

30(10): 2237-2239.

[12] 黄明进, 罗春丽, 郭 刚, 等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 174-177.

[13] Fumiaki K, Hiroaki N, Yasuharu S, *et al.* Prostaglandin E₂ is an enhancer of interleukin-1 β -induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibro-

blasts[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(10): 2819-2828.

[14] Jae-Gyun J, Jong-Mook K, Hongchan C, *et al.* Effects of IL-1 β on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324(1): 3-7.

[15] 王晓玉, 张晓兰, 张 丽, 等. 四妙丸对大鼠佐剂性关节炎作用机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2889-2892.

桑酮碱对 2 型糖尿病肾病大鼠的保护作用及机制

马 志¹, 孟庆海¹, 蒯美玉¹, 林 超¹, 张亚云¹, 孙 鑫¹, 姚 远¹, 张启春^{1,2}, 卞慧敏^{1,2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 观察桑酮碱(桑叶总黄酮和总生物碱)对 2 型糖尿病肾病大鼠的肾功能和肾 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响。**方法** 以高脂联合链脲佐菌素复制 2 型糖尿病肾病大鼠模型, 成模后分为模型组, 二甲双胍组, 桑酮碱低、中、高剂量组, 另设正常空白组 10 只。灌胃给药, 12 周后测定各组大鼠空腹血糖及 24 h 尿量, 尿液中白蛋白、肌酐的含量; 取血测定血清肌酐、尿素氮, 并计算肌酐清除率; HE 染色观察肾脏形态学的变化; Western bolt 方法测定 TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3、IV 型胶原 (CoIV)、E 钙黏蛋白 (E-Ca) 的蛋白表达水平; real time PCR 方法检测 *Tgfb1*、*CoIV* 和 *E-Ca* 的 mRNA 表达水平。**结果** 桑酮碱给药组能够显著降低糖尿病肾病大鼠空腹血糖、24 h 尿量、尿白蛋白含量及肌酐清除率, 改善肾脏组织病理损伤, 下调 TGF- β 1、p-Smad2/3、CoIV 的表达, 上调 E-Ca 表达。**结论** 桑酮碱能延缓 2 型糖尿病大鼠早期肾病并发症的发生, 其机制与调节肾脏 TGF- β 1/Smad 信号通路有关。

关键词: 桑酮碱; 糖尿病肾病; 肾小球滤过率; TGF- β 1/Smad 通路

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)06-1215-06

doi:10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2016. 06. 003

Effect of Sangtongjian mixture on rats with type 2 diabetic nephropathy

MA Zhi¹, MENG Qing-hai¹, KUAI Mei-yu¹, LIN Chao¹, ZHANG Ya-yun¹, SUN Xin¹, YAO Yuan¹, ZHANG Qi-chun^{1,2}, BIAN Hui-min^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the effect of Sangtongjian mixture (total flavones and alkaloids from *Morus alba*) on rats with type 2 diabetic nephropathy (DN) and on TGF- β 1/Smad pathway and its mechanism of action. **METHODS** SD rats induced by the combination of STZ and high fat diet were established as the DN model. The DN rats were divided into model group, metformin group, low-, middle-, and high-dose Sangtongjian mixture groups. Ten normal rats were set as the control group. Each treatment group was orally given the corresponding agents for twelve weeks. The levels of fasting blood glucose, 24 h urine volume, urinary albumin, urine creatinine

收稿日期: 2015-12-30
基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 国家自然科学基金 (81072985, 81573529)
作者简介: 马 志 (1990—), 女, 硕士生, 从事中药心血管药理的研究。Tel: 18351895531, E-mail: 609438966@qq.com
* 通信作者: 卞慧敏 (1958—), 女, 研究员, 博士生导师, 从事中药心血管药理的研究。Tel: 13851495212, E-mail: hmbian@sina.com

were measured after treatments. Histopathology changes of kidney were evaluated by HE staining. Protein levels of TGF- β 1, Smad2/3, p-Smad2/3, CoIV, and E-Ca were determined by Western blot; mRNA levels of *Tgfb1*, *CoIV*, *E-Ca* were evaluated by real time PCR. **RESULTS** Sangtongjian mixture group could remarkably reduce the levels of fasting blood glucose, 24 h urine volume, urinary albumin, and urine creatinine. Furthermore, Sangtongjian mixture could also attenuate the pathological changes of kidney, down-regulate the expression of TGF- β 1, p-Smad2/3, CoIV and up-regulate the expression of E-Ca. **CONCLUSION** Sangtongjian mixture can delay the progression of early 2 type DN, and their mechanism of action might be associated with the regulation of TGF- β 1/Smad pathway in kidney.

KEY WORDS: Sangtongjian mixture; diabetic nephropathy; glomerular filtration rate; TGF- β 1/Smad pathway

糖尿病的发病率逐年升高,特别是 2 型糖尿病,占糖尿病患者总人数的 90% 以上,已经严重威胁人类的健康^[1]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见的并发症之一,已成为导致终末期肾脏病的主要原因^[2]。长期的慢性高血糖和血脂代谢障碍导致肾脏血流动力学异常,加速肾功能损害和功能障碍,在糖尿病肾病早期其临床表现为超滤。研究发现,转换生长因子(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)在 DN 中被认为是关键性因子^[3]。前期研究表明桑酮碱不仅能够抑制葡萄糖及多糖的肠吸收,还有增加胰岛素敏感性,改善脂肪代谢等作用^[4]。本研究则利用 2 型糖尿病肾病大鼠模型探讨桑酮碱的防治作用及其对 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 Sprague-Dawley 大鼠,体质量 200 ~ 220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证编号:11400700025240。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001。实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2012-0042。

1.2 药物和试剂 桑酮碱(镇江吉贝尔药业有限公司,批号 141119)。桑酮碱是由桑叶中总黄酮和总生物碱按 6:1 的比例配比而成。总黄酮以绿原酸为对照,比色法测定含有量为 50.4% (主要是绿原酸及其异构体,其中还含少量芦丁与异槲皮苷)。总生物碱中以 1-脱氧野尻霉素、荞麦碱、表荞麦碱总和计 50.6%。二甲双胍(北京中惠药业有限公司,批号 20130804);葡萄糖试剂盒(批号 20130402147)、尿素氮试剂盒(批号 20140415)、白蛋白试剂盒(批号 20140427)、肌酐试剂盒(批号 20140404),均由南京建成生物研究所提供;水合氯醛(南京宁试化学试剂有限公司,批号 20131123);BCA 蛋白测定试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司,批号 IM000-C021);链脲佐菌素

(STZ) (美国 Sigma 公司,批号 1001270674); TGF- β 1 抗体、Co IV 抗体、Smad2/3 抗体、p-Smad2/3 抗体、E-Ca 抗体均由美国 Santa Cruze 公司提供;二抗羊抗兔 IgG-HRP (EnoGene 公司);逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号#K1622);Trizol (美国 Ambion 公司,RET: 15596026);SYBE GREEN(德国 Qiagen 公司,Cat. NO. 204054);焦碳酸二乙酯水(BIO LINK, BL1005)。

1.3 仪器 低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂);BioTek 酶标仪(美国 BioTek 公司);ULT1386-5-V42 超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific [Asheville] LLC);164-5051 Western 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);5417R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);梯度热循环仪(美国 Applied Biosystems);荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物模型复制、分组及给药 将 SD 雄性大鼠 150 只随机分为对照组 10 只、高脂饮食组(140 只)。高脂饮食组给予高脂饲料(配方:10% 猪油,20% 糖,2.5% 蛋黄,67.5% 基础饲料)喂养,空白组给予常规饲料喂养,8 周后高脂饮食组大鼠一次性腹腔注射 STZ (剂量为 35 mg/kg)。模型组大鼠出现多尿症状后测定血糖,取血糖值 > 16.7 mmol/L 的大鼠为成模大鼠。将成模大鼠随机分为模型组,阳性对照二甲双胍 180 mg/kg 组,桑酮碱 73.5、147、294 mg/kg 3 个剂量组,每组 20 只共 100 只,实验中死亡大鼠不纳入统计。每日一次灌胃给药,连续 12 周,模型组和空白组灌胃等容积的水。

2.2 标本收集 灌胃给药 12 周后,代谢笼收集 24 h 尿液,记录尿量,3 000 r/10 min 取上清测量尿液中尿素氮、肌酐、白蛋白的含有量。末次给药后,动物禁食不禁水过夜,水合氯醛麻醉,

颈总动脉取血，3 000 r/min 离心 10 min 取血清测定葡萄糖、肌酐、尿素氮；切取左侧肾皮质称重，用于 Western blot 及 real time PCR 检测，剩余肾脏置于 10% 中性甲醛中固定用于病理检查。

2.3 肾组织病理形态学观察 10% 中性甲醛固定的肾组织常规脱水、包埋、4 μm 切片，分别行苏木素伊红染色（HE 染色）。光镜下观察肾脏形态学改变情况。根据病变程度分为 0 级无病变“－”，一级轻度“＋”，二级中度“＋＋”和三级重度“＋＋＋”，评分分别记为 0、1、2、3 分。

2.4 Western bolt 检测相关蛋白表达，提取肾脏皮质蛋白，每组 3 个样本，BCA 微量蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度，取蛋白样品 50 μg 进行电泳，转膜、封闭、加入一抗 4 ℃ 孵育过夜，洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗，孵育，充分洗涤后与 ECL 化学发光试剂反应，曝光后扫描，用图像分析软件进行光密度分析。

2.5 Real time PCR 检测相关基因表达 Trizol 提取肾脏皮质总 mRNA，每组 6 个样本，鉴定其浓度及纯度（ A_{260}/A_{280} 介于 1.8 ~ 2.2 之间为最佳）。根据逆转录试剂盒说明书逆转录成 250 ng/μL cDNA。利用 SYBR GREEN 检测目的基因的表达。扩增条件：预变性，95 ℃，10min，共一个循环；变性 15 s，退火 30 s，延伸 30 s，共 45 个循环；溶解程序，60 ℃，81 个循环。引物序列见表 1。

表 2 桑酮碱对给药 12 周后 DN 大鼠血糖、尿白蛋白和血清尿素氮的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of Sangtongjian mixture on fasting blood glucose, urinary albumin and BUN of serum in DN rats after 12 weeks ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	给药前血糖/ (mmol·L ⁻¹)	给药 12 周后		
				血糖/(mmol·L ⁻¹)	尿白蛋白/(mmol·L ⁻¹)	尿素氮/(mmol·L ⁻¹)
空白组	10	—	5.07 ± 0.43 **	6.92 ± 0.77 **	9.82 ± 2.71 **	5.69 ± 0.57 **
模型组	12	—	22.67 ± 2.12	24.67 ± 2.70	37.60 ± 4.23	16.39 ± 1.79
二甲双胍组	14	180	22.44 ± 3.67	17.49 ± 2.72 **	30.05 ± 3.84 **	10.45 ± 2.58 **
桑酮碱组	12	73.5	21.52 ± 2.40	19.15 ± 2.25 **	32.03 ± 4.34 **	12.26 ± 3.74 **
桑酮碱组	13	147	21.96 ± 2.11	17.42 ± 2.66 **	31.03 ± 7.34 **	10.69 ± 2.12 **
桑酮碱组	12	294	23.13 ± 3.11	17.35 ± 2.77 **	27.64 ± 6.30 **	10.60 ± 2.33 **

注：与模型组比较，***P* < 0.01

表 3 桑酮碱给药 12 周后对 DN 大鼠 24 h 尿量、血肌酐，尿肌酐和肌酐清除率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of Sangtongjian mixture on 24 h urine volume, serum creatinine, urine creatinine and creatinine clearance in DN rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	24 h 排尿量/mL	血肌酐/	尿肌酐/	肌酐清除率/
				(μmol·L ⁻¹)	(μmol·L ⁻¹)	(mL·min ⁻¹)
空白组	—	—	26.40 ± 5.30 **	47.00 ± 11.81 **	476.89 ± 336.85 **	0.22 ± 0.20 **
模型组	10	—	137.08 ± 14.01	179.72 ± 21.29	6 635.99 ± 1 337.55	3.59 ± 1.09
二甲双胍组	14	180	104.36 ± 11.07 **	98.10 ± 18.34 **	2 231.30 ± 1 267.35 **	1.70 ± 1.04 **
桑酮碱组	12	73.5	119.92 ± 13.65 **	141.11 ± 16.53 **	3 152.63 ± 1 851.87 **	1.96 ± 1.46 **
桑酮碱组	13	147	107.00 ± 17.05 **	102.05 ± 14.88 **	3 146.47 ± 1 692.78 **	2.24 ± 1.23 **
桑酮碱组	12	294	107.67 ± 15.52 **	100.00 ± 18.03 **	2 688.54 ± 1 288.95 **	2.01 ± 0.92 **

注：与模型组比较，***P* < 0.01

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer information

基因	序列
<i>actin</i>	正向引物:5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3'
	反向引物:5'-CCTGCTTGCTGATCCACATC-3'
<i>Tgfb1</i>	正向引物:5'-CCTGCAAGACCATCGACATG-3'
	反向引物:5'-TGTGTGTACAAAGCGAGCACC-3'
<i>ColIV</i>	正向引物:5'-TGCAGTTCACAGCCAGACTA-3'
	反向引物:5'-CATATCAACAGTGGCCAGCC-3'
<i>E-Ca</i>	正向引物:5'-TCATCACAGACCCCAAGACC-3'
	反向引物:5'-GATCTCCAGACCCACACCAA-3'

2.6 统计学方法 数据以 SPSS 19.0 软件统计，采用单因素方差（one-way ANOVA）分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，*P* < 0.05 为有显著差异。

3 结果

3.1 桑酮碱对 2 型糖尿病大鼠血糖、24 h 尿量、血清肌酐、尿肌酐、和肌酐清除率、尿白蛋白、血清尿素氮的影响 给药前，模型组血糖明显升高（*P* < 0.01），给药组与模型组间血糖无显著性差异（*P* > 0.05）。给药 12 周后，模型大鼠血糖、尿白蛋白、尿素氮、24 h 尿量、血清肌酐、尿肌酐、肌酐清除率明显升高，与空白组比较，差异有高度显著性（*P* < 0.01）；各给药组均能降低模型大鼠的血糖、24 h 尿量、尿白蛋白、尿肌酐、血清肌酐和肌酐清除率，与模型组相比，差异均有高度显著性（*P* < 0.01）见表 2 ~ 3。

3.2 桑酮碱对2型糖尿病大鼠肾脏形态学变化的影响 HE染色显示,正常组大鼠肾小球结构完整,未见肾小球肥大,肾小球基底膜系膜基质未见明显异常改变,肾小管结构完整;模型组可见肾小球系膜及基底膜显著增厚,与空白组比较有显著差

异($P<0.05$, $P<0.01$)。桑酮碱组病理改变程度明显减轻,肾小球基底膜增厚程度显著改善,肾小球系膜基质增生程度减轻,与模型组比较,有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$),如图1,病理评分见表4。

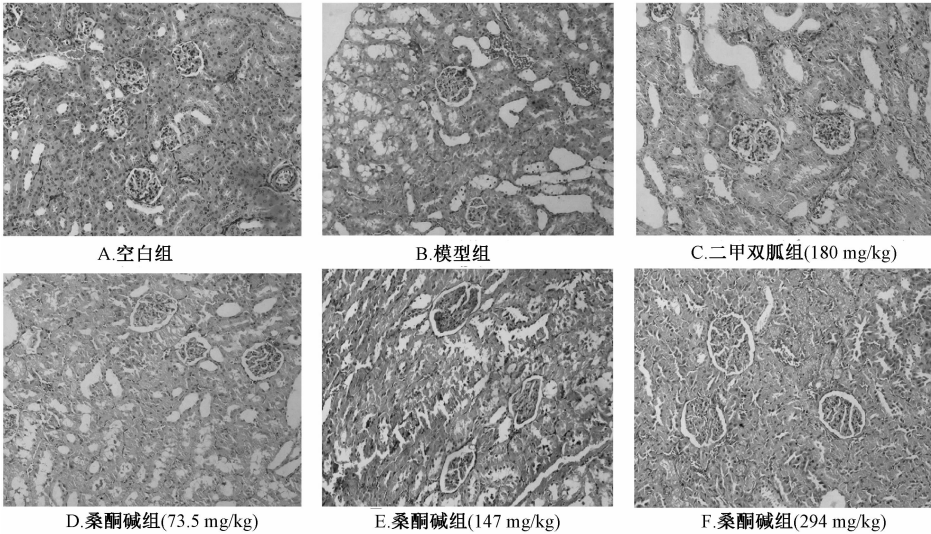


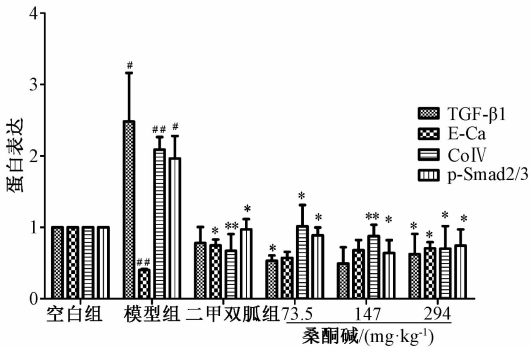
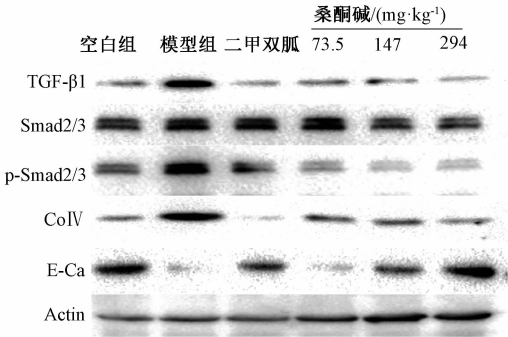
图1 桑酮碱对2型糖尿病大鼠肾脏形态学的影响 (HE, ×400)
Fig.1 Effects of Sangtongjian mixture on pathomorphology in kidney of DN rats (HE, ×400)

表4 桑酮碱对DN大鼠肾脏病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, 分)
Tab.4 Effects of Sangtongjian mixture on the grade of renal pathology in DN rats ($\bar{x} \pm s$, score)

组别	n	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	系膜及基 底膜增生	肾小管变 性坏死
空白组	10	—	0.00 ± 0.00 **	0.00 ± 0.00 **
模型组	12	—	1.33 ± 0.49	2.33 ± 0.49
二甲双胍组	14	180	0.50 ± 0.52 **	1.50 ± 0.52 **
桑酮碱组	12	73.5	0.92 ± 0.29 *	1.92 ± 0.29 *
桑酮碱组	13	147	0.92 ± 0.28 *	1.92 ± 0.28 *
桑酮碱组	12	294	0.50 ± 0.52 **	1.50 ± 0.52 **

3.3 桑酮碱对2型糖尿病大鼠肾脏TGF-β1/Smad信号通路相关蛋白的影响 根据Western bolt结果显示,12周后模型大鼠肾脏的TGF-β1、CoIV、p-Smad2/3的表达升高,E-Ca表达明显降低。桑酮碱给药后能够不同程度的降低TGF-β1、CoIV、p-Smad2/3的蛋白表达,提高E-Ca的蛋白表达,与模型组比较,有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$),如图2。

注:与模型组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

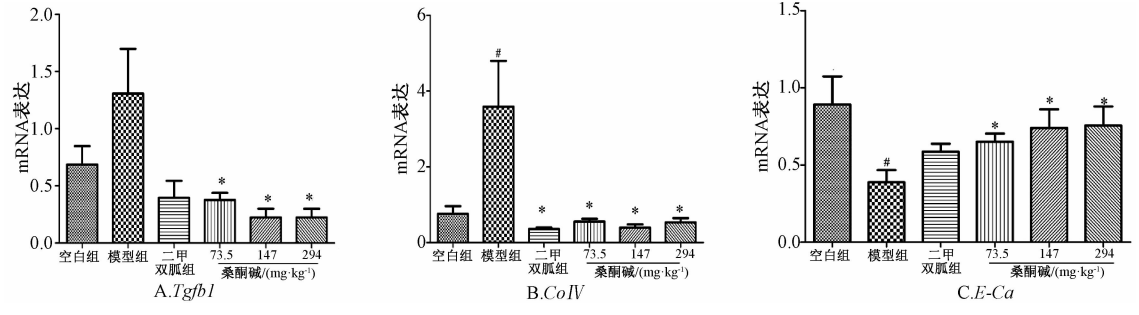


注:与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与空白组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图2 桑酮碱对2型糖尿病大鼠肾脏TGF-β1、Smad、CoIV、E-Ca蛋白表达的影响 (n=3)
Fig.2 Expression of Sangtongjian mixture on TGF-β1/Smad signal pathway and E-Ca, CoIV protein in renal of DN rats (n=3)

3.4 桑酮碱对2型糖尿病大鼠肾脏 *Tgfb1*、*CoIV* 和 *E-Ca* mRNA 表达的影响 Real time PCR 结果显示,模型组大鼠肾脏 *Tgfb1*、*CoIV* 的 mRNA 水平显著升高, *E-Ca* 的 mRNA 水平显著降低,与空白组

比较,有显著性差异 ($P < 0.05$)。桑酮碱给药组能够不同程度的降低 *Tgfb1*、*CoIV* 的 mRNA 水平,提高 *E-Ca* 的 mRNA 水平,与模型组比较有显著性 ($P < 0.05$),如图3。



注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与空白组比较,# $P < 0.05$

图3 桑酮碱对糖尿病肾病大鼠肾脏 *Tgfb1*、*E-Ca*、*CoIV* mRNA 的表达 ($n = 6$)

Fig. 3 Expression of Sangtongjian mixture on *Tgfb1*, *E-Ca* and *CoIV* mRNA in renal of DN rats ($n = 6$)

4 讨论

用高脂饲料联合低剂量 STZ 复制糖尿病大鼠模型,是应用最为广泛的糖尿病动物模型,再经12周后逐步发展成肾病并发症。该方法复制的糖尿病肾病大鼠模型与人类早期肾病的改变十分相似,如滤过率升高和蛋白尿增多,肾小球基底膜超微结构的改变以及肾小球系膜扩张^[5]。在DN早期,除肾小球结构改变之外,更为显著的是近端小管增生^[6],小管增生后加强重吸收,通过小管反馈使肾小球滤过率升高^[7]。因此,在DN早期肾小球清除率升高,这与我们的实验结果一致,即模型组大鼠与空白组比较肌酐清除率显著升高。

研究表明,桑叶中含黄酮类,生物碱类,多糖和酚类化合物等,均具有不同程度的降糖作用^[8]。根据本实验结果发现桑酮碱能够显著降低DN大鼠血糖,进一步减轻由高糖导致的超滤,显著降低肌酐清除率即肾小球滤过率,改善肾小球基底膜、系膜增生以及肾小管变性坏死情况,减轻大鼠肾脏代偿作用,对肾脏起到保护作用。桑酮碱改善肾功能的作用与桑叶总生物碱中的特有成分1-脱氧野尻霉素有关,已有文献报道1-脱氧野尻霉素能够改善STZ诱导的糖尿病肾病大鼠的空腹和餐后血糖,改善受损的肾功能^[9]。桑叶中的总黄酮有良好的降糖和抗氧化作用,还能够激活肝脏中过氧化物酶体增殖物激活受体PPAR- γ 和PPAR- α 提高胰岛素敏感性^[10]。桑酮碱中黄酮与生物碱发挥多靶点多效应的作用,通过降低2型糖尿病大鼠血糖,进一步改善其肾功能。

小管间质纤维化是推动糖尿病肾病进程的主要因素之一^[11-12]。在糖尿病肾病的状态下发生的上皮间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是小管间质纤维化的病理学基础。在EMT过程中发生上皮细胞黏附分子如E-Ca蛋白的缺失,细胞失去黏附性,细胞骨架重塑并且发生形态学的改变进一步导致肾小管基底膜的破坏^[13]。目前已经证实抑制TGF- β 1的表达能够延缓DN的病程^[14]。在DN中,通过TGF- β 1激活Smad信号通路参与肾脏纤维化,诱导EMT,促进胶原沉积,降低细胞黏附分子钙黏蛋白E(E-Ca)水平^[15-16]。TGF- β 1也能够通过Smad3和Smad2调节肾小球系膜细胞肥大、足细胞凋亡,加速肾小球硬化,加重由糖尿病以及其他原因导致的肾脏疾病^[17-18]。在本实验中,模型组大鼠的肾脏TGF- β 1、p-Smad2/3、CoIV的表达水平升高,E-Ca的表达水平降低。在给予桑酮碱后,能够不同程度的调节小管间质纤维化,改善肾小球系膜及基底膜增生的情况,与调节TGF- β 1/Smad信号通路关系密切。

综上所述,本实验证实了桑酮碱能够改善早期DN大鼠肾功能,其机制与调节TGF- β 1/Smad信号通路有关。桑酮碱对实验动物糖尿病及肾病并发症保护作用的机制仍需要进一步研究。

参考文献:

[1] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030 [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(5): 1047-1053.

[2] Forbes J M, Cooper M E. Mechanisms of diabetic complications

- [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1): 137-188.
- [3] Sharma K , Ziyadeh F N. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator[J]. *Diabetes*, 1995, 44(10): 1139-1146.
- [4] 孟庆海, 殷秋忆, 郭 静, 等. 4 种不同桑叶提取物降血糖作用的筛选[J]. *中成药*, 2014, 36(6): 1288-1291.
- [5] Breyer M D, Böttinger E, Coffman T M, *et al.* Mouse models of diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(1): 27-45.
- [6] Dørup J, Morsing P, Rasch R. Tubule-tubule and tubule-arteriole contacts in rat kidney distal nephrons. A morphologic study based on computer-assisted three-dimensional reconstructions [J]. *Lab Invest*, 1992, 67(6): 761-769.
- [7] Volker V, Blantz R C, Scott T. Glomerular hyperfiltration and the salt paradox in early type 1 diabetes mellitus: a tubulo-centric view[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(2): 530-537.
- [8] 何羨霞, 苏 楠, 吴新荣. 桑叶降糖有效部位及其降糖活性研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(7): 245-248.
- [9] Huang S S, Yan Y H, Ko C H, *et al.* A Comparison of food-grade *Folium mori* (Sāng Yè) extract and 1-deoxynojirimycin for glycemic control and renal function in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Tradit Complement Med*, 2014, 4(3): 162-170.
- [10] Park M Y, Lee K S, Sung M K. Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LPL mRNA expressions[J]. *Life Sci*, 2005, 77(26): 3344-3354.
- [11] Yokoyama H, Kanno S, Takahashi S, *et al.* Determinants of decline in glomerular filtration rate in nonproteinuric subjects with or without diabetes and hypertension[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009, 4(9): 1432-1440.
- [12] Ziyadeh F N. Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF- β as the major mediator[J]. *J Am Soc Nephro*, 2004, 15 (Suppl 1): S55-S57.
- [13] Jones S E, Gilbert R E, Kelly D J. Tranilast reduces mesenteric vascular collagen deposition and chymase-positive mast cells in experimental diabetes[J]. *J Diabetes Complications*, 2004, 18 (5): 309-315.
- [14] Hills C E, Siamantouras E, Smith S W, *et al.* TGF β modulates cell-to-cell communication in early epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(3): 812-824.
- [15] Lan H Y. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [16] Masszi A, Fan L, Rosivall L, *et al.* Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: role for beta-catenin [J]. *Ame J Pathol*, 2004, 165(6): 1955-1967.
- [17] Das F, Ghosh-Choudhury N, Bera A , *et al.* Transforming growth factor integrates Smad 3 to mechanistic target of rapamycin complexes to arrest dector abundance for glomerular mesangial cell hypertrophy[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(11): 7756-7768.
- [18] Shi S, Yu L, Zhang T, *et al.* Smad2-dependent downregulation of miR-30 is required for TGF- β -induced apoptosis in podocytes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75572.