

· 药理 ·

# 基于 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路介导的自噬探讨 芪黄益气摄血方治疗免疫性血小板减少症 模型小鼠的作用机制

罗雅琴<sup>1</sup>, 于新阳<sup>2</sup>, 张月明<sup>2</sup>, 黄伟<sup>3,4\*</sup>

(1. 山东中医药大学 附属医院, 济南 250014;

2. 山东中医药大学 中医学院, 济南 250014;

3. 山东省中医药研究院, 济南 250014;

4. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 山东省分析测试中心, 济南 250014)

**【摘要】** 目的:基于腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/Unc-51样激酶1(AMPK/mTOR/ULK1)信号通路介导的自噬探讨芪黄益气摄血方治疗免疫性血小板减少症(ITP)模型小鼠的作用机制。方法:50只BALB/c小鼠随机分为5组,分别为正常组、模型组、芪黄益气摄血方高、低剂量组和强的松组,每组10只。采用豚鼠抗小鼠血小板血清(APS)腹腔注射方法,建立ITP小鼠模型;注射APS后的第8天,各组分别灌胃给药,连续14 d。检测外周血血小板计数(PLT)和血红蛋白(Hb)浓度变化;分离脾脏、胸腺组织,称质量,计算脏器指数;取胸骨做骨髓涂片,显微镜下进行骨髓巨核细胞分类;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清血小板生成素(TPO)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测脾脏AMPK、mTOR、ULK1、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin1)、p62 mRNA表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脾脏AMPK、p-AMPK、p-mTOR、p-ULK1、LC3 II/LC3 I、Beclin1、p62蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组小鼠外周血PLT计数、Hb及TPO水平明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),脾脏和胸腺指数显著升高( $P<0.01$ ),骨髓产板巨核细胞数显著减少( $P<0.01$ ),血清IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 水平显著升高( $P<0.01$ ),而IL-10、TGF- $\beta_1$ 水平显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,芪黄益气摄血方高、低剂量组及强的松组显著增加模型小鼠PLT计数、TPO水平( $P<0.01$ ),明显降低脾脏和胸腺指数( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),明显增加骨髓产板巨核细胞数( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),明显降低血清IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),明显提高IL-10、TGF- $\beta_1$ 水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与芪黄益气摄血方低剂量组比较,芪黄益气摄血方高剂量组和强的松组在改善PLT计数、细胞炎症因子水平方面呈现不同程度的显著性差异( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。Real-time PCR和Western blot结果显示,与正常组比较,模型组小鼠脾脏AMPK、LC3、Beclin1 mRNA和p-AMPK/AMPK、LC3 II/LC3 I、Beclin1蛋白表达均明显上调( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),mTOR、ULK1、p62 mRNA和p-mTOR、p-ULK1、p62蛋白表达水平明显下调( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与模型组比较,芪黄益气摄血方高、低剂量组及强的松组可明显下调脾脏AMPK、LC3、Beclin1 mRNA和p-AMPK/AMPK、LC3 II/LC3 I、Beclin1蛋白表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),同时明显上调mTOR、ULK1、p62 mRNA和p-mTOR、p-ULK1、p62蛋白表达水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:芪黄益气摄血方可能通过调控AMPK/mTOR/ULK1信号通路抑制自噬的过度发生,从而调节免疫耐受,发挥治疗ITP作用。

**【关键词】** 芪黄益气摄血方; 免疫性血小板减少症(ITP); 自噬; 腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/Unc-51样激酶1(AMPK/mTOR/ULK1)信号通路; 炎症反应

**【中图分类号】** R2-0;R33;R259;R554+.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2022)17-0043-09

**【doi】** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221636

**【网络出版地址】** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220615.1712.004.html>

**【网络出版日期】** 2022-06-16 10:14

**【收稿日期】** 2022-04-12

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81704029);齐鲁卫生与健康杰出青年人才资助项目(鲁卫人才字[2020]3号);中央本级重大增支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302);全国名老中医药专家刘持年传承工作室建设项目(国中医药人教发[2014]20号);山东省中医药科技面上项目(2020M027)

**【第一作者】** 罗雅琴,硕士,主治医师,硕士生导师,从事中西医结合治疗血液病的临床与实验研究,E-mail:luoluolu1460@yeah.net

**【通信作者】** \*黄伟,博士,副研究员,硕士生导师,从事中药药效物质基础及作用机理研究,E-mail:huangwei986@126.com

## Mechanism of Qihuang Yiqi Shexue Prescription in Treatment of ITP Model Mice Based on Autophagy Mediated by AMPK/mTOR/ULK1 Signaling Pathway

LUO Yaqin<sup>1</sup>, YU Xinyang<sup>2</sup>, ZHANG Yueming<sup>2</sup>, HUANG Wei<sup>3,4\*</sup>

(1. *The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Jinan 250014, China;*

2. *School of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of TCM, Jinan 250014, China;*

3. *Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China;*

4. *Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China)*

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Qihuang Yiqi Shexue prescription (QHYQSSX) in the treatment of immune thrombocytopenia (ITP) model mice based on the autophagy mediated by the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/Unc-51-like kinase 1 (ULK1) signaling pathway. **Method:** Fifty BALB/c mice were randomly divided into normal group, model group, high- and low-dose QHYQSSX groups, and prednisone group, with 10 mice in each group. The ITP model was induced by intraperitoneal injection of anti-platelet serum (APS) of guinea pig. On the 8th day of the APS injection, drugs were administered by gavage for 14 days. Peripheral blood platelet (PLT) count and hemoglobin (Hb) concentration were detected. Spleen and thymus were separated, weighed, and the organ index was calculated. Sternum was sampled for bone marrow smear, and bone marrow megakaryocytes were classified under a microscope. Thrombopoietin (TPO), interleukin-6 (IL-6), IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in the serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). AMPK, mTOR, ULK1, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), Beclin1, and p62 mRNA expression levels in the spleen were detected by Real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expression of AMPK, p-AMPK, p-mTOR, p-ULK1, LC3 II/LC3 I, Beclin1, and p62 in the spleen was detected by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed reduced peripheral blood PLT count, Hb, and TPO levels ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), increased spleen and thymus indexes ( $P < 0.01$ ), decreased number of bone marrow megakaryocytes ( $P < 0.01$ ), elevated serum levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  ( $P < 0.01$ ), and reduced IL-10 and TGF- $\beta_1$  levels ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the groups with drug intervention showed increased PLT counts and TPO levels ( $P < 0.01$ ), decreased spleen and thymus indexes ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), elevated number of bone marrow megakaryocytes ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), reduced serum levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and up-regulated IL-10 and TGF- $\beta_1$  levels ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the low-dose QHYQSSX group, the high-dose QHYQSSX group and the prednisone group showed different degrees of significant differences in improving PLT counts and levels of cellular inflammatory factors ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Real-time PCR and Western blot results showed that compared with the normal group, the model group showed up-regulated mRNA expression of AMPK, LC3, and Beclin1 and protein expression of p-AMPK/AMPK, LC3 II/LC3 I, and Beclin1 in the spleen ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and down-regulated mRNA expression of mTOR, ULK1, and p62 and protein expression of p-mTOR, p-ULK1, and p62 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the results in the model group, high- and low-dose QHYQSSX and prednisone could down-regulate the mRNA expression of AMPK, LC3, and Beclin1 and protein expression of p-AMPK/AMPK, LC3 II/LC3 I, and Beclin1 in the spleen ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and up-regulate the mRNA expression of mTOR, ULK1, and p62 and protein expression of p-mTOR, p-ULK1, and p62 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** QHYQSSX may inhibit

excessive autophagy by regulating the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway, thereby regulating immune intolerance and playing a role in the treatment of ITP.

**[Keywords]** Qihuang Yiqi Shexue prescription; immune thrombocytopenia (ITP); autophagy; adenosine monophosphate-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin/Unc-51-like kinase 1 (AMPK/mTOR/ULK1) signaling pathway; inflammatory reaction

免疫性血小板减少症(ITP),既往亦称特发性血小板减少性紫癜,是由于自身免疫异常导致的小板破坏过多的临床综合征,以出血及外周血小板减少、骨髓巨核细胞正常或增多为主要临床表现的出血性疾病,部分患者可出现颅内出血以及消化道出血等危重情况进而影响患者生命<sup>[1-2]</sup>。ITP的一线治疗方法主要包括:糖皮质激素、静脉注射用免疫球蛋白和抗-D免疫球蛋白;二线治疗方法包括:脾脏切除术、促血小板生成素受体激动剂、利妥昔单抗、环孢素和免疫抑制剂等<sup>[3]</sup>。相当一部分患者对一线及二线治疗方法均反应不佳,反复治疗迁延不愈成为难治性ITP,严重增加患者负担。临床实践证明,以中医药为主或辅助治疗在防治ITP患者出血、稳定外周血小板数值及改善临床症状等方面具有明显优势,但中医药治疗的效应机制有待深入研究<sup>[4]</sup>。研究表明,自噬异常对于ITP疾病的发生发展具有重要作用<sup>[5-6]</sup>。近年来,随着对自噬研究的不断深入,腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/Atg1蛋白激酶复合体(ULK1)通路作为调控自噬的重要路径而备受关注,因此,芪黄益气摄血方能否通过影响AMPK/mTOR/ULK1信号通路介导的自噬从而治疗ITP尚不清楚。

芪黄益气摄血方主要由黄芪、生地黄、茯苓、白术、赤芍、牡丹皮、等药物组成,是临床治疗ITP的经验方。课题组前期研究发现,芪黄益气摄血方可通过纠正ITP模型小鼠Th1/Th2<sup>[7]</sup>、Th17/Treg<sup>[8]</sup>免疫失衡,调节促炎因子和抑炎因子的分泌失衡,增加骨髓产板巨核细胞和TPO水平<sup>[9]</sup>,发挥治疗ITP的作用。但具体机制仍需进一步证实。本研究从AMPK/mTOR/ULK1信号通路探讨芪黄益气摄血方干预调节自噬,阐明治疗ITP的潜在作用机制,为其临床推广应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级BALB/c小鼠70只,体质量18~20 g,雌雄各半;豚鼠20只,体质量250~300 g,雄性,购自北京维通利华实验动物繁育有限公司,动物合格证号SCXK(京)2016-0006。经由山东中医药大

学附属医院动物伦理委员会批准,实验动物伦理审查号2019-027。于山东中医药大学动物房常规饲养,饲养条件:光照节律12L:12D(6:00~18:00);室温20~25℃;相对湿度(50±5)%。

**1.2 药物与试剂** 芪黄益气摄血方由黄芪30 g,生地黄24 g,茯苓15 g,白术15 g,水牛角30 g,赤芍12 g,牡丹皮9 g,仙鹤草30 g,茜草15 g,墨旱莲15 g,卷柏12 g,三七粉3 g,肿节风9 g,甘草6 g组成,饮片购自北京同仁堂药业股份有限公司,经山东省中医药研究院中药资源研究室林慧彬研究员鉴定均为正品。全方药材加水10倍量提取2次,每次1 h,滤液合并,浓缩,真空干燥,粉碎成细粉,使用前用蒸馏水配置成所需浓度的药液。醋酸泼尼松片商品名强的松,5 mg/片,由山东新华制药股份有限公司制造,国药准字H37020647,为本实验阳性药组。将醋酸泼尼松片研磨成细粉末,用蒸馏水配成悬液,备用。豚鼠抗小鼠血小板血清(APS),由本实验室参照相关文献制备;完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂(美国Sigma公司,批号分别为Lot#SLBZ9884、Lot#SLBZ2765);小鼠血小板生成素(TPO)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )试剂盒(杭州联科生物技术有限公司,批号均为70-E-EK2022);总RNA提取试剂、vigoscript第1链cDNA合成试剂盒[威格拉斯生物技术(北京)有限公司,批号均为N002];SYBR Premix EX Taq™ II[宝生物工程(大连)有限公司,批号K011];总蛋白提取试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号P1250);BCA蛋白浓度测定试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号PA115];AMPK $\alpha$ 、磷酸化(p)-AMPK $\alpha$ 、p-mTOR、p-ULK1、LC3 II/I、Beclin1、p62、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)(美国CST公司,批号分别为5831S、2535S、2971S、14202S、12741S、3738S、23214S、4967S)。

**1.3 仪器** CELL-DYN1700型全自动血细胞分析仪(美国Abbott公司);TGL-16B型离心机(上海安亭科学仪器厂);DMRBE型万能显微镜(德国Leica公司);7500型实时荧光定量聚合酶链式反应

(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);PowerPac Basic型电泳仪、Trans-Blot Turbo System型蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 豚鼠抗小鼠血小板血清(APS)制备** 参照文献[10-11]方法进行制备,具体方法:取20只BALB/c小鼠,经乙醚麻醉后,心脏取血,用EDTA-Na<sub>2</sub>抗凝,梯度离心后得到血小板,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,重悬,计数,调整密度至 $2.5 \times 10^6$ 个/mL,与等量弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂分别混合均匀作为抗原。其中,含弗氏完全佐剂抗原于0周时注射于豚鼠足掌、背及皮下,共5个点,合计注射1 mL;含弗氏不完全佐剂抗原分别于1、2、4周时按上述相同部位、点数、剂量注射。第5周时从豚鼠心脏取不抗凝的全血,静置后,经 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min(温度22 °C,半径13.5 cm),分离血清,即得APS<sup>[10-11]</sup>,储存于-20 °C冰箱,备用。

**2.2 ITP小鼠模型的建立** 参考文献[12-13]方法,采用腹腔注射APS方法,建立ITP小鼠模型。具体方法如下:将APS从-20 °C冰箱中取出,待完全融化后,置于56 °C水浴30 min后灭活补体,红细胞吸附,用生理盐水稀释成1:4浓度时备用。然后分别于0、1、3、5、7、9、11、13 d腹腔注射稀释后的APS 0.1 mL,以维持血小板的持续低水平,以血小板计数持续低水平作为造模成功的标准。

**2.3 分组及给药** 50只BALB/c小鼠随机分为5组,分别为正常组、模型组、芪黄益气摄血方高、低剂量组和强的松组,每组10只。注射APS后第8天,各组分别灌胃给药。参照人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值,按单位体质量的剂量来算,人临床日用量为225 g生药,小鼠的等效剂量相当于人的9.1倍,故设置芪黄益气摄血方低、高剂量组分别为 $30、60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,分别相当于人临床日用量的1、2倍等效量;强的松人临床日用量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,折算成小鼠给药剂量为 $9.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,正常组和模型组给予同体积的生理盐水灌胃,1次/d,连续灌胃14 d,给药体积为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

**2.4 外周血象检测** 分别于造模前(0 d)、给药前(造模后7 d)、给药后(给药14 d),小鼠尾静脉取血,按比例稀释后,全自动血液分析仪检测各组小鼠血象,动态观察各组不同时间点的血小板(PLT)计数;比较各组在给药14 d时血红蛋白(Hb)的差异。

**2.5 脾脏和胸腺指数** 连续给药14 d后称量小鼠体质量,处死解剖并分离脾脏和胸腺,去除黏附的

血液及其他组织,称质量,计算脾脏和胸腺指数:脾脏指数=脾脏质量(mg)/小鼠体质量(g);胸腺指数=胸腺质量(mg)/小鼠体质量(g)。然后将组织储存于-80 °C冰箱备用,用于后续指标检测。

**2.6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清TPO、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$ 水平** 给药结束后,小鼠禁食禁水8 h,取血,分离血清,严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作,检测各组小鼠血清TPO、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$ 水平。

**2.7 骨髓巨核细胞分类** 取小鼠胸骨做骨髓涂片,瑞氏染色,显微镜(1 000 $\times$ )下计数100个巨核细胞并进行巨核细胞分类(包括原始+幼稚巨核细胞、颗粒巨核细胞、产板巨核细胞、裸核巨核细胞)。

**2.8 Real-time PCR检测脾脏AMPK、mTOR、ULK1、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin1)、p62 mRNA表达水平** 从-80 °C超低温冰箱取小鼠脾脏组织,采用RNAzol试剂提取细胞总RNA,用Vigorscript第一链cDNA合成试剂盒逆转录合成cDNA;用Takara SYBR Premix EX Taq<sup>TM</sup> II试剂盒测定组织相关基因表达量。以总RNA为模板合成cDNA,进行PCR反应。扩增条件为95 °C预变性30 s(1个循环);PCR反应条件为95 °C反应5 s,60 °C反应30 s(40个循环);融解曲线分析为95 °C反应15 s,65 °C退火1 min,95 °C反应15 s。在PCR扩增结束后,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示mRNA相对表达量。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
AMPK	上游 AACCTGAGAACGTCCTGCTTGATG	132
	下游 TGACTTCTGGTGCGGCATAATTGG	
mTOR	上游 ACCGTCCGCCTTCACAGATACC	87
	下游 GCAGTCC GTTCCTTCTCCTTCTTG	
ULK1	上游 TCTGGACAAACAACGGCTGCTG	117
	下游 CGGTGCTGGAACATCTCATCAAGG	
LC3	上游 GAGCGAGTTGG TCAAGATCATCCG	119
	下游 CATAGATGTCAGCGATGGGTGTGG	
Beclin1	上游 AGGCAGTGGCGGCTCCTATTC	115
	下游 TGAGGACACCCAGGCAAGACC	
p62	上游 AGGAGGAGACGATGACTGGACAC	150
	下游 TTGGTCTGTAGGAGCC TGGTGAG	
$\beta$ -actin	上游 GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG	174
	下游 ATGCCACAGGATTCCATACC	

**2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测脾脏 AMPK、p-AMPK、p-mTOR、p-ULK1、LC3 II / I、Beclin1、p62 蛋白表达水平** 从-80 °C超低温冰箱取小鼠脾脏组织,按试剂盒法提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取蛋白样品 20 μg 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转膜,封闭。用 AMPK(1:2 000)、p-AMPK(1:2 000)、p-mTOR(1:1 000)、p-ULK1(1:2 000)、LC3 II / I(1:2 000)、Beclin1(1:2 000)、p62(1:1 000)、β-actin(1:1 000)一抗,4 °C孵育过夜,PBST洗膜3次,二抗(1:1万),室温孵育2 h,PBST洗膜3次,HRP化学发光底物曝光,全自动化学发光成像分析系统显影成像,拍照,保存图像。采用 Image J 图像分析软件,统计分析条带蛋白灰度值。

**2.10 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计软件处理数据,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD), $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 ITP 模型小鼠外周血 PLT 计数的影响** 造模前,各组小鼠外周血 PLT 计数无明显差异;给药前(造模后 7 d),与正常组比较,各造模组小鼠外周血 PLT 计数均显著下降( $P < 0.01$ ),尤其模型组小鼠外周血 PLT 计数持续减少,提示 ITP 小鼠模型复制成功。连续给药 14 d 后,与模型组比较,芪黄益气摄血方高、低剂量组及强的松组 PLT 计数均显著升高( $P < 0.01$ );与芪黄益气摄血方低剂量组比较,芪黄益气摄血方高剂量组 PLT 计数明显升高( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 芪黄益气摄血方对 ITP 模型小鼠外周血 PLT 计数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Qihuang Yiqi Shexue prescription(QHYQSXP) on PLT counts in peripheral blood of ITP mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	PLT/(×10 <sup>9</sup> )/个/L		
		造模前	给药前	给药 14 d
正常组		413.60±57.77	410.00±47.02	425.70±50.02
模型组		402.10±53.49	165.20±21.05 <sup>2)</sup>	178.00±25.01 <sup>2)</sup>
芪黄益气摄血方低剂量组	30	396.20±73.68	190.68±47.14 <sup>2)</sup>	340.80±63.28 <sup>4)</sup>
芪黄益气摄血方高剂量组	60	413.40±62.06	175.30±35.79 <sup>2)</sup>	400.90±60.05 <sup>4,5)</sup>
强的松	0.009 1	424.44±43.40	180.89±38.11 <sup>2)</sup>	398.60±73.44 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ;与芪黄益气摄血方低剂量组比较<sup>5)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>6)</sup> $P < 0.01$ (表 3-表 8 同)

**3.2 对 ITP 模型小鼠 Hb 和 TPO 水平的影响** 与正常组比较,模型组小鼠 Hb、TPO 水平明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组比较,芪黄益气摄血方高、

低剂量组及强的松组 TPO 水平均显著升高( $P < 0.01$ ),芪黄益气摄血方高剂量组 Hb 浓度明显增加( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 芪黄益气摄血方对 ITP 模型小鼠 Hb 和 TPO 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of QHYQSXP on Hb and TPO levels of ITP mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Hb/g·L <sup>-1</sup>	TPO/μg·L <sup>-1</sup>
正常组		155.20±17.47	52.21±4.77
模型组		133.60±16.78 <sup>1)</sup>	27.25±3.41 <sup>2)</sup>
芪黄益气摄血方低剂量组	30	145.73±13.73	41.71±4.38 <sup>4)</sup>
芪黄益气摄血方高剂量组	60	160.50±25.57 <sup>3)</sup>	50.17±4.55 <sup>4)</sup>
强的松组	0.009 1	139.55±20.72	50.88±5.37 <sup>4)</sup>

**3.3 对 ITP 模型小鼠脾脏和胸腺指数的影响** 与正常组比较,模型组小鼠脾脏和胸腺指数均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,芪黄益气摄血方高、低剂量组及强的松组脾脏和胸腺指数均出现明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4。

**3.4 对 ITP 模型小鼠血清炎症细胞因子水平的影响** 与正常组比较,模型组小鼠血清 IL-6、TNF-α、

IFN-γ 水平显著升高( $P < 0.01$ ),而 IL-10、TGF-β<sub>1</sub> 水平显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,芪黄益气摄血方高、低剂量组及强的松组 IL-6、TNF-α、IFN-γ 水平明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),而 IL-10、TGF-β<sub>1</sub> 水平明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ );与芪黄益气摄血方低剂量组比较,芪黄益气摄血方高剂量组和强的松组 TNF-α 水平明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),TGF-β<sub>1</sub> 水平

表 4 芪黄益气摄血方对 ITP 模型小鼠脾脏和胸腺指数的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of QHYQSXP on spleen and thymus index of ITP mice ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	脾脏指数	胸腺指数
正常组		4.09±0.61	2.72±0.46
模型组		9.27±0.70 <sup>2)</sup>	3.91±0.62 <sup>2)</sup>
芪黄益气摄血方低剂量组	30	7.91±0.59 <sup>4)</sup>	3.36±0.55 <sup>3)</sup>
芪黄益气摄血方高剂量组	60	7.19±0.59 <sup>4)</sup>	3.18±0.26 <sup>4)</sup>
强的松组	0.009 1	6.58±0.46 <sup>4)</sup>	2.99±0.47 <sup>4)</sup>

显著升高 ( $P<0.01$ ), 仅强的松组 IL-6 水平明显降低 ( $P<0.05$ ), 高剂量组 IL-10 水平明显升高 ( $P<0.05$ ), IFN- $\gamma$  水平明显降低, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 5。

3.5 对 ITP 模型小鼠骨髓巨核细胞分类的影响  
与正常组比较, 模型组小鼠骨髓产板巨核细胞数显著减少 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 芪黄益气摄血方高、低剂量组及强的松组骨髓产板巨核细胞数均显著增加, 差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。见表 6。

表 5 芪黄益气摄血方对 ITP 模型小鼠血清 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$  水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 5 Effect of QHYQSXP on serum levels of IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$  and IFN- $\gamma$  in ITP mice ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$	TGF- $\beta_1$	IFN- $\gamma$
正常组		19.97±5.08	42.38±7.20	30.83±4.84	98.07±12.14	4.75±0.83
模型组		40.49±6.93 <sup>2)</sup>	19.19±6.05 <sup>2)</sup>	71.08±9.33 <sup>2)</sup>	40.61±7.71 <sup>2)</sup>	7.63±1.22 <sup>2)</sup>
芪黄益气摄血方低剂量组	30	26.70±4.90 <sup>4)</sup>	26.73±4.59 <sup>3)</sup>	46.67±4.73 <sup>4)</sup>	76.32±8.18 <sup>4)</sup>	5.92±1.03 <sup>3)</sup>
芪黄益气摄血方高剂量组	60	22.66±6.48 <sup>4)</sup>	33.41±6.11 <sup>4,5)</sup>	38.96±5.93 <sup>4,6)</sup>	92.09±8.14 <sup>4,6)</sup>	4.92±0.93 <sup>4,5)</sup>
强的松组	0.009 1	21.01±5.24 <sup>4,5)</sup>	31.25±5.64 <sup>4)</sup>	40.05±7.87 <sup>4,5)</sup>	93.20±9.01 <sup>4,6)</sup>	5.09±0.76 <sup>4)</sup>

表 6 芪黄益气摄血方对 ITP 模型小鼠骨髓巨核细胞分类的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 6 Effect of QHYQSXP on classification of bone marrow megakaryocytes in ITP mice ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	原始+幼稚巨核细胞	颗粒巨核细胞	产板巨核细胞	裸核巨核细胞
正常组		28.79±5.19	40.79±4.38	27.62±3.21	5.49±2.44
模型组		31.97±5.25	42.51±3.31	12.91±3.09 <sup>2)</sup>	6.13±1.55
芪黄益气摄血方低剂量组	30	32.68±3.50	39.11±4.34	20.16±3.87 <sup>4)</sup>	5.92±1.01
芪黄益气摄血方高剂量组	60	29.17±4.96	39.76±3.98	23.29±5.05 <sup>4)</sup>	6.27±2.03
强的松组	0.009 1	30.11±3.12	43.04±6.43	23.40±5.18 <sup>4)</sup>	6.18±1.90

3.6 对 ITP 模型小鼠脾脏 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路 mRNA 和蛋白表达水平的影响  
与正常组比较, 模型组小鼠脾脏 AMPK mRNA 表达水平和 p-AMPK/AMPK 蛋白均明显上调 ( $P<0.05, P<0.01$ ), mTOR、ULK1 mRNA 和 p-mTOR、p-ULK1 蛋白表达水平均明显下调 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 与模型组比较, 芪黄益气摄血方高剂量组和强的松组可明

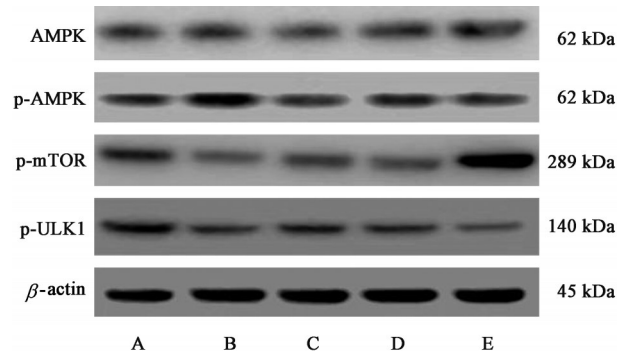
显下调脾脏 AMPK mRNA 表达和 p-AMPK/AMPK 蛋白 ( $P<0.05, P<0.01$ ), 明显上调 mTOR、ULK1 mRNA 和 p-mTOR、p-ULK1 蛋白表达水平 ( $P<0.05, P<0.01$ )。见表 7、图 1。

3.7 对 ITP 模型小鼠脾脏细胞自噬相关 mRNA 和蛋白表达水平的影响  
与正常组比较, 模型组小鼠脾脏 LC3 II/LC3 I、Beclin1 mRNA 和蛋白表达水平

表 7 芪黄益气摄血方对 ITP 模型小鼠脾脏 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路 mRNA 和蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of QHYQSXP on mRNA and protein expression levels of AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway in spleen of ITP mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AMPK mRNA	p-AMPK /AMPK	mTOR mRNA	p-mTOR / $\beta$ -actin	ULK1 mRNA	p-ULK1 / $\beta$ -actin
正常组		0.78±0.28	1.07±0.05	1.18±0.39	1.63±0.12	1.02±0.23	1.74±0.12
模型组		4.00±1.13 <sup>2)</sup>	1.71±0.21 <sup>1)</sup>	0.49±0.05 <sup>2)</sup>	0.61±0.03 <sup>2)</sup>	0.34±0.06 <sup>2)</sup>	0.41±0.06 <sup>2)</sup>
芪黄益气摄血方低剂量组	30	2.36±1.01	1.45±0.19	0.84±0.19 <sup>3)</sup>	1.09±0.10 <sup>3)</sup>	0.51±0.03 <sup>3)</sup>	0.75±0.04 <sup>4)</sup>
芪黄益气摄血方高剂量组	60	1.85±0.45 <sup>3)</sup>	1.16±0.14 <sup>3)</sup>	1.49±0.31 <sup>3)</sup>	1.52±0.13 <sup>4)</sup>	0.87±0.12 <sup>4)</sup>	1.31±0.08 <sup>4)</sup>
强的松组	0.009 1	1.70±0.41 <sup>3)</sup>	1.01±0.15 <sup>4)</sup>	1.93±0.38 <sup>4)</sup>	1.84±0.16 <sup>4)</sup>	0.73±0.13 <sup>4)</sup>	0.90±0.18 <sup>3)</sup>



注:A.正常组;B.模型组;C.芪黄益气摄血方低剂量组;D.芪黄益气摄血方高剂量组;E.强的松组(图2同)

图1 ITP模型小鼠脾脏AMPK/mTOR/ULK1信号通路蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway protein expression in spleen of ITP mice

均明显上调( $P<0.05, P<0.01$ ),而p62表达水平明显

下调( $P<0.05, P<0.01$ );与模型组比较,芪黄益气摄血方高、低剂量组及强的松组可明显下调脾脏LC3 II/LC3 I、Beclin1 mRNA表达水平( $P<0.05, P<0.01$ ),明显上调p62表达水平( $P<0.05, P<0.01$ )。见图2、表8。

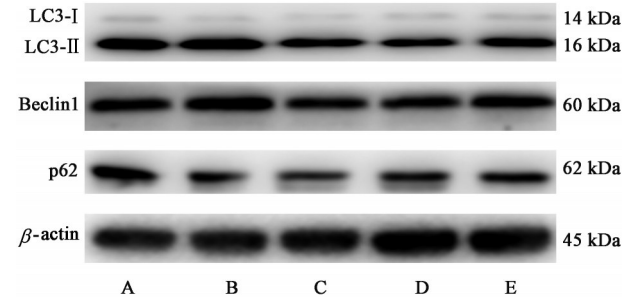


图2 ITP模型小鼠脾脏细胞自噬相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of autophagy-related protein expression in spleen of ITP mice

表8 芪黄益气摄血方对ITP模型小鼠脾脏细胞自噬相关mRNA和蛋白表达水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of QHYQSXP on expression levels of autophagy-related mRNA and protein in spleen of ITP mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LC3 mRNA	LC3 II/LC3 I	Beclin1 mRNA	Beclin1/β-actin	p62 mRNA	p62/β-actin
正常组		0.28±0.11	1.71±0.12	0.20±0.13	1.19±0.11	1.06±0.30	1.19±0.09
模型组		1.82±0.16 <sup>2)</sup>	3.14±0.19 <sup>1)</sup>	1.51±0.37 <sup>2)</sup>	2.11±0.08 <sup>1)</sup>	0.21±0.07 <sup>2)</sup>	0.56±0.04 <sup>2)</sup>
芪黄益气摄血方低剂量组	30	1.25±0.21 <sup>3)</sup>	2.53±0.13 <sup>3)</sup>	0.78±0.21 <sup>3)</sup>	1.52±0.14 <sup>3)</sup>	0.44±0.11 <sup>3)</sup>	0.81±0.09 <sup>3)</sup>
芪黄益气摄血方高剂量组	60	0.58±0.25 <sup>4)</sup>	1.82±0.15 <sup>4)</sup>	0.47±0.03 <sup>4)</sup>	1.30±0.13 <sup>4)</sup>	0.67±0.09 <sup>4)</sup>	1.14±0.09 <sup>4)</sup>
强的松组	0.009 1	0.98±0.14 <sup>4)</sup>	1.96±0.19 <sup>4)</sup>	0.30±0.08 <sup>4)</sup>	1.49±0.14 <sup>3)</sup>	0.90±0.22 <sup>4)</sup>	0.10±0.11 <sup>3)</sup>

#### 4 讨论

中医古籍未见对ITP的病名记载,但据其临床特征,可将其归属于“血证”“发斑”“葡萄疫”“肌衄”等范畴<sup>[14]</sup>。“血证”之名首见于《医学正传·血证》。《金匱要略·百合狐惑阴阳毒病脉并治》对皮肤发斑的形态、色泽进行了描述和分类:“阳毒之为病,面赤斑斑如锦纹,咽喉痛……”,“阴毒之为病,面目青,身痛如被杖,咽喉痛……”。即阳证发斑,斑色紫红而鲜;阴证发斑,斑色青紫而晦暗。《医宗金鉴》言:“皮肤出血谓之肌衄。”《外科正宗》将本病称之为“葡萄疫”,指出:“葡萄疫,其患多生于小儿,感受四时不正之气,郁于皮肤不散,结成大小青紫斑点,色若葡萄,发在遍体头面……邪毒传胃,牙根出血,久则虚人,斑渐方退。”《圣济总录》描述“紫癜风之状,皮肤生紫点,搔之皮起而不痒痛是也。”《寿世保元·衄血》指出:“衄血者,鼻中出血也。”《景岳全书》中:“血从齿缝牙龈中出者为齿衄”。

现代医学认为,ITP是一种自身免疫紊乱性疾病,其临床表现主要为免疫介导的血小板破坏增加和生成减少<sup>[15]</sup>。ITP发病机制较复杂,至今尚未明

确,除抗体介导的血小板破坏以外,以T淋巴细胞免疫失衡是ITP发生的中心环节<sup>[16-17]</sup>。临床研究显示,ITP患者不仅存在Th1/Th2细胞失衡<sup>[18-19]</sup>,而且存在Th17/Treg细胞失衡<sup>[20-21]</sup>,进而介导一系列免疫反应,导致机体免疫调节紊乱,最终引发ITP。

芪黄益气摄血方是本科室根据中医辨证施治理论总结的治疗ITP的临床经验方,主要由黄芪、生地、茯苓、白术、赤芍、牡丹皮、等药物组成。方中黄芪与生地配伍,益气养阴、清热凉血,茯苓、白术健脾益气,水牛角、赤芍、牡丹皮、卷柏、肿节风清热凉血,茜草、仙鹤草、墨旱莲凉血止血,三七止血,甘草调和诸药,全方配伍共奏健脾益气,清热凉血止血之功。本方在临床辨证应用治疗ITP中,均取得了较好的临床疗效,尤以气不摄血型患者效果更好。研究发现,芪黄益气摄血方可显著增加ITP模型小鼠PLT计数、TPO水平,降低脾脏和胸腺指数,增加骨髓产板巨核细胞数;同时还显著降低血清IL-6、TNF-α、IFN-γ水平,提高IL-10、TGF-β<sub>1</sub>水平,说明芪黄益气摄血方可通过增加骨髓产板巨核细胞和TPO水平,抑制炎症反应,发挥治疗ITP作用。

细胞自噬(autophagy)是近年来的研究热点,作为细胞应对内外环境变化的适应性反应,自噬对于维持细胞稳态和存活至关重要<sup>[22]</sup>。研究显示,AMPK/mTOR/ULK1信号通路在调控自噬防治疾病方面发挥着重要作用<sup>[23-24]</sup>。AMPK是真核生物体内重要的蛋白激酶,也是一种重要的能量感受器,受ATP/AMP的调控。AMPK是参与自噬调节的关键蛋白,其在ATP缺乏或AMP过度积累时被激活。mTOR是非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,也是ATP的感受器及自噬的主要调控因子,在自噬过程中发挥重要作用。研究表明,AMPK活化后激活磷酸化结节性硬化复合体(TSC1/2),进而抑制小GTP酶Rheb,负向调控mTOR<sup>[25]</sup>。AMPK通过磷酸化连接蛋白raptor,阻碍raptor与mTOR或mTOR与底物的结合,同样可以抑制mTOR的活化<sup>[26]</sup>。此外,AMPK还可以直接磷酸化mTOR并导致自身磷酸化水平下降<sup>[27]</sup>。目前,越来越多的研究证实,当细胞处于异常状态时,活化的AMPK能够抑制mTOR的活性,导致mTOR与ULK1 Ser757位点的复合体解离,从而使ULK1的激活,促进自噬的发生<sup>[28-29]</sup>。本研究发现,ITP模型小鼠脾脏LC3 II/LC3 I、Beclin1 mRNA和蛋白表达水平显著上调,p62 mRNA和蛋白表达水平显著下调,提示脾脏细胞自噬活性增强;p-AMPK蛋白表达增加,p-mTOR、p-ULK1蛋白表达降低,提示AMPK磷酸化水平上调,加强了对mTOR的抑制,从而进一步抑制了ULK1磷酸化进而促进了自噬。研究证实,给予芪黄益气摄血方治疗后,可抑制细胞自噬,调节免疫耐受。

综上所述,本研究显示,芪黄益气摄血方可能通过调控AMPK/mTOR/ULK1信号通路抑制自噬的过度发生,从而调节免疫耐受,进而发挥治疗ITP的作用。然而芪黄益气摄血方是否通过其他的信号通路调控自噬发挥作用仍有待进一步探索。明确其在ITP中的具体作用机制,将为芪黄益气摄血方的临床应用提供理论依据,也为临床免疫性血小板减少症的治疗提供新的思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] SNYDER C F, MATHIAS S D, CELLA D, et al. Health-related quality of life of immune thrombocytopenic purpura patients: Results from a web-based survey[J]. *Curr Med Res Opin*, 2008, 24

(10):2767-2776.

- [2] MCMILLAN R, BUSSEL J B, GEORGE J N, et al. Self-reported health-related quality of life in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura[J]. *Am J Hematol*, 2010, 83(2):150-154.
- [3] 侯明. 免疫性血小板减少症的治疗进展[J]. *临床血液学杂志*, 2020, 33(1):6-9.
- [4] 张玲,陈科,张雅月,等. 健脾益气摄血方治疗免疫性血小板减少症临床疗效及其机制研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(4):343-352.
- [5] WALSH C M, EDINGER A L. The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis[J]. *Immunol Rev*, 2010, 236(1):95-109.
- [6] SHAN N N, DONG L L, ZHANG X M, et al. Targeting autophagy as a potential therapeutic approach for immune thrombocytopenia therapy[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 100:11-15.
- [7] 罗雅琴,黄伟. 芪黄益气摄血方对ITP模型小鼠Th1/Th2细胞因子及转录因子T-bet/GATA3表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(1):48-51.
- [8] 罗雅琴,黄伟. 芪黄益气摄血方对免疫性血小板减少症模型小鼠Th17/Treg细胞因子及转录因子ROR- $\gamma$ t/Foxp3表达的影响[J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(6):129-133.
- [9] 罗雅琴,黄伟. 芪黄益气摄血方对免疫性血小板减少症模型小鼠的治疗作用及抗炎机制研究[J]. *中国药物警戒*, 2022, doi: 11. 5219. R. 20220207. 1822. 008. html.
- [10] 富琦,范颖,王家辉,等. 免疫性血小板减少性紫癜病证结合动物模型建立与评价[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2004, 10(2):30-32.
- [11] 朱长乐,何昊,徐玥,等. 健脾摄血方对ITP模型小鼠生命体征和脏器指数的影响[J]. *中医药学报*, 2017, 45(2):10-14.
- [12] 郎海燕,褚雨霏,马薇,等. 免疫性血小板减少症病证结合动物模型研究[J]. *中医药信息*, 2017, 34(1):39-43.
- [13] 祁烁,李天天,何昊,等. 强的松对ITP模型小鼠血管活性物质调节作用研究[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(34):6601-6606.
- [14] 徐颖超,宋玲玲,刘朝霞. 原发免疫性血小板减少症的中西医研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(8):128-129.
- [15] 崔清彦,颀迎新,王文欣,等. 免疫性血小板减少症发病机制的研究进展[J]. *山东医药*, 2020, 60(4):102-105.
- [16] AUDIA S, MAHÉVAS M, SAMSON M, et al.

- Pathogenesis of immune thrombocytopenia [J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(6):620-632. .
- [17] WEI Y, HOU M. T cells in the pathogenesis of immune thrombocytopenia [J]. *Semin Hematol*, 2016, 53(Suppl 1):S13-S15.
- [18] 李姜惠子, 刘洋, 王秀娟, 等. sPD-1/sPD-L1 与 Th1/Th2 及 Th17/Treg 相关细胞因子在原发免疫性血小板减少症中的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(4): 467-470.
- [19] 王明镜, 许勇钢, 丁晓庆, 等. 免疫性血小板减少症患者 Th1/Th2 细胞失衡与特异性转录因子表达异常 [J]. *临床血液学杂志*, 2018, 31(3):379-382.
- [20] 谢东杰, 王爱迪, 刘宝山. CD4<sup>+</sup>T 细胞在原发性免疫性血小板减少症中作用机制的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(9):1415-1417.
- [21] 王明镜, 许勇钢, 丁晓庆, 等. 免疫性血小板减少症患者促炎因子与抑炎因子分泌失衡 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(2):522-527.
- [22] 王敏, 余薇, 查文良. 自噬和线粒体自噬在糖尿病心肌病中的作用研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(10):1337-1340.
- [23] YANG H P, LI L, ZHOU K C, et al. Shengmai injection attenuates the cerebral ischemia/reperfusion induced autophagy via modulation of the AMPK, mTOR and JNK pathways [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54 (10):2288-2297.
- [24] XUE T F, DING X, JI J, et al. PD149163 induces hypothermia to protect against brain injury in acute cerebral ischemic rats [J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 135 (3):105-113.
- [25] WATAYA-KANEDA M. Mammalian target of rapamycin and tuberous sclerosis complex [J]. *J Dermatol Sci*, 2015, 79(2):93-100.
- [26] GWINN D M, SHACKELFORD D B, EGAN D F, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint [J]. *Mol Cell*, 2008, 30 (2) : 214-226.
- [27] CHUN Y, KIM J. AMPK-mTOR signaling and cellular adaptations in hypoxia [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (18):9765-9787.
- [28] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13 (2):132-141.
- [29] TIAN W L, LI W, CHEN Y Q, et al. Phosphorylation of ULK1 by AMPK regulates translocation of ULK1 to mitochondria and mitophagy [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589 (15):1847-1854.

[责任编辑 孙丛丛]