

☆ XXXX ☆

隔药饼灸通过调控 Bcl-2/Bax/Caspase 3 信号通路改善肾间质纤维化的机制研究

陈 欣, 方漾彬, 李 丽, 蔡洛阳, 陈天宇, 左 政*

(云南中医药大学, 昆明 650500)

【摘要】 目的:观察隔药饼灸对肾间质纤维化(RIF)大鼠 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)/B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)信号通路的调控作用,探讨其在慢性肾脏病(CKD)治疗中的潜在机制。**方法:**雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、缬沙坦组和隔药饼灸组,每组 6 只。采用单侧输尿管梗阻术建立 RIF 模型。隔药饼灸组双侧“脾俞”“肾俞”及“关元”,每穴灸 3 壮,7 d 为 1 个疗程,连续干预 4 个疗程。实验期间记录体质量变化,干预结束后计算肾脏指数,检测 24 h 尿蛋白(24 h-UTP)、血肌酐(Scr)及尿素氮(BUN)水平。采用 HE 染色与 Masson 染色观察肾组织病理学变化;免疫组织化学法检测大鼠肾组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)蛋白表达;RT-qPCR 与 Western blot 法分析大鼠肾组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3、 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠肾脏指数、24 h-UTP、Scr 及 BUN 均升高($P<0.01$);HE 和 Masson 染色显示肾组织损伤严重,大量炎性细胞浸润,间质胶原沉积明显;肾组织 α -SMA 蛋白表达升高($P<0.01$),Bcl-2 mRNA 和蛋白表达下调,Bax、Caspase-3 及 α -SMA mRNA 和蛋白表达上调($P<0.01$)。与模型组比较,隔药饼灸组与缬沙坦组大鼠肾脏指数降低($P<0.01$),24 h-UTP、Scr 及 BUN 下降($P<0.01$);HE 染色显示肾小球和肾小管结构恢复,炎细胞浸润减少,Masson 染色显示胶原沉积减少($P<0.01$),肾组织 α -SMA 阳性表达减少($P<0.01$),Bcl-2 mRNA 和蛋白表达升高($P<0.01$),Bax、Caspase-3 及 α -SMA mRNA 和蛋白表达下调($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论:**隔药饼灸可有效改善 CKD 模型大鼠肾功能,减轻 RIF,其机制可能与调控 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路有关。

【关键词】 隔药饼灸;肾间质纤维化;Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路

Herbal cake-separated moxibustion alleviates renal interstitial fibrosis by modulating Bcl-2/Bax/Caspase-3 signaling pathway

Chen Xin, Fang Yangbin, Li Li, Cai Luoyang, Chen Tianyu, Zuo Zheng* (Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the regulatory effect of herbal cake-separated moxibustion on the Bax/Bcl-2/Caspase-3 signaling pathway in rats with renal interstitial fibrosis (RIF), so as to elucidate its potential mechanism in the treatment of chronic kidney disease (CKD). **Methods** Male SD rats were randomly divided into four groups: sham-operation, RIF model, medication (Valsartan), and herbal cake-separated moxibustion (moxibustion), with 6 rats in each group. The RIF model was established by unilateral ureteral obstruction (UUO). In the moxibustion group, herbal cake-separated moxibustion was applied to bilateral “Pishu” (BL20), “Shenshu” (BL23) and “Guanyuan” (CV4), with three moxa-cones for each acupoint, once daily, 7 days a week for 4 consecutive weeks. During the experiment, the rats’ body weight changes were recorded, and after the intervention, the renal index (the obstructed kidney wet weight/body weight $\times$ %) was calculated, and the contents of 24-hour urine total protein (24 h-UTP), serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) were measured using a fully automatic biochemical analyzer. HE and Masson’s trichrome staining were used to observe the histopathological changes in the renal tissue.

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251374

引用格式:陈欣,方漾彬,李丽,等.隔药饼灸通过调控 Bcl-2/Bax/Caspase 3 信号通路改善肾间质纤维化的机制研究[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-10.

项目来源:云南省自然基金重点项目(No.202301AZ070001-009);云南省教育厅科学研究基金项目(No.2024Y397)

通信作者:左政,E-mail:zz120663@163.com

Immunohistochemistry staining was used to detect the immunoactivity of α -smooth muscle actin (α -SMA) in the renal tissue. RT-qPCR and western blot were separately employed to analyze the mRNA and protein expression levels of renal Bcl-2, Bax, Caspase-3 and α -SMA. **Results** Compared with the sham-operation group, rats in the model group exhibited a significant increase in the levels of renal index, 24 h-UTP, Scr, BUN, collagen volume fraction (CVF), α -SMA immunoactivity, and expression levels of Bax, caspase-3 and α -SMA mRNAs and proteins ($P<0.01$), and a striking downregulation of Bcl-2 mRNA and protein and ratio of Bcl-2/Bax ($P<0.01$). Histological analysis via H.E. and Masson's staining revealed severe renal tissue damage, marked inflammatory cell infiltration, and substantial interstitial collagen deposition. Compared with the model group, the rats of both moxibustion and medication groups exhibited a marked reduction in the levels of renal index, 24 h-UTP, Scr, BUN, CVF, α -SMA immunoactivity, and expression levels of Bax, caspase-3 and α -SMA mRNAs and proteins levels ($P<0.05$, $P<0.01$), and a considerable upregulation of Bcl-2 mRNA and protein and the ratio of Bcl-2/Bax ($P<0.01$). The histopathological analysis showed an improvement of the glomerular and tubular structures and a reduction of inflammatory infiltration and collagen fiber deposition in renal tissues of both moxibustion and medication groups. **Conclusion** Herbal cake-separated moxibustion can effectively improve the renal function and attenuate renal interstitial fibrosis in CKD model rats, which may be associated with its function in modulating the Bax/Bcl-2/Caspase-3 signaling pathway.

【KEYWORDS】 Herbal cake-separated moxibustion; Renal interstitial fibrosis; Renal function; Bax/Bcl-2/Caspase-3 signaling pathway

慢性肾脏病(CKD)是一类以肾脏结构和/或功能异常持续存在3个月以上为特征的慢性进展性疾病。2021年全球CKD患病人数约达6.74亿,占全球总人口的8.0%^[1],中国成年人群的患病率高达8.2%^[2]。CKD已被世界卫生组织列为全球重大公共卫生问题之一^[3],预计至2040年,将成为全球第5大死亡原因^[4]。肾间质纤维化(RIF)是多种慢性肾脏病向终末期肾病(ESRD)进展过程中的关键病理特征,表现为肾小管萎缩、细胞外基质(ECM)过度沉积^[5-6],与肾功能持续恶化、不良预后高度相关^[7]。当疾病进展至ESRD阶段,患者需依赖血液透析、腹膜透析或肾移植等肾脏替代治疗手段以维持生命^[8],但此类治疗方案成本高昂,给全球医疗系统带来沉重负担^[9-10]。因此,寻找有效延缓RIF进展的干预方法具有重要的临床意义。

RIF的发病机制复杂,通常呈不可逆性进展^[11]。在单侧输尿管梗阻(UUO)模型中,持续激活的肾素-血管紧张素系统可引发显著的血管收缩与肾小球灌注障碍,诱发间质细胞活化和纤维化进程,并伴随多种炎症因子释放与程序性细胞凋亡的激活^[12-13]。程序性细胞凋亡在RIF进展中发挥关键作用,主要通过内源性与外源性两条经典信号通路介导。内源性通路以线粒体功能障碍为中心,B细胞淋巴瘤-2蛋白(Bcl-2)家族成员如抗凋亡蛋白Bcl-2与促凋亡蛋白Bcl-2相关X蛋白(Bax)调控线粒体外膜通透性,并进一步激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-9(Caspase)/Caspase-3级联反应;外源性通路则依赖肿瘤坏死因子家族信号通过死亡受

体介导,如Caspase-8/Caspase-3等下游效应蛋白,最终诱导细胞凋亡^[14]。上述信号通路的失衡在RIF发病机制中占据重要地位,因此深入研究其调控机制对于CKD干预具有重要价值。

艾灸可通过抑制炎症反应、减轻肾小球毛细血管损伤与蛋白渗漏改善肾功能,并在缓解RIF方面展现出积极疗效^[15-17]。与传统灸疗相比,隔药饼灸具有经皮给药与艾灸协同的双重优势。课题组前期研究结果显示,隔药饼灸在CKD患者中具有良好临床疗效^[18]。在慢性肾衰竭(CRF)兔模型中,隔药饼灸可通过调节转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/Smad信号通路,抑制异常ECM沉积,延缓纤维化进展^[19-20]。但当前尚缺乏研究探讨该疗法是否可通过调控Bax/Bcl-2/Caspase-3信号通路抑制细胞凋亡、减轻肾损伤并延缓RIF进展。因此,本研究在前期工作基础上,进一步从细胞凋亡信号通路角度,探讨隔药饼灸干预RIF的潜在作用机制,以期为中医外治法防治CKD提供实验依据与理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物

24只雄性SPF级SD大鼠,体质量180~220 g,由昆明医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(滇)2020-0004。实验前予以7 d适应性喂养,自由摄食与饮水,饲养温度24~25℃,相对湿度40%~50%。本实验由昆明医科大学动物实验伦理委员会审核批准(批号:kmmu20241741)。

1.2 主要试剂和仪器

Bax、Bcl-2 抗体(北京博奥森),Caspase-3 抗体(美国 Abcam), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(美国 Affinity),HRP 标记抗兔 IgG(上海艾比玛特),RIPA 裂解液(上海 Beyotime),BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天),ECL 化学发光液(美国 Advansta),Trizol(美国 Ambion),反转录试剂盒(美国 VAZYME),荧光定量 PCR 试剂盒(北京康为),伊红、苏木精染液、Masson 三色染色液(北京索莱宝),黑附片、黄芪(云南宗顺),党参、炙仙灵脾、仙茅、熟地(云南永顺堂),白花蛇舌草、大黄、丹参(云南新世纪),艾绒(湖北李时珍),尿蛋白、血清肌酐和血尿素氮试剂盒(南京建成)。转膜仪、电泳仪(北京六一),MicroCL 17R 高速冷冻离心机(美国 thermo scientific),CFX 型荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad),SPECTCA MAX190 酶标仪(美国 Molecular),Vortex 混合仪(美国 Scilogex),石蜡包埋机(德国徠卡),石蜡切片机(德国徠卡),显微镜(德国徠卡),ImageJ 软件(美国 NIH),PVDF 膜(美国 Millipore),电子天平(上海 LICHEN)。

1.3 模型制备方法

大鼠适应性饲养 7 d 后,按随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、缬沙坦组及隔药饼灸组,每组 6 只。除假手术组外,其余各组均采用 UUO 手术建立 RIF 动物模型^[21]。大鼠术前按 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射 3% 戊巴比妥钠进行麻醉。于背部肋脊角区域切开皮肤,沿脊柱做长约 2~3 cm 的纵形切口,逐层分离组织暴露左侧输尿管,于输尿管中下 1/3 交界处结扎。假手术组仅分离输尿管,不予结扎。术后逐层缝合切口,注射抗生素预防感染,并密切监测大鼠生命体征与行为状态。造模后大鼠逐渐出现典型的肾功能损伤与纤维化特征,表明 RIF 模型构建成功。具体表现为 24 h 尿蛋白定量(24 h-UTP)显著升高,血清肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)增加,肾脏指数上升;HE 染色提示肾小管结构破坏、管腔扩张及间质增宽,Masson 染色显示明显胶原沉积增加; α -SMA 表达显著增强。

1.4 干预方法

假手术组仅游离左侧输尿管,不进行结扎。其余三组大鼠均进行造模。隔药饼灸组给予隔药饼灸干预。药饼制作方法:将黑附片、黄芪、党参、熟地、炙仙灵脾、仙茅、白花蛇舌草、大黄、丹参按 3:3:2:2:2:2:1:1:1 打磨成药粉,药粉用月桂氮酮调匀成糊状后,置于模具中压紧,制成直径为 1 cm、厚

0.5 cm、重 2.5 g 的圆形薄饼。另取艾绒 100 mg,将细艾绒填塞至艾炷模具制成炷底直径约 1 cm,炷高 1 cm 的艾炷。取穴参照文献[22]选取双侧“脾俞”“肾俞”及“关元”。将大鼠置于大鼠专用固定器中进行约束固定,使其在清醒状态下限制大幅度躯体活动,同时保持自主呼吸平稳及基础体位相对稳定,全程不使用麻醉药物。定位后剪除局部被毛,将药饼置于相应腧穴部位,在其上施以艾炷灸。双侧“脾俞”与“肾俞”为第一组穴位,关元为第二组穴位,两组穴位隔日交替施灸;每穴灸 3 壮,7 d 为 1 个疗程,连续干预 4 个疗程。灸后如局部出现水泡,应保持创面清洁干燥,避免感染。缬沙坦组每日给予缬沙坦($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃。假手术组与模型组每日灌胃等体积 0.9% 氯化钠溶液,持续 4 周。

1.5 检测指标及方法

一般情况观察及肾脏脏器指数测定:干预期间,观察各组大鼠的精神状态、活动能力、饮食情况及二便变化,并定期记录体质量。干预结束后用 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,摘取梗阻侧肾脏,精确称量其湿重并计算肾脏脏器指数。肾脏脏器指数(%)=梗阻侧肾脏湿质量 $\div$ 体质量 $\times 100\%$ 。

24 h 尿蛋白定量及肾功能相关指标:收集各组大鼠 24 h 尿液后,采用 3% 戊巴比妥钠麻醉,并于腹主动脉采血,离心 10 min 后取血清。采用全自动生化分析仪与尿液分析仪分别检测 Scr、BUN 及 24 h-UTP。所有操作严格按照各项检测试剂盒说明书进行。

肾组织病理学检测:取梗阻侧肾组织置于 4% 多聚甲醛中固定,依次进行脱水、透明、石蜡包埋及切片($5 \mu\text{m}$)。石蜡切片经 HE 染色及 Masson 三色染色处理后脱水封片,于光学显微镜下观察肾组织形态及纤维化程度。

免疫组织化学染色检测大鼠肾组织 α -SMA 蛋白的表达:将肾组织石蜡切片依次进行常规脱蜡、水化后,于柠檬酸缓冲液中进行热修复以恢复抗原性。随后应用 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶活性,并以正常山羊血清封闭非特异性结合位点。切片分别加入以磷酸盐缓冲液稀释的 α -SMA 一抗(1:8 000),于 4°C 孵育过夜。次日经 PBS 漂洗后,加入与一抗来源物种相匹配的 HRP 标记二抗(1:4 000),于室温下孵育。DAB 显色后,苏木精复染,切片经乙醇梯度脱水及二甲苯透明后封片。通过光学显微镜观察大鼠肾组织中 α -SMA 蛋白表达情况,棕黄色沉积物视为阳性表达。每张切片在

200倍显微镜下随机选择3个非重叠阳性视野进行成像,采用ImageJ软件分析图像并计算平均吸光度值以评估 α -SMA表达水平。胶原容积分数(CVF)(%)=胶原染色阳性面积/所分析组织区域总面积 $\times 100\%$ 。

qRT-PCR法检测大鼠肾组织Bcl-2、Bax、Caspase-3和 α -SMA mRNA表达:取每组6只大鼠40 mg肾组织加Trizol裂解液并研磨后提取总RNA,在分光光度计中测定其含量,随后反转录为cDNA。以 β -actin为内参基因,反应条件设为95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火30 s,共40个循环,扩增完毕后,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算各蛋白的mRNA表达量,引物序列见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	产物长度/bp
Bcl-2	上游 AGAACAGGGTATGATAAC	94
	下游 AGTCTTCATCTCCAGTAT	
Bax	上游 GAGTGTCTCAGGCGAATT	75x
	下游 TGTATCCACATCAGCAATCA	
Caspase-3	上游 TATTGAGACAGACAGTGGAA	83
	下游 TAGAGTAAGCATACAGGAAAGT	
α -SMA	上游 CCAGAAGGCATATAGGAA	82
	下游 ATCGCACTATCACTTAGG	
β -actin	上游 CTGGAGAAGAGCTATGAG	141
	下游 GATGGAATTGAATGTAGTTTC	

注:Bax为Bcl-2相关X蛋白,Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2,Caspase-3为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3, α -SMA为 α -平滑肌肌动蛋白。

Western blot法检测大鼠肾组织Bcl-2、Bax、Caspase-3和 α -SMA蛋白表达:取每组6只大鼠肾组织100 mg,加入适量RIPA裂解液充分匀浆,提取总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度,确保样本浓度一致后,每孔上样60 μ g进行电泳分离,并将蛋白转移至PVDF膜。于TBST缓冲液中漂洗,随后在室温下以5%脱脂奶粉封闭非特异性位点30 min。分别加入按比例稀释的一抗Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:16 000)、Caspase-3(1:2 000)、 α -SMA(1:8 000)和内参 β -actin(1:4 000),于4℃条件下孵育过夜。次日用TBST洗膜3次,每次10 min,继而加入相应二抗(1:4 000),在室温下孵育2 h。采用ECL化学发光法进行蛋白显影,并使用ImageJ图像分析软件

对各蛋白条带进行灰度扫描,以 β -actin为内参,计算Bcl-2、Bax、Caspase-3和 α -SMA相对表达量。

1.6 统计学分析

所有数据均使用SPSS29.0软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。首先对各组数据进行正态性检验及方差齐性检验,对于符合正态分布且满足方差齐性的组间比较,采用单因素方差分析进行多组间比较,事后两两比较采用LSD法;若不满足方差齐性,则采用Tamhane's T2法进行非参数比较。对于不符合正态分布的数据,采用非参数秩和检验进行分析。以 $P\leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况及肾脏指数的比较

假手术组大鼠在术后短期内表现为轻度精神萎靡、食欲减退及活动减少,随着术后时间的延长,逐步恢复正常,表现为精神良好、饮食饮水正常、被毛光滑、行为活跃,排便排尿正常。模型组大鼠则持续表现出精神不振、反应迟钝、食欲下降、活动减少、弓背蜷缩、被毛粗乱失泽,同时伴有尿量增多及大便稀溏等表现。缬沙坦组与隔药饼灸组大鼠在干预前表现与模型组一致,经干预治疗后,上述症状均较模型组明显改善。

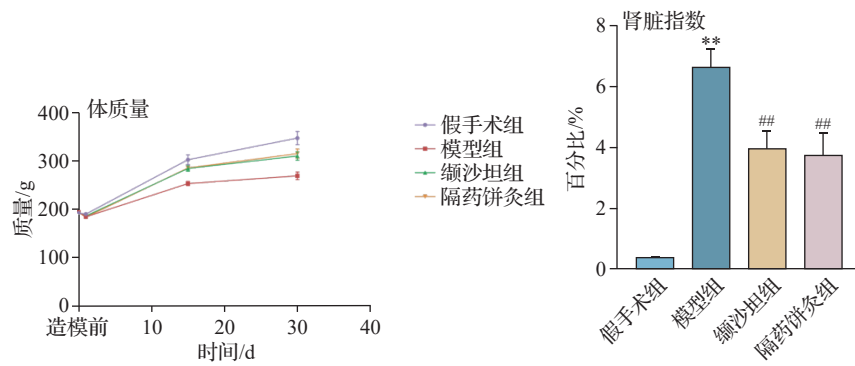
造模前各组大鼠体质量差异无统计学意义。造模当日(第0天)体质量较基线略有下降,随后在干预第15天及第30天时各组体质量均呈上升趋势。肾脏指数结果显示,与假手术组相比,模型组肾脏指数升高($P<0.01$);缬沙坦组及隔药饼灸组肾脏指数较模型组下降($P<0.01$)。见图1。

2.2 各组大鼠24 h-UTP、Scr及BUN的比较

干预4周后,与假手术组相比,模型组大鼠24 h-UTP、Scr及BUN含量均升高($P<0.01$);与模型组比较,缬沙坦组与隔药饼灸组上述指标均降低($P<0.01$)。见图2。

2.3 各组大鼠肾组织病理学变化的比较

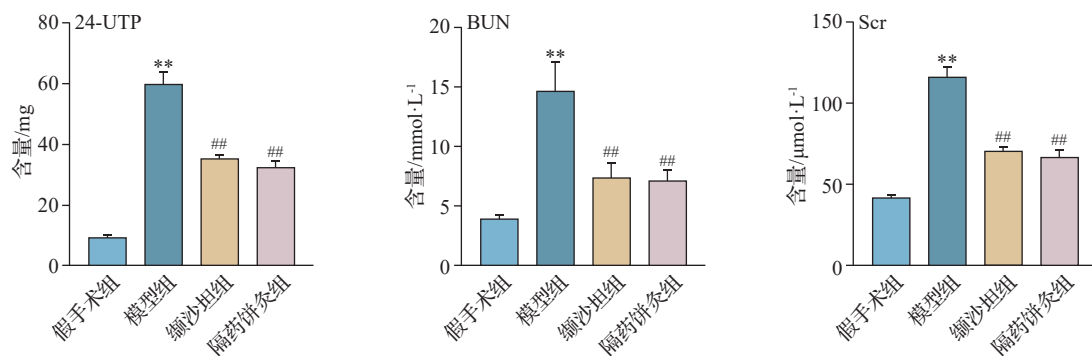
HE染色结果显示,假手术组大鼠肾组织形态、结构基本正常,未见明显改变;模型组肾组织损伤显著,肾小管上皮细胞变性、肿胀及脱落,部分管腔扩张或闭塞,间质显著增宽并可见大量炎性细胞浸润。缬沙坦组与隔药饼灸组肾组织结构较模型组明显改善,肾小球结构相对完整,部分肾小管上皮细胞尚可见轻度肿胀,炎细胞浸润和间质增生程度较模型组减轻。



注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图1 各组大鼠体质量和肾脏指数比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of body weight and renal index among different groups of rats($\bar{x}\pm s$,6 mice/group)



注:24 h-UTP为24 h尿蛋白定量,BUN为血尿素氮,Scr为血清肌酐。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图2 各组大鼠24 h-UTP、BUN、Scr含量比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

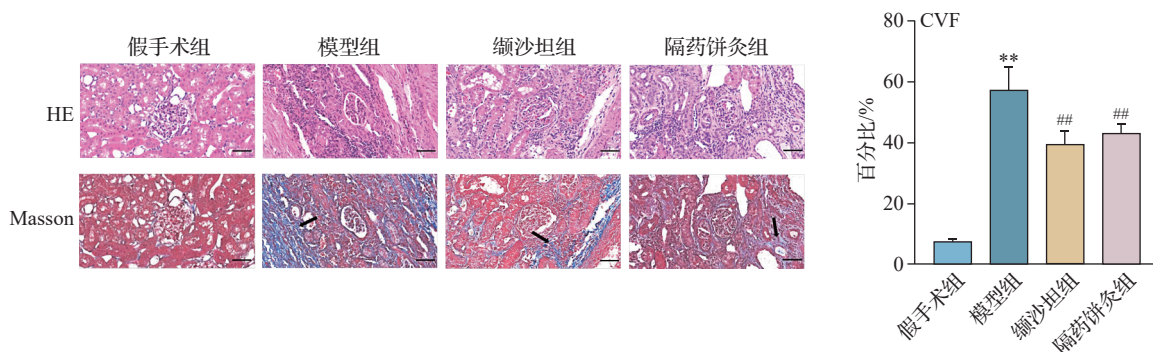
Fig. 2 Comparison of 24-UTP, BUN, and Scr contents of rats in the 4 groups($\bar{x}\pm s$,6 rats/group)

Masson染色显示,假手术组大鼠肾组织结构正常,间质区域胶原纤维较少,仅见少量淡蓝色染色;模型组可见大量蓝色胶原纤维广泛沉积于肾间质,肾小管显著萎缩、排列紊乱,肾小球周围结构破坏明显,间质显著增宽;缜沙坦组与隔药饼灸组胶原沉积明显减少,肾小管与肾小球结构较为完整,间质纤维化程度较模型组减轻。模型组大鼠肾组织中CVF相比假手术组升高($P<0.01$);缜沙坦组及

隔药饼灸组与模型组比较,CVF下降($P<0.01$)。见图3。

2.4 各组大鼠肾组织 α -SMA蛋白阳性表达的比较

假手术组肾组织中未见明显棕黄色染色;模型组肾小管间质区域可见大量棕黄色颗粒沉积;缜沙坦组及隔药饼灸组棕黄色颗粒沉积明显减少。与假手术组比较,模型组肾组织 α -SMA蛋白阳性表达升高($P<0.01$);与模型组比较,缜沙坦组和隔药饼



注:标尺=50 μ m。黑色箭头示间质纤维化。CVF为胶原容积分数。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠肾组织病理学态比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

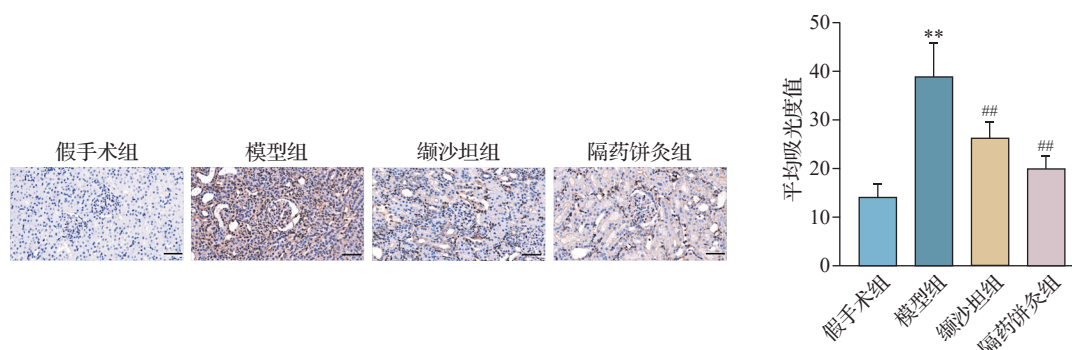
Fig. 3 Comparison of renal tissue pathological states of rats in the 4 groups($\bar{x}\pm s$,6 rats/group)

灸组肾组织 α -SMA 蛋白阳性表达降低 ($P < 0.01$)。见图 4。

2.5 隔药饼灸对大鼠肾组织中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 α -SMA mRNA 的表达的影响

与假手术组比较,模型组肾组织 Bcl-2 mRNA

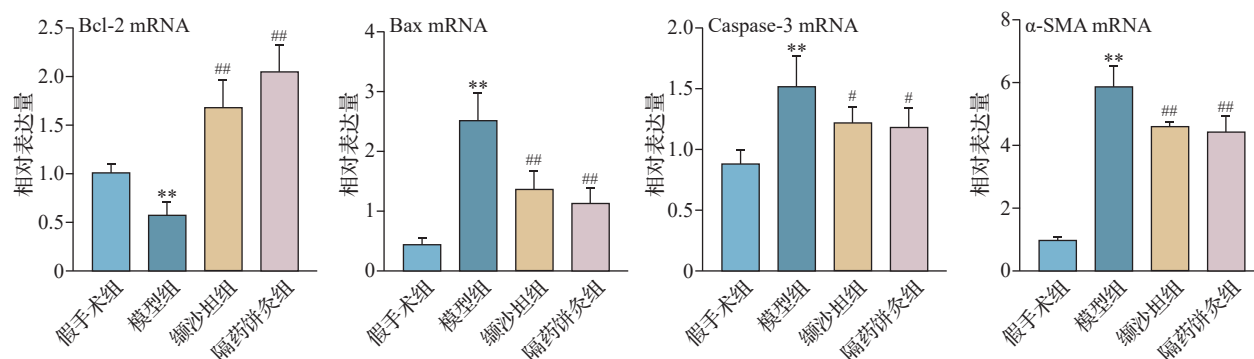
表达降低 ($P < 0.01$), Bax、Caspase-3 和 α -SMA mRNA 表达升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,隔药饼灸与缬沙坦组 Bcl-2 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), Bax、Caspase-3 和 α -SMA mRNA 表达降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见图 5。



注:标尺=50 μ m。 α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白。与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

图 4 各组大鼠肾组织 α -SMA 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of α -SMA protein expression in renal tissues of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)



注:Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白,Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2,Caspase-3 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3, α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白。与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 5 各组大鼠肾组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 α -SMA mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of Bcl-2, Bax, Caspase-3, and α -SMA mRNA expression in renal tissues of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

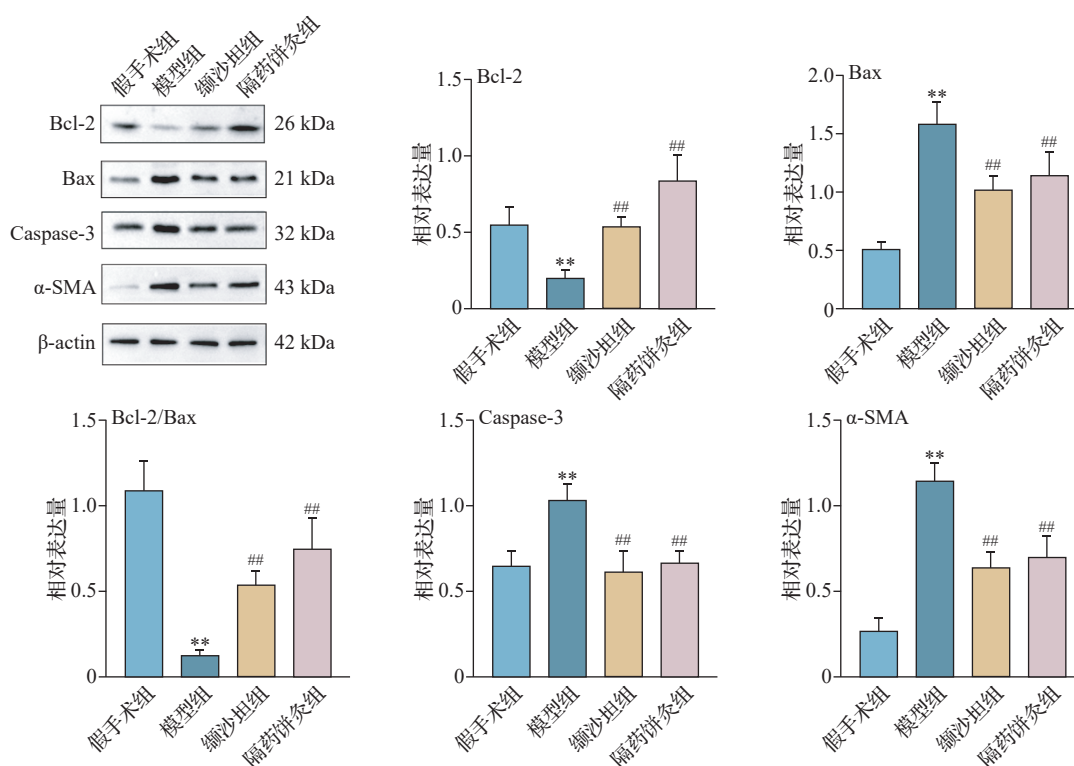
2.6 各组大鼠肾组织中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 α -SMA 蛋白表达的比较

与假手术组比较,模型组肾组织 Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值降低 ($P < 0.01$),Bax、Caspase-3 和 α -SMA 蛋白表达升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,隔药饼灸与缬沙坦组 Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值升高 ($P < 0.01$),Bax、Caspase-3 和 α -SMA 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。见图 6。

3 讨论

中医认为 CKD 的病因病机主要体现为本虚标实,核心病理机制涉及“虚、湿、瘀、毒”,其中以脾肾阳虚为本,贯穿病程始终^[23]。RIF 因病程漫长,亦属

虚实夹杂之证。肾阳虚损,温煦功能减弱,导致脾阳亦虚,运化失司。脾肾阳虚可致水湿停滞、痰浊瘀阻,进一步形成肌酐、尿素氮等代谢产物。上述病理产物又反过来损耗脾肾阳气,形成恶性循环。因此,温阳散寒、调理脾肾成为治疗关键。艾灸通过增强脾肾阳气、促进气血运行,有助于祛除湿浊痰瘀,恢复脏腑功能。隔药饼灸在艾灸温热刺激基础上,结合药物经皮渗透,通过腧穴发挥多重调节效应。本研究选取肾俞以温补肾阳、利水消肿,脾俞以健脾益气、运化水湿,关元以培元固本、补气活血,综合发挥扶正祛邪之效。将艾灸、腧穴与药物结合,最终达到改善 CKD 相关脾肾亏虚与毒湿内停



注: Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白, Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2, Caspase-3 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3, α-SMA 为 α-平滑肌肌动蛋白。
与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 6 各组大鼠肾组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 α-SMA 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, 6 只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of Bcl-2, Bax, Caspase-3, and α-SMA protein expression in renal tissues of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)

的病理状态。

近年来,调控细胞凋亡作为干预 CKD 及 RIF 的重要机制受到广泛关注。研究表明,在慢性肾病中,实质性肾细胞丧失主要由程序性凋亡所致,进而导致肾小管萎缩、炎症反应及纤维化进展^[24]。Bcl-2 为线粒体通路中的关键抗凋亡蛋白,可抑制线粒体外膜通透性增加,阻止细胞色素 c 释放及 Caspase 级联激活。相反, Bax 作为 Bcl-2 家族中促凋亡成员,促进线粒体通透化并激活 Caspase-9/3 通路^[25]。在 CKD 进展中,病理刺激常下调 Bcl-2、上调 Bax,打破凋亡与存活之间的平衡,促进肾小管上皮细胞凋亡,加剧肾组织瘢痕化。

值得指出的是, RIF 并非单纯由 ECM 过度沉积所致,其关键环节在于成纤维细胞及成肌成纤维细胞的持续活化。其中 α-SMA 为成肌成纤维细胞的经典标志物,在正常肾组织中表达极低,而在 UUO 及多种 CKD 模型中明显升高,并与 ECM 沉积程度及肾功能损害程度密切相关,因此被广泛用于反映 RIF 严重程度及评价抗纤维化疗效^[26]。越来越多研究认为,肾小管上皮细胞损伤与凋亡不仅参与肾功能恶化过程,同时可通过诱发炎症反应、破坏基底

膜结构并促进 TGF-β1 等促纤维化因子的释放,进而驱动成纤维细胞向成肌成纤维细胞转化,导致 α-SMA 表达持续增强并推动纤维化进展。已有实验研究表明,在 UUO 模型中 Bax/Bcl-2 比值升高及 Caspase-3 激活的凋亡增强过程,常与 α-SMA 上调及胶原沉积增加同步出现,而抑制线粒体凋亡通路则可降低 α-SMA 表达并减轻纤维化程度^[27-28]。

在 UUO 模型中,肾小管上皮细胞广泛凋亡伴随炎症与成纤维细胞活化,最终促进间质纤维化形成^[29]。本研究亦证实,模型组大鼠 Bcl-2 表达显著下调, Bax 与 Caspase-3 表达上调,伴随 α-SMA 过度表达及胶原沉积,与前期研究的 UUO 致凋亡信号增强、纤维化加重的趋势一致^[30]。经隔药饼灸干预后,大鼠肾组织 Bcl-2 水平显著升高, Bax 和 Caspase-3 显著下降, α-SMA 表达减少,肾小管结构与功能明显改善,提示该疗法具有调控凋亡、延缓纤维化的作用。Wang 等^[31]通过靶向递送 Bak-BH3 肽至肌成纤维细胞,激活线粒体凋亡通路,提高 Bax、Cleaved Caspase-3 表达,抑制 Bcl-2,从而减少肌成纤维细胞数量并减轻组织损伤与纤维化程度。

本研究选取的“肾俞”“脾俞”“关元”均为调补

脾肾、温阳培本的要穴。上述穴位配伍并施以隔药饼灸,可激活经络气血、改善肾区循环,缓解虚实夹杂的病机状态。临床研究表明^[18,32],在“肾俞”“脾俞”“关元”“足三里”使用隔药饼灸治疗可改善CKD患者微炎性反应状态,降低尿蛋白、Scr等指标。在动物实验中^[19-20],隔药饼灸可下调结缔组织生长因子(CTGF)与整合素连接激酶(ILK)表达,上调骨形态发生蛋白-7(BMP-7),减轻细胞外基质沉积及间质纤维化。在肾小球硬化所致肾损伤大鼠中,于“肾俞”进行艾灸能显著降低蛋白尿、改善足细胞损伤,抑制TGF- β_1 、纤维连接蛋白(FN)、 α -SMA表达^[33]。电针“肾俞”与“足三里”亦能显著上调Bcl-2及Bcl-2/Bax比值、降低Bax与Caspase-3,减轻高糖诱导的肾小管上皮细胞凋亡^[34]。数据挖掘^[35]结果显示,糖尿病肾病干预中常用腧穴包括肾俞、关元,涉及足太阳膀胱经、任脉与足太阴脾经,这与本研究选穴原则高度契合。

隔药饼灸所含的黑附片、黄芪、党参、熟地、炙仙灵脾、仙茅、白花蛇舌草、大黄、丹参等中药,通过调控凋亡及抑制RIF等机制,协同干预慢性肾损伤。其中,黄芪的主要活性成分黄芪甲苷已被证实高糖诱导的足细胞损伤模型中具有抗凋亡作用,其机制为上调抗凋亡蛋白Bcl-2、下调促凋亡蛋白Bax,恢复两者的平衡,并抑制Caspase-3的过度活化^[36]。且黄芪甲苷通过抑制尾加压素II诱导的肾小管上皮细胞焦亡及上皮-间质转化,减轻肾纤维化^[37]。丹参中的丹参酮IIA同样表现出良好的抗凋亡与抗纤维化活性。大黄中主要成分大黄酚可特异性干扰TGF- β_1 受体与其下游Smad 3之间的信号传导,显著降低UO模型小鼠 α -SMA和胶原蛋白的表达,从而发挥抗纤维化作用^[38]。

缬沙坦作为血管紧张素II受体拮抗剂,已被大量基础与临床研究证实,具有减少蛋白尿、改善肾血流动力学异常及延缓RIF进展等明确的肾脏保护作用^[39-40]。鉴于肾素-血管紧张素-醛固酮系统过度激活及高血压在CKD发生、发展中的重要作用,缬沙坦的药理效应对于评估抗纤维化疗效具有较好参考价值。因此,本研究设置缬沙坦作为阳性对照,结果显示,隔药饼灸组在多项肾功能及组织学指标方面与缬沙坦组呈现相似的改善趋势,表明隔药饼灸具有潜在的肾脏保护作用,并可能作为延缓RIF补充治疗。

综上,隔药饼灸能改善大鼠肾功能,减轻肾脏病理损害,上调Bcl-2,下调Bax、Caspase-3及

α -SMA mRNA及蛋白表达,延缓CKD RIF进展,其机制可能与Bcl-2/Bax/Caspase3信号通路有关。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] GBD 2021 Diseases and Injuries Collaborators. Global incidence, prevalence, years lived with disability (YLDs), disability-adjusted life-years (DALYs), and healthy life expectancy (HALE) for 371 diseases and injuries in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. *Lancet*, 2024, 403(10440): 2133-2161.
- [2] Wang L M, Xu X, Zhang M, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: results from the sixth China chronic disease and risk factor surveillance [J]. *JAMA Intern Med*, 2023, 183(4): 298-310.
- [3] Liu M Y, Zhang Y J, Ye Z L, et al. Inflammatory bowel disease with chronic kidney disease and acute kidney injury[J]. *Am J Prev Med*, 2023, 65(6): 1103-1112.
- [4] 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.
- [5] Humphreys B D. Mechanisms of renal fibrosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 2018, 80: 309-326.
- [6] Qi R C, Yang C. Renal tubular epithelial cells: the neglected mediator of tubulointerstitial fibrosis after injury [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1126.
- [7] Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(5): 269-288.
- [8] Peek J L, Wilson M H. Cell and gene therapy for kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19(7): 451-462.
- [9] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 709-733.
- [10] Chen T K, Knicely D H, Grams M E. Chronic kidney disease diagnosis and management: a review [J]. *JAMA*, 2019, 322(13): 1294.
- [11] 李艺文,唐志书,张珍,等.沙棘总黄酮抗单侧输尿管梗阻大鼠肾脏纤维化作用及机制[J]. *中南药学*, 2021, 19(5): 845-850.
- Li Y W, Tang Z S, Zhang Z, et al. Effect of total flavonoids of *Hippophae* on the renal fibrosis of unilateral ureteral obstructive and related mechanism (in Chinese) [J]. *Central South Pharmacy*, 2021, 19(5): 845-850.
- [12] Chen W, Zhang L, Zhou Z Q, et al. Effects of long non-coding RNA LINC00963 on renal interstitial fibrosis and oxidative stress of rats with chronic renal failure via the foxo signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(2):

- 815-828.
- [13] Qin X H, Zhu S Y, Chen Y X, et al. Long non-coding RNA (LncRNA) CASC15 is upregulated in diabetes-induced chronic renal failure and regulates podocyte apoptosis[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e919415.
- [14] 张婷, 周志华, 朱莉, 等. 细胞凋亡与慢性肾脏病[J]. 临床与病理杂志, 2024, 44(1): 108-116.
Zhang T, Zhou Z H, Zhu L, et al. Apoptosis and chronic kidney disease (in Chinese) [J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2024, 44(1): 108-116.
- [15] 翟春涛, 侯亚薇, 史林娟, 等. 隔药饼灸干预TLR4/MyD88/NF- κ B通路改善慢性疲劳综合征大鼠神经免疫炎症的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(4): 140-149.
Zhai C T, Hou Y W, Shi L J, et al. Mechanism of herbal cake-separated moxibustion in improving neuroimmune inflammation in rats with chronic fatigue syndrome by interfering TLR4/MyD88/NF- κ B pathway (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2025, 31(4): 140-149.
- [16] 曹树琦, 董宝强, 林星星, 等. 艾灸关元穴对成人慢性肾病综合征1~3期临床症状、肾功能及微炎症状态的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(10): 2390-2393.
Cao S Q, Dong B Q, Lin X X, et al. Effect of moxibustion at Guanyuan on clinical symptoms, renal function and microinflammation in patients with stage 1 - 3 adult nephrotic syndrome (in Chinese) [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2019, 37(10): 2390-2393.
- [17] 王东梅, 林星星. 艾灸关元穴对慢性肾小球肾炎患者微炎症状态及肾功能的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(6): 40-43.
Wang D M, Lin X X. Effects of moxibustion at Guanyuan acupoint on microinflammation and renal function in patients with chronic glomerulonephritis (in Chinese) [J]. Academic Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2017, 31(6): 40-43.
- [18] 左政, 黄培冬, 袁恺. 隔药饼灸治疗慢性肾脏病的疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2018, 37(7): 738-741.
Zuo Z, Huang P D, Yuan K. Observation on the efficacy of herb-partitioned moxibustion in treating chronic kidney disease (in Chinese) [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2018, 37(7): 738-741.
- [19] 左政, 黄培冬, 姜云武, 等. 隔药饼灸对慢性肾衰竭兔肾组织TGF- β_1 、Smad3、Smad7蛋白表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(4): 73-77.
Zuo Z, Huang P D, Jiang Y W, et al. Influence of medicinal cake-separated moxibustion on protein expressions of TGF- β_1 , Smad3 and Smad7 in kidney tissue of rabbits with chronic renal failure (in Chinese) [J]. Academic Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2017, 31(4): 73-77.
- [20] 黄培冬, 王馨悦, 易玮, 等. 隔药饼灸对慢性肾衰竭兔肾组织纤维化相关因子表达的影响[J]. 针刺研究, 2019, 44(8): 577-582.
Huang P D, Wang X Y, Yi W, et al. Effect of herbal cake-partitioned moxibustion on renal function and expression of renal connective tissue growth factor, integrin-linked kinase and bone morphogenetic protein-7 in chronic renal failure rabbits (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2019, 44(8): 577-582.
- [21] Bai Y, Wang W, Yin P, et al. Ruxolitinib alleviates renal interstitial fibrosis in UUO mice[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(2): 194-203.
- [22] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第2部分: 大鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(4): 351-352.
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals .Part 2: rats(in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(4): 351-352.
- [23] 乐文卿. 基于中医“扶阳学说”探讨慢性肾脏病的治疗[J]. 四川中医, 2022, 40(7): 35-37.
Le W Q. Exploring the treatment of chronic kidney disease based on “Fuyang theory” (in Chinese) [J]. Journal of Sichuan Traditional Chinese Medicine, 2022, 40(7): 35-37.
- [24] Sanz A B, Sanchez-Niño M D, Ramos A M, et al. Regulated cell death pathways in kidney disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19(5): 281-299.
- [25] Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease[J]. Cell, 2011, 147(4): 742-758.
- [26] Huang R S, Fu P, Ma L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines [J]. Sig Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 129.
- [27] Xie Y X, Lan F, Zhao J, et al. Hirudin improves renal interstitial fibrosis by reducing renal tubule injury and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) mice [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 81: 106249.
- [28] Zhang Y P, Lv L, Zhou Z K, et al. Piezo1 facilitates the initiation and progression of renal fibrosis by mediating cell apoptosis and mitochondrial dysfunction[J]. Ren Fail, 2024, 46(2): 2415519.
- [29] Nan Q Y, Piao S G, Jin J Z, et al. Pathogenesis and management of renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction [J]. Kidney Res Clin Pract, 2024, 43(5): 586-599.
- [30] Li N, Qi H L, Li J C, et al. Mechanism of *Eucalyptus* oil in alleviating UUO-induced renal fibrosis revealed by transcriptomics and metabolomics[J]. Phytomedicine, 2025, 146: 157133.
- [31] WANG X H, XU L M, KONG L X, et al. Targeted delivery of Bak BH3 peptide to renal myofibroblast for renal fibrosis treatment by activating the mitochondrial-dependent apoptosis pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2025, 164: 115324.
Wang X H, Xu L M, Kong L X, et al. Targeted delivery of Bak BH3 peptide to renal myofibroblast for renal fibrosis treatment by activating the mitochondrial-dependent apoptosis pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2025, 164: 115324.
- [32] Liu X Y, Wang X R, Ma H Z, et al. Mechanisms underlying

- acupuncture therapy in chronic kidney disease: a narrative overview of preclinical studies and clinical trials [J]. *Front Nephrol*, 2022, 2: 1006506.
- [33] Li Y, Sun Y X, Zhang C L, et al. Moxibustion alleviates injury in a rat focal segmental glomerulosclerosis model [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 7169547.
- [34] 李丹, 陈泽斌, 郑洲, 等. 电针预处理通过下调瞬时受体电位阳离子通道蛋白6抑制肾小管上皮细胞凋亡[J]. *针刺研究*, 2022, 47(3): 209-215.
- Li D, Chen Z B, Zheng Z, et al. Electroacupuncture pretreatment alleviates apoptosis of renal tubular epithelial cells by down-regulating expression of TRPC6 in hyperglycemic mice (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2022, 47(3): 209-215.
- [35] 高阳. 基于临床循证的数据挖掘选穴决策研究电针治疗糖尿病肾脏病的疗效与机制探讨[D]. 成都: 成都中医药大学, 2022.
- Gao Y. Efficacy and mechanism of electroacupuncture in the treatment of diabetic kidney disease by acupoint selection decision based on clinical evidence-based data mining (in Chinese)[D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2022.
- [36] GUI D K, GUO Y P, WANG F, et al. Astragaloside IV, a novel antioxidant, prevents glucose-induced podocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39824.
- Gui D K, Guo Y P, Wang F, et al. Astragaloside IV, a novel antioxidant, prevents glucose-induced podocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39824.
- [37] ZHANG L, LIU W Y, LI S F, et al. Astragaloside IV alleviates renal fibrosis by inhibiting renal tubular epithelial cell pyroptosis induced by urotensin II through regulating the cAMP/PKA signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2024, 19(5): e0304365.
- Zhang L, Liu W Y, Li S F, et al. Astragaloside IV alleviates renal fibrosis by inhibiting renal tubular epithelial cell pyroptosis induced by urotensin II through regulating the cAMP/PKA signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2024, 19(5): e0304365.
- [38] Yu X Y, Sun Q, Zhang Y M, et al. TGF- β /smad signaling pathway in tubulointerstitial fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 860588.
- [39] Ledwidge M, Dodd J D, Ryan F, et al. Effect of sacubitril/valsartan vs valsartan on left atrial volume in patients with pre-heart failure with preserved ejection fraction: the PARABLE randomized clinical trial [J]. *JAMA Cardiol*, 2023, 8(4): 366.
- [40] Jackson A M, Jhund P S, Anand I S, et al. Sacubitril-valsartan as a treatment for apparent resistant hypertension in patients with heart failure and preserved ejection fraction [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(36): 3741-3752.

收稿日期:2025-12-15 修回日期:2026-03-09