

枸杞水提取物对马兜铃酸I诱导 HK-2 细胞损伤的保护作用及机制

刘 倩^{1,2}, 李茂娟³, 汤海明³, 唐文超³, 楼迪栋^{3*}

1. 贵州中医药大学 基础中医学院 (岐黄学院), 贵州 贵阳 550025

2. 贵州中医药大学 第一附属医院, 贵州 贵阳 550001

3. 贵州中医药大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: **目的** 探讨枸杞水提取物 (LBAE) 对马兜铃酸I (AAI) 诱导 HK-2 细胞损伤的保护作用及其可能机制。**方法** 采用 CCK-8 法筛选 AAI 建模浓度及 LBAE 干预浓度。正式实验设置对照组、模型组、N-乙酰半胱氨酸 (NAC, 阳性药, 5 mmol·L⁻¹) 组和 LBAE (800 μg·mL⁻¹) 组, 模型组和给药组给予 100 μmol·L⁻¹ AAI 造模, 同时给予相应药物处理 24 h, 对照组加入等体积二甲基亚砜 (DMSO)。采用 CCK-8 法检测细胞活力, 检测培养上清乳酸脱氢酶 (LDH) 释放水平, 倒置显微镜和透射电镜观察细胞形态及超微结构; 试剂盒法检测超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 及肿瘤坏死因子 (TNF)-α、白细胞介素 (IL)-6、IL-12 水平; 采用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡; Western blotting 检测凋亡相关蛋白及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路相关蛋白表达。**结果** 100 μmol·L⁻¹ AAI 可使 HK-2 细胞形成稳定损伤, 800 μg·mL⁻¹ LBAE (以生药量计) 和 5 mmol·L⁻¹ NAC 干预作用较明显, 故分别作为后续建模及干预浓度。与对照组比较, 模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$), LDH 释放水平显著升高 ($P < 0.01$), 细胞形态及超微结构损伤明显; SOD、GSH 水平显著降低, MDA 及 TNF-α、IL-6、IL-12 水平显著升高 ($P < 0.01$); 细胞总凋亡率显著升高 ($P < 0.01$), Bcl-2 表达显著降低, Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 及半胱氨酸蛋白水解酶 (Caspase) 相关蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达及其磷酸化比值显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, LBAE 干预后细胞活力显著升高 ($P < 0.01$), LDH 释放水平显著降低 ($P < 0.01$), 细胞形态及超微结构损伤减轻; SOD、GSH 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), MDA 及 TNF-α、IL-6、IL-12 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$); 细胞总凋亡率显著降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 表达显著升高 ($P < 0.05$), Bax 及 Caspase 相关蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达及其磷酸化比值显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** LBAE 可减轻 AAI 诱导的 HK-2 细胞损伤, 其作用可能与改善氧化应激和炎症反应、抑制细胞凋亡及调节 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 枸杞水提取物; 马兜铃酸I; HK-2 细胞; 氧化应激; 细胞凋亡; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)09-3032-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.09.005

Protective effect and mechanism of *Lycium barbarum* aqueous extract against aristolochic acid I-induced injury in HK-2 cells

LIU Qian^{1,2}, LI Maojuan³, TANG Haiming³, TANG Wenchao³, LOU Didong³

1. College of Basic Traditional Chinese Medicine (Qihuang College), Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. The First Affiliated Hospital, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

3. School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of *Lycium barbarum* aqueous extract (LBAE) against aristolochic acid I (AAI)-induced injury in HK-2 cells and its potential mechanisms. **Methods** CCK-8 assay was used to determine the optimal concentrations for AAI-induced model establishment and LBAE intervention. The formal experiment included a control group, a model

收稿日期: 2026-04-27

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (82560859); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK [2024] 一般 366); 贵州中医药大学 2025 年校级研究生科研基金项目 (YCXKYB2025004)

作者简介: 刘 倩, 副主任医师, 博士研究生, 从事中医防治肾病研究。E-mail: 402581951@qq.com

***通信作者:** 楼迪栋, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药毒理学与肾脏疾病病理机制研究。E-mail: 15761879@qq.com

group, an *N*-acetylcysteine (NAC, positive control drug at $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) group, and an LBAE group ($800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). The model and treatment groups were exposed to $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AAI for 24 h, with corresponding drugs administered simultaneously; the control group received an equal volume of dimethyl sulfoxide (DMSO). Cell viability was assessed by CCK-8 assay, LDH release levels in culture supernatants were measured, and cell morphology and ultrastructure were observed using inverted microscopy and transmission electron microscopy. Levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, and IL-12 were determined using commercial kits. Apoptosis was analyzed by Annexin V-FITC/PI flow cytometry, and expression of apoptosis-related proteins and PI3K/Akt signaling pathway proteins was detected by Western blotting.

Results Exposure to $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AAI induced stable damage in HK-2 cells, while interventions with $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LBAE (based on crude drug weight) and $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAC showed significant effects, thus these concentrations were selected for subsequent experiments. Compared with the control group, the model group exhibited significantly reduced cell viability ($P < 0.01$), markedly increased LDH release ($P < 0.01$), obvious morphological and ultrastructural damage, significantly decreased SOD and GSH levels, and significantly elevated MDA, TNF- α , IL-6, and IL-12 levels ($P < 0.01$). The total apoptosis rate was significantly higher ($P < 0.01$), Bcl-2 expression was significantly downregulated, whereas Bax and Caspase-related protein expressions were significantly upregulated ($P < 0.01$). Expression of PI3K/Akt signaling pathway proteins and their phosphorylation ratios were significantly reduced ($P < 0.01$). In comparison with the model group, LBAE treatment significantly improved cell viability ($P < 0.01$), reduced LDH release ($P < 0.01$), and alleviated cellular morphological and ultrastructural damage. SOD and GSH levels were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), while MDA, TNF- α , IL-6, and IL-12 levels were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). The total apoptosis rate was significantly lower ($P < 0.01$), Bcl-2 expression was significantly enhanced ($P < 0.05$), and Bax and Caspase-related protein expressions were significantly suppressed ($P < 0.01$). Expression of PI3K/Akt signaling pathway proteins and their phosphorylation ratios were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$).

Conclusion LBAE can alleviate AAI-induced injury in HK-2 cells, possibly through ameliorating oxidative stress and inflammatory responses, inhibiting apoptosis, and modulating the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: *Lycium barbarum* aqueous extract; aristolochic acid I; HK-2 cells; oxidative stress; apoptosis; PI3K/Akt signaling pathway

马兜铃酸 I (AAI) 是马兜铃酸类化合物中主要的肾毒性成分之一, 长期、反复或累积暴露可导致马兜铃酸肾病 (AAN) [1-3]。AAN 主要表现为肾小管上皮细胞损伤及肾小管间质病变, 病情进展后可出现肾小管萎缩、间质纤维化, 甚至发展为终末期肾病[1, 3-5]。肾小管上皮细胞是 AAI 肾毒性作用的重要靶细胞, AAI 可诱导细胞活力下降、线粒体损伤、氧化应激、炎症反应及细胞凋亡等改变, 进而加重肾小管损伤[2, 4-7]。

氧化应激、炎症反应和细胞凋亡是 AAI 诱导肾小管上皮细胞损伤的重要环节[2, 5, 7-8]。AAI 暴露后, 细胞氧化与抗氧化平衡被破坏, 表现为丙二醛 (MDA) 等脂质过氧化产物增加, 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 等抗氧化防御水平降低[2, 5, 8]; 同时可伴随肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6 等炎症因子释放增加[7-9]。随着氧化应激和炎症反应加重, 线粒体结构和功能受损, 细胞凋亡信号被激活, 表现为 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax) 比值下降及天冬氨酸特异性的半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase) 级联反应增强[4, 6, 8]。因此, 从氧化应激、炎症反应和细胞凋亡等方面探讨 AAI 诱导的肾小管上皮细胞损伤机制, 有助于明确其干

预靶点。

磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路 with 细胞存活和凋亡调控密切相关[6, 10]。AAI 诱导的 HK-2 细胞损伤常伴随氧化应激增强、线粒体功能受损和细胞凋亡增加, 而这些改变与细胞存活/凋亡相关信号通路的失衡密切相关。PI3K/Akt 通路活化后可影响 Bcl-2、Bax 及 Caspase 等凋亡相关蛋白表达, 进而调节细胞凋亡水平[6, 10-12]。已有体外研究显示[6], AAI 诱导的人肾小管上皮细胞凋亡与 PI3K/Akt 信号抑制有关, 激活 PI3K/Akt 信号可减轻 AAI 诱导的细胞凋亡。

从中医药理论看, 枸杞子性平、味甘, 归肝、肾经, 具有滋补肝肾、益精明目的功效, 常用于虚劳精亏、腰膝酸痛、眩晕耳鸣、内热消渴、血虚萎黄及目昏不明等肝肾不足相关证候[13]。同时, 枸杞子作为药食同源中药材, 在中成药和保健食品中应用较广, 常作为补益肝肾、益精养血类药物使用, 并可与其他药物配伍以兼顾补益与改善损伤反应[14]。鉴于 AAI 相关肾损伤主要累及肾小管上皮细胞, 并伴随氧化应激、炎症反应和细胞凋亡等病理改变, 选择枸杞水提物 (LBAE) 观察其对 HK-2 细胞损伤的干预作用, 具有一定中医理论依据和实验研究价值。

枸杞子的补益肝肾作用与其多成分、多效应特点具有一定关联,其为常用药食同源品种,主要含枸杞多糖、甜菜碱、类胡萝卜素、黄酮及酚酸类等成分^[15-17]。其中,枸杞多糖被认为是枸杞子最主要的活性成分,既往研究显示其在多种肾损伤模型中可通过改善氧化应激、抑制炎症反应和减少细胞凋亡发挥保护作用^[18-20]。甜菜碱、类胡萝卜素及黄酮/酚酸类成分同样具有抗氧化和细胞保护作用,同时可作为枸杞子药效物质和质量评价的重要参考^[16,21-23]。根据《中国药典》2025 年版^[13],枸杞子质量评价常以多糖和甜菜碱含量作为关键指标,本研究 LBAE 的多糖和甜菜碱含量将作为后续质量控制的参考。

本研究采用 AAI 诱导 HK-2 细胞损伤模型,观察 LBAE 对细胞活力、乳酸脱氢酶(LDH)释放、细胞超微结构、氧化应激、炎症因子、细胞凋亡及 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响,以探讨其对 AAI 诱导肾小管上皮细胞损伤的保护作用及可能机制。

1 材料

1.1 细胞株

人肾小管上皮细胞 HK-2 购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号 CL-0109)。

1.2 药物与主要试剂

枸杞子药材购自湖南省松龄堂中药饮片有限公司,产地为宁夏中宁,批号为 260101,经贵州中医药大学第一附属医院药剂科于佳教授鉴定为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实。称取枸杞子干燥药材 40 g,加入蒸馏水 400 mL,于 100 °C 条件下热水浸提 10 min,提取液经 4 层纱布滤过去除药渣,滤液浓缩并定容至 10 mL,制得折合生药质量浓度为 4 g·mL⁻¹ 的 LBAE 母液。母液经 0.22 μm 微孔滤膜除菌后,于 4 °C 保存,细胞实验前用完全培养基稀释至所需浓度,实验中 LBAE 浓度均以生药量计。枸杞水提物得率以干物质质量计算,得率为 8.68%;枸杞多糖的平均质量分数为 30.85%,甜菜碱的平均质量分数为 1.13%。

AAI(质量分数≥98%,CAS 号 313-67-7,批号 DST231116-021)购自成都乐美天医药科技有限公司;N-乙酰半胱氨酸(NAC),海南赞邦制药有限公司,批号 1012962;DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司(货号 C11965500BT);胎牛血清购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号 164210);青霉素-链

霉素双抗(批号 20241205)、CCK-8 试剂盒(货号 CA1210)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(货号 CA1020)购自北京索莱宝科技有限公司;LDH 检测试剂盒(货号 A020-2-2)购自南京建成生物工程研究所;SOD、GSH、MDA、TNF-α、IL-6、IL-12 检测试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,货号分别为 E-BC-K020-M、E-BC-K030-M、E-BC-K028-M、E-EL-H010、E-EL-H615、E-EL-H0150。Bcl-2 抗体(货号 381702,1:1 000)、Bax 抗体(货号 R22708,1:1 000)、Caspase-3 抗体(货号 R23315,1:1 000)、Caspase-9 抗体(货号 R22844,1:1 000)、cleaved-Caspase-3 抗体(货号 341034,1:1 000)、cleaved-Caspase-9 抗体(货号 R381336,1:1 000)、PI3K 抗体(货号 381176,1:1 000)、Akt 抗体(货号 R23412,1:1 000)、p-PI3K 抗体(货号 341468,1:1 000)、p-Akt1 抗体(货号 R3815551,1:1 000)均购自成都正能生物技术有限公司;β-actin 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司(货号 66009-1-Ig,1:10 000);ECL 化学发光试剂(货号 BG0001)购自葆光生物技术研究(重庆)有限公司;RIPA 裂解液(北京索莱宝科技有限公司,货号 R0010)。

1.3 主要仪器

CLM-170B-8-CN CO₂ 细胞培养箱购自太仓艺斯医疗器械科技有限公司;TE2000-S 倒置显微镜购自尼康株式会社;DNM-9602G 酶标仪购自北京普朗医疗设备有限公司;BD FACSCanto™ II 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司);Hitachi HT7700 透射电子显微镜(日本日立公司);SCL-24 高速冷冻离心机购自 Scilogex 公司;DYC Mini 4 垂直电泳槽购自南京裕成实验设备有限公司;Mini-P4、Mini-Trans blot 电泳仪及转膜系统购自北京君意东方电泳设备有限公司;ChemiScope 6100 Western blotting 显影仪购自上海勤翔科学仪器有限公司。

2 方法

2.1 HK-2 细胞培养

HK-2 细胞采用含 10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 μg·mL⁻¹ 链霉素的 DMEM 高糖培养基培养,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。细胞融合度达 80%~90%时,采用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化传代,取对数生长期细胞用于后续实验。

2.2 药物溶液配制

AAI 用二甲基亚砜(DMSO)配制成 50 mmol·L⁻¹

储备液,分装后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,实验前用完全培养基稀释至所需浓度。各组均加入等体积 DMSO,使 DMSO 终浓度保持一致。LBAE 折合生药质量浓度为 $4\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,细胞实验前经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过除菌,并以完全培养基稀释至 100、200、400、800、1 000、1 500、2 000、3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期 HK-2 细胞,消化后制备成细胞悬液,按每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板,细胞贴壁培养 24 h 后,进行如下实验。实验一:①对照组和 AAI 10、20、40、60、80、100、120、140 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,考察 AAI 的最佳作用浓度,置于倒置显微镜下观察细胞形态、贴壁状态及细胞密度,并采集代表性图像;实验二:对照组和 LBAE (100、200、400、800、1 000、1 500、2 000、3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,考察 LBAE 的安全浓度;实验三:对照组、模型(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AAI)组和 LBAE (100、200、400、800、1 600、3 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,模型组和给药组给予 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AAI 造模,考察 LBAE 有效浓度;④对照组、模型组和 NAC (0.5、1.0、2.5、5.0、15.0、20.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,阳性药)组,模型组和给药组给予 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AAI 造模,考察 NAC 有效浓度。给予相应药物处理 24 h,对照组加入等体积 DMSO。处理结束后,吸弃培养基,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂和 100 μL 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,于 450 nm 波长处测定吸光度(A)值,计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 LDH 释放水平检测

取对数生长期 HK-2 细胞,消化后制备细胞悬液,按每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板,设置对照组、模型组、NAC (5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组、LBAE (800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,每组设 6 个复孔。常规培养 24 h 细胞贴壁稳定后,模型组和给药组给予 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AAI 造模,同时给予相应药物处理 24 h,对照组加入等体积 DMSO。置于倒置显微镜下观察细胞形态、贴壁状态及细胞密度,并采集代表性图像。收集培养上清,按 LDH 检测试剂盒说明书操作,于 490 nm 波长处测定 A 值,计算 LDH 释放水平。

2.5 透射电镜观察细胞超微结构

细胞接种、分组及给药处理方式均同“2.4”项,细胞处理结束后,收集细胞并离心,弃上清。细胞沉淀加入含 4%多聚甲醛和 2.5%戊二醛的固定液,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,加入

1%锇酸固定 3 h,经乙醇梯度脱水、丙酮置换、树脂浸透、包埋和聚合后制备超薄切片。切片经染色后置于 Hitachi HT7700 透射电子显微镜下观察并采集图像,重点观察线粒体、内质网及细胞膜等超微结构变化。

2.6 氧化应激指标检测

细胞接种、分组及给药处理方式均同“2.4”项,各组 HK-2 细胞处理 24 h 后,收集细胞,加入 RIPA 裂解液裂解,离心后取上清。按试剂盒说明书检测 SOD 活性和 GSH、MDA 水平。采用 BCA 法测定蛋白浓度,并按蛋白浓度校正检测结果。

2.7 炎症因子检测

细胞接种、分组及给药处理方式均同“2.4”项,细胞处理结束后,收集培养上清,离心去除细胞碎片。按 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-6 和 IL-12 水平,于 450 nm 波长处读取 A 值,并根据标准曲线计算各指标浓度。

2.8 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞接种、分组及给药处理方式均同“2.4”项,细胞处理结束后,收集细胞,PBS 洗涤 3 次,按 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书染色。采用 BD FACSCanto™ II 流式细胞仪检测,激发波长为 488 nm,并用 BD FACSDiva™ 软件分析。总凋亡率为早期凋亡率与晚期凋亡率之和。实验重复 3 次。

2.9 Western blotting 检测相关蛋白表达

细胞接种、分组及给药处理方式均同“2.4”项,各组 HK-2 细胞处理结束后,PBS 洗涤,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 15 min,离心取上清,采用 BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品,经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜。膜经 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,加入相应一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。检测蛋白包括 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、cleaved-Caspase-3、cleaved-Caspase-9、PI3K、Akt、p-PI3K 和 p-Akt1, β -actin 作为内参。次日洗膜后加入相应二抗,室温孵育 1 h,采用 ECL 法显色,使用 ChemiScope 6100 显影系统采集图像。采用 Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与 β -actin 灰度值比值表示蛋白相对表达量,并计算 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt1/Akt。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合正态分布的两组间比较采用

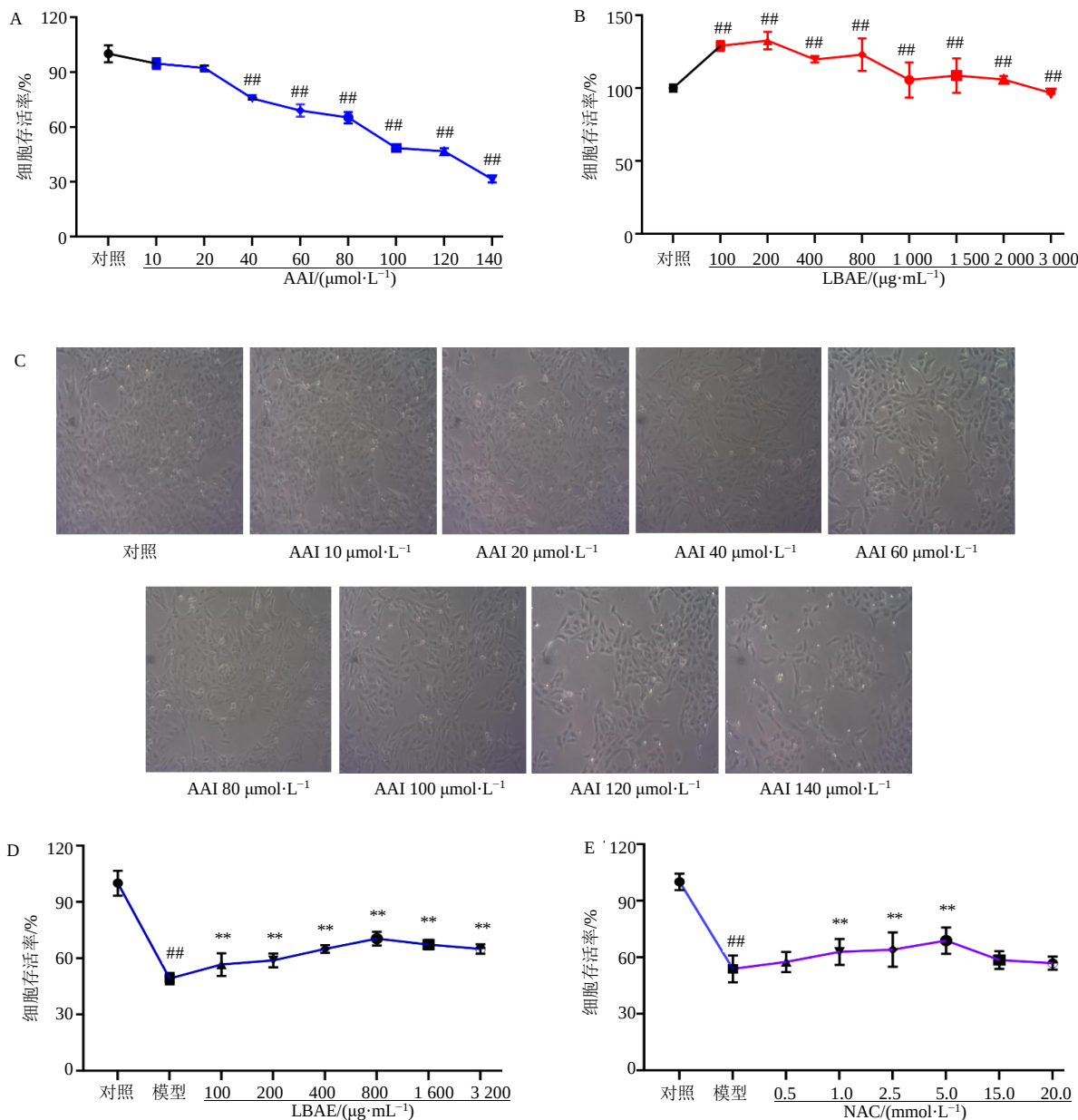
独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 方差齐时组间两两比较采用 LSD 法, 方差不齐时采用 Tamhane's T2 法。不符合正态分布的资料采用非参数检验。

3 结果

3.1 AAI 损伤模型建立及药物干预浓度筛选

如图 1-A 所示, CCK-8 检测结果显示, 与对照

组比较, $40 \sim 140 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AAI 处理后细胞活力明显降低 ($P < 0.01$), 其中 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理后细胞活力降至约 50%。HK-2 细胞经不同浓度 AAI 处理 24 h 后, 细胞形态随 AAI 浓度升高逐渐发生改变 (图 1-C)。对照组细胞贴壁良好, 排列较紧密, 呈典型上皮样细胞形态; AAI 处理后, 细胞密度逐渐降低, 细胞间隙增大, 部分细胞由上皮样形态转变



A、B-不同浓度 AAI、LBAE 对 HK-2 细胞存活率的影响; C-不同浓度 AAI 对细胞形态的影响 ($\times 100$); D、E-不同浓度 LBAE、NAC 对 AAI 损伤 HK-2 细胞模型的影响; 与对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $**P < 0.01$ 。

A, B-Effects of different concentrations of AAI and LBAE on the survival rate of HK-2 cells; C- Effects of different concentrations of AAI on cell morphology ($\times 100$); D, E-Effects of different concentrations of LBAE and NAC on the AAI-injured HK-2 cell model; $##P < 0.01$ vs control group; $**P < 0.01$ vs model group.

图 1 AAI 诱导 HK-2 细胞损伤模型建立及药物干预浓度筛选 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Establishment of AAI-induced HK-2 cell injury model and screening of intervention concentrations ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

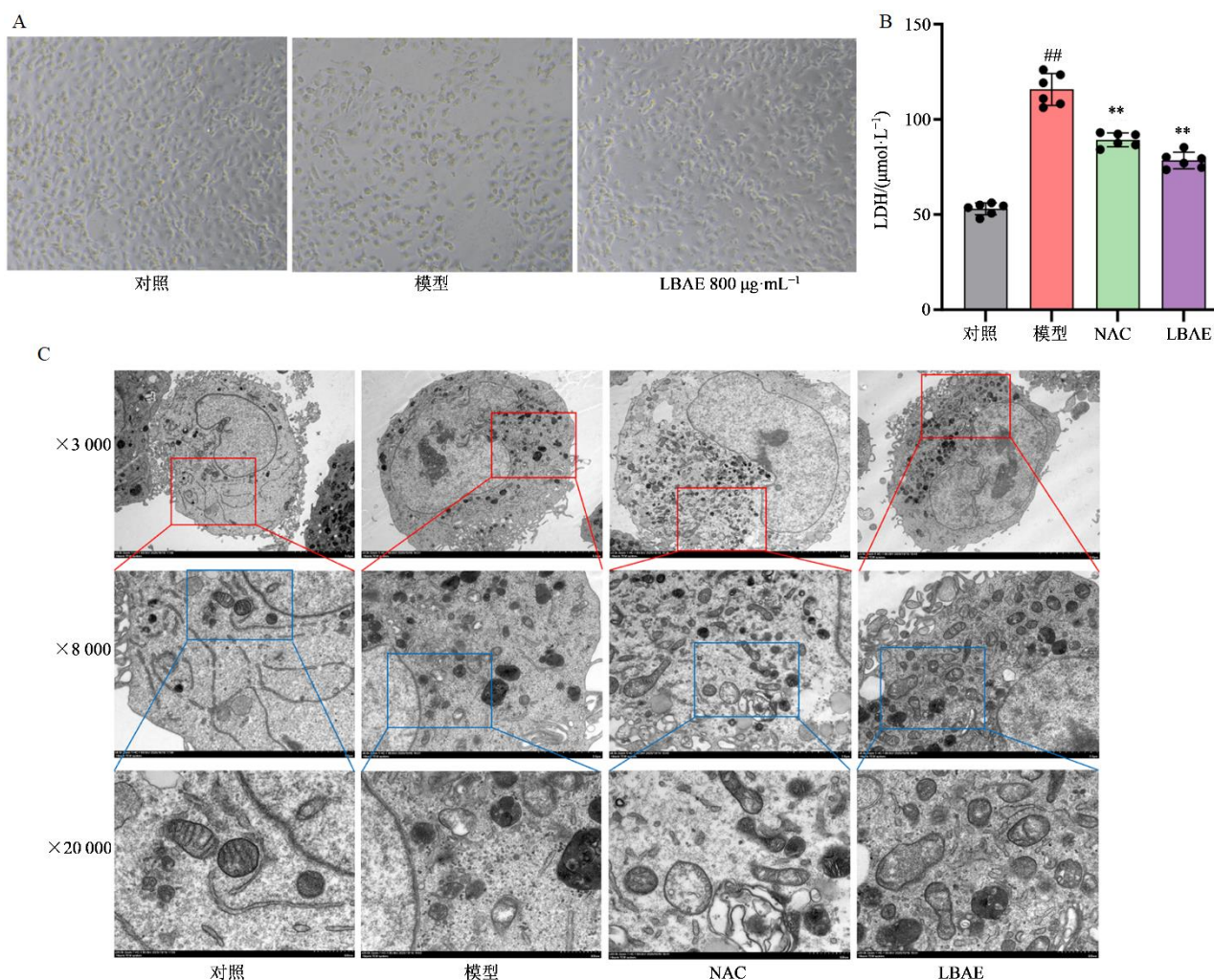
为长梭形或不规则形,伴有细胞皱缩、变圆、脱落及漂浮细胞增多等改变。高浓度 AAI 处理后上述损伤表现更加明显,提示 AAI 可诱导 HK-2 细胞发生浓度相关性形态损伤。结合 CCK-8 结果,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AAI 处理 24 h 后细胞活力降至约 50%,且形态学损伤较为明确,同时仍保留一定数量贴壁细胞,故选取 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AAI 作为后续建模浓度。

LBAE 单独处理后(图 1-B),HK-2 细胞活力未见降低,提示 100~3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LBAE 对 HK-2 细胞无明显毒性。在 AAI 损伤模型基础上给予不同浓度 LBAE 干预后(图 1-D),各干预组细胞活力较模型组显著升高($P<0.01$),其中 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组作用较明显,故选取 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为后续干预浓度。

在 AAI 损伤模型基础上给予不同浓度 NAC 干预后(图 1-E),1.0、2.5、5.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAC 均可改善 HK-2 细胞活力($P<0.01$),其中 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAC 作用最明显,故选取 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为后续阳性对照浓度。这一浓度既参考了文献报道^[24-27]中 HK-2 氧化应激模型常用浓度,也结合了本研究实验筛选结果。

3.2 LBAE 减轻 AAI 诱导的 HK-2 细胞损伤

如图 2 所示,对照组 HK-2 细胞贴壁良好,细胞密度较高,形态较规则;模型组细胞数量减少,贴壁状态变差,部分细胞皱缩、变圆;LBAE 干预后,细胞形态及生长状态较模型组改善。与对照组比较,模型组培养上清 LDH 释放水平升高($P<$



A-各组 HK-2 细胞形态变化 ($\times 100$); B-各组培养上清 LDH 释放水平; C-各组细胞超微结构变化。与对照组比较: $^{###}P<0.01$; 与模型组比较: $^{**}P<0.01$ 。

A-Morphological changes of HK-2 cells in each group ($\times 100$); B-LDH release levels in the culture supernatants of each group; C-Ultrastructural changes of cells in each group. $^{###}P<0.01$ vs control group; $^{**}P<0.01$ vs model group.

图 2 LBAE 对 AAI 诱导 HK-2 细胞损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 2 Effects of LBAE on AAI-induced injury in HK-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

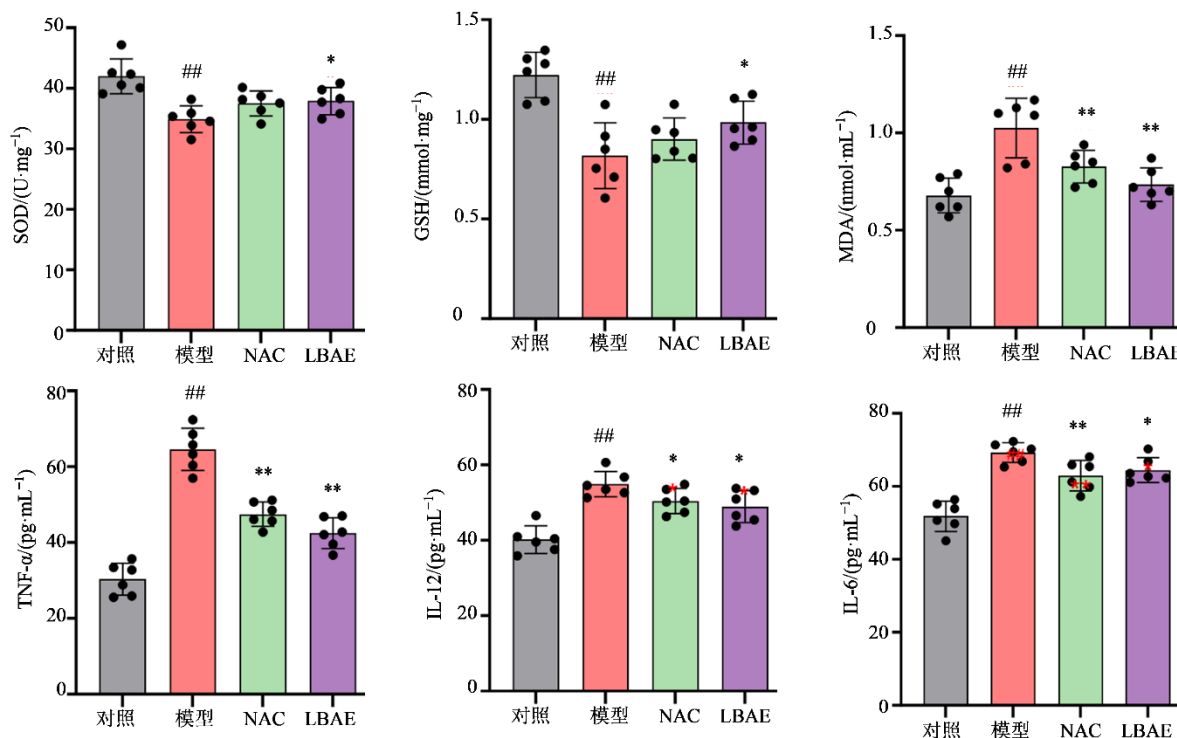
0.01); 与模型组比较, NAC 组、LBAE 组 LDH 释放水平降低 ($P < 0.01$)。透射电镜观察显示, 模型组细胞超微结构损伤明显, 主要表现为细胞膜结构不清、胞质溶解、线粒体肿胀、嵴断裂或消失; NAC、LBAE 干预后, 上述损伤减轻。提示 LBAE 可减轻 AAI 诱导的 HK-2 细胞损伤。

3.3 LBAE 改善 AAI 诱导的氧化应激和炎症反应

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组 HK-2 细

胞 SOD、GSH 水平显著降低, MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, LBAE 组 SOD、GSH 水平显著升高, MDA 水平降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

炎症因子检测结果显示, 与对照组比较, 模型组 TNF- α 、IL-12 和 IL-6 水平均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, NAC、LBAE 组 TNF- α 、IL-12 和 IL-6 水平均降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。提示 LBAE 可改善 AAI 诱导的 HK-2 细胞氧化应激和炎症反应。



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group.

图 3 LBAE 对 AAI 诱导 HK-2 细胞氧化应激和炎症反应的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 3 Effects of LBAE on oxidative stress and inflammatory response in HK-2 cells induced by AAI ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.4 LBAE 抑制 AAI 诱导的 HK-2 细胞凋亡

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组 HK-2 细胞总凋亡率升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, NAC 组及 LBAE 组细胞总凋亡率降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

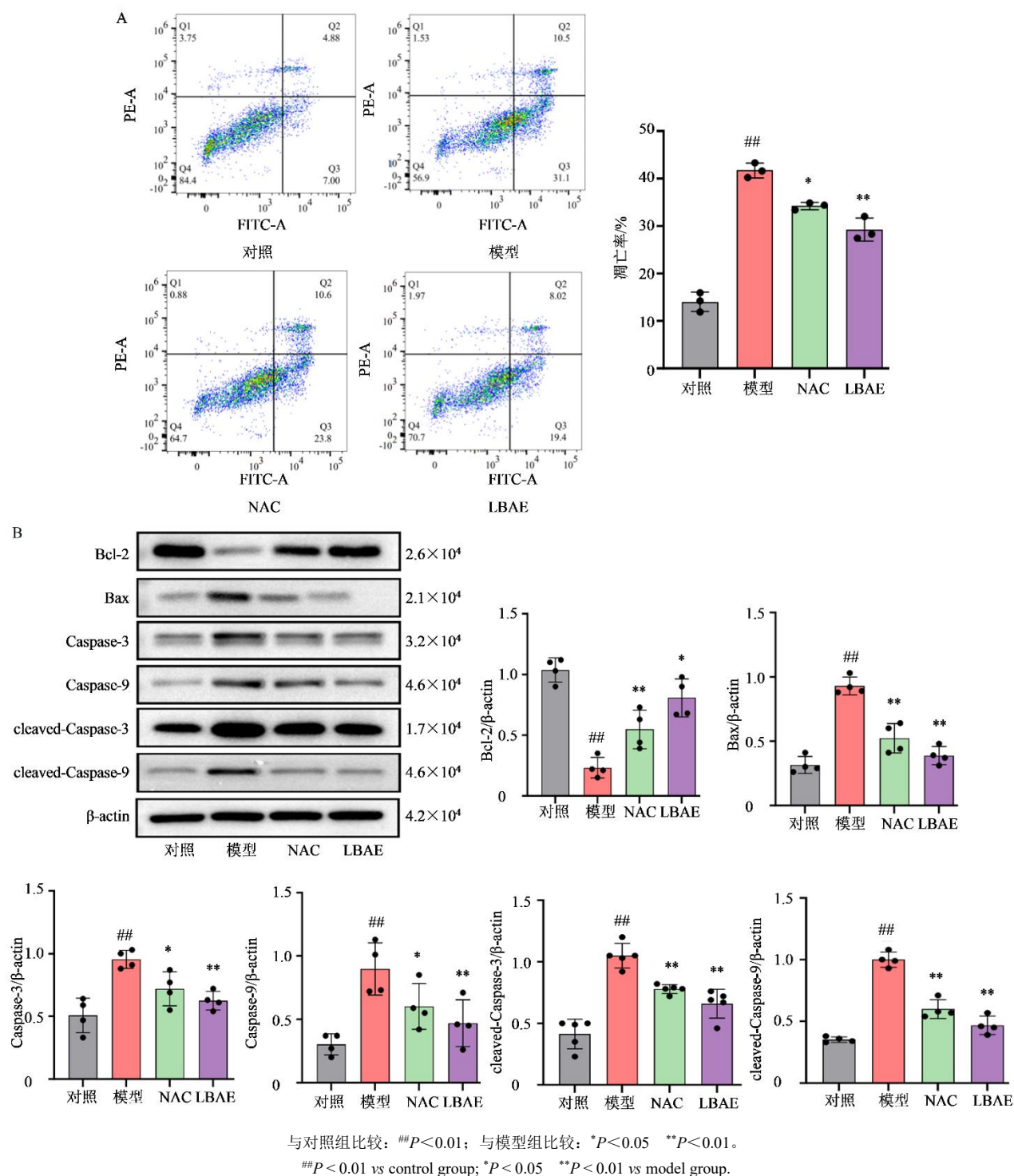
Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组 Bcl-2 蛋白表达降低, Bax、Caspase-3、Caspase-9、cleaved-Caspase-3 及 cleaved-Caspase-9 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, NAC 组及 LBAE 组 Bcl-2 蛋白表达升高, Bax、Caspase-3、Caspase-9、cleaved-Caspase-3 及 cleaved-Caspase-9 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果提示 LBAE 可抑制 AAI 诱导的 HK-2 细胞凋亡。

3.5 LBAE 对 AAI 诱导 HK-2 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组 HK-2 细胞 PI3K、Akt、p-PI3K 和 p-Akt1 蛋白表达均明显降低, p-PI3K/PI3K 及 p-Akt1/Akt 亦明显下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, NAC 组、LBAE 组 PI3K、Akt、p-PI3K 和 p-Akt1 蛋白表达均升高, p-PI3K/PI3K 及 p-Akt1/Akt 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果提示 LBAE 可上调 AAI 诱导损伤状态下 HK-2 细胞 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达, 并提高 PI3K 和 Akt 磷酸化水平。

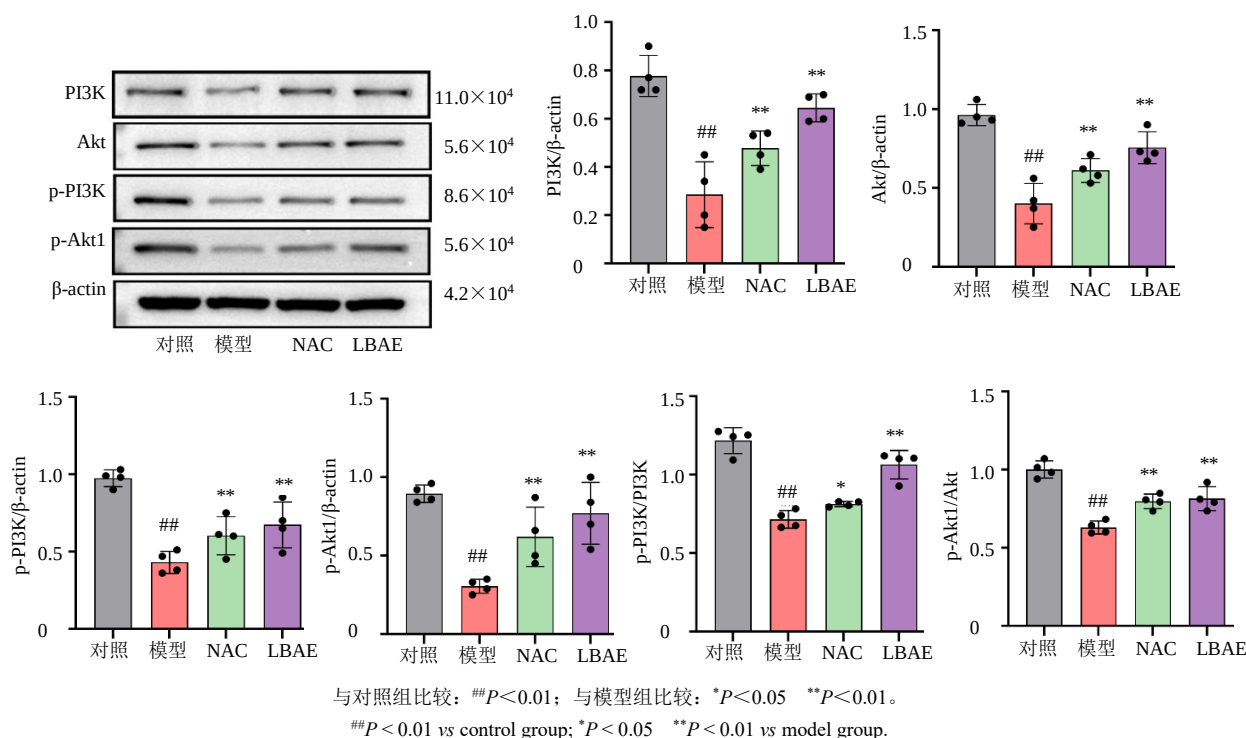
4 讨论

AAI 相关肾损伤主要累及肾小管上皮细胞, 肾小

图 4 LBAE 对 AAI 诱导 HK-2 细胞凋亡 (A) 及相关蛋白表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Fig. 4 Influence of LBAE on apoptosis (A) of HK-2 cells induced by AAI and expression of related proteins (B) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

管上皮细胞损伤是 AAN 发生发展的关键环节^[1, 3-4]。HK-2 细胞来源于人近端肾小管上皮细胞, 具有较稳定的肾小管上皮细胞特征, 常用于药物性肾小管损伤的体外研究^[6]。本研究采用 AAI 干预 HK-2 细胞, 模型组细胞活力降低、LDH 释放增加, 并伴有

细胞形态异常和超微结构损伤, 主要表现为线粒体肿胀、嵴断裂或消失, 说明 AAI 可诱导 HK-2 细胞形成较明确的损伤状态。浓度筛选结果显示, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AAI 处理后细胞活力降至约 50%, 既能形成稳定损伤, 又保留药物干预观察空间, 故

图 5 LBAE 对 AAI 诱导 HK-2 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Fig. 5 Effects of LBAE on PI3K/Akt signaling pathway in HK-2 cells induced by AAI ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

作为后续建模浓度。因此,该模型可为评价 LBAE 对 AAI 诱导肾小管上皮细胞损伤的干预作用提供实验基础。

枸杞子为常用药食同源中药材,化学成分较为复杂,主要包括枸杞多糖、甜菜碱、类胡萝卜素、黄酮、酚酸及有机酸等^[15-17]。在质量评价方面,多糖和甜菜碱常被作为枸杞子质量控制的重要参考指标;同时,HPLC、HILIC-ELSD、UHPLC-QTOF-MS/MS 等分析方法也被用于枸杞子中甜菜碱、酚酸、黄酮、类胡萝卜素及其他差异代谢物的检测和质量评价^[28-32]。除多糖类成分外,甜菜碱、类胡萝卜素以及黄酮/酚酸类成分也具有一定抗氧化和细胞保护潜力,可能共同参与 LBAE 的整体药效^[16-17, 30, 33]。此外,网络药理学研究提示^[34],LBAE 相关成分可能通过多成分、多靶点、多通路方式参与肾脏保护,其中 PI3K/Akt 通路可能与细胞存活、抗凋亡和应激反应调控有关。因此,本研究中 LBAE 对 AAI 诱导的 HK-2 细胞损伤保护作用,可能是多种活性成分协同发挥作用的结果,而非单一成分所致。后续仍需结合成分鉴定、含量测定及单体或组分的药效和机制验证,进一步明确主要药效物质及其作用机制。

氧化应激是 AAI 诱导肾小管上皮细胞损伤的重要机制之一^[2, 5, 8]。AAI 暴露后,细胞内活性氧生成增加,氧化与抗氧化平衡被破坏,脂质过氧化反应增强,抗氧化防御能力下降,进而加重细胞结构和功能损伤^[35]。本研究中,模型组 SOD、GSH 水平降低,MDA 水平升高,与 AAI 诱导氧化应激损伤的特点一致;LBAE 干预后上述指标得到改善,说明其对 HK-2 细胞的保护作用与减轻氧化应激有关。

炎症反应是 AAI 诱导肾小管上皮细胞损伤的重要环节,并与氧化应激密切相关^[2, 7-9]。AAI 暴露可促进 TNF- α 、IL-6 等炎症因子表达,进而加重肾小管上皮细胞损伤^[7-9]。本研究中,LBAE 可降低 AAI 诱导的 TNF- α 、IL-6 和 IL-12 水平,结合氧化应激指标变化,提示其保护作用可能与改善氧化应激及降低炎症因子水平有关。

细胞凋亡是 AAI 诱导肾小管上皮细胞损伤的重要形式之一^[2, 4, 6]。在线粒体凋亡途径中,Bcl-2 和 Bax 分别发挥抗凋亡和促凋亡作用,二者表达失衡可促进下游 Caspase 级联反应启动;其中 Caspase-9 主要参与凋亡信号启动,Caspase-3 主要参与凋亡执行过程^[11, 36]。本研究结果显示,AAI 处理后 HK-2

细胞总凋亡率升高, Bcl-2 表达降低, Bax 及 cleaved-Caspase-9、cleaved-Caspase-3 表达升高, 说明 AAI 可诱导 HK-2 细胞发生线粒体相关凋亡。LBAE 干预后, 上述凋亡相关改变均有不同程度改善, 提示其可减轻 AAI 诱导的 HK-2 细胞凋亡损伤。

PI3K/Akt 信号通路是调节细胞存活和凋亡的重要信号通路, 该通路活化后可影响 Bcl-2、Bax 及 Caspase 等凋亡相关蛋白表达, 进而参与细胞凋亡调控^[6, 10-12, 37]。已有研究显示^[6], AAI 诱导的人肾小管上皮细胞凋亡与 PI3K/Akt 信号抑制有关, 激活该通路可减轻 AAI 诱导的凋亡损伤。本研究中, 模型组 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达及磷酸化比值下降, LBAE 干预后上述指标回升; 结合凋亡相关指标变化, 提示 LBAE 减轻 AAI 诱导 HK-2 细胞凋亡的作用可能与调节 PI3K/Akt 信号通路有关。

PI3K/Akt 信号通路与细胞存活、增殖和凋亡密切相关, 其活化状态可影响线粒体相关凋亡及 Bcl-2 家族蛋白介导的细胞死亡过程^[38-40]。在该通路中, PI3K 受到上游信号刺激后可促进 PIP3 生成, 进而募集并促进 Akt 磷酸化; 磷酸酶与张力蛋白同源物基因 (PTEN) 则可通过降低 PIP3 水平对 Akt 活化形成负向调控^[39-40]。因此, Akt 磷酸化水平下降通常提示该通路活化不足, 其原因可能与 PI3K 激活受限或 PTEN 相关负调控增强有关。Akt 激活后, 可通过多种下游分子发挥作用。一方面, Akt 可调节 Bcl-2、Bax、BAD 及 Caspase 等凋亡相关蛋白, 从而影响线粒体凋亡过程; 另一方面, 其下游雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 和叉头框蛋白 O (FOXO) 等分子也参与细胞代谢、氧化应激应答及炎症反应的调控^[38, 40-41]。已有研究显示, AAI 可诱导 HK-2 细胞 ROS 生成增加、线粒体功能受损和肾小管上皮细胞损伤; 在 AA/AAI 相关细胞损伤研究中, PI3K/Akt 信号抑制、Bcl-2 下调、Bax 上调及 Caspase 激活均与细胞凋亡密切相关^[2, 42]。在 HK-2 细胞中, AAI 处理可降低 Akt 磷酸化水平并增加 Bax/Bcl-2 比值及 cleaved-Caspase-3 表达; 激活 PI3K/Akt 通路可减轻 AAI 诱导的细胞凋亡, 而 Akt 抑制剂 LY294002 可削弱这一保护作用^[6]。本研究中, 模型组 PI3K、Akt、p-PI3K 和 p-Akt1 表达降低, p-PI3K/PI3K 及 p-Akt1/Akt 比值下降, 提示 AAI 损伤状态下 HK-2 细胞 PI3K/Akt 通路活化不足。LBAE 干预后, PI3K/Akt 通路相关指标较模型组升高, Bcl-2 表达增加, 而 Bax、cleaved-

Caspase-9 和 cleaved-Caspase-3 表达降低。结合既往研究, 本研究结果提示, LBAE 可能通过改善 AAI 诱导的 PI3K/Akt 通路活化不足, 调节 Bcl-2/Bax 平衡并抑制 Caspase 级联反应, 从而减轻线粒体相关凋亡。同时, 本研究中氧化应激和炎症因子水平也得到改善, 提示 LBAE 对 PI3K/Akt 通路的影响可能与其减轻氧化应激和炎症反应有关。

本研究以 HK-2 细胞为研究对象, 初步观察了 LBAE 对 AAI 诱导肾小管上皮细胞损伤的干预作用, 但体外细胞模型尚不能完全反映体内 AAI 肾损伤的复杂过程。LBAE 为水提物, 成分组成复杂, 其主要活性成分、有效部位及质量控制指标仍需进一步明确。本研究检测了 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达及磷酸化水平, 并观察到其变化趋势与细胞凋亡、氧化应激和炎症因子改善具有一致性, 提示该通路可能参与 LBAE 的保护作用。然而, 本研究尚未采用 PI3K/Akt 通路特异性抑制剂、激动剂或基因沉默/过表达等反向验证方法, 因此目前只能说明 LBAE 的保护作用与 PI3K/Akt 通路变化相关, 尚不能证明其保护作用依赖该通路。此外, 本研究未进一步检测 PTEN、mTOR、GSK-3 β 、FoxO 等上下游分子, 难以明确该通路上游调控和下游效应的具体参与环节。后续研究需结合动物实验、主要成分分析、通路阻断、基因干预及上下游分子检测, 进一步阐明 LBAE 抗 AAI 诱导肾小管上皮细胞损伤的物质基础和作用机制。同时, 剂量-反应研究中浓度设置和样本量安排需在研究目的、结果解释能力和实验资源消耗之间平衡, 未来将通过低、中、高浓度梯度明确 LBAE 的剂量-效应关系。

LBAE 对 AAI 诱导的 HK-2 细胞损伤具有保护作用, 其机制可能涉及抗氧化、抗炎、抗凋亡及 PI3K/Akt 通路调节。本研究为 LBAE 干预 AAI 相关肾小管损伤提供了实验依据, 但其物质基础和确切机制仍需进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Debelles F D, Vanherweghem J L, Nortier J L. Aristolochic acid nephropathy: A worldwide problem [J]. *Kidney Int*, 2008, 74(2): 158-169.
- [2] Anger E E, Yu F, Li J. Aristolochic acid-induced nephrotoxicity: Molecular mechanisms and potential protective approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1157.

- [3] Zhou Q Q, Jiang L, Su T, et al. Overview of aristolochic acid nephropathy: An update [J]. *Kidney Res Clin Pract*, 2023, 42(5): 579-590.
- [4] Pozdzik A A, Salmon I J, DeBelle F D, et al. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(5): 595-607.
- [5] Wu T K, Wei C W, Pan Y R, et al. Vitamin C attenuates the toxic effect of aristolochic acid on renal tubular cells via decreasing oxidative stress-mediated cell death pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 6086-6092.
- [6] Xie X C, Zhao N, Xu Q H, et al. Relaxin attenuates aristolochic acid induced human tubular epithelial cell apoptosis in vitro by activation of the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(6): 769-776.
- [7] Komatsu M, Funakoshi T, Aki T, et al. Aristolochic acid induces an inflammatory response with prostaglandin E2 production and apoptosis in NRK-52E proximal tubular cells [J]. *Toxicol Lett*, 2023, 378: 39-50.
- [8] Wang Y, Liu Z H, Ma J, et al. Lycopene attenuates the inflammation and apoptosis in aristolochic acid nephropathy by targeting the Nrf2 antioxidant system [J]. *Redox Biol*, 2022, 57: 102494.
- [9] Taguchi S, Azushima K, Yamaji T, et al. Effects of tumor necrosis factor- α inhibition on kidney fibrosis and inflammation in a mouse model of aristolochic acid nephropathy [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23587.
- [10] Chai Y J, Zhu K S, Li C, et al. Dexmedetomidine alleviates cisplatin-induced acute kidney injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via the α 2AR/PI3K/AKT pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(3): 1597-1605.
- [11] Wyllie A H. "Where, O death, is thy sting" A brief review of apoptosis biology [J]. *Mol Neurobiol*, 2010, 42(1): 4-9.
- [12] Carpenter R, Brady M F. *BAX Gene* [M]. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2025.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2025.
- [14] 童丽梅, 姜胤秀, 郭盛, 等. 枸杞子药食产品研究现状及开发策略分析 [J]. *南京中医药大学学报*, 2023, 39(9): 943-953.
Tong L M, Jiang Y X, Guo S, et al. Research status and development strategy analysis of *Lycii Fructus* medicinal and edible products [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2023, 39(9): 943-953.
- [15] Baimakhanova B, Sadanov A, Bogoyavlenskiy A, et al. Exploring phytochemicals and their pharmacological applications from ethnomedicinal plants: A focus on *Lycium barbarum*, Solanaceae [J]. *Heliyon*, 2025, 11(2): e41782.
- [16] Gao Y J, Wei Y F, Wang Y Q, et al. *Lycium barbarum*: A traditional Chinese herb and a promising anti-aging agent [J]. *Aging Dis*, 2017, 8(6): 778-791.
- [17] Qiang X, Xia T, Geng B B, et al. Bioactive components of *Lycium barbarum* and deep-processing fermentation products [J]. *Molecules*, 2023, 28(24): 8044.
- [18] Zhou X L, Zhang Z G, Shi H, et al. Effects of *Lycium barbarum* glycopeptide on renal and testicular injury induced by di(2-ethylhexyl) phthalate [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2022, 27(3): 257-271.
- [19] Wan F Q, Ma F L, Wu J X, et al. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on decreasing serum amyloid A3 expression through inhibiting NF- κ B activation in a mouse model of diabetic nephropathy [J]. *Anal Cell Pathol*, 2022, 2022: 7847135.
- [20] Xie W, Huang Y Y, Chen H G, et al. Study on the efficacy and mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharide against lead-induced renal injury in mice [J]. *Nutrients*, 2021, 13(9): 2945.
- [21] Qian D, Zhao Y X, Yang G, et al. Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae) [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 911.
- [22] Hu S K, Xu Y T, Shadrack S M, et al. *Lycium barbarum* (goji berry): A comprehensive review of chemical composition, bioactive compounds, health-promoting activities, and applications in functional foods and beyond [J]. *Food Chem*, 2025, 496: 146588.
- [23] Tian X J, Liang T S, Liu Y L, et al. Extraction, structural characterization, and biological functions of *Lycium barbarum* polysaccharides: A review [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(9): 389.
- [24] Zhang B H, Liu H, Yuan Y, et al. Knockdown of TRIM8 protects HK-2 cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury by inhibiting oxidative stress-mediated apoptosis and pyroptosis via PI3K/Akt signal pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4973-4983.
- [25] Liu H, Wang L, Weng X D, et al. Inhibition of Brd4 alleviates renal ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis and endoplasmic reticulum stress by blocking FoxO4-mediated oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2019, 24: 101195.
- [26] Zhang G M, Jin S X, Fan X Y, et al. Glucosamine mitigates ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury through anti-inflammatory mechanisms [J]. *Front Mater*, 2024, 11: 1438610.

- [27] Zhang F J, Lau S S, Monks T J. The cytoprotective effect of *N*-acetyl-*L*-cysteine against ROS-induced cytotoxicity is independent of its ability to enhance glutathione synthesis [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 120(1): 87-97.
- [28] Yao R Y, Heinrich M, Zou Y F, et al. Quality variation of goji (fruits of *Lycium* spp.) in China: A comparative morphological and metabolomic analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 151.
- [29] Li Y T, Wang X Y, Sa Y P, et al. A comparative UHPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach reveals the metabolite profiling of wolfberry sourced from different geographical origins [J]. *Food Chem X*, 2024, 21: 101221.
- [30] Lu Y Y, Guo S, Zhang F, et al. Comparison of functional components and antioxidant activity of *Lycium barbarum* L. fruits from different regions in China [J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2228.
- [31] Cho H, Lee D H, Jeong D H, et al. Study on betaine and growth characteristics of *Lycium chinense* mill. in different cultivation environments in South Korea [J]. *Plants*, 2024, 13(16): 2316.
- [32] Zhao B T, Jeong S Y, Hwangbo K, et al. Quantitative analysis of betaine in *Lycii Fructus* by HILIC-ELSD [J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36(10): 1231-1237.
- [33] Teixeira F, Silva A M, Delerue-Matos C, et al. *Lycium barbarum* berries (Solanaceae) as source of bioactive compounds for healthy purposes: A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5): 4777.
- [34] Liu M Y, Gao K, Cui J, et al. Network pharmacology-based strategy to investigate pharmacological mechanisms of polysaccharide-free *Lycium barbarum* extract for chronic kidney disease treatment and verification in an animal model [J]. *Ren Fail*, 2025, 47(1): 2539942.
- [35] Feng C, Anger E E, Zhang X, et al. Protective effects of mitochondrial uncoupling protein 2 against aristolochic acid I-induced toxicity in HK-2 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3674.
- [36] Li P, Zhou L B, Zhao T, et al. Caspase-9: Structure, mechanisms and clinical application [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 23996-24008.
- [37] Datta S R, Brunet A, Greenberg M E. Cellular survival: A play in three Acts [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(22): 2905-2927.
- [38] Shiao J P, Chuang Y T, Tang J Y, et al. The impact of oxidative stress and AKT pathway on cancer cell functions and its application to natural products [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1845.
- [39] Rascio F, Spadaccino F, Rocchetti M T, et al. The pathogenic role of PI3K/AKT pathway in cancer onset and drug resistance: An updated review [J]. *Cancers*, 2021, 13(16): 3949.
- [40] Liu S J, Ren J, ten Dijke P. Targeting TGF β signal transduction for cancer therapy [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2021, 6: 8.
- [41] Shiao J P, Chuang Y T, Cheng Y B, et al. Impacts of oxidative stress and PI3K/AKT/mTOR on metabolism and the future direction of investigating fucoidan-modulated metabolism [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(5): 911.
- [42] Upadhyay R, Batuman V. Aristolochic acid I induces proximal tubule injury through ROS/HMGB1/mt DNA mediated activation of TLRs [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(15): 4277-4291.

[责任编辑 兰新新]