

糖肾方对 db/db 小鼠肾脏纤维化的保护作用

刘 鹏^{1,2} 陈姣伊^{1,3} 刘言振^{1,3} 赵婷婷¹ 张浩军¹ 严美花¹ 赵海玲¹ 李 平¹

(1 中日友好医院临床医学研究所, 免疫炎症性疾病北京市重点实验室, 北京, 100029; 2 中国医学科学院/北京协和医学院研究生院, 北京, 100730; 3 北京中医药大学, 北京, 100029)

摘要 目的: 观察糖肾方(Tang Shen Fang, TSF)对于自发性 2 型糖尿病肾病 db/db 小鼠肾脏纤维化的保护作用。方法: 8 周龄雄性 db/db 小鼠随机分为 2 组, 分别为模型组(db/db)和观察组(db/db + TSF), 每组 9 只; 8 周龄雄性 db/m 小鼠为正常对照组(db/m), 顺应性喂养 2 周后, 给予糖肾方干预 12 周, 处死小鼠, 分离小鼠肾脏用于后续检测。利用 PAS 和 Masson 染色观察肾脏病理; 利用 Western Blotting、Real-time PCR 和免疫组化等技术检测肾脏组织纤维化 TGF- β 1/Smad3 通路以及 miRNA21 和 miRNA29b 的表达。结果: 糖肾方可以改善 db/db 小鼠尿微量白蛋白水平, 减轻小鼠肾脏损伤; Western Blotting、Real-time PCR 和免疫组化结果显示, 糖肾方可下调 db/db 小鼠肾脏中纤维化标志分子 TGF- β 1、Smad3、Collagen I 和 Fibronectin 的表达; 下调 db/db 小鼠肾脏 miRNA 21 的表达, 上调 miRNA 29b 的表达。结论: 糖肾方可作用于 TGF- β 1/Smad3 信号通路抑制肾脏纤维化。

关键词 糖肾方; 糖尿病肾病; 肾脏纤维化; miRNA

Protective Effects of Tangshen Formula in Renal Fibrosis in db/db Mice

Liu Peng^{1,2}, Chen Jiaoyi^{1,3}, Liu Yanzhen^{1,3}, Zhao Tingting¹, Zhang Haojun¹, Yan Meihua¹, Zhao Hailing¹, Li Ping¹

(1 Beijing Key Lab of Immune-mediated Inflammatory Diseases, Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 2 Graduate School of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; 3 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Tangshen Formula (TSF) treatment on renal fibrosis and explore its potential mechanism in db/db mice. **Methods:** Eight weeks old db/db and db/m mice were randomly divided into three subgroups, (db/m, db/db, db/db + TSF), and all mice were fed with a normal diet. After two weeks adaptation, mice were maintained on TSF treatment for 12 weeks and were then sacrificed under anesthesia after overnight fast. Animal urine and renal tissues samples were collected for further analyses. The kidneys were washed with cold PBS solution; one part of the renal tissue were stored in liquid nitrogen, and another deposited -80 °C directly for subsequent frozen sections; the rest of the kidney were fixed into the neutral formalin for pathological analysis. The renal fibrosis was detected by PAS and Masson staining. The renal expression of TGF- β 1/Smad3 and its target genes were assessed by Western Blotting, real-time PCR, and IHC. **Results:** TSF diminished UACR of db/db mice. Histological analysis using PAS and Masson staining revealed the occurrence of mesangial matrix expansion and extracellular matrix deposition in the kidneys of db/db mice. The treatment with TSF significantly ameliorated these histological renal injuries in db/db mice. Western Blotting and real-time PCR analysis showed that expression levels of TGF- β 1, Smad3, Collagen I and Fibronectin were significantly downregulated in the db/db mice with TSF treatment. With TSF treatment, the expression levels of miRNA 21 was downregulated, but the expression levels of miRNA 29b was upregulated. **Conclusion:** TSF attenuated renal fibrosis in db/db mice, through suppression of TGF- β 1/Smad3 pathway.

Key Words Tangshen formula; Diabetic nephropathy; Renal fibrosis; miRNA

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.06.010

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)主要的微血管并发症之一, 已成为发达国家和我国发达地区终末期肾病(End Stage Renal Disease, ESRD)的主要原因^[1-2]。

DN 主要病理改变是由于细胞外基质的过度沉积, 肾小球基底膜的厚度增加, 进而导致系膜增殖和扩张, 最终发展成为肾小球硬化和肾脏纤维化, 丧失正常的功能。在 DN 的早期阶段(微量白蛋白尿阶段),

基金项目: 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(81620108031); 科技部国际合作项目(2011DFA31860); 北京市科委“十病十药”专项项目(Z151100003815015)

作者简介: 刘鹏(1989.06—), 男, 在读博士研究生, 研究方向: 中医药防治糖尿病肾病, E-mail: drliupeng@sina.cn

通信作者: 李平(1956.12—), 女, 博士, 教授, 研究员, 免疫炎症性疾病北京市重点实验室主任, 研究方向: 中医药防治糖尿病肾病, E-mail: lp8675@163.com

胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白在肾小球基底膜和系膜细胞外基质中的沉积明显增加,导致糖尿病弥漫性肾小球硬化症;在晚期阶段,肾脏中Ⅰ型和Ⅲ型胶原明显沉积^[3]。由此可见,纤维化是DN肾脏病理的最主要特征。转化生长因子-β1(TGF-β1)是一种广谱细胞因子,可被高血糖、晚期糖基化终产物(Advanced Glycation End-products, AGEs)、促分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK)和蛋白激酶C(Protein Kinase C, PKC)等多种途径诱导,在导致DN纤维化过程中发挥着决定性的作用^[4]。多项研究表明TGF-β1/Smad3信号通路是引起糖尿病肾病肾脏纤维化的重要通路,此外TGF-β1还可通过调控一些微小RNA(MicroRNA, miRNA)进一步引起肾脏损伤(如:miRNA 21, miRNA 29等)^[5-6]。因此,TGF-β/Smad3信号通路已成为防治DN的重要靶点之一。

目前的治疗方案尚不能产生显著的疗效,因此迫切需要新的治疗方法来减缓DN的进展^[7]。中医药是祖国瑰宝,同时国内的糖尿病肾脏疾病(Diabetic Kidney Diseases, DKD)患者广泛接受中医药的治疗^[8]。中药糖肾方(Tangshen Formula, TSF)颗粒是由七味药组成,分别为黄芪、生地黄、山茱萸、三七、卫矛、熟大黄和枳壳,是李平教授团队在继承名老中医经验基础上,结合自身临床实践和现代研究成果拟定的中药复方。在国家“973计划”和国际科技合作等项目资助下,课题组前期多中心临床试验证实糖肾方可以减少DKD患者尿蛋白排泄率,改善肾小球滤过率^[9]。本研究主要探讨糖肾方对于肾脏纤维化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性自发性2型糖尿病db/db小鼠,8周龄,体重(35±5)g;同遗传背景db/m小鼠,体重(20±2)g,购自北京大学实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(京)2011-0001。小鼠均饲养于中日友好医院SPF级实验动物室屏障环境,使用许可证号:SYXK(京)2010-0011。温度:(23±3)℃,相对湿度(55±15)%,保持12h光照/12h黑暗交替,自由饮水和常规饲料喂养。本次实验所有操作均严格按照实验动物伦理相关规定进行。

1.1.2 药物 糖肾方配方颗粒,由江阴天江药业有限公司制剂,规格:8g/袋,批号:1206346。糖肾方组成药物为:黄芪、卫矛、生地黄、枳壳、山茱萸、大黄、三七7味中药,其重量比依次为10:5:4:3.4:3:

2:1。

1.1.3 试剂与仪器 小鼠白蛋白Elisa试剂盒(美国Bethyl Laboratories公司);iQTM SYBR Green supermix(美国Bio-RAD公司);蛋白预染Marker(中国天根生化科技有限公司);PVDF膜(德国Merck Millipore公司);Collagen I抗体(美国Santa Cruz公司);Fibronectin抗体(美国Santa Cruz公司);Smad3抗体(美国Cell Signaling Technology公司);P-Smad3抗体(美国Cell Signaling Technology公司);β-actin抗体(美国Santa Cruz公司);辣根酶标记兔抗小鼠IgG(美国DAKO公司);Trizol试剂(美国Santa Cruz公司);Quick start Bradford Dye Reagent(美国Bio-RAD公司);Taqman miRNA试剂盒(美国Thermo Fisher公司);BSA(美国Amresco公司)。CD-1600全自动生化分析仪(美国雅培公司);BX43型光学显微镜(日本Olympus公司);多功能酶标仪(美国Thermo Fisher公司);PH仪(美国Thermo Fisher公司);垂直凝胶电泳系统(美国Bio-RAD公司);Nanodrop高精度核算分光光度计(美国Thermo Fisher公司);PCR仪(美国Bio-RAD公司);real-time PCR仪(美国Bio-RAD公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 实验动物购入后,顺应性喂养2周,称重并进行基础状态观察,于10周龄时根据体重将db/db小鼠随机分为2组。

1.2.2 给药方法 动物分组后从第1天开始灌胃给药,1次/d,每周称重,连续给药12周。糖肾方剂量参考前期临床研究并按照标准动物剂量换算^[10],根据体重按照体表面积进行换算,糖肾方的临床给药剂量是16g/d,按照人的标准体重为60kg计算,小鼠体重按照20g计算,小鼠给药剂量应为人给药剂量的9倍,则小鼠给药剂量为还是2.4g/(kg·d)^[9]。糖肾方颗粒剂按照0.18g/mL的浓度进行配制,4℃保存,灌胃前取出恢复至室温,混匀后备用。各组小鼠灌胃给药方案如下表所示见,表1.1。

表 1.1 实验动物给药方案

组别	给药措施	剂量
正常对照组(db/m)(n=9)	蒸馏水	2.4 g/(kg·d)
模型组(db/db)(n=9)	蒸馏水	2.4 g/(kg·d)
糖肾方组(db/db+TSF)(n=9)	糖肾方	2.4 g/(kg·d)

1.2.3 标本采集 实验期间从给药0周开始,每4周将小鼠转移入代谢笼一次,小鼠禁食但不禁水,收集24h尿液后测定尿量,混匀后留取1.5mL,10000rpm 4℃离心5min,留取上清液,保存于-80℃

冰箱用于检测尿白蛋白及尿肌酐水平。在给药 12 周实验结束时,小鼠禁食 12 h 后,眼内眦取血,3 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min,留取上清液,保存于 -80 ℃ 冰箱用于检测各项生化指标。之后迅速打开小鼠腹腔,摘取双侧肾脏,分别称重。一侧肾脏去除髓质后,一半置于 10% 中性福尔马林溶液中固定,另一半置于 4% 多聚甲醛中固定;另一侧分离出肾皮质,迅速置于干燥冻存管中,于液氮保存。

1.2.4 检测指标与方法 取尿液上清,检测尿白蛋白浓度和尿肌酐;并计算尿白蛋白肌酐比值 (Urine Albumin-to-Creatinine Ratio, UACR)。肾组织经过 10% 中性福尔马林固定 24 h 后,依次进行脱水、透明、石蜡包埋后,使用切片机分别切为 3 μm 厚切片,进行过碘酸-雪夫 (Periodic Acid-Schiff, PAS) 染色和 Masson 染色,光镜下观察肾脏组织病理变化,采用评分法对其进行半定量分析。采用 Western Blotting 以及免疫组化法检测肾脏组织中 Smad3、P-Smad3、Collagen I 和 Fibronectin 的表达情况,采用 Real-time PCR 检测肾脏组织中 TGF- β 1 Smad3、Collagen I 和 Fibronectin 的 mRNA 水平以及 miRNA 21 和 miRNA 29b 的表达情况。

1.3 统计学方法 所有计量数据均以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析,采用 One-way ANOVA 分析和 Dunnett-t 多组间比较等检验方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖肾方对 db/db 小鼠 UACR 的影响 尿微量白蛋白是评价 DN 病情进展的重要指标,本研究中以尿肌酐进行校正,使用 UACR 作为评价病情进展。如图 1.1 B 所示。在 10 周龄实验开始时,模型组 db/db 小鼠 UACR 显著高于正常组 db/m 小鼠,而模型组与糖肾方组 db/db 小鼠 UACR 无明显差异;从 18 周龄开始,在给予糖肾方干预后,db/db 小鼠 UACR 显著降低,抑制病情进展。图 1.1 中,db/m 表示正常对照组,db/db 表示模型组,db/db + TSF 表示糖肾方观察组。

2.2 糖肾方显著改善 db/db 小鼠肾脏病理损伤

肾脏组织经过 PAS 染色后,糖原在光镜下呈紫红色颗粒。如图 1.2A 所示。正常组 db/m 小鼠肾小球的结构正常,系膜区阳性物质未见增多;模型组 db/db 小鼠肾小球官腔的结构异常,系膜区阳性物质明显增多,同时伴有系膜基质显著增生以及基底膜增厚;在给予糖肾方干预后,可明显改善 db/db 小

鼠肾小球系膜基质的增生及基底膜增厚,同时对肾小球系膜基质百分比进行半定量分析,结果具有统计学差异。见图 1.2 B。

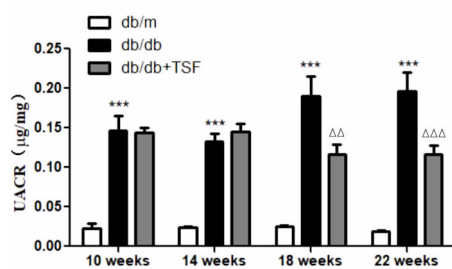


图 1.1 糖肾方对 db/db 小鼠 UACR 的影响

注:db/db 组与 db/m 组比较,*** $P < 0.001$; db/db + TSF 组与 db/db 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

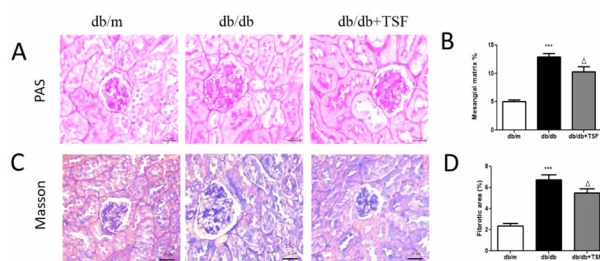


图 1.2 肾脏 PAS 染色 ($\times 400$) 和 Masson 染色 ($\times 400$)

注:db/db 组与 db/m 组比较,*** $P < 0.001$; db/db + TSF 组与 db/db 组比较, $\Delta P < 0.05$

经过 Masson 染色后,胶原在光镜下呈现蓝色。如图 1.2 C 所示。正常组 db/m 小鼠肾小球和肾小管的结构正常,胶原表达未见增多;模型组 db/db 小鼠肾小球系膜区及基底膜胶原出现明显的增生,同时出现肾小管扩张;给予糖肾方干预后,可明显减少 db/db 小鼠肾小球及小管间质的胶原沉积,使用纤维化面积进行半定量分析,结果具有统计学差异。见图 1.2 D。

2.3 糖肾方对 db/db 小鼠肾脏皮质 Collagen I 和 Fibronectin 蛋白及 mRNA 水平的影响 如图 1.3 所示,免疫组化检测发现,模型组 db/db 小鼠肾脏皮质 Collagen I 和 Fibronectin 蛋白水平显著高于正常组 db/m 小鼠,在给予糖肾方干预后,db/db 小鼠肾脏皮质 I 型胶原和纤维连接蛋白水平显著下降,结果具有统计学差异。见图 1.4 所示。Western Blotting 检测发现,模型组 db/db 小鼠肾脏皮质 Collagen I 和 Fibronectin 蛋白水平显著高于正常组 db/m 小鼠,在给予糖肾方干预后,db/db 小鼠肾脏皮质 I 型胶原和纤维连接蛋白水平显著下降。如图 1.5 所示。Real-time PCR 检测发现,模型组 db/db 小鼠肾脏皮质 I 型胶原和纤维连接蛋白 mRNA 水平显著高于正常组 db/m 小鼠,在给予糖肾方干预后,db/db 小鼠肾脏

皮质 I 型胶原和纤维连接蛋白 mRNA 水平显著下降。

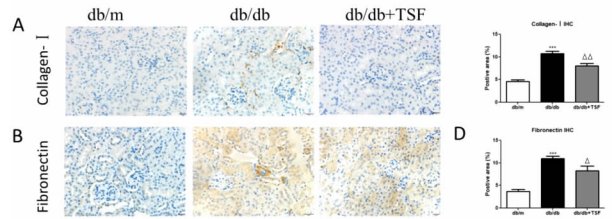


图 1.3 免疫组化检测小鼠肾脏 Collagen I 和 Fibronectin 蛋白表达

注:db/db 组与 db/m 组比较,*** $P < 0.001$;db/db + TSF 组与 db/db 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

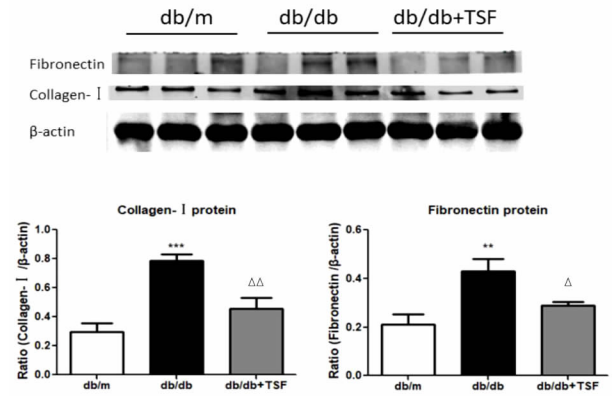


图 1.4 Western Blotting 检测小鼠肾脏 Collagen I 和 Fibronectin 蛋白表达

注:db/db 组与 db/m 组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;db/db + TSF 组与 db/db 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

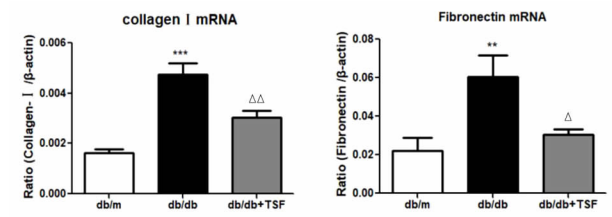


图 1.5 real-time PCR 检测小鼠肾脏 Collagen I 和 Fibronectin mRNA 表达

注:db/db 组与 db/m 组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;db/db + TSF 组与 db/db 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.4 糖肾方对 db/db 小鼠肾脏皮质 TGF- β 1/Smad3 信号通路的影响 如图 1.6 所示,Western Blotting 检测发现,模型组 db/db 小鼠肾脏皮质中 Smad3 蛋白磷酸化水平显著高于正常组 db/m 小鼠,在给予糖肾方干预后,db/db 小鼠肾脏皮质 Smad3 蛋白磷酸化水平显著下降。如图 1.7 所示,real-time PCR 检测发现,模型组 db/db 小鼠肾脏皮质中 TGF- β 1 mRNA 水平显著高于正常组 db/m 小鼠,在给予糖肾方干预后,db/db 小鼠肾脏皮质 TGF- β 1 mRNA 水平显著下降。

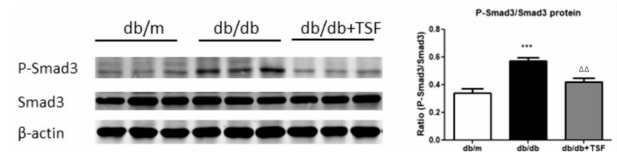


图 1.6 Western Blotting 检测小鼠肾脏 P-Smad3/Smad3 蛋白表达

注:db/db 组与 db/m 组比较,*** $P < 0.001$;db/db + TSF 组与 db/db 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

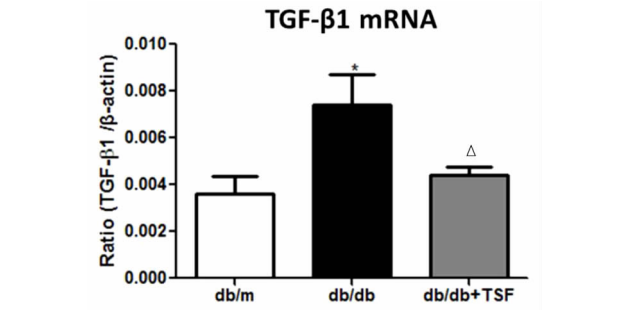


图 1.7 real-time PCR 检测小鼠肾脏 TGF- β 1 mRNA 表达

注:db/db 组与 db/m 组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$;db/db + TSF 组与 db/db 组比较, $\Delta P < 0.05$

2.5 糖肾方对 db/db 小鼠肾脏皮质 miRNA 21 和 miRNA 29b 的影响 miRNA 是可以调节各项生命活动的小内源非编码 RNA,抑制目标基因翻译和/或诱导 mRNA 降解,Smad3 介导的 miRNA (例如:miRNA 21,miRNA 29 等)在糖尿病肾脏纤维化过程中发挥着重要作用。如图 1.8 所示,real-time PCR 检测发现,模型组 db/db 小鼠肾脏皮质中 miRNA 21 水平显著高于正常组 db/m 小鼠,miRNA 29b 水平显著低于正常组 db/m 小鼠;在给予糖肾方干预后,db/db 小鼠肾脏皮质中 miRNA 21 水平显著下降,miRNA 29b 水平显著升高。

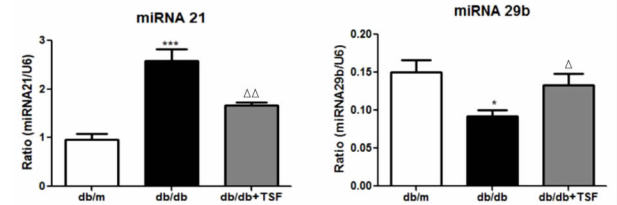


图 1.8 Real-time PCR 检测小鼠肾脏 miRNA 21 和 miRNA 29b 表达

注:db/db 组与 db/m 组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;db/db + TSF 组与 db/db 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

我国已经成为了全球 DM 患者最多的国家,而且患病人数还在继续增加,最新的研究显示我国目前 DM 的患病率已经达到了 10.9%,同时糖尿病前期的人口预计在 35.7%^[11]。DN 作为 DM 主要的微血管并发症之一,已成为 ESRD 的主要病因,严重威

胁着人类的健康,给国家和社会造成了巨大的经济负担^[1]。本研究发现糖肾方可显著抑制 TGF- β 1/Smad3 信号通路的表达,下调 I 型胶原和纤维连接蛋白的表达,减轻肾脏纤维化;此外研究还发现糖肾方还可通过下调肾脏中 miRNA 21 的表达以及上调 miRNA 29b 的表达,抑制肾脏纤维化的进展,保护肾脏功能。

TGF- β 1/Smad3 信号通路是引起糖尿病肾病肾脏纤维化的重要通路,可引起 ECM 的过度沉积,导致肾脏纤维化^[6]。DN 状态下的许多物质,例如高血糖水平、AGEs 及血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 都可上调 TGF- β 1 的表达,并通过依赖及非依赖 TGF- β 1 途径激活 Smad 信号通路。Smad3 可直接结合到胶原蛋白的启动子区域,来上调胶原蛋白的表达,促进肾脏的纤维化进展^[12-13]。同时降低成纤维细胞中的基质金属蛋白酶-1 (Matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 活性,减少胶原蛋白的降解^[14]。DN、UUO、高血压肾损害及药物导致的肾损害动物模型中,敲除 Smad3 均可抑制肾脏的纤维化^[15-18]。TGF- β 1/Smad 信号通路导致肾脏纤维化的主要机制有:1) 可通过诱导胶原和纤维连接蛋白的表达,直接引起 ECM 的过度沉积^[19];2) 可诱导上皮细胞通过上皮-间质转分化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 转化为肌成纤维细胞,诱导巨噬细胞通过巨噬细胞-肌成纤维细胞转化肌成纤维细胞 (Macrophage-myofibroblast transition, MMT), 以及诱导内皮细胞-间质转分化 (Endothelial-mesenchymal transition, EndMT) 为肌成纤维细胞^[20-21];3) 可诱导肾小球系膜细胞分泌增强,导致系膜基质增多;还可诱导肾小管上皮细胞和足细胞的凋亡,影响肾脏正常的功能,加重肾脏的纤维化^[22];4) 降低成纤维细胞中的 MMP-1 活性,减少胶原蛋白的降解^[14]。所以, TGF- β 1/Smad 信号通路的激活可显著促进肾脏纤维化的进展,可作为治疗 DN 的潜在靶点。

在一项纳入 1 604 例 DN 患者的 meta 分析中发现, DN 患者的血清和尿液中的 TGF- β 1 含量显著升高^[23]。一些 TGF- β 1 的抑制剂已经进行了临床前和临床研究,但由于不良反应以及疗效不显著等原因, 还尚未得到广泛的应用^[24]。在一项有 77 例 DN 患者参与的随机双盲安慰剂对照研究中发现, 一种可以阻断 TGF- β 1 启动子的小分子药物 Pirfenidone, 可延缓 DN 患者的肾小球滤过率 (Estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR) 的下降^[25]。但在有 36 例激素抵抗型原发局灶性节段性肾小球硬化症的随机双盲

安慰剂对照研究中发现, 给予人源的 TGF- β 1 单克隆抗体 fresolimumab (GC1008) 后并未发现患者的 eGFR 有明显改善^[26]。

miRNA 是可以调节各项生命活动的小内源非编码 RNA, 长度为 20 ~ 22 个核苷酸, 可与靶基因的 3' 端非翻译区结合, 抑制目标基因翻译和/或诱导 mRNA 降解, 其中一些 miRNA (例如: miRNA 21, miRNA 29 等) 在糖尿病肾脏纤维化过程中发挥着重要作用^[6]。miRNA 21 是被广泛研究的 miRNAs 之一, 早在 2008 年的一项研究中发现, 心力衰竭模型中 miRNA 21 可加重心脏的纤维化^[27]。尽管在正常肾脏中 miRNA 21 的含量比较低, 但是在多种肾脏疾病模型中, 例如糖尿病肾病和急性肾小球肾炎的动物模型中, 均可发现 miRNA 21 表达升高, 肾脏发生纤维化改变^[28-29]。已有大量研究表明, TGF- β 1 可上调 miRNA 21 的表达; 在敲除 TGF- β 1 的糖尿病模型中, miRNA 21 的表达减少, 肾脏纤维化程度减轻^[30]。因此, miRNA 21 可成为改善纤维化相关疾病的重要靶点; 在敲除 miRNA 21 的小鼠模型中也进一步证实, 敲除 miRNA 21 后, 可抑制肾脏的纤维化^[31]。也有研究证实, miRNA 21 的表达是由 Smad3 调控的, Smad3 的激活可以上调 miRNA 21 的表达^[29]。此外, miRNA 21 还可通过其他途径促进肾脏纤维化, 包括: 1) miRNA 21 可抑制肾脏过氧化物酶体增殖物激活受体 α (Peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 的表达, 干扰正常的脂质代谢, 引起肾脏脂质沉积, 继而导致肾脏纤维化改变^[31]; 2) 激活肾脏中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 复合物 1 (mTORC1), 促进纤维连接蛋白的表达, 引起肾脏纤维化^[32]。此外, 在 STZ 诱导的糖尿病小鼠中发现, 沉默 miRNA 21 后, 可改善小鼠的系膜扩张、肾间质纤维化及巨噬细胞浸润, 减少蛋白尿以及抑制肾脏的纤维化和炎症反应基因的表达^[33]。

miR 29 是另一个被广泛研究的 miRNAs, miR 29 家族中包括 miR 29a、miRNA 29b 和 miR 29c 3 个成员, 其所有成员均具有相同的序列并且都可结合到相同的目标基因, 在临床试验和动物实验中均发现 miRNA 29 具有抗纤维化作用, 还可抑制 TGF- β 1 的转录^[34]。在正常肾脏和肺中 miRNA 29b 的表达较高, 但当肾脏和肺发生纤维化改变时, miRNA 29b 的表达明显降低^[35-36]。在单侧输尿管梗阻 (Unilateral ureteral obstruction, UUO) 小鼠模型中, 肾脏出现纤维化改变, 同时 miRNA 29b 的表达降低; 而在敲除

Smad3 的 UUO 小鼠模型中,肾脏纤维化程度明显减轻,miRNA 29b 的表达也明显升高,因此 Smad3 可抑制 miRNA 29b 的表达^[36]。由于 miRNA 29b 可直接作用于 I/III/IV 型胶原蛋白、纤维连接蛋白和弹性蛋白的 3'端非翻译区,抑制其表达;在糖尿病肾病小鼠模型中,将 db/db 小鼠过表达 miRNA 29b 后,其蛋白尿明显减少,胶原蛋白和纤维连接蛋白表达减少,肾脏纤维化程度明显减轻^[37]。

因此,miRNA 21 及 miRNA 29b 的表达与 DN 肾脏纤维化具有密切联系,miRNA 21 及 miRNA 29b 可作为治疗 DN 的潜在靶点。在台湾的 DN 患者中发现,其血清中的 miRNA 21 含量明显高于正常对照组,而 miRNA 29b 含量明显降低;随着疾病的进展,miRNA 21 的表达逐渐提高,miRNA 29b 的表达逐渐降低;所以血清中的 miRNA 21 及 miRNA 29b 的含量可作为 DN 的进展期间的生物标志物^[38]。

糖肾方作为临床上治疗 DKD 的经验方,课题组前期研究已经证明其通过抑制 TGF- β 1/Smad3 信号通路改善 STZ 加单侧肾切除大鼠肾脏纤维化^[39]。本研究发现,给予糖肾方干预 12 周后,db/db 小鼠肾脏皮质中 Smad3 的磷酸化程度降低, I 型胶原和纤维连接蛋白及 mRNA 表达的下调,肾脏纤维化明显减轻,表明糖肾方可减轻 DN 的肾脏纤维化保护肾脏功能。

综上所述,糖肾方可抑制 db/db 小鼠肾脏 TGF- β 1/Smad3 信号通路的表达,可能通过下调 miRNA 21 的表达,同时上调 miRNA 29b 的表达,显著减轻肾脏纤维化进展保护肾脏功能。

参考文献

- [1] Breyer M D, Kretzler M. Novel avenues for drug discovery in diabetic kidney disease[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2018, 13(1): 65.
- [2] Bolignano D, Cernaro V, Gembillo G, et al. Antioxidant agents for delaying diabetic kidney disease progression: A systematic review and meta-analysis[J]. *Plos One*, 2017, 12(6): e178699.
- [3] Sun J, Wang Y, Cui W, et al. Role of Epigenetic Histone Modifications in Diabetic Kidney Disease Involving Renal Fibrosis[J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017(3): 7242384.
- [4] Hills CE, Alrasheed N, Alrasheed N, et al. C-peptide reverses TGF- β 1-induced changes in renal proximal tubular cells: implications for treatment of diabetic nephropathy[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2009, 296(3): F614.
- [5] Chung ACK, Lan HY. MicroRNAs in renal fibrosis[J]. *Frontiers in Physiology*, 2015, 11(6): 474-482.
- [6] Meng X, Tang PM, Li J, et al. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis[J]. *Frontiers in Physiology*, 2015, 6: 82.
- [7] Marathe PH, Gao HX, Close KL. American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes[J]. *Journal of Diabetes*, 2017,

- 9(4): 320.
- [8] Sun H, Li Q, Liu Y, et al. Xiao-Yao-San, A Chinese Medicine Formula, Ameliorates Chronic Unpredictable Mild Stress Induced Polycystic Ovary in Rat[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017(8): 729.
- [9] Li P, Chen Y, Liu J, et al. Efficacy and safety of tangshen formula on patients with type 2 diabetic kidney disease: a multicenter double-blinded randomized placebo-controlled trial[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e126027.
- [10] Li P, Chen Y, Liu J, et al. Efficacy and Safety of Tangshen Formula on Patients with Type 2 Diabetic Kidney Disease: A Multicenter Double-Blinded Randomized Placebo-Controlled Trial[J]. *Plos One*, 2015, 10(5): e126027.
- [11] Wang L, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and Ethnic Pattern of Diabetes and Prediabetes in China in 2013, JAMA, 2017, 317(24): 2515.
- [12] Chen SJ, Yuan W, Mori Y, et al. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF- β : involvement of Smad 3[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1999, 112(1): 49-57.
- [13] Vindevoghel L, Lechleider R J, Kon A, et al. SMAD3/4-Dependent Transcriptional Activation of the Human Type VII Collagen Gene (COL7A1) Promoter by Transforming Growth Factor β [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 95(25): 14769-14774.
- [14] Yuan W, Varga J. Transforming Growth Factor- β Repression of Matrix Metalloproteinase-1 in Dermal Fibroblasts Involves Smad3, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(42): 38502.
- [15] Liu Z, Huang XR, Lan HY. Smad3 mediates ANG II-induced hypertensive kidney disease in mice[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2012, 302(8): F986.
- [16] Zhou L, Fu P, Huang X R, et al. Mechanism of chronic aristolochic acid nephropathy: role of Smad3[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2010, 298(2): F1006.
- [17] Sato M, Muragaki Y, Saika S, et al. Targeted disruption of TGF- β 1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112(10): 1486.
- [18] Fujimoto M, Maezawa YK, Joh K, et al. Mice lacking Smad3 are protected against streptozotocin-induced diabetic glomerulopathy, *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2003, 305(4): 1002.
- [19] Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins SP, et al. TGF- β 1 $\rightarrow$ SMAD/p53/USF2 $\rightarrow$ PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis[J]. *Cell & Tissue Research*, 2012, 347(1): 117-128.
- [20] Meng XM, Chung ACK, Lan HY. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases, *Clinical Science*, 2013, 124(4): 243.
- [21] Wu CF, Chiang WC, Lai CF, et al. Transforming growth factor β -1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis[J]. *American Journal of Pathology*, 2013, 182(1): 118-131.
- [22] Lópezhernández FJ, Lópeznovoa JM. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects[J]. *Cell & Tissue Research*, 2012, 347(1): 141-154.

- [23] Qiao YC, Chen YL, Pan YH, et al. Changes of transforming growth factor beta 1 in patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2017, 96(15): e6583.
- [24] Tampe D, Zeisberg M. Potential approaches to reverse or repair renal fibrosis[J]. Nature Reviews Nephrology, 2014, 10(4): 226-237.
- [25] Sharma K, Ix J H, Mathew AV, et al. Pirfenidone for diabetic nephropathy[J]. Journal of the American Society of Nephrology Jasn, 2011, 22(6): 1144-1151.
- [26] Vincenti F, Fervenza FC, Campbell KN, et al. A Phase 2, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study of Fresolimumab in Patients With Steroid-Resistant Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis, Kidney International Reports, 2017, 2(5): 800-810.
- [27] Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts[J]. Nature, 2008, 456(7224): 980-984.
- [28] Wang J, Gao Y, Ma M, et al. Effect of miR-21 on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice[J]. Cell Biochemistry & Biophysics, 2013, 67(2): 537.
- [29] Zhong X, Chung AC, Chen HY, et al. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis[J]. J. Am. Soc. Nephrol, 2011, 22(9): 1668-1681.
- [30] Zhong X, Chung A C K, Chen HY, et al. miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes[J]. Diabetologia, 2013, 56(3): 663-674.
- [31] Chau B N, Xin C, Hartner J, et al. MicroRNA 21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways[J]. Science Translational Medicine, 2012, 4(121): 118r-121r.
- [32] Dey N, Das F, Mariappan M M, et al. MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes, Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(29): 25586-25603.
- [33] Kölling M, Kaucsar T, Schauerte C, et al. Therapeutic miR-21 Silencing Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Mice Molecular Therapy [J]. the Journal of the American Society of Gene Therapy, 2017, 25(1): 165.
- [34] Khella HW, White NM, Faragalla H, et al. Exploring the role of miRNAs in renal cell carcinoma progression and metastasis through bioinformatic and experimental analyses [J]. Tumor Biology, 2012, 33(1): 131-140.
- [35] Xiao J, Meng X, Huang XR, et al. miR-29 Inhibits Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice[J]. Molecular Therapy, 2012, 20(6): 1251-1260.
- [36] Qin W, Chung AC, Huang XR, et al. TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29[J]. Journal of the American Society of Nephrology Jasn, 2011, 22(8): 1462.
- [37] Chen HY, Zhong X, Huang XR, et al. MicroRNA-29b inhibits diabetic nephropathy in db/db mice. Molecular Therapy [J]. Journal of the American Society of Gene Therapy, 2014, 22(4): 842-853.
- [38] Chien H, Chen C, Chiu Y, et al. Differential microRNA Profiles Predict Diabetic Nephropathy Progression in Taiwan [J]. International Journal of Medical Sciences, 2016, 13(6): 457-465.
- [39] Zhao TT, Sun SF, Zhang HJ, et al. Therapeutic Effects of Tangshen Formula on Diabetic Nephropathy in Rats [J]. Plos One, 2016, 11(1): e147693.

(2018-05-10 收稿 责任编辑: 张文婷)

(上接第 1346 页)

仁和肾络微型癥瘕辨证方法的应用规范进行调整修正, 对其进一步量化。从而使辨证量表较为精确、客观、全面。并且对吕仁和肾络微型癥瘕辨证方法的应用规范进行效度和信度的校验, 为临床应用提供客观依据。

参考文献

- [1] 刘刚, 马序竹, 邹万忠. 肾活检患者肾脏病构成十年对比分析[J]. 临床内科杂志, 2004, 21(12): 834-838.
- [2] 赵新菊, 王琰, 甘良英. 北京市新增维持性血液透析患者的人口统计学及病因构成的变迁[J]. 中国血液净化 2014, 13(3): 185-189.
- [3] 汪六林, 宋恩峰. 中西医结合治疗慢性肾小球肾炎的 Meta 分析[J]. 西部中医药, 2014, 27(5): 60-63.
- [4] 史楠楠. 基于综合方法的中医临床实践指南制定程序研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2016.
- [5] 罗静, 付长庚, 徐浩. 定性访谈法在名老中医传承研究中的应用: 思路与体会[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(4): 492-496.
- [6] 李赞华, 万霞, 刘建平. 队列研究与随机对照试验的方法学比较

[J]. 北京中医药大学学报: 中医临床版, 2008, 15(5): 11-14.

- [7] 刘宝厚, 许筠. 慢性肾小球肾炎的诊断、辨证分型及疗效评定(试行方案)[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(6): 8-9.
- [8] 慢性肾炎辨证分型、诊断、疗效评定标准[J]. 陕西中医, 1988, 9(1): 52.
- [9] 吕仁和, 沈庆法, 戴京璋. 慢性肾炎(前期)中医辨证标准[J]. 中医杂志, 1996, 37(10): 627.
- [10] 国家食品药品监督管理局. 中药新药临床研究指导原则[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 157-162.
- [11] 李靖. 吕仁和教授对“肾络癥瘕说”的认识及分期辨治隐匿性肾小球肾炎[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(8): 661-663.
- [12] 诸彦含. 社会科学研究方法[M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 2016.
- [13] 李先涛, 张伯礼. 证候诊断标准研究的迫切性和可行性[J]. 天津中医药, 2007, 24(1): 36-38.
- [14] 吕仁和. 吕仁和教授糖尿病肾病分期辨证学术思想和临床经验[A]. 第三届国际传统医药大会文集[C]. 北京: 中国中医科学院; 世界中医药学会联合会, 2004: 1.

(2018-05-10 收稿 责任编辑: 张文婷)