

水蛭素对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其分子机制

何怡芊, 谢 骏, 赵炳佳, 梁晓春, 屈 岭

中国医学科学院北京协和医院中医科, 北京 100730

通信作者: 梁晓春, E-mail: Xiaochun_Liang@yeah.net

屈 岭, E-mail: quling@pumch.cn

【摘要】目的 探究水蛭素对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其分子机制。**方法** 18 只 SD 大鼠随机分为对照组 ($n=5$) 和造模组 ($n=13$)。造模组予以腹腔注射链脲佐菌素制备糖尿病大鼠模型。8 周后, 取造模成功的糖尿病大鼠 ($n=11$) 随机分为糖尿病模型组 ($n=6$, 后因血糖过高死亡 1 只) 和水蛭素组 ($n=5$)。水蛭素组皮下注射水蛭素 5 U/只, 连续 6 周; 对照组和糖尿病模型组皮下注射等体积磷酸盐缓冲液。实验期间每 2 周记录 1 次大鼠的随机血糖和体质量。给药 6 周后, 测定 3 组大鼠肾功能指标, 肾脏组织肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6)、纤连蛋白 (fibronectin, FN)、nephlin、IV 型胶原纤维 (collagen type IV, COL-IV) 及酪氨酸激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)/信号转导与转录激活因子 3 (signal transduction and transcriptional activator 3, STAT3) 信号通路相关蛋白表达水平, 并观察肾脏病理改变。**结果** 与对照组比较, 糖尿病模型组实验期间随机血糖及给药 6 周内肾功能指标均升高 (P 均 <0.05), 体质量明显降低 (P 均 <0.05), 且肾脏出现病理损伤。与糖尿病模型组比较, 水蛭素组肾功能指标降低 ($P<0.05$), 肾脏病理损伤减轻。与对照组比较, 糖尿病模型组肾脏组织 FN、COL-IV、TNF- α 、TGF- $\beta 1$ 、IL-6、p-JAK2、p-STAT3 表达水平均明显升高 (P 均 <0.05), nephlin 表达水平降低 ($P<0.05$)。与糖尿病模型组比较, 水蛭素组肾脏组织 FN、COL-IV、TNF- α 、TGF- $\beta 1$ 、IL-6、p-JAK2、p-STAT3 表达水平均降低 (P 均 <0.05), nephlin 表达水平升高 ($P<0.05$)。**结论** 水蛭素可减轻糖尿病大鼠肾脏病理损伤, 其作用机制可能与降低纤维化相关因子水平、抑制 JAK2/STAT3 通路活化相关。

【关键词】 糖尿病; 肾损害; 水蛭素; 纤维化; 酪氨酸激酶 2; 信号转导与转录激活因子 3

【中图分类号】 R25; R736 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-9081(2024)06-1372-10

DOI: 10.12290/xhyxzz.2024-0366

Protective Effect and Molecular Mechanism of Hirudin on Kidney of Diabetic Rats

HE Yiqian, XIE Jun, ZHAO Bingjia, LIANG Xiaochun, QU Ling

Department of Traditional Chinese Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Corresponding authors: LIANG Xiaochun, E-mail: Xiaochun_Liang@yeah.net

QU Ling, E-mail: quling@pumch.cn

【Abstract】Objective To investigate the protective effect of hirudin on kidneys of diabetic rats and its molecular mechanism. **Methods** Eighteen Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group ($n=5$) and model group ($n=13$). The model group was injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ) to establish a diabetic rat model. Eight weeks after STZ injection, successfully modeled diabetic rats were randomly divided into diabetic model group ($n=6$, with 1 rat dead due to hyperglycemia) and hirudin treatment group ($n=5$). The hirudin treatment group was administered 5 U hirudin while the control group and diabetic model group were injected subcutaneously with equal volume of phosphate buffered saline once daily for six weeks. During the

基金项目: 国家自然科学基金 (82104669)

引用本文: 何怡芊, 谢骏, 赵炳佳, 等. 水蛭素对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其分子机制 [J]. 协和医学杂志, 2024, 15 (6): 1372-1381. doi: 10.12290/xhyxzz.2024-0366.

experiment, the rats' body weight and random blood glucose levels were monitored every two weeks. After 6 weeks of treatment, renal function parameters were measured, and the levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), interleukin 6 (IL-6), fibronectin (FN), nephrin, collagen-IV (COL-IV), and proteins related to the Janus kinase 2 (JAK2) /signal transduction and transcriptional activator 3 (STAT3) signaling pathway were assessed. Renal histopathological changes were also observed. **Results** Compared with the control group, the diabetic model group showed significantly elevated random blood glucose and renal function parameters during the 6-week treatment (both $P < 0.05$), along with a significant decrease in body weight ($P < 0.05$) and renal pathological damage. Compared with the diabetic model group, the renal function parameters of hirudin treatment group were significantly decreased ($P < 0.05$), the renal pathological damage was ameliorated. Compared with the control group, the expression levels of FN, COL-IV, TNF- α , TGF- β 1, IL-6, p-JAK2, and p-STAT3 in the kidneys of diabetic model group were significantly increased (all $P < 0.05$), while the expression of nephrin was reduced ($P < 0.05$). Compared with the diabetic group, the expression level of FN, COL-IV, TNF- α , TGF- β 1, IL-6, p-JAK2, and p-STAT3 in hirudin treatment group were significantly reduced (all $P < 0.05$), while the nephrin expression increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Hirudin improved renal pathological changes in diabetic rats, and its mechanism may be related to the decrease of fibrosis-related factors and inhibition of the activation of the JAK2/STAT3 pathway.

[Key words] diabetes mellitus; kidney injury; hirudin; fibrosis; Janus kinase 2; signal transduction and transcriptional activator 3

Funding: National Natural Science Foundation of China (82104669)

Med J PUMCH, 2024,15(6):1372-1381

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见的微血管并发症之一,也是导致终末期肾脏疾病的主要原因之一,在糖尿病患者中的发生率高达 30%~40%^[1-2],临床表现为蛋白尿、肌酐清除率下降等,严重影响生活质量^[3]。DN 病理变化包括肾小球基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) 增厚、系膜增生、足细胞损伤和丢失等^[4-5]。随着病情进展,炎症损伤和血液循环紊乱等因素将加剧肾组织内胶原纤维沉积和系膜细胞增生,最终导致肾小球硬化和肾功能完全丧失^[6]。

酪氨酸激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) /信号转导与转录激活因子 3 (signal transduction and transcriptional activator 3, STAT3) 信号通路在 DN 肾纤维化进程中发挥至关重要的作用^[7-8]。研究发现,活化的 JAK2 可磷酸化 STAT 蛋白并使其转移至细胞核,继而促进纤维化相关因子,如转化生长因子- β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 和Ⅳ型胶原纤维蛋白 (collagen-IV, COL-IV) 表达^[9-10];同时,由高血糖诱发的炎症因子如白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 也可促进 STAT3 蛋白^[11-12]活化,并上调 IL-6 表达,进一步增强 STAT3 信号通路,最终导致炎症反应级联放大和肾脏纤维化^[13]。

水蛭素是从水蛭及其唾液腺中提取的一种活性多

肽,具有抗凝、抗血栓和抗纤维化的功效^[14]。本课题组前期研究发现,水蛭素对高糖培养的原代大鼠雪旺细胞和背根神经元具有保护作用^[15-17]。近年来研究表明,水蛭素可通过减轻足细胞损伤、下调肾脏炎症对糖尿病大鼠和小鼠肾脏起到保护效应^[18-20],但具体作用机制尚需阐明。本研究旨在探索水蛭素对链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病大鼠肾脏的保护作用,并分析其对 JAK2/STAT3 通路相关蛋白和纤维化相关细胞因子表达水平的影响,以期对 DN 药物研发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

18 只 6 周龄健康雄性 SD 大鼠购自斯贝福生物技术有限公司,体质量为 200~220 g,动物实验许可证号为 SCXK (京) 2019-0004。本研究已通过北京协和医院动物实验伦理委员会批准 (审批号: XHDW-2024-41)。

1.1.2 主要试剂与仪器

水蛭素、STZ (美国 Sigma-Aldrich 公司),肌酐、尿素氮、尿蛋白定量测试盒 (南京建成生物工程研究所有限公司),FN、COL-IV 抗体 (武汉三鹰生物技术有限

公司), IL-6、TNF- α 、TGF- β 1 抗体 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司), JAK2、磷酸化 STAT3 (phosphorylated STAT3, p-STAT3) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司), nephrin、STAT3、磷酸化 JAK2 (phosphorylated JAK2, p-JAK2)、 β -actin 抗体 (武汉爱博泰克生物科技有限公司), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (二抗)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (二抗) (北京中杉金桥生物技术有限公司); Synergy H1 多功能酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司), 罗氏血糖仪 (德国 Roche 公司), AI680 多功能成像仪 (美国 GE Health Care 公司), Panoramic 250 flash III 数字切片扫描仪 (匈牙利 3DHISTECH 公司), 蛋白电泳转印系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 造模与分组

大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为对照组 5 只和造模组 13 只。禁食 12 h 后, 造模组大鼠腹腔注射 0.45% STZ [柠檬酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH = 4.5) 配置而成] 60 mg/kg 制备糖尿病模型。对照组腹腔注射等量柠檬酸盐缓冲液。72 h 后, 检测大鼠尾静脉随机血糖, 11 只大鼠血糖 ≥ 16.7 mmol/L 视为造模成功, 2 只大鼠血糖 < 16.7 mmol/L 予以剔除。将 11 只造模成功的大鼠随机分为糖尿病模型组 6 只和水蛭素组 5 只。将造模成功时间设置为实验观察起点 (第 0 周)。根据既往文献, 造模 8 周后糖尿病大鼠可出现肾脏损伤^[21], 故本研究在造模第 8 周后开始给药。水蛭素组于颈后部皮下注射水蛭素 (由磷酸盐缓冲液配制而成) 5 U/只, 1 次/d, 连续 6 周; 对照组和糖尿病模型组皮下注射等体积磷酸盐缓冲液^[18]。

1.2.2 样本收集

实验期间, 每 2 周测定 1 次大鼠的体质量和尾静脉血随机血糖。给药 6 周后使用代谢笼收集每只大鼠的 24 h 尿液。异氟烷麻醉后腹主动脉采集大鼠全血及双侧肾脏。

1.2.3 生化指标检测

收集的血液及尿液样本分别在 4 $^{\circ}\text{C}$, 3000 rpm/min 和 4 $^{\circ}\text{C}$, 3500 rpm/min 的条件下离心 10 min。取上清液, 采用生化检测试剂盒按说明书指示检测大鼠血肌酐 (serum creatinine, SCr)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和 24 h 尿总蛋白。

1.2.4 组织病理学观察

取大鼠肾脏组织, 经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、连续切片, 采用 PAS 染色法和 MASSON 染色法观察肾脏组织病理结构变化。

1.2.5 肾脏组织 FN、nephrin 蛋白检测

采用免疫组化法检测大鼠肾脏组织 FN、nephrin 蛋白表达情况, 并采用 Image J 软件计算染色阳性面积比例。

1.2.6 血清和肾脏组织 TNF- α 、TGF- β 1 和 IL-6 检测

取肾脏组织, 制备提取液: 肾脏组织置于含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液中进行匀浆。收集裂解液于 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\times g$ 离心 20 min 取上清留存。采用 ELISA 法检测大鼠血清和肾脏组织提取液中 TNF- α 、TGF- β 1 和 IL-6 水平。

1.2.7 肾脏组织 COL-IV 及 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白检测

肾脏组织提取液制备方法同上, 随后在上清液中加入 loading buffer, 95 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 10 min。采用 Western blot 检测大鼠肾脏组织 COL-IV、p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白表达含量, 并采用 Image J 软件进行定量分析。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析。血糖、体质量、肾功能指标、纤维化相关因子等符合正态分布的计量资料, 以均数 \pm 标准误表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 检验。非正态分布的计量资料, 以中位数 (四分位数) 表示, 多组比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 组间两两比较采用 Dunn's 多重比较检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血糖和体质量变化

实验期间, 糖尿病模型组 (1 只大鼠因血糖过高而死亡) 和水蛭素组大鼠血糖维持于大于 16.7 mmol/L 的水平, 自第 2 周开始至第 14 周, 其随机血糖水平均显著高于对照组 (P 均 < 0.05)。与之类似, 自第 2 周开始至第 14 周, 糖尿病模型组和水蛭素组大鼠的体质量均显著低于对照组大鼠 (P 均 < 0.05)。与糖尿病模型组比较, 水蛭素组大鼠实验期间随机血糖、体质量均无显著差异 (P 均 > 0.05), 见图 1。

2.2 水蛭素对糖尿病大鼠肾功能的影响

给药 6 周后, 与对照组比较, 糖尿病模型组 SCr、BUN、24 h 尿总蛋白显著升高 (P 均 < 0.05); 水蛭素组大鼠 SCr、BUN、24 h 尿总蛋白均低于糖尿病模型组 (P 均 < 0.05), 但与对照组均无显著差异 (P 均 > 0.05), 见图 2。

2.3 水蛭素对糖尿病大鼠肾脏组织病理学形态的影响

给药 6 周后，与对照组比较，糖尿病模型组、水

蛭素组 GBM 增厚、系膜增生，肾小管变性和肾小管上皮细胞肿胀。与糖尿病模型组比较，水蛭素组上述病理表现均减轻，见图 3。

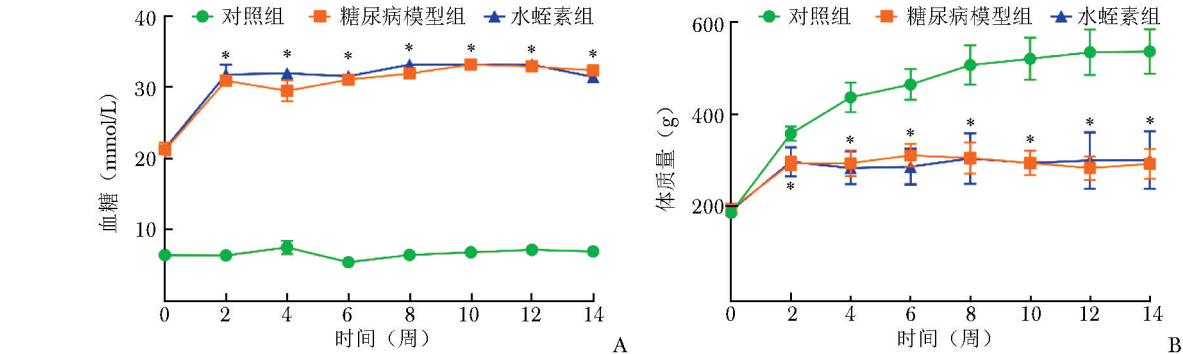


图 1 实验期间三组大鼠血糖 (A) 和体质量 (B) 变化
与对照组比较，* $P<0.05$

Fig. 1 Changes in blood glucose levels (A) and body weight (B) in the 3 groups during the experiment compared with the control group, * $P<0.05$

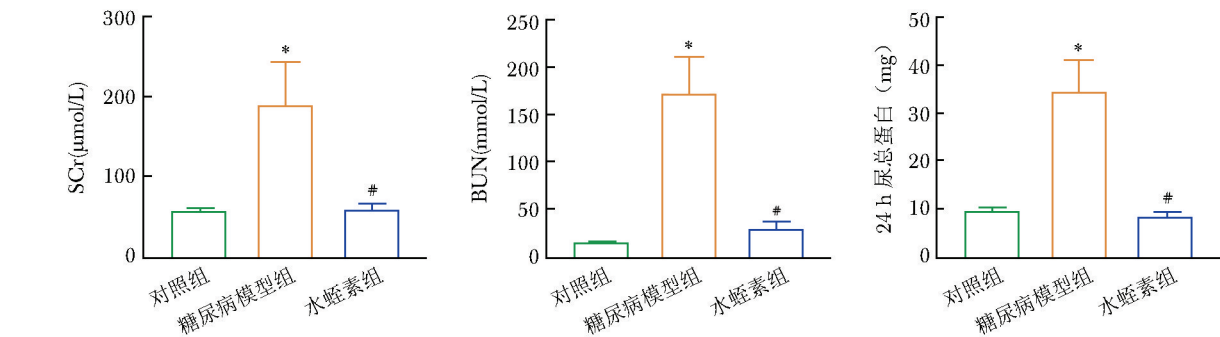


图 2 三组大鼠肾功能指标比较
与对照组比较，* $P<0.05$ ；与糖尿病模型组比较，# $P<0.05$

Fig. 2 Comparison of renal function indexes in 3 groups compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the diabetes model group, # $P<0.05$
SCr: (serum creatinine): 血肌酐; BUN (blood urea nitrogen): 血尿素氮

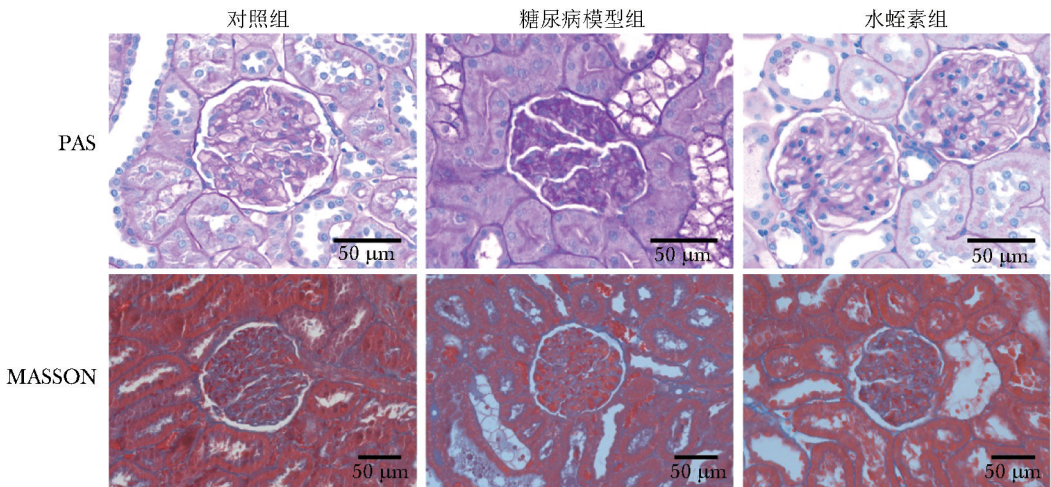


图 3 三组大鼠肾脏组织病理改变 ($\times 400$)
Fig. 3 Histopathological changes in the kidney of rats in 3 groups ($\times 400$)

2.4 水蛭素对糖尿病大鼠肾脏组织 COL-IV、FN、nephryn 表达的影响

给药 6 周后，与对照组比较，糖尿病模型组肾脏组织 COL-IV、FN 水平升高，nephryn 水平降低，差异均具有统计学意义 (P 均 <0.05)。与糖尿病模型组比

较，水蛭素组肾脏组织 COL-IV、FN 水平均降低，nephryn 水平升高，差异均具有统计学意义 (P 均 <0.05)。水蛭素组 nephryn 低于对照组，差异具有统计学意义 ($P<0.05$)，COL-IV、FN 水平高于对照组，差异无统计学意义 (P 均 >0.05)，见图 4。

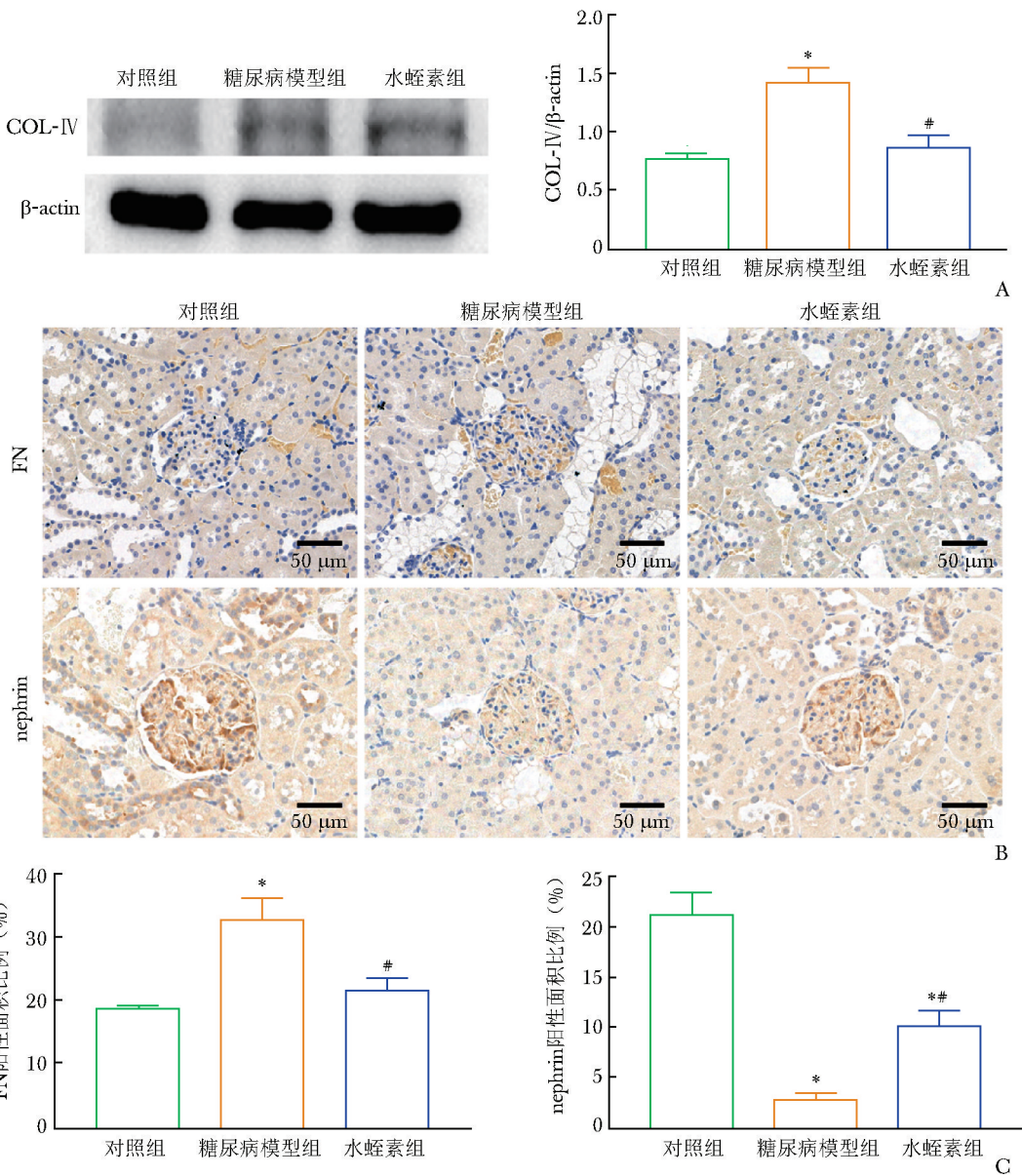


图 4 三组大鼠肾脏组织 COL-IV、FN、nephryn 表达水平比较
A. COL-IV 表达 Western blot 图和定量比较；B. FN 和 nephryn 表达免疫组化图 (×400)；C. FN 和 nephryn 免疫染色阳性面积比例的定量比较
与对照组比较， $^*P<0.05$ ；与糖尿病模型组比较， $^{\#}P<0.05$

Fig. 4 Comparison of the expression levels of COL-IV, FN and nephryn in the kidneys of rats in 3 groups
A. Western blot images and quantitative comparison of COL-IV expression; B. immunohistochemistry images of FN and nephryn expression (×400); C. quantitative comparison of the proportion of FN and nephryn immunostaining-positive areas compared with the control group, $^*P<0.05$; compared with the diabetes model group, $^{\#}P<0.05$
COL-IV (collagen-IV): IV 型胶原纤维; FN (fibronectin): 纤连蛋白

2.5 水蛭素对糖尿病大鼠血清和肾脏组织炎症因子表达的影响

给药 6 周后，与对照组比较，糖尿病模型组肾脏组织 IL-6 [(284.72 ± 12.27) pg/mg 比 (178.11 ± 33.34) pg/mg, $P = 0.024$]、TNF- α [(288.72 ± 27.78) pg/mg 比 (164.70 ± 2.37) pg/mg, $P = 0.009$] 和 TGF- β 1 [(288.27 ± 26.20) pg/mg 比 (116.61 ± 14.43) pg/mg, $P = 0.005$] 水平均显著升高。水蛭素组肾脏组织 IL-6 [(185.22 ± 0.91) pg/mg 比 (284.72 ± 12.27) pg/mg, $P = 0.032$]、TNF- α [(185.92 ± 18.30) pg/mg 比 (288.72 ± 27.78) pg/mg, $P = 0.022$] 和 TGF- β 1 [(159.89 ± 28.02) pg/mg 比 (288.27 ± 26.20) pg/mg, $P = 0.020$] 水平均低于糖尿病模型组，与对照组比较均无显著差异 (P 均 > 0.05)。血清 TNF- α 和 IL-6 由于低于检测下限未能检出。与对照组比较，糖尿病模型组和水蛭素组血清 TGF- β 1 均升高 (P 均 < 0.05)；与糖尿病模型组比较，水蛭素组血清 TGF- β 1 降低 ($P < 0.05$)，见图 5。

2.6 水蛭素对 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响

给药 6 周后，与对照组比较，糖尿病模型组 p-JAK2、p-STAT3 水平显著升高 (P 均 < 0.05)，水蛭素组 p-JAK2、p-STAT3 水平无显著差异 (P 均 > 0.05)；与糖尿病模型组比较，水蛭素组 p-JAK2、p-STAT3 水平均降低 (P 均 < 0.05)。3 组 JAK2、STAT 水平均无显著差异 (P 均 > 0.05)，见图 6。

3 讨论

本研究结果显示，与糖尿病模型组比较，水蛭素组肾脏组织损伤减轻，COL-IV、FN、IL-6、TNF- α 、TGF- β 1、p-JAK2、p-STAT3 水平均降低，nephrin 水平升高，提示水蛭素对糖尿病大鼠肾脏组织具有保护作用，且机制可能与降低炎症因子水平、抑制 JAK2/STAT3 通路活化相关。

糖尿病是导致慢性肾病的主要原因之一，糖尿病

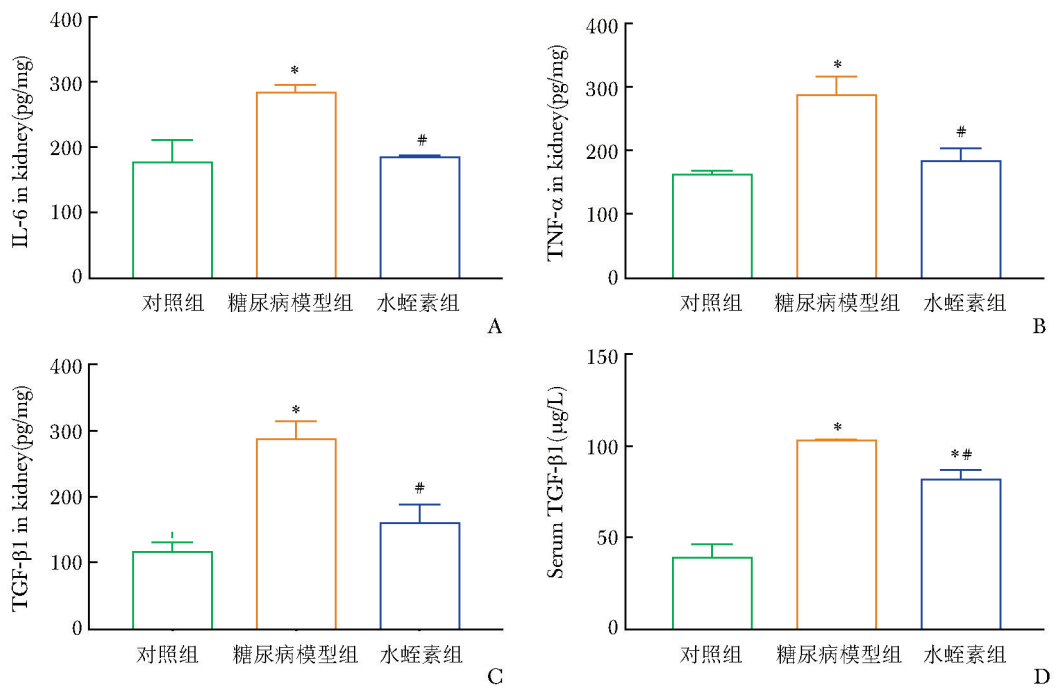


图 5 三组大鼠肾脏组织 IL-6 (A)、TNF- α (B) 和 TGF- β 1 (C) 和血清 TGF- β 1 (D) 表达水平比较
与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与糖尿病模型组比较，# $P < 0.05$

Fig. 5 Comparison of IL-6 (A), TNF- α (B) and TGF- β 1 (C) expression levels in kidneys and TGF- β 1 level in serum (D) of rats in 3 groups

compared with the control group, * $P < 0.05$; compared with the diabetes model group, # $P < 0.05$

IL-6 (interleukin 6): 白细胞介素-6; TGF- β 1 (transforming growth factor β 1): 转化生长因子- β 1; TNF- α (tumor necrosis factor α): 肿瘤坏死因子- α

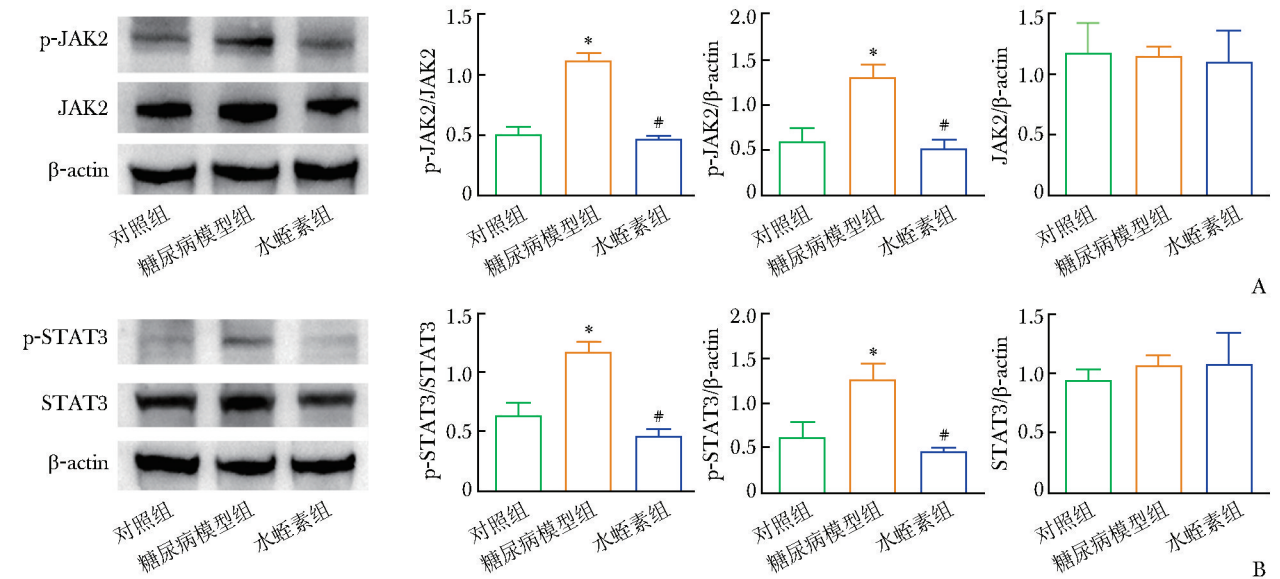


图 6 三组大鼠 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达水平比较
A. p-JAK2 和 JAK2 蛋白 Western blot 图及定量比较；B. p-STAT3 和 STAT3 Western blot 图及定量比较
与对照组比较，* $P<0.05$ ；与糖尿病模型组比较，# $P<0.05$

Fig. 6 Comparison of JAK2/STAT3 signaling pathway-related protein expression levels in 3 groups compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the diabetes model group, # $P<0.05$
JAK2 (Janus kinase 2): 酪氨酸激酶 2; STAT3 (signal transduction and transcriptional activator 3): 信号转导与转录激活因子 3

相关肾脏疾病比例已超过与肾小球肾炎相关的慢性肾脏病的比例^[22]，其进展为肾功能衰竭和死亡的风险较高，是导致患者透析或肾移植的主要原因，给患者及其家庭带来了沉重的经济负担^[2, 4]。因此，探索预防和治疗糖尿病相关肾脏疾病的药物具有重要意义。

水蛭素是一种高效的天然凝血酶特异性抑制剂，具有抗凝、促进微血管生成、抗纤维化、抗肿瘤、改善心脑血管疾病和糖尿病并发症等多种药理作用^[23]。本课题组前期研究发现，水蛭素可减轻高糖环境对雪旺细胞、背根神经节细胞及二者共培养体系造成的细胞损伤，增加髓鞘节段数目和长度^[15-17]，从体外模型的角度提示了水蛭素可能对糖尿病微血管并发症糖尿病周围神经损伤具有一定的保护作用。糖尿病肾损伤亦属于糖尿病微血管并发症，国内外研究表明，水蛭素可通过抑制肾脏炎症以减轻糖尿病肾损伤^[18-20]，但具体作用通路及相关机制尚待阐明。

本研究通过腹腔注射 0.45% STZ 的方式成功建立糖尿病大鼠模型，实验期间糖尿病模型组和水蛭素组大鼠随机血糖显著高于对照组，体质量显著低于对照组，亦提示大鼠具有糖尿病的典型症状。给药 6 周后，糖尿病模型组和水蛭素组肾脏均出现典型的病理变化，包括 GBM 增厚、系膜增生、肾小管变性和肾小管上皮细胞肿胀，且肾功能指标均升高，证实此两组糖尿病

大鼠具有肾脏损伤。与糖尿病模型组比较，水蛭素组肾脏病理改变减轻，肾功能指标明显降低，提示水蛭素可减轻糖尿病所致的肾脏损伤，发挥保护效应。

典型的 DN 病理变化以肾小球硬化为特征。肾脏纤维化包括两个阶段，纤维化形成期和瘢痕形成期^[24]。在第一阶段，成纤维细胞持续合成细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。随着疾病的进展，过量合成的 ECM 和胶原纤维在肾脏中沉积并形成永久性瘢痕，最终导致肾小球硬化^[25]。因此，在第一阶段进行干预对于 DN 的防治至关重要。由于 FN 和 COL-IV 是构成 ECM 的主要蛋白^[26]，降低二者水平有助于缓解 DN 大鼠肾小球硬化程度^[27-28]。足细胞裂孔膜结构蛋白 nephrin 是肾小球脏滤过屏障的重要蛋白成分，nephrin 表达减少将破坏 GBM 的完整性^[29]。本研究结果显示，与糖尿病模型组比较，水蛭素组肾脏组织 COL-IV、FN 水平均降低，nephrin 水平升高，提示水蛭素可能通过缓解糖尿病大鼠肾脏纤维化以保护肾功能。

为进一步探讨水蛭素对肾功能保护的具体机制，本研究首先检测了血清和肾脏组织中纤维化相关细胞因子 IL-6、TNF- α 和 TGF- β 1 变化情况^[30-31]。TGF- β 1 可通过 TGF- β /Smad 信号通路促进 ECM 合成与沉积，加重肾脏纤维化^[32]。TNF- α 和 IL-6 可诱导系膜细胞

增殖，加剧肾小球硬化^[33]。本研究结果显示，与糖尿病模型组比较，水蛭素组肾脏组织 IL-6、TNF-α 和 TGF-β1 水平均降低，提示水蛭素可下调这些细胞因子以减轻糖尿病大鼠肾纤维化。

JAK2/STAT3 通路在肾脏纤维化过程中发挥重要作用，推测可能的机制：过表达的 IL-6 通过作用于 gp130 受体可促进 JAK2 蛋白磷酸化，并进一步活化磷酸化的 STAT3 蛋白，使其向细胞核内转移，调控 TGF-β1、COL-IV 和 FN 等纤维化因子表达，最终促进肾脏纤维化。研究表明，抑制 JAK2/STAT3 通路可显著改善糖尿病大鼠的肾功能^[9, 34]。目前，水蛭素是否通过作用于 JAK2/STAT3 通路继而发挥对糖尿病大鼠肾脏的保护作用尚未得到证实。本研究结果显示，与对照组比较，糖尿病模型组 p-JAK2、p-STAT3 水平显著升高；与糖尿病模型组比较，水蛭素组 p-JAK2、p-STAT3 水平均降低，提示水蛭素可能通过抑制 JAK2 和 STAT3 的磷酸化，继而影响 JAK2/STAT3 通路的激活，从而延缓肾脏纤维化病理进程^[13, 35-36]。

本研究局限性：（1）未设立拮抗水蛭素作用机制的大鼠组别；（2）仅为动物实验。虽然有少量研究发现，联合使用含水蛭素成分的药物对慢性肾脏

病患者，相比未联合使用含水蛭素成分的单药疗效更为显著^[37-41]，但水蛭素对 DN 患者的保护作用，仍需进行大样本、高质量临床随机对照试验予以验证。

综上所述，水蛭素可改善 STZ 诱导的糖尿病大鼠肾功能，减轻肾脏病理损伤并降低其肾脏组织中纤维化因子 TGF-β1、TNF-α 和 IL-6 表达。其作用机制可能与抑制肾脏组织中 JAK2、STAT3 蛋白磷酸化有关（图 7）。本研究结果为研究水蛭素减轻糖尿病肾脏损伤的潜在作用机制提供了实验依据，并为相关药物的研发提供了新的思路。目前，作为水蛭素的非活性前药，重组水蛭素证实是肝素引起的血小板减少症患者的可替代选择^[41]，其治疗深静脉血栓症的 I 期临床试验也在开展中^[42-43]，预示着水蛭素在许多领域中具有潜在的应用价值。相信随着相关研究的深入，进一步挖掘水蛭素的分子机制，其在 DN 防治中将会发挥更大作用。

作者贡献：何怡芊负责研究实施及论文撰写；谢骏、赵炳佳、屈岭负责研究设计数据分析；梁晓春负责指导论文修订。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突

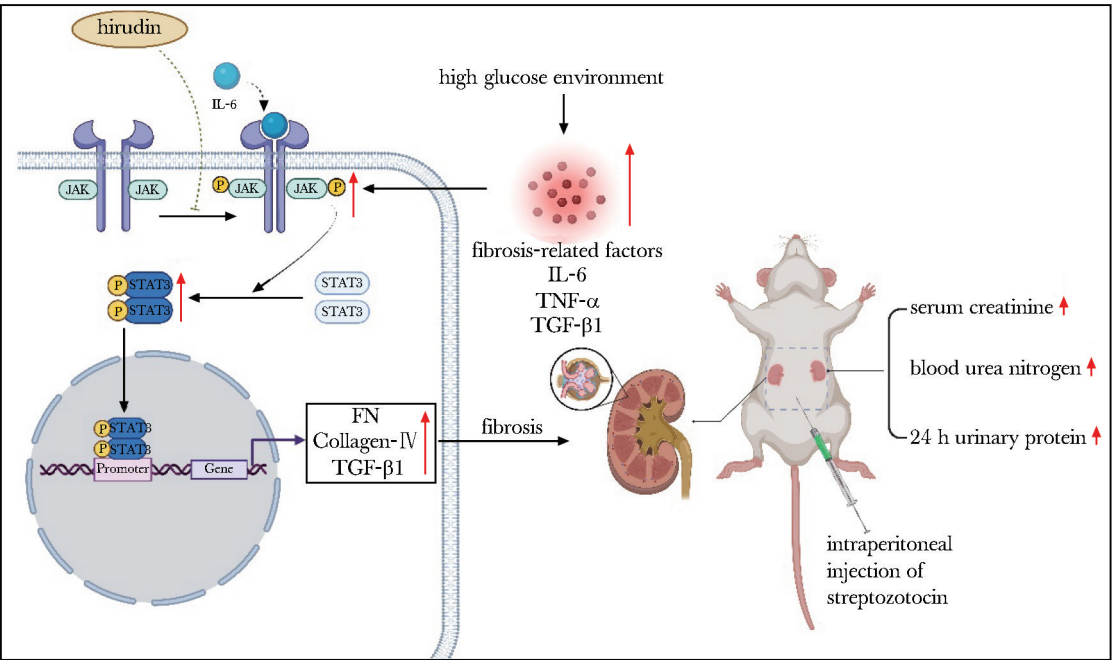


图 7 水蛭素对糖尿病大鼠肾损伤保护作用的可能机制

Fig. 7 The possible protective mechanism of hirudin on renal injury in diabetic rat model

FN: 同图 4; IL-6、TGF-β1、TNF-α: 同图 5; JAK2、STAT3: 同图 6

参 考 文 献

- [1] International Diabetes Federation. IDF 1040 Atlas Diabetes and Kidney Disease Report V4 [EB/OL]. [2023-10-01]. <https://diabetesatlas.org/>.
- [2] Umanath K, Lewis J B. Update on diabetic nephropathy: core curriculum 2018 [J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71 (6): 884-895.
- [3] Alicic R Z, Rooney M T, Tuttle K R. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12 (12): 2032-2045.
- [4] 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 (S1): 3-15.
- [5] Feng L X, Chen C, Xiong X, et al. PS-MPs promotes the progression of inflammation and fibrosis in diabetic nephropathy through NLRP3/Caspase-1 and TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathways [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 273: 116102.
- [6] Bhattacharjee N, Barma S, Konwar N, et al. Mechanistic insight of diabetic nephropathy and its pharmacotherapeutic targets: an update [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 791: 8-24.
- [7] Brosius F C, Tuttle K R, Kretzler M. JAK inhibition in the treatment of diabetic kidney disease [J]. *Diabetologia*, 2016, 59 (8): 1624-1627.
- [8] Chen Y, Chen L, Yang T W. Silymarin nanoliposomes attenuate renal injury on diabetic nephropathy rats via co-suppressing TGF- β /Smad and JAK2/STAT3/SOCS1 pathway [J]. *Life Sci*, 2021, 271: 119197.
- [9] Gao C, Fei X, Wang M, et al. Cardamomin protects from diabetes-induced kidney damage through modulating PI3K/AKT and JAK/STAT signaling pathways in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 107: 108610.
- [10] Huang J S, Lee Y H, Chuang L Y, et al. Cinnamaldehyde and nitric oxide attenuate advanced glycation end products-induced the Jak/STAT signaling in human renal tubular cells [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116 (6): 1028-1038.
- [11] Zaghoul R A, Abdelghany A M, Samra Y A. Rutin and selenium nanoparticles protected against STZ-induced diabetic nephropathy in rats through downregulating Jak-2/Stat3 pathway and upregulating Nrf-2/HO-1 pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 933: 175289.
- [12] Zheng C, Huang L, Luo W, et al. Inhibition of STAT3 in tubular epithelial cells prevents kidney fibrosis and nephropathy in STZ-induced diabetic mice [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (11): 848.
- [13] Lu T C, Wang Z H, Feng X B, et al. Knockdown of Stat3 activity *in vivo* prevents diabetic glomerulopathy [J]. *Kidney Int*, 2009, 76 (1): 63-71.
- [14] Junren C, Xiaofang X, Huiqiong Z, et al. Pharmacological activities and mechanisms of hirudin and its derivatives-a review [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 660757.
- [15] Shi Y, Liang X C, Zhang H, et al. Combination of quercetin, cinnamaldehyde and hirudin protects rat dorsal root ganglion neurons against high glucose-induced injury through Nrf-2/HO-1 activation and NF- κ B inhibition [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23 (9): 663-671.
- [16] 刘頔. ERK 信号通路在高糖诱导的髓鞘化损伤中的作用及槲皮素、桂皮醛、水蛭素和单体组合对其影响的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [17] Liu D. The mechanism of ERK pathway in high glucose induced myelination impairment and the protective effects of quercetin, hirudin, cinnamaldehyde and the combinations of them [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2016.
- [18] Liu D, Liang X C, Sun Y, et al. Combination of quercetin, hirudin and cinnamaldehyde promotes Schwann cell differentiation and myelination against high glucose by inhibiting ERK signaling pathway [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26 (8): 591-598.
- [19] Pang X X, Zhang Y G, Peng Z N, et al. Hirudin reduces nephropathy microangiopathy in STZ-induced diabetes rats by inhibiting endothelial cell migration and angiogenesis [J]. *Life Sci*, 2020, 255: 117779.
- [20] Han J R, Pang X X, Zhang Y G, et al. Hirudin protects against kidney damage in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats by inhibiting inflammation via P38 MAPK/NF- κ B pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3223-3234.
- [21] Long C L, Lin Q, Mo J L, et al. Hirudin attenuates puromycin aminonucleoside-induced glomerular podocyte injury by inhibiting MAPK-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Drug Dev Res*, 2022, 83 (4): 1047-1056.
- [22] Noshahr Z S, Salmani H, Khajavi Rad A, et al. Animal models of diabetes-associated renal injury [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 9416419.
- [23] 中华中医药学会, 北京中医药大学东直门医院, 北京中医药大学. 糖尿病肾脏疾病中西医结合诊疗指南 [J]. *北京中医药大学学报*, 2024, 47 (4): 580-592.
- China Association of Chinese Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine. Diagnosis and treatment guideline of integrated traditional Chinese and western medicine for diabetic kidney disease [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2024, 47 (4): 580-592.
- [23] 柳志诚, 方永晟, 杨国华, 等. 水蛭素的药理作用研究进展 [J]. *中国医药科学*, 2022, 12 (21): 56-59.
- Liu Z C, Fang Y S, Yang G H, et al. Research progress on pharmacological effects of hirudin [J]. *China Med Pharm*, 2022, 12 (21): 56-59.

- [24] Fan M L, Lan X T, Wang Q L, et al. Renal function protection and the mechanism of ginsenosides: current progress and future perspectives [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1070738.
- [25] Cao Y L, Lin J H, Hammes H P, et al. Cellular phenotypic transitions in diabetic nephropathy: An update [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1038073.
- [26] Chen F, Zhu X G, Sun Z Q, et al. Astilbin inhibits high glucose-induced inflammation and extracellular matrix accumulation by suppressing the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in rat glomerular mesangial cells [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1187.
- [27] Zhu X G, Shi J, Li H C. Liquiritigenin attenuates high glucose-induced mesangial matrix accumulation, oxidative stress, and inflammation by suppression of the NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 976-982.
- [28] Chen Q, Tao J, Li G P, et al. Astaxanthin ameliorates experimental diabetes-induced renal oxidative stress and fibronectin by upregulating connexin43 in glomerular mesangial cells and diabetic mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 840: 33-43.
- [29] Lennon R, Randles M J, Humphries M J. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5: 160.
- [30] Li Y M, Liu J P, Liao G N, et al. Early intervention with mesenchymal stem cells prevents nephropathy in diabetic rats by ameliorating the inflammatory microenvironment [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41 (5): 2629-2639.
- [31] El-Kady M M, Naggar R A, Guimei M, et al. Early renoprotective effect of ruxolitinib in a rat model of diabetic nephropathy [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14 (7): 608.
- [32] Wu H M, Xu F, Huang X L, et al. Lupenone improves type 2 diabetic nephropathy by regulating NF- κ B pathway-mediated inflammation and TGF- β 1/Smad/CTGF-associated fibrosis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 118: 154959.
- [33] Shen Y L, Jiang Y P, Li X Q, et al. Corrigendum: ErHuang formula improves renal fibrosis in diabetic nephropathy rats by inhibiting CXCL6/JAK/STAT3 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 789192.
- [34] Shi Y H, Zhao S, Wang C, et al. Fluvastatin inhibits activation of JAK and STAT proteins in diabetic rat glomeruli and mesangial cells under high glucose conditions [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28 (12): 1938-1946.
- [35] Li Y X, Zhao J, Yin Y, et al. The role of IL-6 in fibrotic diseases: molecular and cellular mechanisms [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18 (14): 5405-5414.
- [36] Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, et al. Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21 (5): 763-772.
- [37] 李莹, 崔丽. 水蛭素药物治疗尿微量白蛋白为主要表现的糖尿病肾病和高血压肾病的临床研究 [J]. *临床合理用药杂志*, 2010, 3 (22): 6-7.
- Li Y, Cui L. Clinical study on hirudin in diabetic nephropathy with umalb as the main manifestations and hypertension kidney disease [J]. *Chin J Clin Ration Drug Use*, 2010, 3 (22): 6-7.
- [38] 于丹丹, 章轶立, 谢雁鸣, 等. 基于倾向性评分法的脉血康胶囊治疗肾病的临床用药有效性研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46 (11): 2265-2269.
- Yu D D, Zhang Y L, Xie Y M, et al. Propensity score-based study on effectiveness of clinical drugs for treating kidney disease with Maixuekang capsule [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2019, 46 (11): 2265-2269.
- [39] 刘蒙蒙, 陈学勋, 秦萍, 等. 脉血康胶囊对特发性膜性肾病患者血栓弹力图影响及其疗效观察 [J]. *中成药*, 2016, 38 (4): 751-755.
- Liu M M, Chen X X, Qin P, et al. Effect of maixuekang capsules on thrombelastography in patients with idiopathic membranous nephropathy and clinical observation [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2016, 38 (4): 751-755.
- [40] 刘吉尧, 徐霜霜, 曾海文, 等. 水蛭对糖尿病肾病的疗效及安全性的 Meta 分析 [J]. *实用中医内科杂志*, 2021, 35 (5): 137-139.
- Liu J Y, Xu S S, Zeng H W, et al. Meta-analysis of efficacy and safety of leech on diabetic nephropathy [J]. *J Pract Tradit Chin Intern Med*, 2021, 35 (5): 137-139.
- [41] van Es N, Bleker S M, Büller H R, et al. New developments in parenteral anticoagulation for arterial and venous thromboembolism [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2013, 26 (2): 203-213.
- [42] 王朝, 蒋莉莉, 施莉莉, 等. 水蛭配合西药治疗糖尿病肾病及对尿微量白蛋白和内皮功能的影响 [J]. *陕西中医*, 2014, 35 (10): 1306-1307.
- Wang C, Jiang L L, Shi L L, et al. Effect of hirudo combined with western medicine on diabetes nephropathy and urinary microalbumin and endothelial function [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2014, 35 (10): 1306-1307.
- [43] Dong X N, Meng Z Y, Jin J D, et al. Development, validation, and clinical pharmacokinetic application of ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneously determining a novel recombinant hirudin derivative (Neorudin) and its active metabolite in human serum [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1063: 204-213.

(收稿: 2024-05-26 录用: 2024-07-22)

(本文编辑: 董 哲)