

柚皮素通过下调 RhoA/ROCK 信号通路 改善糖尿病肾病小鼠肾纤维化

谢发江¹, 冉茂霞², 冯健^{3*}, 李燕³, 李家富³, 邓莉⁴

¹达州市中心医院心血管内科; ²达州市中心医院肾内科, 达州 635000; ³西南医科大学附属医院心血管内科;

⁴西南医科大学附属医院风湿免疫科, 泸州 646000

摘要:为探讨柚皮素对糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)小鼠肾纤维化的影响及其机制。将32只C57BL/6小鼠随机分为正常组、模型组、柚皮素组、法舒地尔组。DN模型复制成功后分别予柚皮素及法舒地尔处理,正常组、模型组予生理盐水对照,连续12周,处死小鼠,观察血肌酐(serum creatinine, Scr)、24 h尿蛋白定量(24-hour urinary protein quantity, 24 h Upro)、血糖、体重的变化;HE及Masson染色观察肾脏形态学改变;免疫组化观察肾脏RhoA、ROCK1、ROCK2、I型胶原蛋白(type-I collagen, Col1)、III型胶原蛋白(type-III collagen, Col3)的水平;Western blot测定肾脏RhoA、ROCK1、ROCK2、p-MYPT1、层粘连蛋白(laminin, LN)、纤连蛋白(fibronectin, FN)的水平。结果显示肾脏形态学观察可见正常组间质少许胶原纤维,模型组间质大量胶原纤维,处理组间质少量胶原纤维。与正常组相比,模型组24 h Upro, Scr升高($P < 0.05$);与模型组相比,处理组24 h Upro, Scr降低($P < 0.05$),血糖、体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。与正常组相比,模型组RhoA、ROCK1、ROCK2、Col1、Col3、p-MYPT1 Thr853、LN、FN的水平升高($P < 0.05$);与模型组比较,处理组RhoA、ROCK1、ROCK2、Col1、Col3、p-MYPT1 Thr853、LN、FN的水平降低($P < 0.05$)。与柚皮素组相比,法舒地尔组各指标差异无统计学显著性($P > 0.05$)。柚皮素具有改善DN小鼠肾纤维化的作用,其机制可能与下调RhoA/ROCK信号通路有关。

关键词:糖尿病肾病;肾纤维化;柚皮素;RhoA/ROCK信号通路

中图分类号:R589.1;R587.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)10-1637-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.10.002

Naringin ameliorates fibrosis via down-regulating RhoA/ROCK signaling pathway in diabetic nephropathy mice

XIE Fa-jiang¹, RAN Mao-xia², FENG Jian^{3*}, LI Yan³, LI Jia-fu³, DENG Li⁴

¹Department of cardiology, Dazhou Central Hospital; ²Department of Nephrology, Dazhou Central Hospital, Dazhou 635000, China;

³Department of cardiology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University;

⁴Department of Rheumatology and Immunology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: To investigate the effect of naringin on renal fibrosis in diabetic nephropathy mice and its' specific mechanism. C57BL/6 mice ($n = 32$) were randomly divided into normal group, diabetic nephropathy group, naringin group and fasudil group. After the successful establishment of diabetic nephropathy (DN) model, the naringin group mice were given naringin suspension by gavage, the fasudil group mice were given fasudil by intraperitoneal injection, simultaneously, the normal and diabetic nephropathy group were given isopyknic normal saline. After 12 weeks of intervention, all mice were sacrificed and the level changes of serum creatinine (Scr), 24-hour urinary protein (24 h Upro), blood glucose and body weight were observed. HE and Masson staining were used to observe renal morphological changes. The protein expressions of RhoA, ROCK1, ROCK2, type-I collagen (Col1) and type-III collagen (Col3) in renal tissues were tested by immunohistochemical (IHC) staining. And Western blot was applied to detected the protein levels of RhoA, ROCK1, ROCK2, p-MYPT1, Laminin (LN),

收稿日期:2019-10-15 接受日期:2020-08-26

基金项目:国家自然科学基金(31300946);泸州市-川医大联合课题(2015LZCYD-S03(7/7))

* 通信作者 Tel:86-015182516519; E-mail:jerryfeng@swmu.edu.cn

Fibronectin (FN) in renal tissue. HE and Masson staining showed a little collagen fiber in the renal interstitium of normal group, a large amount of collagen fiber in diabetic nephropathy group and a small amount of collagen fiber in naringin and fasudil group. Compared with normal group, the levels of 24 h Upro and Scr were increased in diabetic nephropathy group ($P < 0.05$); Compared with diabetic nephropathy group, the levels of 24 h Upro and Scr were decreased in naringin and fasudil group ($P < 0.05$). However, no statistically difference in blood glucose and body weight between the treatment groups and diabetic nephropathy group was observed ($P > 0.05$). Compared with the normal group, the protein levels of RhoA, ROCK1, ROCK2, Col 1, Col 3, p-MYPT1 Thr853, LN and FN were increased in the diabetic nephropathy group ($P < 0.05$); And compared with the diabetic nephropathy group, these protein levels were markedly decreased in the naringin and fasudil group ($P < 0.05$). In addition, there was no statistically significant difference in each index between naringin and fasudil group. Naringin could ameliorate the renal fibrosis in DN mice, which is possibly related to the down-regulation of RhoA/ROCK signaling pathway.

Key words: diabetic nephropathy; renal fibrosis; naringin; RhoA/ROCK signaling pathway

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见的微血管并发症,也是终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD) 最常见的病因^[1]。DN 目前发病机制复杂,涉及肾脏血流动力学改变、缺血、氧化应激、炎症激活、肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 激活等方面导致肾脏纤维化,最终累及肾脏功能。及时阻断肾脏纤维化,能够有效防止 DN 进展为 ESRD^[2]。

RhoA/ROCK 信号通路的过度激活介导多种疾病包括 DN 在内的纤维化过程,并且法舒地尔为代表的 ROCK 阻断剂,已经显示了良好的抗 DN 肾纤维化作用^[3]。柚皮素 (naringenin, NRG) 是从柑橘类植物中提纯出的一种具有抗心律失常、抗动脉粥样硬化、抗炎、抗纤维化、抗病毒、抗肿瘤等多种药效的黄酮类化合物,被广泛用于体内外研究^[4]。而关于柚皮素在 DN 中作用,目前研究较少,因此本研究通过复制 DN 小鼠模型,予柚皮素处理后观察 DN 肾纤维化的进展,同时我们设立法舒地尔作为阳性对照组,以期进一步探讨柚皮素对 RhoA/ROCK 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料、药品与试剂

1.1.1 动物

健康雄性 SPF 级 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 32 只,体重 20 ± 1.5 g,购自成都达硕实验动物有限公司。动物许可证号:SCXK(川)2015-030。实验期间进食普通饲料,自由饮水,12 h 光照维持昼夜循环,室温控制在 25 ± 1 °C。

1.1.2 药物及试剂

STZ 购自美国 Sigma 公司 (货号 S8050);柚皮素标准品购自上海思域化工科技有限公司 (批号

JD8051003);盐酸法舒地尔注射液购自天津红日药业股份有限公司 (批准文号:国药准字 H20040356);抗 RhoA (货号 ab187027)、ROCK1 (货号 ab45171)、ROCK2 (货号 ab71598)、层粘连蛋白 (laminin, LN) (货号 ab11575)、纤连蛋白 (fibronectin, FN) (货号 ab2413)、GAPDH (货号 ab37168) 抗体均购自英国 Abcam 公司;抗 MYPT1 (货号 2643)、p-MYPT1 Thr853 (货号 4563) 抗体均购自美国 CST 公司;抗 I 型胶原蛋白 (type-I collagen, Col1) (货号 AF7001)、III 型胶原蛋白 (type-III collagen, Col3) (货号 AF0136) 抗体均购自美国 Affbiotech 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号 AS1086) 购自武汉阿斯本生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器

BX53 型光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司);RM2016 转轮式切片仪 (德国 LEICA 公司);BMJ-III 型包埋机、TSJ-II 型全自动封闭式组织脱水机、PHY-III 型病理组织漂烘仪,均为常州市中威电子仪器有限公司;DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂);LiDE110 型扫描仪 (日本 Canon 公司);Advia 2400 型全自动生化分析仪 (德国 Siemens 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组、模型复制及给药方法

C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周,按随机数表法分成正常组 (NS 组)、模型组 (DN 组)、柚皮素组 (D+N 组)、法舒地尔组 (D+H 组),每组 8 只。DN 组、D+N 组、D+H 组小鼠禁食 12 h 后腹腔注射 1% STZ 80 mg/(kg·d),NS 组、DN 组予等体积柠檬酸钠缓冲液腹腔注射,连续 5 天,每天 1 次,2 周后断尾取血测得随机血糖大于 16.7 mmol/L 建立 1 型糖尿病小鼠模型,继续喂养 4 周测定 24 h 尿蛋白

定量(24-hour urinary protein quantity, 24 h Upro) 大于造模前 2 倍则视为 DN 模型复制成功,成模后 D + N 组予生理盐水配制的柚皮素 50 mg/(kg · d) 混悬液灌胃^[5], D + H 组予生理盐水稀释的盐酸法舒地尔注射液 40 mg/(kg · d) 腹腔注射^[3], NS 组、DN 组等予体积生理盐水灌胃,连续 12 周。代谢笼收集小鼠 24 h 尿液,测定 24 h Upro,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉后留取血清测定血肌酐 (serum creatinine, Scr),处死小鼠,取肾脏组织将其纵向对半切开,部分用 4% 多聚甲醛固定后制作成厚 4 μm 石蜡切片,部分冻存于 -80 °C 冰箱,用于 Western blot 检测。

1.2.2 24 h Upro 及 Scr 的测定

将血液及尿液标本,离心,取上清液,采用全自动生化分析仪检测 24 h Upro 及 Scr。

1.2.3 肾脏组织病理学观察

分别选取各组石蜡切片,脱蜡后行 HE 及 Masson 染色,于光镜下观察拍照。

1.2.4 免疫组化观察肾脏组织中 RhoA、ROCK1、ROCK2、Col1、Col3 的水平

选取各组切片脱蜡后浸入柠檬酸盐缓冲液并予高火加热至沸腾后断电 5 min,再加热 1 次,冷却后予 PBS 洗 5 min (2 次,进行抗原修复。滴加山羊血清室温封闭 20 min。分别加入抗 RhoA (1:100)、ROCK1 (1:150)、ROCK2 (1:150)、Col1 (1:200)、Col3 (1:100) 抗体,4 °C 孵育过夜,滴加 II 抗后继续 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗 5 min × 3 次, DAB 显色后

苏木素复染,封片观察。在 100 倍镜下随机选取 5 个不同视野 200 倍放大, Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测定该视野平均光密度 (mean density, MD), MD = 全部图像的光密度 (integrated optical density, IOD) / 面积 (area), 将 5 张图像 MD 的平均数视为每例样本的 MD, 再进行统计分析。

1.2.5 Western blot 测定 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-MYPT1、LN、FN 的蛋白水平

取冻存肾脏组织 37 °C 水浴解冻后,按质量体积比 1:10 加入 RIPA 裂解液,研磨组织后于碎冰上裂解 30 min,取裂解液,4 °C 12 000 rpm 离心 5 min,收集上清液,按试剂盒说明书测定蛋白浓度。根据所需样本体积,以 4:1 比例加入 5 × loading buffer,混匀后沸水浴 95 °C 5 min 使蛋白变性。配制 8%、10% 分离胶和 5% 浓缩胶,按蛋白量 50 μg 上样,进行电泳分离,转 PVDF 膜,经 5% BSA 液室温封闭 1.5 h 后,根据抗体说明书加入稀释后的 I 抗,4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 5 min × 3 次,加入 II 抗 (1:10 000) 中,室温孵育 2 h, TBST 洗膜 10 min (4 次, ECL (A:B = 1:1) 显色,胶片扫描存档, AlphaEaseFC 软件进行条带分析。

1.3 统计学处理方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数间的比较采用 one-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 时视为其组间差异具有统计学显著性。

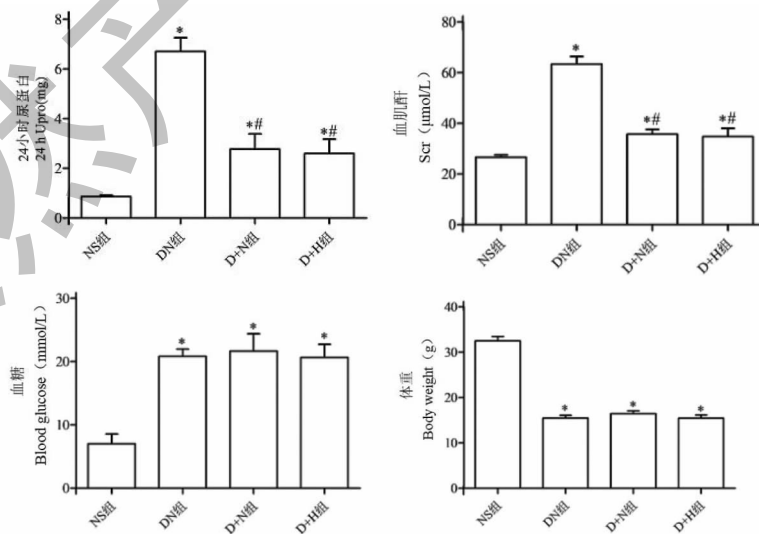


图 1 12 周末各组小鼠 24 h Upro、Scr、血糖、体重的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 The 24 h Upro, Scr, blood glucose and body weight of the mice were detected at the end of 12 weeks ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。Note: * $P < 0.05$ vs NS group; # $P < 0.05$ vs DN group.

2 结果

2.1 12 周末各组小鼠 24 h Upro、Scr、血糖、体重变化

与 NS 组相比, DN 组 24 h Upro、Scr 升高 ($P < 0.05$); 与 DN 组相比, D + N 组、D + H 组 24 h Upro、Scr 降低 ($P < 0.05$), 血糖、体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$); D + N 组与 D + H 组 24 h Upro、Scr、血糖、体重的差异无统计学显著性 ($P > 0.05$) (见图 1)。

2.2 肾脏组织病理学观察

各组小鼠肾脏 HE 及 Masson 染色观察 NS 组肾

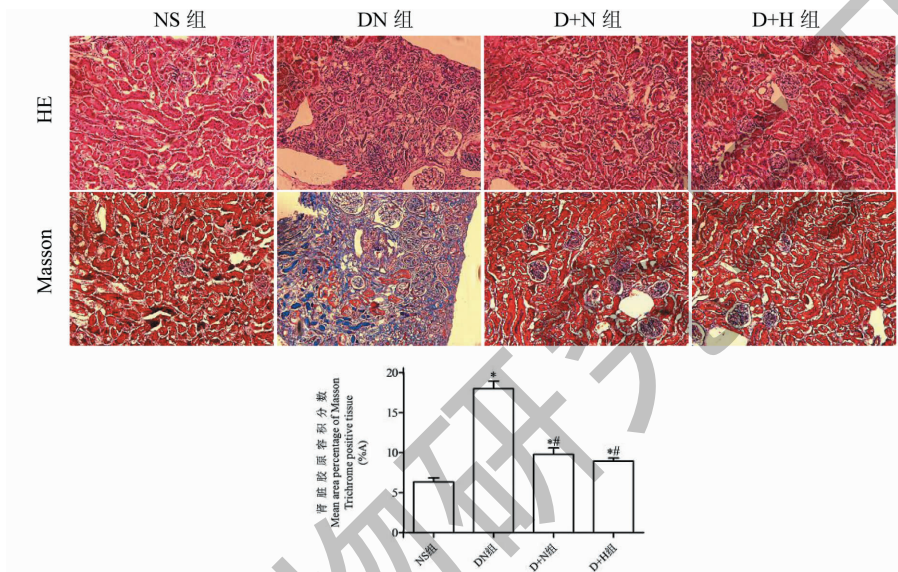


图 2 各组小鼠肾脏组织 HE 及 MASSON 染色 ($\times 200$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 The representative images of HE and Masson staining in each group under light microscope ($\times 200$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。Note:* $P < 0.05$ vs NS group;# $P < 0.05$ vs DN group.

2.3 免疫组化观察肾脏组织中 RhoA、ROCK1、ROCK2、Col1、Col3 的水平

棕黄色颗粒为阳性反应。与 NS 组相比, DN 组 RhoA、ROCK1、ROCK2、Col1、Col3 的水平升高 ($P < 0.05$); 与 DN 组比较, D + N 组、D + H 组 RhoA、ROCK1、ROCK2、Col1、Col3 的水平降低 ($P < 0.05$); D + N 组与 D + H 组 RhoA、ROCK1、ROCK2、Col1、Col3 的水平差异无统计学显著性 ($P > 0.05$, 见图 3)。

2.4 Western blot 测定 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-MYPT1 Thr853、LN、FN 的蛋白水平

与 NS 组相比, DN 组 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-MYPT1 Thr853、LN、FN 的水平升高 ($P < 0.05$); 与 DN 组相比, D + N 组、D + H 组 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-MYPT1 Thr853、LN、FN 的水平降低 ($P <$

小球、肾小管及系膜结构排列整齐,轮廓清楚,间质可见少许胶原纤维; DN 组肾小球肥大,肾小管上皮细胞结构排列紊乱并且不同程度变性坏死,系膜基质增多,间质可见大量胶原纤维; D + N 组、D + H 组肾小球、肾小管及系膜结构排列较整齐,轮廓大致清晰,间质可见少量胶原纤维。肾脏胶原容积分数比较, DN 组较 NS 组的水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 DN 组比较, D + N 组、D + H 组的水平明显降低 ($P < 0.05$); D + N 组与 D + H 组的水平差异无统计学显著性 ($P > 0.05$) (见图 2)。

0.05); D + N 组与 D + H 组 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-MYPT1 Thr853、LN、FN 的水平差异无统计学显著性 ($P > 0.05$, 见图 4)。

3 结论

DN 肾病早期病理改变以肾小球硬化、肾小动脉损害、肾小管退行性变为主,并逐渐出现肾脏纤维化,晚期出现大量蛋白尿及肾衰竭^[6]。柚皮素为黄酮类化合物代表性药物之一,文利等^[5]发现柚皮素可能通过下调 TGF- β 1/smad 信号通路减轻 DN 大鼠肾脏纤维化,保护肾脏功能。Ning 等^[7]进一步研究发现柚皮素上调 let-7a 的表达,后者负调节转化生长因子- β 1 受体 1 (transforming growth factor- β 1 receptor 1, TGFBR1) 进而抑制 TGF- β 1/smad 信号通路进而治疗 DN。此外,柚皮素还可能通过下调氧化应激水平,抑制炎症因子的表达及细胞凋亡等途径

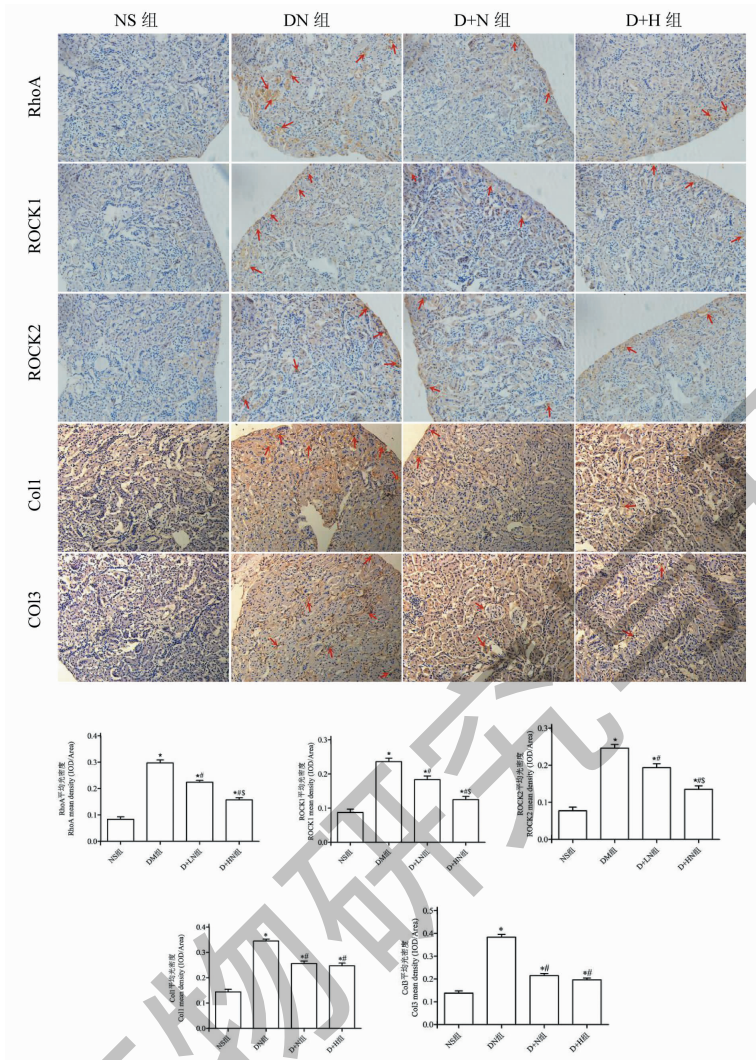


图3 免疫组化观察小鼠肾脏组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、Col1、Col3 蛋白水平变化(×200) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 Immunohistochemical identification of protein expression of RhoA, ROCK1, ROCK2, Col1 and Col3 in different group(×200) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。Note: * $P < 0.05$ vs NS group; # $P < 0.05$ vs DN group.

延缓 DN 进展,保护肾脏功能^[8]。本研究中,通过采用 STZ 腹腔注射建立 1 型糖尿病小鼠模型后继续喂养 4 周以 24 h Upro 大于造模前 2 倍视为 DN 模型复制成功,成模后予柚皮素 50 mg/(kg·d)灌胃 12 周,并设置法舒地尔 40 mg/(kg·d)腹腔注射作为阳性对照组,检测模型组小鼠血糖升高,体重减少,肾脏组织结果显示 Col1、Col3、LN、FN 表达增加,病理切片也可见明显肾纤维化,并伴有明显蛋白尿及肾功能下降,而柚皮素和法舒地尔分别干预后 Col1、Col3、LN、FN 表达减少,肾纤维化减轻,蛋白尿及肾功能得到改善,血糖及体重较模型组无明显变

化,说明了柚皮素、法舒地尔能够改善 DN 肾纤维化,且不影响体重及血糖。

RhoA 为小分子三磷酸鸟苷 (guanosinetriphosphate, GTP) 结合蛋白中 Ras 超家族的一员。酪氨酸激酶和 G 蛋白偶联受体能够募集并激活 RhoA 的鸟苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factors, GEF),从而使 RhoA 由 GDP 结合的非活化状态转换为 GTP 结合的活性状态, RhoA 扮演分子开关的角色实现两种状态之间的转换,作用于其下游信号分子产生物学效应^[9]。Rho 相关蛋白激酶 (rho-associated protein kinase, ROCK) 是第一个被发现的同

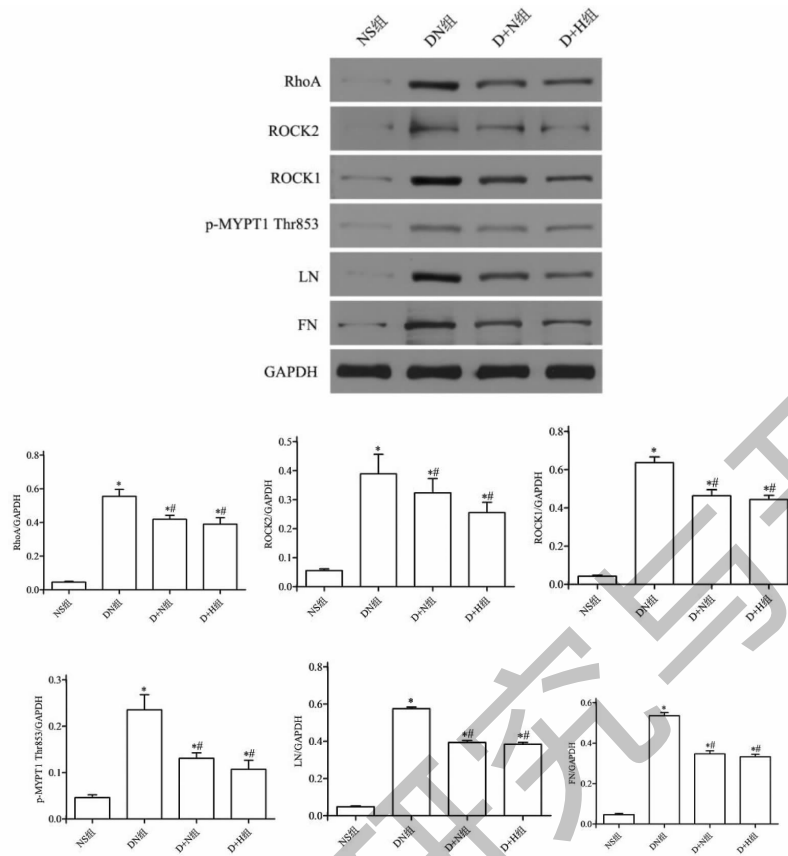


图4 各组小鼠肾脏组织 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-MYPT1 Thr853、LN、FN 蛋白水平变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 The protein levels of RhoA, ROCK1, ROCK2, p-MYPT1 Thr853, LN and FN in different groups determined by Western blot ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。Note: * $P < 0.05$ vs NS group; # $P < 0.05$ vs DN group.

时也是目前功能研究最为明确的 RhoA 下游效应分子。ROCK 的相对分子质量约为 160 kDa,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族系统。ROCK 存在两种亚型:ROCK1 和 ROCK2,二者基本结构包括 3 个主要的结构域:N 端的具有催化作用的激酶域、中间包含 Rho 结合域(rho binding domain, RBD)的卷曲螺旋结构区、C 端富含半胱氨酸(cysteine-rich domain, CRD)的 PH 结构域。ROCK1 和 ROCK2 65% 氨基酸序列是一致的,激酶域的同源性可达 92%^[10]。ROCK 在大多数组织中都有表达,但不同组织中存在异质性,ROCK1 主要表达于肝、睾丸、脾、肾和肺等,ROCK2 主要表达于大脑、骨骼肌、心脏等^[11]。RhoA/ROCK 组成的信号通路通过与下游底物肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)、MYPT-1、CPI-17、ERM 等相互作用参与细胞增殖、粘附、迁移、凋

亡等生理活动的调节^[12]。在病理状态下,RhoA/ROCK 信号通路上调多种促纤维化因子的分泌,如血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、血管紧张素 II(angiotensin II, AngII)、内皮素-1(endothelin, ET-1)、单核细胞趋化因子-1(monocyte chemotactic factor, MCP-1)、白细胞介素-6(interleukin, IL-6)、转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)等的表达^[13]。ROCK 也可诱导核转录因子 kappa B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的活化,而后的激活又可上调肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)、IL-1 β 等促纤维化因子的分泌^[14]。法舒地尔是目前第一个也是唯一批准上市可用于临床的 ROCK 抑制剂,因其强大的扩血管作用,而被广泛应用于蛛网膜下腔出血、缺血

性心脏病等血管痉挛疾病,其能够有效结合 ATP 依赖的激酶结构域阻断 ROCK 进而抑制 RhoA/ROCK 信号通路的信号转导^[15]。在 DN 领域,法舒地尔亦被广泛研究,并且通过影响以下多种途径改善 DN:(1)抑制 NF- κ B、FN、TGF- β 的活化,减弱炎症反应,缓解肾小球硬化^[16];(2)促进足突细胞的形成^[17],恢复异常的收缩运动,减少肾小球滤过膜通透性及蛋白尿形成^[18];(3)抑制肾小管上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程,减弱肾间质纤维化^[19];(4)扩张肾脏血管网,改善肾脏血流动力学,减少肾脏损伤^[20]。本研究中,与正常组相比,模型组小鼠肾脏组织中 RhoA、ROCK1、ROCK2 的表达显著升高,MYPT1 Thr853 磷酸化程度增加,ROCK 活性增高;法舒地尔组与模型组相比肾脏组织中 RhoA、ROCK1、ROCK2 的表达显著下降,MYPT1 Thr853 磷酸化程度减低,ROCK 活性减弱,并伴有尿蛋白减少和肾功能改善;与法舒地尔组相似,柚皮素组与模型组相比较,肾脏组织中 RhoA、ROCK1、ROCK2 的表达显著下降,MYPT1 Thr853 磷酸化程度减低,ROCK 活性减弱,并伴有尿蛋白减少和肾功能改善,而法舒地尔组与柚皮素组二者各指标差异未见统计学显著性,该实验结果表明 RhoA/ROCK 信号通路参与 DN 小鼠肾纤维化的形成,柚皮素改善 DN 小鼠肾纤维化可能与下调 RhoA/ROCK 信号通路有关。

综上所述,动物实验研究提示柚皮素能够显著降低 DN 小鼠肾纤维化程度,其机制可能与下调 RhoA/ROCK 信号通路有关,但其具体机制及作用位点有待细胞分子水平的进一步深入研究。

参考文献

- 1 Pu Q, Xu WL, Li N, et al. Experimental study of total flavones of *Abelmoschus manihot* to ameliorate renal fibrosis of db/db mice on the inhibition of infiltration and activation of macrophage[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 1887-1895.
- 2 Lin YC, Chang YH, Yang SY, et al. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease[J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117: 662-675.
- 3 Xie FJ, Jiang SC, Gao SY, et al. Fasudil ameliorates myocardial fibrosis by regulating polarization of macrophages in diabetic mice[J]. Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志),

- 2019, 35(5): 121-128.
- 4 Xie FJ, Deng L, Li Y, et al. Naringenin ameliorates myocardial fibrosis by down-regulating RhoA/ROCK signaling pathway in diabetic mice[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2019, 30: 671-677.
- 5 Wen L, Chen L, Sun YX, et al. Naringenin ameliorates kidney injury by inhibiting TGF- β 1/smad signaling pathway in diabetic nephropathy rats[J]. Basic Clin Med (基础医学与临床), 2016, 36: 896-901.
- 6 Xu X, Qi X, Shao Y, et al. High glucose induced-macrophage activation through TGF- β -activated kinase 1 signaling pathway[J]. Inflamm Res, 2016, 65(8): 1-10.
- 7 Ning Y, Li W, Rui P, et al. Naringenin ameliorated kidney injury through Let-7a/TGFB1 signaling in diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 1-13.
- 8 Roy S, Ahmed F, Banerjee S, et al. Naringenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic rat renal impairment by downregulation of TGF- β 1 and IL-1 via modulation of oxidative stress correlates with decreased apoptotic events[J]. Pharm Biol, 2016, 54: 1616-1627.
- 9 Xie FJ, Feng J, Li JF. Progress of researches on pathogenesis of RhoA/ROCK signaling pathway involved in diabetic cardiomyopathy[J]. J Clin Cardiol (临床心血管病杂志), 2018, 34: 846-850.
- 10 Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(2): H287-H296.
- 11 Tan HB, Zhong YS, Cheng Y, et al. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage[J]. Int J Ophthalmol, 2011, 4(6): 652.
- 12 Cai A, Li L, Zhou Y. Pathophysiological effects of RhoA and Rho-associated kinase on cardiovascular system[J]. J Hypertens, 2016, 34(1): 3-10.
- 13 Chang WJ, Cai H. RhoA/Rock signaling pathway and ventricular remodeling[J]. J Chin Pract Diagn Ther (中华实用诊断与治疗杂志), 2013, 5: 417-419.
- 14 Xiong F, Li X, Yang Z, et al. TGR5 suppresses high glucose-induced upregulation of fibronectin and transforming growth factor- β 1 in rat glomerular mesangial cells by inhibiting RhoA/ROCK signaling[J]. Endocrine, 2016, 54: 657-670.
- 15 Guan R, Xu X, Chen M, et al. Advances in the studies of roles of Rho/Rho-kinase in diseases and the development of its inhibitors[J]. Eur J Med Chem, 2013, 70: 613-622.