白芍总苷对糖尿病肾病小鼠肾纤维化及 RhoA/ROCK1 信号通路的影响*

杨林燕，陈洁，侯世杰，苗盈盈，孙楠

邯郸市中心医院肾内二科，河北 邯郸 056001

摘要：目的：探讨白芍总苷（total glucosides of paeony，TGP）对糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）小鼠肾纤维化及 Ras 同源基因家族成员 A（Ras homolog gene family member A，RhoA）/Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 1（Rho associated coiled－coil forming protein kinase 1，ROCK1）信号通路的影响。方法：采用高脂饮食 6 周后腹腔注射链脲佐菌素（50 mg·kg^{-1}）的方法构建 DN 小鼠模型，设正常对照组、模型组、二甲双胍（metformin，MET，200 mg·kg^{-1}）组和白芍总苷低、中、高剂量（125、250、500 mg·kg^{-1}）组，每组 8 只。连续灌胃 8 周，每日 1 次，随后检测空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）水平，计算肾脏指数；分光光度法检测 24 h 尿蛋白（24 h urinary protein，24 h UTP）、血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、血肌酐（serum creatinine，Scr）水平，ELISA 法检测血清炎症因子［肿瘤坏死因子－α（tumor necrosis factor－α，TNF－α）、白细胞介素－1β（interleukin－1β，IL－1β）、IL－6、C－反应蛋白（C－reactive protein，CRP）］含量；HE、Masson 染色法观察肾组织病理学改变及纤维化状况，计算胶原容积分数（collagen volume fraction，CVF）；Western blot 法、免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）法、RT－PCR 法检测肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关 mRNA 和蛋白表达。结果：与正常对照组比较，模型组小鼠 FBG 水平、肾脏指数、24 h UTP、BUN、Scr 水平均升高（$P<0.05$），血清 TNF－α、IL－1β、IL－6、CRP 含量均升高（$P<0.05$）；肾组织 RhoA、ROCK1、NF－κB p65、TGF－β1、α－SMA、Collagen－Ⅰ蛋白和 mRNA 表达水平均升高（$P<0.05$）。与模型组比较，MET 组和 TGP 中、高剂量组小鼠 FBG 水平、肾脏指数、24 h UTP、BUN、Scr 水平均降低（$P<0.05$），血清 TNF－α、IL－1β、IL－6、CRP 含量均降低（$P<0.05$）；肾组织 RhoA、ROCK1、NF－κB p65、TGF－β1、α－SMA、Collagen－Ⅰ蛋白和 mRNA 表达水平均降低（$P<0.05$）。HE 染色显示，与正常对照组比较，模型组小鼠肾小球明显增大，肾小管上皮细胞空泡化变性，肾间质炎症细胞浸润、纤维化增生；与模型组比较，MET 组和 TGP 各剂量组小鼠肾组织病理形态得到改善。Masson 染色显示，与正常对照组比较，模型组小鼠肾组织胶原纤维明显增生，CVF 升高（$P<0.05$）；与模型组比较，MET 组和 TGP 各剂量组小鼠肾组织胶原纤维增生减轻，CVF 降低（$P<0.05$）。结论：TGP 可减轻 DN 小鼠肾纤维化并改善其肾功能，作用机制可能与抑制 RhoA/ROCK1 信号通路有关。

关键词：糖尿病肾病；白芍总苷；肾纤维化；RhoA/ROCK1 信号通路；TGF－β1；IL－6；小鼠
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2026.06.198
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2026)06－1331－09

Effects of Total Glucosides of Paeony on Renal Fibrosis and RhoA/ROCK1 Signaling Pathway in Diabetic Nephropathy Mice

YANG Linyan，CHEN Jie，HOU Shijie，MIAO Yingying，SUN Nan

Department of Nephrology II，Handan Central Hospital，Handan Hebei China 056001

Abstract：Objective：To investigate the effects of total glucosides of paeony（TGP）on renal fibrosis and the Ras homolog gene family member A（RhoA）/Rho－associated coiled－coil forming protein kinase 1（ROCK1）signaling pathway in mice with diabetic nephropathy（DN）. Methods：A DN mouse model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin（50 mg·kg^{-1}）after 6 weeks of high－fat diet. Mice were divided into the normal control group，model group，metformin（MET，200 mg·kg^{-1}）group，and TGP low，

* **基金项目**：河北省医学科学研究课题项目（20220526）

medium, and high dose groups (125, 250, 500 mg · kg^{-1}), with 8 mice in each group. Oral gavage was administered once daily for 8 consecutive weeks. Fasting blood glucose (FBG) levels were measured, and kidney index was calculated. The 24 - hour urinary protein (24 h UTP), blood urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (Scr) levels were determined by spectrophotometry. Serum inflammatory factors [tumor necrosis factor - α (TNF - α), interleukin - 1β (IL - 1β), IL - 6, C - reactive protein (CRP)] were measured by ELISA. Histopathological changes and fibrosis in kidney tissue were observed using HE and Masson staining, and the collagen volume fraction (CVF) was calculated. The expression of RhoA/ROCK1 signaling pathway - related mRNA and protein in kidney tissue was detected by Western blot, immunohistochemistry (IHC), and RT - PCR. Results: Compared with the normal control group, the model group mice showed increased levels of FBG, kidney index, 24 h UTP, BUN, and Scr ($P < 0.05$), and increased serum levels of TNF - α, IL - 1β, IL - 6, and CRP ($P < 0.05$); the expression levels of RhoA, ROCK1, NF - κB p65, TGF - β1, α - SMA, and Collagen - I proteins and mRNAs in renal tissues were all increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, mice in the MET group and the TGP medium - and high - dose groups showed decreased FBG, kidney index, 24 h UTP, BUN, and Scr levels ($P < 0.05$), and decreased serum levels of TNF - α, IL - 1β, IL - 6, and CRP ($P < 0.05$); the expression levels of RhoA, ROCK1, NF - κB p65, TGF - β1, α - SMA, and Collagen - I proteins and mRNAs in renal tissues were decreased ($P < 0.05$). HE staining showed that, compared with the normal control group, the glomeruli of model group mice were significantly enlarged, renal tubular epithelial cells exhibited vacuolar degeneration, and there was inflammatory cell infiltration and fibrosis in the renal interstitium; compared with the model group, the renal tissue pathological morphology of mice in the MET group and each dose group of TGP was improved. Masson staining showed that, compared with the normal control group, model group mice exhibited significant proliferation of collagen fibers in renal tissues, and CVF was increased ($P < 0.05$); compared with the model group, collagen fiber proliferation in the renal tissues of mice in the MET group and each dose group of TGP was alleviated, and CVF was reduced ($P < 0.05$). Conclusion: TGP can reduce renal fibrosis and improve renal function in DN mice, and its mechanism may be related to the inhibition of the RhoA/ROCK1 signaling pathway.

Key words: diabetic nephropathy; total glucosides of paeony; renal fibrosis; RhoA/ROCK1 signaling pathway; TGF - β1; IL - 6; mouse

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病患者严重且高发的一种微血管并发症,严重影响患者生活质量和生命健康。肾组织纤维化是 DN 进行性加重的关键因素,由 Ras 同源基因家族成员 A(Ras homolog gene family member A, RhoA)及 Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 1(Rho associated coiled - coilforming protein kinase 1, ROCK1)组成的信号通路在组织纤维化过程中扮演着重要角色。研究证实,通过抑制 RhoA/ROCK1 信号通路可明显减轻 DN 小鼠肾纤维化及糖尿病大鼠心肌纤维化、CCl_4 所致肝纤维化等,并改善相应脏器功能[1-3]。

DN 在中医归属“消渴”“下消”“肾浊”“水肿”等范畴,消渴日久、脾肾亏虚、瘀血阻络、浊毒内蕴是其主要病机,当以益气活血、化瘀通络为基本疗法[4-5]。白芍为毛茛科植物芍药的干燥根,经沸水煮后除去外皮、晒干而制成,具有养血调经、敛阴止汗等功效,常用于血虚萎黄、月经不调、自汗盗汗等病症的治疗。白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)是提取自白芍的一类糖苷类化合物,主要成分包括芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、氧化芍药苷等,具有较好的抗炎、抗纤维化等药理学作用[6]。研究显示,TGP 可减轻糖尿病大鼠心肌纤维化和阿霉素所致肾纤维化[7-8],对膝骨关节炎大鼠 RhoA/ROCK1 信号通路具有抑制作用[9]。本研究探讨 TGP 对 DN 小鼠肾纤维化及 RhoA/ROCK1 信号通路的影响,以期为 DN 临床治疗提供新思路。

1　材料

1.1　动物　清洁级雄性 C57BL/6J 小鼠 55 只,8 周龄,体质量 21 ~ 28 g,购自河北医科大学实验动物公共服务平台,许可证号:SCXK(冀)2020 - 001。动物饲养于温度 23 ~ 25 ℃、湿度 45% ~ 65% 、光暗循环 12 h/12 h 的环境,自由进食和饮水。本实验获得河北省邯郸市中心医院伦理委员会批准,伦理审批号:HDZXLL(K)2022 - 013。

1.2　药物与试剂　TGP 胶囊(宁波立华制药有限公司,批号:2104A09002);二甲双胍胶囊(metformin, MET, 常州兰陵制药有限公司, 批号:202204018);24 h 尿蛋白(24 h urinary protein, 24 h UTP)试剂盒、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)试剂盒、血肌酐(serum creatinine, Scr)试剂盒、RIPA 裂解液、增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)溶液、肿瘤坏死因子 - α(tumor necrosis factor - α, TNF - α)ELISA 试剂盒、白细胞介素 - 1β(interleukin - 1β, IL - 1β)ELISA 试剂盒、IL - 6 ELISA 试剂盒、C - 反应蛋白(C - reactive protein, CRP)ELISA 试剂盒、总 RNA 提取试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司, 货号: BC5650、BC1530、BC4910、R0010、PE0010、SEKR - 0009、SEKR - 0002、SEKR - 0005、SEKR - 0017、R1100);一步法反

转录聚合酶链反应(reverse transcription－polymerase chain reaction,RT－PCR)试剂盒、二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid,BCA)蛋白含量测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:N116、A045－4－2);苏木精－伊红(hematoxylin eosin,HE)、Masson 染色试剂盒(上海碧云天生物技术公司,货号:C0105M、C0189M);RhoA、ROCK1、核因子－κB p65(nuclear factor－κB p65,NF－κB p65)、转化生长因子－β1(transforming growth factor－β1,TGF－β1)、α－平滑肌肌动蛋白(α－smooth muscle actin,α－SMA)、Ⅰ型胶原(Collagen－Ⅰ)、甘油醛－3－磷酸脱氢酶(glyceraldehyde－3－phosphate dehydrogenase,GAPDH)一抗及 IgG 二抗、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的二抗、二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)试剂(北京博奥森公司,货号:bs－1180R、bs－1166R、bs－20160R、bs－0086R、bs－10196R、bs－0578R、bs－41373R、bs－0295G、bs－0295G－HRP、C－0003)。

2　方法

2.1　药物制备　TGP 溶液:精确称量 TGP 胶囊内容物质量,用生理盐水溶解,配制质量浓度为 12.5、25.0、50.0 g·L^{-1}的溶液。MET 溶液:精确称量 MET 胶囊内容物质量,用生理盐水溶解,配制质量浓度为 20 g·L^{-1}的溶液。

2.2　分组、造模及给药　从 55 只小鼠中随机选取 8 只作为正常对照组,剩余 47 只小鼠参照 Shen 等[10]报道的方法构建 DN 模型:高脂饲料(碳水化合物 21.21%、脂肪 60.65%、蛋白质 18.14%)连续喂养 6 周后禁食 12 h,腹腔注射 1% 链脲佐菌素(50 mg·kg^{-1}),3 d 后检测空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)≥11.1 mmol·L^{-1}则判定糖尿病模型制备成功,成功 45 只、失败 2 只;继续高脂饲料喂养 8 周,检测 24 h UTP≥30 mg·dL^{-1}则判定 DN 模型制备成功[11－12],成功 42 只、失败 2 只、死亡 1 只。随机取 40 只成模小鼠,按随机数字表法分为模型组、MET 组(200 mg·kg^{-1})和 TGP 低、中、高剂量组(125、250、500 mg·kg^{-1}),每组 8 只。4 个药物组小鼠以相应剂量灌胃,正常对照组和模型组小鼠以等体积生理盐水灌胃,每日 1 次,连续 8 周。

2.3　FBG 水平检测及标本采集　末次灌胃后,小鼠禁食 24 h,收集 24 h 尿液,1 500 r·min^{-1}离心(5424 型离心机,德国 Eppendorf 公司)5 min 取上清液,－20 ℃保存备检。取小鼠尾静脉血,通过动物血糖仪(One－Touch 型,美国强生公司)检测 FBG 水平。称量小鼠体质量,45 mg·kg^{-1}腹腔注射戊巴比妥钠实施麻醉后,摘眼球取血,1 500 r·min^{-1}离心 5 min 取血清,－20 ℃保存备检。开腹取小鼠双侧肾脏,称质量,左侧肾脏－20 ℃冻存,右侧肾脏置于甲醛溶液固定,并计算肾脏指数。

肾脏指数＝肾脏质量/体质量

2.4　生化指标检测　取小鼠 24 h 尿液上清,按照试剂盒说明书的步骤,通过紫外－可见分光光度计(DS－11 型,美国 Nanodrop 公司)检测 24 h UTP 水平。取小鼠血清,按照试剂盒说明书的步骤,通过紫外－可见分光光度计检测 BUN、Scr 水平;通过酶标仪(MK3 型,芬兰雷勃公司)检测 TNF－α、IL－1β、IL－6、CRP 含量。

2.5　HE 染色法观察小鼠肾组织病理学改变　取甲醛溶液固定 5 d 后的小鼠右侧肾脏组织,常规梯度乙醇脱水、石蜡包埋、4 μm 连续切片(RM 2264 型石蜡切片机,德国 Leica 公司)、贴片、烤片(HI 1220 型烤片机,德国 Leica 公司)处理后,按试剂盒说明书行 HE 染色处理,光学显微镜(CL－L 型,日本 Nikon 公司)下观察肾组织病理学改变。

2.6　Masson 染色法观察小鼠肾组织纤维化情况　取脱蜡后的小鼠肾组织切片,按照试剂盒说明书行 Masson 染色处理,光学显微镜下观察肾组织纤维化状况(蓝色为胶原纤维着色)。通过 Image J 图像处理软件计算胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF),即蓝色胶原纤维着色面积占视野面积的百分比。

2.7　Western blot 法检测小鼠肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关蛋白表达水平　取 100 mg 小鼠左侧肾脏组织,剪碎后加入 4 ℃预冷 RIPA 裂解液匀浆,12 000 r·min^{-1}离心 20 min 取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,沸水浴 10 min 使蛋白变性后,10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(PowerPac Basic 型电泳仪,美国 Bio－Rad 公司)分离蛋白,转膜(Criterion Blotter 型转膜仪,美国 Bio－Rad 公司),5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,滴加一抗 RhoA(1∶1 000)、ROCK1(1∶1 000)、NF－κB p65(1∶1 000)、TGF－β1(1∶1 000)、α－SMA(1∶1 000)、Collagen－Ⅰ(1∶1 500)、GAPDH(1∶2 000)4 ℃孵育过夜,TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min;滴加二抗 IgG(1∶3 000)室温孵育 1.5 h,TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min 后,滴加 ECL 溶液显色。通过 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白灰度值的比值作为目标蛋白的相对表达量。

2.8　免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)法检测小鼠肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关蛋白表达水平　取脱蜡水化后的小鼠肾组织切片,经 3% 双氧水灭活过氧化氢酶、柠檬酸缓冲液修复抗原和山羊血清封闭处理后,RhoA(1∶200)、ROCK1(1∶200)、NF-κB p65(1∶200)、TGF-β1(1∶200)、α-SMA(1∶200)、Collagen-Ⅰ(1∶500)一抗 4 ℃孵育过夜,HRP 标记二抗室温孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染,盐酸乙醇分化后中性树脂封片,光学显微镜下观察目标蛋白的表达情况(棕褐色为阳性着色)。通过 Image J 图像处理软件分析平均光密度值(积分光密度值/面积)作为目标蛋白的半定量结果。

2.9　RT-PCR 法检测小鼠肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关基因表达水平　取 100 mg 小鼠左侧肾脏组织,按照试剂盒说明书的步骤,Trizol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA 后进行 PCR 扩增(CFX96 型 RT-PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司),扩增条件:95 ℃ 10 min 预变性,95 ℃ 15 s、60 ℃ 45 s,共循环 40 次,以 *GAPDH* 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计与合成,见表 1。

表 1　引物序列

基因	上游(5′-3′)	下游(5′-3′)	扩增长度/bp
RhoA	TTGGCTTTATGGGACA	GGACAGAAATGCTTGACT	158
ROCK1	CTTATTGTTCTTGGGAAATCT	GGGAAATCCAATCTTATTCTT	174
NF-κB p65	TCCGAACTCCCCCATACGCT	GCGATCGTCTGTGTCTGGCA	131
TGF-β1	AGCAACTCCTGGCGTTACCT	CCTGTACGTCTCCTTGGTTCA	124
α-SMA	GCTATGTGGGGGACGAAGCG	GCCTCCGTTAGCAAGGTCGG	165
*Collagen-*Ⅰ	ACTGGCAACCTCAAGAAGTCCC	AAGTTCCGGTGTGACTCGTGC	153
GAPDH	CAAGTTCAACGGCACAG	CCAGTAGACTCCACGACAT	138

2.10　统计学方法　运用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,计量资料符合正态分布者以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *LSD-t* 检验(方差齐时)或 *Dunnett's T3* 检验(方差不齐时)。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　TGP 对 DN 小鼠 FBG 水平和肾脏指数的影响　与正常对照组比较,模型组小鼠 FBG 水平和肾脏指数均升高($P<0.05$);与模型组比较,MET 组和 TGP 中、高剂量组小鼠 FBG 水平和肾脏指数均降低($P<0.05$);与低剂量组比较,TGP 中、高剂量组小鼠 FBG 水平和肾脏指数均降低($P<0.05$);与中剂量组比较,TGP 高剂量组小鼠 FBG 水平和肾脏指数均降低($P<0.05$),见表 2。

表 2　各组小鼠 FBG 水平和肾脏指数比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG(c/mmol·L^{-1})	肾脏指数/mg·g^{-1}
正常对照组	8	5.25 ± 0.57	10.48 ± 1.06
模型组	8	16.08 ± 2.14^{a}	16.75 ± 1.39^{a}
MET 组	8	6.79 ± 0.81^{b}	13.96 ± 1.25^{b}
TGP 低剂量组	8	14.35 ± 1.90	15.82 ± 1.41
TGP 中剂量组	8	11.26 ± 1.38^{bc}	14.17 ± 1.20^{bc}
TGP 高剂量组	8	8.94 ± 1.02^{bcd}	12.86 ± 1.13^{bcd}

注:与正常对照组比较,a$P<0.05$;与模型组比较,b$P<0.05$;与 TGP 低剂量组比较,c$P<0.05$;与 TGP 中剂量组比较,d$P<0.05$。

3.2　TGP 对 DN 小鼠 24 h UTP、BUN、Scr 水平的影响　与正常对照组比较,模型组小鼠 24 h UTP、BUN、Scr 水平均升高($P<0.05$);与模型组比较,MET 组和 TGP 低、中、高剂量组小鼠 24 h UTP、BUN(低剂量组除外)、Scr 水平降低($P<0.05$);与低剂量组比较,TGP 中、高剂量组小鼠 24 h UTP、BUN、Scr 水平均降低($P<0.05$);与中剂量组比较,TGP 高剂量组小鼠 24 h UTP、BUN、Scr 水平均降低($P<0.05$),见表 3。

表 3　各组小鼠 24 h UTP、BUN、Scr 水平比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h UTP (m/mg)	BUN (c/mmol·L^{-1})	Scr (c/μmol·L^{-1})
正常对照组	8	14.72 ± 1.58	6.31 ± 0.74	31.90 ± 3.62
模型组	8	43.19 ± 5.26^{a}	17.54 ± 2.39^{a}	83.18 ± 11.35^{a}
MET 组	8	23.64 ± 2.83^{b}	12.09 ± 1.85^{b}	52.03 ± 6.72^{b}
TGP 低剂量组	8	35.08 ± 4.02^{b}	15.47 ± 2.11	67.59 ± 8.43^{b}
TGP 中剂量组	8	26.47 ± 3.19^{bc}	11.82 ± 1.74^{bc}	53.14 ± 6.91^{bc}
TGP 高剂量组	8	20.15 ± 2.36^{bcd}	9.08 ± 1.13^{bcd}	43.36 ± 5.28^{bcd}

注:与正常对照组比较,a$P<0.05$;与模型组比较,b$P<0.05$;与 TGP 低剂量组比较,c$P<0.05$;与 TGP 中剂量组比较,d$P<0.05$。

3.3　TGP 对 DN 小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6、CRP 含量的影响　与正常对照组比较,模型组小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6、CRP 含量均升高($P<0.05$);与模型组比较,MET 组和 TGP 低、中、高剂量组小鼠血清 TNF-α(低剂量组除外)、IL-1β、IL-6、

CRP(低剂量组除外)含量均降低($P<0.05$);与低剂量组比较,TGP 中、高剂量组小鼠血清 TNF－α、IL－1β、IL－6、CRP 含量均降低($P<0.05$);与中剂量组比较,TGP 高剂量组小鼠血清 TNF－α、IL－1β、IL－6 含量均降低($P<0.05$),见表 4。

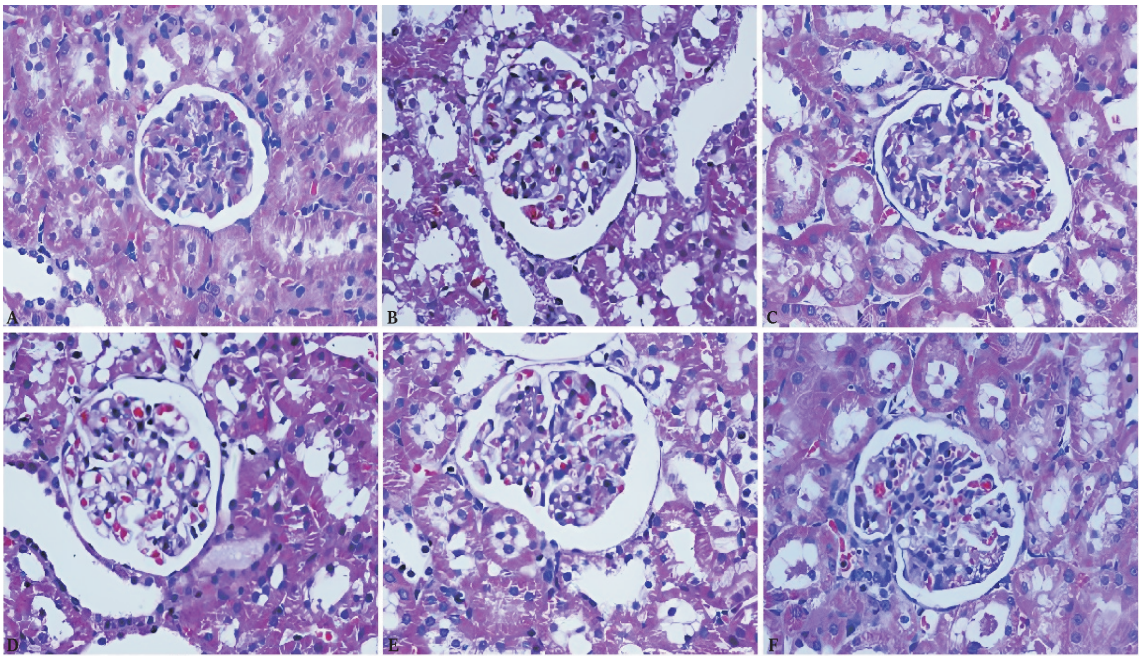
3.4　TGP 对 DN 小鼠肾组织病理学改变的影响

HE 染色显示,正常对照组小鼠肾组织结构清晰、形态正常。与正常对照组比较,模型组小鼠肾组织排列疏松,结构紊乱,系膜明显扩张,肾小球明显增大,肾小管上皮细胞空泡化变性,肾间质炎症细胞浸润、纤维化增生。与模型组比较,MET 组和 TGP 低、中、高剂量组小鼠肾组织病理形态呈不同程度减轻;TGP 高剂量组可见系膜轻度扩张、肾间质少量炎症细胞浸润和轻度纤维化增生,见图 1。

表 4　各组小鼠血清 TNF－α、IL－1β、IL－6、CRP 含量比较　($\bar{x}\pm s$, ng·L^{-1})

组别	n	TNF－α	IL－1β	IL－6	CRP
正常对照组	8	63.08±5.24	17.25±1.98	50.73±4.86	7.92±0.91
模型组	8	117.43±13.95^{a}	50.48±7.21^{a}	132.65±15.99^{a}	15.17±2.03^{a}
MET 组	8	85.27±9.86^{b}	32.90±4.52^{b}	81.46±11.03^{b}	11.34±1.48^{b}
TGP 低剂量组	8	106.39±13.24	41.62±5.86^{b}	107.40±12.58^{b}	13.95±1.76
TGP 中剂量组	8	87.45±10.91^{bc}	30.81±3.97^{bc}	83.29±10.63^{bc}	11.61±1.52^{bc}
TGP 高剂量组	8	75.16±8.83^{bcd}	24.50±3.15^{bcd}	71.84±9.26^{bcd}	10.17±1.39^{bc}

注:与正常对照组比较,a$P<0.05$;与模型组比较,b$P<0.05$;与 TGP 低剂量组比较,c$P<0.05$;与 TGP 中剂量组比较,d$P<0.05$。



注:A:正常对照组;B:模型组;C:MET 组;D:TGP 低剂量组;E:TGP 中剂量组;F:TGP 高剂量组。

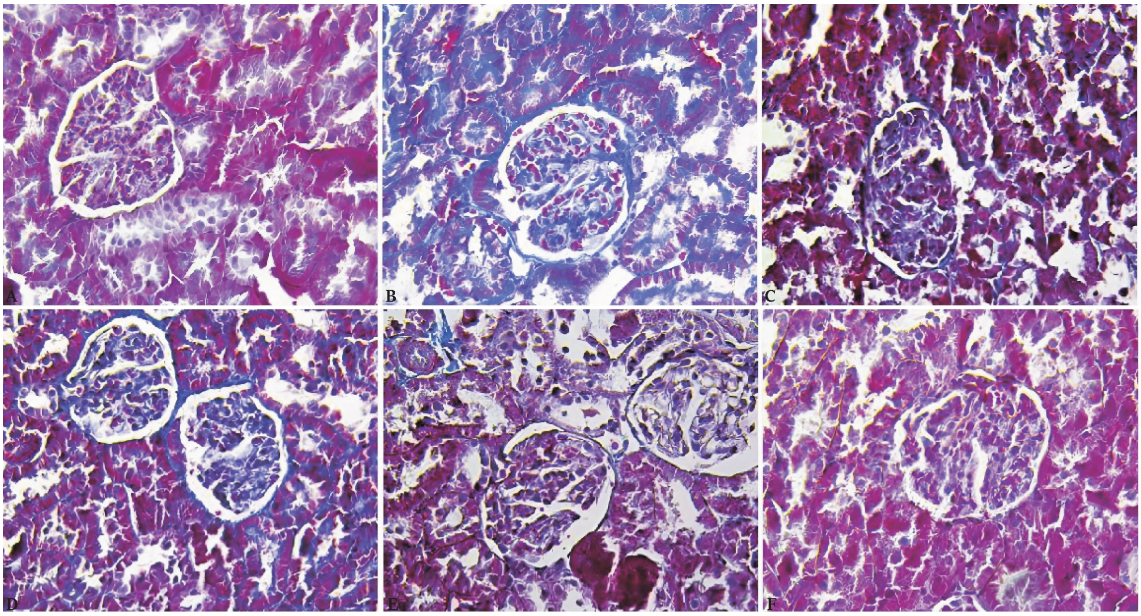
图 1　各组小鼠肾组织 HE 染色图(400×)

Masson 染色显示,正常对照组小鼠肾组织可见少量胶原纤维。与正常对照组比较,模型组小鼠肾间质区、肾小管及肾小球胶原纤维沉积明显增多,CVF 显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,MET 组和 TGP 低、中、高剂量组小鼠肾组织胶原纤维沉积呈不同程度减少,CVF 显著降低($P<0.05$);与低剂量组比较,TGP 中、高剂量组小鼠 CVF 降低($P<0.05$);与中剂量组比较,TGP 高剂量组小鼠 CVF 降低($P<0.05$),见图 2、表 5。

表 5　各组小鼠肾组织 CVF 比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CVF/%
正常对照组	8	2.26±0.29
模型组	8	46.91±5.35^{a}
MET 组	8	18.74±2.60^{b}
TGP 低剂量组	8	20.46±3.25^{b}
TGP 中剂量组	8	13.29±2.28^{bc}
TGP 高剂量组	8	6.83±0.84^{bcd}

注:与正常对照组比较,a$P<0.05$;与模型组比较,b$P<0.05$;与 TGP 低剂量组比较,c$P<0.05$;与 TGP 中剂量组比较,d$P<0.05$。

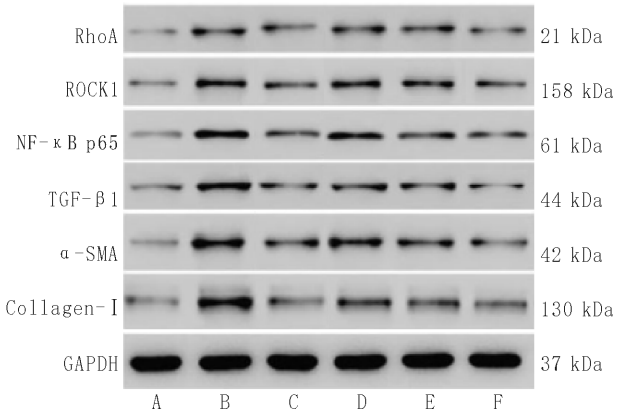


注：A：正常对照组；B：模型组；C：MET 组；D：TGP 低剂量组；E：TGP 中剂量组；F：TGP 高剂量组。

图 2　各组小鼠肾组织 Masson 染色图（400 ×）

3.5　TGP 对 DN 小鼠肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关蛋白表达的影响　Western blot 显示，与正常对照组比较，模型组小鼠肾组织 RhoA、ROCK1、NF－κB p65、TGF－β1、α－SMA、Collagen－Ⅰ蛋白表达水平均升高（$P<0.05$）；与模型组比较，MET 组和 TGP 中、高剂量组小鼠肾组织上述蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）；与低剂量组比较，TGP 中、高剂量组小鼠肾组织上述蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）；与中剂量组比较，TGP 高剂量组小鼠肾组织上述蛋白表达水平均降低（$P<0.05$），见图 3、表 6。

IHC 显示，与正常对照组比较，模型组小鼠肾组织 RhoA、ROCK1、NF－κB p65、TGF－β1、α－SMA、Collagen－Ⅰ蛋白表达水平均升高（$P<0.05$）；与模型组比较，MET 组和 TGP 中、高剂量组小鼠肾组织上述蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）；与低剂量组比较，TGP 中、高剂量组小鼠肾组织上述蛋白表达水平均降低（$P<0.05$）；与中剂量组比较，TGP 高剂量组小鼠肾组织 ROCK1、NF－κB p65、TGF－β1、α－SMA、Collagen－Ⅰ蛋白表达水平均降低（$P<0.05$），见图 4、表 7。



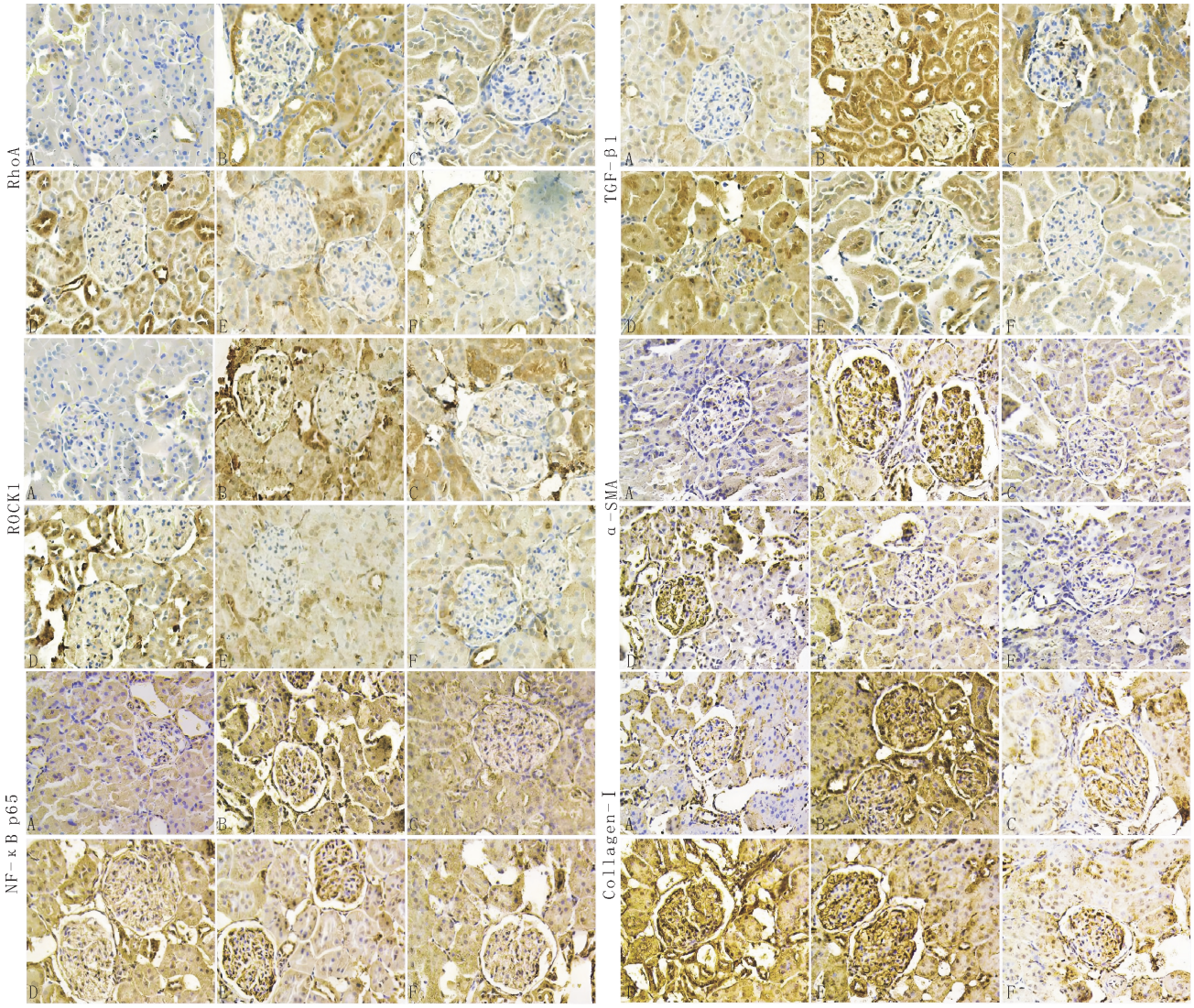
注：A：正常对照组；B：模型组；C：MET 组；D：TGP 低剂量组；E：TGP 中剂量组；F：TGP 高剂量组。

图 3　各组小鼠肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关蛋白条带图

表 6　Western blot 检测各组小鼠肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关蛋白表达水平　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	RhoA/GAPDH	ROCK1/GAPDH	NF－κB p65/GAPDH	TGF－β1/GAPDH	α－SMA/GAPDH	Collagen－Ⅰ/GAPDH
正常对照组	8	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.11 ± 0.03
模型组	8	0.36 ± 0.06^{a}	0.58 ± 0.10^{a}	0.52 ± 0.09^{a}	0.61 ± 0.11^{a}	0.57 ± 0.10^{a}	0.72 ± 0.13^{a}
MET 组	8	0.18 ± 0.03^{b}	0.23 ± 0.04^{b}	0.21 ± 0.04^{b}	0.17 ± 0.03^{b}	0.24 ± 0.05^{b}	0.15 ± 0.04^{b}
TGP 低剂量组	8	0.32 ± 0.06	0.49 ± 0.09	0.42 ± 0.07^{b}	0.28 ± 0.05^{b}	0.48 ± 0.09	0.31 ± 0.07^{b}
TGP 中剂量组	8	0.27 ± 0.05^{bc}	0.34 ± 0.06^{bc}	0.28 ± 0.05^{bc}	0.20 ± 0.04^{bc}	0.30 ± 0.06^{bc}	0.18 ± 0.04^{bc}
TGP 高剂量组	8	0.14 ± 0.03^{bcd}	0.15 ± 0.03^{bcd}	0.17 ± 0.03^{bcd}	0.10 ± 0.03^{bcd}	0.14 ± 0.03^{bcd}	0.13 ± 0.03^{bcd}

注：与正常对照组比较，a$P<0.05$；与模型组比较，b$P<0.05$；与 TGP 低剂量组比较，c$P<0.05$；与 TGP 中剂量组比较，d$P<0.05$。



注：A：正常对照组；B：模型组；C：MET 组；D：TGP 低剂量组；E：TGP 中剂量组；F：TGP 高剂量组。

图 4　各组小鼠肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关蛋白 IHC 染色图（400 ×）

表 7　IHC 检测各组小鼠肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关蛋白表达水平　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	RhoA	ROCK1	NF-κB p65	TGF-β1	α-SMA	Collagen-Ⅰ
正常对照组	8	0.032 ± 0.005	0.028 ± 0.004	0.040 ± 0.007	0.046 ± 0.007	0.033 ± 0.004	0.061 ± 0.008
模型组	8	0.271 ± 0.035^{a}	0.334 ± 0.048^{a}	0.385 ± 0.057^{a}	0.507 ± 0.073^{a}	0.316 ± 0.042^{a}	0.526 ± 0.079^{a}
MET 组	8	0.163 ± 0.024^{b}	0.172 ± 0.026^{b}	0.209 ± 0.025^{b}	0.198 ± 0.024^{b}	0.097 ± 0.012^{b}	0.242 ± 0.031^{b}
TGP 低剂量组	8	0.198 ± 0.028^{b}	0.247 ± 0.036^{b}	0.329 ± 0.048	0.316 ± 0.044^{b}	0.182 ± 0.027^{b}	0.450 ± 0.068
TGP 中剂量组	8	0.103 ± 0.017^{bc}	0.105 ± 0.014^{bc}	0.238 ± 0.031^{bc}	0.175 ± 0.26^{bc}	0.126 ± 0.019^{bc}	0.337 ± 0.046^{bc}
TGP 高剂量组	8	0.094 ± 0.012^{bc}	0.086 ± 0.010^{bcd}	0.153 ± 0.024^{bcd}	0.092 ± 0.013^{bcd}	0.075 ± 0.010^{bcd}	0.162 ± 0.025^{bcd}

注：与正常对照组比较，a$P < 0.05$；与模型组比较，b$P < 0.05$；与 TGP 低剂量组比较，c$P < 0.05$；与 TGP 中剂量组比较，d$P < 0.05$。

3.6　TGP 对 DN 小鼠肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关基因表达的影响　RT-PCR 显示，与正常对照组比较，模型组小鼠肾组织 *RhoA* mRNA、*ROCK1* mRNA、*NF-κB p65* mRNA、*TGF-β1* mRNA、*α-SMA* mRNA、*Collagen-Ⅰ* mRNA 表达水平均升高（$P < 0.05$）；与模型组比较，MET 组和 TGP 中、高剂量组小鼠肾组织上述基因表达水平均降低（$P < 0.05$）；与低剂量组比较，TGP 中、高剂量组小鼠肾组织上述基因表达水平均降低（$P < 0.05$）；与中剂量组比较，TGP 高剂量组小鼠肾组织上述基因表达水平均降低（$P < 0.05$），见表 8。

表 8　各组小鼠肾组织 RhoA/ROCK1 信号通路相关基因表达水平比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	*RhoA*	*ROCK1*	*NF－κB p65*	*TGF－β1*	*α－SMA*	*Collagen－Ⅰ*
正常对照组	8	1.14±0.12	1.06±0.13	1.35±0.16	1.21±0.14	0.97±0.12	1.28±0.15
模型组	8	3.56±0.47[a]	3.71±0.45[a]	4.28±0.60[a]	3.90±0.53[a]	3.38±0.45[a]	4.07±0.56[a]
MET 组	8	2.24±0.29[b]	2.58±0.31[b]	2.71±0.42[b]	2.27±0.32[b]	2.34±0.33[b]	2.29±0.30[b]
TGP 低剂量组	8	3.02±0.41[b]	3.16±0.40[b]	3.75±0.53	3.41±0.49	2.98±0.42	3.27±0.45[b]
TGP 中剂量组	8	2.19±0.28[bc]	2.35±0.32[bc]	2.59±0.40[bc]	2.38±0.31[bc]	2.23±0.30[bc]	2.36±0.34[bc]
TGP 高剂量组	8	1.58±0.22[bcd]	1.49±0.19[bcd]	1.73±0.24[bcd]	1.62±0.20[bcd]	1.51±0.19[bcd]	1.75±0.24[bcd]

注：与正常对照组比较，aP<0.05；与模型组比较，bP<0.05；与 TGP 低剂量组比较，cP<0.05；与 TGP 中剂量组比较，dP<0.05。

4　讨论

DN 是引发终末期肾病和糖尿病患者死亡的重要原因之一，主要临床表现为蛋白尿、血尿、水肿等，胶原纤维沉积所致肾小球硬化是其典型病理表现，因此抑制肾纤维化可作为 DN 药物研发的靶点[13]。本研究显示，DN 模型小鼠 FBG 水平与肾脏指数明显升高，肾功能明显降低（24 h UTP、BUN、Scr 水平均明显升高），肾组织表现出排列疏松、结构紊乱、系膜明显扩张、肾小球明显增大、肾小管上皮细胞空泡样变性、肾间质炎症细胞浸润等病理改变，肾间质区及肾小管、肾小球胶原纤维沉积明显增多，与代云莉等[14]、杨帆等[15]和戴标等[16]报道一致。但王江侠等[17]报道 DN 模型小鼠肾小球呈现萎缩变小，这可能与小鼠品系、成模方法不同有关。经 MET 或 TGP 治疗能够明显降低 DN 小鼠 FBG 水平及肾脏指数，改善肾功能、肾组织病理形态及肾纤维化状况。

肾纤维化是包括 DN 在内的多种慢性肾病进行性加重的共同病理阶段，TGF－β1 可诱导肾成纤维细胞增殖分化，并诱导 Collagen－Ⅰ表达，从而促使细胞外基质生成与沉积，对肾纤维化起到促进作用[18]。α－SMA 为成纤维细胞典型标记蛋白，其表达水平能够反映组织纤维化状况[19]。本研究发现，经 MET 或 TGP 治疗能够明显降低 DN 小鼠肾组织 TGF－β1、α－SMA、Collagen－Ⅰ蛋白和基因表达水平。持续高血糖将导致 TNF－α、IL－1β、IL－6、CRP 等炎症因子大量分泌而引发炎症反应，而 TNF－α、IL－1β 等可诱导 TGF－β1 表达而促进组织纤维化[20]。Bai 等[21]发现，下调 TNF－α、IL－6 表达可抑制 DN 大鼠肾纤维化。NF－κB 核转位后，NF－κB p65 亚基可诱导 TNF－α、IL－1β、IL－6 等促炎因子转录表达而加重炎症反应。TGP 具有良好的抗炎活性，本研究发现经 MET 或 TGP 治疗能够明显降低 DN 小鼠血清 TNF－α、IL－1β、IL－6、CRP 含量，降低肾组织 NF－κB p65 蛋白和基因表达水平，说明 TGP 对 DN 小鼠肾纤维化的抑制作用可能与其降低 TGF－β1、α－SMA、Collagen－Ⅰ、NF－κB p65 表达及抑制炎症反应有关，这与杨帆等[22]的报道相似。

RhoA 是一种小分子 G 蛋白，RhoA 通常以无生理活性的 RhoA－GDP 形式存在于细胞质中，可被酪氨酸激酶与其 G 蛋白耦联受体结合而激活，转换成具有生理活性的 RhoA－GTP 形式并向细胞膜转移，通过影响下游蛋白表达与活化而产生生物学效应[23]。ROCK 为 RhoA 下游靶蛋白，ROCK 有 ROCK1（主要分布于肝、脾、肺、肾等器官）和 ROCK2（主要分布于脑和骨骼肌）两种亚型，RhoA－GTP 通过与 ROCK 分子中 N 端激酶域结合而激活 ROCK[24]。活化态 ROCK1 可上调 TGF－β1 表达而促进组织纤维化[25－27]，可上调 NF－κB 表达而促进炎症反应[28]。本研究发现，经 MET 或 TGP 治疗能够明显降低 DN 小鼠肾组织 RhoA、ROCK1 蛋白和基因表达水平，说明 TGP 对 DN 小鼠肾纤维化的抑制作用可能与抑制 RhoA/ROCK1 信号通路有关，与谢发江等[1]的报道相似。

综上所述，TGP 可减轻 DN 小鼠肾纤维化并改善其肾功能，作用机制可能与抑制 RhoA/ROCK1 信号通路有关。

参考文献：

[1]谢发江，冉茂霞，冯健，等. 柚皮素通过下调 RhoA/ROCK 信号通路改善糖尿病肾病小鼠肾纤维化[J]. 天然产物研究与开发，2020，32(10)：1637－1643，1703.

[2]张昕，符丽娟. 丹酚酸 B 调节 RhoA/ROCK1 信号通路抑制糖尿病大鼠心肌纤维化的作用研究[J]. 中国药理学通报，2022，38(10)：1487－1491.

[3]李汶航，张睿，崔欣怡，等. 一贯煎联合骨髓间充质干细胞调控 RhoA/ROCK1 通路抑制大鼠肝纤维化的实验研

究[J]. 世界中医药,2022,17(18):2563 - 2568.
[4]吴瑕,古秀芬,黄静婷,等. 糖尿病和糖尿病肾病的中医体质及中医证型规律分析[J]. 广州中医药大学学报,2023,40(8):1863 - 1869.
[5]周梦琪,郑慧娟,田蕾,等. 糖尿病肾病肾间质纤维化"肾络癥瘕聚散消长"病机内涵[J]. 中医学报,2022,37(2):293 - 298.
[6]ZHANG J,FU Y W,YANG B,et al. Total glucosides of paeony inhibits liver fibrosis and inflammatory response associated with cirrhosis via the FLI1/NLRP3 axis[J]. Am J Transl Res,2022,14(6):4321 - 4336.
[7]王振贤,王立哲. 白芍总苷对糖尿病大鼠心肌纤维化的影响及机制研究[J]. 中国药师,2021,24(1):42 - 45.
[8]朱亚利,关凤军,安娜,等. 白芍总苷通过下调 TLR4/NF - κB/TGF - β1 信号通路改善阿霉素肾病大鼠肾纤维化[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(7):43 - 46.
[9]王健. 白芍总苷对木瓜蛋白酶诱导的膝骨性关节炎模型 Rho/Rock 信号转导通路的调控作用[J]. 吉林中医药,2021,41(4):501 - 504.
[10]SHEN Q,QI S M,ZHANG J T,et al. Platycodin D inhibits HFD/STZ - induced diabetic nephropathy via inflammatory and apoptotic signaling pathways in C57BL/6 mice[J]. J Ethnopharmacol,2023,314:116596.
[11]任宇晴,唐堂,李颖,等. 降糖丸抑制 TGF - β1 改善糖尿病肾病小鼠肾损伤及纤维化[J]. 中国药理学通报,2023,39(10):1988 - 1993.
[12]刘五梅,刘永飞,彭林,等. 紫丹酸 B 对糖尿病肾病模型小鼠糖代谢和肾功能的改善作用及机制[J]. 中国药房,2023,34(23):2855 - 2860.
[13]林添辉,崔艳铭,吴传聪,等. 雷米普利与白藜芦醇联用通过减弱 RhoA/ROCK 通路改善早期糖尿病肾病大鼠肾小球硬化实验研究[J]. 新中医,2023,55(14):1 - 7.
[14]代云莉,彭灿,梁丹,等. 氧化苦参碱减轻糖尿病肾病小鼠肾组织炎症及纤维化反应的机制研究[J]. 中国现代医学杂志,2024,34(6):31 - 37.
[15]杨帆,张亚京,张晓云,等. 恩格列净通过自噬 - 溶酶体途径改善糖尿病肾病小鼠肾组织损伤[J]. 中国药理学通报,2023,39(10):1938 - 1943.
[16]戴标,施丽丹,谢鸣部,等. 栀子苷改善糖尿病肾病小鼠肾功能的作用[J]. 解剖学研究,2023,45(1):40 - 45.
[17]王江侠,杨丽霞,米登海,等. 当归多糖对糖尿病肾病 KK - Ay 小鼠肾脏 AMPK 信号通路及线粒体自噬的影响[J]. 中草药,2023,54(10):3189 - 3196.
[18]赵杰,张琳琳. TGF - β1 信号通路负调控因子 Ski/SnoN 与肾纤维化的相关性[J]. 重庆医学,2023,52(12):1882 - 1886,1892.
[19]罗婷,袁德政,李天纲,等. 天龙竭胶囊对肺纤维化模型大鼠 α - SMA 和 E - Cadherin 的影响[J]. 中医学报,2024,39(1):174 - 180.
[20]刘孟楠,杨廷富,罗钢,等. NLRP3/IL - 1β/TGF - β1 信号轴在 AngⅡ诱导高血压心肌纤维化小鼠中的作用研究[J]. 中国循证心血管医学杂志,2022,14(11):1320 - 1324.
[21]BAI Y H,WANG J P,HE Z K,et al. Mesenchymal stem cells reverse diabetic nephropathy disease via lipoxin A4 by targeting transforming growth factor β (TGF - β)/smad pathway and pro - inflammatory cytokines[J]. Med Sci Monit,2019,25:3069 - 3076.
[22]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.
[23]邓仁生,朱小琴. 五味子多糖对 2 型糖尿病大鼠结肠肌层 RhoA/ROCK 信号通路蛋白表达的影响[J]. 西部中医药,2020,33(10):25 - 29.
[24]刘建兵,刘敏丽. RhoA/ROCK 信号通路相关疾病的研究进展[J]. 海南医学院学报,2019,25(6):472 - 476.
[25]XIE L L,WANG T Y,LIN S,et al. Uncaria rhynchophylla attenuates angiotensin Ⅱ - induced myocardial fibrosis via suppression of the RhoA/ROCK1 pathway[J]. Biomed Pharmacother,2022,146:112607.
[26]XIE J J,NING Q Y,ZHANG H N,et al. RhoA/ROCK signaling regulates TGF - β1 - induced fibrotic effects in human pterygium fibroblasts through MRTF - A[J]. Curr Eye Res,2022,47(2):196 - 205.
[27]ZHANG Y,YUAN R X,BAO D. TGF - β1 promotes pulmonary arterial hypertension in rats via activating RhoA/ROCK signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2020,24(9):4988 - 4996.
[28]陈艳霞,涂卫平,房向东,等. 益肾化湿颗粒通过 RhoA/ROCK1 信号通路对糖尿病肾病炎症的影响[J]. 重庆医学,2022,51(18):3074 - 3078.

收稿日期:2026 - 01 - 12

作者简介:杨林燕(1988 -),女,河北邯郸人,医学硕士,主治医师,主要从事肾脏疾病的诊治及研究。

编辑:刘凯歌