

# 葛根抑制高糖诱导巨噬细胞损伤与调控内质网应激信号通路的关系探讨

容子玲, 刘玉晖\*, 朱洪杨, 李玉婷, 刘荣华  
(江西中医药大学药学院, 南昌 300004)

**[摘要]** 目的:观察葛根含药血清对高糖诱导的重度内质网应激(ERS)模型中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、内质网应激信号通路蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、活化转录因子4(ATF4)、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)、真核翻译起始因子2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )的作用,观察葛根对高糖诱导巨噬细胞炎症损伤的影响,并探讨其可能的作用机制。方法:采用血清药理学方法,制备空白血清和葛根含药血清,体外培养RAW264.7巨噬细胞,采用62.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖诱导巨噬细胞建立体外重度ERS模型,使用不同体积分数的葛根含药血清及内质网应激抑制剂(4-PBA)干预细胞。通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测不同葡萄糖浓度(22.5、23.5、25.0、27.5、32.5、47.5、72.5、122.5 mmol·L<sup>-1</sup>)及不同体积分数葛根含药血清(0%、2.5%、5%、7.5%、10%、15%、20%)对RAW264.7巨噬细胞存活率的影响;在CCK-8法检测葡萄糖浓度对巨噬细胞存活率影响结果基础上采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测不同葡萄糖浓度(22.5、32.5、42.5、52.5、62.5、72.5 mmol·L<sup>-1</sup>)及不同时间段下(6、12、24、36、48 h) ERS的标志性蛋白GRP78的表达量,筛选出建立重度ERS模型最适造模浓度和时间,基于上述实验结果将细胞分为分别将细胞分为空白组、62.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖模型组、2 mmol·L<sup>-1</sup> 4-PBA组、高、中、低(15%、10%、5%)葛根含药血清组开展后续实验,通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测重度ERS模型中RAW264.7巨噬细胞上清液中TNF- $\alpha$ 的表达,Western blot检测重度ERS模型中相关通路蛋白表达情况。结果:CCK-8法检测发现,在葡萄糖浓度为27.5 mmol·L<sup>-1</sup>刺激下巨噬细胞存活率达到最高( $P<0.01$ )、而在葡萄糖浓度22.5~27.5 mmol·L<sup>-1</sup>刺激下,巨噬细胞存活率随浓度增加而呈上升趋势,葡萄糖浓度在25.0 mmol·L<sup>-1</sup>时差异有统计学意义( $P<0.01$ ),在葡萄糖浓度37.5~122.5 mmol·L<sup>-1</sup>刺激下,则出现了下降趋势,葛根含药血清在1%~15%皆差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),Western blot法检测不同葡萄糖浓度和不同时间段下的GRP78蛋白表达量发现,在24 h时,GRP78蛋白表达显著性最强( $P<0.01$ ),葡萄糖浓度为62.5 mmol·L<sup>-1</sup>时,GRP78蛋白表达量最强( $P<0.01$ );由此可知葡萄糖浓度为62.5 mmol·L<sup>-1</sup>可作为诱导重度ERS模型的最适浓度。与空白组相比较,模型组中TNF- $\alpha$ 、GRP78、ATF4蛋白表达水平,磷酸化(p)-PERK/PERK、p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ 明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),而与模型组比较,各给药组的TNF- $\alpha$ 、GRP78、ATF4蛋白表达水平,p-PERK/PERK、p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ 明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:在体外实验结果表明,葛根在一定程度上可缓解高糖诱导巨噬细胞所出现的炎症损伤及通过抑制ERS信号通路中GRP78、ATF4、PERK、eIF2 $\alpha$ 的表达,以此来恢复细胞稳态。

**[关键词]** RAW264.7巨噬细胞; 细胞损伤; 葛根; 高糖; 内质网应激

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0058-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221702

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220830.1435.021.html>

**[网络出版日期]** 2022-08-31 8:30

## Relationship Between Inhibition of High Glucose-induced Macrophage Damage and Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Pathways by Puerariae Lobatae Radix

RONG Ziling, LIU Yuhui\*, ZHU Hongyang, LI Yuting, LIU Ronghua

(School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 300004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of the serum containing Puerariae Lobatae Radix on tumor

**[收稿日期]** 2022-06-03

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2017YFC1702902)

**[第一作者]** 容子玲,在读硕士,从事心血管药理学研究,E-mail:2570638024@qq.com

**[通信作者]** \*刘玉晖,博士,教授,从事中药药理心血管方向研究,E-mail:liuyuhui77@126.com

necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), endoplasmic reticulum stress signaling pathway protein endoplasmic reticulum stress protein glucose-regulated protein 78 (GRP78), activated transcription factor 4 (ATF4), protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), and eukaryotic translation initiation factors (eIF2 $\alpha$ ) and on inflammatory injury of macrophages induced by high glucose, and explore its possible mechanism. **Method:** The control serum and serum containing Puerariae Lobatae Radix were prepared by serum pharmacology. The RAW264.7 macrophages were cultured *in vitro*, and 62.5 mmol·L<sup>-1</sup> glucose was used to induce macrophages to establish a model of severe endoplasmic reticulum (ER) stress (ERS) *in vitro*. Different volume fractions of serum containing Puerariae Lobatae Radix and ERS inhibitor (4-PBA) were used to interfere with the cells. Different glucose concentrations (22.5, 23.5, 25.0, 27.5, 32.5, 47.5, 72.5, 122.5 mmol·L<sup>-1</sup>) and the effect of different volume fractions of serum containing Puerariae Lobatae Radix (0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%) on the survival rate of RAW264.7 macrophages were detected by cell proliferation and cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Based on the results of the effect of glucose concentrations on macrophage survival rate by CCK-8, Western blot (WB) was used to determine the protein expression levels of GRP78, the signature protein of ERS, by different concentrations of glucose (22.5, 32.5, 42.5, 52.5, 62.5, 72.5 mmol·L<sup>-1</sup>) at different time periods (6, 12, 24, 36, 48 h), and the optimal concentration and time for establishing the model of severe ERS were screened out. Based on the above experimental results, the cells were divided into blank group, 62.5 mmol·L<sup>-1</sup> glucose model group, 2 mmol·L<sup>-1</sup> 4-PBA group, and high, medium, and low-dose (15%, 10%, 5%) serum containing Puerariae Lobatae Radix groups for subsequent experiments. The expression of TNF- $\alpha$  in the supernatant of RAW264.7 macrophages in the model of severe ERS was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of related pathway proteins in the model of severe ERS were determined by WB. **Result:** The results of CCK-8 assay showed that the survival rate of macrophages reached the highest under the stimulation of glucose concentration of 27.5 mmol·L<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ ), while the survival rate of macrophages increased with the concentration increasing from 22.5 mmol·L<sup>-1</sup> to 27.5 mmol·L<sup>-1</sup>. When the glucose concentration was 25.0 mmol·L<sup>-1</sup>, there was a significant difference ( $P < 0.01$ ), and when the glucose concentration was 37.5 mmol·L<sup>-1</sup> to 122.5 mmol·L<sup>-1</sup>, there was a downward trend. The serum containing Puerariae Lobatae Radix showed significant differences in the volume of 1% to 15% ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The results of WB found that the GRP78 protein expression was the most significant at 24 h ( $P < 0.01$ ), and the GRP78 protein expression was the most significant when the glucose concentration was 62.5 mmol·L<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ ). Therefore, 62.5 mmol·L<sup>-1</sup> of glucose was the optimal concentration to induce the model of severe ERS. As compared with the blank group, the protein expression levels of TNF- $\alpha$ , GRP78, ATF4, phosphorylation(p)-PERK/PERK, p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  in the model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and as compared with the model group, the protein expression levels of TNF- $\alpha$ , GRP78, ATF4, p-PERK/PERK, p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  in each administration group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The results of *in vitro* experiments show that Puerariae Lobatae Radix can alleviate the inflammatory injury of macrophages induced by high glucose to a certain extent and restore cell homeostasis by inhibiting the expression of GRP78, ATF4, PERK, and eIF2 $\alpha$  in the ERS signaling pathway.

**[Keywords]** RAW264.7 macrophages; cellular damage; Puerariae Lobatae Radix; high glucose; endoplasmic reticulum stress (ERS)

糖尿病是一种胰岛素分泌利用出现障碍,以慢性高血糖为主要表现,可引起三大营养物质出现代谢紊乱的慢性炎症疾病,会累及机体其他器官从而诱发多种并发症<sup>[1-3]</sup>。其复杂的发病机制及低水平的治愈率和控制率、高水平的患病率成为许多研究

人员们致力攻克的一个难点<sup>[4]</sup>。研究指出,内质网应激(ERS)会引起内质网内未折叠蛋白、错误折叠蛋白的堆积,使得内质网正常的工作程序出现紊乱<sup>[5]</sup>,其中未折叠蛋白反应(UPR)引起的炎症是许多慢性疾病的重要发病机制<sup>[6-8]</sup>,启动炎症信号使炎

症反应一直处于激活状态会损害胰腺 $\beta$ 细胞并导致胰岛素分泌不足,从而出现诱发糖尿病<sup>[9]</sup>。

葛根为豆科植物野葛的干燥根,是一种常见的中药,含有异黄酮类、三萜类化合物、香豆素和葛根苷类等活性成分<sup>[10]</sup>。研究表明,葛根具有解酒、降血压、生津止渴、发表解肌、抗炎等作用<sup>[11-12]</sup>,但是对于其是否可以通过调控ERS信号通路来改善高糖引起的细胞损伤还尚未明确,本研究拟从体外实验来探究葛根对高糖诱导巨噬细胞出现损伤的影响,并从ERS的角度探讨其作用机制,为中医药防治相关慢性炎症疾病提供不同研究思路。

## 1 材料

**1.1 动物与细胞** SPF级SD大鼠30只,体质量(170±10)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2016-0002。动物房相对湿度40%~70%,室温(25±1)℃,12h白天/昼夜循环,动物自由进食饮水,实验动物使用经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,伦理委员会批准号JZLLSC20210075,RAW264.7巨噬细胞购于北京鼎国生物科技有限公司,产品编号CS0064。

**1.2 药物及试剂** 胎牛血清(美国Gibco公司,批号2138109RP);肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号H052-1-2);DMEM培养基、DMEM无糖培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)溶液、二甲基亚砜(DMSO)试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号20200925、20201106、2020903、1213C0336); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、真核翻译起始因子2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )、磷酸化(p)-eIF2 $\alpha$ 、活化转录因子4(ATF4)、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)兔单克隆抗体(美国CST公司,批号分别为4970S-18、5324T-8、3398T-6、11815S-5、3192S-11);p-PERK兔单克隆抗体(美国ABclonal公司,批号AP0886);内质网应激信号通路蛋白内质网应激蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78)/BIP兔单克隆抗体(英国Abcam公司,批号GR28872-2);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(日本Dojindo公司,批号LF673)。

**1.3 仪器** MCO-175恒温保湿CO<sub>2</sub>细胞培养箱(日本Sanyo公司);041BR120387型电泳仪、721BR09151型伯乐凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);2K15型台式高速冷冻离心机(美国Thermo公司);H1650-W型普通台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Elx800型酶标仪(美国Bio Tek公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** RAW264.7巨噬细胞培养于细胞培养液(10% FBS+90% DMEM)并置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养至细胞贴壁,取生长对数期细胞开展后续实验。

**2.2 含药血清的制备** 根据中药血清药理学实验方法<sup>[13-14]</sup>采集葛根含药血清。依据历代葛根临床用量<sup>[15]</sup>及人与动物体表面积的换算比值<sup>[16]</sup>计算出大鼠每日所需的给药剂量为2.1 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。将30只SD雄性大鼠适应性喂养3d后,随机将大鼠分为正常组及给药组,每组各15只,根据药理学灌胃期间,实验组给予葛根水提物灌胃,正常组给予等体积生理盐水,每天灌胃1次,连续7d。动物处死前,禁食不禁水12h,末次给药后2h进行麻醉,用一次性无菌注射器从腹主动脉取血,收集血液于15mL的无菌离心管中,室温静置30min后,4℃,3500 r·min<sup>-1</sup>离心10min(离心半径95mm),取上清液置于无菌15mL离心管。56℃水浴灭活30min,在超净工作台用一次性无菌注射器和0.22  $\mu$ m的微孔滤膜过滤除菌,分装后放-80℃冰箱保存备用。

**2.3 实验分组给药** 取对数生长期RAW264.7巨噬细胞,经过消化吹打制作成细胞悬浮液后,根据不同实验要求的细胞密度,随机将其分为6组,分组给药情况如下:空白组(20%空白血清+无糖基础培养基)、模型组(20%空白血清+无糖基础培养基+62.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖)、葛根含药血清高剂量组(15%葛根含药血清+5%空白血清+无糖基础培养基+62.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖)、葛根含药血清中剂量组(10%葛根含药血清+10%空白血清+无糖基础培养基+62.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖)、葛根含药血清低剂量组(5%葛根含药血清+15%空白血清+无糖基础培养基+62.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖)、ERS抑制剂(4-PBA)组(20%空白血清+无糖基础培养基+62.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖+2 mmol·L<sup>-1</sup>4-PBA)。

**2.4 CCK-8法检测RAW264.7巨噬细胞细胞增殖情况**

**2.4.1 检测巨噬细胞在含有不同浓度葡萄糖的培养基中存活率情况** 使用无糖(含有10% FBS)的完全培养基配制含不同葡萄糖浓度(22.5、23.5、25.0、27.5、32.5、42.5、52.5、62.5、122.5 mmol·L<sup>-1</sup>)的实验组后进行给药,其余步骤同2.3.3项。

**2.4.2 检测巨噬细胞在不同体积分数的葛根含药血清存活率** 配制含不同体积分数的葛根含药血清完全培养基,其葛根含药血清体积分数分别为

0%、2.5%、5%、7.5%、10%、15%、20%(用空白血清补充各梯度差异至总血清浓度为20%)后进行给药,其余步骤同2.3.3项。

**2.4.3 CCK-8实验步骤** 取生长状态良好,密度约80%的巨噬细胞,收集细胞悬液,进行细胞计数,稀释细胞密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL,接种至在96孔板中,每孔加入细胞悬液100  $\mu$ L,培养12 h,随后按分组给药干预24 h后,每孔加入CCK-8溶液10  $\mu$ L,在培养箱内孵育1~2 h后,立即使用酶标仪检测,在波长450 nm处测其吸光度A。

**2.5 ELISA检测细胞上清液中TNF- $\alpha$ 的表达水平** 收集各组细胞培养上清,根据相关因子细胞试剂盒说明书,严格按照操作步骤进行处理,用酶标仪在450 nm测定A,记录结果。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测RAW264.7巨噬细胞相关蛋白表达情况** 按照分组进行药物处理,处理结束后提取细胞总蛋白,以BCA法测定蛋白含量,制备蛋白样品。按照制胶配方制备分离胶和浓缩胶,对蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳、转膜、封闭,一抗(1:1 000)4  $^{\circ}$ C孵育过夜,洗膜,二抗(1:5 000)孵育2 h,采用Image J软件对条带进行灰度值处理,实验重复3次,计算灰度值平均值及标准差。

**2.7 统计学方法** 采用SPSS 21.0处理数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态性分析后,3组以上数据使用单因素方差分析,并用最小显著性差异法(LSD)进行两两比较,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 不同浓度葡萄糖溶液对RAW264.7存活率的影响** 以含有22.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的培养基培养的RAW264.7为对照组。27.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖作用时,巨噬细胞存活率显著增强( $P < 0.01$ )。在22.5~27.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖刺激下,巨噬细胞的存活率逐渐增大,呈一定的量效关系;在37.5~122.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖刺激下,巨噬细胞存活率有下降的趋势。122.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组对比22.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组差异无统计学意义。见表1。

**3.2 不同的体积分数葛根含药血清对RAW264.7存活率的影响** 与空白血清组比较,在葛根1%~7.5%含药血清刺激下,巨噬细胞活力值呈上升趋势,且与空白血清组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。葛根10%~20%含药血清刺激下,巨噬细胞活力值呈下降趋势,且20%含药血清组与空白血清组比较差异无统计学意义。见表2。

表1 不同葡萄糖浓度对RAW264.7存活率的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 1 Effect of different glucose concentrations on RAW264.7 survival ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	RAW264.7存活率
葡萄糖组	22.5	1.00 $\pm$ 0.01
	23.5	1.05 $\pm$ 0.09
	25.0	1.31 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>
	27.5	1.42 $\pm$ 0.25 <sup>2)</sup>
	32.5	1.30 $\pm$ 0.30 <sup>2)</sup>
	47.5	1.18 $\pm$ 0.37 <sup>2)</sup>
	62.5	1.24 $\pm$ 0.24 <sup>2)</sup>
	122.5	1.02 $\pm$ 0.29

注:与22.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表3同)

表2 不同体积分数葛根含药血清对RAW264.7存活率的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 2 Effect of different volume fractions of kudzu containing serum on RAW264.7 survival ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

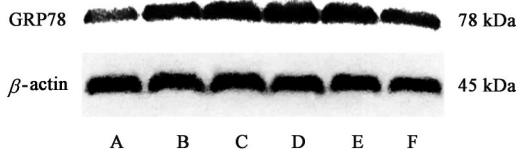
组别	体积分数/%	RAW264.7存活率
空白血清组		0.99 $\pm$ 0.05
FBS组		1.41 $\pm$ 0.14 <sup>2)</sup>
葛根含药血清组	1	1.16 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>
	2.5	1.11 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>
	5	1.15 $\pm$ 0.13 <sup>2)</sup>
	7.5	1.21 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>
	10	1.17 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>
	15	1.15 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>
20	1.01 $\pm$ 0.08	

注:与空白血清组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$

**3.3 不同浓度葡萄糖对重度ERS模型中GRP78蛋白表达的影响** 与22.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较,42.5、52.5、62.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组GRP78蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ )。实验中发现葡萄糖浓度在42.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可刚好引起GRP78升高,葡萄糖浓度在62.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时引起GRP78表达最强,所以选取葡萄糖浓度为62.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为重度ERS的模型浓度。见图1、表3。

**3.4 不同作用时间对重度ERS模型中GRP78蛋白表达的影响** 在重度ERS模型的葡萄糖浓度用62.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 刺激下,24 h时GRP78的蛋白表达量显著升高( $P < 0.01$ ),高于12 h时的GRP78蛋白表达,因此选取24 h为重度ERS模型的造模时间。见图2、表4。

**3.5 葛根含药血清对重度ERS模型中TNF- $\alpha$ 表达的影响** 与空白组比较,模型组TNF- $\alpha$ 表达明显上升( $P < 0.05$ );与模型组比较,葛根高、中、低剂量组,



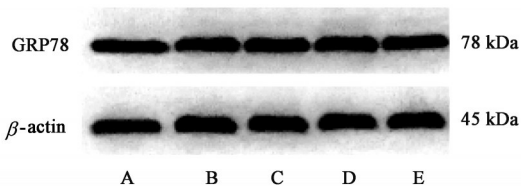
注: A. 22.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖组; B. 32.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖组; C. 42.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖组; D. 52.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖组; E. 62.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖组; F. 72.5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖组

图1 不同浓度葡萄糖对重度ERS模型中GRP78蛋白表达的影响  
Fig. 1 Effect of different concentrations of glucose on GRP78 protein expression in severe ERS models

表3 不同浓度葡萄糖对ERS模型中GRP78蛋白表达含量的影响  
( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of different concentrations of glucose on GRP78 protein expression content in ERS model ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/mmol·L <sup>-1</sup>	GRP78/ $\beta$ -actin
葡萄糖组	22.5	0.95±0.13
	32.5	1.06±0.18
	42.5	1.18±0.09 <sup>2)</sup>
	52.5	1.39±0.08 <sup>2)</sup>
	62.5	1.41±0.17 <sup>2)</sup>
	72.5	1.27±0.55



注: A. 作用6 h; B. 作用12 h; C. 作用24 h; D. 作用36 h; E. 作用48 h

图2 不同作用时间对重度ERS模型中GRP78蛋白表达的影响  
Fig. 2 Effect of GRP78 protein expression in severe ERS models at different times

表4 不同作用时间对重度ERS模型中GRP78蛋白表达的影响  
( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of different times on GRP78 protein expression in severe ERS models ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	作用时间/h	GRP78/ $\beta$ -actin
62.5 mmol·L <sup>-1</sup> 葡萄糖组	6	1.14±0.18
	12	1.31±0.08 <sup>2)</sup>
	24	1.54±0.08 <sup>2)</sup>
	36	1.42±0.11 <sup>2)</sup>
	48	1.10±0.26

注: 与作用6 h比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$

4-PBA组明显降低( $P<0.05$ )。见表5。

3.6 葛根含药血清对重度ERS模型中ERS相关通路蛋白表达的影响 与空白组比较, 重度ERS模型组GRP78、ATF4蛋白表达均有明显升高( $P<0.05$ ),

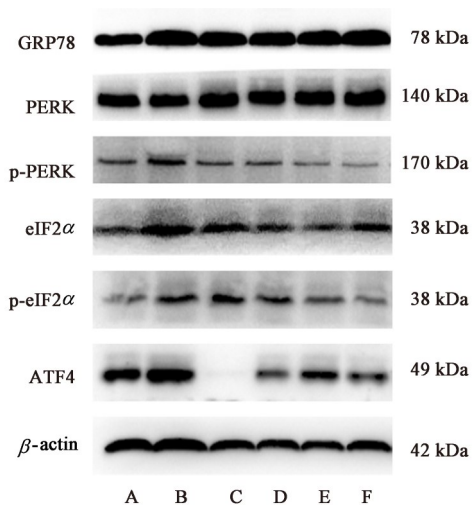
表5 葛根含药血清对重度ERS模型中TNF- $\alpha$ 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of kudzu-containing serum on TNF- $\alpha$  expression in severe ERS models ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	体积分数/%	TNF- $\alpha$ / $\mu$ g·L <sup>-1</sup>
正常组		71.51±6.34
模型组		109.02±12.03 <sup>1)</sup>
葛根高剂量组	15	82.78±6.78 <sup>2)</sup>
葛根中剂量组	10	79.79±12.81 <sup>2)</sup>
葛根低剂量组	5	63.85±17.41 <sup>2)</sup>
4-PBA组	2 <sup>3)</sup>	54.70±20.03 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ; <sup>3)</sup>表示浓度单位为mmol·L<sup>-1</sup>

p-PERK/PERK、p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ 明显升高( $P<0.05$ )。与模型组比较, 葛根含药血清高、中、低剂量组降低GRP78、ATF4的蛋白表达水平( $P<0.05, P<0.01$ ); 葛根含药血清中、低剂量组降低p-PERK/PERK、p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ ( $P<0.05, P<0.01$ ); ERS抑制剂4-PBA组可有效降低GRP78、ATF4蛋白的表达水平( $P<0.01$ ), 显著降低p-PERK/PERK、p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ ( $P<0.01$ )。见图3、表6。



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 4-PBA组; D. 葛根含药血清高剂量组; E. 葛根含药血清中剂量组; F. 葛根含药血清低剂量组

图3 各组ERS相关通路蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of ERS-related pathway proteins expression in each group

#### 4 讨论

许多研究报道表明葡萄糖可诱导巨噬细胞出现炎症, 致细胞损伤<sup>[16-17]</sup>, 也会下调蛋白质糖基化数量, 导致未折叠蛋白堆积, 启动ERS信号<sup>[19]</sup>这对2型糖尿病的发展起重要的促进影响。本课题前期进行体内实验研究中通过高脂高糖饲料喂养4周及一

表6 葛根含药血清对重度ERS模型中ERS相关通路蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of kudzu-containing serum on ERS-related pathway protein expression content in severe ERS models ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	GRP78/ $\beta$ -actin	p-PERK/PERK	ATF4/ $\beta$ -actin	p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$
正常组		0.50 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.03
模型组		0.70 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	0.89 $\pm$ 0.14 <sup>1)</sup>	0.42 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	0.98 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>
葛根高剂量组	15	0.58 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	0.66 $\pm$ 0.15	0.24 $\pm$ 0.05 <sup>3)</sup>	0.89 $\pm$ 0.01
葛根中剂量组	10	0.48 $\pm$ 0.09 <sup>3)</sup>	0.55 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	0.36 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	0.74 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>
葛根低剂量组	5	0.49 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup>	0.56 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.61 $\pm$ 0.04 <sup>3)</sup>
4-PBA组	2 <sup>4)</sup>	0.50 $\pm$ 0.13 <sup>3)</sup>	0.39 $\pm$ 0.05 <sup>3)</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>3)</sup>	0.67 $\pm$ 0.08 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ ;<sup>4)</sup>表示浓度单位为 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)建立2型糖尿病(T2DM)模型大鼠,实验结束后对大鼠中空腹血糖(FBG)、血清糖化蛋白(GSP)、空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及GRP78、ATF6这几个指标进行检测,发现在给药干预后上述指标与模型组相比均出现明显降低,说明葛根具有降低血糖,降低机体炎症因子TNF- $\alpha$ 的释放,改善内质网应激程度,进而起到抑制机体IR的作用<sup>[20]</sup>,虽然在前期中证实了葛根在心血管疾病中发挥的作用,但是对于他是否改善巨噬细胞损伤及降低重度内质网应激还尚未进一步进行探讨,因此本实验中将巨噬细胞暴露在葡萄糖中,建立一个高糖环境使其类似于糖尿病动物或者糖尿病患者的高糖状态,来探究葛根对高糖诱导巨噬细胞出现损伤及对重度ERS的影响。

在探索合适的造模浓度、时间和筛选不同剂量葛根含药血清对RAW264.7巨噬细胞活力产生的影响时发现,葡萄糖浓度在22.5~27.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,RAW264.7巨噬细胞存活率显著增强,而在37.5~122.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 其存活率出现便出现下降,推测原因有可能其浓度过高抑制巨噬细胞增值生长;在葛根含药血清的体积分数在1%~7.5%,RAW264.7巨噬细胞存活率显著增强出现最高值,而葛根含药血清的体积分数在10%~20%中RAW264.7巨噬细胞活力呈下降趋势,说明葛根含有可促进细胞增殖的成分但是浓度过高又可能会抑制细胞增殖生长,这为后期使用Western blot方法探索出诱导巨噬细胞出现重度内质网应激的葡萄糖浓度和时间铺垫一定的实验基础。GRP78是ERS的标志蛋白,其表达含量与内质网应激程度是成正比<sup>[11]</sup>,利用Western blot检测GRP78筛选诱导巨噬细胞出现重度ERS的最佳葡萄糖浓度和时间,发现葡萄糖浓度在62.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、诱导时间达到24 h时,其GRP78蛋白表达含量最高,因此选择葡萄糖浓度在

62.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、诱导时间达24 h为本次实验研究造模浓度和时间。

巨噬细胞是人体的免疫细胞,自身可分泌趋化因子和细胞炎症因子<sup>[21]</sup>,过度表达TNF- $\alpha$ 、白细胞介素-17(IL-17)等炎症因子时可激活炎症反应,TNF- $\alpha$ 对胰岛素受体对胰岛素的感知起到干扰的影响<sup>[22]</sup>,本次ELISA实验研究结果显示,与空白组比较,重度ERS模型组中TNF- $\alpha$ 表达含量明显升高,而与模型组比较,高、中、低剂量葛根含药血清组、4-PBA组的TNF- $\alpha$ 表达含量明显下降,此结果一方面验证了HG可诱导巨噬细胞分泌过量的炎症因子,另一方面也表明了葛根含药血清可降低由HG诱导巨噬细胞分泌过量炎症因子TNF- $\alpha$ 表达含量,改善因炎症反应所致的细胞损伤。

PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4通路<sup>[23]</sup>是激活ERS的信号通路之一,未受到任何刺激的时候,PERK与GRP78结合处于一种稳定状态,受到外界刺激后,PERK与GRP78分离后,转变为磷酸化PERK而被激活<sup>[24]</sup>,PERK发生二聚化和自身磷酸化有可激活eIF2 $\alpha$ 使其出现磷酸化<sup>[25]</sup>,从而抑制蛋白的翻译,减低内质网应激程度,但可上调转录激活因子ATF4 mRNA的表达<sup>[26]</sup>,ATF4长期表达会引起内质网源性转录因子(CHOP)等因子的表达,诱发细胞凋亡<sup>[27]</sup>。本次实验研究中发现,与空白组比较,重度ERS模型组GRP78、ATF4蛋白表达水平均显著性升高,p-PERK/PERK、p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ 显著升高,表明实验中HG可激活ERS,而与模型组比较,4-PBA组、高、中、低剂量葛根含药血清下调了GRP78、ATF4的表达以及p-PERK/PERK、p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ 值,表明葛根可抑制PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4信号通路的激活,阻断内质网相关蛋白PERK、eIF2 $\alpha$ 、ATF4蛋白的表达,以此来达到下调ERS程度的目的。

综上所述,葛根可改善高糖诱导巨噬细胞时对其造成的损伤,下调ERS信号通路相关蛋白表达。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ZHENG J, RUTEGÅRD M, SANTONI G, et al. Prediabetes and diabetes in relation to risk of gastric adenocarcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2019, 120 (12): 1147-1152.
- [2] ANDERSEN D K, KORC M, PETERSEN G M, et al. Diabetes, pancreatogenic diabetes, and pancreatic cancer[J]. *Diabetes*, 2017, 66(5): 1103-1110.
- [3] 陈锋, 张帆, 郝二伟, 等. 中药多糖防治糖尿病及其并发症的作用机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(12): 256-266.
- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2020年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(4): 315-409.
- [5] BHATTARAI K R, CHAUDHARY M, KIM H R, et al. Endoplasmic Reticulum (ER) stress response failure in diseases [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30 (9): 672-675.
- [6] SHIMOURA N, NAGAI H, FUJIWARA S, et al. Exacerbation and prolongation of psoriasiform inflammation in diabetic obese mice: A synergistic role of CXCL5 and endoplasmic reticulum stress[J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(4): 854-863.
- [7] 佟红娜, 张晨阳, 韩美欣, 等. 糖尿病心肌病的发病机制及药物干预研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(2): 257-265.
- [8] RAHMATI M, MOOSAVI M A, MCDERMOTT M F. ER stress: A therapeutic target in rheumatoid arthritis? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(7): 610-623.
- [9] BERBUDI A, RAHMADIKA N, TJAHAJADI A I, et al. Type 2 diabetes and its impact on the immune system [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2020, 16(5): 442-449.
- [10] 朱卫丰, 李佳莉, 孟晓伟, 等. 葛属植物的化学成分及药理活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(6): 1311-1331.
- [11] 蒙秋艳, 黄靖洲, 梁艳玲, 等. 广西不同产地粉葛、野葛的多糖和异黄酮含量比较[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(21): 43-50.
- [12] 管咏梅, 许攀, 沈倩, 等. 葛根解酒的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(2): 210-217.
- [13] 李若飞, 于春萍, 兰丁璇, 等. 中药血清药理学实验方法与相关问题探讨[J]. *全科口腔医学杂志: 电子版*, 2019, 6(31): 125, 136.
- [14] 张文娟, 林陶秀, 孙新慧, 等. 基于“阳化气, 阴成形”理论探讨温阳化瘀法在子宫内膜异位症中的应用[J]. *现代中医临床*, 2022, 29(3): 65-68.
- [15] 傅延龄, 张林, 刘绍永. 葛根历代临床用量分析[J]. *中医杂志*, 2014, 55(20): 1773-1776.
- [16] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 202-203.
- [17] VEIRAS L C, BERNSTEIN E A, CAO D, et al. Tubular IL-1 $\beta$  induces salt sensitivity in diabetes by activating renal macrophages [J]. *Circ Res*, 2022, 131 (1): 59-73.
- [18] ZHU M, SUN X, QI X, et al. Exosomes from high glucose-treated macrophages activate macrophages and induce inflammatory responses via NF- $\kappa$ B signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106551.
- [19] 张路煜, 刘玉晖, 游宇, 等. 葛根对2型糖尿病大鼠胰腺内质网应激相关蛋白GRP78, ATF6表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20): 82-87.
- [20] IBRAHIM I M, ABDELMALEK D H, ELFIKY A A. GRP78: A cell's response to stress [J]. *Life Sci*, 2019, 226: 156-163.
- [21] 张瀚文, 贾晶晶, 朱旭冬, 等. 心血管疾病中的巨噬细胞[J]. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52(5): 709-731.
- [22] ZHUANG H, LI B, XIE T, et al. Indole-3-aldehyde alleviates chondrocytes inflammation through the AhR-NF- $\kappa$ B signalling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A): 109314.
- [23] FU X, CUI J, MENG X, et al. Endoplasmic reticulum stress, cell death and tumor: Association between endoplasmic reticulum stress and the apoptosis pathway in tumors (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45 (3): 801-808.
- [24] LEMMER I L, WILLEMSSEN N, HILAL N, et al. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders [J]. *Mol Metab*, 2021, 47: 101169.
- [25] STONE S I, ABREU D, MCGILL J B, et al. Monogenic and syndromic diabetes due to endoplasmic reticulum stress [J]. *J Diabetes Complications*, 2021, 35(1): 107618.
- [26] YAO Y, LU Q, HU Z, et al. A non-canonical pathway regulates ER stress signaling and blocks ER stress-induced apoptosis and heart failure [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 133.
- [27] ZHOU L, YANG X, SHU S, et al. Sufentanil protects the liver from ischemia/reperfusion-induced inflammation and apoptosis by inhibiting ATF4-induced TP53BP2 expression [J]. *Inflammation*, 2021, 44(3): 1160-1174.

[责任编辑 周冰冰]