

# 益肾活血方通过 miR-126/VEGF-Notch 信号通路改善肾纤维化

钟建 赵宁博 刘朝业 胡军福 张威英 熊冲 陈虹彤 龚彩弟

530023 广西壮族自治区南宁,广西中医药大学第一附属医院肾病科

通讯作者:钟建,Email:zhongjian@medmail.com.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.10.018

**【摘要】目的** 探讨益肾活血方通过调控微小 RNA-126/血管内皮生长因子-Notch (miR-126/VEGF-Notch) 信号通路延缓肾纤维化发展的分子机制。**方法** 按照随机数字表法将 90 只雄性 SD 大鼠平均分为假手术 (Sham) 组、单侧输尿管结扎术 (UUO) 模型组、氯沙坦治疗组 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 以及高、中、低剂量益肾活血方治疗组 (25.2、12.6、6.3 mL/kg)。各治疗组于 UUO 制模结束当日开始灌胃给药,直至实验结束。术后 7、14、21 d 取大鼠左侧肾脏,用苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色于镜下观察肾组织病理学改变,并计算肾纤维化评分;用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测肾组织 miR-126、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2)、Notch1 的 mRNA 表达。**结果** ① 病理结果: Sham 组肾组织形态正常。UUO 模型组肾小管扩张,肾间质炎性细胞增多,术后 7 d 即可见肾小管间质纤维化,并随时间延长程度逐渐加重;术后各时间点肾纤维化评分较 Sham 组明显增高。各治疗组肾脏肿胀程度、肾实质萎缩等均较 UUO 模型组有所改善;中、高剂量益肾活血方组和氯沙坦组术后 7 d 肾纤维化评分即明显低于 UUO 模型组 (分:  $1.00 \pm 1.00$ 、 $0.91 \pm 0.58$ 、 $1.01 \pm 0.58$  比  $2.00 \pm 0.00$ , 均  $P < 0.01$ ), 而低剂量益肾活血方组肾纤维化评分与 UUO 模型组无明显差异。② RT-PCR 结果: UUO 模型组术后各时间点肾组织 miR-126、VEGFA、VEGFR-2 及 Notch1 的 mRNA 表达量均较 Sham 组明显升高。与 UUO 模型组比较,中、高剂量益肾活血方组和氯沙坦组术后 7 d 肾组织 miR-126、VEGFA、VEGFR-2 及 Notch1 的 mRNA 表达量即明显升高 [miR-126 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $0.465 \pm 0.067$ 、 $0.639 \pm 0.092$ 、 $0.404 \pm 0.069$  比  $0.132 \pm 0.021$ , VEGFA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $0.024 \pm 0.005$ 、 $0.027 \pm 0.007$ 、 $0.023 \pm 0.006$  比  $0.014 \pm 0.006$ , VEGFR-2 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $0.021 \pm 0.007$ 、 $0.023 \pm 0.008$ 、 $0.019 \pm 0.007$  比  $0.012 \pm 0.004$ , Notch1 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $0.017 \pm 0.004$ 、 $0.020 \pm 0.005$ 、 $0.018 \pm 0.005$  比  $0.007 \pm 0.004$ , 均  $P < 0.05$ ], 且中、高剂量益肾活血方组各指标基因表达量较氯沙坦组有一定上升趋势 (但  $P > 0.05$ ); 而低剂量益肾活血方组各指标基因表达量与 UUO 模型组比较差异无统计学意义。**结论** 中、高剂量益肾活血方可以有效拮抗肾纤维化,其机制可能是通过上调 miR-126/VEGF-Notch 信号通路,从而介导肾脏微血管新生,最终改善肾微血管损伤和延缓肾纤维化进程。

**【关键词】** 微小 RNA; 血管内皮生长因子; Notch 信号通路; 益肾活血方; 肾纤维化

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81360536); 广西自然科学基金 (2016GXNSFAA380047)

**Research on the intervention of Yishen Huoxue prescription to renal fibrosis through the signal regulation by microRNA-126 to VEGF-Notch** Zhong Jian, Zhao Ningbo, Liu Chaoye, Hu Junfu, Zhang Weiyong, Xiong Chong, Chen Hongtong, Gong Caidi

Department of Nephropathy, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi, China

Corresponding author: Zhong Jian, Email: zhongjian@medmail.com.cn

**【Abstract】Objective** To explore the molecular mechanism of Yishen Huoxue prescription in delaying the development of renal fibrosis by regulating the microRNA-126/vascular endothelial growth factor-Notch (miR-126/VEGF-Notch) signaling pathway. **Methods** Ninety male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation group (sham group), unilateral ureteral obstruction (UUO) model group, losartan group ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and high, medium and low doses Yishen Huoxue prescription group (25.2, 12.6, 6.3 mL/kg). Each treatment group began to administer drugs by gavage on the day when UUO modeling was finished until the end of the experiment. Left renal tissues of rats were harvested after 7, 14 and 21 days postoperatively. The pathological changes of renal tissue were observed after hematoxylin and eosin (HE) and Masson staining under the microscope, and the renal fibrosis score was calculated. The mRNA expressions of renal tissues miR-126, VEGFA, vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2), Notch1 were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** ① Pathology results: the kidney tissue of sham group was normal. In UUO model group, renal tubules expanded and inflammatory cells in renal interstitium increased; renal tubulointerstitial fibrosis could be seen 7 days after operation, and the degree of fibrosis was gradually increased with time. The renal fibrosis score at each time point after operation in UUO model group was significantly higher than that in sham group. Compared with UUO model group, each treatment group were improved the degree of renal swelling and atrophy of renal parenchyma; the score of renal fibrosis were

significantly decreased in the middle and high doses Yishen Huoxue prescription group and losartan group at the 7th day after operation ( $1.00 \pm 1.00, 0.91 \pm 0.58, 1.01 \pm 0.58$  vs.  $2.00 \pm 0.00$ , all  $P < 0.01$ ); but there was no significant difference between low dose Yishen Huoxue prescription group and UUO model group. ② RT-PCR results: Compared with sham group, the mRNA expressions of miR-126, VEGFA, VEGFR-2 and Notch1 in renal tissues were significantly increased at each time point after operation in UUO model group. Compared with the UUO model group, the mRNA expressions of miR-126, VEGFA, VEGFR-2 and Notch1 in renal tissue of 7 days postoperatively in the middle and high doses Yishen Huoxue prescription group and the losartan group were significantly increased [miR-126 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $0.465 \pm 0.067, 0.639 \pm 0.092, 0.404 \pm 0.069$  vs.  $0.132 \pm 0.021$ ; VEGFA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $0.024 \pm 0.005, 0.027 \pm 0.007, 0.023 \pm 0.006$  vs.  $0.014 \pm 0.006$ ; VEGFR-2 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $0.021 \pm 0.007, 0.023 \pm 0.008, 0.019 \pm 0.007$  vs.  $0.012 \pm 0.004$ ; Notch1 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $0.017 \pm 0.004, 0.020 \pm 0.005, 0.018 \pm 0.005$  vs.  $0.007 \pm 0.004$ ; all  $P < 0.05$ ]; compared with the losartan group, the mRNA expressions of each index in the middle and high doses Yishen Huoxue prescription group were increased at all the time points, but there was no significant difference between them (all  $P > 0.05$ ). There was no significant difference in mRNA expression of each index between low dose Yishen Huoxue prescription group and UUO model group. **Conclusions** The medium and high doses of Yishen Huoxue prescription can effectively antagonize renal fibrosis. Yishen Huoxue prescription may use up-regulation the signaling pathways of miR-126/VEGF-Notch to mediate renal microvascular newly born, eventually to improve renal microvascular damage and delay the development of renal fibrosis progression.

**【Key words】** MicroRNA; Vascular endothelial growth factor; Notch signaling pathway; Yishen Huoxue prescription; Renal fibrosis

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81360536); Guangxi Natural Science Foundation of China (2016GXNSFAA380047)

肾脏纤维化(RIF)是所有慢性肾脏疾病(CKD)进展到终末期肾病(ESRD)的最终途径,其关键的病理改变为正常肾小球和肾小管丧失、肾小球硬化、肾小管间质纤维化,最后致使肾功能进行性下降。近年来,缺血缺氧导致的肾小管周毛细血管(PTC)损伤在肾间质纤维化中的作用已引起普遍重视。如何有效减轻PTC损伤以及促进其修复,进而延缓甚至逆转CKD的进展已成为当今肾脏学界的一大难题。本课题组前期研究证实,单侧输尿管结扎术(UUO)模型大鼠肾小管周毛细血管密度(MVD)的下降程度随时间推移逐渐加重,中药益肾活血方通过促血管新生可以显著改善UUO大鼠肾功能,延缓RIF的进展<sup>[1]</sup>。

目前有关肾间质微血管损伤及其与RIF之间的具体分子调控机制尚未完全阐明,已有研究表明,微小RNA-126(miR-126)可以通过下调血管内皮生长因子(VEGF)的靶基因SPRED1/PIK3R2表达,进而激活VEGF-Notch信号通路,从而介导肾脏微血管新生<sup>[2]</sup>。因此,本实验以左侧输尿管结扎大鼠为研究对象,通过研究益肾活血方对miR-126/VEGF-Notch信号分子表达的影响,进而探讨益肾活血方对肾纤维化微血管再生的干预机制,为肾纤维化的“微观辨证”及中医药治疗带来新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及药物:** SFP级雄性SD大鼠90只,体重180~200g,购自广西医科大学实验中心,动物许可证号:SYXK(桂)2014-0003。氯沙坦〔商品名

科素亚,血管紧张素II(Ang II)受体拮抗剂,默沙东制药有限公司生产,国药准字:J20170054,每片50mg〕。益肾活血方组方为黄芪、当归、川芎、丹参、大黄、田七,由本院药剂科提供,先将药材与自来水以1:5的比例浸泡2h,煮沸后微火煎煮30min,过滤后收集煎液,将原药渣加少量水煎煮,得二煎液;两煎液混合,于水浴恒温器上浓缩至每毫升药液含生药1g。

**1.2 实验分组:**按随机数字表法将大鼠分为假手术(Sham)组、UUO模型组、氯沙坦治疗组及高、中、低剂量益肾活血方治疗组。

**1.3 RIF动物模型制备:**采用UUO制备大鼠RIF模型。腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠,仰卧位固定,自左侧旁正中切口逐层开腹,钝性分离皮下组织及肌层,暴露左侧肾脏,分离并结扎左侧输尿管,使左肾完全梗阻。观察30~50s无继续出血后,将组织小心还纳腹腔,逐层缝合肌层及皮肤,局部消毒。Sham组只分离输尿管,不结扎及离断输尿管,其余操作同模型组。术后大鼠分笼饲养,次日正常投喂水和饲料。

**1.4 给药方法:**高、中、低剂量益肾活血方组于制模结束当日开始,每日晨间分别灌胃25.2、12.6、6.3mL/kg的益肾活血方(所需中药剂量根据人与大鼠等效剂量换算公式计算,分别为临床剂量等效量的2、1、0.5倍),每日1次。氯沙坦组灌胃氯沙坦(12.5g/L)50mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,每日1次。模型组和Sham组给予等体积生理盐水,每日2次。各组均连

续给药至大鼠处死当日。

**1.5 伦理学:** 本实验取得广西中医药大学医学与实验动物伦理委员会的同意, 实验过程中动物处置方法符合动物伦理学标准(审批号: ECAER2014-07)。

### 1.6 检测指标及方法

**1.6.1 肾组织病理学观察:** 分别于术后 7、14、21 d 取大鼠左侧肾组织, 用 4% 多聚甲醛溶液固定, 洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片, 分别行苏木素-伊红(HE)染色和 Masson 染色, 于光镜下观察肾组织病理学改变, 并参照 Banff 07 肾间质纤维化分级标准, 进行肾纤维化评分。

**1.6.2 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肾组织 miR-126、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、血管内皮生长因子受体 2(VEGFR-2)、Notch1 的 mRNA 表达:** 提取左侧肾组织总 RNA, 检测 RNA 纯度, 去除基因组 DNA 反应, 进行反转录反应; 应用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂(日本 TAKARA 公司产品)进行实时 PCR 反应。各引物序列由大连宝生物工程有限公司合成, 反应结束后确认实时 PCR 的扩增曲线和融解曲线, PCR 定量时绘制标准曲线。以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的相对表达量。

**1.7 统计学处理:** 使用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析。先分析计量资料是否符合正态分布及方差齐性, 符合正态分布且方差齐性的数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组独立样本比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验; 不符合正态分布或方差不齐时采用非参数检验。  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠肾组织病理学改变:** Sham 组左侧肾脏组织形态正常, 呈暗红色, 表面光滑弹性好。UUO 模型组左侧肾脏组织呈囊性扩张, 颜色为略带白色的暗红色, 切开左肾后有暗黑色血块流出; HE 染色和 Masson 染色可见肾小管扩张, 肾间质炎性细胞增多; 术后 7 d 以肾小管扩张为主, 细胞增殖和凋亡并存, 部分肾小管基底膜呈不规则改变、完整性缺失, 肾间质有较多单核细胞浸润和成纤维细胞聚集, 表现为肾小管间质纤维化; 术后 14 d 出现肾盂积水, 肾皮质萎缩变薄, 肾小管结构不同程度破损, 管腔塌陷, 有较多上皮细胞死亡, 肾间质呈现纤维化; 至术后 21 d 肾间质纤维化程度逐渐加重。益肾活血方组和氯沙坦组各时间点肾脏肿胀程度、肾实质萎缩

等情况均较 UUO 模型组有所改善。

**2.2 各组大鼠肾纤维化评分变化比较(表 1):** 术后各组大鼠肾纤维化评分均逐渐升高。与 Sham 组比较, UUO 模型组各时间点肾纤维化评分明显增高(均  $P < 0.01$ )。与 UUO 模型组比较, 中、高剂量益肾活血方组和氯沙坦组各时间点肾纤维化评分均明显降低(均  $P < 0.01$ ); 而低剂量益肾活血方组各时间点肾纤维化评分虽有下降, 但差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

表 1 各组大鼠肾纤维化评分比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	肾纤维化评分(分)		
		术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
Sham 组	5	0.00 $\pm$ 0.00	0.76 $\pm$ 0.55	1.00 $\pm$ 1.00
UUO 模型组	5	2.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.01 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	3.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
氯沙坦组	5	1.01 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	1.55 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	2.33 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>
低剂量益肾活血方组	5	1.93 $\pm$ 0.58 <sup>c</sup>	2.66 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>	3.00 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>
中剂量益肾活血方组	5	1.00 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>	1.43 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	2.20 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
高剂量益肾活血方组	5	0.91 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	1.30 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	2.11 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>

注: 与假手术(Sham)组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与单侧输尿管结扎术(UUO)致肾纤维化模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与氯沙坦组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$

**2.3 各组大鼠 miR-126、VEGF、Notch1 基因表达量的变化比较(表 2~5):** 与 Sham 组比较, UUO 模型组各时间点 miR-126、VEGFA、VEGFR-2 及 Notch1 的基因表达量均明显上升(均  $P < 0.05$ )。与 UUO 模型组比较, 中、高剂量益肾活血方组及氯沙坦组各时间点 miR-126、VEGFA、VEGFR-2 及 Notch1 的基因表达量均明显上调(均  $P < 0.05$ ); 而低剂量益肾活血方组术后 21 d miR-126、VEGFA 基因表达量及各时间点 VEGFR-2、Notch1 的基因表达量均有下降趋势, 但差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。与氯沙坦组比较, 中、高剂量益肾活血方组各时间点 miR-126、VEGFA、VEGFR-2 及 Notch1 的基因表达量均有上升趋势, 但差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

表 2 各组大鼠肾组织微小 RNA-126(miR-126)表达变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	miR-126( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )		
		术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
Sham 组	5	0.108 $\pm$ 0.042	0.101 $\pm$ 0.035	0.107 $\pm$ 0.083
UUO 模型组	5	0.132 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>	0.159 $\pm$ 0.073 <sup>a</sup>	0.122 $\pm$ 0.040 <sup>a</sup>
氯沙坦组	5	0.404 $\pm$ 0.069 <sup>b</sup>	0.220 $\pm$ 0.087 <sup>be</sup>	0.158 $\pm$ 0.128 <sup>bef</sup>
低剂量益肾活血方组	5	0.160 $\pm$ 0.062 <sup>d</sup>	0.115 $\pm$ 0.014 <sup>d</sup>	0.091 $\pm$ 0.063 <sup>d</sup>
中剂量益肾活血方组	5	0.465 $\pm$ 0.067 <sup>e</sup>	0.231 $\pm$ 0.084 <sup>ee</sup>	0.200 $\pm$ 0.084 <sup>ef</sup>
高剂量益肾活血方组	5	0.639 $\pm$ 0.092 <sup>e</sup>	0.240 $\pm$ 0.090 <sup>ee</sup>	0.228 $\pm$ 0.080 <sup>ef</sup>

注: 与假手术(Sham)组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与单侧输尿管结扎术(UUO)致肾纤维化模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与氯沙坦组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与本组 7 d 比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ ; 与本组 14 d 比较, <sup>f</sup> $P < 0.05$

**表3 各组大鼠肾组织血管内皮生长因子 A (VEGFA) mRNA 表达变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数 (只)	VEGFA mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )		
		术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
Sham 组	5	0.012±0.002	0.011±0.001	0.009±0.003
UUO 模型组	5	0.014±0.006 <sup>a</sup>	0.012±0.001 <sup>a</sup>	0.010±0.008 <sup>a</sup>
氯沙坦组	5	0.023±0.006 <sup>b</sup>	0.017±0.010 <sup>be</sup>	0.013±0.005 <sup>bef</sup>
低剂量益肾活血方组	5	0.013±0.006 <sup>d</sup>	0.013±0.008 <sup>d</sup>	0.007±0.002 <sup>d</sup>
中剂量益肾活血方组	5	0.024±0.005 <sup>c</sup>	0.017±0.005 <sup>ce</sup>	0.015±0.005 <sup>cef</sup>
高剂量益肾活血方组	5	0.027±0.007 <sup>c</sup>	0.018±0.006 <sup>ce</sup>	0.016±0.002 <sup>cef</sup>

注：与假手术 (Sham) 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与单侧输尿管结扎术 (UUO) 致肾纤维化模型组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，<sup>c</sup> $P < 0.01$ ；与氯沙坦组比较，<sup>d</sup> $P < 0.01$ ；与本组 7 d 比较，<sup>e</sup> $P < 0.05$ ；与本组 14 d 比较，<sup>f</sup> $P < 0.05$

**表4 各组大鼠肾组织血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2) mRNA 表达变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数 (只)	VEGFR-2 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )		
		术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
Sham 组	5	0.009±0.006	0.008±0.005	0.006±0.009
UUO 模型组	5	0.012±0.004 <sup>a</sup>	0.009±0.005 <sup>a</sup>	0.007±0.003 <sup>a</sup>
氯沙坦组	5	0.019±0.007 <sup>b</sup>	0.017±0.005 <sup>be</sup>	0.013±0.006 <sup>bef</sup>
低剂量益肾活血方组	5	0.007±0.003 <sup>d</sup>	0.006±0.003 <sup>d</sup>	0.004±0.000 <sup>d</sup>
中剂量益肾活血方组	5	0.021±0.007 <sup>c</sup>	0.016±0.009 <sup>ce</sup>	0.012±0.005 <sup>cef</sup>
高剂量益肾活血方组	5	0.023±0.008 <sup>c</sup>	0.018±0.004 <sup>ce</sup>	0.017±0.002 <sup>cef</sup>

注：与假手术 (Sham) 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与单侧输尿管结扎术 (UUO) 致肾纤维化模型组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，<sup>c</sup> $P < 0.01$ ；与氯沙坦组比较，<sup>d</sup> $P < 0.05$ ；与本组 7 d 比较，<sup>e</sup> $P < 0.05$ ；与本组 14 d 比较，<sup>f</sup> $P < 0.05$

**表5 各组大鼠 Notch1 mRNA 表达变化比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数 (只)	Notch1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )		
		术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
Sham 组	5	0.005±0.002	0.004±0.001	0.004±0.001
UUO 模型组	5	0.007±0.004 <sup>a</sup>	0.006±0.004 <sup>a</sup>	0.006±0.002 <sup>a</sup>
氯沙坦组	5	0.018±0.005 <sup>b</sup>	0.014±0.005 <sup>be</sup>	0.011±0.005 <sup>bef</sup>
低剂量益肾活血方组	5	0.004±0.000 <sup>d</sup>	0.004±0.000 <sup>d</sup>	0.005±0.001 <sup>d</sup>
中剂量益肾活血方组	5	0.017±0.004 <sup>c</sup>	0.015±0.001 <sup>ce</sup>	0.012±0.005 <sup>cef</sup>
高剂量益肾活血方组	5	0.020±0.005 <sup>c</sup>	0.018±0.006 <sup>ce</sup>	0.015±0.002 <sup>cef</sup>

注：与假手术 (Sham) 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与单侧输尿管结扎术 (UUO) 致肾纤维化模型组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，<sup>c</sup> $P < 0.01$ ；与氯沙坦组比较，<sup>d</sup> $P < 0.05$ ；与本组 7 d 比较，<sup>e</sup> $P < 0.05$ ；与本组 14 d 比较，<sup>f</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

**3.1 氯沙坦的作用机制：**氯沙坦属于 Ang II 受体拮抗剂，其降压作用主要依赖于阻断组织的 Ang II 受体亚型 AT1，可以有效地阻断 Ang II 的水钠潴留、血管收缩与重构作用。有研究者发现，氯沙坦对肾脏血管内皮有保护作用，可以延缓肾病的发展<sup>[3]</sup>。实验研究证明，氯沙坦能够通过调节 Ang II 形成及其受体水平，阻止 Ang II 收缩血管功能的发挥，对肾微血管损伤具有一定的保护作用<sup>[4]</sup>。在糖尿病大鼠模型中，有学者发现氯沙坦能够反馈性的抑制肾脏单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 的表达，减少肾小管间质炎性细胞

的生成，起到保护肾微血管的作用<sup>[5]</sup>。

**3.2 益肾活血方对 RIF 大鼠的肾脏保护作用：**中医古籍对 RIF 并无相应的病名诊断，根据主要症状、体征将其归属于“癃闭”“肾风”“溺毒”等病证范畴，且本病主要病机为脾肾亏虚、毒瘀互结，针对这一机制，由黄芪、当归、川芎、丹参、大黄、田七等 6 味具有补益、化瘀、排浊功效的中药组成益肾活血方。方中重用黄芪，补益元气，使气旺则血行，瘀去络通，为君药；当归活血通络而不伤血，为活血化瘀要药，为臣药；辅以川芎、丹参、田七以活血通络，既增化瘀通络之功，又借气行血行之力，使行血破滞之功能倍增；大黄入手阳明大肠经，为荡涤之品，佐以此药以助浊毒排出，与黄芪、当归、川芎、丹参、田七合用，则气旺、瘀消、络通、浊排，诸症向愈。

本课题组前期实验证实：益肾活血方不仅能显著减少 UUO 模型大鼠术侧肾脏的炎性细胞浸润，改善肾功能，还能降低肾脏早期致纤维化标志物，如细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 的蛋白表达，并能改善 MVD，且效果明显优于氯沙坦组，提示益肾活血方极有可能通过促血管新生发挥早期抗 RIF 的作用<sup>[1]</sup>。本实验中通过肾组织病理学观察及肾纤维化评分证实，高、中剂量益肾活血方组肾纤维化程度明显轻于 UUO 模型组，说明益肾活血方对 UUO 大鼠肾脏病理损伤有一定的修复功能。

### 3.3 目的基因表达水平分析

**3.3.1 miR-126、VEGFA、VEGFR-2；miR-126 在血管新生中属于促血管生成的一种分子信号，是内皮细胞特异性表达的 miRNA，无论是在对斑马鱼亦或是大鼠的实验研究中，将 miR-126 敲除后，二者的血管完整性均遭到破坏，导致血管生成存在一定的缺陷性<sup>[6-7]</sup>，提示 miR-126 在血管新生中发挥着重要的作用。国内有学者分别于脑缺血 / 再灌注损伤和肾缺血动物模型中对 miR-126 在血管新生中的作用机制进行了研究，结果均显示，miR-126 表达量显著升高，证实了 miR-126 在血管新生中所具有的重要作用<sup>[8-9]</sup>。**

VEGFA、VEGFR-2 是 VEGF 在血管内皮细胞中表达的两个受体，主要在肾小管周毛细血管中表达，对肾脏微血管新生具有重要作用。有研究证实，在肾缺血血管新生机制中，miR-126 能够激活 VEGF 信号通路促进血管形成<sup>[10]</sup>。本课题组前期研究也证实，VEGF-Notch 信号通路在 RIF 血管的损伤和

修复中起重要调控作用<sup>[11]</sup>。

**3.3.2 Notch1、VEGFA、VEGFR-2:**Notch1作为Notch基因的受体之一,是VEGF-Notch信号通路的下游因子,在肾脏发育过程中具有高度的活跃性,对肾脏微血管新生具有重要的作用。有研究表明,在动脉内皮细胞中Notch1及其配体Dll4的表达通过VEGF诱导而进行<sup>[12-13]</sup>;还有研究显示,在小鼠血管内皮细胞中,由于VEGF信号途径被阻断导致Notch1配体Dll4表达相应减少,对血管生成有一定的阻碍作用<sup>[14]</sup>。据此可以推测,Notch1在血管新生中主要依赖VEGF信号分子的调节而发挥作用,这一效应主要由VEGFA和VEGFR-2来介导。

本研究结果显示,与UO模型组比较,中、高剂量益肾活血方组和氯沙坦组各时间点miR-126、VEGFA、VEGFR-2表达量均明显上调;且益肾活血方组各指标表达量较氯沙坦组有上升趋势,而低剂量益肾活血方组却明显下降。中、高剂量益肾活血方组和氯沙坦组miR-126、VEGFA、VEGFR-2表达量均于术后7d达到高峰,但随着时间推移,14d内迅速下降,21d降至最低。我们推测可能与RIF过程中出现VEGF的足细胞数目及功能减退有关。随着肾微血管损伤的逐渐加重,足细胞数目及功能相应的减少和减退,在初期采用益肾活血方进行干预时,可促进VEGF基因表达上调,对肾微血管损伤起到保护甚至逆转的效果,至中、后期其表达量显著下降,在血管损伤修复方面的功能渐渐消失。在UO模型中,miR-126、VEGFA、VEGFR-2可能均参与了早期肾脏微血管生成的过程,而益肾活血方通过促使miR-126、VEGFA、VEGFR-2基因的表达上升,从而介导肾微血管新生,对肾脏损伤的早期有一定的保护作用,进而延缓RIF的进程。

本研究显示,中、高剂量益肾活血方组和氯沙坦组各时间点Notch1表达量均较UO模型组明显上调,且在术后7d达到高峰,14d迅速下降,21d降至最低,与VEGFA、VEGFR-2的表达一致,这一结果与Notch1在血管新生中主要依赖VEGF调节(主要由VEGFA和VEGFR-2介导)的机制吻合。

综上所述,本研究表明,miR-126、VEGFA、VEGFR-2可能均参与了早期肾脏微血管生成的过程,而益肾活血方通过促使miR-126、VEGFA、VEGFR-2基因表达上调,从而介导肾微血管新生,进而延缓RIF进程。至于二者是以怎样的形式发生调控作用,尚需进一步的实验研究证实。

## 参考文献

- [1] 钟建,黎凤仪.益肾活血方对UO大鼠肾脏HIF-1 $\alpha$ 、PDGF-BB、ICAM-1及VCAM-1表达的影响[J].山东中医药大学学报,2014,38(1):52-55. DOI: 10.16294/j.cnki.1007-659x.2014.01.025.  
Zhong J, Li FY. Effects of Yishen Huoxue formula on expression of HIF-1 $\alpha$ , PDGF-BB, ICAM-1 and VCAM-1 in kidney of UO rats [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2014, 38 (1): 52-55. DOI: 10.16294/j.cnki.1007-659x.2014.01.025.
- [2] Du R, Sun W, Xia L, et al. Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-34a promotes EMT by targeting the Notch signaling pathway in tubular epithelial cells [J]. PLoS One, 2012, 7 (2): e30771. DOI: 10.1371/journal.pone.0030771.
- [3] 王琰,余毅,周丽娜.氯沙坦对残肾大鼠肾小球毛细血管内皮细胞的保护作用[J].中华高血压杂志,2012,20(7):654-658. DOI: 10.16439/j.cnki.1673-7245.2012.07.038.  
Wang Y, Yu Y, Zhou LN. Effects of losartan on glomerular microvascular endothelium injury in the remnant kidney model [J]. Chin J Hypertension, 2012, 20 (7): 654-658. DOI: 10.16439/j.cnki.1673-7245.2012.07.038.
- [4] 焦素敏,傅淑霞,温丽颖,等.氯沙坦对血管紧张素II诱导人肾小球系膜细胞衰老作用机制的研究[J].解放军医药杂志,2018,30(4):1-4.  
Jiao SM, Fu SX, Wen LY, et al. Action mechanism of losartan on human mesangial cell senescence induced by angiotensin II [J]. Med Pharm J Chin PLA, 2018, 30 (4): 1-4.
- [5] 刘萍,杨霞,白彬,等.氯沙坦对STZ诱导糖尿病大鼠肾小管间质纤维化的保护作用[J].宁夏医科大学学报,2014,36(12):1336-1340,封3. DOI: 10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2014.12.011.  
Liu P, Yang X, Bai B, et al. The protection of losartan on the tubulointerstitial fibrosis in the STZ induced diabetic rats [J]. J Ningxia Med Univ, 2014, 36 (12): 1336-1340, inside back cover. DOI: 10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2014.12.011.
- [6] Sessa R, Seano G, di Blasio L, et al. The miR-126 regulates angiopoietin-1 signaling and vessel maturation by targeting p85 $\beta$  [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823 (10): 1925-1935. DOI: 10.1016/j.bbamer.2012.07.011.
- [7] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease [J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 97: 47-55. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.05.007.
- [8] 刘芬.缺氧诱导miRNA调控肾缺血后血管新生的分子机制[D].南昌:南昌大学,2011.  
Liu F. Molecular mechanism of hypoxia-induced miRNA regulating angiogenesis after renal ischemia [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011.
- [9] 徐虹,张亚敏,孙华,等.针刺对缺血大鼠外周血miRNA-126和VEGF表达的干预作用[J].针灸临床杂志,2016,32(10):80-84,封3.  
Xu H, Zhang YM, Sun H, et al. Effect of acupuncture on peripheral serum expression of miRNA-126 and vascular endothelial growth factor in rats with cerebral ischemia [J]. JCAM, 2016, 32 (10): 80-84, inside back cover.
- [10] Zhao F, Anderson C, Karnes S, et al. Expression, regulation and function of miR-126 in the mouse choroid vasculature [J]. Exp Eye Res, 2018, 170: 169-176. DOI: 10.1016/j.exer.2018.02.026.
- [11] 钟建,赵宁博,刘朝业.基于肾络瘀阻研究益肾活血方对单侧输尿管结扎大鼠肾脏血管内皮生长因子和Notch信号通路的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2015,22(6):577-581. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.06.006.  
Zhong J, Zhao NB, Liu CY. Based on kidney vascular and network static blood obstruction to study influence of prescription for boosting kidney and promoting blood circulation (Yishen Huoxue) on kidney vascular endothelial growth factor and Notch signal pathway in rats with unilateral ureter ligation [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (6): 577-581. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.06.006.
- [12] Quillien A, Moore JC, Shin M, et al. Distinct Notch signaling outputs pattern the developing arterial system [J]. Development, 2014, 141 (7): 1544-1552. DOI: 10.1254/dev.099986.
- [13] Tang Q, Jin H, Tong M, et al. Inhibition of Dll4/Notch1 pathway promotes angiogenesis of Masquelet's induced membrane in rats [J]. Exp Mol Med, 2018, 50 (4): 41. DOI: 10.1038/s12276-018-0062-9.
- [14] Niderla-Bielińska J, Bartkowiak K, Ciszek B, et al. Pentoxifylline inhibits angiogenesis via decreasing Dll4 and Notch1 expression in mouse proepicardial explant cultures [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 827: 80-87. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.03.015.

(收稿日期:2018-07-16)