

补阳还五汤对 LPS 诱导巨噬细胞活化与自噬的影响

侯贝贝¹, 游宇², 刘玉晖^{1*}, 徐伟¹, 张路煜¹

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004, 2. 南昌大学第一附属医院, 南昌 330006)

[摘要] **目的:**探讨磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路在补阳还五汤抗脂多糖(LPS)诱导巨噬细胞活化与自噬中的作用。**方法:**细胞增殖毒性检测(CCK-8)法筛选诱导 RAW264.7 巨噬细胞活力值的最适 LPS 浓度。在最适 LPS 浓度下,利用 PI3K 阻断剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)(5 mmol·L⁻¹),Akt 阻断剂 MK2206(5 μmol·L⁻¹),mTOR 阻断剂 Rapamycin(10 μmol·L⁻¹),Beclin-1 阻断剂 Spautin-1(5 μmol·L⁻¹)及不同剂量的补阳还五汤含药血清(5%,10%,20%)处理 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 RAW264.7 巨噬细胞炎症因子白细胞介素-1β(IL-1β),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的浓度,蛋白免疫印迹法(Western blot)测定磷酸化(p-)PI3K,p-Akt,p-mTOR 通路蛋白的表达及微管轻链蛋白 3(LC3),泛素结合蛋白 1(p62),Beclin-1 的水平。自噬双标腺病毒转染检测 RAW264.7 细胞自噬流的变化。**结果:**CCK-8 结果显示 10 mg·L⁻¹ LPS 作用时,细胞活性显著增强。模型组 IL-1β,IL-6,TNF-α 浓度显著高于空白组(P<0.01),与模型组比较,Rapamycin 显著升高 IL-6 浓度,其他给药组均可降低 IL-1β,IL-6,TNF-α 的水平(P<0.05,P<0.01)。模型组 p-Akt,p-PI3K,p-mTOR 蛋白表达量明显低于空白组(P<0.05),LC3,p62 蛋白表达量显著高于空白组(P<0.01),与模型组比较,Rapamycin 显著降低 p-Akt 蛋白表达量,不影响 p-mTOR 表达,补阳还五汤各剂量组与其他各阻断剂组均可明显升高 p-Akt,p-PI3K,p-mTOR 蛋白表达量(P<0.05,P<0.01),降低 LC3,p62 蛋白表达量(P<0.05,P<0.01),各组 Beclin-1 蛋白表达量均无显著性差异。与空白组比较,模型组中有明显的自噬体斑点形成,自噬流顺畅;与模型组比较,补阳还五汤含药血清组,3-MA,Spautin-1 组自噬斑点的形成明显减少或消失,MK2202,Rapamycin 组自噬体斑点大小明显减小,但自噬活力仍较强。**结论:**补阳还五汤抗 LPS 诱导巨噬细胞活化与自噬与抑制巨噬细胞炎症反应,调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,抑制自噬的过度发生有关。

[关键词] 巨噬细胞;补阳还五汤;自噬;炎症反应;动脉粥样硬化

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0016-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191101

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190218.1037.002.html>

[网络出版时间] 2019-02-19 10:48

Effect of Buyang Huanwu Tang on LPS-induced Macrophage Activation and Autophagy

HOU Bei-bei¹, YOU Yu², LIU Yu-hui^{1*}, XU Wei¹, ZHANG Lu-yu¹

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Buyang Huanwu Tang in resisting lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and autophagy through phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian rapamycin target protein (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway. **Method:** The cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to screen out the optimal LPS concentration for inducing the activity of RAW264.7 macrophages. RAW264.7 macrophages were treated separately with PI3K blocker 3-methyladenine (3-MA) (5 mmol·L⁻¹), Akt blocker MK2206 (5 μmol·L⁻¹), mTOR blocker Rapamycin (10 μmol·L⁻¹), Beclin1

[收稿日期] 20181203(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460612)

[第一作者] 侯贝贝,在读硕士,从事中药心血管药理研究,E-mail:2522549228@qq.com

[通信作者] *刘玉晖,博士,副教授,硕士生导师,从事中药药理学研究,E-mail:liuyuhui77@126.com

blocker Spautin-1 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), different doses of Buyang Huanwu Tang serum (5%, 10%, 20%) and the optimum concentration of LPS for 24 h. The concentrations of inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in RAW264.7 macrophages were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was used to detect the expression levels of phosphorylated PI3K, phosphorylated Akt, phosphorylated mTOR protein, microtubule light chain protein 3 (LC3), ubiquitin-binding protein 1 (p62) and Beclin-1. The autophagy flow of RAW264.7 cells was detected by transfection with autophagy double-labeled adenovirus. **Result:** Results of CCK-8 showed the highest cell viability when $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS was applied. The concentrations of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the model group were significantly higher than those in the blank group ($P < 0.01$). Compared with the model group, Rapamycin significantly increased IL-6 concentration ($P < 0.05$), and other administration groups could decrease the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression levels of p-Akt, p-PI3K and p-mTOR in the model group were significantly lower ($P < 0.05$), and LC3 and p62 protein expressions were significantly higher than those in the blank group ($P < 0.01$). Compared with the model group, Rapamycin significantly decreased the expression of p-Akt protein, with no impact on the expressions of p-mTOR. However, Buyang Huanwu Tang and other blockers significantly increased p-Akt, p-PI3K and p-mTOR ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while decreased the protein expressions of LC3 and p62 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no significant difference in the expression level of Beclin-1 protein in each group. Compared with the blank group, there were obvious autophagosome spots in the model group, and the autophagic flow was smooth. Compared with the model group, the formation of autophagic spots in 3-MA, Spautin-1 group and Buyang Huanwu Tang groups were significantly decreased or disappeared, and the size of autophagosome spots in MK2206 and Rapamycin groups was significantly reduced, but the autophagy activity was still strong. **Conclusion:** Buyang Huanwu Tang can resist LPS-induced macrophages activation and autophagy, inhibit macrophage inflammatory response, regulate PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, and inhibit the excessive occurrence of autophagy.

[**Key words**] macrophage; Buyang Huanwu Tang; autophagy; inflammatory response; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种血管系统的慢性炎症疾病,以粥样斑块和纤维斑块为主要病理特征。近几年的临床研究和众多科研发现斑块破裂及继发病变是心血管事件致病、致死的主要原因。血管发生损伤时,血管平滑肌细胞大量增生,同时血管内皮细胞与血管平滑肌细胞产生大量的炎症因子,如白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),单核细胞趋化因子 1(MCP-1)等,诱导血液中的单核细胞进入血管内皮转变为巨噬细胞。巨噬细胞大量吞噬氧化低密度脂蛋白(ox-LDL),形成泡沫细胞,泡沫细胞的大量堆积、血管平滑肌细胞继续大量增生以及炎症因子的持续刺激,最终导致 AS 的形成。巨噬细胞作为 AS 斑块中最主要的炎性细胞,通常集中在斑块中易于破裂的肩部和脂质核心位置,时刻影响着 AS 进程及斑块的稳定性。

自噬是广泛存在于真核细胞内的一种“自食”现象,细胞膜包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等形成自噬体,与溶酶体融合形成自噬溶

酶体,降解其所包裹的内容物实现细胞本身代谢需要和某些细胞器更新,在维持细胞存活、更新、物质再利用和内环境稳态中起着重要作用。研究发现,磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路的激活在自噬中发挥关键的调节作用,选择性阻断 PI3K, Akt, mTOR 信号通路能够调控巨噬细胞自噬,稳定 AS 易损斑块^[1-2]。

补阳还五汤出自清朝《医林改错》,是理血补气代表经方,临床常用于气虚血瘀引起的中风及心脑血管意外后遗症。近几年大量动物实验和临床试验发现,补阳还五汤具有改善微循环、降低血压、扩张冠状动脉、改善脑缺血等药理作用^[3],其经方及加减方在治疗脑梗死、脑血栓、冠心病等方面具有积极的治疗效果。本课题组前期研究表明,补阳还五汤具有抗内皮细胞损伤、改善内皮细胞通透性、抑制血管平滑肌细胞增殖、调控巨噬细胞自噬、缩小 AS 斑块面积、降低斑块的易损指数等作用^[4-7]。本研究用脂多糖(LPS)诱导 RAW264.7 巨噬细胞炎症

模型,选用 PI3K 抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA),Akt 抑制剂 MK2206,mTOR 抑制剂 Rapamycin,自噬相关基因 1(Beclin-1)抑制剂 Spautin-1 选择性阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及自噬通路,进一步探讨 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在补阳还五汤抗 AS 过程中的作用。

1 材料

1.1 动物及细胞株 SPF 级雄性 SD 大鼠 35 只,体质量 180 ~ 220 g,合格证号 SCXK(湘)2016-0002,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,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,批准号 JZLLSC2015006。RAW264.7 巨噬细胞,干细胞库编号 SCSp-5036,购于中国科学院上海细胞库。

1.2 药物及试剂 补阳还五汤(复方组成:黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 5 g,川芎 3 g,红花 3 g,桃仁 3 g,地龙 3 g),共 5 剂,购于北京同仁堂(集团)有限责任公司,由江西中医药大学药学院付小梅教授鉴定为正品。按照配方,加 8 ~ 10 倍量水浸泡药材 0.5 h,文火水煎 2 次,每次 1 h,合并 2 次煎煮液,最后浓缩成 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓缩液。脂多糖(LPS),PI3K 阻断剂 3-MA,Beclin-1 阻断剂 Spautin-1(美国 Sigma 公司,批号分别为 025M4040V,124M4071V,12344612V);Akt 阻断剂 MK2206,mTOR 阻断剂 Rapamycin(美国 Selleckchem 公司,批号分别为 S107807,S103908);DMEM 培养液(美国 Hyclone 公司,批号 AB218124);胎牛血清(FBS,新西兰 Gibco 公司,批号 1908121);细胞增殖毒性(CCK-8)检测试剂盒(日本 Dojindo 公司,批号 LF673);IL-1 β ,IL-6,TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 Ray Biotech 公司,批号分别为 0302160408,0302160413,0302160430);Beclin-1,磷酸化(p)-Akt,p-PI3K,p-mTOR,泛素结合蛋白 1(p62), β -肌动蛋白(β -actin),山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗,山羊抗鼠 HRP 标记二抗(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 3495S,4060S,4228S,2971S,5114S,12262S,7074S,7076P2);微管轻链蛋白 3(LC3)抗体(英国 Abcam 公司,批号 GR252926-8);电泳液、转膜液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0014A,P0021A);Immobilon Western 化学发光底物(美国 Millipore 公司,批号 1505101);BCA 蛋白浓度测定试剂盒,高灵敏度化学发光底物(美国 Thermo 公司,批号分别为 PC200898,MD158290);显影粉、定影粉(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 10122,

00041510);自噬双标腺病毒(mRFp-GFP-LC3)(山东维真生物技术有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS),4%多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20161111,20160913);Hoechst 染色液(南京凯基生物技术有限公司,批号 20150915)。

1.3 仪器 T25 型细胞培养瓶,96 孔细胞培养板(美国 Corning 公司);041BR120387 型电泳仪、水平和垂直电泳槽、转移槽、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);Elx800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);CKX53 型荧光显微镜及成像系统(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 将 35 只 SD 大鼠随机分为 2 组,分别为正常组(15 只)和给药组(20 只),适应性喂养 3 d 后开始进行灌胃,给药组为补阳还五汤浓缩液 $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (给药剂量 = 标准体质量 \times 人体剂量),空白组灌胃等剂量自来水,每天灌胃 1 次,连续灌胃 1 周,灌胃期间,正常饮食饮水。第 7 天灌胃后 2 h,腹主动脉取血,大鼠麻醉后,用一次性无菌注射器腹主动脉取血,收集血清于离心管中,室温静置 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$,3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取细胞上清液,56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min,0.22 μm 的微孔滤膜过滤,分装,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 CCK-8 检测不同浓度 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞活力 取生长状态良好,密度约 80% 的巨噬细胞,消化,离心,收集细胞悬液并计数。稀释至合适的密度,接种到无菌 96 孔板中,每孔加入 100 μL (约 8 000 个细胞),12 h 后,按 0,1,2.5,5,10,25,50,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS 浓度进行刺激,每组设 4 个复孔,做好相应标记。置于 5% CO_2 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h 后按说明书加入 CCK-8 液,450 nm 检测吸光度 A,计算各组细胞活性。给药组细胞活性 = [(实验组 A - 阴性组 A) / (空白组 A - 阴性组 A)] \times 100%。

2.3 细胞分组与造模 将 RAW264.7 细胞随机分为 10 组,分别为空白组(10% 空白血清),模型组(10% 空白血清 + 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS),补阳还五汤含药血清组(分别为 5%,10%,20% 含药血清 + 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS),10% FBS 组(10% 胎牛血清 + 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS),PI3K 阻断剂 3-MA + 组(10% 含药血清 + 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-MA + 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS),Akt 阻断剂 MK2202 组(10% 含药血清 + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK2202 + 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS),mTOR 阻断剂

Rapamycin 组 (10% 含药血清 + $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rapamycin + $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS), Beclin-1 阻断剂 Spautin-1 组 (10% 含药血清 + $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Spautin-1 + $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS)。RAW264.7 巨噬细胞汇合度达到约 60% 时, PBS 润洗 2 遍, 按上面的分组方法, 加入相应的含药血清、阻断剂作用后, 加入 $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS, 置于细胞培养箱中继续作用 24 h。

2.4 ELISA 检测 RAW264.7 巨噬细胞 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的含量 按照 2.3 项下细胞培养方法, 24 h 后将各组细胞上清液收集于 5 mL 无菌离心管中, 做好相应标记, 并置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。配制相关溶液, 加入对照品 $100 \mu\text{L}$, 各组细胞上清液于 ELISA 96 孔板中, 室温慢摇孵育 2.5 h, 清洗液润洗玻璃板孔, 反复润洗 4 遍, 吸干残留润洗液。加入提前配置的生物素化抗体 $100 \mu\text{L}$, 室温慢摇孵育 1 h, 清洗液清洗 4 遍, 加入 $100 \mu\text{L}$ 链霉亲和素溶液, 室温慢摇孵育 45 min, 清洗液再次清洗 4 遍, 加入 TMB 底物试剂 $100 \mu\text{L}$ 组, 室温慢摇避光孵育 30 min, 加入终止液 $50 \mu\text{L}$, 立即用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度 A 。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定通路蛋白 p-PI3K, p-Akt, p-mTOR 的表达及自噬相关蛋白 LC3B, Beclin-1, p62 的表达 使用含 1% 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的 RIPA 高效裂解液制备蛋白样品, 放冰上裂解 20 min, 用细胞刮收集, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清。留取 $30 \mu\text{L}$ 用于 BCA 试剂盒测蛋白浓度, 其余加入 $6 \times$ 蛋白上样缓冲液, 置于 PCR 仪中, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭活 10 min, 并置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。制胶, 蛋白上样, SDS-PAGE 凝胶电泳 ($60 \text{ V } 15 \text{ min}, 80 \text{ V } 2 \text{ h}$), 200 mA 转膜至 NC 膜上 (具体时间以相对分子质量而定), 5% BSA 室温封闭 2.5 h, 目的蛋白分别与对应特异性抗体 Beclin-1 (1:1 000), p-Akt (1:2 000), p-PI3K (1:1 000), p-mTOR (1:1 000), LC3B (1:2 000), Beclin-1 (1:250), P62 (1:1 000), β -actin (1:1 000) 抗体特异性结合 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 摇床洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入相应二抗 (1:3 000) 室温孵育 2 h, 摇床洗膜 3 次, 每次 10 min, 化学发光显影定影, 拍照保存, 用 Quantity One 图像分析软件测定条带的积分吸光度。

2.6 mRFP-GFP-LC3 腺病毒转染检测 RAW264.7 细胞自噬流的变化 铺板细胞密度约 1.5×10^5 个/mL。当细胞汇合度达到 40% 左右时, 更换新鲜培养基, 加入 mRFP-GFP-LC3 双标腺病毒 $20 \mu\text{L}$ 和 GFP 对照腺病毒, 作用 12 h, 更换新鲜培养

基, 各组按照 2.3 项造模方法加入相应药物, 作用 24 h, PBS 润洗 2 遍, 加入 4% 的多聚甲醛固化 10 min, PBS 再次润洗 2 遍, 再每孔加入 Hoechst 染色液 $2 \mu\text{L}$, 进行染核, 之后加入 50% 甘油封闭保存于荧光显微镜下观察拍照。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用单因素方差分析的方法对多样本间的均数进行比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度的 LPS 对 RAW264.7 巨噬细胞活力的影响 实验结果表明, 低浓度时, 随着 LPS 质量浓度增大 ($0 \sim 10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 巨噬细胞活性也增大, 且呈一定量效关系; 在质量浓度 $25 \sim 100 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围时, 随着浓度增大, 巨噬细胞活性有逐渐降低趋势。且在 $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用时, 细胞活性最强, 故本研究均采用 $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LPS 诱导炎症模型。见表 1。

表 1 LPS 对 RAW264.7 细胞活性的影响

Table 1 Effect of lipopolysaccharide on viability of RAW264.7 cells

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
空白	-	0.678	1.000 ± 0.069
LPS	1	0.852	1.255 ± 0.049
	2.5	1.082	$1.595 \pm 0.074^{1)}$
	5	1.134	$1.671 \pm 0.072^{1)}$
	10	1.233	$1.818 \pm 0.014^{1)}$
	25	1.204	$1.776 \pm 0.033^{1)}$
	50	1.061	$1.565 \pm 0.063^{1)}$
	100	0.788	1.161 ± 0.050

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 补阳还五汤对 RAW264.7 巨噬细胞 IL-1 β , IL-6, TNF- α 炎症因子水平的影响 与空白组比较, 模型组 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平显著上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤含药血清组以及各阻断剂组 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平有明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而 IL-6 检测中, 阻断剂 Rapamycin 组与模型组比较, IL-6 水平明显上升 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 补阳还五汤对 p-PI3K, p-Akt, p-mTOR 信号通路蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组中 p-Akt, p-PI3K, p-mTOR 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 5%, 10%, 20% 补阳还五汤含药血清组 p-Akt, p-PI3K, p-mTOR 蛋白表达量明显上升 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其中以中、高

表 2 补阳还五汤对 RAW264.7 细胞 IL-1 β , IL-6, TNF- α 质量浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Buyang Huanwu Tang on level of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

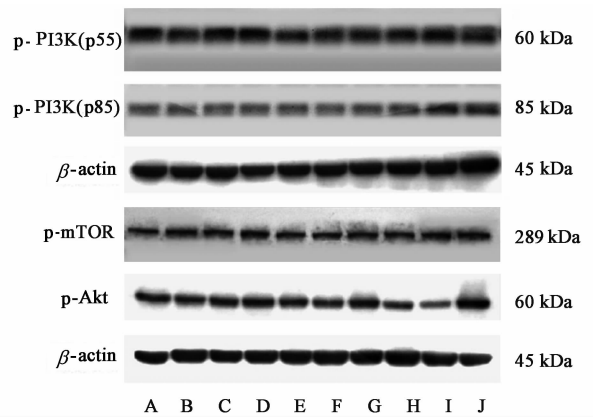
组别	剂量	IL-1 β /ng·L ⁻¹	IL-6/ μ g·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
空白	-	50.24 \pm 1.48	2.44 \pm 0.54	370.97 \pm 3.48
模型	-	324.77 \pm 8.59 ²⁾	202.22 \pm 8.79 ²⁾	30 819.06 \pm 1 809.89 ²⁾
补阳还五汤	5%	79.30 \pm 2.58 ³⁾	36.89 \pm 13.06 ⁴⁾	21 505.60 \pm 1 802.37 ⁴⁾
	10%	71.26 \pm 2.31 ³⁾	53.04 \pm 11.27 ⁴⁾	21 260.15 \pm 1 348.77 ⁴⁾
	20%	76.39 \pm 1.80 ³⁾	55.29 \pm 0.64 ⁴⁾	23 716.38 \pm 110.89 ⁴⁾
10% FBS	-	319.47 \pm 3.49	200.93 \pm 2.58	29 816.11 \pm 617.85
3-MA	5 mmol·L ⁻¹	75.88 \pm 2.31 ³⁾	36.84 \pm 1.90 ⁴⁾	16 642.17 \pm 1 474.71 ⁴⁾
MK2206	5 μ mol·L ⁻¹	68.19 \pm 3.88 ³⁾	35.82 \pm 2.31 ⁴⁾	20 259.42 \pm 2 037.62 ⁴⁾
Rapamycin	10 μ mol·L ⁻¹	66.99 \pm 1.29 ³⁾	227.40 \pm 6.37 ³⁾	6 750.49 \pm 771.21 ³⁾
Spautin-1	10 μ mol·L ⁻¹	67.33 \pm 2.35 ³⁾	36.18 \pm 0.69 ⁴⁾	12 372.44 \pm 1 321.92 ⁴⁾

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⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

剂量效果显著。与模型组比较,阻断剂 3-MA, MK2202, Spautin-1, Rapamycin 均能显著增加 p-PI3K 蛋白表达量 ($P < 0.01$), 阻断剂 3-MA, Spautin-1 能明显增加 p-mTOR, p-Akt 蛋白表达量 ($P < 0.05, P < 0.01$), 阻断剂 Rapamycin 能明显降低 p-Akt 蛋白表达量 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 3。

3.4 补阳还五汤对 LC3, p62, Beclin-1 自噬相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组中 LC3, p62 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤含药血清组与各阻断剂组 LC3, p62 蛋白表达量达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较,模型组 Beclin-1 蛋白的表达量无显著性差异;其他各组与模型组比较,Beclin-1 蛋白的表达量无显著性差异。见图 2, 表 4。

3.5 补阳还五汤对 RAW264.7 细胞自噬流的影响 mRFP-GFP-LC3 串联荧光蛋白腺病毒中表达的



A. 空白组; B. 模型组; C. 5% 补阳还五汤组; D. 10% 补阳还五汤组; E. 20% 补阳还五汤组; F. 10% FBS 组; G. 3-MA 组; H. MK2206 组; I. Rapamycin 组; J. Spautin-1 组(图 2, 3 同)

图 1 RAW264.7 细胞磷酸化 Akt, PI3K 与 mTOR 蛋白表达电泳
Fig.1 Electrophoresis of expression of phosphorylated Akt, PI3K and mTOR protein in RAW264.7 cells

表 3 补阳还五汤对 RAW264.7 细胞磷酸化 Akt, PI3K 与 mTOR 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Buyang Huanwu Tang on expression of phosphorylated Akt, PI3K and mTOR protein in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	p-PI3K		p-Akt	p-mTOR
		p55	p85		
空白	-	0.21 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	1.01 \pm 0.04	0.49 \pm 0.02
模型	-	0.06 \pm 0.01 ²⁾	0.06 \pm 0.01 ¹⁾	0.81 \pm 0.07 ¹⁾	0.37 \pm 0.01 ¹⁾
补阳还五汤	5%	0.23 \pm 0.03 ⁴⁾	0.09 \pm 0.00 ³⁾	1.10 \pm 0.08 ³⁾	0.42 \pm 0.02 ³⁾
	10%	0.22 \pm 0.02 ⁴⁾	0.25 \pm 0.02 ⁴⁾	1.28 \pm 0.12 ⁴⁾	0.49 \pm 0.03 ³⁾
	20%	0.18 \pm 0.01 ⁴⁾	0.19 \pm 0.02 ⁴⁾	1.21 \pm 0.03 ⁴⁾	0.51 \pm 0.03 ⁴⁾
10% FBS	-	0.08 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.88 \pm 0.06	0.53 \pm 0.02 ⁴⁾
3-MA	5 mmol·L ⁻¹	0.17 \pm 0.02 ⁴⁾	0.18 \pm 0.02 ⁴⁾	1.20 \pm 0.10 ⁴⁾	0.46 \pm 0.02 ³⁾
MK2206	5 μ mol·L ⁻¹	0.22 \pm 0.02 ⁴⁾	0.18 \pm 0.02 ⁴⁾	0.97 \pm 0.12	0.50 \pm 0.02 ⁴⁾
Rapamycin	10 μ mol·L ⁻¹	0.18 \pm 0.02 ⁴⁾	0.16 \pm 0.02 ⁴⁾	0.64 \pm 0.08 ³⁾	0.35 \pm 0.01
Spautin-1	10 μ mol·L ⁻¹	0.17 \pm 0.01 ⁴⁾	0.14 \pm 0.01 ⁴⁾	1.03 \pm 0.09 ³⁾	0.43 ³⁾

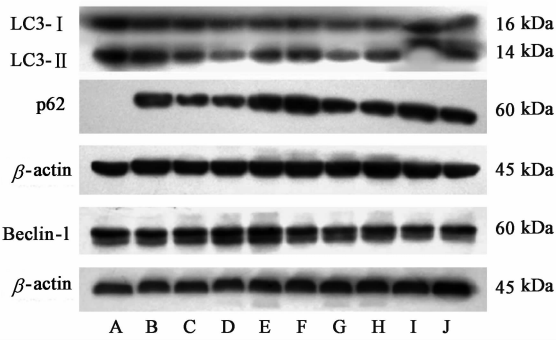


图 2 RAW264.7 细胞 LC3, p62 和 Beclin-1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of expression of LC3, p62 and Beclin-1 protein in RAW264.7 cells

表 4 补阳还五汤对 RAW264.7 细胞 LC3, p62 和 Beclin-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Buyang Huanwu Tang on expression of LC3, p62 and Beclin-1 protein in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	LC3-II / LC3-I	p62	Beclin-1
空白	-	1.70 ± 0.07	0.01 ± 0.00	0.85 ± 0.07
模型	-	2.32 ± 0.08 ²⁾	0.91 ± 0.05 ²⁾	0.82 ± 0.07
补阳还五汤	5%	1.67 ± 0.05 ⁴⁾	0.59 ± 0.03 ⁴⁾	0.83 ± 0.08
	10%	1.41 ± 0.05 ⁴⁾	0.63 ± 0.04 ⁴⁾	0.88 ± 0.06
	20%	1.79 ± 0.08 ⁴⁾	0.81 ± 0.04 ³⁾	0.86 ± 0.09
10% FBS	-	2.32 ± 0.08	1.00 ± 0.07	0.81 ± 0.04
3-MA	5 mmol·L ⁻¹	1.50 ± 0.08 ⁴⁾	0.72 ± 0.04 ⁴⁾	0.83 ± 0.05
MK2206	5 μmol·L ⁻¹	1.51 ± 0.06 ⁴⁾	0.72 ± 0.02 ⁴⁾	0.86 ± 0.04
Rapamycin	10 μmol·L ⁻¹	1.53 ± 0.06 ⁴⁾	0.81 ± 0.05 ³⁾	0.82 ± 0.07
Spautin-1	10 μmol·L ⁻¹	1.31 ± 0.06 ⁴⁾	0.66 ± 0.06 ⁴⁾	0.84 ± 0.08

4 讨论

巨噬细胞的炎症反应与自噬程度是 AS 易损斑块形成的最主要原因之一。诱导因素下,受损的血管内皮聚集单核细胞,启动炎症反应,单核细胞进入组织成为巨噬细胞,通过清道夫受体促进内膜下脂质吞噬和泡沫细胞的形成,释放 TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12 致炎因子及抗炎因子 IL-10, 转化生长因子-β 和干扰素-γ 等,影响脂代谢、促进平滑肌细胞的迁移和增殖、调节细胞外基质重塑等多个环节参与 AS 进程,影响 AS 斑块的结局^[8]。在斑块核心坏死部位,巨噬细胞通过分泌肿瘤坏死因子、一氧化氮,激活平滑肌细胞、内皮细胞以及巨噬细胞的凋亡通路,导致大量的细胞凋亡及炎症应答,分泌基质金属蛋白酶(MMPs)等各种细胞因子,参与纤维帽与胶原纤维等基质成分的降解,增加 AS 斑块的易损性^[9]。本实验结果显示, LPS 刺激后 IL-1β, IL-6, TNF-α 促炎因子水平升高,补阳还五汤和各抑制剂可有效降

mRFP 和 GFP 可用于标记及追踪 LC3, GFP 是酸敏感型蛋白,自噬小体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,由于内部的酸性环境改变, GFP 荧光淬灭。因此, GFP 的减弱可指示自噬溶酶体形成的顺利程度,即红(mRFP)绿(GFP)荧光合成后出现的黄色斑点越亮表示自噬流越顺畅,反之,自噬流进程受阻。与空白组比较,模型组中有明显的自噬体斑点形成,自噬活力显著增强;与模型组比较,补阳还五汤含药血清组与阻断剂 3-MA, Spautin-1 组自噬斑点的形成明显减少或消失,阻断剂 MK2206 与 Rapamycin 组自噬体斑点大小明显减小,但自噬活力仍较强。见图 3。

低促炎因子的水平,其中阻断剂 Rapamycin 组 IL-6 水平显著上升,这可能是由于阻断 mTOR 通路后,细胞自噬过度发生加重炎症反应的发生,促进了 IL-6 的释放。

细胞自噬是由溶酶体系统降解胞内受损、变性及衰老的蛋白质与细胞器的过程,在维持细胞稳态中发挥着重要作用。AS 易损斑块内的细胞存在一定程度的自噬现象,基础或适度水平的自噬是可保护细胞免受炎症反应、氧化应激等环境刺激的影响,对于控制 AS 进程具有积极作用;反之过度自噬释放大量炎症因子如 IL-1β, IL-6, TNF-α 等,加重炎症反应的发生,导致细胞死亡、斑块失稳^[10]。巨噬细胞是 AS 斑块中最主要的炎性细胞,主要分布在易于破裂的斑块肩部和脂质核心附近,巨噬细胞自噬的程度时刻关系着 AS 进程及 AS 斑块的稳定性。PI3K 有 I, II, III 3 种亚型, I 型 PI3K 活化时,可以激活下游信号通路,阻断细胞自噬的进程; III 型 PI3K

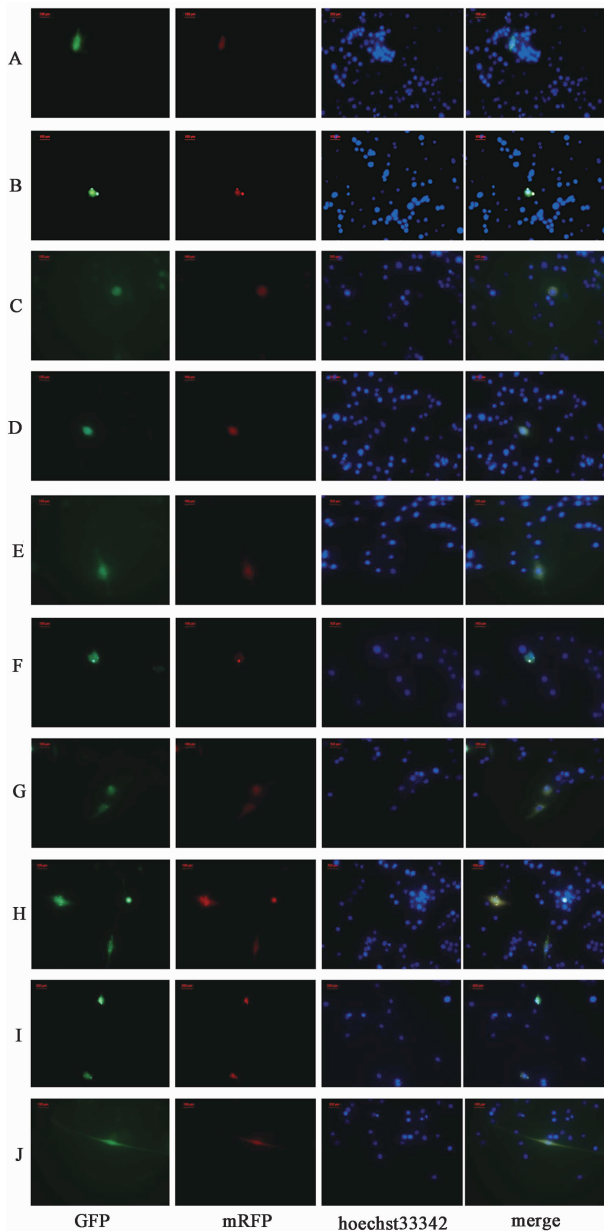


图 3 补阳还五汤对 RAW264.7 细胞 LC3, p62 和 Beclin-1 自噬流的影响(×400)

Fig. 3 Effect of Buyang Huanwu Tang on autophagic flow of LC3, p62 and Beclin-1 in RAW264.7 cells(×400)

活化时,可以激活 Beclin-1,促进细胞自噬的发生。3-MA 可以阻断 III 型 PI3K 活化,抑制自噬的发生。PI3K 下游信号分子 Akt,参与调节细胞增殖、迁移、凋亡等生物反应,调节有关基因的转录、翻译过程^[11]。活化后的 Akt 激活下游 mTOR 通路,阻断细胞自噬的发生。研究发现,自噬相关基因 5(ATG5)沉默或通过其他自噬介质抑制自噬时,凋亡和氧化应激增强,同时使泡沫细胞不能很好识别凋亡细胞,促进斑块坏死。ATG6(Beclin-1)是启动自噬的重要开关,通过与 III 型的 PI3K 形成复合物,调控自噬相

关基因,进而调控自噬的作用^[12]。哺乳动物细胞中微管轻链蛋白 3(LC3)定位于自噬泡与自噬泡膜表面,当细胞中未发生自噬现象时,LC3 经细胞内加工而形成 LC3-I;当细胞自噬启动时,LC3-I 转化为 LC3-II,结合到自噬体膜表面,因此 LC3-II/LC3-I 值可以作为检查自噬活性强弱的“指示器”^[13]。泛素结合蛋白-1 又名 p62,是一种自噬底物蛋白,当自噬发生时,细胞质中的 p62 结合相关泛素化蛋白,再与 LC3 结合形成复合物,由 LC3 介导进入自噬体中,最后在自噬溶酶体中完成降解^[14]。p62 与自噬的发生密切相关,也可作为评价自噬强弱的标准之一。本实验结果显示,补阳还五汤可以降低 LC3-II/LC3-I, p62 自噬标志蛋白的表达,减少自噬斑点的形成,降低自噬活性,通过调控 PI3K/Akt/mTOR 自噬通路,协同各通路抑制剂促进 p-Akt, p-PI3K, p-mTOR 的表达,抑制自噬的过度发生。

从中医角度分析自噬理论,细胞生理水平的自噬为阳,细胞的损伤、病理产物的堆积属阴,正常细胞在稳态下呈阴阳自和;刺激作用下,细胞自噬水平升高,细胞膜包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等自噬降解为细胞的生存提供新的物质和能量,发挥保护作用,即是阴阳由失衡逐渐趋于新的平衡的过程^[15]。适度的自噬是对细胞的一种保护形式,自噬不足可以导致代谢废物的堆积,过度则将导致凋亡的产生,阴阳自和遭到破坏。细胞自噬产生再次被细胞所利用的新的营养物质,与中医“精化气”和自我清除内生实邪相一致,气是活力很强的精微物质,气足则自噬功能正常推动精血津液的生成、输布和排泄,气虚则细胞生理活动减退,导致自噬过度或不足出现一系列病理变化,因此可以采用益气活血方药进行调治^[16]。补阳还五汤是经典的益气活血方剂,对心脑血管系统疾病的治疗有着积极的作用。本研究探究补阳还五汤抗 AS 的机制与巨噬细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路之间的联系,结果表明,补阳还五汤通过抑制巨噬细胞炎症反应,选择性阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,减少巨噬细胞自噬体的形成,抑制自噬的过度发生,从而发挥其抗 AS 斑块形成,稳定 AS 易损斑块的作用。

[参考文献]

[1] 张志鑫,李彦杰,秦合伟,等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控巨噬细胞自噬探讨黄芪甲苷抗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 中草药, 2017, 48(17): 3575-3581.

- [2] 王和峰,翟纯刚,庞文会,等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在巨噬细胞自噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(3):390-397.
- [3] 董雯,李保玉,屈园利,等. 补阳还五汤治疗脑梗死恢复期气虚血瘀证的 Meta 分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(6):580-585.
- [4] 刘玉晖,侯贝贝,游宇,等. 补阳还五汤稳定 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化易损斑块的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(15):112-119.
- [5] 杨琳,卢斌,庞晓丽,等. 基于 TGF- β_1 /Smad4 信号探讨缺氧条件下补阳还五汤促进新生血管成熟的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(3):114-119.
- [6] 刘志勇,游宇,刘玉晖,等. 补阳还五汤通过调节 MAPK 信号通路抗内皮细胞损伤的作用[J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(22):2098-2103.
- [7] 游宇,李林,侯贝贝,等. 补阳还五汤抗 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化作用与调控巨噬细胞自噬的机制研究[J]. 中药药理与临床,2018,34(4):2-6.
- [8] 吴伟烽,李翔,刁胜朋,等. 全反式维甲酸对兔颈动脉粥样硬化斑块中 TGF- β_1 、IL-10、MMP-2 和 MMP-9 表达的影响[J]. 药物评价研究,2018,41(9):1606-1610.
- [9] 郑冠琳. 巨噬细胞在 Irisin 抗动脉粥样硬化中的作用及相关机制研究[D]. 济南:山东大学,2018.
- [10] 密泗宇,周影,王静巧,等. 巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中作用的研究进展[J]. 基础医学与临床,2018,38(7):1020-1024.
- [11] Meijer A J, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12):2445-2462.
- [12] Mathew R, Karp C M, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62 [J]. Cell, 2009, 137(6):1062-1075.
- [13] Jacquin E, Stéphanie L M, Judon C, et al. Pharmacological modulators of autophagy activate a parallel noncanonical pathway driving unconventional LC3 lipidation[J]. Autophagy, 2017, 13(5):854-867.
- [14] Zaffagnini G, Savova A, Danieli A, et al. p62 filaments capture and present ubiquitinated cargos for autophagy [J]. EMBO J, 2018, 37(5):e98308.
- [15] 许继文,李金霞,张华敏. 中医药调控心血管疾病自噬研究进展[J]. 中国医药导报, 2018, 15(10):38-41.
- [16] 吕仕超,李艳阳,张军平. 中医药调控自噬防治心血管疾病的研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(9):2249-2250.

[责任编辑 周冰冰]