

基于 ROCK/NOX4 信号通路探究刺芒柄花素对 2 型糖尿病大鼠内质网应激损伤及肾功能的影响

刘芳薇 鲁丽 唐阳 (辽宁省人民医院内分泌科, 辽宁 沈阳 110016)

〔摘要〕 目的 基于 RAS 同源基因家族成员相关激酶(ROCK)/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NOX)4 信号通路探究刺芒柄花素对 2 型糖尿病大鼠内质网应激损伤及肾功能的影响。方法 SPF 级健康 8 周龄雄性 C57BL/6 大鼠 60 只, 随机分为 5 组, 各 12 只, 健康组、模型组、刺芒柄花素低、中、高组, 除健康组外均建立 2 型糖尿病大鼠模型, 刺芒柄花素低组、刺芒柄花素中组、刺芒柄花素高组分别给予 20、40、100 mg/kg 刺芒柄花素灌胃, 其余组别灌胃等体积生理盐水。采用自动生化分析仪测定肾功能指标。苏木素-伊红(HE)染色与 Masson 染色观察大鼠肾组织病形态。TUNEL 检测肾小管上皮细胞凋亡。免疫组化检测 RAS 同源基因家族成员(Rho)A、NOX4、ROCK 阳性表达。Western 印迹检测内质网应激相关蛋白表达。结果 HE 染色结果显示:健康组肾脏组织结构正常;模型组肾小球有一定程度萎缩,组织结构排列不均匀,并且有肿胀、脱落现象,还存在空泡样变性、鲍曼囊腔扩,而经过刺芒柄花素干预后,上述情况有所改善,且呈现出明显的剂量依赖性。Masson 染色结果显示:健康组肾组织正常;模型组肾小球、肾小管基底膜增厚,产生空泡样病变,肾间质胶原纤维沉积明显;在经过刺芒柄花素干预后上述状况明显改善,且呈现出明显的剂量依赖性。健康组 24 h MAU、SCr、BUN、细胞凋亡率、RhoA、NOX4、ROCL、eIF2 α 、GRP78 水平显著低于模型组($P < 0.05$)。模型组 24 h MAU、SCr、BUN、细胞凋亡率、RhoA、NOX4、ROCL、eIF2 α 、GRP78 水平显著高于刺芒柄花素低组($P < 0.05$)。刺芒柄花素低组 24 h MAU、SCr、BUN、细胞凋亡率、RhoA、NOX4、ROCL、eIF2 α 、GRP78 水平显著高于刺芒柄花素中组($P < 0.05$)。刺芒柄花素中组 24 h MAU、SCr、BUN、细胞凋亡率、RhoA、NOX4、ROCL、eIF2 α 、GRP78 水平显著高于刺芒柄花素高组($P < 0.05$)。结论 刺芒柄花素可能是通过调控 Rho/ROCK/NOX4 信号通路抑制了 2 型糖尿病大鼠内质网应激,改善肾功能,对肾脏起保护作用。

〔关键词〕 RAS 同源基因家族成员相关激酶(ROCK)/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NOX)4 信号通路;刺芒柄花素;2 型糖尿病;内质网应激损伤;肾功能

〔中图分类号〕 R589 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2024)02-0397-06;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2024.02.040

2 型糖尿病是由多种病因导致的体内胰岛素分泌不足或人体不能有效利用胰岛素,从而出现血糖水平持续升高的疾病,患者体内环境中,大血管、微血管、神经等都会发生病变,进而危害心脏、肾脏、眼睛等器官^[1],常伴有糖尿病肾病、糖尿病血管病变的等并发症^[2]。机体内,高糖环境下会提高 RAS 同源基因家族成员相关激酶(ROCK)表达,且其下游通路将会被激活,造成炎症反应、蛋白异常合成等,上述反应均与糖尿病的产生与发展联系密切^[3]。内质网(ER)是参与细胞凋亡内在途径的细胞器,其应激介导的细胞凋亡是糖尿病心脏病发生发展的重要机制之一^[4]。刺芒柄花素是红车轴草的主要成分,属异黄酮类,是具有雌激素活性的多酚非甾体植物化学物质,它普遍存在于各种植物中,例如黄芪、鸡血藤等,同时其还具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等作用。研究表

明^[5],刺芒柄花素对糖尿病有治疗作用,如刺芒柄花素可通过抑制胰岛 β 细胞凋亡在四氧嘧啶诱导的 1 型糖尿病小鼠中表现出降血糖作用,通过增加沉默信息调控因子 2 样蛋白相关酶基因表达改善糖尿病肾病纤维化。但其对 2 型糖尿病的内质网应激及肾损伤等相关文献较少,具体机制尚不明确,因此本研究基于 ROCK 信号通路探究刺芒柄花素对 2 型糖尿病大鼠内质网应激损伤及肾功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SD 健康大鼠 60 只,购自湖南斯莱克景达实验动物公司,鼠龄 8 w,体质量 200~300 g,动物许可证号:SCXK(湘)2019-0142,合格证号:1100111905081682。大鼠常规饲养 1 w,自由饮食饮水后进行实验。本实验经伦理委员会批准(批号:Y2018-009-17)。

1.2 实验试剂与仪器 刺芒柄花素(山西开普勒生物公司);真核翻译起始因子 2D(eIF2d)、葡萄糖调节蛋白(GRP)78 一抗(武汉菲恩生物公司);辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(南京博研生物公司);高脂饲料(常州信立泰生物公

基金项目:辽宁省科学技术计划项目(2020-MS-050)

通信作者:鲁丽(1976-),女,博士,主任医师,主要从事甲状腺功能减退及相关疾病研究。

第一作者:刘芳薇(1988-),女,硕士,主治医师,主要从事甲状腺内分泌疾病研究。

司);TUNEL 工作液(上海赫果生物公司);自动生化分析仪(深圳市美思康电子公司,型号:iChem-520);苏木素-伊红(HE)染色液(江苏伊势久生物公司);醋酸苯胺蓝溶液(桂林天倪生物公司);RAS 同源基因家族成员(Rho)A、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NOX)4、ROCK 一抗(上海齐一生物公司)。

1.3 模型建立、分组与给药 取 12 只大鼠作为健康对照进行普通饲料饲养(健康组)。剩余 48 只大鼠建模。高脂饲料喂养 8 w(蛋黄 3.0%、基础饲料 59.8%、蔗糖 20.0%、猪油 16.0%)。参考文献^[6]建立模型。大鼠于腹腔注射链脲佐菌素 40 mg/kg,连续注射 2 w 后,鼠尾取血测定随机血糖,以血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为建模成功。建模大鼠分为模型组 12 只;刺芒柄花素低、中、高组各 12 只,分别给予 20、40、100 mg/kg 刺芒柄花素灌胃,1 次/d,共 6 w。

1.4 大鼠肾功能测定 干预后,取各组大鼠尾部静脉血 2 ml,离心 10 min,1 250 r/min,分离血清,采用自动生化分析仪测定 24 h 尿微量白蛋白(24 h MAU)、血肌酐(SCr)、血清尿素氮(BUN)。

1.5 HE 染色与 Masson 染色观察大鼠肾组织病形态 HE 染色:取各组大鼠,麻醉后开腹取肾组织,生理盐水冲洗,将左侧肾脏组织修饰为 5 mm \times 5 mm \times 5 mm 的组织块,放入 4%甲醛中固定,石蜡切片,厚度 4 μ m,脱蜡后,进行 HE 染色,光镜观察肾组织形态学改变。Masson 染色:干预 4 w 取大鼠肾脏经石蜡包埋、切片脱蜡至水,苏木素染色 5 min 后,置于 95%乙醇中洗 2 次,在苦味酸乙醇溶液中分色 1 min。清洗 10 min,磷钼酸染色 5 min、醋酸苯胺蓝溶液染色 10 min。乙醇脱水、透明、风干、封片。每张切片中随机选择 30 个视野。染色分为 4 个等级评分。0 分:无染色;1 分:染色面积 $>0\%$ 且 $\leq 50\%$;2 分:染色面积 51%~75%;3 分:染色面积 76%~100%。

1.6 TUNEL 检测肾小管上皮细胞凋亡 取各组大鼠肾组织切片与蛋白酶 K 室温孵育,切片浸入 TUNEL 反应液中,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,0.05%二氨基联苯胺(DAB)显色 4 min,蒸馏水洗 4

次,苏木素复染 10 min,蒸馏水清洗、脱水、透明、封片,于荧光显微镜下观察。

1.7 免疫组化检测 RhoA、NOX4、ROCK 水平 取各组大鼠肾组织切片经脱蜡、水化、水洗后,羊血清封闭 30 min。抗体与 TBST(RhoA、NOX4、ROCK)按照 1:200 比例稀释,滴于切片上以 PBS 作为阴性对照,置于湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜。室温放置 1 h 后清洗,滴加 1:500 比例的二抗稀释液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,树胶封片。结果可见细胞核呈蓝色,阳性反应区域为棕黄色。显微镜下观察,对每张切片中阳性染色区域进行评估,并作 4 个等级评分。0 分:无阳性染色或阳性染色面积 $<25\%$;1 分:阳性染色面积 25%~50%;2 分:阳性染色面积 51%~75%;3 分:阳性染色面积 76%~100%。

1.8 Western 印迹检测 eIF2 α 、GRP78 取大鼠肾组织 PBS 清洗后切碎,裂解液裂解,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,取上清液,用 5 \times 上样缓冲液混合于 PBS 稀释蛋白样品中(4:1),沸水煮沸 5 min,二喹啉甲酸(BCA)测蛋白浓度,十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,脱脂奶粉封闭 1 h。加入 eIF2 α 、GRP78 一抗(1:500)后,清洗 3 次,10 min/次;加入辣根根过氧化物酶二抗(1:2 500),37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min,TTBS 漂洗 10 min \times 3 次,DAB 试剂盒,在 1 ml 水中加 A、B、C 液各一滴,再加于膜上,电化学发光试剂后凝胶成像系统(JY-Clear)分析目标条带的光密度值。

1.9 统计学分析 采用 SPSS21.0 软件进行单因素方差分析、*t* 检验。

2 结果

2.1 肾功能 健康组血清 24 h MAU、SCr、BUN 水平显著低于其他组($P < 0.05$)。模型组血清 24 h MAU、SCr、BUN 显著高于刺芒柄花素低、中、高组($P < 0.05$)。刺芒柄花素低组血清 24 h MAU、SCr、BUN 水平显著高于刺芒柄花素中、高组($P < 0.05$)。刺芒柄花素中组血清 24 h MAU、SCr、BUN 水平显著高于刺芒柄花素高组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组肾功能指标及 RhoA、NOX4、ROCK 阳性表达比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	24 h MAU(mg/24 h)	SCr(μ mol/L)	BUN(mmol/L)	RhoA	NOX4	ROCK
健康组	7.24 \pm 0.65	6.18 \pm 0.72	78.24 \pm 8.31	19.84 \pm 1.23	48.22 \pm 3.37	24.31 \pm 2.52
模型组	57.62 \pm 6.37 ¹⁾	19.54 \pm 2.08 ¹⁾	182.49 \pm 19.67 ¹⁾	52.31 \pm 6.85 ¹⁾	82.37 \pm 7.54 ¹⁾	52.37 \pm 3.75 ¹⁾
刺芒柄花素低组	45.24 \pm 5.29 ¹⁾²⁾	15.21 \pm 1.05 ¹⁾²⁾	146.71 \pm 16.38 ¹⁾²⁾	45.81 \pm 5.26 ¹⁾²⁾	74.26 \pm 6.31 ¹⁾²⁾	45.38 \pm 3.62 ¹⁾²⁾
刺芒柄花素中组	32.41 \pm 4.65 ¹⁾²⁾³⁾	11.37 \pm 0.94 ¹⁾²⁾³⁾	119.85 \pm 14.37 ¹⁾²⁾³⁾	36.24 \pm 4.14 ¹⁾²⁾³⁾	66.48 \pm 5.76 ¹⁾²⁾³⁾	37.51 \pm 2.54 ¹⁾²⁾³⁾
刺芒柄花素高组	19.38 \pm 1.64 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	9.24 \pm 0.81 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	95.41 \pm 10.12 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	26.47 \pm 2.57 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	57.31 \pm 4.25 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	30.46 \pm 2.36 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
F/P 值	257.800/ <0.001	217.500/ <0.001	99.650/ <0.001	107.300/ <0.001	68.540/ <0.001	166.500/ <0.001

与健康组相比:1) $P < 0.05$;与模型组相比:2) $P < 0.05$;与刺芒柄花素低组相比:3) $P < 0.05$;与刺芒柄花素中组相比:4) $P < 0.05$;下表同

2.2 免疫组化检测结果 RhoA 表达于肾小管; ROCK 表达于肾小管、肾小球; Nox4 均有表达。健康组肾组织中 RhoA、NOX4、ROCK 阳性表达显著低于其他组 ($P < 0.05$)。模型组肾组织中 RhoA、NOX4、ROCK 表达显著高于刺芒柄花素低、中、高组 ($P < 0.05$)。刺芒柄花素低组肾组织中 RhoA、NOX4、ROCK 显著高于刺芒柄花素中、高组 ($P < 0.05$)。刺芒柄花素中组肾组织中 RhoA、NOX4、ROCK 显著高于刺芒柄花素高组 ($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

2.3 染色结果 HE 染色:健康组肾脏组织结构正常;模型组肾小球有一定程度萎缩,组织结构排列不均匀,并且有肿胀、脱落现象、还存在空泡样变性、鲍曼囊腔扩,而经过刺芒柄花素干预后,上述情况有所改善,且呈现出明显的剂量依赖性。Masson 染色:健康组肾组织正常;模型组肾小球、肾小管基底膜增厚,产生空泡样病变,肾间质胶原纤维沉积明显;在经过刺芒柄花素干预后上述状况明显改善,且呈现出明显的剂量依赖性。见图 2。

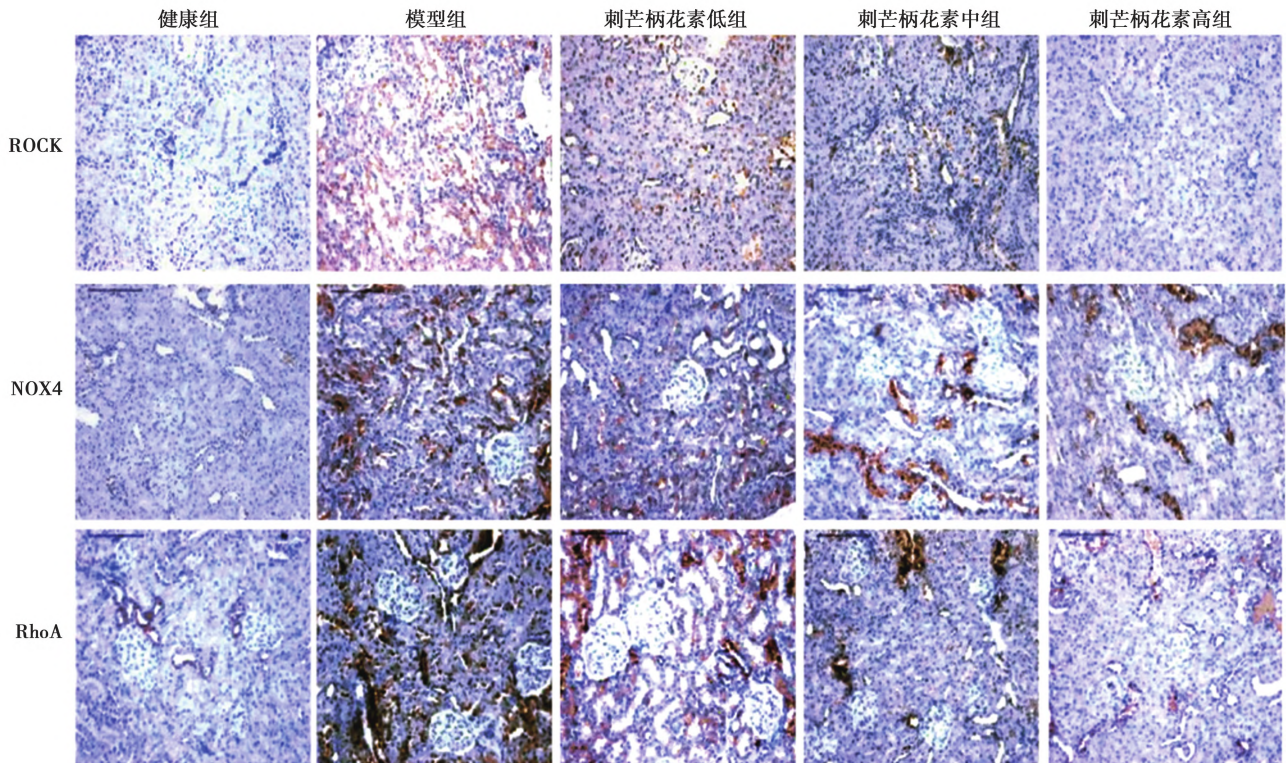


图 1 各组肾组织 RhoA、NOX4、ROCK 表达 (免疫组化染色, ×400)

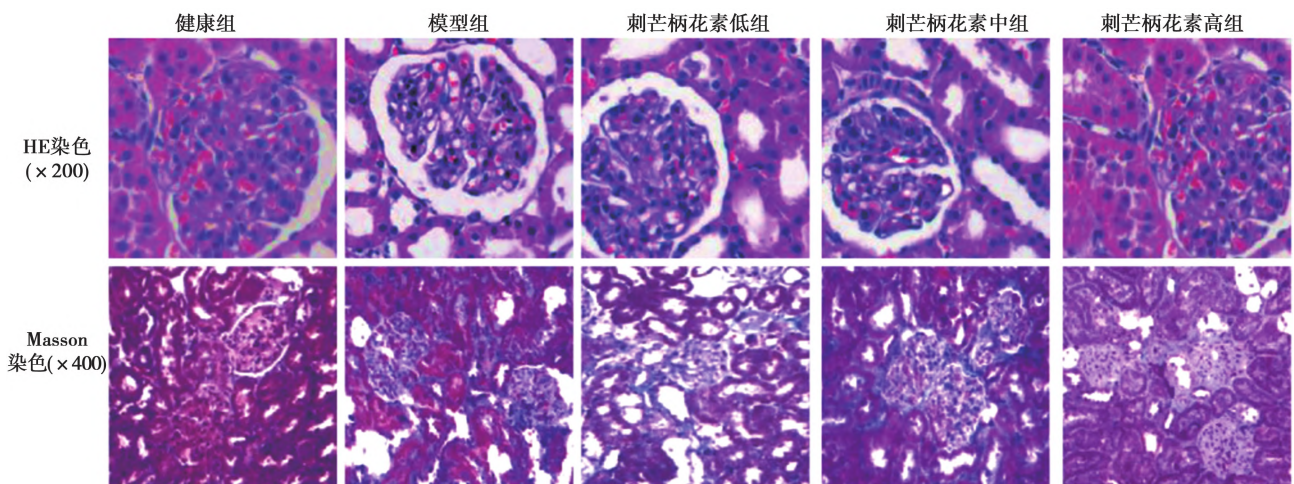


图 2 各组肾组织

2.4 TUNEL 检测结果 健康组肾小管上皮细胞凋亡率 $[(5.24 \pm 0.48)\%]$ 低于模型组 $[(45.31 \pm 5.27)\%]$, 有显著差异 ($t = 26.230, P < 0.001$)。模型组肾小管上皮细胞凋亡率高于刺芒柄花素低组 $[(36.47 \pm 4.11)\%]$, 有显著差异 ($t = 4.582, P <$

0.001)。刺芒柄花素低组肾小管上皮细胞凋亡率高于刺芒柄花素中组 $[(25.47 \pm 3.54)\%]$, 有显著差异 ($t = 7.025, P < 0.001$)。刺芒柄花素中组凋亡率高于刺芒柄花素高组 $[(13.26 \pm 1.38)\%]$, 有显著差异 ($t = 11.130, P < 0.001$)。见图 3。

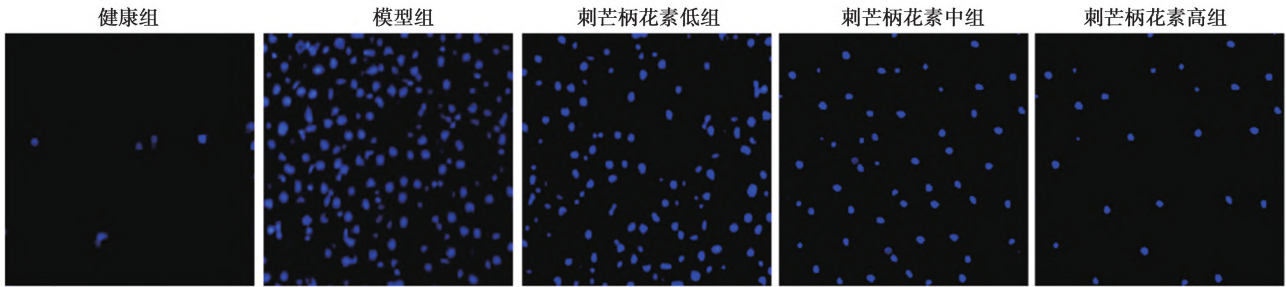
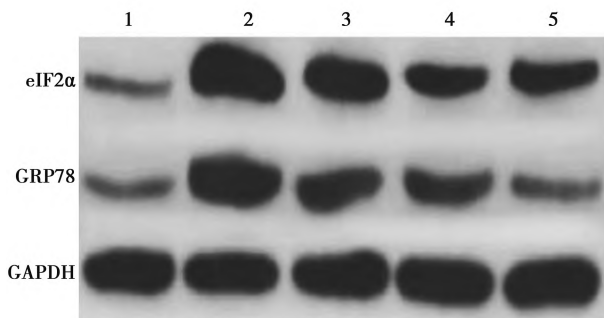


图 3 各组肾小管上皮细胞(TUNEL 染色, $\times 200$)

2.5 内质网应激相关指标检测结果 健康组肾组织中 eIF2 α 、GRP78 水平显著低于其他组 ($P < 0.05$)。模型组肾组织中 eIF2 α 、GRP78 显著高于刺芒柄花素低、中、高组 ($P < 0.05$)。刺芒柄花素低组肾组织中 RhoA、NOX4、ROCK 显著高于刺芒柄花素中、高组 ($P < 0.05$)。刺芒柄花素中组肾组织中 eIF2 α 、GRP78 显著高于刺芒柄花素高组 ($P < 0.05$)。见表 2、图 4。

表 2 各组肾组织中 eIF2 α 、GRP78 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	eIF2 α	GRP78
健康组	0.68 \pm 0.04	0.54 \pm 0.02
模型组	1.52 \pm 0.10 ¹⁾	1.38 \pm 0.09 ¹⁾
刺芒柄花素低组	1.05 \pm 0.08 ¹⁾²⁾	0.94 \pm 0.08 ¹⁾²⁾
刺芒柄花素中组	0.91 \pm 0.07 ¹⁾²⁾³⁾	0.82 \pm 0.06 ¹⁾²⁾³⁾
刺芒柄花素高组	0.75 \pm 0.06 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.71 \pm 0.05 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
F 值	251.500	141.200
P 值	<0.001	<0.001



1~5: 健康组、模型组、刺芒柄花素低组、刺芒柄花素中组、刺芒柄花素高组

图 4 Western 印迹检测各组 eIF2 α 、GRP78 蛋白

3 讨论

2 型糖尿病氧化应激的分子作用机制比较复杂, 目前尚未完全阐明, 近年来, RhoA/ROCK/NOX4 信号通路对 2 型糖尿病的影响作用受到广泛关注和高度重视。Rho/ROCK/NOX4 信号通路是蛋白激酶 C 的下游靶点, 高糖可导致蛋白激酶 C 激活, 进而激活 Rho/ROCK/NOX4 信号通路。

研究提示^[7,8], 高糖会激活 Rho/ROCK 通路使其处于异常活化状态。RhoA 属 Rho-GTP 酶家族成员之一, 又被称为“分子调控枢纽”, 发挥多生物活性调控作用。ROCK 为丝氨酸/苏氨酸激酶, 是 RhoA 下游第一个信号蛋白酶, ROCK 参与了糖尿病肾病进程总肾间质纤维化过程, 是促使糖尿病肾病发展的重要原因。在糖尿病大鼠肾脏中和高糖诱导的肾小球系膜细胞中, RhoA 在细胞膜上的表达显著增加, 同时, 氧化应激反应、高血糖等均可激活 RhoA/ROCK/NOX4 信号通路。NOX4 为 NADPH 氧化酶主要亚基, 其广泛表达于大鼠及小鼠 2 型糖尿病模型、肾组织的肾小球系膜细胞、足细胞、肾小管细胞中。研究发现^[9], RhoA/ROCK 信号通路的激活可通过介导 NOX4, 引发肾组织多种细胞释放大量活性氧, 进而诱导多种纤维化蛋白的表达。另有研究表明^[10], 肾小管上皮细胞间凋亡参与了糖尿病肾病的发病始末, 是引起肾纤维化、导致肾脏功能丧失的重要因素, 而 Rho/ROCK/NOX4 信号通路亦是参与肾小管上皮细胞间充质转化过程的主要信号转导通路之一。体外细胞培养实验及动物模型也均显示 Rho/ROCK/NOX4 信号通路参与了糖尿病肾病的致病过程^[11]。姚蓝等^[12]在对糖尿病大鼠的研

究中提出,通过抑制 RhoA/ROCK/NOX4 信号通路的激活,进而抑制肾脏纤维物质沉积,减轻肾脏损伤。侯伟等^[13]研究提出,刺芒柄花素可改善 2 型糖尿病骨病大鼠病情严重程度。Li 等^[14]研究表明刺芒柄花素通过调控 ROCK 信号通路的活性,进而调控细胞的生物学行为。本文研究与上述研究结果相似,推测刺芒柄花素可能是通过调控 Rho/ROCK/NOX4 信号通路改善 2 型糖尿病大鼠肾脏损伤。

2 型糖尿病发病是一个漫长和复杂的过程,其主要归因于细胞代谢异常和血多细胞器的缺陷,如线粒体、内质网和肌纤维膜。内质网应激会导致细胞发生凋亡影响细胞功能。GRP78、eIF2 α 是内质网应激的标志^[15]。发生内质网应激时,GRP78 解离后发生自身磷酸化,并使 eIF2 α 磷酸化,阻止新蛋白质合成。刺芒柄花素具有抗氧化应激与调控细胞凋亡的作用^[16]。

本实验病理结果提示,内质网功能紊乱对肾小管上皮细胞功能造成影响,从而导致肾脏发生病理损伤;刺芒柄花素可通过降低 eIF2 α 、GRP78 水平起到保护肾组织内质网应激的作用。余臣祖等^[17]研究提出,通过降低 eIF2 α 、GRP78,可减轻 2 型糖尿病大鼠内质网应激损伤。薛万腾等^[18]在研究 ROCK 信号通路和心肌梗死关系的实验中提出,通过调控 RhoA/ROCK 信号通路可调控细胞生物学行为,抑制炎症反应与内质网应激。程圣杰等^[19]研究表明,刺芒柄花素可抑制糖尿病小鼠心肌细胞凋亡。本文与上述研究结果相似,因此推测,刺芒柄花素可能是通过调控 ROCK 信号通路,抑制内质网应激,减少肾小管上皮细胞凋亡。

当肾小球发生病变时,BUN 水平迅速升高。糖尿病大鼠清除氧化自由基的能力下降,导致过氧化脂水平升高,肾脏过氧化脂水平与 BUN 水平正相关,随肾脏损伤程度变化。SCr、BUN 及 24 h MAU 均是评价糖尿病肾病的重要指标,机体生理条件下,代谢终产物以 BUN、SCr 等形式通过肾小球滤过作用排出体外,但肾组织损伤导致功能异常状态下,肾小球滤过作用减弱,导致代谢终产物排出减少,血中 SCr、BUN 水平升高,而尿蛋白含量升高。研究发现^[20],刺芒柄花素能够改善间质纤维化大鼠肾功能,降低肾小管间质损伤,阻碍肾间质纤维化的发展。在本研究中发现,模型组大鼠 SCr、BUN 及 24 h MAU 水平降低,在经过刺芒柄花素干预后,水平升高,且呈现出明显的剂量依赖性。杨飞飞^[21]在对小鼠肾缺血再灌注损伤的实验中提出,刺芒柄花素可

通过降低 BUN、SCr 水平及肾小管上皮细胞凋亡,起到肾保护的作用。

综上所述,刺芒柄花素可能是通过调控 Rho/ROCK/NOX4 信号通路抑制了 2 型糖尿病大鼠内质网应激,改善肾功能,对肾脏起保护作用。

4 参考文献

- 1 Lima AL, Illing T, Schliemann S, et al. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus; a review [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2017; 18 (4): 541-53.
- 2 Palumbo C, Nicolaci N, Manna A, et al. Association between central diabetes insipidus and type 2 diabetes mellitus [J]. *Medicina*, 2018; 78(2): 127-30.
- 3 Yuan P, Ma D, Gao X, et al. Liraglutide ameliorates erectile dysfunction via regulating oxidative stress, the RhoA/ROCK pathway and autophagy in diabetes mellitus [J]. *Front Pharmacol*, 2020; 11: 1257.
- 4 唐成玉, 曾慧妍. 从内质网应激探讨 2 型糖尿病合并肥胖的脾虚痰湿病机 [J]. *广州中医药大学学报*, 2019; 36(7): 1102-5.
- 5 田心, 常盼, 周亚光, 等. 刺芒柄花素对高糖诱导的小鼠系膜细胞炎症因子调控及增殖的影响 [J]. *中成药*, 2017; 39(5): 1052-6.
- 6 税晓平, 李春莹, 曹艳霞, 等. 有氧和抗阻运动干预 2 型糖尿病模型大鼠周围神经内质网应激相关蛋白的表达 [J]. *中国组织工程研究*, 2021; 25(11): 1693-8.
- 7 Wang J, Yao Y, Liu X, et al. Protective effects of lycium barbarum polysaccharides on blood-retinal barrier via ROCK1 pathway in diabetic rats [J]. *Am J Transl Res*, 2019; 11(10): 6304-15.
- 8 田浩, 熊永红, 张艺, 等. NRF2 在糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用: 与铁死亡的关系 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2021; 41(3): 5.
- 9 黄晨恺. NOX4/ROS 与 RhoA/ROCK1 信号通路对 HSC-T6 细胞行为学的影响及熊果酸的干预靶点 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- 10 邹美娜, 贾懿劫, 郑宗基, 等. 微 RNA-324-3p 对高糖条件下人肾小管上皮细胞凋亡的影响 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2019; 11(2): 126-31.
- 11 徐艳梅, 熊艳, 黄杰, 等. 肾康注射液 (SKI) 对大鼠糖尿病肾病的保护作用及可能机制研究 [J]. *内蒙古医科大学学报*, 2020; 42(6): 84-8.
- 12 姚蓝, 蒋洁, 王靖宣, 等. 两色金鸡菊对糖尿病大鼠肾脏纤维化 RhoA/ROCK/Nox4 信号通路的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2019; 26(1): 62-7.
- 13 侯伟, 万冠. 刺芒柄花素对 II 型糖尿病大鼠骨质疏松的缓解作用 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020; 40(3): 232-5.
- 14 Li S, Dang Y, Zhou X, et al. Formononetin promotes angiogenesis through the estrogen receptor alpha-enhanced ROCK pathway [J]. *Sci Rep*, 2015; 16(5): 16815.
- 15 Yu Y, Yu R, Men W, et al. Psoralen induces hepatic toxicity through PERK and ATF6 related ER stress pathways in HepG2 cells [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2019; 30(4): 1-22.
- 16 张翠, 张思琪, 王丹枫, 等. 刺芒柄花素对单侧输尿管梗阻大鼠 ASK1、JNK 蛋白表达的影响 [J]. *中草药*, 2018; 49(19): 4607-13.
- 17 余臣祖, 秦双红, 高攀, 等. 黄金胶囊对 2 型糖尿病大鼠肝组织

- eIF2α 及 GRP78 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2020; 27(2): 33-7.
- 18 薛万腾, 吕志慧, 高向向, 等. RhoA/ROCK 信号通路心肌梗死关系的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2019; 40(9): 1282-5.
- 19 程圣杰, 何夕松, 黄健, 等. 刺芒柄花素通过 AKT/FoxO1 信号通路改善糖尿病小鼠心肌损伤[J]. 中药新药与临床药理, 2020; 31(10): 39-46.
- 20 张思琪. 刺芒柄花素对肾间质纤维化大鼠 ASK1-JNK 通路调控机制的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2019.
- 21 杨飞飞. 刺芒柄花素对小鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[D]. 宜昌: 三峡大学, 2016.
- [2022-19-10 修回]
(编辑 王一涵)

基于 JAK2 信号通路探究散瘀止痛续骨方对肱骨骨折大鼠骨微结构的保护机制

张永占¹ 张宁² 尚红涛² 刘子豪² 田永利¹

(1 秦皇岛市第一医院, 河北 秦皇岛 066600; 2 衡水市人民医院)

〔摘要〕 目的 基于酪氨酸激酶(JAK2)信号通路探究散瘀止痛续骨方对肱骨骨折大鼠骨微结构保护机制。方法 选取健康大鼠 40 只, 平均分为正常组、模型组、散瘀止痛续骨方组、杜仲提取物组各 10 只。除正常组外, 其余组别大鼠均建立肱骨骨折大鼠模型, 对照组及模型组采用相同体积生理盐水 1 次/d 灌胃, 散瘀止痛续骨方组采用散瘀止痛续骨方制剂 3 g/kg 灌胃, 杜仲提取物组采用生药 5 g/kg 进行灌胃, 连续给药 30 d 后, 通过骨微结构、苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠病理组织形态, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中骨形态发生蛋白(BMP)7、神经肽(NP)Y 表达, Western 印迹和荧光定量聚合酶链反应(PCR)分别检测 JAK2、信号转导和转录激活因子(STAT)3 表达。结果 与正常组比较, 模型组血清中 BMP7、NPY、骨小梁数量(Th. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)、BV/TV、骨密度(BMD)、连接密度(Conn. D)表达明显降低, 骨小梁分离度(Tb. Sp)表达、JAK2、STAT3 mRNA 及蛋白表达明显升高($P < 0.05$), 与模型组比较, 散瘀止痛续骨方组 BMP7、NPY、Th. N、Tb. Th、BV/TV、BMD、Conn. D 表达明显升高, Tb. Sp 表达、JAK2、STAT3 mRNA 及蛋白表达显著降低($P < 0.05$), 与散瘀止痛续骨方组比较, 杜仲提取物组 BMP7、NPY、Th. N、Tb. Th、BV/TV、BMD、Conn. D 表达明显降低, Tb. Sp 表达、JAK2、STAT3 mRNA 及蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。正常组肱骨骨结构基本正常, 骨皮质未见变薄, 骨髓腔大小正常, 无受损状况产生, 细胞间排列整齐且均匀分布, 未见破骨细胞产生; 模型组肱骨骨皮质变薄且细胞间、排列稀疏, 骨髓腔扩大、断裂明显, 骨髓脂肪组织增生明显, 可见大量破骨细胞, 散瘀止痛续骨方组骨结构趋于稳定, 骨基质中少量骨细胞沉积, 组织密度增大, 组织细胞排列趋于有序, 有新生组织生成; 杜仲提取物组骨组织中仍有受损现象, 伴随破骨细胞分布, 骨髓脂肪组织间仍有破骨少量细胞。结论 散瘀止痛续骨方可降低血清 BMP7、NPY 表达, 和抑制 JAK2、STAT3 蛋白水平, 改善骨折中的骨微结构及病理变化, 从而发挥促进骨愈合的作用。

〔关键词〕 酪氨酸激酶(JAK)2 信号通路; 散瘀止痛续骨方; 肱骨骨折; 骨微结构

〔中图分类号〕 R365 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2024)02-0402-05; doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2024.02.041

在临床骨科治疗的过程中, 肱骨骨折是常见的病症之一, 肱骨骨折时可伴随出现骨强度下降、骨微结构遭到破坏进而使骨脆性增加。在相关疾病治疗中骨微结构作为反应骨材料、骨构筑及骨强度等方面的依据, 对判断治疗中的骨愈合程度具有重要意义^[1]。肱骨骨折的恢复是一个漫长复杂的生理过程, 创伤后患者机体内诸多分子水平及微环境会发生一定改变, 进而影响骨愈合进程^[2]。中药在治疗疾病方面具有悠久的历史, 其独特的治疗方式更是具有准确高效、经济便捷、辨证施治、分期治疗等特

点^[3]。以往研究经验发现, 中医补肾法、补肾单味药或其有效成分中均具有诱导骨增殖和成骨分化的作用, 可有效促进骨损伤的治疗进程^[4]。散瘀止痛续骨方具有补血活血、消肿止痛、祛瘀生新、续筋接骨之功效^[5]。酪氨酸激酶(JAK)2 信号通路作为一种信号转导途径不仅能够参与机体应激与炎症反应, 还可发挥信号转导和基因转录活化蛋白的双重作用^[6]。而骨折所引起的众多免疫抑制细胞因子对 JAK2 的表达具有一定影响, JAK2 可介导多种病理过程中的炎症反应及免疫调节, 是机体中重要的调节机制, 与骨折组织创伤后所引起的炎症反应关系十分密切, 可促使骨折后炎症反应增加骨损伤作用^[7]。本研究基于 JAK2 信号通路探求散瘀止痛续骨方对肱骨骨折大鼠骨微结构

基金项目: 河北省中医药管理局中医药类科研计划课题(2020539)
第一作者: 张永占(1980-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事骨伤科疾病研究。