

引用本文:陈霞,米爱红,秦丽.丹参素对糖尿病肾病大鼠 Notch1/免疫球蛋白 κ J 区重组信号结合蛋白/Msh 同源异型基因 2 信号通路及钙磷代谢的影响[J].安徽医药,2023,27(1):50-54.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.01.011.

◇ 药学研究 ◇



丹参素对糖尿病肾病大鼠 Notch1/免疫球蛋白 κ J 区重组信号结合蛋白/Msh 同源异型基因 2 信号通路及钙磷代谢的影响

陈霞,米爱红,秦丽

作者单位:河南省直第三人民医院肾内科,河南 郑州 450000

摘要: **目的** 探讨丹参素通过调控 Notch1/免疫球蛋白 κ J 区重组信号结合蛋白(RBP-J κ)/Msh 同源异型基因 2(Msx2)信号通路对糖尿病肾病大鼠钙磷代谢的影响。**方法** 2019 年 10 月至 2020 年 4 月,北京维通利华实验动物科技有限公司购入 SD 大鼠,采用高糖高脂饲养 4 周,腹腔注射链脲佐菌素(STZ, 40 mg/kg)建立糖尿病肾病大鼠模型。建模后按随机数字表法分为模型组、丹参素(低、中、高)剂量组(2.5 mL·kg⁻¹·d⁻¹、5.0 mL·kg⁻¹·d⁻¹、10.0 mL·kg⁻¹·d⁻¹)、糖适平组(阳性对照,9.45 mL·kg⁻¹·d⁻¹),每组 10 只;对照组 10 只大鼠基础饲料饲养。给予相应的药物连续灌胃 4 周,1 次/天。实验结束,观察大鼠一般情况;血糖仪检测空腹血糖(FBG)水平;24 h 尿微量白蛋白(24 h 尿 mALB)试剂盒检测 24 h 尿 mALB 水平;全自动生化分析仪检测血清中钙、磷水平;苏木精-伊红(HE)染色检测大鼠肾脏组织形态;Von Kossa 染色检测大鼠肾主动脉钙盐沉积情况;蛋白免疫印迹检测大鼠肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、Msx2、Jagged1、Notch1 基因的胞内域(N1-ICD)蛋白水平。**结果** 给药前,与对照组相比,造模组大鼠的 FBG、24 h 尿 mALB 水平升高($P<0.05$)。给药后,模型组大鼠精神萎靡、活动减少,反应迟钝、眼神无力,多饮多食、排尿量增加、垫料易潮湿;出现肾小球肥大、基膜增厚现象,组织纤维化、炎症浸润明显;肾主动脉血管内膜、中膜弹性纤维间出现大量黑色颗粒,血管钙化严重。丹参素(低、中、高)给药组随着剂量的增加,大鼠活动逐渐恢复正常,反应迟钝减少,但仍有多饮多食、排尿量增加、垫料易潮湿现象;肾小球肥大、基膜增厚缓解,组织纤维化消失、炎症缓解;肾主动脉血管内膜、中膜弹性纤维间黑色颗粒减少,血管钙化稍缓解。与对照组相比,模型组 FBG、24 h 尿 mALB 水平,血清中钙[(2.89±0.14)mmol/L 比(2.24±0.09)mmol/L]、磷[(3.48±0.28)mmol/L 比(2.49±0.21)mmol/L]、钙×磷[(126.29±13.16)mg²/dL² 比(71.06±13.48)mg²/dL²],肾脏组织中 Notch1[(1.06±0.15)比(0.31±0.06)],RBP-J κ [(1.15±0.03)比(0.37±0.04)],Msx2[(0.69±0.05)比(0.23±0.04)],Jagged1、N1-ICD 蛋白水平升高($P<0.05$);与模型组相比,丹参素低剂量组 24 h 尿 mALB 水平,血清中钙、磷、钙×磷,肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、N1-ICD 蛋白水平降低,丹参素(中、高)剂量组、糖适平组 FBG、24 h 尿 mALB 水平,血清中钙、磷、钙×磷,肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、Msx2、Jagged1、N1-ICD 蛋白水平降低($P<0.05$)。**结论** 丹参素可通过调控 Notch1/RBP-J κ /Msx2 信号通路发挥对糖尿病肾病大鼠钙磷沉积现象的改善。

关键词: 丹参; 糖尿病肾病; Notch1/RBP-J κ /Msx2 信号通路; 钙磷代谢; 大鼠, Sprague-Dawley

Effects of Danshensu on Notch1/recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region (RBP-J κ)/Msh homeobox 2 (Msx2) signaling pathway and calcium and phosphorus metabolism in diabetic nephropathy rats

CHEN Xia, MI Aihong, QIN Li

Author Affiliation: Nephrology Department, Henan Provincial Third People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Danshensu on calcium and phosphorus metabolism by regulating the signal pathway of Notch1/recombination signal-binding protein for immunoglobulin kappa J region (RBP-J κ)/Msh homeobox 2 (Msx2) in diabetic nephropathy rats. **Methods** From October 2019 to April 2020, SD rats were purchased from Beijing Weitong Lihua Laboratory Animal Technology Co., Ltd. The diabetic nephropathy rat model was established by feeding them with high glucose and fat for 4 weeks and injecting streptozotocin (STZ, 40 mg/kg) intraperitoneally. After modeling, the rats were randomly assigned into model group, Danshensu (low, medium, and high) dose groups (2.5 mL·kg⁻¹·d⁻¹, 5.0 mL·kg⁻¹·d⁻¹, 10.0 mL·kg⁻¹·d⁻¹), and glycolipin group (positive control, 9.45 mL·kg⁻¹·d⁻¹), with 10 rats in each group. In the control group, 10 rats were fed basal diet. Corresponding drugs were given by gavage for 4 weeks, once a day. At the end of the experiment, the general situation of the rats was observed, and the fasting blood glucose (FBG) level was detected by the blood glucose meter; 24 h urinary microalbumin (24 h urinary mALB) kit was used to detect 24 h urinary mALB; the levels of serum calcium and phosphorus were measured by automatic biochemical analyzer; hematoxylin eosin (HE) staining was used to detect the renal morphology; Von Kossa staining was used to detect calcium deposition in renal aorta of rats; and the protein

levels of Notch1, RBP-J κ , Msx2, Jagged1 and Notch1 intracellular domain in the kidney of rats were detected by Western blot. **Results** Before administration, compared with those in the control group, the levels of FBG and 24 h urinary mALB in the model group were higher ($P < 0.05$). After administration, the rats in the model group had depressed spirit, decreased activity, slow response, weak eyes, excessive drinking and eating, increased urinary output, and easily wet bedding; there were glomerular hypertrophy, basement membrane thickening, obvious fibrosis and inflammatory infiltration; in addition, there were a lot of black granules between the elastic fibers of the intima and the media of the renal aorta, and the calcification of the vessels was serious. With the increase of Danshensu (low, medium and high) administration, the activity of rats gradually returned to normal, and the slow reaction was decreased, however, there were still excessive drinking and eating, increased urination, and easily wet bedding; the glomerular hypertrophy, basement membrane thickening, tissue fibrosis and inflammation were relieved; the black granules between the elastic fibers of the intima and the media of the renal aorta decreased, and the calcification of the blood vessels slightly relieved. Compared with those in the control group, the levels of FBG and 24 h urinary mALB, serum calcium $[(2.89 \pm 0.14) \text{ mmol/L vs. } (2.24 \pm 0.09) \text{ mmol/L}]$, phosphorus $[(3.48 \pm 0.28) \text{ mmol/L vs. } (2.49 \pm 0.21) \text{ mmol/L}]$, calcium $\times$ phosphorus $[(126.29 \pm 13.16) \text{ mg}^2/\text{dL}^2 \text{ vs. } (71.06 \pm 13.48) \text{ mg}^2/\text{dL}^2]$, the protein levels of Notch1 $[(1.06 \pm 0.15) \text{ vs. } (0.31 \pm 0.06)]$, RBP-J κ $[(1.15 \pm 0.03) \text{ vs. } (0.37 \pm 0.04)]$, Msx2 $[(0.69 \pm 0.05) \text{ vs. } (0.23 \pm 0.04)]$, Jagged1, and N1-ICD in kidney tissue of the model group were higher ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the level of 24-hour urinary mALB, serum calcium, phosphorus, calcium $\times$ phosphorus, the protein levels of Notch1, RBP-J κ , and N1-ICD in kidney tissue in the low-dose Danshensu group were lower, the levels of FBG and 24-hour urinary mALB, serum calcium, phosphorus, calcium $\times$ phosphorus, the protein levels of Notch1, RBP-J κ , Msx2, Jagged1, and N1-ICD in kidney tissue in the Danshensu (medium and high) dose group and Tangshiping group were lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Danshensu can inhibit the Notch1/RBP-J κ /Msx2 signaling pathway to alleviate the calcium and phosphorus deposition in diabetic nephropathy rats.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; Diabetic nephropathy; Notch1/recombination signal-binding protein for immunoglobulin kappa J region/Msh homeobox 2 signal pathway; Calcium and phosphorus metabolism; Rats, Sprague-Dawley

糖尿病肾病属糖尿病引起的慢性微血管并发症之一,临床上表现为尿蛋白和肾功能衰退^[1];骨代谢、矿物质紊乱代谢综合征是终末期肾脏疾病的并发症之一,表现为钙、磷水平异常,而钙、磷水平异常可提高血管钙化率,是骨质疏松形成的途径之一,增加肾脏诱发骨病的风险,不利于治疗^[2]。减少糖尿病肾病的并发症对于治疗疾病意义重大。丹参素对心血管具有保护作用,可作为一种钙拮抗剂有效抑制钙内流,从而抑制血管钙化^[3],但具体作用机制尚不清楚。Notch1/免疫球蛋白 κ J区重组信号结合蛋白(RBP-J κ)/Msh同源异型基因2(Msx2)信号通路与血管钙化有明显的相关性^[4],丹参素是否影响Notch1/RBP-J κ /Msx2信号通路从而影响糖尿病肾病钙磷代谢而发挥对肾脏的保护作用尚未见报道。因此,本研究通过高糖高脂、链脲佐菌素(STZ)诱导建立糖尿病肾病大鼠模型,探究丹参素对糖尿病肾病大鼠钙磷代谢的影响,并探讨其初步机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2019年10月至2020年4月,健康SD大鼠购自北京维通利华实验动物科技有限公司[SPF级,许可证号SCXK(京)-2018-0017],体质量 $(210 \pm 10) \text{ g}$ 。河南省直第三人民医院动物饲养中心暂养,温度 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照/黑暗(12 h/12 h)常规饲养。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 试剂与仪器 丹参素(西安清乐生物科技有限公司,批号090208,纯度 $\geq 98\%$);STZ(美国sigma公

司,批号S0131);格列喹酮片(糖适平,北京万辉双鹤药业有限责任公司,批号H10940258);24 h尿微量白蛋白(microalbuminuria, mALB)试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司,批号SBJ-R0088);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(上海生工生物技术公司,批号E607318);Von Kossa染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号G3282);一抗兔源Notch1、RBP-J κ 、Msx2、Jagged1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、二抗辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔(英国abcam公司);一抗兔源Notch1基因的胞内域(N1ICD,美国Bioworld公司)。血糖仪(强生医疗器材有限公司,型号UltraVue);全自动生化分析仪(日本Toshiba公司,型号TBA-40ER)。

1.3 动物分组及给药处理 所有大鼠实验前检测尿蛋白、血糖水平。高糖高脂饲料各组分比例:胆酸钠0.1%、猪油10%、基础饲料61.9%、蔗糖20%、蛋黄粉8%。参照文献[5]构建糖尿病肾病大鼠模型,高糖高脂饲料连续饲养大鼠4周,禁食12 h后腹腔注射 40 mg/kg STZ,72 h后采集尾静脉血检测血糖水平,若空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) $\geq 16.70 \text{ mmol/L}$,即为造模成功。选择造模成功大鼠50只,随机数字表法随机分为模型组、丹参素(低、中、高)剂量组、糖适平组,每组10只;对照组($n=10$)基础饲料正常饲养相同时间,禁食12 h后腹腔注射等体积 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液。丹参素(低、中、高)剂量组灌胃 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $5.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 10.0

$\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 丹参素, 糖适平组灌胃 $9.45 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 糖适平, 对照组、模型组灌胃等体积蒸馏水, 1 次/天, 连续 4 周。

1.4 实验结束观察大鼠一般情况 实验结束后观察各组大鼠精神状态, 活动量情况, 机体反应、饮食饮水、排尿量情况。

1.5 血糖仪检测 FBG 水平 在给药前和实验结束后, 动物禁食不禁水, 尾静脉采血, 血糖仪检测 FBG 水平。

1.6 24 h 尿 mALB 试剂盒检测 24 h 尿 mALB 水平 在给药前和实验结束后, 动物禁食不禁水, 收集 24 h 尿液, 离心取上清, 按照 24 h 尿 mALB 试剂盒说明书检测上清液中 24 h 尿 mALB 水平。

1.7 全自动生化分析仪检测血清中钙、磷水平 给药后尾静脉取血, 分离血清, 全自动生化分析仪检测血清中钙、磷水平。钙 $\times$ 磷(mg^2/dL^2)=钙(mmol/L) $\times$ 4 $\times$ 磷(mmol/L) $\times$ 3.1。

1.8 HE 检测大鼠肾脏组织形态 实验结束, 尾静脉取血后立即处死大鼠, 剖开腹腔取出肾脏, 部分置于 4% 多聚甲醛固定后制备石蜡切片, 苏木精染色、伊红复染, 显微镜下观察肾脏组织形态。部分置于 -80°C 冰箱保存待检; 同时剪取脊柱旁肾主动脉血管置于 4% 多聚甲醛固定。

1.9 Von Kossa 染色检测大鼠肾主动脉钙盐沉积情况 4% 多聚甲醛中取出肾主动脉, 制备石蜡切片, 5% 硝酸银浸染, 5% 硫代硫酸钠处理, 0.5% 伊红浸染, 显微镜下观察肾主动脉钙盐沉积情况。黑色颗粒为钙盐沉积。

1.10 蛋白免疫印迹检测大鼠肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、Mx2、Jagged1、N1-ICD 蛋白水平 -80°C 冰箱中取肾脏组织, 添加蛋白裂解液冰上研磨, $10\,000\text{ g } 4^\circ\text{C}$ 离心 20 min, 上清即为总蛋白。相同蛋白量上样、凝胶电泳分离转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭; 分别加入一抗 Notch1、RBP-J κ 、Mx2、Jagged1、N1-ICD、GAPDH, 4°C 孵育过夜; 加入对应二

抗, 室温孵育 1 h。凝胶成像系统采集图像, Image J 软件对条带进行灰度分析。

1.11 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 计量数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较行单因素方差分析, 两两比较行 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参素对大鼠一般情况影响 对照组大鼠正常饮食、饮水, 精神状态良好; 模型组大鼠精神萎靡、活动减少, 反应迟钝、眼神无力, 多饮多食、排尿量增加、垫料易潮湿; 丹参素低剂量组症状稍优于模型组, 但仍出现精神萎靡、活动减少、反应迟钝、双目无神, 多饮多食、排尿量增加, 垫料易潮湿; 丹参素(中、高)剂量组、糖适平组情况缓解, 活动基本正常, 反应稍迟钝, 但仍多饮多食、排尿量增加、垫料易潮湿。

2.2 丹参素对 FBG、mALB 的影响 给药前, 与对照组相比, 模型组、丹参素(低、中、高)剂量组、糖适平组 FBG、24 h 尿 mALB 水平升高($P < 0.05$)。给药后, 与对照组相比, 模型组 FBG、24 h 尿 mALB 水平升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 丹参素低剂量组 24 h 尿 mALB 水平, 丹参素(中、高)剂量组、糖适平组 FBG、24 h 尿 mALB 水平降低($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 丹参素对大鼠肾脏组织形态的影响 对照组大鼠肾脏组织形态正常, 结构清晰; 模型组出现肾小球肥大、基膜增厚现象, 组织纤维化、炎症浸润明显; 丹参素低剂量组肾小球肥大、基膜增厚现象明显, 组织纤维化、炎症现象明显; 丹参素中剂量组肾小球肥大、基膜增厚缓解, 组织纤维化消失、炎症缓解; 丹参素高剂量组和糖适平组肾脏组织形态基本正常, 无组织纤维化、炎症现象。见图 1。

2.4 丹参素对大鼠肾主动脉血管钙化的影响 对照组肾主动脉血管正常; 模型组肾主动脉血管内膜、中膜弹性纤维间出现大量黑色颗粒, 血管钙化严重; 丹参素低剂量组肾动脉血管内膜、中膜弹性纤维间出现黑色颗粒, 但相对模型组减少, 血管钙

表 1 大鼠空腹血糖(FBG)、24 h 尿微量白蛋白(24 h 尿 mALB)水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	FBG/(mmol/L)		24 h 尿 mALB/(mg/L)	
		给药前	给药后	给药前	给药后
对照组	10	6.73 $\pm$ 0.52	7.09 $\pm$ 0.98	22.18 $\pm$ 3.95	22.81 $\pm$ 4.17
模型组	10	19.48 $\pm$ 3.18 ^①	20.35 $\pm$ 3.73 ^①	60.76 $\pm$ 5.93 ^①	101.38 $\pm$ 13.15 ^①
丹参素低剂量组	10	19.56 $\pm$ 3.59 ^①	17.56 $\pm$ 3.15	59.48 $\pm$ 6.17 ^①	77.86 $\pm$ 7.14 ^②
丹参素中剂量组	10	19.83 $\pm$ 3.44 ^①	16.34 $\pm$ 3.86 ^②	60.98 $\pm$ 5.76 ^①	51.48 $\pm$ 6.95 ^②
丹参素高剂量组	10	20.06 $\pm$ 3.61 ^①	16.18 $\pm$ 3.15 ^②	60.37 $\pm$ 6.14 ^①	47.29 $\pm$ 5.37 ^②
糖适平组	10	19.98 $\pm$ 3.19 ^①	16.29 $\pm$ 3.18 ^②	60.33 $\pm$ 5.79 ^①	64.75 $\pm$ 6.18 ^②
F 值		29.27	20.13	75.61	123.35
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: ①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与模型组相比, $P < 0.05$ 。

化稍缓解;丹参素中剂量组肾主动脉血管内膜出现黑色颗粒,中膜弹性纤维间黑色颗粒减少,血管钙化缓解;丹参素高剂量组和糖适平组血管内膜、中膜弹性纤维间颗粒明显减少,血管钙化缓解。见图2。

2.5 丹参素对大鼠血清中钙、磷水平的影响 与对照组相比,模型组血清中钙、磷、钙×磷升高($P<0.05$);与模型组相比,丹参素(低、中、高)剂量组、糖适平组血清中钙、磷、钙×磷降低($P<0.05$)。见表2。

表2 大鼠血清中钙、磷、钙×磷水平比较 $\bar{x}\pm s$

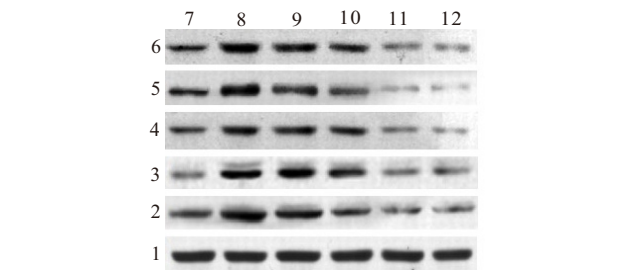
组别	鼠数	钙/ (mmol/L)	磷/ (mmol/L)	钙×磷/(mg ² / dL ²)
对照组	10	2.24±0.09	2.49±0.21	71.06±13.48
模型组	10	2.89±0.14 ^①	3.48±0.28 ^①	126.29±13.16 ^①
丹参素低剂量组	10	2.74±0.11 ^②	3.14±0.29 ^②	106.73±12.57 ^②
丹参素中剂量组	10	2.63±0.08 ^②	3.01±0.25 ^②	96.18±10.33 ^②
丹参素高剂量组	10	2.46±0.09 ^②	2.78±0.18 ^②	84.83±8.18 ^②
糖适平组	10	2.64±0.07 ^②	3.02±0.22 ^②	97.96±9.18 ^②
F值		51.77	19.14	27.63
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。

2.6 丹参素对大鼠肾脏组织 Notch1、RBP-J κ 、Msx2、Jagged1、N1-ICD 蛋白水平的影响 与对照组相比,模型组肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、Msx2、Jagged1、N1-ICD 蛋白水平升高($P<0.05$);与模型组相比,丹参素低剂量组肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、N1-ICD 蛋白水平降低,丹参素(中、高)剂量组、糖适平组肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、Msx2、Jagged1、N1-ICD 蛋白水平降低($P<0.05$)。见图3,表3。

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病终末阶段,血管钙化率明显高于正常同龄人。血管钙化是钙磷沉积血管壁,可促进高血压、肾小球囊内压升高,加速肾脏微血管钙化,从而加速疾病发展^[6];钙磷积累导致血管变窄



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—Notch1 基因的胞内域(N1-ICD);3—Jagged1;4—Msh 同源异型基因2(Msx2);5—免疫球蛋白 κ J 区重组信号结合蛋白(RBP-J κ);6—Notch1;7—对照组;8—模型组;9—丹参素低剂量组;10—丹参素中剂量组;11—丹参素高剂量组;12—糖适平组。

图3 大鼠肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、Msx2、Jagged1 和 N1-ICD 蛋白水平

变脆,与心血管事件死亡率相关,是心血管疾病的危险因素^[7]。本研究首先构建糖尿病肾病大鼠模型,通过检测 FBG、24 h 尿 mALB 水平,观察肾脏组织病理学形态改变以验证模型构建是否成功。结果发现与正常对照组相比,模型组 FBG、24 h 尿 mALB 水平升高;大鼠出现精神萎靡、活动减少,反应迟钝、眼神无力,多饮多食、排尿量增加、垫料易潮湿;形态学观察发现肾小球肥大、基膜增厚现象,组织纤维化、炎症浸润明显,提示模型建立成功。Von Kossa 染色发现模型组大鼠肾主动脉血管内膜、中膜弹性纤维间出现大量黑色颗粒,血清中钙、磷、钙×磷升高,提示糖尿病肾病大鼠血管钙化严重,沉积于肾主动脉血管处,导致肾小球肥大、基膜增厚,影响病情。

丹参素是从中药丹参中提取的水溶性酚酸类化合物,易溶于水,难溶于有机溶剂,具有广泛的药理作用,可预防动脉粥样硬化、抗氧化、减少纤维化、促进骨髓基质干细胞分化为成骨细胞等;同时可抑制钙离子内流;起抗炎作用,可清除自由基,保护因钙离子超载和氧化应激引起的细胞损伤^[8-9]。冠心病中钙离子负荷是引起心肌细胞缺血及再灌注损伤的一个重要机制,丹参素可调节钙离子进出,减轻钙离子负荷,实现对心肌细胞的保护^[10]。

表3 大鼠肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、Msx2、Jagged1、N1-ICD 蛋白水平比较 $\bar{x}\pm s$

组别	鼠数	Notch1	RBP-J κ	Msx2	Jagged1	N1-ICD
对照组	10	0.31±0.06	0.37±0.04	0.23±0.04	0.18±0.04	0.24±0.04
模型组	10	1.06±0.15 ^①	1.15±0.03 ^①	0.69±0.05 ^①	0.89±0.08 ^①	1.27±0.21 ^①
丹参素低剂量组	10	0.94±0.11 ^②	1.01±0.06 ^②	0.64±0.05	0.83±0.11	0.87±0.14 ^②
丹参素中剂量组	10	0.46±0.08 ^②	0.38±0.04 ^②	0.42±0.04 ^②	0.43±0.08 ^②	0.36±0.05 ^②
丹参素高剂量组	10	0.14±0.03 ^②	0.08±0.01 ^②	0.13±0.03 ^②	0.17±0.02 ^②	0.17±0.04 ^②
糖适平组	10	0.15±0.04 ^②	0.07±0.02 ^②	0.14±0.04 ^②	0.23±0.04 ^②	0.21±0.05 ^②
F值		202.90	1 572.59	345.14	226.51	168.17
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:RBP-J κ 为免疫球蛋白 κ J 区重组信号结合蛋白,Msx2 为 Msh 同源异型基因2,N1-ICD 为 Notch1 基因的胞内域。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。

本研究发现,丹参素随着剂量的增加,大鼠活动逐渐恢复正常,反应迟钝减少;肾小球肥大、基膜增厚缓解,组织纤维化消失、炎症缓解;肾主动脉血管内膜、中膜弹性纤维间黑色颗粒减少,血管钙化缓解;血清中钙、磷、钙×磷升高。提示丹参素可缓解糖尿病肾病大鼠活动减少、精神萎靡、反应迟钝等临床症状,缓解肾脏组织损坏,减少肾主动脉血管钙化情况,从而实现对大鼠的保护。

Notch1 信号通路属高度保守信号转导通路,可调节细胞增殖、凋亡、分化等过程,参与多种组织器官发育^[11],同时参与血管钙化、骨骼异常改变、癌症发生发展等过程,其中血管钙化类似于骨形成的主动调节过程,与血管钙化关系密切^[12]。转录因子 RBP-J κ 属 Notch 信号通路调节因子,DNA 结合蛋白在哺乳动物中成为 RBP-J κ ,可识别并结合特定的 DNA 序列从而发挥功能^[13]。Msx2 属肌节同源框家族一员,存在于充质细胞与上皮细胞交界处,参与细胞增殖、分化过程,与心血管、骨骼等组织发育密切相关,编码的转录抑制蛋白可参与调控细胞增殖、凋亡过程,从而影响机体发育^[14]。在肾结石中存在明显的钙化情况,肾脏组织中 Msx2 水平明显高于对照组,Msx2 表达水平可显示肾结石的钙化情况^[15]。Jagged1 作为 Notch1 的配体,在血管生成中发挥重要作用^[16]。受体 Notch1 与相邻的配体 Jagged1 结合可活化 Notch 信号通路,活化 Notch 信号通路可暴露出 N1-ICD,活化的 N1-ICD 可与 RBP-J κ 结合活化 Notch 靶基因,Msx2 是其中的一个靶基因,可直接参与血管钙化过程^[17-19]。本研究发现,与对照组相比,模型组大鼠肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、Msx2、Jagged1、N1-ICD 蛋白水平升高,提示糖尿病肾病肾脏组织中 Notch 信号通路处于激活状态,Notch1 与 Jagged1 结合后暴露出 N1-ICD,N1-ICD 结合 RBP-J κ 促进 Msx2 表达,促进钙、磷水平升高,钙、磷过多在血管中累积,肾血管出现钙化,钙化的血管加重疾病进程。与模型组相比,丹参素低剂量组肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、N1-ICD 蛋白水平降低,丹参素(中、高)剂量组、糖适平组肾脏组织中 Notch1、RBP-J κ 、Msx2、Jagged1、N1-ICD 蛋白水平降低,提示丹参素可抑制上述 Notch 信号通路从而降低钙、磷水平,实现对肾脏组织保护。

通过本研究认为丹参素可能通过 Notch1/RBP-J κ /Msx2 信号通路发挥对糖尿病肾病大鼠钙磷异常的调控,从而实现肾脏的保护作用。

(本文图 1,2 见插图 1-3)

参考文献

[1] 陈玉琴,林丽,张子阳,等. SDF-1/CXCR4 在糖尿病肾组织中的表达及其与微血管异常的关系[J]. 中国免疫学杂志,

2017, 33(12):1870-1873.

- [2] 阚艳红. 糖尿病肾病与慢性肾小球肾炎血液透析患者血钙、血磷及全段甲状旁腺激素水平分析[J]. 河南医学研究, 2020, 29(6):1021-1022.
- [3] 张杰,王少敏,刘敏,等. 丹参素对血管平滑肌细胞钙化和凋亡的抑制作用[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(18):1857-1859.
- [4] 龚财判,欧三桃. Notch1 信号通路血管钙化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(2):213-216.
- [5] 尹江宁,汪华君,卢国元,等. 熊果酸对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17):132-138.
- [6] COZZOLINO M, CICERI P, GALASSI A, et al. The key role of phosphate on vascular calcification [J]. Toxins, 2019, 11(4):213-226.
- [7] AZPIAZU D, GONZALO S, VILLA-BELLOSTA R. Tissue non-specific alkaline phosphatase and vascular calcification: a potential therapeutic target[J]. Curr Cardiol Rev, 2019, 15(2):91-95.
- [8] 吴晓东,张峰,梁瑞峰. 大黄素与丹参素合用对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的保护作用[J]. 天津中医药, 2018, 35(2):143-146.
- [9] 孙大伟,冯丽莎,高青,等. 基于自噬基因 Beclin-1 与 LC3 探讨丹参素对 H/R 大鼠心肌细胞 ATP5G1 表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(11):1493-1497.
- [10] 郑云霞,孟萌. 中药丹参治疗冠心病的药理成分及作用分析[J]. 双足与保健, 2018, 27(17):190-191.
- [11] WANG F, HOU W, CHITSIKE L, et al. ABL1, overexpressed in hepatocellular carcinomas, regulates expression of Notch1 and promotes development of liver tumors in mice[J]. Gastroenterology, 2020, 159(1):289-305.
- [12] GONG CP, LI L, QIN CM, et al. The involvement of Notch1-RBP-J κ /Msx2 signaling pathway in aortic calcification of diabetic nephropathy rats [J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 8968523. DOI: 10.1155/2017/8968523.
- [13] 王文娟,刘梦洁,徐瑞,等. RBP-J κ 对结肠癌细胞增殖和移植瘤生长的影响及其在小鼠结肠癌组织的表达[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(3):282-289.
- [14] SHANMUGASUNDARAM N, KAYA OHS, ARPITA B, et al. Msx homeobox genes act downstream of bmp2 to regulate endometrial decidualization in mice and in humans [J]. Endocrinology, 2019, 160(7):1631-1644.
- [15] 白棚搏. BMP2 信号转导通路在特发性高钙尿大鼠肾结石形成中的调控作用[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(4):503-506.
- [16] 张志,李益亮,孙达武,等. Notch 信号通路中的 Jagged1 配体在血管形成中的作用[J]. 中医正骨, 2016, 28(11):77-80.
- [17] PAN M, HUANG Y, ZHU XF, et al. miR-125b-mediated regulation of cell proliferation through the Jagged-1/Notch signaling pathway by inhibiting BRD4 expression in psoriasis [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(6):5227-5236.
- [18] ZHOU XL, WU X, XU QR, et al. Notch1 provides myocardial protection by improving mitochondrial quality control [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7):11835-11841.
- [19] 肖洋,杜瑶瑶,高成,等. microRNA 在高磷诱导血管平滑肌细胞钙化早期的动态变化[J]. 北京大学学报(医学版), 2016, 48(5):756-765.

(收稿日期:2020-06-30,修回日期:2020-08-11)