

严颖,谭睿陟,赵长英,等. 姜黄素对 5/6 肾结扎诱导的慢性肾病小鼠模型肾纤维化的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 52-58.

Yan Y, Tan RZ, Zhao CY, et al. Protective effect of curcumin on renal fibrosis induced by 5/6 kidney ligation in the mouse model of chronic renal disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 52-58.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.01.009

姜黄素对 5/6 肾结扎诱导的慢性肾病小鼠模型 肾纤维化的保护作用

严颖¹,谭睿陟¹,赵长英²,李健春¹,钟霞¹,王露¹,林晓¹,王丽^{1*}

(西南医科大学 1. 附属中医医院中西医结合研究中心; 2. 附属中医医院内分泌科, 泸州 646000)

【摘要】 目的 研究姜黄素对慢性肾病 (CKD) 肾纤维化的保护作用,并探讨可能作用机制。**方法** 30 只 C57BL/6 J 小鼠随机分成假手术对照组 (NC)、5/6 肾结扎模型组 (LIG) 和姜黄素治疗组 (LIG+CUR), 每组 10 只,按照改良的 5/6 肾结扎方法制作 CKD 动物模型,姜黄素组小鼠给予含姜黄素饲料 (每日 100 mg/kg),其余组给予正常饲料,三月后牺牲小鼠,检测纤维化指标 α -SMA 及参与慢性肾病纤维化的 Hippo 通路转录激活子 Yap。**结果** 肾功能检测结果显示,与假手术组相比,结扎组中的尿素氮 (BUN)、血肌酐 (Scr) 显著增高,给予姜黄素可以有效保护肾功能受损;H&E、Masson 和免疫组化结果均显示,结扎组小鼠的肾出现明显肾小管病变和一定程度的纤维化改变,给予姜黄素后纤维化程度显著减轻 ($P < 0.05$);而 Yap 蛋白在造模后 mRNA 和蛋白水平均出现升高,姜黄素处理后则显著下降 ($P < 0.05$)。**结论** 姜黄素可有效改善 5/6 肾结扎诱导的慢性肾病病症和减轻纤维化病变,机制研究结果初步提示可能与降低 Hippo 信号通路中的 Yap 表达有关。

【关键词】 慢性肾病;5/6 肾结扎;姜黄素;Yap

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 01-0052-07

Protective effect of curcumin on renal fibrosis induced by 5/6 kidney ligation in the mouse model of chronic renal disease

YAN Ying¹, TAN Ruizhi¹, ZHAO Ghangying², LI Jianchun¹, ZHONG Xia¹, WANG Lu¹, LIN Xiao¹, WANG Li^{1*}

(1. Research Center, Affiliated Chinese Medicine Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine.

2. Department of Endocrinology, Affiliated Chinese Medicine Hospital, Southwestern Medical University, Luzhou 646000, China)

Corresponding author: WANG Li. E-mail: wangli120@swmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the protective effect of curcumin on renal fibrosis in chronic kidney disease (CKD) and explore its possible mechanism of action. **Methods** Thirty C57BL/6 J mice were randomly divided into a sham-operated control group (NC), 5/6 kidney ligation model group (LIG) and curcumin treatment group (LIG + CUR), with 10 mice in each group. The CKD animal model was prepared according to the modified 5/6 kidney ligation method.

【基金项目】 泸州市-学校重点研发计划项目 (2017LZXNYD-Z03); 教育厅科研创新团队项目 (17TD0046); 卫生厅项目 (17PJ493, 2011-717); 泸州市科技局项目 (2011-108)。

Funded by Luzhou City School Key Research and Development Program (2017LZXNYD-Z03), Education Department Research Innovation Team Project (17TD0046), Sichuan Provincial Health Department (17PJ493, 2011-717), and Luzhou Science And Technology Bureau Project (2011-108)。

【作者简介】 严颖 (1994—) 女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治肾纤维化。Email: 313416744@qq.com

【通信作者】 王丽 (1976—) 女, 教授, 博士生导师。Email: wangli120@swmu.edu.cn

The curcumin group was given a curcumin-containing diet (100 mg/(kg·d) and the other groups were given normal feed. The mice were euthanized after 3 months. The levels of the fibrosis index α -SMA and the Hippo pathway transcriptional activator Yap involved in fibrosis in CKD were determined. **Results** Renal function tests showed that urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were significantly increased in the LIG group compared with the NC group, and that the administration of curcumin effectively protected kidney function. H&E, Masson and immunohistochemical staining showed that the LIG kidneys had obvious tubular lesions and some fibrotic changes, and that the degree of fibrosis was significantly reduced after the administration of curcumin ($P<0.05$). The mRNA and protein levels of Yap increased after modeling, and decreased significantly after curcumin treatment ($P<0.05$). **Conclusions** Curcumin can significantly ameliorate the mouse CKD induced by 5/6 kidney ligation, and its mechanism may be related to a decrease of Yap in the Hippo signaling pathway.

[Keywords] Chronic renal disease; 5/6 kidney ligation; curcumin; Yap; mouse

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

近年来,随着糖尿病、高血压、血管性疾病的增多,并发的慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)的发病率也呈上升趋势。Zhang 等^[1]对我国 13 个省市进行多阶段随机抽样调查证实我国 CKD 患病率约 10.8%,约有 1.2 亿成年人罹患 CKD,严重影响患者的劳动能力和生活质量,占用了大量的医疗资源,给社会和家庭带来了沉重的经济负担。

姜黄素是一种植物多酚,是姜黄的主要成分,其具有广泛的生物学活性,包括抗炎、抗肿瘤及抗氧化等作用。已有的研究报道,姜黄素可以通过抑制 PI3K/AKT 和 CYP2E/Nrf2/ROS 通路相应蛋白的表达治疗由 LPS 诱导的败血症和肝衰竭^[2]。Liu 等^[3]研究发现联合使用姜黄素和白藜芦醇可以显著的提高苯并芘诱导的小细胞肺癌的抗氧化物酶水平,改善肺部组织变化。Zhao 等^[4]研究发现姜黄素具有治疗肝纤维化小鼠模型的作用,其作用机制可能与抑制巨噬细胞极性转化和枯否细胞活化、减少单核细胞相关的细胞因子分泌有关。关于姜黄素在肾纤维化方面研究甚少,有研究应用含姜黄素代谢产物的四氢姜黄素饮食饲料喂养 5/6 肾切除模型所致慢性肾疾病 SD 大鼠,发现具有改善大鼠蛋白尿、减轻纤维化程度、增加抗氧化蛋白和过氧化物酶的效果^[5-6]。但是,姜黄素在防治慢性肾疾病中的具体机制依然不明,而姜黄素作为一种在治疗多种疾病方面极具潜力的天然药物,大力开发其应用价值尤其在肾领域方面的研究极为重要。本课题组运用改良的 5/6 肾结扎方式造模^[7],通过消融肾实质使肾单位减少从而诱导 CKD 模型,进一步探讨姜黄素对 CKD 的防治效果并初步揭示其相应的保护作用机制,为临床防治 CKD 提供一定参考,具体研究报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 J 雄性小鼠,8 周龄,体重 20 ~ 25 g,购自成都达硕实验动物有限公司【SCXK(川)2015-030】,饲养于西南医科大学动物实验中心【SYXK(川)2018-065】。将小鼠饲养在恒温 20 ~ 22℃,湿度 50% ~ 60% 环境中,每天光照黑暗各 12 h 交替处理,适应性饲养一周。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:2017DW027)。

1.1.2 试剂

姜黄素购自西安开来生物技术有限公司(纯度 98.15%);总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;逆转录试剂盒购自上海普洛麦格生物产品有限公司;Real-time PCR 试剂盒购自上海普洛麦格生物产品有限公司;血肌酐,尿素氮试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Yap 购自美国 Cell Signaling Technology; α -SMA 购自 Invitrogen。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模

30 只 C57BL/6 J 小鼠随机分成假手术对照组(NC)、5/6 肾结扎组(LIG)、姜黄素组(LIG+CUR)。5/6 肾结扎模型:在无菌环境中用 1%戊巴比妥钠麻醉小鼠,背脊柱右侧腹切口暴露右肾并切除,一周后,背脊柱左侧腹切口暴露左肾,根据长度大致分成上中下三部分,用 3-0 不可吸收的缝合线结扎上下段,结扎至线圈直径为肾的 1/2。术后,立即给予姜黄素组每日喂养含 100 mg/kg 姜黄素含药饲料,其余小鼠自由饮水摄食普通养殖饲料,于肾结扎后三月处死取材,取相应的血尿及其组织标本用于实验室分析。姜黄素饲料配制方式:按照口服姜黄素

剂量为每日 100 mg/kg 制作含药饲料^[8],姜黄素组每只小鼠体重约 20 g,则每只小鼠每日需要口服姜黄素 2 mg,根据小鼠每日摄食量约 5 g^[9],因此配置成 2 mg/5 g 姜黄素饲料,单笼喂养,先喂养含姜黄素的饲料,再换正常饲料,每日精确记录含姜黄素饲料的摄入情况。制作方法:常规小鼠饲料打粉,按照上述比例添加姜黄素,搅拌均匀后加入一定量灭菌水,成团后用面条机制出圆柱形粗面条状饲料,切割成 1 cm 的小颗粒,48℃ 烘烤 24 h 后投食或 4℃ 冷藏保存。

1.2.2 观察指标

(1) 一般情况

观察小鼠的精神状态、活动、饮食及饮水、皮毛、二便等情况变化。

(2) 生化指标检测

心脏穿刺取血处死,用血肌酐、尿素氮试剂盒测定生化指标。

(3) 组织病理学与免疫组化观察

新鲜组织固定脱水包埋后切片,脱蜡复水用于常规病理学 H&E 染色、Masson 染色观察肾小球硬化肾小管扩张情况及其纤维化程度,免疫组织化学法检测 α -SMA 和 Yap 表达情况。

免疫组化:制作石蜡切片脱蜡复水,放入 pH 6.0 的柠檬酸缓冲液中微波抗原修复,自然冷却至室温,用 3% 过氧化氢孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次, 3 min/次。滴加用 5% BSA 封闭 10 min,滴加一抗,4℃ 湿盒孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 3 min/次,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 3 min/次, DAB 显色,镜下控制显色时间,蒸馏水冲洗终止反应。苏木素染核,水洗,无水乙醇脱水 1 min,二甲苯透明 10 min,中性树胶封片。

(4) Western blot 检测蛋白质

液氮研磨肾皮质部分,冰浴上裂解 30 min,离心取上清,测定相应的蛋白浓度,加入上样缓冲溶液进行封闭,10 min 沸水浴,-20℃ 保存。以 50 μ g 总蛋白样品上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗 3 次, 10 min/次,一抗孵育 4℃ 过夜, TBST 洗 3 次, 10 min/次,二抗室温 37℃ 孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 10 min/次,用等体积的 A 液和 B 液混匀显色,暗室中操作,置于暗盒中曝光,根据目的蛋白荧光信号强弱选择合适的曝光时间,显影定影,用 Gel-Pro Analyzer 软件

分析结果。

(5) 总 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

设计引物送至上海生物工程有限公司合成, *Yap* 基因上游 (5'-3'): TGAGATCCCTGATGATGTAC CAC; *Yap* 基因下游 (5'-3'): TGTGTGTGTCTGATCG TTGTGAT; α -SMA 基因上游 (5'-3'): GTCCCA GACATCAGGGAGTAA; α -SMA 基因下游 (5'-3'): TCGGATACTTCAGCGTCAGGA; *GAPDH* 基因上游 (5'-3'): AGGTCCGTGTGAACGGATTTG; *GAPDH* 基因下游 (5'-3'): GGGGTCGTTGATGGCAACA。取肾皮质提取 RNA, 逆转录为 cDNA, 并按照试剂盒说明书进行 Real-time PCR, 反应条件: 95℃ 2 min, 40 个循环; 95℃ 15 s; 60℃ 1 min。以 *GAPDH* 为内参进行校正后, 比较循环阈值 (CT) 的方法对靶基因的 mRNA 表达水平进行相对定量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行实验数据统计, 处理, 分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 三组间比较用方差分析和 Shapiro-Wilk 检验进行两两比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5/6 肾结扎小鼠造模及其一般情况观察

实验期间假手术组精神状态良好, 毛发光泽, 行动自如, 反应灵敏, 进食, 饮水, 排尿排便正常。结扎组小鼠出现食欲不振, 精神状态萎靡, 活动欠佳等表现, 姜黄素治疗一月后出现食欲好转, 精神状态相对活跃, 饮食饮水状态相对改善。由图 1 结果可见, 与假手术组相比, 结扎组肾上下极出现明显萎缩吸收。

2.2 CKD 小鼠肾功能改变

与假手术组相比, 结扎组血肌酐以及尿素氮明显升高, 而姜黄素治疗后血肌酐与尿素氮值明显下降, 各组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.001$)。见图 2。

2.3 姜黄素治疗后的肾病理学改变

H&E 染色结果显示为肾皮质部分, 可见, 假手术组肾小球毛细血管腔无扩张, 肾小管结构清晰, 排列紧密, 上皮细胞基底膜完整, 间质未见炎性细胞浸润, 结扎组肾小球肥大变形, 肾小管扩张明显, 炎性浸润增多, 姜黄素组肾小球和肾小管相应的结构变化得到明显改善 (见图 3)。

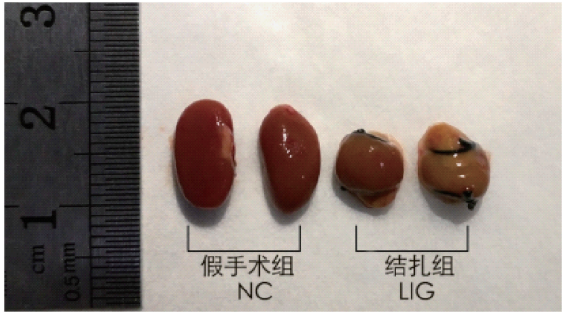


图 1 5/6 肾结扎造模示意图

Figure 1 Comparison of the kidney of normal control and 5/6 kidney ligation model mice

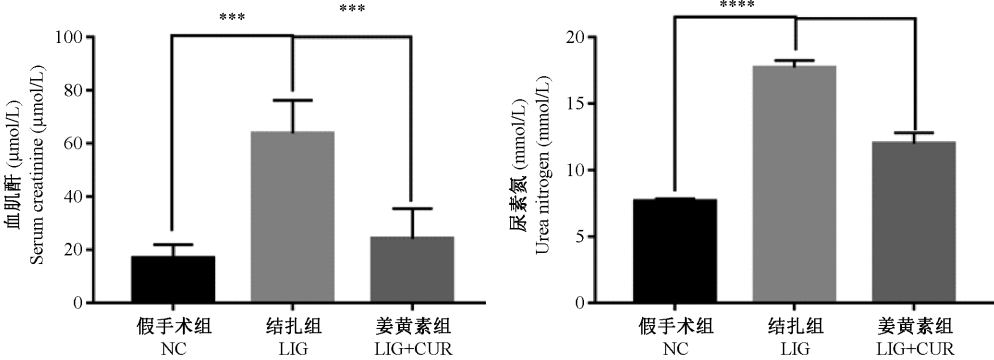
2.4 姜黄素对纤维化的影响作用

Masson 染色和 α -SMA 免疫组化结果显示部位均为肾皮质,可见,与假手术组相比,结扎组出现一

定程度纤维化改变,应用姜黄素后,Real-time PCR 和 Western blot 结果显示, α -SMA 在基因和蛋白表达水平均出现降低,表明以 5/6 肾结扎的造模方式同样可以诱导肾纤维化,且经过姜黄素治疗后可以减缓肾纤维化程度(见图 4)。

2.5 姜黄素通过降低 Yap 的表达减缓 CKD 进程

喂食姜黄素三月后各组小鼠肾皮质的免疫组化结果显示:假手术组的肾组织中,仅有少量 Yap 表达于远曲小管上皮细胞的细胞质和细胞核内,而结扎组则出现 Yap 入核增多、阳性表达增强现象,集中表达于肾近端小管和远曲小管中,姜黄素治疗后细胞核阳性表达区域显著减少;Real-time PCR 和 Western Blot 检测结果可见,与假手术组相比,结扎组 Yap 在基因和蛋白水平的表达均显著升高,而姜黄素治疗后表达下降(见图 5)。



注: NC:假手术对照组; LIG: 5/6 肾结扎模型组; LIG+CUR:姜黄素治疗组; Serum creatinine:血肌酐; Urea nitrogen:尿素氮. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$.

图 2 三组小鼠血肌酐与尿素氮水平检测

Note. NC.Sham operated control group. LIG: 5/6 kidney ligation model group. LIG + CUR: The ligation group treated with curcumin. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Detection of serum creatinine and urea nitrogen levels in the three groups of mice

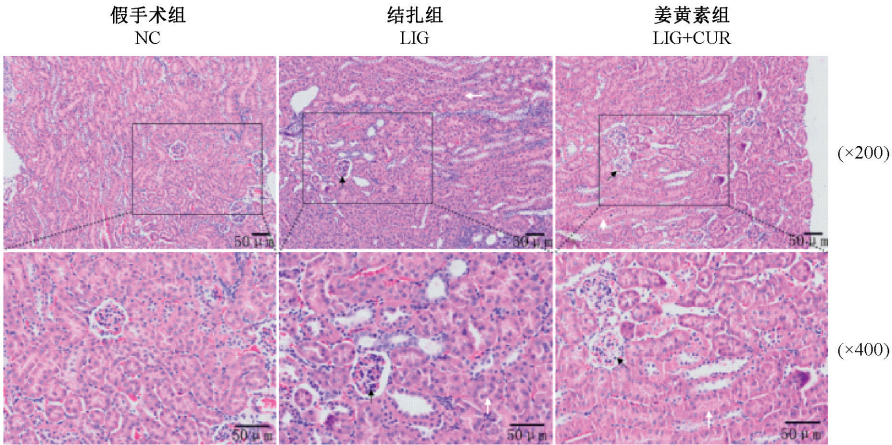


图 3 三组小鼠肾病理组织 H&E 染色

Figure 3 Histological changes in renal tissues of the three groups of mice(H&E staining)

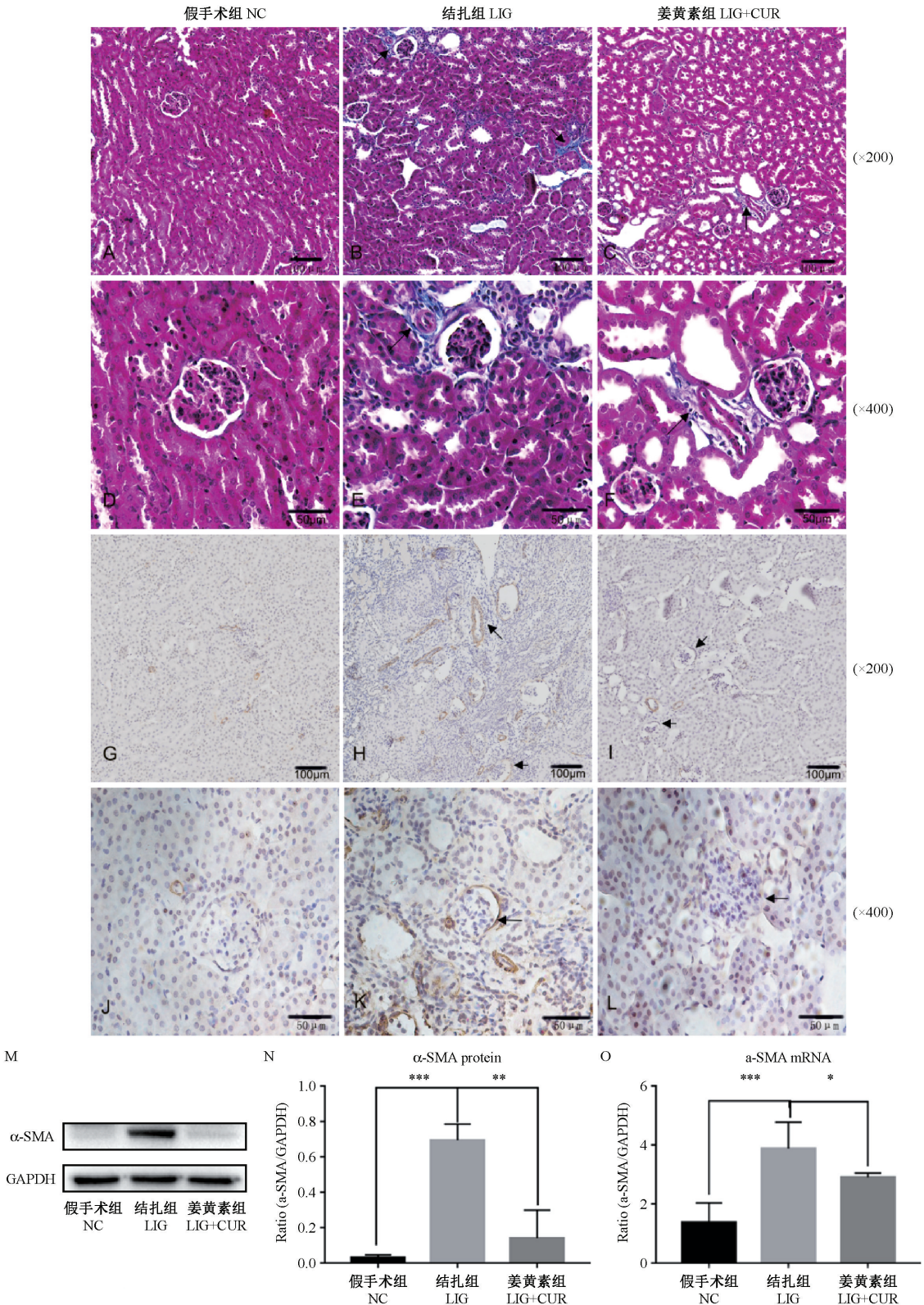
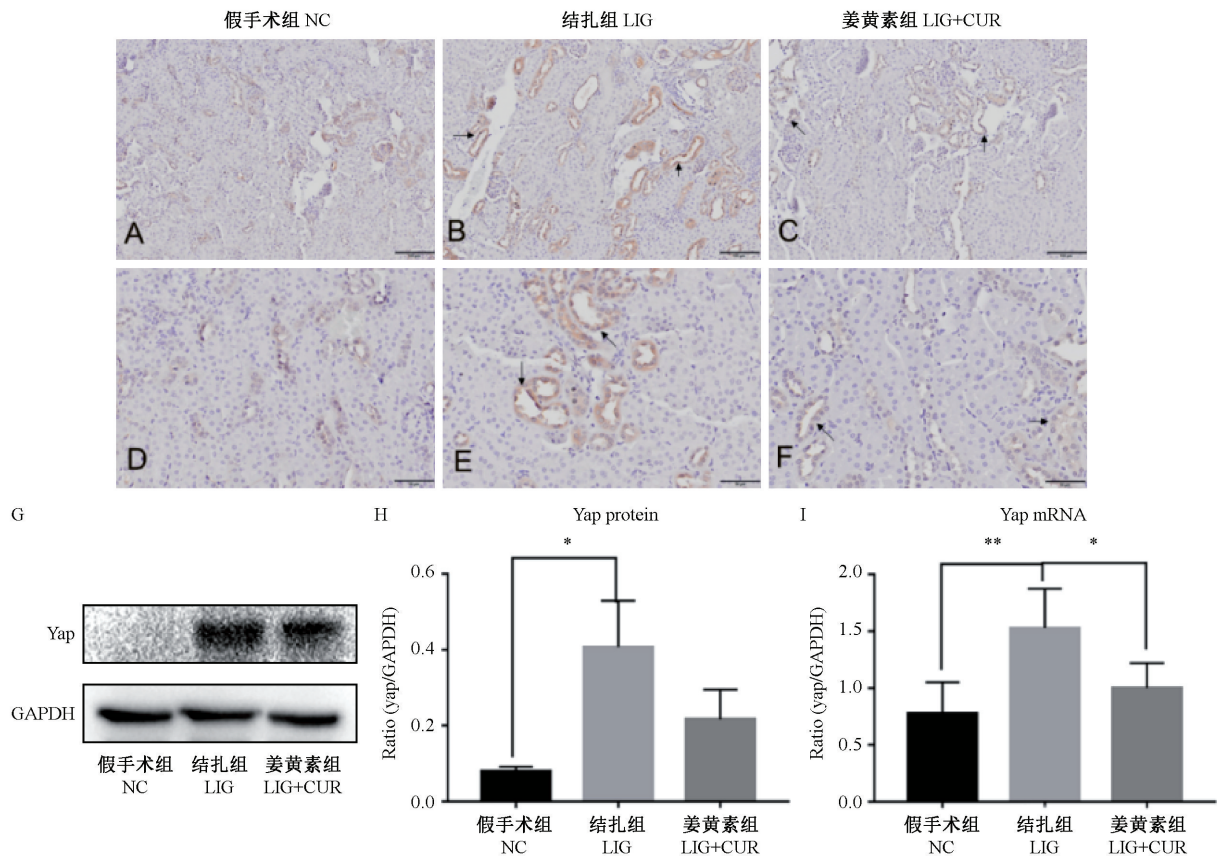


图 4 三组小鼠肾脏组织 Masson 染色和 α-SMA 基因与蛋白的表达情况

Note. A-F: Masson staining. G-L: Results of α-SMA immunohistochemical staining. M-N: α-SMA protein expression, and O: Results of α-SMA RT-PCR.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4 Changes of histology and expression of α-SMA gene and protein in renal tissues of the three groups of mice



注:A-F 为 Yap 免疫组化结果;G-H 为 Yap 蛋白表达结果;I 是 Yap RT-PCR 结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 Yap 在各组小鼠肾组织中基因和蛋白表达情况

Note. A-F: Yap expression, immunohistochemistry. G-H: Yap protein expression. I: Results of Yap RT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Gene and protein expression of Yap in kidney tissues of the mice

3 讨论

在本研究中,我们报道了姜黄素可以有效的减缓由改良的 5/6 肾结扎方式所诱导的慢性肾病纤维化进程,降低血清肌酐和尿素氮水平,下调纤维化指标 α -SMA 的表达,其机制可能与下调 Hippo 信号通路中 Yap 蛋白的表达有关。

CKD 动物模型制备方法有多种,可以通过反复注射顺铂或喂养阿霉素等化学方式诱导^[10-11],也可以通过手术方式诱导,其中以 5/6 肾切除模型最为常见,采用的是左侧肾切除上下极,一周后切除右侧肾的方式^[5]。然而以该方法造模会导致动物在术中或术后大量出血,严重影响动物术后的生存率。随后有研究用电凝止血法对切除后的肾止血,但依然会产生约 20% 的死亡^[12]。而本实验模拟 5/6 肾切除模型的机制,采用新型改良的 5/6 肾结扎模型制备方法,通过结扎肾上下极,使肾单位减少,残存的肾组织超负荷,致使肾小球出现高灌注、高滤过、肥大增生,进一步出现萎缩硬化。该方法可

有效的减少动物在造模过程中的大出血,降低动物术后死亡率至 10% 以下。免疫组化和 Masson 染色的结果显示,结扎组小鼠肾还出现纤维化改变,说明该改良造模方式不仅能诱导 CKD 模型,还能导致纤维化改变,更加贴近 CKD 患者的病理生理过程,具体研究数据已另成文,在本文中不再赘述。

针对慢性肾疾病的肾纤维化治疗,Wang 等^[13]采用高内容筛选(HCS)方法筛选出了具有潜在抗纤维化作用的 16 种化合物,其中包含有姜黄素,提示其可能在抗纤维化方面具有一定开发价值。姜黄素是从姜黄根茎部提取出来的一种疏水性多酚,具有广泛的生物药理学作用,如抗炎、抗肿瘤等。现有研究表明姜黄素对慢性肾损伤动物模型具有一定的治疗作用。在本研究中我们应用姜黄素治疗新型的 5/6 肾结扎方式诱导的 CKD 纤维化模型,结果显示,姜黄素可以显著减缓 CKD 进程,减慢肾纤维化进展,有利于肾功能恢复,与 Lau 等采用四氢姜黄素的实验结果一致。四氢姜黄素作为姜黄素在生物体内的主要代谢产物,研究发现其在抗氧化

方面的药理活性优于姜黄素,据此推测本研究中姜黄素的抗肾纤维化作用可能与姜黄素的代谢产物有关。

对于姜黄素抗纤维化的机制研究多集中于氧化应激方面^[14]。近年来,有关 Yap 与器官纤维化关系的研究日益受到关注。Yes 相关蛋白(Yap)是 Hippo 通路中最主要的转录共激活因子,Lats1 存在于 Yap 的上游,Last1/2-Mob1 复合物被磷酸化而激活,进而使下游的 Yap/Taz 磷酸化,磷酸化的 Yap 与控制蛋白亚细胞定位的调节蛋白结合,继而滞留在细胞质中,导致 Yap/Taz 沉默,从而抑制下游因子细胞周期素 E 等表达来维持组织稳态,若 Hippo 通路被抑制,导致 Yap 过分活化,迁移进入细胞核,激活下游靶基因从而导致细胞增殖活跃。它们之间相互作用参与许多病理生理过程,与调控器官体积、细胞增殖分化凋亡相关。Liu 等^[15-16]从人肺组织和细胞实验研究中得出 Yap 能够通过介导成纤维细胞活化和基质形成促进肺纤维化进程。Zeng 等^[17]通过 UUO 和缺血再灌注构建的小鼠模型发现,随着损伤时间延长,Yap 在细胞核表达的阳性率升高。Anorga S 等^[18]通过三种模型发现在 UUO 模型诱导的 CKD 疾病中存在 Yap 的高表达。以上研究均提示,Yap 高表达与肾纤维化进展存在一定相关性。我们在研究中发现,无论是基因还是蛋白水平,Yap 在结扎组小鼠中均出现表达升高,而在姜黄素治疗后均显著性降低。据此初步推测,采用姜黄素治疗 CKD 的机制可能涉及到 Hippo 信号通路,但对于确切的机制研究还需要在细胞水平上进一步证实和深入性探讨。

参 考 文 献(References)

- [1] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. *Lancet*, 2012, 379(9818): 815-822.
- [2] Zhong W, Qian K, Xiong J, et al. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF- κ B related signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 302-313.
- [3] Liu Y, Wu YM, Yu Y, et al. Curcumin and resveratrol in combination modulate drug-metabolizing enzymes as well as antioxidant indices during lung carcinogenesis in mice [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2015, 34(6): 620-627.
- [4] Zhao XA, Chen G, Liu Y, et al. Curcumin reduces Ly6C monocyte infiltration to protect against liver fibrosis by inhibiting Kupffer cells activation to reduce chemokines secretion [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 868-878.
- [5] Lau WL, Khazaeli M, Savoj J, et al. Dietary tetrahydrocurcumin reduces renal fibrosis and cardiac hypertrophy in 5/6 nephrectomized rats [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2018, 6(2): e00385.
- [6] Aparicio-Trejo OE, Tapia E, Molina-Jijón E, et al. Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: Relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics [J]. *Biofactors*, 2017, 43(2): 293-310.
- [7] Wang X, Chaudhry MA, Nie Y, et al. A mouse 5/6th nephrectomy model that induces experimental uremic cardiomyopathy [J]. *J Vis Exp*, 2017, 7(129): 1-6.
- [8] Fan Y, Chen H, Peng H, et al. Molecular mechanisms of curcumin renoprotection in experimental acute renal injury [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 912.
- [9] 宋娟,孙燕妮,秦熠,等.侧脑室注入网膜素对小鼠摄食量及其下丘脑组织 NPY、AGRP、CRH、POMC mRNA 表达的影响 [J]. *山东医药*, 2015, 55(31): 37-38.
Song J, Sun YN, Qin Y, et al. Effects of injecting retinal into lateral ventricle on the food intake of mice and the expression of NPY, AGRP, CRH and POMC mRNA in hypothalamus [J]. *Shandong Med*, 2015, 55(31): 37-38.
- [10] 黄统生,郭赞,杨陈,等.反复注射顺铂诱导小鼠慢性肾功能不全模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(1): 20-28.
Huang TS, Guo Y, Yang C, et al. Establishment of a model of chronic renal insufficiency induced by repeated injection of cisplatin in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(1): 20-28.
- [11] Sugiura H, Matsushita A, Futaya M, et al. Fibroblast growth factor 23 is upregulated in the kidney in a chronic kidney disease rat model [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0191706.
- [12] Zou H, Zhao X, Sun N, et al. Effect of chronic kidney disease on the healing of titanium implants [J]. *Bone*, 2013, 56(2): 410-415.
- [13] Wang XT, Sun XJ, Li C, et al. Establishing a cell-based high-content screening assay for TCM compounds with anti-renal fibrosis effects [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 7942614.
- [14] Ali BH, Al-Salam S, Al Suleimani Y, et al. Curcumin ameliorates kidney function and oxidative stress in experimental chronic kidney disease [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 122(1): 65-73.
- [15] Liu F, Lagares D, Choi KM, et al. Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(4): L344-57.
- [16] Mitani A, Nagase T, Fukuchi K, et al. Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(4): 326-338.
- [17] Zeng F, Miyazawa T, Kloepper LA, et al. Erbb4 deletion accelerates renal fibrosis following renal injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 314(5): F773-F787.
- [18] 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.