

· 基础研究 ·

人参养荣汤对慢性肾衰竭大鼠
骨骼肌萎缩的影响胡 蓉^{1,2} 王明清^{1,2} 刘玲玉^{1,2} 尤海岩^{1,2} 伍晓辉^{1,2} 魏连波² 王艳靖³

摘要 目的 观察人参养荣汤对慢性肾衰竭(CRF)大鼠骨骼肌萎缩的作用及机制。方法 采用 5/6 肾切除方法制作 CRF 大鼠模型,术后 8 周测血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)以判断模型成败。造模成功的大鼠随机分为模型组、人参养荣汤组和复方 α -酮酸片(KA)组,每组 9 只;另设对照组($n=10$)。治疗 12 周后,全自动生化仪检测 Scr、BUN、血清白蛋白(Alb);取胫骨前肌、腓肠肌,进行称重、固定、HE 染色观察其病理学改变;Western Blot 测 Jagged1-Notch 通路蛋白水平。结果 与对照组比较,模型组大鼠 4 周后体重明显减轻($P<0.01$),8 周后模型组大鼠血清 Scr、BUN 水平升高($P<0.01$),Alb 水平降低($P<0.01$);肌纤维横截面积减少($P<0.01$),细胞核移位;大鼠骨骼肌 Jagged1、Notch 蛋白水平均下调($P<0.01$)。与模型组比较,人参养荣汤组和 KA 组大鼠的体重增加($P<0.01$),Scr、BUN 水平降低($P<0.01$),Alb 水平升高($P<0.01$);大鼠骨骼肌肌纤维横截面积增加($P<0.05$);骨骼肌中 Jagged1、Notch 蛋白水平上调($P<0.05$)。结论 人参养荣汤与 KA 均可改善 CRF 大鼠营养不良,增加其体重,改善 Scr、BUN 和 Alb,减轻骨骼肌萎缩,两者效果相当。人参养荣汤作用机制可能与调节 Jagged1/Notch 信号通路相关。

关键词 慢性肾衰竭;营养不良;骨骼肌萎缩;人参养荣汤;Jagged1/Notch 蛋白

Effect of Renshen Yangrong Decoction on Skeletal Muscle Atrophy in Chronic Renal Failure Malnutrition Rats HU Rong^{1,2}, WANG Ming-qing^{1,2}, LIU Ling-yu^{1,2}, YOU Hai-yan^{1,2}, WU Xiao-hui^{1,2}, WEI Lian-bo², and WANG Yan-jing³ 1 School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou(510515); 2 Chinese Medicine Department, Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Guangdong(518110); 3 Chinese Medicine Department, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou(510280)

ABSTRACT Objective To investigate the effect and mechanism of Renshen Yangrong Decoction on skeletal muscle atrophy in rats with chronic renal failure(CRF). **Methods** The rat model of CRF was established by 5/6 nephrectomy. Serum creatinine(Scr) and blood urea nitrogen(BUN) were measured after 8 weeks of operation to determine the success of the model. The successful model rats were randomly divided into model group, Renshen Yangrong Decoction group and Compound α -Ketoacid Tablets(KA) group, 9 rats in each group, and another sham operation group(10 rats) was established. After 12 weeks of treatment, Scr, BUN, serum albumin(Alb) were measured; tibialis anterior and gastrocnemius muscles were taken for weighing, fixation and HE staining to observe pathological changes; Western Blot was used to test the levels of Jagged1-Notch pathway proteins. **Results** Compared with the control group, the body weight of the model group was significantly decreased after 4 weeks($P<0.01$). After 8 weeks, the levels of Scr and BUN in model rats were increased($P<0.01$), and Alb level was decreased($P<0.01$), the cross sectional area of muscle fibers were decreased($P<0.01$), the levels of Jagged1 and Notch proteins in the model group were down-regulated($P<0.01$). Compared with the model group, the body weight of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81603472);广东省中医药局科研项目(No. 20171161)

作者单位:1. 南方医科大学中医药学院(广州 510515); 2. 南方医科大学深圳医院中医科(广东 518110); 3. 南方医科大学珠江医院中医科(广州 510280)

通讯作者:王艳靖, Tel: 020-62782110, E-mail: wyj0810@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 2020. 0408. 011

the Renshen Yangrong Decoction group and the KA group were increased ($P < 0.01$), the levels of SCr, BUN were decreased ($P < 0.01$), meanwhile, the Alb level was increased ($P < 0.01$), the skeletal muscle fiber cross sectional area were increased ($P < 0.05$), the levels of Jagged1 and Notch protein in the skeletal muscle were up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusions** Renshen Yangrong Decoction could improve the body weight, increase the levels of SCr, BUN and Alb, and ameliorate skeletal muscle atrophy in CRF rats with malnutrition, with the efficacy similar to that of KA. The mechanism might be related to regulating Jagged1/Notch signaling pathway.

KEYWORDS chronic renal failure; malnutrition; skeletal muscle atrophy; Renshen Yangrong Decoction; protein Jagged1/Notch

营养不良是慢性肾衰竭 (chronic renal failure, CRF) 常见并发症之一, 与疾病进展、心血管事件等并发症及死亡率密切相关, 是 CRF 的独立危险因素之一^[1]。研究发现, 营养不良患者心血管疾病发病率和死亡率是普通人群的 10~30 倍^[2]。CRF 营养不良主要表现为蛋白质能量消耗 (protein-energy wasting, PEW), 预防和治疗 CRF-PEW, 是阻断终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD) 进展的重要措施。

CRF-PEW 核心环节是蛋白质合成和分解代谢失衡。尿毒症状态下, 氮质毒素蓄积, 通过 Lepin 等神经递质抑制下丘脑食欲中枢, 导致神经性厌食症, 蛋白质摄入不足^[3-5]。而一些内环境的改变, 如代谢酸累积, 持续微炎症状态等可通过激活泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 及自噬信号加速蛋白质分解, 使蛋白质-能量消耗增加。同时, 胰岛素抵抗、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 和脂联素水平下降等引起 Akt/mTOR 信号下调, 抑制蛋白质合成代谢, 减少蛋白质储量^[6,7]。此外, CKD 患者后期常合并慢性炎症、内分泌紊乱、电解质失衡和肠-脑中枢抑制、生活方式改变、透析不充分等, 均可进一步加重 CRF-PEW 的发展^[8-10]。

骨骼肌萎缩是 CRF-PEW 的主要病理表现, 目前对骨骼肌损伤修复机制的研究集中在以下几方面, 包括 UPS、多种转录因子 [如蛋白水解诱导因子 (proteolysis inducing factor, PIF)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、血管紧张素 II、干扰素 (interferon, IFN) γ 及白介素类 (interleukins, ILs)]。通过不同信号通路如神经内分泌途径、自噬信号通路、半胱氨酸蛋白酶依赖的细胞凋亡和 Ca^{2+} 依赖的蛋白分解途径等调节蛋白质合成-分解代谢^[11]。CRF 状态下某些病理因素激活 UPS、蛋白水解酶系统 (Caspase)、自噬系统等蛋白质分解代谢信

号, 促进蛋白酶体对蛋白进行降解, 导致蛋白分解代谢增加, 蛋白含量逐渐减少, 肌纤维横截面积和肌肉湿重进行性下降, 通过一系列反应导致骨骼肌细胞坏死、纤维化、骨骼肌萎缩^[12]。

Jagged1 是 Notch 信号通路主要的细胞表面配体, 而 Notch 信号通路几乎涉及所有细胞的增殖和分化活动, 与修复骨骼肌萎缩、维持肌卫星细胞分化能力、抗炎和抗纤维化密切相关^[13]。Jagged1/Notch 信号通路在 CRF-PEW 发病中的作用机制尚不明确。目前临床唯一治疗 CRF-PEW 的西药——复方 α 酮酸片 (Compound α -Ketoacid Tablets, KA) 疗效有限, 中医药联合常规疗法治疗 CRF 疗效优于单用西药常规治疗^[14]。本课题组通过前期研究发现, 人参养荣汤化裁而成的肾衰营养胶囊, 可通过上调骨骼肌 Wnt7a-Akt/mTOR 信号通路、阻止瘦素受体 JAK2/STAT3 的信号传导、提升神经肽 Y 水平、上调下丘脑 NPY mRNA 的表达等, 改善 CRF-PEW 状态^[15,16]。提示肾衰营养胶囊对蛋白质代谢及骨骼肌损伤修复的多个环节具有调节作用, 而其对骨骼肌萎缩的影响及 Jagged1-Notch 通路在其中的机制尚待研究。本实验旨在探讨人参养荣汤对 CRF 大鼠的改善作用及对 Jagged1/Notch 的调节机制。

材料与方法

1 实验动物 60 只雄性 SD 大鼠, SPF 级, 180~220 g, 鼠龄 40~45 天, 购自南方医科大学医学实验动物中心, 动物合格证号: No. 44002100015013, 实验动物中心许可证号: SCXK (粤) 2016-0041。饲养条件: 温度 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$; 湿度 (55 ± 5) %; 光照 12 h/d。适应性饲养 1 周, 自由饮水、饮食。本研究经南方医科大学实验动物伦理审查会批准 (No. L2018182)。

2 药物 人参养荣汤组成: 人参 10 g 茯苓 10 g 黄芪 20 g 当归 10 g 白术 10 g 附子 5 g 陈皮 10 g 大黄 10 g 丹参 30 g 薏仁 12 g, 饮片购自从

南方医科大学南方医院中药房。人参、黄芪、当归、大黄产于甘肃,茯苓产于安徽,白术产于浙江,附子、丹参产于四川,陈皮产于广东,薏仁产于广西。饮片经南方医科大学中医药学院中药实验室鉴定,高效液相色谱法(HPLC法)进行中药质量控制。制备方法:熬药时2剂汤药(共254 g)加去离子水600 mL煎至150 mL时停止。中药浓度:6.6675 g/4 mL=1.67 g/mL。KA(开同,0.63 g/片,北京费森尤斯卡比医药有限公司生产,批号:U1430)药液制备方法:将KA片放入碾磨器皿碾成粉末状,加0.9% NaCl注射液溶解摇匀,震荡成混悬液。KA浓度:0.6 g/4 mL=0.15 g/mL=150 mg/mL。

3 主要试剂及仪器 RIPA蛋白裂解液购自上海碧云天公司(货号:P0013B);PVDF膜(0.45 μ m,货号:IPVH00010)及超敏ECL化学发光试剂盒(货号:WBKLS0010)购自美国Millipore公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自美国ThermoFisher公司(货号:23225);GAPDH鼠抗(货号:AF7021),山羊抗兔二抗(货号:S0001)购自美国Affinity公司,Jagged1(货号:ab109536)、Notch(货号:ab52627)购自英国Abcam公司。曝光仪:美国Kodak Image Station 2000MM成像系统。

4 造模、分组及干预方法 大鼠适应性饲养1周,在无菌麻醉条件下,参照文献[17]采用二步法5/6肾切除制作CRF模型,第1次手术切除左肾上下极各1/3组织,1周后行第2次手术摘除右肾。术后1周予4%酪蛋白饮食干预,制作CRF营养不良大鼠模型。手术后1~3周有21只大鼠死亡,弃去。术后8周后检查SCr、BUN指标判断造模成功与否,SCr>60 μ mol/L,BUN>12 nmol/L为造模成功^[18]。其中有2只大鼠造模未成功,弃去。造模成功的大鼠按质量随机分为模型组、人参养荣汤组、KA组,每组9只,连续给药12周。另设对照组(10只),同样行两期手术,仅剥离肾包膜,不作肾切除,正常饮食。模型组予生理盐水(4 mL)灌胃;人参养荣汤组灌胃人参养荣汤[13.335 g/(kg·d)],KA组灌胃KA[1.2 g/(kg·d)]。人参养荣汤及KA给药剂量根据《药理实验方法学》^[18]“人和动物体表面积换算比例”,按单位体重的剂量计算,大鼠的等效剂量相当于人的6.3倍^[17]。人参养荣汤大鼠的等效剂量为13.335 g/kg,大鼠体重统一按500 g/只计算,即每只大鼠每天给汤药剂量6.6675 g,灌胃4 mL汤剂。KA成人用量:成人3次/日,4~8片/次,取中剂量6片/次,3次/日,即11.34 g/d,KA等效剂量为1.2 g/kg,大鼠按500 g/只

计算,即每只大鼠每天KA剂量为0.6 g,灌胃体积4 mL/d,饲养期间各组自由饮水。

5 检测指标及方法 干预结束后10%水合氯醛麻醉,迅速分离大鼠比目鱼肌、腓肠肌和胫骨前肌,在玻璃皿上用手术刀切取100、500 mg骨骼肌组织。部分骨骼肌组织做石蜡切片,部分骨骼肌组织液氮冷冻后,-80℃冰箱保存待检。

5.1 一般情况 观察大鼠精神状态、毛色、饮食、活动、大小便情况。手术前用电子秤对大鼠称重,记录体重。手术后2周称量1次体重,记录体重。此后每4周称量1次体重,记录体重变化。

5.2 生化指标 在造模前和术后8周分别进行眼眶采血1 mL,灌胃12周后腹主动脉采血10 mL,将血标本置于4℃冰箱静置2~3 h,3 000×g离心15 min吸取上清血清,-80℃保存待测。采用全自动生化仪检测血清肌酐(serum creatinine,SCr),血清尿素氮(blood urea nitrogen,BUN),血清白蛋白(serum Albumin,Alb)。

5.3 骨骼肌组织病理学改变及肌纤维横截面积改变 采用HE染色法检测骨骼肌组织形态学肌纤维横径。取动物模型的胫骨前肌(tibia anterior,TA)组织,用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,厚度4 μ m,60℃脱蜡2~3 h。将切片放入二甲苯20 min,置于100%、95%、85%、75%酒精中各3~5 min,后在流水中冲洗10 min,将已入蒸馏水后的切片放入苏木精水溶液中染色5 min。流水冲洗10 min后入蒸馏水片刻。入酒精伊红染色液染色2~3 min。流水冲洗10 min,后用盐酸及氨水中分色各数秒,流水冲洗10 min,入75%、85%、95%、100%酒精中脱水各3 min,再经二甲苯2 min使切片透明。后用在200×显微镜下,随机选取600个以上肌管测量其横径,并计算面积,采用Image Pro-software(Silver Spring,MD)分析肌管萎缩的程度。

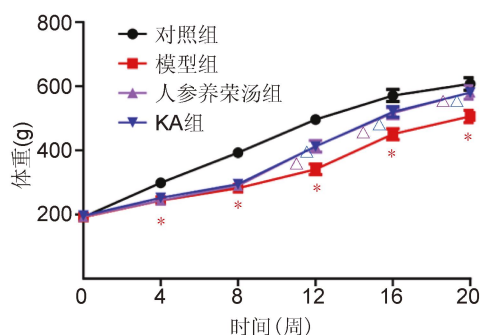
5.4 骨骼肌中相关蛋白水平检测 采用Western Blot检测骨骼肌中相关蛋白水平。提取骨骼肌组织中的总蛋白质,BCA法蛋白定量,取各样本80 μ g蛋白质进行SDS-PAGE电泳分离蛋白,电泳结束后将蛋白转移到PVDF膜上,浸没于抗体封闭液中,室温封闭1 h后,1×TBST洗涤5 min×3次,加入按说明书稀释好的一抗(1:500~1:2 000),4℃轻摇过夜。次日用1×TBST洗涤5 min×3次。加入稀释的山羊抗兔二抗(1:5 000),室温孵育1~2 h,1×TBST洗涤5 min×3次。采用ECL化学发光法,将条带于曝光仪下曝光,获取目的条带图像,以GAPDH为内参。

6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,实验资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较方差齐,采用 *One-Way ANOVA*,组间两两比较采用 *Bonferroni's Test*, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般状态比较 对照组大鼠精神状态可,毛发正常,饮食正常,大小便正常。与对照组大鼠比较,模型组大鼠精神一般,毛发正常,饮食略差,小便带少量泡沫,大便可。造模成功的大鼠在干预期间无死亡。

2 各组大鼠体重比较(图 1) 手术前各组大鼠体重比较,差异无统计学意义($P = 0.66$)。与对照组同期比较,模型组大鼠体重降低($P < 0.01$)。与模型组同期比较,人参养荣汤组与 KA 组干预后大鼠体重升高($P < 0.01$),人参养荣汤组与 KA 组比较,差异无统计学意义($P = 0.44$)。



注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

图 1 各组各时间点大鼠体重比较

3 各组 SCr、BUN、Alb 比较(表 1) 与对照组比较,模型组大鼠血清 SCr、BUN 升高($P < 0.01$),Alb 下降($P < 0.01$)。与模型组比较,人参养荣汤组和 KA 组大鼠血清 SCr 和 BUN 降低($P < 0.01$),Alb 升高($P < 0.01$)。

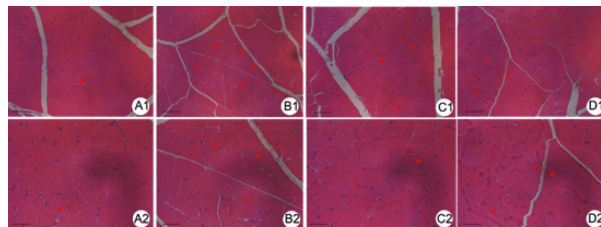
表 1 各组大鼠 SCr、BUN、Alb 水平比较

组别	n	SCr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)	Alb (g/L)
对照	10	36.44 $\pm$ 3.76	9.46 $\pm$ 0.86	56.01 $\pm$ 2.48
模型	9	95.06 $\pm$ 4.35*	17.75 $\pm$ 0.57*	41.44 $\pm$ 2.29*
人参养荣汤	9	67.42 $\pm$ 4.14 Δ	12.31 $\pm$ 1.06 Δ	46.08 $\pm$ 1.82 Δ
KA	9	61.75 $\pm$ 4.89 Δ	11.96 $\pm$ 1.34 Δ	48.07 $\pm$ 2.08 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

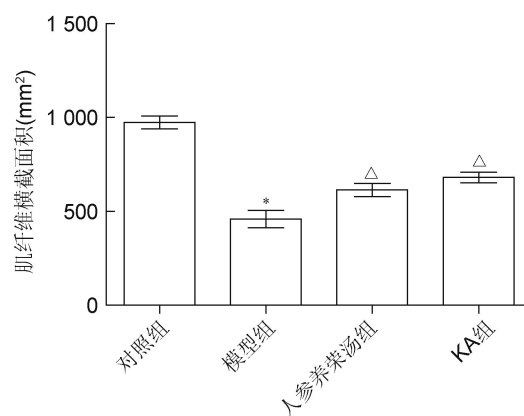
4 各组大鼠骨骼肌纤维横截面积比较(图 2、3) 与对照组比较,模型组大鼠骨骼肌纤维横截面积

减少($P < 0.01$),体积变小,形态不规则,细胞核移位。与模型组比较,人参养荣汤组和 KA 组干预后大鼠骨骼肌纤维横截面积均增加,体积增加,细胞核移位减少,形态向对照组靠近($P < 0.05$)。



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为人参养荣汤组;D 为西药组;1 为 200 $\times$;2 为 400 $\times$;红色箭头所指处为骨骼肌萎缩的代表性病理改变;比例尺:50 μm ;n=5

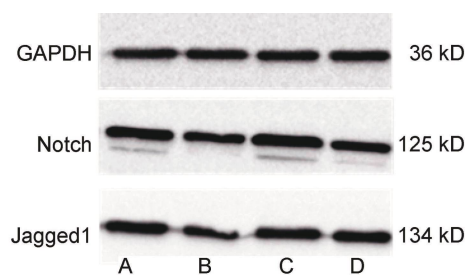
图 2 各组大鼠骨骼肌纤维染色结果比较 (HE)



注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

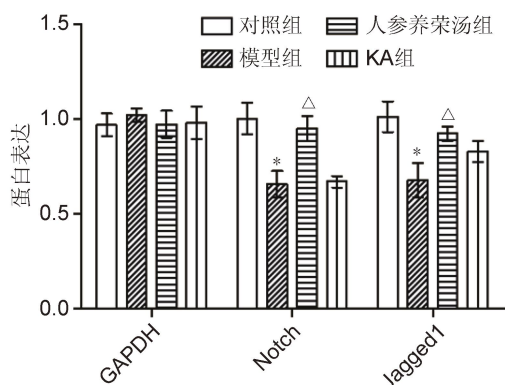
图 3 各组大鼠骨骼肌纤维横截面积比较

5 各组大鼠骨骼肌 Jagged1、Notch 蛋白表达水平比较(图 4、5) 与对照组比较,模型组大鼠骨骼肌 Jagged1、Notch 蛋白表达水平下调($P < 0.01$)。与模型组比较,人参养荣汤组干预后大鼠骨骼肌组织中 Jagged1、Notch 蛋白表达水平均上调($P < 0.05$),KA 组大鼠骨骼肌组织中 Jagged1 有一定程度上调,Notch 变化未见显著性差异($P > 0.05$)。



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为人参养荣汤组;D 为 KA 组

图 4 各组大鼠骨骼肌 Jagged1、Notch 蛋白表达电泳图



注:与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图5 各组大鼠骨骼肌 Jagged1、Notch 蛋白表达水平比较

讨 论

CRF-PEW 是由各种肾脏疾病持续发展导致体内代谢产物滞留所出现的症候群,中医学属“虚劳”“虚损”“关格”等范畴。其病理性质主要是气血亏耗,心、脾、肾三脏虚损,使气血来源不充,水谷精微不化,脏腑经络失于濡养,进而累及五脏,发为营养不良。人参养荣汤组成为人参、茯苓、黄芪、当归、白术、附子、陈皮、大黄、丹参、薏仁。诸药合参,共奏养营气补虚、活血祛瘀之功。现代药理发现其主要成分中,人参具有促进机体细胞免疫功能恢复、促进机体造血等多种功能^[19]。黄芪含有多种氨基酸及多糖,具有增强机体免疫,延缓衰老等作用,可促进肝细胞及骨骼肌蛋白质的合成,对骨骼肌萎缩具有改善作用^[20]。茯苓具有利水渗湿、健脾益肾功效,主要含有的化学成分是多糖类、三萜类、甾醇类等,具有免疫调节、抗炎、抗氧化、保护肾脏等作用,还可以有助骨骼肌细胞生长^[21]。当归主要生物活性包括造血,还可减轻肾小球硬化和肾间质纤维化病变,改善肾功能^[22]。白术则可以提高骨骼肌细胞能荷值,具有较好的抗骨骼肌疲劳作用^[23]。附子为回阳救逆要药,主要有对心血管保护、抗炎、免疫调节、抗衰老作用等,抵抗骨骼肌疲劳^[24]。基于网络药理分析研究发现陈皮可以调节凋亡过程、氧化还原过程、蛋白质自磷酸化等生物过程,可能调节蛋白质合成分解代谢途径^[25]。大黄有保肝、抗肿瘤及免疫调节,还可以抗肾脏纤维化^[26,27]。丹参作为活血化瘀的高效药,具有改善微循环,加速细胞生长,可以减轻失神经骨骼肌萎缩^[28]。薏仁可以温中燥湿,保护胃肠及调节机体免疫等作用^[29]。人参养荣汤对 CRF-PEW 的疗效机制目前尚不清楚研究。本实验旨在探讨人参养荣汤对 CRF-PEW 大鼠骨骼肌萎缩的修复作用及对 Jagged1-Notch 信号通路的调节机制。

在哺乳动物中,Notch 是一种编码膜蛋白受体,其信号通路由 4 种 Notch 受体(Notch1~4)、5 种 Notch 配体(Dll1、Dll3、Dll4、Jagged1、Jagged2)以及细胞内效应器分子(Hes1、Hes5)3 部分组成^[30]。Notch 对多种组织干细胞的维持和增殖具有调控作用,包括造血干细胞、肌细胞、间质细胞核神经干细胞。Jagged1 是高度保守的 Notch 信号通路的 5 个配体之一,为单孔跨膜蛋白,具有一个保守的功能区^[31]。Notch 信号通路活化被分为经典的 Notch 信号通路 CSL (CBF-1/Suppressor of Hairless/LAG-1, 又称 RBP-J κ) 依赖途径和 CSL 非依赖途径 2 种。在经典 Notch 信号中,Notch 受体与任一配体 DSL (Delta/Serrate/LAG2) 结合后使溶蛋白裂解,级联激活释放出 Notch 的胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD),其进入细胞核与 CSL 蛋白结合,激活下游靶基因^[32],而通过非 CSL 依赖性途径时,Notch 受体的 ANK 区和细胞内的锌指蛋白特异性结合,不需要 Notch 受体的裂解,也无需 CSL 参与^[33]。目前比较公认的 Notch 直接靶基因主要是 Hes 和 Hey 家族分子^[34]。

受体和配体的相互作用活化 Notch 信号通路,不同水平的 Notch 活化是卫星细胞自我更新和激活的开关。研究发现,特异性激活卫星细胞中的 NICD 可增强 Pax7 表达,过度加强骨骼卫星细胞的自我更新,可能导致肌肉再生不良^[35]。Notch 通过 Pten 调控 Akt 信号促使 β 细胞上的叉头转录因子 1 (Forkhead box O1, FoxO1) 得到上调,同样促进骨骼肌卫星细胞的自我更新^[36]。缺失 Notch 途径的转录共激活因子 RBP-J κ 或受体 Dll1 产生卫星细胞的过早分化和消耗,丧失自我更新能力,引起出生后肌肉生长丧失和肌肉肌张力减退^[37]。FoxO3 促进 Notch1 和 Notch3 受体表达,使卫星细胞在自我更新过程中恢复静息状态^[38]。Notch 信号通路的激活促进肌肉卫星细胞静息和增殖,但抑制肌肉卫星细胞分化。慢肌纤维中必要的转录因子 Prox1 在卫星细胞中能显著下调 Notch1、Notch4、Nrarp、Dll4、Jag1,进而促进卫星细胞的分化^[39]。用乙醇缺氧处理小鼠或敲除 Lkb1 能激活 Notch 信号通路,降低 MyoD 和 MyoG 表达,从而抑制细胞分化,同时上调 Pax7 水平^[40]。Notch1 可能通过效应基因 Hes5 的激活,实现体内卫星细胞增殖并维持卫星细胞状态^[41]。这些研究表明,Notch 信号通路在调节卫星细胞以及骨骼肌发育中具有关键作用。

本实验结果表明:与对照组比较,模型组的大鼠体重增加较缓慢。相比模型组,予人参养荣汤灌胃后,CRF-PEW 大鼠的体重变化、生长发育情况及肾功能

明显得到改善,骨骼肌萎缩明显减轻。进一步检查蛋白变化发现,人参养荣汤大鼠骨骼肌中 Jagged1、Notch 的含量明显高于模型组。表明人参养荣汤可通过调控 Jagged1/Notch 通路改善 CRF-PEW 及骨骼肌萎缩。本研究发现人参养荣汤可以改善 CRF 大鼠营养不良状态,增加白蛋白、血红蛋白水平,与以往研究结果^[42]一致;另发现人参养荣汤可以减轻 CRF 大鼠骨骼肌萎缩,提高 Jagged1 和 Notch 蛋白的水平,与以往研究不同,分析其原因为以往研究是着重在探究人参养荣汤对肾脏的影响及其调节机制,该研究进一步研究了对骨骼肌萎缩的影响及可能的机制,另外加上中药复方有效成分较多,作用机制较复杂,可能存在多靶点的作用。研究只进行了动物体内实验,对大鼠骨骼肌的表型和蛋白调节进行了初步实验,但是没有进行细胞层面的进一步,且具体的作用机制还有待进一步研究。下一步实验拟在骨骼肌细胞 C2C12 细胞中过表达或敲除 Jagged1 基因,探究 Jagged1-Notch 信号在骨骼肌细胞中的作用,以及通过人参养荣汤含药血清的干预进一步验证,确认其作用靶点。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Takahashi H, Inoue K, Shimizu K, et al. Comparison of nutritional risk scores for predicting mortality in Japanese chronic hemodialysis patients[J]. J Ren Nutr, 2017, 27(3): 201-206.
- [2] Malgorzewicz S, Heleniak Z, Lichodziejewska NM, et al. Protein-energy wasting and asymmetric dimethylarginine in peritoneal dialysis patients[J]. Acta Biochim Pol, 2018, 65(4): 581-584.
- [3] Lee SW, Kim YS, Kim YH, et al. Dietary Protein Intake, protein energy wasting, and the progression of chronic kidney disease: analysis from the KNOW-CKD Study [J]. Nutrients, 2019, 11(1): 121.
- [4] Lodebo BT, Shah A, Kopple JD. Is it Important to prevent and treat protein-energy wasting in chronic kidney disease and chronic dialysis patients[J]. J Ren Nutr, 2018, 28(6): 369-379.
- [5] Bossola M, Scribano D, Colacicco L, et al. Anorexia and plasma levels of free tryptophan, branched chain amino acids, and ghrelin in hemodialysis patients[J]. J Ren Nutr, 2009, 19(3): 248-255.
- [6] Wang DT, Lu L, Shi Y, et al. Supplementation of ketoacids contributes to the up-regulation of the Wnt7a/Akt/p70S6K pathway and the down-regulation of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems in the muscle of 5/6 nephrectomised rats[J]. Br J Nutr, 2014, 111(9): 1536-1548.
- [7] Wang DT, Yin Y, Yang YJ, et al. Resveratrol prevents TNF-alpha-induced muscle atrophy via regulation of Akt/mTOR/FoxO1 signaling in C2C12 myotubes[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 9(2): 206-213.
- [8] Fvon Haehling S, Lainscak M, Springer J, et al. Cardiac cachexia: a systematic overview [J]. Pharmacol Ther, 2009, 121(3): 227-252.
- [9] Wang AY, Sea MM, Tang N, et al. Energy intake and expenditure profile in chronic peritoneal dialysis patients complicated with circulatory congestion[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 90(5): 1179-1184.
- [10] Zhang QY, Jiang CM, Sun C, et al. Hypovitaminosis D is associated with endothelial dysfunction in patients with non-dialysis chronic kidney disease [J]. J Nephrol, 2015, 28(4): 471-476.
- [11] Mielcarek M, Isalan M. A shared mechanism of muscle wasting in cancer and Huntington's disease[J]. Clin Transl Med, 2015, 4(1): 34.
- [12] Carrero JJ, Stenvinkel P, Cuppari L, et al. Etiology of the protein-energy wasting syndrome in chronic kidney disease: a consensus statement from the International Society of Renal Nutrition and Metabolism (ISRNM) [J]. J Renal Nutrition, 2013, 23(2): 77-90.
- [13] Mu X, Tang Y, Lu A, et al. The role of Notch signaling in muscle progenitor cell depletion and the rapid onset of histopathology in muscular dystrophy [J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(10): 2923-2937.
- [14] 包能. 中医多种方式治疗慢性肾衰竭的网状 META 分析[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [15] 邓聪, 魏连波, 黄丽雯, 等. 肾衰养真胶囊对慢性肾衰竭营养不良大鼠 Leptin-下丘脑 NPY/POMC 轴的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(9): 952-956.
- [16] 王明, 汪东涛, 尹懿, 等. Wnt7a-Akt/mTOR 信号通路在肾衰营养改善慢性肾衰竭大鼠骨骼肌萎缩中的作用[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(8): 1-5.
- [17] 马林林, 解汝娟. 用改良的 5/6 肾切除法制作的大鼠慢性肾衰竭模型[J]. 中国伤残医学, 2010, 18(6): 5-7.
- [18] 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1124.
- [19] 宿延丽, 宿艳霞, 宿武林. 人参有效成分及其复方研究进展[J]. 人参研究, 2008, 20(2): 7-11.

- [20] 王海燕, 李惊子, 潘缉圣, 等. 中药黄芪当归合剂对肾病综合征肾损伤的保护作用及对代谢紊乱的影响[J]. 北京大学学报(医学版), 2002, 34(5): 542-552.
- [21] 张年, 李兆星, 李娟, 等. 茯苓的化学成分与生物活性研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(2): 220-233.
- [22] 宋锦叶, 李深, 孟立强, 等. 黄芪当归合剂对 5/6 肾切除大鼠肾组织损伤的治疗作用[J]. 北京大学学报(医学版), 2009, 41(2): 196-202.
- [23] 刘友章, 王昌俊, 刘静, 等. 四君子汤对脾虚大鼠肝、心肌、胃黏膜和骨骼肌细胞线粒体损伤的修复作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(39): 170-173.
- [24] 唐梅, 赵立春, 徐敏, 等. 附子化学成分和药理作用研究进展[J]. 广西植物, 2017, 37(12): 1614-1627.
- [25] 黄秀芳, 庾国桢, 童晶晶. 基于网络药理学分析陈皮的药理作用机制[J]. 中成药, 2019, 41(12): 3038-3045.
- [26] 杜怡雯, 冯江毅, 胡黎文, 等. 大黄的药理活性研究及临床应用[J]. 中医临床研究, 2018, 10(25): 24-27.
- [27] 刘丹. 大黄治疗慢性肾脏病的活性部位及其抗肾纤维化的作用机制研究[D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [28] 裴艳宏, 刘坤祥. 黄芪丹参联合应用可延缓大鼠失神经骨骼肌萎缩[J]. 解剖学报, 2014, 45(2): 278-282.
- [29] 李献华. 杨从鑫主任运用厚朴温中汤的经验研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2012, 10(7): 16-17.
- [30] Greenwald I, Kovall R. Notch signaling: genetics and structure[J]. WormBook, 2013, 17: 1-28. doi: 10.1895/wormbook.1.10.2.
- [31] Grochowski CM, Loomes KM, Spinner NB. Jagged1(JAG1): structure, expression, and disease associations[J]. Gene, 2016, 576(3): 381-384.
- [32] Previs RA, Coleman RL, Harris AL, et al. Molecular pathways: translational and therapeutic implications of the Notch signaling pathway in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(5): 955-961.
- [33] Zhang KJ, Lu QY, Niu XQ, et al. Notch 1 signaling inhibits growth of EC109 esophageal carcinoma cells through downmodulation of HPV18 E6/E7 gene expression[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(2): 153-158.
- [34] Iso T, Sartorelli V, Poizat C, et al. HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(17): 6080-6089.
- [35] Wen YF, Bi PP, Liu WY, et al. Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells[J]. Cell Mol Biol, 2012, 32(12): 2300-2311.
- [36] Bi PP, Kuang SH. Notch signaling as a novel regulator of metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(5): 248-255.
- [37] Yue F, Bi PP, Wang C, et al. Pten is necessary for the quiescence and maintenance of adult muscle stem cells[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14328. doi: 10.1038/ncomms14328.
- [38] Gopinath SD, Webb AE, Brunet A, et al. FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of self-renewal[J]. Stem Cell Rep, 2014, 2(4): 414-426.
- [39] Kivela R, Salmela I, Nguyen YH, et al. The transcription factor Prox1 is essential for satellite cell differentiation and muscle fibre-type regulation[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13124. doi: 10.1038/ncomms13124.
- [40] Shan TZ, Zhang PP, Xiong Y, et al. Lkb1 deletion upregulates Pax7 expression through activating Notch signaling pathway in myoblasts[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 76: 31-38.
- [41] Qin LL, Xu J, Wu ZF, et al. Notch1-mediated signaling regulates proliferation of porcine satellite cells (PSCs)[J]. Cell Signal, 2013, 25(2): 561-569.
- [42] 王明, 王艳靖, 许璇, 等. 人参养荣汤对腺嘌呤致 CRF 营养不良模型大鼠下丘脑信号传导蛋白 STAT3、PIAS3 的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(2): 3-16.

(收稿: 2019-03-25 在线: 2020-08-10)

责任编辑: 赵芳芳