

雨生红球藻粉通过改善线粒体功能障碍缓解尿路梗阻导致的肾纤维化

吴雨桐¹, 陈彩炼¹, 谢金梅², 张勇³, 郑云剑³, 常秀亭⁴, 胡文婷¹, 谢曦^{1*}

(1. 海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海南大学药学院, 海南海口 570228)

(2. 海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228) (3. 爱尔发生物科技(嘉兴)有限公司, 浙江嘉兴 314400)

(4. 海南大学生命健康学院, 海南海口 570228)

摘要: 为了研究雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*, *H. pluvialis*) 粉是否可以通过改善线粒体功能障碍且同时改善上皮-间质转化 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) 来缓解尿路梗阻导致的肾纤维化, 该研究采用 CCK8 法、免疫荧光、线粒体膜电位检测法、线粒体活性氧检测法以及免疫组化染色进行验证。结果表明, *H. pluvialis* 粉可以改善单侧输尿管梗阻 (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO) 手术诱导的大鼠肾脏病理改变。与模型组相比, *H. pluvialis* 粉给药后显著降低了纤连蛋白 1 表达 (下降 65.52%)。*H. pluvialis* 粉还可以改善转化生长因子- β 1 诱导的 HK-2 细胞中 EMT 指标变化, E-钙粘蛋白阳性面积分数上升 51.35%、N-钙粘蛋白下降 62.30%、波形蛋白下降 39.36%, 并提高线粒体膜电位, 降低线粒体超氧化物堆积。同时, 该文采用虾青素 (Astaxanthin, AST) 干预大鼠 UUO 模型和 HK-2 细胞促纤维化模型, 并发现在同等剂量下 *H. pluvialis* 粉的效果优于 AST。综上所述, *H. pluvialis* 粉可以通过改善细胞外基质沉积、肾皮质损伤、EMT 过程以及线粒体功能障碍来缓解尿路梗阻导致的肾纤维化病理进程, *H. pluvialis* 粉可以作为具有肾脏保护效应的功能性食品开发。

关键词: 雨生红球藻粉; 虾青素; 尿路梗阻; 肾纤维化; 线粒体功能障碍; 上皮间质转化

文章编号: 1673-9078(2026)02-11-20

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.2.1575

Haematococcus pluvialis Powder Alleviates Urinary Tract Obstruction-induced Renal Fibrosis by Ameliorating Mitochondrial Dysfunction

WU Yutong¹, CHEN Cailian¹, XIE Jinmei², ZHANG Yong³, ZHENG Yunjian³, CHANG Xiuting⁴, HU Wenting¹, XIE Xi^{1*}

(1.Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China)(2.School of Food Sciences and Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China)

(3.Alphy Biotechnology (Jiaxing) Co. Ltd., Jiaxing 314400, China)

(4.School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The potential of *Haematococcus pluvialis* powder in alleviating urinary tract obstruction-induced renal fibrosis by ameliorating mitochondrial dysfunction and epithelial-mesenchymal transition (EMT) was investigated in this study. Various

引文格式:

吴雨桐,陈彩炼,谢金梅,等.雨生红球藻粉通过改善线粒体功能障碍缓解尿路梗阻导致的肾纤维化[J].现代食品科技, 2026,42(2):11-20.

WU Yutong, CHEN Cailian, XIE Jinmei, et al. *Haematococcus pluvialis* powder alleviates urinary tract obstruction-induced renal fibrosis by ameliorating mitochondrial dysfunction [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(2): 11-20.

收稿日期: 2024-10-22; 修回日期: 2024-12-18; 接受日期: 2024-12-23

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (823RC467; 821MS027; 822MS053); 国家自然科学基金项目 (82360731); 海南大学全健康协同创新中心项目 (XTCX2022JKB08); 海南省研究生创新科研课题 (Qhys2024-284); 云南省孙树侠专家工作站 (202305AF150114)

作者简介: 吴雨桐 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药食同源物质抗纤维化疾病药理研究, E-mail: 23211007000041@hainanu.edu.cn

通讯作者: 谢曦 (1986-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 海洋活性物质及纤维化疾病药理研究, E-mail: xiexi@hainanu.edu.cn

methods, including the CCK8 assay, immunofluorescence, mitochondrial membrane potential measurement, mitochondrial reactive oxygen species detection assay, and immunohistochemical staining, were used for validation. The results demonstrated the ability of *H. pluvialis* powder in mitigating renal pathological changes in rats induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) surgery. Compared with the model group, treatment with *H. pluvialis* powder significantly decreased fibronectin 1 expression (65.52%). *In vitro*, *H. pluvialis* powder ameliorated transforming growth factor- β 1-induced changes in EMT markers in HK-2 cells, with the positive area fraction of E-cadherin increasing by 51.35%, and those of N-cadherin and vimentin decreasing by 62.30% and 39.36%, respectively. An increase in mitochondrial membrane potential and a decrease in mitochondrial superoxide accumulation were also observed. Subsequently, astaxanthin (AST) was used to intervene in the rat UUO and HK-2 pro-fibrotic cell models. The results revealed that *H. pluvialis* powder outperformed AST at equivalent dosages/concentrations. In summary, this study found that *H. pluvialis* powder could alleviate the pathological progression of renal fibrosis caused by urinary tract obstruction via mechanisms that include improving extracellular matrix deposition, reducing renal cortical injury, modulating the EMT process, and mitigating mitochondrial dysfunction. Therefore, *H. pluvialis* powder shows potential for the development of functional foods with renoprotective effects.

Key words: *Haematococcus pluvialis* powder; astaxanthin; urinary tract obstruction; renal fibrosis; mitochondrial dysfunction; epithelial-mesenchymal transition

肾小管间质纤维化常见于进行性慢性肾脏疾病 (Chronic Kidney Disease, CKD), 其特征是肾组织小管萎缩、肾小球硬化和细胞外基质 (Extracellular Matrix, ECM) 积聚^[1]。肾纤维化与肾脏炎症、氧化应激以及线粒体功能障碍息息相关。由于纤维化被认为是不可逆的, 抑制间质纤维化进展被认为是防止 CKD 发展的潜在策略。越来越多研究表明, 肾纤维化与上皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal Transition, EMT) 有关^[2]。由于转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 在细胞中的表达水平与 EMT 和 ECM 的产生密切相关, 因此被认为是肾纤维化和 CKD 的强介质^[3]。研究表明, TGF- β 1 在肾脏中的过表达可激活小管间质纤维化和肾小球硬化^[4]。因此, TGF- β 1 是肾纤维化的潜在关键驱动因素。

肾脏是一个高能量代谢器官, 其正常的生理功能需要大量的腺嘌呤核苷三磷酸 (Adenosine Triphosphate, ATP), 而 ATP 主要通过线粒体内营养物质的氧化磷酸化产生^[5]。线粒体是维持细胞氧化还原和能量稳态的产能细胞器^[6], 存在于大多数真核细胞中的细胞器, 它由外膜、高度内陷的含有嵴的内膜和基质组成。线粒体通过氧化磷酸化产生 ATP, 同时也是细胞中活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 的主要产生器官^[7]。线粒体的膜电位变化、线粒体通透性转化孔开放与闭合和线粒体超氧化物产生是线粒体质量控制的主要方式^[8, 9]。而线粒体功能障碍会导致线粒体超氧化物堆积, 线粒体膜电位降低、线粒体通透性转化孔异常开放, 进而引发线粒体功能障碍。线粒体发生氧化应激, 可导致诸如肾纤维化等多种肾脏疾病, 最终演变为难以治愈的 CKD。

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*, *H. pluvialis*) 粉因其积累大量次生类胡萝卜素的能力及其富含不饱和脂肪酸、多种氨基酸的成分而具有一定的药用潜力。破壁 *H. pluvialis* 粉的有效活性成分之一是虾青素 (Astaxanthin, AST)^[10], 破壁 *H. pluvialis* 粉的类胡萝卜素次生代谢物中虾青素含量超过 80%, 藻粉整体虾青素积累水平为 1%~3%, 因此 *H. pluvialis* 粉是目前天然虾青素的主要来源之一^[11]。已有研究证明 *H. pluvialis* 粉中的 AST 等成分具有抗氧化和抗炎作用, 且 AST 在 *H. pluvialis* 粉中以酯化形式存在^[12], 这种形式的虾青素更稳定, 可以更好地被人体吸收和利用。同时, *H. pluvialis* 粉中除了含有高浓度的 AST 外, 还含有多种营养成分, 如谷氨酸、亮氨酸、天冬氨酸等必需氨基酸^[13], 以及亚油酸、油酸、 α -亚麻酸等不饱和脂肪酸, 尤其是 ω -3 不饱和脂肪酸, 此外还含有 β -胡萝卜素和藻蛋白等生物活性物质, 这些成分使 *H. pluvialis* 粉可以增强机体免疫力, 促进细胞代谢^[14]等, 其综合效果极有可能优于 AST。研究表明 AST 的抗氧化活性约为 β -胡萝卜素的 10 倍, 维生素 E 的 500 倍^[15]。AST 也可以有效地在线粒体中积累, 改善线粒体功能障碍。然而, 天然 AST 资源有限, 生产复杂, 成本高, 限制了其大规模应用, 而 *H. pluvialis* 粉作为天然 AST 的最佳生物来源, 1999 年美国食品和药物管理局审查并批准将其作为一种新的膳食成分上市^[16]。先前有研究报道 AST 可以被用于改善线粒体功能障碍、防治心肌纤维化、肝纤维化等^[17], 也有研究显示 *H. pluvialis* 粉可以调节线粒体功能障碍^[18], 但目前还没有研究报道认为富含 AST 及其他生物活性成分的 *H. pluvialis* 粉能够用于治疗纤维化疾病, 尤其是

肾纤维化。且相比于AST, *H. pluvialis* 粉具有成本低廉, 生产过程简单等优点, 更适于开发应用。值得注意的是, *H. pluvialis* 粉细胞壁较厚, 未破壁情况下较难对细胞及哺乳动物产生作用效果, 该研究采用破壁 *H. pluvialis* 粉进行探究, 旨在通过体内和体外实验讨论破壁 *H. pluvialis* 粉是否能够通过改善 EMT 和线粒体功能障碍改善肾纤维化, 为 *H. pluvialis* 粉开发为具有肾脏保护效应的功能性食品提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料试剂与仪器

破壁雨生红球藻粉、未破壁雨生红球藻粉, 云南爱尔康生物技术有限公司; 32 只无特定病原体 (Specific Pathogen Free, SPF) 级 SD 大鼠 (动物许可证编号: NO.110324231106182758), 体质量 (180 ± 10) g, 斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 所有实验程序均获得《美国国立卫生研究院实验动物护理和使用指南》的许可, 并得到海南大学伦理委员会的批准 (HNUAUCC2021-00089); 人肾小管上皮细胞, 上海美湾生物科技有限公司; DMEM/F-12 (1:1) 培养基、胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS), 赛默飞世尔科技公司; 游离态虾青素 (Astaxanthin) 粉末, 纯度 HPLC $\geq 97\%$, 北京索莱宝科技有限公司; 青链霉素混合液 (双抗, 100 $\times$), 武汉赛维尔生物科技有限公司; CCK8 细胞增殖检测试剂盒、增强型线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L), Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (H+L), 上海碧云天生物技术有限公司; 线粒体超氧化物红色荧光探针 (MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator), 翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; E-cadherin Polyclonal antibody (货号: 20874-1-AP)、N-cadherin Polyclonal antibody (货号: 22018-1-AP)、Vimentin Polyclonal antibody (货号: 10366-1-AP), 武汉三鹰生物技术有限公司。

SpectraMax i3x 多功能酶标仪, 美谷分子仪器 (上海) 有限公司; CPY-180 二氧化碳培养箱, 天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; XDS-3KY 倒置显微镜, 上海启步生物技术有限公司; SW-CJ-1D (标准式) 双人单面净化工作台, 苏州博莱尔净化设备有限公司; H1750R 高速台式冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; FV3000 单光子激光共聚焦显微镜, 奥林巴斯 (北京) 销售服务有限公司; Phenom ProX 颗粒表面分析系统 (扫描电镜), 荷兰 Phenom-World BV。

1.2 方法

1.2.1 扫描电镜

将破壁 *H. pluvialis* 粉与未破壁 *H. pluvialis* 粉置于 37 °C 烘箱干燥 2 d, 干燥后的样品用于电镜扫描。在金属导电台上粘贴导电胶, 将干燥好的 *H. pluvialis* 粉涂于导电胶上进行喷金处理提高导电性。喷金结束后将样品台置于仪器内进行扫描拍摄。

1.2.2 实验动物模型

选取 32 只体质量为 (180 ± 10) g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠, 置于 SPF 级别标准环境下饲养, 动物许可证号: NO.110324231106182758, 伦理许可证号: HNUAUCC2021-00089。提供标准饲料, 大鼠可自由饮水。经过一周的正常饲料适应性饲养后, 将动物随机分为四组, 每组 8 只。在造模前 7 d, UUO+*H. pluvialis* 组和 UUO+AST 组分别接受破壁 *H. pluvialis* 粉 (剂量为 $833.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 AST (剂量为 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的灌胃处理, 每日一次, 最后一次灌胃后禁食 24 h。其中, *H. pluvialis* 和 AST 的配制为根据剂量称取适量破壁 *H. pluvialis* 粉和 AST 溶于生理盐水中。禁食结束后, 对 UUO 组、UUO+*H. pluvialis* 组、UUO+AST 组进行造模。术前皮下注射硫酸阿托品, 随后肌肉注射舒泰 50 进行麻醉。正常组进行假手术处理, 模型组及给药组则进行输尿管结扎。术后常规饲养并观察其状态, 造模成功后开始给药。正常组和模型组每日正常提供水和饲料, 给药组术后分别每日灌胃 *H. pluvialis*、AST, 持续 14 d, 每周对大鼠进行称重。给药至第 14 天时, 对所有大鼠进行麻醉并处死, 收集肾脏皮质组织。将收集到的肾脏皮质组织固定于 4% 多聚甲醛中, 进行脱水、包埋和切片处理, 制得石蜡切片。

1.2.3 细胞培养与处理

永生化人肾小管上皮 (Human Kidney, HK-2) 细胞购自上海美湾生物科技有限公司。将 HK-2 置于 DMEM/F-12 (1:1) 培养基中培养一段时间。待细胞状态稳定, 将 HK-2 细胞接种于六孔板中, 每孔细胞密度约为 2×10^5 个, 随后将六孔板置于细胞培养箱中培养 24 h。待细胞状态稳定后将其根据实验分组为: 正常组 (Con)、模型组 (TGF- $\beta 1$)、给药组 (TGF- $\beta 1$ + $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *H. pluvialis*、TGF- $\beta 1$ + $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *H. pluvialis*、TGF- $\beta 1$ + $24 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *H. pluvialis*、TGF- $\beta 1$ + $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AST)。其中, *H. pluvialis* 和 AST 的配制为根据剂量称取适量破壁 *H. pluvialis* 粉和 AST 溶于 DMSO 中, DMSO 在培养基中的体积分数不超过 0.1%。并将细胞

在培养基中处理 48 h 后即可进行后续实验操作。

1.2.4 细胞活力测定

将 HK-2 细胞接种于在 96 孔板中, 每孔细胞密度约为 5×10^4 个, 使用细胞增殖试剂盒 (Cell Counting Kit 8, CCK8) 评估 *H. pluvialis* 的活力。随后将 96 孔板置于细胞培养箱中培养 24 h。之后, 细胞用不同浓度 (0、8、16、24、48、96、192、384 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 *H. pluvialis* 处理 48 h。处理结束后每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液, 在细胞培养箱中孵育 1 h, 使用紫外分光光度计于 450 nm 波长处测定吸光度^[19]。

1.2.5 免疫荧光实验

将上述收集到的 HK-2 细胞在 PBS 中洗涤三次, 用多聚甲醛固定 20 min。固定结束晾干 10 min, 然后在 PBS 中洗涤三次, 用 Triton X-100 透化 10 min。随后, 在含有体积分数为 10% 山羊血清的 PBS 中封闭 30 min, 然后用相应的一抗 (E-cadherin、N-cadherin、Vimentin) 在含有体积分数为 10% 山羊血清中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。一抗孵育结束用 PBS 洗涤三次, 并加入相应的二抗孵育 1 h。细胞核用即用型 DAPI 染色液孵育 30 min。最后, 用抗荧光淬灭封片封片。封片结束立即置于单光子激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.6 线粒体膜电位检测

使用 JC-1 检测试剂盒检测不同处理后 HK-2 细胞的膜电位, 将上述处理好的细胞用预热的 PBS 洗涤两次后, 用 JC-1 染色工作液处理细胞, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。然后用 Hoechst 33342 对细胞核染色 30 min, 染色结束用 PBS 洗涤两次, 在单光子激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.7 线粒体活性氧检测

使用线粒体活性氧检测试剂盒检测不同处理后 HK-2 细胞的线粒体活性氧堆积情况, 将上述处理好的细胞用预热的 PBS 洗涤两次后, 用线粒体超氧化物红色荧光探针工作液处理细胞, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。然后用 Hoechst33342 对细胞核染色 30 min, 染色结束用 PBS 洗涤两次, 在共聚焦显微镜 (奥林巴斯) 下观察。

1.2.8 免疫组化实验

用二甲苯对 5 μm 厚的肾组织石蜡切片进行脱蜡处理, 并在分级醇中再水化。用山羊血清封闭 30 min 以减少非特异性结合, 随后用一抗 (FN1) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的湿室中孵育过夜。切片用对应二抗孵育 50 min, PBS 洗涤, 用现用现配的 DAB 显色液处理, 立即于显微镜下观察,

阳性则呈棕黄色。用自来水冲洗切片, 终止显色, 用苏木精染细胞核 3 min, 脱水后封片, 于光学显微镜下观察。

1.2.9 数据统计与分析

所有实验都独立进行了至少三次, 结果相似。实验数据采用 SPSS 软件进行统计分析, 数值以均数 $\pm$ SD 表示。采用单因素方差分析和多重比较对数据进行统计分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。用 GraphPad Prism 绘制条形图。

2 结果与讨论

2.1 *H. pluvialis* 粉破壁与否的形态变化

已有研究表明, *H. pluvialis* 作为目前天然虾青素最丰富来源, 单个藻体内虾青素积累量最高可达 3%, 且其中富含谷氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、缬氨酸, 可以作为一种潜在的优质蛋白源被机体吸收利用, 富含亚油酸、油酸、 α -亚麻酸等不饱和脂肪酸, 以及 β -胡萝卜素和藻蛋白等生物活性物质^[14]。由于这些特点, *H. pluvialis* 可以提高免疫力、抗氧化能力等。然而, 雨生红球藻为淡水单细胞绿藻, 其细胞壁厚而致密且直径大、层数多^[20], 未破壁的 *H. pluvialis* 粉难以释放出其中的有效物质在哺乳动物体内发挥作用, 这也是目前使用 *H. pluvialis* 提取虾青素的难点之一。因此, 该研究分别对破壁与未破壁的 *H. pluvialis* 粉进行透射电镜扫描 (图 1), 结果显示破壁 *H. pluvialis* 粉细胞壁几乎完全破损, 可以释放有效物质, 后续实验中使用破壁 *H. pluvialis* 粉进行。

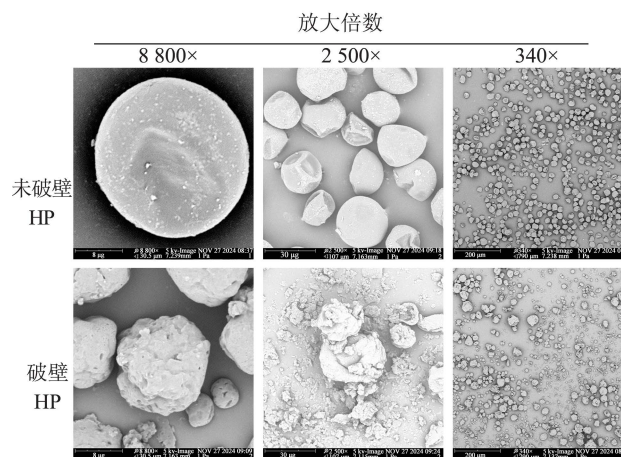


图 1 *H. pluvialis* 粉破壁与否形态变化

Fig.1 Morphological alterations of *H. pluvialis* powder with and without cell wall disruption

注: “破壁 *H. pluvialis* 粉” 在图中缩写为 “HP”, 下文相同。

2.2 破壁 *H. pluvialis* 粉改善尿路梗阻导致的大鼠肾脏病理学损害

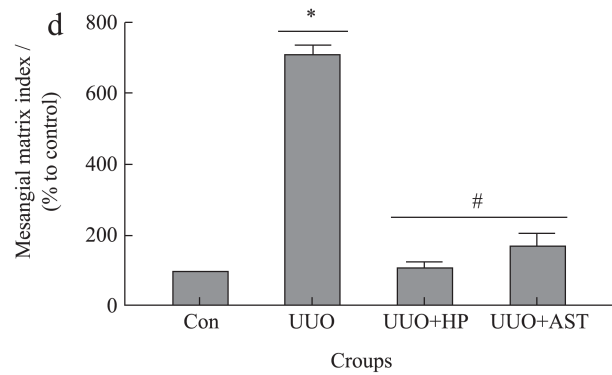
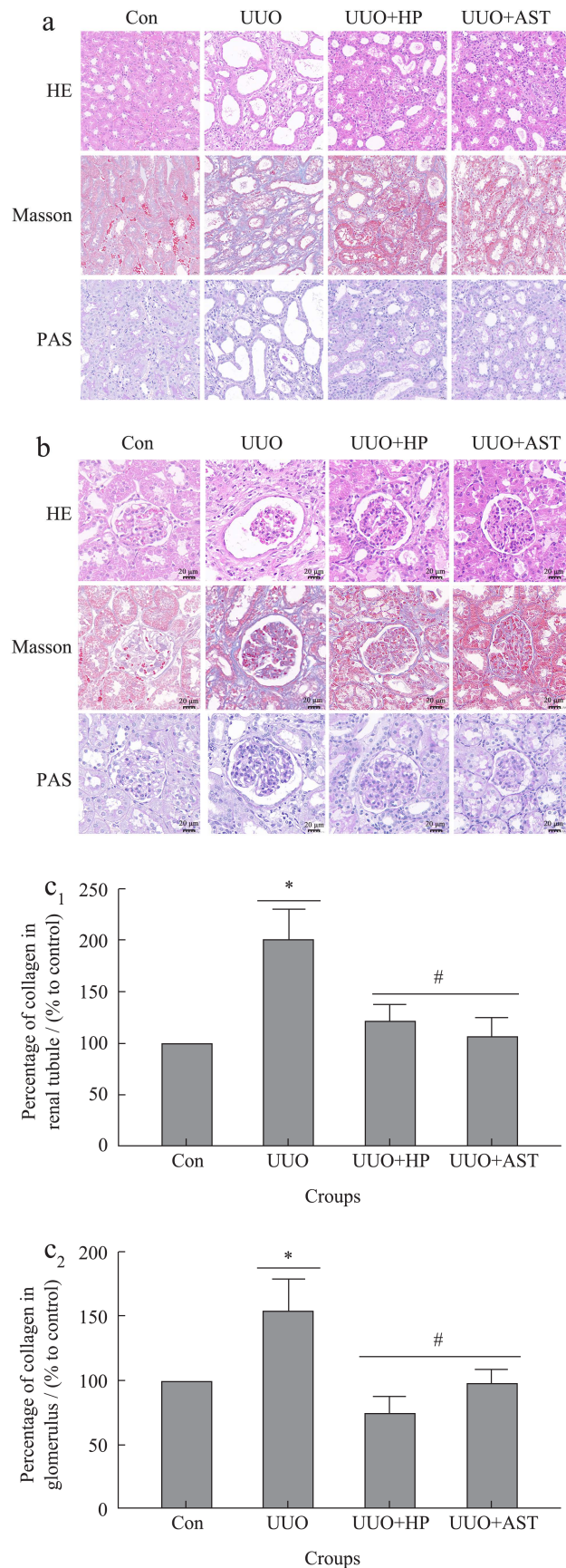


图2 破壁 *H. pluvialis* 粉改善 UUO 大鼠肾脏组织病理变化和纤维化病变

Fig.2 Cell wall-disrupted *H. pluvialis* powder ameliorates pathological changes and fibrotic lesions in the renal tissues of UUO rats

注：与正常组相比，* $P < 0.05$ ；与模型组相比，# $P < 0.05$ 。下文相同。(a、b) 大鼠肾脏皮质组织进行 HE、Masson、PAS 染色，标尺为 20 μm ，a 为肾小管代表性部位，放大倍数为 63 $\times$ ，b 为肾小球代表性部位，放大倍数为 40 $\times$ ；(c) 对肾小管、肾小球 Masson 染色中胶原纤维面积分数使用 ImageJ 进行定量分析 ($n=8$)，其中蓝色代表胶原纤维；(d) 对 PAS 染色中肾小球阳性系膜基质占比使用 ImageJ 进行定量分析 ($n=8$)，其中紫红色代表糖原沉积。

首先通过苏木精-伊红 (Hematoxylin-eosin Staining, HE) 染色、过碘酸雪夫 (Periodic Acid-Schiff, PAS) 染色和马松 (Masson) 染色评估破壁 *H. pluvialis* 粉对肾脏组织学改变和系膜基质沉积的影响。HE 染色显示，与正常大鼠相比，UUO 大鼠出现肾积水，肾盂进行性扩张和肾皮质变薄，破壁 *H. pluvialis* 粉、AST 可以改善肾小管及肾小球损伤，且破壁 *H. pluvialis* 粉的改善效果优于 AST (图 2a、2b)。Masson 染色显示，UUO 大鼠肾脏肾小管及肾小球部分蓝色胶原沉积增加 (图 2a、2b)，破壁 *H. pluvialis* 粉、AST 可以减少 UUO 大鼠肾小球蓝色胶原沉积，且破壁 *H. pluvialis* 粉的效果优于 AST (图 2a、2b)。通过分别计算肾小管和肾小球中胶原蛋白面积分数，评估肾脏胶原沉积程度 (图 2c、2d)。结果显示，UUO 大鼠肾小管和肾小球中胶原面积分数显著增加，而破壁 *H. pluvialis* 粉和 AST 的治疗降低了 UUO 大鼠肾脏胶原纤维面积分数，即减轻纤维化 ($P < 0.05$)。PAS 染色显示，与正常大鼠相比，UUO 大鼠肾小管内及肾小球周围紫红色 PAS 阳性系膜基质增加 (图 2a、2b)，染色图中显示破壁 *H. pluvialis* 粉和 AST 可减少 UUO 大鼠肾小球内紫红色 PAS 阳性系膜基质，且破壁 *H. pluvialis* 粉的效果优于 AST (图 2b)。进一步使用系膜基质指数 (Mesangial Matrix Index, MMI)

以面积分数形式对图 1b 中肾小球的 PAS 染色结果进行定量分析,用于评估肾小球周围系膜基质增生的程度。结果显示(图 2d),UUO 大鼠肾小球 MMI 增加,破壁 *H. pluvialis* 粉和 AST 治疗可以降低 UUO 大鼠肾小球 MMI ($P<0.05$)。综上所述,这些结果表明破壁 *H. pluvialis* 粉可以通过减少细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)沉积、改善肾皮质损伤来减轻肾纤维化,肾小球部位改善程度效果优于 AST。

2.3 破壁 *H. pluvialis* 粉可以有效改善尿路梗阻导致的大鼠肾纤维化

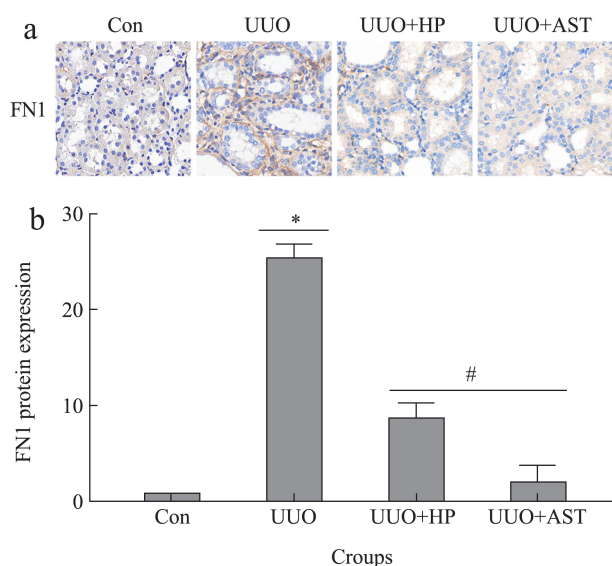


图 3 破壁 *H. pluvialis* 粉调节 UUO 大鼠肾脏中 FN1 的蛋白表达

Fig.3 Cell wall-disrupted *H. pluvialis* powder modulates the protein expression of FN1 in the kidneys of unilateral UUO rats

注:蓝色代表细胞核,黄色代表 FN1。(a)通过免疫组化染色法检测肾脏皮质组织中 FN1 蛋白的阳性表达水平,放大倍数为 $63\times$,标尺为 $20\mu\text{m}$; (b)使用 ImageJ 对免疫组化结果中阳性面积进行定量分析 ($n=8$),其中黄色部分代表阳性面积。

先前研究报道认为破壁 *H. pluvialis* 粉可以通过调节 Keap1/Nrf2/HO-1 通路来减轻阿霉素诱导的肝损伤,研究中认为雨生红球藻粉抑制了肝酶、一氧化氮、胶原蛋白 1、 α -平滑肌肌动蛋白和 TGF- β 的表达,提高了过氧化氢酶的抗氧化活性,同时激活细胞增殖,从而改善肝纤维化^[20]。为了进一步观察破壁 *H. pluvialis* 粉对肾脏纤维化病变的影响,通过免疫组化的方法观察纤维蛋白 1 (Fibronectin1, FN1) 在大鼠组织中的表达情况。FN1 蛋白是细胞外基质中的一种糖蛋白,在纤维化病变过程中, FN1 蛋白会出现异常和超量沉积。免疫组化染色及其定量分析结果显示,与正常组相比, UUO 模型组中 FN1 蛋白的表达显著上调,存在明显

胶原沉积和细胞间纤维化现象,破壁 *H. pluvialis* 粉治疗后 FN1 蛋白的阳性面积分数显著降低 65.52% (图 3a、3b),与对照组 AST 的治疗效果相当 ($P<0.05$)。综上所述,破壁 *H. pluvialis* 粉可以通过减少尿路梗阻的大鼠组织中纤维化因子的表达来改善大鼠 UUO 模型导致的肾纤维化。

2.4 破壁 *H. pluvialis* 粉对 HK-2 细胞无明显毒性

在之前的体内研究中发现破壁 *H. pluvialis* 粉可以明显改善 UUO 导致的肾纤维化中的 ECM 沉积和皮质损伤,以及降低纤维化因子的表达。因此,进一步推测破壁 *H. pluvialis* 粉是否可以在体外改善 TGF- β 1 诱导的人肾小管上皮细胞纤维化的发生与进展。首先通过 CCK8 法检测不同剂量破壁 *H. pluvialis* 粉 (0、8、16、24、48、96、192、384 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对 HK-2 细胞的安全性。结果显示(图 4a), 0~96 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的破壁 *H. pluvialis* 粉对 HK-2 细胞无明显毒性作用,且破壁 *H. pluvialis* 粉剂量为 8、16、24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 HK-2 细胞活力呈现增长趋势。观察不同浓度时 HK-2 细胞形态,结果显示,破壁 *H. pluvialis* 粉并不会过度改变细胞生长状态以及形态(图 4b)。因此推断破壁 *H. pluvialis* 粉对 HK-2 细胞无明显毒性,该文分别采取 8、16、24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的破壁 *H. pluvialis* 粉进行细胞水平研究。

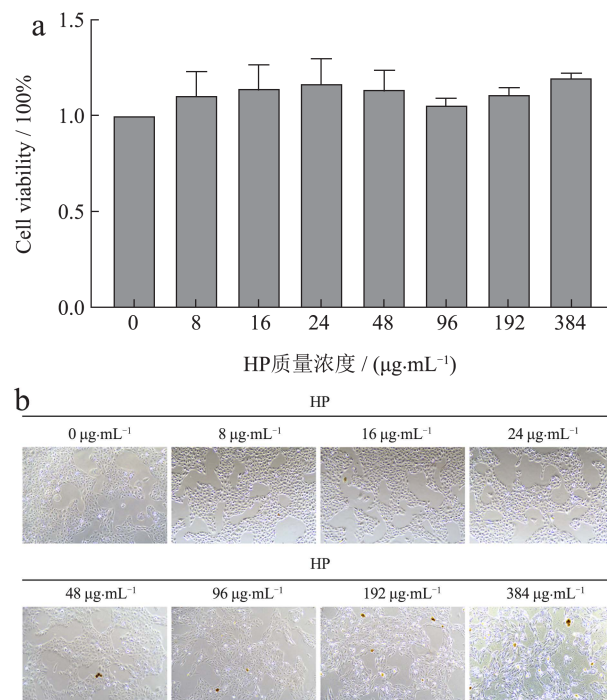


图 4 破壁 *H. pluvialis* 粉对 HK-2 细胞活力的影响

Fig.4 The impact of cell wall-disrupted *H. pluvialis* powder on the viability of HK-2 cells

注:(a)使用 CCK8 法检测细胞活力 ($n=3$); (b)在不同剂量的破壁 *H. pluvialis* 粉处理下 HK-2 细胞的明场照片 ($n=3$)。

2.5 破壁 *H. pluvialis* 粉通过抑制 EMT 来改善肾纤维化

据先前的研究, 尿路梗阻会引起梗阻侧肾小管间质增生, 肾部纤维化变性, 最终导致肾积水、肾萎缩和永久性肾功能的丧失^[21,22]。同时, 机体发生肾损伤时, 会伴随着 ECM 沉积、EMT 和线粒体功能障碍^[23,24], 出现氧化应激, 也推动肾纤维化的进一步发展。因此认为 EMT 是肾纤维化发展的关键。EMT 的特征在于上皮细胞标志物, 例如 E-钙粘蛋白 (E-cadherin) 的缺失, 间充质细胞标志物, 例如 N-钙粘蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 的表达上调。因此通过 IF 法检测 E-cadherin、N-cadherin 以及 Vimentin 蛋白的表达情况。

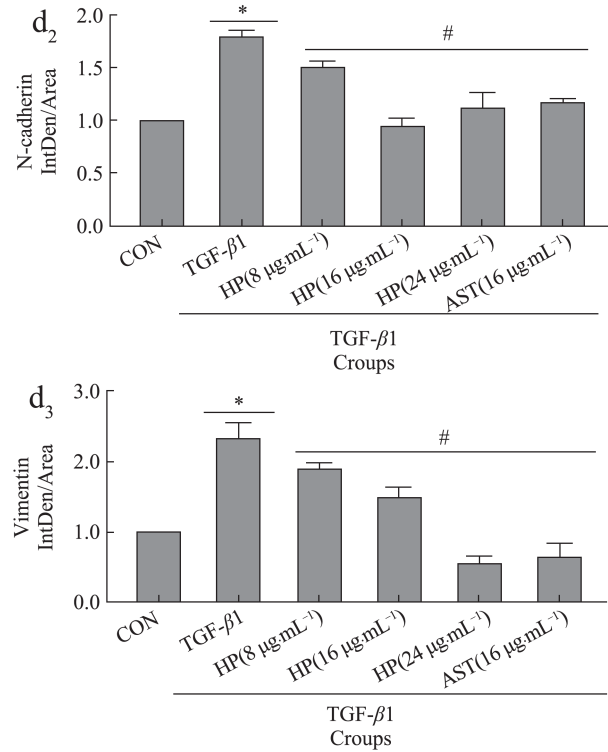
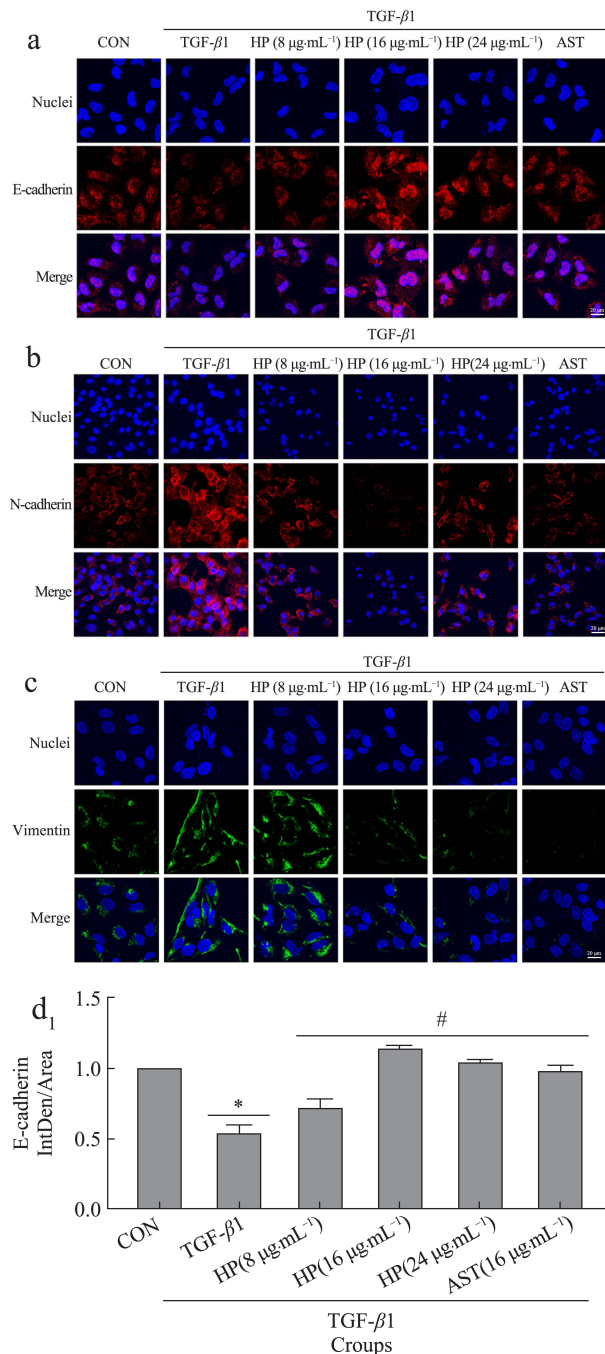


图5 破壁 *H. pluvialis* 粉对 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞表达 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白的影响

Fig.5 The effect of cell wall-disrupted *H. pluvialis* powder on the expression of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin in HK-2 cells induced by TGF-β1

注: 蓝色代表 DAPI。(a) 红色: E-cadherin, 通过免疫荧光染色法检测 E-cadherin 蛋白的表达, 放大倍数为 100×, 标尺为 20 μm; (b) 红色: N-cadherin, 通过免疫荧光染色法检测 N-cadherin 蛋白的表达, 放大倍数为 100×, 标尺为 20 μm; (c) 绿色: Vimentin, 通过免疫荧光染色法检测 Vimentin 蛋白的表达, 放大倍数为 100×, 标尺为 20 μm; (d) 对免疫荧光结果使用 ImageJ 进行定量分析 ($n=6$)。

TGF-β1 作为转化生长因子-β 家族中的重要成分, 可以激活并促使细胞持续增殖和分化为肌成纤维细胞, 同时增加细胞外基质的合成、减少其降解, 最终导致纤维化病变的形成和发展^[25]。因此该文中使用 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞的纤维化。在 EMT 的过程中, HK-2 作为肾小管上皮细胞会失去其原有的特征, 获得间质细胞的特性^[26]。且发生 EMT 的 HK-2 会大量产生细胞外基质成分, 过量的 ECM 在组织中沉积^[27], 导致组织硬度增加, 组织结构紊乱, 是纤维化形成的重要物质基础^[2,28]。如图 5a 所示, E-cadherin 蛋白在对照组中荧光强度较强, TGF-β1 处理后, 其荧光强度减弱, 表明细胞间结构受损, 纤维化程度加剧。经破壁 *H. pluvialis* 粉干预后, 随着破壁 *H. pluvialis* 粉剂量的增加, 荧光强度呈现出增强趋势。经 AST 干预后, 荧光强度也升高 (图 5a)。对荧光强度进行定量,

结果显示(图5d),在同等剂量下,破壁 *H. pluvialis* 粉的效果优于 AST ($P<0.05$)。图5b、5c显示,Vimentin 蛋白和 N-cadherin 蛋白在对照组中荧光强度较弱,经 TGF- β 1 处理后,细胞间接触区域表达显著,呈现出集中的特异性荧光定位(图5b、5c)。而破壁 *H. pluvialis* 粉干预后,随着破壁 *H. pluvialis* 粉剂量的增加,荧光强度呈现出梯度减弱的趋势,经 AST 干预后,荧光强度亦有所降低(图5d) ($P<0.05$)。综合以上结果,破壁 *H. pluvialis* 粉能够改善由 TGF- β 1 诱导的人肾小管上皮细胞的 EMT 进程,并且同等剂量下破壁 *H. pluvialis* 粉 E-cadherin 蛋白表达的增强、对 N-cadherin 的减弱效果的优于 AST。

2.6 破壁 *H. pluvialis* 粉改善 UUO 大鼠和 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞的线粒体功能障碍

通过以往的研究可知在 EMT 和纤维化的过程中,细胞的代谢方式转变、细胞骨架重构^[29],而线粒体作为细胞内产能的主要细胞器也受到影响,引起线粒体功能障碍^[30-32]。因此该文认为通过 UUO 手术诱导大鼠肾纤维化和以 TGF- β 1 诱导 HK-2 分泌促纤维化因子的过程中同样存在着线粒体功能障碍。使用透射电镜观察不同处理后大鼠肾脏的形态结构。结果显示,与正常组相比,UUO 模型组大鼠线粒体形态发生明显改变,具体表现为红色箭头指出的线粒体出现损伤、空泡化的变化,且碎片数量增加(图6a)。在使用破壁 *H. pluvialis* 粉、AST 治疗后,线粒体损伤程度减轻,出现绿色箭头指出的自噬小体,线粒体形态恢复(图6a)。初步认为破壁 *H. pluvialis* 粉能够改善尿路梗阻所导致的大鼠肾脏线粒体功能障碍并恢复受损线粒体的自噬,且效果优于 AST。

进一步在体外水平探索 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞分泌促纤维化因子的过程中线粒体的变化。首先使用 JC-1 膜电位检测试剂盒检测不同情况下 HK-2 线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)的变化情况,JC-1 在 $\Delta\psi_m$ 较高会选择性地聚集在线粒体基质中,形成聚合物(J-aggregates),产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1 无法聚集,则显示为单体(monomer),产生绿色荧光。结果显示,以 TGF- β 1 诱导纤维化后,出现了红色荧光到绿色荧光的转变,指示 $\Delta\psi_m$ 的下降,使用 *H. pluvialis* 干预后 $\Delta\psi_m$ 发生明显提高,使用 AST 干预后 $\Delta\psi_m$ 也有所改善,但效果远不如破壁 *H. pluvialis* 粉的改善效果(图6b)。线粒体功能障碍会导致其内部电子泄露增加进而使代谢产物如线粒体超氧化物的积累^[33],进一步检测线粒体活性氧堆积情况。结果显示,TGF- β 1 诱导后线粒体超氧化物明显增多,当使用破壁 *H. pluvialis* 粉、AST 干预后线粒体超氧化物堆积有所改善,且同等剂

量下破壁 *H. pluvialis* 粉的治疗效果优于 AST(图6c)。综上所述,当使用 TGF- β 1 诱导后 HK-2 细胞存在线粒体功能障碍,破壁 *H. pluvialis* 粉可以对此障碍进行改善,且同等剂量下其效果优于 AST。

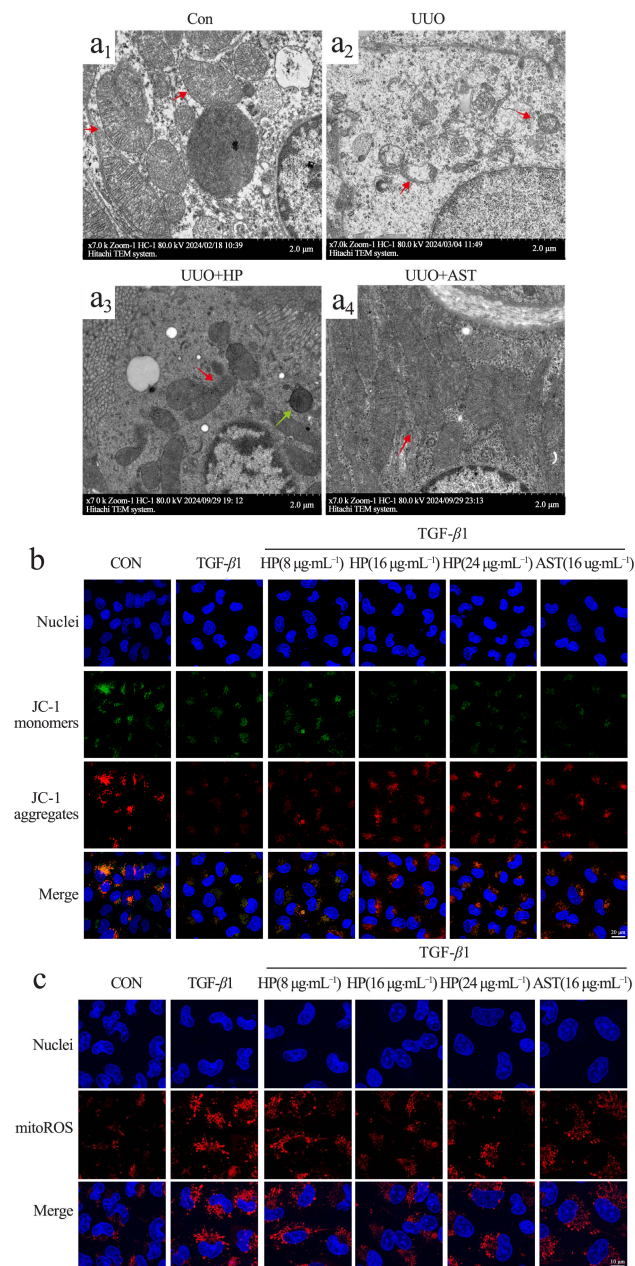


图6 破壁 *H. pluvialis* 粉对 UUO 大鼠及 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞线粒体功能障碍的改善

Fig.6 Mitochondrial dysfunction alleviation by cell wall-disrupted *H. pluvialis* powder in UUO Rats and TGF- β 1 Induced HK-2 Cells

注:(a)通过透射电镜观察肾脏皮质组织内线粒体的超微结构,标尺为 2.0 μ m,其中红色箭头指示线粒体,绿色箭头指示自噬小体;(b)通过增强型线粒体膜电位检测试剂盒检测线粒体膜电位($n=3$),放大倍数为 60 $\times$,标尺为 20 μ m;(c)通过线粒体超氧化物红色荧光探针标记 mtROS ($n=3$),放大倍数为 100 $\times$,标尺为 20 μ m。

3 结论

本研究认为在 UUO 手术导致的大鼠肾纤维化和 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞分泌促纤维化因子的过程中,存在 EMT 和线粒体功能障碍,并进一步加剧纤维化的发展,破壁 *H. pluvialis* 粉可以缓解这一过程。HE、Masson、PAS 染色结果显示单侧输尿管梗阻时大鼠肾组织出现明显纤维化病变,且免疫组化染色结果显示 FN1 的表达在大鼠 UUO 模型中增长 25.57 倍,破壁 *H. pluvialis* 粉干预可以使其阳性面积分数下降 65.52%。在体外水平通过 CCK8 验证破壁 *H. pluvialis* 粉对 HK-2 细胞无毒性后进一步探索破壁 *H. pluvialis* 粉改善肾纤维化的主要机制为抑制 EMT,使 E-cadherin 表达上升、N-cadherin 和 Vimentin 表达下降,并提高线粒体膜电位,降低线粒体超氧化物堆积,改善线粒体功能障碍。通过对比破壁 *H. pluvialis* 粉与 AST,认为破壁 *H. pluvialis* 粉可以对大鼠 UUO 模型以及 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞促纤维化的过程起到改善作用,部分效果优于 AST。综合考虑到破壁 *H. pluvialis* 粉成本低廉、生产工艺简单,含多种氨基酸,是一种潜在的优质蛋白源,并富含多种不饱和脂肪酸能促进机体新陈代谢,提高机体免疫力。同时,化学合成的 AST 为游离态,极不稳定,而 *H. pluvialis* 粉中的 AST 为酯化态,更利于被机体吸收利用。本研究认为破壁 *H. pluvialis* 粉更适于作为功能性食品大规模开发,为通过 *H. pluvialis* 粉改善 CKD 提供了一种新的思路,破壁 *H. pluvialis* 粉有望成为一种新兴的抗慢性肾纤维化的功能性食品。

参考文献

- [1] HAN Y C, TANG S Q, LIU Y T, et al. AMPK agonist alleviates renal tubulointerstitial fibrosis via activating mitophagy in high fat and streptozotocin induced diabetic mice [J]. Cell Death Disease, 2021, 12(10): 925.
- [2] WANG Y, PING Z, GAO H, et al. LYC inhibits the AKT signaling pathway to activate autophagy and ameliorate TGF β -induced renal fibrosis [J]. Autophagy, 2024, 20(5): 1114-1133.
- [3] YANG M, LIU J W, ZHANG Y T, et al. The role of renal macrophage, AIM, and TGF- β 1 expression in renal fibrosis progression in IgAN patients [J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 646650.
- [4] FUKUDA A, MINAKAWA A, SATO Y, et al. Urinary podocyte and TGF- β 1 mRNA as markers for disease activity and progression in anti-glomerular basement membrane nephritis [J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2017, 32(11): 1818-1830.
- [5] XU H, WANG M, LI Y, et al. Blocking connexin 43 and its promotion of ATP release from renal tubular epithelial cells ameliorates renal fibrosis [J]. Cell Death Disease, 2022, 13(5): 511.
- [6] KOCH R E, JOSEFSON C C, HILL G E. Mitochondrial function, ornamentation, and immunocompetence [J]. Biological Reviews, 2017, 92(3): 1459-1474.
- [7] VALDEBENITO G E, CHACKO A R, DUCHEN M R. The mitochondrial ATP synthase as an ATP consumer-a surprising therapeutic target [J]. The EMBO Journal, 2023, 42(10): e114141.
- [8] LU T, ZHANG J, CAI J, et al. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells as nanotherapeutics for liver ischaemia-reperfusion injury by transferring mitochondria to modulate the formation of neutrophil extracellular traps [J]. Biomaterials, 2022, 284: 121486.
- [9] 梁玉琼,黄庆,陈梁可,等.薯蓣皂苷对HepG2肝癌细胞增殖的抑制作用[J].现代食品科技,2021,37(8):62-66.
- [10] LI X, WANG X, DUAN C, et al. Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. Biotechnology Advances, 2020, 43: 107602.
- [11] 唐海南,柏月,许金震,等.雨生红球藻粉对斑节对虾肝胰腺免疫性能及甲醛胁迫下相关基因表达的影响[J/OL].厦门大学学报(自然科学版),1-11[2025-03-07].
- [12] KHOO K S, LEE S Y, OOI C W, et al. Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. Bioresource Technology, 2019, 288: 121606.
- [13] 邱月,赵晓燕,刘红开,等.雨生红球藻中蛋白质的研究进展及开发利用现状[J].粮油食品科技,2018,26(5):42-47.
- [14] 王裕玉,董浩,孙爱华,等.雨生红球藻的营养价值及其在虾蟹饲料中的应用研究进展[J].饲料研究,2022,45(18):142-145.
- [15] NI Y, NAGASHIMADA M, ZHUGE F, et al. Astaxanthin prevents and reverses diet-induced insulin resistance and steatohepatitis in mice: A comparison with vitamin E [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 17192.
- [16] 陈涛,沼泽彻,杨福梅,等.雨生红球藻中天然虾青素的应用研究[J].农业工程技术,2023,43(15):76-77.
- [17] 范永梅,曾跃勤,彭一凡,等.虾青素对纤维化疾病的研究进展[J].医学研究杂志,2024,53(2):169-172.
- [18] WANG M, XU P, LIAO L, et al. *Haematococcus pluvialis* extends yeast lifespan and improves slc25a46 gene knockout-associated mice phenotypic defects [J]. Molecular Nutrition Food Research, 2021, 65(24): e2100086.
- [19] 丁紫涵,吕雪明,李梁杰,等.虾青素与维生素E抗氧化药物的研究现状[J].山西化工,2022,42(3):58-59.
- [20] 季晓敏,王亚男,徐嘉杰,等.扫描电镜和响应面优化雨生红球藻破壁萃取虾青素的工艺研究[J].核农学报,2014,28(6):1052-1061.
- [21] EL-BAZ F K, SALAMA A, ALI S I, et al. *Haematococcus pluvialis* carotenoids enrich fractions ameliorate liver fibrosis induced by thioacetamide in rats: modulation of metalloproteinase and its inhibitor [J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 6631415.
- [22] BAI Y, WANG W, YIN P, et al. Ruxolitinib alleviates renal interstitial fibrosis in UUO mice [J]. International Journal of Biological Sciences, 2020, 16(2): 194-203.

- [23] LOVISA S, LEBLEU V S, TAMPE B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis [J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(9): 998-1009.
- [24] MIAO J, LIU J, NIU J, et al. Wnt/ β -catenin/RAS signaling mediates age-related renal fibrosis and is associated with mitochondrial dysfunction [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(5): e13004.
- [25] QIU D, SONG S, CHEN N, et al. NQO1 alleviates renal fibrosis by inhibiting the TLR4/NF- κ B and TGF- β /Smad signaling pathways in diabetic nephropathy [J]. *Cellular Signalling*, 2023, 108: 110712.
- [26] HUANG F, WANG Q, GUO F, et al. FoxO1-mediated inhibition of STAT1 alleviates tubulointerstitial fibrosis and tubule apoptosis in diabetic kidney disease [J]. *EBioMedicine*, 2019, 48: 491-504.
- [27] ZHAO X, LI Y, YU J, et al. Role of mitochondria in pathogenesis and therapy of renal fibrosis [J]. *Metabolism*, 2024, 155: 155913.
- [28] SU W, GUO Y, WANG Q, et al. YAP1 inhibits the senescence of alveolar epithelial cells by targeting Prdx3 to alleviate pulmonary fibrosis [J]. *Experimental Molecular Medicine*, 2024, 56(7): 1643-1654.
- [29] LOVISA S, ZEISBERG M, KALLURI R. Partial epithelial-to-mesenchymal transition and other new mechanisms of kidney fibrosis [J]. *Trends in Endocrinology Metabolism*, 2016, 27(10): 681-695.
- [30] ZHANG S, TAN X, CHEN Y, et al. Postconditioning protects renal fibrosis by attenuating oxidative stress-induced mitochondrial injury [J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2017, 32(10): 1628-1636.
- [31] LU Y, LI Z, ZHANG S, et al. Cellular mitophagy: Mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation [J]. *Theranostics*, 2023, 13(2): 736-766.
- [32] 张红玲, 韦豪华, 李兴太. 刺参多糖清除活性氧保护线粒体的研究[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(5): 81-86.
- [33] SU C T, SEE D, HUANG Y J, et al. LTBP4 protects against renal fibrosis *via* mitochondrial and vascular impacts [J]. *Circulation Research*, 2023, 133(1): 71-85.