

孔露娇,王心,刘静,等. 金丝桃苷通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对肾病综合征大鼠自噬反应的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 88-95.

Kong LJ, Wang X, Liu J, et al. Influence of hyperoside on autophagy in rats with nephrotic syndrome through AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 88-95.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.012

# 金丝桃苷通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对肾病综合征大鼠自噬反应的影响

孔露娇,王 心,刘 静,郭晓阳,薛明伟\*

(邢台市人民医院肾内科,河北 邢台 054000)

**【摘要】** 目的 探究金丝桃苷(Hyp)对肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)大鼠肾自噬及 AMPK/mTOR/ULK1 通路的影响。方法 32 只 6 周龄 SD 大鼠分为正常组(N 组)、肾病综合征组(NS 组)、金丝桃苷组(Hyp 组, 60 mg/kg Hyp)、金丝桃苷+AMPK 抑制剂组(Hyp+CC 组, 60 mg/kg Hyp+0.2 mg/kg CC), 每组 8 只。除 N 组外, 其余各组大鼠采用一次性尾静脉注射阿霉素(6.5 mg/kg)建立 NS 模型, 模型成功率为 75.0%。Hyp 组大鼠灌胃给予 60 mg/kg 的 Hyp, Hyp+CC 组给予 60 mg/kg 的 Hyp 灌胃和 0.2 mg/kg CC 腹腔注射, N 组和 NS 组给予等量溶剂, 每天 1 次, 连续 14 d。给药结束后, 全自动分析仪检测 24 h 尿液总蛋白(UTP)、血尿素氮(BUN)、血清肌酐(Scr)和白蛋白(ALB)水平; HE 染色观察肾组织病理形态; 透射电子显微镜(TEM)观察肾组织超微结构变化; Western blot 检测肾中自噬、足细胞及 AMPK/mTOR/ULK1 通路蛋白表达; 免疫荧光染色观察自噬体和足细胞的定位。结果 相比于 N 组, NS 组肾小球体积变大、肾小管萎缩或部分消失、基底膜增厚; UTP、BUN、Scr、基底膜厚度、足突宽度及 p-AMPK/AMPK 比值显著增加( $P < 0.05$ ), ALB、LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7、NPHS2 蛋白水平、NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度及 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值显著降低( $P < 0.05$ )。相比于 NS 组, Hyp 治疗可改善肾小球形态, 降低 UTP、BUN、Scr、基底膜厚度、足突宽度及 p-AMPK/AMPK 比值( $P < 0.05$ ), 增加 ALB、LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7、NPHS2 蛋白水平、NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度及 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值( $P < 0.05$ )。相比于 Hyp 组, Hyp+CC 组肾小球体积变大、肾小管萎缩或部分消失、基底膜增厚; UTP、BUN、Scr、基底膜厚度、足突宽度及 p-AMPK/AMPK 比值显著增加( $P < 0.05$ ), ALB、LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7、NPHS2 蛋白水平、NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度及 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值显著降低( $P < 0.05$ )。结论 Hyp 可能通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 通路促进肾细胞自噬活性, 减轻 NS 大鼠的足细胞损伤等肾病变。

**【关键词】** 金丝桃苷; 肾病综合征; AMPK/mTOR/ULK1 通路; 自噬; 足细胞损伤

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0088-08

## Influence of hyperoside on autophagy in rats with nephrotic syndrome through AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway

KONG Lujiao, WANG Xin, LIU Jing, GUO Xiaoyang, XUE Mingwei\*

(Department of Nephrology, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054000, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the influence of hypericin (Hyp) on renal autophagy and the AMPK/mTOR/ULK1 pathway in nephrotic syndrome (NS) rats. **Methods** Thirty-two 6-week-old SD rats were grouped into normal (N), NS, Hyp (60 mg/kg Hyp), and Hyp+CC (60 mg/kg Hyp+0.2 mg/kg CC AMPK inhibitor) groups, with eight rats per group. The NS model was established by one-time injection of adriamycin (6.5 mg/kg) through the tail vein,

**【基金项目】** 邢台市科技计划项目(2019ZC214)。

**【作者简介】** 孔露娇(1986—), 女, 硕士, 研究方向: 肾病综合征及肾衰竭的诊治。E-mail: 448626740@qq.com

**【通信作者】** 薛明伟(1985—), 男, 硕士, 研究方向: 原发性膜性肾病及急性肾衰竭。E-mail: 258417587@qq.com

and the success rate of the model was 75.0%. Rats in the Hyp group were given 60 mg/kg Hyp intragastric administration; rats in the Hyp+CC group were given 60 mg/kg Hyp intragastric administration and 0.2 mg/kg CC intraperitoneal injection; and rats in the N and NS groups were given the same amount of solvent once a day for 14 days. After administration, an automatic analyzer was applied to detect the levels of 24-h urine total protein (UTP), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), and albumin (ALB). HE staining was used to observe the pathological morphology of the kidney tissue. The ultrastructure of the renal tissue was observed by transmission electron microscope. Western blot was applied to detect the expression of autophagy, podocyte, and AMPK/mTOR/ULK1 pathway proteins in the kidney. Immunofluorescence staining was applied to visualize the localization of autophagosomes and podocytes. **Results** Compared with the N group, the NS group had increased glomerular volume; atrophied or partially disappeared renal tubules; a thickened basement membrane; and obviously increased UTP, BUN and Scr levels, basement membrane thickness, foot process width, and p-AMPK/AMPK ratio ( $P < 0.05$ ), while the levels of ALB, LC3-II/I, Beclin-1, Atg5, Atg7 and NPHS2; the relative fluorescence intensity of NPHS2 and Beclin-1; and p-AMPK/AMPK and p-ULK1/ULK1 ratios were obviously decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the NS group, the Hyp treatment group had improved glomerular morphology and decreased UTP, BUN, and Scr levels, basement membrane thickness, foot process width, and p-AMPK/AMPK ( $P < 0.05$ ) ratio, but there was an increase in the protein levels of ALB, LC3-II/I, Beclin-1, Atg5, Atg7, NPHS2; relative fluorescence intensity of NPHS2 and Beclin-1; and p-AMPK/AMPK and p-ULK1/ULK1 ratios ( $P < 0.05$ ). Compared with the Hyp group, the Hyp+CC group's glomerular volume increased; renal tubules atrophied or partially disappeared; basement membrane thickened; and UTP, BUN, Scr levels, basement membrane thickness, foot process width, and p-AMPK/AMPK ratio were obviously increased ( $P < 0.05$ ), whereas the protein levels of ALB, LC3-II/I, Beclin-1, Atg5, Atg7, and NPHS2; relative fluorescence intensity of NPHS2 and Beclin-1; and p-AMPK/AMPK and p-ULK1/ULK1 ratios were obviously decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Hyp may enhance the autophagic activity of renal cells and attenuate renal pathology, such as podocyte injury, in NS rats by activating the AMPK/mTOR/ULK1 pathway.

**[Keywords]** hyperoside; nephrotic syndrome; AMPK/mTOR/ULK1 pathway; autophagy; podocyte injury

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)是由于基底膜受损和肾小球通透性增加等导致的临床综合征,多伴随水肿、蛋白尿和低白蛋白血症等症状,若不能有效纠正,可能导致感染、血栓形成、肾功能衰竭等,威胁患者生命<sup>[1]</sup>。尽管多数患者对类固醇有反应,但是易复发,且长期服用类固醇的患者面临耐药、全身感染、骨质疏松等并发症的风险<sup>[2]</sup>,因此,有必要开发新型治疗药物。据报道,感染、过量药物等病理生理压力会导致足细胞损伤,损害肾小球的滤过功能,使得蛋白质等未经过滤直接进入尿液,导致蛋白尿症状<sup>[3-4]</sup>。与NS相对应的动物模型是目前国际公认的大鼠阿霉素肾性水肿模型,与临床NS患者肾活检结果相似,是经典的研究NS的动物模型,基于该模型可筛选治疗肾病相关中药的药效评价。足细胞丢失后无法通过增殖恢复数量,但在其脱落前及时给予药物干预,能让足细胞恢复到健康状态<sup>[5]</sup>。据报道,自噬功能障碍会导致足细胞损伤,而AMP活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/unc-51样自噬激活激酶1(AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin/unc-51 like autophagy activating kinase 1, AMPK/mTOR/

ULK1)通路的活化可诱导自噬<sup>[6]</sup>,可能是防止足细胞衰老和损伤的保护机制,有望成为NS的治疗策略。金丝桃苷(hyperoside, Hyp)为桔梗科、豆科、金丝桃科等植物的天然活性物,具有抗炎、调节自噬、抗氧化及肾保护等活性<sup>[7]</sup>。研究显示,Hyp可通过抑制线粒体分裂减轻足细胞损伤,改善糖尿病肾病大鼠的肾炎症、肾小球硬化等损伤<sup>[8-9]</sup>,但其对足细胞自噬的调节作用鲜见报道。本研究拟构建NS大鼠模型,探讨Hyp对NS大鼠足细胞自噬和AMPK/mTOR/ULK1通路的影响,以进一步揭示Hyp对NS的治疗机制,为Hyp的开发提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

32只雄性SD大鼠,SPF级,体重190~205g,6周龄(北京维通利华实验动物公司[SCXK(京)2019-0009])。统一在河北医科大学实验动物中心[SYXK(冀)2020-0002]的动物房中分笼饲养,温度(25.0±1.0)℃、湿度(46.0±2.0)%,昼/夜循环设为12h/12h,确保自由获取水和食物。本研究通过河北医科大学实验动物伦理委员会审批(IACUC-

202103008)。实验动物饲养和实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

## 1.2 主要试剂与仪器

金丝桃苷 (Hyp,  $\geq 95\%$  纯度) (美国 Merck 公司, 批号: 20200405); AMPK 抑制剂 Compound C (CC) (美国 MCE 公司, 批号: 20200811); 阿霉素 (每支 10 mg, 深圳万乐药业有限公司, 批号: 1905E1); HE 试剂盒、电泳预制胶 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: C0105S、P0539S); 兔源抗 pAMPK、AMPK、微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、自噬相关蛋白 5 (Autophagy associated protein 5, Atg5)、Atg7、pmTOR、mTOR 抗体 (美国 CST 公司, 批号: #2535、#2532、#4108、#5174、#12994、#8558、#5536、#2983); 兔源 NPHS2、pULK1、ULK1 抗体、小鼠源 Beclin-1 抗体、羊抗兔 (Cy3) 和羊抗小鼠 (Alexa Flour 488) 荧光二抗 (美国 Proteintech 公司, 批号: 20384-1-AP、29006-1-AP、20986-1-AP、66665-1-Ig、SA00009-2、SA00006-1)。带荧光组件的光学显微镜 (德国 Leica 公司); 7100 型全自动生化分析仪、透射电子显微镜 (日本 HITACHI 公司); 全自动生化分析仪 (美国 BECKMAN 公司); 转膜及电泳仪器 (美国 BioRad 公司); 7500 型 RT-qPCR 仪 (美国 ABI 公司); MDF-392 型超低温冰箱 (日本 SONY 公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 NS 大鼠模型建立及分组

将 6 周龄 SD 大鼠适应喂养至 7 周龄, 分为正常组 (N 组)、肾病综合征组 (NS 组)、金丝桃苷组 (Hyp 组, 60 mg/kg Hyp)、金丝桃苷 + AMPK 抑制剂组 (Hyp+CC 组, 60 mg/kg Hyp+0.2 mg/kg CC), 每组 8 只。除 N 组的 8 只外, 其他大鼠一次性尾静脉注射 6.5 mg/kg 阿霉素建立 NS 大鼠模型<sup>[10]</sup>。末次阿霉素注射 14 d 后, 尾静脉采血检测血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 水平, 并收集大鼠 24 h 尿液, 检测尿蛋白含量。以建模大鼠 BUN 和 Scr 水平显著高于 N 组大鼠, 且 24 h 尿蛋白量  $>100$  mg 为模型复制成功。实验共采用 32 只大鼠造模, 在造模过程中有 5 只大鼠死亡, 3 只大鼠造模失败, 共成功造模 24 只大鼠, 模型成功率为 75.0%。Hyp 剂量 (溶在 1% 羧甲基纤维素钠中) 根据文献<sup>[9]</sup>和体表面积法确定为 60 mg/kg 且预实验显示 60 mg/kg Hyp 灌胃可有效减轻 NS 大鼠

肾损伤; 抑制剂 CC 剂量根据文献<sup>[11]</sup>确定为 0.2 mg/kg, N 组和 NS 组给予等量 1% 羧甲基纤维素钠灌胃和生理盐水腹腔注射。每天 1 次, 连续 14 d。

### 1.3.2 样本采集

给药结束后, 收集 24 h 尿液测定尿总蛋白 (urine total protein, UTP); 异氟醚麻醉大鼠后从颈动脉针刺采血, 4℃ 离心 (3000 r/min, 15 min) 收集血清, 分装存在 -80℃ 冰箱用于检测 BUN、Scr 及白蛋白 (albumin, ALB) 水平; 处死大鼠, 剖腹取肾, 剪下左肾纵剖为两半, 一半甲醛固定并做石蜡切片 (5  $\mu\text{m}$ ) 用于 HE 染色和免疫荧光染色, 另一半戊二醛、锇酸固定并做超薄树脂切片用于透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 实验; 剪碎右肾用 RIPA 裂解液提取蛋白, 分装、标记并存在 -80℃ 冰箱用于 Western blot 实验。

### 1.3.3 UTP、BUN、Scr 及 ALB 水平测定

取尿液和血清样本, 采用全自动生化分析仪检测 24 h 尿液总蛋白 (UTP)、BUN、Scr 和白蛋白 (ALB) 水平。

### 1.3.4 HE 染色观察肾组织病理变化

取肾石蜡切片, 进行脱蜡复水后, 采用苏木素染色和伊红染色, 脱水封片后, 在光镜下观察肾组织病理形态变化。

### 1.3.5 TEM 观察肾组织超微结构变化

将肾超薄树脂切片放在铜网上烙片, 用醋酸铀和柠檬酸铅行双重染色, TEM 下观察肾小球超微结构, 并用 Image J 软件分别对每只大鼠某一肾切片电镜图的随机 5 个视野下肾小球基底膜、足细胞突等超微结构进行分析, 计算平均值。

### 1.3.6 Western blot 检测

将 20  $\mu\text{g}$  肾蛋白样品冰上解冻、凝胶孔上样、恒压电泳、恒流转聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 取封闭后的膜与 pAMPK、AMPK、GAPDH、LC3、Beclin-1、Atg5、Atg7、NPHS2、pmTOR、mTOR 特异性一抗孵育 (4℃ 过夜), 之后与二抗孵育 (室温 1.5 h), 用化学发光液显示条带, 在凝胶成像系统的暗盒中曝光拍照, 分析相对灰度 (以 GAPDH 为内参)。

### 1.3.7 免疫荧光染色

肾石蜡切片经烤片、抗原修复、封闭混杂抗原表位等处理后, 滴加小鼠源 Beclin-1、兔源 NPHS2 特异性一抗孵育 (4℃ 过夜), 次日滴加羊抗兔 (Cy3) 和羊抗小鼠 (Alexa Flour 488) 荧光二抗避光孵育

50 min,接着加 DAPI 染细胞核后封片,荧光显微镜下(同样曝光时间)观察拍照。绿色荧光的 Beclin-1<sup>+</sup>小泡为自噬体,红色荧光的 NPHS2<sup>+</sup>细胞为足细胞,Image J 随机统计每只大鼠某一肾切片荧光图的随机 5 个视野肾小球区域的荧光强度,计算平均值。

### 1.4 统计学方法

数据使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析和作图,计量资料用平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Hyp 对生化指标的影响

相比于 N 组,NS 组 UTP、BUN、Scr 水平显著增高,ALB 水平显著降低( $P < 0.05$ );相比于 NS 组,Hyp 组 UTP、BUN、Scr 水平显著降低,ALB 水平显著增高( $P < 0.05$ );相比于 Hyp 组,Hyp+CC 组 UTP、

BUN、Scr 水平显著增高,ALB 水平显著降低( $P < 0.05$ ),见表 1。提示 Hyp 可改善 NS 大鼠肾小球滤过功能。

### 2.2 Hyp 对肾组织形态的影响

如图 1 所示,N 组肾小球、肾小管形态完整、结构清晰;NS 组肾小球体积变大、系膜基质增生、大量肾小管空泡变性;Hyp 组肾形态明显恢复;与 Hyp 组比较,Hyp+CC 组肾病理形态损伤加重,肾小管空泡变性增多。提示 Hyp 可减轻 NS 大鼠肾组织损伤。

### 2.3 Hyp 对肾小球超微结构的影响

如图 2,表 2 所示,TEM 下可见 NS 大鼠基底膜普遍增厚,足细胞肿胀,足突消失、散开或融合。量化分析显示,相比于 N 组,NS 组基底膜厚度和足突宽度显著增加( $P < 0.05$ );相比于 NS 组,Hyp 组基底膜厚度和足突宽度显著降低( $P < 0.05$ );相比于 Hyp 组,Hyp

表 1 各组 UTP、BUN、Scr 和 ALB 水平比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 1 Comparison of UTP、BUN、Scr and ALB levels among groups

组别 Groups	尿总蛋白(mg) UTP	血尿素氮(mmol/L) BUN	血清肌酐( $\mu$ mol/L) Scr	白蛋白(g/L) ALB
正常组 N group	6.28±1.47	4.27±1.05	28.61±2.53	43.89±4.16
肾病综合征组 NS group	45.37±5.46*	6.86±1.16*	46.02±4.17*	19.46±2.53*
金丝桃苷组 Hyp group	20.75±3.52 <sup>#</sup>	4.51±0.73 <sup>#</sup>	31.38±3.76 <sup>#</sup>	37.68±3.17 <sup>#</sup>
金丝桃苷+AMPK 抑制剂组 Hyp+CC group	39.64±4.27 <sup>▲</sup>	6.63±0.94 <sup>▲</sup>	40.42±4.28 <sup>▲</sup>	25.74±3.02 <sup>▲</sup>

注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与肾病综合征组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与金丝桃苷组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with N group, \* $P < 0.05$ . Compared with NS group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ . Compared with Hyp group, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ .

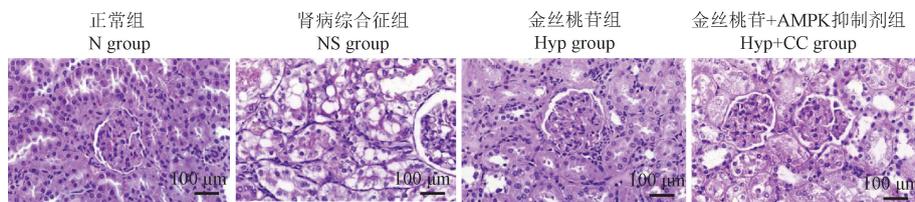


图 1 各组肾组织学观察(HE 染色)

Figure 1 Histological observation of the renal issue among groups (HE staining)

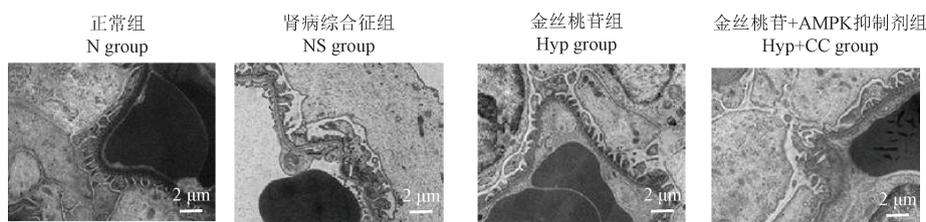


图 2 各组肾小球透射电镜图

Figure 2 Representative image of glomerular transmission electron microscope

+CC 组基底膜厚度和足突宽度显著增高 ( $P < 0.05$ )。提示 Hyp 可减轻 NS 大鼠肾组织肾小球损伤。

## 2.4 Hyp 对自噬蛋白和足细胞蛋白的影响

如图 3 所示, NS 组 LC3-II/I 比值、Beclin-1、Atg5、Atg7 和 NPHS2 蛋白水平显著低于 N 组 ( $P < 0.05$ ); Hyp 组 LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7 和 NPHS2 蛋白水平显著增高于 NS 组 ( $P < 0.05$ ); 而 Hyp + CC 组 LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7 和 NPHS2 蛋白水平显著低于 Hyp 组 ( $P < 0.05$ )。提示 Hyp 可提高 NS 大鼠肾组织自噬水平。

## 2.5 免疫荧光观察自噬体和足细胞在肾小球中的定位

如图 4、图 5 所示, 足细胞采用 NPHS2 抗体标

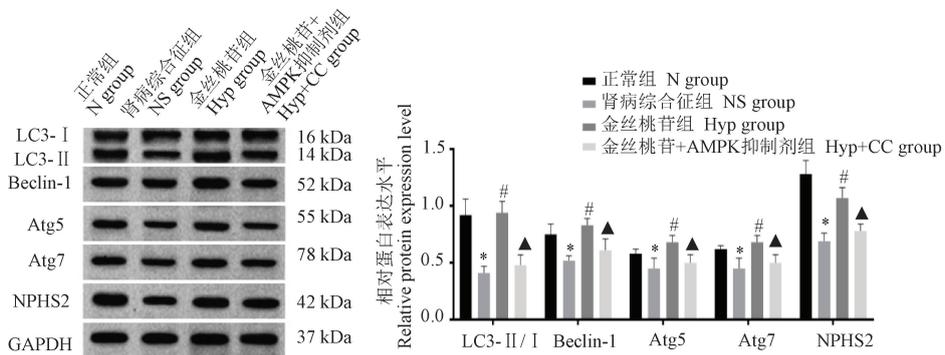
表 2 各组基底膜厚度和足突宽度比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Comparison of glomerular basement membrane thickness and foot process width among groups

组别 Groups	肾小球基底膜厚度 ( $\mu\text{m}$ ) Glomerular basement membrane thickness	足突宽度 ( $\mu\text{m}$ ) Foot process width
正常组 N group	0.22 ± 0.06	0.14 ± 0.03
肾病综合征组 NS group	0.34 ± 0.08*	0.21 ± 0.04*
金丝桃苷组 Hyp group	0.25 ± 0.05 <sup>#</sup>	0.16 ± 0.04 <sup>#</sup>
金丝桃苷+AMPK 抑制剂组 Hyp+CC group	0.31 ± 0.09 <sup>▲</sup>	0.20 ± 0.05 <sup>▲</sup>

注: 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与肾病综合征组比较, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ ; 与金丝桃苷组比较, <sup>▲</sup>  $P < 0.05$ 。

Note. Compared with N group, \*  $P < 0.05$ . Compared with NS group, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ . Compared with Hyp group, <sup>▲</sup>  $P < 0.05$ .



注: 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与肾病综合征组比较, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ ; 与金丝桃苷组比较, <sup>▲</sup>  $P < 0.05$ 。

图 3 Western blot 检测 LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7 及 NPHS2 蛋白表达

Note. Compared with N group, \*  $P < 0.05$ . Compared with NS group, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ . Compared with Hyp group, <sup>▲</sup>  $P < 0.05$ .

Figure 3 The level of LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7 and NPHS2 protein detected by Western blot

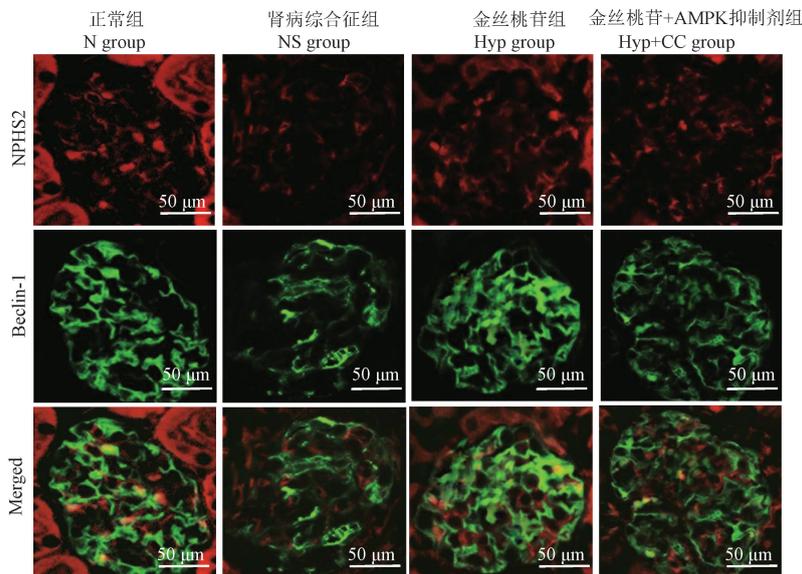


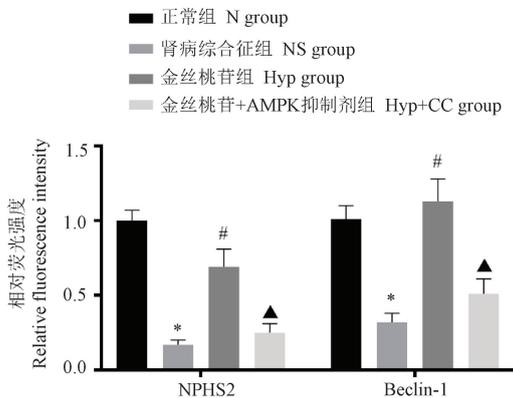
图 4 自噬体和足细胞标记蛋白的免疫荧光染色图

Figure 4 Representative images of immunofluorescence staining for autophagosome and podocyte marker proteins

记,呈红色荧光;自噬体采用 Beclin-1 抗体标记,呈绿色荧光,绿色荧光主要集中在红色荧光附近。NS 组 NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度弱于 N 组 ( $P < 0.05$ );Hyp 组 NPHS2、Beclin-1 蛋白相对荧光强度高于 NS 组 ( $P < 0.05$ );Hyp+CC 组 NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度弱于 Hyp 组 ( $P < 0.05$ )。提示 Hyp 可增强 NS 大鼠肾组织足细胞自噬。

### 2.6 Hyp 对 AMPK/mTOR/ULK1 通路的影响

如图 6 所示,相比于 N 组,NS 组 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值显著降低, p-mTOR/mTOR 比值显著增加 ( $P < 0.05$ );相比于 NS 组, Hyp 组 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 水平显著增加, p-mTOR/mTOR 比值显著降低 ( $P < 0.05$ );相比于 Hyp 组, Hyp+CC 组 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值显著降低, p-mTOR/mTOR 比值显著增加 ( $P < 0.05$ )。提示 Hyp 可激活 NS 大鼠肾组织 AMPK/mTOR/ULK1 通路。

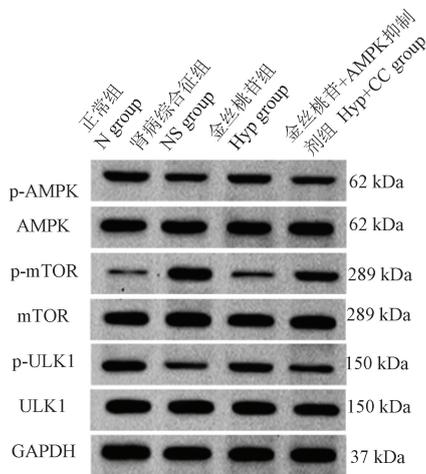


注:与正常组比较, \* $P < 0.05$ ;与肾病综合征组比较, # $P < 0.05$ ;与金丝桃苷组比较, ^ $P < 0.05$ 。

图 5 各组 NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度比较

Note. Compared with N group, \* $P < 0.05$ . Compared with NS group, # $P < 0.05$ . Compared with Hyp group, ^ $P < 0.05$ .

Figure 5 Comparison of relative fluorescence intensity of NPHS2 and Beclin-1 among groups

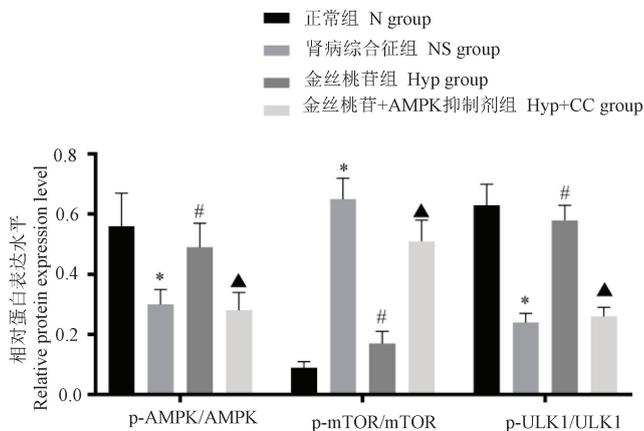


注:与正常组比较, \* $P < 0.05$ ;与肾病综合征组比较, # $P < 0.05$ ;与金丝桃苷组比较, ^ $P < 0.05$ 。

图 6 Western blot 检测 AMPK/mTOR/ULK1 通路蛋白水平

Note. Compared with N group, \* $P < 0.05$ . Compared with NS group, # $P < 0.05$ . Compared with Hyp group, ^ $P < 0.05$ .

Figure 6 Level of AMPK/mTOR/ULK1 pathway protein detected by Western blot



### 3 讨论

NS 肾损伤涉及炎症、氧化、自噬等参与,类固醇等药物为主要治疗药物,但对器官实质性损伤的改善效果有限。阿霉素是一种含醌式结构的抗肿瘤药物,在体内药物代谢酶的作用下,形成半醌自由基,半醌自由基与氧化反应生成超氧阴离子和羟自由基,两者可通过膜的脂质过氧化作用,对肾造成损伤,从而诱发肾小球上皮细胞脂质过氧化反应,破坏滤过膜结构和功能,产生蛋白尿,并导致肾小

管和肾小球发生病理变化<sup>[10]</sup>。尾静脉注射阿霉素是制作 NS 大鼠模型常用的造模方法,具有操作简单、成模较快、动物死亡率低等优点,已被广泛应用于 NS 治疗药物的药理学研究<sup>[12]</sup>。在本研究中,模型组大鼠在造模后第 15 天 24 h 尿蛋白含量、BUN 和 Scr 水平显著高于正常大鼠,表明成功复制阿霉素肾病模型。Hyp 已被证实具有保护肾细胞免于氧化损伤<sup>[13]</sup>、抑制缺血再灌注造成的肾细胞凋亡<sup>[7]</sup>、预防糖尿病相关肾小球基底膜损伤<sup>[14]</sup>等作用,因此 Hyp 可作为肾保护药物。本研究与 Zhou 等<sup>[9]</sup>研究

一致, Hyp 可降低 NS 大鼠 UTP、BUN、Scr 和 ALB 水平,减轻肾小球体积变大、肾小管萎缩、足细胞肿胀、足突消失等损伤,表明 Hyp 可恢复足细胞形态,提高肾小球滤过功能,对 NS 大鼠肾损伤有保护作用。

足细胞为一类有很多足突的无法增殖且高度特化上皮细胞,包围着肾小球基底膜、毛细血管等组成滤过屏障,其稳态和完整性依赖于较高的基础自噬水平<sup>[15]</sup>。研究已指出,自噬水平的变化与足细胞稳态密切相关,并参与多种肾病的发展<sup>[16-17]</sup>。细胞质中的 LC3-I 与磷脂酰乙醇胺结合并转变为膜型 LC3-II,是自噬体膜形成的关键标志<sup>[18]</sup>;在 ATG 家族蛋白的作用下自噬体膜进一步延伸<sup>[18]</sup>;另外, Beclin-1 也可通过招募其他自噬蛋白参与自噬过程的启动<sup>[19]</sup>。因此,LC3-II/I、Beclin-1 和 ATG 蛋白表达增加提示自噬激活。在本研究中,NS 大鼠 LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7 蛋白水平降低;同时足细胞特异蛋白 NPHS2 表达降低。推测 NS 组大鼠的肾自噬活性不足,导致受损细胞器、蛋白质等在足细胞中不断积累,损害足细胞。而给予 Hyp 干预后,LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7 蛋白水平和 NPHS2 表达均升高,提示 Hyp 可增强 NS 大鼠自噬活性,恢复足细胞稳态,减轻足细胞损害。另外,免疫荧光半定量分析显示,肾组织中 NPHS2 和 Beclin-1 的荧光总量均呈 NS 组、Hyp 组、N 组依次增高趋势,与 Western blot 结果趋势相符,且 Beclin-1<sup>+</sup>的绿色自噬体主要分布在 NPHS2<sup>+</sup>的红色足细胞周围,佐证了足细胞是自噬活性增强的主要受益者。

自噬可作为适应性应激,促进对有害物质的清除,减轻细胞损伤或死亡<sup>[20]</sup>。AMPK/mTOR/ULK 通路是重要的自噬通路之一,其中 AMPK 为主要的能量传感器,通过直接磷酸化并活化 ULK1 来维持细胞的能量代谢、促进自噬并维持细胞稳态<sup>[21]</sup>。而 mTOR 也通过磷酸化活化,活化的 mTOR 可抑制 ULK1 的激活,是自噬过程的关键负调节剂<sup>[22]</sup>。AMPK/mTOR 通路已被证实参与肾病大鼠的自噬进程,AMPK/mTOR 通路的激活有利于自噬体的形成、足细胞的恢复和肾病理损伤的改善<sup>[11,23]</sup>。Hyp 对自噬具有双重调节作用,一方面 Hyp 可通过抑制 AMPK-ULK1 介导的自噬来减轻 D-半乳糖诱导的肾衰老和损伤<sup>[24]</sup>;另一方面 Hyp 可通过激活沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, Sirt1)/

AMPK 信号通路,促进自噬,改善糖尿病骨质疏松大鼠骨代谢<sup>[25]</sup>;在皮肤癌中,Hyp 可激活 AMPK 信号,诱导癌细胞自噬和凋亡,抑制增殖<sup>[26]</sup>。本研究中,给予 Hyp 干预后大鼠 p-AMPK/AMPK 和 p-ULK1/ULK1 水平增加,p-mTOR/mTOR 水平降低,结合 Hyp 可增加 LC3-II/I、Beclin-1 和 ATG 蛋白水平的结果,提示 Hyp 可促进 NS 大鼠体内的 AMPK/mTOR/ULK1 自噬通路活化。此外,在 Hyp 的基础上采用 AMPK/mTOR 通路抑制剂 CC 抑制 AMPK/mTOR/ULK1 通路的活化,结果显示,CC 可减弱 Hyp 的足细胞保护作用及促自噬作用,部分抵消 Hyp 对 NS 的改善效果,验证了 AMPK/mTOR/ULK1 通路的活化在 Hyp 保护 NS 大鼠足细胞损伤中发挥了积极作用。本研究结果表明 Hyp 在 NS 中通过激活 AMPK 信号发挥促自噬作用,推测 Hyp 对自噬是发挥抑制或促进作用,可能与疾病种类及病程有关,不同疾病或同一疾病在不同时期其自噬水平是不同的。

综上所述,Hyp 可通过促进肾细胞自噬,减轻足细胞损伤实现对 NS 的治疗作用,其中 AMPK/mTOR/ULK1 通路为其促进自噬的重要靶点。下一步将分离足细胞,进一步探讨 Hyp 对足细胞自噬的作用机制。

#### 参考文献:

- [1] Rodriguez-Ballestas E, Reid-Adam J. Nephrotic syndrome [J]. *Pediatr Rev*, 2022, 43(2): 87-99.
- [2] Iijima K, Sako M, Oba M, et al. Mycophenolate mofetil after rituximab for childhood-onset complicated frequently-relapsing or steroid-dependent nephrotic syndrome [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2022, 33(2): 401-419.
- [3] Barutta F, Bellini S, Gruden G. Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy [J]. *Clin Sci*, 2022, 136(7): 493-520.
- [4] Blaine J, Dylewski J. Regulation of the actin cytoskeleton in podocytes [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1700.
- [5] Müller-Deile J, Schiffer M. Podocyte directed therapy of nephrotic syndrome-can we bring the inside out? [J]. *Pediatr Nephrol*, 2016, 31(3): 393-405.
- [6] 熊哲学,唐明娟,李凝旭. 达格列净通过上调 SIRT1 增强糖尿病肾病大鼠肾脏细胞自噬从而抑制足细胞损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(4): 680-687.
- [7] Wu L, Li Q, Liu S, et al. Protective effect of hyperoside against renal ischemia-reperfusion injury via modulating mitochondrial fission, oxidative stress, and apoptosis [J]. *Free Radic Res*, 2019, 53(7): 727-736.
- [8] Chen Z, An X, Liu X, et al. Hyperoside alleviates adriamycin-

- induced podocyte injury via inhibiting mitochondrial fission [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(51): 88792-88803.
- [ 9 ] Zhou J, Zhang S, Sun X, et al. Hyperoside ameliorates diabetic nephropathy induced by STZ via targeting the miR-499-5p/APC axis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 146(1): 10-20.
- [ 10 ] 包玉龙, 杨瑞, 刘禾, 等. 阿霉素大鼠肾病综合征模型最佳剂量的筛选 [J]. *动物医学进展*, 2018, 39(5): 61-63.
- [ 11 ] 李浩田, 李梦丽, 张臣, 等. 基于 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬途径研究黄芪多糖对急性放射性肠炎大鼠肠黏膜的保护作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(2): 311-317.
- [ 12 ] 马雪莉, 魏锦慧, 马鸿斌. 草薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠足细胞 podocalyxin、 $\alpha$ -actinin-4 的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(12): 49-56.
- [ 13 ] Chen Y, Ye L, Li W, et al. Hyperoside protects human kidney-2 cells against oxidative damage induced by oxalic acid [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(1): 486-494.
- [ 14 ] An X, Zhang L, Yuan Y, et al. Hyperoside pre-treatment prevents glomerular basement membrane damage in diabetic nephropathy by inhibiting podocyte heparanase expression [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6413.
- [ 15 ] Tagawa A, Yasuda M, Kume S, et al. Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2016, 65(3): 755-767.
- [ 16 ] Chen XC, Li ZH, Yang C, et al. Lysosome depletion-triggered autophagy impairment in progressive kidney injury [J]. *Kidney Dis*, 2021, 7(4): 254-267.
- [ 17 ] Sun B, Zhai S, Zhang L, et al. The role of extracellular vesicles in podocyte autophagy in kidney disease [J]. *J Cell Commun Signal*, 2021, 15(3): 299-316.
- [ 18 ] de la Ballina LR, Munson MJ, Simonsen A. Lipids and lipid-binding proteins in selective autophagy [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(1): 135-159.
- [ 19 ] Hill SM, Wrobel L, Ashkenazi A, et al. VCP/p97 regulates beclin-1-dependent autophagy initiation [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(4): 448-455.
- [ 20 ] Li W, He P, Huang Y, et al. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances [J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 222-256.
- [ 21 ] Puustinen P, Keldsbo A, Corcelle-Termeau E, et al. DNA-dependent protein kinase regulates lysosomal AMP-dependent protein kinase activation and autophagy [J]. *Autophagy*, 2020, 16(10): 1871-1888.
- [ 22 ] Xiang H, Zhang J, Lin C, et al. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(4): 569-581.
- [ 23 ] Liu H, Wang Q, Shi G, et al. Emodin ameliorates renal damage and podocyte injury in a rat model of diabetic nephropathy via regulating AMPK/mTOR-mediated autophagy signaling pathway [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14: 1253-1266.
- [ 24 ] Liu B, Tu Y, He W, et al. Hyperoside attenuates renal aging and injury induced by D-galactose via inhibiting AMPK-ULK1 signaling-mediated autophagy [J]. *Aging*, 2018, 10(12): 4197-4212.
- [ 25 ] 王云飞, 王会方, 史栋梁, 等. 金丝桃苷激活 Sirt1/AMPK 自噬通路改善糖尿病骨质疏松大鼠骨代谢和骨结构的机制研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(3): 434-444.
- [ 26 ] Kong Y, Sun W, Wu P. Hyperoside exerts potent anticancer activity in skin cancer [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2020, 25(3): 463-479.

[ 收稿日期 ] 2022-12-20