

## 益肾活血方对肾纤维化小鼠血管内皮结构及功能的影响

钟建<sup>1\*</sup>, 罗芳<sup>2</sup>, 方桂玉<sup>2</sup>, 卢登勇<sup>2</sup>, 石晓冬<sup>2</sup>, 吴慧敏<sup>2</sup>, 翁雪莹<sup>2</sup>, 陈宇珊<sup>2</sup>, 左金中<sup>2</sup>

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 2. 广西中医药大学研究生学院, 南宁 530001)

**[摘要]** 目的:从内皮细胞及细胞能量代谢角度,探讨益肾活血方对肾间质纤维化(RIF)的作用机制。方法:采用单侧输尿管梗阻(UUO)方法造模成功后将75只SPF级C57BL/6小鼠随机分为模型组、白藜芦醇组(50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、益肾活血方低、中、高剂量组(7.1、14.2、28.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),每组15只。另设15只作为假手术组。假手术组及模型组予等体积生理盐水灌胃。所有小鼠于造模术后第7、14、21天(d7、d14、d21)处死并取材,采用免疫组织化学S-P法检测血小板内皮细胞黏附分子31(CD31)蛋白表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肾组织α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、IV型胶原蛋白(Col-IV)、促血管生成素-1(Ang-1)/酪氨酸激酶受体-2(Tie-2)、血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)、闭合蛋白(Occludin)蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肾组织Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin mRNA表达,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠活性氧(ROS)水平。结果:与假手术组比较,模型组肾组织中CD31表达明显减少且随造模时间延长而加重(P<0.05),α-SAM、Col-IV蛋白表达水平显著升高(P<0.01);但d14~d21间CD31表达趋于平稳;ROS水平显著升高(P<0.01);Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin蛋白表达及mRNA表达显著下调(P<0.01)。与模型组比较,白藜芦醇组、益肾活血方中、高剂量组治疗后CD31表达量明显增加(P<0.05),α-SAM、Col-IV显著下降(P<0.01),ROS含量显著减少(P<0.01),Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin的蛋白表达及mRNA表达量均显著上调(P<0.01)。与白藜芦醇组比较,益肾活血方低剂量组与益肾活血方中剂量组Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin蛋白表达具有显著差异(P<0.01),益肾活血方高剂量组CD31、Ang-1/Tie-2 mRNA表达量差异无统计学意义,益肾活血方中剂量组ROS水平差异无统计学意义。结论:益肾活血方抗RIF作用可能与促进血管内皮修复、调控线粒体ROS减轻氧化应激,保护肾脏内皮结构完整性,延缓细胞凋亡,维持细胞能量代谢有关。

**[关键词]** 益肾活血方; 单侧输尿管梗阻(UUO)小鼠; 肾间质纤维化; 内皮细胞

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0070-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220901

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220302.1514.005.html>

**[网络出版日期]** 2022-03-05 8:47

### Effect of Yishen Huoxue Prescription on Endothelial Structure and Function in Mice with Renal Interstitial Fibrosis

ZHONG Jian<sup>1\*</sup>, LUO Fang<sup>2</sup>, FANG Guiyu<sup>2</sup>, LU Dengyong<sup>2</sup>, SHI Xiaodong<sup>2</sup>, WU Huimin<sup>2</sup>,

WENG Xueying<sup>2</sup>, CHEN Yushan<sup>2</sup>, ZUO Jinjin<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China;

2. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Yishen Huoxue prescription in renal interstitial fibrosis (RIF) from the perspective of endothelial cell and cell energy metabolism. **Method:** The model was successfully established by unilateral ureteral obstruction (UUO). Seventy-five SPF C57BL/6 mice were randomly divided into a model group, a resveratrol group (50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), three Yishen Huoxue prescription low, medium, and high-dose groups (7.1, 14.2, 28.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), with 15 mice in each group. In addition,

**[收稿日期]** 2021-11-21

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81760807,82060820)

**[通信作者]** \*钟建,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事中西医结合防治慢性肾脏病研究,E-mail:zhongjian@medmail.com.cn

another 15 mice were used to prepare sham operation model. Mice in the sham operation group and the model group were gavaged with equal volume of normal saline. All mice were sacrificed on 7, 14, and 21 d after modeling. The protein expression of platelet endothelial cell adhesion molecule 31 (CD31) was detected by immunohistochemical S-P method. The expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), collagen IV (Col-IV), angiopoietin 1 (Ang-1) and tyrosine kinase receptors 2 (Tie-2), vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), and occludin in renal tissues was detected by Western blotting. The mRNA expressions of Ang-1/Tie-2, VEGF, VE-cadherin, and occludin in renal tissues were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the levels of reactive oxygen species (ROS) in mice were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** As compared with the sham operation group, the expression of CD31 in renal tissues of the model group was significantly decreased and worsened with the extension of modeling time ( $P < 0.05$ ),  $\alpha$ -SMA and Col-IV protein expression levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ), but the expression of CD31 was stable in 14-21 d. ROS levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the protein and mRNA expressions of Ang-1/Tie-2, VEGF, VE-cadherin, and occludin were significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the expression of CD31 was increased ( $P < 0.05$ ), and  $\alpha$ -SMA and Col-IV in the resveratrol group and the medium and high-dose Yishen Huoxue prescription groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The ROS content was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the protein and mRNA expressions of Ang-1/Tie-2, VEGF, VE-cadherin, and occludin were up-regulated ( $P < 0.01$ ). As compared with the resveratrol group, the protein expressions of Ang-1/Tie-2, VEGF, VE-cadherin, and occludin in the medium and low-dose Yishen Huoxue prescription groups were significantly different ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in the mRNA expressions of CD31 and Ang-1/Tie-2 in the high-dose Yishen Huoxue prescription group, and no significant difference in the ROS level in the medium-dose Yishen Huoxue prescription group. **Conclusion:** The anti-RIF effect of Yishen Huoxue prescription may be related to promoting vascular endothelial repair, regulating mitochondrial ROS to reduce oxidative stress, protecting the integrity of renal endothelial structure, delaying cell apoptosis, and maintaining cell energy metabolism.

**[Keywords]** Yishen Huoxue prescription; unilateral ureteral obstruction (UUO) mice; renal interstitial fibrosis; endothelial cells

慢性肾脏疾病(CKD)是威胁人类生命健康的主要危险因素,全球CKD发病率在1992~2019年间增加了89%<sup>[1]</sup>。肾间质纤维化(RIF)是CKD进程中常见的一个特征,而肾小管周围毛细血管网损伤(PTC)在肾小管间质病变及纤维化中发挥重要作用,其中内皮细胞是肾脏PTC主要参与成分<sup>[2-3]</sup>。白藜芦醇作为一种天然的多酚化合物,具有抗氧化应激反应、减轻管状损伤、抑制线粒体活性氧(ROS)生成,调节细胞凋亡等作用<sup>[4-6]</sup>。

益肾活血方是根据中医络病学理论及长期临床经验形成的自拟方,其主要用于慢性肾衰竭发病过程中脾肾亏虚、毒瘀阻络病机的治疗。前期实验证实,单侧输尿管结扎(UUO)大鼠模型肾小管PTC密度稀疏程度随时间延长逐渐加重,且益肾活血方不仅能调控miR-126/血管内皮生长因子(VEGF)-Notch信号通路,而且可减少炎症因子的浸润,促进

肾脏微血管新生,改善PTC和延缓RIF的进程<sup>[7-9]</sup>。本研究采用白藜芦醇作为实验对照药物及UUO小鼠模型,观察益肾活血方对小鼠肾脏组织 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、IV型胶原(Col-IV)蛋白、血小板-内皮细胞黏附分子31(CD31)、促血管生成素-1(Ang-1)/酪氨酸激酶受体-2(Tie-2)、VEGF、血管内皮黏附蛋白(VE-cadherin)、闭合蛋白(Occludin)表达及血管内皮能量ROS水平的影响,以改善肾脏血管内皮功能、纠正肾脏内皮能量代谢为切入点,进一步探讨益肾活血方对UUO小鼠RIF的机制研究。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级的雄性C57BL/6小鼠90只,广西医科大学实验中心提供,动物合格证号SCXK(桂)2020-0003,体质量18~22 g,室内适应性喂养1周,保持温度湿度适宜,提供充足的饲料及饮水。本实验动物伦理批号DW20201011-125。

**1.2 药物** 益肾活血方:黄芪 15g、丹参 15g、红花 15g、当归 10g、大黄 10g、田七 6g,现使用单味中药浓缩颗粒由江阴天江药业有限公司生产,批号分别为 21082443、21071273、21101173、21071183、21092123、21102773;白藜芦醇(美国 Sigma 公司,批号 R5010)。

**1.3 试剂**  $\alpha$ -SMA 抗体、Col-IV 抗体、Ang-1 抗体、VEGF 抗体、VE-cadherin 抗体、Occludin 抗体、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体,兔二抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab245222、ab231957、ab183701、ab32152、ab205336、ab216327、ab8226、ab6721); Tie-2 抗体(美国 CST 公司,批号 4224S); EDTA 抗原修复液(50 $\times$ )、TriQuick Reagent 总 RNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 C1034、R1100); CD31 Ab 抗体(美国 Affinity Biosciences 公司,批号 AF5113); DAB 显色液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZLI-9018); 苏木素染液(南昌雨露实验器材有限公司,批号 191202); PrimeScript<sup>™</sup> RT Master Mix (Perfect Real Time)、TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNase H Plus)(日本 Takara 公司,批号分别为 RR036A、RR820A); 小鼠 ROS 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号 ml009876-1)。

**1.4 器材** 2235 型组织切片机、HI1210 型组织摊片机(上海徠卡仪器有限公司); P70D20N1P-G5 (W0)型微波炉(广东格兰仕微波生活电器制造有限公司); HWS-28 型金属恒温水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司); TD4 型普通离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); Mini Trans-Blot Cell 型蛋白转印模块(湿转)(美国 Bio-Rad 公司); AriaMx 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪器(美国 Agilen 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与造模** 随机原则将 SPF 级小鼠 90 只分为假手术组、模型组、白藜芦醇组、益肾活血方低、中、高剂量组,每组 15 只。参考文献行 UUO 小鼠造模<sup>[10]</sup>,于左肾下极及输尿管中上 1/3 处结扎,并在两道结扎点间剪断。假手术组同前方法,但不结扎及离断输尿管。小鼠分别在 UUO 术后第 7、14、21 天(d7、d14、d21)处死,收集梗阻侧肾脏组织,储存备用。

**2.2 实验给药** 使用前将益肾活血方免煎颗粒用蒸馏水充分溶解,稀释成每 1 mL 相当于原药材 1.18 g 的颗粒剂溶度。根据《实验动物学》小鼠与成人折算系数及临床剂量等效量的 0.5、1、2 倍换算,

益肾活血方低剂量组给药量为 7.1 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>、中剂量组为 14.2 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>、高剂量组为 28.4 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>,每日予以灌胃 1 次。白藜芦醇溶于 25% DMSO,给药剂量为 50 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d<sup>-1</sup>,每日予腹腔注射给药 1 次。假手术组及模型组予等体积生理盐水灌胃,每日 2 次。

## 2.3 检测方法

**2.3.1 免疫组化检测 CD31 蛋白表达** 取材,将组织脱水包埋、切片脱蜡,组织切片行抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,封闭,将一抗 CD31 Ab(1:50)滴在玻片表面覆盖组织,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)洗片。二抗(1:1 000)孵育,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗片。切片显色,苏木素复染细胞核及封片,使用 Image-Pro Plus 6.0 分析免疫组化图片。

**2.3.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测  $\alpha$ -SAM、Col-IV、Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin 蛋白表达** 将肾脏组织称取 20~40 mg,加入 RIPA-PMSF 200~400  $\mu$ L, 12 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 5 min(离心半径 7 cm,下同),取上清蛋白测定蛋白浓度后将浓度调齐,加入 5 $\times$ 蛋白上样 buffer,于 100 $^{\circ}$ C 中变性约 10 min,采用 BCA 法行样本蛋白含量测定,配制分离胶与浓缩胶,电泳后行转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入稀释的一抗  $\alpha$ -SAM(1:1 000)、Col-IV(0.2 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)、Ang-1(1:1 万)、Tie-2(1:1 000)、VEGF(1:1 000)、VE-cadherin(1:1 000)、Occludin(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 摇床过夜, TBST 洗涤 3 次加入二抗(1:8 000),37 $^{\circ}$ C 孵育, TBST 洗涤 3 次,电子显影后采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

**2.3.3 Real-time PCR 检测肾组织 Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin mRNA 表达** 采用 Solarbio 公司 TriQuick Reagent 行总 RNA 提取; RNA 浓度测定,行 RNA 逆转录反应得到 cDNA 模板,调整反应程序,实行引物扩增,95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,循环 40 次。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>方法计算。以  $\beta$ -actin 为内参,Real-time PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

**2.3.4 ELISA 检测小鼠 ROS 水平** 取肾组织,加入一定量的 PBS(pH7.4),将标本匀浆充分,(2 000~3 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>)离心 20 min,收集上清,标本用标本稀释液 1:1 稀释后加入 50  $\mu$ L 于反应孔内,加样后 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h,洗板每次 30 s,重复 3 次,加底物液显色,取出酶标板,迅速加入终止液 50  $\mu$ L,在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度 A。

表1 引物序列

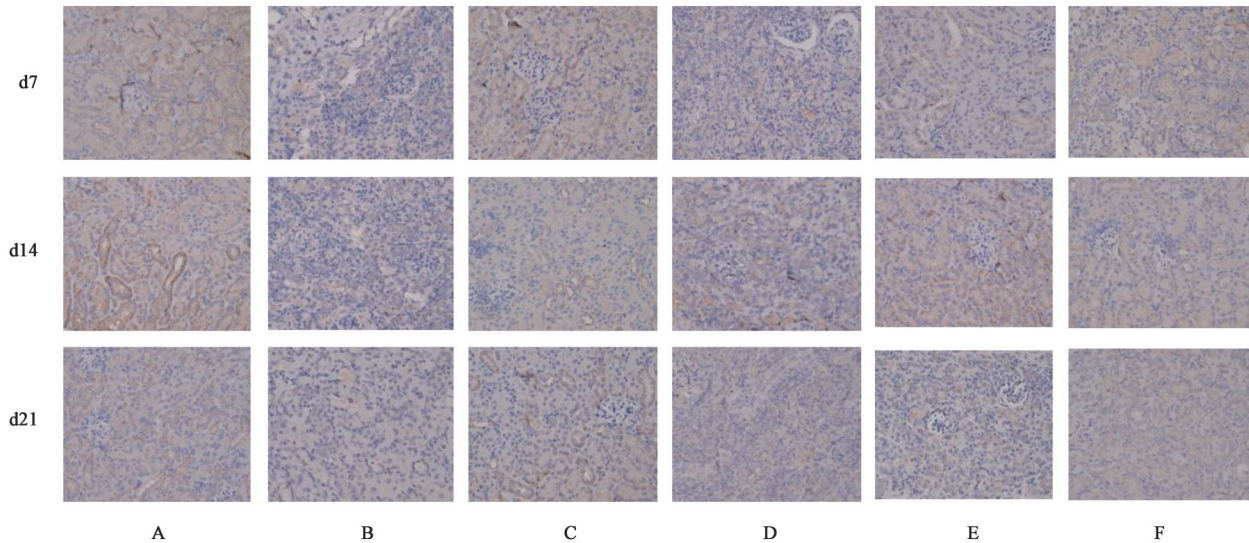
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Ang-1	上游 ACGCTGAACGGTTACACAGA	145
	下游 ACTAGCCATTTGTTAGCTTTGTTCT	
Tie-2	上游 GTAAGCTCAGGTGCCACTGT	106
	下游 GGCCTGCCTTCTTTCTCACA	
VEGF	上游 TTGCCTGGTCAAACAGCTCA	111
	下游 AGGAGTGTGCCAGCCTACTA	
VE-cadherin	上游 AATTTGCCCAGCCCTACGAA	96
	下游 CTGGCACCACATCCTTGCT	
Occludin	上游 CCTGGTGTGAGCTGTGATGT	105
	下游 GAGGGCTGTGCAAAGATTG	
$\beta$ -actin	上游 CAGCCTTCTTCTTGGGTAT	100
	下游 TGGCATAGAGGTCTTTACGG	

2.4 统计学方法 采用SPSS 25.0软件统计分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间两两比较用最小显著性差异法(LSD)检验, 多组间比较用单因素方差分析, 方差不齐使用Tamhane's  $T_2$ 检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 对UUO小鼠CD31蛋白表达的影响 CD31为血管内皮细胞的标志物, 免疫组化中表现为黄色或棕黄色。与假手术组比较, 模型组肾组织中CD31表达明显减少, 随造模时间延长而加重( $P<0.05$ ), 但CD31表达量从d14~d21期间略微下降; 与模型组比较, 经白藜芦醇及益肾活血方低、中、高剂量干预下, CD31表达量增加( $P<0.05$ ); 与白藜芦醇组比较, 益肾活血方高剂量组CD31表达差异无统计学意义。见图1和表2。



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 白藜芦醇组; D. 益肾活血方低剂量组; E. 益肾活血方中剂量组; F. 益肾活血方高剂量组(图2和图3同)  
图1 益肾活血方对UUO小鼠d7、d14、d21肾组织CD31蛋白表达的影响(免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Yishen Huoxue prescription on CD31 protein expression in d7, d14 and d21 renal tissues of UUO mice (IHC,  $\times 400$ )

表2 益肾活血方对UUO小鼠肾组织CD31蛋白表达平均积分吸光度的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2 Effect of Yishen Huoxue prescription on integral absorbance of CD31 protein expression in renal tissue of UUO mice ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	d7	d14	d21
假手术组		0.033 $\pm$ 0.008	0.031 $\pm$ 0.009	0.033 $\pm$ 0.008
模型组		0.004 $\pm$ 0.001 <sup>1)</sup>	0.002 $\pm$ 0.001 <sup>1)</sup>	0.002 $\pm$ 0.001 <sup>1)</sup>
白藜芦醇组	0.05	0.022 $\pm$ 0.008 <sup>3)</sup>	0.025 $\pm$ 0.009 <sup>3)</sup>	0.023 $\pm$ 0.004 <sup>3)</sup>
益肾活血方低剂量组	7.1	0.005 $\pm$ 0.001 <sup>3,5)</sup>	0.009 $\pm$ 0.003 <sup>3,5)</sup>	0.009 $\pm$ 0.001 <sup>3,5)</sup>
益肾活血方中剂量组	14.2	0.009 $\pm$ 0.002 <sup>3,5)</sup>	0.017 $\pm$ 0.005 <sup>3)</sup>	0.016 $\pm$ 0.005 <sup>3)</sup>
益肾活血方高剂量组	28.4	0.022 $\pm$ 0.005 <sup>3)</sup>	0.022 $\pm$ 0.004 <sup>3)</sup>	0.020 $\pm$ 0.004 <sup>3)</sup>

注: 与假手术组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ ; 与白藜芦醇组比较<sup>5)</sup> $P<0.05$ , <sup>6)</sup> $P<0.01$ (表3-表6同)

3.2 对UUO小鼠纤维化指标 $\alpha$ -SAM、Col-IV的影响 假手术组在不同时期的 $\alpha$ -SAM、Col-IV蛋白表达水平差异无统计学意义; 与假手术组比较, 模型

组 $\alpha$ -SAM、Col-IV蛋白表达水平均显著上升, 且模型组 $\alpha$ -SAM在d7、d14、d21蛋白表达水平逐渐升高( $P<0.01$ ), 说明造模后肾纤维化指标蛋白表达显著

增加,可提示模型组造模成功;与模型组比较,白藜芦醇组、益肾活血方中、高剂量组 $\alpha$ -SMA、Col-IV显著下降( $P<0.01$ );与白藜芦醇组比较,益肾活血方高剂量组d14、d21 $\alpha$ -SMA、Col-IV蛋白表达水平差异无统计学意义,可见白藜芦醇组与益肾活血方高剂量组均有延缓肾间质纤维化的功效。见图2和表3。

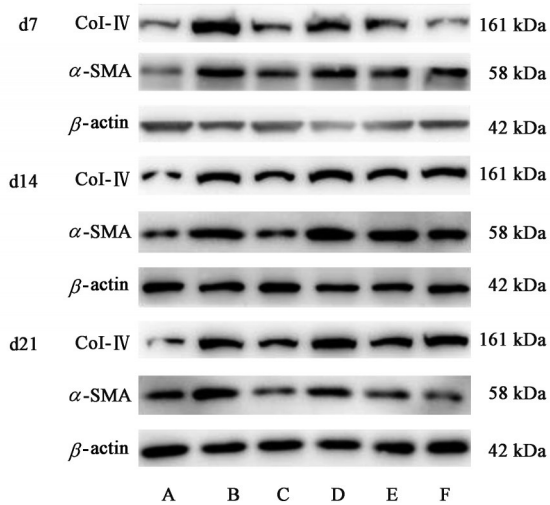


图2 各组小鼠d7、d14、d21肾组织 $\alpha$ -SMA、Col-IV蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of  $\alpha$ -SMA and Col-IV protein expression in d7, d14 and d21 renal tissues of each group mice

### 3.3 对UUO小鼠血管内皮能量ROS水平的影响

假手术组小鼠肾脏血管内皮可见少量ROS含量。UUO小鼠造模后可发现ROS水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,经白藜芦醇组、益肾活血方

表4 益肾活血方对UUO小鼠肾组织ROS水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	d7	d14	d21
假手术组		28.18 $\pm$ 2.94	25.86 $\pm$ 10.21	36.25 $\pm$ 1.56
模型组		143.18 $\pm$ 8.64 <sup>2)</sup>	132.27 $\pm$ 3.16 <sup>2)</sup>	148.98 $\pm$ 3.27 <sup>2)</sup>
白藜芦醇组	0.05	57.18 $\pm$ 4.00 <sup>4)</sup>	49.22 $\pm$ 2.55 <sup>4)</sup>	66.98 $\pm$ 4.13 <sup>4)</sup>
益肾活血方低剂量组	7.1	100.37 $\pm$ 5.44 <sup>4,6)</sup>	78.16 $\pm$ 4.32 <sup>4,6)</sup>	102.98 $\pm$ 2.67 <sup>4,6)</sup>
益肾活血方中剂量组	14.2	56.42 $\pm$ 4.28 <sup>4)</sup>	49.35 $\pm$ 5.30 <sup>4)</sup>	68.80 $\pm$ 1.29 <sup>4)</sup>
益肾活血方高剂量组	28.4	27.39 $\pm$ 2.33 <sup>4,6)</sup>	30.50 $\pm$ 16.91 <sup>4,6)</sup>	34.50 $\pm$ 3.16 <sup>4,6)</sup>

著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,经白藜芦醇、益肾活血方中、高剂量治疗后Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin蛋白表达均显著上升( $P<0.01$ );与白藜芦醇组比较,益肾活血方低、中剂量组Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin蛋白表达差异有统计学意义( $P<0.01$ ),而益肾活血方高剂量组则差异无统计学意义。见图3、表5。

表3 益肾活血方对UUO小鼠肾组织 $\alpha$ -SMA、Col-IV蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 3 Effect of Yishen Huoxue prescription on  $\alpha$ -SMA and Col-IV protein expression in kidney of UUO mice ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	时间/d	$\alpha$ -SMA/ $\beta$ -actin	Col-IV/ $\beta$ -actin
假手术组		7	0.42 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.06
		14	0.42 $\pm$ 0.10	0.42 $\pm$ 0.07
		21	0.71 $\pm$ 0.10	0.62 $\pm$ 0.08
模型组		7	1.38 $\pm$ 0.24 <sup>2)</sup>	1.90 $\pm$ 0.23 <sup>2)</sup>
		14	1.74 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>	1.66 $\pm$ 0.20 <sup>2)</sup>
		21	1.96 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>	1.84 $\pm$ 0.19 <sup>2)</sup>
白藜芦醇组	0.05	7	0.47 $\pm$ 0.11 <sup>4)</sup>	0.56 $\pm$ 0.08 <sup>4)</sup>
		14	0.49 $\pm$ 0.08 <sup>4)</sup>	0.50 $\pm$ 0.10 <sup>4)</sup>
		21	0.70 $\pm$ 0.09 <sup>4)</sup>	0.66 $\pm$ 0.10 <sup>4)</sup>
益肾活血方低剂量组	7.1	7	1.34 $\pm$ 0.29 <sup>6)</sup>	1.72 $\pm$ 0.23 <sup>6)</sup>
		14	1.81 $\pm$ 0.32 <sup>6)</sup>	1.63 $\pm$ 0.22 <sup>6)</sup>
		21	1.93 $\pm$ 0.21 <sup>6)</sup>	1.82 $\pm$ 0.18 <sup>6)</sup>
益肾活血方中剂量组	14.2	7	0.82 $\pm$ 0.20 <sup>4,6)</sup>	0.92 $\pm$ 0.13 <sup>4,6)</sup>
		14	0.73 $\pm$ 0.12 <sup>4,5)</sup>	0.81 $\pm$ 0.12 <sup>4,6)</sup>
		21	0.93 $\pm$ 0.12 <sup>4,5)</sup>	0.83 $\pm$ 0.09 <sup>4,5)</sup>
益肾活血方高剂量组	28.4	7	0.58 $\pm$ 0.12 <sup>4)</sup>	0.78 $\pm$ 0.11 <sup>4,5)</sup>
		14	0.52 $\pm$ 0.12 <sup>4)</sup>	0.66 $\pm$ 0.18 <sup>4)</sup>
		21	0.70 $\pm$ 0.08 <sup>4)</sup>	0.63 $\pm$ 0.07 <sup>4)</sup>

低、中、高剂量组治疗后ROS含量显著减少( $P<0.01$ );与白藜芦醇组比较,益肾活血方中剂量组ROS水平差异无统计学意义。见表4。

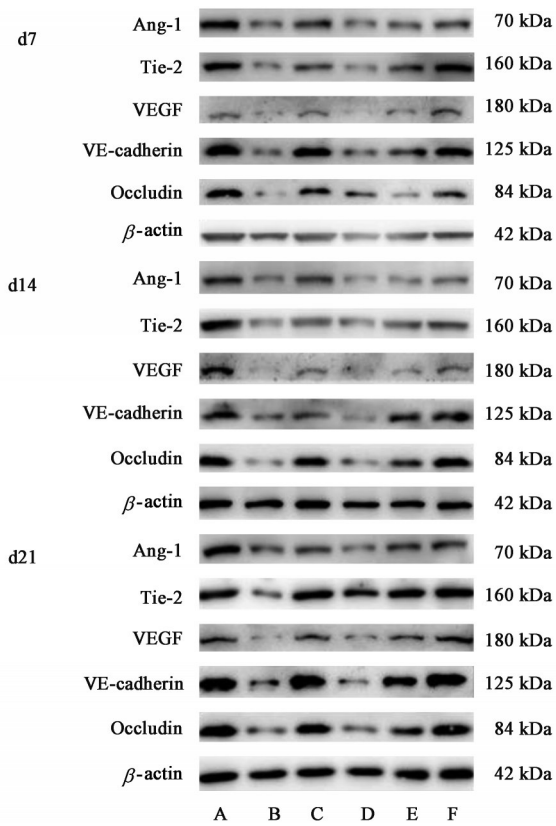


图3 各组小鼠 d7、d14、d21 肾组织 Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Ang-1/Tie-2, VEGF, VE-cadherin and Occludin in d7, d14 and d21 expression renal tissues

3.5 对 UUO 小鼠 Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin mRNA 表达的影响 假手术组在不同时间段 Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin mRNA 表达量差异无统计学意义;与假手术组比较,模型组 Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin mRNA 表达量在 d7 显著减少, d14 表达量出现突然性增加, d21 又开始下降与 d7 水平保持一致;与模型组比较,白藜芦醇组、益肾活血方中、高剂量组 Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin mRNA 表达量均显著升高 ( $P < 0.01$ );与白藜芦醇组比较,益肾活血方高剂量组 Ang-1/Tie-2 mRNA 表达量差异无统计学意义,而益肾活血方高剂量组 d14 VEGF、VE-cadherin 及 d7、d21 Occludin mRNA 表达量明显更高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 6。

#### 4 讨论

血管内皮细胞是单层扁平上皮细胞结构,主要发挥调节血管通透性与张力、血管生成、炎症反应、免疫反应等方面<sup>[11]</sup>。内皮细胞损伤失去完整性,血管通透性增加,导致血脑屏障障碍,出现脑水肿和出血现象。CD31 为内皮细胞标志物, AHMADI

等<sup>[12]</sup>发现卵巢移植后 CD31 表达明显下降出现缺血性损伤,牛磺酸治疗后加速血管生成,防止氧化应激和细胞凋亡反应。Ang-1 与 Tie-2 结合能维持血管稳定性及促进血管新生<sup>[13]</sup>。VEGF 是血管生成的重要传导器,促使内皮细胞增殖、迁移、血管形成等过程, VEGF 与 Ang-1 联合治疗急性心肌梗死,可改善心肌功能诱导新生血管形成<sup>[14-15]</sup>。VE-cadherin 是内皮细胞粘附连接的关键组成部分,当表面 VE-cadherin 表达减少会破坏血管壁完整及机体的稳态<sup>[16]</sup>。ZHANG 等<sup>[17]</sup>研究证实 Occludin 在缺血情况下降解促使内皮细胞凋亡破坏血脑屏障。

肾脏是个多血管脏器,血管内皮细胞功能障碍、内皮损伤、炎症、氧化应激等与 CKD 关系紧密<sup>[18]</sup>。在急性肾损伤模型中,败血症或缺血-再灌注引起内皮细胞屏障功能丧失出现器官纤维化<sup>[19-20]</sup>。CHIANG 等<sup>[21]</sup>采用敲除 Ang-1 和过表达观察缺血性肾损伤情况,当 Ang-1 表达增加影响内皮细胞存活能减轻肾损伤, Ang-1 的下调肾小管再生减少。糖尿病小鼠模型中,替米沙坦改善了 Occludin 表达且减轻了高糖诱导的肾小球内皮细胞损伤<sup>[22]</sup>。本研究中发现小鼠 UUO 造模术后免疫组化中观察发现肾组织中血管内皮细胞标志物 CD31 表达明显减少随时间延长而加重,但在 d14 至 d21 期间 CD31 表达轻微下调,表明肾脏组织内皮细胞破损后达一定程度将趋于平稳状态。模型组中  $\alpha$ -SAM、Col-IV 蛋白表达水平明显上升, Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin 蛋白表达及 mRNA 表达与假手术组比较显著下调,同时 UUO 小鼠造模后发现 ROS 水平显著升高,可提示 UUO 小鼠造模成功术后肾脏内皮细胞结构损害发生氧化应激反应促使细胞凋亡现象。

中医上认为 CKD 的主要病机为“久病入络”与“肾络瘀阻”,和肾间质纤维化 PTC 损伤关系密切。实验选用益肾活血方由黄芪、当归、丹参、田七、红花、大黄组成,具有益气活血通络功效,能明显保护血管内皮损伤,防止细胞凋亡,恢复有效的血液循环<sup>[9,23]</sup>。经白藜芦醇、益肾活血方高剂量治疗后 UUO 小鼠肾脏组织纤维  $\alpha$ -SAM、Col-IV 蛋白表达与 ROS 含量明显减少, CD31 表达量、Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin 蛋白表达及 mRNA 表达明显升高,故推测益肾活血方可促进血管内皮细胞修复及通过调节线粒体 ROS 减轻氧化应激,延缓细胞凋亡,维持细胞能量代谢,有效减轻 UUO 小鼠导致的 RIF。基于 RIF 作用机制的广泛性及复杂

表 5 益肾活血方对 UO 小鼠肾组织 Ang-1/Tie-2、VEGF、VE-cadherin、Occludin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of Yishen Huoxue prescription on expression of Ang-1/Tie-2, VEGF, VE-cadherin and Occludin in renal tissues of UO mice ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	t/d	Ang-1/ $\beta$ -actin	Tie-2/ $\beta$ -actin	VEGF/ $\beta$ -actin	VE-cadherin/ $\beta$ -actin	Occludin/ $\beta$ -actin
假手术组		7	2.17±0.21	2.18±0.22	2.28±0.26	2.29±0.24	2.16±0.24
		14	2.19±0.29	2.22±0.22	2.18±0.23	2.26±0.22	2.25±0.25
		21	2.05±0.24	2.03±0.20	2.07±0.21	2.02±0.21	2.04±0.21
模型组		7	0.80±0.11 <sup>2)</sup>	0.71±0.09 <sup>2)</sup>	0.78±0.09 <sup>2)</sup>	0.73±0.08 <sup>2)</sup>	0.69±0.07 <sup>2)</sup>
		14	0.70±0.07 <sup>2)</sup>	0.69±0.08 <sup>2)</sup>	0.69±0.08 <sup>2)</sup>	0.73±0.08 <sup>2)</sup>	0.63±0.07 <sup>2)</sup>
		21	0.66±0.08 <sup>2)</sup>	0.64±0.08 <sup>2)</sup>	0.63±0.07 <sup>2)</sup>	0.71±0.07 <sup>2)</sup>	0.61±0.06 <sup>2)</sup>
白藜芦醇组	0.05	7	1.63±0.18 <sup>4)</sup>	1.63±0.19 <sup>4)</sup>	1.65±0.17 <sup>4)</sup>	1.68±0.18 <sup>2)4)</sup>	1.66±0.18 <sup>4)</sup>
		14	1.71±0.17 <sup>4)</sup>	1.63±0.17 <sup>4)</sup>	1.72±0.18 <sup>4)</sup>	1.70±0.18 <sup>4)</sup>	1.70±0.17 <sup>4)</sup>
		21	1.60±0.19 <sup>4)</sup>	1.70±0.19 <sup>4)</sup>	1.62±0.18 <sup>4)</sup>	1.63±0.18 <sup>4)</sup>	1.62±0.18 <sup>4)</sup>
益肾活血方低剂量组	7.1	7	0.77±0.08 <sup>6)</sup>	0.76±0.08 <sup>6)</sup>	0.83±0.09 <sup>6)</sup>	0.80±0.08 <sup>6)</sup>	0.74±0.08 <sup>6)</sup>
		14	0.77±0.09 <sup>6)</sup>	0.71±0.09 <sup>6)</sup>	0.75±0.10 <sup>6)</sup>	0.72±0.08 <sup>6)</sup>	0.62±0.10 <sup>6)</sup>
		21	0.63±0.08 <sup>6)</sup>	0.65±0.08 <sup>6)</sup>	0.71±0.08 <sup>6)</sup>	0.73±0.08 <sup>6)</sup>	0.62±0.08 <sup>6)</sup>
益肾活血方中剂量组	14.2	7	1.27±0.15 <sup>4,6)</sup>	1.22±0.15 <sup>4,6)</sup>	1.25±0.16 <sup>4,6)</sup>	1.22±0.19 <sup>4,6)</sup>	1.23±0.17 <sup>4,6)</sup>
		14	1.25±0.13 <sup>4,6)</sup>	1.31±0.17 <sup>4,6)</sup>	1.35±0.14 <sup>4,6)</sup>	1.26±0.16 <sup>4,6)</sup>	1.30±0.13 <sup>4,6)</sup>
		21	1.23±0.14 <sup>4,6)</sup>	1.22±0.11 <sup>4,6)</sup>	1.22±0.12 <sup>4,6)</sup>	1.23±0.13 <sup>4,6)</sup>	1.21±0.14 <sup>4,6)</sup>
益肾活血方高剂量组	28.4	7	1.63±0.16 <sup>4)</sup>	1.68±0.16 <sup>4)</sup>	1.67±0.19 <sup>4)</sup>	1.63±0.17 <sup>4)</sup>	1.68±0.17 <sup>4)</sup>
		14	1.71±0.17 <sup>4)</sup>	1.65±0.18 <sup>4)</sup>	1.75±0.20 <sup>4)</sup>	1.68±0.17 <sup>4)</sup>	1.73±0.18 <sup>4)</sup>
		21	1.64±0.17 <sup>4)</sup>	1.69±0.17 <sup>4)</sup>	1.64±0.17 <sup>4)</sup>	1.65±0.17 <sup>4)</sup>	1.62±0.20 <sup>4)</sup>

表 6 益肾活血方对 UO 小鼠肾组织 Ang-1/Tie-2、VEGF、Notch3、VE-cadherin、Occludin mRNA 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 6 Effect of Yishen Huoxue prescription on mRNA expressions of Ang-1/Tie-2, VEGF, Notch3, VE-cadherin and Occludin in renal tissues of UO mice ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	t/d	Ang-1	Tie-2	VEGF	VE-cadherin	Occludin
假手术组		7	1.01±0.15	1.01±0.17	1.01±0.16	1.01±0.14	1.01±0.16
		14	1.01±0.11	1.01±0.12	1.01±0.17	1.01±0.14	1.01±0.17
		21	1.01±0.15	1.01±0.13	1.01±0.17	1.01±0.15	1.01±0.14
模型组		7	0.34±0.05 <sup>2)</sup>	0.36±0.06 <sup>2)</sup>	0.35±0.04 <sup>2)</sup>	0.35±0.05 <sup>2)</sup>	0.35±0.06 <sup>2)</sup>
		14	0.47±0.06 <sup>2)</sup>	0.44±0.06 <sup>2)</sup>	0.46±0.05 <sup>2)</sup>	0.38±0.05 <sup>2)</sup>	0.39±0.06 <sup>2)</sup>
		21	0.34±0.05 <sup>2)</sup>	0.37±0.04 <sup>2)</sup>	0.34±0.03 <sup>2)</sup>	0.33±0.04 <sup>2)</sup>	0.31±0.04 <sup>2)</sup>
白藜芦醇组	0.05	7	0.71±0.08 <sup>4)</sup>	0.71±0.09 <sup>4)</sup>	0.70±0.07 <sup>4)</sup>	0.72±0.07 <sup>4)</sup>	0.65±0.07 <sup>4)</sup>
		14	0.80±0.07 <sup>4)</sup>	0.74±0.07 <sup>4)</sup>	0.71±0.06 <sup>4)</sup>	0.76±0.07 <sup>4)</sup>	0.73±0.08 <sup>4)</sup>
		21	0.84±0.09 <sup>4)</sup>	0.78±0.08 <sup>4)</sup>	0.84±0.08 <sup>4)</sup>	0.78±0.09 <sup>4)</sup>	0.71±0.07 <sup>4)</sup>
益肾活血方低剂量组	7.1	7	0.33±0.04 <sup>6)</sup>	0.35±0.05 <sup>6)</sup>	0.33±0.05 <sup>6)</sup>	0.40±0.04 <sup>6)</sup>	0.34±0.04 <sup>6)</sup>
		14	0.42±0.05 <sup>6)</sup>	0.34±0.04 <sup>6)</sup>	0.47±0.06 <sup>6)</sup>	0.40±0.05 <sup>6)</sup>	0.40±0.05 <sup>6)</sup>
		21	0.40±0.05 <sup>6)</sup>	0.36±0.04 <sup>6)</sup>	0.38±0.04 <sup>6)</sup>	0.35±0.05 <sup>6)</sup>	0.36±0.04 <sup>6)</sup>
益肾活血方中剂量组	14.2	7	0.54±0.05 <sup>4,6)</sup>	0.55±0.09 <sup>4,6)</sup>	0.53±0.06 <sup>4,6)</sup>	0.52±0.07 <sup>4,6)</sup>	0.46±0.06 <sup>4,6)</sup>
		14	0.61±0.06 <sup>4,6)</sup>	0.62±0.08 <sup>4,6)</sup>	0.62±0.06 <sup>4,6)</sup>	0.56±0.06 <sup>4,6)</sup>	0.65±0.06 <sup>4)</sup>
		21	0.60±0.08 <sup>4,6)</sup>	0.58±0.08 <sup>4,6)</sup>	0.65±0.07 <sup>4,6)</sup>	0.51±0.07 <sup>4,6)</sup>	0.63±0.07 <sup>4,5)</sup>
益肾活血方高剂量组	28.4	7	0.65±0.05 <sup>4)</sup>	0.68±0.09 <sup>4)</sup>	0.66±0.08 <sup>4)</sup>	0.73±0.07 <sup>4)</sup>	0.51±0.06 <sup>4,6)</sup>
		14	0.72±0.06 <sup>4)</sup>	0.71±0.08 <sup>4)</sup>	0.88±0.07 <sup>4,6)</sup>	0.65±0.06 <sup>4,6)</sup>	0.70±0.06 <sup>4)</sup>
		21	0.78±0.06 <sup>4)</sup>	0.77±0.08 <sup>4)</sup>	0.80±0.07 <sup>4)</sup>	0.75±0.07 <sup>4)</sup>	0.08±0.05 <sup>4,5)</sup>

性,课题组将对能量代谢-内皮细胞-RIF方面进行更深入的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] PROVENZANO M, MANCUSO C, GAROFALO C, et al. Temporal variation of chronic kidney disease's epidemiology[J]. *G Ital Nefrol*, 2019, 36(2):231.
- [2] LOVISA S, FLETCHER-SANANIKONE E, SUGIMOTO H, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition compromises vascular integrity to induce Myc-mediated metabolic reprogramming in kidney fibrosis[J]. *Sci Signal*, 2020, 13(635)
- [3] EIRIN A, ZHU X Y, JONNADA S, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles improve the renal microvasculature in metabolic renovascular disease in swine [J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(7):1080-1095.
- [4] XU Y, ZHANG B, XIE D, et al. Nanoparticle-mediated dual delivery of resveratrol and DAP5 ameliorates kidney ischemia/reperfusion injury by inhibiting cell apoptosis and inflammation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24):39547-39558.
- [5] AKYUVA Y, NAZIROĞLU M. Resveratrol attenuates hypoxia-induced neuronal cell death, inflammation and mitochondrial oxidative stress by modulation of TRPM2 channel[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):6449.
- [6] 孙兰, 伍徐娴, 彭煜芬. 白藜芦醇对高糖环境下肾小管上皮细胞 PTEN 表达及纤维化效应的影响[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(18):4793-4799.
- [7] 钟建, 黎凤仪. 益肾活血方对 UUO 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.
- [8] 钟建, 赵宁博, 刘朝业, 等. 益肾活血方通过 miR-126/VEGF-Notch 信号通路改善肾纤维化[J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30(10):991-995.
- [9] 钟建, 刘朝业, 赵宁博, 等. 益肾活血方对 CKD3-4 期血瘀证患者 ADAMTS13 及炎症因子水平的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(10):2508-2511.
- [10] MARTINEZ-KLIMOVA E, APARICIO-TREJO O E, TAPIA E, et al. Unilateral ureteral obstruction as a model to investigate fibrosis-attenuating treatments[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(4):141.
- [11] KRÜGER-GENGE A, BLOCKI A, FRANKE R P, et al. Vascular endothelial cell biology: An update[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4411.
- [12] AHMADI S, MEHRANJANI M S. Taurine improves follicular survival and function of mice ovarian grafts through increasing CD31 and GDF9 expression and reducing oxidative stress and apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 903:174134.
- [13] 魏小晶, 段恒, 唐立明, 等. 右归丸通过调节 CXCL8/CXCR1/2 信号通路及 Ang-1, Ang-2 表达促进大鼠卵巢血管生成的作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(1):50-57.
- [14] PANG Q, ZHAO Y, CHEN X, et al. Apigenin protects the brain against ischemia/reperfusion injury via Caveolin-1/VEGF *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018:7017204.
- [15] OLIVEIRA A, SCHEFFER J P, MARKOSKI M, et al. Vascular endothelial growth factor association with angiopoietin 1 promotes improvement in ventricular function after ischemic cardiomyopathy induced in mini pigs[J]. *Acta Cir Bras*, 2018, 33(4):386-395.
- [16] CHRIFI I, LOUZAO-MARTINEZ L, BRANDT M M, et al. CMTM4 regulates angiogenesis by promoting cell surface recycling of VE-cadherin to endothelial adherens junctions [J]. *Angiogenesis*, 2019, 22(1):75-93.
- [17] ZHANG Y, LI X, QIAO S, et al. Occludin degradation makes brain microvascular endothelial cells more vulnerable to reperfusion injury *in vitro* [J]. *J Neurochem*, 2021, 156(3):352-366.
- [18] JOURDE-CHICHE N, FAKHOURI F, DOU L, et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(2):87-108.
- [19] STASI A, INTINI A, DIVELLA C, et al. Emerging role of Lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32(1):24-31.
- [20] BASILE D P, COLLETT J A, YODER M C. Endothelial colony-forming cells and pro-angiogenic cells: Clarifying definitions and their potential role in mitigating acute kidney injury[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2018, doi:10.1111/apha.12914.
- [21] CHIANG W C, HUANG Y C, FU T I, et al. Angiopoietin 1 influences ischemic reperfusion renal injury via modulating endothelium survival and regeneration[J]. *Mol Med*, 2019, 25(1):5.
- [22] ZHAN X, CHEN W, CHEN J, et al. Telmisartan mitigates high-glucose-induced injury in renal glomerular endothelial cells (rGECs) and albuminuria in diabetes mice[J]. *Chem Res Toxicol*, 2021, 34(9):2079-2086.
- [23] 李秀典, 沈萍, 沈晓璞, 等. 慢性肾脏病铁代谢紊乱的辨治思路[J]. *世界中医药*, 2021, 16(5):811-814.

[责任编辑 周冰冰]