

Wnt/ β -catenin 通路在肾衰康灌肠液抑制 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤的作用

邓荣荣¹, 罗苾怡¹, 叶乃菁¹, 吴新萍¹, 王意君², 李明权^{3*}
(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2. 成都市第一人民医院内分泌科, 四川 成都 610000; 3. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610075)

摘要: **目的** 观察肾衰康灌肠液(大黄、丹参、红花、黄芪)含药血清对缺氧/复氧损伤人肾小管上皮细胞的保护作用,并探讨其对 Wnt/ β -catenin 通路的影响。**方法** 将新西兰大白兔随机分为对照组、肾衰康高剂量组、PBS 组,分别予相应药物灌肠 3 d 后取血清。以对照组、PBS 组、肾衰康高剂量组、肾衰康中剂量组、肾衰康低剂量组兔血清分别处理缺氧/复氧 HK-2 细胞。以 ROS 荧光探针检测 H/R 损伤发生。CFSE/PI 法、流式细胞分析联合 Annexin V-FITC/PI 法分析细胞的损伤/凋亡情况。荧光定量 PCR 技术考察药物对 *Wnt4*、 *β -catenin* mRNA 表达的影响。**结果** 与造模前相比,造模后细胞内 ROS 表达的荧光强度明显增高。CFSE/PI 双染显示,与对照组和 PBS 组相比,肾衰康高、中、低剂量组细胞死亡率明显降低,且以肾衰康高剂量组死亡率最低。Annexin V-FITC/PI 联合流式细胞术检测显示,与对照组 [12 h, (45.6 $\pm$ 2.2)%] 和 PBS 组 [12 h, (41.6 $\pm$ 0.7)%] 相比,肾衰康低、中、高剂量组均有明显的凋亡/死亡抑制 [12 h, 低剂量组 (14.8 $\pm$ 0.3)%, 中剂量组 (10.3 $\pm$ 0.6)%, 高剂量组 (12.9 $\pm$ 0.9)%]。荧光定量 PCR 结果显示,肾衰康灌肠液含药血清对 *Wnt4* mRNA 表达有显著上调作用,对 *β -catenin* mRNA 表达有显著双向调节作用 ($P < 0.05$)。**结论** 肾衰康灌肠液含药血清对缺氧/复氧损伤 HK-2 细胞的凋亡/死亡有明显的抑制效果,其作用可能与激活 Wnt/ β -catenin 通路有关。

关键词: 肾衰康灌肠液; 缺氧/复氧; H/R; HK-2 细胞; Wnt/ β -catenin

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)05-1036-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.006

Effects of Shenshuaikang Enema Liquid on the Wnt/ β -catenin pathway for inhibiting the hypoxia reoxygenation injury in HK-2 cells

DENG Rong-rong¹, LUO Xin-yi¹, YE Nai-jing¹, WU Xin-ping¹, WANG Yi-jun², LI Ming-quan^{*}
(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. The First People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610000, China; 3. The Hospital Affiliated to Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the protective effect of serum containing Shenshuaikang Enema Liquid (*Rhei Radix et Rhizoma*, *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Carthami Flos*, *Astragali Radix*) on HK-2 cells injured by hypoxia/reoxygenation (H/R) and its effect on Wnt/ β -catenin pathway. **MEHTODS** Six New Zealand white rabbits randomly divided into control group, Shenshuaikang high dose group and PBS group ($n = 2$) were treated accordingly for serum collection after 3 days' enema. The HK-2 cells injured by hypoxia/reoxygenation were then administered with serum of rabbits from the control group, PBS group, Shenshuaikang groups (high dose, middle dose and low dose groups due to the differently diluted concentrations) respectively. The H/R damage was determined by ROS fluorescence probe, the cellular damage/apoptosis were analyzed by CFSE/PI method and flow cytometry combined with Annexin V-FITC/PI, and the investigation on effects of drugs on expression of

收稿日期: 2017-10-11
基金项目: 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项 (JDZX2012127)
作者简介: 邓荣荣 (1984—), 女, 博士生, 主治医师, 讲师, 从事中西医结合临床 (肾脏病) 研究。E-mail: 715419876@qq.com
* 通信作者: 李明权 (1964—), 男, 博士生导师, 主任医师, 从事中西医结合临床 (肾脏病) 研究。Tel: 13880984985, E-mail: lmq863@126.com

Wnt4 mRNA and β -catenin mRNA were accomplished by fluorescence quantitative PCR. **RESULTS** The fluorescence intensity of intracellular ROS expression was significantly increased after modeling. CFSE/PI double staining showed that the variant Shenshuaikang dose groups displayed obvious proportional mortality superiority to either the control group or PBS group, and the high dose group achieved the lowest mortality. Annexin V-FITC/PI and flow cytometry showed that, at 12 h, compared with the control group (45.6 ± 2.2)% and PBS group (41.6 ± 0.7)%, Shenshuaikang groups [low dose group (14.8 ± 0.3)%, middle dose group (10.3 ± 0.6)%, high dose group (12.9 ± 0.9)%] obviously inhibited apoptosis/death. Shenshuaikang Enema Liquid medicated serum demonstrated its significant effect on the increase of the *Wnt4* mRNA expression and a dual-directional regulation on the expression of β -catenin mRNA by quantitative PCR ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Inhibition of the apoptosis/death of HK-2 cells with hypoxia/reoxygenation injury due to the serum containing Shenshuaikang Enema Liquid suggests the agent's influence on the activation of Wnt/ β -catenin pathway.

KEY WORDS: Shenshuaikang Enema Liquid; hypoxia/reoxygenation; H/R; HK-2; Wnt/ β -catenin

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是临床上常见的病证^[1]。而缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 引起的急性肾小管坏死 (acute tubular necrosis, ATN) 是导致 AKI 发生的主要因素之一。近数十年来, 虽然血液净化技术和危重症医学等发展迅速, 但现代医学对 ATN 仍缺乏有效的治疗方法, 故 ATN 的病死率一直高达 50% 以上^[2]。而肾衰康灌肠液是目前以 AKI 为适应症的唯一上市应用的中成药, 临床疗效确切, 具有减轻肾小管坏死、促进肾小管上皮细胞再生和修复等作用。但其具体作用机制及靶点尚需深入研究。

研究显示, Wnts 信号蛋白家族在肾脏的生长发育阶段起重要作用^[3]。其中 Wnt/ β -catenin 信号通路在 AKI 过程中活化^[4], 可促进肾小管上皮细胞的修复及增殖^[5]。本研究采用人肾小管上皮细胞株 (HK-2), 建立缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型, 模拟在体肾小管上皮细胞缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 的病变过程, 从细胞水平观察肾衰康灌肠液含药血清对缺氧/复氧损伤 HK-2 细胞的保护作用, 以及对 Wnt/ β -catenin 通路的影响, 以探索肾衰康灌肠液的治疗机制及作用靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 肾衰康灌肠液 (海南天元制药厂, 国药准字 Z32060048); ROS 测定试剂盒 Cellular ROS/Superoxide Detection Assay Kit, 购自英国 Abcam 公司 (货号 Ab39476); 逆转录试剂盒购于 Thermo scientific (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit); 荧光定量试剂盒购于罗氏公司 (Fast Start Essential DNA Green Master); *Wnt4* 购自英国 Abcam 公司 (货号 Ab91226); β -catenin 购自

英国 Abcam 公司 (货号 Ab76005); 荧光定量 PCR 仪 (LC-96, 罗氏公司, 瑞士)。

1.2 实验动物及分组 健康新西兰大白兔 6 只, 雌雄各半, 体质量 2.0 ~ 2.2 kg, 动物合格证号 SCXK (川) 2013-17, 购自成都达硕实验动物公司。购买后分笼饲养于成都中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室, 保持室内相对湿度 (60 ± 5)%, 温度 20 ~ 22 $^{\circ}\text{C}$, 12 h 明暗自动切换, 自由饮水, 标准饲料饲养。适应性喂养 1 周后, 按体质量随机分为对照组、肾衰康高剂量组和 PBS 组, 每组 2 只, 共 3 组。

1.3 肾衰康灌肠液兔血清的制备 对照组予正常喂养不予灌肠; 高剂量组给予肾衰康灌肠液 9.617 mL/(kg · d) 灌肠, 药量按人与动物体表面积换算得出; PBS 组给予 PBS 溶液 9.617 mL/(kg · d) 灌肠。每天灌肠量分 4 次完成, 并于第 4 天上午灌肠 1 次结束后, 立即对 3 组大白兔分别采血, 离心取上清, 过滤除菌, 得到对照组、肾衰康高剂量组、PBS 组 3 组兔血清。然后以肾衰康高剂量组血清与对照组血清按比例混合, 制备肾衰康中剂量组血清 (含肾衰康高剂量组血清 50%) 和肾衰康低剂量组血清 (含肾衰康高剂量组血清 25%)。将最终得到的对照组、PBS 组、肾衰康高剂量组、肾衰康中剂量组、肾衰康低剂量组 5 组血清冷存备用。

1.4 H/R 损伤 HK-2 细胞的建立及分组 用含 10% 胎牛血清的 DM EM/F12 培养液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下传代培养 HK-2 细胞, 同步化 24 h 后, 将细胞的培养皿加盖并胶带密封 5 h, 以模拟在体肾小管上皮细胞缺血再灌注的病变过程^[6], 然后去盖及胶带, 并随机分为 6 组。以其中 1 组进行细胞内 ROS 检测。另 5 组细胞分别加入对

照组、PBS 组、肾衰康高剂量组、肾衰康中剂量组、肾衰康低剂量组 5 组血清培养，并检测相关指标。

1.5 细胞 ROS 检测 以化学荧光法测定在加盖并胶带密封 5 h 后细胞内 ROS 水平，操作步骤严格按照说明书方法，加放荧光探针，用荧光倒置显微镜进行检测。

1.6 细胞凋亡/死亡率检测 以 CFSE/PI 法、流式细胞分析联合 Annexin V-FITC/PI 法检测 5 组 H/R 损伤细胞分别加入对照组、PBS 组、肾衰康高剂量组、肾衰康中剂量组、肾衰康低剂量组 5 组血清后 0、4、12、24 h 的细胞凋亡/死亡情况。

1.7 实时定量 PCR 检测 使用 PCR 技术检测 5 组细胞中 *Wnt4*、*β-catenin* mRNA 表达情况。PCR 中所用的引物由上海生物工程技术有限公司合成。*Wnt4* 正向引物 5' -CTGGAGAAGTGTGGCTGTGA-3'，反向引物 5' -GGACTGTGAGAAGGCTACGC-3'。*β-catenin* 正向引物 5' -CGGAACACCTTGTC-CTGAAT-3'，反向引物 5' -GAGTCAGCTGG-GAAAAGCAC-3'。实时定量 PCR 的反应条件：预变性 94 ℃ 2 min；94 ℃ 20 s，60 ℃ 45 s 循环 40 次。读取 C_T (cycle threshold) 值，首先分别计算各样本测定基因 *Wnt4*、*β-catenin* CT 与内对照基因 *β-actin* CT 的差值，即 $\Delta CT = C_{T(Wnt4)} - CT_{(\beta-actin)}$ ， $CT = CT_{(\beta-catenin)} - CT_{(\beta-actin)}$ ，再用各实验组样本的 ΔCT 减去正常对照组样本的 ΔCT ，得到 $\Delta\Delta CT$ ，利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行计算，表示高、中、低剂量组测定基因 *Wnt4*、*β-catenin* 的表达相对与 PBS 组样本 *Wnt4*、*β-catenin* 表达的变化倍数。

1.8 统计学方法 本部分实验所得数据以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，以 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。两组之间的统计学分析采用 *t* 检验方法检验；多组间比较若方差齐，采用单因素方差分析，若不齐则采用秩和检验。 $P < 0.05$ 可认为有统计学差异。

2 结果

2.1 H/R 损伤对 HK-2 细胞内 ROS 水平的影响 如图 1 所示，与造模前相比，造模后细胞内释放的 ROS 荧光强度明显增高。这说明 HK-2 细胞已发生 H/R 损伤。

2.2 肾衰康灌肠液含药血清对 H/R 损伤 HK-2 细胞 CFSE/PI 染色的影响 结果显示：造模 0 h 时 (如图 2、图 6)，各组细胞凋亡/死亡率未出现明显变化；而 4 h 时 (如图 3、图 6) 各组细胞凋亡/

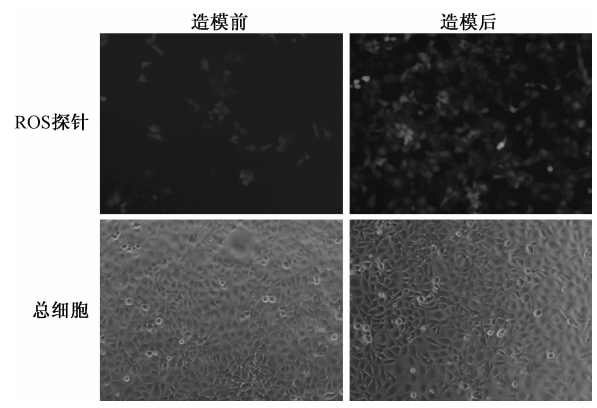


图 1 造模前后 HK-2 细胞中 ROS 含有量对比 (×100)

Fig. 1 Comparison of ROS content in HK-2 cells before and after modeling (×100)

死亡率明显增加，表明细胞造模成功；在 12 h (如图 4、图 6)，肾衰康高、中、低剂量组细胞凋亡/死亡率明显低于对照组和 PBS 组，且以肾衰康高剂量组凋亡/死亡率最低，随着培养时间的延长 (如图 5、图 6)，各组细胞凋亡/死亡率逐渐回到正常水平，造模效果消失。

2.3 肾衰康灌肠液含药血清对 H/R 损伤 HK-2 细胞凋亡/死亡率的影响 结果表明 (如图 7)：造模完成 0 h 时各组细胞的凋亡/死亡率均未出现明显变化；4 h 及 12 h，对照组和 PBS 组均能检测到大量的细胞凋亡/死亡；而肾衰康低、中、高剂量组均有明显的凋亡/死亡抑制。当 4 h 时，低剂量组 (13.5 ± 0.2)%，中剂量组 (7.8 ± 2.1)%，高剂量组 (13.3 ± 0.1)%；12 h 时，低剂量组 (14.8 ± 0.3)%，中剂量组 (10.3 ± 0.6)%，高剂量组 (12.9 ± 0.9)%；($P < 0.05$ ； $P < 0.01$) 均显著低于对照组，[4 h，(47.8 ± 3.5)%；12 h，(45.6 ± 2.2)%] 和 PBS 组 (4 h，(45.7 ± 1.2)%；12 h，(41.6 ± 0.7)%)，如图 8，24 h 后细胞凋亡/死亡情况明显恢复。

2.4 肾衰康灌肠液含药血清对 H/R 损伤 HK-2 细胞 *Wnt4*、*β-caterin* mRNA 表达水平的影响 如图 9 所示，肾衰康灌肠液含药血清对 H/R 损伤 HK-2 细胞内 *Wnt4* mRNA 的表达明显上调作用，而对 *β-caterin* mRNA 的表达有双向调节作用 ($P < 0.05$) 且其上调/下调作用呈现一定的剂量相关性。具体表现为，在含药血清处理 H/R 损伤细胞 4 h 后，*Wnt4* mRNA 表达明显上调、*β-caterin* mRNA 表达明显下调；从 4 h 到 24 h，*Wnt4* mRNA 表达水平较 4 h 时有所下调，但仍明显高于 PBS 组；而 *β-ca-*

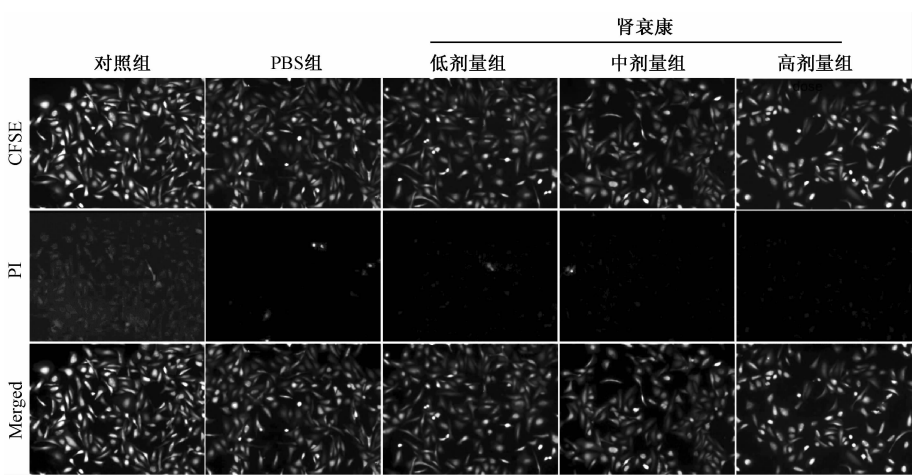


图 2 含药血清对 H/R 损伤 HK-2 细胞 0 h 时 CFSE/PI 染色的影响 (×100)

Fig. 2 Effects of serum containing drugs on CFSE/PI staining of HK-2 cells with H/R injury at 0 h (×100)

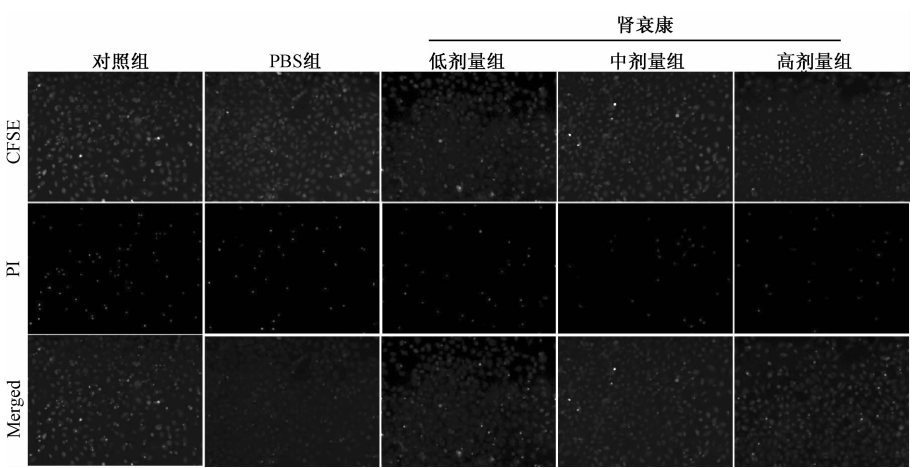


图 3 含药血清对 H/R 损伤 HK-2 细胞 4 h 时 CFSE/PI 染色的影响 (×100)

Fig. 3 Effects of serum containing drugs on CFSE/PI staining of HK-2 cells with H/R injury at 4 h (×100)

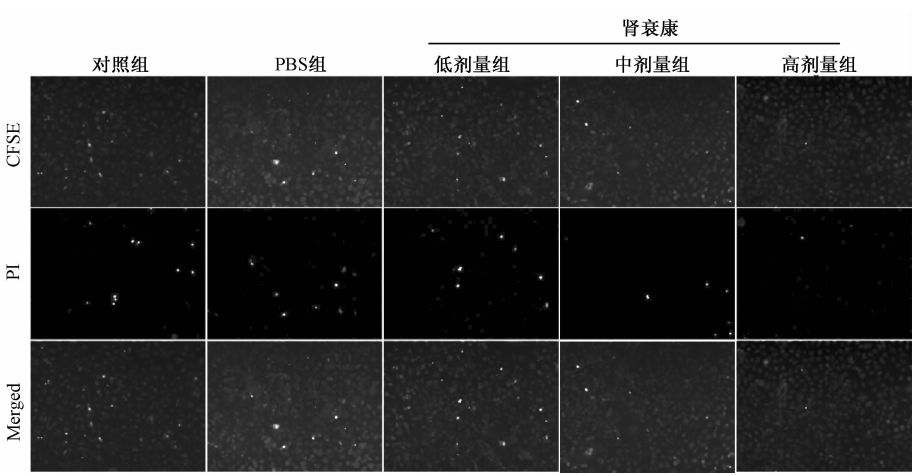


图 4 含药血清对 H/R 损伤 HK-2 细胞 12 h 时 CFSE/PI 染色的影响 (×100)

Fig. 4 Effects of serum containing drugs on CFSE/PI staining of HK-2 cells with H/R injury at 12 h (×100)

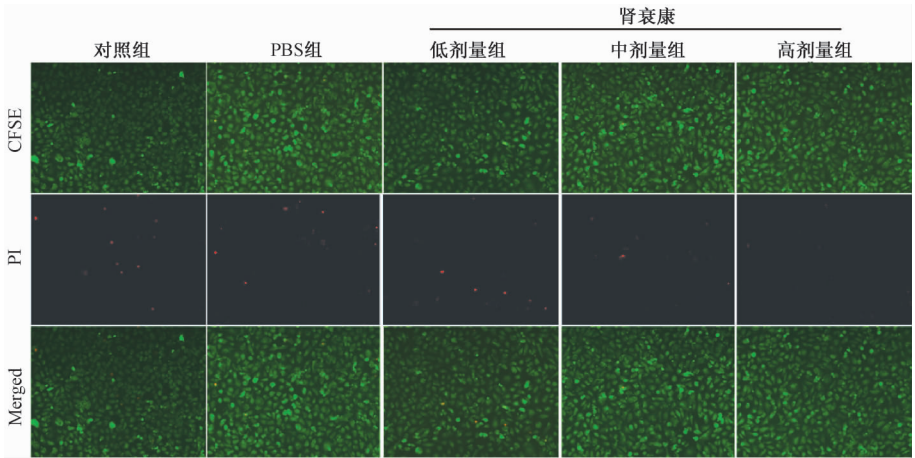
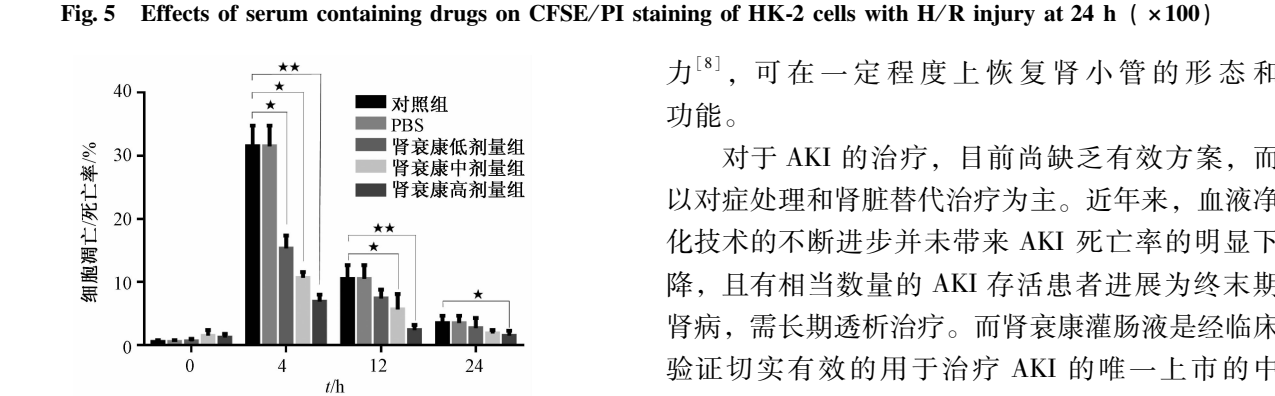


图 5 含药血清对 H/R 损伤 HK-2 细胞 24 h 时 CFSE/PI 染色的影响 (×100)



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图 6 含药血清对 H/R 损伤 HK-2 细胞 0 ~ 24 h 时 CFSE/PI 染色的影响

Fig. 6 Effects of serum containing drugs on CFSE/PI staining of HK-2 cells with H/R injury during 0-24 h

terin mRNA 表达在 8 h 达到最低水平后逐渐上调，并于 24 h 时表达水平上调，且明显高于 PBS 组。这说明肾衰康灌肠液含药血清能诱导 H/R 损伤 HK-2 细胞内 *Wnt4* mRNA 表达增加，而对 β -caterin 的 mRNA 表达有双向调节作用。

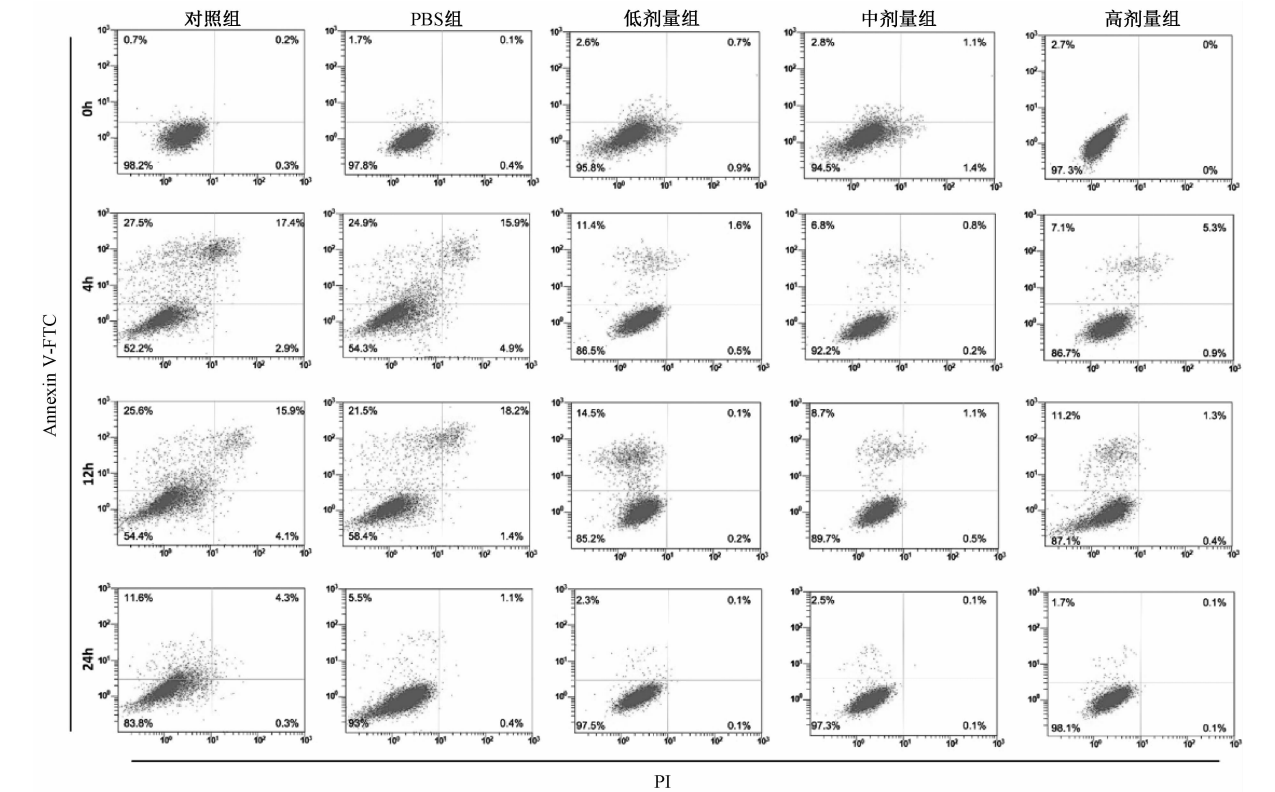
3 讨论

AKI 是一组临床综合征，主要包括缺血性和中毒性两类，其中缺血性 AKI 占 75% 以上^[7]。AKI 可表现为突发（1 ~ 7 d 内）和持续（>24 h）的肾功能下降；出现氮质血症、少尿或无尿、水电解质和酸碱平衡紊乱失以及全身各系统症状；是临床常见的急危重症，死亡率高。目前，AKI 的发病机制尚未完全阐明。现有的研究表明，缺血性 AKI 可引起肾小管上皮细胞损伤/凋亡、急性肾小管坏死和肾功能异常。但肾脏有强大的自我修复能

力^[8]，可在一定程度上恢复肾小管的形态和功能。对于 AKI 的治疗，目前尚缺乏有效方案，而以对症处理和肾脏替代治疗为主。近年来，血液净化技术的不断进步并未带来 AKI 死亡率的明显下降，且有相当数量的 AKI 存活患者进展为终末期肾病，需长期透析治疗。而肾衰康灌肠液是经临床验证切实有效的用于治疗 AKI 的唯一上市的中成药。

肾衰康灌肠液是由大黄、丹参、红花、黄芪 4 味药按 1.5 : 1 : 1 : 1.5 比例，经水煮、过滤、灭菌、浓缩制成的纯中药制剂。研究发现，肾衰康灌肠液具有增加肾血流量、改善肾微循环、减轻肾小管坏死程度及促进肾小管上皮细胞修复再生等作用。本次通过离体细胞试验，观察肾衰康灌肠液对 H/R 损伤 HK-2 细胞的干预效果，运用 CFSE/PI 法、流式细胞分析 Annexin V-FITC/PI 检测及 PCR 技术探索肾衰康灌肠液减轻急性肾损伤、抑制肾小管上皮细胞凋亡/死亡及促进肾小管上皮细胞再生修复的分子机制，以明确肾衰康灌肠液的治疗效应靶点。

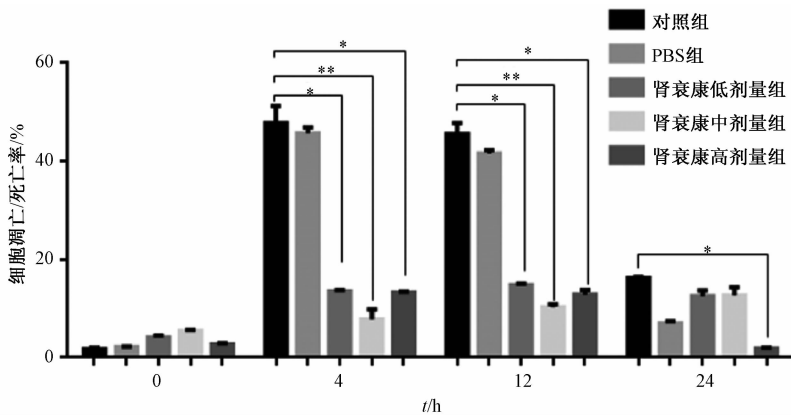
近年来研究发现，Wnt/ β -catenin 信号通路主要参与细胞的增殖、分化、凋亡与抗凋亡等生物效应的调控，尤其在肾脏的生长、发育阶段及肾脏疾病的修复过程中显示出极其重要的作用^[5,9]。例如，在胚胎中，Wnt 的表达可促进肾脏组织的生长和发育，而 Wnt 基因突变可导致严重的肾脏发育不全^[10]。在成熟的肾脏中，Wnt 信号通路仅在调节失常或肾脏损伤等情况下被激活。Wnt 信号通路调节失常可引起梗阻性肾病、肾肿瘤等疾病的发



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图7 含药血清对H/R损伤HK-2细胞凋亡/死亡率的影响

Fig. 7 Effects of serum containing drugs on apoptosis/death rate of HK-2 cells with H/R injury



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

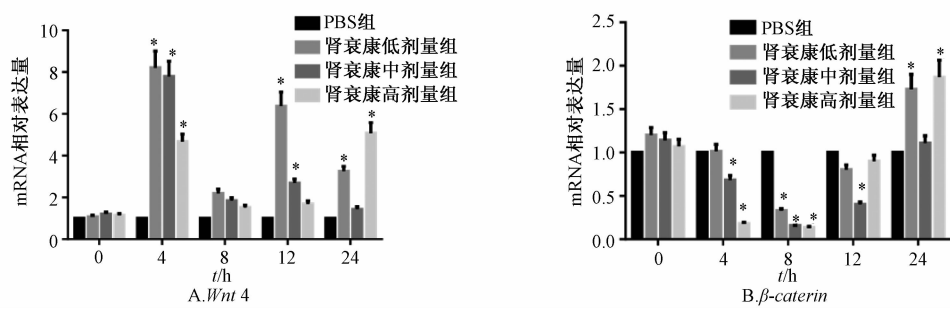
图8 不同时间点，含药血清对H/R损伤HK-2细胞凋亡/死亡率的影响

Fig. 8 Effects of serum containing drugs on apoptosis/death rate of HK-2 cells with H/R injury at different time points

生。而AKI后Wnt信号活性明显增加，激活后的Wnt/ β -catenin信号通路参与AKI修复。有研究证明，在急性缺血性肾损伤后，Wnt信号活性明显增加，且损伤的肾小管上皮细胞对Wnt信号产生应答^[11]。

而本次实验发现，肾衰康灌肠液含药血清可抑制H/R损伤HK-2细胞的凋亡/死亡，且呈现一定

的剂量相关性，即高剂量组效果最佳。肾衰康灌肠液含药血清对Wnt/ β -catenin通路中Wnt mRNA及 β -catenin mRNA的表达有明显的上调/下调作用。这说明，Wnt/ β -catenin通路很可能参与了肾衰康灌肠液对急性缺血再灌注损伤的抑制或损伤后肾小管上皮细胞的修复。但其具体机制仍需进一步探索及验证。



注：与 PBS 组比较，* $P < 0.05$

图 9 肾衰康灌肠液含药血清对 H/R 损伤 HK-2 细胞 *Wnt4* mRNA、*β-catenin* mRNA 表达的影响

Fig. 9 Effects of Shenshuaikang on the mRNA expression of *Wnt4* and *β-catenin* in HK-2 with H/R injury

综上所述，肾衰康灌肠液抗 HK-2 细胞 H/R 损伤作用的机制涉及 Wnt/ β -catenin 信号通路，其可能通过上调/下调 *Wnt* 及 *β-catenin* 基因的表达来发挥治疗作用。

参考文献：

[1] 陈香美, 谢院生. 急性肾损伤的修复与再生[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(7): 565-567.

[2] Lameire N, Nan Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure [J]. *Lancet*, 2005, 365 (6): 417-430.

[3] Kispert A, Vainio S, McMahon A P. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney[J]. *Development*, 1998, 125(21): 4225-4234.

[4] Terada Y, Tanaka H, Okado T, *et al.* Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14 (5): 1223-1233.

[5] Lin S L, Li B, Rao S, *et al.* Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(9): 4194-4199.

[6] Lin M, Li L, Zhang Y, *et al.* Baicalin ameliorates H₂O₂ induced cytotoxicity in HK-2 cells through the inhibition of ER stress and the activation of Nrf2 signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7): 12507-12522.

[7] Andrikos E, Tseke P, Balafa O, *et al.* Epidemiology of acute renal failure in ICUs: a multi-center prospective study [J]. *Blood Purif*, 2009, 28(3): 239-244.

[8] Dufield J D, Park K M, Hsiao L L, *et al.* Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(7): 1743-1755.

[9] Kispert A, Vainio S, McMahon A P. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney[J]. *Development*, 1998, 125(21): 4225-4234.

[10] Mande H, Shemer R, Borochowitz Z U, *et al.* SERKALSyndrome: an autosomal recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4[J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 82 (1): 39-47.

[11] 裴华颖. Wnt/ β -catenin 信号通路在急性肾损伤修复过程中作用机制的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2008: 25-37.