

## 肾病 I 号方醋酸乙酯提取物对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响

木林洁<sup>1,2</sup>, 董飞侠<sup>1,2</sup>, 姜程曦<sup>2\*</sup>, 程锦国<sup>1,2\*</sup>

1. 浙江中医药大学附属温州市中医院, 浙江 温州 325000

2. 温州医科大学, 浙江 温州 325000

**摘要:** **目的** 探讨肾病 I 号方醋酸乙酯提取物 (ethyl acetate extract of Shenbingyihao Decoction, EASD) 对肾纤维化大鼠转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 表达的影响。**方法** 50 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、洛丁新 (洛丁新片 1.67 mg/kg) 组、肾病 I 号方 (生药 18.75 g/kg) 组、EASD (EASD, 300 mg/kg) 组, 除假手术组外, 其他各组采用单侧输尿管结扎的方法制备单侧输尿管梗阻 (UUO) 大鼠模型。各组 ig 给药 14 d 后处死大鼠, 采集血清, 检测尿素氮 (BUN) 和血肌酐 (Scr) 水平, 取肾组织行 HE 和 Masson 染色评价肾小管间质纤维化损伤程度, 采用免疫组织化学染色方法和实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 法检测 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 蛋白及 mRNA 的表达情况。**结果** 与假手术组比较, 模型组和 3 个给药组大鼠血清 Scr、BUN 升高 ( $P < 0.05$ ), 间质纤维化程度加重 ( $P < 0.05$ ), 肾组织 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 表达明显增多 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 3 个给药组大鼠的血清 Scr、BUN 下降 ( $P < 0.05$ ), 肾组织 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 表达下降 ( $P < 0.05$ )。**结论** 肾病 I 号方及 EASD 能够延缓肾纤维化的发生发展, 其作用机制可能是通过下调 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 的表达, 从而达到保护肾脏的作用。

**关键词:** 肾病 I 号方; 单侧输尿管结扎; 转化生长因子- $\beta_1$ ;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; 肾纤维化

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)07-1380-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.020

## Effect of ethyl acetate extract of Shenbing No. 1 Decoction on renal interstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction in rats

MU Lin-jie<sup>1,2</sup>, DONG Fei-xia<sup>1,2</sup>, JIANG Cheng-xi<sup>2</sup>, CHENG Jin-guo<sup>1,2</sup>

1. Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou 325000, China

2. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of ethyl acetate extract of Shenbing No. 1 Decoction (EASD) on the expression of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA in rats with renal fibrosis. **Methods** Totally 50 SD rats were randomly divided into Sham operation group, unilateral ureteral obstruction (UUO) model group, Lotensin treated group (1.67 mg/kg), Shenbing No. 1 Decoction group (18.75 g/kg) and EASD group (300 mg/kg). A rat model of renal fibrosis was induced by unilateral ureteral ligation. The rats were executed after 14 d. The contents of 24 h urinary protein (24hUP), serum blood urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (Scr) were tested. Renal tubular interstitial fibrosis was evaluated by HE staining and Masson staining. The protein expression levels of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA were observed by immunohistochemical method. Quantitative real-time PCR was adopted to inspect the mRNA expression of  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta_1$ . **Results** Compared with Sham-operation group, in rats of other groups, the serum levels of BUN and Scr increased ( $P < 0.05$ ), renal interstitial fibrosis degree increased, and protein expression levels of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA increased in the renal tissue ( $P < 0.05$ ). Compared with UUO model group, in rats of other groups, the serum levels of BUN and Scr decreased ( $P < 0.05$ ) and protein expression levels of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA decreased ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference among three treatment groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Shenbing No. 1 Decoction and EASD may ameliorate renal interstitial fibrosis by down-regulating the expression levels of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA.

**Key words:** Shenbing No. 1 Decoction; unilateral ureteral obstruction;  $\alpha$ -SMA; TGF- $\beta_1$ ; renal interstitial fibrosis

收稿日期: 2016-09-14

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY14H270001); 浙江省药学会重中之重一级学科开放基金 (YKFJ005); 2015 年温州市中医药建设资助项目 (温财社 [2015] 628 号)

作者简介: 木林洁 (1991—), 女, 浙江温州人, 硕士在读, 研究方向为中西医结合治疗肾病。Tel: 13758458157 E-mail: 1019319920@qq.com

\*通信作者 姜程曦, 研究员, 研究方向为中医药学及新药研发。E-mail: jiangchengxi@126.com

程锦国, 教授, 研究方向为中西医结合治疗肾病研究。Tel: 13857797188 E-mail: wsjcg@126.com

研究表明近年来我国慢性肾脏病患者率呈不断上升趋势<sup>[1]</sup>,慢性肾脏病是继心脑血管疾病、肿瘤、糖尿病之后又一个严重威胁人类健康的疾病。绝大部分慢性肾脏病发展至终末期的共同通路是肾纤维化<sup>[2]</sup>,因此探索寻找能够延缓肾纤维化的药物具有重要意义。肾病I号方是温州市中医院治疗慢性肾纤维化的经验方,由柴胡、黄芩、半夏、白芍、土茯苓、半枝莲、菝葜、漏芦等组成,能够调畅三焦枢机、祛除三焦邪浊,在临床治疗中取得良好疗效,前期研究已经证明肾病I号方具有抗肾纤维化的作用<sup>[3-4]</sup>。为进一步探讨肾病I号方抗肾纤维化作用机制及其药效学物质基础,本课题组用石油醚、正丁醇、醋酸乙酯萃取肾病I号方有效部位,发现肾病I号方醋酸乙酯提取物(ethyl acetate extract of Shenbingyihao Decoction, EASD)对肾纤维化具有较好的疗效,故本实验拟探讨EASD对单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)大鼠肾间质纤维化的影响,旨在为该复方治疗肾纤维化提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

健康雄性SD大鼠50只,普通级,体质量(180±20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号SCXK(沪)2012-0002。

### 1.2 药物

洛丁新(盐酸贝那普利片,北京诺华制药有限公司,批号12294563);肾病I号方(柴胡6g、黄芩12g、半夏12g、白芍30g、土茯苓30g、半枝莲30g、菝葜30g、漏芦30g)由浙江中医药大学附属温州市中医院中药房提供,并经主任药师朱雪梅鉴定,由该院制剂科按比例水煎浓缩后制成口服液100mL(相当于生药量1.875g/mL);EASD由肾病I号方原药材加5倍量水煎煮3次,每次1h,浓缩滤过,收集滤液,滤液用醋酸乙酯萃取3次,萃取液65℃旋蒸至结晶干燥,得到EASD(含总黄酮70%)。

### 1.3 试剂

抗 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)抗体(Abcam公司,编号ab5694);抗转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )抗体(Abcam公司,编号ab92486);一抗稀释液(北京索莱宝生物科技公司);pH 7.2~7.4磷酸盐缓冲液(北京索莱宝生物科技公司);浓缩型DAB显色试剂盒(北京中杉金桥公司);免疫组化一步法聚合物检测系统(PV6001,北京中杉金桥公司);苏

木精-伊红染色(HE)试剂盒(碧云天生物技术研究);Masson三色染色液(北京索莱宝生物科技公司);引物设计合成(上海生工生物工程有限公司);Trizol Reagent、逆转录酶、DTT(Invitrogen公司);TaqDNA聚合酶、DNaseI、dNTP(TaKaRa公司);SYBR I荧光染料(Bio-Rad公司)

## 1.4 仪器

DW-86L626超低温冰箱,海尔集团;BX51光学显微镜,日本Olympus公司;微量加样枪,德国Eppendorf公司;RM2235病理切片机,德国Leica公司;KD-TS3A组织脱水机,郑州南北仪器设备有限公司;AU5800全自动生化分析仪,美国Beckman Coulter公司;LightCycler480实时荧光定量PCR(RT-PCR)仪(瑞士Roche公司);蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司);TS-8型脱色摇床(上海琪特分析仪器有限公司);BiosenSC300凝胶图像分析系统(上海山富科学仪器有限公司提供)。

## 2 方法

### 2.1 UUO大鼠模型制备

50只SD大鼠适应性喂养1周后,按随机数字表法分为假手术组( $n=10$ )和造模组( $n=40$ )。造模组采用结扎单侧输尿管方法制备肾间质纤维化大鼠模型<sup>[5-6]</sup>:禁食不禁水12h,10%水合氯醛3.5mL/kg ip麻醉,常规术前准备,从背部距左侧脊肋角1.5cm处做一斜向切口,暴露左侧肾脏,寻找左侧输尿管并游离,于肾盂处和输尿管上1/3处双重结扎(不剪断),消毒后回纳肾脏并逐层缝合。假手术组开腹后只游离左侧输尿管不进行结扎。

### 2.2 分组及给药

40只造模大鼠随机分为模型组、洛丁新组、肾病I号方组、EASD组,每组10只。根据动物与人体剂量折算系数表计算给药剂量<sup>[7]</sup>,洛丁新组ig给予洛丁新1.67mg/(kg·d),肾病I号方组以相当于生药18.75g/(kg·d)ig给药,EASD组按提取物300mg/(kg·d)[相当于原方生药18.75g/(kg·d)]ig给药,模型组和假手术组ig等量生理盐水,造模后第2天开始给药,每天1次,连续14d。

### 2.3 观察指标及检测方法

**2.3.1 血、尿生化指标检测** 大鼠处死前禁食不禁水12h,将大鼠放在干净的代谢笼中收集24h尿液,采用双缩脲法测定24h尿蛋白定量。采用10%水合氯醛(3.5mL/kg)ip麻醉大鼠,固定大鼠后心脏取血3~5mL,3000r/min离心5min,取血清保存于-20℃

冰箱,通过全自动生化分析仪检测血肌酐(Scr)和血尿素氮(BUN),由温州市中医院检验科检测。

**2.3.2 肾脏组织常规染色** 处死大鼠时留取梗阻侧肾脏,去除包膜,于4%多聚甲醛溶液中固定24 h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,制成4.0 μm薄片,按常规方法行HE染色和Masson染色,光学显微镜下观察肾脏组织病理学改变。

**2.3.3 免疫组织化学法检测肾组织 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 的表达** 4.0 μm石蜡切片(制备同“2.3.2”项)于60℃烤箱烤片60 min;入二甲苯和梯度酒精常规脱蜡水化;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育30 min,以阻断内源性过氧化物酶活性;PBS冲洗5 min,3次;将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)的容器中置高压锅内煮沸10 min,自然冷却;PBS冲洗5 min,3次;10%正常山羊血清封闭液封闭30 min,分别滴加一抗(抗α-SMA 1:200、抗TGF-β<sub>1</sub> 1:100),4℃过夜;滴加二抗30 min;PBS冲洗5 min,3次;新鲜配制的DAB溶液显色,显微镜下控制染色时间;苏木素复染10 min;常规脱水、透明、封片。光学显微镜下观察,400倍视野下,每张切片随机选取5个非重叠的皮质区视野,采用Image Pro Plus 6.0软件测量每个视野下平均积分吸光度值(IOD),以IOD值反映组织切片中阳性物质的表达程度。

**2.3.4 RT-PCR 法检测肾组织 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA mRNA 表达** 提取肾组织总RNA后,用紫外分光光度计测各组样品RNA纯度,以20 μL为体系进行逆转录反应,采用RT-PCR仪,以25 μL为反应体系进行PCR扩增,内含25×SYBR Green I 荧光染料1.0 μL,上、下游引物各0.5 μL,双蒸水14.7 μL, cDNA 1.0 μL,每个样本设3个复孔。反应程序为95℃预变性90 s,退火5 s,58℃延伸30 s,共40个循环,每个循环结束后采集荧光信号。

## 2.4 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验,方差不齐时采用Dunnett T3检验。

## 3 结果

### 3.1 大鼠血、尿生化指标变化

与假手术组比较,模型组和3个给药组大鼠Scr和BUN均有上升,模型组上升更明显( $P < 0.05$ )。与模型组比较,3个给药组大鼠Scr和BUN明显降低( $P < 0.05$ )。肾病I号方组和EASD组大鼠Scr差异不明显( $P > 0.05$ ),但2组间BUN差异显著( $P < 0.05$ )。24 h尿蛋白定量各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表1。

表1 各组大鼠血清Scr、BUN、24 h尿蛋白定量结果( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Results of Scr, BUN, and 24 hUP in serum of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | Scr/(μmol·L <sup>-1</sup> ) | BUN/(mmol·L <sup>-1</sup> ) | 24 h 尿蛋白定量/(mg·L <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 假手术   | —                         | 18.01 ± 3.63                | 7.20 ± 0.53                 | 420.67 ± 197.95                  |
| 模型    | —                         | 50.17 ± 6.74*               | 15.82 ± 0.59*               | 412.33 ± 178.41                  |
| 洛丁新   | 1.67                      | 24.83 ± 2.64* <sup>△</sup>  | 10.01 ± 0.41* <sup>△</sup>  | 342.67 ± 143.05                  |
| 肾病I号方 | 18 750                    | 28.67 ± 3.67* <sup>△</sup>  | 11.76 ± 0.51* <sup>△#</sup> | 367.01 ± 156.39                  |
| EASD  | 300                       | 29.83 ± 1.94* <sup>△</sup>  | 10.89 ± 0.87* <sup>△</sup>  | 372.17 ± 93.32                   |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与EASD组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ , 下同

\* $P < 0.05$  vs Sham group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs EASD group, same as below

## 3.2 肾脏组织病理学改变

**3.2.1 HE 染色结果** 如图1所示,假手术组肾小球结构完整,无萎缩塌陷,肾小管排列紧密,肾间质无明显炎症细胞浸润。模型组肾小球萎缩变小,肾小管上皮细胞出现大量变性和坏死,管腔扩张,间质增宽,大量炎症细胞浸润,肾间质纤维化程度严重;洛丁新组、肾病I号方组和EASD组的肾小管损伤程度较模型组明显减轻,可见部分结构完整的肾小管,肾间质炎症细胞浸润减少。

**3.2.2 Masson 染色结果** 如图2所示,假手术组未见明显病理改变,肾小管无扩张,仅见肾小管基膜处和毛细血管周围少量呈线状分布的蓝染的胶原组织;模型组可见肾间质大量蓝染的胶原纤维增生;各给药组大鼠肾间质蓝染胶原纤维较模型组明显减少。

### 3.3 免疫组化检测 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 蛋白的表达变化

如图3所示,假手术组无明显病理改变,肾小球结构完整,肾小管无扩张,间质无明显的炎性细

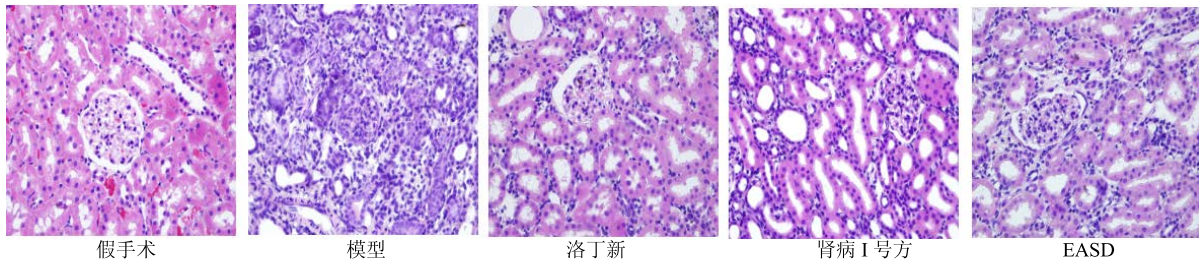


图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色结果

Fig. 1 Results of HE staining for kidney tissue of rats in each group

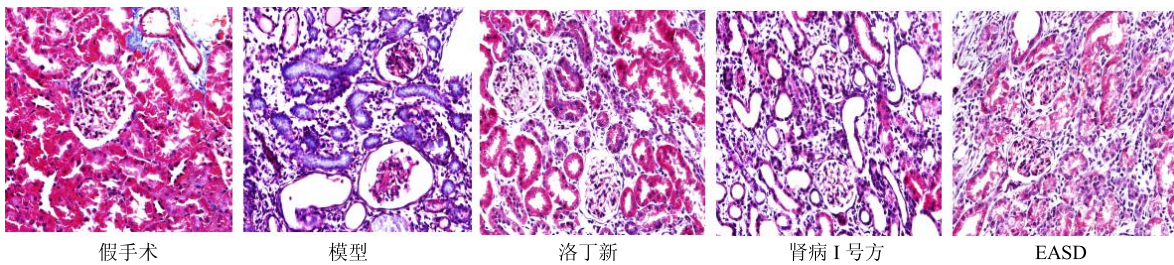


图 2 各组大鼠肾组织 Masson 染色结果

Fig. 2 Results of Masson staining for kidney tissue of rats in each group

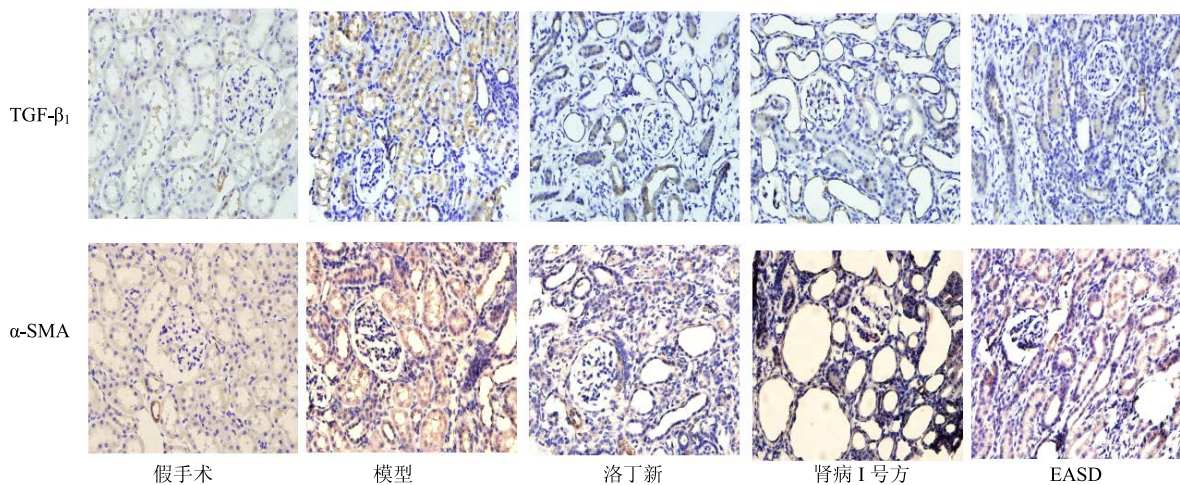


图 3 各组大鼠肾组织 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 免疫组化结果

Fig. 3 Immunohistochemical results of TGF-β<sub>1</sub> and α-SMA in kidney tissue of rats in each group

胞浸润，视野内无明显黄染，TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 较少阳性表达；模型组可见大量黄染，TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 阳性表达增强，肾小球萎缩，肾小管塌陷，肾间质纤维化严重；3 个给药组比模型组黄染面积减少。对 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 阳性表达进行半定量分析，结果见表 2。与假手术比较，模型组和 3 个给药组 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 的阳性表达量上升明显 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，3 个给药组 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 的阳性表达均明显下降 ( $P < 0.05$ )。肾病 I 号方组和 EASD 组相比，TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 的阳性表达差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各组大鼠肾组织 TGF-β<sub>1</sub> 和 α-SMA 蛋白的表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Protein expression of TGF-β<sub>1</sub> and α-SMA in kidney tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | TGF-β <sub>1</sub>         | α-SMA                      |
|---------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 假手术     | —                         | 1.92 ± 0.21                | 1.99 ± 0.17                |
| 模型      | —                         | 34.36 ± 3.45*              | 25.97 ± 4.51*              |
| 洛丁新     | 1.67                      | 14.11 ± 2.57* <sup>△</sup> | 9.07 ± 1.03* <sup>△</sup>  |
| 肾病 I 号方 | 18 750                    | 13.93 ± 1.55* <sup>△</sup> | 12.93 ± 1.15* <sup>△</sup> |
| EASD    | 300                       | 18.06 ± 2.57* <sup>△</sup> | 13.30 ± 1.04* <sup>△</sup> |

### 3.4 RT-PCR 检测肾组织 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA mRNA 的表达变化

如表 3 所示, 与假手术比较, 模型组和 3 个给药组大鼠肾组织中 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA mRNA 表达量均上升明显 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 3 个给药组肾组织中 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA mRNA 表达量均有所下降 ( $P < 0.05$ )。

表 3 各组大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA mRNA 的表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 mRNA expression of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA in kidney tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | TGF- $\beta_1$ mRNA      | $\alpha$ -SMA mRNA       |
|---------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术     | —                         | 1                        | 1                        |
| 模型      | —                         | 807.16 ± 70.65*          | 368.64 ± 30.69*          |
| 洛丁新     | 1.67                      | 1.19 ± 0.09* $\Delta$    | 2.44 ± 0.16* $\Delta$    |
| 肾病 I 号方 | 18 750                    | 4.42 ± 0.54* $\Delta$    | 8.37 ± 0.95* $\Delta$    |
| EASD    | 300                       | 230.50 ± 20.49* $\Delta$ | 201.50 ± 17.32* $\Delta$ |

## 4 讨论

肾纤维化是大部分慢性肾脏病发展至终末期的共同通路<sup>[2]</sup>, 其本质是肾脏组织损伤后的“疤痕化”修复<sup>[8]</sup>。肾小管间质纤维程度是反映肾功能的重要指标, 其主要病理表现为正常的肾小管和肾间质结构被大量细胞外基质所代替, 出现大量的肌成纤维细胞<sup>[9-10]</sup>。研究表明,  $\alpha$ -SMA 是肌成纤维细胞产生的标志<sup>[11-12]</sup>, TGF- $\beta_1$  是公认的在上皮细胞间充质转化中必不可少的诱导因子, 是促进肾间质纤维化的最重要作用因子<sup>[13-14]</sup>。因此  $\alpha$ -SMA 和 TGF- $\beta_1$  的表达对于肾间质纤维化进展及预后具有重要意义。

肾纤维化是现代医学术语, 中医古籍中并没有这个病名的记载, 但是其所表现出的临床症候, 可以见于中医的水肿、腰痛、癃闭、虚劳、关格、喘证等病症中<sup>[15]</sup>, 属于中医学肾络病的范畴。肾络病的病机特点主要是“易滞易淤、易入难出、易积成形”<sup>[16]</sup>, 治疗上以行气活血、化湿祛瘀为主。肾病 I 号方根据肾脏病病机特点, 将小柴胡汤作为君药, 疏利三焦, 使三焦气机调畅, 另以土茯苓、半枝莲清热除湿解毒, 菝葜解毒化瘀, 从而调畅三焦气机, 祛除三焦浊邪。肾病 I 号方是温州市中医院肾病科常用方, 大量临床实践证明其具有较好的临床疗效, 能有效减轻患者症状, 改善患者肾功能。前期实验研究也证明肾病 I 号

方能够有效延缓肾纤维化的发展<sup>[3-4]</sup>。在进一步探讨肾病 I 号方抗肾纤维化作用机制及其药效物质基础中, 本课题组发现 EASD 对肾纤维化具有较好的疗效。

本研究结果显示, 肾病 I 号方及其醋酸乙酯提取物能够有效降低肾纤维化大鼠肾脏血清 Scr 和 BUN ( $P < 0.05$ ), 且两组之间无明显差异, 对于 24 h 尿蛋白定量无明显作用 ( $P > 0.05$ ); 能够下调 UO 大鼠肾间质 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ ), 两组之间无明显差异; 同时能够下调肾组织中 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA mRNA 表达量, 两组之间无明显差异。综上, 肾病 I 号方及其醋酸乙酯提取物具有延缓肾纤维化发生发展的作用, 其作用机制可能是下调肾间质 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平和 TGF- $\beta_1$  mRNA、 $\alpha$ -SMA mRNA 表达量, 从而抑制细胞外基质沉积, 达到抗肾纤维化的作用; 肾病 I 号方与其醋酸乙酯提取物在抗肾纤维化疗效上无明显差异, EASD 可能是肾病 I 号方发挥抗肾纤维化作用的有效物质基础之一。

## 参考文献

- [1] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. *Lancet*, 2012, 379(9818): 815-822.
- [2] 王海燕. 肾脏病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [3] 胡振奋, 程锦国, 董飞侠, 等. 肾病 I 号方对大鼠系膜细胞增殖及 IL-6 和 FN 表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(1): 21-24.
- [4] 胡振奋, 程锦国, 董飞侠, 等. 肾病 I 号方对大鼠系膜细胞增殖及 CTGF COL-IV 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(4): 863-865.
- [5] Yuan X P, Liu L S, Fu Q, et al. Effects of ligustrazine on ureteral obstruction-induced renal tubulointerstitial fibrosis [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(5): 697-703.
- [6] 罗婷, 程锦国, 姜程曦, 等. 清化固肾排毒颗粒对肾纤维化大鼠 Wnt 通路 Wnt1 和  $\beta$ -catenin 表达的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 955-962.
- [7] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [8] Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(12): 684-696.
- [9] Eddy A A. Molecular basis of renal fibrosis [J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 15(3/4): 290-301.

- [10] Duffield J S, Luper M, Thannickal V J, *et al.* Host responses in tissue repair and fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8(8): 241-276.
- [11] 丁武杰, 方敬爱, 孙艳艳, 等. 益肾胶囊对糖尿病肾病大鼠肾组织 JAK/STAT 信号通路及  $\alpha$ -SMA、FN 的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(6): 484-487.
- [12] 李林蔚, 周景华, 刘华生, 等. 柴胡桂枝汤对肝纤维化大鼠 FN 及  $\alpha$ -SMA 表达的影响 [J]. 黑龙江医药, 2014, 27(2): 265-267.
- [13] 王颖航, 潘志, 南红梅, 等. 肾纤维化的分子病理机制探讨 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2006(1): 34-37.
- [14] He J, Xu Y, Koya D, *et al.* Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2013, 17(4): 488-497.
- [15] 张承承. 慢性肾功能衰竭中医症候学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [16] 贾振华, 吴以岭. 络病理论及其应用研究 [A] // 全国中医药中青年科技创新与成果展示论坛论文集 [C]. 重庆: 中国科学技术学会, 2009.