

## • 综 述 •

## 阿霉素肾病模型及其病理机制研究进展

贺升升<sup>1,2</sup>, 李爱平<sup>1\*</sup>, 张王宁<sup>1</sup>, 秦雪梅<sup>1\*</sup>

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

**摘 要:** 阿霉素肾病模型是目前公认的能够较好模拟人类肾病的模型之一, 其动物模型的表现类似于临床的人类肾病综合征, 其细胞模型因能够较好地模拟肾小球足细胞的基本功能而广泛应用于肾病的病理机制研究。从阿霉素肾病的动物模型和体外细胞模型入手, 旨在系统地阐述阿霉素肾病模型的造模方法和病理机制, 为基于肾脏疾病的药物研发提供科学、合理的药理学实验模型参考, 为开展中药复方治疗肾病的作用机制研究提供依据。

**关键词:** 阿霉素肾病; 动物模型; 细胞模型; 病理机制; 足细胞; 蛋白尿

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)22-5426-09

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.22.030

## Research progress on adriamycin nephropathy model and its pathological mechanism

HE Sheng-sheng<sup>1,2</sup>, LI Ai-ping<sup>1</sup>, ZHANG Wang-ning<sup>1</sup>, QIN Xue-mei<sup>1</sup>

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering of Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** Adriamycin-induced nephritic model is one of the well-recognized models in simulating human nephropathy, whose clinical manifestations of animal models are similar to human nephrotic syndrome, and its cell models are widely used in the pathological mechanism study of nephropathy because of the well-simulated basic function of glomerular podocyte. Based on the animal models and cell models *in vitro* of adriamycin nephropathy, this study aims at reviewing the modelling method and pathological mechanism of adriamycin-induced nephritic model in order to provide a scientific and rational pharmacological experimental model reference for drug research and development based on kidney disease, and provide evidence for the research of the mechanism of Chinese herbal compound in the treatment of nephropathy.

**Key words:** adriamycin nephropathy; animal model; cell model; pathological mechanism; podocyte; proteinuria

阿霉素肾病 (adriamycin nephropathy, AN) 是用来模拟人体肾脏疾病所建立的一种药理学实验模型, 其方法是通过使用阿霉素 (adriamycin, ADR) 干预动物或体外细胞, 使其表现出与患者肾脏疾病相似的病理特征和临床表现。肾病综合征 (nephrotic syndrome, NS) 是儿童和成人最常见的肾小球疾病, 因其并发症多、治疗效果差、预后困难, 给人们生活和健康带来巨大的压力。中医认为 NS 的发病机

制在于机体脏腑功能的失调, 其中尤以肺、脾、肾的功能失调为主要的病理特征<sup>[1]</sup>。AN 动物模型是研究该疾病病理机制和开发治疗该疾病药物的典型模型, 一般以高蛋白尿、低蛋白血症、高血脂及水肿为特征, 其病理过程为足细胞损伤、肾小管间质炎症和纤维化, 继之肾小球硬化和肾功能衰竭<sup>[2]</sup>。与此同时, 体外构建的能够体现 NS 中足细胞损伤的 AN 细胞模型是筛选 NS 相关药物和研究其发病机

收稿日期: 2018-06-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目“多效中药黄芪的定向药效化学成分研究”(31570346)

作者简介: 贺升升 (1995—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药体内药物分析。Tel: 15991287943 E-mail: 15991287943@163.com

\*通信作者 秦雪梅, 女, 博士, 教授, 主要从事中药质量控制及新药研发方面的工作。Tel: (0351)7011501 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

李爱平, 女, 博士, 讲师, 主要从事中药质量评价及中药药理研究方面的工作。Tel: (0351)7018379 E-mail: aipingli@sxu.edu.cn

制的典型细胞模型<sup>[3]</sup>。总结国内外学者对该模型的研究发现,目前,AN 研究的焦点:(1)阐释 ADR 损伤足细胞的机制<sup>[4]</sup>;(2)足细胞损伤后超微结构的变化特征<sup>[5]</sup>;(3)足细胞损伤与蛋白尿发生的相关性<sup>[6]</sup>;(4)AN 的病理过程<sup>[7]</sup>。虽然涉及的方面较广,却没有系统综述 AN 的造模方法以及病理机制过程的文献报道,本文从体内动物模型和体外细胞模型方面系统地阐述 AN 模型及其病理机制,以期作为 NS 的实验药理学研究提供参考,为开展中药复方治疗肾病的作用机制研究提供依据及临床研究提供一定线索。

## 1 AN 模型的造模方法

### 1.1 AN 动物模型的造模方法

AN 动物模型最早在 1982 年由 Bertani 等<sup>[8]</sup>首次报道,现广泛应用于肾脏疾病的研究领域。其造模的类型分为急性 AN 模型(单次尾 iv ADR,与人类微小病变性肾病相似)和慢性 AN 模型(多次注射 ADR 而诱发的局灶性节段性肾小球硬化)。然而实际应用时发现该模型造模方法的文献报道不尽相同,其原因归结于动物品系、给药方式、给药次数和给药剂量的不同对模型复制所带来的影响。

**1.1.1 动物品系** 动物模型的建立需要选择对药物敏感,病理特征出现迅速、持续、稳定的动物品系。现有研究的动物品系包括 SD 系大鼠<sup>[9]</sup>、Wistar 系大鼠<sup>[10]</sup>、Lewis 系大鼠<sup>[11]</sup>、BALB/c 系小鼠<sup>[12]</sup>、裸鼠<sup>[13]</sup>等。研究发现<sup>[14]</sup>,SD 大鼠,Wistar 大鼠、BALB/c 小鼠均表现对 ADR 敏感,且 SD 大鼠较 BALB/c 小鼠对 ADR 表现更为敏感。在诱导的肾病模型中 Lewis 与 Wistar 大鼠的病理特征之间无差异<sup>[15]</sup>。

**1.1.2 给药方式** iv 是目前主要采用的给药方式,包括尾 iv<sup>[16]</sup>、阴茎 iv<sup>[17]</sup>、股 iv<sup>[18]</sup>等,其中以尾 iv 的方式最为常见。由于尾 iv ADR 存在组织液外渗的现象,容易导致尾部腐烂。李爱平等<sup>[19]</sup>研究表明在操作时大鼠尾部应使用热水和酒精浸泡,使血管膨胀,注射针插入血管后倒抽有回血,且注射后无阻力则表明注射成功,否则可能会导致组织液外漏,造成尾部尾巴腐烂的现象。

**1.1.3 给药次数** 由于单次尾 iv 大剂量 ADR 后,对消化道产生的不良反应较强,大鼠出现严重的腹泻,且造模后死亡率高,不利于 ig 后的药物在胃肠道的吸收,有碍于口服药物的筛选和实验药理研究。研究者逐渐对该模型进行改良,目前多采用 2 次尾 iv 的方法,2 次注射间隔 1 周的时间,研究表明<sup>[20]</sup>,

2 次尾 iv ADR 较单次注射出现腹泻的程度减轻,模型成功率达 90%。蔺建军等<sup>[21]</sup>从大鼠精神状态、尿蛋白含量、死亡率、肾组织病理等方面综合比较不同给药次数对模型的影响,结果发现 2 次尾 iv ADR,4 周后可高效地复制出模型。

**1.1.4 给药剂量** ADR 属于蒽环类抗生素,在大鼠体内的代谢缓慢,尾 iv 后主要累积于肾脏,其对心脏、肝脏、骨髓、胃肠等均具有较强的副作用<sup>[22]</sup>。ADR 具有安全窗窄、毒性大、副作用广泛的特点,因而,掌握娴熟的尾 iv 技术和选择合适的给药剂量成为 AN 模型复制的关键和难点。研究表明<sup>[23-25]</sup>,一次性单次尾 iv ADR 剂量范围在 6~10 mg/kg,7~14 d 出现 NS 的症状,但死亡率却高达 60%。2 次尾 iv 时第 1 次的剂量在 3~5 mg/kg,间隔 1 周后,第 2 次注射的剂量在 1~4 mg/kg,可高效复制 AN 模型<sup>[19,26]</sup>。

综上所述,ADR 造模时动物品系的选择及给药方式、次数、剂量的不同,直接影响该模型的成模率和稳定性,以及 ADR 对肾组织的损伤程度,影响后期基于该模型筛选治疗肾病相关中药的药效评价结果。此外,若能综合造模后各指标和病理特征,规范蛋白尿的测量方法,建立完整的实验操作流程,将有利于该模型复制的稳定性,为后期药效物质基础的研究提供可靠的实验动物模型。

### 1.2 AN 细胞模型的造模方法

**1.2.1 细胞系的选择** 若要从细胞生物学和分子生物学的角度解释足细胞的生物功能,研究肾病的发病机制,则必须在体外构建能够模拟体内足细胞损伤特征的 AN 细胞模型。目前文献报道最多的是永生小鼠足细胞(MPC5),该细胞最初是由 Jat 等<sup>[27]</sup>从构建的 H-2Kb-tsA58 转基因小鼠中获得,其基本培养条件为在 33 ℃、 $\gamma$ -干扰素诱导下足细胞进行分裂增殖,为鹅卵石样,胞体较小(增殖态);在 37 ℃培养 10 d 左右 tsA58 抗原灭活使得足细胞停止分裂而分化成熟,胞体变大,呈星形且有突起形成(分化态)<sup>[28-29]</sup>。

**1.2.2 造模剂的选择** 通过文献调研发现,蒽醌类抗生素(ADR<sup>[30]</sup>)和氨基糖苷类抗生素(如嘌呤霉素<sup>[31]</sup>、衣霉素<sup>[32]</sup>)多用于 MPC5 细胞的造模剂,其可导致细胞的损伤,表现为足细胞中特异性蛋白 Nephron、Podocin 的表达量下降,足细胞骨架紊乱以及足细胞中凋亡小体的生成<sup>[33]</sup>。

**1.2.3 造模剂量的选择** 本课题组前期研究发现,

不同厂家的不同制剂类型的 ADR 对足细胞的损伤程度不同。目前已报道的使用 ADR 作为造模剂的制剂类型有单体、注射剂和脂质体,其作用于 MPC5 细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 不同<sup>[34-36]</sup>。闫梦苗等<sup>[37]</sup>使用 0.25  $\mu\text{g/mL}$  的 ADR 注射剂作用于 MPC5 细胞 24 h, 细胞抑制率达 50%。陈秀萍等<sup>[38]</sup>通过 0.15  $\mu\text{g/mL}$  ADR 单体作用于 MPC5 细胞 24 h, 细胞抑制率达 50%。Che 等<sup>[36]</sup>通过 200 nmol/L 的 ADR 脂质体诱导 MPC5 细胞 24 h, 结果发现模型组与正常组相比, 细胞存活率有显著性差异。

综上所述, MPC5 细胞因来源明确, 细胞形态和功能与小鼠肾脏足细胞相似, 被广泛用于肾脏疾病的体外细胞实验研究。其造模剂多选用以 ADR 为代表的蒽醌类抗生素, 其模型制备成功与否多以 Nephlin、Podocin 蛋白的下调为标志。AN 细胞模型的建立模拟了 AN 动物足细胞损伤的特征, 为进一步研究足细胞功能以及蛋白尿发生的分子机制提供合适的体外细胞模型。

## 2 AN 的病理机制研究

### 2.1 AN 动物模型的病理机制研究

#### 2.1.1 足细胞损伤

(1) 干扰裂孔隔膜蛋白: 裂孔隔膜蛋白在维持足细胞的功能和蛋白尿的滤过中发挥重要的作用。已报道构成裂孔隔膜的蛋白质包括 Nephlin<sup>[39]</sup>、Podocin<sup>[40]</sup>、Neph1<sup>[41]</sup>、CD2AP<sup>[42]</sup>等。

Nephlin 是免疫球蛋白家族的成员, 由胞外和胞内结构域组成, 其胞内区的酪氨酸残基在相邻的足细胞之间发挥信号转导作用。研究表明 Nephlin 能够被 Src 家族激酶 Fyn 磷酸化, 并且磷酸化的 Nephlin 与 CD2AP 和 Podocin 一起诱导磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 依赖的蛋白激酶 B (Akt) 活化, 从而抑制足细胞的凋亡<sup>[43]</sup>。据报道<sup>[44]</sup>, 肾小球损伤时转录因子 c-maf 诱导蛋白 (c-mip) 在足细胞中过量产生, c-mip 通过阻止 Nephlin 与 Fyn 的相互作用来干扰足细胞信号传导, 从而降低了 Nephlin 磷酸化。此外, 阻止 Nephlin 与 Fyn 和肌动蛋白成核蛋白之间的相互作用, 可能会导致细胞骨架解体和足突的融合<sup>[45]</sup>。

Podocin 是膜相关的细胞内蛋白质, 参与裂孔隔膜的组成, 可与 Nephlin 和 CD2AP 相互作用, 且 Podocin 与 Nephlin、CD2AP 和肌动蛋白细胞骨架连接, 将信号转导至肌动蛋白细胞骨架。此外, Podocin 可作为将肌动蛋白细胞骨架固定于细胞间接接触的支

架, 参与足细胞间的信号传导, 维持肌动蛋白骨架的完整性<sup>[46]</sup>。

Neph 是免疫球蛋白超家族 (immunoglobulins superfamily, IgSF) 的成员, 由细胞外免疫球蛋白样结构域、跨膜区和信号传导所需的细胞质组成。在结构上与含有胞外 IgG 样基序的 Nephlin 类似, 并能与 Nephlin 相互作用形成 Nephlin-Neph1 复合物, 参与细胞内信号传导, 诱导足细胞中的肌动蛋白聚合<sup>[47]</sup>。Hulkko 等<sup>[48]</sup>发现 AN 小鼠中 Neph1 与 Nephlin 的表达降低, Nephlin 和 Neph1 在足细胞中分离, 细胞之间的信号转导受阻, 进而导致肌动蛋白细胞骨架紊乱和蛋白尿发生。

(2) 干扰足细胞骨架蛋白: 足细胞损伤和蛋白尿也可能由细胞骨架改变引起, 已经证实足细胞特异性突触连接蛋白 (Synaptopodin)、细胞骨架肌动蛋白  $\alpha$ -actinin-4、肾母细胞瘤蛋白 1 (WT1) 为足细胞的主要骨架蛋白分子, 维持足细胞正常表型, 其中 Synaptopodin、 $\alpha$ -actinin-4 在足细胞开始分化并发展其足突结构时才开始表达, 因而被认为是成熟足细胞表型的重要标志。Synaptopodin 存在足细胞中, 是一种肌动蛋白结合蛋白, 可通过调节 Ras 超家族 RhoA 信号竞争性阻断泛素连接酶 (Smurf1) 介导的 RhoA 泛素化来诱导应激纤维, 维持肌动蛋白的完整性, 调节足细胞迁移<sup>[49]</sup>。 $\alpha$ -actinin-4 参与肌动蛋白伸长, 是足细胞特异性标志蛋白。WT1 是一种对正常足细胞和肾小球发育至关重要的基因, 通过促进足细胞特异性基因表达促进足细胞分化。Guo 等<sup>[50]</sup>研究发现 AN 小鼠足细胞中 miR-206 表达上调, WT1 和 Synaptopodin 的表达量下降, 而过表达 miR-206 可诱导 WT1 和 Synaptopodin 蛋白降解和肌动蛋白重排, 引发足细胞细胞骨架紊乱, 这表明 ADR 可通过过表达的 miR-206 下调 WT1 和 Synaptopodin 最终导致足细胞损伤。

(3) 干扰基底膜 (GBM) 蛋白: 足细胞与 GBM 的黏附受到几种黏附蛋白表达的控制。整合素是将细胞外基质连接至细胞骨架的跨膜  $\alpha\beta$  糖蛋白, 足突通过  $\alpha3\beta1$ -整联蛋白黏附分子 ( $\alpha3\beta1$  整合素) 和肌萎缩蛋白聚糖 (dystroglycan, DG) 复合物固定在 GBM 上。 $\alpha3\beta1$  整合素由 2 个膜蛋白亚单位组成, 包括 1 条大的  $\alpha$  链和 1 条小的  $\beta$  链, 是足细胞成熟所必需的, 主要分布在足细胞与 GBM 相连接的基底部区域, 是足细胞贴附于 GBM 的主要受体, 在足细胞中, 能够与 GBM 的纤连蛋白、胶原蛋白 IV、

层黏连蛋白和跨膜蛋白 CD151 结合以维持功能性过滤屏障<sup>[51]</sup>。研究表明<sup>[52]</sup>, AN 大鼠肾小球内  $\alpha 3\beta 1$  整合素蛋白及 mRNA 表达水平降低。整合素  $\alpha 3$  的糖基化增加可引起肺病和 NS, 阻断  $\alpha 3\beta 1$  整合素的结合域可导致足突消失和蛋白尿的发生, 且  $\alpha 3\beta 1$  整合素不足的小鼠在出生后几小时内死于肾衰竭<sup>[53]</sup>。

### 2.1.2 氧化应激

(1) 活性氧 (ROS) 的来源: 研究表明, 肾脏还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 是血管和肾脏 ROS 产生的重要来源<sup>[54]</sup>。肾脏肾小球中 ROS 主要产物是含 p47phox 的 NADPH 氧化酶 NOX1 和 NOX2, 胞浆 p47phox 亚基是 NOX1 和 NOX2 的组装和功能的关键调节因子, 其在肾损伤过程中表达和磷酸化上调, 将其敲除则抑制体内 ROS 产生并因此减少氧化应激对肾脏的损伤。已经确定了 5 种不同的 NOX 家族异构体, 其中 NOX1、NOX2 和 NOX4 存在于肾皮质中, 且 ADR 被认为可以上调 NOX, 通过增加 ROS 的产生, 诱导足细胞的凋亡<sup>[55]</sup>。由此可见, 肾脏中 NOX 的激活是 AN 大鼠 ROS 产生的重要途径。

(2) 氧化应激与足细胞损伤的关系: 氧化应激在足细胞损伤和肾小球硬化中是至关重要的, 已经证明 ROS 参与足细胞损伤及蛋白尿的发生过程, 并与脂质过氧化物、血清尿素和蛋白尿的升高, 肾中 NPSH 含量和 CAT 活性的降低以及高脂血症的发生直接相关<sup>[56]</sup>。早期的研究表明氧化应激是促进足细胞损伤和蛋白尿产生的一个重要介质<sup>[57]</sup>。氧化蛋白产物 (AOPPs) 是一种已确立的氧化应激触发因子, 已证明 AOPPs 过载的小鼠尿白蛋白排泄和足细胞损伤显著加重。Mo 等<sup>[58]</sup>研究发现 AN 大鼠肾脏 NADPH 氧化酶 (NOX2、NOX4)、8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG)、丙二醛 (MDA) 和 CXCR4 趋化因子受体 4 (CXCR4) 的含量以时间依赖性的方式增加, 且 CXCR4 的表达伴随着氧化应激的增加而上调, 并与 AOPPs 共同定位, 而抑制 CXCR4 可减少氧化应激和蛋白尿, 并改善了小鼠由 AOPPs 诱导的足细胞损伤。由此可见, 氧化应激是引起足细胞损伤的重要因素, 在介导足细胞损伤和蛋白尿中发挥着重要作用。

**2.1.3 炎症反应** 炎症反应是导致 AN 进展至终末期肾病的重要因素, ADR 经血液循环途径可以到达肾脏并直接破坏肾脏固有细胞, 诱导炎症反应的发生。p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 在炎症的

形成中起决定性作用, 激活 p38MAPK 可诱导促炎性细胞因子如白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的分泌和产生<sup>[59]</sup>, 而 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  可通过自分泌与旁分泌的方式增强 p38 MAPK 活性, 促进炎症反应, 进而加剧肾小球损伤<sup>[60]</sup>。Li 等<sup>[61]</sup>证明黄葵胶囊通过降低肾小球中巨噬细胞的浸润与活化以及肾脏中 TNF- $\alpha$  蛋白的表达, 抑制 p38MAPK 信号通路活性, 从而改善 AN 大鼠的肾组织炎症和肾小球损伤<sup>[62]</sup>。

已显示趋化因子和转录因子的表达与肾组织炎症反应密切相关<sup>[63]</sup>, 人单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 和 IL-6 是 2 个重要的与肾间质炎症高度相关的细胞因子, 在 AN 过程中其表达量显著增高<sup>[64]</sup>。C/EBP- $\alpha$  是转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白 (C/EBP) 家族的成员, 是各种细胞功能的关键调节因子, 可与一些对肾脏疾病很重要的转录因子如过氧化物酶体增生物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )、p53 和核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 相互作用。Zhong 等<sup>[65]</sup>研究表明 ADR 可导致 C/EBP- $\alpha$  敲除的小鼠足细胞损伤加重, 而 C/EBP- $\alpha$  的过表达可降低以 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  处理的足细胞中 MCP-1 和 IL-6 的表达量, 这些结果表明 C/EBP- $\alpha$  可在足细胞中介导抗炎作用并减轻肾小球足细胞的损伤。

炎症被归因于肠道微生物组的生态失调, 其与慢性肾病中的蛋白尿有关。最新研究表明<sup>[66]</sup>, 在慢性肾病的患者大便中观察到肠道微生物群的生态失调, 且越来越多的证据表明肠道微生物群与肾脏-肠轴有关系。Jiang 等<sup>[67]</sup>分析了 AN BALB/C 小鼠 (ADR 易感株) 的肠道微生物群谱, 并用 C57BL/6 小鼠 (ADR 抗性株) 作为对照, 结果表明尾 iv ADR 后显著增加 BALB/C 小鼠血清 IL-2 的水平, 而 C57BL/6 小鼠则无此作用, 并且发现肠道微生物群谱与尿白蛋白/肌酐值之间存在关联。据报道<sup>[68]</sup>, ADR 也可诱导胃肠上皮损伤, 并改变肠道菌群, 而 IL-2 通常被认为与肠道微生物群相关<sup>[69]</sup>, 提示改变大便微生物可能促进 BALB/C 小鼠炎症反应和蛋白尿的发生, 这为肾病的致病性提供了新的见解。综上所述, ADR 通过诱导多种促炎性细胞因子和趋化因子, 并协同其他机制, 通过多种通路导致炎症反应发生, 加速 NS 的进程。

**2.1.4 脂质代谢异常** NS 的许多并发症, 如动脉粥样硬化和血栓栓塞的发病风险增加可能与脂质代谢异常和血脂异常有关, 这些异常表现为血浆胆固

醇(TC)、三酰甘油(TG)、极低密度脂蛋白(VLDL)、中密度脂蛋白(IDL)、前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9)升高和脂肪酶活性降低<sup>[70]</sup>。体外研究表明<sup>[71]</sup>,低密度脂蛋白(LDL)、氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)和 VLDL 等主要脂质成分能直接刺激系膜细胞增殖和分泌炎症因子,包括 IL-6、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、MCP-1、结缔组织生长因子。另外,LDL 和 oxLDL 能促进肾脏免疫细胞活化,继而上调 NF- $\kappa$ B 活性,加速炎症因子释放。王海燕等<sup>[72]</sup>发现黄芪与当归联合治疗可延缓 NS 患者的脂质代谢紊乱,治疗后 TG、VLDL、LDL 的含量显著低于 AN 组。可以看出,ADR 可通过诱导脂质代谢的异常来参与肾脏炎症的发生过程。

近年来肾组织中血管生成素样-3(Angptl3)在 ADR 诱导的脂质代谢异常中的作用备受关注。Angptl3 是具有特征性血管生成素结构的分泌蛋白,由 N 端卷曲螺旋结构域(CLD)和 C 端球状纤维蛋白原样结构域(FLD)组成。CLD 可抑制脂肪酶活性,导致血浆 TG 水平升高,FLD 可通过与整合素- $\alpha$ V $\beta$ 3 结合诱导血管生成<sup>[73]</sup>。研究表明<sup>[74-76]</sup>,Angptl3 在 AN 大鼠的足细胞中明显上调,且上调的 Angptl3 可刺激足细胞 F-肌动蛋白骨架重排,而 Angptl3 的失活可通过降低 VLDL 分泌来降低 TC 和载脂蛋白(ApoB)水平,发挥稳定的调脂作用。由此可以看出,Angptl3 可通过调节脂质代谢过程,干预足细胞足突的运动,诱导蛋白尿的发生。

**2.1.5 肾纤维化** 肾纤维化是所有进行性肾病最后的共同途径。各种致病因子刺激肾脏细胞不断产生炎症介质和细胞因子,导致肾小管上皮细胞向肾小球系膜细胞转化(EMT)和细胞外基质(ECM)的产生,最终改变肾组织的正常结构和功能<sup>[77]</sup>。Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号途径对于调节细胞黏附、迁移、EMT、胚胎发育和组织器官的体内平衡非常重要,并与肾纤维化的进展密切相关<sup>[78]</sup>。TGF- $\beta$ 通常被认为是促纤维化细胞因子和肾纤维化的中心介质<sup>[79]</sup>,可作为 ECM 合成的诱导剂和 ECM 降解的抑制剂,其可通过直接抑制基质金属蛋白酶发挥作用。EMT 是肾小管细胞失去上皮表型并获得间质新表型的过程,是肾纤维化过程中的关键步骤和关键因素。研究显示 ROS 可直接介导 TGF- $\beta$ 1 诱导的肾小管上皮细胞中的 EMT,加快肾小管间质纤维化的发展,由此可见 EMT 是导致肾脏间质肌成纤维细胞产生的重要途径<sup>[80]</sup>。P311 是一种高度保守的细胞内蛋白,已被

证明是肌成纤维细胞转化和纤维化进程中的重要因子,Jia 等<sup>[81]</sup>通过检测肾纤维化大鼠中 EMT 标记物(E-钙黏蛋白和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白)、信号转导物(p-Smad2/3 和 Smad7)和控制 TGF- $\beta$ 1 介导的 EMT 的关键细胞介质整联蛋白连接激酶(ILK)的含量表明,P311 可能是通过 Smad-ILK 信号通路减弱 TGF- $\beta$ 1 介导的 EMT,增加 pSmad2/3 和 ILK 表达,降低 E-钙黏蛋白和 Smad7 表达来改善肾纤维化的进程。

**2.1.6 自噬** 自噬是一种保守的细胞自我降解方式,可以作为促进细胞存活的主要保护途径,维持组织稳态和基本功能。据报道<sup>[82]</sup>,在 AN 大鼠中激活自噬可以保护肾小管免受蛋白尿诱导的损伤,表现为:(1)自噬体和自溶酶体数目增加;(2)肾功能损害的潜在生物标志物[脂质运载蛋白-2/中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(LCN2/NGAL)和肝炎病毒细胞的受体 1/肾损伤分子 1(HAVCR1/KIM-1)]的生成减少;(3)SQSTM1/p62 的表达减少;(4)自噬相关蛋白 LC3-II 的表达增加和溶酶体的核周聚集。目前雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路是公认的调控细胞自噬的主要信号通路。PI3K 通路和 AMP 依赖蛋白激酶(AMPK)通路作为 mTOR 通路和生长因子信号通路的连接,是调控 mTOR 的上游通路,可介导生长因子引起细胞自噬。在 mTOR 敲除小鼠的研究<sup>[83-84]</sup>中发现,抑制足细胞 mTOR 途径可导致细胞内自噬水平升高。由此可见,AN 中自噬的激活通常发生在蛋白尿后,其机制主要是通过 PI3K/mTOR 途径增强自噬活性来改善 ADR 诱导的肾损伤。

## 2.2 AN 细胞模型的造模机制研究

目前对于 AN 大鼠模型的病理机制研究较多,而 ADR 损伤 MPC5 细胞的机制报道较少。已报道瞬时受体电位阳离子通道蛋白 6(transient receptor potential cation channel 6, TRPC6)是一种存在于裂孔隔膜蛋白的跨膜蛋白,能够与 Nephrin 和 Podocin 发生相互作用,并参与基因转录的调节,其功能的异常可导致 AN 大鼠蛋白尿发生<sup>[85]</sup>。Jiang 等<sup>[86]</sup>发现在 MPC5 细胞中过表达 TRPC6,可导致足细胞 F-肌动蛋白异常分布和细胞骨架紊乱显著降低,Nephrin 和 synaptopodin 表达的降低以及活化的 RhoA 增加,而用 RhoA 抑制剂 Y-27632 处理过表达 TRPC6 的足细胞,F-肌动蛋白排列则得以改善,Nephrin 和 Synaptopodin 的表达增加。另有研究表

明 TRPC6 能够介导细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  信号转导并参与细胞骨架重排, T 细胞核因子 NFAT 依赖性转录, NADPH 氧化酶活化和足细胞凋亡<sup>[87-89]</sup>。已证明在人类和动物模型的肾脏疾病中, ADR 可诱导肾小球中 TGF- $\beta$ 1 的过度表达, 并参与调节足细胞的多种病理生理功能<sup>[90]</sup>。Yu 等<sup>[91]</sup>表明用 TGF- $\beta$ 1 处理足细胞可促进足细胞的凋亡, 并能时间依赖性诱导肌动蛋白骨架的解体, TRPC6 的磷酸化水平升高, 而特异性敲出 TRPC6 则可减轻 TGF- $\beta$ 1 诱导的足细胞凋亡。研究表明在各种蛋白尿性肾病的足细胞中, Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路被激活, 控制 WT1、Snail1 和基质金属蛋白酶 7 (MMP7) 的表达<sup>[92]</sup>。Zhou 等<sup>[93]</sup>研究发现 ADR 作用于 MPC5 细胞后, WT1 表达量下调, 且 WT1 可通过调节 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路引起足细胞功能障碍和细胞凋亡。Zhang 等<sup>[94]</sup>发现 ADR 处理的足细胞中染色体 1q (AF1q) 表达升高, 且 AF1q 的过表达直接导致 desmin 和 snail 蛋白水平上调, 诱导足细胞损伤。此外, Che 等<sup>[36]</sup>发现 ADR 处理的 MPC5 细胞中线粒体被破坏并伴随着高水平的线粒体衍生的 ROS 产生, 槐耳提取物干预能够消除 ROS 在细胞内的过载状态, 恢复线粒体的氧化还原稳态, 并保护足细胞免于凋亡。

### 3 结语与展望

AN 模型是现代生物医学研究人体肾脏疾病的一个极为重要的实验方法和手段, 其建立有助于更方便、更有效地认识肾脏疾病的发生、发展规律和研究防治措施。AN 的造模方法多且复杂, 但不规范。动物品系、造模剂量、造模次数等诸多实验因素是决定模型成败的重要因素。课题组前期发现不同厂家的 ADR (注射用盐酸多柔比星注射液) 对 AN 动物模型的成模率影响较大, 究其原因发现, 制剂辅料的添加量直接影响 ADR 诱导的 AN 动物模型的死亡率, 而使用 ADR 单体则能有效降低因制剂辅料的添加对模型建立的影响。目前, AN 造模方法是基于 ADR 的理化性质干预动物, 从而引发肾脏疾病症状或特定的病理状态, 并以其相应的生化指标来表征模型是否构建成功, 而缺乏在中医理论指导下采用中医症候为指标、病症结合地构建符合中医病因病机学说的 AN 模型。中医认为 NS 的病因病机是虚实夹杂, 肾虚为本, 且肾阴与肾阳的机能失衡, 是导致水肿发生的重要原因。此外, 中医认为 NS 发生时存在的高凝状态与水肿密切相关, 体内津液代谢紊乱, 瘀血久积导致血行不畅,

进而导致继发水停, 表现为顽固性水肿。因而笔者认为在复制 AN 模型时应结合中医病因学和临床病理学, 客观、系统地选择模型的评价指标, 运用现代药理学手段进行长期、多方向、对比性的研究, 提高模型的特征性和稳定性, 这将为基于中医理论指导下的中药复方制剂治疗肾脏疾病提供合理的模型, 为中药现代化的进程和中药临床研究奠定基础。

AN 的病理机制错综复杂, 由多种因素、多个环节共同参与, 且诸多因素相互影响、互相关联。可以看出蛋白尿是诸多因素诱导后造成的一系列病理变化的直接表现, 也是诊断 NS 患者的指标因素。有证据表明, 蛋白尿不仅是肾病进展的标志物, 而且还可以作为致病介质, 引起肾脏炎症, 促进肾小管损伤和间质纤维化。其主要的作用包括: (1) 蛋白尿可以激活肾小管细胞分泌许多趋化因子和介质, 这些趋化因子和介质可引起肾脏炎症和纤维化; (2) 蛋白尿可以促进肾淋巴管生成, 并且随着促纤维化反应和肾小管活化的增加而发生; (3) 蛋白尿可以通过增加尿嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 排泄来反映肾小管的损伤、间质炎症、纤维化、胶原和纤连蛋白沉积。探究 AN 模型的病理机制对基于该疾病的中药药效评价以及作用机制的研究起关键作用, 然而目前的病理机制研究仍需进一步的完善和深入研究, 以期为新药的研发提供新的途径和方案, 为 NS 的临床诊断和治疗提供新的思路。

### 参考文献

- [1] 马迪. 浅谈中医对肾病综合征发病机理的认识 [A] // 吉林省第四届科学技术学术年会论文集 (下册) [C]. 长春: 吉林省科学技术协会, 2006.
- [2] Wolf G, Ziyadeh F N. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(2): 393-405.
- [3] 赛依帕, 宋元春, 高霞, 等. 黄芪总苷对阿霉素诱导的足细胞损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(3): 70-73.
- [4] Lee V W S, Harris D C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis [J]. *Nephrology*, 2011, 16(1): 30-38.
- [5] Wang Y, Wang Y P, Tay Y C, et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events [J]. *Kidney Int*, 2000, 58(4): 1797-1804.
- [6] Sonneveld R, Ferrè S, Hoenderop J G J, et al. Vitamin D down-regulates TRPC6 expression in podocyte injury and proteinuric glomerular disease [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(4): 1196-1204.

- [7] Chen X P, Lei F Y, Qin Y H, *et al.* The role of retinoic acid receptors in the signal pathway of all-trans retinoic acid-induced differentiation in adriamycin-induced podocyte injury [J]. *J Recep Signal Transd*, 2014, 34(6): 484-492.
- [8] Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, *et al.* Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events [J]. *Lab Invest*, 1982, 46(1): 16-23.
- [9] 刘俊朝, 和永瑞, 薛媛媛, 等. 青春早期 SD 雌性大鼠在阿霉素肾病模型过程中生长发育的变化 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2016, 8(4): 383-386.
- [10] Zan J, Shen C, Zhang L, *et al.* Effect of Poria cocos hydroethanolic extract on treating adriamycin-induced rat model of nephrotic syndrome [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(12): 916-922.
- [11] Kunitomo M, Yamaguchi Y, Matsushima K, *et al.* Hyperlipidemic effects of adriamycin in rats [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1985, 39(3): 323-329.
- [12] Liu G, Wang Q, Shi Y, *et al.* Resveratrol attenuates adriamycin-induced focal segmental glomerulosclerosis through C3aR/C5aR-sphingosine kinase 1 pathway [J]. *Pharmacology*, 2017, 100(5/6): 253-260.
- [13] Amore A, Mazzucco G, Cavallo F, *et al.* Adriamycin-induced proteinuria in nude mice: An immune-system-mediated toxic effect [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1996, 11(6): 1012-1018.
- [14] Zheng Z, Schmidt K M, Chua S, *et al.* A mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(7): 2502-2507.
- [15] De B E, Navis G, Tiebosch A T, *et al.* Systemic factors are involved in the pathogenesis of proteinuria-induced glomerulosclerosis in adriamycin nephrotic rats [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(11): 2359-2366.
- [16] Liu G, Shi Y, Peng X, *et al.* Astaxanthin attenuates adriamycin-induced focal segmental glomerulosclerosis [J]. *Pharmacology*, 2015, 95(3/4): 193-200.
- [17] Hussein A M, Eldosoky M, Handhale A, *et al.* Effects of long-acting erythropoietin analog darbepoetin- $\alpha$  on adriamycin-induced chronic nephropathy [J]. *Int Urol Nephrol*, 2016, 48(2): 287-297.
- [18] Fernández-Llama P, Andrews P, Nielsen S, *et al.* Impaired aquaporin and urea transporter expression in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome [J]. *Kidney Int*, 1998, 53(5): 1244-1253.
- [19] 李爱平, 张王宁, 秦雪梅. 阿霉素肾病大鼠模型的优化 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 151-159.
- [20] 杨维娜, 于琳华, 郭尚温, 等. 改良阿霉素肾病大鼠模型的建立 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2009, 30(4): 445-448.
- [21] 蔺建军, 杨 勇, 高 娜, 等. 阿霉素注射次数及剂量对肾病综合征模型的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(8): 676-678.
- [22] Tacar O, Sriamornsak P, Dass C R. Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(2): 157-170.
- [23] 梁春玲. miRNA 与 AQP2 在真武汤治疗阿霉素肾病综合征中的作用机理研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [24] 张 勇, 张 蓓, 宁华英, 等. 单次尾静脉注射法阿霉素大鼠肾病模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(1): 1-4.
- [25] Liu S, Jia Z, Zhou L, *et al.* Nitro-oleic acid protects against adriamycin-induced nephropathy in mice [J]. *Am J Physiol*, 2013, 305(11): F1533-F1541.
- [26] 张王宁, 李爱平, 刘少博, 等. 基于代谢组学的阿霉素肾病大鼠模型损伤程度评价 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 360-367.
- [27] Jat P S, Noble M D, Ataliotis P, *et al.* Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88(12): 5096-5100.
- [28] 范青锋, 丁 洁. 肾小球足细胞系的研究进展 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2005, 20(1): 71-72.
- [29] Ohse T, Pippin J W, Vaughan M R, *et al.* Establishment of conditionally immortalized mouse glomerular parietal epithelial cells in culture [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(10): 1879-1890.
- [30] Miao L, Wei D, Zhang Y, *et al.* Effects of stromal interaction molecule 1 or orail overexpression on the associated proteins and permeability of podocytes [J]. *Nephrology*, 2016, 21(11): 959-967.
- [31] Yuan Y, Zhao C, An X, *et al.* A vital role for myosin-9 in puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury by affecting actin cytoskeleton [J]. *Free Rad Res*, 2016, 50(6): 627-637.
- [32] Li T, Mao J, Huang L, *et al.* Huaqi Huang may protect from proteinuria by resisting MPC5 podocyte damage via targeting p-ERK/CHOP pathway [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2016, 16(3): 193-200.
- [33] 刘淑芳, 丁 洁, 范青锋, 等. 嘌呤霉素致足细胞损伤细胞模型的建立 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2008, 40(6): 586-589.
- [34] Miao L, Wei D, Zhang Y, *et al.* Effects of stromal interaction molecule 1 or Orail overexpression on the associated proteins and permeability of podocytes [J]. *Nephrology*, 2016, 21(11): 959-967.
- [35] 闫梦苗, 刘光珍. 复方蛇龙胶囊的拆方研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, (10): 2383-2385.
- [36] Che R, Zhu C, Ding G, *et al.* Huaier cream protects against adriamycin-induced nephropathy by restoring mitochondrial function via PGC-1 $\alpha$  upregulation [J]. *PPAR Res*, 2015, 2015: 720383.
- [37] 闫梦苗, 刘光珍. 阿霉素致足细胞损伤模型的建立 [J]. 医学分子生物学杂志, 2017, 14(1): 14-17.
- [38] 陈秀萍, 覃远汉, 雷凤英, 等. 全反式维甲酸受体在阿霉素致足细胞损伤中的表达及作用 [J]. 广西医学,

- 2014(5): 556-560.
- [39] Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome [J]. *Mol Cell*, 1998, 1(4): 575-582.
- [40] Boute N, Gribouval O, Roselli S, *et al.* NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome [J]. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 349-354.
- [41] Donoviel D B, Freed D D, Vogel H, *et al.* Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(14): 4829-4836.
- [42] Angst B D, Marozzi C, Magee A I. The cadherin superfamily [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(4): 625-626.
- [43] Lv Z, Hu M, Ren X, *et al.* Fyn mediates high glucose-induced actin cytoskeleton reorganization of podocytes via promoting ROCK activation *in vitro* [J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 5671803.
- [44] Liu Y, Su L, Lin Q, *et al.* Induction of C-Mip by IL-17 plays an important role in adriamycin-induced podocyte damage [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4): 1274-1290.
- [45] Zhang S, Kamal M, Dahan K, *et al.* C-mip impairs podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria [J]. *Sci Signal*, 2010, 3(122): ra39.
- [46] Akchurin O, Reidy K J. Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: Impact on podocyte pathobiology [J]. *Pediatr Nephrol*, 2015, 30(2): 221-233.
- [47] Völker L A, Petry M, Abdelsabour-Khalaf M, *et al.* Comparative analysis of Neph gene expression in mouse and chicken development [J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, 137(3): 355-366.
- [48] Hulkko J, Patrakka J, Lal M, *et al.* Neph1 is reduced in primary focal segmental glomerulosclerosis, minimal change nephrotic syndrome, and corresponding experimental animal models of adriamycin-induced nephropathy and puromycin aminonucleoside nephrosis [J]. *Nephron Extra*, 2014, 4(3): 146-154.
- [49] Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, *et al.* Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(5): 485-491.
- [50] Guo N, Guo J, Su D. MicroRNA-206 and its down-regulation of Wilms'tumor-1 dictate podocyte health in adriamycin-induced nephropathy [J]. *Ren Fail*, 2016, 38(6): 989-995.
- [51] 马进, 范志宏. 整合素的研究进展 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2004, 24(1): 11-13.
- [52] 韩雯雯.  $\alpha 3\beta 1$  整合素与足细胞病变 [J]. 国际泌尿系统杂志, 2015, 35(5): 787-790.
- [53] Nicolaou N, Margadant C, Kevelam S H, *et al.* Gain of glycosylation in integrin  $\alpha 3$  causes lung disease and nephrotic syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(12): 4375-4387.
- [54] Jha J C, Banal C, Okabe J, *et al.* NADPH oxidase Nox5 accelerates renal injury in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2017, 66(10): 2691-2703.
- [55] Kawamorita Y, Shiraishi T, Tamura Y, *et al.* Renoprotective effect of topiroxostat via antioxidant activity in puromycin aminonucleoside nephrosis rats [J]. *Physiol Rep*, 2017, 5(15): e13358.
- [56] Badary O A, Abdel-Naim A B, Abdel-Wahab M H, *et al.* The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats [J]. *Toxicology*, 2000, 143(3): 219-226.
- [57] Tan R J, Zhou D, Xiao L, *et al.* Extracellular superoxide dismutase protects against proteinuric kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(10): 24-47.
- [58] Mo H, Wu Q, Miao J, *et al.* Chemokine receptor CXCR4 plays a crucial role in mediating oxidative stress-induced podocyte injury [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 17(2): S77.
- [59] Yoshinari D, Takeyoshi I, Koibuchi Y, *et al.* Effects of a dual inhibitor of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Crit Care Med*, 2001, 29(3): 628-634.
- [60] Furuichi K, Wada T, Iwata Y, *et al.* Administration of FR167653, a new anti-inflammatory compound, prevents renal ischaemia/reperfusion injury in mice [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(3): 399-407.
- [61] Li J, Campanale N V, Liang R J, *et al.* Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and transforming growth factor- $\beta 1$ /Smad signaling pathways modulates the development of fibrosis in adriamycin-induced nephropathy [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(5): 1527-1540.
- [62] Ge J, Miao J J, Sun X Y, *et al.* Huangkui capsule, an extract from *Abelmoschus manihot* (L.) medic, improves diabetic nephropathy via activating Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha/\gamma$  and attenuating endoplasmic reticulum stress in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 189: 238-249.
- [63] Daha M R, Van Kooten C. Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(Suppl 6): 41-43.
- [64] Zhong F, Chen H, Han L, *et al.* Curcumin attenuates lipopolysaccharide-induced renal inflammation [J]. *Chin J Integr Tradit And West Nephrol*, 2009, 34(2): 226-232.
- [65] Zhong F, Wang W M, Lee K, *et al.* Role of C/EBP- $\alpha$  in adriamycin-induced podocyte injury [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33520.
- [66] Vaziri N D, Wong J, Pahl M, *et al.* Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora [J]. *Kidney Int*, 2013, 83(2): 308-315.
- [67] Jiang Q, He X, Zou Y, *et al.* Altered gut microbiome promotes proteinuria in mice induced by adriamycin [J]. *AMB Express*, 2018, 8(1): 31.

- [68] Fahim M A, Kataya H, El-Kharraz R, *et al.* Ghrelin attenuates gastrointestinal epithelial damage induced by doxorubicin [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(33): 3836-3841.
- [69] Bajaj J S, Ridlon J M, Hylemon P B, *et al.* Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy [J]. *Am J Physiol*, 2016, 302(1): 168-175.
- [70] Agrawal S, Zaritsky J J, Fornoni A, *et al.* Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: Mechanisms and treatment [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 14(1): 70.
- [71] Liang C, Wu J, Lai J, *et al.* Protection effect of Zhen-Wu-Tang on adriamycin-induced nephrotic syndrome via inhibiting oxidative lesions and inflammation damage [J]. *J Evidence-Based Compl Altern Med*, 2014, doi: 10.1155/2014/131604.
- [72] 王海燕, 李惊子, 潘辑圣, 等. 中药黄芪当归合剂对肾病综合征肾损伤的保护作用及对代谢紊乱的影响 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2002, 34(5): 542-552.
- [73] Wang Y, Gusarova V, Banfi S, *et al.* Inactivation of ANGPTL3 reduces hepatic VLDL-triglyceride secretion [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(7): 1296-1307.
- [74] 王玉柱. 血管生成素样蛋白 3 (ANGPTL3) 与高脂血症性急性胰腺炎的相关性研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [75] Liu J, Gao X, Zhai Y, *et al.* A novel role of angiopoietin-like-3 associated with podocyte injury [J]. *Pediatric Res*, 2015, 77(6): 732-739.
- [76] Lin Y, Rao J, Zha X, *et al.* Angiopoietin-like 3 induces podocyte F-actin rearrangement through integrin/FAK/PI3K pathway-mediated rac1 activation [J]. *Biomed Res Inter*, 2013, 2013: 135608.
- [77] Falke L L, Gholizadeh S, Goldschmeding R, *et al.* Diverse origins of the myofibroblast-implications for kidney fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015, 11(4): 233-244.
- [78] Guo Y, Xiao L, Sun L, *et al.* Wnt/beta-catenin signaling: A promising new target for fibrosis diseases [J]. *Physiol Res*, 2012, 61(4): 337-346.
- [79] Sutariya B, Jhonsa D, Saraf M N. TGF- $\beta$ : The connecting link between nephropathy and fibrosis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2016, 38(1): 39-49.
- [80] Greene I. *Kaempferol and Esculetin as Potential Therapeutic Agents in Chronic Renal Allograft Injury* [M]. Mount Sinai: Icahn School of Medicine, 2015.
- [81] Jia L, Ma X, Gui B, *et al.* Sorafenib ameliorates renal fibrosis through inhibition of TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117757.
- [82] Liu W J, Luo M N, Tan J, *et al.* Autophagy activation reduces renal tubular injury induced by urinary proteins [J]. *Autophagy*, 2014, 10(2): 243-256.
- [83] Button R W, Vincent J H, Strang C J, *et al.* Dual PI-3 kinase/mTOR inhibition impairs autophagy flux and induces cell death independent of apoptosis and necroptosis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5157-5175.
- [84] Cinà D P, Onay T, Paltoo A, *et al.* Inhibition of mTOR disrupts autophagic flux in podocytes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(4): 412-420.
- [85] Nicolaou N, Margadant C, Kevelam S H, *et al.* Gain of glycosylation in integrin  $\alpha 3$  causes lung disease and nephrotic syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(12): 4375-4387.
- [86] Jiang L, Ding J, Tsai H, *et al.* Over-expressing transient receptor potential cation channel 6 in podocytes induces cytoskeleton rearrangement through increases of intracellular  $Ca^{2+}$  and RhoA activation [J]. *Exp Biol Med*, 2011, 236(2): 184-193.
- [87] Möller C C, Wei C, Altintas M M, *et al.* Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(1): 29-36.
- [88] Wang Z, Wei X, Zhang Y, *et al.* NADPH oxidase-derived ROS contributes to upregulation of TRPC6 expression in puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2009, 24(5/6): 619-626.
- [89] Schloöndorff J, del Camino D, Carrasquillo R, *et al.* TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription [J]. *Am J Physiol*, 2009, 296(3): C558-C569.
- [90] Lee H S, Song C Y. Effects of TGF- $\beta$  on podocyte growth and disease progression in proliferative podocytopathies [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2010, 33(1): 24-29.
- [91] Yu L, Lin Q, Liao H, *et al.* TGF- $\beta$ 1 induces podocyte injury through Smad3-ERK-NF- $\kappa$ B pathway and Fyn-dependent TRPC6 phosphorylation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 26(6): 869-878.
- [92] Zhou L, Liu Y. Wnt/[beta]-catenin signalling and podocyte dysfunction in proteinuric kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015, 11(9): 535-545.
- [93] Zhou J, Yuan W J, Feng Y, *et al.* Down-regulation of Wt1 activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling through modulating endocytic route of LRP6 in podocyte dysfunction *in vitro* [J]. *Cell Signalling*, 2015, 27(9): 1772-1780.
- [94] Zhang H, Ren R, Du J, *et al.* AF1q contributes to adriamycin-induced podocyte injury by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2017, 42(5): 794-803.