

本文引用: 唐路军, 张 稳, 曾 阳, 袁柳媚, 刘慧慧, 贺海霞, 胡国恒. 防己茯苓汤改善糖尿病肾病肾小球系膜细胞焦亡的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(7): 1231–1239.

防己茯苓汤改善糖尿病肾病肾小球系膜细胞焦亡的机制研究

唐路军¹, 张 稳², 曾 阳², 袁柳媚², 刘慧慧², 贺海霞², 胡国恒^{2*}

1. 湖南航天医院, 湖南 长沙 410205; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

〔摘要〕 **目的** 探讨防己茯苓汤对糖尿病肾病小鼠肾功能和肾小球系膜细胞焦亡的影响及其作用机制。**方法** 40 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、防己茯苓汤组、抑制剂组和防己茯苓汤+抑制剂组, 每组 8 只。对照组小鼠正常喂养, 灌胃等量生理盐水, 其余 3 组小鼠均通过高脂饲料喂养并注射链脲佐菌素构建糖尿病肾病模型。造模成功后, 模型组灌胃等量生理盐水, 防己茯苓汤组予防己茯苓汤灌胃, 抑制剂组腹腔注射 NLRP3 抑制剂 MCC950, 防己茯苓汤+抑制剂组予防己茯苓汤灌胃+腹腔注射 NLRP3 抑制剂 MCC950, 每组连续干预 8 周。MES-13 细胞随机分为对照组、模型组、防己茯苓汤组、抑制剂组和防己茯苓汤+抑制剂组。对照组即正常培养的肾小球系膜细胞 MES-13 细胞加入空白血清处理, 其余 3 组细胞用含 30 mmol/L 葡萄糖的高糖培养基处理建立糖尿病高糖环境诱导的细胞损伤模型。模型组细胞予空白血清处理, 防己茯苓汤组予 10% 防己茯苓汤含药血清处理, 抑制剂组予 NLRP3 抑制剂 MCC950 处理, 防己茯苓汤+抑制剂组予 10% 防己茯苓汤含药血清+NLRP3 抑制剂 MCC950 处理, 所有细胞均处理 48 h。检测各组小鼠空腹血糖(FBS)、血清肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、尿白蛋白/肌酐比值(UACR)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C); 采用 HE 染色观察小鼠肾组织病理形态; 采用 Western blot 检测小鼠肾组织和肾小球系膜细胞 MES-13 细胞中焦亡相关蛋白 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、胱天蛋白酶-1(Caspase-1)、裂解素 D(GSDMD)及炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-18 的表达水平; 采用透射电子显微镜进一步观察各组 MES-13 细胞的焦亡形态。**结果** 动物实验结果示: 与对照组相比, 模型组小鼠肾组织出现明显糖尿病肾病病理改变, FBS、Scr、BUN、UACR、TC、TG、LDL-C、NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 水平均升高($P<0.05$, $P<0.001$); 与模型组相比, 防己茯苓汤组和抑制剂组小鼠肾组织病理改变有所改善, FBS、Scr、BUN、UACR、TC、TG、LDL-C、NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$); 与防己茯苓汤组相比, 防己茯苓汤+抑制剂组小鼠肾组织病理形态改善, FBS、Scr、BUN、UACR、TC、TG、LDL-C、NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 水平均下降($P<0.05$)。细胞实验结果示: 与对照组相比, 模型组细胞焦亡明显, 且 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 水平均升高($P<0.01$); 与模型组相比, 防己茯苓汤组和抑制剂组细胞焦亡有所改善, NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 水平均降低($P<0.05$); 与防己茯苓汤组相比, 防己茯苓汤+抑制剂组细胞焦亡有所改善, NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 防己茯苓汤可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1 通路介导的细胞焦亡, 改善糖尿病肾病小鼠的肾功能, 从而减少肾组织病理损伤及炎症反应。

〔关键词〕 糖尿病肾病; 防己茯苓汤; 细胞焦亡; 肾功能; 炎症反应; NOD 样受体蛋白 3; 胱天蛋白酶 1

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.07.005

Mechanism of Fangji Fuling Decoction in ameliorating glomerular mesangial cell pyroptosis in diabetic nephropathy

TANG Lujun¹, ZHANG Wen², ZENG Yang², YUAN Liumei², LIU Huihui², HE Haixia², HU Guoheng^{2*}

1. Hunan Aerospace Hospital, Changsha, Hunan 410205, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan

University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔收稿日期〕 2025-02-17

〔基金项目〕 北京航天医科集团青年项目课题(2022YK15); 国家中医药管理局“全国名老中医药专家传承工作室”建设项目(国中医药人教函[2022]75 号); 国家自然科学基金青年基金项目(82104842); 湖南省教育厅科学研究项目(19A379)。

〔通信作者〕 * 胡国恒, 男, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: huguoheng@hnucm.edu.cn。

[Abstract] Objective To investigate the effects of Fangji Fuling Decoction (FJFLD) on renal function and glomerular mesangial cell pyroptosis in diabetic nephropathy (DN) mice, and to explore its underlying mechanism of action. **Methods** Forty 8-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, FJFLD group, inhibitor group, and FJFLD+inhibitor group, with eight mice in each group. The control group was fed normally and administered an equivalent volume of normal saline by gavage, while the other groups were induced with a high-fat diet and streptozotocin (STZ) injection to establish DN models. After successful modeling, the model group was given an equivalent volume of normal saline by gavage, the FJFLD group was treated with FJFLD via gavage, the inhibitor group received intraperitoneal injection of NLRP3 inhibitor MCC950, and the FJFLD+inhibitor group received both FJFLD by gavage and intraperitoneal injection of MCC950. All groups were continuously treated for eight weeks. MES-13 cells were randomly divided into control group, model group, FJFLD group, inhibitor group, and FJFLD+inhibitor group. The control group (normal cells) was treated with blank serum, while the other groups were exposed to a high-glucose (30 mmol/L) medium to establish DN-induced cell injury models. The model group received blank serum, the FJFLD group received 10% FJFLD-containing serum, the inhibitor group received the NLRP3 inhibitor MCC950, and the FJFLD+inhibitor group received combined 10% FJFLD-containing serum and MCC950. All cells were treated for 48 h. The fasting blood glucose (FBG), serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), urinary albumin-to-creatinine ratio (UACR), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were measured in mice. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe renal histopathological changes. Western blot was performed to determine the expression levels of pyroptosis-related proteins (NLRP3, Caspase-1, and GSDMD), and inflammatory factors (IL-1 β and IL-18) in renal tissue and MES-13 cells. Transmission electron microscopy was used to further observe the pyroptotic morphology of MES-13 cells in each group. **Results** Animal experiments indicate that, compared with the control group, the model group showed significant DN pathological changes in renal tissue, along with elevated FBS, Scr, BUN, UACR, TC, TG, LDL-C, NLRP3, GSDMD, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 levels ($P<0.05$, $P<0.001$). Compared with the model group, both FJFLD and inhibitor groups exhibited ameliorated renal histopathology, along with reduced FBS, Scr, BUN, UACR, TC, TG, LDL-C, NLRP3, GSDMD, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 levels ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). Compared with the FJFLD group, the FJFLD+inhibitor group demonstrated improvement in renal histopathology, with lower levels of FBS, Scr, BUN, UACR, TC, TG, LDL-C, NLRP3, GSDMD, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.05$). Cell experiments indicate that compared with the control group, the model group showed obvious pyroptosis and elevated NLRP3, GSDMD, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 levels ($P<0.01$). Compared with the model group, both the FJFLD group and FJFLD+inhibitor group exhibited ameliorated pyroptosis and reduced NLRP3, GSDMD, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 levels ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the FJFLD group, the FJFLD+inhibitor group showed ameliorated pyroptosis and reduced NLRP3, GSDMD, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 levels ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** FJFLD may improve the renal function of DN mice by inhibiting NLRP3/Caspase-1-mediated pyroptosis, thereby reducing pathological damage and inflammatory response in renal tissue.

[Keywords] diabetic nephropathy; Fangji Fuling Decoction; pyroptosis; renal function; inflammatory reaction; NOD-like receptor protein 3; Caspase-1

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病患者最常见的并发症之一,也是导致终末期肾病的主要原因^[1]。全球范围内,糖尿病的发病率持续上升,伴随 DN 的高发病率^[2-3]。据统计,有 20%~40% 的糖尿病患者病程的不同阶段发展为 DN^[4]。DN 的发生和进展与多种因素相关,包括高血糖、高血压、遗传因素以及慢性炎症等^[5-6]。鉴于目前对 DN 的治疗效果有限,且发病机制复杂,探究其潜在的分

子机制并寻找新的治疗靶点,成为 DN 研究的热点之一。

肾小球系膜细胞是肾小球的重要组成部分,参与维持肾小球基质和毛细血管结构的完整性^[7]。在 DN 患者中,肾小球系膜细胞常受到高糖环境的损伤,导致系膜扩展、基质沉积等病理性变化,最终引发肾小球硬化^[8]。近年来,细胞焦亡作为一种程序性细胞死亡方式,在炎症反应及肾脏损伤中的作用受

到广泛关注。细胞焦亡主要通过 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体激活胱天蛋白酶-1 (cysteine aspartic acid specific protease, Caspase-1), 并释放大促炎症细胞因子, 从而加剧炎症反应^[9-10]。研究发现, 在 DN 过程中, 肾小球细胞焦亡导致肾小球内皮细胞损伤, 从而加重 DN 的进展^[11]。因此, 抑制肾小球系膜细胞的焦亡过程, 可能成为 DN 治疗的重要策略之一。

防己茯苓汤源自《金匮要略方论·水气病脉证并治第十四》, 由防己、茯苓、黄芪、桂枝、甘草 5 味药物组成, 具有温阳利水、益气通络的功效。多项研究表明, 防己茯苓汤具有抗炎、镇痛效果, 并用于治疗肾功能不全^[12-13], 但其具体机制仍不明晰。因此, 本研究旨在探讨防己茯苓汤在 DN 中的具体作用机制, 重点关注其对肾小球系膜细胞焦亡的影响。通过构建 DN 动物模型和细胞模型, 研究防己茯苓汤对 NLRP3/Caspase-1 通路的调控作用, 进一步揭示其在 DN 中的潜在治疗价值。

1 材料

1.1 动物和细胞

40 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠和 20 只体质量 180~220 g 的雄性 SD 大鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[生产许可证: SYXK(京)2021-0006], 使用许可证: SYXK(京)2022-0052。12 h 光/暗循环, 温度 (22±2) °C, 相对湿度 50%~60%, 小鼠自由摄食和饮水。所有动物实验均经湖南中医药大学第一附属医院机构审查委员会批准, 伦理编号为 ZYFY20221210-10。

肾小球系膜细胞 MES-13 细胞购自美国典型培养物保藏中心, 货号: CRL-1927。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号: 11995065、16000-044); 青霉素-链霉素双抗、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、化学发光显影试剂 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号: 15140122、23225、32106); HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: G1120); NLRP3 抗体、裂解素 D (gasdermin D, GSDMD) 抗体、Caspase-1 抗体、白细胞介素 (interleukin)-1 β 抗体、IL-18 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号: ab263899、ab219800、ab207802、ab283818、ab243091); 辣根过

氧化物酶标记的二抗 (horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, HRP) (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号: 21230)。

1.3 主要仪器

CO₂ 细胞培养箱 (上海龙跃仪器设备有限公司, 型号: LCI-85T); 组织破碎均浆机 (无锡博弗瑞德生物科技有限公司, 型号: BD-GDB1); 恒温摇床 (上海一恒科学仪器有限公司, 型号: THZ-300C); 倒置显微镜 (德国 Leica 公司, 型号: DMI3000B); 蛋白电泳仪 (上海伯乐生命科学研究发展有限公司, 型号: Mini-PROTEAN Tetra 1658033); pH 计 (上海盛磁仪器有限公司, 型号: PHG-30); 电子天平 (天津市德安特传感技术有限公司, 型号: ML623); 透射电镜 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 型号: Tecnai G2 20-s-twin)。

2 方法

2.1 血清制备

20 只 SD 大鼠随机分为含药血清组和空白血清组, 每组 10 只。适应性喂养 1 周后, 进行血清制备。防己茯苓汤临床用量为 70 kg 成人每日服用 125 g 生药, 按体表面积转换为大鼠等效剂量为每日 11.25 g/kg^[14]。含药血清制备采用等效剂量的 5 倍进行灌胃, 剂量为 56.25 g/kg, 根据生药浓度 2.5 g/mL, 每日灌胃 22.5 mL/kg^[14], 分两次进行, 连续 7 d。最后一次给药后 1 h 进行大鼠的腹主动脉采血。采集的血液静置 30 min 后, 以 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min (离心半径 15 cm), 分离血清^[14]。空白血清的制备按相同剂量的生理盐水进行灌胃, 最后一次给药后 1 h, 采用与含药血清相同的方法采血、离心、分离血清。56 °C 灭活上清液 30 min, 0.22 μ m 过滤膜过滤细菌, -80 °C 储存, 用于后续实验。根据预实验结果, 确定 10% 的含药血清为最佳使用浓度, 用于后续细胞实验的处理。

2.2 动物造模方法

参考文献[15]构建 DN 模型, 实验环境为小鼠在无菌条件下观察, 随后开始喂养高脂饲料, 持续 6 周, 然后连续 5 d 静脉注射 35 mg/kg 链脲佐菌素。每周通过尾静脉采血测定小鼠的血糖水平。实验结束时, 小鼠的空腹血糖水平需持续高于 11.1 mmol/L, 同时通过尿液检测尿白蛋白/肌酐比值 (Urine albu-

min-to-creatinine ratio, UACR) 升高以评估肾功能的损伤程度, 判定 DN 模型造模成功^[15]。

2.3 动物分组、给药及取材

实验共使用 40 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 其中 32 只小鼠进行 DN 造模, 剩下 8 只设为对照组。32 只造模成功的小鼠按照随机数字表法分为模型组、防己茯苓汤组、抑制剂组以及防己茯苓汤+抑制剂组, 每组 8 只。对照组、模型组灌胃等量生理盐水, 防己茯苓汤组予以 200 mg/(kg·d) 防己茯苓汤灌胃, 抑制剂组予以腹腔注射 NLRP3 抑制剂 MCC950 (10 mg/kg)^[16], 防己茯苓汤+抑制剂组予以防己茯苓汤 200 mg/(kg·d) 灌胃+腹腔注射 NLRP3 抑制剂 MCC950 (10 mg/kg), 每组均连续干预 8 周。小鼠尿液样本在实验第 8 周采集, 将小鼠单独置于代谢笼中, 收集 24 h 尿液样本, 期间小鼠禁食但不禁水。收集的尿液在 4 ℃、2 000 r/min 离心 10 min (离心半径 15 cm) 后, 取上清液用于检测。实验结束后, 所有小鼠在禁食 12 h, 麻醉后从眼静脉采集外周血, 然后颈椎脱臼处死。外周血样本在 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min (离心半径 15 cm) 获得血清, 于 -80 ℃ 保存备用。此外, 收集小鼠肾脏组织样本于 -80 ℃ 保存备用。

2.4 细胞造模方法

肾小球系膜细胞 MES-13 细胞以 DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养。为模拟糖尿病高糖环境诱导的细胞损伤, 将 1×10⁵ 个 MES-13 细胞接种于 6 孔板中, 培养至 80% 融合度后, 用含 30 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 高糖培养基处理 48 h, 建立肾小球系膜细胞的高糖损伤模型^[17]。

2.5 细胞分组及干预

本研究细胞分组为: 对照组 (正常培养的 MES-13 细胞加入空白血清处理 48 h)、模型组 (MES-13 细胞按上述“2.4”方法造模后+空白血清处理 48 h)、防己茯苓汤组 (在模型组的基础上+10% 防己茯苓汤含药血清处理 48 h)、抑制剂组 [在模型组的基础上+NLRP3 抑制剂 MCC950 (5 μmol/L) 处理 48 h^[18]]、防己茯苓汤+抑制剂组 [在模型组的基础上+10% 防己茯苓汤含药血清+NLRP3 抑制剂 MCC950 (5 μmol/L) 处理 48 h]。

2.6 血糖和肾功能相关指标检测

在实验过程中, 通过采集小鼠尾静脉血进行血糖水平检测, 每周 1 次, 测量空腹血糖 (fasting blood glucose, FBS) 以评估模型构建的进展和干预效果。

肾功能相关指标包括血清肌酐 (serum creatinine, Scr)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和 UACR 的检测。使用全自动生化分析仪检测 Scr、BUN 水平以及 UACR, 以评估肾功能损伤情况。

2.7 脂质代谢指标检测

脂质代谢相关指标包括总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglycerides, TG) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 均通过全自动生化分析仪进行检测。所有检测操作均按照生化分析仪的标准流程进行操作, 用于评估小鼠脂质代谢的变化及药物干预效果。

2.8 HE 染色观察肾组织病理形态

将肾组织用 10% 中性福尔马林固定 24 h, 随后经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。将包埋好的肾组织切成 4 μm 的切片, 进行 HE 染色。染色后, 使用光学显微镜观察肾小球结构变化, 包括肾小球体积、间质水肿、炎症细胞浸润等病理特征。

2.9 透射电镜观察细胞焦亡形态

将 MES-13 细胞用 2.5% 戊二醛固定 4 h, 磷酸缓冲液冲洗后, 再用 1% 锇酸固定 2 h。随后经过乙醇梯度脱水、环氧树脂包埋、超薄切片 (70 nm), 使用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色。样本制备完成后, 通过透射电镜观察 MES-13 细胞的超微结构变化, 重点评估细胞器膨胀、膜结构破裂等焦亡特征, 并对不同组别间的差异进行比较。

2.10 Western blot 检测相关蛋白表达情况

从搜集的肾脏组织和细胞裂解液中提取总蛋白, 并使用 BCA 蛋白检测试剂盒进行定量。然后, 用 SDS-PAGE 将提取的 20 μg 蛋白分离并转移到 PVDF 膜上。随后将 PVDF 膜分别与以下一抗在 4 ℃ 下孵育过夜: NLRP3 (1:1 000)、GSDMD (1:1 000)、Caspase-1 (1:1 000)、IL-1β (1:1 000) 和 IL-18 (1:1 000)。洗膜后, 加入 HRP (1:1 000) 在 37 ℃ 下孵育 45 min。GAPDH 作为内部对照。使用化学发光成像系统对膜进行显影和成像, 利用 ImageJ 软件分析图像光密度值, 计算目标蛋白的表达量。

2.11 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, Graph-Pad 9.0 软件行数据可视化。所有细胞实验均进行了至少 3 次独立生物重复 (n=3), 计量数据记为“ $\bar{x} \pm s$ ”, 统计比较采用单因素方差分析, 然后进行 Tukey 事后检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠血糖和肾功能比较

与对照组相比,模型组小鼠 FBS、Scr、BUN、UACR 水平平均升高($P<0.05$)。与模型组相比,防己茯苓汤组、抑制剂组和防己茯苓汤组+抑制剂组小鼠 FBS、Scr、BUN 和 UACR 指标均下降($P<0.05$)。与防己茯苓汤组、抑制剂组相比,防己茯苓汤组+抑制剂组小鼠 FBS、Scr、BUN 和 UACR 指标均下降($P<0.05$)。详见表 1。

3.2 各组小鼠脂质代谢相关指标比较

与对照组相比,模型组小鼠 TC、TG 和 LDL-C 水平升高($P<0.05$)。与模型组相比,防己茯苓汤组、抑制剂组和防己茯苓汤组+抑制剂组小鼠 TC、TG 和

LDL-C 水平平均降低($P<0.05$)。与防己茯苓汤组、抑制剂相比,防己茯苓汤组+抑制剂组小鼠 TC、TG 和 LDL-C 水平降低($P<0.05$)。详见表 2。

3.3 各组小鼠肾组织病理情况

对照组小鼠肾小球毛细血管袢排列规则,结构完整,间质无水肿和炎症浸润;模型组小鼠肾组织出现明显的病理性改变,具体表现为肾小球体积增大,肾囊腔变窄,间质水肿,伴大量炎症细胞浸润,肾小管上皮细胞肥大,并伴有空泡变性;防己茯苓汤组和抑制剂组小鼠肾小球体积和间质水肿减轻,炎症细胞浸润减少;防己茯苓汤+抑制剂组小鼠肾小球和肾小管的结构接近正常,水肿和炎症细胞浸润明显减少。详见图 1。

表 1 各组小鼠血糖和肾功能指标比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of blood glucose and renal function indicators among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	FBS/(mmol/L)	Scr/(μ mol/L)	BUN/(mmol/L)	UACR/(mg/mmol)
对照组	4.37 $\pm$ 0.66	24.05 $\pm$ 1.36	5.24 $\pm$ 1.03	0.03 $\pm$ 0.02
模型组	20.40 $\pm$ 0.89*	66.83 $\pm$ 1.49*	12.37 $\pm$ 0.71*	0.36 $\pm$ 0.07*
防己茯苓汤组	9.61 $\pm$ 0.65 [#]	36.53 $\pm$ 0.95 [#]	8.28 $\pm$ 0.94 [#]	0.13 $\pm$ 0.03 [#]
抑制剂组	9.70 $\pm$ 0.52 [#]	35.26 $\pm$ 0.94 [#]	8.18 $\pm$ 0.94 [#]	0.10 $\pm$ 0.01 [#]
防己茯苓汤+抑制剂组	6.39 $\pm$ 0.81 ^{#Δ}	27.57 $\pm$ 0.69 ^{#Δ}	5.40 $\pm$ 0.78 ^{#Δ}	0.05 $\pm$ 0.03 ^{#Δ}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与防己茯苓汤组比较,[#] $P<0.05$;与抑制剂组比较, ^{Δ} $P<0.05$ 。

表 2 各组小鼠脂质代谢指标比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Comparison of lipid metabolism indicators among different groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	TC/(mmol/L)	TG/(μ mol/L)	LDL-C/(mmol/L)
对照组	1.13 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.06	0.22 $\pm$ 0.04
模型组	3.01 $\pm$ 0.15*	1.68 $\pm$ 0.09*	0.95 $\pm$ 0.08*
防己茯苓汤组	1.36 $\pm$ 0.49 [#]	0.65 $\pm$ 0.08 [#]	0.44 $\pm$ 0.07 [#]
抑制剂组	1.38 $\pm$ 0.04 [#]	0.63 $\pm$ 0.09 [#]	0.42 $\pm$ 0.09 [#]
防己茯苓汤+抑制剂组	1.12 $\pm$ 0.11 ^{#Δ}	0.34 $\pm$ 0.10 ^{#Δ}	0.22 $\pm$ 0.04 ^{#Δ}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与防己茯苓汤组比较,[#] $P<0.05$;与抑制剂组比较, ^{Δ} $P<0.05$ 。

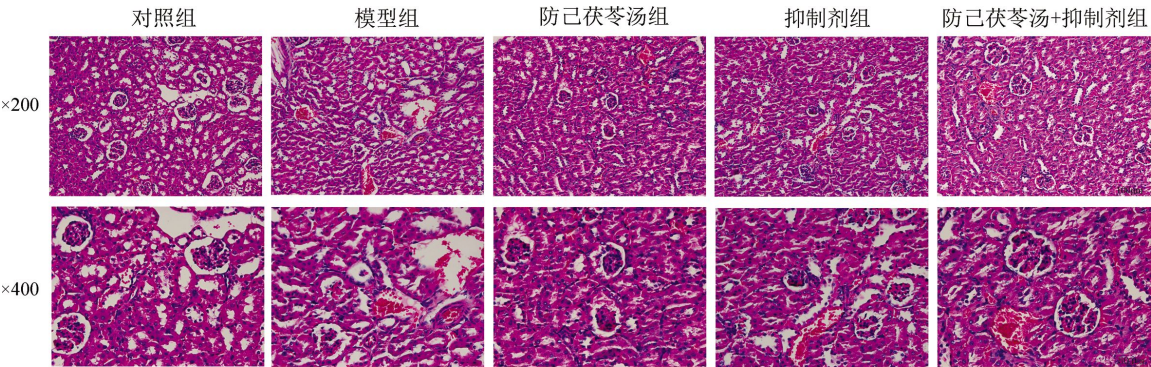


图 1 各组小鼠肾组织 HE 染色结果图

Fig.1 HE staining images of renal tissue in each group of mice

3.4 各组小鼠肾组织细胞焦亡相关因子表达的蛋白表达情况

与对照组相比,模型组小鼠肾组织中细胞焦亡相关因子 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白水平升高($P<0.001$)。与模型组相比,防己茯苓汤组、抑制剂组和防己茯苓汤组+抑制剂组小鼠肾组织中 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白水平下降($P<0.01$, $P<0.001$)。与防己茯苓汤组、抑制剂组相比,防己茯苓汤+抑制剂组小鼠肾组织中 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白水平下降($P<0.05$)。详见图 2—3。

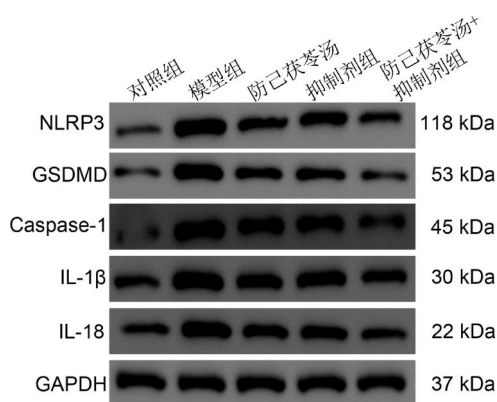


图 2 各组小鼠肾组织细胞焦亡相关因子蛋白条带图

Fig.2 Protein band patterns of pyroptosis-related proteins in renal tissue in each group of mice

3.5 各组肾小球系膜细胞焦亡情况

对照组 MES-13 细胞结构完整,细胞呈梭形或

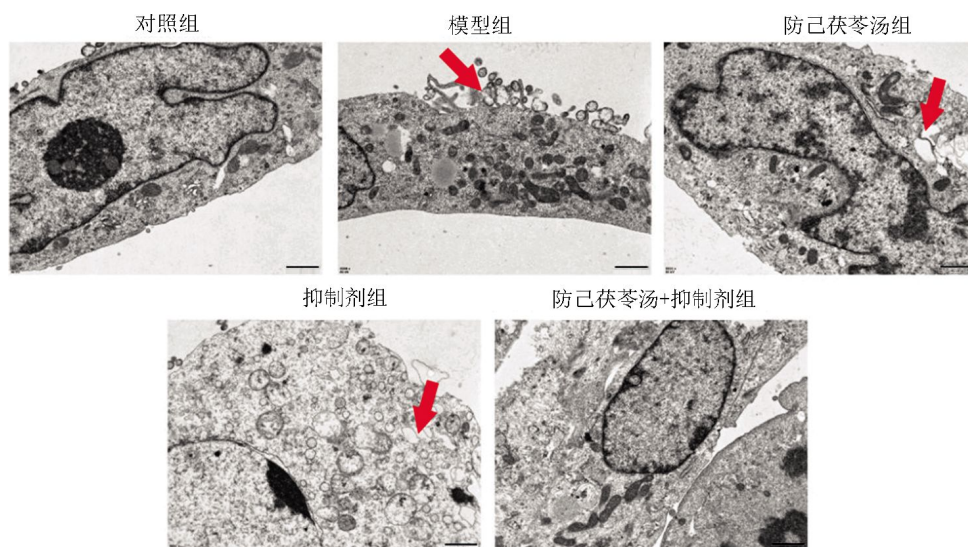


图 4 各组细胞透射电镜结果($\times 4\,000$, 标尺: $1\,\mu\text{m}$)

Fig.4 Transmission electron microscopy images of cells in each group ($\times 4\,000$, scale: $1\,\mu\text{m}$)

注:红色箭头表示细胞破裂、细胞内容物释放或细胞质空泡。

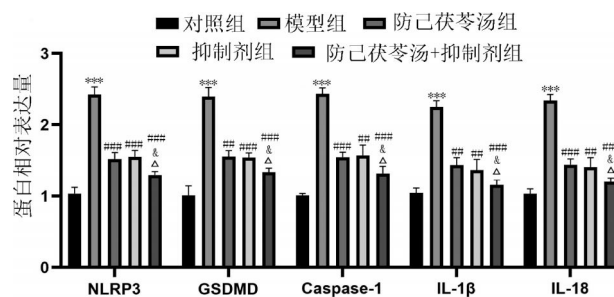


图 3 各组小鼠肾组织细胞焦亡相关因子蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Fig.3 Comparison of expression levels of pyroptosis-related proteins in renal tissue among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

注:与对照组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与防己茯苓汤组比较,* $P<0.05$;与抑制剂组比较, $\Delta P<0.05$ 。

者多边形,细胞核大且呈椭圆形;模型组 MES-13 细胞内质网肿胀,细胞质呈现空泡状,部分细胞膜结构破裂;防己茯苓汤组和抑制剂组 MES-13 细胞形态相对完整,内质网破坏程度较低;防己茯苓汤+抑制剂组 MES-13 细胞结构较完整,内质网和细胞膜的损伤程度最低。详见图 4。

3.6 各组肾小球系膜细胞焦亡相关因子的蛋白表达情况

与对照组相比,模型组 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白水平均升高($P<0.01$);与模型组相比,防己茯苓汤组、抑制剂组和防己茯苓汤组+抑制剂组 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白水平均降低($P<0.05$);与防己茯苓汤组、

抑制剂组相比, 防己茯苓汤+抑制剂组细胞内 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白水平降低($P<0.05$, $P<0.01$)。详见图 5—6。

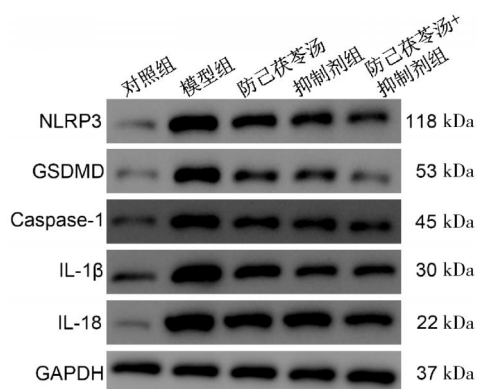


图 5 各组肾小球系膜细胞焦亡相关因子蛋白条带图

Fig.5 Protein band patterns of pyroptosis-related proteins in glomerular mesangial cells in each group

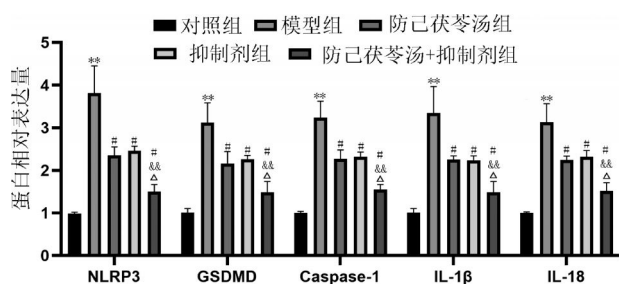


图 6 各组肾小球系膜细胞焦亡相关因子蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Fig.6 Comparison of expression levels of pyroptosis-related proteins in glomerular mesangial cells of renal tissue among different groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

注: 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$; 与防己茯苓汤组比较, ## $P<0.01$; 与抑制剂组比较, ^ $P<0.05$ 。

4 讨论

中医药在治疗糖尿病及其并发症方面具有悠久的历史, 尤其是在 DN 的防治中展现出显著疗效^[19]。近年来, 随着现代医学技术的发展, 越来越多的研究证实中医药在 DN 中的潜在疗效^[20]。中药通过多靶点、多途径的作用机制, 能有效调节体内的炎症反应、氧化应激以及代谢异常, 从而对 DN 产生显著的治疗效果^[19-20]。本研究结合经典中药复方防己茯苓汤, 通过动物实验和细胞实验发现其能抑制 NLRP3/Caspase-1 炎症小体介导的细胞焦亡, 从而改善 DN 小鼠的肾功能, 为进一步研究中医药的分子机制奠定了基础。

细胞焦亡是一种通过炎症反应介导的细胞死亡方式, 与 DN 的病理进展密切相关^[21]。焦亡的主要机制是通过 NLRP3 炎症小体的激活, 导致 Caspase-1 裂解 GSDMD, GSDMD-N 端片段插入细胞膜, 形成穿孔, 导致细胞内容物如炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 释放, 进而触发强烈的炎症反应^[22]。这种炎症不仅加重了肾小球系膜细胞的损伤, 还进一步推动了肾脏纤维化和病理变化, 如肾小球硬化、系膜基质扩展等^[23]。DN 的发展与 NLRP3 炎症小体密切相关, 其激活不仅引发了肾脏局部的炎症反应, 还通过诱发焦亡加速肾脏的损伤进程^[24]。研究表明, NLRP3/Caspase-1 介导的焦亡是 DN 中肾脏固有细胞受损的重要途径^[25]。此外, 内质网应激与细胞焦亡之间存在密切联系, 内质网应激的增加能进一步激活 NLRP3 炎症小体, 促进焦亡的发生^[26]。研究表明, 通过抑制肿瘤坏死因子- α /高迁移率族蛋白 B1 通路, 与焦亡相关的肾脏和肝脏病变也得到了有效改善^[27]。本研究结果显示, 在 DN 模型中, NLRP3、Caspase-1 以及下游的焦亡相关因子如 IL-1 β 和 IL-18 的表达水平显著升高, 提示焦亡在 DN 进程中起到了关键作用, 可能和抑制 NLRP3/Caspase-1 通路, 有效减少焦亡相关的肾脏炎症反应和损伤有关。在动物实验中, 氢化硫作为 NLRP3 炎症小体的抑制剂, 能有效减少缺血再灌注诱导的急性肾损伤中的焦亡过程, 并通过抑制 NLRP3/Caspase-1 通路改善肾脏病理改变^[28]。同样, 安石榴苷作为一种天然多酚, 通过抑制 NLRP3 通路减少 DN 中的焦亡相关蛋白表达, 显著缓解了高糖环境引发的肾脏损伤^[23]。这些结果为未来 DN 的治疗提供了新思路, 并进一步强调了 NLRP3 炎症小体作为治疗靶点的潜力。

临床上, 防己茯苓汤已被证实在心肌纤维化、2 型糖尿病、急性肾损伤等多种疾病中有显著疗效^[29-31]。例如, 庞健丽等^[32]发现, 防己茯苓汤联合二甲双胍治疗肥胖 2 型糖尿病能降低患者血糖, 减轻体质量, 改善胰岛素抵抗和炎症指标。然而, 国内外关于防己茯苓汤改善各类疾病的机制研究相对较少。现有的研究中, HUANG 等^[33]发现防己茯苓汤通过动物实验验证, 防己茯苓汤可显著改善缺血再灌注诱导的急性肾损伤病理状态, 降低 SCr 和 BUN 水平。这与本研究结果类似, 本研究同样发现防己茯苓汤可调控血糖水平并降低 SCr、BUN 和 UACR 水平^[33]。本研究进一

步的研究表明,防己茯苓汤能降低 NLRP3、GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的表达水平,减轻肾小球系膜细胞的炎症反应,进而减轻肾脏病理变化。此外,本研究还发现防己茯苓汤与 NLRP3 抑制剂联合使用时,焦亡相关因子的表达进一步下降,肾功能改善更为显著。本研究结果提示,防己茯苓汤可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1 介导的细胞焦亡,从而改善 DN 模型中的肾损伤。

防己茯苓汤中多味药物可能共同参与了焦亡的抑制作用。防己中的防己碱在脑缺血再灌注损伤模型中能显著下调 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的表达,减轻神经组织炎症和细胞焦亡^[34]。黄芪中的黄芪皂苷 IV 可抑制氧化应激诱导的 NLRP3 炎症小体及其下游 GSDMD、Caspase-1、IL-1 β 等关键蛋白的表达,减少脑组织中焦亡的发生率^[35]。甘草中的甘草酸也被证实在肝缺血再灌注损伤中通过阻断 GSDMD 依赖性焦亡,显著降低 IL-1 β 水平,发挥抗炎和细胞保护作用^[36]。这些研究为防己茯苓汤发挥抗细胞焦亡、改善 DN 提供了成分和机制上的实验依据,提示其多成分联合干预可能通过协同抑制 NLRP3 炎症小体通路,从多个层面减轻肾组织炎症和结构损伤。

本研究通过实验验证了防己茯苓汤在 DN 中的作用机制,初步得出防己茯苓汤可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1 通路,抑制糖尿病肾小球系膜细胞焦亡,最终改善 DN 小鼠肾损伤。然而,本研究也存在一定的局限性。虽然通过动物实验验证了防己茯苓汤对 DN 的治疗效果,但仍需要进一步研究以确定防己茯苓汤中哪种活性成分直接作用于 NLRP3 炎症小体。此外,本研究主要集中于 NLRP3/Caspase-1 通路的调控,未来的研究可进一步探讨防己茯苓汤对其他炎症小体或焦亡相关通路的调节作用。

参考文献

- [1] ZHAO T T, LI M Y, XIANG Q, et al. Yishen Huashi Granules ameliorated the development of diabetic nephropathy by reducing the damage of glomerular filtration barrier[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 872940.
- [2] 贾伟平. 糖尿病肾病流行病学, 病因及发病机制新启示[C]//中华医学学会肾脏病学分会 2010 学术年会专题讲座汇编. 杭州: 中华医学学会, 2010: 66.
- [3] 李 阳, 王一梅, 李 芳, 等. “一带一路”国家慢性肾脏病的疾病负担及变化趋势研究[J]. *中华肾脏病杂志*, 2024, 40(5): 335–344.
- [4] LI Y, HOU J G, LIU Z, et al. Alleviative effects of 20(R)-Rg3 on HFD/STZ-induced diabetic nephropathy via MAPK/NF- κ B signaling pathways in C57BL/6 mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 267: 113500.
- [5] HU F, ZHANG T T. Study on risk factors of diabetic nephropathy in obese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *International Journal of General Medicine*, 2020, 13: 351–360.
- [6] 陈会玲, 张 苇, 张 丽. 2 型糖尿病患者慢性肾脏病风险感知现状及其影响因素[J]. *河南医学研究*, 2024, 33(7): 1199–1203.
- [7] ABBOUD H E. Mesangial cell biology[J]. *Experimental Cell Research*, 2012, 318(9): 979–985.
- [8] TUNG C W, HSU Y C, SHIH Y H, et al. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy[J]. *Nephrology (Carlton, Vic)*, 2018, 23(Suppl 4): 32–37.
- [9] 毛开睿, 孙 兵. NLRP3 炎症小体研究进展[J]. *现代免疫学*, 2011, 31(1): 1–4.
- [10] 唐依婷, 高 岩, 邵凌云. NLRP3 炎症小体在感染性疾病中作用机制研究进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2024, 24(5): 607–612.
- [11] SHAO Y W, DENG S J, TANG W, et al. Molecular mechanism of GSDMD mediated glomerular endothelial cells pyroptosis: An implying in the progression of diabetic nephropathy[J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 122: 110632.
- [12] 苏中昊, 叶 进, 张占刚. 防己茯苓汤对急性肾损伤大鼠肾组织 KIM-1 和 NGAL 表达的影响[J]. *中医杂志*, 2014, 55(6): 500–503.
- [13] 石立鹏, 邓静薇, 尹二谦, 等. 防己茯苓汤对心肌纤维化小鼠巨噬细胞极化和氧化应激的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(24): 11–18.
- [14] QIN M Y, HUANG S Q, ZOU X Q, et al. Drug-containing serum of rhubarb-Astragalus capsule inhibits the epithelial-mesenchymal transformation of HK-2 by downregulating TGF- β 1/p38MAPK/Smad2/3 pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 280: 114414.
- [15] LIU C Y, ZHAO S L, ZHU C J, et al. Ergosterol ameliorates renal inflammatory responses in mice model of diabetic nephropathy[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 128: 110252.
- [16] GAO R F, SHI H R, CHANG S C, et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces myocardial fibrosis and improves cardiac remodeling in a mouse model of myocardial infarction[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 74: 105575.
- [17] CHEN X T, XIE H W, LIU Y, et al. Interference of ALOX5 alleviates inflammation and fibrosis in high glucose-induced

- renal mesangial cells[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2022, 25(1): 34.
- [18] LI S H, WITHAAR C, RODRIGUES P G, et al. The NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 improves cardiac function in a HFpEF mouse model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024, 181: 117711.
- [19] LIU X J, HU X K, YANG H, et al. A review of traditional Chinese medicine on treatment of diabetic nephropathy and the involved mechanisms[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2022, 50(7): 1739-1779.
- [20] 桑永浩, 宋立群, 负 捷. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨中医药治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. *中医药学报*, 2023, 51(9): 111-118.
- [21] ELIAS E E, LYONS B, MURUVE D A. Gasdermins and pyroptosis in the kidney[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2023, 19(5): 337-350.
- [22] 张发君, 马 萍. NLRP3 炎症小体与细胞焦亡相关研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(38): 33-34.
- [23] AN X, ZHANG Y H, CAO Y, et al. Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway[J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1516.
- [24] HENEDAK N T, EL-ABHAR H S, SOUBH A A, et al. NLRP3 Inflammasome: A central player in renal pathologies and nephropathy[J]. *Life Sciences*, 2024, 351: 122813.
- [25] CAO Z H, HUANG D, TANG C F, et al. Pyroptosis in diabetes and diabetic nephropathy[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2022, 531: 188-196.
- [26] 陈淑珍. 内质网应激调控 NLRP3 炎症小体的研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(10): 905-910.
- [27] WANG Y, ZHANG H Y, CHEN Q, et al. TNF- α /HMGB1 inflammation signalling pathway regulates pyroptosis during liver failure and acute kidney injury[J]. *Cell Proliferation*, 2020, 53(6): e12829.
- [28] NI J D, JIANG L J, SHEN G F, et al. Hydrogen sulfide reduces pyroptosis and alleviates ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury by inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. *Life Sciences*, 2021, 284: 119466.
- [29] 杨长游, 汤婷婷, 刘秋美, 等. 基于网络药理学探究防己茯苓汤治疗肾病综合征的成分与机制[J]. *武汉工程大学学报*, 2023, 45(5): 496-505.
- [30] 孙师钢, 汪 勤. 肥胖 2 型糖尿病痰热互结证患者治疗中小陷胸汤合防己茯苓汤的应用效果[J]. *糖尿病新世界*, 2024, 27(10): 106-108, 112.
- [31] 董为技. 防己茯苓汤联合四逆汤对脓毒症急性肾损伤患者尿肾损伤分子-1、正五聚蛋白 3 水平的影响[J]. *新中医*, 2022, 54(17): 35-41.
- [32] 庞健丽, 钟润芬, 周卓宁, 等. 小陷胸汤合防己茯苓汤联合二甲双胍治疗肥胖 2 型糖尿病痰热互结证的临床研究[J]. *中医药导报*, 2023, 29(7): 96-100, 121.
- [33] HUANG J X, WANG B X, ZOU H B, et al. Mechanism of Fangji Fulingtang for treating acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion based on network pharmacology and molecular docking verification[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2022, 175-82.
- [34] WANG J, GUO M, MA R J, et al. Tetrandrine alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation via Sirt-1[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9042.
- [35] XIAO L, DAI Z W, TANG W J, et al. Astragaloside IV alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury through NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis inhibition via activating Nrf2[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021(1): 9925561.
- [36] HUA S Y, MA M Y, FEI X Y, et al. Glycyrrhizin attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing HMGB1-dependent GSDMD-mediated kupffer cells pyroptosis[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 68: 145-155.

(本文编辑 田梦妍)