

大黄素对 TGF- β 1 诱导的 NRK-49F 细胞增殖的影响

吉 晶^{1,2} 何立群^{1,2}

(1 上海中医药大学,上海,200123; 2 上海中医药大学附属曙光医院肾内科,上海,200021)

摘要 目的:研究大黄素对 TGF- β 1 诱导的肾成纤维细胞株(NRK-49F)增殖以及降低 FN(纤连蛋白),Col-I(I 型胶原蛋白),Smad2/3 蛋白及基因表达的机制。方法:采用 CCK8 法检测不同浓度大黄素对 NRK-49F 细胞增殖情况的影响;终浓度为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的大黄素处理 NRK-49F 细胞 30 min 后,模型组和观察组均以 TGF- β 1 以 5 ng/mL 的终浓度刺激 24 h,并收集细胞,蛋白质免疫印迹技术(Western blot)检测 FN,Col-I,Smad2/3 蛋白表达水平,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 FN,Col-I,Smad2/3 mRNA 表达。结果:模型组 FN,Col-I,Smad2/3 蛋白和基因的表达明显增加,大黄素含药血清组能抑制 NRK-49F 细胞增殖,且抑制 FN,Col-I,Smad2/3 蛋白和的表达($P < 0.05$)。大黄素浓度越高,抑制作用越明显,成一定的量效关系。结论:大黄素干预后,可改善肾纤维化程度,保护 NRK-49F 细胞模型损伤。

关键词 大黄素;NRK-49F 细胞;纤连蛋白(FN);I 型胶原蛋白(Col-I);Smad2/3

Effects of Emodin on Proliferation of NRK-49F Cells Induced by TGF- β 1

Ji Jing^{1,2}, He Liqun^{1,2}

(1 Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200123, China; 2 Department of Nephrology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

Abstract **Objective:** To investigate the mechanism of emodin on the proliferation of TGF- β 1 induced renal fibroblasts (NRK-49F) and the reduction of protein and gene expressions of FN (fibronectin), Col-I (type I collagen) and Smad2/3. **Methods:** The effects of different concentrations of emodin on the proliferation of NRK-49F cells were detected by CCK8 assay. NRK-49F cells were treated with emodin at a final concentrations of 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ for 30 min. Both the model group and the treatment group were stimulated with TGF- β 1 at a final concentration of 5 ng/mL for 24 h, and the cells were collected. The expression levels of FN, Col-I and Smad2/3 protein were detected by Western blot, and the expressions of FN, Col-I and Smad2/3 mRNA were detected by real-time PCR. **Results:** The expression of FN, Col-I, Smad2/3 protein and gene in the model group was significantly increased. The emodin-containing serum group inhibited the proliferation of NRK-49F cells and inhibited the expression of FN, Col-I, Smad2/3 protein ($P < 0.05$). The higher the concentration of emodin was, the more obvious the inhibition was. Emodin concentration and inhibition were dose-effect relationships. **Conclusion:** After emodin intervention, it can improve the degree of renal fibrosis and protect the NRK-49F cell model injury.

Key Words Emodin; Renal fibroblasts (NRK-49F); Fibronectin (FN); Col-I; Smad2/3

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.05.007

肾纤维化是一切慢性肾脏疾病(Chronic Kidney Disease, CKD)进展至终末期肾衰竭的共同通路,机制非常复杂,已影响全球人类的健康,成为世界公共卫生关注的主要关注点之一。我国 CKD 发病率达 11%,患者数已达 1.2 亿。肾纤维化可以发展成为慢性肾衰竭(Chronic Renal Failure, CRF),而最终结局是终末期肾脏病(End-stage Renal Disease, ESRD)^[1-2]。肾纤维化以肾脏成纤维细胞活化、增殖,进一步转化成为肌成纤维细胞,及细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)在肾间质过度积聚,最终

导致肾功能丧失为特征^[3]。中药由于其多环节、多方位、多靶点的作用优点,在治疗肾纤维化方面具有独特的优势。大黄素是中药大黄的有效单体成分之一,它能抗菌消炎、抗肿瘤,不仅可抑制肾脏成纤维细胞的活化增殖和 ECM 的积聚,还能保护肾脏成纤维细胞,减轻 TGF- β 1 诱导的肾纤维化^[4-7]。转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)被认为是致纤维化因子之一,在多组织器官纤维化中起重要作用^[8]。近年来运用大黄素治疗肾纤维化报道已屡见不鲜,并且都取得了良好的疗效。本文采用 TGF- β 1 刺激大鼠肾脏成纤

基金项目:上海市名老中医学术经验研究工作室(SHGZS-2017027);上海中医药大学研究生“创新能力培养”专项科研项目(Y201804)

作者简介:吉晶(1988.08—),女,博士研究生在读,研究方向:中医药防治慢性肾脏疾病的研究, E-mail:jj664758895@qq.com

通信作者:何立群(1959.08—),男,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:中医药防治慢性肾脏疾病, Tel: (021) 53821650, E-mail: heliqun59@163.com

维细胞(NRK-49F)模型,观察大黄素对NRK-49F细胞增殖以及对FN,Col-I,Smad2/3蛋白及基因的影响,探讨大黄素对肾脏纤维化的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 NRK-49F大鼠肾脏成纤维细胞株,购自上海中科院细胞中心。大黄素(含量>98%),溶解于二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide,DMSO)后制成混悬液。将NRK-49F细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,在含有5%CO₂及饱和湿度的37℃恒温培养箱中连续培养。细胞隔天换液,每2~3d传代1次。待细胞生长培养至60%~70%,胰酶消化并传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.1.2 试剂与仪器 大黄素(Sigma,E7881);TGF-β1人重组蛋白(美国Peprotech公司)、DMEM培养基、双抗(美国Hyclone公司);0.25%胰酶(美国Thermo Scientific公司);二甲基亚砜(DMSO,上海生工有限公司);Fbs10099-141胎牛血清(美国Gibco公司);BCA蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、PMSF、山羊抗兔二抗(威奥生物技术有限公司);PVDF膜(美国Millipore公司,0.45 μm);兔抗小鼠FN IgG、Col-I IgG、Smad2/3 IgG(英国Abcam公司)。BioTek Synergy2酶标仪(美国Biotek公司);5810R台式离心机(德国Eppendorf公司);Mill-Q Integral 3超纯水仪(美国Millipore公司);二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);OLYMPUS IX71倒置荧光显微镜(日本OLYMPUS公司);ProteinSimple FluorChem M全自动成像分析系统(美国ProteinSimple公司);trizol试剂(美国Invitrogen公司);荧光定量PCR仪(罗氏LightCycler 480)。

1.2 方法

1.2.1 大黄素存储液 精确称取大黄素50 mg,并用1 mL DMSO超声破碎溶解,加入4 mL培养基稀释,得到大黄素浓度37 mmol/L储存,使用时稀释。

1.2.2 CCK 8法检测细胞增殖活性 复苏NRK-49F细胞,以每孔100 μL,4×10⁴个细胞/mL接种于96孔板中,放入5% CO₂及37℃培养箱中培养。待细胞贴壁后,弃去上清液,向各孔加入100 μL的(20、40、80、160、320) μmol/L大黄素进行实验,每组平行设置5个复孔,并设空白对照组。加入各浓度大黄素培养12、24 h后,滴加10 μL CCK 8,用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度OD值,计算细胞抑制率=(1-A检验组/A空白组)×100%。

1.2.3 细胞培养及分组 细胞分为5组:空白对照

组、模型组(TGF-β1 5 ng/mL)、大黄素组(20、40、80 μmol/L)。取对数生长期的NRK-49F细胞株,胰酶消化,并以2×10⁶个/mL的密度接种于六孔板中,细胞生长至60%~70%时,用无血清的培养基培养细胞24 h,观察组分别加入终浓度为20、40、80 μmol/L的大黄素30 min后,模型组和观察组都加入终浓度为5 ng/mL的TGF-β1刺激24 h,使每组的总体积为2 mL,然后收集细胞做蛋白印迹和qPCR分析。

1.2.4 Western Blot检测蛋白表达 药物干预24 h后,弃去上清液,并用PBS漂洗3次,RIPA裂解液:PMSF=50:1的比例,在冰上裂解细胞5 min,4℃,12 000 r/min离心15 min后收集细胞。超声破碎细胞收取上清液,并通过BCA方法测定蛋白浓度并定量。每份样品蛋白上样量均为40 μg,蛋白marker 5 μL,电泳80 V 120 min后,湿转250 mA转膜2 h,蛋白被转移到0.45 μm的PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温封闭1 h,分别与FN(ab2413,1:500),Col-I(ab34710,1:5 000),Smad 2/3(ab63672,1:1 000),GAPDH(weiao,1:2 000)一抗在4℃摇床孵育过夜。第2天TBST漂洗3次,10 min/次,再加入二抗,室温下孵育1 h,并用TBST漂洗3次,10 min/次后曝光。GAPDH作为内参,Image J软件进行灰度值分析。

1.2.5 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测基因表达 按照Trizol试剂使用方法,提取各组细胞的总RNA。酶标仪检测RNA浓度及纯度,确保A_{260 nm}/A_{280 nm}在1.8~2.0为合格,表明RNA未降解。将RNA逆转录cDNA,反应条件为37℃ 15 min,85℃ 5 s。采取20 μL体系,PCR扩增反应:95℃ 30 s预变性,95℃ 5 s变性,60℃ 34 s退火延伸,40个循环。引物由上海生工生物工程有限公司合成(引物序列见表1)。结果用2^{-ΔΔC_t}进行数据分析,ΔC_t=C_t目的基因-C_t内参基因,ΔΔC_t=ΔC_t大黄素组-ΔC_t空白对照组,各组mRNA的相对表达量=2^{-ΔΔC_t},其中空白对照组的数值设为1。

1.3 统计学方法 采用SPSS 23.0统计软件进行数据分析。所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组之间均数比较,满足正态分布和方差齐性则采用单因素方差分析(One way ANOVA),如果进一步比较采用LSD法,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对NRK-49F细胞增殖的影响 与空白对照组比较,浓度为160、320 μmol/L的大黄素对NRK-49F

表 1 引物序列

引物	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')
FN	ACCAAGTATGAAGTCAGCGTCTATGC	CAGTGATCGTCTCTGTCTTCGTTCTC
Col-I	TGTGCGATGGCGTGCTATGC	TGCGTCTGGTGATACATATTCTTCTGG
Smad2	GCCAGACCTTCACAGCCATCATG	TAGTCATCCAGAGCGGCAGTTC
Smad3	TCCTGGCTACCTGAGTGAAGATGG	TGGTTCAGCTCGTAGTAGGAGATGG
GAPDH	ACGCAAGTTCAACGGCACAG	CGACATACTCAGCACCAGCATCAC

表 2 大黄素对 NRK-49F 细胞增殖 A 的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	12 h	24 h
空白对照	0.98 ± 0.08	0.98 ± 0.03
大黄素(μmol/L)		
20	0.98 ± 0.18	0.97 ± 0.14
40	0.96 ± 0.13	0.94 ± 0.11
80	0.92 ± 0.16	0.91 ± 0.09
160	0.68 ± 0.15	0.63 ± 0.12
320	0.56 ± 0.11	0.52 ± 0.11

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

细胞有明显的抑制作用;浓度为 20、40、80 μmol/L 的大黄素对 NRK-49F 细胞活性无显著影响。因此选用 20、40、80 μmol/L 用于后续实验。见表 2。

2.2 大黄素对 TGF-β1 诱导下 NRK-49F 细胞 FN, Col-I, Smad 2/3 蛋白表达的影响 与空白对照组比较,经 TGF-β1 刺激的模型组细胞增殖, FN, Col-I, Smad 2/3 蛋白都较对照组高表达($P < 0.01$)。而与模型组比较,各浓度大黄素均可下调 FN, Col-I, Smad 2/3 蛋白表达,差异有统计学意义($P < 0.01$)。图 1 和表 3。

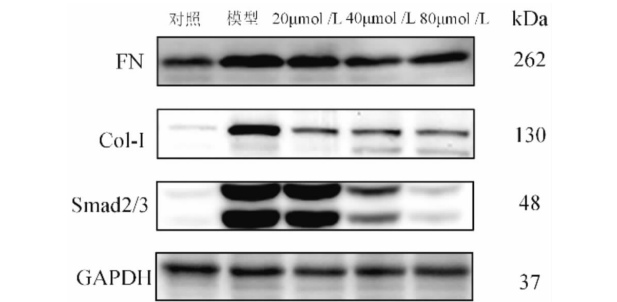


图 1 对 TGF-β1 诱导的 NRK-49F 细胞蛋白表达的影响

表 3 不同浓度的大黄素对 TGF-β1 诱导下 NRK-49F 细胞蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	FN/GAPDH	Col-I/GAPDH	Smad 2/3/GAPDH
空白对照组	0.83 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.12 ± 0.01
模型组	1.30 ± 0.10 **	0.72 ± 0.09 **	1.65 ± 0.15 **
大黄素(μmol/L)			
20	1.10 ± 0.07 Δ	0.37 ± 0.08 $\Delta\Delta$	1.55 ± 0.14
40	1.00 ± 0.05 $\Delta\Delta$	0.35 ± 0.06 $\Delta\Delta$	0.78 ± 0.08 $\Delta\Delta$
80	0.90 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.24 ± 0.05 $\Delta\Delta$	0.18 ± 0.03 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 大黄素对 TGF-β1 诱导下 NRK-49F 细胞 FN, Col-I, Smad 2, Smad 3 mRNA 表达水平的影响 与空白对照组比较,TGF-β1 刺激后的 NRK-49F 细胞分泌的 FN, Col-I, Smad 2, Smad 3 mRNA 表达均上调($P < 0.01$);与模型组比较,各浓度大黄素给药组均可明显抑制 FN, Col-I, Smad 2, Smad 3 mRNA 的表达,且大黄素给药浓度越大,相关基因表达量越低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

3 讨论

肾功能的恶化程度与肾间质纤维化程度密切相关。肾纤维化是一种多信号通路传导、多细胞因子介导、多因素驱动的慢性肾病,包括肾间质纤维化、肾小球和肾小管硬化,最终都将发展成为慢性肾衰竭^[9]。肾纤维化的典型病理特征是间质成纤维细胞增殖,系膜增厚,固有细胞数量减少和 ECM 过度沉积。肾小球毛细血管因此损伤,血流量减少,肾小球毛细血管硬化,微循环出现障碍,最终肾脏萎缩、表面凹凸不平及变硬,出现肾脏结构被破坏及功能丧失^[10-12]。肾脏纤维化是由多种原因导致细胞外基质过度沉积而引起,超过了其自身的代偿能力,造成肾脏不可逆的肾脏病变。

在中医学中并无“肾纤维化”的病名,属于“关格”“水肿”“腰痛”“淋证”等范畴。病因为正气不足,又感受外邪。其发病机制主要表现在“虚、湿、瘀、毒”4 方面,其中“虚”是肾纤维化的起始因素,“湿”和“瘀”是病理基础,“毒”是加重肾纤维化的重要方面。近些年一些专家学者提出肾纤维化与肾络微型癥积理论,微型癥积与气虚、气滞、血瘀等密切相关。气虚或气运不畅通,气虚可致瘀,气滞也致瘀,肾脏脉络瘀阻,久瘀则积。肾主水,一旦肾脏受损,不可避免地导致水液代谢失调,津液不畅,湿邪与毒邪内停。日久成痰,痰伏于肾络,日久积聚生成痰毒、瘀毒,而导致微型癥积^[13]。

肾脏固有的成纤维样细胞包括系膜细胞、间质成纤维细胞等,其中 TGF-β1 是重要的诱导因素,肾纤维化进展的多种途径可诱导成纤维细胞激活为肌纤维母细胞表型。TGF-β1 可以诱导成纤维细胞增

表 4 不同浓度的大黄素对 TGF-β1 诱导下 NRK-49F 细胞基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	FN	Col-I	Smad 2	Smad 3
空白对照组	1. 00	1. 00	1. 00	1. 00
模型组	9. 63 ± 1. 25 **	12. 39 ± 2. 86 **	26. 78 ± 5. 23 **	27. 99 ± 1. 75 **
大黄素(μmol/L)				
20	8. 76 ± 0. 93 Δ	11. 24 ± 2. 48 Δ	24. 30 ± 3. 75 Δ	25. 43 ± 1. 89 Δ
40	7. 39 ± 0. 82 $\Delta\Delta$	10. 48 ± 2. 05 $\Delta\Delta$	21. 75 ± 3. 13 $\Delta\Delta$	22. 83 ± 1. 62 $\Delta\Delta$
80	6. 52 ± 0. 25 $\Delta\Delta$	9. 02 ± 1. 89 $\Delta\Delta$	20. 95 ± 1. 34 $\Delta\Delta$	21. 37 ± 1. 59 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

殖,胶原蛋白的产生,阻断 TGF-β1 可以延缓肾纤维化的进程^[14-17]。肌成纤维细胞能够分泌大量的 ECM,包括 FN,Col-I 等^[18]。TGF-β1 刺激成纤维细胞,一方面增加 ECM 成分合成,另一方面通过抑制基质金属蛋白酶(MMPs)表达来抑制 ECM 降解^[19-20]。TGF-β1 能够直接增强肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化,引起细胞外基质的异常积聚和肾小球基底膜的增厚,导致肾纤维化^[21-22]。TGF-β1 有 I 型受体(TβR-I)、II 型受体(TβR-II)和 III 型受体(TβR-III),其中 Smad2/3 是 TGF-β1 通路下游的重要递质,也是主要的效应蛋白,其在肾小球硬化和肾间质纤维化中起着非常重要的作用^[23-26]。当 TGF-β1 受体被激活时,P-Smad 2 和 P-Smad 3 可以与 Smad 4 结合,复合物的形成转移到细胞核中以调节下游基因转录^[27-28]。大黄素作为中药大黄活性成分之一,是中药大黄蒽醌类物质,有减轻肾脏损伤的功能,且具有显著的抗肾脏纤维化的作用^[29-31]。I 型胶原蛋白是 ECM 的主要成分,当机体保护炎症反应受损的组织时,成纤维细胞异常性聚集活化,许多细胞因子开始刺激成纤维细胞分泌胶原蛋白,诸如 I 型胶原蛋白等等,因此说肾纤维化是 I 型胶原在肾小球和肾小管过度表达的最终结果^[32-34]。

本实验中,外源性的 TGF-β1 刺激成纤维细胞株活化,结果显示与空白对照组比较,模型组(单纯 TGF-β1 刺激组)成纤维细胞大量增殖, FN, Col-I, Smad 2/3 蛋白及基因分泌明显增加。大黄素组较模型组 FN, Col-I, Smad 2/3 蛋白及基因表达明显降低,表明大黄素可以抑制 NRK-49F 成纤维细胞的增殖;且大黄素浓度越高,抑制作用越强,又说明大黄素能够有效延缓慢性肾纤维化的进展。在后期研究中,本课题组将对大黄素对其他胶原蛋白和 TGF-β1 信号通路下游作进一步研究,以开发其在临床的应用价值。

参考文献

[1] 王东,张江,何立群. 活血化瘀方有效单体对活化的肾成纤维细胞株和系膜细胞株增殖的影响[J]. 北京中医药大学学报,2013,

36(11):762-767.
[2] 骆晓婷,罗静雯,孙蒋,等. 甘草酸联合大黄素抑制成纤维细胞增殖及转分化的抗肾脏纤维化作用[J]. 中成药,2018,40(5):1160-1163.
[3] Duffield JS. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis [J]. J Clin Invest,2014,124(6):2299-306.
[4] Qu W, Wang Y, Wu Q, et al. Emodin inhibits HMGB1-induced tumor angiogenesis in human osteosarcoma by regulating SIRT1 [J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(9):15054-15064.
[5] Zhang X, Zhang R, Lv P, et al. Emodin up-regulates glucose metabolism, decreases lipolysis, and attenuates inflammation in vitro [J]. J Diabetes,2015,7(3):360-368.
[6] 刘理静,尹辉明,贺兼斌,等. 大黄素抑制肺成纤维细胞增殖及转分化和胶原蛋白合成[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2016,32(7):921-925.
[7] 胡浩,孙伟,顾刘宝,等. 大黄素抑制 HBSS 诱导的肾小管上皮细胞自噬的分子机制[J]. 中国中药杂志,2015,40(10):1965-1970.
[8] 韩璐,胡涛,丁雪峰,等. 高糖刺激大鼠肾间质成纤维细胞 TGF-β、CTGF 及 α-SMA 作用研究[J]. 中国实验诊断学,2018,22(5):878-880.
[9] 吉晶,何立群. 中西医防治肾纤维化的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(19):221-228.
[10] 吉晶,何立群. 抗纤灵方抗肾纤维化作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(1):51-56.
[11] 蒋宇峰,朱尧熔,唐英,等. 抗纤灵方对阿霉素肾病大鼠肾纤维化作用机制的研究[J]. 上海中医药杂志,2018,52(12):72-77.
[12] 王金荣,熊洋洋,李斌超,等. 肾纤维化的研究进展[J]. 医学研究杂志,2015,44(6):158-160.
[13] 钟建,赵宁博. 肾纤维化络病实质及辨治探讨[J]. 南京中医药大学学报,2014,30(6):510-512.
[14] Mishra R, Cool BL, Laderoute KR, et al. AMP-activated protein kinase inhibits transforming growth factor-beta-induced Smad3-dependent transcription and myofibroblast transdifferentiation [J]. J Biol Chem,2008,283(16):10461-10469.
[15] Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, et al. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis [J]. Am J Physiol Renal Physiol,2003,284(2):F243-F252.
[16] Border WA, Okuda S, Languino LR, et al. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1 [J]. Nature,1990,346(6282):371-374.
[17] 孟晓明,蓝辉耀. 转化生长因子-β 与肾脏纤维化的研究进展 [J]. 生理学报,2018,70(6):612-622.
[18] Liboiron BD, Mayer LD. Nanoscale particulate systems for multidrug

- delivery:towards improved combination chemotherapy[J]. Ther Deliv,2014,5(2):149-171.
- [19]臧秀娟,刘梅,宋莹,等. 肾小球疾病中转化生长因子- $\beta 1$ 与肌成纤维细胞的表达及意义[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2010,11(5):386-390.
- [20]赵静,赵淑珍. 莲慈颗粒对 5/6 肾切除大鼠肾小球硬化的抑制作用[J]. 江苏医药,2018,44(3):233-235.
- [21]Casalena G, Daehn I, Bottinger E. Transforming growth factor- β , bioenergetics, and mitochondria in renal disease[J]. Semin Nephrol, 2012,32(3):295-303.
- [22]Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders[J]. Am J Pathol, 2011,179(3):1074-1080.
- [23]Chen Q, Pang L, Huang S, et al. Effects of emodin and irbesartan on ventricular fibrosis in Goldblatt hypertensive rats[J]. Pharmazie, 2014,69(5):374-378.
- [24]Wang HY, Wang YJ, Cui MJ, et al. Hepatocyte growth factor-induced amelioration in renal interstitial fibrosis is associated with reduced expression of alpha-smooth muscle actin and transforming growth factor-beta1[J]. Indian J Biochem Biophys, 2011,48(5):308-315.
- [25]Doi S, Zou Y, Togao O, et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice[J]. J Biol Chem, 2011,286(10):8655-8665.
- [26]Meng XM, Chung AC, Lan HY. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases[J]. Clin Sci(Lond), 2013,124(4):243-254.
- [27]刘劲松,林哲,郑燕姣. 肾复康对肾纤维化模型大鼠转化生长因子- $\beta 1$ 、Smad2、Smad7 表达的影响[J]. 世界中医药, 2018,13(12):3095-3098,3102.
- [28]张旭,朱元美,唐保露,等. 丹酚酸 B 对糖尿病大鼠肾纤维化的改善作用及其机制[J]. 中国药理学通报, 2019,35(1):51-55.
- [29]Sun Z, Luo B, Liu ZH, et al. Adipose-derived stromal cells protect intervertebral disc cells in compression: implications for stem cell regenerative disc therapy[J]. Int J Biol Sci, 2015,11(2):133-143.
- [30]Ma L, Li H, Zhang S, et al. Emodin ameliorates renal fibrosis in rats via TGF- $\beta 1$ /Smad signaling pathway and function study of Smurf 2[J]. Int Urol Nephrol, 2018,50(2):373-382.
- [31]窦芳,丁一,姚敏娜,等. 大黄素通过激活自噬对 TGF- $\beta 1$ 诱导的 HK-2 细胞纤维化因子的影响[J]. 中国药理学通报, 2018,34(11):1555-1559.
- [32]陈建,曾莉,陈刚,等. 抗纤灵方对 Ang II 诱导肾纤维化小鼠肾组织 α -SMA 和 I 型胶原的影响. 中华中医药杂志, 2017,32(2):739-742.
- [33]朱尧焰,陈潇,蒋宇峰. 不同剂量抗纤灵方对阿霉素肾纤维化大鼠 I 型胶原基因表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018,33(11):4940-4943.
- [34]Zhao J, Wang H, Cao A L, et al. Renal tubulointerstitial fibrosis: a review in animal models[J]. J Integr Nephrol Androl, 2015,2(3):75-80.
- (2019-04-10 收稿 责任编辑:王明)
- (上接第 1092 页)
- [35]窦一田,杨洪涛,林燕,等. 名老中医曹式丽治疗慢性肾脏病 3 期经验概述[J]. 中华中医药杂志, 2017,32(11):4978-4980.
- [36]李小会,雷根平,潘冬辉. 名老中医杜雨茂教授运用经方辨治慢性肾脏病经验采撷[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012,13(2):101-102.
- [37]毕礼明,陈英兰. 不同炮制方法的大黄制剂对慢性肾脏病的治疗综述[J]. 世界中西医结合杂志, 2015,10(6):877-879,884.
- [38]姚木铭,聂莉芳. 聂莉芳教授运用黄芪治疗慢性肾脏病经验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2018,19(6):473-475.
- [39]刘泽辉,张亚同,胡欣. 百令胶囊治疗慢性肾衰有效性系统评价[J]. 临床药物治疗杂志, 2017,15(2):37-42.
- [40]熊有明,蒋背乐,唐镜,等. 百令胶囊联合大黄蛰虫丸对慢性肾衰竭患者 TGF- $\beta 1$ 和 Col-IV 的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017,18(3):236-238.
- [41]谭秦湘,陈国姿,陈思诺,等. 肾康颗粒对 CKD 患者 TGF- $\beta 1$ 、miR-21 表达及肾功能的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2018,19(5):391-394.
- [42]陈艳春. 黄葵胶囊与氯沙坦联合用药方案在慢性肾小球肾炎中的临床应用[J]. 当代医学, 2018,24(31):5-7.
- [43]杨雨琪,夏智明,杨志敏,等. 肾康注射液治疗早期慢性肾脏病的效果及其对患者免疫功能的影响[J]. 海南医学, 2015,(3):410-411.
- [44]苏杭. 保肾口服液治疗气阴两虚型慢性肾脏病的临床观察[J]. 山西中医学院学报, 2018,19(4):65-68.
- [45]李庆珍,刘佩佩,宋卫国. 益肾化湿颗粒对慢性肾脏病 2~3 期患者微炎症反应状态的影响[J]. 医学信息(下旬刊), 2013,26(15):225-226.
- [46]胡晚君,刘燕兰. 中药保留灌肠联合中药穴位敷贴治疗慢性肾衰竭的疗效观察[J]. 湖北中医杂志, 2015,37(1):46-47.
- [47]武淑梅,刘金辉,刘兰英. 慢性肾衰中医治疗思路[J]. 临床合理用药杂志, 2015,8(26):141-142.
- [48]于敏,张波,王姣,等. 从中医体质学说论治慢性肾脏病的思路与方法[J]. 中医杂志, 2010,51(4):368-370.
- (2019-04-10 收稿 责任编辑:王明)