

大黄-丹参药对通过调控 TNC/EGFR/STAT3 通路改善单侧输尿管结扎模型大鼠肾纤维化的机制

王 宏, 江 茜, 康 利, 袁 玲, 崔晓雪, 陈 冠, 王璐瑶, 王 蕾*

天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘 要: **目的** 探讨大黄-丹参药对 (RS) 调控肌腱蛋白 C (TNC) /表皮生长因子受体 (EGFR) /信号转导和转录活化因子 3 (STAT3) 通路延缓单侧输尿管梗阻 (UUO) 大鼠肾纤维化的机制。**方法** 50 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、尿毒清颗粒 (阳性药, $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和 RS 低、高剂量 (生药 3.0 、 $6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 每组 10 只。除假手术组外, 其余各组大鼠采用 UUO 法制备肾间质纤维化模型。各给药组 ig 相应药物, 假手术组、模型组 ig 等体积纯净水, 连续 14 d。代谢笼收集各组大鼠 24 h 尿液, 腹主动脉取血分离血清, 测定肌酐 (Scr) 和尿素氮 (BUN) 水平; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测尿液和血清中 TNC 的水平; HE 和 Masson 染色观察各大鼠肾组织病理形态学变化; 实时荧光定量法 (qRT-PCR) 检测肾组织 *TNC*、*EGFR*、*STAT3*、*TGF- β* 、纤维连接蛋白 (*FN*) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -*SMA*) 的 mRNA 表达; 蛋白免疫印记法 (Western blotting) 检测肾组织 TNC、EGFR、STAT3 和磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 的蛋白表达; 免疫组化染色 (IHC) 观察肾组织 TNC、EGFR、p-STAT3 的阳性表达。SD 大鼠 ig RS (生药 $6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 或纯净水制备含药或空白血清; 以人肾皮质近曲小管上皮 (HK-2) 细胞为研究对象, 将细胞分为对照组、模型组 ($\text{TGF-}\beta$ $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、RS 含药血清 (10%) (RS) 组、过表达阴性对照 (NC-OE) 组、TNC 过表达 (TNC-OE) 组、TNC 过表达+RS 含药血清 (10%) (TNC-OE+RS) 组。按相应条件培养后, qRT-PCR 检测各组细胞 *TNC*、*EGFR* 和 *STAT3* mRNA 的表达, Western blotting 检测 TNC、EGFR、STAT3 和 p-STAT3 的表达。**结果** 体内实验结果表明, 与假手术组相比, 模型组大鼠血清 Scr、BUN、TNC 水平和尿液 TNC 水平均明显升高 ($P < 0.01$); 肾组织病理损伤加重, 肾纤维化评分显著升高 ($P < 0.01$); 肾组织 *TNC*、*EGFR*、*STAT3*、*TGF-}\beta*、*FN* 和 α -*SMA* mRNA 水平和 TNC、EGFR、p-STAT3 蛋白表达水平及其阳性表达占比均明显上调 ($P < 0.01$)。与模型组相比, RS 低、高剂量组和尿毒清颗粒组大鼠血清 Scr、BUN、TNC 水平和尿液 TNC 水平均显著降低 ($P < 0.01$); 肾组织损伤减轻, 纤维化评分明显降低 ($P < 0.01$); 肾组织 *TNC*、*EGFR*、*STAT3*、*TGF-}\beta*、*FN* 和 α -*SMA* mRNA 水平和 TNC、EGFR、p-STAT3 蛋白表达水平及其阳性表达占比均显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。细胞实验结果表明, 与对照组相比, 模型组细胞 *TNC*、*EGFR*、*STAT3* mRNA 表达及 TNC、EGFR、p-STAT3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, RS 组细胞 *TNC*、*EGFR*、*STAT3* mRNA 表达及 TNC、EGFR、p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与 NC-OE 组相比, TNC-OE 组细胞 *TNC*、*EGFR*、*STAT3* mRNA 表达及 TNC、EGFR、p-STAT3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 与 TNC-OE 组相比, TNC-OE+RS 组细胞 *TNC*、*EGFR*、*STAT3* mRNA 表达及 TNC、EGFR、p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** RS 能够从体内、外延缓肾纤维化的进展, 其作用机制可能与调控 TNC/EGFR/STAT3 通路有关。

关键词: 大黄; 丹参; 肾纤维化; 单侧输尿管结扎模型; HK-2 细胞; TNC/EGFR/STAT3 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)11-3121-11

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2025.11.007

Mechanism of *Rheum palmatum-Salvia miltiorrhiza* drug pairs in improving renal fibrosis in unilateral ureteral ligation model rats through regulating TNC/EGFR/STAT3 pathway

WANG Hong, JIANG Qian, KANG Li, YUAN Ling, CUI Xiaoxue, CHEN Guan, WANG Luyao, WANG Lei
Tianjin Institute of Medical & Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

收稿日期: 2025-08-08

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目 (T2025032)

作者简介: 王 宏 (1986—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向为药理学。E-mail: wh19860906@126.com

*通信作者: 王 蕾 (1979—), 女, 硕士, 研究员, 研究方向为医药研究 (药理)。E-mail: zws9905@sina.com

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which the *Rheum palmatum-Salvia miltiorrhiza* drug pairs (RS) regulates the tendon protein C (TNC)/epidermal growth factor receptor (EGFR)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway in delaying renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction (UUO) rats. **Methods** Fifty male SD rats were randomly divided into the sham-operated group, the model group, the urine Niaoduoqing Granule (positive drug, $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and the RS low-dose and high-dose (raw drug 3.0 and $6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups, with 10 rats in each group. Except for the sham-operated group, the other groups of rats were prepared to establish a renal interstitial fibrosis model by UUO. Each administration group was given the corresponding drug, while the sham-operated group and the model group were given the same volume of pure water. The drugs were administered for 14 consecutive days. Metabolic cages were used to collect the 24 h urine of each groups of rats, and blood was taken from the abdominal aorta to separate the serum. The levels of creatinine (Scr) and urea nitrogen (BUN) were measured; the levels of TNC in urine and serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); HE and Masson staining were used to observe the morphological changes of renal tissue; real-time fluorescence quantitative method (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression of *TNC*, *EGFR*, *STAT3*, *TGF- β* , fibronectin (*FN*), and α -smooth muscle actin (α -SMA) in renal tissue; Western blotting was used to detect the protein expression of TNC, EGFR, STAT3, and phosphorylated STAT3 (p-STAT3); immunohistochemical staining (IHC) was used to observe the positive expression of TNC, EGFR, and p-STAT3 in renal tissue. SD rats were given RS (raw drug $6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) or pure water to prepare the drug-containing or blank serum; human renal cortical proximal tubular epithelial (HK-2) cells were used as the research object. The cells were divided into the control group, the model group ($\text{TGF-}\beta$ $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), the 10% RS drug-containing serum (RS) group, the negative control group (NC-OE), the TNC overexpression group (TNC-OE), and the TNC overexpression + RS drug-containing serum (10%) (TNC-OE + RS) group. After corresponding conditions of cultivation, qRT-PCR was used to detect the expression of *TNC*, *EGFR*, and *STAT3* mRNA in each group of cells, and Western blotting was used to detect the expression of TNC, EGFR, STAT3, and p-STAT3. **Results** The results of the *in vivo* experiments showed that compared with the sham operation group, the levels of serum Scr, BUN, TNC, and urine TNC in the model group were significantly increased ($P < 0.01$); The renal tissue pathological damage was aggravated, and the renal fibrosis score was significantly increased ($P < 0.01$); The mRNA levels of *TNC*, *EGFR*, *STAT3*, *TGF- β* , *FN*, and α -SMA in renal tissue and the protein expression levels and positive expression ratios of TNC, EGFR, p-STAT3 were significantly upregulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, the serum Scr, BUN, TNC levels, and urine TNC levels in the RS low-dose and high-dose groups and the urine Niaoduoqing Granule group were significantly decreased ($P < 0.01$); the renal tissue damage was alleviated, and the fibrosis score was significantly reduced ($P < 0.01$); The mRNA levels of *TNC*, *EGFR*, *STAT3*, *TGF- β* , *FN*, and α -SMA in renal tissue and the protein expression levels and positive expression ratios of TNC, EGFR, p-STAT3 were significantly downregulated ($P < 0.05, 0.01$). The results of the cell experiments showed that compared with the control group, the mRNA expressions of *TNC*, *EGFR*, and *STAT3* in the model group and the protein expressions of TNC, EGFR, and p-STAT3 were significantly increased ($P < 0.01$); Compared with the model group, the mRNA expressions of *TNC*, *EGFR*, and *STAT3* and the protein expressions of TNC, EGFR, and p-STAT3 in the RS group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the NC-OE group, the mRNA expressions of *TNC*, *EGFR*, and *STAT3* and the protein expressions of TNC, EGFR, and p-STAT3 in the TNC-OE group were significantly increased ($P < 0.01$); Compared with the TNC-OE group, the mRNA expressions of *TNC*, *EGFR*, and *STAT3* and the protein expressions of TNC, EGFR, and p-STAT3 in the TNC-OE + RS group were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** RS can delay the progression of renal fibrosis both *in vivo* and *in vitro*, and its mechanism of action may be related to the regulation of the TNC/EGFR/STAT3 pathway.

Key words: *Rheum palmatum* L.; *Salvia miltiorrhiza* Bge.; drug pairs; renal fibrosis; unilateral ureteral obstruction model; HK-2 cell; TNC/EGFR/STAT3 pathway

肾纤维化是几乎所有慢性肾脏病 (CKD) 进展至终末期肾病的“必经之路”，延缓其进程对改善患者预后、降低终末期肾病发生率具有重要临床意义^[1]。肌腱蛋白 C (TNC) 作为一种六聚体细胞外基质 (ECM) 糖蛋白，已有大量研究证实其在多种器官纤维化进程中表达显著上调，其不仅是反映纤维化程度的重要生物标志物，更能通过调控多条信号通路主动推动纤维化发展，是介导纤维化进程的

关键分子^[2-4]。

在肾脏疾病领域，虽有研究初步提示 TNC 与肾纤维化存在关联^[5]，但其参与肾纤维化的具体分子机制，以及在中药干预肾纤维化过程中所扮演的角色，目前尚不十分明确。课题组前期开展的细胞转录组分析结果显示，大黄-丹参含药血清可显著下调转化生长因子- β (TGF- β) 诱导的人肾小管上皮细胞 (HK-2 细胞) 中 TNC 的表达水平，基于此，课

课题组确定将 TNC 作为本研究的核心起始靶点。从分子结构来看, TNC 由多个功能结构域构成, 包括寡聚化域、表皮生长因子样重复序列、纤维连接蛋白 III 型重复序列及 C 末端纤维蛋白原样球状域。这些结构域的功能多样性, 使其能够与多种细胞表面受体结合, 进而调控细胞增殖、分化、凋亡等关键生物学行为^[6]。已有研究表明, TNC 可通过其表皮生长因子样结构域与表皮生长因子受体 (EGFR) 直接结合, 在不依赖表皮生长因子 (EGF) 配体的情况下, 持续激活 EGFR 及其下游信号通路^[7]。

信号转导及转录活化因子 3 (STAT3) 通路是 EGFR 介导的经典下游信号通路之一。当 EGFR 被激活后, 可通过 Janus 激酶 (JAK) 或 Src 家族激酶磷酸化 STAT3, 使其发生活化; 活化后的 STAT3 会进入细胞核, 作为转录因子直接调控多种促纤维化相关基因的表达, 是介导纤维化进程的核心信号枢纽^[8]。因此, 深入解析 TNC/EGFR/STAT3 通路在肾纤维化中的调控机制, 可为开发肾纤维化靶向治疗策略提供重要理论支撑。

中药在肾纤维化治疗领域具有悠久应用历史与独特优势, 其中大黄-丹参药对 (RS) 是中医临床治疗慢性肾脏病、延缓肾纤维化进展的经典配伍^[9]。课题组前期动物实验研究已证实, RS 可有效保护 5/6 肾切除模型大鼠的残存肾功能, 显著延缓其肾纤维化病理进程^[10]。但目前关于该药对是否通过调控 TNC/EGFR/STAT3 通路发挥抗肾纤维化作用, 尚未有明确研究证据。

基于上述背景, 本研究旨在系统探讨 RS 对肾纤维化的干预效果, 并深入阐明其对 TNC/EGFR/STAT3 通路关键分子表达及活性的影响, 以期 RS 防治肾纤维化的临床应用提供新的理论依据与实验支撑。

1 材料

1.1 仪器

7080 型全自动生化分析仪 (日本积水医疗科技有限公司); Infinite M2000 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); EG1150 自动生物组织包埋机、RM2255 切片机 (德国莱卡仪器有限公司); Ci-L 显微镜 (日本尼康公司); Mini PROTEAN Tetra 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); ImageQuant LAS 500 一体化成像仪 (美国 GE 公司); ABI7500 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.2 药材与试剂

大黄饮片 (批号 202047-1)、丹参饮片 (批号

G2005018-01) 均购自达仁堂 (天津) 中药饮片有限公司, 经天津市医药科学研究所陈冠副研究员鉴定为蓼科大黄属植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 和唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎。

尿毒清颗粒 (无糖型), (批号 20231150, 每袋 5 g), 康臣药业 (霍尔果斯) 有限公司, 临用前用纯净水配制为 $0.25 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混悬液; 戊巴比妥钠 (批号 020919), 北京化学试剂公司; 大鼠 TNC 酶联免疫吸附测定试剂盒 (批号 ml602236), 上海酶联生物科技有限公司; Masson 三色染色液 (批号 C211201)、鼠一抗 β -actin (批号 240090110), 北京中杉金桥生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (批号 240008023、2500020002), 北京索莱宝科技有限公司; 兔一抗 TNC、EGFR, 鼠一抗 STAT3 (批号 0096333、00110865、10025143), 武汉三鹰生物技术有限公司; Phospho-STAT3 (Tyr705, 批号 9145S)、山羊抗兔二抗 (批号 28), Cell Signaling Technology 公司; 山羊抗鼠二抗 (批号 916A035), 爱必信 (上海) 生物科技有限公司; HiFiScript cDNA Synthesis kit、UltraSYBR Mixture (Low ROX, 批号 26621、33121), 北京康为世纪生物科技有限公司; jetPRIME 转染试剂 (批号 B210623), 法国 PolyPlus-transfection 公司; TGF- β (批号 0506S354), 美国 Perprotech 公司; TNC 过表达质粒由美国 Addgene 公司提供。

1.3 细胞

人肾皮质近曲小管上皮细胞 (HK-2), 购自中国科学院上海细胞库, ATCC 编号 CRL-2190TM。

1.4 动物

雄性 SD 大鼠 60 只, SPF 级, 7~8 周龄, 体重 190~210 g, 购自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) 2024-0003。各大鼠饲养于屏障环境内, 温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度 40%~70%, 12 h 光照配合 12 h 黑暗, 自由饮水摄食。本实验经天津市医药科学研究所实验动物伦理委员会批准 (批准号 IMPS-EAEP-Z-T2025032-01)。

2 方法

2.1 大黄-丹参浸膏的制备

称取等质量的大黄和丹参饮片, 一煎加入药材 10 倍量纯净水, 二煎加入药材 8 倍量纯净水, 合并 2 次滤液, 加热浓缩, 制成每毫升含 1.1 g 生药的浸膏。

采用 HPLC 法对浸膏中的大黄素和大黄酚进行含量测定,二者质量分数总计不少于 0.18%。

2.2 大黄-丹参含药血清的制备

将 10 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组(空白血清)和 RS 组,每组 5 只。RS 给药剂量为生药 $6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (2 倍临床等效剂量),ig 体积为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。对照组 ig 等体积纯净水,每天 ig 2 次,连续给药 7 次。末次给药(给药前禁食不禁水 16 h)1 h 后各大鼠 ip 戊巴比妥钠($45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉,腹主动脉取血,4 ℃ 静置 2 h 后, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离血清。将每组 5 只大鼠血清混合,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,56 ℃ 灭活 30 min 后分装, -80 ℃ 冻存备用。

2.3 体内实验

2.3.1 动物造模、分组及给药 大鼠预饲养 1 周后,采用单侧输尿管梗阻法(UUO)复制大鼠肾间质纤维化模型。各大鼠 ip 戊巴比妥钠($45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉,右侧卧位固定于手术台上,碘伏-75%酒精消毒手术区,行左侧腹切口,无菌分离左侧输尿管,用 3-0 号缝合线结扎两道,并在两结扎点间剪断,逐层缝合。假手术组大鼠仅打开腹腔并游离左侧输尿管,并不结扎和剪断。按体质量将模型大鼠随机分为模型组、尿毒清颗粒($2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,大鼠临床等效剂量)组和 RS 高、低剂量[生药 3.0 (大鼠临床等效剂量)、 $6.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$]组,每组 10 只。各给药组大鼠 ig 相应药物,假手术组和模型组大鼠 ig 等体积纯净水,体积均为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,每天 1 次,连续 14 d。

2.3.2 标本采集 末次给药 1 h 后,代谢笼收集各组大鼠 24 h 尿液,离心后用于 TNC 水平的检测;ip 戊巴比妥钠($45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉,腹主动脉取血, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血清,用于肾功能指标及 TNC 水平的检测;剖取结扎侧肾组织,部分组织 10%中性甲醛固定,用于组织病理学观察,部分

组织-80 ℃ 冻存,用于分子生物学检测。

2.3.3 大鼠血清肾功能指标测定 取“2.3.2”项下采集的血清样本,利用全自动生化分析仪测定各组大鼠血清中肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)含量。

2.3.4 大鼠血清及尿液中 TNC 水平检测 按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组大鼠血清及尿液中 TNC 水平。

2.3.5 大鼠结扎侧肾组织病理学观察 取固定好的肾组织,脱水包埋后切片($4\text{ }\mu\text{m}$),HE 和 Masson 染色观察大鼠肾组织形态学变化及纤维化程度并评分。评分标准^[1]: Masson 染色后,在 200 倍显微镜下随机选取 10 个视野进行观察,按病变面积占该视野的百分比计算,无:0 分,小于 25%:1 分,25%~50%:2 分,大于 50%:3 分。

2.3.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测大鼠肾组织 TNC、EGFR、STAT3、TGF- β 、FN 和 α -SMA mRNA 表达 称取肾组织标本 100 mg,提取其总 RNA 并逆转录成 cDNA,将合成的 cDNA 置于 PCR 反应体系($20\text{ }\mu\text{L}$)中进行扩增。反应条件:95 ℃ 预变性 10 min 后进行 PCR 循环;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 1 min,40 个循环。绘制熔解曲线。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 TNC、EGFR、STAT3、TGF- β 、FN 和 α -SMA mRNA 的表达水平。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体见表 1。

2.3.7 Western blotting 法检测大鼠肾组织 TNC、EGFR、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达 提取“2.3.2”项下冻存肾组织的总蛋白,BCA 法进行蛋白定量并统一浓度。蛋白变性后上样,进行电泳分离并转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,4 ℃ 一抗(TNC、EGFR、p-STAT3、STAT3 和 β -actin 均 1:1 000 稀释)孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后,加入相应种属二抗(山羊抗兔和山羊抗鼠 IgG 均 1:2 000 稀释)室温摇床

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

基因名称	引物序列 (5'→3')		长度/bp
TNC	上游 GACAAGGACACAGATTCAGCCATC	下游 CAGGTTGACACGGTGACAGTTC	87
EGFR	上游 GTGTGCCACCTGTGCCATCC	下游 GCCACCACCAGCAGCAAGAG	137
STAT3	上游 GAGGCAGGAGAATCGCTTGAACC	下游 TCTCAGACTGTGCCCCAGGATG	97
TGF- β	上游 AGCAACAATTCCTGGCGATACCTC	下游 TCAACCACTGCCGCACAACCTC	103
FN	上游 GCTTCGTGCCCCAGTGCTGAC	下游 GCCGCTTCTGTCCAGTTCGTAG	146
α -SMA	上游 TGCTGGACTCTGGAGATGGTGTG	下游 CGGCAGTAGTCACGAAGGAATAGC	159
β -actin	上游 CCATCAGCCAGCAGTCGTCTAATC	下游 AGAGCAGCAACTTCTTCGTACAC	124

低速振荡孵育 2 h。TBST 充分洗涤后，ECL 显色，凝胶成像系统采集图像。使用 Image J 软件计算各条带灰度值。

2.3.8 免疫组化检测大鼠肾组织 TNC、EGFR 和 p-STAT3 蛋白的表达 将肾组织石蜡切片置于烘箱内，60 ℃ 烤片 2 h。脱蜡及抗原修复后，PBS 洗涤 3 次。滴加山羊血清室温封闭 20 min 后，滴加一抗（TNC、EGFR 和 p-STAT3，均 1：100），4 ℃ 过夜。磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤 3 次后，滴加对应种属二抗（IgG，1：500），室温孵育 30 min。加入 DAB 染液显色，苏木素复染后封片。黄棕色染色为阳性表达。显微镜采集图片，Image J 软件进行分析，计算阳性面积占比。

2.4 体外实验

2.4.1 细胞分组、造模与培养 取对数生长期的 HK-2 细胞，以 3×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板中培养，将细胞分为 6 组，分别为对照组、模型组、10% RS 含药血清（RS）组、过表达阴性对照（NC-OE）组、TNC 过表达（TNC-OE）组、TNC 过表达+RS 含药血清（10%）组（TNC-OE+RS）。待细胞密度达到 70% 后，NC-OE、TNC-OE 和 TNC-OE+RS 组加入现配的转染复合物，继续培养 24 h。转染培养结束后，对照组加入 10% 的空白大鼠血清，模型组加入 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- β +10% 的空白大鼠血清，RS 组加入 10% RS 含药血清+TGF- β ，NC-OE 组和 TNC-OE 组加入 10% 空白大鼠血清，TNC-OE+RS 组加入 10% RS 含药血清，各组干预后均孵育 24 h。

2.4.2 q-RT-PCR 法检测各组细胞 TNC、EGFR 和 STAT3 mRNA 表达 提取各组细胞总 RNA，测定其浓度并逆转录为 cDNA，按“2.3.6”项下反应条件进行扩增反应，绘制熔解曲线。以 β -actin 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 TNC、EGFR 和 STAT3 mRNA 表达水平。

2.4.3 Western blotting 法检测各组细胞 TNC、EGFR、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达 收集各组细胞，每孔加入 1 mL 裂解液冰上裂解 30 min，离心取上清，BCA 法测定蛋白浓度。后续步骤同“2.3.7”项。

2.5 统计学方法

利用 GraphPad Prism 6.0 软件对实验数据进行统计分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），两组间比较采用 LDS- t 检验，以 $P < 0.05$ 表示两组差异有统计学意义。

3 结果

3.1 RS 对肾间质纤维化模型大鼠血清 Scr 和 BUN 水平的影响

与假手术组相比，模型组大鼠血清 Scr 和 BUN 水平显著升高（ $P < 0.01$ ）；与模型组相比，尿毒清颗粒组和 RS 低、高剂量组大鼠血清 Scr 和 BUN 水平明显降低（ $P < 0.01$ ）。见表 2。

表 2 RS 对肾间质纤维化模型大鼠血清 Scr 和 BUN 水平的影响（ $\bar{x} \pm s, n=10$ ）

Table 2 Effect of RS on levels of Scr and BUN in serum of rat models of renal interstitial fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Scr/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	BUN/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
假手术	—	25.6 ± 3.04	6.6 ± 0.5
模型	—	$57.7 \pm 9.47^{**}$	$10.3 \pm 0.8^{**}$
尿毒清颗粒	2.5	$34.5 \pm 3.50^{##}$	$8.2 \pm 0.7^{##}$
RS	3.0	$40.3 \pm 5.39^{##}$	$9.1 \pm 0.9^{##}$
	6.0	$36.4 \pm 4.03^{##}$	$8.3 \pm 0.6^{##}$

与假手术组比较： $^{**}P < 0.01$ ；与模型组比较： $^{##}P < 0.01$ 。

$^{**}P < 0.01$ vs sham-operation group; $^{##}P < 0.01$ vs model group.

3.2 RS 对肾间质纤维化模型大鼠血清及尿液 TNC 水平的影响

与假手术组相比，模型组大鼠血清及尿液 TNC 水平明显升高（ $P < 0.01$ ）；与模型组相比，尿毒清颗粒组和 RS 低、高剂量组大鼠血清及尿液 TNC 水平均显著降低（ $P < 0.01$ ），见表 3。

表 3 RS 对肾间质纤维化模型大鼠血清及尿液 TNC 水平的影响（ $\bar{x} \pm s, n=10$ ）

Table 3 Effect of RS on levels of TNC in serum and urine of rats with renal interstitial fibrosis model ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	TNC/($\text{mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
		血清	尿液
假手术	—	0.18 ± 0.06	2.80 ± 0.70
模型	—	$1.16 \pm 0.17^{**}$	$5.65 \pm 0.43^{**}$
尿毒清颗粒	2.5	$0.49 \pm 0.05^{##}$	$3.75 \pm 0.42^{##}$
RS	3.0	$0.78 \pm 0.04^{##}$	$4.35 \pm 0.61^{##}$
	6.0	$0.60 \pm 0.03^{##}$	$3.91 \pm 0.28^{##}$

与假手术组比较： $^{**}P < 0.01$ ；与模型组比较： $^{##}P < 0.01$ 。

$^{**}P < 0.01$ vs sham-operation group; $^{##}P < 0.01$ vs model group.

3.3 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织形态学及纤维化的影响

HE 染色结果显示，假手术组大鼠肾小球及肾小管结构正常，间质未见明显胶原沉积；模型组大鼠肾组织被压缩形成囊性结构，肾小球萎缩明显，部分肾

小管代偿性扩张,炎症细胞浸润较明显;尿毒清颗粒组及 RS 低、高剂量组大鼠肾组织病变有较为明显的改善。Masson 染色显示,与假手术组相比,模型组大鼠出现严重的小管间质胶原沉积;与模型组相比,

各给药组大鼠肾组织纤维化程度显著改善。见图 1。模型组大鼠肾组织纤维化评分较假手术组明显升高 ($P<0.01$),各给药组大鼠肾组织纤维化评分较模型组均显著降低 ($P<0.01$)。见表 4。

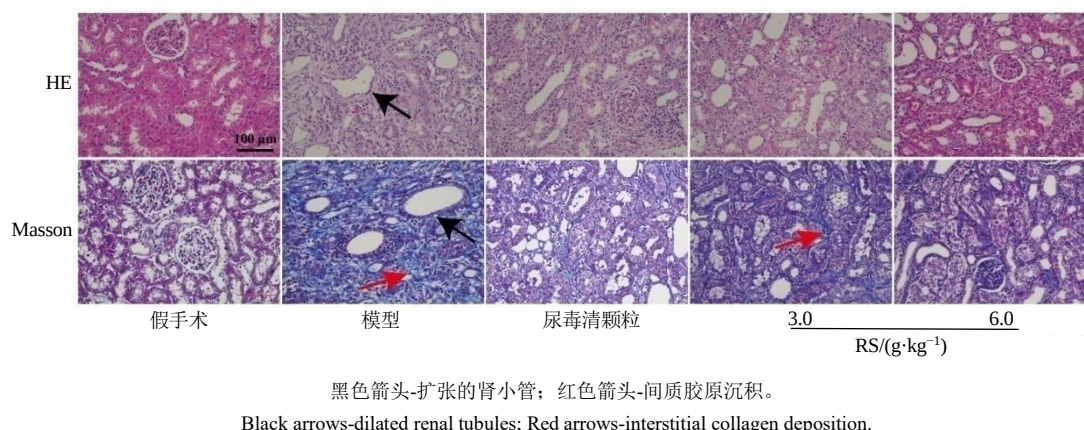


图 1 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织形态学及纤维化的影响 (×200)

Fig. 1 Effects of RS on morphological changes and fibrosis of renal tissues in rat models of renal interstitial fibrosis (×200)

表 4 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织纤维化评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of RS on fibrosis score of renal tissue in rat models of renal interstitial fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	纤维化评分
假手术	—	0
模型	—	2.8±0.4**
尿毒清颗粒	2.5	1.5±0.5 ^{##}
RS	3.0	1.9±0.7 ^{##}
	6.0	1.6±0.5 ^{##}

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs sham-operation group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group.

表 5 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织 *TNC*、*EGFR* 和 *STAT3* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 5 Influence of RS on mRNA expression of *TNC*, *EGFR* and *STAT3* in renal tissues of rats with renal interstitial fibrosis model ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>TNC</i> /β-actin	<i>EGFR</i> /β-actin	<i>STAT3</i> /β-actin
假手术	—	1.00±0.00	1.00±0.00	1.0±0.0
模型	—	14.02±3.03**	33.26±18.69**	9.5±1.2**
尿毒清颗粒	2.5	4.86±3.43 ^{##}	10.41±3.14 [#]	2.8±0.3 ^{##}
RS	3.0	7.79±1.76 [#]	11.05±4.21 [#]	4.3±1.3 ^{##}
	6.0	3.40±0.39 ^{##}	5.95±3.23 ^{##}	3.9±0.8 ^{##}

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs sham-operation group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group.

白表达明显升高 ($P<0.01$); 与模型组相比,尿毒清颗粒组及 RS 低、高剂量组大鼠肾组织中 *TNC*、*EGFR* 和 p-*STAT3* 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。与 *TNC* 蛋白表达下调的结果相一致,其

3.4 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织中 *TNC*、*EGFR* 和 *STAT3* mRNA 表达的影响

与假手术组相比,模型组大鼠肾组织中 *TNC*、*EGFR* 和 *STAT3* mRNA 表达明显上调 ($P<0.01$); 与模型组相比,尿毒清颗粒组及 RS 低、高剂量组大鼠肾组织中 *TNC*、*EGFR* 和 *STAT3* mRNA 表达显著下调 ($P<0.05$ 、 0.01)。见表 5。

3.5 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织中 *TNC*、*EGFR*、p-*STAT3* 和 *STAT3* 蛋白表达的影响

结果如图 2、表 6 所示。与假手术组相比,模型组大鼠肾组织中 *TNC*、*EGFR* 和 p-*STAT3* 蛋

下游信号分子 *EGFR* 蛋白水平也显著降低,*EGFR* 的抑制进一步导致了其关键下游转录因子 *STAT3* 磷酸化水平下降,提示整个信号通路能够被 RS 阻断。

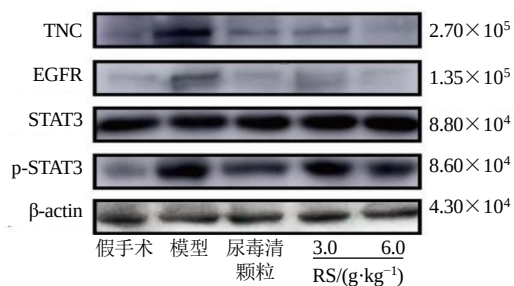


图 2 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织中 TNC、EGFR、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of RS on protein expressions of TNC, EGFR, p-STAT3 and STAT3 in renal tissues of rats with renal interstitial fibrosis model

3.6 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织 TNC、EGFR 和 p-STAT3 蛋白阳性表达的影响(免疫组化)

与假手术组相比,模型组大鼠肾组织中 TNC、EGFR 和 p-STAT3 蛋白阳性表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,尿毒清颗粒组及 RS 低、高剂量组大鼠肾组织中 TNC、EGFR 和 p-STAT3 蛋白

表达明显降低 ($P < 0.01$)。见图 3、表 7。

3.7 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织中 *TGF-β*、*FN* 和 *α-SMA* mRNA 表达的影响

与假手术组相比,模型组大鼠肾组织中 *TGF-β*、*FN* 和 *α-SMA* mRNA 表达明显上调 ($P < 0.01$);与模型组比较,尿毒清颗粒组及 RS 低、高剂量组大鼠肾组织中 *TGF-β*、*FN* 和 *α-SMA* mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见表 8。

3.8 RS 含药血清对 HK-2 细胞 *TNC*、*EGFR* 和 *STAT3* mRNA 表达的影响

与对照组相比,模型组细胞 *TNC*、*EGFR* 和 *STAT3* mRNA 水平明显升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,RS 组 *TNC*、*EGFR* 和 *STAT3* mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与 NC-OE 组相比,*TNC*-OE 组细胞 *TNC*、*EGFR* 和 *STAT3* mRNA 水平明显升高 ($P < 0.01$);与 *TNC*-OE 组相比,*TNC*-OE+RS 组细胞 *TNC*、*EGFR* 和 *STAT3* mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$)。见表 9。

表 6 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织中 TNC、EGFR、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effects of RS on protein expressions of TNC, EGFR, p-STAT3 and STAT3 in renal tissues of rats with renal interstitial fibrosis model ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNC/β-actin	EGFR/β-actin	STAT3/β-actin	p-STAT3/β-actin
假手术	—	0.46 ± 0.05	0.35 ± 0.05	1.22 ± 0.09	0.43 ± 0.06
模型	—	1.62 ± 0.07**	1.45 ± 0.23**	1.19 ± 0.07	1.61 ± 0.09**
尿毒清颗粒	2.5	0.49 ± 0.07###	0.55 ± 0.07###	1.14 ± 0.07	0.61 ± 0.08###
RS	3.0	0.62 ± 0.06###	0.88 ± 0.07###	1.30 ± 0.03	0.79 ± 0.12###
	6.0	0.57 ± 0.05###	0.42 ± 0.07###	1.29 ± 0.09	0.58 ± 0.09###

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ### $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs sham-operation group; ### $P < 0.01$ vs model group.

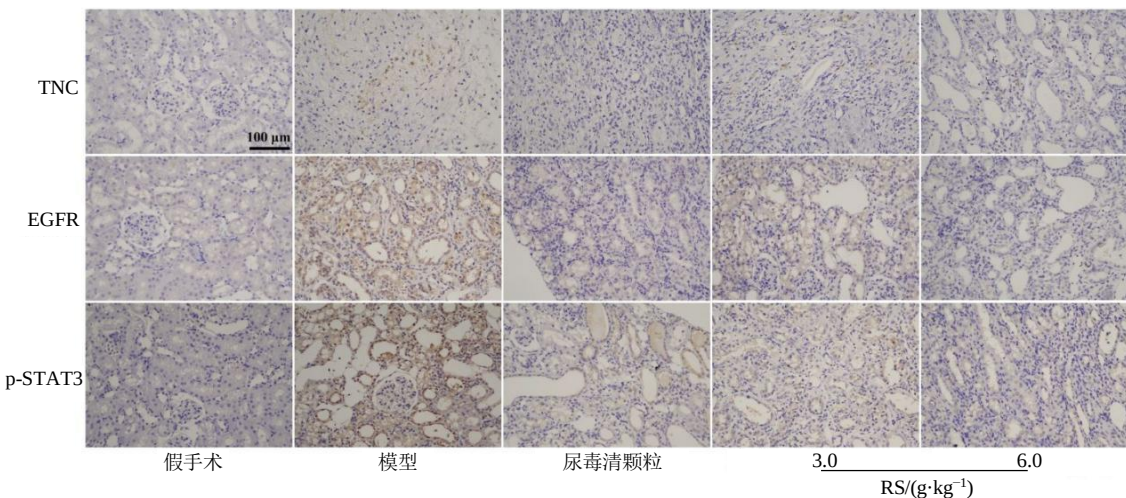


图 3 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织 TNC、EGFR 和 p-STAT3 蛋白阳性表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 3 Influence of RS on positive expression of TNC, EGFR and p-STAT3 proteins in renal tissues of rats with renal interstitial fibrosis model (immunohistochemistry, ×200)

表 7 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织 TNC、EGFR 和 p-STAT3 蛋白阳性表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 7 Influence of RS on positive expression levels of TNC, EGFR and p-STAT3 proteins in renal tissues of rats with renal interstitial fibrosis model ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNC/β-actin	EGFR/β-actin	p-STAT3/β-actin
假手术	—	0	0	0
模型	—	23.0±1.4**	24.1±2.1**	29.1±2.4**
尿毒清颗粒	2.5	8.7±1.2 ^{##}	9.1±1.1 ^{##}	10.7±1.6 ^{##}
RS	3.0	13.7±1.3 ^{##}	14.2±1.8 ^{##}	18.6±1.7 ^{##}
	6.0	10.9±1.1 ^{##}	11.2±1.8 ^{##}	13.8±1.6 ^{##}

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs sham-operation group; ^{##} $P<0.01$ vs model group.

表 8 RS 对肾间质纤维化模型大鼠肾组织 TGF-β、FN 和 α-SMA mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 8 Effect of RS on expression of TGF-β、FN and α-SMA mRNA in renal tissue of UUO rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TGF-β/β-actin	FN/β-actin	α-SMA/β-actin
假手术	—	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
模型	—	12.8±1.9**	11.9±2.6**	11.9±4.8**
尿毒清颗粒	2.5	2.9±1.3 ^{##}	5.5±1.5 ^{##}	3.6±0.5 ^{##}
RS	3.0	7.5±2.5 [#]	6.6±1.3 ^{##}	6.7±2.1 ^{##}
	6.0	4.0±1.2 ^{##}	4.9±1.0 ^{##}	4.3±1.7 ^{##}

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs sham-operation group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group.

表 9 RS 含药血清对 HK-2 细胞 TNC、EGFR 和 STAT3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 9 Effect of RS-containing serum on expression of TNC, EGFR and STAT3 mRNA in HK-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	TNC/β-actin	EGFR/β-actin	STAT3/β-actin
对照	1.0±0	1.0±0	1.0±0
模型	519.2±77.8**	14.3±2.9**	8.8±0.6**
RS	132.3±21.6 ^{##}	8.0±0.8 [#]	2.6±0.7 ^{##}
NC-OE	1.0±0	1.0±0	1.0±0
TNC-OE	439.4±66.8 ^{▲▲}	13.2±1.6 ^{▲▲}	8.1±1.2 ^{▲▲}
TNC-OE+RS	33.3±5.9 ^{△△}	5.0±0.3 ^{△△}	2.4±0.3 ^{△△}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与 NC-OE 组比较: ^{▲▲} $P<0.01$, 与 TNC-OE 比较: ^{△△} $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; ^{▲▲} $P<0.01$ vs NC-OE group; ^{△△} $P<0.01$ vs TNC-OE group.

3.9 RS 含药血清对 HK-2 细胞 TNC、EGFR、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组细胞 TNC、EGFR 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, RS 组细胞 TNC、EGFR 和 p-STAT3 蛋白表达

水平显著降低 ($P<0.01$)。与 NC-OE 组相比, TNC-OE 组细胞 TNC、EGFR 和 p-STAT3 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$); 与 TNC-OE 组相比, TNC-OE+RS 组细胞 TNC、EGFR 和 p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)。见图 4、表 10。

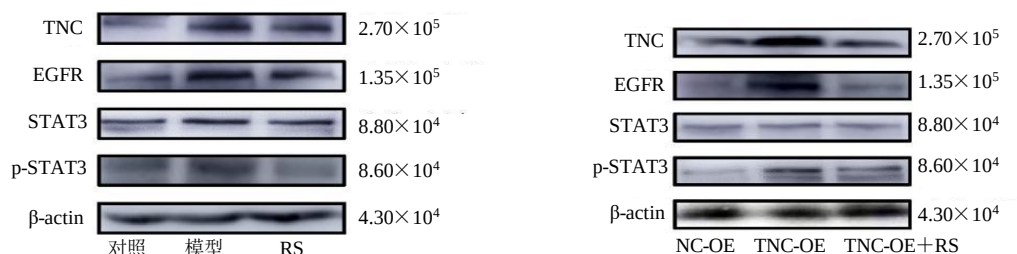


图 4 RS 含药血清对 HK-2 细胞 TNC、EGFR、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of RS-containing serum on protein expressions of TNC, EGFR, p-STAT3 and STAT3 in HK-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 10 RS 含药血清对 HK-2 细胞 TNC、EGFR、p-STAT3 和 STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 10 Effect of RS-containing serum on protein expressions of TNC, EGFR, p-STAT3 and STAT3 in HK-2 cells
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNC/ β -actin	EGFR/ β -actin	STAT3/ β -actin	p-STAT3/ β -actin
对照	0.64 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.04	0.390 $\pm$ 0.050	0.57 $\pm$ 0.03
模型	1.19 $\pm$ 0.04**	1.39 $\pm$ 0.05**	0.360 $\pm$ 0.030	1.17 $\pm$ 0.03**
RS	0.80 $\pm$ 0.03##	0.64 $\pm$ 0.02##	0.380 $\pm$ 0.010	0.72 $\pm$ 0.09##
NC-OE	0.33 $\pm$ 0.10	0.33 $\pm$ 0.05	0.391 $\pm$ 0.018	0.26 $\pm$ 0.06##
TNC-OE	1.08 $\pm$ 0.10 $\blacktriangle\blacktriangle$	1.02 $\pm$ 0.09 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.375 $\pm$ 0.024	1.17 $\pm$ 0.10 $\blacktriangle\blacktriangle$
TNC-OE+RS	0.45 $\pm$ 0.08 $\triangle\triangle$	0.53 $\pm$ 0.07 $\triangle\triangle$	0.340 $\pm$ 0.009	0.40 $\pm$ 0.08 $\triangle\triangle$

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ## $P<0.01$; 与 NC-OE 组比较: $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$, 与 TNC-OE 比较: $\triangle\triangle P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs model group; $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ vs NC-OE group, $\triangle\triangle P<0.01$ vs TNC-OE group.

4 讨论

肾纤维化是一个渐进的过程。目前的研究表明,肾纤维化并非均匀分布于整个肾实质,而是始于局部的肾组织损伤。肾损伤后,不同种类的肾细胞如成纤维细胞、小管上皮细胞和浸润的巨噬细胞受到刺激产生 ECM 及其相关蛋白,这些成分在局部积累形成一个复杂的三维基质网络,即“纤维化生态位”^[12-13]。纤维化生态位是肾纤维化的起始和维持的核心区域,特定细胞产生的 ECM 将影响临近其他细胞活动,包括细胞增殖、分化、迁移、衰老和凋亡,从而介导纤维化生态位的维持与增强,推动肾纤维化的持续进展^[14]。因此,ECM 蛋白作为纤维化生态位的锚点,在肾纤维化的发生和发展中发挥核心作用。

TNC 是肾损伤后最早响应的 ECM 蛋白之一,与其他 ECM 蛋白相比,TNC 在纤维化起始阶段具有更高的表达特异性和更强的促纤维化能力^[15]。TNC 的高表达可以促进细胞与 ECM 之间的相互作用,诱导肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化,并促进肾成纤维化细胞的增殖与活化^[16]。选择 TNC 作为起始靶点,能够将研究视角从静态的 ECM 堆积转向动态的 ECM-细胞信号对话;且在肾纤维化领域,TNC 作为中药干预靶点的研究尚不充分。本研究采用 ELISA 法检测了各组大鼠血清及尿液中 TNC 的水平,结果发现 RS 能够显著降低肾间质纤维化模型大鼠血清及尿液中 TNC 的含量;课题组进一步对肾间质纤维化模型大鼠肾组织和 TGF- β 诱导的 HK-2 细胞中 TNC 基因及蛋白表达情况进行检测,实验表明 RS 能够明显降低肾纤维化组织及细胞中 TNC mRNA 及蛋白的表达水平。上述结果均证实本研究选择 TNC 作为起始关键靶点的合

理性。

本研究以 TNC 为起始靶点,构建了一条从细胞外到细胞核的连贯信号通路。TNC/EGFR/STAT3 通路是一条从 ECM 到细胞膜受体,再到细胞核转录因子的、逻辑连贯的促纤维化信号放大器。研究表明,TNC 通过其表皮生长因子样结构域可直接结合并激活 EGFR,这是不依赖配体的持续性激活^[7,17]。活化的 EGFR 可以激活下游的 STAT3 信号通路(EGFR 下游的一条经典通路)^[18-19],导致 STAT3 磷酸化并转位入核。在中药抗纤维化研究的整体背景下,本研究旨在验证 TNC/EGFR/STAT3 通路的存在及其药理学意义。研究采用 qRT-PCR、Western blotting 及免疫组化等实验技术,首先明确了 TNC/EGFR/STAT3 信号通路在肾纤维化进程中的激活状态。进一步研究发现,经 RS 干预后,无论是肾间质纤维化大鼠体内模型,还是体外细胞模型,TNC、EGFR 及 p-STAT3 的表达变化趋势高度一致,这一共变关系强烈提示三者可能处于同一信号级联通路中,为后续机制探索奠定基础。

为初步验证 RS 抗肾纤维化作用与 TNC/EGFR/STAT3 信号通路的因果关系,本研究构建 TNC 过表达质粒并转染至 HK-2 细胞。结果显示,TNC 过表达可显著上调细胞中 EGFR 及 p-STAT3 的表达水平;而给予 RS 含药血清干预后,由 TNC 过表达引起的 TNC、EGFR 及 p-STAT3 表达异常上调被显著逆转,由此初步证实:RS 可能通过抑制 TNC 的表达,进而阻断其下游纤维化相关信号通路的激活,发挥抗肾纤维化作用。

此外,作为 STAT3 信号通路的活化形式,p-STAT3 入核后可直接调控多种肾纤维化相关基因的转录,这些基因主要涉及促纤维化因子、ECM 成分

及肌成纤维细胞活化标志物等^[20-22]。例如, TGF- β 是肾纤维化的核心驱动因子, 可促进肌成纤维细胞转分化及 ECM 沉积, 而 p-STAT3 可直接结合至 TGF- β 基因启动子区, 激活其转录^[23]; FN 是 ECM 的主要组成成分, 其过度沉积是肾小球硬化与肾间质纤维化的重要病理特征, p-STAT3 可直接促进 FN 基因的转录^[24]; α -SMA 是肌成纤维细胞的核心标志物, 肌成纤维细胞的异常活化可大量分泌 ECM 并驱动纤维化进程, 而 p-STAT3 同样可直接激活 α -SMA 基因启动子, 促进肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转分化^[25]。本实验结果显示, RS 干预可显著下调肾组织中 TGF- β 、FN 及 α -SMA 的 mRNA 表达水平, 这一结果进一步佐证了 RS 对 STAT3 下游纤维化相关通路的调控作用, 完善了 RS 抗肾纤维化的作用机制链条。

综上所述, 本研究证实了 RS 在治疗肾纤维化方面的有效性, 并通过体内外模型初步揭示了其通过调控 TNC/EGFR/STAT3 信号通路发挥作用的机制, 为 RS 在肾纤维化治疗中的应用提供了新的理论依据, 也为肾纤维化的治疗提供了新的研究方向。但是, RS 成分复杂, 本研究未明确具体是哪些活性成分发挥主要作用, 后续需要进一步分离和鉴定有效成分, 并研究其具体作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Abbad L, Esteve E, Chatziantoniou C. Advances and challenges in kidney fibrosis therapeutics [J]. Nat Rev Nephrol, 2025, 21(5): 314-329.
- [2] Zhang X X, Xie Y Z, Cai Y, et al. RNA-seq analysis and in vivo experiments identified the protective effect of kaempferol on idiopathic pulmonary fibrosis by regulating the PPARG/TNC signaling pathway to reduce ECM deposition [J]. Food Funct, 2024, 15(24): 12193-12209.
- [3] Altinbas A, Holmes J A, Salloum S, et al. LOXL-2 and TNC-C are markers of liver fibrogenesis in HCV/HIV-, HIV- and HCV-infected patients [J]. Biomark Med, 2022, 16(11): 839-846.
- [4] Imanaka-Yoshida K, Tawara I, Yoshida T. Tenascin-C in cardiac disease: A sophisticated controller of inflammation, repair, and fibrosis [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2020, 319(5): C781-C796.
- [5] Sun L Q, Liu L S, Jiang J J, et al. Transcription factor Twist1 drives fibroblast activation to promote kidney fibrosis via signaling proteins Prx1/TNC [J]. Kidney Int, 2024, 106(5): 840-855.
- [6] Abedsaeidi M, Hojjati F, Tavassoli A, et al. Biology of tenascin C and its role in physiology and pathology [J]. Curr Med Chem, 2024, 31(19): 2706-2731.
- [7] Zhang H, Zhou L, Wang H H, et al. Tenascin-C-EGFR activation induces functional human satellite cell proliferation and promotes wound-healing of skeletal muscles via oleanic acid [J]. Dev Biol, 2023, 504: 86-97.
- [8] Wei P Y, Lin D X, Zhang M Y, et al. Cryptotanshinone modulates proliferation, apoptosis, and fibrosis through inhibiting AR and EGFR/STAT3 axis to ameliorate benign prostatic hyperplasia progression [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 938: 175434.
- [9] 张婧, 王景红, 张冰, 等. 基于数据挖掘的某院中药治疗慢性肾脏病的用药规律和用药安全性分析 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2025, 25(2): 148-152.
Zhang J, Wang J H, Zhang B, et al. Medication rules and safety of traditional Chinese medicine in the treatment of chronic kidney disease in a hospital based on data mining [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China, 2025, 25(2): 148-152.
- [10] 王宏, 江茜, 康利, 等. 大黄-丹参药对对慢性肾衰竭大鼠结肠黏液屏障功能的影响 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(4): 746-753.
Wang H, Jiang Q, Kang L, et al. Effects of *Rheum palmatum-Salvia miltiorrhiza* drug pairs on colonic mucus barrier function in chronic renal failure rats [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(4): 746-753.
- [11] 毕慧欣, 刘瑞洪, 刘虹, 等. 热休克蛋白 47 在单侧输尿管梗阻大鼠肾小管间质中的表达变化 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(20): 32-38.
Bi H X, Liu R H, Liu H, et al. Expression of HSP47 in kidneys of rats with unilateral ureteral obstruction [J]. China J Mod Med, 2015, 25(20): 32-38.
- [12] Li L, Fu H Y, Liu Y H. The fibrogenic niche in kidney fibrosis: Components and mechanisms [J]. Nat Rev Nephrol, 2022, 18(9): 545-557.
- [13] 张明慧, 冀蒙, 高静东, 等. 中药多糖抗纤维化作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(4): 1063-1074.
Zhang M H, Ji M, Gao J D, et al. Research progress on anti-fibrotic effects of polysaccharides from traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(4): 1063-1074.
- [14] He M Z, Liu Z, Li L, et al. Cell-cell communication in kidney fibrosis [J]. Nephrol Dial Transplant, 2024, 39(5): 761-769.
- [15] Korenić M, Korenić A, Stamenković V, et al. The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C supports the

- enriched environment-stimulated neurogenesis in the adult dentate gyrus of mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2025, 776: 152232.
- [16] Bhattacharyya S, Midwood K S, Varga J. Tenascin-C in fibrosis in multiple organs: Translational implications [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2022, 128: 130-136.
- [17] Zhou S A, Zhang W, Cai G H, et al. Myofiber necroptosis promotes muscle stem cell proliferation via releasing Tenascin-C during regeneration [J]. *Cell Res*, 2020, 30(12): 1063-1077.
- [18] Bi J, Wu Z H, Zhang X, et al. TMEM25 inhibits monomeric EGFR-mediated STAT3 activation in basal state to suppress triple-negative breast cancer progression [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2342.
- [19] Zhong Z, Zhong H. KIF22 promotes the proliferation and glycolysis of melanoma by activating EGFR/STAT3 signaling [J]. *Clinics*, 2023, 78: 100307.
- [20] Du C Y, Zhu Y, Duan J L, et al. A-485 alleviates fibrosis and apoptosis in kidney by disrupting tandem activation of acetylation and phosphorylation on STAT3 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2025, 188: 118217.
- [21] Yang X Y, Jiang D, Wang Y Z, et al. Chlorogenic acid alleviates renal fibrosis by reducing lipid accumulation in diabetic kidney disease through suppressing the Notch1 and STAT3 signaling pathway [J]. *Ren Fail*, 2024, 46(2): 2371988.
- [22] Dong Z H, Sun X. Chemical components in cultivated *Cordyceps sinensis* and their effects on fibrosis [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 16(1): 162-167.
- [23] 唐婵, 欧剑波, 农晓琳. 青蒿琥酯通过抑制 STAT3/TGF- β 1 信号通路改善大鼠头颈放射性皮肤纤维化的实验研究 [J]. *广西医科大学学报*, 2025, 42(2): 226-232.
- Tang C, Ou J B, Nong X L. Experimental study of artesunate ameliorating head-and-neck radiation-induced skin fibrosis in rats through inhibiting STAT3/TGF- β 1 signaling pathway [J]. *J Guangxi Med Univ*, 2025, 42(2): 226-232.
- [24] 李慧凇, 吴萍, 刘爽, 等. 可溶性 Klotho 蛋白抑制高糖诱导的 STAT3 磷酸化通路减轻肾纤维化 [J]. *诊断学理论与实践*, 2017, 16(4): 371-376.
- Li H L, Wu P, Liu S, et al. Soluble Klotho attenuates high glucose-induced renal fibrosis through inhibiting STAT3 pathway [J]. *J Diagn Concepts Pract*, 2017, 16(4): 371-376.
- [25] Hassan N M E, Shehatou G S G, Kenawy H I, et al. Dasatinib mitigates renal fibrosis in a rat model of UUO via inhibition of Src/STAT-3/NF- κ B signaling [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2021, 84: 103625.

[责任编辑 孙英杰]