

- 路的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2021, 29(10): 84-88.
- [20] Huang J, Chen C, Liang C, et al. Dysregulation of the Wnt signaling pathway and synovial stem cell dysfunction in osteoarthritis development [J]. *Stem Cells*, 2020, 29(7): 401-413.
- [21] 汪国翔, 章晓云. 骨关节炎病变过程中炎症细胞因子及相关信号通路的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(14): 2266-2273.
- [22] Xia H, Cao D, Yang F, et al. Jiawei Yanghe decoction ameliorates cartilage degradation *in vitro* and *in vivo* via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109708.
- [23] Yao N, Chen G C, Lu Y Y, et al. Bushen Qiangjin capsule inhibits the Wnt/ β -catenin pathway to ameliorate papain-induced knee osteoarthritis in rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 41(6): 935-942.
- [24] 黄璐, 谭旭仪, 邝高艳, 等. 加味独活寄生合剂对兔膝骨关节炎软骨 Wnt3a 及 β -catenin 蛋白表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(9): 2053-2055.

芪黄健脾滋肾颗粒调控 JAK1/STAT1 信号通路对 MRL/lpr 狼疮小鼠足细胞凋亡的影响

陈君洁¹, 黄传兵^{2*}, 程丽丽¹, 汤忠富¹, 尚双双², 李明², 刘思娣²

(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽合肥 230031; 2. 安徽中医药大学第一附属医院, 新安医学与中医药现代化研究所, 安徽合肥 230031)

摘要: 目的 研究芪黄健脾滋肾颗粒(即健脾滋肾方)对 MRL/lpr 狼疮小鼠 Janus 激酶 1 (JAK1) /信号转导和转录激活因子 1 (STAT1) 通路及对足细胞凋亡的影响。方法 将 24 只 MRL/lpr 小鼠随机分为模型组、醋酸泼尼松组 (4.55 mg/kg)、芪黄健脾滋肾颗粒 (3.9 g/kg) 和吗替麦考酚酯组 (0.26 g/kg), 每组 6 只, 另以 C57BL/6 小鼠作为对照组。给药 8 周后, 检测小鼠 24 h 尿蛋白、尿总蛋白/尿肌酐、尿白蛋白/尿肌酐水平; 采用 HE 和 PAS 染色观察小鼠肾组织病理变化; 透射电镜观察足细胞超微结构; 免疫荧光 (IF) 法检测小鼠肾组织 p-JAK1、p-STAT1 蛋白表达量; RT-qPCR 法检测肾组织 JAK1、STAT1 mRNA 表达; Western blot 法检测肾组织 Nephin、Podocin、p-JAK1、p-STAT1、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达。结果 与模型组比较, 芪黄健脾滋肾颗粒组肾组织病理损伤改善, 足细胞足突清晰, 偶有少量融合; 24 h 尿蛋白、尿总蛋白/尿肌酐、尿白蛋白/尿肌酐水平均降低 ($P < 0.01$); Nephin、Podocin、Bel-2 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), p-JAK1、p-STAT1、Bax、Caspase-3 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。结论 芪黄健脾滋肾颗粒可能通过抑制 JAK1/STAT1 信号通路的激活, 减轻足细胞凋亡, 从而减缓 MRL/lpr 狼疮小鼠疾病进展。**关键词:** 芪黄健脾滋肾颗粒; 健脾滋肾方; 系统性红斑狼疮; MRL/lpr 狼疮小鼠; 足细胞损伤; 凋亡; JAK/STAT 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)12-4145-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.040

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种自身免疫性疾病, 其主要特征为免疫复合物沉积并累及多系统损伤。据报道约 50% ~ 70% 的 SLE 患者出现不同程度的肾脏损害, 最终导致死亡^[1-2]。肾小球疾病早期病理改变特征为足细胞损伤和脱落^[3]。足细胞不仅受到肾小

球毛血管病变的附带损害, 也是狼疮性肾炎的潜在靶点^[4]。细胞凋亡与足细胞损伤密切相关, 并在 SLE 的发展中起重要作用^[5-6]。探讨足细胞病理损伤和功能改变并抑制这种进展越来越成为 SLE 治疗关注的热点。Janus 激酶 (JAK) /信号转导和转录激活因子 (STAT) 通路是重要的

收稿日期: 2024-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81473672); 安徽省临床医学研究转化专项项目 (202304295107020114); 安徽省卫生健康科研项目重点项目 (AHWJ2022a005); 安徽省教育厅研究生创新创业实践项目 (ahzydx-tb83); 安徽省高校协同创新项目 (GXXT-2021-085); 大健康研究院新安医学与中医药现代化研究所专项资金资助 (2023CXMMTCM015)

作者简介: 陈君洁 (1997—), 女, 博士生, 研究方向为中医药防治风湿免疫疾病。Tel: 15256544970, E-mail: junjiechen132@163.com

* 通信作者: 黄传兵 (1971—), 男, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为中医药防治风湿病。Tel: 13865922531, E-mail: chuanbinh@163.com

细胞因子信号传导通路,与多条通路产生互联,参与细胞凋亡、免疫调节等多种生物学过程^[7]。研究表明 JAK/STAT 通路参与蛋白尿的形成^[8],可以调控足细胞凋亡及损伤,加重肾脏纤维化进展^[9]。

SLE 中医上归属“蝶疮流注”范畴,其病机以“脾肾亏损为本”。芪黄健脾滋肾颗粒即健脾滋肾方是特色院内制剂(国家发明专利,专利号 ZL202011227827.8),是由经典古方“六味地黄汤”和“四君子汤”化裁而来,具有益气健脾、滋肾固精功效。前期研究显示,健脾滋肾方能减轻蛋白尿,显著降低 SLE 病情活动度,改善 SLE 肾脏损害^[10-12]。本实验以 JAK1/STAT1 信号通路为线索,观察健脾滋肾方对 MRL/lpr 小鼠足细胞凋亡的干预作用,进一步探讨健脾滋肾方减轻 SLE 肾脏损害的可能机制。

1 材料

1.1 动物 24 只无特定病原体级(specific pathogen free, SPF) MRL/lpr 小鼠,雌性,8 周龄,体质量(20±2)g;另有 6 只相同周龄、体质量的雌性 C57BL/6 小鼠,均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[实验动物生产许可证号 SCXK(沪)2017-0005],饲养于安徽中医药大学 SPF 级别动物房,温度(24±1)℃,相对湿度 40%~70%。本动物实验已获得安徽中医药大学实验动物伦理委员会审查与批准(伦理编号 AHUCM-mouse-2022130)。

1.2 药物 芪黄健脾滋肾颗粒(由黄芪、盐菟丝子、熟地黄、山药、麸炒白术、茯苓、覆盆子、金樱子组成)由安徽中医药大学第一附属医院制剂中心提供(批号 20220041000,规格 10 g/袋);醋酸泼尼松片(天津天药药业股份有限公司,批号 H12020689);吗替麦考酚酯胶囊(无锡福祈制药有限公司,批号 H20080642)。

1.3 试剂 组织自发荧光淬灭剂(北京普利莱基因技术有限公司,批号 2023X2GC1212);抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI)、山羊抗兔 IgG (FITC)(美国 eBioscience 公司,批号 09262310、09302309);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号 AM62082A);JAK1、p-JAK1、STAT1、p-STAT1、Nephrin、Podocin、Bcl-2 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 AD18205164、AG11052631、AF19520152、AH19620156、AD18210159、AD19821745、AH18269152);Bax、Caspase-3 抗体(英国 Abcam 公司,批号 GR3275117-9、GR3241586-6);苏木素染液、醇溶伊红染液染色液、高碘酸-席夫(PAS)染色试剂盒(美国 eBioscience 公司,批号 10052316、08152311、09062308、09132310)。

1.4 仪器 ZT-12M 型生物组织自动脱水机、YB-7LF 型生物组织包埋机(孝感市亚光医用电子技术有限公司);UC-7 型徕卡超薄切片机(德国 Leica 公司);JEM1400 型透射电镜(日本电子株式会社);Morada G3 型数码相机(德国 EMSIS 公司);PIKOREAL 96 荧光定量 PCR 仪、10212432C PIKO Plate Illuminator(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);JW-3021HR 高速冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限

公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 小鼠适应性喂养 1 周,将 MRL/lpr 小鼠随机分为模型组、醋酸泼尼松组、芪黄健脾滋肾颗粒组及吗替麦考酚酯组,每组 6 只;6 只 C57BL/6 小鼠为对照组。根据药理实验方法学^[13],按照人与动物体表面积折算成小鼠药物剂量,分别予以醋酸泼尼松 4.55 mg/kg、芪黄健脾滋肾 3.9 g/kg、吗替麦考酚酯 0.26 g/kg 灌胃;对照组和模型组灌胃予以等体积生理盐水。8 周给药结束后,小鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠,并在麻醉后通过腹主动脉取血,随后收集小鼠的血清和肾组织备用。

2.2 小鼠 24 h 尿蛋白、尿总蛋白/尿肌酐、尿白蛋白/尿肌酐水平检测 代谢笼收集小鼠 24 h 尿液,按照试剂盒说明书检测 24 h 尿蛋白、尿总蛋白/尿肌酐、尿白蛋白/尿肌酐水平。

2.3 HE 染色、PAS 染色、透射电镜观察小鼠肾组织病理变化 取小鼠新鲜肾组织,使用多聚甲醛固定肾组织,进行常规的石蜡包埋和切片处理,在进行脱蜡和复水处理后,分别进行 HE 染色和 PAS 染色,封片后于显微镜下观察并拍摄。透射电镜标本制作步骤参考文献[14]报道。

2.4 免疫荧光法检测小鼠肾组织 p-JAK1、p-STAT1 蛋白表达 取肾组织切片,依次进行二甲苯和乙醇的处理,清洗,使用柠檬酸盐修复液进行抗原修复,滴加稀释后的一抗孵育 60 min, PBST 溶液冲洗后,滴加山羊抗兔 IgG (FITC) 二抗孵育 30 min,切片扫描仪(Pannoramic MIDI)扫描荧光切片,拍照,使用 ImageJ 软件进行分析。

2.5 Western blot 法检测小鼠肾组织各目的蛋白表达 提取小鼠肾组织总蛋白,处理蛋白样本并充分变性,后经电泳、转膜、封闭后,加入 JAK1、p-JAK1、STAT1、p-STAT1、Podocin、Bcl-2 (1:1 000) 和 Nephrin、Caspase-3、Bax、GAPDH (1:2 000) 一抗,4℃孵育过夜, PBST 洗涤后加入二抗稀释液(1:20 000)孵育, PBST 洗涤后,使用 ECL 发光试剂盒显色、曝光,并通过 ImageJ 软件对条带进行半定量分析。

2.6 RT-qPCR 法检测小鼠肾组织 JAK1、STAT1 mRNA 表达 称取肾组织并提取总 RNA,于-80℃保存备用。在 37℃ 15 min, 85℃ 5 s 条件下进行逆转录反应。使用 cDNA 作为荧光定量的参考模板,并进行反应扩增,反应条件为 95℃ 预变性 1 min; 95℃ 变性 20 s, 60℃ 退火延伸 1 min, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算肾组织中目标基因 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

2.7 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 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

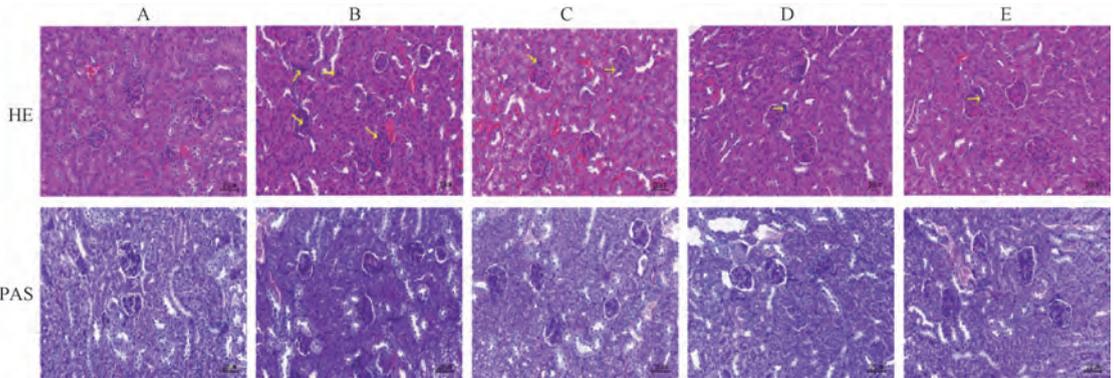
3.1 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠肾组织病理损伤的影响 如图 1 所示,正常小鼠肾组织未见炎症渗出和结缔

表1 引物序列

基因	序列(5'→3')	长度/bp
GAPDH	正向 GCACTGGCAAAGTGGAGATTG	169
	反向 CGCTCCTGGAAGATGGTGAT	
JAK1	正向 ACCAGGCAAGATCCAGACAT	85
	反向 TCTTCAGGAACCGCTTTTCA	
STAT1	正向 GTCATCCCGCAGAGAGAAC	74
	反向 CAGGATAAGAGAGCCAAGCA	

组织增生, 肾小球结构良好, 系膜区基质均匀, 符合正常形态表现; MRL/lpr 小鼠肾组织肾小球结构紊乱, 形态不规则, 边界融合, 界限不清, 肾小管间质内炎性细胞浸润, 肾小球皱缩塌陷, 球囊粘连; 各给药组肾小管均有不同程度的改善, 炎性细胞浸润减少, 系膜和间质增生情况好转, 肾小球结构趋于正常。

3.2 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠足细胞超微结构的影响 如图2所示, 正常组小鼠足突排列均匀, 肾小球基

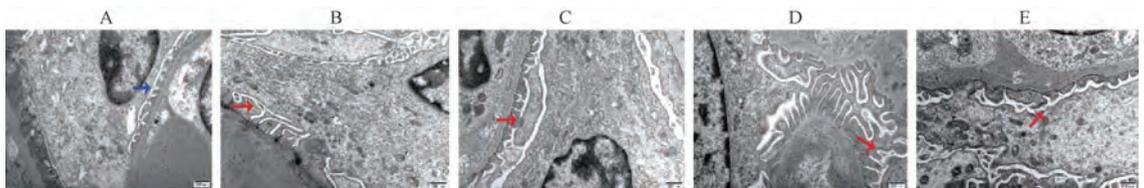


注: A 为对照组, B 为模型组, C 为醋酸泼尼松组, D 为芪黄健脾滋肾颗粒组, E 为吗替麦考酚酯组。黄色箭头指示炎性细胞浸润。

图1 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠肾组织病理损伤的影响 (×400)

底膜厚度无显著差异; 模型组足细胞足突广泛融合或缺失, 基底膜厚度不均; 与模型组比较, 醋酸泼尼松组、芪黄健脾滋肾组及吗替麦考酚酯组小鼠足突融合减轻, 基底膜异

常增厚有所减轻, 足突清晰可见, 足突呈现齿梳状结构, 偶有少量融合。

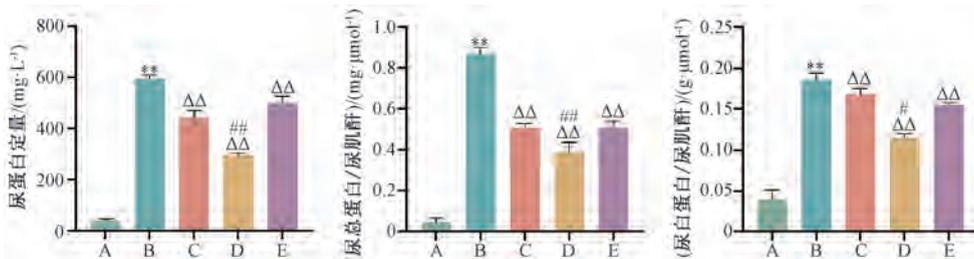


注: A 为对照组, B 为模型组, C 为醋酸泼尼松组, D 为芪黄健脾滋肾颗粒组, E 为吗替麦考酚酯组。蓝色箭头指示足突处, 红色箭头指示足突融合或消失。

图2 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠足细胞超微结构的影响

3.3 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠 24 h 尿蛋白、尿总蛋白/尿肌酐、尿白蛋白/尿肌酐水平的影响 如图3所示, 与对照组比较, 模型组小鼠 24 h 尿蛋白、尿总蛋白/尿肌酐、尿白蛋白/尿肌酐水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各

给药组小鼠 24 h 尿蛋白、尿总蛋白/尿肌酐、尿白蛋白/尿肌酐水平降低 ($P < 0.01$); 与醋酸泼尼松组、吗替麦考酚酯组比较, 芪黄健脾滋肾组 24 h 尿蛋白、尿总蛋白/尿肌酐、尿白蛋白/尿肌酐水平降低更显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

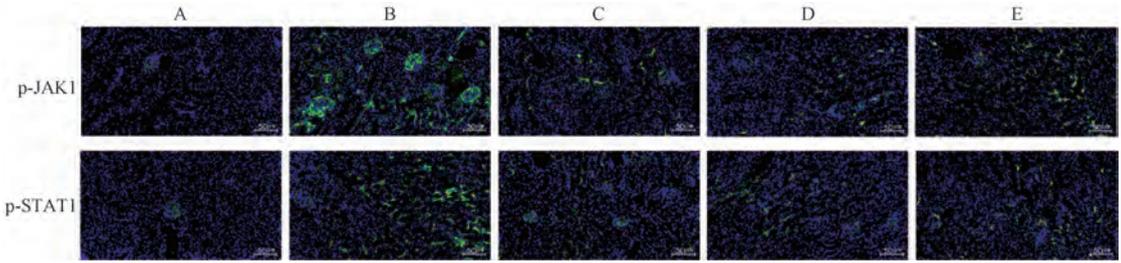


注: A 为对照组, B 为模型组, C 为醋酸泼尼松组, D 为芪黄健脾滋肾颗粒组, E 为吗替麦考酚酯组。与对照组比较, $**P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与醋酸泼尼松组或吗替麦考酚酯组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#\#P < 0.01$ 。

图3 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠 24 h 尿蛋白、尿总蛋白/尿肌酐、尿白蛋白/尿肌酐水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.4 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠肾组织 p-JAK1、p-STAT1 蛋白表达的影响 与对照组比较,模型组小鼠肾组织中 p-JAK1、p-STAT1 荧光强度增强 ($P<0.01$);与模型

组比较,各给药组小鼠肾组织 p-JAK1、p-STAT1 荧光强度降低 ($P<0.01$),见图 4、表 2。



注: A 为对照组, B 为模型组, C 为醋酸泼尼松组, D 为芪黄健脾滋肾颗粒组, E 为吗替麦考酚酯组。

图 4 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠肾组织 p-JAK1、p-STAT1 蛋白表达的影响 (免疫荧光, $\times 200$)

表 2 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠肾组织免疫荧光平均光密度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	p-JAK1 平均光密度	p-STAT1 平均光密度
对照组	0.151±0.024	0.148±0.029
模型组	0.531±0.042**	0.529±0.035**
醋酸泼尼松组	0.421±0.031 $\Delta\Delta$	0.424±0.039 $\Delta\Delta$
芪黄健脾滋肾组	0.219±0.021 $\Delta\Delta\#$	0.236±0.040 $\Delta\Delta\#$
吗替麦考酚酯组	0.349±0.021 $\Delta\Delta$	0.318±0.017 $\Delta\Delta$

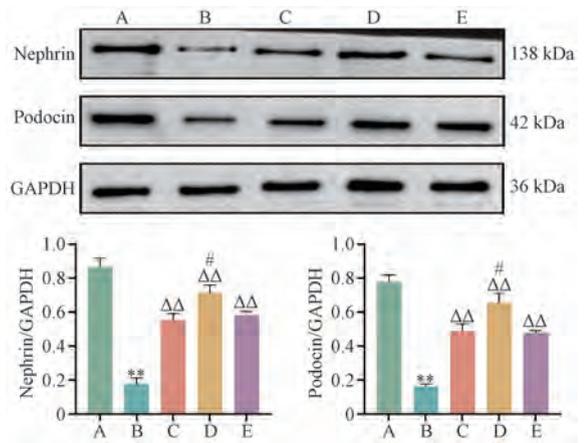
注: A 为对照组, B 为模型组, C 为醋酸泼尼松组, D 为芪黄健脾滋肾颗粒组, E 为吗替麦考酚酯组。与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$; 与醋酸泼尼松组或吗替麦考酚酯组比较, # $P<0.05$ 。

3.5 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠肾组织足细胞标志蛋白的影响 如图 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠肾组织 Nephrin、Podocin 蛋白表达均降低 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肾组织 Nephrin、Podocin 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与醋酸泼尼松组、吗替麦考酚酯组比较,芪黄健脾滋肾组小鼠肾组织 Nephrin、Podocin 蛋白表达升高更显著 ($P<0.05$)。

3.6 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠肾组织 JAK1、STAT1 磷酸化水平的影响 如图 6 所示,与对照组比较,模型组小鼠肾组织 JAK1、STAT1 蛋白磷酸化水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肾组织 JAK1、STAT1 磷酸化水平降低 ($P<0.01$);与醋酸泼尼松组、吗替麦考酚酯组比较,芪黄健脾滋肾组小鼠肾组织 JAK1、STAT1 磷酸化水平降低 ($P<0.05$),与免疫荧光结果相符合。

3.7 芪黄健脾滋肾颗粒对小鼠肾组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响 如图 7 所示,与对照组比较,模型组小鼠肾组织 Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.01$), Bax、Caspase-3 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肾组织 Bcl-2 蛋白表达均升高 ($P<0.01$), Bax、Caspase-3 蛋白表达降低 ($P<0.05, P<0.01$);与醋酸泼尼松组、吗替麦考酚酯组比较,芪黄健脾滋肾组小鼠肾组织 Bcl-2 表达升高更显著 ($P<0.01$), Bax、Caspase-3 蛋白表达降低更显著 ($P<0.05, P<0.01$)。

3.8 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠肾组织 JAK1、



注: A 为对照组, B 为模型组, C 为醋酸泼尼松组, D 为芪黄健脾滋肾颗粒组, E 为吗替麦考酚酯组。与对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$; 与醋酸泼尼松组或吗替麦考酚酯组比较, # $P<0.05$ 。

图 5 芪黄健脾滋肾颗粒对 MRL/lpr 小鼠肾组织 Nephrin、Podocin 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

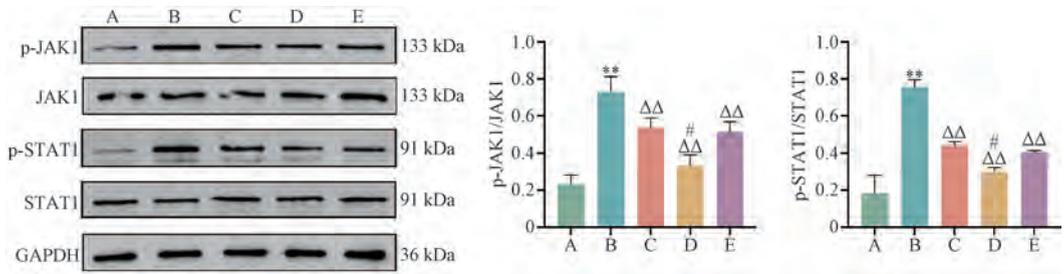
STAT1 mRNA 表达的影响 如图 8 所示,与对照组比较,模型组小鼠肾组织 JAK1、STAT1 mRNA 表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肾组织 JAK1、STAT1 mRNA 表达均降低 ($P<0.05, P<0.01$);与醋酸泼尼松组、吗替麦考酚酯组比较,芪黄健脾滋肾组小鼠肾组织 JAK1、STAT1 mRNA 表达降低更显著 ($P<0.01$)。

4 讨论

蛋白尿是系统性红斑狼疮患者临床上最常见的并发症之一,与疾病活动度密切相关。足细胞是肾小囊脏层上皮细胞,在维持肾小球滤过屏障上起着关键作用^[15]。足细胞损伤与蛋白尿水平相关,研究表明,在炎症、氧化应激、I 型干扰素等刺激下,足细胞发生凋亡、脱落、密度降低、间充质转化等形态改变,从而使肾小球滤过屏障受损,增加蛋白尿流失^[16]。足细胞损伤的病理特征主要表现为足细胞形态肥大、足细胞裂膜关键蛋白 (Nephrin、Podocin)、足细胞足突 (FPs) 消失融合和脱离等^[17-18]。狼疮性肾炎中常表现出肾脏足细胞数量减少,其多由细胞凋亡或足细

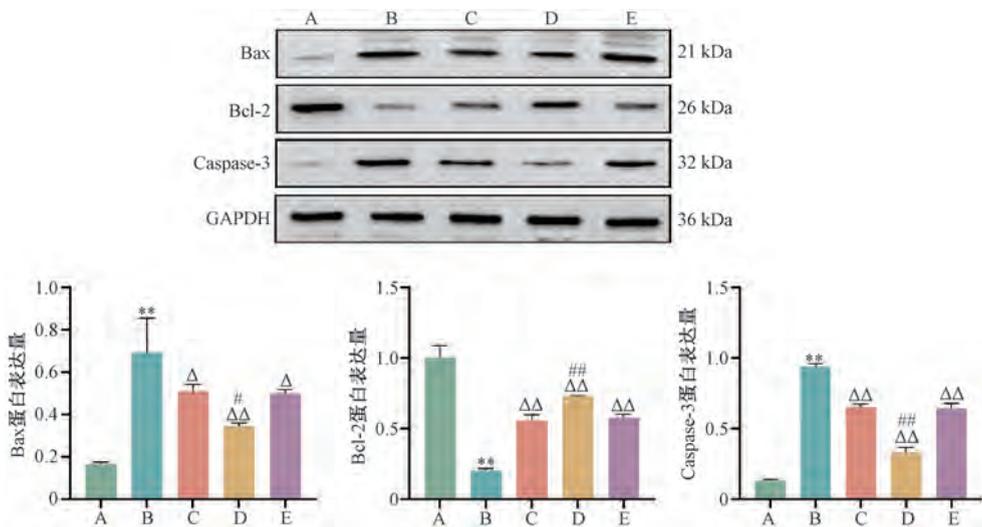
胞脱落造成^[19]。

膜重要组成部分^[21]，能够维持足细胞正常结构与生理功



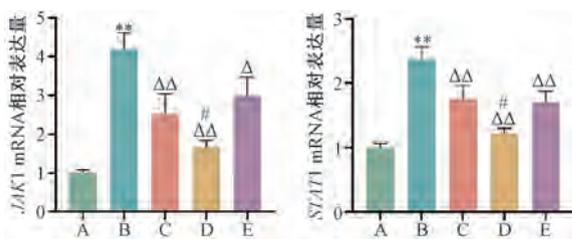
注：A为对照组，B为模型组，C为醋酸泼尼松组，D为芪黄健脾滋肾颗粒组，E为吗替麦考酚酯组。与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与醋酸泼尼松组或吗替麦考酚酯组比较，# $P < 0.05$ 。

图6 芪黄健脾滋肾颗粒对MRL/lpr小鼠肾组织JAK1、STAT1磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



注：A为对照组，B为模型组，C为醋酸泼尼松组，D为芪黄健脾滋肾颗粒组，E为吗替麦考酚酯组。与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与醋酸泼尼松组或吗替麦考酚酯组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图7 芪黄健脾滋肾颗粒对MRL/lpr小鼠肾组织Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



注：A为对照组，B为模型组，C为醋酸泼尼松组，D为芪黄健脾滋肾颗粒组，E为吗替麦考酚酯组。与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与醋酸泼尼松组或吗替麦考酚酯组比较，# $P < 0.05$ 。

图8 芪黄健脾滋肾颗粒对MRL/lpr小鼠肾组织JAK1、STAT1 mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

本研究发现，模型组小鼠肾组织呈现肾小球结构紊乱、形态不规则，边界融合不清，小管间质内充满炎性细胞，并通过电镜观察到模型组小鼠足突广泛融合或缺失，基底膜厚度不均，提示MRL/lpr小鼠肾脏存在病理改变且足细胞受损。Nephrin蛋白特异性表达于肾小球足细胞，是肾脏足细胞早期损伤的标志之一^[20]。Podocin是足细胞裂孔隔

能。本研究发现，模型组小鼠肾组织中足细胞相关蛋白(Nephrin、Podocin)表达降低，进一步佐证了MRL/lpr小鼠体内处于足细胞损伤状态。模型组小鼠抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调，促凋亡蛋白Bax、Caspase-3表达上调，表明MRL/lpr小鼠肾脏病理改变及足细胞损伤可能与细胞凋亡有关。在芪黄健脾滋肾颗粒的干预下，小鼠病理形态得到改善，足细胞足突融合减轻，基底膜异常增厚有所减轻，足突清晰可见，同时Bcl-2表达上调，Bax、Caspase-3表达下调，说明芪黄健脾滋肾颗粒可能通过减少足细胞凋亡，减轻足细胞损伤，从而改善MRL/lpr小鼠肾脏病理变化。

JAK/STAT通路具有广泛的生物学效应，能够发挥调控细胞生长增殖和凋亡的作用^[7]，其中JAK1和STAT1在SLE发生发展中发挥关键作用。干扰素应答相关通路是与SLE发病机制密切相关的生物学途径之一^[22]，IFN的生物学效应通过JAK/STAT途径介导，其中IFN- α/β 和IFN- γ 激活转录因子STAT1^[23]。生长因子、干扰素、白介素等配体激活并促进JAK1和STAT1的磷酸化，进而进入细胞核，因此，p-JAK1/JAK1、p-STAT1/STAT1体现了JAK1/STAT1信号通路活化水平。STAT1作为细胞凋亡的参与者，参与几种半胱天

冬酶的表达,能够调节 *Bcl-2*、*Bcl-XL*、*CycD*、*c-Myc* 等基因^[24]。研究发现,通过抑制 JAK1/STAT1 信号通路能有效抑制狼疮性肾炎中炎症反应,减少细胞凋亡,改善肾脏功能^[23,25]。JAK1/STAT1 信号通路激活并通过对下游靶点的调控,促进足细胞凋亡,从而导致肾小球滤过屏障受损,增加蛋白尿流失。本实验结果表明, MRL/lpr 小鼠肾脏中 JAK1、STAT1 磷酸化水平升高, JAK1、STAT1 蛋白表达升高, p-JAK1/JAK1 和 p-STAT1/STAT1 比值升高,表明 JAK/STAT 通路处于激活状态。经芪黄健脾滋肾颗粒干预后, MRL/lpr 小鼠 24 h 尿蛋白定量、尿总蛋白/尿肌酐、尿白蛋白/尿肌酐下降,提示该方可能通过抑制 JAK1/STAT1 信号通路减轻足细胞损伤,降低蛋白尿水平,改善肾脏受累情况。

综上所述,本研究证实芪黄健脾滋肾颗粒可能通过抑制 JAK1/STAT1 信号通路的激活,缓解肾组织病理改变,减轻足细胞凋亡,降低蛋白尿水平,改善 SLE 肾脏受累。然而, JAK1/STAT1 可与多种通路相互联,芪黄健脾滋肾颗粒是否还可以通过其他途径及机制调控足细胞凋亡,仍需要进一步深入探索与研究。

参考文献:

[1] Tonsawan P, Sawanyawisuth K. Clinical comparisons between previously diagnosed SLE and newly diagnosed SLE by kidney biopsy[J]. *Auto Immun Highlights*, 2020, 11(1): 18.

[2] Shrestha S, Budhathoki P, Adhikari Y, et al. Belimumab in lupus nephritis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Cureus*, 2021, 13(12): e20440.

[3] Lee H W, Khan S Q, Khaliqina S, et al. Absence of miR-146a in podocytes increases risk of diabetic glomerulopathy via up-regulation of ErbB4 and Notch-1[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(2): 732-747.

[4] Sakhi H, Moktefi A, Bouachi K, et al. Podocyte injury in lupus nephritis[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(9): 1340.

[5] Kemp M G. Crosstalk between apoptosis and autophagy: environmental genotoxins, infection, and innate immunity [J]. *J Cell Death*, 2017, 9: 1179670716685085.

[6] Yu F, Haas M, Glassock R, et al. Redefining lupus nephritis: clinical implications of pathophysiologic subtypes [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(8): 483-495.

[7] Xue C, Yao Q, Gu X, et al. Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 204.

[8] Li X, Wang Y, Wang K, et al. Renal protective effect of paeoniflorin by inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway in diabetic mice [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(2): 168-176.

[9] Richter P, Cardoneanu A, Burlui A M, et al. Why do we need JAK inhibitors in systemic lupus erythematosus? [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11788.

[10] 李 明,尚双双,李云飞,等. 芪黄健脾滋肾颗粒治疗脾胃亏虚型系统性红斑狼疮的临床疗效观察 [J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(2): 370-373.

[11] 陈君洁,黄传兵,李 明. 健脾滋肾方抑制系统性红斑狼疮患者的足细胞自噬:基于网络药理学和临床研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(3): 465-473.

[12] 汤富忠,黄传兵,程丽丽,等. 芪黄健脾滋肾颗粒对系统性红斑狼疮患者疗效及 STAT3/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(8): 118-125.

[13] 徐叔云,卞如濂,陈 修. *药理实验方法学* [M]. 北京:人民卫生出版社, 2003: 202-203.

[14] Luan P, Zhuang J, Zou J, et al. NLRC5 deficiency ameliorates diabetic nephropathy through alleviating inflammation [J]. *FASEB J*, 2018, 32(2): 1070-1084.

[15] Ye Q, Lan B, Liu H, et al. A critical role of the podocyte cytoskeleton in the pathogenesis of glomerular proteinuria and autoimmune podocytopathies [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2022, 235(4): e13850.

[16] Davidson A. What is damaging the kidney in lupus nephritis? [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(3): 143-53.

[17] Li X, Zhang Y, Xing X, et al. Podocyte injury of diabetic nephropathy: Novel mechanism discovery and therapeutic prospects [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115670.

[18] Li J, Zheng S, Ma C, et al. Research progress on exosomes in podocyte injury associated with diabetic kidney disease [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1129884.

[19] Barutta F, Bellini S, Gruden G. Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2022, 136(7): 493-520.

[20] Zeng L, Szeto C C. Urinary podocyte markers in kidney diseases [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 523: 315-324.

[21] Shi L, Xiao C, Zhang Y, et al. Vitamin D/vitamin D receptor/Atg16L1 axis maintains podocyte autophagy and survival in diabetic kidney disease [J]. *Ren Fail*, 2022, 44(1): 694-705.

[22] Deng Y, Zheng Y, Li D, et al. Expression characteristics of interferon-stimulated genes and possible regulatory mechanisms in lupus patients using transcriptomics analyses [J]. *eBioMedicine*, 2021, 70: 103477.

[23] Lee J, Park Y, Jang S G, et al. Baricitinib attenuates autoimmune phenotype and podocyte injury in a murine model of systemic lupus erythematosus [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 704526.

[24] Thomas M, Finnegan C E, Rogers K M, et al. STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(22): 8357-8364.

[25] Zhang L H, Jiang S Z, Guo X, et al. MiR-146b-5p targets IFI35 to inhibit inflammatory response and apoptosis via JAK1/STAT1 signalling in lipopolysaccharide-induced glomerular cells [J]. *Autoimmunity*, 2021, 54(7): 430-438.