

基于 P38 MAPK/ERK 自噬通路探讨五眼果水提物对草酸钙晶体致 HKC 细胞损伤的抑制作用

李雨君, 曾春晖, 李森华, 言娇霞, 杨柯*

(广西中医药大学药学院, 广西中医药大学广西高校中药药理重点实验室, 广西南宁 530001)

摘要: **目的** 基于 P38 MAPK/ERK 通路探讨五眼果水提物抑制一水合草酸钙 (COM) 晶体致 HKC 细胞损伤的作用机制。**方法** 将 HKC 细胞分为正常组、模型组和五眼果水提物高、中、低剂量组 (160、80、40 $\mu\text{g/mL}$), 除正常组外其余各组用 100 $\mu\text{g/mL}$ COM 晶体构建 HKC 细胞损伤模型, 药物组同时给予相应质量浓度药物。采用 MTT 法检测细胞存活率, 微板法检测细胞上清液中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和粘附在细胞表面钙离子 (Ca^{2+}) 水平, 自噬双标腺病毒 (mRFP-GFP-LC3) 结合激光共聚焦显微镜检测自噬流, Western blot 法检测细胞 LC3B、Beclin1、P62、mTOR、p-mTOR、ERK1/2、p-ERK1/2、P38 和 p-P38 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 五眼果水提物组细胞存活率升高 ($P < 0.05$), 细胞上清液 LDH 活性和粘附在细胞表面 Ca^{2+} 水平降低 ($P < 0.05$), 细胞自噬体和自噬溶酶体形成减少 ($P < 0.05$), p-ERK1/2/ERK1/2、LC3B II/LC3B I 和 Beclin-1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), P62、p-P38/P38 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$)。**结论** 五眼果水提物通过调控 P38 MAPK/ERK 信号通路抑制自噬, 降低 COM 晶体与细胞的黏附性, 从而减轻草酸钙晶体对肾小管上皮细胞的损伤。

关键词: 五眼果水提物; 肾小管上皮细胞; 草酸钙晶体; 自噬; P38 MAPK/ERK 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)03-0982-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.042

肾结石是泌尿外科的常见疾病, 肾小管损伤、草酸钙浓度过饱和和晶体粘附是肾结石发生的必要条件, 肾小管上皮细胞与草酸钙晶体之间的相互作用可导致细胞损伤^[1], 受损的肾小管上皮细胞为草酸钙晶体的粘附与沉积提供附着点, 从而促进结石的形成。尽管目前肾结石形成机制尚未完全清楚, 但近年来研究表明自噬与肾结石的形成密切相关^[2-3]。自噬是真核细胞本身具有的一种保护和防御机制, 它可有效降解细胞内有害物质对肾小管上皮细胞的损害, 维持真核细胞内环境稳态。

课题组前期研究表明五眼果体外可抑制一水合草酸钙晶体 (COM) 形成^[4], 其水提物体内可通过降低小鼠 IL-6 和 TNF- α 水平, 减轻小鼠炎症免疫反应引起的肾脏损伤, 抑制小鼠泌尿系统草酸钙结石的发生^[5]。在炎症发生的过程中常伴随自噬的产生, 过度的自噬会加重肾小管上皮细胞的损伤, 促进结石的形成。因此, 本实验基于 P38 MAPK/ERK 自噬通路探讨五眼果水提物对 COM 晶体损伤肾上皮细胞的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 细胞 人肾小管上皮细胞 HKC, 由广西中医药大学科学实验中心惠赠。

1.2 药物与试剂 五眼果购自桂林鼎康中药饮片有限公

司, 经广西中医药大学郭敏副教授鉴定为漆树科植物南酸枣 *Choerospondias axillaris* (Roxb.) Burt et Hill 的干燥果实。BCA 蛋白质试剂盒 (批号 16E25C46, 武汉博士德生物工程有限公司); LDH、 Ca^{2+} 检测试剂盒 (批号 20210311、20210720, 南京建成生物工程研究所); LC3B、P62、p-mTOR、Beclin-1 抗体 (批号 2755S、39749S、5536S、3738S, 美国 Cell Signaling Technology 公司); mTOR、P38、ERK1/2、p-ERK1/2 抗体 (批号 10018370、10018370、00057920、00097416, 美国 Proteintech 公司); p-P38 抗体 (批号 7gd6101, 江苏亲科生物研究中心有限公司)。

1.3 仪器 TCSPTSII 激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); Synergy H1 酶标仪 (美国 BioTek 公司); TS2 倒置显微镜成像系统 (日本 Nikon 公司); DYY-6D 六一电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); C170 二氧化碳培养箱 (德国 BINDER 公司)。

2 方法

2.1 五眼果水提物制备 取 2 kg 药材粗粉, 加入 12 L 蒸馏水, 浸泡 30 min, 加热提取 2 h, 过滤取滤液; 药渣加 10 L 蒸馏水加热提取 1 h, 过滤取滤液, 合并 2 次滤液, 并浓缩得 0.4 kg 浸膏, 即得五眼果水提物。用含 10% 血清的培养基将五眼果水提物配制成 1 mg/mL 母液, 0.22 μm 滤

收稿日期: 2023-01-22

基金项目: 国家自然科学基金 (81260667)

作者简介: 李雨君 (1995—), 女, 硕士生, 从事抗炎免疫药理研究。Tel: 15289679244, E-mail: 2443105016@qq.com

* 通信作者: 杨柯 (1975—), 男, 硕士, 教授, 从事中草药药理研究。Tel: (0771) 2279423, E-mail: kyang_11@126.com

膜过滤除菌备用,用时配制所需质量浓度。

2.2 COM 晶体制备 参考文献 [6-7] 报道方法稍加改进,10 mol/L 草酸钠溶液和 10 mol/L 氯化钙溶液混匀,置于 4 ℃ 冰箱静置 3 d,4 ℃、1 000 r/min 离心 15 min,用超纯水反复清洗沉淀物 3 次,将沉淀物置于 50 ℃ 烘箱干燥,研磨成粉末,灭菌、密封备用。实验时用含 10% 血清的培养基配制成 100 μg/mL COM 晶体。

2.3 细胞分组及处理 取对数生长期 HKC 细胞,接种于孔板,待贴壁后将细胞分为正常组、模型组和五眼果水提取物高、中、低剂量组 (160、80、40 μg/mL),除正常组外其余各组用 100 μg/mL COM 晶体损伤细胞,药物组同时给予相应质量浓度药物,培养 24 h。

2.4 细胞 LDH 活性和细胞活性检测 取对数生长期 HKC 细胞,以每孔 5×10⁴ 个的密度接种于 96 孔板,按“2.3”项下方法处理 24 h 后取上清液,严格按照试剂盒说明书测定 LDH 活性。然后向各孔加入 100 μL MTT (0.5 mg/mL) 溶液,避光孵育 4 h,吸弃上清液,每孔加入 100 μL DMSO,振荡 10 min,在 570 nm 波长处测定吸光度值。

2.5 细胞粘附情况及 Ca²⁺ 水平检测 取对数生长期 HKC 细胞,以每孔 7×10⁴ 个的密度接种于 6 孔板,按“2.3”项下方法处理 24 h 后,于倒置显微镜下观察细胞形态和粘附晶体数量。然后用 PBS 清洗细胞 3 次,加入 30 μL 5 mol/L 盐酸,晃动 6 孔板使盐酸浸润细胞,收集样品至离心管静置 1 h,14 000 r/min 离心 10 min,取上清液按照钙离子试剂盒说明书进行测定。

2.6 细胞自噬流检测 取对数生长期 HKC 细胞,以每皿

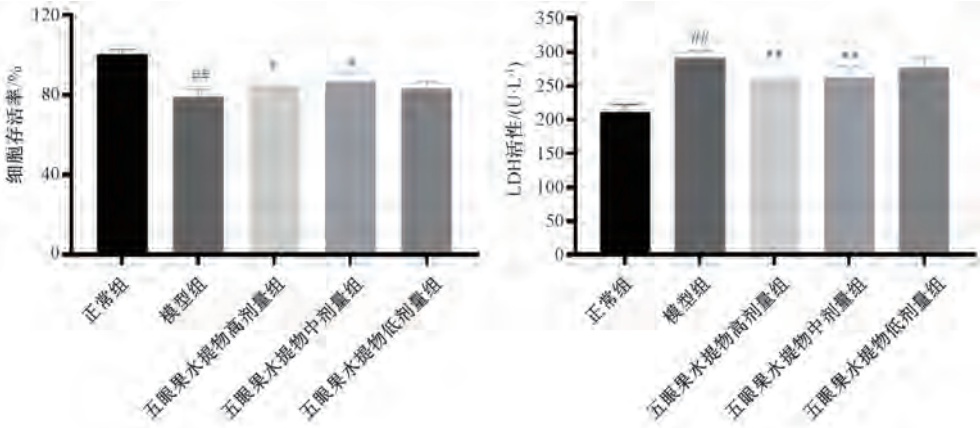
1×10⁴ 个的密度接种于共聚焦培养皿,待贴壁后,吸弃上清液,加入含有腺病毒 MOI 值为 100 的完全培养基培养 4 h 后更换回完全培养基继续培养 48 h。吸弃上清液,按“2.3”项下方法处理 24 h 后,于激光显微共聚焦下观察各组细胞自噬流,红绿荧光通过 Merge 后出现的红色斑点为自噬溶酶体,黄色斑点为自噬体,通过不同颜色斑点的计数可判断自噬流的强弱。

2.7 自噬通路相关蛋白表达检测 取对数生长期 HKC 细胞,以每孔 2×10⁵ 个的密度接种于 6 孔板,按“2.3”项下方法处理 24 h 后,收集细胞,提取蛋白,BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度。各组蛋白样本通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,然后转移到甲醇活化的 PVDF 膜上,于无蛋白的快速封闭液中室温封闭 30 min,置于一抗溶液中 4 ℃ 孵育过夜,TBST 清洗膜后,将膜置于二抗溶液中室温孵育 2 h,TBST 清洗膜后,与 ECL 底物试剂盒反应后,于凝胶成像仪中发光显色。使用 Image Lab 6.0 软件测量目标蛋白灰度值,分析各组目的蛋白的表达量。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理,符合正态分布的数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示,组间比较采用方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 五眼果水提取物对 COM 晶体损伤 HKC 细胞损伤的影响 与正常组比较,模型组细胞存活率降低 ($P<0.01$),细胞上清液中 LDH 活性升高 ($P<0.01$);与模型组比较,五眼果水提取物高、中剂量组细胞存活率升高 ($P<0.05$),细胞上清液中 LDH 活性降低 ($P<0.01$),见图 1。



注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 1 五眼果水提取物对 COM 晶体损伤 HKC 细胞损伤的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.2 五眼果水提取物对 COM 晶体损伤 HKC 细胞黏附性的影响 与正常组比较,模型组大量晶体粘附在细胞表面,细胞间隙变大,有内容物流出,Ca²⁺ 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,五眼果水提取物各剂量组上述变化明显减轻,Ca²⁺ 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图 2~3。

3.3 五眼果水提取物对 COM 晶体损伤 HKC 细胞自噬流的影响 与正常组比较,模型组细胞自噬体和自噬溶酶体数量增加 ($P<0.01$);与模型组比较,五眼果水提取物各剂量组

细胞自噬体和自噬溶酶体数量减少 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图 4。

3.4 五眼果水提取物 COM 晶体损伤 HKC 细胞自噬相关通路蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组细胞 p-ERK1/2/ERK1/2 和 LC3B II/LC3B I 比值升高 ($P<0.05$),P62 蛋白表达和 p-mTOR/mTOR 比值有降低趋势,Becn-1 蛋白表达和 p-P38/P38 比值有升高趋势,但差异均无统计学意义 ($P>0.05$);与模型组比较,五眼果水提取物高剂量组细胞 p-

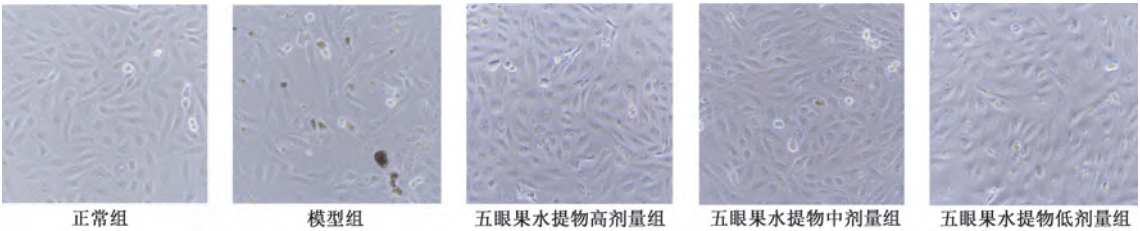
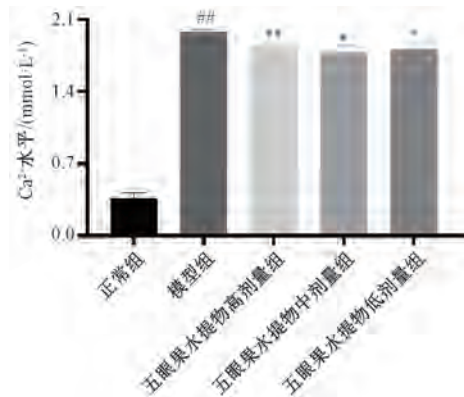
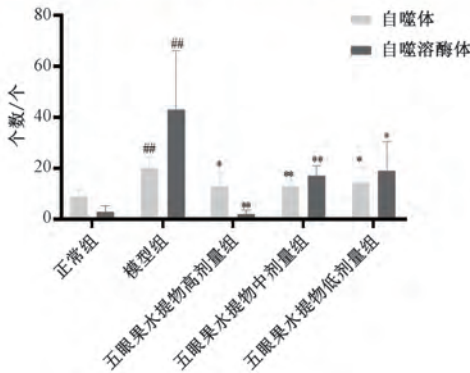
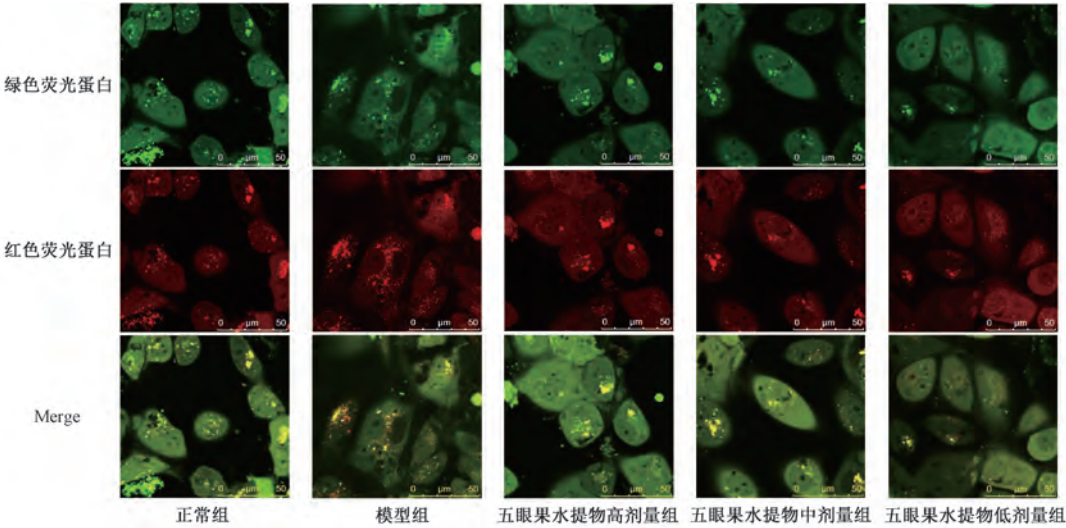


图 2 五眼果水提取物对 COM 晶体损伤细胞形态的影响 (×200)



注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 3 五眼果水提取物对 COM 晶体损伤 HKC 细胞 Ca²⁺ 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)



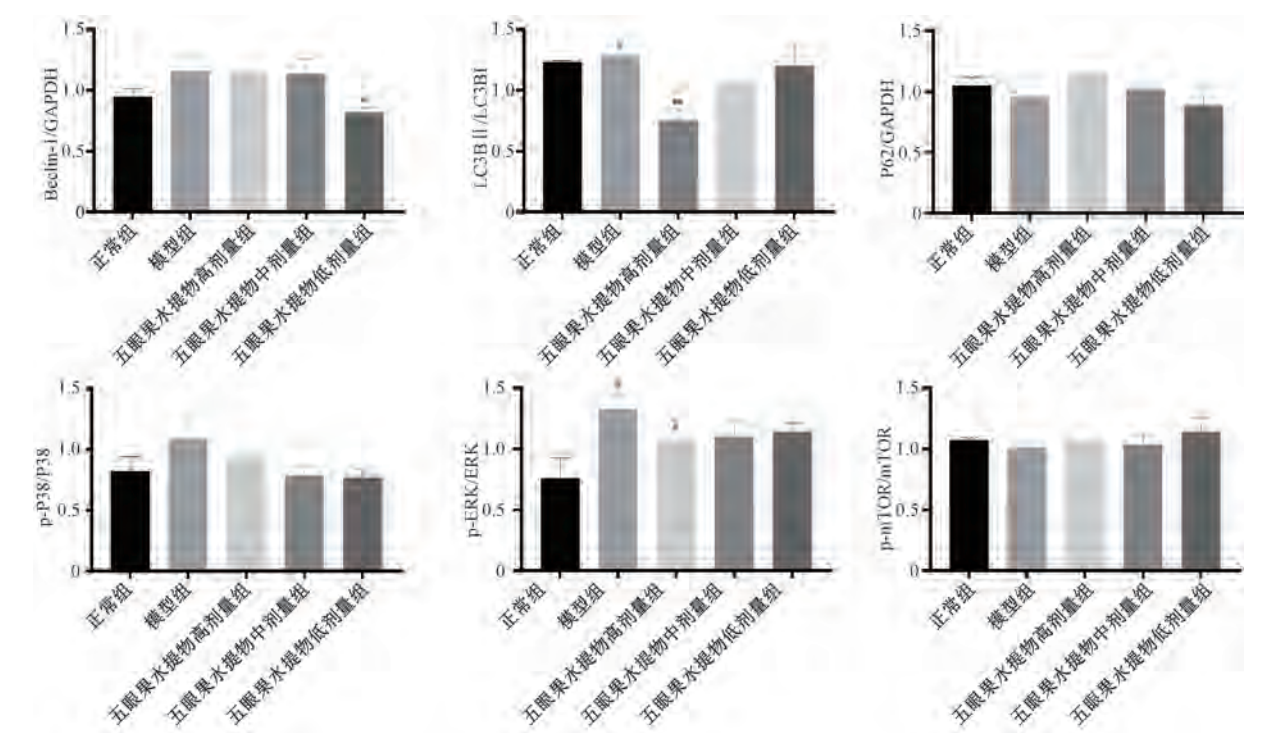
注：与正常组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 4 五眼果水提取物对 COM 晶体损伤 HKC 细胞自噬流的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

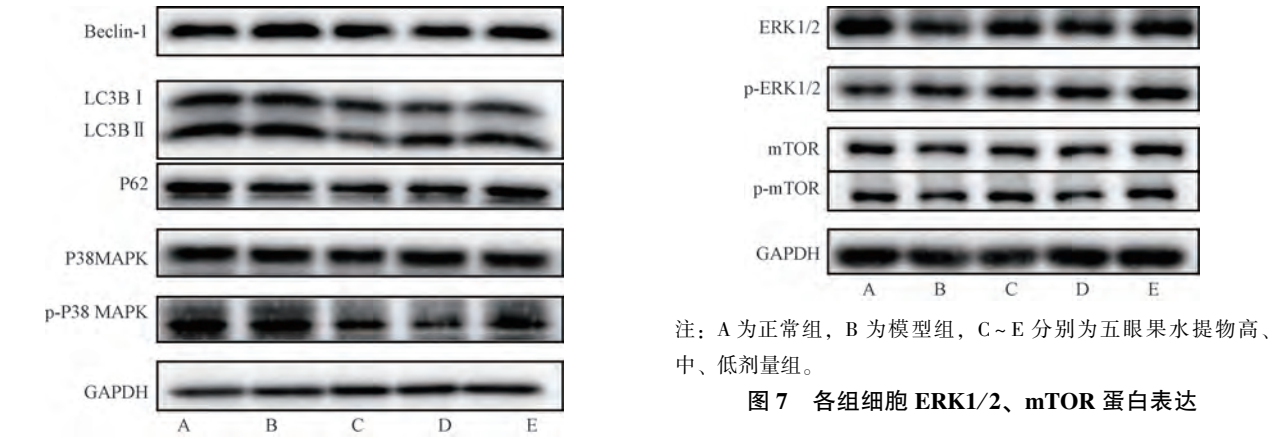
ERK1/2/ERK1/2、LC3B II/LC3B I 比值降低 (*P*<0.05, *P*<0.01), 而低剂量组细胞 Beclin-1 蛋白表达降低 (*P*<0.05), 见图 5~7。

4 讨论

HKC 细胞具有存活时间长、易于传代培养的特点，并且具有肾小管上皮细胞特有的结构和功能^[8]，COM 晶体易与细胞表面粘附，导致肾小管上皮细胞损伤，受损灶为晶体提供有效的附着点，不断循环加重晶体对细胞的损伤，促进草酸钙肾结石的形成^[1]，因此，本实验构建体外 COM 晶体损伤 HKC 细胞模型进行研究。在正常状态下，各种组织细胞中 LDH 释放量较少，LDH 释放量升高可反映细胞损伤的情况^[9-10]，COM 晶体粘附在细胞表面，可通过测定 Ca²⁺ 水平评价肾小管上皮细胞损伤后晶体在细胞表面的黏附性。本实验结果表明，五眼果水提取物可升高细胞存活率，



注：与正常组相比，[#]*P*<0.05；与模型组相比，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01
图5 五眼果水提取物对受损细胞自噬相关通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)



注：A为正常组，B为模型组，C~E分别为五眼果水提取物高、中、低剂量组。

图6 各组细胞 Beclin-1、LC3B、P62、P38 MAPK 蛋白表达

降低 COM 晶体与细胞的黏附性，减少 LDH 释放，对 COM 晶体损伤的 HKC 细胞具有保护作用。

正常肾脏有较高的代谢需求，损伤会加重代谢紊乱，并激活许多类型肾细胞的自噬，它是肾小管的一种损伤反应^[11]。在自噬相关研究中，mRFP-GFP-LC3 腺病毒转染细胞在自噬流的检测中应用广泛。GFP 在溶酶体酸性环境中可使其绿色荧光发生猝灭，绿色荧光减弱指示自噬小体与溶酶体融合成自噬溶酶体。而 mRFP 对酸性环境不敏感，在溶酶体酸性环境中不会使其红色荧光减弱。共聚焦显微镜成像后合成红绿色荧光，图片中黄色斑点为自噬体，红色斑点为自噬溶酶体，红色斑点越多标志着自噬水平增

注：A 为正常组，B 为模型组，C~E 分别为五眼果水提取物、中、低剂量组。

图7 各组细胞 ERK1/2、mTOR 蛋白表达

加^[12]。本实验结果表明五眼果水提取物可抑制自噬。肾损伤后导致自噬相关的多种细胞信号通路激活，如 AMPK、P38 MAPK、ERK 和 JNK 通路^[13]。P38 MAPK 通路是 MAPK 信号通路里的一个重要亚型，在调控细胞自噬中发挥重要的作用，其作用机制主要通过抑制 mTOR 依赖性途径，激活自噬^[14]。ERK 也是 MAPK 家族重要的亚型之一，包括 ERK1 和 ERK2。Raf/MEK/REK 信号通路在应激的情况下激活 ERK，ERK 信号通路被激活后不仅可激活自噬，还可以通过上调自噬相关蛋白 LC3B 和 P62 来诱导自噬的发生^[15-16]。近年来研究表明 P38 MAPK 和 ERK 信号通路与肾结石的形成有关，草酸刺激细胞可激活 P38 MAPK 和 ERK 信号通路，通过调节细胞自噬以迅速响应各种应激，保护肾小管上皮细胞，若过度自噬则会加剧损伤，促进结石的形成^[17-19]。本实验结果表明，五眼果水提取物可降低 P38 MAPK、ERK1/2 磷酸化和 LC3B II/LC3B I 表达。

综上所述，五眼果水提物可通过调控 P38 MAPK/ERK 通路抑制自噬，降低晶体与细胞的粘附性，从而减轻草酸钙晶体对肾小管上皮细胞的损伤。

参考文献：

[1] 梁雄发, 卢小刚, 陈 东, 等. 肾小管上皮细胞损伤促进草酸钙结石形成的研究进展[J]. 中华腔镜泌尿外科杂志, 2018, 12(4): 281-283.

[2] Dong F, Jiang S, Tang C, *et al.* Trimethylamine N-oxide promotes hyperoxaluria-induced calcium oxalate deposition and kidney injury by activating autophagy[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 179: 288-300.

[3] Liu Y, Liu Q, Wang X, *et al.* Inhibition of autophagy attenuated ethylene glycol induced crystals deposition and renal injury in a rat model of nephrolithiasis[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2018, 43(1): 246-255.

[4] 李先梅, 谭娥玉, 蔡妮娜, 等. 五眼果不同提取部位体外对草酸钙结晶的影响[J]. 广西中医药, 2015, 38(5): 54-56.

[5] 杨 柯, 曾春晖, 黎文智, 等. 五眼果对小鼠泌尿系统结石的作用研究[J]. 中成药, 2010, 32(5): 719-722.

[6] Xie H, Li J, Gao H, *et al.* Total flavone of *Desmodium styracifolium* relieved apoptosis and autophagy of COM-induced HK-2 cells by regulating KIM-1 *via* p38/MAPK pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 442(1-2): 169-175.

[7] Yu L, Gan X, Liu X, *et al.* Calcium oxalate crystals induces tight junction disruption in distal renal tubular epithelial cells by activating ROS/Akt/p38 MAPK signaling pathway[J]. *Ren Fail*, 2017, 39(1): 440-451.

[8] 王 磊, 张金晓, 张宗鹏, 等. 肾细胞体外模型在药物评价与筛选中的应用[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(5): 597-599.

[9] 陈广勇, 韩乾杰, 张玲玲, 等. 黄芪多糖对脂多糖刺激小鼠巨噬细胞形态及免疫功能的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(9): 4358-4365.

[10] Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(12): 2977-2992.

[11] Lin F. Autophagy in renal tubular injury and repair[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017, 220(2): 229-237.

[12] 陈 缘, 易 扬, 杨海波, 等. TLR4 介导自噬流在脂多糖诱导肾小管上皮细胞炎症反应中的作用研究[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(5): 811-816.

[13] Wu M, Ma Y, Chen X, *et al.* Hyperuricemia causes kidney damage by promoting autophagy and NLRP3-mediated inflammation in rats with urate oxidase deficiency[J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14(3): 1-9.

[14] Ge J, Liu Y, Li Q, *et al.* Resveratrol induces apoptosis and autophagy in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK[J]. *Biomed Environ Sci*, 2013, 26(11): 902-911.

[15] Kim J H, Hong S K, Wu P K, *et al.* Raf/MEK/ERK can regulate cellular levels of LC3B and SQSTM1/p62 at expression levels[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 327(2): 340-352.

[16] Kim J H, Hong S K, Wu P K, *et al.* Raf/MEK/ERK can regulate cellular levels of LC3B and SQSTM1/p62 at expression levels[J]. *Experimental Cell Research*, 2014, 327(2): 340-352.

[17] Guzel A, Yunusoglu S, Calapoglu M, *et al.* Protective effects of quercetin on oxidative stress-induced tubular epithelial damage in the experimental rat hyperoxaluria model[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(6): 1-9.

[18] Hui Z, Jiang Z, Qiao D, *et al.* Increased expression of LCN2 formed a positive feedback loop with activation of the ERK pathway in human kidney cells during kidney stone formation[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1-12.

[19] Zhou J, Fan Y, Zhong J, *et al.* TAK1 mediates excessive autophagy *via* p38 and ERK in cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(5): 2908-2921.