健脾益气方调控 Pink1/Parkin 通路干预人腹膜间皮细胞损伤*

孟立锋[1]，邓湘雨[2]，史伟[1]

1. 广西中医药大学第一附属医院，广西 南宁 530022；2. 广西中医药大学，广西 南宁 530200

摘要：目的：基于 Pink1/Parkin 通路探讨健脾益气方干预人腹膜间皮细胞 HMrSV5 损伤的作用机制。方法：采用转化生长因子－β1（transforming growth factor－β1，TGF－β1）干预 HMrSV5 细胞 48 h 构建损伤模型。将 HMrSV5 细胞分为空白组（10% 胎牛血清）、模型组（10 μg·L^{-1} TGF－β1）、健脾益气方组（10 μg·L^{-1} TGF－β1＋160 mg·L^{-1} 健脾益气方含药血清）、抑制剂组（10 μg·L^{-1} TGF－β1＋160 mg·L^{-1} 健脾益气方含药血清＋50 μmmol·L^{-1} Mdivi－1）。采用 CCK－8 法检测细胞活力，流式细胞术检测细胞凋亡率，JC－1 荧光探针检测线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，MMP）。采用免疫荧光法和 Western blot 法检测细胞 Parkin、Pink1、微管相关蛋白 1 轻链 3－Ⅱ（microtubule－associated protein light chain 3－Ⅱ，LC3－Ⅱ）、P62、cleaved Caspase－3 表达水平。结果：CCK－8 检测显示，与空白组比较，模型组和抑制剂组细胞存活率降低（$P<0.05$）。流式细胞术显示，与空白组比较，模型组细胞凋亡率和 MMP 升高（$P<0.000\ 1$）；与模型组比较，健脾益气方组和抑制剂组细胞凋亡率降低（$P<0.000\ 1$）。与模型组比较，健脾益气方组细胞 MMP 降低（$P<0.000\ 1$）；与健脾益气方组比较，抑制剂组细胞 MMP 升高（$P<0.001$）。免疫荧光显示，与空白组比较，模型组和抑制剂组细胞 Parkin、Pink1、LC3－Ⅱ表达减少，P62、cleaved Caspase－3 表达增加。与模型组和抑制剂组比较，健脾益气方组细胞 Parkin、Pink1、LC3－Ⅱ表达增加，P62、cleaved Caspase－3 表达减少。Western blot 显示，与空白组比较，模型组细胞 Parkin、Pink1 表达水平降低（$P<0.01$），LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ、P62、cleaved Caspase－3 表达水平升高（$P<0.05$）。与模型组比较，健脾益气方组细胞 Parkin、Pink1、LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ表达水平升高（$P<0.05$），P62、cleaved Caspase－3 表达水平降低（$P<0.000\ 1$）。与健脾益气方组比较，抑制剂组细胞 Parkin、Pink1、LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ表达水平降低（$P<0.05$），P62、cleaved Caspase－3 表达水平升高（$P<0.05$）。结论：健脾益气方可能通过激活 Pink1/Parkin 通路，修复线粒体损伤，抑制细胞凋亡，从而发挥干预 HMrSV5 细胞损伤的作用。

关键词：健脾益气方；腹膜间皮细胞；Pink1/Parkin 通路；线粒体自噬；HMrSV5

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.02.041

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)02－0248－07

Jianpi Yiqi Formula Interfering with Human Peritoneal Mesothelial Cell Injury by Regulating Pink1/Parkin Pathway

MENG Lifeng[1]，DENG Xiangyu[2]，SHI Wei[1]

1. The First Affiliated Hospital to Guangxi University of Chinese Medicine，Nanning Guangxi China 530022；
2. Guangxi University of Chinese Medicine，Nanning Guangxi China 530200

Abstract：Objective：To explore the mechanism of action of Jianpi Yiqi Formula in intervening human peritoneal mesothelial cell HMrSV5 injury based on Pink1/Parkin pathway. Methods：HMrSV5 cells were treated with transforming growth factor β1（TGF－β1）for 48 h to construct an injury model. HMrSV5 cells were divided into a blank group（10% fetal bovine serum），a model group（10 μg·L^{-1} TGF－β1），a Jianpi Yiqi Formula group（10 μg·L^{-1} TGF－β1＋160 mg·L^{-1} spleen－healthy formula），and an inhibitor group（10 μg·L^{-1} TGF－β1＋160 mg·L^{-1} Jianpi Yiqi Formula ＋50 μmmol·L^{-1} Mdivi－1）. Cell viability was detected

＊**基金项目**：广西自然科学基金面上项目（2020GXNSFAA297200）；国家中医药管理局第五批全国中医临床优秀人才研修项目｛国中医药人教函〔2022〕1 号｝

by CCK－8 method, apoptosis rate was detected by flow cytometry, and mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by JC－1 fluorescent probe. The expression levels of Parkin, Pink1, microtubule－associated protein light chain 3－II (LC3－II), P62, and cleaved caspase－3 were detected by immunofluorescence and Western blot. Results: CCK－8 assay showed that cell survival was reduced in the model and inhibitor groups compared with the blank group ($P<0.05$). Flow cytometry showed that the apoptosis rate and MMP were elevated in the model group compared with the blank group ($P<0.000\ 1$); the apoptosis rate was reduced in Jianpi Yiqi Formula group and the inhibitor group compared with the model group ($P<0.000\ 1$). Compared with the model group, the cellular MMP was decreased in Jianpi Yiqi Formula group ($P<0.000\ 1$); compared with the spleen－enhancing and qi－beneficial formula group, the cellular MMP was elevated in the inhibitor group ($P<0.001$). Immunofluorescence showed that the expression of Parkin, Pink1 and LC3II decreased, and the expression of P62 and cleaved caspase－3 increased in the cells of the model and inhibitor groups compared with the blank group. Compared with the model and inhibitor groups, the expression of Parkin, Pink1 and LC3II in cells of Jianpi Yiqi Formula group was increased, and the expression of P62 and cleaved caspase－3 was decreased. Western blot showed that the expression levels of Parkin and Pink1 in cells of the model group were decreased compared with those of the blank group ($P<0.01$), and the expression levels of LC3－II/LC3－Ⅰ, P62, cleaved caspase－3 levels were increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression levels of Parkin, Pink1 and LC3II/Ⅰ in cells of Jianpi Yiqi Formula group were increased ($P<0.05$), and the expression levels of P62 and cleaved caspase－3 were decreased ($P<0.000\ 1$). Compared with the group of Strengthening the Spleen and Benefiting the Qi Formula, the expression levels of Parkin, Pink1 and LC3II/Ⅰ in cells of the inhibitor group were decreased ($P<0.05$), and the expression levels of P62 and cleaved caspase－3 were increased ($P<0.005$). Conclusion: Jianpi Yiqi Formula may play a role in interfering with HMrSV5 cell injury by activating the Pink1/Parkin pathway, repairing mitochondrial damage and inhibiting apoptosis.

Key words: Jianpi Yiqi Formula; peritoneal mesothelial cells; Pink1/Parkin pathway; mitochondrial autophagy; HMrSV5

腹膜间皮细胞(peritoneal mesothelial cell, PMC)是构成腹膜的关键细胞群体, PMC 正常生理代谢和分泌对维持腹膜内环境稳态具有重要作用[1]。PMC 结构的完整性和功能的有效性是长期施行腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)的关键。在 PD 期间, PMC 长时间暴露于高葡萄糖水平的高渗环境中, 使 PMC 的线粒体呼吸链与抗氧化物酶活性被抑制, 最终导致 PMC 受损[2]。HMrSV5 细胞分离自人腹膜组织, 属于上皮组织中的单层扁平上皮细胞, 是覆盖于腹膜表面的一层细胞, 具有特异性强、灵敏度高等特点。

线粒体功能异常可导致细胞凋亡, 线粒体自噬是一种选择性清除功能障碍线粒体的调控机制[3]。Parkin 依赖性的线粒体自噬信号通路 Pink1/Parkin 能有效维持线粒体质量和功能的稳定性, 以保证细胞的正常生理功能[4]。因此, 调控 Pink1/Parkin 通路从而影响线粒体自噬过程, 有望成为防治 PMC 损伤的重要途径之一。

本课题组提出“脾气亏虚”为腹膜早期病变的主要病机, 健脾益气方能有效干预腹膜纤维化(peritoneal fibrosis, PF)进程[5]。因此推测, 健脾益气方可能通过调控线粒体自噬起到防治 PMC 损伤的效果。自噬是在多重应激下恢复细胞稳态所必需的调节机制, 而过度自噬会导致细胞受损[6]。为深入探讨健脾益气方防治 PMC 损伤的作用机制, 本研究采用转化生长因子－β1(transforming growth factor－β1, TGF－β1)诱导 HMrSV5 构建细胞损伤模型, 观察健脾益气方对 HMrSV5 细胞活力、凋亡率、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)及 Pink1/Parkin 通路的影响。

1　材料

1.1　动物与细胞　SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只, 体质量 150～180 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物质量合格证号: SYXK 桂 2019－0001。本实验严格按照广西中医药大学伦理委员会管理条例实施, 伦理审批号: DW20221227－039。

人腹膜间皮细胞 HMrSV5 购自上海博尔森生物科技有限公司。

1.2　试剂　健脾益气方颗粒(黄芪 30 g, 党参 15 g, 白术 10 g, 茯苓 15 g, 丹参 15 g, 大腹皮 6 g, 川芎 7 g, 葛根 15 g, 炙甘草 8 g, 江苏江阴天江药业有限公司); Mdivi－1(美国 MCE 公司, 货号: HY－15886); TGF－β1 抗体(江苏 Novoprotein 公司, 货号: CA59); DMEM 培养基、CCK－8 法细胞增殖检测试剂盒、PBS 缓冲液(江苏 KeyGen Biotec 公司, 货号: KGM12800S、KGA317、KGB5001); 胰蛋白酶－EDTA 消化液、30% 丙烯酰胺、Tris－HCl 缓冲液、牛血清白蛋白(北京索莱宝科技有限公司, 货号: T1300、A1010、T1020、A8020); RIPA 细胞裂解液、封闭专用

脱脂奶粉(北京普利莱基因技术有限公司,货号:C1053、P1622);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,货号:IPVH00010);BCA 蛋白定量试剂盒(武汉 Elabscience 公司,货号:E-BC-K318-M);十二烷基硫酸钠(西陇科学股份有限公司,货号:151-21-3);超敏发光液(赛默飞世尔科技公司,货号:RJ239676);β-Actin(北京 TransGen Biotech 公司,货号:HC201);P62(美国 Proteintech 公司,货号:66184-1-lg);LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ(美国 CST 公司,货号:12741T);Parkin、Pink1、cleaved Caspase-3(英国 Abcam 公司,货号:Ab77924、Ab186303、Ab179517);JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(上海贝博生物科技公司,货号:BB-4105);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测剂盒(杭州联科生物技术有限公司,货号:AP101-100-kit)。

1.3　仪器　CO_2 培养箱(上海一恒科学仪器有限公司,型号:BPN-80CW);MF53 倒置荧光显微镜(广州市明美光电有限公司);TD4A 医用离心机(长沙英泰仪器有限公司);多功能酶标分析仪(上海闪谱生物科技有限公司,型号:SuPerMax3100);单道可调移液器[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];5424R 低温高速离心机(Eppendorf);电热恒温水浴锅(上海助蓝仪器科技有限公司,型号:HH-11-2);蛋白垂直电泳仪(北京市六一仪器厂,型号:DYY-6C);恒温摇床(上海领成生物科技有限公司,型号:TC-100B);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon-5200);XH-C 旋涡混合器(常州越新仪器制造有限公司);NovoCyte™流式细胞仪[艾森生物(杭州)有限公司,型号:NovoCyte 2060R]。

2　方法

2.1　健脾益气方含药血清制备　12 只 SD 大鼠随机分为健脾益气方组和阴性对照组,每组 6 只。健脾益气方组大鼠的灌胃剂量为 36 g·kg^{-1},阴性对照组大鼠以等剂量生理盐水灌胃,每日 2 次,持续 5 d。大鼠灌胃前禁食 8~12 h,于末次给药后 1 h,乙醚麻醉大鼠,无菌操作,腹主动脉取血,室温静置 2 h,离心分离血清,56 ℃水浴灭活 30 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,混合分装于 2 mL EP 管中,-20 ℃保存备用,使用前一天转移至 4 ℃冰箱解冻。

2.2　细胞处理　将 HMrSV5 细胞用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U·mL^{-1}、链霉素 100 mg·L^{-1} 的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中进行培养。HMrSV5 细胞培养至状态良好,依据前期研究,使用 10 μg·L^{-1} TGF-β1 处理 48 h 构建细胞损伤模型。将 HMrSV5 细胞分为空白组、模型组、健脾益气方组、抑制剂组。具体操作如下:空白组:采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养。模型组:采用含 10 μg·L^{-1} TGF-β1 的 DMEM 培养基处理 48 h。健脾益气方组:采用含 10 μg·L^{-1} TGF-β1 的 DMEM 培养基处理 24 h 后,加入 160 mg·L^{-1}健脾益气方含药血清处理 24 h。抑制剂组:采用含 10 μg·L^{-1} TGF-β1 的 DMEM 培养基处理 24 h 后,加入 160 mg·L^{-1}健脾益气方和 50 μmmol·L^{-1} Mdivi-1 处理 24 h。

2.3　CCK-8 实验检测细胞活性　HMrSV5 细胞培养至状态良好,于 96 孔板中进行不同处理 24 h 后,更换新鲜培养基,向各孔中加入 10 μL CCK-8 试剂,培养箱中孵育 2 h,使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度值。

2.4　流式细胞术检测细胞凋亡　收集 HMrSV5 细胞(1×10^6 个),用 PBS 洗涤 2 次,1 500 r·min^{-1}离心 3 min。取 300 μL 预冷的 Annexin V-FITC 结合液(1×)重悬细胞,向各孔中加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI;轻微混匀后,室温避光孵育 10 min,采用 NovoCyte 流式细胞仪进行检测。

2.5　JC-1 探针检测细胞线粒体膜电位　收集 HMrSV5 细胞(1×10^6 个),重悬于 1 mL 培养基中,加入等体积 JC-1 工作液,37 ℃孵育 20 min。采用提前 37 ℃预热的 JC-1 染色缓冲液洗涤细胞,用流式细胞仪进行检测。

2.6　免疫荧光法检测细胞 Pink1/Parkin 通路、线粒体自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ、P62 及凋亡标志蛋白 cleaved Caspase-3 表达情况　取处理后的细胞,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.5% Triton X-100 通透 20 min。经 5% BSA 在 37 ℃封闭 30 min 后,分别加入 Parkin、Pink1、LC3-Ⅱ、P62、cleaved Caspase-3 抗体,4 ℃孵育过夜。洗涤后滴加荧光二抗,在复染 DAPI 后封片,荧光显微镜下观察。

2.7　Western blot 法检测细胞 Pink1/Parkin 通路、线粒体自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、P62 及凋亡标志蛋白 cleaved Caspase-3 表达情况　取各组 HMrSV5 细胞,弃去培养基,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白。4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心 10 min,弃沉淀,取上清液移至新的离心管。BCA 蛋白定量试剂盒对总蛋白进行定量,蛋白变性后,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳 1.5 h,后用 300 mA 恒流转膜

1.5 h。PVDF 膜用脱脂奶粉封闭后，一抗 4 ℃孵育过夜，二抗室温孵育 2 h。加入发光液，置于超高灵敏度化学发光成像系统中进行显影。

2.8　统计学方法　采用 Graphpad Prism 9 软件进行数据统计分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，每组实验均至少重复 3 次。若数据符合正态分布，两组间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析；若数据不符合正态分布，采用非参数检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　TGF－β1 刺激时间筛选　基于前期研究给予 10 μg·L^{-1} TGF－β1 处理 HMrSV5 细胞[7]，培养 0 h、24 h、48 h 后，采用 Western blot 法检测 LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ、P62 蛋白表达水平。结果显示，与 0 h 比较，24 h 的 LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ、P62 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。与 24 h 比较，48 h 的 P62 蛋白表达水平升高（$P<0.01$），见表 1、图 1。因此，选择 10 μg·L^{-1} TGF－β1 处理 HMrSV5 细胞 48 h 构建细胞损伤模型。

表 1　TGF－β1 处理 HMrSV5 细胞不同时间的 LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ、P62 蛋白表达水平比较（$\bar{x} \pm s$）

时间	n	LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ	P62
0 h	3	3.976 ± 0.401	0.770 ± 0.035
24 h	3	2.582 ± 0.457*	0.511 ± 0.012**
48 h	3	3.017 ± 0.622	0.797 ± 0.083##

注：与 0 h 比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与 24 h 比较，##$P<0.01$。

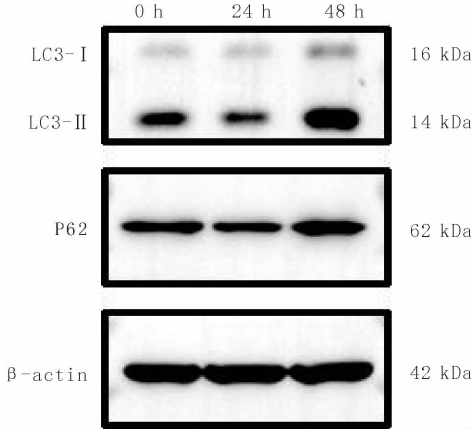


图 1　TGF－β1 处理 HMrSV5 细胞不同时间的 LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ、P62 蛋白条带图

3.2　健脾益气方安全质量浓度筛选　为了确定健脾益气方干预 HMrSV5 细胞的最佳浓度，给予 0、40、80、120、160、200 mg·L^{-1} 健脾益气方含药血清干预 HMrSV5 细胞 24 h，采用 CCK－8 法检测细胞活力。结果显示，与 0 mg·L^{-1} 比较，160 mg·L^{-1} 健脾益气方含药血清干预 HMrSV5 的细胞活力升高（$P<0.05$），见表 2。因此，选择 160 mg·L^{-1} 健脾益气方作为后续实验的药物质量浓度。

表 2　不同浓度健脾益气方含药血清对 HMrSV5 细胞活力的影响（$\bar{x} \pm s$）

质量浓度（ρ/mg·L^{-1}）	n	存活率/%
0	3	100.00 ± 3.37
40	3	111.16 ± 2.90
80	3	110.43 ± 4.82
120	3	105.42 ± 10.48
160	3	112.79 ± 9.04*
200	3	98.17 ± 8.52

注：与 0 mg·L^{-1} 比较，*$P<0.05$。

3.3　各组 HMrSV5 细胞增殖情况变化　CCK－8 检测显示，与空白组比较，模型组和抑制剂组细胞存活率降低（$P<0.05$），见表 3。

表 3　各组 HMrSV5 细胞存活率比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	存活率/%
空白组	5	100.00 ± 1.71
模型组	5	93.43 ± 4.89*
健脾益气方组	5	97.80 ± 4.55
抑制剂组	5	61.94 ± 3.87****

注：与空白组比较，*$P<0.05$，****$P<0.000\ 1$。

3.4　各组 HMrSV5 细胞凋亡率变化　AnnexinV/PI 双参数法能准确地反映细胞凋亡情况，其左下、左上、右上、右下四个象限分别代表活细胞、坏死细胞、晚期凋亡细胞、早期凋亡细胞[8]。流式细胞术显示，与空白组比较，模型组细胞凋亡率升高（$P<0.000\ 1$）。与模型组比较，健脾益气方组和抑制剂组细胞凋亡率降低（$P<0.000\ 1$），见表 4、图 2。

表 4　各组 HMrSV5 细胞凋亡率比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	凋亡率/%
空白组	3	2.38 ± 0.28
模型组	3	6.74 ± 0.77****
健脾益气方组	3	2.28 ± 0.19####
抑制剂组	3	2.88 ± 0.07####

注：与空白组比较，****$P<0.000\ 1$；与模型组比较，####$P<0.000\ 1$。

3.5　各组 HMrSV5 细胞 MMP 变化　流式细胞术显示，与空白组比较，模型组细胞 MMP 升高（$P<0.000\ 1$）。与模型组比较，健脾益气方组细胞 MMP 降低（$P<0.000\ 1$）；与健脾益气方组比较，抑制剂组细胞 MMP 升高（$P<0.001$），见表 5、图 3。

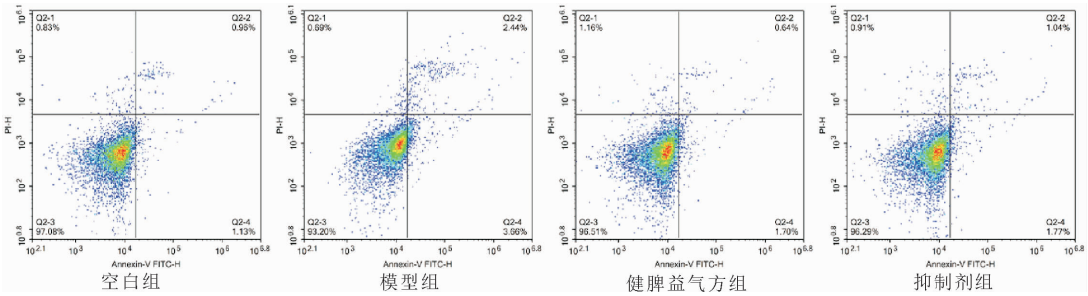


图 2　各组 HMrSV5 细胞凋亡流式图

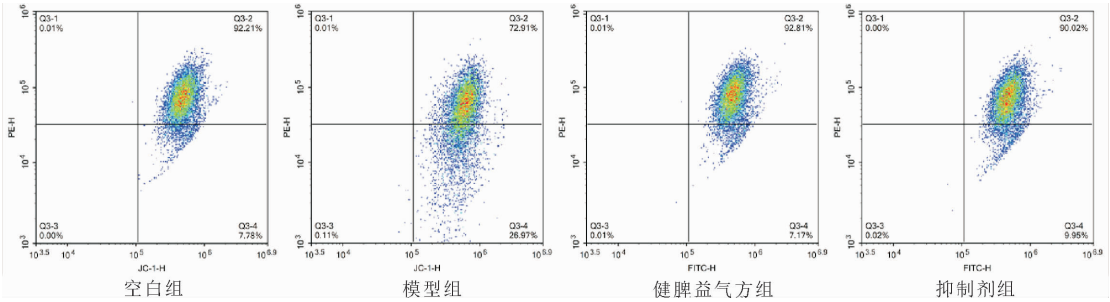


图 3　各组 HMrSV5 细胞线粒体膜电位流式图

表 5　各组 HMrSV5 细胞 MMP 水平比较　$(\bar{x} \pm s)$

组别	n	MMP
空白组	3	8.07 ± 0.40
模型组	3	26.31 ± 0.78****
健脾益气方组	3	7.20 ± 0.03####
抑制剂组	3	10.59 ± 0.57&&&

注：与空白组比较，**** $P < 0.000\ 1$；与模型组比较，#### $P < 0.000\ 1$；与健脾益气方组比较，&&& $P < 0.001$。

3.6　各组 HMrSV5 细胞 Parkin、Pink1、LC3 - Ⅱ、P62、cleaved Caspase - 3 表达情况　免疫荧光显示，与空白组比较，模型组和抑制剂组细胞 Parkin、Pink1、LC3 - Ⅱ表达减少，P62、cleaved Caspase - 3 表达增加。与模型组和抑制剂组比较，健脾益气方组细胞 Parkin、Pink1、LC3 - Ⅱ表达增加，P62、cleaved Caspase - 3 表达减少，见图 4。

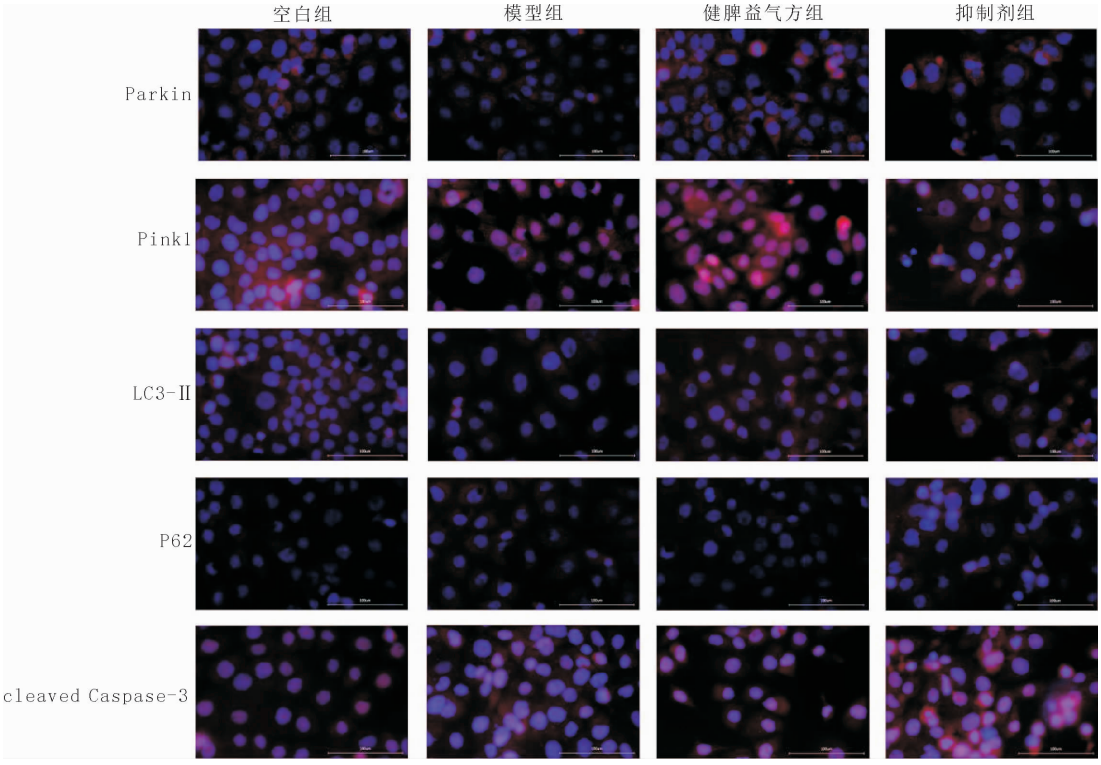
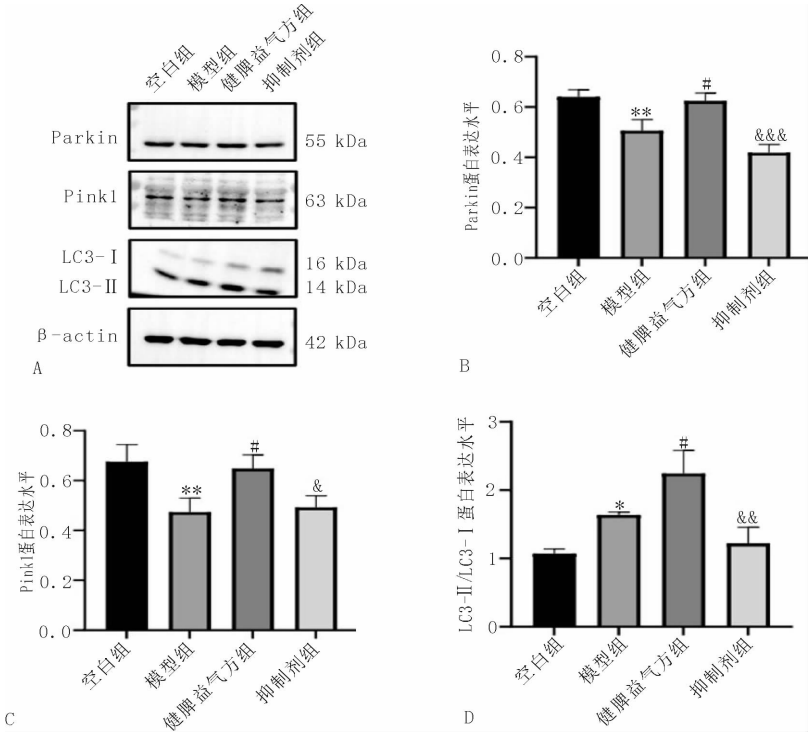


图 4　各组细胞 Parkin、Pink1、LC3 - Ⅱ、P62、cleaved Caspase - 3 免疫荧光图（×400）

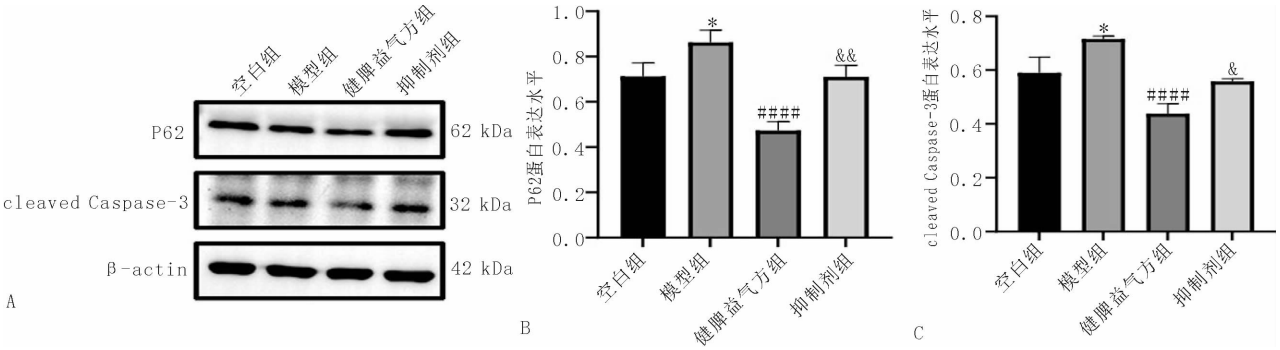
3.7　各组 HMrSV5 细胞 Parkin、Pink1、LC3 - Ⅱ/LC3 - Ⅰ、P62、cleaved Caspase - 3 表达水平变化

Western blot 显示，与空白组比较，模型组细胞 Parkin、Pink1 表达水平降低（$P<0.01$），LC3 - Ⅱ/LC3 - Ⅰ、P62、cleaved Caspase - 3 表达水平升高（$P<0.05$）。与模型组比较，健脾益气方组细胞 Parkin、Pink1、LC3 - Ⅱ/LC3 - Ⅰ表达水平升高（$P<0.05$），P62、cleaved Caspase - 3 表达水平降低（$P<0.000\ 1$）。与健脾益气方组比较，抑制剂组细胞 Parkin、Pink1、LC3 - Ⅱ/LC3 - Ⅰ表达水平降低（$P<0.05$），P62、cleaved Caspase - 3 表达水平升高（$P<0.05$），见图 5、图 6。



注：A：Parkin、Pink1、LC3 - Ⅱ、LC3 - Ⅰ蛋白条带图；B：Parkin 蛋白表达水平比较；C：Pink1 蛋白表达水平比较；D：LC3 - Ⅱ/LC3 - Ⅰ蛋白表达水平比较；与空白组比较，$*P<0.05$，$**P<0.01$；与模型组比较，$\#P<0.05$；与健脾益气方组比较，$\&P<0.05$，$\&\&P<0.01$，$\&\&\&P<0.001$。

图 5　各组 HMrSV5 细胞 Parkin、Pink1、LC3 - Ⅱ/LC3 - Ⅰ蛋白表达水平比较



注：A：P62、cleaved Caspase - 3 蛋白条带图；B：P62 蛋白表达水平比较；C：cleaved Caspase - 3 蛋白表达水平比较；与空白组比较，$*P<0.05$；与模型组比较，$\#\#\#\#P<0.000\ 1$；与健脾益气方组比较，$\&P<0.05$，$\&\&P<0.01$。

图 6　各组 HMrSV5 细胞 P62、cleaved Caspase - 3 蛋白表达水平比较

4　讨论

前期研究发现，“脾气亏虚”是 PF 的早期病机。脾虚证通常伴随着线粒体结构或功能损伤，并与线粒体氧化损伤相关，进而影响能量代谢过程[9]。有研究表明，四君子汤可显著升高脾虚证大鼠骨骼肌线粒体 SOD、GSH - Px、Na^+ - K^+ - ATP 酶、Ca^{2+} - Mg^+ - ATP 酶活性，降低 MDA 含量，表明健脾益气中药可减轻线粒体氧化损伤，调节能量代谢[10]。健脾益气方以健脾名方四君子汤加味而成，方中黄芪、

党参健脾益气,白术、茯苓健脾燥湿,葛根、川芎升阳理气,炙甘草调和诸药。但与 HPMCs 损伤相关的线粒体自噬机制尚不清楚,健脾益气方干预线粒体自噬机制也亟待研究。

TGF－β1 作为一种关键的促纤维化因子,能通过刺激 PMC 释放细胞外囊泡[11],从而促进成纤维细胞活化和 PF 形成。有研究证明,TGF－β1 能有效抑制 Pink1、Parkin 蛋白的表达,导致线粒体自噬机制异常[12]。Pink1/Parkin 信号通路是 Parkin 依赖性的线粒体自噬途径。当线粒体受损时,MMP 下降,使降解 Pink1 的蛋白酶受到抑制,Pink1 聚集在受损线粒体外膜。这一过程可诱导 Parkin 转位到受损线粒体,并与 LC3－Ⅱ结合,促进线粒体与溶酶体的融合,从而去除受损的线粒体[13]。线粒体自噬可以选择性清除功能障碍的线粒体,维持细胞的能量代谢平衡,从而减轻细胞损伤[14]。因此,调控 Pink1/Parkin 通路,激活线粒体介导的自噬活性和适应性保护机制,可能是防治 PMC 损伤的重要途径之一。

本研究发现,在 TGF－β1 的作用下,HMrSV5 细胞存活率明显下降,细胞凋亡率明显上调,MMP 增加;线粒体自噬标志蛋白 Pink1、Parkin 表达明显下调,LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ、P62 表达上调,凋亡蛋白 cleaved Caspase－3 表达上调,说明 TGF－β1 可能通过干扰线粒体内外电荷平衡,引起膜电位去极化,导致线粒体自噬机制功能障碍[12],抑制自噬流活化,从而促进 PMC 的损伤与凋亡。健脾益气方处理后,HMrSV5 细胞存活率明显上调,细胞凋亡率明显下降,MMP 减少;Pink1、Parkin、LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ表达明显上调,P62 和 cleaved Caspase－3 表达明显下调,提示健脾益气方可能通过激活 Pink1/Parkin 通路,调控线粒体自噬,修复 PMC 损伤,提高 PMC 存活率。在健脾益气方处理的基础上,加入线粒体自噬抑制剂 Mdivi－1 后发现,HMrSV5 细胞存活率明显下降,细胞凋亡率明显上升,MMP 增加;Pink1、Parkin、LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ表达明显下调,P62 和 cleaved Caspase－3 表达上调,提示线粒体自噬抑制剂可通过抑制线粒体自噬,从而影响健脾益气方的治疗效果。

综上所述,健脾益气方可能通过激活 Pink1/Parkin 通路,修复线粒体损伤,抑制细胞凋亡,从而发挥干预 HMrSV5 细胞损伤的作用。

参考文献:

[1]邓湘雨,孟立锋,周少华,等. 黄芪干预腹膜纤维化作用机制的研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊,1－11[2024－12－13]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240704.1116.002.html.

[2]朱雪婧,文枫,杨淡跌,等. 高糖腹膜透析液对腹膜间皮细胞 PGC－1α 蛋白表达以及线粒体相关氧化凋亡的影响[J]. 中南大学学报:医学版,2013,38(11):1085－1091.

[3]SEHGAL S A,WU H,SAJID M,et al. Pharmacological progress of mitophagy regulation[J]. Curr Neuropharmacol,2023,21(5):1026－1041.

[4]LIU X Q,HUSSAIN R,MEHMOOD K,et al. Mitochondrial－endoplasmic reticulum communication－mediated oxidative stress and autophagy[J]. Biomed Res Int,2022,2022:6459585.

[5]孟立锋,杨端云,史伟,等. 健脾益气方调控间隙连接蛋白 43 防治 PD 大鼠腹膜损伤的作用机制研究[J]. 湖南中医杂志,2020,36(7):157－161.

[6]GLICK D,BARTH S,MACLEOD K F. Autophagy:cellular and molecular mechanisms[J]. J Pathol,2010,221(1):3－12.

[7]刘小贤,汪卫,王圳,等. 转化生长因子－β1 对大鼠腹膜间皮细胞炎症因子及细胞外基质表达的影响[J]. 浙江医学,2015,37(4):273－277.

[8]管强东,杨健,刘艳青,等. Annexin V/PI 法流式细胞术检测细胞凋亡的影响因素[J]. 生物技术,2022,32(6):710－714.

[9]游艳婷,金丽琴. 中医脾虚证与线粒体的相关性[J]. 温州医科大学学报,2015,45(10):774－778.

[10]胡齐,孙莹,宋雅芳,等. 四君子汤对脾虚大鼠线粒体氧化损伤及能量代谢的影响[J]. 中华中医药学刊,2017,35(8):1972－1976.

[11]HUANG Q,SUN Y X,PENG L,et al. Extracellular vesicle－packaged ILK from mesothelial cells promotes fibroblast activation in peritoneal fibrosis[J]. J Extracell Vesicles,2023,12(7):e12334.

[12]BHATIA D,CHUNG K P,NAKAHIRA K,et al. Mitophagy－dependent macrophage reprogramming protects against kidney fibrosis[J]. JCI Insight,2019,4(23):e132826.

[13]IVANKOVIC D,CHAU K Y,SCHAPIRA A H,et al. Mitochondrial and lysosomal biogenesis are activated following PINK1/parkin－mediated mitophagy[J]. J Neurochem,2016,136(2):388－402.

[14]SU L J,ZHANG J H,GOMEZ H,et al. Mitochondria ROS and mitophagy in acute kidney injury[J]. Autophagy,2023,19(2):401－414.

收稿日期:2024－10－15

作者简介:孟立锋(1982－),男,医学博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:中医药防治肾系病证。

通信作者:史伟(1960－),女,教授,研究方向:中医药防治肾系病证。E－mail:shiw1960@163.com

编辑:刘凯歌