

· 基础研究 ·

基于 HDAC6 介导的自噬 - 溶酶体途径探究温肾通督方对微血管内皮细胞吞噬髓鞘碎片的影响

吴承杰¹ 马 勇^{1,2} 郭 杨¹ 潘娅岚³ 刘孟敏² 涂鹏程¹ 杨光露¹ 杨一麟¹

摘要 **目的** 基于组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 6 介导的自噬 - 溶酶体途径, 探究温肾通督方影响微血管内皮细胞 (MECs) 吞噬髓鞘碎片的作用机制。**方法** 通过 CCK-8 法检测温肾通督方冻干粉干预后 MECs 的增殖状态, 筛选其最佳干预浓度; 构建体外类血管结构, 并建立髓鞘碎片与类血管结构共培养模型; 将实验分为空白组 (MECs)、模型组 (MECs 与髓鞘碎片共培养)、Tubastatin-A 组 (MECs 与髓鞘碎片共培养 + HDAC6 抑制剂 Tubastatin-A) 以及温肾通督方组 (MECs 与髓鞘碎片共培养 + 温肾通督方冻干粉), 通过免疫荧光染色法检测 MECs 吞噬髓鞘碎片的情况, 并利用激光共聚焦进行拍照分析; 通过 Western Blot 法检测 MECs 微管稳定系统 (HDAC6、Kinesin5、Dynein) 及自噬 - 溶酶体途径 (LC3 II / LC3 I、p62、Beclin1) 相关蛋白的表达。**结果** 免疫荧光结果表明, 与模型组比较, Tubastatin-A 组和温肾通督方组都可显著促进 MECs 吞噬髓鞘碎片 ($P < 0.05$)。Western Blot 结果表明, 与空白组比较, 模型组 HDAC6 的蛋白表达显著增高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, Tubastatin-A 组和温肾通督方组 HDAC6 的蛋白表达显著降低, 而 Kinesin5、Dynein、Beclin1、p-ULK1/ULK1 的蛋白表达显著增高 ($P < 0.05$); 与 Tubastatin-A 组比较, 温肾通督方组 HDAC6、Kinesin5、Dynein、LC3 II / LC3 I、Beclin1、p-ULK1/ULK1 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** MECs 吞噬髓鞘碎片会导致 HDAC6 的表达上调, 但并不会影响 MECs 微管稳定系统及自噬 - 溶酶体途径; Tubastatin-A 及温肾通督方均可通过抑制 HDAC6 的表达增强 MECs 微管系统的稳定, 进而激活自噬 - 溶酶体途径, 促进 MECs 吞噬髓鞘碎片。

关键词 脊髓损伤; 温肾通督方; 微血管内皮细胞; 组蛋白脱乙酰基酶, 自噬 - 溶酶体; 髓鞘碎片

Effects of Wenshen Tongdu Decoction on the Phagocytosis of Myelin Debris by Microvascular Endothelial Cells Based on HDAC6-mediated Autophagy-Lysosomal Pathway WU Cheng-jie¹, MA Yong^{1,2}, GUO Yang¹, PAN Ya-lan³, LIU Meng-min², TU Peng-cheng¹, YANG Guang-lu¹, and Yang Yi-lin¹
1 Laboratory of New Techniques of Restoration & Reconstruction, Institute of Traumatology & Orthopedics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023); 2 School of Chinese Medicine, School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023); 3 Laboratory of Chinese Medicine Nursing Intervention for Chronic Diseases, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023)

ABSTRACT Objective To observe the mechanism of Wenshen Tongdu Decoction (WSTDD) for affecting the phagocytosis of myelin debris by microvascular endothelial cells (MECs) based on the autophagy-lysosomal pathway mediated by histone deacetylase (HDAC) 6. **Methods** The CCK-8 method was used to detect the proliferation state of MECs after the intervention of WSTDD freeze-dried powder, and the optimal intervention concentration was screened. The *in vitro* vascular-like structure was constructed, and the co-culture model of

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81973885); 国家自然科学基金青年项目 (No.81704100); 南京中医药大学自然科学基金青年项目 (No.NZY81704100); 江苏高校优势学科 (中西医结合) 建设工程资助项目 (No. 苏政办发 [2018]87 号); 2020 年江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (No.KYCX20-1533)

作者单位: 1. 南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室 (南京 210023); 2. 南京中医药大学中医学部·中西医结合学院 (南京 210023); 3. 南京中医药大学慢性病中医护理干预实验室 (南京 210023)

通讯作者: 郭 杨, Tel: 029-85811654, E-mail: drguoyang@njucm.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjm.20220127.122

myelin debris and the vascular-like structure was established. The experiments were divided into the blank group (MECs), the model group (MECs co-cultured with myelin debris), Tubastatin-A group (MECs co-cultured with myelin debris+HDAC6 inhibitor Tubastatin-A), and WSTDD group (MECs co-cultured with myelin debris+WSTDD freeze-dried powder). The phagocytosis of myelin debris by MECs was detected by immunofluorescence staining, and photographed by confocal laser analysis. The expressions of related proteins of microtubule stabilization system (HDAC6, Kinesin5, Dynein) and autophagy-lysosomal pathway (LC3 II /LC3 I, p62, Beclin1) of MECs were detected by Western Blot. **Results** The results of immunofluorescence showed, compared with the model group, the phagocytosis of myelin debris by MECs could be significantly promoted in Tubastatin-A group and WSTDD group ($P<0.05$). Western Blot results showed that compared with the blank group, the protein expressions of HDAC6 in the model group significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the protein expression of HDAC6 significantly decreased ($P<0.05$), while the protein expressions of Kinesin5, Dynein, Beclin1, p-ULK1/ULK1 significantly increased ($P<0.05$) in Tubastatin-A group and WSTDD group. There were no significant differences in the expressions of HDAC6, Kinesin5, Dynein, LC3 II /LC3 I, Beclin1, and p-ULK1/ULK1 between WSTDD group and Tubastatin-A group ($P>0.05$). **Conclusions** The phagocytosis of myelin debris by MECs up-regulated the expression of HDAC6, but it did not affect the microtubule stabilization system and autophagy-lysosome pathway of MECs. Both Tubastatin-A and WSTDD enhanced the stability of MECs microtubule system by inhibiting the expression of HDAC6, thereby activating the autophagy-lysosome pathway and promoting the phagocytosis of myelin debris by MECs.

KEYWORDS spinal cord injury; Wenshen Tongdu Decoction; microvascular endothelial cell; histone deacetylase; autophagy-lysosome; myelin debris

脊髓损伤是一种中枢神经系统严重受损的疾病,具有高致残率且后期康复困难,亟待有效的治疗方法。脊髓急性损伤后神经元大量死亡并伴随髓鞘碎片的堆积,而髓鞘碎片长时间存在于损伤部位是后期功能恢复困难的重要原因,其中含有大量抑制轴突和髓鞘再生的分子^[1-2]。因此,从损伤部位清除髓鞘碎片对于脊髓损伤的修复至关重要。近期有研究发现,微血管内皮细胞(microvascular endothelial cells, MECs)是脊髓损伤初期参与髓鞘碎片吞噬的新细胞类型,通过免疫球蛋白调理素机制吞噬髓鞘碎片以及胞内自噬-溶酶体途径进行降解^[3]。组蛋白脱乙酰基酶(histone deacetylase, HDAC)参与染色质结构和基因表达的调控,而主要定位于细胞质中的HDAC6可以特异性催化非组蛋白底物(如 α -微管蛋白)的脱乙酰基作用,调节轴突运输、细胞迁移和血管生成等过程^[4-6]。越来越多的证据表明,HDAC6的药理抑制作用可有效恢复受损的 α -微管蛋白乙酰化,降解蛋白质聚集体或防止神经元氧化应激,从而改善各种神经退行性疾病模型^[7-9],这提示选择性抑制HDAC6可能成为神经系统疾病中有效的治疗介入。由此,笔者推测HDAC6可能是MECs吞噬髓鞘碎片过程中的关键环节,并设计了包含HDAC6的抑制剂组(Tubastatin-A)进行对照实验,以探究其中的具体机制。

本课题组将脊髓损伤的基本病机概括为督脉受损、脏腑受累,应治以“通督脉,调脏腑”,并据此构建了温肾通督方(脊髓康)。前期研究表明,温肾通督方(脊髓康)具有抗炎镇痛,减缓神经元凋亡,增强小胶质细胞吞噬功能,改善轴突生长微环境的作用^[10-13],但其机制研究不够清晰。由此,本实验通过观察温肾通督方对MECs吞噬髓鞘碎片的影响并探究其干预HDAC6调控自噬-溶酶体途径的具体机制。

材料与方法

1 细胞 小鼠脑 MECs (bEND.3) 购自 Procell Life Science&Technology Co., Ltd. (货号:CL-0598), 扩增后冻存储备。

2 动物 10只6~8周龄雌性C57BL/6小鼠,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司[合格证编号:No.202126160;许可证号SYXK(苏)2018-0008],实验经南京中医药大学动物伦理委员会批准(No.202107A007)。

3 主要试剂及仪器 胎牛血清(货号:04-001-1ACS)、DMEM高糖培养基(货号:06-1055-57-1ACS)、青霉素/链霉素(货号:03-031-1B)均购自以色列Bioind; CFSE(货号:FMS-CF-500)、CCK8检测试剂盒(货号:FMS-AP-003)均购自南京福麦斯生物技术有限公司;

CD31 (货号: AF6191)、 β -actin (货号: AF7018) 均购自美国 Affinity; Dynein (货号: ab171964)、KIF5B (货号: ab167429) 均购自美国 ABCam; Acetyl- α -Tubulin (货号: #5335, 美国 CST); LC3B (货号: 18725-1-AP)、HDAC6 (货号: 16167-1-AP)、 α -Tubulin (货号: 11224-1-AP)、p62/SQSTM1 (货号: 18420-1-AP)、Phospho-ULK1 (货号: 80218-1-RR)、ULK1 (货号: 20986-1-AP)、Beclin1 (货号: 11306-1-AP)、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit (货号: SA00001-2) 均购自美国 Proteintech; 基质胶 (货号: 356234), 美国 Corning。

冷冻干燥机 (FreeZone, 美国 Labconco); EYELA 旋转蒸发仪 (N-1200B, 上海爱朗仪器有限公司); 激光共聚焦倒置荧光显微镜 (Eclipse Ti, 日本 NIKON); 二氧化碳培养箱 (HERAcell 150i, 美国 Thermo); 大容量高速冷冻离心机 (5810R, 德国 Eppendorf); 多功能酶标仪 (Enspire, 美国 Perkin Elmer); 蛋白湿转仪及 WB 设备 (221BR, 美国 Bio-Bad)。

4 药物 Tubastatin-A (货号: 1252003-15-8, 上海源叶生物科技有限公司); 温肾通督方 (脊髓康) 为临床经验方 (已获得国家发明专利: ZL200910026193.7), 由生黄芪、丹参、川芎、赤芍、当归、水蛭、蜈蚣等中药组成, 购自江苏省中医院, 称取单倍处方量药材, 加 10 倍水量, 常规煎煮, 滤液浓缩至每毫升含 1.25 g 生药, 低温真空冻干至恒重, 精密称定质量备用。

5 实验分组 实验共分为 4 组, 分别为空白组 (MECs)、模型组 (MECs 与髓鞘碎片共培养)、Tubastatin-A 组 (MECs 与髓鞘碎片共培养 + 40 μ mol/L Tubastatin-A) 以及温肾通督方组 (MECs 与髓鞘碎片共培养 + 100 μ g/mL 温肾通督方冻干粉)。

6 MECs 的培养 收到常温细胞后用 75% 的酒精擦拭瓶身, 置于培养箱中静置培养 2~4 h。吸弃旧培养基, 用 PBS 润洗后加入 0.25% 的胰酶, 消化后用加入完全培养基 (DMEM+10% FBS+1% 双抗) 终止消化, 将细胞吹打下来后 4 $^{\circ}$ C, 1 000 r/min 离心 5 min。将细胞重悬后按 1:3 进行传代培养。

7 体外类血管结构的构建 将基质胶冰上解冻后分装, 吸取适量的基质胶均匀平铺于冷却的 24 孔板爬片上, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱孵育 30 min。将培养的 MECs 用 0.25% 的胰酶消化, 重悬计数后以每孔 5×10^4 的细胞量接种于基质胶上, 于细胞培养箱中培养 24 h 后形成类血管结构。

8 髓鞘碎片的制备 取 10 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠脱颈处死, 75% 的酒精消毒后剪开头部, 用镊子取出大脑组织置于预冷的 0.32 mol/L 蔗糖溶液。将其切成约 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 的小块, 用玻璃匀浆器匀浆后加入 0.32 mol/L 蔗糖溶液进行稀释。在超高速离心管中先加入等量的 0.85 mol/L 蔗糖溶液, 将稀释液缓慢加于其液面上, 总体积不超过 26 mL。于超高速离心机中 4 $^{\circ}$ C, 25 000 r/min, 45 min (ACC:9; DEC:9) 离心, 收集两种蔗糖溶液之间的粗制髓鞘碎片。将粗制髓鞘碎片置于 Tris-HCl 溶液, 冰上打成匀浆后 4 $^{\circ}$ C, 25 000 r/min, 60 min (ACC:9; DEC:9) 离心。弃上清后重悬于 Tris-HCl 溶液, 再次匀浆后分成两个超速离心管配平后 4 $^{\circ}$ C, 25 000 r/min, 60 min (ACC:9; DEC:9) 离心, 分装于 1.5 mL 的离心管, 于 4 $^{\circ}$ C, 25 000 r/min, 10 min 离心。弃掉上清, 称重后将髓鞘碎片按照 100 mg/mL 分装于 1.5 mL 离心管, 储存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

9 CCK-8 法检测细胞增殖状态 取生长状态良好的 MECs, 消化后重悬计数, 以每孔 3 000 个 / 100 μ L 接种至 96 孔板内, 在培养箱内预培养 24 h。向培养板中分别加入 0~200 μ g/mL 不同浓度的温肾通督方冻干粉, 培养 24 h 后每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液 (避免产生气泡), 静置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h, 多功能酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

10 髓鞘碎片与类血管结构共培养 取出髓鞘碎片后经过 10 次 25 G/1 mL 的注射器混匀, 用 50 μ mol/L 的 CFSE 标记髓鞘碎片, 充分混匀后置于培养箱 15 min, 加入含 100 mmol/L 甘氨酸的 PBS 重悬髓鞘碎片, 细胞培养箱孵育 5 min 后 4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min 离心 15 min。用 PBS 重悬髓鞘碎片后 4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min 离心 15 min 两次, 重悬髓鞘碎片至 100 mg/mL, 并避光保存。将髓鞘碎片与类血管结构分组共培养 72 h。

11 免疫荧光染色检测 MECs 的吞噬情况 髓鞘碎片与类血管结构共培养后吸弃培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。以 4% 多聚甲醛固定 10 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。以 0.2% Triton-100 通透 10 min, 并用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。以 5% 山羊血清室温封闭 60 min, 加入一抗 CD31 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入二抗 (Alexa 594 羊抗兔), 室温避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。Dapi 复染后

PBS 洗涤, 加入防荧光淬灭剂后激光共聚焦显微镜下观察拍照。

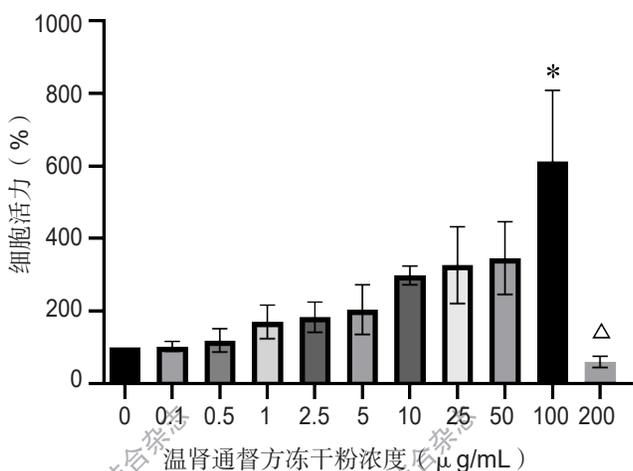
12 Western Blot 法检测 MECs 相关蛋白的表达 使用 RIPA (含 1%PMSF) 裂解液将干预后的 MECs 裂解, 用细胞刷将细胞层刮下, 置于冰上裂解 30 min 后 4 °C, 12 000 r/min, 离心 30 min。蛋白定量后配平加 buffer, 沸水煮 10 min 后冷却保存于 -20 °C 待测。使用预制胶进行电泳, 160 V 恒压电泳 40 min, 使用 PVDF 膜 400 mA 转 30 min, 5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h, 按说明书比例配制 β-actin、HDAC6、Acetyl-α-Tubulin/α-Tubulin、Kinesin5、Dynein、LC3 II /LC3 I、p62、p-ULK1/ULK1、Beclin1 抗体, 4 °C 过夜孵育。次日按 1:10 000 比例配制二抗, 室温孵育 2 h。滴加 ECL 显影液, 凝胶成像系统显影, 利用 Image J 图像分析系统分析条带。

13 统计学方法 所有数据分析由 SPSS 19.0 统计软件完成, 所有检测数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 不同浓度温肾通督方冻干粉对 MECs 增殖的影响 (图 1) CCK8 检测结果表明, 浓度在 0~100 μg/mL 的温肾通督方冻干粉对 MECs 具有一定的增殖作用, 且 100 μg/mL 的温肾通督方冻干粉促增殖作用最佳。当浓度达到 200 μg/mL 时, 温肾通督方冻干粉则具有一定的毒性。因此, 选用 100 μg/mL 的温肾通督方冻干粉进行以下实验。

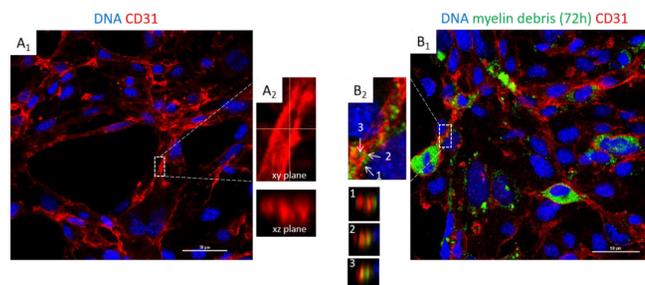
2 体外类血管结构的构建及共培养结果 (图 2)



注: 与 0 μg/mL 的温肾通督方冻干粉比较, * $P < 0.05$; 与 100 μg/mL 的温肾通督方冻干粉比较, [△] $P < 0.05$; $n = 3$

图 1 不同浓度温肾通督方冻干粉对 MECs 增殖的影响

激光共聚焦检测结果显示, MECs 排列成中空血管样, 表明成功构建类血管结构 (图 2 A1、A2)。将标记 CFSE 的髓鞘碎片与类血管结构共培养 72 h, 结果显示 MECs 胞内存在大量的髓鞘碎片, 且能检测到髓鞘碎片动态进入胞内的过程, 表明 MECs 具有吞噬髓鞘碎片的功能 (图 2 B1、B2)。



注: A1: 细胞核染色为蓝色, CD31 染色为红色; A2: 为 A1 图的局部放大, 分为 x-y 轴及 x-z 轴, 展现类血管的 3D 结构; B1: 细胞核染色为蓝色, 髓鞘碎片为绿色, CD31 染色为红色; B2: 为 B1 图的局部放大, 分为 x-y 轴及 x-z 轴; 其中箭头 1 提示髓鞘碎片正在靠近 MECs, 箭头 2 提示髓鞘碎片刚与 MECs 接触, 箭头 3 提示髓鞘碎片进入 MECs 胞内

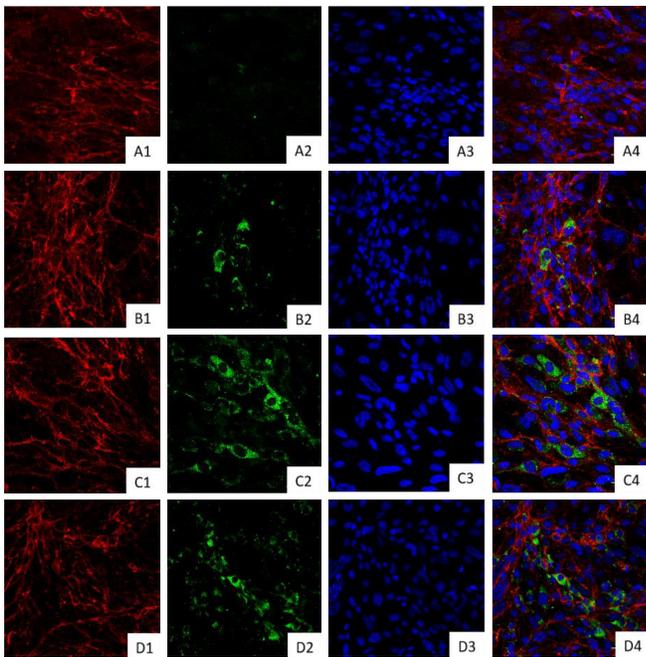
图 2 体外类血管结构的构建及共培养结果

3 各组 MECs 吞噬髓鞘碎片作用的比较 (图 3, 表 1) 免疫荧光结果表明, 与模型组比较, Tubastatin-A 组和温肾通督方组都可显著促进 MECs 吞噬髓鞘碎片 ($P < 0.05$); 温肾通督方组与 Tubastatin-A 组具有类似的促吞噬作用, 但作用效果温肾通督方组不及 Tubastatin-A 组 ($P < 0.05$)。

4 各组 MECs 吞噬髓鞘碎片后微管系统相关蛋白表达的比较 (图 4, 表 2) 与空白组比较, 模型组 HDAC6、Acetyl-α-Tubulin/α-Tubulin 的表达显著增高 ($P < 0.05$), 而 Kinesin5、Dynein 的表达无明显差异 ($P > 0.05$); 与模型组比较, Tubastatin-A 组和温肾通督方组 HDAC6 的表达显著降低 ($P < 0.05$), 而 Kinesin5、Dynein 的表达显著增高 ($P < 0.05$), Tubastatin-A 组 Acetyl-α-Tubulin/α-Tubulin 的表达显著增高 ($P < 0.05$); 与 Tubastatin-A 组比较, 温肾通督方组 HDAC6、Kinesin5、Dynein 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

5 各组 MECs 吞噬髓鞘碎片后自噬-溶酶体途径相关蛋白表达的比较 (图 5, 表 3) 与空白组比较, 模型组 LC3 II /LC3 I、p62、Beclin1、p-ULK1/ULK1 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与模型组比较, Tubastatin-A 组和温肾通督方组 Beclin1、p-ULK1/ULK1 的表达显著增高 ($P < 0.05$), 温肾通督方组 p62 表达显著增高, LC3 II /LC3 I 表

达明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Tubastatin-A 组比较, 温肾通督方组 p62 的表达显著



注: A 为空白组, B 为模型组, C 为 Tubastatin-A 组, D 为温肾通督方组; 1 代表 CD31 染色为红色, 2 代表髓鞘碎片 (CFSE) 染色为绿色, 3 代表 DAPI 染色为蓝色, 4 代表 Merge 为合图

图 3 各组 MECs 吞噬髓鞘碎片的免疫荧光检测结果

表 1 各组髓鞘碎片的相对荧光面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	髓鞘碎片的相对荧光面积
空白	3	1.00 ± 0.42
模型	3	13.74 ± 1.29*
Tubastatin-A	3	22.81 ± 1.20 [△]
温肾通督方	3	17.27 ± 0.54 ^{△△}

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与 Tubastatin-A 组比较, ^{△△} $P < 0.05$

表 2 4 组 HDAC6、Kinesin5、Dynein、Acetyl- α -Tubulin 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

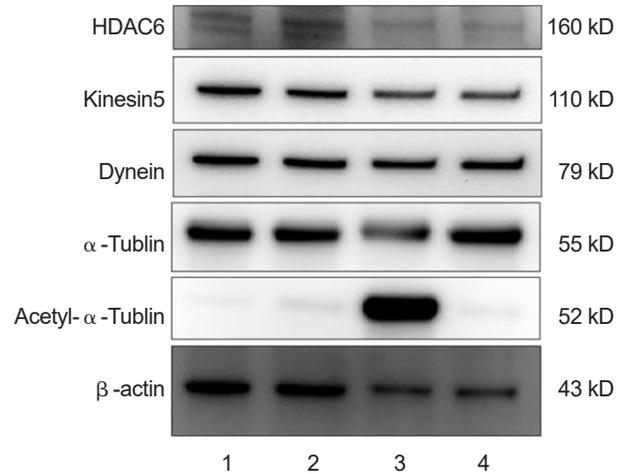
组别	n	HDAC6	Kinesin5	Dynein	Acetyl- α -Tubulin / α -Tubulin
空白	3	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01
模型	3	1.39 ± 0.01*	0.83 ± 0.10	0.87 ± 0.10	2.83 ± 0.08*
Tubastatin-A	3	1.08 ± 0.06 [△]	1.22 ± 0.05 [△]	1.48 ± 0.06 [△]	72.83 ± 0.82 [△]
温肾通督方	3	1.02 ± 0.08 [△]	1.26 ± 0.12 [△]	1.74 ± 0.16 [△]	1.83 ± 0.11 [△]

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与 Tubastatin-A 组比较, [△] $P < 0.05$

表 3 4 组 p-ULK1、Beclin1、p62、LC3 II 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

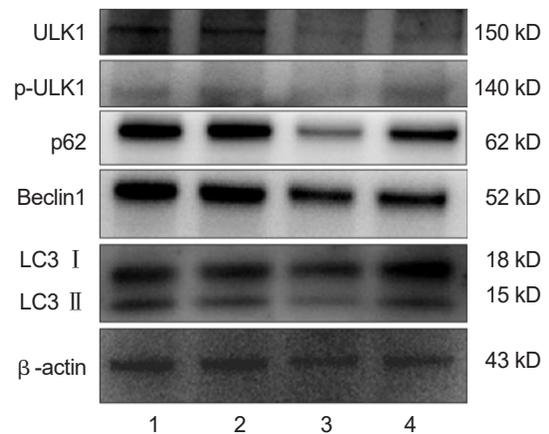
组别	n	p-ULK1/ULK1	Beclin1	p62	LC3 II / LC3 I
空白	3	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01
模型	3	1.13 ± 0.06	0.96 ± 0.11	0.97 ± 0.11	0.88 ± 0.06
Tubastatin-A	3	1.48 ± 0.06*	1.40 ± 0.06*	0.86 ± 0.04	0.73 ± 0.11
温肾通督方	3	1.44 ± 0.07*	1.64 ± 0.15*	1.64 ± 0.15 [△]	0.65 ± 0.11*

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与 Tubastatin-A 组比较, [△] $P < 0.05$



注: 1 为空白组, 2 为模型组, 3 为 Tubastatin-A 组, 4 为温肾通督方组

图 4 各组 MECs 吞噬髓鞘碎片后微管系统相关蛋白的表达情况



注: 1 为空白组, 2 为模型组, 3 为 Tubastatin-A 组, 4 为温肾通督方组

图 5 各组 MECs 吞噬髓鞘碎片后自噬-溶酶体途径相关蛋白的表达情况

增高 ($P < 0.05$), 而 LC3 II /LC3 I、Beclin1、p-ULK1/ULK1 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

脊髓损伤是常见的中枢神经系统脱髓鞘疾病, 髓鞘的脱失及碎片残留会严重阻碍神经功能的修复。在中枢神经系统中髓鞘是由少突胶质细胞形成的髓磷脂, 呈同心圆状包裹轴突, 形成管状样外膜, 而在周围神经系统中髓鞘则是由施旺细胞形成的髓磷脂^[14]。有研究表明, 髓鞘碎片在脊髓损伤后短期内产生, 主要被骨髓来源的巨噬细胞、小胶质细胞等吞噬^[15]。然而, 巨噬细胞、小胶质细胞等短时间内不会被募集到损伤局部, 进而限制了髓鞘碎片的吞噬^[16, 17]。近期有研究发现, MECs 具有吞噬髓鞘碎片的功能, 可能在脊髓损伤早期发挥重要作用, 其吞噬机制与自噬-溶酶体途径相关^[3], 但具体机制仍不清晰。据报道, 受损神经元中 HDAC6 的表达显著上调, 而抑制 HDAC6 可促进神经元的存活及再生^[18]。Zheng Z 等^[19]也发现, 脊髓损伤后受伤部位周围 HDAC6 的表达显著升高, 增强了微管蛋白的脱乙酰作用, 从而影响微管稳定系统的功能, 并导致自噬-溶酶体沿微管系统运输障碍。由此, 笔者推测 MECs 吞噬髓鞘碎片的机制可能与 HDAC6 介导的自噬-溶酶体途径有关。

《灵枢·寒热病》曰:“身有所伤, 血出多, 若有所堕坠, 四肢懈惰不收, 名曰体惰”^[20]。此句所描述的病因及症状类似于脊髓损伤, 其中“体惰”是有关脊髓损伤病名的最早记载。《难经·二十八难》曰:“督脉者, 起于下极之命, 并于脊里, 上至风府, 入属于脑”^[21]。其所述督脉之结构与脊髓走向相似, 脊髓损伤与督脉受损存在一定关联。脊髓损伤可能造成部分肢体的痿废不用, 而机体由细胞构成, 损伤局部的细胞骨架亦会受损, 可见督脉受损与微管稳定化受损可能关系密切。课题组以健脾温肾、化痰通督为治法构建了温肾通督方(脊髓康), 近十多年的临床应用验证了其疗效显著^[12]。温肾通督方(脊髓康)中黄芪大补元气、气旺则血行, 为君药; 茯苓、泽泻、车前子健脾利水, 肉苁蓉、淫羊藿温补肾阳, 赤芍、丹参、当归、川芎祛瘀通督, 皆为臣药; 大黄、枳实、厚朴行气导滞, 虻虫、水蛭逐瘀通经, 益智仁温脾暖肾, 皆为佐药; 蜈蚣通络止痛, 引药达脊柱、四肢, 为使药, 全方共奏健脾温肾、化痰通督之功。前期基础研究表明, 温肾通督方具有促进小胶质细胞吞噬髓鞘碎片的作用^[10, 22]。由此, 笔者推测温肾通督方也可能

影响 MECs 吞噬的作用, 作用机制可能与 HDAC6 介导的自噬-溶酶体途径有关。

首先通过 CCK8 法筛选出温肾通督方冻干粉的最佳干预浓度 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 并构建了体外类血管结构及与髓鞘碎片共培养模型。激光共聚焦检测结果表明 MECs 具有吞噬髓鞘碎片的作用, 与 Zhou T 等^[3]研究结果相符。接着用 Tubastatin-A、温肾通督方冻干粉分别干预共培养模型, 发现 Tubastatin-A 和温肾通督方皆可促进 MECs 吞噬髓鞘碎片, 但温肾通督方的促进作用不及 Tubastatin-A。可见, 抑制 HDAC6 在 MECs 吞噬髓鞘碎片过程中起到关键作用, 而温肾通督方中可能也存在抑制 HDAC6 的有效成分。

为深入探究其具体机制, 笔者进行了微管稳定系统相关蛋白 (HDAC6、Kinesin5、Dynein、Acetyl- α -Tubulin/ α -Tubulin) 的检测, Western Blot 结果表明 MECs 吞噬髓鞘碎片会导致 HDAC6 的表达上调, 而 α -Tubulin 的乙酰化程度居然也被上调 (一般认为 α -Tubulin 的去乙酰化会破坏微管的稳定), 驱动蛋白 Kinesin5 和动力蛋白 Dynein 的表达 (与微管结合而起运输作用) 则无明显改变。可见, HDAC6 的表达上调并未破坏 MECs 的微管稳定系统, 可能 α -微管蛋白 N-乙酰基转移酶 1 与 HDAC6 的作用保持了平衡等。此外, 在共培养模型中使用 Tubastatin-A 干预后, HDAC6 的表达下调, 而且温肾通督方也表现出类似抑制的作用。对应的 Tubastatin-A 组 Kinesin5 和 Dynein 的表达以及 α -Tubulin 的乙酰化程度显著上调, 而温肾通督方组仅有 Kinesin5 和 Dynein 的表达与 Tubastatin-A 组类似, α -Tubulin 的乙酰化程度并未有明显变化。笔者推测 HDAC6 可能有亚型, 且对其他蛋白具有脱乙酰化作用 (如 p62 蛋白等^[23])。综上, MECs 吞噬髓鞘碎片会导致 HDAC6 的表达上调, 但并不会影响微管稳定系统; 抑制 HDAC6 可促进微管系统的稳定, Tubastatin-A 促进 MECs 吞噬髓鞘碎片的机制可能与此有关; 温肾通督方可抑制 HDAC6, 进而促进微管运输蛋白的表达, 但不会影响微管稳定系统。

有研究表明, MECs 吞噬髓鞘碎片需经自噬-溶酶体途径进行降解^[3]。笔者通过 Western Blot 检测自噬-溶酶体途径相关蛋白 (LC3 II /LC3 I、p62、Beclin1、p-ULK1/ULK1), 其结果表明, MECs 吞噬髓鞘碎片后自噬-溶酶体途径保持稳定状态 (自噬上游相关蛋白 p-ULK1、Beclin1 和自噬结构蛋白 LC3 II /LC3 I 和 p62 的表达未见明显差异)。此

外,在共培养模型中使用 Tubastatin-A 干预后,自噬上游相关蛋白 p-ULK1、Beclin1 的表达上调,而自噬结构蛋白 LC3 II / LC3 I 和 p62 的表达未见明显差异,提示抑制 HDAC6 可激活 MECs 的自噬-溶酶体途径。在使用温肾通督方干预后,自噬上游相关蛋白 p-ULK1、Beclin1 的表达上调,这类似于 Tubastatin-A 作用效果,但自噬结构蛋白 LC3 II / LC3 I 和 p62 的表达趋势不一致。温肾通督方组 LC3 II / LC3 I 的表达下调,而 p62 的表达却显著上调。p62/SQSTM1 是一种具有泛素结合功能的蛋白,参与细胞代谢、自噬与蛋白降解和抗氧化反应等,其功能异常与神经系统病变、肿瘤、代谢性疾病等多种疾病有关^[24-26]。作为重要的选择性自噬结合蛋白,p62 可通过泛素结合区域、LC3 互相作用区域及 PB1 结构域将泛素化蛋白送入自噬溶酶体中降解。有研究表明,乙酰化可以明显增强 p62 对泛素的亲和力,从而促进 p62 体的形成及泛素化蛋白的清除,而 HDAC6 是靶向 K420 和 K435 的 p62 的脱乙酰基酶^[27]。Caccamo A 等^[28]研究发现,通过上调 p62 蛋白的表达可增强 p62 蛋白介导的自噬途径,进而改善痴呆模型小鼠的认知功能。联系到前面的实验结果,笔者认为温肾通督方抑制 HDAC6 后可能增加了 p62 的乙酰化程度,促进对髓鞘碎片的摄取,进而通过自噬-溶酶体途径降解。

根据以上分析,发现 MECs 吞噬髓鞘碎片会导致 HDAC6 的表达上调,但并不会影响微管稳定系统及自噬-溶酶体途径;Tubastatin-A 通过抑制 HDAC6 的表达增强微管系统的稳定,进而激活自噬-溶酶体途径,促进 MECs 吞噬髓鞘碎片;温肾通督方可能通过抑制 HDAC6 激活自噬-溶酶体途径促进 MECs 吞噬髓鞘碎片,但具体机制仍需进一步实验研究。此外,本实验未检测髓鞘碎片刺激 MECs 后炎症因子及纤维化因子的表达,这是脊髓损伤后继发性损伤的关键因素,需要进一步探索。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Kotter MR, Li WW, Zhao C, et al. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation[J]. J Neurosci, 2006, 26 (1): 328-332.
- [2] Syed YA, Zhao C, Mahad D, et al. Antibody-mediated neutralization of myelin-associated EphrinB3 accelerates CNS remyelination[J]. Acta Neuropathol, 2016, 131 (2): 281-298.
- [3] Zhou T, Zheng Y, Sun L, et al. Microvascular endothelial cells engulf myelin debris and promote macrophage recruitment and fibrosis after neural injury[J]. Nat Neurosci, 2019, 22 (3): 421-435.
- [4] Authement ME, Kodangattil JN, Gouty S, et al. Histone deacetylase inhibition rescues maternal deprivation-induced GABAergic metaplasticity through restoration of AKAP signaling[J]. Neuron, 2015, 86 (5): 1240-1252.
- [5] Wang G, Shi Y, Jiang X, et al. HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3 β /PTEN/Akt axis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112 (9): 2853-2858.
- [6] Kaluza D, Kroll J, Gesierich S, et al. Class II b HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin[J]. EMBO J, 2011, 30 (20): 4142-4156.
- [7] Guo W, Naujock M, Fumagalli L, et al. HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients[J]. Nat Commun, 2017, 8 (1): 861.
- [8] Prior R, Van Helleputte L, Klingl YE, et al. HDAC6 as a potential therapeutic target for peripheral nerve disorders[J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22 (12): 993-1007.
- [9] Schulz R, Marchenko ND, Holembowski L, et al. Inhibiting the HSP90 chaperone destabilizes macrophage migration inhibitory factor and thereby inhibits breast tumor progression[J]. J Exp Med, 2012, 209 (2): 275-289.
- [10] 潘娅岚,郭杨,周龙云,等.脊髓康对共培养体系中小胶质细胞吞噬及损伤神经元再生的影响[J].中国免疫学杂志,2017,33(11):1652-1657.
- [11] Guo Y, Ma Y, Pan YL, et al. Jisuikang, a Chinese herbal formula, increases neurotrophic factor expression and promotes the recovery of neurological function after spinal cord injury[J]. Neural Regen Res, 2017, 12 (9): 1519-1528.
- [12] 马勇,吴毛,王建伟.脊髓康治疗脊髓损伤 28 例[J].辽宁中医杂志,2004,(4):309.

- [13] 吴承杰, 郭杨, 马勇, 等. 脊髓康对脊髓损伤小鼠小胶质细胞活化及组蛋白乙酰化水平的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32 (4): 790–794.
- [14] 周添. 微血管内皮细胞影响脱髓鞘疾病发展的机理研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2019.
- [15] Napoli I, Neumann H. Protective effects of microglia in multiple sclerosis[J]. *Exp Neurol*, 2010, 225 (1): 24–28.
- [16] Wang X, Cao K, Sun X, et al. Macrophages in spinal cord injury: phenotypic and functional change from exposure to myelin debris[J]. *Glia*, 2015, 63 (4): 635–651.
- [17] Guo L, Rolfe AJ, Wang X, et al. Rescuing macrophage normal function in spinal cord injury with embryonic stem cell conditioned media[J]. *Mol Brain*, 2016, 9 (1): 48.
- [18] Rivieccio MA, Brochier C, Willis DE, et al. HDAC6 is a target for protection and regeneration following injury in the nervous system[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (46): 19599–19604.
- [19] Zheng Z, Zhou Y, Ye L, et al. Histone deacetylase 6 inhibition restores autophagic flux to promote functional recovery after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2020, 324: 113138.
- [20] 张登本译. 黄帝内经·灵枢 [M]. 北京: 新世界出版社, 2008: 217–220.
- [21] 刘源, 吴潜智校注. 难经 [M]. 四川: 四川科技出版社, 2008: 43–45.
- [22] 苑文超, 王磊, 马勇, 等. 中药复方脊髓康对小胶质细胞吞噬神经元碎片作用的影响 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33 (20): 3359–3363.
- [23] Yan J, Seibenhener ML, Calderilla-Barbosa L, et al. SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (9): e76016.
- [24] Liu WJ, Ye L, Huang WF, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2016, 21: 29.
- [25] Bitto A, Lerner CA, Nacarelli T, et al. p62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease[J]. *Age (Dordr)*, 2014, 36 (3): 9626.
- [26] 王圆圆, 朱明伟, 王鲁宁, 等. p62 蛋白在常见神经变性病中的表达观察 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2019, 19 (8): 573–580.
- [27] You Z, Jiang WX, Qin LY, et al. Requirement for p62 acetylation in the aggregation of ubiquitylated proteins under nutrient stress[J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 5792.
- [28] Caccamo A, Ferreira E, Branca C, et al. p62 improves AD-like pathology by increasing autophagy[J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22 (6): 865–873.

(收稿: 2021–09–18 在线: 2022–02–24)

责任编辑: 段碧芳
英文责编: 张晶晶

Chinese Journal of Integrative Medicine (《中国结合医学杂志》)

2020 年 SCI 影响因子为 1.978

2021 年 6 月 29 日, 科睿唯安公布 2020 年 *Journal Citation Reports*, *Chinese Journal of Integrative Medicine* (CJIM, 《中国结合医学杂志》英文版) 影响因子为 1.978。

Chinese Journal of Integrative Medicine 创办于 1995 年, 2007 年被 SCI 收录。杂志由中国中医科学院和中国中西医结合学会主办, 国家中医药管理局主管, 主编为陈可冀院士。本刊 2012—2020 年连续被中国知网评选为最具国际影响力学术期刊之一。2019 年入选中国科技期刊卓越行动计划。

期刊以创办国际化期刊为目标, 不断促进结合医学发展为己任, 欢迎大家积极向我刊投稿、赐稿。在今后的工作中, 我们将力争为广大读者、作者提供更好服务!