

肾福康胶囊通过STAT3/YAP通路调控细胞串扰改善肾间质纤维化的机制^Δ

杜 炜^{1*}, 杨玉芳², 廖燕红¹, 邹小琴³, 梁志伟¹, 冯祥乾¹, 钟小斌^{1,4#} (1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学第一附属医院药学部, 南宁 530021; 3. 广西医科大学第一附属医院科研部, 南宁 530021; 4. 广西医科大学附属肿瘤医院临床药学部, 南宁 530012)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)12-1547-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.12.05



摘要 目的 探讨肾福康胶囊(SFK)通过信号转导及转录活化因子3(STAT3)/Yes相关蛋白(YAP)通路调控巨噬细胞-成纤维细胞串扰改善肾间质纤维化(RIF)的作用机制。方法 用转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)诱导巨噬细胞RAW264.7极化,再建立巨噬细胞与肾成纤维细胞NRK-49F的非接触共培养体系,以及巨噬细胞与YAP敲低肾成纤维细胞非接触共培养体系,给予低、中、高浓度(4、8、16 $\mu\text{g/mL}$)SFK,以及STAT3抑制剂(STAT3-I, 1.64 $\mu\text{g/mL}$)、氯沙坦钾片(阳性对照, 0.28 $\mu\text{g/mL}$),干预48 h。检测巨噬细胞中CD86、CD163、STAT3蛋白和CD86、F4/80、STAT3 mRNA表达水平,共培养肾成纤维细胞中 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、波形蛋白(Vimentin)、I型胶原(Col-I)、基质金属蛋白酶1(MMP-1)、YAP蛋白及mRNA表达水平,以及共培养YAP敲低肾成纤维细胞中 α -SMA、Vimentin、MMP-1蛋白及mRNA表达水平。结果 TGF- β_1 诱导后巨噬细胞中CD86、CD163、STAT3蛋白表达水平和CD86、F4/80、STAT3 mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$);极化的巨噬细胞的培养液可激活肾成纤维细胞,使肾成纤维细胞中 α -SMA、Vimentin、Col-I、YAP蛋白及mRNA表达水平均显著升高, MMP-1蛋白及mRNA表达水平显著降低($P<0.05$);SFK、STAT3-I可逆转以上指标的变化,其中SFK中浓度组部分指标效果强于SFK低、高浓度组。在巨噬细胞与YAP敲低肾成纤维细胞非接触共培养实验中,各组细胞中 α -SMA、Vimentin、MMP-1蛋白及mRNA表达差异均无统计学意义。结论 SFK可通过阻断STAT3/YAP通路,抑制巨噬细胞-肾成纤维细胞串扰,从而延缓RIF进展。

关键词 肾福康胶囊; 肾间质纤维化; 巨噬细胞; 成纤维细胞; 细胞串扰; STAT3/YAP通路

Mechanism of Shenfukang capsule in ameliorating renal interstitial fibrosis by regulating cellular crosstalk via the STAT3/YAP pathway

DU Wei¹, YANG Yufang², LIAO Yanhong¹, ZOU Xiaoqin³, LIANG Zhiwei¹, FENG Xiangqian¹, ZHONG Xiaobin^{1,4} (1. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Dept. of Scientific Research, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 4. Dept. of Clinical Pharmacy, Guangxi Medical University Cancer Hospital, Nanning 530012, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the mechanism by which Shenfukang capsule (SFK) ameliorates renal interstitial fibrosis (RIF) by regulating macrophage-fibroblast crosstalk via the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)/Yes-associated protein (YAP) pathway. **METHODS** RAW264.7 macrophages were induced to polarize with transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1). Subsequently, a non-contact co-culture system of macrophages with renal fibroblasts NRK-49F, as well as a non-contact co-culture system of macrophages with YAP-knockdown renal fibroblasts, were established. Cells were treated with low, medium, and high concentrations (4, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$) of SFK, as well as a STAT3 inhibitor (STAT3-I, 1.64 $\mu\text{g/mL}$) and losartan potassium tablets (positive control, 0.28 $\mu\text{g/mL}$), for 48 h. After intervention, the protein and mRNA expression levels of CD86, CD163, and STAT3 in macrophages, as well as CD86, F4/80, and STAT3 mRNA, were detected. In co-cultured renal fibroblasts, the protein and mRNA expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), Vimentin, collagen type I (Col-I), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), and YAP were detected. In co-cultured YAP-knockdown renal fibroblasts, the protein and mRNA expression levels of α -SMA, Vimentin, and MMP-1 were also detected. **RESULTS** Following TGF- β_1 induction, the protein expression levels of CD86, CD163, and STAT3, as well as the mRNA expression levels of CD86, F4/80, and STAT3 in macrophages were significantly increased ($P<0.05$). The conditioned medium from polarized macrophages activated renal fibroblasts, as evidenced by significantly increased protein and mRNA expression levels of α -SMA, Vimentin,

^Δ基金项目 国家自然科学基金项目(No.82360811);广西自然科学基金区域高发疾病研究联合专项资助(No.2023GXNSFAA026233)

*第一作者 硕士研究生。研究方向:中药多靶点调节防治肾脏疾病的药效与分子机制。E-mail:1085233292@qq.com

#通信作者 主任药师,硕士生导师。研究方向:中药延缓慢性肾进展的作用机制。E-mail:zhongxiaobin@gxmu.edu.cn

Col- I , and YAP, and significantly decreased protein and mRNA expression levels of MMP-1 in renal fibroblasts ($P<0.05$). Treatment with SFK and STAT3-I reversed the changes in the above indicators, with the medium concentration SFK group showing stronger effects on some indicators than the low and high concentration groups. In the non-contact co-culture experiment of macrophages and YAP-knockdown renal fibroblasts, there were no statistically significant differences in the protein and mRNA expression of α -SMA, Vimentin, and MMP-1 among the groups. **CONCLUSIONS** SFK can inhibit macrophage-renal fibroblast crosstalk by blocking the STAT3/YAP pathway, thereby delaying the progression of RIF.

KEYWORDS Shenfukang capsule; renal interstitial fibrosis; macrophage; fibroblast; cellular crosstalk; STAT3/YAP pathway

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)发病率高、预后不佳,现已成为全球性公共卫生问题^[1]。肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是CKD的病理特征,其病变范围和严重程度与CKD病程进展及患者预后的关系密切,因此,抑制RIF已成为延缓CKD进展的重要治疗策略。RIF的主要病理表现为肾间质中成纤维细胞异常活化,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)大量产生并在肾间质内沉积,最终导致组织结构重塑^[2]。

RIF的发生发展与ECM沉积、炎症细胞浸润及肾间质细胞活化密切相关,其中巨噬细胞活化和成纤维细胞异常激活是推动纤维化进展的重要环节。研究表明,活化巨噬细胞可通过分泌多种炎症因子和促纤维化介质促进成纤维细胞迁移、增殖及活化,而成纤维细胞的持续活化又可进一步维持局部炎症微环境,形成巨噬细胞-成纤维细胞串扰并加重RIF进程^[3]。信号转导及转录活化因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是调控巨噬细胞活化及极化的重要信号分子, Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)则参与成纤维细胞活化及ECM沉积;已有研究提示, STAT3可作为YAP/含有PDZ结合基序的转录共激活因子通路的上游调控因子,参与细胞增殖、炎症反应及纤维化进程^[4-6]。因此, STAT3/YAP通路可能是介导巨噬细胞-成纤维细胞串扰并促进RIF进展的重要机制,但其具体作用及干预价值仍有待进一步阐明。

肾福康胶囊(Shenfukang capsule, SFK)是广西医科大学第一附属医院院内制剂,由大黄和黄芪组成,其中大黄粉末与黄芪干膏粉末质量比为1:0.3,按生药量换算后两者质量比约为1:1。SFK已广泛应用于CKD的临床治疗,并显示出良好的肾保护作用^[7]。已有研究表明,大黄和黄芪的活性成分具有抗炎、调节巨噬细胞极化及抗纤维化等作用^[8]。SFK可通过调控转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)/p38-促分裂原活化的蛋白激酶(p38-mitogen-activated protein kinase, p38-MAPK)/Smad等通路抑制肾小管上皮细胞间充质转化、减少ECM沉积,从而改善RIF^[9]。本文基于巨噬细胞与肾成纤维细胞非接触共培养体系和STAT3/YAP通路,探讨SFK改善RIF的作用及机制,旨在为SFK的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括WCI-180型CO₂培养箱(德国Wiggen公司)、Synergy H1型多功能微孔板检测仪(美国BioTek公司)、Odyssey CLx型红外荧光扫描成

像系统(美国LI-COR公司)、NanoDrop 2000型超微量分光光度计和GeneAmp[®] 9700系列聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、小型垂直电泳转印系统和CFX Touch型实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪(美国Bio-Rad公司)等。

1.2 主要药品与试剂

SFK(批号20180307,批准文号为桂药制字Z01060136)来源于广西医科大学第一附属医院院内制剂;氯沙坦钾片(货号R054426,规格为每片100 mg)购自杭州默沙东制药有限公司;TGF- β_1 和STAT3抑制剂STAT3-I(货号分别为HY-10431、HY-13818,纯度均大于99%)均购自美国MedChemExpress公司;NucleoZOL RNA提取试剂(货号740404.200)购自德国Macherey-Nagel公司;定量PCR专用快速反转录试剂盒(货号RRO92A)购自日本Takara公司;通用型SYBR Green qPCR预混液(2 $\times$)(货号G3326-01)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(货号P0010)购自上海碧云天生物技术有限公司;RIPA强裂解液(货号IN-WB001)购自北京英文特生物技术有限公司;DMEM高糖培养基分别购自武汉赛维尔生物科技有限公司(货号G4510)和美国Gibco公司(货号C119955-00BT);小干扰RNA(siRNA)慢病毒载体由上海吉玛制药技术有限公司构建;嘌呤霉素(货号BL528A)购自北京兰杰柯生物科技有限公司;qRT-PCR实验所用引物由广西捷尼斯生物科技有限公司设计、合成;兔源CD86多克隆抗体(货号bs-1035R)购自北京博奥森生物技术有限公司;兔源STAT3单克隆抗体(货号CY5165)购自上海埃必威生物技术有限公司;兔源CD163、 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、波形蛋白(Vimentin)、I型胶原(collagen type I, Col- I)、基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、YAP、 β -肌动蛋白(β -actin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(货号分别为16646-1-AP、14395-1-AP、10366-1-AP、14695-1-AP、10371-2-AP、13584-1-AP、20536-1-AP、10494-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;山羊抗兔IgG(H+L)荧光二抗(货号5151P)购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.3 细胞

巨噬细胞RAW264.7购自中国科学院上海细胞生物研究所,正常大鼠肾成纤维细胞NRK-49F购自上海钟新桥生物科技有限公司。RAW264.7细胞培养于含5%胎牛血清的赛维尔DMEM高糖培养基中, NRK-49F细胞

培养于含 5% 胎牛血清的 Gibco DMEM 高糖培养基中。所有细胞均在 37 ℃ 及 5%CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养。所有实验均选用处于对数生长期的细胞。

2 方法

2.1 巨噬细胞和肾成纤维细胞的非接触共培养实验

2.1.1 分组培养与给药处理

RAW264.7 细胞消化后,以 1:3 的比例传代于 T75 培养瓶中培养 48 h,待细胞状态稳定后再次消化,并传代于 10 cm 培养皿中继续培养 24 h。细胞贴壁稳定后,分为 7 组,分别为对照组、模型组、STAT3-I 组、阳性对照(氯沙坦钾片)组和 SFK 低、中、高浓度(SFK-L、SFK-M、SFK-H)组,除对照组不加药物外,其他各组均加入 TGF-β₁ 和相应浓度的药物,干预 48 h。SFK 的给药浓度依据前期 CCK-8 细胞活力预实验结果确定:SFK 8 μg/mL 为产生显著效应的最低浓度,故设为中浓度;另设置 4 μg/mL 为低浓度,16 μg/mL 为高浓度。TGF-β₁ (0.01 μg/mL) 及 STAT3-I (1.64 μg/mL) 的给药浓度参考既往文献报道^[9-10] 确定。氯沙坦钾片(0.28 μg/mL) 的给药浓度根据临床给药浓度换算确定。药物干预 48 h 后,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 1 次,更换新鲜 DMEM 培养基继续培养 48 h,随后收集各组 RAW264.7 细胞培养液(即条件培养基)用于 NRK-49F 细胞的后续非接触共培养。

将 NRK-49F 细胞分为 7 组,分别为 c 对照组、c 模型组、cSTAT3-I 组、c 阳性对照组、cSFK-L 组、cSFK-M 组、cSFK-H 组,各组分别加入上述对应组别 RAW264.7 细胞的条件培养基进行共培养 48 h。

2.1.2 细胞中 CD86、CD163、α-SMA、Vimentin、Col- I 、MMP-1、STAT3、YAP 蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测 RAW264.7 细胞中 CD86、CD163 蛋白表达水平,以及 NRK-49F 细胞中 α-SMA、Vimentin、Col- I 、MMP-1、STAT3、YAP 蛋白表达水平。收集“2.1.1”项下干预后的 RAW264.7 细胞和共培养后的 NRK-49F 细胞,采用加入蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂的 RIPA 强裂解液吹打混匀,置于冰上裂解后提取总蛋白,用 BCA 法定量加入蛋白上样缓冲液;取等量蛋白样品加入蛋白上样缓冲液,混匀后于 100 ℃ 加热变性 5 min,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,再转至 PVDF 膜上;用快速封闭液封闭后,加入相应 CD86、CD163、α-SMA、Vimentin、Col- I 、MMP-1、STAT3、YAP、β-actin、GAPDH(稀释比例分别为 1:500、1:2 000、1:2 000、1:20 000、1:1 000、1:2 000、1:1 000、1:20 000、1:4 000、1:5 000)一抗,4 ℃ 孵育过夜;洗膜后加入山羊抗兔 IgG(H+L)荧光二抗(稀释比例 1:30 000),室温避光孵育 1 h;洗膜后使用红外荧光扫描成像系统采集蛋白条带,以 β-actin 和 GAPDH 为内参,采用 Image J 软件分析目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值。实验重复 3 次。

2.1.3 细胞中 CD86、F4/80、α-SMA、Vimentin、Col- I 、MMP-1、STAT3、YAP mRNA 表达检测

采用 qRT-PCR 法检测 RAW264.7 细胞中 CD86、F4/80、STAT3 mRNA 表达水平,以及 NRK-49F 细胞中 α-SMA、Vimentin、Col- I 、MMP-1、YAP mRNA 表达水平。收集“2.1.1”项下干预后的 RAW264.7 细胞和共培养后的 NRK-49F 细胞,使用 NucleoZOL RNA 提取试剂提取总 RNA,经纯度和浓度检测后,将 RNA 反转录为 cDNA,再进行 PCR 扩增。反应体系包括 cDNA 模板 1 μL,2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 5 μL,正、反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,无菌无酶水 3 μL,总体积 10 μL。反应条件如下:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火/延伸 30 s,共 40 个循环。采用 CFX Touch 实时荧光定量 PCR 仪完成检测。以 β-actin 和 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法对 mRNA 表达水平进行定量分析。实验重复 3 次。引物序列和产物大小见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列与产物大小

细胞	基因	引物序列(5'→3')	产物大小/bp
RAW264.7	CD86	正向引物:TGCTCATCTATACACGGTTACC	181
		反向引物:TGCATAACACCATCATACTCGA	
	F4/80	正向引物:GACTGACAACCCAGACGGC	147
		反向引物:TTGCGAGAGCTGAAATAA	
	STAT3	正向引物:GAAGCCGACCCAGGTAGTG	143
		反向引物:CCATGTCAAACGTGAGCGAC	
NRK-49F	β-actin	正向引物:CTGCCGATCCTCTTCTCT	134
		反向引物:GCCACAGGATTCATACCCAA	
	α-SMA	正向引物:CATCCGACCTTGCTAACGGA	367
		反向引物:AGTCCAGAGCGACATAGCAC	
	Vimentin	正向引物:GGCTGCGAGAAAATTGCAG	113
		反向引物:TTCAGGTCGAAGACGTGCCA	
	Col- I	正向引物:CACTGCAAGAACAGCGTAGC	159
		反向引物:AGTTCGGGTGTGACTCGTG	
	MMP-1	正向引物:TGCAACAACACCATCCAT	104
		反向引物:TTACACGAATGTAGAACCTGCC	
	YAP	正向引物:ACGCTGATGAACCTCTGCCTC	150
		反向引物:CCTCTGGTTTCATGGCAAAACG	
	GAPDH	正向引物:GGCAGTCAGGCTGAGAATG	143
		反向引物:ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	

2.2 巨噬细胞与敲低基因的肾成纤维细胞的非接触共培养实验

2.2.1 敲低 YAP 基因的成纤维细胞培养

利用重组慢病毒系统作为 siRNA 的载体,对 NRK-49F 细胞中的 YAP 基因进行敲低。在预实验确定感染复数后,取 NRK-49F 细胞接种于 6 孔板中,待细胞密度达到 50%~60% 时,分别加入携带 YAP 靶向序列的重组慢病毒或阴性对照慢病毒进行感染,以敲低 NRK-49F 细胞中 YAP 基因的表达;感染 24 h 后,再用新鲜培养基培养 48 h,以获得稳定敲低 YAP 的 NRK-49F 细胞(siYAP NRK-49F)和阴性对照细胞(siNC NRK-49F),在细胞培养基中加入嘌呤霉素进行筛选,并稳定传代 5 代,以确保获得稳定敲低的细胞系。

2.2.2 分组培养与给药处理

siNC NRK-49F 细胞中加入“2.1.1”项下对照组 RAW264.7 细胞的条件培养基共培养 48 h,作为 siNC c 对照组;siYAP NRK-49F 细胞分为 6 组,分别为 siYAP c 模型组、siYAP cSTAT3-I 组、siYAP c 阳性对照组、siYAP cSFK-L 组、siYAP cSFK-M 组、siYAP cSFK-H 组,各组分 别加入“2.1.1”项下对应组别 RAW264.7 细胞的条件培 养基进行共培养 48 h。

2.2.3 细胞中α-SMA、Vimentin、MMP-1 蛋白表达检测

收集“2.2.2”项下共培养后的细胞,按照“2.1.2”项下 方法检测细胞中α-SMA、Vimentin、MMP-1 蛋白表达水 平。实验重复 3 次。

2.2.4 细胞中α-SMA、Vimentin、MMP-1 mRNA 表达水平

收集“2.2.2”项下共培养后的细胞,按照“2.1.3”项下 方法检测细胞中α-SMA、Vimentin、MMP-1 mRNA 表达 水平。实验重复 3 次。

2.3 统计学方法

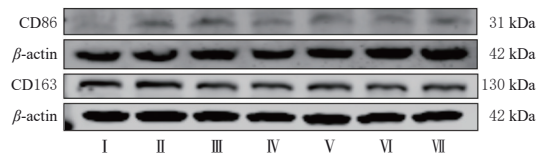
采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表 示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较 采用 LSD-*t* 检验,方差不齐时采用 Dunnett's *T*3 检验。 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 SFK 对巨噬细胞极化及肾成纤维细胞活化的影响

3.1.1 SFK 对巨噬细胞极化标志物表达的影响

Western blot 检测结果显示,与对照组比较,模型组 RAW264.7 细胞中 CD86、CD163 蛋白表达水平均显著升 高($P<0.05$);与模型组比较,SFK 各浓度组、STAT3-I 组、阳性对照组 RAW264.7 细胞中 CD86 (SFK-L 组和 SFK-H 组除外)、CD163 蛋白表达水平均显著降低($P< 0.05$)。结果见图 1 和表 2。



I: 对照组; II: 模型组; III: SFK-L 组; IV: SFK-M 组; V: SFK-H 组; VI: STAT3-I 组; VII: 阳性对照组。

图 1 各组 RAW264.7 细胞中 CD86 及 CD163 蛋白表达的 电泳图

表 2 各组 RAW264.7 细胞中 CD86、CD163、F4/80 表达 水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

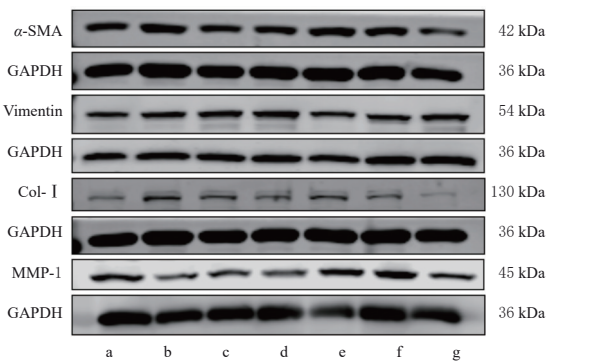
组别	蛋白		mRNA	
	CD86	CD163	CD86	F4/80
对照组	0.15±0.05	0.65±0.02	1.00±0.04	1.00±0.04
模型组	0.31±0.05 ^a	0.73±0.03 ^a	1.69±0.18 ^a	1.41±0.01 ^a
SFK-L 组	0.27±0.04	0.56±0.07 ^b	1.72±0.15 ^a	0.69±0.10 ^b
SFK-M 组	0.22±0.05 ^b	0.57±0.06 ^b	1.35±0.12 ^b	0.79±0.03 ^b
SFK-H 组	0.26±0.03	0.57±0.04 ^b	0.99±0.03 ^{bc}	0.65±0.10 ^{bc}
STAT3-I 组	0.14±0.05 ^b	0.50±0.04 ^b	1.34±0.08 ^b	0.82±0.02 ^b
阳性对照组	0.22±0.05 ^b	0.54±0.06 ^b	1.34±0.10 ^b	0.45±0.06 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$; c: 与 SFK-M 组比较, $P<0.05$ 。

RT-qPCR 检测结果显示,与对照组比较,模型组 RAW264.7 细胞中 CD86、F4/80 mRNA 表达水平均显著 升高($P<0.05$);与模型组比较,SFK 各浓度组、STAT3-I 组、阳性对照组 RAW264.7 细胞中 CD86 (SFK-L 组除 外)、F4/80 mRNA 表达水平均显著降低($P<0.05$)。与 SFK-M 组比较,SFK-H 组 RAW264.7 细胞中 CD86、F4/ 80 mRNA 表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表 2。

3.1.2 SFK 对共培养肾成纤维细胞中纤维化相关因子 表达的影响

与 c 对照组比较,c 模型组共培养 NRK-49F 细胞中 α-SMA、Vimentin、Col- I 蛋白及 mRNA 表达水平均显著 升高,MMP-1 蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低($P< 0.05$);与 c 模型组比较,cSFK 各浓度组、cSTAT3-I 组、 c 阳性对照组共培养 NRK-49F 细胞中 α-SMA、Vimentin (cSFK-L 组蛋白除外)、Col- I (cSFK-H 组蛋白和 cSFK-L 组 mRNA 除外)蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低, MMP-1 (cSFK-L 组、c 阳性对照组蛋白和 mRNA 除外)蛋白 及 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$),其中 cSFK-M 组在部分指标中的表现显著强于 SFK-L 组、SFK-H 组 ($P<0.05$)。结果见图 2 和表 3。



a: c 对照组; b: c 模型组; c: cSFK-L 组; d: cSFK-M 组; e: cSFK-H 组; f: cSTAT3-I 组; g: c 阳性对照组。

图 2 各组共培养 NRK-49F 细胞中 α-SMA、Vimentin、 Col- I、MMP-1 蛋白表达的电泳图

表 3 各组共培养 NRK-49F 细胞中 α-SMA、Vimentin、 Col- I、MMP-1 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

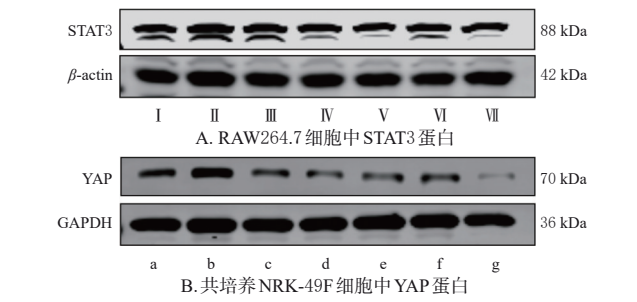
组别	蛋白				mRNA			
	α-SMA	Vimentin	Col- I	MMP-1	α-SMA	Vimentin	Col- I	MMP-1
c 对照组	0.49±0.06	0.67±0.07	0.11±0.01	0.54±0.07	1.00±0.07	1.00±0.03	1.00±0.07	1.00±0.04
c 模型组	0.69±0.10 ^a	0.81±0.05 ^a	0.23±0.03 ^a	0.30±0.01 ^a	1.30±0.09 ^a	4.54±0.19 ^a	2.71±0.03 ^a	0.22±0.01 ^a
cSFK-L 组	0.43±0.09 ^b	0.74±0.07	0.15±0.04 ^b	0.38±0.06	0.99±0.02 ^b	1.07±0.08 ^{bc}	2.75±0.02 ^b	0.19±0.03 ^b
cSFK-M 组	0.42±0.13 ^b	0.68±0.08 ^b	0.12±0.05 ^b	0.47±0.10 ^b	1.02±0.07 ^b	0.85±0.13 ^b	1.63±0.05 ^b	0.56±0.08 ^b
cSFK-H 组	0.46±0.17 ^b	0.66±0.09 ^b	0.19±0.05	0.57±0.03 ^{bc}	0.90±0.06 ^{bc}	1.15±0.08 ^{bc}	2.28±0.10 ^{bc}	1.28±0.04 ^{bc}
cSTAT3-I 组	0.46±0.12 ^b	0.67±0.08 ^b	0.15±0.02 ^b	0.60±0.05 ^b	0.96±0.03 ^b	1.10±0.04 ^b	1.75±0.06 ^b	0.41±0.06 ^b
c 阳性对照组	0.34±0.05 ^b	0.69±0.03 ^b	0.10±0.02 ^b	0.34±0.03	0.87±0.08 ^b	1.22±0.06 ^b	1.96±0.03 ^b	0.26±0.02

a: 与 c 对照组比较, $P<0.05$; b: 与 c 模型组比较, $P<0.05$; c: 与 cSFK-M 组比较, $P<0.05$ 。

3.1.3 SFK 对巨噬细胞和共培养肾成纤维细胞中 STAT3/YAP 通路相关蛋白及 mRNA 表达的影响

在 RAW264.7 细胞中,与对照组比较,模型组细胞中 STAT3 蛋白及 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$); 与模型组比较,SFK 各浓度组、STAT3-I 组、阳性对照组

细胞中STAT3蛋白及mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$),其中SFK-H组的STAT3蛋白表达水平显著低于SFK-M组($P<0.05$)。结果见图3和表4。



I : 对照组; II : 模型组; III : SFK-L 组; IV : SFK-M 组; V : SFK-H 组; VI : STAT3-I 组; VII : 阳性对照组; a: c 对照组; b: c 模型组; c: cSFK-L 组; d: cSFK-M 组; e: cSFK-H 组; f: cSTAT3-I 组; g: c 阳性对照组。

图3 各组细胞中STAT3及YAP蛋白表达的电泳图

表4 各组细胞中STAT3、YAP表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	STAT3		组别	YAP	
	蛋白	mRNA		蛋白	mRNA
对照组	1.22 ± 0.06	1.00 ± 0.03	c 对照组	0.31 ± 0.17	1.00 ± 0.03
模型组	1.48 ± 0.13 ^a	1.12 ± 0.04 ^a	c 模型组	0.63 ± 0.20 ^a	1.18 ± 0.03 ^a
SFK-L 组	1.30 ± 0.13 ^{bc}	0.68 ± 0.02 ^{bc}	cSFK-L 组	0.26 ± 0.11 ^b	0.96 ± 0.04 ^b
SFK-M 组	1.00 ± 0.03 ^b	0.61 ± 0.02 ^b	cSFK-M 组	0.23 ± 0.10 ^b	1.00 ± 0.06 ^b
SFK-H 组	0.83 ± 0.06 ^{bc}	0.58 ± 0.01 ^b	cSFK-H 组	0.29 ± 0.09 ^b	0.96 ± 0.06 ^b
STAT3-I 组	1.11 ± 0.08 ^b	0.72 ± 0.03 ^b	cSTAT3-I 组	0.31 ± 0.14 ^b	1.06 ± 0.03 ^b
阳性对照组	0.83 ± 0.12 ^b	0.64 ± 0.01 ^b	c 阳性对照组	0.11 ± 0.06 ^b	0.93 ± 0.04 ^b

a: 与对照组或c对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组或c模型组比较, $P<0.05$; c: 与SFK-M组比较, $P<0.05$ 。

在共培养NRK-49F细胞中,与c对照组比较,c模型组细胞中YAP蛋白及mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$);与c模型组比较,cSFK各浓度组、cSTAT3-I组、c阳性对照组细胞中YAP蛋白及mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图3和表4。

3.2 SFK对共培养YAP敲低肾成纤维细胞中纤维化相关因子表达的影响

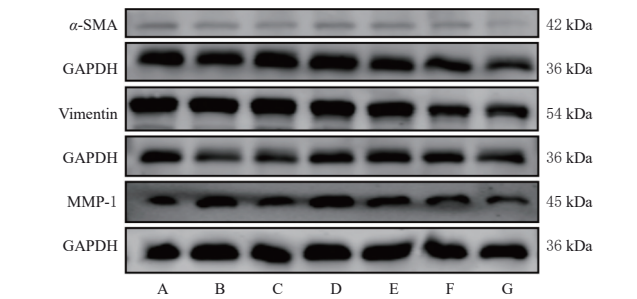
与siNC c对照组比较,siYAP c模型组细胞中 α -SMA、Vimentin、MMP-1蛋白及mRNA表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。与siYAP c模型组比较,siYAP cSFK各浓度组、siYAP cSTAT3-I组、siYAP c阳性对照组细胞中 α -SMA、Vimentin、MMP-1蛋白及mRNA表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见图4和表5。

4 讨论

4.1 SFK通过抑制巨噬细胞异常极化缓解RIF

巨噬细胞活化及成纤维细胞异常激活是RIF发生发展的重要病理基础,二者之间的串扰可进一步放大局部炎症及纤维化反应^[3,10]。已有研究表明,STAT3参与巨噬细胞炎症反应及极化调控^[11],而YAP则参与成纤维细胞活化及ECM沉积过程^[12];STAT3还可作为YAP的上游调控因子参与炎症及纤维化进程^[13]。

巨噬细胞的激活和募集在RIF进程中至关重要,它不仅可通过分泌炎症因子参与免疫调控,还可通过调节成纤维细胞活化直接影响纤维化进展。因此,巨噬细胞极化状态的变化往往决定局部微环境的炎症与纤维化



A: siNC c 对照组; B: siYAP c 模型组; C: siYAP cSFK-L 组; D: siYAP cSFK-M 组; E: siYAP cSFK-H 组; F: siYAP cSTAT3-I 组; G: siYAP c 阳性对照组。

图4 各组细胞中 α -SMA、Vimentin、MMP-1蛋白表达的电泳图

表5 各组细胞中 α -SMA、Vimentin、MMP-1表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	蛋白			mRNA		
	α -SMA	Vimentin	MMP-1	α -SMA	Vimentin	MMP-1
siNC c 对照组	0.13 ± 0.01	1.03 ± 0.03	0.21 ± 0.01	1.01 ± 0.13	1.01 ± 0.19	1.07 ± 0.46
siYAP c 模型组	0.11 ± 0.02	1.05 ± 0.06	0.22 ± 0.01	1.50 ± 0.14	1.66 ± 0.13	2.05 ± 0.12
siYAP cSFK-L 组	0.10 ± 0.01	1.05 ± 0.03	0.22 ± 0.01	0.58 ± 0.42	1.55 ± 0.36	1.57 ± 0.14
siYAP cSFK-M 组	0.14 ± 0.04	1.12 ± 0.08	0.24 ± 0.03	1.07 ± 0.16	1.44 ± 0.12	1.95 ± 0.71
siYAP cSFK-H 组	0.15 ± 0.03	1.07 ± 0.04	0.22 ± 0.02	1.26 ± 0.21	1.52 ± 0.19	2.14 ± 1.15
siYAP cSTAT3-I 组	0.12 ± 0.03	0.96 ± 0.03	0.22 ± 0.01	1.23 ± 0.10	1.08 ± 0.15	3.65 ± 0.79
siYAP c 阳性对照组	0.06 ± 0.02	0.97 ± 0.07	0.26 ± 0.03	1.23 ± 0.16	1.56 ± 0.05	1.81 ± 0.18

程度^[14]。本研究首先检测在TGF- β_1 影响下巨噬细胞的极化情况,实验结果显示,与对照组比较,TGF- β_1 诱导后的模型组细胞中CD86、CD163蛋白表达水平和CD86、F4/80 mRNA表达水平均显著升高,提示TGF- β_1 可驱动巨噬细胞进入高度活化状态,从而为后续成纤维细胞激活创造促纤维化微环境;给予SFK后,上述指标水平较模型组均降低,说明SFK可以有效降低巨噬细胞的极化水平,抑制TGF- β_1 诱导的巨噬细胞异常极化。SFK对极化指标的抑制作用提示其可能通过干预极化相关信号转导过程发挥调控作用。

4.2 SFK通过阻断巨噬细胞-成纤维细胞串扰缓解RIF

巨噬细胞可通过释放细胞因子等可溶性因子调节成纤维细胞功能,并通过招募、增殖和激活成纤维细胞诱导纤维化^[3]。本研究结果显示,与c对照组比较,c模型组NRK-49F细胞中 α -SMA、Vimentin、Col- I的蛋白及mRNA表达水平均显著升高,MMP-1蛋白及mRNA表达水平均显著降低,提示活化后的巨噬细胞能够通过分泌可溶性因子诱导成纤维细胞向促纤维化表型转变。由于本研究采用非接触共培养模式,上述效应主要来源于巨噬细胞分泌的细胞因子或信号分子,而非细胞间直接接触,进一步强调了巨噬细胞-成纤维细胞串扰在RIF进程中的关键作用。与c模型组比较,cSFK各浓度组、cSTAT3-I组、c阳性对照组上述指标水平均改善,提示SFK可减弱条件培养基诱导的肾成纤维细胞活化,从而减少纤维化的发生。值得注意的是,cSTAT3-I组与cSFK-M组效果相同,均显著逆转了c模型组上述指标变化,提示STAT3信号在巨噬细胞介导的促纤维化串扰

中发挥重要调控作用,抑制 STAT3 可减弱活化后巨噬细胞培养液对肾成纤维细胞的激活作用。结合前述巨噬细胞极化实验结果,推测 SFK 可能通过抑制 STAT3 相关通路;抑制巨噬细胞异常极化及其促纤维化功能,能抑制肾成纤维细胞活化,最终缓解 RIF。

4.3 SFK 通过阻断 STAT3/YAP 通路抑制巨噬细胞-成纤维细胞串扰

已有研究表明,STAT3 可激活 YAP 信号^[15],而 YAP 参与成纤维细胞活化及 RIF 进程^[12]。本研究结果显示,与对照组或 c 对照组比较,TGF- β_1 诱导后,巨噬细胞中 STAT3 表达显著上调,而经条件培养基共培养的肾成纤维细胞中 YAP 表达同步上调,提示巨噬细胞活化后可能通过 STAT3/YAP 通路介导巨噬细胞-成纤维细胞串扰;SFK 干预后,巨噬细胞中 STAT3 表达及共培养的肾成纤维细胞中 YAP 表达均显著下调,提示 SFK 可能通过抑制 STAT3/YAP 通路,减弱促纤维化信号传递。进一步研究发现,STAT3-I 的作用趋势与 SFK 相似,均可下调巨噬细胞极化水平及肾成纤维细胞纤维化相关因子的表达,提示 STAT3 可能位于该通路的上游。为进一步验证 YAP 在该通路中的作用,本研究采用 YAP 敲低的肾成纤维细胞进行非接触共培养,结果显示,敲低 YAP 后,各组细胞中 α -SMA、Vimentin、MMP-1 蛋白及 mRNA 表达差异均无统计学意义,可见极化巨噬细胞条件培养基对肾成纤维细胞纤维化相关因子的影响显著减弱,提示 YAP 是 STAT3 介导的巨噬细胞-成纤维细胞串扰的重要下游分子。

5 结语

本研究发现,SFK 可通过阻断 STAT3/YAP 通路,抑制巨噬细胞-成纤维细胞串扰,发挥抗纤维化作用,从而抑制 RIF 进展。值得注意的是,本研究中 SFK-M 组在部分指标中表现显著强于 SFK-L 组、SFH-H 组,提示 SFK 的作用可能并非单纯呈浓度依赖性增强。SFK 作为复方制剂,其药效可能与多成分、多靶点及多通路协同调节有关,存在相对适宜的作用浓度范围;当浓度进一步升高时,SFK 的作用可能出现平台效应,或因细胞应激、反馈调节及不同成分间相互作用等因素,使 SFK-H 组未表现出更强的干预效果。因此,后续仍需进一步结合不同给药浓度、作用时间及药效物质基础研究,明确 SFK 发挥最佳作用的浓度范围及其关键活性成分。

本研究仍存在一定不足。首先,本研究主要基于体外细胞实验开展,尚缺乏动物实验验证,其体内药效仍需进一步研究。其次,本研究主要围绕 STAT3/YAP 通路进行机制探讨,SFK 对其他潜在靶点及相关信号通路的影响尚未完全阐明。此外,受客观条件限制,在 YAP 基因敲低细胞实验中,本研究仅选取 α -SMA、Vimentin 和 MMP-1 作为纤维化相关指标进行验证,尚未进一步检测 Col-I 等细胞外基质沉积相关指标。后续研究将补充 Col-I 等指标检测,并结合体内实验、药效物质基础分析及多通路验证,进一步阐明 SFK 改善肾纤维化的作用及其分子机制。

参考文献

- [1] 高月红,王春丽,毛艳艳,等.全球慢性肾病防治药物研究进展[J].科技导报,2021,39(5):99-105.
- [2] 陈驰,吕静.中医药防治慢性肾脏病肾间质纤维化的研究进展[J].湖南中医杂志,2024,40(1):182-185.
- [3] BUECHLER M B, FU W X, TURLEY S J. Fibroblast-macrophage reciprocal interactions in health, fibrosis, and cancer[J]. Immunity, 2021, 54(5):903-915.
- [4] LEE S H, KIM K H, LEE S M, et al. STAT3 blockade ameliorates LPS-induced kidney injury through macrophage-driven inflammation[J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1):476.
- [5] SZETO S G, NARIMATSU M, LU M L, et al. YAP/TAZ are mechanoregulators of TGF- β -Smad signaling and renal fibrogenesis[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(10):3117-3128.
- [6] SHEN Y, WANG X H, LIU Y, et al. STAT3-YAP/TAZ signaling in endothelial cells promotes tumor angiogenesis[J]. Sci Signal, 2021, 14(712):eabj8393.
- [7] 蔡果珍,钟小斌,杨玉芳,等.肾福康胶囊治疗肾功能不全的临床研究[J].中国药房,2017,28(14):1934-1937.
- [8] 闫晓欢,孙乔,吴振华,等.大黄及其中药复方干预肾脏纤维化研究进展[J].陕西中医,2025,46(9):1294-1296.
- [9] QIN M Y, HUANG S Q, ZOU X Q, et al. Drug-containing serum of Rhubarb-Astragalus capsule inhibits the epithelial-mesenchymal transformation of HK-2 by downregulating TGF- β /p38MAPK/Smad2/3 pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 280:114414.
- [10] ZHANG X Y, ZHANG Y X, LIU Y H. Fibroblast activation and heterogeneity in fibrotic disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2025, 21(9):613-632.
- [11] HUANG Q Y, ZHONG W, CHEN R X, et al. SETD7 exacerbates diabetic nephropathy through activating A2B receptor-JAK2/STAT3 pathway[J]. Cell Biosci, 2025, 15(1):153.
- [12] WANG Y, WU Y D, XIANG L, et al. Inhibition of the YAP-E2F2-FGF2 axis in renal tubular cells ameliorates renal fibrosis in chronic kidney disease[J]. Sci China Life Sci, 2026, 69(1):166-179.
- [13] HE L Z, PRATT H, GAO M S, et al. YAP and TAZ are transcriptional co-activators of AP-1 proteins and STAT3 during breast cellular transformation[J]. eLife, 2021, 10:e67312.
- [14] 高可利,杨静,朱永俊.巨噬细胞极化参与肾间质纤维化的机制研究进展[J].临床肾脏病杂志,2023,23(11):962-966.
- [15] YOU Z C, HUANG Q H, ZENG L, et al. Rab26 promotes hypoxia-induced hyperproliferation of PSMCs by modulating the AT1R-STAT3-YAP axis[J]. Cell Mol Life Sci, 2025, 82(1):396.

(收稿日期:2026-01-04 修回日期:2026-06-13)

(本文责编:邹丽娟)