

基于 AMPK/mTOR/ULK1 自噬相关通路探讨左归降糖通脉方对 AGEs 合并缺糖缺氧星形胶质细胞炎性损伤的影响

李钰佳, 李定祥, 彭珣, 邓奕辉*
(湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨左归降糖通脉方对糖基化终末产物(AGEs)合并缺糖缺氧(OGD)损伤后星形胶质细胞(AS)的影响及干预机制。方法:使用细胞增殖与活性检测试剂盒(CCK-8)确定 AGEs 作用浓度及 OGD 时间,选择左归降糖通脉方(ZGJTTP)含药血浆的作用浓度;将星形胶质细胞随机分为空白组、模型(AGEs+OGD)组、ZGJTTP 组、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抑制剂(Compound C)组、AMPK 激动剂(AICAR)组、ZGJTTP+AICAR 组,倒置显微镜下观察各组细胞形态结构,CCK-8 法检测各组细胞存活率,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组细胞中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量;电镜下观察各组细胞内自噬小体的数目,免疫荧光染色法观察各组细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)的表达情况,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞 LC3、p62、磷酸化(p)-AMPK、AMPK、磷酸化(p)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、mTOR、磷酸化(p)-UNC-51 样激酶 1(ULK1)、ULK1 蛋白的表达情况。结果:选择 AGEs 200 mg·L⁻¹ 合并 OGD 6 h 作为最适造模条件,5% 作为 ZGJTTP 含药血浆的最佳作用体积分数。倒置显微镜下见造模后细胞受损严重,ZGJTTP 组与 Compound C 组细胞损伤得到明显改善;ELISA 结果示模型组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量显著增加($P<0.01$),ZGJTTP 组与 Compound C 组炎症因子含量显著下降($P<0.01$);电镜下可见模型组细胞内自噬小体数目明显增多,免疫荧光结果示 LC3 荧光表达面积显著增加($P<0.01$),ZGJTTP 组与 Compound C 组细胞内自噬小体数目明显减少,LC3 表达面积显著减少($P<0.01$);Western blot 结果显示,与空白组比较,模型组细胞 LC3 II/LC3 I、p-AMPK/AMPK 蛋白表达显著升高($P<0.01$),p62、p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1 显著下降($P<0.01$),与模型组比较,ZGJTTP 组与 Compound C 组细胞内 LC3 II/LC3 I、p-AMPK/AMPK 蛋白表达显著下降($P<0.01$),p62、p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1 显著升高($P<0.01$)。结论:ZGJTTP 对 AGEs 合并 OGD 炎性损伤的星形胶质细胞具有保护作用,这一作用是通过抑制了 AMPK/mTOR/ULK1 自噬相关通路的激活,从而抑制了自噬的过度表达实现的。

[关键词] 星形胶质细胞;自噬;左归降糖通脉方;腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK);哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR);UNC-51 样激酶 1(ULK1)

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R587.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)16-0090-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221541

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220610.1703.005.html>

[网络出版日期] 2022-06-13 9:47

Effect of Zuogui Jiangtang Tongmai Prescription on Astrocyte Injury by AGEs Combined with Oxygen-glucose Deprivation Based on AMPK/mTOR/ULK1 Pathway Related to Autophagy

LI Yujia, LI Dingxiang, PENG Xun, DENG Yihui*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Zuogui Jiangtang Tongmai prescription (ZGJTTP) on astrocytes (ASs) injured by advanced glycation end products (AGEs) combined with oxygen-

[收稿日期] 2022-03-04

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81874416);湖南省科技创新团队项目(2020RC4050)

[第一作者] 李钰佳,博士,从事中医药防治糖尿病及其脑血管并发症的研究,E-mail:393824181@qq.com

[通信作者] * 邓奕辉,教授,博士生导师,从事中医药防治糖尿病及其脑血管并发症的研究,E-mail:644138330@qq.com

glucose deprivation (OGD). **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to determine the optimal concentration of AGEs and the action time of OGD, and the optimal blood concentration of ZGJTTP was selected for follow-up experiments. ASs were divided into normal group, model group (AGEs + OGD), ZGJTTP group, an adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) inhibitor (Compound C) group, AMPK activator (AICAR) group, and combination group (ZGJTTP + AICAR). The morphological changes in ASs in each group were observed under an inverted microscope. The cell survival rate in each group was detected by CCK-8. The content of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The number of autophagosomes in each group was counted under an electron microscope. The expression of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) was observed by immunofluorescence. The protein expression of LC3, p62, p-AMPK, AMPK, p-mammalian target of rapamycin (mTOR), mTOR, p-UNC-51 like kinase 1 (ULK1), and ULK1 was detected by Western blot. **Result:** According to the results of cell survival rate, 200 mg·L⁻¹ AGEs and OGD for 6 h were selected as the optimal modeling conditions for the model group, and 5% was selected as the optimal blood concentration of ZGJTTP. Under the inverted microscope, the cells were severely damaged after modeling, but the cell injury in the ZGJTTP group and the Compound C group was significantly improved. As revealed by ELISA results, the content of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the model group increased ($P < 0.01$), and the content of inflammatory factors in the ZGJTTP group and the Compound C group decreased ($P < 0.01$). Under the electron microscope, the number of autophagosomes in the model group increased significantly. The immunofluorescence results showed that the expression area of LC3 increased in the model group ($P < 0.01$), and the ZGJTTP group and the Compound C group showed decreased number of autophagosomes and reduced expression area of LC3 ($P < 0.01$). As demonstrated by the results of Western blot, compared with the normal group, the model group showed increased expression of LC3 II / LC3 I and p-AMPK / AMPK ($P < 0.01$) and decreased p62, p-mTOR / mTOR, and p-ULK1 / ULK1 ($P < 0.01$). Compared with the model group, the ZGJTTP group and the Compound C group showed decreased expression of LC3 II / LC3 I and p-AMPK / AMPK ($P < 0.01$) and increased p62, p-mTOR / mTOR, and p-ULK1 / ULK1 ($P < 0.01$). **Conclusion:** ZGJTTP possesses a protective effect on ASs with inflammatory injury by AGEs combined with OGD, which may be achieved by inhibiting the activation of the AMPK / mTOR / ULK1 pathway related to autophagy, thus inhibiting the overexpression of autophagy.

[Keywords] astrocytes; autophagy; Zuogui Jiangtang Tongmai prescription; adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK); mammalian target of rapamycin (mTOR); UNC-51 like kinase 1 (ULK1)

糖尿病是一种以血糖水平异常升高为特征的慢性代谢疾病。据国际糖尿病联盟最新统计,2021年全球约有5.37亿成人患有糖尿病^[1]。我国成人糖尿病的发病率为11.28%,与十年前相比大约增加了3.5倍^[2]。糖尿病患者通常承受比非糖尿病患者更严重的脑部损伤,糖尿病患者发生脑缺血的危险性是非糖尿病患者的1.5~3倍^[3]。多种因素如炎症因子、胰岛素抵抗、糖脂代谢紊乱等引起的脑血管损伤是脑血管并发症发生的主要原因^[4]。西医临床治疗糖尿病多使用双胍类、噻唑烷二酮类等多种降糖药物控制血糖,但药物相关性不良反应发生率较高,且对糖尿病慢性并发症的控制不理想^[5]。近年

来自噬与糖尿病及缺氧缺血性脑损伤疾病的关系已成为研究热点^[6-7]。当自噬作为一种生存反应被激活时,能清除破坏受损的细胞器和突变蛋白,以应对低于一定阈值的损伤;但当损伤超过这个阈值时,自噬被过度激活,一些必不可少的细胞成分被自我消化和降解,引起细胞程序性死亡^[8-9]。自噬的这种双向调节作用可作为糖尿病缺血性脑损伤疾病治疗的潜在作用机制。星形胶质细胞是中枢神经系统中丰富的胶质细胞,是维持脑稳态和脑正常功能的必需细胞,也是脑炎症的重要介质,能对中枢神经系统的损伤作出迅速反应^[10]。左归降糖通脉方(ZGJTTP)由左归丸加减化裁而来,是基于

滋阴益气活血法而组成的治疗糖尿病并发脑梗死的临床有效方剂,临床总有效率达87.5%^[11]。课题组前期研究发现,ZGJTTPM能明显降低血糖,抑制糖尿病合并脑梗死大鼠炎症反应,降低大鼠血清中炎症因子的含量,并通过改善血管内皮细胞的舒缩功能保护血管内皮细胞^[12-13]。本研究首次从自噬的角度探讨ZGJTTPM对糖尿病合并脑梗死诱导的神经保护机制,为该方的药理作用提供研究参考。

1 材料

1.1 细胞 大鼠原代神经星形胶质细胞(AS),购自武汉普诺赛生命科技有限公司,货号CP-R137。

1.2 动物 SPF级雄性SD大鼠16只,体质量200~240 g,购自湖南斯莱克景达公司,动物合格证号SCXK(湘)2019-0004,饲养于湖南中医药大学动物实验中心。本实验所有操作均符合实验动物伦理学要求,已通过湖南中医药大学实验动物中心伦理审查(伦理审查批号LL2020060301)。

1.3 药物 ZGJTTPM由熟地黄20 g,枸杞子12 g,山茱萸12 g,黄芪30 g,黄连10 g,地龙12 g,丹参20 g,川芎12 g,水蛭8 g,石菖蒲8 g组成,共144 g,购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,所用中药经湖南中医药大学第一附属医院张志国主任药师鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》性状与外观。中药采用水煎法,药煎2次,第1次加入4倍于中药体积的水,煎1 h后滤出煎液,第2次加入2倍体积的水,煎30 min,合并煎液,过滤浓缩至含生药2 g·mL⁻¹。

1.4 试剂 大鼠神经星形胶质细胞完全培养基、DMEM/F12高糖、无糖培养液、0.25%胰蛋白酶(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号分别为WH01121212XP28、WH0021A281、WH0321K31、WH0621D181),糖基化终末产物(AGEs)蛋白(北京博奥森生物技术公司,批号BA11057845),细胞增殖与活性检测试剂盒(CCK-8,安徽白鲨公司,批号21208262),腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抑制剂(Compound C)、AMPK激动剂(AICAR)(美国MedChemExpress公司,批号分别为95584、97416),白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉Cusabio公司,批号分别为J23019018、J22019017、J21019016),p62一抗(美国CST公司,批号23214S),微管相关蛋白1轻链3(LC3)一抗、山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗、山羊抗兔IgG二抗、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗(美国Proteintech公司,批

号分别为14600-1-AP、SA00001-1、SA00001-2、66009-1-Ig),AMPK、磷酸化(p)-AMPK、驴抗兔IgG(美国Abcam公司,批号分别为ab207442、ab133448、ab150075),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-mTOR、UNC-51样激酶1(ULK1)、p-ULK1(美国CST公司,批号分别为2983、5536、8054T、14202S),BCA蛋白定量试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号SANDB4UL18),RIPA裂解液、SuperECL Plus超敏发光液(中国Abiowell公司,批号分别为AWB0136、AWB0005)。

1.5 仪器 CYTATION 3型多功能酶标仪(美国BioTek公司),SDS-PAGE电泳系统(美国Bio-Rad公司),IX51型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司),Iamger.Z2全景组织细胞定量分析系统(奥地利Tissue Gnostics公司),JEM1400型透射电子显微镜(日本电子公司),FRESCO 17型微量高速冷冻离心机(美国Thermo Scientific公司)。

2 方法

2.1 含药血浆的制备 SD大鼠按照随机数字表法随机分为空白组、ZGJTTPM组,每组8只。根据动物体表面积剂量换算法^[14],以60 kg成人每日服用药物剂量与220 g大鼠体表面积换算比值计算出大鼠的等体积灌胃量。大鼠每天灌胃2倍等体积灌胃药量,即28 g·kg⁻¹,1次/d,连续5 d。空白组予同体积的蒸馏水灌胃。末次灌胃前禁食12 h,待末次灌胃1 h后,无菌条件下腹主动脉采血,使用含肝素钠的抗凝采血管收集血清,4 °C、3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径17.8 cm),取上清,用0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌,-80 °C冰箱贮存备用。

2.2 AGEs合并缺糖缺氧(OGD)模型的制备 取生长良好的原代大鼠神经星形胶质细胞,待传代至3~4代且细胞密度为70%~80%,加入胰蛋白酶消化离心成细胞悬液,将细胞密度稀释至1 \times 10⁴个/孔接种于96孔板中,继续培养24 h待细胞贴壁完全后,分别向每组加入含50、100、200、400 mg·L⁻¹ AGEs的DMEM/F12高糖培养液作用24 h,弃去孔内培养液,加入DMEM/F12无糖培养液,立即置于通以缺氧混合气(95% N₂+5% CO₂)的三气培养箱,37 °C饱和湿度条件下培养,此时开始计算缺氧时间,分别作用2、4、6、8、12 h,选择最合适的AGEs作用浓度及OGD时间进行后续实验。

2.3 ZGJTTPM含药血浆浓度的确定 向细胞培养液中分别加入体积分数为2.5%、5%、10%、15%、20%的ZGJTTPM含药血浆及空白血浆作用24 h,

以未加入血浆的空白组作对照, CCK-8法检测各组含药血浆对细胞存活率的影响, 确定含药血浆的最佳作用浓度。使用酶标仪测定其在450 nm处的吸光度 A , 计算各组细胞存活率。细胞存活率= $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

2.4 对各组AS进行不同的药物处理 将AS完全随机分为空白组(正常细胞+空白血浆)、模型(AGEs+OGD)组、ZGJTTP组(AGEs+OGD+ZGJTTP含药血浆)、Compound C组(AGEs+OGD+空白血浆+Compound C)、AICAR组(AGEs+OGD+空白血浆+AICAR)、ZGJTTP+AICAR组(AGEs+OGD+ZGJTTP含药血浆+AICAR)。Compound C与AICAR所使用的浓度分别为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [15]、 $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [16], 作用24 h。

2.5 指标检测

2.5.1 CCK-8法检测不同药物对AS细胞存活率

将细胞以 1×10^4 个/孔的浓度接种至96孔板, 放入 37°C 含5% CO_2 的培养箱中继续培养24 h。各组细胞经不同药物处理作用后避光向每孔加入CCK-8溶液 $10 \mu\text{L}$, 在培养箱内继续孵育1 h, 计算各组细胞存活率。

2.5.2 倒置显微镜下观察细胞的形态变化 将各组AS根据前期研究条件进行不同的药物处理后, 在倒置显微镜下观察各组细胞形态结构的改变并进行组间比较。

2.5.3 ELISA检测各组细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 因子的含量 收集各组细胞上清液, 低温 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 转速 $1\,000 \times g$ 离心15 min(离心半径10 cm, 下同), 取上清立即用于实验。根据试剂盒中说明书的步骤严格操作, 用酶标仪测量各孔的 A 并绘制标准曲线, 将 A 代入标准曲线得到各组样本炎症因子的含量。

2.5.4 电镜下观察各组细胞胞内结构 各组细胞经药物干预后, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗并用细胞刮刀将细胞刮下, 4°C 、 $3\,000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 弃去上清, 加入电镜固定液, 避光 4°C 冰箱固定1~2 d。经过细胞固定、脱水、浸透、包埋、切片环节后使用铅、铀进行染色, 透射电镜下观察, 并用数码相机记录图像。

2.5.5 免疫荧光法检测各组细胞中LC3的表达

将无菌细胞爬片放入干燥的24孔板中, 每孔加入细胞悬液 $300 \mu\text{L}$, 轻轻晃动孔板使细胞均匀覆盖爬片。继续培养24 h, 待细胞充分贴壁后对各组细胞进行模型及药物干预。反应结束后吸出细胞培养

液, PBS冲洗后对细胞爬片进行固定、通透及封闭处理, 加入以1:200比例稀释的LC3一抗, 放入湿盒中 4°C 过夜。孵育结束后, 避光滴加稀释比例为1:1 000的荧光二抗, 室温孵育1 h, 再避光加入DAPI进行染核, 最后进行封片。使用全景组织细胞定量分析系统进行拍片, Image J软件对结果进行分析。

2.5.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关蛋白LC3、p62及自噬信号调控分子p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、p-ULK1、ULK1蛋白表达

将经不同药物处理后的细胞用PBS洗涤1次, 加入RIPA裂解液冰上裂解30 min后用细胞刮刀刮下, $12\,000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min, 取上清液。使用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 计算出各组样品蛋白的上样量。配置10%、12%的分离胶, 4.8%的浓缩胶, 电泳恒定电压80 V, 时间为120 min, 待条带电泳至胶底部时终止电泳; 以300 mA恒定电流将蛋白条带转移至PVDF膜上。脱脂奶粉室温封闭1 h, TBST漂洗后分别加入LC3、p62、p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、p-ULK1、ULK1及 β -actin抗体, 将膜与各一抗(1:1 000)一起孵育, 4°C 过夜。将二抗(1:5 000)与膜 37°C 恒温箱共同孵育1 h后, 加入配置好的显影液1 mL, 在化学发光凝胶成像仪中显影。使用Image J软件计算各组条带的灰度值并分析结果。

2.6 统计学分析 所有实验数据采用SPSS 25.0统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据符合正态分布且方差齐, 采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著性差异(LSD)- t 检验, 方差不齐则用秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度AGEs、不同时间OGD作用时间对AS细胞存活率的影响 与正常组比较, OGD组、AGEs 50、100、200、400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +OGD组在OGD 2、4、6、8、12 h后AS的存活率均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且随着AGEs浓度升高、OGD作用时间的延长, 细胞存活率的下降愈加明显; OGD作用6 h, AGEs质量浓度 $200 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞的存活率最接近50%, 故选择AGEs质量浓度 $200 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、缺糖缺氧6 h作为最佳浓度及时间点进行后续实验及指标检测。见表1。

3.2 倒置显微镜下观察模型组细胞形态结构 正常AS呈单层贴壁生长, 贴壁能力强, 细胞间排列紧密规整, 胞体圆润, 突起细长光滑, 胞膜完整, 细胞

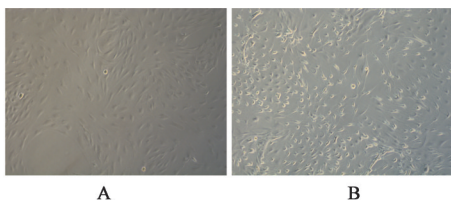
表1 不同浓度AGEs、不同时间OGD作用时间对AS细胞存活率的变化 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Changes of different concentrations of AGEs and OGD treatment time on survival rate of AS ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
正常组		100.00±7.22	100.00±3.31	100.00±11.17	100.00±5.75	100.00±8.41
OGD组		82.19±4.40 ¹⁾	71.90±3.16 ^{2,4)}	70.24±9.14 ²⁾	68.41±8.51 ²⁾	50.81±9.05 ²⁾
AGEs+OGD组	50	74.15±13.18 ²⁾	60.55±5.09 ^{2,4)}	69.50±8.30 ²⁾	68.25±6.68 ²⁾	49.16±3.88 ²⁾
	100	70.40±6.57 ²⁾	59.32±2.33 ^{2,4)}	69.06±7.55 ²⁾	64.36±9.18 ²⁾	46.07±7.46 ²⁾
	200	74.90±4.91 ²⁾	58.87±3.97 ^{2,4)}	53.64±4.29 ^{2,4,5,6)}	60.71±5.77 ²⁾	45.93±7.46 ²⁾
	400	72.14±2.82 ²⁾	58.83±4.74 ^{2,4)}	54.02±7.01 ^{2,3,5,6)}	56.33±5.82 ^{2,3,5)}	42.56±5.71 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与OGD组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与AGEs+OGD 50 mg·L⁻¹组比较⁵⁾ $P<0.05$;与AGEs+OGD 100 mg·L⁻¹组比较⁶⁾ $P<0.05$

透光性较强;与正常细胞相比较,加入AGEs 200 mg·L⁻¹作用24 h+OGD 6 h后,AS镜下可见形态结构变化明显,细胞间隙增宽细胞分离皱缩,胞体变小胞间间距变大,细胞损伤明显。见图1。



注:A.正常细胞;B.AGEs+OGD细胞

图1 AS形态结构的改变(倒置显微镜,×100)

Fig. 1 Changes of AS morphology and structure (inverted microscope, ×100)

3.3 对AS细胞存活率的影响 与空白组比较,10%、20%空白血浆组与各浓度含药血浆组细胞存活率均明显上升($P<0.05, P<0.01$);与同浓度空白血浆组比较,5%含药血浆组细胞存活率升高最明显($P<0.05$),且5%空白血浆对细胞存活率无明显影响($P<0.05$),故选择5% ZGJTTMP含药血浆浓度作为中药最佳作用浓度进行后续实验及指标检测。见表2。

3.4 对AS形态结构的影响 与模型组比较,ZGJTTMP组、Compound C组细胞损伤程度得到明显改善,细胞贴壁更紧密,胞体变圆润,胞间连接恢复紧密,AICAR组细胞损伤进一步加重,细胞皱缩明显,ZGJTTMP+AICAR组细胞恢复程度优于AICAR组。见图2。

3.5 对AS细胞存活率的影响 与空白组比较,其余5组细胞存活率均显著下降($P<0.01$);与模型组比较,ZGJTTMP组、Compound C组及ZGJTTMP+AICAR组细胞存活率明显上升($P<0.05, P<0.01$),AICAR组细胞存活率明显下降($P<0.05$);与

表2 不同浓度血浆对细胞存活率的比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of cell viability in different concentrations of plasma ($\bar{x}\pm s, n=6$)

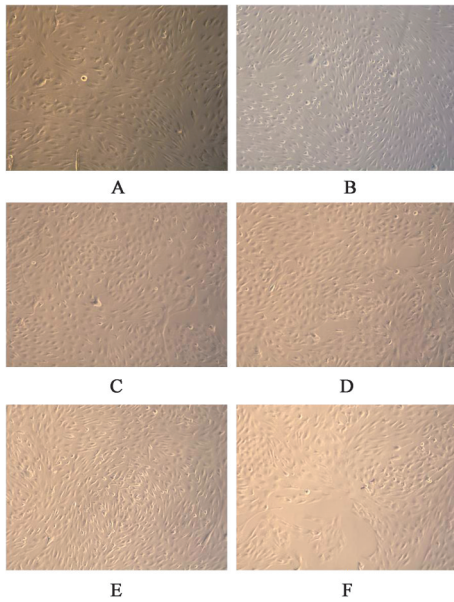
组别	体积分数/%	存活率/%
空白组		100.00±1.94
空白血浆组	2.5	121.37±7.03
	5	117.48±1.82
	10	117.70±3.28 ²⁾
	20	131.58±1.11 ²⁾
含药血浆组	2.5	133.08±11.45 ¹⁾
	5	153.55±13.04 ^{1,3)}
	10	151.29±7.74 ^{2,3)}
	20	145.90±12.96 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与同浓度空白血浆组比较³⁾ $P<0.05$

ZGJTTMP组、Compound C组比较,AICAR组细胞存活率显著下降($P<0.01$);与AICAR组比较,ZGJTTMP+AICAR组细胞存活率显著升高($P<0.01$);ZGJTTMP组与Compound C组间差异无统计学意义。见表3。

3.6 对各组细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的影响 与空白组比较,模型组及AICAR组细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,ZGJTTMP与Compound C组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量显著降低($P<0.01$);与ZGJTTMP组和Compound C组比较,AICAR组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量明显升高($P<0.05, P<0.01$);与AICAR组比较,ZGJTTMP+AICAR组细胞IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量明显降低($P<0.05, P<0.01$);ZGJTTMP组与Compound C组之间比较差异无统计学意义。见表4。

3.7 对各组AS内自噬小体形成的影响 电镜下见



注:A.空白组;B. AGEs+OGD组;C.ZGJTTP组;D.Compound C组;E.AICAR组;F.ZGJTTP+AICAR组(图3-图6同)

图2 左归降糖通脉方(ZGJTTP)对各组细胞形态结构的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 2 Effect of Zuogui Jiangtang Tongmai prescription (ZGJTTP) on cell morphology and structure in each group (inverted microscope, ×100)

空白组细胞保留有较完整的细胞结构,细胞核、线粒体、溶酶体等细胞器清晰可见,自噬小体数目较少;与空白组比较,模型组和AICAR组细胞内可见大量自噬小体及自噬溶酶体的形成,细胞器结构破坏较明显,细胞内出现空泡;与模型组比较,ZGJTTP与Compound C组细胞结构损伤程度较轻,自噬小体及自噬溶酶体数目有明显减少,ZGJTTP+AICAR组相较于AICAR组细胞自噬小体数目减少。见图3。

3.8 对各组细胞LC3免疫荧光表达的影响 与空白组比较,模型组及AICAR组的LC3免疫荧光强度及面积显著增加($P<0.01$);与模型组比较,ZGJTTP组、Compound C组与ZGJTTP+AICAR组的LC3免疫荧光强度及面积显著降低($P<0.01$);与ZGJTTP组和Compound C组比较,AICAR组的LC3表达显著升高($P<0.01$);与AICAR组比较,ZGJTTP+AICAR组细胞中LC3表达面积明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);ZGJTTP组与Compound C组间差异无统计学意义。见图4、表5。

表3 ZGJTTP对AS细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of ZGJTTP on survival rate of AS ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度	细胞存活率
空白组		100.00±7.93
模型组		46.61±8.14 ¹⁾
ZGJTTP组	5%	68.92±6.93 ^{1,3)}
Compound C组	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	70.49±8.25 ^{1,3)}
AICAR组	1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	30.54±9.77 ^{1,2,4,5)}
ZGJTTP+AICAR组	5%+1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	61.15±6.16 ^{1,2,6)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与ZGJTTP组比较⁴⁾ $P<0.01$;与Compound C组比较⁵⁾ $P<0.01$;与AICAR组比较⁶⁾ $P<0.01$

表4 ZGJTTP对各组细胞上清液中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of ZGJTTP on content of IL-1 β , IL-6, TNF- α in cell supernatant of each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度	IL-1 β / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
空白组		0.090±0.012	1.367±0.013	1.689±0.499
模型组		1.385±0.421 ¹⁾	1.864±0.500 ¹⁾	19.490±3.869 ¹⁾
ZGJTTP组	5%	0.108±0.022 ²⁾	1.416±0.024 ²⁾	3.519±1.009 ²⁾
Compound C组	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.119±0.019 ²⁾	1.420±0.038 ²⁾	3.436±0.499 ²⁾
AICAR组	1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.577±0.247 ^{1,2,4,6)}	1.745±0.123 ^{1,2,4,6)}	9.924±1.144 ^{1,2,3,5)}
ZGJTTP+AICAR组	5%+1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.287±0.066 ^{2,7)}	1.493±0.018 ^{1,2,8)}	4.850±0.519 ^{2,7)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$;与ZGJTTP组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与Compound C组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与AICAR组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$

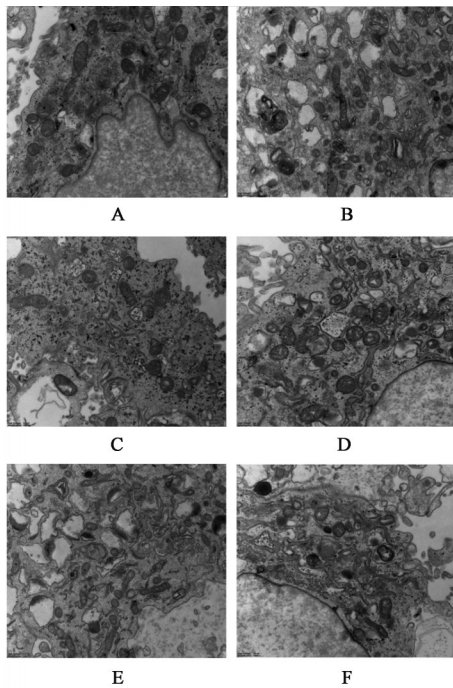


图3 ZGJTTP对自噬小体形成的影响(透射电镜, ×10 000)
Fig. 3 Effect of ZGJTTP on formation of autophagosome (TEM, ×10 000)

3.9 对各组细胞 LC3、p62 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组及 AICAR 组 LC3 II/LC3 I 显著升高($P<0.01$),p62 表达水平显著下降($P<0.01$);与模型组比较,ZGJTTP 与 Compound C 组 LC3 II/LC3 I

表5 ZGJTTP对各组细胞 LC3 免疫荧光表达面积的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 5 Effect of ZGJTTP on LC3 immunofluorescence expression area of cells in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=6$) %

组别	浓度	荧光面积
空白组		0.037±0.021
模型组		2.307±0.664 ¹⁾
ZGJTTP 组	5%	0.245±0.026 ²⁾
Compound C 组	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.132±0.027 ²⁾
AICAR 组	1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	2.162±1.695 ^{1,3,4)}
ZGJTTP+AICAR 组	5%+1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.514±0.176 ^{2,5)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$;与 ZGJTTP 组比较³⁾ $P<0.01$;与 Compound C 组比较⁴⁾ $P<0.01$;与 AICAR 组比较⁵⁾ $P<0.05$

显著降低($P<0.01$), p62 表达水平显著升高($P<0.01$);与 ZGJTTP 组和 Compound C 组比较, AICAR 组 LC3 II/LC3 I 显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),p62 表达水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$);与 AICAR 组比较,ZGJTTP+AICAR 组细胞 LC3 II/LC3 I 表达明显降低($P<0.05$),p62 表达水平明显升高($P<0.05$);ZGJTTP 组与 Compound C 组间比较差异无统计学意义。见表 6、图 5。

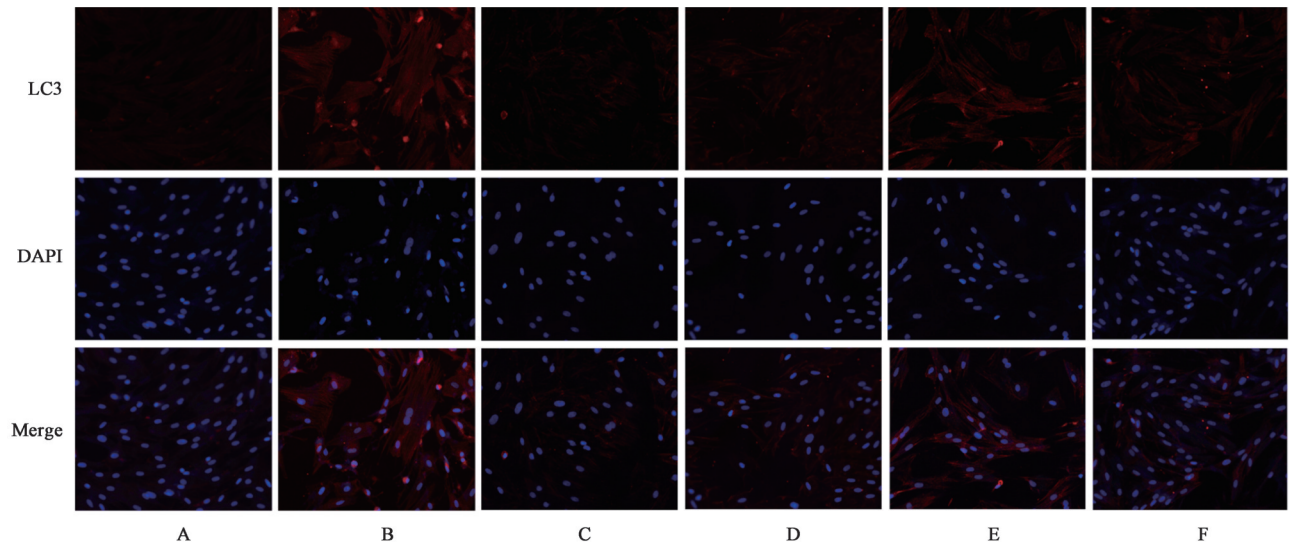


图4 ZGJTTP对各组细胞 LC3 表达的影响(免疫荧光, ×200)
Fig. 4 Effect of ZGJTTP on expression of LC3 in group (IF, ×200)

3.10 对各组细胞 p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、p-ULK1、ULK1 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组、AICAR 组及 ZGJTTP+AICAR 组 p-AMPK/AMPK 表达显著升高($P<0.01$), p-mTOR/

mTOR 及 p-ULK1/ULK1 表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,ZGJTTP 组及 Compound C 组 p-AMPK/AMPK 表达显著下降($P<0.01$), p-mTOR/mTOR 及 p-ULK1/ULK1 表达显著升高($P<$

表6 ZGJTTP对各组细胞LC3、p62蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of ZGJTTP on expression of LC3 and p62 in cells of each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	LC3 II / LC3 I	p62/ β -actin
空白组		0.29 \pm 0.17	0.30 \pm 0.09
模型组		4.78 \pm 0.72 ²⁾	0.08 \pm 0.01 ²⁾
ZGJTTP组	5%	0.50 \pm 0.02 ⁴⁾	0.25 \pm 0.03 ⁴⁾
Compound C组	5 μ mol \cdot L ⁻¹	0.44 \pm 0.08 ⁴⁾	0.27 \pm 0.04 ⁴⁾
AICAR组	1 mmol \cdot L ⁻¹	3.35 \pm 1.59 ^{2,3,5,6)}	0.12 \pm 0.02 ^{2,5,6)}
ZGJTTP+AICAR组	5%+1 mmol \cdot L ⁻¹	1.71 \pm 0.19 ^{4,7)}	0.21 \pm 0.05 ^{1,4,7)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与ZGJTTP组比较⁵⁾ $P<0.01$;与Compound C组比较⁶⁾ $P<0.01$;与AICAR组比较⁷⁾ $P<0.05$

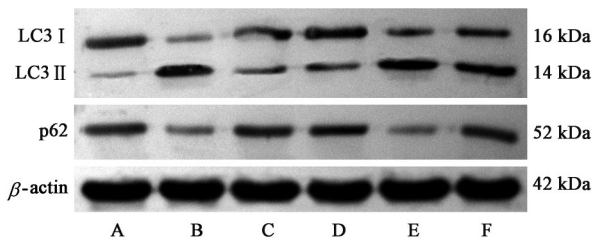


图5 不同药物处理AS后LC3、p62蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of LC3 and p62 in AS treated with different drugs in each group

0.01);与ZGJTTP组和Compound C组比较, AICAR组p-AMPK/AMPK表达显著升高($P<0.01$), p-mTOR/mTOR及p-ULK1/ULK1表达显著降低($P<0.01$);与AICAR组比较, ZGJTTP+AICAR组p-mTOR/mTOR及p-ULK1/ULK1表达明显升高($P<0.05, P<0.01$);ZGJTTP组及Compound C组间差异无统计学意义。见图6、表7。

4 讨论

AGEs是蛋白质和脂类非酶糖基化反应启动后的一系列化学反应的产物,这些化合物在组织中不断积累损害细胞功能,诱发一系列疾病的产生^[17]。AGEs可与AGEs受体的相互作用激活多个细胞信号级联,促进如IL6、IL1- β 和TNF- α 等促炎因子的

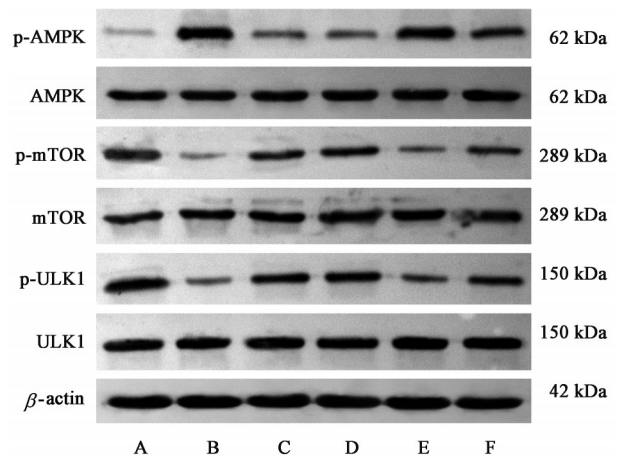


图6 不同药物处理AS后p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、p-ULK1、ULK1蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of p-AMPK, AMPK, p-mTOR, mTOR, p-ULK1 and ULK1 in AS treated with different drugs in each group

分泌。有报道提出,经AGEs处理的细胞系可诱导自噬的过度表达^[18]。本研究在前期的研究基础上,合并OGD作为糖尿病合并脑梗死体外模型^[19]。

自噬的全过程由多种自噬相关蛋白共同参与的。自噬相关蛋白LC3通常以LC3 I(胞浆型)和LC3 II(胞膜型)2种形式存在于细胞内,LC3首先

表7 ZGJTTP对p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、p-ULK1、ULK1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of ZGJTTP on expression of p-AMPK, AMPK, p-mTOR, mTOR, p-ULK1 and ULK1 in cells of each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR	p-ULK1/ULK1
空白组		0.13 \pm 0.01	0.65 \pm 0.04	0.66 \pm 0.18
模型组		0.84 \pm 0.05 ²⁾	0.18 \pm 0.05 ²⁾	0.19 \pm 0.03 ²⁾
ZGJTTP组	5%	0.39 \pm 0.10 ^{2,4)}	0.53 \pm 0.06 ⁴⁾	0.60 \pm 0.07 ⁴⁾
Compound C组	5 μ mol \cdot L ⁻¹	0.38 \pm 0.10 ^{2,4)}	0.54 \pm 0.08 ⁴⁾	0.63 \pm 0.10 ⁴⁾
AICAR组	1 mmol \cdot L ⁻¹	0.70 \pm 0.10 ^{2,6,8)}	0.22 \pm 0.07 ^{2,6,8)}	0.25 \pm 0.03 ^{2,6,8)}
ZGJTTP+AICAR组	5%+1 mmol \cdot L ⁻¹	0.55 \pm 0.14 ^{2,4,5,7)}	0.44 \pm 0.14 ^{1,4,10)}	0.43 \pm 0.08 ^{1,3,7,9)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与ZGJTTP组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与Compound C组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$;与AICAR组比较⁹⁾ $P<0.05$,¹⁰⁾ $P<0.01$

被裂解形成LC3 I,然后与磷脂酰乙醇胺(PE)偶联形成LC3-PE结合物LC3 II。LC3 II的形成是自噬小体形成的必要条件,其表达水平与自噬水平呈正相关^[20]。自噬衔接蛋白p62是一种常见的自噬相关蛋白,其在自噬过程中不断在溶酶体中被降解,因此p62的表达通常与细胞自噬呈负相关^[21]。AMPK、mTOR、ULK1是自噬启动环节重要的分子靶点,其构成的AMPK/mTOR/ULK1分子信号通路是调控自噬的重要通路之一。由ULK1/2、黏着斑激酶家族相互作用蛋白200(FIP200)、自噬相关基因13(Atg13)和Atg101组成的ULK1复合物是自噬的起始物;mTOR可形成两种功能不同的复合物:mTOR复合物1(mTORC1)和mTOR复合物2(mTORC2)^[22],活化的mTORC1通过RAPTOR(调节分子)磷酸化ULK1,使ULK1复合物失活。AMPK可通过抑制mTOR的激活和直接磷酸化ULK1诱导自噬^[23]。AMPK直接磷酸化mTOR抑制mTOR的激活,失活的mTOR去除了对ULK1在丝氨酸757位点(Ser757)的磷酸化抑制,提高了ULK1的活性促进自噬的启动,这是AMPK激活自噬的主要机制^[24]。

中医认为本病因阴虚燥热,炽盛伤血,内火上炎,气血津液不布而生。王永炎教授提出了“毒损脑络”的学说,认为“瘀毒”是引起该病的主要致病因素^[25]。瘀血化为毒邪蕴积于内损伤络脉,使脑髓失养,神机失用。消渴病之阴虚、气虚是瘀血产生的病理基础,脉、络瘀阻或损伤是血管并发症发病的根本,滋阴益气、活血化瘀通络是本病的基本治疗原则^[26]。ZGJT TMP即课题组前期研究的降糖通脉方、滋阴益气活血方^[27-28],以熟地黄、枸杞子、山茱萸滋阴为君,滋肝肾之阴;黄芪益气为臣,推动全身气血运行;地龙善通十二经脉,与血中之气药川芎、养血活血的丹参、通经搜络之水蛭共同为伍,共奏活血通络之功,佐以石菖蒲活血化瘀开窍,黄连清热解毒;全方共奏滋阴益气活血解毒之功。

本研究以AMPK抑制剂Compound C及AMPK激动剂AICAR作为对照,探讨ZGJT TMP的作用机制,结果发现AGEs+OGD造模后细胞存活率明显下降,细胞中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量明显升高,细胞发生炎症损伤,自噬水平异常升高,AMPK/mTOR/ULK1通路被激活,细胞结构受损严重;与模型组结果对比发现,ZGJT TMP和Compound C能显著提高AS的存活率,抑制促炎因子的释放,并通过抑制AMPK/mTOR/ULK1通路的激活降低了自噬的过度

表达;通过比较不同药物组间的结果发现,ZGJT TMP含药血浆与AICAR对AS的作用相反,AICAR能通过激活AMPK/mTOR/ULK1通路,使自噬表达升高,而ZGJT TMP能抵消部分AICAR的作用效果,这说明ZGJT TMP与AICAR的作用机制相反,即通过抑制AMPK/mTOR/ULK1通路的激活,抑制自噬的过度表达,减轻AS的炎症损伤。

综上所述,ZGJT TMP对AS的炎症损伤具有保护作用,这一作用是通过抑制了AMPK/mTOR/ULK1通路的激活,减少了自噬小体的形成,降低了自噬的过度表达而实现的。本研究对ZGJT TMP的药理研究和临床应用提供了新的思路和理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CHIVESI T, HOEGFELDT C A A, WERFALLI M, et al. IDF Diabetes Atlas: The prevalence of pre-existing diabetes in pregnancy-A systematic review and Meta-analysis of studies published during 2010-2020 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109049.
- [2] 陈鑫星. 糖尿病合并卒中患者发病与治疗的研究现状综述[J]. *糖尿病新世界*, 2021, 24(15): 194-198.
- [3] 张笑翔, 杨志强. 中医药治疗糖尿病合并卒中现状[J]. *实用中医内科杂志*, 2020, 34(8): 106-111.
- [4] 马成虹, 张危, 赵睿, 等. 2型糖尿病合并脑梗死的发病机制研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2020, 36(22): 3571-3574.
- [5] 郭杨志, 杜娟, 姜敏. 白虎汤调节IRS-1/PI3K/Akt信号通路对2型糖尿病大鼠血糖、血脂代谢及血管重构的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(1): 23-30.
- [6] LI Y Q, FU S, WANG L, et al. Autophagy and hypoxic ischemic brain injuries [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2017, 69(3): 316-324.
- [7] WEI N, YU S P, GU X H, et al. The involvement of autophagy pathway in exaggerated ischemic brain damage in diabetic mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(10): 753-763.
- [8] 郭涛, 任璐, 何红云, 等. 自噬及其在缺血性脑卒中双重作用的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(9): 1339-1342.
- [9] 吴瑞华, 邓海霞, 陀鹏, 等. 细胞自噬在脑缺血再灌注损伤中作用机制的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(7): 131-134.
- [10] ORTIZ-RODRIGUEZ A, AREVALO M A. The contribution of astrocyte autophagy to systemic metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2479.

- [11] 邓奕辉,喻嵘,陈大舜. 降糖通脉方治疗糖尿病合并脑梗死32例临床观察[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(5):40-42.
- [12] 颜佳博,邓奕辉,廖俞强,等. 基于RAGE/NF- κ B/mTOR信号通路探讨滋阴活血解毒方对AGEs诱导VEC损伤的干预作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(7):719-722.
- [13] 廖俞强,邓奕辉,颜佳博,等. 滋阴活血解毒方对AGEs诱导VEC损伤黏附分子及凝血相关因子表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(5):485-488.
- [14] 贺石林,王键,王净净. 中医科研设计与统计学:中医科研设计与统计方法[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 2001:64.
- [15] OOSTERMAN J E, BELSHAM D D. Glucose alters per2 rhythmicity independent of AMPK, whereas AMPK inhibitor Compound C causes profound repression of clock genes and AgRP in mHypoE-37 hypothalamic neurons[J]. PLoS One, 2016, 11(1):e0146969.
- [16] GUO X X, JIANG Q, ALESSANDRA T, et al. The AMPK-PGC-1 α signaling axis regulates the astrocyte glutathione system to protect against oxidative and metabolic injury[J]. Neurobiol Dis, 2018, 113:59-69.
- [17] SRUTHI C R, RAGHU K G. Advanced glycation end products and their adverse effects: The role of autophagy[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(4):22710.
- [18] SHELDON R, ELOY B, ALLEN T. Mechanistic targeting of advanced glycation end-products in age-related diseases[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(12):3631-3643.
- [19] 李钰佳,李定祥,马钟丹妮,等. 左归降糖通脉方含药血清对晚期糖基化终末产物诱导脑微血管内皮细胞损伤的影响[J]. 中医杂志, 2019, 60(3):237-241.
- [20] UCHIYAMA Y, SHIBATA M, KOIKE M, et al. Autophagy-physiology and pathophysiology [J]. Histochem Cell Biol, 2008, 129(4):407-420.
- [21] 陆麒麟,李佳钰,蔡义思,等. 当归拈痛汤对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠自噬蛋白LC3, Beclin1, p62表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(1):41-49.
- [22] JHANWAR-UNİYAL M, WAINWRIGHT J V, MOHAN A L, et al. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship [J]. Adv Biol Regul, 2019, 72:51-62.
- [23] WANG Y, XU W, YAN Z, et al. Metformin induces autophagy and G₀/G₁ phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1):63.
- [24] WANG J F, MEI Z G, FU Y, et al. Puerarin protects rat brain against ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the AMPK-mTOR-ULK1 signaling pathway [J]. Neural Regen Res, 2018, 13(6):989-998.
- [25] 张利东,王淑玲. 近20年“毒损脑络”研究进展[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(20):45-46.
- [26] 彭珣,李定祥,李钰佳,等. 从络病学角度探讨2型糖尿病并发脑梗死的病机演变[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(8):1239-1243.
- [27] 邓奕辉,李定祥,成细华,等. 降糖通脉方对葡萄糖、胰岛素和氧化低密度脂蛋白诱导损伤的血管内皮细胞ET-1、NO的影响[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(5):309-310.
- [28] 邓奕辉,陈大舜,李定祥. 滋阴益气活血法对糖尿病合并脑缺血大鼠内皮素、一氧化氮及一氧化氮合酶含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(8):25-26.

[责任编辑 孙丛丛]