

基于 SGLT2 介导肾小管上皮-间充质转化探讨落新妇苷治疗糖尿病肾病的机制

支明峰¹, 杨浪², 赖永春², 阮清锋^{3*}
(1. 武汉市第一医院护理部, 湖北 武汉 430022; 2. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 武汉市第一医院药学部, 湖北 武汉 430022)

摘要: **目的** 探讨落新妇苷 (ASB) 对糖尿病肾病 (DKD) 肾小管上皮细胞-间充质细胞转化 (EMT) 的影响。**方法** 小鼠腹腔注射 40 mg/kg 链脲佐菌素 (STZ) 联合高脂饲料构建 DKD 模型, 造模成功后随机分为模型组、达格列净 (DAPA) 组 (2 mg/kg) 及 ASB 低、中、高剂量组 (20、40、80 mg/kg), 另设不造模的空白组。给药 10 周后, 采用试剂盒检测 Scr、BUN 水平, HE、Masson、天狼猩红染色观察肾小管间质纤维化, Western blot 法检测肾组织 FN、ICAM-1、E-cad、 α -SMA、Vimentin 蛋白表达, 网络药理学、分子对接检测 SGLT2 及 HIF-1 α 蛋白表达。体外采用 30 mmol/L 高糖诱导 HK-2 细胞建立 EMT 模型, 给予梯度浓度 ASB (10、20、40 μ mol/L) 干预, CCK-8 法检测细胞活性, Western blot 法检测细胞 EMT、SGLT2/HIF-1 α 通路相关蛋白表达, 免疫荧光染色观察 HIF-1 α 核转位情况。开展细胞热转移实验 (CETSA) 验证 ASB 与 SGLT2 靶蛋白的互作情况。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠 24 h-UP、Scr、BUN、TNF- α 、IL-6、NO、FBG 水平升高 ($P<0.01$), 肾小管间质纤维化明显, FN、ICAM-1、 α -SMA、Vimentin、SGLT2 蛋白表达升高 ($P<0.01$), E-cad 蛋白表达降低 ($P<0.01$), HIF-1 α 核转位增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, ASB 组及 DAPA 组上述指标均逆转 ($P<0.05$, $P<0.01$)。共得到 77 个共同靶点, ASB 与 SGLT2 结合良好, ASB 增加 SGLT2 热稳定性并呈剂量依赖性。与空白组比较, 高糖诱导组 HK-2 细胞 α -SMA、Vimentin、FN、ICAM-1、SGLT2 蛋白表达升高 ($P<0.01$), E-cad 蛋白表达降低 ($P<0.01$), HIF-1 α 核转位增加, 而 ASB (10、20、40 μ mol/L) 及 DAPA 可逆转上述变化 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** ASB 通过调控 SGLT2 表达抑制 HIF-1 α 表达, 延缓肾小管 EMT 进程, 改善肾小管间质纤维化, 从而发挥对 DKD 的治疗作用。

关键词: 落新妇苷 (ASB); 糖尿病肾病 (DKD); 肾小管间质纤维化; 上皮-间充质转化; SGLT2; HIF-1 α ; 网络药理学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2026)09-3132-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.09.038

糖尿病以高血糖为特征, 其中 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 最常见^[1], 随着生活方式改变其发病率持续上升, 我国患者数位居世界前列^[2]。糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是 T2DM 主要微血管并发症之一, 超过三分之一的患者会并发, 并且它是进展为终末期肾衰竭的关键因素^[3]。目前, 治疗 DKD 以控制血糖、血脂、血压联合舒肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂为主, 缺乏特异性治疗药物^[4]。肾小管间质纤维化是 DKD 的主要病理特征, 肾小管上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是其核心驱动因素^[5], T2DM 状态下肾小管上皮细胞极性消失、形态改变^[6], 最终进入间质并分泌促纤

维化因子, 导致肾小管间质纤维化, 加剧 DKD 进展^[7]。因此, 抑制 EMT 以改善纤维化是治疗 DKD 的有效途径。

钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (sodium-dependent glucose transporters 2, SGLT2) 在肾脏近曲小管重吸收约 90% 葡萄糖^[8], 其抑制剂已广泛应用于临床, 可独立于降糖作用发挥肾脏保护效应^[9]。研究证实, 抑制 SGLT2 可通过调控缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 来抑制肾小管 EMT^[10-12], 故靶向 SGLT2 调控 HIF-1 α 通路是抑制肾小管 EMT、纤维化治疗 DKD 的可行策略。

中药具有多靶点、整体协同优势, 在 DKD 治疗中展现出良好前景。落新妇苷 (astilbin, ASB)

收稿日期: 2025-12-08
基金项目: 湖北省自然科学基金青年基金 (2022CFB976)
作者简介: 支明峰 (1996—), 女 (土家族), 硕士, 研究方向为中药活性成分及其作用机制。E-mail: wyz_246810@163.com
* 通信作者: 阮清锋 (1994—), 男 (土家族), 博士, 主管中药师, 研究方向为中药药效物质基础及其作用机制。E-mail: rqfblack@163.com

是治疗 DKD 常用中药土茯苓的主要活性成分^[13-15]，具有抗炎、降尿酸、调节糖脂代谢等作用^[16-17]，有一定治疗效果^[13]，但其机制尚待阐明。因此，本研究围绕 SGLT2 介导的 EMT 探讨 ASB 抗 DKD 机制，以期对相关治疗及药物研发提供新思路。

1 材料

1.1 动物与细胞 C57BL/6J 小鼠，体质量 (20±2) g，购于河南斯克贝斯生物科技股份有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (豫) 2025-0005]，饲养于贵州中医药大学实验动物研究所 [实验动物使用许可证号 SYXK (黔) 2021-0005]，环境为 SPF 级，温度 20~26 ℃，相对湿度 40%~70%，氨浓度≤14 mg/m³，12 h/12 h 光照/黑暗循环 (15~20 lx)，噪声≤60 dB。动物实验方案及操作符合相关法律法规要求，经贵州中医药大学伦理委员会批准 (批准号 20250409004)。人肾小管上皮细胞 HK-2 购于美国模式培养物集存库，采用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基 (含 5.5 mmol/L 葡萄糖)，置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 药物与试剂 ASB (批号 B20812) 购于上海源叶生物科技有限公司;达格列净(dapagliflozin, DAPA, 批号 BMS-512148) 购于美国 MedChemExpress 公司。CCK-8 试剂盒 (批号 C0037) 购于上海碧云天生物技术有限公司;蛋白酶抑制剂 (批号 K1007)、磷酸酶抑制剂 (批号 K1012-1) 均购于美国 APEX BIO 公司;BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 23225) 购于美国 Pierce 公司;肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 测定试剂盒 (批号 70-EK282/4)、白介素-6 (interleukin, IL-6) 测定试剂盒 (批号 70-EK206/3) 均购于杭州联科生物科技股份有限公司;α-Tubulin (批号 11224-1-AP)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN, 批号 15613-1)、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1, 批号 10831-1)、上皮钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad, 批号 20874-1)、α-平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin, α-SMA, 批号 14395-1)、Vimentin (批号 10366-1)、SGLT2 (批号 24654-1)、HIF-1α (批号 20960-1) 抗体均购于武汉三鹰生物技术有限公司;HRP 偶联鼠二抗 (批号 ab6728)、HRP 偶联兔二抗 (批号 ab6721)、Lamin B1 兔多克隆抗体 (批号 ab13374) 均购于英国 Abcam 公司;核蛋白提取试剂盒 (批号 40010) 购于美国 Active Motif 公司;血肌酐 (serum creatinine, Scr, 批号 C011-2-1)、血尿素氮 (blood

urea nitrogen, BUN, 批号 C013-3-1)、24 h 尿蛋白 (urinary protein, 24h-UP, 批号 C035-2-1) 检测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 CO₂ 细胞培养箱、EVOS FL Auto 细胞成像系统 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);-80 ℃超低温冰箱 (日本 SANYO 公司);Universal 型电泳仪、VE-180 型垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司);Tanon 5200 化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司);FLUOstar Omega-ACU 多功能酶标仪 (德国 BMG LABTECH 公司);FV3000 激光扫描超高分辨率显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 ASB 潜在靶点预测 将“astilbin”输入 PubChem 服务器(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行检索,下载 ASB 化学式、3D 结构及 SDF 格式文件。将 SDF 格式文件上传至 PharmMapper 数据库 (<http://59.78.98.102/pharmmapper/get.php>),按照软件所设定的配体空腔要求设置 Pharmacophore Models Whose Pkd≥6.0,查询到与 ASB 有关的靶点。在 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 中输入 ASB 化学式,查询其潜在作用靶点。将相关信息汇总,采用 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 搜索靶点,限定物种为人,对靶点名称进行规范校正。

2.1.2 DKD 相关靶点筛选 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中输入关键词“diabetic kidney disease”进行检索,收集与 DKD 相关的疾病靶点。

2.1.3 ASB 治疗 DKD 潜在靶点筛选 采用 Venn 分析,将 ASB 预测靶点与 DKD 疾病相关靶点取交集,作为 ASB 治疗 DKD 的潜在靶点。

2.1.4 靶标蛋白相互作用核心网络构建 将“2.1.3”项下潜在靶点导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>),采用 Multiple proteins 工具,限定物种为“*Homo sapiens* (人)”,检索蛋白相互作用关系,获得其网络。采用 Cytoscape 3.8.0 软件对数据进行可视化分析,构建 PPI 图,CytoHubba 插件在 Cytoscape 中筛选出交集基因中排名前十的潜在靶点基因。

2.1.5 GO、KEGG 通路分析 交集靶点采用 R 语言 ClusterProfiler 包进行分析,获取生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cell composition, CC)、分子功能 (molecular fuction, MF) 相关信息,以 *P*<0.05 为

标准进行筛选，绘制条形图和气泡图。

2.1.6 分子对接 采用 SYBYL-X 2.0 软件进行分子对接，Discovery Studio 2019 软件进行可视化分析。从 PDB 数据库中获取受体蛋白三维结构，进行预处理（包括去除水分子和添加氢原子），配体分子经 MMFF94 力场优化得到最低能量构象。采用 Surflex-Dock 模块的“Flexible Docking”模式对分子对接进行模拟，基于 Total Score 评分函数筛选最优结合构象，结合位点的氢键、疏水性等分子间相互作用通过 Discovery Studio 软件来直观展示。

2.2 动物实验

2.2.1 模型建立与给药 小鼠给予高脂饲料（含 58% 脂肪、17% 碳水化合物以及 25% 蛋白质）喂养 4 周后，腹腔注射 40 mg/kg 0.5% STZ 溶液 [STZ 溶于 0.1 mol/mL 预冷柠檬酸盐缓冲液（pH=4.5）中，现配现用]，每天 1 次，连续 5 d，其间均予以高脂饲料喂养。2 周后检测空腹血糖（fasting blood glucose, FBG）水平，>11.1 mmol/L 即为模型建立成功。将造模成功的小鼠随机分为模型组、DAPA 组及 ASB 低、中、高剂量组，每组 6 只，继续饲养 4 周后，ASB 低、中、高剂量组分别灌胃给予 20、40、80 mg/kg ASB^[13]，DAPA 组灌胃给予 2 mg/kg DAPA^[18]，给药体积 0.1 mL/10 g，连续 10 周。此外，取 6 只同周龄小鼠作为空白组，灌胃给予生理盐水。

2.2.2 标本收集 给药期间，采用血糖仪检测小鼠 FBG 水平，每周 1 次。实验结束前 1 周，采用代谢笼收集小鼠 24 h 尿液，置于-80 ℃冰箱中保存。实验结束前 1 d，小鼠禁食 12 h，采集血液，室温静置 1 h，4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min，吸取上层血清，置于-80 ℃冰箱中保存。解剖小鼠，取肾脏组织并剔除肾包膜，一部分于液氮中保存，另一部分于多聚甲醛中固定。

2.2.3 生化指标检测 采用试剂盒检测血清 Scr、BUN、24 h-UP、NO、TNF-α、IL-6 水平。

2.2.4 Western blot 法检测肾组织各蛋白表达 取肾组织 20 mg，加入 200 μL RIPA 裂解液（含磷酸酶和蛋白酶抑制剂），冰上匀浆并静置裂解 30 min，4 ℃、12 000×g 离心 15 min，取上清液，即为总蛋白。采用试剂盒提取蛋白，取一部分上清液，BCA 法进行定量；剩余上清液中加入 Loading Buffer，100 ℃加热 5 min 变性。采用 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白，湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜，置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中，室温封闭 1 h，TBST 洗

涤，裁剪目的蛋白对应条带并置于一抗中，4 ℃孵育 24 h，次日 TBST 洗涤条带后加入二抗，室温孵育 2 h，TBST 洗涤 PVDF 膜，滴加 ECL 显色液。采用 Tanon 5200 化学发光成像仪显影，ImageJ 软件对蛋白进行定量分析，其中 α-Tubulin 作为总蛋白内参，Lamin B1 作为核蛋白内参。

2.2.5 肾组织病理学检查 将肾组织于 4% 多聚甲醛中固定 12 h，流水冲洗 2 次以去除残留固定液，75%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水，二甲苯 I、II 各浸泡 10 min 进行透明，石蜡浸渍后对肾组织进行包埋，制备切片，进行 HE、Masson、天狼星红染色^[5]。

2.3 细胞实验

2.3.1 模型建立与给药 取对数生长期 HK-2 细胞，接种于培养皿，待细胞融合度约 60% 时进行无血清处理 12 h，再给予药物（ASB 和 DAPA）预处理 2 h。除空白组外，模型组、ASB 组及 DAPA 组均给予 30 mmol/L 高浓度葡萄糖（high glucose, HG）刺激 24 h，收集样品后进行检测。

2.3.2 CCK-8 法检测细胞活性 取 200 μL 细胞悬浮液接种于 96 孔板，每孔 2×10⁴ 个，待细胞融合度为 70% 时无血清饥饿处理 12 h，再给予梯度浓度 ASB 孵育 24 h。干预结束后每孔加入 20 μL CCK-8 工作液，37 ℃避光孵育 2 h，在 450 nm 波长性检测吸光度，计算细胞活性。

2.3.3 Western blot 法检测细胞中蛋白表达 给药后弃除培养液，预冷 PBS 洗涤细胞，加入含磷酸酶和蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，收集细胞后转移至 1.5 mL EP 管中，置于冰上裂解 30 min，其余操作同“2.2.4”项。

2.3.4 免疫荧光法检测细胞 HIF-1α 表达 将细胞爬片置于 24 孔板内，以每孔 1×10⁶ 个的密度接种于 24 孔板，每孔 500 μL，当细胞生长至 50% 融合度时无血清处理 12 h，按“2.3.1”项下方法进行 HG 诱导及给药，弃培养基，预冷 PBS 洗涤 3 次，加入 4% 多聚甲醛，室温固定 10 min，PBS 漂洗 3 次，加入 200 μL 0.3% TritonX-100，室温孵育 10 min，PBS 洗涤 3 次，加入 200 μL 10% 山羊血清室温轻微振荡，孵育 1 h，去除封闭液，加入用 10% 山羊血清稀释的一抗，置于湿盒内，4 ℃孵育 12 h，回收一抗，PBS 洗涤 3 次，加入用 10% 山羊血清稀释的荧光标记二抗，室温避光，于摇床上轻微振荡孵育 1 h，PBS 洗涤 3 次，加入 DAPI，室温避光，摇床上轻微振荡孵育 10 min，PBS 洗涤 3

次，将细胞爬片从 24 孔板内取出，滴加抗淬灭剂封片，在激光共聚焦显微镜下观察并拍照记录。

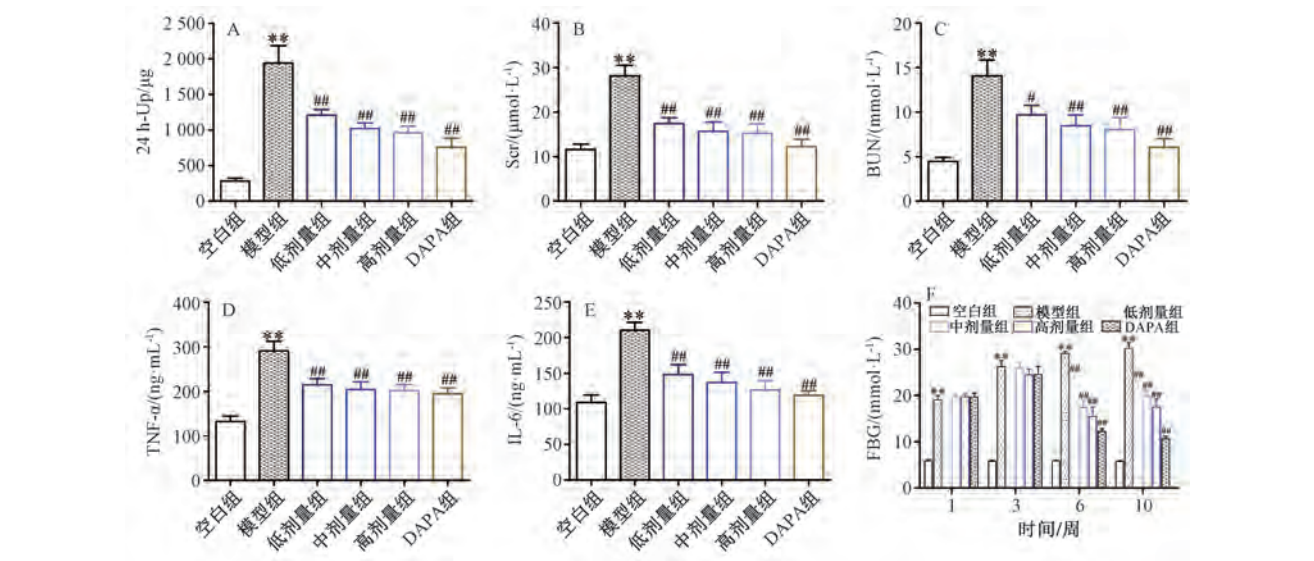
2.3.5 细胞热转移实验 将细胞接种于培养皿中，待其生长至覆盖面积约占培养皿底面积 80% 时，给予 ASB 或 DMSO 孵育 6 h，胰酶消化后收集细胞至 EP 管中，PBS 洗涤 3 次，再加入 PBS 重悬。EP 管中加入等体积细胞悬液，分别在梯度温度下加热 5 min，立即冷却，再于液氮中反复冻融 10 次（每次 1 min，间隔 1 min），4 ℃、12 000×*g* 离心 15 min，取上清液，采用 Western blot 法检测 SGLT2 蛋白表达。

2.4 统计学分析 通过 Graphpad Prism 5.0 软件进

行处理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，2 组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析和 Bonferroni 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 ASB 对 DKD 小鼠肾功能、炎症反应及血糖的影响 与空白组比较，模型组小鼠肾功能指标 24 h-UP、Scr、BUN 水平均升高 (*P*<0.01)，炎症因子 TNF-α、IL-6 水平均升高 (*P*<0.01)，第 1、3、6、10 周 FBG 水平均升高 (*P*<0.01)；与模型组比较，ASB 各剂量组和 DAPA 组小鼠 24 h-UP、Scr、BUN、TNF-α、IL-6 水平均降低 (*P*<0.05, *P*<0.01)，第 6、10 周 FBG 水平均降低 (*P*<0.01)，见图 1。



注：与空白组比较，***P*<0.01；与模型组比较，#*P*<0.05，##*P*<0.01。

图 1 各组小鼠 24 h-UP (A)、Scr (B)、BUN (C)、TNF-α (D)、IL-6 (E)、FBG (F) 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

3.2 ASB 对 DKD 小鼠肾小管间质纤维化及 EMT 的影响 HE 染色显示，与空白组比较，模型组肾小管管腔狭窄，基底膜增厚、皱褶，上皮细胞扁平化或消失，同时伴炎症细胞浸润；与模型组比较，ASB 各剂量组及 DAPA 组上述病理变化得到逆转。Masson 染色显示，与空白组比较，模型组肾小管蓝色加深，表明发生了显著的纤维化；与模型组比较，ASB 各剂量组及 DAPA 组能逆转肾小管间质纤维化。天狼星红染色显示，ASB 能有效改善模型动物肾小管间质纤维化。见图 2。

如图 3 所示，与空白组比较，模型组小鼠肾组织纤维化标志蛋白 FN、ICAM-1 蛋白表达升高 (*P*<0.01)；与模型组比较，ASB 各剂量组及 DAPA 组小鼠肾组织 FN、ICAM-1 蛋白表达降低 (*P*<0.01)。鉴于 EMT 在肾小管间质纤维化中的重要作用，本研究进一步检测 EMT 相关指标的变化，结果显示，

与空白组比较，模型组小鼠肾组织 EMT 标志蛋白 E-cad 表达降低 (*P*<0.01)，α-SMA、Vimentin 表达升高 (*P*<0.01)；与模型组比较，ASB 各剂量组及 DAPA 组小鼠肾组织 E-cad 表达升高 (*P*<0.01)，α-SMA、Vimentin 表达降低 (*P*<0.01)。

3.3 ASB 干预 DKD 潜在靶点 共得到 232 个 ASB 潜在作用靶点、4 138 个 DKD 疾病相关靶点，取两者交集，筛选出 77 个包括 SGLT2 在内的共同作用靶点，见图 4。

3.4 靶标蛋白相互作用核心网络 对 77 个交集基因进行可视化分析，发现 ASB 治疗 DKD 的核心基因主要包括 MMP2、PPARG、KIT、EGFR、GSK3B、STAT1、SRC、CDC42、MMP9、AKT1、CASP3、SLC5A2、HIF-1A，见图 5。其中，SLC5A2 与 HIF-1A 是 ASB 干预 DKD 的核心基因，而 ASB 可能通过调控 SGLT2/HIF-1α 通路来治疗 DKD。

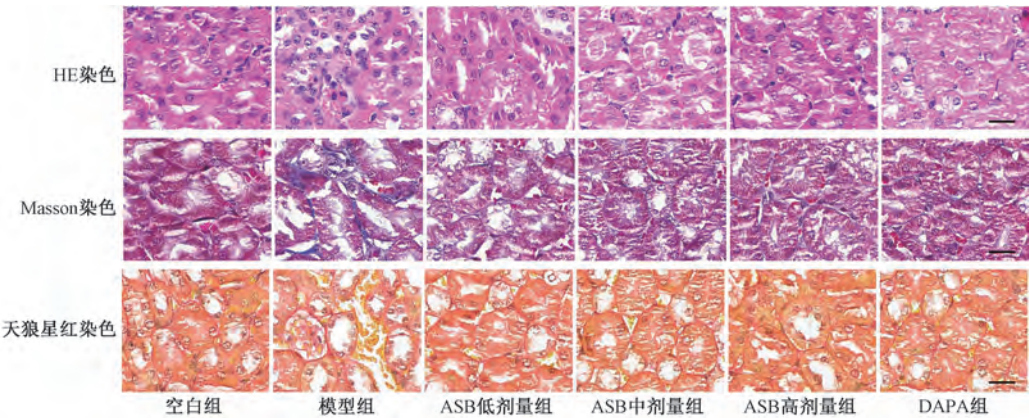
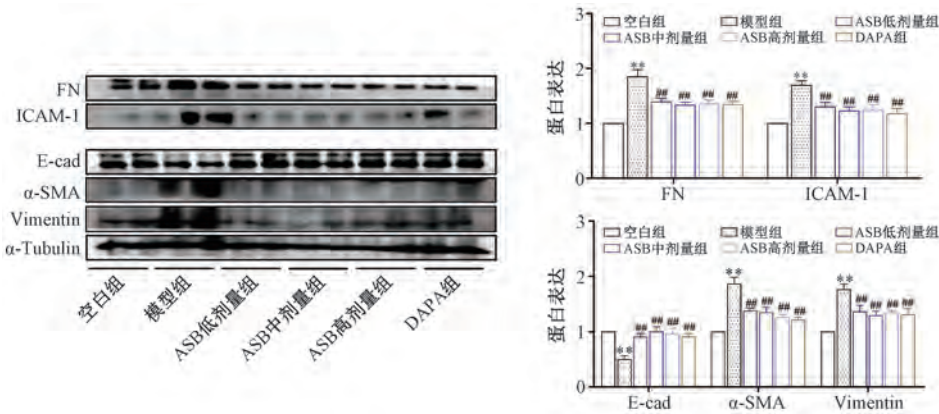


图 2 各组小鼠肾组织病理变化图 (×100)



注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图 3 各组小鼠肾组织 FN、ICAM-1、E-cad、α-SMA、Vimentin 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

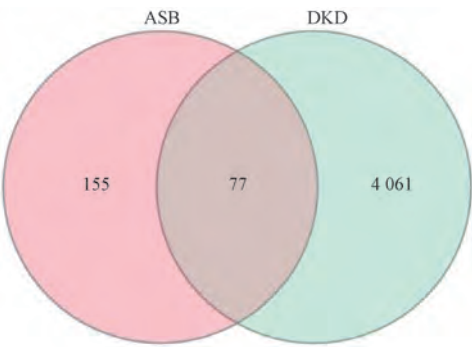


图 4 ASB 潜在靶点与 DKD 治疗靶点 Venn 图

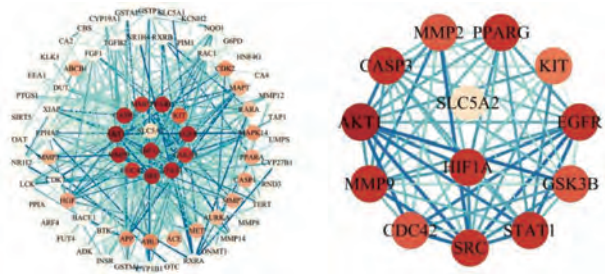


图 5 蛋白相互作用网络图

3.5 GO 功能、KEGG 通路富集分析

ASB 治疗 DKD 涉及的主要生物学机制包括对氧化应激的反应、细胞对化学应激的反应、对活性氧的反应、细胞对氧化应激的反应等途径，其中 ASB 调节氧化应激反应是其治疗 DKD 的主要生物学机制。研究表明，氧化应激能诱导 EMT 发生，同时 HIF-1α 能通过干预氧化应激途径来参与 EMT 的病理进程^[10-12]。

3.6 分子对接 图 7 显示，ASB 与 SGLT2 蛋白的结合分数为 6.351 7，表明该分子具有较强的结合亲和力；Crash 值为-2.615 8，提示在对接过程中存在一定程度的原子间冲突，但仍在可接受范围内，结构合理；Polar 值达 4.399 6，表明它在结合过程中存在较强的极性相互作用，可能通过氢键等方式来稳定与靶点的结合位点。

3.7 ASB 对 DKD 小鼠肾组织 SGLT2/HIF-1α 通路的影响 如图 8 所示，与空白组比较，模型组小鼠肾组织 HIF-1α 核蛋白、SGLT2 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，ASB 各剂量组和 DAPA 组小鼠肾组织 HIF-1α 核蛋白、SGLT2 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，见图 8。

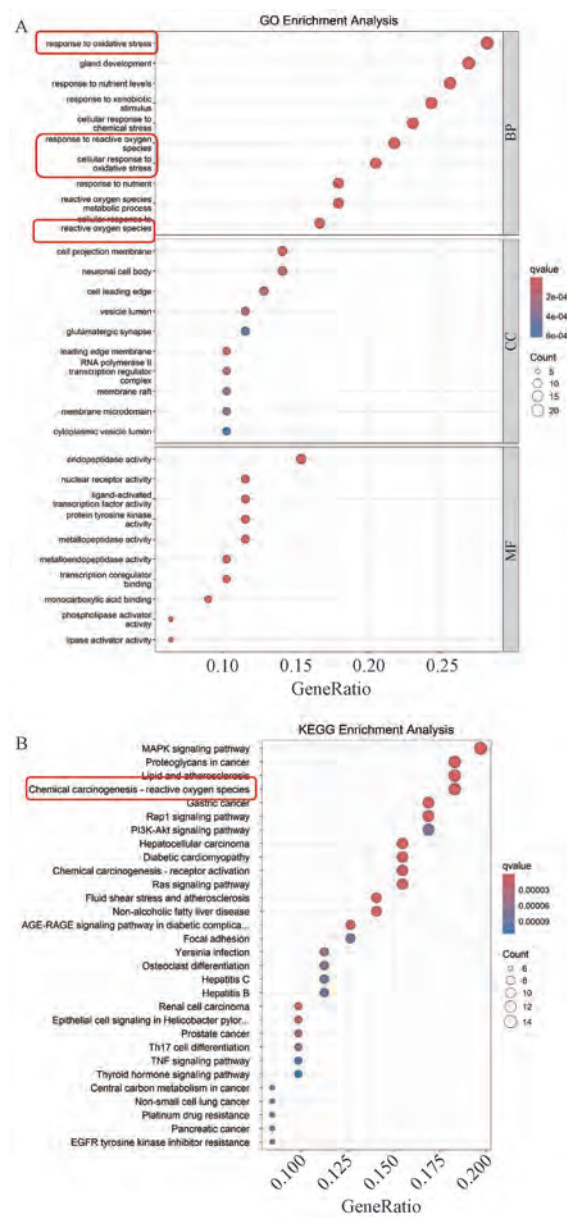


图 6 GO 功能 (A)、KEGG 通路 (B) 富集分析图

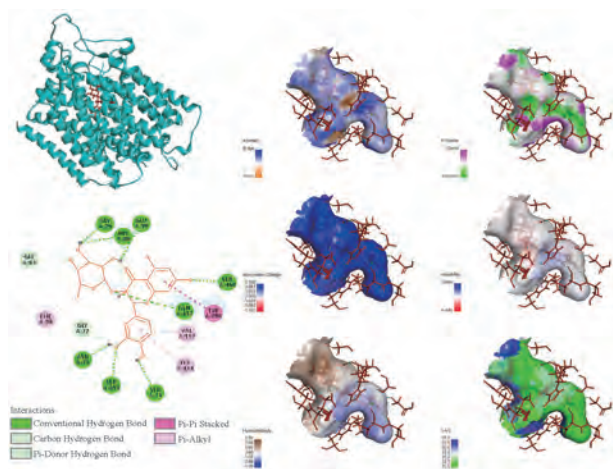


图 7 分子对接模式图

3.8 ASB 对 HG 诱导 HK-2 细胞 EMT 及纤维化的影响 如图 9A 所示, ASB 浓度低于 160 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞存活率无显著影响 ($P>0.05$)。如图 9B~9C 所示, 10、20 $\mu\text{mol/L}$ ASB 可抑制 EMT 标志蛋白 Vimentin 表达。因此, 选择 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ ASB 开展体外实验。

如图 10 所示, 与空白组比较, HG 诱导组 EMT 标志蛋白 $\alpha\text{-SMA}$ 、Vimentin 表达升高 ($P<0.01$), E-cad 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与 HG 诱导组比较, DAPA 和各浓度 ASB 处理后细胞 $\alpha\text{-SMA}$ 、Vimentin 蛋白表达降低 ($P<0.01$), E-cad 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。与空白组比较, HG 诱导组纤维化标志蛋白 FN、ICAM-1 表达升高 ($P<0.01$); 与 HG 诱导组比较, DAPA 和各浓度 ASB 处理后细胞 FN、ICAM-1 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.9 ASB 对 HG 诱导 HK-2 细胞 SGLT2/HIF-1 α 通路的影响 如图 11A~11B 所示, 与空白组比较, HG 诱导组 SGLT2、细胞核内 HIF-1 α 蛋白表达升

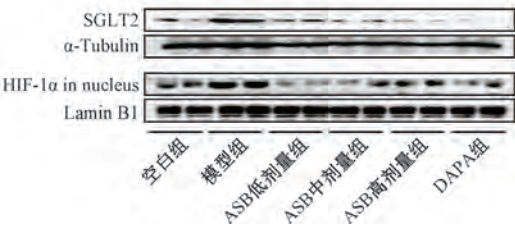
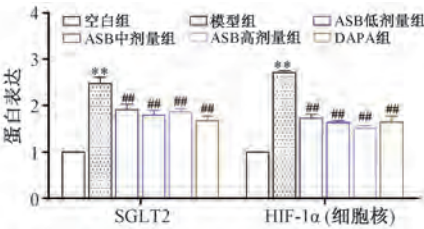


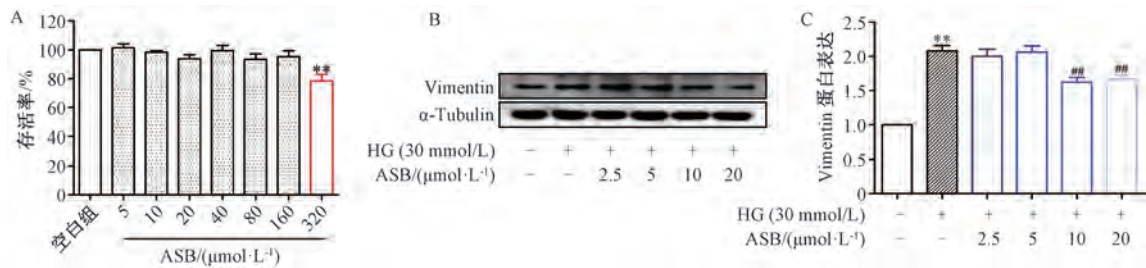
图 8 各组小鼠肾组织 HIF-1 α 核蛋白、SGLT2 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

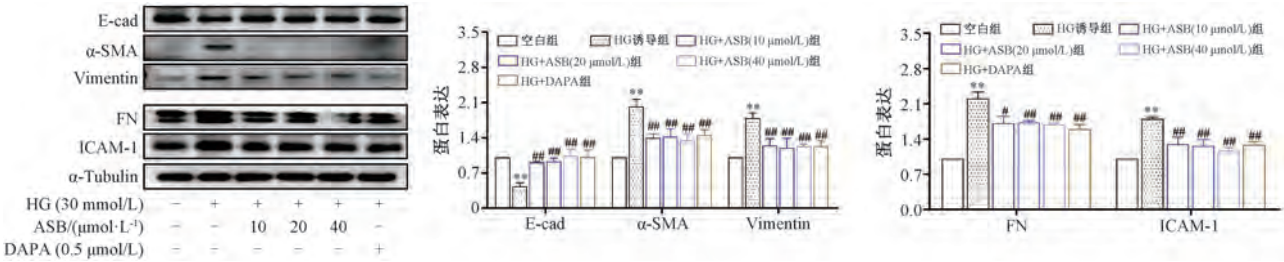
高 ($P<0.01$); 与 HG 诱导组比较, DAPA 和各浓度 ASB 处理后 SGLT2、细胞核内 HIF-1 α 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。如图 11C 所示, HG 诱导后可促进 HIF-1 α 入核, 而 ASB、DAPA 干预后

可阻止 HIF-1 α 的核转位。
3.10 ASB 与 SGLT2 蛋白的相互作用 如图 12A~12B 所示, 在同等温度 (55、60、65 $^{\circ}\text{C}$) 下 ASB 孵育组 SGLT2 蛋白表达高于空白组 ($P<0.05$, $P<$



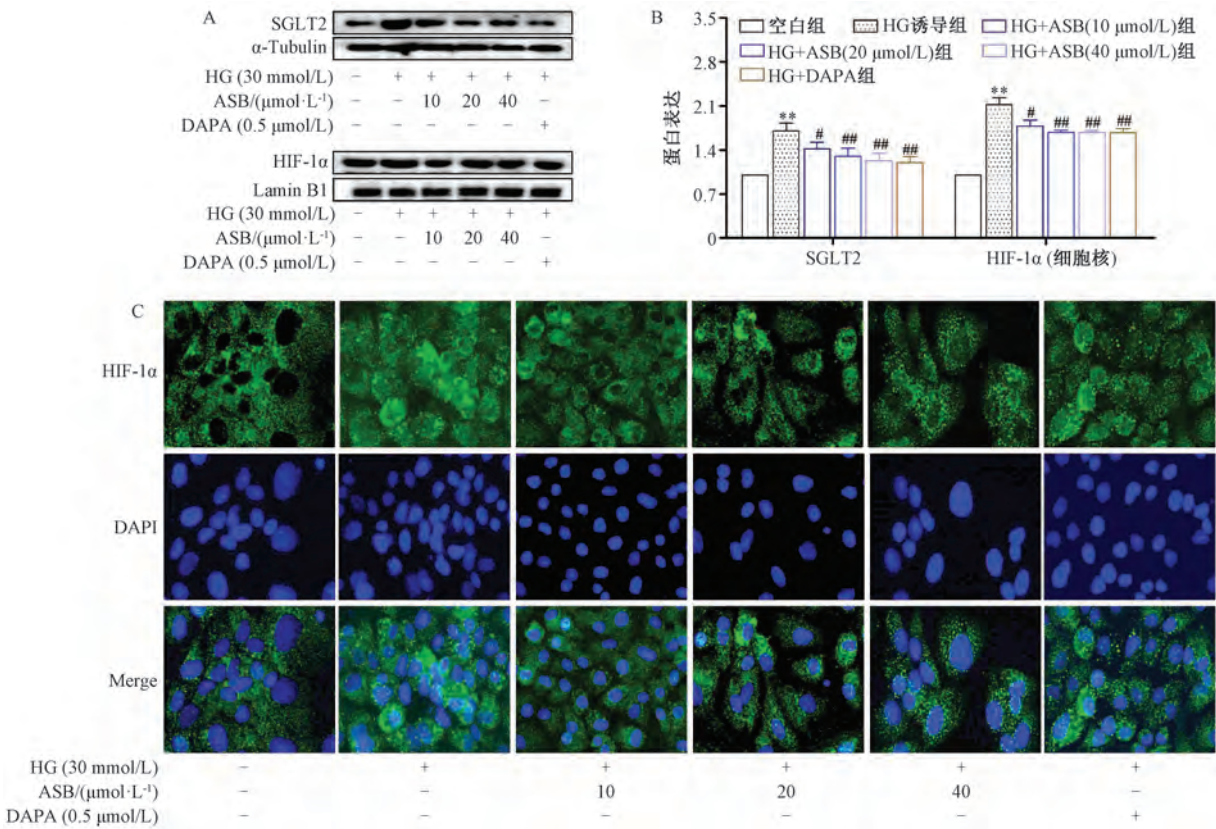
注：A 为细胞存活率，B 为细胞 Vimentin 蛋白条带，C 为细胞 Vimentin 蛋白表达。与空白组比较，** $P<0.01$ ；与 HG 诱导组比较，## $P<0.01$ 。

图 9 ASB 体外给药剂量筛选结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与 HG 诱导组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 10 各组细胞 E-cad、α-SMA、Vimentin、FN、ICAM-1 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

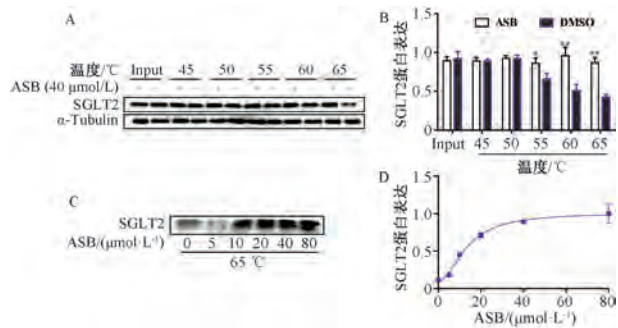


注：A 为细胞 SGLT2、核内 HIF-1α 蛋白条带，B 为细胞 SGLT2、核内 HIF-1α 蛋白表达，C 为细胞 HIF-1α 蛋白免疫荧光染色。与空白组比较，** $P<0.01$ ；与 HG 诱导组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 11 各组细胞 SGLT2、HIF-1α 蛋白表达及 HIF-1α 核转位情况比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

0.01)，表明 ASB 能增加 SGLT2 蛋白热稳定性，两者存在直接作用。此外，本研究在固定温度（65 °C）下给予不同浓度 ASB 处理，发现 ASB 对 SGLT2 蛋白稳定性的影响呈现剂量依赖性，见图 12C ~ 12D，

进一步证实两者相互作用。



注：A~B 为不同温度下 ASB 对 SGLT2 蛋白表达的影响，C~D 为 65 °C 下不同浓度 ASB 对 SGLT2 蛋白表达的影响。与 DMSO 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 12 ASB 对 SGLT2 蛋白稳定性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

中药具有多成分、多靶点、多途径特点，在 T2DM 及其并发症治疗中展现出独特优势^[19]。DKD 归属于中医“水肿”“消渴肾病”范畴，本虚标实为其基础病机^[20]。土茯苓具有解毒通络、利湿泄浊功效，广泛用于 DKD 的治疗^[15,21]。ASB 是土茯苓重要药效物质，对 DKD 具有保护作用^[13]，但其机制尚不完全清晰。

肾小管间质纤维化是 DKD 的标志性病理特征，主要表现为 ECM 成分在肾小管间质过度蓄积^[22]。作为肾小管的主要功能细胞，肾小管上皮细胞发生 EMT 是导致肾小管间质纤维化的重要原因^[5]。EMT 表现为上皮特性丧失和间充质特性获得，糖尿病状态下肾小管上皮细胞极性消失、紧密连接破坏，E-cad 等上皮标志蛋白下调， α -SMA、Vimentin、FN 等间质标志物增多，最终细胞进入间质分泌促纤维化因子^[5-7]。因此，抑制 EMT 可有效改善肾小管间质纤维化从而治疗 DKD。

HIF-1 α 是缺氧状态下稳定表达的转录因子，对细胞代谢、炎症反应等具有重要影响^[23]。正常氧环境下，HIF-1 α 被脯氨酸羟化酶修饰后经泛素化降解，故其表达极低或不表达；缺氧时脯氨酸羟化酶活性被抑制，HIF-1 α 稳定表达并转位入核与 HIF-1 β 结合，激活靶基因^[24]。DKD 常伴有慢性缺氧，HIF-1 α 可代偿性稳定表达以保护肾脏组织，但持续激活反而促进肾脏纤维化^[25-26]。研究表明，调节肾小管 EMT 是 HIF-1 α 介导 DKD 的重要机制，抑制或敲低 HIF-1 α 可逆转 EMT 进程^[27]。

SGLT2 抑制剂是近年来应用于临床的新型降糖药物，具有降糖以外的肾脏保护作用^[28-29]，可通过改善血流动力学、控制血压、调节代谢等多种途

径来对 DKD 发挥治疗作用^[30]。HG 的刺激可上调肾小管细胞 SGLT2 表达，抑制 SGLT2 可减少耗氧量以改善肾脏缺氧，进而影响 HIF-1 α 通路^[10-12]。

高脂饮食喂养可诱导实验动物胰岛素抵抗，联合低剂量 STZ 可轻度损害胰岛素分泌，模拟 T2DM 后期特征，并且该方法复制的动物模型伴有明显肾损伤^[31-32]。因此，本研究采用 STZ 合并高脂饲料诱导 C57BL/6J 小鼠复制 DKD 模型，结果显示，ASB 能逆转 DKD 小鼠肾纤维化及 EMT 关键指标，同时对 SGLT2/HIF-1 α 信号轴发挥调控作用。HG 诱导 HK-2 细胞 EMT 模型已被广泛用于 DKD 研究^[33]，本研究结果显示，ASB 干预后模型细胞 EMT 关键指标逆转，SGLT2/HIF-1 α 信号轴受控，进一步佐证了动物实验结果，同时说明 ASB 对上述指标的调节至少部分独立于其降糖功能。

网络药理学显示，ASB 干预 DKD 涉及包括 SGLT2 在内的众多靶点；体内外实验结果均表明，ASB 可抑制 SGLT2 表达及 HIF-1 α 核转位。分子对接与 CETSA 实验进一步证实 ASB 与 SGLT2 存在直接相互作用，ASB 能下调 SGLT2 蛋白表达。目前诸多研究证实，配体与受体作用后可影响蛋白表达，如胰岛素作用后通过受体内化来影响自身受体表达^[34]，龙胆苦苷作用于 FGFR1 后通过泛素化修饰来影响其表达^[35]。虽然 ASB 与 SGLT2 互作并调控其蛋白表达的详细机制尚待阐明，但本研究结果充分证实靶向抑制 SGLT2/HIF-1 α 通路以调节肾小管 EMT 是 ASB 治疗 DKD 的重要机制。

综上所述，ASB 可靶向抑制 SGLT2 以调控下游 HIF-1 α 通路，逆转 EMT，改善肾小管间质纤维化，从而治疗 DKD，为它及土茯苓治疗 DKD 提供了科学依据。然而，本研究尚存在局限性，如 ASB 对 SGLT2 与 HIF-1 α 的调控是否为因果关系尚需确证，其详细机制有待深入研究，并且 ASB 多靶点特点决定仍有其他机制可供发掘。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献：

[1] Liu L, Zhang J, Cheng Y, et al. Gut microbiota: A new target for T2DM prevention and treatment[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 958218.

[2] Zheng Y, Ley S H, Hu F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(2): 88-98.

[3] Thipsawat S. Early detection of diabetic nephropathy in patient with type 2 diabetes mellitus: A review of the literature[J].

Diab Vasc Dis Res, 2021, 18(6): 14791641211058856.

[4] Samsu N. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 1497449.

[5] Du L, Qian X, Li Y, *et al.* Sirt1 inhibits renal tubular cell epithelial-mesenchymal transition through YY1 deacetylation in diabetic nephropathy[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(2): 242-251.

[6] Gong M, Guo Y, Dong H, *et al.* Trigonelline inhibits tubular epithelial-mesenchymal transformation in diabetic kidney disease *via* targeting Smad7[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115747.

[7] Xu D, Moru P, Liao K, *et al.* High glucose-induced senescence contributes to tubular epithelial cell damage in diabetic nephropathy[J]. *Exp Gerontol*, 2024, 197: 112609.

[8] Kramer C K, Zinman B. Sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitors and the treatment of type 2 diabetes[J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 323-334.

[9] Dai Z C, Chen J X, Zou R, *et al.* Role and mechanisms of SGLT-2 inhibitors in the treatment of diabetic kidney disease[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1213473.

[10] Chatterjee A, Tumarin J, Prabhakar S. Cellular cross-talk drives mesenchymal transdifferentiation in diabetic kidney disease[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2025, 11: 1499473.

[11] Li J, Liu H, Takagi S, *et al.* Renal protective effects of empagliflozin *via* inhibition of EMT and aberrant glycolysis in proximal tubules[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(6): e129034.

[12] Packer M. Mechanisms leading to differential hypoxia-inducible factor signaling in the diabetic kidney: modulation by SGLT2 inhibitors and hypoxia mimetics[J]. *Am J Kidney Dis*, 2021, 77(2): 280-286.

[13] Li G S, Jiang W L, Yue X D, *et al.* Effect of astilbin on experimental diabetic nephropathy *in vivo* and *in vitro*[J]. *Planta Med*, 2009, 75(14): 1470-1475.

[14] 王德军, 寿旗扬, 陈方明, 等. 土茯苓对糖尿病肾病大鼠肾组织形态学及相关因子 ET、NO、TGF-β1 的影响[J]. 中国中医药科技, 2010, 17(4): 320-322.

[15] 刘世林, 李安冬, 姜 斌, 等. 基于中医传承辅助平台的南征治疗糖尿病肾病用药规律分析[J]. 国医论坛, 2021, 36(6): 26-30.

[16] 杨婷婷, 王万山, 李树基. 落新妇苷研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(7): 1019-1024.

[17] 张清峰, 聂海纯, 郑国栋, 等. 落新妇苷的理化性质与生物活性研究进展[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1834-1838.

[18] Wen M, Sun X, Pan L, *et al.* Dihydromyricetin ameliorates diabetic renal fibrosis *via* regulating SphK1 to suppress the activation of NF-κB pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 978: 176799.

[19] 胡茂芳, 朱 轶. 中药治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 中医临床研究, 2024, 16(11): 32-37.

[20] 李薇羽. 糖尿病肾病中医辨证论治研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2025, 23(3): 72-75.

[21] 范九梅, 马 卓. 土茯苓药学研究概述[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(8): 36-37; 57.

[22] Zeng L F, Xiao Y, Sun L. A glimpse of the mechanisms related to renal fibrosis in diabetic nephropathy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 49-79.

[23] Corcoran S E, O ’ Neill L A. HIF1α and metabolic reprogramming in inflammation[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(10): 3699-3707.

[24] Cowman S J, Koh M Y. Revisiting the HIF switch in the tumor and its immune microenvironment[J]. *Trends Cancer*, 2022, 8(1): 28-42.

[25] Catrina S B, Zheng X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications[J]. *Diabetologia*, 2021, 64(4): 709-716.

[26] Liu H, Li Y, Xiong J. The role of hypoxia-inducible factor-1 alpha in renal disease[J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7318.

[27] Sun X, Huang K, Haiming X, *et al.* Connexin 43 prevents the progression of diabetic renal tubulointerstitial fibrosis by regulating the SIRT1-HIF-1α signaling pathway[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(13): 1573-1592.

[28] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版) (下) [J]. 中国实用内科杂志, 2021, 41(9): 757-784.

[29] 王 宇, 吴 洋, 肖 珉, 等.《ACC 2020 降低 2 型糖尿病患者心血管风险新疗法的专家共识》解读[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2021, 13(11): 1281-1283; 1300.

[30] 朱冰冰, 范 瑛, 汪年松. 钠-葡萄糖耦联转运体 2 抑制剂治疗糖尿病肾病研究进展[J]. 世界临床药物, 2023, 44(1): 19-26.

[31] Azushima K, Gurley S B, Coffman T M. Modelling diabetic nephropathy in mice[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(1): 48-56.

[32] Singh R, Gholipourmalekabadi M, Shafikhani S H. Animal models for type 1 and type 2 diabetes: advantages and limitations[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15: 1359685.

[33] Xu J, Kitada M, Ogura Y, *et al.* Dapagliflozin restores impaired autophagy and suppresses inflammation in high glucose-treated HK-2 cells[J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1457.

[34] Green A, Olefsky J M. Evidence for insulin-induced internalization and degradation of insulin receptors in rat adipocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(2): 427-431.

[35] Xu Z, Huang J, Wen M, *et al.* Gentiopicroside ameliorates glucose and lipid metabolism in T2DM *via* targeting FGFR1[J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155780.