论著·基础研究

金丝桃素通过抑制NF-κB信号通路减轻糖尿病肾病足细胞损伤

韩　珍[1]，王　浩[1]，苏秀秀[2#]，方　际[1#]
1. 上海中医药大学附属普陀医院肾内科，上海 200062；2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院心内科，上海 200025

［摘要］**目的**·探讨天然化合物金丝桃素（hypericin，HYP）对糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）足细胞损伤的保护作用及其可能的分子机制。**方法**·选取18只*db*/*db*小鼠构建DN模型，随机分为模型组、*db*/*db*+HYP低剂量组（*db*/*db*+HYP-L，1.5 mg/kg）、*db*/*db*+HYP高剂量组（*db*/*db*+HYP-H，3.0 mg/kg），并设6只*db*/*m*小鼠为正常对照组。检测各组小鼠空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）、胰岛素（insulin，INS）、总胆固醇（total cholesterol，TC）、甘油三酯（triglyceride，TAG）、低密度脂蛋白（low-density lipoprotein，LDL）、高密度脂蛋白（high-density lipoprotein，HDL）、血肌酐（serum creatinine，Scr）、血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、尿白蛋白/肌酐比值（urinary albumin-to-creatinine ratio，UACR）及炎症因子［肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）、单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemoattractant protein-1，MCP-1）］水平。经苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）、过碘酸-希夫（periodic acid Schiff，PAS）染色以及透射电镜观察各组小鼠肾脏病理变化及足细胞超微结构。免疫组化及蛋白质印迹法（Western blotting）检测各组小鼠肾组织中足细胞标志物Wilms瘤1（Wilms tumor 1，WT-1）的表达。蛋白质印迹法检测肾组织核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）的表达水平。体外培养人足细胞系，建立高糖诱导足细胞损伤模型，实验分为5组：正常糖组（5.5 mmol/L glucose，NG）、甘露醇组（5.5 mmol/L glucose+24.5 mmol/L mannitol，MA）、高糖组（30 mmol/L glucose，HG）、高糖+HYP 0.05 μg/mL组（HG+0.05 μg/mL HYP）、高糖+HYP 0.20 μg/mL组（HG+0.20 μg/mL HYP），48 h后收集细胞。通过蛋白质印迹法检测WT-1、p-NF-κB p65、NF-κB p65蛋白水平，实时荧光定量PCR（quantitative real-time，qPCR）检测各组人足细胞炎症因子（*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*、*MCP-1*）的mRNA水平。**结果**·与模型组相比，HYP显著降低*db*/*db*小鼠FBG、INS、TC、TAG、LDL、Scr、BUN及UACR水平，显著升高HDL水平（均$P<0.05$），并减轻*db*/*db*小鼠足细胞损伤，表现为足突融合现象显著减轻，足突排列重现梳子齿状。体内和体外研究均发现，HYP上调WT-1表达，同时抑制NF-κB p65磷酸化及其介导的炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-6、MCP-1）释放（均$P<0.05$）。**结论**·HYP可以减轻*db*/*db*小鼠足细胞损伤，其作用可能与上调WT-1表达、抑制NF-κB通路、下调炎症因子表达有关。

［关键词］金丝桃素；糖尿病肾病；足细胞；核因子κB；炎症反应
［DOI］10.3969/j.issn.1674-8115.2026.01.005　［中图分类号］R692.9　［文献标志码］A

Hypericin alleviates podocyte injury in diabetic nephropathy by inhibiting the NF-κB signaling pathway

Han Zhen[1], Wang Hao[1], Su Xiuxiu[2#], Fang Ji[1#]
1.Department of Nephrology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 2.Department of Cardiology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the protective effect of the natural compound hypericin (HYP) on podocyte injury in diabetic nephropathy (DN) and its underlying molecular mechanism. **Methods**·A total of eighteen *db*/*db* mice were selected to establish the DN model and were randomly divided into three groups: the model group, the *db*/*db* + HYP low-dose group (*db*/*db*+HYP-L, 1.5 mg/kg), and the *db*/*db*+HYP high-dose group (*db*/*db*+HYP-H, 3 mg/kg). Additionally, six *db*/*m* mice were designated as the normal control group. The following parameters were measured in mice from each group: fasting blood glucose (FBG), insulin (INS), total

[基金项目] 上海市普陀区卫生健康系统临床特色专科建设项目（2021tszk02）。
[通信作者] 苏秀秀，主治医师，硕士；电子信箱：sxx11901@rjh.com.cn。方　际，副主任医师，硕士；电子信箱：fjzyy2025@163.com。#为共同通信作者。
[Funding Information] Shanghai Putuo District Health System Clinical Specialty Construction Project (2021tszk02).
[Corresponding Author] Su Xiuxiu, E-mail: sxx11901@rjh.com.cn. Fang Ji, E-mail: fjzyy2025@163.com. #Co-corresponding authors.

cholesterol (TC), triglyceride (TAG), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), urinary albumin-to-creatinine ratio (UACR), as well as levels of inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Renal pathological changes and podocyte ultrastructure in mice from each group were examined by hematoxylin-eosin (HE) staining, periodic acid-Schiff (PAS) staining, and transmission electron microscopy. The expression of the podocyte marker Wilms tumor 1 (WT-1) in renal tissues from each group was assessed using immunohistochemistry and Western blotting. The protein expression level of nuclear factor-κB (NF-κB) was also measured by Western blotting. Human podocyte lines were cultured *in vitro* to establish a high-glucose-induced podocyte injury model. The experiment was divided into five groups: normal glucose (5.5 mmol/L glucose, NG), mannitol (5.5 mmol/L glucose+24.5 mmol/L mannitol, MA), high glucose (30.0 mmol/L glucose, HG), high glucose+0.05 μg/mL HYP, and high glucose+0.20 μg/mL HYP. Cells were harvested after 48 h of incubation. The protein levels of WT-1, phospho-NF-κB p65 (p-NF-κB p65), and NF-κB p65 were determined by Western blotting. The mRNA expression levels of inflammatory cytokines (*TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6,* and *MCP-1*) in human podocytes across all groups were measured by quantitative real-time PCR (qPCR). **Results**·Compared with the model group, HYP administration significantly reduced the levels of FBG, INS, TC, TAG, LDL, Scr, BUN, and UACR in *db*/*db* mice, while significantly increasing the level of HDL (all $P<0.05$). Concomitantly, HYP alleviated podocyte injury in *db*/*db* mice, as evidenced by a marked reduction in foot process effacement and restoration of a comb-like alignment of the foot processes. Both *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated that HYP upregulated the expression of WT-1 while concurrently suppressing the phosphorylation of NF-κB p65 and the subsequent release of NF-κB-mediated inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6, and MCP-1) (all $P<0.05$). **Conclusion**·HYP alleviates podocyte injury in *db*/*db* mice, an effect that may be attributed to the upregulation of WT-1 expression and inhibition of the NF-κB signaling pathway, leading to reduced expression of downstream inflammatory cytokines.

[Key words] hypericin (HYP); diabetic nephropathy (DN); podocyte; nuclear factor-kappa B (NF-κB); inflammation

糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）是糖尿病最常见的微血管并发症之一，也是导致终末期肾病的主要原因[1]。据统计，全球约有40%的糖尿病患者最终发展为DN，且DN患者的死亡率显著高于非DN患者[2]。足细胞作为肾小球滤过屏障的重要组成部分，其损伤会导致蛋白尿和肾小球硬化，加速DN进展[3]。足细胞损伤被认为是DN早期病变的核心环节，单位肾小球内足细胞数量的减少是DN进展的最强预测因子[4]。因此，研究如何减轻足细胞损伤对于延缓DN进展具有重要的现实意义。

近年来，炎症反应在DN发病机制中的作用备受关注[5]。核因子κB（nuclear factor κB，NF-κB）信号通路是调控炎症反应的关键通路之一，其异常激活可导致DN患者足细胞损伤、肾小球硬化和肾间质纤维化[6]。研究表明，NF-κB通路的激活可促进多种炎症因子［如肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、白细胞介素-6（interleukin -6，IL-6）］的表达，进而诱导足细胞凋亡和上皮-间质转化。TNF-α可通过ROS依赖途径激活NF-κB，诱导足细胞中裂孔隔膜蛋白表达减少，加重足细胞损伤[7]。高糖或脂毒性环境下，NF-κB的激活进一步上调烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase，NOX）表达，导致氧化应激加剧[8]。此外，线粒体膜电位下降和细胞色素C释放可促进足细胞凋亡[8]。高糖还可以通过Toll样受体4（Toll-like receptor 4，TLR4）/NF-κB通路上调B细胞淋巴瘤2相关X蛋白（B-cell lymphoma 2-associated X protein，Bax）表达，诱导足细胞凋亡[9]。因此，抑制NF-κB信号通路可能成为治疗DN的策略之一。

传统中药及其活性成分具有多靶点、低毒性的特点，已经在DN治疗中展现出广阔的应用前景[10]。金丝桃素（hypericin，HYP）是从金丝桃属植物中提取的一种天然化合物，为萘骈二蒽酮类化合物，可发出明亮的橘红色荧光，是一种良好的光敏剂[11]。HYP具有抗抑郁、抗病毒［包括人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）］及抗肿瘤等活性[12-14]。随着研究的深入，发现其还具有降糖、抑制肥胖、抗炎等多种作用[15-16]。然而，HYP能否减轻*db*/*db*小鼠足细胞损伤及其可能的机制未见报道。因此，本研究通过建立*db*/*db*小鼠DN模型和高糖诱导的足细胞损伤模型，研究HYP对DN足细胞损伤的影响及其作用机制。

1 对象与方法

1.1 实验动物、细胞及其培养

18只雄性C57 BLKS/J *db*/*db*小鼠（瘦素受体突变）和6只*db*/*m*小鼠，6周龄，体质量为30~35 g，购自赛业（苏州）生物科技有限公司，生产许可证号为SCXK（苏）

2022-0016。小鼠饲养于普陀区中心医院的SPF级动物房。使用许可证号为SYXK（沪）2022-0002。

永生化的人源足细胞（human podocyte，HPC）由美国西奈山医学院何慈江教授惠赠。使用RPMI-1640完全培养基［含10%澳洲胎牛血清、1%青霉素-链霉素、1%胰岛素-转铁蛋白-硒培养基补充剂（insulin-transferrin-selenium media supplement，ITS-G）］于33 ℃、5% CO_2培养箱中培养。当细胞融合度达70%时，转入37 ℃、5% CO_2培养箱，培养分化7d用于后续实验，分化时使用不含ITS-G的RPMI-1640完全培养基。

1.2　主要试剂和仪器

HYP［TargetMol，美国；纯度为99%，由二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO；MCE，美国）溶解后−20 ℃避光保存］，澳洲胎牛血清（Sigma，美国），RPMI-1640培养基、青霉素-链霉素混合液、ITS-G（Gibco，美国），无水葡萄糖、RPMI-1640无糖培养基（北京兰杰柯科技有限公司），增强型RIPA裂解液（武汉博士德生物工程有限公司），BCA蛋白定量试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司），SDS PAGE胶配制试剂盒（上海雅酶生物医药科技有限公司），彩色预染蛋白Marker（Thermo Fisher，美国），PVDF膜（Millipore，美国），磷酸化细胞核因子NF-κB p65（phosphorylated nuclear factor-κB p65，p-NF-κB p65）、细胞核因子NF-κB p65（nuclear factor-κB p65，NF-κB p65）抗体（CST，美国），兔源一抗Wilms瘤1（Wilms tumor 1，WT-1）、辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的山羊抗兔IgG（Abcam，美国），TNF-α、IL-1β、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemoattractant protein-1，MCP-1）的ELISA检测试剂盒（欣博盛生物科技有限公司），PCR引物［生工生物工程（上海）股份有限公司］，苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染液、过碘酸-希夫（periodic acid-Schiff，PAS）染液（武汉塞维尔生物科技有限公司），甘油三酯（triglyceride，TAG）测定试剂盒、总胆固醇（total cholesterol，TC）测定试剂盒、高密度脂蛋白（high-density lipoprotein，HDL）测定试剂盒、低密度脂蛋白（low-density lipoprotein，LDL）测定试剂盒、小鼠血肌酐（serum creatinine，Scr）的ELISA检测试剂盒、血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）测试盒（南京建成生物工程研究所），小鼠尿白蛋白抗体（Bethyl，美国），小鼠尿肌酐（urine creatinine，Ucr）检测试剂盒（Cayman Chemical，美国）。化学发光成像仪、全波长多功能酶标仪、电泳仪、转膜仪、PCR仪（Bio-Rad，美国），荧光显微镜（Olympus，日本），活体成像仪（Caliper，美国）。

1.3　动物和细胞分组

db/*db*小鼠适应性喂养2周后随机分为3组，每组6只，分别为模型组（*db*/*db*）、*db*/*db*+HYP低剂量组（*db*/*db*+HYP-L，1.5 mg/kg）、*db*/*db*+HYP高剂量组（*db*/*db*+HYP-H，3.0 mg/kg），将6只同龄*db*/*m*小鼠作为正常对照组*db*/*m*。HYP给药方式及剂量参考相关文献[17]，正常对照组和模型组小鼠给予等体积的生理盐水腹腔注射，隔天给药，连续8周。

将HPCs分为正常糖组（5.5 mmol/L glucose，NG）、甘露醇组（5.5 mmol/L glucose+24.5 mmol/L mannitol，MA）、高糖组（30.0 mmol/L glucose，HG）、高糖+HYP低剂量组（HG+0.05 μg/mL HYP）、高糖+HYP高剂量组（HG+0.20 μg/mL HYP）。细胞培养48 h后用于后续实验。

1.4　样本采集

分别在给药0、2、4、6、8周记录各组小鼠的空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）、体质量、摄食量及饮水量。在最后一次给药结束后将动物禁食过夜，次日早晨给予异氟烷麻醉处理，安乐死后取血离心保存血清，取双侧肾脏皮质，左肾皮质用于肾脏病理检测，右肾皮质用于蛋白表达检测。

1.5　细胞毒性和增殖实验

使用CCK-8实验试剂盒评估HYP对HPCs的细胞毒性，将对数期的HPCs以1×10^4/mL的密度接种于96孔板中，分别用不同浓度的HYP（0、0.05、0.10、0.20、0.30 μg/mL）处理，通过计算细胞活力评估药物细胞毒性。在高糖情况下孵育12、24、48、72 h，确定高糖诱导足细胞损伤模型的最佳孵育时间。在高糖诱导足细胞损伤模型设不同浓度HYP（0、0.05、0.10、0.20 μg/mL）处理HPCs，观察HYP对该模型下HPCs增殖能力的影响。在37 ℃、5% CO_2条件下培养细胞48 h后，每孔加入100 μL的CCK-8工作液，在37 ℃培养箱中继续培养2 h，用酶标仪测定各孔在波长为450 nm处的吸光度。

1.6 HYP在*db*/*db*小鼠肾脏中的分布

单剂量尾静脉注射HYP（5 mg/kg），给药4 h后观察HYP在小鼠体内的分布（激发波长590 nm，发射波长660 nm）。

1.7 生化指标及炎症因子含量检测

使用相关的ELISA试剂盒检测尿白蛋白，比色测定试剂盒定量Ucr，通过尿白蛋白/肌酐比值（urinary albumin-to-creatinine ratio，UACR）评估尿蛋白水平。利用ELISA试剂盒检测各组小鼠血清INS、TC、TAG、LDL、HDL，以及炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6和MCP-1。

1.8 肾脏病理检测

用4%多聚甲醛固定小鼠肾脏，经乙醇溶液梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片（厚度2 μm）；依次经二甲苯脱蜡、乙醇溶液梯度水化后，进行HE、PAS染色；封片后使用显微镜观察肾小球结构及糖原聚集情况。将肾脏皮质切成约2 mm×2 mm×2 mm大小的组织块，用预冷的2.5%戊二醛固定，透射电子显微镜观察肾组织超微结构。

1.9 肾组织免疫组化

石蜡切片烤片3 h后，脱蜡处理；使用1×EDTA缓冲液，对切片进行抗原修复；每张切片滴加3 % H_2O_2溶液，室温孵育10 min；PBS冲洗后，用山羊免疫血清封闭，室温孵育10 min后甩去多余液体；滴加WT-1抗体（1∶200），4 ℃冰箱过夜，次日从冰箱取出切片恢复至室温后，每张切片滴加生物素标记的山羊抗兔IgG，于37 ℃孵育1 h，PBS洗涤后，用二氨基联苯胺显色，最后使用苏木精染核15 s，中性树胶封片。结果判定标准及方法：阳性表达的部位显色呈棕黄色，且其显色强度明显高于其背景无特异性染色的部位，细胞核显色呈浅蓝色。

1.10 肾脏组织及细胞蛋白表达检测

取小鼠肾脏皮质，加入含有1%磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液，进行匀浆裂解；裂解后，于4 ℃，12 000×*g*条件下离心15 min，随后提取总蛋白。提取HPCs总蛋白时，其余操作与提取小鼠肾脏皮质总蛋白相同。使用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白质定量。提取的总蛋白经变性后进行上样，电泳，经过转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育，最后进行显影。检测肾皮质和HPCs中WT-1、p-NF-κB p65/NF-κB p65蛋白表达情况。使用ImageJ软件分析，取β-actin蛋白为内参，以“目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值”计算目的蛋白相对表达量。

1.11 实时荧光定量PCR

收集经48 h孵育的HPCs，使用RNA提取试剂盒提取总RNA，再使用反转录试剂盒合成cDNA。qPCR反应体系20 μL：SYBR Green Master Mix 10 μL，上游引物（10 μmol/L）0.4 μL，下游引物（10 μmol/L）0.4 μL，模板cDNA 4 μL，ddH_2O 5.2 μL。反应条件：预变性95 ℃ 5 min；变性95 ℃ 10 s，退火/延伸60 ℃ 30 s，循环次数40次。采用$2^{-\Delta\Delta C_T}$计算基因的相对表达量。各基因引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequences for qPCR

Gene	Forward primer (5′→3′)	Reverse primer (5′→3′)
TNF-α	GGCAGGTTCTGTCCCTTTCA	CTGTGCTCATGGTGTCTTTTCTG
IL-1β	CTACAGGCTCCGAGATGAACAAC	TCCATTGAGGTGGAGAGCTTTC
IL-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTCAGGTTG
MCP-1	CAGCCAGATGCAATCAATGCC	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
β-actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

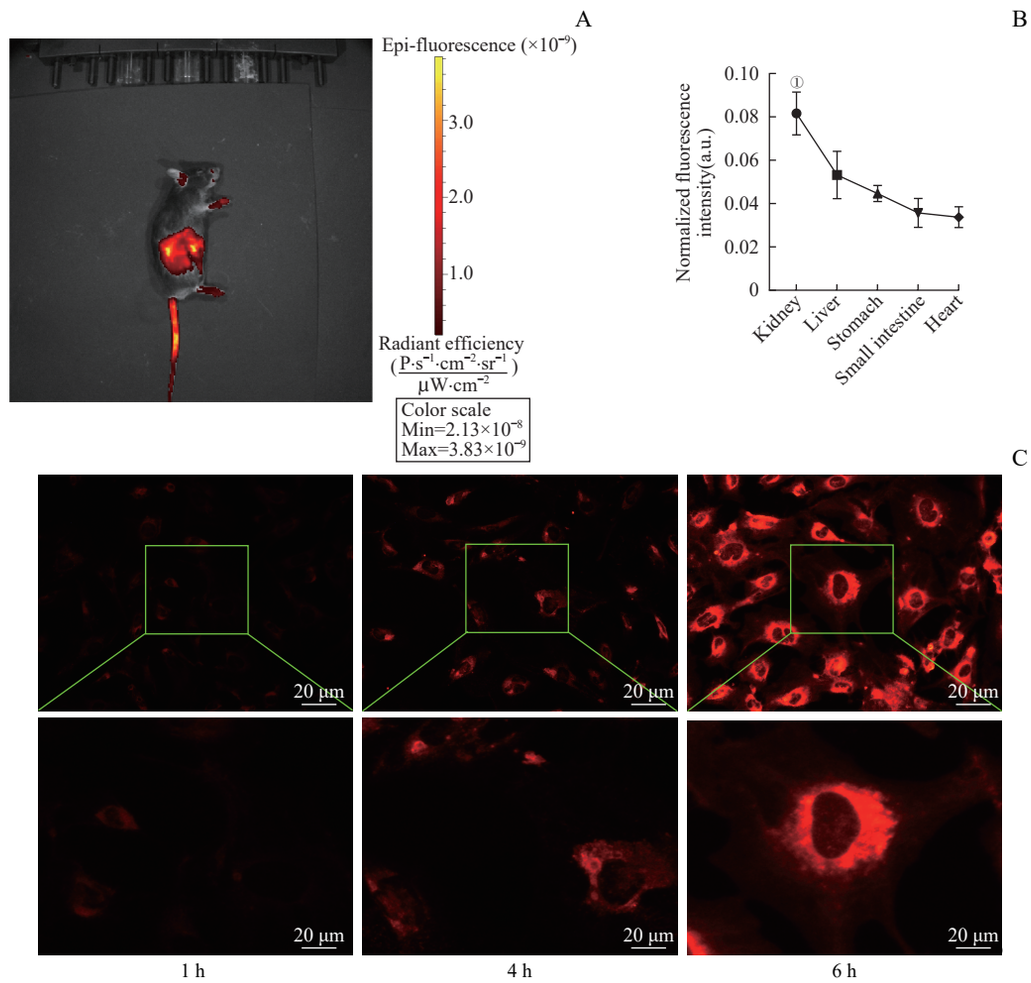
1.12 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.5软件进行数据统计分析。符合正态分布的定量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间的差异比较使用单因素方差分析；不符合正态分布或方差不齐的定量资料以M（Q_1，Q_3）表示，用秩和检验（Kruskal-Wallis）进行组间比较。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　HYP在*db*/*db*小鼠肾脏和HPCs中的分布

单剂量小鼠尾静脉注射HYP（5 mg/kg）4 h后，通过动物活体成像观察到HYP在肾脏浓度较高，在心脏中浓度较低，提示HYP具有肾脏特异性（图1A、B，P=0.021）。进一步研究发现（图1C），HYP还能够被HPCs摄取，在6 h时荧光强度最强，提示其可能在足细胞中发挥重要的药理作用。



Note：Fluorescence intensity in the organs of *db*/*db* mice at 4 h after intravenous injection of HYP (5 mg/kg). A. *In vivo* imaging showed fluorescence intensity. B. Line graph of background-subtracted fluorescence intensity in various organs. ①P=0.021, compared with the heart. C. Fluorescence intensity of HYP in HPCs at different time points (×200). Scale bar=20 μm.

图1　金丝桃素在*db*/*db*小鼠肾脏和HPCs中的分布

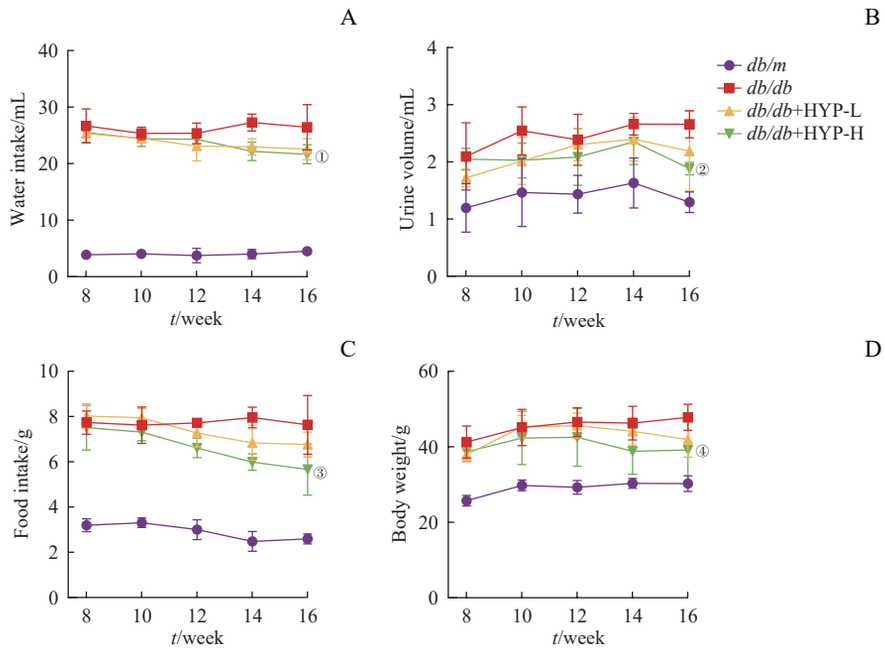
Fig 1　Distribution of HYP in the kidneys of *db*/*db* mice and HPCs

2.2　HYP减少*db*/*db*小鼠饮水量、尿量、摄食量，减轻体质量

正常对照组小鼠体质量增长较为缓慢，尿量处于正常生理状态范围，摄食量和饮水量也基本保持稳定。模型组小鼠饮水量、尿量、摄食量及体质量呈明显上升趋势。模型组给予HYP干预后，与模型组相比，*db*/*db*小鼠的体质量增长速度缓慢，饮水量、尿量、摄食量及体质量明显减少（图2A，P=0.007；图2B，P=0.034；图2C，P=0.023；图2D，P=0.042）。

2.3　HYP降低了*db*/*db*小鼠INS水平，改善其糖脂代谢紊乱

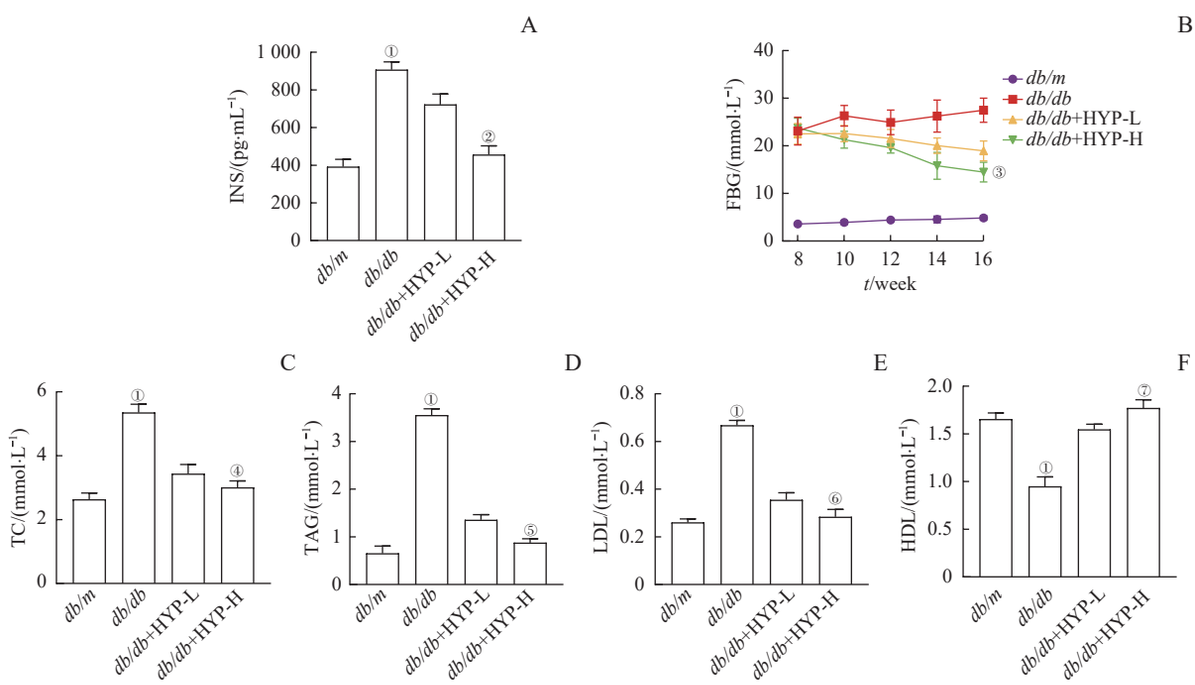
与正常对照组相比，模型组小鼠的血清INS水平显著升高，FBG持续高于11.1 mmol/L，TC、TAG、LDL显著升高，HDL下降（图3，均P<0.001）。与模型组相比，经HYP干预后，各组小鼠的INS水平及FBG明显降低（图3，P=0.003，P=0.027），TC、TAG、LDL值下降，HDL值升高（图3，P=0.032，P=0.006，P=0.017，P=0.002）。



Note: HYP reduced water intake, urine output, food consumption, and body weight in *db*/*db* mice. A. Water intake. B. Urine volume. C. Food intake. D. Body weight. ①P=0.007, ②P=0.034, ③P=0.023, ④P=0.042, compared with the model group (n=6).

图2 *db*/*db*小鼠糖尿病代谢表型的多参数动态分析

Fig 2 Dynamic multi-parameter analysis of diabetic metabolic phenotypes in *db*/*db* mice



Note: HYP reduced insulin levels and ameliorated glucose and lipid metabolic disorders in *db*/*db* mice. A. Insulin levels. B. Fasting blood glucose levels. C. Total cholesterol (TC). D. Triglycerides (TAG). E. Low-density lipoprotein (LDL). F. High-density lipoprotein (HDL). ①P<0.001, compared with the *db*/*m* group; ②P=0.003, ③P=0.027, ④P=0.032, ⑤P=0.006, ⑥P=0.017, ⑦P=0.002, compared with the model group (n=6).

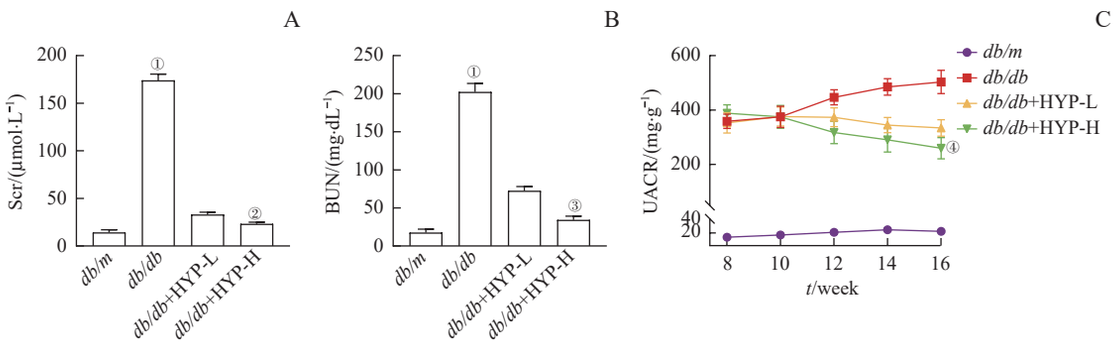
图3 HYP干预对*db*/*db*小鼠糖脂代谢的影响

Fig 3 Effect of HYP intervention on glucose and lipid metabolism in *db*/*db* mice

2.4 HYP改善*db*/*db*小鼠肾脏功能

与正常对照组相比，模型组的Scr和BUN显著升高（图4A、B，均P<0.001）；与模型组相比，HYP干预组的Scr、BUN水平显著下降（图4A、B，P=0.003，P=0.006）；与正常对照组相比，模型组的UACR水平显著升高；与模型组相比，HYP干预组的

UACR水平显著降低（图4C，P=0.026）。



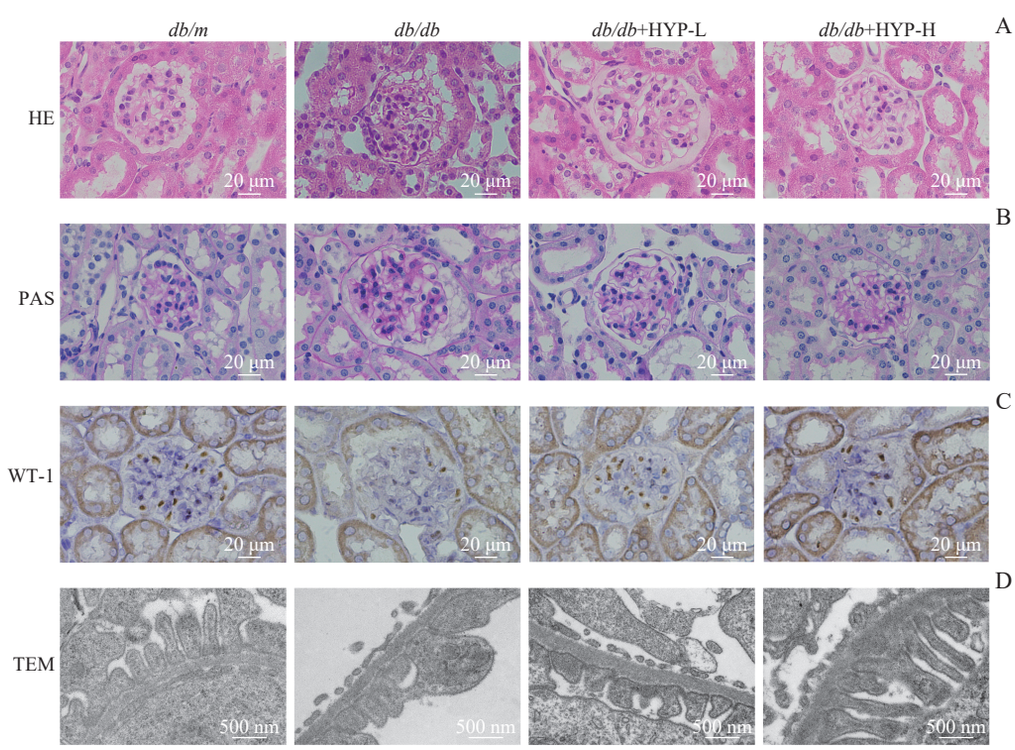
Note: HYP ameliorated renal function in *db*/*db* mice. A. Scr. B. BUN. C. UACR. ①P<0.001, compared with the *db*/*m* group; ②P=0.003, ③P=0.006, ④P=0.026, compared with the model group (n=6).

图4　HYP对*db*/*db*小鼠肾功能的改善

Fig 4　Hypericin ameliorates renal dysfunction in *db*/*db* mice

2.5　HYP改善*db*/*db*小鼠足细胞损伤

对各组小鼠肾脏组织进行HE、PAS染色、免疫组化检测及透射电镜观察，结果（图5）显示：与正常对照组相比，模型组的肾小球体积显著增大，系膜基质出现增生；肾小球内WT-1表达明显减少，足细胞足突发生融合、消失。经HYP干预后，上述病理改变得到明显改善：肾小球体积缩小，系膜基质增生减少；肾小球内WT-1表达显著增加；足细胞足突融合现象显著减轻。以上结果提示，HYP能够减轻*db*/*db*小鼠的足细胞损伤，具有足细胞保护作用。



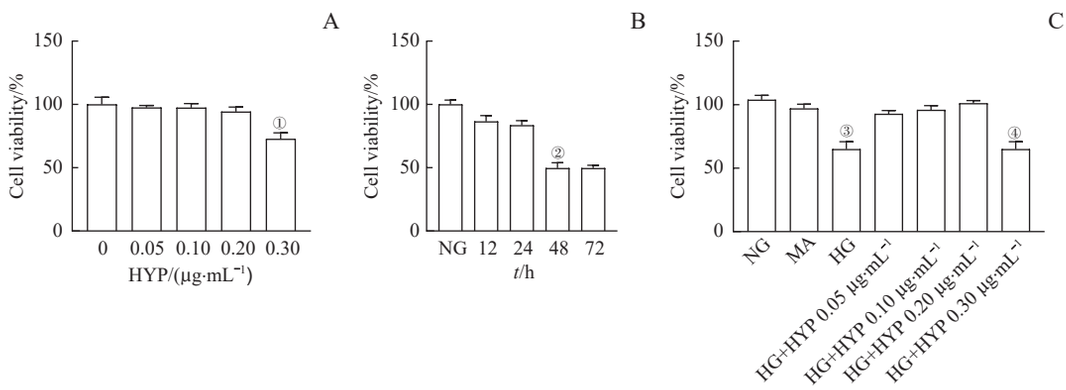
Note: HYP ameliorated podocyte injury in *db*/*db* mice. A. HE staining showed histopathological changes in glomeruli across groups (×400). B. PAS staining revealed glomerular basement membrane thickness and mesangial matrix expansion in each group (×400). C. WT-1 expression in mouse glomeruli from different groups (×400). D. Transmission electron microscopy showed podocyte foot process effacement (×20 000). Scale bars=20 μm (A, B, C); 500 nm (D).

图5　HE、PAS染色、免疫组化、透射电镜评估肾组织病理学变化

Fig 5　Renal histopathological changes were evaluated by HE staining, PAS staining, immunohistochemistry, and transmission electron microscopy

2.6 HYP提高高糖下调的HPCs活力

首先，我们检测HYP对HPCs的细胞毒性，结果显示：分别用0.05、0.10、0.20、0.30 μg/mL的HYP处理后，0.30 μg/mL HYP对细胞活力有明显抑制作用，0.20 μg/mL及以下各浓度间细胞活力无显著差异。这表明0.20 μg/mL及以下浓度的HYP对HPCs活性无抑制作用（图6A，P=0.037）。随后，我们分别使用30.0 mmol/L高糖处理HPCs 12、24、48、72 h，结果显示：48 h后，HPCs出现明显损伤，因此选择48 h来构建HPC高糖诱导的足细胞损伤模型（图6B，P=0.008）。为评估HYP对HPCs增殖的影响，分别用不同浓度的HYP在高糖条件下处理HPCs 48 h，结果显示：0.30 μg/mL HYP对细胞增殖有一定抑制作用，0.20 μg/mL及以下各浓度组对细胞增殖无抑制作用且提高了高糖下调的HPCs活力（图6C，P=0.016，P=0.009）。基于上述结果，0.05 μg/mL和0.20 μg/mL均属于HYP对HPCs的无细胞毒性浓度范围，二者可形成一定的浓度梯度，便于后续探究HYP干预高糖诱导HPCs损伤的剂量依赖性效应，故选取这两个浓度用于后续实验。



Note: HYP restored the viability of HPCs downregulated by high-glucose-induced. A. Cell viability of HPCs cultured under normal glucose conditions with different concentrations of HYP. B. Cell viability of the high-glucose-induced HPCs at different time points. C. Cell viability of the high-glucose-induced HPC model after intervention with different concentrations of HYP. ①P=0.037, compared with the 0 group. ②P=0.008, ③P=0.016, ④P=0.009, compared with the NG group.

图6 HYP对高糖诱导的HPCs细胞活力的影响

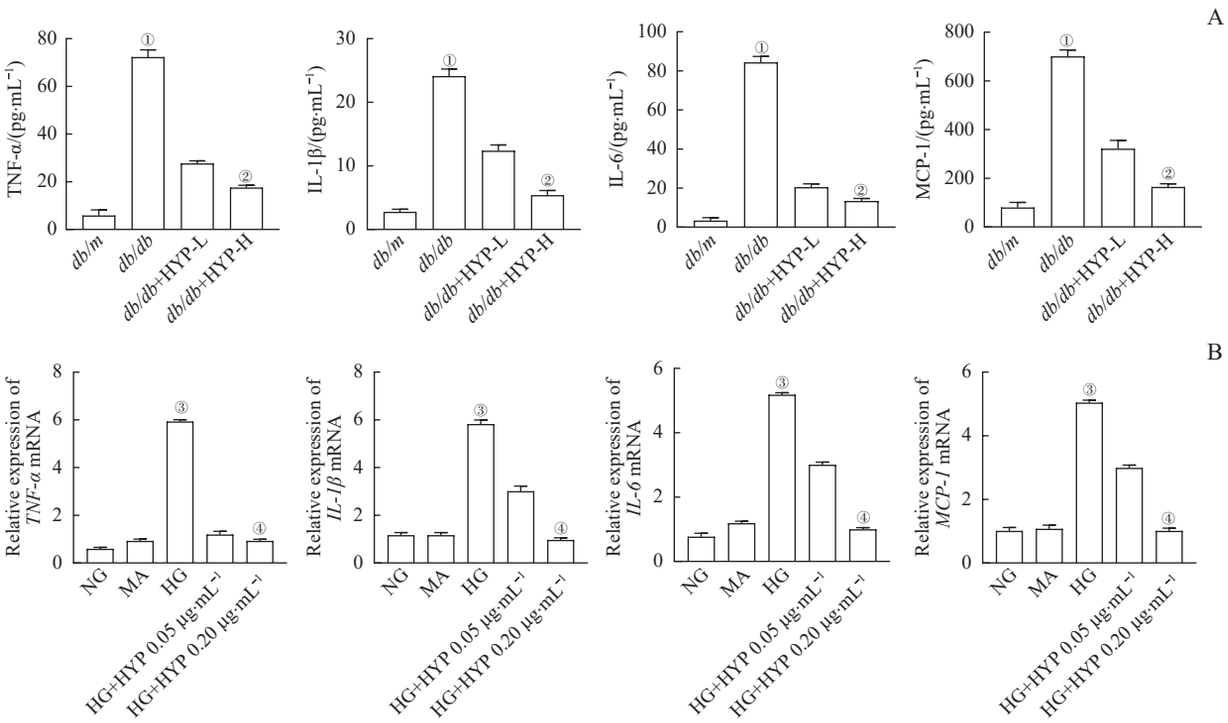
Fig 6 Effects of HYP on the viability of high-glucose-induced HPCs

2.7 HYP下调炎症因子表达

为探究HYP对多种炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-6、MCP-1）表达的影响，我们检测了不同组小鼠血清中炎症因子的表达水平，结果显示：正常对照组小鼠血清中各炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-6、MCP-1）的表达量均较低。与之相比，模型组小鼠血清中各炎症因子水平均显著上调（图7A，均P<0.001）。经HYP干预后，HYP干预组小鼠血清中各炎症因子的水平均明显下调（图7A，均P<0.001）。进一步的体外实验表明，NG组及MA组各炎症因子（*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*、*MCP-1*）mRNA水平均较低，HG组各炎症因子mRNA水平明显上调（图7B，均P<0.001）。与HG组相比，HG+HYP组各炎症因子mRNA水平明显下调（图7B，均P<0.001）。体内和体外研究结果均表明，HYP能够抑制炎症因子（TNF-α、IL-1β、IL-6、MCP-1）的释放，提示HYP在调控足细胞炎症损伤中发挥重要作用。

2.8 HYP对WT-1蛋白及NF-κB信号通路蛋白表达的影响

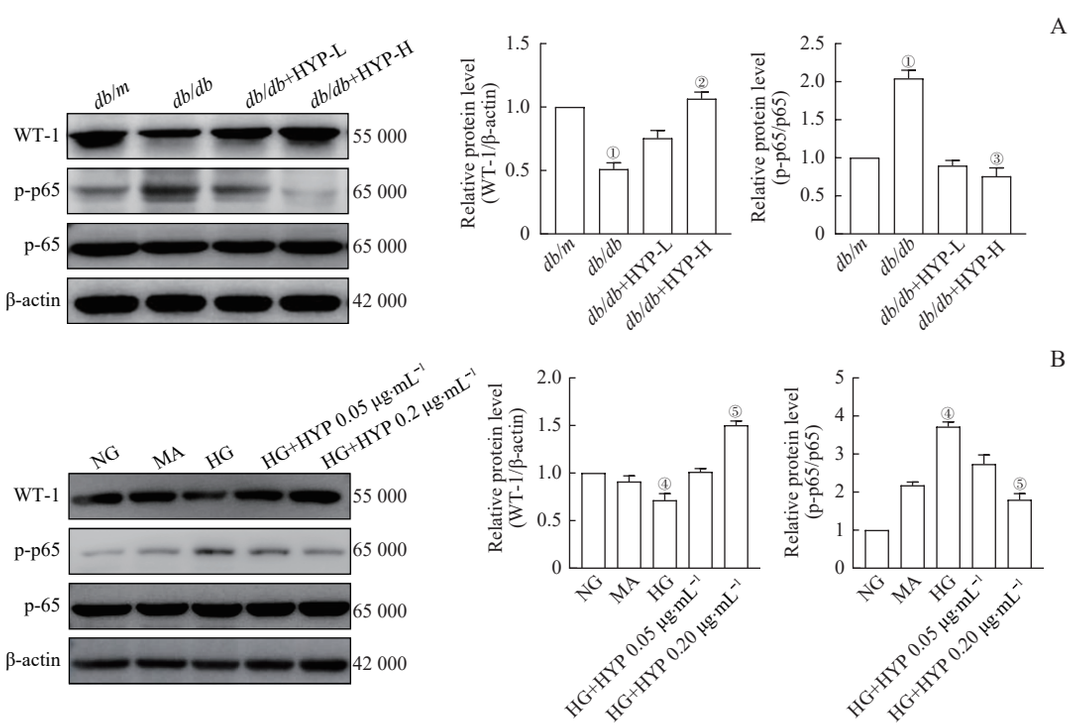
为了明确HYP改善DN足细胞损伤的可能机制，我们检测了WT-1蛋白及p-NF-κB p65、NF-κB p65蛋白表达水平。结果表明：与正常对照组比较，模型组小鼠肾组织中WT-1蛋白表达显著减少，而p-NF-κB p65/NF-κB p65表达水平的比值显著升高（图8A，均P<0.001）；与模型组相比，HYP干预后小鼠肾组织中的WT-1蛋白表达明显增加，而p-NF-κB p65/NF-κB p65的比值显著降低（图8A，P=0.003，P=0.002）。进一步体外实验发现，与NG组及MA组相比较，HG组WT-1蛋白水平明显下调，而p-NF-κB p65/NF-κB p65比值显著上调（图8B，均P<0.001）；和HG组相比，HG+HYP组WT-1蛋白水平明显上调，而p-NF-κB p65/NF-κB p65比值显著下调（图8B，均P<0.001）。以上结果提示，HYP减轻*db*/*db*小鼠足细胞损伤，其作用机制可能与上调WT-1蛋



Note: Inflammatory cytokine levels across groups. A. TNF-α (pg/mL), IL-1β (pg/mL), IL-6 (pg/mL), and MCP-1 (ng/mL). ①P<0.001, compared with the *db*/*m* group; ②P<0.001, compared with the model group (n=6). B. The mRNA expression levels of *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, and *MCP-1*. ③P<0.001, compared with the NG group; ④P<0.001, compared with the HG group.

图7　HYP下调炎症因子表达

Fig 7　HYP downregulates the expression of inflammatory cytokines



Note: The effect of HYP on the expression of WT-1 protein and NF-κB signaling pathway-related proteins. A. Western blotting analysis of WT-1, p-NF-κB p65, NF-κB p65, and β-actin protein expression. (①P<0.001, compared with the *db*/*m* group; ②P=0.003, ③P=0.002, compared with the model group; n=3). B. Western blotting analysis of the protein expression levels of WT-1, p-NF-κB p65, NF-κB p65, and β-actin in HPCs. Quantitative analysis of WT-1, p-NF-κB p65, and NF-κB p65. (④P<0.001, compared with the NG group; ⑤P<0.001, compared with the HG group).

图8　蛋白质印迹法检测HYP对WT-1蛋白及NF-κB信号通路蛋白表达的影响

Fig 8　Effect of HYP on WT-1 and NF-κB signaling pathway protein expression analyzed by Western blotting

白及抑制NF-κB通路蛋白表达有关。

3 讨论

DN是导致终末期肾衰竭和血液透析的主要原因之一，足细胞损伤是促使DN病情发展的重要因素，然而目前对DN的治疗尚不能逆转足细胞损伤。应用传统中药及其提取物治疗DN，一直是我们重点的研究方向之一。HYP是传统中药贯叶连翘（*Hypericum perforatum*）的主要活性成分。近年来研究发现，其具有显著的降糖、调脂及肾脏保护作用[18-19]。例如，HYP可通过激活腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）通路，促进外周组织对葡萄糖的摄取，并抑制肝脏糖异生，从而显著降低链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠FBG水平[20]；还可以通过激活蛋白激酶A催化亚基α（protein kinase A catalytic subunit α，PKACα）通路加速脂肪酸分解，并抑制固醇调节元件结合蛋白1c（sterol regulatory element-binding protein 1c，SREBP-1c）活性、减少脂质生成[20]。该研究提示HYP在DN治疗中具有潜在的应用前景。

本研究借助*db*/*db*小鼠构建DN模型，并利用HYP自发光的特性，发现HYP优先在*db*/*db*小鼠肾脏聚集，提示HYP具有肾脏特异性。此外，HYP还能够被人足细胞摄取，提示其可能在足细胞中发挥重要的药理作用。进一步研究表明，与模型组相比，HYP干预后能显著降低*db*/*db*小鼠的血糖及血脂水平，改善其胰岛素抵抗状况，提升*db*/*db*小鼠肾功能并减少尿蛋白水平，显著上调WT-1表达，修复足细胞足突融合，减轻足细胞损伤，提示HYP具有足细胞保护作用。

炎症反应在DN发生发展中起着关键作用，糖尿病小鼠体内存在多种炎症因子的表达上调，包括TNF-α、IL-1β和IL-6等[21]。本研究通过ELISA和qPCR分别检测*db*/*db*小鼠血清及高糖诱导足细胞损伤模型中上述炎症因子的表达，与对照组相比，HYP干预能够显著降低上述炎症因子表达，证实了其具有抗炎作用。众所周知，NF-κB的过度激活会导致促炎细胞因子（如TNF-α、IL-1β和IL-6）的过度表达，加剧足细胞损伤[22]。药理学研究已经证明，HYP具有调节NF-κB信号通路的作用。例如，HYP作为NF-κB的非抗氧化抑制剂，可减少IL-6的表达[23]；通过黑色素瘤分化相关基因5（melanoma differentiation-associated gene 5，MDA5）信号途径上调Ⅰ型干扰素的mRNA表达，并通过NF-κB信号途径下调*Il-6*、*Tnf-α* mRNA表达，发挥抗传染性支气管炎病毒的作用[24]；HYP光动力疗法治疗人类风湿性关节炎的作用，至少部分是通过诱导细胞内活性氧生成、调控细胞凋亡通路及抑制NF-κB信号通路来实现的[25]；HYP还能抑制细胞因子诱导的胰岛β细胞NF-κB通路活化，减轻胰岛β细胞损伤[26]。因此，我们推测HYP可能通过调节NF-κB信号通路抑制炎症反应，发挥保护足细胞的作用。研究结果证实，HYP能够抑制*db*/*db*小鼠肾组织和人足细胞系p-p65的磷酸化，降低TNF-α、IL-1β等炎症因子水平，与其在肝纤维化及神经炎症模型中的抗炎机制一致[20,27]。

综上所述，本研究证明HYP可通过上调WT-1的表达以及抑制NF-κB信号通路介导的相关炎症因子释放，减轻足细胞损伤，这为HYP的临床应用提供了更多的参考数据。尽管本研究初步阐明了HYP减轻*db*/*db*小鼠足细胞损伤的作用机制，但仍存在一些局限性。后续研究将聚焦HYP调节NF-κB通路的具体靶点，以及开发肾脏特异性纳米载体以降低全身暴露带来的潜在毒性，为将来的临床转化提供更多的实验依据。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors declare no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海中医药大学附属普陀医院实验动物伦理委员会的审核（审批号：DWEC-A-2024-03-1-73）。所有实验过程均遵照上海中医药大学附属普陀医院实验动物有关的各项规章制度和操作规范进行。

All animal experiments in this study were approved by the Ethics Committee on Experimental Animals of Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (Approval No. DWEC-A-2024-03-1-73). The experimental procedures were conducted in accordance with the relevant regulations and operating procedures of Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine.

作者贡献/Authors′ Contributions

韩珍和苏秀秀负责实验操作、数据采集和分析、论文撰写，方际和王浩参与实验设计与论文的修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

Han Zhen and Su Xiuxiu were responsible for experimental operations, data collection and analysis, and paper writing. Fang Ji and Wang

Hao participated in the experimental design and paper revision. All authors have read the final version of the paper and consented to its submission.

· Received: 2025-05-22
· Accepted: 2025-08-12
· Published online: 2026-01-28

参·考·文·献

[1] Wang H, Liu D W, Zheng B, et al. Emerging role of ferroptosis in diabetic kidney disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(9): 2678-2694.

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

[3] Zuo F W, Liu Z Y, Wang M W, et al. CCDC92 promotes podocyte injury by regulating PA28α/ABCA1/cholesterol efflux axis in type 2 diabetic mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2024, 45(5): 1019-1031.

[4] Qiu D J, Song S, Chen N, et al. NQO1 alleviates renal fibrosis by inhibiting the TLR4/NF-κB and TGF-β/Smad signaling pathways in diabetic nephropathy[J]. Cell Signal, 2023, 108: 110712.

[5] Myakala K, Wang X X, Shults N V, et al. NAD metabolism modulates inflammation and mitochondria function in diabetic kidney disease[J]. J Biol Chem, 2023, 299(8): 104975.

[6] Tang S C W, Yiu W H. Innate immunity in diabetic kidney disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16(4): 206-222.

[7] Sun L, Kanwar Y S. Relevance of TNF-α in the context of other inflammatory cytokines in the progression of diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2015, 88(4): 662-665.

[8] Lin Q X, Ma Y Q, Chen Z W, et al. Sestrin-2 regulates podocyte mitochondrial dysfunction and apoptosis under high-glucose conditions *via* AMPK[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(5): 1361-1372.

[9] Zhu L P, Han J K, Yuan R R, et al. Berberine ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting TLR4/NF-κB pathway[J]. Biol Res, 2018, 51(1): 9.

[10] Zhong Y F, Lee K, Deng Y Y, et al. Arctigenin attenuates diabetic kidney disease through the activation of PP2A in podocytes[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4523.

[11] Peng Z L, Lu J, Liu K, et al. Hypericin as a promising natural bioactive naphthodianthrone: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, toxicity, and safety[J]. Phytother Res, 2023, 37(12): 5639-5656.

[12] Zirak N, Shafiee M, Soltani G, et al. *Hypericum perforatum* in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders: current evidence and potential mechanisms of action[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8496-8508.

[13] Cao K, Zhang Y, Yao Q, et al. Hypericin blocks the function of HSV-1 alkaline nuclease and suppresses viral replication[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 296: 115524.

[14] WoźNiak M, Nowak-Perlak M. Hypericin-based photodynamic therapy displays higher selectivity and phototoxicity towards melanoma and squamous cell cancer compared to normal keratinocytes *in vitro*[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(23): 16897.

[15] Karioti A, Bilia A R. Hypericins as potential leads for new therapeutics[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(2): 562-594.

[16] Dong Q, Hu N, Yue H L, et al. Inhibitory activity and mechanism investigation of hypericin as a novel α-glucosidase inhibitor[J]. Molecules, 2021, 26(15): 4566.

[17] Chen S Z, Liu X X, Peng C, et al. The phytochemical hyperforin triggers thermogenesis in adipose tissue *via* a Dlat-AMPK signaling axis to curb obesity[J]. Cell Metab, 2021, 33(3): 565-580.e7.

[18] Dellafiora L, Galaverna G, Cruciani G, et al. On the mechanism of action of anti-inflammatory activity of hypericin: an in silico study pointing to the relevance of Janus kinases inhibition[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3058.

[19] Novelli M, Masiello P, Beffy P, et al. Protective role of St. John′s wort and its components hyperforin and hypericin against diabetes through inhibition of inflammatory signaling: evidence from *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8108.

[20] Liang C, Li Y, Bai M, et al. Hypericin attenuates nonalcoholic fatty liver disease and abnormal lipid metabolism *via* the PKA-mediated AMPK signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. Pharmacol Res, 2020, 153: 104657.

[21] Wu L, Liu C J, Chang D Y, et al. Annexin A1 alleviates kidney injury by promoting the resolution of inflammation in diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2021, 100(1): 107-121.

[22] Sun Z J, Chang D Y, Chen M, et al. Deficiency of CFB attenuates renal tubulointerstitial damage by inhibiting ceramide synthesis in diabetic kidney disease[J]. JCI Insight, 2022, 7(24): e156748.

[23] Bork P M, Bacher S, Schmitz M L, et al. Hypericin as a non-antioxidant inhibitor of NF-kappa B[J]. Planta Med, 1999, 65(4): 297-300.

[24] Chen H J, Muhammad I, Zhang Y, et al. Antiviral activity against infectious bronchitis virus and bioactive components of *Hypericum perforatum* L[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1272.

[25] Zhang K, Gao S, Guo J Y, et al. Hypericin-photodynamic therapy inhibits proliferation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes cell line MH7A[J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(2): 130-137.

[26] Novelli M, Beffy P, Gregorelli A, et al. Persistence of STAT-1 inhibition and induction of cytokine resistance in pancreatic β cells treated with St John′s wort and its component hyperforin[J]. J Pharm Pharmacol, 2019, 71(1): 93-103.

[27] Zhai X J, Chen Y, Han X M, et al. The protective effect of hypericin on postpartum depression rat model by inhibiting the NLRP3 inflammasome activation and regulating glucocorticoid metabolism[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 105: 108560.

［本文编辑］徐　敏