

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250901.001

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1089.R.20250901.1350.002>

芪莠糖肾方通过 AMPK/SIRT3 信号通路调控 NLRP3 炎症小体改善糖尿病肾病肾损伤的机制研究

徐 睿,李文诗,孙家乐,吴燕升,郭小平,王 琳✉

(上海中医药大学附属龙华医院肾病二科,上海 200032)

[摘要]目的:基于 AMPK/SIRT3 信号通路探讨芪莠糖肾方对糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)小鼠与 HK2 细胞的 NLRP3 炎症小体的改善作用。方法:(1)体内实验:60 只 C57BL/6J 小鼠随机选取 10 只作为对照(CON)组,其余成功构建 DKD 模型后分为模型(DKD)组、芪莠糖肾方低剂量(QBTSF-L)组、芪莠糖肾方中剂量(QBTSF-M)组、芪莠糖肾方高剂量(QBTSF-H)组、达格列净(DAPA)组,连续灌胃给药治疗 12 周。实验结束后,收集小鼠肾脏 H&E、PAS、Masson 染色观察肾组织形态学变化;透射电子显微镜观察肾组织超微结构变化;免疫组化检测 NLRP3 表达水平;Western blot 检测肾组织 SIRT3、AMPK、P-AMPK、NLRP3、ASC、Caspase-1 表达水平;ELISA 检测小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量。(2)体外实验:体外采用高糖刺激 HK2 细胞,将其分为正常(NG, 5.6 mmol/L glucose)组、高糖(HG, 30 mmol/L glucose)组、芪莠糖肾方(QBTSF, 30 mmol/L glucose+2 mg/mL QBTSF)组、达格列净(DAPA, 30 mol/L glucose+20 μ mol/L DAPA)组。Western blot 检测细胞内 SIRT3、AMPK、P-AMPK、NLRP3、ASC、Caspase-1 表达水平;免疫荧光检测 SIRT3、NLRP3 荧光强度。结果:(1)体内实验:与 CON 组相比,DKD 组小鼠肾脏系膜细胞和基质增多,胶原纤维沉积明显增加,肾小球体积扩大,线粒体脊断裂,边界模糊;IL-1 β 、IL-18、NLRP3、Caspase-1、ASC 含量明显升高,SIRT3、P-AMPK/AMPK 含量明显降低($P<0.01$)。与 DKD 组相比,芪莠糖肾方干预后,上述病理损伤得到明显改善,IL-1 β 、IL-18、NLRP3、Caspase-1、ASC 含量明显降低,SIRT3、P-AMPK/AMPK 含量升高($P<0.05$)。(2)体外实验:与 NG 组相比,HG 组 NLRP3、Caspase-1、ASC 含量明显升高,SIRT3、P-AMPK/AMPK 含量明显降低($P<0.01$);与 HG 组相比,QBTSF 组 NLRP3、Caspase-1、ASC 含量明显降低,SIRT3、P-AMPK/AMPK 含量明显升高($P<0.01$)。结论:芪莠糖肾方可以有效抑制 DKD 中 NLRP3 炎症小体生成,其保护作用可能与调节 AMPK/SIRT3 信号通路相关蛋白表达有关。

[关键词] 糖尿病肾病;芪莠糖肾方;AMPK/SIRT3;NLRP3 炎症小体

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)16-1232-10

Mechanism of Qibang Tangshen Formula ameliorating diabetic nephropathy renal injury via AMPK/SIRT3 signaling pathway-mediated NLRP3 inflammasome regulation

XU Rui, LI Wenshi, SUN Jiale, WU Yansheng, GUO Xiaoping, WANG Lin✉

(Department of Nephrology II, Affiliated Longhua Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Health Industry Special Project of Pudong New District Health Commission, Shanghai (PW2023E-03); Shanghai TCM Three-Year Action Plan (2021-2023) for Advancing Inheritance, Innovation, and Development [ZY(2021-2023)-0403]

[Author]: XU Rui, E-mail: 15861371876@163.com.

[Correspondence to]: WANG Lin, Ph.D., Chief Physician, Doctoral Supervisor, E-mail: happytlynn@163.com.

Received: 2025-05-20

Revised: 2025-08-12

JHMu, 2026;32(16):1232-1241

[基金项目] 上海市浦东新区卫生健康委员会卫生行业专项(PW2023E-03);上海市中医药管理局上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划(2021年~2023年)[ZY(2021-2023)-0403]

[作者简介] 徐睿, Email: 15861371876@163.com。

[通讯作者] 王琳, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: happytlynn@163.com。

[收稿日期] 2025-05-20

[修回日期] 2025-08-12

[网络出版时间] 2025-09-01 14:40:52

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic effects of Qibang Tangshen Formula (QBTSF) on NLRP3 inflammasome *via* the AMPK/SIRT3 signaling pathway in mice with diabetic kidney disease (DKD) and HK-2 cells. **Methods:** (1) *In vivo* experiments: Out of 60 C57BL/6J mice, 10 were randomly selected into the control (CON) group, and after the successful construction of the DKD model, the remaining were divided into the model (DKD) group, the QBTSF low-dose (QBTSF-L) group, the QBTSF medium-dose (QBTSF-M) group, the QBTSF high-dose (QBTSF-H) group, and the dapagliflozin (DAPA) group, and the mice were administered gastric gavage continuously for 12 weeks. At the end of the experiment, the kidneys of mice were collected and stained by H&E, PAS, and Masson staining to observe the morphological changes of renal tissues; transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes of renal tissues; Immunohistochemistry was used to detect the expression level of NLRP3; Western blot was used to detect the expression levels of SIRT3, AMPK, P-AMPK, NLRP3, ASC, and Caspase-1 in the renal tissues; ELISA was used to detect serum IL-1 β and IL-18 levels in mice. (2) *In vitro* experiments: HK2 cells were stimulated with high glucose *in vitro*, and divided into the normal (NG, 5.6 mmol/L glucose) group, the high glucose (HG, 30 mmol/L glucose) group, the QBTSF (QBTSF, 30 mmol/L glucose+2 mg/mL QBTSF) group, and the dapagliflozin (DAPA, 30 mol/L glucose+20 μ mol/L DAPA) group. Western blot was used to detect the expression levels of SIRT3, AMPK, P-AMPK, NLRP3, ASC, and Caspase-1 in the cells; Immunofluorescence was used to detect SIRT3 and NLRP3 fluorescence intensity. **Results:** (1) *In vivo* experiments: Compared to the CON group, DKD group mice exhibited mesangial cell proliferation, mesangial matrix expansion, marked collagen fiber deposition, glomerular enlargement, mitochondrial cristae disruption, and blurred mitochondrial boundaries; the contents of IL-1 β , IL-18, NLRP3, Caspase-1, and ASC were significantly increased, and the contents of SIRT3 and P-AMPK/AMPK were significantly decreased ($P<0.01$). Compared to the DKD group, after QBTSF intervention, the pathologic impairments mentioned above were significantly improved, and the contents of IL-1 β , IL-18, NLRP3, Caspase-1, and ASC were significantly decreased, and the contents of SIRT3 and P-AMPK/AMPK were increased ($P<0.05$). (2) *In vitro* experiments: Compared to the NG group, the contents of NLRP3, Caspase-1, and ASC were significantly increased, and the contents of SIRT3 and P-AMPK/AMPK were significantly decreased in the HG group ($P<0.01$); Compared to the HG group, the contents of NLRP3, Caspase-1, and ASC were significantly decreased, and the contents of SIRT3 and P-AMPK/AMPK were significantly increased in the QBTSF group ($P<0.01$). **Conclusion:** QBTSF effectively inhibits NLRP3 inflammasome activation in DKD, and its renal protective effects may be associated with the modulation of AMPK/SIRT3 signaling pathway-related protein expression.

[Key words] Diabetic kidney disease; Qibang Tangshen Formula; AMPK/SIRT3; NLRP3 inflammasome

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病中最严重的微血管并发症之一,同时也是导致终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的主要原因之一^[1]。当前 DKD 已经成为导致中国血液透析患者新增数量居首的主要原因,这一状况不仅对患者的生活质量构成了严重威胁,也会对家庭造成明显的经济压力^[2]。DKD 作为代谢性疾病之一,由多种炎症因子介导,具有复杂的生理和病理机制^[3]。细胞焦亡是一种程序化的死亡过程,其核心机制是核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)引发的炎症小体激活和孔道形成蛋白 Gasdermin(GSDMD)导致的细胞膜穿孔,从而加剧炎症反应^[4]。炎症小体的生成不仅能引发肾小管损伤,还可能加速肾纤维化进程,这一过程与 DKD 进展至 ESRD 之间存在密切联系^[5]。近年来科学研究已经证明,AMPK/SIRT3 通路在调控 NLRP3 炎症小体生成过程中存在多维调节作用,这一发现揭示了该通路在炎症反应调控机制中的核心地位及复杂交互作用^[6]。因此,通过靶向 AMPK/SIRT3 通路以调控炎症小体生成,进而减

轻 DKD 肾损伤,展现出这一策略在 DKD 治疗领域具有明显的潜在价值与应用前景。

芪蒡糖肾方是由全国名老中医专家传承工作室指导老师、上海市名中医陈以平教授多年来总结 DKD 治疗经验所拟的经验方。至今,该方已在临床实践中应用逾十年,专门针对 DKD 患者,其明显功效体现在保护肾功能与降低蛋白尿水平上,得到广泛认可与实证支持^[7,8]。此外,前期通过体内、外实验发现芪蒡糖肾方可以通过调控 Nrf2/Gpx4 通路缓解链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导 DKD 小鼠蛋白尿,降低血肌酐,缓解肾脏纤维化损伤^[9]。现有研究表明,AMPK/SIRT3 信号通路在 NLRP3 炎症小体的生成过程中扮演着至关重要的角色。为进一步揭示芪蒡糖肾方治疗 DKD 的作用机制,本研究将观察芪蒡糖肾方对 STZ 诱导 DKD 小鼠及高糖诱导 HK2 细胞的 AMPK/SIRT3 信号通路介导 NLRP3 炎症小体相关分子表达的干预效应,探讨其作用靶点及分子机制,以期为临床应用和新药开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 达格列净(HY-10450)购于美国MCE公司;芪蒺糖肾方颗粒(黄芪60 g、金蝉花10 g、三七粉3 g、黄精20 g以及葛根、山茱萸、僵蚕、川芎、牛蒡子、灵芝各15 g)由江阴天江药业有限公司生产;STZ(S8050)、柠檬酸钠缓冲液(C1013)购于北京Solarbio公司;SIRT3抗体(10099-1-AP)、AMPK抗体(10929-2-AP)、NLRP3抗体(19771-1-AP)、ASC抗体(10500-1-AP)、Caspase-1抗体(22915-1-AP)、GAPDH抗体(60004-1-IG)购于武汉Proteintech公司;P-AMPK抗体(4185S)购于美国CST公司;IL-1 β ELISA试剂盒(JL18442)、IL-18 ELISA试剂盒(JL20253)购于上海江莱公司。

CO₂培养箱(型号:3111)、化学发光成像仪(型号:2102013)购于上海勤翔科学仪器有限公司;荧光倒置显微镜(型号:Eclipse Ti-E)、酶标仪(型号:Synergy H1 MF)购于BioTek公司。

1.1.2 细胞 HK2细胞(人肾皮质近曲小管上皮细胞,STCC10303P),购于武汉Servicebio公司。

1.1.3 动物 60只8周龄的雄性C57BL6/J品系SPF级小鼠,购于上海中医药大学动物实验中心(上海必凯科翼生物科技有限公司)。动物生产许可证号:SCXK(沪)2023-0009,实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2020-0009。在22~25℃的室内温度、相对湿度为55%±10%及12 h光暗周期的环境下进行饲养。上海中医药大学实验动物伦理委员会已授权此动物实验方案,认定其遵循既定伦理标准(授权文件编号:PZSHUTCM2402190002)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模给药 C57小鼠经历为期1周的适应性喂养阶段。随机选择10个样本作为对照(CON)组。其余小鼠则被喂以高糖高脂饲料,并每日以50 mg/kg剂量注射STZ,STZ溶解于柠檬酸钠缓冲液(浓度为0.1 mol/L,pH调至4.5)。注射操作完成后1周,通过尾静脉采血,测定小鼠的空腹血糖水平,若血糖值超过16.7 mmol/L,则认定造模成功。成功造模后,小鼠被进一步分为模型(DKD)组、达格列净(DAPA)组、芪蒺糖肾方低剂量(QBTSF-L)组、芪蒺糖肾方中剂量(QBTSF-M)组及芪蒺糖肾方高剂量(QBTSF-H)组。根据人与小鼠体表面积换算法进行计算,小鼠是人的9.1倍,故芪蒺糖肾方的低、中、高剂量分别调整为0.65、1.3、

2.6 g·kg⁻¹·d⁻¹(其中,中剂量视为等效剂量)。同时,达格列净以1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹的剂量进行给药。连续12周灌胃给药后,实验结束时收集肾组织进行后续分析。

1.2.2 肾组织H&E染色 将新鲜的肾脏组织放入4%的多聚甲醛中固定24 h,使用梯度乙醇脱水,使用二甲苯进行透明处理,石蜡包埋并制作出3 μ m厚度的切片。在染色过程中,依次进行以下步骤:二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、苏木素染色6 min、1%盐酸乙醇分化5 s、流水蓝化、伊红染色2 min,最终通过梯度乙醇脱水和二甲苯透明后的中性树胶封片。

1.2.3 肾组织PAS染色 将新鲜的肾脏组织放入4%的多聚甲醛中固定24 h,使用梯度乙醇脱水,使用二甲苯进行透明处理,石蜡包埋并制作出3 μ m厚度的切片。在染色过程中,依次进行以下步骤:二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、氧化剂处理10 min、Schiff试剂孵育15 min、苏木素复染,最终通过梯度乙醇脱水和二甲苯透明后的中性树胶封片。

1.2.4 肾组织Masson染色 将新鲜的肾脏组织放入4%的多聚甲醛中固定24 h,使用梯度乙醇脱水,使用二甲苯进行透明处理,石蜡包埋并制作出3 μ m厚度的切片。在染色过程中,依次进行以下步骤:二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、苏木素染色5 min、丽春红染色5 min、1%磷钼酸溶液分化3 min、2%苯胺蓝溶液染5 min、1%冰醋酸快速分化,最终通过梯度乙醇脱水和二甲苯透明后的中性树胶封片。

1.2.5 肾组织免疫组化染色 使用4%的多聚甲醛固定的肾组织,依次进行石蜡包埋并切割成3 μ m厚度的切片,二甲苯脱蜡后柠檬酸钠缓冲液抗原修复20 min;牛血清白蛋白(BSA)封闭后,将样本与NLRP3抗体过夜孵育;PBST洗涤后,滴加二抗,并于室温下培养;通过DAB进行显色反应,使用树脂进行封装。

1.2.6 透射电子显微镜观察肾脏线粒体超微结构 肾组织首先置于4%戊二醛溶液中固定4 h,随后经磷酸盐缓冲液冲洗,浸入1%锇酸中固定2 h。通过乙醇脱水处理,再以丙酮和环氧树脂包埋。实施切片操作。对切片依次加入醋酸铀和柠檬酸铅溶液进行双重电子染色。最终使用透射电子显微镜观察并完成影像记录。

1.2.7 Western blot检测SIRT3、AMPK、P-AMPK、NLRP3、ASC、Caspase-1水平 取60 mg肾脏组织,置于2 mL离心管内,随后加入600 μ L RIPA裂解液

并混入 2 颗钢珠,进行研磨步骤,收集上清液。通过 BCA 法测定蛋白浓度后,制备样品并使其变性,执行电泳和湿转步骤。在 5% BSA 条件下室温封闭 1 h。封闭操作完成后,依次用 SIRT3、AMPK、P-AMPK、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GAPDH 的一抗(稀释比例为 1:1 000)4 ℃过夜孵育。完成孵育后,进行洗涤步骤,随后与相应的二抗(同样为 1:1 000 稀释)在 4 ℃条件下孵育 1 h。再次洗涤,将膜浸入 ECL 超敏发光液中孵育,并在暗室中的显影仪上曝光显影。整个实验流程重复 3 次以确保结果的可靠性。

1.2.8 细胞培养及分组 在 37 ℃与 5% CO₂ 的恒温条件下,采用含有 10% 胎牛血清及 1% 青链双抗的葡萄糖浓度设定为 5.6 mmol/L 的完全培养基,对 HK2 细胞进行培养。当细胞密度升至 70%~80% 时,即开始执行后续的细胞消化实验程序。选取处于指数生长阶段、状态良好的细胞经过常规胰酶处理后,被分批次栽种至 6 孔板、24 孔板及 96 孔板。当细胞的融合程度达到 60%~70% 时,将其分为 4 组进行干预:正常(NG, 5.6 mmol/L glucose)组、高糖(HG, 30 mmol/L glucose)组、芪蒺糖肾方(QBTSF, 30 mmol/L glucose+2 mg/mL QBTSF)组、达格列净(DAPA, 30 mol/L glucose+20 μmol/L DAPA)组,共干预 24 h。干预结束后收集细胞进行后续操作(葡萄糖造模条件及芪蒺糖肾方干预条件来自于前期实验结果^[9])。

1.2.9 芪蒺糖肾方冻干粉制备 取芪蒺糖肾方中药饮片,投入煎药锅,以凉水浸至水面超出药面约一指宽,预浸 3 h。合并浸出液后,大火煮沸,继而改用小火熬煮 30 min,收集初次煎煮的药液。加入部分凉水后,进行第 2 轮煎煮。此阶段应避免浸泡。大火煮沸后,转用小火续煮 30 min,收集第 2 轮药

液。使用旋转蒸发仪浓缩药液,于 -80 ℃环境下冷冻存储 1 周,以实现脱水并形成粉末。于 4 ℃环境下保存粉末。

1.2.10 免疫荧光检测 SIRT3、NLRP3 水平 将细胞培养于 24 孔板中,培养完成后,PBS 洗涤 2 次,加入 4% 多聚甲醛固定 20 min,洗涤后加入通透剂,再次洗涤后室温封闭 1 h,加入 SIRT3 与 NLRP3 一抗 4 ℃过夜,在室温条件下进行封闭处理 1 h。向细胞添加 SIRT3 与 NLRP3 的一抗,并于 4 ℃条件下孵育过夜。次日,在室温环境下孵育二抗 1 h。完成 DAPI 染色以标记细胞核后,通过荧光倒置显微镜观察并记录实验结果。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析,并采用 GraphPad Prism 8.4.0 进行绘图,所有的计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差分析用于比较多组之间的差异, t 检验用于比较两组之间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肾脏组织病理染色结果

与 CON 组相比,DKD 组的小鼠肾小球较为肥大,并出现了炎性细胞浸润和系膜增生,肾小管胶原纤维沉积明显。药物治疗后,肾小球肥大以及炎性细胞浸润和系膜增生得到了缓解,肾小管胶原纤维沉积也得到了改善。其中,QBTSF-H 组与 DAPA 组疗效较为明显(图 1~3)。

2.2 各组小鼠肾脏超微结构的变化

电子显微镜结果显示,CON 组小鼠肾组织线粒体结构清晰;DKD 组小鼠肾组织线粒体空泡肿胀,线粒体脊断裂,边界模糊,排列紊乱;经过治疗后,QBTSF-H 组与 DAPA 组小鼠肾组织线粒体损伤情况明显减轻(图 4)。

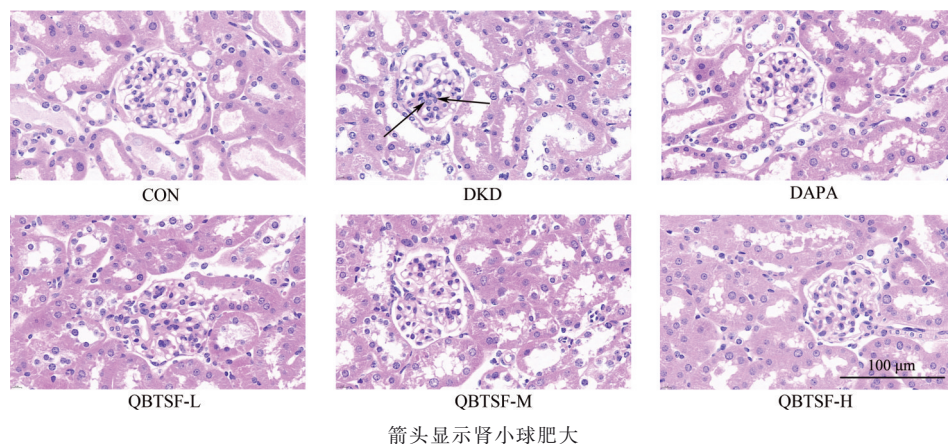


图 1 各组小鼠肾脏组织病理变化(H&E 染色, ×1 000)

Fig 1 Histopathological changes in renal tissue of mice in each group (H&E staining, ×1 000)

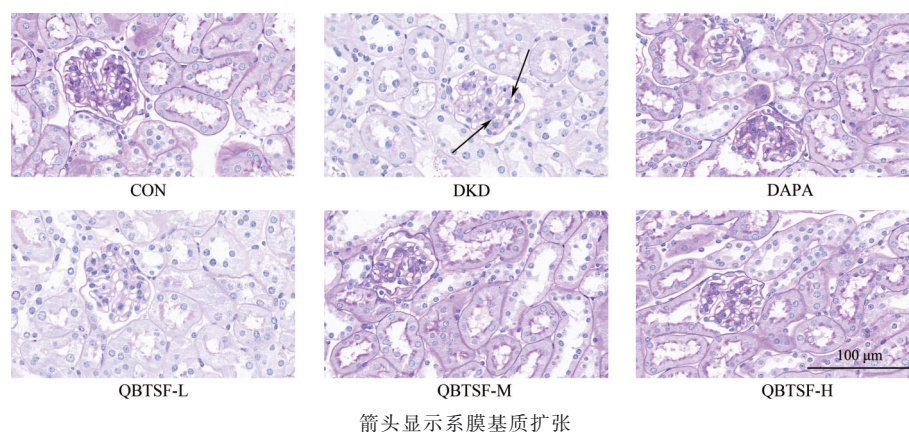


图2 各组小鼠肾组织病理变化(PAS染色, ×1 000)

Fig 2 Histopathological changes in renal tissue of mice in each group (PAS staining, ×1 000)

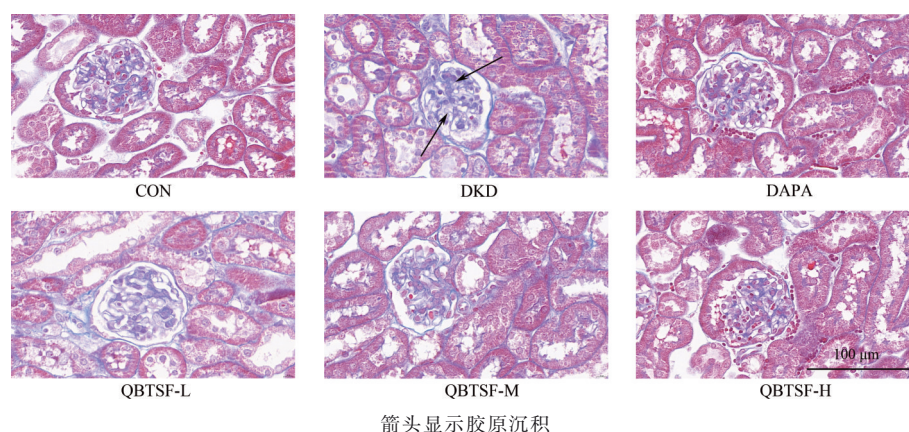


图3 各组小鼠肾组织病理变化(Masson染色, ×1 000)

Fig 3 Histopathological changes in renal tissue of mice in each group (Masson staining, ×1 000)

2.3 免疫组化检测各组小鼠NLRP3表达水平
与CON组相比,DKD组的NLRP3阳性染色面积
积明显增加($P<0.01$);与DKD组相比,QBTSF-M

组、QBTSF-H组与DAPA组NLRP3阳性染色面积
明显减少($P<0.01$),见图5。

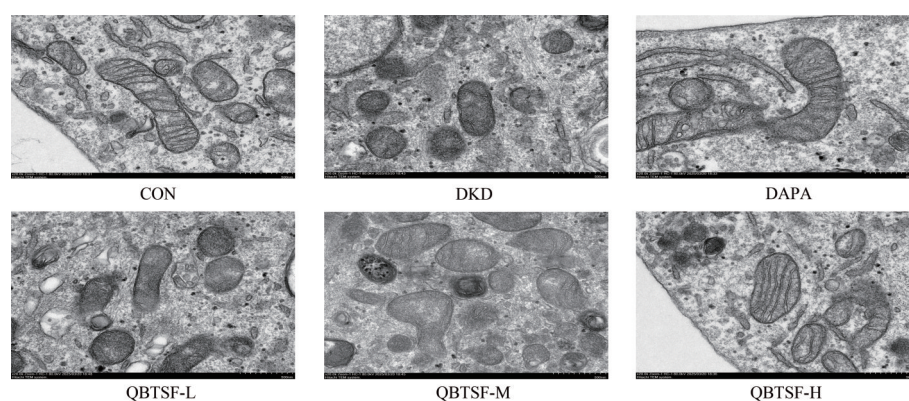


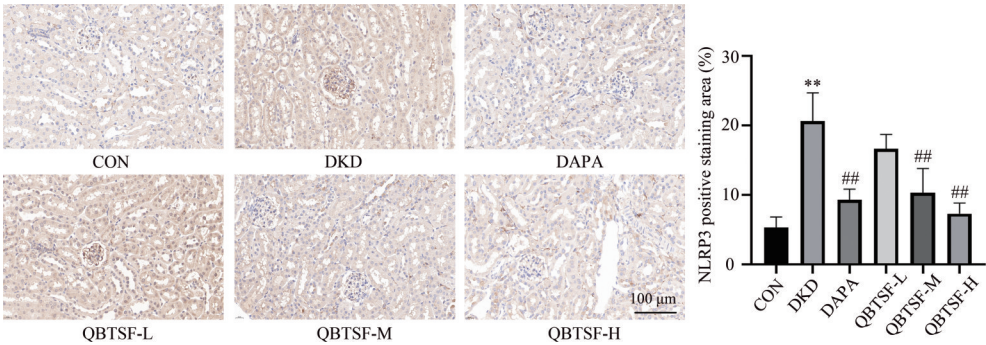
图4 各组小鼠肾组织超微结构变化(透射电子显微镜, ×20 000)

Fig 4 Ultrastructural changes in renal tissue of mice in each group (transmission electron microscopy, ×20 000)

2.4 ELISA检测各组小鼠血清IL-1 β 、IL-18浓度
与CON组相比,DKD组血清中IL-1 β 、IL-18浓
度升高($P<0.01$);与DKD组相比,QBTSF-M组、
QBTSF-H组与DAPA组血清中IL-1 β 、IL-18浓度
降低($P<0.05$),见图6。

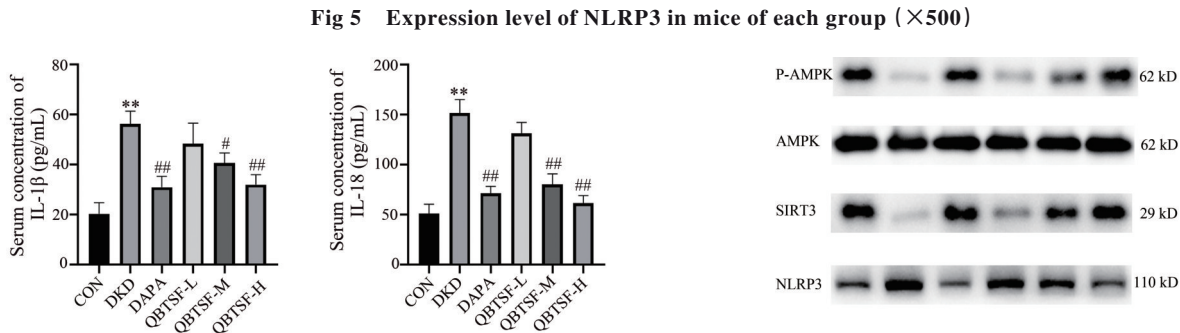
2.5 各组小鼠SIRT3、AMPK、P-AMPK、NLRP3、
ASC、Caspase-1的表达水平

以GAPDH为内参:与CON组相比,DKD组
NLRP3、ASC、Caspase-1表达水平升高,SIRT3与
P-AMPK/AMPK表达水平降低($P<0.01$);与DKD



与 CON 组相比, ** $P < 0.01$; 与 DKD 组相比, ## $P < 0.01$

图 5 各组小鼠 NLRP3 表达水平 ($\times 500$)



与 CON 组相比, ** $P < 0.01$, 与 DKD 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 6 各组小鼠血清 IL-1β、IL-18 浓度

Fig 6 Serum concentration of IL-1β and IL-18 in mice of each group

组相比, QBTSF-M 组、QBTSF-H 组与 DAPA 组 NLRP3、ASC、Caspase-1 表达水平降低, SIRT3 与 P-AMPK/AMPK 表达水平升高 ($P < 0.05$), 见图 7、8。

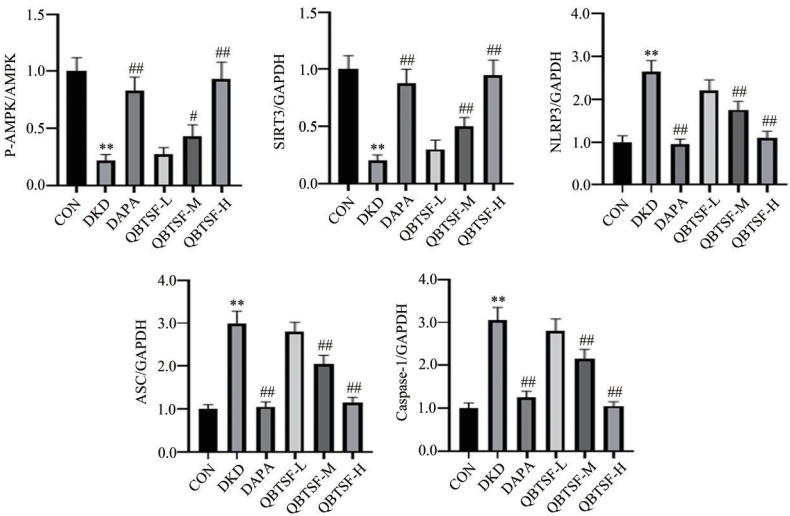
2.6 免疫荧光检测各组 HK2 细胞 SIRT3、NLRP3 水平

与 NG 组相比, HG 组 NLRP3 平均荧光强度升高, SIRT3 平均荧光强度降低 ($P < 0.01$); 与 HG 组相

图 7 各组小鼠 SIRT3、AMPK、P-AMPK、NLRP3、ASC、Caspase-1 的表达情况

Fig 7 Expression of SIRT3, AMPK, P-AMPK, NLRP3, ASC, and Caspase-1 of mice in each group

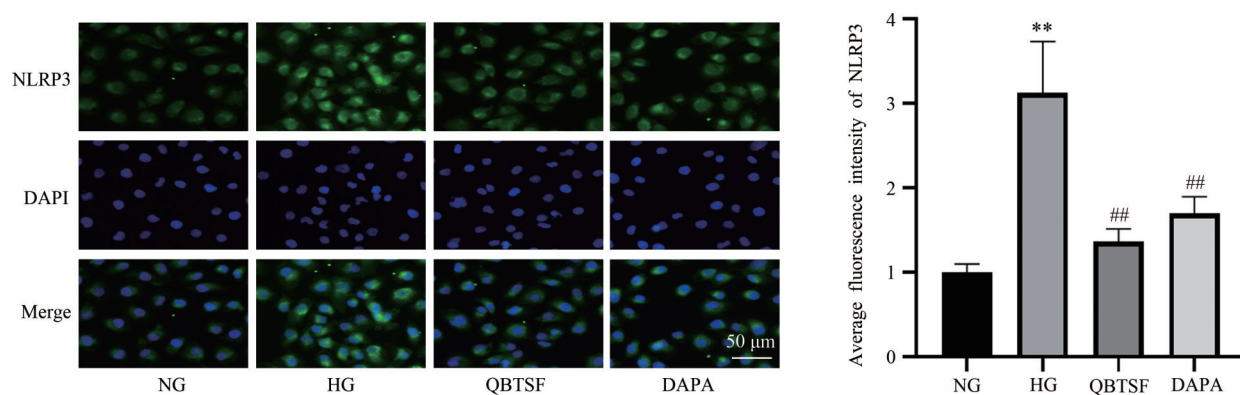
比, QBTSF 组与 DAPA 组 NLRP3 平均荧光强度降低, SIRT3 平均荧光强度升高 ($P < 0.01$), 见图 9、10。



与 CON 组相比, ** $P < 0.01$; 与 DKD 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 8 各组小鼠 SIRT3、AMPK、P-AMPK、NLRP3、ASC、Caspase-1 表达水平

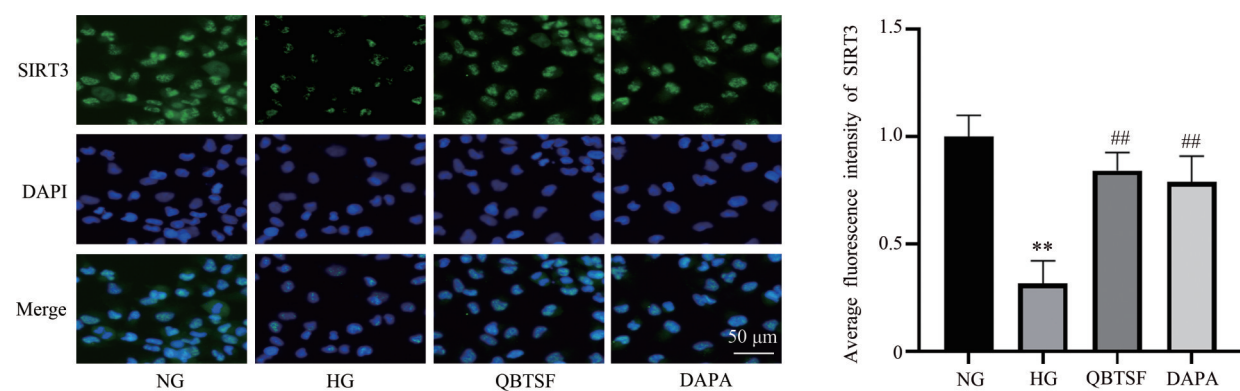
Fig 8 Expression levels of SIRT3, AMPK, P-AMPK, NLRP3, ASC, and Caspase-1 of mice in each group



与NG组相比, ** $P < 0.01$; 与HG组相比, ## $P < 0.01$

图9 各组HK2细胞NLRP3免疫荧光染色

Fig 9 Immunofluorescence staining of NLRP3 of HK2 cells in each group



与NG组相比, ** $P < 0.01$; 与HG组相比, ## $P < 0.01$

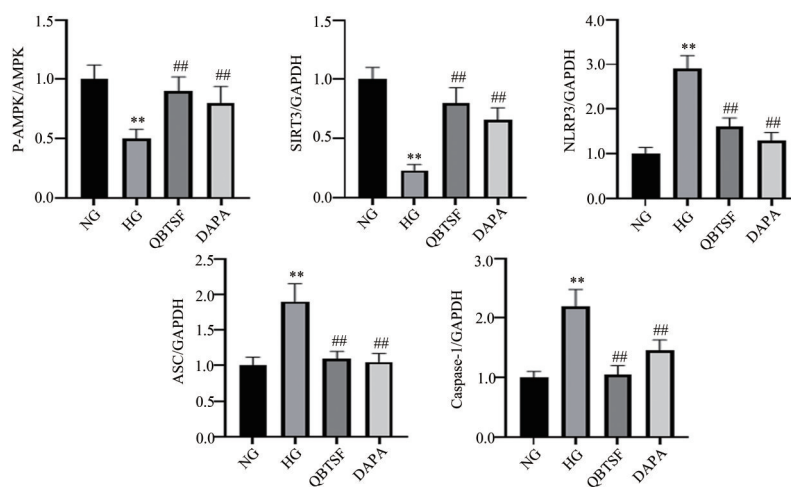
图10 各组HK2细胞SIRT3免疫荧光染色

Fig 10 Immunofluorescence staining of SIRT3 of HK2 cells in each group

2.7 各组HK2细胞SIRT3、AMPK、P-AMPK、NLRP3、ASC、Caspase-1表达水平

以GAPDH为内参:与NG组相比, HG组的NLRP3、ASC、Caspase-1表达水平升高, SIRT3与

P-AMPK/AMPK表达水平降低($P < 0.01$); 与HG组相比, QBTSF组与DAPA组NLRP3、ASC、Caspase-1表达水平降低, SIRT3与P-AMPK/AMPK表达水平升高($P < 0.01$)。见图11、12。



与NG组相比, ** $P < 0.01$; 与HG组相比, ## $P < 0.01$

图11 各组HK2细胞SIRT3、AMPK、P-AMPK、NLRP3、ASC、Caspase-1表达水平

Fig 11 Expression levels of SIRT3, AMPK, P-AMPK, NLRP3, ASC, and Caspase-1 of HK2 cells in each group

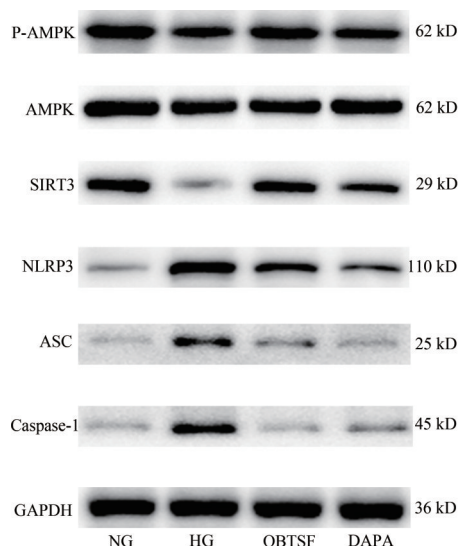


图 12 各组 HK2 细胞 SIRT3、AMPK、P-AMPK、NLRP3、ASC、Caspase-1 表达情况

Fig 12 Expression of SIRT3, AMPK, P-AMPK, NLRP3, ASC, and Caspase-1 of HK2 cells in each group

3 讨论

传统中医并无“糖尿病肾病”这一特定命名,现代中医研究学者将其纳入“肾劳”“消渴”“关格”等范畴进行探讨与治疗^[10]。现代中医在前人们的基础上持续发展与创新,促进了中医药理论的更新与进步。陈以平教授基于其丰富的临床实践,创立了芪蒺糖肾方,此方专为应对 DKD 后期常见的脾肾虚损类型而设^[11]。该方由黄芪、黄精、灵芝、山茱萸、牛蒡子、葛根等药材组成,旨在通过补益脾肾、调畅气血,达到治疗目的。先前研究已揭示,芪蒺糖肾方在减轻蛋白尿与保护 DKD 肾功能等方面展现出明显疗效^[9]。本研究通过细胞与动物实验证实了芪蒺糖肾方能有效抑制 NLRP3 炎症小体生成,改善 DKD 肾损伤,其机制可能涉及 AMPK/SIRT3 信号通路的调节。

NLRP3 炎症小体具有调控肾脏慢性炎症反应的功能,由 NLRP3、ASC 与 Caspase-1 等组件形成^[12]。NLRP3 炎症小体被激活后引发 Caspase-1 的活化,导致 Caspase-1 裂解,最终触发 GSDMD 的切割,推动细胞焦亡的进程,并加速 IL-1 β 和 IL-18 等炎症介质的成熟与释放^[13]。此外,Shahzad 等^[14]的临床研究发现,与没有蛋白尿的糖尿病患者和非糖尿病患者相比,患有蛋白尿的糖尿病患者的 NLRP3 炎症小体表达水平有所增加,且这种增加与蛋白尿的水平呈正相关。更深入的临床研究揭示,抑制糖尿病患者体内的 NLRP3 炎症小体的活化可延缓糖尿病肾病肾损伤的进展^[15]。因此,靶向干预 NLRP3 炎

症小体的生成有可能成为治疗 DKD 的新方向。在本次研究的体内实验中,与 CON 组相比,DKD 组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 浓度升高,肾组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达水平升高,使用芪蒺糖肾方进行治疗后,DKD 小鼠肾组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 的蛋白表达水平有了明显的降低,血清中 IL-1 β 与 IL-18 浓度也明显降低,高剂量组的疗效更好。以上结果提示芪蒺糖肾方可抑制 DKD 小鼠 NLRP3 炎症小体的激活,发挥保护肾脏的作用。体外实验发现,与 NG 组相比,HG 组 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达水平明显升高并且 NLRP3 平均荧光强度明显增强,经过治疗后,QBTSF 组 NLRP3、ASC、Caspase-1 的蛋白表达水平降低且 NLRP3 平均荧光强度降低。这也说明芪蒺糖肾方可能是通过抑制 NLRP3 炎症小体的形成改善高糖诱导的 HK2 细胞的损伤。

AMPK/SIRT3 通路在 DKD 的发展过程中扮演关键调控角色,该通路与 NLRP3 炎症小体的生成关系密切^[16]。作为细胞能量代谢的核心调控节点,AMPK 响应血糖变化、胰岛素抵抗与氧化压力水平,动态调控脂肪酸 β 氧化和糖异生过程间的平衡^[17]。除了在能量代谢过程中扮演中心角色外,AMPK 还参与到 NLRP3 炎症小体的激活机制中^[18]。Yang 等^[19]的研究发现,二甲双胍能通过促进 AMPK 磷酸化,抑制 NLRP3 炎症小体生成,从而减轻糖尿病心肌病所致损伤。此外,AMPK 能通过表观遗传机制增强 SIRT3 的转录活性。SIRT3 作为线粒体去乙酰化酶家族的核心组成部分,发挥着至关重要的作用,在维持线粒体功能稳定性方面具有核心意义。在高糖环境下,活性氧爆发与表观修饰的异常增加明显削弱了 SIRT3 的去乙酰化能力,进而造成线粒体膜电位失衡和抗氧化防御机制的瓦解,最终导致肾小管的结构损害^[20]。实验证据表明,SIRT3 的缺陷会促进糖尿病心肌病小鼠活性氧的积累,从而导致了 NLRP3 炎症小体的形成^[21]。AMPK/SIRT3 信号通路在调控 DKD 中 NLRP3 炎症小体的生成方面,扮演了重要角色。在本研究的体内实验中,与 CON 组相比,DKD 组小鼠肾组织中 P-AMPK/AMPK 以及 SIRT3 蛋白表达水平降低,使用芪蒺糖肾方进行治疗后,DKD 小鼠肾组织中 P-AMPK/AMPK 以及 SIRT3 蛋白表达水平升高。体外实验发现,与 NG 组相比,HG 组 P-AMPK/AMPK、SIRT3 蛋白表达水平和 SIRT3 平均荧光强度明显降低。经过治疗后,QBTSF 组 P-AMPK/AMPK、SIRT3 蛋白表达水平和 SIRT3 平均荧光强度明显

升高。以上结果提示芪莠糖肾方可以抑制STZ诱导DKD小鼠以及高糖诱导HK2细胞中NLRP3炎症小体的生成,这可能与促进AMPK/SIRT3通路的激活有关。本研究以分子、细胞及组织层面多角度剖析了芪莠糖肾方对DKD的影响机制,彰显了中药复方在多靶点与多途径整合调控方面的治疗效能,为中医药治疗DKD提供了新的实验基础。

综上所述,本研究经由体内及体外实验验证,揭示芪莠糖肾方可以抑制NLRP3炎症小体生成,对DKD肾损伤起到一定的改善作用,其机制可能涉及AMPK/SIRT3信号通路的激活,为芪莠糖肾方治疗DKD提供了支持性证据。然而,影响DKD进展的因素多样,芪莠糖肾方可能通过额外途径改善DKD,其具体机制仍需进一步探究。

作者贡献度说明:

徐睿:设计实验方案、操作实验、分析数据、撰写论文;李文诗、孙家乐、吴燕升、郭小平、王琳:提供研究思路、指导论文撰写与修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Gupta S, Dominguez M, Golestaneh L. Diabetic kidney disease: An update[J]. Med Clin North Am, 2023, 107(4): 689-705.
- 卢姚宏, 黄辰杰, 袁文葵, 等. 基于信号通路探讨糖尿病肾病的发病机制及中药干预研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(11): 287-299.
Lu YH, Huang CJ, Yuan WQ, et al. Explore pathogenesis of diabetic nephropathy and research progress of Chinese medicine intervention based on signal pathways [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2026, 32(11): 287-299.
- Shen S, Zhong H, Zhou X, et al. Advances in traditional Chinese medicine research in diabetic kidney disease treatment[J]. Pharm Biol, 2024, 62(1): 222-232.
- Wang Y, Sui Z, Wang M, et al. Natural products in attenuating renal inflammation *via* inhibiting the NLRP3 inflammasome in diabetic kidney disease[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1196016.
- Jin Q, Liu T, Qiao Y, et al. Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: Role of polyphenols[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1185317.
- Zhang H, Jiang Y, Song J, et al. Urinary exosomes exacerbate diabetic kidney disease by promoting NLRP3 inflammasome activation *via* the microRNA-516b-5p/SIRT3/AMPK pathway [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2025, 328(6): E911-E923.
- 张先闻, 陈以平, 盛凌黎, 等. “真实世界”陈氏糖肾方治疗IV~V期糖尿病肾脏疾病的疗效评价[J]. 中国中医药科技, 2017, 24(1): 1-3, 15.
Zhang XW, Chen YP, Sheng LL, et al. Real-world analysis of curative effect of Chen's Tangshen Fang in stage IV-V diabetic kidney disease [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2017, 24(1), 1-3, 15.
- 连松铭, 王琳, 张先闻, 等. 陈氏糖肾方结合西医常规疗法治疗IV期糖尿病肾病临床研究[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(5): 9-11.
Lian SM, Wang L, Zhang XW, et al. A prospective cohort study on "Chen's Tangshen Decoction" in the treatment of stage-IV diabetic nephropathy [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2010, 44(5): 9-11.
- 徐睿, 雍军, 郭小平, 等. 芪莠糖肾方调控Nrf2/Gpx4通路改善糖尿病肾病肾纤维化的机制研究[J]. 海南医科大学学报, 2026, 32(11): 845-853.
Xu R, Yong J, Guo XP, et al. Mechanism of Qibang Tangshen Formula improving renal fibrosis in diabetic nephropathy *via* regulating the Nrf2/Gpx4 pathway [J]. J Hainan Med Univ, 2026, 32(11): 845-853.
- 牟新, 刘超. 糖尿病中医治疗切入点的探讨与思考[J]. 实用医学杂志, 2024, 40(16): 2211-2218.
Mou X, Liu C. Discussion and reflection on the entry point of traditional Chinese medicine for treatment of diabetes [J]. J Pract Med, 2024, 40(16): 2211-2218.
- 杜晓妹, 王琳. 中医药治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(23): 2615-2619.
Du XM, Wang L. Study progression in the treatment of diabetic nephropathy with traditional Chinese medicine [J]. Mod J Integr Tradit Chin Western Med, 2020, 29(23): 2615-2619.
- Fan Q, Li R, Wei H, et al. Research progress of pyroptosis in diabetic kidney disease [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(13): 7130.
- Hang X, Ma J, Wei Y, et al. Renal microcirculation and mechanisms in diabetic kidney disease [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2025, 16: 1580608.
- Shahzad K, Fatima S, Khawaja H, et al. Podocyte-specific NLRP3 inflammasome activation promotes diabetic kidney disease [J]. Kidney Int, 2022, 102(4): 766-779.
- Shahzad K, Bock F, Dong W, et al. NLRP3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy [J]. Kidney Int, 2015, 87(1): 74-84.
- Liu Z, Liu H, Xiao L, et al. STC-1 ameliorates renal injury in diabetic nephropathy by inhibiting the expression of BNIP3 through the AMPK/SIRT3 pathway [J]. Lab Invest, 2019, 99(5): 684-697.

17 Qu L, Jiao B. The interplay between immune and metabolic pathways in kidney disease [J]. Cells, 2023, 12(12):1584.

18 Han Y, Tang S, Liu Y, et al. AMPK agonist alleviate renal tubulointerstitial fibrosis *via* activating mitophagy in high fat and streptozotocin induced diabetic mice [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 925.

19 Yang F, Qin Y, Wang Y, et al. Metformin inhibits the NLRP3 inflammasome *via* AMPK/mTOR-dependent effects in diabetic cardiomyopathy [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(5): 1010-1019.

20 Peng X, Ni H, Kuang B, et al. Sirtuin 3 in renal diseases and aging: From mechanisms to potential therapies [J]. Pharmacol Res, 2024, 206: 107261.

21 Song S, Ding Y, Dai G, et al. Sirtuin 3 deficiency exacerbates diabetic cardiomyopathy *via* necroptosis enhancement and NLRP3 activation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(2): 230-241.

[本文编辑] 陈思润