

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research加减补阳还五汤通过 SIRT3 调控线粒体动力学
改善糖尿病肾病小鼠肾损伤的研究Supplemented Buyang Huanwu tang ameliorates kidney injury by SIRT3 regulating
mitochondrial dynamics in diabetic kidney disease mice杨帆^{1a,2}, 黄家安^{1a,2}, 张晓云^{1a,2},
刘利飞^{1b}, 刘妍^{1a,2}, 王月华^{1a,2,3}

(1. 河北中医药大学, a. 中西医结合学院; b. 中医临床技能中心, 河北石家庄 050091; 2. 河北省中西医结合肝病证研究重点实验室, 河北石家庄 050091; 3. 河北省第七人民医院 肾内科, 河北保定 073000)

YANG Fan^{1a,2}, HUANG Jia-an^{1a,2},
ZHANG Xiao-yun^{1a,2}, LIU Li-fei^{1b},
LIU Yan^{1a,2}, WANG Yue-hua^{1a,2,3}

(1. a. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine; b. Chinese Medicine Clinical Skills Center, Hebei University of Chinese Medicine Shijiazhuang 050091, Hebei Province, China; 2. Hebei Key Laboratory of Integrative Medicine on Liver-kidney Patterns, Shijiazhuang 050091, Hebei Province, China; 3. Department of Nephrology, Hebei Seventh People's Hospital, Baoding 073000, Hebei Province, China)

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(H2022423320, H2022423342); 河北省中医药管理局科研计划基金资助项目(2022109, 2024102); 河北省卫生健康委员会医学科学研究课题计划基金资助项目(20230213); 河北中医药大学燕赵医学研究基金资助项目(YZSY2023003)**作者简介:**杨帆(1983-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事慢性肾病的基础和临床研究**通信作者:**王月华, 教授, 主任医师, 硕士生导师
Tel: (0311) 89926292
E-mail: wangyuehua@hebcm.edu.cn

摘要:目的 探讨加减补阳还五汤是否通过调控线粒体动力学改善糖尿病肾病(DKD)小鼠肾组织损伤。方法 将 db/db 小鼠随机分为模型组(蒸馏水 0.2 mL·d⁻¹)和低、高剂量实验组(16.0、32.0 g·kg⁻¹加减补阳还五汤), 每组 8 只; 另取 8 只 db/m 组小鼠作为正常组(蒸馏水 0.2 mL·d⁻¹)。4 组小鼠每天灌胃给药 1 次, 连续给药 8 周。实验结束后, 检测总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、尿微量白蛋白(mALB)水平; 用蛋白质印迹法检测小鼠肾组织线粒体融合蛋白 1(Mfn1)、线粒体融合蛋白 2(Mfn2)、视神经萎缩蛋白 1(OPA1)、线粒体分裂蛋白 1(Fis1)、线粒体动力相关蛋白 1(Drp1)、沉默信息调节因子 3(SIRT3)、转化生长因子-β₁(TGF-β₁)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、Ⅲ型胶原抗体(Col-Ⅲ)和纤连蛋白(FN)的表达水平。结果 低、高剂量实验组和模型组、正常组的 TG 水平分别为(1.98 ± 0.13)、(1.69 ± 0.13)、(3.38 ± 0.59)和(1.25 ± 0.16) mmol·L⁻¹, TC 水平分别为(3.86 ± 0.14)、(3.19 ± 0.15)、(5.41 ± 0.61)和(1.46 ± 0.19) mmol·L⁻¹, BUN 水平分别为(10.04 ± 2.21)、(8.79 ± 1.75)、(16.92 ± 4.57)和(4.78 ± 1.07) mmol·L⁻¹, Scr 水平分别为(19.17 ± 2.25)、(17.16 ± 2.03)、(27.92 ± 4.13)和(13.37 ± 1.77) μmol·L⁻¹, mALB 水平分别为(26.92 ± 4.61)、(20.54 ± 2.31)、(46.78 ± 7.32)和(6.14 ± 1.13) mg·L⁻¹, TGF-β₁ 蛋白相对表达水平分别为 0.73 ± 0.09、0.59 ± 0.05、1.01 ± 0.14 和 0.48 ± 0.05, α-SMA 蛋白相对表达水平分别为 0.79 ± 0.09、0.56 ± 0.05、1.12 ± 0.11 和 0.55 ± 0.04, FN 蛋白相对表达水平分别为 0.61 ± 0.03、0.55 ± 0.05、0.83 ± 0.09 和 0.22 ± 0.03, Col-Ⅲ 蛋白相对表达水平分别为 0.53 ± 0.06、0.35 ± 0.05、0.73 ± 0.09 和 0.17 ± 0.03, SIRT3 蛋白相对表达水平分别为 0.65 ± 0.07、0.41 ± 0.14、0.23 ± 0.12 和 0.91 ± 0.04, Drp1 蛋白相对表达水平分别为 0.54 ± 0.08、0.49 ± 0.09、0.98 ± 0.11 和 0.37 ± 0.03, Fis1 蛋白相对表达水平分别为 0.71 ± 0.05、0.51 ± 0.03、1.14 ± 0.11 和 0.35 ± 0.05, Mfn1 蛋白相对表达水平分别为 0.61 ± 0.04、0.95 ± 0.05、0.43 ± 0.05 和 1.02 ± 0.07, Mfn2 蛋白相对表达水平分别为 0.67 ± 0.06、0.89 ± 0.09、0.52 ± 0.03 和 1.08 ± 0.05, OPA1 蛋白相对表达水平分别为 0.77 ± 0.06、0.79 ± 0.09、0.52 ± 0.03 和 1.13 ± 0.11。低、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(P < 0.05, P < 0.01)。同时, 肾病理损伤程度显著改善, 线粒体损伤减轻。结论 加减补阳还五汤可以通过维持 DKD 小鼠肾组织线粒体动力学平衡, 降低尿蛋白, 减轻肾损伤和肾纤维化, 其机制可能与调控 SIRT3 蛋白表达有关。

关键词:加减补阳还五汤; 糖尿病肾病; 沉默信息调节因子 3; 线粒体动力学; 纤维化

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.09.014

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)09-1280-06

Abstract: Objective To investigate whether the supplemented Buyang Huanwu tang can improve the kidney injury in diabetic kidney disease (DKD) mice through regulating mitochondrial dynamics. **Methods** The db/db mice were randomized into the model group (0.2 mL · d⁻¹ distilled water), low and high-dose experimental groups (16.0, 32.0 g · kg⁻¹ supplemented Buyang Huanwu tang), with 8 mice in each group. Another 8 db/m mice were included in the normal group (0.2 mL · d⁻¹ distilled water). The four groups were orally administered once a day for 8 consecutive weeks. Then, the levels of fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), and urinary microalbumin (mALB) were detected at the end of the experiment. The expression of mitofusin 1 (Mfn1), mitofusin 2 (Mfn2), optic atrophy 1 (Opa1), dynamin-related protein 1 (Drp1), fission protein 1 (Fis1), sirtuin 3 (SIRT3), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type III (Col-III) and fibronectin (FN) was measured by Western blotting. **Results** The levels of TG in the experimental-L, -H groups, model group and normal group were (1.98 ± 0.13), (1.69 ± 0.13), (3.38 ± 0.59) and (1.25 ± 0.16) mmol · L⁻¹; the levels of TC were (3.86 ± 0.14), (3.19 ± 0.15), (5.41 ± 0.61) and (1.46 ± 0.19) mmol · L⁻¹; the levels of BUN were (10.04 ± 2.21), (8.79 ± 1.75), (16.92 ± 4.57) and (4.78 ± 1.07) mmol · L⁻¹; the levels of SCr were (19.17 ± 2.25), (17.16 ± 2.03), (27.92 ± 4.13) and (13.37 ± 1.77) μ mol · L⁻¹; the levels of mALB were (26.92 ± 4.61), (20.54 ± 2.31), (46.78 ± 7.32) and (6.14 ± 1.13) mg · L⁻¹; the relative expression levels of TGF- β_1 were 0.73 ± 0.09, 0.59 ± 0.05, 1.01 ± 0.14 and 0.48 ± 0.05; the relative expression levels of α -SMA were 0.79 ± 0.09, 0.56 ± 0.05, 1.12 ± 0.11 and 0.55 ± 0.04; the relative expression levels of FN were 0.61 ± 0.03, 0.55 ± 0.05, 0.83 ± 0.09 and 0.22 ± 0.03; the relative expression levels of Col-III were 0.53 ± 0.06, 0.35 ± 0.05, 0.73 ± 0.09 and 0.17 ± 0.03; the relative expression levels of SIRT3 were 0.65 ± 0.07, 0.41 ± 0.14, 0.23 ± 0.12 and 0.91 ± 0.04; the relative expression levels of Drp1 were 0.54 ± 0.08, 0.49 ± 0.09, 0.98 ± 0.11 and 0.37 ± 0.03; the relative expression levels of Fis1 were 0.71 ± 0.05, 0.51 ± 0.03, 1.14 ± 0.11 and 0.35 ± 0.05; the relative expression levels of Mfn1 were 0.61 ± 0.04, 0.95 ± 0.05, 0.43 ± 0.05 and 1.02 ± 0.07; the relative expression levels of Mfn2 were 0.67 ± 0.06, 0.89 ± 0.09, 0.52 ± 0.03 and 1.08 ± 0.05; the relative expression levels of OPA1 were 0.77 ± 0.06, 0.79 ± 0.09, 0.52 ± 0.03 and 1.13 ± 0.11, respectively. Significant differences were found between the model group and experimental-L, -H groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Simultaneously, the renal pathological and mitochondrial damage was significantly improved. **Conclusion** The supplemented Buyang Huanwu tang can maintain the balance of mitochondrial dynamics, thereby reducing urinary protein, alleviating renal injury and fibrosis. Its potential mechanism may be related to the regulation of SIRT3 protein expression.

Key words: supplemented Buyang Huanwu tang; diabetic kidney disease; Sirtuin 3; mitochondrial dynamics; fibrosis

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是导致患者进展至终末期肾病最终行肾替代治疗的主要原因之一。中药复方已被临床证实具有延缓 DKD 进展的作用。研究发现, 气虚血瘀是 DKD 的主要病机^[1-2]。因此, 益气化瘀通络法是治疗 DKD 的主要方法。补阳还五汤是益气化瘀通络法的经典代表方剂。研究表明, 以补阳还五汤为基础加减的方剂治疗 DKD 疗效显著^[3]。实验研究表明, 加减补阳还五汤中的化瘀通络中药可以抑制 DKD 肾组织氧化应激和炎症因子的表达^[4], 而线粒体是氧化应激的主要靶标, 其可以通过多个途径导致线粒体损伤^[5]。本研究拟探讨加减补阳还五汤对 db/db 小鼠肾组织线粒体损伤的影响, 及其是否与调控沉默信息调节因子 3 (sirtuin 3,

SIRT3) 表达有关, 为该方治疗 DKD 提供实验依据。

材料与方法

1 材料

动物 雄性 SPF 级 db/m 小鼠, 体质量 (22.14 ± 0.75) g, db/db 小鼠, 体质量 (36.19 ± 0.85) g, 鼠龄均为 8 周, 均购自江苏常州卡文斯实验动物有限公司。动物许可证号: SCXK (苏) 2021-0013。本实验经河北中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理批号: DWLL202203117)。

药品与试剂 生地, 批号: 0101963, 产地: 河南, 黄芪, 批号: 0093253, 产地: 内蒙古, 丹参, 批号:

8080971,产地:四川,当归,批号:0093103,产地:甘肃,川芎,批号:8122561,产地:四川,地龙,批号:7125701,产地:广东,水蛭,批号:8081351,产地:山东,均购自广东一方药业有限公司(佛山),均经河北中医药大学第一附属医院相聪坤教授鉴定为正品。尿微量白蛋白(micro-albumin, mALB)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;线粒体融合蛋白1(mitofusin1, Mfn1)、Mfn2、视神经萎缩蛋白1(optic atrophy 1, OPA1)、线粒体分裂蛋白1(fission protein1, Fis1)、线粒体动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1, Drp1)、 β -actin 抗体、HRP-山羊抗兔免疫球蛋白G 抗体,均购自武汉三鹰生物技术有限公司;转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1),购自美国 PeproTech 公司;纤连蛋白抗体(fibronectin, FN)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、Ⅲ型胶原抗体(collagen-Ⅲ, Col-Ⅲ),均购自英国 Abcam 公司。

仪器 ImagQuant LAS4000 凝胶成像系统,美国通用 GE 公司产品;PowerPac HC 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司产品;H-7650 透射电镜,日本 HITACHI 株式会社产品;BX63 + DP72 正置研究级显微镜,日本 OLYMPUS 株式会社。

2 实验方法

2.1 药物制备

取黄芪 30 g、生地黄 30 g、丹参 15 g、川芎 12 g、当归 15 g、水蛭 6 g、地龙 15 g 制成加减补阳还五汤颗粒剂,溶于蒸馏水中,充分混匀后,配制成质量浓度为 $8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,置于 4°C 冰箱保存,备用。

2.2 模型构建、动物分组与给药方法

db/db 小鼠是 DKD 模型小鼠,以 db/db 小鼠尿 mALB 含量高于 db/m 小鼠,且空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) $\geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 判定造模成功^[6]。然后,将 db/db 小鼠随机分为模型组和低、高剂量实验组,每组 8 只;另取 8 只 db/m 小鼠作为正常组。参照文献^[7]的方法,低、高剂量实验组分别灌胃给予 16.0 、 $32.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的加减补阳还五汤溶液。db/m 组及模型组均灌胃给予蒸馏水 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 。4 组小鼠每天给药 1 次,连续给药 8 周。实验结束后收集血、尿及肾组织标本用于后续实验检测。

2.3 检测各组小鼠 mALB^[7]

实验结束时,将小鼠置于代谢笼收集的 24 h 尿液,在 4°C 下,以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集上清液,根据试剂盒说明书检测小鼠 mALB 浓度。

2.4 检测各组小鼠生化指标^[7]

用全自动生化分析仪测定小鼠 FBG、总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和肌酸酐(serum creatinine, SCr)水平。

2.5 各组小鼠肾组织病理变化^[8]

将固定在 4% 多聚甲醛中的小鼠肾组织石蜡包埋切片,二甲苯脱蜡透明,乙醇脱水,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)和马松(Masson)染色,观察肾组织病理学变化并拍照。

2.6 免疫组化法检测肾组织 FN 和 Col-Ⅲ的表达水平^[9]

取固定完全的肾组织,经包埋、切片、脱蜡、脱水等处理,加入一抗 FN、Col-Ⅲ 孵育过夜;然后滴加二抗,室温孵育;DAB 显色,树脂封片,在显微镜下观察并拍照。

2.7 蛋白质印迹法检测线粒体动力学及纤维化相关蛋白的表达水平^[8]

小鼠肾组织 100 mg 经研磨、裂解、离心等提取总蛋白,制胶上样,经电泳、封闭,加入一抗 Mfn1、Mfn2、OPA1、Fis1、Drp1、FN、TGF- β 1、 α -SMA、Col-Ⅲ 和 β -actin 孵育过夜,加入二抗, ECL 显影,观察并拍照。

2.8 透射电镜观察肾线粒体超微结构^[10]

将肾组织固定于 4% 戊二醛中 4 h,磷酸盐缓冲液冲洗并加入 1% 锇酸固定 2 h,乙醇脱水,丙酮和环氧树脂包埋后切片,依次滴加醋酸铀、柠檬酸铅溶液进行双重电子染色,用透射电镜观察并拍照。

2.9 免疫荧光法检测肾组织 SIRT3 的表达水平^[11]

取固定完全的肾组织,经包埋、切片、脱蜡、脱水、抗原修复等处理,加入一抗 SIRT3 孵育过夜;然后滴加荧光二抗,室温孵育;DAPI 染核,抗荧光淬灭剂的封片液封片,在显微镜下观察并拍照。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。先进行方差齐性检验,方差齐选择单因素方差分析,方差不齐选择秩和检验,组间比较用 Mann-Whitney 法。

结 果

1 加减补阳还五汤对 DKD 小鼠 FBG、TG、TC 的影响

低、高剂量实验组分别给予 16.0 、 $32.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的加减补阳还五汤;模型组和正常组均给予蒸馏水 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

模型组与正常组比较,小鼠 FBG、TG 和 TC 均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);低、高剂量实验组与模型组比较,小鼠的 TG、TC 均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),而 FBG 在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结果见表 1。

表 1 加减补阳还五汤对糖尿病肾疾病(DKD)小鼠空腹血糖(FBG)和血脂水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of supplemented Buyang Huanwu tang on fasting blood glucose (FBG) and blood lipid levels in diabetic kidney disease (DKD) mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose(g · kg ⁻¹)	n	FBG(mmol · L ⁻¹)	TG(mmol · L ⁻¹)	TC(mmol · L ⁻¹)
Normal	—	8	6.18 ± 1.81	1.25 ± 0.16	1.46 ± 0.19
Model	—	8	27.18 ± 4.41**	3.38 ± 0.59**	5.41 ± 0.61**
Experiment - L	16.0	8	26.13 ± 3.91	1.98 ± 0.13##	3.86 ± 0.14##
Experiment - H	32.0	8	26.82 ± 4.17	1.69 ± 0.13##	3.19 ± 0.15##

TC: Total cholesterol;TG: Triglyceride; Compared with normal group, ** $P < 0.01$; Compared with model group, ## $P < 0.01$.

2 加减补阳还五汤对 DKD 小鼠 mALB 及肾功能影响

模型组与正常组比较,小鼠 mALB、BUN 和 SCr 均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);低、高剂量实验组与模型组比较,小鼠 mALB、BUN 和 SCr 均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 加减补阳还五汤对 DKD 小鼠微量白蛋白(mALB)及肾功能影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of supplemented Buyang Huanwu tang on micro-albumin (mALB) and renal function in DKD mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	BUN (mmol · L ⁻¹)	SCr (μmol · L ⁻¹)	mALB (mg · L ⁻¹)
Normal	4.78 ± 1.07	13.37 ± 1.77	6.14 ± 1.13
Model	16.92 ± 4.57**	27.92 ± 4.13**	46.78 ± 7.32**
Experiment - L	10.04 ± 2.21##	19.17 ± 2.25##	26.92 ± 4.61##
Experiment - H	8.79 ± 1.75##	17.16 ± 2.03##	20.54 ± 2.31##

Dose and n refer to table 1; BUN: Blood urea nitrogen;SCr: Serum creatinine; Compared with normal group, ** $P < 0.01$; Compared with model group, ## $P < 0.01$.

3 加减补阳还五汤对 DKD 小鼠肾病理变化的影响

正常组小鼠肾结构清晰;模型组小鼠肾组织病变严重,表现为肾小球肥大,基底膜增厚,系膜基质增生,淋巴及单核细胞浸润,间质纤维化;低、高剂量实验组小鼠肾损伤均有不同程度改善。结果见图 1。

4 加减补阳还五汤对 DKD 小鼠肾纤维化的影响

低、高剂量实验组和正常组、模型组的 TGF-β1 蛋白相对表达水平分别为 0.73 ± 0.09、0.59 ± 0.05、0.48 ± 0.05 和 1.01 ± 0.14,α-SMA 蛋白相对表达水平分别为 0.79 ± 0.09、0.56 ± 0.05、0.55 ± 0.04 和 1.12 ± 0.11, FN 蛋白相对表达水平分别为 0.61 ± 0.03、0.55 ± 0.05、0.22 ± 0.03 和 0.83 ± 0.09, Col-Ⅲ 蛋白相对表达水平分别为 0.53 ± 0.05、0.35 ± 0.05、0.17 ± 0.03 和 0.73 ± 0.09。模型组与正常组比较,TGF-β1、α-SMA、FN 及 Col-Ⅲ 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$);低、高剂量实验组与模型组比较,TGF-β1、α-SMA、FN 及 Col-Ⅲ 蛋

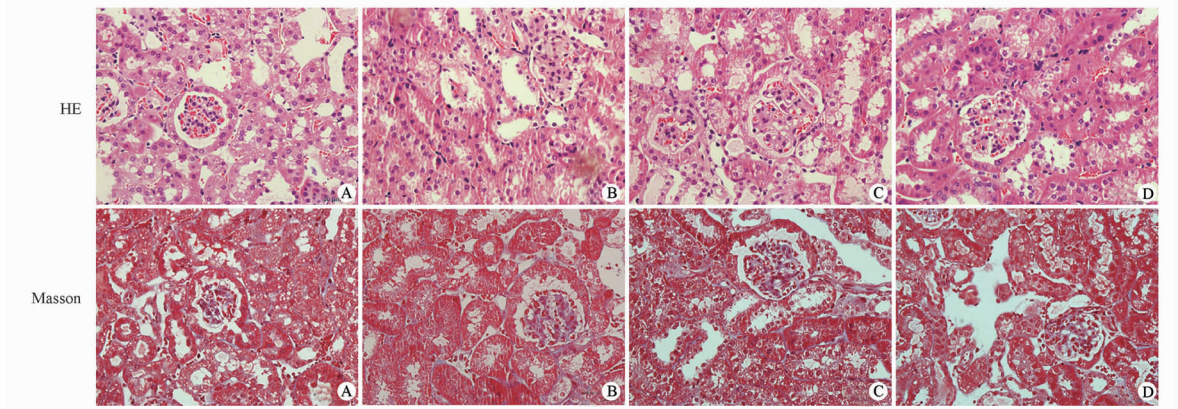


图 1 加减补阳还五汤对 DKD 小鼠肾组织病理变化的影响(×400)

Figure 1 Effects of supplemented Buyang Huanwu tang on renal histopathology in DKD mice (×400)

HE: Hematoxylin-eosin; A: Normal group; B: Model group; C, D: Experiment - L, H groups, respectively.

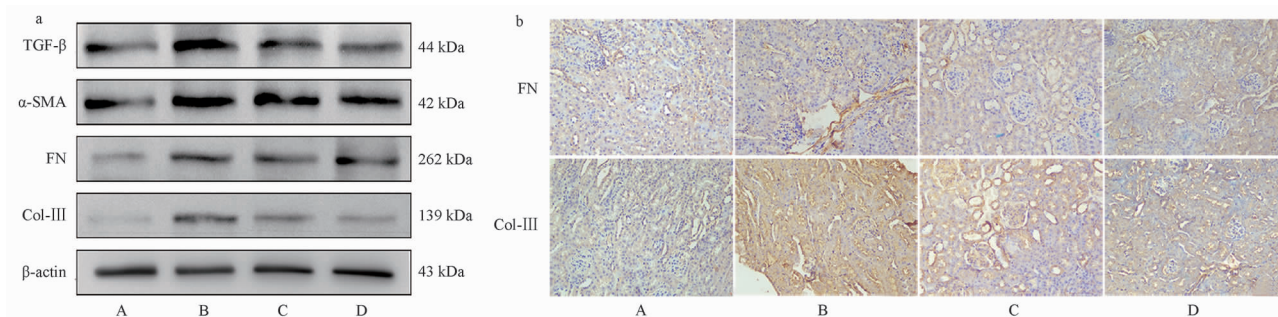


图2 DKD小鼠肾组织中纤维化相关蛋白表达(a)和纤连蛋白抗体(FN)、Ⅲ型胶原抗体(Col-Ⅲ)的免疫组化染色(b, $\times 200$)

Figure 2 The expression of fibrosis-associated proteins (a) and the immunohistochemical staining of fibronectin (FN) and collagen-Ⅲ (Col-Ⅲ; b, $\times 200$) in the renal tissue of DKD mice

TGF- β 1: Transforming growth factor- β 1; α -SMA: α -smooth muscle actin; A-D refer to figure 1.

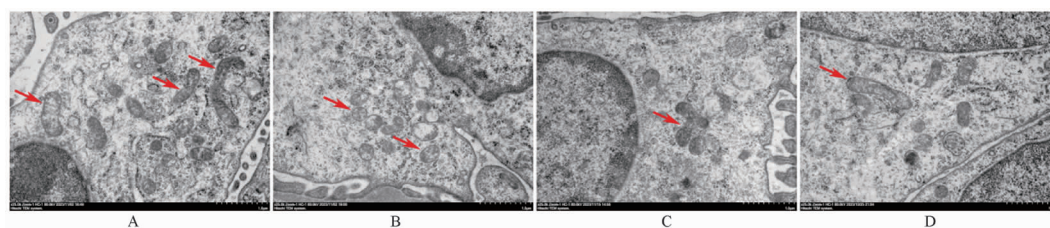


图3 各组小鼠肾组织细胞线粒体超微结构变化(透射电子显微镜, $\times 3.0 \times 10^4$)

Figure 3 Changes in mitochondrial ultrastructure of renal tissue cells in mice of all groups. (transmission electron microscope, $\times 3.0 \times 10^4$)

Clipper points to the mitochondria; A-D refer to figure 1.

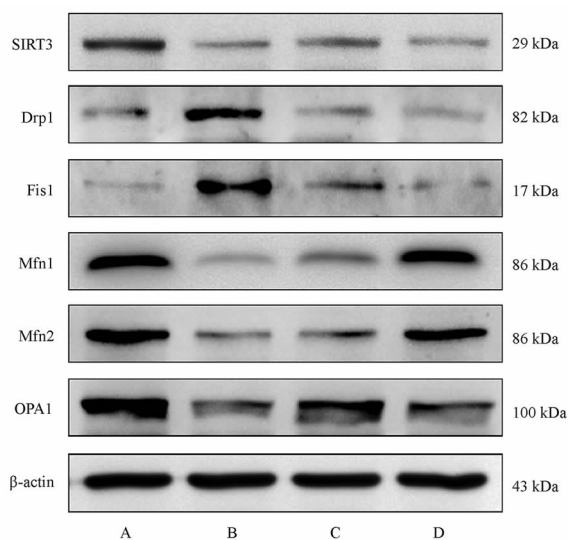


图4 DKD小鼠肾组织沉默信息调节因子3(SIRT3)及线粒体动力学蛋白表达情况

Figure 4 The expression of sirtuin 3 (SIRT3) and mitochondrial dynamics related proteins in the renal tissue of DKD mice

Drp1: Dynamin-related protein 1; Fis1: Fission protein 1; OPA1: Optic atrophy 1; Mfn1: Mitofusin 1; A-D refer to figure 1.

白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.01$)。同时,免疫组化结果也显示,低、高剂量实验组的FN和Col-Ⅲ表达水平均较模型组降低。结果见图2。

5 加减补阳还五汤对DKD小鼠肾线粒体超微结构的影响

正常组小鼠肾线粒体结构清晰;模型组小鼠肾线粒体空泡肿胀,线粒体脊断裂,边界模糊,排列紊乱,低、高剂量组小鼠肾线粒体损伤减轻,并一定程度上恢复了线粒体的“长丝状”形态,见图3。

6 加减补阳还五汤对DKD小鼠肾SIRT3、Mfn1、Mfn2、OPA1、Fis1和Drp1蛋白表达的影响

如图4所示:低、高剂量实验组和正常组、模型组的SIRT3蛋白相对表达水平分别为 0.65 ± 0.07 、 0.41 ± 0.14 、 0.91 ± 0.04 和 0.23 ± 0.12 , Drp1蛋白相对表达水平分别为 0.54 ± 0.08 、 0.49 ± 0.09 、 0.37 ± 0.03 和 0.98 ± 0.11 , Fis1蛋白相对表达水平分别为 0.71 ± 0.05 、 0.51 ± 0.03 、 0.35 ± 0.05 和 1.14 ± 0.11 , Mfn1蛋白相对表达水平分别为 0.61 ± 0.04 、 0.95 ± 0.05 、 1.02 ± 0.07 和 0.43 ± 0.05 , Mfn2蛋白相对表达水平分别为 0.67 ± 0.06 、 0.89 ± 0.09 、 1.08 ± 0.05 和 0.52 ± 0.03 , OPA1蛋白相对表达水平分别为 0.77 ± 0.06 、 0.79 ± 0.09 、 1.13 ± 0.11 和 0.52 ± 0.03 。模型组与正常组比较, SIRT3、Mfn1、Mfn2和OPA1蛋白相对表达水平均显著降低, Fis1、Drp1蛋白相对表达水平均显著增加(均 $P < 0.01$); 低、高剂量实验组与模型组比较, SIRT3、Mfn1、Mfn2、

OPA1 蛋白相对表达水平均显著增加, Fis1、Drp1 蛋白相对表达水平均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时, 免疫荧光也显示 SIRT3 表达有所恢复。

讨 论

线粒体是细胞的能量工厂, 在多种急、慢性肾发病和进展中起着重要作用。线粒体通过不断进行分裂和融合(线粒体动力学)维持其质量和稳态, Mfn1、Mfn2 和 Opa1 是促进线粒体融合的关键蛋白。研究发现, 糖尿病小鼠肾中 Mfn1 与 Mfn2 水平降低, 导致线粒体融合缺陷, 线粒体膜电位和氧化磷酸化水平降低, ATP 合成减少^[12]。与之相反, Fis1、Drp1 是介导线粒体分裂的关键蛋白, 在高糖、氧化应激等刺激下, Drp1 活化并随之由细胞质异位到线粒体, 启动线粒体分裂。此外, 研究表明, SIRT3 表达于线粒体基质, 是调控线粒体动力学的重要因子。HUANG 等^[13]研究发现, 在急性肾损伤模型 SIRT3 表达下调, 同时伴随着线粒体外膜中 Drp1 和 MFF 表达增加, 而 OPA1 表达降低, 这引起线粒体分裂和碎片化增加, 肾损伤加重。同样, SIRT3 基因敲除加剧了脂多糖诱导的线粒体功能障碍和线粒体动力学的紊乱。反之, SIRT3 过表达可以通过上调 OPA1 的表达, 促进线粒体融合, 抑制线粒体分裂, 减轻肾小管上皮细胞线粒体功能障碍^[14]。本研究证实, DKD 小鼠肾组织 SIRT3 表达降低, 线粒体空泡肿胀, 线粒体脊断裂, 排列紊乱; 线粒体分裂蛋白 Drp1、Fis1 表达增加, 线粒体融合蛋白 Mfn1、Mfn2 和 OPA1 表达降低。给予加减补阳还五汤干预后, 逆转了这一趋势, 恢复了线粒体正常的“长丝状”形态。

线粒体损伤是肾小球硬化及间质纤维化形成和进展的重要病理机制。TGF- β 1 被认为是最有效的纤维化分子, 其可以增强细胞外基质的合成介导 DKD 肾小球硬化和间质纤维化。 α -SMA 是肌成纤维细胞的标志蛋白。本研究发现, 加减补阳还五汤可以抑制 DKD 小鼠肾组织中 TGF- β 1 的表达, 纤连蛋白及 α -SMA 的表达也降低。同时, 肾组织病理损害也明显减轻。

本研究提示: 加减补阳还五汤可以通过调控 DKD 小鼠肾组织 SIRT3 蛋白表达, 维持线粒体动力学平

衡, 降低尿蛋白, 减轻肾损伤和肾纤维化。

参考文献:

- [1] 胡艳红, 杨静, 修成奎, 等. 益气活血方治疗糖尿病血管病变的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8): 1—12.
- [2] 韩云鹏, 谢春光. 补阳还五汤治疗糖尿病及其并发症的研究进展[J]. 四川中医, 2021, 39(10): 213—218.
- [3] 杨帆, 马赞, 刘利飞, 等. 加减补阳还五汤对早期糖尿病肾病临床疗效及足细胞损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2025, 41(1): 106—110.
- [4] 李雅纯, 方敬, 郭帅, 等. 化瘀通络中药对糖尿病肾病大鼠氧化应激和炎症的干预作用及其机制研究[J]. 中成药, 2022, 44(2): 568—573.
- [5] YANG N, GUAN Q W, CHEN F H, et al. Antioxidants targeting mitochondrial oxidative stress: Promising neuroprotectants for epilepsy [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 6687185. 2020-11-25 [2024-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33299529/>.
- [6] 陈彦旭, 张磊, 金智生, 等. 红芪多糖对糖尿病肾病 db/db 小鼠肾损伤的改善作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(14): 2078—2082.
- [7] 杨帆, 张晓云, 张亚京, 等. 补阳还五汤加味通过抑制炎症和纤维化改善糖尿病肾病小鼠肾脏损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(24): 114—121.
- [8] 杜丽东, 王颖, 辛蕊华, 等. 乌梅丸调控 Keap-1-Nrf2/HO-1 信号通路抑制溃疡性结肠炎小鼠氧化应激损伤[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(14): 2088—2092.
- [9] 裴贵兵, 张波, 陈志成, 等. 济川煎对慢传输型便秘大鼠肠道功能的影响及作用机制的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(8): 1189—1193.
- [10] 张磊, 金智生, 万生芳, 等. 红芪多糖对 ob/ob 小鼠肝蛋白激酶 R 样内质网激酶-转录因子 NF-E2 相关因子 2 信号通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(17): 2034—2038.
- [11] 雷静文, 郭小莉, 宋丽华, 等. 香叶木素对高糖诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(22): 2679—2683.
- [12] YAO L, LIANG X, QIAO Y, et al. Mitochondrial dysfunction in diabetic tubulopathy [J/OL]. *Metabolism*, 2022, 131: 155195. 2022-03-28 [2024-08-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35358497/>.
- [13] HUANG H, LI D, HUANG X, et al. Association of complement and inflammatory biomarkers with diabetic nephropathy [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2019, 49(4): 488—495.
- [14] XU H, HERTZEL AV, STEEN KA, et al. Loss of fatty acid binding protein 4/aP2 reduces macrophage inflammation through activation of SIRT3 [J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 30(3): 325—334.

(收稿日期 2024-12-02)