

糖肾康中药复方含药血清对高糖环境下 RMCs 的增殖及 TGF- β_1 /Smad2/3 信号通路的影响

娄凯¹ 何永² 魏静³ 韩文霞¹ 刘丹丹⁴ 宋玉文⁵
姜秀云¹ 于春晓¹ 高聆⁶ 管庆波¹

摘要 **目的** 研究糖肾康中药复方含药血清对高糖环境下大鼠肾系膜细胞(RMCs)增殖及 TGF- β_1 /Smad2/3 信号通路的影响。**方法** 12 只 SD 大鼠采用随机数字法分为小剂量中药组、中剂量中药组、大剂量中药组、空白组,每组 3 只,灌胃 7 天后门静脉取血。分别用含中药血清和普通大鼠血清培养 RMCs。采用 4-甲偶氮唑蓝(MTT)法测定系膜细胞的增殖率,以确定最佳中药血清浓度;实时定量 PCR 及酶联免疫吸附剂(ELISA)法测定 TGF- β_1 mRNA 及蛋白的表达,蛋白免疫印迹(Western blot)及免疫荧光方法测定 Smad2/3 蛋白表达及磷酸化水平。**结果** 不同剂量的糖肾康中药含药血清均能抑制大鼠肾小球系膜细胞的增殖;中药血清可显著抑制高糖诱导的 TGF- β_1 表达及 Smad2/3 磷酸化。**结论** 糖肾康中药含药血清能抑制高糖刺激下的 RMCs 增殖,其作用机制可能与抑制 TGF- β_1 /Smad2/3 通路有关。

关键词 糖肾康中药复方;含药血清;TGF- β_1 /Smad2/3 通路;增殖;糖尿病肾病

Effect of Tangshenkang Granule Containing Serum on Renal Mesangial Cells' Proliferation and TGF- β_1 /Smad2/3 Pathway in the High Glucose Condition LOU Kai¹, HE Yong², WEI Jing³, HAN Wen-xia¹, LIU Dan-dan⁴, SONG Yu-wen⁵, JIANG Xiu-yun¹, YU Chun-xiao¹, GAO Ling⁶, and GUAN Qing-bo¹ 1 Department of Endocrinology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Shandong Clinical Medicine Center of Endocrinology, Institute of Endocrinology, Shandong Clinical Medicine Academy, Jinan (250021), China; 2 School of Information Management, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250355), China; 3 Department of Endocrinology, Jinan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250012), China; 4 Shandong Chest Hospital, Jinan (250013), China; 5 Department of Anesthesia, West Ward of Shandong Provincial Hospital, Jinan (250022), China; 6 Central Laboratory of Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan (250021), China

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Tangshenkang Granule (TG) containing serum on renal mesangial cells' (RMCs) proliferation and TGF- β_1 /Smad2/3 pathway in the high glucose condition. **Methods** Twelve SD rats were randomly divided into four groups, i.e., the low dose TG group, the middle dose TG group, the high dose TG group, and the blank control group, 3 in each group. After 7-day gastrogavage via portal vein blood, rats were sacrificed and their serum samples were collected. RMCs were cultured in common rat serum and TG containing serum respectively. The proliferation of mesangial cells was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay to determine the optimal TG containing serum concentration. Expression levels of TGF- β_1 mRNA and protein were determined by real time quantitative PCR and ELISA. Smad2/3 protein expression and phosphorylation were determined by Western blot

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30701130);国家自然科学基金资助项目(No. 81273880);国家自然科学基金资助项目(No. 30971408;81170764);山东省自然科学基金面上项目(No. ZR2009CM101);国家中医药管理局中医临床研究基地业务建设科研专项资助项目(No. JDZX2012007);山东省自然科学基金资助项目(No. Y2008C113);山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2009CM101)

作者单位:1. 山东大学附属省立医院内分泌科,山东省内分泌代谢病临床医学中心,山东省临床医学研究院内分泌与代谢研究所(济南 250021);2. 山东中医药大学信息管理学院(济南 250355);3. 山东省济南市中医院内分泌科(济南 250012);4. 山东省胸科医院(济南 250013);5. 山东省立医院西院麻醉科(济南 250022);6. 山东大学附属省立医院中心实验室(济南 250021)

通讯作者:韩文霞, Tel:15168889956, E-mail:hanwx97@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 01. 0088

and immunofluorescence. Results TG containing serum at different doses could inhibit high glucose induced RMC cells' proliferation, TGF- β_1 over-expression and Smad2/3 phosphorylation. Conclusion TG containing serum could inhibit high glucose induced RMC cells' proliferation, and its mechanism might be possibly associated with inhibiting TGF- β_1 /Smad2/3 signaling pathway.

KEYWORDS Tangshenkang Granule; drug containing serum; TGF- β_1 /Smad2/3 pathway; proliferation; diabetic nephropathy

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最重要的并发症之一,近年来其发病率逐年上升,该病往往进行性发展至肾功能衰竭,但其发病机制尚未完全阐明。据有关文献报道,截止到 2010 年我国糖尿病患者约 1.71 亿^[1]。近年来,随着对 DN 发病机制研究的逐渐深入,转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad 信号通路逐渐被受到关注。Noh HJ 等^[2]研究证实,高糖可诱导系膜细胞 TGF- β_1 mRNA 及 TGF- β_1 蛋白过度表达,是导致 DN 的重要共同中介物质。TGF- β_1 能刺激 Smad2 和 Smad3 的磷酸化并使之激活,在细胞核中调节靶基因的转录^[3]。本实验旨在观察糖肾康中药血清对高糖环境下大鼠肾系膜细胞(RMCs)增殖及 TGF- β_1 /Smads2/3 信号转导通路的影响,以探讨糖肾康中药复方延缓 DN 肾间质纤维化的分子作用机制。

材料与方法

1 动物及分级 SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只,6 周龄,体重(200±10)g,购于山东中医药大学实验动物中心,动物许可证号:SKXK(鲁)20110003。

2 细胞 大鼠 RMCs 购自于中国典型培养物保藏中心。

3 药物和试剂 糖肾康中药复方颗粒:购自山东省中医院;该中药复方主要由生黄芪 18 g 枸杞子 6 g 山茱萸 9 g 牡丹皮 12 g 泽泻 6 g 茯苓 9 g 红花 6 g 桃仁 6 g 生地 12 g 熟大黄 6 g 山药 30 g 肉桂 3 g 猪苓 6 g 马齿苋 9 g 路路通 6 g 等组成,中药颗粒冲剂 6 g,每包 3 g,密闭包装,1 g 颗粒剂相当于生药 2.4 g,避光干燥恒温保存备用。DMEM 培养基、胎牛血清(FBS),美国 GIBCO 公司;MTT、DMSO,美国 Sigma 公司;TGF- β_1 ELISA 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;Smad2/3 及 P-Smad2/3,美国 ImmunoWay 公司;PCR 试剂盒、引物,上海生工生物工程有限公司。

4 仪器 CO₂ 培养箱购自日本 SANYO;HERA cell 240, Thermo ELECTROW CORPORATION,超净工作台购自 AIR TECH 苏静集团安泰公司;酶标仪

购自 Spectra Max M₂。

5 方法

5.1 含药血清制备 采用随机数字表法将实验动物随机分为 4 组,每组 3 只,大鼠给药量按人和动物体表面积折算:大鼠等效给药量(g/kg)=6.25×人给药量(g/kg),即健脾益阴活血中药复方颗粒低剂量组(0.4 g/kg,0.5 倍等效剂量)、中剂量组(0.8 g/kg,等效剂量)、高剂量组(1.6 g/kg,2 倍等效剂量),将中药复方颗粒分别溶于 2 mL 蒸馏水中,正常对照组用生理盐水 2 mL,每天 1 次,连续灌胃 7 天。末次灌胃 1 h 后门静脉取血,将采集的血液在室温中静置 4 h,3×10³ r/min,离心 15 min,收集血清,56℃水浴 30 min 进行灭活,然后过滤除菌,分装。

5.2 RMCs 培养 大鼠 RMCs 复苏后移入培养皿中静置培养。培养基为体积分数为 10% FBS、青链霉素和 DMEM;培养环境为体积分数为 5% CO₂、37℃饱和湿度的孵箱。

5.3 不同浓度中药血清对 RMCs 毒性及增殖抑制

5.3.1 毒性 RMCs 培养融合至 80% 左右时用 0.25% 胰蛋白酶,消化后再用培养液稀释为单个细胞悬液接种于 96 孔培养板(6×10³/mL)。细胞贴壁后,用无血清低糖 DMEM 培养液同步化细胞 24 h 后,将细胞分组:对照组、低剂量、中剂量、高剂量中药血清组及甘露醇组,每组设 5 个复孔。将培养板移入孵箱中培养,48 h 后加入 MTT(0.5 mg/mL) 20 μL/孔,继续孵育 4 h,终止培养。吸去上清液,加入 150 μL DMSO 溶解液振荡 10 min,待结晶物充分溶解后,酶标仪上检测各孔吸光值(A₄₉₀),并计算细胞存活率(%)=各组 OD 值/对照组 OD 值×100%。

5.3.2 增殖抑制作用 将 RMCs 接种至 96 孔培养板,密度约为 4×10³ 个/孔,过夜贴壁后,吸掉旧的培养基,换不含 FBS 的 DMEM 低糖培养基继续培养 24 h,将细胞分组:对照组、高糖(HG)组、HG 加低剂量中药血清组、HG 加中剂量中药血清组、HG 加高剂量中药血清组、甘露醇组。以下步骤同毒性实验。以确定中药血清的最佳浓度,并将这一浓度用于后续实验中。

5.4 分组 实验分为对照组(5.6 mmol/L 葡萄糖组)、HG 组(30 mmol/L 葡萄糖组)、中药血清组[30 mmol/L 葡萄糖加中药血清(上述实验中的最佳浓度血清)]、甘露醇组(5.6 mmol/L 葡萄糖加 24.4 mmol/L 甘露醇)。

5.5 TGF-β₁、VEGF、PDGF、CTGF、IL-6、MCP-1 表达 采用实时定量 PCR 检测。收集各组细胞,用 Trizol 提取各组细胞总 RNA,并经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。参照逆转录操作试剂盒说明书合成 10 μL cDNA RCR 扩增各基因片段。以大鼠 GAPDH 作为内参照。目的基因的相对 mRNA 表达水平用以下公式计算:相对 mRNA 表达 = 2^{-ΔΔCt}, ΔΔCt 值 = 靶基因 Ct 值 - GAPDH Ct 值。TGF-β₁、VEGF、PDGF、CTGF、IL-6、MCP-1 引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

基因	引物序列	引物长度 (bp)
TGF-β ₁	F-5'-GGCGGTGCTCGCTTTGTA-3'	135
	R-5'-ATTGCGTTGTTGCGGTCC-3'	
VEGF	F-5'-AGGAGTACCCCGATGAGATAGAGT-3'	142
	R-5'-TCCGCATGATCTGCATAGTGA-3'	
PDGF	F-5'-GCGTAGAACAAATCGGGATAAAA-3'	139
	R-5'-CTTGTCCTGCTCTGGTGAAACT-3'	
CTGF	F-5'-GGTAAAGCAATGGATCAGAAAGTCA-3'	151
	R-5'-AGTCATAGTCAAAGAAGCAGCAAAC-3'	
IL-6	F-5'-TTCCAGCCAGTTGCCTTCTT-3'	155
	R-5'-GGTCTGTTGTGGGTGGTATCCT-3'	
MCP-1	F-5'-ATGGGTCCAGAAAGTACATTAGAAAAC-3'	147
	R-5'-GTGCTGAAGTCCTTAGGGTTGAT-3'	
GAPDH	F-5'-ACCACAGTCCATGCCATC-3'	142
	R-5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	

5.6 细胞 TGF-β₁ 表达水平 采用 ELISA 测定。严格按照 ELISA 检测试剂盒说明书进行操作,检测 450 nm 处吸光度值。

5.7 Smad2/3 及 p-Smad2/3 蛋白表达 采用免疫印迹法(Western blot)检测。将 RMCs 第 6 代接种于培养皿中,用完全培养基培养。待细胞融合至 80% 左右时,更换为无血清低糖型 DMEM 培养液同步化 24 h,按 5.4 分组分别进行处理,继续培养 48 h。48 h 后收集细胞,提取总蛋白;BCA 试剂盒测定蛋白浓度;与 5 × SDS 上样缓冲液 100 ℃ 煮沸 5 min,以每孔 70 μg 加入体积分数为 0.10 的 SDS-PAGE 凝胶中,电泳,转膜 3 h,在质量浓度为 0.05 的脱脂奶粉 37 ℃ 封闭 1 h,鼠抗 Smad2/3 多克隆抗体 4 ℃ 孵育过夜,

TBST 洗 3 次,羊抗鼠 37 ℃ 孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,暗室中 ECL 发光,图像扫描并分析结果。

5.8 p-Smad2/3 蛋白表达 采用免疫荧光法检测。RMCs 融合至 80% 时,传代接种于 6 孔板中并植入爬片,按 5.4 细胞分组,严格按照免疫荧光步骤操作。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组样本间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 中药血清对 RMCs 的毒性及增值抑制作用

1.1 毒性作用(表 2) 与对照组比较,不同浓度中药血清组细胞存活率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组血清 RMCs 的毒性效应值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值	细胞存活率(%)
对照	5	0.613 3 ± 0.057 8	100.00
低剂量中药血清	5	0.597 4 ± 0.056 7 *	97.41
中剂量中药血清	5	0.627 9 ± 0.052 1 *	102.38
高剂量中药血清	5	0.620 4 ± 0.116 0 *	101.16
甘露醇	5	0.601 3 ± 0.063 1	98.04

注:与对照组比较,* $P > 0.05$

1.2 各组血清对 RMC 增殖抑制率比较(表 3)

与对照组比较,HG 组差异有统计学意义($P < 0.05$),与 HG 组比较,HG 加各剂量中药血清组细胞增殖均明显下降($P < 0.05$);HG 加中、高剂量中药血清组细胞增殖明显被抑制($P < 0.05$),但 HG 加中剂量中药血清组与 HG 加高剂量中药血清组比较,细胞增殖差异无统计学意义($P > 0.05$)。后续实验均采用中剂量中药血清作为处理因素。

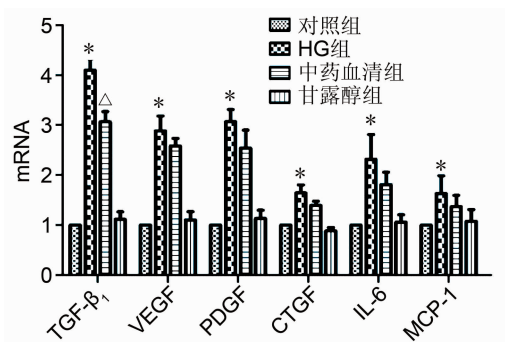
表 3 各组血清对 RMCs 增殖抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值	增殖率(%)
对照	5	0.587 4 ± 0.064 2	100.00
HG	5	0.823 8 ± 0.066 3 *	140.25
HG 加低剂量中药血清	5	0.711 5 ± 0.048 3 ^Δ	121.12
HG 加中剂量中药血清	5	0.682 2 ± 0.062 3 ^Δ	116.14
HG 加高剂量中药血清	5	0.677 2 ± 0.044 1 ^Δ	115.29
甘露醇	5	0.563 8 ± 0.058 2 ^Δ	96.98

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 HG 组比较,^Δ $P < 0.05$

2 4 组 TGF-β₁、VEGF、PDGF、CTGF、IL-6、MCP-1 mRNA 表达比较(图 1) 与对照组比较,HG 组 TGF-β₁、VEGF、PDGF、CTGF、IL-6、MCP-1 mRNA 表达均有增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 HG 组比较,中药血清组 TGF-β₁、VEGF、PDGF、CT-

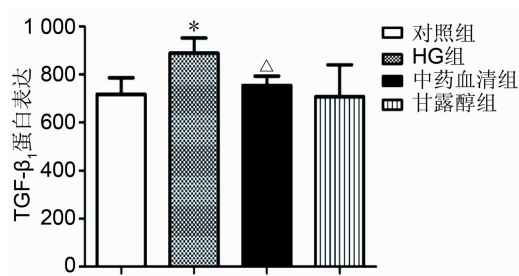
GF、IL-6、MCP-1 mRNA 表达均减少,且 TGF- β_1 mRNA 差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与 HG 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 1 4 组 TGF- β_1 、VEGF、PDGF、CTGF、IL-6、MCP-1 mRNA 表达比较

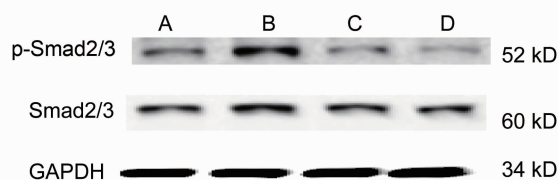
3 4 组细胞 TGF- β_1 蛋白表达水平比较(图 2) 与对照组比较,HG 组 TGF- β_1 蛋白表达明显升高($P < 0.05$);与 HG 组比较,中药血清组 TGF- β_1 蛋白表达下降($P < 0.05$)。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 HG 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 2 4 组细胞 TGF- β_1 蛋白表达比较

4 4 组细胞 Smad2/3 及 p-Smad2/3 蛋白表达比较(图 3) 与对照组比较,HG 组 Smad2/3 表达无明显变化;p-Smad2/3 蛋白表达明显增高($P < 0.05$),与 HG 组比较,中药血清组 p-Smad2/3 表达明显降低($P < 0.05$)。



注:A 为对照组;B 为 HG 组;C 为中药血清组;D 为甘露醇组

图 3 4 组细胞 Smad2/3 及 p-Smad2/3 蛋白表达电泳图

5 3 组细胞 p-Smad2/3 表达比较(图 4) 与对照组比较,HG 组 p-Smad2/3 表达明显增加($P < 0.05$);与 HG 组比较,中药血清组 p-Smad2/3 表达明显减少($P < 0.05$)。

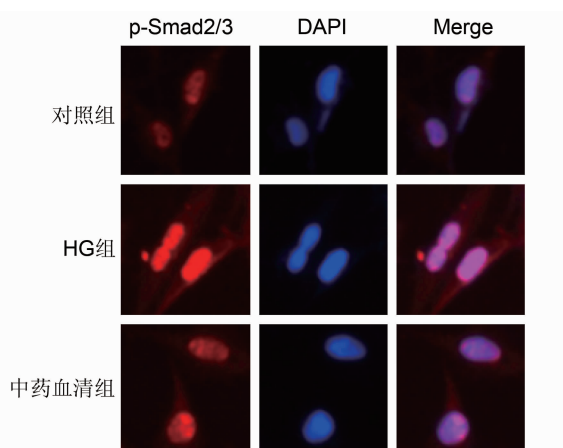


图 4 3 组细胞 p-Smad2/3 表达比较

讨 论

糖肾康中药复方已在临床应用多年,在治疗 DN 方面已取得了较为肯定的效果,但其作用机制仍不明确。从中医学角度讲,DN 可归属中医学“水肿”、“关格”、“腰痛”、“虚劳”、“胀满”等范畴。在发病早期,其病机关键在“虚与瘀”,即脾肾亏虚为发病根本,瘀血阻滞贯穿始终。肾虚是 DN 发生的关键,肾脏精气不足,直接影响诸脏的气化功能,日久伤阴耗气,阴损及阳,形成气阴两虚之证。气虚行血无力,阴虚血行艰涩而瘀阻经脉,则形成气阴两虚血瘀证候。方中生黄芪、枸杞子、山茱萸、山药、生地为主药,益气养阴补精气,气旺则促血行;辅以丹皮、当归、川芎、红花、桃仁、肉桂、大黄活血祛瘀通经,佐以泽泻、茯苓、猪苓、路路通利湿泄浊,去菟陈莖。诸药合用,补正气,填阴精,通经络,泄瘀浊,补不碍气,泻不伤正,使瘀去新生,精气得复,共奏益气养阴活血之功。本实验中笔者通过中药血清药理学方法,用该中药复方给大鼠灌胃,取血后用含药血清刺激细胞,发现 RMCs 在含药血清刺激下 TGF- β_1 、p-Smad2/3 的表达明显降低,说明该复方可通过抑制 TGF- β_1 /Smad2/3 通路,从而减轻 HG 刺激下 RMCs 的纤维化,达到治疗 DN 的目的。

TGF- β_1 、VEGF、PDGF、CTGF、IL-6、MCP-1 等被认为是 DN 发病的主要致纤维化因子^[4],本实验中,通过基因筛选发现,上述指标中,TGF- β_1 的变化最为显著,因此笔者认为该药物的主要作用靶点是 TGF- β_1 。TGF- β_1 是研究最多、也是作用最强的纤维化因子^[5],

也是 DN 发病机制的最后共同通路^[6], 肾组织的 TGF- β_1 主要由肾小球和肾小管上皮细胞分泌。DM 时多种因素可促使 TGF- β_1 表达异常升高, TGF- β_1 能刺激 IV 型胶原等细胞外基质 (ECM) 组分合成增加。ECM 作为系膜区围绕系膜细胞的非弥散固相介质, 调节系膜增生并分泌各种活性物质。ECM 积聚可引起肾小球系膜区扩张、毛细血管基底膜增厚, 导致弥漫性或结节性肾小球硬化, 从而成为引起 DN 的主要病理基础。

TGF- β_1 结合并激活受体后, 其信号传递需要有一系列受体后信号分子来进行, 其中转录因子 Smads 被认为是多个器官系统纤维化最主要的引起者, 是纤维细胞的分化及疾病进展的最关键因素^[7]。目前, 在哺乳动物分离鉴定出的 Smad 蛋白有 9 种, 分别用 Smad1~9 表示, 其中 smad2、3 可被 TGF- β_1 激活, 作为 TGF- β_1 受体 (T β RI) 激酶的直接底物, 活化后与通用介体型 Smads (Smad4、10) 形成复合物转位入核, 转到特异性信号, 调节靶基因转录^[8]。有研究表明, 随着 DN 病变逐渐加重, DM 大鼠肾 TGF- β_1 和 p-Smad2/3 的表达量比正常对照组显著增多, ECM 基质合成分泌也相应增加^[9]。Inazaki K 等^[10]研究发现, 在与 DN 发病相似的 UUO 大鼠模型中, 随着肾脏纤维化的加重, p-Smad2/3 表达呈进行性增加, 通过 Smad3 基因敲除下调 Smad3 的表达可明显减轻肾纤维化、炎症细胞浸润和凋亡, 提示 p-Smad2/3 表达的增高与肾纤维化的发生密切相关, 同时也表明抑制 Smad2/3 的活化能明显减轻肾纤维化。

笔者前期的实验表明, 糖肾康中药复方能上调 BMP-7 的表达^[11]。在本研究结果显示糖肾康中药血清可有效抑制 HG 下大鼠 RMCs Smad2/3 磷酸化, 而对总 Smad2/3 的表达无统计学意义。通过抑制 TGF- β_1 /Smad2/3 信号通路和上调 BMP-7 的表达, 可能是糖肾康中药血清减轻 HG 环境对肾组织损害的机制。

与甘露醇组比较, HG 环境下 RMCs TGF- β_1 、p-Smad2/3 的表达增多, 而对照组 TGF- β_1 、p-Smad2/3 的表达无明显差异, 表明 HG 不是通过改变渗透压的途径影响 TGF- β_1 、Smad2/3 蛋白表达, 而是存在其他的途径。这与栾家杰等^[12]在探讨黄芪对 DN 保护作用时发现, 高渗对 TGF- β_1 家族和 Smad 家族的表达无影响具有一致性。

综上所述, 本研究结果证明糖肾康中药血清中具有抑制 TGF- β_1 生成及 Smad2/3 的磷酸化, 进而保护

肾系膜的作用。对其有效成分开展分子药理学研究, 将很有可能发现防治 DN 的新药物。通过对糖肾康中药复方对 TGF- β_1 /Smad 信号通路的影响分析, 将有助于我们更深入理解 DN 发病机制, 发现 DN 的治疗靶点和新治疗手段。

参 考 文 献

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *New Engl J Med*, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [2] Noh HJ, Kim HC, Lee SS, et al. The inhibitory effect of siRNAs on the high glucose-induced over-expression of TGF- β_1 in mesangial cells [J]. *Korean Med Sci*, 2006, 21(3): 430-435.
- [3] Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins SP, et al. TGF- β_1 $\rightarrow$ SMAD/p53/USF2 $\rightarrow$ PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 117-128.
- [4] Merchant ML, Klein JB. Proteomic discovery of diabetic nephropathy biomarkers [J]. *Adv Chron Kidney Dis*, 2010, 17(6): 480-486.
- [5] Nacu N, Luzina IG, Highsmith K, et al. Macrophages produce TGF- β -induced (β -ig-h3) following ingestion of apoptotic cells and regulate MMP14 levels and collagen turnover in fibroblasts [J]. *Immunology*, 2008, 180(7): 5036-5044.
- [6] Forbes JM, Fukami K, Cooper ME. Diabetic nephropathy: where hemodynamics meets metabolism [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2007, 115(2): 69-84.
- [7] Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, et al. Vasopressin increases type IV collagen production through the induction of transforming growth factor-beta secretion in rat mesangial cells [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 57(2): 142-150.
- [8] Herman-Edelstein M, Weinstein T, Gafter U. TGF β_1 -dependent podocyte dysfunction [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013, 22(1): 93-99.
- [9] 杨勤, 谢汝佳, 韩冰, 等. 转化生长因子胞内信号蛋白 Smad2/3 在糖尿病大鼠肾脏表达的动态观察及意义研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(10): 1879-1884.
- [10] Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, et al. Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction [J]. *Kidney Internat*, 2004, 66(2): 597-604.
- [11] 刘丹丹, 高聆, 赵家军, 等. 健脾益肾, 活血化瘀中药复方对高糖刺激下肾小球系膜细胞增殖的影响 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2013, 51(5): 29-32.
- [12] 栾家杰. 黄芪总苷对实验性糖尿病动物肾脏保护作用及其机制研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.

(收稿: 2014-01-15 修回: 2014-09-19)