

基于 IRS1/PI3K/Akt 通路探究黄蜀葵花总黄酮 改善糖尿病肾脏疾病胰岛素抵抗 和足细胞转分化的作用和机制

王玉^{1,2,3#}, 曹东维^{4#}, 万毅刚^{2*}, 穆耕林^{3*}, 吴薇², 房其军², 李雅静¹, 蔡思雨¹,
涂玥⁵, WAN Zi-yue⁶

(1. 南京中医药大学 鼓楼临床医学院 中医科, 江苏 南京 210008; 2. 南京大学 医学院 附属鼓楼医院 中医科, 江苏 南京 210008; 3. 南京大学 中医研究院, 江苏 南京 210008; 4. 上海中医药大学 附属 市中医院 肾病科, 上海 200071; 5. 南京中医药大学 针灸推拿学院·养生康复学院, 江苏 南京 210023; 6. Graduate School of Social Sciences, Faculty of Social Sciences, Hitotsubashi University, Tokyo 186-8601)

摘要 为了探究传统治肾中药黄蜀葵花的提取物——黄蜀葵花总黄酮(total flavones of *Abelmoschus manihot*, TFA)在体内改善糖尿病肾脏疾病(diabetic kidney disease, DKD)胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和足细胞转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的作用和机制,并进一步揭示其科学内涵,将32只大鼠随机分为正常组、模型组、TFA组和罗格列酮(rosiglitazone, ROS)组。通过“高脂饲料饲养、单肾切除以及STZ腹腔注射”等综合措施联合诱导改良型DKD大鼠模型。成模后,对于4组大鼠,每天经灌胃分别给予其双蒸水、TFA混悬液以及ROS混悬液。在中、西药物干预的第8周末,处死全部大鼠,收集尿液、血液以及肾组织等标本,进而针对DKD模型鼠IR和足细胞EMT相关的各项参数和指标进行检测和观察,包括大鼠一般情况、体质量(body weight, BW)及肾脏质量(kidney weight, KW),生化参数和IR指标,肾组织胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)1/磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/丝氨酸-苏氨酸激酶(serine-threonine kinase, Akt)通路关键信号分子和裂隙膜结构分子蛋白表达水平,足突形态和肾小球基底膜(glomerular basement membrane, GBM)厚度,足细胞EMT标志分子和裂隙膜结构分子的表达程度以及肾小球组织形态特征等。结果显示,首先,对于DKD模型鼠,TFA和ROS均能改善一般情况、部分生化参数、肾脏外观和KW;然后对于BW、尿白蛋白(urinary albumin, UAlb)/尿肌酐(urinary creatinine, UCr)、血清肌酐(serum creatinine, Scr)、血清甘油三酯(triglyceride, TG)、KW的改善作用,TFA和ROS相似;再者,两者均能改善IR指标,其中,对于空腹血清胰岛素(fast insulin, FIN)、IR指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)的改善作用,ROS优于TFA;其次,两者均能不同程度地改善肾组织IRS1/PI3K/Akt通路关键信号分子的蛋白表达水平和肾小球硬化,而且TFA的改善作用和ROS相似;最后,两者均能改善足细胞损伤和EMT,其中TFA的改善作用优于ROS。总之,该研究提示,肾组织IR及其IRS1/PI3K/Akt通路活性低下会诱导DKD足细胞EMT和肾小球硬化;TFA和ROS相似,其抑制DKD足细胞EMT的作用与诱导IRS1/PI3K/Akt通路活性而改善IR有关,这可能是TFA治疗DKD的科学内涵之一。该研究为TFA在糖尿病并发症领域的开发和应用提供了初步的药理学证据。

关键词 黄蜀葵花总黄酮; 糖尿病肾脏疾病; 胰岛素抵抗; 足细胞转分化; IRS1/PI3K/Akt 通路

收稿日期 2022-10-30

基金项目 国家自然科学基金面上项目(82174472、81573903); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20211298); 江苏省中医药科技发展计划项目(MS2021037); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX22_2065); 南京中医药大学自然科学基金项目(XZR2021087); 南京市医学科技发展项目(YKK20085); 南京市名中医专家工作室建设项目

通信作者 * 万毅刚, 博士, 主任中医师, 教授, 博士生导师, Tel: (025) 83106666-20806, E-mail: wyg68918@sina.com; * 穆耕林, 博士, 研究员, Tel: (025) 83106666-66868, E-mail: glydwsj@163.com

作者简介 # 王玉, 硕士研究生, Tel: (025) 83106666-20806, E-mail: penelope0118@126.com; # 曹东维, 博士, 主任医师, 硕士生导师, Tel: (021) 56639828-8548, E-mail: cdwlqq@hotmail.com

Effects and mechanisms of total flavones of *Abelmoschus manihot* in improving insulin resistance and podocyte epithelial-mesenchymal transition in diabetic kidney disease based on IRS1/PI3K/Akt pathway

WANG Yu^{1,2,3#}, CAO Dong-wei^{4#}, WAN Yi-gang^{2*}, MU Geng-lin^{3*}, WU Wei², FANG Qi-jun², LI Ya-jing¹, CHA Si-yu¹, TU Yue⁵, WAN Zi-yue⁶

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China; 3. Institute of Chinese Medicine, Nanjing University, Nanjing 210008, China; 4. Department of Nephrology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China; 5. Department of Traditional Chinese Medicine Health Preservation, Acupuncture, Moxibustion and Massage College, Health Preservation and Rehabilitation College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 6. Graduate School of Social Sciences, Faculty of Social Sciences, Hitotsubashi University, Tokyo 186-8601, Japan)

[Abstract] This study aimed to explore the effects and mechanisms of total flavones of *Abelmoschus manihot* (TFA), the extracts from traditional Chinese medicine indicated for kidney diseases, on insulin resistance (IR) and podocyte epithelial-mesenchymal transition (EMT) in diabetic kidney disease (DKD), and further to reveal the scientific connotation. Thirty-two rats were randomly divided into a normal group, a model group, a TFA group, and a rosiglitazone (ROS) group. The modified DKD model was induced in rats by methods including high-fat diet feeding, unilateral nephrectomy, and streptozotocin (STZ) intraperitoneal injection. After modeling, the rats in the four groups were given double-distilled water, TFA suspension, and ROS suspension correspondingly by gavage every day. At the end of the 8th week of drug administration, all rats were sacrificed, and the samples of urine, blood, and kidney tissues were collected. The parameters and indicators related to IR and podocyte EMT in the DKD model rats were examined and observed, including the general condition, body weight (BW) and kidney weight (KW), the biochemical parameters and IR indicators, the protein expression levels of the key signaling molecules and structural molecules of slit diaphragm in the renal insulin receptor substrate (IRS) 1/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/serine-threonine kinase (Akt) pathway, foot process form and glomerular basement membrane (GBM) thickness, the expression of the marked molecules and structural molecules of slit diaphragm in podocyte EMT, and glomerular histomorphological characteristics. The results showed that for the DKD model rats, both TFA and ROS could improve the general condition, some biochemical parameters, renal appearance, and KW. The ameliorative effects of TFA and ROS were equivalent on BW, urinary albumin (UAlb)/urinary creatinine (UCr), serum creatinine (Scr), triglyceride (TG), and KW. Secondly, they could both improve IR indicators, and ROS was superior to TFA in improving fast insulin (FIN) and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). Thirdly, they could both improve the protein expression levels of the key signaling molecules in the IRS1/PI3K/Akt pathway and glomerulosclerosis in varying degrees, and their ameliorative effects were similar. Finally, both could improve podocyte injury and EMT, and TFA was superior to ROS. In conclusion, this study suggested that podocyte EMT and glomerulosclerosis could be induced by IR and the decreased activation of the IRS1/PI3K/Akt pathway in the kidney in DKD. Similar to ROS, the effects of TFA in inhibiting podocyte EMT in DKD were related to inducing the activation of the IRS1/PI3K/Akt pathway and improving IR, which could be one of the scientific connotations of TFA against DKD. This study provides preliminary pharmacological evidence for the development and application of TFA in the field of diabetic complications.

[Key words] total flavones of *Abelmoschus manihot*; diabetic kidney disease; insulin resistance; podocyte epithelial-mesenchymal transition; IRS1/PI3K/Akt pathway

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20221111.703

糖尿病肾脏疾病 (diabetic kidney disease, DKD) 患者存在全身或肾组织局部的胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)。IR 不仅是 DKD 的致病因素, 还是其进展至终末期肾病 (尿毒症) 的重要机

制之一^[1-3]。肾脏作为胰岛素的靶器官具备丰富的胰岛素受体,其中,足细胞是胰岛素高度敏感的效应细胞,因此,DKD患者足细胞损伤(结构异常和功能紊乱)与胰岛素及其受体的活性低下关系密切^[3-5]。在已知的胰岛素信号调控途径中,胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS) 1/磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/丝氨酸-苏氨酸激酶(serine-threonine kinase, Akt)通路、葡萄糖转运蛋白4通路以及单磷酸腺苷活化蛋白激酶通路等为人所熟知^[6-7]。其中,IRS1/PI3K/Akt通路是足细胞IR的主要信号调控途径,其活性低下会直接诱导足细胞转分化,即上皮细胞-间充质细胞转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),进而引发足细胞损伤以及相应的肾小球病变。研究表明,足细胞发生EMT时会失去上皮细胞标志分子,如nephrin或P钙黏蛋白等,转而高表达间充质细胞标志分子,如I型胶原(collagen-I)或结蛋白(desmin)等。此外,在足细胞结构方面,表现为足细胞肥大、足突融合、足细胞脱落或程序性死亡等;在足细胞功能方面,表现为足细胞裂隙膜结构分子表达下调和分布失衡^[8-9]。最终,形成肾小球硬化。简言之,肾组织IR及其IRS1/PI3K/Akt通路活性低下是诱导DKD足细胞EMT和肾小球病变的上游致病因素,也是中、西药物的治疗靶标^[10-13]。

近年来,黄蜀葵花的提取物——黄蜀葵花总黄酮(total flavones of *Abelmoschus manihot*, TFA)及其中成药制剂黄葵胶囊(Huangkui Capsules, HKC)在DKD的临床治疗领域中得到了广泛的应用^[14-16]。笔者团队发现,对于早期DKD患者,“HKC联合西医常规基础治疗”的干预措施能改善IR和尿微量白蛋白^[17]。此外,HKC还能抑制DKD模型鼠肾小管上皮细胞EMT^[18]。尽管如此,在DKD状态下,对于肾组织IR诱导的足细胞EMT以及TFA的作用和机制,下述涉及其科学内涵的关键问题还没有明确的答案:肾组织IR及其IRS1/PI3K/Akt通路活性低下是否会诱导DKD足细胞EMT和肾小球硬化? TFA抑制DKD足细胞EMT的作用与诱导IRS1/PI3K/Akt通路活性而改善IR有关吗?因此,笔者借助改良型大鼠DKD模型,试图阐明TFA在体内改善IR和足细胞EMT的作用和机制,并揭示其治疗DKD的科学内涵。

2648

1 材料

1.1 动物 从上海杰思捷实验动物有限公司购入40只SD雄性大鼠,8周龄,体质量180~200 g,许可证号SCXK(沪)2012-0006,分笼饲养于南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验中心SPF级屏障环境内(许可证号SYXK20140052),并进行相关实验,实验方案经南京大学医学院动物伦理委员会批准(许可证号SCXK20210114)。将40只大鼠按照随机数字表分为正常组(8只)和造模组(32只)。其中,正常组大鼠喂以普通饲料;造模组大鼠喂以高脂饲料(碳水化合物44.6%、蛋白质22.3%、脂肪22.3%,购自上海普路腾生物科技有限公司,沪饲证201404001)。

1.2 药品 TFA购自江苏苏中药业集团股份有限公司(批号219990040);将1 g TFA溶解于1 mL双蒸水中而配制成1 g·mL⁻¹ TFA混悬液。罗格列酮(rosiglitazone, ROS)购自重庆涪陵制药厂有限公司(批号H20041399);将1 g ROS溶解于1 mL双蒸水中配制成1 g·mL⁻¹ ROS混悬液。链脲佐菌素(streptozocin, STZ)购自Sigma公司(批号S0130);将1 mg STZ冻干粉溶解于1 mL柠檬酸缓冲液中配制成1 g·L⁻¹ STZ溶液。诺和灵N购自诺和诺德公司中国分公司(批号J20120034)。

1.3 试剂及抗体 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒和全蛋白提取试剂盒(批号20220221、20220520)购自南京凯基生物科技发展有限公司;5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(批号03693996)购自上海碧云天生物技术有限公司;蛋白相对分子质量标记物(批号91254484)购自Thermo Scientific公司;显色液(批号1100221)购自Millipore公司;大鼠血清胰岛素试剂盒(批号20210617)购自武汉华美生物工程有限公司;兔抗大鼠Akt(抗体号4691)、磷酸化Akt(phosphorylated Akt, p-Akt, 抗体号4060)、PI3K(抗体号4257)、磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K, 抗体号17366)、IRS1(抗体号2382)以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 抗体号5174)抗体均购自Cell Signaling Technology公司;兔抗大鼠nephrin(抗体号ab216341)、nephl(抗体号ab82804)抗体均购自Abcam公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG(抗体号BS13278)抗体购自Biorworld公司。

2 方法

2.1 改良型大鼠 DKD 模型造模、分组及给药 40 只大鼠适应性喂养 1 周后,将其随机分为正常组(8 只)和造模组(32 只);根据文献和笔者团队的前期研究^[19-21],采用“高脂饲料饲养、单肾切除以及 STZ 腹腔注射”等综合措施联合诱导改良型大鼠 DKD 模型。在大鼠糖尿病模型成功建立后 8 周左右,模型鼠会陆续出现异常升高的尿白蛋白(urinary albumin, UAlb)。当其 UAlb/尿肌酐(urinary creatinine, UCr)持续 $>30\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,判定为改良型大鼠 DKD 模型造模成功。这里需要说明的是,在整个造模过程中,有 8 只大鼠因手术操作、伤口感染以及过高血糖而死亡。最后,只有 24 只大鼠存活并完成实验。将 24 只改良型 DKD 模型鼠按照随机数字表分为模型组、TFA 组和 ROS 组(每组 8 只),加上正常组(8 只),共 4 组。每天经灌胃分别给予正常组和模型组大鼠双蒸水;此外,每天经灌胃分别给予 TFA 组、ROS 组大鼠 TFA 混悬液或 ROS 混悬液,持续干预 8 周。根据 60 kg 标准体质量患者的 HKC(每颗 HKC 含有 34 mg TFA)和 ROS 临床治疗量,采用动物标准换算公式计算出 200 g 大鼠的每天给药量相当于 $136\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TFA 混悬液和 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ROS 混悬液。

2.2 大鼠一般情况、BW 及 KW 每天观察各组大鼠精神状态、活动情况、皮毛色泽等一般情况;分别于造模前、成模时以及给药后的第 2、4、6、8 周末检测各组大鼠体质量(body weight, BW);处死全部大鼠后摘取右侧肾脏,摄片并称量肾脏质量(kidney weight, KW)。

2.3 大鼠生化参数 分别于造模前、成模时以及给药后的第 2、4、6、8 周末分次收集各组大鼠的尿液,采用免疫扩散法检测 UAlb/UCr 等尿液生化参数;采用强生稳捷血糖仪检测各组大鼠的随机血糖(blood glucose, BG)。此外,在给药的第 8 周末,经腹主动脉采血,采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清白蛋白(albumin, Alb)、血清肌酐(serum creatinine, Scr)、血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血清胆固醇(cholesterol, CHOL)、血清甘油三酯(triglyceride, TG)等血清生化参数。

2.4 大鼠 IR 指标 在处死大鼠前禁食 8 h,而后检测各组大鼠的空腹血糖(fast blood glucose, FBG)和空腹血清胰岛素(fast insulin, FIN);根据文献报道

的公式^[21]计算各组大鼠的 IR 指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR),计算公式为 $\text{HOMA-IR} = \text{FBG} \times \text{FIN} / 22.5$ 。

2.5 大鼠肾组织 IRS1/PI3K/Akt 通路关键信号分子和裂隙膜结构分子蛋白表达水平 采用免疫印迹法(Western blot, WB)半定量分析各组大鼠肾组织 IRS1/PI3K/Akt 通路关键信号分子(IRS1、PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt)和裂隙膜结构分子(nephrin、nephl)蛋白表达水平。具体方法详见笔者团队的前期研究^[19-21],其中,一抗包括 IRS1(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、Akt(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、nephrin(1:500)、nephl(1:500)以及 GAPDH(1:1 000)等。在各个条带曝光后进行灰度分析,结果分别与 GAPDH 灰度对照,其比值表示目的蛋白相对表达量。

2.6 大鼠足突形态和 GBM 厚度 将少许肾皮质组织制作成标准的病理切片,具体方法详见笔者团队的前期研究^[19-21],在透射电子显微镜(电镜)下观察足突形态和肾小球基底膜(glomerular basement membrane, GBM)厚度,并摄片。采用病理图像分析系统 Image-Pro Plus(IPP)计算 GBM 厚度。

2.7 大鼠足细胞 EMT 标志分子和裂隙膜结构分子的表达程度 采用免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)分析各组大鼠足细胞 EMT 标志分子(collagen-1、desemin)和裂隙膜结构分子(nephrin、nephl)的表达程度。具体方法详见笔者团队的前期研究^[19,21],其中,一抗包括 collagen-1(1:100)、desemin(1:100)、nephrin(1:500)以及 nephl(1:500)等。采用 IPP 软件观察并分析各组大鼠肾小球内 collagen-1、desemin、nephrin、nephl 的表达程度。

2.8 大鼠肾小球组织形态特征 将少许肾皮质组织制作成标准的病理切片,分别进行过碘酸雪夫(periodic acid schiff, PAS)染色和 Masson 染色。具体方法详见笔者团队的前期研究^[19-21]。在光学显微镜(光镜)下观察肾小球组织形态特征,采用 IPP 软件计算肾小球内细胞总数(glomerular cellular population, GCP)、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)面积以及胶原(collagen)面积。

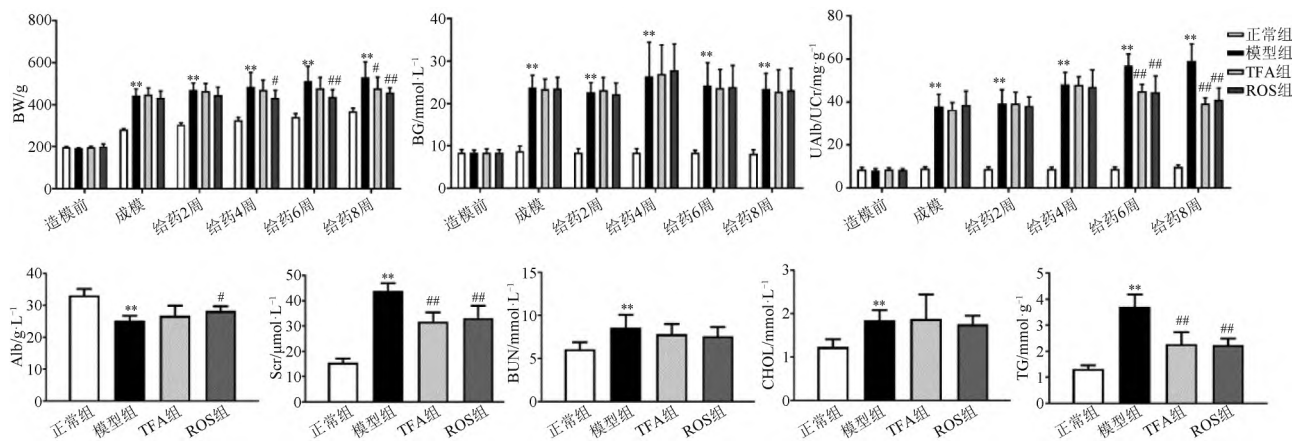
2.9 统计学分析 采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计分析,组间比较在进行方差齐性检验之后,再采用单因素方差分析,所有数据使用均数 $\pm$ 标准

准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TFA 和 ROS 对 DKD 模型鼠一般情况、生化指标、肾脏外观和 KW 的影响 模型组大鼠在造模成功后出现精神萎靡、活动迟缓、皮毛暗淡、多饮、多食、多尿等糖尿病的典型特征,而且,BW 增长较快,

与正常组对比,其差异有统计学意义;TFA 和 ROS 组大鼠在给药的第 4、8 周末,BW 明显减轻,与模型组相比,其差异均有统计学意义,见图 1。在 DKD 成模后的第 2、4、6、8 周,除正常组外,其余 3 组大鼠 BG 均稳定在 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上,然而,经胰岛素联合 TFA 或 ROS 干预后,2 组大鼠间 BG 的差异无统计学意义,见图 1。



BW. 体重; BG. 血糖; UAlb/UCr. 尿白蛋白/尿肌酐; Alb. 血清白蛋白; Scr. 血清肌酐; BUN. 血清尿素氮; CHOL. 血清胆固醇; TG. 血清甘油三酯。TFA. 黄蜀葵总黄酮; ROS. 罗格列酮; 与正常组相比* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组相比# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (图 2~8 同)。

图 1 4 组大鼠一般情况和生化指标的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

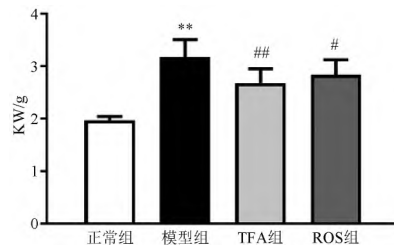
Fig. 1 Comparison of general conditions and biochemical indicators of rats in the four groups($\bar{x} \pm s, n = 8$)

模型组大鼠在造模成功后,其 UAlb/UCr 逐渐升高,与正常组相比,其差异有统计学意义;在给药后的第 6、8 周末,TFA 和 ROS 组大鼠 UAlb/UCr 有所下降,与模型组相比,其差异有统计学意义,见图 1。此外,在成模后的第 8 周末,模型组大鼠 Alb 明显降低,与正常组相比,其差异有统计学意义;经 TFA 和 ROS 干预后,ROS 组大鼠 Alb 明显升高,与模型组相比,其差异有统计学意义,而 TFA 组大鼠 Alb 无明显改变,见图 1。

模型组大鼠在成模后的第 8 周末,其 Scr、BUN、CHOL、TG 水平均有不同程度的升高,与正常组相比,其差异分别有统计学意义;经 TFA 和 ROS 干预后,TFA 和 ROS 组大鼠 Scr 和 TG 明显下降,与模型组相比,其差异分别有统计学意义,然而,TFA 组和 ROS 组大鼠间 BUN、CHOL 的差异无统计学意义,见图 1。

模型组大鼠在成模后的第 8 周末,其肾脏明显肿大、缺血;经 TFA 和 ROS 干预后,TFA 组和 ROS

组大鼠肾脏肿大、缺血有所改善;在成模后的第 8 周末,模型组大鼠 KW 明显增加,与正常组相比,其差异有统计学意义;经 TFA 和 ROS 干预后,TFA 组和 ROS 组大鼠 KW 明显下降,与模型组相比,其差异分别有统计学意义,见图 2。上述结果说明,TFA 和 ROS 均能改善 DKD 模型鼠的一般情况、生化指标、肾脏外观和 KW;其中,对于 BW、UAlb/UCr、Scr、TG、KW 的改善作用,TFA 和 ROS 相似。



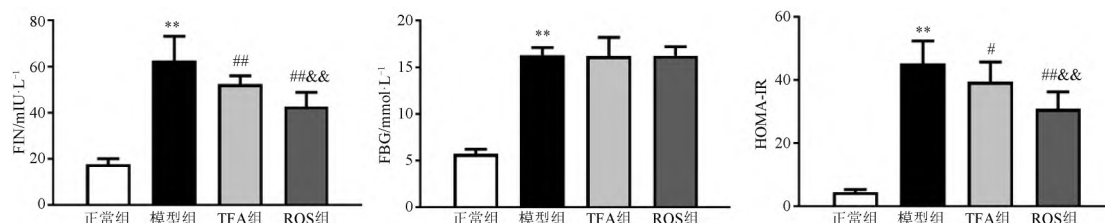
KW. 肾脏质量。

图 2 4 组大鼠肾脏质量的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Comparison of kidney weight of rats in the four groups($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 TFA 和 ROS 对 DKD 模型鼠 IR 指标的影响 IR 指标包括“FIN、FBG 以及 HOMA-IR”等^[6-4]。模型组大鼠在成模后的第 8 周末,FIN、FBG、HOMA-IR 均明显升高,与正常组相比,其差异分别有统计学意义;经 TFA 和 ROS 干预后,TFA 组和 ROS 组大鼠 FIN、HOMA-IR

明显降低,与模型组相比,其差异分别有统计学意义;此外,ROS 组大鼠 FIN、HOMA-IR 明显下降,与 TFA 组相比,其差异分别有统计学意义,见图 3。上述结果说明,TFA 和 ROS 均能改善 DKD 模型鼠 IR 指标,其中,对于 FIN、HOMA-IR 的改善作用,ROS 优于 TFA。



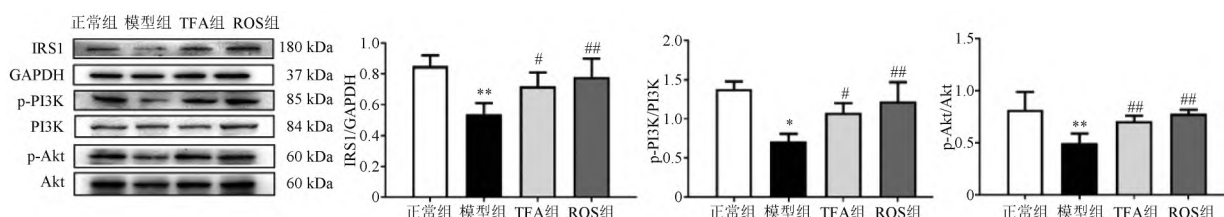
FIN. 空腹胰岛素; FBG. 空腹血糖; HOMA-IR. 胰岛素抵抗指数; 与 TFA 组相比^{&&} $P < 0.01$ (图 6 同)。

图 3 4 组大鼠 IR 相关指标的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Comparison of insulin resistance-related indicators of rats in the four groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 TFA 和 ROS 对 DKD 模型鼠肾组织 IRS1/PI3K/Akt 通路关键信号分子蛋白表达水平的影响 IRS1/PI3K/Akt 通路关键信号分子包括“IRS1、PI3K、Akt、p-PI3K 以及 p-Akt”等^[23]。经 WB 分析,模型组大鼠在成模后的第 8 周末,其肾组织 IRS1、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平均明显下调,与正常组相比,其差异分别有统计学意义;经

TFA 和 ROS 干预后,TFA 组和 ROS 组大鼠肾组织 IRS1、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平均明显上调,与模型组相比,其差异分别有统计学意义,见图 4。上述结果说明,TFA 和 ROS 均能不同程度地改善 DKD 模型鼠肾组织 IRS1/PI3K/Akt 通路关键信号分子的蛋白表达水平,而且,TFA 的改善作用和 ROS 相似。



IRS1. 胰岛素受体底物 1; GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; p-PI3K. 磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶; PI3K. 磷脂酰肌醇 3 激酶; p-Akt. 磷酸化丝氨酸-苏氨酸激酶; Akt. 丝氨酸-苏氨酸激酶 (图 6 同)。

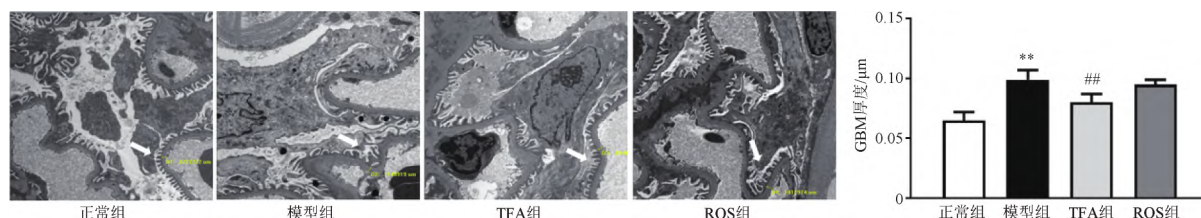
图 4 4 组大鼠肾组织 IRS1/PI3K/Akt 通路关键信号分子蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Comparison of protein expression levels of the key signaling molecules in the IRS1/PI3K/Akt pathway of rats in the four groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.4 TFA 和 ROS 对 DKD 模型鼠足细胞损伤的影响 足细胞损伤的标志性特征涉及“肾小球滤过膜结构、足突形态、GBM 厚度以及肾小球内 nephrin、nephl 表达程度和肾组织蛋白表达水平”^[23]等。经电镜观察,正常组大鼠肾小球滤过膜结构完整、清晰,足突排列整齐,GBM 厚度正常;模型组大鼠在成模后的第 8 周末,其足突排列紊乱、部分融合或缩短,GBM 厚度明显增加,其中,GBM 厚度与正常组

相比,其差异有统计学意义;经 TFA 和 ROS 干预后,TFA 组大鼠足突形态和 GBM 厚度均明显改善,其中,GBM 厚度与模型组相比,其差异有统计学意义,见图 5。

经 IHC 和 WB 分析,模型组大鼠在成模后的第 8 周末,其肾小球内 nephrin、nephl 表达程度和肾组织蛋白表达水平均明显减弱和下调,与正常组相比,其差异分别有统计学意义;经 TFA 和 ROS 干预后,



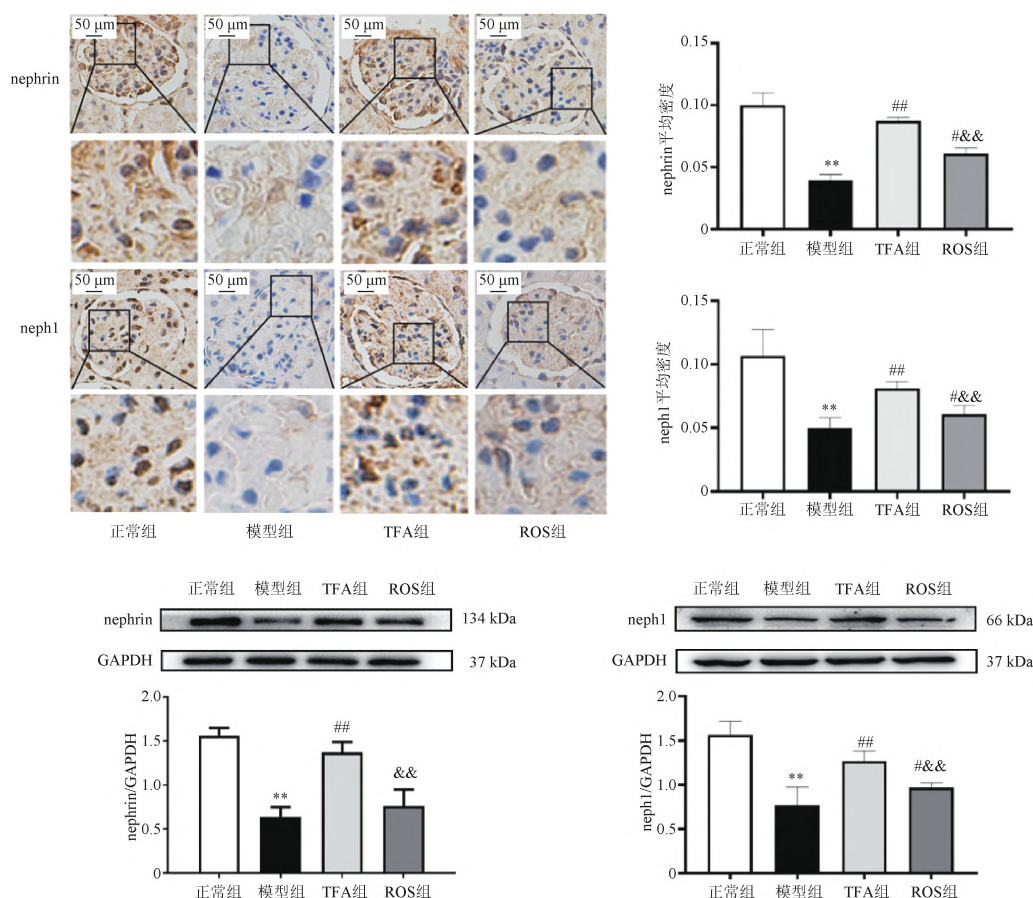
GBM. 肾小球滤过膜。

图 5 4 组大鼠足突形态和 GBM 厚度的比较(电镜, $\times 1\ 700$; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Comparison of foot process form and GBM thickness of rats in the four groups(electron microscope, $\times 1\ 700$; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

TFA 和 ROS 组大鼠肾小球内 nephrin、nephl 表达程度和肾组织蛋白表达水平均明显增强和上调,与模型组相比,其差异分别有统计学意义;此外,TFA 组大鼠肾小球内 nephrin、nephl 表达程度和肾组织蛋

白表达水平均明显增强和上调,与 ROS 组相比,其差异分别有统计学意义,见图 6。上述结果说明,TFA 和 ROS 均能改善 DKD 模型鼠足细胞损伤,其中,TFA 的改善作用优于 ROS。



局部放大为 400 倍(图 7、8 同)。

图 6 4 组大鼠肾小球内 nephrin、nephl 表达程度和肾组织蛋白表达水平的比较(免疫组化; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Comparison of nephrin and nephl expression in the glomerulus and protein expression level in the kidney of rats in the four groups(immunohistochemistry; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.5 TFA 和 ROS 对 DKD 模型鼠足细胞 EMT 的影响 足细胞 EMT 的标志性分子包括“collagen-1、

desmin”等^[8-9]。研究表明,肾小球内 collagen-1、desmin 表达程度增强提示足细胞发生 EM。经 IHC

分析,模型组大鼠在成模后的第 8 周末,其肾小球内 collagen-1、desmin 表达程度明显增强,与正常组相比,其差异有统计学意义;经 TFA 和 ROS 干预后,TFA 组大鼠肾小球内 collagen、desmin 表达程度均明显减弱,与模型组相比,其差异分别有统计学意义;

ROS 组大鼠肾小球内 desmin 表达程度明显减弱,与模型组相比,其差异有统计学意义,但是,肾小球内 collagen-1 表达程度的变化不显著,见图 7。上述结果说明,TFA 和 ROS 均能改善 DKD 模型鼠足细胞 EMT,其中,TFA 的改善作用优于 ROS。

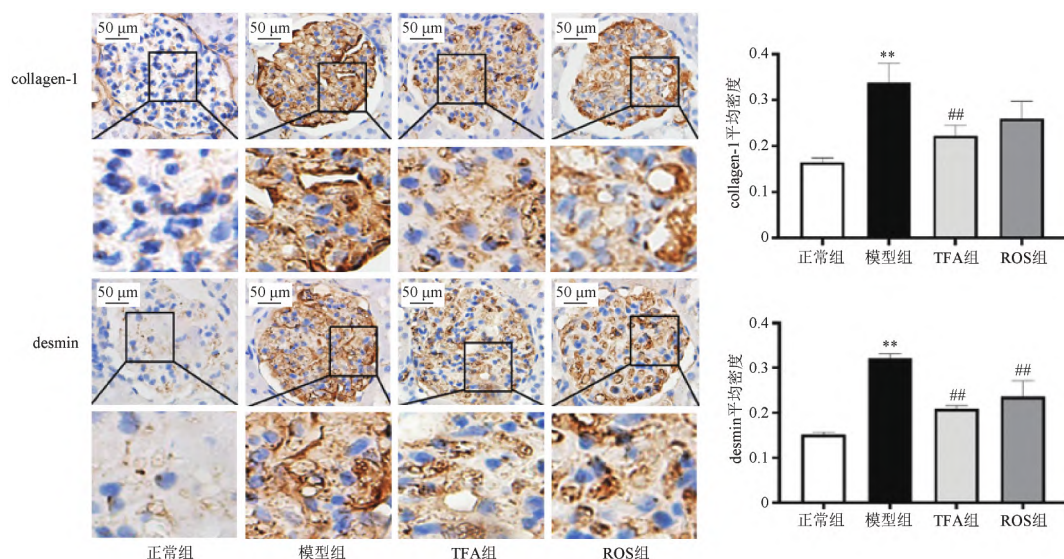


图 7 4 组大鼠肾小球内 collagen-1、desmin 表达程度的比较(免疫组化; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Comparison of collagen-1 and desmin expression in the glomeruli of rats in the four groups(immunohistochemistry; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

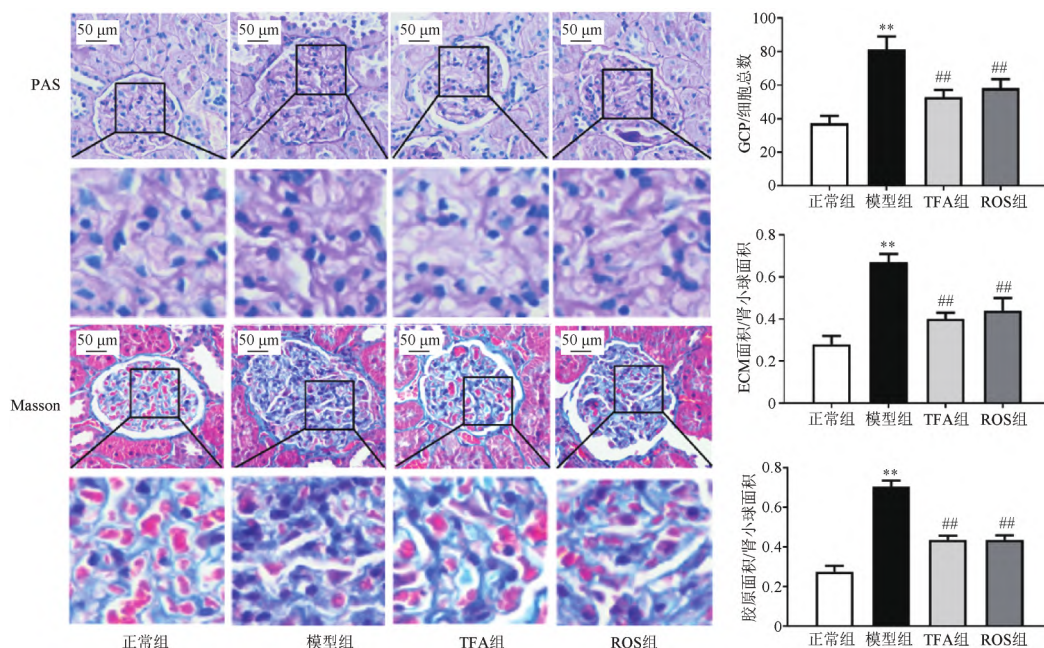
3.6 TFA 和 ROS 对 DKD 模型大鼠肾小球硬化的影响 肾小球硬化的相关指标包括“肾小球内 GCP、ECM 面积以及胶原面积”^[19-21]等。经光镜观察,模型组大鼠在成模后的第 8 周末,其肾小球内 GCP、ECM 面积、胶原面积均明显增多,与正常组相比,其差异分别有统计学意义;经 TFA 和 ROS 干预后,TFA 组和 ROS 组大鼠肾小球内 GCP、ECM 面积、胶原面积均明显减少,其差异分别有统计学意义,见图 8。上述结果说明,TFA 和 ROS 均能改善 DKD 模型鼠肾小球硬化,而且,TFA 的改善作用和 ROS 相似。

4 讨论

胰岛素受体在肌肉、脂肪、肝脏乃至肾脏中都有广泛的分布,所以,肾脏也被称之为“胰岛素受体靶器官”^[24-26]。胰岛素及其受体相结合才能实现其在肾脏的生理作用;当胰岛素靶器官对外源性和(或)内源性胰岛素的敏感性和反应性降低时就会发生 IR^[4]。研究显示,DKD 患者肾损伤与 IR 密切相关^[24]。目前,临床上是根据 HOMA-IR 来评估 IR,并且,常用包括 ROS 在内的胰岛素增敏剂来改善

IR^[1-3]。在本研究中,笔者发现,对于“高脂饲料饲养、单肾切除以及 STZ 腹腔注射”等综合措施联合诱导的改良型 DKD 大鼠模型,在成模后的第 8 周末,模型鼠不仅出现肾损伤指标(UAlb/UCr、Scr、BUN)和 IR 指标(FBG、FIN、HOMA-IR)的明显升高,而且,与 IR 相关的指标(BW、TG、CHOL)也异常升高。经 TFA 和 ROS 干预后,除 BG 以外,模型鼠肾损伤和 IR 指标均得到改善。其中,对于 BW、UAlb/UCr、Scr、TG、KW 的改善作用,TFA 和 ROS 相似;对于 FIN、HOMA-IR 的改善作用,ROS 优于 TFA。简言之,TFA 和 ROS 均能改善 DKD 模型鼠肾损伤和 IR。

研究表明,足细胞是胰岛素的效应细胞之一^[3]。胰岛素及其受体相结合,足细胞膜上的 IRS1 被激活,可进一步启动胞内相应的信号转导途径,包括经典的 IRS1/PI3K/Akt 通路。若该通路信号转导途径受阻,尤其是关键信号分子——IRS1 以及 PI3K、Akt 的蛋白磷酸化水平降低,导致 IRS1/PI3K/Akt 通路活性低下而发生足细胞损伤^[23]。据报道,在 Akt 亚型 Akt2 敲除的 DKD 小鼠模型中出



PAS. 过碘酸雪夫染色; Masson. Masson 染色; GCP. 肾小球内细胞总数; ECM. 细胞外基质。

图 8 4 组大鼠肾小球组织形态特征的比较(光镜; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 8 Comparison of histomorphological characteristics of the glomerulus of rats in the four groups(light microscope; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

现了明显的足细胞损伤,包括足突融合、足细胞凋亡以及 nephrin 表达下调^[27]。在本研究中,笔者发现,在成模后的第 8 周末,DKD 模型组大鼠肾组织 IRS1、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平均明显下调;同时,模型鼠出现足细胞损伤的标志性特征,包括“肾小球滤过膜结构改变、足突形态异常、GBM 厚度增加以及肾小球内 nephrin、nephrin 表达程度增强和肾组织蛋白表达水平上调”等。这些结果说明,对于改良型 DKD 大鼠模型,肾组织 IRS1/PI3K/Akt 通路活性低下的确诱导了下游的足细胞损伤。更为重要的是,笔者还发现,经 TFA 和 ROS 干预后,模型鼠肾组织 IRS1/PI3K/Akt 通路活性不仅有所恢复,而且,其足突形态、GBM 厚度以及肾小球内 nephrin、nephrin 表达程度和肾组织蛋白表达水平均得到改善。这里,需要注意的是,对于 IRS1/PI3K/Akt 通路活性的改善作用,TFA 和 ROS 相似;对于足细胞损伤的改善作用,TFA 优于 ROS。据报道,ROS 在体内外能诱导 IRS1/PI3K/Akt 通路活性^[28],基于此,笔者推测,TFA 保护 DKD 足细胞损伤的靶标很可能与其上游的胰岛素信号有关。然而,TFA 的干预靶点是 IRS1/PI3K/Akt 通路中哪一个关键信号分子呢?还需要体外细胞实验的验证。简言之,TFA 和 ROS 均

能改善 DKD 模型鼠肾组织 IRS1/PI3K/Akt 通路活性和足细胞损伤。

在高血糖等各种有害因素的刺激下,足细胞失去上皮细胞的标志分子(nephrin) 而高表达间充质细胞的标志分子(collagen-1、desmin),就会发生 EMT^[29]。BONNET F 等^[29]报道,在 DKD 大鼠模型足细胞中,上皮细胞标志分子 nephrin 蛋白表达水平明显下调;LI C 等报道,经转化生长因子 β 刺激的足细胞模型,其上皮细胞标志分子 nephrin 表达减少,间充质细胞标志分子 desmin、collagen-1 表达增多,足细胞出现了结构和功能的改变^[30]。因此,DKD 足细胞 EMT 的特征是其标志性分子 desmin、collagen-1 在肾小球内的高表达。在本研究中,笔者发现,DKD 模型鼠在成模后的第 8 周末,其肾组织 nephrin、nephrin 表达程度和蛋白表达水平均下调, collagen-1、desmin 表达程度均明显上调。经 TFA 和 ROS 干预后,模型鼠足细胞 EMT 标志性分子在肾小球内的表达程度均得到改善,其中,TFA 的改善作用优于 ROS。简言之,TFA 和 ROS 均能改善 DKD 模型足细胞 EMT。

尽管 EMT 是 DKD 足细胞损伤的早期过程,但是,一旦足细胞出现脱落或程序性死亡,GBM 失去

足细胞的覆盖而裸露、粘连,就会诱发肾小球硬化^[23]。因此,足细胞 EMT 的直接后果就是肾小球硬化,其病理形态特征包括“肾小球内 GCP、ECM 面积以及胶原面积增多”等。在本研究中,笔者发现,DKD 模型鼠在成模后的第 8 周末,模型组大鼠肾小球内 GCP 明显增多,ECM 面积和胶原面积也明显增加。经 TFA 和 ROS 干预后,模型鼠肾小球硬化得到明显改善,而且,TFA 和 ROS 的改善作用相似。这些结果提示,对于 DKD 肾损伤,TFA 的保护作用不仅在于诱导肾组织 IRS1/PI3K/Akt 通路活性而改善 IR,还能抑制足细胞 EMT 而改善肾小球硬化。当然,TFA 多靶点的作用和机制还需要更加精准的体内外实验加以验证^[24]。

总之,本研究提示,肾组织 IR 及其 IRS1/PI3K/Akt 通路活性低下会诱导 DKD 足细胞 EMT 和肾小球硬化;TFA 和 ROS 相似,其抑制 DKD 足细胞 EMT 的作用与诱导 IRS1/PI3K/Akt 通路活性而改善 IR 有关,这可能是 TFA 治疗 DKD 的科学内涵之一。本研究为 TFA 在糖尿病并发症领域的开发和应用提供了初步的药理学证据。

参考文献

- [1] COOPER M, WARREN A M. A promising outlook for diabetic kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(2): 68.
- [2] AKHTAR M, TAHA N M, NAUMAN A, et al. Diabetic kidney disease: past and present [J]. Adv Anat Pathol, 2020, 27(2): 87.
- [3] ROGACKA D. Insulin resistance in glomerular podocytes: potential mechanisms of induction [J]. Arch Biochem Biophys, 2021, 710: 109005.
- [4] SPOTO B, PISANO A, ZOCCALI C. Insulin resistance in chronic kidney disease: a systematic review [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 311(6): F1087.
- [5] 石格, 毛志敏, 万毅刚, 等. 糖尿病肾病足细胞损伤的病理机制及中药的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2416.
- [6] YARIBEYGI H, FARROKHI F R, BUTLER A E, et al. Insulin resistance: review of the underlying molecular mechanisms [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8152.
- [7] YEE H Y, 杨晶晶, 万毅刚, 等. 胰岛素抵抗的分子机制及中药的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1289.
- [8] YING Q, WU G. Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases: an update [J]. Ren Fail, 2017, 39(1): 474.
- [9] 石格, 吴薇, 万毅刚, 等. 低剂量雷公藤甲素抑制 Wnt3 α / β -catenin 信号通路活性改善高剂量 D-葡萄糖糖诱导的足细胞转分化 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(1): 139.
- [10] 杨汝春, 朱晓玲, 张华琴, 等. 白藜芦醇及 SRT1720 对 2 型糖尿病大鼠肾小球足细胞裂孔隔膜分子表达的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(2): 164.
- [11] 陈正涛, 高泓, 张愿, 等. 足细胞自噬与糖尿病肾病的关系及中医药调控研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(7): 227.
- [12] 吴薇, 杨晶晶, 万毅刚, 等. 慢性肾脏病胰岛素抵抗的发病机制、治疗策略及中药的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 49.
- [13] TANG G, LI S, ZHANG C, et al. Clinical efficacies, underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(9): 2749.
- [14] ZHAO J, TOSTIVINT I, XU L, et al. Efficacy of combined *Abelmoschus manihot* and irbesartan for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes and diabetic kidney disease: a multicenter randomized double-blind parallel controlled clinical trial [J]. Diabetes Care, 2022, 45(7): e113.
- [15] SHI L, FENG L, ZHANG M, et al. *Abelmoschus manihot* for diabetic nephropathy: a systematic review and Meta-analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 9679234.
- [16] AN W, HUANG Y, CHEN S, et al. Efficacy and safety of Huangkui Capsule for diabetic nephropathy: a protocol for systematic review and Meta-analysis [J]. Medicine(Baltimore), 2021, 100(42): e27569.
- [17] 吴薇, 刘莹露, 万毅刚, 等. 黄葵胶囊对早期糖尿病肾脏疾病患者胰岛素抵抗和尿微量白蛋白的多靶点治疗作用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5797.
- [18] HAN W, MA Q, LIU Y, et al. Huangkui Capsule alleviates renal tubular epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and TLR4/NF- κ B signaling [J]. Phytomedicine, 2019, 57: 203.
- [19] 王美子, 岳丽军, 万毅刚, 等. 葛根苓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.
- [20] WU W, HU W, HAN W B, et al. Inhibition of Akt/mTOR/p70S6K signaling activity with Huangkui Capsule alleviates the early glomerular pathological changes in diabetic nephropathy [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 443.
- [21] MATTHEWS D R, HOSKER J P, RUDENSKI A S, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man [J]. Diabetologia, 1985, 28(7): 412.
- [22] ZHONG F Y, LI J, WANG Y M, et al. MicroRNA-506 modulates insulin resistance in human adipocytes by targeting S6K1 and altering the IRS1/PI3K/AKT insulin signaling pathway [J]. J Bioenerg Biomembr, 2021, 53(6): 679.
- [23] PODGÓRSKI P, KONIECZNY A, LIS Ł, et al. Glomerular podocytes in diabetic renal disease [J]. Adv Clin Exp Med, 2019, 28(12): 1711.

- [24] FORNONI A. Proteinuria, the podocyte, and insulin resistance [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(21): 2068.
- [25] 脇野修, 水口育, 伊藤裕. 腎とインスリン抵抗性 [J]. *日腎会誌*, 2014, 56(1): 28.
- [26] SHOKO H, MOTONOBU N, MASASHI S, et al. Selective insulin resistance in the kidney [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 5825170.
- [27] CANAUD G, BIENAIMÉ F, VIAU A, et al. AKT2 is essential to maintain podocyte viability and function during chronic kidney disease [J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1288.
- [28] GUAN D Y, SUN H W, WANG J T, et al. Rosiglitazone promotes glucose metabolism of GIFT tilapia based on the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Physiol Rep*, 2021, 9(5): e14765.
- [29] BONNET F, COOPER M E, KAWACHI H, et al. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension [J]. *Diabetologia*, 2001, 44 (7): 874.
- [30] LI C, SIRAGY H M. High glucose induces podocyte injury via enhanced (pro) renin receptor-Wnt- β -catenin-snail signaling pathway [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(2): e89233.
- [31] 万毅刚, 黄燕如, 孙伟, 等. 对实验性肾脏病动物模型的再认识 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(21): 4075.

责任编辑 陈琰