

## · 基础研究 ·

# 丹参酮 II A 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

冯定浩 李 均 徐静雅 张力之

**摘要** **目的** 观察丹参酮 II A 配伍  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 3,5-二氟苯乙酰-L-丙氨酸-S-苯基甘氨酸-t-丁酯(DAPT)对单侧输尿管梗阻(UUO)模型大鼠肾组织 Notch/Jagged 通路相关蛋白 NICD、Hey1、Rbp-Jk 及 Col I 表达的影响,探讨其防治肾纤维化的分子机制。**方法** 取 24 只大鼠结扎右侧输尿管建立 UUO 模型,随机分为模型组、丹参酮 II A 组、DAPT 组、配伍组,每组 6 只。另取 6 只大鼠设为正常组。正常组及模型组给予羧甲基纤维素钠(CMC-Na)灌胃,其余各给药组分别给予丹参酮 II A(25 mg/kg)、DAPT(12 mg/kg)、丹参酮 II A(25 mg/kg) + DAPT(12 mg/kg)灌胃,2 周后处死大鼠取右肾组织。采用 Masson 染色观察肾组织胶原纤维,免疫组织化学法检测各组大鼠肾组织 NICD、Hey1 表达,Western Blot 技术检测各组大鼠肾组织 Rbp-Jk、Col I 表达。**结果** 与正常组比较,模型组 Masson 染色评分升高( $P < 0.05$ ),NICD、Hey1、Rbp-Jk、Col I 蛋白表达均升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,各给药组 Masson 染色评分、NICD、Hey1、Rbp-Jk、Col I 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ )。与丹参酮 II A 组及 DAPT 组比较,配伍组 Masson 评分、NICD、Hey1、Rbp-Jk、Col I 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ )。**结论** 丹参酮 II A 配伍 DAPT 可改善 UUO 模型肾间质病理损害,减轻肾纤维化过程中胶原纤维合成沉积,其机制可能与抑制 NICD、Rbp-Jk、Hey1 及 Col I 在肾组织中的表达,影响 Notch/Jagged 信号途径转导相关。

**关键词** 丹参酮 II A;  $\gamma$ -分泌酶抑制剂; 配伍; 肾间质纤维化

Effect of Tanshinone II A Combined with DAPT on Notch/Jagged Pathway Proteins in Renal Tissue of UUO Rat Models FENG Ding-hao, LI Jun, XU Jing-ya, and ZHANG Li-zhi *Key Laboratory of Chinese Medicine Application and Basic Research, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Guangdong(519100)*

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effects of Tanshinone II A combined with  $\gamma$ -secretase inhibitor N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-s-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) on the protein expressions of Notch/Jagged pathway, i.e., NICD, Hey1, Rbp-Jk and Col I in renal tissue of UUO rat models, and to explore it's molecular mechanism in preventing and treating renal fibrosis. **Methods** Twenty-four rats were recruited for establishing UUO models by ligating the right ureter. The UUO model rats were randomly divided into model group, Tanshinone II A group, DAPT group and combination group, 6 in each group. Six rats were recruited as the normal group. The normal group and the model group were administered with CMC-Na by gavage. The medication groups were administered with Tanshinone II A (25 mg/kg), DAPT (12 mg/kg), Tanshinone II A (25 mg/kg) combined with DAPT (12 mg/kg) by gavage respectively. The rats were sacrificed after 2 weeks. The collagen fibers in renal tissue were observed by Masson staining. The expressions of NICD and Hey1 in renal tissues were detected by immunohistochemical. The expressions of Rbp-Jk and Col I in renal tissues were determined by Western Blot. **Results** Compared with the normal group, the Masson score was increased ( $P <$

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81660746)

作者单位:遵义医科大学珠海校区中药应用与基础研究重点实验室(广东 519100)

通讯作者:李 均, Tel: 13928038553, E-mail: lijun69 - 1214@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20190330. 005

0.05), the protein expressions of NICD, Hey1, Rbp-Jk and Col I were increased in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the Masson scores were decreased ( $P < 0.05$ ), the protein expressions of NICD, Hey1, Rbp-Jk and Col I were decreased in the medication groups ( $P < 0.05$ ). Compared with Tanshinone II A group and DAPT group, the Masson score was decreased ( $P < 0.05$ ); the protein expressions of NICD, Hey1, Rbp-Jk and Col I were decreased in combination group ( $P < 0.05$ ).  
**Conclusions** Tanshinone II combined with DAPT can improve the pathological damage of renal interstitial in UUO model, and alleviate collagen fiber synthesis deposition during renal fibrosis. The mechanism might be correlated to inhibiting the expression of NICD, Rbp-Jk, Hey1 and Col I in renal tissue, and affecting the Notch/Jagged signaling pathway.

**KEYWORDS** Tanshinone II A;  $\gamma$ -secretase inhibitor; compatibility; renal interstitial fibrosis

近年来研究发现 Notch/Jagged 信号通路在肾纤维化过程中扮演重要的作用,信号通路成员参与肾间质纤维化过程<sup>[1]</sup>。而 Notch/Jagged 信号通路  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 3,5-二氟苯乙酰-L-丙氨酸-S-苯基甘氨酸-t-丁酯 [N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-s-phenylglycine t-butyl ester, DAPT] 可阻断该信号通路,延缓肾纤维化进展<sup>[2]</sup>。丹参酮 II A 作为丹参中二萜醌成分,可通过上调肾小管上皮细胞 E-钙黏蛋白的表达及减轻 I 型胶原蛋白 (collagen I, Col I)、III 型胶原蛋白、IV 型胶原蛋白合成,改善肾间质纤维化<sup>[3]</sup>。既往中药抗肾纤维化研究主要局限在中药间配伍,中西医分子药物之间配伍则鲜见报道,目前已发现多种防治肾纤维化的细胞因子如肝细胞因子、DAPT<sup>[4,5]</sup>,这些细胞因子与丹参酮 II A 配伍是否对肾纤维化过程中 Notch/Jagged 通路的关键环节或治疗靶点具有协同效应,需要实验研究进一步证实。本实验采用大鼠单侧输尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 模型,观察丹参酮 II A 配伍 DAPT 对 Notch/Jagged 通路相关蛋白 Notch1 胞内端 (Notch intracellular domain, NICD)、重组信号结合蛋白-Jk (recombination signal binding protein-J kappa, Rbp-Jk)、发状分裂增强子相关亚基因家族成员 1 (hairy enhancer of split related with YRPW motif family members1, Hey1) 表达的影响,为临床应用丹参酮 II A 配伍细胞因子延缓肾纤维化提供依据。

## 材料与方法

**1 动物** 健康 SPF 级 SD 大鼠 30 只,雄性,8 周龄,体重 (190  $\pm$  10) g,由广东省实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002,实验动物质量合格证明号:44007200040361。5~6 只/笼,群养,自由进食饮水,造模前采用昼夜间断照明条

件适应性饲养 3 天。本实验严格遵守中华人民共和国科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》,经遵义医学院伦理委员会批准(批准时间:2017 年 1 月 1 日)。

**2 药物** 羧甲基纤维素钠 (carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na,天津市福晨化学试剂厂,批号:20150627),使用前用纯净水配置浓度 0.5% (m:v);丹参酮 II A (大连美仑生物有限公司,批号:M1205A),DAPT (北京索莱宝生物有限公司,批号:330A031),丹参酮 II A 及 DAPT 使用前溶于 0.5% CMC-Na (2.4 mg/mL)。

**3 主要试剂及仪器** 兔抗大鼠 Notch1 (Cleaved) 多克隆抗体 (美国 Sigma 公司,批号:SAB450501),小鼠抗大鼠 Rbp-Jk 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司,批号:SC-271128),兔抗大鼠 Col I 多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-0578R),HRP 山羊抗兔 IgG (武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号:AS014),HRP 山羊抗兔 IgG (武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号:AS003),小鼠抗- $\beta$ -actin (北京博奥森生物技术有限公司,批号:bsm-33036M),Masson 染液 (南京建成生物工作研究所,批号:D026),SP 法免疫组织化学试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司,批号:CW2069S),兔抗大鼠 Hey1 多克隆抗体 (美国 Thermo Fisher 公司,批号:PA5-40553)。TC-120M 自动脱水机 (湖北省泰维医疗科技有限公司),倒置摄影显微镜 (德国 Leica 公司),电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司),转印仪 (美国 Bio-Tek 公司),凝胶图像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

**4 模型制备** 取 24 只大鼠,参照参考文献<sup>[6]</sup>建立 UUO 模型:3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,右侧肾脏位置清洁毛发,消毒,切开皮肤,组织钳分离筋膜肌肉,暴露右侧肾脏及肾门,于靠近肾门处缝线结扎输尿管,再结扎输尿管远端,两次结扎处剪断输尿管,

防止尿液逆行性感染,术中注意避免损伤其他器官。依次缝合肌肉、皮下组织及皮肤。术后大腿肌肉注射青霉素钠 16 万 U/(kg·d),连续 3 d。本次造模成功率 100%。

**5 分组及干预方法** 将建模成功的 24 只大鼠采用随机数字表法分为 4 组:模型组、丹参酮 II A 组、DAPT 组、配伍组,每组各 6 只大鼠。另取 6 只大鼠作为正常组。术后第 2 日,正常组及模型组予以 0.5% CMC-Na 灌胃,根据参考文献[7,8]及本课题组预实验结果,其余各给药组给药剂量分别为丹参酮 II A 25 mg/kg(相当于临床给药剂量 2 倍)、DAPT 12 mg/kg、丹参酮 II A 25 mg/kg + DAPT 12 mg/kg,每日 1 次。各组连续灌胃 2 周。

## 6 检测指标及方法

**6.1 一般情况观察** 观察各组大鼠被毛、活动、进食、饮水、体重、灌胃配合及死亡等情况。

**6.2 各组大鼠肾组织肉眼观** 肉眼观察各组大鼠沿右侧肾脏肾门纵向切开剖面形态、皮髓质分界、肾盂等。

**6.3 肾组织 Masson 染色评分** 给药 2 周后,20% 乌拉坦腹腔注射麻醉动物后,腹主动脉放血处死动物。取右侧肾组织,一半放入 10% 中性甲醛固定液中,用于石蜡标本制作,进行 Masson 染色,在 400 倍光学显微镜下观察肾组织蓝色胶原纤维着色情况,观察每张切片不重复的 10 个视野,得出每个视野下肾间质蓝色面积占整个视野的比值,根据 Mizuguchi Y 等<sup>[9]</sup> 描述方法评分:(1)肾间质无着色为 0 分;(2)着色面积小于 1/4 为 1 分;(3)着色面积 1/4 ~ 1/2 为 2 分;(4)着色面积 > 1/2 为 3 分。

**6.4 免疫组织化学技术检测肾组织 NICD、Hey1 表达** 石蜡包埋切片(3 μm)在 60 °C 烤箱烘烤 2 h 后,经二甲苯 I、II 脱蜡及梯度酒精水化,热修复抗原,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻断内源性过氧化物酶,山羊血清工作液封闭后,滴加适量 NICD(1:400)及 Hey1(1:200)一抗,4 °C 孵育过夜。次日,经常温下复温后 PBS 冲洗,滴加适量小鼠抗兔来源二抗室温孵育 10 min, PBS 冲洗后滴加适量 HRP 标记的链霉亲和素,室温孵育 10 min, PBS 冲洗后滴加适量新鲜配置 DAB 显色液,镜下观察见棕黄色颗粒着色时,立即终止反应。自来水冲洗 10 min,苏木素复染 30 s ~ 2 min,自来水冲洗返蓝。梯度酒精脱水,二甲苯 I、II 透明,中性树胶封片。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定单位体积阳性染色区域的平均光密度值。

**6.5 Western Blot 技术检测 Rbp-Jk、Col I 表**

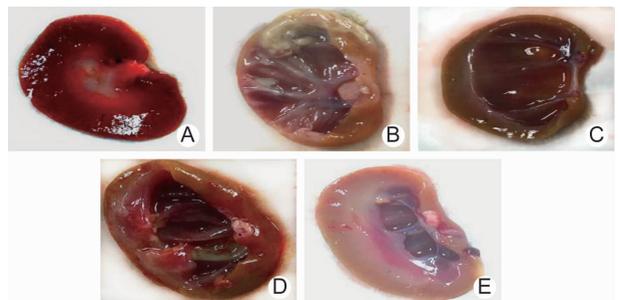
达 各组大鼠肾组织经匀浆、离心后提取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度。按照说明书要求配置浓缩胶及分离胶,进行蛋白电泳后采用半干转印法将蛋白转至 PVDF 膜,经 5% 脱脂奶粉封闭、Rbp-Jk(1:500)及 Col I(1:500)一抗 4 °C 孵育、二抗(1:5 000)室温孵育、TBST 漂洗后显影及曝光。扫描 X 光片条带,采用 Image J 软件测定光密度值。目的蛋白光密度值与 β-actin 光密度值比值作为目的蛋白相对表达量。

**7 统计学方法** SPSS 16.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较用单因素方差分析,采用 LSD 法与 Tamhane's T2 多重比较组间差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 各组大鼠一般情况** 正常组大鼠被毛光泽,活动灵敏,进食及饮水正常,体重匀速增长,灌胃配合。模型组被毛稀疏,精神萎靡,反应迟钝,进食及饮水量少,体重增长缓慢,灌胃难以配合。除进食及体重增长情况,各给药组一般状态较模型组较佳。造模及干预期间,各组大鼠均无死亡,大小便正常。

**2 各组大鼠肉眼观检查结果比较(图 1)** 正常组大鼠肾脏饱满,皮髓质分界清晰。模型组结扎侧肾脏明显大于对侧,肾盂扩张呈囊状,肾实质萎缩,皮髓质界限辨认不清。各给药组大鼠肾脏肾盂扩张、肾实质萎缩较模型组减轻,其中以配伍组尤为明显。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为丹参酮 II A 组;D 为 DAPT 组;E 为配伍组

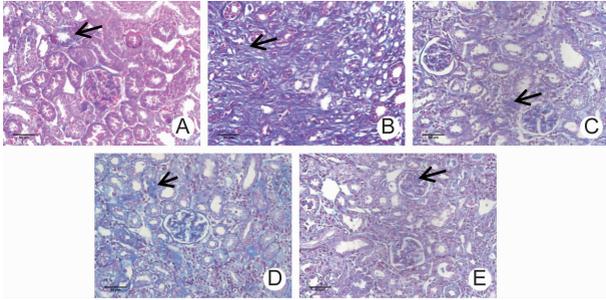
图 1 各组大鼠沿肾门纵向切开剖面图

**3 各组大鼠肾组织 Masson 染色结果比较(表 1, 图 2)** 与正常组比较,模型组大鼠肾组织 Masson 染色评分升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,各给药组大鼠肾组织 Masson 染色评分均降低( $P < 0.05$ )。与丹参酮 II A 组及 DAPT 组比较,配伍组大鼠肾组织 Masson 染色评分降低( $P < 0.05$ )。

**表 1** 各组大鼠肾组织 Masson 染色评分比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	评分
正常	6	0.15 ± 0.08
模型	6	2.48 ± 0.26*
丹参酮 II A	6	1.30 ± 0.14 <sup>△△</sup>
DAPT	6	1.30 ± 0.17 <sup>△△</sup>
配伍	6	1.10 ± 0.09 <sup>△</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与配伍组比较,<sup>△△</sup> $P < 0.05$



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为丹参酮 II A 组;D 为 DAPT 组;E 为配伍组;箭头所指为胶原纤维

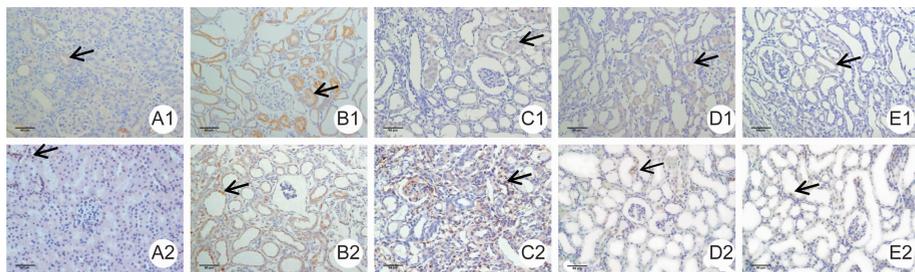
**图 2** 各组大鼠肾组织病理结果 (Masson, ×400)

**4 各组大鼠肾组织 NICD、Hey1 蛋白表达比较** (表 2, 图 3) 与正常组比较,模型组大鼠肾组织 NICD、Hey1 蛋白表达均增加( $P < 0.05$ )。与模型组比较,各给药组大鼠肾组织 NICD、Hey1 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ )。与丹参酮 II A 组及 DAPT 组比较,配伍组大鼠肾组织 NICD、Hey1 蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。与丹参酮 II A 组比较,DAPT 组大鼠肾组织 NICD、Hey1 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ )。

**表 2** 各组大鼠肾组织 NICD、Hey1 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	NICD	Hey1
正常	6	0.718 ± 0.223*	0.922 ± 0.094*
模型	6	6.337 ± 0.618	4.516 ± 0.385
丹参酮 II A	6	3.827 ± 0.553*	2.552 ± 0.232*
DAPT	6	2.648 ± 0.432 <sup>△△</sup>	1.747 ± 0.203 <sup>*△</sup>
配伍	6	1.652 ± 0.403 <sup>*△△</sup>	1.136 ± 0.155 <sup>*△△</sup>

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与丹参酮 II A 组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与 DAPT 组比较,<sup>△△</sup> $P < 0.05$



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为丹参酮 II A 组;D 为 DAPT 组;E 为配伍组;1 为 NICD 蛋白表达;2 为 Hey1 蛋白表达;箭头所指为蛋白表达

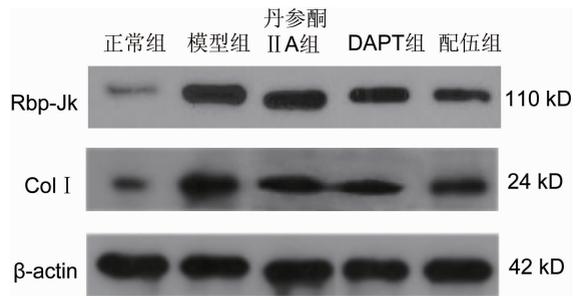
**图 3** 各组大鼠 NICD、Hey1 蛋白免疫组化结果 (×400)

**5 各组大鼠肾组织 Rbp-Jk、Col I 蛋白表达比较**(表 3, 图 4) 与正常组比较,模型组大鼠肾组织 Rbp-Jk 和 Col I 蛋白表达均增加( $P < 0.05$ )。与模型组比较,各给药组大鼠肾组织 Rbp-Jk 和 Col I 蛋白表达均降低( $P < 0.05$ )。与丹参酮 II A 组及 DAPT 组比较,配伍组大鼠肾组织 Rbp-Jk 与 Col I 蛋白均降低( $P < 0.05$ )。

**表 3** 各组大鼠肾组织 Rbp-Jk、Col I 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Rbp-Jk/β-actin	Col I /β-actin
正常	3	0.176 ± 0.023*	0.168 ± 0.015*
模型	3	0.863 ± 0.012	0.805 ± 0.032
丹参酮 II A	3	0.738 ± 0.023 <sup>*△</sup>	0.636 ± 0.055 <sup>*△</sup>
DAPT	3	0.756 ± 0.016 <sup>*△</sup>	0.662 ± 0.013 <sup>*△</sup>
配伍	3	0.423 ± 0.046*	0.436 ± 0.032*

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与配伍组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$



**图 4** 各组 Rbp-Jk、Col I 蛋白表达

## 讨论

Notch 信号通路异常表达与局灶性节段性肾小球硬化症、高血压肾病、糖尿病肾病、IgA 肾病等肾脏疾病的发病相关,并参与肾纤维化的过程<sup>[10]</sup>。刘丹等<sup>[11]</sup>研究也证实 Notch1、Jagged1、发状分裂相关增强子 1 (hairy enhancer of split 1, Hes1)、Hey1 等通路蛋白在 IgA 肾病大鼠肾脏组织呈高表达。人类 Notch2 或 Jagged1 基因突变可导致 Alagille 综合征,常并发肾纤维化<sup>[12]</sup>。在转化生长因子 β (transforming growth factor-β, TGF-β) 诱导肾小管上皮细

胞间充质转分化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)过程中, Notch/Jagged 信号通路成员 Notch1、Jagged1、Hes1 等表达上调<sup>[13]</sup>, 并且 NICD 上调与肾间质化程度呈正相关<sup>[10]</sup>。然而剔除 NICD、Rbp-Jk 基因后可使细胞内炎症反应及变性有所减轻, 减少 Col I、波形蛋白合成, 缓解肾间质纤维化同时下游靶基因 Hey1 等表达下调<sup>[1,7]</sup>。既往研究表明  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 DAPT 可减轻糖尿病肾病大鼠蛋白尿形成, 同时调节 Trp53、Bax 等促凋亡基因表达, 抑制肾小球足细胞凋亡<sup>[14]</sup>。此外, 在动物肾脏缺血再灌注实验中, DAPT 也能通过下调 P21、P16 蛋白表达, 减轻肾小管上皮细胞急性损伤后增生及分化, 缓解肾纤维化<sup>[15]</sup>。研究证实 DAPT 能显著抑制马兜铃酸所致肾纤维化过程中 Notch 信号通路的激活, 下调肾小管上皮细胞 Col I、Ⅲ型胶原蛋白表达, 缓解肾间质纤维化进展, 甚至一定程度逆转肾小管上皮细胞 EMT 及细胞外基质(extracellular matrix, ECM) 累积<sup>[16]</sup>。刘晗等<sup>[17]</sup>也发现 DAPT 可调节通路关键蛋白 NICD、Hes1 的表达, 阻断 Notch 信号途径的转导, 抑制 TGF- $\beta_1$  诱导大鼠肾小管上皮细胞 EMT。由此得知, DAPT 有可能成为今后防治肾纤维化新的潜在治疗药物, 值得进一步深入研究。

中西医结合疗法是临床治疗慢性肾脏病常用方法之一, 该领域的基础研究非常活跃, 已从经典复方、有效验方的药效物质基础研究深入到单味中药及其活性成分的干预作用研究。丹参酮 II A 作为丹参脂溶性成分, 具有微溶于水, 易溶于乙醚、乙醇、苯等有机溶剂等特点。丹参酮 II A 因含有醌型结构, 参与体内多种生物化学反应, 具有抗炎、抗氧化、保护脏器缺血再灌注损伤、营养细胞等功效<sup>[18]</sup>。Jiang C 等<sup>[19]</sup>在叶酸诱导大鼠肾损伤模型中, 观察到丹参酮 II A 可以减少 Col、纤维连接蛋白(fibronectin, FN) 在肾间质沉积, 延缓肾间质纤维化进展。Cao L 等<sup>[20]</sup>研究发现丹参酮 II A 能抑制高糖诱导 HK-2 细胞分泌  $\alpha$ -平滑肌蛋白、FN 等 EMT 标志蛋白合成, 并促进肾小管上皮细胞 E-钙黏蛋白生成, 且呈剂量效应关系。可见丹参酮 II A 在防治肾纤维化病理进展中作用同样不可忽视, 丹参酮 II A 能否通过干预 Notch/Jagged 信号通路关键蛋白发挥作用, 协同 DAPT 发挥缓解肾间质纤维化作用, 未见相关文献报道。

目前建立肾纤维化模型方法主要包括手术诱导模型及药物诱导模型两类<sup>[21]</sup>。UUO 模型部分实验结果与人类梗阻性肾病相同<sup>[22]</sup>, 并且具有造模简单、病变均匀、成功率高、易重复、快速等特点<sup>[23]</sup>, 故本实验采

用此模型可直接反映梗阻性肾病与肾纤维化关系。既往课题组研究表明黄芪—丹参药对及丹参有效成分均能有效干预 UUO 模型大鼠肾纤维化进展<sup>[24,25]</sup>。

本实验研究结果表明正常组大鼠肾小球可见少量淡蓝色胶原纤维, 而 UUO 模型大鼠术后 2 周, 梗阻侧肾脏胶原纤维弥漫性分布, 并且肾小管腔局部扩张甚至萎缩, 上皮细胞胞浆染色较淡, 可能与细胞水肿或炎症反应相关; 同时伴 Col I、NICD、Rbp-Jk、Hey1 蛋白表达上调。据此推测术后 UUO 模型大鼠肾组织 ECM 累积, 进而发展为肾间质纤维化, 而且与 Notch/Jagged 信号通路关键蛋白表达上调相关。与模型组比较, 各给药组 UUO 大鼠肾间质纤维化病理改变均有改善, 其中配伍组尤为明显。与模型组比较, 经丹参酮 II A、DAPT 干预后, Col I 蛋白表达减少, 同时 NICD、Rbp-Jk、Hey1 蛋白表达均下调, 以丹参酮 II A 配伍 DAPT 更为明显。结果显示 UUO 模型大鼠在丹参酮 II A、DAPT 干预后, ECM 累积有所减轻, 同时 Notch/Jagged 信号途径关键蛋白表达受抑制。但丹参酮 II A、DAPT 及其配伍在体外是否具有相同药理作用仍需进一步研究。

综上所述, 丹参酮 II A、DAPT 可通过干预 Notch/Jagged 信号通路关键蛋白表达, 减轻胶原纤维沉积, 缓解肾间质纤维化进展。丹参酮 II A 配伍 DAPT 干预 Col I、NICD、Rbp-Jk、Hey1 蛋白表达作用优于单用丹参酮 II A 或 DAPT。随着丹参酮 II A、DAPT 与肾间质纤维化机制研究不断深入, 丹参酮 II A 配伍 DAPT 有望为中西医分子药物配伍防治肾纤维化提供新的研究模式, 并且通过抑制肾上皮细胞 EMT、改善肾脏 ECM 累积机制, 发挥中西医药物结合延缓肾纤维化优势。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突。

## 参 考 文 献

- [1] Choi A, Nam SA, Kim WY, et al. Notch signaling in the collecting duct regulates renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in mice[J]. Korean J Intern Med, 2018, 33(4): 774 - 782.
- [2] 黄飞, 王小琴. DAPT 对 Notch2/hes1 信号通路在庆大霉素所致大鼠肾损伤及修复过程中表达的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(17): 1401 - 1405.
- [3] 黄宝英, 曹罗元, 富显果, 等. 丹参酮 II A 对高糖诱导肾小管上皮细胞转分化中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(7): 965 - 969.
- [4] Zhang C, Li W, Wen J, et al. Autophagy is in-

- involved in mouse kidney development and podocyte differentiation regulated by Notch signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(7): 1315–1328.
- [5] 陈雨思, 李均. 肝细胞生长因子抗肾纤维化的机制[J]. *海南医学*, 2016, 27(20): 3364–3366.
- [6] 马园园, 刘成海, 陶艳艳. 肾纤维化动物模型特点与研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 398–403.
- [7] 吕彦洁, 孙建平, 高延霞, 等. 丹参酮 II A 磺酸钠对大鼠肾间质纤维化的影响及机制探讨[J]. *山东医药*, 2014, 54(10): 30–32.
- [8] Bielez B, Sirin Y, Han S, 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.
- [9] Mizuguchi Y, Miyajima A, Kosaka T, et al. Atorvastatin ameliorates renal tissue damage in unilateral ureteral obstruction [J]. *J Urol*, 2004, 172(6): 2456–2459.
- [10] Murea M, Park JK, Sharma S, et al. Expression of Notch pathway proteins correlates with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function [J]. *Kidney Int*, 2010, 78(5): 514–522.
- [11] 刘丹, 王彩丽. 雷公藤红素对 IgA 肾病大鼠肾脏组织中 Notch 信号通路表达的影响研究 [J]. *重庆医学*, 2016, 45(25): 3457–3461.
- [12] Gilbert MA, Spinner NB. Alagille syndrome: genetics and functional models [J]. *Curr Pathobiol Rep*, 2017, 5(3): 233–241.
- [13] Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, et al. Integration of TGF- $\beta$ /Smad and Jagged1/Notch signaling in epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *EMBO J*, 2004, 23(5): 1155–1165.
- [14] Niranjan T, Bielez B, Gruenwald A, et al. The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease [J]. *Nat Med*, 2008, 14(3): 290–298.
- [15] Sørensen-Zender I, Rong S, Susnik N, et al. Renal tubular Notch signaling triggers a prosenescent state after acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(8): F907–F915.
- [16] 洪炜龙, 陆红, 吴存造, 等.  $\gamma$ -分泌酶抑制剂 DAPT 抑制 Notch 信号逆转马兜铃酸诱导的肾小管细胞表型转化 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(3): 209–214.
- [17] 刘晗, 王玲莉, 程剑剑, 等.  $\gamma$ -分泌酶抑制剂对大鼠肾小管上皮细胞间充质转分化的抑制作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(4): 805–807.
- [18] 闫俊, 冯娟, 杨雪, 等. 丹参酮 II A 的药理作用及疾病治疗的最新进展 [J]. *实用药物与临床*, 2015, 18(8): 972–977.
- [19] Jiang C, Zhu W, Yan X, et al. Rescue therapy with Tanshinone II A hinders transition of acute kidney injury to chronic kidney disease via targeting GSK3 $\beta$  [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36698.
- [20] Cao L, Huang B, Fu X, et al. Effects of tanshinone II A on the regulation of renal proximal tubular fibrosis [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 4247–4252.
- [21] 张翥, 秦中豪. 肾小管间质纤维化动物模型和药物干预 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15(7): 565–570.
- [22] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(5): F861–F875.
- [23] Forbes MS, Thornhill BA, Chevalier RL. Proximal tubular injury and rapid formation of atubular glomeruli in mice with unilateral ureteral obstruction: a new look at an old model [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(1): F110–F117.
- [24] 李均, 曹轶璇, 王冬, 等. 黄芪—丹参药对及其组分对肾纤维化梗阻大鼠肾组织 I、III 型胶原的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2012, 39(8): 1640–1642.
- [25] 李均, 付旭, 姚兰, 等. 丹酚酸 B、C 分子药对配伍对 UUO 大鼠肾间质纤维化的保护作用及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(20): 113–117.

(收稿: 2018-07-11 在线: 2019-04-23)

责任编辑: 赵芳芳