

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research武威汉简“瘀方”对高血压肾损伤大鼠
HIF-1 α /VEGF/Notch1 通路的影响Effects of Wu Wei Han bamboo slips “Yufang” on HIF-1 α /VEGF/Notch1
pathway in hypertensive kidney injury rats马睿玲^{1,2}, 吕红英¹, 侯明双¹,
王怡园^{1,2}, 寇雨顺¹, 沈路凡¹,
王 鸿¹, 张玲娜¹, 伊 琳^{1,2}(1. 甘肃中医药大学 中西医结合学院, 甘肃
兰州 730000; 2. 甘肃省中医药防治慢性疾病重
点实验室, 甘肃 兰州 730000)MA Rui-ling^{1,2}, LÜ Hong-ying¹,
HOU Ming-shuang¹,
WANG Yi-yuan^{1,2}, KOU Yu-shun¹,
SHEN Lu-fan¹, WANG Hong¹,
ZHANG Ling-na¹, YI Lin^{1,2}(1. School of Traditional Chinese and
Western Medicine, Gansu University of
Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu
Province, China; 2. Gansu Provincial Key
Laboratory of Traditional Chinese
Medicine Prevention and Treatment of
Chronic Diseases, Lanzhou 730000, Gansu
Province, China)**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目
(82160842); 甘肃省自然科学基金
资助项目(24JRRA1019); 甘肃省联
合科研基金(一般项目)资助项目
(23JRRA1521); 甘肃省教育厅高校
教师创新基金资助项目(2023A-
083)**作者简介:** 马睿玲(1982-), 女, 讲师, 博士研究
生, 主要从事中西医结合心脑血管疾
病的相关研究**通信作者:** 伊琳, 教授, 博士生导师

MP: 13893296649

E-mail: yxxlyyy@163.com

摘要:目的 探索武威汉简“瘀方”对自发性高血压大鼠肾损伤的影响, 及其作用机制。方法 分析 GEO 数据库中高血压肾病数据集 GSE37460 中正常肾组织与高血压肾病肾组织的差异基因, 探讨高血压肾损伤机制。将自发性高血压大鼠(SHR)随机分为模型组(等体积蒸馏水)、对照组(7.59 mg·kg⁻¹缬沙坦)和低、中、高剂量实验组(7.15、14.29、28.58 g·kg⁻¹武威汉简“瘀方”颗粒剂), 每组 10 只; 另取 Wistar-Kyoto(WKY)大鼠设为正常组(等体积蒸馏水)。6 组大鼠每天灌胃 1 次, 连续给药 8 周。用酶联免疫吸附试验法检测大鼠尿中微量白蛋白(mALB)、N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)含量和血清中血栓素(TXB2)、6-酮-前列腺素 F1 α (6-keto PGF1 α)含量, 用蛋白质印迹法检测大鼠肾组织中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)和跨膜受体蛋白 1(Notch1)蛋白的表达水平。结果 在数据集 GSE37460 中, 共发现 155 个差异基因, 其中, 上调 94 个、下调 61 个, 通路富集涉及 HIF-1 α /VEGF/Notch1 等通路。正常组、模型组、对照组和高剂量实验组的尿 mALB 含量分别为(60.83 $\pm$ 3.81)、(159.60 $\pm$ 20.65)、(70.45 $\pm$ 3.97)和(79.72 $\pm$ 9.01) μ g·L⁻¹, 尿 NAG 含量分别为(34.37 $\pm$ 6.92)、(91.30 $\pm$ 9.05)、(44.65 $\pm$ 10.09)和(54.79 $\pm$ 2.87) ng·L⁻¹, 血清 TXB2 含量分别为(78.58 $\pm$ 3.78)、(107.80 $\pm$ 5.16)、(80.92 $\pm$ 4.02)和(85.65 $\pm$ 2.17) pg·mL⁻¹, 血清 6-keto PGF1 α 含量分别为(121.50 $\pm$ 3.45)、(85.05 $\pm$ 2.92)、(108.30 $\pm$ 2.96)和(101.90 $\pm$ 3.08) pg·mL⁻¹, HIF-1 α 蛋白相对表达水平分别为 0.56 $\pm$ 0.03、1.25 $\pm$ 0.02、0.77 $\pm$ 0.01 和 0.83 $\pm$ 0.02, VEGF 蛋白相对表达水平分别为 0.24 $\pm$ 0.02、1.24 $\pm$ 0.03、0.81 $\pm$ 0.04 和 0.95 $\pm$ 0.02, Notch1 蛋白相对表达水平分别为 0.33 $\pm$ 0.03、1.02 $\pm$ 0.01、0.50 $\pm$ 0.04 和 0.68 $\pm$ 0.01, 对照组和高剂量实验组的上述指标与模型组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。结论 武威汉简“瘀方”可以改善高血压肾损伤, 减轻肾纤维化, 其机制可能与抑制 HIF-1 α /VEGF/Notch1 信号通路有关。

关键词: 武威汉简“瘀方”; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 跨膜受体蛋白 1; 肾损伤**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.11.014**中图分类号:** R28**文献标志码:** A**文章编号:** 1001-6821(2025)11-1575-07

Abstract: Objective To explore the effects of Wu Wei Han bamboo slips “Yufang” on kidney injury in spontaneously hypertensive rats and its mechanism of action. **Methods** To analyze the differential genes between normal kidney tissues and hypertensive kidney tissues in GSE37460, a hypertensive kidney disease dataset in GEO database, and to explore the mechanism of hypertensive kidney injury; Spontaneously

hypertensive rats (SHR) were randomly divided into model group (equal volume of distilled water), control group ($7.59 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ valsartan) and experimental - L, - M, - H groups ($7.15, 14.29, 28.58 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ “Yufang” granules), with 10 rats in each group; additionally, Wistar - Kyoto (WKY) rats were taken as a normal group (equal volume of distilled water). Six groups were gavaged once a day for 8 consecutive weeks. The levels of urinary microalbumin (mAlb), *N* - acetyl - β - *D* - glucosaminidase (NAG) and serum thromboxane (TXB2), 6 - keto - prostaglandin F1 α (6 - keto PGF1 α) were detected by enzyme linked immunosorbent assay. Western blot was used to detect the expression levels of hypoxia inducible factor - 1 α (HIF - 1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and transmembrane receptor protein 1 (Notch1) in rat kidney. **Results** The data set GSE37460 contained 155 differential genes, 94 of which were up - regulated and 61 were down regulated and pathway enrichment involves pathways such as HIF - 1 α /VEGF/Notch1. The urinary mAlb levels of normal, model, control and experimental - H groups were (60.83 ± 3.81), (159.60 ± 20.65), (70.45 ± 3.97) and (79.72 ± 9.01) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the urinary NAG levels were (34.37 ± 6.92), (91.30 ± 9.05), (44.65 ± 10.09) and (54.79 ± 2.87) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the contents of TXB2 in serum were (78.58 ± 3.78), (107.80 ± 5.16), (80.92 ± 4.02) and (85.65 ± 2.17) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the serum 6 - keto PGF1 α levels were (121.50 ± 3.45), (85.05 ± 2.92), (108.30 ± 2.96), (101.90 ± 3.08) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of HIF - 1 α protein in rat kidney were 0.56 ± 0.03 , 1.25 ± 0.02 , 0.77 ± 0.01 and 0.83 ± 0.02 , respectively; the relative expression levels of VEGF protein were 0.24 ± 0.02 , 1.24 ± 0.03 , 0.81 ± 0.04 and 0.95 ± 0.02 , respectively; the relative expression levels of Notch1 protein were 0.33 ± 0.03 , 1.02 ± 0.01 , 0.50 ± 0.04 and 0.68 ± 0.01 , respectively; there were significant differences in the above indexes between the control and experimental - H groups and the model group (all $P < 0.05$). **Conclusion** The Wuwei Han bamboo slips “Yufang” can improve hypertension - related kidney damage and reduce kidney fibrosis, and its mechanism may be related to the inhibition of the HIF - 1 α /VEGF/Notch1 signaling pathway.

Key words: Wu Wei Han bamboo slips “Yufang”; hypoxia inducible factor - 1 α ; vascular endothelial growth factor; transmembrane receptor protein 1; kidney injury

高血压肾损伤是长期高血压控制不佳, 血管压力增加, 肾血流量减少, 最终所致的肾小动脉或肾实质的损伤。在我国, 高血压已上升为终末期肾病的第二大常见病因^[1-2]。研究行之有效的早期诊断及治疗策略已成为临床上亟须解决的问题。武威汉代医简是甘肃武威出土的汉代经典方剂, 本研究所选“瘀方”是目前发现我国现存最早的载有“活血化瘀”治法的医学古籍, 记载于汉代医简 11 - 12 简第五个方^[3], 其功效为养血活血, 理气化瘀, 与高血压肾损伤的中医治则一致。本课题组前期初步证实本方能够降低高血压肾损伤大鼠的血压; 本研究通过分析基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 中高血压肾病数据集探讨高血压肾损伤可能的机制; 并用武威汉简“瘀方”干预高血压肾损伤大鼠, 观察其是否通过该机制来减轻肾损伤, 进一步探讨“瘀方”对自发性高血压大鼠肾损伤的作用机制。

材料与方法

1 材料

动物 雄性自发性高血压 (spontaneous hyperten-

sive rats, SHR) 大鼠、Wistar - Kyoto (WKY) 大鼠, 鼠龄均为 14 周, 体质量 $250 \sim 350 \text{ g}$, 均由北京维通利华实验动物有限公司提供。动物许可证号: SCXK (京) 2021 - 0011。本实验经甘肃中医药大学动物实验中心伦理委员会批准 (伦理批号: 2021 - 372)。

药品与试剂 武威汉简“瘀方”颗粒剂: 川芎, 批号: A1090193; 当归, 批号: A1070353, 花椒, 批号: A3041673; 漏芦, 批号: A2015763; 牡丹, 批号: A2079283; 水蛭, 批号: A2061883; 均由广东一方制药厂生产, 上述中药材均经甘肃中医药大学刘立教授鉴定为正品。缬沙坦胶囊, 规格: 每粒 80 mg , 批号: X3176, 批准文号: 国药准字 H20040217, 北京诺华制药有限公司生产。尿微量白蛋白 (urinary microalbumin, mALB)、*N* - 乙酰 - β - *D* - 氨基葡萄糖苷酶 (*N* - acetyl - β - *D* - glucosaminidase, NAG)、血清中血栓素 (thromboxane, TXB2)、6 - 酮 - 前列腺素 F1 α (6 - keto - prostaglandin F1 α , 6 - keto PGF1 α) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒, 均购自江苏菲亚生物科技有限公司; 缺氧诱导因子 - 1 α (hypoxia inducible factor - 1 α ,

HIF-1 α)抗体、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体,均购自美国 Abcam 公司;跨膜受体蛋白 1(transmembrane receptor protein 1, Notch1)抗体,购自美国 Cell Signaling Technology 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、HRP 羊抗兔免疫球蛋白 G(H+L)抗体,均购自美国 Immunoway 公司。

仪器 鼠仪 BP98A 无创性大鼠尾动脉血压计,北京软隆生物科技公司产品;Power Pac 电泳仪、SW-CJ-1D 转膜仪、CFX 荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、iMark 多功能酶标仪,均为美国 Bio-Rad 公司产品;Nano Drop2000 超微量分光光度计,美国 Thermo 公司产品;Ge LView 6000plus 凝胶成像系统,广州博鹭腾生物科技有限公司产品。

2 实验方法

2.1 差异基因分析和富集分析^[4]

GEO 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)搜索“高血压肾病(hypertensive nephropathy, HN)”,样本应包括疾病和正常样本且来自人体组织,微阵列的数据类型是基因表达谱。选择高血压肾病数据集 GSE37460 下载数据,平台号为 GPL11670 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array(Gene symbol),选择高血压肾病 15 例、健康对照 4 例。用 R 语言“Limma”软件包进行差异基因筛选,筛选条件为 $|\log FC| \geq 1$ 和 $P < 0.05$,然后将筛选出的差异基因进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,并通过微生信网站(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化。

2.2 溶液配制^[5]

武威汉简“瘀方”原方组成为“干当归二分、川芎二分、牡丹二分、漏芦二分、蜀椒二分、蛇一分”,换算成现代剂量为川芎 20 g、当归 20 g、花椒 5 g、漏芦 10 g、牡丹 15 g 和水蛭 10 g,以颗粒剂剂型按原方配比配制。

2.3 动物分组与给药方法^[6]

大鼠适应性饲养 1 周后,将 SHR 大鼠随机分为模型组、对照组和低、中、高剂量实验组,每组 10 只;另取 WKY 大鼠作为正常组。根据人与大鼠体表面积换算公式,以成人每日剂量的 6.25 倍为大鼠的等效剂量^[4],最终确定给药剂量,低、中、高剂量实验组分别给予 7.15、14.29、28.58 g·kg⁻¹武威汉简“瘀方”,对照组给予 7.59 mg·kg⁻¹缬沙坦,正常组和模型组均

给予等体积的蒸馏水。6 组大鼠每天灌胃给药 1 次,连续给药 8 周,并随大鼠体质量变化,每周按时调整给药剂量。

2.4 大鼠生物学指标的监测^[7]

在灌胃前后分别测量各组大鼠尾动脉血压,包括收缩压(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP),连续测量 3 次取平均值。各组大鼠在末次给药后,禁食 12 h,将大鼠放入代谢笼中,禁食不禁水,收集大鼠 24 h 尿液,置于 -80 °C 贮存。留取尿液后,用 10%水合氯醛(0.3 mL·100 g⁻¹)腹腔注射麻醉大鼠,腹部做横切口后剪开胸隔膜,暴露心脏,于心尖冲动最强点采血,常温静置 60 min,以 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上层血清,按分组封装放置 -20 °C 冰箱保存。严格按 ELISA 试剂盒说明书的步骤进行操作,检测尿中 mALB、NAG 含量,以及血清中 Cys-C、TXB2 及 6-keto PGF1 α 含量。

2.5 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色和 Masson 染色法检测肾组织病理改变^[8]

心尖采血后,将大鼠颈椎脱臼处死摘取左肾,10%甲醛溶液固定,用无水乙醇、二甲苯脱水透明后,石蜡包埋,制成 5 μ m 厚切片。严格按照染色剂试剂盒说明书的步骤进行 HE 染色和 Masson 染色,用显微成像系统拍照系统进行观察、拍照。

2.6 实时荧光定量 PCR 法检测肾组织中 HIF-1 α 、VEGF 和 Notch1 mRNA 的表达水平^[9]

提取各组大鼠肾组织的总 RNA,用微量分光光度计测定光密度并计算 RNA 纯度及浓度,然后逆转录合成 cDNA。扩增程序为两步法,95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火/延伸 30 s。以 GAPDH 为内参,按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因相对表达水平。

2.7 蛋白质印迹法检测肾组织 HIF-1 α 、VEGF 和 Notch1 蛋白的表达水平^[10]

按照 Western blot 实验步骤要求取各组大鼠肾组织进行蛋白提取,BCA 测定蛋白浓度,凝胶电泳分离后转膜,加入一抗(1:1 000)4 °C 冰箱过夜孵育,加入二抗(1:1.0 $\times 10^4$)2 h 后洗膜,再加 ECL 化学显色。以 GAPDH 条带灰度值为参考,并用 Image J 软件进行数据分析,计算蛋白相对表达量。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较用单因素方差分析,方差齐用最小显著性差异法(LSD)检验;方差不齐用 Tamhane T2 法检验。

结 果

1 差异基因筛选及富集分析

差异基因分析结果显示:高血压肾病组与健康对照组相比,共有 155 个差异基因,其中,上调 94 个、下调 61 个。差异基因进行 GO 富集分析结果显示:生物过程主要涉及氧气输送、内皮细胞分化迁移、血管生成的调节等;细胞成分主要涉及血红蛋白复合物、血液微粒、血浆脂蛋白颗粒、细胞间连接等;分子功能主要涉及珠蛋白结合、载氧体活性、抗氧化活性、Notch 结合等。KEGG 富集结果显示,涉及通路主要包括 Notch 信号通路、甲状腺激素信号通路、VEGF 信号通路、HIF-1 信号通路等。

2 武威海筒“瘀方”对大鼠血压的影响

低、中、高剂量实验组分别给予 7.15、14.29、28.58 g·kg⁻¹瘀方,对照组给予 7.59 mg·kg⁻¹缬沙坦,正常组和模型组均给予等体积的蒸馏水。

治疗前,SHR 大鼠的 SBP 和 DBP 均显著高于 WKY 大鼠,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。治疗后,中、高剂量实验组的 SBP 和 DBP 均较模型组显著降低,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$);高剂量实验组的 SBP 和 DBP 均较对照组显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);低剂量实验组的血压与对照组比较,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结果见表 1。

3 武威海筒“瘀方”对大鼠肾功能和大鼠血管舒缩功能的影响

模型组与正常组比较,尿中 mALB、NAG 含量及血清中 Cys-C、TXB2 含量均较模型组显著升高,血清中 6-keto PGF1 α 含量显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。低、中、高剂量实验组和对照组尿中 mALB、NAG 含量及血清中 Cys-C、TXB2 含量均较模型组显著降低,血清中 6-keto PGF1 α 含量均较模型组显著升高,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$)。结果见表 2。

表 1 武威海筒“瘀方”对大鼠血压的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Wu Wei Han bamboo slips “Yu Fang” on blood pressure in rats($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose (g·kg ⁻¹)	n	SBP(mmHg)		DBP(mmHg)	
			Before intervention	After intervention	Before intervention	After intervention
Normal	—	10	118.80 ± 8.51	125.20 ± 8.54	82.20 ± 4.71	84.30 ± 8.47
Model	—	10	178.10 ± 13.62 ^{##}	187.70 ± 12.77 ^{##}	123.30 ± 7.27 ^{##}	126.30 ± 11.8 ^{##}
Control	7.59 × 10 ⁻³	10	171.40 ± 15.65	155.60 ± 14.62 ^{**}	123.10 ± 6.69	107.90 ± 8.06 ^{**}
Experimental - L	7.15	10	179.40 ± 11.92	176.40 ± 9.54	120.40 ± 7.35	119.50 ± 6.08
Experimental - M	14.29	10	181.80 ± 11.22	170.90 ± 12.97 [*]	120.60 ± 12.08	113.50 ± 11.15 [*]
Experimental - H	28.58	10	182.90 ± 12.31	165.90 ± 14.16 ^{**}	124.90 ± 7.78	109.60 ± 8.44 ^{**}

Compared with normal group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$.

表 2 各组大鼠尿微量白蛋白(mALB)、N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)含量和血清中胱抑素 C(Cys-C)血栓素(TXB2)、6-酮-前列腺素 F1 α (6-keto PGF1 α)含量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the levels of rat urinary microalbumin(mAlb), N-acetyl-β-D-glucosaminidase(NAG) and cystatin(Cys-C) serum thromboxane(TXB2), 6-keto-prostaglandin F1 α (6-keto PGF1 α) in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	mALB (μg·L ⁻¹)	NAG (ng·L ⁻¹)	Cys-C (μg·L ⁻¹)	TXB2 (pg·mL ⁻¹)	6-keto PGF1 α (pg·mL ⁻¹)
Normal	60.83 ± 3.81	34.37 ± 6.92	203.20 ± 23.52	78.58 ± 3.78	121.50 ± 3.45
Model	159.60 ± 20.65 ^{##}	91.30 ± 9.05 ^{##}	563.00 ± 48.56 ^{##}	107.80 ± 5.16 ^{##}	85.05 ± 2.92 ^{##}
Control	70.45 ± 3.97 ^{**}	44.65 ± 10.09 ^{**}	284.60 ± 34.86 ^{**}	80.92 ± 4.02 ^{**}	108.30 ± 2.96 ^{**}
Experimental - L	119.50 ± 8.59 ^{**}	76.69 ± 5.54 [*]	418.70 ± 22.40 ^{**}	96.61 ± 5.02 [*]	93.37 ± 2.85 ^{**}
Experimental - M	95.91 ± 10.95 ^{**}	64.36 ± 6.59 ^{**}	388.30 ± 30.94 ^{**}	88.02 ± 6.09 ^{**}	96.37 ± 2.59 ^{**}
Experimental - H	79.72 ± 9.01 ^{**}	54.79 ± 2.87 ^{**}	322.60 ± 31.89 ^{**}	85.65 ± 2.17 ^{**}	101.90 ± 3.08 ^{**}

Dose and n refer to table 1; Compared with normal group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$.

4 武威汉简“瘀方”对大鼠肾组织病理变化的影响

HE 染色结果显示:正常组肾组织结构基本正常,模型组肾小球变形萎缩,结构破坏,肾小囊壁层断裂,管腔狭窄、蛋白管型形成,肾小管上皮细胞排列紊乱,坏死、脱落,肾间质大量炎性细胞浸润、出血;药物干预后,肾组织损伤均较模型组明显减轻,其中,对照组肾小管管型明显减少、部分肾小囊壁层完整,肾小球形态基本恢复,低、中、高剂量实验组肾小球结构损伤减轻,肾小囊壁层断裂减少,蛋白管型减少,肾小管上皮细胞脱落减少,其中,高剂量实验组的恢复程度优于低、中剂量实验组。结果见图 1 I。

Masson 染色结果显示:模型组与正常组比较,肾小球肥大且基底膜增厚,大量肾小球变为空泡,毛细血管狭窄且出现闭塞,肾小球、肾小管周围间质存在大量蓝染胶原纤维;对照组和高剂量实验组的蓝染胶原纤维均较模型组明显减少,肾小球结构趋于正常;低、中剂量实验组的蓝染胶原纤维较多,且低剂量实验组肾小球及肾间质存在大量胶原纤维。结果见

图 1 II。

5 武威汉简“瘀方”对大鼠肾组织 *HIF-1α*、*VEGF* 和 *Notch1* mRNA 表达的影响

模型组与正常组比较,肾组织中 *HIF-1α*、*VEGF*、*Notch1* mRNA 相对表达水平均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。中、高剂量实验组和对照组肾组织中 *HIF-1α*、*VEGF*、*Notch1* mRNA 相对表达水平均较模型组显著降低,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果见表 3。

6 武威汉简“瘀方”对大鼠肾组织 *HIF-1α*、*VEGF*、*Notch1* 蛋白表达的影响

如表 3 和图 2:模型组与正常组相比,肾组织中 *HIF-1α*、*VEGF* 及 *Notch1* 蛋白相对表达水平均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。低、中、高剂量实验组和对照组肾组织中 *HIF-1α*、*VEGF* 及 *Notch1* 蛋白相对表达水平均较模型组显著降低,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$),且高剂量实验组降低最为明显。

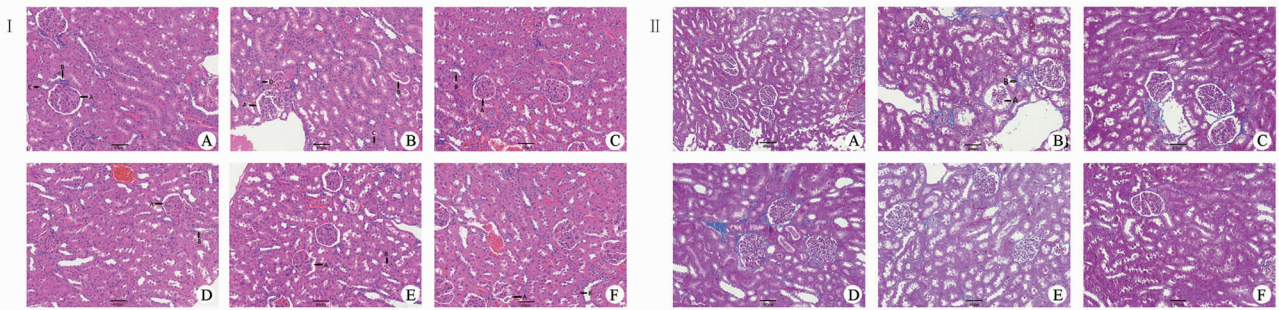


图 1 武威汉简“瘀方”对大鼠肾组织病理变化的影响(×200)

Figure 1 Effects of Wu Wei Han bamboo slips “Yu Fang” on the pathological changes of rat kidney tissue (×200)
I: Hematoxylin-eosin staining results; II: Masson staining results; A: Normal group; B: Model group; C: Control group; D, E, F: Experimental - L, - M, - H groups, respectively.

表 3 武威汉简“瘀方”对各组大鼠肾组织中缺氧诱导因子-1α(*HIF-1α*)、血管内皮生长因子(*VEGF*)和跨膜受体蛋白 1(*Notch1*)表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Wu Wei Han bamboo slips “Yu Fang” on expression of hypoxia inducible factor-1α (*HIF-1α*), vascular endothelial growth factor (*VEGF*) and transmembrane receptor protein 1 (*Notch1*) in renal tissues of various groups of rats($\bar{x} \pm s$)

Group	mRNA			Protein		
	<i>HIF-1α</i>	<i>VEGF</i>	<i>Notch1</i>	<i>HIF-1α</i>	<i>VEGF</i>	<i>Notch1</i>
Normal	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.11	0.56 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.33 ± 0.03
Model	5.47 ± 1.03 ^{##}	7.87 ± 1.4 ^{##}	4.51 ± 1.29 ^{##}	1.25 ± 0.02 ^{##}	1.24 ± 0.03 ^{##}	1.02 ± 0.01 ^{##}
Control	1.53 ± 0.14 ^{**}	3.10 ± 0.46 ^{**}	1.88 ± 0.74 ^{**}	0.77 ± 0.01 ^{**}	0.81 ± 0.04 ^{**}	0.50 ± 0.04 ^{**}
Experimental - L	4.00 ± 0.39 [*]	5.72 ± 0.43 [*]	3.48 ± 0.12	1.16 ± 0.02 ^{**}	1.19 ± 0.02 [*]	0.95 ± 0.01 [*]
Experimental - M	2.33 ± 0.37 ^{**}	5.20 ± 0.36 ^{**}	2.59 ± 0.16 [*]	1.03 ± 0.02 ^{**}	1.04 ± 0.05 ^{**}	0.83 ± 0.01 ^{**}
Experimental - H	1.78 ± 0.17 ^{**}	3.39 ± 0.91 ^{**}	2.13 ± 0.21 ^{**}	0.83 ± 0.02 ^{**}	0.95 ± 0.02 ^{**}	0.68 ± 0.01 ^{**}

Dose and n refer to table 1; Compared with normal group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

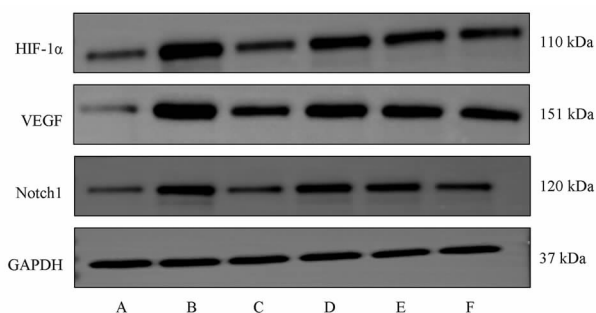


图2 武威汉简“瘀方”对大鼠肾组织 HIF-1 α 、VEGF 和 Notch1 蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of Wu Wei Han bamboo slips “Yu Fang” on proteins expression of HIF-1 α 、VEGF、Notch1 in rat kidney tissue A: Normal group; B: Model group; C: Control group; D, E, F: Experimental - L, - M, - H groups, respectively.

讨 论

高血压肾损伤是血压长时间升高导致肾灌注压持续升高,对肾小球滤过膜及肾小管产生损伤。因此对高血压肾损伤的早期诊断和治疗有助于逆转肾功能,修复损伤。尿 mALB、NAG 和血清 Cys-C 都是检测早期肾功能损伤的可靠、敏感的生物标志物^[11-14]。本研究发现:中、高剂量实验组尿中 mALB、NAG 含量及血清中 Cys-C 含量均较模型组明显降低;病理染色结果也表明,在武威汉简“瘀方”干预之后,肾损伤较模型组有明显改善,这表明瘀方能够改善 SHR 大鼠肾小球滤过膜的通透性,修复肾小管上皮细胞,改善肾功能及肾纤维化。TXB2 是前列腺素中的一种,具有血小板凝聚及血管收缩作用;6-keto PGF1 α 是前列环素的代谢产物,正常情况下两者保持动态平衡。当二者失衡会导致血管收缩及血小板在血管内聚集,检测 TXB2/6-keto PGF1 α 可以反映血小板及血管内皮功能的变化。本研究发现,经瘀方干预后,SHR 大鼠血液中 TXB2 含量降低而 6-keto PGF1 α 含量升高,这表明瘀方可以调节血管舒缩,改善内皮功能进而改善环境缺血缺氧状态。

通过分析 GEO 芯片结果显示高血压肾损伤机制可能与 HIF-1 α /VEGF/Notch1 信号通路的过度激活相关。HIF-1 α 是缺血、缺氧组织中基质细胞衍生因子-1 表达的关键转录因子^[15]。在肾缺氧时, HIF-1 α 降解受到阻碍,积聚后进入细胞核并上调下游靶基因(包括 VEGF)的表达,从而调节多种缺氧诱导的病理反应,如血管内皮损伤、微血管功能障碍、血管生成、代谢和细胞凋亡,加速肾损伤向终末期肾脏

病(end stage renal disease, ESRD)的进程^[16]。HIF-1 α 表达增多可在糖尿病合并肾小管间质损伤患者的肾小管和肾小球中检测到^[17];用 HIF-1 α 抑制药可以减轻 I 型糖尿病小鼠的肾肥大、细胞外基质蛋白的积累和尿白蛋白的流出^[18]。VEGF 作为 HIF-1 α 重要的下游基因,其活化后,可以激活 VEGF 的表达,并与内皮细胞表面的特定受体结合,引起血管内皮细胞的扩张和细胞间隙的增大,促进内皮细胞增殖和迁移^[19],能够提高肾小球毛细血管的通透性,引起蛋白尿,并在持续低氧损伤中导致促炎、促纤维化反应^[20]。研究发现,实验性敲除 HIF-1 α 可以减轻系膜基质扩张,并减轻炎症和纤维化的发展^[21]。这与中医病邪损伤络脉后导致络脉瘀阻,使络脉弥散气血、津血互换、营养代谢等功能异常的病机一致。中医认为气为血之帅,气行则血行,气虚鼓动无力则血液停滞而成瘀。反过来,血为气之母,瘀血既是病理产物也可作为病理因素使气的生成和运行受阻。Notch 信号通路的激活及表达异常会对血管生成、肾小管上皮细胞向间充质干细胞的转化产生影响,促进足细胞损伤、肾小管间质损伤和纤维化的发展^[22]。Notch1 是 Notch 受体之一,是 VEGF-Notch 信号通路的下游因子。研究发现,化瘀通络类中药组能够通过抑制 Notch1 等蛋白的表达,进而减少 DKD 大鼠尿蛋白的排泄,减轻肾病理损伤^[23]。以上研究结果充分证明,长期高血压控制不良导致肾微循环障碍时,武威汉简“瘀方”能够靶向 HIF-1 α ,抑制 VEGF 的表达,进而抑制其下游效应因子 Notch1 的表达来调节肾内皮细胞的损伤,改善肾微循环障碍,起到保护肾的作用从而延缓肾纤维化的进程。

本研究结合 GEO 基因芯片数据探讨了武威汉简“瘀方”通过调控 HIF-1 α /VEGF/Notch1 通路保护高血压肾损伤大鼠肾功能、改善血管内皮损伤,减轻肾纤维化的作用,部分揭示了武威汉简“瘀方”治疗高血压肾损伤的机制,为临床应用武威汉简“瘀方”治疗高血压肾损伤提供了实验依据。

参考文献:

- [1] STOMPOR T, PERKOWSKA - PTASINSKA A. Hypertensive kidney disease: A true epidemic or rare disease? [J]. *Pol Arch Intern Med*, 2020, 130(2): 130-139.
- [2] 张蓓蓓, 方媛, 王晗. 浅述高血压肾损害的病机及中医药治疗的临床研究进展 [J]. *中医临床杂志*, 2021, 33(5): 1003-1007.
- [3] 李盛华, 张彦昌. 武威汉代医简研究集成 [M]. 安徽合肥: 安徽科学技术出版社, 2014: 2-3.
- [4] 杨淑贤, 孙阿宁, 朱斌等. 基于网络药理学联合 GEO 数据库及

- 分子对接探究脑安胶囊治疗缺血性脑卒中的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(3): 435—439.
- [5] 张丽, 徐冬萍, 黄芳等. 抗骨增生颗粒剂联合硫酸氨基葡萄糖胶囊治疗膝骨关节炎临床研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2024, 34(10): 927—931.
- [6] 剧嘉欣, 程草草, 葛腾, 等. 基于NLRP3炎症小体探讨脑清通汤对自发性高血压大鼠肾损伤的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(4): 125—131.
- [7] 施滢, 胡甲乙, 朱瑶, 等. 复方高滋斑片通过PI3K/AKT改善自发性高血压大鼠肾损伤的研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 553—556.
- [8] 王虎平, 孟志鹏, 胡韵韵, 等. 黑逍遥散通过MKP-1/JUK通路改善阿尔茨海默病大鼠的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(17): 2518—2522.
- [9] 李珍, 阿依江·哈拜克, 丛媛媛, 等. 阿里红多糖对阿尔茨海默症小鼠认知功能的作用机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(10): 1097—1100.
- [10] 卫小红, 郑荣华. 异叶青兰总黄酮对自发性高血压大鼠肾损伤的保护作用及机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(12): 1763—1767.
- [11] ZHANG L, SUN J, ZHANG M, *et al.* The significance of combined detection of CysC, urinary mAlb and β_2 -MG in diagnosis of the early renal injury in pregnancy-induced hypertension syndrome [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(8): 1982—1985.
- [12] 邢莉, 申虎威. 早期肾损伤标志物对老年高血压糖尿病肾损害的诊断价值[J]. 中国药物与临床, 2020, 20(20): 3356—3358.
- [13] 王垚, 刘翠兰, 杨明. 尿N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶在IgA肾病肾小管间质损伤中的评估价值[J]. 国际泌尿系统杂志, 2020, 40(1): 112—115.
- [14] CHEN H, LI H. Clinical implication of cystatin C and β_2 -microglobulin in early detection of diabetic nephropathy [J]. *Clin Lab*, 2017, 63(2): 241—247.
- [15] 王珍, 曹雪, 侯绍章, 等. 甘草酸通过下调缺氧诱导因子-1 α 抑制小鼠肾小球系膜细胞炎症因子的表达[J]. 解放军医学院学报, 2023, 44(6): 685—693.
- [16] GUNARATNAM L, BONVENTRE J V. HIF in kidney disease and development [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(9): 1877.
- [17] HIGGINS D F, KIMURA K, BERNHARDT W M, *et al.* Hypoxia promotes fibrogenesis *in vivo* via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Clin Invest*, 2007, 117(12): 3810—3820.
- [18] NAYAK B K, SHANMUGASUNDARAM K, Friedrichs W E, *et al.* HIF-1 mediates renal fibrosis in OVE26 type 1 diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2016, 65(5): 1387—1397.
- [19] FU J, ZENG W, CHEN M, *et al.* Apigenin suppresses tumor angiogenesis and growth *via* inhibiting HIF-1 α expression in non-small cell lung carcinoma [J/OL]. *Chem Biol Interact*, 2022, 361: 109966. 2022-07-01 [2024-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35513012/>.
- [20] PACKER M. Mechanisms leading to differential hypoxia-inducible factor signaling in the diabetic kidney: Modulation by SGLT2 inhibitors and hypoxia mimetics [J]. *Am J Kidney Dis*, 2021, 77(2): 280—286.
- [21] FENG W, YING Z, KE F, *et al.* Apigenin suppresses TGF- β 1-induced cardiac fibroblast differentiation and collagen synthesis through the downregulation of HIF-1 α expression by miR-122-5p [J/OL]. *Phytomedicine*, 2021, 83: 153481. 2021-01-27 [2024-12-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33607460/>.
- [22] NISHAD R, MUKHI D, TAHASEEN S V, *et al.* Growth hormone induces Notch1 signaling in podocytes and contributes to proteinuria in diabetic nephropathy [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(44): 16109—16122.
- [23] 刘利飞, 李雅纯, 国芳, 等. Notch通路在糖尿病肾病大鼠的表达及化痰通络中药的干预作用[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1866—1870.

(收稿日期 2024-12-24)