

# 益气活血解毒中药及肾上腺髓质素抑制醛固酮诱导的 HK2 细胞自噬作用研究

郝娟<sup>1</sup>, 马雪莲<sup>1,2</sup>, 常奕<sup>1</sup>, 熊云昭<sup>1</sup>, 张雨轩<sup>1</sup>, 王香婷<sup>1,2</sup>, 许庆友<sup>1,2</sup>

1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050091; 2. 河北省中西医结合肝肾病重点实验室, 河北 石家庄 050091

**[摘要]** 目的: 观察益气活血解毒中药血清及肾上腺髓质素 (Adrenomedullin, ADM) 抑制醛固酮 (Aldosterone, ALD) 诱导的人近端肾小管上皮细胞 HK2 自噬的作用。方法: 本实验采用 1 μmol/L 的 ALD 诱导 HK2 细胞自噬, 给予 10% 的益气活血解毒含药血清及 100 nmol/L 的 ADM 治疗。实验分为对照组 (CON 组), ALD 组, ALD+益气活血解毒含药血清组 (ALD+TCM 组), ALD+ADM 组, 48 h 后收集细胞并观察变化。采用免疫细胞荧光、Western blot 法检测血清糖皮质激素诱导蛋白激酶 1 (Serum and glucocorticoid induced kinase, SGK-1)、磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 (Phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase, P-ERK1/2)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (Phosphorylated mammalian target of rapamycin, P-mTOR) / mTOR、自噬相关基因 5 (Autophagy associated gene, Atg5)、酵母自噬基因 6 (Atg6) 的同源物 Beclin1、自噬标志微管相关蛋白 1 轻链 3 (Microtubular-associated protein 1 light chain 3, LC3) 的表达。结果: 与 CON 组比较, ALD 组 SGK-1、P-ERK1/2、Atg5、LC3 和 Beclin1 表达明显增强 ( $P < 0.01$ ), P-mTOR/mTOR 表达减弱 ( $P < 0.01$ ); 与 ALD 组比较, ALD+TCM 组、ALD+ADM 组这些指标表达均减弱 ( $P < 0.01$ ), P-mTOR/mTOR 表达增强 ( $P < 0.01$ )。结论: 益气活血解毒中药、ADM 均可抑制 ALD 诱导的 HK2 细胞自噬, 从而减轻肾小管的损伤, 减缓肾脏损伤的进程。

**[关键词]** 细胞自噬; 益气活血解毒中药; 肾上腺髓质素 (ADM); 醛固酮 (ALD); 细胞实验

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 05-0008-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.05.003

## Study on Chinese Herbal Medicine for Boosting Qi, Invigorating Blood and Resolving Toxins Combined with Adrenomedullin for Inhibiting the Autophagy of HK2 Cells Induced by Aldosterone

HAO Juan, MA Xuelian, CHANG Yi, XIONG Yunzhao,  
ZHANG Yuxuan, WANG Xiangting, XU Qingyou

**Abstract:** **Objective:** To observe the effect of the serum of Chinese herbal medicine for boosting qi, invigorating blood and resolving toxins combined with Adrenomedullin (ADM) for inhibiting the autophagy of HK2 (Human Kidney 2) cell, a human proximal tubular epithelial cell, induced by aldosterone (ALD). **Methods:** In this experiment, 1 μmol/L ALD was used to induce the autophagy of HK2 cells, and 10% medicated serum of boosting qi, invigorating blood and resolving toxins as well as 100 nmol/L ADM were given. The control group (CON group), the ALD group, the ALD+medicated serum of boosting qi, invigorating blood and resolving toxins group (ALD+TCM group), the ALD+ADM group were involved. After 48 hours, the cells were collected and the changes were observed. The methods of immunofluorescence and Western blot were adopted to detect the expressions of serum and glucocorticoid induced kinase 1 (SGK-1), phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (P-ERK1/2), phosphorylated mammalian target of rapamycin (P-mTOR)/mammalian target of rapamycin (mTOR), autophagy associated gene 5 (Atg5), Beclin1 which is the homologue of autophagy associated gene 6 (Atg6) in yeast and microtubular-associated protein 1 light chain 3 (LC3). **Results:** The expressions of SGK-1, P-ERK1/2, Atg5, LC3 and Beclin1 in the ALD group were significantly increased when compared with those in the CON group ( $P < 0.01$ ), and the expressions of P-mTOR/mTOR in the ALD group were decreased when compared with those in the CON group ( $P < 0.01$ ). The expressions of

**[收稿日期]** 2018-10-09

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81473652, 81873251)

**[作者简介]** 郝娟 (1991-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗肾脏病。

**[通信作者]** 许庆友, E-mail: qingyouxu@sohu.com; 王香婷, E-mail: hbwangxiangting@163.com。

SGK-1, P-ERK1/2, Atg5, LC3 and Beclin1 in the ALD+TCM group and the ALD+ADM group were decreased when compared with those in the ALD group ( $P < 0.01$ ), and the expressions of P-mTOR/mTOR were increased when compared with those in the ALD group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Both Chinese herbal medicine for boosting qi, invigorating blood and resolving toxins and ADM can inhibit the autophagy of HK2 cells induced by ALD, thus reducing the injury of renal tubular and slowing down the process of the kidney injury.

**Keywords:** Autophagy; Chinese herbal medicine for boosting qi, invigorating blood and resolving toxins; Adrenomedullin (ADM); Aldosterone (ALD); Cell experiment

梗阻性肾病是一类早期即可导致肾小管损伤的病变,其病理可见肾小管萎缩,肾单位数减少,肾间质纤维化等。研究显示自噬参与肾小管上皮细胞凋亡及肾小管上皮细胞向间质转化<sup>[1-2]</sup>。研究证明血清糖皮质激素诱导蛋白激酶 1(Serum and glucocorticoid induced kinase, SGK-1)在肾素-血管紧张素-醛固酮(Aldosterone, ALD)系统激活的情况下可促进细胞凋亡及肾脏细胞表型转化<sup>[3-4]</sup>。本实验通过体外培养人近端肾小管上皮细胞 HK2, 给以 ALD 刺激, 观察益气活血解毒含药血清及肾上腺髓质素(Adrenomedullin, ADM)对 SGK-1、细胞外信号调节激酶 1/2 (Phosphorylated Extracellular signal-regulated protein kinase, P-ERK1/2)、自噬相关基因 5(Autophagy associated gene, Atg5)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Phosphorylated mammalian target of rapamycin, P-mTOR)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、自噬标志微管相关蛋白 1 轻链 3(Microtubular-associated protein 1 light chain 3, LC3)以及 Beclin1 的调控作用, 探讨益气活血解毒含药血清, ADM 拮抗 ALD 活化所致的 HK2 细胞自噬的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验细胞与分组** 选用 HK2 细胞作为研究对象, 分为对照组(CON 组)、ALD 组、ALD + 益气活血解毒含药血清组(ALD + TCM 组)、ALD + ADM 组。

**1.2 药物试剂和主要仪器** ADM 和 ALD(用量依据预实验及文献[5~7]而定, Sigma 公司)。益气活血解毒中药(黄芪 15 g, 山药、僵蚕、乌梢蛇、丹参、黄芩、赤芍、醋鳖甲、地龙、金银花、蒲公英各 10 g, 大黄 6 g, 选用广东一方制药有限公司中药配方颗粒), 按每味中药相对饮片用量比例混匀煎煮 10 min。参照《药理实验方法学》折合大鼠用量为 14 g/(kg·d)<sup>[8]</sup>。SGK-1 抗体(英国 Abcam 公司), Atg5、Beclin1、ERK1/2 及 P-ERK1/2 抗体(美国 Proteintech 公司), mTOR、P-mTOR、LC3 抗体(美国 CST 公司)。电泳槽及电泳仪(北京六一公司), 激光共聚焦扫描显微镜(德国 LEICA 公司), ODY-3059 扫描仪(Li-cor 公司)。

**1.3 细胞培养及给药方法** -80 °C 冻存的 HK2 细胞复苏后用含 10%FBS 的 DMEM 培养液, 在 37 °C、5%的 CO<sub>2</sub> 条件下培养, 用 0.25%胰蛋白酶消化传代, 约 2~3 天传代 1 次。细胞悬液的制备: 取处于对数期的 HK2 细胞, 0.25%的胰蛋白酶消

化细胞, 加入含 10%的 FBS 培养基吹打细胞, 制成单细胞悬液, 根据实验需要, 将 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 细胞悬液接种进玻底培养皿进行免疫细胞荧光检测, 将 8 × 10<sup>4</sup> 个/mL 细胞悬液接种到 75 mm<sup>2</sup> 的培养瓶中进行 Western blot 检测。含药血清的制备: 取 20 只清洁级健康雄性 SD 大鼠, 以随机数字表法随机分为对照组和中药组, 每组 10 只, 中药组给予益气活血解毒中药颗粒煎剂 13.7 g/(kg·d); 对照组给予等体积的生理盐水, 5 天后取血, 离心取血清。

### 1.4 SGK-1、P-ERK1/2、P-mTOR、Atg5、Beclin1 和 LC3 II/I 的表达检测

①免疫细胞荧光检测: 将培养 48 h 的细胞爬片, PBS 清洗 3 次, 每次 3 min, 4%多聚甲醛固定爬片 15 min, PBS 清洗 3 次, 每次 3 min, 0.5%TritonX-100 室温通透 20 min, PBS 清洗 3 次, 每次 3 min, 吸水纸吸干。滴加正常山羊血清室温封闭 30 min, 吸水纸吸干, 滴加一抗, 浓度为 1:100, 湿盒内 4 °C 孵育过夜; PBST 清洗爬片 4 次, 每次 8 min, 吸水纸吸干, 滴加荧光二抗, 湿盒内室温孵育 2 h, PBST 清洗爬片 4 次, 每次 8 min, 复染 DAPI, 避光孵育 5 min, PBST 清洗爬片 3 次, 每次 3 min, 滴加含防淬灭封片剂封片, 激光共聚焦显微镜观察检测指标的表达。②Western blot 检测: 各组 HK2 细胞给以裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取并测定蛋白含量; 上样蛋白 10~20 μg, 电泳、转膜; 5%脱脂牛奶室温封闭 1~2 h, 加入兔抗鼠一抗(1:500~1000), 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗 4 次每次 6 min; 加入荧光素标记的羊抗兔二抗(1:2000), 室温孵育 60 min, TBST 清洗 4 次每次 6 min, TBS 清洗 3 min 后用红外激光成像系统扫描, 所得结果给以内参校正。

**1.5 统计学方法** 数据资料结果采用 SPSS21.0 统计软件进行统计分析, 各组数据均满足正态性检验, 方差齐性检验, 采用单因素方差分析, 数据结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

各组 SGK-1、P-ERK1/2、P-mTOR/mTOR、Atg5、Beclin1 和 LC3 蛋白表达结果 见图 1、图 2。CON 组中肾小管上皮细胞 SGK-1、P-ERK1/2、Atg5、Beclin1 和 LC3 呈弱表达, 而 P-mTOR 呈强表达; 与 CON 组比较, ALD 组 SGK-1、PERK1/2、Atg5、Beclin1 和 LC3 刺激后明显增强( $P < 0.01$ ), 主要表达于细胞浆中, 而 P-mTOR 呈弱表达( $P < 0.01$ ); 与 ALD 组比较,

ALD + TCM 组、ALD + ADM 组 SGK-1、P-ERK1/2、Atg5、Beclin1 和 LC3 表达减弱( $P < 0.01$ ), 而 P-mTOR 表达增强( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

自噬是发生在真核细胞内的溶酶体依赖性蛋白降解过程, 也是一种进化上保守的分解代谢机制, 其实质是细胞内的“自我消化”, 为细胞修复提供原料与营养, 因此是维持能量平衡的重要机制。按细胞内底物运送到溶酶体的方式不同, 可将自

噬分为微自噬、巨自噬、分子伴侣介导的自噬, 因巨自噬在人体疾病中最为重要, 本文所指自噬为巨自噬, 简称自噬。自噬过程主要包括各种因素对细胞内细胞外信号的诱导, 来源于内质网的双层膜结构对被降解物进行包裹形成自噬体, 自噬体与溶酶体进行融合形成自噬溶酶体, 自噬体在溶酶体内进行4个分解步骤。本实验通过探究自噬体膜形成过程, 及自噬标记蛋白的表达来说明 ALD 诱导自噬的形成。自噬体膜形成过程与自噬相关基因 Atg5 和 Atg7 密切相关, 其中 Atg5 和 Atg7 是调

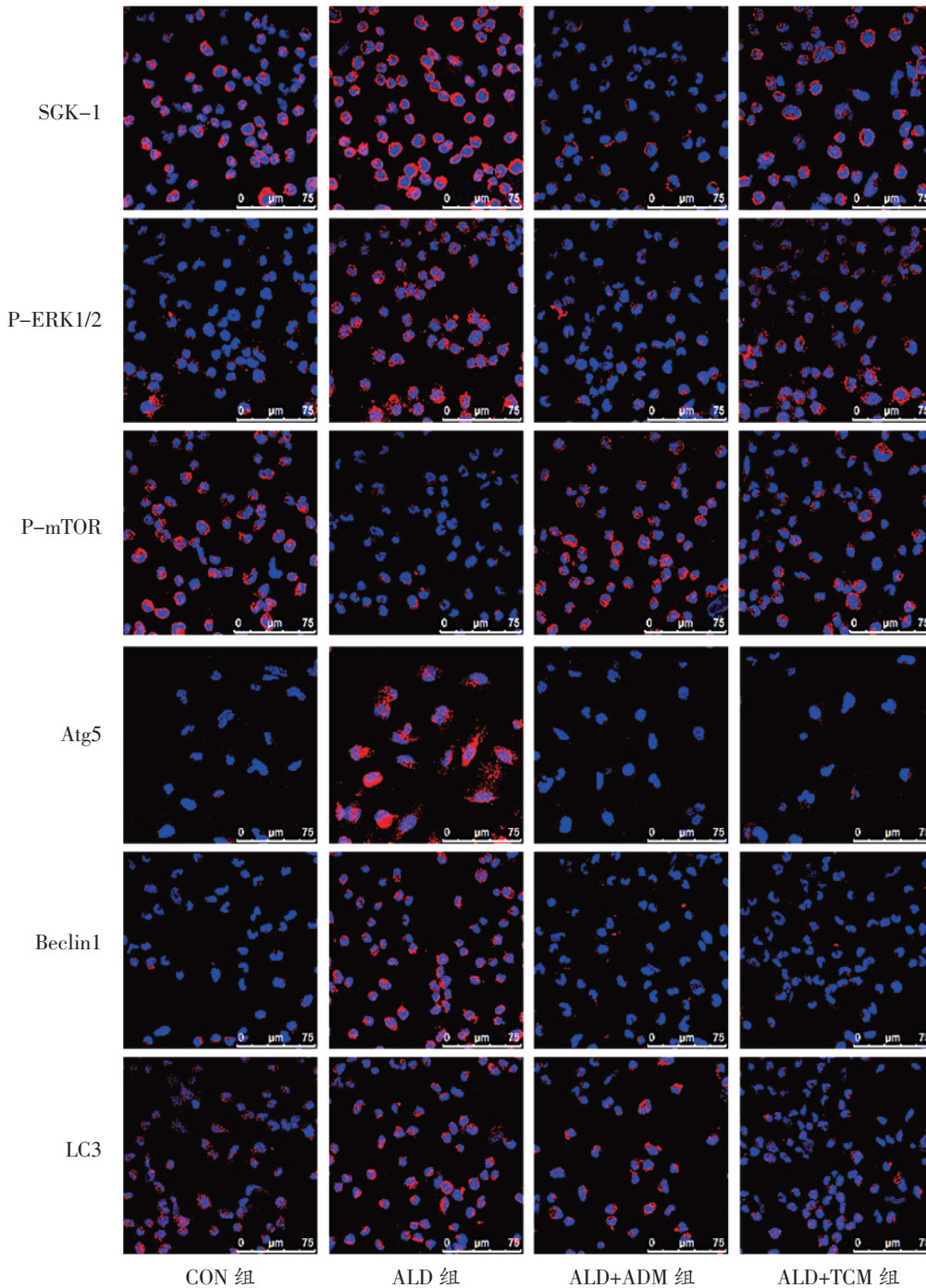
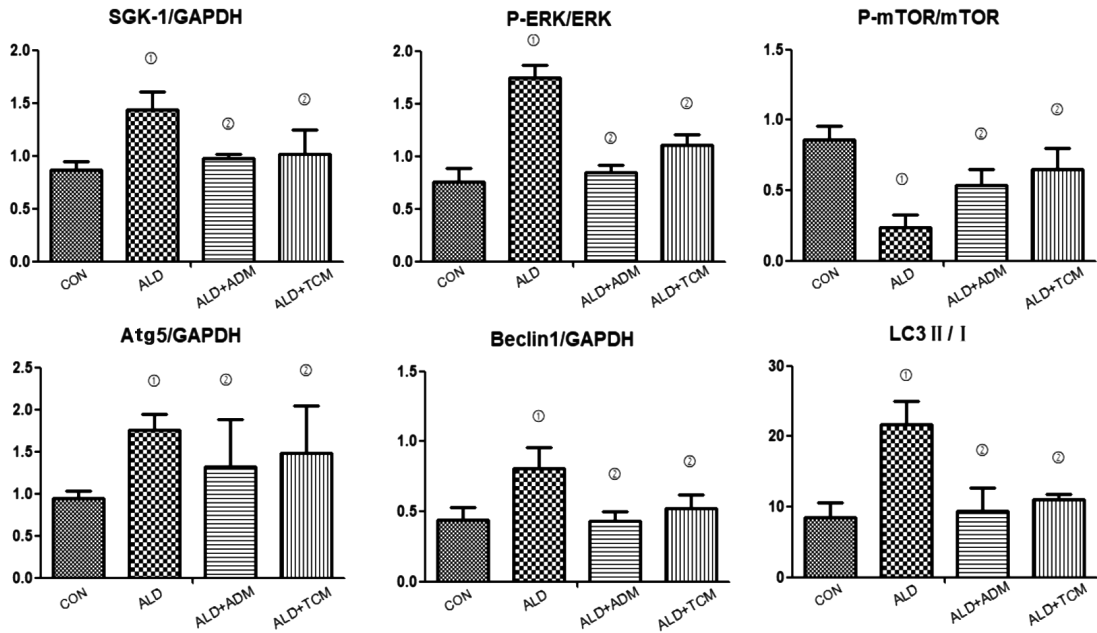


图1 免疫荧光检测各组 SGK-1、P-ERK1/2、P-mTOR、Atg5、Beclin1 和 LC3 蛋白表达结果 (×630)



与 CON 组比较, ① $P < 0.01$ ; 与 ALD 组比较, ② $P < 0.01$

图2 Western blot 检测各组 SGK-1、P-ERK1/2、P-mTOR/mTOR、Atg5、Beclin1 和 LC3 蛋白表达结果

控自噬的关键, 其过程主要是 Atg12 的 C 端羧基被 Atg7 的 E1 酶激活, 并消耗 ATP 形成硫酯键, 依附在催化半胱氨酸残基上, 并形成复合体, 其复合体最终通过异肽键附着在 Atg5 中赖氨酸残基的氨基上, 这个过程是形成自噬体膜的关键<sup>[9]</sup>。因此 Atg 5 蛋白表达水平升高, 可说明自噬体膜形成。LC3 是第一个被发现的自噬体膜上的标记蛋白, 其存在形式主要有 2 种, 即 LC3 I 和 LC3 II, LC3 I 主要存在细胞浆中, 在 Atg7 和 Atg3 的催化下与磷脂酰乙醇胺共价结合在自噬体膜上, 随后自噬体膜沿细胞内微管结构快速接近溶酶体并形成自噬溶酶体, 此过程 LC3 I 向 LC3 II 转化, LC3 II 是目前反映细胞内自噬水平的标记蛋白。Beclin1 是介导其他自噬蛋白定位于前自噬小体的关键因子, 参与哺乳动物自噬体早期的调控。因此本实验通过定位及半定量方法检测自噬标记蛋白 LC3 II、Beclin1 的表达即可说明肾小管上皮细胞发生自噬。

盐皮质激素受体活化是近年来临床研究的热点, 而 ALD 作为人类主要的盐皮质激素, 在心血管疾病、慢性肾脏疾病病理损伤中可作为独立危险因素直接参与疾病进展。研究显示, ALD 除了对远端小管有重吸收钠的作用外, 其促纤维化和促炎等作用在肾脏病的进展中更为重要<sup>[10]</sup>, 同时在细胞的过度自噬中也发挥了作用, 这些效应正是通过盐皮质激素受体活化介导的。作为 ALD 的下游调节因子 SGK 发挥多种生物学效应, SGK 是 Ser/Thr 蛋白激酶家族的成员之一, 它属于 Ser/Thr 激酶的 1 个亚家族, 其同源体有 3 种形式即 SGK-1、SGK-2 和 SGK-3。与其他蛋白激酶不同, 它主要在转录水平中克隆, 并被糖皮质激素和血清调控。ALD 能快速诱导靶细胞表达 Ser/Thr 激酶, 这种诱导作用似乎是一种直接的效应。近几年的研究显示,

SGK-1 可能是多种信号传导通路的 1 个功能性交汇点, 它在离子通路调节、细胞增殖、存活及信号传导等方面起重要作用<sup>[11]</sup>。前期研究表明, 在单侧输尿管梗阻大鼠模型中可通过上调 SGK-1 诱导肾小管细胞发生增殖及纤维化<sup>[12]</sup>, 这种结果与盐皮质激素受体活化有密切联系, 且已有实验证实 ALD 可诱导足细胞、大鼠肾小管上皮细胞发生自噬<sup>[13-15]</sup>。但 SGK-1 如何调控人近端肾小管上皮细胞自噬机制尚未阐明。研究显示 ALD 可能通过激活下游 SGK-1, ERK1/2 介导肾小管上皮细胞发生炎症反应诱导自噬发生<sup>[16]</sup>。而本研究结果显示加入 ALD 刺激后, SGK-1、自噬相关蛋白表达均较 CON 组明显增强。

慢性肾脏病归属于中医水肿、淋证等范畴, 虽然临床表现多样, 但其发病机制均以“虚、瘀、毒”为特点, 其中“虚”在《素问遗篇·刺法论》说:“正气存内, 邪不可干。”当人体脏腑功能低下或亢进, 正气相对虚弱, 卫外不固的情况下, 或人体阴阳失调, 病邪内生, 或外邪乘虚而入, 均可使人体脏腑组织经络官窍功能紊乱, 发生疾病。就脏腑辨证而言, 慢性肾脏病以脾肾亏虚为主, 日久牵及他脏, 临床应用时以黄芪、山药补益脾肾。“瘀”是疾病进展已久的结果, 中医认为“久病入络”, 结合病理改变, 认为肾小球硬化, 肾间质纤维化都属于瘀的表现, 治疗上给予赤芍、地龙、醋鳖甲以活血化瘀通络。“毒”中医认为脏腑亏虚导致湿毒、火毒、热毒等一些病理产物的淤积, 与现代医学提出的内源性、外源性致炎因子相吻合, 在此基础上给予金银花、黄芩、蒲公英、大黄等清热解毒之品, 临床应用疗效显著。因此本实验通过制备益气活血解毒含药血清来减慢由 ALD 诱导的肾小管上皮细胞自噬, 结果显示益气活血解毒中药组 SGK-1, P-ERK1/2 及自噬相关蛋白

表达均较 ALD 组降低,提示益气活血解毒方可能对 ALD 受体、SGK-1、P-ERK1/2 有调控作用,且 SGK-1 可能是益气活血解毒中药拮抗 ALD 诱导肾小管上皮细胞自噬的靶点之一。

ADM 有较强的血管舒张活性,参与心血管疾病的发病和循环稳态,其生理作用远远超出了血管张力的调控范围,且可能通过其对炎性细胞因子的调控起抗炎调节作用,对巨噬细胞参与的炎症反应起作用<sup>[6,17]</sup>。研究发现在离体孵育的大鼠主动脉血管外膜上,ALD 促进 ADM 分泌,内源性 ADM 反过来拮抗 ALD 的促外膜增殖作用,此过程是通过 ADM 特异性受体而不是降钙素基因受体实现的,且 ADM 的拮抗效应能通过抑制 ALD 诱导的 MAPK 活化实现<sup>[18]</sup>。本研究结果显示 ADM 组 SGK-1、P-ERK1/2 表达均减弱,且自噬标志蛋白 Atg5、LC3 II / I、Beclin1 表达均降低。说明 ADM 可通过下调 SGK-1、P-ERK1/2 表达抑制 ALD 诱导的肾小管上皮细胞发生自噬,减轻肾脏损伤。研究发现 ADM 能抑制肾小管上皮细胞表型转化<sup>[19]</sup>,但由于 ADM 在肾脏病中抗炎、抗纤维化作用研究范围较小,相关实验仍需进一步完善。

#### [参考文献]

- [1] LIANG A, WANG Y, WOODARD L E, et al. Loss of Glutathione S-transferase A4 Accelerates Obstruction-induced Tubule Damage and Renal Fibrosis[J]. *Journal of Pathology*, 2012, 228(4): 448.
- [2] LIU Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2004, 15(1): 1-12.
- [3] 梁文杰. 化痰解毒中药调控 NLRP3 炎症小体信号通路抑制细胞焦亡(Pyroptosis)的实验研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [4] 梁丽娟, 王箏, 王蕊, 等. 依普利酮下调 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 抑制细胞表型转化的研究[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(11): 1553-1557.
- [5] DING W, GUO H, XU C, et al. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated NLRP3 inflammasome activation contributes to aldosterone-induced renal tubular cells injury[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 17479-17491.
- [6] HU W, SHI L, LI M, et al. Adrenomedullin protects Leydig cells against lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory reaction via MAPK/NF- $\kappa$ B signalling pathways[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16479.
- [7] HU W, ZHOU P H, RAO T, et al. Adrenomedullin attenuates interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation and apoptosis in rat Leydig cells via inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Experimental Cell Research*, 2015, 339(2): 220.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版, 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203-204.
- [9] SHIBATA S, NAGASE M, YOSHIDA S, et al. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1[J]. *Hypertension*, 2007, 49(2): 355-364.
- [10] RITZ E, TOMASCHITZ A. Aldosterone and the kidney: a rapidly moving frontier (an update)[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(11): 2012-2019.
- [11] NÁRAYFEJESTÓTH A, CANESSA C, CLEAVELAND E S, et al. sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na<sup>+</sup> channels[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(24): 16973-16978.
- [12] 吴丽敏, 陈立祥, 梁丽娟, 等. 依普利酮下调 SGK-1 表达抑制梗阻性肾病细胞增殖的研究[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(1): 69-73.
- [13] WANG L, MAO N, TAN R Z, et al. Ginsenoside Rg1 reduces aldosterone-induced autophagy via the AMPK/mTOR pathway in NRK-52E cells [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2015, 36(2): 518-526.
- [14] MAO N, CHENG Y, SHI X L, et al. Ginsenoside Rg1 protects mouse podocytes from aldosterone-induced injury in vitro[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2014, 35(4): 513-522.
- [15] LAMANUZZI A, SALTARELLA I, DESANTIS V, et al. Inhibition of mTOR complex 2 restrains tumor angiogenesis in multiple myeloma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(29): 20563-20577.
- [16] YANG M, WANG B, MIAO L, et al. Autophagy is involved in aldosterone-induced mesangial cell proliferation[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14(5): 4638-4642.
- [17] SHINDO T, TANAKA M, KAMIYOSHI A, et al. Regulation of cardiovascular development and homeostasis by the adrenomedullin-RAMP system[J]. *Peptides*, 2019, 111: 55-61.
- [18] 吴胜英, 蒋维, 潘春水, 等. 肾上腺髓质素抑制醛固酮促大鼠主动脉外膜增殖效应[J]. *微循环学杂志*, 2005, 15(4): 1-5.
- [19] 孙东云. 化痰涤痰通路中药调控肾上腺髓质素抑制肾小管上皮细胞表型转化的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)