

基于TXNIP/NLRP3/GSDMD信号通路探讨当归补血汤对糖尿病肾病大鼠足细胞焦亡的影响

靳贺超¹, 梁胜然¹, 张冠文¹, 强家维¹, 郭登洲^{1,2*}

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

[摘要] **目的:**观察当归补血汤对糖尿病肾病(DKD)大鼠足细胞焦亡的影响,探讨其防治DKD及足细胞焦亡的可能作用机制。**方法:**将50只雄性SD大鼠随机分为造模组42只和正常组8只,造模组大鼠高糖高脂饮食6周结合链脲佐菌素(STZ)35 mg·kg⁻¹一次性腹腔注射制备2型糖尿病模型。造模成功后随机分为模型组、当归补血汤低剂量(0.72 g·kg⁻¹)组、当归补血汤高剂量(1.44 g·kg⁻¹)组、厄贝沙坦(0.017 g·kg⁻¹)组进行灌胃,正常组及模型组给予等体积生理盐水灌胃,每日1次,连续干预20周。给药期间定期检测各组大鼠空腹血糖(FBG),24 h尿蛋白(24 h-UTP);给药结束后采用过碘酸六胺银(PASM)染色观察肾组织病理形态学变化;透射电镜(TEM)观察足细胞超微结构变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-18(IL-18)水平;原位末端标记法(TUNEL)检测大鼠肾组织细胞DNA损伤情况;免疫组化法(IHC)检测大鼠肾组织硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1),消素D(GSDMD)蛋白表达水平;免疫荧光(IF)三标法检测核苷酸结合域样受体蛋白3(NLRP3)及肿瘤蛋白-1(WT-1)在足细胞的表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾组织TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD通路蛋白及足细胞突触足蛋白(Synaptopodin)表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠FBG,24 h-UTP显著升高,肾小球肥大,系膜增生,系膜外基质增加,基底膜增厚,出现K-W结节,肾小管上皮细胞空泡变性,足突融合或丢失,血清中IL-1 β ,IL-18含量明显升高,肾组织TUNEL阳性细胞明显增多,NLRP3在足细胞表达增多且WT-1在足细胞表达减少,Synaptopodin蛋白表达水平显著降低,TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,当归补血汤高剂量组明显降低FBG,24 h-UTP水平,明显改善肾组织病理学,改善足细胞的损伤和丢失,减少肾组织TUNEL阳性细胞数,NLRP3在足细胞表达减少且WT-1在足细胞表达增多,升高Synaptopodin蛋白表达水平,降低TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD蛋白表达水平($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论:**当归补血汤可能通过调控TXNIP/NLRP3/GSDMD信号通路,抑制足细胞焦亡以减少蛋白尿,从而延缓DKD的发展进程。

[关键词] 当归补血汤;糖尿病肾病;足细胞焦亡;活性氧;核苷酸结合域样受体蛋白3;硫氧还蛋白相互作用蛋白

[中图分类号] R2-0;R289;R33;R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0049-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212441

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211106.0845.001.html>

[网络出版日期] 2021-11-08 11:40

Effect of Danggui Buxuetang on Podocyte Pyroptosis in Diabetic Kidney Disease Rats: An Exploration Based on TXNIP/NLRP3/GSDMD Signaling Pathway

JIN He-chao¹, LIANG Sheng-ran¹, ZHANG Guan-wen¹, QIANG Jia-wei¹, GUO Deng-zhou^{1,2*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Hebei Provincial Hospital of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Danggui Buxuetang on podocyte pyroptosis in diabetic kidney disease (DKD) rats and to explore the possible mechanism of its prevention and treatment of DKD and podocyte pyroptosis. **Method:** Eight of the 50 male SD rats were randomly classified into a normal group, and

[收稿日期] 20210722(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373804);河北省博士研究生创新项目(CXZZBS2021087)

[第一作者] 靳贺超,在读博士,从事中医药治疗肾病的研究,E-mail:jinxiaochi1987@163.com

[通信作者] *郭登洲,教授,博士生导师,从事中医药治疗肾病的研究,E-mail:guodengzhou@sohu.com

the remaining 42 were fed a high-glucose and high-fat diet for six weeks and then intraperitoneally injected with $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ streptozotocin (STZ) for inducing type 2 diabetes. After successful modeling, they were randomized into the model group, low- ($0.72 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and high-dose ($1.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Danggui Buxuetang group, and irbesartan ($0.017 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group and gavaged with the corresponding drugs, while those in the normal group and model group with an equal volume of normal saline, once per day, for 20 weeks. During the medication, the fasting blood glucose (FBG) and 24 h urine protein (24 h-UTP) were measured regularly. After administration, the pathological changes in renal tissues were observed by periodic acid-silver methemamine (PASM) staining, followed by the observation of ultrastructural changes in podocytes under the transmission electron microscope (TEM). Serum levels of interleukin- 1β (IL- 1β) and interleukin-18 (IL-18) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The DNA damage in renal tissue cells of rats was detected by *in situ* nick end-labeling (TUNEL) assay. The protein expression levels of thioredoxin interacting protein (TXNIP), cysteine-dependent aspartate-directed protease-1 (Caspase-1), and gasdermin D (GSDMD) in renal tissues of rats were detected by immunohistochemistry (IHC), the expression levels of nucleotide binding domain like receptor protein 3 (NLRP3) and Wilms tumor protein-1 (WT-1) in podocytes by immunofluorescent (IF) staining, and the expression levels of TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway proteins and Synaptopodin in renal podocytes by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group exhibited increased FBG and 24 h UTP, glomerular hypertrophy, mesangial hyperplasia, increased extracellular matrix, thickened basement membrane, K-W nodules, vacuolar degeneration in renal tubular epithelial cells, foot process fusion or loss, elevated serum IL- 1β and IL-18 levels and TUNEL-positive cells in renal tissue, enhanced NLRP3 but diminished WT-1 expression in podocytes, down-regulated Synaptopodin protein expression, and up-regulated TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD protein expression ($P < 0.01$). Compared with the model group, Danggui Buxuetang high-dose group remarkably lowered FBG, 24-h UTP, and TUNEL-positive cells in renal tissue, improved renal histopathology and podocyte injury and loss, down-regulated NLRP3 expression in podocytes and TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD protein expression levels, and up-regulated WT-1 expression in podocytes and Synaptopodin protein expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Danggui Buxuetang inhibits podocyte pyroptosis to reduce proteinuria and delays the development of DKD possibly by regulating the TXNIP/NLRP3/GSDMD signaling pathway.

[Keywords] Danggui Buxuetang; diabetic kidney disease (DKD); podocyte pyroptosis; reactive oxygen species; nucleotide binding domain like receptor protein 3 (NLRP3); thioredoxin interacting protein (TXNIP)

糖尿病肾病(DKD)是指由糖尿病所致的慢性肾脏疾病,是一种以尿蛋白升高、预估肾小球滤过率下降、心血管疾病风险增加为特征的综合征^[1]。DKD的发病机制复杂,氧化应激和慢性低度炎症是导致DKD发病及进展的关键因素。高糖引起的活性氧(SOD)的显著增加是DKD多种病理途径的主要原因^[2]。活性氧的过度产生导致硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)与其结合蛋白硫氧还蛋白(TRX)分离,然后与核苷酸结合域样受体蛋白3(NLRP3)结合,导致NLRP3炎症小体激活^[3]。NLRP3炎症小体的形成激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1),活化的Caspase-1导致细胞因子如白细胞介素(IL)- 1β 和IL-18的成熟和分泌,通过切割

蛋白 gasdermin D(GSDMD)诱导细胞焦亡,细胞焦亡时细胞肿胀,细胞膜上形成1~2 nm的孔隙,导致膜破裂和释放IL- 1β 和IL-18,引起炎症反应^[4]。早期DKD临床特征是微量蛋白尿,蛋白尿是肾脏损伤的临床标志,也是肾病进展和心血管疾病的独立危险因素。研究证明足细胞损伤直接导致DKD中的蛋白尿^[5]。大量研究亦表明,中医药在早期DKD的防治中具有独特优势^[6-7]。

当归补血汤出自金元大家李东垣的《内外伤辨惑论·暑伤胃气论》,其中两味药当归和黄芪相须为用,或补气生血或益气活血以起到协同增效作用。体内、体外以及临床研究^[8-9]均证实当归补血汤通过抗氧化应激、抗炎、降低24 h尿蛋白、改善足细胞损

伤等作用延缓DKD进展。动物实验发现,当归补血汤可抑制NLRP3炎症小体的激活及IL-1 β 的释放从而发挥肾保护作用^[10]。前期研究证实,在高脂饮食结合链脉佐菌素(STZ)制备的DKD动物模型中,通过抑制TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD通路介导的细胞焦亡可延缓DKD进展^[3]。在前期研究基础上,本次实验通过观察当归补血汤对DKD大鼠肾组织病理、足细胞损伤及TXNIP/NLRP3/GSDMD信号通路的影响,进一步探讨当归补血汤对DKD大鼠足细胞焦亡的干预作用及潜在分子机制,以期对DKD的中药治疗提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 7周龄SPF级雄性SD大鼠50只,体重(200 \pm 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于河北中医学院实验动物中心标准化动物房(相对湿度50%~70%,温度23~25℃,昼夜各半),普通饲料及高糖高脂饲料喂养,自由饮水。动物实验经河北中医学院动物伦理委员会批准,伦理审查编号DWLL2019018。

1.2 药物与试剂 厄贝沙坦片(浙江华海药业股份有限公司,批号H20030016,75mg/片);当归补血汤由黄芪30g,当归6g组成(本实验药材均为免煎颗粒剂,由广东一方制药有限公司提供,批号分别为0071093,0061513),其中1g黄芪免煎颗粒相当于5g生药,1g当归免煎颗粒相当于3.3g生药,将当归补血汤免煎颗粒加入煮沸的蒸馏水中,配成质量浓度分别为0.36,0.72g \cdot mL⁻¹的中药混悬液,4℃保存备用;STZ,柠檬酸钠缓冲液(美国Sigma公司,批号分别为S0130,S4641);24h尿蛋白(UTP)测定试剂盒(石家庄长江生物实验科技开发有限公司,批号201216);六胺银(PASM)染液,DAPI染色试剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1059,GDP1012);原位末端标记法(TUNEL)检测试剂盒(美国Millipore公司,批号S7100);兔来源一抗TXNIP,NLRP3,Caspase-1抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号分别为ET1705-72,ET1610-93,ET1608-69);兔来源一抗GSDMD,兔来源一抗肿瘤蛋白-1(WT-1)(武汉ABclonal公司,批号分别为A18281,A16319);鼠来源一抗足细胞突触足蛋白(Synaptopodin)抗体(美国Santa Cruz公司,批号sc-515842);IL-1 β ,IL-18试剂盒(英国Abcam公司,批号分别为ab214025,ab215539)。

1.3 仪器 One Touch型血糖仪(美国强生

LifeScan公司);RM2016型病理切片机(德国Leica公司);1-15K型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);HEMIX-180型全自动生化分析仪(日本Sysmex公司);BX53型光学显微镜(日本Olympus公司);HT7800型透射电子显微镜(日本Hitach公司);DYCZ-40K型电泳仪及转膜仪(北京六一仪器厂);Infinite 200型酶标仪(瑞士Tecan公司);Clinx ChemiScope型荧光及化学发光成像系统(上海Clinx公司)。

2 方法

2.1 动物分组、模型制备、给药与取样 50只SD大鼠适应性喂养1周后,按随机数字表法分为造模组42只和正常组8只。采用高糖高脂饲料(北京博泰宏达生物技术有限公司,CAS号HD001)6周结合STZ 35mg \cdot kg⁻¹一次性腹腔注射制备2型糖尿病模型,72h后大鼠尾静脉随机血糖>16.7mmol \cdot L⁻¹为造模成功^[11]。2只大鼠血糖<16.7mmol \cdot L⁻¹,3只大鼠造模后死亡均予以剔除。依据大鼠与人药物剂量折算公式^[12],将37只造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组10只、当归补血汤低剂量(0.72g \cdot kg⁻¹)组9只、当归补血汤高剂量(1.44g \cdot kg⁻¹)组9只、厄贝沙坦(0.017g \cdot kg⁻¹)组9只进行灌胃,正常组及模型组予等体积生理盐水灌胃。每日灌胃1次,连续20周。给药期间每周检测体质量并调整灌胃剂量,每4周检测1次24h-UTP。干预20周后禁食不禁水12h后使用异氟烷吸入麻醉,股动脉取血,离心机分离上清用于生化指标检测;左肾沿纵轴切开,先取肾皮质1mm \times 1mm \times 1mm组织块,置于预冷后的2.5%戊二醛并4℃冰箱保存;取0.5cm厚肾皮质置于4%多聚甲醛固定;取肾皮质3mm \times 3mm \times 3mm组织块置于冻存管,液氮速冻后转移至-80℃冰箱备检。

2.2 双缩脲法检测24h-UTP水平 代谢笼收集24h尿液,于40℃,3500r \cdot min⁻¹离心10min(离心半径10cm),取上清液按照试剂盒说明检测大鼠UTP水平。

2.3 PASM染色及透射电镜观察大鼠肾组织病理学改变 肾组织于4%多聚甲醛固定48h后石蜡包埋、切片,石蜡切片脱蜡至水,行PASM染色处理,脱水封片,显微镜下观察肾组织病理学变化;肾脏组织于2.5%戊二醛固定后,磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗、固定、脱水、丙酮树脂包埋、切片,使用透射电子显微镜观察足细胞超微结构的改变。

2.4 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清IL-1 β ,IL-18水平 各组大鼠血液上清采用ELISA

检测 IL-1 β , IL-18 水平, 实验步骤严格按照试剂盒操作方法进行。

2.5 TUNEL 检测大鼠肾组织细胞 DNA 损伤情况 将石蜡包埋肾皮质切为 4 μ m 薄片并置于载玻片上, 脱蜡, 乙醇水化, 蛋白酶 K 修复, H₂O₂ 淬灭过氧化物酶, TdT 酶孵育, 辣根过氧化物酶标记链霉卵白素孵育, DBA 显色, 苏木素复染细胞核, 脱水透明, 中性树脂封片。光学显微镜拍照, 每张切片随机选 5 个视野, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件统计每个视野中阳性细胞数及有核细胞总数, 以阳性细胞数/有核细胞总数为 TUNEL 阳性细胞率。

2.6 免疫组化 (IHC) 法检测大鼠肾组织 TXNIP, Caspase-1, GSDMD 蛋白表达水平 石蜡切片脱蜡至水, 抗原修复, 室温孵育, 血清封闭, 滴加 PBS 稀释好的一抗 (1:100), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 加入生物素标记的二抗, 室温孵育, DBA 显色, 苏木素复染, 脱水封片, 电子显微镜观察并拍照。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对免疫组化图片 (\times 400) 进行半定量分析, 以积分吸光度 IA/面积作为检测结果。

2.7 免疫荧光 (IF) 三标法检测 NLRP3 及 WT-1 在足细胞的表达水平 石蜡切片脱蜡至水, 抗原修复, 组化笔画圈, 双氧水封闭, 血清封闭。依次滴加一抗、对应 HRP 标记的二抗, 微波处理, DAPI 复染细胞核, 淬灭组织自发荧光, 封片, 荧光显微镜下采集图像。

表 1 当归补血汤对 DKD 大鼠 FBG 及 24 h-UTP 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Danggui Buxuetang on FBG and 24 h-UTP in DKD rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹	24 h-UTP/mg·24 h ⁻¹		
			8周	16周	20周
正常		5.67 \pm 0.33	6.50 \pm 0.97	6.40 \pm 0.83	6.90 \pm 1.27
模型		29.10 \pm 2.55 ¹⁾	23.21 \pm 3.84 ¹⁾	41.02 \pm 4.34 ¹⁾	46.57 \pm 5.66 ¹⁾
当归补血汤	0.78	27.70 \pm 2.36	21.36 \pm 2.79	37.90 \pm 3.92	42.45 \pm 4.81
	1.56	22.10 \pm 1.82 ²⁾	17.18 \pm 2.20 ²⁾	29.03 \pm 3.92 ²⁾	34.17 \pm 4.40 ²⁾
厄贝沙坦	0.017	28.90 \pm 2.03	16.15 \pm 2.68 ²⁾	29.03 \pm 3.57 ²⁾	32.95 \pm 4.51 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表2~5同)。

3.2 对 DKD 大鼠肾组织病理学改变的影响 PASM 染色显示, 与正常组比较, 模型组大鼠肾小球肥大, 基底膜增厚, 出现 K-W 结节; 透射电镜显示, 与正常组比较, 模型组大鼠基底膜增厚, 足突融合或丢失; 与模型组比较, 经各药物干预后, 各组大鼠 PASM 染色基底膜增厚缓解, K-W 结节较少见, 足细胞超微结构均有不同程度改善。见图 1。

3.3 对 DKD 大鼠血清 IL-1 β , IL-18 水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠 IL-1 β , IL-18 水平显著

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组大鼠肾组织中 TXNIP, NLRP3, Caspase-1, GSDMD 及 Synaptopodin 蛋白表达 使用 RIPA 裂解液提取肾组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白溶液加入 5 \times Loading buffer 缓冲液, 沸水浴变性, 10% SDS-RAGE 电泳, PVDF 转膜, 将膜放入 TBST 孵育槽中, 加脱脂牛奶室温封闭, TXNIP (1:1 000), NLRP3 (1:1 000), Caspase-1 (1:1 000), GSDMD (1:1 000), Synaptopodin (1:200), β -actin (1:1 000) 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育摇床过夜, 将二抗用 TBST 按 1:5 000 比例稀释, 室温孵育, ECL 法显色。使用 Image J 软件分析条带灰度值, 目的蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/内参 β -actin 灰度值。

2.9 统计学分析 数据资料使用 SPSS 21.0 软件分析处理, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 符合正态分布且方差齐采用单因素方差分析; 不符合采用非参数秩和检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 DKD 大鼠 FBG, 24 h-UTP 的影响 与正常组比较, 模型组大鼠 FBG, 24 h-UTP 显著升高, 差异具有显著统计学意义 (P<0.01); 与模型组比较, 当归补血汤高剂量组 FBG 明显降低, 差异具有明显统计学意义 (P<0.05), 当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组 24 h-UTP 明显降低, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。见表 1。

升高 (P<0.01); 与模型组比较, 当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组大鼠 IL-1 β , IL-18 水平明显降低 (P<0.05)。见表 2。

3.4 对 DKD 大鼠肾组织细胞 DNA 损伤的影响 与正常组比较, 模型组肾组织 TUNEL 阳性细胞显著增多 (P<0.01); 与模型组比较, 当归补血汤高、低剂量组及厄贝沙坦组 TUNEL 阳性细胞率均明显降低, 差异具有统计学意义 (P<0.05, P<0.01)。见表 3, 图 2。

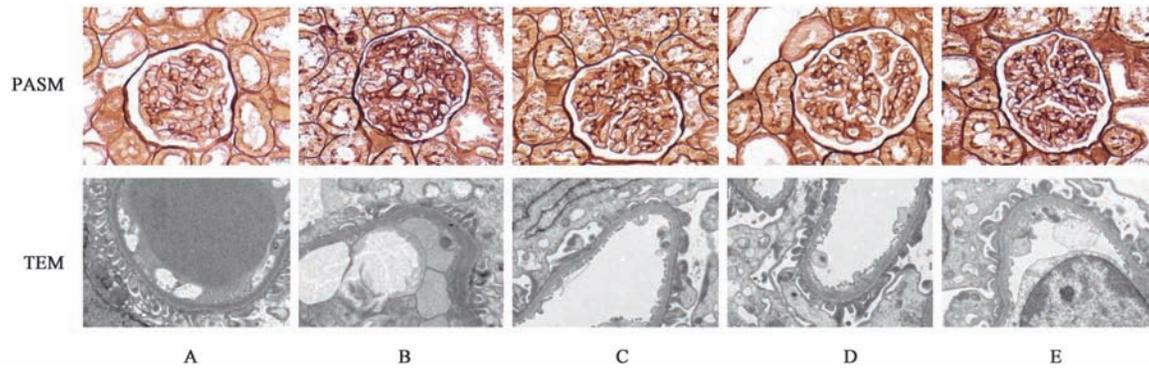


图 1 当归补血汤对 DKD 大鼠肾组织病理形态的影响 (PASM, ×400; 透射电镜, ×7 000)

图 1 当归补血汤对 DKD 大鼠肾组织病理形态的影响 (PASM, ×400; 透射电镜, ×7 000)

Fig. 1 Effect of Danggui Buxuetang on renal morphology in DKD rats (PASM, ×400; TEM, ×7 000)

表 2 当归补血汤对 DKD 大鼠血清 IL-1 β , IL-18 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Table 2 Effect of Danggui Buxuetang on IL-1 β , IL-18 in serum of DKD rats ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-18
正常		17.94±4.30	20.98±4.81
模型		33.64±5.99 ¹⁾	40.47±6.25 ¹⁾
当归补血汤	0.78	25.28±4.12	32.13±5.02
	1.56	21.19±4.80 ²⁾	26.90±4.64 ²⁾
厄贝沙坦	0.017	27.13±4.95 ²⁾	31.91±5.61 ²⁾

表 3 当归补血汤对 DKD 大鼠肾组织细胞 DNA 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Table 3 Effect of Danggui Buxuetang on DNA damage of kidney tissue cells in DKD rats ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	阳性细胞率/%
正常		15.11±2.19
模型		34.83±4.13 ¹⁾
当归补血汤	0.78	23.68±3.64 ²⁾
	1.56	19.33±3.19 ³⁾
厄贝沙坦	0.017	24.57±3.28 ²⁾

3.5 对 DKD 大鼠肾组织 TXNIP, Caspase-1, GSDMD 定位表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中 TXNIP, Caspase-1, GSDMD 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,当归补血汤高、

低剂量组及厄贝沙坦组大鼠肾组织中 TXNIP, GSDMD 表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组大鼠肾组织中 Caspase-1 表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4, 图 3。

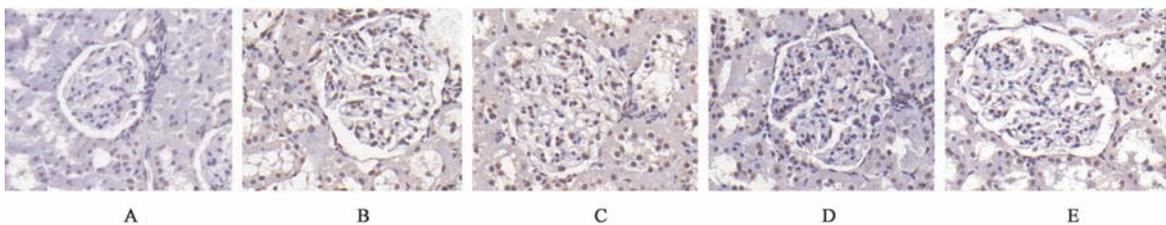


图 2 当归补血汤对 DKD 大鼠肾组织细胞 DNA 损伤的影响 (TUNEL, ×400)

Fig. 2 Effect of Danggui Buxuetang on DNA damage of kidney tissue cells in DKD rats (TUNEL, ×400)

表 4 当归补血汤对 DKD 大鼠肾组织 TXNIP, Caspase-1, GSDMD 定位表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Table 4 Effect of Danggui Buxuetang on expression of TXNIP, Caspase-1, GSDMD in DKD rats ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TXNIP	Caspase-1	GSDMD
正常		0.136±0.011	0.205±0.028	0.129±0.017
模型		0.412±0.046 ¹⁾	0.442±0.050 ¹⁾	0.305±0.034 ¹⁾
当归补血汤	0.78	0.283±0.022 ²⁾	0.422±0.047	0.237±0.029 ²⁾
	1.56	0.165±0.018 ³⁾	0.251±0.023 ³⁾	0.140±0.019 ³⁾
厄贝沙坦	0.017	0.201±0.023 ²⁾	0.298±0.028 ²⁾	0.228±0.025 ²⁾

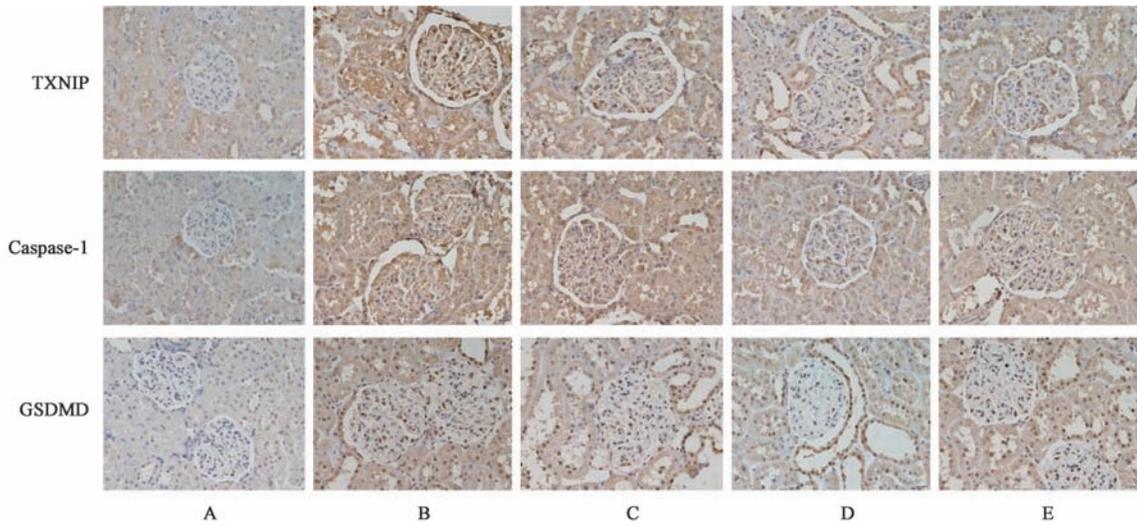


图3 当归补血汤对DKD大鼠肾组织TXNIP, Caspase-1, GSDMD蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Danggui Buxuetang on expression of TXNIP, Caspase-1, GSDMD in DKD rats (IHC, ×400)

3.6 对DKD大鼠足细胞中NLRP3表达水平的影响
与正常组比较,模型组大鼠NLRP3在足细胞表

达显著升高;与模型组比较,当归补血汤高剂量组
NLRP3在足细胞表达显著降低。见图4。

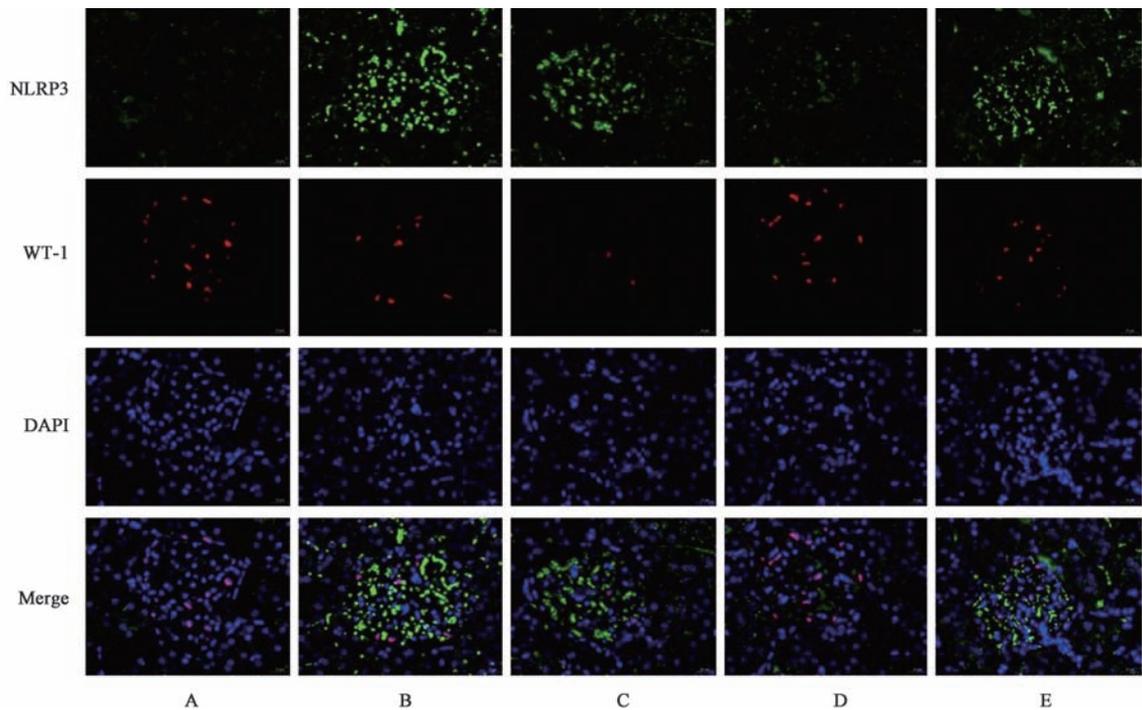


图4 当归补血汤对DKD大鼠足细胞中NLRP3表达水平的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 4 Effect of Danggui Buxuetang on expression of NLRP3 in DKD rat podocytes (IF, ×400)

3.7 对DKD大鼠肾组织TXNIP, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, Synaptopodin蛋白表达的影响
与正常组比较,模型组大鼠TXNIP, NLRP3, Caspase-1, GSDMD蛋白表达显著升高,模型组大鼠Synaptopodin蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,当归补血汤高剂量组及厄贝沙坦组大鼠TXNIP, NLRP3, Caspase-1, GSDMD蛋白表达明显降低,当归补血汤低、高剂量组及厄贝沙坦组大鼠

Synaptopodin蛋白表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表5,图5。

4 讨论

近年来糖尿病的发病率逐渐升高,至2040年全世界糖尿病患者人数预计将增加到6.42亿人,其中30%~40%将发展为DKD^[13]。DKD是终末期肾病(ESRD)最常见的原因,与心血管疾病和过早死亡的风险升高相关^[14]。目前临床用于DKD肾脏保护

表5 当归补血汤对DKD大鼠肾组织TXNIP, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, Synaptopodin蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Danggui Buxuetang on protein expression of TXNIP, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, Synaptopodin in DKD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TXNIP/ β -actin	NLRP3/ β -actin	Caspase-1/ β -actin	GSDMD/ β -actin	Synaptopodin/ β -actin
正常		0.57±0.06	0.82±0.07	0.31±0.04	0.36±0.04	1.34±0.11
模型		1.14±0.15 ¹⁾	1.20±0.18 ¹⁾	1.18±0.11 ¹⁾	0.96±0.09 ¹⁾	0.83±0.05 ¹⁾
当归补血汤	0.78	1.04±0.10	1.00±0.11 ²⁾	0.93±0.08 ²⁾	0.78±0.10 ²⁾	1.21±0.13 ²⁾
	1.56	0.78±0.07 ²⁾	0.89±0.13 ³⁾	0.73±0.06 ³⁾	0.69±0.08 ³⁾	1.32±0.15 ³⁾
厄贝沙坦	0.017	0.70±0.05 ²⁾	0.77±0.10 ³⁾	0.61±0.04 ³⁾	0.57±0.07 ³⁾	1.27±0.12 ²⁾

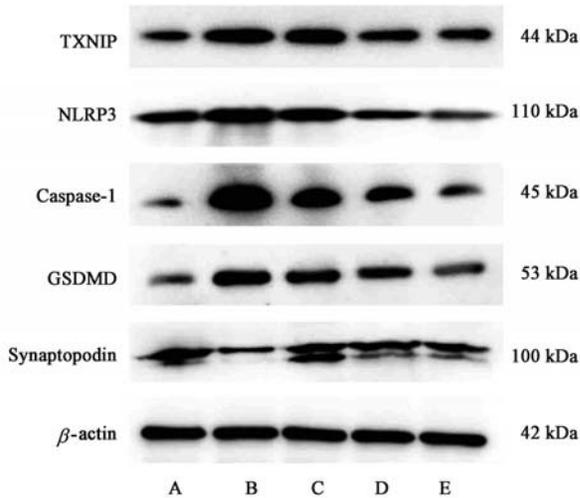


图5 肾组织中TXNIP, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, Synaptopodin蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of TXNIP, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, Synaptopodin protein expression in renal tissue

的治疗方法是肾素-血管紧张素系统(RAS)阻断,具有抗高血压和抗蛋白尿的作用。血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂和血管紧张素II受体阻滞剂(ARB)通过降低肾小球内压、水钠的重吸收以及蛋白尿以延缓肾脏疾病的进展,但进展为ESRD的残余风险仍然很高。随着中医药防治DKD理论和临床研究的不断进展,中医药在DKD防治中的优势逐渐显现^[15-16]。

DKD属中医“肾消”“水肿”“肾劳”等范畴。本病迁延难愈,病程绵长,久病多虚,气虚无以推动血行以成瘀血,因此益气活血、保持肾脏络脉气血条达是治疗DKD的关键。多项研究在辨证论治基础上,采用益气活血法治疗糖尿病血管病变取得显著疗效^[17-18]。当归补血汤出自金元大家李东垣的《内外伤辨惑论·暑伤胃气论》,为临床经典的补气生血、益气活血名方。动物实验及临床研究均证实当归补血汤通过抗氧化应激、抗炎、降低24h尿蛋白、改善足细胞损伤等作用改善DKD症状^[8-9]。本方由黄芪-当归5:1组成,现代药理研究表明,黄芪有效

成分在抗炎、抗氧化、激活自噬抑制凋亡、调节糖脂代谢等方面疗效显著^[19];当归及其活性成分具有肾脏保护、免疫调节、抗氧化、抗炎等疗效^[20]。当归和黄芪相须为用,或补气生血或益气活血以起到协同增效作用。本实验中,模型组大鼠FBG,24hUTP显著升高,光镜结果显示肾小球肥大,系膜增生,系膜外基质增加,基底膜增厚,出现K-W结节,肾小管上皮细胞空泡变性,电镜结果显示基底膜增厚、足突融合或消失;经当归补血汤干预后,蛋白尿、血糖及肾组织病理明显改善,提示当归补血汤对DKD大鼠具有肾保护作用。

微量蛋白尿是早期DKD临床特征,而足细胞损伤直接导致蛋白尿的产生^[5]。蛋白尿主要由肾小球滤过屏障损伤导致的,肾小球滤过屏障分为3层将血液侧与尿液侧分开,分别为肾小球内皮细胞、基底膜和最外侧的足细胞足突及其间的裂孔隔膜(SD)蛋白。足细胞是一种终末分化细胞,损伤后不易增殖和再生,足细胞数量反映足细胞丢失和增殖之间的平衡,足细胞脱落/凋亡/焦亡/坏死性凋亡均导致足细胞数量减少^[11]。当各种原因导致足细胞损伤及数量减少,肾小球滤过屏障受损便引起微量蛋白尿的发生。足细胞损伤的病理表现为足细胞肥大、足突融合或脱失。WT-1表达于足细胞核,可作为足细胞特异性标志以反映足细胞数量;Synaptopodin是一种肌动蛋白结合蛋白,是足细胞骨架组成成分,当DKD大鼠足细胞受到损伤时,Synaptopodin的表达显著降低^[21]。本研究结果显示,模型组大鼠基底膜增厚、足突融合或脱失,足细胞TUNEL阳性细胞增多,WT-1及Synaptopodin的表达显著降低,提示DKD模型大鼠存在足细胞损伤及数量减少;当归补血汤可改善足细胞病理,通过促进足细胞标志蛋白WT-1及Synaptopodin的表达,改善足细胞损伤以维持肾小球滤过屏障,降低尿蛋白。

氧化应激和慢性低度炎症是导致DKD中足细

胞损伤的关键因素^[22-23]。活性氧作为及其重要的细胞内信使,生理状态下肾脏会少量产生,当肾组织中固有细胞因为高糖不能有效降低葡萄糖转运率以维持细胞内葡萄糖稳态时,这些细胞的胞浆和线粒体产生超出自身抗氧化能力的活性氧,导致足细胞中产生过量活性氧诱导氧化应激进而导致DKD的发生和进展^[24]。硫氧还蛋白(TRX)系统是一种重要的抗氧化系统,其通过向过氧还原蛋白提供电子从而有效地去除活性氧和氮来抵抗氧化应激,活性氧的过度产生导致TXNIP与其结合蛋白Trx分离,后与NLRP3结合,导致NLRP3炎症小体激活^[3]。TXNIP将氧化应激与炎症小体激活联系起来。NLRP3炎症小体的形成导致Caspase-1的激活,活化的Caspase-1导致炎症因子IL-1 β 和IL-18的成熟和分泌,通过切割蛋白GSDMD释放其活性结构域GSDMD-N,N端诱导细胞焦亡,细胞焦亡时细胞肿胀,细胞膜上形成大量1~2 nm的孔隙,导致膜破裂和释放IL-1 β 和IL-18,引起炎症反应^[4]。本实验中,模型组大鼠IL-1 β ,IL-18水平明显升高,NLRP3在足细胞表达增多,TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD蛋白表达水平显著升高;经当归补血汤干预后血清IL-1 β ,IL-18水平降低,NLRP3在足细胞表达减少,TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD蛋白表达均降低,提示当归补血汤可能通过TXNIP/NLRP3/GSDMD信号通路抑制足细胞焦亡。

综上,当归补血汤可通过抑制DKD大鼠肾组织氧化应激及炎症反应,调控TXNIP/NLRP3/GSDMD信号通路的激活,抑制足细胞焦亡,减少蛋白尿,从而发挥肾保护作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] FORBES J M, THORBURN D R. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease[J]. *Nature Rev Nephrol*, 2018, 14(5): 291-312.
- [2] SUN L, LI W, LI W, et al. Astragaloside IV prevents damage to human mesangial cells through the inhibition of the NADPH oxidase/ROS/Akt/NFkappaB pathway under high glucose conditions[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(1): 167-176.
- [3] AN X, ZHANG Y, CAO Y, et al. Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway[J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1516.
- [4] MANGAN M S J, OLHAVA E J, ROUSH W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(9): 688.

- [5] LI J J, KWAK S J, JUNG D S, et al. Podocyte biology in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int Suppl*, 2007, 106: S36-S42.
- [6] 杜世拔,李国政,卢微媛,等. 健脾固肾方联合常规治疗对脾肾亏虚型早期糖尿病肾病患者的临床疗效[J]. *中成药*, 2021, 43(3): 649-653.
- [7] 张亚丽,李廷振,汪伟环,等. 杞菊地黄丸加味联合艾塞那肽对早期糖尿病肾病肝肾阴虚夹瘀证的临床疗效[J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(7): 95-98.
- [8] KE H L, ZHANG Y W, ZHOU B F, et al. Effects of Danggui Buxue Tang, a traditional Chinese herbal decoction, on high glucose-induced proliferation and expression of extracellular matrix proteins in glomerular mesangial cells[J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(11): 1022-1026.
- [9] YE T S, ZHANG Y W, ZHANG X M. Protective effects of Danggui Buxue Tang on renal function, renal glomerular mesangium and heparanase expression in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(6): 2477-2483.
- [10] WANG L, MA J, GUO C, et al. Danggui Buxue Tang attenuates tubulointerstitial fibrosis via suppressing NLRP3 inflammasome in a rat model of unilateral ureteral obstruction[J]. *Biomed Res Int*, 2016, doi: 10.1155/2016/9368483.
- [11] KE R, WANG Y, HONG S, et al. Endoplasmic reticulum stress related factor IRE1alpha regulates TXNIP/NLRP3-mediated pyroptosis in diabetic nephropathy[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 396(2): 112293.
- [12] 靳贺超,于文涛,刘晓,等. 补肾活血方对血管性痴呆大鼠脑海马细胞凋亡及ERK2, CREB表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12): 129-135.
- [13] TANG S C W, YIU W H. Innate immunity in diabetic kidney disease[J]. *Nat Revs Nephrol*, 2020, 16(4): 206-222.
- [14] DING X, JING N, SHEN A, et al. MiR-21-5p in macrophage-derived extracellular vesicles affects podocyte pyroptosis in diabetic nephropathy by regulating A20[J]. *J Endocrinol Invest*, 2021, 44(6): 1175-1184.
- [15] 杨凤文,高飞,陈素枝,等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(11): 89-97.
- [16] 王美子,岳丽军,万毅刚,等. 葛根芩连汤加味方改善糖尿病肾病模型鼠足细胞焦亡和胰岛素抵抗的作用和机制[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(17): 4471-4479.
- [17] 胡艳红,杨静,修成奎,等. 人参-三七-川芎提取物延缓高糖诱导的小鼠血管钙化的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(8): 13-20.

- [18] 孙玉霞,李屹,李林,等. 益气活血汤对糖尿病肾病患者血清CRP,IL-8的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(13):164-168.
- [19] LEI X, ZHANG B D, REN J G, et al. Astragaloside suppresses apoptosis of the podocytes in rats with diabetic nephropathy via miR-378/TRAF5 signaling pathway[J]. Life Sci, 2018, 206: 77-83.
- [20] WEN W C, BI F L. Bioactivities of major constituents isolated from *Angelica sinensis* [J]. Chin Med, 2011, 6: 29.
- [21] CHEN Y, LIU Q, SHAN Z, et al. Catalpol ameliorates podocyte injury by stabilizing cytoskeleton and enhancing autophagy in diabetic nephropathy [J]. Front Pharmacol, 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.01477.
- [22] ZHAI R, JIAN G, CHEN T, et al. Astragalus membranaceus and *Panax notoginseng*, the novel renoprotective compound, synergistically protect against podocyte injury in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Diabetes Res, 2019, doi: 10.1155/2019/1602892.
- [23] ZHANG C, ZHU X, LI L, et al. A small molecule inhibitor MCC950 ameliorates kidney injury in diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2019, 12: 1297-1309.
- [24] DU N, XU Z, GAO M, et al. Combination of Ginsenoside Rg₁ and Astragaloside IV reduces oxidative stress and inhibits TGF-beta1/Smads signaling cascade on renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 3517-3524.

[责任编辑 孙丛丛]

·书讯·

膜塑形镜去片裸眼视力低下的影响因素 ——评《眼科疾病诊疗指南(第3版)》

角膜塑形镜采用了特殊几何形态逆向设计的、性质功能特殊的硬性角膜接触镜其在改变角膜形态方面具有突出医疗价值作用。从医学角度讲,他对于患者角膜屈光度的改变是明显的,可实现在短时期内对患者近视度数的有效降低,确保患者能够重新获得良好的日间裸眼视力。就目前医学领域看来,为患者佩戴角膜塑形镜可实现对周边离焦的有效控制,进而达到延缓眼轴增长的目的,有效控制患者近视病情进一步发展。

《眼科疾病诊疗指南(第3版)》张虹主编,由科学出版社2013年4月出版。是一部眼科临床医师诊疗丛书。全书内容分为三篇,第一篇为眼科检查,第二篇为眼科诊疗,相对全面、系统、深入地介绍了不同眼病的发生病因、病理、以及结合病例分析了临床表现与诊断、鉴别,特别是对其治疗后、痊愈后的相关问题也进行了阐述分析;第三篇主要介绍了眼病治疗的相关内容,全面介绍了眼科疾病外科手术的治疗过程与方法。分20章节,包括了眼科检查、眼险病、泪器病、结膜病、角膜病、巩膜病、玻璃体病、青光眼、视网膜疾病、视神经疾病等。最后章节对角膜塑形镜去片进行了分析,基本了解了其治疗手术过程中、过程后的诸多药物反应,最后对眼科疾病的治疗手术内容进行了分析,其包含了38种手术的介绍,在附录中介绍了眼科疾病的常用药物,并对眼科病患者的病程记录进行示范。该书中,对角膜移植手术中的角膜塑形镜去片内容进行分析,深度理解了患者在使用角膜塑形镜去片以后的角膜排斥反应,结合双眼同时同供体手术进行分析,理解其手术病例排斥反应发生率明显降低的有效方法。进行二次角膜移植植片透明性过程中需要对其最佳矫正视力临床效果进行分析,将其高风险移植床最大量与全身局部系统给药排斥反应控制在一定水平。在利用手术针对异体抗原进行分析过程中,需要合理保证患者双眼基于手术病例成功完成二次角膜移植手术,针对异体抗原中所产生的抗移植体抗体进行分析,确保在新生血管中完成手术过程。在使用角膜塑形镜去片过程中,还需要对患者眼部血管阻塞与渗漏问题进行分析,分析获得结果其血管中是缺氧血的,最终导致患者血管床严重充血,这就是患者在使用角膜塑形镜去片后产生眼角膜移植排斥反应的主要原因。在该书中,也详细分析了患者角膜缺乏抗原提呈细胞(APCs)的主要原因,他属于一种低水平的抗原递呈分子(MHC-II)类抗原表达,一旦角膜移植手术后患者出现验证,其眼角膜中央的MHC-II类抗原表达就会增加,患者的双眼不同供体会相继出现抗原表达情况,而患者的中央角膜区域则会出现大量的APCs细胞,这些细胞直接会寄宿到患者的T细胞之中,进而使得患者在眼角膜手术之后出现严重的排斥反应。在眼角膜移植手术过程中,需要基于这一点进行分析,做好手术眼的前期免疫工作,避免出现植片浑浊现象。在双眼相同供体进行手术过程中,则希望结合单眼手术相同免疫环境进行分析,确保角膜APCs细胞增加,同时使得MHC-II类抗原表达增加,避免二次抗原刺激产生,对剧烈的高危角膜移植排斥反应进行分析,提高其反应率,对药物治疗效果较差问题进行重新讨论,提高患者佩戴角膜塑形镜片药物手术治疗效果。如果在眼角膜移植手术过程中需要结合患者的高危移植角膜情况进行分析,确保科学合理为患者佩戴角膜塑形镜去片。而在对抗排斥反应相关策略过程中,则需要分析植片透明率升高这一问题,结合排斥反应发生率较低这一问题对排斥反应药物治疗效果进行分析。本书中也对眼科手术有关激光光学角膜切削术(PRK)治疗屈光不正技术规范,激光辅助角膜原位磨镶术(LASIK)治疗近视技术规范相关内容进行了分析。

《眼科疾病诊疗指南(第3版)》整体看来全书内容丰富,特别是在角膜塑形镜去片裸眼视力低下的影响因素及近视可以控制效果观察等方面做到了研究细致、方法丰富、提高了当前临床医疗过程中角膜塑形镜去片的治疗水平。

(作者唐云户,赵晓娟*,电子科技大学医学院附属绵阳医院 绵阳市中心医院,四川 绵阳,621000)