

文章编号 1006-8147(2023)02-0153-08

论 著

基于 RNA-seq 探讨扶肾降浊方及蚓激酶对肾间质纤维化的作用机制

王超坤,刘婷婷,帅一尘,李春雨,苏玮莲,宁志芬,李国霞

(天津医科大学基础医学院药理学系,天津 300070)

摘要 目的:探讨扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药对肾间质纤维化的作用机制。方法:雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 60 只,随机分为假手术组、模型组、扶肾降浊方组、蚓激酶组和联合用药组,每组 12 只,术后第 2 天开始,每天给药 1 次,扶肾降浊方灌胃给药:29 g/(kg·d),蚓激酶腹腔注射给药:36 万 U/(kg·d),假手术组、模型组给予等体积生理盐水,于第 7、14 天剖杀。HE 和 Masson 染色评价纤维化改变;RNA 测序(RNA-seq)检测第 7 天模型组和治疗组的基因表达;Western 印迹检测第 7、14 天肾脏中纤维化标志蛋白[纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)、Collagen-1、纤连蛋白(Fibronectin)]、上皮-间充质转化(EMT)标志蛋白(E-cad、-SMA、Vimentin)、Flna、磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)和细胞外信号调节激酶(ERK)的蛋白水平。结果:病理显示造模 7 天后肾脏出现明显纤维化改变($P<0.01$),随造模时延长而加重($P<0.01$);扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药对纤维化有明显抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$),第 7 天,扶肾降浊方较蚓激酶作用更为明显($P<0.01$);第 14 天,蚓激酶较扶肾降浊方作用更为明显($P<0.05$),两个时期均以联合用药效果最佳。同时,造模后肾脏中的纤维化和 EMT 标志蛋白显著升高(均 $P<0.01$),扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药对纤维化和 EMT 标志蛋白均有明显抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$),第 7 天,扶肾降浊方较蚓激酶作用更为明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$);第 14 天,蚓激酶较扶肾降浊方作用更为明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$),两个时期均以联合用药作用最明显($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。机制上,第 7、14 天,造模后各组 Flna 和 p-ERK 蛋白表达均明显升高(均 $P<0.01$),扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药均可抑制 Flna 和 p-ERK 的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药均能抑制肾间质纤维化,病变早期应用扶肾降浊方效果优于蚓激酶且联合用药优于单独用药,其共同机制可能通过抑制 Flna 基因及 ERK 的磷酸化,抑制表型转化,减少细胞外基质的产生而起作用。

关键词 扶肾降浊方;蚓激酶;肾间质纤维化;Flna;ERK

中图分类号 R692.9

文献标志码 A

Mechanism of FushenJiangzhuo recipe and lumbrokinase on renal interstitial fibrosis based on RNA-seq

WANG Chao-kun, LIU Ting-ting, SHUAI Yi-chen, LI Chun-yu, SU Wei-lian, NING Zhi-fen, LI Guo-xia

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the mechanisms of FushenJiangzhuo Recipe (FSJZ), lumbrokinase and their combination on renal interstitial fibrosis (RF). **Methods:** Sixty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation group, model group, FSJZ group, lumbrokinase group and combined group, with 12 rats in each group. Starting from the second day after surgery, the drug was given once a day. The FSJZ was given intragastric administration: 29 g/(kg·d), and the lumbrokinase intraperitoneal injection: 360 000 U/(kg·d). The sham group and model group were given the same volume of normal saline and dissected on the 7th and 14th day. HE and Masson staining were used to evaluating the fibrosis changes. RNA sequencing (RNA-seq) was used to detect gene expression in the model group and treatment group on day 7. Western blotting was used to detect the protein levels of RF marker proteins [plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Collagen-1, fibronectin], epithelial-mesenchymal transition (EMT) marker proteins (E-cad, α -SMA, Vimentin), Flna, phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the kidney on the 7, 14 days. **Results:** Pathological findings showed obvious RF changes after modeling ($P<0.01$) and increased with the lengthening of mold-making time ($P<0.01$). FSJZ, lumbrokinase and their combination could significantly inhibit fibrosis ($P<0.05$ or $P<0.01$) on the 7th day, the effect of FSJZ was more obvious than that of lumbrokinase ($P<0.01$). On day 14, the effect of lumbrokinase was more obvious than that of FSJZ ($P<0.05$), the best effect was found in combination therapy in both periods. At the same time, RF and EMT marker proteins were significantly increased after modeling (both $P<0.01$), FSJZ, lumbrokinase and their combination had significant inhibitory effects on fibrosis and EMT marker protein ($P<0.05$ or $P<0.01$), on the 7th day, the effect of FSJZ was more obvious than that of lumbrokinase ($P<0.05$ or $P<0.01$); On day 14, the effect of lumbrokinase was more obvious than that of FSJZ ($P<0.05$ or $P<0.01$), the most obvious

基金项目 天津市卫生健康委员会中医中西医结合科研项目(2021032)

作者简介 王超坤(1997-),女,硕士在读,研究方向:中西医结合治疗肾纤维化;通信作者:李国霞, E-mail: liguoxia96@163.com。

effect was found in combination therapy ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In terms of mechanism, on the 7th and 14th day, the expression of Flna and p-ERK protein increased significantly in each group after modeling (both $P < 0.01$), FSJZ, lumbrokinase and their combination could inhibit the expression of Flna and p-ERK ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** FSJZ, lumbrokinase and combination can inhibit RF. The effect of FSJZ is better than lumbrokinase at the early stage of lesions, and the combination is better than single drug. The common mechanism may be through inhibiting Flna and ERK phosphorylation, inhibiting EMT, and reducing the production of extracellular matrix.

Key words FushenJiangzhuo recipe; lumbrokinase; renal interstitial fibrosis; Flna; ERK

肾间质纤维化(renal fibrosis, RF)是各种慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)进展至肾功能衰竭的共同途径^[1]。RF是CKD进展的标志,RF进展与肾功能恶化密切相关^[2]。在持续的慢性炎症过程中,肾小管上皮细胞发生了上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),同时,肌成纤维细胞的形成,造成细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)产生过多,降解减少,过量的ECM沉积,损害了肾实质,导致RF发生^[3-4]。目前导致ECM积聚的确切机制及基因调控靶点尚不十分清楚,西医尚无治疗肾纤维化的有效治疗措施^[5]。

课题组前期对扶肾降浊方、蚓激酶治疗肾纤维化分别进行了多项研究,结果表明,扶肾降浊方、蚓激酶对肾纤维化均具有很好的治疗作用^[6-7],但扶肾降浊方、蚓激酶治疗肾纤维化的各自优势及联合用药是否具有协同作用尚不十分清楚。本研究旨在以往研究基础上,对扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药治疗肾纤维化的作用优势、作用基因靶点及相关机制做进一步研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 动物 SPF级Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠60只,体重190~210 g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,动物合格证书编号:SCXK(京)2019-0010,常规饲养,动物房温度23℃,湿度40%,光照和黑暗按12 h循环交替,自由饮水,自由获取饲料。经适应性喂养1周后开始实验。动物实验方案经天津医科大学动物伦理委员会批准(编号:TMUaMEC 2022005)。

1.1.2 药物与试剂 扶肾降浊方组成:山茱萸12 g,生黄芪30 g,白花蛇舌草30 g,丹参30 g,鬼箭羽30 g,益母草30 g,由天津药物研究院中药现代研究部按既定工艺制备成浓缩剂,每克含生药量为3.32 g。蚓激酶肠溶胶囊购自北京百奥药业有限公司(批号:H11021129)。大鼠的给药剂量按70 kg人体表面积换算^[8]。根据前期实验结果,扶肾降浊方、蚓激酶在高剂量时抑制RF的效果最佳^[7,9],故本实验采用高剂量。抗体 β -actin、 α -SMA,abcam公司(批号:ab82226、ab7817);抗体Collagen-1,

Affinity公司(批号:AF7001);抗体Vimentin、纤连蛋白(Fibronectin)、Flna、纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)、磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)、细胞外信号调节激酶(ERK),Immunoway公司(批号:YT4879、YT1733、YT1625、YT3569、YT1625、YP0101);E-cad、兔抗IgG, Saierbio公司(批号:SRP05266、SRPGAR001)。苏木素,上海源叶生物科技有限公司(批号:S19007);水溶性伊红染色液,北京鼎国昌盛生物技术有限公司(批号:AR-0733);Masson三色染色液,索莱宝生物科技有限公司(批号:G1340)。

1.1.3 仪器 细胞培养箱,美国Thermo公司(型号:YZB/USA1802-2009);正置显微镜,日本尼康株式会社(型号:LV150NL);电泳仪,中国北京六一生物科技有限公司(型号:DYCP-31BN);组织脱水机,德国Leica公司(型号:TP1020);加热石蜡包埋机,德国Leica公司(型号:EG1150C);手动轮转式切片机,德国Leica公司(型号:RM2235)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 大鼠经适应性喂养1周后采用如下方法对其进行肾间质纤维化造模:大鼠全麻诱导后,在模型组大鼠腹部正中切开,露出左肾,在上、下1/3处结扎左输尿管,两次结扎点之间切断输尿管,切口用5-0线缝合,在伤口处涂碘伏消毒^[10]。假手术组大鼠采用相同的手术方式但不结扎输尿管。除假手术组外,其余各组大鼠均进行肾间质纤维化造模。

1.2.2 分组与干预 将大鼠随机分为假手术组、模型组、扶肾降浊方组、蚓激酶组和联合用药组,每组12只。对假手术组大鼠进行输尿管游离,对其他组大鼠进行肾间质纤维化造模。造模后第2天开始给药,扶肾降浊方灌胃给药:29 g/(kg·d),蚓激酶腹腔注射给药:360 000 U/(kg·d),假手术组、模型组给予等体积生理盐水,每天给药1次。术后第7天及14天各组分别处死6只大鼠。在无菌操作台上迅速打开腹腔,在距肾门1 mm切取左侧梗阻肾脏,用生理盐水冲洗后,沿矢状面切开,分为等量的两份,分别放入无菌微型离心管中,一份用液氮快速冷却后保存

于 -80°C 冰箱,用于Western 印迹实验,另切取黄豆大小组织用于转录组测序,一份放入 4%多聚甲醛液固定 24 h,用于病理学实验。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 肾组织病理学评估:肾脏标本在 4%多聚甲醛液中固定 24 h,常规修块,脱水,浸蜡,包埋,将样品切成 $4\ \mu\text{m}$ 厚的切片,HE 染色观察肾脏皮质、髓质和肾小管等情况;Masson 染色观察胶原纤维分布情况。在光学显微镜下观察 Masson 三色染色切片,并在 $200\times$ 放大镜下拍照。从整个切片中选取 5 个视野,蓝染面积百分比计算为总阳性面积/总分析面积的百分比。

1.2.3.2 分析各治疗组差异表达基因:取给药 7 d 时的模型组及治疗组大鼠的肾脏组织,切取黄豆大小样本,每组设置两个生物学重复,转移到离心管中送至中国华大生物科技公司进行测序分析,进行 RNA 的提取与检测、反转录、PCR 富集、构建文库,最后上机检测。分析扶肾降浊方组、蚓激酶组及联合用药组相比模型组差异表达的基因。

1.2.3.3 Western 印迹:检测梗阻侧大鼠肾组织 PAI-1、Collagen-1、Fibronectin、E-cad、 α -SMA、Vimentin、Flna、ERK 和 p-ERK 的表达,取肾组织标本加入预冷的 RIPA 裂解缓冲液,研磨后静置于冰上裂解 60 min, 4°C , $12\ 000\times g$ 离心,取上清。BCA 法测定蛋白浓度。10%SDS-PAGE 胶进行电泳蛋白分离,并将目的蛋白转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h 后,将膜与一抗 PAI-1、Collagen-1、Fibronectin、E-cad、 α -SMA、Vimentin、Flna、p-ERK 和 ERK,浓度均为 1:1 000, β -actin (1:10 000) 4°C 孵育过夜。用 TBST 洗膜 4 次,每次 5 min。将印记与耦联于辣根过氧化物酶的二抗[羊抗兔 IgG(1:10 000)]室温孵育 2 h。用 TBST 洗膜 4 次,每次 5 min。按 ECL 试剂盒

说明进行显影,用 X 感光胶片在暗室内进行曝光。以 β -actin 为内参进行条带灰度分析。将目标条带与参考条带的灰度比值作为蛋白的相对表达,用 Image J 14.1 软件进行图片处理。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件对数据进行统计分析,符合正态分布或近似正态分布的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏病理组织形态学

2.1.1 HE 染色 假手术组肾小管结构正常,排列整齐紧密,未见扩张或萎缩,未见间质炎症细胞浸润。模型组肾小管上皮细胞肿胀脱落、变性坏死,致结构被破坏,伴有炎症细胞浸润,随造模时间地延长,模型组纤维化程度进一步加重。扶肾降浊方、蚓激酶和联合用药均可不同程度地减轻肾纤维化。第 7 天,扶肾降浊方组纤维化减轻更为突出,随着纤维化程度的加重,扶肾降浊方组作用减弱,到第 14 天时,蚓激酶组纤维化改变较扶肾降浊方组轻。此外,第 7、14 天,均以联合用药效果最佳,见图 1。

2.1.2 Masson 染色 假手术组肾小管周围间质未见蓝色胶原纤维沉积;模型组间质可见较多蓝色胶原纤维染色,且随造模时间地延长蓝染面积进一步加重($P<0.01$)。与模型组比较,扶肾降浊方组、蚓激酶和联合用药组纤维化蓝染面积均有不同程度的减轻($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。第 7 天,与蚓激酶组相比,扶肾降浊方组纤维化蓝染面积明显降低($P<0.01$)。第 14 天,蚓激酶组较扶肾降浊方组纤维化蓝染面积降低($P<0.05$)。两个时间段均以联合用药后纤维化蓝染面积最小($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见图 2。

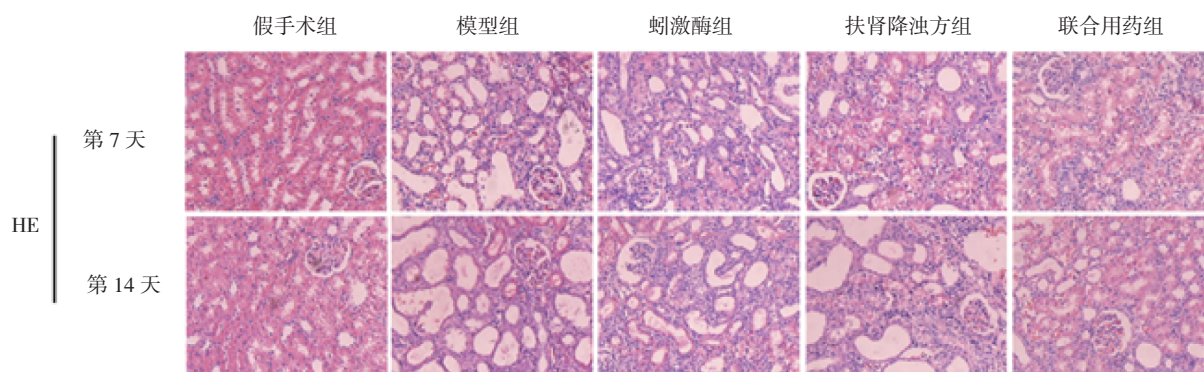
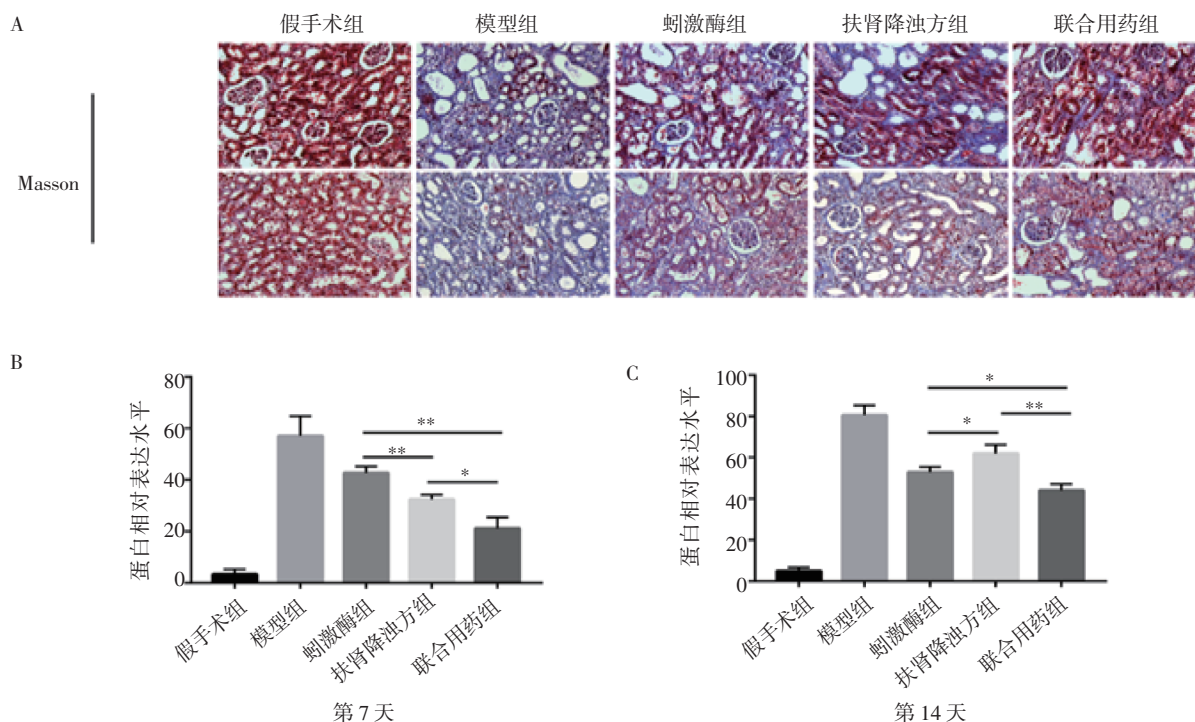


图 1 各治疗组术后 7 d、14 d 肾脏病理改变(HE 染色, $200\times$)

Fig 1 Renal pathological changes in 7 d, 14 d among groups (HE staining, $200\times$)



注:A:各组肾脏组织 Masson 染色;B:给药后第 7 天各组肾脏组织纤维化面积统计;C:给药后第 14 天各组肾脏组织纤维化面积统计(* $P<0.05$; ** $P<0.01$)

图 2 各组肾脏病理改变(Masson 染色, 200 \times)

Fig 2 Renal pathological changes in each group(Masson staining, 200 \times)

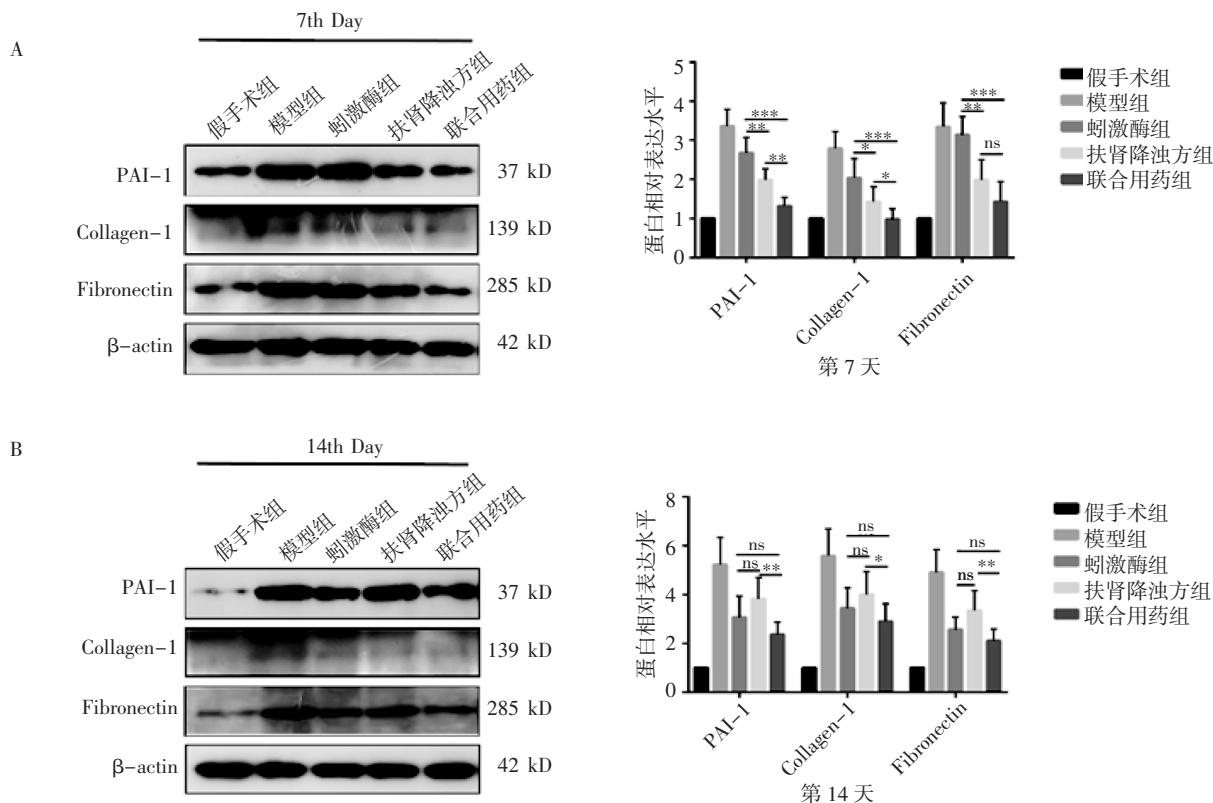
2.2 各组大鼠 ECM 相关蛋白表达 通过检测 ECM 标志物 PAI-1、Collagen-1 和纤连蛋白的表达量进一步了解药物对 RF 中 ECM 异常积聚的作用。与假手术组相比,模型组 PAI-1、Collagen-1 和纤连蛋白的表达量明显增加($P<0.01$)。扶肾降浊方组、蚓激酶组及联合用药组可显著降低 PAI-1、Collagen-1 和纤连蛋白的表达($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。第 7 天,相比蚓激酶组,扶肾降浊方组 PAI-1、Collagen-1 和纤连蛋白的表达量较低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。第 14 天,蚓激酶组 PAI-1、Collagen-1 和纤连蛋白的表达量较扶肾降浊方组低,但无统计学意义($P>0.05$)。两个阶段均以联合用药 PAI-1、Collagen-1 和纤连蛋白的表达量最低($P<0.01$ 或 $P<0.05$),见图 3。

2.3 各组 UUO 大鼠 EMT 相关蛋白表达 通过检测 EMT 标志物 E-cad、 α -SMA、Vimentin 蛋白的表达量进一步了解药物对 RF 中 EMT 的作用。与假手术组相比,模型组 α -SMA 和 Vimentin 的表达量明显增加, E-cad 的表达量明显降低($P<0.01$)。扶肾降浊方组、蚓激酶组及联合用药组可显著降低 α -SMA 和 Vimentin 的表达,促进 E-cad 的表达($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。第 7 天,相比蚓激酶组,扶肾降浊方组 α -SMA 和 Vimentin 的表达较低, E-cad

的表达较高($P<0.01$)。第 14 天,蚓激酶组 α -SMA 和 Vimentin 的表达较扶肾降浊方组低, E-cad 的表达较扶肾降浊方组高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。第 7、14 天均以联合用药组 α -SMA 和 Vimentin 的表达量最低, E-cad 的表达量最高($P<0.01$ 或 $P<0.05$),见图 4。

2.4 模型组和给药组大鼠基因转录本差异表达情况 与模型组相比,扶肾降浊方组有 136 个转录本差异表达, 蚓激酶组有 836 个转录本差异表达,扶肾降浊方联合蚓激酶组有 1 011 个转录本差异表达。笔者选取了这 3 个区间的交集,共 30 个转录本。与模型组相比,相对于其他转录本, Flna 在 3 个治疗组中均明显降低,见图 5。

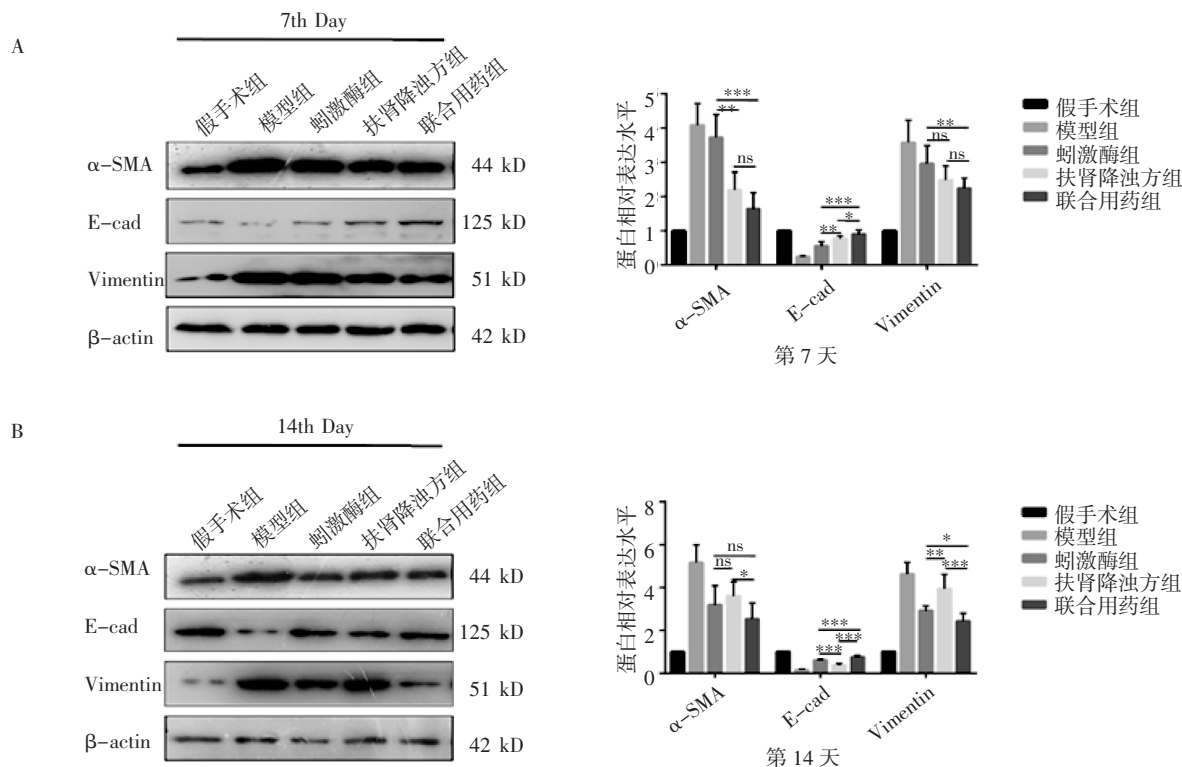
2.5 各组大鼠 Flna 基因表达量及 ERK 信号通路 与假手术组相比,模型组 Flna 和 p-ERK 蛋白的表达量明显增加($P<0.01$)。扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药可显著降低 Flna 和 p-ERK 蛋白的表达($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。第 7 天,与蚓激酶组相比,扶肾降浊方组 Flna 和 p-ERK 蛋白的表达量较低($P<0.05$)。第 14 天, 蚓激酶组 Flna 和 p-ERK 蛋白的表达量较扶肾降浊方组低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。第 7、14 天均以联合用药组 Flna 和 p-ERK 蛋白的表达量最低($P<0.01$ 或 $P<0.05$),见图 6。



注:A:Western 印迹检测给药后第 7 天各组肾组织中 ECM 积聚相关蛋白的表达水平;B:Western 印迹检测给药后第 14 天各组肾组织中 ECM 积聚相关蛋白的表达水平(* $P<0.05$; ** $P<0.01$; $^{***}P>0.05$)

图 3 各组 PAI-1、Collagen-1 和 Fibronectin 蛋白表达

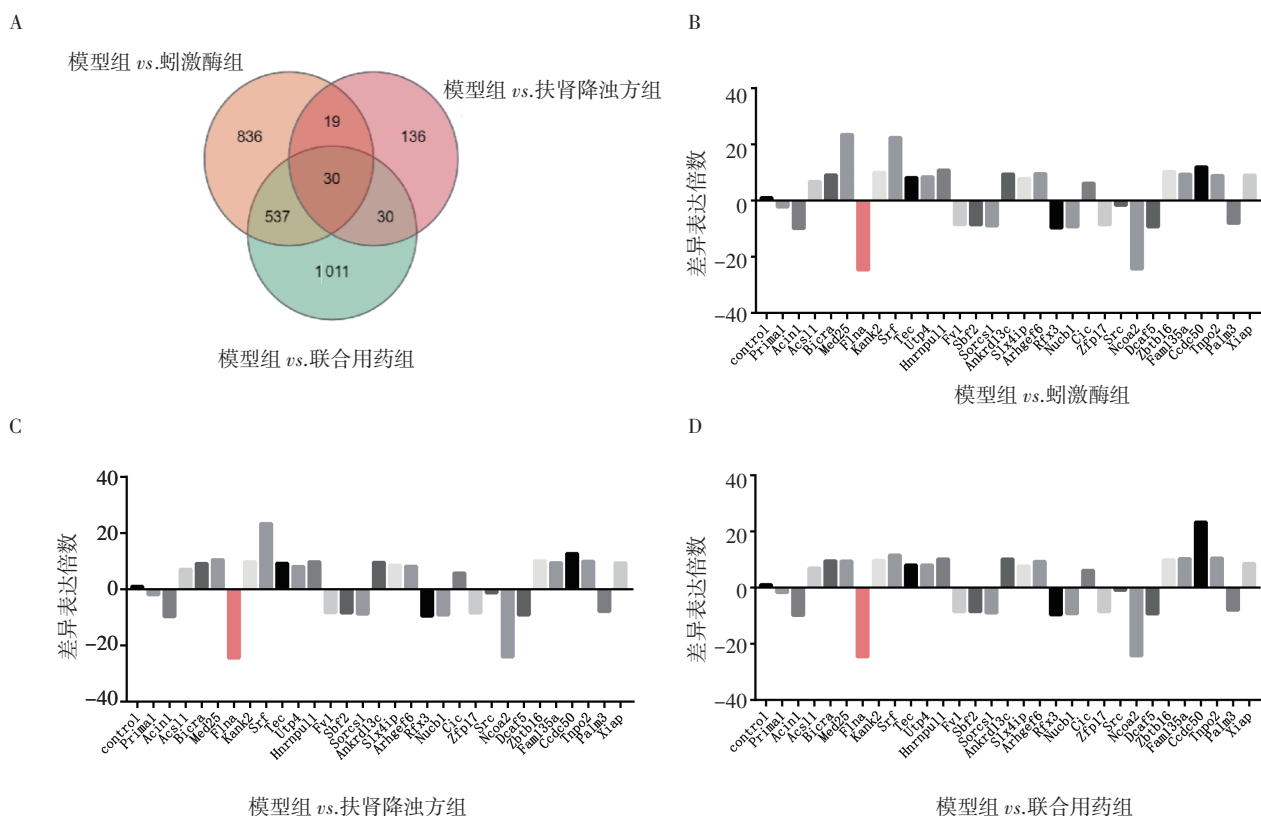
Fig 3 The expression of PAI-1, Collagen-1 and Fibronectin in each group



注:A:Western 印迹检测给药后第 7 天各组肾组织中 EMT 相关蛋白的表达水平;B:Western 印迹检测给药后第 14 天各组肾组织中 EMT 相关蛋白的表达水平(* $P<0.05$; ** $P<0.01$; $^{***}P<0.01$; $^{***}P>0.05$)

图 4 各组 α-SMA、Vimentin 和 E-cad 蛋白表达

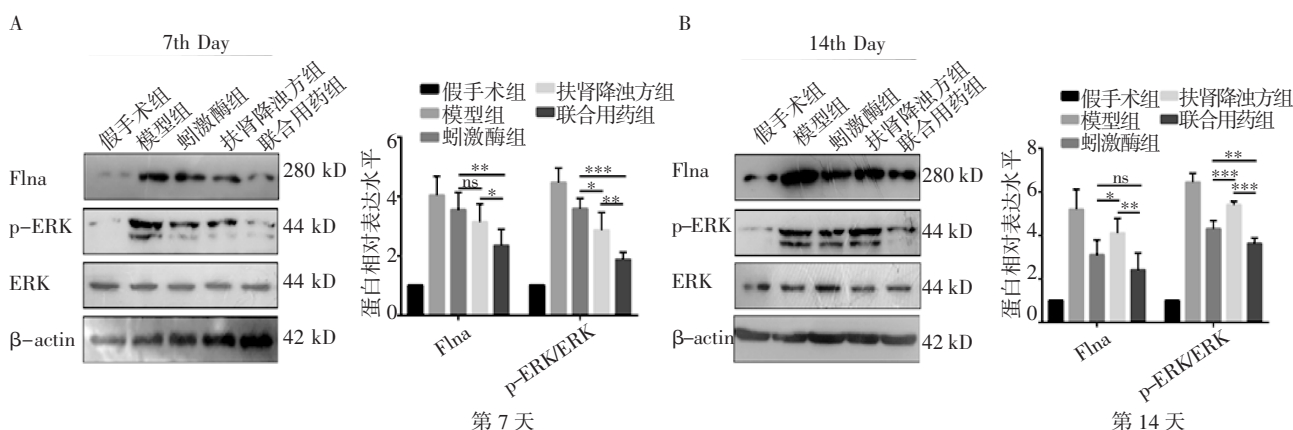
Fig 4 The expression of α-SMA, Vimentin and E-cad in each group



注:A:各治疗组相比模型组差异表达的转录本的交集;B:蛔激酶组相比模型组差异表达最明显的 30 个转录本;C:扶肾降浊方组相比模型组差异表达最明显的 30 个转录本;D:联合用药组相比模型组差异表达最明显的 30 个转录本

图 5 针对模型组和治疗组的转录组测序分析

Fig 5 Transcriptome sequencing analysis for model group and treatment group



注:A:Western 印迹检测给药后第 7 天各组肾组织中 Flna 和 p-ERK 蛋白的表达水平;B:Western 印迹检测给药后第 14 天各组肾组织中 Flna 和 p-ERK 蛋白的表达水平(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; $^{\#}P > 0.05$)

图 6 各组 Flna、p-ERK 蛋白表达

Fig 6 The expression of Flna and p-ERK in each group

3 讨论

肾间质纤维化是慢性肾病严重程度重要标志^[11],也是临床上治疗和预防进展性慢性肾病的关键。肾间质纤维化的病理特征是 ECM 合成增多与降解减少,表现为细胞与基质相互作用失调,炎症细胞浸润和固有细胞转化^[12-13],而 ECM 的合成与降解是一个复杂的调控体系,目前,对 ECM 调控机制

的认知并不十分清楚,如 ECM 来源途径存在争议、各种细胞因子及其形成信号通路的作用机制尚未完全阐明。其中,细胞 EMT 是组织发生纤维化的一种重要方式,在 EMT 过程中,上皮细胞向间充质细胞转分化,其主要特征是上皮表型的破坏和间质表型的获得^[14]。E-cad 参与上皮细胞的黏附,其表达的减少导致上皮细胞特性的丧失,活化的成纤维细胞

转化为肌成纤维细胞,其可表达 α -SMA^[15-16]。Vimentin 是间充质细胞骨架蛋白的重要组成部分^[17]。由此,E-cad 表达的减少而 Vimentin 和 α -SMA 表达的增加被认为是 EMT 的特征^[18-19]。

文献报道 Flna 是一种非肌性肌动蛋白结合蛋白,广泛存在于细胞浆,少数跨膜或存在于细胞核内,在细胞黏附、ECM 重塑以及细胞骨架重建中发挥重要作用,在肺癌细胞中,它促进 TGF- β 诱导的 EMT 进程^[20]。Flna 可以通过促进 MAPK 家族中 ERK 的磷酸化从而激活 ERK 信号通路,而 ERK 信号通路与纤维化密切相关。有文献报道,Flna 作为中央调节器在平衡 ECM 的产生和重塑中起重要作用,可能通过激活 RAS/MEK/ERK 信号通路而实现的^[21-22]。

本研究表明,扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药对 RF 具有显著疗效,建模 7 d 治疗组疗效优于建模 14 d,以中药组及联合用药组作用更为突出,随着纤维化程度的加重,中药组作用减弱,蚓激酶组及联合用药组作用明显,提示早期进行药物干预,尤其是中药干预,治疗效果较好,且联合用药在各期效果均优于单独用药。

为进一步阐明药物作用机制,课题组采用转录组测序技术,在 UUO 大鼠模型中分析扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药调控 RF 所涉及的基因表达差异,结果显示,相比模型组,扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药组转录本 Flna 的表达均显著降低,同时 Flna 蛋白表达也均明显降低,推测 Flna 可能在 RF 中发挥核心调控作用,扶肾降浊方与蚓激酶可能通过调控共同基因靶点 Flna 而起到治疗 RF 作用。

研究表明,Flna 是 ECM 合成和重塑的中心调节因子,在 ERK 和 Smad 的激活中起平衡作用^[23],而 Flna 的下游信号通路—RAS/MEK/ERK 可调控肾纤维化^[24]。本研究发现,扶肾降浊方、蚓激酶及联合用药引起 Flna 降低的同时造成 Collagen-1、PAI-1、FN、 α -SMA、Vimentin、p-ERK 蛋白的明显减少,E-cad 蛋白明显升高,推测药物可能通过调控 Flna 基因抑制 ERK 的磷酸化水平、抑制表型转化、减少 ECM 积聚而起到治疗 RF 作用,进一步证明联合用药优势,为 RF 的治疗提供科学依据。

参考文献:

- [1] HARZANDI A,LEE S,BIDKHORI G,et al. Acute kidney injury leading to CKD is associated with a persistence of metabolic dysfunction and hypertriglyceridemia[J]. iScience,2021,24(2):102046.
- [2] LI Q,MING Y,JIA H,et al. Poricoic acid A suppresses TGF- β 1-induced renal fibrosis and proliferation via the PDGF-C,Smad3 and MAPK pathways[J]. Exp Ther Med,2021,21(4):289.
- [3] ZHANG X,FANG J,CHEN Z,et al. Qingshen buyang formula attenuates renal fibrosis in 5/6 nephrectomized rats via inhibiting EMT and Wnt/-catenin pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med,2019,2019:5370847.
- [4] TENNAKOON A H,IZAWA T,KUWAMURA M,et al. Pathogenesis of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal and hepatic fibrosis[J]. J Clin Med,2015,5(1):4.
- [5] LI H,DONG S,LIU Y,et al. Efficacy and safety of "sushen huoxue therapy"-based combined Chinese and western medicine treatment for diabetic kidney disease:an updated meta-analysis of 2105 patients[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2022,2022:3710074.
- [6] 魏晓露,李春雨,苏玮莲,等. 扶肾降浊方对肾间质纤维化大鼠的治疗作用及 TGF- β 1,HGF,Col I 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(6):114-118.
- [7] 王晓敏,申坤,刘婷婷,等. 蚓激酶对 UUO 大鼠肾组织 NOX4、FAK、Src 的影响[J]. 天津医科大学学报,2021,27(3):234-238.
- [8] WU D,CHEN J,ZHU H,et al. UPLC-PDA determination of paeoniflorin in rat plasma following the oral administration of Radix Paeoniae Alba and its effects on rats with collagen-induced arthritis[J]. Exp Ther Med,2014,7(1):209-217.
- [9] 李春雨,苏玮莲,魏晓露,等. 扶肾降浊方含药血清对肾小管间质损害大鼠成纤维细胞 TGF- β 1/Smads 信号转导通路的影响[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(11):2043-2047.
- [10] 申坤,李春雨,苏玮莲,等. 蚓激酶对 UUO 模型大鼠肾间质纤维化的影响[J]. 中药新药与临床药理,2018,29(4):404-408.
- [11] SUN H,ZHAO A,LI M,et al. Interaction of calcium binding protein S100A16 with myosin-9 promotes cytoskeleton reorganization in renal tubulointerstitial fibrosis[J]. Cell Death Dis,2020,11(2):146.
- [12] HUANG E,PENG N,XIAO F,et al. The roles of immune cells in the pathogenesis of fibrosis[J]. Int J Mol Sci,2020,21(15):5203.
- [13] LI G,QIN S,SUN X,et al. Retrospective observational cohort study on cosmetic outcome of using Ti-Ni memory alloy wire for intradermal suture following mastectomy in patients with breast cancer[J]. Oncol Lett,2018,15(2):2465-2470.
- [14] ZEISBERG M,NEILSON E G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. J Clin Invest,2009,119(6):1429-1437.
- [15] CHEVALIER R L,FORBES M S,THORNHILL B A,et al. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy[J]. Kidney Int,2009,75(11):1145-1152.
- [16] LI Y,MA D,WANG Z,et al. The glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide attenuates renal fibrosis[J]. Pharmacol Res,2018,131:102-111.
- [17] YAMASAKI T,SEKI N,YAMADA Y,et al. Tumor suppressive microRNA-138 contributes to cell migration and invasion through its targeting of vimentin in renal cell carcinoma[J]. Int J Oncol,2012,41(3):805-817.
- [18] LABERNADIE A,KATO T,BRUGUES A,et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion[J]. Nat Cell Biol,2017,19(3):224-237.
- [19] PIERA-VELAZQUEZS,MENDOZA F A,JIMENEZ S A,et al. En-

dothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of human fibrotic diseases[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(4):45.

- [20] WIECZOREK K, WIKTORSKA M, SACEWICZ-HOFMAN I, et al. Filamin A upregulation correlates with Snail-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cell adhesion but its inhibition increases the migration of colon adenocarcinoma HT29 cells[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359(1):163-170.
- [21] TIAN H, LIU X, HAN W, et al. Differential expression of filamin A and its clinical significance in breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(3):681-686.

- [22] CARGNELLOM, ROUXPP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1):50-83.
- [23] TOOMER K, SAULS K, FULMER D, et al. Filamin-a as a balance between Erk/Smad activities during cardiac valve development[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2019, 302(1):117-124.
- [24] LI Y, GAO J, YANG X, et al. Combination of curcumin and ginkgolide B inhibits cystogenesis by regulating multiple signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(3):195.

(2022-09-25 收稿)

(上接第 125 页)

- [3] 张静. MPNST 中 SUZ12 过表达及敲除稳定细胞株的构建及意义[D]. 天津医科大学, 2020.
- [4] 周欣, 李伟芸, 王红艳. MST1/2 调控先天免疫的功能和机制[J]. *遗传*, 2017, 39(7):642-649.
- [5] ISFORT I, ELGES S, CYRA M, et al. Prevalence of the hippo effectors YAP1/TAZ in tumors of soft tissue and bone[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):19704.
- [6] ZANCONATO F, CORDENONSI M, PICCOLO S. YAP/TAZ at the roots of cancer[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(6):783-803.
- [7] WU LMN, DENG Y, WANG J, et al. Programming of Schwann cells by Lats-1/2-TAZ/YAP signaling drives malignant peripheral nerve sheath tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(2):292-308.
- [8] TORIGATA K, DAISUKE O, MUKAI S, et al. LATS2 positively regulates polycomb repressive complex 2[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7):e0158562.
- [9] WIDEMANN B C. Current status of sporadic and neurofibromatosis type 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. *Curr Oncol Rep*, 2009, 11(4):322-328.
- [10] MIETTINEN M M, ANTONESCU C R, FLETCHER CDM, et al. Histopathologic evaluation of atypical neurofibromatous tumors and their transformation into malignant peripheral nerve sheath tumor in patients with neurofibromatosis 1—a consensus overview [J]. *Hum Pathol*, 2017, 67:1-10.
- [11] CARROLL S L. The challenge of cancer genomics in rare nervous system neoplasms: malignant peripheral nerve sheath tumors as a paradigm for cross-species comparative oncogenomics[J]. *Amer J Pathol*, 2016, 186:464-477.
- [12] LI Y, PEI J, XIA H, et al. Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition[J]. *Oncogene*, 2003, 22(28):4398-4405.
- [13] ABE Y, OHSUGI M, HARAGUCHI K, et al. LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(3):782-788.
- [14] REUVEN N, ADLER J, MELTSEER V, et al. The Hippo pathway

- kinase Lats2 prevents DNA damage-induced apoptosis through inhibition of the tyrosine kinase c-Abl[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(10):1330-1340.
- [15] GUO C, LIANG C, YANG J, et al. LATS2 inhibits cell proliferation and metastasis through the Hippo signaling pathway in glioma[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(5):2753-2761.
- [16] SHI Y, GENG D, ZHANG Y, et al. LATS2 inhibits malignant behaviors of glioma cells via inactivating YAP[J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 68(1):38-48.
- [17] AYLON Y, MICHAEL D, SHMUELI A, et al. A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(19):2687-2700.
- [18] SHAO D, ZHAI P, HU C, et al. Lats2 promotes heart failure by stimulating p53-mediated apoptosis during pressure overload[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):23469.
- [19] INOUE A, JANKE L J, GUDENAS B L, et al. A genetic mouse model with postnatal *Nf1* and *p53* loss recapitulates the histology and transcriptome of human malignant peripheral nerve sheath tumor [J]. *Neurooncol Adv*, 2021, 3(1):v-dab129.
- [20] WANG Q, LIU L, ZHANG S, et al. Long noncoding RNA NEAT1 suppresses hepatocyte proliferation in fulminant hepatic failure through increased recruitment of EZH2 to the LATS2 promoter region and promotion of H3K27me3 methylation[J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(3):461-472.
- [21] ZHANG P, GARNETT J, CREIGHTON C J, et al. EZH2-miR-30d-KPNB1 pathway regulates malignant peripheral nerve sheath tumor cell survival and tumorigenesis[J]. *J Pathol*, 2014, 232(3):308-318.
- [22] VÉLEZ-REYES G L, KOES N, RYU J H, et al. Transposon mutagenesis-guided CRISPR/Cas9 screening strongly implicates dysregulation of Hippo/YAP signaling in malignant peripheral nerve sheath tumor development[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(7):1584.

(2022-10-09 收稿)