

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.13.010

益肾通络方调控 BNIP3 介导的线粒体自噬对膜性
肾病大鼠 Th1/Th2 失衡的机制*郑金梅,王新爱,刘 照,高 卉,魏晓娜[△]
河北省中医院肾病二科,河北石家庄 050000

摘 要:目的 探讨益肾通络方调控腺病毒 E1B 19kD 相互作用蛋白 3(BINP3)介导的线粒体自噬对膜性肾病(MN)大鼠 Th1/Th2 失衡的机制。方法 将 40 只大鼠随机分为空白对照组(Control 组)、MN 大鼠模型组(MN 组)、MN 大鼠模型给予益肾通络方干预组(YSTLF 组)和 MN 大鼠给予盐酸贝那普利片干预组(YSB-NPLP 组),每组 10 只。检测各组 24 h 尿蛋白定量(24 h UTP)。采用全自动生化分析仪检测各组大鼠清蛋白(ALB)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平。采用酶联免疫吸附试验检测血清中 Th1 相关细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素(IL)-2 和 Th2 相关细胞因子 IL-6、IL-4 水平。采用苏木素-伊红(HE)染色、马松三色(Masson)染色观察肾脏病理学变化。采用透射电镜检测肾组织超微结构。采用免疫荧光染色检测肾小球中免疫球蛋白 G(IgG)表达水平;采用蛋白质印迹法检测肾组织中微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3(LC3)、Beclin-1、BNIP3、低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)蛋白表达水平。结果 与 Control 组相比,MN 组大鼠 24 h UTP、IgG 相对沉积荧光强度及血清 IL-6、IL-4 水平均明显升高($P < 0.05$),血清 ALB、IFN- γ 、IL-2 水平及肾组织中 LC3 II/LC3 I 比值及 Beclin-1、BNIP3、HIF-1 α 蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$);与 MN 组相比,YSTLF 组和 YSBNPLP 组大鼠 24 h UTP、IgG 相对沉积荧光强度及血清 IL-6、IL-4 水平均明显降低($P < 0.05$),血清 ALB、IFN- γ 、IL-2 水平及肾组织中 LC3 II/LC3 I 比值及 Beclin-1、BNIP3、HIF-1 α 蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$)。结论 益肾通络方可通过促进 BNIP3 表达增强线粒体自噬,从而调控 MN 大鼠 Th1/Th2 免疫平衡。

关键词:益肾通络方; BNIP3; 线粒体自噬; 膜性肾病; Th1/Th2 免疫平衡

中图法分类号:R692

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)13-1781-06

**Mechanism of Yishen Tongluo recipe in regulating Th1/Th2 imbalance in
membranous nephropathy rats via BNIP3-mediated mitophagy***ZHENG Jinmei, WANG Xin'ai, LIU Zhao, GAO Hui, WEI Xiaona[△]Department of Nephrology II, Hebei Provincial Hospital of Traditional
Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei 050000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of regulating adenovirus E1B 19kD interacting protein 3 (BINP3)-mediated mitochondrial autophagy by Yishen Tongluo recipe on Th1/Th2 imbalance in membranous nephropathy (MN) rats. **Methods** Forty rats were randomly divided into a blank control group (Control group), a MN rat model group (MN group), a MN rat model group with Yishen Tongluo recipe intervention (YSTLF group) and a MN rat group with Benadryl Hydrochloride tablets intervention (YSBNPLP group), with 10 rats in each group. The 24 h urine protein quantification (24 h UTP) was detected in each group. The levels of albumin (ALB), serum creatinine (Scr) and urea nitrogen (BUN) were detected by automatic biochemical analyzer in each group. Serum levels of Th1-related cytokines interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-2 and Th2-related cytokines IL-6 and IL-4 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson's trichrome (Masson) staining were used to observe renal pathological changes. Transmission electron microscopy was used to detect the ultrastructure of renal tissue. Immunofluorescence staining was used to detect the expression level of immunoglobulin G (IgG) in the glomeruli; Western blotting was used to detect the expression levels of microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 (LC3), Beclin-1, BNIP3 hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in renal tissues. **Results** Compared with the control group, 24 h UTP, relative immunofluorescence intensity of IgG deposition and serum levels of IL-6 and IL-4 in the MN group increased significantly ($P < 0.05$), while serum ALB, IFN- γ , IL-2 levels and LC3 II/LC3 I ratio and Beclin-1, BNIP3, HIF-1 α protein expression levels were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the MN group, YSTLF group and YSBNPLP group rats 24 h UTP, IgG relative deposition fluorescence intensity and serum IL-6, IL-4 levels were significantly decreased ($P < 0.05$), serum ALB, IFN- γ , IL-2 levels and LC3 II/LC3 I ratio and Beclin-1, BNIP3, HIF-1 α protein expression levels were significantly increased ($P < 0.05$).

* 基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(2021040)。

作者简介:郑金梅,女,主治医师,主要从事中西医结合科肾病方向的研究。 [△] 通信作者, E-mail:907206442@qq.com。

LC3 I ratio as well as Beclin-1, BNIP3 and HIF-1 α protein expression levels in renal tissues decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the MN group, 24 h UTP, relative immunofluorescence intensity of IgG deposition and serum levels of IL-6 and IL-4 in the YSTLF group and the YSBNPLP group decreased significantly ($P < 0.05$), while serum ALB, IFN- γ , IL-2 levels and LC3 II / LC3 I ratio as well as Beclin-1, BNIP3 and HIF-1 α protein expression levels in renal tissues increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Yishen Tongluo recipe can enhance mitochondrial autophagy by promoting the expression of BNIP3, thus regulating the Th1/Th2 immune balance in MN rats.

Key words: Yishen Tongluo recipe; BNIP3; mitochondrial autophagy; membranous nephropathy; Th1/Th2 immune balance

膜性肾病(MN)是常见的肾病综合征之一,以肾小球上皮细胞下免疫复合物弥漫性沉淀,同时伴有肾小球基底膜增厚为主要特征,临床以大量蛋白尿、低蛋白血症、渐进性肾功能受损等为主要表现^[1]。据统计,MN的发病率约占全球原发性肾小球肾炎的10%,且全球MN患病率逐年增加^[2]。由于MN病程存在较大的异质性,部分患者可自发缓解,但仍有30%~40%的MN患者经药物治疗后约在10年后会进展为终末期肾脏病,对患者的生活质量造成严重的影响。在肾脏疾病中,T淋巴细胞发挥着免疫调节、激活和耐受的作用,特别是CD4⁺T淋巴细胞在肾小球疾病中引起了广泛关注^[3]。活化后的CD4⁺T细胞分化为Th1和Th2细胞,其中Th1细胞能分泌如干扰素- γ (IFN- γ)和白细胞介素(IL)-1等细胞因子,参与细胞免疫反应;而Th2细胞则主要分泌IL-6和IL-4等细胞因子,参与体液免疫过程,当机体免疫功能异常时,Th1/Th2则处于失衡状态,其失衡可能造成肾组织病理性改变,在MN疾病的免疫环境中占重要地位^[4]。因此,探讨有效治疗MN大鼠Th1/Th2失衡的方法尤为重要。益肾通络方具有健脾益肾、化痰通络的功效,目前已有研究证实,益肾通络方能降低MN大鼠尿蛋白、改善病理损伤^[5-6],但具体的作用机制尚未明确。线粒体自噬是一种去除受损线粒体以维持线粒体稳态的过程,在肾细胞健康和肾功能的稳定性中发挥重要作用^[7]。目前已有研究证实,线粒体自噬在阿霉素肾病中发挥重要作用^[8]。B细胞白血病/淋巴瘤2(BCL-2)/腺病毒E1B 19kD相互作用蛋白3(BNIP3)是线粒体自噬相关受体之一,相关研究表明,BNIP3介导的线粒体自噬可保护肾脏免受损伤^[9]。然而,BNIP3介导的线粒体自噬在MN中的具体作用机制尚不清楚。因此,本研究旨在探讨益肾通络方能否通过上调BNIP3介导的线粒体自噬改善MN大鼠Th1/Th2失衡。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 40只SPF级、雄性SD大鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[动物许可证号:SCXK(京)2021-001],体质量180~200 g。将大鼠饲养于温度(23~26℃)恒定的动物房内,室内相对湿度40%~60%,光照12 h/12 h昼夜交替,自由摄食

饮水。此研究已通过本院伦理委员会审核批准(批号:HBZY2021-KY-163-01)。

1.2 药物、试剂和仪器 益肾通络方由黄芪20 g,当归、党参、绞股蓝、炒白术、淫羊藿各15 g,莪术、地龙各12 g,水蛭9 g组成,由本院制剂室提供,随水浸泡后浓煎,浓缩药物至每毫升含生药2.0 g;盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司)。大鼠24 h蛋白尿检测试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司);酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司);HE染色试剂盒、线粒体膜电位荧光检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);微管相关蛋白1A/1B轻链3(LC3)抗体、Beclin-1抗体、BNIP3、低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)抗体(美国CST公司);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(南京森贝伽生物科技有限公司)。正置显微镜(日本Olympus公司,型号:CX41);酶标仪(美国PE公司,型号:Victor Nivo);离心机(德国Eppendorf公司,型号:5430R);全自动生化分析仪(日本日立,型号:Image-7170A);成像系统(美国Kodak公司,型号:Kodak Image Station 2000MM)。

1.3 分组和模型制备 将40只大鼠随机分为空白对照组(Control组)、MN大鼠模型组(MN组)、MN大鼠模型给予益肾通络方干预组(YSTLF组)和MN大鼠给予盐酸贝那普利片干预组(YSBNPLP组),每组10只。除Control组外,其余各组大鼠参照改良Borde方^[10]制备MN模型:取2 g/L阳离子化牛血清蛋白(C-BSA)和弗氏不完全佐剂,充分混匀,后注射于各组大鼠腋下、腹股沟皮下进行预免疫,0.1 mL/次,2 d注射1次,共连续注射3次。取2 g/L C-BSA和等体积磷酸盐缓冲液(PBS),充分混匀后于上述同等位置注射进行正式免疫,每次注射0.5 mL,每周注射3次,共注射12次。Control组大鼠仅注射等量的生理盐水,注射时间和次数同其他各组。模型制备成功标准:24 h尿蛋白定量(24 h UTP) ≥ 20 mg,且经苏木素-伊红(HE)染色确定造模成功。本研究MN组死亡1只,YSTLF组1只造模失败,为保证每组大鼠数量一致,每组均剔除1只,每组9只。

造模成功后,YSTLF组大鼠灌胃益肾通络方,按照20 g/kg剂量给药^[11],每只大鼠灌胃3 mL,1次/d,

连续灌胃 4 周;YSBNPLP 组按照 10 mg/(kg·d) 剂量灌胃盐酸贝那普利片,溶于 3 mL 蒸馏水中灌胃,1 次/d,连续灌胃 4 周;Control 组和 MN 组大鼠均灌胃等量的生理盐水,共给药 4 周。

1.4 血清生化指标及 24 h UTP 检测 取材前先用代谢笼收集各组大鼠 24 h 尿液,后计算各组大鼠 24 h UTP。采用 3%戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉取血 4 mL,后于室温环境静置 30 min,在离心机上以 3 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,采用全自动生化分析仪检测各组大鼠清蛋白(ALB)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平。采用 ELISA 检测血清中 Th1 相关细胞因子 IFN-γ、IL-2 和 Th2 相关细胞因子 IL-6、IL-4 水平。

1.5 HE 染色、马松三色(Masson)染色观察肾脏病理学变化 脱颈处死各组大鼠,分离大鼠肾脏并分为 3 部分,一部分肾组织置于 4%多聚甲醛溶液中固定,一部分置于 4℃冰箱保存,最后部分保存于 2.5%戊二醛溶液中;将固定于 4%多聚甲醛溶液中的肾组织取出,经石蜡包埋后切成组织切片,厚度为 5 μm,后经脱蜡、水化后,分别进行 HE 染色、Masson 染色,后将切片置于显微镜下观察肾脏病理学变化。

1.6 透射电镜检测肾组织超微结构 取保存于 2.5%戊二醛溶液中的肾组织,用 0.1 mol/L 的 PBS 清洗 3 次;后将 1%锇酸加入组织中固定 2 h,再用 0.1 mmol/L PBS 清洗 2 次;梯度脱水后置于含 70%丙酮饱和醋酸铀溶液中;过夜后再丙酮梯度脱水。将包埋机与 100%丙酮按照 1:1 比例放置 1 h,用胶囊包埋组织块后置于烤箱,用切片机切成厚度为 50 nm 的薄片,用枸橼酸铅染色后于透射电镜观察下观察肾组织超微结构。

1.7 免疫荧光染色检测肾小球中 IgG 水平 取肾组织切片,用固定液固定过夜,固定后充分洗涤,然后用封闭液封闭 1 h,在 4℃环境下加入一抗 IgG(1:1 000),孵育过夜;用 PBS 洗涤 3 次后,将切片与 FITC 偶联的二抗(1:2 000)在 37℃环境中孵育 1 h;清洗后加入含有 DAPI 染液封片,在荧光显微镜下观察肾组织内 IgG 沉积情况,采用 Image J 软件定量

分析荧光强度。

1.8 蛋白质印迹法检测肾组织中 LC3、Beclin-1、BNIP3、HIF-1α 蛋白表达水平 将 100 μL 的裂解液加入肾组织中,将组织匀浆后,裂解在 4℃环境下以 15 000 r/min 速度离心 15 min,收集上清液于 EP 管中,采用 BCA 法测定总蛋白水平。在沸水中煮沸组织使其变形,SDS-PAGE 胶分离蛋白,将蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5%奶粉封闭蛋白 1 h,后按照 1:500 比例稀释一抗,并在 4℃环境中过夜孵育;随后按照 1:1 000 比例加入 HRP 标记的二抗抗体,并进行常规的 2 h 孵育。接下来,在标本中滴加 ECL 发光液,并进行显影。最后,使用相机拍摄图像,并利用 Image Lab 软件分析蛋白条带的灰度。

1.9 统计学处理 实验数据采用 Graphpad priam 8.0 软件进行统计学处理和分析。符合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,多组间两两比较使用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠 24 h UTP 和血清生化指标水平比较 MN 组大鼠 24 h UTP 明显高于 Control 组,血清 ALB 水平低于 Control 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 MN 组相比,YSTLF 组和 YSBNPLP 组大鼠 24 h UTP 明显降低,血清 ALB 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);YSTLF 组和 YSBNPLP 组大鼠 24 h UTP 和血清 ALB 水平比较,差异均无统计学意义($P < 0.05$);4 组大鼠血清 Scr、BUN 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠血清 Th1、Th2 相关细胞因子水平比较 与 Control 组相比,MN 组血清中 IFN-γ、IL-2 水平降低,血清 IL-6、IL-4 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 MN 组相比,YSTLF 组和 YSBN-PLP 组血清中 IFN-γ、IL-2 水平升高,IL-6、IL-4 水平明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);YSTLF 组和 YSBNPLP 组血清 IFN-γ、IL-2、IL-6、IL-4 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 各组大鼠 24 h UTP 和血清 ALB、Scr、BUN 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	24 h UTP(mg)	ALB(g/L)	Scr(μmol/L)	BUN(mmol/L)
Control 组	9	7.36±0.81	34.25±4.06	6.35±0.71	34.11±3.52
MN 组	9	65.33±7.12 [*]	21.54±2.36 [*]	6.79±0.72	33.98±3.47
YSTLF 组	9	25.19±2.97 ^{*#}	27.61±2.89 [#]	6.54±0.68	34.67±3.50
YSBNPLP 组	9	27.42±3.06 ^{*#}	29.73±3.11 [#]	6.87±0.70	33.28±3.46
<i>F</i>		328.10	25.69	1.08	0.24
<i>P</i>		<0.001	<0.001	0.370	0.867

注:与 Control 组比较,^{*} $P < 0.05$;与 MN 组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠肾组织病理学变化 HE 染色结果显示,Control 组肾小球结构完整,且系膜细胞和系膜基质均未见明显增生,无显著病理学变化;MN 组较 Control 组肾小球明显肿胀,可见显著的系膜细胞和内皮细胞增生,细胞外基质增多且系膜区扩张显著;与 MN 组相比,YSTLF 组和 YSBNPLP 组肾组织病理损伤明显改善,系膜细胞、系膜基质增生明显减轻,肾小球肿胀程度明显好转。Masson 染色结果显示,

Control 组肾小球基底膜未见明显异常,无嗜复红蛋白、IgG 和电子致密物沉积;与 Control 组相比,MN 组肾小球明显增大,基底膜增厚且有空泡变性,显著可见大量的嗜复红蛋白和 IgG 弥漫性沉积,电子致密物在上皮下大量沉积;YSTLF 组和 YSBNPLP 组肾脏病理学损伤明显减轻,基底膜趋于正常,嗜复红蛋白、IgG 和电子致密物均明显减少。见图 1。

表 2 各组大鼠血清中 IFN-γ、IL-2、IL-6、IL-4 水平比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IFN-γ	IL-2	IL-6	IL-4
Control 组	9	271.54±3.11	164.35±18.12	87.54±9.23	68.31±7.04
MN 组	9	134.62±15.47 [*]	65.94±7.23 [*]	174.63±18.91 [*]	158.62±16.33 [*]
YSTLF 组	9	214.36±23.52 [#]	114.72±12.68 [#]	114.06±12.24 [#]	89.47±9.34 [#]
YSBNPLP 组	9	220.68±24.09 [#]	121.55±13.17 [#]	104.31±11.97 [#]	80.91±9.01 [#]
F		89.50	83.83	73.51	126.50
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^{*} $P<0.05$;与 MN 组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠肾组织超微结构比较 Control 组肾组织线粒体无明显病理学变化,多为椭圆形,且外膜光滑完整;与 Control 组相比,MN 组足细胞线粒体明显减少,线粒体体积明显增大,且肿胀变圆,外膜基质有明显的空泡样变性;与 Control 组相比,YSTLF 组和 YSBNPLP 组线粒体结构区域嵴结构正常,仅有少量空泡。见图 2。

2.5 各组大鼠肾组织中 IgG 沉积情况比较 Control

组、MN 组、YSTLF 组和 YSBNPLP 组肾组织中 IgG 相对沉积荧光强度分别为 1.00 ± 0.10 、 9.12 ± 1.04 、 3.21 ± 0.40 和 3.11 ± 0.38 。MN 组 IgG 相对沉积荧光强度明显高于 Control 组($P<0.05$);MN 组相比,YSTLF 组和 YSBNPLP 组肾组织中 IgG 相对沉积荧光强度明显低于 MN 组($P<0.05$);YSTLF 组和 YSBNPLP 组肾组织中 IgG 相对沉积荧光强度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。

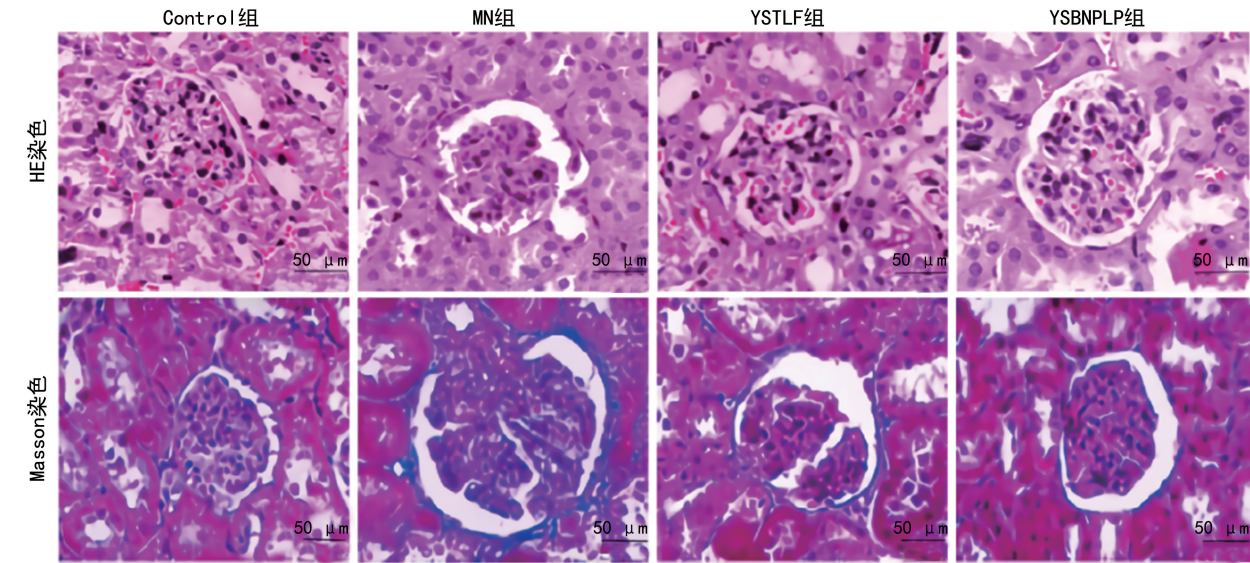


图 1 各组肾组织染色结果(200×)

2.6 各组大鼠肾组织中 LC3、Beclin-1、BNIP3、HIF-1α 蛋白表达水平比较 和 Control 组相比,MN 组肾组织中 LC3 II/LC3 I 比值及 Beclin-1、BNIP3、HIF-1α 蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$);和 MN 组相比,YSTLF 组和 YSBNPLP 组肾组织中 LC3 II/LC3

I 比值及 Beclin-1、BNIP3、HIF-1α 蛋白表达水平均明显增加($P<0.05$);YSTLF 组和 YSBNPLP 组肾组织中 LC3 II/LC3 I 比值及 Beclin-1、BNIP3、HIF-1α 蛋白表达水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

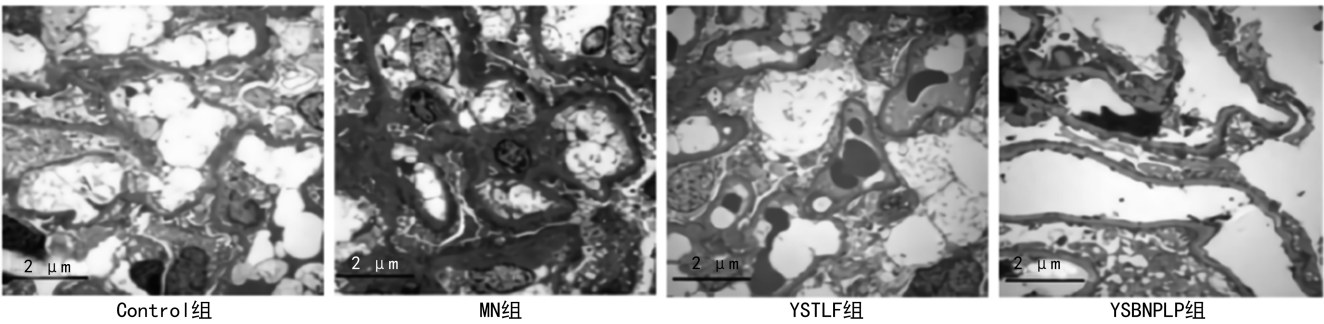


图 2 透射电子镜检测肾组织超微结构(20 000×)

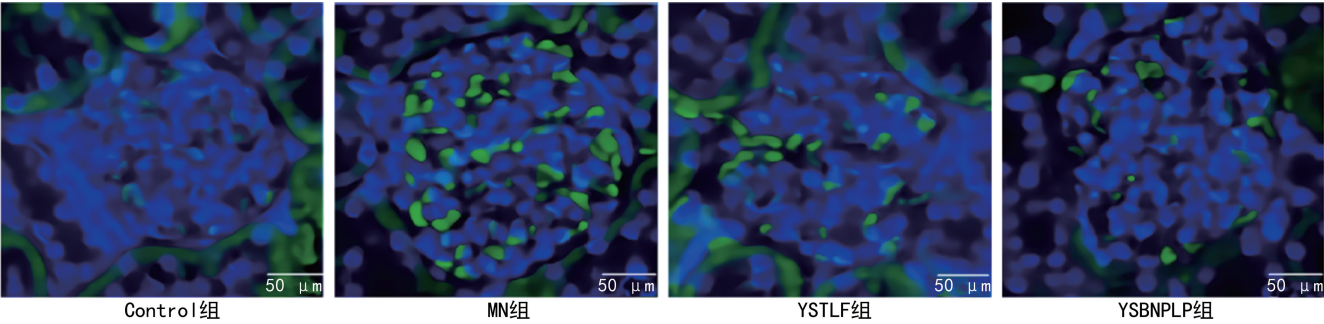


图 3 免疫荧光检测肾组织中 IgG 沉积(200×)

表 3 各组大鼠肾组织中 Beclin-1、BNIP3、HIF-1α 蛋白表达水平及 LC3 II /LC3 I 比值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	LC3 II /LC3 I 比值	Beclin-1 蛋白	BNIP3 蛋白	HIF-1α
Control 组	9	0.87±0.10	0.91±0.11	0.72±0.09	0.98±0.12
MN 组	9	0.21±0.04 [*]	0.32±0.05 [*]	0.18±0.02 [*]	0.37±0.05 [*]
YSTLF 组	9	0.63±0.08 [#]	0.72±0.09 [#]	0.58±0.07 [#]	0.73±0.09 [#]
YSBNPLP 组	9	0.60±0.08 [#]	0.70±0.09 [#]	0.55±0.07 [#]	0.71±0.09 [#]
<i>F</i>		112.50	72.73	105.30	68.26
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Control 组, ^{*} *P*<0.05;与 MN 组, [#] *P*<0.05。

3 讨 论

目前,雷公藤、他克莫司、环孢素等免疫抑制剂是临床治疗 MN 的主要药物,其能通过降低患者尿蛋白水平缓解 MN 临床症状,但停药后极易复发,且长期使用会出现感染等不良反应,导致治疗效果并不理想^[12]。研究表明,中医治疗 MN 不仅能增加临床疗效,且在一定程度上能减少西药治疗带来的不良反应,目前被广泛应用于 MN 治疗^[13]。根据中医“络病”的理论,MN 被称为肾络之病。在 MN 的发生、发展中,肾络的脉络作为外邪侵袭体内的通道可通过正邪相争产生湿浊、瘀毒等病理产物,这些物质滞留在肾络中,由于络脉的细小,容易积聚,形成阻滞。随着时间的推移,这种痹阻肾络的情况可能会加重^[14]。目前益肾通络方已在临床治疗 MN 中取得一定疗效,其方中的黄芪、党参和炒白术均具有健脾益气功效,能促使水湿顺畅排出,同时实现清气上升和浊气下降;淫羊藿则能够温补肾阳,固摄肾气,使肾阳得以温暖,从而促进气化利水的功能,保护精微物质的固藏;绞股蓝帮助祛除体内的浊邪,提升脾阳,恢复气机,畅通络脉;莪术和当归则有助于破血行气,驱散瘀滞,改善

肾络的通畅;地龙和水蛭能够深入络脉,疏通瘀滞,活络通经,帮助顺利排出邪气。以上药物的协同作用,能够健脾益气、补肾气、祛痰邪、化瘀浊和通肾络,从而扶正不留邪,祛邪又不损伤正气。24 h UTP 是由后天脾脏运化而成的精微物质,其减少往往是由于脾肾亏虚、精微下注所致。本研究结果显示,益肾通络方可降低 MN 大鼠 24 h UTP,增加血清 ALB 水平,改善肾组织病理损伤。檀金川等^[15]研究证实,益肾通络方均可减轻 MN 大鼠肾脏病理损伤,抑制足细胞和肾小管细胞凋亡,与本研究结果一致。

有研究表明,CD4⁺T 淋巴细胞可以被分为 2 个主要亚群:Th1 和 Th2^[16]。在正常生理状态下,这 2 种 Th 细胞亚群彼此之间相互制约,各自产生的细胞因子对对方的生成和活化有抑制作用。这种相互影响和制约机制使 Th1 和 Th2 在免疫应答中能够相互调节,从而维持免疫系统的平衡^[17]。因此 Th1 及 Th2 亚群失衡与 MN 的发生、发展密切相关。本研究结果显示,益肾通络方可改善 MN 大鼠 Th1/Th2 免疫平衡,但其具体的作用机制还需进一步探究。

线粒体自噬是一种选择的自噬形式,旨在清除受

损的线粒体过程,在维持线粒体质量和肾功能方面发挥重要作用^[18]。越来越多研究表明,线粒体自噬功能破坏可促进肾小球硬化等肾脏疾病的发展^[19]。LC3 I 和 LC3 II 是 LC3 的 2 种形式。LC3 I 为不活性形式,经过脱脂酶作用后转变为 LC3 II,即有磷脂化的活性形式;LC3 II 在自噬过程中与自噬体膜结合,参与自噬小体的形成和降解损坏细胞器^[18]。Beclin-1 是自噬相关基因 1 的编码蛋白,它是自噬过程的关键调节因子,可通过结合 Vps34 复合物形成复合体,从而参与启动自噬小体的形成。LIN 等^[20]研究证实,MN 中肾小管上皮细胞的自噬被抑制,激活自噬能缓解肾小管上皮细胞损伤。本研究结果显示,YSTLF 组和 YSBNPLP 组肾组织中 LC3 II /LC3 I 比值及 Beclin-1 蛋白水平均明显高于 MN 组,提示益肾通络方能促进 MN 大鼠线粒体自噬。BNIP3 是众多线粒体选择性自噬相关受体之一,据报道 BNIP3 在线粒体外膜发生同源二聚化后,通过其 LIR 结构域与 LC 相互结合,从而介导线粒体自噬的发生^[21]。HIF-1 α 作为细胞对缺氧反应的关键调控因子,可通过上调 BINP3 等靶基因的表达参与线粒体的自噬调控。本研结果显示,YSTLF 组和 YSBNPLP 组肾组织中 BNIP3 蛋白表达水平均明显高于 MN 组,表明益肾通络方能增加 MN 大鼠肾组织中 BNIP3、HIF-1 α 蛋白水平,提示益肾通络方可通过促进 BNIP3 表达增强线粒体自噬,从而调控 MN 大鼠 Th1/Th2 免疫平衡。

综上所述,益肾通络方可通过促进 BNIP3 水平增强线粒体自噬,从而调控 MN 大鼠 Th1/Th2 免疫平衡。

参考文献

[1] DUBE P, ARADHYULA V, LAD A, et al. Novel model of oxalate diet-induced chronic kidney disease in dahl-salt-sensitive rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12):10062.

[2] WANG Y, HAN W, ZHONG Y, et al. Calcitriol combined with high-calcium and high-phosphorus diet induces vascular calcification model in chronic kidney disease rats[J]. *Environ Toxicol*, 2024, 39(3):1769-1779.

[3] 王晓亮,谭鹏,孔维信. 黄芪甲苷 IV 通过抑制 TIM-1 信号通路增加 Th1/Th2 细胞比率减轻 IgA 肾病小鼠肾损伤[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2024, 40(6):501-507.

[4] 吴媛,张学琴,安恒通,等. 基于 Th1/Th2 平衡探讨升阳益胃汤对膜性肾病大鼠足细胞的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(16):60-67.

[5] 陈素枝,杨凤文,李永章,等. 益肾通络方药治疗膜性肾病的临床疗效和安全性的 Meta 分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2022, 23(7):595-599.

[6] 陈素枝,臧倩男,张卓,等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠的肾保护作用及足细胞骨架相关蛋白的影响[J]. *中草药*, 2018, 49(20):4857-4863.

[7] QIN S, LIU C, CHEN Y, et al. Cobaltosic oxide-polyethylene glycol-triphenylphosphine nanoparticles ameliorate

the acute-to-chronic kidney disease transition by inducing BNIP3-mediated mitophagy[J]. *Kidney Int*, 2023, 103(5):903-916.

[8] 梁国强,倪道磊,周岚,等. 基于线粒体自噬途径探讨黄芪甲苷对阿霉素肾病大鼠的肾保护作用[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(9):35-39.

[9] LI J, LIN Q, SHAO X, et al. HIF1 α -BNIP3-mediated mitophagy protects against renal fibrosis by decreasing ROS and inhibiting activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(3):200.

[10] 王含香,林威,崔师妍,等. 基于 AMPK/SIRT1/SREBP1 信号通路探究膜肾颗粒对膜性肾病大鼠蛋白尿的治疗作用[J]. *中草药*, 2024, 55(2):509-515.

[11] 张倩,范华平,张秀侠,等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织中乙酰肝素酶、转化生长因子 β_1 表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2015, 16(3):228-229.

[12] SEALFON R, MARIANI L, AVILA C C, et al. Molecular characterization of membranous nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2022, 33(6):1208-1221.

[13] KISTLER A D, SALANT D J. Complement activation and effector pathways in membranous nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2024, 105(3):473-483.

[14] 唐欣斌,张蓉,张园,等. 补肾活血汤对膜性肾病大鼠足细胞的保护作用[J]. *南通大学学报(医学版)*, 2023, 43(1):30-34.

[15] 檀金川,田力铭,张姝媛,等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织中 NF- κ B, MMP-2 表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(21):3111-3113.

[16] 沈岚,张之蕙,费梅. 活血养阴方治疗原发性 IgA 肾病阴虚血瘀证的疗效及对 hs-CRP、Th1/Th2 的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2024, 25(2):167-169.

[17] LV X, WANG J, ZHANG L, et al. Canagliflozin reverses Th1/Th2 imbalance and promotes podocyte autophagy in rats with membranous nephropathy[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:993869.

[18] LI C R, LI L, YANG M, et al. PACS-2 ameliorates tubular injury by facilitating endoplasmic reticulum-mitochondria contact and mitophagy in diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2022, 71(5):1034-1050.

[19] YANG M, ZHANG Q, LUO S L, et al. DsbA-L alleviates tubular injury in diabetic nephropathy by activating mitophagy through maintenance of MAM integrity[J]. *Clin Sci*, 2023, 137(12):931-945.

[20] LIN Q S, LI S, JIN H J, et al. Mitophagy alleviates cisplatin-induced renal tubular epithelial cell ferroptosis through ROS/HO-1/GPX4 axis[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(4):1192-1210.

[21] CAO Y, ZHENG J, WAN H, et al. A mitochondrial SCF-FBXL4 ubiquitin E3 ligase complex degrades BNIP3 and NIX to restrain mitophagy and prevent mitochondrial disease[J]. *EMBO J*, 2023, 42(13):e113033.