

· 研究论文 ·

姜黄素调节Notch1/Hes1通路对高糖诱导的 肾小球系膜细胞纤维化的影响

王雅蕊¹ 孔文文² 朱维娜³ 陈婷¹ 孙龙¹ 夏勤¹ 赵珊^{1*}(¹南京市中医院药学部, 南京 210000; ²南京市中医院内分泌科, 南京 210000;³南京市中医院中心实验室, 南京 210000)

摘要 该文旨在探讨姜黄素 (curcumin, Cur) 调节 Notch1/Hes1 通路对高糖 (HG) 诱导的肾小球系膜细胞纤维化的影响。CCK-8 法筛选 Cur 作用浓度。将 HBZY-1 细胞分为正常对照 (NG) 组、高渗对照 (NG+M) 组、HG 组、Cur 低浓度 (HG+Cur-L) 组、Cur 高浓度 (HG+Cur-H) 组、Notch1 抑制剂 DAPT (HG+DAPT) 组、Notch1 激活剂 Jagged1 (HG+Jagged1) 组、Cur-H+Notch1 激活剂 Jagged1 (HG+Cur-H+Jagged1) 组。EdU 染色检测细胞增殖情况; Western blot 和免疫荧光染色测定蛋白表达情况; ELISA 检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6 及单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 水平; 试剂盒测定丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平; qRT-PCR 测定 *Notch1*、*Hes1* mRNA 水平。与 NG 组比较, HG 组 EdU 阳性率升高 ($P < 0.05$); 纤维化相关指标 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、I 型胶原蛋白 (collagen I)、纤维连接蛋白 (FN) 蛋白表达水平及 α -SMA、collagen I 平均荧光强度升高 ($P < 0.05$); 炎症或氧化应激指标 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1 及 MDA 水平升高, 而 SOD、GSH-Px 水平降低 ($P < 0.05$); 通路相关分子 *Notch1*、*Hes1* mRNA 及 Notch1、Notch 细胞内结构域 (NICD)、Hes1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。NG+M 组与 NG 组无显著差异。HG+Cur-L、HG+Cur-H 组、HG+DAPT 组较 HG 组上述异常指标得到逆转, 且 HG+Cur-H 组效果更优。Notch1 激活剂 Jagged1 可显著加重 HG 诱导的细胞损伤, 并部分逆转高浓度 Cur 对 HG 条件下 HBZY-1 细胞的保护效应。Cur 可能通过抑制 Notch1/Hes1 通路减轻 HG 诱导的 HBZY-1 细胞纤维化, 并缓解其炎症反应与氧化应激。

关键词 姜黄素; Notch1/Hes1 通路; 高糖; 肾小球系膜细胞; 纤维化; 炎症; 氧化应激

Effect of Curcumin on High Glucose-Induced Glomerular Mesangial Cell Fibrosis via Modulating the Notch1/Hes1 Pathway

WANG Yaru¹, KONG Wenwen², ZHU Weina³, CHEN Ting¹, SUN Long¹, XIA Qin¹, ZHAO Shan^{1*}(¹Department of Pharmacy, Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China;²Department of Endocrinology, Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China;³Central Laboratory of Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China)

收稿日期: 2026-06-16

接受日期: 2026-08-22

江苏省南京市卫生科技发展专项资金项目(批准号: YKK20170)资助的课题

*通信作者。Tel: 025-86369319, E-mail: 99605039@qq.com

Received: June 16, 2026

Accepted: August 22, 2026

This work was supported by the Health Science and Technology Development Special Fund Project of Nanjing, Jiangsu Province (Grant No. YKK20170)

*Corresponding author. Tel: +86-25-86369319, E-mail: 99605039@qq.com

Abstract This study aims to investigate the effect of Cur (curcumin) on HG (high glucose)-induced fibrosis in rat glomerular mesangial cells (HBZY-1) via modulating the Notch1/Hes1 pathway. CCK-8 assay was used to screen the appropriate concentration of Cur. HBZY-1 cells were divided into normal control (NG) group, hyperosmotic control (NG+M) group, HG group, Cur low-concentration (HG+Cur-L) group, Cur high-concentration (HG+Cur-H) group, Notch1 inhibitor DAPT (HG+DAPT) group, Notch1 activator Jagged1 (HG+Jagged1) group, and Cur-H+Notch1 activator Jagged1 (HG+Cur-H+Jagged1) group. Cell proliferation was assessed by EdU staining; protein expression was determined by Western blot and immunofluorescence staining; levels of IL-1 β (interleukin-1 β), TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-6, and MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) were detected by ELISA; levels of MDA (malondialdehyde), SOD (superoxide dismutase), and GSH-Px (glutathione peroxidase) were measured using assay kits; and mRNA levels of *Notch1* and *Hes1* were quantified by qRT-PCR. Compared with the NG group, the HG group showed a significant increase in EdU-positive rate ($P<0.05$); elevated fibrosis-related indicators [protein expression of α -SMA (α -smooth muscle actin), TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1), collagen I, and FN (fibronectin), as well as mean fluorescence intensity of α -SMA and collagen I ($P<0.05$)]; elevated levels of inflammatory or oxidative stress indicators IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, and MDA, and decreased levels of SOD and GSH-Px ($P<0.05$); and up-regulated pathway-related molecules [*Notch1* and *Hes1* mRNA levels, as well as protein expression of Notch1, NICD (Notch intracellular domain), and Hes1 ($P<0.05$)]. No significant differences were observed between the NG+M and NG groups. Compared with the HG group, the above abnormal indicators were reversed to varying degrees in the HG+Cur-L, HG+Cur-H, and HG+DAPT groups, with the HG+Cur-H group showing more pronounced effects. The Notch1 activator Jagged1 significantly aggravated HG-induced injury and partially reversed the cytoprotective effects of high-concentration curcumin on HBZY-1 cells. Cur may alleviate HG-induced fibrosis in HBZY-1 cells by inhibiting the Notch1/Hes1 pathway, mitigating associated inflammation and oxidative stress.

Keywords curcumin; Notch1/Hes1 pathway; high glucose; glomerular mesangial cells; fibrosis; inflammation; oxidative stress

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)作为糖尿病主要的微血管并发症,是全球范围内终末期肾病的主导诱因。其关键病理特征表现为肾小球结构改变,特别是肾小球基底膜增厚与系膜区扩张^[1]。在此过程中,肾小球系膜细胞在高糖(high glucose, HG)诱导下异常活化、增殖,并过量合成细胞外基质成分,是驱动肾纤维化进程的核心环节^[2]。因此,深入探究HG诱导肾小球系膜细胞损伤的分子机制,对开发DN治疗策略具有重要意义。姜黄素(curcumin, Cur)是从姜黄中提取的一种天然多酚,是其主要活性成分,具有广泛的抗炎、抗氧化及抗纤维化等药理活性^[3-4]。研究表明, Cur在多种肾脏疾病模型中表现出保护作用^[5-7],但其在DN背景下,对抗HG所致肾小球系膜细胞纤维化的具体分子途径尚未被完全阐明。Notch1(neurogenic locus notch homolog protein 1)/Hes1(hairy and enhancer of split-1)信号通路在肾纤维化进程中发挥着重要调控作用^[8]。该通路的持续活化,能促进上皮-间质转化、增加纤维连接蛋白(fibronectin, FN)及I型胶原蛋

白(collagen I)等细胞外基质成分的合成与沉积,从而加速肾纤维化进程^[9]。在肾小球系膜细胞中, Notch通路异常激活可促进细胞增殖与纤维化表型转化; HG环境下系膜细胞中Notch通路相关分子及转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)表达上调,而 γ -分泌酶抑制剂DAPT可阻断Notch信号并抑制上述促纤维化因子的表达^[10]。因此,靶向抑制Notch1/Hes1通路被视为一个潜在的治疗方向。近期研究提示, Cur在肾病模型中可调控Notch1及Hes1的表达^[11-12],但Notch1/Hes1通路在HG诱导的肾小球系膜细胞纤维化中是否介导了Cur的抗纤维化效应,目前仍缺乏直接的因果验证。本研究旨在明确Cur对HG环境下肾小球系膜细胞纤维化的影响,并探讨其作用是否与调控Notch1/Hes1信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

大鼠肾小球系膜细胞HBZY-1(货号: CL-0092)

购自武汉普诺赛生命科技生物公司; Cur(货号: C805205)购自上海麦克林生化科技股份有限公司; Notch1抑制剂DAPT、Notch1激活剂Jagged1、兔源Notch1一抗(货号: HY-13027、HY-P1846、HY-P86591)购自美国MCE公司; CCK-8试剂(货号: CP201)购自昆明云亘生物科技有限公司; EdU试剂盒(货号: C0071S)购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 逆转录试剂盒、SYBR Green Master Mix(货号: 11141ES、11201ES50)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6及单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) ELISA试剂盒(货号: JL20884、JL13202、JL20896、JL11450)购自上海江莱生物科技有限公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(货号: A003-1-2、A001-3-2、A005-1-1)购自南京建成生物工程研究所; 兔源 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、TGF- β 1、collagen I、FN、Hes1、GAPDH一抗及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(货号: ab124964、ab215715、ab270993、ab45688、ab108937、ab181602、ab205718)购自英国Abcam公司; 兔源Notch细胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD)一抗(货号: 4147)购自美国CST公司。

1.2 细胞培养及Cur作用浓度筛选

HBZY-1细胞用含10%胎牛血清及1%青霉素-链霉素的DMEM/F12完全培养基, 于37℃、5% CO₂饱和湿度条件下常规传代培养。取对数生长期、状态良好的特定代次细胞进行实验。为评估Cur对正常细胞增殖活性的影响, 将细胞以每孔约 5×10^3 个的密度均匀接种于96孔板中, 待细胞贴壁后, 分别加入终浓度为1、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的Cur处理正常细胞。为排除Cur本身对正常细胞纤维化标志物及Notch信号通路蛋白表达的潜在影响, 另设20 $\mu\text{mol/L}$ Cur处理组, 采用Western blot检测 α -SMA、FN、Notch1、NICD及Hes1的蛋白表达水平。为筛选Cur在HG环境下的有效作用浓度, 设置以下分组: 正常对照(NG)组(5.5 mmol/L葡萄糖)、高渗对照(NG+M)组(5.5 mmol/L葡萄糖+24.5 mmol/L甘露醇)、HG组(30 mmol/L葡萄糖^[2,13]), 以及在HG基础上分别加入1、5、10、20、40

$\mu\text{mol/L}$ 等不同终浓度Cur的干预组。其中, Cur母液以二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配制, 并确保各孔中DMSO的终浓度一致且不超过0.1%。细胞于处理条件下继续培养48 h^[13]后, 每孔加10 μL CCK-8溶液, 37℃避光孵育2 h。使用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的吸光度(*D*)值。最终, 细胞活力以各处理组的平均*D*值占正常对照组平均*D*值的百分比表示, 计算公式为: $CV = [(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{正常对照组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$; CV表示细胞活力。

1.3 细胞分组与给药

HBZY-1细胞分为NG组(5.5 mmol/L葡萄糖)、NG+M组(5.5 mmol/L葡萄糖+24.5 mmol/L甘露醇)、HG组(30 mmol/L葡萄糖)、Cur低浓度(HG+Cur-L)组(30 mmol/L葡萄糖+5 $\mu\text{mol/L}$ Cur)、Cur高浓度(HG+Cur-H)组(30 mmol/L葡萄糖+20 $\mu\text{mol/L}$ Cur)、Notch1抑制剂(HG+DAPT)组(30 mmol/L葡萄糖+10 $\mu\text{mol/L}$ DAPT^[14])、Notch1激活剂Jagged1(HG+Jagged1)组(30 mmol/L葡萄糖+2 $\mu\text{g/mL}$ 重组Jagged1蛋白)、Cur高浓度+Notch1激活剂Jagged1(HG+Cur-H+Jagged1)组(30 mmol/L葡萄糖+20 $\mu\text{mol/L}$ Cur+2 $\mu\text{g/mL}$ 重组Jagged1蛋白)。其中Jagged1工作浓度2 $\mu\text{g/mL}$ 参照文献[15]并经预实验验证。预实验设0.5、1、2、4 $\mu\text{g/mL}$ 浓度梯度处理HG诱导的HBZY-1细胞, 检测NICD表达情况以筛选最佳浓度, 结果显示2 $\mu\text{g/mL}$ 即可显著激活NICD表达, 故后续实验选用Jagged1工作浓度为2 $\mu\text{g/mL}$ 。所有组别均使用含10%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基, 在37℃、5% CO₂条件下培养48 h, 且确保各实验组中DMSO等溶剂的终浓度一致($\leq 0.1\%$)。

1.4 EdU染色

将对数生长期HBZY-1细胞以每孔 5×10^3 个的密度接种于96孔板, 分组处理后, 加入终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的EdU培养基于37℃孵育2 h。细胞于室温下经4%多聚甲醛固定20 min和0.5% Triton X-100透化15 min后, 使用Apollo[®]染色反应液进行荧光标记, 并用DAPI复染细胞核。于荧光显微镜下随机选取至少5个视野, 通过ImageJ软件计算EdU阳性细胞(红色荧光)占总细胞数(蓝色荧光)的百分比, 即EdU阳性率。

1.5 Western blot

收集各组细胞后, 使用RIPA裂解液提取总蛋白, BCA法进行定量。取等量蛋白样品进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 随后利用湿转法将其转移至PVDF膜上。用含5%脱脂奶粉的Tris缓冲盐溶液室温

封闭1 h, 之后分别与相应的一抗4 °C孵育过夜。所用一抗包括: α -SMA、TGF- β 1、collagen I、FN、Notch1、NICD、Hes1(稀释比例均为1:1 000)及内参蛋白GAPDH(1:2 000)的特异性抗体。次日, 经Tris缓冲盐溶液洗涤后, 用辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1:5 000)室温孵育1 h。最后, 使用增强化学发光显影液于化学发光成像系统上显影并采集图像。以GAPDH为内参, 采用ImageJ软件分析目标条带的灰度值, 计算目标蛋白与内参蛋白灰度值的比值以进行相对定量分析。

1.6 免疫荧光染色

将各组HBZY-1细胞以适宜密度接种于激光共聚焦培养皿中, 待其贴壁并经相应处理后, 弃去培养液, 使用预冷的4%多聚甲醛室温固定15 min。磷酸盐缓冲液清洗后, 以0.5% Triton X-100溶液室温通透处理20 min。随后, 加入5%牛血清白蛋白封闭液于室温下封闭1 h以消除非特异性结合。弃去封闭液, 不洗, 直接加入用抗体稀释液配制的小鼠抗 α -SMA单克隆抗体(1:200)及兔抗collagen I多克隆抗体(1:200)混合工作液, 置于湿盒中4 °C孵育过夜。次日, 用磷酸盐缓冲液充分洗涤, 加入对应的荧光素标记山羊抗小鼠IgG(1:400)(Alexa Fluor 488, 绿色荧光)及山羊抗兔IgG(1:400)(Alexa Fluor 594, 红色荧光)二抗混合工作液, 室温避光孵育1 h。再次用磷酸盐缓冲液洗涤后, 使用含DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片, 以标记细胞核。最后, 于激光共聚焦显微镜下, 在相同的激光强度、增益与曝光参数下观察并采集图像, 并使用Image-Pro Plus软件对特定通道(α -SMA对应488 nm激发光, collagen I对应594 nm激发光)下的平均荧光强度进行定量分析。

1.7 炎症因子及氧化应激指标检测

收集各组细胞培养上清, 使用商品化ELISA试剂盒, 严格依据其说明书操作流程, 检测IL-1 β 、TNF- α 、IL-6及MCP-1的浓度。简要步骤为: 将样品与标准品加入预包被抗体的酶标板中, 37 °C孵育90 min, 洗涤后加入生物素化检测抗体, 37 °C孵育60 min, 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素, 37 °C孵育30 min, 洗涤后加入底物溶液显色, 测定450 nm波长处的 D 值, 依据标准曲线计算各因子浓度(pg/mL)。另收集细胞, 裂解后取上清, 使用BCA法测定蛋白浓度以归一化。采用硫代巴比妥酸法测定MDA含量, 通过黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性, 并基于谷胱甘肽底物消耗速率法测定GSH-Px活

性, 各指标检测均严格遵循相应试剂盒说明书进行, MDA含量以nmol/mg prot表示, SOD及GSH-Px活性以U/mg prot表示。

1.8 qRT-PCR

使用TRIzol试剂提取各组细胞的总RNA, 采用微量分光光度计测定其浓度与纯度(D_{260}/D_{280} 值在1.8~2.0之间视为合格)。取1 μ g总RNA, 依照逆转录试剂盒说明书合成第一链cDNA。使用Primer Premier 5.0软件设计并合成Notch1、Hes1及内参基因GAPDH的特异性引物序列。引物序列为: Notch1正向引物5'-GCC AGC AAG AAG AAG CGG AGA G-3', 反向引物5'-CCA CTC GTT CTG ATT GTC GTC CAT C-3'; Hes1正向引物5'-CTA ACG CAG TGT CGC CTT CCA G-3', 反向引物5'-AGA GAG GTG GGC TAG GGA GTT TAT G-3'; GAPDH正向引物5'-ACG GCA AGT TCA ACG GCA CAG-3', 反向引物5'-CGA CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC-3'。qRT-PCR反应体系: 10 μ L SYBR Green Master Mix、正反向引物各0.5 μ L、2 μ L cDNA模板, 补加ddH₂O至20 μ L。于实时荧光定量PCR仪上进行扩增。反应程序设置为: 95 °C预变性30 s; 随后进行40个循环的95 °C变性5 s、60 °C退火/延伸30 s; 最后进行熔解曲线分析以验证扩增产物的特异性。实验以GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达水平。

1.9 统计学分析

所有数据均采用GraphPad Prism 9.0进行统计分析, 并以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示。对数据进行正态性检验(如Shapiro-Wilk检验)和方差齐性检验(如Levene检验)。多组间比较行单因素方差分析, 随后以Bonferroni法进行事后多重比较。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cur对HG诱导的HBZY-1细胞增殖的影响

CCK-8结果显示, 与0 μ mol/L Cur相比, 1、5、10、20、40 μ mol/L Cur对正常培养下HBZY-1细胞活力[(101.23 $\pm$ 6.21)%、(103.49 $\pm$ 7.23)%、(106.96 $\pm$ 8.15)%、(111.24 $\pm$ 8.87)%、(109.42 $\pm$ 10.65)% vs (99.68 $\pm$ 3.49)%], P 值分别为0.999、0.955、0.590、0.134、0.280]无明显影响, 表明Cur本身无细胞毒性。进一步检测NG+Cur组(20 μ mol/L Cur)发现, 与NG

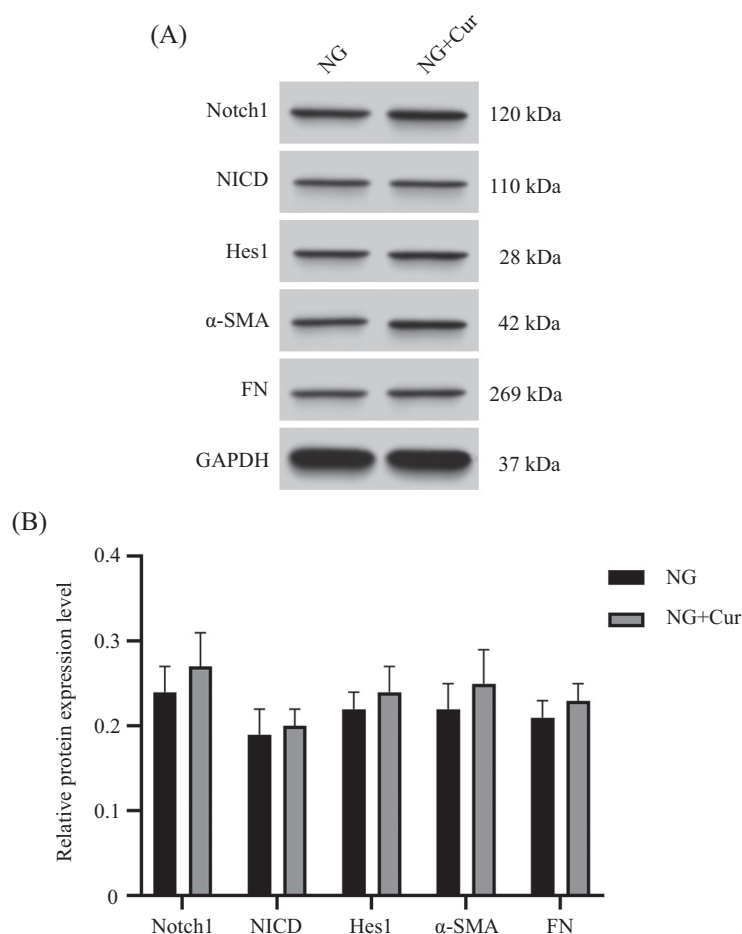
组相比, Cur单独干预不影响Notch1、NICD、Hes1、 α -SMA和FN的蛋白表达水平(P 值分别为0.172、0.512、0.204、0.172、0.114, 图1), 排除了Cur对正常细胞中上述指标的基础影响。

图2显示, 与NG组相比, HG组细胞活力显著升高($P<0.05$), 表明HG成功诱导了细胞过度增殖, 模拟了DN早期的病理改变。使用甘露醇的NG+M组细胞活力与NG组无显著差异($P=1.000$), 排除了渗透压的干扰。Cur干预呈现剂量依赖性效应: 1 $\mu\text{mol/L}$ Cur对HG诱导的细胞增殖无显著抑制作用($P=1.000$); 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ Cur均能显著逆转HG引起的细胞活力升高(P 值分别为0.006、 <0.001 、 <0.001), 其中20 $\mu\text{mol/L}$ Cur效果最显著; 40 $\mu\text{mol/L}$ 时效应进入平台期($P<0.05$, 但其细胞活力与20 $\mu\text{mol/L}$ 组无显著差异)。因此, 后续实验选定5 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 分别作为Cur低(Cur-L)、高(Cur-H)浓度。

图3显示, HG组EdU阳性率显著高于NG组($P<0.05$); 与HG组比较, HG+Cur-L组、HG+Cur-H组、HG+DAPT组EdU阳性率下降($P<0.05$), 且HG+Cur-H组效果显著优于HG+Cur-L组($P<0.05$), 而HG+Jagged1组EdU阳性率升高($P<0.05$); 与HG+Cur-H组比较, HG+Cur-H+Jagged1组EdU阳性率升高($P<0.05$)。

2.2 Cur对HG诱导的HBZY-1细胞纤维化的影响

图4和图5显示, HG组 α -SMA、TGF- β 1、collagen I、FN蛋白表达水平及 α -SMA、collagen I平均荧光强度均高于NG组($P<0.05$); 与HG组比较, HG+Cur-L组、HG+Cur-H组、HG+DAPT组 α -SMA、TGF- β 1、collagen I、FN蛋白表达水平及 α -SMA、collagen I平均荧光强度均下降($P<0.05$), 且HG+Cur-H组效果显著优于HG+Cur-L组($P<0.05$), 而HG+Jagged1组 α -SMA、TGF- β 1、collagen I、FN蛋白表达水平及 α -SMA、collagen I平均荧光强度均升高($P<0.05$); 与

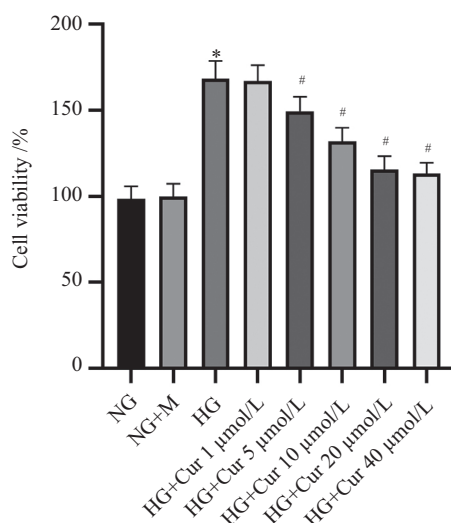


A: Western blot实验检测Notch1、NICD、Hes1、 α -SMA和FN蛋白表达情况; B: 各组蛋白表达量比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

A: Western blot detection of Notch1, NICD, Hes1, α -SMA and FN protein expression; B: comparison of protein expression levels among groups. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.

图1 Notch1、NICD、Hes1、 α -SMA和FN蛋白表达量检测及各组蛋白表达量比较

Fig.1 Detection of Notch1, NICD, Hes1, α -SMA and FN protein expression and comparison of protein expression levels in each group



* $P < 0.05$, 与NG组相比; # $P < 0.05$, 与HG组相比。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with the NG group; # $P < 0.05$ compared with the HG group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

图2 各组细胞活力比较

Fig.2 Comparison of cell viability among different groups

HG+Cur-H组比较, HG+Cur-H+Jagged1组 α -SMA、TGF- β 1、collagen I、FN蛋白表达水平及 α -SMA、collagen I平均荧光强度均升高($P < 0.05$)。

2.3 Cur对HG诱导的HBZY-1细胞炎症因子的影响

图6显示, HG组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1水平高于NG组($P < 0.05$); 与HG组比较, HG+Cur-L组、HG+Cur-H组、HG+DAPT组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1水平下降($P < 0.05$), 且HG+Cur-H组效果显著优于HG+Cur-L组($P < 0.05$), 而HG+Jagged1组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1水平升高($P < 0.05$); 与HG+Cur-H组比较, HG+Cur-H+Jagged1组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1水平升高($P < 0.05$)。

2.4 Cur对HG诱导的HBZY-1细胞氧化应激指标的影响

图7显示, 与NG组比较, HG组 MDA水平升高, SOD、GSH-Px水平降低($P < 0.05$); 与HG组比较, HG+Cur-L组、HG+Cur-H组、HG+DAPT组MDA水平降低, SOD、GSH-Px水平升高($P < 0.05$), 且HG+Cur-H组效果显著优于HG+Cur-L组($P < 0.05$), 而HG+Jagged1组MDA水平升高, SOD、GSH-Px水平降低($P < 0.05$); 与HG+Cur-H组比较, HG+Cur-H+Jagged1组MDA水平升高, SOD、GSH-Px水平降低($P < 0.05$)。

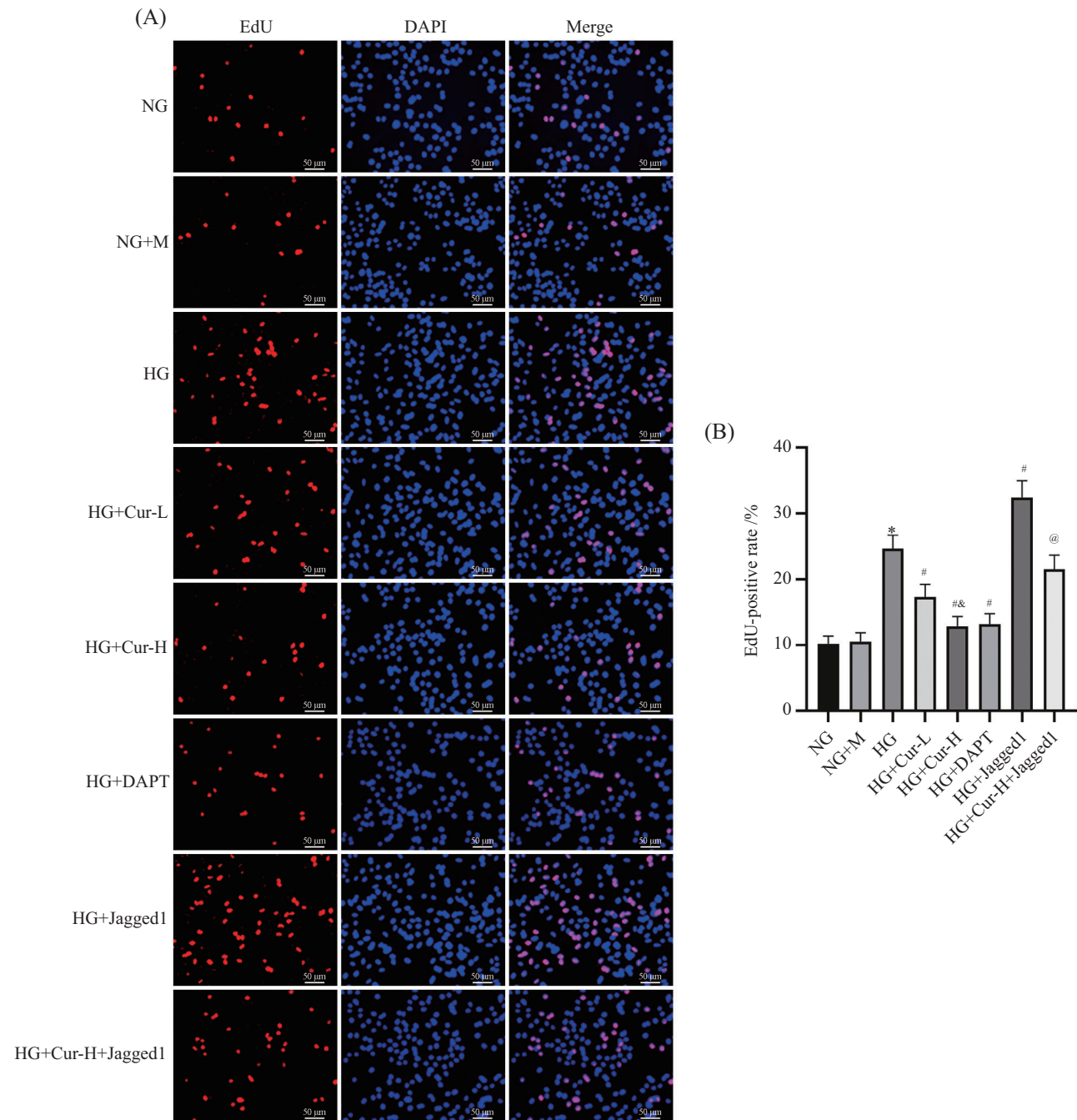
2.5 Cur对HG诱导的HBZY-1细胞中Notch1/Hes1通路相关分子表达的影响

图8显示, 与NG组比较, HG组 *Notch1*、*Hes1*

mRNA及Notch1、NICD、Hes1蛋白表达水平均升高($P < 0.05$); 与HG组比较, HG+Cur-L组、HG+Cur-H组、HG+DAPT组 *Notch1*、*Hes1* mRNA及Notch1、NICD、Hes1蛋白表达水平均下降($P < 0.05$), 且HG+Cur-H组效果显著优于HG+Cur-L组($P < 0.05$), 而HG+Jagged1组 *Notch1*、*Hes1* mRNA及Notch1、NICD、Hes1蛋白表达水平均升高($P < 0.05$); 与HG+Cur-H组比较, HG+Cur-H+Jagged1组 *Notch1*、*Hes1* mRNA及Notch1、NICD、Hes1蛋白表达水平均升高($P < 0.05$)。

3 讨论

HG环境是诱导细胞功能紊乱、结构损伤及病理生理改变的核心诱因, 在糖尿病相关并发症进程中发挥关键启动作用^[16-17]。在本研究中, HG干预后细胞活力显著升高, EdU阳性率增加, 提示HG成功诱导了细胞过度增殖与早期损伤, 模型构建成功; 同时, NG+M组与NG组无显著差异, 排除了渗透压对实验结果的干扰, 确保了模型可靠性^[18]。CCK-8结果显示, 1~40 μ mol/L Cur对正常培养下HBZY-1细胞活力无显著影响, 且20 μ mol/L Cur不影响Notch1、NICD、Hes1、 α -SMA及FN的蛋白表达水平, 表明Cur本身无细胞毒性, 亦不干扰正常细胞中上述蛋白的基础表达。在HG环境下, 本研究发现Cur干预呈剂量依赖性逆转了HG引起的细胞活力异常升高: 1 μ mol/L Cur



A: EdU染色检测细胞增殖能力; B: 各组EdU阳性率比较。* $P<0.05$,与NG组相比; # $P<0.05$,与HG组相比; * $P<0.05$,与HG+Cur-L组相比; @ $P<0.05$,与HG+Cur-H组相比。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

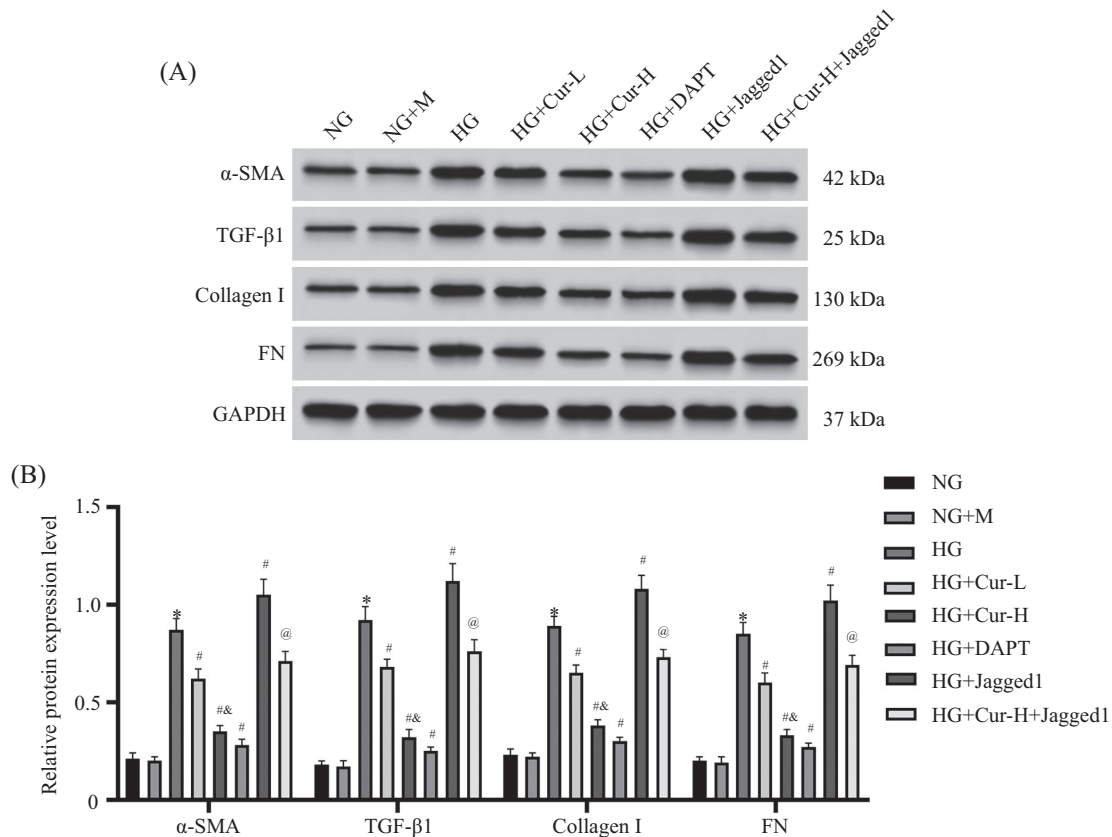
A: EdU staining for detecting cell proliferation; B: comparison of EdU-positive rate among groups. * $P<0.05$ compared with the NG group; # $P<0.05$ compared with the HG group; * $P<0.05$ compared with the HG+Cur-L group; @ $P<0.05$ compared with the HG+Cur-H group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

图3 EdU染色检测细胞增殖能力以及EdU阳性率比较

Fig.3 EdU staining for detecting cell proliferation and comparison of EdU-positive rate among groups

效果不显著; 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ Cur均能显著逆转HG引起的细胞活力升高, 其中20 $\mu\text{mol/L}$ Cur的效果最显著; 40 $\mu\text{mol/L}$ 时效应进入平台期, 与20 $\mu\text{mol/L}$ 组无显著差异。据此, 后续实验选取5 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 分别作为Cur低、高干预浓度。

本研究进一步从纤维化标志物层面对Cur的保护效应进行了验证。成纤维细胞过度激活是HG诱导细胞慢性损伤的重要表现, 其标志是细胞外基质的异常积累与组织结构的重塑^[19]。本研究所检测的 $\alpha\text{-SMA}$ 、 $\text{TGF-}\beta 1$ 、collagen I和FN是评估这一进程



A: Western blot实验检测 α -SMA、TGF- β 1、collagen I和FN蛋白表达情况; B: 各组蛋白表达量比较。* P <0.05, 与NG组相比; # P <0.05, 与HG组相比; & P <0.05, 与HG+Cur-L组相比; @ P <0.05, 与HG+Cur-H组相比。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

A: Western blot detection of α -SMA, TGF- β 1, collagen I and FN protein expression; B: comparison of protein expression levels among groups. * P <0.05 compared with the NG group; # P <0.05 compared with the HG group; & P <0.05 compared with the HG+Cur-L group; @ P <0.05 compared with the HG+Cur-H group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.

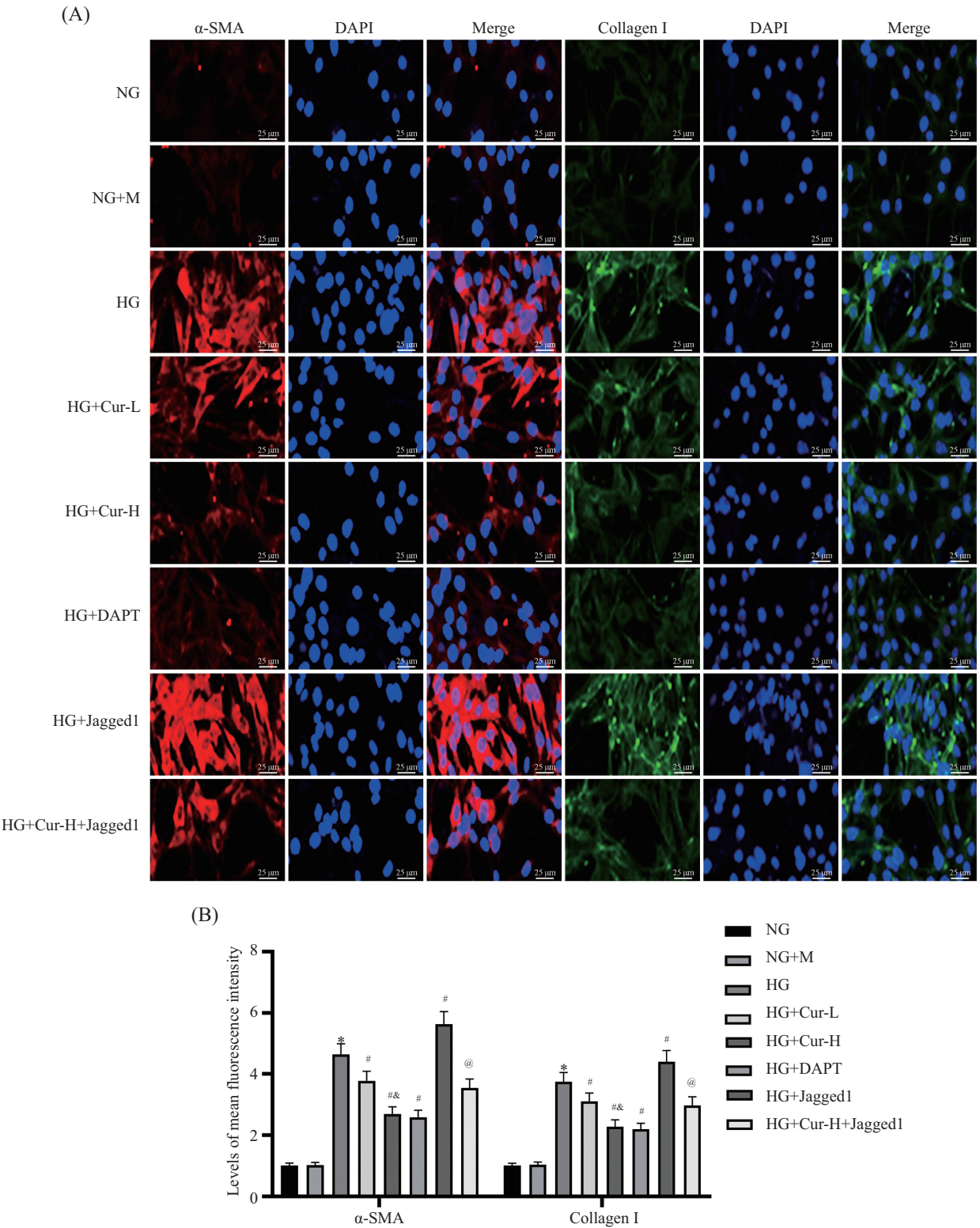
图4 α -SMA、TGF- β 1、collagen I和FN蛋白表达量检测及各组蛋白表达量比较

Fig.4 Detection of α -SMA, TGF- β 1, collagen I and FN protein expression and comparison of protein expression levels in each group

的关键分子标志物^[20-21]。 α -SMA表达是肾小球系膜细胞等间质细胞向具有收缩和强分泌功能的肌成纤维细胞转分化的经典标志,其表达上调标志着细胞向促纤维化表型转化^[20]。TGF- β 1被认为是驱动纤维化的核心细胞因子,它通过Smad等通路,直接诱导肌成纤维细胞的活化和细胞外基质蛋白相关基因的转录^[21]。而collagen I和FN则是病理性沉积的细胞外基质的主要蛋白质成分,它们的过度合成与沉积直接导致肾小球系膜扩张和基底膜增厚,是纤维化病变的结构基础^[20]。本实验结果显示, HG可显著上调上述蛋白表达及荧光强度,表明HG可促进细胞向促纤维化表型转化;而Cur干预后, α -SMA、TGF- β 1、collagen I及FN蛋白表达水平均降低,且高浓度Cur的效果更好,表现出剂量依赖性。这表明Cur能够有效逆转HG诱导的纤维化反应,对维持细胞正常结构与功能具有积极意义。

此外,本研究还从炎症和氧化应激角度评估了Cur的保护效应。炎症反应失控与氧化应激失衡是HG诱导的细胞损伤的两大核心病理环节^[22]。在本研究中, HG组IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1水平均升高,MDA水平升高,SOD和GSH-Px水平降低,表明细胞同时处于炎症反应激活与氧化应激损伤状态。Cur干预后,上述促炎因子及MDA水平均降低,SOD和GSH-Px水平升高,与已有报道^[23-24]相一致。Cur可显著降低促炎因子水平,减轻氧化应激损伤,提升抗氧化能力,提示其具有明确的抗炎、抗氧化作用,可从多个层面阻断HG诱导的细胞损伤级联反应。

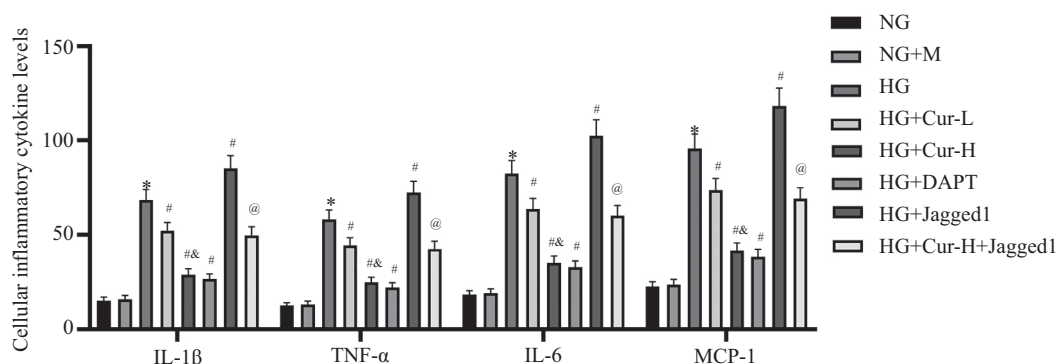
本研究进一步验证了Cur对Notch1/Hes1通路的调控作用。Notch通路是调控细胞增殖、分化、炎症与纤维化的关键通路,其中Notch1/NICD/Hes1轴在HG相关细胞损伤中尤为重要^[9,25-26]。经典Notch信号的活化始于细胞膜表面Notch受体(如Notch1)与其相邻细胞



A: 免疫荧光染色检测 α -SMA、collagen I表达情况; B: 各组 α -SMA、collagen I平均荧光强度比较。* $P<0.05$, 与NG组相比; # $P<0.05$, 与HG组相比; & $P<0.05$, 与HG+Cur-L组相比; @ $P<0.05$, 与HG+Cur-H组相比。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

A: immunofluorescence staining for detecting α -SMA and collagen I expression; B: comparison of mean fluorescence intensity of α -SMA and collagen I among groups. * $P<0.05$ compared with the NG group; # $P<0.05$ compared with the HG group; & $P<0.05$ compared with the HG+Cur-L group; @ $P<0.05$ compared with the HG+Cur-H group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$.

图5 免疫荧光染色检测 α -SMA、collagen I表达情况及各组 α -SMA、collagen I平均荧光强度比较
Fig.5 Immunofluorescence staining for detecting α -SMA and collagen I expression and comparison of their mean fluorescence intensity among groups

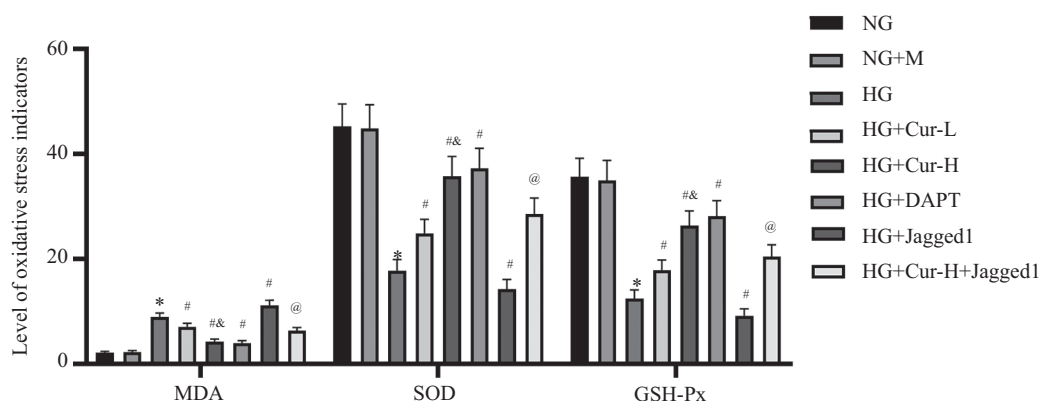


* $P < 0.05$, 与NG组相比; # $P < 0.05$, 与HG组相比; & $P < 0.05$, 与HG+Cur-L组相比; @ $P < 0.05$, 与HG+Cur-H组相比。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with the NG group; # $P < 0.05$ compared with the HG group; & $P < 0.05$ compared with the HG+Cur-L group; @ $P < 0.05$ compared with the HG+Cur-H group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

图6 各组HBZY-1细胞IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1水平比较

Fig.6 Comparison of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and MCP-1 levels in HBZY-1 cells among groups



* $P < 0.05$, 与NG组相比; # $P < 0.05$, 与HG组相比; & $P < 0.05$, 与HG+Cur-L组相比; @ $P < 0.05$, 与HG+Cur-H组相比。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with the NG group; # $P < 0.05$ compared with the HG group; & $P < 0.05$ compared with the HG+Cur-L group; @ $P < 0.05$ compared with the HG+Cur-H group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

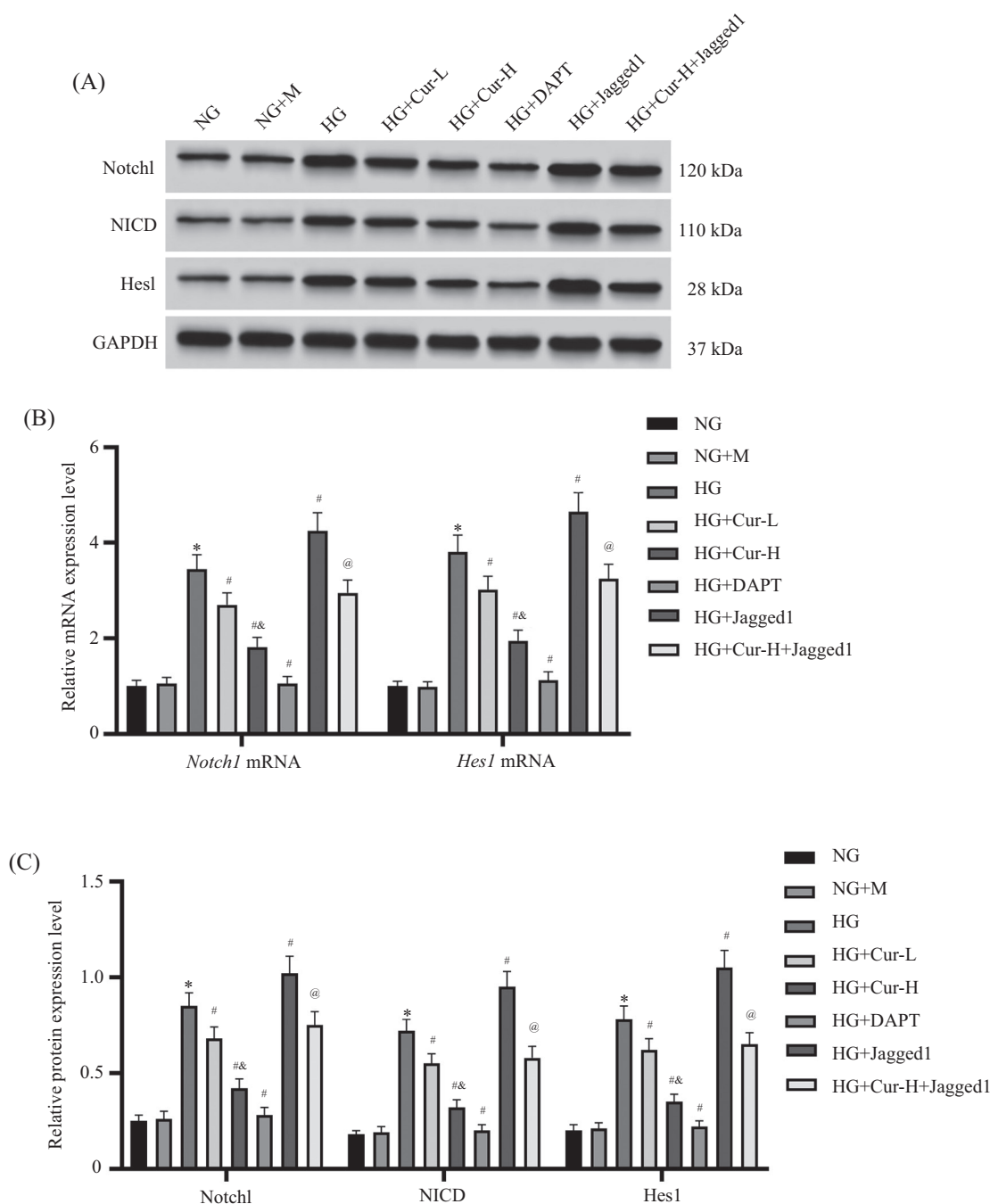
图7 各组HBZY-1细胞MDA、SOD、GSH-Px水平比较

Fig.7 Comparison of MDA, SOD and GSH-Px levels in HBZY-1 cells among groups

上配体(如Jagged1)的结合,随后结合后的Notch受体经 γ -分泌酶介导的连续酶切,释放出其具有转录活性的细胞内结构域NICD。NICD转移至细胞核内,与转录因子CSL结合,进而激活下游Hes1的转录^[27]。在肾脏疾病背景下,Notch1信号异常活化已被证实可促进肾小球系膜细胞纤维化表型转化^[28]。其下游关键效应因子Hes1,一方面可抑制上皮分化相关基因(如CDH1)表达,另一方面则直接或间接上调包括 α -SMA、FN及collagen I在内的多种促纤维化分子表达,从而驱动细胞外基质的过度沉积^[9,29]。本研究显示, HG可显著激活Notch1、Hes1的mRNA与蛋白表达,提示Notch通路过度活化参与HG诱导的细胞损伤。而Cur干预后上述分子表达水平均呈剂量依赖性降低,提示Cur可抑制

Notch1/Hes1通路的异常激活。为验证Cur的保护效应是否确实依赖于Notch1/Hes1通路的抑制,本研究进一步使用Notch通路抑制剂DAPT模拟Cur的保护效应,而激动剂Jagged1则可加重细胞损伤;进一步的回复实验显示, Jagged1可逆转Cur的保护作用,使纤维化、炎症及氧化应激相关指标升高,并使细胞活力下降,证实Cur对HG诱导的肾小球系膜细胞纤维化、炎症和氧化应激的保护作用,至少部分是通过抑制Notch1/Hes1信号通路的过度激活来实现的。

综上,本研究发现Cur能有效减轻HG环境下肾小球系膜细胞的损伤,表现为提高细胞活力、改善细胞形态、抑制异常增殖、减少纤维化、减轻炎症反应与氧化应激。其分子机制与下调Notch1/Hes1信号



A: Western blot实验检测Notch1、NICD和Hes1蛋白表达情况; B: *Notch1*、*Hes1* mRNA水平比较; C: 各组蛋白表达量比较。* $P < 0.05$, 与NG组相比; # $P < 0.05$, 与HG组相比; & $P < 0.05$, 与HG+Cur-L组相比; @ $P < 0.05$, 与HG+Cur-H组相比。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

A: Western blot detection of Notch1, NICD and Hes1 protein expression; B: comparison of *Notch1* and *Hes1* mRNA levels; C: comparison of protein expression levels among groups. * $P < 0.05$ compared with the NG group; # $P < 0.05$ compared with the HG group; & $P < 0.05$ compared with the HG+Cur-L group; @ $P < 0.05$ compared with the HG+Cur-H group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.

图8 各组Notch1、NICD、Hes1蛋白及*Notch1*、*Hes1* mRNA表达比较

Fig.8 Comparison of Notch1, NICD, Hes1 protein and *Notch1*, *Hes1* mRNA expression among groups

通路的活性密切相关。这为理解Cur在DN中的肾脏保护作用提供了新的实验依据,也为以Notch1/Hes1通路为靶点开发抗肾纤维化药物提供了理论参考。需要指出的是,本研究结论主要基于大鼠HBZY-1细

胞系的体外实验,虽然该细胞系是DN患者肾小球系膜细胞损伤研究中公认的经典细胞模型, HG诱导的纤维化相关信号通路在大鼠与人之间高度保守,但动物细胞与人类细胞在遗传背景及信号调控细节上

仍存在一定差异,其结果的外推性尚需更多模型验证。Western blot及免疫荧光实验均未设置阳性对照(如TGF- β 1刺激的细胞)及阴性对照(如同型IgG对照),未能从对照层面进一步验证抗体结合的特异性。此外,受实验周期与条件限制,本研究未开展转录组测序等组学筛选实验,未能从全局视角评估Cur处理后Notch1/Hes1在整体信号网络中的相对权重及是否存在其他协同通路。因此,未来研究应首先在动物模型及人源细胞中验证该机制,并在此基础上探讨Cur与其他抗纤维化疗法的联合应用潜力,以期为DN治疗提供更可靠的临床前证据。

参考文献 (References)

- [1] Dwivedi S, Sikarwar M S. Diabetic nephropathy: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic strategies [J]. *Hormone and Metabolic Research*, 2025, 57(1): 7-17.
- [2] Wang Y, Pi P, Hu M L, et al. Inhibition of LTBP2 suppresses high glucose-induced proliferation, fibrosis, and inflammation in glomerular mesangial cells by disrupting the PI3K/Akt/NF- κ B pathway [J]. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 2025, 24(3): 361-374.
- [3] Eldesoqui M, Embaby E M, Fouad R A, et al. Curcumin attenuates malathion-induced lung injury in rats by modulating oxidative stress, inflammation, and fibrosis via Nrf2/HO-1, NF- κ B/TNF- α , and COX-2 pathways [J]. *Tissue and Cell*, 2026, 98: 103144.
- [4] Alsulaim A K, Almutaz T H, Albati A A, et al. Therapeutic potential of curcumin, a bioactive compound of turmeric, in prevention of streptozotocin-induced diabetes through the modulation of oxidative stress and inflammation [J]. *Molecules*, 2023, 29(1): 128.
- [5] Zou Z Y, Cheng X Y, Chen J Y, et al. Curcumin alleviates atrazine-induced nephrotoxicity by enhancing mitophagy through PINK1/Parkin signaling pathway in mice [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2025, 295: 118118.
- [6] Wang L F, Wu N N, Zhang W D, et al. Curcumin alleviates sepsis-associated acute kidney injury potentially by inhibiting ferroptosis through the ACSL4/GPX4 signaling pathway [J]. *Drug Development Research*, 2025, 86(7): e70181.
- [7] An P, Li X Y, Zhao Y H, et al. Curcumin alleviates renal fibrosis in chronic kidney disease by targeting the circ_0008925-related pathway [J]. *Renal Failure*, 2025, 47(1): 2444393.
- [8] Yang X Y, Jiang D, Wang Y Z, et al. Chlorogenic acid alleviates renal fibrosis by reducing lipid accumulation in diabetic kidney disease through suppressing the Notch1 and Stat3 signaling pathway [J]. *Renal Failure*, 2024, 46(2): 2371988.
- [9] Qing M J, Zhang X M, Li Q X, et al. Study on effect of pancreatic kininogenase on diabetic nephropathy-induced fibrosis via Notch1/Hes1/Pten/Akt signaling pathway [J]. *BMC Nephrology*, 2025, 26(1): 196.
- [10] Liu L, Gao C L, Chen G, et al. Notch signaling molecules activate TGF- β in rat mesangial cells under high glucose conditions [J]. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 2013: 979702.
- [11] 曹慧慧, 王悦彤, 屈凯, 等. 姜黄素对阿霉素肾病大鼠Notch信号通路相关蛋白的影响[J]. *陕西中医*, 2022, 43(7): 827-832.
Cao H H, Wang Y T, Qu K, et al. Effects of curcumin on Notch signaling pathway related protein expression in adriamycin nephropathy rats [J]. *Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 43(7): 827-832.
- [12] 邓文荣, 石文清, 李海俏, 等. 姜黄素对糖尿病肾病大鼠肾功能及肾组织JNK、Notch2/hes1信号通路的影响[J]. *山东医药*, 2020, 60(14): 5-8.
Deng W R, Shi W Q, Li H Q, et al. Effects of curcumin on renal function and JNK and Notch 2/hes1 signaling pathway in renal tissues of diabetic nephropathy rats [J]. *Shandong Medical Journal*, 2020, 60(14): 5-8.
- [13] 温玉, 付晓, 刘城, 等. 甘草素调节Hippo/YAP/TAZ信号通路对高糖诱导的肾小球系膜细胞炎症反应及纤维化的影响[J]. *西部医学*, 2024, 36(8): 1131-1136.
Wen Y, Fu R, Liu C, et al. Impacts of liquiritigenin on high glucose-induced inflammatory response and fibrosis in glomerular mesangial cells by regulating Hippo/YAP/TAZ signaling pathway [J]. *Medical Journal of West China*, 2024, 36(8): 1131-1136.
- [14] 李雅琪, 马晓莉, 赵云丽, 等. 田蓟苷对大鼠A7R5血管平滑肌细胞增殖、迁移、表型转化及Notch1信号通路调控的影响[J]. *中成药*, 2024, 46(3): 977-981.
- [15] 蔡承敏, 何玉茂, 余亚东. 缬沙坦对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞活性损伤的干预作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1): 35-42.
Cai C M, He Y M, Yu Y D. Intervention of valsartan on high glucose-induced injury of rat glomerular mesangial cells activity [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2021, 31(1): 35-42.
- [16] Tian Y, Zhou C X, Yan Q, et al. Dapagliflozin improves diabetic kidney disease by inhibiting ferroptosis through β -hydroxybutyrate production [J]. *Renal Failure*, 2025, 47(1): 2438857.
- [17] Wudtiwai B, Sittiju P, Chongchai A, et al. Role of anthocyanins in protecting chondrocytes from high glucose damage through SIRT-1 and autophagy in diabetic osteoarthritis [J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2025, 193: 118870.
- [18] Huang L J, Lin T T, Shi M Z, et al. Liraglutide ameliorates inflammation and fibrosis by downregulating the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in diabetic kidney disease [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2024, 327(4): R410-R422.
- [19] Qiao Y Y, Ji J L, Hou W L, et al. tRF3-IleAAT reduced extracellular matrix synthesis in diabetic kidney disease mice by targeting ZNF281 and inhibiting ferroptosis [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2024, 45(5): 1032-1043.
- [20] Zhang L P, Jin G, Zhang W, et al. CircRNA Arf3 suppresses glomerular mesangial cell proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy via miR-107-3p/Tmbim6 axis [J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2024, 56(5): 543-552.
- [21] Chen J, Hu Z Y, Ma Y, et al. Rutaecarpine alleviates inflammation and fibrosis by targeting CK2 α in diabetic nephropathy [J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2024, 180: 117499.
- [22] Du L L, Xia H, Lü L B, et al. The diagnostic value and mechanism of miR-127-3p in type 2 diabetes and complications of diabetic nephropathy [J]. *Hereditas*, 2025, 163(1): 10.
- [23] Zhu P, Wu Y, Gu Y, et al. JAB1 promotes high glucose-induced

- inflammation and extracellular matrix deposition in glomerular mesangial cells by regulating angiopoietin-like protein 2 [J]. *Folia Biologica*, 2021, 67(5/6): 191-198.
- [24] Wen F Y, Zhang S M, Sun L Q, et al. Salvianolic acid b inhibits oxidative stress in glomerular mesangial cells alleviating diabetic nephropathy by regulating SIRT3/FOXO1 signaling [J]. *Kidney and Blood Pressure Research*, 2023, 48(1): 738-751.
- [25] Jiang L, Liu X Q, Hu X R, et al. METTL3-mediated m⁶A modification of TIMP2 mRNA promotes podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(4): 1721-1740.
- [26] Zhang Y, Cao Y, Zheng R, et al. Fibroblast-specific activation of Rnd3 protects against cardiac remodeling in diabetic cardiomyopathy via suppression of Notch and TGF- β signaling [J]. *Theranostics*, 2022, 12(17): 7250-7266.
- [27] Sun Z F, Wang X D, Xu Z, et al. Kuanxiong aerosol attenuates post-myocardial infarction heart failure by immune modulation via the NOTCH1 pathway [J]. *American Journal of Translational Research*, 2025, 17(9): 6960-6974.
- [28] Zhong W, Hong C, Zhang Y Y, et al. ASH2L-mediated H3K4me3 drives diabetic nephropathy through HIPK2 and Notch1 pathway [J]. *Translational Research*, 2024, 264: 85-96.
- [29] Chen H S, Zhou X J, Yang Y X, et al. Shen Qi Wan-containing serum alleviates renal interstitial fibrosis via restraining Notch1-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2023, 2023: 3352353.