

益气解毒方对糖尿病肾病大鼠肾小管上皮 细胞线粒体自噬作用机制

孙敏¹, 顾俊菲², 封亮^{2*}

(1. 连云港市第二人民医院, 江苏 连云港 222006;

2. 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 南京中医药大学附属中西医结合医院, 南京 210028)

[摘要] **目的:**研究益气解毒方对糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)大鼠肾小管上皮细胞线粒体自噬作用机制。**方法:**采用 DN 大鼠模型,观察益气解毒方对 DN 的治疗作用。采用苏木素伊红(HE)染色法观察给药后 DN 大鼠肾脏病理变化,透射电镜观察 DN 大鼠肾小管上皮细胞线粒体自噬体情况。采用蛋白免疫印迹法检测肾组织中微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, MAP1LC3-II, LC3-II), 自噬标志物 p62 蛋白 (sequestosome-1, p62), 促凋亡蛋白 Nix (Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like, Nix) 的表达,并应用实时荧光定量 PCR 测定 Nix mRNA 的表达。**结果:**与模型组比较,益气解毒方能够增加 DN 大鼠体重,改善 DN 大鼠血尿素氮(BUN),血肌酐(Scr),血糖(GLU),甘油三酯(TG)及总胆固醇(CHOL),白蛋白(Alb)等血、尿生化指标($P < 0.01$),并且能抑制由 DN 导致的肾小管上皮细胞线粒体过度自噬,显著降低 LC3-II, p62, Nix 蛋白的表达($P < 0.01$),同时降低 Nix mRNA 的表达($P < 0.01$)。**结论:**益气解毒方对 DN 有较好的治疗效果,这可能与其调节 DN 肾小管上皮细胞线粒体自噬紊乱有关。

[关键词] 益气解毒方; 糖尿病肾病; 肾小管上皮细胞; 线粒体自噬

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0109-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017020109

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161027.1504.034.html>

[网络出版时间] 2016-10-27 15:04

Effect and Mechanism of Yiqi Jiedufang on Mitophagy in Tubular Epithelial Cells of Diabetic Nephropathy Rats

SUN Min¹, GU Jun-fei², FENG Liang^{2*}

(1. The Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222006, China;

2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Nanjing Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Yiqi Jiedufang (YQJDF) on the mitophagy in tubular epithelial cells of diabetic nephropathy (DN) rats and investigate the mechanism. **Method:** DN rat models were established in this study to observe the therapeutic effect of YQJDF on DN. The pathological changes in rat kidney were observed by using hematoxylin-eosin (HE) staining after administration of YQJDF. Autophagic vacuoles in renal tubular epithelial cells of DN rats were tested by scanning electron microscopy. The protein expression levels of microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (MAP1LC3-II), sequestosome-1 (p62), and Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like (Nix) were detected by western blot. The expression level of Nix mRNA was

[收稿日期] 20160214(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473394)

[第一作者] 孙敏,副主任药师,从事中药药理研究, E-mail:lygsm0381@163.com

[通讯作者] *封亮,副研究员,从事组分结构中中药药效物质基础及作用机制研究, Tel:025-85637809, E-mail:wenmoxiushi@163.com

detected by using real-time PCR. **Result:** as compared with the model group, YQJDF could increase the body weight of DN rats, improve the biochemical indicators of blood and urine such as blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), blood glucose (GLU), triglyceride (TG) and cholesterol (CHOL), albumin (Alb) ($P < 0.01$). YQJDF can also inhibit the excessive mitophagy in renal tubular epithelial cells caused by DN, significantly decrease the protein expression levels of LC3-II, P62, and Nix ($P < 0.01$), and decrease the mRNA expression levels of Nix ($P < 0.01$). **Conclusion:** YQJDF has a better therapeutic effect on DN, which may be related to the regulation of mitophagy disorders caused by DN in renal tubular epithelial cells.

[**Key words**] Yiqi Jiedufang; diabetic nephropathy; tubular epithelial cells; mitophagy

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最为严重的慢性并发症之一,也是我国继发性慢性肾脏疾病的主要原因^[1-2]。DN 发病后机体释放多种炎症因子,进一步加重糖尿病病情^[3-4]。DN 临床治疗措施有限,中药及复方在治疗 DN 这类慢性疾病的临床治疗过程中均有显著疗效。自噬 (autophagy) 是细胞内的一种清除细胞中损伤或衰老细胞器及生物大分子的保护性机制。自噬能够清除细胞内受损的蛋白质和 (或) 衰老的细胞器,调节固有免疫和适应性免疫等。线粒体自噬 (mitophagy) 是细胞通过自噬的机制选择性地清除损伤线粒体的过程^[5-6]。在 DN 中,线粒体形态和功能出现异常时,线粒体肿胀变性,片段化增多,同时伴有细胞氧化损伤及凋亡增多等。但目前对于自噬在糖尿病肾损伤中的作用机制以及药物治疗 DN 的治疗机制还不清楚。因此,本课题组以益气解毒活络方^[7]为基础,自拟益气解毒方,并就其对糖尿病肾病大鼠肾小管上皮细胞线粒体自噬作用的机制进行研究,以期对 DN 的治疗以及益气解毒方的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性清洁级 SD 大鼠 60 只,体重 (200 ± 20)g,购自上海斯莱克动物中心,合格证号 SCXK(沪)2015-0011。所有动物饲养于清洁级动物室,室温 26 °C,湿度 45%,动物室内光照 12 h 昼夜循环。

1.2 试剂及仪器 高糖高脂饲料 (10% 蔗糖,10% 蛋黄粉,5% 猪油,1% 胆固醇,0.2% 胆盐) (南京市青龙山动物繁殖场加工),链脲佐菌素 (STZ, Sigma 公司,批号 20140214);兔抗人微管相关蛋白 1 轻链 3 II (LC3-II) 单克隆抗体 (Abcam 公司,货号 ab48394);兔抗人促凋亡蛋白 Nix 单克隆抗体,兔抗人 β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的二抗和辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠的二抗 (美国 Cruze 公司,货号分别为 sc-

28240, sc-10731, sc-2004, sc-2005);兔抗人自噬标志物 p62 蛋白 (p62) 单克隆抗体 (Proteintech 公司,货号 18420-1-AP);Trizol (美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026);反转录试剂盒 (Takara 公司,批号 D6110A);引物序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, Rat-GAPDH (352 bp): 上游 5'-AAGGTC GGTGTGAACGGATT-3', 下游 5'-AGATGATGACCCT TTTGGCCC-3'; Rat-Nix (223 bp): 上游 5'-GGCTCGGCA TCTATATTGGA-3', 下游 5'-AAATGCCCAACAGAG TTTG-3'。

Anke TDL-40B 型低速大容量多管离心机 (上海安亭科学仪器厂);PVDF 膜 (美国 Millipore 公司);IX51 型显微镜 (日本 Olympus 公司);ABI 7500 型基因扩增仪 (美国 ABI 公司);Mini Protean 3 Cell 型垂直电泳仪及显影设备 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 药品 STZ 的配制:用 pH 4.4 的 0.1 mol·L⁻¹ 无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制,避光冷藏,现用现配。益气解毒方由黄芪、丹参、牡丹皮、川芎、黄连组成,所用中药饮片均经江苏省中医药研究院贾晓斌教授鉴定为正品,加入 5 倍量水回流提取,2 h/次,提取 2 次,纱布滤过,浓缩至粉末,储存于连云港市第二人民医院内备用,编号 YQJDF001。

2 方法

2.1 糖尿病肾病大鼠模型的建立 SD 大鼠 60 只,适应喂养 1 周测定血糖。随机选择 8 只作为正常组,其余建立糖尿病肾病大鼠模型。正常组给予常规饲料,造模组给予高糖高脂饲料 2 周,测定血糖,并注射 STZ 溶液 (45 mg·kg⁻¹),正常组注射同等剂量柠檬酸钠缓冲液。4 周后分别测定大鼠空腹血糖、血肌酐、尿蛋白、体重,血糖 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹,尿蛋白含量 ≥ 20 mg·(24 h)⁻¹ 为造模成功。期间死亡 1 只,造模未成功 2 只。

2.2 分组及给药 取未造模的大鼠 8 只为正常组;取造模成功的 49 只大鼠随机分为模型组、益气解毒方高、中、低剂量组 (生药 10, 5, 2.5 g·kg⁻¹)。益气

解毒方组每天灌胃给药 1 次,连续给药 8 周。

2.3 大鼠血、尿生化指标检测 给药 8 周,末次给药后 24 h 禁食不禁水,收集 24 h 尿液。10% 的水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,离心取上清。血清及尿液送连云港市第二人民医院生化科检测血尿素氮(BUN),血肌酐(SCr),血糖(GLU),甘油三酯(TG)及胆固醇(CHOL),白蛋白(Alb)。尿素氮和甘油三酯用试剂盒比色法检测,血肌酐和胆固醇用酶法检测,血糖用己糖激酶法检测,均参照说明书操作。

2.4 苏木素伊红染色(HE)观察肾脏病理变化 迅速取出双肾,去除包膜,0.9% 的冷生理盐水冲洗擦干,称取肾重。取肾脏组织于多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋,切片,切片脱蜡,乙醇梯度洗脱,苏木精液染色,2% 伊红染色液浸泡,梯度酒精脱水,中性树脂胶封片。

2.5 透射电镜观察肾组织线粒体自噬小体 肾组织切片固定于磷酸缓冲液配制的 5% 戊二酸中 4 ℃ 过夜,常规丙酮脱水、包埋,超薄切片,3% 醋酸铀、枸橼酸铅双染色,将制备好的样品用 JEM-1010 透射电镜观察观察自噬体。

2.6 蛋白免疫印迹法检测大鼠肾组织中 LC3-II, p62, Nix 蛋白表达 冻存肾脏组织解冻匀浆,充分裂解,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取蛋白样品电泳,转移至 PVDF 膜,4 ℃ 封闭过夜,分别用 LC3-II, p62, Nix(1:200)和 β -actin 兔多克隆抗体(1:1 000)孵育,室温轻摇 3 h,洗涤,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:2 000)室温孵育,洗涤,室温显影,凝胶成像系统拍照,封存。以目的蛋白/ β -actin 表示蛋白相对表达。

2.7 实时荧光定量 PCR 检测各组大鼠肾组织 Nix mRNA 的表达 Trizol 一步法提取肾脏组织 RNA,测定纯度和浓度。逆转录为 cDNA,基因扩增,进行 PCR 反应,反应条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 45 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 105 s,32 循环,72 ℃ 80 min。以 GAPDH 为参照,荧光发射量反应循环数,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行分析比较。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

3 结果

3.1 益气解毒方对糖尿病肾病大鼠一般情况的影响 糖尿病模型成功后第 8 周,除模型组死亡 1 只大鼠,其他组均未出现死亡。与空白组比较,模型组

大鼠多饮、多食、多尿,毛色晦暗,逐渐消瘦,体重显著减轻($P < 0.01$),精神状况较差,肾重/体重显著增高($P < 0.01$)。与模型组比较,益气解毒方给药后糖尿病肾病大鼠体重增加,且高剂量组大鼠体重增加明显($P < 0.05$),同时肾重/体重明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 益气解毒方对糖尿病肾病大鼠体重及肾重/体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of YQJDF on body weight and kidney weight/body weight of DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体重/g	肾重/体重
空白	-	479.0 ± 14.98	0.003 3 ± 0.000 2
模型	-	229.3 ± 12.41 ¹⁾	0.008 7 ± 0.001 3 ³⁾
益气解毒方	2.5	230.3 ± 15.60	0.007 2 ± 0.000 9
	5	259.3 ± 3.18	0.005 0 ± 0.000 3 ²⁾
	10	288.7 ± 12.41 ²⁾	0.003 9 ± 0.000 1 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 益气解毒方对糖尿病大鼠血、尿生化指标的影响 糖尿病模型成功后第 8 周,与空白组比较,模型组大鼠血生化指标如血糖、胆固醇、甘油三酯、肌酐、尿素氮明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),白蛋白含量显著减少($P < 0.01$),尿蛋白/肌酐显著提高($P < 0.01$)。与模型组比较,益气解毒方给药干预后,各项血、尿生化指标均得到改善($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.3 益气解毒方对糖尿病大鼠肾脏病理改变的影响 空白组肾小球结构清晰,形状正常;糖尿病肾病模型组大鼠肾脏肾小球肥大,系膜细胞增生、系膜基质增多,益气解毒方给药干预后,肾组织比模型组病理损伤减少,肾小球结构变清晰。见图 1。

3.4 益气解毒方对糖尿病大鼠肾小管上皮细胞线粒体自噬的影响 线粒体分布主要以肾小管上皮细胞为主,空白组线粒体形态正常,模型组观察到大量大小不等的自噬泡,线粒体肿胀,棘断裂、消失,益气解毒方给药后自噬减少,益气解毒方对糖尿病大鼠肾小管上皮细胞线粒体自噬有一定抑制作用。见图 2。

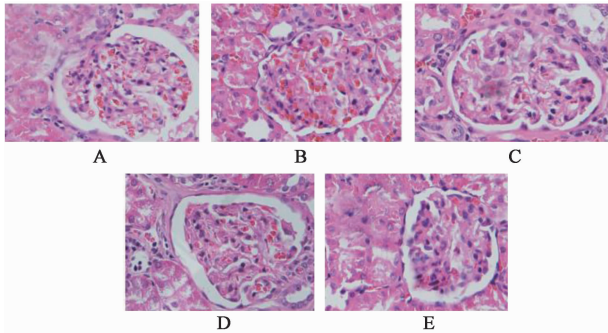
3.5 益气解毒方对糖尿病大鼠肾组织中 LC3-II, p62, Nix 蛋白水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠肾脏中 LC3-II, p62, Nix 蛋白水平显著升高($P < 0.01$),表明糖尿病肾病造模后肾组织中线粒体自噬,引起机体损伤。与模型组比较,益气解毒方

表 2 益气解毒方对糖尿病肾病大鼠尿、血生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of YQJDF on biochemical indexes of urine, blood of DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	血糖 /mmol·L ⁻¹	胆固醇 /mmol·L ⁻¹	甘油三酯 /mmol·L ⁻¹	肌酐 /μmol·L ⁻¹	尿素氮 /mmol·L ⁻¹	白蛋白 /g·L ⁻¹	尿蛋白 /肌酐/g·mmol ⁻¹
空白	-	7.87 ± 0.49	2.19 ± 0.09	1.24 ± 0.03	45.12 ± 2.76	7.26 ± 0.01	42.91 ± 12.09	0.34 ± 0.01
模型	-	35.21 ± 2.56 ²⁾	2.37 ± 0.12 ¹⁾	1.94 ± 0.08 ¹⁾	75.33 ± 3.01 ¹⁾	14.23 ± 1.54 ¹⁾	29.12 ± 9.23 ²⁾	0.46 ± 0.03 ²⁾
益气解毒方	2.5	30.96 ± 1.02	2.34 ± 0.08	1.87 ± 0.11	70.56 ± 1.84	13.36 ± 0.82	30.33 ± 8.25	0.45 ± 0.03
	5	25.78 ± 0.59 ⁴⁾	2.28 ± 0.10	1.65 ± 0.04 ³⁾	59.82 ± 3.16	11.33 ± 1.45 ³⁾	33.46 ± 9.89	0.41 ± 0.01 ³⁾
	10	14.12 ± 0.77 ⁴⁾	2.14 ± 0.12 ⁴⁾	1.41 ± 0.08 ³⁾	55.33 ± 4.16 ³⁾	8.98 ± 3.39 ⁴⁾	34.47 ± 3.44 ³⁾	0.39 ± 0.02 ⁴⁾

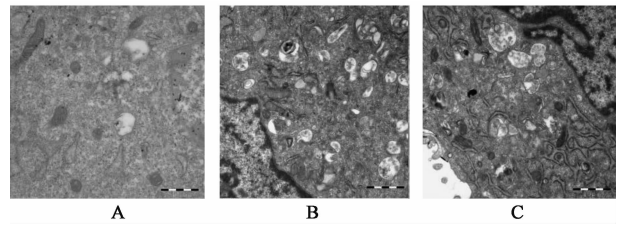
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。



A. 空白组; B. 模型组; C~E. 益气解毒方(2.5, 5, 10 g·kg⁻¹)组(图 3 同)
图 1 益气解毒方对大鼠肾组织病理变化的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of YQJDF on pathological changes in renal tissues (HE, ×400)

给药后, LC3-II, p62, Nix 蛋白水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明益气解毒方能够抑制糖尿病肾病大鼠肾组织中线粒体自噬。见图 3。

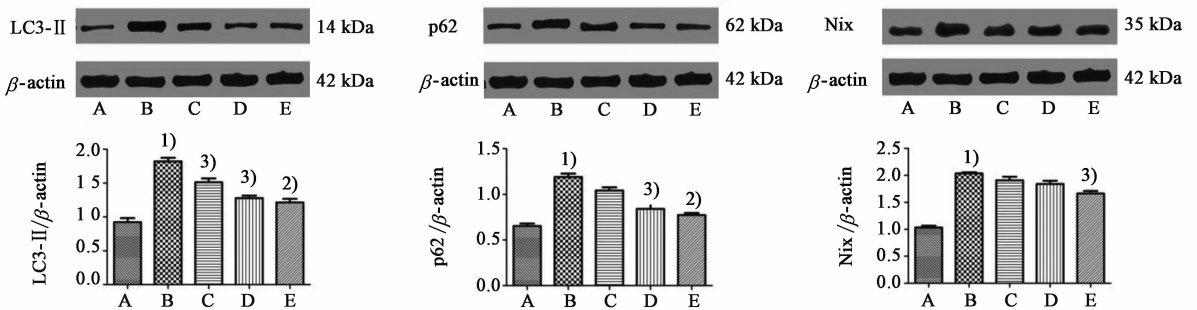


A. 空白组; B. 模型组; C. 益气解毒方组

图 2 益气解毒方对糖尿病肾病大鼠肾小管上皮细胞线粒体自噬形成的影响(透射电镜, ×30 000)

Fig. 2 Effect of YQJDF on autophagy of renal tubular epithelial cell mitochondria in DN rats (TEM, ×30 000)

3.6 益气解毒方对糖尿病大鼠肾组织中 Nix mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组 Nix mRNA 明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 益气解毒方干预后, Nix mRNA 表达降低, 益气解毒方高剂量组 Nix mRNA 降低明显 ($P < 0.05$)。见表 3。



与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$

图 3 益气解毒方对糖尿病肾病大鼠肾组织中线粒体自噬活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of YQJDF on mitochondrial autophagy activity in renal tissues of DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

糖尿病中晚期均会发生肾脏损害, 糖尿病肾病近年来在我国有着较高的发病率^[8]。目前对糖尿病肾病的发病机制仍未完全明确。遗传、糖代谢紊乱、缺氧、内质网应激和氧化应激均被报道是 DN 的主要发病机制^[9]。近年来, 临床研究显示中药及

中药复方可有效地改善患者的临床症状, 减轻患者的 DN 损伤^[10]。益气解毒方在连云港市第二人民医院临床治疗 DN 的过程中具有较好的疗效, 具有益气固表、泻火解毒等功效, 方中主药材黄芪、丹参、牡丹皮等本身对于糖尿病肾病就有较好的治疗效果^[11-14]。本研究发现益气解毒方给药后的大鼠体

表 3 益气解毒方对糖尿病肾病大鼠肾组织 Nix mRNA 水平的影响
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of YQJDF on level of Nix mRNA in renal tissues of DN rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nix
空白	-	1.00 ± 0.09
模型	-	2.02 ± 0.21 ¹⁾
益气解毒方	2.5	1.43 ± 0.05
	5	1.25 ± 0.09
	10	1.17 ± 0.11 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05;与模型组比较²⁾P < 0.05。

重较模型组有所增加, DN 大鼠血糖, 24 h 尿蛋白和血肌酐等血、尿生化指标均得到改善, 说明益气解毒方对 DN 大鼠有治疗作用。

自噬普遍存在于真核细胞中, 是通过溶体的参与使得细胞内的代谢废物以及老化的细胞器得以降解的一个基本的代谢过程。自噬可以保持细胞自身正常的生理功能, 维持细胞自我稳态。但在某些应激情况下, 若细胞需要营养或者能量, 机体自噬水平会迅速上调, 释放能量和生物大分子的合成, 以便维持细胞的生存^[15]。自噬体膜上的标记蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3/Atg8) 对于自噬体形成至关重要。LC3 蛋白分为 LC3-I 和 LC3-II 两种形式。LC3-I 分散于细胞浆内, LC3-II 则保留在自噬体膜上直到与溶酶体融合, 所以 LC3-II 被用来作为自噬体的标记, LC3-II 的水平某种程度可以反映自噬体的数量^[16]。本实验结果表明 DN 组大鼠肾组织中 LC3-II 蛋白水平较空白组明显增加。益气解毒方组 LC3-II 蛋白减少, 说明 DN 组自噬体增加, 而益气解毒方能抑制自噬体的产生。p62 蛋白水平高低可以反映细胞内自噬活性的高低^[17], 自噬增加时候, p62 蛋白的水平降低则自噬活性增强, 而且自噬过程中的 p62 大多能被自噬溶酶体所清除^[18], 因此 p62 蛋白也可以用来判断自噬过程是否通畅。研究发现 DN 大鼠肾脏 p62 蛋白水平较对空白组增加, 表明 DN 大鼠可能出现自噬体降解受阻, 自噬通路障碍等情况。而益气解毒方能抑制 p62 蛋白水平, 增强细胞自噬活性。

线粒体是细胞内的“动力工厂”, 负责给细胞提供能量, 线粒体产能与活性氧(ROS)的产生密切相关, ROS 会导致蛋白质、脂质及 DNA 的损伤, 适时清除损伤和老化的线粒体, 能减少 ROS 的生成, 从而达到细胞保护的目的。有研究表明氧化应激蛋白参与高糖及 Ang II 诱导的线粒体损伤, ROS 增加和

细胞凋亡。DN 模型中线粒体自噬可能存在异常, 导致 ROS 增多, 损伤细胞^[19]。透射电镜观察发现 DN 大鼠肾脏组织中自噬泡增多, 线粒体过多与之结合, 导致线粒体损伤, 益气解毒方能够减少自噬泡数量, 缓解线粒体的损伤。Nix 是红细胞发育中线粒体自噬必需的结合蛋白, 可用来“标记”线粒体使其发生自噬^[20]。在缺氧过程中, 线粒体自噬随着 Nix 的增加而增强^[20]。Nix 在线粒体自噬的调节中起着关键作用。研究发现 DN 大鼠肾小管上皮细胞中 Nix 蛋白及 mRNA 表达增加, 而益气解毒方组 Nix 蛋白及 mRNA 表达下降。

综上所述, 本研究发​​现益气解毒方可有效改善 DN 大鼠症状, 抑制自噬泡的产生, 同时增强自噬活性, 疏通线粒体自噬通路障碍。益气解毒方可能是通过调节 DN 肾小管细胞的线粒体自噬紊乱而发挥治疗糖尿病肾病的作用。

[参考文献]

[1] LI C, LEI T. Rs12976445 Polymorphism is associated with risk of diabetic nephropathy through modulating expression of microRNA-125 and interleukin-6R [J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 3490-3497.

[2] Tsai S F, SU C W, WU M J, et al. Urinary cyclophilin A as a new marker for diabetic nephropathy: a cross-sectional analysis of diabetes mellitus [J]. Medicine, 2015, 94(42): e1802.

[3] YUAN Y L, GUO C R, CUI L L, et al. Timosaponin B-II ameliorates diabetic nephropathy via TXNIP, mTOR, and NF-κB signaling pathways in alloxan-induced mice [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 6247-6258.

[4] YANG M, XU J, YU J, et al. Anti-inflammatory effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in monocytes cultured in serum from patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy with uremia via Toll-like receptor 4 and nuclear factor-κB p65 [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(6): 8215-8222.

[5] ZHOU M, XIA Z Y, LEI S Q, et al. Role of mitophagy regulated by Parkin/DJ-1 in remote ischemic postconditioning-induced mitigation of focal cerebral ischemia-reperfusion [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(24): 4866-4871.

[6] YU X, XU Y, ZHANG S, et al. Quercetin attenuates chronic ethanol-induced hepatic mitochondrial damage through enhanced mitophagy [J]. Nutrients, 2016, 8(1): 27-40.

[7] 杨芳, 李敬林, 依秋霞, 等. 益气解毒活络方对早期糖尿病肾病大鼠的防治作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 165-169.

- [8] 生生. 益气解毒活络方对早期糖尿病肾病大鼠“毒损肾络”病理机制影响的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2014.
- [9] 李敏州, 高彦彬, 马鸣飞, 等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 344-349.
- [10] 赵铁, 张浩军, 殷婷婷, 等. 柴黄益肾颗粒对糖尿病肾病大鼠保护作用的脂质组学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 155-162.
- [11] 刘星星, 孟晓, 刘斌. 黄芪注射液对早期糖尿病肾病患者尿白蛋白及细胞因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 311-315.
- [12] 刘星星, 孟晓, 魏娜. 黄芪对早期糖尿病肾病患者内皮素及降钙素基因相关肽的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 35(8): 2059-2061.
- [13] 李会芳, 程生辉, 赵换. 丹参注射液辅助治疗糖尿病肾病有效性及安全性的系统评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 353-358.
- [14] 张明华, 封亮, 顾俊菲, 等. 牡丹皮对 AGEs 诱导的系膜细胞增殖及基底膜增厚的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 478-482.
- [15] 邵枫. 自噬在糖尿病肾病中的作用及自噬增强剂干预研究[D]. 北京: 解放军医学院, 2013.
- [16] Landajuela A, Hervás J H, Antón Z, et al. Lipid geometry and bilayer curvature modulate LC3/GABARAP-Mediated model autophagosomal elongation[J]. Biophys J, 2016, 110(2): 411-422.
- [17] JU W, LI S, WANG Z, et al. Decorin protects human hepatoma HepG2 cells against oxygen-glucose deprivation via modulating autophagy[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 13347-13352.
- [18] SONG P, LI S, WU H, et al. Parkin promotes proteasomal degradation of p62; implication of selective vulnerability of neuronal cells in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. Protein Cell, 2016, 13(2): 114-129.
- [19] 李一梅, 刘宽芝. 氧化应激、线粒体功能障碍与 2 型糖尿病[J]. 临床荟萃, 2014, 29(2): 213-219.
- [20] Ney P A. Mitochondrial autophagy: origins, significance, and role of BNIP3 and Nix[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1853(10): 2775-2283.

[责任编辑 张丰丰]