DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.08.023

五味子合剂对糖尿病肾病大鼠氧化应激与铁死亡的影响及机制

张术姣[1,2],张帅星[1,2],曹梓静[1,2],白雪慧[1,2],吴玲[1,2],邓媛媛[3],张赛[4],马钰[4],刘伟敬[1,2],张勉之[3,4]
(1.北京中医药大学东直门医院,北京 100700;2.北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部重点实验室,北京 100700;
3.北京中医药大学东方医院,北京 100078;4.天津中医药研究院,天津 300120)

摘要:目的 探讨五味子合剂(Schisandrae mixture,SM)对糖尿病肾病(Diabetic nephropathy,DN)大鼠肾脏的保护作用及机制。方法 将60只雄性SPF级SD大鼠随机分为对照组、模型组、达格列净(Dagliquin,DA)组、SM高剂量(SM-H)组、SM中剂量(SM-M)组、SM低剂量(SM-L)组,高糖高脂饲料联合链脲佐菌素(Streptozocin,STZ)诱导造模。每4周检测血糖(Glu)、24 h尿蛋白定量(24 hUTP);给药12周后,称取肾质量,采集血清及肾组织,计算肾脏指数(Kidney index,KI);检测血肌酐(Serum creatinine,Scr)、血尿素氮(Blood urea nitrogen,BUN);苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin,HE)、六胺银(Silver hexamine,PASM)及马松(Masson)染色观察肾组织病理形态;相应试剂盒检测肾组织丙二醛(Malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)及谷胱甘肽(Glutathione,GSH)水平;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western Blotting(WB)检测肾组织中缺氧诱导因子-1α(Hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)、血红素氧合酶1(Heme Oxygenase-1,HO-1)的mRNA及蛋白表达量;免疫组化检测肾组织谷胱甘肽过氧化物酶4(Glutathione Peroxidase 4,GPX4)及酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4,ACSL4)水平。结果 与对照组相比,模型组病理损伤明显加重;Glu、24hUTP、Scr、BUN及KI明显升高,MDA水平明显升高,SOD、GSH水平明显降低,HIF-1α和HO-1的蛋白及mRNA表达水平明显升高,GPX4表达水平明显降低,ACSL4表达水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比,DA组及SM各组病理损伤明显减轻;Glu、24hUTP、Scr、BUN和KI均降低,肾组织MDA水平降低,SOD、GSH水平增高,其中以SM-H组上述各指标变化最为明显,并且除SM-L组BUN、MDA及SOD外均有统计学意义($P<0.05$);SM-H组HIF-1α和HO-1的蛋白及mRNA水平明显升高,GPX4表达水平明显升高,ACSL4表达水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 SM对DN具有一定肾保护作用,可能与调控HIF-1α/HO-1通路减轻氧化应激及调控GPX4/ACSL4通路抑制铁死亡有关。

关键词:糖尿病肾病;五味子合剂;氧化应激;铁死亡;HIF-1α/HO-1通路;GPX4/ACSL4通路
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)08-0111-08

Effect and Mechanism of Schisandrae Mixture(五味子合剂) on Oxidative Stress and Ferroptosis in Diabetic Nephropathy Rats

ZHANG Shujiao[1,2],ZHANG Shuaixing[1,2],CAO Zijing[1,2],BAI Xuehui[1,2],
WU Ling[1,2],DENG Yuanyuan[3],ZHANG Sai[4],MA Yu[4],LIU Weijing[1,2],ZHANG Mianzhi[3,4]
(1. Dongzhimen Hospital,Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 100700,China;
2. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Ministry of Education,Beijing Dongzhimen Hospital,
Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 100700,China;
3. Dongfang Hospital,Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 100078,China;
4. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine,Tianjin 300120,China)

Abstract:*Objective* To investigate the protective effect and mechanism of Schisandrae Mixture(五味子合剂,SM) on the kidneys of diabetic nephropathy(DN) rats. *Methods* Sixty male SPF SD rats were randomly divided into control group,model group,dapagliflozin(DA) group,SM high-dose(SM-H) group,SM medium-dose(SM-M) group and SM low-dose(SM-L) group. The model was induced by a high-sugar and high-fat diet combined with streptozotocin(STZ). Blood glucose(Glu) and 24-hour urinary protein(24 h UTP) were measured every 4 weeks. After 12 weeks of administration,the kidney was weighed,the serum and kidney tissue were collected,and the kidney index(KI) was calculated. The levels of serum creatinine(Scr) and blood urea nitrogen(BUN) were detected. Hematoxylin-eosin(HE),silver hexamine(PASM) and Masson staining

基金项目:国家自然科学基金项目(82074242,82074361,82374382);天津市中医药研究院附属医院科研项目(2022008);北京中医药大学"解码中医"揭榜挂帅项目(2023-JYB-JBZD-037)

作者简介:张术姣(1992-),女(土家族),湖北恩施人,博士在读,研究方向:中西医结合防治肾脏疾病。
通讯作者:张勉之(1973-),男,天津人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合防治肾脏疾病的基础和临床。E-mail:zhangmianzhi@vip.sina.com。

were used to observe the pathological morphology of renal tissue. The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in renal tissue were detected by corresponding kits. The mRNA and protein expression of hypoxia - inducible factor - 1α (HIF - 1α) and heme oxygenase - 1 (HO - 1) in renal tissue were detected by real - time fluorescence quantitative PCR (qRT - PCR) and Western Blotting (WB). The levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4) and acyl - CoA synthetase long - chain family member 4 (ACSL4) in renal tissue were detected by immunohistochemistry. *Results* Compared with those of the control group, the pathological damage of the model group was significantly aggravated; the levels of Glu, 24 h UTP, Scr, BUN and KI were significantly increased, MDA level was significantly increased, the levels of SOD and GSH were significantly decreased, HIF - 1α and HO - 1 protein and mRNA expression levels were significantly increased, GPX4 expression level was significantly decreased, ACSL4 expression level was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those of the model group, the pathological damage of DA group and SM group was significantly reduced; the levels of Glu, 24 h UTP, Scr, BUN and KI were decreased, the level of MDA in renal tissue was decreased, and the levels of SOD and GSH were increased. Among them, the changes of the above indexes in SM - H group were the most obvious, and there was statistical significance except for BUN, MDA and SOD in SM - L group ($P < 0.05$). The protein and mRNA levels of HIF - 1α and HO - 1 in the SM - H group were significantly increased, the expression level of GPX4 was significantly increased, and the expression level of ACSL4 was significantly decreased ($P < 0.05$). *Conclusion* SM has a certain renal protective effect on DN, which may be related to regulating HIF - 1α/HO - 1 pathway to reduce oxidative stress and regulating GPX4/ACSL4 pathway to inhibit ferroptosis.

Keywords: diabetic nephropathy; Schisandrae Mixture (五味子合剂); oxidative stress; ferroptosis; HIF - 1α/HO - 1 pathway; GPX4/ACSL4 pathway

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(Diabetes mellitus, DM)严重的微血管并发症,是终末期肾脏病(End - stage renal disease, ESRD)的主要病因[1]。DN 的主要病理特征为肾小球基底膜增厚、细胞外基质和系膜扩张、肾小球硬化并伴有不同程度的肾间质和肾小管损害[2]。DN 发病机制复杂,可能与遗传、缺氧、糖代谢紊乱、血流动力学异常、糖基化终产物、内质网应激和氧化应激等因素相关[3]。越来越多的研究证据表明,氧化应激及其驱动的铁死亡是 DN 发生发展的关键因素[4-5]。中医药治疗具有多靶点、多通路的特点。现代研究表明,一些中医临床验方可通过抑制氧化应激和铁死亡发挥肾脏保护作用[6-7]。五味子合剂(Schisandrae mixture, SM)是在国医大师张大宁教授"补肾活血法"指导下创立的治疗 DN 的基础方剂,由五味子(*Schisandrae Chinensis Fructus*)、川芎(*Chuanxiong Rhizoma*)、牡蛎(*Ostreae Concha*)按 3∶2∶1 的比例组成,方中五味子为主药,功效强阴益精,滋肾补水;川芎活血行气,祛瘀通络;牡蛎味咸入肾,敛涩固精,三药共奏补肾活血之功。临床研究表明 SM 对 DN 透析前患者的临床症状及实验室检验指标均有改善作用[8]。本研究以 DN 模型大鼠为研究对象,旨在探讨 SM 基于氧化应激及铁死亡对 DN 的肾保护作用及机制,为其临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,6 ~ 8 周龄,体质量(200 ± 20) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2021 - 0011。本研究已通过北京中医药大学东方医院动物保护和伦理委员会批准(DFYY202102R)。

1.2 药品与试剂 五味子、川芎、牡蛎(天津市中药饮片厂,批号:G2011040 - 03、9210800101、G2104019 - 01);达格列净(Dagliquin, DA,阿斯利康制药有限公司,批号:LP2385);链脲佐菌素(Streptozocin, STZ,美国 Sigma 公司,批号:S0130);肌酐(Serum creatinine, Scr)测定试剂盒、尿蛋白定量测试盒、尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)试剂盒、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(T - SOD)测试盒、还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:C011 - 2 - 1、C035 - 2 - 1、C013 - 2 - 1、A003 - 4、A001 - 3 - 2、A006 - 2 - 1);苏木精 - 伊红(Hematoxylin - eosin, HE)染色试剂盒、六胺银(silver hexamine, PASM)染色试剂盒、马松(Masson)染色试剂盒(武汉 Servicebio 公司,批号:G1003、G1059、G1006);BCA 蛋白定量试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司,批号:ZJ102);缺氧诱导因子 - 1α (Hypoxia inducible factor - 1α, HIF - 1α)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:14179);血红素氧合酶 1(Heme Oxygenase - 1, HO - 1)抗体、β - actin 抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 二抗(美国 Proteintech 公司,批号:10701 - 1 - AP、66009 - 1、SA00001 - 2);谷胱甘肽过氧化物酶 4(Glutathione Peroxidase 4, GPX4)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(Acyl - CoA synthetase long - chain family member 4, ACSL4)(英国 Abcam 公司,批号:ab125066、ab155282)。

1.3 仪器 血糖仪、血糖试纸(罗氏血糖健康医护公司);SCIENTZ - 48 高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司);高压灭菌锅(日本 Sanyo 公司);高速低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);超微量分光光度计(上海析谱仪器有限公司);电热恒温金属浴(杭州奥盛仪器有限公司);PCR 仪、SDS - PAGE 电泳仪与转膜系统(美国 Bio - Rad 公司);全自动化学发光图像分析仪(上海 Tanon 科技公司);石蜡包埋机、轮转切片机、组织摊片机(德国 Leica 公司);CX31 正置显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 SM 于天津药物研究所制备,采用乙醇回流提取法收集。SM 中五味子、川芎及牡蛎比例为(3∶2∶1)。将 90% 乙醇加入药材。然后进行 2 次回流提取(3 h/次)。将 2 次醇提液混匀、过滤,除去乙醇后浓缩成最终提取物。最后将滤液浓缩至 1 g/mL,并于 - 20 ℃冰箱储存备用。经超高效液相色谱 - 串联质谱法分析,SM 中主要成分包括五味子乙素、杨梅酮、洋川芎酮和脱氧三尖杉酯碱等[9]。

2.2 造模、分组及给药 适应性饲养 7 d 后,将 60 只大鼠随

机分为对照组 10 只和高糖高脂饮食组 50 只。高糖高脂饮食组给予高糖高脂饲料至实验结束,对照组同步给予普通饲料。4 周后,所有大鼠禁食 12 h,高糖高脂饮食组一次性腹腔注射 STZ(35 mg/kg,溶解于柠檬酸钠缓冲液中,现配现用),对照组同步腹腔注射等体积柠檬酸钠缓冲液。造模结束 3 d 后尾静脉采血检测血糖,连续 3 d 随机血糖≥16.7 mmol/L[10]。随后将此 50 只大鼠随机分为模型组、达格列净(Dagliquin,DA)组、SM 高剂量(SM-H)组、SM 中剂量(SM-M)组及 SM 低剂量(SM-L)组,每组 10 只。3 d 后开始给药:SM 组以 SM 溶液(溶于双蒸水)灌胃,SM-L 组 1.5 g·kg^{-1}·d^{-1},SM-M 组 3 g·kg^{-1}·d^{-1},SM-H 组 6 g·kg^{-1}·d^{-1};DA 组以 DA 溶液(0.9 g·kg^{-1}·d^{-1})灌胃,其他组同步以等体积双蒸水灌胃,连续给药 12 周。

2.3 样本采集 在第 0、4、8、12 周时将大鼠放入代谢笼中收集 24 h 尿液,并将尿样本于 4 ℃离心机,3000 r/min 离心 10 min,记录尿量后取上清,-80 ℃保存。12 周饲养结束时,麻醉后腹主动脉取血,将血液常温静置 2 h 后,4 ℃、3500 r/min 离心 15 min,取上清,-80 ℃保存。摘取双肾,去除周围血管、脂肪及包膜,称取肾脏质量,取左肾上段 1/3 放于 4% 多聚甲醛中固定 48 h 后进行组织脱水、石蜡包埋、切片,剩余肾脏组织存于-80 ℃冰箱。

2.4 一般情况及肾功能指标的检测 在第 0、4、8、12 周时测定各组大鼠体质量、Glu;根据相应试剂盒说明书检测血清及尿样本,并计算比较各组大鼠 24 hUTP、Scr 及 BUN 水平。肾脏指数(Kidney index,KI) = 右肾质量/体质量。

2.5 肾脏组织病理染色 根据试剂盒说明书,将 3 μm 厚度的肾脏石蜡切片脱蜡至水,并进行 HE、PASM 及 Masson 染色,染色切片透明后用中性胶封保存。在光镜 40 倍下进行观察并拍照。

2.6 肾组织中 MDA 水平及 SOD、GSH 活性测定 称取约 50 mg 肾组织放入 EP 管中,以 1∶9 的比例加入预冷的生理盐水,经高通量组织研磨器碾磨,制成 10% 的组织匀浆,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,按照试剂盒说明书测定肾组织中 MDA 水平及 SOD、GSH 活性。

2.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 取 1 mm^3 肾脏组织放入 EP 管中,加入 RNA 提取液,经高通量组织研磨器研磨后,4 ℃下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清,根据 RNA 提取步骤进行操作。提取完成后用超微量分光光度计测 RNA 浓度,将浓度过高的 RNA 稀释,使其终浓度为 200 ng/μL。进行反转录(20 μL 体系)合成 cDNA。取 0.1 mL PCR 反应板,依据说明书配制反应体系,点完样用 PCR 封板膜配合封膜仪完成封膜,并用微孔板离心机离心,于 qRT-PCR 仪上完成扩增。结果以目的基因与 GAPDH 的相对表达量表示。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

目的基因	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
HIF-1α	GGCGAAGCAAAGAGTCTGAAGT	TAGCACCATAACAAAGCCATCC
HO-1	TAAGACCGCCTTCCTGCTCAA	ACGGTCGCCAACAGGAAACT
GAPDH	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT

2.8 Western Blotting 检测 HIF-1α、HO-1 蛋白表达 剪取 1 mm^3 肾脏组织加入 RIPA 裂解液经过研磨,静置离心后取上清液,BCA 蛋白定量后,置于恒温金属浴中使蛋白变性。制备 10% SDS-PAGE 凝胶,加入蛋白样本,电泳并转至 NC 膜,5% 牛奶封闭,加入 HIF-1α 和 HO-1 一抗,置于摇床 4 ℃过夜孵育,次日 TBST 洗涤后加入对应二抗,室温慢摇 1 h,洗涤后用 ECL 发光液进行显色,全自动化学发光图像分析仪曝光。采用 Image J 1.8.0 软件进行灰度分析。

2.9 免疫组化检测 GPX4、ACSL4 表达 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水,使用 3% 双氧水溶液进行内源性过氧化物酶淬灭处理,在 0.01 mmol/L 枸橼酸盐中进行高压抗原修复,3% 胎牛血清白蛋白封闭;滴加一抗,4 ℃孵育过夜;滴加二抗,37 ℃孵育 30 min;滴加新鲜配制的 DAB 显色液染色,5 min 后苏木素染液复染 3 min;脱水封片后于光镜 40 倍下进行观察并拍照;采用 Image J 软件分析图片平均吸光度(A)值,平均 A 值为图片上各点的 A 值之和除以目标分布区域的面积[11]。

2.10 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示;GraphPad Prism 8.0 软件进行图形绘制。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ABOVA),若方差齐性不成立,则选取 Tamhane T2 检验;若方差齐性成立,选取 LSD 检验。

3 结果

3.1 SM 对 DN 大鼠 Glu、24 hUTP、肾功能指标及 KI 的影响 与对照组相比,模型组 Glu、24hUTP、Scr、BUN、KI 明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,DA 组及 SM 各组的上述指标均降低,除 SM-L 组 BUN 外差异均有统计学意义($P<0.05$);其中以 SM-H 组上述各指标变化最为明显。结果见插页XXXⅣ图 1。

3.2 SM 对 DN 大鼠肾组织病理形态的影响 对照组的肾小球、肾小管大小及形态均无明显变化。与对照组相比,模型组 HE 染色可见肾小球体积增大,鲍氏囊腔扩大,肾小管扩张,肾小管上皮细胞出现肿胀、空泡变性及脱落;PASM 染色可见肾小球系膜增宽、系膜基质增生,肾小球基底膜增厚;Masson 染色可见细胞结构排列紊乱,大量蓝色胶原纤维沉积。与模型组相比,DA 组及 SM 各组上述病理损伤均有所减轻,其中,SM-H 组病理损伤减轻最为明显。结果见插页XXXⅤ图 2。

3.3 SM 对 DN 大鼠肾组织氧化应激水平的影响 与对照组比较,模型组肾脏组织中 MDA 含量明显升高,SOD、GSH 含量均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,DA 组、SM-H 组及 SM-M 组肾脏组织中 MDA 含量降低,SOD、GSH 含量均升高,SM-L 组 GSH 含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),但 SM-L 组 MDA 及 SOD 无明显变化,差异无统计学意义;其中以 SM-H 组上述各指标变化最为明显。结果见插页XXXⅥ图 3。

3.4 SM 对 DN 大鼠肾组织 HIF-1α、HO-1 mRNA 及蛋白表达量的影响 与对照组比较,模型组肾脏组织中 HIF-1α 和 HO-1 mRNA 及蛋白表达量均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,SM-H 组肾脏组织中 HIF-1α 和 HO-1 mRNA 及蛋白表达均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见插页XXXⅦ图 4。

3.5 SM 对 DN 大鼠肾组织 GPX4、ACSL4 表达水平的影响 使用免疫组化检测各组大鼠肾脏组织中 GPX4、ACSL4 的表达,如插页XXXⅧ图 5 所示,与对照组比较,GPX4 表达明显降低,ACSL4 表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,SM-H 组大鼠肾脏组织中 GPX4 表达明显升高,AC-

SL4 表达明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。结果见插页XXXVI图 5。

4 讨论

DN 以蛋白尿、水肿、腰膝酸软、乏力等为主要临床表现，故可归属于中医学“尿浊”“水肿”“肾劳”“消瘅”等范畴。《圣济总录·卷第五十八·消渴门》云：“消渴……久则渗漏脂膏，脱耗精液，下流胞中，与水液混浊，随小便利下膏凝”，由此可见，DN 是由 DM 迁延不愈所致，病位在肾，肾元亏虚，封藏失职，精微不固，从小便而泄，则出现蛋白尿。王清任《医林改错》谓：“元气既虚，必不能达到于血管，血管无气必停留而为瘀”，由此可见，肾元亏虚亦可阻碍气血运行，导致血瘀的发生。国医大师张大宁教授在 20 世纪 70 年代开展证候学调查发现，绝大多数 DN 患者均存在着不同程度的“肾虚与血瘀”。在此基础上，张大宁教授结合临床经验提出“肾虚血瘀”理论，认为“肾虚血瘀”是 DN 的核心病机，“补肾活血”为 DN 的基本治法，SM 为 DN 治疗的基础方剂[12]。本研究中，DA 及 SM 干预后 DN 大鼠 Glu、24hUTP、Scr、BUN 及 KI 明显降低，肾组织病理损伤明显减轻，且以 SM－H 组效果最为明显，提示 SM 对 DN 有一定的肾保护作用。但其机制有待进一步探讨。

氧化应激是指在各种病理状态下（如高血糖、应激等），机体产生过量的体内活性氧（ROS）无法被及时清除，使蛋白质、脂质、核酸等受到损伤，导致蛋白质变性和脂质过氧化的过程[13]。DN 出现氧化应激与 ROS 增多和抗氧化能力下降有关[14]。研究表明[15－17]，高血糖诱导肾脏细胞产生过量 ROS，ROS 可以刺激多种氧化应激相关信号分子的产生，导致炎症细胞聚集和多种细胞因子释放，激活炎症反应及进一步的氧化应激，加重肾脏损伤。MDA 与 SOD、GSH 是评价机体氧化应激水平的重要指标，其中 MDA 是脂质过氧化的终产物，是反映组织 ROS 水平和细胞氧化损伤程度的指标之一。SOD 是一种生物体内清除超氧阴离子自由基的重要抗氧化酶，可以保护细胞免受氧自由基的损害。GSH 是体内主要的抗氧化剂，能够减轻机体氧化应激反应程度[18]。董奥等[19]研究表明，五味子醇提液能够降低 DN 模型小鼠 MDA 水平，减轻氧化应激对肾组织的损伤。赵同峰[20]研究表明，阿魏酸钠（川芎主要成分阿魏酸的钠盐）有降低 DM 模型大鼠肾脏 MDA 水平和提高 SOD 的作用，从而增强肾脏抗氧化能力，减少氧自由基对肾脏的损害。陆颖翀[21]研究表明，牡蛎壳及杨桃提取物为主要成分的牡杨水提物可以提高 DM 小鼠血清 SOD 活性和 GSH 含量，具有清除自由基、提高机体抗氧化能力的作用。在本研究中，与对照组相比，模型组肾脏组织中 MDA 含量明显增加，SOD、GSH 含量明显减少，说明 DN 大鼠体内存在严重的氧化应激反应，且抗氧化能力减弱，而 DA 及不同剂量 SM 干预后 MDA 含量减少，SOD、GSH 含量明显增加，并以 SM－H 组最为明显，说明不同剂量的 SM 能在不同程度上有效改善 DN 大鼠体内的氧化应激，增强抗氧化能力，但高剂量 SM 效果相对最佳。据此我们在接下来的研究中主要使用高剂量 SM 对相关机制进行深入探讨。

研究表明，在单次大剂量 STZ 诱导的 1 型 DN 大鼠模型[22－23]及高糖高脂饮食联合小剂量 STZ 腹腔注射的 2 型 DN 大鼠模型[24]中，HIF－1α、HO－1 表达显著增加。HIF－1α 是机体适应氧损伤的重要调节因子，HO－1 则是受其调控的下游靶基因之一，也是关键的抗氧化酶，HIF－1α/HO－1 激活可促进下游 SOD、GSH－PX 等抗氧化酶表达，提高机体抗氧化能力[25]。宋玮等[26]研究发现 DN 模型大鼠肾组织存在氧化应激损伤，同时 HO－1、HIF－1α 蛋白表达量显著增加，这可能是机体在 DN 损伤状态下为了增强自身抗氧化能力而产生的一种应激反应。另有研究表明[27]，HIF－1α 的不稳定性及其下游代偿途径的丧失是 DN 的早期致病机制，而增强 HIF－1α 水平能够明显延缓 DN 的进展[28－31]。刘清岩等[32]研究表明，HO－1 基因过表达载体转染鼠源骨髓间充质干细胞（BMSCs）可以抑制 Caspase－3 的表达，从而抑制细胞的凋亡，保护肾小球基底膜，对 DN 大鼠起一定的保护作用。在本研究中，与对照组相比，模型组肾脏组织中的 HIF－1α 和 HO－1 的 mRNA 和蛋白表达明显升高，说明 DN 大鼠肾脏 HIF－1α/HO－1 信号通路被激活，这将可能进一步增强机体的抗氧化能力以达到自我保护的目的；而与模型组比较，SM－H 组 HIF－1α 和 HO－1 蛋白及 mRNA 表达明显升高，说明高剂量 SM 能够进一步激活 HIF－1α/HO－1 信号通路，这可能使机体的抗氧化能力在原有基础上变得更强以减轻氧化应激导致的肾损伤。

由氧化应激所导致的脂质过氧化物堆积会诱导铁死亡的发生[5]，并且铁死亡被认为在 DN 的发生发展中起着重要作用[4]。GPX4/ACSL4 通路是调节铁死亡的关键通路，其中 GPX4 是铁死亡中的关键调控因子，也是细胞内重要的抗氧化物酶，可抑制脂质过氧化物的毒性，清除铁蓄积产生的脂质过氧化物[33]。而 ACSL4 则是参与合成膜磷脂氧化来调控铁死亡的关键因子，能够促进多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化，参与磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇等易氧化膜磷脂的合成，促进铁死亡的发生[11]。有学者[34]发现 DN 模型小鼠肾组织中脂质过氧化产物和铁含量增加，同时 ACSL4 表达水平升高，GPX4 表达水平降低。韩佳瑞等[35]发现 DN 模型大鼠肾组织中 GPX4 蛋白及其 mRNA 表达水平降低，而 ACSL4 蛋白及其 mRNA 表达水平升高。杨素清等[36]发现五味子乙素能够上调 GPX4 mRNA 及蛋白的表达抑制铁死亡减轻 DM 小鼠心肌损伤。郑琳琳等[37]发现补阳还五汤通过上调 GPX4 表达和下调 ACSL4 表达抑制铁死亡，减轻 MDA 含量，提高 GSH 活性，减轻氧化应激损伤，改善 DN 小鼠肾组织病理损伤。本研究的免疫组织化学染色结果提示，与对照组比较，模型组 GPX4 蛋白表达水平显著降低，ACSL4 蛋白表达水平显著增加，说明 DN 大鼠肾脏组织中 GPX4/ACSL4 通路被抑制；与模型组比较，SM－H 组肾脏 GPX4 蛋白表达水平明显升高，ACSL4 蛋白表达水平显著降低，说明高剂量 SM 可能通过激活 GPX4/ACSL4 通路进而抑制了铁死亡的发生。

综上所述，SM 对 DN 具有一定的肾保护作用，其机制可能与调控 HIF－1α/HO－1 通路减轻氧化应激，以及调控 GPX4/ACSL4 通路抑制铁死亡有关。

参考文献

[1] ILYAS Z, CHAIBAN J T, KRIKORIAN A. Novel insights into the pathophysiology and clinical aspects of diabetic nephropathy[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2017, 18(1): 21－28.

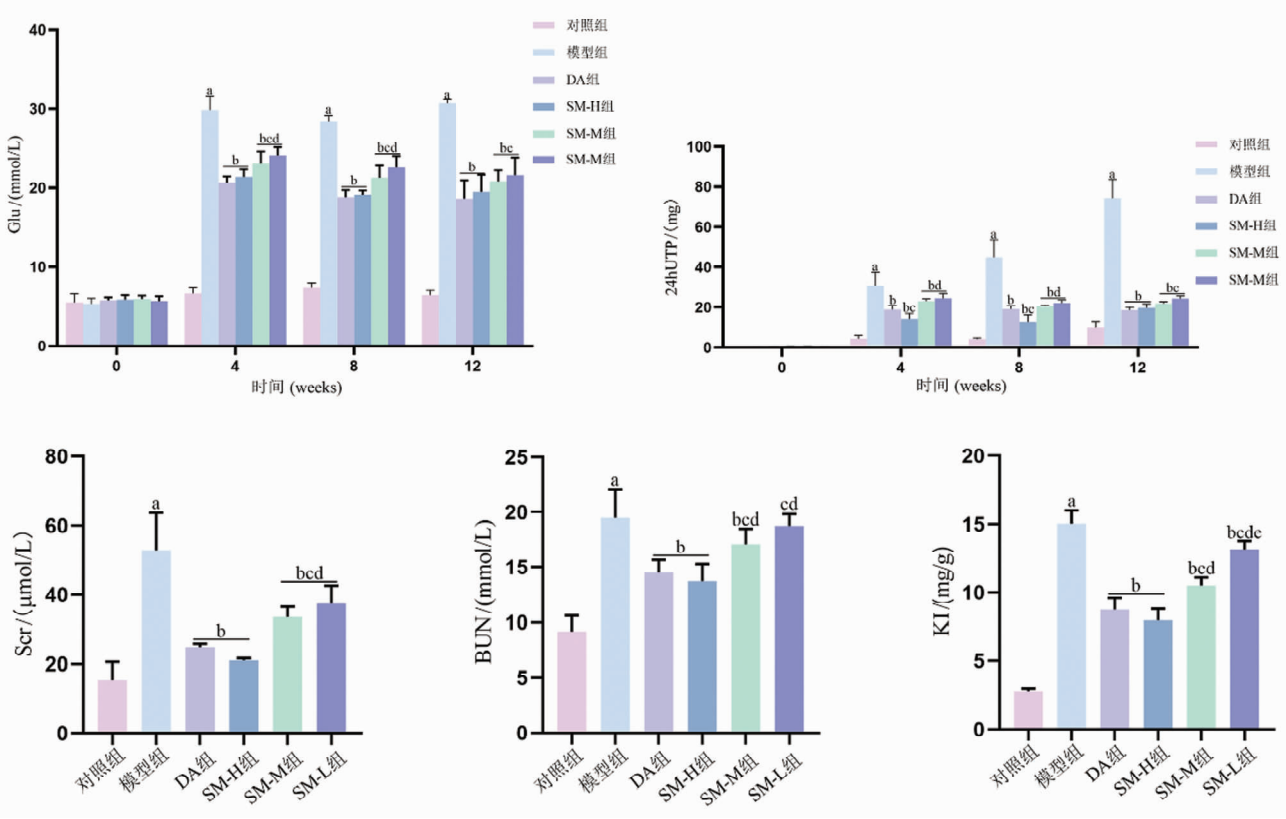
[2] ZELMANOVITZ T, GERCHMAN F, BALTHAZAR A P, et al. Diabetic nephropathy[J]. Diabetol Metab Syndr, 2009, 1(1): 10.

[3] NI W J, TANG L Q, WEI W. Research progress in signalling path-

way in diabetic nephropathy[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2015, 31(3): 221 - 233.
[4] DEV S, BABITT J L. Overview of iron metabolism in health and disease[J]. Hemodial Int, 2017, 21(Suppl 1): S6 - S20.
[5] WANG Y, BI R, QUAN F, et al. Ferroptosis involves in renal tubular cell death in diabetic nephropathy[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 888: 173574.
[6] 肖郁朋,丁英钧,丁宝珠,等. 肾消解毒通络方对糖尿病肾病金黄地鼠肾脏 AIM2 介导细胞焦亡的影响[J]. 中成药,2024,46(11): 3603 - 3612.
[7] 赵哲,陈光顺,白敏,等. 基于 Nrf2/HO - 1/GPX4 信号通路探讨真武汤改善脾肾阳虚型糖尿病肾病小鼠的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(15):29 - 37.
[8] 蔡艳. 五味子合剂联合复方 α - 酮酸片对糖尿病肾病Ⅳ期尿蛋白及炎性指标的影响[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(7): 1671 - 1674.
[9] MA Y, DENG Y Y, LI N, et al. Network pharmacology analysis combined with experimental validation to explore the therapeutic mechanism of *Schisandra* Chinensis Mixture on diabetic nephropathy[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 302(Pt A): 115768.
[10] CHAO P C, LI Y X, CHANG C H, et al. Investigation of insulin resistance in the popularly used four rat models of type - 2 diabetes[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 155 - 161.
[11] 饶政清, 梅志刚, 葛金文, 等. 脑泰方调控细胞铁转运抑制铁死亡保护脑卒中缺血损伤的机制研究[J]. 中草药, 2021, 52(21): 6552 - 6560.
[12] 李娜, 马钰, 董奥, 等. 国医大师张大宁教授从"肾虚血瘀"辨证论治糖尿病肾脏病经验[J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(4): 668 - 670, 686.
[13] SIES H. Biological redox systems and oxidative stress[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(17): 2181 - 2188.
[14] BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. Nature, 2001, 414(6865): 813 - 820.
[15] MIRANDA - DÍAZ A G, PAZARÍN - VILLASEÑOR L, YANOWSKY - ESCATELL F G, et al. Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease[J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 7047238.
[16] MANDA G, CHECHERITA A I, COMANESCU M V, et al. Redox signaling in diabetic nephropathy: hypertrophy versus death choices in mesangial cells and podocytes[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 604208.
[17] GIACCO F, BROWNLEE M. Oxidative stress and diabetic complications[J]. Circ Res, 2010, 107(9): 1058 - 1070.
[18] UTSUMI K, YASUDA F, WATANABE Y, et al. Effects of olmesartan and imidapril on the plasma adiponectin, P - selectin, and MDA - LDL levels of diabetic nephropathy patients[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(1 - 2): 348 - 349.
[19] 董奥, 谭小月, 孔琪, 等. 五味子醇提液对糖尿病肾病小鼠氧化应激的保护作用及机制研究[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6038 - 6044.
[20] 赵同峰. 阿魏酸钠对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2002.
[21] 陆颖翀. 牡杨水提物对糖尿病小鼠的降糖作用及其相关机制初步研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
[22] TANG L, YI R, YANG B, et al. Valsartan inhibited HIF - 1α pathway and attenuated renal interstitial fibrosis in streptozotocin - diabetic rats[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 97(1): 125 - 131.
[23] PANG X X, ZHANG Y G, SHI X J, et al. Hirudin reduces the expression of markers of the extracellular matrix in renal tubular epithelial cells in a rat model of diabetic kidney disease through the hypoxia - inducible factor - 1α (HIF - 1α)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e921894.
[24] XU X J, CHEN P, ZHENG Q L, et al. Effect of pioglitazone on diabetic nephropathy and expression of HIF - 1α and VEGF in the renal tissues of type 2 diabetic rats[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 93(1): 63 - 69.
[25] FAN J H, LV H, LI J, et al. Roles of Nrf2/HO - 1 and HIF - 1α/VEGF in lung tissue injury and repair following cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 7695 - 7707.
[26] 宋玮, 刘国玲, 田华, 等. 白皮杉醇对糖尿病肾病大鼠肾纤维化及 HO - 1、HIF - 1α 蛋白表达的影响[J]. 营养学报, 2021, 43(1): 86 - 91.
[27] HASEGAWA S, TANAKA T, SAITO T, et al. The oral hypoxia - inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor enarodustat counteracts alterations in renal energy metabolism in the early stages of diabetic kidney disease[J]. Kidney Int, 2020, 97(5): 934 - 950.
[28] PERSSON P, PALM F. Hypoxia - inducible factor activation in diabetic kidney disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2017, 26(5): 345 - 350.
[29] NORDQUIST L, FRIEDERICH - PERSSON M, FASCHING A, et al. Activation of hypoxia - inducible factors prevents diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(2): 328 - 338.
[30] TIAN Y M, GUAN Y, LI N, et al. Chronic intermittent hypobaric hypoxia ameliorates diabetic nephropathy through enhancing HIF1 signaling in rats[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2016, 118: 90 - 97.
[31] YANG J, LI L H, HONG S J, et al. LINK - a lncRNA activates HIF1α signaling and inhibits podocyte cell apoptosis in diabetic nephropathy[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(1): 119 - 124.
[32] 刘清岩, 李霞, 王涛, 等. HO - 1 过表达载体对 2 型糖尿病肾病大鼠模型的保护作用[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(6): 743 - 747.
[33] FIRSOV A M, FOMICH M A, BEKISH A V, et al. Threshold protective effect of deuterated polyunsaturated fatty acids on peroxidation of lipid bilayers[J]. FEBS J, 2019, 286(11): 2099 - 2117.
[34] TIWARI B K, PANDEY K B, ABIDI A B, et al. Markers of oxidative stress during diabetes mellitus[J]. J Biomark, 2013, 2013: 378790.
[35] 韩佳瑞, 彭紫凝, 王学艺, 等. 糖尿病肾病血瘀证大鼠铁死亡相关基因 GPX4、ACSL4 表达水平变化[J]. 安徽中医药大学学报, 2023, 42(2): 78 - 84.
[36] 杨素清,何天乐,苏军华,等. 五味子乙素调控 Nrf2/HO - 1/GPX4 铁死亡途径减轻糖尿病小鼠心肌损伤的机制研究[J]. 中药材,2022,45(7): 1705 - 1713.
[37] 郑琳琳, 郭登洲. 补阳还五汤对糖尿病肾病小鼠铁死亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(17): 34 - 41.

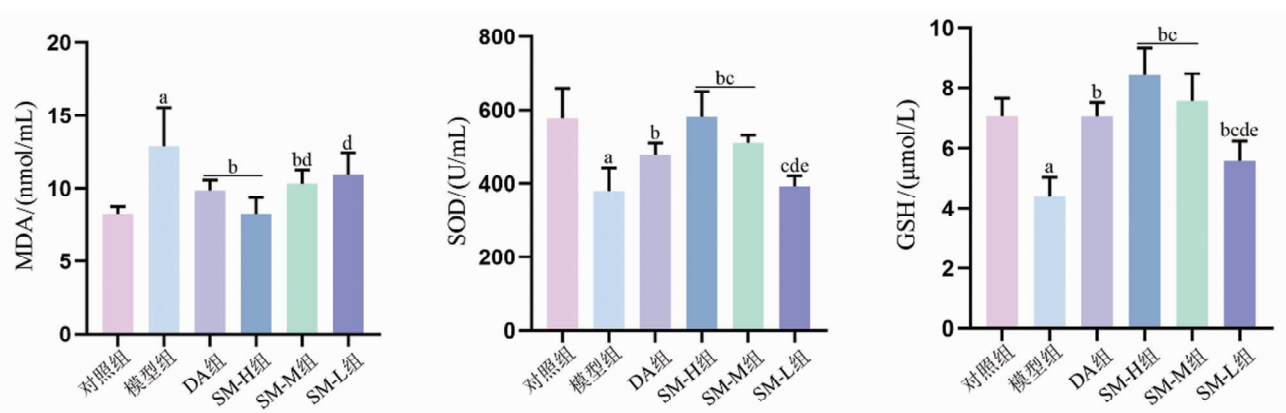
五味子合剂对糖尿病肾病大鼠氧化应激与铁死亡的影响及机制

（正文见 111 – 115 页）



注：a 与对照组比较，$P<0.05$；b 与模型组比较，$P<0.05$；c 与 DA 组比较，$P<0.05$；d 与 SM – H 组比较，$P<0.05$；e 与 SM – M 组比较，$P<0.05$。

图 1　SM 对 DN 大鼠 Glu、24hUTP、肾功能指及 KI 的影响（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）



注：a 与对照组比较，$P<0.05$；b 与模型组比较，$P<0.05$；c 与 DA 组比较，$P<0.05$；d 与 SM – H 组比较，$P<0.05$；e 与 SM – M 组比较，$P<0.05$。

图 3　SM 对 DN 大鼠肾组织氧化应激水平的影响（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

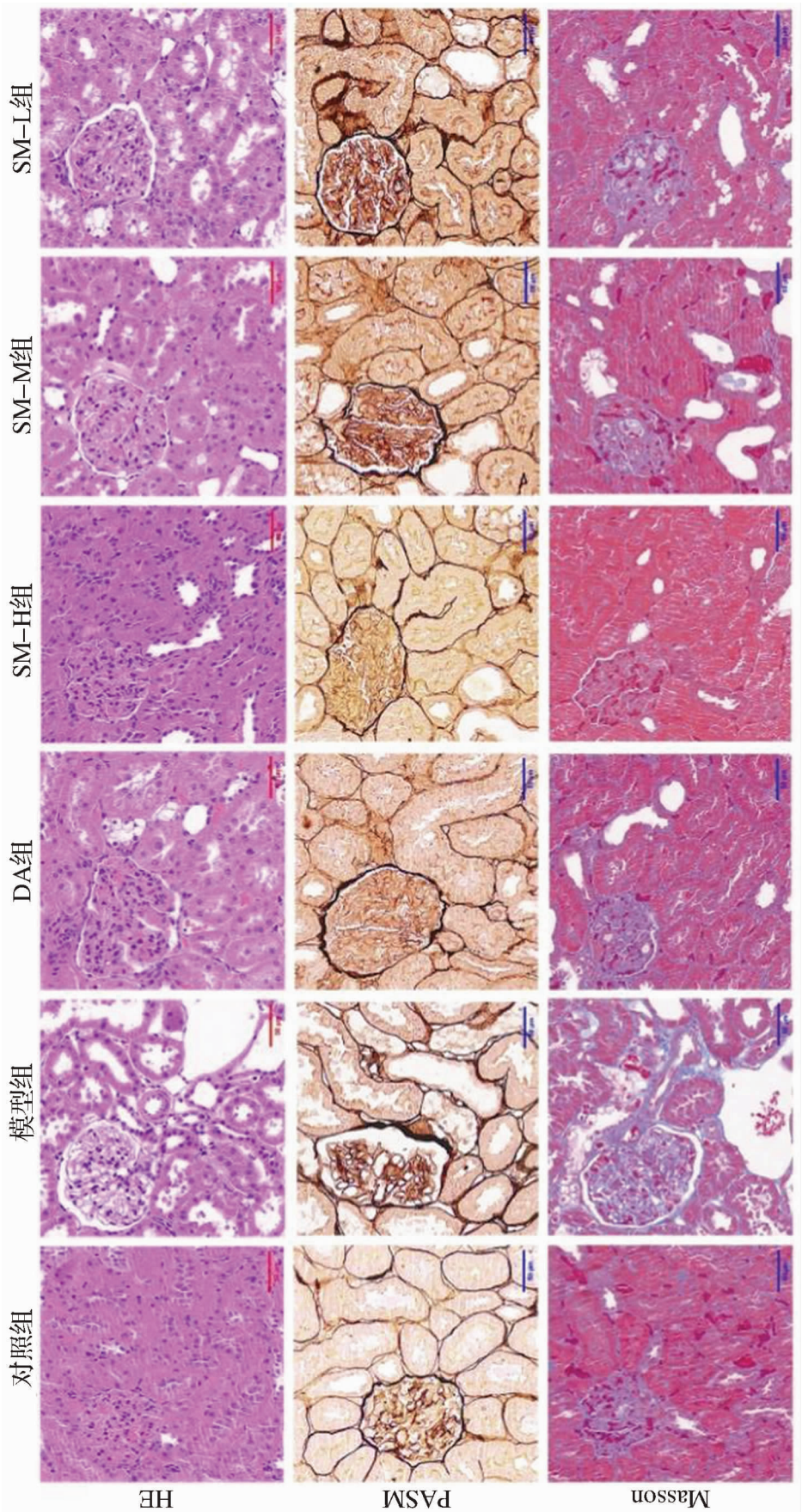
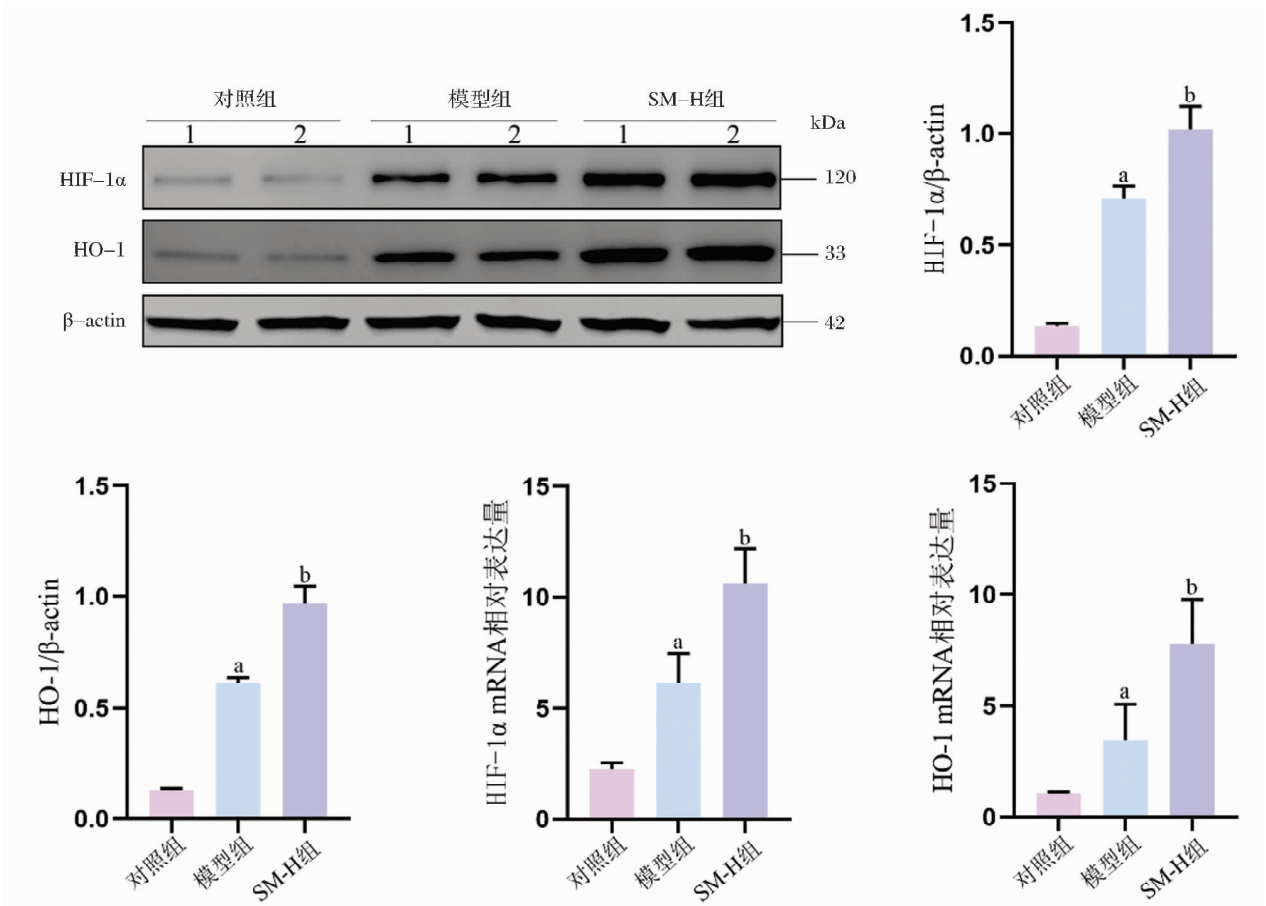
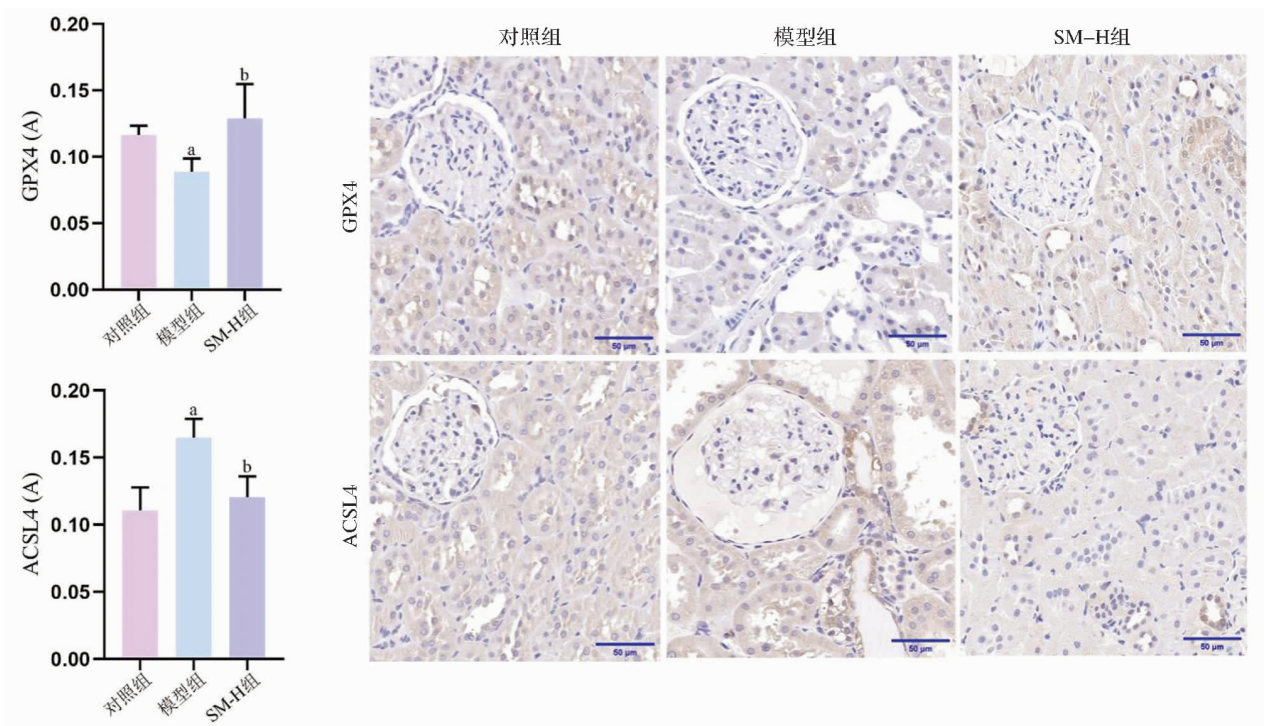


图 2　SM 对 DN 大鼠肾组织病理形态的影响(×400)



注：a 与对照组比较，$P<0.05$；b 与模型组比较，$P<0.05$；c 与 DA 组比较，$P<0.05$；d 与 SM－H 组比较，$P<0.05$；e 与 SM－M 组比较，$P<0.05$。

图 4 SM 对 DN 大鼠肾组织 HIF－1α、HO－1 的 mRNA 及蛋白表达量的影响（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）



注：a 与对照组比较，$P<0.05$；b 与模型组比较，$P<0.05$；c 与 DA 组比较，$P<0.05$；d 与 SM－H 组比较，$P<0.05$；e 与 SM－M 组比较，$P<0.05$。

图 5 SM 对 DN 大鼠肾组织 GPX4、ACSL4 表达水平的影响（×400）（$n=5$，$\bar{x}\pm s$）