通心络胶囊对糖尿病肾病模型大鼠肾纤维化的干预作用Δ

白　璐*，沈士朋，王　倩，李　敏，郭　帅，刘茂东（河北医科大学第三医院肾内科，石家庄　050051）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）13-1584-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.13.08

摘　要　目的　探讨通心络胶囊对糖尿病肾病（DN）模型大鼠肾纤维化的干预作用及机制。**方法**　随机选取8只大鼠作为对照组（普通饲料），其余大鼠给予高糖高脂饲料饲养联合腹腔注射链脲佐菌素（35 mg/kg）建立DN模型。造模成功的大鼠随机分为模型组（纯化水）、厄贝沙坦组（阳性对照，14.12 mg/kg）、通心络胶囊组（0.3 g/kg），其中模型组12只，其余2组各11只。各组大鼠灌胃相应药物或水，每天给药1次，连续16周。末次给药后，检测大鼠空腹血糖、24 h尿蛋白（24 h UTP）；观察大鼠肾皮质病理形态学变化；检测大鼠血清中纤溶酶原激活物（PA）、纤溶酶原激活剂抑制因子1（PAI-1）水平；检测大鼠肾皮质中转化生长因子β_1（TGF-β_1）、Ⅳ型胶原蛋白（COL-Ⅳ）、Wnt4、β-连环蛋白（β-catenin）mRNA表达水平；观察或检测大鼠肾皮质中TGF-β_1、COL-Ⅳ、黏着斑激酶（FAK）、整合素连接激酶（ILK）、E-钙黏蛋白（E-cadherin）、PA、PAI-1、Wnt4、β-catenin蛋白沉积或表达水平。**结果**　与模型组比较，通心络胶囊组大鼠24 h UTP均显著降低（$P<0.05$）；肾皮质病理损伤及纤维化程度均减轻；血清和肾皮质中PA表达水平均显著升高、PAI-1表达水平均显著降低（$P<0.05$）；肾皮质中TGF-β_1、COL-Ⅳ蛋白沉积及相应mRNA表达水平均显著减少或降低（$P<0.05$），ILK、FAK蛋白沉积均减少，E-cadherin蛋白沉积均增多，Wnt4、β-catenin蛋白和mRNA的表达水平均显著降低（$P<0.05$）。**结论**　通心络胶囊能减轻DN模型大鼠肾组织病理损伤及肾纤维化程度，减少细胞外基质沉积；其机制可能与调节纤溶系统活性，降低ILK、FAK表达，抑制Wnt/β-catenin信号通路激活有关。

关键词　糖尿病肾病；通心络胶囊；纤溶系统；肾纤维化；Wnt/β-catenin信号通路

Intervention effect of Tongxinluo capsule on renal fibrosis in diabetic nephropathy rats

BAI Lu, SHEN Shipeng, WANG Qian, LI Min, GUO Shuai, LIU Maodong (Dept. of Nephrology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the intervention effect and related mechanism of Tongxinluo capsule on renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy (DN). **METHODS** Eight rats were selected as control group (ordinary feed), the remaining rats were given high-glucose and high-fat diet combined with ip injection of streptozotocin (35 mg/kg) to induce DN model. Model rats were randomly divided into model group (purified water), irbesartan group (positive control, 14.12 mg/kg) and Tongxinluo capsule group (0.3 g/kg), including 12 rats in the model group and 11 rats for each of the other two groups. All groups were given relevant medicine or water intragastrically, once a day, for 16 consecutive weeks. After the last medication, fasting blood glucose and 24 h urinary total protein (24 h UTP) were detected. Pathological changes in renal cortex of rats in each group were observed. Serum levels of tissue-type plasminogen activator (PA) and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) were measured. mRNA expressions of transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1), type Ⅳ collagen (COL-Ⅳ), Wnt4 and β-catenin in renal cortex of rats were detected. The protein depositions or expressions of TGF-β_1, COL-Ⅳ, focal adhesion kinase (FAK), integrin-linked kinase (ILK), E-cadherin, PA, PAI-1, Wnt4 and β-catenin in renal cortex of rats were observed or determined. **RESULTS** Compared with model group, 24 h UTP of rats in Tongxinluo capsule group were all significantly reduced ($P<0.05$); pathological damage and fibrosis of renal cortex were relieved; the expression of PA in serum and renal cortex was significantly increased, while PAI-1 level was significantly reduced ($P<0.05$); the depositions of COL-Ⅳ and TGF-β_1 in renal cortex were all reduced, and corresponding mRNA expression was decreased significantly ($P<0.05$); the depositions of ILK and FAK were decreased, while the deposition of E-cadherin was increased; protein and mRNA expressions of Wnt4 and β-catenin were significantly reduced ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Tongxinluo capsule can relieve pathological damage to renal tissue and renal fibrosis of DN model rats, and reduce extracellular matrix deposition. The mechanism may be related to regulation of fibrinolytic system activity, the decrease of ILK and FAK expression, and inhibition of Wnt/β-catenin signaling pathway.

KEYWORDS　diabetic nephropathy; Tongxinluo capsule; fibrinolytic system; renal fibrosis; Wnt/β-catenin signaling pathway

糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）是糖尿病常见而严重的微血管病变之一，以持续蛋白尿及进行性肾功能恶化为临床表现，主要的病理特征为肾小球基底膜弥漫性增厚、系膜基质增生、Kimmelstiel-Wilson结节形

Δ**基金项目**　河北省中医药管理局科研计划项目（No.2019131，No.2022408）

＊**第一作者**　副主任医师，博士。研究方向：肾脏病的中西医结合治疗。E-mail：bailu2011@126.com

成、肾小管间质纤维化，最终出现球性硬化和荒废[1-2]。肾小球细胞外基质（extracellular matrix，ECM）积聚是导致肾小球硬化的病理基础，纤溶酶原激活物（tissue-type plasminogen activator，PA）、纤溶酶原激活剂抑制因子1（plasminogen activator inhibitor 1，PAI-1）作为纤溶系统的关键因子在ECM的降解中起重要作用，其异常表达会进一步导致ECM积聚、肾小球硬化及肾小管间质纤维化[3]。转化生长因子β_1（transforming growth factor-β_1，TGF-β_1）是重要的致纤维化因子，其高表达能增加系膜细胞ECM的产生，刺激ECM主要成分Ⅳ型胶原蛋白（type Ⅳ collagen，COL-Ⅳ）的增加，从而促进肾间质纤维化[4]。纤溶系统失衡及TGF-β_1的高表达可致内环境紊乱，从而激活肾脏中Wnt/β-连环蛋白（β-catenin）信号通路，进而推动纤维化的进程，加重肾功能恶化进展[5]。因此，抑制Wnt/β-catenin信号通路激活对于减轻肾纤维化程度具有重要作用。

清朝医家叶天士云：“初病在经，久病血伤入络”，在消渴病（即糖尿病）气阴两虚病机基础上，加之DN病程日久缠绵，患者久病多瘀、久瘀入络、久病入络。现代吴以岭院士创立络病学学科，依据络病学理论，肾脏的毛细血管网符合脉络的概念，因此“肾络瘀阻”为DN致病的核心病机且贯穿DN病程始终。通心络胶囊在络病学理论的基础上拟定而成，由人参、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、乳香（制）、酸枣仁（炒）、冰片12味药材组成，具有益气活血、通络止痛的功效；多项临床研究也表明，其对DN具有延缓病情进展、保护肾功能的作用[6-7]，但具体作用机制并不明确。基于此，本研究以DN模型大鼠为研究对象，基于肾纤维化经典信号通路Wnt/β-catenin，探讨通心络胶囊对DN的干预作用及可能机制，以期为DN的临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有NanoDrop2000C型紫外分光光度计（美国Thermo Fisher Scientific公司），Eco型实时定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国Illumina公司），BX63+DP72型正置显微镜（日本Olympus公司），Odyssey型红外激光扫描仪（美国LI-COR公司）。

1.2 主要药品与试剂

通心络胶囊购自石家庄以岭药业股份有限公司（规格0.26 g/粒，批号A2110023，国药准字Z19980015）；厄贝沙坦片购自赛诺菲（杭州）制药有限公司（规格0.15 g/片，批号CHG0360，国药准字J20130049）；链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）（批号04081408）购自美国Enzo公司；DNA第一链合成试剂盒（批号KR202）购自北京天根生化科技有限公司；Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG（批号11733046）购自美国Invitrogen公司；大鼠PA、PAI-1酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为1068283、1067862）均购自上海蓝基生物科技有限公司；兔源β-肌动蛋白（β-actin）多克隆抗体（批号3309872）购自生工生物工程（上海）股份有限公司；兔源PA多克隆抗体（批号a11876）购自美国ABclonal公司；兔源PAI-1、COL-Ⅳ、黏着斑激酶（focal adhesion kinase，FAK）、E-钙黏蛋白（E-cadherin）多克隆抗体（批号分别为15060320、15060109、15061189、15060220）均购自沈阳万类生物科技有限公司；兔源TGF-β_1多克隆抗体（批号56985）购自美国Bioworld Technology公司；兔源整合素连接激酶（integrin-linked kinase，ILK）多克隆抗体、兔源β-catenin单克隆抗体（批号分别为130981、211375）均购自英国Abcam公司；兔源Wnt4多克隆抗体（批号1872987）购自美国GeneTex公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号GB23303）购自武汉赛维尔生物科技有限公司。本研究所用PCR引物由生工生物工程（上海）股份有限公司设计并合成，PCR引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列（5′→3′）	扩增产物长度/bp
β-actin	上游：ACCCGCGAGTACAACCTTCT	266
	下游：TTCAGGGTCAGGATGCCTCT	
COL-IV	上游：GGCCCCTGCTGAAGCGTT	139
	下游：GTTCCCCGAGCACCTTAG	
TGF-β_1	上游：ATGGTGGACCGCAACAAC	329
	下游：TGAGCACTGAAGCGAAAGC	
Wnt4	上游：AGCCCACAGGGTTTCCA	233
	下游：GCTCGCCAGCATGTCTTT	
β-catenin	上游：AACGGCTTTCGGTTGAGCTG	147
	下游：TGGCGATATCCAAGGGCTTC	

1.3 动物

本研究所用动物为清洁级雄性SD大鼠，共45只，体质量为（120±20）g，购自河北医科大学实验动物中心，动物生产许可证号为SCXK（冀）2018-1-004。本实验由河北医科大学实验动物伦理委员会批准，批准号为DW2019001。

2 方法

2.1 造模、分组和给药

大鼠适应性饲养1周后，随机选取8只作为对照组，给予普通饲料饲养，剩余37只作为造模组，给予高糖高脂饲料（由河北医科大学实验动物中心加工制作，含绵白糖10%、蛋黄粉10%、食用猪油10%、胆固醇1.5%、胆酸盐0.5%，其余为普通全价颗粒饲料）饲养。大鼠饲养6周后，造模组大鼠禁食不禁水12 h，腹腔注射1%STZ溶液（35 mg/kg），72 h后尾静脉取血检测血糖，当血糖≥16.7 mmol/L时，表明DN模型复制成功[8]。造模组有3只大鼠血糖检测不达标，故予以剔除。将造模成功的大鼠随机分为模型组、厄贝沙坦组（阳性对照，14.12 mg/kg，临床等效剂量）、通心络胶囊组（0.3 g/kg，临床等效剂量）。其中模型组12只，其余2组各11只。

各给药组大鼠灌胃相应药物，对照组和模型组大鼠灌胃等体积纯化水；每天给药1次，连续16周。实验干预16周内，模型组大鼠死亡4只，厄贝沙坦组大鼠死亡3只，通心络胶囊组死亡2只（另外有1只大鼠在干预过程中血糖恢复，故也予以剔除）。

2.2 大鼠空腹血糖、24 h尿蛋白检测

各组大鼠末次给药后禁食12 h，尾静脉采血，检测大鼠空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）。收集各组大鼠24 h尿液，离心后取上清液，采用终点法检测24 h尿蛋白（24 h urinary total protein，24 h UTP）。

2.3 样本收集

尿液收集后，麻醉大鼠并剖开腹腔，然后进行腹主动脉采血，离心分离血清，4 ℃保存备用。采血完成后，快速分离大鼠肾脏，切割肾皮质，将肾皮质分别置于4%中性甲醛溶液及冻存管中，保存备用。

2.4 大鼠肾皮质病理形态学观察

取“2.3”项下固定于4%中性甲醛溶液的肾皮质适量，经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片（厚度2 μm）、二甲苯脱蜡、乙醇梯度水化后，进行Masson染色、封片，采用显微镜观察切片并采集图像。

2.5 大鼠血清中PA、PAI-1水平检测

采用ELISA法进行检测。取“2.3”项下保存的大鼠血清样品，按照ELISA试剂盒说明书方法处理，然后采用酶标仪于450 nm波长处检测大鼠血清中PA、PAI-1水平。

2.6 大鼠肾皮质中TGF-β_1、COL-Ⅳ、Wnt4、β-catenin mRNA表达水平检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测。取“2.3”项下冻存的大鼠肾皮质适量，提取总RNA，并将其反转录成cDNA进行PCR扩增。PCR反应条件为95 ℃预变性30 s；95 ℃变性15 s，60 ℃退火/延伸30 s，共40个循环。以β-actin为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因mRNA的表达水平。

2.7 大鼠肾皮质中TGF-β_1、COL-Ⅳ、FAK、ILK、E-cadherin蛋白表达水平检测

采用免疫组化法进行检测。取“2.3”项下冻存的肾皮质适量，经梯度脱水后，以石蜡包埋切片。将切片脱蜡、微波修复后，置于3%过氧化氢溶液中，以磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗，滴加10%山羊血清封闭液，室温孵育30 min；滴加一抗（TGF-β_1稀释度为1∶200、COL-Ⅳ稀释度为1∶200、FAK稀释度为1∶100、ILK稀释度为1∶50、E-cadherin稀释度为1∶100），4 ℃孵育过夜；滴加二抗（稀释度为1∶200），37 ℃孵育30 min；滴加C液，37 ℃孵育30 min；以DAB显色，苏木素复染3 min，经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后，采用显微镜观察，并以棕黄色为阳性表达。

2.8 大鼠肾皮质中PA、PAI-1、Wnt4、β-catenin蛋白表达水平检测

采用Western blot法进行检测。取“2.3”项下冻存的肾皮质适量，提取总蛋白，采用BCA法测定蛋白浓度后，于100 ℃下变性5 min。取变性后的蛋白50 μg，于4 ℃、120 V条件下进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜；以5%脱脂奶粉封闭液封闭1 h，加入一抗（PA、PAI-1、Wnt4稀释度均为1∶500，β-actin、β-catenin稀释度均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；洗膜后避光加入荧光二抗（稀释比例为1∶10 000），37 ℃避光孵育1 h；洗膜后采用红外激光扫描仪分析条带灰度值，以目的蛋白条带灰度值与内参β-actin条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行数据处理。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，若方差齐，采用单因素方差分析和SNK-q检验进行统计分析；若方差不齐，采用秩和检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 通心络胶囊对DN模型大鼠FBG、24 h UTP的影响

与对照组比较，模型组大鼠FBG、24 h UTP均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，厄贝沙坦组和通心络胶囊组大鼠24 h UTP均显著降低（$P<0.05$）；与厄贝沙坦组比较，通心络胶囊组大鼠FBG、24 h UTP差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表2。

表2 各组大鼠FGB、24 h UTP检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	FGB/（mmol/L）	24 h UTP/mg
对照组	5.66±0.86	6.33±1.58
模型组	28.75±4.76[a]	33.64±5.25[a]
厄贝沙坦组	28.27±5.64	26.03±4.98[b]
通心络胶囊组	27.31±4.99	24.57±6.17[b]

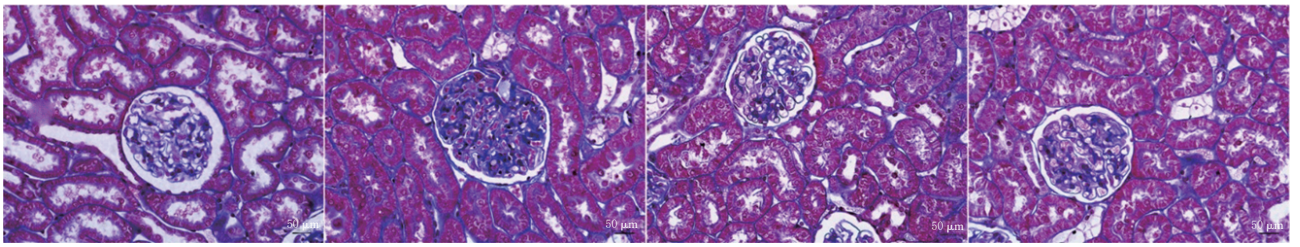
a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.2 通心络胶囊对DN模型大鼠肾皮质病理形态学的影响

对照组大鼠肾皮质可见肾小球、肾小管无明显异常；模型组大鼠肾皮质中肾小球肥大，基底膜轻度增厚，系膜细胞和基质增多，肾小囊腔变窄；与模型组比较，厄贝沙坦组和通心络胶囊组大鼠肾皮质病理损伤及纤维化减轻。结果见图1。

3.3 通心络胶囊对DN模型大鼠血清和肾皮质中PA、PAI-1水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清和肾皮质中PA（蛋白表达）水平均显著降低、PAI-1（蛋白表达）水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，厄贝沙坦组和通心络胶囊组大鼠血清和肾皮质中上述指标水平均显著逆转（$P<0.05$），且2个给药组间上述指标水平差异无统计学意义（$P<0.05$）。结果见图2、表3。



A.对照组　B.模型组　C.厄贝沙坦组　D.通心络胶囊组

图1　大鼠肾皮质病理形态学观察显微图（Masson染色，×400）

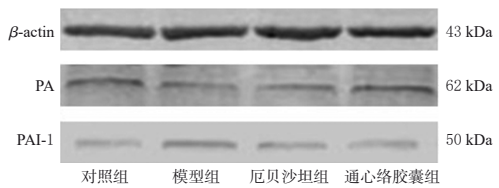


图2　大鼠肾皮质中PA、PAI-1蛋白表达的电泳图

表3　各组大鼠血清和肾皮质中PA、PAI-1（蛋白表达）水平检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	血清		肾皮质	
	PA/(pg/mL)	PAI-1/(ng/mL)	PA/(pg/mL)	PAI-1/(ng/mL)
对照组	119.61±21.03	3.04±0.58	0.288±0.034	0.067±0.027
模型组	75.69±16.98[a]	5.91±0.62[a]	0.085±0.012[a]	0.129±0.037[a]
厄贝沙坦组	96.34±20.91[b]	4.46±0.48[b]	0.151±0.027[b]	0.085±0.031[b]
通心络胶囊组	102.81±24.51[b]	4.63±0.43[b]	0.144±0.032[b]	0.086±0.036[b]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.4　通心络胶囊对DN模型大鼠肾皮质中TGF-β_1、COL-Ⅳ蛋白和mRNA表达的影响

与对照组比较，模型组大鼠肾皮质中TGF-β_1、COL-Ⅳ蛋白沉积增多，相应mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，厄贝沙坦组和通心络胶囊组大鼠肾皮质中TGF-β_1、COL-Ⅳ蛋白沉积减少，相应mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与厄贝沙坦组比较，通心络胶囊组大鼠肾组织中TGF-β_1、COL-Ⅳ蛋白沉积减少，相应mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图3、表4。

表4　各组大鼠肾皮质中TGF-β_1、COL-Ⅳ蛋白和mRNA表达水平检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	TGF-β_1		COL-Ⅳ	
	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
对照组	0.087±0.015	1.00±0.15	0.077±0.011	1.00±0.11
模型组	0.241±0.032[a]	2.65±0.24[a]	0.201±0.027[a]	2.61±0.37[a]
厄贝沙坦组	0.142±0.025[b]	2.09±0.31[b]	0.124±0.032[b]	1.98±0.29[b]
通心络胶囊组	0.102±0.027[bc]	1.77±0.27[bc]	0.098±0.031[bc]	1.46±0.31[bc]

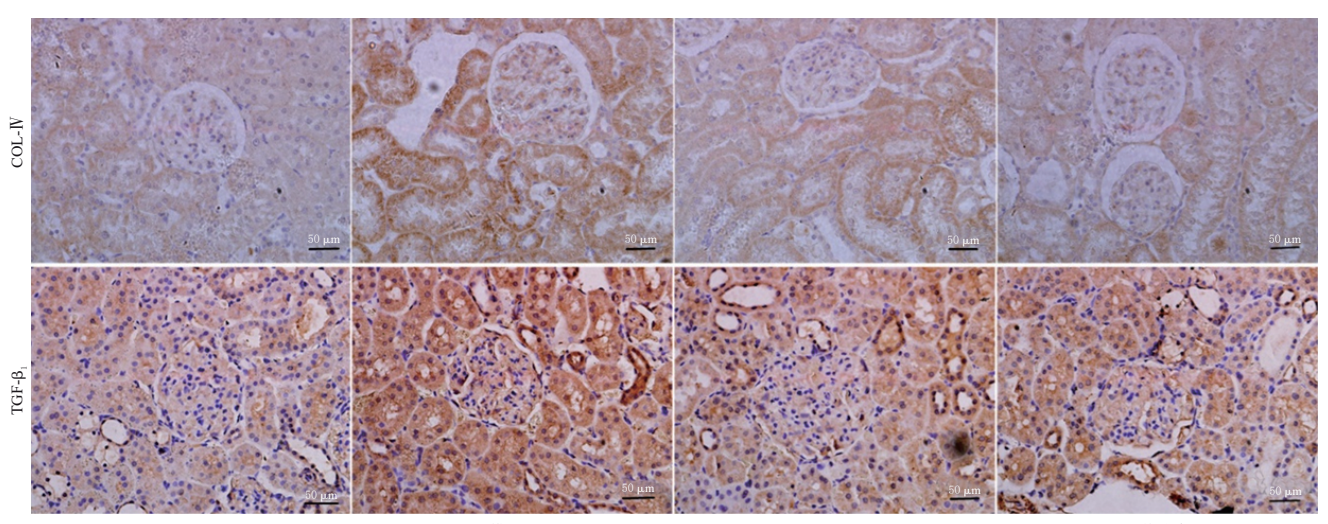
a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与厄贝沙坦组比较，$P<0.05$。

3.5　通心络胶囊对DN模型大鼠肾皮质中FAK、ILK、E-cadherin蛋白表达的影响

对照组大鼠肾间质有少量ILK、FAK蛋白沉积，肾小管上皮细胞及部分肾小球中有大量E-cadherin蛋白沉积；与对照组比较，模型组大鼠相应区域中FAK蛋白沉积增加，E-cadherin蛋白沉积均减少；与模型组比较，给药组大鼠肾皮质相应区域中ILK、FAK蛋白沉积均减少，E-cadherin蛋白沉积均增多。结果见图4。

3.6　通心络胶囊对DN模型大鼠肾皮质中Wnt4、β-catenin蛋白和mRNA表达的影响

与对照组比较，模型组大鼠肾皮质中Wnt4、β-catenin蛋白和mRNA的表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，厄贝沙坦组和通心络胶囊组大鼠肾皮质中上述指标表达水平均显著降低（$P<0.05$），且2个给药组间上述指标水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图5、表5。



对照组　模型组　厄贝沙坦组　通心络胶囊组

图3　大鼠肾皮质中TGF-β_1、COL-Ⅳ蛋白表达的免疫组化图

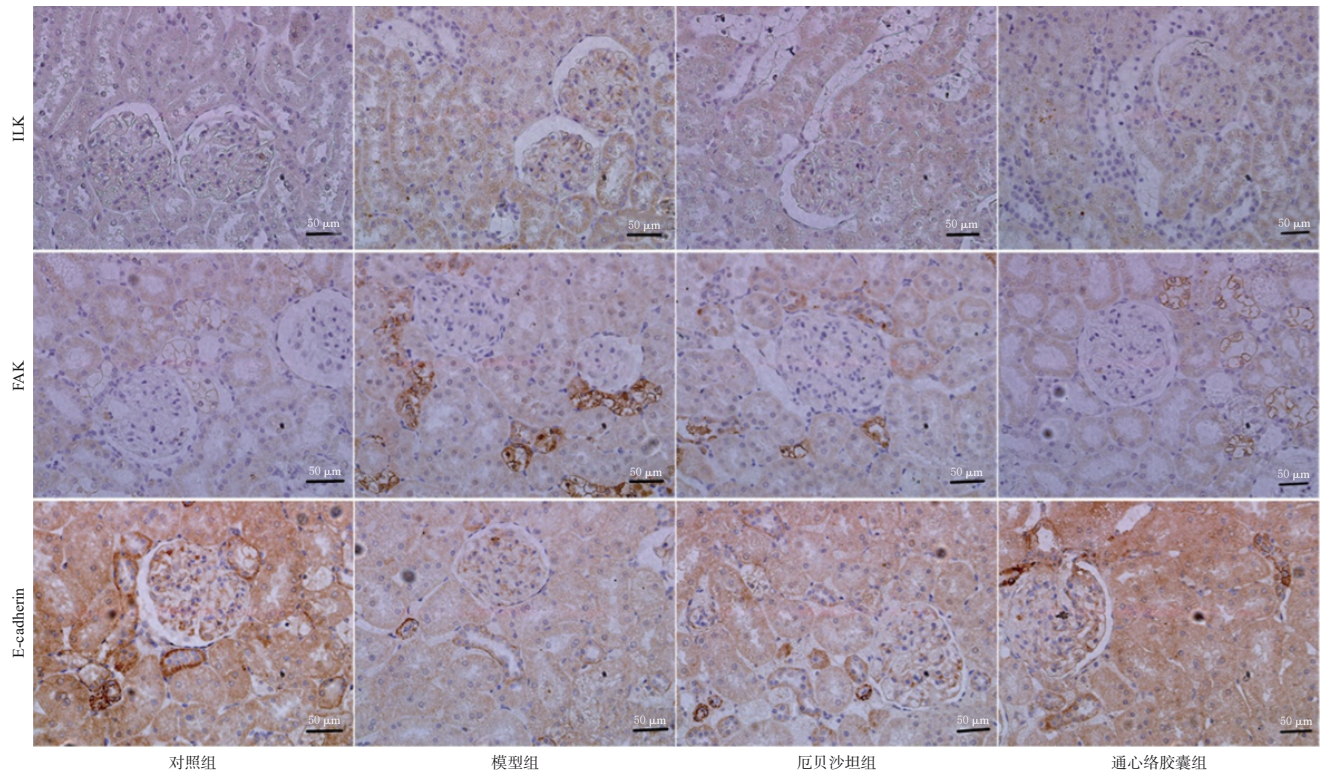


图4　大鼠肾皮质中ILK、FAK、E-cadherin蛋白表达的免疫组化图

表5　各组大鼠肾皮质中TGF-β1、COL-Ⅳ、Wnt4、β-catenin mRNA表达水平检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	Wnt4		β-catenin	
	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
对照组	0.124±0.026	1.00±0.09	0.096±0.029	1.00±0.12
模型组	0.427±0.089[a]	2.94±0.46[a]	0.213±0.066[a]	1.98±0.41[a]
厄贝沙坦组	0.227±0.058[b]	1.86±0.29[b]	0.127±0.038[b]	1.14±0.22[b]
通心络胶囊组	0.221±0.065[b]	1.77±0.38[b]	0.138±0.047[b]	1.12±0.19[b]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

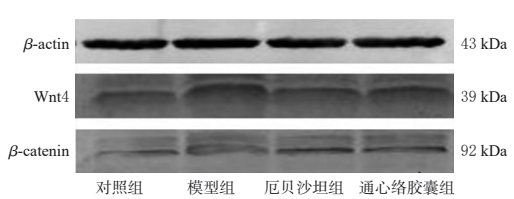


图5　大鼠肾皮质中Wnt4、β-catenin蛋白表达的电泳图

4　讨论

“络”的概念首见于《黄帝内经》。《难经本义·二十三难》言：“直行者谓之经，旁出者谓之络”。络者，细密繁多，是经脉的分支，错综联络，遍布全身也。肾小球由毛细血管网组成，肾小血管、微血管皆从肾动脉分支而来，均与中医络脉支横别出、逐层细分、络体细窄迂曲、网状分布的结构特点相似[9]。《临证指南医案》曰：“百日久恙，血络必伤，经年宿病，病必在络，初为气结在经，久则血伤入络”。DN是糖尿病迁延难愈，日久累及肾脏出现的微血管病变，其从病理机制上亦与中医学“久病入络”的理论相契合。糖尿病属中医学消渴病的范畴，消渴病病机为气阴两虚，加之日久致气无力运血，阴虚耗伤津液，正气耗损，病邪之气乘虚内袭，累及肾脏，微型症瘕结于肾络，致肾用失司，封藏不固，精微外泄[10]。基于DN从络论治的理论基础，本研究以通心络胶囊对DN模型大鼠进行干预，借其攻逐走窜之性，意在疏利肾络、破积逐血。结果显示，通心络胶囊可明显减少DN模型大鼠尿蛋白排泄，减轻肾组织病理形态学损伤，从而发挥保护肾脏的作用。

糖尿病长期存在的糖脂代谢紊乱，易导致血管内皮细胞受损、血液黏度增加，造成体内纤溶系统失衡和血栓微血管病变发生，而纤溶系统的异常在微血管病变中具有重要的作用[11]。PA、PAI-1均由血管内皮细胞分泌产生。其中，PA可激活纤溶酶原，主要参与肾小球及血管内的血栓溶解及ECM降解过程；PAI-1作为PA的抑制物，不仅发挥纤溶抑制作用，还可以抑制ECM降解[3]。当发生DN时，机体的纤溶活性降低，PA水平降低，PAI-1活性升高，导致ECM堆积[12]。COL-Ⅳ是ECM的主要胶原组成成分，其在糖尿病早期合成增加[4]，因此检测COL-Ⅳ在肾组织中的表达对于评估肾纤维化程度具有重要意义。同时，TGF-β1是糖尿病中导致肾脏ECM积累的关键细胞因子[13]，亦是纤维化的关键介质，其可通过诱导系膜细胞和成纤维细胞的增殖、迁移，激活包括胶原蛋白、纤连蛋白等纤维化分子的转录来促进肾脏的纤维化进程[14]。有研究从动物实验及临床观察两方面证明了厄贝沙坦能降低DN模型大鼠和DN患者的TGF-β1、COL-Ⅳ、结缔组织生长因子表达水平，从而有效延缓DN肾纤维化进展[15]，故本研究以厄贝沙坦为阳性对照

药物。本研究结果显示，通心络胶囊可升高DN模型大鼠血清和肾皮质中PA表达水平，降低PAI-1表达水平，减少大鼠肾皮质中COL-Ⅳ、TGF-β_1蛋白沉积并降低相应mRNA表达水平。这表明，通心络胶囊可通过调节纤溶系统，降低纤维化相关因子TGF-β_1、COL-Ⅳ表达，发挥改善DN模型大鼠肾纤维化的作用。

肾纤维化是DN发生、发展的中心环节，也是其进展至终末期肾病的重要原因，阻断或抑制参与纤维化进展的细胞因子具有现实意义。ILK参与多种信号传导通路，在调节细胞黏附、生长、基质积聚等过程中起重要作用，与肾间质纤维化密切相关，且间质病变越重，其表达范围越广[16]。FAK可调节细胞黏附和增殖，在肾纤维化进程中被TGF-β_1激活，并作为其下游介导信号的重要调节分子，在纤维化的发病机制中起重要作用[17]。相关研究证实，DN纤维化进程中存在肾小管上皮细胞-间充质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT），表现为E-cadherin的减少或缺失，上皮细胞黏附减少，基质胶原成分积聚[18]。另一方面，ILK在肾脏的高表达能激活转录因子激活蛋白，从而对E-cadherin产生抑制作用，导致E-cadherin的表达减少[19]。Wnt/β-catenin信号通路作为参与纤维化进展的重要通路，在正常成熟的肾脏中常处于静默状态，高表达的TGF-β_1及ILK均可激活该通路，从而导致其下游的β-catenin大量表达，激活下游靶基因，产生大量的ECM，进而促进肾纤维化[20]。研究证实，厄贝沙坦能通过下调Wnt/β-catenin信号通路中Wnt4、β-catenin的高表达，抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞EMT，从而延缓肾间质纤维化进展[21]。本研究结果显示，通心络胶囊可减少DN模型大鼠肾组织相应区域中ILK、FAK蛋白沉积，增加E-cadherin蛋白沉积，下调Wnt4、β-catenin蛋白表达。这表明，通心络胶囊可通过降低ILK、FAK活性，抑制Wnt/β-catenin信号通路激活，减少ECM沉积，从而减缓DN模型大鼠的肾纤维化进展。

综上所述，通心络胶囊能减少DN模型大鼠尿蛋白排泄，减轻肾组织病理损伤及肾纤维化程度，减少ECM沉积；其机制可能与调节纤溶系统失衡，降低ILK、FAK表达，抑制Wnt/β-catenin信号通路激活有关。

参考文献

[1] 邹万忠. 肾活检病理学[M]. 4版. 北京：北京大学医学出版社，2017：295-297.

[2] 谌贻璞. 肾内科学[M]. 2版. 北京：人民卫生出版社，2015：62-63.

[3] 韦秀英，黄锦雄. 纤溶系统与糖尿病肾病[J]. 中国医学文摘（内科学），2004(5)：683-684.

[4] MENG X M，NIKOLIC-PATERSON D J，LAN H Y. TGF-β：the master regulator of fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol，2016，12(6)：325-338.

[5] 郭鑫，许春花. Wnt/β-catenin信号通路在肾纤维化中的作用研究进展[J]. 延边大学医学学报，2022，45(1)：59-62.

[6] 马锐，李瑞雪，夏丽芳，等. 通心络胶囊对早期糖尿病肾病患者血管内皮功能及肾功能的影响[J]. 疑难病杂志，2015，14(9)：884-887.

[7] 李九文，吕娜. 厄贝沙坦联合通心络胶囊治疗糖尿病肾病45例[J]. 中国老年学杂志，2013，33(18)：4597-4598.

[8] 黎娅，范培云，马晓雨，等. 长期稳定的SD大鼠2型糖尿病模型制备方法[J]. 中国实验动物学报，2020，28(3)：364-369.

[9] 吴以岭. “脉络-血管系统”相关性探讨[J]. 中医杂志，2007，48(1)：5-8.

[10] 肖遥，黄为钧，赵进喜. 从“癥瘕致病、虚实相因”探讨早期糖尿病肾病的治疗[J]. 环球中医药，2021，14(12)：2184-2186.

[11] 李曦光，刘晓云，陈黎忠，等. 糖尿病肾病纤溶酶原激活物抑制因子-1检测分析[J]. 吉林医学，2011，32(20)：4067-4068.

[12] 苏惠娟，陈永强，李红帅，等. 血必净注射液对糖尿病肾病患者凝血纤溶系统及血管内皮功能指标的影响[J]. 安徽医学，2018，39(5)：602-605.

[13] CHEN S，HONG S W，IGLESIAS-DE LA CRUZ M C，et al. The key role of the transforming growth factor-beta system in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Ren Fail，2001，23(3/4)：471-481.

[14] STEWART A G，THOMAS B，KOFF J. TGF-β：master regulator of inflammation and fibrosis[J]. Respirology，2018，23(12)：1096-1097.

[15] 白继琼，秦中豪，白晓辉. 厄贝沙坦胶囊对糖尿病肾病患者血清TGF-β_1、CTGF及纤维化指标的影响[J]. 医学理论与实践，2021，34(14)：2433-2434.

[16] 林智峰，杨晓萍，张春江，等. 整合素连接激酶与肝细胞生长因子在肾间质纤维化过程中的作用[J]. 吉林医学，2012，33(30)：6524-6525.

[17] 王晓敏，申珅，刘婷婷，等. 蚓激酶对UUO大鼠肾组织NOX4、FAK、Src的影响[J]. 天津医科大学学报，2021，27(3)：234-238.

[18] 郭帅，白璐，潘利敏，等. 补阳还五汤合参芪地黄汤化裁对糖尿病肾病小鼠肾小管间质纤维化的作用及机制研究[J]. 中草药，2022，53(2)：470-477.

[19] LEE Y I，KWON Y J，JOO C K. Integrin-linked kinase function is required for transforming growth factor β-mediated epithelial to mesenchymal transition[J]. Biochem Biophys Res Commun，2004，316(4)：997-1001.

[20] MIAO J H，LIU J F，NIU J，et al. Wnt/β-catenin/RAS signaling mediates age-related renal fibrosis and is associated with mitochondrial dysfunction[J]. Aging Cell，2019，18(5)：e13004.

[21] 闫喆，姚芳，张丽萍，等. 厄贝沙坦对高糖诱导肾小管上皮细胞转分化中Wnt/β-catenin信号途径表达的影响[J]. 中国药理学通报，2009，25(12)：1630-1634.

（收稿日期：2022-11-14　修回日期：2023-04-24）

（编辑：唐晓莲）