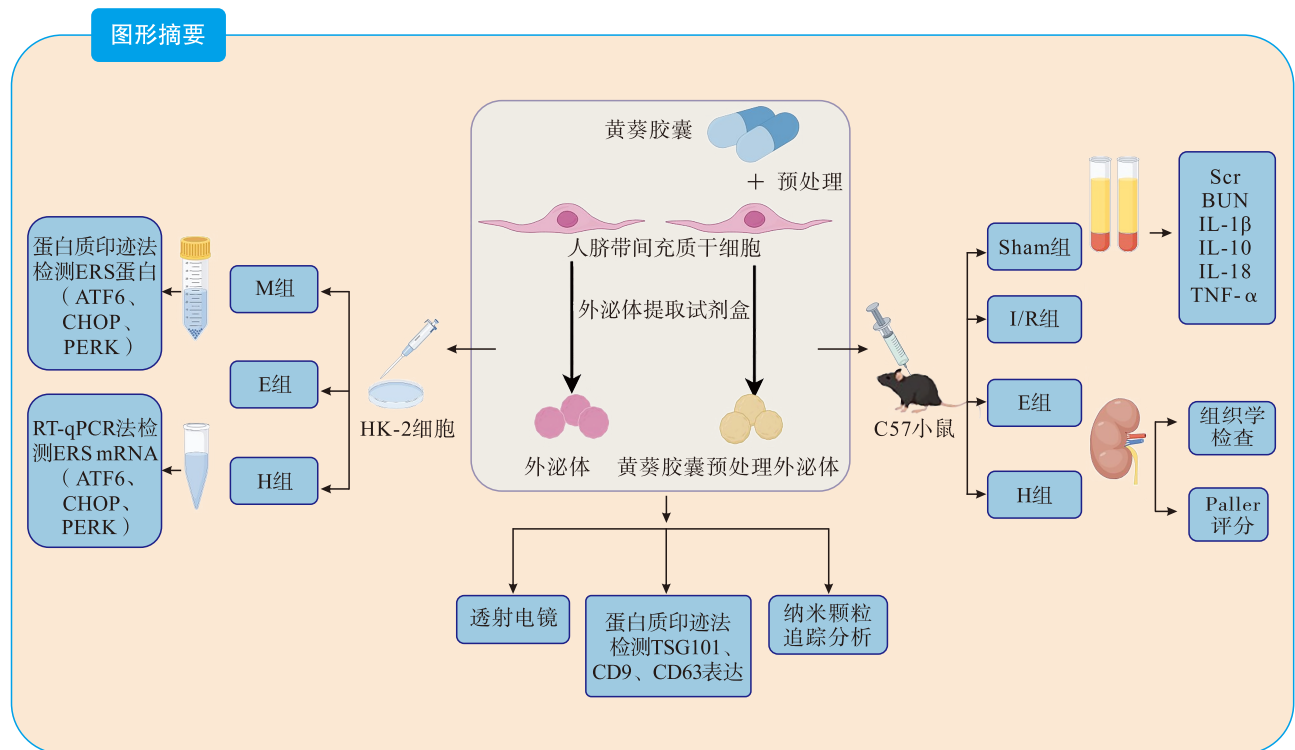


· 论著 ·

黄葵胶囊预处理人脐带间充质干细胞外泌体改善肾脏缺血-再灌注损伤的作用及机制

姚雅韡 贺佳辉 王浩 王誉潼 王睿妍 万幸雨 刘雨佳 吕兴华



【摘要】 目的 探讨黄葵胶囊预处理的人脐带间充质干细胞（HUC-MSC）来源外泌体（Exo）对肾脏缺血-再灌注损伤（IRI）的影响及机制。方法 将 HUC-MSC 分别置于含有不同浓度的黄葵胶囊培养基中培养 24 h，测定细胞活力，选取适宜浓度进行后续实验。选取 50 μg/mL 的黄葵胶囊预处理 HUC-MSC 24 h，使用 Exo 提取试剂盒提取 Exo，透射电镜观察其形态、纳米粒径分析检测粒径大小、蛋白质印迹法检测 Exo 膜表面标记蛋白表达。将人肾小管上皮细胞（HK-2 细胞）随机分为缺氧/复氧组（M 组）、缺氧/复氧+Exo 组（E 组）和缺氧/复氧+黄葵胶囊预处理 Exo 组（H 组）。蛋白质印迹法测定内质网应激（ERS）相关蛋白表达，实时荧光定量聚合酶链反应测定 ERS 相关基因信使 RNA（mRNA）表达。将小鼠随机分为假手术组（Sham 组）、缺血-再灌注组（I/R 组）、缺血-再灌注+Exo 组（E 组）和缺血-再灌注+黄葵胶囊预处理 Exo 组（H 组）。24 h 后行肾脏组织学

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2024259

基金项目: 甘肃省自然科学基金 (23JRRA0932)

作者单位: 730000 兰州, 兰州大学第一临床医学院 (姚雅韡、贺佳辉、王誉潼、王睿妍、万幸雨、刘雨佳); 兰州大学第一医院日间手术中心 (王浩、吕兴华)

作者简介: 姚雅韡 (ORCID 0009-0004-7615-0328), 硕士研究生, 研究方向为围手术期器官保护, Email: 317997960@qq.com

通信作者: 吕兴华 (ORCID 0000-0002-6757-6974), 博士, 硕士研究生导师, 研究方向为围手术期器官保护, Email: ldyyrjsszx18@163.com

评估,血清肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)测定及炎症因子检测。**结果** Exo和黄葵胶囊预处理Exo均具有双层膜结构,呈杯形态;二者平均粒径大小分别为116.8 nm和81.3 nm;两者均表达CD9、CD63、TSG101。与M组比较,E组转录激活因子6(ATF6)、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)蛋白相对表达量下降,mRNA相对表达量升高,C/EBP同源蛋白(CHOP)蛋白相对表达量升高,mRNA相对表达量下降;与E组相比,H组ATF6、PERK、CHOP蛋白相对表达量均降低,ATF6、PERK mRNA相对表达量下降(均为 $P<0.05$)。动物实验结果显示,与Sham组相比,I/R组肾小管损伤评分升高,Scr、BUN、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-10、IL-18、肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平升高;与I/R组比较,E组和H组肾小管损伤评分降低,Scr、BUN、IL-1 β 、IL-10、IL-18、TNF- α 水平下降;与E组比较,H组肾小管损伤评分下降,Scr、BUN、IL-1 β 、IL-10、IL-18、TNF- α 水平下降(均为 $P<0.05$)。**结论** 黄葵胶囊预处理HUC-MSC来源的Exo可通过抑制ERS,改善肾脏IRI。

【关键词】 肾移植;缺血-再灌注损伤;黄葵胶囊;人脐带间充质干细胞;外泌体;内质网应激;急性肾损伤;炎症因子

【中图分类号】 R617,R28 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2025)02-0008-09

The effect and mechanism of Huangkui capsule pretreatment of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes on improving renal ischemia-reperfusion injury Yao Yawei*, He Jiahui, Wang Hao, Wang Yutong, Wang Ruiyan, Wan Xingyu, Liu Yujia, Lü Xinghua. *The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China
Corresponding author: Lü Xinghua, Email: ldyjrjsszx18@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effects and mechanisms of human umbilical cord mesenchymal stem cell (HUC-MSC)-derived exosomes (Exo) pretreated with Huangkui capsules on renal ischemia-reperfusion injury (IRI). **Methods** HUC-MSCs were cultured in media containing different concentrations of Huangkui capsules for 24 hours to determine cell viability and select an appropriate concentration for subsequent experiments. HUC-MSCs were pretreated with 50 $\mu\text{g/mL}$ Huangkui capsules for 24 hours, and Exo were extracted using an exosome extraction kit. The morphology was observed under a transmission electron microscope, particle size was measured by nanoparticle tracking analysis, and the expression of exosomal membrane surface marker proteins was detected by Western blot. Human renal tubular epithelial cells (HK-2 cells) were randomly divided into hypoxia/reoxygenation group (M group), hypoxia/reoxygenation + Exo group (E group), and hypoxia/reoxygenation + Huangkui capsules pretreated Exo group (H group). Western blotting was used to measure the expression of endoplasmic reticulum stress (ERS)-related proteins, and real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction was used to measure the expression of ERS-related gene messenger RNA (mRNA). Mice were randomly divided into sham operation group (Sham group), ischemia-reperfusion group (I/R group), ischemia-reperfusion + Exo group (E group), and ischemia-reperfusion + Huangkui capsules pretreated Exo group (H group). Renal histological assessment, serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN) measurement and inflammatory factor detection were performed 24 hours later. **Results** Both Exo and Huangkui capsules pretreated Exo had a bilayer membrane structure and a cup-shaped morphology; their average particle sizes were 116.8 nm and 81.3 nm, respectively. Both expressed CD9, CD63, TSG101. Compared with the M group, the E group had decreased relative expression of transcription factor 6 (ATF6) and protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) proteins, increased mRNA relative expression, increased relative expression of C/EBP homologous protein (CHOP) protein, and decreased mRNA relative expression. Compared with the E group, the H group had decreased relative expression of ATF6, PERK, CHOP proteins, and decreased mRNA relative expression of ATF6 and PERK (all $P<0.05$). Animal experimental results showed that compared with the Sham group, the I/R group had increased renal tubular injury scores, Scr, BUN, interleukin (IL)-1 β , IL-10, IL-18, tumor necrosis factor (TNF)- α levels. Compared with the I/R group, the E and H groups had decreased renal tubular injury scores and Scr, BUN, IL-1 β , IL-10, IL-18, TNF- α levels. Compared with the E group, the H group had decreased renal tubular injury scores and Scr, BUN, IL-1 β , IL-10, IL-18, TNF- α levels (all $P<0.05$). **Conclusions** Huangkui capsules pretreatment HUC-MSC-derived Exo may alleviate renal IRI by inhibiting ERS.

【Key words】 Kidney transplantation; Ischemia-reperfusion injury; Huangkui capsule; Human umbilical cord mesenchymal stem cell; Exosome; Endoplasmic reticulum stress; Acute kidney injury; Inflammatory factor

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是一种重症并发症, 具有较高的发生率和病死率。缺血-再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 是导致 AKI 的主要原因之一, 临床上常见于肾移植、肾部分切除术以及复杂心血管手术等过程^[1]。因此, 防治 IRI 是治疗 AKI 的靶向措施之一。大量研究表明, 内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 参与调控肾脏 IRI^[2-4], 且 ERS 又是引起肾小管上皮细胞损伤的主要原因之一^[5]。因此, AKI 发展过程中, 调控 ERS 对保护肾脏具有重要意义^[6]。

外泌体 (exosome, Exo) 是一种由细胞分泌的细胞外囊泡, 内部含有蛋白质、核酸以及脂类等具有生物活性的物质, 能够参与介导细胞间的信号传递, 调控受体细胞的生理和病理过程^[7]。相比于干细胞, Exo 具有许多优势, 如不具备增殖能力、无免疫原性、能够通过血脑屏障、并且便于储存和运输^[8]。Tao 等^[9]研究表明, Exo 可通过调节 ERS, 发挥器官保护作用。Zhang 等^[10]研究表明, Exo 可通过抑制 ERS 和炎症来减轻器官 IRI。因此, Exo 被认为是治疗 IRI 的一种可行的选择。

近年来研究报道指出, 预处理可以增强 Exo 的治疗作用^[11-12]。Huang 等^[13]研究证实, 阿托伐他汀预处理 Exo 能够增强对急性心肌损伤的治疗效应。Hu 等^[14]研究证明, 吡格列酮预处理的 Exo 可通过激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路来促进血管新生, 加速糖尿病伤口愈合。Zhang 等^[15]研究证明, 黄芩苷预处理 Exo 可通过诱导肝细胞中 FGF21 的表达、抑制 JAK2/STAT3 通路和激活 Foxo1 表达来减轻肝脏 IRI。

黄葵胶囊的主要活性成分源自黄蜀葵花, 其可通过减轻炎症反应、抗氧化应激等机制减缓肾脏损伤, 发挥保护肾脏的作用^[16-17]。黄葵胶囊结合 Exo 的研究未见报道, 因此, 本研究以肾脏保护为切入点, 探讨黄葵胶囊预处理人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cell, HUC-MSC) 来源 Exo 对肾脏 IRI 的影响, 丰富中医及中药单体治疗肾脏疾病的机制研究, 并为黄葵胶囊治疗肾脏疾病提供一个可能的方向。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与细胞

20 只 7 周龄、体质量 (20±1) g 的无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雄性 C57 小鼠购于

兰州大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号: SCXK (甘) 2023-0003]。在温度为 (22±1) °C, 相对湿度为 40%~60%, 12 h 明暗交替的环境中饲养。人肾小管上皮细胞 (HK-2)、HUC-MSC 购自中国科学院细胞库。本研究经兰州大学第一医院伦理委员会批准 (批准号: LDYYLL2024-437), 并严格按照动物实验伦理规范进行实验。

1.2 材料与试剂

胎牛血清购自美国 Gibco 公司, DMEM/F12 培养基、CCK-8 试剂盒购自山东思科捷公司, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒、增强化学发光试剂盒、RIPA 裂解液购自上海雅酶生物医药科技有限公司, CD9、CD63、TSG101 抗体购自英国 Abcam 公司, 转录激活因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP)、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司, 引物由塞维尔生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.3 研究内容与方 法

1.3.1 细胞实验

1.3.1.1 CCK-8 法测定细胞活力 HUC-MSC 调整密度至 1×10^4 /mL, 取 100 μ L 细胞悬液将其接种至 96 孔板中。各组分别加入浓度梯度为 5、10、25、50、75、100、150、200 μ g/mL 黄葵胶囊的培养基培养 24 h, 对照组加入不含黄葵胶囊的培养基培养 24 h, 加入 10 μ L CCK-8 溶液孵育 30 min, 使用酶标仪测定各组吸光度 (A) 值 (450 nm 处), 实验重复 3 次, 计算细胞活力。结果发现 50 μ g/mL 组细胞活力最高, 因此选取 50 μ g/mL 药物浓度进行后续实验。

1.3.1.2 黄葵胶囊预处理 Exo HUC-MSC 融合到 80%~90% 时, 去除原有培养基, 预处理组使用 50 μ g/mL 黄葵胶囊的无 Exo 血清培养基培养 24 h, 未处理组更换为无 Exo 血清培养基培养 24 h。

1.3.1.3 Exo 鉴定和纯化 收集细胞上清液, 根据外泌体提取试剂盒说明书提取 Exo。分别取 20 μ L 悬液滴加到载样网上, 静置后吸干液体, 滴加 1% 醋酸双氧铀溶液, 室温下复染 1 min, 干燥后放入样品室内, 透射电镜观察外泌体形态并拍摄照片。Exo 悬液置于样本池内, 应用纳米粒径分析仪检测。蛋白质印

迹法检测 CD9、CD63、TSG101 蛋白表达。

1.3.1.4 模型建立及分组 待 HK-2 细胞生长融合至 80% 时, 随机分为缺氧/复氧组 (M 组): 无血清 4 g/L DMEM 培养基培养 24 h 后, 更换无血清 1 g/L DMEM 培养基, 置于缺氧孵箱 ($N_2 : O_2 : CO_2$ 为 94 : 1 : 5) 24 h 后, 复氧常规培养 4 h; Exo 组 (E 组): 在无血清 4 g/L DMEM 培养基加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Exo, 其余处理与 M 组相同; 黄葵胶囊预处理 Exo 组 (H 组): 在无血清 4 g/L DMEM 培养基加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄葵胶囊预处理的 Exo, 其余处理与 M 组相同。

1.3.1.5 ERS 相关蛋白表达检测 用蛋白质印迹法测定。提取各组蛋白并进行电泳, 转膜后封闭 90 min 后参照抗体说明书加入一定稀释比例的一抗 (CHOP、ATF6、PERK、 β -actin), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日洗涤后加入山羊抗兔 IgG 二抗, 孵育 1 h, 洗涤 3 次, 最后加入显影液, 使用凝胶成像系统拍照记录分析。

1.3.1.6 ERS 相关基因表达检测 用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 测定。提取各组细胞样本总 RNA, 检测浓度及纯度后反转录合成互补 DNA, 之后进行扩增。以 β -actin 作为内参基因, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 相对表达量, 实验重复 3 次。引物序列见表 1。

1.3.2 动物实验

1.3.2.1 模型建立及分组 小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (30 mg/kg), 俯卧位固定, 备皮, 在背部两侧做切口, 游离双侧肾蒂, 用无创动脉夹夹闭两侧肾蒂, 45 min 后松开动脉夹, 恢复血供 24 h, 取小鼠肾脏组织, 行后续实验。将小鼠按照随机数字表法分成 4 组: 假手术组 (Sham 组)、缺血-再灌注组 (I/R 组)、缺血-再灌注+Exo 组 (E 组)、缺血-再灌注+黄葵胶囊预处理 Exo 组 (H 组), 每组 5 只。

Sham 组小鼠只进行麻醉、开腹处理; I/R 组小鼠麻醉后建立肾 IRI 模型; E 组小鼠于术前 5 min 尾静脉注射 50 μg Exo, 麻醉后建立肾 IRI 模型; H 组小鼠于术前 5 min 尾静脉注射黄葵胶囊预处理的 Exo 50 μg , 麻醉后建立肾 IRI 模型, 术后 24 h 取材。

1.3.2.2 组织学评估 肾组织石蜡切片后进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 根据 Paller 评分法进行评分^[18]。

1.3.2.3 肾功能检测 全自动生化分析仪检测各组小鼠血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平。

1.3.2.4 炎症因子检测 按照试剂盒说明书检测各组小鼠血清白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β 、IL-10、IL-18、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - α 水平。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, GraphPad Prism5.0 制图。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 利用 Levene 法进行方差齐性检验, 确定方差齐性且整体比较组间差异有统计学意义后进一步作多重比较, 多重比较采用 LSD 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Exo 的鉴定

透射电镜结果显示, Exo 和黄葵胶囊预处理的 Exo 均具有双层膜结构, 呈杯状形态 (图 1A); 纳米粒径分析结果显示, Exo 和黄葵胶囊预处理 Exo 的平均粒径大小分别为 116.8 nm 和 81.3 nm (图 1B); 蛋白质印迹法结果显示, 两者均表达 CD9、CD63、TSG101 (图 1C)。

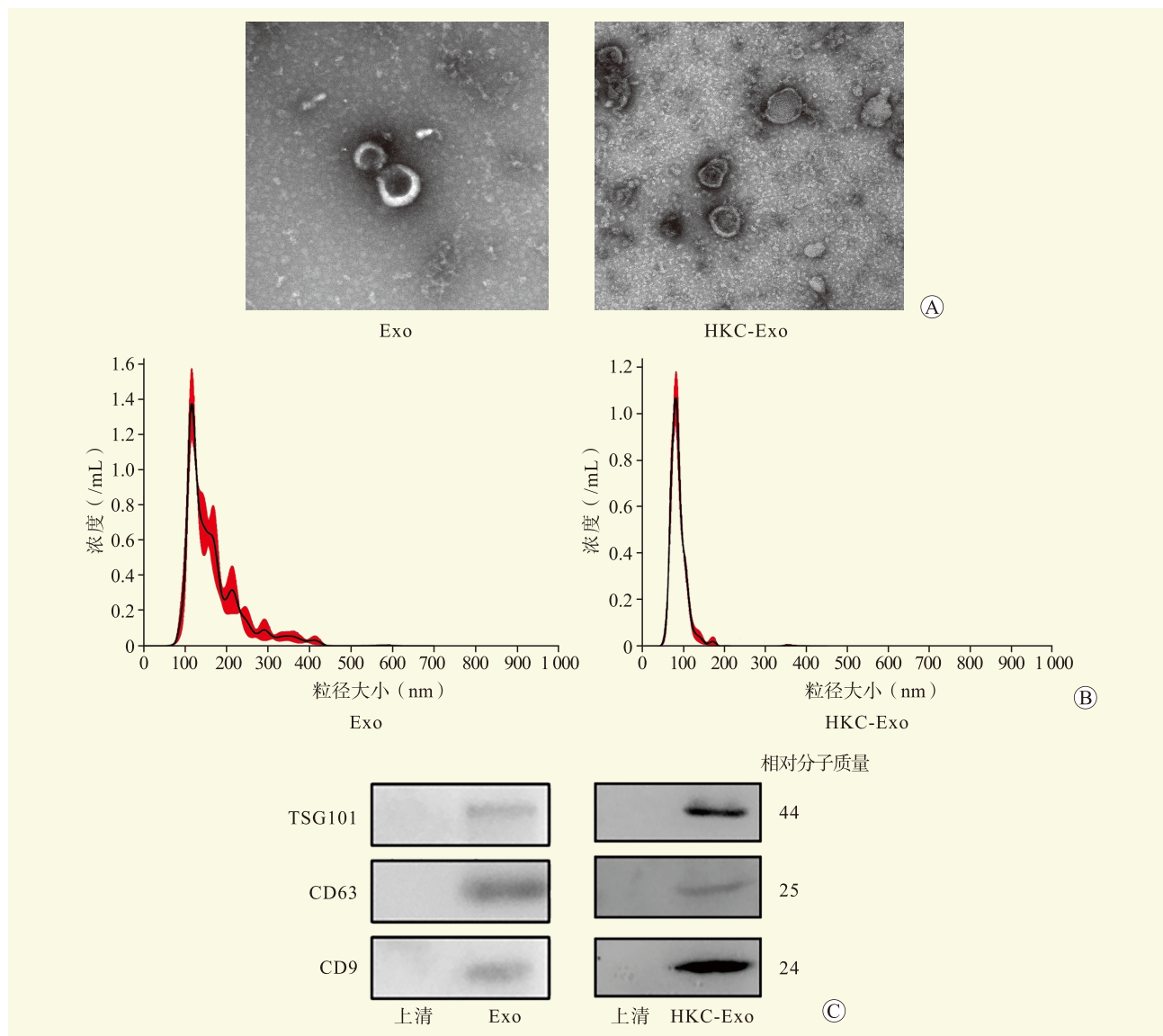
2.2 Exo 对 ERS 的影响

与 M 组相比, E 组 ATF6、PERK 蛋白相对表达量下降, CHOP 蛋白相对表达量升高; 与 E 组相比,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	正向引物 (5'→3')	反向引物 (3'→5')
β -actin	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC
CHOP	CACCACTCTTGACCCTGCTT	CTTCATGCGCTGCTTTCCAG
ATF6	CGCAGAAGGGGAGACACATT	CACTTCGTAGTCCTGCCCAT
PERK	AGAGATTGAGACTGCGTGCC	TGGATGACACCAAGGAACCG



注：A 图为透射电镜下 Exo 观察结果 ($\times 200\ 000$)；B 图为 Exo 粒径分布；C 图为蛋白质印迹法检测外泌体膜表面标记蛋白表达。HKC-Exo 为黄葵胶囊预处理 Exo。

图 1 Exo 的鉴定

Figure 1 Identification of Exo

H 组 ATF6、PERK、CHOP 蛋白相对表达量均降低 (均为 $P < 0.05$, 图 2)。

与 M 组相比, E 组 ATF6、PERK mRNA 相对表达量升高, CHOP mRNA 相对表达量下降; 与 E 组相比, H 组 ATF6、PERK mRNA 相对表达量下降 (均为 $P < 0.05$, 图 3)。

2.3 Exo 对小鼠肾组织和功能的影响

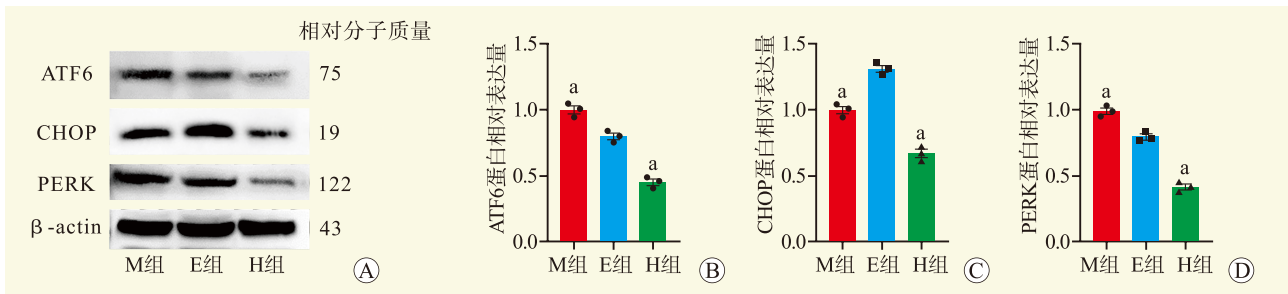
与 Sham 组相比, I/R 组肾组织排列疏松, 出现大量间隙, 结构紊乱, 肾小球出现萎缩, 肾小管壁变薄, 出现水肿, 管腔内出现大量空泡, 有炎症细胞浸润, 肾小管损伤评分升高; 与 I/R 组相比, E 组和

H 组细胞排列逐渐紧密, 肾小管排列整齐, 管壁更完整均匀, 肾小球大小均匀, 肾小管损伤评分降低; 与 E 组相比, H 组肾小管损伤评分降低 (均为 $P < 0.05$, 图 4A、B)。

与 Sham 组相比, I/R 组血清 Scr、BUN 水平升高; 与 I/R 组相比, E、H 组血清中 Scr、BUN 水平下降; 与 E 组相比, H 组血清 Scr、BUN 水平下降 (均为 $P < 0.05$, 图 4C、D)。

2.4 Exo 对小鼠炎症因子表达的影响

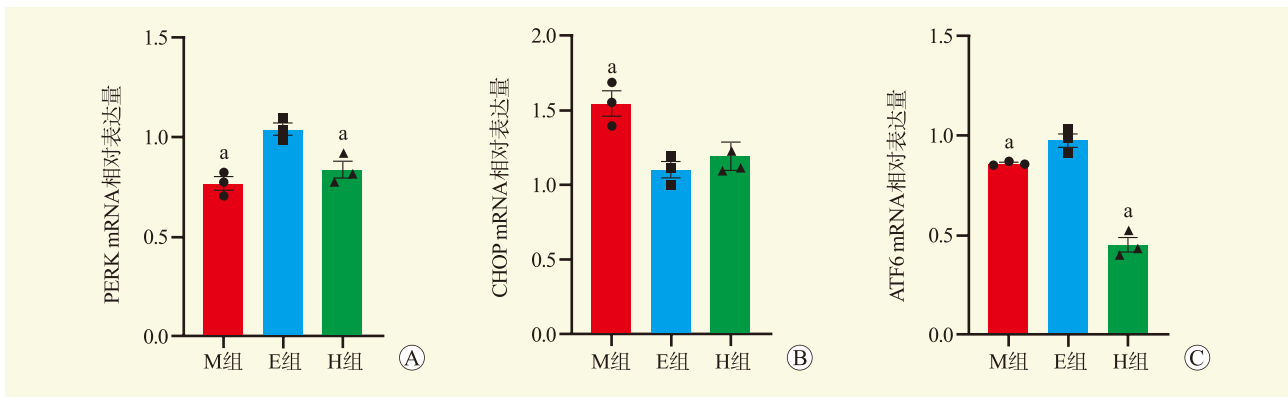
与 Sham 组比较, I/R 组血清 IL-1 β 、IL-10、IL-18、TNF- α 水平升高; 与 I/R 组比较, E、H 组血清



注：与 E 组相比，^a*P*<0.05。

图 2 各组 ERS 相关蛋白表达水平比较

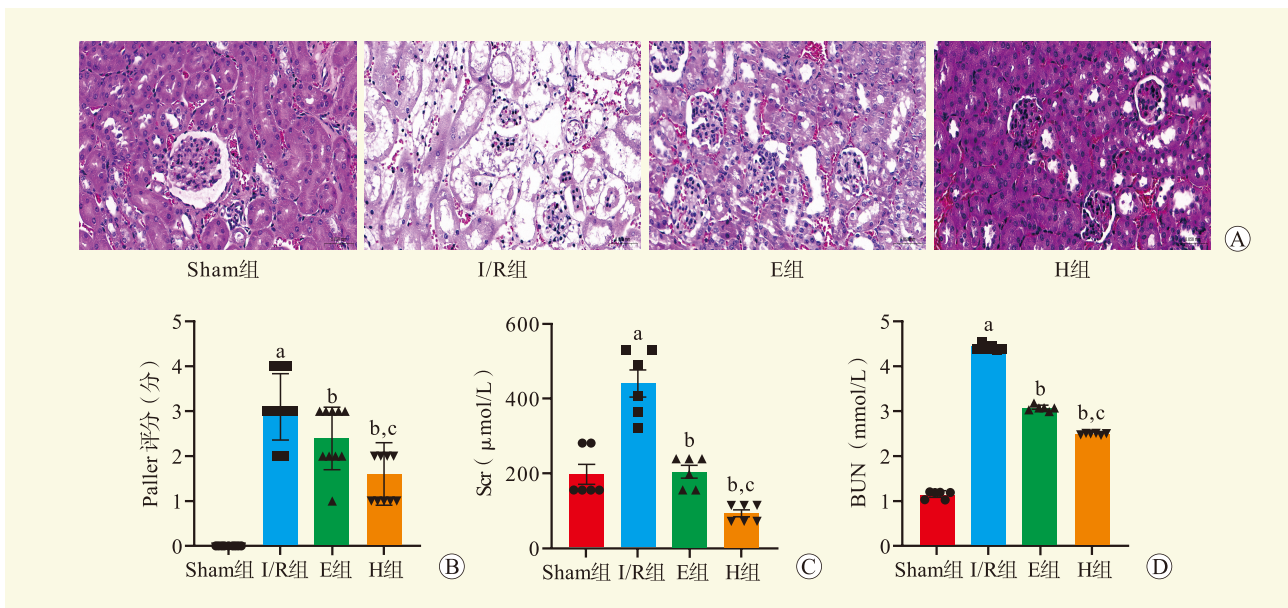
Figure 2 Comparison of expression levels of ERS-related proteins among different groups



注：与 E 组比较，^a*P*<0.05。

图 3 各组 ERS 相关基因 mRNA 表达水平比较

Figure 3 Comparison of mRNA expression levels of ERS-related genes among different groups



注：A 图为肾脏组织 HE 染色 (×400)；B 图为肾小管损伤 Paller 评分；C 图为 Scr 水平；D 图为 BUN 水平。与 Sham 组比较，^a*P*<0.05；与 I/R 组比较，^b*P*<0.05；与 E 组比较，^c*P*<0.05。

图 4 各组肾组织病理学及肾功能

Figure 4 Pathology and renal function of kidney tissues among each group

IL-1 β 、IL-10、IL-18、TNF- α 水平下降；与 E 组比较，H 组血清 IL-1 β 、IL-10、IL-18、TNF- α 水平下降（均为 $P < 0.05$ ，图 5）。

3 讨 论

AKI 是以肾功能急剧下降为特征的严重综合征^[19-20]。其病因复杂，常涉及多种因素，IRI、梗阻性损伤、脓毒血症、肾脏微循环障碍、炎症反应或感染等^[19,21]。IRI 常见于肾移植、外伤、失血性休克、心血管手术及弥散性血管内凝血等^[22]。目前治疗通过降低组织氧耗、使用钙通道阻断剂或氧自由基清除剂减轻 IRI，但 AKI 预后仍不理想^[22-23]。更加优化的治疗方式可能是防治肾脏 IRI 的研究趋势。

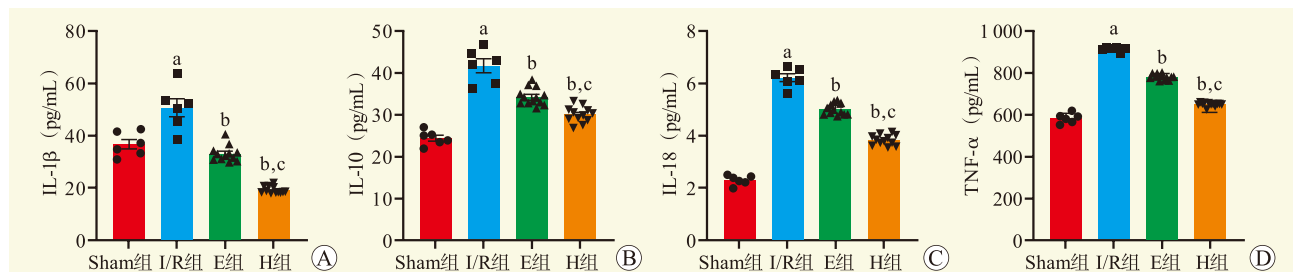
肾脏 IRI 病理生理机制极为复杂，其中包含了中性粒细胞的激活过程、活性氧簇和其他炎症介质的释放^[2]。被激活的巨噬细胞可通过产生活性氧簇影响早期灌注，导致出现氧化应激和损伤^[4]。本研究中，ERS 是影响肾小管上皮细胞 IRI 的原因之一，ERS 相关蛋白在肾脏 IRI 过程中表达有变化，且动物实验证实小鼠肾脏 IRI 中有炎症因子参与。

MSC 在疾病中的作用主要通过细胞外囊泡的旁分泌途径发挥，尤其是通过 Exo 实现，其机制涉及自主靶向性、抗炎、抗凋亡、抗氧化等多种途径，从而保护肾脏免受损害^[24-26]。Exo 具有体积小、循环半衰期长、免疫原性低、渗透能力强及生物相容性好等特点，在多种疾病治疗中展现出了重要的应用价值，近年来广泛用于肾病治疗^[27]。本研究证实 Exo 能改善肾脏 IRI 小鼠肾功能，减少炎症因子表达，且黄葵胶囊处理的 Exo 治疗效果更佳。

有研究表明，肾脏 IRI 的大鼠在透射电镜下可见内质网扩张扭曲，这表明内质网腔中错误折叠蛋白的积聚^[28]。在肾脏 IRI 发生时，肾脏的固有细胞，如内皮

细胞和肾小管上皮细胞，会受到功能和结构上的损伤，这导致氧自由基的生成增多以及 ERS 的发生，进一步引起肾脏细胞的损伤，这是 AKI 发生和发展的关键机制^[29-31]。ERS 的主要传感器包括肌醇需求酶 1（inositol-requiring enzyme 1, IRE1）、PERK 和 ATF6 三种^[32-33]。有研究报道了中介素抑制了肾 IRI 中的 CHOP 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶（cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase）-12 表达，表明 ERS 在肾脏 IRI 存在致病作用^[34]。Noh 等^[35]发现 CHOP 是肾 IRI 中 ERS 相关凋亡的重要参与者，与野生型小鼠相比，CHOP 基因敲除小鼠的肾脏 IRI 程度明显减轻，证实了 CHOP 介导的细胞凋亡在这种情况下的致病作用。Fan 等^[36]在 AKI 患者的肾活检中发现了 ERS 标志物，且与 AKI 严重程度相关。本研究结果发现，在肾脏 IRI 模型中会发生 ERS，而 Exo 可以影响 ERS 相关蛋白表达，表明 Exo 可通过抑制 ERS，保护小鼠肾脏功能，且黄葵胶囊预处理的 Exo 效果更明显。

有研究发现，Exo 受细胞外刺激的影响^[37-38]，如采用药物预处理等方式，可以改变 Exo 内容物，增强治疗潜能^[13]。有研究表明，与未预处理 Exo 进行比较，经吗啡预处理的 Exo 能够提升心肌细胞活力，同时降低乳酸脱氢酶活性，从而减轻心肌 IRI，发挥显著心肌保护作用^[39]；川芎嗪预处理可以提高骨髓间充质干细胞来源 Exo 治疗脑缺血的效应，可激活 Akt 信号通路，调控 Bcl-2 和 Bax 表达，从而抑制神经元凋亡，保护脑缺血损伤^[40]。褪黑素能够提高 Exo 对大鼠肾脏 IRI 的治疗潜力^[41]。在大鼠模型中，黄葵胶囊已被证明通过抑制 NLRP3 炎症小体激活来减轻肾小管损伤^[42]。黄葵胶囊也可通过抑制 PI3K/Akt 信号活性，有效减轻肾小球早期病理变化^[43]。上述研究提示黄葵胶囊预处理可以增强 Exo 对肾脏 IRI 治疗作用。



注：A 图为 IL-1 β 水平；B 图为 IL-10 水平；C 图为 IL-18 水平；D 图为 TNF- α 水平。与 Sham 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 I/R 组比较，^b $P < 0.05$ ；与 E 组比较，^c $P < 0.05$ 。

图 5 各组大鼠血清炎症因子水平

Figure 5 Levels of serum inflammatory factors of rats among each group

本实验证实, 黄葵胶囊预处理 Exo 较 Exo 更能够保护肾脏功能。

综上所述, 黄葵胶囊预处理可以提高 HUC-MSC 来源 Exo 治疗肾脏 IRI 的效应, 其机制与 ERS 相关。本研究为肾脏 IRI 的治疗提供了新思路, 补充了肾脏保护机制, 为后续临床应用提供了实验数据支撑。

参考文献:

- [1] KURZHAGEN J T, DELLEPIANE S, CANTALUPPI V, et al. AKI: an increasingly recognized risk factor for CKD development and progression[J]. *J Nephrol*, 2020, 33(6): 1171-1187. DOI: 10.1007/s40620-020-00793-2.
- [2] WANG M, CHEN Z, TANG Z, et al. Natural products derived from traditional Chinese medicines targeting ER stress for the treatment of kidney diseases[J]. *Ren Fail*, 2024, 46(2): 2396446. DOI: 10.1080/0886022X.2024.2396446.
- [3] WU J, ZHANG F, ZHENG X, et al. Identification of renal ischemia reperfusion injury subtypes and predictive strategies for delayed graft function and graft survival based on neutrophil extracellular trap-related genes[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1047367. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1047367.
- [4] WANG J, WANG W, ZHANG J, et al. Deficiency of flavin-containing monooxygenase 3 protects kidney function after ischemia-reperfusion in mice[J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 1054. DOI: 10.1038/s42003-024-06718-0.
- [5] SUN Y, KANG J, GUAN X, et al. Regulation of endoplasmic reticulum stress on the damage and apoptosis of renal tubular epithelial cells induced by calcium oxalate crystals[J]. *Urolithiasis*, 2021, 49(4): 291-299. DOI: 10.1007/s00240-021-01261-7.
- [6] YANG Y, YUAN F, XIANG D, et al. Spotlight on endoplasmic reticulum stress in acute kidney injury: a bibliometric analysis and visualization from 1997 to 2024[J]. *Medicine*, 2024, 103(36): e39567. DOI: 10.1097/MD.00000000000039567.
- [7] WANG S, WU R, CHEN Q, et al. Exosomes derived from TNF- α -treated bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate myocardial infarction injury in mice[J]. *Organogenesis*, 2024, 20(1): 2356341. DOI: 10.1080/15476278.2024.2356341.
- [8] DAI Z, CAI R, ZENG H, et al. Exosome may be the next generation of promising cell-free vaccines[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2024, 20(1): 2345940. DOI: 10.1080/21645515.2024.2345940.
- [9] TAO S C, YUAN T, RUI B Y, et al. Exosomes derived from human platelet-rich plasma prevent apoptosis induced by glucocorticoid-associated endoplasmic reticulum stress in rat osteonecrosis of the femoral head via the Akt/Bad/Bcl-2 signal pathway[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 733-750. DOI: 10.7150/thno.17450.
- [10] ZHANG Q, PIAO C, XU J, et al. ADSCs-exo attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury after hepatectomy by inhibiting endoplasmic reticulum stress and inflammation[J]. *J Cell Physiol*, 2023, 238(3): 659-669. DOI: 10.1002/jcp.30968.
- [11] YU M, LIU W, LI J, et al. Exosomes derived from atorvastatin-pretreated MSC accelerate diabetic wound repair by enhancing angiogenesis via AKT/eNOS pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 350. DOI: 10.1186/s13287-020-01824-2.
- [12] ZHANG G, ZHU Z, WANG H, et al. Exosomes derived from human neural stem cells stimulated by interferon gamma improve therapeutic ability in ischemic stroke model[J]. *J Adv Res*, 2020, 24: 435-445. DOI: 10.1016/j.jare.2020.05.017.
- [13] HUANG P, WANG L, LI Q, et al. Atorvastatin enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell-derived exosomes in acute myocardial infarction via up-regulating long non-coding RNA H19[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(2): 353-367. DOI: 10.1093/cvr/cvz139.
- [14] HU Y, TAO R, CHEN L, et al. Exosomes derived from pioglitazone-pretreated MSCs accelerate diabetic wound healing through enhancing angiogenesis[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 150. DOI: 10.1186/s12951-021-00894-5.
- [15] ZHANG B, SU L, CHEN Z, et al. Exosomes derived from Baicalin-pretreated bone mesenchymal stem cells improve Th17/Treg imbalance after hepatic ischemia-reperfusion via FGF21 and the JAK2/STAT3 pathway[J]. *IUBMB Life*, 2024, 76(8): 534-547. DOI: 10.1002/iub.2810.
- [16] 于小芸, 薛雪峰, 李锋, 等. 黄葵胶囊治疗慢性肾脏病的研究进展[J]. *世界中医药*, 2024, 19(9): 1365-1368. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2024.09.026.
- [16] YU X Y, XUE X F, LI F, et al. Huangkui capsules in treatment of chronic kidney disease: a review[J]. *World Chin Med*, 2024, 19(9): 1365-1368. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2024.09.026.
- [17] WU C, TANG H, CUI X, et al. A single-cell profile reveals the transcriptional regulation responded for *Abelmoschus Manihot* (L.) treatment in diabetic kidney disease[J]. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155642. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155642.
- [18] ZHANG Y, CHANG Y, HAN Z, et al. Estrogen protects against renal ischemia-reperfusion injury by regulating Th17/Treg cell immune balance[J]. *Dis Markers*, 2022: 7812099. DOI: 10.1155/2022/7812099.
- [19] KONG F X, LIU H, XU T, et al. RG108 attenuates acute kidney injury by inhibiting P38 MAPK/FOS and JNK/JUN pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 142(Pt A): 113077. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.113077.
- [20] CAILLARD P, BENNIS Y, BOUDOT C, et al. Acute kidney disease in mice is associated with early cardiovascular dysfunction[J]. *Ren Fail*, 2024, 46(2): 2415510. DOI: 10.1080/0886022X.2024.2415510.
- [21] REDINGER J W, JOHNSON K M, SLAWSKI B A. Perioperative liver and kidney diseases[J]. *Med Clin North Am*, 2024, 108(6): 1119-1134. DOI: 10.1016/j.mcna.2024.04.001.
- [22] NØRGÅRD M Ø, SVENNINGSEN P. Acute kidney injury by ischemia/reperfusion and extracellular vesicles[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20): 15312. DOI: 10.3390/ijms242015312.
- [23] CHAUDHARY S, KASHANI K B. Acute kidney injury management strategies peri-cardiovascular interventions[J]. *Interv Cardiol Clin*, 2023, 12(4): 555-572. DOI: 10.1016/j.iccl.2023.06.008.

- [24] YUAN Y, YUAN L, YANG J, et al. Autophagy-deficient macrophages exacerbate cisplatin-induced mitochondrial dysfunction and kidney injury via miR-195a-5p-SIRT3 axis[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4383. DOI: 10.1038/s41467-024-47842-z.
- [25] MAO R, SHEN J, HU X. RETRACTED: BMSCs-derived exosomal microRNA-let-7a plays a protective role in diabetic nephropathy via inhibition of USP22 expression[J]. *Life Sci*, 2021, 268: 118937. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118937.
- [26] 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. DOI: 10.1007/s12079-020-00594-z.
- [27] HADE M D, SUIRE C N, SUO Z. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: applications in regenerative medicine[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1959. DOI: 10.3390/cells10081959.
- [28] ELRASHIDY R A, ZAKARIA E M, HASAN R A, et al. Implication of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial perturbations in remote liver injury after renal ischemia/reperfusion in rats: potential protective role of azilsartan[J]. *Redox Rep*, 2024, 29(1): 2319963. DOI: 10.1080/13510002.2024.2319963.
- [29] ZHANG H, ZHENG C, XU Y, et al. Comprehensive molecular and cellular characterization of endoplasmic reticulum stress-related key genes in renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1340997. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1340997.
- [30] DIAZ-BULNES P, RODRÍGUEZ R M, BANON-MANEUS E, et al. Inhibition of BRD4 attenuates ER stress-induced renal ischemic-reperfusion injury[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(5): 1547-1562. DOI: 10.7150/ijbs.83040.
- [31] WANG J, YU Y, ZHANG H, et al. Gypenoside XVII attenuates renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome-triggered pyroptosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 962: 176187. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.176187.
- [32] RODVOLD J J, GRIMMER M, RUIZ K, et al. ATF6 promotes colorectal cancer growth and stemness by regulating the Wnt pathway[J]. *Cancer Res Commun*, 2024, 4(10): 2734-2755. DOI: 10.1158/2767-9764.CRC-24-0268.
- [33] ZHENG J, LI Y, ZHANG T, et al. Endoplasmic reticulum stress and autophagy in cerebral ischemia/reperfusion injury: PERK as a potential target for intervention[J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20(5): 1455-1466. DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-23-00794.
- [34] WANG Y, TIAN J, QIAO X, et al. Intermedin protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *BMC Nephrol*, 2015, 16: 169. DOI: 10.1186/s12882-015-0157-7.
- [35] NOH M R, KIM J I, HAN S J, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(9): 1895-1901. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.06.004.
- [36] FAN Y, XIAO W, LEE K, et al. Inhibition of reticulon-1A-mediated endoplasmic reticulum stress in early AKI attenuates renal fibrosis development[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(7): 2007-2021. DOI: 10.1681/ASN.2016091001.
- [37] CHEN S, SUN F, QIAN H, et al. Preconditioning and engineering strategies for improving the efficacy of mesenchymal stem cell-derived exosomes in cell-free therapy[J]. *Stem Cells Int*, 2022: 1779346. DOI: 10.1155/2022/1779346.
- [38] SHA Z, LIU W, JIANG T, et al. Astragaloside IV induces the protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells derived exosomes in acute myocardial infarction by inducing angiogenesis and inhibiting apoptosis[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2024, 40(3): 1438-1455. DOI: 10.1080/02648725.2023.2194087.
- [39] 刘中, 产进中, 潘永露, 等. 吗啡预处理诱导的大鼠血清外泌体对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(11): 1600-1605. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2018.11.024.
- LIU Z, CHAN J Z, PAN Y L, et al. Effects of morphine preconditioning induced serum exosome on hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cardiomyocytes[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2018, 34(11): 1600-1605. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2018.11.024.
- [40] 毛诗慧, 李琳, 孙逸梅, 等. 川芎嗪预处理增强骨髓间充质干细胞外泌体对脑缺血大鼠的神经保护和抗神经元凋亡作用[J]. *浙江中医药大学学报*, 2023, 47(5): 455-462. DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2023.05.001.
- MAO S H, LI L, SUN Y M, et al. Tetramethylpyrazine pretreatment enhances the neuroprotective and anti-neuronal apoptosis effects of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes in rats with cerebral ischemia[J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2023, 47(5): 455-462. DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2023.05.001.
- [41] ALZHRANI F A. Melatonin improves therapeutic potential of mesenchymal stem cells-derived exosomes against renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(5): 2887-2907.
- [42] HAN W, MA Q, LIU Y, et al. Huangkui capsule alleviates renal tubular epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and TLR4/NF- κ B signaling[J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 203-214. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.12.021.
- [43] LIU B H, TU Y, NI G X, et al. Total flavones of *Abelmoschus Manihot* ameliorates podocyte pyroptosis and injury in high glucose conditions by targeting METTL3-dependent m(6)a modification-mediated NLRP3-inflammasome activation and PTEN/PI3K/Akt signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 667644. DOI: 10.3389/fphar.2021.667644.

(收稿日期: 2024-10-20)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)