

DOI:10.13350/j.cjpb.240605

• 论著 •

左归降糖益肾方改善 2 型糖尿病肾病 MKR 小鼠肾损害机制研究*

印红爱, 向家强**

(湖南省中医药大学附属常德医院肾病科, 湖南常德 415000)

【摘要】 **目的** 探究左归降糖益肾方能否通过激活 PI3K/Akt 信号通路和保护肠道菌群稳态改善 2 型糖尿病肾病 MKR 小鼠肾损害机制。**方法** 将 30 只 MKR 小鼠随机分为 DN+MKR 组、ZGJTYSF 组和 ZGJTYSF+LY294002 组, 每组 10 只; 将 10 只 FBV 小鼠作为对照组(Control 组)。测定小鼠血糖和 24 h 尿蛋白总量; ELISA 检测空腹胰岛素和血清中肾损伤指标; 16S-rDNA 肠道菌群测序检测小鼠粪便肠道菌群结构; 蛋白质印迹法检测肾脏组织中 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达; HE 染色检测肾脏组织病理学变化。**结果** 和 Control 组相比, DN+MKR 组小鼠 FBG、UACR、血清中 Scr、BUN、 β 2-MG 水平、Simpson 指数明显升高, OTU 数、Shannon、Chao1、ACE 指数及肾脏组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值明显降低($P < 0.05$); 和 DN+MKR 组相比, ZGJTYSF 组小鼠 FBG、UACR、血清中 Scr、BUN、 β 2-MG 水平、Simpson 指数明显降低, OTU 数、Shannon、Chao1、ACE 指数及肾脏组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值增加($P < 0.05$); 和 ZGJTYSF 组相比, ZGJTYSF+LY294002 组小鼠 FBG、UACR、血清中 Scr、BUN、 β 2-MG 水平、Simpson 指数明显升高, OTU 数、Shannon、Chao1、ACE 指数及肾脏组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值降低($P > 0.05$)。和 DN+MKR 组相比, ZGJTYSF 组厚壁菌门和变形菌门、普雷沃菌属和拟杆菌属菌落相对丰度明显降低, 拟杆菌门和疣微菌门及乳酸菌属菌落明显升高($P < 0.05$); 和 ZGJTYSF 组相比, ZGJTYSF+LY294002 组厚壁菌门和变形菌门、普雷沃菌属和拟杆菌属菌落相对丰度明显升高, 拟杆菌门和疣微菌门及乳酸菌属菌落相对丰度明显降低($P < 0.05$)。**结论** 左归降糖益肾方可通过调节肠道菌群紊乱减轻 2 型糖尿病肾病 MKR 小鼠肾损害, 保护肾脏组织, 其作用机制可能和激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

【关键词】 左归降糖益肾方; PI3K/Akt 信号通路; 2 型糖尿病肾病 MKR 小鼠; 肠道菌群

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)06-0642-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jun.; 19(6): 642-647, 652.]

Research on the mechanism of Zuogui Glucose Reducing and Kidney Benefiting Formula formula in ameliorating renal damage in MKR mice with type 2 diabetic nephropathy

YIN Hongai, XIANG Jiaqiang (Department of Nephrology, Changde Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changde 415000, Hunan, China)***

【Abstract】 **Objective** To investigate whether Zuogui Glucose Reducing and Kidney Benefiting Formula can improve insulin resistance in MKR mice with type 2 diabetic nephropathy through activation of PI3K/Akt signaling pathway and protection of intestinal flora homeostasis. **Methods** Thirty MKR mice were randomly divided into DN+MKR group, ZGJTYSF group and ZGJTYSF+LY294002 group, 10 mice in each group; 10 FBV mice were used as the control group (Control group). Blood glucose and total 24 h urinary protein were measured in mice; fasting insulin, insulin resistance index and kidney injury index in serum were detected by ELISA; 16S-rDNA intestinal flora sequencing was used to detect the structure of fecal intestinal flora in mice; and protein blotting was used to detect the expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt proteins in liver tissues. **Results** Compared with the Control group, mice in the DN+MKR group had significantly higher FBG, 24 h UTP, FINS, HOMA-IR, serum Scr, BUN, β 2-MG levels, Simpson index, and significantly lower OTU number, Shannon, Chao1, ACE index, and p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt ratio in liver tissue ($P < 0.05$); and mice in the ZGJTYSF group had significantly lower FBG, 24 h UTP, FINS, HOMA-IR compared with the DN+MKR group. were significantly lower ($P < 0.05$); compared with the DN+MKR group, mice in the ZGJTYSF group had significantly lower FBG, 24h UTP, FINS, HOMA-IR, serum levels of Scr, BUN, β 2-MG, and Simpson's index, and significantly lower OTU

* **【基金项目】** 湖南省中医药大学校级科研基金与联合基金项目(No. 2021XJJ075)。

** **【通讯作者】** 向家强, E-mail: 13787886672@163.com

【作者简介】 印红爱(1985-), 女, 湖南常德人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事中西医结合防治糖尿病肾病的研究。
E-mail: 381071135@qq.com

count, Shannon, Chao1, ACE index, and hepatic tissues of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt ratio. PI3K, p-Akt/Akt ratio increased ($P < 0.05$); compared with the ZGJTYSF group, mice in the ZGJTYSF+LY294002 group had significantly higher FBG, 24h UTP, FINS, HOMA-IR, serum levels of Scr, BUN, β 2-MG, and Simpson's index, and significantly higher OTU count, Shannon, Chao1, ACE index and p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt ratio in liver tissue were decreased ($P > 0.05$). Compared with the DN+MKR group, the relative abundance of thick-walled and anamorphic phyla, *Prevotella spp.* and *Mycobacterium spp.* colonies was significantly lower, and the colonies of *Mycobacterium spp.* and *Micrococcus wartyi* and *Lactobacillus spp.* colonies were significantly higher in the ZGJTYSF group ($P < 0.05$); compared with the ZGJTYSF group, the relative abundance of thick-walled and anamorphic phyla, *Prevotella spp.* and *Mycobacterium spp.* colonies was significantly higher in the ZGJTYSF+LY294002 group ($P > 0.05$). The relative abundance of colonies was significantly higher, and the relative abundance of colonies of *Mycobacterium anisopliae* and *Micrococcus verticillioides* and *Lactobacillus spp.* was significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Zuogui Glucose Reducing and Kidney Beneficial Formula can reduce insulin resistance and protect renal tissues in MKR mice with type 2 diabetic nephropathy by regulating the disorder of intestinal flora, and its mechanism of action may be related to the activation of PI3K/Akt signaling pathway.

【Keywords】 Zuo Gui Jiang Tang Yi Shen Fang; PI3K/Akt signaling pathway; MKR mice with type 2 diabetic nephropathy; intestinal microbiota

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)常见的慢性微血管并发症,临床主要表现为蛋白尿和肾功能减退^[1]。2020年数据统计显示^[2],全球约有1.6亿DM患者,中国约有1.16亿DM患者,且约有40%的患者可能发展为DN。研究发现^[3-4],近年来我国DN发病率呈逐年上升趋势,是导致终末期肾病的主要因素。目前,降糖药物、RAS抑制剂、免疫抑制剂等是临床治疗DN的主要方法,虽可改善DN症状但副作用较大,因此探究有效治疗DN的方法尤为重要^[5]。中药复方左归降糖益肾方主要功效为滋阴益气、活血解毒,现已有研究表明^[6],其对糖尿病肾病小鼠具有良好的治疗作用,但具体的作用机制尚未明确。肠道菌群是存在于人体的“微生态器官”,参与宿主物质代谢和能量代谢,其在T2DM发生发展中发挥重要作用^[7-8]。研究表明,肠道菌群可降低肠道通透性,增加肠道炎症反应,在2型糖尿病肾病发生发展中发挥重要作用^[9-10]。由此可见,改善肠道菌群紊乱可能是治疗2型糖尿病肾病的新靶点。大量研究显示^[11-13],磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)信号通路的激活与肾脏纤维化的发展密切相关。本研究旨在探究左归降糖益肾方能否通过激活PI3K/Akt信号通路和肠道菌群稳态改善2型糖尿病肾病MKR小鼠肾损害的机制,结果报告如下。

材料与方 法

1 材料

1.1 实验动物 8周龄SPF级MKR小鼠(利用同源重组技术把T2DM候选基因Insulin/IGF双受体敲除

的转基因T2DM小鼠),雌雄各半,由美国国立卫生研究院(Dr. D. LeRoith)提供的MKR鼠(纯合子)经自然交配后繁殖的子代30只,雄性,体质量20~25g,动物许可证号:SYXK(湘)2013-0005。10只同龄FBV小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,SPF级,体质量18~22g,生产许可证号:SCXK(京)2019-0008。所有小鼠均饲养于本院SPF级实验动物中心室温恒定22~26℃,相对湿度40%~60%,光照12h/12h明暗交替。

1.2 试剂和仪器 高脂饲料(江苏省协同生物有限公司产品)。小鼠胰岛素ELISA检测试剂盒、苏木素-伊红染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);兔抗鼠p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt抗体、山羊抗兔 β -actin抗体(美国CST公司);山羊抗体HRP-IgG抗体(上海艾博抗贸易有限公司);ECL发光液(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);PI3K/Akt抑制剂LY294002(美国Selleck公司);小动物血糖仪(型号:GA-3,三诺生物有限公司);化学发光凝胶成像系统(型号:XRS+Imager,美国Bio-Rad公司);全自动生化分析仪(型号:Tanon-5200,上海天能公司);酶标仪(型号9602A,北京艾普生物设备有限公司)。

1.3 药品制备 左归降糖益肾方由熟地黄、黄芪、丹参等组成,由湖南中医药大学第一附属医院提供。将各味中药经水煎2次,合并煎液,过滤浓度至含生药2g/mL,灭菌后保存于4℃冰箱。

2 方法

2.1 模型制备及分组 本研究采用高脂饮食联合单侧肾切除法建立DN模型,腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉30只MKR小鼠,消毒背部右侧肾区,纵向切1cm小口,暴露右侧肾脏并分离,结扎肾蒂后切除右肾,

同时腹腔注射青霉素粉抗感染;缝合皮肤后再用青霉素粉外敷抗感染。FBV小鼠设为对照组(Control组)仅打开腹腔再缝合。于造模前1周,Control组小鼠给予普通饲养,30只MKR小鼠称取体质量后给予高脂饲料喂养。造模后8周测量30只MKR小鼠空腹血糖(FBG) ≥ 7.0 mmol/L,尿微量白蛋白/尿肌酐(microalbuminuria/creatinine,UACR) ≥ 30 mg/g,即认为2型DN模型制备成功。按照随机数字表法将造模成功的30只MKR小鼠随机分为DN+MKR组、ZGJTYSF组和ZGJTYSF+LY294002组,每组10只。ZGJTYSF组灌胃左归降糖益肾方28.8 g/kg,灌胃容量为14.4 mL/kg,1次/d;ZGJTYSF+LY294002组在ZGJTYSF组基础上经腹腔一次性注射LY294002 20 μ mol/L;Control组和DN+MKR组灌胃等体积的生理盐水,1次/d;各组小鼠共连续灌胃28 d。观察MKR小鼠一般状态(精神、活动、饮食饮水及体质量等)。

2.2 血糖和UACR测定 药物干预结束后,测定各组小鼠空腹血糖值(FBG)。收集各组小鼠随机尿液,检测UACR。

2.3 ELISA检测 血糖测定结束后禁食12 h,自由饮水,麻醉小鼠摘取眼球取血,静置30 min后离心,4 $^{\circ}$ C环境3 500 r/min(离心半径为15 cm)离心15 min,收集上清液。采用全自动生化分析仪检测血清中肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)和 β 2-MG水平。

2.4 HE染色检测肾组织病理学变化 麻醉小鼠,无菌开腹后取肾组织,固定于4%中性甲醛中24 h,取出后石蜡包埋,切片机切成厚度为3~4 μ m的组织切片,二经本脱蜡后乙醇水化,将组织切片进行苏木素-伊红染色,经脱水、透明后封片,将组织切片置于显微镜下观察。

2.5 16S-rDNA肠道菌群测序 乙醚麻醉小鼠,取出肾脏组织(速置于液氮中,后保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱)和结肠组织,用无菌冻存管收集肠内容物,使用磁珠土壤和粪便基因组DNA提取试剂盒提取各组小鼠粪便中DNA,电泳质检并定量DNA定量。在338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')-806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')的基础上,扩增16S rRNA基因V3-V4可变区,扩增条件:95 $^{\circ}$ C预变性3 min,95 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共27个循环。将提取的DNA保存于-80 $^{\circ}$ C环境保存,将PCR产物构建测定文库,用Illumina MiSeq平台测序并分析数据。采用uPares软件对OTU进行聚类分析,将得到的OTU数据分析 α 多样性和群落组成,从而评估肠道菌群变化。

2.6 蛋白质印迹法检测肾脏组织p-PI3K、PI3K、p-

Akt、Akt蛋白 用BCA法测定肾脏中总蛋白浓度。热水煮沸蛋白样品(终浓度为2 μ g/mL)10 min,后于-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存蛋白样品。取蛋白上样50 μ g,将上样缓冲液加入到蛋白样品中煮沸,将变性的蛋白样品用SDS-PAGE分离,后转移蛋白样品于PVDF膜上,加入脱脂牛奶(5%)封闭PVDF膜,1 h后用TBST溶液清洗PVDF膜,将PAR2、TRPV1、SP、CGRP一抗(1:1000)添加到反应液中,并在4 $^{\circ}$ C的环境中,避光条件下过夜孵育。随后,将二抗(1:5000)加入反应液中并继续孵育2 h。将ECL发光液加入到组织中显影,曝光后拍照,用Image Lab软件分析蛋白条带灰度。

2.7 统计学分析 实验数据采用Graphpad prism 8.0软件进行统计学分析。计量资料均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。针对不同组间的数据,采用单因素方差(one-way ANOVA)分析来进行统计学比较。同时使用LSD-*t*检验来比较组间两两比较的差异。根据实验结果, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果

1 各组小鼠一般情况比较

Control组小鼠活动、饮食饮水等无明显异常,体质量为(22.36 \pm 2.48)g;和Control组相比,DN+MKR组小鼠精神萎靡、反应迟钝、毛色无光泽、活动减少、饮食饮水增加、多尿等症状,体质量(45.91 \pm 4.67)g明显升高($P < 0.05$);ZGJTYSF组精神状态明显好转,活动增加,饮食饮水基本正常,且多尿明显好转,体质量(44.32 \pm 4.58)g和DN+MKR组相比无明显差异($P > 0.05$),提示左归降糖益肾方对糖尿病肾病MKR体质量无明显影响;ZGJTYSF+LY294002组小鼠一般情况和体质量均和DN+MKR组相似。

2 各组小鼠FBG和UACR比较

和Control组相比,DN+MKR组小鼠FBG和UACR明显增加($P < 0.05$);和DN+MKR组相比,ZGJTYSF组小鼠FBG和UACR明显降低($P < 0.05$);和ZGJTYSF组相比,ZGJTYSF+LY294002组小鼠FBG和UACR明显升高($P < 0.05$)(图1)。

3 各组小鼠血清中Scr、BUN和 β 2-MG水平比较

DN+MKR组小鼠血清中Scr、BUN、 β 2-MG水平均高于Control组;ZGJTYSF组血清中Scr、BUN、 β 2-MG水平均低于DN+MKR组($P < 0.05$);ZGJTYSF+LY294002组小鼠血清中Scr、BUN、 β 2-MG水平明显高于ZGJTYSF组($P < 0.05$)(图2)。

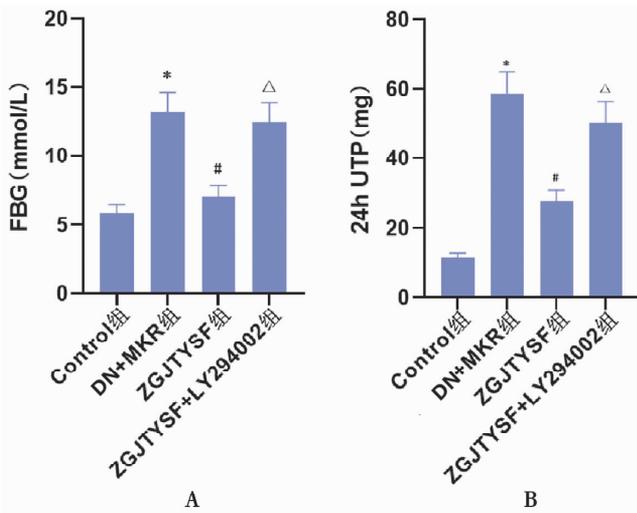


图 1 各组小鼠空腹血糖(FBG)比较 B 小鼠 UACR 比较。vs Control 组 * $P < 0.05$; vs DN+MKR 组 # $P < 0.05$; vs ZGJTYSF 组 △ $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠 FBG 和 UACR 比较

A Comparison of fasting blood glucose (FBG) levels across all mouse groups B Comparison of urinary albumin-to-creatinine ratio (UACR) in mice. Compared to the control group, * $P < 0.05$; Compared to the DN+MKR group, # $P < 0.05$; Compared to the ZGJTYSF Formula group, △ $P < 0.05$

Fig. 1 Comparison of fasting blood glucose (FBG) and urinary albumin-to-creatinine ratio (UACR) among various mouse groups

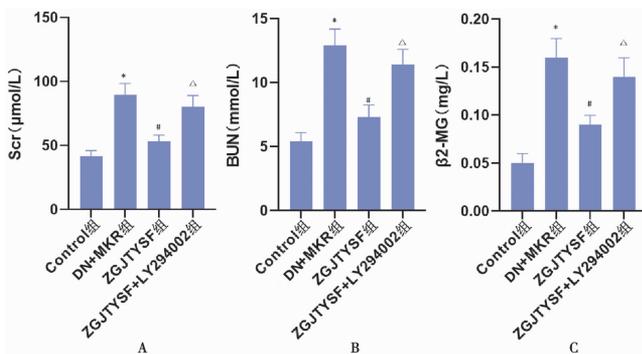


图 2 各组小鼠血清中 Scr、BUN、β2-MG 水平比较 A 血清中 Scr 水平比较 B 血清中 BUN 水平比较 C 血清中 β2-MG 水平比较。vs Control 组 * $P < 0.05$; vs DN+MKR 组 # $P < 0.05$; vs ZGJTYSF 组 △ $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠血清中 Scr、BUN、β2-MG 水平比较

A Comparison of serum creatinine (Scr) Levels B Comparison of blood urea nitrogen (BUN) levels in serum C Comparison of serum Beta-2 microglobulin (β2-MG) levels compared to the control group, * $P < 0.05$; Compared to the DN+MKR group, # $P < 0.05$; Compared to the ZGJTYSF Formula group, △ $P < 0.05$

Fig. 2 Comparison of serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), and beta-2 microglobulin (β2-MG) levels among different mouse groups

4 各组小鼠肾组织病理学变化比较

Control 组肾小球、肾小管及系膜基质细胞未见明显的病理学变化; DN+MKR 组肾小球明显肥大, 可见系膜细胞、系膜基质细胞有大量的增生, 肾小管上皮细胞呈空泡样病变, 血管明显淤血、扩张; ZGJTYSF 组小鼠肾组织病理学变化较模型组明显减轻; ZGJ-

TYSF+LY294002 组和 DN+MKR 组肾组织病理学变化相似(表 3)。

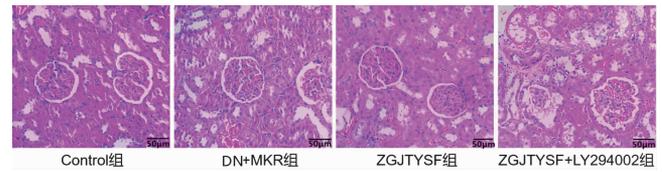


图 3 各组小鼠肾组织 HE 染色 (200 ×)

Fig. 3 Hematoxylin and eosin (HE) staining of renal tissue in different mouse groups (200 ×)

5 各组小鼠肠道菌群比较

5.1 共有物种分析 根据每组样品的 OTU 分布结果绘制 Venn 图, 对样本的物种分布情况初步判断, 如图 4 所示, 所有组的共享 OTU 数为 584 个, Control 组 OTU 数为 1 839 个, DN+MKR 组 OTU 数(1267 个)明显低于 Control 组; ZGJTYSF 组 OTU 数(1774 个)明显高于 DN+MKR 组; ZGJTYSF+LY294002 组 OTU 数(1375 个)明显低于 DN+MKR 组。

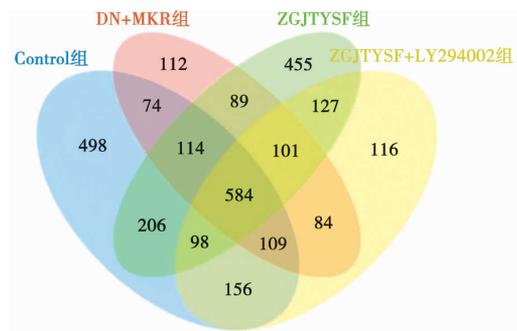


图 4 共有物种 Venn 图

Fig. 4 Venn diagram of shared species

5.2 α 多样性分析 和 Control 组相比 DN+MKR 组小鼠 Shannon、Chao1、ACE 指数均明显降低, Simpson 指数明显升高 ($P < 0.05$); 和 DN+MKR 组相比, ZGJTYSF 组小鼠 Shannon、Chao1、ACE 指数均明显升高, Simpson 指数明显降低 ($P < 0.05$); ZGJTYSF+LY294002 组小鼠 Shannon、Chao1、ACE 指数均低于 ZGJTYSF 组, Simpson 指数高于 ZGJTYSF 组 ($P < 0.05$)(图 5)。

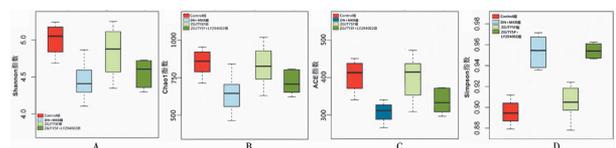


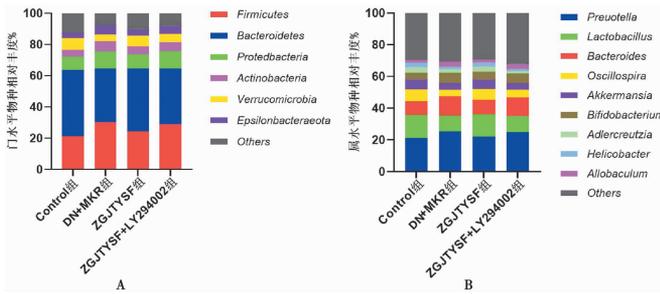
图 5 肠道菌群 alpha 多样性比较 A 各组 Shannon 指数比较 B 各组 Chao1 指数比较 C 各组 ACE 指数比较 D 各组 Simpson 指数比较

图 5 肠道菌群 alpha 多样性比较

A Comparison of shannon index across groups B Comparison of chao1 index across groups C Comparison of ACE index across groups D Comparison of simpson index across groups

Fig. 5 Comparison of gut microbiota alpha diversity

5.3 不同分类水平菌落丰度比较 门水平上,菌群丰度排名前4位的有厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)和变形菌门(*Proteobacteria*),各组门水平不同的群落丰度有显著差异($P < 0.05$)。和 Control 组相比, DN+MKR 组厚壁菌门和变形菌门菌落相对丰度明显升高,拟杆菌门和疣微菌门菌落相对丰度明显降低($P < 0.05$);和 DN+MKR 组相比, ZGJTYSF 组厚壁菌门和变形菌门菌落相对丰度明显降低,拟杆菌门和疣微菌门菌落明显升高($P < 0.05$);和 ZGJTYSF 组相比, ZGJTYSF+LY294002 组厚壁菌门和变形菌门菌落相对丰度明显升高,拟杆菌门和疣微菌门菌落相对丰度明显降低($P < 0.05$) (图 6A)。属水平上排名前3名的菌属为普雷沃菌属(*Prevotella*)、乳酸菌属(*Lactobacillus*)和拟杆菌属(*Bacteroides*),各组大鼠属水平不同的群落丰度有显著差异($P < 0.05$)。和 Control 组相比, DN+MKR 组普雷沃菌属和拟杆菌属菌落相对丰度明显升高,乳酸菌属菌落相对丰度明显降低($P < 0.05$);和 DN+MKR 组相比, ZGJTYSF 组普雷沃菌属和拟杆菌属菌落相对丰度明显降低,乳酸菌属菌落相对丰度明显升高($P < 0.05$);和 ZGJTYSF 组相比, ZGJTYSF+LY294002 组普雷沃菌属和拟杆菌属菌落相对丰度明显升高,乳酸菌属菌落相对丰度明显降低($P < 0.05$) (图 6B)。



A 各组门水平物种相对丰度差异分析 B 各组属水平物种相对丰度差异分析

图 6 各组小鼠菌群物种分布比较

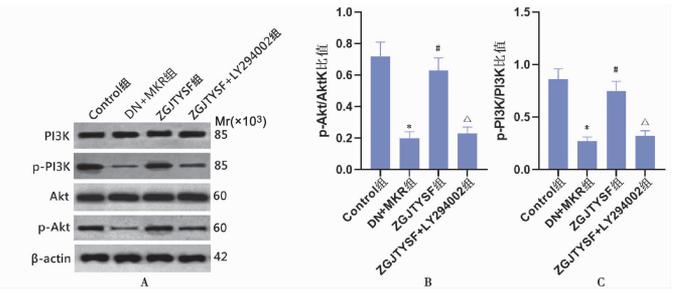
A Analysis of differences in relative abundance of species at the phylum level among groups B Analysis of differences in relative abundance of species at the genus level among groups

Fig. 6 Comparison of microbial species distribution among different mouse groups

6 肾脏组织中 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达比较

和 Control 组相比, DN+MKR 组肝组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值均明显降低($P < 0.05$);和 DN+MKR 组相比, ZGJTYSF 组 DN+MKR 组肝组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值均明显增加($P < 0.05$);和 ZGJTYSF 组相比, ZGJTYSF + LY294002 组肝组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比

值均明显降低($P < 0.05$) (图 7)。



A 肾组织中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白条带图 B 肾组织中 p-PI3K/PI3K 比值比较 C 肾组织中 p-Akt/Akt 比值比较。vs Control 组 * $P < 0.05$; vs DN+MKR 组 # $P < 0.05$; vs ZGJTYSF 组 $\Delta P < 0.05$ 。

图 7 肾脏组织中 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达比较

A Protein band images of PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt in renal tissue B Comparison of the p-PI3K/PI3K ratio in renal tissue C Comparison of the p-Akt/Akt Ratio in renal tissue. Compared to the control group, * $P < 0.05$; Compared to the DN+MKR group, # $P < 0.05$; Compared to the ZGJTYSF formula group, $\Delta P < 0.05$

Fig. 7 Comparison of the expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, and Akt proteins in renal tissue

讨论

DN 是我国慢性肾脏病患者住院甚至死亡的主要因素之一^[14-15]。近年来,中医药研究在 DN 治疗领域逐渐得到认可,但由于中药制剂成分复杂且作用机制未明确,在临床应用方面具有一定局限性。传统医学将 DN 归属为“水肿”“尿浊”“消渴”“虚劳”等范畴,其基本病机是本虚标实,以气阴两虚、经气亏耗、阴阳两虚为本虚,以燥热内生、水湿滞留、湿浊淤毒为标实,病位在肾可累及肝、脾^[16-17]。左归降糖益肾方是一种中草药方剂,方中包括熟地黄、山药、丹参、黄芪等重要成分。熟地黄和山药具有滋阴养起作用,可以补充体内的阴精和气血,属于扶正组;丹参和黄芪具有滋阴益气、活血解毒的功效,能清体内的邪气,被归属为祛邪组。现代药理学研究表明^[18],左归降糖益肾方具有降血糖、保护肾功能、调节代谢功能等多种生物学功能。因此,本研究结果显示, DN+MKR 组小鼠 FBG 及血清中 Scr、BUN、 β 2-MG 水平均明显升高,病理损伤明显, ZGJTYSF 组小鼠 FBG 及血清中 Scr、BUN、 β 2-MG 水平均明显降低,肾脏病理改善明显,提示左归降糖益肾方可降低血糖,促进肾功能恢复。陈聪等^[19]研究证实,左归降糖益肾方可通过调控 VDR、CYP27B1 表达水平,改善肾组织病理结构损伤。

近年来,越来越多的研究证实了肠道微生物群介导了 DN 的进程,且已有研究发现,糖尿肾病病患者肠道微生物菌群丰度和健康志愿者存在差异^[20-21]。Alpha 多样性是指在一个特定区域或者生态系统中物种的多样性程度^[22],临床通常采用 Shannon 和 Simpson 指数可反应物种多样性,采用 Chao1 指数反映样品中

总菌群数,采用 ACE 指数来衡量样本的覆盖率。本研究结果显示,ZGJTYSF 组小鼠 OTU 数、Shannon、Chao1、ACE 指数均明显升高,Simpson 指数明显降低,提示左归降糖益肾方可增加 DN MKR 小鼠肠道菌群多样性。肠道菌群中门级群落主要由拟杆、厚壁、放线和变形菌门四大菌门组成,研究发现^[23],肠道厚壁菌门和拟杆菌门对机体内糖脂代谢发挥重要作用。本研究结果显示,DN+MKR 组厚壁菌门和变形菌门菌落相对丰度明显增加,拟杆菌门和疣微菌门明显减少,提示肠道菌门明显紊乱。在属水平上,DN+MKR 组拟杆菌属丰度降低,乳酸菌丰度升高,乳酸菌虽是机体中一种益生菌,但其作为厌氧菌会通过体内升高的炎症反应导致肠组织内缺氧^[24]。左归降糖益肾方可通过调节肠道菌群紊乱改善 DN。李鑫等^[25]研究证实,升清降浊胶囊可改变 DN db/bd 小鼠代谢及肠道菌群,对肾脏发挥保护作用。

研究发现,PI3K/Akt 信号通路在胰岛素的代谢效应可发挥重要作用^[26-27]。当胰岛素结合细胞表面的胰岛素受体时会激活酪氨酸蛋白激酶(PTK),使胰岛素底物 1,2(ISR-1,ISR-2)上的酪氨酸残基磷酸化,从而通过促进 PI3K p38 调节亚单位被激活。激活的 PI3K 可通过磷酸化 Akt 的丝氨酸残基,使活化的 Akt 从胞质中释放出来,进而转移到细胞核、线粒体和胞质的内部,对糖原合成、糖异生和葡萄糖等进行调节,从而引一系列发生物效应^[28-29]。隋春红等^[30]研究证实,ASGE 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路调控 T2DM 小鼠糖代谢,缓解胰岛素抵抗。本研究结果显示,左归降糖益肾方可激活 DN MKR 小鼠肾组织中 PI3K/Akt 信号通路,因此猜测,其可能是左归降糖益肾方改善 DN MKR 小鼠肠道菌群紊乱的作用机制。为了验证这一猜想,本研究采用 PI3K/Akt 信号通路抑制 LY294002 剂联合左归降糖益肾方共同干预 DN MKR 小鼠,结果显示,LY294002 可减弱左归降糖益肾方为 DN MKR 小鼠胰岛素抵抗和肠道菌群紊乱的改善作用。

综上所述,左归降糖益肾方可通过调节肠道菌群紊乱减轻 2 型糖尿病肾病 MKR 小鼠损害,其作用机制可能和激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

【参考文献】

[1] Li X, Lu L, Hou W, et al. Epigenetics in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2022, 54(2): 163-172.

[2] Tan H, Chen J, Li Y, et al. Glabridin, a bioactive component of licorice, ameliorates diabetic nephropathy by regulating ferroptosis and the VEGF/Akt/ERK pathways[J]. Mol Med, 2022, 28(1): 58.

[3] Huang TS, Wu T, Wu YD, et al. Long-term statins administra-

tion exacerbates diabetic nephropathy via ectopic fat deposition in diabetic mice[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 390.

[4] Yang M, Chen W, He L, et al. Intermittent fasting—a healthy dietary pattern for diabetic nephropathy[J]. Nutrients, 2022, 14(19): 3995.

[5] Gui H, Chen X, Ye L, et al. Seven basement membrane-specific expressed genes are considered potential biomarkers for the diagnosis and treatment of diabetic nephropathy[J]. Acta Diabetol, 2023, 60(4): 493-505.

[6] 陈聪, 罗文娟, 喻嵘, 等. 左归降糖益肾方含药血浆对高糖培养小鼠足细胞凋亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(9): 8-12.

[7] Lee CB, Chae SU, Jo SJ, et al. The relationship between the gut microbiome and metformin as a key for treating type 2 diabetes mellitus[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3566.

[8] Aydin OC, Ayd? n S, Barun S. Role of natural products and intestinal flora on type 2 diabetes mellitus treatment[J]. World J Clin Cases, 2023, 11(1): 65-72.

[9] Chen Z, Radjabzadeh D, Chen L, et al. Association of insulin resistance and type 2 diabetes with gut microbial diversity: A microbiome-wide analysis from population studies[J]. JAMA Netw Open, 2021, 4(7): e2118811.

[10] Qi Q, Li J, Yu B, et al. Host and gut microbial tryptophan metabolism and type 2 diabetes: an integrative analysis of host genetics, diet, gut microbiome and circulating metabolites in cohort studies[J]. Gut, 2022, 71(6): 1095-1105.

[11] Hussain N, Chuang SJ, Johanns M, et al. Effects of PKB/Akt inhibitors on insulin-stimulated lipogenesis and phosphorylation state of lipogenic enzymes in white adipose tissue[J]. Biochem J, 2020, 477(8): 1373-1389.

[12] Aierken A, Li B, Liu P, et al. Melatonin treatment improves human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy in a mouse model of type II diabetes mellitus via the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 164.

[13] Zhang T, Zhang Q, Zheng W, et al. Fructus Zanthoxyli extract improves glycolipid metabolism disorder of type 2 diabetes mellitus via activation of AMPK/PI3K/Akt pathway: Network pharmacology and experimental validation[J]. J Integr Med, 2022, 20(6): 543-560.

[14] Niibo M, Kanasaki A, Iida T, et al. d-allulose protects against diabetic nephropathy progression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats with type 2 diabetes[J]. PLoS One, 2022, 17(1): e0263300.

[15] 韩博, 于敏, 熊锡山. Sirt6 在糖尿病肾病患者血清中的表达及其与患者肾功能指标及肠道菌群分布变化的相关性研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(1): 90-93.

[16] Singh B, Kumar A, Singh H, et al. Protective effect of vanillic acid against diabetes and diabetic nephropathy by attenuating oxidative stress and upregulation of NF- κ B, TNF- α and COX-2 proteins in rats[J]. Phytother Res, 2022, 36(3): 1338-1352.

[17] 韩雪莹, 单国顺, 窦德强, 等. 基于肠道产丁酸菌代谢探讨益糖康防治 2 型糖尿病的作用机制[J]. 中华中医药学刊, 2023, 42(3): 46-51.

- rus infection in glioblastoma multiforme cancer stem cells[J]. J Neurovirol, 2022, 28(4/5/6): 566-582.
- [6] Gottschlich A, Gondara L, Smith LW, et al. Human papillomavirus-based screening at extended intervals missed fewer cervical precancers than cytology in the HPV for cervical cancer (HPV FOCAL) trial[J]. Int J Cancer, 2022, 151(6): 897-905.
- [7] Shikeeva AA, Kekeeva TV, Zavalishina LE, et al. Expression of microRNA let-7a, miR-155, and miR-205 in tumor and tumor adjacent histologically normal tissue in patients with non-small cell lung cancer[J]. Arkh Patol, 2021, 78(3): 3-10.
- [8] 廖婵婵, 瞿微微, 吕杰强. 高危型人乳头瘤病毒持续感染妇女阴道微生态状态分析[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(5): 594-597.
- [9] 谢建萍, 杨志红, 伊芳, 等. 宫颈高危型人乳头瘤病毒感染与阴道菌群及宫颈局部免疫功能的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(10): 2336-2339.
- [10] Garland SM, Steben M, Hernandez-Avila M, et al. Noninferiority of antibody response to human papillomavirus type 16 in subjects vaccinated with monovalent and quadrivalent L1 virus-like particle vaccines[J]. Clin Vaccine Immunol, 2021, 15(16): 792-795.
- [11] Harata G, He F, Kawase M, et al. Differentiated implication of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 to immune responses of murine Peyer's patch[J]. Microbiol Immunol, 2019, 53(8): 475-480.
- [12] 陆宇枫, 李永懿, 王兆焯, 等. miR-221/222 及其靶基因与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(2): 238-247.
- [13] Busnelli A, Garolla A, Tersigni C, et al. Sperm human papillomavirus infection and risk of idiopathic recurrent pregnancy loss: insights from a multicenter case-control study[J]. Fertil Steril, 2023, 119(3): 410-418.
- [14] Boro A, Bauer D, Born W, et al. Plasma levels of miRNA-155 as a powerful diagnostic marker for dedifferentiated liposarcoma. [J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(2): 544-552.
- [15] 李阳芳, 程群仙, 徐灵, 等. 高危型 HPV 感染对宫颈阴道微生态菌群及 miR-222, miR-18a 表达的影响[J]. 临床和试验医学杂志, 2023, 22(4): 389-393.

【收稿日期】 2024-01-24 【修回日期】 2024-04-15

(上接 647 页)

- [18] Matboli M, Ibrahim D, Hasanin AH, et al. Epigenetic modulation of autophagy genes linked to diabetic nephropathy by administration of isorhamnetin in Type 2 diabetes mellitus rats[J]. Epigenomics, 2021, 13(3): 187-202.
- [19] 陈聪, 陈家旭, 喻嵘, 等. 左归降糖益肾方对糖尿病肾病 MKR 鼠肾组织 VDR、CYP27B1 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(12): 5665-5669.
- [20] Deng L, Yang Y, Xu G. Empagliflozin ameliorates type 2 diabetes mellitus-related diabetic nephropathy via altering the gut microbiota[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2022, 1867(12): 159234.
- [21] Zhang L, Wang Z, Zhang X, et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients with Diabetic Nephropathy[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(4): e0032422.
- [22] Lu X, Ma J, Li R. Alterations of gut microbiota in biopsy-proven diabetic nephropathy and a long history of diabetes without kidney damage[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 12150.
- [23] Nagase N, Ikeda Y, Tsuji A, et al. Efficacy of probiotics on the modulation of gut microbiota in the treatment of diabetic nephropathy[J]. World J Diabetes, 2022, 13(3): 150-160.
- [24] Cai K, Ma Y, Cai F, et al. Changes of gut microbiota in diabetic nephropathy and its effect on the progression of kidney injury[J]. Endocrine, 2022, 76(2): 294-303.
- [25] 李鑫, 洪素珍, 李宝华, 等. 升降浊胶囊通过调节肠道菌群对 db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏的保护作用及其机制探讨[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(6): 742-753.
- [26] Alaaeldin R, Abdel-Rahman IAM. Carpachromene Ameliorates Insulin Resistance in HepG2 Cells via Modulating IR/IRS1/PI3k/Akt/GSK3/FoxO1 Pathway[J]. Molecules, 2021, 26(24): 7629.
- [27] Xu Y, Tang Z, Dai H, et al. MiR-195 promotes pancreatic β -cell dedifferentiation by targeting Mfn2 and impairing Pi3k/Akt signaling in type 2 diabetes[J]. Obesity (Silver Spring), 2022, 30(2): 447-459.
- [28] Feng L, Li B, Xi Y, et al. Aerobic exercise and resistance exercise alleviate skeletal muscle atrophy through IGF-1/IGF-1R-PI3K/Akt pathway in mice with myocardial infarction[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2022, 322(2): C164-C176.
- [29] Qi B, Ren D, Li T, et al. Fu Brick Tea Manages HFD/STZ-Induced Type 2 Diabetes by Regulating the Gut Microbiota and Activating the IRS1/PI3K/Akt Signaling Pathway[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(27): 8274-8287.
- [30] 隋春红, 吴沚蒙, 耿泽男, 等. 刺五加苷提取物调控 PI3K/AKT 信号通路对糖尿病小鼠糖代谢的作用及机制[J]. 中国兽医杂志, 2021, 57(4): 85-92.

【收稿日期】 2024-01-24 【修回日期】 2024-04-19