

升阳益胃汤调控 Th17/Treg 细胞免疫平衡对被动型 Heymann 肾炎大鼠的肾脏保护作用

吴 媛¹, 张学琴¹, 王帅杰¹, 安恒通¹, 王开爽¹, 陈志强^{2*}

(1. 河北中医药大学研究生院, 河北 石家庄 050200; 2. 河北中医药大学第一附属医院/河北省中医院, 河北 石家庄 050011)

摘要: **目的** 探讨升阳益胃汤对被动型 Heymann 肾炎大鼠的肾脏保护作用。**方法** 大鼠尾静脉注射 Fx1A 羊抗大鼠血清, 建立被动型 Heymann 肾炎模型, 设立正常组、模型组、盐酸贝那普利组 (10 mg/kg) 和升阳益胃汤低、高剂量组 (12、24 g/kg), 每组 10 只。检测大鼠 24 h 尿蛋白; 免疫荧光染色观察大鼠肾组织 IgG 沉积情况; HE、Masson 染色观察大鼠肾组织病理形态; 免疫组化法和 Western blot 法检测大鼠肾组织 Synaptopodin、Nephrin、Podocalyxin 蛋白表达; ELISA 法检测大鼠血清 IL-6、IL-10 水平; 流式细胞仪检测大鼠脾组织 Th17/Treg 细胞比例; Western blot 法检测大鼠肾组织 mTOR、p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠 24 h 尿蛋白水平升高 ($P<0.01$); 肾组织存在 IgG 沉积 ($P<0.01$); 肾小球结构紊乱, 体积增大, 系膜增生; 肾组织胶原容积分数升高 ($P<0.01$); 肾组织 Nephrin、Podocalyxin、Synaptopodin 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 血清 IL-6 水平升高 ($P<0.01$), IL-10 水平降低 ($P<0.01$); Th17 细胞比例升高 ($P<0.01$), Treg 细胞比例降低 ($P<0.05$), Th17/Treg 比值升高 ($P<0.05$); 肾组织 p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 各给药组大鼠 24 h 尿蛋白水平降低 ($P<0.01$); 肾组织 IgG 荧光强度降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 病理状态有所减轻; Nephrin、Podocalyxin、Synaptopodin 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 血清 IL-6 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), IL-10 水平升高 ($P<0.05$); Th17 细胞比例降低 ($P<0.05$), Treg 细胞比例升高 ($P<0.05$), Th17/Treg 比值升高 ($P<0.05$); 肾组织 p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 升阳益胃汤对被动型 Heymann 肾炎大鼠的肾脏和足细胞具有保护作用, 其机制可能与调控 Th17/Treg 细胞免疫平衡有关。

关键词: 升阳益胃汤; 特发性膜性肾病; Th17 细胞; Treg 细胞; 免疫平衡; 足细胞; 被动型 Heymann 肾炎大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)07-2423-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.048

特发性膜性肾病是一种自身免疫性足细胞病^[1], 也是肾病综合征的主要原因之一^[2], 中医药治疗本病疗效显著, 安全性高^[3-4]。中医认为, 特发性膜性肾病的病机为脾肾亏虚, 水湿内停, 瘀血阻滞, 核心病机为脾虚湿盛, 临床上应用升阳益胃汤治疗。课题前期研究表明, 升阳益胃汤可通过调节免疫平衡, 有效缓解特发性膜性肾病病程^[5]。辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) /调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 免疫失衡在器官特异性免疫和特发性膜性肾病的发生发展中发挥重要作用^[6], 因此, 对其调控是防治特发性膜性肾病的重要手段, 它受到多种细胞因子和信号通路的调控^[7]。研究表明, 哺乳动物雷帕霉素靶标 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 可调控缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-

1 α) 活性, 介导 CD4⁺T 细胞向 Th17 或 Treg 的极化, 影响 Th17/Treg 细胞免疫平衡^[8-9], 因此, 抑制 mTOR/HIF-1 α 通路可恢复 Th17/Treg 的免疫平衡, 从而减少足细胞损伤, 是治疗特发性膜性肾病的有效途径。被动型 Heymann 肾炎与特发性膜性肾病发病机制具有许多相同之处, 已被广泛用于特发性膜性肾病的研究^[1]。本研究建立被动型 Heymann 肾炎大鼠模型, 探究升阳益胃汤是否通过 mTOR/HIF-1 α 信号通路介导 Th17/Treg 细胞免疫平衡保护足细胞延缓特发性膜性肾病病情进展, 以期对相关临床治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 6 周龄 SD 大鼠 52 只, 体质量 150~200 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [实验动

收稿日期: 2024-08-08

基金项目: 河北省自然科学基金 (H2022423337); 河北中医药大学研究生创新能力培养资助项目 (XCXZZBS2023020)

作者简介: 吴 媛 (1992—), 女, 博士生, 从事中西医结合肾病研究。Tel: 18330100796, E-mail: 775261141@qq.com

* 通信作者: 陈志强 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合肾病研究。E-mail: chenchiqiang2011@163.com

网络出版日期: 2024-10-22

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20241021.1657.002.html>

物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0011], 饲养于河北中医药大学实验动物中心标准化动物房, 屏障系统环境 [温度 (20±2)℃, 相对湿度 (50±5)%], 普通饲料喂养, 自由饮水。实验经河北中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理审查编号 DWLL202212019)。

1.2 药材与药物 升阳益胃汤组方药材黄芪 30 g、半夏 9 g、党参 12 g、炙甘草 6 g、独活 9 g、防风 9 g、白芍 30 g、羌活 9 g、陈皮 12 g、茯苓 30 g、柴胡 9 g、泽泻 9 g、炒白术 12 g、黄连 6 g (批号 A2010033、A2111013、A2069403、A2110283、A1120423、A2032143、A1081263、A3010573、A2032283、A208A243、A2090483、A2082583、A2102133、A1123663), 均购自广东一方制药公司。盐酸贝那普利片 (北京诺华制药有限公司, 国药准字 H20030514)。

1.3 试剂 10% 凝胶快速制备试剂盒、7.5% 凝胶快速制备试剂盒 (上海雅酶生物医药科技有限公司, 批号 036C1300、03771900); 兔源 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体、兔源突触足蛋白 (Synaptopodin) 抗体、鼠源 mTOR 抗体、鼠源 p-mTOR 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 00120799、10010541、10024436、10020406); 兔源肾病蛋白 (Nephrin) 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 1001701-6); 兔源足萼蛋白 (Podocalyxin) 抗体、HIF-1 α 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 AG09303807、BC02253601); 山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 CR2212109、CR2206088); 白介素 (interleukin, IL) -6 ELISA 试剂盒、IL-10 ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司, 批号 L240119149、L240119157)。

1.4 仪器 DK-98-II 型电热恒温水浴槽 (天津市泰斯特仪器有限公司); Mini-PROTEAN 型电泳系统、Mini Trans-Blot 转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司); Varioskan LUX 型多功能微孔板读数仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); AK-RO-C2 型实验室超纯水机 (美国 Elkay 公司); CytoFLEX 型流式细胞仪 (美国 Beckman 公司); RM2245 型石蜡切片机、石蜡包埋机、CM3050 型冷冻切片机 (德国 Leica 公司); -80℃ 冰箱 (青岛海尔集团有限公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 52 只大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为正常组 (10 只) 和造模组 (42 只)。参考文献 [10-11] 报道, 制备被动型 Heymann 肾炎模型, 造模组大鼠造模前禁食不禁水 12 h, 单次尾静脉注射羊抗大鼠 Fx1A 血清, 剂量 0.4 mL/100 g, 2 周后测得 24 h 尿蛋白定量>10 mg, 随机处死造模组中 2 只大鼠, 进行肾脏病理学检测, 显微镜下观察到免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 沿毛细血管壁颗粒样沉积, 表明造模成功。将造模成功的大鼠随机分为模型组、盐酸贝那普利组 (10 mg/kg) 和升阳益胃汤低、高剂量组 (12、24 g/kg), 每组 10 只, 升阳益胃汤依据成人与大鼠临床等效剂量折算系数^[12], 即以

60 kg 成人剂量的 6.25 倍计算大鼠每天给药剂量, 确定 12 g/kg 为低剂量, 24 g/kg 为高剂量, 灌胃前将免煎颗粒用蒸馏水加热充分溶解, 制成 6 g/mL 混悬液, 置于 4℃ 冰箱中; 盐酸贝那普利剂量为 10 mg/kg, 给药前将其研磨成细粉末, 充分溶于蒸馏水中, 制成 5 mg/mL 混悬液; 正常组和模型组大鼠灌胃给予等体积生理盐水, 连续 6 周。

2.2 标本采集 采用大鼠代谢笼留取 24 h 尿液, 记录尿量, 4℃、3 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 分装保存于 EP 管中, 于 -80℃ 冰箱中保存。大鼠禁食禁水 12 h 后麻醉, 喷湿毛发后快速开腹, 腹主动脉取血, 室温放置 30 min, 4℃、3 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 分装后置于 -80℃ 冰箱中。摘取大鼠肾脏, 除去被膜, 冲洗后置于冰上, 将肾脏皮质部分保存于冻存管中, 液氮冷冻后转存至 -80℃ 冰箱, 取部分肾组织放入包埋盒, 浸于 4% 多聚甲醛溶液中固定; 取部分肾皮质, 以最佳切割温度包埋剂 (OCT) 处理切片。摘取大鼠脾脏, 置于 RPMI-1640 培养基中, 研磨, 过滤, 取滤液。

2.3 考马斯亮蓝法检测大鼠 24 h 尿蛋白水平 收集大鼠 24 h 尿液, 严格按照相关试剂盒说明书, 检测 24 h 尿蛋白水平。

2.4 免疫荧光染色观察大鼠肾组织免疫球蛋白 G 沉积情况 将肾组织用 OCT 包埋, 冰冻切片, 丙酮固定液固定过夜, 封闭 1 h, 滴加 FITC 标记的兔抗鼠 IgG 一抗 (1:100) 4℃ 孵育过夜, 加入二抗避光孵育 1 h, 封片, 于显微镜下观察 IgG 沉积情况, 采集图像, 随机选取 5 个视野, 使用 Image J 软件计算每个视野下的荧光强度。

2.5 HE、Masson 染色观察大鼠肾组织病理形态 将固定于 4% 多聚甲醛中的肾组织取出, 经乙醇脱水、透明、浸蜡、组织包埋、制作切片后透明、脱蜡, 分别进行 HE、Masson 染色, 梯度脱水, 封片, 于显微镜下观察组织形态并拍照记录, 计算胶原容积分数。

2.6 免疫组化法检测大鼠肾组织 Nephrin、Podocalyxin、Synaptopodin 蛋白表达 将组织切片放入 65℃ 温箱中烘烤 4 h 使蜡融化, 乙醇梯度脱水, 每张切片滴约 100 μ L 3% 过氧化氢, 37℃ 水浴锅内孵育 20 min, 清洗后进行高压抗原修复, 加入一抗 (1:100) 孵育过夜, 加入二抗孵育 30 min, 避光显色, 梯度脱水, 中性树胶进行封片, 待干透后于显微镜下观察并拍照记录。

2.7 ELISA 法检测大鼠血清 IL-6、IL-10 水平 严格按照相关试剂盒说明书, 经包被、封闭、加样、温育后吸取 100 μ L 第一抗体工作液, 加到 96 孔板各孔内, 放入 37℃ 温箱中孵育 2 h, 清洗后加入酶结合物, 孵育 30 min, 每孔加 100 μ L 硫酸终止反应, 450 nm 波长处测定吸光度, 检测血清 IL-6、IL-10 水平。

2.8 流式细胞仪检测大鼠脾脏 Th17/Treg 细胞比例 对脾脏组织进行匀浆, 制成组织悬浮液, 提取淋巴细胞悬液, 接种于 6 孔板, 培养箱中培养 4 h, 加入 CD4-FITC 抗体表面标记, 流式细胞仪检测 CD4⁺IL-17A⁺ Th17 细胞比例和 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞比例。

2.9 Western blot 法检测大鼠肾组织 Nephrin、Podocalyxin、Synaptopodin、mTOR、p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解大鼠肾组织, 提取蛋白, BCA 法检测含量, 取等量进行变性, 用 10%、7.5% 预混胶制胶, 按每孔总质量 30 μ g 体积上样, 80 V 电压电泳 30 min, 待 Marker 分开后将电压调整至 120 V 继续电泳 1 h, 湿转法转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, 分别加入 Synaptopodin (1 : 1 000)、Nephrin (1 : 1 000)、Podocalyxin (1 : 3 000)、mTOR (1 : 5 000)、p-mTOR (1 : 2 000)、HIF-1 α (1 : 2 000)、 β -actin (1 : 5 000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日加入二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h, 化学发光液孵育显色, 以 β -actin 为内参, 通过 Image J 软件计算蛋白灰度值。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理, 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 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

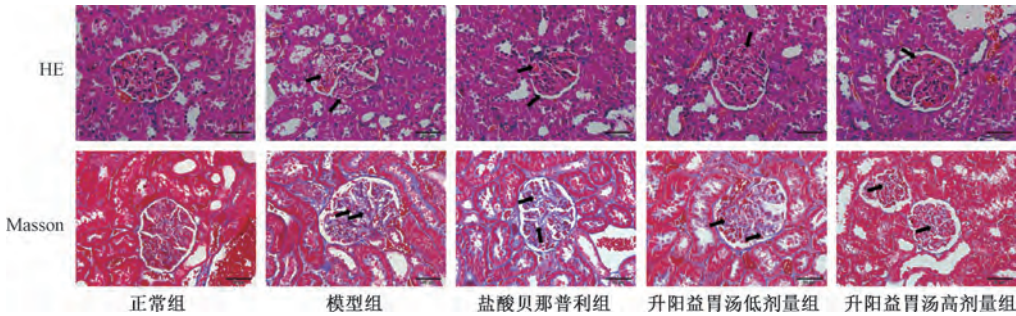
3 结果

3.1 升阳益胃汤对大鼠 24 h 尿蛋白水平的影响 给药前, 与正常组比较, 模型组和各给药组大鼠 24 h 尿蛋白水平升高 (*P*<0.01)。给药后, 与正常组比较, 模型组大鼠 24 h 尿蛋白水平升高 (*P*<0.01); 与模型组比较, 升阳益胃汤各剂量组和盐酸贝那普利组大鼠 24 h 尿蛋白水平降低 (*P*<0.01); 与盐酸贝那普利组比较, 升阳益胃汤高剂量组大鼠 24 h 尿蛋白水平降低 (*P*<0.05), 见表 1。

表 1 升阳益胃汤对大鼠 24 h 尿蛋白水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

组别	剂量/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	给药前/ ($\text{mg}\cdot 24\text{ h}^{-1}$)	给药后/ ($\text{mg}\cdot 24\text{ h}^{-1}$)
正常组	—	5.69 $\pm$ 1.17	5.59 $\pm$ 1.38
模型组	—	37.94 $\pm$ 4.82**	39.53 $\pm$ 4.64**
盐酸贝那普利组	0.01	38.21 $\pm$ 3.75**	19.38 $\pm$ 4.13##
升阳益胃汤低剂量组	12	38.04 $\pm$ 5.01**	20.15 $\pm$ 2.93##
升阳益胃汤高剂量组	24	37.98 $\pm$ 2.27**	16.46 $\pm$ 3.21### Δ

注: 与正常组比较, ** *P*<0.01; 与模型组比较, ## *P*<0.01; 与盐酸贝那普利组比较, Δ *P*<0.05。



注: 黑色箭头指示肾小球系膜区增生。

图 2 各组大鼠肾组织病理学变化 ($\times 400$)

3.4 升阳益胃汤对大鼠肾组织 Nephrin、Podocalyxin、Synaptopodin 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠 Nephrin、Podocalyxin、Synaptopodin 表达降低 (*P*<0.05); 与模型组比较, 升阳益胃汤各剂量组大鼠 Nephrin、

3.2 升阳益胃汤对大鼠肾组织 IgG 沉积的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肾组织 IgG 平均荧光强度升高 (*P*<0.01); 与模型组比较, 盐酸贝那普利组和升阳益胃各剂量组大鼠 IgG 平均荧光强度降低 (*P*<0.05, *P*<0.01), 见图 1、表 2。

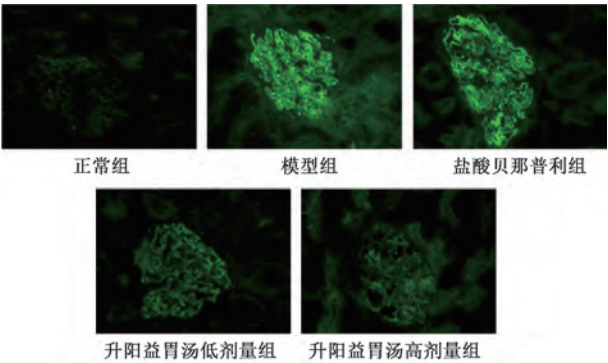


图 1 各组大鼠肾组织 IgG 沉积情况 ($\times 400$)

表 2 升阳益胃汤对大鼠肾组织 IgG 平均荧光强度的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

组别	剂量/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	IgG 平均荧光强度
正常组	—	1.04 $\pm$ 0.13
模型组	—	38.22 $\pm$ 2.25**
盐酸贝那普利组	0.01	30.53 $\pm$ 1.84#
升阳益胃汤低剂量组	12	22.34 $\pm$ 2.56##
升阳益胃汤高剂量组	24	15.51 $\pm$ 1.27##

注: 与正常组比较, ** *P*<0.01; 与模型组比较, # *P*<0.05, ## *P*<0.01。

3.3 升阳益胃汤对大鼠肾脏病理状态的影响 正常组大鼠肾组织结构正常, 肾小球结构完整, 囊腔大小正常, 未见病理改变, 胶原增生和上皮下嗜复红蛋白沉积; 与正常组比较, 模型组大鼠肾小球结构紊乱, 体积增大, 系膜增生, 肾组织胶原容积分数升高 (*P*<0.01); 与模型组比较, 各给药组大鼠病理状态有所减轻, 肾组织胶原容积分数降低 (*P*<0.05, *P*<0.01), 见图 2、表 3。

Podocalyxin、Synaptopodin 蛋白表达升高 (*P*<0.05), 盐酸贝那普利组大鼠 Synaptopodin 蛋白表达升高 (*P*<0.05), 图 3、表 4。

3.5 升阳益胃汤对大鼠血清 IL-6、IL-10 水平的影响 与

表 3 升阳益胃汤对大鼠肾组织胶原容积分数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	胶原容积分数/%
正常组	—	0.48±0.08
模型组	—	18.68±1.31 [*]
盐酸贝那普利组	0.01	15.35±2.72 [#]
升阳益胃汤低剂量组	12	12.77±1.49 ^{##}
升阳益胃汤高剂量组	24	10.67±0.65 ^{##}

注：与正常组比较,^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。
正常组比较,模型组大鼠血清 IL-6 水平升高 ($P<0.01$),

IL-10 水平降低 ($P<0.01$)；与模型组比较,盐酸贝那普利组和升阳益胃汤各剂量组大鼠血清 IL-6 水平降低 ($P<0.05$), IL-10 水平升高 ($P<0.05$), 见表 5。
3.6 升阳益胃汤对大鼠脾组织 Th17/Treg 细胞比例的影响 与正常组比较,模型组大鼠 Th17 细胞比例升高 ($P<0.01$), Treg 细胞比例降低 ($P<0.05$), Th17/Treg 比值升高 ($P<0.05$)；与模型组比较,盐酸贝那普利组和升阳益胃汤各剂量组大鼠 Th17 细胞比例降低 ($P<0.05$), Treg 细胞比例升高 ($P<0.05$), Th17/Treg 比值降低 ($P<0.05$), 见图 4、表 6。

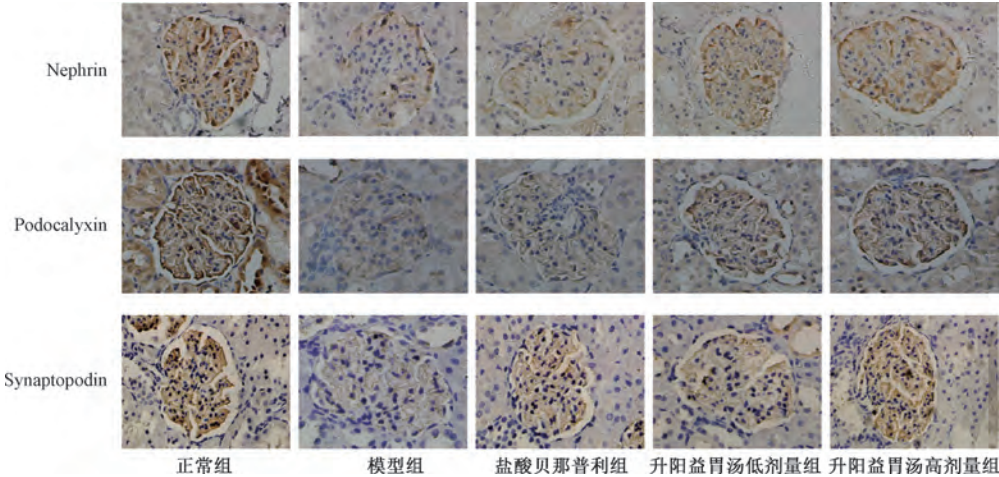


图 3 各组大鼠肾组织 Nephrin、Podocalyxin、Synaptopodin 蛋白定位 (免疫组化, ×400)

表 4 升阳益胃汤对大鼠肾组织 Nephrin、Podocalyxin、Synaptopodin 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Nephrin	Podocalyxin	Synaptopodin
正常组	—	0.92±0.11	1.42±0.13	1.49±0.12
模型组	—	0.32±0.06 [*]	0.38±0.08 [*]	0.40±0.03 [*]
盐酸贝那普利组	0.01	0.41±0.08	0.46±0.07	0.62±0.11 [#]
升阳益胃汤低剂量组	12	0.49±0.08 [#]	0.59±0.11 [#]	0.71±0.06 [#]
升阳益胃汤高剂量组	24	0.66±0.05 [#]	0.71±0.07 [#]	0.81±0.09 [#]

注：与正常组比较,^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。
表 5 升阳益胃汤对大鼠血清 IL-6、IL-10 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)
正常组	—	26.98±7.53	69.53±9.74
模型组	—	90.7±11.73 [*]	26.15±5.86 [*]
盐酸贝那普利组	0.01	74.32±9.07 [#]	38.62±9.09 [#]
升阳益胃汤低剂量组	12	58.81±7.97 [#]	40.44±7.90 [#]
升阳益胃汤高剂量组	24	45.26±5.21 ^{##}	47.22±6.12 [#]

注：与正常组比较,^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

3.7 升阳益胃汤对大鼠肾组织 Synaptopodin、Podocalyxin、Nephrin 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织 Synaptopodin、Podocalyxin、Nephrin 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；与模型组比较,盐酸贝那普利组和升阳益胃汤各剂量组大鼠肾组织 Synaptopodin、Podocalyxin、Nephrin 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 见图 5、表 7。

3.8 升阳益胃汤对大鼠肾组织 mTOR、p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织 p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达升高 ($P<0.05$)；与模型组比较,盐酸贝那普利组和升阳益胃汤各剂量组大鼠肾组织 p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 见图 6、表 8。

4 讨论

近年来,特发性膜性肾病发病率急剧升高,一项基于 34 630 例病例 10 年回顾性研究证实,特发性膜性肾病已超过 IgA 肾病,成为我国成年人中最常见的原发性肾小球肾炎类型^[2],但目前仍缺乏安全有效的治疗方法。特发性膜性肾病属于中医“水肿病”“水气病”的范畴,总属“本虚标实”之证,本虚以脾肾亏虚为主,标实以水湿、瘀血为患,总体病机可概括为脾肾亏虚、水湿内停、瘀血阻滞,核心病机为脾虚湿盛,治宜益气升阳、健脾益胃,即由脾论治。升阳益胃汤为李东垣脾胃论学术思想的代表方剂,方中重用黄芪以益气固表,利水消肿,益气治本;人参可

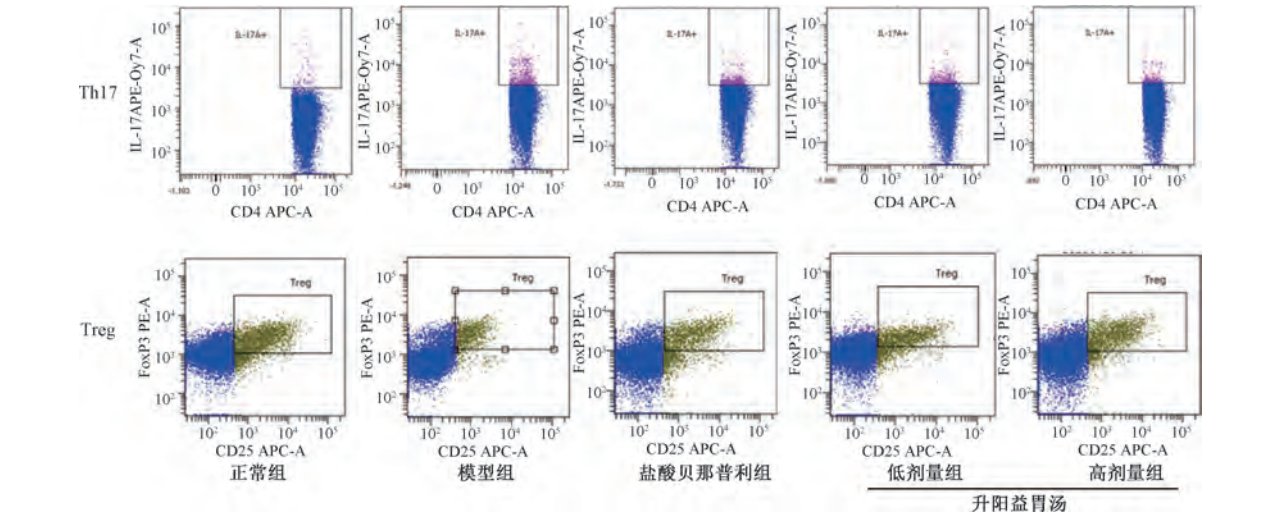


图 4 各组大鼠脾脏 Th17、Treg 细胞流式图

表 6 升阳益胃汤对大鼠脾脏 Th17/Treg 细胞比例的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

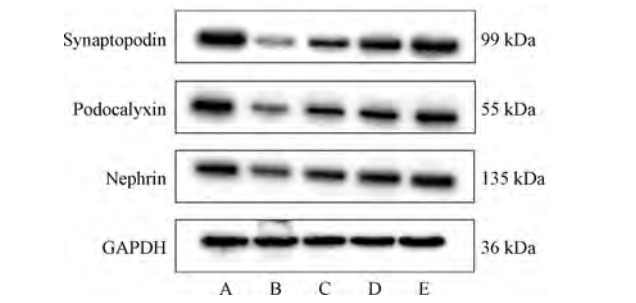
组别	剂量/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
正常组	—	1.62±0.08	16.82±0.16	0.10±0.06
模型组	—	12.41±0.06**	3.6±0.05*	3.45±0.05*
盐酸贝那普利组	0.01	10.45±0.11#	5.9±0.07#	1.78±0.03#
升阳益胃汤低剂量组	12	9.56±0.13#	7.7±0.06#	1.24±0.02#
升阳益胃汤高剂量组	24	7.32±0.08#	9.6±0.10#	0.76±0.04#

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。

表 7 升阳益胃汤对大鼠肾组织 Synaptopodin、Podocalyxin、Nephrin 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

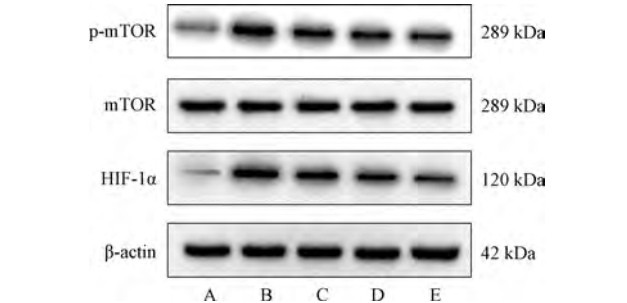
组别	剂量/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Synaptopodin	Podocalyxin	Nephrin
正常组	—	1.28±0.07	1.21±0.06	0.89±0.06
模型组	—	0.32±0.13*	0.43±0.03*	0.36±0.09*
盐酸贝那普利组	0.01	0.65±0.08#	0.67±0.08#	0.48±0.08
升阳益胃汤低剂量组	12	0.79±0.05#	0.75±0.03#	0.55±0.06#
升阳益胃汤高剂量组	24	0.89±0.06#	0.91±0.04#	0.65±0.05#

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为盐酸贝那普利组，D~E 分别为升阳益胃汤低、高剂量组。

图 5 各组大鼠肾组织 Synaptopodin、Podocalyxin、Nephrin 蛋白表达



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为盐酸贝那普利组，D~E 分别为升阳益胃汤低、高剂量组。

图 6 各组大鼠肾组织 mTOR、p-mTOR、HIF-1α 蛋白表达

安神益气补脾；白术健脾益气，利水渗湿；炙甘草补脾益气；黄芪、人参、白术、炙甘草合用可健脾胃补元气；柴胡升举阳气，与防风合用，可助其升发有力；黄连清热燥湿，半夏燥湿化痰和胃，陈皮健脾理气化痰，黄连、半夏、陈皮合用清热除湿，使湿热从中焦而去且有陈皮顾护脾胃，使祛湿而不伤脾；羌活、独活可升阳祛风燥湿；茯苓健脾利湿安神，泽泻亦可利水渗湿泄热，两者合用又可

导湿热从下焦排出，通利水道，通腑泄浊，使浊邪去而清阳升；人参、白术、茯苓、甘草组成的四君子汤亦可壮元补气，白芍可调节机体代谢，运脾燥湿。诸药合用，补泻有度，升降相宜，共奏益气升阳、健脾益胃、化湿清热之功，在临床治疗特发性膜性肾病疗效显著，然而其发挥肾保护作用的具体机制尚待进一步探讨。

特发性膜性肾病作为一种自身免疫介导的肾小球肾炎，

表 8 升阳益胃汤对大鼠肾组织 mTOR、p-mTOR、HIF-1α 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	p-mTOR/mTOR	HIF-1α
正常组	—	0.32±0.05	0.29±0.06
模型组	—	0.92±0.12 [*]	0.88±0.07 [*]
盐酸贝那普利组	0.01	0.69±0.07 [#]	0.59±0.09 [#]
升阳益胃汤低剂量组	12	0.61±0.08 [#]	0.55±0.06 [#]
升阳益胃汤高剂量组	24	0.45±0.04 [#]	0.41±0.08 [#]

注：与正常组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ 。

由于自身抗原决定簇暴露，获得免疫活性，致自身抗体识别引发自身免疫攻击，抗原抗体免疫复合物沉积于上皮细胞下，激活补体系统，最终导致足细胞损伤^[13]，引起特发性膜性肾病发生。因此，足细胞是特发性膜性肾病病理过程中的主要损伤细胞，而免疫细胞在特发性膜性肾病病程中发挥重要的调控作用。辅助性 T 细胞作为人类免疫系统的关键组成部分，通过表达 CD4 在免疫应答中起辅助或调节作用^[14]。Th17 为重要的 CD4⁺T 细胞亚群，通过分泌 IL-17A、IL-6 等细胞因子参与炎症反应和组织损伤过程^[15]。Treg 细胞亦是近年免疫学研究的热点之一，其来源于 TGF-β 单独诱导的初始 T 细胞，主要受转录因子叉头盒 P3 (forkhead/winged helix transcription-al factor p3, FoxP3) 调控^[16]，分泌 IL-10 等细胞因子，其功能主要是抑制自身反应性 T 细胞的活性和维持免疫耐受，若受损可直接导致自身免疫性疾病。特发性膜性肾病患者中观察到 Th17/Treg 失衡，因此，Th17/Treg 细胞失衡是特发性膜性肾病的发病机制和治疗靶点的关键^[17-18]。

本研究结果显示，模型组大鼠肾组织 Synaptopodin、Nephrin、Podocalyxin 蛋白表达降低，表明特发性膜性肾病状态下存在足细胞损伤；升阳益胃汤干预后，上述蛋白表达升高，表明它可有效减少足细胞损伤，保护肾功能。Th17/Treg 细胞平衡受到多种细胞因子和信号通路的调控^[19]，而 mTOR 可通过调控 HIF-1α 活性，介导 CD4⁺T 细胞向 Th17 或 Treg 的极化，影响 Th17/Treg 细胞免疫平衡状态^[20-21]。本研究结果显示，与模型组比较，升阳益胃汤各剂量组 p-mTOR、HIF-1α 表达降低，提示它抑制了 mTOR/HIF-1α 信号通路的活化；Th17 细胞比例降低，Treg 细胞比例升高，且足细胞蛋白表达增多，推测它可能通过抑制 mTOR/HIF-1α 信号通路调控 Th17/Treg 细胞免疫平衡减少足细胞损伤，达到保护肾功能、延缓疾病发展的目的。

综上所述，升阳益胃汤可通过抑制 mTOR/HIF-1α 信号通路活化，恢复 Th17/Treg 细胞免疫平衡减少足细胞损伤，保护特发性膜性肾病大鼠肾功能，延缓疾病进展。

参考文献：

[1] 王新慧. 健脾祛湿和络方上调线粒体自噬减少被动 Heymann 肾炎大鼠足细胞凋亡的机制研究[D]. 北京：中国中医科学院，2021.

[2] Hu R M, Quan S X, Wang Y Z, *et al.* Spectrum of biopsy proven renal diseases in central China: a 10-year retrospective study based on 34, 630 cases[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10994-10998.

[3] 刘宝利, 钟逸斐, 刘伟敬, 等. 中医药临床优势病种探讨——膜性肾病[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021,

27(16): 185-190.

[4] 蔡小凡, 张晓丹, 李雪玲, 等. 中医方案治疗伴肾病范围蛋白尿的特发性膜性肾病的疗效分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(32): 3535-3540; 3550.

[5] 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.

[6] Motavalli R, Etemadi J, Soltani-Zangbar M S, *et al.* Altered Th17/Treg ratio as a possible mechanism in pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy[J]. *Cytokine*, 2021, 141: 155-159.

[7] Zhang W Q, Liu X, Zhu Y C, *et al.* Transcriptional and posttranslational regulation of Th17/Treg balance in health and disease[J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(9): 2137-2150.

[8] Endo K, Matsui R, Sugiyama M, *et al.* Procyanidin B2 gallate regulates TNF-α production from T cells through inhibiting glycolytic activity *via* mTOR-HIF-1 pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 17(2): 113952.

[9] Ren W K, Yin J, Duan J L, *et al.* mTORC1 signaling and IL-17 expression: defining pathways and possible therapeutic targets[J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(2): 291-299.

[10] Wang X H, Lang R, Zeng Q, *et al.* Jianpi Qushi Heluo formula alleviates renal damages in passive Heymann nephritis in rats by upregulating parkin-mediated mitochondrial autophagy[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 183-138.

[11] Wang X H, Yang Y N, Liang Y, *et al.* Structural modulation of gut microbiota during alleviation of experimental passive Heymann nephritis in rats by a traditional Chinese herbal formula[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 145: 112475.

[12] 张欣欣, 高 飞, 陈素枝, 等. 益肾通络方对膜性肾病大鼠的肾保护作用及对 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 57-66.

[13] Panagakis A, Bellos I, Grigorakos K, *et al.* Recurrence of idiopathic membranous nephropathy in the kidney allograft: a systematic review[J]. *Biomedicines*, 2024, 12(4): 739-752.

[14] Zhao Q H, Dai H R, Liu X L, *et al.* Helper T cells in idiopathic membranous nephropathy[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 665629.

[15] Lee G R. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 730-746.

[16] Huang J H, Lin Y L, Wang L C, *et al.* M2-like macrophages polarized by Foxp3⁺ Treg-of-B cells ameliorate imiquimod-induced psoriasis[J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(11): 1477-1492.

[17] Fasching P, Stradner M, Graninger W, *et al.* Therapeutic potential of targeting the Th17/Treg axis in autoimmune disorders[J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 134-150.

[18] Zhou X S, Dai H R, Jiang H X, *et al.* MicroRNAs: potential mediators between particulate matter 2.5 and Th17/Treg immune disorder in primary membranous nephropathy[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13(5): 968-976.

[19] Zhang W Q, Liu X, Zhu Y C, *et al.* Transcriptional and posttranslational regulation of Th17/Treg balance in health and disease[J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(9): 2137-2150.

[20] Chi H B. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions[J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(5): 325-338.

[21] Ren W K, Yin J, Duan J L, *et al.* mTORC1 signaling and IL-17 expression: defining pathways and possible therapeutic targets[J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(2): 291-299.