

[药 理]

芪归益肾方通过调控 miR-141 对 UUO 小鼠肾脏纤维化的影响

尹佳琦, 魏明刚*, 黄星星, 夏 凡, 毛叶勤, 谢宇峰
(苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006)

摘要: **目的** 探讨芪归益肾方(黄芪、当归、川芎、怀牛膝)通过调控微小 RNA-141 (miR-141) 的表达对单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)小鼠肾脏纤维化的影响及其机制。**方法** 采用 UUO 方法建立肾间质纤维化模型。30 只雄性 Balb/c 小鼠随机分为以下 5 组,假手术组,模型组,洛汀新组(50 g/kg),芪归益肾方高(50 g/kg)、低(10 g/kg)剂量组。术后连续灌胃 10 d 后将小鼠处死,留取各组小鼠肾组织。肾组织标本用 HE 染色观察组织形态学改变,免疫组织化学法检测转化生长因子-β(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、胶原蛋白 IV(collagen IV, Col IV)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloprotein-9, MMP-9)表达,实时定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction PCR, RT-PCR)法检测 miR141、TGF-β1 表达。**结果** HE 染色显示除假手术组外,其余各组存在不同程度的肾间质纤维化改变,而药物组病理损伤较模型组减轻($P<0.05$);免疫组织化学结果表明,芪归益肾方高、低剂量组和洛汀新组 TGF-β1、ColIV 表达明显低于模型组,而 MMP-9 表达则明显高于模型组($P<0.05$);RT-PCR 结果表明,与模型组比较,芪归益肾方高、低剂量组和洛汀新组 miR-141 表达明显升高,而 TGF-β1 表达明显降低($P<0.05$)。**结论** 在小鼠 UUO 模型中,芪归益肾方可能通过调控 miR-141 表达来影响 TGF-β1 和 MMP-9 表达,减少 ECM 成分的异常积聚,从而抑制肾脏纤维化进展。

关键词: 芪归益肾方;肾脏纤维化;微小 RNA;细胞外基质

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)04-0765-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.04.001

Effect of Qigui Yishen Decoction on miR-141 regulation in UUO mice with renal fibrosis

YIN Jia-qi, WEI Ming-gang*, HUANG Xing-xing, XIA Fan, MAO Ye-qin, XIE Yu-feng
(The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effect and mechanism of Qigui Yishen Decoction (QGYS, *Astragali Radix*, *Angelicae sinensis Radix*, *Chuanxiong Rhizoma*, *Achyranthis bidentatae Radix*) on regulating the expression of miR-141 in unilateral ureteral obstruction (UUO) mice with renal fibrosis. **METHODS** Thirty Balb/c male mice randomly divided into sham-operated group ($n=6$), UUO group ($n=6$), Lotensin (50 g/kg) group ($n=6$), QGYS high dose (50 g/kg) group ($n=6$), and QGYS low dose (10 g/kg) group ($n=6$) were conducted UUO surgery to promote kidney fibrosis except the six mice in the sham operation group. After a successive 10-day medication of QGYS and Lotensin to mice by oral gavage on daily basis, all mice were killed to procure renal tissue to observe its morphology and pathology changes by HE staining. The expressions of TGF-β1, ColIV, and MMP-9 were analyzed by immunohistochemical method, and the expressions of miR141, TGF-β1 were measured by real-time PCR. **RESULTS** The obviously pathological injuries including renal interstitial fibrosis were identified by

收稿日期: 2017-10-25
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81273723, 81473633, 81673896); 国家中医临床研究基地业务建设第二批科研专项课题(JDZX2015096); 苏州市科技局应用基础研究项目(SYS201602); 江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX17-2003)
作者简介: 尹佳琦(1991—),女(满族),硕士生,从事中西医结合肾脏病的基础与临床研究。Tel: 13626192072, E-mail: 492128523@qq.com
*通信作者: 魏明刚(1975—),男,博士,副教授,硕士生导师,从事中西医结合肾脏病的基础与临床研究。Tel: 13812791993, E-mail: weiminggang@suda.edu.cn

HE staining among the groups intervened with UUO, but the variance in the extent due to different administrations of QGYS and Lotensin was noticed as well ($P < 0.05$). As compared to the UUO group, high and low dose QGYS groups and Lotensin group achieved an up-regulated expression of TGF- β 1 and ColIV, and a down-regulated expression of MMP-9 by immunohistochemistry ($P < 0.05$), and significantly increased mRNA expression of miR-141, and decreased mRNA expression of TGF- β 1 by real-time PCR ($P < 0.05$). **CONCLUSION** In UUO mouse models, QGYS gives influence to TGF- β 1 and MMP-9 through inducing miR-141 expression change to decrease abnormal accumulation of ECM, and thus inhibits the progression of renal fibrosis.

KEY WORDS: Qigui Yishen Decoction; renal fibrosis; miRNA; extracellular matrix

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 作为一个全球的重要公共卫生问题, 严重威胁着公众健康。近年来 CKD 发病率呈逐年上升趋势, 最新流行病学研究表明我国 CKD 的患病率约为 10.8%^[1], 由此可推算出我国患有 CKD 的成年人约 1.2 亿。美国肾脏病基金会 K/DOQI 专家组对 CKD 分期, 可由 1 期逐渐发展为 5 期肾衰竭, 近 20 年来慢性肾衰是人类主要死亡病因的第五位至第九位, 严重威胁着人类健康^[2]。慢性肾衰目前仍没有行之有效的治疗手段, 只能依赖血液透析、腹膜透析、肾移植等替代治疗维持生命, 这不仅降低患者生活质量, 而且增加患者家庭及国家的医疗卫生支出, 因此, 必须重视 CKD 病变早期的防治才能延缓病情发展, 减少慢性肾衰患者的数量。CKD 从早期发展为慢性肾衰的必由之路是肾脏纤维化, 故抑制肾脏纤维化是延缓 CKD 病情发展的关键^[3]。

miRNA 是一类约 22 个核糖核苷酸组成的高度保守的非编码单链蛋白质 RNA 分子, 广泛参与了机体细胞的分化、增殖、代谢、凋亡等过程^[4]。机体细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的异常积聚是肾脏纤维化的主要机制之一。miRNA 与肾脏生理和病理过程密切相关, 是肾脏纤维化进程中的核心环节^[4], 可以通过调控 TGF- β 1 和 MMP-9 对 ECM 异常积聚明显的调节作用进而影响肾脏纤维化的进程。课题组从 2002 年开始研究用中医药治疗 CKD, 通过基础研究和临床研究发现慢性肾脏病的特点多为脾肾两虚, 血脉瘀阻。结合慢性肾脏病的病机特点创立的芪归益肾方具有健脾益肾、活血通络的功效, 并在调控细胞因子、延缓肾脏纤维化方面具有明显作用^[5-7]。本研究旨在观察芪归益肾方通过对 miR-141 表达的调控作用在 UUO 模型所致的肾脏纤维化的影响, 探讨其延缓肾脏纤维化作用的确切靶点及机制, 为该方在延缓肾脏纤维化的过程中寻找治疗依据。

1 材料

1.1 动物 选用雄性 Balb/c 小鼠 30 只, 体质量 (20 ± 2) g, SPF 级, 由上海灵畅生物科技有限公司提供, 动物合格证号 SCXK (沪) 2013-0018, 动物使用场地合格证号 SYXK (苏) 2012-0045。

1.2 试剂和仪器 由苏州市天灵中药饮片有限公司提供的中药饮片, 包括黄芪 (批号 161005015)、当归 (批号 160912010)、川芎 (批号 160905101)、怀牛膝 (批号 160629015), 以上药物按照 3 : 1 : 1 : 1 的比例配制煎煮, 最后将药液浓缩至生药浓度为 2 g/mL^[8], 所有药材经由苏州大学附属第一医院药学部毛叶勤主管中药师鉴定均符合 2015 年版《中国药典》相关要求, 药物剂量及浓度根据课题组之前的研究结果确定^[8]。洛汀新片 (北京诺华制药有限公司, 批号 X2026)。试剂均为 Abcam 公司产品, TGF- β 1 抗体 (批号 ab92486)、MMP-9 抗体 (批号 ab132867)、ColIV 抗体 (批号 ab19808)。RT-PCR 所用试剂盒均为 Qiagen 公司产品, miRNeasy Mini Kit (批号 154036748)、miScript II RT Kit (批号 154039023)、miScript SYBR Green PCR Kit (批号 154047141)。NanoDrop 2000/2000c 分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司); 罗氏 LightCycler96 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士罗氏公司); 基因扩增热循环仪 Genesy 96T (西安天隆科技有限公司)。

2 研究方法

2.1 动物分组、给药及标本收集 将 30 只小鼠适应性饲养 1 周, 普通饲料喂养, 自由饮食和进水。根据随机数字表法随机分为假手术组, 模型组, 洛汀新组, 芪归益肾方高、低剂量组。模型组和 3 个药物组行左侧输尿管结扎术, 0.2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔内注射麻醉, 将小鼠固定进行腹部消毒, 延腹正中线切开皮肤及腹膜, 暴露左侧肾脏及输尿管, 游离左侧肾脏和输尿管后以 5/0 号手术线结扎近肾盂端输尿管, 用生理盐水冲洗后关腹

并逐层缝合腹膜、皮肤；假手术组仅游离左侧输尿管后关腹缝合^[9]。术后第2天开始给小鼠灌胃，按照人常规剂量与小鼠用药的换算关系直接确定^[10]：芪归益肾方低剂量组灌胃量为10 g/kg；芪归益肾方高剂量组灌胃量为低剂量组的5倍，为50 g/kg；同法确立洛汀新的使用剂量。按照小鼠低剂量组的灌胃的容积情况，配置各组药物的灌胃药物容积/体质量比例关系，模型组和假手术组灌胃相应体积的蒸馏水。造模手术次日开始灌胃连续10 d，第11天将小鼠颈椎脱臼处死，快速剖取左肾，剥离包膜并用生理盐水冲洗，沿肾长轴横切为二，一半肾组织放于冻存管中迅速置于液氮罐储存以行分子生物学检测，另一半置于4%多聚甲醛溶液中固定保存，以完成苏木素-伊红（HE）染色及免疫组织化学检测。

2.2 观察小鼠一般情况 实验过程中密切观察各组小鼠一般情况，包括体质量、毛发、排泄物、精神活动等情况。

2.3 光学显微镜检测 将固定的肾组织进行乙醇梯度脱水、浸蜡、石蜡包埋，切成约2 μm厚度的切片后常规HE染色，显微镜下观察肾组织病理改变，每张切片随机选取8~10个视野观察肾小管-间质病理变化，进行肾小管-间质病变半定量评分^[9]。

2.4 免疫组织化学检测 肾组织石蜡切片常规脱蜡，PBS冲洗，微波加热修复，分别滴加一抗4℃孵育过夜；PBS冲洗后二抗37℃孵育1 h，PBS冲洗后DAB显色，复染后封片。每张切片随机观察8~10个非重叠视野的病理变化，棕黄色表达为阳性表达，应用病理图文分析软件进行半定量表达程度的分析。

2.5 RT-PCR检测 *miR-141*、*TGF-β1* 表达 将保存于液氮的肾组织通过miRNeasy Mini Kit试剂盒提取总RNA，测定其浓度。mRNA反转录使用miScript II RT Kit试剂盒将RNA反转录成cDNA。实时定量PCR检测 *mir-141*、*TGF-β1* 表达严格按照德国Qiagen公司miScript SYBR Green PCR Kit试剂盒说明书步骤完成，*U6*作为内参照。PCR扩增条件为95℃预热15 min，94℃变性15 s，55℃退火30 s，70℃延伸30 s，40个循环。*mir-141*、*TGF-β1*、*U6*的引物序列是根据网上NCBI数据库中各自基因序列设计获得，由上海生工生物技术有限公司合成。采用加尾法设计 *mir-141* 引物序列正向5'-ATCTTCCAGTGCAGTGTGGAT-3'，*TGF-β1* 引物序列正向5'-CCTCAGCCTGTACAACACCA-3'，*U6* 引

物序列正向5'-ATGGACTATCATATGCTTACCGTA-3'，反向引物都为通用引物。根据所得Ct值，通过2^{-ΔΔCt}相对定量法分别计算目的基因相对表达量。每个样本做3个复孔，取平均值。

2.6 统计学分析 采用SPSS 19.0软件进行分析，样本数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，方差不齐时采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般情况 各组小鼠均存活，UUO术后伤口愈合情况良好。假手术组小鼠精神状态佳，进食饮水、排泄物和毛色正常，活动自如；模型组小鼠精神萎靡，反应迟缓，皮毛凌乱且光泽度差，进食和饮水量少，大便稀烂，体质量增长也较假手术组缓慢；芪归益肾方高、低剂量组及洛汀新组小鼠情况比模型组均有所改善。

3.2 肾组织结构改变 光镜下观察各组小鼠左肾组织HE染色发现，假手术组左肾组织结构清晰，肾小管排列整齐，基底膜完整；模型组肾组织结构混乱，皮髓质交界不清，肾小管上皮细胞广泛萎缩、变性，小管损伤严重，基底膜裸露，还可见炎性细胞浸润明显，以嗜酸粒细胞为主，胶原纤维形成增多，纤维化程度严重。与模型组相比，芪归益肾方高、低剂量组及洛汀新组的肾小管损伤、炎性细胞增生及纤维化程度均有明显减轻。肾小管间质损伤评分结果显示，芪归益肾方高、低剂量组及洛汀新组肾小管损伤均较模型组明显改善（ $P < 0.05$ ），且芪归益肾方高剂量组优于洛汀新组和芪归益肾方低剂量组（ $P < 0.05$ ）。见表1、图1。

表1 芪归益肾方对UUO小鼠肾小管-间质损伤指数的影响（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 6$ ）

Tab. 1 Effect of QGYS on renal tubulointerstitial injury index in UUO mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肾小管-间质损伤指数
假手术组	—	0.65 ± 0.26
模型组	—	16.21 ± 1.03 *
洛汀新组	50	10.21 ± 1.16 ^Δ
芪归益肾方低剂量组	10	9.84 ± 0.98 ^Δ
芪归益肾方高剂量组	50	7.21 ± 1.32 ^Δ

注：与假手术组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，^Δ $P < 0.05$

3.3 各组小鼠左肾组织TGF-β1、MMP-9、ColIV的免疫组化结果 在假手术组中TGF-β1、MMP-9、ColIV无明显变化；与假手术组相比，模型组中TGF-β1、ColIV大量表达，而MMP-9表达明显减少（ $P < 0.05$ ）；而与模型组相比，洛汀新组和芪

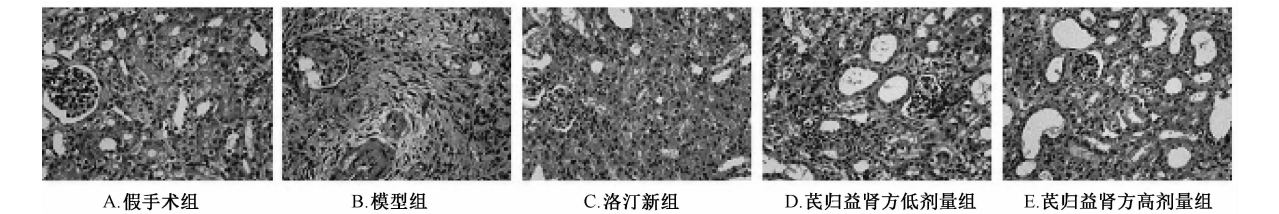


图 1 芪归益肾方对 UUO 小鼠肾组织病理学的影响 (HE × 400)

Fig. 1 Effect of QGYS on renal histopathology in UUO mice (HE, ×400)

归益肾方高、低剂量组 TGF-β1、ColIV 表达均有明显下降, MMP-9 表达明显上升 ($P < 0.05$), 且芪归益肾方高剂量组优于洛汀新组和芪归益肾方低剂量组 ($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

表 2 芪归益肾方对 UUO 小鼠 TGF-β1、MMP-9、ColIV 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 2 Effects of QGYS on expressions of TGF-β1, MMP-9 and ColIV in UUO mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)				
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TGF-β1	MMP-9	ColIV
假手术组	—	0.196 ± 0.032	0.431 ± 0.021	0.286 ± 0.039
模型组	—	0.533 ± 0.045 *	0.178 ± 0.042 *	0.598 ± 0.034 *
洛汀新组	50	0.361 ± 0.039 [△]	0.231 ± 0.019 [△]	0.486 ± 0.025 [△]
芪归益肾方低剂量组	10	0.342 ± 0.041 [△]	0.226 ± 0.032 [△]	0.477 ± 0.041 [△]
芪归益肾方高剂量组	50	0.279 ± 0.036 [△]	0.302 ± 0.025 [△]	0.398 ± 0.033 [△]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

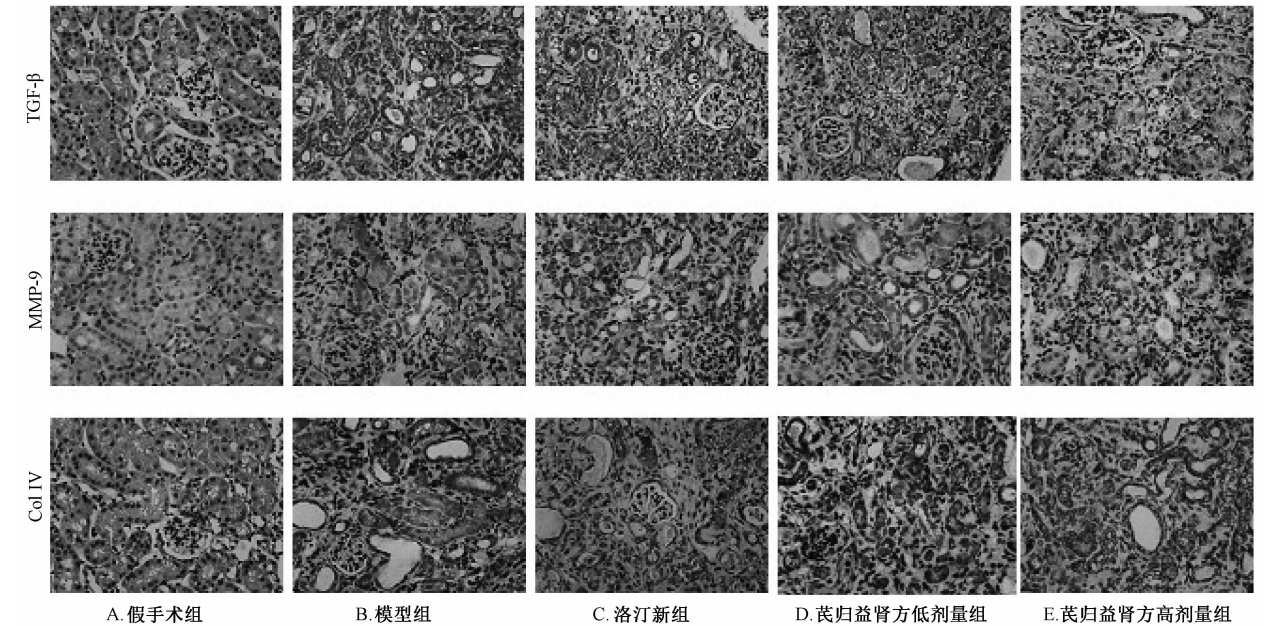


图 2 芪归益肾方对 UUO 小鼠 TGF-β1、MMP-9、ColIV 表达的影响 (免疫组织化学, ×400)

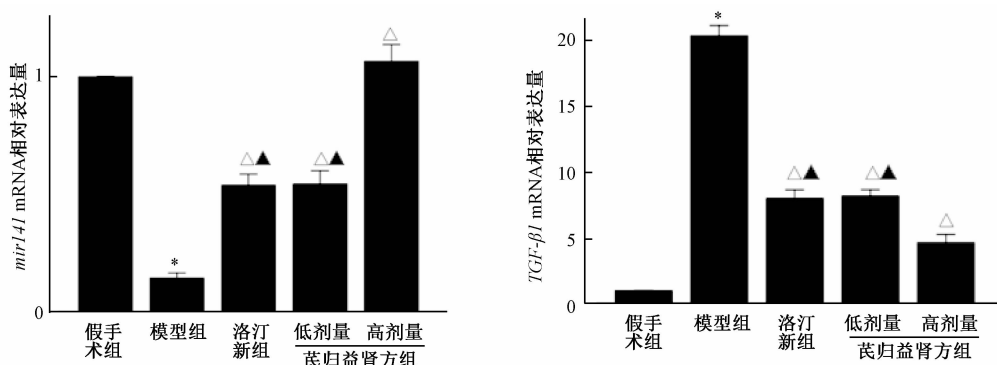
Fig. 2 Effects of QGYS on expressions of TGF-β1, MMP-9 and ColIV in UUO mice (immunohistochemistry, ×400)

3.4 对小鼠肾组织 miR-141、TGF-β1 mRNA 表达的影响 实时定量 PCR 检测结果显示,与假手术组比较,模型组小鼠肾组织中 miR-141 mRNA 表达明显降低,而 TGF-β1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,芪归益肾方高、低剂量组和洛汀新组 miR-141 mRNA 表达明显升高,而 TGF-β1 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$),且芪归益肾方高剂量组 miR-141 mRNA 表达明显升高,

TGF-β1 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$)。见图 3。

4 讨论

CKD 病变的核心是肾脏纤维化,肾脏纤维化与 ECM 成分在肾脏的异常积聚密切相关^[4]。TGF-β1 是目前作用最明确的致肾纤维化因子,可以促进 ECM 成分过度增加;MMP-9 是降解 ColIV 最主要的酶,能够影响 ECM 成分的降解,ECM 在病理情况下增生与降解关系失衡,在肾组织中出现异常



注：与假手术组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ；与芪归益肾方高剂量组比较， $\Delta P < 0.05$

图 3 芪归益肾方对 UUO 小鼠 miR-141、TGF-β1 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effects of QGYS on expressions of miR-141 and TGF-β1 mRNA in UUO mice

积聚而直接导致肾纤维化。研究表明，miRNA 能够通过调控 TGF-β1 和 MMP-9 的表达来调控 ECM 成分的异常积聚，进而对肾脏纤维化产生影响^[11-14]；miR-141 在肾脏中高表达，是 miR-200 家族的主要成员之一，能够明显减少 ECM 表达，对缓解肾脏纤维化起着关键作用^[15]。由此推测，mi-141 可能通过调控 TGF-β1 的表达来影响 ECM 表达，另一方面也可以通过调控 MMP-9 的表达来影响 ECM 表达，从而在肾脏纤维化的进程中起到了关键作用。

UUO 小鼠模型是研究肾纤维化的经典动物模型^[9]。表 1 和图 1 表明，实验组肾组织 HE 染色中，模型组与假手术组肾小管-间质损伤指数差异明显，组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；经治疗后各组与模型组比较，肾小管-间质损伤指数有统计学差异 ($P < 0.05$)；且芪归益肾方高剂量组与芪归益肾方低剂量组和洛汀新组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，说明经芪归益肾方高、低剂量组和洛汀新组治疗后，肾小管间质损伤程度明显减轻，且芪归益肾方高剂量组治疗效果比低剂量组和洛汀新组好，治疗组能够改善肾脏纤维化的进展。表 2 和图 2 中各组肾组织的细胞因子、细胞外基质和基质金属蛋白酶的免疫组织化学结果通过半定量分析提示，与假手术组比较，模型组中 TGF-β1、ColIV 表达增加，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，说明在肾脏纤维化模型中 TGF-β1、ColIV 表达明显增强；芪归益肾方高、低剂量组和洛汀新组 TGF-β1、ColIV 的表达明显低于模型组，但较假手术组增加，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；芪归益肾方高剂量组与芪归益肾方低剂量组和洛汀新组比较，TGF-β1、ColIV 的表达明显降

低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；MMP-9 在模型组表达明显低于假手术组，而在芪归益肾方高、低剂量组和洛汀新组的表达较模型组明显增加，差异都具有统计学意义 ($P < 0.05$)，且芪归益肾方高剂量组与芪归益肾方低剂量组和洛汀新组比较，MMP-9 表达明显增加，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结合表 3 和图 3 各组肾组织的分子生物学研究提示，miR-141 在模型组的表达低于假手术组，在芪归益肾方高、低剂量组和洛汀新组的表达高于模型组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，且芪归益肾方高剂量组与芪归益肾方低剂量组和洛汀新组比较，miR-141 表达明显增加，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；而 TGF-β1 在模型组的表达明显高于假手术组，而在芪归益肾方高、低剂量组和洛汀新组的表达明显低于模型组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，且芪归益肾方高剂量组与芪归益肾方低剂量组和洛汀新组比较，TGF-β1 表达明显降低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。综上所述，在小鼠肾脏纤维化模型中 ECM 成分 ColIV 的表达增加与 TGF-β1、MMP-9 的表达有关，而 miR-141 对 TGF-β1、MMP-9 的表达有影响；芪归益肾方对 miR-141、MMP-9 表达具有正调控作用，对 TGF-β1、ColIV 具有负调控的作用，且芪归益肾方高剂量组的调控作用优于芪归益肾方低剂量组和洛汀新组。芪归益肾方可能通过调控 miR-141 表达来增加 MMP-9 的表达和减少 TGF-β1 的表达，从而减少 ECM 成分的异常积聚，进一步延缓肾脏纤维化，改善肾脏功能，对肾脏纤维化的治疗效果与用药剂量有关。miR-141 可能是延缓肾脏纤维化进程的潜在靶点。

肾脏纤维化的形成过程贯穿于 CKD1 期发展为

5 期肾衰竭的始终。CKD 在中医属于水肿、腰痛、尿血、关格和虚劳等疾病范畴，其病位涉及五脏，肺、脾、肾三脏为关键，病因病机为本虚标实，本虚为脾胃气虚，标实为血脉瘀阻。芪归益肾方主要由当归、黄芪、川芎、牛膝组成，具有益肾健脾，活血通络的功效^[9]，黄芪益肾健脾、利尿消肿、补中益气，为君药；当归补血活血、补虚通络，为臣药；川芎活血通络、消瘀去癥，也为臣药；牛膝入肾经，活血通经、补肾利水，助黄芪补虚益肾利水，为引经药和佐使药。因此从中医的角度来看，慢性肾脏病的核心病机是脾肾两虚、血脉瘀阻，结合病变情况，芪归益肾方具有健脾益肾、活血通络的功效，针对性强且疗效显著。

芪归益肾方作为治疗 CKD 的中药复方，已获得国家发明专利（专利号 ZL201310069692.0）。课题组近年来通过一系列的实验和临床研究发现，芪归益肾方及其主要成分能够调控 TGF-β1 /Smads 信号通路，减少 Col 和 FN 等 ECM 成分异常积聚，对肾脏具有明显的保护作用从而有效延缓了肾脏纤维化的进程^[6, 9, 16-18]。本研究表明，芪归益肾方以 miR-141 为潜在治疗靶点，能够减缓肾脏纤维化程度，具有延缓 CKD 病情进展的作用。

参考文献：

[1] Zhang L, Wang F, Wang L, *et al.* Prevalence of chronic kidney disease in China; a cross-sectional survey[J]. *Lancet*, 2012, 379(9818): 815-822.

[2] 陆再英. 内科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 550.

[3] 刘必成. 肾脏纤维化发生机制研究进展[C] //中华医学会肾脏病学分会 2010 学术年会专题讲座汇编. 北京: 中华医学会, 2010: 88-89.

[4] Wang B, Komers R, Carew R, *et al.* Suppression of micro RNA-29 expression by TGF-β1 promotes collagen expression and renal fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(2): 252-265.

[5] 魏明刚, 熊佩华, 张 玲, 等. 中药对 IgA 肾炎肾小管损害的保护作用[J]. 中医杂志, 2006, 47(11): 839-840.

[6] 魏明刚, 孙 伟, 程宗琦, 等. 加味当归补血汤抑制微炎症与慢性肾小球肾炎临床疗效的研究[J]. 中成药, 2014, 36(1): 48-51.

[7] Wei M, Xiong P, Zhang L. Effect of Chinese herbs on immunoglobulin A nephropathy: a randomized controlled trial [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(1): 65-69.

[8] Wei M, Sun W, He W, *et al.* Qiguiyishen decoction reduced the accumulation of extracellular matrix in the kidneys of rats with adriamycin-induced nephropathy[J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(3): 351-356.

[9] 杨彦裕, 魏明刚, 刘 蔚, 等. 芪归益肾方对 UUO 小鼠肾组织 TGF-β₁/Smads/PI3K 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 89-93.

[10] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版, 2001: 356.

[11] Zhang L, He S, Yang F, *et al.* Hyperoside ameliorates glomerulosclerosis in diabetic nephropathy by downregulating miR-21 [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(12): 1249-1256.

[12] Han F, Konkalmatt P, Chen J, *et al.* MiR-217 mediates the protective effects of the dopamine D2 receptor on fibrosis in human renal proximal tubule cells[J]. *Hypertension*, 2015, 65(5): 1118-1125.

[13] Wang B, Koh P, Winbanks C, *et al.* miR-200a prevents renal fibrogenesis through repression of TGF-β2 expression [J]. *Diabetes*, 2011, 60(1): 280-287.

[14] Zhong X, Chung A C, Chen H Y, *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.

[15] Xiong M, Jiang L, Zhou Y, *et al.* The miR-200 family regulates TGF-β1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302(3): F369-F379.

[16] 魏明刚, 杨彦裕, 陈 琳, 等. 基于细胞信号通路机制探讨芪归益肾方剂延缓肾脏纤维[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1136-1140.

[17] 魏明刚, 程宗琦, 刘 蔚, 等. 芪归益肾方对阿霉素肾病大鼠肾功能保护作用的实验研究[J]. 中成药, 2015, 37(4): 865-869.

[18] Wei M G, He W M, Lu X, *et al.* JiaWeiDangGui Decoction ameliorates proteinuria and kidney injury in adriamycin-induced rat by blockade of TGF-β/Smad signaling[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 5031890.