

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 μg/mL)，除正常组外其余各组用 100 μg/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.) Burtt 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 TCSPS5II 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，用时配制成所需质量浓度。

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 5×10^4 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 Ca^{2+} 水平检测 取对数生长期 HKC 细胞，以每孔 7×10^4 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

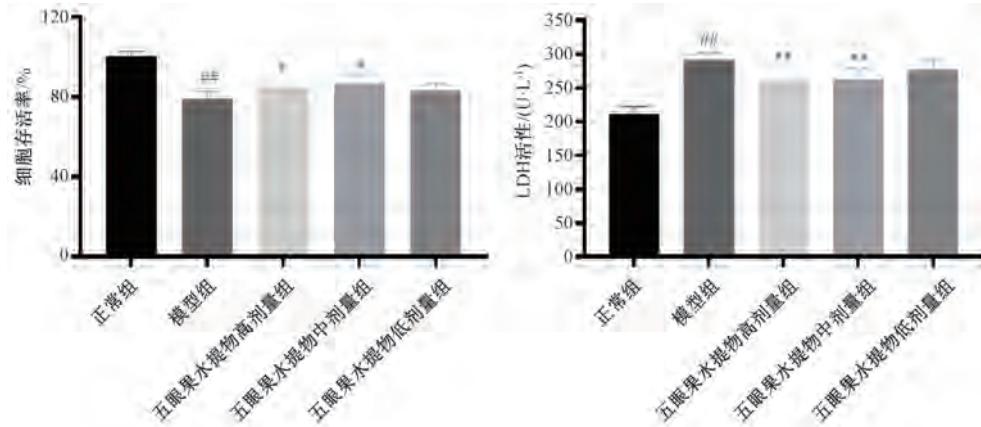
1×10^4 个的密度接种于共聚焦培养皿，待贴壁后，吸弃上清液，加入含有腺病毒 MOI 值为 100 的完全培养基培养 4 h 后更换回完全培养基继续培养 48 h。吸弃上清液，按“2.3”项下方法处理 24 h 后，于激光显微共聚焦下观察各组细胞自噬流，红绿荧光通过 Merge 后出现的红色斑点为自噬溶酶体，黄色斑点为自噬体，通过不同颜色斑点的计数可判断自噬流的强弱。

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 2×10^5 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影。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， ${}^{\ast}P < 0.05$ ， ${}^{\ast\ast}P < 0.01$ 。

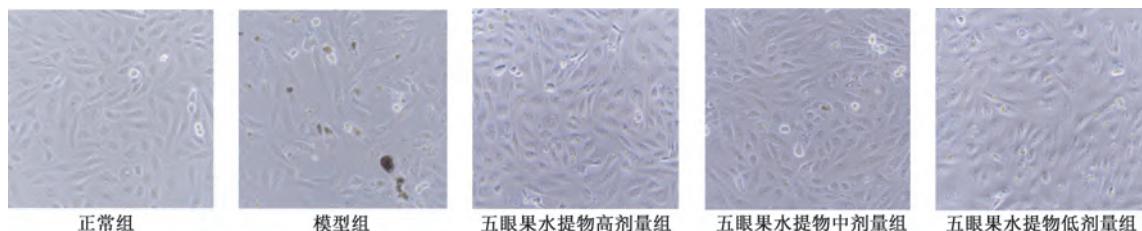
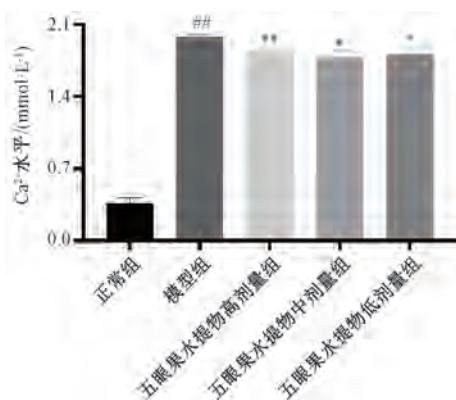
图 1 五眼果水提物对 COM 晶体损伤 HKC 细胞损伤的影响 $(\bar{x} \pm s, n=6)$

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， Ca^{2+} 水平升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，五眼果水提物各剂量组上述变化明显减轻， Ca^{2+} 水平降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)，见图 2~3。

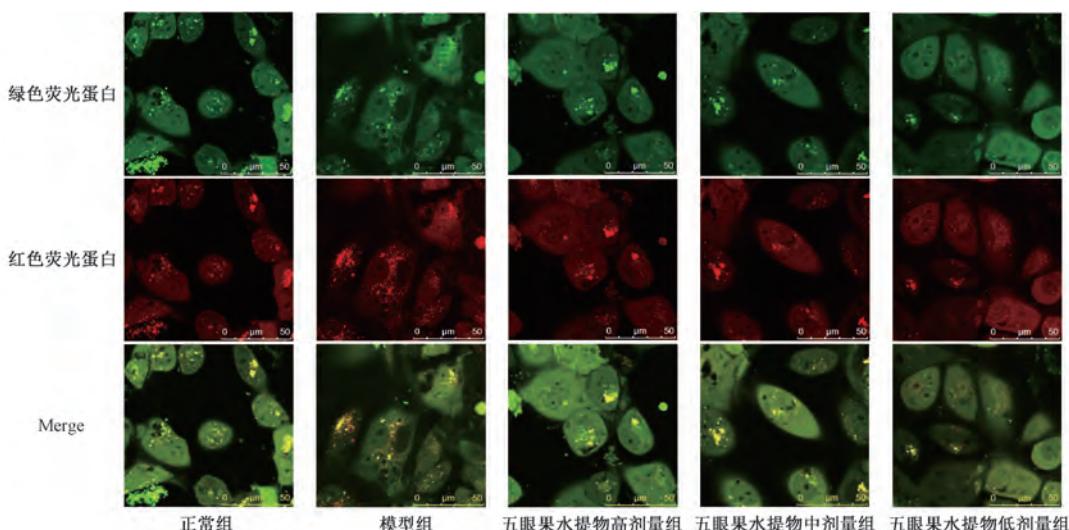
3.3 五眼果水提物对 COM 晶体损伤 HKC 细胞自噬流的影响 与正常组比较，模型组细胞自噬体和自噬溶酶体数量增加 ($P < 0.01$)；与模型组比较，五眼果水提物各剂量组

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，Beclin-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，五眼果水提物高剂量组细胞 p-

图2 五眼果水提物对COM晶体损伤细胞形态的影响 ($\times 200$)

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)

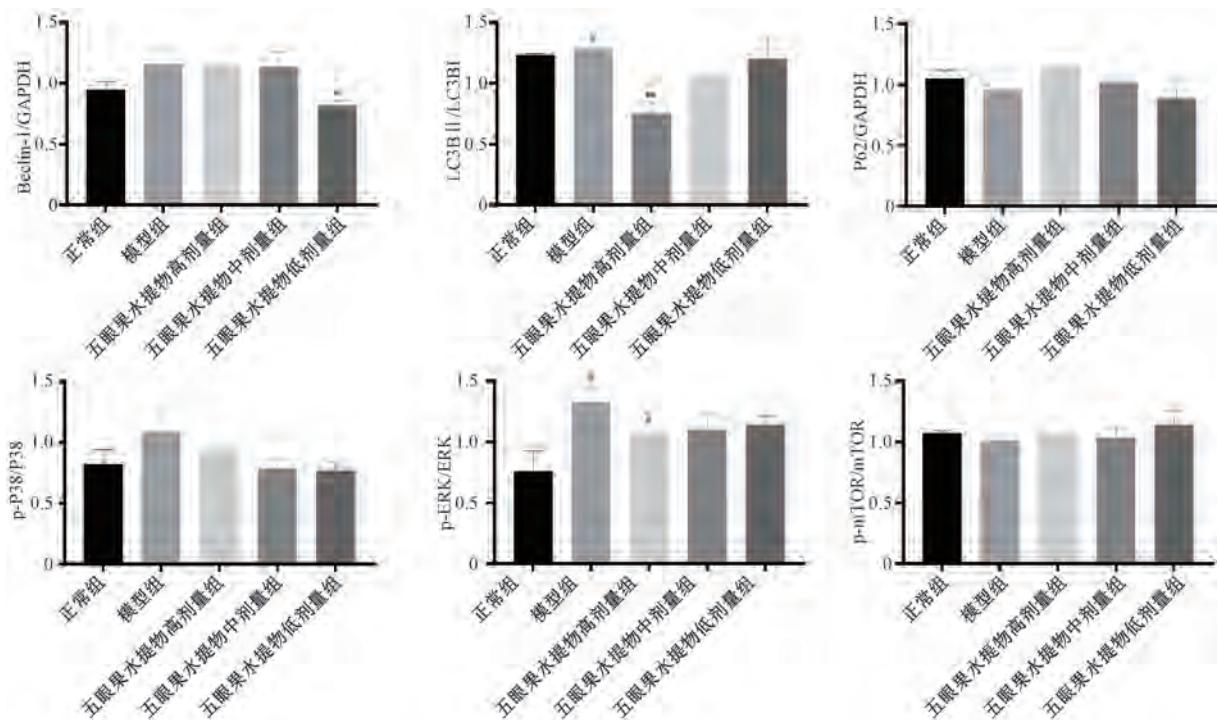
注：与正常组比较， $^{**}P<0.01$ ；与模型组比较， $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

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。

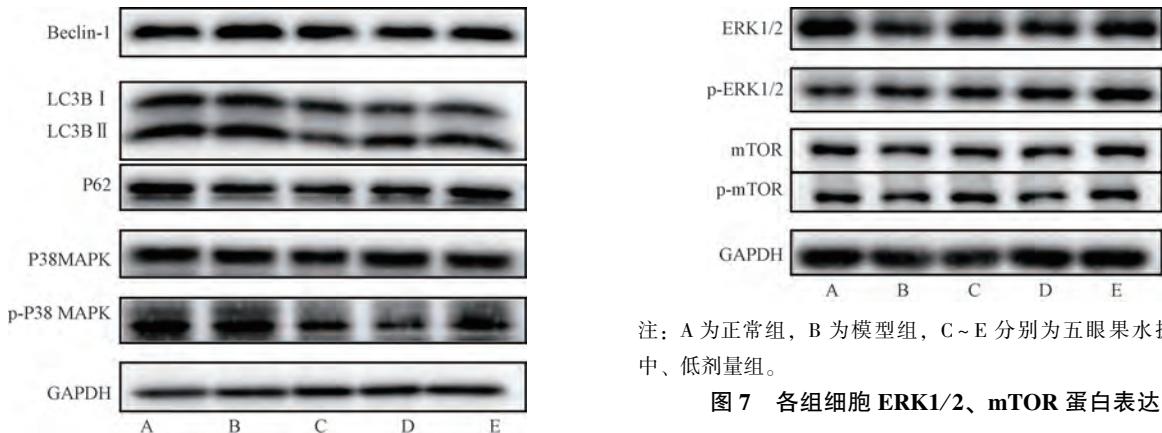
4 讨论

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)

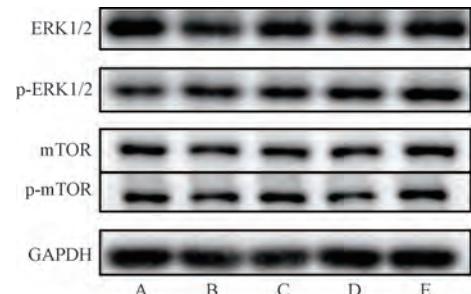


注：A为正常组，B为模型组，C~E分别为五眼果水提物高、中、低剂量组。

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分别为五眼果水提物高、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.