

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.06.002

黄芪甲苷联合骨髓间充质干细胞对糖尿病肾病大鼠的肾脏保护作用研究 *

高崇婷¹ 桂定坤^{1,2Δ} 翟若男¹ 谢玲³ 苏君¹ 叶丹³

(1 上海交通大学附属第六人民医院肾内科 上海 200233;

2 上海健康医学院附属第六人民医院东院肾脏风湿科 上海 201306; 3 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 目的:研究黄芪甲苷 (Astragaloside IV, AS-IV)联合骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)对链脲佐菌素 (Streptozocin, STZ) 诱导的糖尿病肾病 (Diabetic nephropathy, DN) 大鼠肾脏的保护作用。**方法:**8 周龄正常雄性 SD (Sprague Dawley, SD)随机选取 8 只作为正常对照组,其余大鼠给予腹腔注射 60 mg/kg 剂量 STZ 建立糖尿病模型。造模成功的大鼠随机分为模型组、BMSCs 组和 BMSCs + AS-IV 组,每组 8 只。BMSCs+AS-IV 组给予 AS-IV 口服灌胃治疗。BMSCs 组与 BMSCs+AS-IV 组给予尾静脉注射 BMSCs,正常对照组和模型组尾静脉注射相同剂量的无血清 DMEM 培养基。于第 10 周末收集大鼠 24 小时尿液,并留取肾脏组织,测定 24 h 尿白蛋白排泄,观察肾脏病理改变,并采用免疫组织化学方法检测肾脏组织中 α -SMA、Desmin、Nephrin、NOX4 的表达。**结果:**与模型组相比,BMSCs 组与 BMSCs+AS-IV 组大鼠的肾脏病理损伤明显改善,肾小球系膜细胞增生,系膜基质增多;肾组织中 NOX4、Desmin 和 α -SMA 蛋白表达降低,Nephrin 蛋白表达增加,24 h 尿白蛋白排泄均明显减轻,且 BMSCs 联合 AS-IV 治疗组效果更显著($P<0.05$)。**结论:**AS-IV 联合 BMSCs 治疗可缓解糖尿病肾病大鼠肾脏病理损伤,改善 DN 大鼠肾组织的氧化应激,改善肾脏足细胞转分化,从而减轻蛋白尿排泄,具有肾脏保护作用。

关键词:黄芪甲苷;骨髓间充质干细胞;糖尿病肾病;氧化应激

中图分类号:R-33;R587.2;R331.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)06-1006-05

Renal Protective Effect of Astragaloside IV Combined with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on STZ-induced Diabetic Rats*

GAO Chong-ting¹, GUI Ding-kun^{1,2Δ}, ZHAI Ruo-nan¹, XIE Ling³, SU Jun¹, YE Dan³

(1 Department of Nephrology, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai, 200233, China;

2 Department of nephrorheumatology, Shanghai Health Medical College Affiliated Sixth People's Hospital East Hospital, Shanghai, 201306, China; 3 Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China)

ABSTRACT Objective: To study the renal protective effect of Astragaloside IV (AS-IV) combined with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on streptozotocin (STZ) induced type 1 diabetic rats. **Methods:** Eight male Sprague-Dawley (SD) rats aged 8 weeks were randomly selected as the normal control group, and the remaining rats were given intraperitoneal injection of STZ (60 mg/kg) to establish type 1 diabetes models. The diabetic rats were randomly divided into model group, BMSCs treatment group and BMSCs + AS-IV treatment group (n=8). BMSCs+AS-IV group was given AS-IV solution by oral gavage. BMSCs group and BMSCs+AS-IV group were injected with BMSCs by caudal vein. The normal control group and model group were injected with the same dose of serum-free DMEM culture medium. At the end of the 10th week, the excretion of urine albumin and renal histopathology were examined. The expressions of α -SMA, Desmin, Nephrin and NOX4 in the renal tissues were detected by immunohistochemistry. **Results:** Compared with diabetes model group, the renal pathological injury was significantly improved, the expression of NOX4, α -SMA and Desmin in the renal tissue was decreased, the expression of Nephrin was increased, and the excretion of urinary protein was reduced in BMSCs treatment group and BMSCs + AS-IV treatment group, and the combination treatment group was more significant. **Conclusions:** Treatment of AS-IV combined with BMSCs can alleviate renal pathological injury in DN rats, improve oxidative stress and reduce proteinuria excretion, has a protective effect on the kidney of STZ-induced type 1 diabetic rats.

Key words: Astragaloside IV; Bone marrow mesenchymal stem cells; Diabetic nephropathy; Oxidative stress

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R587.2; R331.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)06-1006-05

* 基金项目:上海市浦东新区科技发展基金项目(PKJ2015-Y10);国家自然科学基金面上项目(81573738);

上海健康医学院师资人才百人库项目

作者简介:高崇婷(1993-),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治糖尿病肾病基础研究,

电话:18817573609, E-mail: gao_tutu@sjtu.edu.cn

Δ 通讯作者:桂定坤(1978-),男,博士,主任医师,研究方向:中西医结合防治肾脏病,电话:18017579169, E-mail: dingkungui@alufudan.edu.cn

(收稿日期:2019-08-23 接受日期:2019-09-18)

前言

DN 是糖尿病的常见微血管并发症之一,随着疾病的进展,肾脏结构和功能障碍将难以逆转^[1],足细胞 (podocyte) 是肾小球滤过屏障的重要成分之一,与 DN 的进展密切相关^[2],缺乏早期且有效的干预措施是目前 DN 防治面临的瓶颈问题。我国传统中药以其多位点、整体调节的特点,在 DN 的防治表现出一定的优势。中医学认为, DN 属 " 消渴 "、" 水肿 " 等范畴,基本病机为本虚标实、气阴两虚,益气是 DN 的基本治法之一。黄芪 (Astragalus membranaceus) 是传统的 " 健脾益气 " 中药,具有补气升阳、利水消肿等功效,临床 Meta 分析显示黄芪具有肾脏保护作用,是临床防治 DN 的常用中药^[3]。黄芪甲苷是黄芪的主要活性成分之一,其抗炎、抗氧化及免疫调节等生物学特性在大量实验中得到证实^[4]。

BMSCs 是一类有多向分化潜能的成体干细胞,可以分化为骨、肌肉、脂肪等间充质组织。有研究表明 BMSCs 在抗炎、抗氧化应激和免疫调节中都可发挥重要作用^[5],能在受损组织中进行分化并修复相应组织^[6]。研究发现 AS-IV 能促进 BMSC 的增殖,增加干细胞因子 (Stem cell factor, SCF) 的分泌^[7],还能减少高糖所致的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 表达的增加减轻炎症反应^[8]。

本实验通过建立 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠模型^[9],采用 AS-IV 与 BMSCs 联合治疗,进一步探讨 AS-IV 与 BMSCs 联合治疗对 DN 的保护作用,为 DN 提供新的治疗依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用动物为 6 周龄雄性 SD 大鼠,购自复旦大学实验动物中心。黄芪甲苷购自中国西安赛邦医药科技有限公司 (检验纯度 $\geq 98\%$)。链脲佐菌素购自美国西格玛奥德里奇 (Sigma-Aldrich) 公司。胎牛血清购自 (Gibco) 公司。L-DMEM 培养液购自 (Gibco) 公司。Nephrin 抗体购自美国西格玛奥德里奇 (Sigma-Aldrich) 公司, α -SMA、Desmin、NOX4 抗体均购自艾博抗 (Abcam) 公司。全自动生化仪 (日立, HITACHI 7600-120E)。显微镜 (莱卡, Leica)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠骨髓间充质干细胞分离与培养 选择 6 只 SD 大鼠,获得动物骨髓,进行骨髓间充质干细胞分离与培养,用 4% 水合氯醛麻醉,获得大鼠双侧股骨、胫骨,利用含胎牛血清的 L-DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞悬液并接种在培养瓶中,加入到含有胎牛血清的 L-DMEM 培养液重悬细胞,制成单细胞悬液,接种到 6 孔板中,置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养;每天进行细胞观察;当出现梭形细胞为主、类成纤维细胞的 BMSCs 集落且达 80% 汇合度后,用 0.05% 胰蛋白酶, 37 °C 消化 2 min,按 1:2 的传代比例进行铺板,置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱中培养,记为第 1 代 (P1),然后进行传代和培养。

1.2.2 大鼠骨髓间充质干细胞鉴定 大鼠骨髓间充质干细胞呈现出基本一致的长梭形,骨髓间充质干细胞表面抗原表达经流式细胞仪检测,第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞抗原 CD29 表达阳性率为 96 %, CD90 表达阳性率为 93%, 但不表达 CD34

(1.9 %) 和 CD45 (2.3 %),表明培养所得细胞为骨髓间充质干细胞。

1.2.3 流式细胞检测方法 收集第三代 (P3) BMSCs 细胞, PBS 洗涤后制备单细胞悬液。细胞分为 3 份, 分别加入 CD29、CD34-PE 抗体;充分混匀,常温避光孵育 1 个小时,离心 5 分钟后弃上清,加入 PBS 轻轻重悬细胞。然后采用流式细胞仪检测其表面抗原表达,记录数据。

1.2.4 动物分组与给药 6 周龄雄性 SD 大鼠,在 SPF 级环境中适应性喂养 2 周。随机取 8 只 SD 大鼠作为正常对照组,其余大鼠给予腹腔注射 60 mg/kg 剂量 STZ 建立糖尿病模型,注射 72 h 后尾静脉采血测量随机血糖,随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 的大鼠则确认为 1 型糖尿病模型成功。将造模成功的大鼠随机分为模型组、BMSCs 组、BMSCs + AS-IV 组,每组 8 只。取第 3 代 (P3) 骨髓间充质干细胞,利用胰蛋白酶进行消化,用含胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,离心,用无血清 DMEM 培养基悬浮细胞。用生理盐水将第 3 代 (P3) MSCs 制成单细胞悬液,模型组 BMSCs 组与 MSCs + AS-IV 组予尾静脉注射 BMSCs ($4 \times 10^6/500 \mu\text{L}$),首次移植后 2、4 周,分别进行第 2、3 次移植,共移植 3 次,正常对照组和模型组予尾静脉注射相同剂量的无血清 DMEM 培养基。同时 BMSCs + AS-IV 组给予 AS-IV (10 mg/kg) 口服灌胃治疗,连续 10 周。

1.2.5 标本采集及检测 (1) 尿液标本采集及检测方法 灌胃第 10 周末,将大鼠置于大鼠代谢笼中,自主饮水进食,收集 24 h 所有尿液。将所收集的尿液离心,弃沉渣留取上清,记录尿量,保存待送检。采用全自动生化仪检测尿液生化指标。(2) 肾脏组织病理标本采集及检测方法 灌胃第 10 周末,用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,手术暴露心脏及肾脏,用生理盐水对心脏进行灌流直至肾脏颜色发白,迅速取下肾脏,去除肾包膜,沿肾蒂剖开肾脏。将肾组织迅速放入 10% 福尔马林溶液中固定。将固定完成后的肾脏组织酒精梯度脱水,石蜡包埋。切片后进行 HE 及 PAS 染色,用显微镜观察肾脏组织病理改变。(3) 肾脏组织免疫组织化学检测 将切好的石蜡白片放入 60 °C 烘箱, 30 分钟后依次用二甲苯及梯度酒精脱蜡处理。随后将已脱蜡的片子进行抗原修复,用 PAP 组化笔在肾脏周围画疏水圈,滴加 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶, 5% 山羊血清封闭后孵第一抗体 (4 °C 过夜),用 TBST 溶液洗 3 次每次 5 分钟,孵第二抗体 (室温, 60 分钟),用 TBST 溶液洗 3 次每次 5 分钟,将片子擦拭干净后滴加 DAB 显色液 (观察颜色变为棕黄色时用双蒸水终止显色),用苏木精染液进行核染色,梯度酒精及二甲苯脱水后用中性树胶封片。用显微镜进行观察,拍片。

1.3 统计学方法

本实验数据采用 GraphPad Prism 5.0 和 SPSS 24.0 软件进行分析,计量资料的组间显著性检验采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 AS-IV 与 BMSCs 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠尿蛋白的影响

给予 SD 大鼠 AS-IV 与 BMSCs 治疗 10 周后,留取大鼠 24 h 尿液进行尿蛋白的检测,结果发现,与正常对照组相比,模型组大鼠 24 h 尿蛋白排泄明显升高,提示糖尿病大鼠出

现肾脏损伤;与模型组相比,BMSCs 组与 AS-IV+BMSCs 组大鼠的 24 h 尿白蛋白水平均明显降低,且 AS-IV+BMSCs 组降低更为显著。表明,BMSCs 能明显改善 1 型糖尿病大鼠的尿蛋白排泄,且联合 AS-IV 治疗效果更明显。

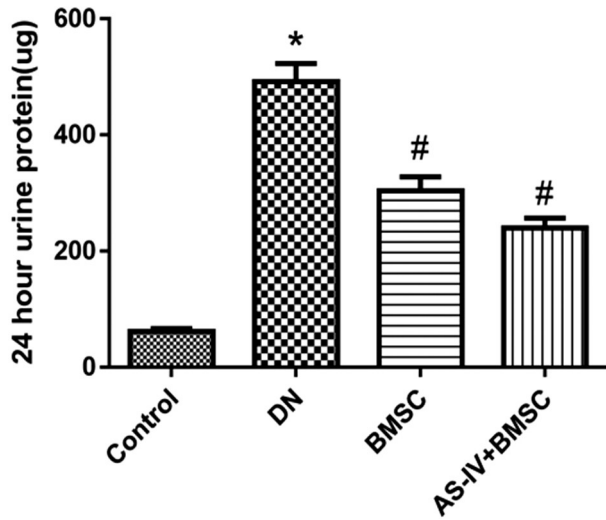


图1 AS-IV 与 BMSCs 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠蛋白尿的影响

Fig.1 Effect of AS-IV and BMSCs on albuminuria in type 1 diabetes model rats

Note: Data were expressed as $\pm$ SD, $n=8$. * $P<0.05$, compared with the normal group; # $P<0.05$, compared with the diabetic model group.

2.2 AS-IV 与 BMSCs 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠肾脏病理改变的影响

在灌胃第 10 周末留取大鼠肾脏组织标本进行 HE 及 PAS 染色。可观察到,正常组肾小球结构清晰、形状规则。与正常组相比,模型组大鼠肾脏发生显著的病理改变,肾小球系膜细胞的增生,系膜基质增多;与模型组相比,BMSCs 组与 AS-IV+BMSCs 组肾小球系膜细胞增生与系膜基质增多得到显著性改善。表明,AS-IV 与 BMSCs 能够明显改善 1 型糖尿病大鼠的肾脏病理改变。

2.3 AS-IV 与 BMSCs 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠肾脏 Nephlin、 α -SMA 及 Desmin 蛋白表达的影响

通过免疫组织化学方法检测大鼠肾脏中 α -SMA、Desmin 及 Nephlin 的表达情况,进一步探讨 AS-IV 与 BMSCs 对 1 型糖尿病大鼠肾脏的影响。结果发现,与正常对照组相比,模型组大鼠肾脏 Nephlin 蛋白的表达明显减少;与模型组相比, BMSCs 组与 AS-IV+BMSCs 组大鼠肾脏 Nephlin 蛋白表达明显上调。与正常对照组相比,模型组大鼠肾脏 α -SMA 与 Desmin 表达明显增多;与模型组相比,BMSCs 组与 AS-IV+BMSCs 组大鼠肾脏 α -SMA 与 Desmin 蛋白表达均明显下降。表明,AS-IV 与 BMSCs 能够改善 1 型糖尿病大鼠肾脏足细胞转分化。

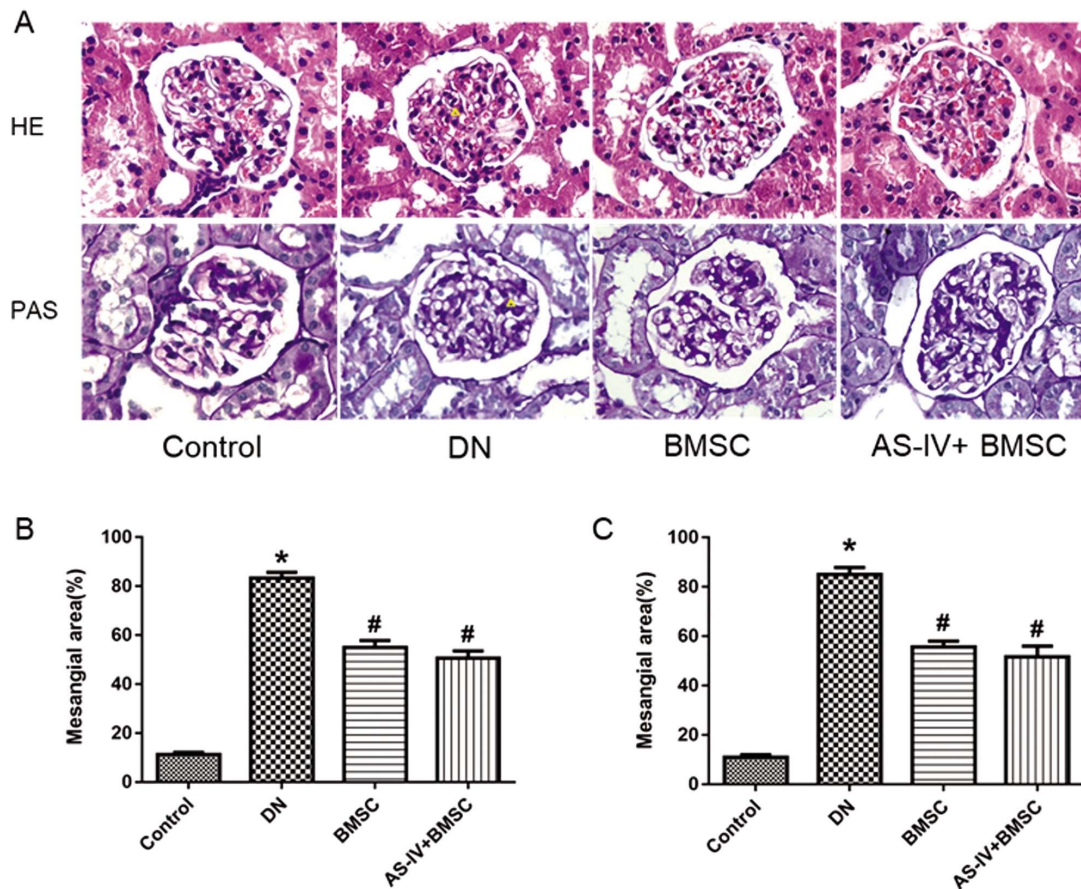


图2 AS-IV 与 BMSCs 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠肾脏病理改变的影响

Fig.2 Effect of AS-IV and BMSCs on pathological staining in type 1 diabetes model rats

Note: A: HE and PAS staining of rats' kidney tissue (400 $\times$); B: Semi-quantitative analysis of HE; C: Semi-quantitative analysis of PAS. * $P<0.05$, compared with the normal group; # $P<0.05$, compared with the diabetic model group.

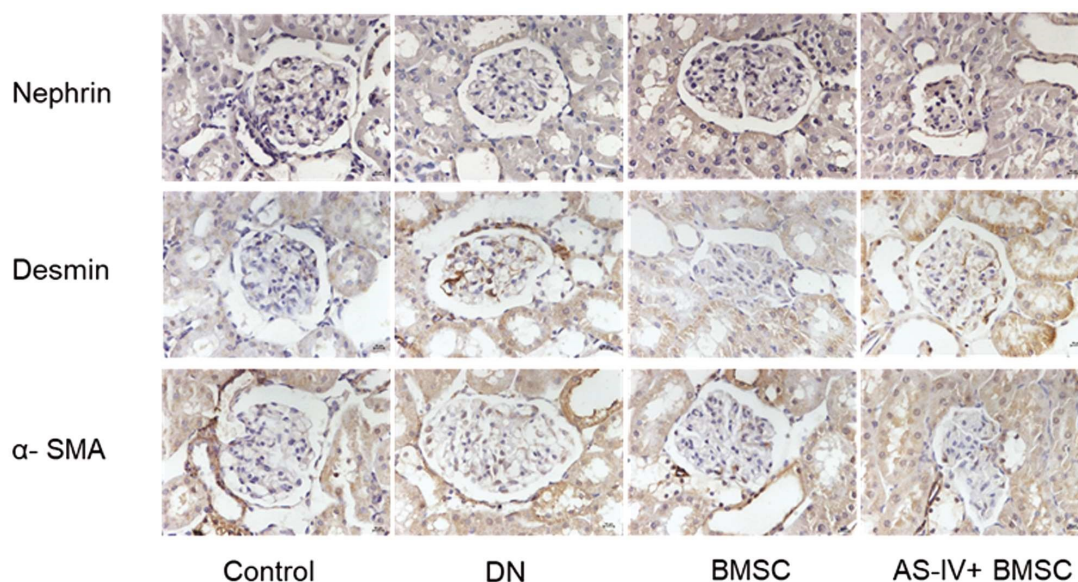


图3 AS-IV 与 BMSCs 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠肾脏 Nephlin、 α -SMA 及 Desmin 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of AS-IV and BMSCs on Nephlin, α -SMA and Desmin protein expression of kidney in type 1 diabetes model rats

Note: Immunohistochemical staining of rats' kidney tissue (400 $\times$)

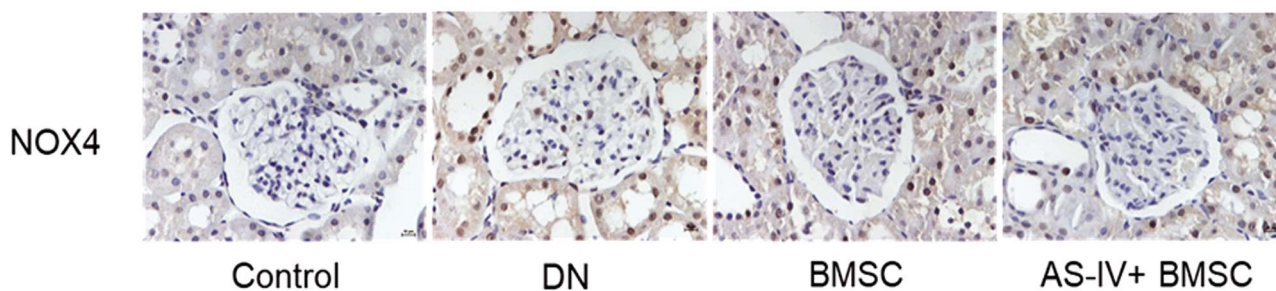


图4 AS-IV 与 BMSCs 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠肾脏 Nox4 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of AS-IV and BMSCs on Nox4 protein expression of kidney in type 1 diabetes model rats

Note: Immunohistochemical staining of rats' kidney tissue (400X)

2.4 AS-IV 与 BMSCs 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病大鼠肾脏 NOX4 蛋白表达的影响

通过免疫组织化学方法检测大鼠肾脏中 NOX4 蛋白表达情况,进一步探讨 AS-IV 与 BMSCs 对 1 型糖尿病大鼠肾组织氧化应激的影响。结果发现,与正常对照组相比,模型组大鼠肾脏 NOX4 蛋白表达明显增多;与模型组相比,BMSCs 组与 AS-IV+BMSCs 组 NOX4 蛋白表达明显下降。表明,AS-IV 与 BMSCs 能够降低 1 型糖尿病大鼠肾组织氧化应激。

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病常见的微血管并发症,是引发终末期肾脏病(End-stage renal disease, ESRD)的重要病因之一,当进展至 ESRD 时,肾损伤是不可逆的,只能通过透析及肾脏移植维持生命。DN 的发病机制复杂,与多种基因、蛋白、代谢途径及环境因素相关^[10]。微量蛋白尿是糖尿病患者出现肾脏损伤的早期表现,是糖尿病肾病临床肾脏受损最早期、最敏感的指标^[11]。蛋白尿的发生与肾小球滤过屏障受损有关,多伴随着肾脏组织病理学改变,如细胞外基质沉积,肾小球基底膜增厚和系膜增生等。DN 的现行治疗策略主要有:控制血糖、调节血脂、降低

血压及减少蛋白尿,目前临床上多用阻断肾素-血管紧张素-醛固酮系统药物控制其进展^[12]。然而这些治疗措施并不能完全阻止 DN 的进展,晚期患者则需要通过透析及肾移植维持生命。因此,寻找早期且有效的干预措施来延缓甚至阻断 DN 的进展迫在眉睫。

针对 DN 这一发病机制复杂的内分泌代谢病,我国传统中医药以其整体、多位点调控疾病的发生发展过程的优势,被广泛用于临床 DN 辅助治疗。传统中医学认为“气阴两虚”是 DN 的基本病机,益气法是 DN 的基本治法之一。黄芪是一味“补中益气、健脾利水”的传统中草药,能减少尿蛋白具有肾脏保护作用,现已广泛应用于临床糖尿病、慢性肾炎蛋白尿的辅助治疗^[13]。黄芪甲苷是黄芪的重要有效成分,多项研究表明其具有免疫调节、抗炎、抗病毒、调节细胞凋亡等多方面的药理作用,在心衰、慢性哮喘、糖尿病外周神经病变等多种疾病中都发挥着重要作用^[14]。BMSCs 是一种具有多种分化能力的非造血干细胞^[15],有抗炎、免疫调节及修复受损组织等作用^[16],在临床得到越来越广泛的应用^[17]。本研究通过 STZ 诱导建立 1 型糖尿病大鼠模型,探究 AS-IV 与 BMSCs 对 DN 大鼠的疗效及其机制。与正常对照组相比,模型组大鼠 24 h 尿蛋白排泄明显升

高,肾脏发生明显的病理改变,肾小球系膜增厚,系膜基质增生。AS-IV 与 BMSCs 干预 10 周后,治疗组大鼠 24 h 尿白蛋白排泄较模型组明显减少且 AS-IV 联合 BMSCs 治疗降蛋白效果更佳显著,同时可观察到肾脏病理改变也有所改善,说明 AS-IV 与 BMSCs 对 DN 大鼠肾脏具有一定的保护作用。

DN 是典型的足细胞损伤性疾病,足细胞是附着于肾小球基底膜外侧的一种高度分化的终末期细胞,是构成肾小球滤过膜的一道重要屏障,当足细胞发生损伤时,肾小球滤过屏障受损,启动 DN 蛋白尿和肾小球硬化。蛋白尿与肾小球损伤的严重程度成正相关^[18]。足细胞具有多种病理损伤途径,与 DN 进展密切相关。足细胞凋亡(Apoptosis)可由高糖直接诱导,是 DN 早期进展的重要机制之一;持续的高糖刺激还能可导致足细胞脱落,足细胞与肾小球基底膜之间的粘附力降低,加重 DN 进展^[19];足细胞上皮-间充质细胞转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是导致 DN 进展的另一重要机制,上皮细胞转化为间质细胞,足细胞损伤,肾小球滤过屏障受损,进一步加重 DN 的进展^[20,21]。肾病蛋白(Nephrin)是构成足细胞裂孔隔膜的主要蛋白,与肾小球滤过屏障密切相关,当足细胞发生损伤时 Nephrin 蛋白表达下降^[22]。本实验结果显示,模型组大鼠肾脏 Nephrin 蛋白表达水平较正常组明显下降,经 AS-IV 与 BMSCs 干预 10 周后, Nephrin 蛋白的表达均增加。 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)是由肌成纤维细胞分泌的一种蛋白,参与组织修复,与肾间质纤维化密切相关,是足细胞转分化的标志性蛋白^[23]。结蛋白(Desmin)是一种细胞骨架中间的丝蛋白成分,当足细胞发生转分化时,其表达量明显增加^[22]。本实验中,与正常组大鼠相比,模型组大鼠肾脏 α -SMA 与 Desmin 蛋白表达明显增多,表示发生明显的肾间质纤维化及足细胞转分化损伤,给予 AS-IV 与 BMSCs 干预后 α -SMA 与 Desmin 蛋白表达均明显下降。

近年来研究表明氧化应激在 DN 的发生与发展过程中均发挥着关键作用^[24]。还原型辅酶 II 氧化酶 4 (NOX4)是 DN 早期活性氧族(ROS)的主要来源,是氧化应激重要标志蛋白之一^[25]。本研究通过观察肾脏组织中 NOX4 的表达探讨 AS-IV 与 BMSCs 对 DN 肾组织氧化应激的作用,实验发现,与正常组大鼠相比,模型组大鼠肾脏组织中 NOX4 的表达增多,提示 DN 大鼠肾组织发生氧化应激;经 AS-IV 与 BMSCs 干预后的大鼠肾组织中 NOX4 表达较模型组明显减少,提示 DN 大鼠的肾脏组织中氧化应激水平有所缓解。

综上所述,AS-IV 与 BMSCs 能够改善 DN 大鼠肾脏病理损伤及足细胞相关蛋白 Nephrin、 α -SMA 与 Desmin 蛋白的表达,同时减轻肾组织氧化应激,有效减轻 DN 大鼠的尿蛋白排泄,对 DN 具有肾脏保护作用,且 AS-IV 联合 BMSCs 干预后降低蛋白尿效果更加显著。因此,AS-IV 与 BMSCs 对 DN 的肾脏保护作用可能是通过减轻肾组织氧化应激及足细胞转分化进而减轻足细胞损伤来实现的,AS-IV 联合 BMSCs 干预有更好的肾脏保护作用。我们将在后续的实验研究中对相关抗氧化应激及足细胞保护的具体信号通路做进一步探讨,为防治 DN 提供新的思路和方法。

参考文献(References)

[1] Varma V K, Kajdacsyballa A, Akkina S, et al. A label-free approach

by infrared spectroscopic imaging for interrogating the biochemistry of diabetic nephropathy progression [J]. *Kidney International*, 2016, 89(5): 1153-1159

- [2] Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354: 1387-1401
- [3] Ou JY, Huang D, Wu YS, et al. A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials of Yiqi Yangyin Huoxue Method in Treating Diabetic Nephropathy[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 3257603
- [4] Zhao L H, Ma Z X, Zhu J, et al. Characterization of polysaccharide from Astragalus radix as the macrophage stimulator [J]. *Cellular Immunology*, 2011, 271(2): 329-334
- [5] Hickson L T J, Eirin A, Lerman L O. Challenges and opportunities for stem cell therapy in patients with chronic kidney disease [J]. *Kidney International*, 2016, 89(4): 767-778
- [6] Maxson S, Lopez EA, Yoo D, et al. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair [J]. *Stem Cells Trans Med*, 2012, 1: 142-149
- [7] Tan Y F, Yin X C, Xiong Y J, et al. Stem cell factor secretion by bone mesenchymal stem cells stimulated with astragaloside IV[J]. *Chinese journal of contemporary pediatrics*, 2010, 12(4): 290
- [8] Li M, Yu L, She T, et al. Astragaloside IV attenuates Toll-like receptor 4 expression via NF- κ B pathway under high glucose condition in mesenchymal stem cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2012, 696(1-3)
- [9] 王洪敏, 钟志勇, 吴庆洲, 等. 大鼠糖尿病模型早期病理观察指标的筛选[J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(1): 86-90
- [10] Kitada M, Ogura Y, Monno I, et al. Regulating Autophagy as a Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy[J]. *Curr Diab Rep*, 2017, 17(7): 53
- [11] Roscioni S S, Lambers Heerspink H, De Zeeuw D. Microalbuminuria: Target for renoprotective therapy PRO[J]. *Kidney International*, 2014, 86(1): 40-49
- [12] Futrakul N, Futrakul P. Therapeutic resistance to ACEI and ARB combination in macroalbuminuric diabetic nephropathy [J]. *Clin Nephrol*, 2012, 78(3): 250
- [13] Fu J, Wang Z, Huang L, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of Astragalus membranaceus (Huangqi)[J]. *Phytotherapy Research* Ptr, 2015, 28(9): 1275-1283
- [14] Gui D, Guo Y, Wang F, et al. Astragaloside IV, a novel antioxidant, prevents glucose-induced podocyte apoptosis in vitro and in vivo[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(6): e39824
- [15] Burst V, Putsch F, Kubacki T, et al. Survival and distribution of injected haematopoietic stem cells in acute kidney injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 28: 1131-1139
- [16] Valle1311 Dial, Conget PA. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress[J]. *Stem cells and development*, 2010, 19: 1885-1893
- [17] Khalilpourfarshbafi M, Hajiaghaalipour F, Selvarajan KK, et al. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies against Podocyte Damage in Diabetic Nephropathy [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2017, 14 (3): 201-210

(下转第 1021 页)

- tral nervous system[J]. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2012, 814: 3-7
- [20] Jiang JH, Ge G, Gao K, et al. Calcium Signaling Involvement in Cadmium-Induced Astrocyte Cytotoxicity and Cell Death Through Activation of MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(9): 1929-1944
- [21] Kushwaha R, Mishra J, Tripathi S, et al. Arsenic, Cadmium, and Lead Like Troglitazone Trigger PPAR γ -Dependent Poly (ADP-Ribose) Polymerase Expression and Subsequent Apoptosis in Rat Brain Astrocytes [J]. *Molecular neurobiology*, 2018, 55(3): 2125-2149
- [22] Rai A, Tripathi S, Kushwaha R, et al. CDK5-induced p-PPARgamma (Ser 112) downregulates GFAP via PPRES in developing rat brain: effect of metal mixture and troglitazone in astrocytes [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1033
- [23] Turnquist C, Horikawa I, Foran E, et al. p53 isoforms regulate astrocyte-mediated neuroprotection and neurodegeneration [J]. *Cell death and differentiation*, 2016, 23(9): 1515-1528
- [24] Cui ZG, Ogawa R, Piao JL, et al. Molecular mechanisms involved in the adaptive response to cadmium-induced apoptosis in human myelomonocytic lymphoma U937 cells [J]. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 2011, 25(8): 1687-1693
- [25] Matias M, Silvestre S, Falcão A, et al. *Gastrodia elata* and epilepsy: Rationale and therapeutic potential [J]. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 2016, 23(12): 1511-1526
- [26] Hu Y, Li C, Shen W. Gastrodin alleviates memory deficits and reduces neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neuropathology*, 2014, 34(4): 370-377
- [27] Zhang R, Peng Z, Wang H, et al. Gastrodin ameliorates depressive-like behaviors and up-regulates the expression of BDNF in the hippocampus and hippocampal-derived astrocyte of rats [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(1): 172-179
- [28] Zhang TH, Huang CM, Gao X, et al. Gastrodin inhibits high glucose-induced human retinal endothelial cell apoptosis by regulating the SIRT1/TLR4/NF- κ Bp65 signaling pathway [J]. *Molecular medicine reports*, 2018, 17: 7774-7780
- [29] Haddadi R, Poursina M, Zeraati F, et al. Gastrodin microinjection suppresses 6-OHDA-induced motor impairments in parkinsonian rats: insights into oxidative balance and microglial activation in SNc [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26: 1305-1316
- [30] Li Q, Niu C., Zhang X., et al. Gastrodin and Isorhynchophylline Synergistically Inhibit MPP-Induced Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells by Targeting ERK1/2 and GSK-3 β Pathways: Involvement of Nrf2 Nuclear Translocation [J]. *ACS chemical neuroscience*, 2018, 9(3): 482-493
- [31] Zhang H, Yuan B, Huang H, et al. Gastrodin induced HO-1 and Nrf2 up-regulation to alleviate H₂O₂-induced oxidative stress in mouse liver sinusoidal endothelial cells through p38 MAPK phosphorylation [J]. *Brazilian journal of medical and biological research*, 2018, 51(10): e7439
- [32] Li Y, Zhang Z. Gastrodin improves cognitive dysfunction and decreases oxidative stress in vascular dementia rats induced by chronic ischemia [J]. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015, 8(11): 14099-109
- [33] Huang R, Wu F, Zhao J, et al. Electroacupuncture plus Gastrodin Improves Learning-memory Ability Possibly by Up-regulating Expression of SIRT 1 and PGC-1 α in Hippocampal CA 1 Region of Alzheimer's Disease Rats [J]. *Zhen ci yan jiu = Acupuncture research*, 2018, 43(3): 140-145
- [34] Zhang JS, Zhou SF, Wang Q, et al. Gastrodin suppresses BACE1 expression under oxidative stress condition via inhibition of the PKR/eIF2 α pathway in Alzheimer's disease [J]. *Neuroscience*, 2016, 325: 1-9

(上接第 1010 页)

- [18] Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2005, 54: 1626-1634
- [19] Anil Kumar P, Welsh GI, Saleem MA, et al. Molecular and cellular events mediating glomerular podocyte dysfunction and depletion in diabetes mellitus [J]. *Front Endocrinol*, 2014, 5: 151
- [20] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21: 212-222
- [21] Zhao L, Wang X, Sun L, et al. Critical role of serum response factor in podocyte epithelial-mesenchymal transition of diabetic nephropathy [J]. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 2016, 13(1): 81-92
- [22] Wang Z, Liu J, Sun W. Effects of asiaticoside on levels of podocyte cytoskeletal proteins and renal slit diaphragm proteins in adriamycin-induced rat nephropathy [J]. *Life Sci*, 2013, 93(8): 352-358
- [23] Wu X, Gao Y, Xu L, et al. Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells trigger the epithelial-mesenchymal transition and dysfunction of podocytes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9371
- [24] Singh D K, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2011, 7(3): 176-184
- [25] Gorin Y, Block K. Nox4 and diabetic nephropathy: With a friend like this, who needs enemies? [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 61: 130-142