

基于 m6A 激活自噬探讨糖肾灌肠方对糖尿病肾病肾纤维化的改善作用

余 辉¹, 王先敏², 藏 登², 阿曼古丽·苏力唐², 王 晶³, 段晓梅³, 刘 新⁴,
马 丽^{2*}

(1. 新疆医科大学第四临床医学院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学附属中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆医科大学附属中医医院呼吸病研究重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830000; 4. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: **目的** 探讨糖肾灌肠方改善糖尿病肾病 (DN) 肾纤维化的作用机制。**方法** 通过 GEO 数据库和 Karolinska 肾脏研究中心获取正常人、DN 患者数据, 结合网络药理学获得药物作用于疾病的潜在靶点。将小鼠随机分为正常组、模型组、糖肾灌肠方组 (13 g/kg) 和卡格列净组 (0.013 g/kg), 采用高糖高脂饲料喂养+腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 建立 DN 模型, 给药 4 周。测量小鼠体质量, 生化试剂盒检测小鼠尿微量白蛋白、尿肌酐、血肌酐、血糖水平, 透射电镜下观察肾组织自噬水平, m6A 检测试剂盒和斑点杂交 (Dot blot) 法检测肾组织 m6A 水平, Western blot 法检测肾组织 WTAP、METTL3、METTL14、FTO、Caspase-3、LC3、P63、TGF-β、FN 蛋白表达, RT-qPCR 法检测肾组织 *Caspase-3*、*LC3*、*P63*、*TGF-β*、*FN* mRNA 表达, MeRIP-qPCR 法检测 *Caspase-3* 甲基化富集水平。**结果** 药物作用疾病的潜在作用靶点为 *Caspase-3*, 主要通过调控自噬发挥作用。与模型组比较, 糖肾灌肠方组及卡格列净组改善了肾组织自噬水平及纤维化 ($P<0.05$), 下调了 *Caspase-3* 蛋白、mRNA 表达 ($P<0.05$), 肾组织、m6A 水平 ($P<0.05$) 及 *Caspase-3* 的 m6A 富集倍数, 降低了 m6A 甲基化酶中 METTL3 蛋白表达 ($P<0.05$), 并且 *Caspase-3* 表达与 METTL3 表达呈显著正相关 ($P<0.05$)。**结论** 糖肾灌肠方通过 *Caspase-3* 调控肾小管上皮细胞自噬, 进一步改善肾小管纤维化, 而对 *Caspase-3* 的调控依赖于 METTL3。

关键词: 糖肾灌肠方; 糖尿病肾病; 肾小管; 自噬; m6A; *Caspase-3*; METTL3

中图分类号: R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)10-3473-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.045

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病的主要微血管并发症之一, 也是终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD) 的主要原因之一, 有 40% 的 2 型糖尿病患者会在患病后 5~10 年发展成为 DN^[1], 其病理变化包括肾脏肥大, 肾小球硬化、肾小管间质纤维化等, 其中肾小管间质纤维化的发生较肾小球硬化早, 并且与 DN 的发展和预后更密切^[2-3]。自噬即“自食”, 细胞通过清理受损的细胞器、错误的蛋白质及病原体来维持细胞活性^[4], 它与 DN 肾小管损伤密切相关, 在糖尿病状态下肾小管上皮细胞的自噬被抑制, 使细胞中有害物质增加, 导致细胞死亡及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 积累, 最终引起肾小管间质纤维化^[5-7]。目前, 针对 DN 的药物主要是肾素-血管紧张素系统抑制剂或血管紧张素受体阻滞剂, 以及醛固酮受体拮抗剂非利酮, 可延缓其进展为 ESRD^[8], 但效果不理想, 因此, 需要寻找安全且有效的治疗方法。

糖肾灌肠方是新疆医科大学附属中医医院的协定处方,

可改善 DN 患者和小鼠蛋白尿、肾纤维化及炎症指标^[9-11]。本研究旨在探讨糖肾灌肠方通过调控 m6A 甲基化修饰改善 DN 肾纤维化的具体机制, 以期对相关治疗提供更多的理论基础。

1 材料

1.1 动物 40 只 C57BL/6J 雄性小鼠, 6 周龄, 体质量 (17±0.56) g, 购买并饲养于新疆医科大学动物实验房 [实验动物生产许可证号 SCXK (新) 2018-0001, 实验动物使用许可证号 SYXK (新) 2018-0002], 环境温度 22 ℃, 相对湿度 50%~80%, 昼夜明暗 12 h/12 h 交替, 高脂饲料 (批号 B1135DM) 购自北京博爱港生物技术有限公司。本实验经新疆医科大学动物伦理委员会审查批准 (伦理批号 IACUC-20220127-03)。

1.2 药物 灌肠方由生大黄 30 g、煅牡蛎 50 g、泽泻 30 g 等中药组成, 由新疆医科大学附属中医院药剂科提供, 经新疆维吾尔自治区中医院陈良主任中药师鉴定为正品。

收稿日期: 2024-12-27

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发专项 (2023B03002)

作者简介: 余 辉 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为糖尿病肾病。Tel: 13579967526, E-mail: 7290259012@qq.com

* 通信作者: 马 丽 (1974—), 女 (东乡族), 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为糖尿病微血管病变。Tel: 13699983028, E-mail: malixj322122@163.com

2 kg 中药加入 20 kg 水煎煮，浓缩至 1 L，再加热熬煮至 150 mL，浓缩成浸膏，烘干机烘干，研磨成粉。

1.3 试剂 链脲佐菌素（STZ）、Magna MerIP m6A 试剂盒（美国 Sigma-Aldrich 公司，批号 040M1367、17-10449-1/1710449-2）；小鼠尿微量白蛋白 ELISA 试剂盒 [生工生物工程（上海）股份有限公司，货号 D721120]；动物组织/细胞总蛋白提取试剂盒（柱式法）、血糖含量检测试剂盒、肌酐含量检测试剂盒（北京索莱宝生物科技有限公司，货号 BC4915、BC3790、BC2495）；硝酸纤维素转印膜、ECL Puls 超敏发光液（合肥白鲨生物科技有限公司，货号 BS-NC-22、BL520A）；m6A 抗体（美国 Cell Signaling Technology 公司，批号 56593S）；LC3、FN、 β -actin 抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，货号 14600-1-AP、15613-1-AP、66009-1-IG）；Caspase-3、WTAP、METTL3、METTL14、FTO、P62、TGF- β 抗体，山羊抗兔 IgG H&L（HRP）二抗（英国 Abcam 公司，货号 ab184787、ab195380、ab195352、ab252562、ab94482、ab109012、ab315254、ab6721）；小鼠抗兔二抗（上海碧云天生物技术有限公司，货号 A0210）；PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real Time）、TB Green® Premix Ex Taq™ II（Tli RNaseH Plus）试剂（日本 TaKaRa 公司，货号 RR047A、RR820A）；RNA 纯化试剂盒（德国 QIAGEN 公司，批号 74104）。

1.4 仪器 MULTISKAN 酶标仪、7500 实时荧光定量 PCR 仪 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；OI900 全自动化学发光凝胶成像仪（广州光仪生物科技有限公司）；PowerpPac HC 高电流电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 差异基因（DGEs）筛选及 GO、KEGG 富集分析 从 GEO 数据库（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>）下载包含 12 例正常人、10 例 DN 患者肾小管的基因芯片数据集 GSE30529，再从 Karolinska 肾脏研究中心（<http://karokidney.org/rna-seq-dn/>）下载 KaroKidney RNA-seq counts 文件，包含 20 例正常人、19 例 DN 患者的肾小管测序数据。使用 R 语言 limma 及 edgeR 包线性拟合方法、贝叶斯分析和 *t* 检验识别正常人、DN 患者肾小管病变之间的差异表达基因（DEGs），以 $P < 0.05$ 为标准，Venn 图展示差异基因分布情况，进行基因本体（gene ontology，GO）富集分析和 KEGG（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）富集分析，以 $q < 0.05$ 为阈值筛选 DEGs 的富集功能和信号通路。

2.2 自噬基因、复合靶点筛选 将 GSE30529、RNAseq 共有差异基因与自噬相关基因取交集，得到差异基因，再与药物作用靶点取交集，得到药物作用于疾病的靶点。

2.3 造模 小鼠喂以高糖高脂饲料（65% 维持饲料+10% 猪油+20% 蔗糖+2.5% 胆固醇）4 周后，一次性腹腔注射 1% STZ（溶于 pH 4.5、0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中，0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌），72 h 后尾尖静脉采血，

血糖水平 ≥ 16.7 mmol/L 为糖尿病模型制备成功^[12]。小鼠继续高糖高脂饲料饲养 8 周，代谢笼收集 24 h 尿液，尿量大于原尿量 50%、尿蛋白排泄率 > 30 mg/24 h 为 2 型糖尿病肾病模型制备成功^[13]。

2.4 分组及给药 小鼠随机分为正常组、模型组、糖肾灌肠方组和卡格列净组，每组 10 只，除正常组外，其余各组小鼠按“2.3”项下方法造模，糖肾灌肠方组给予 13 g/kg（相当于生药量 52 g/kg）药物灌肠，剂量为 4 mL/kg，然后将小鼠头朝下放置 20~30 min；卡格列净为阳性药^[14]，该组小鼠灌胃给予 10 mL/kg（即 0.013 g/kg）药物。

2.5 生化指标检测 给药 4 周后小鼠禁食 24 h，称定体质量，收集尿液，采用生化试剂盒检测尿微量白蛋白、尿肌酐水平；眼球取血，检测血糖水平；全血静置后离心，取上层血清，采用生化试剂盒检测血肌酐水平。

2.6 肾组织病理学观察 将小鼠断颈处死，取肾脏，一部分组织以冰盐水灌洗，分离肾皮质，4% 多聚甲醛固定，经脱水、石蜡包埋、苏木精-伊红（HE）染色后在光学显微镜下观察；另一部分以电镜固定液固定，经脱水、石蜡包埋、柠檬酸铅染色后在透射电镜下观察；剩余部分置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

2.7 蛋白印迹（Western blot）法检测肾组织相关蛋白表达 取小鼠肾组织 30~50 mg，研磨后加入 RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂提取总蛋白，BCA 试剂盒测定蛋白浓度，每孔加 20 μ g 蛋白，进行电泳及转膜，5% 脱脂奶粉溶液封闭，加一抗，孵育过夜，TBST 洗膜，加二抗，室温孵育 1 h，化学发光液浸膜 1 min，显色。采用 ImageJ 软件分析蛋白条带相对灰度值，以 β -actin 为内参，分析目的蛋白相对表达。

2.8 RT-qPCR 法检测肾组织相关基因 mRNA 表达 取小鼠肾组织约 30 mg，研磨，匀浆，加入 TRIzol 试剂提取总 RNA，反转录得 cDNA，进行 PCR 扩增反应，体系为 TB Green premix Ex Tap II 10 μ L，正反向引物各 0.8 μ L，ROX Reference Dye II 0.4 μ L，DEPC 水 6 μ L，模板 2 μ L，扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s；95 $^{\circ}$ C 扩增 5 s，60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 34 s，共 40 个循环。以 β -actin 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因 mRNA 表达。引物由北京擎科生物科技股份有限公司提供，序列见表 1。

2.9 RNA m6A 斑点印迹（Dot blot）检测肾组织 m6A 水平 总 RNA 用 DEPC 水依次稀释至 100、200、400 ng/ μ L，在 95 $^{\circ}$ C 下变性 5 min，取 2 μ L 滴入 NC 膜，室温风干 5 min，在 245 nm 紫外线（UV）下交联 5 min，5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h，加入抗 m6A 抗体（1 : 1 000 稀释），孵育 1 h，PBST 洗涤，每次 5 min，加入 HRP 山羊抗兔 IgG（1 : 1 000 稀释），室温孵育 1 h，PBST 洗涤，显色液孵育 1 min 后曝光，PBST 清洗，亚甲蓝染色 30 min，ddH₂O 清洗至背景干净，拍照。

2.10 RNA m6A 含量测定 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA，试剂盒检测小鼠肾组织 m6A 含量。将 80 μ L 结合溶液和

表 1 引物序列

基因	引物序列	扩增产物长度/bp
Caspase-3(MERIP-pcr)	正向 ATTATACTGTGCTAGAAACGAAAGGG	92
	反向 CCGCAGCTTCTCCACATGG	
Caspase-3	正向 AGTGGGACTGATGAGGAGATGGC	140
	反向 ATGCTGCAAAGGGA CTGGATGAAC	
LC3B	正向 GAGCGAGTTGGTCAAGATCATCCG	119
	反向 CATAGATGTCAGCGATGGGTGTGG	
P62	正向 AGGAGGAGACGATGACTGGACAC	150
	反向 TTGCTCTGTAGGAGCCTGGTGAG	
TGF-β	正向 GACCGCAACAACGCCATCTATG	99
	反向 GGGTTCGGGCACTGCTTCC	
FN	正向 ACCGAGTACACCATCTACGTCATTG	86
	反向 GCTTCCTGTCTCTCTCTCTCCTC	
β-actin	正向 GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	245
	反向 GCCGGACTCATCGTACTCC	

200 ng RNA 样品加到指定孔中，37 ℃ 孵育 90 min 进行 RNA 结合，缓冲液洗涤 3 次，每孔加入 50 μL 稀释的捕获抗体，室温孵育 60 min，加入检测抗体和增强剂溶液，室温孵育 30 min，加入显影液，37 ℃ 避光孵育 10 min，终止溶液终止反应，在 2~10 min 内测定 450 nm 波长处吸光度。

2.11 m6A-RNA 免疫沉淀（RIP）测定 提取小鼠肾组织总 RNA，使用 Magna MeRIP m6A 试剂盒进行 RNA 免疫沉淀（RIP）测定。再将含有 mRNA 的 m6A 富集物用 RNA 纯化试剂盒纯化，RT-qPCR 进行验证。

2.12 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.0、SPSS Statistics 26 软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，符合正态分布且方差齐时，多组间比较采用单因素方差分析，多重比较采用 LSD 检验；不符合正态分布或方差不齐时，多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 糖肾灌肠方调控 DN 自噬的潜在靶点

3.1.1 正常人、DN 患者差异表达基因（DEGs）筛选 在 GSE30529 基因集中筛选出差异基因 3 271 个，在 RNAseq 基因集中筛选出差异基因 9 174 个，两者取交集，筛选出共有差异基因 1 436 个。

3.1.2 共有差异基因 GO、KEGG 富集分析 GO 富集的生物学过程（BP）主要是细胞活化、免疫反应等，发生的部位涉及囊泡、膜、细胞外基质等；细胞组分（CC）主要是细胞膜部分、细胞外基质等；分子功能（MF）主要是信号受体结合、细胞外基质结构组成等，见图 1。KEGG 富集主要集中在细胞程序性死亡（如凋亡、自噬、铁死亡等）、PI3K-AKT 信号通路、NF-κB 信号通路等，见图 2。结果显示，细胞程序性死亡疾病的发生发展中占据重要位置。

3.1.3 糖肾灌肠方作用于 DN 的关键基因筛选 将 GSE30529、RNAseq 基因集中的差异基因在细胞程序性死亡相关基因中进行基因集变异分析（GSVA），发现自噬在 2 个基因集中都具有显著差异（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），见图 3。将 1 436 个共有差异基因与自噬相关基因取交集，发现在

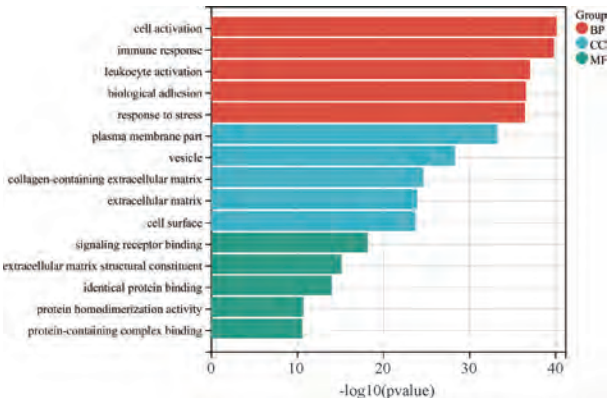


图 1 DEGs 的 GO 富集分析柱状图

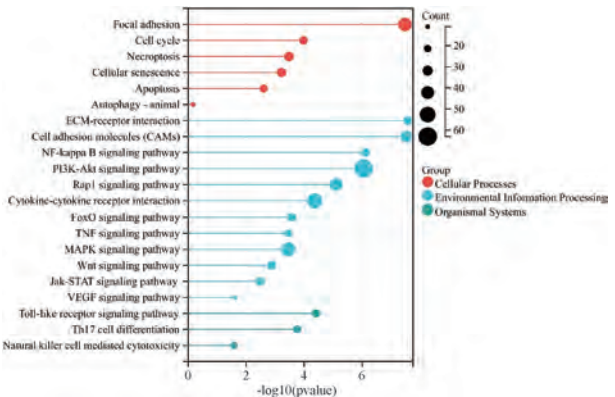
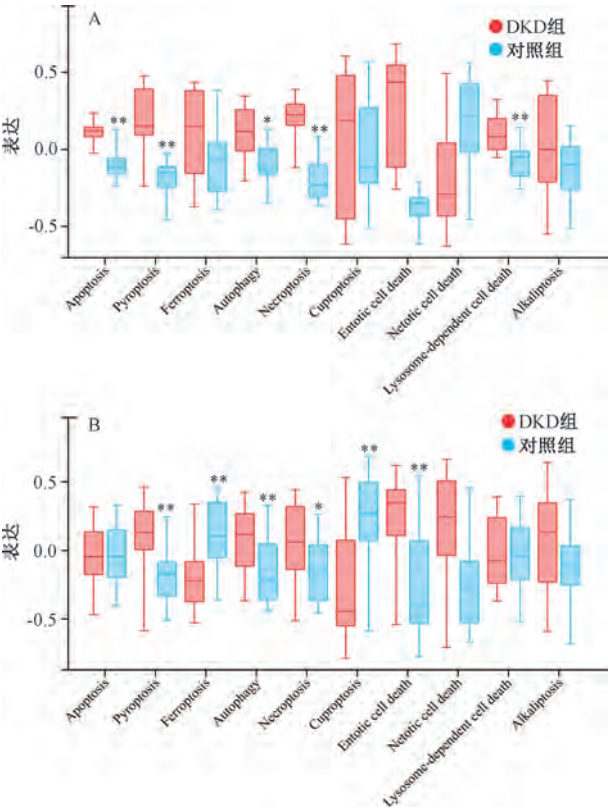


图 2 DEGs 的 KEGG 富集分析气泡图

DN 中共有 28 个自噬相关差异基因。前期网络药理学发现，药物作用靶点共有 193 个，本研究通过对 28 个自噬相关差异基因机器学习，与药物作用靶点取交集，发现 Caspase-3 为潜在调控自噬的靶点，见图 4。由此推测，糖肾灌肠方可能通过改善 Caspase-3 介导的自噬来进一步缓解肾损伤。

3.2 动物实验

3.2.1 糖肾灌肠方对小鼠体质量、血糖、血肌酐、尿微量白蛋白、尿肌酐的影响 与正常组比较，模型组小鼠体质量、血糖、血肌酐、尿微量白蛋白、尿肌酐水平升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，糖肾灌肠方组和卡格列净组小鼠体



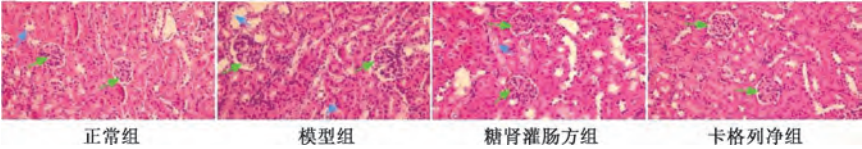
注：与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 3 细胞程序性死亡在 GSE30529 (A)、RNAseq (B) 中的 GSVA 评分箱式图

表 2 糖肾灌肠方对小鼠体重、血糖、尿肌酐、尿微量白蛋白、血肌酐水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	体重/g	血糖/(mmol·L ⁻¹)	尿肌酐/(μmol·L ⁻¹)	尿微量白蛋白/(ng·mL ⁻¹)	血肌酐/(ng·mL ⁻¹)
正常组	23.90±2.39	5.96±1.19	39.70±14.71	291.06±56.33	28.27±10.04
模型组	29.38±1.93**	26.92±3.16**	651.36±170.13**	2 833.06±440.55**	67.58±17.97**
糖肾灌肠方组	25.87±4.17 [#]	20.91±2.30 ^{##}	362.58±199.63 ^{##}	1 271.71±311.74 ^{##}	42.76±10.98 ^{##}
卡格列净组	24.56±2.03 ^{##}	17.70±5.36 ^{##}	312.82±138.58 ^{##}	1 265.22±288.06 ^{##}	38.63±12.93 ^{##}

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



注：绿色箭头指示肾小球，蓝色箭头指示肾小管上皮细胞。

图 5 各组小鼠肾组织 HE 染色 (×200)

3.2.2.2 透射电镜观察 正常组小鼠肾小管基本结构清晰，上皮细胞排列整齐，同类管腔大小均一，核基质电子密度及线粒体、初级溶酶体结构正常，可见少量自噬小体，间质内未见胶原纤维增生；与正常组比较，模型组小鼠肾小管基本结构清晰，上皮细胞排列紊乱，核基质电子密度降低，小管内可见脱落的细胞残片，大部分线粒体结构基本正常，可见较多线粒体肿胀和自噬，初级溶酶体很少，间质内可见胶原纤维增生；与模型组比较，糖肾灌肠方组、

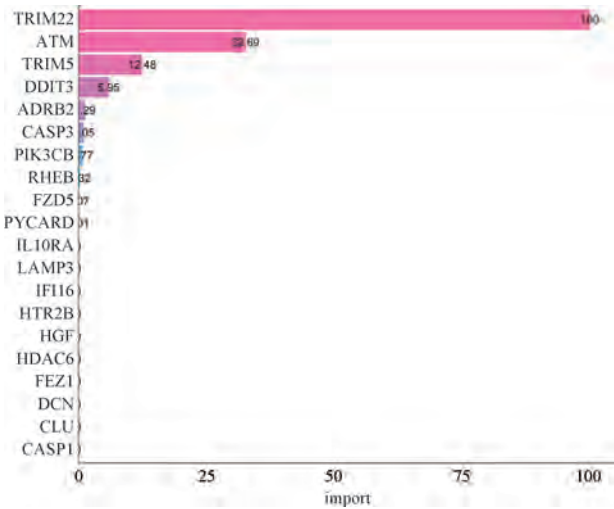


图 4 自噬相关基因的 XGBoost 分析柱状图

质量、血糖、血肌酐、尿微量白蛋白、尿肌酐水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见表 2。

3.2.2 糖肾灌肠方对小鼠肾组织病理学的影响

3.2.2.1 HE 染色 正常组小鼠肾小球毛细血管袢开放良好，管壁薄而纤细，足细胞、肾小囊壁完整；与正常组比较，模型组小鼠肾小球体积增大，肾小球细胞增多，毛细血管袢开放尚可，管壁僵硬，肾小囊壁完整，肾小管局部上皮脱落性管型；与模型组比较，糖肾灌肠方组、卡格列净组小鼠肾小球体积增大改善，肾小管上皮细胞局部变形，毛细血管袢开放尚可，管壁僵硬，肾小囊壁完整，见图 5。

卡格列净组小鼠肾组织超微结构有不同程度改善，见图 6。

3.2.3 糖肾灌肠方对小鼠肾组织自噬的影响 与正常组比较，模型组小鼠肾组织 LC3 II 蛋白、mRNA 表达降低 ($P<0.01$)，P62、Caspase-3、TGF-β、FN 蛋白、mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，糖肾灌肠方组、卡格列净组小鼠肾组织 LC3 II 蛋白、mRNA 表达升高 ($P<0.01$)，P62、Caspase-3、TGF-β、FN 蛋白、mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 7、表 3~4。

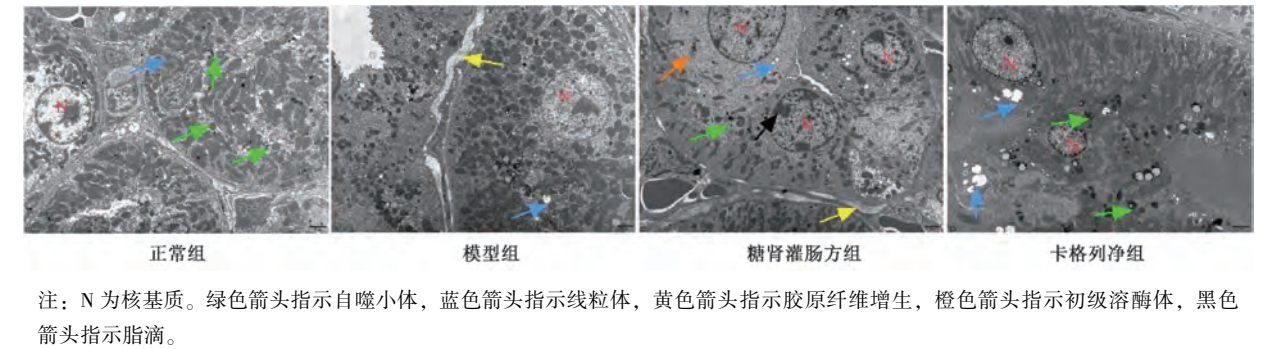
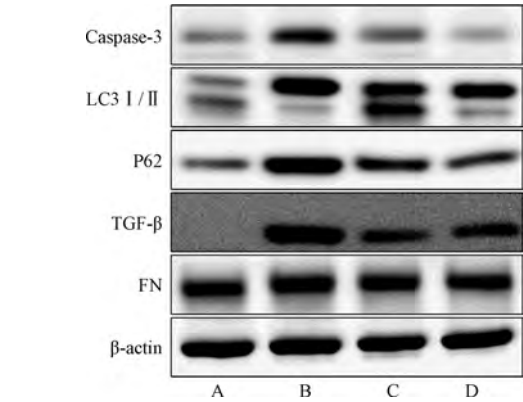


图 6 各组小鼠肾组织超微结构（透射电镜，×5 000）



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为糖肾灌肠方组，D 为卡格列净组。
图 7 各组小鼠肾组织 Caspase-3、LC3、P62、TGF-β、FN 蛋白印迹

表 3 各组小鼠肾组织 Caspase-3、LC3、P62、TGF-β、FN 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	LC3 II/LC3 I	P62/β-actin	Caspase-3/β-actin	TGF-β/β-actin	FN/β-actin
正常组	1.53±0.07	0.71±0.13	0.64±0.04	0.22±0.10	1.09±0.08
模型组	0.22±0.00**	1.49±0.00**	0.86±0.02*	0.97±0.02**	1.54±0.12**
糖肾灌肠方组	0.86±0.01##	0.92±0.01##	0.67±0.02#	0.67±0.08#	1.12±0.06##
卡格列净组	0.42±0.03##	0.69±0.09##	0.65±0.13#	0.48±0.17##	1.07±0.04##

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

表 4 各组小鼠肾组织 LC3B、P62、Caspase-3、TGF-β、FN mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	LC3B	P62	Caspase-3	TGF-β	FN
正常组	1.03±0.30	1.47±1.01	1.03±0.31	1.03±0.32	1.00±0.19
模型组	0.39±0.05**	8.28±5.75**	1.48±0.07*	1.68±0.47*	1.71±0.34**
糖肾灌肠方组	0.64±0.16##	4.08±0.50##	1.00±0.17#	1.19±0.33	1.16±0.46#
卡格列净组	0.53±0.05##	3.41±1.67##	1.10±0.21	1.16±0.3##	1.34±0.29

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

表 5 各组小鼠肾组织中 m6A 水平比较（Dot blot 法， $\bar{x}\pm s$, $n=3$ ）

组别	100 ng	200 ng	400 ng
正常组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	4.44±1.59**	3.88±1.49**	2.49±1.14**
糖肾灌肠方组	1.37±1.03##	0.70±0.44##	0.54±0.11##
卡格列净组	0.97±0.26##	0.65±0.39##	0.52±0.10##

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

3.2.4 糖肾灌肠方下调 Caspase-3 的 m6A 甲基化修饰水平 与正常组比较，模型组上调 m6A 甲基化修饰的水平 ($P<0.01$)；与模型组比较，糖肾灌肠方组和卡格列净组下调 m6A 水平 ($P<0.01$)，见图 8、表 5。m6A 检测试剂盒检测的结果与 Dot blot 结果一致，见表 6。为了证明是否是 Caspase-3 的 m6A 修饰发生了改变，再进行 MeRIP-PCR 实验，结果显示，与正常组比较，模型组 Caspase-3 的 m6A 富集倍数升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，糖肾灌肠方组和卡格列净组 Caspase-3 的 m6A 富集倍数降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 9。

3.2.5 糖肾灌肠方对 m6A 修饰酶的影响 与正常组比较，模型组 METTL3 表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，糖肾灌肠方组和卡格列净组 METTL3 表达降低 ($P<0.01$)。各组间 METTL14、FTO、WTAP 表达均无显著差异 ($P>0.05$)，见图 9、表 8。另外，METTL3 表达与 Caspase-3 表

表 6 各组小鼠肾组织 m6A 水平比较（m6A 试剂盒， $\bar{x}\pm s$, $n=3$ ）

组别	m6A 水平
正常组	0.12±0.01
模型组	0.15±0.00*
糖肾灌肠方组	0.12±0.01##
卡格列净组	0.13±0.01#

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

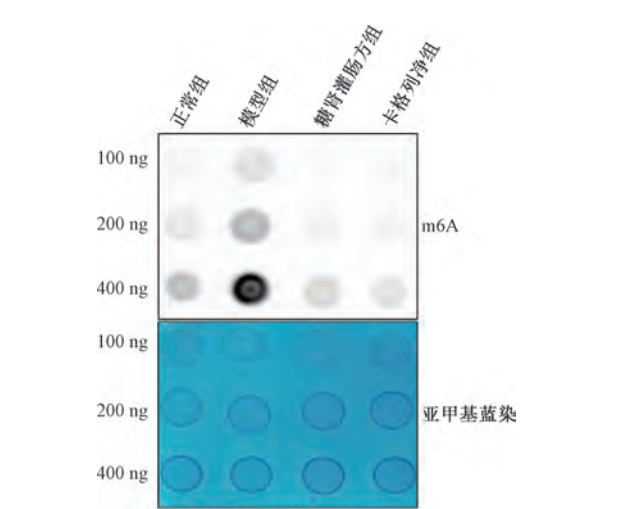


图 8 各组小鼠肾组织 m6A 图 (Dot blot 法)

达呈显著正相关 ($r=0.771$, $P<0.05$), 见图 10。

4 讨论

糖肾灌肠方基于“浊毒内蕴”的病机,以清泄三焦壅塞湿浊之邪、荡涤肠胃湿热秽浊瘀毒为治则,可减轻对肾络损伤,全方“泻而不猛”,具有泄浊解毒、扶正祛邪之

表 8 各组小鼠肾组织 METTL3、METTL14、FTO、WTAP 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	METTL3	METTL14	FTO	WTAP
正常组	1.02±0.15	0.83±0.05	0.67±0.11	0.52±0.31
模型组	1.50±0.06**	0.87±0.02	0.63±0.05	0.40±0.08
糖肾灌肠方组	1.08±0.13##	0.79±0.07	0.66±0.01	0.44±0.22
卡格列净组	1.09±0.09##	0.87±0.12	0.74±0.16	0.51±0.25

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

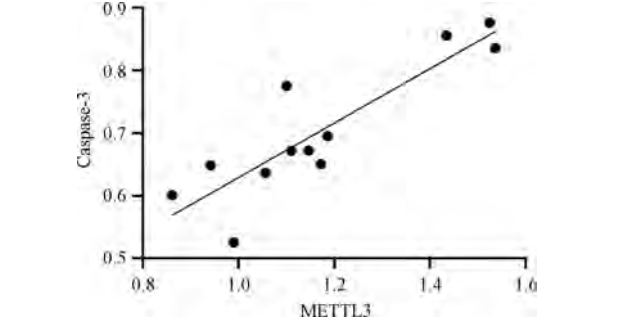


图 10 METTL3 表达与 Caspase-3 表达相关性分析

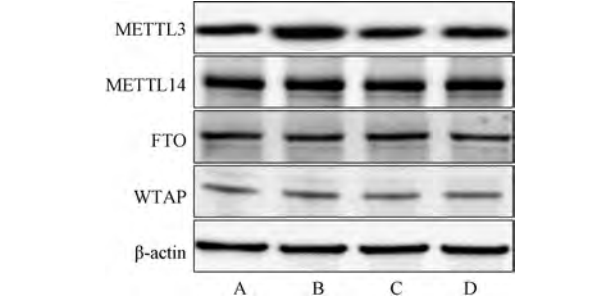
功,同时采用保留灌肠给药是该方特色。药物灌肠是通过刺激肠道蠕动及分泌,增加大便次数,减少食物残渣在肠道停留时间及毒素堆积,同时降低体内毒素水平,达到通腑泄浊、解毒导滞功效^[15-16]。中药复方具有多靶点、多途径的特性,而 DN 发病机制复杂且多样化,故可使用生信分析及网络药理学探索前者靶点,为后者治疗提供新的途径。

本研究首先通过对 GEO 数据库及 Karolinska 肾脏研究中心的正常人、DN 肾小管损伤的数据进行分析,得到疾病的 DGEs,并进行 KEGG、GO 富集分析,发现程序性死亡在 DN 的发生发展中起着至关重要的作用,其中 Caspase-3

表 7 各组小鼠肾组织 Caspase-3 的 MeRIP-PCR 比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	IP-m6A	IgG
正常组	10.10±6.37	1.11±0.54
模型组	78.66±38.22**	1.04±0.25
糖肾灌肠方组	22.25±6.72##	1.16±0.24
卡格列净组	19.23±10.60##	0.92±0.27

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



注:A 为正常组,B 为模型组,C 为糖肾灌肠方组,D 为卡格列净组。

图 9 各组小鼠肾组织 METTL3、METTL14、FTO、WTAP 蛋白印迹

为糖肾灌肠方调控自噬的关键靶点。越来越多的证据表明,程序性死亡中的自噬失常会导致 DN 肾纤维化^[17-18]。Caspase-3 是一种半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶,因其在组织分化、再生和神经发育中的作用而被关注^[19],它作为调控凋亡的关键蛋白,激活了凋亡外泌体样囊泡,后者生物发生位点为溶酶体,多泡体和自噬体融合产生大型自噬溶酶体,在一定程度上也与自噬关系密切^[20],本研究发现, DN 小鼠肾组织中 Caspase-3 蛋白表达升高,而给予糖肾灌肠方后降低;在 DN 小鼠肾组织中自噬被抑制,纤维化加重,而给予糖肾灌肠方后前者上调,后者改善,提示糖肾灌肠方可能是通过调控 Caspase-3 介导的自噬进一步改善肾纤维化。m6A 甲基化修饰是真核 mRNA 中最常见的内部修饰,调控着蛋白稳定及生物发生^[21],它对肾纤维化有着积极或消极的作用^[22-23],本研究结果显示,Caspase-3 在高糖状态下 m6A 的富集倍数升高,给予糖肾灌肠方后有不同程度的降低,表明该方调控了 Caspase-3 的 m6A 甲基化修饰。另外,虽然 m6A 甲基化修饰是通过 m6A 甲基化酶调控的,但本研究发现只有 METTL3 表达有明显改变,它作为代表性转移酶催化了 m6A 甲基化过程,并且其表达与 Caspase-3 表达呈正相关,表明糖肾灌肠方可能调控 METTL3 介导的 Caspase-3 甲基化修饰。

综上所述，糖肾灌肠方可能通过 Caspase-3 来调控肾小管上皮细胞自噬，改善肾小管纤维化，并且对该因子的调控是由 METTL3 介导的。

参考文献：

[1] Selby N M, Taal M W. An updated overview of diabetic nephropathy: diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22 (Suppl 1): 3-15.

[2] Mise K, Hoshino J, Ueno T, *et al.* Prognostic value of tubulointerstitial lesions, urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase, and urinary β2-microglobulin in patients with type 2 diabetes and biopsy-proven diabetic nephropathy[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2016, 11(4) : 593-601.

[3] Xu Y, Ouyang C H, Lyu D Y, *et al.* Diabetic nephropathy excretes epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) *via* miR-2467-3p/Twist1 pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109920.

[4] Liu S Z, Yao S J, Yang H, *et al.* Autophagy: regulator of cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10) : 648.

[5] Han Y P, Liu L J, Yan J L, *et al.* Autophagy and its therapeutic potential in diabetic nephropathy[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1139444.

[6] Tang C Y, Liyingston M J, Liu Z W, *et al.* Autophagy in kidney homeostasis and disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(9) : 489-508.

[7] Takahashi A, Takabatake Y, Kimura T, *et al.* Autophagy inhibits the accumulation of advanced glycation end products by promoting lysosomal biogenesis and function in the kidney proximal tubules[J]. *Diabetes*, 2017, 66(5) : 1359-1372.

[8] Kim Y K, Ning X Y, Munir K M, *et al.* Emerging drugs for the treatment of diabetic nephropathy[J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2022, 27(4) : 417-430.

[9] 叶 婷, 徐利娟, 藏 登, 等. 糖肾灌肠方对糖尿病肾病的预防作用[J]. *中成药*, 2020, 42(10) : 2760-2763.

[10] 马 静, 郭诗韵, 冯程程, 等. 糖肾灌肠方联合替米沙坦对糖尿病肾病小鼠的影响[J]. *中成药*, 2020, 42 (12): 3307-3311.

[11] 王 尹, 余 辉, 徐利娟, 等. 糖肾灌肠方通过 PI3K/AKT/NF-κB 信号通路调节糖尿病肾病炎症反应的机制研究[J].

中药药理与临床, 2024, 40(3) : 8-16.

[12] 杨张良, 童海玲, 孙梦蝶, 等. 2 型糖尿病模型小鼠造模时间的选择[J]. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35 (2): 155-159.

[13] 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.

[14] Park C H, Lee B, Han M, *et al.* Canagliflozin protects against cisplatin-induced acute kidney injury by AMPK-mediated autophagy in renal proximal tubular cells[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1) : 12.

[15] 冯程程, 藏 登, 陈 茜, 等. 糖肾灌肠方经肠道干预糖尿病肾病小鼠模型的肠道菌群研究[J]. *实用中医内科杂志*, 2022, 36(4) : 75-79; 148-151.

[16] 刘 锐, 钟印芹, 卿 艳, 等. 中药灌肠治疗糖尿病肾病的用药规律分析[J]. *护理研究*, 2023, 37(4) : 707-711.

[17] Yu J W, Liu Y, Li H J, *et al.* Pathophysiology of diabetic kidney disease and autophagy: a review[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(30) : e33965.

[18] Liu W J, Huang W F, Ye L, *et al.* The activity and role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(10) : 3182-3189.

[19] Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, *et al.* Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(4) : 1633-1645.

[20] Beillevaire D, Migneault F, Turgeon J, *et al.* Autolysosomes and caspase-3 control the biogenesis and release of immunogenic apoptotic exosomes[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2) : 145.

[21] Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71(10) : 3971-3975.

[22] Tang W M, Zhao Y L, Zhang H, *et al.* METTL3 enhances NSD2 mRNA stability to reduce renal impairment and interstitial fibrosis in mice with diabetic nephropathy[J]. *BMC Nephrol*, 2022, 23(1) : 124.

[23] Xu Z X, Jia K, Wang H, *et al.* METTL14-regulated PI3K/Akt signaling pathway *via* PTEN affects HDAC5-mediated epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells in diabetic kidney disease[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1) : 32.