DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250210.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250210.1358.002

益智仁抑制PFKFB3介导的糖酵解对糖尿病肾病上皮间充质转化的影响

李小燕[1],袁 勇[2],王 晶[3],马天鹏[4],李丽丹[1],颜子杰[4],肖 曼[5]✉,谢毅强[4]✉
(1.贵州中医药大学,贵州 贵阳 550005;2.三亚市中医院,海南 三亚 572000;3.成都中医药大学,四川 成都 610075;4.海南医科大学 中医学院,海南 海口 571199;5.海南医科大学 基础医学与生命科学学院,热带转化医学教育部重点实验室,海南 海口 571199)

[摘要] **目的**:利用体内和体外模型探究益智仁对糖尿病肾病上皮间充质转化的潜在治疗作用,并研究其作用机制。**方法**:体内实验:db/m小鼠作为空白组,将db/db小鼠分为模型组、阳性药物对照组(恩格列净组)、益智仁低、中、高剂量组。通过HE染色观察肾脏组织病理改变,采用RT-qPCR、Western blot检测肾脏组织中PFKFB3、E-cadherin、Col3α1和Vimentin的mRNA及蛋白表达水平。体外实验:将HK-2细胞分为空白组、模型组以及益智仁含药血清不同剂量组(低、中、高剂量组),同时设立恩格列净阳性对照组。经过24 h的药物干预后,首先通过划痕实验评估各组细胞的迁移能力,并据此确定最佳药物浓度。随后,采用RT-qPCR和Western blot技术,检测HK-2细胞中PFKFB3、E-cadherin、Col3α1和Vimentin的mRNA及蛋白表达水平;利用免疫荧光技术进一步验证EMT中关键蛋白Col3α1的表达情况。**结果**:体内实验:HE染色显示:与空白组相比,模型组肾小球体积增大、基底膜增厚,肾小管上皮细胞肿胀、管腔变窄,益智仁及恩格列净干预后各治疗组肾脏病理变化均有不同程度的减轻;在mRNA及蛋白表达水平中,与空白组相比,模型组E-cadherin表达水平显著下调($P<0.05$),PFKFB3、Col3α1、Vimentin的表达水平则显著上调($P<0.05$),与模型组比较,各给药组E-cadherin表达上调($P<0.05$),PFKFB3、Col3α1、Vimentin的表达显著下调($P<0.05$)。体外实验:与空白组相比,模型组细胞的迁移能力显著增强($P<0.05$),与模型组比较,各含药血清组以及恩格列净组的HK-2细胞迁移能力均有所降低($P<0.05$),其中以10%含药血清组降低最为明显;在mRNA及蛋白表达水平中,与空白组相比,模型组E-cadherin表达水平显著下调($P<0.05$),PFKFB3、Col3α1、Vimentin的表达水平则显著上调($P<0.05$),与模型组比较,各给药组E-cadherin的表达明显上调($P<0.05$),PFKFB3、Col3α1、Vimentin的表达显著下调($P<0.05$);与空白组比较,模型组Col3α1荧光表达水平升高,给予药物处理后Col3α1荧光表达水平下降。**结论**:益智仁通过抑制PFKFB3介导的异常糖酵解改善糖尿病肾病上皮间充质转化。

[关键词] 益智仁;糖尿病肾病;糖酵解;上皮间充质转化
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2025)07-0481-09

Effect of inhibition of PFKFB3-mediated glycolysis on epithelial mesenchymal transition in diabetic kidney disease by Alpiniae Oxyphyllae Fructus

LI Xiaoyan[1], YUAN Yong[2], WANG Jing[3], MA Tianpeng[4], LI Lidan[1], YAN Zijie[4], XIAO Man[5]✉, XIE Yiqiang[4]✉
(1. *Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang* 550005, *China*; 2. *Sanya Hospital of Traditional Chinese Medicine, Sanya* 572000, *China*; 3. *Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu* 610075, *China*; 4. *College of Traditional Chinese Medicine, Hainan Medical University, Haikou* 571199, *China*; 5. *Key Laboratory of Tropical Translational Medicine of Ministry of Education, School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou* 571199, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the National Natural Science Foundation of China-General Project* (82174334); *Key Experiment on Traditional Chinese Medicine Regulation of Metabolic Diseases in Sichuan Province*, 2022 *Open Fund* (*SZKF*202203)

[基金项目] 国家自然科学基金-面上项目(82174334);代谢性疾病中医药调控四川省重点实验2022年开放基金(SZKF202203)
[作者简介] 李小燕,E-mail:1271230249@qq.com。
[通讯作者] 谢毅强,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:xieyiqiang@muhn.edu.cn;肖曼,博士,教授,E-mail:xiaoman@muhn.edu.cn。
[收稿日期] 2024-11-07 [修回日期] 2025-01-21 网络出版时间:2025-02-10 15:13:50

[*Author*]: *LI Xiaoyan*, *E-mail*: 1271230249@*qq.com*.
[*Correspondence to*]: *XIE Yiqiang*, *Ph.D.*, *Professor Doctoral Supervisor*, *E-mail*: *xieyiqiang@muhn.edu.cn*; *XIAO Man*, *Ph.D.*, *Professor*, *E-mail*: *xiaoman@muhn.edu.cn*.
Received: 2024-11-07 *Revised*: 2025-01-21 *JHMU*, 2025;31(7):481-489

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To investigate the potential therapeutic effect of Alpiniae Oxyphyllae Fructus on epithelial mesenchymal transition in diabetic kidney disease using *in vivo* and *in vitro* models and to study its mechanism of action. **Methods**: *In vivo* experiments: db/m mice were used as a blank group, and db/db mice were divided into the model group, the positive drug control group (the Empagliflozin group), and the low, medium, and high dose groups of Alpiniae Oxyphyllae Fructus. The pathological changes of renal tissues were observed by H&E staining, and the mRNA and protein expression levels of PFKFB3, *E*-cadherin, Col3α1 and Vimentin in renal tissues were detected by RT-qPCR and Western blot. *In vitro* experiments: HK-2 cells were divided into the blank group, the model group, the different dose groups (low, medium, and high dose groups) of Alpiniae Oxyphyllae Fructus-containing serum, and the positive control group of Empagliflozin. After 24 h of drug intervention, the migration ability of cells in each group was firstly assessed by scratch assay, and the optimal drug concentration was determined accordingly. Subsequently, the mRNA and protein expression levels of PFKFB3, *E*-cadherin, Col3α1 and Vimentin in HK-2 cells were detected by RT-qPCR and Western blot; the expression of the key protein Col3α1 in EMT was further verified by immunofluorescence. **Results**: *In vivo* experiments: H&E staining revealed that, in comparison to the blank group, the model group exhibited an increase in glomerular volume, thickening of the basement membrane, swelling of tubular epithelial cells, and narrowing of the tubular lumen. After intervention with Alpiniae Oxyphyllae Fructus and Empagliflozin, renal pathological changes were observed to be reduced to varying degrees.The model group showed a significant downregulation of *E*-cadherin mRNA and protein expression ($P<0.05$) compared to the blank group, while the expression levels of PFKFB3, Col3α1, and Vimentin were significantly upregulated in each administered group ($P<0.05$). In contrast to the model group, the administered groups demonstrated a significant upregulation of E-cadherin expression ($P<0.05$) and a significant downregulation of PFKFB3, Col3α1, and Vimentin expression ($P<0.05$).*In vitro* experiments: The model group's cell migration ability was significantly enhanced ($P<0.05$) compared to the blank group. The migration ability of HK-2 cells was reduced in all serum-containing groups and the Empagliflozin group ($P<0.05$), with the 10% serum-containing group showing the most pronounced reduction.The model group displayed a significant downregulation of *E*-cadherin mRNA and protein expression ($P<0.05$) and an upregulation of PFKFB3, Col3α1, and Vimentin mRNA and protein expression ($P<0.05$) compared to the blank group. In the drug-administered groups, E-cadherin expression was significantly upregulated ($P<0.05$), while the expression of PFKFB3, Col3α1, and Vimentin was significantly downregulated ($P<0.05$) when compared to the model group. Additionally, the fluorescence expression level of Col3α1 was elevated in the model group compared to the blank group, and this level decreased following drug treatment. **Conclusion**: Alpiniae Oxyphyllae Fructus improves epithelial mesenchymal transition in diabetic nephropathy by inhibiting PFKFB3-mediated abnormal glycolysis.

[Key words] Alpiniae Oxyphyllae Fructus; Diabetic kidney disease; Glycolysis; Epithelial-mesenchymal transition

糖尿病肾病(diabetic kidney disease,DKD)是糖尿病最常见的微血管并发症之一,主要临床表现为持续性白蛋白尿,同时伴有肾功能逐渐衰退。调查显示,糖尿病的发病率逐年升高,其中约30%到40%的糖尿病患者会发展成DKD,给社会造成巨大的经济压力[1,2]。目前研究发现,肾纤维化是DKD向终末期肾脏病进展的重要原因[3],而上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transition,EMT)是肾纤维化过程中一个关键步骤,极大的促进了肾纤维化的发生、发展。EMT是指上皮细胞逐渐丧失其原有的上皮特性,转而表现出成纤维细胞的特征。这一复杂过程具体体现在上皮标志物如E-钙粘蛋白(*E*-cadherin)的表达下调,同时伴随着EMT相关标志物如Ⅲ型胶原蛋白alpha 1链(Col3α1)和波形蛋白(Vimentin)的表达上调[4,5]。而甲基化修饰、线粒体功能障碍、铁死亡以及异常糖酵解等因素均被证实能够诱发EMT的发生[4,6-8]。近期,糖酵解与EMT之间的紧密联系已成为不同科研领域的热点议题,受到了广泛的关注与研究。特别是6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3(PFKFB3),作为磷酸果糖激酶-1(PFK-1)的一种强效异位激活剂,在促进肾脏纤维化方面发挥着重要作用,PFKFB3的缺失或PFKFB3活性降低能阻止肾纤维化的形成,对肾脏起到保护作用[9]。因此,本研究推测PFKFB3或许能成为抑制异常糖酵解改善糖尿病肾病EMT的关键治疗靶点。

DKD在中医中归属于"肾消"范畴。其病因主要是禀赋不足、情志失调、劳逸失度、消渴日久等。国医大师吕仁和教授认为该病病机关键为"微型癥瘕",以肾虚为本,久病入络,气阴耗伤,痰浊瘀毒互

结,阻滞肾络形成微癥瘕为标。益智仁,味辛性温,归脾肾二经,具有温肾固精缩尿、温脾止泻摄唾之效,可补肾虚之本,截断“微癥瘕”的形成。课题组前期研究发现益智仁对DKD小鼠肾脏具有保护作用,但益智仁能否通过抑制PFKFB3诱导的异常糖酵解改善EMT保护肾脏尚未报道。因此,本研究旨在探究益智仁是否通过抑制糖酵解关键酶PFKFB3的表达,从而改善糖尿病肾病EMT,以期为DKD临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

益智仁(Alpiniae Oxyphyllae Fructus)(批号:24011204)购于北京大恒倍生药业有限公司,并按《中国药典》2020版鉴定,药材符合规定且为正品;恩格列净片(规格:10 mg/片、国药准字H2020341,生产企业:四川科伦药业股份有限公司),购于海南医科大学第一附属医院;MEM培养基(含NEAA)(货号:PM150410)、胎牛血清(FBS)(货号:164210)购于武汉普诺赛生命科技有限公司;青霉素-链霉素溶液(双抗)(货号:15070063)购于美国Gibco公司;45%D-(+)-葡萄糖溶液(货号:G8769)购于Sigma公司;RNA提取试剂盒(货号:LS1040)购于北京普洛麦格生物技术有限公司;Omni-Rapid™快速蛋白定量试剂盒(货号:ZJ103)、RIPA裂解液(强)(货号:PC102)购于雅酶生物科技有限公司;苯甲磺酰氟(PMSF)(货号:ST507)购于碧云天生物技术有限公司;HRP标记山羊抗兔IgG(货号:33101ES60)购于翌圣生物科技有限公司;PFKFB3抗体(货号:ab181861,兔抗)、Col3α1抗体(货号:ab184993,兔抗)购于Abcam公司,E-cadherin抗体(货号:3195T,兔抗)、Vimentin抗体(货号:5741T,兔抗)购于CST公司;β-actin抗体(货号:GB15003-100,兔抗)购于武汉赛维尔生物科技有限公司;人肾皮质近曲小管上皮细胞(HK-2细胞)(货号:CL-0109)购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 实验动物

1.2.1 制备含药血清大鼠 7~8周龄SPF级SD雄性大鼠,购于北京维通利华实验动物技术有限公司(动物许可证号:SCXK(京)2021-0011),饲养于海南云量生物科技有限公司。

1.2.2 实验小鼠 6周龄SPF级db/db小鼠和同窝db/m小鼠(品系编号:T002407),购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,许可证号(SCXK(苏)2018-0008)。饲养于海南医科大学安评中心,温度(22±2)℃和湿度(50±5)%,光/暗周期为12 h,食用标准食物并自由饮水。本研究经海南医科大学动物护理与伦理委员会批准(批准文号:HYLL-2021-389),并按照《实验动物护理和使用指南》进行动物实验。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 分组及给药 将6周龄db/db小鼠和db/m小鼠适应性喂养2周后,检测随机血糖(GLU)和尿微量白蛋白(mAlb),db/db小鼠的GLU≥16.7 mmol/L,mAlb显著高于db/m小鼠,表明DKD模型成功建立。将DKD小鼠随机分为五组:模型组、益智仁低剂量组、益智仁中剂量组、益智仁高剂量组、恩格列净组,db/m小鼠为空白组,每组6只小鼠,依据人与小鼠体表面积法[10]确定益智仁低、中、高剂量组分别以益智仁(0.625 mg·g^{-1}·d^{-1}、1.25 mg·g^{-1}·d^{-1}、2.5 mg·g^{-1}·d^{-1})灌胃,恩格列净组以恩格列净0.001 3 g·kg^{-1}·d^{-1}灌胃,空白组、模型组以等体积无菌水灌胃。

2.1.2 H&E染色 采用二氧化碳法处死小鼠后,取出肾脏采用4%多聚甲醛固定24 h,进行石蜡包埋和切片,并按照试剂盒说明书进行苏木精-伊红染色(hematoxylin eosin staining,HE),通过光学显微镜观察肾组织病理学改变并拍照。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养 HK-2细胞培养条件 培养箱条件:温度37 ℃、CO_2浓度5%;培养基:1%双抗、10%FBS、MEM(含NEAA)培养基;细胞生长至密度约80%时,进行传代。

2.2.2 含药血清制备 将SD大鼠随机分为空白组、益智仁用药组(n≥20),参考人和动物体表面积转换公式[10],确定益智仁等效动物药物用量为9 g·kg^{-1}·d^{-1}(相当于临床等效剂量),空白组给予等容量无菌水灌胃,每天给药1次,连续灌胃7 d,末次给药2 h待药物浓度达高峰时,用2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,无菌条件下腹主动脉取血,血液静置2 h后4 000 r/min,4 ℃离心30 min,吸取血清在温度为56 ℃的金属浴中灭活30 min,分装在1.5 mL离心管中,-80 ℃冰箱保存备用。

2.2.3 HK-2细胞分组及给药 将对数生长期HK-2细胞接种于培养瓶中分组为:空白组、模型组、益智仁含药血清低剂量组、益智仁含药血清中剂量组、

益智仁含药血清高剂量组、恩格列净组。待细胞贴壁及生长状态良好后，除空白组外，其余组加无血清MEM培养基饥饿培养12 h后，给予含60 mmol/L高糖和5 ng/mL TGF-β1的MEM完全培养基胁迫72 h后，空白组、模型组加10%空白血清，益智仁含药血清低剂量组加2.5%含药血清和7.5%空白血清，益智仁含药血清中剂量组加5%含药血清和5%空白血清，益智仁含药血清高剂量组加10%含药血清，恩格列净组加100 nmol/L恩格列净和10%空白血清。

2.2.4　划痕试验检测HK-2细胞细胞迁移力　将HK-2细胞悬液按3×10^5个/孔接种于6孔板中，细胞贴壁及生长状态良好后，除空白组外，其余组加无血清MEM培养基饥饿培养12 h后，给予含60 mmol/L高糖和5 ng/mL TGF-β1的MEM完全培养基胁迫72 h后，用1 000 μL枪头在孔中划直线，在显微镜下观察拍照，作为0 h划痕。空白组、模型组加入10%空白血清，给药组分别加入2.5%、5%、10%益智仁含药血清和恩格列净干预24 h后，拍照记录作为24 h划痕。使用Image J软件测量划痕的面积并按面积法计算细胞迁移率，即细胞迁移率=(0 h划痕面积-24 h划痕面积)/ 0 h划痕面积 × 100%。

2.3　RT-qPCR

根据RNA提取试剂盒说明书提取细胞总RNA，然后依照逆转录试剂盒步骤将RNA逆转录为cDNA，最后将肌动蛋白(β-actin)作为内参于PCR仪器内按条件进行扩增，采用循环阈值(Ct)，使用公式$2^{-\triangle\triangle Ct}$进行计算mRNA相对表达量。所用引物由广州艾基生物技术有限公司合成。见表1。

表1　引物序列

Tab 1　Primer sequences

基因名称	引物序列(5′→3′)	长度(bp)
E-cadherin(小鼠)	Forward:5′-CAGTTCCGAGGTCTACACCTT-3′	21
	Reverse:5′-TGAATCGGGAGTCTTCCGAAAA-3′	22
Col3α1(小鼠)	Forward:5′-CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA-3′	23
	Reverse:5′-CCATAGCTGAACTGAAAACCACC-3′	23
Vimentin(小鼠)	Forward:5′-TCCACACGCACCTACAGTCT-3′	20
	Reverse:5′-CCGAGGACCGGGTCACATA-3′	19
β-actin(小鼠)	Forward:5′-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA-3′	22
	Reverse:5′-GCCGGACTCATCGTACTCC-3′	19
E-cadherin(人)	Forward:5′-AAGCCTCAGGTCATAAACA-3′	19
	Reverse:5′-TGATAGATTCTTGGGTTGG-3′	19
Col3α1(人)	Forward:5′-GGAGCTGGCTACTTCTCGC-3′	19
	Reverse:5′-GGGAACATCCTCCTTCAACAG-3′	21
Vimentin(人)	Forward:5′-GACGCCATCAACACCGAGTT-3′	20
	Reverse:5′-CTTTGTCGTTGGTTAGCTGGT-3′	21
β-actin(人)	Forward:5′-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3′	21
	Reverse:5′-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3′	21

2.4　Western blot

首先，使用RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂裂解细胞，获得总蛋白。依照蛋白定量试剂盒步骤测定蛋白浓度并调平蛋白浓度。加入蛋白上样缓冲液(loading buffer)进行变性。将变性后的蛋白样品等体积加入十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)凝胶上进行电泳，并转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)。用5%脱脂牛奶在室温下封闭2 h，一抗PFKFB3(1∶2 000)、E-cadherin(1∶1 000)、Col3α1(1∶1 000)、Vimentin(1∶1 000)、β-actin(1∶2 000)在4 ℃下孵育过夜。最后，在室温下用二抗孵育1 h后使用ECL显影液显影。使用Image J软件分析PFKFB3、E-cadherin、Col3α1、Vimentin的蛋白相对表达水平。

2.5　免疫荧光

首先将培养于24孔板的HK-2细胞，弃去培养基，用PBS洗涤3次，加入4 %的多聚甲醛溶液固定30 min。PBS洗涤3次，每次5 min后用0.3% Triton X-100处理20 min，加入10%的山羊血清常温封闭30 min。PBS洗涤3次，每次5 min，加入一抗(Col3α1，1∶50)在4 ℃下孵育过夜。然后用PBS洗涤3次，每次5 min，室温下荧光二抗(1∶500)避光孵育1 h。PBS洗涤3次，每次5 min，样本用DAPI复染细胞核，室温孵育5 min。在荧光显微镜下观察。

2.6 统计分析

实验数据均使用GraphPad Prism 9.5进行统计分析和绘图。为了评估统计显著性，两组样本采用t检验分析，多组样本采用单因素方差分析。以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 体内实验

3.1.1 益智仁对DKD小鼠肾脏组织病理的影响

如图1的HE染色所示，空白组小鼠肾小球显微结构正常，未见基底膜增厚(GBM)，肾小管各段形态正常。与空白组相比，模型组体积增大、基底膜增厚，肾小管上皮细胞肿胀、管腔变窄。益智仁及恩格列净干预后，各治疗组肾脏病理变化均有不同程度的减轻。根据前期研究成果[11]以及HE染色结果确定益智仁中剂量为最佳药物浓度，因此，后续将采用中剂量益智仁进行后续实验。

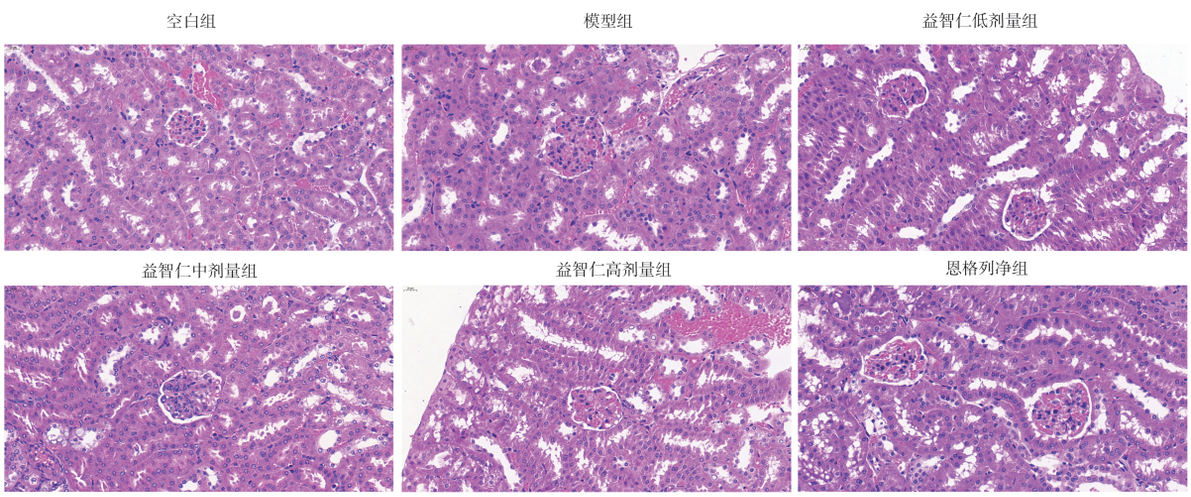
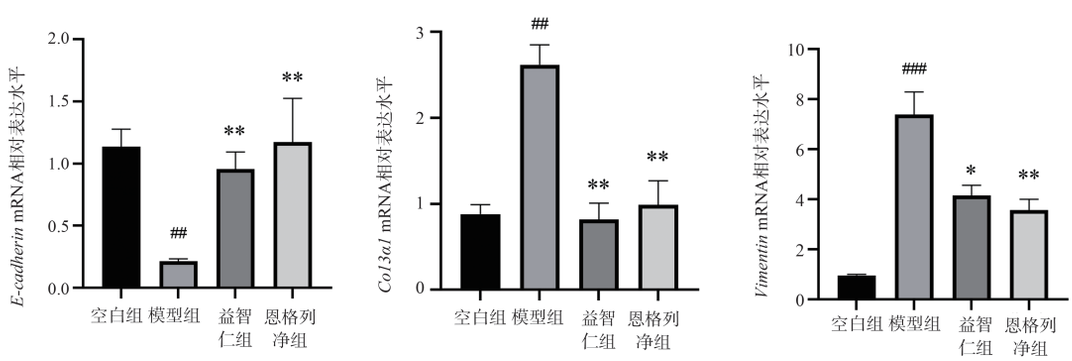


图1 益智仁对DKD小鼠肾组织病理的影响(×40)

Fig 1 Effect of Alpiniae Oxyphyllae Fructus on renal histopathology in DKD mice(×40)

3.1.2 益智仁对DKD小鼠EMT标志物E-cadherin、Col3α1、Vimentin mRNA水平的影响

如图2的RT-qPCR显示，与空白组比较，模型组EMT标志物E-cadherin下降($P<0.01$)，Col3α1、Vimentin明显升高($P<0.01$、$P<0.001$)；与模型组比较，益智仁组和恩格列净组E-cadherin明显上升($P<0.01$)，Col3α1、Vimentin明显下降($P<0.05$、$P<0.01$)；益智仁组与恩格列净组比较无统计学差异($P>0.05$)。

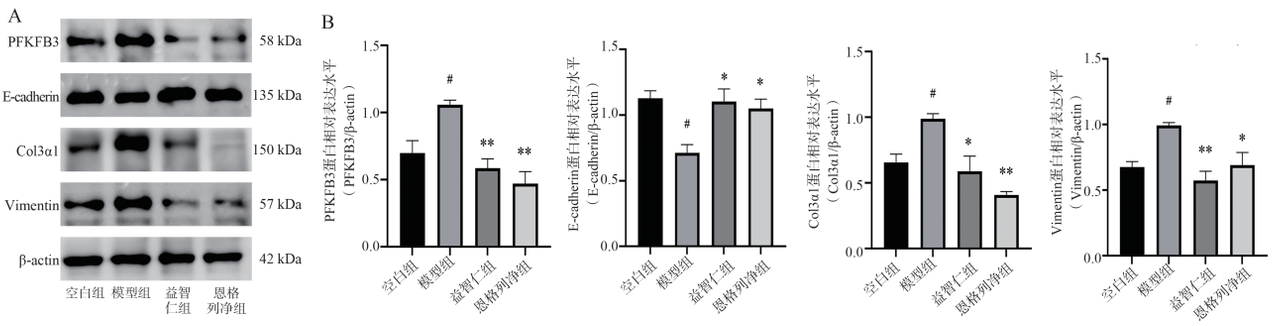


$n=3$，与空白组比较，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

图2 益智仁对DKD小鼠EMT标志物mRNA水平的影响

Fig 2 Effect of Alpiniae Oxyphyllae Fructus on mRNA levels of EMT markers in DKD mice

3.1.3　益智仁对DKD小鼠糖酵解酶PFKFB3、EMT标志物E-cadherin、Col3α1、Vimentin蛋白水平的影响　如图3的Western blot所示，与空白组相比，模型组糖酵解酶PFKFB3、EMT标志物Col3α1、Vimentin明显升高（$P<0.05$），E-cadherin下降（$P<0.05$）；与模型组比较，益智仁组和恩格列净组PFKFB3、Col3α1、Vimentin明显下降（$P<0.05$、$P<0.01$），E-cadherin明显上升（$P<0.05$）；益智仁组与恩格列净组比较无统计学差异（$P>0.05$）。



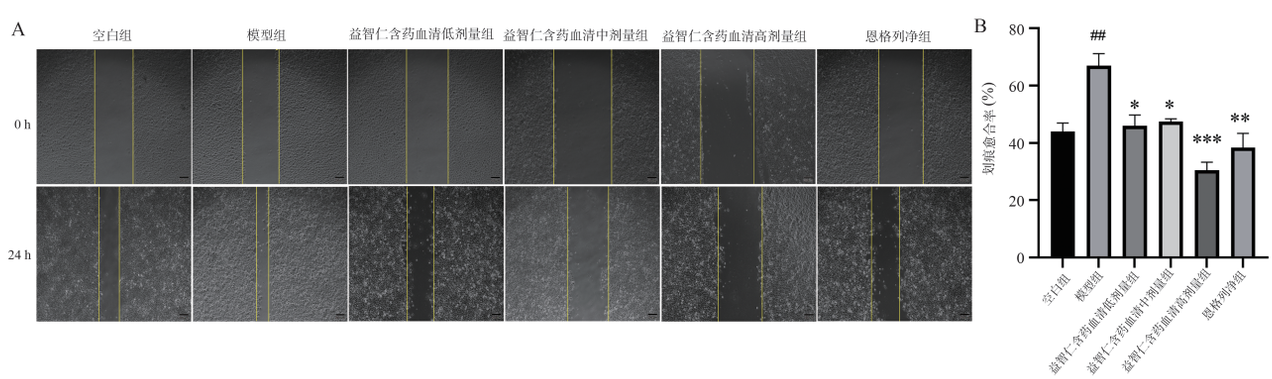
$n=3$，与空白组相比，$^{\#}P<0.05$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

图3　益智仁对DKD小鼠糖酵解酶PFKFB3、EMT标志物蛋白水平的影响

Fig 3　Effect of Alpiniae Oxyphyllae Fructus on the protein levels of glycolytic enzymes PFKFB3 and EMT markers in DKD mice

3.2　体外实验

3.2.1　不同浓度益智仁含药血清对高糖加TGF-β1胁迫下HK-2细胞细胞迁移力的影响　图4划痕实验显示，与空白组比较，模型组细胞划痕愈合率增加，HK-2细胞细胞迁移能力明显增加（$P<0.01$）；与模型组比较，2.5%、5%、10%含药血清组和恩格列净组划痕愈合率降低，HK-2细胞细胞迁移能力降低（$P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.001$），以10%益智仁含药血清组HK-2细胞细胞迁移能力降低最明显，结合本课题组前期实验结果[12]，确定以10%益智仁含药血清进行后续实验。



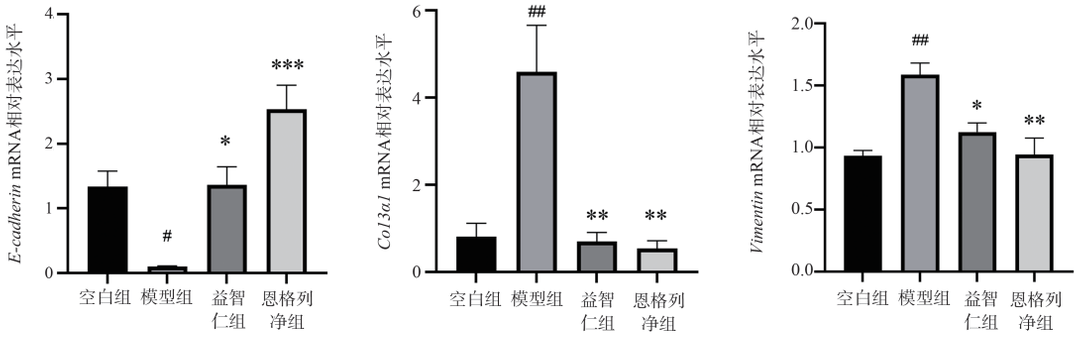
$n=3$，与空白组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

图4　不同浓度的益智仁含药血清对细胞迁移力的影响

Fig 4　Effect of different concentrations of serum containing Alpiniae Oxyphyllae Fructus on cell migration force

3.2.2　益智仁含药血清对高糖加TGF-β1胁迫下HK-2细胞中EMT标志物E-cadherin、Col3α1、Vimentin mRNA水平的影响　如图5的RT-qPCR结果显示，与空白组比较，模型组EMT标志物E-cadherin下降（$P<0.05$），Col3α1、Vimentin明显升高（$P<0.01$）；与模型组比较，10%含药血清组和恩格列净组E-cadherin明显上升（$P<0.05$、$P<0.001$），Col3α1、Vimentin明显下降（$P<0.05$、$P<0.01$）；益智仁组与恩格列净组相比无统计学差异（$P>0.05$）。

3.2.3　益智仁含药血清对高糖加TGF-β1胁迫下HK-2细胞中糖酵解酶PFKFB3、EMT标志物

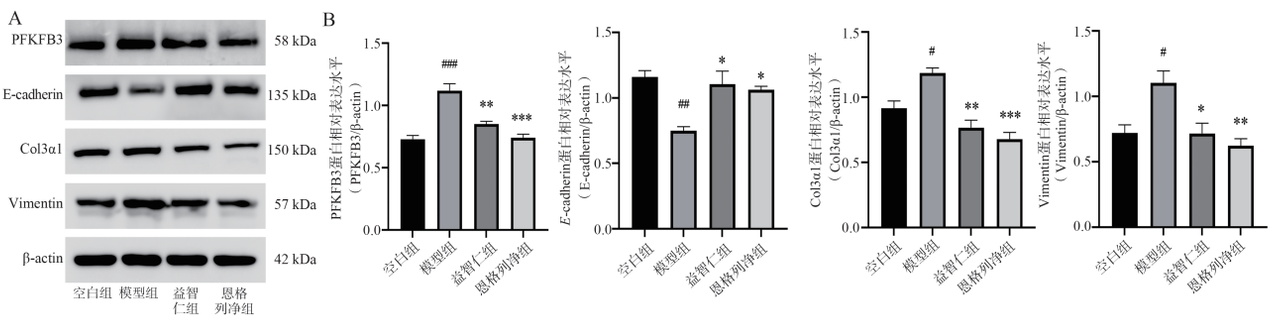


$n=3$，与空白组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

图5 益智仁含药血清对高糖加TGF-β1胁迫下HK-2细胞中EMT标志物mRNA水平的影响

Fig 5 Effects of Alpiniae Oxyphyllae Fructus containing serum on mRNA levels of EMT markers in HK-2 cells under high glucose plus TGF-β1 stress

E-cadherin、Col3α1、Vimentin蛋白水平的影响 如图6的Western blot结果显示，与空白组比较，模型组PFKFB3、EMT标志物Col3α1、Vimentin明显升高（$P<0.05$、$P<0.001$），E-cadherin下降（$P<0.01$）；与模型组比较，10%含药血清组和恩格列净组PFKFB3、Col3α1、Vimentin明显下降（$P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.001$），E-cadherin明显上升（$P<0.05$）；益智仁组与恩格列净组相比无统计学差异（$P>0.05$）。



$n=3$，与空白组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.01$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

图6 益智仁含药血清对高糖加TGF-β1胁迫下HK-2细胞中糖酵解酶、EMT标志物蛋白水平的影响

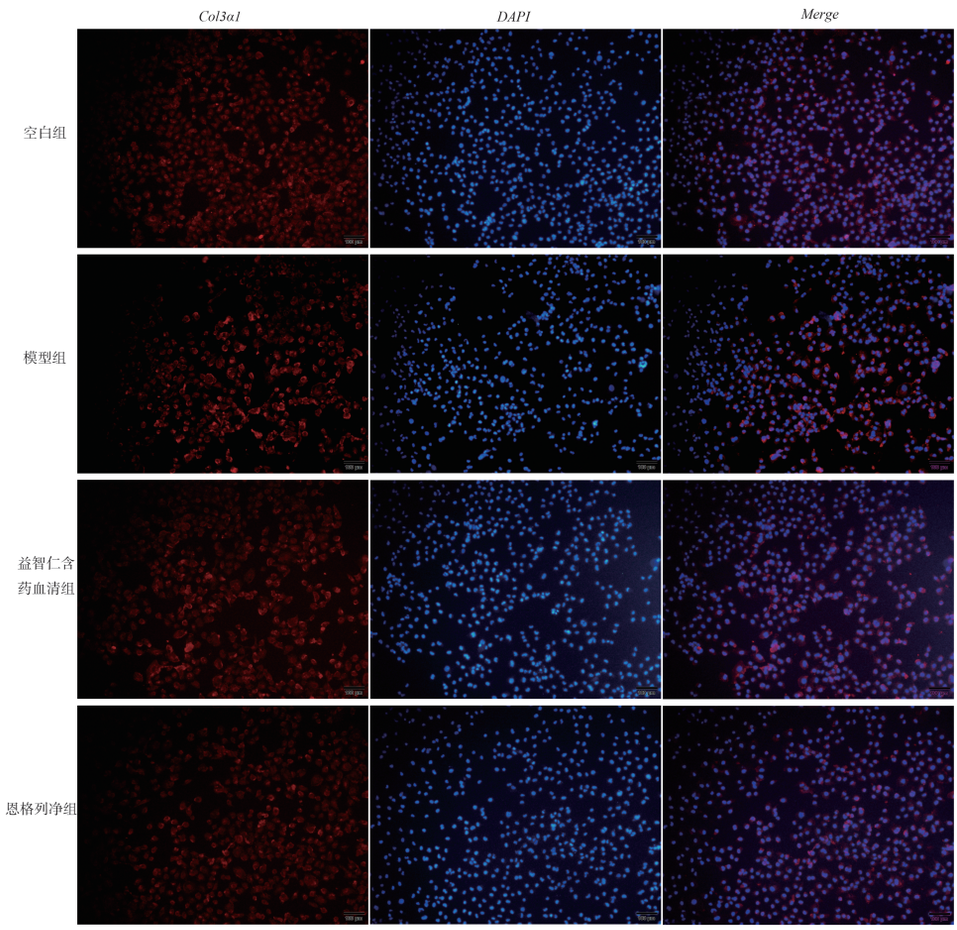
Fig 6 The effect of Alpiniae Oxyphyllae Fructus containing serum on the levels of glycolytic enzymes and EMT marker proteins in HK-2 cells under high glucose plus TGF-β1 stress

3.2.4 益智仁含药血清对HK-2细胞中Col3α1荧光表达的影响 如图7免疫荧光结果显示，与空白组比较，模型组中Col3α1荧光的表达显著上调，给予益智仁含药血清组和恩格列净组Col3α1荧光的表达下调。

4 讨论

肾纤维化是DKD一个重要病理特征，是推动DKD进展至肾衰竭阶段的关键因素，主要表现为肾小管间质纤维化、肾小管萎缩、肾小球硬化和肾脏正常结构受损[13,14]。具体而言，肾纤维化是细胞外基质的过度沉积，逐渐取代正常实质器官的功能，最终导致器官功能衰竭，而EMT过程能够激活并累积成纤维细胞，促进细胞外基质的沉积。因此，EMT被视为促进DKD纤维化进展的一个重要因素[15]。最新的研究揭示，糖酵解过程与糖尿病肾病中EMT的发生密切相关[16]。

糖酵解是一种至关重要的新陈代谢途径，其始于葡萄糖转运至细胞内部，并最终以每分子葡萄糖转化为两分子丙酮酸及伴随产生两分子ATP作为终点。随后，丙酮酸在有氧环境下，被转化为乙酰辅酶A并进入三羧酸循环进行进一步的能量生成；而在无氧条件下，则转变为乳酸。然而，有研究表明，在DKD中即便在有氧条件下，糖酵解途径同样能诱发乳酸的产生[17]。PFKFB3作为一种高效的异位激活剂，对磷酸果糖激酶-1（PFK-1）的活性具有显著增强作用。PFKFB3引发的异常糖酵解促进了



蓝色：细胞核，红色：Col3α1阳性表达

图7　益智仁含药血清对高糖加TGF-β1胁迫下HK-2细胞Col3α1免疫荧光图（×10）

Fig 7　Immunofluorescence of Col3α1 of HK-2 cells under high glucose plus TGF-β1 stress by Alpiniae Oxyphyllae Fructus contained serum（×10）

肾纤维化的发生，另有研究发现，DKD模型小鼠中，PFKFB3的表达水平呈现上升趋势，这一变化导致了乳酸浓度及细胞外酸化速率的显著增加[18]。尤为重要的是，乳酸能够通过激活H3K14la/KLF5信号通路驱动EMT的发生[16]。糖尿病肾病细胞外基质过度堆积导致EMT发生的过程及形态学改变与中医理论“由癥转瘕”特点（病理产物互相交结、有形可征、病位固定）相吻合，故将其归于中医“癥瘕”范畴。

中药具有多成分、多靶点以及整体调节的特点，在抑制异常糖酵解改善纤维化具有潜在应用价值[19,20]。益智仁是姜科植物益智的干燥成熟果实，属于四大南药之一，其补益脾肾、补虚荣络之效，可使肾虚得补，癥瘕得消，符合“微型癥瘕”病机。因此，本研究重点探讨了益智仁对糖尿病肾病EMT的作用机制。

本实验构建DKD体内体外模型，探究益智仁治疗DKD的作用机制。通过HE染色观察肾脏组织病理损伤，发现益智仁能改善DKD小鼠肾脏组织病理损伤。结合前期研究结果表明，益智仁对DKD小鼠具有较好的疗效。本研究聚焦益智仁可能通过抑制异常糖酵解改善糖尿病肾病EMT这一研究假说，检测小鼠肾脏、HK-2细胞中糖酵解关键酶PFKFB3、EMT相关标志物E-cadherin、Col3α1、Vimentin的mRNA及蛋白表达水平，多层次地评估益智仁抑制异常糖酵解酶改善糖尿病肾病EMT的分子机制。研究发现，益智仁能有效降低糖酵解关键酶PFKFB3的表达水平，上调E-cadherin表达，下调Col3α1、Vimentin的表达，发挥治疗DKD的作用。然而研究中发现，E-cadherin、Col3α1、Vimentin表达的蛋白水平及mRNA水平有差异，可能与mRNA没有被有效翻译成蛋白质或有抑制翻译的机制的存在，或蛋白质被迅速降解，以及抗体的敏感的度等相关，后期将进一步进行实验验证分析。

综上所述，益智仁治疗糖尿病肾病EMT的机制，可能是通过抑制糖酵解关键酶PFKFB3的表达，上调E-cadherin表达，下调Col3α1、Vimentin的表达，有效延缓了糖尿病肾病EMT进程。但本实验具有一定的局限性，异常糖酵解的发生是如何引起EMT的发生未进行验证，后期将进一步探究益智仁调控糖酵解改善糖尿病肾病EMT的分子机制。

作者贡献度说明：

谢毅强，肖曼：实验设计及指导；李小燕：实验操作及撰写文章；袁勇、王晶：统计分析及文章校稿；马天鹏：中药提取物制备；李丽丹、颜子杰：实验操作。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Tuttle KR, Agarwal R, Alpers CE, et al. Molecular mechanisms and therapeutic targets for diabetic kidney disease [J]. Kidney Int, 2022, 102(2): 248-260.

2 Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109119.

3 Zheng W, Guo J, Liu ZS. Effects of metabolic memory on inflammation and fibrosis associated with diabetic kidney disease: An epigenetic perspective [J]. Clin Epigenetics, 2021, 13(1): 87.

4 Zhang HF, Liu HM, Xiang JY, et al. Alpha lipoamide inhibits diabetic kidney fibrosis *via* improving mitochondrial function and regulating RXRα expression and activation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(5): 1051-1065.

5 Chen H, Zhang H, Li AM, et al. VDR regulates mitochondrial function as a protective mechanism against renal tubular cell injury in diabetic rats [J]. Redox Biol, 2024, 70: 103062.

6 Xu Z, 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.

7 Liu Z, Nan P, Gong Y, et al. Endoplasmic reticulum stress-triggered ferroptosis *via* the XBP1-Hrd1-Nrf2 pathway induces EMT progression in diabetic nephropathy [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 164: 114897.

8 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.

9 Wang Y, Li H, Jiang S, et al. The glycolytic enzyme PFKFB3 drives kidney fibrosis through promoting histone lactylation-mediated NF-κB family activation [J]. Kidney Int, 2024, 106(2): 226-240.

10 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海：上海科学技术出版社，2006：50-53.
Li YK. Experimental methodology of pharmacology of Chinese medicines[M]. Shanghai: Shanghai Sci Technol Press, 2006: 50-53.

11 颜子杰，康渝，刘书蔓，等.益智仁激活PPARα介导的自噬作用改善糖尿病肾病[J].海南医学院学报，2024，30(17)：1281-1289.
Yan ZJ, Kang Y, Liu SM, et al. Activation of PPARα-mediated autophagy by pueraria mirifica improves diabetic nephropathy [J]. J Hainan Med Coll, 2024, 30(17): 1281-1289.

12 Yan ZJ, Zhang L, Kang Y, et al. Integrating serum pharmacochemistry and network pharmacology to explore potential compounds and mechanisms of Alpiniae oxyphyllae fructus in the treatment of cellular senescence in diabetic kidney disease [J]. Front Med (Lausanne), 2024, 11: 1424644.

13 Zeng LF, 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.

14 Chen Y, Zou H, Lu H, et al. Research progress of endothelial-mesenchymal transition in diabetic kidney disease [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(12): 3313-3322.

15 Srivastava SP, Hedayat AF, Kanasaki K, et al. microRNA crosstalk influences epithelial-to-mesenchymal, endothelial-to-mesenchymal, and macrophage-to-mesenchymal transitions in the kidney [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 904.

16 Zhang X, Chen J, Lin R, et al. Lactate drives epithelial-mesenchymal transition in diabetic kidney disease *via* the H3K14la/KLF5 pathway [J]. Redox Biol, 2024, 75: 103246.

17 Zhang G, Darshi M, Sharma K. The warburg effect in diabetic kidney disease [J]. Semin Nephrol, 2018, 38(2): 111-120.

18 Song C, Wang S, Fu Z, et al. IGFBP5 promotes diabetic kidney disease progression by enhancing PFKFB3-mediated endothelial glycolysis [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(4): 340.

19 Guo X, Zheng B, Wang J, et al. Exploring the mechanism of action of Chinese medicine in regulating liver fibrosis based on the alteration of glucose metabolic pathways [J]. Phytother Res, 2024, 38(10): 4865-4876.

20 Fan N, Zhang X, Zhao W, et al. Covalent inhibition of pyruvate kinase M2 reprograms metabolic and inflammatory pathways in hepatic macrophages against non-alcoholic fatty liver disease [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(14): 5260-5275.

[本文编辑] 邹 洲 宋睿璞 朱 昊