

抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾功能及肾组织 ECM 表达的影响

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, 上海 200021)

[摘要] **目的:**探讨抗纤灵方对 5/6 肾切除诱导肾纤维化模型大鼠肾功能及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 表达的影响。**方法:**将 50 只 SD 大鼠随机分为正常组 ($n=7$), 假手术组 ($n=7$), 手术组 ($n=36$)。手术组建立 5/6 肾切除肾纤维化模型, 将造模成功的大鼠随机分为模型组、抗纤灵组、氯沙坦钾组。氯沙坦钾组、抗纤灵方组每日分别给予氯沙坦钾 ($33.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 及抗纤灵方 ($21 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 灌胃治疗, 其余正常组、假手术组、模型组都用等体积的生理盐水干预, 24 周后测定各组肾功能, 24 h 尿量及 24 h 尿蛋白定量, 免疫组化测定肾脏组织 I 型胶原 (Col I), III 型胶原 (Col III) 表达情况, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定肾脏组织 Col I, Col III 蛋白表达水平。**结果:**与正常组和假手术组比较, 模型组血肌酐, 尿素氮, 24 h 尿量, 24 h 尿蛋白定量及肾组织 Col I, Col III 表达水平均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 抗纤灵方组和氯沙坦钾组血肌酐, 尿素氮, 24 h 尿蛋白及肾组织 Col I, Col III 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**抗纤灵方能下调肾脏组织 Col I, Col III 表达, 从而抑制 ECM 的积聚, 发挥延缓肾脏纤维化和保护肾功能的作用。

[关键词] 抗纤灵方; 细胞外基质; 肾纤维化; I 型胶原; III 型胶原

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0063-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190123

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181015.1716.002.html>

[网络出版时间] 2018-10-18 17:28

Effect of Kangxianling Decoction on Renal Function and Kidney ECM Expression in Rats with Renal Fibrosis

Ji Jing^{1,2}, HE Li-qun^{1,2*}

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Kangxianling decoction on renal function and expression of extracellular matrix (ECM) in renal tissue of rats with renal fibrosis induced by 5/6 nephrectomy. **Method:** Totally 50 SD rats were randomly divided into control group ($n=7$), sham-operation group ($n=7$), operation group ($n=36$). The 5/6 nephrectomized renal fibrosis model was established in operation group. After successful modeling, rats were randomly divided into model group, Kangxianling group and losartan potassium group. The losartan potassium group and the Kangxianling group were given losartan potassium ($33.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Kangxianling decoction ($21 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) every day. The control group, sham-operation group and model group were all treated with equal volume of normal saline. Rats were put to death after 24 weeks of consecutive medication, and renal function, 24 h urine volume and 24 h-Pro quantitation of each group were measured. The expressions of

[收稿日期] 20180810(017)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81403358);上海市名老中医学术经验研究工作室项目(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)

[第一作者] 吉晶,在读博士,从事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,主任医师,博士生导师,教授,从事中医药防治慢性肾脏疾病的研究, Tel: 021-53821650, E-mail: heliqun59@163.com

collagen I (Col I) and Col III in renal tissues were determined by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** Compared with the normal group and sham-operation group, serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), 24 h urine volume, 24 h-Pro quantitation, renal tissue Col I and Col III expression levels were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of SCr, BUN, 24 h-Pro quantitation, protein expression levels of renal tissue Col I and Col III were significantly decreased in the Kangxianling group and the losartan potassium group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Kangxianling decoction can down-regulate the expressions of Col I and Col III in kidney tissue, there by inhibiting the accumulation of ECM, and exerting the effect in delaying renal fibrosis and protecting renal function.

[**Key words**] Kangxianling decoction; extracellular matrix (ECM); renal fibrosis; collagen I; collagen III

细胞外基质(ECM)由各种胶原蛋白组成,包括纤维黏连蛋白(FN), I 型胶原(Col I)蛋白, III 型胶原(Col III)蛋白等,若合成增加,降解减少则造成 ECM 过度积聚,平衡被打破,引起蛋白尿、肾小球硬化、肾脏纤维化,破坏了肾小球的正常功能^[1]。Col I 和 Col III 既是 ECM 的主要成分,也能诱导 ECM 生成^[2]。何立群教授课题组经过多年临床和基础实验,精心研制出抗纤灵方,其由桃红四物汤化裁而来,主要功效在于养血活血,选取桃红四物汤中的当归、桃仁 2 味活血化瘀的药物,另加牛膝活血化瘀、强筋骨补肾,大黄清热活血,丹参补肾通络、清热活血。

前期临床试验发现抗纤灵方可通过活血化瘀法改善 CKD 3-4 期患者肌肤甲错、纳呆、乏力、腰酸等,降低患者血肌酐(SCr),尿素氮(BUN),血脂,24 h 尿蛋白(24 h-Pro)^[3];抑制血管活性因子血管紧张素 II (Ang II),减少胶原蛋白在体内的沉积,延缓慢性肾衰的进展^[4-5]。基础实验体内动物部分发现抗纤灵方可以下调转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), Smad2, Smad3 蛋白与 mRNA 的表达,上调 Smad7 蛋白与 mRNA 表达,减少纤维化面积,降低肾脏损伤评分,减缓肾纤维化^[6-8];体外细胞部分发现抗纤灵方能抑制肾间质成纤维细胞(FBS)中 TGF- β_1 的表达,减少 Col I 的沉积,从而拮抗肾纤维化^[9]。

本研究由 5/6 肾切除术诱导肾纤维化模型,西药选用 Ang II 受体拮抗剂氯沙坦钾,其可扩张出球小动脉,改善血流动力学,降低肾小球内高压和毛细血管压力,减少蛋白尿,增加有效肾血流量,减缓 ECM 增殖,抑制胶原蛋白积聚,达到延缓肾衰的目的^[4,10-13];中药选用抗纤灵方,观察抗纤灵方和氯沙坦钾对肾功能,24 h-Pro 定量及肾组织 ECM(如 Col I, Col III)表达的影响,从抑制胶原蛋白合成的角度探讨该方在抗纤维化方面的病理机制,以便为其治

疗肾纤维化提供足够的证据支持。

1 材料

1.1 动物 50 只雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 (200 ± 20) g, 由上海必凯有限公司提供, 合格证号 SCXK(沪)2013-0016, 伦理委员会登记编号 SZY2017020041。饲养于上海中医药大学实验动物中心, 每天从早 7:00-19:00 给予 12 h 人工光照, 自由进食, 饮用纯净水, 适应性喂养 1 周后进行实验。

1.2 药物与试剂 抗纤灵方由丹参 15 g, 制大黄 9 g, 桃仁 12 g, 当归 12 g 和怀牛膝 15 g 组成。购自曙光医院东院中药房, 经上海中医药大学附属曙光医院陈刚主任医师和沈沛成主任医师分别进行盲法鉴定, 所有药材均为正品, 符合 2015 年版《中国药典》规范。先将药材用 3 倍药材量的蒸馏水浸泡 2 h, 煎药 30 min 后过滤收集药液; 继续加没过中药材的水煎 30 min, 收集第 2 次药液。将 2 次汤药混合并浓缩至 2.1 g·L⁻¹ 的药液。氯沙坦钾片(杭州默沙东药业有限公司, 批号 J20130048); Col I, Col III 抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab34710, ab7778); 戊巴比妥钠(上海医药集团股份有限公司); 预染蛋白 Marker(美国 Thermo 公司, 批号 26616); RIPA 裂解液, 兔抗二抗, 鼠抗二抗, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体, 蛋白酶抑制剂, 磷酸酶抑制剂, PMSF, BCA 蛋白浓度测定试剂盒, SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒, 通用型强力抗原修复液, 苏木素染色液, ECL 超敏发光试剂盒, 5% BSA 封闭液, DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒-棕黄色(上海威奥生物公司, 批号分别为 WB0101, WB0177, WB0176, WB0197, WB2118, WB0117, WB0114, WB0125, WB0130, WB1036, WH2013, WB0164, WB2051, WB0167)。

1.3 仪器 Synergy2 型多功能酶标仪(美国 Bio-

Tek 公司), DW-25L262 型医用低温保存箱(青岛海尔公司), Thermo 905 系列超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), FluorChem M 型自动成像分析系统(美国 Protein Simple 公司), 041BR155637 型 mini-protein tetra cell 垂直电泳槽及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司), 5417R 型离心机(德国 Eppendorf 公司), Hitachi7080 型全自动生化仪(日本 Tokyo 公司), Axio Lab A1 型正置显微镜(德国 Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 造模及分组方法 5/6 肾切除法建立肾纤维化模型^[14], 第 1 次手术腹腔注射 4% 戊巴比妥钠 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉, 剃毛刀剔除左侧背部的毛, 75% 乙醇消毒, 距脊柱左侧 1.5 cm, 左肋缘下方 2 cm, 从脊柱的平行方向切开皮肤, 分离皮下组织, 暴露左肾, 分离肾包膜, 上、下极分别切除 1/3, 明胶海绵按压止血, 将残余的肾脏纳入腹中, 依次缝合筋膜、肌肉和皮肤。1 周后进行第 2 次手术, 同样方法暴露右侧肾脏, 分离肾包膜, 结扎血管, 摘除整个右侧肾脏。正常组不做任何处理, 假手术组分 2 次分别拨开两侧肾包膜, 并不切除肾脏。2 周后, 对大鼠进行内眦静脉取血, 测量正常组、假手术组、手术组的大鼠 SCr, SCr 明显高于正常组和假手术组为模型成功的标志, 然后根据肌酐值把造模成功的老鼠分为 3 组(包括模型组、抗纤灵方组、氯沙坦钾组, 每组各 12 只), 使实验组间血清肌酐无显著差异。

2.2 药物干预方法及标本采集 正常组、假手术组、模型组自由进食, 每日给予生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。按大鼠与人体(60 kg)质量比 20:1 换算, 抗纤灵方组以 100 g 大鼠对应给予药液 2.1 g, 氯沙坦钾组以 100 g 大鼠对应给予 3.33 g, 每天给药 1 次, 持续灌胃 24 周后处死。期间观察大鼠一般状态及大鼠存活率, 处死前 1 d, 代谢笼留取 24 h 尿液, 同时腹主动脉取血。切除左侧残余肾, 冻存于液氮罐以备检测。

2.3 肾功能 SCr, BUN, 24 h-Pro 检测 于 4 °C, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 全自动生化分析仪分别测定各组大鼠 SCr, BUN, 24 h-Pro 并记录。

2.4 免疫组化法检测 Col I, Col III 蛋白表达 肾组织石蜡切片脱蜡、水化, 使用二步法, 3% H_2O_2 浸泡 10 min 灭活, 流水冲洗 10 min, 热抗原修复 2 次。在室温下冷却后, 倒去修复液, 并用 PBS 洗涤 2 次, 每次 15 min。室温下加 5% BSA 封闭液, 封闭 30 min, 不洗涤, 除去多余液体。滴加适量的抗 Col I 抗体

(1:200), 抗 Col III 抗体(1:800), 4 °C 孵育过夜。第 2 天 PBS 清洗 4 次, 每次 15 min。二抗 37 °C 孵育 30 min, 显色, 用流水冲洗 10 min, 并用苏木素浸染 2 min。流水再次冲洗, 经无水乙醇、二甲苯各 3 min 分别脱水, 塑胶封片。每只大鼠肾脏组织选取 5 张切片, 400 倍显微镜下每张切片随机选取 5 个除肾小球及血管的不重叠视野, 棕黄色为阳性区域, 结果用 Image Pro Plus 6.0 软件进行半定量分析, 计算各组的积分吸光度 IA 平均值。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Col I, Col III 蛋白表达 残肾组织 50 mg 置碎冰上按照一定比例, 加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂, 磷酸酶抑制剂, PMSF, 超声破碎组织匀浆, $14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取上清液, 提取总蛋白, BCA 蛋白定量测定蛋白浓度后, 蛋白变性, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s, -80 °C 保存。蛋白 40 μg 经 10% SDS 凝胶电泳分离, 转移至甲醇浸泡过的 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 后分别加入兔抗 Col I 抗体(1:5000), 兔抗 Col III 抗体(1:5000), 4 °C 摇床孵育过夜。第 2 天用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗(1:5000), 室温摇床上孵育 1 h, 再重复洗膜, 并通过化学发光剂显影曝光。Image J 测定目的条带与内参 GAPDH 灰度值比值, 反应目的蛋白表达水平。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 23.0 进行统计分析, 各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 形式来表示, 组与组之间采用单因素方差分析。任意两组之间若满足正态分布且方差齐, 采用独立样本的 *t* 检验; 若方差不齐, 需校正方差分析; 若不符合正态分布, 则用非参数检验 Kruskal-Wallis *H* 方法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察 正常组和假手术组精神良好, 毛色光泽, 喜动, 进食未见减少, 无腹泻, 体质量随时间而增加; 造模后, 随着时间的推移, 模型组、抗纤灵方组、氯沙坦钾组分别有 4 只, 2 只, 3 只死亡, 模型组和各治疗组大鼠精神均有不同程度的萎靡, 不爱运动, 厌食, 毛色无光泽, 腹泻, 体质量随时间延长而减轻; 模型组症状更严重, 抗纤灵方和氯沙坦钾组症状较模型组减轻。

3.2 大鼠存活率 经 5/6 肾切除, 大鼠逐渐死亡。至第 24 周时, 模型组死亡率达到 33.3%, 存活率 66.7%; 而抗纤灵组死亡率 16.7%, 存活率 83.3%。可见抗纤灵方可降低肾纤维化大鼠的死亡率, 并提高肾纤维化大鼠的存活率。见表 1。

表 1 抗纤灵方对肾纤维化大鼠存活率的影响

Table 1 Effect of Kangxianling decoction on survival rate of rats with renal fibrosis

组别	死亡数	存活数	合计	死亡率/%	存活率/%
正常	0	7	7	0	100
假手术	0	7	7	0	100
模型	4	8	12	33.3	66.7
抗纤灵方	2	10	12	16.7	83.3
氯沙坦钾	3	9	12	25	75

3.3 对肾纤维化大鼠 SCr, BUN, 24 h-Pro 影响 与

表 2 抗纤灵方对肾纤维化大鼠 SCr, BUN, 24 h-Pro 影响 ($\bar{x} \pm s$)

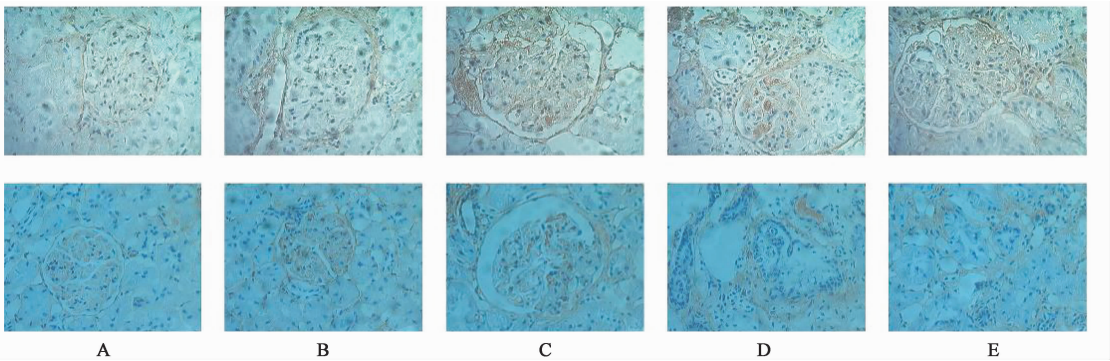
Table 2 Effect of Kangxianling decoction on SCr, BUN, 24 h-Pro in rats with renal fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	SCr /μmol·L ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	24 h 尿量 /mL	24 h-Pro /mg·L ⁻¹
正常	7	-	19.14 ± 1.64	4.24 ± 0.48	5.39 ± 1.45	11.26 ± 0.63
假手术	7	-	19.86 ± 1.73	4.91 ± 0.56	6.11 ± 2.33	13.10 ± 0.63
模型	8	-	78.75 ± 5.29 ²⁾	40.61 ± 3.55 ²⁾	14.17 ± 5.42 ²⁾	30.50 ± 2.28 ²⁾
抗纤灵	10	21	68.20 ± 2.90 ⁴⁾	31.54 ± 2.81 ⁴⁾	9.22 ± 2.67 ³⁾	20.54 ± 1.62 ⁴⁾
氯沙坦钾	9	33.3	55.44 ± 2.45 ^{4,6)}	27.23 ± 2.25 ^{4,6)}	9.69 ± 2.07 ³⁾	20.70 ± 1.12 ⁴⁾

注:与正常组和假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与抗纤灵组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

正常组和假手术组对比,模型组大鼠血肌酐, SCr, BUN, 24 h-Pro 均显著提高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,抗纤灵组、氯沙坦钾组干预后各项指标均下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.4 对肾纤维化大鼠肾脏组织 Col I, Col III 蛋白表达的影响 与正常组和假手术组比较,模型组有大量 Col I 和 Col III 沉积,棕黄色阳性染色面积显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,治疗组 Col I 和 Col III 表达显著减少,棕黄色阳性染色面积显著减小 ($P < 0.01$)。见图 1 和表 3。



A. 正常组; B. 假手术组; C. 模型组; D. 抗纤灵方组; E. 氯沙坦钾组 (图 2 同)

图 1 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾脏组织 Col I, Col III 阳性表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 1 Effect of Kangxianling decoction on immunohistochemical expression of Col I and Col III in renal tissues of rats with renal fibrosis (IHC, ×400)

3.5 对肾纤维化大鼠肾组织 Col I, Col III 蛋白表达影响 与正常组和假手术组比较,模型组 Col I, Col III 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比较,抗纤灵组和氯沙坦钾组 TGF-β₁, Smad2/3 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2 和表 4。

4 讨论

抗纤灵方在中医学中属于“关格”“水肿”“癃闭”“虚劳”等范畴,脾虚、湿浊、血瘀是肾纤维化的病理因素。方中丹参、怀牛膝、当归、桃仁活血化瘀

扶正,调经络,补气血;同时牛膝补益脾肾;大黄活血化瘀,通脏腑,清热降浊,导滞,因此全方主要从活血化瘀,补益脾肾,扶正祛邪降浊治疗肾纤维化^[9,10,15-17]。

5/6 肾切除是经典的肾纤维化模型之一^[18-21]。实验结果显示,与正常组和假手术组比较,模型组大鼠 SCr, BUN, 24 h 尿量, 24 h-Pro 显著升高,免疫组化和 Western blot 显示 Col I, Col III 的表达也明显上升,这些均提示 5/6 肾切除肾纤维化造模成功;在每

表 3 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾组织 Col I, Col III IA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Kangxianling decoction on IA of Col I and Col III in renal tissues of rats with renal fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	Col I (×10 ³)	Col III (×10 ³)
正常	7	-	1.97 ± 0.15	1.77 ± 0.13
假手术	7	-	2.52 ± 0.31	2.00 ± 0.19
模型	8	-	6.34 ± 0.55 ²⁾	3.46 ± 0.32 ²⁾
抗纤灵方	10	21	3.25 ± 0.28 ⁴⁾	2.44 ± 0.29 ⁴⁾
氯沙坦钾	9	33.3	4.51 ± 0.37 ^{4,6)}	2.54 ± 0.32 ⁴⁾

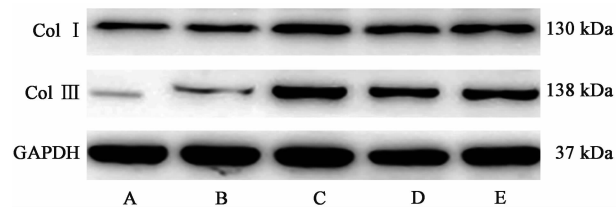


图 2 大鼠肾组织 Col I, Col III 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expressions of Col I, Col III detected in renal tissues

表 4 抗纤灵方对肾纤维化大鼠肾脏组织 Col I, Col III 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Kangxianling decoction on protein expressions of Col I and Col III in renal tissues of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	Col I /GAPDH	Col III /GAPDH
正常	7	-	0.35 ± 0.01	0.05 ± 0.01
假手术	7	-	0.38 ± 0.02	0.15 ± 0.01
模型	8	-	0.63 ± 0.03 ²⁾	0.61 ± 0.03 ²⁾
抗纤灵方	10	21	0.49 ± 0.02 ³⁾	0.44 ± 0.01 ⁴⁾
氯沙坦钾	9	33.3	0.52 ± 0.01 ³⁾	0.50 ± 0.03 ³⁾

日 21 g·kg⁻¹ 的抗纤灵方及 33.3 g·kg⁻¹ 的氯沙坦钾治疗作用下,大鼠存活率升高,死亡率降低,蛋白尿减少,肾间质损伤减轻,肾间质 Col I, Col III 等细胞外基质沉积减轻,从而改善肾功能,减轻肾纤维化。

肾纤维化是一个不可逆的动态过程,涉及细胞凋亡、炎症反应等诸多环节,最终导致终末期肾功能衰竭^[22-24]。治疗上,西医除了对症治疗,严格控制血压血糖,血钙血脂,保护肾功能,还可应用抗氧化吡非尼酮、抗炎治疗、肝细胞生长因子等。中医从瘀血、湿热、浊毒、气血两虚着手研究抗纤维化,中药具有提高机体免疫力、毒副作用小、多靶点多方位抗炎抗纤维化等优点^[25-28]。目前看来,中西医结合疗法

是取得最佳疗效的理论基础^[13]。肾单位一旦丢失,肌成纤维细胞的增殖,产生大量胶原蛋白等 ECM,引起 ECM 过度积聚,发展成为肾小球硬化、肾间质纤维化^[29-30]。ECM 蛋白是构成肾脏组织的结构框架,包括 FN, LN, I 型胶原, III 型胶原, IV 型胶原等,其合成代谢与细胞生长有关,积聚与细胞接触密切相关。肾间质过度产生 I 型胶原和 III 型胶原是导致肾纤维化的重要因素。

综上所述,抗纤灵方可下调肾组织 Col I, Col III 的表达,抑制 ECM 积聚,发挥延缓肾脏纤维化和保护肾功能的作用。

[参考文献]

[1] 李霄,徐静,王斌,等.中药调节细胞外基质治疗肾小球疾病的研究进展[J].中医药信息,2018,35(3):123-127.

[2] 麻志恒,钟利平,余柯娜,等.抗纤灵对 5/6 肾切除诱导的慢性肾纤维化小鼠模型不同时期 Col I、 α -SMA、FN 的影响[J].中成药,2017,39(1):181-184.

[3] 张长明,周家俊,何立群,等.抗纤灵方治疗慢性肾脏病 3 期患者 110 例临床研究[J].中医杂志,2013,54(3):214-217.

[4] 张长明,周家俊,何立群,等.从血管活性因子角度研究抗纤灵方改善肾功能抑制肾纤维化的作用机制[J].中华中医药杂志,2014,29(2):405-407.

[5] 张长明,周家俊,何立群,等.抗纤灵方对 CKD 3-4 期患者疗效及机制的临床多中心随机对照研究[J].辽宁中医杂志,2013,40(1):122-124.

[6] 吉晶,何立群.抗纤灵方对肾纤维化大鼠 TGF- β ₁/Smad 信号通路表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):69-75.

[7] 王颖,麻志恒,钟利平,等.抗纤灵方对 5/6 肾切除小鼠 p38MAPK/NF- κ Bp65 介导的炎症因子的影响[J].中国中西医结合杂志,2017,37(3):365-370.

[8] 钟利平,麻志恒,余柯娜,等.抗纤灵方对 5/6 肾切除小鼠肾衰模型肾纤维化作用及机制研究[J].时珍国医国药,2015,26(7):1547-1549.

[9] 王东,张江,陈刚,等.抗纤灵药物血清对骨髓来源的成纤维细胞转化生长因子- β 和 I 型胶原的抑制作用[J].中国中医药信息杂志,2012,19(10):29-32.

[10] 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[J].中华中医药杂志,2017,32(2):739-742.

[11] 叶彬,崔寒玥,王惠,等.慢性肾衰模型大鼠脑组织线粒体呼吸功能变化及氯沙坦的干预作用[J].药学与临床研究,2016,24(3):205-208.

[12] HE P, LI D, ZHANG B. Losartan attenuates renal

- interstitial fibrosis and tubular cell apoptosis in a rat model of obstructive nephropathy [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(2):638-644.
- [13] 孙亭如,姚源璋. 肾纤维化中西医治疗进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(12):1126-1128.
- [14] Ma S K, Joo S Y, Kim C S, et al. Increased phosphorylation of PI3K/Akt/mTOR in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral obstruction [J]. *Chonnam Med J*, 2013, 11(3):108-112.
- [15] 董飞侠,张新志,吴锋,等. 抗纤灵对单侧输尿管梗阻大鼠肾脏纤维化基因与蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(7):1380-1382.
- [16] 陈建,应汝炯,盛昭园,等. 抗纤灵方对肾纤维化小鼠肾组织 CD68、CD45、VCAM-1 表达的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(9):781-785.
- [17] 王瑞鑫,陈刚,何立群. 抗纤灵方抑制肾络病慢性肾衰竭大鼠 TGF- β /PI3K/Akt 信号旁路的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(6):480-483.
- [18] 陈丽,周忠志,何泽云,等. 六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠致慢性肾衰竭模型的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(12):2869-2871.
- [19] 李建军,陈香美,顾玥,等. 复方肾华片对 5/6 肾切除大鼠的疗效观察[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5):377-381.
- [20] Souza M K, Neves R V P, Rosa T S, et al. Resistance training attenuates inflammation and the progression of renal fibrosis in chronic renal disease [J]. *Life Sci*, 2018, 206:93-97.
- [21] Miyata K N, Nast C C, Dai T, et al. Renal matrix Gla protein expression increases progressively with CKD and predicts renal outcome [J]. *Exp Mol Pathol*, 2018, 105(1):120-129.
- [22] LIU Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(12):684-696.
- [23] Ito Y, Aten J, Bende R J, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis [J]. *Kidney Int*, 1998, 53(4):853-861.
- [24] 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.
- [25] 钟利平,麻志恒,余柯娜,等. 抗纤灵方通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路干预肾纤维化机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(18):126-129.
- [26] 黄东华,何红涛,檀银川. 肾络通汤对慢性肾小球肾炎患者 TGF- β_1 , MMP-9 和 TIMP-1 因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15):196-201.
- [27] 钟利平,麻志恒,余柯娜,等. 抗纤灵方对 5/6 肾切除小鼠肾组织纤维化作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2):118-121.
- [28] 毛志敏,万毅刚,孙伟,等. 黄葵胶囊抑制糖尿病肾病肾组织氧化应激和 p38 MAPK 信号通路活性改善肾纤维化的作用和机制[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21):4110-4117.
- [29] Duffield J S. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(6):2299-2306.
- [30] 谭稳青,王维,郑璇,等. 氟非尼酮对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的疗效观察[J]. 中南大学学报:医学版, 2018, 43(5):511-519.

[责任编辑 周冰冰]