

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research益肾祛风方通过调节 Nrf2/HO-1 介导的铁死亡
改善单侧输尿管梗阻大鼠肾纤维化的研究Research of Yishen Qufeng formulation ameliorates renal fibrosis in unilateral
ureteral obstruction rats by regulating Nrf2/HO-1-mediated ferroptosis高晶琳^{1,2,3,4}, 韦 缘^{1,2,3,4},
周恩超^{1,2,3,4}

(1. 南京中医药大学 附属医院/江苏省中医院
肾内科, 江苏 南京 210029; 2. 南京中医药大学
第一临床医学院, 江苏 南京 210046; 3. 中医补
益肾元抗衰老研究江苏高校重点实验室, 江苏
南京 210023; 4. 国医大师邹燕勤传承工作室, 江
苏 南京 210029)

GAO Jing-lin^{1,2,3,4}, WEI Yuan^{1,2,3,4},
ZHOU En-chao^{1,2,3,4}

(1. Department of Nephrology, Nanjing
University of Traditional Chinese Medicine
Affiliated Hospital / Jiangsu Provincial
Hospital of Traditional Chinese Medicine,
Nanjing 210029, Jiangsu Province, China;
2. First Clinical School, Nanjing
University of Traditional Chinese
Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu
Province, China; 3. Key Laboratory of
Traditional Chinese Medicine Tonifying
Kidney Elements and Anti Aging Research
in Jiangsu Universities, Nanjing 210023,
Jiangsu Province, China; 4. Master of
Traditional Chinese Medicine Zou Yanqin
Inheritance Studio, Nanjing 210029,
Jiangsu Province, China)

基金项目: 国家自然科学基金面上基金资助项目
(82474427); 第三批江苏省中医药
领军人才基金资助项目(SLJ0319);
江苏省研究生实践创新计划基金资
助项目(KYCX24-2232); 江苏省中
医院科技基金资助项目
(Y2022zj07); 江苏省中医院院级课
题面上基金资助项目(Y2202)

作者简介: 高晶琳(1999-), 女, 硕士研究生, 主
要从事中医肾病的临床诊断及相关
基础研究

通信作者: 周恩超, 主任中医师
Tel: (025) 86617141

E-mail: zhouenchao@njucm.edu.cn

摘要:目的 通过构建单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾纤维化模型, 探究益肾祛风方(YQF)通过调节核因子红系2相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)轴介导铁死亡改善肾纤维化的机制。**方法** 将8周龄SD大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹达格列净)和低、中、高剂量实验组(15.21、22.82和30.42 g·kg⁻¹·d⁻¹益肾祛风方)。除假手术组外, 其余各组大鼠单侧结扎左侧输尿管构建肾间质纤维化(RIF)模型。待造模成功后, 阳性对照组和低、中、高剂量实验组分别灌胃给予对应药物, 假手术组和模型组均灌胃给予等体积的0.9% NaCl。6组大鼠每天给药1次, 连续14 d。用全自动整合式生化分析仪检测血清肌酐、尿素氮和尿蛋白水平, 用蛋白质印迹法检测肾组织中纤维化、氧化应激及铁死亡相关蛋白相对表达水平的变化。**结果** 中、高剂量实验组、假手术组、模型组及阳性对照组的血清肌酐水平分别为(50.24±7.81)、(49.15±8.87)、(41.96±5.25)、(59.44±11.93)和(52.14±8.38) μmol·L⁻¹, 尿素氮水平分别为(4.58±0.56)、(4.45±0.55)、(4.32±0.60)、(6.00±1.03)和(6.55±1.02) mmol·L⁻¹, 尿蛋白水平分别为(640.59±205.70)、(538.74±237.98)、(526.51±192.62)、(982.91±349.13)和(964.26±456.84) mg·d⁻¹, 谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)蛋白相对表达水平分别为1.62±0.15、3.01±0.41、2.25±0.27、1.01±0.51和2.15±0.63, 胱氨酸/谷氨酸反向转运体(xCT)蛋白相对表达水平分别为0.62±0.10、1.02±0.06、1.65±0.13、0.52±0.20和1.18±0.13, Nrf2蛋白相对表达水平分别为0.66±0.12、1.04±0.16、1.20±0.10、0.54±0.03和1.19±0.14, HO-1蛋白相对表达水平分别为1.13±0.15、1.21±0.18、2.21±0.17、0.64±0.44和1.57±0.26, α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)相对表达水平分别为1.63±0.47、1.13±0.57、0.49±0.91、2.88±0.97和1.05±0.60, 高剂量实验组的上述指标与模型组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均P<0.05)。**结论** 益肾祛风方可能通过激活Nrf2/HO-1信号通路抑制铁死亡进而有效缓解UUO大鼠的肾间质纤维化。

关键词: 益肾祛风方; 肾纤维化; 慢性肾病; 铁死亡; 单侧输尿管梗阻大鼠

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.17.016

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)17-2489-07

Abstract: Objective To establish a rat model of renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (UUO), and investigate the mechanism of the Yishen Qufeng Formula (YQF) improves renal fibrosis through regulating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) axis to mediate ferroptosis. **Methods** Eight-week-old SD rats were randomly divided into the sham-operation group, model group, positive control group (dapagliflozin at 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹),

and experimental - L, - M, - H groups (Yishen Qufeng Formula at 15.21, 22.82 and 30.42 g · kg⁻¹ · d⁻¹). Except for the sham operation group, rats in the other groups were subjected to left ureteral ligation to establish a renal interstitial fibrosis (RIF) model. After successful modeling, the positive control group and the - L, - M, and - H dose experimental groups were given the corresponding drugs by gavage, while the sham operation group and model group were given an equal volume of 0.9% NaCl by gavage. All rats in the 6 groups were administered once a day for 14 consecutive days. Serum creatinine, urea nitrogen and urine protein levels were detected using a fully automatic integrated biochemical analyzer. The content of transforming growth factor - β 1 (TGF - β 1) was measured by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). The changes in the relative expression levels of fibrosis - related, oxidative stress - related and ferroptosis - related proteins in renal tissues were determined by Western blotting. **Results** The levels of serum creatinine in the experimental - M, - H groups, sham operation group, model group and positive control group were (50.24 ± 7.81), (49.15 ± 8.87), (41.96 ± 5.25), (59.44 ± 11.93) and (52.14 ± 8.38) μ mol · L⁻¹, respectively; the levels of urea nitrogen were (4.58 ± 0.56), (4.45 ± 0.55), (4.32 ± 0.60), (6.00 ± 1.03) and (6.55 ± 1.02) mmol · L⁻¹, respectively; the levels of urine protein were (640.59 ± 205.70), (538.74 ± 237.98), (526.51 ± 192.62), (982.91 ± 349.13) and (964.26 ± 456.84) mg · d⁻¹, respectively; the relative protein expression levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4) were 1.62 ± 0.15, 3.01 ± 0.41, 2.25 ± 0.27, 1.01 ± 0.51 and 2.15 ± 0.63, respectively; the relative protein expression levels of cystine/glutamate antiporter (xCT) were 0.62 ± 0.10, 1.02 ± 0.06, 1.65 ± 0.13, 0.52 ± 0.20 and 1.18 ± 0.13, respectively; the relative protein expression levels of Nrf2 were 0.66 ± 0.12, 1.04 ± 0.16, 1.20 ± 0.10, 0.54 ± 0.03 and 1.19 ± 0.14, respectively; the relative protein expression levels of HO - 1 were 1.13 ± 0.15, 1.21 ± 0.18, 2.21 ± 0.17, 0.64 ± 0.44 and 1.57 ± 0.26, respectively; the relative protein expression levels of α - smooth muscle actin (α - SMA) were 1.63 ± 0.47, 1.13 ± 0.57, 0.49 ± 0.91, 2.88 ± 0.97 and 1.05 ± 0.60, respectively. There were statistically significant differences in the above indicators between the high - dose experimental group and the model group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Yishen Qufeng Formula may inhibit ferroptosis by activating the Nrf2/HO - 1 signaling pathway, thereby effectively alleviating renal interstitial fibrosis in UUO rats. This provides important theoretical evidence for the mechanism by which the Yishen Qufeng Formula improves renal fibrosis through regulation of ferroptosis.

Key words: Yishen Qufeng Formula; renal fibrosis; chronic kidney disease; ferroptosis; unilateral ureteral obstruction rats

肾纤维化(renal fibrosis, RF)是各类慢性肾疾病发展到终末期肾病过程中出现的病理改变,主要涵盖肾小球的硬化、肾小管和周围间质组织的纤维化以及血管的硬化等^[1]。铁死亡是以铁代谢异常和脂质过氧化物为特征的细胞死亡方式。研究表明,铁死亡在调控 RF 过程发挥重要作用,靶向铁死亡能有效减轻肾组织纤维化,延缓疾病进展^[2-3]。中医药以其独特的优势在延缓慢性疾病的进展方面具有极大的作用。益肾祛风方是由周恩超教授在继承国医大师邹燕勤补益肾元学术思想的基础上,以“补益肾气、祛风解毒”为临床诊疗方法,拟出的临床经验方(CN117018076B)^[4]。主要由生黄芪、太子参、酒萸肉、全蝎等药物组成,具有益气祛风清利之功。本课题组前期通过小鼠肾组织非靶向代谢组学分析发现,益肾祛风方可能通过调节脂质过氧化、核苷酸等相关代谢通路发挥“解肾毒”作用^[5]。本研究旨在通过体

内实验探究益肾祛风方抑制单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)肾纤维化模型大鼠铁死亡延缓 RF 的机制,以期 RF 提供新的治疗方案。

材料与方法

1 材料

动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,鼠龄 8 周,体重(200 ± 20)g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司。动物生产许可证号:SCXK(浙)2024 - 0001,动物使用许可证号:SYXK(苏)2022 - 0070。本实验经南京中医药大学伦理委员会批准(伦理批号:2024DW - 042 - 02)。

药品与试剂 达格列净,规格:每片 10 mg,批号:WA3040,注册证号:国药准字 HJ20170119,美国 AstraZeneca Pharmaceuticals LP 生产;生黄芪,批号:

270076192,产地:甘肃、酒萸肉,批号:294241001,产地:陕西、全蝎,批号:081241201,产地:河南、炒僵蚕,批号:354240101,产地:江苏、太子参,批号:008240901,产地:贵州、炒白术,批号:20240504,产地:唐山、石韦,批号:469231002,产地:广西、红花,批号:022250501,产地:新疆、川芎,批号:20240502,产地:四川、白花蛇舌草,批号:292241001,产地:广东、茯苓皮,批号:240246,产地:安徽、车前子,批号:365241001,产地:河北,均购自江苏省中医院中药房,均经江苏省中医院中药制剂研发中心单位傅静娟副主任中药师鉴定为正品。尿蛋白定量测试盒、肌酸酐(creatinine,Cr)测定试剂盒、尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)测定试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$,TGF- $\beta 1$)测定试剂盒,购自江苏苏酶生物科技有限公司;核因子红系2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)、血红素氧合酶1(heme oxygenase-1,HO-1)、转化生长因子- $\beta 1$ 、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、胱氨酸/谷氨酸反向转运体(cystine/glutamate antiporter,xCT)抗体,均购自美国proteintech公司,谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)抗体,均购自中国Servicebio公司。

仪器 CHEMIDOC XRS 全自动化学发光凝胶成像分析系统、Mini-Protean 垂直电泳仪和 Trans-Blot 转印槽,均为美国 Bio-Rad 公司产品;BS124S 电子称量仪,北京赛多利斯科学仪器有限公司产品。

2 实验方法

2.1 溶液配制

益肾祛风方溶液 取生黄芪 30 g、酒萸肉 10 g、全蝎 4 g、炒僵蚕 10 g、太子参 15 g、炒白术 10 g、石韦 10 g、红花 10 g、川芎 10 g、白花蛇舌草 15 g、茯苓皮 30 g 和盐车前子 15 g,煎制 2 次,过滤,浓缩至每毫升药液含生药 1 g,置于 4℃ 冰箱储存备用。

达格列净溶液 达格列净每片 10 mg,研磨成粉末后溶解于双蒸水中配成 5 mg·mL⁻¹ 备用。

2.2 模型构建^[6]

SD 大鼠取仰卧位,备皮,常规消毒,异氟烷麻醉后侧切一约 2.5 cm 的竖直切口,暴露左肾,游离左侧输尿管,缝合线在肾下极打一个外科结结扎,在输尿管靠近下极水平处再次结扎 1 次,并在 2 个节点中间剪断输尿管,逐层缝合。腹腔注射 0.9% NaCl 500 μ L 补液,肌内注射青霉素钠 20 万单位抗感染。假手术组开腹后游离输尿管不结扎,其余操作同模型组。

2.3 动物分组与处理方法

在大鼠适应性喂养 1 周后,用随机数表法将 48 只 SD 大鼠分为假手术组、模型组、阳性对照组和低、中、高剂量实验组,每组 8 只。根据“人和动物体表面积折算等效剂量比率表”,以 6.3 为系数计算各组大鼠灌胃剂量,低、中、高剂量实验组分别给予 15.21、22.82、30.42 g·kg⁻¹·d⁻¹ 益肾祛风方,阳性对照组给予 20 mg·kg⁻¹ 达格列净^[4],各治疗组于造模后第 1 天开始灌胃,假手术组、模型组每天予以同等体积的 0.9% NaCl 灌胃,持续到造模后第 14 天,次日处死大鼠并收集样本。

2.4 生化指标检测^[7]

处死各组大鼠,腹主动脉取血,4℃ 静置 30 min,以 3 500 r·min⁻¹ 离心 20 min,以获得血清样本。使用全自动整合式生化分析仪检测血清、尿液生化指标(包括血清肌酸酐、血尿素氮以及尿蛋白浓度)。

2.5 组织学染色法观察肾组织病理学形态改变^[8]

取出的各组 SD 大鼠的左肾进行固定(4% 多聚甲醛浸泡)并用于制作石蜡包埋、切片,二甲苯脱蜡、分级乙醇再水合等操作后分别进行 HE、Masson、天狼星红等染色处理,光学显微镜下观察肾组织的病理变化情况。

2.6 ELISA 检测血清中 TGF- $\beta 1$ 含量^[9]

取“2.4”中血清样本,按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测光密度值,计算血液中 TGF- $\beta 1$ 水平。

2.7 蛋白质印迹法检测大鼠肾中 GPX4、xCT、Nrf2、HO-1、TGF $\beta 1$ 和 α -SMA 蛋白的表达水平^[10]

取肾组织样本进行蛋白质提取,通过 BCA 法测定各组样本总蛋白浓度并配平,随后进行上样电泳,用 PVDF 膜进行转膜操作。蛋白质印迹实验用 GPX4、xCT、Nrf2、HO-1、TGF $\beta 1$ 、 α -SMA 和 β -Tubulin—抗在 4℃ 摇床条件下孵育过夜,二抗在相同条件下孵育 2 h。封闭处理后直接进行化学发光显影,最终用 Image Lab 软件对蛋白条带进行定量分析。

2.8 免疫组化法检测 GPX4 和 xCT 蛋白的表达情况^[11]

用柠檬酸缓冲液对肾组织切片进行抗原修复处理。随后按照试剂说明书要求配制一抗工作液,将处理后的切片置于 4℃ 环境下进行过夜孵育。次日经 PBS 缓冲液充分洗涤后,加入相应种属来源的二抗,在避光条件下于室温孵育 60 min。显色阶段用 DAB 显色系统处理样本,同时进行细胞核复染。最后通过梯度乙醇脱水、中性树胶封片等步骤完成样本制备,在光学显微镜下采集图像数据。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。符合正态分布

的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析(ANOVA)。

结 果

1 益肾祛风方对各组大鼠肾功能及纤维化因子表达水平的影响

低、中、高剂量实验组分别给予 15.21、22.82、30.42 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 益肾祛风方,阳性对照组给予 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 达格列净,假手术组、模型组均给予同等体积的 0.9% NaCl。

与假手术组相比,模型组大鼠的血清肌酐、血尿素氮、尿蛋白及 TGF- β 1 水平均显著升高(均 $P < 0.05$)。与模型组相比,各实验组的肌酐、血尿素氮、尿蛋白及 TGF- β 1 水平均不同程度降低,高剂量实验组治疗效果与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 1。

2 益肾祛风方对大鼠肾组织病理形态的影响

HE 染色结果显示:假手术组可见肾形态正常,肾小球边界清晰,皮髓质边界清晰,无明显损伤,肾小管排列整齐,结构完整,管周无明显肾间质纤维化;模型

组可见肾组织结构紊乱、形态异常,肾小管上皮细胞出现坏死和脱落,肾小管排列紊乱,管腔增大,腔内缘参差;而经益肾祛风方或达格列净处理后,肾组织学损伤变化减轻,肾小管扩张程度减轻。结果见图 1。

MASSON 结果显示:假手术组肾组织未见明显形态学异常,无明显蓝染区域;模型组可见肾组织有胶原沉积,系膜及基底膜区域有明显蓝染,间质纤维面积增加;而经益肾祛风方或达格列净处理后,肾组织蓝染面积降低,纤维化面积显著降低。结果见图 1。

天狼星红染色结果显示:假手术组未见明显形态学异常;模型组有明显红染,胶原沉积面积显著增加;而经益肾祛风方或达格列净处理后,可见间质纤维面积明显减少。结果见图 1。

3 益肾祛风方对 GPX4、xCT、Nrf2、HO-1、TGF β 1、 α -SMA 蛋白表达水平的影响

模型组肾组织中的 GPX4、xCT、Nrf2 和 HO-1 相较于假手术组相对表达水平均明显降低,TGF β 1 和 α -SMA 相对表达水平均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。低、中、高剂量实验组与阳性对照组的 GPX4、xCT、Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达水平与模型组相比均显著升高(均 $P < 0.05$),

表 1 各组大鼠肾功能及纤维化因子表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the expression levels of renal function and fibrosis factors in rats of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose	n	Blood creatinine ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Blood urea nitrogen ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Urinary protein ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$)	TGF β 1 ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Sham-operation	-	8	41.96 $\pm$ 5.25	4.32 $\pm$ 0.60	526.51 $\pm$ 192.62	57.59 $\pm$ 14.77
Model	-	8	59.44 $\pm$ 11.93 [*]	6.00 $\pm$ 1.03 [*]	982.91 $\pm$ 349.13 [*]	80.90 $\pm$ 10.51 [*]
Experimental-L	15.21 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	8	51.27 $\pm$ 4.73	5.25 $\pm$ 1.13	747.03 $\pm$ 305.30	67.65 $\pm$ 7.41 [#]
Experimental-M	22.82 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	8	50.24 $\pm$ 7.81	4.58 $\pm$ 0.56 [#]	640.59 $\pm$ 205.70 [#]	67.51 $\pm$ 18.89 [#]
Experimental-H	30.42 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	8	49.15 $\pm$ 8.87 [#]	4.45 $\pm$ 0.55 [#]	538.74 $\pm$ 237.98 [#]	63.84 $\pm$ 12.25 [#]
Positive control	20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	8	52.14 $\pm$ 8.38	6.55 $\pm$ 1.02 [#]	964.26 $\pm$ 456.84	61.20 $\pm$ 6.46 [#]

Compared with sham-operation group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with the model group, [#] $P < 0.05$.

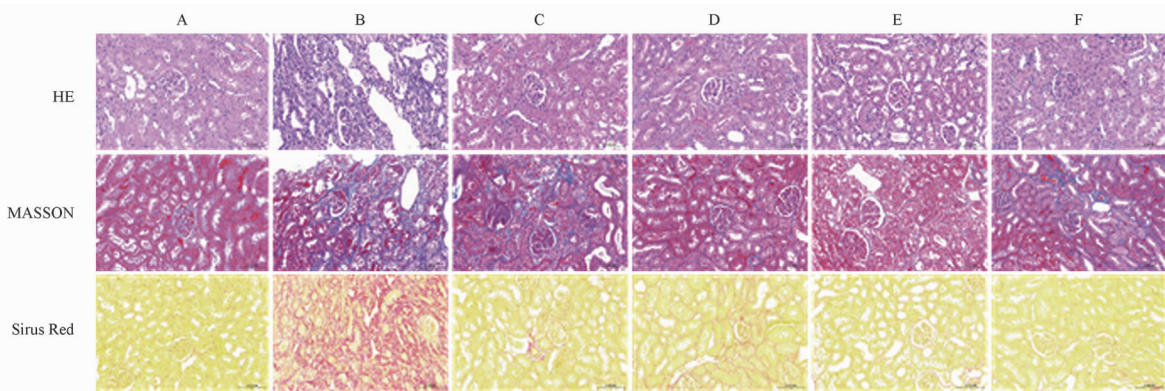


图 1 益肾祛风方(YQF)对大鼠肾组织病理形态的影响($\times 400$)

Figure 1 The effects of Yishen Qufeng Formula (YQF) on the pathological morphology of rat kidney tissue($\times 400$)

A: Sham-operation group; B: Model group; C, D, E: Experimental L, -M, -H groups, respectively; F: Positive control group.

TGFβ1 和 α - SMA 相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.05$)。结果见图 2 和表 2。这表明 YQF 干预能有效诱导肾组织中 Nrf2/HO - 1 的表达进而抑制纤维化形成相关蛋白 (TGFβ1、α - SMA) 的表达从而抑制 RF 的发生发展。

4 益肾祛风方对肾组织中 GPX4、xCT 阳性表达的影响

低、中、高剂量实验组、假手术组、模型组和阳性对照组肾组织中 GPX4 阳性表达水平分别为 2.35 ± 0.26 、 1.72 ± 0.14 、 2.22 ± 0.14 、 1.00 ± 0.38 、 0.28 ± 0.11 和 1.40 ± 0.30 ；xCT 阳性表达水平分别为 1.09 ± 0.35 、 1.21 ± 0.26 、 1.59 ± 0.47 、 1.00 ± 0.46 、 0.34 ± 0.21 和 1.23 ± 0.30 ；相较于假手术组，模型组中 GPX4 及 xCT 均显著低表达 (均 $P < 0.05$)，而与模型组相比，低、中、高剂量实验组及阳性对照组中，GPX4 和 xCT 表达均显著升高 (均 $P < 0.05$)。可见 YQF 能明显上调铁死亡关键分子 GPX4、xCT 的表达水平，进而抑制细胞的铁死亡，见图 2 和图 3。

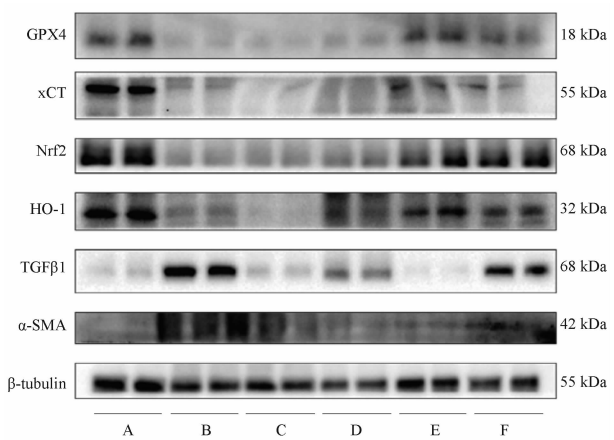


图 2 益肾祛风方对谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、胱氨酸/谷氨酸反向转运体 (xCT)、核因子红系 2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素氧合酶 - 1 (HO - 1)、转化生长因子 - β1 (TGFβ1) 和 α - 平滑肌肌动蛋白 (α - SMA) 蛋白表达水平的影响

Figure 2 Effects of YQF on the protein expression levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4), cystine/glutamate antiporter (xCT), nuclear factor erythroid 2 - related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase - 1 (HO - 1), transforming growth factor - beta 1 (TGFβ1) and α - smooth muscle actin (α - SMA)

表 2 GPX4、xCT、Nrf2、HO - 1、TGFβ1 和 α - SMA 蛋白相对表达水平的定量分析

Table 2 Quantitative analysis of the protein relative expression levels of GPX4, xCT, Nrf2, HO - 1, TGFβ1 and α - SMA

Group	GPX4/β - tubulin	xCT/β - tubulin	Nrf2/β - tubulin	HO - 1/β - tubulin	TGFβ1/β - tubulin	α - SMA/β - tubulin
Sham - operation	2.25 ± 0.27	1.65 ± 0.13	1.20 ± 0.10	2.21 ± 0.17	0.09 ± 0.02	0.49 ± 0.91
Model	1.01 ± 0.51 *	0.52 ± 0.20 *	0.54 ± 0.03 *	0.64 ± 0.44 *	0.83 ± 0.13 *	2.88 ± 0.97 *
Experimental - L	1.31 ± 0.23	0.65 ± 0.30	0.58 ± 0.20	0.59 ± 0.03	0.10 ± 0.03 #	2.43 ± 0.73
Experimental - M	1.62 ± 0.15 #	0.62 ± 0.10	0.66 ± 0.12	1.13 ± 0.15 #	0.28 ± 0.04 #	1.63 ± 0.47 #
Experimental - H	3.01 ± 0.41 #	1.02 ± 0.06 #	1.04 ± 0.16 #	1.21 ± 0.18 #	0.08 ± 0.01 #	1.13 ± 0.57 #
Positive control	2.15 ± 0.63 #	1.18 ± 0.13 #	1.19 ± 0.14 #	1.57 ± 0.26 #	0.52 ± 0.04 #	1.05 ± 0.60 #

Compared with the sham - operation group, * $P < 0.05$; Compared with the model group, # $P < 0.05$.

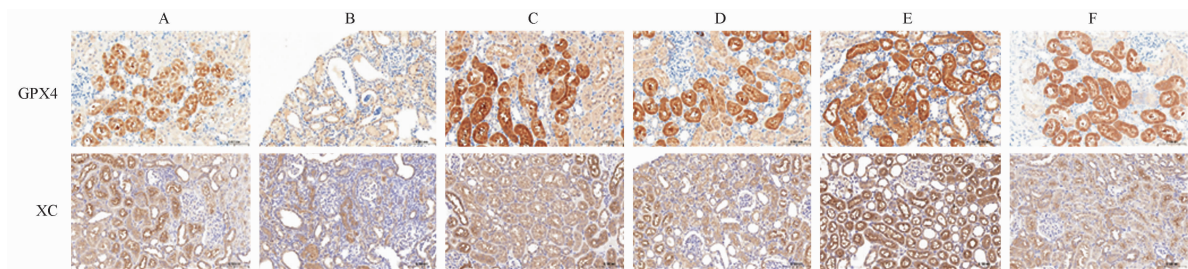


图 3 益肾祛风方对肾组织中 GPX4、xCT 阳性表达的影响 (×400)

Figure 3 Effect of Yishen Qufeng Decoction on the positive expression of GPX4 and xCT in renal tissue (×400)

讨 论

据报道，慢性肾疾病影响全球 10% ~ 14% 的人口，过去 20 年间，全球与 CKD 相关的死亡人数上升了 82.3%，RF 几乎是所有类型的 CKD 的常见病理表现，

其特征是细胞外基质过度沉积导致瘢痕形成^[12-13]。当前暂无有效的治疗策略。肾病在中医理论中，常根据临床症状被归类为“关格”“癃闭”“肾劳”等，导师周恩超教授延续国医大师邹燕勤“补益肾元”的学术思想，推崇“肾气不足”，“风邪”等病机，结合多年的

临床经验,研制了益肾祛风方^[5]。该方由生黄芪、酒萸肉、全蝎、炒僵蚕、太子参、炒白术等药物组成^[14]。本课题通过建立大鼠单侧输尿管结扎的 RF 模型探讨益肾祛风方对 RF 的作用及其可能的机制。结果显示,模型组大鼠肾组织结构紊乱,肾小管扩张,胶原沉积明显;经益肾祛风方治疗后,大鼠肾小管排列有序,管腔扩张减少,胶原沉积减少。证明益肾祛风方具有明显的抗纤维化作用。

肾组织纤维化是多数肾病进展的最终归宿。有研究表明,慢性 RF 常由多种介导,包括生长因子、细胞因子和应激分子等,其中, TGF- β 1 已被公认为 RF 发病机制的关键介质^[15]。抑制 TGF- β 1 信号传导已经在临床前模型中显示出针对 RF 的保护作用, Xiang 等^[16]发现通过抑制组蛋白乳酸化可抑制 TGF- β 1 的表达,进而减轻 RF。Yao 等^[17]发现,抑制体内 TGF- β 1/Smad 2/3 信号通路可以改善 RF。也有研究表明,在肾成纤维细胞中,增强 TGF- β 1 能促进 RF^[18], α -血管肌动蛋白是 SMA 亚型,称为“ α -SMA”,其过表达将促进纤维化^[19]。 α -SMA 阳性的肌成纤维细胞是导致病理条件下肾间质中 ECM 过度沉积的主要细胞。研究发现靶向调节 TGF- β 1/ α -SMA 相关蛋白信号通路能直接改善大鼠肾组织纤维化^[20-21],近年来,研究表明,铁死亡可能与肾组织纤维化密切相关^[4],铁死亡是由 GPX4 磷脂过氧化物酶活性的缺失和活性氧的致命积累诱导的一种受调节的细胞死亡形式^[22]。目前认为,铁死亡的脂质过氧化主要由 Xc 和 GPX4 引起^[23-24],本研究也发现,与对照组相比模型组铁死亡相关蛋白 xCT 及 GPX4 的表达明显升高, TGF- β 1、 α -SMA 等纤维化因子的表达也升高。此外, Nrf2 被认为能直接调控铁死亡并影响 GPX4 及 xCT 的表达, siRNA 诱导的 Nrf2 表达沉默阻断了褪黑素诱导的 MC3T3 细胞中 GPX4 和 xCT 表达的上调^[25],柚皮素通过调节 Nrf2/Xc/GPX4 轴抑制铁细胞凋亡来减轻心肌缺血/再灌注损伤^[26]。HO-1 是 Nrf2 的主要的下游蛋白之一,多项研究表明,通过激活 Nrf2/HO-1 信号传导能抑制铁死亡^[27-29]。与本研究实验结果一致,益肾祛风方通过干预 Nrf2/HO-1 信号通路,提高了组织中 GPX4、xCT 的蛋白表达水平,抑制铁死亡的发生来保护肾。

本研究提示:益肾祛风方可以延缓 RF,保护肾的机制可能是通过干预 Nrf2/HO-1 通路上调 GPX4、xCT 的表达,抑制铁死亡;下调 TGF- β 1、 α -SMA 等纤维化因子的表达,抑制纤维化。

参考文献:

- [1] 刘必成,伍敏. 肾脏纤维化的进展与挑战[J]. 中华内科杂志, 2011,50(7):3.
- [2] EL N A M, MUCHANETA - KUBARA E C, ESSAWAY M, et al. Renal fibrosis: Insights into pathogenesis and treatment[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997,29(1):55—62.
- [3] LIU Y, WANG J. Ferroptosis, a rising force against renal fibrosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022,2022:1—12.
- [4] 周恩超,傅静娟,雍晨. 一种益肾祛风的中药复方组合物及其制备方法与应用:江苏省, CN117018076B[P]. 2024-07-02 [2025-01-04].
- [5] 黄国顺,雍晨,张敏,等. 基于肾毒理论探讨益肾祛风方对阿霉素致小鼠肾损伤的防治作用及肾脏代谢组学研究[J]. 中华中医药杂志, 2024,39(9):4938—4945.
- [6] 陈静,覃远汉,赵艳君,等. PAX2 和 α -SMA 在肾小管间质纤维化大鼠肾脏中的表达及意义[J]. 现代预防医学, 2010,37(20):3950—3952.
- [7] 雍晨. 苏茵解毒颗粒“解肾毒”减轻 CKD3~4 期肾脏损伤的临床及机理研究[D]. 江苏南京:南京中医药大学, 2022.
- [8] 周波,宋立群,负捷,等. 真武汤对 UUO 模型大鼠肾小管损伤和肾间质纤维化影响的研究[J]. 中国药学报, 2014,42(3):136—138.
- [9] 邱赛悦,唐录,骆美秀,等. 当归补血汤配伍人参调控 Notch 信号通路改善单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的机制[J]. 中国医院药学杂志, 2025,45(2):128—134.
- [10] MISHRA M, TIWARI S, GOMES A V. Protein purification and analysis: Next generation Western blotting techniques[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2017,14(11):1037—1053.
- [11] 刘先海,孙小林,胡嘉波,等. 南蛇藤素靶向 PI3K/Akt 通路诱导耐利妥昔单抗弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞铁死亡[J]. 江苏大学学报(医学版), 2025,35(4):285—291.
- [12] HUANG R, FU P, MA L. Kidney fibrosis: From mechanisms to therapeutic medicines[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2023,8(1):129.
- [13] BELLO A K, LEVIN A, TONELLI M, et al. Assessment of global kidney health care status[J]. *JAMA*, 2017,317(18):1864.
- [14] 邹燕勤,周恩超. 邹燕勤中医肾病学学术经验传承与创新[M]. 南京:江苏凤凰科学技术出版社. 2014:120.
- [15] LAN H Y. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. *Int J Biol Sci*, 2011,7(7):1056—1067.
- [16] XIANG T, WANG X, HUANG S, et al. Inhibition of PKM2 by shikonin impedes TGF- β 1 expression by repressing histone lactylation to alleviate renal fibrosis[J/OL]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156324. 2024-12-15 [2025-01-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39700636/>.
- [17] YAO M, LIAN D, WU M, et al. Isoliquinoline attenuates renal fibrosis and inhibits TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway in spontaneously hypertensive rats[J/OL]. *Drug Des Devel Ther*, 2023,17:2749—2762. 2023-09-07 [2025-01-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37701045/>.
- [18] CHEN Y T, JHAO P Y, HUNG C T, et al. Endoplasmic reticulum protein TXNDC5 promotes renal fibrosis by enforcing TGF- β signaling in kidney fibroblasts[J]. *J Clin Invest*, 2021,131(5):

- e143645.
- [19] 姚小兵,程帆. 肾纤维化的发病机制及治疗研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志,2019,39(2):371—374.
- [20] 刘鹏,申正日,王晨,等. 糖肾方调控 FXR/vimentin/ α -SMA 通路减轻糖尿病肾脏疾病肾脏纤维化的研究[J]. 北京中医药大学学报,2022,45(12):1196—1204.
- [21] 廖青,王小平. 微小 RNA-155-5p 靶向沉默信息调节因子 1 调节转化生长因子- β /Sma 和 Mad 相关蛋白信号通路对糖尿病肾脏疾病大鼠肾纤维化作用机制的研究[J]. 中国糖尿病杂志,2025,33(1):57—64.
- [22] YANG W S, KIM K J, GASCHLER M M, *et al.* Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(34):E4966—E4975.
- [23] LIU J, XIA X, HUANG P. xCT: A critical molecule that links cancer metabolism to redox signaling[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(11):2358—2366.
- [24] LIM J K M, DELAIDELLI A, MINAKER S W, *et al.* Cystine/glutamate antiporter xCT (SLC7A11) facilitates oncogenic RAS transformation by preserving intracellular redox balance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(19):9433—9442.
- [25] MA H, WANG X, ZHANG W, *et al.* Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose *via* activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis[J/OL]. *Oxid med cell longev*, 2020, 2020:9067610. 2020-12-04[2025-01-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33343809/>.
- [26] XU S, WU B, ZHONG B, *et al.* Naringenin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2)/System xc-/glutathione peroxidase 4 (GPX4) axis to inhibit ferroptosis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2):10924—10934.
- [27] YANG R, GAO W, WANG Z, *et al.* Polyphyllin I induced ferroptosis to suppress the progression of hepatocellular carcinoma through activation of the mitochondrial dysfunction *via* Nrf2/HO-1/GPX4 axis[J/OL]. *Phytomedicine*, 2024, 2:155135. 2023-12-12[2025-01-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37856990/>.
- [28] LI J, LU K, SUN F, *et al.* Panaxydol attenuates ferroptosis against LPS-induced acute lung injury in mice by Keap1-Nrf2/HO-1 pathway[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1):96.
- [29] WANG H, YU X, LIU D, *et al.* VDR activation attenuates renal tubular epithelial cell ferroptosis by regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway in diabetic nephropathy[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(10):e2305563. 2023-12-25[2025-01-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38145959/>.
- (收稿日期 2025-04-05)

· 科学文摘 ·

托瑞帕利单抗联合顺铂治疗鼻咽癌的随机对照研究

引自:DIAMOND STUDY GROUP, *et al.* Toripalimab combination therapy without concurrent cisplatin for nasopharyngeal carcinoma: The DIAMOND randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2025, 34(11):973—983.

本研究为开放标签、多中心、随机 3 期临床试验。2021 年 8 月至 2022 年 7 月以中国 13 家医院的 T4N1M0 或 T1-4N2-3M0 鼻咽癌患者纳入为研究对象,评价托瑞帕利单抗联合诱导化疗和放疗治疗局部晚期鼻咽癌的疗效和安全性。最终随访日期为 2025 年 3 月 21 日。将患者随机分为标准治疗组($n=266$)和未联合顺铂治疗组($n=266$),2 组均给予托瑞帕利单抗联合吉西他滨-顺铂诱导化疗和顺铂-放射治疗($100\text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$,3 周,2 个周期),未同步联合顺铂治疗组在此基础上不同步联合顺铂的治疗。17 个周期的托瑞帕利单抗给药(240 mg ,3 周 1 次)分别在诱导期、放疗期和辅助期,分别为 3、3 和 11 周期。主要终点为无失败生存率(非劣效边缘,8%)和所有级别呕吐发生率(优势设计)。次要终点包括总生存期、局部无复发生存期、远处无转移生存期、安全性、肿瘤反应性、生活质量和耐受性。532 例意向性治疗患者,中位年龄[四分位值(interquartile range, IQR)]为 47(39~54)岁,女性占 25.2%,中位随访时间(IQR)37.0(4.0~50.0)个月后,未同步联合顺铂治疗组 3 年无失败生存率为 88.3%,标准治疗组为 87.6%,差异为 0.7%[单侧 95% 置信区间(confidence interval, CI)下限, -3.9%;非劣性 $P=0.002$;分层危险比为 0.92(95% CI, 0.66~1.79);log rank $P=0.73$]。在安全性分析中,未同步联合顺铂治疗组和标准治疗组的所有级别呕吐发生率分别为 26.2%(68 例/206 例)和 59.8%(156 例/261 例),未同步联合顺铂治疗组显著低于标准治疗组,差异为 33.6%(单侧 95% CI, 26.9%~ ∞ ; $P<0.001$)。在胃肠道、功能和整体健康状况方面,患者报告的生活质量(参与率为 87.5%)和耐受性(参与率为 94.7%)均优于标准治疗组。结论与相关性:在本 3 期随机临床试验中,在局部区域晚期鼻咽癌患者中,不同步顺铂的托瑞帕利单抗联合治疗是一种可行的治疗方法,无失败生存率高,药物不良反应发生率低。