桃红四物汤加味颗粒对糖尿病肾病模型大鼠足细胞上皮-间充质转化及肾脏纤维化的影响Δ

白　璐[1,2*]，沈士朋[1,2]，吴　苏[1,2]，郭　帅[1,2]，刘茂东[1,2]（1.河北医科大学第三医院肾内科，石家庄　050051；2.河北省糖尿病肾脏疾病重点实验室，石家庄　050051）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）11-1327-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.11.08

摘　要　目的　探讨桃红四物汤加味颗粒对糖尿病肾病（DKD）模型大鼠足细胞上皮-间充质转化（EMT）及肾脏纤维化的影响。**方法**　随机选取8只大鼠为正常组（予普通饲料），其余大鼠采用高糖高脂饲料联合腹腔注射链脲佐菌素（35 mg/kg）建立DKD模型。将模型大鼠分为模型组、厄贝沙坦组[阳性对照，13.5 mg/（kg·d）]、桃红四物汤加味组[6.48 g/（kg·d）]，每组最终纳入8只。各组大鼠灌胃相应药物，每日1次，连续干预16周。干预第4、8、12、16周末检测各组大鼠24 h尿蛋白（24 h UTP），末次给药后检测各组大鼠体重、饮水量、饮食量、尿量、空腹血糖、血肌酐（Scr）、尿素氮（BUN）和肾组织中P-钙黏素（P-cadherin）、足细胞裂孔膜蛋白（nephrin）、α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、肾母细胞瘤蛋白1（WT1）、转化生长因子β$_1$（TGF-β$_1$）、Ⅳ型胶原蛋白（Col-Ⅳ）mRNA及蛋白的表达情况，观察肾组织病理形态学变化并测量肾小球基底膜厚度。**结果**　与模型组比较，桃红四物汤加味组大鼠从第8周末开始24 h UTP显著降低，体重显著增长，饮水量、尿量均显著减少，Scr、BUN水平和α-SMA mRNA以及TGF-β$_1$、Col-Ⅳ mRNA及蛋白表达水平均显著降低，P-cadherin、nephrin、WT1 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）；α-SMA蛋白沉积减少，P-cadherin、nephrin、WT1蛋白沉积均增多；大鼠肾组织病理损伤及纤维化程度减轻，肾小球基底膜厚度显著减小（$P<0.05$）。**结论**　桃红四物汤加味颗粒可通过抑制DKD模型大鼠足细胞EMT，减轻肾组织病理损伤及足细胞损伤，从而保护肾功能、延缓肾脏纤维化进展。

关键词　糖尿病肾病；桃红四物汤加味颗粒；肾脏纤维化；足细胞；上皮-间充质转化

Effects of Taohong siwu decoction modified granules on podocyte epithelial-mesenchymal-transition and renal fibrosis in rats with diabetic kidney disease

BAI Lu[1,2], SHEN Shipeng[1,2], WU Su[1,2], GUO Shuai[1,2], LIU Maodong[1,2]（1. Dept. of Nephrology, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China; 2. Hebei Provincial Key Laboratory of Diabetic Kidney Disease, Shijiazhuang 050051, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of Taohong siwu decoction modified granules on podocyte epithelial-mesenchymal-transition (EMT) and renal fibrosis in diabetic kidney disease (DKD) model rats. **METHODS** Eight rats were selected as normal group (ordinary feed); the remaining rats were given a high-glucose and high-fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (35 mg/kg) to induce the DKD model. Model rats were randomly divided into model group, irbesartan group [positive control, 13.5 mg/(kg·d)] and modified Taohong siwu decoction group [6.48 g/(kg·d)], with 8 rats in each group. All groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for 16 consecutive weeks. Twenty-four-hour urinary total protein (24 h UTP) was detected at the end of the 4th, 8th, 12th and 16th week of administration. After the last medication, the body mass, water intake, food intake, urine output, the levels of fasting blood glucose, serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) as well as mRNA and protein expressions of P-cadherin, nephrin, α-smooth muscle actin (α-SMA), Wilms' tumor gene 1 (WT1), transforming growth factor-β$_1$ (TGF-β$_1$) and type Ⅳ collagen (Col-Ⅳ) in renal tissue were determined. The pathological and morphological changes in renal tissue were observed and the thickness of the glomerular basement membrane was determined. **RESULTS** Compared with the model group, 24 h UTP of rats was significantly decreased in modified Taohong siwu decoction group since the 8th weekend ($P<0.05$); the body weight of rats increased significantly, but the amount of water intake and urine decreased significantly; Scr and BUN level, mRNA expression of α-SMA, mRNA and protein expressions of TGF-β$_1$ and Col-Ⅳ were significantly reduced, while the mRNA expressions of P-cadherin, nephrin and WT1 were increased significantly ($P<0.05$); the protein deposition of α-SMA was reduced, protein depositions of P-cadherin, nephrin and WT1 were increased; the pathological damage and fibrosis of renal tissue were relieved; the thickness of glomerular basement membrane was decreased significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Taohong siwu decoction modified granules

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

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

can inhibit the EMT of podocyte in DKD model rats, and alleviate renal pathological damage and podocyte damage, thus protecting renal function, and delaying the process of renal fibrosis.

KEYWORDS diabetic kidney disease; Taohong siwu decoction modified granules; renal fibrosis; podocyte; epithelial-mesenchymal-transition

糖尿病（diabetes mellitus，DM）作为最常见的代谢性疾病，其发病率逐年增高，据估计到2030年，全球将有6.43亿人患有DM，约高达35%的DM患者会出现糖尿病肾病（diabetic kidney disease，DKD）[1-2]。在我国，DKD已成为中老年人患终末期肾病（end-stage kidney disease，ESKD）的首要原因[3]。DKD以持续进展性蛋白尿及进行性肾功能受损为主要临床表现，其病理特征为肾小球硬化及肾间质纤维化，蛋白尿不仅是DKD的主要表现亦是其病程进展的独立危险因素[4]，因此积极控制蛋白尿是治疗DKD的关键。足细胞是肾小球滤过屏障的重要组成部分，其损伤及脱落可直接影响蛋白尿的漏出及肾小球的硬化[5-6]，且其也是肾小球中唯一一种高度终末分化的细胞，一旦脱落将不可再生。足细胞上皮-间充质转化（epithelial-mesenchymal-transition，EMT）是足细胞损伤的早期事件，抑制EMT进展可减轻足细胞损伤[7]。有研究表明，DKD患者在高血糖等各种危险因素的刺激下可出现足细胞EMT[8]，因此抑制足细胞EMT对减轻DKD所致的肾损伤具有重要意义。

DKD中医证候包括浮肿、气短乏力、腰膝酸软、口干舌燥、五心烦热、双目干涩、多食易饥、头晕耳鸣、尿沫增多等，还伴有血瘀的表现。中医学认为，瘀血阻于肾络，微型癥瘕结于肾络，致肾体受损、肾用失司、封藏不固、精微外泄，是DKD的核心病机[9-10]，故当以活血化瘀通络为DKD的治疗大法。桃红四物汤由当归、熟地黄、红花、白芍、桃仁及川芎组成，具有活血祛瘀、养血调经的功效。因为DKD的病程日久，久病入络，故本研究在桃红四物汤基础上加入了地龙、僵蚕，借其血肉之质增强通络之力[11]。本研究以DKD模型大鼠为研究对象，探讨桃红四物汤加味颗粒对足细胞EMT及肾脏纤维化的影响，以期为DKD的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有稳豪型血糖仪[强生（中国）医疗器材有限公司]，7600-020型全自动生化分析仪、H-7650型透射电子显微镜（日本Hitachi公司），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型正置研究级显微镜（日本Olympus公司），MICROM-340E型石蜡切片机（德国Zeiss公司），EMUC7型超薄切片机（德国Leica公司），Odyssey型红外激光扫描仪（美国LI-COR公司）等。

1.2 主要药品与试剂

桃红四物汤加味颗粒由桃仁10 g、红花10 g、当归12 g、熟地黄10 g、川芎10 g、白芍10 g、地龙10 g、僵蚕10 g组成，均为配方颗粒（批号分别为21092651、20192723、21092822、21101963、21103132、21093011、21080244、21080432），均购自神威药业集团有限公司；厄贝沙坦片（规格0.15 g/片，批号4A293）购自赛诺菲（杭州）制药有限公司；链脲佐菌素（批号04081408）购自美国Enzo公司；TRIquick Reagent总RNA提取试剂（批号R1100）购自北京索莱宝科技有限公司；FastQuant cDNA第一链合成试剂盒（批号KR202）购自天根生化科技（北京）有限公司；Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG（批号11733046）购自美国Invitrogen公司；脑脊液与尿蛋白测定试剂盒（批号2400134）购自北京利德曼生化股份有限公司；兔β-肌动蛋白（β-actin）多克隆抗体（批号19086）购自生工生物工程（上海）股份有限公司；小鼠P-钙黏素（P-cadherin）多克隆抗体（批号GR211713-5）购自英国Abcam公司；兔足细胞裂孔膜蛋白（nephrin）、α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）、Ⅳ型胶原蛋白（type Ⅳ collagen，Col-Ⅳ）多克隆抗体（批号分别为15060320、15060220、15060232）均购自沈阳万类生物科技有限公司；兔转化生长因子β_1（transforming growth factor-β_1，TGF-β_1）多克隆抗体（批号BS91338）购自美国Bioworld Technology公司；兔肾母细胞瘤蛋白1（Wilms' tumor gene 1，WT1）多克隆抗体（批号A2446）购自美国ABclonal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；超敏ECL化学发光试剂盒（批号P0018S）购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为清洁级雄性SD大鼠，共40只，体重（100±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。实验动物饲养于12 h明暗交替、温度（24±2）℃、相对湿度（50±10）%的环境中，自由进食饮水。本实验由河北医科大学实验动物福利伦理委员会批准，批号为DW2019001。

2 方法

2.1 建模、分组和给药

大鼠适应性饲养1周后，随机选取8只为正常组，给予普通饲料饲养；剩余32只为造模组，给予高糖高脂饲料饲养，饲养6周后造模：大鼠禁食不禁水12 h后，按35

mg/kg腹腔注射1%链脲佐菌素溶液，72 h后尾静脉取血检测血糖，血糖≥16.7 mmol/L为DM模型造模成功[12]。造模组中有1只大鼠不符合成模标准予以剔除，有1只大鼠造模后死亡，30只大鼠造模成功。将造模成功的大鼠随机分为模型组、厄贝沙坦组（阳性对照）和桃红四物汤加味组，每组10只。桃红四物汤加味组大鼠灌胃桃红四物汤加味颗粒6.48 g/（kg·d）（以生药量计算，依据前期研究最佳剂量设置），厄贝沙坦组大鼠灌胃厄贝沙坦13.5 mg/（kg·d）（按临床常用剂量换算），正常组和模型组大鼠灌胃等体积纯化水，每日1次，连续干预16周。干预期间，正常组大鼠给予普通饲料喂养，其余各组大鼠均给予高糖高脂饲料喂养；每4周检测1次大鼠血糖，选取血糖大于≥16.7 mmol/L的大鼠继续实验。干预期内共有5只（模型组2只、厄贝沙坦组2只、桃红四物汤加味组1只）大鼠死亡，1只（桃红四物汤加味组）大鼠因血糖恢复正常予以剔除，每组最终均纳入8只。

2.2 标本的收集

于各组大鼠灌胃干预的第4、8、12、16周末，以代谢笼收集24 h尿液并记录尿量，取尿液1.5 mL，离心，冻存。末次给药后，将各组大鼠禁食8 h后麻醉，于腹主动脉采血，离心，冻存血清；快速分离肾组织，分别留取肾皮质于甲醛-乙酸-乙醇固定液、4%戊二醛固定液及冻存管中。

2.3 大鼠体重、饮水量、饮食量、尿量、空腹血糖的检测

末次给药后，对各组大鼠称重，并记录其24 h的饮水量、饮食量、尿量；禁食12 h后采集大鼠尾静脉血，检测空腹血糖。

2.4 大鼠不同时间点24 h尿蛋白的检测

取“2.2”项下收集的24 h尿液样本，按试剂盒说明书方法检测各组大鼠被干预第4、8、12、16周末的24 h尿蛋白（24 h urine total protein，24 h UTP）。

2.5 大鼠肾功能指标的检测

取“2.2”项下冻存的血清样本，应用全自动生化分析仪检测各组大鼠血肌酐（serum creatinine，Scr）、尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）水平。

2.6 大鼠肾组织病理形态学观察

2.6.1 光镜观察

取“2.2”项下甲醛-乙酸-乙醇固定液中的肾皮质样本，以乙醇梯度脱水、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，进行过碘酸六胺银（periodic acid silver methenamine，PASM）+Masson染色，封片，于显微镜下采集图像并观察各组大鼠肾组织病理形态学变化。

2.6.2 电子显微镜观察

取“2.2”项下4%戊二醛固定液中的肾皮质样本，用1%锇酸固定后，以丙酮梯度脱水，丙酮和树脂混合液中浸透，环氧树脂包埋，切片，醋酸铀、柠檬酸铅双重染色，于电子显微镜下采集图像并观察各组大鼠肾组织病理形态学变化，测量肾小球基底膜厚度。

2.7 大鼠肾组织中P-cadherin、nephrin、α-SMA、WT1、Col-Ⅳ、TGF-β_1 mRNA表达的检测

采用实时定量PCR法检测。取“2.2”项下冻存的肾组织，采用TRIquick提取肾组织总RNA，反转录成cDNA进行扩增（引物序列和产物大小见表1），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$2^{-\Delta\Delta Ct}$法定量分析肾组织中P-cadherin、nephrin、α-SMA、WT1、Col-Ⅳ、TGF-β_1 mRNA表达水平。

表1 引物序列和产物大小

基因	引物序列（5′→3′）	产物大小/bp
β-actin	正向引物ACCCGCGAGTACAACCTTCT	266
	反向引物TTCAGGGTCAGGATGCCTCT	
P-cadherin	正向引物AGCGTGGTCTCCGAGTCCTA	117
	反向引物TCCAGCCAATGCCTCTTTCT	
nephrin	正向引物CTATGCCCTCTTCAAATGCACG	135
	反向引物TATGCTGACAACCTTCAGTCCC	
α-SMA	正向引物CCGACCGAATGCAGAAGGA	126
	反向引物ACAGAGTATTTGCGCTCCGGA	
WT1	正向引物TCTTCCGAGGCATTCA	325
	反向引物TGGGTCTTCAGGTGGTC	
Col-IV	正向引物GGCCCCTGCTGAAGCGTT	139
	反向引物GTTCCCCGAGCACCTTAG	
TGF-β_1	正向引物ATGGTGGACCGCAACAAC	329
	反向引物TGAGCACTGAAGCGAAAGC	

2.8 大鼠肾组织中P-cadherin、nephrin、α-SMA、WT1蛋白表达的检测

采用免疫组织化学法检测。取“2.2”项下冻存的肾组织，固定后以石蜡包埋，切片，脱蜡，微波修复，滴加P-cadherin、nephrin、α-SMA、WT1一抗（稀释比例分别为1∶200、1∶200、1∶100、1∶200），于4 ℃孵育过夜，滴加二抗（稀释比例为1∶200），孵育，以DAB显色、苏木精复染、乙醇梯度脱水后透明并封片，于显微镜下采集图像并观察肾组织中P-cadherin、nephrin、α-SMA、WT1蛋白表达情况。

2.9 大鼠肾组织中TGF-β_1、Col-Ⅳ蛋白表达的检测

采用蛋白质印记法检测。取“2.2”项下冻存的肾组织，提取总蛋白，用BCA法测定浓度，以100 ℃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β-actin、TGF-β_1、Col-Ⅳ一抗（稀释比例分别为1∶1 000、1∶500、1∶500），于4 ℃摇床孵育过夜；洗膜后避光加入二抗（稀释比例为1∶10 000），于37 ℃摇床避光孵育1 h后洗膜，采用ECL化学发光法显色。用红外激光扫描仪曝光、拍照，使用Image J软件分析荧光条带的灰度值，以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.10 统计学方法

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。所有数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 桃红四物汤加味颗粒对DKD模型大鼠体重、饮水量、饮食量、尿量、空腹血糖的影响

与正常组比较，模型组大鼠体重显著降低（$P<0.05$），饮水量、饮食量、尿量、空腹血糖均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，厄贝沙坦组和桃红四物汤加味组大鼠体重均显著增长（$P<0.05$），桃红四物汤加味组大鼠饮水量、尿量均显著降低（$P<0.05$）。与厄贝沙坦组比较，桃红四物汤加味组大鼠体重显著增长（$P<0.05$），饮水量、尿量均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

表2 各组大鼠体重、饮水量、饮食量、尿量、空腹血糖检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	体重/g	饮水量/mL	饮食量/g	尿量/mL	空腹血糖/(mmol/L)
正常组	498.12±32.33	35.02±6.02	15.36±3.08	19.12±2.23	5.02±0.66
模型组	220.23±25.66[a]	298.14±32.16[a]	38.20±4.08[a]	275.32±23.24[a]	29.15±3.06[a]
厄贝沙坦组	264.34±34.51[b]	287.31±34.72	39.23±4.81	264.64±26.42	28.97±3.14
桃红四物汤加味组	313.01±37.12[bc]	212.32±28.83[bc]	32.03±3.53	205.43±20.26[bc]	28.88±2.72

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与厄贝沙坦组比较，$P<0.05$。

3.2 桃红四物汤加味颗粒对DKD模型大鼠不同时间点24 h UTP的影响

干预第4周末，各组大鼠24 h UTP差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与正常组比较，模型组大鼠干预第8、12、16周末的24 h UTP均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，厄贝沙坦组和桃红四物汤加味组大鼠干预第8、12、16周末的24 h UTP均显著降低（$P<0.05$），而厄贝沙坦组与桃红四物汤加味组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表3。

表3 各组大鼠不同时间点24 h UTP检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，mg）

组别	第4周末	第8周末	第12周末	第16周末
正常组	7.19±1.61	7.01±1.23	7.04±1.24	7.13±1.52
模型组	8.34±2.33	14.12±3.12[a]	26.08±3.85[a]	37.54±5.44[a]
厄贝沙坦组	8.49±1.25	9.81±3.24[b]	16.19±3.32[b]	25.57±5.41[b]
桃红四物汤加味组	7.54±1.73	8.38±2.24[b]	17.23±3.13[b]	24.46±4.32[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.3 桃红四物汤加味颗粒对DKD模型大鼠肾功能指标的影响

与正常组比较，模型组大鼠Scr、BUN水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，厄贝沙坦组和桃红四物汤加味组大鼠Scr、BUN水平均显著降低（$P<0.05$），而厄贝沙坦组与桃红四物汤加味组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表4。

表4 各组大鼠Scr、BUN水平检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

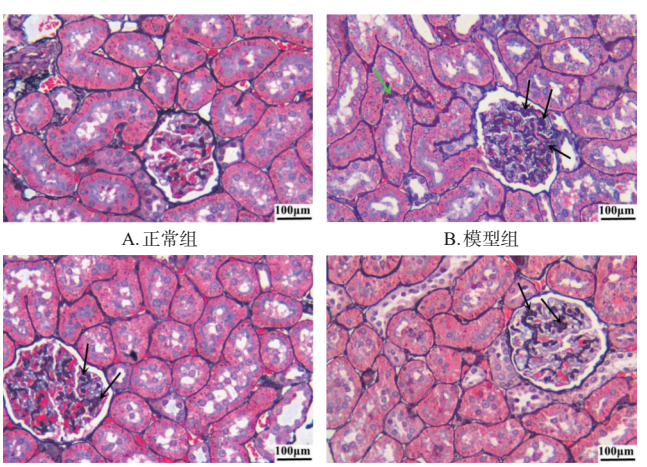
组别	Scr/(μmol/L)	BUN/(mmol/L)
正常组	25.23±3.53	6.42±1.62
模型组	37.13±5.68[a]	15.41±3.14[a]
厄贝沙坦组	30.12±4.63[b]	10.28±2.53[b]
桃红四物汤加味组	28.11±5.37[b]	9.64±2.26[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.4 桃红四物汤加味颗粒对DKD模型大鼠肾组织病理形态学的影响

3.4.1 光镜观察结果

正常组大鼠肾组织可见正常肾小球、肾小管形态，肾间质未见胶原增生，肾小球系膜未见明显异常。模型组大鼠肾组织可见肾小球肥大，部分肾小球可见囊壁粘连，基底膜轻度增厚，系膜细胞和基质增多，肾间质可见少量胶原增生，肾小管部分萎缩。与模型组比较，厄贝沙坦组和桃红四物汤加味组大鼠肾组织病理损伤程度均减轻。结果见图1。



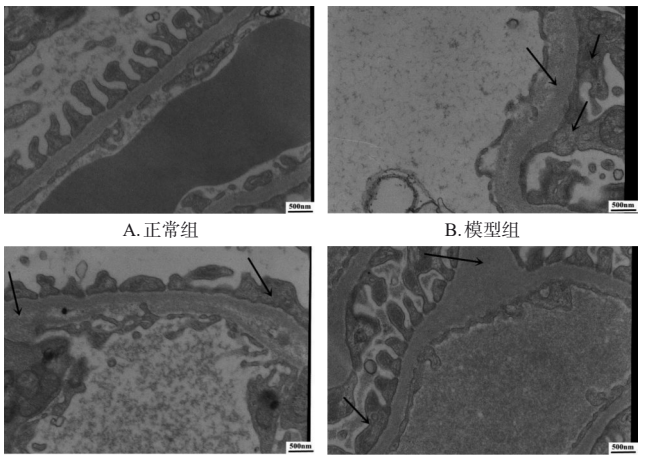
A.正常组　B.模型组　C.厄贝沙坦组　D.桃红四物汤加味组

黑色箭头：肾小球系膜基质增多；绿色箭头：肾间质胶原纤维沉积，肾小管萎缩。

图1 大鼠肾组织病理形态学PASM+Masson染色的显微图

3.4.2 电子显微镜观察结果

正常组大鼠肾小球基底膜未见明显异常，基底膜厚度为（156.33±20.04）nm，足突清晰完整。与正常组比较，模型组大鼠肾小球基底膜厚度[（247.46±36.28）nm]显著增加（$P<0.05$），足突严重融合，系膜基质增多，超微结构紊乱。与模型组比较，厄贝沙坦组[基底膜厚度（204.23±31.74）nm]和桃红四物汤加味组[基底膜厚度（181.12±24.87）nm]大鼠肾小球基底膜厚度均显著减小（$P<0.05$），足部融合程度及系膜基质增生均减轻。与厄贝沙坦组比较，桃红四物汤加味组大鼠肾小球基底膜厚度显著减小（$P<0.05$）。结果见图2。



A.正常组　B.模型组　C.厄贝沙坦组　D.桃红四物汤加味组

箭头：足细胞足突融合，肾小球基底膜增厚。

图2　大鼠肾组织病理形态学醋酸铀+柠檬酸铅双重染色的显微图

3.5　桃红四物汤加味颗粒对DKD模型大鼠肾组织中P-cadherin、nephrin、α-SMA、WT1 mRNA的影响

与正常组比较，模型组大鼠肾组织中P-cadherin、nephrin、WT1 mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$），α-SMA mRNA表达水平显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，厄贝沙坦组和桃红四物汤加味组大鼠肾组织中P-cadherin、nephrin、WT1 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$），α-SMA mRNA表达水平显著降低（$P<0.05$）。与厄贝沙坦组比较，桃红四物汤加味组大鼠肾组织中P-cadherin mRNA表达水平显著升高（$P<0.05$），α-SMA mRNA表达水平显著降低（$P<0.05$）。结果见表5。

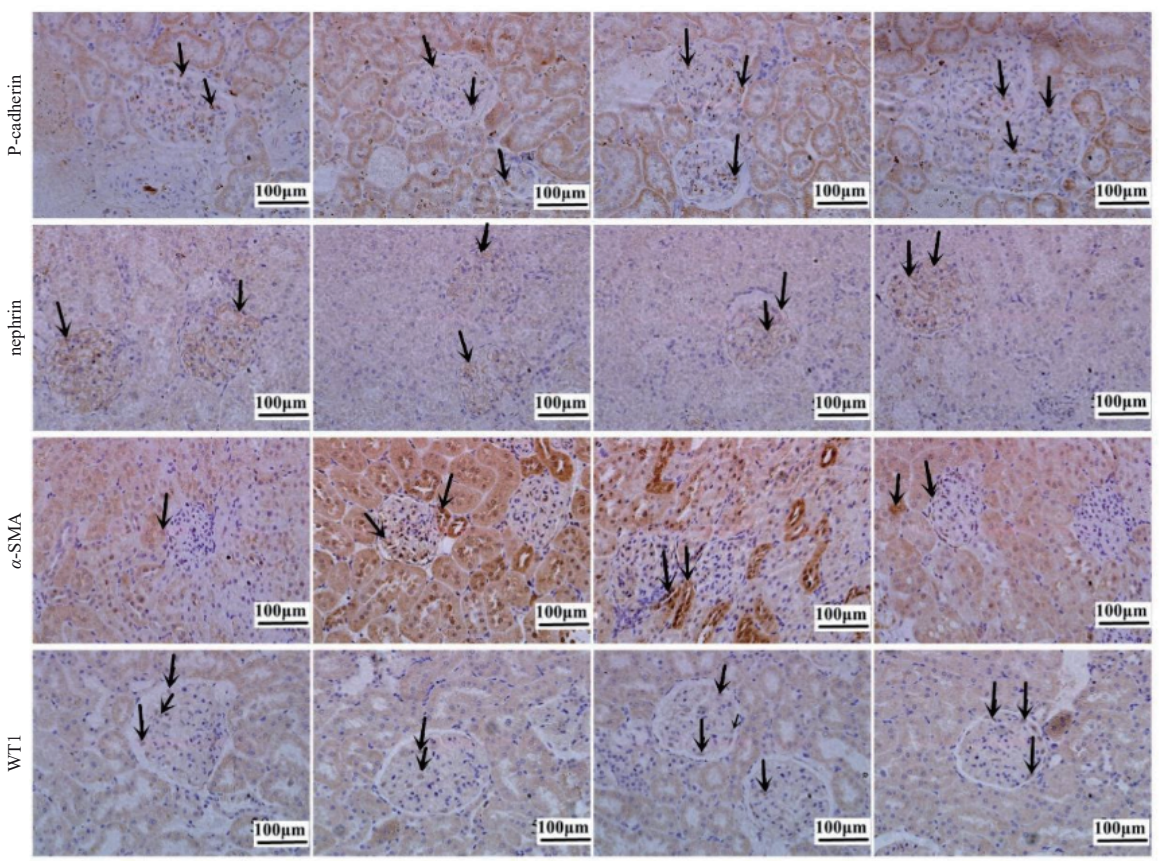
表5　各组大鼠肾组织中P-cadherin、nephrin、α-SMA、WT1 mRNA检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	P-cadherin	nephrin	α-SMA	WT1
正常组	1.00±0.11	1.00±0.12	1.00±0.09	1.00±0.07
模型组	0.46±0.09[a]	0.52±0.11[a]	2.61±0.32[a]	0.52±0.31[a]
厄贝沙坦组	0.72±0.14[b]	0.77±0.12[b]	1.98±0.24[b]	0.74±0.17[b]
桃红四物汤加味组	0.85±0.18[bc]	0.79±0.15[b]	1.47±0.21[bc]	0.79±0.18[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与厄贝沙坦组比较，$P<0.05$。

3.6　桃红四物汤加味颗粒对DKD模型大鼠肾组织中P-cadherin、nephrin、α-SMA、WT1蛋白表达的影响

正常组大鼠肾小球可见较多P-cadherin、nephrin、WT1蛋白沉积，肾间质中有少量α-SMA蛋白沉积。与正常组比较，模型组大鼠肾小球中P-cadherin、nephrin、WT1蛋白沉积均减少，肾小球及肾小管上皮细胞、肾间质中α-SMA蛋白沉积增多。与模型组比较，厄贝沙坦组和桃红四物汤加味组大鼠肾组织相应部位中P-cadherin、nephrin、WT1蛋白沉积均增多，α-SMA蛋白沉积均减少。结果见图3。



A.正常组　B.模型组　C.厄贝沙坦组　D.桃红四物汤加味组

箭头：阳性表达蛋白。

图3　大鼠肾组织中P-cadherin、nephrin、α-SMA、WT1蛋白表达的免疫组化图

3.7 桃红四物汤加味颗粒对DKD模型大鼠肾组织中TGF-β_1、Col-Ⅳ mRNA和蛋白表达的影响

与正常组比较，模型组大鼠肾组织中Col-Ⅳ、TGF-β_1 mRNA和蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，厄贝沙坦组和桃红四物汤加味组大鼠肾组织中Col-Ⅳ、TGF-β_1 mRNA和蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$），而厄贝沙坦组与桃红四物汤加味组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图4、表6。

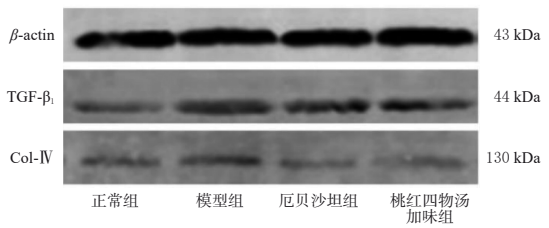


图4 大鼠肾组织中TGF-β_1、Col-Ⅳ蛋白表达的电泳图

表6 各组大鼠肾组织中Col-Ⅳ、TGF-β_1 mRNA和蛋白检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	TGF-β_1		Col-Ⅳ	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
正常组	1.00±0.11	0.22±0.03	1.00±0.08	0.14±0.03
模型组	2.51±0.35[a]	0.64±0.12[a]	1.98±0.28[a]	0.53±0.05[a]
厄贝沙坦组	1.67±0.38[b]	0.34±0.06[b]	1.22±0.24[b]	0.27±0.03[b]
桃红四物汤加味组	1.52±0.29[b]	0.30±0.05[b]	1.28±0.19[b]	0.21±0.03[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

4 讨论

DKD是DM病程日久、累及肾脏而出现的慢性微血管病变，早期仅表现为间歇性微量白蛋白尿或转铁蛋白尿，随着病程进展，微量蛋白尿逐渐转变为持续性蛋白尿，甚至肾功能衰竭，是引起ESKD的重要原因。DKD主要的病理表现为肾小球体积肥大、肾小球基底膜弥漫性增厚、系膜基质增生、Kimmelstiel-Wilson结节形成，最终出现肾小球硬化及肾间质纤维化[13]。本研究结果显示，与正常组比较，模型组大鼠24 h UTP显著升高，肾组织出现明显的DKD病理表现，提示DKD建模成功。

《圣济总录》云“消渴病久，肾气受伤……”，《临证指南医案》载“大凡经主气，络主血，久病血瘀”，由此可见，DKD是在DM病久及肾、耗气伤阴基础上瘀血内停，阻于肾络，导致肾络瘀阻所致。基于此，本研究以桃红四物汤加味颗粒对DKD模型大鼠进行干预，方中熟地黄滋阴补肾填精、当归补血活血、白芍柔肝养血，三药合用加强补血养血之效；川芎行气理血，为“血中气药”，助当归活血祛瘀；桃仁、红花均为破血之品，合用加强活血祛瘀之效；然络脉瘀结多病根深伏，非一般草木之力能疏，故本研究加入僵蚕、地龙以疏通肾络瘀阻。全方合用可滋阴、补肾、活血、行气、通络，正中DKD肾络瘀阻的基本病机。本研究结果显示，与模型组比较，经桃红四物汤加味颗粒干预后，模型大鼠消瘦、多饮、多尿的症状均明显改善，同时该颗粒从第8周开始即具有降低UTP的作用，能减轻模型大鼠肾组织病理损伤，改善肾功能，但对大鼠血糖无改善作用，提示该颗粒具有肾保护作用。

DKD进展至ESKD的早期标志是蛋白尿的发生，而病程一旦进展至大量蛋白尿及肾功能衰竭，则肾脏损伤往往呈现不可逆的发展，因此治疗早期蛋白尿对于DKD整个病程的控制具有重要意义。肾小球滤过屏障结构及功能的改变是蛋白尿产生的重要病理基础，而足细胞作为滤过屏障的最外层部分，对于维持肾小球的完整性至关重要[7]。EMT作为足细胞损伤的一种表现形式，是指足细胞失去其标志性的表型特征，转化为具有间充质表型细胞的过程，伴随细胞形态的改变和细胞功能的缺失。研究表明，蛋白尿的发生明显早于足细胞脱落，而EMT是足细胞脱落和凋亡前的一个可逆过程，因此抑制EMT能在一定程度上控制蛋白尿的漏出[14]。P-cadherin、nephrin均是足细胞裂孔膜的标志蛋白，而WT1只表达于足细胞核，是成熟足细胞的特异性标志蛋白[15]。本研究结果显示，与正常组比较，模型组大鼠肾组织中P-cadherin、nephrin mRNA表达水平均降低、蛋白沉积均减少，而间充质细胞表型标志物α-SMA mRNA表达水平升高、蛋白沉积增多；经桃红四物汤加味颗粒干预后，模型大鼠肾组织中P-cadherin、nephrin mRNA表达水平均升高、蛋白沉积均增加，α-SMA mRNA表达水平降低、蛋白沉积均减少，提示DKD模型大鼠存在足细胞EMT过程，而桃红四物汤加味颗粒能抑制EMT过程。此外，笔者通过电子显微镜及WT1标记足细胞的方法，观察到模型组大鼠足细胞足突弥漫融合、肾小球基底膜增厚，WT1标记的足细胞明显减少；而经桃红四物汤加味颗粒干预后，足细胞在形态及数量上均有改善，同时肾小球基底膜厚度亦有改善，表明该颗粒能改善DKD模型大鼠肾组织病理损伤，减轻足细胞损伤。

DKD进展至ESKD的最终病理表现是肾脏纤维化。肾脏纤维化是以肾小管及肾脏毛细血管结构变性及丧失、细胞外基质大量积聚为特征的病理表现。随着肾间质纤维化的加重，肾功能逐渐丧失，因此延缓肾脏纤维化进展是治疗DKD的关键。TGF-β_1是一种重要的致纤维化因子，其活化可以诱导肌成纤维细胞增殖，导致胶原纤维在肾组织间大量堆积，进一步加重肾脏纤维化进展[16]。Col-Ⅳ是细胞外基质的主要胶原成分，α-SMA是肌纤维细胞表达的特征蛋白，两者在肾脏中的表达水平升高均能直接反映肾脏纤维化程度[17]。本研究结果显示，与正常组比较，模型组大鼠肾组织中可见胶原纤维在肾小球及肾间质沉积较多，TGF-β_1、Col-Ⅳ及α-SMA在肾组织中的表达上调；经桃红四物汤加味颗粒干预后，大鼠肾组织中胶原纤维沉积减少，TGF-β_1、Col-Ⅳ及α-SMA表达下调，表明该颗粒能有效减轻肾脏纤维化进

展，具有肾保护作用。

综上所述，桃红四物汤加味颗粒可通过抑制DKD模型大鼠足细胞EMT，减轻肾组织病理损伤及足细胞损伤，从而保护肾功能、延缓肾脏纤维化进展。但本文未对桃红四物汤加味颗粒抑制足细胞EMT所涉及的信号通路进行研究，这也是本课题组在后续研究中需探讨的方向之一。

参考文献

[1] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas，10th edition[EB/OL].[2022-10-23]. https://diabetesatlas.org/data/upload/download/global_factsheet_en.pdf.

[2] LIN E，ERICKSON K F. Payer mix among patients receiving dialysis[J]. JAMA，2020，324(9)：900-901.

[3] ZHANG L X，LONG J Y，JIANG W S，et al. Trends in chronic kidney disease in China[J]. N Engl J Med，2016，375(9)：905-906.

[4] 余学清，赵明辉. 肾内科学[M]. 3版. 北京：人民卫生出版社，2021：71-75.
YU X Q，ZHAO M H. Nephrology[M]. 3ed. Beijing：People's Health Publishing House，2021：71-75.

[5] SHANKLAND S J，WANG Y L，SHAW A S，et al. Podocyte aging：why and how getting old matters[J]. J Am Soc Nephrol，2021，32(11)：2697-2713.

[6] 吴其晶，杨倩倩. 足细胞衰老与肾小球疾病[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2023，32(5)：472-476.
WU Q J，YANG Q Q. Advance in glomerular disease and podocyte senescence[J]. Chin J Nephrol Dial Transplant，2023，32(5)：472-476.

[7] 陈海云，敖英，朱亚男，等. 足细胞上皮-间充质转分化与肾小球疾病[J]. 临床肾脏病杂志，2020，20(5)：425-430.
CHEN H Y，AO Y，ZHU Y N，et al. Podocyte epithelial-mesenchymal transdifferentiation and glomerular disease [J]. J Clin Nephrol，2020，20(5)：425-430.

[8] YING Q D，WU G Z. Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases：an update[J]. Ren Fail，2017，39(1)：474-483.

[9] 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.
XIAO Y，HUANG W J，ZHAO J X. Discussion on the treatment of early diabetic nephropathy from the perspective of "the cause of illness and the cause of deficiency and excess" [J]. Glob Tradit Chin Med，2021，14(12)：2184-2186.

[10] 陈慧楠，林敏. 糖尿病肾病从络病论治研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28(8)：265-271.
CHEN H N，LIN M. Treatment of diabetic nephropathy from collateral diseases：a review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae，2022，28(8)：265-271.

[11] 陈凯丽，陈占科，陈昺伃，等. 含虫类药处方治疗糖尿病肾病的用药规律[J]. 实用临床医药杂志，2022，26(18)：87-92，97.
CHEN K L，CHEN Z K，CHEN B Y，et al. Medication rules of insect-containing prescriptions in treatment of diabetic nephropathy[J]. J Clin Med Pract，2022，26(18)：87-92，97.

[12] 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.
LI Y，FAN P Y，MA X Y，et al. A long-term and stable method for the preparation of a type 2 diabetes Sprague-Dawley rat model[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin，2020，28(3)：364-369.

[13] 邹万忠. 肾活检病理学[M]. 5版. 北京：北京大学医学出版社，2021：370-375.
ZOU W Z. Renal biopsy pathology[M]. 5ed. Beijing：Peking University Medical Press，2021：370-375.

[14] 王婉懿，王悦芬. 中药干预足细胞上皮间质转分化治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 环球中医药，2022，15(10)：1969-1976.
WANG W Y，WANG Y F. Research progress on podocyte epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy and intervention effect of traditional Chinese medicine[J]. Glob Tradit Chin Med，2022，15(10)：1969-1976.

[15] 李童，赵媛媛，杨发奋. 足细胞标志蛋白在足细胞病中的研究进展[J]. 右江医学，2022，50(1)：72-75.
LI T，ZHAO Y Y，YANG F F. Research progress of podocyte marker protein in podocyte disease[J]. Chin Youjiang Med J，2022，50(1)：72-75.

[16] 胡欣欣，孟晓凡，徐圣洁，等. TGF-β_1/Smad信号通路与肾间质纤维化[J]. 生命的化学，2023，43(4)：601-609.
HU X X，MENG X F，XU S J，et al. TGF-β_1/Smad signaling pathway and renal interstitial fibrosis[J]. Chem Life，2023，43(4)：601-609.

[17] 白璐，沈士朋，王倩，等. 通心络胶囊对糖尿病肾病模型大鼠肾纤维化的干预作用[J]. 中国药房，2023，34(13)：1584-1589.
BAI L，SHEN S P，WANG Q，et al. Intervention effect of Tongxinluo capsule on renal fibrosis in diabetic nephropathy rats[J]. China Pharm，2023，34(13)：1584-1589.

（收稿日期：2023-12-16　修回日期：2024-04-23）
（编辑：邹丽娟）