

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.003

降压通络方对大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响*

马 钰^{1#} 韩 琳^{2#} 李 冰¹ 王淑艳² 沈一凡¹ 贾祎凡³ 杨 柳⁴ 秦建国^{5Δ}

(1 北京中医药大学 北京 100029; 2 北京中医药大学中医学院 北京 100700; 3 天津怡泰医院 天津 300011;

4 保定市第一中医院 河北 保定 071000; 5 北京中医药大学东方医院 北京 100078)

摘要 目的:研究降压通络方对大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响。**方法:**体外培养大鼠肾小管上皮细胞,经过缺血缺氧,将大鼠肾小管细胞随机分为4组:正常组、模型组、降压通络方组、缬沙坦组。采用CCK-8检测细胞增殖情况,免疫组化法检测大鼠肾小管上皮细胞p-AKT蛋白的表达,蛋白免疫印迹法检测大鼠肾小管上皮细胞凋亡相关基因调控蛋白Bcl-2、Bax的表达,对Bcl-2、Bax蛋白的表达水平进行相关性分析。**结果:**缺血缺氧呈时间依赖性抑制大鼠肾小管上皮细胞活性;免疫组化结果显示:p-AKT在正常组呈高表达,模型组低表达,降压通络方组p-AKT表达明显高于模型组($P<0.01$),缬沙坦组表达低于模型组($P>0.05$);蛋白免疫印迹法结果显示:模型组Bcl-2表达较正常组明显降低($P<0.01$),降压通络方组和缬沙坦组Bcl-2的表达均高于模型组($P<0.05$, $P<0.01$);模型组Bax表达较正常组明显升高($P<0.01$),降压通络方组和缬沙坦组Bax的表达均较模型组降低($P<0.05$);Bcl-2蛋白与Bax蛋白表达呈负相关性($r=-0.811$, $P<0.01$)。**结论:**降压通络方可抑制大鼠肾小管上皮细胞凋亡,其作用机制可能与上调p-AKT、Bcl-2蛋白,下调Bax蛋白表达有关。

关键词:高血压肾损害;降压通络方;肾小管上皮细胞;缺血缺氧;细胞凋亡

中图分类号:R-33;R256.5;R692 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)07-1211-06

Effect of JiangyaTongluo Formula on Apoptosis of Rat Renal Tubular Epithelial Cells*

MA Yu[#], HAN Lin[#], LI Bing¹, WANG Shu-yan², SHEN Yi-fan¹, JIA Yi-fan³, YANG Liu⁴, QIN Jian-guo^{5Δ}

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China; 2 College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700, China; 3 Tianjin Yitai Hospital, Tianjin, 300011, China; 4 Baoding The first Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baoding, Hebei, 071000, China; 5 Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100078, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of JiangyaTongluo Formula on apoptosis of renal tubular epithelial cells in rats.

Methods: Rat renal tubular epithelial cells were cultured in vitro and then randomly divided into 4 groups after ischemia and hypoxia: normal group, model group, JiangyaTongluo Formula group, valsartan group. Cell proliferation was detected by CCK-8, p-AKT protein expression in rat renal tubular epithelial cells was detected by immunocytochemistry, and expression of apoptosis-related gene regulatory proteins Bcl-2 and Bax in rat renal tubular epithelial cells was detected by Western blot. Correlation analysis was conducted on the expression levels of Bcl-2 and Bax proteins. **Results:** Ischemia and hypoxia inhibited the activity of rat renal tubular epithelial cells in a time-dependent manner; Immunocytochemical results showed that the expression of p-AKT was high in the normal group, but low in the model group. The expression of p-AKT in JiangyaTongluo Formula group was significantly higher than that in the model group ($P<0.01$), and that in the valsartan group was lower than that in the model group ($P>0.05$); Western blot results showed that the expression of Bcl-2 in the model group was significantly lower than that in the normal group ($P<0.01$), while the expression of Bcl-2 in JiangyaTongluo Formula group and the valsartan group was higher than that in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). Bax expression in the model group was significantly higher than that in the normal group ($P<0.01$), while Bax expression in JiangyaTongluo Formula group and the valsartan group was significantly lower than that in the model group ($P<0.05$); the expression of Bcl-2 protein and Bax protein was negatively correlated ($r=-0.811$, $P<0.01$). **Conclusions:** The apoptosis of rat renal tubular epithelial cells can be inhibited by JiangyaTongluo Formula, and the mechanism may be related to the up-regulation of p-AKT and Bcl-2 proteins and the down-regulation of Bax protein expression.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(811734071)

北京市中医管理局北京中医药“薪火传承3+3工程”建设项目郭士魁名家研究室项目(2011-SZ-A-27)

共同第一作者

作者简介:马钰(1993-),女,博士研究生,主要从事肾脏疾病的临床与基础研究,E-mail:494978371@qq.com;

韩琳(1970-),女,博士,副教授,主要从事肾脏疾病的临床与基础研究,E-mail:hanlinxf89@sohu.com

Δ 通讯作者:秦建国(1971-),男,主任医师,博士生导师,主要研究方向:肾脏疾病的临床与基础研究,

E-mail:qindocor@163.com,电话:15810208606

(收稿日期:2019-12-07 接受日期:2019-12-31)

Key words: Hypertensive Nephrosclerosis; Jiangya Tongluo Formula; Renal tubular epithelial cells; Ischemia-hypoxia; Cell apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R256.5; R692 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1211-06

前言

高血压肾损害(Hypertensive Nephrosclerosis, HN)是高血压病严重并发症之一,目前已成为终末期肾脏病第二位病因^[1-5]。而HN起病隐匿,往往在高血压发病10-15年后才出现相应的临床病症,HN早期损害主要表现为肾小管的损伤,出现夜尿增多,尿蛋白升高^[6,7]。研究表明,高血压早期即可通过肾动脉痉挛,引起缺血缺氧,从而引起肾小管上皮细胞凋亡,促进肾间质纤维化形成^[8-11]。无论是低氧、缺血状态下培养的大鼠肾近曲小管上皮细胞,还是慢性缺血性肾病模型大鼠的肾小管上皮细胞,均存在肾小管上皮细胞凋亡,并促进肾间质纤维化^[12-14]。细胞凋亡参与了高血压的靶器官损害,肾小管上皮细胞凋亡是HN的早期细胞事件,也是HN发生发展的重要机制之一。由此可见,改善缺血缺氧导致的肾小管上皮细胞凋亡,对于改善高血压肾损害具有重要意义。

本课题组前期研究证实降压通络方能明显降低大鼠血压、肾脏血管紧张素Ⅱ、血肌酐及尿素氮含量,改善肾小动脉及肾小球硬化,改善肾小球缺血状态^[15,16];此外,降压通络方能通过上调肾脏局部ADM含量拮抗血管紧张素Ⅱ扩张小血管,改善肾脏缺血情况^[17]。为进一步探讨降压通络方的作用途径及信号机制,本文以大鼠肾小管上皮细胞凋亡为切入点,探讨降压通络方对大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响及其可能的作用机制,为其临床应用提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60只清洁级SD大鼠,雄性,体重 200 ± 10 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2012-0001。饲养于SPF动物房内。

1.2 NRK-52E 细胞株

本实验中所用大鼠肾小管上皮细胞即NRK-52E冻存细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.3 主要仪器

超净工作台(哈尔滨市东联公司);恒温CO₂培养箱(Thermo Electron公司);倒置相差光学显微镜(OLYMPUS公司);冷冻高速离心机(Eppendorf centrifuge公司);高压蒸汽灭菌锅(SANYO公司);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);酶标仪(Thermo-Multiskan MS公司);MINI-PROTEIN 3 CASTING STAND制胶器、MINI-PROTEIN 3 ELECTROPHORESIS CELL电泳槽、Mini Trans-Blot Cell湿转系统(Bio-Rad公司);恒温摇床(中国科学院武汉科学仪器厂)。

1.4 药物与试剂

降压通络方配方颗粒(珍珠母30 g、草决明15 g、黄芩15 g、菊花15 g、丹参25 g、红花10 g)购自北京康仁堂药业有限公司;缬沙坦胶囊购自北京诺华制药有限公司;DMEM高糖培养

基购自Hyclone公司;胎牛血清(FBS)、Penicillin Streptomycin(双抗)、0.05%胰蛋白酶购自Gibco公司;CCK-8试剂盒购自同仁化学研究所;兔SP试剂盒(含H₂O₂)、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;p-AKT(Ser473)购自Cell Signaling Technology公司;Bcl-2抗体、Bax抗体购自Abcam公司。

1.5 方法

1.5.1 降压通络方含药血清的制备 60只SD大鼠随机分为3组,空白对照组30只、降压通络方组15只、缬沙坦组15只。降压通络方组根据成人日用药量,按动物系数折算,大鼠的有效剂量为1.5 g/100 g/d,给予灌胃,每日1次;缬沙坦组给予缬沙坦10 mg/kg/d灌胃,每日1次;空白对照组给予等量生理盐水灌胃,每日1次。各组连续灌胃7天,最后一次灌胃2小时后进行腹主动脉取血,取血前禁食不禁水12小时。大鼠称重,腹腔注射10%水合氯醛(0.4 mL/100 g)进行麻醉,打开腹腔,暴露腹主动脉取血。于室温静置4 h,离心、分离血清、水浴灭活,静置常温后放入-20℃冰箱保存备用。

1.5.2 NRK-52E 细胞缺血缺氧模型的建立 将培养瓶中生长状态良好的NRK-52E进行消化离心,加入适量DMEM高糖完全培养基重悬细胞,计算细胞密度稀释细胞悬液至 5×10^4 个/mL,接种于两块96孔板中(分为正常组、模型组),每组设5个复孔,每孔加入100 μ L细胞悬液,均放入正常培养箱(37℃,5%CO₂)中培养。24 h后取出96孔板,在显微镜下观察其形态长势,可见细胞贴壁生长约铺满孔底的80%,弃废液,PBS冲洗2遍。正常组孔板加入完全培养基100 μ L/孔,放入正常培养箱中(37℃,5%CO₂)培养;模型组孔板加入不含胎牛血清的培养基,放入缺氧培养箱(37℃,5%CO₂,1%O₂)中培养。分别继续培养8 h、10 h、12 h后,通过CCK-8检测细胞活力值,确定最佳造模时间。

1.5.3 实验分组 分为4组:①正常组:10%正常大鼠血清培养基,正常培养箱培养;②模型组:10%正常大鼠血清培养基,缺氧培养箱培养;③降压通络方组:10%降压通络方大鼠含药血清培养基,缺氧培养箱培养;④缬沙坦组:10%缬沙坦大鼠含药血清培养基,缺氧培养箱培养。

1.5.4 CCK-8 检测细胞存活率 将各组细胞以 5×10^4 个/mL的细胞数接种96孔板内,按干预时间取出相应孔板,弃废液,PBS缓冲液洗2遍。避光下每孔加入100 μ L含10 μ L CCK-8的DMEM培养基,放入正常培养箱中进行反应。反应1 h后用酶标仪检测各孔450 nm波长下的吸光度(OD)值,细胞存活率=各组OD值均值/正常组OD值均值 $\times 100\%$ 。

1.5.5 免疫组化检测 p-AKT 蛋白的水平 将各组细胞以 2.5×10^4 个/mL的细胞数接种24孔板内,分为4组:正常组、模型组、降压通络方组、缬沙坦组。加药造模干预后,取出检测。各孔用PBS清洗3次,4%多聚甲醛固定,30 min后吸弃废液,PBS洗5次,每孔滴加0.5%曲拉通100 L,摇床匀20 min后PBS洗3次。避光下加入3% H₂O₂,室温静置10 min后PBS洗

3次,加封闭用正常山羊血清工作液,室温15 min后倾倒,加一抗,每孔100 L,放入4℃冰箱过夜,PBS洗3次。加二抗,室温静置20 min后PBS洗3次。加辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温静置20 min后PBS洗3次。避光下加入DAB显色液,室温3-4 min后于显微镜下观察色情况。去离子水反复清洗24孔板后至显微镜室拍摄图片。使用Image-pro Plus 6.0图像分析系统进行图片分析,测定各组阳性表达区域的总面积(Area sum)及积分光密度(OD sum)。

1.5.6 蛋白免疫印迹法检测 Bcl-2、Bax 蛋白的表达 将各组细胞以 5×10^4 个/mL的细胞数接种6孔板内,每孔加细胞悬液2 mL,分为4组:正常组、模型组、降压通路方组、缬沙坦组。加药造模干预后,取出6孔板,弃废液,用PBS洗2次后加含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液冰上裂解,用细胞刮将细胞刮下来,收集至EP管中,离心,取上清液,得到蛋白。对提取蛋白进行定量后,加上样缓冲液100℃煮5分钟,样品放置于-20℃保存。SDS-PAGE后,转膜。牛奶封闭,清洗,分别加兔抗大鼠Bax抗体(1:5000)、兔抗大鼠Bcl-2抗体(1:500)、兔抗大鼠 β -actin抗体(1:5000),加入PVDF膜后,置于水平摇床上,一起放入4℃冰箱摇动过夜,用TBST洗去未结合的一抗,10 min/次,共3次。用脱脂牛奶封闭液稀释辣根过氧化酶标记的二抗

(1:5000),放入PVDF膜,室温孵育1 h后弃去二抗,用TBST洗去未结合的二抗,10 min/次,共3次。然后加ECL发光液,压片晾干后采集图像。使用Image J图像分析软件进行图像的处理和分析。

1.6 统计学分析

应用SPSS20.0软件进行统计学处理,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料比较采用单因素ANOVA(方差分析),组间比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 降压通路方对缺血缺氧诱导的NRK-52E细胞存活能力的影响

与正常组相比,缺血缺氧可以使NRK-52E细胞活力值下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$,表1)。随缺血缺氧时间的延长,细胞的存活率逐渐降低,当缺血缺氧时间为12h时,细胞存活率为48.4%,符合实验需求,故选择12h作为造模时间(图1)。与正常组相比较,各组细胞活力值均显著降低($P < 0.01$);缬沙坦组和降压通路方组的细胞活力值均高于模型组(均 $P < 0.05$);缬沙坦组与降压通路方组之间无显著性差异($P > 0.05$)(表2)。

表1 不同缺血缺氧时间NRK-52E细胞的活力值($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 1 Activity values of NRK-52E cells at different ischemic and hypoxic time($\bar{x} \pm s$, n=3)

Ischemia and hypoxia time	Normal group	Model group
8 h	0.34 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.004*
10 h	0.64 $\pm$ 0.08	0.34 $\pm$ 0.03*
12 h	0.62 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.02*

Note: compared with the normal group, * $P < 0.01$.

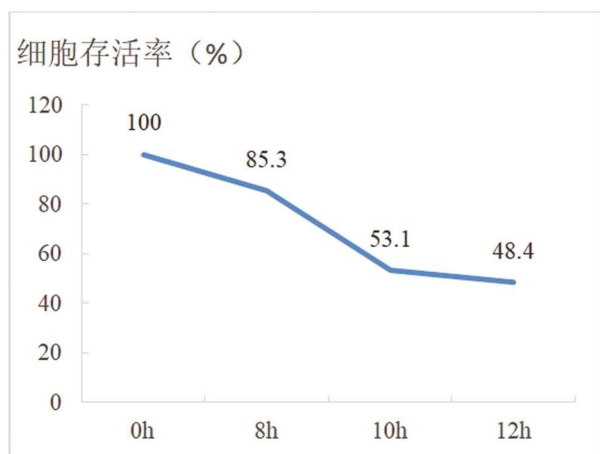


图1 不同缺血缺氧时间细胞存活率

Fig.1 Cell survival rate at different ischemic and hypoxic time

2.2 降压通路方对NRK-52E细胞p-AKT蛋白表达的影响

结果如图2、表3所示,正常组的p-AKT蛋白主要表达于肾小管上皮细胞的胞质中,模型组中的表达偏少;Area sum及OD sum在统计结果上基本同步,p-AKT在正常组呈高表达,模型组低表达;正常组与各组比较均有显著性差异($P < 0.05$);缬沙坦组p-AKT表达虽低于模型组,但两者之间无显著性差异($P > 0.05$);降压通路方组p-AKT表达明显高于模型组($P < 0.01$)。

2.3 降压通路方对NRK-52E细胞凋亡相关蛋白表达的影响

结果如图3所示,Bcl-2在正常组呈高表达,模型组低表达;Bcl-2在模型组的表达较正常组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);降压通路方组和缬沙坦组Bcl-2的表达均高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),正常组Bcl-2的表达高于降压通路方组、缬沙坦组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。Bax在模型组的表达较正常组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);降压通路方组和缬沙坦组Bax的表达均较模型组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),降压通路方组、缬沙坦组Bax的表达均高于正常组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。降压通路方组Bax的表达略低于缬沙坦组,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

将Bcl-2蛋白与Bax蛋白进行相关性分析,结果如图4所示,二者呈负相关性,并且随着Bax蛋白含量的增加,Bcl-2蛋白呈下降趋势。($r = -0.811$, $P < 0.01$)。

3 讨论

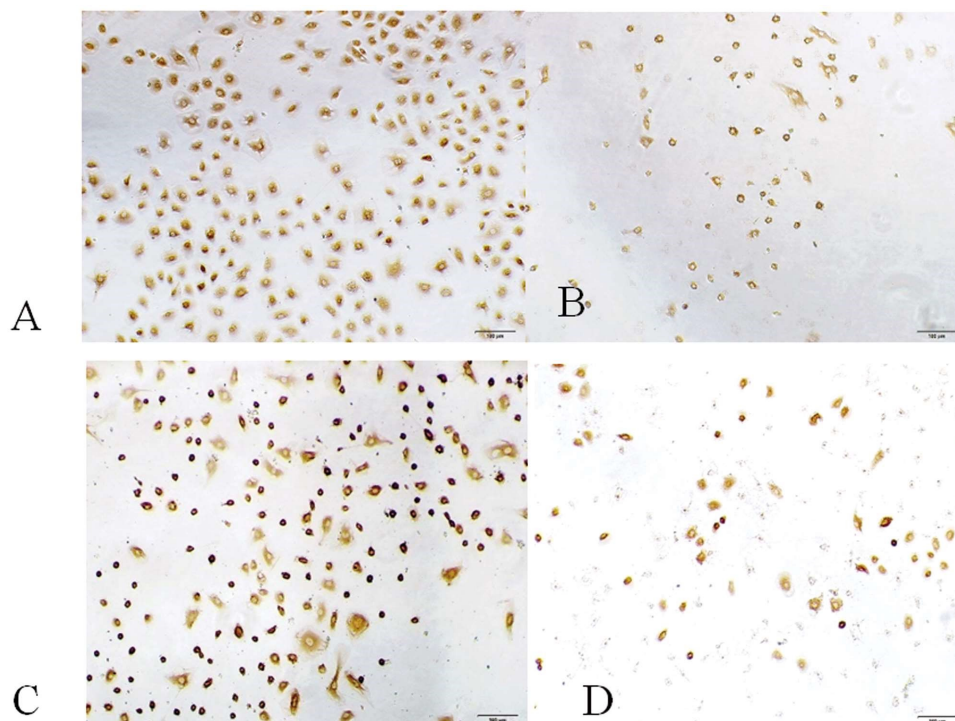
高血压肾损害早期,肾小管上皮细胞在缺血缺氧诱导下可发生细胞凋亡^[18]。研究显示,细胞凋亡参与了高血压肾损害^[19],并且在高血压肾损害早期以肾小管上皮细胞凋亡为主^[20,21]。因此,若能有效干预肾小管上皮细胞凋亡,对于改善高血压肾损害具有重要意义。

表 2 10%含药血清缺氧干预 12 h 后 NRK-52E 细胞活力值($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Activity of NRK-52E cells after 12 h of 10% serum hypoxia intervention($\bar{x} \pm s, n=3$)

Normal group	Model group	JiangyaTongluo Formula group	Valsartan group
1.37± 0.05	0.74± 0.01*	0.84± 0.04*	0.85± 0.02* [#]

Note: after different drug intervention time, compared with the normal group, * $P<0.01$, and compared with the model group, [#] $P<0.05$.



A 正常组;B 模型组;C 降压通路方组;D 缬沙坦组

A Normal group; B Model group; C JiangyaTongluo Formula group; D Valsartan group

图 2 加药造模干预后各组细胞 p-AKT 的表达 (DAB 染色× 100)

Fig.2 Expression of P-AKT in each group after injection and modeling intervention (DAB staining × 100)

表 3 免疫组化染色 P-AKT 的图像分析($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Image analysis of P-AKT by immunohistochemical staining($\bar{x} \pm s$)

Groups	Area sum	IOD sum
Normal group	215353.33± 12428.53	46944.98± 1722.98
Model group	46236.67± 18145.28**	10383.18± 4226.94**
Valsartan group	25256.67± 5623.08**	5678.05± 1790.54**
JiangyaTongluo Formula group	121992.00± 8843.71** [△]	40089.39± 4841.63** [△]

Note: compared with the normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with the model group, [#] $P<0.01$; Compared with the valsartan group, [△] $P<0.01$.

高血压病肾损害在中医上属于 " 眩晕 "、" 腰痛 "、" 水肿 " 等范畴。对于此病的中医治疗,秦建国教授在继承郭士魁、郭维琴教授活血化瘀治法的基础上,结合自身的临床经验,以郭士魁教授降压通脉方^[22,23]为基础进行了化裁,创制了以平肝通络为核心治法的降压通络方,方中以珍珠母、草决明、菊花、黄芩清肝潜阳,以丹参、红花等祛瘀通络,共同达到平肝、活血、通络的作用,提高了临床治疗高血压肾损害的疗效。本课题组前期做了大量研究表明降压通络方能改善高血压肾损害大鼠肾脏缺血情况。本研究构建了缺血缺氧诱导的大鼠肾小管上皮细胞凋亡模型,通过观察降压通络方对大鼠肾小管上皮细胞凋亡水平的影响,发现降压通络方可抑制大鼠肾小管上皮细胞凋

亡,其作用机制可能与上调 p-AKT、Bcl-2 蛋白,下调 Bax 蛋白表达有关。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是一种受诸多凋亡基因控制的细胞主动死亡的过程^[24]。其中 Bcl-2 家族表达水平的高低与细胞凋亡的发生发展密切相关,按 Bcl-2 家族成员的结构及生物化学功能,可分为抗凋亡和促凋亡两大类。Bcl-2 和 Bax 均是 Bcl-2 家族的重要分子,Bcl-2 与 Bax 的作用相反,当 Bax 过量表达则细胞凋亡,Bcl-2 过量表达则细胞存活,由此可见 Bcl-2 属于抗凋亡蛋白,Bax 属于促凋亡蛋白。因此,Bcl-2、Bax 蛋白的表达水平是调节细胞凋亡的重要指标^[25-28]。本研究结果显示,大鼠肾小管上皮细胞 Bcl-2 蛋白表达上升,Bax 蛋白表达

下降,Bcl-2 蛋白与 Bax 蛋白表达呈负相关性,说明降压通路方能够调控大鼠肾小管上皮细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平,从而

抑制大鼠肾小管上皮细胞的凋亡,进而达到治疗高血压肾损害的目的。

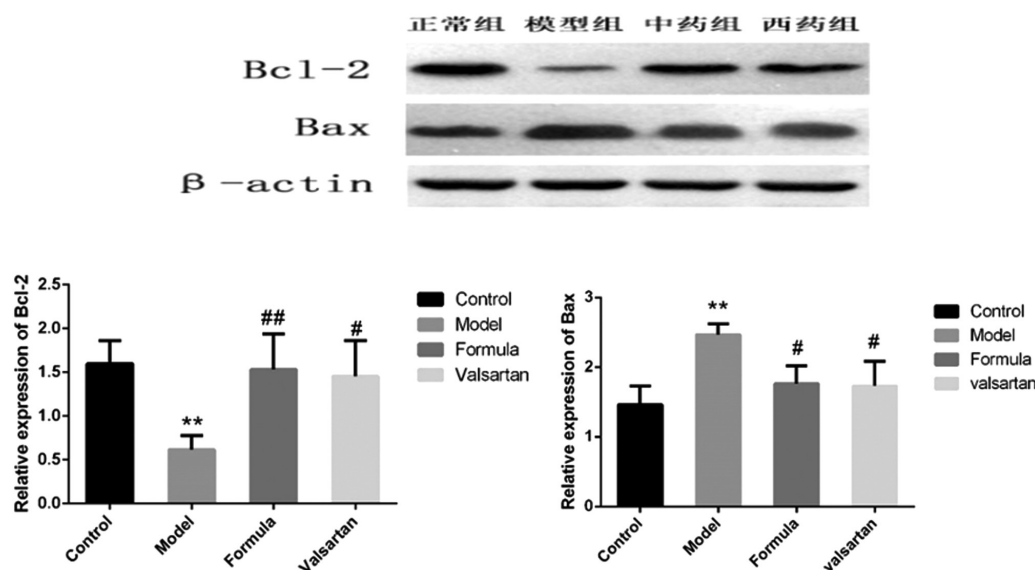


图3 各组 NRK-52E 中 Bcl-2、Bax 的表达

Fig.3 Expression of Bcl-2 and Bax in NRK-52E of each group

Note: compared with the normal group, ** $P < 0.01$, compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

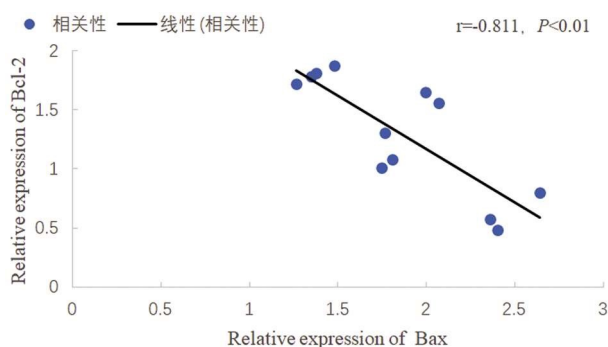


图4 NRK-52E 细胞中 Bcl-2 蛋白与 Bax 蛋白表达相关性分析

Fig.4 Correlation analysis of Bcl-2 protein expression and Bax protein expression in NRK-52E cells

此外,AKT 是一种临床上较为常见的丝 / 苏氨酸蛋白激酶,p-AKT 则是磷酸化的 AKT,p-AKT 具有一定的生物学活性,能够通过对人体各种下游分子产生作用,从而调控细胞周期,促进细胞的增殖,抑制细胞的凋亡^[29,30]。本研究结果显示,降压通路方组大鼠肾小管上皮细胞中 p-AKT 蛋白的表达呈现出了上升水平,说明降压通路方能够上调大鼠肾小管上皮细胞 p-AKT 蛋白的表达,从而抑制大鼠肾小管上皮细胞凋亡。

综上所述,降压通路方具有抑制大鼠肾小管上皮细胞凋亡的作用,其机制可能与调节凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 表达水平、上调 p-AKT 蛋白表达有关。

参考文献(References)

- [1] Batchu SN, Dugbartey GJ, Wadosky KM, et al. Innate Immune Cells Are Regulated by Axl in Hypertensive Kidney[J]. Am J Pathol, 2018, 188(8): 1794-1806
- [2] Yuan X, Wang W, Wang J, et al. Down-regulation of integrin $\beta 1$ and focal adhesion kinase in renal glomeruli under various hemodynamic conditions[J]. PLoS One, 2014, 9: e94212

- [3] Rebholz CM, Coresh J, Ballew SH, et al. Kidney failure and esrd in the atherosclerosis risk in communities (aric) study: comparing ascertainment of treated and untreated kidney failure in a cohort study[J]. Am J Kidney Dis, 2015, 66: 231-239
- [4] Webster AC, Nagler EV, Morton RL, et al. Chronic Kidney Disease[J]. Lancet, 2017, 389: 1238-1252
- [5] Wang F, Yang C, Long J, et al. Executive summary for the 2015 Annual Data Report of the China Kidney Disease Network (CK-NET)[J]. Kidney Int, 2019, 95(3): 501-505
- [6] Wang XC, Liu CH, Chen YJ, et al. Clinical and pathological analysis of the kidney in patients with hypertensive nephropathy [J]. Exp Ther Med, 2013, 6: 1243-1246
- [7] Jiahui Zhao, Qingli, Cheng Yang, et al. Atorvastatin alleviates early hypertensive renal damage in spontaneously hypertensive rats [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 602-609
- [8] Imig JD, Inschoo EW. Adaptation of the renal microcirculation to hypertension[J]. Microcirculation, 2002, 9(4): 315
- [9] Cpc O, Ngo J P, Ullah M M, et al. Renal Hypoxia in Kidney Disease: Cause or Consequence?[J]. Acta Physiologica, 2017, 222(4): e12999
- [10] Tsogbadrakh B, Ryu H, Ju KD, et al. AICAR, an AMPK activator, protects against cisplatin-induced acute kidney injury through the JAK/STAT/SOCS pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(3): 680-686
- [11] Carey RM, Muntner P, Bosworth HB, et al. Prevention and control of hypertension: JACC health promotion series [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(11): 1278-1293
- [12] Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, et al. Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia [J]. Kidney Int, 2004, 65: 871-880
- [13] Zhou Y, Cai T, Xu J, et al. UCP2 attenuates apoptosis of tubular epithelial cells in renal ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol-renal,

- 2017, 313(4): F926-F937
- [14] Qin C, Xiao C, Su Y, et al. Tisp40 deficiency attenuates renal ischemia reperfusion injury induced apoptosis of tubular epithelial cells [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359(1): 138-144
- [15] Han L, Ma Y, Qin JG, et al. The Renal Protective Effect of Jiangya-Tongluo Formula, through Regulation of Adrenomedullin and Angiotensin II, in Rats with Hypertensive Nephrosclerosis[J]. *Evid-based Compl Alt*, 2015, 2015: 428106
- [16] 韩琳, 秦建国, 高誉珊, 等. 降压通络方对高血压肾损害大鼠肾脏血管紧张素 II 及肾功能的影响[J]. *环球中医药*, 2015, 8(1): 36-41
- [17] 秦建国, 韩琳, 王媛媛, 等. 降压通络方对高血压肾损害大鼠肾上腺髓质素表达的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2015, 38(12): 801-805
- [18] 杨成, 任星峰, 彭隽. 普罗布考对肾脏缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及机制[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2017, 46(6): 660-664
- [19] 林乐迎, 符信清, 王庆志, 等. 自发性高血压大鼠窦房结细胞凋亡 [J]. *赣南医学院学报*, 2016, 36(1): 36-37
- [20] Balasubramanian S, Jansen M, Valerius M T, et al. Orphan nuclear receptor Nur77 promotes acute kidney injury and renal epithelial apoptosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(4): 674
- [21] Grgic I, Campanholle G, Bijol V, et al. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis[J]. *Kidney Int*, 2012, 82: 172-183
- [22] 于英奇, 郭士魁, 翁维良. 中国百年百名临床家丛书 (第 1 版)[M]. 北京: 北京中国中医药出版社, 2001: 315
- [23] 秦建国, 王亚红, 韩琳, 等. 降压通络方治疗早中期高血压肾损害临床经验[J]. *中华中医药学会第二十六次肾病分会学术交流会议论文集*, 2013, 11: 462-464
- [24] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541
- [25] Tait S. W. G, Green D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2010, 11(9): 621-632
- [26] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis[J]. *Cell Prolif*, 2012, 45: 487-498
- [27] He P, Zhou G, Qu D, et al. HBx inhibits proliferation and induces apoptosis via Fas/Fas L upregulation in rat renal tubular epithelial cells[J]. *J Nephrol*, 2013, 26(6): 1033-1041
- [28] Chen H, Huang RS, Yu XX, et al. Emodin protects against oxidative stress and apoptosis in HK-2 renal tubular epithelial cells after hypoxia/reoxygenation[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 447-452
- [29] 刘文涓, 王前, 李凤杰, 等. p-Akt-mTOR-p70S6K 信号通路蛋白与卵巢癌临床病理特征及化疗耐药的相关性[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2017, 42(8): 882-888
- [30] Long Q, Li X, He H, et al. Autophagy activation protects shock wave induced renal tubular epithelial cell apoptosis may through modulation of Akt/GSK-3 β pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12 (12): 1461-1471

(上接第 1240 页)

- [15] Hsiao KY, Sun HS, Tsai SJ. Circular RNA - New member of noncoding RNA with novel functions [J]. *J Biotechnol*, 2017, 242 (11): 1136-1141
- [16] Chen B, Wei W, Huang X, et al. circEPSTI1 as a Prognostic Marker and Mediator of Triple-Negative Breast Cancer Progression [J]. *Theranostics*, 2018, 8(14): 4003-4015
- [17] Weng W, Wei Q, Toden S, et al. Circular RNA ciRS-7-A Promising Prognostic Biomarker and a Potential Therapeutic Target in Colorectal Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(14): 3918-3928
- [18] Du WW, Yang W, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): 2846-2858
- [19] Bian D, Wu Y, Song D, et al. Novel circular RNA, hsa_circ_0025039 promotes cell growth, invasion and glucose metabolism in malignant melanoma via the miR-198/CDK4 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108(2018): 165-176
- [20] Ju H, Zhang L, Mao L, et al. Altered expression pattern of circular RNAs in metastatic oral mucosal melanoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(9): 1788-1800
- [21] Ni XF, Zhao LH, Li G, et al. MicroRNA-548-3p and MicroRNA-576-5p enhance the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells via NR1P1 down-regulation[J]. *Neoplasma*, 2018, 65(6): 881-887