

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research丹皮酚对白蛋白诱导的肾小管上皮细胞自噬和
NLRP3 炎症小体影响的研究Research of Effects of paeonol on autophagy and NLRP3 inflammasome
in renal tubular epithelial cells induced by albumin郝永熙¹, 梁 卫², 时 乐¹,
秦子怡¹, 梁 涛¹(1. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210023;
2. 中国人民解放军东部战区空军医院 中医科,
江苏 南京 210002)HAO Yong-xi¹, LIANG Wei²,
SHI Le¹, QIN Zi-yi¹,
LIANG Tao¹(1. School of Pharmacy, Nanjing
University Of Chinese Medicine, Nanjing
210023, Jiangsu Province, China; 2.
Department of Traditional Chinese
Medicine, Air Force Hospital of People's
Liberation Army of China the Eastern
Theater Command, Nanjing 210002,
Jiangsu Province, China)

作者简介: 郝永熙(2000-), 女, 硕士研究生, 主
要从事抗炎免疫药理方面的研究
通信作者: 梁涛, 副教授, 研究生导师
MP: 13851847077
E-mail: liangtao@njucm.edu.cn

摘要:目的 观察丹皮酚对白蛋白(HSA)诱导的肾小管上皮细胞(HK-2)自噬和 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体的调控作用。方法 体外培养 HK-2 细胞并随机分为对照组、模型组和低、中、高剂量实验组。对照组细胞正常培养; 模型组用 20 mg·mL⁻¹ HSA 干预 24 h; 低、中、高剂量实验组在模型组的基础上分别加入 25、50 和 100 μmol·L⁻¹ 丹皮酚处理 24 h。酶联免疫吸附实验法检测上清液肾损伤因子 1(KIM-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白介素-1β(IL-1β)和胱天蛋白酶-1(caspase-1)的含量, 用实时荧光定量聚合酶链反应法检测 KIM-1 和 MCP-1 基因表达, 用蛋白质印迹法检测含吡喃结构域的 NLRP3、含 CARD 结构域的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、IL-1β、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、泛素结合蛋白 p62(p62)、自噬效应蛋白 Beclin 1(Beclin-1)、PTEN 诱导激酶 1(PINK1)和 Parkin 蛋白的表达。结果 对照组、模型组和低、中、高剂量组细胞上清中 KIM-1 浓度分别为(8.65±0.53)、(17.33±2.04)、(10.76±1.41)、(8.48±0.47)和(8.47±0.24) pg·mL⁻¹, MCP-1 含量为(531.38±15.64)、(2198.55±148.21)、(1966.29±53.52)、(1605.49±234.68)和(937.33±36.96) pg·mL⁻¹, IL-1β 分泌水平为(71.66±2.29)、(109.92±4.41)、(91.68±4.75)、(80.66±4.00)和(62.38±3.24) pg·mL⁻¹, caspase-1 含量为(66.57±10.52)、(210.50±17.50)、(201.88±7.22)、(195.42±13.95)和(129.81±13.20) pg·mL⁻¹, KIM-1 mRNA 基因相对表达水平分别为 1.05±0.05、2.38±0.45、1.58±0.20、1.44±0.08 和 1.38±0.22, MCP-1 mRNA 相对表达水平分别为 1.04±0.04、1.53±0.08、1.32±0.16、1.16±0.16 和 0.62±0.13, NLRP3 蛋白相对表达水平为 0.89±0.08、1.13±0.07、1.00±0.07、0.84±0.12 和 0.55±0.16, ASC 蛋白相对表达水平分别为 0.23±0.03、0.87±0.19、0.81±0.16、0.78±0.08 和 0.46±0.05, IL-1β 蛋白相对表达水平分别为 0.49±0.12、1.46±0.29、1.10±0.26、0.71±0.06 和 0.53±0.13, 微管相关蛋白 1 轻链 3-2(LC3 II)/LC3 I 蛋白相对表达水平分别为 1.08±0.04、0.90±0.06、1.00±0.02 和 1.05±0.04, p62 蛋白相对表达水平分别为 0.38±0.06、1.23±0.11、1.05±0.20 和 0.62±0.19, Beclin-1 蛋白相对表达水平分别为 0.82±0.07、0.59±0.06、0.90±0.07 和 0.93±0.09, PINK1 蛋白相对表达水平分别为 1.10±0.03、0.68±0.07、0.78±0.11 和 1.03±0.08, Parkin 蛋白相对表达水平为 0.64±0.06、0.46±0.05、0.58±0.08 和 0.79±0.12。模型组的上述指标与对照组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(P<0.05, P<0.01, P<0.001), 高剂量实验组的上述指标与模型组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(P<0.05, P<0.01, P<0.001)。结论 丹皮酚可能通过促进线粒体自噬, 抑制 NLRP3 炎症小体, 缓解白蛋白导致的肾小管损伤。

关键词: 丹皮酚; 白蛋白; 自噬; 炎症小体; 肾小管上皮细胞**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.01.009**中图分类号:** R28 **文献标志码:** A**文章编号:** 1001-6821(2026)01-0053-06

Abstract: Objective To investigate the regulatory effects of paeonol on autophagy and the NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome in human renal proximal tubular epithelial cells (HK-2) induced by human serum albumin (HSA). **Methods** HK-2 cells were cultured *in vitro* and randomly assigned to control group, model group, as well as low-, medium- and high-dose experimental groups. Cells in the control group were cultured under normal conditions; those in the model group were treated with $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ HSA for 24 h; and cells in the low-, medium- and high-dose experimental groups were administered 25, 50 and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ paeonol, respectively, for 24 h on the basis of the model group intervention. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to determine the concentrations of kidney injury molecule 1 (KIM-1), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), interleukin 1β (IL- 1β) and caspase-1 in the cell supernatant. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression levels of KIM-1 and MCP-1. Western blotting was applied to measure the protein expression levels of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), interleukin- 1β (IL- 1β), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), sequestosome 1 (p62), Beclin-1, PTEN-induced kinase 1 (PINK1) and Parkin. **Results** The concentrations of KIM-1 in the cell supernatant of the control group, model group, and low-, medium- and high-dose experimental groups were (8.65 ± 0.53) , (17.33 ± 2.04) , (10.76 ± 1.41) , (8.48 ± 0.47) and $(8.47 \pm 0.24) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the contents of MCP-1 were (531.38 ± 15.64) , (2198.55 ± 148.21) , (1966.29 ± 53.52) , (1605.49 ± 234.68) and $(937.33 \pm 36.96) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the secretion levels of IL- 1β were (71.66 ± 2.29) , (109.92 ± 4.41) , (91.68 ± 4.75) , (80.66 ± 4.00) and $(62.38 \pm 3.24) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the contents of caspase-1 were (66.57 ± 10.52) , (210.50 ± 17.50) , (201.88 ± 7.22) , (195.42 ± 13.95) and $(129.81 \pm 13.20) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of KIM-1 mRNA in each group were 1.05 ± 0.05 , 2.38 ± 0.45 , 1.58 ± 0.20 , 1.44 ± 0.08 and 1.38 ± 0.22 , respectively; while those of MCP-1 were 1.04 ± 0.04 , 1.53 ± 0.08 , 1.32 ± 0.16 , 1.16 ± 0.16 and 0.62 ± 0.13 , respectively; the relative expression levels of NLRP3 protein were 0.89 ± 0.08 , 1.13 ± 0.07 , 1.00 ± 0.07 , 0.84 ± 0.12 and 0.55 ± 0.16 , respectively; those of ASC were 0.23 ± 0.03 , 0.87 ± 0.19 , 0.81 ± 0.16 , 0.78 ± 0.08 and 0.46 ± 0.05 , respectively; those of IL- 1β were 0.49 ± 0.12 , 1.46 ± 0.29 , 1.10 ± 0.26 , 0.71 ± 0.06 and 0.53 ± 0.13 , respectively; the LC3 II/I ratios were 1.08 ± 0.04 , 0.90 ± 0.06 , 1.00 ± 0.02 and 1.05 ± 0.04 , respectively; the expression levels of p62 protein were 0.38 ± 0.06 , 1.23 ± 0.11 , 1.05 ± 0.20 and 0.62 ± 0.19 , respectively; those of Beclin-1 were 0.82 ± 0.07 , 0.59 ± 0.06 , 0.90 ± 0.07 and 0.93 ± 0.09 , respectively; those of PINK1 were 1.10 ± 0.03 , 0.68 ± 0.07 , 0.78 ± 0.11 and 1.03 ± 0.08 , respectively; those of Parkin were 0.64 ± 0.06 , 0.46 ± 0.05 , 0.58 ± 0.08 and 0.79 ± 0.12 , respectively. Compared with the control group, all the above indicators in the model group exhibited statistically significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). Moreover, the indicators in the high-dose experimental group showed statistically significant differences compared with the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Paeonol may alleviate albumin-induced renal tubular injury by promoting mitophagy and inhibiting the activation of the NLRP3 inflammasome.

Key word: paeonol; albumin; autophagy; inflammasome; renal tubular epithelial cell

慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)是由多种因素引发的肾结构和功能受损的一类疾病,包括狼疮性肾炎和糖尿病肾病等。白蛋白尿是CKD的典型症状,通过损伤肾小球内皮细胞、损害肾小管功能、促进炎症反应等^[1-2]。因此,探究这些病理变化背后的机制对于开发针对CKD的疗法是至关重要的。在CKD患者肾小管上皮细胞、内皮细胞等细胞中均发现NOD样受体蛋白(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎

症小体激活^[3]。CKD患者高浓度白蛋白的累积会干扰肾小管上皮细胞的自噬功能。研究表明,过量的白蛋白可以抑制自噬体形成和自噬通量,使细胞内受损蛋白质和细胞器积累增加^[4]。丹皮酚是一种从牡丹皮中分离出来的主要酚类化合物,前期研究已经证实,丹皮酚在狼疮模型中对肾的保护作用,但其作用机制尚缺乏系统研究。本研究用白蛋白诱导的肾小管上皮细胞炎症模型,探讨丹皮酚对肾小管上皮细胞

中自噬和 NLRP3 炎症小体相关蛋白的影响。

材料和方法

1 材料

细胞系 人肾小管上皮细胞 HK-2, 购自北京协和细胞库。

药品与试剂 丹皮酚, 规格: 每支 20 mg, 纯度: $\geq 98\%$, 批号: DD0048-0020, 四川成都德思特生物技术有限公司生产; 白蛋白 (albumin, HAS), 规格: 每瓶 1 g, 纯度: $\geq 98\%$, 批号: A1653-1G, 德国 SIGMA 公司生产; 反转录试剂盒和实时定量聚合酶链式反应试剂, 均由南京诺维赞公司生产; 放射免疫沉淀法裂解缓冲液 (radio-immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA), 上海碧云天生物技术有限公司生产; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、含吡喃结构域的 NOD 样受体家族蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3, NLRP3) 抗体、含 CARD 结构域的凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 抗体、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β) 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 抗体、Beclin-1 抗体、PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, PINK1) 抗体和 Parkin 抗体, 均由湖北武汉三鹰 proteintech 公司生产; p62 抗体, 美国 Affinity 公司生产; 二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒, 江苏苏州新赛美生物科技有限公司生产; 肾损伤分子 1 (kidney injury molecule-1, KIM-1)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、IL-1 β 和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 1 (cysteine-dependent aspartate-directed protease 1, caspase-1) 检测试剂盒, 均由江苏南京迈博生物有限公司生产。

仪器 LightCycler 96 荧光定量聚合酶链式反应仪, 瑞士罗氏公司产品; infinte M200Pro 酶标仪, 瑞士 TECAN 公司产品; 264-5050 电泳仪、GelDoc 2000 凝胶成像仪, 均为美国 Bio-Rad 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养

将 HK-2 细胞在含有 10% 胎牛血清和含双抗的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基与 Ham's F-12 营养混合物 (Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12, DMEM/F12) 培养基中, 并将培养基置于 37 °C、

5% CO₂ 的培养箱中传代培养。

2.2 细胞分组与处理方法

将对数生长期的 HK-2 细胞调整细胞密度 2×10^5 接种于 6 孔板中, 分为对照组、模型组和低、中、高剂量实验组。对照组细胞正常培养; 模型组加入 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HSA 溶液, 低、中、高剂量实验组在模型组的基础上分别加入 25, 50 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹皮酚, 各组均培养 24 h 后收集细胞和上清进行后续检测。

2.3 酶联免疫吸附 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测 KIM-1、MCP-1、IL-1 β 和 caspase-1 水平^[5]

收集细胞上清, 以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 按照相应试剂盒说明书操作, 通过酶标仪于 450 nm 处测定各孔的光密度 (optical density, OD) 值, 然后根据 OD 值绘制标准曲线, 进而计算各组培养上清中 KIM-1、MCP-1、IL-1 β 和 caspase-1 浓度。

2.4 逆转录实时荧光定量聚合酶链式反应 (reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 法检测 KIM-1 和 MCP-1 mRNA 相对表达水平^[6]

按 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA, 鉴定提取的总 RNA 浓度和纯度。通过逆转录反应试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA, 荧光定量得出 C_t 值, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因相对表达水平, 以 GAPDH 为内参, 检测各组 KIM-1 和 MCP-1 基因表达。

2.5 蛋白质印记法检测 NLRP3、ASC、IL-1 β 、LC3、Beclin-1、p62、PINK1 和 Parkin 蛋白表达水平^[7]

收集细胞, 用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 100 °C 加热 5 min, 充分变性后置于 -80 °C 保存。电泳分离, 转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, $1 \times \text{TBST}$ 洗 3 次, 每次 10 min, 加入 LC3 (1:2 000)、Beclin-1 (1:2 000)、p62 (1:1 000)、PINK1 (1:2 000)、Parkin (1:2 000)、NLRP3 (1:1 000)、ASC (1:2 000)、IL-1 β (1:2 000)、GAPDH (1:2 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 室温下孵育二抗 ($1:1.0 \times 10^4$) 1 h, TBST 洗涤 3 次, 加入 ECL 显色液, 用凝胶成像系统曝光, 用 Image Lab 分析软件进行图像分析。

3 统计学处理

用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析与作图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 Student's t 检验进行 2 组间的差异比较, 用单因素方差 (ANOVA) 进行多组

间的差异比较。

结 果

1 丹皮酚对 HSA 诱导的 HK-2 细胞分泌的 KIM-1、MCP-1、IL-1 β 、caspase-1 含量的影响

与对照组比较,模型组的 KIM-1、MCP-1、IL-1 β 和 caspase-1 均显著升高(均 $P < 0.001$);与模型组比较,低剂量实验组的 KIM-1 和 IL-1 β 含量均显著下降(均 $P < 0.05$),中、高剂量实验组的 KIM-1、MCP-1、IL-1 β 和 caspase-1 水平均显著降低($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$)。结果见表 1。

2 丹皮酚对 HSA 诱导的 HK-2 细胞中 KIM-1 和 MCP-1 mRNA 的影响

与对照组比较,模型组的 KIM-1 和 MCP-1 mRNA 均显著升高($P < 0.05, P < 0.001$);与模型组比较,中、高剂量实验组细胞的 KIM-1 和 MCP-1 mRNA 均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 丹皮酚对 HSA 诱导的 HK-2 细胞中 KIM-1 和 MCP-1 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of paeonol on KIM-1 and MCP-1 mRNA in HSA-induced HK-2 cells($\bar{x} \pm s$)

Group	KIM-1 mRNA	MCP-1 mRNA
Control	1.05 $\pm$ 0.05	1.04 $\pm$ 0.04
Model	2.38 $\pm$ 0.45 *	1.53 $\pm$ 0.08 ***
Experimental-L	1.58 $\pm$ 0.20	1.32 $\pm$ 0.16
Experimental-M	1.44 $\pm$ 0.08 [#]	1.16 $\pm$ 0.16 [#]
Experimental-H	1.38 $\pm$ 0.22 [#]	0.62 $\pm$ 0.13 ^{##}

Dose and n refer to table 1; Compared with control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

表 1 丹皮酚对白蛋白(HSA)诱导的肾小管上皮(HK-2)细胞分泌的上清液肾损伤因子 1(KIM-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白介素-1 β (IL-1 β)和胱天蛋白酶 1(caspase-1)含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of paeonol on the levels of kidney injury molecule 1(KIM-1), monocyte chemoattractant protein 1(MCP-1), interleukin-1 β (IL-1 β) and caspase-1 secreted by human serum albumin (HSA)-induced human renal proximal tubular epithelial cells (HK-2) cells($\bar{x} \pm s$)

Group	KIM-1 (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	MCP-1 (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	IL-1 β (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	caspase-1 (pg $\cdot$ mL ⁻¹)
Control	8.65 $\pm$ 0.53	531.38 $\pm$ 15.64	71.66 $\pm$ 2.29	66.57 $\pm$ 10.52
Model	17.33 $\pm$ 2.04 **	2 198.55 $\pm$ 148.21 ***	109.92 $\pm$ 4.41 ***	210.50 $\pm$ 17.50 ***
Experimental-L	10.76 $\pm$ 1.41 [#]	1 966.29 $\pm$ 53.52	91.68 $\pm$ 4.75 [#]	201.88 $\pm$ 7.22
Experimental-M	8.48 $\pm$ 0.47 ^{##}	1 605.49 $\pm$ 234.68 [#]	80.66 $\pm$ 4.00 ^{##}	195.42 $\pm$ 13.95 [#]
Experimental-H	8.47 $\pm$ 0.24 ^{###}	937.33 $\pm$ 36.96 ^{###}	62.38 $\pm$ 3.24 ^{###}	129.81 $\pm$ 13.20 ^{###}

Control group: Rouine treatment; Model group: 20 mg $\cdot$ mL⁻¹ HSA induced cell for 24 h; Low-, medium-, high-dose experimental groups: 25, 50, 100 μ mol $\cdot$ L⁻¹ paeonol to HSA induced cells treatment for 24 h; Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.

3 丹皮酚对 HSA 诱导的 HK-2 细胞中 NLRP3、ASC 和 IL-1 β 蛋白水平的影响

与对照组比较,模型组的 NLRP3、ASC 和 IL-1 β 蛋白相对表达水平均显著上调($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,中剂量实验组的 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白相对表达水平均显著下调(均 $P < 0.05$),高剂量实验组的 NLRP3、ASC 和 IL-1 β 蛋白相对表达水平均显著下调($P < 0.05, P < 0.01$)。结果见表 3。

4 丹皮酚对 HSA 诱导的 HK-2 细胞中自噬蛋白 LC3、Beclin-1 和 p62 水平的影响

与对照组比较,模型组的 LC3 II/I 和 Beclin-1 蛋白相对表达水平均显著下调, p62 蛋白相对表达水平显著上调($P < 0.05, P < 0.001$);与模型组比较,中剂量实验的 Beclin-1 蛋白相对表达水平显著上调,高剂量实验组的 LC3 II/I 和 Beclin-1 蛋白相对表达水平均显著上调, p62 蛋白相对表达水平显著下调($P < 0.05, P < 0.01$)。结果见图 1 和表 4。

表 3 丹皮酚对 HSA 诱导的 HK-2 细胞中 NOD 样受体家族蛋白 3(NLRP3)、含 CARD 结构域的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of paeonol on NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3(NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD(ASC), and interleukin-1 β (IL-1 β) protein levels in HSA-induced HK-2 cells($\bar{x} \pm s$)

Group	NLRP3	ASC	IL-1 β
Control	0.89 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.12
Model	1.13 $\pm$ 0.07 *	0.87 $\pm$ 0.19 **	1.46 $\pm$ 0.29 *
Experimental-L	1.00 $\pm$ 0.07	0.81 $\pm$ 0.16	1.10 $\pm$ 0.26
Experimental-M	0.84 $\pm$ 0.12 [#]	0.78 $\pm$ 0.08	0.71 $\pm$ 0.06 [#]
Experimental-H	0.55 $\pm$ 0.16 ^{##}	0.46 $\pm$ 0.05 [#]	0.53 $\pm$ 0.13 [#]

Dose and n refer to table 1; Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

5 丹皮酚对 HSA 诱导的 HK-2 细胞中 PINK1 和 Parkin 的影响

与对照组比较,模型组的 PINK1 和 Parkin 蛋白相对表达水平均显著下调($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,高剂量实验组的 PINK1 和 Parkin 蛋白相对表达水平均显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见图 2 和表 5。

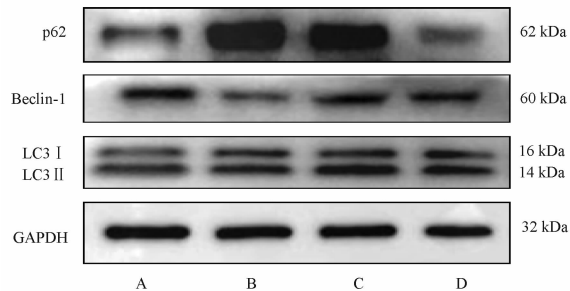


图 1 蛋白质印迹法检测各组 HK-2 细胞自噬相关蛋白相对表达水平

Figure 1 The relative expression levels of autophagy related proteins of HK-2 cells in each groups detected by Western blot

A: Control group; B: Model group; C: Experimental - M group; D: Experimental - H group; p62: Sequestosome 1; LC3 II: Microtubule-associated protein 1 light chain 3 - II.

表 4 丹皮酚对 HSA 诱导的 HK-2 细胞中自噬蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)、自噬效应蛋白 Beclin 1 (Beclin-1)、p62 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of paeonol on the levels of autophagy proteins microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), Beclin-1 and p62 in HSA-induced HK-2 cells($\bar{x} \pm s$)

Group	LC3II/LC3I	Beclin-1	p62
Control	1.08 ± 0.04	0.82 ± 0.07	0.38 ± 0.06
Model	0.90 ± 0.06 *	0.59 ± 0.06 *	1.23 ± 0.11 ***
Experimental - M	1.00 ± 0.02	0.90 ± 0.07 ##	1.05 ± 0.20
Experimental - H	1.05 ± 0.04 #	0.93 ± 0.09 ##	0.62 ± 0.19 #

Dose and n refer to table 1; Compared with control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

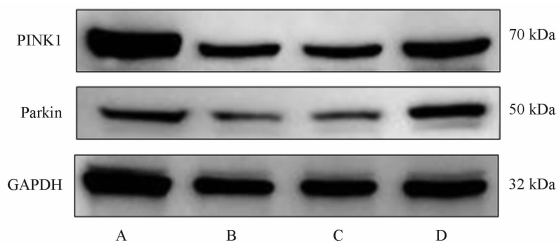


图 2 蛋白质印迹法检测各组 HK-2 细胞线粒体自噬相关蛋白表达

Figure 2 The expression of autophagy related proteins of HK-2 cells in each group detected by Western blot

A: Control group; B: Model group; C: Experimental - M group; D: Experimental - H group; PINK1: PTEN-induced kinase 1.

表 5 丹皮酚对 HSA 诱导的 HK-2 细胞中 PINK1、Parkin 蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of paeonol on PINK1 and Parkin protein levels in HSA-induced HK-2 cells($\bar{x} \pm s$)

Group	PINK1	Parkin
Control	1.10 ± 0.03	0.64 ± 0.06
Model	0.68 ± 0.07 **	0.46 ± 0.05 *
Experimental - M	0.78 ± 0.11	0.58 ± 0.08
Experimental - H	1.03 ± 0.08 ##	0.79 ± 0.12 #

Dose and n refer to table 1; Compared with control group, * $P < 0.05$,

** $P < 0.001$; Compared with Model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

讨 论

白蛋白尿是危害肾功能的独立危险因素,也是 DKD 的独立预测因子^[8]。白蛋白作为蛋白尿中的关键成分^[9],可以通过肾小管上皮细胞的内吞受体 megalin 和 cubilin 摄取,导致 MCP-1、CCL5 和 CXCL8 等趋化因子释放增加^[10]。KIM-1 是一种 1 型跨膜糖蛋白,由近端肾小管上皮细胞显著表达,KIM-1 作为肾损伤生物标志物已在各种动物模型和人类疾病中得到证实^[11]。本实验发现,白蛋白诱导的 HK-2 细胞上清液中 KIM-1 和 MCP-1 分泌增加,并且 KIM-1、MCP-1 mRNA 表达增加,而丹皮酚 25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞上清液中 KIM-1、MCP-1 分泌减少,丹皮酚 50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞中 KIM-1 和 MCP-1 mRNA 表达显著降低。

NLRP3 炎症小体由 NLRP3、ASC 和 pro-Caspase-1 组成,白蛋白能够促进 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1 的转录、组装及蛋白表达,募集的 ASC 把 pro-caspase-1 切割为有活性的 caspase-1, caspase-1 进一步将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 裂解成同源的炎性细胞因子,引起 IL-1 β 等促炎细胞因子成熟分泌^[12],进而促进炎症的发生。本研究发现,丹皮酚 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组能够显著抑制白蛋白所致的 HK-2 细胞中 NLRP3、ASC 和 IL-1 β 蛋白水平的上调,减少细胞上清液中 IL-1 β 和 caspase-1 的分泌。

最近研究发现,自噬通过影响 NLRP3 炎症小体参与 LN 的发生和发展^[13]。如:Tris DBA 等药物可以通过促进自噬,抑制 NLRP3 炎症小体的激活,从而缓解 NLRP3 炎症小体介导的炎症反应对肾的损伤^[14]。LC3 II/I、Beclin-1 和 p62 均为自噬溶酶体相关蛋白。LC3 II/I 是自噬体形成的标志性成分,也是自噬被激活的标志^[15-16]。Beclin-1 是自噬相关基因 Atg6 同源物,对自噬体形成及成熟起着关键作

用^[17-18],随着自噬的激活其表达水平增高。p62 随着自噬体一起降解,当自噬体降解障碍时,其含量会升高,2者相互作用反映自噬水平的改变^[19]。本研究发现,丹皮酚高剂量实验组显著上调自噬蛋白 LC3 II/I、Beclin-1,下调自噬蛋白 p62 的表达,起到促进自噬作用。线粒体自噬是自噬的一种特殊形式,专门负责清除受损的线粒体。线粒体自噬功能发生障碍时,受损线粒体的积累会导致 ROS 大量生成,激活 NLRP3 炎症小体,诱发炎症^[20-21]。PINK1 和 Parkin 是调控线粒体自噬的核心分子,当线粒体受损时,线粒体膜电位下降, PINK1 蛋白在线粒体外膜上稳定积累并激活 Parkin,促进自噬体包裹受损线粒体,使受损线粒体的降解,从而抑制 NLRP3 炎症小体激活^[22]。本研究发现,丹皮酚高剂量实验组显著上调线粒体自噬通路蛋白 PINK1 和 Parkin 蛋白的表达。

本研究提示:丹皮酚可能通过促进白蛋白所诱导的 HK-2 细胞线粒体自噬,抑制 NLRP3 炎症小体激活,减少促炎因子 IL-1 β 的释放,从而缓解肾功能的损伤。

参考文献:

- [1] LI J, LIN Q, SHAO X, *et al.* HIF1 α - BNIP3 - mediated mitophagy protects against renal fibrosis by decreasing ROS and inhibiting activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(3):200.
- [2] ELEFThERiADIS T, PISSAS G, GOLFINOPOULOS S, *et al.* Routes of albumin overload toxicity in renal tubular epithelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11):9640.
- [3] YUAN Q, TANG B, ZHANG C. Signaling pathways of chronic kidney diseases, implications for therapeutics[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):182.
- [4] LIU W J, XU B H, YE L, *et al.* Urinary proteins induce lysosomal membrane permeabilization and lysosomal dysfunction in renal tubular epithelial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 308(6):F639—F649.
- [5] 陈晓宇,席加喜,刘晓霞,等. 丹参酮 II-A 对万古霉素所致肾小管上皮细胞 KIM-1 及 TGF- β 1 表达的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(9):1637—1641.
- [6] JIA Y, ZHENG Z, YANG Y, *et al.* miR-4756 promotes albumin-induced renal tubular epithelial cell epithelial to mesenchymal transition and endoplasmic reticulum stress via targeting Sestrin2[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3):2905—2915.
- [7] 李方,曹建民,翟鹏飞,等. 白藜芦醇干预白蛋白诱导人近端肾小管上皮细胞 HK-2 细胞焦亡相关蛋白的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(14):2164—2169.
- [8] JIA Y, ZHENG Z, YANG Y, *et al.* miR-4756 promotes albumin-induced renal tubular epithelial cell epithelial to mesenchymal transition and endoplasmic reticulum stress via targeting Sestrin2[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3):2905—2915.
- [9] 张想想. 纤维蛋白原/白蛋白比值与初诊系统性红斑狼疮疾病活动度及狼疮肾炎的相关性研究[D]. 安徽 合肥:安徽医科大学, 2023.
- [10] LAI K N, LEUNG J C, CHAN L Y, *et al.* Interaction between proximal tubular epithelial cells and infiltrating monocytes/T cells in the proteinuric state[J]. *Kidney Int*, 2007, 71(6):526—538.
- [11] LIM A I, CHAN L Y, TANG S C, *et al.* Albumin and glycated albumin activate KIM-1 release in tubular epithelial cells through distinct kinetics and mechanisms[J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(10):831—839.
- [12] ELLIOTT E I, SUTTERWALA F S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly[J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1):35—52.
- [13] AI S, LI Y, ZHENG H, *et al.* Global research trends and hot spots on autophagy and kidney diseases: A bibliometric analysis from 2000 to 2022 [J/OL]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1275792. 2023-11-30[2025-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38099142/>.
- [14] WU C Y, HUA K F, CHU C L, *et al.* Tris DBA ameliorates accelerated and severe lupus nephritis in mice by activating regulatory T cells and autophagy and inhibiting the NLRP3 inflammasome[J]. *J Immunol*, 2020, 204(6):1448—1461.
- [15] YORIMITSU T, KLIONSKY D J. Autophagy: Molecular machinery for self eating[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(S2):1542—1552.
- [16] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. *Embo j*, 2000, 19(21):5720.
- [17] WAN Q, CHEN H, XIONG G, *et al.* Artesunate protects against surgery induced knee arthrofibrosis by activating Beclin-1 mediated autophagy via inhibition of mTOR signaling[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 854:149—158. 2019-07-05[2025-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30995437/>.
- [18] XU H D, QIN Z H. Beclin 1, Bcl-2 and autophagy[J/OL]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206:109—126. 2018-11-28[2025-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31776982/>.
- [19] ICHIMURA Y, WAGURI S, SOU Y, *et al.* Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy[J]. *Mol Cell*, 2013, 51(5):618—631.
- [20] WANG H, SHEN M, MA Y, *et al.* Novel mitophagy inducer alleviates lupus nephritis by reducing myeloid cell activation and autoantigen presentation[J]. *Kidney Int*, 2024, 105(4):759—774.
- [21] DUAN P, TAN J, MIAO Y, *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy plays a protective role in albumin overload-induced renal tubular cell injury[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2022, 27(6):184.
- [22] ZUO Z, JING K, WU H, *et al.* Mechanisms and functions of mitophagy and potential roles in renal disease[J/OL]. *Front Physiol*, 2020, 11:935. 2020-08-07[2025-05-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32903665/>.

(本文编辑:马凌云 收稿日期 2025-05-09)