

# 淫羊藿总黄酮通过 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路改善自然衰老大鼠肾脏组织纤维化

盖李乐<sup>1,2</sup>, 袁 丁<sup>1</sup>, 张长城<sup>1</sup>, 夏宗保<sup>2</sup>, 石 越<sup>1</sup>, 高 艳<sup>1</sup>, 袁成福<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>三峡大学医学院, 宜昌 443000; <sup>2</sup>荆门市第一人民医院, 荆门 448000

**摘要:**为探讨淫羊藿总黄酮(TFE)对自然衰老大鼠肾脏纤维化的影响及其可能的作用机制,将18月龄SD大鼠随机分为自然衰老组、淫羊藿总黄酮低(10 mg/kg)、高(40 mg/kg)剂量组,另取2月龄SD大鼠作为青年对照组,给药4个月。通过HE染色和Masson染色观察肾脏组织形态及胶原纤维含量,生化酶法检测肾脏组织SOD活力和MDA含量,免疫组化法检测 $\alpha$ SMA的蛋白表达水平,实时定量PCR和Western blot技术检测TGF- $\beta$ 1和Smad3的mRNA及蛋白表达水平。结果显示,TFE(低、高剂量)可改善衰老SD大鼠肾脏组织形态,减少胶原纤维,提升肾脏组织SOD活力( $P < 0.05$ ),降低MDA含量( $P < 0.05$ ),并降低肾脏组织中 $\alpha$ SMA蛋白表达( $P < 0.05$ ),同时显著下调TGF- $\beta$ 1及Smad3的mRNA和蛋白表达( $P < 0.05$ )。淫羊藿总黄酮可改善自然衰老大鼠肾脏纤维化,其机制可能与其抑制TGF $\beta$ 1/Smad3信号通路传导有关。

**关键词:**淫羊藿总黄酮;衰老大鼠;肾纤维化;TGF- $\beta$ 1/Smad3 通路

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)3-0373-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.3.003

## Total flavonoids of Herba Epimedii improve renal fibrosis in natural aging rats through TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway

GAI Li-yue<sup>1,2</sup>, YUAN Ding<sup>1</sup>, ZHANG Chang-cheng<sup>1</sup>, XIA Zong-bao<sup>2</sup>, SHI Yue<sup>1</sup>, GAO Yan<sup>1</sup>, YUAN Cheng-fu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443000, China;

<sup>2</sup>The First People's Hospital of Jingmen, Jingmen 448000, China

**Abstract:**To investigate the effects and possible mechanisms of total flavonoids of Herba Epimedii (TFE) on renal fibrosis in natural aging rats, 18-month-old SD rats were randomly divided into natural aging group, low- (10 mg/kg) and high- (40 mg/kg) dose of TFE groups, the other 2-month-old SD rats as young control group. After 4 months of administration, the morphology of kidney was observed by HE staining, and the collagen fibers of kidney were observed by Masson staining, the activity of SOD and the content of MDA in kidney tissues were detected by biochemical enzymatic methods, the expression of  $\alpha$ SMA protein in kidney tissues was observed by immunohistochemistry. Real-time PCR and Western blot were adopted to detect the mRNA level and protein expression of TGF- $\beta$ 1 and Smad3. The results showed that TFE (low- and high-dose) improved the damage of renal tissue histomorphology, reduced the number of inflammatory cells and collagen fibers. SOD activity was increased and MDA content was decreased in renal tissues. It also decreased the protein expression of  $\alpha$ SMA in kidney, down-regulated the mRNA and protein expression of TGF- $\beta$ 1 and Smad3. Total flavonoids of Herba Epimedii can protect kidney from fibrosis in natural aging rats, and its mechanism may be related to the regulation of TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway.

**Key words:** total flavonoids of Herba Epimedii; aging rats; renal fibrosis; TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway

随着人口老龄化的到来,年龄相关性疾病的发病率呈现出显著增长趋势,经大数据统计,近10年

来慢性肾病的患病率已高达10%<sup>[1]</sup>。肾脏是人体最重要的代谢器官之一,在维持正常的生命活动中起着至关重要的作用。随着年龄增长,衰老所伴随发生的肾小球硬化、肾小管萎缩及肾间质纤维化,使得肾脏结构及血流动力学发生改变,肾功能进行性

收稿日期:2020-08-05 接受日期:2021-02-22

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81773959,81974528)

\*通信作者 Tel:86-013085163876; E-mail:yuancf46@ctgu.edu.cn

恶化甚至丧失<sup>[24]</sup>。肾纤维化是慢性肾病的终末期表现,一旦发生,严重影响患者的生活质量以及生存时间,因此,寻找防治衰老相关纤维化的有效药物具有重要的医学价值和社会意义,积极地改善肾脏组织慢性损伤和纤维化,是防治慢性肾病的重要环节。

淫羊藿(*Herba Epimedii*)又名仙灵脾,是一味常见的传统天然补肾中药,性温,走肝肾二经,具有补肾壮阳、强筋健骨、祛风除湿之功效,其药用历史悠久<sup>[5]</sup>。淫羊藿总黄酮(total flavonoids of *Herba Epimedii*, TFE)是淫羊藿的有效成分,现代药理学研究显示,TFE具有改善骨质疏松<sup>[6]</sup>、心血管疾病<sup>[7]</sup>、睾丸病变<sup>[8]</sup>的功效,同时可通过促进细胞增殖、抗氧化、抗炎等多种途径来抵抗衰老<sup>[9]</sup>,具有较大的研究价值。本课题组前期研究显示,TFE能通过调节IRE1 $\alpha$ /XBP1信号通路改善自然衰老大鼠睾丸支持细胞的分泌功能<sup>[10]</sup>;TFE还可通过抑制MAPK/NF $\kappa$ B信号通路改善自然衰老大鼠的脑部炎症,延缓脑衰老<sup>[11]</sup>。多项报道显示淫羊藿能够有效抵抗多部位脏器衰老,然而其能否改善肾脏衰老所致的纤维化却鲜有报道。因此,本研究通过观察TFE对自然衰老大鼠肾脏形态、功能以及 $\alpha$ SMA、TGF $\beta$ 1、Smad3蛋白表达水平的影响,来探讨TFE对自然衰老大鼠肾脏组织纤维化的影响及其作用机制,为丰富淫羊藿在衰老相关性疾病的防治提供有力的实验依据。

## 1 实验材料与仪器

### 1.1 实验药物

淫羊藿总黄酮购于成都仁诚生物科技有限公司,其纯度为80%,用1%羟甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na)配置成相应浓度的溶液。

### 1.2 实验动物

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性SD大鼠18月龄36只、2月龄10只,购自北京维通利华技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2012-0001,分笼饲养于三峡大学实验动物中心SPF级屏障系统,温度 $22 \pm 2$  °C,湿度 $60\% \pm 5\%$ ,光照明暗交替,饲养期间大鼠均自由摄食饮水。

### 1.3 实验试剂

Trizol、逆转录试剂盒、实时定量PCR试剂盒(大连宝生物科技有限公司);PCR引物(生工生物工程股份有限公司);SOD试剂盒、MDA试剂盒、Masson染色试剂盒(南京建成生物工程研究所); $\beta$ -

actin抗体(美国Santa cruz公司); $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ SMA)抗体(美国Santa cruz公司);转化生长因子(transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$ )抗体(美国Abcam公司);Smad3抗体(美国CST公司)。

### 1.4 实验仪器

MICROM GmbHM340E超薄切片机(德国MICROM);StepOnePlus™实时定量PCR仪(美国Applied Biosystems);TYPE1500-458全波长酶标仪(美国Thermo Electron);PowerPac™ Basic电泳仪(美国Bio-Rad);Bioshine ChemiQ4800化学发光成像自动显影仪(中国欧翔科学仪器有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 实验分组及处理

将36只18月龄雄性SD大鼠适应性喂养一周后,随机分为3组:自然衰老组、TFE低剂量组(10 mg/kg)、TFE高剂量组(40 mg/kg),每组12只,10只2月龄大鼠为青年对照组。每日定时给予大鼠灌胃1次,共计给药4个月。根据大鼠体重,TFE低、高剂量组给予相对应浓度的药物灌胃,青年对照组及自然衰老组分别给予体重相对应的1% CMC-Na溶液灌胃,每周称量一次体重,根据体重调整灌胃容量。

### 2.2 肾脏组织的收集及保存

大鼠喂养4个月后,在取材前称量大鼠体重;麻醉后用脱颈法处死,组织剪沿皮肤及皮下组织各层剖开胸腹腔,迅速摘取大鼠肾脏等组织,用预冷的PBS清洗后滤纸吸干多余液体,一部分肾脏组织过液氮后冻存在-80 °C,另一部分肾脏纵行切开后浸泡于4%多聚甲醛用于HE染色和免疫组化实验。

### 2.3 HE染色和Masson染色观察肾脏组织形态和胶原沉积

肾脏标本用4%多聚甲醛固定,脱水后石蜡包埋,切片用二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水,经苏木精和伊红染色(HE staining)后在光学显微镜下观察肾脏病理改变,Masson染色评估肾脏组织胶原沉积情况。在200倍镜下每张切片随机选取5个不同视野,呈现蓝色的区域为胶原纤维,蓝色区域的面积与整个视野总面积的比值为肾脏纤维化指数。采用Image Pro Plus 6.0软件进行半定量分析。

### 2.4 检测肾脏组织SOD活力及MDA含量

称取100 mg肾脏组织,加入1 mL预冷的PBS缓冲液制备成10%匀浆,用冰冻离心机4 °C 3 500 rpm离心15 min,吸取上清液,按照试剂盒步骤,分

别采用黄嘌呤氧化酶法和 TBA 法检测肾脏组织中的 SOD 活力和 MDA 含量。

## 2.5 Real-time PCR 检测 mRNA 表达水平

称取 40 mg 肾脏组织,加入 Trizol 充分裂解,再依次加氯仿、异丙醇、75% 乙醇抽提 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,核酸仪检测 RNA 浓度,经

逆转录得到 cDNA。反应体系为:SYBR 5  $\mu$ L,超纯水 3.4  $\mu$ L,引物 0.4  $\mu$ L(上、下游引物各 0.2  $\mu$ L),Dye 0.2  $\mu$ L,cDNA 1  $\mu$ L,在 ABI StepOneplus™ 仪器进行扩增,反应条件:95  $^{\circ}$ C 3 min,95  $^{\circ}$ C 20 s,60  $^{\circ}$ C 20 s,共 40 个循环。每个样本 2 个复孔,以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算出目的基因相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

| 名称<br>Gene name | 序列<br>Gene sequence  |
|-----------------|--|
| GAPDH           | Forward:5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'<br>Reverse:5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3' |
| TGF- $\beta$ 1  | Forward:5'-TGCCTTGCAGAGATTAATA-3'<br>Reverse:5'-AGCCCTGTATTCCCTCTCT-3'   |
| Smad3           | Forward:5'-CATTCCATTCCCAGAACTAA-3'<br>Reverse:5'-GCTGTGGTTCATCTGGTCT-3'  |

## 2.6 免疫组化法检测大鼠肾脏组织 $\alpha$ SMA 的表达

肾脏组织石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,柠檬酸盐修复液高压修复 10 min,PBS 冲洗后滴加 3% 过氧化氢 37  $^{\circ}$ C 孵育 10 min,再 PBS 冲洗,用 5% BSA 室温下封闭 1 h,滴加一抗(1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后滴加二抗,室温孵育 1 h,PBS 冲洗 3 遍,用 DAB 显色液显色,苏木精复染、盐酸酒精分化后,自来水冲洗,干燥后封片。镜下观察到阳性表达呈现棕黄色,在 200 倍镜下随机选取 5 个不同视野,用 Image Pro Plus 6.0 软件分析阳性表达的相对面积。

## 2.7 Western blot 检测肾脏组织 TGF- $\beta$ 1 及 Smad3 的蛋白水平表达

称取 40 mg 肾脏组织,加入裂解液高速研磨 30 s,涡旋仪振荡 15 s,冰上静置 10 min,重复 3 次,4  $^{\circ}$ C 下 12 000 rpm 离心 15 min,用 BCA 法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液煮沸 10 min。制备 SDS-PAGE 凝胶,电泳并转印至 PVDF 膜上,5% 牛奶室温下封闭 1 h,4  $^{\circ}$ C 下一抗孵育过夜,TBST 洗膜后在室温下孵育二抗 1 h,洗膜后用 ECL 化学发光液显影。

## 2.8 统计学方法

计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 Image Pro Plus 6.0 等软件分析处理,各组之间用单因素方差分析进行检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 TFE 对自然衰老大鼠肾脏组织病理形态的影响

如图 1HE 染色图片所示,与青年对照组相比,

自然衰老组大鼠肾脏肾小球血管祥增生,肾小管扩张,广泛炎性细胞浸润,局部有点片状萎缩坏死,大量胶原纤维增生;而与自然衰老组相比,TFE 低、高剂量组大鼠肾脏组织中肾小管扩张程度减轻,炎性细胞数量减少,胶原纤维明显减少,形态结构明显改善。

### 3.2 TFE 对自然衰老大鼠肾脏组织胶原沉积的影响

由图 2 Masson 染色可见,肾脏组织中肾小球上皮细胞胞浆、间质细胞胞浆等呈红色,胶原纤维呈蓝色。与青年对照组比较,自然衰老组胶原纤维明显增多( $P < 0.05$ ),而 TFE 组肾脏组织中的胶原纤维较自然衰老组减少,且高剂量组效果显著( $P < 0.05$ )。

### 3.3 TEF 对自然衰老大鼠肾脏组织 SOD 活力的影响

如图 3 所示,与青年对照组相比,自然衰老组 SOD 活力显著下降,而 MDA 的含量在自然衰老组大鼠肾脏组织中明显上升( $P < 0.05$ ),TFE 组较自然衰老组 SOD 活力升高,MDA 含量用药后下降,且高剂量组有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3.4 TFE 对自然衰老大鼠肾脏组织 TGF- $\beta$ 1、Smad3 mRNA 表达的影响

如图 4 所示,与青年对照组相比,自然衰老组 TGF- $\beta$ 1、Smad3 mRNA 表达明显增加( $P < 0.05$ ),而 TFE 组较自然衰老组显著降低( $P < 0.05$ )。

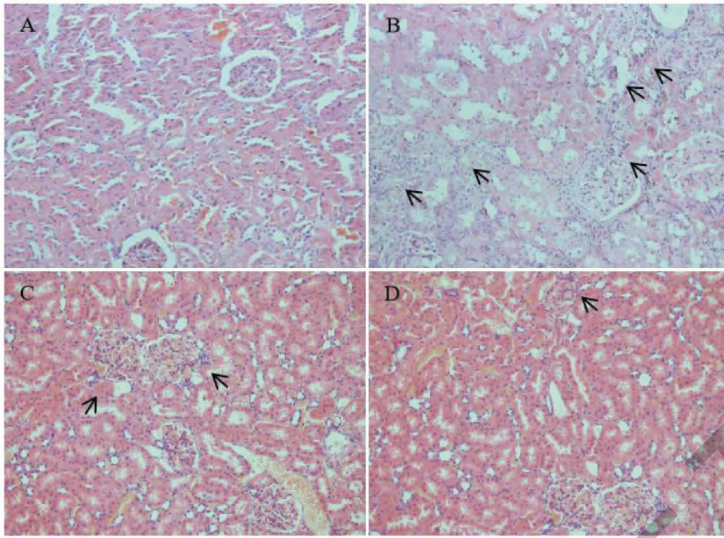


图1 HE 淫羊藿总黄酮对肾脏组织形态的影响( $\times 200$ )

Fig. 1 The effects of TFE on morphology of kidney slice of rats ( $\times 200$ )

注:箭头所示为炎性细胞浸润。A:青年对照组;B:自然衰老组;C:淫羊藿总黄酮低剂量组;D:淫羊藿总黄酮高剂量组(下同)。Note: The arrows indicate inflammatory cell infiltration. A is the young control group; B is the natural aging group; C is the low-dose group of TFE; D is the high-dose group of TFE (the same below).

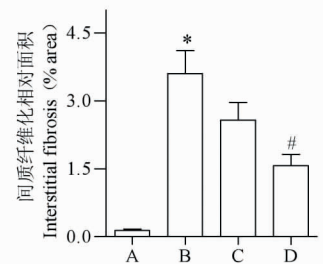
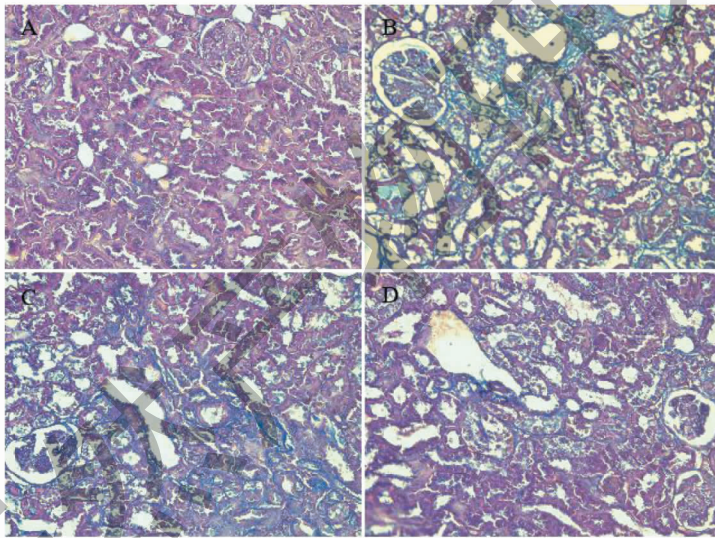


图2 淫羊藿总黄酮对肾脏组织胶原纤维沉积的影响( $\bar{x} \pm s, n = 9 \sim 11$ )

Fig. 2 The effects of TFE on collagenous fiber in kidney slice of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 9-11$ )

注:与青年对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与自然衰老组比较,# $P < 0.05$ (下同)。Note:Compared with young control group,\* $P < 0.05$ ;Compared with natural aging group,# $P < 0.05$  (the same below).

### 3.5 TFE 对自然衰老大鼠肾脏组织 $\alpha$ SMA 蛋白表达的影响

如图5免疫荧光结果所示,与青年对照组相比,自然衰老组肾脏  $\alpha$ SMA 阳性表达明显增加(棕黄色部分)( $P < 0.05$ ),而经 TFE 给药组较自然衰老组降低,且高剂量组效果更为显著,具有统计学意义

( $P < 0.05$ )。

### 3.6 TFE 对自然衰老大鼠肾脏组织 TGF- $\beta$ 1、Smad3 蛋白表达的影响

如图6所示,与青年对照组相比,自然衰老组 TGF- $\beta$ 1、Smad3 蛋白表达明显增加,TFE 组较自然衰老组明显降低( $P < 0.05$ )。

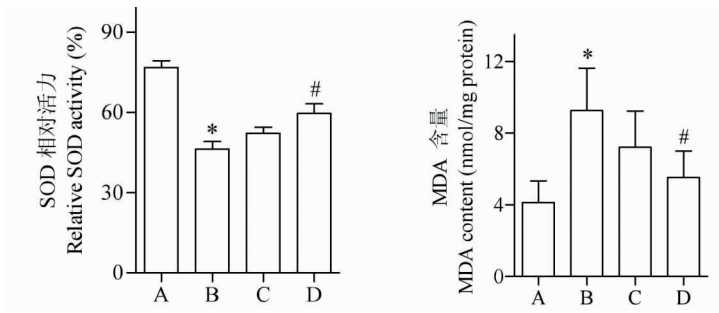


图3 淫羊藿总黄酮对大鼠肾脏 SOD 活力和 MDA 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 9 \sim 11$ )

Fig. 3 The effects of TFE on SOD vitality and the content of MDA in kidney of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 9-11$ )

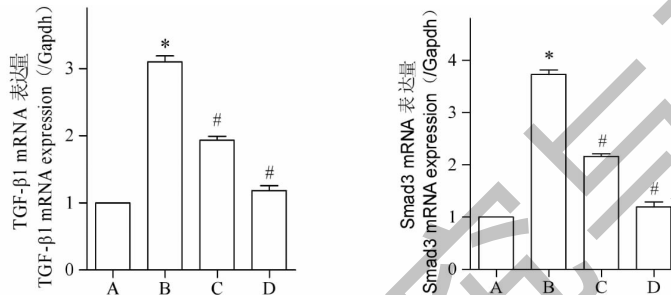


图4 淫羊藿总黄酮对肾脏组织中 TGF- $\beta$ 1 和 Smad3 的 mRNA 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 9 \sim 11$ )

Fig. 4 The effects of TFE on the mRNA level of TGF- $\beta$ 1 and Smad3 in kidney ( $\bar{x} \pm s, n = 9-11$ )

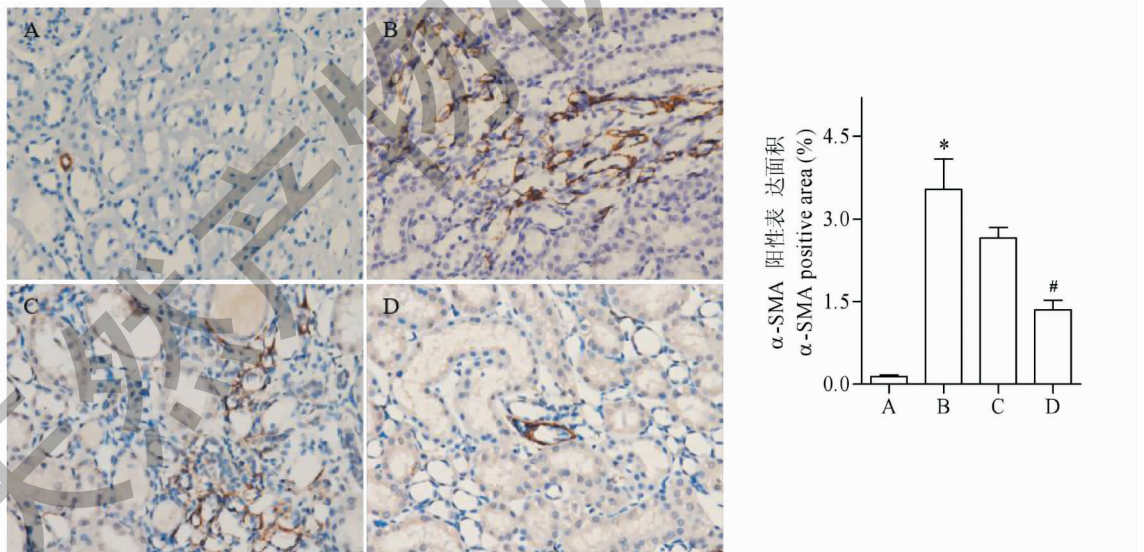


图5 淫羊藿总黄酮对肾脏组织中  $\alpha$ SMA 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 9 \sim 11$ )

Fig. 5 The effects of TFE on the protein expression of  $\alpha$ SMA in kidney ( $\bar{x} \pm s, n = 9-11$ )

#### 4 讨论

目前,我国老年人占总人口数的百分比已高达 17%,老龄化是慢性肾脏疾病的主要因素之一,且老年患者并发症的发生率也成倍增长,肾脏疾病的发

生及发展将严重威胁到老年人口的生存时间和质量<sup>[12]</sup>。因此,探寻有效的干预措施,对慢性肾病患者的转归有一定的改善作用,而对于衰老过程而言,预防肾脏衰老可能是防治老年性肾脏疾病的途径之一。

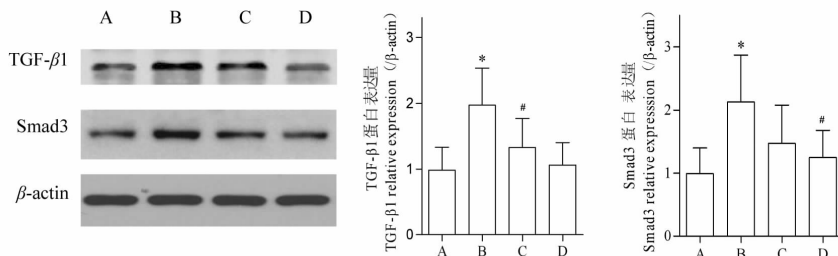


图6 淫羊藿总黄酮对肾脏组织中 TGF-β1/Smad3 信号通路中蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9 \sim 11$ )

Fig. 6 The effects of TFE on the protein expression of TGF-β1 and Smad3 in kidney ( $\bar{x} \pm s, n = 9-11$ )

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是多种慢性肾脏疾病发展到终末期的一种病理表现,也是衰老肾脏的主要表现之一和导致肾衰竭的主要原因之一<sup>[13]</sup>。肾小管上皮细胞表型转分化是肾间质纤维化发生的核心环节,αSMA 作为一种高度特异性的转分化标记物,是纤维化发生的标记物之一<sup>[14]</sup>。通过 HE 染色和 Masson 染色可以观察到,自然衰老大鼠肾脏组织中的胶原纤维明显增多,免疫组化显示 αSMA 表达量显著升高,给予不同浓度淫羊藿总黄酮灌胃处理后,肾脏组织中胶原纤维含量减少,αSMA 表达量下降,且高剂量组效果显著,表明 TFE 能通过减少胶原纤维的产生而改善肾间质纤维化。

随着年龄的增加,抗氧化能力逐步下降,机体自由基的产生和消除能力失衡,氧自由基不断蓄积,导致细胞的损伤,功能下降<sup>[15,16]</sup>。SOD 是一种抗氧化酶,以自由基为底物,与 O<sub>2</sub> 结合生成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,是清除体内氧自由基的主要物质<sup>[17]</sup>。氧自由基通过诱发多不饱和脂肪酸的过氧化形成 MDA 等脂质过氧化物,引起细胞损伤。MDA 含量可反映机体内脂质过氧化程度,与 SOD 共同反映抗氧化能力。本研究实验结果显示,与青年大鼠相比,自然衰老大鼠肾脏组织中 SOD 活力明显下降,MDA 含量升高,而给予淫羊藿总黄酮灌胃组的大鼠 SOD 活力较模型组增加,MDA 含量下降。这说明衰老大鼠的抗氧化能力下降,而给予 TFE 灌胃后抗氧化能力较之提升。

伴随着衰老的发生,机体代谢的代偿能力逐渐衰弱,细胞受到代谢产物的刺激后活化,产生一系列炎症因子,从而诱导炎症细胞的产生和浸润<sup>[18]</sup>。我们通过 HE 染色还可以观察到,衰老大鼠肾脏组织中有广泛炎症细胞浸润,淫羊藿总黄酮处理组中的炎症浸润明显减少,说明淫羊藿总黄酮能通过减轻

炎症细胞浸润起到保护肾脏的作用。这与前期夏世金<sup>[19]</sup>、韩桂芳<sup>[20]</sup>等研究报道的淫羊藿总黄酮的抗炎作用相似。

TGF-β 是一种强致肾小球硬化和肾纤维化的细胞因子<sup>[18]</sup>,其主要通过促进炎症细胞的募集和活化,介导肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化以及促进细胞外机制的合成与沉积<sup>[21,22]</sup>。Smad 蛋白是 TGF-β 受体的胞内激酶底物<sup>[23]</sup>,作为 TGF-β 信号的重要中介,它能够通过 TGF-β 的早期靶基因的 DNA 结合特征域,直接激活编码转录调控因子和信号转导的基因。因此,TGF-β/Smad 信号通路在慢性肾纤维化损伤进程中起着重要作用<sup>[23]</sup>。这说明找到针对 TGF-β1 这一靶点的有效药物,有极大可能改善纤维化进展。在本项研究中,自然衰老大鼠肾脏组织中 TGF-β1 和 Smad3 的 mRNA 及蛋白水平均明显升高,而给予 TFE 灌胃处理后降低,且高剂量效果显著。这提示淫羊藿总黄酮可能通过抑制 TGF-β1 的表达,减少 Smad3 的表达,起到改善肾脏组织纤维化的作用。

综上所述,TFE 具有改善自然衰老 SD 大鼠肾脏纤维化的作用,其可能机制与降低自然衰老大鼠肾脏组织中 TGF-β1、Smad3 和 αSMA 的蛋白表达水平有关,以及通过减少炎症细胞浸润、减轻氧化应激对肾脏造成的损伤,从而改善衰老肾脏纤维化。目前已有研究证实淫羊藿总黄酮在多部位脏器中具有抗炎、抗氧化、抗衰老等作用,但尚未有研究报道其在肾脏组织中具有改善衰老所致的纤维化作用,而肾脏组织是机体代谢的重要参与者,因此,本研究具有一定的创新性和应用价值,为淫羊藿在衰老肾脏纤维化等相关一系列疾病的临床防治中的应用提供了实验基础和应用依据。

#### 参考文献

1 Ding XQ, Chen N, Deng YY, et al. Chronic kidney disease: A

- hidden killer of the elderly's health[J]. Home Med(家庭医药),2016(4):54-57.
- 2 Kliem V,Johnson RJ,Alpers CE,et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats[J]. Kidney Int,1996,49:666-678.
  - 3 Abrass CK,Adcox MJ,Raugi GJ. Aging-associated changes in renal extracellular matrix[J]. Am J Pathol,1995,146:742-752.
  - 4 Abrass CK. The nature of chronic progressive nephropathy in aging rats[J]. Adv Renal Replace Th,2000,7(1):4-10.
  - 5 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)[M]. Beijing:China Medical Science and Technology Press,2015:132.
  - 6 Peng S,Zhang G,He Y,et al. Epimedium-derived flavonoids promote osteoblastogenesis and suppress adipogenesis in bone marrow stromal cells while exerting an anabolic effect on osteoporotic bone[J]. Bone,2009,45:534-544.
  - 7 Fu LB,Xia YH,Yu L,et al. Effects of TFE on the blood pressure and its mechanism in rat[J]. Chin J Appl Physiol(中国应用生理学杂志),2007,23(1):115-116.
  - 8 Shi J,Gong Y,Xie GY,et al. Protective effect of total flavonoids of Herba Epimedii on testis degeneration in diabetic mice[J]. Chin J Appl Physiol(中国应用生理学杂志),2013,29:428-431.
  - 9 Zhang JL,Ding H,Song XB. Research progress on anti-aging effect of total flavonoids of Herba Epimedii[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:339-343.
  - 10 Chen Q,Zhang CC,Han GF,et al. Effect of *Epimedium* flavonoids on decreasing secretion function of Sertoli cells in testis of natural aging rats[J]. Chin Pharmacol Toxicol(中国药理学与毒理学杂志),2019,33:208-215.
  - 11 Song LX,Zhang CC,Wang T,et al. Total flavonoids of *Epimedium* attenuate aging-related inflammation in rat brain by inhibiting MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报),2017,33(1):84-90.
  - 12 Nitta K,Okada K,Yanai M,et al. Aging and chronic kidney disease[J]. Kidney Blood Press Res,2013,38(1):109-120.
  - 13 Li LS,Liu ZH. Zhongguo Shenzang Bingxue(中国肾脏病学)[M]. Beijing:People's Military Medical Press,2008:706.
  - 14 He J,Xu Y,Koya D,et al. Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease[J]. Clin Exp Nephrol,2013,17:488-497.
  - 15 Rubinsztein DC,Marino G,Kroemer G. Autophagy and aging[J]. Cell,2011,146:682-695.
  - 16 Harman D. Aging:a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. J Gerontol,1956,11:298-300.
  - 17 Yao D,Shi W,Gou Y,et al. Fatty acid-mediated intracellular iron translocation:a synergistic mechanism of oxidative injury[J]. Free Radic Biol Med,2005,39:1385-1398.
  - 18 Lopez-Hernandez FJ,Lopez-Novoa JM. Role of TGF- $\beta$  in chronic kidney disease:an integration of tubular,glomerular and vascular effects[J]. Cell Tissue Res,2012,347(1):141-154.
  - 19 Xia SJ,Shen ZY,Yu ZW,et al. Intervention outcome and mechanism of *Epimedium* total flavonoids on aged rat hippocampus during inflamm-aging progress based on gene expression profile[J]. Pract Geriatr(实用老年医学),2010,24(1):24-27.
  - 20 Han GF,Zhang CC,Chen Q,et al. Total flavonoids of *Epimedium* reduce inflammatory reaction via AMPK/SIRT1/NF- $\kappa$ B signaling pathway in testes of natural aging rats[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:1489-1493.
  - 21 Wang W,Koka V,Lan HY. Transforming growth factor- $\beta$  and Smad signalling in kidney diseases[J]. Nephrology,2005,10(1):48-56.
  - 22 Lutz M,Knaus P. Integration of the TGF- $\beta$  pathway into the cellular signalling network[J]. Cell Signal,2002,14:977-988.
  - 23 Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response[J]. Int J Exp Pathol,2004,85(2):47-64.
  - 24 Leask A,Abraham DJ. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response[J]. FASEB J,2004,18:816-827.