

Wnt/ β -catenin 通路在糖尿病肾病大鼠的表达及化瘀通络中药的干预作用

白璐¹, 霍贝贝¹, 郭倩¹, 徐晶², 方敬², 张江华¹, 陈志强^{1*}

1. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017

2. 河北中医学院, 河北 石家庄 050020

摘要: 目的 探讨 Wnt/ β -catenin 通路在糖尿病肾病 (DN) 大鼠肾脏的表达及化瘀通络中药对其的干预作用。方法 60 只大鼠中选取 10 只为对照组, 其余大鼠给予高糖高脂饲料喂养联合 ip 小剂量链脲佐菌素 (STZ) 制备 DN 模型。成模大鼠随机分为模型组、厄贝沙坦组、化瘀通络中药组, 各组 ig 给药, 20 周末检测 24 h 尿蛋白定量, RT-PCR 法检测 Wnt4、 β -catenin mRNA 表达, 免疫组化及 Western blotting 法检测 Wnt4、 β -catenin 蛋白的表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量及 Wnt4、 β -catenin mRNA 和蛋白的表达量明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 中药组及厄贝沙坦组 24 h 尿蛋白定量及 Wnt4、 β -catenin mRNA 和蛋白的表达量明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 化瘀通络中药可减少 DN 大鼠尿蛋白, 且能够抑制大鼠肾脏存在的 Wnt/ β -catenin 通路高表达, 该作用可能是其减少蛋白尿排泄的主要途径之一。

关键词: 糖尿病肾病; 化瘀通络中药; 蛋白尿; Wnt/ β -catenin 通路; 足细胞损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)05-0946-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.018

Expression of Wnt/ β -catenin pathway in diabetic nephropathy rats and intervention effect of Chinese materia medica for dispersing blood stasis and dredging collaterals

BAI Lu¹, HUO Bei-bei¹, GUO Qian¹, XU Jing², FANG Jing², ZHANG Jiang-hua¹, CHEN Zhi-qiang¹

1. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

2. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050020, China

Abstract: Objective To investigate the expression of Wnt/ β -catenin pathway in diabetic nephropathy (DN) rats and the intervention effect of Chinese materia medica (CMM) for dispersing blood stasis and dredging collateral. **Methods** Ten rats were selected as control group from 60 rats, the remaining rats were established as DN models by feeding high glucose and high fat diet combined with low-dose streptozotocin ip injection. Model rats were randomly divided into model group, irbesartan treatment group, and CMM group. The rats in each group were ig administered with corresponding drug, at the end of the 20th week, the 24 h urinary total protein was detected. The expression levels of Wnt4 and β -catenin mRNA and protein in renal tissue were detected. **Results** Compared with control group, the 24 h urinary total protein, expression of Wnt4, β -catenin mRNA, and protein significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with model group, 24 h urinary total protein, the expression of Wnt4, β -catenin mRNA, and protein decreased significantly in irbesartan group and CMM group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** CMM for dispersing blood stasis and dredging collateral might decrease proteinuria in DN rats. It can also inhibit the high expression of Wnt/ β -catenin pathway in the kidney of diabetic nephropathy rats. The effect might be one of the main ways to reduce urinary protein excretion.

Key words: diabetic nephropathy; Chinese materia medica for dispersing blood stasis and dredging collateral; proteinuria; Wnt/ β -catenin pathway; podocyte injury

持续蛋白尿是糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 的主要临床表现, 足细胞损伤、裂孔膜蛋白的丢失是形成蛋白尿的重要原因^[1-2], 有研究报道 DN 异常激活的 Wnt/ β -catenin 通路介导了足细胞损伤所

造成的 nephrin 等裂孔膜蛋白表达的减少、肾小球系膜细胞的增殖及肾间质的纤维化, 从而造成蛋白尿持续进行性增多, 阻断该通路的表达则能减轻足细胞损伤^[3-5]。本课题组通过前期研究证实基于 DN

收稿日期: 2016-11-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373804, 81173419)

作者简介: 白璐 (1987—), 男, 在读博士, 研究方向为中西医结合治疗肾脏病。Tel: 15303312600 E-mail: bailu2011@126.com

*通信作者 陈志强 (1962—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中西医结合治疗肾脏病。Tel: (0311)69095003 E-mail: chenzhiqiang2011@163.com

瘀血阻络而进行治疗的化瘀通络中药能够减少裂孔膜 nephrin、podocin、CD2AP 等蛋白的丢失,保护足细胞,减少蛋白尿的漏出^[6-8]。基于此,本实验制备 DN 大鼠模型,探索该大鼠模型肾脏是否存在 Wnt/ β -catenin 通路的异常表达,以及化瘀通络中药减轻足细胞损伤、减少蛋白尿的作用靶点是否与 Wnt/ β -catenin 通路有关。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 60 只,体质量(100±20) g,购自河北医科大学实验动物中心,动物许可证号 SCXK(冀)2013-1-003。

1.2 药物

化瘀通络中药颗粒剂:丹参(1.8 g/袋,相当于饮片 10 g,批号 501306T)、川芎(1.3 g/袋,相当于饮片 6 g,批号 412272T)、水蛭(1.5 g/袋,相当于饮片 3 g,批号 408245T)、地龙(1.0 g/袋,相当于饮片 10 g,批号 501153T)、全蝎(1.0 g/袋,相当于饮片 3 g,批号 412299T),广东一方制药有限公司生产;厄贝沙坦片(0.15 g/片,批号 4A293),赛诺菲(杭州)制药有限公司生产。

1.3 试剂

链脲佐菌素(STZ,美国 Enzo Life Sciences,批号 04081408);TRIzol Reagent(Life technologies 公司);FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒(北京天根生化科技有限公司);Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG(美国 Invitrogen 公司);引物(上海生工生物工程有限公司);BCA 蛋白质定量试剂盒(北京天根生化科技有限公司);兔免疫组化试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司);兔多克隆抗体 Wnt4(Gene Tex 公司);兔单克隆抗体 β -catenin(Abcam 公司)。

1.4 仪器

NanoDrop2000C 紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);Eco 实时定量 PCR 仪(美国 Illumina 公司);BX63+DP72 正置研究级显微镜(日本 OLYMPUS 株式会社);Odyssey 红外激光扫描仪(美国 LI-COR 公司)。

2 方法

2.1 模型制备与分组

60 只大鼠适应性喂养 1 周,按随机数字法选 10 只作为对照组给予普通饲料饲养,余 50 只大鼠予高糖高脂饲料喂养联合小剂量 STZ 复制 DN 模型^[9]。

高糖高脂喂养 6 周后大鼠禁食不禁水 12 h,按 35 mg/kg 一次性 ip 1% STZ 溶液,72 h 后尾静脉采血测血糖,血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为造模成功^[10]。造模过程中 3 只大鼠死亡,2 只大鼠血糖 < 16.7 mmol/L,予以剔除。将 45 只成模大鼠随机分为模型组 15 只、厄贝沙坦组 15 只、中药组 15 只。

2.2 给药方法

大鼠造模成功后即给予相应药物干预,根据药物成人临床使用剂量及人与大鼠体表面积法计算药物大鼠 ig 给药剂量^[11]。中药按照人用药的配伍比例配制药物混悬液,化瘀通络中药颗粒剂混合物(颗粒中丹参、川芎、地龙、水蛭、全蝎质量比为 27:26:10:30:20,剂量分别为 1.41、1.12、0.94、0.56、0.56 g/kg)给药剂量为 4.59 g/(kg·d),厄贝沙坦组给药剂量为 14.12 mg/(kg·d),对照组及模型组大鼠予以相应体积的纯净水,每日 1 次,连续给药 20 周。

2.3 观察指标及测定

2.3.1 大鼠死亡情况 观察实验期间大鼠的死亡情况。

2.3.2 24 h 尿蛋白定量检测 给药 20 周末,代谢笼留取各组大鼠 24 h 尿液,3 500 r/min,离心 10 min 后取上清,采用终点法检测尿蛋白浓度,乘以尿量得出 24 h 尿蛋白定量数据。

2.3.3 肾脏 Wnt4、 β -catenin mRNA 的表达 采用 Real-time PCR 法检测,TRIzol Reagent 提取肾皮质总 RNA,按 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒操作将 RNA 反转录为 cDNA。采用 Primer 5.0 软件设计引物,序列如下: β -actin 上游引物 5'-ACCCGCGAGTACAACCTTCT-3',下游引物 5'-TTCAGGGTCAGGATGCCTCT-3',引物长度 266 bp;Wnt4 上游引物 5'-AGCCCACAGGGTTTCCA-3',下游引物 5'-GCTCGCCAGCATGTCTTT-3',引物长度 233 bp; β -catenin 上游引物:5'-AACGGCTTTTCGTTGAGCTG-3',下游引物:5'-TGGCGATATCCAAGGGCTTC-3',引物长度 147 bp。PCR 反应体系为 SYBR Green qPCR SuperMix 5 μ L,DEPC 水 2 μ L,上、下游引物(5 μ mol/L)各 1 μ L,cDNA 1 μ L。扩增条件为 UDG 孵育 50 $^{\circ}$ C,2 min;聚合酶活化 95 $^{\circ}$ C,10 min;95 $^{\circ}$ C,10 s;60 $^{\circ}$ C,30 s;40 个循环;熔解曲线形成条件为 95 $^{\circ}$ C,15 s;55 $^{\circ}$ C,15 s;95 $^{\circ}$ C,15 s。每个样本设 3 个复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算样本基因的相对表达量。

2.3.4 免疫组织化学法检测肾脏 Wnt4、 β -catenin 蛋白的表达 肾组织常规石蜡包埋、切片。采用 SP

法,切片脱蜡,抗原微波修复,3% H₂O₂ 清除内源性过氧化酶,山羊血清封闭,依次滴加一抗(Wnt4 1:50 稀释;β-catenin 1:100 稀释;4℃过夜),抗兔生物素化二抗、HRP 标记链亲和素后,显微镜下 DAB 显色、复染、封片。阳性结果呈棕黄或棕褐色,显微镜下×400 倍放大拍照,数据采用 Image-Pro Plus version 6.0 图像处理软件进行分析。每张切片取 10 个视野进行测量,选取视野内有染色调的区域并测量该区域的积分吸光度值(IOD),选择并测量有效染色区域的面积(area),以 IOD/area 来表示该蛋白的表达量。

2.3.5 Western blotting 法检测肾脏 Wnt4、β-catenin 蛋白的表达 RIPA 裂解液提取肾皮质蛋白,按 BCA 蛋白质定量试剂盒操作测定蛋白浓度。5×上样缓冲液稀释蛋白样品,干浴器中 100℃变性 5 min,上样量 Wnt4 为 100 μg、β-catenin 为 50 μg,4℃、100 V 电泳 2 h,转膜 1 h 后,5%脱脂奶粉封闭液中室温摇床封闭 1 h,加入 TBST 稀释的一抗(Wnt4 稀释比例 1:500;β-catenin 稀释比例 1:1 000),4℃摇床孵育 18 h。洗膜后避光加入稀释的荧光二抗(稀释比例 1:10 000),37℃摇床避光孵育 1 h 后洗膜,用红外激光扫描仪拍照并分析荧光条带的灰度值,以目的条带与 β-actin 灰度值的比值来表示蛋白表达量。

2.4 统计学方法

数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理,所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验;方差不齐采用秩和检验,组间比较采用 Mann-Whitney 法。

3 结果

3.1 各组大鼠死亡情况

干预 20 周内,模型组、厄贝沙坦组大鼠分别死亡 3 只,中药组大鼠死亡 2 只,模型组、厄贝沙坦组各有 1 只大鼠血糖缓解,中药组 2 只大鼠血糖缓解,予以剔除。

3.2 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量的比较

如表 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量明显增多($P<0.01$);与模型组比较,厄贝沙坦组、中药组大鼠 24 h 尿蛋白定量明显减少($P<0.01$);与厄贝沙坦组比较,中药组 24 h 尿蛋白定量明显减少($P<0.05$)。

3.3 各组大鼠肾脏 Wnt4、β-catenin mRNA 表达量的比较

如表 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠 Wnt4、

表 1 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 1 Comparison on 24 h UTP of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	24 h 尿蛋白定量/(mg·24·h ⁻¹)
对照	—	6.79 ± 1.38
模型	—	53.04 ± 5.94 ^{**}
厄贝沙坦	0.014 12	24.05 ± 2.28 ^{△△}
中药	4.59	20.65 ± 4.39 ^{△△#}

与对照组比较: ^{**} $P<0.01$, 与模型组比较: ^{△△} $P<0.01$, 与厄贝沙坦组比较: [#] $P<0.05$, 表 2 同

^{**} $P<0.01$ vs control group, ^{△△} $P<0.01$ vs model group, [#] $P<0.05$ vs irbesartan treatment group, same as Table 2

表 2 各组大鼠 Wnt4、β-catenin mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 2 Comparison on Wnt4 and β-catenin mRNA of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Wnt4	β-catenin
对照	—	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.08
模型	—	2.10 ± 0.38 ^{**}	1.56 ± 0.23 ^{**}
厄贝沙坦	0.014 12	0.96 ± 0.13 ^{△△}	0.74 ± 0.09 ^{△△}
中药	4.59	1.07 ± 0.21 ^{△△}	0.91 ± 0.07 ^{△△}

β-catenin 的 mRNA 表达均明显增多($P<0.01$);与模型组比较,厄贝沙坦组、中药组大鼠 Wnt4、β-catenin 的 mRNA 表达均明显减少($P<0.01$);厄贝沙坦组与中药组大鼠 2 种蛋白的 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.4 各组大鼠肾脏 Wnt4、β-catenin 蛋白表达量的比较

免疫组化结果显示:对照组大鼠 Wnt4 蛋白仅微弱表达于部分肾小管上皮细胞中,β-catenin 蛋白在部分肾小球、肾小管上皮细胞及远端小管有少量表达;模型组大鼠 Wnt4、β-catenin 蛋白在肾小球及肾小管均有表达,较对照组明显增多;厄贝沙坦组、中药组大鼠 Wnt4、β-catenin 蛋白表达量较模型组明显减少,且作用程度相当,结果见图 1、2。

Western blotting 结果显示:与对照组比较,模型组大鼠 Wnt4、β-catenin 蛋白的表达量均明显增多($P<0.01$);与模型组比较,厄贝沙坦组、中药组大鼠 Wnt4、β-catenin 蛋白的表达量均明显减少($P<0.05$ 、 $P<0.01$);与厄贝沙坦组比较,中药组 2 种蛋白的表达量差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3 和表 3。

4 讨论

糖尿病其病机重在气阴两虚,气虚无力运血,血行迟滞,滞而为瘀;阴虚燥热,热灼津伤,血稠

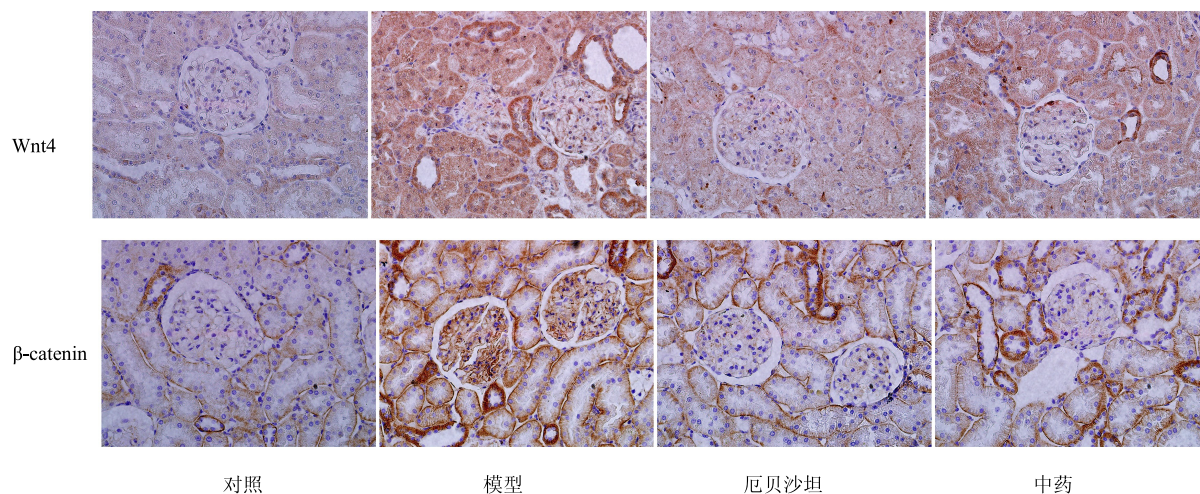
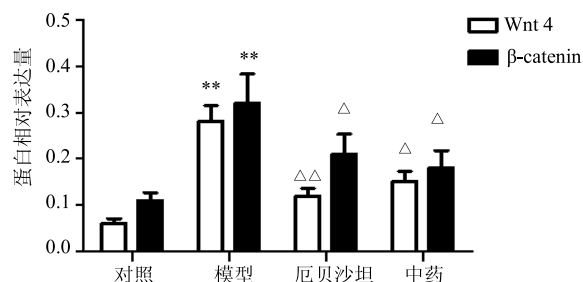


图 1 各组大鼠肾组织 Wnt4、β-catenin 蛋白表达 (免疫组化法)

Fig. 1 Protein expression of Wnt4 and β-catenin in renal tissue of rats in each group (immunohistochemical staining)



与对照组比较: ** $P < 0.01$, 与模型组比较: $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group, $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$ vs model group

图 2 各组大鼠肾组织 Wnt4、β-catenin 蛋白表达的比较 (免疫组化法, $\bar{x} \pm s, n = 11$)

Fig. 2 Comparison on Wnt4 and β-catenin protein expression in renal tissue of rats in each group (immunohistochemical staining, $\bar{x} \pm s, n = 11$)

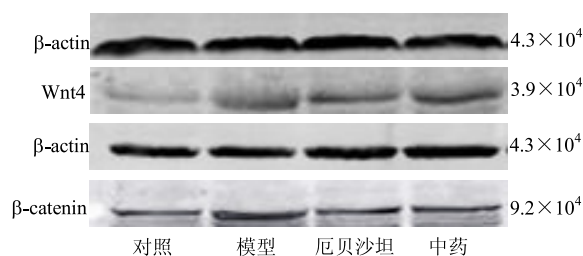


图 3 各组大鼠肾组织 Wnt4、β-catenin 蛋白表达 (Western blotting)

Fig. 3 Protein expression of Wnt4 and β-catenin in renal tissue of rats in each group (Western blotting)

黏滞, 久而致瘀; 病程日久, 肾络瘀阻, 引起肾小球毛细血管团结构及功能受损, 导致蛋白尿的漏出, 由此 DN 期, 病机重在瘀血阻络。鉴于瘀血阻络为

表 3 各组大鼠 Wnt4、β-catenin 蛋白表达量的比较 (Western blotting, $\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 3 Comparison on Wnt4 and β-catenin protein of rats in each group (Western blotting, $\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Wnt4	β-catenin
对照	—	0.054 ± 0.012	0.051 ± 0.021
模型	—	0.154 ± 0.055**	0.231 ± 0.143**
厄贝沙坦	0.014 12	0.098 ± 0.042 [△]	0.075 ± 0.037 ^{△△}
中药	4.59	0.077 ± 0.033 [△]	0.082 ± 0.046 ^{△△}

与对照组比较: ** $P < 0.01$, 与模型组比较: $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group, $\triangle P < 0.05$ $\triangle\triangle P < 0.01$ vs model group

贯穿 DN 全过程的主要病理改变^[12-13], 近年来在中医治疗 DN 的复方中, 化瘀通络中药已成为复方的重要组成部分和必用药。在临床上将化瘀通络中药置于复方中治疗 DN 患者可以明显改善患者症状, 减少尿蛋白排泄, 保护肾功能^[14]。但目前针对化瘀通络中药深入的基础研究并不多见, 鉴于此本课题组开展了化瘀通络中药干预 DN 的系列基础研究, 选取化瘀的丹参、川芎和通络的地龙、水蛭、全蝎, 意在祛逐肾络瘀血、改善肾脏微循环、延缓肾脏纤维化。前期研究证实化瘀通络中药可以通过抑制 DN 肾脏 RAS 系统的激活, 减少足细胞裂孔膜蛋白的丢失, 维持滤过屏障的完整性, 减少蛋白尿^[7-8,15]。

目前蛋白尿的发生机制尚未完全明确, 而足细胞损伤在蛋白尿发生过程中的作用受到广泛关注。研究报道 DN 时伴随足细胞 Wnt/β-catenin 通路的激活、Wnt 信号活化及 β-catenin 核易位表达的增加, 该机制参与了足细胞损伤的进展及蛋白尿的发生^[16-17]。在该

通路中 Wnt4 蛋白对肾小管的形成及肾脏纤维化导致的肾小球硬化及蛋白尿具有重要意义^[18]。

β -catenin 作为经典 Wnt 信号通路的核心蛋白,参与细胞代谢的增殖、分化和凋亡过程,具有介导细胞间黏附和参与基因表达的功能^[19]。动物实验证明 DN 时 Wnt 通路的激活导致下游因子 β -catenin 降解减少,在胞核及胞质中聚集增多,而异常升高的 β -catenin 可抑制 nephrin 的表达,诱导足细胞损伤,影响到细胞的分化、增殖、凋亡、迁移等功能^[20]。体外实验表明足细胞中 β -catenin 的减少,可使足细胞标记蛋白如 WT1 和 podocin 表达增强,可见该通路的激活影响到足细胞滤过屏障的完整性^[21]。基于此,本研究就 Wnt/ β -catenin 通路是否参与了 DN 病程的进展及化癥通络中药能否对该通路的激活产生干预作用进行探讨。

实验结果显示,模型组大鼠出现大量蛋白尿,肾脏出现明显损伤,Wnt/ β -catenin 通路在 DN 大鼠肾脏存在高表达,由此证明该通路的激活参与了 DN 大鼠病程的进展。通过对该通路中 Wnt4、 β -catenin 基因及蛋白水平的检测,可见化癥通络中药对该通路的过表达具有抑制作用。前期研究^[7-8,22-23]证实化癥通络中药可以通过上调足细胞裂孔膜蛋白 nephrin、podocin、CD2AP 及电荷屏障相关蛋白的表达,对足细胞起到保护作用,能够明显减少尿蛋白的排泄。由此推测化癥通络中药抑制 Wnt/ β -catenin 通路高表达的作用可能是该药物保护肾脏足细胞、减少蛋白尿排泄的主要途径之一。

参考文献

- [1] Long X J, Lin S, Zhang X, *et al.* Correlation between podocyte excretion and proteinuria in patients with diabetic nephropathy [J]. *J Med Coll PLA*, 2010, 25(3): 180-186.
- [2] Huby A C, Rastaldi M P, Caron K, *et al.* Restoration of podocyte structure and improvement of chronic renal disease in transgenic mice overexpressing renin [J]. *PLoS One*, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0006721.
- [3] Dai C, Stolz D B, Kiss L P, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(9): 1997-2008.
- [4] He W, Dai C, Li Y, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(4): 765-776.
- [5] Tan R J, Zhou D, Zhou L, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling and kidney fibrosis [J]. *Kidney Int Suppl*, 2014, 4(1): 84-90.
- [6] 徐 晶, 马二卫, 白 璐, 等. 糖尿病肾病大鼠模型瘀血阻络证的确认 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(1): 12-15.
- [7] 曹 晨, 郝世梦, 孟泽松, 等. 化癥通络中药对糖尿病肾病代谢指标及裂孔膜蛋白 nephrin 的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(6): 484-487.
- [8] 方 敬, 陈志强, 郭 倩, 等. 化癥通络中药对糖尿病肾病大鼠肾脏足细胞裂孔膜蛋白 podocin、CD2AP 的调节作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(7): 835-841.
- [9] Danda R S, Habiba N M, Rincon-Choles H, *et al.* Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes [J]. *Kidney Int*, 2005, 68(13): 2562-2571.
- [10] 李志杰, 张 悦. 糖尿病肾病动物模型的研究进展 [J]. 生命科学, 2011, 23(1): 90-95.
- [11] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [12] 胡筱娟, 秦 艳, 刘恬园, 等. 糖尿病肾病中医证型与肾络瘀阻相关性临床探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(1): 91-92.
- [13] 卞 镒, 李敬林, 董天宝. 从瘀论治糖尿病肾病 [J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(10): 1266-1267.
- [14] 王凤丽, 陈志强, 王月华, 等. 益气养阴消癥通络方治疗早期糖尿病肾病临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 35-38.
- [15] 徐 晶, 马二卫, 白 璐, 等. 化癥通络中药对糖尿病肾病大鼠肾皮质血管紧张素转化酶 2-血管紧张素 (1-7)-Mas 轴的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(6): 714-721.
- [16] Naves M A, Requião-Moura L R, Soares M F, *et al.* Podocyte Wnt/ β -catenin pathway is activated by integrin-linked kinase in clinical and experimental focal segmental glomerulosclerosis [J]. *J Nephrol*, 2012, 25(3): 401-409.
- [17] Kawakami T, Ren S, Duffield J S. Wnt signalling in kidney diseases: dual roles in renal injury and repair [J]. *J Pathol*, 2013, 229(2): 221-231.
- [18] Surendran K, Mc Caul S P, Simon T C. A role for Wnt-4 in renal fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 282(3): 431-441.
- [19] Chen J X, Yan H W, Ren D N, *et al.* LRP6 dimerization through its LDLR domain is required for robust canonical Wnt pathway activation [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(5): 1068-1074.
- [20] Mac Donald B T, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26.
- [21] Kato H, Gruenwald A, Suh J H, *et al.* Wnt/ β -catenin pathway in podocytes integrates cell adhesion, differentiation, and survival [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(29): 26003-26015.
- [22] 张江华, 陈志强, 赵雯红, 等. 益气养阴消癥通络中药对早期糖尿病肾病大鼠 24 h 尿蛋白及 nephrin、podocin 基因表达的相关性分析 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(10): 671-675.
- [23] 郭 倩, 张 肖, 刘利飞, 等. 化癥通络中药对糖尿病肾病大鼠肾小球电荷屏障的影响 [J]. 中医杂志, 2016, 57(8): 671-675.