【基础研究】

毛兰素通过调节 YAP/TAZ 信号通路减轻糖尿病肾病大鼠肾纤维化

王 静，李 敏，何立明，高瑞超，檀增桓
（邯郸中心医院内分泌科，河北邯郸 056001）

摘要：目的 探讨毛兰素对糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）大鼠肾纤维化的影响及调节机制。**方法** 雄性 SD 大鼠分为对照组、模型组、地塞米松组、维替泊芬组、毛兰素低剂量组、毛兰素高剂量组以及毛兰素联合地塞米松用药组，每组 10 只。检测大鼠微量白蛋白尿（microalbuminuria，MAU）和肾功能相关指标水平；观察肾组织病理变化及胶原纤维沉积；检测肾组织中丙二醛和超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）水平；实时定量荧光定量聚合酶链反应检测肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α、白介素（interleukin，IL）-1β、转化生长因子（transforming growth factor，TGF）-β_1 信使（messenger，m）RNA 水平；免疫印迹法检测 Yes 相关蛋白（Yes-associated protein，YAP）/PDZ 结合基序的转录共激活因子（transcriptional co-activator with PDZ-binding motif，TZA）、结缔组织生长因子（connective tissue growth factor，CTGF）、纤连蛋白（fibronectin，FN）以及纤溶酶原激活物抑制剂（plasminogen activator inhibitor-1，PAI）-1 蛋白表达。**结果** 与对照组相比，模型组和地塞米松组的 MAU、血清肌酐（serum creatinine，Scr）、血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、丙二醇、TNF-α、IL-1β、TGF-β_1 mRNA 水平及 YAP、TAZ、CTGF、FN、PAI-1 蛋白表达均升高，SOD 活性降低（$P < 0.05$）；与模型组相比，维替泊芬组和毛兰素组的 MAU、Scr、BUN、丙二醇、TNF-α、IL-1β、TGF-β_1 mRNA 水平及 YAP、TAZ、CTGF、FN、PAI-1 蛋白表达均降低，SOD 活性升高（$P < 0.05$）；回补实验加入地塞米松后显示，高剂量毛兰素对 DN 大鼠的保护作用被逆转（$P < 0.05$）。**结论** 毛兰素可通过抑制 YAP/TAZ 信号通路减轻 DN 大鼠的肾纤维化。

关键词：毛兰素；糖尿病肾病；肾纤维化；Yes 相关蛋白 /PDZ 结合基序的转录共激活因子信号通路
中图分类号：R587.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188(2023)11-1144-08
DOI：10.13683/j.wph.2023.11.003

Erianin alleviates renal fibrosis in diabetic nephropathy rats by regulating YAP/TAZ signaling pathway

WANG Jing, LI Min, HE Liming, GAO Ruichao, TAN Zenghuan
(*Department Endocrinology, Handan Central Hospital, Handan 056001, Hebei Province, China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the effects of erianin on renal fibrosis in diabetic nephropathy(DN) rats and its regulatory mechanism. ***Methods*** All male SD rats were divided into control group, model group, dexamethasone group, vertepofin group, low-dose erianin group, high-dose erianin group and erianin combined with dexamethasone group, with 10 rats in each group. The levels of microalbuminuria(MAU) and renal function were detected. The renal tissue pathological changes and collagen fibers deposition were observed. The levels of malondialdehyde(MDA) and superoxide dismutase(SOD) in renal tissue were detected. Real-time quantitative polymerase chain reaction was used to detect tumor necrosis factor(TNF)-α, interleukin(IL)-1β and transforming growth factor(TGF)-β_1 mRNA level. Western blotting was used to detect the Yes-associated protein(YAP)/transcriptional co-activator with PDZ-binding motif(TZA), connective tissue growth factor(CTGF), fibronectin(FN), and plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) protein expression. ***Results*** Compared with the control group, MAU, serum creatinine(Scr), blood urea nitrogen(BUN), propylene diol content,

收稿日期：2023-02-28
作者简介：王静，主治医师，研究方向：内分泌与代谢。
基金项目：邯郸市科学技术研究与发展计划项目(19422083009-30)

messenger（m）RNA levels of TNF-α, IL-1β, TGF-β_1 and protein expression of YAP, TAZ, CTGF, FN, PAI-1 in model group and dexamethasone group were increased, while SOD activity was decreased（$P<0.05$）. Compared with model group, MAU, Scr, BUN, propanediol content, mRNA levels of TNF-α, IL-1β, TGF-β_1 and protein expression of YAP, TAZ, CTGF, FN and PAI-1 in vertepofin group and erianin group were decreased, while SOD activity was increased（$P<0.05$）. After dexamethasone was added in the supplement experiment, the protective effect of high dose of erianin on DN rats was reversed（$P<0.05$）. ***Conclusion*** Erianin can alleviate renal fibrosis in DN rats by inhibiting YAP/TAZ signaling pathway.

Key words: erianin; diabetic nephropathy; renal fibrosis; Yes-associated protein/transcriptional co-activator with PDZ-binding motif signal pathway

糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）是糖尿病患者最常见的微血管并发症，也是导致终末期肾病的主要原因之一[1]。在 DN 组织学病变中，肾脏纤维化被认为是糖尿病神经病变晚期，复杂且不可逆，是各种慢性肾脏病的终点[2]。毛兰素具有抗纤维化、抗糖尿病以及抗肿瘤等生物活性[3]，其可通过抑制细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinases，ERK）/ 核因子（nuclear factor，NF）-κB 信号通路，以及活性氧（reactive oxygen species，ROS）/ 丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）/NF-κB 信号通路来阻止高葡萄糖诱导的肾功能障碍，为 DN 提供新的治疗靶点[4—5]，但对 DN 的影响及具体作用机制还未知。Yes 相关蛋白（Yes-associated protein，YAP）和具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子（transcriptional co-activator with PDZ-binding motif，TZA）在各种肿瘤中高表达，是重要的促恶性肿瘤的转移蛋白[6]。但有证据表明，YAP/TAZ 也是纤维化反应的关键驱动因素，在肌成纤维细胞中，YAP/TAZ 激活加剧小鼠和人类多器官损伤后的纤维化，包括肾脏、肺和肝纤维化[7]。因此，基于上述研究，本实验旨在探讨毛兰素是否可以通过调节 YAP/TAZ 信号通路减轻 DN 大鼠的肾纤维化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 70 只，7 周龄，体质量 250 ～ 300 g，由北京维通利华本处提供，实验动物生产许可证号：SCXK（京）2021-0011，实验动物使用许可证号：SYXK（京）2022-0052。将大鼠饲养在温度 24 ～ 26 ℃，湿度 50% ～ 60% 的环境中，12 h 光照与黑暗交替。

1.1.2 主要试剂及仪器

毛兰素（高效液相色谱 ≥ 98%，5 mg/ 支，WKQ-0000378）购自四川省维克奇生物科技有限公司；维替泊芬（YAP 抑制剂，HY-B0146）、地塞米松（YAP 激活剂，HY-14648）均购自美国 MedChemExpress 公司；普通饲料（1010002）购自江苏省协同医药生物工程有限公司；45 kcal% 高脂饲料（02960452）购自美国 MP biomedicals 公司；链脲佐菌素（streptozocin，STZ，1 g/ 瓶，60256ES76）购自上海翌圣生物科技股份有限公司；真空采血管（43803-5）购自上海希言科学仪器有限公司；尿蛋白酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（JH-R31156）购自上海继和生物科技有限公司；微量白蛋白尿（microalbuminuria，MAU）ELISA 检测试剂盒（EK-R37872）购自广州博辉生物科技有限公司；血肌酐（serum creatinine，Scr，HB-PD6737S）、血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN，HB-PD6164S）ELISA 检测试剂盒购自上海化邦生物科技有限公司；苏木精 - 伊红（hematoxylin and eosin，HE）染色试剂盒（G1120）、Masson 三色染色试剂盒（G1340）均购自北京索莱宝科技有限公司；丙二醛（malondialdehyde，MDA，SBJ-R0007）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD，SBJ-R0008）ELISA 检测试剂盒购自南京森贝伽生物

科技有限公司；YAP（ab52771）、TZA（ab110239）、结缔组织生长因子（connective tissue growth factor，CTGF，ab209780）、纤连蛋白（fibronectin，FN，ab2413）、纤溶酶原激活物抑制剂-1（plasminogen activator inhibitor-1，PAI-1，ab222754）抗体购自英国 Abcam；山羊抗兔 IgG（H＋L，FNab09778）购自武汉菲恩生物科技有限公司。

大鼠代谢笼和血糖仪购自上海玉研科学仪器有限公司；艾本德高速低温离心机购自德国 Eppendorf 公司；SpectraMax iD5 多功能微孔板酶标仪购自上海美谷分子仪器有限公司；CX43 生物显微镜购自日本奥林巴斯公司；CFX96 实时荧光定量聚合酶链式反应（real time quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）仪购自美国伯乐公司；Mini-Protean 小垂直板电泳装置及转印系统购自美国伯乐公司；iBright FL1500 凝胶成像系统购自赛默飞世尔科技。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备

将所有大鼠使用普通饲料适应性喂养 7 d 后，随机选取 10 只大鼠作为对照组置于另一笼中接受普通饲料的喂食，其余 60 只大鼠均接受高脂肪饮食，所有大鼠均正常饮水。饲喂 21 d 后，所有大鼠禁食 12 h，再将接受高脂肪饮食的大鼠参照文献[8]方法腹膜内注射 35 mg/kg 溶于 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液（pH 4.5）的 STZ，对照组注射等体积的 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液，大鼠均正常饮食 60 h，随后禁食 12 h 后空腹采血测量血糖，当空腹血糖水平≥ 250 mg/dl 说明糖尿病模型建立成功。接着每 7 d 检测一次大鼠的尿蛋白水平，在检测前 1 d 的上午 8 点将每只大鼠单独放入代谢笼中收集 24 h 尿液，并记录尿量，该过程禁食不禁水。然后将收集的尿液在 1 000 *g* 下离心 10 min，收集上清，利用 ELISA 试剂盒测定尿蛋白浓度，并根据公式计算尿蛋白水平＝尿蛋白浓度 × 24 h 尿量。在注射 STZ 56 d 后，观察糖尿病大鼠尿量明显增加，尿蛋白水平≥ 20 mg/24 h，表明 DN 模型建立成功。

1.2.2 分组与给药

将模型建立成功的 60 只大鼠随机分为模型组、地塞米松组[9]（50 mg/kg）、维替泊芬组[10]（10 mg/kg）、毛兰素低剂量组（1 mg/kg）、毛兰素高剂量组[4]（10 mg/kg）、联合用药组（10 mg/kg 毛兰素联合 50 mg/kg 的地塞米松），每组 10 只，并按照分组分笼喂养。模型组和对照组均腹膜内注射等体积的生理盐水。一日给药 1 次，持续 28 d。

1.2.3 样本采集

给药结束后，将大鼠禁食禁水 24 h 并利用独立代谢笼收集 24 h 尿液，然后将大鼠用 1% 戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉并处死，通过腹主动脉采血，将尿液和血液分别在 1 000 *g* 下离心 10 min 后收集上清并保存至 −20 ℃备用。然后摘取大鼠的双肾，将一半左肾组织固定于 4% 的多聚甲醛中，剩余左肾和全部右肾组织均保存于 −80 ℃备用。

1.2.4 检测 MAU 和血清中肾功能相关指标的水平

取保存的尿液上清和血清解冻，然后按照 ELISA 试剂盒的操作步骤测定大鼠尿液中 MAU 以及血清中 Scr 和 BUN 的水平。

1.2.5 观察肾组织病理变化及胶原纤维沉积

将固定于多聚甲醛中的左肾组织进行石蜡包埋并切片，然后将切片依次放入梯度乙醇和二甲苯中脱蜡和水化，接着放入 HE 染液中染色，再次用乙醇和二甲苯脱水并透明，最后中性树脂封片。

将脱蜡后的组织切片加入 Weiger 铁 HE 染色 10 min，Masson 染液反蓝 5 min，丽春红品红染色 10 min，然后用 1% 磷酸溶液清洗 5 min，再放入苯胺蓝染液中复染 5 min，用 1% 冰醋酸清洗 1 min，乙醇和二甲苯脱水透明，最后中性树脂封片。在显微镜下观察肾组织的病理形态及胶原纤维沉积。

1.2.6 检测肾组织中 MDA 和 SOD 的水平

取“**1.2.3**”中冻存的左肾脏组织加入磷酸盐缓冲液冰浴研磨成匀浆，8 000 *g*，4 ℃离心 10 min，取上清。然后分别按照 MDA 和 SOD 检测试剂盒的操作步骤处理上清液，使用酶标仪检测 450 nm 处的

吸光值，并根据相应试剂盒的标准品制作标准曲线，然后将吸光值代入标准曲线计算肾组织中 MDA 和 SOD 的水平。

1.2.7 RT-qPCR 检测大鼠肾脏组织中肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α、白介素（interleukin，IL）-1β、转化生长因子（transforming growth factor，TGF）-β_1 信使（messenger，m）RNA 水平

取“**1.2.3**”中冻存的右肾组织提取总 RNA，然后配制一步法 RT-qPCR 反应体系：2×One Step SYBR Green Mix 10 μl，Enzyme 1 μl，上下游引物各 0.5 μl，RNA 1 μl，补水至总体积 20 μl。95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 30 s，40 个循环。以甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算肾脏组织中 mRNA 的相对表达量，引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物
Table 1 RT-qPCR primers

引物名	正向（5'-3'）	反向（5'-3'）
TNF-α	CGGAAAGGACACCATGAGCA	TCTGGGCCATGGAACTGATG
IL-1β	AGGCTTCCTTGTGCAAGTGT	TGTCGAGATGCTGCTGTGAG
TGF-β_1	CGGAATACAGGGCTTTCGCT	TCGACGTTTGGGACTGATCC
GAPDH	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT

1.2.8 免疫印迹法（western blotting，WB）检测肾组织中 YAP、TAZ、CTGF、FN、PAI-1 蛋白表达

取“**1.2.3**”中冻存的剩余右肾组织置于匀浆器中，并加入放射免疫沉淀法裂解液匀浆，提取总蛋白。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，然后用 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并转至聚偏二氟乙烯膜。结束后将膜取出放入 5% 的脱脂牛奶中在 4 ℃封闭过夜，再将膜放入一抗稀释液（YAP：1 ∶ 5 000，TAZ、CTGF、FN、PAI-1：1 ∶ 1 000）中，室温孵育 2 h，TBST 清洗后分别放入羊抗兔 IgG 二抗稀释液（1 ∶ 500）中，室温孵育 2 h，最后显影剂避光显色。以 GAPDH 为内参，在凝胶成像仪中观察蛋白条带，并用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.3 统计学方法

利用软件 Graphpad prism 9.0 分析数据，数据均符合正态分布，为（均数 ± 标准差）表示，多组间比较采用 One-way ANOVA 分析，两两多重比较采用 SNK-*q* 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛兰素对大鼠 MAU 和血清中肾功能相关指标的影响

与对照组相比，模型组和地塞米松组大鼠 MAU 含量及血清 Scr、BUN 水平均升高（$P < 0.05$）；与模型组相比，维替泊芬和毛兰素低、高剂量组大鼠 MAU 含量及血清 Scr、BUN 水平均降低（$P < 0.05$）；与毛兰素高剂量组相比，联合用药组大鼠 MAU 含量及血清 Scr、BUN 水平升高（$P < 0.05$），见表 2。

2.2 毛兰素对大鼠肾组织病理变化及胶原纤维沉积的影响

HE 染色和 Masson 染色结果显示，与对照组相比，模型组和地塞米松组肾大鼠组织中肾小球体积变大，基底膜增厚，炎性细胞浸润，胶原纤维沉积增多，病理损伤严重；与模型组相比，维替泊芬和毛兰素低、高剂量组肾小球体积缩小，基底膜变薄，无明显炎性细胞浸润，胶原纤维沉积减少；与毛兰素高剂量组相比，联合用药组大鼠肾组织的病理损伤和胶原纤维沉积再次增多，见图 1、2。

2.3 毛兰素对大鼠肾组织 MDA 和 SOD 水平的影响

与对照组相比，模型组和地塞米松组大鼠肾组织 MDA 水平升高，SOD 水平降低（$P < 0.05$）；与模型组相比，维替泊芬和毛兰素低、高剂量组大鼠肾组织 MDA 水平降低，SOD 水平升高（$P < 0.05$）；与毛兰素高剂量组相比，联合用药组大鼠肾组织 MDA 水平升高，SOD 水平降低（$P < 0.05$），见表 3。

2.4 毛兰素对大鼠肾组织中 TNF-α、IL-1β、TGF-β_1 mRNA 水平的影响

与对照组相比，模型组和地塞米松组大鼠肾组织中 TNF-α、IL-1β 及 TGF-β_1 mRNA 水平升高（$P < 0.05$）；与模型组相比，维替泊芬和毛兰素低、高剂

表 2 各组大鼠 MAU 和肾功能相关指标的水平（$\bar{x}\pm s$）

Table 2 The levels of MAU and renal function related indicators in each group of rats（$\bar{x}\pm s$）

组别	MAU/mg·24 h^{-1}	Scr/μmol·L^{-1}	BUN/mmol·L^{-1}
对照组（n=10）	6.78±1.15	37.62±2.15	4.36±0.71
模型组（n=10）	57.28±3.32*	93.81±3.67*	21.73±1.54*
地塞米松组（n=10）	55.49±3.25*	92.64±3.58*	20.24±1.41*
维替泊芬组（n=10）	20.96±2.14*$^{\#}$	46.35±2.54*$^{\#}$	7.92±0.83*$^{\#}$
毛兰素低剂量组（n=10）	38.67±2.51*$^{\#\blacktriangle}$	69.72±2.73*$^{\#\blacktriangle}$	12.69±1.02*$^{\#\blacktriangle}$
毛兰素高剂量组（n=10）	21.71±2.09*$^{\#}$	45.18±2.36*$^{\#}$	7.53±0.68*$^{\#}$
联合用药组（n=10）	46.63±2.82*$^{\#\blacktriangle\blacktriangledown}$	81.26±3.24*$^{\#\blacktriangle\blacktriangledown}$	16.85±1.23*$^{\#\blacktriangle\blacktriangledown}$
F值	565.315	642.326	372.956
P值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与对照组比较，*P ＜ 0.05；与模型组比较，$^{\#}P$ ＜ 0.05；与维替泊芬组比较，$^{\blacktriangle}P$ ＜ 0.05；与毛兰素高剂量组比较，$^{\blacktriangledown}P$ ＜ 0.05。

Note: *vs* control group, *P ＜ 0.05; *vs* model group, $^{\#}P$ ＜ 0.05; *vs* verteporfin group, $^{\blacktriangle}P$ ＜ 0.05; *vs* erianin high dose group, $^{\blacktriangledown}P$ ＜ 0.05.

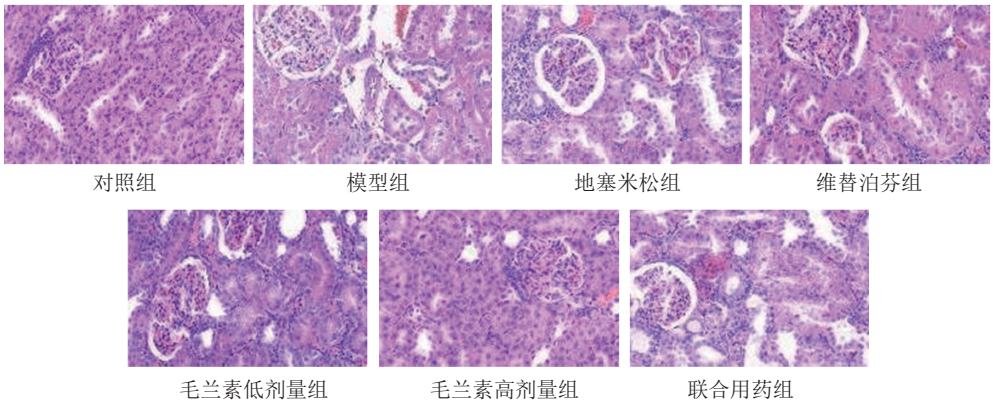


图 1 染色各组大鼠肾脏组织病理（HE, ×400）

Figure 1 Staining of renal histopathology in each group（HE, ×400）

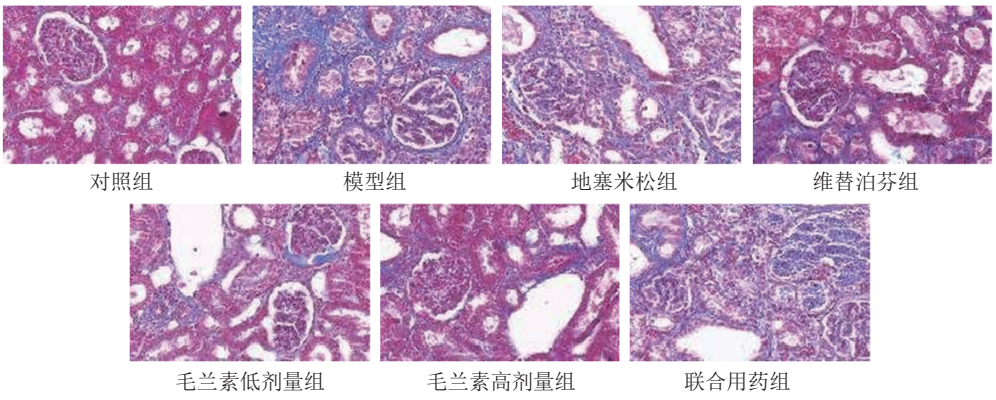


图 2 染色各组大鼠肾脏组织病理（Masson, ×400）

Figure 2 Staining was used for renal histopathology in each group（Masson, ×400）

表 3 各组大鼠肾组织中 MDA 及 SOD 水平 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 The level of MDA content and SOD in renal tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	MDA/nmol·mg^{-1}	SOD/U·mg^{-1}
对照组(n=10)	5.35±0.82	68.93±3.21
模型组(n=10)	25.64±1.58*	21.69±1.43*
地塞米松组(n=10)	24.73±1.62*	20.57±1.38*
维替泊芬组(n=10)	10.65±1.07*$^{\#}$	53.91±2.96*$^{\#}$
毛兰素低剂量组(n=10)	16.72±2.73*$^{\#\blacktriangle}$	42.87±2.71*$^{\#\blacktriangle}$
毛兰素高剂量组(n=10)	9.37±0.96*$^{\#}$	54.26±3.05*$^{\#}$
联合用药组(n=10)	19.81±1.21*$^{\#\blacktriangle\blacktriangledown}$	29.68±1.39*$^{\#\blacktriangle\blacktriangledown}$
F值	131.630	286.246
P值	<0.001	<0.001

注：与对照组比较，*$P<0.05$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$；与维替泊芬组比较，$^{\blacktriangle}P<0.05$；与毛兰素高剂量组比较，$^{\blacktriangledown}P<0.05$。

Note: *vs* control group, *$P<0.05$; *vs* model group, $^{\#}P<0.05$; *vs* verteporfin group, $^{\blacktriangle}P<0.05$; *vs* erianin high dose group, $^{\blacktriangledown}P<0.05$.

量组大鼠肾组织中 TNF-α、IL-1β 及 TGF-β_1 mRNA 水平降低（$P<0.05$）；与毛兰素高剂量组相比，联合用药组大鼠肾组织中 TNF-α、IL-1β 及 TGF-β_1 mRNA 水平升高（$P<0.05$），见表 4。

2.5 毛兰素对大鼠肾组织 YAP、TAZ、CTGF、FN 及 PAI-1 蛋白表达的影响

与对照组相比，模型组和地塞米松组大鼠肾组织中 YAP、TAZ、CTGF、FN 及 PAI-1 蛋白表达均升高（$P<0.05$）；与模型组相比，维替泊芬和毛兰素低、高剂量组大鼠肾组织中 YAP、TAZ、CTGF、FN 及 PAI-1 蛋白表达均降低（$P<0.05$）；与毛兰素高剂量组相比，联合用药组大鼠肾组织中 YAP、TAZ、CTGF、FN 及 PAI-1 蛋白表达升高（$P<0.05$），见表 5。

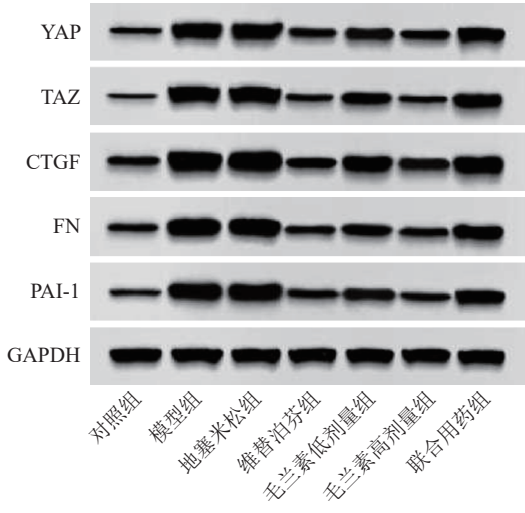


图 3 各组大鼠肾组织中 YAP、TAZ、CTGF、FN 及 PAI-1 蛋白表达

Figure 3 Expression of YAP, TAZ, CTGF, FN, and PAI-1 proteins in renal tissue of rats in each group

3 讨论

DN 是糖尿病引起严重微血管并发症之一，也是导致肾功能衰竭的关键原因。DN 最终导致肾纤维化和慢性肾功能衰竭。肾纤维化是糖尿病神经病变发

表 4 各组大鼠肾组织中 TNF-α、IL-1β 及 TGF-β_1 mRNA 水平 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 The mRNA levels of TNF-α, IL-1β and TGF-β_1 in renal tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α	IL-1β	TGF-β_1
对照组(n=10)	1.05±0.07	0.98±0.06	1.03±0.08
模型组(n=10)	3.17±0.23*	2.47±0.18*	2.87±0.21*
地塞米松组(n=10)	3.09±0.21*	2.36±0.15*	2.76±0.19*
维替泊芬组(n=10)	1.46±0.11*$^{\#}$	1.35±0.08*$^{\#}$	1.39±0.09*$^{\#}$
毛兰素低剂量组(n=10)	2.28±0.16*$^{\#\blacktriangle}$	1.71±0.13*$^{\#\blacktriangle}$	1.88±0.13*$^{\#\blacktriangle}$
毛兰素高剂量组(n=10)	1.45±0.12*$^{\#}$	1.28±0.07*$^{\#}$	1.40±0.11*$^{\#}$
联合用药组(n=10)	2.69±0.17*$^{\#\blacktriangle\blacktriangledown}$	2.04±0.16*$^{\#\blacktriangle\blacktriangledown}$	2.38±0.17*$^{\#\blacktriangle\blacktriangledown}$
F值	140.517	101.264	120.577
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注：与对照组比较，*$P<0.05$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$；与维替泊芬组比较，$^{\blacktriangle}P<0.05$；与毛兰素高剂量组比较，$^{\blacktriangledown}P<0.05$。

Note: *vs* control group, *$P<0.05$; *vs* model group, $^{\#}P<0.05$; *vs* verteporfin group, $^{\blacktriangle}P<0.05$; *vs* erianin high dose group, $^{\blacktriangledown}P<0.05$.

表 5 各组大鼠肾组织中 YAP、TAZ、CTGF、FN 及 PAI-1 蛋白的相对表达量（$\bar{x}\pm s$）

Table 5 Relative expression levels of YAP, TAZ, CTGF, FN, and PAI-1 proteins in renal tissues of rats in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	YAP/GAPDH	TAZ/GAPDH	CTGF/GAPDH	FN/GAPDH	PAI-1/GAPDH
对照组（n=10）	0.31±0.02	0.25±0.02	0.45±0.03	0.41±0.03	0.38±0.03
模型组（n=10）	1.29±0.13*	1.34±0.10*	1.71±0.14*	1.57±0.11*	1.40±0.13*
地塞米松组（n=10）	1.30±0.12*	1.33±0.11*	1.69±0.13*	1.49±0.12*	1.41±0.11*
维替泊芬组（n=10）	0.54±0.04*#	0.43±0.03*#	0.71±0.06*#	0.60±0.05*#	0.57±0.04*#
毛兰素低剂量组（n=10）	0.78±0.06*#▲	0.81±0.07*#▲	1.14±0.11*#▲	0.82±0.07*#▲	0.83±0.07*#▲
毛兰素高剂量组（n=10）	0.55±0.04*#	0.44±0.03*#	0.72±0.06*#	0.58±0.04*#	0.56±0.05*#
联合用药组（n=10）	1.03±0.08*#▲▼	1.08±0.08*#▲▼	1.38±0.12*#▲▼	1.12±0.09*#▲▼	1.12±0.09*#▲▼
F值	117.951	199.757	124.524	166.779	132.756
P值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与对照组比较，*P ＜ 0.05；与模型组比较，#P ＜ 0.05；与维替泊芬组比较，▲P ＜ 0.05；与毛兰素高剂量组比较，▼P ＜ 0.05。

Note: *vs* control group, *P ＜ 0.05; *vs* model group, #P ＜ 0.05; *vs* verteporfin group, ▲P ＜ 0.05; *vs* erianin high dose group, ▼P ＜ 0.05.

展为终末期肾病的常见途径[11—12]。尽管严格控制血糖水平、限制蛋白质摄入和改变生活方式等治疗方法可控制糖尿病神经病变，但不能对 DN 提供足够的治疗[13]。因此，寻找更有效的 DN 治疗策略至关重要。在糖尿病神经病变中，MAU 是最早公认的无创诊断指标，Scr、BUN 是肾功能检测的主要指标[14]。本研究结果显示，模型组和地塞米松组大鼠 MAU 及血清 Scr、BUN 水平均高于对照组；而维替泊芬和毛兰素组大鼠 MAU 及血清 Scr、BUN 水平均低于模型组。提示毛兰素可以减轻 DN 大鼠的肾功能障碍。

HE 染色和 Masson 染色结果显示，模型组和地塞米松组大鼠肾组织病理损伤严重，炎性细胞浸润明显，胶原纤维沉积增多；维替泊芬和毛兰素组肾组织损伤减轻，无明显炎性细胞浸润，胶原纤维沉积减少。提示毛兰素可抑制 DN 大鼠肾组织的病理损伤和纤维化程度。炎症也被认为是 DN 相关性肾纤维化的关键致病因素，高血糖刺激线粒体产生过量的 ROS，从而触发一系列下游炎症因子的分泌，包括 TNF-α、IL-1β、TGF-β_1，从而促进肾纤维化的发展并加重其症状[15—16]。TGF-β 是导致肾纤维化的核心途径，其中 TGF-β_1 的过表达可诱导肾纤维化。本研究显示，模型组和地塞米松组大鼠肾组织中炎性因子 TNF-α、IL-1β 及 TGF-β_1 mRNA 水平及氧化因子 MDA 含量较对照组升高，抗氧化因子 SOD 活性降低；而维替泊芬和 ER 组大鼠肾组织中 TNF-α、IL-1β 以及 TGF-β_1 mRNA 水平及 MDA 含量较模型组降低，SOD 活性升高。表明毛兰素可抑制 DN 大鼠的氧化应激和炎性反应，从而减轻肾纤维化，但具体的作用机制还未了解。

YAP 和 TAZ 在器官大小控制、组织稳态和肿瘤发生中起关键作用，也可在多种人类恶性肿瘤中被异常激活[17]。研究显示，YAP 在糖尿病心脏中被激活，从而促进糖尿病心肌病大鼠的心肌纤维化。同时也显示 TAZ 在 DN 小鼠中的表达水平显著升高，肾上皮细胞中 TAZ 持续表达能够促进 CTGF、FN 和 PAI-1 等纤维化因子的表达[18—19]。CTGF、FN 和 PAI-1 均与细胞外基质的过度沉积相关，加快心、肺和肾等各个器官的纤维化进展[20]。本研究结果显示，模型组和地塞米松组大鼠肾组织中 YAP、TAZ、CTGF、FN 以及 PAI-1 蛋白较对照组升高；维替泊芬和毛兰素组大鼠肾组织中 YAP、TAZ、CTGF、FN 以及 PAI-1 蛋白表达较模型组降低。提示毛兰素可以抑制 YAP 和 TAZ 被激活，从而抑制促纤维化因子的表达，减轻肾纤维化。在高剂量毛兰素的基础上进一步加入 YAP 激活剂地塞米松，发现毛兰素对 DN 大鼠的保护作用被逆转。因此，推测毛兰素对 DN

大鼠肾纤维化的保护作用是通过抑制 YAP/TAZ 信号通路实现的。

4 结论

综上所述，毛兰素可通过抑制 YAP/TAZ 信号通路减轻 DN 大鼠的肾纤维化。本研究为糖尿病引发的肾病提供新的治疗策略和途径。但该通路涉及的下游信号因子在该疾病中的调节机制还有待进一步深入探索。

参考文献：

[1] Li M, Deng L, Xu G. METTL14 promotes glomerular endothelial cell injury and diabetic nephropathy via m6A modification of α-klotho[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 106.

[2] Tziastoudi M, Theoharides TC, Nikolaou E, *et al*. Key genetic components of fibrosis in diabetic nephropathy: an updated systematic review and meta-analysis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 15331.

[3] Xu Y, Fang R, Shao J, *et al*. Erianin induces triple-negative breast cancer cells apoptosis by activating PI3K/Akt pathway[J]. Biosci Rep, 2021, 41(6): BSR20210093.

[4] Zhang T, Ouyang H, Mei X, *et al*. Erianin alleviates diabetic retinopathy by reducing retinal inflammation initiated by microglial cells via inhibiting hyperglycemia-mediated ERK1/2-NF-κB signaling pathway[J]. FASEB J, 2019, 33(11): 11776-11790.

[5] Chen MF, Liou SS, Kao ST, *et al*. Erianin protects against high glucose-induced oxidative injury in renal tubular epithelial cells[J]. Food Chem Toxicol, 2019, 126: 97-105.

[6] Zhao W, Wang M, Cai M, *et al*. Transcriptional co-activators YAP/TAZ: potential therapeutic targets for metastatic breast cancer[J]. Biomed Pharmacother. 2021, 133: 110956.

[7] He X, Tolosa MF, Zhang T, *et al*. Myofibroblast YAP/TAZ activation is a key step in organ fibrogenesis[J]. JCI Insight, 2022, 7(4): e146243.

[8] Nie P, Bai X, Lou Y, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce oxidative damage and apoptosis in diabetic nephropathy by activating Nrf2[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 450.

[9] Gong P, Zhang Z, Zou C, *et al*. Hippo/YAP signaling pathway mitigates blood-brain barrier disruption after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Behav Brain Res, 2019, 356: 8-17.

[10] Quan Y, Li Z, Zhu K, *et al*. Transcatheter arterial chemoembolization combined with Hippo/YAP inhibition significantly improve the survival of rats with transplanted hepatocellular carcinoma[J]. Lipids Health Dis, 2021, 20(1): 74.

[11] Chen K, Yu B, Liao J. LncRNA SOX2OT alleviates mesangial cell proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy via Akt/mTOR-mediated autophagy[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 71.

[12] Liu D, Liu F, Li Z, *et al*. HNRNPA1-mediated exosomal sorting of miR-483-5p out of renal tubular epithelial cells promotes the progression of diabetic nephropathy-induced renal interstitial fibrosis[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(3): 255.

[13] Shu S, Zhang Y, Wang Q, *et al*. Liuwei dihuang pill attenuates diabetic nephropathy by inhibiting renal fibrosis via TGF-β/Smad2/3 pathway[J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 5063636.

[14] Chen L, Wu J, Hu B, *et al*. The role of cell division autoantigen 1(CDA1) in renal fibrosis of diabetic nephropathy[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6651075.

[15] Qu X, Zhai B, Liu Y, *et al*. Pyrroloquinoline quinone ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy by inhibiting the pyroptosis pathway in C57BL/6 mice and human kidney 2 cells[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 150: 112998.

[16] 宋瑞婧, 张欣欣, 高飞, 等. 加味升降散通过介导RIP1/RIP3/MLKL通路抑制坏死性凋亡减轻糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17): 33-42.

[17] Li H, Wu BK, Kanchwala M, *et al*. YAP/TAZ drives cell proliferation and tumour growth via a polyamine-eIF5A hypusination-LSD1 axis[J]. Nat Cell Biol, 2022, 24(3): 373-383.

[18] Hu M, Wang H, Li S, *et al*. Yes-associated protein is involved in myocardial fibrosis in rats with diabetic cardiomyopathy[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2021, 14: 2133-2143.

[19] Anorga S, Overstreet JM, Falke LL, *et al*. Deregulation of Hippo-TAZ pathway during renal injury confers a fibrotic maladaptive phenotype[J]. FASEB J, 2018, 32(5): 2644-2657.

[20] Tang G, Li S, Zhang C, *et al*. Clinical efficacies, underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(9): 2749-2767.

（编辑：沈佳婕）