

· 基础研究 ·

基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨补肾抗衰片介导自噬调控动脉粥样硬化的机制

谢盈彧¹ 许晓敏¹ 张军平² 仲爱芹² 方子寒¹ 李艳阳¹ 熊鑫¹ 张宁¹ 辛颖¹

摘要 目的 观察补肾抗衰片对动脉粥样硬化(AS)和巨噬细胞自噬的影响并探讨其分子机制。**方法** 采用单纯高脂饮食喂养法建立 AS 兔模型。于 4 周末,24 只兔随机分为对照组、模型组、补肾抗衰片[1 g/(kg·d)]组及阿托伐他汀[5 mg/(kg·d)]组,每组 6 只,干预 8 周。检测血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 的水平;油红 O 染色观察动脉粥样硬化斑块形成情况,HE 染色观察血管内膜病理变化,计算内膜增生面积与中膜面积的比值;检测 LC3 II 蛋白、Beclin-1 蛋白表达水平。建立氧化低密度脂蛋白(100 μg/mL)诱导的巨噬细胞株 RAW264.7 自噬模型,分为模型组、补肾抗衰片组(10%含药血清)和雷帕霉素(10nmol/L)组,另设正常对照组。Western blot 技术检测各组细胞 LC3 II、p62、PI3K、p-Akt、p-mTOR 的蛋白表达水平。**结果** 在体研究结果显示,与模型组比较,阿托伐他汀组血清 TC、TG、LDL-C 水平降低($P < 0.01$),HDL-C 水平升高($P < 0.01$);阿托伐他汀组和补肾抗衰片组主动脉内中膜面积比值降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),主动脉 LC3 II 阳性面积百分比、Beclin-1 蛋白的表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。体外研究结果显示,与模型组比较,补肾抗衰片组和雷帕霉素组细胞 LC3 II/I 表达水平升高($P < 0.01$),p62、PI3K、p-Akt、p-mTOR 表达降低($P < 0.01$)。**结论** 补肾抗衰片能减轻 AS 病变程度,上调自噬水平,其机制可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,促进巨噬细胞自噬相关。

关键词 动脉粥样硬化;巨噬细胞自噬;补肾抗衰片;氧化低密度脂蛋白;PI3K/Akt/mTOR 通路

Mechanism of Bushen Kangshuai Tablet Interfere Autophagy of Atherosclerosis Based on PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway XIE Ying-yu¹, XU Xiao-min¹, ZHANG Jun-ping², ZHONG Ai-qin², FANG Zi-Han¹, LI Yan-yang¹, XIONG Xin¹, ZHANG Ning¹, and XIN Ying¹ 1 Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193); 2 Department of Cardiovascular Disease, First Teaching Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193)

ABSTRACT Objective To observe the effects of Bushen Kangshuai Tablet (BSKST) on atherosclerosis (AS) and macrophage autophagy, and to explore its possible molecular mechanism. **Methods** AS rabbit model was established by feeding the pure high-fat diet for 4 weeks, and the successful model rabbits were randomly divided into 4 groups, including normal control group, model group, BSKST [1 g/(kg·d)] group and atorvastatin calcium tablet (ACT, 5 mg/kg·d) group, 6 in each group. After 8 weeks intervention, levels of serum TC, TG, LDL-C and HDL-C were detected; the aortic plaque general formation of the aortic tissue was observed by Oil red O staining, and the pathological morphological changes were observed by HE staining, then to calculate the ratio of intima to media area. The protein of LC3 II and Beclin-1 expression were detected. The macrophage autophagy model was induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL, 100 μg/mL) in macrophage cell lines RAW264.7. The cells were divided into 4 groups, including normal control group, model group, BSKST group and rapamycin (10 nmol/L) group. The autophagy related proteins expression of LC3-II, p62, PI3K, phospho-mAkt (p-Akt) and

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81173244); 第二批国家“万人计划”百千万工程领军人才项目资助(No. 20160621)

作者单位: 1. 天津中医药大学研究生院(天津 300193); 2. 天津中医药大学第一附属医院心血管科(天津 300193)

通讯作者: 张军平, Tel: 022-27432016, E-mail: tjzhtcm@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180420.162

phospho-mTOR (p-TOR) were detected by Western blot. Results *In vivo* research, compared with model group, serum TC, TG and LDL-C level reduced in ACT group ($P < 0.01$), and HDL-C level was increased ($P < 0.01$). The ratio of intima to media area decreased in ACT group and BSKST group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Aortic autophagy related protein LC3 II and Beclin 1 expression increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, the expression of the autophagy-related protein LC3 II was increased and the expression of p62 PI3K, p-Akt, and p-mTOR were decreased in the BSKST intervention and rapamycin group ($P < 0.01$). Conclusion BSKST can reduce the degree of atherosclerosis. It promotes macrophage autophagy by increasing the level of autophagy protein and inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

KEYWORDS atherosclerosis; macrophages autophagy; Bushen Kangshuai Tablet; oxidized low density lipoprotein; PI3K/Akt/mTOR pathway

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种脂质代谢失衡性疾病,也是一种进程缓慢的、机制复杂的血管炎症性疾病。疾病产生初期由炎症反应激活造成了内皮细胞损伤,单核细胞粘附于受损内皮表面,并迁移到内皮下形成巨噬细胞,巨噬细胞吞噬修饰的脂质形成泡沫细胞。随着疾病继续发展,泡沫细胞等凋亡和坏死造成了坏死脂质核心、炎症反应激活、脂质代谢异常、细胞凋亡、内质网应激和自噬。

基础性或适度的自噬是 AS 斑块内细胞对抗氧化应激和炎症的重要保护方式,是 AS 斑块稳定性的一个重要决定因素,自噬不足或者自噬过度均会影响斑块的发生发展进程。Ox-LDL 在 AS 的发生发展中起重要作用,ox-LDL 被巨噬细胞表面的清道夫受体识别并吞噬,在细胞内转化为胆固醇酯储存在细胞脂滴中,形成泡沫细胞,过多的脂质在细胞中堆积会增强细胞的自噬水平。研究表明适度的细胞自噬通过降解细胞内受损的结构起到抑制 AS 的形成和发展的作用^[1]。

补肾抗衰老片是百岁国医大师阮士怡教授经验方,临床用于治疗 AS^[2]、冠心病疗效显著^[3,4],尤其在早期预防和延缓进展方面有着独特优势。前期实验研究表明,补肾抗衰老片具有抗炎、抗氧化、抗硝基化、保护内皮组织的作用,从而稳定 AS 斑块、阻抑动脉硬化进程^[5-8]。然而,补肾抗衰老片对于巨噬细胞自噬的调控,以及相关机制仍需进一步研究。基于以上认识,本研究以 AS 兔和巨噬细胞株作为研究对象,观察补肾抗衰老片对兔 AS 的影响,及对巨噬细胞株自噬的调控作用,并探讨其可能的作用机制。

材料与方法

1 实验动物与细胞 清洁级健康成年雄性新西兰大白兔 24 只,体重 (2.2 ± 0.2) kg,购自北京维通利华实

验动物技术有限公司(动物许可证号:SCXK 京 2010-0002)。小鼠 RAW264.7 巨噬细胞株购自国家实验细胞资源共享平台(China Infrastructure of Cell Line Resource),资源编号 3111C0001CCC000146。本研究通过天津中医药大学伦理委员会审批,审批号:TCM-LAE(20170041)。

2 主要药物 补肾抗衰老片(由丹参、何首乌、夏枯草、茯苓、海藻、龟板、石菖蒲、党参、菟丝子、桑寄生组成,0.5 g/片,天津中医药大学第一附属医院制剂,批号:071105);阿托伐他汀钙片(商品名:立普妥,20 mg/片,辉瑞制药有限公司生产,生产批号 75837030)。

3 试剂与仪器 氧化低密度脂蛋白(oxLDL,北京欣源佳和生物科技有限公司),雷帕霉素(Rapamycin,德国 Calbiochem 公司),Cell Counting Kit-8 (CCK8,日本同仁化学研究所),mRFP-GFP-LC3(柏礼生物医药科技有限公司),兔抗 LC3 多克隆抗体(美国 Abcam 公司),兔抗 P62 单克隆抗体(美国 Sigma 公司),兔抗 PI3K 单克隆抗体、兔抗 Akt 单克隆抗体、兔抗 p-Akt 单克隆抗体、兔抗 mTOR 单克隆抗体、兔抗 p-mTOR 单克隆抗体、兔抗 β -actin 多克隆抗体、兔抗 PCNA 多克隆抗体(武汉三鹰),HRP-goat anti-rabbit IgG(武汉博士德)。TC 测定试剂盒、TG 测定试剂盒、HDL-C 测定试剂盒、LDL-C 测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)。全自动生化分析仪(7020 型 ISE,日本日立公司)、激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)、二氧化碳恒温培养箱、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)等。

4 在体实验

4.1 造模、分组及干预方法 24 只雄性新西兰大白兔给予 1 周普通饮食适应期,采用随机数字表法随机分为 4 组,分别为对照组、模型组、阿托伐他汀组

及补肾抗衰片组,每组 6 只。对照组给予普通饲料喂饲 12 周,其余 3 组给予高脂饲料(组成:1.5%胆固醇 + 5%猪油 + 9%蛋黄粉 + 0.2%胆酸 + 84.3%普通饲料)喂饲 12 周。喂饲 4 周后,模型组给予生理盐水 3 mL 灌胃;补肾抗衰片组给予补肾抗衰片[1 g/(kg·d)]进行治疗,相当于人用量的 3.27 倍^[9],将补肾抗衰片溶于生理盐水 3 mL 中,灌胃给药,每日 2 次;阿托伐他汀组给予阿托伐他汀钙片[5 mg/(kg·d)]进行治疗,相当于人用量的 3.27 倍,将阿托伐他汀钙片溶于生理盐水 3 mL 中,灌胃给药,每日 1 次。第 12 周末,将各组实验兔取材,取材前禁食 12 h。从兔耳正中动脉采血,每只兔采血 3 mL,常温静止 2~4 h 后离心(3 000 r/min, 15 min),提取上清液, -80 ℃冻存待用。麻醉固定后迅速开胸暴露心脏,采取心脏血后,剪开一侧心耳,向心脏内注射生理盐水 500 mL 左右冲洗胸主动脉。无菌条件下获取胸主动脉并剥除外膜结缔组织及脂肪组织,分成两段,一段置于 10%中性福尔马林溶液中,一段用锡纸包好置于冻存管内, -80 ℃冰箱保存,备用。

4.2 血脂水平检测 检测兔血清中 TC、TG(酶比色法)、LDL-C 和 HDL-C(清除法)的水平。

4.3 油红 O 染色 胸主动脉血管组织石蜡切片脱蜡至水,经水洗后用异丙醇放置 5 min,吸去异丙醇溶液后,加入 0.5%油红 O/异丙醇溶液,染色 30 min;蒸馏水清洗 3 次;苏木素染色 5 min,盐酸乙醇分色,氨水返蓝;大体观察形态。在有脂质浸润的斑块处主动脉内膜呈橘红色染色,观察 AS 斑块形成情况。

4.4 HE 染色 主动脉用 10%中性福尔马林溶液固定 1~2 天,行梯度酒精脱水、浸蜡、常规石蜡包埋、切片(厚 5 μm),42 ℃水浴展片,37 ℃烤箱烘烤过夜,脱蜡至水,经水洗后,苏木素浸染 10 min,10%盐酸酒精分化 10 s,0.5%氨水返蓝,伊红浸染 3~5 min,行梯度酒精脱水,二甲苯透明后,中性树脂封片。按照常规苏木素-伊红(HE)染色方法进行染色。光学显微镜下观察血管内膜的病理变化。采用 Image-pro plus 6.0 System 病理图像分析系统对血管内膜增生面积、中膜面积进行测定,并计算它们的比值。将 HE 染色后的主动脉照片输入图像分析系统,用鼠标准确勾勒出动脉管壁的内腔以及内外弹力层的完整轮廓。每个目标血管各取 6 张切片,每张切片取 1 个血管环均测量 2 次取平均值,最后计算 6 个血管环所得的数据均值作为该标本的最终数值。计算参数如下:(1)内膜增生面积(cm^2) = 内弹力层围绕面积

- 血管环腔横截面积;(2)中膜面积(cm^2) = 外弹力层围绕面积 - 内弹力层围绕面积。

4.5 LC3 II 免疫组织化学染色 主动脉石蜡切片脱蜡至水;微波枸橼酸热修复;冷却至室温,0.01 mol PBS 洗 3 次,3%双氧水封闭;0.01 mol PBS 洗 3 次,5%兔血清封闭液封闭 45 min;滴加一抗,置于湿盒中 4 ℃过夜;4 ℃取出,复温 20 min;0.01 mol PBS 洗 3 次,滴加二抗,37 ℃孵育;PBS 洗 3 次,链霉卵白素工作液,37 ℃下孵育;PBS 洗 3 次,DAB 显色;苏木素复染,流水冲洗;分化液分化,流水下返蓝;中性树胶封片,显微镜下观察。每只动物选取 3 张切片,每张切片随机观察 5 个不同的高倍镜视野(10×40),用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理系统进行处理,以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性,计算 LC3 II 蛋白的表达面积,并计算所占整个标本面积的百分比。

4.6 Beclin-1 蛋白检测 提取主动脉组织蛋白,主动脉组织用蛋白裂解液充分研磨,冰上裂解 30 min,4 ℃离心 15 min,取上清。BCA 法进行蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳,恒定电流 200 mA,4 ℃转膜 2 h 至聚偏二氟乙烯膜(PVDF),5%脱脂牛奶 TBST 溶液封闭 1 h 后,分别加入一抗(1:1 000)4 ℃过夜,二抗(1:2 000)室温 1 h,ECL 化学发光试剂盒曝光,Image-J 软件进行图像灰度分析,所有目的蛋白灰度值与内参灰度值之比为所需结果。

5 体外实验

5.1 巨噬细胞自噬模型建立 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 常规培养于 10%胎牛血清 + 1%双抗的 DMEM 中,置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱培养。待细胞状态良好、贴壁紧,生长面积达 90%左右时分瓶传代。传代培养 3 次后取对数生长期的细胞用于实验。建立 oxLDL 诱导的巨噬细胞株 RAW264.7 自噬模型。经预实验,60 μg/mL 和 100 μg/mL 的 ox-LDL 均可诱导巨噬细胞自噬。在 6、12、24 h,自噬活性随时间增加,在 24 h 达到峰值,60 μg/mL ox-LDL 组的自噬溶酶体持续增加至 48 h,无法判断自噬强度减弱。在 48 h,100 μg/mL ox-LDL 组红色自噬溶酶体数目的增加减少,提示自噬体的融合,溶酶体被阻断。故选择 100 μg/mL 的 ox-LDL 干预巨噬细胞作为本研究的最佳建模条件。

5.2 补肾抗衰片浓度筛选 取指数生长期 RAW264.7,消化离心后计数,调整细胞悬液密度为 1×10^4 个/孔细胞,接种于 96 孔板,每孔 100 μL,每组均设定 6 个副孔,孵育 24 h 后更换培养基为无血清培

培养基。分别用 5%、10%、15%、20% 补肾抗衰片含药血清孵育细胞,每组 6 个复孔,孵育 24 h。各组培养液作用完成后,弃液,D-hank's 每孔 100 μ L 润洗 2 遍,每孔加入 100 μ L 10% CCK8 (CCK8: DMEM = 1:9),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,450 nm 酶标仪检测不同孔内 OD 值,检测细胞活力。与空白对照组比较,10% 含药血清促增殖作用最明显,故选用进行给药干预。

5.3 Western blot 检测蛋白表达 将自噬模型巨噬细胞分为模型组、补肾抗衰片组和雷帕霉素组,补肾抗衰片组给予 10% 含药血清,雷帕霉素组给予雷帕霉素 10 nmol/L,给予相应干预后,另设对照组。提取各组巨噬细胞的核蛋白和浆蛋白,具体操作参照凯基核蛋白提取试剂盒说明书。BCA 法进行蛋白定量,SDS-PAGE 电泳同前。

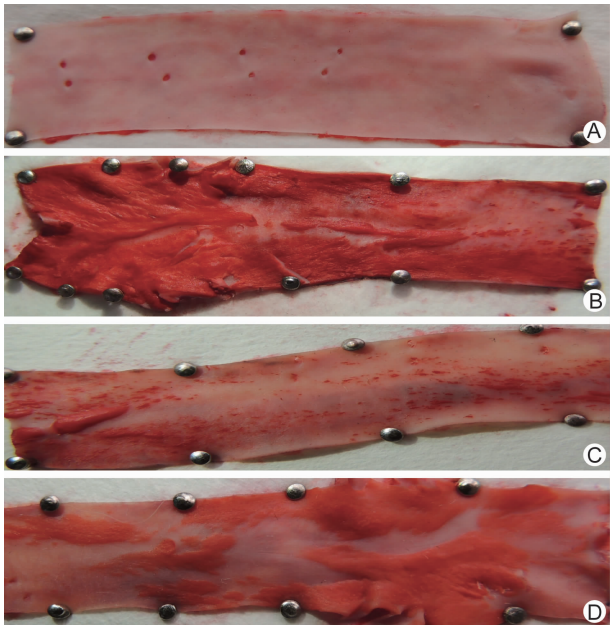
6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计与分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,变量间采用 Pearson 相关分析方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 体内实验结果

1.1 各组兔血脂水平比较(表 1) 与对照组比较,模型组兔血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平均升高($P < 0.01$);与模型组比较,阿托伐他汀组兔血清 TC、TG、LDL-C 水平降低($P < 0.01$),HDL-C 水平升高($P < 0.01$);补肾抗衰片组兔血清 TC、TG、LDL-C 水平降低,HDL-C 水平升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与补肾抗衰片组比较,阿托伐他汀组兔血清 TC、TG、LDL-C 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),HDL-C 水平升高($P < 0.05$)。

1.2 各组兔主动脉油红 O 染色结果比较(图 1) 对照组主动脉内膜均匀轻度红染,内膜光滑,无斑块及脂纹形成;模型组主动脉内膜大部分呈橘红色,明显油红沉积,说明形成大量斑块;阿托伐他汀组主动脉内膜散在的橘红色染色,有散在斑块;补肾抗衰片组内膜部分呈橘红色,有散在斑块。



注: A 为对照组;B 为模型组;C 为阿托伐他汀组;D 为补肾抗衰片组

图 1 各组兔主动脉油红 O 染色结果比较

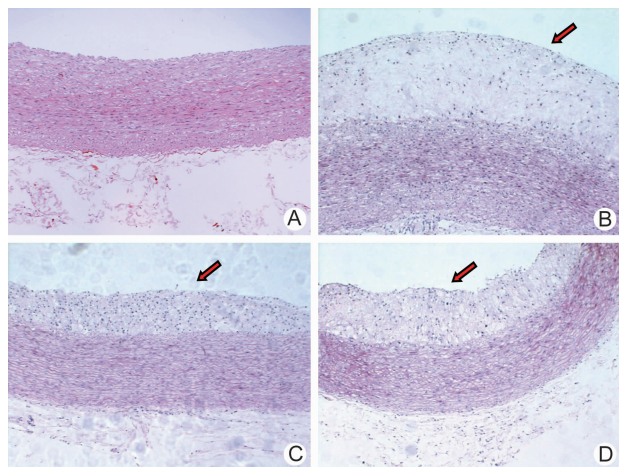
1.3 各组 HE 染色和内膜增生面积与中膜面积比值比较(图 2) 对照组兔主动脉管壁结构完整,管腔未见异常改变;内膜无增厚,内皮细胞完整连续、单层结构;中膜平滑肌细胞排列整齐,呈长椭圆形,外膜附有大量疏松结缔组织。模型组兔主动脉可见 AS 斑块病变,内膜、中膜明显增厚,内皮细胞部分缺失、不完整,内膜下层可见大量泡沫细胞;斑块下的中膜呈不同程度破坏,平滑肌细胞增殖并向内膜迁移。阿托伐他汀组兔主动脉内膜明显增厚,主动脉内膜增生的程度显著低于模型组,内膜下层存在少量的泡沫细胞及炎症细胞;中层平滑肌细胞排列较整齐,病理改变情况均较模型组减轻。补肾抗衰片组可见内膜增生明显,内膜下层有大量泡沫细胞及炎性细胞的浸润;中层平滑肌细胞排列较整齐,与模型组比较,病变程度减轻。

对照组、模型组、阿托伐他汀组、补肾抗衰片组内中膜面积比分别为 0.07 ± 0.02 、 1.82 ± 0.12 、 0.94 ± 0.09 、 1.52 ± 0.23 。与对照组比较,模型组主动脉内中膜面积比升高($P < 0.01$)。与模型组比较,阿托伐他汀组和补肾抗衰片组主动脉内中膜面积比值

表 1 各组兔血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC	TG	LDL-C	HDL-C
对照	6	1.45 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.11	0.39 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.11
模型	6	70.05 $\pm$ 2.52 *	10.26 $\pm$ 2.12 *	31.55 $\pm$ 1.95 *	2.70 $\pm$ 0.51 *
阿托伐他汀	6	44.04 $\pm$ 2.15 Δ ▲	5.51 $\pm$ 1.13 Δ ▲	13.40 $\pm$ 1.73 Δ ▲▲	5.70 $\pm$ 0.75 Δ ▲
补肾抗衰片	6	67.79 $\pm$ 2.89	9.74 $\pm$ 0.86	29.97 $\pm$ 2.23	3.30 $\pm$ 0.35

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与补肾抗衰片组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$



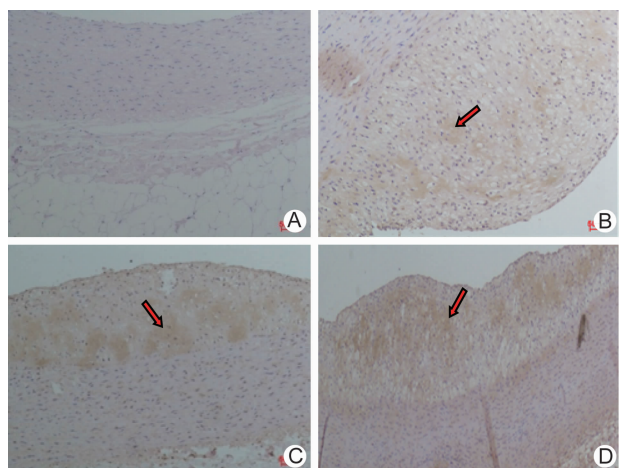
注: A 为对照组; B 为模型组; C 为阿托伐他汀组; D 为补肾抗衰片组; 箭头所指为内膜增生区域

图 2 各组兔主动脉 HE 染色结果比较 ($\times 100$)

降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 阿托伐他汀组和补肾抗衰片组主动脉内中膜面积比比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.4 各组 LC3 II 免疫组化染色结果比较(图 3) 对照组、模型组、阿托伐他汀组、补肾抗衰片组主动脉 LC3 II 阳性面积百分比为 0.00 ± 0.00 、 6.30 ± 0.89 、 8.72 ± 1.11 、 8.47 ± 1.73 。与对照组比较, 模型组主动脉 LC3 II 阳性面积百分比增大($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿托伐他汀组及补肾抗衰片组主动脉 LC3 II 阳性面积百分比增大($P < 0.05$)。

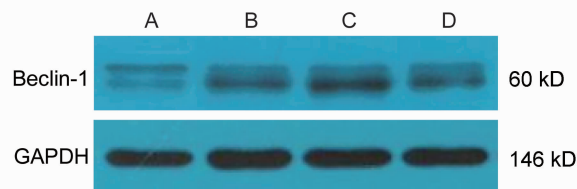
1.5 各组 Beclin-1 蛋白表达比较(图 4) 对照组、模型组、阿托伐他汀组、补肾抗衰片组 Beclin-1 蛋白表达分别为: 1.01 ± 0.05 、 1.22 ± 0.03 、 1.63 ± 0.17 、 1.43 ± 0.16 。与对照组比较, 模型组兔主动脉



注: A 为对照组; B 为模型组; C 为阿托伐他汀组; D 为补肾抗衰片组; 箭头所指为 LC3 II 阳性表达区域

图 3 各组兔主动脉 LC3 II 免疫组化染色 ($\times 100$)

Beclin-1 蛋白的表达升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 阿托伐他汀组和补肾抗衰片组兔主动脉 Beclin-1 蛋白的表达升高($P < 0.01$)。

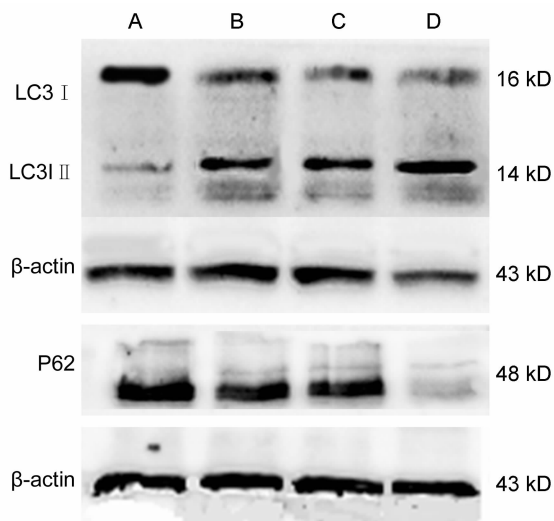


注: A 为对照组; B 为模型组; C 为阿托伐他汀组; D 为补肾抗衰片组

图 4 各组 Beclin-1 的蛋白电泳图

2 体外实验

2.1 各组 LC3 II/I 及 p62 表达(图 5) 正常对照组、模型组、补肾抗衰片组、雷帕霉素组 LC3 II/I 分别为: 0.37 ± 0.06 , 0.94 ± 0.16 , 1.46 ± 0.14 , 1.81 ± 0.09 ; p62 分别为 7.81 ± 0.62 , 5.77 ± 0.22 , 4.26 ± 0.34 , 2.40 ± 0.11 。与对照组比较, 模型组细胞 LC3 II/I 表达水平升高($P < 0.01$), p62 表达水平降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 补肾抗衰片组和雷帕霉素组细胞 LC3 II/I 表达水平升高($P < 0.01$), p62 表达水平均降低($P < 0.01$); 与补肾抗衰片组比较, 雷帕霉素组细胞 LC3 II/I 表达升高, p62 表达降低($P < 0.05$)。

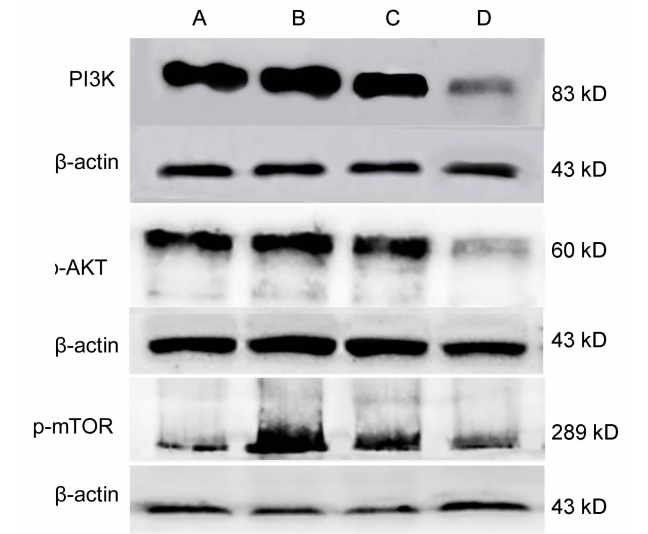


注: A 为对照组; B 为模型组; C 为补肾抗衰片组; D 为雷帕霉素组

图 5 自噬相关蛋白 LC3 II 和 p62 的蛋白电泳图

2.2 各组 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达比较(图 6, 表 2) 与对照组比较, 模型组细胞 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白的表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 补肾抗衰片组和雷帕霉素组细胞 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白的表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

0.01);与模型组比较,补肾抗衰片组与雷帕霉素组细胞 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);补肾抗衰片组与雷帕霉素组各蛋白表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为补肾抗衰片组;D 为雷帕霉素组

图 6 各组巨噬细胞内 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白电泳图

表 2 各组 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	PI3K	p-Akt	p-mTOR
对照	6	0.96 ± 0.21	0.93 ± 0.13	1.48 ± 0.09
模型	6	1.18 ± 0.08 *	1.17 ± 0.21 *	6.74 ± 0.68 **
补肾抗衰片	6	0.84 ± 0.08 $\Delta\Delta$	0.59 ± 0.12 $\Delta\Delta$	4.76 ± 0.88 Δ
雷帕霉素	6	0.67 ± 0.17 $\Delta\Delta$	0.44 ± 0.08 $\Delta\Delta$	3.45 ± 0.18 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

AS 是一个复杂的病理生理过程,是许多心脑血管疾病的病理基础。在治疗上,阮士怡教授强调整体观和辨证论治^[10],从脾肾立论^[11],结合多年的临床实践经验研制了具有益肾健脾、软坚散结功效的补肾抗衰片,其主要成分为:丹参、淫羊藿、石菖蒲、何首乌、夏枯草、龟板、海藻、茯苓、桑寄生、砂仁等。全方遵循“治病必求于本”和“正气存内,邪不可干”的原则,脾肾同补,同时针对疾病发生过程中产生的痰浊、瘀血等病理产物软坚散结、化瘀通络^[12]。

自噬是一种存在于哺乳动物中的高度进化的自我调节过程,是维持细胞稳态、适应各种环境变化的重要机制^[13]。在正常生理条件下,自噬在细胞内始终维持

在较低水平,但在 AS 的形成和发展过程中,自噬被持续激活,基础性或适度的自噬是 AS 斑块内细胞对抗氧化应激和炎症的重要保护方式,自噬不足或者自噬过度均会影响斑块的发生发展进程。AS 进程中自噬水平存在变化,自噬水平在 AS 的发生发展过程中持续增加到某一时间点达到峰值,而后逐渐降低^[14]。检测人动脉内膜切除手术取材的主动脉 AS 斑块,可见多种细胞的超微结构中都有自噬体存在,在巨噬细胞吞噬脂质后形成的泡沫细胞内脂滴及自噬体数目最多^[15]。此外,通过免疫组化定量检测人早期和晚期颈动脉 AS 斑块(动脉内膜切除手术取出)中的自噬情况得出,与早期斑块比较,人晚期斑块中自噬相关基因 ATG5 的表达量明显降低,自噬受体蛋白 p62 的表达量明显升高^[16],也说明随着 As 发病时间延长,自噬水平并非持续一直上升,而是在达到某一峰值后开始降低。

本研究在体实验观察到高脂饮食喂养的模型组动物,随时间推移逐渐地出现了 AS 疾病相关的症状,血脂水平明显升高,油红 O 染色与病理方面均观察到主动脉 AS 斑块形成。油红 O 染色显示主动脉内膜形成大量 AS 斑块,大量脂质沉积,内膜大部分呈橘红色染色;光镜下观察 HE 染色切片,结果显示动脉管壁内膜明显增厚,斑块内大量泡沫细胞以及巨噬细胞等炎性细胞浸润,证实造模成功。与模型组比较,补肾抗衰片组血清中 TC、TG、LDL-C 的水平有降低的趋势,HDL-C 水平有升高的趋势;提示补肾抗衰片不能明显降低 AS 兔的血脂水平,只能调节 AS 兔的血脂水平。主动脉内中膜面积比值能够反映内膜增生程度,与正常对照组相比,模型组主动脉内中膜面积比值升高,内膜增厚;与模型组相比,补肾抗衰片组主动脉内中膜面积比值降低,提示补肾抗衰片能够降低 AS 兔主动脉内膜的增生程度,发挥抑制 AS 发展的作用。

实验选择了两个重要的自噬相关分子 Beclin-1、LC3 II 作为检测 AS 兔主动脉血管壁中自噬发生情况的指标。Beclin-1 是细胞自噬相关基因 Atg6 的同源基因,定位于高尔基体上,通过与 PI3K 形成复合物来调控自噬小体的形成,在自噬的早期阶段发挥启动作用^[17]。一般用 Beclin-1 作为自噬启动阶段活化的标志分子,其表达增多可看作自噬增强的标志。LC3 II 是酵母自噬标志基因 Atg8 的同源基因,是自噬小体的稳定剂,是目前较为公认的自噬活动的标志,通过对 LC3 II 的检测可以判断自噬活动的程度。与正常对照组比较,模型组兔主动脉 LC3 II、Beclin-1 蛋白的表达上调;提示在 AS 兔模型主动脉血管壁中发生了自噬现象,即表明自噬参与了 AS 的发生发展。与模型

组比较,补肾抗衰片组 LC3 II、Beclin-1 蛋白的表达明显上调;补肾抗衰片可能是通过上调 AS 兔细胞自噬相关蛋白的表达,起到减轻 AS 兔模型病变程度,抗 AS 的作用。

进一步离体实验中,选择巨噬细胞为研究对象,以 ox-LDL 干预巨噬细胞,模拟 AS 脂质环境,检测巨噬细胞中自噬相关蛋白的变化,探讨补肾抗衰片对巨噬细胞自噬的调控作用。实验选择自噬相关分子 LC3 II/I 和 p62 作为检测自噬发生情况的指标。自噬的形成主要分为 4 个阶段,每个阶段都有特定的标志蛋白,Beclin-1 反映自噬的启动阶段、LC3 II 反映出自噬体的延伸^[18,19]、溶酶体标志蛋白 Cathepsin D 反映自噬体的成熟阶段^[20],p62 反映自噬体的降解^[21]。因为实验选取的干预时间是 24 h,已经到达了自噬的二、三、四阶段,所以不检测 Beclin-1。LC3 参与自噬的形成,胞浆型 LC3(即 LC3-I)会酶解掉一小段多肽,转变为自噬体膜型(即 LC3-II),LC3 II 升高代表自噬的启动,通过对检测 LC3 II/I 比值的检测可以判断自噬活动的程度。P62 是自噬发生的重要相关基因,是哺乳细胞自噬相关基因 Atg 6 的同源基因,通过自噬来降解,可以用来检测自噬的强弱状态。实验结果显示,ox-LDL 干预巨噬细胞可以使 LC3 II/I 蛋白的表达上调,p62 蛋白的表达下调,发生自噬现象。与模型组比较,补肾抗衰片组和雷帕霉素细胞 LC3 II/I 蛋白的表达明显上调,p62 蛋白的表达明显下调,提示补肾抗衰片可以进一步促进细胞自噬。PI3K/Akt/mTOR 信号通路在自噬过程中起到关键的调节作用。PI3K 激活下游分子 Akt,再通过大量的调节子最终造成其下游信号分子 mTOR 的磷酸化^[22],PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活后能够对细胞自噬进行调节^[23]。PI3K 是一个复杂的大家族,基于它的结构可以分为 3 类: class I、II、III。PI3K 被激活后在细胞膜上生成 PIP3,以它作为第二信使激活下游的蛋白,PIP3 与细胞内信号蛋白 Akt 和 PDK1 结合,促使 PDK1 磷酸化 Akt 蛋白的 Ser308 导致 Akt 的活化,活化的 Akt 通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、Caspase9、NF- κ B、GSK-3、FKHR、p21Cip1 和 p27 Kip1 等,进而调节细胞的增殖、分化、凋亡^[24]以及迁移等。mTOR 是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 PI3K/Akt 信号途径下游的一个重要效应分子。现已明确,mTOR 通路是多条信号通路的汇聚点,通过对上、下游信号的传导来影响细胞自噬,是调控自噬的关键环节。mTORC1 主要参与细胞生长、细胞凋亡、能量代谢和细胞自噬的调节,

mTORC2 参与细胞骨架蛋白的构建和存活^[25]。TOR 在信号转导通路中通过下游效应器同时控制翻译和转录的过程,TOR 可直接或间接影响 ATG 蛋白,影响自噬体的形成^[26]。本研究结果显示,与对照组比较,模型组 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白的表达升高;与模型组相比,补肾抗衰片组细胞 PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白的表达显著降低。说明补肾抗衰片可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活,促进巨噬细胞自噬。

但本研究存在一定不足,离体细胞实验中巨噬细胞研究并不能直接反应体内 AS 的情况,仍需在 AS 模型中进一步研究巨噬细胞自噬与其他细胞自噬的情况;另外,对于疾病不同时间点的自噬水平是如何变化的,以及过程中自噬具体的作用机制,需要在今后的研究中进一步探索。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Wang D, Fan Z, Liu F, et al. Hsa-miR-21 and Hsa-miR-29 in tissue as potential diagnostic and prognostic biomarkers for gastric cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(4): 1454-1462.
- [2] 周欢, 张军平. 阮士怡教授“益肾健脾、涤痰散结”法防治动脉粥样硬化理论探讨[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(10): 2400-2402.
- [3] 王丹, 李小妮, 邹煜, 等. 补肾抗衰片干预不稳定型心绞痛的临床疗效及其对血清炎症介质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14): 171-176.
- [4] 张光银, 张军平. 益肾健脾涤痰散结法治疗心脑血管疾病的机制研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(4): 734-745.
- [5] 张军平, 许颖智, 李明, 等. 补肾抗衰片对实验性动脉粥样硬化家兔的 NF- κ B 及炎症因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(9): 816-820.
- [6] 张军平, 许颖智, 李明, 等. 补肾抗衰片对动脉粥样硬化氧化应激状态的干预[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(4): 279-281.
- [7] 张光银, 李明, 许颖智, 等. 动脉粥样硬化家兔蛋白质硝基化修饰及补肾抗衰片干预研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9): 179-184.
- [8] 张光银, 李明, 许颖智, 等. 补肾抗衰片干预动脉粥样硬化的氧化应激机制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(5): 1083-1088.
- [9] 徐叔云主编. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 200-223.
- [10] 倪淑芳, 张军平. 阮士怡教授基于整体观辨治心血管疾病临床经验撷萃[J]. 天津中医药, 2010, 27(5): 356-357.

- [11] 谢盈晟, 张军平, 李明, 等. 阮士怡从脾肾立论治疗冠心病经验[J]. 中医杂志, 2016, 57(3): 193-195.
- [12] 王筠, 张军平. 动脉粥样硬化的中医分期论治初探[J]. 中医杂志, 2006, 47(7): 541-542.
- [13] Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response [J]. Molecular cell, 2010, 40(2): 280-293.
- [14] 王洪亮, 潘旭东, 马爱军, 等. Apo E^{-/-}小鼠颈总动脉粥样硬化不同阶段自噬水平的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(2): 109-114.
- [15] Perrotta I. The use of electron microscopy for the detection of autophagy in human atherosclerosis [J]. Micron, 2013, 50: 7-13.
- [16] Li W, Sultana N, Siraj N, et al. Autophagy dysfunction and regulatory cystatin C in macrophage death of atherosclerosis [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(9): 1664-1672.
- [17] Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex [J]. J Cell Biology, 2000, 150(6): 1507-1513.
- [18] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [19] Chifenti B, Locci MT, Lazzeri G, et al. Autophagy-related protein LC3 and Beclin-1 in the first trimester of pregnancy [J]. Clin Exp Reprod Med, 2013, 40(1): 33-37.
- [20] Gong F, Peng X, Sang Y, et al. Dichloroacetate induces protective autophagy in LoVo cells: involvement of cathepsin D/thioredoxin-like protein 1 and Akt-mTOR-mediated signaling [J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e913.
- [21] Song P, Li S, Wu H, et al. Parkin promotes proteasomal degradation of p62: implication of selective vulnerability of neuronal cells in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Protein cell, 2016, 7(2): 114-129.
- [22] Rodon J, Dienstmann R, Serra V, et al. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2013, 10(3): 143-153.
- [23] Rabinowitz JD, White E. Autophagy and Metabolism [J]. Science, 2010, 330(6009): 1344-1348.
- [24] Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation [J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 25-32.
- [25] Gurumurthy S, Xie SZ, Alagesan B, et al. The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival [J]. Nature, 2010, 468(7324): 659-663.
- [26] Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation [J]. Nature, 2000, 408: 488-492.

(收稿: 2017-09-28 在线: 2018-05-07)

责任编辑: 邱禹