XXXX DOI:

益气养阴活血方通过调节AHR/NF-κB/Nrf2轴改善膜性肾病作用机制研究

梁 爽[1],宋纯东[1],贾评评[1],姜浩然[2],段凤阳[1],丁 樱[1]
(1.河南中医药大学第一附属医院儿科医院,郑州 450000;2.河南中医药大学儿科医学院,郑州 450046)

【摘 要】目的:探讨益气养阴活血方通过调节芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor,AHR)/核因子κB(nuclear factor kappa B,NF-κB)/核因子红细胞2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)轴改善膜性肾病(membranous nephropathy,MN)大鼠肾损伤的作用机制。**方法:**将42只SPF级雄性SD大鼠随机选取6只作为空白组,其余大鼠通过单次尾静脉注射羊抗大鼠Fx1A血清构建MN模型。造模成功后,将36只成模大鼠随机分为模型组、贝那普利组(10 mg/kg)以及益气养阴活血方低、高剂量组(11.0、22.0 g/kg)。连续给药6周,检测大鼠24 h尿蛋白定量(urinary protein quantity,UTP)、血尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)、血清肌酐(serum creatinine,SCr)、甘油三酯(triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、白蛋白(albumin,ALB)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)水平;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)、基底膜六胺银(periodic acid-silver methenamine,PASM)染色观察大鼠肾组织病理形态;蛋白免疫印迹法(Western blot,WB)和实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,RT-qPCR)检测肾组织中AHR、NF-κB、Nrf2通路相关蛋白及mRNA的表达。**结果:**与空白组相比,模型组大鼠24 h UTP、血清TG、TC、BUN、SCr水平显著升高,ALB水平显著降低($P<0.01$);肾脏病理损伤明显;肾组织AHR、NF-κB p65、COX-2蛋白表达显著升高($P<0.01$),Nrf2、HO-1蛋白及mRNA表达显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,各治疗组大鼠24 h UTP、血清TG、TC、BUN、SCr水平显著降低($P<0.01$),ALB水平显著升高($P<0.01$);各治疗组肾脏病理损伤均得到明显改善;肾组织AHR、NF-κB p65、COX-2蛋白表达显著降低($P<0.01$),Nrf2、HO-1蛋白及mRNA表达显著升高($P<0.01$)。**结论:**益气养阴活血方可能通过调控AHR/NF-κB/Nrf2轴,缓解肾组织氧化应激,抑制炎症,进而保护肾脏及延缓疾病进展。

【关键词】益气养阴活血方;膜性肾病;AHR/NF-κB/Nrf2轴;氧化应激;炎症;肾损伤
【中图分类号】R285.5 **【文献标志码】**A

Mechanism of action of Yiqi Yangyin Huoxue prescription in improving membranous nephropathy by regulating the aromatic hydrocarbon receptor/nuclear factor kappa B/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 axis

Liang Shuang[1], Song Chundong[1], Jia Pingping[1], Jiang Haoran[2], Duan Fengyang[1], Ding Ying[1]
(1.Pediatric Hospital of The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine; 2.Pediatrics College of Henan University of Chinese Medicine)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mechanism of action of Yiqi Yangyin Huoxue prescription in improving renal injury in rats with membranous nephropathy(MN) by regulating the aromatic hydrocarbon receptor(AHR)/nuclear factor kappa B(NF-κB)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2) axis. ***Methods*:** A total of 42 specific pathogen-free male Sprague-Dawley rats were used, among which 6 rats were randomly selected as the blank group, and the remaining 36 rats were given a single injection of sheep anti-rat Fx1A serum via the caudal vein to establish a model of MN. After successful modeling, the 36 rats for modeling were randomly divided into model group, benazepril group(10 mg/kg), equal-dose Yiqi Yangyin Huoxue prescription group(11.0 g/kg), and high-dose Yiqi Yangyin Huoxue prescription group(22.0 g/kg). After administration for 6 consecutive weeks, the rats were measured for 24-hour urinary total protein(24h-UTP), blood urea nitrogen(BUN), serum creatinine(SCr), triglyceride(TG), total cholesterol(TC), albumin(ALB), alanine aminotransferase(ALT), and aspartate aminotransferase(AST); HE staining and basement membrane periodic acid-silver methenamine(PASM) staining were used to observe the pathological morphology of rat renal tissue; Western blot and RT-

作者介绍:梁 爽,Email:liangshuang202209@163.com,研究方向:中医药防治小儿肾脏疾病研究。
通信作者:宋纯东,Email:scd670918@126.com。
基金项目:河南省中医药学科领军人才资助项目(编号:豫卫中医函[2021]8号);河南省卫健委国家中医临床研究基地科研专项资助项目(编号:2022JDZX003);河南省中医药科学研究重大专项资助项目(编号:2023ZYZD02);河南省"双一流"创建工程资助项目(编号:HSRP-DFCTCM-2023-3-07);河南省中医药科学研究专项重点课题资助项目(编号:2024ZYZ1002)。

qPCR were used to measure the protein and mRNA expression levels of AHR/NF-κB/Nrf2 pathway-related proteins in renal tissue. ***Results***: Compared with the normal group, the model group had significant increases in 24h-UTP and the serum levels of TG, TC, BUN, and SCr and a significant reduction in the level of ALB ($P<0.01$), with marked renal pathological injury, as well as significant increases in the protein expression levels of AHR, NF-κB p65, and COX-2 in renal tissue ($P<0.01$) and significant reductions in the protein and mRNA expression levels of Nrf2 and HO-1 in renal tissue ($P<0.01$). Compared with the model group, each treatment group had significant reductions in 24h-UTP and the serum levels of TG, TC, BUN, and SCr ($P<0.01$), a significant increase in the level of ALB ($P<0.01$), a significant improvement in renal pathological injury, significant reductions in the protein expression levels of AHR, NF-κB p65, and COX-2 in renal tissue ($P<0.01$), and significant increases in the protein and mRNA expression levels of Nrf2 and HO-1 in renal tissue ($P<0.01$). ***Conclusion***: Yiqi Yangyin Huoxue prescription can alleviate oxidative stress in renal tissue, inhibit inflammation, protect the kidneys, and delay disease progression by regulating the AHR/NF-κB/Nrf2 axis.

【Key words】Yiqi Yangyin Huoxue prescription; membranous nephropathy; the aromatic hydrocarbon receptor/nuclear factor kappa B/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 axis; oxidative stress; inflammation; renal injury

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是成人肾病综合征的主要原因,临床表现主要为大量蛋白尿、水肿,主要由免疫复合沉积物在肾小球足细胞和基底膜之间的区域积累形成,从而导致补体激活和蛋白尿发展[1-3]。其治疗主要以激素及免疫抑制剂等药物为主,然而目前的治疗方法未能有效抑制MN进展,同时还存在毒副作用、不良反应、停药后易复发等缺点[4]。因而寻求中医药学优势,减轻治疗过程中副作用、增加临床疗效及减少疾病复发率刻不容缓。

MN肾脏病变的潜在机制尚未被完全阐明,氧化应激和炎症途径在慢性肾病的发病机制和进展中发挥着核心作用[5-7],核因子κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)和核因子红细胞2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是氧化应激和炎症经典途径。研究确定了多种足细胞特异性基因,这些基因在MN患者的肾小球中表达,在NF-κB的靶标中富集[8],且研究证实MN小鼠肾内磷酸化NF-κB p65的蛋白表达明显增加[9],表明炎症通路激活,证明了NF-κB通路改变在疾病发病机制中的重要性;而Nrf2作为抗氧化应激的关键转录因子,在机体抗氧化应答过程中起着重要作用,Nrf2/血红素加氧酶1(Haem oxygenase-1, HO-1)信号通路则是Nrf2最经典的效应产生途径。芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AHR)信号传导的下游靶点是NF-κB/Nrf2通路,通过阻断AHR信号传导,能抑制NF-κB通路并逆转蛋白尿和肾小球损伤[10-11]。且AHR和NF-κB p65诱导下游靶基因环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的转录,亦具有抗蛋白尿作用[12]。

近年来,中医药在治疗MN中疗效确切,并具有不良反应少的独特优势。本课题组自拟的益气养阴活血方,基于中医'久病必虚、久病必瘀'理论,以益气养阴、清热化瘀为主要功效。前期研究证实,该方能增强机体抗氧化应激能力、减轻炎症反应,从而降低蛋白尿、减轻肾脏病理损伤并保护肾功能[13]。因此,本研究基于AHR/NF-κB/Nrf2轴,探讨益气养阴活血方对MN大鼠的肾脏保护作用机制,旨在为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 酶标检测仪(Rayto, Rt-6100);台式高速冷冻离心机(DRAGONLAB, D3024R);蛋白免疫印迹法(Western blot, WB)分析软件(武汉赛维尔生物科技有限公司, AIWBwell™);实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪(北京东胜创新生物科技有限公司, ETC811);脱色摇床(武汉赛维尔生物科技有限公司, DS-2S100);全自动生化检测仪(美国Beckman Coulter公司, AU5800);正置白光拍照显微镜(Nikon, Eclipse Ci-L)等。

1.1.2 药物及试剂 药物:益气养阴活血方颗粒剂(组成:生黄芪30 g、生地黄10 g、菟丝子30 g、积雪草30 g、制大黄4 g、水蛭3 g;生产商:四川新绿药业科技有限公司);盐酸贝那普利片(生产商:北京诺华制药有限公司;批准文号:国药准字H20030514)。

一抗:芳烃受体(Aryl hydrocarbon receptor, AHR, 货号:28284-1-AP, 武汉三鹰);核因子κB p65(Nuclear factor kappa B p65, NF-κB p65, 货号:GB11997)、环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2, 货号:GB115672)、核因子红细胞2相关因子2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2, 货号:GB113808),均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

二抗:辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(HRP-goat anti-rabbit IgG, 货号:GB23303, 武汉赛维尔生物科技有限公

司）

1.1.3 动物 SPF级雄性SD大鼠42只，体质量140~160 g，由郑州市惠济区华兴实验动物养殖场提供[实验动物生产许可证号：SCXK（豫）2019-0002]。饲养于河南中医药大学第一附属医院中心实验室，环境温度21 ℃~23 ℃，相对湿度50%~60%。适应性喂养1周。本动物实验经由河南中医药大学实验动物伦理委员会批准，伦理审查（编号：YFYDW2024013）。

1.2 方法

1.2.1 造模、分组 适应性喂养1周后，将42只大鼠随机分为空白组（6只）、模型组、贝那普利组、益气养阴活血方低剂量组（简称低剂量组）及高剂量组（简称高剂量组），每组9只（空白组除外）。参照文献方法并加以改进[14-15]，除空白组外，其余各组大鼠均经单次尾静脉注射羊抗大鼠Fx1A血清（剂量：6 mL/kg）进行造模；空白组注射等体积生理盐水。注射2周后，以24 h尿蛋白定量（UTP）>10 mg为造模成功标准。总造模周期为4周。

1.2.2 给药剂量及方法 自第5周起开始给药。贝那普利组给予贝那普利溶液10 mg/（kg·d）灌胃；益气养阴活血方低、高剂量组分别按成人临床等效剂量（以60 kg成人体质量计）的6.25倍[11.0 g/（kg·d）]和12.5倍[22.0 g/（kg·d）]灌胃；空白组与模型组给予等体积生理盐水灌胃。连续给药6周。于第6周末，收集24 h尿液。配制2%戊巴比妥钠溶液，按2.5 mL/kg腹腔注射麻醉大鼠，经腹主动脉取血后，摘取肾脏组织。实验期间共死亡3只大鼠，最终各组动物数为：贝那普利组8只，模型组与低剂量组各9只，高剂量组7只。

1.2.3 标本采集 尿液标本留取：实验结束后大鼠禁食不禁水置于代谢笼中留取24 h尿液标本，记录尿量，离心后取上清液置于-20 ℃冰箱冻存待检；血生化标本留取：大鼠麻醉后，腹主动脉取5~10 mL血液，进行离心3 000 r/min，离心15 min后取上层血清分装于2 mL离心管中待检；肾脏组织标本留取：取血后迅速剥离肾脏置于冰生理盐水中，右肾沿横切面切开，置于4 %多聚甲醛中固定，常温保存。部分左肾放置液氮中用于制作冰冻切片，其余部分置于-80 ℃冰箱中用于蛋白及相关基因检测。

1.2.4 尿液及血液指标测定 采用全自动生化分析仪检测尿液标本24 h尿蛋白定量（urinary protein quantity，UTP）及腹主动脉血标本血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、血清肌酐（serum creatinine，SCr）、甘油三酯（triglyceride，TG）、总胆固醇（total cholesterol，TC）、白蛋白（albumin，ALB）、丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）、天门冬酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）水平。

1.2.5 肾脏病理检测 固定后经乙醇梯度脱水、二甲苯透明，制备4 μm石蜡切片，并进行苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）、过碘酸六胺银（periodic acid-silver methenamine，PASM）染色，置于显微镜下观察并采集图像。

1.2.6 蛋白免疫印迹法（Western blot，WB）检测相关蛋白表达 肾组织匀浆12 000 r/min离心10 min后，收集上清总蛋白溶液，进行BCA蛋白浓度测定，蛋白溶液加入蛋白上样缓冲液，金属浴95 ℃变性10 min，进行SDS-PAGE电泳、转膜和封闭后，加入一抗4 ℃孵育摇床过夜，二抗稀释后室温孵育30 min，ECL法进行显影和定影，使用AIWBwell™分析软件进行数据分析。

1.2.7 实时荧光定量聚合酶链式反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，RT-qPCR）法检测相关基因表达 取适量肾组织匀浆研磨，提取总RNA，使用Nanodrap仪检测RNA浓度及纯度，进行反转录，反转录条件为25 ℃ 5 min、42 ℃ 30 min、85 ℃ 5 s。之后进行PCR扩增反应，反应条件为95 ℃ 30 s预变性；95 ℃ 15 s变性，60 ℃ 30 s退火/延伸，进行40个循环；65 ℃升到95 ℃，每升温0.5 ℃，采集1次荧光信号。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成，序列见表1。

表1 PCR引物序列

引物名称	引物序列（5′-3′）	扩增长度（bp）
AHR	上游：CGCAACTCAGAGACCGCTAA	161
	下游：TGCTTTTGGTGCGTATTGGC	
NF-κB p65	上游：AACGCAAAAGGACCTACGAGA	156
	下游：TTGAAAAGGCATAGGGCTGG	
COX-2	上游：CACGGACTTGCTCACTTTGTTG	162
	下游：GAAGCGTTTGCGGTACTCATT	
Nrf 2	上游：AATTGCCACCGCCAGGACT	100
	下游：TCAAACACTTCTCGACTTACCCC	
HO-1	上游：TAAGACCGCCTTCCTGCTCAA	237
	下游：ACGGTCGCCAACAGGAAACT	
GAPDH	上游：CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游：GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

1.3 统计学方法

采用SPSS 21.0统计软件（IBM，USA）进行数据分析。计量资料经Shapiro-Wilk检验证实符合正态分布后，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（One-way ANOVA），方差齐性由Levene检验确认。若总体差异具有统计学意义，则进一步采用最小显著性差异法（LSD-t检验）进行组间两两比较。所有统计检验均为双侧检验，检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 益气养阴活血方对MN大鼠尿蛋白及肾功能水平的影响

与空白组相比，模型组大鼠24 h UTP、BUN、SCr水平均显著升高（P<0.01），表明造模后出现肾脏损伤；与模型组相比，贝那普利组、低剂量组、高剂量组大鼠24 h UTP、BUN、SCr水平均显著降低（P<0.01），表明药物治疗有效。见表2、表3。

2.2 益气养阴活血方对MN大鼠肝功能及血脂水平的影响

与空白组相比，模型组大鼠血清TC、TG水平显著升高（P<0.01），ALB水平显著降低（P<0.01）；与模型组相比，各给药组大鼠血清TC、TG水平显著降低（P<0.01），ALB水平显著升高（P<0.01）；各组间血清AST、ALT水平均无统计学差异（P>0.05）。

表2 益气养阴活血方对MN大鼠尿蛋白及肾功能水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n(%)	24 h尿蛋白定量(24-UTP,mg/24 h)	
		造模后	给药结束后
空白组	6(15.4)	5.16 ± 0.79	6.22 ± 0.59
模型组	9(23.1)	52.56 ± 7.49	49.84 ± 6.08[a]
贝那普利组	8(20.5)	53.63 ± 7.03	17.05 ± 3.33[b]
低剂量组	9(23.1)	53.89 ± 4.93	25.98 ± 6.91[b]
高剂量组	7(17.9)	54.47 ± 4.31	19.32 ± 2.71[b]
F值	-	-	89.160
P值	-	-	<0.001

注:a,与空白组比较,P<0.01;b,与模型组比较,P<0.01

表3 益气养阴活血方对MN大鼠肾功能水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n(%)	BUN(mmol/L)	SCr(μmol/L)
空白组	6(15.4)	6.94 ± 0.53	30.80 ± 3.20
模型组	9(23.1)	9.84 ± 1.19[a]	47.57 ± 4.53[a]
贝那普利组	8(20.5)	7.10 ± 0.65[b]	33.20 ± 5.17[b]
低剂量组	9(23.1)	8.53 ± 1.08[b]	38.54 ± 5.10[b]
高剂量组	7(17.9)	7.81 ± 0.95[b]	35.33 ± 3.91[b]
F值	-	12.654	16.570
P值	-	<0.001	<0.001

注:a,与空白组比较,P<0.01;b,与模型组比较,P<0.01

2.3 益气养阴活血方对MN大鼠肾组织病理学变化的影响

空白组大鼠肾组织结构正常:肾小球分布均匀,肾小球内细胞数量及基质均匀;肾小管上皮细胞圆润、饱满;未见明显炎性改变。模型组大鼠肾小球体积明显增大,系膜区增宽,基底膜增厚,毛细血管网结构紊乱,可见少量足细胞肿胀伴胞体增大;偶见肾小管上皮细胞水肿,胞质疏松淡染,伴间质内淋巴细胞小灶性浸润。与模型组相比,各治疗组大鼠的肾脏病理改变均有所减轻:肾小球体积增大不明显,毛细血管基底膜增厚不显著,未见明显炎症细胞浸润(图1)

2.4 益气养阴活血方对MN大鼠肾组织中AHR、NF-κB p65、COX-2、Nrf2及HO-1蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠肾组织中AHR、NF-κB p65、COX-2蛋白表达显著升高(P<0.01),Nrf2、HO-1蛋白表达显著降低(P<0.01)。与模型组比较,贝那普利组、益气养阴活血方低剂量组(低剂量组)及高剂量组大鼠肾组织中AHR、NF-κB p65、COX-2蛋白表达显著降低(P<0.01),Nrf2、HO-1蛋白表达显著升高(P<0.01)(图2,表5)。

2.5 益气养阴活血方对MN大鼠肾组织中AHR、NF-κB p65、COX-2、Nrf2及HO-1 mRNA表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠肾组织中AHR、NF-κB p65、COX-2 mRNA表达显著升高(P<0.01);Nrf2、HO-1 mRNA表达显著降低(P<0.01)。

与模型组比较,贝那普利组、益气养阴活血方低剂量组(低剂量组)及高剂量组大鼠肾组织中AHR、NF-κB p65、COX-2 mRNA表达显著降低(P<0.01),Nrf2、HO-1 mRNA表达显著升高(P<0.01)(表6)。

表4 益气养阴活血方对MN大鼠肝功能及血脂水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n(%)	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALB(g/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
空白组	6(15.4)	46.52 ± 6.65	117.13 ± 13.32	31.35 ± 0.78	1.60 ± 0.09	0.52 ± 0.08
模型组	9(23.1)	52.62 ± 13.02	104.82 ± 15.19	17.78 ± 2.54[a]	4.44 ± 0.54[a]	1.02 ± 0.17[a]
贝那普利组	8(20.5)	54.99 ± 13.02	114.03 ± 35.37	25.89 ± 1.24[b]	2.07 ± 0.45[b]	0.61 ± 0.07[b]
低剂量组	9(23.1)	51.14 ± 16.45	120.33 ± 13.32	22.48 ± 2.35[b]	2.94 ± 0.40[b]	0.73 ± 0.12[b]
高剂量组	7(17.9)	53.30 ± 13.01	124.57 ± 21.52	23.31 ± 2.35[b]	2.22 ± 0.68[b]	0.70 ± 0.12[b]
F值	-	0.376	0.999	41.632	43.118	19.625
P值	-	0.824	0.422	<0.001	<0.001	<0.001

注:a,与空白组比较,P<0.01;b,与模型组比较,P<0.01

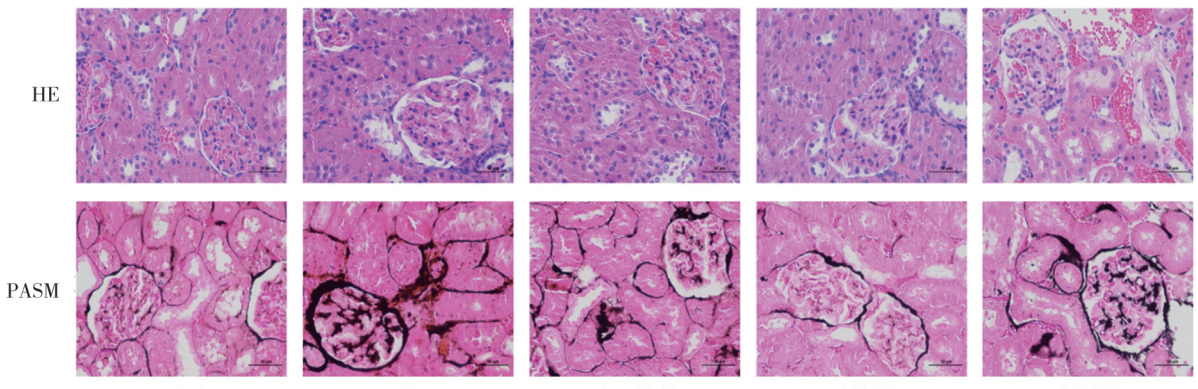


图1 益气养阴活血方对MN大鼠肾脏病理组织学的影响(400×,标尺=50 μm)

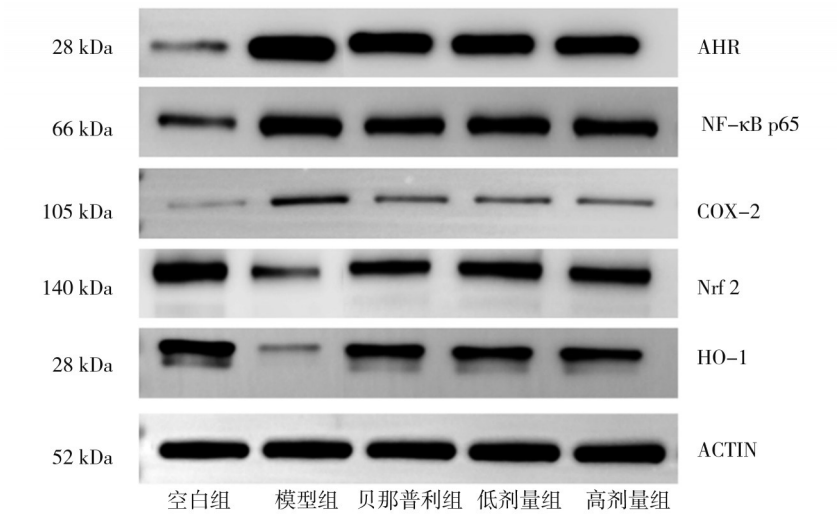


图2 益气养阴活血方对MN大鼠肾组织中AHR、NF-κB p65、COX-2、Nrf 2、HO-1蛋白表达的影响

表5 益气养阴活血方对MN大鼠肾组织中AHR、NF-κB p65、COX-2、Nrf 2、HO-1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n(%)	AHR	NF-κB p65	COX-2	Nrf2	HO-1
空白组	3(20.0)	0.20 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.92 ± 0.02	1.15 ± 0.02
模型组	3(20.0)	2.19 ± 0.15**	0.95 ± 0.02^{a}	0.32 ± 0.02^{a}	0.26 ± 0.02^{a}	0.12 ± 0.01^{a}
贝那普利组	3(20.0)	1.56 ± 0.05$^{\#\#}$	0.78 ± 0.02^{b}	0.15 ± 0.03^{b}	0.63 ± 0.01^{b}	0.88 ± 0.02^{b}
低剂量组	3(20.0)	1.49 ± 0.04$^{\#\#}$	0.76 ± 0.02^{b}	0.15 ± 0.03^{b}	0.62 ± 0.02^{b}	0.87 ± 0.02^{b}
高剂量组	3(20.0)	1.52 ± 0.02$^{\#\#}$	0.75 ± 0.02^{b}	0.14 ± 0.02^{b}	0.64 ± 0.02^{b}	0.89 ± 0.02^{b}
F值		298.316	488.457	88.930	515.592	2323.707
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:a,与空白组比较,P<0.01;b,与模型组比较,P<0.01

表6 益气养阴活血方对MN大鼠肾组织中AHR、NF-κB p65、COX-2、Nrf2、HO-1mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n(%)	AHR	NF-κB p65	COX-2	Nrf2	HO-1
空白组	3(20.0)	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	3(20.0)	2.98 ± 0.08^{a}	3.56 ± 0.05^{a}	2.64 ± 0.02^{a}	0.48 ± 0.02^{a}	0.51 ± 0.02^{a}
贝那普利组	3(20.0)	1.75 ± 0.07^{b}	1.70 ± 0.04^{b}	1.76 ± 0.02^{b}	0.71 ± 0.02^{b}	0.79 ± 0.01^{b}
低剂量组	3(20.0)	1.74 ± 0.03^{b}	1.69 ± 0.03^{b}	1.75 ± 0.03^{b}	0.72 ± 0.02^{b}	0.80 ± 0.02^{b}
高剂量组	3(20.0)	1.72 ± 0.06^{b}	1.64 ± 0.06^{b}	1.73 ± 0.02^{b}	0.71 ± 0.02^{b}	0.81 ± 0.02^{b}
F值		505.096	1954.315	3318.511	398.513	353.885
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:a,与空白组比较,P<0.01;b,与模型组比较,P<0.01

3 讨 论

MN是一种病理定义的肾小球疾病,其病理特征性表现包括肾小球基底膜增厚并弥漫于所有肾小球,肾小球足细胞和基底膜之间可见大量的免疫复合物沉积,足细胞的足突发生融合或退化现象[1,16]。MN发病机制较为复杂,氧化应激与炎症反应、自噬、足细胞损伤等均参与MN的发生[17],氧化应激在MN发病中似乎起着核心作用[18];氧化应激是指机体受到内源性或者外源性刺激后发生的应激反应,使得体内氧化还原系统平衡受到破坏,从而导致组织器官、细胞以及一些重要的生物分子损伤[19]。研究表明,氧化应激和炎症与多种慢性疾病发病机制有关,两者不可分割,并且它们形成恶性循环,氧化应激可通过多种潜在机制(如NF-κB的激活)引起炎症反应,炎症反过来又通过活化的白细胞和驻留细胞产生促炎产物来诱导氧化应激[11],可导致MN在内的多种慢性肾脏病的发生[20],故抗氧化-炎症治疗可能为治疗MN重要措施之一。

NF-κB/Nrf2作为氧化应激和炎症经典途径,在MN中也发挥着重要作用;NF-κB是一种核转录因子,主要由异二聚体p50/p65构成,可调节一系列与炎症、氧化应激和免疫相关的转录基因,在肾脏疾病的发展中起关键作用[21],其中NF-κB p65的蛋白质复合物与IκBα结合,并以无活性形式存在于细胞

质中，从而阻断NF-κB核转[22]。且有研究证实，在MN血清接受者的肾脏中，磷酸化NF-κB p65蛋白表达明显增加[9]。Nrf2通过调控抗氧化物质的表达，减轻活性氧和亲电体引起的细胞损伤，使细胞处于稳定状态，维持机体氧化还原动态平衡[23]。HO-1则是由Nrf2调控的关键抗氧化酶；MN中氧化应激发生时，Nrf2被转运至细胞核，激活抗氧化反应元件（ARE）依赖性基因转录，消除ROS，并上调SOD、HO-1等抗氧化基因，来维持细胞内氧化还原稳态[24]。AHR作为一种细胞质配体介导的转录因子，可表达包括外源性代谢酶、炎性细胞因子和黏附分子在内的一系列基因，有大量证据表明，AHR信号的激活与慢性肾脏病密切相关[25-27]；且研究证实，AHR的激活可介导氧化应激和炎症反应，与NF-κB/Nrf2通路密切相关，NF-κB/Nrf2通路是AHR信号转导的下游靶标[10-11]。在本研究中，模型组大鼠HE染色提示肾组织的病理损伤，同时检测模型组肾组织中AHR/NF-κB/Nrf 2相关通路的分子表达变化，与正常组相比，模型组大鼠肾脏组织中AHR、NF-κB p65、COX-2蛋白及mRNA表达显著升高（P<0.01），Nrf2、HO-1蛋白及mRNA表达显著降低（P<0.01），提示MN大鼠中肾脏病理损害可能与AHR/NF-κB/Nrf2信号通路有关。

MN属中医学“水肿”、“尿浊”等范畴，致病因素不离“虚、湿、瘀、热”，其中湿热内蕴、瘀阻肾络是标，而脾肾气虚是发病之本。基于此形成了健脾益气、清利湿热、活血化瘀的基本治法[28]。益气养阴活血方由生黄芪、生地黄、积雪草、菟丝子、制大黄、水蛭组成。方中生黄芪补气升阳、利水消肿，菟丝子补益肝肾之阴，共为君药；生地黄滋阴补肾清热，积雪草清热利湿、消肿活血共为臣药；制大黄行瘀通便，水蛭破血逐瘀，通经消癥，二者又助生地黄、积雪草活血化瘀，均为佐使。现代药理证明，黄芪主要成分中富含微量元素硒，能提高肾小球基底膜的自我修复能力，对抗氧化应激损伤，降低肾小球基底膜的通透性[29]；生地黄中的地黄多糖和梓醇能够通过抑制炎症相关信号通路的传导与炎症因子的释放等多途径发挥良好的抗炎效果[30]；积雪草苷可以抑制NF-κB信号通路，发挥抗炎作用；又可调控HO-1信号通路，发挥抗炎作用[31-32]；菟丝子黄酮既可以通过降低活性氧水平，增强单磷酸腺苷活化的蛋白激酶通路的表达，又可以通过激活细胞外信号调节激酶/核因子E2相关因子2-抗氧化反应元件信号通路，从而起到抗氧化作用[33]；大黄蒽醌类化合物可通过多途径产生和释放抗炎性介质、抑制炎性反应的发作[34]；水蛭素可通过TLR4/NF-κB信号通路，抑制炎症因子的产生，达到抗炎、抗肾纤维化、改善临床症状的作用[35]。

本研究结果显示，与模型组相比，两个中药剂量组（低剂量组与高剂量组）大鼠24 h UTP、血清TG、TC、BUN、SCr水平显著降低（P<0.01），ALB水平显著升高（P<0.01）；AHR、NF-κB p65、COX-2蛋白及mRNA表达显著降低（P<0.01），Nrf2、HO-1蛋白及mRNA表达显著升高（P<0.01），同时肾组织病理明显改善。证实益气养阴活血方可能通过调控AHR/NF-κB/Nrf2轴，缓解肾组织氧化应激，抑制炎症，进而保护肾脏及延缓疾病进展。贝那普利是血管紧张素转换酶抑制剂（ACEI）类药物，是KDIGO发布的临床实践指南中治疗MN药物之一，且指南指出对于蛋白尿<3.5 g/d且eGFR>60 mL/（min·1.73 m^2）的MN患者并不需要免疫抑制剂治疗，故贝那普利选为阳性对照药物。两个中药剂量组与贝那普利组间各指标均无显著统计学差异；益气养阴活血方低剂量组与高剂量组相比，24 h UTP、各项血清生化指标及通路相关分子表达水平亦无显著统计学差异，提示该方的最佳治疗剂量有待进一步研究。

综上，益气养阴活血方可能通过调控AHR/NF-κB/Nrf2轴，缓解肾组织氧化应激，抑制炎症，进而保护肾脏及延缓疾病进展。但该方中各成分是否通过其他途径改善MN肾损伤的机制有待进一步探讨；同时因实验条件有限，未设置更多中药剂量组以探究最佳用药剂量，后期课题组将继续开展体内外实验以完善上述问题，明确该方用于防治疾病的具体机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 梁爽：实验方案设计、实验数据收集、分析数据、论文撰写；宋纯东：实验技术指导、论文修改；贾评评：实验技术指导、数据收集；姜浩然：实验方案设计、分析数据；段凤阳：论文修改；丁樱：论文修改

参 考 文 献

[1] Gu Y, Xu H, Tang D. Mechanisms of primary membranous nephropathy[J]. Biomolecules, 2021, 11(4): 513.

[2] Miao H, Zhang YM, Yu XY, et al. Membranous nephropathy: Systems biology-based novel mechanism and traditional Chinese medicine therapy[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 969930.

[3] Hua MR, Zhao YL, Yang JZ, et al. Membranous nephropathy: Mechanistic insights and therapeutic perspectives[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 120: 110317.

[4] Ronco P, Beck L, Debiec H, et al. Membranous nephropathy[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7: 69.

[5] Chen DQ, Cao G, Chen H, et al. Identification of serum metabolites associating with chronic kidney disease progression and anti-fibrotic effect of 5-methoxytryptophan[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1476.

[6] Krata N, Foroncewicz B, Zagożdżon R, et al. Peroxiredoxins as markers of oxidative stress in IgA nephropathy, membranous nephropa-

thy and lupus nephritis[J]. Arch Immunol Ther Exp,2021,70(1):3.
[7] Luo LP,Suo P,Ren LL,et al. Shenkang injection and its three anthraquinones ameliorates renal fibrosis by simultaneous targeting IκB/NF-κB and Keap1/Nrf2 signaling pathways[J]. Front Pharmacol,2021,12:800522.
[8] Sealfon R,Mariani L,Avila-Casado C,et al. Molecular characterization of membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol,2022,33(6):1208-1221.
[9] Wu CC,Lu KC,Lin YF,et al. Pathogenic role of effector cells and immunoglobulins in cationic bovine serum albumin-induced membranous nephropathy[J]. J Clin Immunol,2012,32(1):138-149.
[10] Ma SX,Li XJ,Duan TT,et al. Moshen granule ameliorates membranous nephropathy by regulating NF-κB/Nrf2 pathways via aryl hydrocarbon receptor signalling[J]. Heliyon,2023,9(9).
[11] Wang YN,Miao H,Yu XY,et al. Oxidative stress and inflammation are mediated *via* aryl hydrocarbon receptor signalling in idiopathic membranous nephropathy[J]. Free Radic Biol Med,2023,207:89-106.
[12] Takano T,Cybulsky AV,Cupples WA,et al. Inhibition of cyclooxygenases reduces complement-induced glomerular epithelial cell injury and proteinuria in passive Heymann nephritis[J]. J Pharmacol Exp Ther,2003,305(1):240-249.
[13] 宋 珂,宋纯东,段凤阳,等.益气养阴活血方调控Nrf2/NLRP3信号通路对糖尿病肾病大鼠的肾脏保护作用研究[J].中华中医药学刊,2024,42(02):117-121+278.
Song K,Song CD,Duan FY,et al. Study on the nephroprotective effect of Nrf2/NLRP3 signaling pathway on diabetic nephropathy rats[J]. Chin Arch Tradit Chin Med,2024,42(02):117-121+278.
[14] Wang XH,Yang YN,Liang Y,et al. Structural modulation of gut microbiota during alleviation of experimental passive Heymann nephritis in rats by a traditional Chinese herbal formula[J]. Biomed Pharmacother,2022,145:112475.
[15] Wang XH,Lang R,Zeng Q,et al. Jianpi Qushi Heluo Formula alleviates renal damages in Passive Hemann nephritis in rats by upregulating Parkin-mediated mitochondrial autophagy[J]. Sci Rep, 2021, 11(1):18338.
[16] Hoxha E, Reinhard L, Stahl RAK. Membranous nephropathy: new pathogenic mechanisms and their clinical implications[J]. Nat Rev Nephrol,2022,18(7):466-478.
[17] 张新丽,王彩红,魏晓涛,等.中药干预膜性肾病相关信号通路研究进展[J].中药药理与临床,2024,40(9):121-128,63.
Zhang XL,Wang CH,Wei XT,et al. Research progress on intervention of traditional Chinese medicine on related signal pathways of membranous nephropathy[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2024, 40(9):121-128,63.
[18] Nangaku M,Shankland SJ,Couser WG. Cellular response to injury in membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol,2005,16(5):1195-1204.
[19] Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine [J]. Redox Biol,2015,4:180-183.
[20] Saito H. Toxico-pharmacological perspective of the Nrf2-Keap1 defense system against oxidative stress in kidney diseases[J]. Biochem Pharmacol,2013,85(7):865-872.
[21] Wan Q,Liu Z,Yang M,et al. Triptolide ameliorates fine particulate matter-induced podocytes injury via regulating NF-κB signaling pathway[J]. BMC Mol Cell Biol,2020,21(1): 4.
[22] Hayden MS,Ghosh S. Shared principles in NF-κB signaling[J]. Cell,2008,132(3):344-362.
[23] Chan K,Han XD,Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98(8):4611-4616.
[24] Yu CW,Chen H,Du DH,et al. β-Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* alleviates oxidative stress in LPS-stimulated $RAW_{264.7}$ cells *via* Dectin-1/Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Cell Stress Chaperones,2021,26(4):629-637.
[25] Balestrieri N,Palzkill V,Pass C,et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor in muscle exacerbates ischemic pathology in chronic kidney disease[J]. Circ Res,2023,133(2):158-176.
[26] Kim JT,Kim SH,Min HK,et al. Effect of dialysis on aryl hydrocarbon receptor transactivating activity in patients with chronic kidney disease[J]. Yonsei Med J,2020,61(1):56-63.
[27] Miao H,Wu XQ,Wang YN,et al. 1-Hydroxypyrene mediates renal fibrosis through aryl hydrocarbon receptor signalling pathway[J]. Br J Pharmacol,2022,179(1):103-124.
[28] 付 平,李鑫睿.特发性膜性肾病诊疗进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2020,21(7):565-567.
Fu P,Li XR. Progress in diagnosis and treatment of idiopathic membranous nephropathy[J]. Chin J Integr Tradit West Nephrol,2020,21(7):565-567.
[29] 曹博宁,王耀献.论黄芪在膜性肾病治疗中的应用[J].中医杂志,2024,65(16):1725-1729,1740.
Cao BN,Wang YX. Application of Huangqi(*Radix* astragali) in the treatment of membranous nephropathy[J]. J Tradit Chin Med,2024,65(16):1725-1729,1740.
[30] 赵婧含,李 雪,吴文轩,等.生地黄提取物及其有效成分的药理作用研究进展[J].药物评价研究,2024,47(10):2443-2448.
Zhao JH,Li X,Wu WX,et al. Research progress on pharmacological effects of *Radix* Rehmanniae extract and its effective components[J]. Drug Eval Res,2024,47(10):2443-2448.
[31] Zhang CH,Chen SY,Zhang ZX,et al. Asiaticoside alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury *via* NOD2/mitogen-activated protein kinase (MAPK)/nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling pathway[J]. Med Sci Monit,2020,26:e920325.
[32] Zhao JY,Shi J,Shan Y,et al. Asiaticoside inhibits TGF-β1-induced mesothelial-mesenchymal transition and oxidative stress *via* the Nrf2/HO-1 signaling pathway in the human peritoneal mesothelial cell line HMrSV5[J]. Cell Mol Biol Lett,2020,25:33.
[33] 陈鲁宁,胡 扬,辛国松,等.菟丝子化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测[J].中草药,2024,55(15):5298-5314.
Chen LN,Hu Y,Xin GS,et al. Research progress of chemical constituents and pharmacological effects of *Cuscuta chinensis* and prediction of its quality marker(Q-Marker)[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(15):5298-5314.
[34] 刘桂元,罗利亚,李 晓,等.大黄蒽醌类化合物抗炎作用研究进展[J].中成药,2023,45(11):3693-3701.
Liu GY,Luo LY,Li X,et al. Research progress on anti-inflammatory effects of anthraquinone compounds from rhubarb[J]. Chin Tradit Pat Med,2023,45(11):3693-3701.
[35] 龙春莉,谢永祥,林 强,等.基于TLR4/NF-κB信号通路探讨水蛭对大鼠肾纤维化的影响[J].时珍国医国药,2024,35(1):49-52.
Long CL,Xie YX,Lin Q,et al. Study on the effect of *Hirudo* on renal fibrosis in rats based on TLR4/NF-κB signal pathway[J]. Lishizhen Med Mater Med Res,2024,35(1):49-52.

(收稿:2025-09-12;修回:2026-01-06;录用:2026-01-12)
(责任编辑:周一青)
本文引用格式:
梁爽,宋纯东,贾评评,等.益气养阴活血方通过调节AHR/NF-κB/Nrf2轴改善膜性肾病作用机制研究[J].重庆医科大学学报,XXXX,XX(XX):1-7.