雷公藤甲素通过调节ALDOA/AMPK/mTOR通路恢复高糖状态下HK-2细胞自噬的机制研究

段振东[1]，蔡珂丹[2]，胡蕾[1]，王吉娜[1]，胡俊华[1]

1. 舟山市中医院肾内科，浙江 舟山 316000；2. 宁波市第二医院肾内科，浙江 宁波 315010

［摘要］**目的：**探究雷公藤甲素（TP）是否通过调控醛缩酶A/AMP活化蛋白激酶/雷帕霉素靶蛋白（ALDOA/AMPK/mTOR）通路恢复高糖状态下HK-2细胞自噬。**方法：**采用标准培养的人肾小管上皮细胞系HK-2建立高糖损伤模型，具体设为对照组（Control：5.5 mmol/L葡萄糖溶液）、高糖组（High G：25 mmol/L葡萄糖溶液）、低剂量TP组（TP-L：25 mmol/L葡萄糖溶液+10 nmol/L TP）、高剂量TP组（TP-H：25 mmol/L葡萄糖溶液+20 nmol/L TP）、siALDOA组（25 mmol/L葡萄糖溶液+50 nmol/L siALDOA）、siALDOA+TP-L组（25 mmol/L葡萄糖溶液+50 nmol/L siALDOA+10 nmol/L TP），各组均干预48 h。通过MTT比色法系统检测细胞增殖活力变化、PI染色结合流式细胞术定量分析细胞凋亡率、MDC法检测细胞自噬通量变化、免疫荧光技术检测自噬标志物LC3-Ⅱ蛋白的亚细胞定位与表达水平、Western Blot法检测糖酵解关键酶ALDOA的蛋白表达变化。为进一步验证机制，通过siRNA转染技术敲低高糖模型组HK-2细胞的ALDOA表达，联合低剂量TP干预后，Western Blot法检测ALDOA、p-AMPK、p-mTOR蛋白表达，RT-qPCR法检测ALDOA、AMPK、mTOR基因表达。**结果：**细胞功能实验显示，HG组HK-2细胞增殖率下降至（30.69±5.96）%；而TP干预后呈现剂量依赖性恢复，TP-L组、TP-H组分别达到（50.11±7.97）%和（62.78±11.64）%，与HG组比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。凋亡检测发现，HG组凋亡率升高至（49.34±2.52）%；而TP-L组、TP-H组分别降低至（23.89±0.76）%和（13.48±2.33）%，与HG组比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与HG组比较，TP-L组细胞自噬通量和LC3-Ⅱ表达显著增加（$P<0.05$），ALDOA表达明显降低（$P<0.05$）。相关机制研究显示，与HG组比较，siALDOA组与TP-L组mTOR通路激活均显著减少（$P<0.05$），同时AMPK磷酸化水平明显增强（$P<0.05$）；而siALDOA+TP-L组各指标与siALDOA组比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。**结论：**TP能够有效恢复高糖状态下HK-2细胞自噬，其机制与抑制ALDOA/AMPK/mTOR信号通路激活有关。

［关键词］糖尿病肾病；线粒体自噬；雷公藤甲素；醛缩酶A；醛缩酶A/AMP活化蛋白激酶/雷帕霉素靶蛋白通路

［中图分类号］R285.5　　［文献标志码］A　　［文章编号］0256-7415（2026）04-0102-09

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2026.04.017

Mechanistic Study on Triptolide Restoring Autophagy of HK-2 Cells Under High-Glucose Conditions by Modulating the ALDOA/AMPK/mTOR Pathway

DUAN Zhendong[1], *CAI Kedan*[2], *HU Lei*[1], *WANG Ji'na*[1], *HU Junhua*[1]

1. Department of Nephrology, Zhoushan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhoushan Zhejiang 316000, China; 2. Department of Nephrology, Ningbo No.2 Hospital, Ningbo Zhejiang 315010, China

Abstract: Objective: To investigate whether Triptolide (TP) restores autophagy in HK-2 cells under high-

［收稿日期］2025-07-25
［修回日期］2025-11-16
［基金项目］浙江省中医药科技计划项目（2024ZR196）
［作者简介］段振东（1994-），男，主治中医师。
［通信作者］胡俊华（1977-），女，主任医师。

glucose conditions by regulating the Aldolase A/AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (ALDOA/AMPK/mTOR) signaling pathway. **Methods**: A high-glucose injury model was established using the standard cultured human renal tubular epithelial cell line HK-2. The cells were divided into the following groups: control group (5.5 mmol/L glucose), high-glucose group (High G: 25 mmol/L glucose), low-dose TP group (TP-L: 25 mmol/L glucose + 10 nmol/L TP), high-dose TP group (TP-H: 25 mmol/L glucose + 20 nmol/L TP), siALDOA group (25 mmol/L glucose + 50 nmol/L siALDOA), and siALDOA+TP-L组 (25 mmol/L glucose + 50 nmol/L siALDOA+10 nmol/L TP). All groups were treated for 48 hours. Changes in cell proliferation viability were detected by MTT colorimetric assay; apoptosis rate was quantitatively analyzed by PI staining combined with flow cytometry; changes in autophagic flux were detected by the MDC method; subcellular localization and expression levels of the autophagy marker LC3-Ⅱ protein were detected by immunofluorescence; and changes in the protein expression of the key glycolytic enzyme ALDOA were detected by Western Blot. To further verify the mechanism, ALDOA expression was knocked down in HK-2 cells of the high-glucose model group using siRNA transfection technology. Combined with low-dose TP intervention, protein expression of ALDOA, p-AMPK, and p-mTOR was detected by Western Blot, and gene expression of ALDOA, AMPK, and mTOR was detected by RT-qPCR. **Results**: Cell function experiments showed that the proliferation rate of HK-2 cells in the HG group significantly decreased to (30.69 ± 5.96)%; whereas after TP intervention, it recovered in a dose-dependent recovery, reaching (50.11 ± 7.97)% in the TP-L group and (62.78 ± 11.64)% in the TP-H group, with statistically significant differences compared to the HG group ($P<0.05$). Apoptosis detection revealed that the apoptosis rate in the HG group increased to (49.34 ± 2.52)%; whereas it decreased to (23.89 ± 0.76)% in the TP-L group and (13.48 ± 2.33)% in the TP-H group, showing statistically significant differences compared to the HG group ($P<0.05$). Compared with the HG group, autophagic flux and LC3-Ⅱ expression were significantly increased ($P<0.05$), and ALDOA expression was significantly decreased ($P<0.05$) in the TP-L group. Mechanistic studies showed that compared with the HG group, mTOR pathway activation was significantly reduced in both the siALDOA group and the TP-L group ($P<0.05$), while AMPK phosphorylation levels were significantly enhanced ($P<0.05$). Notably, there were no statistically significant differences in the indicators between the siALDOA+TP-L group and the siALDOA group ($P>0.05$). **Conclusion**: TP can effectively restore autophagy in HK-2 cells under high-glucose conditions, and its mechanism is related to the inhibition of the ALDOA/AMPK/mTOR signaling pathway activation.

Keywords: Diabetic nephropathy; Mitophagy; Triptolide; Aldolase A; Aldolase A/AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway

糖尿病肾病(DKD)是糖尿病主要并发症之一，同时也是终末期肾脏病最主要的继发性因素之一[1-2]。阻止和延缓DKD患者向终末期肾脏病(ESRD)发展是当前临床需解决的重要难题。传统认为，蛋白尿是肾小球受损的表现，也是早期DKD标志物[3]。然而近年研究发现，DKD中肾小管及肾间质系统的损伤不仅早于肾小球损伤[4-7]，并且参与介导了肾小球硬化[8]。因此，在早期保护肾小管功能可能是延缓DKD进程的重要方向。自噬是细胞内的一个动态循环系统，通过降解蛋白质和细胞器产生新的构建块和能量，在维持细胞自身稳态中发挥至关重要的作用[9]。丝氨酸/苏氨酸激酶AMP-激活蛋白激酶复合物(AMPK)作为调控能量稳态的重要激酶，在调节线粒体自噬、维持线粒体稳态中发挥了关键作用[10]，且AMPK激活可抑制mTOR磷酸化(p-mTOR降低)，进而促进自噬。既往研究表明，在DKD患者肾小管上皮细胞中AMPK表达显著抑制，而mTOR通路异常激活，进一步导致肾小管自噬降低[11]。而醛缩

酶A（ALDOA）在糖酵解和糖异生途径中起着重要作用，能通过激活AMPK/mTOR来抑制自噬的发生，进而促进DKD进程[12]。因此，ALDOA/AMPK/mTOR是调控DKD发生发展的关键信号通路之一，也是潜在治疗DKD的重要分子靶点。

雷公藤甲素（TP）是中药雷公藤中提取的二萜三环氧化合物，具有强大的免疫抑制、抗炎和抗蛋白尿作用[13]，广泛应于治疗膜性肾病、免疫蛋白（Ig）A肾病、局灶节段性肾小球硬化（FSGS）和DKD等。既往研究表明，TP是一种天然成分的自噬调节剂，能够通过调节自噬发挥神经保护作用、抗肿瘤活性、器官毒性和足细胞保护作用[14]。笔者前期已在TP的下拉实验（pull-down）+质谱分析（MS）实验中发现ALDOA是TP的直接作用靶点。本研究拟通过高糖处理的人肾小管上皮HK-2细胞（模拟DKD细胞模型）为对象，探讨TP能否通过下调ALDOA表达、抑制AMPK/mTOR激活，恢复细胞自噬，从而为TP治疗DKD提供机制依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株 人肾小管上皮细胞HK-2购买自中国科学院细胞库。

1.2 药物 TP（CAS：38748-32-2）购自上海同田生物技术有限公司。

1.3 试剂与仪器 MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒（#C0009S）、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天（#C1052）；FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I购自BD pharmingen（#556547）；细胞自噬染色检测试剂盒（MDC法）（#C3018S）、BCA蛋白分析试剂盒购自碧云天（#P0012S）；ALDO A（D73H4）兔抗（#8060），p-AMPKα（Thr172）兔抗（#50081），p-mTOR（Ser2448）兔抗（D9C2）。β-actin兔抗（#4970）购自Cell Signaling Technology公司。样品Maker购自赛默飞（#26617）；ECL化学发光液购自雅酶（# SQ201）；HRP标记山羊抗兔二抗（# A0208），Cy3标记山羊抗兔二抗（#A0516）购自碧云天。电子天平购自德国Sartorius公司；CO_2恒温培养箱购自德国贺利氏公司；倒置相差显微镜购自日本Olympus公司；酶联免疫检测仪购自美国Biotek公司；BD FACSCanto Ⅱ流式细胞仪购自美国BD公司。

1.4 细胞培养 培养条件如下：HK-2细胞用加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基，在5%CO_2，37 ℃培养箱中培养，取对数期生长的HK-2细胞进行后续实验。

1.5 细胞分组及处理 将HK-2细胞分为对照组（Control：5.5 mmol/L葡萄糖溶液）、高糖组（HG：25 mmol/L葡萄糖溶液）、低剂量TP组（TP-L：25 mmol/L葡萄糖溶液+10 nmol/L TP）、高剂量TP组（TP-H：25 mmol/L葡萄糖溶液+20 nmol/L TP）、siALDOA组（25 mmol/L葡萄糖溶液+ 50 nmol/L siALDOA）、siALDOA+TP-L组（25 mmol/L葡萄糖溶液+ 50 nmol/L siALDOA+10 nmol/L TP）。

1.6 细胞功能检测

1.6.1 MTT法检测细胞增殖 将HK-2细胞以2×10^4/100 μL接种于96孔板，培养24 h待细胞完全贴壁后，按照上述分组方法进行药物干预，每组设6个复孔。干预48 h后，每孔加入10 μL MTT溶液（5 mg/mL，用PBS配制），置于细胞培养箱内继续孵育4 h；随后每孔加入100 μL二甲基亚砜（DMSO，即Formazan溶解液），轻轻混匀后放回细胞培养箱内，继续孵育4 h。使用全自动酶标仪检测各孔在570 nm波长下测定吸光度（OD）。计算细胞生存率并绘制效应曲线，相同实验重复3次。细胞生存率=OD药物组/OD对照组×100%。

1.6.2 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡 将处于对数生长期的HK-2细胞以1×10^6个/孔接种于6孔板，待细胞贴壁后，按照上述分组进行药物干预，每组3个复孔。干预48 h后，使用不含EDTA的胰酶消化细胞，用PBS洗涤2次后进行计数。使用试剂盒配套的1×Binding Buffer将洗涤后的细胞稀释为1×10^6/mL单细胞悬液，吸取300 μL细胞悬液至流式管中，加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI染色液，室温下避光孵育15 min。使用流式细胞仪检测，计算FITC阳性、PI阴性细胞比例，即细胞凋亡率。

1.6.3 MDC法检测细胞自噬 将HK-2细胞接种于6孔板，按照上述分组进行药物干预，每组3个复孔。干预48 h后，吸净培养液，用PBS洗涤1次；加入EBSS溶液，置于细胞培养箱中37 ℃孵育4 h；随后每孔加入1 mL MDC染色液，在37 ℃细胞培养箱中避光孵育30 min。吸净MDC染色液，使用Assay Buffer洗涤3次，吸净残留Assay Buffer后，每孔补加1 mL Assay Buffer。在荧光显微镜下用紫外激发光观察绿色荧光。

1.7 分子水平验证

1.7.1 免疫荧光法检测LC3-Ⅱ表达 将处于对数生长期的HK-2细胞以2×10⁶个/孔接种于含爬片的6孔板，按照上述分组进行药物干预，48 h后取出爬片。用PBS轻轻洗涤爬片2次，去除残留培养基；加入4%多聚甲醛固定15 min，0.1%Triton-X-100(PBS配制)透化10 min；用5%山羊血清(免疫荧光封闭液，PBS配制)封闭30 min。加LC3-Ⅱ抗体(1∶1 500)4 ℃过夜孵育；PBST洗涤3次后，加Cy3山羊抗兔二抗(1∶1 500)，室温避光孵育2 h。使用10 μg/mL DAPI染色5 min，PBS洗涤后用抗淬灭封片剂封片。通过共聚焦显微镜拍照，Image J软件分析LC3-Ⅱ荧光强度。

1.7.2 Western Blot法检测蛋白表达 将HK-2细胞接种于6孔板，按照上述分组进行药物干预，48 h后收集细胞并提取总蛋白；使用BCA蛋白分析试剂盒进行蛋白定量，并按标准流程对蛋白样品进行处理。制备10.0%和12.5%的SDS-PAGE凝胶，加入蛋白样品和蛋白Maker，电泳后湿转到PVDF膜上。转膜后用5%脱脂奶粉(TBST配制)室温封闭2 h，随后将膜分别浸泡在AMPK一抗(1∶1 000)、p-AMPK一抗(1∶1 000)、mTOR一抗(1∶1 000)、p-mTOR一抗(1∶1 000)和β-actin一抗(1∶2 000)中，4 ℃孵育过夜。使用TBST洗膜3次，每次10 min，随后加入HRP标记山羊抗兔二抗室温孵育2 h；再次用TBST洗膜后，滴加ECL化学发光液显色，并用Image J软件分析灰度值。

1.7.3 Real-time PCR法检测基因表达 将HK-2细胞接种于6孔板，按照上述分组进行药物干，48 h后使用TRIzol试剂提取细胞总RNA。使用逆转录试剂盒将合格的总RNA逆转录成cDNA，取适量的cDNA为反应模板、GAPDH为内参进行荧光定量PCR扩增，检测各组HK-2细胞ALDOA、AMPK和mTOR mRNA的表达水平。PCR反应条件：95 ℃预变性30 s；95℃变性10 s，60 ℃退火并延申30 s，共40个循环。每组均设3个复孔，并使用$2^{-\triangle\triangle CT}$方法计算mRNA相对表达水平。扩增引物由上海生工生物工程技术服务公司合成，引物序列见表1。

表1 引物序列

名称	上游引物(5′→3′)	下游引物(5′→3′)
GAPDH	TGTGGGCATCAATGGATTTGG	ACACCATGTATTCCGGGTCAAT
ALDOA	CATCGTGGAGCCTGAGATCC	CAGCACCTTCTCGGTCACAT
AMPK	TTGAAACCTGAAAATGTCCTGCT	GGTGAGCCACAACTTGTTCTT
mTOR	GCTAGGTGCATTGACATACAACA	GCTAGGTGCATTGACATACAACA

2 结果

2.1 TP对高糖状态下HK-2细胞增殖和凋亡的影响 见表2。MTT检测结果显示：与Control组比较，HG组细胞增殖率降低，差异有统计学意义($P<0.05$)；与HG组比较，TP-L组细胞增殖率升高，差异有统计学意义($P<0.05$)；与TP-L组比较，TP-H组细胞增殖率升高，差异有统计学意义($P<0.05$)。Annexin V-FITC/PI双染检测结果显示：与Control组比较，HG组细胞凋亡率升高，差异有统计学意义($P<0.05$)；与HG组比较，TP-L组细胞凋亡率降低，差异有统计学意义($P<0.05$)；与TP-L组比较，TP-H组凋亡率降低，差异有统计学意义($P<0.05$)。

表2 TP对高糖状态下HK-2细胞增殖和凋亡的影响 %

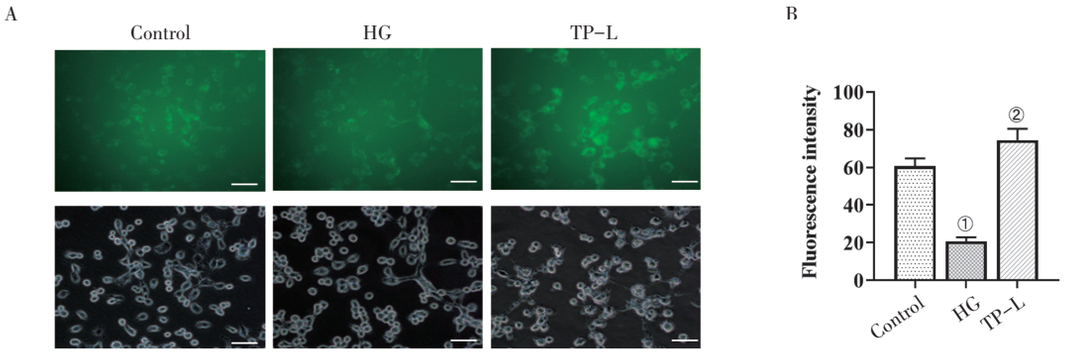
组 别	样本数	细胞增殖率	细胞凋亡率
Control	3	100.00 ± 4.79	3.20 ± 1.07
HG组	3	30.69 ± 5.96①	49.34 ± 2.52①
TP-L组	3	50.11 ± 7.97②	23.89 ± 0.76②
TP-H组	3	62.78 ± 11.64③	13.48 ± 2.33③

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与HG组比较，$P<0.05$；③与TP-L组比较，$P<0.05$。

2.2 TP对高糖状态下HK-2细胞自噬的影响 见图1～2。MDC检测结果显示：与Control组比较，HG组自噬通量降低，差异有统计学意义($P<0.05$)；与HG组比较，TP-L组自噬通量增加，差异有统计学意义($P<0.05$)。免疫荧光检测结果显示：与Control组比较，HG组LC3-Ⅱ荧光强度降低(且点状聚集明显减少)，差异有统计学意义($P<0.05$)；与HG组比较，TP-L组LC3-Ⅱ荧光强度增加(且点状聚集明显增多)，差异有统计学意义($P<0.05$)。

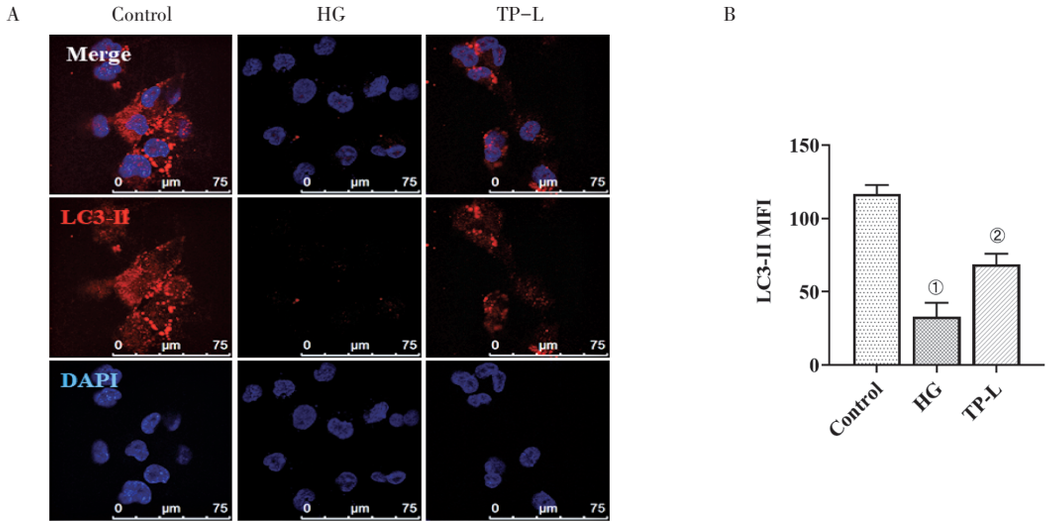
2.3 TP对高糖状态下HK-2细胞ALDOA表达的影响 见图3。通过Western Blot检测发现，与Control组比较，HG组HK-2细胞中ALDOA蛋白表达水平显著增加，差异有统计学意义($P<0.05$)；与HG组比较，TP-L组HK-2细胞中ALDOA蛋白表达水平降低，差异具有统计学意义($P<0.05$)；与TP-L组比较，TP-H组HK-2细胞中ALDOA蛋白表达水平降低，差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 TP通过调节ALDOA恢复高糖状态下HK-2细胞自噬 见图4～5。MDC检测结果显示：与HG组比



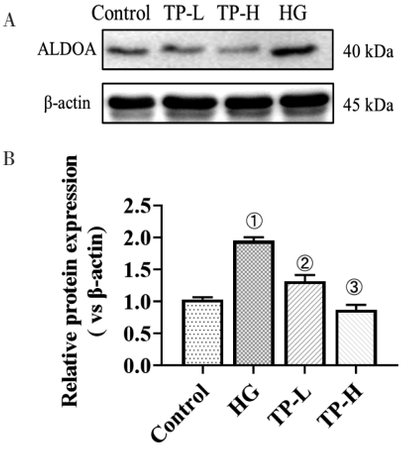
注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与HG组比较，$P<0.05$。

图1　TP对高糖状态下HK-2细胞自噬通量的影响



注：比例尺：75 μm。①与Control组比较，$P<0.05$；②与HG组比较，$P<0.05$。

图2　TP对高糖状态下HK-2细胞LC3-Ⅱ表达的影响

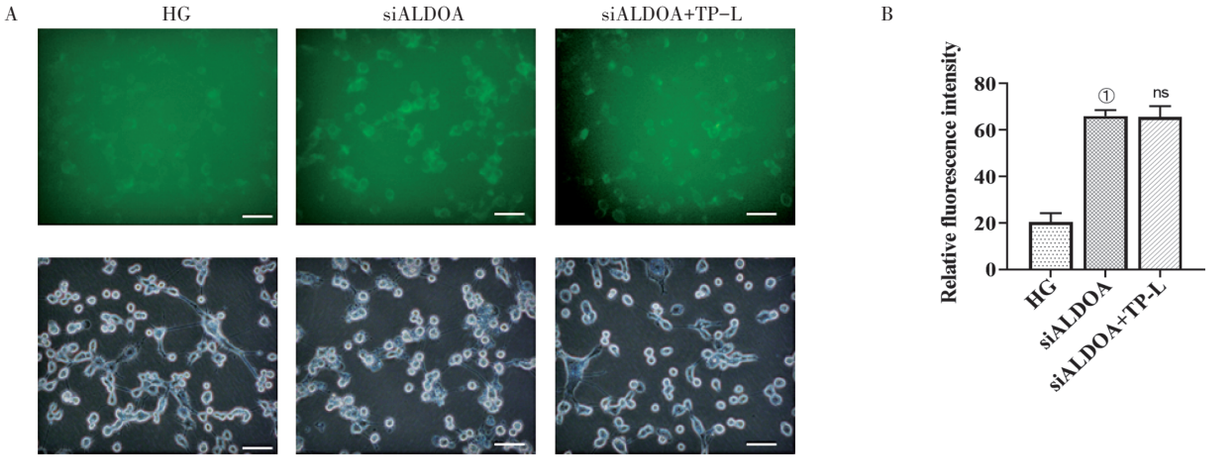


注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与HG组比较，$P<0.05$；③与TP-L组比较，$P<0.05$。

图3　TP对高糖状态下HK-2细胞ALDOA蛋白水平的影响

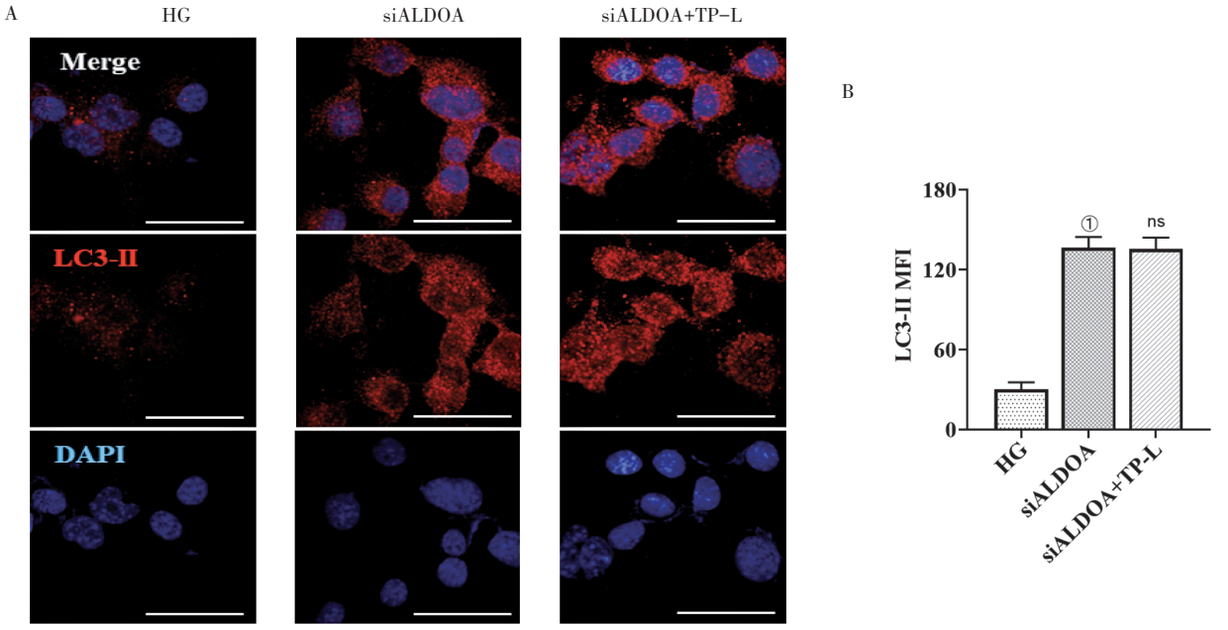
较，siALDOA组和siALDOA+TP-L组自噬通量均增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与siALDOA组比较，siALDOA+TP-L组自噬通量差异无统计学意义（$P>0.05$）。免疫荧光检测结果显示：与HG组比较，siALDOA组和siALDOA+TP-L组LC3-Ⅱ荧光强度均明显升高（且点状聚集明显增多），差异有统计学意义（$P<0.05$）；而与siALDOA组比较，siALDOA+TP-L组LC3-Ⅱ荧光强度及点状聚集程度差异均无统计学意义（$P>0.05$）。

2.5　TP对高糖状态下HK-2细胞ALDOA、p-AMPK/p-AMPK、mTOR/p-mTOR蛋白表达的影响　见图6。通过Western Blot检测发现：与Control组比较，HG组ALDOA、p-mTOR表达水平升高，p-AMPK蛋白表达水平降低，且差异均有统计学意



注：①与HG组比较，$P<0.05$；ns代表与siALDOA组比较无统计学差异。

图4　各组HK-2细胞自噬通量

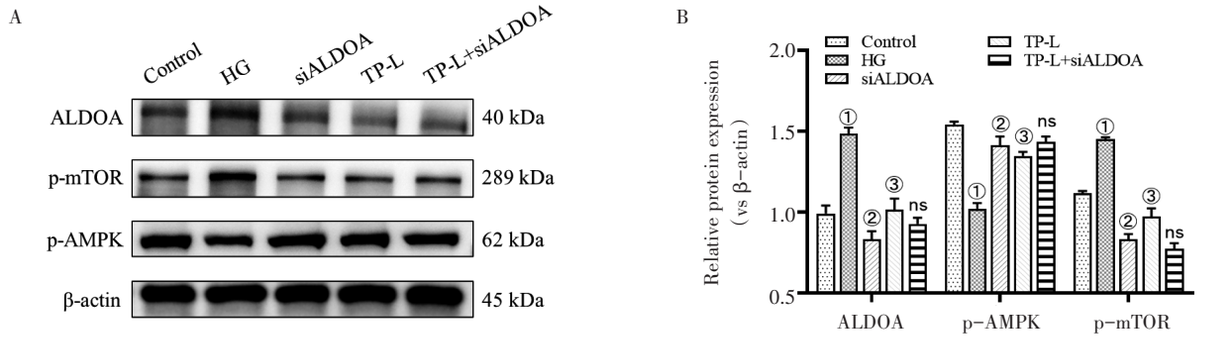


注：①与HG组比较，$P<0.05$；ns代表与siALDOA组比较差异无统计学意义。

图5　各组HK-2细胞LC3-Ⅱ表达

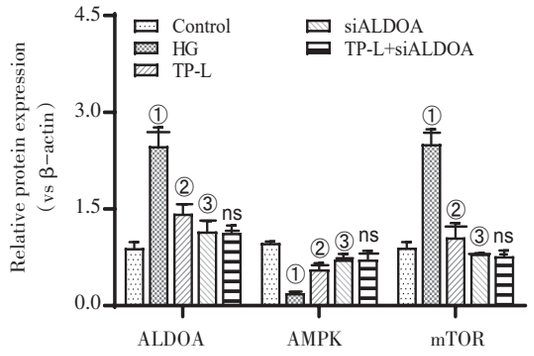
义（$P<0.05$）。与HG组比较，siALDOA组、TP-L组ALDOA、p-mTOR表达水平降低，p-AMPK蛋白表达水平升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与siALDOA组比较，siALDOA+TP-L组ALDOA、p-AMPK、p-mTOR表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.6　TP对高糖状态下HK-2细胞ALDOA、AMPK和mTOR mRNA表达的影响　见图7。通过Real-time PCR检测显示：与Control组比较，HG组ALDOA、mTOR mRNA表达水平升高，AMPK mRNA表达水平显低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；与HG组比较，siALDOA组、TP-L组ALDOA、mTOR mRNA表达水平降低，AMPK mRNA表达水平升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）；与siALDOA组比较，siALDOA+TP-L组ALDOA、AMPK、mTOR表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$）。



注：①与Control组比较，$P<0.05$；②、③与HG组比较，$P<0.05$；ns表示与siALDOA组比较差异无统计学意义。

图6　TP对高糖状态下HK-2细胞AMPK、AMPK/p-AMPK、mTOR/p-mTOR蛋白表达的影响



注：①与Control组比较，$P<0.05$；②、③与HG组比较，$P<0.05$；ns表示与siALDOA组比较差异无统计学意义。

图7　TP对高糖状态下HK-2细胞ALDOA、AMPK、mTOR mRNA表达的影响

3　讨论

全球糖尿病的流行趋势正持续加剧，患者规模呈显著增加态势。据国际糖尿病联合会统计预测，到2045年，全球糖尿病患者数量预计将增加至7.84亿[15]。糖尿病并发症是糖尿病患者死亡的主要原因，约40%的糖尿病患者在长期病程中最终发展成为慢性肾脏病。目前，DKD已经是国内外终末期肾脏病患者的最主要致病原因[16-17]。

DKD在中医学中属于水肿、尿浊、消渴等范畴。其病位主要在脾肾，以虚、湿、痰、热、瘀为常见病因，且多以病邪相兼为患；病性多为本虚标实，阴阳失调，病变后期多累及脾肾，病机以气阴两虚、阴阳两虚为主[18]。中医药治疗DKD具有多组分、多靶点协同的优势，在改善DKD患者肾脏损伤方面发挥着重要的作用[19]。其中，临床上使用TP治疗DKD具有降低蛋白尿、延缓肾功能恶化等作用[20-21]。目前研究进一步发现，雷公藤制剂治疗DKD的机制涉及多方面，如抑制炎性因子、改善氧化应激、修复足细胞损伤、保护肾小球内皮细胞、抑制系膜细胞增殖及细胞外基质过度沉积、促进肾小管间质损伤修复、抑制肾脏纤维化等[22]。本研究基于TP治疗DKD的临床证据和前期实验基础，从改善DKD早期肾小管病变角度进一步探究了TP治疗DKD的内在分子机制。结果发现，TP能够显著促进高糖状态下肾小管上皮细胞的增殖能力，减少细胞凋亡的发生。

肾小管上皮细胞自噬正常的活化有助于维持细胞和细胞器的稳态以及应激能力，防止肾小管间质纤维化。已有研究表明，STZ诱导的早期糖尿病大鼠肾近端小管细胞自噬受到抑制，并且与肾小管肥大有关[23]。另外，在2型糖尿病患者的肾活检标本中，自噬底物p62/SQSTM1在近端小管上皮细胞中检测到积累，提示人类糖尿病肾脏同样缺乏自噬活性[24]。上述研究共同表明，自噬受损是DKD肾损伤的发生和发展的重要内在机制，靶向调节细胞自噬或可成为治疗DKD新的方向[25]。SGLT-2抑制剂的作用机制与自噬调控也存在关联，其能够通过减少肾近端小管对葡萄糖的重吸收，达到降低血糖的作用，现代临床研究发现其具有延缓DKD进程，减少心血管事件发生的作用[26]。Xu J等[27]进一步研究发现，达格列净能够恢复高糖状态下人肾近端小管细胞自噬通量，抑制炎性因子的表达，减少人肾近端小管细胞损伤，这提示SGLT-2抑制剂延缓DKD进程作用可能与调节自噬有关。而本研究通过检测自噬通量和自噬关键蛋白LC3的表达，发现高糖状态下肾小管上皮细胞自噬显著减少，而TP能够明显恢复高糖状态下肾小管

上皮细胞的自噬。

ALDOA/AMPK/mTOR是调控细胞自噬的重要信号通路之一。AMPK是一种能量状态感受器，是维持细胞和全身能量稳态的重要通路[28]。DKD中，细胞AMP/ATP或ADP/ATP比值降低，AMPK磷酸化受到明显抑制[29]。多项研究表明mTOR是细胞自噬的负调节因子[30-32]，mTOR的异常激活能够抑制AMPK介导的自噬发生[33-34]。ALDOA是一种糖酵解相关蛋白，其可通过介导炎性代谢途径促进线粒体活性氧产生和DNA碎片释放，抑制细胞线粒体自噬发生[12]。ALODA作为AMPK的上游负调节因子，在高糖状态下被激活[35]。本研究发现，高糖状态下肾小管上皮细胞中ALDOA表达水平增加，p-AMPK表达减少，p-mTOR表达增加，可见高糖能够通过激活ALDOA/AMPK/mTOR通路抑制肾小管上皮细胞的自噬。而TP治疗明显抑制了肾小管上皮细胞中ALDOA的表达水平，通过下调ALDOA/AMPK/mTOR通路来恢复高糖状态下肾小管上皮细胞的自噬。值得注意的是，本研究发现TP对高糖状态下HK-2细胞ALDOA mRNA表达水平无显著影响，但能够显著降低ALDOA蛋白表达。

TP作为一种自噬调节剂，已有多项研究表明能够通过调节细胞自噬达到保护肾脏的作用，但TP调节治疗DKD的具体机制尚不清楚。本研究发现，TP能够增加高糖状态下肾小管上皮细胞活力，其机制可能与调控ALDOA/AMPK/mTOR通路恢复肾小管上皮细胞自噬有关。本研究可为阐释TP调节细胞自噬的分子机制提供了新思路，为TP治疗DKD提供理论依据。

[参考文献]

[1] INGELFINGER J R，JARCHO J A. Increase in the Incidence of Diabetes and Its Implications[J]. N Engl J Med，2017，376(15)：1473-1474.

[2] RYU H，HONG Y，KANG E，et al. Comparison of outcomes of chronic kidney disease based on etiology：a prospective cohort study from KNOW-CKD[J]. Sci Rep，2023，13(1)：3570.

[3] FINEBERG D，JANDELEIT-DAHM K A，COOPER M E. Diabetic nephropathy：diagnosis and treatment[J]. Nat Rev Endocrinol，2013，9(12)：713-723.

[4] KANWAR Y S，SUN L，XIE P，et al. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy[J]. Annu Rev Pathol，2011，6：395-423.

[5] VALLON V，THOMSON S C. Renal function in diabetic disease models：the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney[J]. Annu Rev Physiol，2012，74：351-375.

[6] TANG S C，LAI K N. The pathogenic role of the renal proximal tubular cell in diabetic nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant，2012，27(8)：3049-3056.

[7] BONVENTRE J V. Can we target tubular damage to prevent renal function decline in diabetes?[J]. Semin Nephrol，2012，32(5)：452-462.

[8] KRIZ W，LOWEN J，GRONE H J. The complex pathology of diabetic nephropathy in humans[J]. Nephrol Dial Transplant，2023，38(10)：3109-2119.

[9] MIZUSHIMA N，KOMATSU M. Autophagy：renovation of cells and tissues[J]. Cell，2011，147(4)：728-741.

[10] HERZIG S，SHAW R J. AMPK：guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2018，19(2)：121-135.

[11] PACKER M. Interplay of adenosine monophosphate-activated protein kinase/sirtuin-1 activation and sodium influx inhibition mediates the renal benefits of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors in type 2 diabetes：A novel conceptual framework[J]. Diabetes Obes Metab，2020，22(5)：734-742.

[12] BAI D，DU J，BU X，et al. ALDOA maintains NLRP3 inflammasome activation by controlling AMPK activation[J]. Autophagy，2022，18(7)：1673-1693.

[13] CHEN Z H，QIN W S，ZENG C H，et al. Triptolide reduces proteinuria in experimental membranous nephropathy and protects against C5b-9-induced podocyte injury in vitro[J]. Kidney Int，2010，77(11)：974-988.

[14] WEI Y M，WANG Y H，XUE H Q，et al. Triptolide，A Potential Autophagy Modulator[J]. Chin J Integr Med，2019，25(3)：233-240.

[15] 姚慧娟，杨宇，徐阿晶. 2022版《ADA/KDIGO共识报告：慢性肾脏病患者的糖尿病管理》要点解读[J]. 中国全科医学，2023，26(12)：1415-1421.

[16] CORESH J，SELVIN E，STEVENS L A，et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States[J]. JAMA，2007，298(17)：2038-2047.

[17] ZHANG L，LONG J，JIANG W，et al. Trends in Chronic Kidney Disease in China[J]. N Engl J Med，2016，375(9)：905-906.

[18] 赵哲，白敏，靳玉秋，等. 中医药调控NLRP3炎症小体治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2023，29(23)：197-206.

[19] TANG G，LI S，ZHANG C，et al. Clinical efficacies，underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management[J]. Acta Pharm Sin B，2021，11(9)：2749-2767.

[20] 陈芸，盛梅笑. 雷公藤多苷治疗糖尿病肾病疗效及安全性的Meta分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志，2013(3)：245-249.

[21] GE Y，XIE H，LI S，et al. Treatment of diabetic nephropathy with Tripterygium wilfordii Hook F extract：a prospective，randomized，controlled clinical trial[J]. J Transl Med，2013，11(1)：134.

[22] 陈玉锦，陈西北. 雷公藤制剂治疗糖尿病肾病相关机制的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志，2018(9)：844-846.

[23] BARBOSA J A A，ZHOU H，HULTENSCHMIDT D，et al. Inhibition of cellular autophagy in proximal tubular cells of the kidney in streptozotocin-diabetic and uninephrectomized rats[J]. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol，1992，61(6)：359-366.

[24] YAMAHARA K，KUME S，KOYA D，et al. Obesity-mediated autophagy insufficiency exacerbates proteinuria-induced tubulointerstitial lesions[J]. J Am Soc Nephrol，2013，24(11)：1769-1781.

[25] KITADA M，OGURA Y，MONNO I，et al. Regulating Autophagy as a Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy[J]. Curr Diab Rep，2017，17(7)：53.

[26] ALICIC R Z，JOHNSON E J，TUTTLE K R. SGLT2 Inhibition for the Prevention and Treatment of Diabetic Kidney Disease：A Review[J]. Am J Kidney Dis，2018，72(2)：267-277.

[27] XU J，KITADA M，OGURA Y，et al. Dapagliflozin Restores Impaired Autophagy and Suppresses Inflammation in High Glucose-Treated HK-2 Cells[J]. Cells，2021，10(6)：1457.

[28] SZREJDER M，PIWKOWSKA A. AMPK signalling：Implications for podocyte biology in diabetic nephropathy[J]. Biol Cell，2019，111(5)：109-120.

[29] PACKER M. Role of Deranged Energy Deprivation Signaling in the Pathogenesis of Cardiac and Renal Disease in States of Perceived Nutrient Overabundance[J]. Circulation，2020，141(25)：2095-2105.

[30] BALLESTEROS-ALVAREZ J，ANDERSEN J K. mTORC2：The other mTOR in autophagy regulation[J]. Aging Cell，2021，20(8)：e13431.

[31] CHENG X，ZHANG P，ZHAO H，et al. Proteotoxic stress disrupts epithelial integrity by inducing MTOR sequestration and autophagy overactivation[J]. Autophagy，2023，19(1)：241-255.

[32] PEI F，MA L，JING J，et al. Sensory nerve niche regulates mesenchymal stem cell homeostasis via FGF/mTOR/autophagy axis[J]. Nat Commun，2023，14(1)：344.

[33] VAN VLIET T，VARELA-EIRIN M，WANG B，et al. Physiological hypoxia restrains the senescence-associated secretory phenotype via AMPK-mediated mTOR suppression[J]. Mol Cell，2021，81(9)：2041-2052.

[34] ZHENG X，LI W，XU H，et al. Sinomenine ester derivative inhibits glioblastoma by inducing mitochondria-dependent apoptosis and autophagy by PI3K/AKT/mTOR and AMPK/mTOR pathway[J]. Acta Pharm Sin B，2021，11(11)：3465-3480.

[35] LI M，ZHANG C S，FENG J W，et al. Aldolase is a sensor for both low and high glucose，linking to AMPK and mTORC1[J]. Cell Res，2021，31(4)：478-481.

[责任编辑：冯天保，蒋维超(英文)]