

·基础研究·

磷酸二酯酶5在肾脏纤维化中的保护作用

翟庆娴, 李 蒙, 隆罗莎, 梁柏恩, 王蔚东
(中山大学中山医学院高血压研究所, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探究磷酸二酯酶5(PDE5)抑制剂西地那非(SIL)或LW1646对单侧输尿管结扎(UUO)诱导的肾间质纤维化的保护作用。【方法】C57BL/6雄性小鼠被随机分为假手术Sham($n=6$)、7UUO($n=6$)、7UUO+SIL($n=6$)或7UUO+LW1646($n=6$)组,术前1h给予SIL或LW1646,或溶剂灌胃给药,连续给药7d后处死小鼠,收集梗阻侧肾脏标本。对肾组织进行H&E和Masson's染色,使用免疫印迹和RT-qPCR检测肾脏中的纤维化、内质网应激、自噬、凋亡相关蛋白表达水平以及纤维化相关基因表达水平。使用人近端小管上皮细胞(HK-2)给予TGF- β 1 48h,检测cGMP对内质网应激和纤维化相关蛋白水平的影响。使用衣霉素孵育HK-2细胞24h,检测PDE5抑制剂对内质网应激、纤维化相关蛋白、自噬和凋亡蛋白水平的影响。【结果】在行UUO术后7d小鼠体质量相对于假手术组显著下降($P<0.0001$),梗阻侧肾脏可见明显肾小管扩张、肾间质炎症细胞浸润,TGF- β 1蛋白和mRNA水平、内质网应激、自噬及凋亡相关蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。而给予SIL或LW1646后小鼠梗阻侧肾脏管腔扩张、炎症细胞浸润被缓解。肾脏TGF- β 1的蛋白及mRNA表达水平被不同程度下调,PDE5抑制剂显著下调内质网应激、自噬和凋亡水平。在HK2细胞中,TGF- β 1诱导的Fibronectin蛋白以及BiP蛋白表达水平显著升高,在cGMP的作用下可被部分逆转;衣霉素诱导的Fibronectin、BiP蛋白水平上调可被SIL或LW1646逆转,同时自噬和凋亡的异常水平也被PDE5抑制剂改变。【结论】PDE5抑制剂可以通过改善肾脏组织细胞内质网应激、自噬水平,以及抗凋亡等途径和缓解纤维化进展,同剂量的LW1646在对缓解内质网应激降低细胞外基质蛋白的表达水平的效果优于SIL。

关键词:磷酸二酯酶5;肾脏纤维化;单侧输尿管结扎术;内质网应激;小鼠

中图分类号:R3 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2023)06-0931-12

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0607

Phosphodiesterase 5 Inhibitors Attenuate Unilateral Ureteral Obstruction-Induced Renal Fibrosis

ZHAI Qing-xian, LI Meng, LONG Luo-sha, LIANG Bai-en, WANG Wei-dong

(Department of Pathophysiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080, China.)

Correspondence to: WANG Wei-dong; E-mail:wangwd6@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate whether phosphodiesterase (PDE) 5 inhibitors sildenafil (SIL) or LW1646 prevented renal interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (UUO).【Methods】Male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups ($n=6$), namely the Sham group, 7UUO group, 7UUO+SIL group and 7UUO+LW1646 group. Sildenafil (SIL) or LW1646, or vehicle was administered 1 hour before surgery, and the mice were continuously treated once daily (i. g., 50 mg/kg) for 7 days. The obstructed kidneys were harvested on day 7. Hematoxylin-eosin (HE) and Masson's staining was used to examine renal histology. Immunoblotting and RT-qPCR were used to detect the expression levels of protein and mRNA for fibrosis, apoptosis, endoplasmic reticulum (ER) stress, autophagy, and pro-fibrotic factors. Human proximal tubule epithelial cells (HK-2) were treated with TGF- β 1 for 48 hours or tunicamycin for 24

收稿日期:2023-05-09

基金项目:国家自然科学基金(82270744);广州市科技计划项目(202201011621)

作者简介:翟庆娴,第一作者,研究方向:肾脏疾病,E-mail:1055512527@qq.com;王蔚东,通信作者,教授,E-mail:wangwd6@mail.sysu.edu.cn

hours, respectively, to evaluate whether cyclic guanosine monophosphate (cGMP) or PDE5 inhibitors prevents ER stress and pro-fibrotic responses.【Results】At the 7th days after UUO, the body weight of the mice showed a significant decrease ($P < 0.0001$) compared with that in the sham group. The obstructed kidneys showed a significant tubular dilation and interstitial inflammation. The levels of protein and mRNA expression in apoptosis, ER stress, autophagy-related protein and pro-fibrotic factors were also markedly increased in UUO mice ($P < 0.05$). In contrast, SIL or LW1646 treatment was associated with attenuated tubular dilation, infiltration of inflammatory cells and collagen content in the obstructed kidney of the mice. The protein and mRNA expression levels of renal TGF- β 1 were markedly decreased, and the protein expression levels of apoptosis, endoplasmic reticulum stress, and autophagy markers were also significantly downregulated by PDE5 inhibitors. In HK-2 cells, TGF- β 1 induced increased expression levels of fibronectin and BiP, which was at least partially reversed by cGMP, a product of PDE inhibition. Additionally, PDE5 inhibitors were found to modulate aberrant levels of autophagy and apoptosis.【Conclusion】In conclusion, PDE5 inhibitors, in particular, LW1646, can alleviate the progression of fibrosis by improving ER stress, apoptosis and autophagy as well as downregulating protein and mRNA expression of TGF- β 1.

Key words: PDE5 inhibitor; renal fibrosis; UUO; ER stress; mouse

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2023, 44(6): 931-942]

慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)是全球持续关注的重大公共健康问题。基于2017年数据,全球共有6.975亿CKD患者,其中,近三分之一CKD患者在中国,且65岁以上人群为主要肾病致死群体^[1]。而肾脏纤维化是大多数CKD以及终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的共同终末期表现。预防和延缓肾脏纤维化形成是防治ESRD的关键。肾脏纤维化的主要特征是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)积累、持续的炎症激活和免疫细胞浸润、损伤肾小管和炎症细胞释放促纤维化因子、促炎因子等,以及实质细胞的表型改变(如上皮细胞间充质转化)和不可逆损失与肾微血管系统减少^[2]。目前多项研究报道可通过靶向TGF- β 1、抗内质网应激、抗凋亡等机制缓解肾脏纤维化^[2]。环核苷酸磷酸二酯酶(phosphodiesterases, PDE)5是PDE家族的11个成员之一,可特异性酶促降解环cGMP。常用的PDE5抑制剂主要有西地那非(sildenafil, SIL)、他达拉非(tadalafil)等^[3-4]。目前西地那非等PDE5抑制剂已被美国食品和药物管理局(FDA)批准治疗勃起功能障碍和肺动脉高压。PDE5抑制剂可以缓解CKD进展。目前已有的研究表明,西地那非或是他达拉非在包括腺嘌呤^[5-6]、阿霉素^[7]、5/6肾切除^[8]、高盐饮食^[9]诱导的CKD模型中起保护作用,而临床试验结果显示PDE5抑制剂对造影剂^[10]诱导的CKD有益。即使是对于需要血液透析的慢性肾衰患者,口服PDE5抑制剂也是一种安全的治疗方法^[11],但对肾脏纤维

化保护作用及机制的研究较少。LW1646是一种新型特异性抑制剂,被报道其治疗肺动脉高压的效果是西地那非的3倍。与传统PDE5抑制剂zaprinast不同,其对PDE5更具有特异性抑制作用,经检测其对PDE5的选择性比PDE1、PDE3、PDE7、PDE8和PDE9均高出数倍^[12]。LW1646半衰期长于西地那非,在肝微粒体中是西地那非的3倍。LW1646的药理学安全性好,在高达1.5 g/kg的剂量下耐受性良好,并且没有急性毒性^[12-14]。单侧输尿管结扎(unilateral ureteral obstruction, UUO)是常用的肾脏纤维化模型^[15]。本研究旨在通过7UUO诱导小鼠肾脏纤维化模型和体外TGF- β 1诱导人肾小管上皮细胞(HK-2)上皮-间质转化模型探究PDE5抑制剂在肾脏纤维化中的保护作用及机制以及新型PDE5抑制剂LW1646的效能。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与取材

健康9~10周龄无特定病原体(SPF)C57BL/6雄鼠24只,体质量(25.35±0.15)g,由广东省医学实验动物中心提供(许可证号:SCXK(粤)2022-0002)。将小鼠随机分为4组,每组6只。①假手术(Sham)组或②单侧输尿管结扎术(7UUO)组:灌胃给予150 μ L溶剂;③7UUO+SIL组:经灌胃给予每天50 mg/kg西地那非;④7UUO+LW1646组:经灌胃

给予每天 50 mg/kg LW1646。于术前 1 h 开始第一次给药,之后每天给药 1 次。术后 7 d 处死小鼠并留取梗阻侧肾脏,剥去被膜后置于液氮中冷冻,放 -80 °C 超低温冰箱待测。

1.2 细胞培养与处理

人肾近端小管上皮细胞(HK-2),采用含 5%FBS 及 100 U/mL 青链霉素的 DMEM/F12 培养基培养于 37 °C、体积分数 5%CO₂ 培养箱。给予 10 μmol/L 8-Br-cGMP 预处理 HK2 细胞 30 min,之后与 5 ng/mL TGF-β1 共孵育 48 h。给予 10 μmol/L 西地那非或 LW1646 预处理 HK2 细胞 1 h,之后与 2 μg/mL 衣霉素(tunicamycin, TM)孵育 24 h。

1.3 主要试剂和仪器

DMEM/F12 培养基购自 CORNING 公司,胎牛血清、青-链霉素均购自 Hyclone 公司,胰蛋白酶购自 ThermoFisher Scientific 公司, TGF-β1 购自美国 R&D 公司, Sildenafil 和 LW1646 来自中山大学药学院罗海彬教授赠与,衣霉素购自 Abcam 公司。抗兔纤连蛋白(Fibronectin, FN)抗体来自博士德公司,抗鼠 TGF-β1 抗体购自 Santa Cruz 公司,抗兔 BiP、抗兔 p-eIF2α、抗兔 eIF2α、抗兔 Bax、抗兔 Bcl-2 抗体均来自 Cell Signal Technology 公司,抗兔 calnexin、p62/SQSTM1、LC3B 抗体来自 Abcam 公司,抗鼠 TGF-β1 抗体来自 Santa Cruz 公司,抗鼠 GAPDH 抗体购自 Proteintech 公司,逆转录试剂(AG)、SYBR Green qPCR master Mix(AG), RNA 提取液(ThermoFisher Scientific),蛋白裂解液(上海博彩)、蛋白酶抑制剂(Roche)、BCA 试剂盒(ThermoFisher Scientific),细胞培养箱(Thermo Fisher),PCR 仪(Life Technologies)、酶标仪(BioTek)、电泳仪(Bio-Rad)、垂直电泳槽和 Trans-Blot 转印槽(Bio-Rad)、Tanon5200 化学发光分析仪(Tannon)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物模型建立 C57BL/6 小鼠经异氟烷麻醉后,用医用胶布固定在手术台上,在腹部正中切口备皮,75%酒精-碘酒-酒精进行消毒手术部位皮肤。之后沿小鼠腹白线开口,以开腹固定器固定切口,用无菌棉签以及小弯镊游离左侧输尿管并用 3-0 线在输尿管靠近膀胱上极处结扎,在腹腔滴一滴生理盐水后缝合腹部,在加热垫上复苏后放回笼中,之后给予正常饮食、饮水并观察。假手术组除不结扎外,其余操作同模型组。

1.4.2 HE 染色与 Masson 染色检测肾脏病理学改

变和胶原沉积 取梗阻侧肾脏,去掉被膜后,取中间 2 mm 组织浸泡在 40 g/L 多聚甲醛中固定,后取出组织,全自动脱水仪脱水,透明组织、石蜡包埋,连续切片,切片厚度为 4 μm 并进行 HE 染色和 Masson's 染色,光学显微镜下观察肾脏病理学改变,使用 ImageJ 对 Masson's 染色切片的蓝色胶原定量。

1.4.3 免疫印迹(Western blot)检测肾脏蛋白表达 从各组梗阻侧肾脏组织和 HK2 细胞中提取蛋白,并使用 BCA 法进行蛋白定量,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜,待膜封闭后,分别加入 Fibronectin、BiP、TGF-β1、IP3R、calnexin、p-eIF2α、eIF2α、Bax、Bcl-2、cleaved caspase 3、p62、LC3B 抗体(均为 1:1 000 稀释)以及 GAPDH 抗体(1:10 000 稀释)4 °C 过夜孵育, TBST 洗膜,然后加入 HRP 标记的抗兔或小鼠二抗(1:300 稀释)室温孵育 1 h, TBST 洗膜,最后经化学发光液显色,凝胶成像系统扫描发光条带。

1.4.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测肾脏 mRNA 表达 使用 RNA 提取液(Trizol reagent)提取肾脏组织中总 RNA,逆转录后得到 cDNA,利用 RT-qPCR 检测试剂盒检测纤维化相关基因表达水平,内参基因为 GAPDH。反应条件如下:阶段一(95 °C 30 s);阶段二(95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环)。反应体系:2 μL cDNA、1 μL 前后引物混合物(Forward primer +Reverse primer)、10 μL 2×Real time-PCR 聚合酶(SYBR Premix ExTaq™)和 7 μL DEPC 水的比例配成 20 μL 的 Real time-PCR 反应体系。小鼠引物序列见表 1。

1.5 统计学分析使用

应用 SPSS 22.0 软件以及 Graphpad Prism 8.3 软件进行统计分析,计量资料以均数±标准误($\bar{x}\pm s_x$)表示,符合正态分布、方差齐的计量资料多组之间比较采用 one-way ANOVA 和 Student-Newman-Keuls - test 进行均数的两两比较,采用 Kruskal-Wallis 非参数检验进行不符合该条件的多组资料分析,使用 Dunn (1964) Kruskal-Wallis 多组间两两比较(使用 Benjamini-Hochberg 法校正 P 值)。P<0.05 (双侧检验)被认为差异有统计学意义。

2 结果

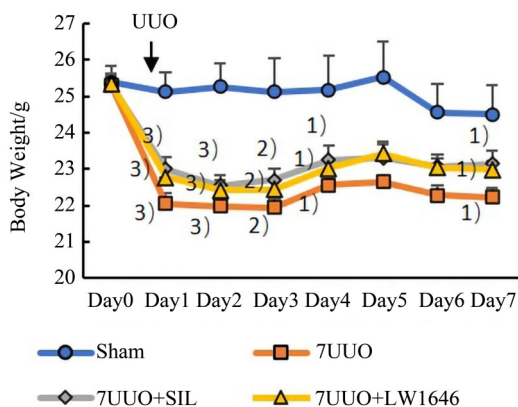
2.1 PDE5 抑制剂缓解 UUO 小鼠体质量下降

在手术 1 d 后,可见 UUO 术后各组小鼠体质量

表1 小鼠RT-qPCR引物序列
Table 1 Primer sequences for RT-qPCR (mouse)

Target gene	Former primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Lengths/bp
TGF- β 1	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG	133
α -SMA	CCCAACTGGGACCATG	TACATGCGGGGACATTGAAG	170
Col1a1	GCTCCTCTTAGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG	103
GAPDH	TGACCTCAACTACATGGTCTACA	CTTCCCATTCTCGGCCTTG	85

间有统计学差异($F=12.89, P<0.0001$)。7UUO组、SIL给药、LW1646给药组[(22.04 \pm 0.29)g, (23.00 \pm 0.31)g, (22.77 \pm 0.28)g]相对于假手术组小鼠体质量(25.12 \pm 0.52)g显著下降(各组 P 值均 <0.0001),给予SIL(23.00 \pm 0.31)g或LW1646(22.77 \pm 0.28)g的小鼠体质量较高于7UUO组($P=0.1636, P=0.1647$),差异无统计学意义。在给予PDE5抑制剂7d后,SIL组小鼠体质量(23.15 \pm 0.37)g、LW1646小鼠体质量(22.98 \pm 0.25)g均较高于7UUO组(22.22 \pm 0.27)g($P=0.3361>0.05, P=0.2485>0.05$),但仍低于假手术组小鼠(24.5 \pm 0.79)g($P=0.0492>0.05, P=0.0714>0.05$;图1)。



Note: Data are presented as $\bar{x} \pm s_x$ ($n=6$ /group). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. ¹⁾ $P < 0.05$ compared with Sham; ²⁾ $P < 0.01$ compared with Sham; ³⁾ $P < 0.001$ compared with Sham.

图1 PDE5抑制剂干预对各组小鼠体质量的影响

Fig. 1 Effect of PDE5 inhibitors on body weight of Sham, 7UUO, 7UUO+SIL, 7UUO+LW1646 mice

2.2 PDE5抑制剂改善UUO小鼠肾脏纤维化病理改变

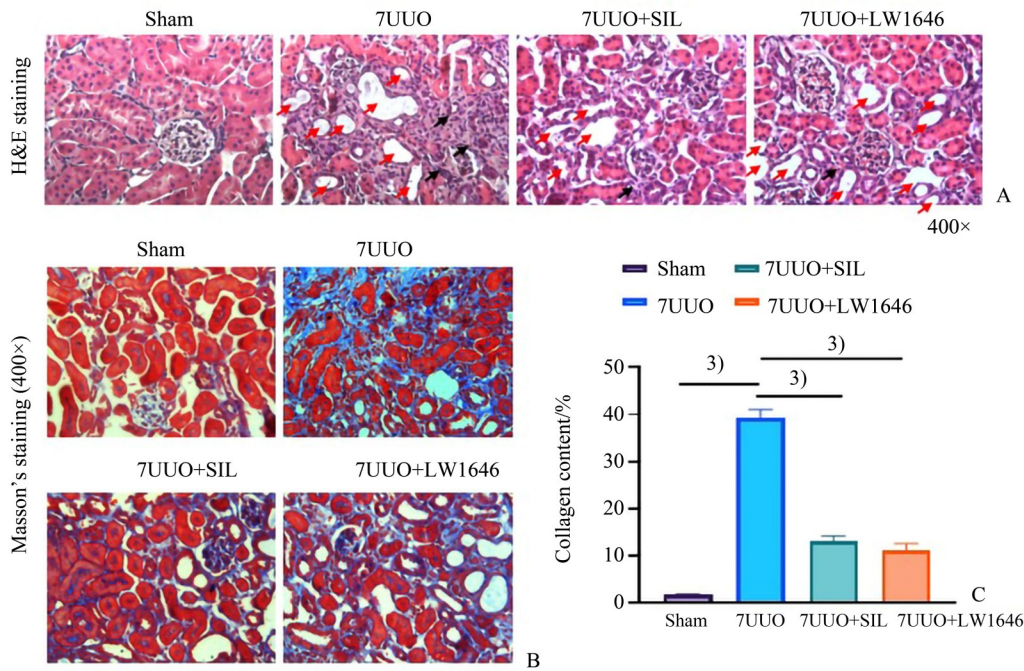
H&E染色结果显示,假手术组小鼠肾脏肾小

管和肾小球结构完整,而在单侧输尿管结扎7d(7UUO)诱导的肾间质纤维化小鼠模型中,梗阻侧肾脏肾小管上皮细胞出现坏死空泡样、颗粒样改变,部分上皮细胞甚至萎缩,肾小管管腔扩张严重,肾间质炎症细胞浸润;给予西地那非(SIL)或LW1646后,梗阻侧肾脏肾间质肾脏炎症细胞浸润减少、肾小管损伤较7UUO组不同程度减轻(图2A)。继而我们使用Masson's染色检测了肾间质胶原沉积情况,结果显示7UUO导致肾脏皮质肾小管间质有明显的胶原积聚,提示明显的肾间质纤维化,而给予SIL或LW1646后,小鼠肾间质胶原堆积有所减轻(图2B, C)。

2.3 PDE5抑制剂降低7UUO小鼠肾脏TGF- β 1蛋白表达及促纤维化因子基因表达

通过免疫印迹分析PDE5抑制剂对7UUO小鼠肾脏中纤维化蛋白表达的影响。结果显示经单因素方差分析,4组间小鼠手术或假手术侧肾脏TGF- β 1蛋白表达水平差异有统计学意义($F=13.90, P<0.0001$)。两两比较后发现其在7UUO组与假手术组的差异有统计学意义($P<0.0001$),7UUO组小鼠梗阻侧肾脏中TGF- β 1蛋白表达水平显著升高,在给予PDE5抑制剂SIL或LW1646后,TGF- β 1蛋白表达显著下降(P 值依次为 $P<0.0001, P=0.0011$;图3)。

我们进一步检测了纤维化标志蛋白基因的表达水平,RT-qPCR结果经单因素方差分析,各组间TGF- β 1、Col1a1、 α SMA的mRNA表达水平差异有统计学意义(各指标统计量分别为 $F=19.60, P<0.0001; F=20.47, P<0.0001; F=15.59, P<0.0001$)。经两两比较后分析,同假手术组小鼠相比,7UUO小鼠梗阻侧肾脏促纤维化因子TGF- β 1、Col1a1、 α SMA mRNA表达增加(各指标 P 值均为 $P<0.0001$);给予SIL处理明显降低梗阻侧



H&E staining (A) and Masson's staining (B, C) results show tubular dilation (red arrow), inflammatory cell infiltration (black arrow) and collagen content in the kidney on the obstructed side of the mice were alleviated by continuously treating mice with SIL or LW 1646 once daily (i.g., 50 mg/kg) for 7 days (400× magnification).

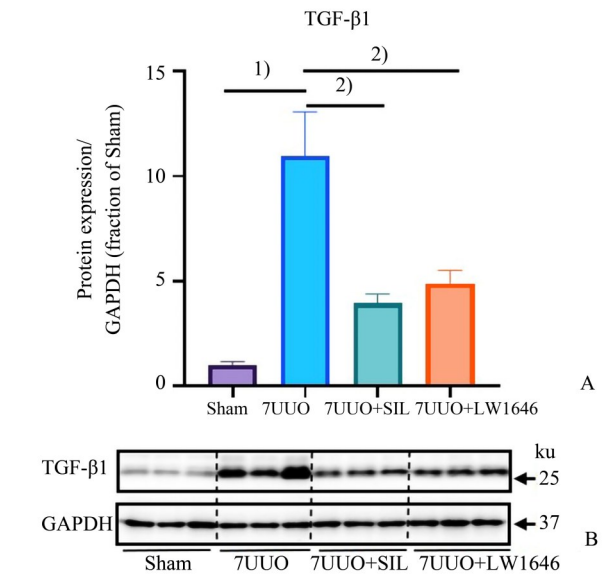
图2 PDE5抑制剂对UUO小鼠肾脏病理形态改变的影响

Fig. 2 Renal pathology in Sham, 7UUO, 7UUO+SIL and 7UUO+LW1646 mouse kidneys

肾脏 TGF-β1、Col1a1 的 mRNA 表达水平 (P 值依次为 $P=0.0419$, $P=0.0047$), LW1646 处理降低 TGF-β1、Col1a1、αSMA 的 mRNA 表达水平 ($P=0.0371$, $P=0.0211$, $P=0.0058$), 但 SIL 没有降低 αSMA 的 mRNA ($P=0.5515$), SIL 与 LW1646 对 αSMA 的 mRNA 表达水平的调控差异具有统计学意义 ($P=0.0041$)。提示 LW1646 可能有比 SIL 更好的抗纤维化作用(图4)。

2.4 PDE5 抑制剂减轻 7UUO 小鼠肾脏组织内质网应激相关蛋白表达水平

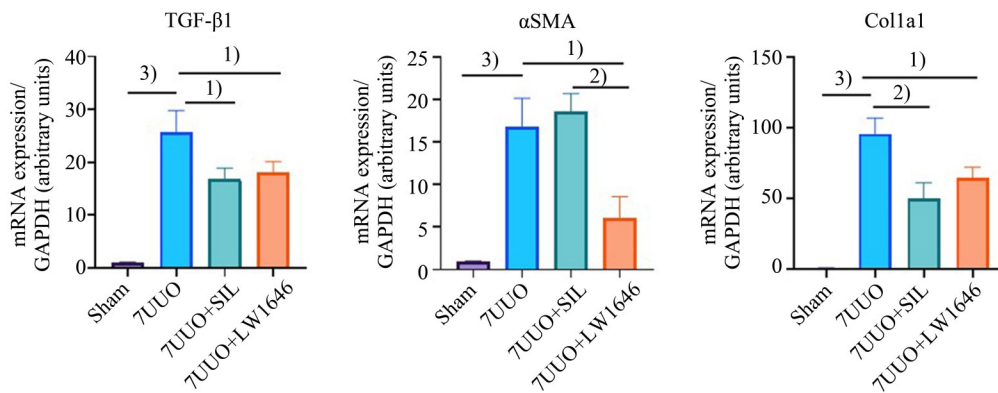
我们进一步通过免疫印迹探索了肾脏内质网应激水平,经单因素方差分析,小鼠梗阻侧肾脏的 BiP、p-eIF2α 多组间差异有统计学意义(各指标统计量分别为 $F=8.91$, $P=0.0006$; $F=8.67$, $P=0.0007$)。经两两比较后发现,7UUO 组 BiP、p-eIF2α 蛋白表达水平较假手术组显著升高 ($P<0.001$),而给予 SIL 或 LW1646 后, BiP 蛋白表达水平较 7UUO 组降低 (P 值依次为 $P=0.0066$, $P=0.0056$); 相比于 7UUO 组, SIL 或 LW1646 组 p-eIF2α 蛋白表达水平降低 (P 值依次为 $P=0.0491$, $P=0.0082$)。经 Kruskal-Wallis 检验, 各组间 eIF2α



A and B representative corresponding densitometry analysis and immunoblots of protein expression levels in the kidney of Sham, 7UUO, 7UUO+SIL, 7UUO+LW1646 mice. Data are presented as $\bar{x} \pm s_x$ ($n=6$ /group). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. ¹⁾ $P<0.05$; ²⁾ $P<0.01$; ³⁾ $P<0.001$.

图3 PDE5抑制剂降低7UUO小鼠肾脏TGF-β1蛋白表达

Fig. 3 PDE5 inhibitors decrease TGF-β1 protein expression in the kidney of 7UUO mice



mRNA expression levels of renal TGF- β 1, α SMA, Collagen I were differentially downregulated with administration of SIL or LW1646. Data are presented as $\bar{x} \pm s_x$ ($n = 6/\text{group}$). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.001$.

图4 PDE5抑制剂降低7UUO小鼠肾脏纤维化相关基因表达

Fig. 4 PDE5 inhibitors decrease TGF- β 1, α SMA, Collagen I mRNA expression in the kidney of 7UUO mice

蛋白表达水平、p-eIF2 α /eIF2 α 比值差异有统计学意义 ($H = 8.61, P = 0.035 0; H = 13.25, P = 0.004 1$), 两两比较后发现 7UUO 组 eIF2 α 蛋白表达水平、p-eIF2 α /eIF2 α 比值较假手术组高 ($P = 0.048 0; P = 0.049 4$), 但 SIL 或 LW1646 处理组与 7UUO 组间的差异无统计学意义 (图 5), 提示 7UUO 诱导的内质网应激反应被 PDE5 抑制剂下调。IP3R 是内质网膜上的钙释放通道, 可通过响应细胞内的次级信使 IP3 来释放内质网内存储的钙离子, 钙结合蛋白 calnexin 是一种分子伴侣蛋白, 可以与内质网中协助蛋白质组装和/或保留未组装的蛋白质亚基。免疫印迹结果显示, 经单因素方差分析, 各组间肾脏 IP3R、calnexin 的蛋白表达水平差异有统计学意义 (各指标统计量分别为 $F = 12.52, P < 0.000 1; F = 5.93, P = 0.004 3$)。经两两比较后发现, 与假手术组相比, 7UUO 小鼠梗阻侧肾脏 IP3R 蛋白表达水平显著升高 ($P = 0.003 4$)。给予 SIL 或 LW1646 后可以显著下调 calnexin 蛋白表达水平 (P 值依次为 $P = 0.017 4, P = 0.001 3$), 以及 UUO 诱导的 IP3R 的蛋白表达水平升高 (P 值均为 $P < 0.001$; 图 6)。

2.5 PDE5 抑制剂减轻 7UUO 小鼠肾脏组织自噬相关蛋白表达

p62 和 LC3B 两种蛋白均是自噬发生的标志物。p62 可以和泛素化蛋白相结合, 之后由 LC3B 参与构成的自噬体囊泡吞噬底物从而进行细胞内损伤细胞器的清除和回收。经单因素方差分析, 四组 p62、LC3B I 的蛋白表达水平差异有统计学意义 (各指标统计量分别为 $F = 10.83, P = 0.000 2; F = 17.99, P < 0.000 1$)。经两两比较后发现, 与假手

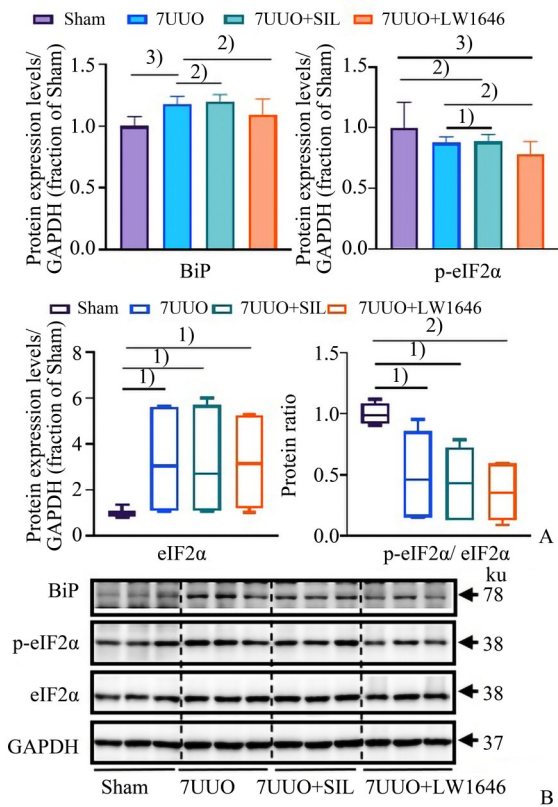
术组小鼠相比, 7UUO 组小鼠肾脏中 p62 与 LC3B 的蛋白表达水平明显升高 (P 值均为 $P < 0.000 1$)。SIL 显著降低 p62 蛋白表达水平 ($P = 0.036 3$), 特别是 LW1646 可以显著降低 p62 和 LC3B I 蛋白表达 (P 值依次为 $P = 0.016 9, P = 0.010 2$), 提示 LW1646 可能有更好地降低自噬水平的作用 (图 7)。

2.6 PDE5 抑制剂减轻 7UUO 小鼠肾脏凋亡相关蛋白表达水平

细胞凋亡是由机体调控的一种程序性死亡, 并以清除不需要或受损的细胞为目的。我们检测了肾脏中凋亡相关蛋白的表达。结果显示经单因素方差分析, 各组间 Bcl-2、cleaved caspase3 的蛋白表达水平差异有统计学意义 (各指标统计量分别为 $F = 3.65, P = 0.029 2; F = 4.25, P = 0.017 0$)。经 Kruskal-Wallis 分析, 各组间 Bax 的蛋白表达水平、Bcl-2/Bax 比值水平差异有统计学意义 ($H = 13.62, P = 0.003 4; F = 19.60, P = 0.000 2$)。经两两比较后发现, 相对于假手术组, 7UUO 组活化的半胱氨酸酶 3 (cleaved caspase 3) 的蛋白表达水平亦是显著上升 ($P = 0.012 2$), SIL 或 LW1646 可不同程度降低 cleaved-caspase 3 蛋白表达水平 ($P = 0.088 1, P = 0.033 9$); 7UUO 组小鼠梗阻侧肾脏 Bcl-2/Bax 比值水平相对于假手术组降低了约 6 倍 ($Z = 4.413, P < 0.000 1$), 在给予 SIL 或 LW1646 后, 肾脏 Bax/Bcl-2 比值显著下降 (P 值依次为 $P = 0.047 7, P = 0.042 3$; 图 8)。

2.7 在 HK2 细胞中, cGMP 抑制内质网应激和促纤维化反应

根据前面动物实验结果, 我们发现 PDE5 抑制

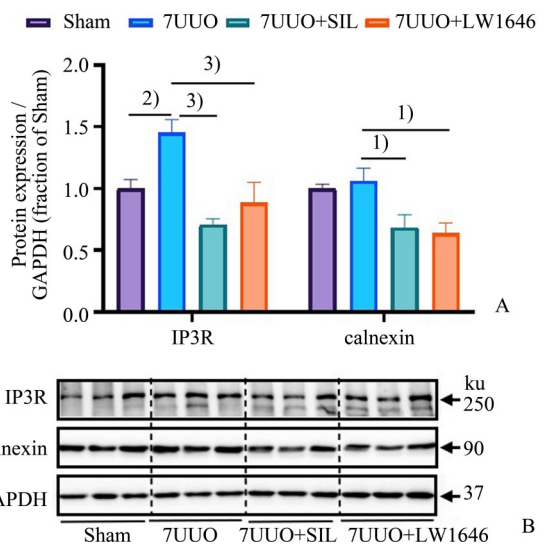


A and B representative corresponding densitometry analysis and immunoblots of protein expression levels in the kidney of Sham, 7UUO, 7UUO+SIL, 7UUO+LW1646 mice. Data are presented as $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ($n = 6$ /group). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. Renal eIF2 α and p-eIF2 α /eIF2 α ratio difference used Dunn Kruskal-Wallis multiple comparison after Kruskal-Wallis test. ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.001$.

图5 PDE5抑制剂减轻7UUO小鼠肾脏组织内质网应激相关蛋白表达

Fig. 5 Effect of PDE5 inhibitors on attenuating protein expression of ER stress-related protein in 7UUO mouse kidneys

剂可能通过调节TGF- β 1基因和蛋白表达水平抑制肾脏纤维化进展。为深入了解PDE5抑制剂抑制肾脏纤维化的作用机制,我们用TGF- β 1孵育HK2,以模拟UO或其他模型中TGF- β 1参与肾脏纤维化发生发展过程。使用10 μ mol/L的8-Br-cGMP预处理HK2细胞30 min后继续与5 ng/mL TGF- β 1共同孵育HK2细胞48 h,了解PDE5抑制剂是否通过cGMP减轻肾脏纤维化。经免疫印迹、单因素方差分析发现,各组间Fibronectin、BiP的蛋白表达水平的差异有统计学意义(各指标统计量分别为 $F=19.25, P=0.0006$; $F=5.58, P=0.0484$)。经两两比较后发现,相对于对照组,TGF- β 1可显著升



A and B representative corresponding densitometry analysis and immunoblots of protein expression levels in the kidney of Sham, 7UUO, 7UUO+SIL, 7UUO+LW1646 mice. Data are presented as $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ($n = 6$ /group). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.001$.

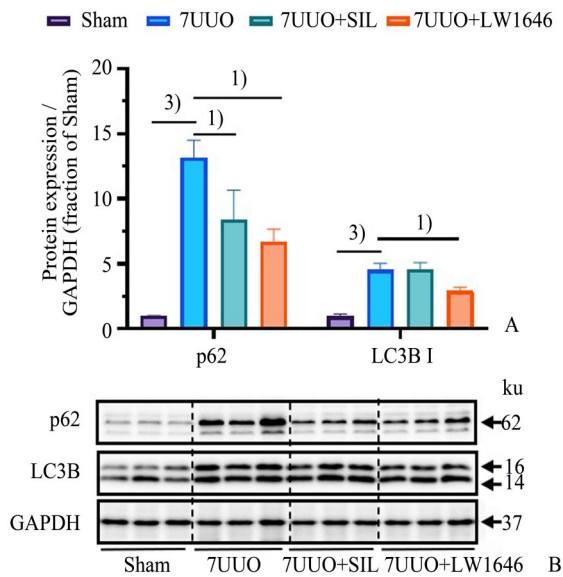
图6 PDE5抑制剂减轻7UUO小鼠肾脏组织内质网应激相关蛋白表达

Fig. 6 Effect of PDE5 inhibitors on attenuating protein expression of ER stress-related protein in 7UUO mouse kidneys

高Fibronectin、BiP的蛋白表达水平(P 值依次为 $P < 0.0001, P = 0.0129$),而cGMP在HK2细胞中可以缓解TGF- β 1诱导的纤维化标志蛋白Fibronectin和内质网应激分子伴侣BiP蛋白高表达水平(P 值依次为 $P = 0.0179, P = 0.0578$)。这一结果与体内实验给予SIL或LW1646相类似,提示PDE5抑制剂对肾脏纤维化的保护作用可能与cGMP的作用有关(图9)。

2.8 在HK2细胞中,PDE5抑制剂抑制衣霉素诱导的内质网应激和促纤维化反应

衣霉素(tunicamycin, TM)是蛋白糖基化抑制剂,可以阻止蛋白糖化的起始步骤从而诱导内质网应激。我们给予HK2细胞2 μ g/mL TM 24h,使用PDE5抑制剂SIL或LW1646 10 μ mol/L预处理1h,检测PDE5抑制剂能否缓解TM诱导的内质网应激反应,以及自噬和凋亡的改变。经免疫印迹、单因素方差分析,各组间BiP、FN蛋白表达水平差异有统计学意义($F=80.62, P < 0.001$; $F=4.62, P=0.0231$)。两两比较后发现,TM组BiP



A and B representative corresponding densitometry analysis and immunoblots of protein expression levels in the kidney of Sham, 7UUO, 7UUO+SIL, 7UUO+LW1646 mice. Data are presented as $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ($n = 6$ /group). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.001$.

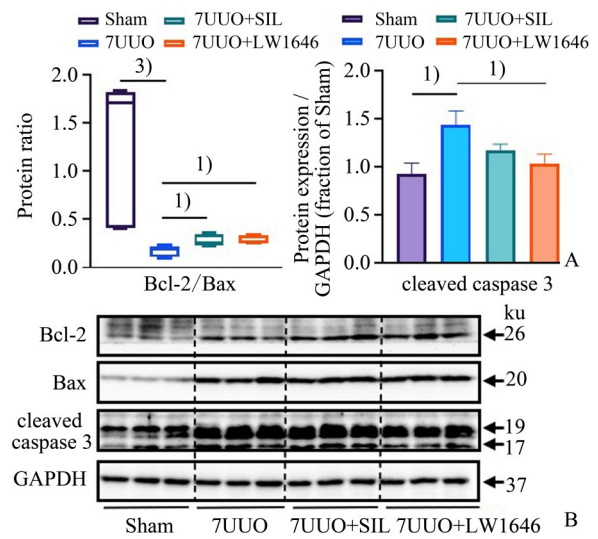
图7 PDE5抑制剂减轻7UUO小鼠肾脏组织自噬相关蛋白表达

Fig. 7 Effect of PDE5 inhibitors on attenuating protein expression of autophagy-related protein in 7UUO mouse kidneys

蛋白表达水平高于对照组 ($P < 0.001$), 给予 SIL 或 LW1646 后, BiP 蛋白表达水平显著下调 ($P = 0.004$, $P = 0.0042$)。TM 组 FN 蛋白表达水平相对于对照组显著升高 ($P = 0.0441$), SIL 组和 LW1646 组 FN 蛋白表达水平被下调 ($P = 0.0280$, $P = 0.0231$; 图 10), 提示 SIL 以及 LW1646 对 TM 诱导的内质网应激和促纤维化反应的缓解作用。

2.9 在 HK2 细胞中, PDE5 抑制剂抑制衣霉素诱导的自噬反应

内质网应激常常诱导自噬发生, 因此我们检测了 HK2 细胞的内质网应激反应。经免疫印迹、单因素方差分析, 各组 p62、LC3B II 蛋白表达水平差异有统计学意义 ($F = 14.86$, $P = 0.0035$; $F = 15.21$, $P = 0.0002$)。两两比较后发现, LW1646 组 p62 蛋白表达水平较 SIL 组低, 但差异无统计学意义 ($P = 0.0522$)。TM 组 LC3B II 蛋白表达水平以及 LC3B I/LC3B II 比值较对照组显著升高 ($P < 0.001$, $P = 0.0436$), LW1646 下调 TM 诱导的上调的 LC3B II 的蛋白表达水平, 但差异无统计学意义



A and B representative immunoblots and corresponding densitometry analysis of protein expression levels in the kidney of Sham, 7UUO, 7UUO+SIL, 7UUO+LW1646 mice. Data are presented as $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ($n = 6$ /group). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. Renal Bcl-2/Bax ratio difference used Dunn Kruskal-Wallis multiple comparison after Kruskal-Wallis test. ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.001$.

图8 PDE5抑制剂减轻7UUO小鼠肾脏组织凋亡蛋白表达
Fig. 8 PDE5 inhibitors attenuate protein expression of apoptosis-related protein in 7UUO mouse kidneys

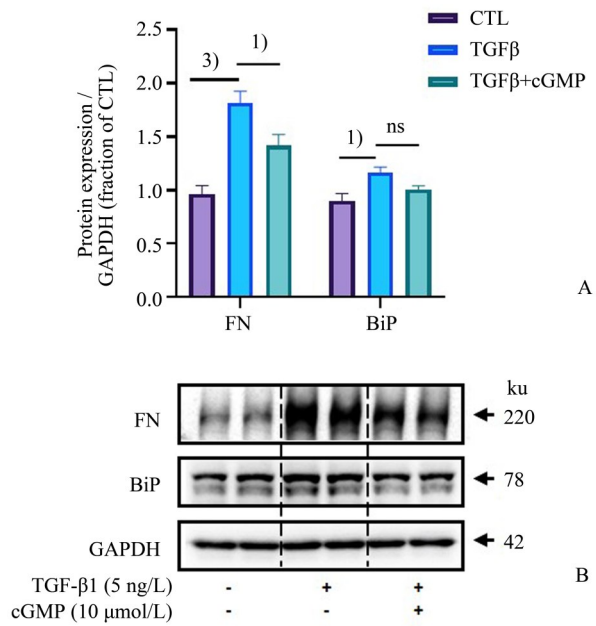
($P = 0.9253$; 图 11)。

2.10 在 HK2 细胞中, PDE5 抑制剂抑制衣霉素诱导的凋亡反应

凋亡是细胞损伤的常见后果。经免疫印迹、单因素方差分析后发现各组间 Bcl-2/Bax 的比值、cleaved caspase 3 差异有统计学意义 ($F = 6.14$, $P = 0.033$; $F = 4.88$, $P = 0.019$), 经两两比较分析, TM 组 Bcl-2/Bax 比值较对照组显著降低 ($P = 0.0499$), cleaved caspase 3 蛋白表达水平显著升高 ($P = 0.0132$), 给予 LW1646 后 Bcl-2/Bax 比值上调 ($P = 0.0141$), 而 SIL 处理组与 TM 组之间差异无统计学意义 ($P = 0.2131$), 提示内质网应激介导的凋亡反应被 LW1646 缓解, LW1646 可能在抗凋亡上起着比 SIL 更优的效益 (图 12)。

3 讨论

肾纤维化治疗依然是一大难题, 目前解决不可逆肾纤维化临床问题的方法是预防急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 向 CKD 转变和/或延缓



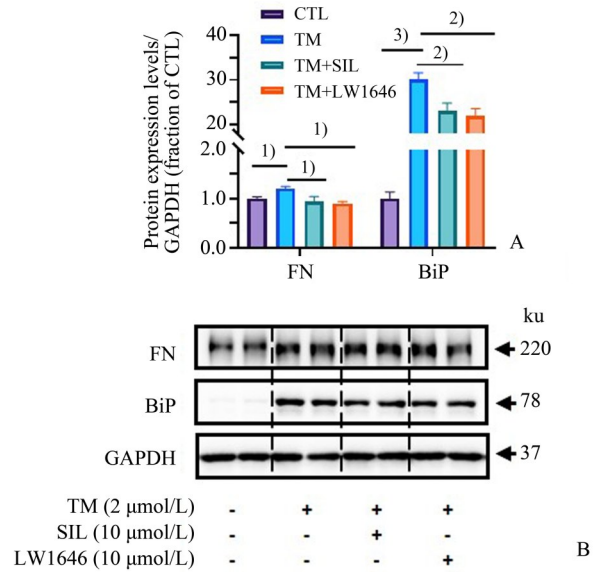
A and B representative immunoblots and corresponding densitometry analysis of protein expression levels in the HK-2 cells of CTL, TGF-β1, TGF-β1+cGMP. Data are presented as $\bar{x} \pm s_x$ ($n = 4/\text{group}$). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.001$. FN: Fibronectin.

图9 cGMP抑制TGF-β1诱导的HK2细胞促纤维化反应及内质网应激

Fig. 9 cGMP inhibits TGF-β1-induced fibrogenic response and endoplasmic reticulum stress in HK-2 cells

现有纤维化的进展^[2, 16]。本研究使用了以持续性肾小管内压增高为特征的UUO导致的肾脏纤维化模型,通过病理切片和免疫印迹观察到SIL或LW1646对UUO导致的肾脏损伤的保护作用,两种PDE5抑制剂均可通过下调TGF-β1的蛋白和mRNA表达水平、促纤维化基因表达水平、内质网应激、自噬、凋亡蛋白的表达水平从而保护肾脏,而这种作用可能是通过cGMP介导的。

肾脏纤维化是一个复杂的病理生理过程,炎症、氧化应激、内质网应激等都会促进肾脏纤维化的进一步发展^[2]。目前已有研究发现PDE5抑制剂可以通过抗氧化应激、抗炎、抗凋亡来缓解疾病症状和发展^[3]。机制上,PDE5抑制剂通过抑制PDE5对cGMP的酶促降解,从而增加PKG活性^[3]。而其他研究表明,PDE5抑制剂主要通过NO-cGMP-PKG通路促进血流、抗血栓等,从而治疗勃起功能障碍以及肺动脉高压。在保护肾脏损伤时,传统的PDE抑制剂zaprinast可以增强梗阻侧肾脏cGMP水



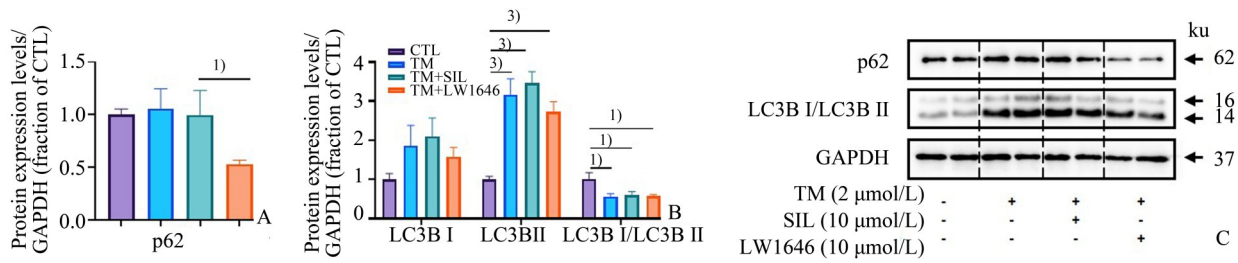
A and B representative immunoblots and corresponding densitometry analysis of protein expression levels in the HK-2 cells of CTL, TM, TM+SIL, TM+LW1646. Data are presented as $\bar{x} \pm s_x$ ($n = 4/\text{group}$). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.001$.

图10 PDE5抑制剂抑制TM诱导的HK2细胞促纤维化反应及内质网应激

Fig. 10 PDE5 inhibitors inhibit TM-induced fibrogenic response and endoplasmic reticulum stress in HK-2 cells

平通过GKI通路缓解肾脏纤维化^[17],他达那非可通过减少ROS产生以及血浆TNFα、IL-1β等炎症因子水平,从而起到抗炎、保护肾盂肾炎的作用^[18]。西地那非可通过cGMP-PKG通路改善巨噬细胞和肾小管的功能,下调TGF-β信号通路以及减少巨噬细胞浸润,从而改善14UUO导致的肾脏纤维化^[19]。

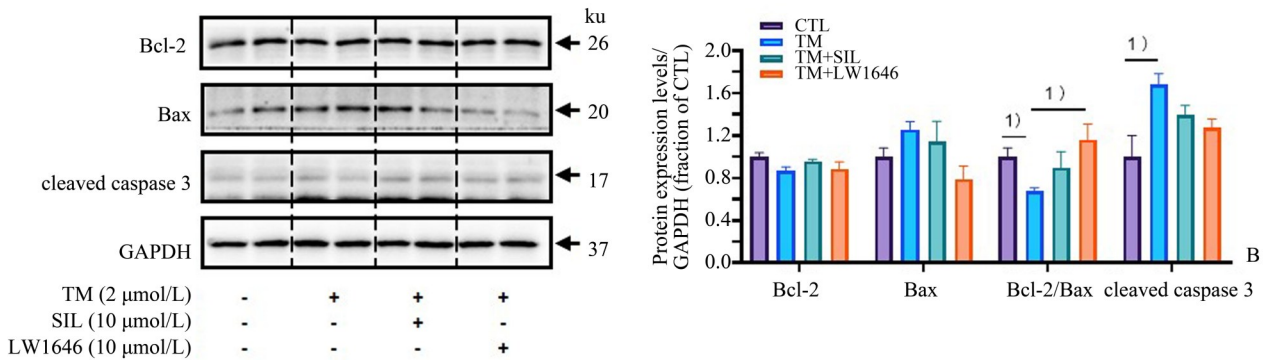
肾脏纤维化进展中出现TGF-β1信号通路过度激活、内质网应激以及自噬、凋亡异常活跃,研究表明对其干预可延缓肾脏纤维化的发展^[2]。TGF-β1在肾脏纤维化过程中可由肾近端小管、免疫细胞尤其是M2巨噬细胞分泌,是促进成纤维细胞活化的强力的细胞因子^[20-21],可诱导多种细胞外基质蛋白如胶原、纤连蛋白的产生^[22],甚至可以诱导上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[23]以促进细胞外基质的进一步产生。另外,也有研究表明TGF-β1可以剂量依赖地激活内质网应激、细胞自噬和纤维化^[24]。我们的研究结果显示,SIL或LW1646可以下调肾脏的TGF-β1转录和翻译水平($P < 0.05$),不同程度下调Collagen I mRNA



A and B representative immunoblots and corresponding densitometry analysis of protein expression levels in the HK-2 cells of CTL, TM, TM+SIL, TM+LW1646. Data are presented as $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ($n = 4/\text{group}$). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.001$.

图 11 PDE5抑制 TM诱导的HK2细胞自噬反应

Fig. 11 PDE5 inhibitors inhibit TM-induced autophagy response in HK-2 cells



A and B representative immunoblots and corresponding densitometry analysis of protein expression levels in the HK-2 cells of CTL, TM, TM+SIL, TM+LW1646. Data are presented as $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ($n = 4/\text{group}$). SNK's multiple comparison test after ANOVA was used to compare different treatment groups. ¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.001$.

图 12 PDE5抑制剂抑制 TM诱导的HK2细胞凋亡反应

Fig. 12 PDE5 inhibitors inhibit TM-induced apoptosis response in HK-2 cells

的表达,提示PDE5抑制剂可以通过调控TGF-β1信号通路以下调ECM蛋白Collagen I的转录水平,以及LW1646可下调肌成纤维细胞活化标志物αSMA的mRNA表达水平。在我们的体外实验中cGMP对TGF-β1诱导的肾近端小管上皮细胞的ECM蛋白Fibronectin的蛋白表达水平以及内质网应激分子伴侣BiP蛋白表达水平的增高具有显著的下调作用。可能提示SIL或LW1646通过下调PDE5A酶活性从而下调对cGMP的降解,因此促进了NO-cGMP-PKG通路从而下调TGF-β1的转录和翻译,进而下调ECM蛋白的表达。另外,我们利用衣霉素诱导内质网应激模型,同样证明了LW1646可缓解内质网应激、ECM蛋白的产生,同时对细胞自噬和凋亡起下调作用。而在动物模型中,PDE5抑制剂可以不同程度下调UUO导致的梗阻侧肾脏内质网应激、自噬水平增高、凋亡蛋白表

达水平的增加,提示PDE5抑制剂可能通过改善肾脏内质网应激、自噬过度激活从而改善了肾脏纤维化和凋亡。

内质网应激、自噬、凋亡的改变提示UUO诱导的肾脏中非折叠蛋白反应、正常蛋白合成、折叠过程受干扰,细胞清除受损细胞器、机体清除受损细胞活跃甚至异常的病理生理状况。在肺中,内质网应激可通过促进成纤维细胞增殖分化为肌成纤维细胞以产生ECM、促进ECM积聚,可促进肺泡上皮细胞发生凋亡以及EMT导致肺进一步损伤,通过促进巨噬细胞极化为M2型巨噬细胞可促进肺的纤维化^[25]。此外,内质网应激可以通过影响IP3R的表达和稳定性来影响细胞内钙离子的释放,从而影响细胞内钙离子的平衡和调节^[26]。最近一项研究表明,内质网应激、自噬与肾纤维化、细胞凋亡的交互作用促进纤维化发生。内质网应激可通过激活

自噬以促进肾纤维化和细胞凋亡,而抑制自噬后内质网应激被缓解^[24],抑制内质网应激后,TGF- β 1诱导的HK2细胞纤维化、自噬和凋亡被缓解^[24]。自噬水平可以被内质网应激或TGF- β 1激活,使用氯喹或3-MA抑制自噬可缓解内质网应激以及TGF- β 1诱导的纤维化^[24]。自噬和凋亡作为机体对抗损伤的清除机制,既是多种病理生理诱发的结果,也是加重损伤和纤维化的重要因素^[24, 27-30]。我们的结果显示在7UUO后的小鼠梗阻侧肾脏中BiP、IP3R的蛋白表达水平显著升高,而给予SIL或LW1646后,BiP、IP3R、calnexin的蛋白表达水平被不同程度下调,提示PDE5抑制剂可能通过下游GKI或PKG活化从而降低IP3R的蛋白水平影响细胞内Ca²⁺的平衡,同时减少了calnexin对错误折叠蛋白的保留从而缓解内质网应激。在HK2细胞中的结果表明cGMP下调TGF- β 1与衣霉素诱导内质网应激。另外,在7UUO诱导的肾纤维化小鼠肾脏中p62以及LC3B的蛋白表达水平显著上升,提示肾脏自噬水平的增加。而给予PDE5抑制剂后,

LW1646显著下调了肾脏p62以及LC3B I蛋白表达水平,SIL下调p62蛋白表达水平,提示PDE5抑制剂可能通过缓解内质网应激以及TGF- β 1信号通路进而降低自噬水平,以及降低的自噬水平缓解了内质网应激、TGF- β 1导致的肾纤维化进展,以及LW1646对自噬的调控作用可能强于SIL。而在体外实验中,衣霉素诱导的内质网应激可被SIL或LW1646缓解,同时LW1646对p62、LC3B、Bax、cleaved caspase 3的蛋白表达水平的调控较SIL更加明显,虽然差异无统计学意义。

综上所述,我们的结果显示新型PDE5抑制剂LW1646与传统PDE5抑制剂SIL均可以通过抑制肾脏内质网应激、增强抗凋亡、降低TGF- β 1的转录和翻译水平来保护肾脏纤维化,而且LW1646在缓解肾脏纤维化、内质网应激以及自噬水平上的效果优于SIL。本研究验证了新型PDE5抑制剂在UUO诱导的肾脏纤维化中的多方面保护作用以及相对于传统PDE5抑制剂SIL的在抗纤维化、抗内质网应激、调控自噬的更优效力。

参考文献

- [1] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 709–733.
- [2] Huang R, Fu P, Ma L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 129.
- [3] Samidurai A, Xi L, Das A, et al. Beyond erectile dysfunction: cGMP-specific phosphodiesterase 5 inhibitors for other clinical disorders [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2023, 63, 585–615.
- [4] Goldstein I, Burnett AL, Rosen RC, et al. The serendipitous story of sildenafil: an unexpected oral therapy for erectile dysfunction [J]. *Sex Med Rev*, 2019, 7(1): 115–128.
- [5] Ali BH, Al Za'abi M, Adham SA, et al. The effect of sildenafil on rats with adenine-induced chronic kidney disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 391–402.
- [6] Hamdy MM, Abdel-Rahman MS, Badary DM, et al. Effects of furosemide and tadalafil in both conventional and nanoforms against adenine-induced chronic renal failure in rats [J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27(1): 117.
- [7] Hu SW, Wang YH, Huang JS, et al. The PDE5 inhibitor, vardenafil, ameliorates progressive pathological changes in a focal segmental glomerulosclerosis mouse model [J]. *Life Sci*, 2022, 309, 120992.
- [8] Rodríguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, et al. Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage [J]. *Kidney Int*, 2005, 68(5): 2131–2142.
- [9] Tomita N, Hotta Y, Naiki-Ito A, et al. The phosphodiesterase 5 inhibitor tadalafil has renoprotective effects in a rat model of chronic kidney disease [J]. *Physiol Rep*, 2020, 8(17): e14556.
- [10] Armaly Z, Artol S, Jabbour AR, et al. Impact of pretreatment with carnitine and tadalafil on contrast-induced nephropathy in CKD patients [J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1): 976–986.
- [11] Seibel I, Poli De Figueiredo CE, Telöken C, et al. Efficacy of oral sildenafil in hemodialysis patients with erectile dysfunction [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(11): 2770–2775.
- [12] Wu D, Zhang T, Chen Y, et al. Discovery and optimization of chromeno [2, 3-c] pyrrol-9(2H)-ones as novel selective and orally bioavailable phosphodiesterase 5 inhibitors for the treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(15): 6622–6637.
- [13] Zhao X, Kong Y, Li S, et al. A newly synthesized specific PDE5A inhibitor LW1646 attenuated lipid-induced kidney in-

- juries through inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. *The FASEB Journal*, 2022, 36(S1).
- [14] Wu D, Huang Y, Chen Y, et al. Optimization of chromeno [2,3-*c*]pyrrol-9(2*H*)-ones as highly potent, selective, and orally bioavailable PDE5 inhibitors: structure-activity relationship, X-ray crystal structure, and pharmacodynamic effect on pulmonary arterial hypertension [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(18): 8468-8473.
- [15] Martínez-Klimova E, Aparicio-Trejo OE, Tapia E, et al. Unilateral ureteral obstruction as a model to investigate fibrosis-attenuating treatments [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(4): 141.
- [16] Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(5): 269-288.
- [17] Wetzl V, Schinner E, Kees F, et al. Differences in the renal antifibrotic cGMP/cGKI-dependent signaling of serelaxin, zaprinast, and their combination [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2017, 390(9): 939-948.
- [18] Zhu CY, Liu M, Liu YZ, et al. Preventive effect of phosphodiesterase 5 inhibitor tadalafil on experimental post-pyelonephritic renal injury in rats [J]. *J Surg Res*, 2014, 186(1): 253-261.
- [19] Cui W, Maimaitiyiming H, Qi X, et al. Increasing cGMP-dependent protein kinase activity attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(9): F996-1007.
- [20] Vallée A, Lecarpentier Y. TGF- β in fibrosis by acting as a conductor for contractile properties of myofibroblasts [J]. *Cell & Bioscience*, 2019, 9(1): 98.
- [21] Scharenberg MA, Pippenger BE, Sack R, et al. TGF- β -induced differentiation into myofibroblasts involves specific regulation of two MKL1 isoforms [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 5): 1079-1091.
- [22] Rypdal KB, Erusappan PM, Melleby AO, et al. The extracellular matrix glycoprotein ADAMTSL2 is increased in heart failure and inhibits TGF β signalling in cardiac fibroblasts [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 19757.
- [23] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [24] Shu S, Wang H, Zhu J, et al. Reciprocal regulation between ER stress and autophagy in renal tubular fibrosis and apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1016.
- [25] Burman A, Tanjore H, Blackwell TS. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis [J]. *Matrix Biol*, 2018, 68-69, 355-365.
- [26] Woll KA, Van Petegem F. Calcium-release channels: structure and function of IP(3) receptors and ryanodine receptors [J]. *Physiol Rev*, 2022, 102(1): 209-268.
- [27] Livingston MJ, Ding HF, Huang S, et al. Persistent activation of autophagy in kidney tubular cells promotes renal interstitial fibrosis during unilateral ureteral obstruction [J]. *Autophagy*, 2016, 12(6): 976-998.
- [28] Park JY, Yoo KD, Bae E, et al. Blockade of STAT3 signaling alleviates the progression of acute kidney injury to chronic kidney disease through antiapoptosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2022, 322(5): F553-F572.
- [29] Chen CM, Lin CY, Chung YP, et al. Protective effects of nootkatone on renal inflammation, apoptosis, and fibrosis in a unilateral ureteral obstructive mouse model [J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 3921.
- [30] 董凤梅, 韩凌. 鬼针草总黄酮调控PI3K/Akt/mTOR自噬通路对高血压大鼠心肌纤维化的影响[J]. *广东医学*, 2023, 44(6): 720-728.
- Dong FM, Han L. Effects of total flavonoids of *Stipium bidens bipinnata* L on myocardial fibrosis in hypertensive rats by regulating autophagy pathway of PI3K/Akt/mTOR [J]. *Guangdong Med*, 2023, 44(6): 720-728.

(编辑 孙慧兰)