

引用:黄上,胡梁,郑燕姣,刘劲松,龚雅琪,黄睿,任佳乐.肾复康调控细胞衰老抑制D-Gal诱导的HK-2细胞纤维化作用及机制[J].中医药导报,2025,31(4):42-47,52.

肾复康调控细胞衰老抑制D-Gal诱导的HK-2细胞纤维化作用及机制^{*}

黄上¹,胡梁¹,郑燕姣¹,刘劲松¹,龚雅琪²,黄睿²,任佳乐²

(1.湖南省中西医结合医院/湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙 410006;

2.湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨肾复康对D-半乳糖(D-Gal)诱导的HK-2细胞纤维化模型的干预作用及机制。方法:采用D-Gal处理构建HK-2细胞纤维化模型;采用噻唑蓝(MTT)检测肾复康对D-Gal培养条件下HK-2细胞活力的影响;将HK-2细胞分为对照组、D-Gal模型组、维生素E组(200 μg/mL)、肾复康低剂量组(200 μg/mL)和肾复康高剂量组(400 μg/mL),干预24 h。采用Western blotting法检测α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、I型胶原(Collagen I)及Janus激酶2(JAK2)信号转导-转录活化蛋白3(STAT3)信号蛋白表达;免疫荧光检测核增殖抗原(Ki-67)表达;β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况;实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测细胞白细胞介素-1β(IL-1β)mRNA、IL-6 mRNA及IL-8 mRNA表达水平;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清液中IL-1β、IL-6及IL-8水平。结果:D-Gal模型组细胞存活率低于对照组($P<0.01$);肾复康200、400 μg/mL组细胞存活率高于D-Gal模型组($P<0.01$)。选用200 μg/mL、400 μg/mL分别作为低、高剂量。D-Gal模型组HK-2细胞α-SMA及Collagen I蛋白相对表达量高于对照组($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组、肾复康高剂量组HK-2细胞α-SMA及Collagen I蛋白相对表达量均低于D-Gal模型组($P<0.01$)。D-Gal模型组细胞Ki-67蛋白荧光相对表达量低于对照组($P<0.01$),β-半乳糖苷酶阳性率高于对照组($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组、肾复康高剂量组HK-2细胞Ki-67蛋白荧光相对表达量均高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),β-半乳糖苷酶阳性率均低于D-Gal模型组($P<0.01$)。D-Gal模型组HK-2细胞IL-1β mRNA、IL-6 mRNA及IL-8 mRNA相对表达量均高于对照组($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组、肾复康高剂量组HK-2细胞IL-1β mRNA、IL-6 mRNA及IL-8 mRNA相对表达量均低于D-Gal模型组($P<0.01$)。D-Gal模型组HK-2细胞上清液中IL-1β、IL-6及IL-8水平均高于对照组($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组、肾复康高剂量组HK-2细胞上清液中IL-1β、IL-6及IL-8水平均低于D-Gal模型组($P<0.01$)。D-Gal模型组HK-2细胞JAK2蛋白相对表达量及p-STAT3/ STAT3均高于对照组($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组、肾复康高剂量组HK-2细胞JAK2蛋白相对表达量及p-STAT3/ STAT3均低于D-Gal模型组($P<0.01$)。结论:肾复康抑制D-Gal诱导的HK-2细胞纤维化的机制可能是调控细胞衰老。

[关键词] 肾纤维化;肾复康;细胞衰老;D-半乳糖;α-平滑肌肌动蛋白;β-半乳糖苷酶;Janus激酶2信号转导-转录活化蛋白3信号

[中图分类号] R285.5;R692.6;R255.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)04-0042-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.04.007

Shenfukang (肾复康) Inhibited the D-Gal-Induced HK-2 Fibrosis via Regulating Cell Senescence

HUANG Shang¹, HU Liang¹, ZHENG Yanjiao¹, LIU Jingsong¹, GONG Yaqi², HUANG Rui², REN Jiale²

(1. Hunan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine/Affiliated Hospital of Hunan Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha Hunan 410006, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China)

*基金项目:湖南省自然科学基金面上项目(2023JJ30363);湖南省中医药研究院科研课题重点项目(202015);湖南省中医药科研计划项目重点项目(2021202);湖南省科技厅-临床医疗技术创新引导项目(2021SK51004);湖南中医药大学研究生创新课题(2023CX112)

通信作者:刘劲松,男,副主任医师,研究方向为中西医治肾纤维化

[Abstract] Objective: To investigate the intervention effect and mechanisms of Shenfukang on D-Galactose (D-Gal)-induced fibrosis model in HK-2 cells. Methods: D-Gal was used to establish the fibrosis model in HK-2 cells. The MTT assay was employed to evaluate the influence of Shenfukang on the viability of HK-2 cells under D-Gal culture conditions. HK-2 cells were divided into control group, D-Gal model group, Vitamin E groups (200 μ g/mL), Shenfukang low-dose group (200 μ g/mL) and Shenfukang high-dose group (400 μ g/mL) with the intervention time of 24 h. Western blotting was utilized to detect the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), Collagen I, Janus kinase 2 (JAK2), and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3). Immunofluorescence was conducted to examine Ki-67 expression. β -galactosidase staining was performed to assess cell senescence. Real-time quantitative PCR (RT-PCR) was used to measure the expression levels of interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA, IL-6 mRNA and IL-8 mRNA in cells. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure the levels of IL-1 β , IL-6 and IL-8 in cell supernatants. Results: The D-Gal model group showed lower cell viability than control group ($P<0.01$). The cell viability in the Shenfukang 200 and 400 μ g/mL groups was higher than the D-Gal model group ($P<0.01$). Then doses of 200 μ g/mL and 400 μ g/mL were chosen as the Shenfukang low and high doses, respectively. The relative expression levels of α -SMA and Collagen I proteins in the D-Gal model group HK-2 cells were higher than the control group ($P<0.01$). The vitamin E group, Shenfukang low-dose group and Shenfukang high-dose group showed lower α -SMA and Collagen I protein relative expression levels than D-Gal model group ($P<0.01$). The D-Gal model group showed lower relative fluorescent expression level of Ki-67 protein than control group ($P<0.01$), while higher β -galactosidase positivity rate than control group ($P<0.01$). The vitamin E group, Shenfukang low-dose group and Shenfukang high-dose group showed higher relative fluorescent expression levels of Ki-67 protein than D-Gal model group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while lower β -galactosidase positivity rate than D-Gal model group ($P<0.01$). The D-Gal model group showed higher relative expression levels of IL-1 β mRNA, IL-6 mRNA and IL-8 mRNA than control group ($P<0.01$). The vitamin E group, Shenfukang low-dose group and Shenfukang high-dose group showed lower relative expression levels of IL-1 β mRNA, IL-6 mRNA and IL-8 mRNA than D-Gal model group ($P<0.01$). The D-Gal model group showed higher levels of IL-1 β , IL-6, and IL-8 in the cell supernatants, than control group ($P<0.01$). The vitamin E group, Shenfukang low-dose group and Shenfukang high-dose group showed lower levels of IL-1 β , IL-6, and IL-8 in the cell supernatants, than D-Gal model group ($P<0.01$). The D-Gal model group showed higher relative expression levels of JAK2 protein and p-STAT3/STAT3 than control group ($P<0.01$). The vitamin E group, Shenfukang low-dose group and Shenfukang high-dose group showed lower relative expression levels of JAK2 protein and p-STAT3/STAT3 than D-Gal model group ($P<0.01$). Conclusion: Shenfukang may inhibit the D-Gal-induced fibrosis model in HK-2 cells by regulating cellular senescence.

[Keywords] renal fibrosis; Shenfukang; cellular senescence; D-Galactose; α -smooth muscle actin; β -galactosidase; JAK2-STAT3 signaling

随着人口老龄化问题的日益凸显,慢性肾脏病的发病率在近年来逐年提升^[1]。肾纤维化是多种慢性肾脏病进展过程中的共同病理状态,主要表现为肾脏胶原等多种细胞外基质大量沉积、炎症细胞浸润和肾小管萎缩。随着疾病的进展,肾纤维化可导致肾衰竭^[2]。近年来,越来越多的临床和实验研究表明,肾纤维化损伤程度已经成为反映肾功能下降严重程度和判断预后最重要的指标^[3],因而对于肾纤维化的防治显得尤为重要。细胞衰老是细胞在遭遇缺氧、饥饿或者病理损伤等急性或慢性应激状态下出现的一种病理性反应,表现为细胞清除能力降低,以及细胞产生的错误蛋白质、异常细胞器过度积累,进而导致细胞出现代谢异常、活力明显降低等状态^[4]。研究表明^[5-6],肾脏细胞遭遇多种应激状况极易发生细胞衰老,且衰老的肾小管上皮细胞具有极为活跃的分泌功能,可分泌大量特异性的衰老相关分泌表型 (senescence-associ-

ated secretory phenotype, SASP)。这些SASP能够诱导肌成纤维化,促进多种免疫炎症细胞浸润,并促进上皮细胞向间质细胞转化,进而分泌大量细胞外基质从而加剧肾纤维化^[5-6]。因此靶向肾小管上皮细胞衰老可能是临床治疗肾纤维化的关键过程。细胞衰老由多种信号通路调控,其中最具代表性的信号通路为Janus激酶(JAK)信号转导-转录活化蛋白3 (signal transducers and activators of transcription,STAT)通路^[7]。一方面,JAK-STAT信号在衰老细胞中高度激活,能够感受外源性细胞因子[如白细胞介素-6(IL-6)]进一步调节衰老相关基因的转录,促使细胞大量分泌SASP,造成DNA损伤并引起组织微环境的改变;另一方面,JAK-STAT信号还可通过与其他衰老相关信号通路联系加剧衰老进程^[8]。

中医学认为,脾肾亏虚、浊毒内蕴是肾纤维化和慢性肾脏病的主要病机,故治疗当以扶正和祛邪为主要治则。肾复

康由湖南省中西医结合医院肾脏专家根据数十年临床经验所创,可通过益气健脾、补肾化瘀和泻浊排毒发挥治疗肾纤维化的功效^[9]。前期研究^[9]表明,肾复康能改善大鼠肾纤维化模型肾功能,逆转肾纤维化,但其更深入的机制还不明确。因此,本研究利用D-半乳糖(D-Galactose,D-Gal)处理HK-2细胞构建体外纤维化模型,从细胞衰老角度探讨肾复康抗肾纤维化的作用机制,旨在为后续更深入的研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系 人肾小管上皮细胞HK-2(批号:GA2306005)购于武汉赛维尔公司,培养于含10%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基中,取4~10代用于实验。

1.2 药物与试剂 肾复康(湖南省中西医结合医院/湖南省中医药研究院附属医院,批号:20230624),其中1 g肾复康颗粒含有3.27 g生药。称取肾复康10 g碾碎后加入30 mL超纯水,超声充分提取后,过滤获得滤液,使用冷冻干燥机冷冻干燥成冻干粉。冻干粉使用时采用完全培养基进行溶解配置高浓度储备液(10 mg/mL),采用0.22 μ m的无菌滤器进行过滤分装、待用。10%胎牛血清(苏州依科赛生物,批号:12B192);DMEM/F12(江苏凯基生物公司,批号:20230816);D-Gal(北京索莱宝公司,批号:SG8010);维生素E(上海源叶生物公司,批号:D16N10R102993);噻唑蓝(MTT)试剂盒(江苏凯基生物公司,批号:20230328);蛋白ECL发光液(大连美仑公司,批号:MA0186-2-mar-26J); α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)一抗(批号:10042045)、I型胶原(Collagen I)蛋白一抗(批号:12063291)及 β -Actin蛋白一抗(批号:00094167)均购自武汉Proteintech生物有限公司;核增殖抗原(Ki-67)蛋白一抗(美国Thermo公司,批号:386CBA55); β -半乳糖苷酶染色试剂盒(北京索莱宝公司,批号:230005005);IL-1 β 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:A11621041)、IL-6 ELISA试剂盒(批号:A10396521)及IL-8 ELISA试剂盒(批号:A10683217)均购自杭州联科生物公司;JAK2蛋白一抗(批号:3230)、STAT3蛋白一抗(批号:12640)及Phospho-STAT3蛋白一抗(批号:9145)均购自美国CST公司。

1.3 主要仪器 多功能酶联免疫分析仪(杭州奥盛仪器有限公司,型号:Feyond A300);细胞培养箱(美国Thermo公司,型号:HERAcell 150);冷冻干燥机(宁波新芝生物公司,型号:SCIENTZ-10N/C);倒置显微镜(德国ZEISS公司,型号:AxioVert A1);蛋白电泳仪(型号:Power Pac TM Basic)、凝胶成像系统(型号:Chemi Doc XRS)及RT-PCR仪(型号:CFX96)均购自美国BIO-RAD公司。

1.4 给药浓度的确定 将HK-2细胞消化、计数后,接种于96孔细胞培养板中(6 000个/孔),待细胞贴壁后弃去原有培养基,加入200 μ L含有肾复康0、25、50、100、200、400 μ g/mL的D-Gal培养基。药物作用24 h后,吸去含药培养基,每孔分别加入90 μ L无血清培养基和10 μ L的MTT溶液继续培养2 h。处理后弃培养基,每孔分别加入150 μ L的DMSO溶液,室温震荡10 min,于酶标仪测定在490 nm处的OD490值(D)。最终确定给药浓度为200、400 μ g/mL。

1.5 分组及给药 取HK-2细胞接种于6孔细胞培养板中,1 \times

10 \times 孔,培养贴壁之后分为对照组、D-Gal模型组、维生素E组(200 μ g/mL)、肾复康低剂量组(200 μ g/mL)及肾复康高剂量组(400 μ g/mL)。干预方法:对照组给予常规培养基,D-Gal模型组更换含有D-Gal培养基(D-Gal质量浓度为20 mg/mL),维生素E组更换为D-Gal培养基(20 mg/mL)+维生素E(200 μ g/mL),肾复康低剂量组更换为D-Gal培养基(20 mg/mL)+肾复康(200 μ g/mL),肾复康高剂量组更换为D-Gal培养基(20 mg/mL)+肾复康(400 μ g/mL)。各组细胞均干预24 h,每组处理重复3次。

1.6 观察指标

1.6.1 α -SMA、Collagen I 及JAK2-STAT3蛋白表达水平 采用Western blotting法检测细胞 α -SMA、Collagen I 及JAK2-STAT3蛋白表达。裂解各组细胞分别提取总蛋白。蛋白定量后进行凝胶电泳,经电泳、转膜到PVDF膜上后,封闭后加入 α -SMA、Collagen I、JAK2、p-STAT3、STAT3和 β -Actin蛋白一抗(1:500)过夜孵育。次日,回收蛋白一抗,孵育二抗后进行曝光成像并采用Image J软件进行灰度值定量。

1.6.2 细胞增殖情况 取各组细胞经4%多聚甲醛固定液室温固定,破膜、封闭后,加入蛋白一抗Ki-67(1:200稀释)避光孵育过夜。次日,弃去一抗,孵育荧光二抗,DAPI染核、封片,于荧光显微镜下拍照。Ki-67是一种增殖细胞的相关抗原,能标记增殖周期中的细胞。Ki-67蛋白荧光相对表达量越高,则细胞增殖活性越明显。

1.6.3 细胞衰老情况 细胞经染色固定液固定后,PBS洗涤,加入染色工作液,封板后置于37℃烘箱中孵育24 h。孵育完毕后拍照并计算 β -半乳糖苷酶阳性率。细胞衰老过程中,其内在的 β -半乳糖苷酶特异性表达增加。 β -半乳糖苷酶阳性率越高,则细胞衰老越明显。

1.6.4 IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA及IL-8 mRNA表达水平 采用RT-PCR检测细胞IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA及IL-8 mRNA表达水平。提取各组细胞总RNA,逆转录成cDNA后进行RT-PCR检测。内参为 β -Actin,采用2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

目的基因	序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
IL-1 β	上游:ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA 下游:GTCGGAGATTCTCTAGCTGGA	132
IL-6	上游:ACTCACCTCTCAGAACGAATTG 下游:CCATCTTGGAAAGGTTCAGGTTG	149
IL-8	上游:ACTGAGACTGATTGAGACTGGAC 下游:AACCCCTCTGCACCCAGTTTC	112
β -Actin	上游:CATGTACGTTGCTATCCAGGC 下游:CTCCCTTAATGTCACGCACGAT	250

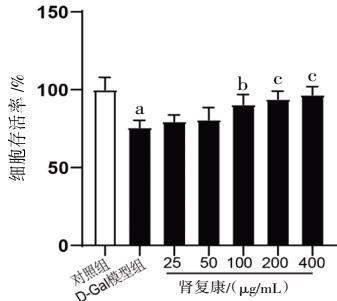
1.6.5 细胞上清液中IL-1 β 、IL-6及IL-8水平 收集各组细胞培养基,采用低温、高速(4℃、13 000 g)离心20 min,分离上清,参考ELISA试剂盒说明书进行操作,最后酶标仪检测吸光值并计算IL-1 β 、IL-6及IL-8水平。

1.7 统计学方法 采用SPSS 27.0进行数据处理,采用Prism 8进行绘图。计量资料符合正态分布且方差齐,以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析(One-way

ANOVA),两两比较采用Turkey检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾复康对HK-2细胞活力的影响 D-Gal模型组细胞存活率低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);肾复康100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞存活率高于D-Gal模型组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见图1)为更好地显示药物的治疗效果,本实验选择效果更为显著的200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别作为肾复康低、高剂量。



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与D-Gal模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

图1 肾复康对HK-2细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

2.2 各组HK-2细胞 α -SMA及Collagen I蛋白相对表达量比较 D-Gal模型组HK-2细胞 α -SMA及Collagen I蛋白相对表达量高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组及肾复康高剂量组HK-2细胞 α -SMA及Collagen I蛋白相对表达量均低于D-Gal模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。(见图2~3)

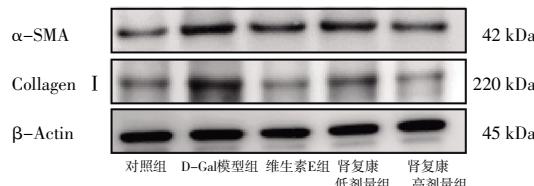
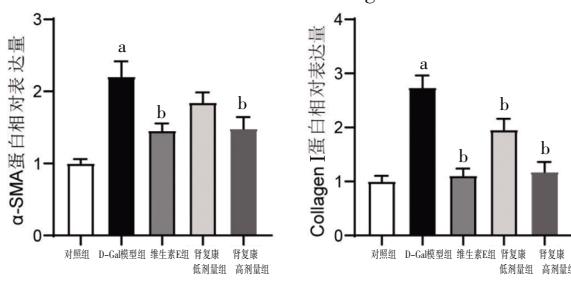


图2 各组HK-2细胞 α -SMA及Collagen I蛋白表达
Western blotting图



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与D-Gal模型组比较,^b $P<0.01$ 。

图3 各组HK-2细胞 α -SMA及Collagen I蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.3 各组HK-2细胞Ki-67蛋白荧光相对表达量比较 D-Gal模型组细胞Ki-67蛋白荧光相对表达量低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组及肾复康高剂量组HK-2细胞Ki-67蛋白荧光相对表达量均高于D-Gal模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见图4~5)

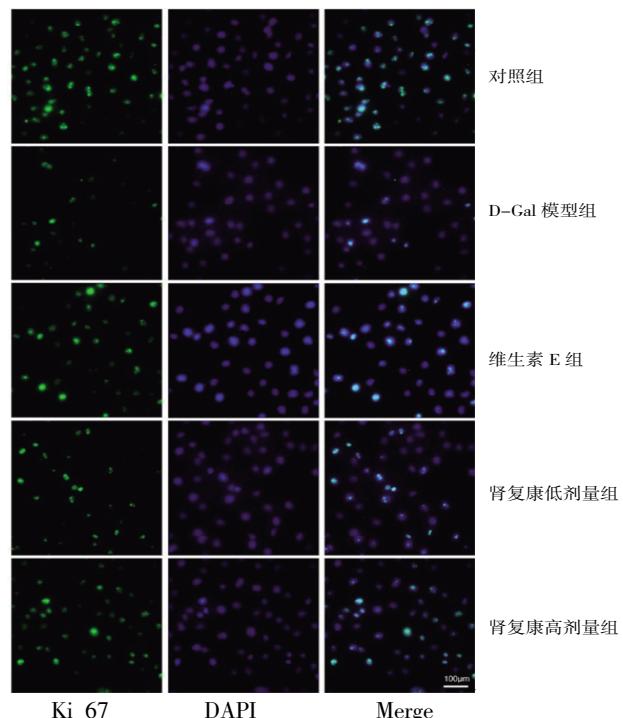
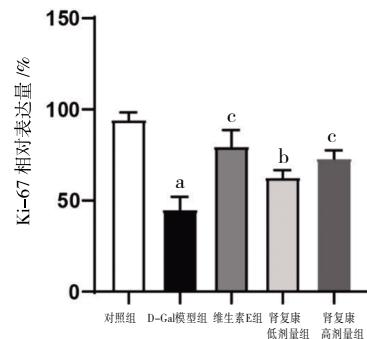


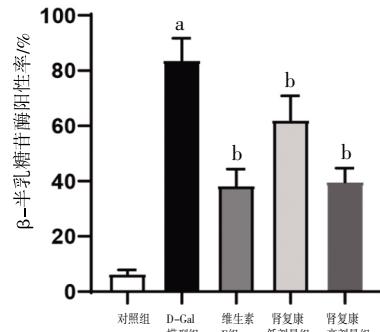
图4 各组HK-2细胞Ki-67蛋白荧光表达图($\times 100$)



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与D-Gal模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

图5 各组HK-2细胞Ki-67蛋白荧光相对表达量比较
($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.4 各组HK-2细胞 β -半乳糖苷酶阳性率比较 D-Gal模型组HK-2细胞 β -半乳糖苷酶阳性率高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组及肾复康高剂量组HK-2细胞 β -半乳糖苷酶阳性率均低于D-Gal模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。(见图6~7)



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与D-Gal模型组比较,^b $P<0.01$ 。

图6 各组HK-2细胞 β -半乳糖苷酶阳性率比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

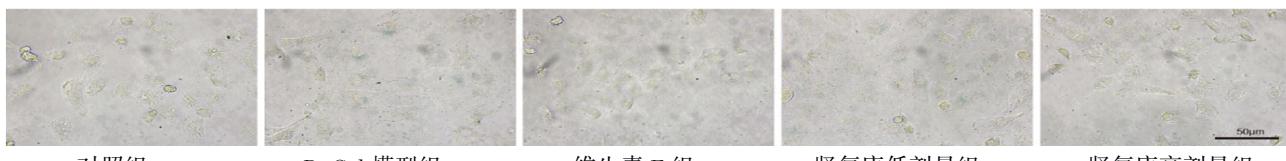
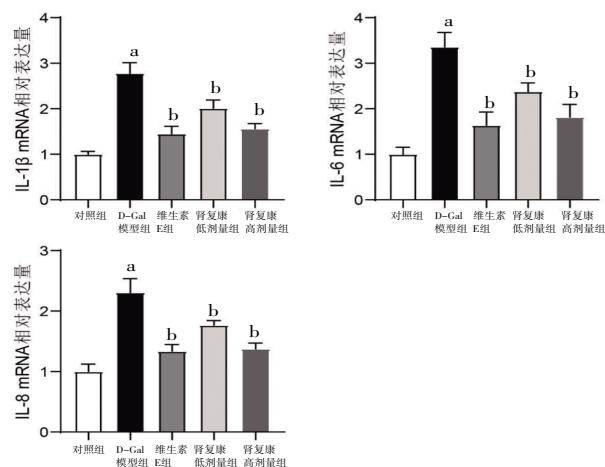


图6 各组HK-2细胞β-半乳糖苷酶阳性表达图 (×400)

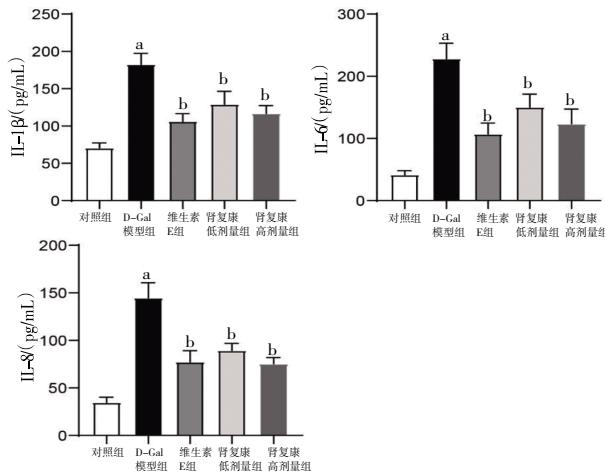
2.5 各组HK-2细胞IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA及IL-8 mRNA相对表达量比较 D-Gal模型组HK-2细胞IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA及IL-8 mRNA相对表达量均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组及肾复康高剂量组HK-2细胞IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA及IL-8 mRNA相对表达量均低于D-Gal模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。(见图8)



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与D-Gal模型组比较,^b $P<0.01$ 。

图8 各组HK-2细胞IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA及IL-8 mRNA相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.6 各组HK-2细胞上清液中IL-1 β 、IL-6及IL-8水平比较 D-Gal模型组HK-2细胞上清液中IL-1 β 、IL-6及IL-8水平高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组及肾复康高剂量组HK-2细胞上清液中IL-1 β 、IL-6及IL-8水平均低于D-Gal模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。(见图9)



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与D-Gal模型组比较,^b $P<0.01$ 。

图9 各组HK-2细胞上清液中IL-1 β 、IL-6及IL-8水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.7 各组HK-2细胞JAK2-STAT3信号蛋白相对表达量比较 D-Gal模型组HK-2细胞JAK2蛋白相对表达量及p-STAT3/STAT3均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);维生素E组、肾复康低剂量组及肾复康高剂量组HK-2细胞JAK2蛋白相对表达量及p-STAT3/STAT3均低于D-Gal模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。(见图10~11)

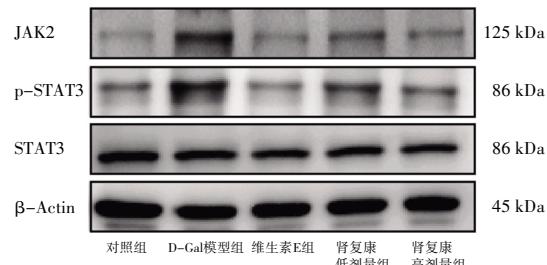
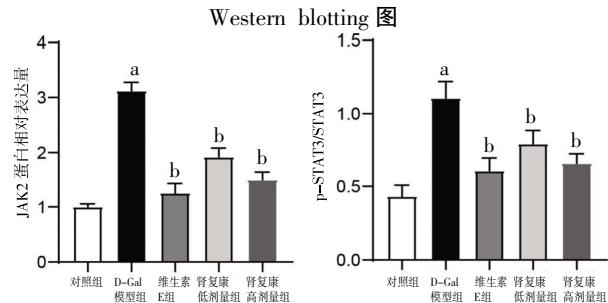


图10 各组HK-2细胞JAK2、p-STAT3及STAT3蛋白表达



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与D-Gal模型组比较,^b $P<0.01$ 。

图11 各组HK-2细胞JAK2蛋白相对表达量及p-STAT3/STAT3比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3 讨 论

肾纤维化是多种肾病进展过程中的重要阶段,最终能够导致终末期肾病^[10-11]。肾纤维化主要发生在肾小球部位,主要表现为细胞外基质分泌增加、免疫细胞浸润及基底膜增厚等过程^[12]。近年来,越来越多的研究表明低氧、高糖及有害物质等应激状态能够直接损伤肾小管上皮细胞的功能,促进肾小管上皮细胞衰老^[13]。细胞衰老是指有丝分裂细胞由于内在或者外在应激而永久退出细胞周期的现象^[14]。衰老细胞一方面自身转化为间质样细胞并分泌大量细胞外基质^[15];另一方面,衰老细胞还能够分泌衰老相关分泌表型,进而吸引大量炎症细胞,进一步加剧局部炎症状态,促进肾上皮细胞向间质样细胞转化,加剧局部纤维化表型^[16-17]。长期恶性循环直接导致肾小管重吸收蛋白等功能下降,加剧肾脏损伤。因此,肾小管上皮细胞衰老可能促进了肾纤维化的进展,抑制肾小管上皮细胞的衰老可能为潜在的逆转肾纤维化的关键机制。

中医药在防治肾病方面具有独特优势,在临床取得了较好的治疗效果。肾纤维化属中医学中“虚劳”“关格”“溺毒”等范畴。病机属于本虚标实,本虚即脾、肾之气虚衰,而标实则

以瘀血、浊毒为主。由于肾脏疾病病程较长,正气受损,造成“久病必虚”。正虚则易致瘀,肾气不足则耗伤津液,虚火上扰可致清从浊化而痰浊内聚,滞而不化,使得瘀血与痰浊互结阻于肾络之内或结于肾络之外,引起络道狭窄或闭塞,日久成积,瘀血与痰浊互相攀援,引起肾脏细胞损伤衰老进而引发肾纤维化。综上,肾间质纤维化的发生发展与虚、瘀、浊、毒密切相关,故治疗多以扶正(补肾、健脾)辅以祛邪(化瘀、泻浊、排毒)为主要治则^[18-19]。而这正与中医学对衰老的病机认识相吻合。因此,众多善长肾脏病治疗的名中医均认为补脾益肾、化瘀排毒法是治疗衰老及肾纤维化的代表性治法^[20]。肾复康为我院肾病专家肖德才教授根据数十年的临床经验所开发,已运用于临床二十余年,用于治疗多种原因导致的慢性肾脏病和肾纤维化疾病。该方中黄芪、太子参益气升阳;生地黄、山茱萸及茯苓健脾补肾;白花蛇舌草、忍冬藤、蝉花及大黄等药清热泻浊,排毒化瘀。诸药配伍,共奏健脾益肾、化瘀排毒、补虚抗衰之功。

D-Gal能够被半乳糖氧化酶分解成过氧化氢和醛糖,最终生成超氧阴离子,是最常见的细胞衰老造模剂^[21-22]。本研究首先考察了细胞活力,结果发现D-Gal处理HK-2细胞后,细胞存活率明显降低且细胞增殖明显减少,细胞呈现出衰老迹象。肾复康干预能够逆转D-Gal介导的细胞存活率下降并促进细胞增殖,提示了肾复康对D-Gal介导的HK-2细胞衰老具有一定的抑制作用。细胞衰老能够介导纤维化表型,因此本研究考察了D-Gal对HK-2细胞纤维化指标表达的影响。结果发现D-Gal能够诱导HK-2细胞纤维化指标 α -SMA和Collagen I蛋白的表达,表明D-Gal能够促进肾小管细胞纤维化转变。肾复康干预后,D-Gal引起的纤维化指标表达明显下降,表明肾复康具有逆转细胞衰老介导的肾纤维化的作用。衰老的细胞分泌大量SASP改变微环境,从而促进肾纤维化的关键过程^[23-24]。LIU T等^[25]研究发现,抑制肾小管上皮细胞的衰老并减少其SASP分泌,能够逆转肾纤维化进程。D-Gal处理HK-2细胞后,细胞增殖明显降低,细胞衰老加剧并分泌IL-1 β 、IL-6及IL-8等多种SASP,表明D-Gal能够促进肾小管上皮细胞衰老并分泌SASP,引起肾脏微环境的改变进而加剧肾纤维化过程。肾复康及维生素E可逆转这一过程,表明肾复康能够通过减少细胞衰老相关SASP分泌逆转肾纤维化。JAK-STAT信号在细胞衰老过程中具有重要作用,JAK-STAT信号活化能够促进细胞衰老、加剧纤维化过程^[26-27],因此干预该信号通路从而抑制细胞衰老并逆转肾纤维化过程,具有重要作用。本研究结果表明,D-Gal处理HK-2细胞后,细胞内的JAK2-STAT3信号通路明显激活,表明D-Gal能够通过激活该信号通路促进细胞衰老加剧肾纤维化表型。肾复康及维生素E能抑制JAK2-STAT3信号通路的活化,表明肾复康可能通过抑制JAK2-STAT3信号通路的活化进而逆转D-Gal引起的肾小管上皮细胞衰老,从而发挥抗肾纤维化的作用。

综上所述,肾小管上皮细胞衰老并分泌SASP是D-Gal诱导肾纤维化疾病进展的关键过程,因而逆转细胞衰老对于肾纤维化的治疗具有重要意义。肾复康能够抑制JAK2-STAT3信号通路进而逆转细胞衰老并减少SASP的分泌,从而抑制肾纤

维化的发生和进展。

参考文献

- [1] TOMKINS M, LAWLESS S, MARTIN-GRACE J, et al. Diagnosis and management of central diabetes insipidus in adults[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107(10):2701-2715.
- [2] BAUER C, MELAMED M L, HOSTETTER T H. Staging of chronic kidney disease: Time for a course correction[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(5):844-846.
- [3] PANIZO S, MARTÍNEZ-ARIAS L, ALONSO-MONTES C, et al. Fibrosis in chronic kidney disease: Pathogenesis and consequences[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(1):408.
- [4] SHMULEVICH R, KRIZHANOVSKY V. Cell senescence, DNA damage, and metabolism[J]. Antioxid Redox Signal, 2021, 34(4):324-334.
- [5] 赵良森,廖勇.细胞衰老及相关抗衰策略研究进展[J].实用皮肤病学杂志,2023,16(6):349-356.
- [6] 熊婕,李秋柏,吴基良,等.木犀草素显著降低hUC-MSCs衰老相关分泌表型[J].湖北科技学院学报(医学版),2024,38(2):93-98.
- [7] ZHANG W, XU M J, CHEN F Y, et al. Targeting the JAK2-STAT3 pathway to inhibit cGAS-STING activation improves neuronal senescence after ischemic stroke [J]. Exp Neurol, 2023, 368:114474.
- [8] 肖德才,陈良春,马赛,等.清热利湿、活血解毒法治疗难治性肾病综合征18例[J].湖南中医杂志,1993,9(5):28.
- [9] 齐亮,刘劲松,周琳,等.肾复康对TGF- β 1诱导的大鼠成纤维细胞转分化模型的抑制作用及机制[J].中药药理与临床,2021,37(4):143-147.
- [10] 田江明,李均.丹参及其单体成分防治肾纤维化的机制研究进展[J].中医药导报,2023,29(5):204-207.
- [11] XIANG Y, YUAN Z, DENG Q C, et al. Potential therapeutic medicines for renal fibrosis: Small-molecule compounds and natural products[J]. Bioorg Chem, 2024, 143:106999.
- [12] 崔方强,江心灿,王悦芬,等.保肾通络方对糖尿病肾病小鼠肾小管间质纤维化及上皮细胞间充质转分化的影响[J].陕西中医,2024,45(8):1011-1015,1025.
- [13] XU L, WANG J, YU H Y, et al. GLIS1 alleviates cell senescence and renal fibrosis through PGC1- α mediated mitochondrial quality control in kidney aging[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 209(Pt 1):171-184.
- [14] 王学,任丽君,张英为,等.细胞衰老分子机制的研究进展[J].中国老年学杂志,2023,43(1):250-253.
- [15] HUANG W J, HICKSON L J, EIRIN A, et al. Cellular senescence: The good, the bad and the unknown [J]. Nat Rev Nephrol, 2022, 18(10):611-627.

(下转第52页)

- fibrosis via downregulating YAP/LOXL2 pathway[J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1):195–201.
- [13] LIAO Y, ZHOU C X, DUAN Y H, et al. Liver sinusoidal endothelial S1pr2 regulates experimental liver fibrosis through YAP/TGF- β signaling pathway[J]. *FASEB J*, 2023, 37(5):e22905.
- [14] SHAN S L, LIU Z X, LIU Z D, et al. MitoQ alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice through regulating JNK/YAP pathway[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2022, 11(5):852–862.
- [15] 瞿旖妮,辛晓丽,周慧君.汉黄芩素通过调节Hedgehog-YAP信号通路减轻肝硬化大鼠的肝纤维化[J].解剖学杂志,2024,47(1):35–39,80.
- [16] SLADITSCHEK-MARTENS HL, GUARNIERI A, BRUMANA G, et al. YAP/TAZ activity in stromal cells prevents ageing by controlling cGAS-STING[J]. *Nature*, 2022, 607(7920):790–798.
- [17] MATTHEW FRANKLIN J, WU Z M, GUAN K L. Insights into recent findings and clinical application of YAP and TAZ in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(8): 512–525.
- [18] WANG H C, YU H, HUANG T Y, et al. Hippo-YAP/TAZ signaling in osteogenesis and macrophage polarization: Therapeutic implications in bone defect repair[J]. *Genes Dis*, 2023, 10(6):2528–2539.
- [19] 杨茂辉,冉恒泉,王何斌,等.汉黄芩素调节Hippo/YAP信号通路对肝硬化大鼠肝纤维化的影响[J].湖南中医药大学学报,2024,44(7):1160–1166.
- [20] 潘火珍,廖明,宋鹏书.YAP/TAZ调控多信号通路参与肝纤维化的发生与发展[J].中南大学学报(医学版),2018, 43(3):313–319.
- [21] 赵晓璐,张春艳,高晓阳,等.Hippo/YAP参与肝纤维化发生发展的作用机制[J].临床肝胆病杂志,2022, 38(7): 1654–1657.

(收稿日期:2024-09-03 编辑:李海洋)

(上接第47页)

- [16] LEVI N, PAPISMADOV N, SOLOMONOV I, et al. The ECM path of senescence in aging: Components and modifiers[J]. *FEBS J*, 2020, 287(13):2636–2646.
- [17] IJIMA S, SAITO Y, NAGAOKA K, et al. Fisetin reduces the senescent tubular epithelial cell burden and also inhibits proliferative fibroblasts in murine lupus nephritis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:960601.
- [18] 陈驰,吕静.中医药防治慢性肾脏病肾间质纤维化的研究进展[J].湖南中医杂志,2024,40(1):182–185.
- [19] 樊博雅,杨康,杨洪涛.肾间质纤维化的机制与中西医干预研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2020,21(4): 363–365.
- [20] 朱婧婧,何伟明,高坤,等.衰老与肾纤维化之间相关机制的研究进展[J].中华中医药学刊,2021,39(3):124–128.
- [21] 侯俊宇,李明慧,许梦然,等.北柴胡多糖对D-gal诱导的HK-2细胞氧化损伤的保护作用[J].吉林大学学报(医学版),2022,48(1):65–73.
- [22] ZHANG Y, NI X R, WEI L, et al. METTL3 alleviates D-gal-induced renal tubular epithelial cellular senescence via promoting miR-181a maturation[J]. *Mech Ageing*

Dev, 2023, 210:111774.

- [23] MAUS M, LÓPEZ-POLO V, MATEO L, et al. Iron accumulation drives fibrosis, senescence and the senescence-associated secretory phenotype[J]. *Nat Metab*, 2023, 5(12):2111–2130.
- [24] 刘星辰,王璟,刘博阳,等.PTH缺失通过诱导肾脏细胞衰老和衰老相关分泌表型分子表达而加速肾脏纤维化[J].现代生物医学进展,2024,24(16):3006–3012.
- [25] LIU T, YANG Q F, ZHANG X, et al. Quercetin alleviates kidney fibrosis by reducing renal tubular epithelial cell senescence through the SIRT1/PINK1/mitophagy axis [J]. *Life Sci*, 2020, 257:118116.
- [26] 韦静,吕宏祥.血管紧张素Ⅱ活化JAK2/STAT3信号上调CXCL4的表达促进RAW264.7巨噬细胞衰老[J].免疫学杂志,2023,39(4):326–331.
- [27] JI T Y, CHEN M H, SUN W W, et al. JAK-STAT signaling mediates the senescence of cartilage-derived stem/progenitor cells[J]. *J Mol Histol*, 2022, 53(4):635–643.

(收稿日期:2024-08-25 编辑:蒋凯彪)