淫羊藿苷调控TGF-β1诱导的DNA高甲基化抑制5/6肾切除大鼠肾间质肌成纤维细胞增殖研究

袁 玲*，王 蕾，王 宏，崔晓雪，江 茜
天津市医药科学研究所，天津 300020

摘 要：目的 观察淫羊藿苷对5/6肾切除大鼠肾间质肌成纤维细胞增殖的影响，并探讨其作用机制。**方法** 将大鼠分为假手术组、模型组及淫羊藿苷高、低剂量（100、50 mg·kg^{-1}）组。假手术组仅分离肾包膜，模型组及淫羊藿苷高、低剂量组进行5/6肾切术，每组7只。术后第3周开始给药，每日1次。14周末留取大鼠血清，检测肌酐（Scr）、尿素氮（BUN）；取部分肾脏，苏木精-伊红（HE）染色法常规病理检查观察组织学改变；天狼星红染色检测肾间质纤维化；免疫组织化学法检测肾脏组织α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、转化生长因子-β1（TGF-β1）、大鼠磷酸化信号转导分子2/3（p-SMAD2/3）、DNA甲基转移酶3A（Dnmt3a）的表达，另部分肾脏冻存，Western blotting检测α-SMA、TGF-β1、和Dnmt3a蛋白表达。**结果** HE染色及天狼星红染色结果显示模型组大鼠肾小管扩张或萎缩，有大量纤维组织增生及胶原沉积，并见散在炎症细胞浸润。免疫组化结果显示模型组肌成纤维细胞标记物α-SMA表达明显升高，促纤维化因子TGF-β1及其下游分子p-Smad2/3表达明显增加；DNA甲基转移酶Dnmt3a表达明显升高。淫羊藿苷处理可以减轻肾脏病理损伤，抑制肌成纤维细胞异常增殖，改善肾间质纤维化，下调α-SMA、TGF-β1、p-Smad2/3和Dnmt3a表达。除淫羊藿苷高剂量组抑制Dnmt3a表达的效应强于淫羊藿苷低剂量组外，其余指标淫羊藿苷高剂量组和低剂量组效应差异不明显。**结论** 淫羊藿苷在5/6肾切除诱导的慢性肾病（CKD）大鼠中表现出抗纤维化作用，其机制可能是通过调控TGF-β1诱导的DNA高甲基化抑制肌成纤维细胞增殖，改善肾间质纤维化。

关键词： 淫羊藿苷；肾纤维化；肌成纤维细胞；TGF-β1；DNA甲基化；DNA甲基转移酶
中图分类号： R572；R363 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2024）12-2770-08
DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.12.007

Icariin inhibits myofibroblasts proliferation and attenuates renal fibrosis in 5/6 nephrectomized rats

YUAN Ling, WANG Lei, WANG Hong, CUI Xiaoxue, JIANG Qian
Tianjin Institute of Medical & Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To observe the effect of icariin on proliferation of renal interstitial myofibroblasts in 5/6 nephrectomized rats and explore its mechanism. **Methods** The rats were divided into sham operation group, model group, icariin high-dose group and icariin low-dose group. In the sham operation group, only the renal envelope was separated without nephrectomy, and the model group and icariin group underwent 5/6 nephrectomy, with seven rats in each group. Icariin was given 50 mg·kg^{-1} in low-dose icariin group and 100 mg·kg^{-1} in high-dose icariin group, once a day. The serum of rats was collected at the end of the 14th week to detect creatinine (Scr) and urea nitrogen (BUN). Part of the kidney was taken and histological changes were observed by routine pathological examination. Sirian red staining was used to detect renal interstitial fibrosis. The expressions of α-smooth muscle actin (α-SMA), transforming growth factor-β1 (TGF-β1), phospho-small mothers against decapentaplegic homolog 2/3 (p-SMAD2/3) and DNA methyltransferase 3A (Dnmt3a) in kidney tissues were detected by immunohistochemistry. The expressions of α-SMA, TGF-β1 and Dnmt3a in other kidney tissues were detected by Western blotting. **Results** HE and Sirius red staining showed that renal tubules in the model group were dilated or atrophied, with a large amount of fibrous tissue hyperplasia and collagen deposition, and scattered inflammatory cell infiltration. Immunohistochemical results showed that the expression of α-SMA, TGF-β1 and its downstream molecule p-Smad2/3 were significantly increased in the model group. The expression of DNA methyltransferase

收稿日期： 2024-06-21
基金项目： 天津市卫生健康科技项目（TJWJ2022MS050）
***通信作者：** 袁 玲，女，硕士，副研究员，主要从事慢性肾病及其并发症的研究。E-mail：1128sun@163.com

Dnmt3a was significantly increased. Icariin treatment can alleviate renal pathological injury, inhibit abnormal proliferation of myofibroblasts, improve renal interstitial fibrosis, and down-regulate the expression of α-SMA, TGF-β1, p-Smad2/3 and Dnmt3a. The inhibitory effect of icariin high-dose group on Dnmt 3a expression was stronger than that of icariin low-dose group, but there was no significant difference in the effect of other indicators between icariin high-dose group and low-dose group. **Conclusion** Icariin shows an antifibrotic effect in 5/6 nephrectomy induced CKD rats, the mechanism may be through regulating TGF-β1-induced DNA hypermethylation to inhibit myofibroblasts proliferation and attenuate renal interstitial fibrosis.

Key words: icariin; renal fibrosis; myofibroblasts; TGF-β1; DNA methylation; DNA methyltransferase

慢性肾病（CKD）是全球的健康负担，随病情进展，肾功能逐渐丧失，发展为终末期肾病。无论最初如何起病，肾小管间质纤维化被认为是导致终末期肾病的所有肾脏疾病的最终共同途径[1]；相比肾小球损伤，它能更好地预测肾功能下降[2]。肾周细胞位于肾间质，呈星形和多角形。在健康肾脏中，周细胞在间质中产生低水平的胶原蛋白，以支持肾脏的结构，在纤维化损伤过程中，周细胞增殖并发生周细胞-肌成纤维细胞转化，从而分化为肌成纤维细胞，并表达肾损伤的纤维化标志物α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）[3]。这些细胞产生细胞外基质（ECM），导致肾脏纤维化[4]。据文献报道，该过程与转化生长因子-β1（TGF-β1）诱导的DNA高甲基化密切相关[5-7]。DNA甲基化修饰需要DNA甲基转移酶（DNMTs）的作用，是可逆的基因修饰过程，能够通过化学药物进行调控，可作为疾病的治疗靶点，其中Dnmt3a被报道通过CpG岛从头甲基化过程来参与多种疾病纤维化的发生发展[8-9]。

淫羊藿苷是从淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.中分离得到的黄酮类活性成分。传统上，它在中国、韩国和日本被用作壮阳和改善骨质疏松症[10]。淫羊藿苷具有多种药理作用，如抗炎[11]、抗癌[12]、肝保护作用[13]、心脏保护作用[14]和神经保护作用[15-17]。新近研究发现淫羊藿苷能抑制高血压大鼠模型TGF-β的表达[18]，通过抑制TGF-β1/Smad信号通路改善心肌梗死后大鼠的心功能和重塑[14]。然而，淫羊藿苷是否能抑制CKD中TGF-β1及DNA甲基化相关的甲基转移酶的表达，从而抑制肌成纤维细胞异常增殖，改善肾纤维化尚不清楚。因此，本研究通过为期14周的大鼠5/6肾切除术模型，评估淫羊藿苷改善肾纤维化的潜力，并探讨淫羊藿苷抑制肌成纤维细胞异常增殖中的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性健康Wistar大鼠28只，体质量190～210 g，购于北京华阜康生物科技股份有限公司，动物生产许可证号：SCXK（京）2016-0006。在天津市医药科学研究所适应性喂养1周后用于实验。本研究已获得天津市医药科学研究所动物伦理委员会批准（IMPS-EAEP-Z-KTSB-202219）。

1.2 药物和试剂

淫羊藿苷（货号：C10464466，上海麦克林生化科技有限公司，质量分数95%）；小鼠抗α-SMA（批号：NBP2-33006，美国Novus Biologicals公司）；小鼠抗TGFβ1、抗Dnmt3a（批号：sc-130348、sc-3739058，美国Santa Cruz公司）；兔抗p-Smad2/3、β-actin、特异性辣根过氧化物酶（批号：abs130992、abs132001、abs20002、abs20001，爱必信上海生物科技有限公司）；DAB显色、Masson染色试剂盒（批号：ZLI-9018、BSBA-4079A，北京中杉金桥生物技术有限公司）。

1.3 仪器

日立7080全自动生化仪（日本日立公司）；Nikon Eclipse Ci光学显微镜、Nikon Ni-U偏振光显微镜（日本尼康公司）；伯乐电泳仪（美国伯乐公司）、Life ECL凝胶成像系统（美国GE公司）；ASP200S全自动组织脱水机、EG1150H组织包埋机、RM2255全自动切片机（德国徕卡公司）。

2 方法

2.1 大鼠的分组及处理

将大鼠分为假手术组（进行同期2步手术，分离肾包膜，但不做任何切除），模型组（5/6肾切除组，第1次手术切除约2/3的左肾，1周后第2次手术切除右肾），淫羊藿苷低剂量组（5/6肾切术后第3周开始ig给予淫羊藿苷50 mg·kg^{-1}，每日1次），淫羊藿苷高剂量组（5/6肾切术后第3周开始ig给予淫羊藿苷100 mg·kg^{-1}，每日1次），每组7只，手术在麻醉下进行，ip给予戊巴比妥钠（45 mg·kg^{-1}）。淫羊藿苷剂量根据文献报道进行了调整[19-20]。14周末处死全部动物，经腹主动脉取血，摘取肾脏，部分肾脏冷冻在−80 ℃，其余肾脏固定在4%多聚甲醛中，以备后续进行病理组织学观察、免疫组化染色和Western blotting分析。

2.2 肾功能检测

腹主动脉取血，3 000 r·min^{-1}离心10 min，分离

血清，全自动生化仪测定血清肌酐（Scr）及尿素氮（BUN）水平。

2.3 苏木精-伊红（HE）染色法及病理组织学观察

肾脏标本用4%多聚甲醛固定，经常规脱水包埋后，切成4 μm厚的切片，二甲苯脱蜡，梯度乙醇脱水，苏木素染色4 min，盐酸乙醇分化，氨水返蓝，伊红染色0.5 min，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封片。在光学显微镜下观察肾脏病理组织学改变。

2.4 天狼星红染色检测肾间质纤维化

肾脏组织切片逐步脱蜡至水，按试剂盒说明进行天狼星红染色后在光学显微镜和偏振光显微镜下观察肾间质胶原沉积。

2.5 免疫组织化学染色

切片组织逐步脱蜡至水，封闭过氧化物酶10 min，磷酸盐缓冲溶液（PBS）冲洗3次，微波抗原修复10 min，PBS冲洗3次，分别加入α-SMA、TGF-β1、p-Smad2/3和Dnmt3a（浓度均为1∶100），4 ℃孵育过夜后，PBS冲洗3次，二抗37 ℃孵育30 min，PBS冲洗3次，DAB显色后苏木素复染，常规脱水、透明、封片后光学显微镜下观察阳性表达。以PBS代替一抗设立阴性对照。采用NIS-BRML测量软件定量阳性染色面积的百分比（每张切片5个高倍视野）。根据棕色染色的程度分为弱（1）、中（2）、强（3）进行强度评价，然后按照文献报道[21]描述的方法计算染色评分。

染色评分＝强度×面积

2.6 Western blotting检测蛋白表达

将各组大鼠肾组织100 mg进行组织匀浆后，采用RIPA裂解液及PMSF提取组织中的总蛋白，检测蛋白浓度，根据检测指标以20～50 μg蛋白样品进行电泳分离组织中的蛋白，湿转法将蛋白转移至PVDF膜上，脱脂奶粉进行抗体封闭，加入小鼠抗TGF-β1，小鼠抗α-SMA，小鼠抗Dnmt3a，小鼠抗β-actin，4 ℃孵育过夜，洗涤后，加入HRP标记的相应二抗，室温孵育1 h，洗涤后，Image QuantLAS500凝胶成像系统ECL发光检测，Image J软件进行分析。

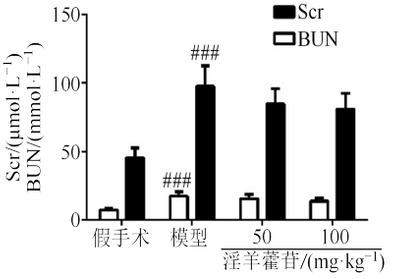
2.7 统计学分析

实验数据以$\bar{x} \pm s$表示，应用SPSS 19.0进行统计分析，组间比较采用单因素方差分析（ANOVA），事后分析采用Tukey's检验。

3 结果

3.1 淫羊藿苷对CKD大鼠肾功能的影响

与假手术组相比，模型组大鼠血清Scr和BUN水平明显升高（P＜0.001）（图1），表明肾功能下降。



与假手术组比较：###P＜0.001。

###P < 0.001 *vs* sham operation group.

图1 淫羊藿苷对CKD大鼠肾功能的影响（$\bar{x}\pm s$，n=7）

Fig. 1 Effect of icariin on renal function in CKD rats（$\bar{x}\pm s$，n=7）

相比于模型组，淫羊藿苷高、低剂量组未能在统计学意义上降低血清Scr和BUN水平。

3.2 淫羊藿苷对CKD大鼠肾脏病理组织学及肾间质纤维化的影响

经5/6肾切除14周后，建立了CKD大鼠肾脏纤维化模型，HE染色及天狼星红染色结果如图2所示，假手术组肾脏组织结构排列整齐，未见明显异常。模型组HE染色见部分肾小管萎缩或代偿性扩张，肾脏间质见散在单核和淋巴细胞浸润，大量肌成纤维细胞增生，形成广泛的间质纤维化；天狼星红染色光镜下在肾间质见大量红染的胶原沉积，偏振光镜下在肾间质见大量呈橙黄色的I型胶原及呈绿色的III型胶原沉积。淫羊藿苷低、高剂量组HE染色见肾小管扩张有所减轻，肾间质炎细胞浸润、纤维组织增生明显减少；天狼星红染色光镜下见红染的胶原沉积明显减少，偏振光镜下亦见呈橙黄色的I型胶原及呈绿色的III型胶原沉积明显减少。表明淫羊藿苷低、高剂量组具有抗纤维化效应，2组干预效果差异不明显。

3.3 淫羊藿苷处理对CKD大鼠肌成纤维细胞增殖标记物α-SMA表达的影响

免疫组化染色检测α-SMA表达能提示肌成纤维细胞的增殖情况，结果显示，假手术组肾脏组织仅见α-SMA在小动脉壁的强阳性表达；模型组肾脏组织除小动脉壁外在肾间质纤维化区域可见α-SMA呈棕黄色的中等强度阳性表达，着色主要在胞浆（图3-A）。淫羊藿苷干预后α-SMA表达明显减少，α-SMA表达在淫羊藿苷低、高剂量组之间差别不明显（图3-B）。Western blotting结果显示，相对于假手术组，模型组α-SMA表达明显增多（P＜0.001），淫羊藿苷低、高剂量组干预后α-SMA表达明显减少（P＜0.001），淫羊藿苷低、高剂量组之间干

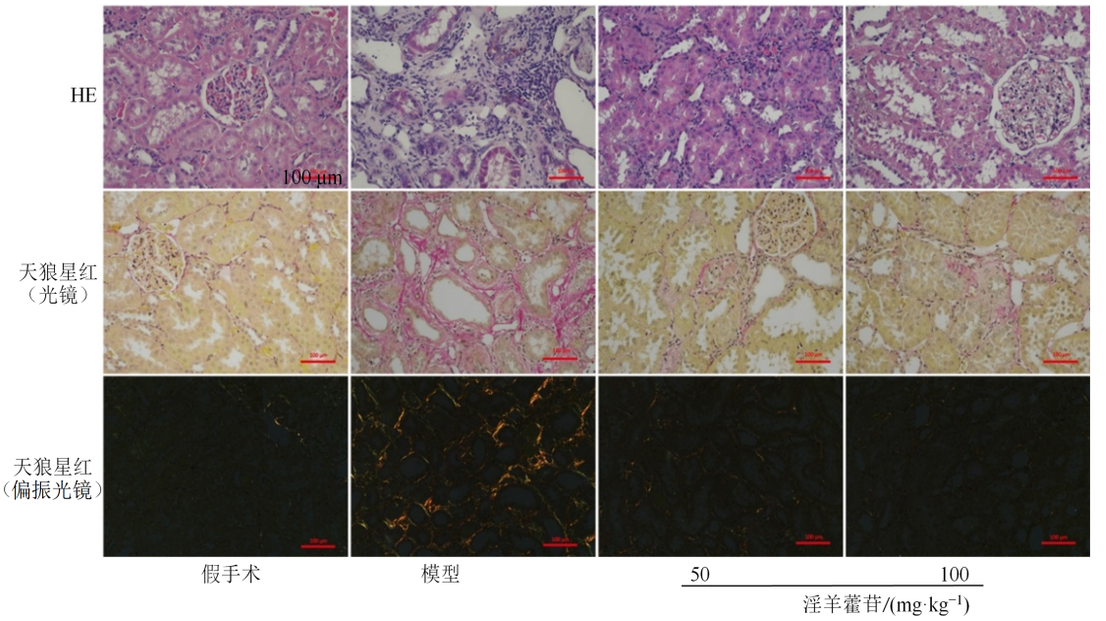
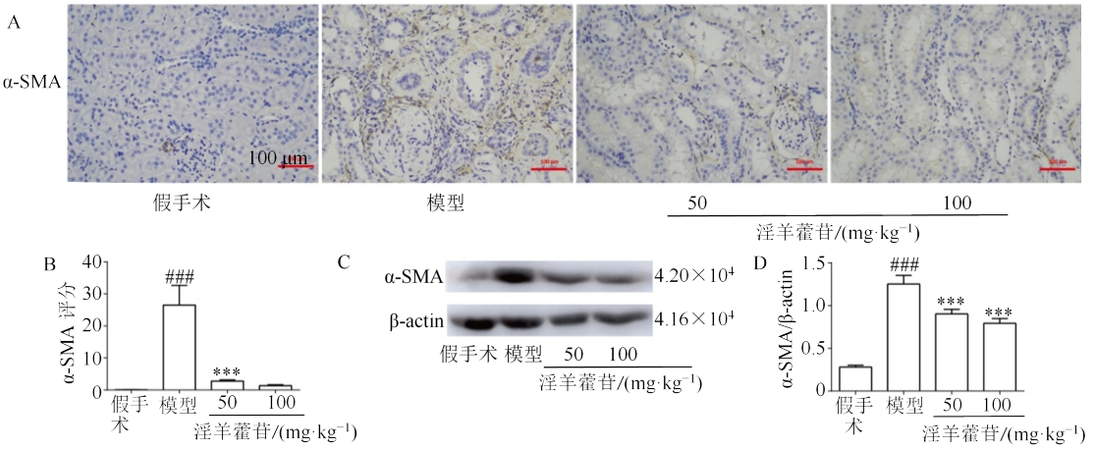


图2 淫羊藿苷对CKD大鼠肾脏病理组织学及肾间质纤维化的影响（×200）

Fig. 2 Effects of icariin on renal histopathology and renal interstitial fibrosis in CKD rats (×200)



与假手术组比较：$^{###}P<0.001$；与模型组比较：$^{***}P<0.001$；A、B-α-SMA的IHC结果；C、D-α-SMA的Western blotting结果。

$^{###}P<0.001$ *vs* sham operation group; $^{***}P<0.001$ *vs* model group; A-B-IHC results of α-SMA; C-D-Western blotting results of α-SMA.

图3 淫羊藿苷处理对CKD大鼠α-SMA表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=7，×200）

Fig. 3 Effect of icariin treatment on α-SMA expression in CKD rats ($\bar{x}\pm s$, n=7, ×200)

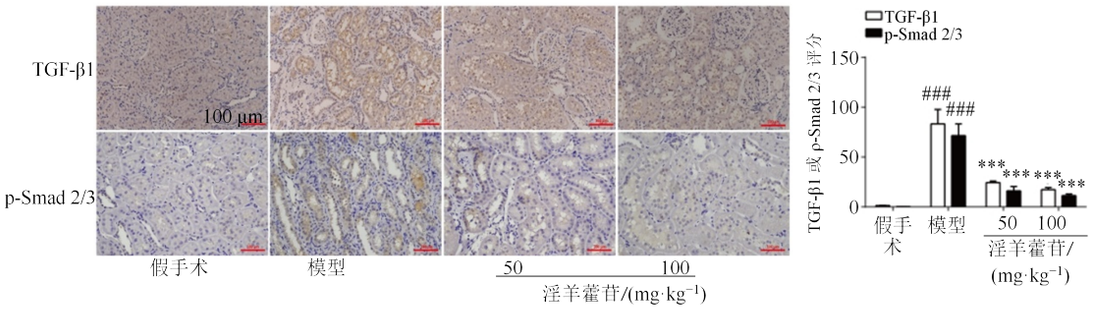
预效果差别不明显（图3-C、D）。

3.4 淫羊藿苷处理对CKD大鼠促纤维化因子TGF-β1及其下游信号分子p-Smad2/3表达的影响

免疫组化染色检测TGF-β1及p-Smad2/3表达能反映促纤维化因子及其下游信号分子的激活，结果如图4所示，假手术组肾脏组织见TGF-β1在肾小管上皮弥漫性弱阳性表达，见p-Smad2/3在肾小管上皮少量弱阳性表达；模型组肾脏组织TGF-β1和p-Smad2/3表达明显增多，可见TGF-β1在肾小管上皮呈深棕色的弥漫性强阳性表达，见p-Smad2/3在肾小管上皮呈棕黄色的散在强阳性表达，TGF-β1和 p-Smad2/3着色均主要在胞浆。淫羊藿苷低、高剂量组干预后TGF-β1和p-Smad2/3表达均明显减少（$P<0.001$），TGF-β1和p-Smad2/3表达在淫羊藿苷低、高剂量组之间差别不明显。

3.5 淫羊藿苷处理对CKD大鼠甲基转移酶Dnmt3a的表达的影响

免疫组化染色检测Dnmt3a表达反映了甲基转移酶的激活状态，结果如图5所示，假手术组肾脏组织未见明显Dnmt3a表达；模型组在肾小管上皮细胞可见Dnmt3a呈棕褐色的强阳性表达，着色主要在细胞核。淫羊藿苷低、高剂量组干预后Dnmt3a表达明显减少（$P<0.001$），Dnmt3a表达在淫羊藿苷低、高剂量组之间差别不明显。

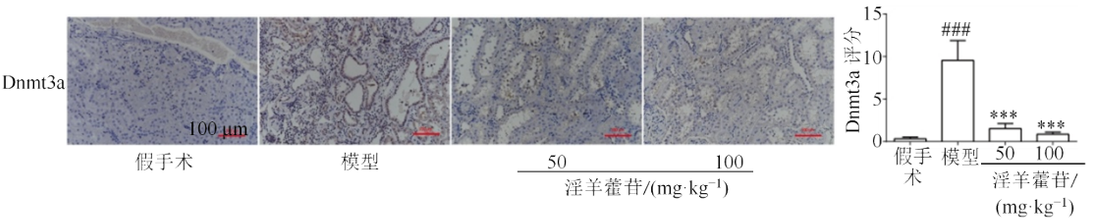


与假手术组比较：###P＜0.001；与模型组比较：***P＜0.001。

###P < 0.001 *vs* sham operation group；***P < 0.001 *vs* model group.

图 4　淫羊藿苷处理对 CKD 大鼠 TGF-β1 和 p-Smad2/3 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=7，×200）

Fig. 4　Effects of icariin treatment on expression of TGF-β1 and p-Smad2/3 in CKD rats（$\bar{x}\pm s$，n=7，×200）



与假手术组比较：###P＜0.001；与模型组比较：***P＜0.001。

###P < 0.001 *vs* sham operation group；***P < 0.001 *vs* model group.

图 5　淫羊藿苷处理对 CKD 大鼠甲基转移酶 Dnmt3a 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=7，×200）

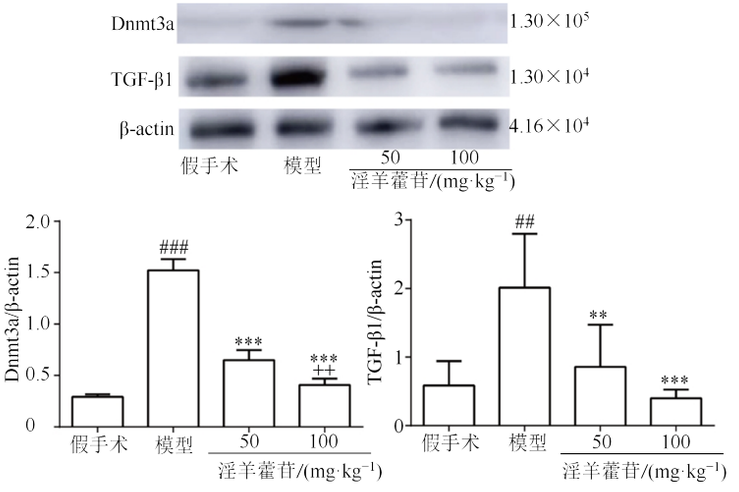
Fig. 5　Effect of icariin treatment on expression of methyltransferase Dnmt3a in CKD rats（$\bar{x}\pm s$，n=7，×200）

3.6　Western blotting 检测淫羊藿苷处理对 CKD 大鼠 TGF-β1 和 Dnmt3a 表达的影响

Western blotting 检测 TGF-β1 和 Dnmt3a 表达一定程度上提示 TGF-β1 诱导的反映 DNA 高甲基化状态的甲基转移酶的激活情况，结果如图 6 所示，相对于假手术组，模型组 TGF-β1 和 Dnmt3a 蛋白表达明显增多（P＜0.001），淫羊藿苷低、高剂量组干预后 TGF-β1 和 Dnmt3a 蛋白表达明显减少（P＜0.001），淫羊藿苷低、高剂量组 TGF-β1 表达差异明显，淫羊藿苷高剂量组 Dnmt3a 蛋白表达低于淫羊藿苷低剂量组（P＜0.01）。

4　讨论

CKD 动物模型是研究肾纤维化病理生理学和筛选评估新的治疗方法的重要手段。常用动物模



与假手术组比较：##P＜0.01 ###P＜0.001；与模型组比较：**P＜0.01 ***P＜0.001；与淫羊藿苷高剂量组比较：++P＜0.01。

##P < 0.01 ###P < 0.001 *vs* sham operation group；**P < 0.01 ***P < 0.001 *vs* model group；++P < 0.01 *vs* icariin high-dose group.

图 6　淫羊藿苷处理对 CKD 大鼠 TGF-β1 和 Dnmt3a 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 6　Effects of icariin treatment on expression of TGF-β1 and Dnmt3a in CKD rats（$\bar{x}\pm s$，n=3）

型包括口服腺嘌呤、5/6肾切除术（次全肾切除术）、缺血/再灌注损伤和单侧输尿管梗阻。然而，每种模式都有一定的局限性。简而言之，用于检查肾小管间质纤维化机制的单侧输尿管梗阻模型不适合监测肾功能参数，因为完整的对侧肾脏确保了肾脏参数的稳态[22]。肾动脉夹持法是肾缺血再灌注损伤常用的方法。急性肾功能衰竭和再灌注的结果与缺血的时间一致。该模型主要由急性炎症过程驱动，通常是可逆的，适合急性研究[23]。最常用的大鼠CKD模型是口服腺嘌呤或5/6肾切除术[24-25]。腺嘌呤引起的肾损伤的严重程度与剂量和暴露时间呈正相关，短期的腺嘌呤喂养会导致大鼠肾脏损伤，但是当停止口服腺嘌呤时，这种CKD模型在很大程度上是可逆的，可能会干扰治疗药物的效应，而长期暴露于腺嘌呤会导致严重的不可逆的肾脏损害，导致给药效应不明显，因此该研究方案不适合作为测试新型治疗剂的CKD模型[24]。5/6肾切除术可能是最成熟的慢性方法来模拟肾脏组织丢失的进行性肾功能衰竭[23]。主要的病理异常是肾小球硬化和小管间质纤维化。根据经典描述，接受5/6肾切除术的动物会出现贫血、间质纤维化、高磷血症和血管钙化[24-25]。该模型的缺点是手术需要一定的技巧，术后初期死亡率高。因此，在设计实验时需要准备更多的大鼠，潜在成本也相对较高。本研究中，在两阶段切除大鼠5/6的肾脏后，血BUN和Scr水平明显升高，提示CKD动物模型建立成功，肾组织病变主要是肾小管扩张或萎缩，肾间质大量纤维组织增生及胶原沉积，伴散在单核和淋巴细胞浸润。

纤维细胞和周细胞是肾纤维化产生胶原的2个细胞来源，在肾间质纤维化上，纤维细胞贡献较小，在肾损伤期间，主要由周细胞增殖并转分化为肌成纤维细胞，以表达α-SMA为特征，并产生致病性ECM[26]。本研究在5/6肾切除诱导的CKD肾间质见到了表达α-SMA的肌成纤维细胞异常增殖，且天狼星红染色显示的I型和III型胶原沉积的增多，淫羊藿苷处理有效地减少了代表肌成纤维细胞异常增殖的α-SMA的表达及天狼星红染色显示的胶原沉积，本研究证实淫羊藿苷处理能改善肾间质纤维化。与Chen等[27]报道的淫羊藿苷能减轻单侧输尿管梗阻诱导的小鼠肾脏的炎症反应和纤维化一致。

TGF-β及其下游信号分子如Smad是肾损伤的成纤维细胞标志物[28]。在慢性小管间质纤维化过程中，TGF-β表达升高，激活Smad家族成员，随后导致肌成纤维细胞活化增殖和ECM的过度沉积。TGF-β受体和Smad家族成员被认为是CKD相关的肾纤维化的有效治疗靶点。有研究报道，淫羊藿次苷通过调节巨噬细胞极化来减轻博莱霉素诱导的肺纤维化[29]及淫羊藿苷或其代谢物可减轻自发性高血压大鼠心肌纤维化[18]，且经淫羊藿苷治疗后，肺脏和心脏纤维化组织中TGF-β的表达均发现有所减弱。本研究随之检测了TGF-β1及其下游信号分子Smad2/3的表达，发现淫羊藿苷处理有效地减轻5/6肾切除诱导的纤维化肾脏组织TGF-β和Smad2/3蛋白的表达，表明淫羊藿苷可以通过抑制TGF-β诱导的信号级联改善CKD小管间质纤维化，与前述文献报道一致。

TGF-β1是诱导周细胞向肌成纤维细胞转化的主要生长因子，新近研究提出纤维化肾中发生的周细胞-肌成纤维细胞转化与TGF-β1诱导的DNA高甲基化密切相关，去除触发损伤的刺激后，这些成肌纤维细胞会逐渐凋亡[30]。DNA甲基化是在DNMT催化下，以S-腺苷甲硫氨酸为甲基化供体，将甲基转移到DNA分子5'端的胞嘧啶残基上，DNMTs的异常表达，会造成甲基化状态紊乱，通常导致机体疾病发生，如DNMTs中的Dnmt3a参与多种疾病纤维化的发生和进展[8-9]。Dnmt3a可在细胞分裂初期结合未甲基化的核酸双链，催化链上新甲基化位点的出现和甲基修饰过程，行使从头甲基化功能。本研究随之检查了反映DNA高甲基化状态的甲基转移酶Dnmt3a的表达，免疫组化染色及Western blotting结果均显示淫羊藿苷治疗降低了肾Dnmt3a的表达。这些结果提示淫羊藿苷处理可能通过抑制TGF-β1诱导的DNA高甲基化对5/6肾切诱导的小管间质纤维化起改善作用。

本研究中淫羊藿苷高、低剂量组最终发挥药效的结果差异不明显，推测可能与剂量组的组数和各组给药剂量差的设置有关，对此需要进一步的具体研究。此外，本研究中淫羊藿苷治疗并没有在统计学上显著降低血清BUN和Scr水平，这表明尽管淫羊藿苷通过调控TGF-β诱导的DNA高甲基化抑制肌成纤维细胞异常增殖在一定程度上改善了肾纤维化，但并没有彻底消除引起慢性肾损伤的因素，肾功能未能完全恢复，提示血清生化可能是肾功能的敏感指标。

综上所述，本研究结果表明，口服淫羊藿苷可改善5/6肾切除诱导的CKD大鼠肾纤维化，其机制可能为通过降低TGF-β1诱导的DNA高甲基化阻止

肌成纤维细胞的增殖。进一步深入研究淫羊藿苷的作用机制有助于其成为延缓CKD进展的潜在治疗药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Humphreys B D. Mechanisms of renal fibrosis [J]. Annu Rev Physiol, 2018, 80: 309-326.

[2] Zeisberg M, Neilson E G. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(11): 1819-1834.

[3] Chen L M, Li X F, Deng Y Y, et al. The PI3K-Akt-mTOR pathway mediates renal pericyte-myofibroblast transition by enhancing glycolysis through HKII [J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 323.

[4] Miao C X, Zhu X Y, Wei X J, et al. Pro- and anti-fibrotic effects of vascular endothelial growth factor in chronic kidney diseases [J]. Ren Fail, 2022, 44(1): 881-892.

[5] Chang Y T, Yang C C, Pan S Y, et al. DNA methyltransferase inhibition restores erythropoietin production in fibrotic murine kidneys [J]. J Clin Invest, 2016, 126(2): 721-731.

[6] Zhou W, Chen M M, Liu H L, et al. Dihydroartemisinin suppresses renal fibrosis in mice by inhibiting DNA-methyltransferase 1 and increasing Klotho [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(10): 2609-2623.

[7] Koh E S, Kim S, Son M, et al. The protective effect of zebularine, an inhibitor of DNA methyltransferase, on renal tubulointerstitial inflammation and fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 14045.

[8] 王 娟, 孙 峰, 杨晶晶, 等. DNMT3A 调控 Drp1 对肝星状细胞活化增殖和迁移能力的影响 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(10):1542-1547.
Wang J, Sun F, Yang J J, et al. Effects of DNMT3A regulating Drp1 on proliferation and migration of activated hepatic stellate cells [J]. Chin Pharm Bullet, 2022, 38(10): 1542-1547.

[9] 陈泽文, 石开虎, 陶辉, 等. TGF-β1 刺激心肌成纤维细胞活化过程中 DNMT3A 的表达变化 [J]. 安徽医药, 2014, 18(10): 1841-1843.
Chen Z W, Shi K H, Tao H, et al. The changes of expression of DNMT3A in the activation of cardiac fibroblasts under the stimulation of TGF-β1 [J]. Anhui Med Pharm J, 2014, 18(10): 1841-1843.

[10] Ma H P, He X R, Yang Y, et al. The genus *Epimedium*: An ethnopharmacological and phytochemical review [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 519-541.

[11] Zhao W, Yu H H, Meng W W, et al. Icariin restrains NLRP3 inflammasome-mediated Th2 immune responses and ameliorates atopic dermatitis through modulating a novel lncRNA MALAT1/miR-124-3p axis [J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 1249-1259.

[12] Liu F Y, Ding D N, Wang Y R, et al. Icariin as a potential anticancer agent: A review of its biological effects on various cancers [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1216363.

[13] Ma Y R, Zhao C, Hu H B, et al. Liver protecting effects and molecular mechanisms of icariin and its metabolites [J]. Phytochemistry, 2023, 215: 113841.

[14] Jia J, Zhao X G, Tao S M, et al. Icariin improves cardiac function and remodeling *via* the TGF-β1/Smad signaling pathway in rats following myocardial infarction [J]. Eur J Med Res, 2023, 28(1): 607.

[15] Yang Y, Fu Y M, Qin Z P, et al. Icariin improves cognitive impairment by inhibiting ferroptosis of nerve cells [J]. Aging, 2023, 15(20): 11546-11553.

[16] 司玉芳, 严少普, 王文博. 淫羊藿苷改善中枢神经系统疾病的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(4): 988-994.
Si Y F, Yan S P, Wang W B. Research progress on icariin in improving central nervous system diseases [J]. Drugs Clin, 2023, 38(4): 988-994.

[17] 张利, 李佳莉, 高苑, 等. 淫羊藿素的药理作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(17): 6069-6077.
Zhang L, Li J L, Gao Y, et al. Research progress on pharmacological effects and mechanisms of icaritin [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(17): 6069-6077.

[18] Fu S, Li Y L, Wu Y T, et al. Icariside II improves myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats by inhibiting collagen synthesis [J]. J Pharm Pharmacol, 2020, 72(2): 227-235.

[19] Chen M, Hao J, Yang Q, et al. Effects of icariin on reproductive functions in male rats [J]. Molecules, 2014, 19, 9502-14.

[20] El-Shitany N A, Eid B G. Icariin modulates carrageenan-induced acute inflammation through HO-1/Nrf2 and NF-κB signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120, 109567.

[21] Garrido P, Ribeiro S, Fernandes J, et al. Iron-hepcidin dysmetabolism, *Anemia* and renal hypoxia, inflammation and fibrosis in the remnant kidney rat model [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124048.

[22] Chevalier R L, Forbes M S, Thornhill B A. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy [J]. Kidney Int, 2009, 75(11): 1145-1152.

[23] Hewitson T D, Ono T, Becker G J. Small animal models of kidney disease: A review [J]. Methods Mol Biol, 2009, 466: 41-57.

[24] Ferrari G O, Ferreira J C, Cavallari R T, et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: Head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models [J]. BMC Nephrol, 2014, 15: 69.

[25] Kim K, Anderson E M, Thome T, et al. Skeletal myopathy in CKD: A comparison of adenine-induced nephropathy and 5/6 nephrectomy models in mice [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2021, 321(1): F106-F119.

[26] Shih H M, Wu C J, Lin S L. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells [J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(11): 955-963.

[27] Chen H A, Chen C M, Guan S S, et al. The antifibrotic and anti-inflammatory effects of icariin on the kidney in a unilateral ureteral obstruction mouse model [J]. Phytomedicine, 2019, 59: 152917.

[28] Yao M Y, Lian D W, Wu M Z, et al. Isoliensinine attenuates renal fibrosis and inhibits TGF-β1/Smad2/3 signaling pathway in spontaneously hypertensive rats [J]. Drug Des Devel Ther, 2023, 17: 2749-2762.

[29] Deng L L, Ouyang B S, Shi H L, et al. Icariside II attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by modulating macrophage polarization [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317: 116810.

[30] Chou Y H, Pan S Y, Shao Y H, et al. Methylation in pericytes after acute injury promotes chronic kidney disease [J]. J Clin Invest, 2020, 130(9): 4845-4857.

[责任编辑 齐静雯]