

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.13.013

基于 NOX4 介导的 SDF-1 α /CXCR4 信号通路探讨益气养阴活血方对膜性肾病模型大鼠氧化应激及炎症损伤的影响

郭笑笑^{1,2}, 宋纯东^{1,2}✉, 张寒晗^{1,2}, 宋珂^{1,2}, 陈晨晨^{1,2}, 姜浩然^{1,2}, 丁樱^{1,2}

1. 河南中医药大学第一附属医院儿科医院, 河南省郑州市金水区人民路 19 号, 450003; 2. 河南中医药大学儿科医学院

[摘要] **目的** 基于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (NOX4) 介导的基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α) / CXC 趋化因子受体 4 (CXCR4) 信号通路探讨益气养阴活血方治疗膜性肾病 (MN) 的可能机制。**方法** 将 42 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组 (6 只) 和造模组 (36 只), 造模组大鼠采用单次尾静脉注射羊抗大鼠肾小管基底膜球蛋白 (Fx1A) 血清 (6 ml/kg) 建立 MN 模型。将造模成功的 36 只大鼠随机分为模型组 (10 ml/kg 生理盐水)、贝那普利组 (10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、益气养阴活血方中剂量组 (11.0 g·kg⁻¹·d⁻¹)、益气养阴活血方高剂量组 (22.0 g·kg⁻¹·d⁻¹), 每组 9 只。各组均每天灌胃 1 次, 连续 6 周。实验期间, 观察各组大鼠的一般状态。灌胃结束后, 全自动生化分析仪检测各组大鼠 24 小时尿蛋白定量 (24 h-UTP) 及血清生化指标 [白蛋白 (ALB)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、血尿素氮 (BUN)、血肌酐 (SCr)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)] 水平; HE 染色及 PASM 染色法观察各组大鼠肾组织病理变化; ELISA 法检测肾组织氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 水平; Western Blot 法检测肾组织 NOX4、SDF-1 α 、CXCR4、Nrf2、核因子 κ B p65 亚基 (NF- κ B p65)、肾小球足细胞裂孔隔膜蛋白 (Nephrin) 蛋白水平; 实时荧光定量 PCR 法检测肾组织 NOX4、SDF-1 α 、CXCR4、Nrf2、NF- κ B p65、Nephrin mRNA 表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠出现精神萎靡、活动减少、毛发枯槁、明显水肿及大量蛋白尿等典型 MN 表现; 与模型组比较, 各给药组大鼠上述异常状态均有不同程度改善, 益气养阴活血方高剂量组改善程度与贝那普利组相近, 整体恢复优于益气养阴活血方中剂量组。与空白组比较, 模型组大鼠 24 h-UTP 及血清 BUN、SCr、TC、TG 水平升高, ALB 水平降低, 肾组织 MDA 水平和 NOX4、SDF-1 α 、CXCR4、NF- κ B p65 蛋白及 mRNA 表达升高, SOD 水平和 Nrf2、Nephrin 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), 肾组织病理损伤严重; 与模型组比较, 贝那普利组及益气养阴活血方中、高剂量组上述各指标均显著改善 ($P < 0.01$), 肾脏病理损伤减轻。益气养阴活血方高剂量组 24 h-UTP 水平低于益气养阴活血方中剂量组 ($P < 0.01$), 余给药组之间差异无统计学意义 ($P > 0.01$)。**结论** 益气养阴活血方治疗 MN 机制可能是通过下调 NOX4, 抑制 SDF-1 α /CXCR4-Nrf2 信号通路, 减轻氧化应激及炎症反应, 改善足细胞损伤, 从而保护肾功能。

[关键词] 膜性肾病; 氧化应激; 炎症; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4; 基质细胞衍生因子-1 α ; CXC 趋化因子受体 4; 足细胞; 益气养阴活血方

基金项目: 国家自然科学基金 (82074493); 河南省中医药学科领军人才项目 (豫卫中医函 [2021] 8 号); 河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项 (2022JDZX003); 河南省中医药科学研究重大专项 (2023ZYD02, 2024ZYD1002); 河南省“双一流”创建工程项目 (HSRP-DFCTCM-2023-3-07)

✉ 通讯作者: scd670918@126.com

膜性肾病 (membranous nephropathy, MN) 是成人肾病综合征最常见的病理类型之一, 大约 40% 的患者在 5~15 年发展为终末期肾病^[1]。其发病机制尚未完全明确, 目前多认为与自身抗体介导的免疫复合物沉积和补体依赖性足细胞损伤有关^[2]。现代医学治疗 MN 已取得较大进展, 但治疗过程中仍

存在感染风险较大、易产生耐药性、复发率高等局限^[3]，因此探索新的治疗方案与靶向治疗药物至关重要。现代研究^[4]发现，MN的进展与氧化应激及炎症损伤密切相关，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4 (NOX4) 是促进氧化应激的关键酶，NOX4的过表达激活其下游基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α)/CXC趋化因子受体4 (CXCR4) 信号通路，加重氧化应激及炎症反应，导致足细胞损伤，加剧肾功能恶化。

MN通常病程较长、易迁延反复。《特发性膜性肾病中医临床实践指南(2021)》中明确益气养阴、活血化瘀法是MN的主要治法之一^[5]。针对MN气阴两虚兼有血瘀的病机，本课题组自拟益气养阴活血方以发挥益气养阴、活血化瘀的功效。临床研究^[6]表明，益气养阴活血方可以增强西药的疗效，并减轻不良反应。前期研究^[7-8]发现，益气养阴活血方可通过抑制炎症反应、改善氧化应激、调节脂质代谢异常、延缓肾脏纤维化进程等机制，从而保护肾功能。本研究基于NOX4介导的SDF-1 α /CXCR4信号通路，探讨益气养阴活血方对MN模型大鼠氧化应激和炎症损伤影响的可能机制，以期为临床治疗MN提供依据。本实验通过河南中医药大学第一附属医院伦理审查委员会批准，伦理审查编号：YFYDW2024013。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠42只，6~7周龄，体质量(160 $\pm$ 20) g，购自河南省郑州市惠济区华兴实验动物养殖场，实验动物生产许可证号：SCXK(豫)2019-0002。动物饲养于河南中医药大学第一附属医院中心实验室动物房，环境温度25℃，相对湿度50% $\pm$ 10%，12 h/12 h昼夜交替光照。

1.2 药物

益气养阴活血方颗粒剂(组成：黄芪30 g、菟丝子30 g、积雪草30 g、生地黄10 g、熟地黄4 g、水蛭3 g，批号分别为21041961、22030302、21101731、21077284、21096874、21096864)，购自河南中医药大学第一附属医院，四川新绿色药业科技发展有限公司生产。益气养阴活血方颗粒剂用蒸馏水溶解，分别配制成生药质量浓度为1.1 g/ml(中剂量)和2.2 g/ml(高剂量)的溶液。盐酸贝那普利片(规格：10 mg/片，批准文号：国药准字H20030514，北京诺华制药有限公司)，研磨成细粉，加生理盐

水配制成浓度为1 mg/ml的混悬液(临用前超声混匀)。

1.3 主要试剂与仪器

羊抗大鼠肾小管基底膜球蛋白(Fx1A)血清(货号：PTX-002S)，美国Probetex公司；丙二醛(MDA)ELISA检测试剂盒(货号：A003-1)，南京建成生物工程所；NOX4(货号：GB11347)、核转录因子E2相关因子2(Nrf2，货号：GB113808)、核因子 κ B p65亚基(NF- κ B p65，货号：GB11997)一抗、凝胶超快速配制试剂盒(货号：G2043-50T)、增强型化学发光(ECL)液(货号：G2161-200ML)、RNA提取液(货号：G3013)、cDNA合成试剂盒(货号：G3337)，武汉赛维尔生物科技有限公司；SDF-1 α 一抗(货号：ab155090)，英国Abcam公司；CXCR4(货号：11073-2-AP)、肾小球足细胞裂孔隔膜蛋白(Nephrin，货号：22912-1-AP)一抗，武汉三鹰生物技术有限公司；HRP标记的山羊抗兔二抗(货号：GB23303)、RIPA裂解液(货号：G2002-100ML)、PVDF膜(货号：G6015-0.45)、BCA蛋白定量检测试剂盒(货号：G2026-200T)、丙二醛(MDA)ELISA检测试剂盒(货号：S0131S)，上海碧云天生物技术有限公司；大鼠超氧化物歧化酶(SOD)ELISA检测试剂盒(货号：CB10258-Ra)，上海科艾博生物技术有限公司。

台式高速冷冻离心机(型号：D3024R)，大龙兴创实验仪器(北京)有限公司；酶标仪(型号：RT-6100)，深圳雷杜生命科学股份有限公司；全自动生化检测仪(型号：AU5800)，美国Beckman Coulter公司；蛋白免疫印迹分析软件(版本：AI-WBwell™)、微孔板离心机(型号：SMP-2)，武汉赛维尔生物科技有限公司；荧光定量PCR仪(型号：CFX Connect)，美国Bio-Rad公司。

1.4 动物分组与造模

42只大鼠适应性喂养1周后，按照体质量编号，采用随机数字表法分为空白组(6只)和造模组(36只)。造模组大鼠采用单次尾静脉注射羊抗大鼠Fx1A血清(6 ml/kg)建立MN模型^[9]，2周后以大鼠24 h尿蛋白定量(24 h-UTP) > 10 mg/24 h为造模成功^[10]。将造模成功的36只大鼠再次按照随机数字表法分为模型组、贝那普利组、益气养阴活血方中剂量组、益气养阴活血方高剂量组，每组9只。

1.5 给药方法

根据成人(按60 kg体质量计)临床等效剂

量^[11]，按体表面积折算为大鼠等效剂量，确定益气养阴活血方中、高剂量分别为 11.0、22.0 g·kg⁻¹·d⁻¹，贝那普利剂量为 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹。各组给药体积均为 10 ml/kg，空白组与模型组均予等体积的生理盐水。给药前根据大鼠每周体质量调整给药量，每日上午灌胃 1 次，连续 6 周。灌胃过程中益气养阴活血方高剂量组大鼠死亡 2 只。

1.6 标本采集及处理

1) 完成末次灌胃操作后，将大鼠转移至代谢笼内，维持 24 h 禁食但正常饮水状态，期间收集 24 h 尿液，标本经离心（室温，3000 r/min，离心半径 10 cm）15 min 后取上清液分装，于 -20 ℃ 冰箱中冻存备用；2) 收集大鼠 24 h 尿液标本后，采用 3% 戊巴比妥钠溶液按 0.1~0.2 ml/100 g 腹腔注射麻醉，经腹主动脉抽取 5~10 ml 全血，离心（4 ℃、3000 r/min、离心半径 10 cm）15 min，分离得到血清，分装后置于 -20 ℃ 冰箱中保存；3) 采血后立即取双侧肾脏，置于冰生理盐水环境中，右肾沿肾门冠状面切取 1 cm³ 组织块，使用 4% 多聚甲醛溶液常温固定保存，其余组织样本则冷冻保存于 -80 ℃ 冰箱中，用于后续的 Western Blot 及实时荧光定量 PCR 实验。

1.7 观察指标及检测方法

1.7.1 大鼠一般状态 实验期间，每日于 8:00—10:00 观察并记录大鼠的精神状态、自主活动、皮毛光泽、眼睑和四肢水肿以及尿液静置后泡沫丰富程度。尿液静置后泡沫丰富程度观察方法为：收集并静置 5 min 大鼠尿液，在白色背景下观察液面泡沫覆盖比例及消散速度，按无泡沫、少量泡沫（泡沫覆盖 < 1/3 液面，消散较快）、大量细密泡沫（泡沫覆盖 > 1/3 液面，久置不散）进行记录。

1.7.2 全自动生化分析仪检测 24 h-UTP 及血清生化指标水平 取上述处理后的尿液上清及血清样本，采用全自动生化分析仪检测 24 h-UTP 及血清白蛋白（ALB）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、尿素氮（BUN）、血肌酐（SCr）、总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）水平。所有操作严格按照仪器及配套试剂说明书进行。

1.7.3 HE 染色及 PASM 染色法观察大鼠肾组织病理变化 将固定的肾组织经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后，切成 3~4 μm 厚的切片，进行 HE 染色及 PASM 染色，通过光学显微镜观察肾脏组织病理变化。

1.7.4 ELISA 法检测肾组织 SOD、MDA 水平 每

组采用随机数字表法选取 3 只大鼠肾组织约 100 mg，按 1:9 加入预冷生理盐水，匀浆，离心取上清。按 ELISA 试剂盒说明书操作，测定各孔吸光度值，根据标准曲线计算肾组织 MDA、SOD 含量。

1.7.5 Western Blot 法检测肾组织 NOX4、SDF-1α、CXCR4、Nrf2、NF-κB p65、Nephrin 蛋白水平 每组采用随机数字表法选取 3 只大鼠肾组织约 50 mg，加入 RIPA 裂解液，确保细胞完全裂解后离心（4 ℃、12 000 r/min、离心半径 10 cm）10 min，收集上清，用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。金属浴 95 ℃ 变性 10 min，经 SDS-PAGE 蛋白电泳后进行 PVDV 膜恒流，300 mA 转膜 30 min，加入 5 ml 5% 脱脂牛奶脱色后室温封闭 30 min，加入 1:1000 稀释后的对应一抗，4 ℃ 孵育摇床过夜，回收一抗并用 TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，加入二抗（1:3000）室温孵育 30 min 并加入 TBST 洗脱 3 次，ECL 化学发光显影，应用蛋白免疫印迹分析软件进行条带灰度分析，以 β-肌动蛋白（β-actin）为内参，计算目的蛋白相对表达量，目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值 ÷ β-actin 条带灰度值。

1.7.6 实时荧光定量 PCR 法检测肾组织 NOX4、SDF-1α、CXCR4、Nrf2、NF-κB p65、Nephrin mRNA 表达 每组采用随机数字表法选取 3 只大鼠肾组织 10 mg，加入 1 ml RNA 提取液充分研磨，离心（4 ℃、12 000 r/min、离心半径 10 cm）10 min 后取上清，沉淀 RNA，再次离心后弃上清，经 75% 乙醇洗涤、干燥后加入 15 μl RNA 溶解液溶解 RNA。经反转录合成 cDNA，以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件：90 ℃ 预变性 30 s，95 ℃ 变性 15 s，60 ℃ 退火/延伸 30 s，共 40 个循环；65 ℃ → 95 ℃ 每升温 0.5 ℃ 采集一次荧光信号。采用 2^{-ΔΔCT} 法计算 mRNA 相对表达量。引物序列由武汉赛维尔生物科技有限公司合成，见表 1。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布，用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，若方差齐，采用 SNK-*q* 检验进行两两比较；若方差不齐，则采用 Dunnett's *T*₃ 检验进行两两比较。以 *P* < 0.01 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态比较

造模期间，与空白组比较，模型组大鼠逐渐出

表 1 大鼠肾组织 *NOX4*、*SDFκ1α*、*CXCR4*、*Nrf2*、*NF-κB p65*、*Nephrin* mRNA 引物序列

Table 1 Primer Sequences for *NOX4*, *SDF-1α*, *CXCR4*, *Nrf2*, *NF-κB p65*, and *Nephrin* mRNA in rat renal tissues

引物名称	引物序列	产物长度/bp
<i>NOX4</i>	上游: ATGTGTCCTACTGAAACCAAAGC	223
	下游: CTCCAGCCACACACAGACTAAC	
<i>SDF-1α</i>	上游: AGTGACGGTAAGCCAGTCAGC	115
	下游: GGGCACAGTTTGGAGTGTGAG	
<i>CXCR4</i>	上游: GTGGGCAATGGGTTGTAAT	262
	下游: CGTGGACAATGGCAAGGTAG	
<i>Nrf2</i>	上游: AATTGCCACCGCCAGGACT	100
	下游: TCAAACACTTCTCGACTTACCCC	
<i>NF-κB p65</i>	上游: AACGCAAAAGGACCTACGAGA	156
	下游: TTGAAAAGGCATAGGGCTGG	
<i>Nephrin</i>	上游: CAGAGTGCATCCCAGACCA	106
	下游: AGGATACAGCACATTGAAGCGG	
<i>GAPDH</i>	上游: CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游: GGTGGAAGAATGGGACTTGCT	

注: *NOX4*, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4; *SDF-1α*, 基质细胞衍生因子-1α; *CXCR4*, CXCR4 趋化因子受体 4; *Nrf2*, 核转录因子 E2 相关因子 2; *NF-κB p65*, 核因子 κB p65 亚基; *Nephrin*, 肾小球足细胞裂孔隔膜蛋白; *GAPDH*, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

现精神萎靡、自主活动减少、毛发枯槁、眼睑及足爪明显水肿、尿液静置后可见大量细密泡沫等典型 MN 表现。干预期间, 与模型组比较, 各给药组大鼠上述异常状态均有不同程度改善。贝那普利组大鼠精神及活动状态明显好转, 水肿减轻, 尿液泡沫减少; 益气养阴活血方中剂量组大鼠精神状态、活动及皮毛光泽度改善, 水肿及尿液泡沫减少, 但改善程度略逊于贝那普利组; 益气养阴活血方高剂量组大鼠精神、活动、皮毛状态及水肿改善程度与贝那普利组相近, 尿液泡沫明显减少, 整体状况优于益气养阴活血方中剂量组。

2.2 各组大鼠 24 h-UTP 比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组大鼠 24 h-UTP 升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 贝那普利组及益气养阴活血方中、高剂量组 24 h-UTP 降低 ($P<0.01$)。贝那普利组、益气养阴活血方高剂量组 24 h-UTP 低于益气养阴活血方中剂量组 ($P<0.01$), 益气养阴活血方高剂量组与贝那普利组比较差异无统计学意义 ($P>0.01$)。

表 2 各组大鼠 24 h-UTP 比较

Table 2 Comparison of 24-hour UTP levels in each group of rats (mg/24 h, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	24 h-UTP
空白组	6	6.39±0.63
模型组	9	49.82±6.55 ^{a)}
贝那普利组	9	17.03±3.72 ^{b) c)}
益气养阴活血方中剂量组	9	25.98±6.92 ^{b)}
益气养阴活血方高剂量组	7	19.32±2.67 ^{b) c)}

注: 24 h-UTP, 24 小时尿蛋白定量。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与益气养阴活血方中剂量组比较, $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠血清生化指标水平比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组大鼠 BUN、SCr、TC、TG 水平升高, ALB 水平降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 贝那普利组及益气养阴活血方中、高剂量组 BUN、SCr、TC、TG 水平降低, ALB 水平升高 ($P<0.01$)。各给药组以上指标水平比较差异无统计学意义 ($P>0.01$)。

2.4 各组大鼠肾组织病理形态比较

图 1 示, 空白组大鼠肾小球大小、细胞数量以及基质均匀, 肾小球囊基膜 (包括囊基膜、毛细血管基膜)、肾小管上皮基膜、肾小囊壁层上皮细胞形态规整, 肾小管上皮细胞圆润、饱满。与空白组比较, 模型组大鼠肾组织可见肾小球系膜区扩张、足细胞肿胀, 肾小囊壁层上皮细胞呈立方柱状增

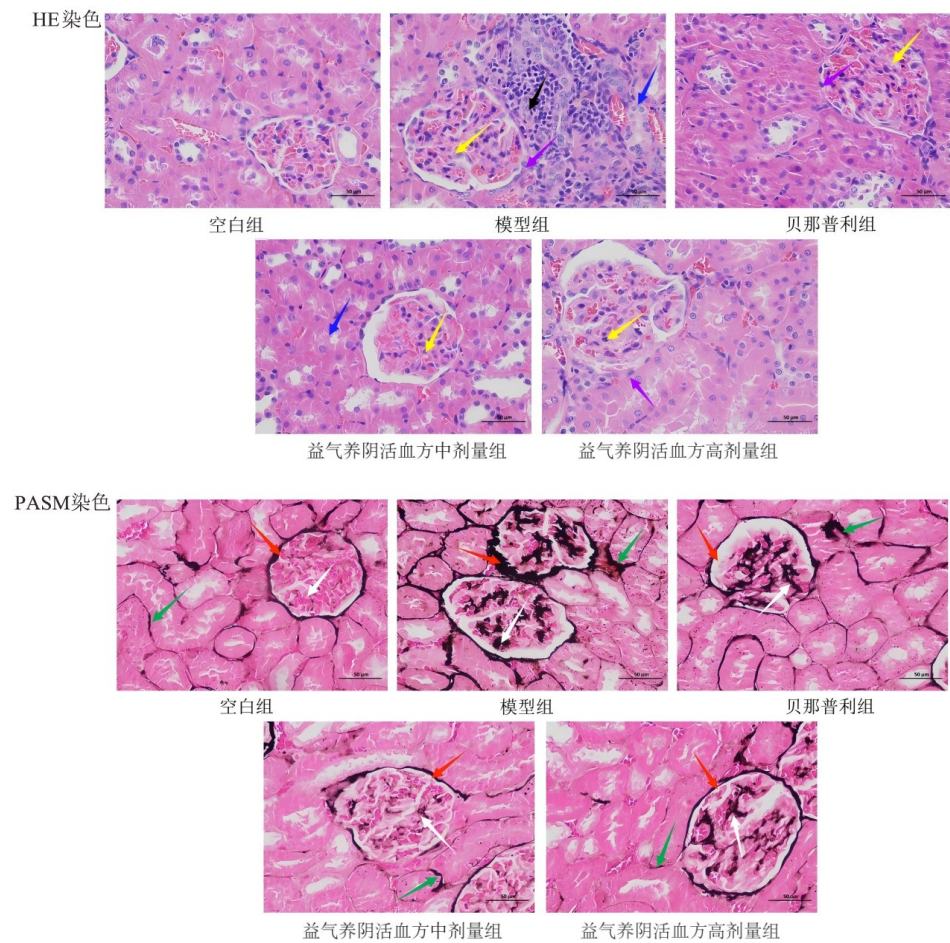
表 3 各组大鼠血清生化指标水平比较

Table 3 Comparison of serum biochemical index levels among groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	BUN/mmole·L ⁻¹	SCr/μmol·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	TC/mmole·L ⁻¹	TG/mmole·L ⁻¹
空白组	6	6.94±13.32	30.80±3.20	31.35±0.78	1.60±0.53	0.52±0.08
模型组	9	9.84±1.19 ^{a)}	47.57±4.53 ^{a)}	17.78±2.54 ^{a)}	4.44±0.54 ^{a)}	1.02±0.17 ^{a)}
贝那普利组	9	7.10±0.65 ^{b)}	33.20±5.18 ^{b)}	25.29±1.24 ^{b)}	2.07±0.45 ^{b)}	0.61±0.07 ^{b)}
益气养阴活血方中剂量组	9	8.53±1.08 ^{b)}	38.54±5.10 ^{b)}	22.48±2.35 ^{b)}	2.94±0.40 ^{b)}	0.73±0.12 ^{b)}
益气养阴活血方高剂量组	7	7.81±0.95 ^{b)}	35.33±3.91 ^{b)}	23.31±2.35 ^{b)}	2.22±0.68 ^{b)}	0.70±0.12 ^{b)}

注: BUN, 血尿素氮; SCr, 血肌酐; ALB, 白蛋白; TC, 总胆固醇; TG, 甘油三酯。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。



注：黄色箭头示肾小球系膜区扩张；黑色箭头示足细胞肿胀；蓝色箭头示肾小囊壁层上皮细胞增生；紫色箭头示肾小管上皮细胞空泡变性；红色箭头示肾小球囊基膜增厚；白色箭头示肾小球毛细血管基膜增厚；绿色箭头示肾小管上皮基膜增厚。

图 1 各组大鼠肾组织病理形态比较 (×400)

Figure 1 Comparison of pathological changes of kidneys in each group of rats (×400)

生，肾小管上皮细胞水肿、空泡变性，部分肾小管萎缩。与模型组比较，各给药组大鼠上述病理改变均有不同程度改善：肾小球基底膜增厚减轻，系膜区扩张程度减小，肾小囊壁层上皮细胞增生及肾小管上皮细胞水肿、空泡变性均明显减少，肾小管结构较完整。各给药组之间形态学变化差异不明显。

2.5 各组大鼠肾组织MDA、SOD水平比较

表4示，与空白组比较，模型组大鼠MDA水平升高，SOD水平降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，贝那普利组及益气养阴活血方中、高剂量组MDA水平降低，SOD水平升高 ($P<0.01$)。各给药组之间MDA、SOD水平比较差异无统计学意义 ($P>0.01$)。

2.6 各组大鼠肾组织NOX4、SDF-1α、CXCR4、Nrf2、NF-κB p65、Nephrin蛋白水平比较

表5示，与空白组比较，模型组大鼠肾组织NOX4、SDF-1α、CXCR4、NF-κB p65蛋白水平升

表 4 各组大鼠肾组织MDA、SOD水平比较

Table 4 Comparison of MDA and SOD levels in renal tissues of rats among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MDA/ nmol·mg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹
空白组	3	1.60±0.08	491.88±7.00
模型组	3	2.81±0.12 ^{a)}	293.64±14.87 ^{a)}
贝那普利组	3	2.02±0.05 ^{b)}	367.28±5.76 ^{b)}
益气养阴活血方中剂量组	3	2.01±1.11 ^{b)}	372.17±12.91 ^{b)}
益气养阴活血方高剂量组	3	1.96±0.14 ^{b)}	382.31±16.43 ^{b)}

注：MDA，丙二醛；SOD，超氧化物歧化酶。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

高，Nrf2、Nephrin蛋白水平降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，贝那普利组及益气养阴活血方中、高剂量组NOX4、SDF-1α、CXCR4、NF-κB p65蛋白水平降低，Nrf2、Nephrin蛋白水平升高 ($P<0.01$)；各给药组以上蛋白水平比较差异无统计学意义 ($P>$

表 5 各组大鼠肾组织 NOX4、SDF-1 α 、CXCR4、Nrf2、NF- κ B p65、Nephrin 蛋白水平比较
Table 5 Comparison of protein expression levels of NOX4, SDF-1 α , CXCR4, Nrf2, NF- κ B p65 and Nephrin
in renal tissues of rats among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NOX4	SDF-1 α	CXCR4	Nrf2	NF- κ B p65	Nephrin
空白组	3	0.08 $\pm$ 0.02	0.75 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.02	0.92 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.02	0.77 $\pm$ 0.02
模型组	3	0.34 $\pm$ 0.02 ^{a)}	1.68 $\pm$ 0.04 ^{a)}	1.26 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.26 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.95 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.31 $\pm$ 0.02 ^{a)}
贝那普利组	3	0.15 $\pm$ 0.01 ^{b)}	1.23 $\pm$ 0.38 ^{b)}	0.75 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.63 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.78 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.58 $\pm$ 0.03 ^{b)}
益气养阴活血方中剂量组	3	0.13 $\pm$ 0.02 ^{b)}	1.25 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.73 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.62 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.76 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.61 $\pm$ 0.02 ^{b)}
益气养阴活血方高剂量组	3	0.12 $\pm$ 0.09 ^{b)}	1.24 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.72 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.63 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.75 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.59 $\pm$ 0.03 ^{b)}

注：NOX4，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4；SDF-1 α ，基质细胞衍生因子-1 α ；CXCR4，CXC趋化因子受体4；Nrf2，核转录因子E2相关因子2；NF- κ B p65，核因子 κ B p65亚基；Nephrin，肾小球足细胞裂孔隔膜蛋白。

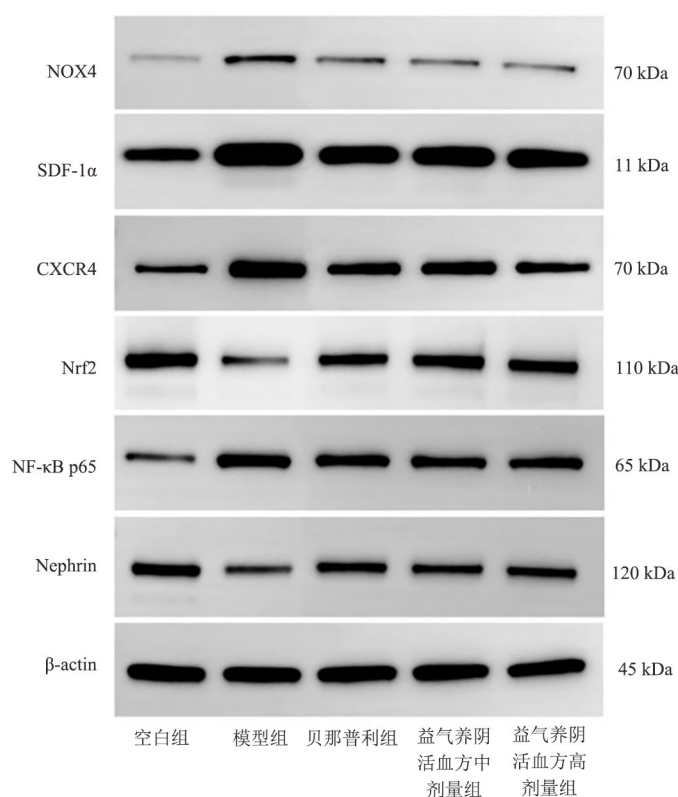
a) 与空白组比较， $P < 0.01$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.01$ 。

0.01)。各组大鼠肾组织 NOX4、SDF-1 α 、CXCR4、Nrf2、NF- κ B p65、Nephrin 蛋白电泳图见图 2。

2.7 各组大鼠肾组织 NOX4、SDF-1 α 、CXCR4、Nrf2、NF- κ B p65、Nephrin mRNA 表达比较

表 6 示，与空白组比较，模型组大鼠肾组织 NOX4、SDF-1 α 、CXCR4、NF- κ B p65 mRNA 表达

升高，Nrf2、Nephrin mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，贝那普利组及益气养阴活血方中、高剂量组 NOX4、SDF-1 α 、CXCR4、NF- κ B p65 mRNA 表达降低，Nrf2、Nephrin mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。各给药组以上 mRNA 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.01$)。



注：NOX4，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4；SDF-1 α ，基质细胞衍生因子-1 α ；CXCR4，CXC趋化因子受体4；Nrf2，核转录因子E2相关因子2；NF- κ B p65，核因子 κ B p65亚基；Nephrin，肾小球足细胞裂孔隔膜蛋白； β -actin， β -肌动蛋白。

图 2 各组大鼠肾组织 NOX4、SDF-1 α 、CXCR4、Nrf2、NF- κ B p65、Nephrin 蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoresis images of NOX4, SDF-1 α , CXCR4, Nrf2, NF- κ B p65, and Nephrin proteins in renal tissues of rats in each group

表6 各组大鼠肾组织 *NOX4*、*SDF-1α*、*CXCR4*、*NF-κB p65*、*Nrf2*、*Nephrin* mRNA 表达比较

Table 6 Comparison of the mRNA expression levels of *NOX4*, *SDF-1α*, *CXCR4*, *NF-κB p65*, *Nrf2* and *Nephrin* in renal tissues of rats among different groups

组别	鼠数	<i>NOX4</i>	<i>SDF-1α</i>	<i>CXCR4</i>	<i>Nrf2</i>	<i>NF-κB p65</i>	<i>Nephrin</i>
空白组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	2.43±0.02 ^{a)}	2.93±0.04 ^{a)}	3.11±0.07 ^{a)}	0.48±0.02 ^{a)}	3.56±0.05 ^{a)}	0.30±0.02 ^{a)}
贝那普利组	3	1.78±0.02 ^{b)}	1.57±0.03 ^{b)}	1.86±0.03 ^{b)}	0.71±0.02 ^{b)}	1.70±0.04 ^{b)}	0.57±0.03 ^{b)}
益气养阴活血方中剂量组	3	1.76±0.02 ^{b)}	1.56±0.03 ^{b)}	1.84±0.02 ^{b)}	0.72±0.02 ^{b)}	1.69±0.03 ^{b)}	0.59±0.05 ^{b)}
益气养阴活血方高剂量组	3	1.75±0.03 ^{b)}	1.55±0.03 ^{b)}	1.85±0.03 ^{b)}	0.71±0.02 ^{b)}	1.64±0.06 ^{b)}	0.58±0.23 ^{b)}

注：*NOX4*，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4；*SDF-1α*，基质细胞衍生因子-1α；*CXCR4*，CXC趋化因子受体4；*Nrf2*，核转录因子E2相关因子2；*NF-κB p65*，核因子κB p65亚基；*Nephrin*，肾小球足细胞裂孔隔膜蛋白。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

3 讨论

根据MN症状可将其归属于中医“水肿”“虚劳”等范畴。《诸病源候论》载：“水病者，由肾脾俱虚故也。”这句话指出脾肾两虚是水液代谢失常、溢于肌肤的关键病机。脾肾失调，则水液代谢失常，溢于肌肤，发为水肿。现代研究中，此类病理性改变常伴有蛋白尿的出现^[12]。此外，MN病程迁延，加之激素、抗生素等燥烈之品易耗气伤阴^[13]，或情志化火、久病致虚，逐渐形成气阴两虚为本、水湿瘀血为标的本虚标实之候。益气养阴活血方中黄芪与菟丝子共为君药，益气固表、补肾益精；积雪草与生地黄为臣，清热利湿、养阴凉血；熟大黄和水蛭为佐使，可破瘀祛邪。诸药合用，共奏补气滋阴、活血利水之效，针对MN气阴两虚、水湿瘀阻的核心病机，体现了扶正祛邪、标本兼治的配伍思想。本研究结果显示，与空白组比较，模型组大鼠24 h-UTP、BUN、SCr、TC、TG升高，ALB降低，且肾组织病理损伤严重，提示MN大鼠造模后出现肾损伤、血脂功能异常。与模型组比较，益气养阴活血方中、高剂量组大鼠24 h-UTP、BUN、SCr、TC、TG降低，ALB升高，肾脏病理状态明显改善，提示益气养阴活血方可降低MN大鼠尿蛋白水平、减少肾功能损伤、降低血脂水平、改善低蛋白血症。益气养阴活血方高剂量组和贝那普利组对降低大鼠24 h-UTP效果优于益气养阴活血方中剂量组，表明益气养阴活血方高剂量的效果与贝那普利相当，且优于中剂量。

本研究通过建立MN大鼠模型，从功能与结构两方面验证了益气养阴活血方的肾脏保护效应，并进一步从分子水平探讨了其潜在机制。结果表明，模型组大鼠肾组织NOX4水平升高。NOX4作为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）氧化

酶家族成员，可直接催化超氧阴离子和过氧化氢（H₂O₂），导致细胞内的活性氧（ROS）水平急剧上升，过量ROS积累不仅直接引起脂质、蛋白质和氧化损伤，还可进一步激活NOX4的下游SDF-1α/CXCR4通路^[14]。SDF-1α是一种由氧化应激诱导产生的致炎和促纤维化趋化因子，属于CXC趋化因子家族，主要通过G蛋白偶联受体CXCR4相结合，在肾内形成持续的促炎和促纤维化微环境^[15]。核因子κB（NF-κB）作为炎症反应的核心转录因子，NF-κB p65是其重要的亚基。本研究结果进一步显示，NOX4/ROS的异常升高构成了MN氧化应激—炎症恶性循环的起点。一方面，ROS直接并持续地激活NF-κB p65，引发经典炎症反应^[15]；另一方面，ROS诱导产生的趋化因子SDF-1α与其受体CXCR4结合，形成一条强大的“炎症放大轴”，该轴不仅能独立激活NF-κB，更能正反馈刺激ROS的进一步生成^[16]。与此同时，活化的NF-κB与持续的氧化应激共同压制了细胞自我保护的核心开关——Nrf2，导致其下游抗氧化酶（如SOD）的合成受阻^[17]。抗氧化防线崩溃后，脂质过氧化终产物MDA蓄积，后者又成为激活NF-κB的新刺激^[18]。由此，“NOX4/ROS/SDF-1α/CXCR4/NF-κB”炎症通路“与Nrf2受抑-抗氧化防御失能”通路相互交织、彼此强化，构成了一个推动MN持续进展的恶性循环网络。这一网络的最终作用点聚焦于足细胞^[19]。Nephrin是足细胞裂孔隔膜上最关键的结构性蛋白，是足细胞上直接决定蛋白尿产生与否的最上游分子之一，对维持肾小球滤过屏障的完整性具有决定性作用，其表达下降或功能异常是导致蛋白尿和MN进展的核心分子事件^[18]，而NOX4/ROS能导致Nephrin蛋白硝基化、磷酸化异常，使其从细胞膜上脱落，破坏裂孔隔膜^[20]。本研究结果表明，益

气养阴活血方对这一复杂网络展现了多靶点、系统性的调控作用。不仅能从源头上抑制 NOX4 的表达,减少 ROS,还能下调 SDF-1 α /CXCR4,切断炎症放大轴;同时,能够解除对 Nrf2 的抑制,重启机体的抗氧化防御程序(表现为 SOD 升高、MDA 降低)。通过这种协同干预,有效打破上述恶性循环,最终抑制了 Nephron 的表达下调,实现了对足细胞和肾小球滤过屏障的结构与功能保护。

综上,益气养阴活血方不仅通过 NOX4 介导的 SDF-1 α /CXCR4 信号通路减轻氧化应激,还可能通过抑制 NF- κ B 介导的炎症反应,保护足细胞裂孔隔膜关键蛋白 Nephron,多靶点、多通路协同发挥肾保护作用,为其临床应用于 MN 的治疗提供了实验依据。

参考文献

- [1] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerular Diseases Work Group. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases[J]. *Kidney Int*, 2021, 100(4S): S1-S276.
- [2] Wang H C, Yang X B. Progress in integrative traditional Chinese and western medicine treatment of idiopathic membranous nephropathy [J]. *J Contemp Med Pract*, 2025, 7(12): 56-61.
- [3] 伍敏,魏青,刘必成. 原发性膜性肾病诊断及治疗新进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2023, 43(3): 183-187.
- [4] Ding H, Tang C F, Wang W, et al. Polydatin ameliorates high fructose-induced podocyte oxidative stress via suppressing HIF-1 α /NOX4 pathway[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(10): 2202.
- [5] 杨丽虹,苏佩玲,包崑. 特发性膜性肾病中医临床实践指南(2021)[J]. *中国全科医学*, 2023, 26(6): 647-659.
- [6] 宋丹丹,宋纯东. 益气养阴活血方联合激素、环磷酰胺治疗成人原发性膜性肾病 20 例[J]. *中医临床研究*, 2013, 5(1): 18-19.
- [7] 宋珂,宋纯东,段凤阳,等. 益气养阴活血方调控 Nrf2/NLRP3 信号通路对糖尿病肾病大鼠的肾脏保护作用研究[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(2): 117-121.
- [8] 刘慧丹,宋丹,宋纯东,等. 益气养阴活血方对 IgA 肾病小鼠结肠病理及免疫的影响[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(4): 769-774.
- [9] Deng Y Y, Zhong Y F, Cai X F. Establishment and study of passive heyman nephritis model [J]. *J Integr Nephrol Androl*, 2015, 2(1): 35.
- [10] Rahman M A, Liu C N, Dunn M J, et al. Complement and leukocyte independent proteinuria and eicosanoid synthesis in rat membranous nephropathy [J]. *Lab Invest*, 1988, 59(4): 477-483.
- [11] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [12] 陈思,潘赢,陆益霏,等. 补体 C3 与原发性膜性肾病患者尿蛋白水平及蛋白尿缓解情况的相关性[J]. *中华肾脏病杂志*, 2024, 40(9): 705-715.
- [13] 马玮玮,李彤彤,熊勇,等. 从“阴火”理论探讨糖皮质激素性骨质疏松症病机[J]. *安徽中医药大学学报*, 2023, 42(6): 1-4.
- [14] Takac I, Schröder K, Zhang L L, et al. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 13304-13313.
- [15] Mo H Y, Wu Q Y, Miao J H, et al. C-X-C chemokine receptor type 4 plays a crucial role in mediating oxidative stress-induced podocyte injury [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(6): 345-362.
- [16] Teicher B A, Fricker S P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(11): 2927-2931.
- [17] Wu S J, Liao X Y, Zhu Z J, et al. Antioxidant and anti-inflammation effects of dietary phytochemicals: the Nrf2/NF- κ B signalling pathway and upstream factors of Nrf2 [J]. *Phytochemistry*, 2022, 204: 113429. DOI: 10.1016/j.phytochem. 2022. 113429.
- [18] Williamson C R, Pantic V U, Wang A Y, et al. Revisiting nephrin signaling and its specialized effects on the uniquely adaptable podocyte [J]. *Biochem J*, 2025, 482(11): 763-788.
- [19] 李鑫,雷根平,冯喆,等. 基于足细胞损伤探讨中医药干预膜性肾病研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(12): 257-264.
- [20] Zhao S, Gu X, Groome L J, et al. Decreased nephrin and GLEPP-1, but increased VEGF, flt-1, and nitrotyrosine, expressions in kidney tissue sections from women with preeclampsia [J]. *Reprod Sci*, 2009, 16(10): 970-979.

Effect of *Yiqi Yangyin Huoxue Formula* (益气养阴活血方) on Oxidative Stress and Inflammatory Injury in Membranous Nephropathy Model Rats: Based on the NOX4-mediated SDF-1 α /CXCR4 Signaling Pathway

GUO Xiaoxiao^{1,2}, SONG Chundong^{1,2}, ZHANG Hanhan^{1,2}, SONG Ke^{1,2}, CHEN Chenchen^{1,2}, JIANG Haoran^{1,2}, DING Ying^{1,2}

1. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450003; 2. College of Pediatrics, Henan University of Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To investigate the potential mechanism of *Yiqi Yangyin Huoxue Formula* (益气养阴活血方, YYHF) in the treatment of membranous nephropathy (MN) based on the NOX4-mediated stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)/CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) signaling pathway. **Methods** A total of 42 male SD rats were randomly divided into blank group (n=6) and modeling group (n=36). The modeling rats were given a single injection of sheep antirat Fx1A (6 ml/kg) serum into the tail vein to establish MN model. Thirty-six rats with successful modeling were further divided into model group (normal saline, 10 ml/kg), benazepril group (10 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹), the medium-dose YYHF group (11.0 g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹) and high-dose YYHF group (22.0 g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹), with 9 rats in each group. All groups received daily intragastric administration for 6 consecutive weeks. During the experimental period, the general condition of rats in each group was observed. After gavage administration finished, a fully automated biochemical analyzer was used to measure the 24-hour urine total protein (24 h-UTP) and serum biochemical parameters, including albumin (ALB), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), total cholesterol (TC), and triglyceride (TG). Hematoxylin-eosin (HE) staining and periodic acid-silver methemamine (PASM) staining were used to observe the histopathological changes of renal tissues in each group of rats. The levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in renal tissues were detected by ELISA. The protein expression levels of NOX4, SDF-1 α , CXCR4, Nrf2, nuclear factor kappa B subunit p65 (NF- κ B p65) and podocyte slit diaphragm protein nephrin in rat renal tissues were detected by Western Blotting. The mRNA expressions of *NOX4*, *SDF-1 α* , *CXCR4*, *Nrf2*, *NF- κ B p65* and *Nephrin* in renal tissues were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared to the blank group, rats in the model group exhibited typical features of MN, including lethargy, reduced activity, dull and coarse fur, marked edema, and massive proteinuria. Compared to the model group, these abnormal conditions were improved to varying degrees in all treatment groups. The high-dose YYHF group showed a level of improvement comparable to that of the benazepril group, with overall recovery superior to that of the medium-dose YYHF group. Compared to the blank group, the model group showed increased levels of 24 h-UTP, BUN, SCr, TC and TG, decreased level of ALB, increased levels of MDA and protein and mRNA expressions of *NOX4*, *SDF-1 α* , *CXCR4* and *NF- κ B p65* in renal tissue, along with decreased levels of SOD and protein and mRNA expressions of *Nrf2*, *Nephrin* ($P<0.01$), accompanied by severe renal pathological damage. Compared to the model group, the benazepril and the medium- and high-dose YYHF groups showed significant improvements in the above indicators ($P<0.01$), along with alleviation of renal pathological injury. The 24 h-UTP level in the high-dose YYHF group was lower than that in the medium-dose group ($P<0.01$), while no statistically significant difference was observed among the other treatment groups ($P>0.01$). **Conclusion** YYHF may alleviate oxidative stress and inflammatory responses by down-regulating the expression of NOX4 and inhibiting the SDF-1 α /CXCR4-Nrf2 signaling pathway, thereby improving podocyte damage and protecting renal function.

Keywords membranous nephropathy; oxidative stress; inflammation; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4; Stromal cell-derived factor-1 α ; CXC chemokine receptor type 4; podocytes; *Yiqi Yangyin Huoxue Formula* (益气养阴活血方)

(收稿日期: 2025-12-18; 录用日期: 2026-02-08; 修回日期: 2026-03-03)

[编辑: 贾维娜]