

# 丹蛭降糖胶囊通过下调Notch1/NICD/MAML1信号通路改善糖尿病肾病大鼠肾脏血管内皮功能

朱思佳, 马竞成, 郑玉娇, 吴传云, 赵建根, 李玲秀, 汪莉, 周雪梅  
安徽中医药大学中医学院, 安徽 合肥 230000

**摘要:**目的 探讨丹蛭降糖胶囊通过Notch信号通路对糖尿病肾病(DN)模型大鼠肾脏血管内皮损伤进行修复的反应机制。方法 随机将大鼠分为正常组、模型组、丹蛭降糖胶囊低、中、高剂量组、抑制剂组( $n=10$ )。除正常组外,其余各组大鼠采取左肾切除术后高糖高脂饲料联合链脲佐菌素(STZ)注射建立DN模型。丹蛭降糖胶囊低、中、高剂量组分别按0.315、0.63、1.26 g/(kg·d)给药,抑制剂组以 $\gamma$ -分泌酶抑制剂DAPT 20 mg/(kg·d)溶解于50%的CMC-Na溶液中隔天给药,正常组和模型组使用同等浓度生理盐水每天灌胃,连续给药4周。给药结束后用ELISA试剂盒检测肌酐(CRE)、尿素氮(BUN)、尿微量白蛋白(mALB)水平,用透射电镜观察肾组织病理学变化,免疫组化法测量血管内皮生长因子(VEGF)、内皮素-1(ET-1)表达水平,Western blotting法测量血管内皮标志物CD31、Notch信号通路中Notch1、NICD、MAML1的蛋白表达,并比较各组数据。结果 与正常组大鼠比较,模型组大鼠CRE、BUN、mALB水平升高( $P<0.01$ ),电镜下肾脏出现病理损伤,肾脏组织中VEGF、ET-1、CD31表达升高( $P<0.01$ ),Notch1、NICD、MAML1水平上调( $P<0.01$ );与模型组大鼠比较,丹蛭降糖胶囊组和抑制剂组的CRE、BUN、mALB水平降低( $P<0.05$ ),电镜下肾脏病理变化也有明显好转,肾脏组织中VEGF、ET-1、CD31表达减少( $P<0.05$ ),Notch1、NICD、MAML1水平下调( $P<0.05$ ),其中丹蛭降糖胶囊高剂量组效果最好。结论 丹蛭降糖胶囊治疗DN的机制可能与抑制肾组织中NICD、MAML1介导的Notch信号通路有关,进而调控内皮细胞VEGF、ET-1水平来改善大鼠血管内皮过度增殖、功能障碍的损伤状态。

**关键词:**丹蛭降糖胶囊;糖尿病肾病;Notch信号通路;血管内皮功能;肾功能

## Danzhi Jiangtang Capsule improves renal vascular endothelial function in rats with diabetic nephropathy by downregulating the Notch1/NICD/MAML1 signaling pathway

ZHU Sijia, MA Jingcheng, ZHENG Yujiao, WU Chuanyun, ZHAO Jiange, LI Lingxiu, WANG Li, ZHOU Xuemei  
College of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, China

**Abstract: Objective** To investigate the therapeutic mechanism of *Danzhi Jiangtang* Capsule (DZJTC) for repairing renal vascular endothelial injury in rats with diabetic nephropathy (DN). **Methods** Fifty male SD rat models of DN, established by left nephrectomy, high-sugar and high-fat diet and streptozotocin injection, were randomized into DN model group, low-, medium-, and high-dose DZJTC treatment groups, and DAPT (a  $\gamma$ -secretase inhibitor) treatment group, with 10 rats with normal feeding as the control group. DZJTC was administered by daily gavage at 0.315, 0.63, or 1.26 g/kg, and DAPT (20 mg/kg, dissolved in 50% CMC-Na solution) was given by gavage every other day for 4 weeks; normal saline was given in the control and model groups. After treatment, the levels of creatinine (CRE), blood urea nitrogen (BUN), and microalbuminuria (mALB) were detected with ELISA, and renal pathologies were observed by transmission electron microscopy. Renal expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 (ET-1) were measured by immunohistochemistry, and the protein expressions of CD31 and Notch signaling pathway components were detected using Western blotting. **Results** The rat models of DN showed significantly increased CRE, BUN, and mALB levels, obvious renal pathologies under electron microscopy, increased renal VEGF, ET-1 and CD31 expressions, and upregulated Notch1, NICD, and MAML1 protein levels. Treatment with DZJTC at the 3 doses and DAPT significantly reduced CRE, BUN, and mALB levels, improved renal pathology, decreased VEGF, ET-1 and CD31 expressions, and lowered Notch1, NICD and MAML1 levels, and the effects were the most pronounced with high-dose DZJTC. **Conclusion** DZJTC ameliorates hyperproliferation and dysfunction of renal vascular endothelium in DN rats possibly by regulating renal VEGF and ET-1 levels via inhibiting NICD- and MAML1-mediated Notch signaling pathway.

**Keywords:** *Danzhi Jiangtang* Capsule; diabetic nephropathy; Notch signaling pathway; vascular endothelium function; renal function

糖尿病肾病(DN)是临床表现为蛋白尿及肾小球滤过率进行性降低的糖尿病微血管并发症之一,也是导致

终末期肾病的常见原因<sup>[1]</sup>。DN的病理特征为肾小球基底膜增厚、肾小球硬化、肾间质纤维化和肾小管损伤等。现代研究显示DN的发病率逐年上升,预计到2040年全球有6亿以上糖尿病患者,其中30%~40%将发展为DN<sup>[2]</sup>,DN在中医学中属于“肾消”“渴消”等范畴,临床早期以气阴两虚夹瘀证最为常见<sup>[3]</sup>,现阶段西医尚无治愈特异性疗法,而中医药治疗因其标本兼治,安全性更高、

收稿日期:2025-05-15

基金项目:新安医学教育部重点实验室开放课题(2022XAYX10);新时代育人质量工程项目(研究生教育)(2023szsfkc085);安徽省科协青年科技人才托举计划项目(RCTJ202429)

作者简介:朱思佳,在读硕士研究生,E-mail: 602536964@qq.com

通信作者:周雪梅,教授,硕士生导师,E-mail: 410761221@qq.com

多靶点共同作用等优点逐渐被重视。

Notch信号通路是一条进化保守的通路,哺乳动物中该通路有5种配体DLL1、DLL3、DLL4和Jagged1-2,4种受体Notch1-4,配体受体结合后,经过三步蛋白酶切割释放胞内结构域NICD进入细胞核激活靶基因。Notch信号通路已被证实与DN的发生发展息息相关,多项研究表明Notch信号升高是DN的中介之一,通过药物或基因治疗稳定其信号水平可延缓疾病进程<sup>[4]</sup>。同时Notch信号通路还是内皮生物学的主要调控因子,在内皮细胞增殖、发芽、迁移、血管稳定和成熟中都发挥着重要作用<sup>[5]</sup>,当该信号通路平衡被打破,可能导致无功能血管生成或血管过度增生等现象<sup>[6]</sup>。在DN早期,血管的异常生成和微血管病变是其重要病因,减少异常血管新生物可能是早期DN的潜在治疗方法,故分析血管内皮细胞功能的改善状态是评估药物是否通过Notch信号通路对糖尿病肾病有效的判断标准。

近年来许多实验表明中药复方可通过靶向调控信号通路来延缓DN的进程。丹蛭降糖胶囊是安徽中医药大学一附院院内制剂,具有益气养阴,活血化瘀通络的功效,临床治疗DN效果显著<sup>[7]</sup>。前期研究发现,丹蛭降糖胶囊可通过抑制Notch信号通路以降低气阴两虚夹瘀证DN大鼠肾组织内皮细胞标志物CD34、CD144的水平,进而参与血管内皮的损伤修复<sup>[8]</sup>,但其如何通过Notch信号通路指导内皮细胞行为的相关机制仍亟待进一步阐明。已知MAML1作为细胞内辅助激活因子可直接结合NICD与之形成稳定的三元素复合物,激活Notch信号通路,而使用负性MAML1(DN-MAML1)可以抑制细胞核中的Notch信号<sup>[9]</sup>,故本实验建立早期DN大鼠模型,以NICD、MAML1介导的Notch信号通路为切入点,进一步研究益气养阴活血方丹蛭降糖胶囊对早期气阴两虚夹瘀型DN的作用机制,旨在为治疗DN提供新靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF级6~8周龄SD雄性大鼠70只,体质量180±20 g,购于辽宁长生生物技术有限公司,许可证号SCXK(辽)2020-0001,饲养于安徽中医药大学中医学动物实验室中心,温度22~25℃,湿度60%~70%,大鼠自由采食及饮水,实验动物房有固定的12 h:12 h白天与黑夜循环交替。本实验经安徽中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号:AHUCM-rats-2024217)。

### 1.2 主要实验仪器

血糖仪、血糖试纸(鱼跃医疗公司),酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司),紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),离心机(安徽嘉文仪器装备有

限公司),漩涡混合器(其林贝尔仪器制造公司),电热恒温箱(上海三发有限公司),电泳仪、电泳槽、转膜仪(上海天能科技有限公司),高速冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司),自动曝光仪(上海培清科技有限公司),超薄切片机(德国徕卡公司),透射电镜(日本电子株式会社),数码相机(德国蒙斯特),生物组织自动脱水机、生物组织包埋机、生物组织摊烤片机(湖北亚光医疗器械有限公司),显微镜(OLYMPUS)。

### 1.3 试剂

血肌酐、血尿素氮、尿微量白蛋白ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究院),ET-1抗体、MAML1抗体(Bioss),VEGF抗体(Santa),CD31、Notch1、NICD抗体(abcam),ECL超敏发光试剂盒(Biosharp),GAPDH抗体、山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG(Zsbio)。丹蛭降糖胶囊(安徽中医药大学第一附属医院院内制剂),由太子参、牡丹皮、生地黄、泽泻、菟丝子、水蛭(配伍比例为5:4:4:3:2:5,皖药制字Z20090006,专利号ZL200310112845.1,批号:20240617)。Notch信号通路抑制剂DAPT(Aladdin)。链脲佐菌素(STZ, Sigma)。羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、pH4.2的0.1mmol/L枸橼酸缓冲液(源叶公司)。

### 1.4 动物模型构建及给药

所有SD大鼠给予普通饲料适应性喂养7d后,随机分出10只为正常组(Con组)继续普通饲料喂养。其余造模组采取左肾切除术并以高糖高脂饲料(10%猪油、2.5%胆固醇、20%蔗糖)喂养4周,单次腹腔注射STZ(30 mg/kg),3d后测量随机血糖值≥16.7 mmol/L,同时观察到饮食、饮水量和尿量明显增多为糖尿病造模成功;2周后经尿白蛋白阳性检测后确认为早期DN模型。成功造模大鼠共50只,随机分为模型组(Mod组)、丹蛭降糖胶囊低剂量组(DZJT-L组)、丹蛭降糖胶囊中剂量组(DZJT-M组)、丹蛭降糖胶囊高剂量组(DZJT-H组)、抑制剂组(DAPT组),10只/组。

丹蛭降糖胶囊低、中、高剂量组分别按0.315、0.63、1.26 g/(kg·d)将丹蛭降糖胶囊颗粒剂配成0.1 g/mL药液每日灌胃。抑制剂组使用Notch通路中 $\gamma$ -分泌酶抑制剂DAPT以20 mg/(kg·d)<sup>[10]</sup>溶解于50%的CMC-Na溶液中隔天灌胃。正常组和模型组使用同等量生理盐水每日灌胃。共干预4周,期间除正常组喂养普通饲料,其余实验组均喂养高糖高脂饲料。

### 1.5 标本收集

干预结束后,使用代谢笼收取大鼠尿液。各组大鼠采用异氟烷吸入诱导深度麻醉后腹主动脉取血,常温静置2 h,3000 r/min离心15 min后上清液置于-80℃冰箱保存。取血后迅速摘取大鼠肾脏,切取部分肾脏组织浸泡于4%多聚甲醛;冰上取约1 mm<sup>3</sup>组织于2.5%戊二醛

溶液中4℃固定保存2~4 h,用于透射电镜观察;剩余组织在液氮速冻后转移至-80℃冰箱中保存。

### 1.6 透射电镜

取材1 mm<sup>3</sup>组织若干块,立刻固定到2.5%戊二醛中,24 h后入PBS缓冲液中6 h,再入1%锇酸中固定,随后再经乙醇逐级脱水,环氧丙烷和环氧树脂浸透后包埋后入烤箱,最后取出包埋块修块后超薄切片(片厚70 nm),电子染色后透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

### 1.7 ELISA检测

取大鼠腹主动脉血和尿液,按照试剂盒说明书依次加入抗体和显色剂,通过酶标仪检测吸光度 $A_{450\text{nm}}$ ,计算血肌酐(CRE)、尿素氮(BUN)、尿微量白蛋白(mALB)的水平。

### 1.8 免疫组化检测

石蜡切片干燥后过3道二甲苯脱蜡和3道梯度乙醇复水,随后用pH为6.0的柠檬酸盐修复液进行抗原高压修复,放入3% $\text{H}_2\text{O}_2$ 中室温孵育后PBS-T冲洗。滴加一抗(1:200)后置于37℃培养箱孵育60 min,之后滴加二抗再置于37℃培养箱孵育30 min,冲洗后滴加DAB显色剂,显微镜下控制显色时间,有阳性终止显色。水洗后经苏木素衬染2 min,1%盐酸酒精分化后碳酸锂溶液蓝化30 s后水洗干净,脱水后使用二甲苯透明,中性树脂胶封片,显微镜观察并拍照,采用ImageJ软件分析内皮素-1(ET-1)、血管内皮生长因子(VEGF)图片的平均光密度值。

### 1.9 Western blotting检测

收取组织样本,加入细胞裂解液进行裂解,离心15 min后收集上清液。随后进行SDS-PAGE凝胶配置,将蛋白样品沸水浴加热15 min使其变性,冷却后将其上样到SDS-PAGE胶加样孔内进行电泳后转膜。漂洗蛋白膜后加入Western封闭液(5%脱脂奶粉),室温摇床封闭2 h。随后参考说明书加入一抗稀释液(CD31抗体浓度为1:5000,Notch1、MAML1抗体浓度为1:2000,NICD、GAPDH抗体浓度为1:1000),4℃摇床孵育过夜,洗涤后加入对应二抗(1:20 000),室温孵育1.2 h,洗涤后使用ECL发光试剂盒来检测蛋白,GAPDH作为内参,后采用ImageJ软件行灰度值分析。

### 1.10 统计学分析

采用SPSS 21软件、GraphPad Prism 10.4软件进行数据处理和统计分析。连续型变量采用均数±标准差进行统计学描述。数据满足正态分布且方差齐时,Con组与Mod组均数比较采用两独立样本 $t$ 检验,除Con组之外其余5组比较采用单因素方差分析,多重比较采用Tukey法;方差不齐采用非参数秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 透射电镜观察大鼠肾组织病理改变

电镜下观察到Con组大鼠肾小球结构正常,Mod组肾小球均质性明显增厚,肾小球基底膜增厚,肾小球系膜基质明显增多,足细胞数目减少,足突不同程度排列紊乱、大片融合或消失。DZJT-L、DZJT-M、DZJT-H组肾组织病理学变化程度依次减轻,DAPT组也有所好转(图1)。

### 2.2 丹蛭降糖胶囊对大鼠肾功能的影响

与Con组比较,Mod组大鼠CRE、BUN、mALB水平升高( $P<0.01$ )。与Mod组比较,DZJT-L、DZJT-M、DZJT-H、DAPT组BUN、mALB水平均降低( $P<0.01$ );DZJT-L组CRE水平降低( $P<0.05$ ),DZJT-M组、DZJT-H组、DAPT组CRE水平降低( $P<0.01$ ,图2)。

### 2.3 丹蛭降糖胶囊对大鼠肾组织ET-1、VEGF水平的影响

与Con比较,Mod组大鼠ET-1、VEGF水平升高( $P<0.01$ )。与Mod组比较,DZJT-L组大鼠VEGF水平降低( $P<0.01$ );DZJT-M组、DZJT-H组、DAPT组ET-1、VEGF水平均降低( $P<0.01$ ,图3、4)。

### 2.4 丹蛭降糖胶囊对大鼠肾组织中CD31、Notch1、NICD、MAML1蛋白表达的影响

与Con组比较,Mod组大鼠的CD31、Notch1、NICD、MAML1水平均升高( $P<0.01$ )。与Mod组比较,DZJT-L组CD31、MAML1水平降低( $P<0.05$ )、Notch1水平降低( $P<0.01$ );DZJT-M组、DZJT-H组、DAPT组CD31、Notch1、NICD、MAML1水平均降低( $P<0.01$ ,图5、6)。

## 3 讨论

DN的病因多与禀赋不足、过食肥甘、情志所伤、劳欲过度等有关,关于DN病机的认识,《临证指南医案》曾明确指出“三消不越阴亏阳亢,津涸热淫”,后世历代医家也同样绕不开“气阴两虚”<sup>[11]</sup>,患者先天不足又后天失养,脾病下流乘肾,肾精亏损虚火内生致气阴两伤,郁久生热则津液不足,血行不畅,易生瘀血伏于肾络发为肾消,故方朝晖教授认为糖尿病并发症病机属本虚标实,以气阴两虚为本,瘀血内阻为标,临床诊疗中应以“益气养阴、活血化瘀”为主<sup>[12]</sup>,创立丹蛭降糖胶囊治疗气阴两虚夹瘀型DN。

丹蛭降糖胶囊临床上可通过调节炎症因子释放、改善氧化应激等降低早期糖尿病肾病患者血糖,减少蛋白尿,改善肾功能<sup>[13]</sup>,方中太子参气阴双补又脾肺同调,研究报道太子参多糖成分可显著改善胰岛素耐受、减轻氧化应激反应,缓解大鼠的胰岛素抵抗<sup>[14]</sup>。牡丹皮清五脏伏热,消脉中瘀血,现代药理研究显示牡丹皮中的丹皮

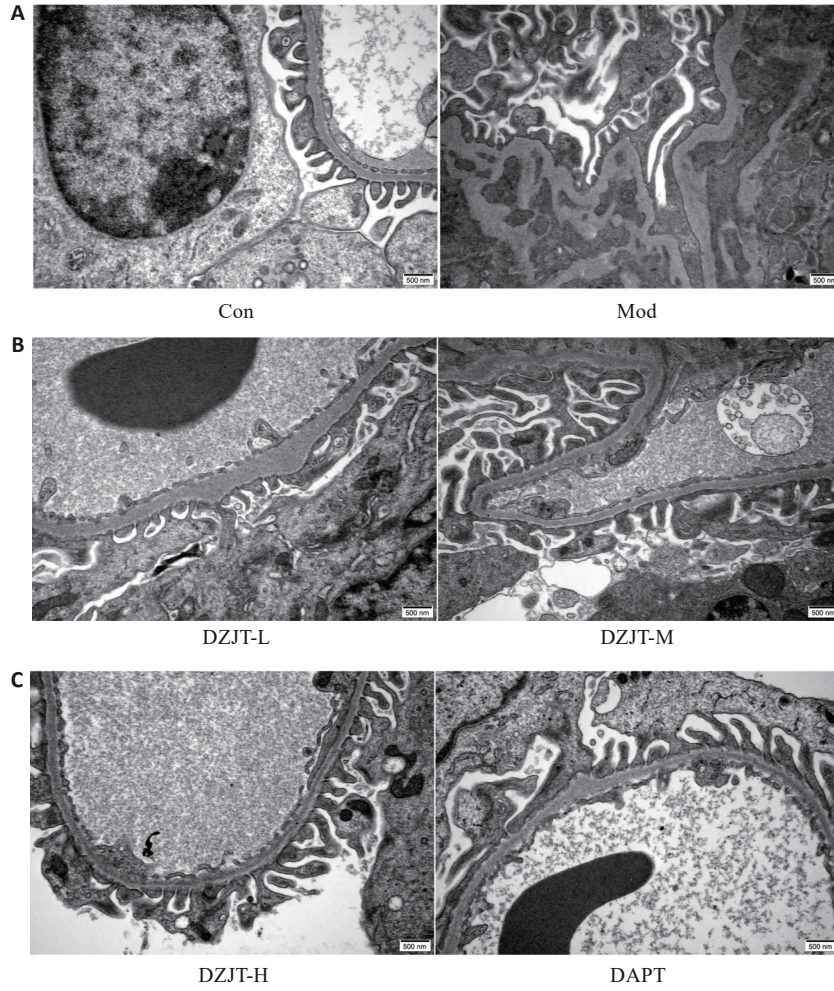


图1 各组大鼠肾组织病理学变化

Fig. 1 Histopathological changes in renal tissue of rats in each group (Original magnification:  $\times 25\ 000$ ). A: Con group and Mod group; B: DZJT-L group and DZJT-M group; C: DZJT-H group and DAPT group.

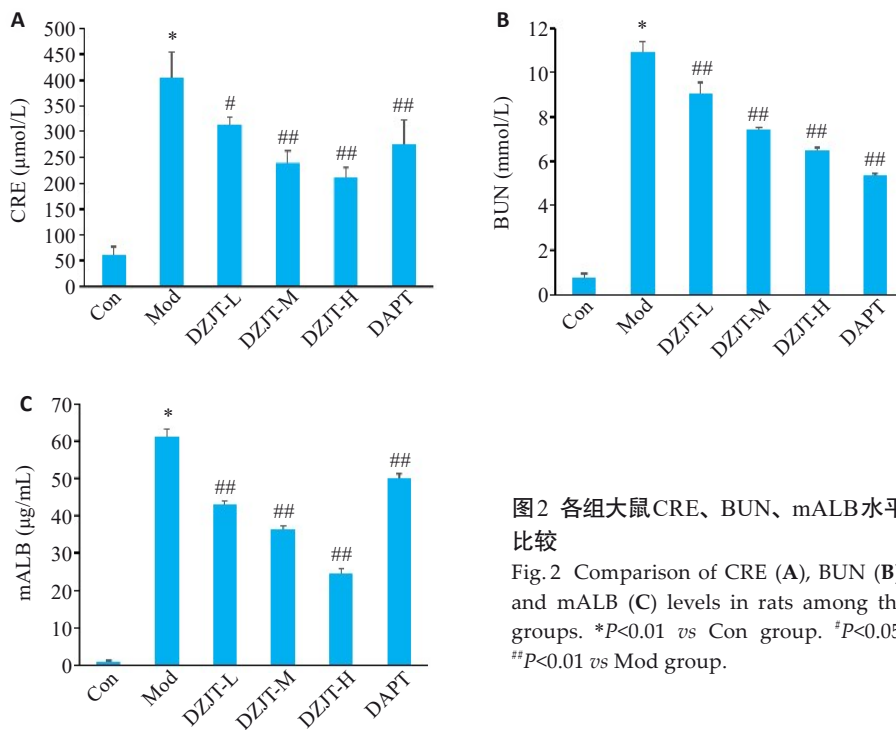


图2 各组大鼠CRE、BUN、mALB水平比较

Fig. 2 Comparison of CRE (A), BUN (B), and mALB (C) levels in rats among the groups. \* $P < 0.01$  vs Con group. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs Mod group.

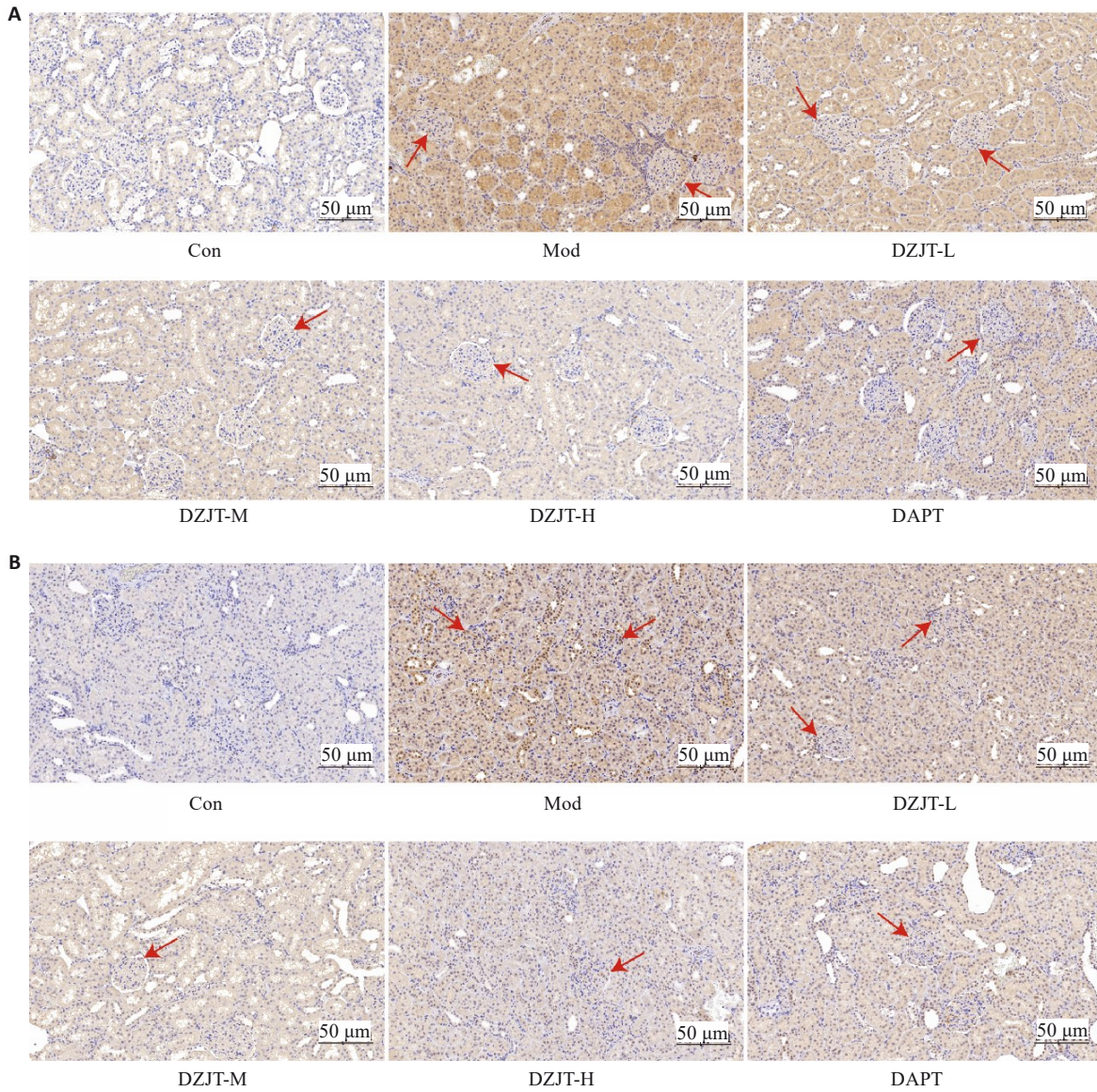


图3 各组大鼠肾组织ET-1、VEGF免疫组化结果

Fig.3 Immunohistochemical results of ET-1 (A) and VEGF (B) in the renal tissues of rats in each group (red arrows indicate positive staining).

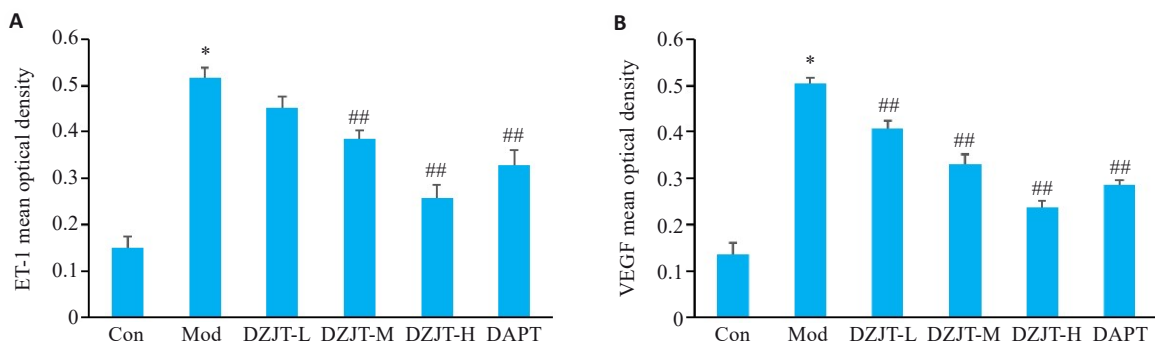


图4 各组大鼠肾组织ET-1、VEGF平均光密度值比较

Fig.4 Comparison of mean optical density values of ET-1 (A) and VEGF (B) in renal tissue of rats among the groups.

\* $P < 0.01$  vs Con group. ## $P < 0.01$  vs Mod group.

酚可通过调节大鼠体内内皮素(ET)、血栓素B2(TXB2)、NO水平保护DN大鼠血管内皮功能<sup>[15]</sup>。生地助与太子参共奏气阴双补之效,佐牡丹皮凉血之功,又

兼生津润燥,陆春红<sup>[16]</sup>研究显示生地环烯醚萜苷类成分能够通过抑制氧化应激和炎症反应,保护血管内皮细胞。水蛭破血逐瘀又不伤气,实验证明水蛭素可抑制

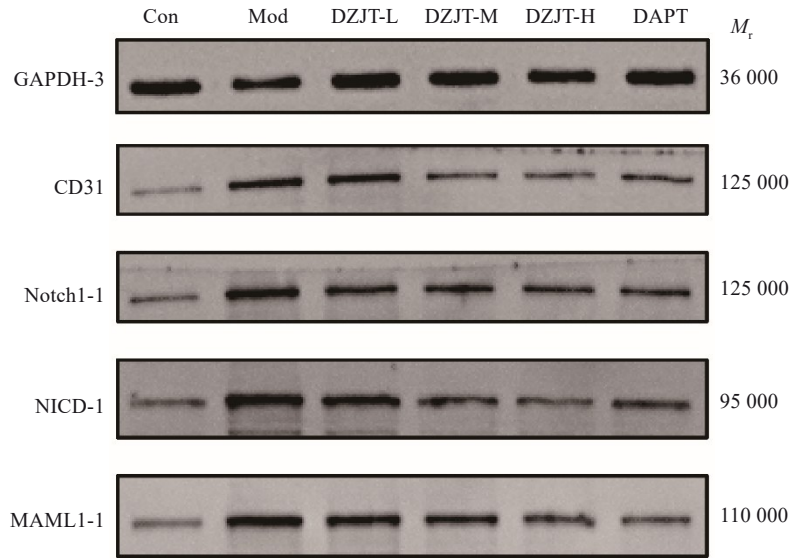


图5 各组大鼠CD31、Notch1、NICD、MAML1的Western blotting条带

Fig.5 Protein bands of CD31, Notch1, NICD and MAML1 by Western blotting in rat renal tissues in each group.

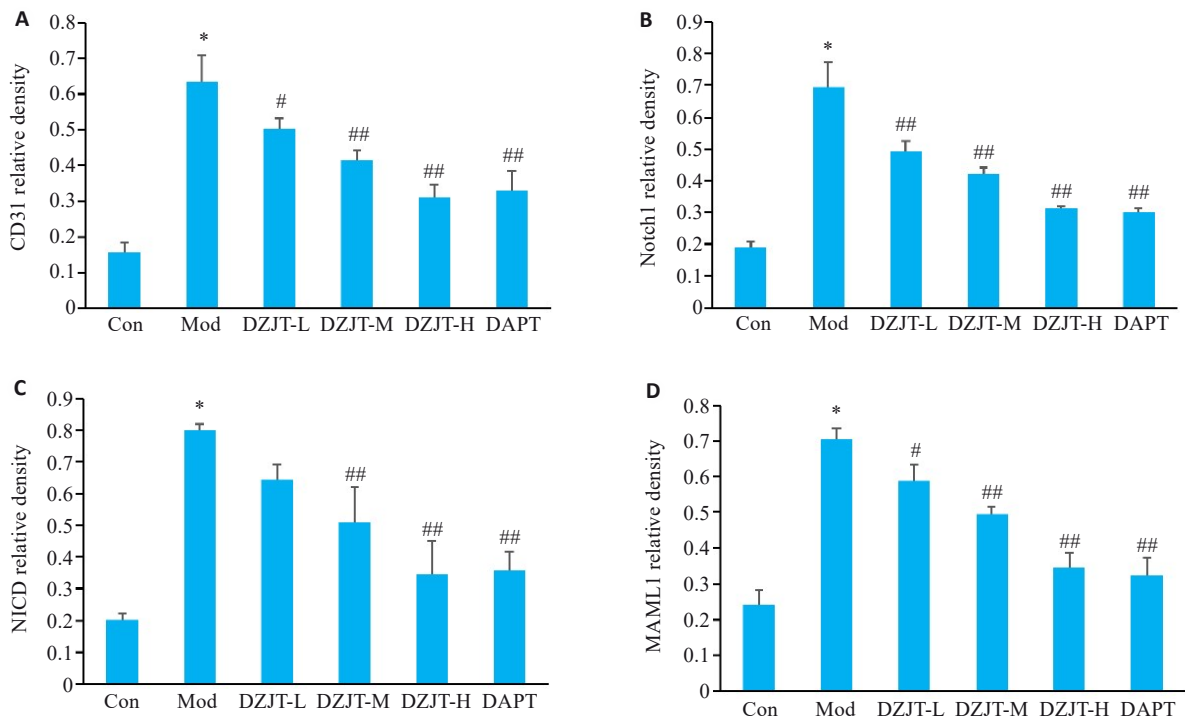


图6 各组大鼠肾组织CD31、Notch1、NICD、MAML1蛋白水平比较

Fig.6 Comparison of CD31 (A), Notch1 (B), NICD (C), and MAML1 (D) protein expression levels in renal tissues among the groups. \* $P < 0.01$  vs Con group. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs Mod group.

DN大鼠肾小球内皮细胞过度迁移和血管增生,恢复其功能<sup>[17]</sup>。菟丝子补益肝肾,驱邪而不伤正,近年研究发现菟丝子有改善胰岛素敏感性,降低血糖调节血脂等功效<sup>[18]</sup>。泽泻利水渗湿,引热下行,现代研究证明泽泻多糖可以降低DN大鼠炎症反应,减轻肾损伤<sup>[19]</sup>。全方标本兼治,补泻兼施,扶正与祛邪并举,补气与滋阴共奏,调和阴阳以宣通血脉。

临床上DN患者的CRE、BUN、mALB指标异常情况比较明显,检测其肾功能为DN早期诊断提供了准确全面的依据。本实验结果显示, DN模型组大鼠CRE、BUN、mALB都较正常组明显升高,电镜下也观察到模型组大鼠肾小球基底膜增厚、肾小球囊腔增大、足突排列紊乱融合等,说明造模成功。经丹蛭降糖胶囊干预后,大鼠CRE、BUN、mALB水平都有所下降,肾组织病

理损伤也得到明显改善,大鼠多饮多尿多食、体质量减轻、精神欠佳、毛发枯槁等症状有所好转,提示益气养阴方丹蛭降糖胶囊可以明显改善DN大鼠的肾损伤。

VEGF作为一种血管形成和功能正常的重要调节因子,它能控制内皮细胞增殖、迁移和存活等重要过程<sup>[20]</sup>,高糖环境诱导VEGF过表达致内皮细胞增生,介导糖尿病患者内皮功能障碍和肾小球损伤,促进DN的发生发展<sup>[21]</sup>。光甘草定被发现可以通过抑制VEGF通路,改善DN大鼠的肾功能损伤<sup>[22]</sup>。研究表明Notch信号通路能通过诱导和激活特定的MMPs,与VEGF相互作用来调节内皮细胞的形态发生<sup>[23]</sup>。ET-1是一种由血管内皮细胞产生的一种具有强烈收缩血管作用的多肽类物质,主要由血管内皮细胞及肾小管上皮细胞等合成分泌,在高糖环境诱导下,ET-1的过表达参与了DN肾脏血流动力学的改变,导致肾小球滤过功能下降<sup>[24]</sup>,同时它还被发现有其他生物学功能,如上调ET-1信号可刺激内皮细胞迁移<sup>[25]</sup>,故ET-1在监测血管功能方面作用显著。已有药物如利格列汀被证实可通过下调ET-1系统来阻止糖尿病介导的病理性新生血管<sup>[26]</sup>。Yuan等<sup>[27]</sup>在ET-1处理的GCTSCs中研究了几种Notch标记物,它们的表达增强意味着ET-1的上调可能与Notch信号的激活有关。CD31是通常在血管内皮细胞中表达的跨膜糖蛋白,是血管生成的一个公认生物标志物<sup>[28]</sup>,有研究显示<sup>[29]</sup>DN大鼠模型中存在非管状CD31染色,缺少相邻PCX染色,表示DN早期出现内皮细胞的过度增殖和血管发育不成熟的现象。在本实验中模型组肾脏的病理改变与高水平的VEGF和ET-1呈正相关,而丹蛭降糖胶囊处理后可显著降低DN大鼠VEGF、ET-1的水平,同时CD31蛋白的表达下调,证明丹蛭降糖胶囊可以通过调控VEGF、ET-1水平来缓解内皮细胞过度增殖和迁移,减少血管功能障碍从而改善DN血管内皮的损伤。

Notch信号通路是与DN的发生发展高度相关的通路之一。Notch信号通过调节多种内皮细胞行为,包括迁移、增殖、血管密度、内皮连接和对血流的极化,来指导血管的发育和功能<sup>[30]</sup>。DN患者血糖及血流动力学等的改变会诱导Notch信号通路的配体Jagged1和受体Notch1表达增加,二者结合后在 $\gamma$ -分泌酶的介导下,向细胞内释放出Notch胞内域NICD,进入细胞核与重复序结合CSL蛋白(RBPJ-K)和51Mastermind-like(MAML)家族的转录辅助激活因子形成Notch转录复合体,激活下游靶基因<sup>[4]</sup>。本实验结果显示, DN模型组大鼠Notch信号通路中Notch1、NICD、MAML1的表达都被诱导上调,说明Notch信号被激活,而低、中、高剂量DZJT三组和 $\gamma$ -分泌酶抑制剂DAPT处理后DN大鼠Notch1、NICD、MAML1水平均下调。DAPT是Notch

信号通路的抑制剂,通过阻断 $\gamma$ -分泌酶活性间接抑制NICD的生成,本实验发现抑制剂组能明显降低Notch信号通路中蛋白表达,且丹蛭降糖胶囊与DAPT效果相当,提示丹蛭降糖胶囊可以通过降低Notch1、NICD和MAML1蛋白水平来多靶点调控Notch信号通路的抑制,促进血管内皮的细胞修复,改善大鼠肾功能。

综上所述,益气养阴方丹蛭降糖胶囊可以通过多靶点调控NICD和MAML1介导的Notch信号通路,帮助血管内皮细胞对VEGF、ET-1信号做出反应并指导其行为功能,有效抑制其过度增殖和异常发育,改善血管内皮功能障碍,降低CRE、BUN、mALB水平,缓解大鼠肾损伤。目前,MAML1在DN中的作用还鲜有报道,仅有细胞实验证明在高糖处理的肾小管上皮细胞中,下调MAML1水平可让Notch信号失活<sup>[31]</sup>。本文在前期研究的基础上,从DN血管内损伤改善角度提示NICD和MAML1可能成为中医药治疗DN的新靶点,以期后续细胞和临床实验研究提供新的思路。但因为中药复方成分和Notch信号通路的复杂性,本次实验研究目标过于局限,仅从Notch1/NICD/MAML1信号通路和血管内皮因子VEGF、内皮素ET-1做了探讨,对于该通路下游靶基因如何进一步影响血管内皮损伤修复的具体机制未做详细研究;且本研究主要依赖于动物模型数据,缺乏体外细胞实验阐明更加精确的分子细胞机制。同时还有学者提出VEGF-NO轴解耦联即VEGF的上调和一氧化氮(NO)生物利用率的降低,与DN的异常血管生成密切相关<sup>[32]</sup>,ET-1也可降低内皮型一氧化氮合酶的激活,可能导致内皮功能障碍<sup>[33]</sup>,故丹蛭降糖胶囊可否通过其他有关NO途径改善DN肾损伤还有待求证。期待未来研究进一步完善疗效评价体系,阐明Notch信号通路调控血管内皮的分子机制,为临床上中医药通过多靶点修复血管内皮损伤来治疗DN提供实验依据。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

#### 参考文献:

- [1] 汪四海,方朝晖,倪英群,等.丹蛭降糖胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏TGF- $\beta$ 1/Smad3信号通路和AGEs/RAGE水平的影响[J].中华中医药杂志,2021,36(4):2019-24.
- [2] 周凯旋.补阳还五汤治疗糖尿病肾病的作用机制及药效物质基础研究[D].长春:长春中医药大学,2024.
- [3] 李建平,朱德礼,马贞,等.丹芪益肾方对糖尿病肾病患者临床疗效及肾保护作用机制研究[J].广州中医药大学学报,2025,42(2):350-7.
- [4] Mukherjee M, Fogarty E, Janga M, et al. Notch signaling in kidney development, maintenance, and disease[J]. Biomolecules, 2019, 9(11):692.
- [5] Fernández-Chacón M, García-González I, Mühleder S, et al. Role of

- Notch in endothelial biology [J]. *Angiogenesis*, 2021, 24(2): 237-50.
- [6] 孙立平, 周霞, 刘炬, 等. 从调控血管内皮生长因子及其受体激活Notch信号通路角度探讨生地梓醇促血管新生及神经功能重塑作用[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2021, 29(11): 63-8.
- [7] 方朝晖, 陈志. 丹蛭降糖胶囊治疗2型糖尿病实验研究进展[J]. *安徽中医药大学学报*, 2019, 38(2): 91-4.
- [8] 周雪梅, 徐从书, 王凯, 等. 益气养阴活血中药对糖尿病肾病大鼠Notch/Hes1通路及血管内皮CD34、CD144的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(7): 855-60.
- [9] Cheng H, Chen L, Hu XX, et al. Knockdown of MAML1 inhibits proliferation and induces apoptosis of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells through SP1-dependent inactivation of TRIM59 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 5186-95.
- [10] 尚立芝, 季书, 李耀洋, 等. 二陈汤加味通过Jagged1/Notch1/Hes1信号通路对慢性阻塞性肺疾病的抗炎机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(9): 109-118.
- [11] 路建饶, 陈晔, 陈杰. 传统医学对糖尿病肾病发病机制的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(2): 415-7.
- [12] 王筠禹, 王帆竞, 张皖豫, 等. 方朝晖基于《不居集》腑消论治思想治疗气阴两虚夹瘀型糖尿病周围神经病变经验[J]. *山西中医药大学学报*, 2025, 26(5): 529-32+538.
- [13] 鲍陶陶, 孟利亚, 黄展鹏, 等. 基于TLRs/MyD88信号通路探讨丹蛭降糖胶囊对糖尿病肾病大鼠的作用机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(9): 2076-80.
- [14] 王奕霏, 卢慧蕴, 丰心月, 等. 太子参化学成分及生物活性研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(7): 122-32.
- [15] 伍琳琳, 李志鹏, 曹世杰, 等. 牡丹皮活性成分改善糖尿病及其并发症的研究进展[J]. *中草药*, 2022, 53(13): 4162-9.
- [16] 陆春红, 许惠琴, 刘凯, 等. 生地环烯醚萜苷类成分对AGEs损伤HUVEC的保护作用[J]. *南京中医药大学学报*, 2015, 31(1): 55-9.
- [17] 马旺霞, 王斌. 通络药水蛭及配伍防治糖尿病肾病的机制探析[J]. *中医临床研究*, 2024, 16(18): 61-6.
- [18] 黄长盛, 谭婷婷, 邢婷婷. 菟丝子对妊娠期糖尿病患者脂质代谢影响的临床研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(20): 2199-201.
- [19] 董莹莹, 张秀媛, 王洁. 泽泻多糖激活PPAR- $\gamma$ /LXR- $\alpha$ /ABCG1信号通路发挥对糖尿病肾病大鼠的保护作用[J]. *药物评价研究*, 2023, 46(7): 1480-7.
- [20] Fan W, Zeng SH, Wang XT, et al. A feedback loop driven by H3K9 lactylation and HDAC2 in endothelial cells regulates VEGF-induced angiogenesis [J]. *Genome Biol*, 2024, 25(1): 165.
- [21] Jiang YY, Li JH, Zhang J, et al. Serum VEGF as a predictive marker of glycemic control and diabetic nephropathy in Chinese older adults with type 2 diabetes mellitus [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1274025.
- [22] Tan HT, Chen JX, Li YC, et al. Glabridin, a bioactive component of licorice, ameliorates diabetic nephropathy by regulating ferroptosis and the VEGF/Akt/ERK pathways [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 58.
- [23] Funahashi Y, Shawber CJ, Sharma A, et al. Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing Matrix Metalloprotease activity [J]. *Vasc Cell*, 2011, 3(1): 2.
- [24] Zhang SH, Li XD, Liu SY, et al. Research progress on the role of ET-1 in diabetic kidney disease [J]. *J Cell Physiol*, 2023, 238(6): 1183-92.
- [25] Morand J, Briançon-Marjollet A, Lemarie E, et al. Zinc deficiency promotes endothelin secretion and endothelial cell migration through nuclear hypoxia-inducible factor-1 translocation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317(2): C270-6.
- [26] Abdelsaid M, Williams R, Hardigan T, et al. Linagliptin attenuates diabetes-induced cerebral pathological neovascularization in a blood glucose-independent manner: Potential role of ET-1 [J]. *Life Sci*, 2016, 159: 83-9.
- [27] Yuan W, Qian M, Li ZX, et al. Endothelin-1 activates the Notch signaling pathway and promotes tumorigenesis in giant cell tumor of the spine [J]. *Spine: Phila Pa 1976*, 2019, 44(17): E1000-9.
- [28] Denize T, Farah S, Cimadamore A, et al. Biomarkers of angiogenesis and clinical outcomes to cabozantinib and everolimus in patients with metastatic renal cell carcinoma from the phase III METEOR trial [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(4): 748-55.
- [29] 张菊云, 陈绵雄, 华炳红, 等. 毛兰素调节Slit2/Robo1信号通路对糖尿病肾病模型大鼠肾小球内皮细胞血管生成的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2024, 38(3): 177-82.
- [30] Raza Q, Nadeem T, Youn SW, et al. Notch signaling regulates UNC5B to suppress endothelial proliferation, migration, junction activity, and retinal plexus branching [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 13603.
- [31] Li YT, Tan P, Liu QP, et al. MiRNA-133a-3p attenuates renal tubular epithelial cell injury via targeting MALM1 and suppressing the Notch signaling pathway in diabetic nephropathy [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2024, 82(3): 2401-11.
- [32] Zhang AF, Fang HW, Chen J, et al. Role of VEGF-A and LRG1 in abnormal angiogenesis associated with diabetic nephropathy [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 1064.
- [33] Gopalakrishna D, Pennington S, Karaa A, et al. ET-1 stimulates superoxide production by ENOS following exposure of vascular endothelial cells to endotoxin [J]. *Shock*, 2016, 46(1): 60-6.

(编辑:吴锦雅)