

# 复方丹参片对高脂血症模型大鼠血脂水平的改善及肾功能保护作用机制研究<sup>△</sup>

张明昊\*,高一盈,董文霞,王 珍,薛鹏坤,马伟洋(河南中医药大学医学院,郑州 450046)

中图分类号 R972;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)07-0818-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.07.09



**摘要** 目的 探讨复方丹参片改善高脂血症大鼠血脂水平的作用及保护其肾功能的作用机制。方法 60只雄性SD大鼠分为正常组、模型组、辛伐他汀联合(2S)-N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酸]-2-苯基甘氨酸叔丁酯(DAPT)组和复方丹参片低、中、高剂量组,每组10只。正常组大鼠常规饲养;其余5组大鼠按10 mL/kg腹腔注射75%蛋黄乳液,禁食、自由饮水,16 h后饲喂高脂饲料,连续喂养4周造模。辛伐他汀联合DAPT组在造模同时灌胃辛伐他汀0.002 g/kg和DAPT 0.012 g/kg,复方丹参片低、中、高剂量组在造模时分别灌胃复方丹参片0.25、0.5、1 g/kg,正常组、模型组灌胃等体积蒸馏水,每日1次,连续4周。采用生化法检测大鼠血清中总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)水平;计算大鼠肾脏系数;采用苏木精-伊红染色法观察大鼠肾脏组织病理形态学变化,根据肾皮质区肾小管损伤和肾小球硬化程度进行肾损伤评分;采用免疫组化法检测肾脏组织中Notch信号受体1(Notch1)、Notch信号配体1(Jagged1)、发状分裂相关增强子1(Hes1)蛋白表达水平;采用实时荧光定量聚合酶链反应检测肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA表达水平。结果 与正常组比较,模型组大鼠血清中TG、TC、Cr、BUN水平均显著升高( $P<0.05$ );肾脏系数显著升高( $P<0.05$ );肾脏组织出现病理变化,肾小管损伤评分、肾小球硬化程度评分均显著升高( $P<0.05$ );肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1蛋白及mRNA表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,复方丹参片低、中、高剂量组大鼠血清中TG、TC、Cr、BUN水平,肾脏系数,肾小管损伤评分,肾小球硬化程度评分,肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1蛋白及mRNA表达水平均降低( $P<0.05$ ),且大部分指标呈现出剂量依赖趋势;肾脏组织病变程度减轻。结论 复方丹参片具有明显的降血脂作用,且可通过下调Notch1/Jagged1信号通路实现对高脂血症模型大鼠肾功能的保护作用。

**关键词** 复方丹参片;高脂血症;肾功能;Notch信号受体1/Notch信号配体1信号通路;血脂

## Study on the improvement of Compound danshen tablets on blood lipid levels and the mechanism of protecting renal functions in hyperlipidemia model rats

ZHANG Minghao, GAO Yiying, DONG Wenxia, WANG Zhen, XUE Pengkun, MA Weiyang (School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To investigate the effect of Compound danshen tablets on improving the blood lipid levels and the mechanism of protecting renal functions in hyperlipidemia model rats. **METHODS** Sixty male SD rats were divided into normal group, model group, simvastatin combined with (2S)-N-[N-(3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl]-2-phenylglycine tert butyl (DAPT) group and low-dose, medium-dose and high-dose groups of Compound danshen tablets, with 10 rats in each group. Rats in the normal group received routine diet. The other 5 groups were intraperitoneally injected with 75% yolk emulsion 10 mL/kg, fasting and drinking freely. After 16 h, they were fed high-fat diet for 4 weeks. Simvastatin combined with DAPT group was given simvastatin 0.002 g/kg and DAPT 0.012 g/kg at the same time of modeling. The low-dose, medium-dose and high-dose groups of Compound danshen tablets were given Compound danshen tablets 0.25, 0.5 and 1 g/kg respectively at the same time of modeling, the normal group and model group were given equal volume of distilled water, once a day, for 4 weeks. The serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), creatinine (Cr) and urea nitrogen (BUN) in serum were detected by biochemical method; kidney coefficient of rats was calculated; histopathological changes of rat kidney were observed by HE staining, and the renal injury was scored according to the degree of renal tubular injury and glomerular sclerosis in renal cortex; expression levels of Notch signal receptor 1 (Notch 1), Notch signal ligand 1 (Jagged1) and hairy division associated enhancer 1 (Hes1) in kidney were detected by immunohistochemistry; mRNA expressions of Notch1, Jagged1 and Hes1 in renal tissue were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. **RESULTS** Compared with normal group, the serum levels of TG, TC, Cr and BUN were increased significantly in model group ( $P<0.05$ ); renal coefficient increased significantly ( $P<0.05$ );

<sup>△</sup> 基金项目:河南省重点研发与推广专项(科技攻关类)(No. 212102311132)

\* 高级实验师,硕士。研究方向:中药药理学。E-mail: zhangminghao@hactcm.edu.cn

pathological changes occurred in renal tissue, and the scores of renal tubular injury and glomerular sclerosis increased significantly ( $P<0.05$ ); protein and mRNA expressions of Notch1, Jagged1, Hes1 in renal tissue were increased

significantly ( $P<0.05$ ). Compared with model group, serum levels of TG, TC, Cr and BUN, renal coefficient, the scores of renal tubular injury and glomerular sclerosis, protein and mRNA expression of Notch1, Jagged1 and Hes1 in renal tissue were all decreased in low-dose, medium-dose and high-dose groups of Compound danshen tablets ( $P<0.05$ ), and most indexes showed a dose-dependent trend; the degree of renal lesions was reduced. **CONCLUSIONS** Compound danshen tablets possess obvious hypolipidemic effect, and can protect the renal function of hyperlipidemia model rats by down-regulating Notch1/Jagged1 signal pathway.

**KEYWORDS** Compound danshen tablets; hyperlipidemia; renal function; Notch1/Jagged1 signal pathway; blood lipid

高脂血症是由脂肪代谢紊乱引起的一种血浆脂质失衡性疾病<sup>[1]</sup>,以血液中总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)水平升高或高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)水平降低为主要临床表现<sup>[2-3]</sup>,是心脑血管疾病的主要诱发因素。Moorhead等<sup>[4]</sup>于1982年提出“脂质肾毒说”后,高脂血症与慢性肾脏病(chronic kidney diseases, CKD)的关系越来越受到学者关注。有研究表明,血脂异常升高可引起肾小球硬化及固有细胞凋亡,在肾损伤发生过程中起重要作用<sup>[5]</sup>。临床上常用他汀类药物控制血脂水平,但该药长期使用也会对肾功能造成一定影响,且停药后血脂水平易反弹,故寻找既能有效降血脂又能保护肾脏的药物意义重大。Notch信号通路是存在于真核生物中的一条高度保守的细胞间信号通路,可影响细胞增殖、分化、迁移、生长和凋亡等过程。在急慢性肾损伤进程中均存在Notch信号通路的异常激活,且肾小球、肾小管上皮Notch信号通路的激活均与肾小球硬化、蛋白尿及肾纤维化有关,而Notch信号通路中的某些成分也被认为是肾损伤的重要标志物<sup>[6]</sup>。血脂异常升高会损伤肾脏,这一过程也存在Notch信号通路的异常激活,因此,通过下调Notch信号通路以改善肾功能成为高脂血症状态下保护肾脏的重要思路之一。复方丹参片是以丹参为君药,辅以三七、冰片制成的一种复方制剂,具有活血化瘀、理气止痛之功效,并对肾脏具有保护作用<sup>[9]</sup>。(2S)-N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰]-2-苯基甘氨酸叔丁酯(简称为DAPT)是较早发现的特异性 $\gamma$ -分泌酶抑制剂,可通过抑制 $\gamma$ -分泌酶复合体阻断Notch信号通路传导,延缓肾损伤进程<sup>[7]</sup>。本实验采用腹腔注射蛋黄乳液后饲喂高脂饲料诱导制备高脂血症大鼠模型,研究复方丹参片对大鼠的降血脂及肾功能保护作用;考虑到血脂水平及Notch信号通路在肾损伤方面的重要作用,本实验选择辛伐他汀联合DAPT为阳性对照药,以降血脂和阻断Notch信号通路的双重作用为阳性衡量标准来探讨复方丹参片的肾功能保护作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物来源

雄性SD大鼠60只,体质量180~200 g,鼠龄8周,

购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,动物生产许可证号:SCXK(豫)2019-0002。所有大鼠饲养于河南中医药大学医学机能实验室,实验单位使用许可证号:SYXK(豫)2020-0004。实验过程严格遵守“3R”原则。实验期间动物饲养室环境温度为20~22℃,相对湿度为55%~60%,正常光照,大鼠自由饮水采食。高脂饲料由郑州市惠济区华兴实验动物养殖场提供,配方比例为10%白糖、10%猪油、10%蛋黄粉、2%胆固醇、68%基础饲料。

### 1.2 主要仪器

BS110S型电子天平购自北京赛多利斯天平有限公司;MR-96TB型酶标仪购自骋克仪器(上海)有限公司;RM2235型石蜡切片机构自德国Leica公司;D3024R型台式高速冷冻型微量离心机购自大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;YD-6D型组织包埋机、YD-A型组织摊片机、YD-B型组织烤片机购自金华市科迪仪器设备有限公司;CX23型光学显微镜购自日本Olympus公司;Step One Plus型实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)仪购自美国ABI公司。

### 1.3 主要药物与试剂

复方丹参片(0.6 g/片,批号G20A045)购自广州白云山和记黄埔中药有限公司;辛伐他汀片(10 mg/片,批号1810409)购自华润双鹤利民药业(济南)有限公司;氨基甲酸乙酯(批号20200326)购自天津百伦斯生物技术有限公司;DAPT(批号D7230)购自北京索莱宝科技有限公司;苏木精染色液(批号20211008)、伊红染色液(批号20211009)均购自福州洗净生物科技有限公司;TC(批号A111-1-1)、TG(批号A110-1-1)、肌酐(creatinine, Cr,批号C011-1-1)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN,批号C013-1-1)酶联免疫吸附试验检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;磷酸盐缓冲液(PBS,批号ZLI-9061)、柠檬酸盐缓冲液(批号ZLI-9064)、兔SP试剂盒(批号SP-9001)、DAB显色试剂盒(批号ZLI-9018)、生物素标记的羊抗兔二抗(批号ZB-2306)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗大鼠Notch信号受体1(Notch1)抗体(克隆号bs-1335R)、Notch信号配体1(Jagged1)抗体(克隆号bs-1448R)、发状分裂相关增强子1(Hes1)抗体(克隆号bs-3948R)均购自北京博奥森生

物技术有限公司。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、造模与给药

根据人鼠换算公式  $S_{大鼠/200g} = 0.018 \times S_{人/70kg}$ , 复方丹参片的人口服剂量为每天 5.4 g, 换算得大鼠灌胃剂量为每天 0.5 g/kg, 故复方丹参片中剂量按 0.5 g/kg 给药, 复方丹参片低、高剂量分别按 0.25 g/kg (中剂量的 1/2)、1 g/kg (中剂量的 2 倍) 给药。辛伐他汀口服剂量为每天 0.02 g, 换算得大鼠灌胃剂量为每天 0.002 g/kg, 故辛伐他汀按 0.002 g/kg 给药。60 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 按体质量均一原则分为正常组、模型组、辛伐他汀联合 DAPT 组和复方丹参片低、中、高剂量组, 每组 10 只。正常组大鼠常规饲养; 其余 5 组大鼠按 10 mL/kg 腹腔注射 75% 蛋黄乳液, 禁食、自由饮水, 16 h 后饲喂高脂饲料, 连续喂养 4 周造模<sup>[7]</sup>。辛伐他汀联合 DAPT 组在造模同时灌胃辛伐他汀 0.002 g/kg 和 DAPT 0.012 g/kg<sup>[7]</sup>, 复方丹参片低、中、高剂量组在造模同时分别灌胃复方丹参片 0.25、0.5、1 g/kg, 正常组、模型组灌胃等体积蒸馏水, 每日 1 次, 连续 4 周。

### 2.2 样本采集

末次给药 24 h 后, 各组大鼠称体质量后腹腔注射 1 g/kg 氨基甲酸乙酯麻醉, 腹主动脉取血, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清于 -80 °C 储存。然后解剖取肾脏, 去除肾脏周围结缔组织, 生理盐水洗涤, 滤纸吸尽脏器表面液体后用电子天平称量并记录。再将肾脏组织一分为二, 其中一份用 4% 多聚甲醛固定, 另一份用液氮速冻后于 -80 °C 储存。

### 2.3 指标检测

2.3.1 血清生化指标检测 按试剂盒说明书, 采用生化法检测大鼠血清中 TC、TG、Cr、BUN 水平。

2.3.2 肾脏系数计算 计算大鼠肾脏系数 (肾脏系数 = 肾脏质量/体质量), 用以评价肾脏病变程度。若肾脏系数明显升高, 则提示肾脏存在纤维化病变。

2.3.3 肾脏组织病理形态学观察 取 4% 多聚甲醛固定的大鼠肾脏组织, 经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、4 μm 切片等过程制作病理切片; 切片经二甲苯脱蜡、苏木精-伊红 (HE) 染色, 乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后, 置于光学显微镜下观察。每组选取 5 张切片, 根据肾皮质区肾小管损伤和肾小球硬化程度进行肾损伤评分: 正常 0 分, 轻度染色 (≤25%) 1 分, 中度染色 (>25% ~ 50%) 2 分, 重度染色 (>50% ~ 75%) 3 分, 极重度染色 (>75%) 4 分。

2.3.4 肾脏组织中 Notch1、Jagged1、Hes1 蛋白表达水平检测 采用免疫组化法检测。石蜡切片经二甲苯脱蜡、脱水后, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭, PBS 清洗, 柠檬酸盐缓冲液热修复

8 min, 滴加山羊血清封闭液, 室温孵育 30 min; 倾去液体, 分别滴加 Notch1、Jagged1、Hes1 抗体 (稀释度均为 1:100), 4 °C 孵育过夜; 滴加生物素标记的羊抗兔二抗, 37 °C 孵育 20 min; DAB 显色 10 min, 自来水冲洗, 苏木精复染 3 min, 盐酸乙醇分化, 自来水冲洗, 经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后, 置于光学显微镜下观察。每组选取 5 张切片, 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图片分析, 检测每个视野中的积分光密度 (integrated optical density, IOD) 值。

2.3.5 肾脏组织中 Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA 表达水平检测 采用 qRT-PCR 法检测。根据 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 已发表的大鼠 Notch1 (登录号 NM001105721)、Jagged1 (登录号 NM019147.1)、Hes1 (登录号 NM024360.3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 登录号 NM017008.4) 基因序列设计特异性引物, 采用 DNASTAR 软件包中的 PrimerSelect 程序设计, 并由武汉赛维尔生物科技有限公司合成, PCR 引物序列及产物长度见表 1。然后取肾脏组织 100 mg, 加入 1 mL TriQuick 试剂充分研磨匀浆后提取总 RNA, 检测 RNA 浓度及纯度。在 20 μL 反应体系内合成 cDNA, 以 2 μL cDNA 为模板, 加入靶基因上下游引物进行 PCR 扩增。反应结束后, 根据扩增曲线及溶解曲线判断 PCR 反应特异性, 所得结果以 GAPDH 为内参、以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因的 mRNA 表达水平。

表 1 PCR 引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度/bp
Notch1	上游: 5'-CGCCCGTGGATTCATCTGTA-3'	267
	下游: 5'-GGGCATAGACAGCGGTAGAAAAG-3'	
Jagged1	上游: 5'-GAGACCTCCTCGGGCTTTGA-3'	144
	下游: 5'-GCACACGCACCTTGAATCCAT-3'	
Hes1	上游: 5'-CAAGCTGGAGAAGGCAGACAT-3'	143
	下游: 5'-CCTCGTTTCATGCACTCGCTG-3'	
GAPDH	上游: 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'	138
	下游: 5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCT-3'	

### 2.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。实验结果满足正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 大鼠血清中 TC、TG、Cr、BUN 水平检测结果

与正常组比较, 模型组大鼠血清中 TC、TG、Cr、BUN 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 辛伐他汀联合 DAPT 组和复方丹参片低、中、高剂量组大鼠血清中 TC、TG、Cr、BUN 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与辛伐他汀联合 DAPT 组比较, 复方丹参片低、中剂量组大鼠血清中 TC、TG、Cr、BUN 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与

复方丹参片低剂量组比较,复方丹参片中、高剂量组大鼠血清中TC、TG、Cr、BUN水平均显著降低( $P<0.05$ );与复方丹参片中剂量组比较,复方丹参片高剂量组大鼠血清中TC、TG、BUN水平均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表2。

表2 各组大鼠血清中TC、TG、Cr、BUN水平检测结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	Cr/( $\mu$ mol/L)	BUN/(mmol/L)
正常组	2.48±0.023	0.77±0.05	185.78±14.61	5.19±0.15
模型组	4.45±0.39 <sup>a</sup>	2.29±0.50 <sup>a</sup>	435.25±28.44 <sup>a</sup>	7.26±0.24 <sup>a</sup>
辛伐他汀联合DAPT组	2.62±0.23 <sup>b</sup>	0.56±0.20 <sup>b</sup>	195.42±26.68 <sup>b</sup>	5.05±0.32 <sup>b</sup>
复方丹参片低剂量组	3.55±0.15 <sup>bc</sup>	1.34±0.22 <sup>bc</sup>	268.34±10.45 <sup>bc</sup>	6.78±0.14 <sup>bc</sup>
复方丹参片中剂量组	3.04±0.23 <sup>bcd</sup>	0.95±0.10 <sup>bcd</sup>	235.34±20.29 <sup>bcd</sup>	6.12±0.26 <sup>bcd</sup>
复方丹参片高剂量组	2.52±0.26 <sup>bde</sup>	0.62±0.14 <sup>bde</sup>	210.90±26.49 <sup>bd</sup>	5.25±0.27 <sup>bde</sup>

a:与正常组比较, $P<0.05$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ ;c:与辛伐他汀联合DAPT组比较, $P<0.05$ ;d:与复方丹参片低剂量组比较, $P<0.05$ ;e:与复方丹参片中剂量组比较, $P<0.05$

### 3.2 大鼠肾脏系数计算结果

正常组、模型组、辛伐他汀联合DAPT组和复方丹参片低、中、高剂量组大鼠肾脏系数分别为 $(6.90\pm 0.25)\times 10^{-2}$ 、 $(8.47\pm 0.30)\times 10^{-2}$ 、 $(6.60\pm 0.34)\times 10^{-2}$ 、 $(7.96\pm 0.14)\times 10^{-2}$ 、 $(7.51\pm 0.12)\times 10^{-2}$ 、 $(7.20\pm 0.10)\times 10^{-2}$ 。与正常组比较,模型组大鼠肾脏系数显著升高( $P<0.05$ );与模型组比较,辛伐他汀联合DAPT组和复方丹参片低、中、高剂量组大鼠肾脏系数均显著降低( $P<0.05$ );与辛伐他汀联合DAPT组比较,复方丹参片低、中、高剂量组大鼠肾脏系数均显著升高( $P<0.05$ );与复方丹参片低剂量组比较,复方丹参片中、高剂量组大鼠肾脏系数均显著降低( $P<0.05$ );与复方丹参片中剂量组比较,复方丹参片高剂量组大鼠肾脏系数显著降

低( $P<0.05$ )。

### 3.3 大鼠肾脏组织病理形态学观察结果

HE染色结果显示,正常组大鼠肾脏组织形态正常,无异常病变;模型组大鼠肾脏组织受到明显挤压,肾小球局部可见空泡及局灶节段性硬化,肾小管变性也较明显;辛伐他汀联合DAPT组和复方丹参片低、中、高剂量组大鼠肾脏组织受挤压及肾小球、肾小管变性程度减轻,肾损伤程度得到明显改善。与正常组比较,模型组大鼠肾小管损伤评分、肾小球硬化程度评分均显著升高( $P<0.05$ );与模型组比较,辛伐他汀联合DAPT组和复方丹参片低、中、高剂量组大鼠肾小管损伤评分、肾小球硬化程度评分均显著降低( $P<0.05$ )。结果见图1、表3。

表3 各组大鼠肾小管损伤、肾小球硬化程度评分结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ ,分)

组别	肾小管损伤评分	肾小球硬化程度评分
正常组	0.80±0.45	0.60±0.55
模型组	3.80±0.45 <sup>a</sup>	3.60±0.55 <sup>a</sup>
辛伐他汀联合DAPT组	0.80±0.45 <sup>b</sup>	0.60±0.55 <sup>b</sup>
复方丹参片低剂量组	1.20±0.44 <sup>b</sup>	1.00±0.71 <sup>b</sup>
复方丹参片中剂量组	0.80±0.45 <sup>b</sup>	0.60±0.55 <sup>b</sup>
复方丹参片高剂量组	0.80±0.44 <sup>b</sup>	0.80±0.45 <sup>b</sup>

a:与正常组比较, $P<0.05$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$

### 3.4 大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1蛋白表达水平检测结果

免疫组化结果显示,正常组大鼠肾脏组织中有少量Notch1、Jagged1、Hes1蛋白表达。与正常组比较,模型组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1蛋白表达增多,其阳性表达IOD值均显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,辛伐他汀联合DAPT组和复方丹参片低、中、高

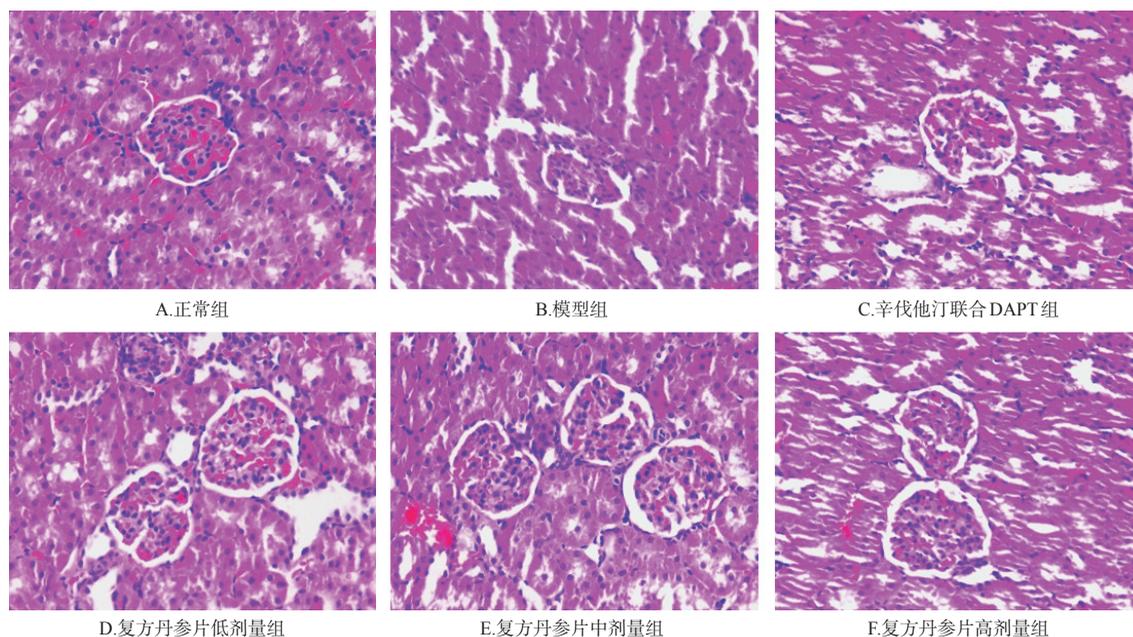


图1 各组大鼠肾脏组织病理形态学显微图(HE染色,×400)

剂量组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1蛋白表达减少,其阳性表达IOD值均显著降低( $P<0.05$ )。与辛伐他汀联合DAPT组比较,复方丹参片低、中、高剂量组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1蛋白表达增多,其阳性表达IOD值均显著升高( $P<0.05$ );复方丹参片低剂量组大鼠肾脏组织中Hes1蛋白表达增多,其阳性表达IOD值显著升高( $P<0.05$ );复方丹参片中、高剂量组大鼠肾脏组织中Hes1蛋白减少,其阳性表达IOD值均显著降低( $P<0.05$ )。与复方丹参片低剂量组比较,复方丹参片中、高剂量组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1蛋白表达减少,其阳性表达IOD值均显著降低( $P<0.05$ )。与复方丹参片中剂量组比较,复方丹参片高剂量组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1蛋白表达减少,其阳性表达IOD值均显著降低( $P<0.05$ )。结果见图2~图4、表4。

### 3.5 大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA表达水平检测结果

qRT-PCR结果显示,与正常组比较,模型组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,辛伐他汀联合DAPT组和复方丹参片低、中、高剂量组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。与辛伐他汀联合DAPT组比较,复方丹参片低、中剂量组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。与复方丹参片低剂量组比较,复方丹参片中、高剂量组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA表达水平均显著降低( $P<0.05$ );与复方丹参片中剂量组比较,复方丹参片高剂量组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表5。

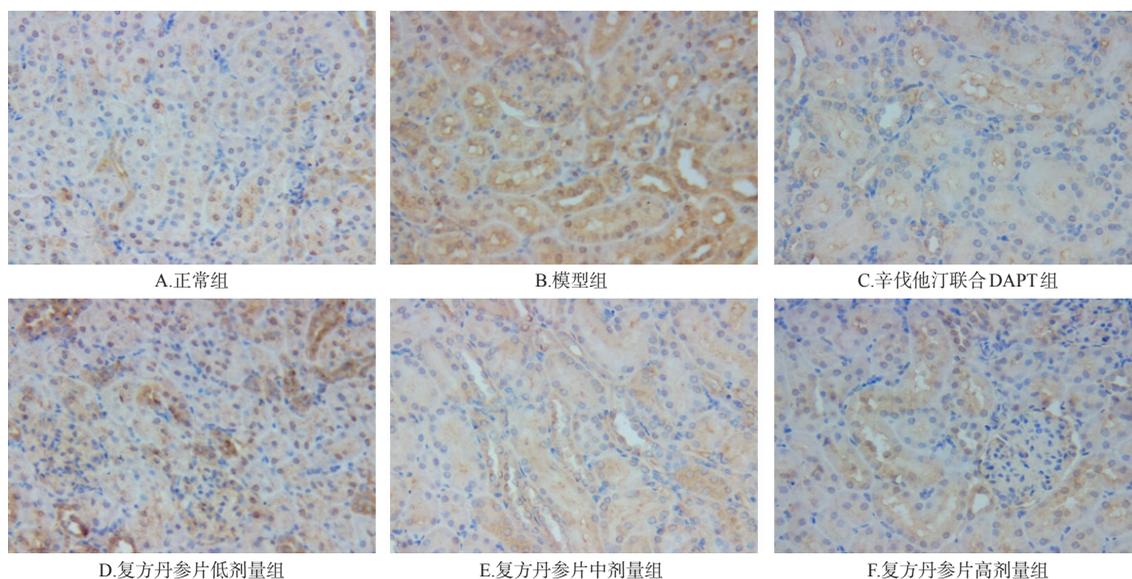


图2 各组大鼠肾脏组织中Notch1蛋白表达的免疫组化显微图(HE染色,×400)

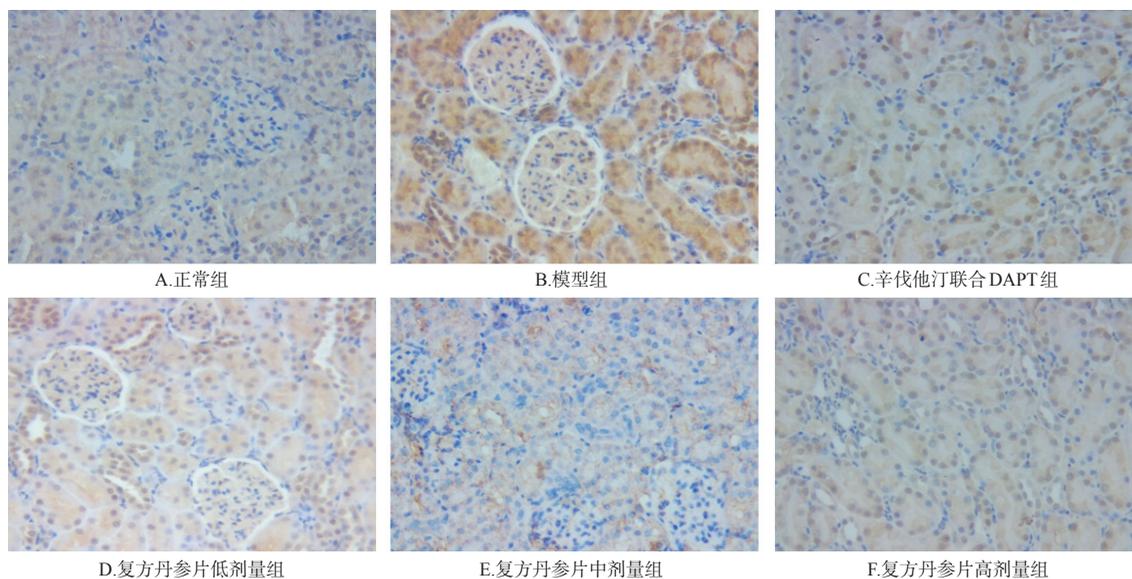


图3 各组大鼠肾脏组织中Jagged1蛋白表达的免疫组化显微图(HE染色,×400)

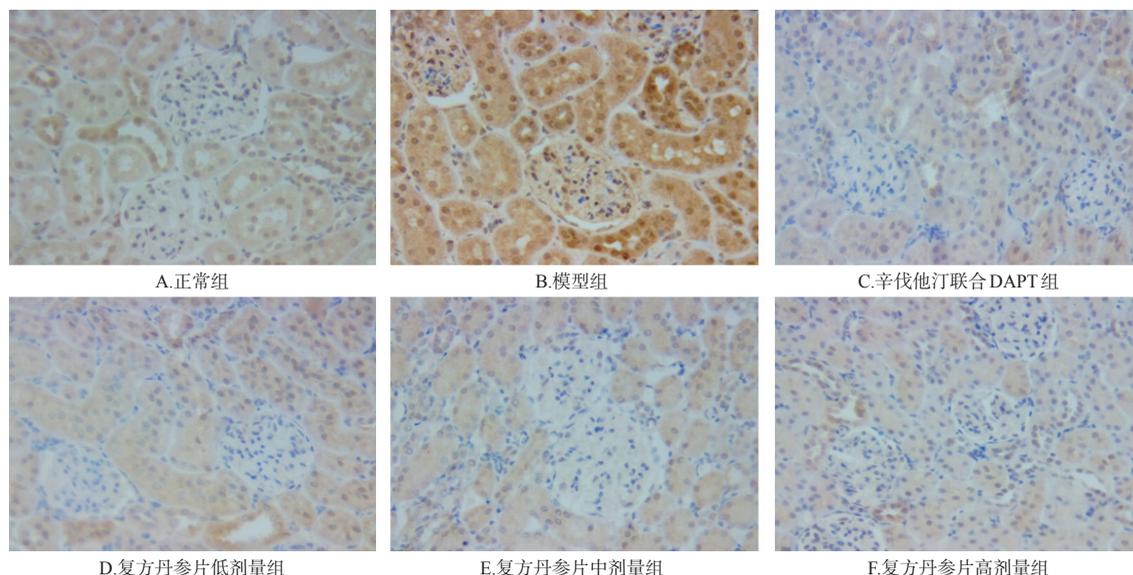


图4 各组大鼠肾脏组织中Hes1蛋白表达的免疫组化显微图(HE染色,×400)

表4 各组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1蛋白阳性表达IOD值检测结果( $\bar{x} \pm s, n=5, \times 10^3$ )

组别	Notch1蛋白	Jagged1蛋白	Hes1蛋白
正常组	138.10 ± 1.89	215.60 ± 1.81	275.83 ± 2.54
模型组	495.05 ± 1.68 <sup>a</sup>	764.69 ± 2.65 <sup>a</sup>	526.76 ± 3.21 <sup>a</sup>
辛伐他汀联合DAPT组	106.37 ± 3.40 <sup>b</sup>	127.88 ± 1.61 <sup>b</sup>	276.30 ± 3.22 <sup>b</sup>
复方丹参片低剂量组	204.80 ± 2.12 <sup>bc</sup>	456.55 ± 3.44 <sup>bc</sup>	295.77 ± 3.95 <sup>bc</sup>
复方丹参片中剂量组	195.35 ± 2.22 <sup>bcd</sup>	293.96 ± 2.85 <sup>bcd</sup>	245.56 ± 2.40 <sup>bcd</sup>
复方丹参片高剂量组	116.84 ± 2.55 <sup>cde</sup>	213.74 ± 1.64 <sup>cde</sup>	245.82 ± 2.54 <sup>cd</sup>

a: 与正常组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与辛伐他汀联合DAPT组比较,  $P < 0.05$ ; d: 与复方丹参片低剂量组比较,  $P < 0.05$ ; e: 与复方丹参片中剂量组比较,  $P < 0.05$

表5 各组大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA表达水平检测结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	Notch1/GAPDH	Jagged1/GAPDH	Hes1/GAPDH
正常组	1.01 ± 0.02	1.01 ± 0.01	1.02 ± 0.02
模型组	8.61 ± 1.27 <sup>a</sup>	10.87 ± 1.13 <sup>a</sup>	5.15 ± 1.21 <sup>a</sup>
辛伐他汀联合DAPT组	0.72 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.68 ± 0.06 <sup>b</sup>
复方丹参片低剂量组	2.63 ± 0.33 <sup>bc</sup>	3.25 ± 1.03 <sup>bc</sup>	3.33 ± 0.41 <sup>bc</sup>
复方丹参片中剂量组	1.84 ± 0.29 <sup>bcd</sup>	1.82 ± 0.33 <sup>bcd</sup>	2.30 ± 0.27 <sup>bcd</sup>
复方丹参片高剂量组	1.08 ± 0.21 <sup>bde</sup>	0.97 ± 0.24 <sup>bde</sup>	1.24 ± 0.15 <sup>bde</sup>

a: 与正常组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与辛伐他汀联合DAPT组比较,  $P < 0.05$ ; d: 与复方丹参片低剂量组比较,  $P < 0.05$ ; e: 与复方丹参片中剂量组比较,  $P < 0.05$

#### 4 讨论

血脂是血浆中TC、TG及类脂的总称,其水平异常升高表示出现高脂血症<sup>[8-9]</sup>。在高脂血症的病因、病理及降血脂新药研究中,构建与人类病变基本相似且具有重复性的高脂血症动物模型是先决条件。由于长期饲喂高脂饲料具有动物食量不精确、停止饲喂后易反弹等局限性<sup>[10]</sup>,本实验采用了一次性腹腔注射蛋黄乳液后饲喂高脂饲料的方法<sup>[10]</sup>,诱导构建高脂血症大鼠模型,结果显示高脂血症大鼠血清中TC、TG水平显著升高,表

明造模成功。该模型在临床上与人类高脂血症特征相似,可用于高脂血症研究。

高脂血症在中医上属“痰浊、瘀血”范畴,故“祛瘀通络”为其主要治疗思路<sup>[11]</sup>。复方丹参片具有活血化瘀、理气止痛、调节脂质代谢及抗氧化等多种药理作用<sup>[12]</sup>,运用此药治疗高脂血症符合“祛瘀通络”的治疗理念。辛伐他汀是一种羟甲基戊二酰辅酶A还原酶抑制剂,可有效降低血脂水平<sup>[7]</sup>;DAPT是一种口服活性较好的 $\gamma$ -分泌酶抑制剂,可间接抑制Notch1/Jagged1信号通路活化<sup>[13]</sup>。基于以上思路,本实验以辛伐他汀联合DAPT为阳性对照药,选择复方丹参片为治疗药物,探讨其对高脂血症模型大鼠的治疗作用,结果发现复方丹参片可以显著降低大鼠血清中TC、TG水平,表明其具有较好的降血脂作用。

血脂异常升高可作为一种独立的致病因素参与肾脏疾病的发生、发展过程。在高脂条件下,脂质可以黏附于肾小球内皮细胞并穿透至皮下间隙,在细胞及化学因子作用下刺激肾小球细胞外基质合成和分泌增加、肾小球硬化、肾脏固有细胞凋亡,从而导致肾脏结构改变、功能减退<sup>[14-15]</sup>。Cr是肌酸代谢终产物,由肾小管排出;BUN是血浆中除蛋白质外的一种含氮化合物,由肾小球滤过排出体外;二者均是临床上检测肾功能的重要指标,其水平升高提示肾功能受损<sup>[16-17]</sup>。本实验结果显示,高脂血症大鼠血清中Cr、BUN水平升高,且肾脏系数升高,进一步病理检查发现该模型大鼠肾脏组织结构明显受挤压、肾小球硬化、肾小管变性,提示高脂血症可造成肾损伤;而复方丹参片可以降低高脂血症模型大鼠血清中Cr、BUN水平,降低肾脏系数,改善肾脏病变程度,表明其对高脂血症模型大鼠肾功能具有保护作用。

Notch信号通路是一条与细胞增殖、分化、凋亡有关

的重要通路,以Notch(1~4)、Jagged(1~2)、Hes为代表的Notch信号受体、配体及胞内效应器共同参与了肾脏发育与肾血管形成过程<sup>[18-20]</sup>,其中Notch1/Jagged1信号通路的异常激活与多种肾脏疾病的发生、发展相关。已有研究证实,体外诱导大鼠肾小管上皮细胞高表达后可使其胞质内Notch1片段大量累积,从而进一步激活Notch信号通路以介导肾损伤过程<sup>[21-23]</sup>。本实验结果显示,高脂血症大鼠肾脏组织中Notch1、Jagged1、Hes1蛋白及mRNA表达水平均显著升高,Notch信号通路被异常激活;采用复方丹参片干预后,Notch1、Jagged1、Hes1蛋白及mRNA表达水平均降低,Notch信号通路被阻断,由血脂异常升高引起的肾损伤进程得到延缓,这与肾损伤病理变化一致。

综上所述,复方丹参片具有明显的降血脂作用,且可通过下调Notch1/Jagged1信号通路实现对高脂血症模型大鼠肾功能的保护作用。

### 参考文献

[1] 陈玉兴,杜铁良,赵自明,等.复方姜黄微囊对高脂血症大鼠血清脂质及肝脏病理的影响[J].中成药,2012,34(6):1025-1029.

[2] 陈娟,汪胡风,邓军,等.丹红注射液对高脂血症大鼠肝脏AMPK/SREBP-1/ACC通路的影响[J].中国药理学通报,2018,34(4):528-532.

[3] ZHANG H L,ZOU X Q,HUANG Q Y, et al. Effects of Kudingcha nanoparticles in hyperlipidaemic rats induced by a high fat diet[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(6): 2257-2267.

[4] MOORHEAD J F, CHAN M K, EL-NAHAS M, et al. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease[J]. Lancet, 1982, 2(8311): 1309-1311.

[5] 王海燕.现代临床医学内科进展:肾脏内科分册[M].北京:科学技术文献出版社,2006:113.

[6] 李晓霞,李新,林娟,等.复方丹参片及其拆方对心肌缺血大鼠模型的影响[J].药物评价研究,2020,43(6):1026-1032.

[7] 冯定浩,李均,徐静雅,等.丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>联合DAPT对UUO模型大鼠肾组织Notch/Jagged通路相关蛋白表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2019,39(7):826-831.

[8] 唐东晖,钟艳花.藜芦夏苓汤通过AMPK通路干预非酒精性脂肪肝病小鼠的作用机制研究[J].中药新药与临床药理,2020,31(7):794-801.

[9] 盛昭园,王佑华,徐燕,等.健脾疏肝降脂汤对高脂血症大鼠血脂及炎症因子水平调节的作用[J].世界中西医结合杂志,2017,12(12):1646-1649,1653.

[10] 李大伟,张玲,夏作理.建立高脂血症模型的动物选择与常用造模方法分析及改进[J].中国临床康复,2006,10

(48):145-147.

[11] 李慧,郑小伟,叶忠伟,等.保肾汤防治大鼠高脂血症致肾脏损伤的实验研究[J].浙江中医药大学学报,2010,34(2):160-162.

[12] 梁小娜,林娟,李新,等.复方丹参片及其拆方对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力的改善作用和机制探讨[J].中草药,2019,50(12):2884-2890.

[13] 李静,尉娜,刘亚美,等.γ-分泌酶抑制剂DAPT阻断Notch通路并纠正脑卒中后抑郁大鼠Th17/Treg失衡[J].中国病理生理杂志,2021,37(3):393-399.

[14] YAO Y, TIAN X K, LIU X C, et al. The p53-mediated apoptosis in hypercholesterolemia-induced renal injury of rats[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2005, 25(4):408-411.

[15] 刘红燕,贾汝汉,丁国华,等.细胞凋亡在脂质肾损害中的作用[J].中国中西医结合肾病杂志,2001,2(4):196-199.

[16] SHARMA A, SHARMA R, AGARWAL T. Evaluation of urea and creatinine levels in vaginal wash fluid for the diagnosis of premature rupture of membranes[J]. Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol, 2020, 9(8):3449.

[17] FUNAYAMA M, MIMURA Y, TAKATA T, et al. Body mass index and blood urea nitrogen to creatinine ratio predicts refeeding hypophosphatemia of anorexia nervosa patients with severe malnutrition[J]. J Eat Disord, 2021, 9(1):1.

[18] ARTAVANIS-TSAKONAS S, RAND M D, LAKE R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284(5415):770-776.

[19] MCCRIGHT B. Notch signaling in kidney development [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003, 12(1):5-10.

[20] LEIMEISTER C, SCHUMACHER N, GESSLER M. Expression of Notch pathway genes in the embryonic mouse metanephros suggests a role in proximal tubule development[J]. Gene Expr Patterns, 2003, 3(5):595-598.

[21] MUREA M, PARK J K, SHARMA S, et al. Expression of Notch pathway proteins correlates with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function[J]. Kidney Int, 2010, 78(5):514-522.

[22] MORRISSEY J, GUO G J, MORIDAIIRA K, et al. Transforming growth factor-beta induces renal epithelial Jagged-1 expression in fibrotic disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(6):1499-1508.

[23] BIELESZ B, SIRIN Y, SI H, et al. Epithelial Notch signaling regulates interstitial fibrosis development in the kidneys of mice and humans[J]. J Clin Invest, 2010, 120(11):4040-4054.

(收稿日期:2021-10-15 修回日期:2022-01-10)

(编辑:舒安琴)