULK1通路介导的体外培养软骨细胞自噬的影响[J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(4): 799-804.

[8] MA Z W, LI L, LIVINGSTON M J, et al. p53/microRNA-214/ULK1 axis impairs renal tubular autophagy in diabetic kidney disease[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(9): 5011-5026.

[9] 张斌,王蕴非,赵飞,等. 雷公藤甲素诱导HeLa细胞p53依赖的自噬和凋亡[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2016, 43(6): 599-606.

[10] 宋纯东,宋丹,贾评评,等. 雷公藤多苷通过NLRP3/caspase-1/GSDMD细胞焦亡通路对糖尿病肾病大鼠肾损伤的影响[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(10): 2639-2645.

[11] 张云,杨世霞,马莉. 苦参碱对糖尿病肾病大鼠Th1/Th2细胞平衡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(1): 72-76.

[12] 赵伟,孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. *畜牧兽医学科技信息*, 2010(5): 52-53.

[13] HASAN I H, SHAHEEN S Y, ALHUSAINI A M, et al. Simvastatin mitigates diabetic nephropathy by upregulating farnesoid X receptor and Nrf2/HO-1 signaling and attenuating oxidative stress and inflammation in rats[J]. *Life Sci*, 2024, 340: 122445.

[14] 唐春颖,于世家. 于世家教授从气虚血瘀论治消渴病兼证经验[J/OL]. *辽宁中医杂志*, 2024: 1-7 (2024-08-15) [2024-09-15]. <http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=LNZY20240814010&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.

[15] 王亚丹,汪祺,张建宝,等. 雷公藤制剂的化学成分及质量研究现状[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(16): 3368-3373.

[16] 孟子璐,宋纯东,王耀献,等. 雷公藤多苷调控鞘氨醇激酶信号通路改善IgA肾病大鼠肾损伤的作用研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(6): 879-883.

[17] 布海霞,郭利芹,徐可,等. 舒洛地特联合缬沙坦对2型糖尿病肾病患者肾保护作用的随机对照临床试验[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2024, 59(2): 260-265.

[18] ZHANG X J, LIU C C, LI Z L, et al. Sacubitril/valsartan ameliorates tubulointerstitial fibrosis by restoring mitochondrial homeostasis in diabetic kidney disease[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2024, 16(1): 40.

[19] 高飞,谢惠迪,于博睿,等. 芪地糖肾方调控Akt1/HIF-1 α /Bcl-x1信号通路提高糖尿病肾病足细胞自噬的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(15): 90-97.

[20] ZHANG Z W, SUN Y T, XUE J J, et al. The critical role of dysregulated autophagy in the progression of diabetic kidney disease[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 977410.

[21] LIU S Z, YAO S J, YANG H, et al. Autophagy: regulator of cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 648.

[22] 宋纯东,宋丹,段风阳,等. 真武汤、越婢汤对阿霉素肾病大鼠肾组织自噬相关基因PTEN/LC3的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(1): 6-9, 259-260.

[23] SANG Z Z, DONG S M, ZHANG P, et al. miR-214 ameliorates sepsis-induced acute kidney injury via PTEN/AKT/mTOR-regulated autophagy[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(4): 683.

[24] LEE D H, PARK S H, AHN J, et al. miR214-3p and Hnf4a/Hnf4 α reciprocally regulate Ulk1 expression and autophagy in nonalcoholic hepatic steatosis[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2415-2431.

[25] 康文武,唐倩,严江天,等. 糖尿病肾病中足细胞损伤机制的研究进展[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2023, 52(2): 270-275.

(收稿日期:2024-09-27 修回日期:2025-02-17)

(编辑:张元媛)