

# 白术内酯Ⅲ纳米粒改善免疫球蛋白 A 肾病大鼠肠道免疫屏障功能



林胜芬, 蔡小巧, 林永强, 王超超

温州市中西医结合医院肾内科 (浙江温州 325000)

**【摘要】目的** 探究白术内酯Ⅲ(AT-Ⅲ)对免疫球蛋白 A 肾病(IgAN)大鼠肠道免疫屏障和肾脏的改善作用,并开发 AT-Ⅲ 纳米颗粒以期优化其保护作用。**方法** 本研究采用沸石咪唑骨架(ZIF-8)负载 AT-Ⅲ 制备 ZIF-8@AT-Ⅲ 纳米粒,通过透射电子显微镜、X 射线多晶衍射仪对制备的样品进行形态结构表征。将 48 只大鼠随机分为正常对照组、IgAN 组、IgAN+AT-Ⅲ 组、IgAN+ZIF-8@AT-Ⅲ 组。使用 AT-Ⅲ 和 ZIF-8@AT-Ⅲ 分别处理 IgAN 大鼠,检测大鼠的肝肾功能、肾小球 IgA 沉淀以及肠道免疫屏障功能。**结果** 成功制备了具有高载药量、稳定性、pH 响应性的 ZIF-8@AT-Ⅲ 纳米粒。ZIF-8@AT-Ⅲ 纳米粒平均粒径为  $(70.62 \pm 1.07)$  nm, Zeta 电位为  $(-26.46 \pm 1.22)$  mV, 载药量为  $(19.2 \pm 1.3)$  %, 包封率为  $(64.0 \pm 0.6)$  %, 且在 pH 5.5 的环境中快速释放, 释放量显著高于 pH 7.4 环境。AT-Ⅲ 和 ZIF-8@AT-Ⅲ 可缓解肠壁结构的破坏和炎症细胞的浸润, 显著下调血清中的二胺氧化酶和 D- 乳酸含量, 上调肠黏膜组织中紧密连接蛋白 1 和紧密连接蛋白 5 的表达, 改善 IgAN 大鼠的免疫屏障功能以及肠道通透性, 抑制肾小球 IgA 沉积并缓解肾脏损伤。且 ZIF-8@AT-Ⅲ 的治疗效果优于 AT-Ⅲ。**结论** AT-Ⅲ 通过改善大鼠肠道免疫屏障功能以及肠道通透性减轻 IgAN。ZIF-8@AT-Ⅲ 是提升 AT-Ⅲ 对 IgAN 治疗效果的良好载药系统。

**【关键词】** 白术内酯Ⅲ; IgA 肾病; 肠道免疫; 肠道通透性

## The improvement of intestinal immune barrier function in immunoglobulin A nephropathy rats by Atractylolactone-III nanoparticles

LIN Shengfen, CAI Xiaoqiao, LIN Yongqiang, WANG Chaochao

Department of Nephrology, Wenzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

Corresponding author: WANG Chaochao, Email: 164459621@qq.com

**【Abstract】Objective** To explore the effects of Atractylenolide-III (AT-III) on the intestinal immune barrier and kidney of rats with immunoglobulin A nephropathy (IgAN), and develop AT-III nanoparticles to optimize its protective efficacy. **Methods** In this study, the zeolitic imidazolate framework (ZIF-8) loaded with AT-III was used to prepare ZIF-8@AT-III nanoparticles. Morphological and structural characterization of the prepared samples was conducted using transmission electron microscopy and X-ray powder diffraction. 48 rats were randomly divided into the normal control group, IgAN group, IgAN+AT-III group, and

DOI: 10.12173/j.issn.1008-049X.202312175

通信作者: 王超超, 硕士, 主任医师, Email: 164459621@qq.com

<https://zgys.whuzhmedj.com>

IgAN+ZIF-8@AT-III group. IgAN rats were treated with AT-III and ZIF-8@AT-III, and the detections of hepatic and renal function, glomerular IgA deposition, and intestinal immune barrier function were performed. **Results** The synthesis of ZIF-8@AT-III nanoparticles with elevated drug loading, stability, and pH responsiveness had been successfully accomplished. The average particle size of ZIF-8@AT-III nanoparticles was  $(70.62\pm 1.07)$  nm, the Zeta potential was  $(-26.46\pm 1.22)$  mV, the drug loading capacity was  $(19.2\pm 1.3\%)$ , and the encapsulation efficiency was  $(64.0\%\pm 0.6\%)$ . Furthermore, rapid release was observed in a pH 5.5 environment, which was significantly higher than that in the pH 7.4 environment. Both AT-III and ZIF-8@AT-III could alleviate the destruction of intestinal wall structure and the infiltration of inflammatory cells, significantly downregulate the levels of (DAO) and (D-LA) in the serum. Moreover, there is a noteworthy upregulation in the expression of (ZO-1) and Claudin-5 in intestinal mucosal tissue, thereby substantially improving the immune barrier function and intestinal permeability in IgAN rats. This intervention also inhibited the deposition of IgA in renal glomeruli and alleviated kidney damage, and ZIF-8@AT-III was more effective than AT-III. **Conclusion** AT-III alleviates IgAN in rats by improving intestinal immune barrier function and permeability. ZIF-8-loaded AT-III serves as an excellent drug delivery system, enhancing the therapeutic efficacy of AT-III in IgAN treatment.

**【Keywords】** Atractonolide III; IgA nephropathy; Intestinal immunity; Intestinal permeability

免疫球蛋白 A 肾病 (Immunoglobulin A nephropathy, IgAN) 是一种以免疫球蛋白 A 在肾小球沉积为病理特征的慢性肾脏疾病, IgAN 占原发性肾小球肾炎的 36.9%~45.3%, 是引起终末期肾衰竭最常见的原因之一<sup>[1]</sup>。大约 25%~30% 的 IgAN 患者在 20~25 年内需要接受肾脏替代治疗, 而另外 20%~40% 的患者在发病后的 20 年内可能会进展至终末期肾病<sup>[2]</sup>。因此, 开发可用于治疗 IgAN 的有效药物变得至关重要。白术内酯 III (atractylenolide-III, AT-III) 是白术根提取物中的主要生物活性化合物之一, 具有抗炎和抗氧化应激等多种药理作用<sup>[3]</sup>。AT-III 是多种治疗 IgAN 和相关肾病的传统方剂中的主要活性成分, 包括防己黄芪汤和益肾化湿颗粒等<sup>[4-5]</sup>。因此, AT-III 在 IgAN 中是否发挥作用至关重要。研究报道, 肠道黏膜屏障受损会导致免疫系统异常激活, 从而对 IgAN 的发展产生影响<sup>[6-7]</sup>。然而, AT-III 是否通过改善大鼠肠道免疫屏障功能减轻 IgAN 仍需进一步阐明。纳米医学利用纳米尺度的材料和技术来改善药物的特性, 增加其生物相容性和靶向能力, 从而提高治疗效果<sup>[8-9]</sup>。咪唑骨架沸石 (zeolite imidazole framework-8, ZIF-8) 因其高孔隙率、

广泛的比表面积、出色的药物承载能力以及对 pH 响应的特性而备受青睐, 因此被视为理想的药物载体<sup>[10]</sup>。本研究以 ZIF-8 负载 AT-III (ZIF-8@AT-III) 来增加 AT-III 的治疗效果, 并探究 AT-III 和 ZIF-8@AT-III 是否通过改善大鼠肠道免疫屏障功能减轻 IgAN。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器及试剂

LEGEND MICRO21R 型离心机 (Thermo); Talos F200X 型透射电子显微镜 (美国 FEI 公司); Smart Lab 型 X 射线衍射仪 (日本理学公司); ZS90 型纳米粒度分析仪 (英国马尔文帕纳科公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); BK-200 型血生化仪 (山东博科生物产业有限公司); 1645050 型电泳仪 (Biorad)。

AT-III (MCE, 货号: HY-N0203, 纯度 99.91%), 牛血清白蛋白 (BSA, 批号: 2064652)、四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>, 批号: C2305311) 和脂多糖 (LPS, 批号: C2302115) 购自 Macklin; 紧密连接蛋白 1 (ZO-1) 抗体 (货号: 21773-1-AP)、紧密连接蛋白 5

(Claudin-5) 抗体 (货号: 29767-1-AP)、GAPDH 抗体 (货号: 10494-1-AP) 及山羊抗兔 IgG (货号: PR30011) 均购自 Proteintech; 二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) ELISA 试剂盒 (货号: AD30909)、D-乳酸 (D-lactate, D-LA) ELISA 试剂盒 (货号: AD31732) 和免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA) ELISA 试剂盒 (货号: AD31786) 购自艾迪抗; 苏木素-伊红试剂盒 (批号: G1120) 和 Masson 三色染色试剂盒 (货号: G1340) 购自北京索莱宝试剂有限公司; 二甲基亚砜 (批号: M2301427)、2-甲基咪唑 (批号: B2301456)、六水合硝酸锌 (批号: L2211253) 购自阿拉丁; 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

## 1.2 动物

6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 10) g, 购自温州医科大学实验动物中心。生产许可证号: SCXK (浙) 2020-0001, 使用许可证号: SYXK (浙) 2020-0014。自由获得饲料和饮水, 保持室温 22~24 °C, 相对湿度 40%~60%, 12 h 光照和 12 h 黑暗的光照周期。

## 1.3 ZIF-8@AT-III 纳米粒的制备

将 10 mg AT-III (100 μL 二甲基亚砜助溶)、330 mg 2-甲基咪唑, 150 mg 六水合硝酸锌溶解于 5 mL 超纯水中。在冰浴下, 将 5 mL 超纯水边搅拌边缓缓倒入 10 mL 甲醇溶液, 搅拌 2 h 后离心 (10 699 × g, 15 min) 去除未反应完全的试剂。然后使用甲醇离心 (10 699 × g, 15 min) 清洗, 重复 3 次, 即获得 ZIF-8@AT-III NPs。

## 1.4 纳米粒的表征

采用透射电子显微镜对 ZIF-8、ZIF-8@AT-III NPs 的外观、微观结构和组成进行表征。采用 X 射线衍射仪观察 ZIF-8、ZIF-8@AT-III 的晶形结构, 采用纳米粒度分析仪测定 ZIF-8、ZIF-8@AT-III 水合粒径和 Zeta 电位。取 1 mg ZIF-8@AT-III 用 10 mL 甲醇溶解破坏, 使 AT-III 释放出来, 离心取上清通过 HPLC 测定 AT-III 含量, 计算载药量和包封率。载药率 (%) = ZIF-8@AT-III 中 AT-III 质量 / ZIF-8@AT-III 质量 × 100%; 包封率 (%) = ZIF-8@AT-III 中 AT-III 质量 / AT-III 的投入质量 × 100%。

## 1.5 ZIF-8@AT-III 的药物释放

采用动态膜透析方法测定药物释放<sup>[11]</sup>。将

ZIF-8@AT-III 分散在不同 pH (7.4 和 5.5) 的 PBS 缓冲溶液中, 然后置于透析袋中 (截止分子量为 3500 Da)。将透析袋置于含有 10 mL 具有相应 pH PBS 的释放管中, 然后将透析袋置于 37 °C 的水浴振荡器中, 并以 100 rpm/min 轻轻摇动; 在规定时间内除去 0.5 mL 上清液, 并补充等体积的新鲜 PBS, 用滤膜过滤得到不同时间点 (0、1、2、4、6、8、12、18、24、48 h) 的分离液。采用 HPLC 测定 AT-III 的浓度, 检测条件<sup>[12]</sup>如下: 色谱柱为 Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相由乙腈-水 (60:40) 组成, 流速为 1.0 mL/min, 柱温保持在 30 °C, 紫外检测器波长设置为 220 nm。ZIF-8@AT-III 释放率 (%) = [溶液中 AT-III 的质量 / (ZIF-8@AT-III 复合物中 AT-III 总质量)] × 100%。

## 1.6 大鼠 IgAN 模型的建立和分组

将 48 h 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后按照随机数字表法分为正常对照 (Control) 组、IgAN 组、IgAN+AT-III 组、IgAN+ZIF-8@AT-III 组, 每组 12 只。采用 LPS+BSA+CCL<sub>4</sub> 法建立 IgAN 模型<sup>[9-10]</sup>: 每 2 d 灌胃 1 次 400 mg/kg BSA (溶于 2 mL 蒸馏水), 持续 6 周, 每周 1 次皮下注射 0.1 mL CCL<sub>4</sub> 和 0.5 mL 蓖麻油的混合溶液, 持续 9 周, 并分别在在第 6 周和第 8 周尾静脉注射 0.05 mg/kg LPS, 造模时间为 10 周。Control 组每 2 天灌胃 0.1% 稀盐酸配制酸化水, 每次 2 mL, 持续 6 周; 皮下注射 0.6 mL 生理盐水, 每周 1 次, 持续 9 周; 于第 6 周和第 8 周尾静脉注射 0.2 mL 生理盐水。每组的相应药物干预在第 11 周开始, IgAN+AT-III 组和 IgAN+ZIF-8@AT-III 组分别尾静脉注射溶解于 200 μL 生理盐水的 AT-III 和 ZIF-8@AT-III (相当于 AT-III 3.5 mg/kg)。每 3 d 注射 1 次, 共注射 3 周, Control 组和 IgAN 组等量生理盐水尾静脉注射。本动物实验经温州医科大学实验动物伦理委员会批准 (批件号: xmsq2021-0500)。

## 1.7 大鼠血清 DAO、D-LA 和 IgA 水平检测

按照说明书描述的方法, 使用 ELISA 法检测大鼠血清中的 DAO、D-LA 和 IgA 水平。DAO 和 D-LA 在血清中的水平可分别反映肠道黏膜上皮细胞损伤程度和肠道黏膜通透性的变化。

## 1.8 血清生化指标检测

使用生化仪检测血清中的 24 h 尿苷三磷酸

(UTP)、血清肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)指标。收集血清样本后离心并于 $-20^{\circ}\text{C}$ ，如有沉淀再次离心。收集组织上清后离心，将血清或组织上清用生化仪检测并读取结果。

### 1.9 标本采集与病理分析

采集肾脏组织标本：处死各组大鼠，剪开大鼠腹腔，取出左肾置于4%多聚甲醛中保存备用，右肾冻存备用；采集结肠组织标本：处死各组大鼠后，取出距肛门8 cm处结肠组织，冲洗内容物，肠标本置于液氮中保存备用。制作肾脏和结肠石蜡标本并制备组织冰冻切片；采用HE染色观察肾脏和结肠形态学改变、Masson染色观察肾脏纤维化程度；免疫荧光染色法检测系膜区IgA沉积。

### 1.10 Western blot检测

将蛋白质进行定量、电泳分离、转膜、封闭后，加入一抗(Claudin-5、ZO-1和GAPDH抗体，均按1:1 000稀释)， $4^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，TBST缓冲液洗膜，二抗IgG(稀释比例1:5 000)室温孵育1.5 h；洗膜，显色，曝片，计算目的蛋白条带灰度值与GAPDH条带灰度值的比值。

### 1.11 统计学分析

采用Graphpad Prism 8统计软件进行统计分析和作图，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间采用独立样本 $t$ 检验；多组之间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ZIF-8@AT-III的表征

成功制备了ZIF-8@AT-III纳米粒。ZIF-8(图1A)以及ZIF-8@AT-III(图1B)的透射电镜图显示合成的ZIF-8晶体形状规则、晶粒大小分布均匀、颗粒略有团聚现象。粒度分析仪结果表明ZIF-8平均粒径为 $(66.86 \pm 1.47)$  nm，多分散系数(PDI)为 $0.42 \pm 0.07$ ，负载药物后平均粒径为 $(70.62 \pm 1.07)$  nm，PDI为 $0.37 \pm 0.06$ (图2A和B)，以及连续7 d两种纳米颗粒的平均粒径无显著变化(图2C)。Zeta电位分析仪检测结果显示ZIF-8的Zeta电位为 $(-22.78 \pm 0.33)$  mV，载药后纳米粒的Zeta电位为 $(-26.46 \pm 1.22)$  mV，由此证明ZIF-8材料成功负载AT-III(图3)。

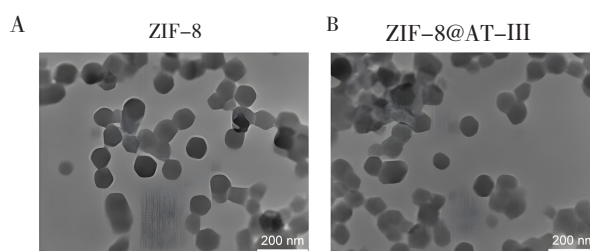


图1 ZIF-8 (A) 和ZIF-8@AT-III (B) 的透射电子显微镜图

Figure 1. Transmission electron microscopy image of ZIF-8 (A) and ZIF-8@AT-III (B)

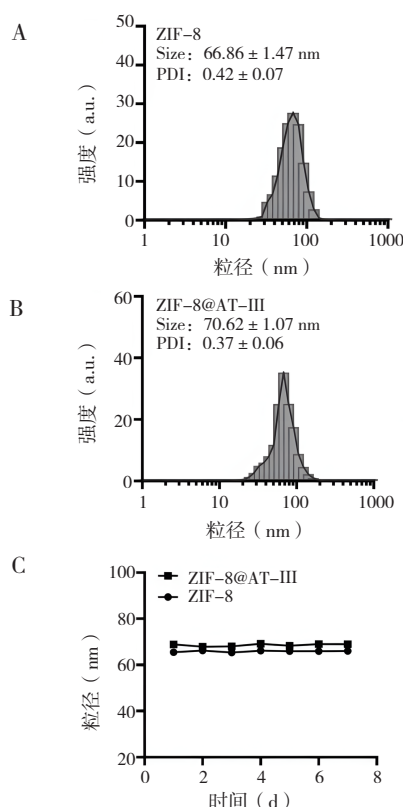


图2 ZIF-8和ZIF-8@AT-III的粒径分布图

Figure 2. Particle size distribution of ZIF-8 and ZIF-8@AT-III

注：A. ZIF-8的粒径分布；B. ZIF-8@AT-III的粒径分布；C. 连续7 d的粒径变化。

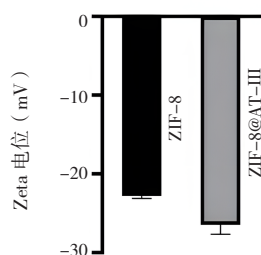


图3 ZIF-8和ZIF-8@AT-III的Zeta电位图

Figure 3. Zeta potential of ZIF-8 and ZIF-8@AT-III



ZIF-8@AT-III 纳米粒的载药率为 (19.2 ± 1.3) %，包封率为 (64.0 ± 0.6) %。由图4可知 X 射线衍射图显示合成样品的特征衍射峰与文献<sup>[11]</sup>中报道的一致，即 (011)，(002)，(112)，(022)，(013)，(222)。采用本研究方法可以得到高结晶度的 ZIF-8 材料，加载药物后晶体结构不改变。药物释放曲线显示 ZIF-8 负载 AT-III 的释放行为具有明显的 pH 响应性。在 pH 5.5 和 pH 7.4 环境下 AT-III 在前 10 h 释放速率较快，10 h 后释放速率逐渐变小，并且在 pH 5.5 环境下累计释放量显著高于 pH 7.4 条件下释放量，表明酸性条件更有利于 AT-III 的

释放 (图 5)。

## 2.2 ZIF-8@AT-III对IgAN模型大鼠肝肾功能的影

响  
与 Control 组相比，IgAN 组大鼠 24 h UTP、SCr 和 BUN 均显著升高；与 IgAN 组相比，AT-III 或 ZIF-8@AT-III 组中 24 h UTP、SCr 和 BUN 的含量均显著降低 ( $P < 0.05$ )，并且 ZIF-8@AT-III 组中含量的降低更为显著 (图 6A~C)。此外，4 组大鼠血清中 ALT 和 AST 的表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 6D 和 E)。结果表明，AT-III 或 ZIF-8@AT-III 治疗对 IgAN 大鼠的肝功能未产生明显的损伤。

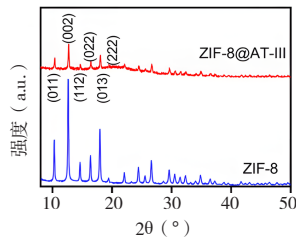


图4 ZIF-8和ZIF-8@AT-III的X射线衍射图  
Figure 4. X-ray diffraction pattern of ZIF-8 and ZIF-8@AT-III

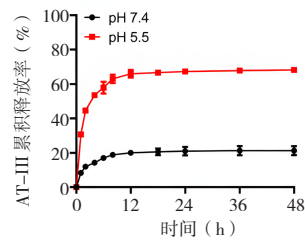


图5 ZIF-8和ZIF-8@AT-III的累计释放曲线  
Figure 5. Cumulative release curve of ZIF-8 and ZIF-8@AT-III

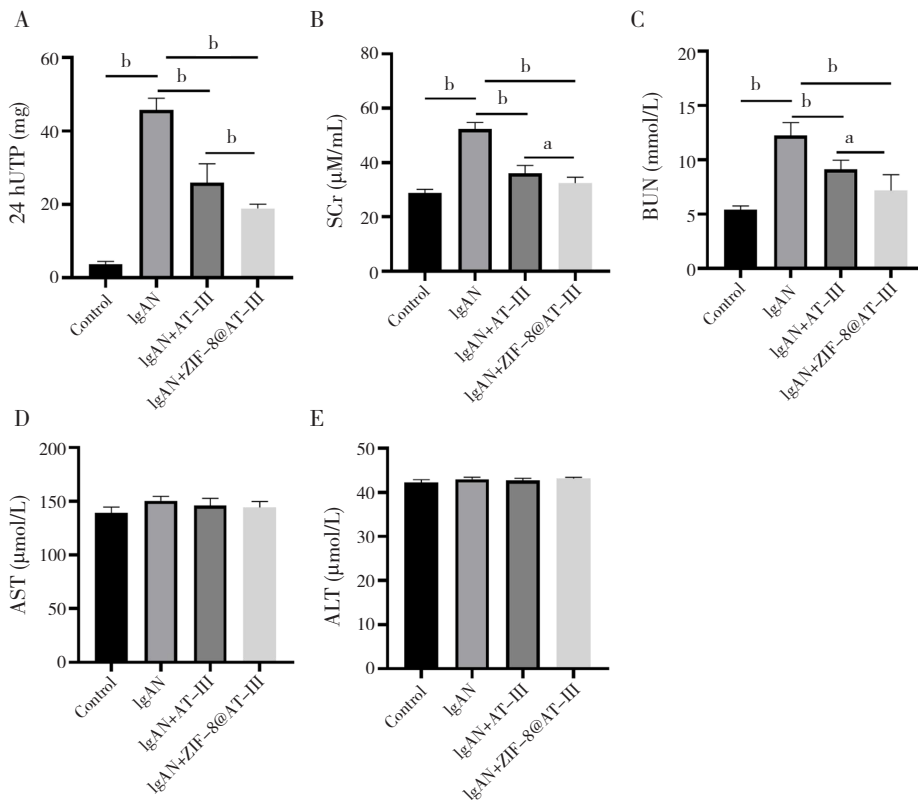


图6 肝肾功能的血生化指标 (n=6)

Figure 6. Blood biochemical indexes of liver and kidney functions (n=6)

注：<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

### 2.3 ZIF-8@AT-III抑制肾小球IgA沉积并改善肾脏损伤

免疫荧光染色结果显示, Control组观察到很少的IgA沉积, IgAN组大鼠肾小球系膜区IgA沉积增加; 而AT-III和ZIF-8@AT-III组IgA沉积显著减少(图7A)。ELISA结果显示, 与Control组相比, IgAN组大鼠血清IgA的含量显著升高( $P < 0.05$ ); 而与IgAN组相比, AT-III和ZIF-8@AT-III组血清中IgA的含量显著降低

( $P < 0.05$ ), 并且ZIF-8@AT-III组的IgA含量显著低于AT-III组(图7B)。Masson染色显示, 与Control组相比, IgAN大鼠肾小球中胶原纤维的沉积增加; 与IgAN组相比, AT-III组和ZIF-8@AT-III组胶原纤维的沉积减少(图7C)。HE染色结果显示, 相较于Control组, IgAN组肾小管基底膜增厚、系膜增生明显; 与IgAN组相比, AT-III组和ZIF-8@AT-III组系膜区未见增生(图7C)。

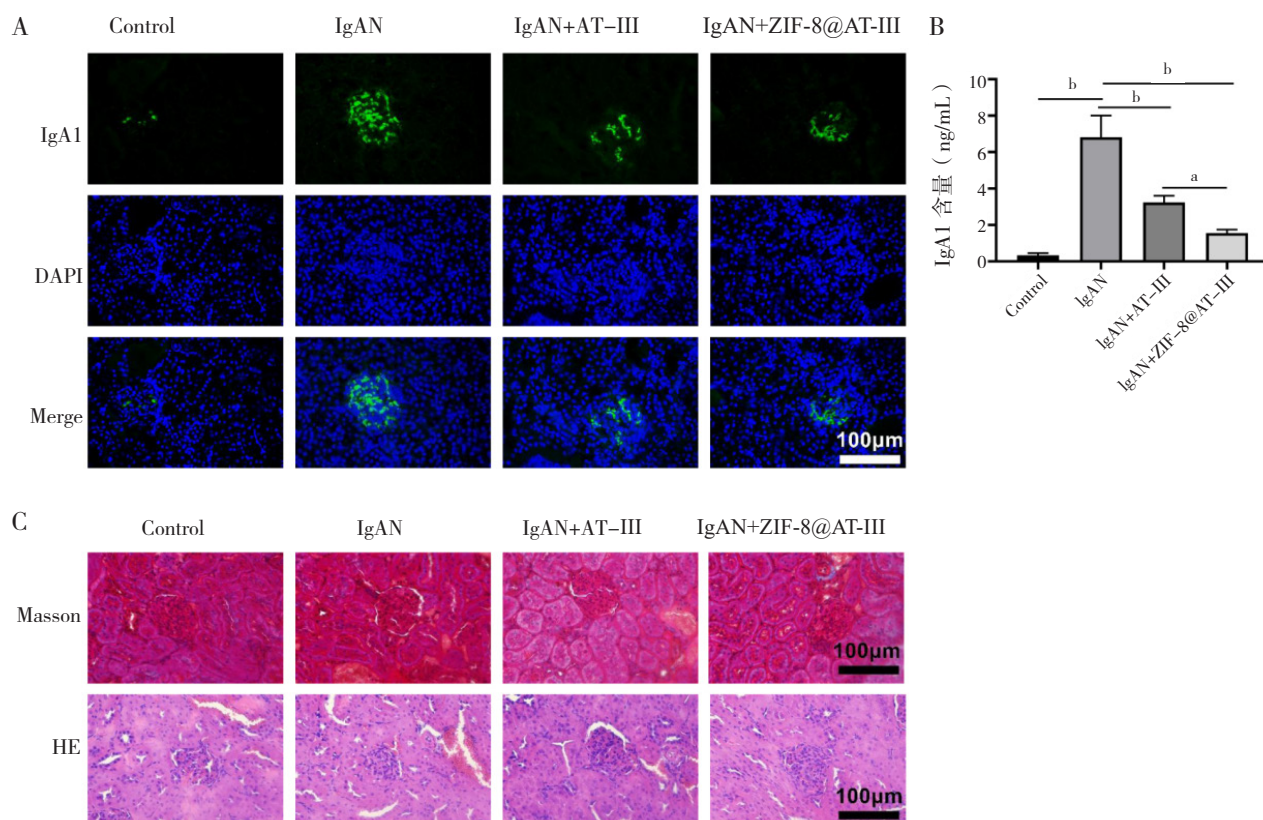


图7 检测各组大鼠IgA沉积和肾脏组织病理变化 ( $n=3$ )

Figure 7. Detections of IgA deposition and renal histopathological changes in each group ( $n=3$ )

注: A. 采用免疫荧光法检测肾组织中的IgA沉积; B. 采用ELISA检测大鼠血清中的IgA; C. 采用Masson染色和HE染色方法检测肾组织的病理变化; <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

### 2.4 ZIF-8@AT-III改善IgAN大鼠肠道免疫屏障功能以及肠道通透性

HE染色结果显示, Control组大鼠结肠组织结构完整且未见炎症细胞浸润; IgAN组大鼠肠壁结构严重破坏, 腺体变形甚至消失, 杯状细胞丢失, 可见大量炎症细胞浸润; AT-III或ZIF-8@AT-III治疗组大鼠的上述病理损伤有所改善(图8A)。ELISA结果显示, 与Control组相比, IgAN组大鼠血清中DAO和D-LA水平升高( $P < 0.05$ ), 表明肠道通透性增加; 与

IgAN组相比, AT-III或ZIF-8@AT-III组血清的DAO和D-LA水平显著降低( $P < 0.05$ ), 并且ZIF-8@AT-III组中DAO和D-LA水平的降低较AT-III组更为显著(图8B和C)。Western blot检测结果显示, 与Control组相比, IgAN组大鼠肠黏膜组织中ZO-1和Claudin-5水平降低( $P < 0.05$ ), 这表明肠道屏障受损和肠道通透性增加; 与IgAN组相比, AT-III或ZIF-8@AT-III组ZO-1和Claudin-5水平均有不同程度的增加( $P < 0.05$ )(图8D~F)。

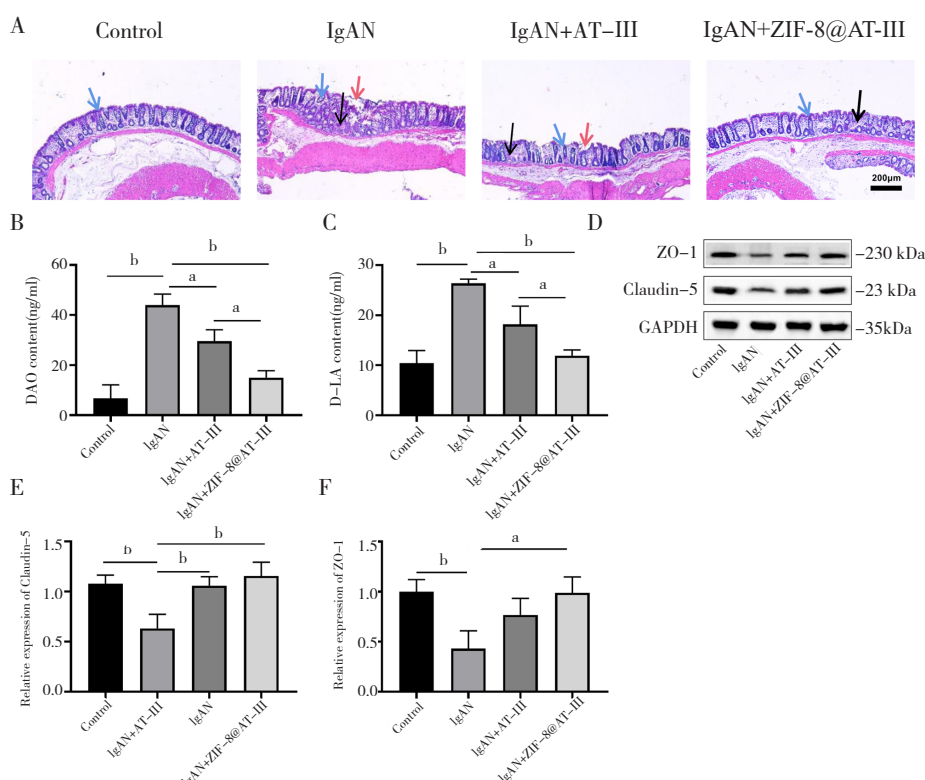


图8 各组大鼠的肠道免疫屏障功能和肠道通透性 (n=3)

Figure 8. The intestinal immune barrier function and intestinal permeability of rats in each group (n=3)

注: A. 采用HE染色方法检测结肠组织的完整性和结构,蓝色箭头代表杯状细胞,红色箭头代表腺体变形,黑色箭头代表炎症细胞浸润;B和C. 采用ELISA检测血清中DAO和D-LA的水平;D-F. 采用Western blot方法分析大鼠肠黏膜组织中ZO-1和Claudin-5的水平; \*P<0.05; <sup>b</sup>P<0.01。

### 3 讨论

肠道黏膜屏障的损伤已被报道与IgAN的发展有关,其损伤可能导致免疫系统激活,包括增殖诱导配体和白细胞介素-6、Toll样受体9、白细胞介素-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和诱导型一氧化氮合酶在内的炎症因子被激活分泌<sup>[12-14]</sup>,这种异常免疫活动可导致Gd-IgA1(一种特定的IgA1亚类)的分子结构发生变异<sup>[15]</sup>。这种异常的Gd-IgA1在免疫系统被认为是抗原,引发免疫反应,导致免疫复合物在肾脏中沉积,最终导致IgAN的发生<sup>[16]</sup>。在本研究中,与Control组相比,IgAN组大鼠的IgA在肾小球系膜区沉积,其次,24 h UTP、SCr和BUN均显著升高,提示IgAN大鼠造模成功。已有临床研究针对肠道相关淋巴组织进行靶向治疗来干预IgAN患者的进展<sup>[17]</sup>。肠道通透性与紧密连接蛋白(包括ZO-1和Claudin-5)的表达密切相关<sup>[18]</sup>,而肠道通透性增加常伴随着肠道黏膜屏障的损伤<sup>[19]</sup>。本研究中,与Control大鼠相比,IgAN大鼠的肠壁结构严重破坏,ZO-1和Claudin-5的表达减少,DAO

和D-LA水平升高,肠道通透性增加。说明肠道免疫屏障和通透性与IgAN的发生有关,这与之前的研究结果一致。

含有AT-III的多种中药方剂在治疗IgAN和相关肾脏疾病方面具有良好治疗作用。例如,防己黄芪汤中含有多种活性成分,包括AT-III,可用于治疗肾炎和糖尿病肾病<sup>[4,20]</sup>。益肾化湿颗粒主要用于治疗肾病综合征和慢性肾小球肾炎等疾病,其功效成分包括AT-III<sup>[5]</sup>。本研究中探讨了AT-III对肾功能的影响,AT-III能显著降低因IgAN诱导的24 h UTP、SCr和BUN含量的增加,且对ALT和AST无明显影响,表明其可恢复肾功能且不引起明显的肝损伤。本研究还进一步探讨了AT-III对IgAN的缓解作用,结果表明AT-III减少IgAN大鼠肾小球IgA沉积,减轻肾脏病理损伤。由于肠道免疫屏障和肠道通透性的调节对IgAN具有一定的调控作用<sup>[21]</sup>,推测AT-III对IgAN的保护作用可能一部分归因于维护肠道免疫屏障功能。据报道,AT-III通过调节Janus激酶2/信号转导转录激活因子3信号通路减轻溃疡性结肠炎模型小鼠



肠道损伤<sup>[22]</sup>。另一项研究发现, AT-III 通过调节自噬水平清除过氧化物减轻小鼠溃疡性结肠炎<sup>[3]</sup>。可见 AT-III 对溃疡性结肠炎具有重要的药用价值。本研究还探讨了 AT-III 对肠道免疫屏障的影响, 结果表明, AT-III 缓解了肠壁组织的损伤, 增加了 ZO-1 和 Claudin-5 的表达, 降低 IgAN 大鼠肠道的高通透性。综上可发现 AT-III 能够恢复 IgAN 大鼠免疫屏障的损伤以及缓解肾脏损伤, 表明 AT-III 可能同时作用于肠道和肾脏来缓解 IgAN。

AT-III 在 IgAN 大鼠中的作用已经被证实, 然而 AT-III 的低水溶性限制了其治疗作用的发挥。纳米医学已被广泛用于药物的靶向递送, 能有效增加药物溶解度和生物相容性<sup>[23]</sup>。为克服 AT-III 的低水溶性限制其治疗作用, Wang 等<sup>[24]</sup>制备了装载了 p38 $\alpha$  MAPK 和 p65 siRNA 的表面电荷依赖性肾小球靶向脂质体纳米颗粒, 有效缓解了 IgAN 的症状。本研究选择 ZIF-8 作为理想的药物载体, 用于有效地传递 AT-III。由于 IgAN 的肾脏组织和肠道组织微环境表现为弱酸性<sup>[25-26]</sup>, 而 ZIF-8 是一种具有酸响应性的框架材料, 能够发挥靶向释放的效果<sup>[27]</sup>。药物释放试验的结果证明, ZIF-8@AT-III 纳米粒的释放具有酸响应特性, 能够在弱酸性环境下快速和大量释放, 而在中性或弱碱性环境下少量释放, 酸性环境能够增加 AT-III 的靶向性以及减少临床上的使用剂量。最后, 体内研究的结果显示, ZIF-8@AT-III 的治疗效果显著优于 AT-III。然而后续需要更多的深入研究和临床验证, 以确定其临床应用的可行性和安全性。

综上所述, AT-III 通过改善 IgAN 大鼠肠道免疫屏障功能以及肠道通透性减少了 IgAN 大鼠肾小球 IgA 沉积并缓解肾脏损伤。此外本课题组还成功制备了具有适宜粒径的 ZIF-8@AT-III 纳米粒, 具备高载药量和包封率, 良好的稳定性和靶向释放特性, 产生优于单纯 AT-III 的治疗效果, 有望成为治疗 IgAN 的新策略。

## 参考文献

- 1 Soares MFS, Roberts ISD. Histologic classification of IgA nephropathy: past, present, and future[J]. *Semin Nephrol*, 2018, 38(5): 477-484. DOI: [10.1016/j.semnephrol.2018.05.017](https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.05.017).

- 2 Floege J, Rauen T, Tang SCW. Current treatment of IgA nephropathy[J]. *Semin Immunopathol*, 2021, 43(5): 717-728. DOI: [10.1007/s00281-021-00888-3](https://doi.org/10.1007/s00281-021-00888-3).
- 3 任燕, 黄明进, 蒋雯文, 等. 白术内酯 III 通过调节自噬水平清除过氧化物减轻小鼠溃疡性结肠炎[J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2022, 24(8): 3219-3225. [Ren Y, Huang MJ, Jiang WW, et al. Atractylenolide III alleviates ulcerative colitis in mice by regulating autophagy levels and scavenging peroxide[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2022, 24(8): 3219-3225.] DOI: [10.11842/wst.20210704004](https://doi.org/10.11842/wst.20210704004).
- 4 汪永国. 防己黄芪汤在肾病综合征治疗中的作用研究[J]. *内蒙古中医药*, 2019, 38(12): 52-53. [Wang YG. Study on the role of Fangji Huangqi Tang in the treatment of nephrotic syndrome[J]. *Inner Mongolia Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 38(12): 52-53.] DOI: [10.16040/j.cnki.cn15-1101.2019.12.034](https://doi.org/10.16040/j.cnki.cn15-1101.2019.12.034).
- 5 姜晨, 徐荣佳, 崔师妍, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学探讨益肾化湿颗粒治疗 IgA 肾病作用机制[J]. *中草药*, 2021, 52(21): 6576-6585. [Jiang C, Xu RJ, Cui SY, et al. Mechanism of Yishen Huashi granules in treatment of IgA nephropathy based on HPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology[J]. *2021, 52(21): 6576-6585.*] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.016](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2021.21.016).
- 6 Zhou N, Shen Y, Fan L, et al. The characteristics of intestinal-barrier damage in rats with IgA Nephropathy[J]. *Am J Med Sci*, 2020, 359(3): 168-176. DOI: [10.1016/j.amjms.2019.11.011](https://doi.org/10.1016/j.amjms.2019.11.011).
- 7 胡彤, 庞智. 炎症性肠病与肠道微生态[J]. *医学新知*, 2022, 32(4): 296-302. [Hu T, Pang Z. Inflammatory bowel disease and intestinal microecology[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2022, 32(4): 296-302.] DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202203027](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202203027).
- 8 曹正宇, 吴茂雄, 黄图城, 等. 透明质酸-二氧化钛纳米颗粒介导的声动力在动脉粥样硬化斑块治疗中的应用研究[J]. *岭南急诊医学杂志*, 2023, 28(1): 8-12. [Cao ZY, Wu MX, Huang TC, et al. Hyaluronic acid-titania nanoparticles mediated sonodynamic therapy for the treatment of atherosclerotic plaque[J]. *Lingnan Journal of Emergency Medicine*, 2023, 28(1): 8-12.] DOI: [10.3969/j.issn.1671-301X.2023.01.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-301X.2023.01.003).



- 9 严新安, Chirume WM, 方跃. 银纳米对不同骨科生物材料上金黄色葡萄球菌生物膜的影响[J]. 华西医学, 2023, 38(7): 1047–1052. [Yan XA, Walter M, Fang Y. Effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* biofilm formation on different orthopedic biomaterials[J]. West China Medical Journal, 2023, 38(7): 1047–1052.] DOI: [10.7507/1002-0179.202110174](https://doi.org/10.7507/1002-0179.202110174).
- 10 Xie H, Liu X, Huang Z, et al. Nanoscale zeolitic imidazolate framework (ZIF)-8 in cancer theranostics: current challenges and prospects[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(16): 3935. DOI: [10.3390/cancers14163935](https://doi.org/10.3390/cancers14163935).
- 11 时慧, 汪河滨, 连培涵, 等. ZIF-8 纳米载体的制备及负载黄芩素性能研究[J]. 塔里木大学学报, 2021, 33(4): 29–35. [Shi H, Wang HB, Lian PH, et al. Study on preparation of ZIF-8 nanocarrier and performance of loading baicalein[J]. Journal of Tarim University, 2021, 33(4): 29–35.] DOI: [10.3969/j.issn.1009-0568.2021.04.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-0568.2021.04.005).
- 12 Makita Y, Suzuki H, Kano T, et al. TLR9 activation induces aberrant IgA glycosylation via APRIL- and IL-6-mediated pathways in IgA nephropathy[J]. Kidney Int, 2020, 7(2): 340–349. DOI: [10.1016/j.kint.2019.08.022](https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.08.022).
- 13 Groza Y, Jemelkova J, Kafkova LR, et al. IL-6 and its role in IgA nephropathy development[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2022, 66: 1–14. DOI: [10.1016/j.cytogfr.2022.04.001](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.04.001).
- 14 Fan F, Ai Y, Sun T, et al. The role of inflammatory cytokines in anemia and gastrointestinal mucosal injury induced by foot electric stimulation[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 3101. DOI: [10.1038/s41598-021-82604-7](https://doi.org/10.1038/s41598-021-82604-7).
- 15 Tang Y, Zhu Y, He H, et al. Gut dysbiosis and intestinal barrier dysfunction promotes IgA nephropathy by increasing the production of Gd-IgA1[J]. Front Med (Lausanne), 2022, 9: 944027. DOI: [10.3389/fmed.2022.944027](https://doi.org/10.3389/fmed.2022.944027).
- 16 Suzuki H, Novak J. IgA glycosylation and immune complex formation in IgAN[J]. Semin Immunopathol, 2021, 43(5): 669–678. DOI: [10.1007/s00281-021-00883-8](https://doi.org/10.1007/s00281-021-00883-8).
- 17 Fellström BC, Barratt J, Cook H, et al. Targeted-release budesonide versus placebo in patients with IgA nephropathy (NEFIGAN): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2b trial[J]. Lancet, 2017, 389(10084): 2117–2127. DOI: [10.1016/s0140-6736\(17\)30550-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30550-0).
- 18 Huang M, Jiang W, Luo C, et al. Atractylenolide III inhibits epithelial-mesenchymal transition in small intestine epithelial cells by activating the AMPK signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2022, 25(3): 98. DOI: [10.3892/mmr.2022.12614](https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12614).
- 19 Schoultz I, Keita ÅV. The intestinal barrier and current techniques for the assessment of gut permeability[J]. Cells, 2020, 9(8): 1909. DOI: [10.3390/cells9081909](https://doi.org/10.3390/cells9081909).
- 20 孙丽英, 袁文婷, 石雪华. 防己黄芪汤临床应用及作用机制研究进展[J]. 中医药信息, 2023, 40(4): 90–95. [Sun LY, Yuan WT, Shi XH. Research progress in clinical application and action mechanism progress of Fangji Huangqi decoction[J]. Information on Traditional Chinese Medicin, 2023, 40(4): 90–95.] DOI: [10.19656/j.cnki.1002-2406.20230415](https://doi.org/10.19656/j.cnki.1002-2406.20230415).
- 21 Kiryluk K, Li Y, Scolari F, et al. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens[J]. Nat Genet, 2014, 46(11): 1187–1196. DOI: [10.1038/ng.3118](https://doi.org/10.1038/ng.3118).
- 22 鲁慧东, 李艳梅. 白术内酯 III 通过调节 JAK2/STAT3 信号通路减轻溃疡性结肠炎模型小鼠肠道损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(1): 142–149. [Lu HD, Li YM, Atractylenolide III attenuates intestinal damage in ulcerative colitis model mice by regulating JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2023, 39(1): 142–149.] DOI: [10.3969/j.issn.1000-4718.2023.01.017](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-4718.2023.01.017).
- 23 吴昭全, 蒋远流, 罗怀青, 等. 羟基积雪草酸固体脂质纳米凝胶的制备及体内外透皮特性研究[J]. 中国药师, 2022, 25(7): 1150–1156. [Wu ZQ, Jiang YL, Luo HQ, et al. Preparation and transdermal permeability *in vitro* and *in vivo* of madecassic acid solid lipid nanoparticles gel[J]. China Pharmacist, 2022, 25(7): 1150–1156.] DOI: [10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.07.004](https://doi.org/10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.07.004).
- 24 Wang Y, Wu Q, Wang J, et al. Co-delivery of p38 $\alpha$  MAPK and p65 siRNA by novel liposomal glomerulus-targeting nano carriers for effective immunoglobulin a nephropathy treatment[J]. J Control Release, 2020, 320: 457–468. DOI: [10.1016/j.jconrel.2020.01.024](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.024).
- 25 Zhang H, He Q, Wang J, et al. Biomimetic micelles to accurately regulate the inflammatory microenvironment for glomerulonephritis treatment[J]. Pharmacol Res, 2022,

- 181: 106263. DOI: [10.1016/j.phrs.2022.106263](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106263).
- 26 Zhang X, Zhao X, Hua Z, et al. ROS-triggered self-disintegrating and pH-responsive astaxanthin nanoparticles for regulating the intestinal barrier and colitis[J]. *Biomaterials*, 2023, 292: 121937. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2022.121937](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121937).
- 27 Shi Y, Xing Y, Gong C, et al. In situ encapsulation of laccase in mesoporous amorphous ZIF-8 for reactive blue 19 removal[J]. *Water Environ Res*, 2023, 95(5): e10879. DOI: [10.1002/wer.10879](https://doi.org/10.1002/wer.10879).

收稿日期: 2023 年 12 月 26 日 修回日期: 2024 年 03 月 01 日

本文编辑: 李 阳 钟巧妮