

益肾通络方改善高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤及其对 SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A 通路的影响^Δ

黎凤仪^{1*}, 钟建^{2#}(1. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 南宁 530222; 2. 广西中医药大学第一附属医院肾内科, 南宁 530023)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)13-1710-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.13.09



摘要 **目的** 探讨益肾通络方对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤的改善作用及其对沉默信息调节因子3(SIRT3)-腺苷一磷酸活化蛋白激酶(AMPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 α (PGC-1 α)/肉碱棕榈酰基转移酶1A(CPT1A)信号通路的影响。**方法** 以人肾小管上皮细胞HK-2为对象,将其分为正常糖组(NC组)、高糖组(HG组)、高糖+益肾通络方低剂量组[HG+L组, 0.5 mg/mL(以总生药量计)]、高糖+益肾通络方高剂量组[HG+H组, 1.0 mg/mL(以总生药量计)]。除NC组外,其余各组细胞均在高糖(30 mmol/L)条件下培养, HG+L、HG+H组细胞同时接受相应质量浓度药液干预。检测各组细胞培养0、24、48 h时的细胞活力,以及培养48 h后的活性氧(ROS)水平、腺苷三磷酸(ATP)含量和SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A信号通路相关分子的表达情况。**结果** 与NC组比较, HG组细胞活力(培养24、48 h)及ATP含量均显著降低, ROS水平显著升高($P<0.05$); SIRT3、PGC-1 α 、CPT1A蛋白表达, PGC-1 α 、CPT1A mRNA表达, 以及AMPK蛋白磷酸化水平均显著下调或降低($P<0.05$)。与HG组比较, HG+L、HG+H组细胞上述指标均显著改善, 且HG+H组的改善更为明显($P<0.05$)。**结论** 益肾通络方可改善高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤, 其作用可能与激活SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A信号通路、改善线粒体能量代谢、减轻氧化应激有关。

关键词 益肾通络方; 肾小管上皮细胞; 高糖; 能量代谢; 氧化应激; SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A信号通路

Effects of Yishen tongluo formula on high glucose-induced injury in renal tubular epithelial cells and its impact on the SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A pathway

LI Fengyi¹, ZHONG Jian²(1. Faculty of Chinese Medicine Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222 China; 2. Dept. of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the protective effect of Yishen tongluo formula on high glucose-induced injury in renal tubular epithelial cells and its impact on the silence information regulator 3 (SIRT3)-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)/carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) signaling pathway. **METHODS** Human renal tubular epithelial cells HK-2 were used as the subject. The cells were divided into a normal glucose group (NC group), a high glucose group (HG group), a high glucose+low-dose Yishen tongluo formula group [HG+L group, 0.5 mg/mL (calculated by crude drugs)], and a high glucose+high-dose Yishen tongluo formula group [HG+H group, 1.0 mg/mL (calculated by crude drugs)]. Except for the NC group, cells in all other groups were cultured under high glucose conditions (30 mmol/L), and cells in the HG+L and HG+H groups were simultaneously treated with the corresponding mass concentrations of medicinal liquid. Cell viability was assessed at 0, 24, and 48 h post-incubation, and reactive oxygen species (ROS) level, adenosine triphosphate (ATP) content, and the expression of molecules related to the SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A signaling pathway were measured after 48 h of incubation. **RESULTS** Compared with the NC group, the HG group showed significantly reduced cell viabilities (at 24 and 48 h) and ATP content, along with significantly elevated ROS levels ($P<0.05$). Additionally, the protein expressions of SIRT3, PGC-1 α and CPT1A, as well as the mRNA expressions of PGC-1 α and CPT1A, and the phosphorylation level of AMPK protein were all significantly downregulated or decreased ($P<0.05$). Compared with the HG group, the aforementioned indicators were significantly improved in both HG+L and HG+H groups, with the improvement being more pronounced in the HG+H group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The Yishen tongluo formula can

^Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82260866); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院自然科学研究项目(No.2025ZD001)

* 第一作者 副主任医师, 硕士。研究方向: 中西医结合(肾病方向)。E-mail: 535386637@qq.com

通信作者 主任医师, 博士。研究方向: 肾内科。E-mail: zhongjian@medmail.com

improve high-glucose-induced damage to renal tubular epithelial cells; its action may be related to activating the SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A signaling pathway, improving mitochondrial energy metabolism, and alleviating oxidative stress.

KEYWORDS Yishen tongluo formula; renal tubular epithelial cells; high glucose; energy metabolism; oxidative stress; SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A signaling pathway

糖尿病慢性肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病最常见且最严重的并发症之一,也是导致终末期肾病的重要原因^[1]。近年来研究发现,除肾小球损伤外,肾小管上皮细胞损伤在DKD发生发展中同样发挥着关键作用,甚至早于肾小球病变出现;同时,肾小管上皮细胞对能量代谢高度依赖,线粒体功能状态将直接影响细胞存活、物质转运及修复能力^[2-3]。在高糖环境下,肾小管上皮细胞线粒体功能受损主要表现为腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)生成减少及活性氧(reactive oxygen species, ROS)过度产生,进而引发氧化应激反应和能量代谢障碍;同时,持续的氧化应激和线粒体功能紊乱可进一步加重肾小管细胞损伤,从而促进DKD进展^[4]。因此,靶向线粒体能量代谢以改善肾小管损伤,已成为DKD机制研究的重要方向。

沉默信息调节因子3(silence information regulator 3, SIRT3)是定位于线粒体内的核心去乙酰化酶。研究表明, SIRT3可通过调控腺苷一磷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)活性,进一步影响过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)及肉碱棕榈酰基转移酶1A(carnitine palmitoyltransferase 1A, CPT1A)等关键因子,该级联反应构成了维持肾小管线粒体生物发生和脂肪酸 β -氧化的关键通路^[5-7]。已有研究证实, SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A信号通路功能受损与DKD肾小管能量代谢障碍密切相关^[8-9]。

益肾通络方为广西中医药大学第一附属医院肾内科的临床经验方,由黄芪、熟地黄、山茱萸、大黄、杜仲、菟丝子、丹参、当归、川芎、赤芍、地龙、牛膝共12味中药组方而成,具有补肾益气、活血通络之效,可用于DKD的治疗,在改善蛋白尿及延缓肾功能进展方面具有一定的临床优势^[4]。方中,黄芪-丹参为核心药对,其中黄芪活性成分可通过激活AMPK信号通路来改善糖尿病小鼠肾脏线粒体功能^[10],丹参活性成分可通过调控线粒体生物发生相关通路来发挥肾脏保护作用^[4]。然而,全方能否靶向调控上述线粒体能量代谢通路尚缺乏明确的实验证据。为此,本研究采用高糖诱导的人肾小管上皮细胞损伤模型,系统考察益肾通络方对细胞活力、氧化应激、能量代谢及SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A信号通路的影响,以期为该方治疗DKD提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括BPN-80CH型CO₂恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司), Multiskan FC型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), SpectraMax i3x型发光酶标仪(美国 Molecular Devices 公司), IX73型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司), Mini-PROTEAN Tetra Cell型垂直电泳、Mini Trans-Blot Cell型转膜系统、ChemiDoc MP型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), QuantStudio 5型实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司)等。

1.2 主要药品与试剂

益肾通络方12味组方中药饮片均购自广西中医药大学赛恩斯新医药学院附属中医门诊部中药房,经副高级实验师盘涌鉴定均为真品。

葡萄糖(货号G8270)购自美国Sigma-Aldrich公司; DMEM/F12培养基(货号11330032)、胎牛血清(FBS, 货号10099141C)、青霉素-链霉素双抗(货号15140122)均购自美国Gibco公司; CCK-8试剂盒(货号C0038)、2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针ROS检测试剂盒(货号S0033S)、ATP检测试剂盒(货号S0026)、RIPA裂解液(货号P0013B)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号P0012)、ECL化学发光试剂盒(货号P0018S)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(货号IPVH00010)购自美国Millipore公司; TRIzol试剂(货号15596026)购自美国Invitrogen公司; 反转录试剂盒(货号RR047A)、TB Green® Premix Ex Taq™ II试剂盒(货号RR820A)均购自日本TaKaRa公司; 兔抗SIRT3、PGC-1 α 抗体和鼠抗CPT1A抗体(货号分别为ab246522、ab54481、ab128568)均购自英国Abcam公司; 兔抗AMPK、磷酸化AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)抗体(货号分别为#5831、#2535)均购自美国Cell Signaling Technology公司; 鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号60004-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗鼠免疫球蛋白G二抗(货号分别为111-035-003、115-035-003)均购自美国Jackson Immuno-Research公司。

1.3 细胞

人肾小管上皮细胞 HK-2(货号 CL-0109)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 益肾通络方药液的制备

取黄芪、熟地黄、山茱萸、大黄、杜仲、菟丝子、丹参、当归、川芎、赤芍、地龙、牛膝饮片,按质量比 30:20:15:6:15:15:20:12:10:12:10:15 混合,加 8 倍量水浸泡 30 min 后煎煮 1 h,过滤;药渣再加 6 倍量水,煎煮 1 h,过滤;合并 2 次滤液,减压浓缩,得质量浓度为 1 g/mL(按总生药量计)的水煎液,分装后于 4℃下保存,备用。

2.2 细胞培养、分组、处理

取 HK-2 细胞,接种于含 10%FBS、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养基中,于 37℃、5%CO₂ 条件下培养。每 2~3 d 更换培养基 1 次,待细胞生长至对数生长期进行后续实验。

取对数生长期的 HK-2 细胞,随机分为正常糖组(NC 组,5.5 mmol/L 葡萄糖)、高糖组(HG 组,30 mmol/L 葡萄糖)、高糖+益肾通络方低剂量组[HG+L 组,益肾通络方终浓度为 0.5 mg/mL(以总生药量计)]和高糖+益肾通络方高剂量组[HG+H 组,益肾通络方终浓度为 1.0 mg/mL(以总生药量计)],每组设 3 个复孔。NC 组细胞正常培养,HG 组细胞在高糖条件下培养,HG+L、HG+H 组细胞在高糖条件下培养的同时接受相应质量浓度药液干预。实验方案设计参考相关文献^[11-12],药物干预浓度参考本课题组前期 CCK-8 细胞毒性实验结果设置。

2.3 细胞活力检测

采用 CCK-8 法检测。取对数生长期的 HK-2 细胞,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,待贴壁后按“2.2”项下方法进行分组(需设置不含药物、不含细胞的空白组)、处理。分别于培养 0、24、48 h 时,向各孔中加入 CCK-8 工作液 10 μL,于 37℃下孵育 2 h 后,采用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的光密度(OD)值并按下式计算细胞活力:细胞活力 = $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{NC组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.4 细胞内 ROS 水平检测

采用 DCFH-DA 荧光探针法检测。取对数生长期的 HK-2 细胞,按“2.3”项下方法分组(勿需设置空白组,下同)、处理。培养 48 h(培养时间参考“2.3”项下结果设置,下同)后,收集各组细胞,加入 DCFH-DA 工作液(终浓度为 10 μmol/L),于 37℃下避光孵育 30 min;孵育结束后,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次以充分去除游离探针;以 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染核,于室温

下避光孵育 5 min;用 PBS 洗涤 3 次后,使用荧光显微镜观察并采集图像,采用 ImageJ 软件对各组细胞 ROS 阳性表达区域(呈绿色荧光)的平均荧光强度进行定量分析,用以表示 ROS 水平(结果以 NC 组为参照进行归一化处理)。

2.5 细胞内 ATP 含量的检测

采用化学发光法检测。取对数生长期的 HK-2 细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养 48 h 后,收集各组细胞,参照相应检测试剂盒说明书方法,加入 ATP 检测裂解液,充分裂解后于 4℃下以 12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液。取 ATP 检测工作液 100 μL,加至 96 孔板中,于室温下放置 3~5 min 以消耗背景发光,随后加入上述上清液 20 μL,使用发光酶标仪检测其化学发光强度,再根据标准曲线法计算各组细胞内 ATP 含量(结果以 NC 组为参照进行归一化处理)。

2.6 细胞中 SIRT3-AMPK/PGC-1α/CPT1A 信号通路相关蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。取对数生长期的 HK-2 细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养 48 h 后,收集各组细胞,加入 RIPA 裂解液裂解后,于 4℃下以 12 000 r/min 离心 15 min;取上清液,经 BCA 法测定浓度后进行变性处理。取变性蛋白适量,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜上,以 5% 脱脂奶粉于室温下封闭 1 h;洗膜后,分别加入 SIRT3、AMPK、p-AMPK、PGC-1α、CPT1A、GAPDH 一抗(稀释比例均为 1:1 000),于 4℃下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为 1:5 000),于室温下孵育 1 h;洗膜后,以 ECL 化学发光法显影、成像,再使用 ImageJ 软件分析各蛋白的条带灰度值,以各目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值表示各目的蛋白的表达水平,以 p-AMPK 与 AMPK 的灰度值比值表示 AMPK 蛋白的磷酸化水平(结果以 NC 组为参照进行归一化处理)。

2.7 细胞中 PGC-1α、CPT1A mRNA 表达检测

采用 RT-qPCR 法检测。取对数生长期的 HK-2 细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养 48 h 后,收集各组细胞,采用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,待检测纯度、浓度后将其逆转录为 cDNA;以此 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应体系共 20 μL,包括 TB Green® Premix Ex Taq™ II 10 μL、正/反向引物(序列及产物长度见表 1)各 0.4 μL、cDNA 模板 2 μL、无 RNase 水 7.2 μL。反应条件为 95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s,60℃退火/延伸 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算细胞中各目的基因的相对表达量。

表1 RT-qPCR所用引物序列及产物长度

目的基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
GAPDH	正向: TGCCTGATTGCGAGTTCACGGCATC	87
	反向: CTGCATGGCCATTAGCTCCACC	
PGC-1 α	正向: AATGTAGAAACAGGACACGG	156
	反向: AGGTTGGGATGCTTGAGTTG	
CPT1A	正向: GGATTCTCTGCTCTCCTC	141
	反向: CTTGTTCCTCCTCAGAGTC	

2.8 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用双因素方差分析(涉及组别和培养时间两个因素的细胞活力)或单因素方差分析(其余指标), 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验(方差齐时)或 Dunnett's *T*3 检验(方差不齐时)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

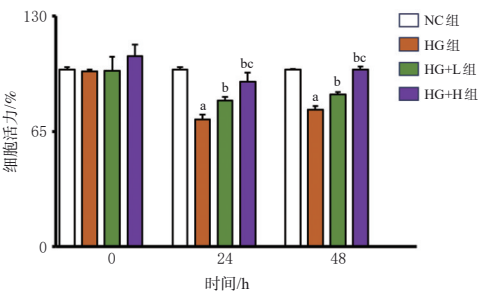
3 结果

3.1 益肾通络方对高糖诱导 HK-2 细胞活力的影响

培养 0 h 时, 各组细胞活力比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。培养 24、48 h 后, 与同期 NC 组比较, HG 组细胞活力均显著降低 ($P<0.05$); 与同期 HG 组比较, HG+L、HG+H 组细胞活力均显著升高, 且 HG+H 组高于 HG+L 组 ($P<0.05$)。结果见图 1。由于药物干预 48 h 的效果最为明显, 故后续指标的检测均在培养 48 h 后进行。

3.2 益肾通络方对高糖诱导 HK-2 细胞内 ROS 水平的影响

NC 组细胞的绿色荧光较弱 (ROS 水平为 1.00 ± 0.09); 与 NC 组比较, HG 组细胞的绿色荧光明显增强, ROS 水平 (2.02 ± 0.12) 显著升高 ($P<0.05$); 与 HG 组比



a: 与同期 NC 组比较, $P<0.05$; b: 与同期 HG 组比较, $P<0.05$; c: 与同期 HG+L 组比较, $P<0.05$ 。

图1 不同培养时间下各组细胞活力比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

较, HG+L、HG+H 组细胞的绿色荧光均有所减弱, ROS 水平 (1.60 ± 0.10 、 1.20 ± 0.10) 均显著降低, 且 HG+H 组显著低于 HG+L 组 ($P<0.05$)。结果见图 2。

3.3 益肾通络方对高糖诱导 HK-2 细胞内 ATP 含量的影响

与 NC 组 [每 2×10^5 个细胞含 (1.00 ± 0.02) μmol] 比较, HG 组细胞内 ATP 含量 [每 2×10^5 个细胞含 (0.55 ± 0.06) μmol] 显著降低 ($P<0.05$); 与 HG 组比较, HG+L、HG+H 组细胞内 ATP 含量 [每 2×10^5 个细胞分别含 (0.72 ± 0.07)、(0.90 ± 0.07) μmol] 均显著升高, 且 HG+H 组显著高于 HG+L 组 ($P<0.05$)。

3.4 益肾通络方对高糖诱导 HK-2 细胞中信号通路相关蛋白表达的影响

与 NC 组比较, HG 组细胞中 SIRT3、PGC-1 α 、CPT1A 蛋白的表达及 AMPK 蛋白的磷酸化水平均显著下调或降低 ($P<0.05$); 与 HG 组比较, HG+L、HG+H 组细胞中 SIRT3、PGC-1 α 、CPT1A 蛋白的表达及 AMPK 蛋

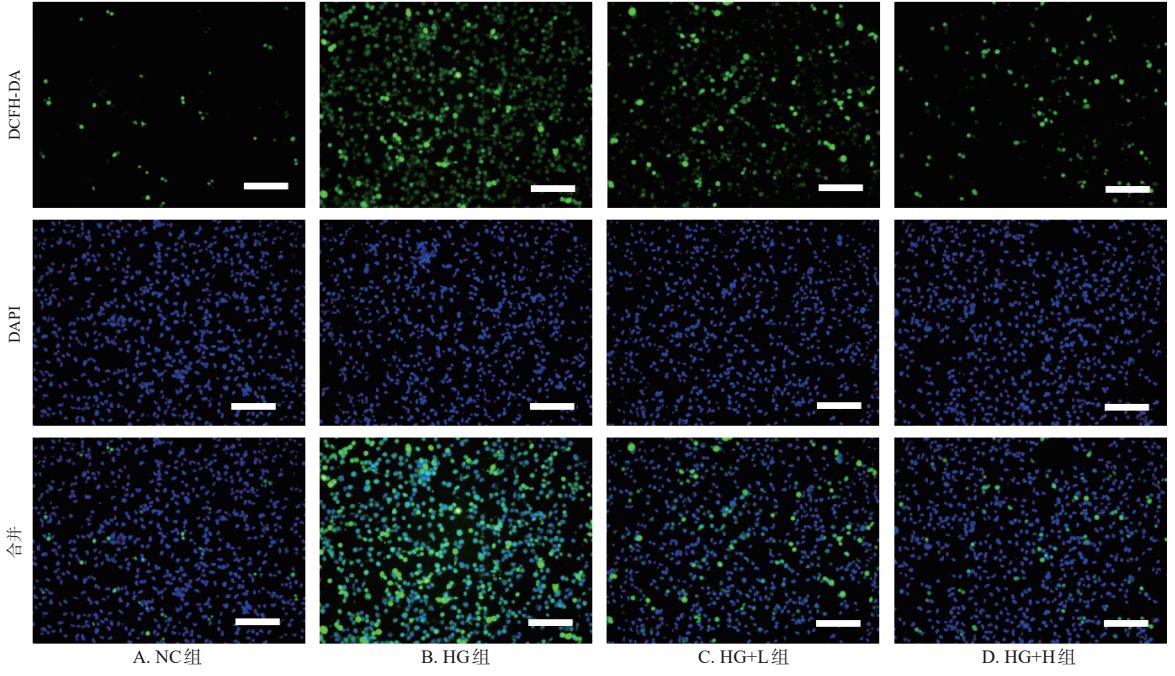
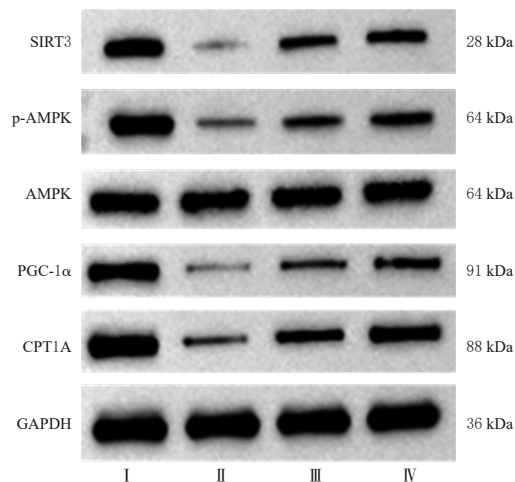


图2 各组细胞内 ROS 水平比较的显微图 (标尺: 100 μm)

白的磷酸化水平均显著上调或升高,且HG+H组上述指标水平均显著高于HG+L组($P<0.05$)。结果见图3、表2。



I : NC组; II : HG组; III : HG+L组; IV : HG+H组。

图3 各组细胞中信号通路相关蛋白表达情况的电泳图

表2 各组细胞中信号通路相关蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	SIRT3/GAPDH	p-AMPK/AMPK	PGC-1α/GAPDH	CPT1A/GAPDH
NC组	1.00±0.08	1.00±0.09	1.00±0.07	1.00±0.08
HG组	0.24±0.03 ^a	0.34±0.04 ^a	0.36±0.04 ^a	0.35±0.04 ^a
HG+L组	0.58±0.06 ^b	0.62±0.06 ^b	0.63±0.05 ^b	0.62±0.06 ^b
HG+H组	0.86±0.07 ^{bc}	0.88±0.08 ^{bc}	0.84±0.07 ^{bc}	0.83±0.07 ^{bc}

a: 与NC组比较, $P<0.05$; b: 与HG组比较, $P<0.05$; c: 与HG+L组比较, $P<0.05$ 。

3.5 益肾通络方对高糖诱导 HK-2 细胞中 PGC-1α、CPT1A mRNA 表达的影响

与 NC 组比较, HG 组细胞中 PGC-1α、CPT1A mRNA 的表达均显著下调($P<0.05$); 与 HG 组比较, HG+L、HG+H 组细胞中 PGC-1α、CPT1A mRNA 的表达均显著上调, 且 HG+H 组上述指标水平均显著高于 HG+L 组($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组细胞中 PGC-1α、CPT1A mRNA 表达情况比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PGC-1α mRNA	CPT1A mRNA
NC组	0.0178±0.0007	0.00205±0.00016
HG组	0.0088±0.0005 ^a	0.00108±0.00018 ^a
HG+L组	0.0122±0.0008 ^b	0.00145±0.00014 ^b
HG+H组	0.0167±0.0011 ^{bc}	0.00225±0.00020 ^{bc}

a: 与NC组比较, $P<0.05$; b: 与HG组比较, $P<0.05$; c: 与HG+L组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

近年来研究表明, 肾小管上皮细胞在 DKD 进展中并非被动受累, 而是主动参与疾病发生的重要环节^[2]。肾小管上皮细胞高度依赖脂肪酸β-氧化供能, 其所需 ATP 主要来源于线粒体氧化磷酸化过程。当高糖持续存在时, 线粒体电子传递链功能受损, 电子外泄增加, 促

使 ROS 大量生成; 过量 ROS 不仅会损伤线粒体 DNA 和膜蛋白, 而且可诱导线粒体通透性转变孔开放, 进一步降低 ATP 生成效率, 形成“氧化应激→线粒体损伤→能量耗竭”的恶性循环^[4]。本研究结果显示, 与 NC 组比较, HG 组 HK-2 细胞活力(作用 24、48 h)显著降低, 并伴有 ROS 水平显著升高、ATP 含量明显下降, 这与上述机制描述基本相符; 经低、高剂量益肾通络方干预后, 细胞活力(作用 24、48 h)均显著升高, ROS 水平均显著降低, 且 ATP 含量明显恢复, 提示该方可能通过改善线粒体结构和功能, 打破高糖诱导的氧化应激恶性循环, 从而恢复细胞能量稳态。

SIRT3 作为定位于线粒体内的关键去乙酰化酶, 是维持线粒体功能完整性的核心调控分子, 可通过去乙酰化反应来调节多种线粒体代谢酶(如参与三羧酸循环及脂肪酸氧化的关键酶类)的活性; 同时, 其还能增强超氧化物歧化酶 2 等抗氧化酶的活性, 从而减少 ROS 生成^[13]。研究表明, 在 DKD 动物模型中, SIRT3 蛋白的表达显著下调, 与线粒体功能障碍及氧化应激加重密切相关^[5]。本研究结果显示, 高糖可显著抑制 HK-2 细胞中 SIRT3 蛋白的表达, 而低、高剂量的益肾通络方则可使细胞中 SIRT3 蛋白的表达显著上调, 提示该方可能通过上调 SIRT3 蛋白的表达, 在上游环节发挥改善线粒体代谢状态的作用^[5]。

AMPK 是细胞内重要的能量感受器, 当细胞中腺苷一磷酸(adenosine monophosphate, AMP)与 ATP 的比值升高时, AMPK 可发生变构激活, 其暴露出的 Thr172 位点可被上游激酶肝激酶 B1(liver kinase B1, LKB1)磷酸化; 激活后的 AMPK 可促进脂肪酸氧化和线粒体生物发生, 同时抑制合成代谢等能量消耗过程, 从而维持细胞能量平衡^[6-7]。SIRT3 与 AMPK 之间存在功能交互关系: SIRT3 可通过去乙酰化激活 LKB1, 进而促进 AMPK 磷酸化; 而 AMPK 亦可调控 PGC-1α 编码基因的转录活性, 增强线粒体生物发生能力^[12]。本研究结果显示, 高糖可显著降低 HK-2 细胞中 AMPK 蛋白的磷酸化水平, 而低、高剂量的益肾通络方则显著升高 AMPK 蛋白的磷酸化水平, 提示该方可能通过调节 SIRT3-AMPK 相关信号转导来改善细胞的能量代谢状态。

PGC-1α 是调控线粒体生物发生的核心转录共激活因子, 其表达下调将直接影响线粒体数量及功能; CPT1A 为β-氧化的限速酶, 是脂肪酸进入线粒体发生氧化的关键节点^[9]。研究指出, PGC-1α、CPT1A 表达的下调意味着线粒体生物发生减少、脂肪酸氧化能力减弱, 从而导致能量供应不足^[11,14]。本研究结果显示, HG 组细胞中 PGC-1α、CPT1A 蛋白及 mRNA 的表达均较 NC 组

显著下调;而经低、高剂量的益肾通络方干预后,细胞中上述蛋白及mRNA的表达均较HG组显著上调,提示该方改善高糖诱导能量代谢障碍的作用可能与其促进PGC-1 α 、CPT1A表达上调有关。此外,本研究中,上述蛋白及mRNA表达的变化趋势(RT-qPCR与Western blot实验结果)一致,提示益肾通络方的调控作用可同时发生在基因转录和蛋白表达层面,可能具有多层次调控特点^[11]。

中医理论认为,DKD归属于“消渴”“水肿”“肾劳”等范畴,其病机多与肾虚、气阴不足及瘀血阻络有关。益肾通络方以补肾益气、活血通络为主要治法,与上述病机契合。本研究从细胞能量代谢角度出发,初步证实了该方对高糖诱导HK-2细胞的保护作用,为其现代药理作用阐释提供了初步的实验依据。然而,本研究仍存在一定的局限性:(1)未设置等渗甘露醇对照组,尚无法完全排除高渗因素对实验结果的影响;(2)本研究主要检测ROS、ATP生成及通路相关分子表达情况,尚未进一步检测线粒体膜电位、氧耗率等直接反映线粒体功能的指标;(3)本研究尚未通过SIRT3抑制剂、基因敲减或过表达实验来进一步验证该通路 with 益肾通络方肾保护作用的因果关系。后续本课题组将结合等渗对照、线粒体功能指标检测及通路干预实验,进一步明确益肾通络方改善高糖致肾小管上皮细胞损伤的具体机制。

综上所述,益肾通络方可改善高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤,该作用可能与激活SIRT3-AMPK/PGC-1 α /CPT1A信号通路、改善线粒体能量代谢、减轻氧化应激有关。

参考文献

[1] Yang S Q, Wang X Y, Zhang Y, et al. SIRT3 regulates CPT1a acetylation and fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells under diabetic condition[J]. Mol Biol Rep, 2025, 52(1):603.

[2] Clark A J, Parikh S M. Targeting energy pathways in kidney disease: the roles of sirtuins, AMPK, and PGC1 α [J]. Kidney Int, 2021, 99(4):828-840.

[3] Juszczak F, Caron N, Mathew A V, et al. Critical role for AMPK in metabolic disease-induced chronic kidney disease[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21):7994.

[4] 朱清,王学艺,韩佳瑞,等. 中药干预糖尿病肾病肾小管损伤的研究进展[J]. 中国医药, 2023, 18(5):787-792.

[5] 陈金虎,倪利华,廖泽锦,等. 沉默信息调节因子3在高糖诱导的肾小管上皮细胞铁死亡中的作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2024, 40(7):540-552.

[6] Wan L, Qian Y C, Ni W J, et al. Linagliptin improves diabetic kidney disease in rats by promoting mitochondrial biogenesis through the AMPK/PGC-1 α /TFAM pathway [J]. Journal of Southern Medical University, 2023, 43(12):2053-2060.

[7] 马学虎,冀思同,曹佩佩,等. 沉默信息调节因子2相关酶3通过提升线粒体功能改善奶牛乳腺氧化应激和炎症反应[J]. 动物营养学报, 2024, 36(12):8049-8061.

[8] 申学婷,张双双,陈小燕,等. 电针“天枢”穴结合二甲双胍对2型糖尿病大鼠糖脂水平的影响[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(1):111-116.

[9] Qin Z, Zhou S Y, Chang X, et al. SIRT3 regulates mitochondrial function: a promising star target for cardiovascular disease therapy[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 170: 116004.

[10] Sun M Y, Ye H J, Zheng C, et al. Astragalin ameliorates renal injury in diabetic mice by modulating mitochondrial quality control via AMPK-dependent PGC1 α pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(8):1676-1686.

[11] Ma Z Y, Huang X N, Kuang J Q, et al. Cpt1a drives primed-to-naive pluripotency transition through lipid remodeling[J]. Commun Biol, 2024, 7(1):1223.

[12] Sharma A, Anand S K, Singh N, et al. AMP-activated protein kinase: an energy sensor and survival mechanism in the reinstatement of metabolic homeostasis[J]. Exp Cell Res, 2023, 428(1):113614.

[13] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6):1615-1625.

[14] 王爽,徐恩爽,范玉营,等. 基于AMPK-PGC-1 α 通路探究阿司匹林对顺铂致急性肾损伤小鼠保护机制研究[C]//中国畜牧兽医学学会兽医外科学分会第十届二次理事会议暨第25次学术研讨会, 2021:225-226.

(收稿日期:2026-02-05 修回日期:2026-06-23)

(本文责编:张元媛)