

基于CXCL12/CXCR4/STAT3信号通路探讨肾必宁颗粒对IgA肾病大鼠的肾脏保护作用及机制[△]

王旭^{1,2*},宋纯东^{1,2#},陈晨晨^{1,2},姜浩然^{1,2}(1.河南中医药大学第一附属医院儿科医院肾病紫癜二病区,郑州450003;2.河南中医药大学儿科医学院,郑州 450046)

中图分类号 R285;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)23-2912-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.23.05



摘要 目的 探讨肾必宁颗粒通过调控CXC型趋化因子配体12(CXCL12)/CXC型趋化因子受体4(CXCR4)/信号转导与转录激活因子3(STAT3)信号通路对免疫球蛋白A肾病(IgAN)大鼠的肾脏保护作用及机制。**方法** 将60只大鼠随机分为空白组($n=12$)与造模组($n=48$)。造模组大鼠采用牛血清白蛋白、四氯化碳联合脂多糖诱导IgAN模型并进行模型验证。最终共55只大鼠(空白组9只、造模组46只)纳入后续研究。将造模组大鼠随机分为模型组($n=10$)、醋酸泼尼松组[阳性对照组,6.25 mg/(kg·d), $n=12$]和肾必宁颗粒低、高剂量组[4.17、8.33 g/(kg·d), $n=12$]，每日灌胃给药/蒸馏水1次，连续4周。末次给药后，检测大鼠尿液及血清中生化指标，观察大鼠肾组织病理形态学改变，检测大鼠肾组织中IgA沉积以及CXCL12、CXCR4、STAT3 mRNA和CXCL12、CXCR4、STAT3、磷酸化STAT3(p-STAT3)蛋白表达情况，并检测肾组织中白细胞介素6(IL-6)水平。**结果** 与模型组比较，肾必宁颗粒低、高剂量组大鼠尿红细胞计数、24 h尿蛋白总量以及血尿素氮、血肌酐、丙氨酸氨基转移酶水平均显著降低($P<0.05$)，白蛋白水平均显著升高($P<0.05$)；肾组织病理损伤减轻，系膜区IgA沉积减少($P<0.05$)；肾组织中CXCL12、CXCR4、STAT3 mRNA及其蛋白表达水平，STAT3蛋白的磷酸化水平以及IL-6水平均显著降低($P<0.05$)。**结论** 肾必宁颗粒可能通过抑制CXCL12/CXCR4/STAT3信号通路活化，下调炎症因子IL-6表达，减轻肾脏炎症反应，进而改善肾组织病理损伤，发挥对IgAN大鼠的肾脏保护作用。

关键词 肾必宁颗粒；IgA肾病；趋化因子；CXCL12/CXCR4/STAT3信号通路；白细胞介素6

Exploration of the renal protective effect and mechanism of Shenbining granule on IgA nephropathy rats based on the CXCL12/CXCR4/STAT3 signaling pathway

WANG Xu^{1,2}, SONG Chundong^{1,2}, CHEN Chenchen^{1,2}, JIANG Haoran^{1,2} (1. Second Ward of Nephropathy Purpura, Pediatric Hospital, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China;2. School of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the renal protective effect and mechanism of Shenbining granule on IgA nephropathy (IgAN) rats by regulating the CXC chemokine motif ligand 12 (CXCL12)/CXC chemokine receptor 4 (CXCR4)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway. **METHODS** A total of 60 rats were randomly assigned into blank group ($n=12$) and modeling group ($n=48$). IgAN model of modeling group was induced by using bovine serum albumin, carbon tetrachloride and lipopolysaccharide, followed by model validation. Ultimately, a total of 55 rats (9 in the blank group, 46 in the modeling group) were included in the subsequent study. The rats in the modeling group were randomly divided into model group ($n=10$), prednisone acetate group [positive control group, 6.25 mg/(kg·d), $n=12$], Shenbining granule low- and high-dose groups [4.17, 8.33 g/(kg·d), $n=12$]. They were given relevant medicine/distilled water intragastrically, once a day, for 4 consecutive weeks. After the last medication, biochemical indicators in the urine and serum of rats were measured, and pathological morphological changes in the renal tissues of rats were observed. IgA deposition in the renal tissues, as well as the mRNA expression levels of CXCL12, CXCR4 and STAT3, and the protein expression levels of CXCL12, CXCR4, STAT3 and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) were detected. Additionally, the level of interleukin-6 (IL-6) in the renal tissue was measured. **RESULTS** Compared with the model group, the low-dose and high-dose Shenbining granule groups showed significantly decreased urinary red blood cell count, 24 h total urinary protein, blood urea nitrogen, serum creatinine, and

△基金项目 国家自然科学基金面上项目(No.82074493);河南省卫生健康委员会国家中医药传承创新中心联合共建科研专项(No.2024ZXZX1019);河南省中医药科学研究专项重点课题(No.2024ZY1002);河南省中医药科学研究专项课题(No.2023ZYD02)

***第一作者** 博士研究生。研究方向：中医药防治小儿肾病及风湿免疫性疾病。E-mail: wangxu980912@163.com

#**通信作者** 教授,主任医师,博士生导师,博士。研究方向：中医药防治小儿肾病及风湿免疫性疾病。E-mail: scd670918@126.com

alanine amino-transferase, along with increased Alb levels ($P<0.05$). Pathological damage in the renal tissues was alleviated, with reduced IgA deposition in the mesangial region ($P<0.05$) ; protein and mRNA expressions of CXCL12, CXCR4 and STAT3, as well as phosphorylation level of STAT3 protein and the IL-6 level, were significantly decreased in renal tissue ($P<0.05$).

CONCLUSIONS Shenbining granule may exert its renal protective effects in IgAN rats by inhibiting the activation of the CXCL12/CXCR4/STAT3 signaling pathway, downregulating the expression of inflammatory factors such as IL-6, alleviating renal inflammation, and thereby improving renal pathological damage.

KEYWORDS Shenbining granule; IgA nephropathy; chemokine; CXCL12/CXCR4/STAT3 signaling pathway; interleukin-6

免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) 肾病 (IgA nephropathy, IgAN) 是全球范围内最常见的原发性肾小球疾病, 其临床表型复杂多样, 可表现为无症状尿检异常、快速进行性肾小球肾炎及肾病综合征等^[1]。流行病学数据显示, 该病在亚太地区的患病率居首位^[1]。我国肾活检病理数据结果显示, IgAN 占原发性肾小球疾病的 45%~55%, 是导致终末期肾病最常见的原因^[2]。目前, 临床针对 IgAN 的常规治疗方案以支持治疗为基础, 常联合使用糖皮质激素或免疫抑制剂^[3]。然而, 长期使用上述药物存在感染、代谢紊乱等风险, 导致相当一部分患者在接受治疗后仍会进展至终末期肾病^[4]。因此, 探寻一种有效、安全的 IgAN 治疗方法很有必要。

当前普遍认可的“多重打击”学说揭示了 IgAN 的复杂发病机制。趋化因子作为调控炎症细胞募集、调节免疫应答、维持细胞稳态及促进组织修复的核心因子, 其作用贯穿疾病发生发展的多个环节^[5]。近年研究发现, CXC 型趋化因子配体 12 (CXC chemokine motif ligand 12, CXCL12) 与其特异性受体 CXC 型趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4, CXCR4) 所构成的信号通路, 不仅能介导炎症细胞迁移, 还可通过激活信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3), 驱动持续的炎症级联反应^[6]。另有研究表明, CXCL12/CXCR4/STAT3 信号通路的异常活化是推动 IgAN 持续进展的关键因素之一^[7]。

肾必宁颗粒是国医大师丁樱教授拟定的经验方, 现已作为河南中医药大学第一附属医院的医疗机构制剂 [备案制号:豫药制字 Z20120721(郑)] 被广泛应用于临床。该方具有益气养阴、清热化瘀的功效, 契合 IgAN “气阴两虚、湿热瘀血”的核心病机。本课题组前期的实验研究初步证实, 肾必宁颗粒能改善肾小球滤过屏障功能, 减少系膜区 IgA 沉积^[8], 但其具体作用机制尚未完全明确。因此, 本研究在既往工作基础上, 通过构建 IgAN 大鼠模型, 进一步探讨肾必宁颗粒对 CXCL12/CXCR4/STAT3 信号通路的调控作用及其介导的肾脏保护机制, 以期为该复方治疗 IgAN 提供更深入的实验依据和科学阐释。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括 BA-400 型全自动特定蛋白仪(西班牙 BioSystems 公司), URIT-1600 型全自动尿液分析仪(桂林优利特医疗电子有限公司), BS-2000 型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司), RT-6100 型酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司), CFX Connect 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司), RM2016 型病理切片机(德国 Leica 公司), Eclipse E100 型正置光学显微镜、Eclipse C1 型正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 主要药品与试剂

肾必宁颗粒(批号 0064771793, 规格 10 g/包)由河南中医药大学第一附属医院提供; 醋酸泼尼松片(批号 2211192, 规格 5 mg)购自安徽金太阳生化药业有限公司; 兔源 CXCL12 抗体(批号 BA06247078)、兔源 CXCR4 抗体(批号 BJ03116963)均购自北京博奥森生物技术有限公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号 CR2406301)、苏木精-伊红(HE)高清恒染试剂盒(批号 CR2406070)、DAPI 染色试剂(批号 2406F002)、鼠源 STAT3 抗体(批号 AC240424001)、兔源磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 抗体(批号 AC240722002)、兔源 β -肌动蛋白(β -actin) 抗体(批号 AC240521001)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 AC2406086061)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(批号 AC2405070522)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 鼠源 IgA 多克隆抗体(批号 PAA546Ra01)购自武汉云克隆科技股份有限公司; 荧光素 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 SA00003-2)购自武汉三鹰生物技术有限公司; 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号 88-50625)购自赛默飞生物制药(杭州)有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为 SPF 级雄性 SD 大鼠, 共 60 只, 6 周龄, 体重 180~200 g, 购于河南省实验动物中心[动物生产许可证号为 SCXK(豫)2022-0001]。购入后, 将动物饲养于河南中医药大学实验动物中心[动物使用许可证号为 SYXK(豫)2021-0015], 3 只/笼。饲养环境温度

为(20~25) °C、相对湿度为50%~60%、昼12 h/夜12 h循环,饲养期间大鼠自由获取常规灭菌饲料及无菌水。本实验由河南中医药大学实验动物伦理委员会审核并批准(批准编号为IACUC202306014),所有实验操作均遵循动物实验“3R”原则。

2 方法

2.1 IgAN大鼠模型构建与实验分组

先将60只大鼠适应性饲养7 d(其间大鼠状态及随机尿蛋白检测结果均正常),然后采用随机数字表法将其分为空白组($n=12$)和造模组($n=48$)。造模组大鼠参考文献[9]方法建立IgAN模型:隔日灌胃牛血清白蛋白溶液(100 g/L)800 mg/kg,持续12周;每周单次皮下注射四氯化碳与蓖麻油的混合液(1:3,V/V)0.4 mL,持续12周;实验第6、8、10周分别单次尾静脉推注脂多糖溶液(0.25 g/L)0.2 mL。空白组大鼠同期予以等体积蒸馏水灌胃、等体积蓖麻油皮下注射及等体积0.9%氯化钠溶液尾静脉注射。造模结束前24 h,对大鼠进行限饲(自由饮水),使用代谢笼收集其24 h尿液,并检测其24 h尿蛋白总量(24 h total urinary protein, 24 h-UTP)。随后随机处死空白组及造模组大鼠各2只,取肾组织行HE染色及免疫荧光检测,方法见“2.4”“2.5”项下。结果显示,造模组大鼠肾组织系膜区可见明显IgA沉积,并伴系膜基质增生;肾小管上皮细胞变性及局灶性坏死,间质见淋巴细胞浸润。上述结果符合IgAN典型病理特征,表明IgAN大鼠模型成功建立^[10]。

剔除用于模型验证的4只大鼠及实验过程中死亡的1只大鼠(空白组)后,将剩余55只大鼠(空白组9只、造模组46只)纳入后续实验。将造模成功的大鼠随机分为模型组($n=10$)、醋酸泼尼松组(阳性对照组, $n=12$)和肾必宁颗粒低、高剂量组($n=12$)。根据人与大鼠体表面积换算,最终确定大鼠的给药剂量如下:肾必宁颗粒低、高剂量分别为4.17、8.33 g/(kg·d)(分别为1、2倍临床等效剂量),醋酸泼尼松为6.25 mg/(kg·d)(临床等效剂量)。各组药物均以蒸馏水为溶剂配制。空白组和模型组大鼠灌胃蒸馏水。药液或蒸馏水的灌胃体积均为5 mL/kg,每日灌胃1次,连续4周。

2.2 标本采集与处理

末次给药后,使大鼠禁食不禁水24 h,收集其24 h尿液。将尿液充分混匀后取10 mL,以3 000 r/min离心15 min,收集上清液,置于-20 °C冰箱中保存,备用。尿液采集完毕后,将大鼠麻醉,开腹暴露其腹主动脉并穿刺采血5~8 mL。将血样在室温下静置30~60 min,然后在4 °C下以3 000 r/min离心15 min,分离血清,置于-20 °C冰箱中保存,备用。采血后夹闭大鼠腹主动脉,迅速剥离其双侧肾脏包膜,取出肾脏,用4 °C生理盐水冲洗。将右肾沿冠状面切开,置于通用固定液中常温

固定保存;将左肾经肾门横切后沿冠状面剖开,分装于无酶冻存管中,以液氮速冻后转至-80 °C冰箱中保存,备用。

2.3 尿液及血清中生化指标检测

取“2.2”项下尿液及血清,采用全自动特定蛋白仪测定尿液中24 h-UTP,采用全自动尿液分析仪检测尿液中红细胞计数,采用全自动生化分析仪检测血清中血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(serum creatinine, Scr)、白蛋白(albumin, Alb)及丙氨酸氨基转移酶(alanine amino-transferase, ALT)水平。

2.4 肾组织病理形态学观察

采用HE染色法观察。取“2.2”项下固定后的肾组织,经修剪、梯度乙醇脱水、石蜡包埋及切片(厚4 μm)后,行常规HE染色,封片。将切片置于正置光学显微镜下,观察肾小球、肾小管及间质区域的病理变化。

2.5 肾小球系膜区IgA沉积检测

采用免疫荧光法检测。取“2.4”项下肾组织石蜡切片(每组3个样本),经脱蜡、复水及抗原修复后,进行封闭。随后滴加IgA一抗(稀释比例为1:10),于4 °C下孵育过夜;采用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,滴加IgG二抗(稀释比例为1:200),室温避光孵育50 min;采用PBS再次充分漂洗后,滴加自发荧光淬灭剂,以抗淬灭封片剂封固。将切片置于正置荧光显微镜下观察,绿色荧光表示阳性表达。采用Image J软件对荧光强度进行定量分析,计算平均光密度值,以此来定量评估IgA的沉积情况。

2.6 肾组织中CXCL12、CXCR4、STAT3 mRNA表达检测

采用RT-qPCR法检测。取“2.2”项下-80 °C保存的大鼠(每组3只)肾组织,采用Trizol法提取组织中总RNA,检测其纯度和浓度后,将RNA反转录合成cDNA,并以cDNA为模板进行qPCR扩增。反应条件为:95 °C预变性30 s;95 °C变性15 s,60 °C退火/延伸30 s,共40个循环。反应体系为:SYBR Green qPCR Master Mix 7.5 μL,上、下游引物各1.5 μL,cDNA模板2.0 μL,无酶水4.0 μL。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因的mRNA相对表达量。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司提供。引物序列及产物扩增长度见表1。

2.7 肾组织中CXCL12、CXCR4、STAT3、p-STAT3蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.2”项下-80 °C保存的大鼠(每组3只)肾组织,粉碎匀浆后取上清液,采用BCA法测定组织中总蛋白浓度。将蛋白高温变性后,上样进行SDS-PAGE电泳(恒压200 V,电泳时间30 min)分离,随后转膜(恒流300 mA,转膜时间30 min),封闭。

表1 引物序列及产物扩增长度

引物名称	引物序列	扩增长度/bp
CXCL12	5'-AGTACGGTAAGCCAGTCAGC-3' 3'-GGGCACAGTTGGAGTGTGAG-5'	115
CXCR4	5'-AGACTATGACTCCAACAAGGAACCC-3' 3'-AAATAGATGGTGGCAGGAAGAT-5'	81
STAT3	5'-CAGTCTCGTCCACCAACAA-3' 3'-TCATTCAAAGGCCAAGAT-5'	215
GAPDH	5'-CTGGAGAACCTGCCAAGTATG-3' 3'-GGTGGAAAGATGGGAGTTGCT-5'	138

加入 CXCL12、CXCR4、STAT3、p-STAT3、 β -actin一抗(稀释比例均为1:1 000),在4℃下孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例为1:3 000),在室温下孵育30 min。以ECL发光液显影,利用化学发光成像系统成像,应用Image J软件分析条带灰度值。以目标蛋白与内参(β -actin)蛋白条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达水平,以p-STAT3与STAT3蛋白条带灰度值的比值表示STAT3蛋白的磷酸化水平。

2.8 肾组织中IL-6水平检测

采用ELISA法检测。取“2.2”项下-80℃保存的大鼠肾组织,解冻后制备组织匀浆,离心收集上清液,按照试剂盒说明书操作,采用酶标仪检测肾组织中IL-6水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行数据的统计分析,采用GraphPad Prism软件绘图。满足正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;方差齐时组间两两比较采用LSD检验,方差不齐时组间两两比较采用Dunnett's T3检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 肾必宁颗粒对IgAN大鼠尿液指标的影响

与空白组比较,模型组大鼠24 h-UTP、尿红细胞计数均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠尿液中上述指标均显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠尿液中24 h-UTP和红细胞计数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h-UTP/mg	尿红细胞计数/(个/ μL)
空白组	9	6.20±1.11	7.26±0.95
模型组	10	17.46±2.29 ^a	18.07±2.11 ^a
醋酸泼尼松组	12	10.88±1.44 ^b	11.04±1.39 ^b
肾必宁颗粒低剂量组	12	11.31±1.76 ^b	11.18±1.12 ^b
肾必宁颗粒高剂量组	12	10.74±2.08 ^b	10.89±1.45 ^b

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

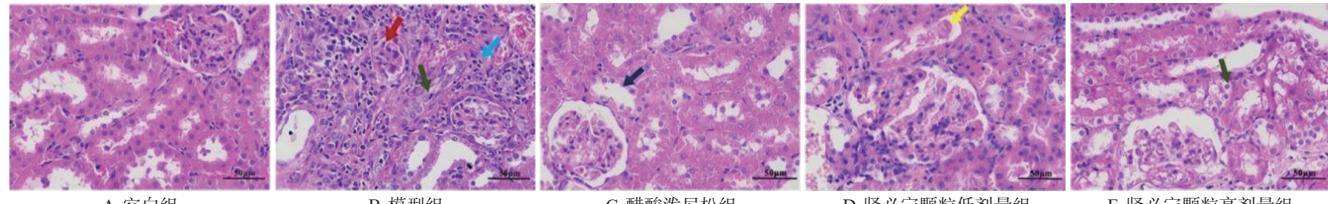


图1 各组大鼠肾组织病理学变化观察结果(HE染色)

3.2 肾必宁颗粒对IgAN大鼠血清生化指标的影响

与空白组比较,模型组大鼠血清中BUN、Scr、ALT水平均显著升高($P<0.05$),Alb水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠血清中BUN、Scr、ALT水平均显著降低($P<0.05$),Alb水平均显著升高($P<0.05$);并且,肾必宁颗粒高剂量组大鼠血清中BUN水平显著低于肾必宁颗粒低剂量组($P<0.05$),Scr水平显著低于醋酸泼尼松组和肾必宁颗粒低剂量组($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组大鼠血清中BUN、Scr、Alb、ALT水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BUN/(mmol/L)	Scr/($\mu\text{mol/L}$)	ALT/(U/L)	Alb/(g/L)
空白组	9	5.01±0.31	53.87±5.01	33.10±2.59	33.19±2.13
模型组	10	7.90±0.41 ^a	79.22±3.47 ^a	54.16±4.14 ^a	22.16±1.07 ^a
醋酸泼尼松组	12	6.03±0.62 ^b	64.86±4.47 ^b	43.46±2.43 ^b	26.40±1.41 ^b
肾必宁颗粒低剂量组	12	6.34±0.51 ^b	65.71±2.77 ^b	43.14±4.25 ^b	26.39±2.25 ^b
肾必宁颗粒高剂量组	12	5.93±0.34 ^{bcd}	61.67±3.55 ^{bcd}	44.23±2.98 ^b	26.53±1.45 ^b

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与肾必宁颗粒低剂量组比较, $P<0.05$;d:与醋酸泼尼松组比较, $P<0.05$ 。

3.3 肾必宁颗粒对IgAN大鼠肾组织病理形态学的影响

空白组大鼠肾小球结构完整,肾小管上皮细胞排列规整。模型组大鼠肾组织可见肾小球系膜区基质增生,肾小管上皮细胞广泛变性伴局灶性坏死。醋酸泼尼松组大鼠仅见局限性肾小管扩张。肾必宁颗粒低剂量组大鼠肾小管腔内可见嗜酸性物质沉积,伴有间质淋巴细胞浸润。肾必宁颗粒高剂量组大鼠肾小管上皮细胞肿胀及空泡变程度较模型组显著减轻。结果见图1。

3.4 肾必宁颗粒对IgAN大鼠肾小球系膜区IgA沉积的影响

与空白组大鼠肾小球系膜区IgA光密度值[0.93±0.20,n=3(下同)]比较,模型组大鼠肾小球系膜区IgA光密度值(1.93±0.07)显著升高($P<0.05$);与模型组比较,醋酸泼尼松组和肾必宁颗粒低、高剂量组大鼠肾小球系膜区IgA光密度值(分别为1.20±0.07、1.25±0.26、1.17±0.05)均显著降低($P<0.05$)。结果见图2。

3.5 肾必宁颗粒对IgAN大鼠肾组织中CXCL12、CXCR4、STAT3 mRNA表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠肾组织中CXCL12、CXCR4、STAT3 mRNA的相对表达量均显著升高($P<$

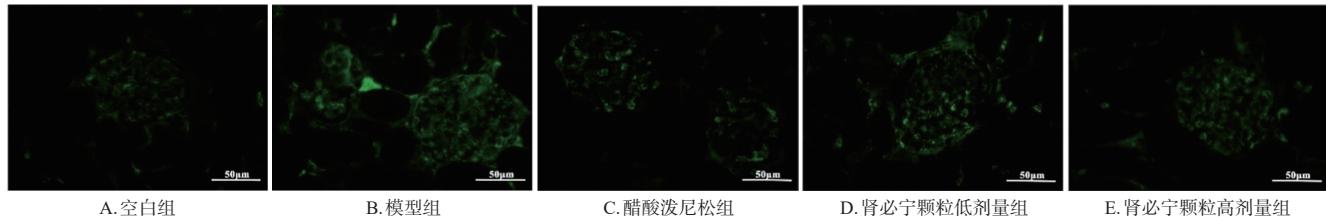


图2 各组大鼠肾小球系膜区 IgA 沉积检测结果(免疫荧光法)

0.05)。与模型组比较,各给药组大鼠肾组织中 CXCL12、CXCR4、STAT3 mRNA 的相对表达量均显著降低($P<0.05$),且肾必宁颗粒高剂量组大鼠肾组织中 CXCR4 mRNA 的相对表达量显著低于肾必宁颗粒低剂量组($P<0.05$)。结果见表4。

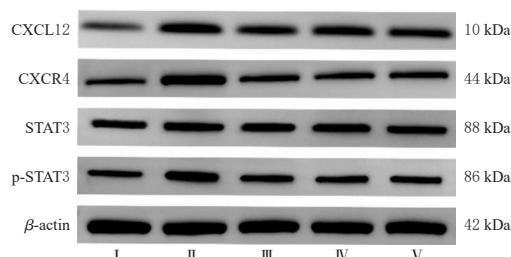
表4 各组大鼠肾组织中 CXCL12、CXCR4、STAT3 mRNA 的相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CXCL12	CXCR4	STAT3
空白组	1.00±0.10	1.08±0.07	1.00±0.11
模型组	2.68±0.10 ^a	2.96±0.04 ^a	3.55±0.30 ^a
醋酸泼尼松组	1.65±0.22 ^b	1.61±0.03 ^b	2.17±0.05 ^b
肾必宁颗粒低剂量组	1.82±0.12 ^b	1.68±0.06 ^b	2.42±0.16 ^b
肾必宁颗粒高剂量组	1.66±0.19 ^b	1.51±0.07 ^b	2.24±0.07 ^b

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与肾必宁颗粒低剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.6 肾必宁颗粒对 IgAN 大鼠肾组织中 CXCL12、CXCR4、STAT3、p-STAT3 蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠肾组织中 CXCL12、CXCR4 的蛋白表达水平及 STAT3 蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠肾组织中上述指标水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图3、表5。



I : 空白组; II : 模型组; III : 醋酸泼尼松组; IV : 肾必宁颗粒低剂量组; V : 肾必宁颗粒高剂量组。

图3 各组大鼠肾组织中 CXCL12、CXCR4、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠肾组织中 CXCL12、CXCR4、STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CXCL12/ β -actin	CXCR4/ β -actin	STAT3/ β -actin	p-STAT3/ β -actin	p-STAT3/STAT3
空白组	0.28±0.01	0.23±0.02	0.71±0.01	0.26±0.01	0.36±0.01
模型组	0.65±0.01 ^a	0.74±0.01 ^a	0.72±0.01	0.83±0.02 ^a	1.16±0.02 ^a
醋酸泼尼松组	0.51±0.01 ^b	0.44±0.01 ^b	0.71±0.01	0.45±0.01 ^b	0.63±0.01 ^b
肾必宁颗粒低剂量组	0.53±0.01 ^b	0.45±0.01 ^b	0.72±0.01	0.46±0.01 ^b	0.64±0.01 ^b
肾必宁颗粒高剂量组	0.51±0.02 ^b	0.46±0.01 ^b	0.71±0.01	0.46±0.01 ^b	0.64±0.01 ^b

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.7 肾必宁颗粒对 IgAN 大鼠肾组织中 IL-6 水平的影响

与空白组大鼠肾组织中 IL-6 水平[(1.49±0.22) ng/mL, $n=9$]比较,模型组大鼠肾组织中 IL-6 水平[(3.16±0.30) ng/mL, $n=10$]显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,醋酸泼尼松组和肾必宁颗粒低、高剂量组大鼠肾组织中 IL-6 水平[分别为(1.69±0.28)、(1.85±0.28)、(1.72±0.25) ng/mL, n 均为 12]均显著降低($P<0.05$)。

4 讨论

IgAN 的典型临床表现为血尿、蛋白尿和水肿,其特征性病理改变为肾小球系膜细胞增生、系膜基质增多,并伴有 IgA 免疫复合物的异常沉积^[1]。本研究结果显示,与空白组比较,模型组大鼠的尿红细胞计数、24 h-UTP 以及 BUN、Scr 水平均显著升高,肾组织系膜基质增多,肾小球系膜区存在明显的 IgA 沉积,表明 IgAN 大鼠模型构建成功。在临床治疗方面,支持治疗联合糖皮质激素是目前指南推荐用于降低活动性 IgAN 患者蛋白尿水平、延缓肾功能进展的重要策略^[3]。因此,本研究选用临床常用糖皮质激素醋酸泼尼松作为阳性对照药物,来评估肾必宁颗粒在 IgAN 治疗中的相对药效。

中医学将 IgAN 归于“尿血”“尿浊”“肾风”等范畴,其病机多责之脾肾气阴两虚。气虚失摄,精微不固,则见蛋白尿;阴虚火旺,灼伤肾络,迫血妄行,则见血尿;肾失气化,水湿内停,泛溢肌肤,乃发为水肿。若久病入络,常致湿热与瘀血互结,痹阻肾络,损伤肾元,终致“虚、热、湿、瘀”相互交织之证,形成本虚标实、缠绵难愈的复杂病机。肾必宁颗粒以黄芪为君,补气健脾、利水消肿、固表御邪;臣以菟丝子益肾填精、生地滋阴凉血;佐以白花蛇舌草清热解毒利湿,水蛭破血逐瘀通络,砂仁化湿醒脾;甘草为使,调和诸药兼益气解毒。诸药合用,共奏“益气养阴固本、清热利湿祛邪、活血化瘀通络”的功效。本研究发现,肾必宁颗粒能显著降低 IgAN 大鼠的尿红细胞计数、24 h-UTP 以及 BUN、Scr、ALT 水平,提高 Alb 水平,减轻肾小球系膜基质增生,减少系膜区 IgA 沉积,表明该复方可有效改善 IgAN 大鼠肾损伤。

近年来,趋化因子介导的炎症反应在慢性肾脏病中的重要性逐渐引起关注。其中 CXCL12/CXCR4 信号通路作为关键调控通路,在多种肾脏疾病的发生发展中扮

演着重要角色^[11-12]。CXCL12是CXC趋化因子家族中被研究得最为深入和广泛的稳态趋化因子,对肾脏发育,特别是肾血管形成具有重要调控作用^[13]。CXCR4是CXCL12的经典受体,在生理状态下,其与CXCL12结合后可促进内皮细胞增殖,维持肾脏局部微环境稳态^[14];在病理状态下,其与CXCL12结合后可触发G蛋白解离为G α 亚基和G $\beta\gamma$ 亚基,进而激活转录因子STAT3并诱导其磷酸化,而磷酸化的STAT3进入细胞核后可调控多种炎症相关基因的转录^[6,15-16]。本研究结果显示,与空白组比较,模型组大鼠肾组织中CXCL12、CXCR4、STAT3 mRNA的相对表达量以及CXCL12、CXCR4蛋白的表达水平和STAT3蛋白的磷酸化水平升高;经低、高剂量肾必宁颗粒干预后,IgAN大鼠肾组织中上述指标均显著降低,这提示肾必宁颗粒对大鼠肾脏的保护作用可能与调控CXCL12/CXCR4/STAT3信号通路有关。

IL-6作为参与炎症反应与免疫应答调控的关键细胞因子,能够通过促进B细胞分化,诱导机体产生大量免疫球蛋白,而此类免疫球蛋白可形成循环免疫复合物并沉积于肾小球系膜区,引发肾脏损伤^[17]。研究表明,IL-6的表达高低与CXCL12/CXCR4/STAT3信号通路紧密相关^[18]。在该通路中,p-STAT3发生核转位后,可直接结合IL-6基因启动子区域的STAT3响应元件,从而增强IL-6的转录活性^[18];同时IL-6又能通过IL-6R/gp130复合物进一步诱导STAT3磷酸化,形成正反馈通路,增强并维持炎症信号的活化^[19]。本研究结果显示,与空白组比较,模型组大鼠肾组织中IL-6水平显著升高;经低、高剂量肾必宁颗粒干预后,IgAN大鼠肾组织中IL-6水平显著降低,这提示肾必宁颗粒可能通过降低炎症因子IL-6的水平来改善大鼠肾脏损伤。

综上所述,肾必宁颗粒可能通过抑制CXCL12/CXCR4/STAT3信号通路活化,下调炎症因子IL-6表达,减轻肾脏炎症反应,进而改善肾组织病理损伤,发挥对IgAN大鼠的肾脏保护作用。然而,本研究仅对该信号通路的关键节点蛋白进行了验证,其上、下游调控网络及其他潜在关联因子还有待深入探索。

参考文献

- [1] STAMELOU E, SEIKRIT C, TANG S C W, et al. IgA nephropathy[J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9: 67.
- [2] ZHANG Z, ZHANG Y M, ZHANG H. IgA nephropathy: a Chinese perspective[J]. Glomerular Dis, 2021, 2(1) : 30-41.
- [3] ROVIN B H, ADLER S G, BARRATT J, et al. KDIGO 2021 clinical practice guideline for the management of glomerular diseases[J]. Kidney Int, 2021, 100 (4) : S1-S276.
- [4] 李正子,马特安. IgAN治疗研究进展[J]. 临床医学进展, 2023, 13(7):11080-11087.
- [5] BIYANI S, PATIL A, SWAMI V. The influence of SDF-1 (CXCL12) gene in health and disease: a review of literature[J]. Biophys Rev, 2024, 17(1):127-138.
- [6] MA Z L, ZHOU F X, JIN H, et al. Crosstalk between CXCL12/CXCR4/ACKR3 and the STAT3 pathway[J]. Cells, 2024, 13(12):1027.
- [7] CHEN X Z, WANG T T, CHEN L, et al. Cross-species single-cell analysis uncovers the immunopathological mechanisms associated with IgA nephropathy progression [J]. JCI Insight, 2024, 9(9):e173651.
- [8] 姜浩然,宋纯东,段凤阳,等. 基于SphK1/S1PR2通路探讨肾必宁颗粒对IgA肾病大鼠肾组织的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(11):1246-1252.
- [9] 王宗隅,范琦强,周芸. IgA肾病实验动物模型的研究进展[J]. 中华肾脏病杂志, 2021, 37(12):1020-1024.
- [10] 王宗隅. 中介素对IgA肾病大鼠微血管损伤及肾脏纤维化的影响[D]. 太原:山西医科大学, 2022.
- [11] SAYYED S G, HÄGELE H, KULKARNI O P, et al. Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes[J]. Diabetologia, 2009, 52(11) : 2445-2454.
- [12] LIAO X F, PIRAPAKARAN T, LUO X M. Chemokines and chemokine receptors in the development of lupus nephritis[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016:6012715.
- [13] SONG A N, JIANG A N, XIONG W, et al. The role of CXCL12 in kidney diseases: a friend or foe? [J]. Kidney Dis (Basel), 2021, 7(3):176-185.
- [14] TAKABATAKE Y, SUGIYAMA T, KOHARA H, et al. The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis is essential for the development of renal vasculature[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(8):1714-1723.
- [15] PACE J, PALADUGU P, DAS B, et al. Targeting STAT3 signaling in kidney disease[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316(6):F1151-F1161.
- [16] 张文娟,刘畅晴,王鑫,等. 鞘内给予外源性头蛋白对缓解神经病理性疼痛的作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2021, 46(7):673-679.
- [17] 白雅雯,麻春杰. 炎症因子在IgA肾病中的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(3):63-68.
- [18] DAMASCENO L E A, PRADO D S, VERAS F P, et al. PKM2 promotes Th17 cell differentiation and autoimmune inflammation by fine-tuning STAT3 activation[J]. J Exp Med, 2020, 217(10):e20190613.
- [19] CHANG Q, BOURNAZOU E, SANSONE P, et al. The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis[J]. Neoplasia, 2013, 15(7):848-862.

(收稿日期:2025-08-01 修回日期:2025-11-09)

(编辑:林 静)