

益气养阴化浊通络方调控肠道菌群-LPS/Caspase-11/GSDMD通路改善糖尿病肾病的机制研究^Δ

侯紫君^{1*}, 李颖利^{2,3}, 郭克磊^{2,3}, 王艺圆², 黄诗雨², 张璐嘉², 卞 华^{2,3#}(1. 河南中医药大学护理学院, 郑州 450046; 2. 南阳理工学院张仲景国医国药学院, 河南 南阳 473004; 3. 南阳理工学院河南省张仲景方药与免疫调节重点实验室, 河南 南阳 473004)

中图分类号 R965;R285

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2026)19-2536-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.19.09



摘要 **目的** 基于肠道菌群-脂多糖(LPS)/胱天蛋白酶11(Caspase-11)/消皮素D(GSDMD)通路探讨益气养阴化浊通络方改善糖尿病肾病(DKD)的作用机制。**方法** 采用高脂高糖饮食联合小剂量链脲佐菌素腹腔注射的方法建立DKD小鼠模型。将成模小鼠随机分为模型组、二甲双胍组(阳性对照, 200 mg/kg)和益气养阴化浊通络方组(32.4 g/kg, 以生药量计), 每组10只; 另取10只小鼠作为对照组。每天灌胃药液/生理盐水1次, 连续8周。末次给药后, 检测小鼠糖脂代谢与肾功能指标, 观察肾脏及结肠组织病理形态学变化, 检测肾脏、结肠内容物及血清中LPS含量, 通过16S rRNA高通量测序对结肠内容物进行肠道菌群分析, 并检测结肠组织中闭合蛋白(Occludin)、闭锁小带蛋白1(ZO-1)及肾脏组织中Caspase-11、GSDMD蛋白表达。**结果** 与对照组相比, 模型组小鼠血清中空腹血糖、甘油三酯、总胆固醇、血清肌酐、尿素氮及尿液中尿微量白蛋白水平, 各样本中LPS含量, 以及肾脏组织中Caspase-11、GSDMD蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$); 结肠组织中ZO-1、Occludin蛋白表达水平和肠道菌群Chao1、Ace指数均显著降低($P<0.05$), 厚壁菌门/拟杆菌门比值异常升高; 肾脏和结肠组织均发生了明显的病理形态学改变, 肾脏过碘酸希夫阳性面积百分比显著升高($P<0.05$)。与模型组相比, 益气养阴化浊通络方组小鼠糖脂代谢及肾功能相关指标(除总胆固醇外), 各样本中LPS含量, 肾脏组织中Caspase-11、GSDMD蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$); 结肠组织中ZO-1蛋白表达水平、肠道菌群Ace指数均显著升高($P<0.05$); 肠道菌群中双歧杆菌属、粪杆菌属和阿克曼氏菌属等有益菌的相对丰度升高; 肾脏和结肠组织的病理形态学损伤得到改善。**结论** 益气养阴化浊通络方改善DKD的机制可能与重塑肠道菌群、修复肠道黏膜屏障、减少LPS入血, 继而抑制肾脏Caspase-11/GSDMD介导的细胞焦亡有关。

关键词 益气养阴化浊通络方; 糖尿病肾病; 肠道菌群; LPS/Caspase-11/GSDMD通路; 细胞焦亡

Mechanism of Yiqi yangyin huazhuo tongluo formula in ameliorating diabetic kidney disease by regulating the gut microbiota-LPS/Caspase-11/GSDMD pathway

HOU Zijun¹, LI Yingli^{2,3}, GUO Kelei^{2,3}, WANG Yiyuan², HUANG Shiyu², ZHANG Lujia², BIAN Hua^{2,3}

(1. School of Nursing, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Zhang Zhongjing School of Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Henan Nanyang 473004, China; 3. Henan Provincial Key Laboratory of Zhang Zhongjing Formulae and Immunoregulation, Nanyang Institute of Technology, Henan Nanyang 473004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the mechanism of Yiqi yangyin huazhuo tongluo formula in ameliorating diabetic kidney disease (DKD) based on the gut microbiota-lipopolysaccharide (LPS)/Caspase-11/gasdermin D (GSDMD) pathway. **METHODS** A DKD mouse model was established by high-fat and high-sugar diet combined with intraperitoneal injection of low-dose streptozotocin. The successfully modeled mice were randomly divided into model group, metformin group (positive control, 200 mg/kg) and Yiqi yangyin huazhuo tongluo formula group (32.4 g/kg, calculated as crude drug dosage), with 10 mice in each group; another 10 mice were set as the control group. Mice were intragastrically administered with corresponding drug solutions or normal saline once a day for 8 consecutive weeks. After the last administration, serum glycolipid metabolism indicators and urinary renal function indicators of mice were determined; the pathological and morphological changes of renal and colonic tissues were

observed; LPS contents in renal tissues, colonic contents and serum were detected. 16S rRNA high-throughput sequencing was performed for gut microbiota analysis of colonic contents. The protein expressions of Occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) in colonic tissues as well as Caspase-11 and GSDMD in renal tissues were detected. **RESULTS** Compared with the

^Δ **基金项目** 河南省科技攻关项目(No.232102311198); 河南省中医药科学研究专项课题(No.2022ZY1202, No.2024ZYZD13)

* **第一作者** 讲师, 博士。研究方向: 中医药防治内科疾病。
E-mail: jiyun0728@163.com

通信作者 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中医药防治内科疾病。E-mail: biancrown@163.com

control group, the model group exhibited significantly elevated levels of serum fasting blood glucose, triglyceride, total cholesterol, serum creatinine, blood urea nitrogen and microalbumin, LPS contents in each sample, as well as protein expressions of Caspase-11 and GSDMD in renal tissues ($P<0.05$). The protein expressions of ZO-1 and Occludin in colonic tissues, together with Chaol and Ace indices of gut microbiota, were markedly decreased ($P<0.05$), and the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes was abnormally increased. Obvious histopathological changes were observed in renal and colonic tissues; the percentage of PAS-positive area in kidney was markedly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the Yiqi yangyin huazhuo tongluo formula group showed remarkable reductions in glycolipid metabolism and renal function-related indicators (except total cholesterol), LPS contents in various samples, and renal protein expressions of Caspase-11 and GSDMD ($P<0.05$). The protein expression level of ZO-1 in colonic tissues and the Ace index of gut microbiota were significantly increased ($P<0.05$), and the relative abundance of beneficial genera including *Bifidobacterium*, *Faecalibaculum* and *Akkermansia* in the gut microbiota was elevated. **CONCLUSIONS** The mechanism by which Yiqi yangyin huazhuo tongluo formula ameliorates DKD may be related to reshaping gut microbiota, repairing intestinal mucosal barrier, reducing LPS translocation into blood, and further inhibiting Caspase-11/GSDMD-mediated pyroptosis in kidney.

KEYWORDS Yiqi yangyin huazhuo tongluo formula; diabetic kidney disease; gut microbiota; LPS/Caspase-11/GSDMD pathway; pyroptosis

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病最常见且最严重的微血管并发症之一,已成为全球终末期肾病的首要致病因素;预计到2040年,DKD将成为全球第五大死亡原因^[1]。国际糖尿病联盟2025年最新统计数据显示,全球糖尿病患者人数已达5.9亿,其中30%~40%的患者会发展为DKD^[2],导致患者生活质量及预期寿命显著下降,并给全球公共卫生带来沉重负担^[3]。当下,DKD的发病机制尚未完全阐明,亟须探索新的治疗靶点和干预策略。

自2011年“肠-肾轴”理论首次提出以来^[4],肠道菌群与肾脏疾病的双向调节机制逐渐成为DKD研究的新范式。该理论认为,肠道微生态失衡会通过破坏肠道屏障功能、诱导免疫炎症反应及改变菌群代谢谱等途径介导肾脏损伤,而肾功能减退亦会因尿素等的蓄积反向加剧菌群紊乱,形成恶性循环^[5]。多项研究证实,DKD患者及模型动物存在显著的肠道菌群失调,表现为菌群多样性下降、有益菌减少、机会致病菌增多^[6-7]。这种失调破坏了肠道屏障功能,导致内源性毒素[如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)]易位入血、有益代谢产物[如短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)]减少,上述改变共同驱动全身及肾脏的慢性低度炎症,加速DKD进展^[8]。LPS作为革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,可通过多种途径激活宿主免疫反应^[8-9]。近年的研究发现,LPS可不依赖经典Toll样受体4途径,直接通过胞内受体胱天蛋白酶11(cysteiny aspartate specific proteinase 11, Caspase-11)激活下游消皮素D(gasdermin D, GSDMD),引发非经典细胞焦亡^[10]。Cheng等^[11]的研究发现,糖尿病小鼠体内Caspase-11表达上调,且该变化与肾功能下降和慢性炎症相关;敲除Caspase-11可减少糖尿病小鼠的足细胞丢失,减轻巨噬细胞浸润。然而,LPS/Caspase-11/GSDMD通路在DKD中的激活状态及

调控机制有待进一步明确。

中医理论认为,DKD属“消渴”继发的“尿浊”“水肿”等范畴,病机以“气阴两虚、浊邪阻络”为核心。本团队基于该病机总结形成益气养阴化浊通络方,该方由黄芪、生地黄、太子参、陈皮、白术、茯苓、鬼箭羽等组成。前期研究发现,该方能有效降低早期DKD患者的尿蛋白排泄率、改善肾功能,其机制可能与减轻内皮细胞损伤、改善血液流变学及增强抗氧化应激能力有关;并且该方可调控微RNA-21a-5p/叉头框蛋白O1/磷酸酶张力蛋白同源物基因诱导假定激酶1通路介导的线粒体自噬,减轻足细胞损伤^[12-14]。然而,该方能否通过调节肠-肾轴发挥肾脏保护作用,尚不清楚。因此,本研究拟通过高脂高糖饮食联合小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)腹腔注射建立DKD模型,探讨益气养阴化浊通络方对肠道菌群-LPS/Caspase-11/GSDMD通路的影响,以期为基于肠-肾轴防治DKD提供新的研究思路。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有: BK-280型全自动生化分析仪(山东博科灭菌技术有限公司), KZ- II型高速组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司), Pico-21型台式高速冷冻离心机、Q33238型Qubit® 4.0荧光计(美国Thermo Fisher Scientific公司), RM2016型石蜡切片机[徕卡仪器(上海)有限公司], Eclipse Ci型光学显微镜、DS-U3型成像系统(日本Nikon公司), ETC 811型PCR仪(北京东胜创新生物科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

黄芪(产地为浙江宁波,批号240901)、生地黄(产地为河南焦作,批号240308)、太子参(产地为贵州黔东南,批号240701-1)、鬼箭羽(产地为河北保定,批号211101)、六月雪(产地为广西南宁,批号210816)、醋香

附(产地为河南濮阳,批号240510)、白术(产地为安徽亳州,批号240801)、茯苓(产地为湖北黄冈,批号240301-2)、陈皮(产地为江西吉安,批号240602-2)、怀牛膝(产地为河南焦作,批号240701-1)、大黄(产地为甘肃陇南,批号230401)、白芥子(产地为安徽宣城,批号240601-1)、水蛭(产地为山东济宁,批号23110201-1)等中药饮片均购自河南张仲景大药房股份有限公司,经南阳理工学院张仲景国医国药学院中药教研室李超、高丽2名副教授鉴定均为真品。

盐酸二甲双胍片(批号Y09054,规格0.85 g)购自中美上海施贵宝制药有限公司;小鼠LPS酶联免疫吸附检测(ELISA)试剂盒(批号MM0634M1/2)购自江苏酶免实业有限公司;兔抗Caspase-11多克隆抗体(批号ab180673)购自英国Abcam公司;兔抗GSDMD、闭锁小带蛋白1(zonula occludens-1,ZO-1)多克隆抗体(批号分别为AF4012、AF5145)均购自美国Affinity公司;兔抗闭合蛋白(Occludin)多克隆抗体(批号AF7644)购自碧云天生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号5220-0336)购自美国SeraCare生物科技公司;STZ(批号60256ES80)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

1.3 实验动物及饲料

本研究所用动物为SPF级雄性C57BL/6小鼠,40只,6~8周龄,体重18~22 g,购于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司[生产许可证号:SCXK(豫)2020-0005]。所有小鼠均饲养于SPF级动物房,饲养环境条件为温度23~25℃、相对湿度40%~60%、12 h明/12 h暗交替。动物实验方案已通过南阳理工学院实验动物管理与使用委员会审查批准(批准编号:南理工动伦审[2024]011号)。

纯化型高脂高糖饲料购自科澳协力(天津)饲料有限公司,生产许可证号为SCXK(津)2020-0004。

2 方法

2.1 药液制备

取黄芪、茯苓、怀牛膝、醋香附各12 g,太子参、陈皮、白术、六月雪、鬼箭羽各9 g,生地黄6 g,大黄、白芥子、水蛭各3 g,加10倍量蒸馏水浸泡30 min;以武火煮沸后改文火煎煮30 min,收集药液;药渣按照相同方法再煎煮一次,收集药液;合并两次药液,浓缩成质量浓度为1.62 g/mL的水提物(以生药量计,下同),即得。

以蒸馏水为溶剂,制备质量浓度为10 mg/mL的盐酸二甲双胍溶液。以0.1 mol/L、pH4.5的柠檬酸钠缓冲液为溶剂,制备质量浓度为10 mg/mL的STZ溶液(临用前制备)。

2.2 造模、分组与给药

采用高脂高糖饲料联合小剂量STZ腹腔注射构建DKD小鼠模型,具体操作如下:小鼠适应性喂养1周后,以高脂高糖饲料喂养4周,然后连续3 d腹腔注射STZ溶

液(35 mg/kg),建立糖尿病模型(以随机血糖>16.7 mmol/L为成模标准);确定糖尿病模型建立成功后,继续以高脂高糖饲料喂养4周,然后监测小鼠尿微量白蛋白(microalbumin,MALB)水平,以MALB>30 mg/dL且随机血糖≥16.7 mmol/L为DKD模型建立成功的标准^[15]。

将造模成功的DKD小鼠随机分为模型组(Mod组)、二甲双胍组(阳性对照,Met组;每日灌胃二甲双胍200 mg/kg^[16])、益气养阴化浊通络方组(YYHT组;每日灌胃相应药液32.4 g/kg;该剂量是根据前期实验确定的最佳有效剂量^[13-14],并经体表面积法校正为小鼠剂量;预实验结果显示该剂量安全有效),每组10只。另取10只小鼠作为对照组(Con组),以普通饲料喂养4周后连续3 d腹腔注射0.1 mol/L柠檬酸钠缓冲液(pH4.5);继续普通饲料喂养4周后,灌胃生理盐水。各组小鼠的灌胃体积均为20 mL/kg,每日1次,持续8周。

2.3 样本采集与处理

末次给药后,小鼠禁食不禁水12 h。使用代谢笼收集小鼠24 h尿液,记录尿量,离心后取上清,置于-80℃冰箱中冻存。采用异氟烷麻醉小鼠,通过摘眼球法取血,将血液静置2 h后经低温离心分离血清,将血清分装并冻存于-80℃冰箱中。取血后,采用颈椎脱臼法处死小鼠,收集新鲜结肠内容物,经液氮速冻后转入-80℃冰箱中保存;同时,快速摘取双侧肾脏及部分结肠组织,将一侧肾脏组织迅速置于-80℃冰箱中冻存,将结肠组织和另一侧肾脏组织用4%多聚甲醛固定。

2.4 血清中糖脂代谢指标与尿液中肾功能指标检测

取“2.3”项下冻存的血清和尿液(每组取5只小鼠的样本),采用全自动生化分析仪检测血清中空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)、甘油三酯(triacylglycerol,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、血清肌酐(serum creatinine,Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)及尿液中MALB水平。

2.5 肾脏与结肠组织病理形态学观察

取4%多聚甲醛固定24 h的结肠和肾脏组织(每组取3只小鼠样本),常规制备石蜡切片(厚度4 μm)后进行染色实验。(1)肾脏和结肠组织苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色:取肾脏和结肠组织切片,常规行HE染色后,采用光学显微镜观察其病理形态学改变。(2)肾脏组织过碘酸希夫(periodic acid-Schiff,PAS)染色:将肾脏组织切片脱蜡复水后,经1%过碘酸氧化10 min,Schiff试剂避光显色20 min,流水冲洗分化5 min,Harris苏木素复染4 min,梯度脱水、透明后中性树脂封片,采用光学显微镜进行观察,肾小球内紫红色区域为PAS阳性区域。采用Image-Pro Plus 6.0软件计算肾小球内PAS阳性区域面积,并计算PAS阳性面积百分比(PAS阳性面积百分比=PAS阳性区域面积/肾小球总面积×100%)。PAS阳性面积百分比越高,表示肾小

球硬化、系膜扩张损伤越重。(3)结肠组织阿利新蓝-PAS (Alcian blue-PAS, AB-PAS)染色:将结肠切片脱蜡复水后,用1%阿利新蓝溶液(pH2.5)室温染色30 min,蒸馏水充分漂洗后,经1%过碘酸氧化10 min, Schiff试剂避光显色20 min,流水冲洗分化5 min, Harris苏木素复染3 min,梯度脱水、透明后中性树胶封片。杯状细胞黏液可被染为蓝色(酸性黏蛋白)、紫红色(中性黏蛋白)或蓝紫色(混合黏蛋白)。光学显微镜下,通过上皮层内细胞黏液着色、基底侧细胞核形态判定杯状细胞。采用Image-Pro Plus 6.0软件框选结肠上皮区域,对杯状细胞进行人工计数。

2.6 肾脏、结肠内容物及血清中LPS含量检测

准确称取肾脏组织及结肠内容物适量,制备组织匀浆。按照ELISA试剂盒说明书操作,测定小鼠肾脏、结肠内容物及血清中LPS含量。每组取5只小鼠样本进行检测。

2.7 肠道菌群16S rRNA基因测序及生物信息学分析

取“2.3”项下冻存的小鼠结肠内容物(每组取5只小鼠样本),委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成微生物总DNA提取、DNA定量、细菌16S rRNA基因V3~V4区PCR扩增(引物341F:5'-CCTACGGGNGG-CWGCAG-3', 805R:5'-GACTACHVGGGTATCTAA-TCC-3')、高通量测序及生物信息学分析等工作。生物信息学分析内容包括:(1)基于操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)水平开展α多样性分析,其中Chao1、Ace指数用于评估菌群群落丰富度, Shannon指数用于评估菌群多样性;(2)基于Bray-Curtis距离开展β多样性分析,采用主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)对菌群群落结构差异进行可视化;(3)开展物种组成分析;(4)采用线性判别分析效应大小(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析识别各组显著富集的差异物种,以线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)得分大于4作为筛选阈值;利用PICRUST2工具基于16S rRNA测序数据开展菌群功能预测,基于京都基因与基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)获得KEGG直系同源(KEGG orthology, KO)基因信息。

2.8 肾脏组织中Caspase-11、GSDMD及结肠组织中ZO-1、Occludin的蛋白表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.5”项下肾脏组织石蜡切片(每组取3只小鼠样本),经脱蜡、抗原修复、封闭后,分别滴加Caspase-11、GSDMD一抗(稀释比例分别为1:50和1:100),4℃孵育过夜;次日滴加HRP标记的IgG二抗(稀释比例为1:500),避光室温孵育50 min;经二氨基联苯胺显色、苏木素复染、中性树胶封片后,采用光学显微镜观察并采集图像(阳性染色呈棕黄色)。使用

Image-Pro Plus 6.0软件分析目标蛋白的平均光密度(mean density, MD), MD越大表示蛋白表达水平越高。按相同方法检测结肠组织中ZO-1、Occludin蛋白的表达水平;ZO-1、Occludin一抗的稀释比例分别为1:200和1:500,二抗的稀释比例为1:500。

2.9 统计学方法

采用R(4.2.1)软件进行数据分析。符合正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey HSD检验;符合正态分布但方差不齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用Welch单因素方差分析,组间两两比较采用Games-Howell检验。不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用Kruskal-Wallis H检验,组间两两比较采用Dunn检验。基于Bray-Curtis距离的肠道菌群群落组成组间整体差异比较采用置换多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 糖脂代谢及肾功能指标检测结果

与Con组相比,Mod组小鼠血清中FBG、TG、TC、Scr、BUN和尿液中MALB水平均显著升高($P<0.05$)。与Mod组相比, Met组小鼠血清中FBG、Scr水平均显著降低($P<0.05$); YYHT组小鼠血清中FBG、TG、Scr、BUN及尿液中MALB水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组小鼠血清中糖脂代谢指标与尿液中MALB水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	FBG/ (mmol/L)	TG/ (mmol/L)	TC/ (mmol/L)	Scr/ (μmol/L)	BUN/ (mmol/L)	MALB/ (mg/dL)
Con组	7.09±0.66	0.71±0.26	2.91±0.40	42.12±11.23	7.85±0.77	7.19±1.55
Mod组	30.84±2.20 ^a	4.24±1.01 ^a	5.64±0.92 ^a	74.61±4.67 ^a	11.83±1.97 ^a	28.20±5.88 ^a
Met组	19.31±5.83 ^b	3.86±2.62	5.39±0.83	57.97±8.02 ^b	9.34±1.86	21.09±3.02
YYHT组	22.60±4.61 ^b	1.77±0.72 ^b	5.03±0.99	49.61±11.11 ^b	8.57±0.56 ^b	17.95±4.46 ^b
F	166.31	19.53	11.61	11.60	7.29	23.12
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a: 与Con组相比, $P<0.05$; b: 与Mod组相比, $P<0.05$ 。

3.2 肾脏组织病理形态学观察结果

HE染色结果显示, Con组小鼠肾小球结构完整, 肾小管上皮细胞排列规则, 间质未见炎症细胞浸润和出血。Mod组小鼠可见肾小球毛细血管扩张充血, 肾小管刷状缘脱落, 部分管腔可见蛋白管型, 组织内可见大量炎症细胞浸润。与Mod组相比, Met组和YYHT组小鼠肾脏组织炎症损伤明显减轻。PAS染色结果显示, 与Con组相比, Mod组小鼠PAS阳性面积百分比显著升高($P<0.05$); 与Mod组相比, Met组和YYHT组小鼠PAS阳性面积百分比均降低, 且Met组差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见图1、表2。

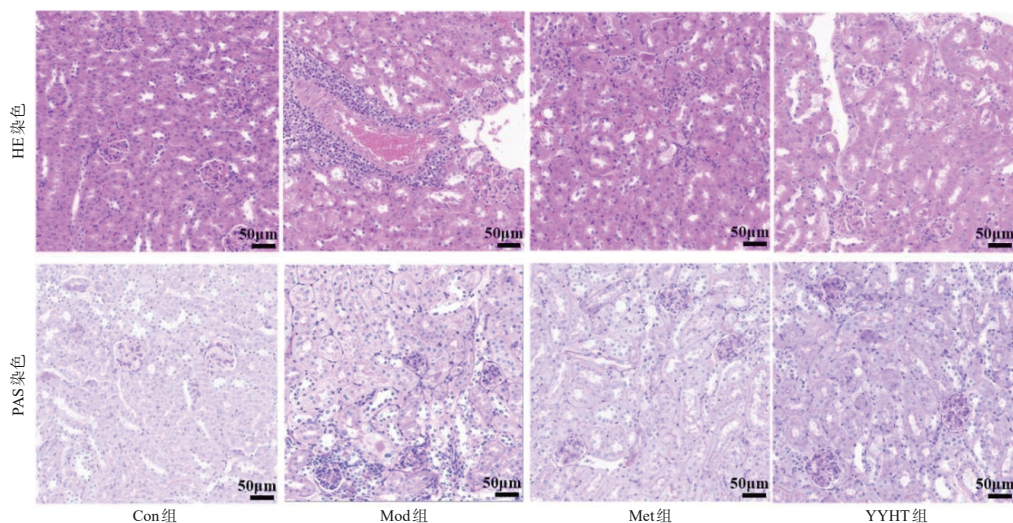


图1 各组小鼠肾脏组织HE、PAS染色结果

3.3 结肠组织病理形态学观察结果

HE染色结果显示,Con组小鼠结肠组织黏膜层上皮结构完整,隐窝排列整齐紧密,无扩张、水肿及炎症细胞浸润。其余各组小鼠的结肠组织均出现不同程度的炎症细胞浸润。AB-PAS染色结果显示,与Con组相比,Mod组小鼠结肠杯状细胞数量减少;与Mod组相比,Met组和YYHT组小鼠结肠杯状细胞数量均有所增加,但差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见图2(仅展示部分组别的结果)、表2。

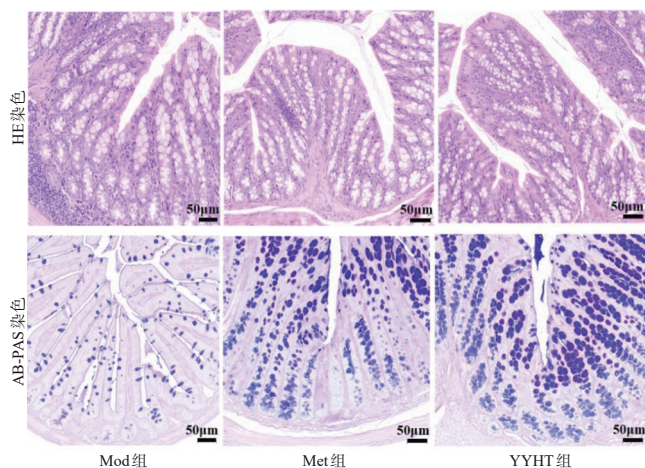


图2 各组小鼠结肠组织HE、AB-PAS染色结果

表2 各组小鼠肾脏组织PAS阳性面积百分比及结肠杯状细胞数量比较[$M(P_{25}, P_{75}), n=3$]

组别	PAS阳性面积百分比/%	杯状细胞数量/个
Con组	0.43(0.24, 1.27)	600(583, 626)
Mod组	32.08(26.27, 33.42) ^a	358(225, 436)
Met组	0.89(0.69, 0.99) ^b	405(399, 467)
YYHT组	4.26(3.99, 5.44)	487(313, 530)
<i>H</i>	9.46	7.31
<i>P</i>	<0.05	0.06

a: 与Con组相比, $P<0.05$; b: 与Mod组相比, $P<0.05$ 。

3.4 结肠组织中ZO-1、Occludin蛋白表达检测结果

与Con组相比,Mod组小鼠结肠组织中ZO-1、Occludin蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。与Mod组相比,Met组小鼠结肠组织中ZO-1、Occludin蛋白以及YYHT组小鼠结肠组织中ZO-1蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表3(免疫组化图请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图1)。

表3 各组小鼠结肠组织中Occludin、ZO-1蛋白的MD比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ZO-1	Occludin
Con组	0.86 ± 0.16	0.82 ± 0.17
Mod组	0.10 ± 0.03^a	0.19 ± 0.04^a
Met组	0.33 ± 0.12^b	0.40 ± 0.09^b
YYHT组	0.28 ± 0.08^b	0.32 ± 0.06
<i>F</i>	27.11	21.11
<i>P</i>	<0.05	<0.05

a: 与Con组相比, $P<0.05$; b: 与Mod组相比, $P<0.05$ 。

3.5 肾脏、结肠内容物及血清中LPS含量检测结果

与Con组相比,Mod组小鼠肾脏、结肠内容物及血清中LPS含量均显著升高($P<0.05$);与Mod组相比,Met组小鼠肾脏以及YYHT组小鼠肾脏、结肠内容物、血清中LPS含量均显著降低($P<0.05$)。结果见表4。

表4 各组小鼠肾脏、结肠内容物及血清中LPS含量比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	肾脏/(ng/g prot)	结肠内容物/(ng/g prot)	血清/(ng/L)
Con组	60.81 ± 4.83	73.73 ± 16.64	456.98 ± 15.33
Mod组	90.11 ± 2.85^a	160.29 ± 21.17^b	652.26 ± 29.94^a
Met组	82.49 ± 4.26^b	142.40 ± 25.20	625.09 ± 22.53
YYHT组	63.62 ± 1.77^b	124.32 ± 14.36^b	519.06 ± 21.94^b
<i>F</i>	77.54	17.78	78.58
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

a: 与Con组相比, $P<0.05$; b: 与Mod组相比, $P<0.05$ 。

3.6 肠道菌群的生物信息学分析结果

3.6.1 菌群多样性分析结果

与Con组相比,Mod组小鼠肠道菌群的Chao1、Ace指数均显著降低($P<0.05$);与Mod组相比,Mod组和YYHT组小鼠肠道菌群的Ace指数均显著升高($P<0.05$)。β多样性分析结果显示,4组样本在坐标图上明显分离,PERMANOVA检验证实组间差异极显著($R^2=0.57,P=0.001$)。结果见表5、图3。

表5 各组小鼠肠道菌群的α多样性分析结果($\bar{x}\pm s,n=5$)

组别	Chao1指数	Ace指数	Shannon指数
Con组	882.03±67.79	930.86±66.02	3.12±0.62
Mod组	680.59±65.23 ^a	719.21±67.04 ^a	2.71±0.61
Met组	793.81±71.69	844.04±78.08 ^b	3.30±0.29
YYHT组	835.15±32.88	880.67±32.41 ^b	3.20±0.18
F	9.84	10.20	1.53
P	<0.05	<0.05	0.25

a: 与Con组相比, $P<0.05$;b: 与Mod组相比, $P<0.05$ 。

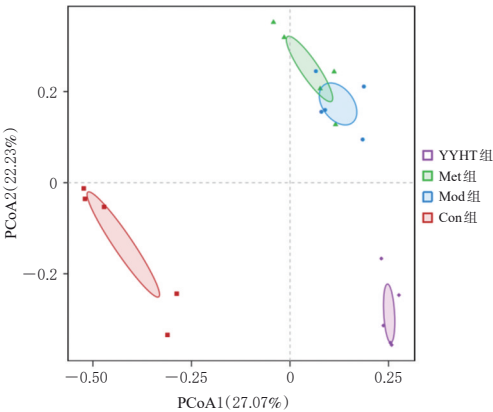


图3 各组小鼠肠道菌群的β多样性分析结果

3.6.2 物种组成分析结果

在门水平上,Con组小鼠肠道菌群中厚壁菌门(Bacillota)的相对丰度为61.9%,拟杆菌门(Bacteroidota)的相对丰度为10.6%;与Con组相比,Mod组小鼠肠道菌群中厚壁菌门的相对丰度为80.9%,而拟杆菌门的相对丰度降至0.6%,厚壁菌门/拟杆菌门比值升高;与Mod组相比,Mod组和YYHT组小鼠肠道菌群中厚壁菌门/拟杆菌门比值回落,Mod组小鼠肠道菌群中厚壁菌门、拟杆菌门的相对丰度分别为76.2%、1.6%,YYHT组分别为60.2%、2.7%。在属水平上,与Con组相比,Mod组小鼠肠道菌群中联合乳杆菌属(*Ligilactobacillus*)、粪单胞菌属(*Faecalimonas*)等的相对丰度降低,罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)的相对丰度升高;与Mod组相比,Mod组小鼠肠道菌群中乳杆菌属(*Lactobacillus*)及阿克曼氏

菌属(*Akkermansia*)的相对丰度升高,罗姆布茨菌属的相对丰度降低;与Mod组相比,YYHT组小鼠肠道菌群中双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)的相对丰度升高,阿克曼氏菌属、粪杆菌属(*Faecalibaculum*)的相对丰度也保持在较高水平,而罗姆布茨菌属的相对丰度降低。具体结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图2。

3.6.3 差异物种分析结果

LEfSe分析结果显示,在属水平上,联合乳杆菌属、*norank_Muribaculaceae*、粪单胞菌属等在Con组显著富集;*unclassified_Lachnospiraceae*、罗姆布茨菌属、阿德勒菌属(*Adlercreutzia*)、*norank_Atopobiaceae*、*unclassified_Eggerthellaceae*等在Mod组显著富集;乳杆菌属、阿克曼氏菌属、科利德克菌属(*Colidextribacter*)在Met组显著富集;双歧杆菌属、粪杆菌属、杜博菌属(*Dubosiella*)、毛梭菌属(*Lachnoclostridium*)、*unclassified_Oscillospiraceae*在YYHT组显著富集。具体结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图3。

3.6.4 菌群功能预测分析结果

PICRUSt2功能预测分析结果显示,Mod组小鼠肠道菌群中参与DNA修复的KO基因(如K03657 *uvrD*、K03655 *recG*)的预测丰度显著升高($P<0.05$)。与Mod组相比,YYHT组肠道菌群中K03657 *uvrD*基因的预测丰度降低,碳水化合物代谢相关KO基因(如K01190 *lacZ*)的预测丰度升高;上述变化与该组双歧杆菌属等的富集趋势相一致。具体结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图4。

3.7 肾脏组织中Caspase-11、GSDMD蛋白表达检测结果

与Con组相比,Mod组小鼠肾脏组织中Caspase-11、GSDMD蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。与Mod组相比,Mod组和YYHT组小鼠肾脏组织中Caspase-11、GSDMD蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表6、图4。

表6 各组小鼠肾脏组织中Caspase-11、GSDMD蛋白的MD值比较($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	Caspase-11	GSDMD
Con组	0.11±0.03	0.03±0.01
Mod组	0.63±0.15 ^a	0.50±0.09 ^a
Met组	0.30±0.07 ^b	0.05±0.02 ^b
YYHT组	0.32±0.06 ^b	0.17±0.03 ^b
F	17.43	59.65
P	<0.05	<0.05

a: 与Con组相比, $P<0.05$;b: 与Mod组相比, $P<0.05$ 。

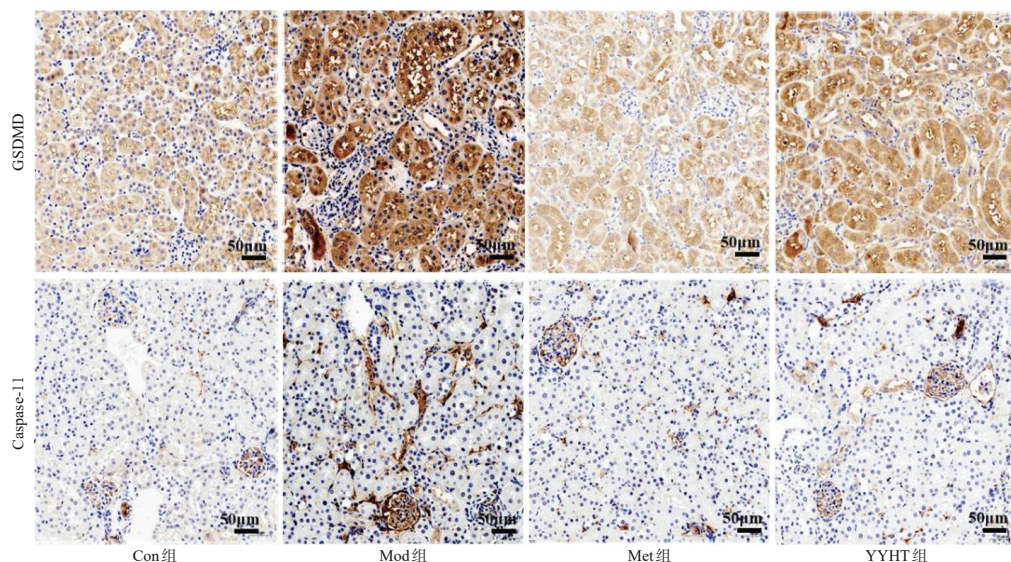


图4 各组小鼠肾脏组织中Caspase-11、GSDMD蛋白表达检测的免疫组化图

4 讨论

DKD是消渴迁延日久所致之病,其病机为消渴之阴虚燥热逐步发展为气阴两虚、浊毒内停、络脉瘀阻,终至肝肾虚损、肾元衰败。多项临床研究及网状Meta分析表明,益气养阴类中药联合常规治疗能显著降低患者血糖、血脂等指标的水平^[17]。本研究所用益气养阴化浊通络方由黄芪、生地黄、太子参、陈皮等13味药组成;其中黄芪、生地黄、太子参益气养阴,白术、茯苓益气健脾,怀牛膝滋肾填精,鬼箭羽、水蛭、醋香附、陈皮、白芥子、六月雪、大黄活血化瘀、利湿降浊,整方具有益气养阴、化浊通络之功效,契合DKD的病机。

糖脂代谢紊乱是DKD发生发展的重要因素,持续高血糖与脂质异常沉积可诱发肾脏微循环障碍、氧化应激与炎症反应,最终导致肾小球硬化、肾小管损伤及肾衰竭^[18]。本研究采用高脂高糖饲料联合小剂量STZ腹腔注射构建DKD小鼠模型,结果显示Mod组小鼠出现明显的糖脂代谢紊乱、肾功能减退及组织病理形态学损伤,与文献报道一致^[19],提示DKD模型造模成功。经益气养阴化浊通络方干预后,DKD小鼠糖脂代谢指标(除TC外)和MALB、Scr、BUN等肾功能指标均显著改善,肾脏组织中肾小球充血、肾小管刷状缘脱落、炎症浸润等病理损伤明显缓解,PAS阳性面积百分比降低,表明该方可从代谢调控与肾脏结构保护等方面发挥效应。

近年来,肠-肾轴学说逐渐成为理解DKD发病机制和探索新型治疗策略的关键^[20]。慢性肾病患者常因肠道通透性增加而出现“肠漏”现象,内毒素(如LPS等)迁移到血液中,形成代谢性内毒素血症,这与肠道上皮紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin等)表达减少有关^[21]。肠漏后LPS等内毒素经循环到达肾脏,诱发持续性炎症与细胞焦亡,加重肾损伤^[22]。本研究中,Mod组小鼠结肠组织HE与AB-PAS染色显示,结肠组织可见炎症细胞浸润,杯状细胞数量减少;免疫组化实验结果表明,Mod组

小鼠结肠ZO-1、Occludin蛋白表达下调,提示DKD状态下肠道机械屏障完整性受损。而益气养阴化浊通络方可以减轻DKD小鼠结肠组织炎症细胞浸润,恢复杯状细胞数量,上调结肠ZO-1蛋白表达,改善肠道屏障功能。此外,该方可同步降低肾脏、结肠内容物及血清中LPS含量。上述结果表明,益气养阴化浊通络方可以减轻LPS介导的肠-肾轴炎症传导。

Tsuji等^[21]系统阐述了肠-肾轴的“菌群失衡-毒素-炎症-纤维化”框架,其中肠道菌群作为肠-肾轴的上游部分,在DKD发病机制中发挥关键作用。多项临床研究发现,DKD患者存在典型的微生物失衡,包括肠道菌群多样性减少、产丁酸盐有益菌的相对丰度降低、产LPS革兰氏阴性菌的相对丰度升高等^[23-24]。本研究菌群分析结果显示,Mod组小鼠肠道菌群的丰富度明显下降,拟杆菌门的相对丰度显著降低,厚壁菌门的相对丰度异常升高;而益气养阴化浊通络方可恢复DKD小鼠肠道菌群稳态,显著富集双歧杆菌属、阿克曼氏菌属等益生菌,降低有害菌的相对丰度。LEfSe分析结果证实,益气养阴化浊通络方可特异性富集双歧杆菌属等有益菌,与Mod组富集的机会致病菌形成鲜明对比。功能预测结果显示,Mod组小鼠肠道菌群中参与DNA修复的KO基因的预测丰度上调,提示Mod组小鼠肠道菌群DNA损伤应答增强,也从侧面提示该组小鼠肠道微环境可能存在应激性损伤,这与其肠道屏障损伤(ZO-1、Occludin蛋白表达下调)和LPS渗漏的病理背景相符;而益气养阴化浊通络方可下调DKD小鼠肠道菌群中参与DNA修复的KO基因的预测丰度,上调碳水化合物代谢相关KO基因的预测丰度,这与益生菌富集、肠道屏障修复的表型相契合。以上结果表明,益气养阴化浊通络方能够调控肠道菌群结构与功能,从上游改善肠-肾轴紊乱。

LPS是激活Caspase-11-GSDMD非经典细胞焦亡通路的关键启动因子,其可直接激活Caspase-11,切割

GSDMD形成N端穿孔结构,导致细胞肿胀、破裂和炎症因子大量释放,加速组织损伤^[10]。本研究发现,Mod组小鼠肾脏组织中Caspase-11、GSDMD蛋白表达均显著上调,提示DKD小鼠肾脏非经典焦亡通路异常激活;而益气养阴化浊通络方可显著下调DKD小鼠肾脏组织中Caspase-11、GSDMD蛋白表达,抑制焦亡通路过度激活,减轻肾脏细胞损伤。

综上,益气养阴化浊通络方改善DKD的机制可能与重塑肠道菌群、修复肠道黏膜屏障、减少LPS入血,继而抑制肾脏Caspase-11/GSDMD介导的细胞焦亡有关。然而,基于16S rRNA测序数据进行的菌群功能预测无法直接反映菌群实际代谢活性,且未能直接证明菌群变化与肾损伤之间的因果关系。未来需要进一步增加样本量,结合宏基因组测序、靶向代谢组学及粪菌移植实验,验证益气养阴化浊通络方及相应菌群在DKD肾损伤中的作用及其机制。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Foreman K J, Marquez N, Dolgert A, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories[J]. Lancet, 2018, 392(10159):2052-2090.
- [2] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas 11th edn[R/OL]. 2026-07-21. <https://diabetesatlas.org/resources/idf-diabetes-atlas-2025/>.
- [3] Romagnani P, Agarwal R, Chan J C N, et al. Chronic kidney disease[J]. Nat Rev Dis Primers, 2025, 11(1):8.
- [4] Meijers B K, Evenepoel P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(3):759-761.
- [5] Rusu M, Ichim C, Anderco P, et al. Gut-kidney axis: unraveling the role of the microbiome in chronic kidney disease[J]. Biomedicines, 2026, 14(1):109.
- [6] Jiang H Y, Wang X R, Zhou W, et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids mediate the antifibrotic effects of traditional Chinese medicine in diabetic nephropathy[J]. Front Endocrinol, 2025, 16:1643515.
- [7] Wu X Q, Zhao L, Zhao Y L, et al. Traditional Chinese medicine improved diabetic kidney disease through targeting gut microbiota[J]. Pharm Biol, 2024, 62(1):423-435.
- [8] Shi R Y, Tao Y J, Tang H T, et al. *Abelmoschus manihot* ameliorates the levels of circulating metabolites in diabetic nephropathy by modulating gut microbiota in non-obese diabetes mice[J]. Microb Biotechnol, 2023, 16(4):813-826.
- [9] Luo R Q, Yao Y X, Chen Z, et al. An examination of the LPS-TLR4 immune response through the analysis of molecular structures and protein-protein interactions[J]. Cell Commun Signal, 2025, 23(1):142.
- [10] Vasudevan S O, Russo A J, Kumari P, et al. A TLR4-independent critical role for CD14 in intracellular LPS sensing[J]. Cell Rep, 2022, 39(5):110755.
- [11] Cheng Q, Pan J, Zhou Z L, et al. Caspase-11/4 and gasdermin D-mediated pyroptosis contributes to podocyte injury in mouse diabetic nephropathy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(6):954-963.
- [12] 韩立, 吕芹, 郭东义, 等. 益气养阴化浊通络方对早期糖尿病肾脏疾病患者氧化应激的影响[J]. 科学技术与工程, 2016, 16(14):23-26.
- [13] 郭克磊, 李颖利, 宣晨光, 等. 益气养阴化浊通络方通过调控miR-21a-5p/FoxO1/PINK1介导的线粒体自噬减轻糖尿病肾病小鼠的足细胞损伤[J]. 南方医科大学学报, 2025, 45(1):27-34.
- [14] 郭克磊, 李颖利, 韩立, 等. 益气养阴化浊通络方对高糖诱导小鼠肾足细胞自噬ATG5、Beclin-1及BNIP3表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(16):1808-1813.
- [15] Zhu Q, Li X H, Chen H Y, et al. The effects of Compound centella formula on OxInflammation and silent information regulator 1 in a high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic kidney disease rat model[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(3):962.
- [16] 陈璟, 杨小艺, 陈静, 等. 银杏叶提取物对糖尿病肾病模型小鼠肾脏炎症的抑制作用及机制[J]. 中国药房, 2024, 35(2):186-191.
- [17] 王文茹, 张旭明, 李纪新, 等. 益气养阴类中成药治疗早期糖尿病肾病的网状Meta分析[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(14):3949-3964.
- [18] Feng A Q, Yin R L, Xu R, et al. An update on renal tubular injury as related to glycolipid metabolism in diabetic kidney disease[J]. Front Pharmacol, 2025, 16:1559026.
- [19] 冷昌龙, 皮明山, 龚晓康. 单次大剂量对比多次小剂量STZ诱导C57BL/6J小鼠糖尿病肾病模型的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9):113-118.
- [20] Wang X R, Liu X Y, Gong F H, et al. Targeting gut microbiota for diabetic nephropathy treatment: probiotics, dietary interventions, and fecal microbiota transplantation[J]. Front Endocrinol, 2025, 16:1621968.
- [21] Tsuji K, Uchida N, Nakanoh H, et al. The gut-kidney axis in chronic kidney diseases[J]. Diagnostics, 2025, 15(1):21.
- [22] Horowitz A, Chanez-Paredes S D, Haest X, et al. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(7):417-432.
- [23] Yan H J, Zhang Y, Lin X Q, et al. Resveratrol improves diabetic kidney disease by modulating the gut microbiota-short chain fatty acids axis in db/db mice[J]. Int J Food Sci Nutr, 2024, 75(3):264-276.
- [24] Kim J E, Nam H, Park J I, et al. Gut microbial genes and metabolism for methionine and branched-chain amino acids in diabetic nephropathy[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(2):e0234422.

(收稿日期:2026-06-01 修回日期:2026-07-20)

(本文责编:林 静)