

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

张志鑫, 李彦杰, 秦合伟, 任 锐, 邢若星, 韩 磊

河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院), 河南 郑州 450002

摘要: **目的** 观察黄芪甲苷对磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路的调控, 研究黄芪甲苷抗动脉粥样硬化的作用机制。**方法** 体外细胞实验中, 将小鼠巨噬细胞 RAW264.7 随机分为 5 组, 即对照组、黄芪甲苷组、康士得组、雷帕霉素组以及 siRNA 组。分别用黄芪甲苷含药血清、Akt 抑制剂康士得、mTOR 抑制剂雷帕霉素及 mTOR-siRNA 体外处理 RAW264.7 细胞 48 h, 透射电镜观察巨噬细胞自噬体的变化, 免疫荧光法及 Western blotting 法检测微管相关蛋白 LC3-II 表达, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blotting 法检测 Akt、mTOR 及自噬相关蛋白 Beclin 1 的表达, ELISA 检测 RAW264.7 细胞分泌炎症因子白细胞介素-4 (IL-4)、IL-10、IL-2 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 水平。体内实验采用 HE 染色检测各组小鼠主动脉横截面病理损伤程度; qRT-PCR 和 Western blotting 法分别检测小鼠主动脉组织中 Akt、mTOR 的 mRNA 和蛋白表达。**结果** 体外实验结果显示, 与对照组比较, 黄芪甲苷含药血清组和各抑制剂组细胞透射电镜下观察到自噬体明显增多 ($P < 0.05$), LC3-II 和 Beclin1 蛋白的表达水平明显上调 ($P < 0.05$), 而 Akt 及 mTOR 的 mRNA 及蛋白表达水平明显减少 ($P < 0.05$), 巨噬细胞分泌的 IL-10 明显降低, 而分泌的 IFN- γ 显著增加 ($P < 0.05$)。小鼠主动脉 HE 染色结果显示, 与模型组比较, 黄芪甲苷组小鼠血管各层结构正常, 排列整齐, 局部有小灶性的钙化颗粒沉积, 病变轻、斑块小, 泡沫细胞和脂质减少, 弹力板基本完整, 病变程度明显较轻, 并较各抑制剂组轻。黄芪甲苷组小鼠主动脉组织 Akt、mTOR 的 mRNA 和蛋白表达均较低 ($P < 0.05$)。**结论** 黄芪甲苷抑制动脉粥样硬化斑块的形成机制与调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路、抑制炎症反应有关。

关键词: 黄芪甲苷; PI3K/Akt/mTOR; 巨噬细胞; 自噬; 抗动脉粥样硬化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)17-3575-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.019

Mechanism of anti-atherosclerosis of astragaloside IV based on regulation of macrophage autophagy by PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

ZHANG Zhi-xin, LI Yan-jie, QIN He-wei, REN Kun, XING Ruo-xing, HAN Lei

Henan Province Chinese Medicine (Second Affiliated Hospital of Henan College), Zhengzhou 450002, China

Abstract: **Objective** To study the mechanism of anti-atherosclerosis of astragaloside IV by observing the regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Methods** In the *in vitro* experiments, macrophages were randomly divided into control group, astragaloside IV group, Kangshide group, rapamycin group and siRNA group. The changes of autophagy of macrophages were observed by transmission electron microscopy (TEM) after 48 h of mouse RAW264.7 macrophages *in vitro* treated by astragaloside IV-containing serum, Akt inhibitor Kangshide, mTOR inhibitor rapamycin and mTOR-siRNA. The expression of Akt, mTOR and autophagy-associated protein Beclin 1 was detected by real-time quantitative RT-PCR and Western blotting. The expression of Beclin 1 was detected by immunofluorescence and Western blotting. IL-4, IL-10, IL-2, and IFN- γ in RAW264.7 cells were detected by ELISA. In the *in vivo* experiments, the pathological changes of aorta were detected by HE staining. The expression of Akt, mTOR mRNA and protein in aorta of mice was detected by qRT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** *In vitro* experimental results showed that compared with control group, the autophagus of astragaloside IV-containing serum group and each inhibitor group was significantly increased under the TEM ($P < 0.05$). The expression levels of LC3-II and Beclin1 were significantly up-regulated ($P < 0.05$). The expression of Akt and mTOR mRNA and protein was significantly decreased ($P < 0.05$). The secretion of IL-10 was significantly decreased and the

收稿日期: 2017-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573739); 河南省中医药科学研究专项课题 (2016ZY2097)

作者简介: 张志鑫 (1980—), 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向为脑血管疾病的中西医治疗与康复。E-mail: zhangzhixin0371@126.com

secretion of IFN- γ was significantly increased ($P < 0.05$). HE staining results showed that, compared with the model group, the blood vessels of astragalus membranaceus group were normal, arranged neatly, with small focal calcification of the granules. The lesions were mild, the patches were small, the foam cells and the lipids were reduced, the elastic plates were basically complete. The degree of lesion was significantly lighter and lighter than that of the inhibitor groups. The expression of Akt, mTOR mRNA and protein were significantly lower in the aorta of astragaloside IV group ($P < 0.05$). **Conclusion** Astragaloside IV inhibition of atherosclerotic plaque formation mechanism and regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, inhibition of inflammatory response.

Key words: astragaloside IV; PI3K/Akt/mTOR; macrophage; autophagy; anti-atherosclerosis

动脉粥样硬化 (athrosclerosis, AS) 是缺血性心脑血管疾病的基本病理基础, 一般认为, 脂质代谢紊乱、血液流变学异常和炎症反应是促使 AS 斑块形成的危险因素^[1]。新近研究发现, AS 斑块中的巨噬细胞是斑块炎症反应的关键因素, 斑块中巨噬细胞的变化与细胞的自噬关系密切, 自噬参与了 AS 的发生、发展过程, 激活的巨噬细胞参与了血管的重构和斑块的失稳定^[2]。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) 信号通路是 AS 形成的重要信号传导通路, PI3K/Akt/mTOR 信号传导通路的激活在自噬中发挥关键的调节作用, 通过药物对该信号通路进行选择性的抑制能够有效抑制 AS 的进程^[3]。黄芪在中国传统医学中尤其是在心血管疾病治疗中应用广泛, 其化学成分主要包括苷类、多糖、氨基酸、微量元素等, 是一种天然的抗氧化剂。黄芪甲苷是从黄芪中提取分离的单体化合物, 目前, 对黄芪甲苷在治疗心血管疾病方面进行了多项研究, 并取得了一定的进展^[4-5], 黄芪甲苷具有改善脂质代谢紊乱、抑制主动脉粥样斑块基质细胞衍生因子 (SDF-1) 及其受体 CXCR4 的 mRNA 和蛋白表达, 以及抑制骨髓源性内皮祖细胞 CXCR4 基因和蛋白表达的作用^[6]。本实验通过观察黄芪甲苷对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的调控, 探索黄芪甲苷抗 AS 的作用机制, 为其在心脑血管疾病中的应用提供实验依据。

1 材料

1.1 实验细胞与动物

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自中国科学院上海生命科学研究所; SD 大鼠 20 只, 雄性, 体质量 (300 $\pm$ 20) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK (沪) 2003-0003。C57BL/6J 小鼠 12 只, ApoE^{-/-}小鼠 48 只, SPF 级, 8 周龄, 体质量 (18 $\pm$ 2) g, 雄性, 购自南京大学模式动物研究所, 动物许可证号 SCXK (苏) 2010-0001。所有动物饲养于河南中医药大学 SPF 级动物实验中

心, (22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 恒温、60%~75%恒湿、12 h 循环照明, 自由摄食、饮水。

1.2 药物与试剂

黄芪甲苷原料药 (质量分数大于 98%, 批号 84687-43-4, 南京春秋生物工程有限公司); 口服雷帕霉素 (质量分数 98%, 批号 IH-0519, 上海中康伟业生物科技有限公司); 细胞干预雷帕霉素 (质量分数大于 99%, 批号 HY-10235) 购自美国 Sigma 公司; 康士得片剂 (批号 H20100390) 购自阿斯利康制药有限公司; 细胞干预康士得 (质量分数大于 99%, 批号 1001580659) 购自 Sigma 公司。

荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; RNA 逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司; 蛋白提取试剂盒购自碧云天公司; 抗体 p-mTOR、mTOR、p-Akt、Akt、LC3-II 和 GAPDH 均购自 Cell Signaling 公司; 抗体 RAM-11 购自 Dako 公司; 二抗 (羊抗小鼠 IG-HRP), 武汉博士德生物工程有限公司; mTOR-siRNA 购自广州瑞博生物科技有限公司; 白细胞介素-4 (IL-4)、IL-10、IL-2 和 γ 干扰素 (IFN- γ) 检测所需 ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司。

1.3 仪器

Finesse325 石蜡切片机, 美国 Thermo 公司; TP1020 全自动脱水机, Feica 公司; PHY-III 病理组织漂烘仪, 常州市中威电子仪器有限公司; DMR+0550 型图像分析仪, 德国 Leica 公司; Y-FL078077 落射荧光显微镜, 日本尼康公司生产; 蛋白电泳系统, 美国 Bio-Rad 公司; BB5060 CO2 培养箱, Thermo 公司; XSP-17C 倒置生物显微镜, 上海长方光学仪器有限公司; PCR 基因扩增仪, Bio-Rad 公司; Icyler IQ 荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司。ImageQuant LAS 4000mini 超灵敏化学发光成像仪, 广州倍立思仪器有限公司。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 黄芪甲苷含药血清的制备 将 20 只 SD 大鼠随机分为 2 组, 即对照组和黄芪甲苷组。对照组 ig

蒸馏水, 黄芪甲苷组 ig 黄芪甲苷 40 mg/kg (按照动物与人体每千克体重剂量折算系数表计算^[7]), 连续给药 1 周。1 周后, 腹主动脉取血, 12 000×g 高速离心, 取上清液, 56 °C 灭活, -80 °C 保存备用。

2.1.2 细胞培养及分组 取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 稀释成 1×10^5 /mL 单细胞悬液, 接种到 96 孔培养板, 每孔 0.1 mL, 每组设 5 个复孔。用 RPMI 1640 培养基常规培养 24 h, 随机分为对照组 (10%空白血清)、黄芪甲苷组 (10%含药血清)、康士得组 (康士得 20 μ mol/L)、雷帕霉素组 (雷帕霉素 10 nmol/L) 以及 siRNA 组 (mTOR-siRNA 30 nmol/L)。药物处理 48 h 后, 透射电镜观察各组巨噬细胞自噬体的变化。

2.1.3 免疫荧光检测细胞 LC3-II 蛋白表达 按照“2.1.2”项下方法处理细胞, 取出细胞爬片放到 35 mm 细胞培养皿中, PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min; 用 4%多聚甲醛固定爬片 15 min, PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min; 0.2%Triton X-100 室温通透 20 min; PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min, 吸水纸吸干 PBS, 在玻片上滴加正常山羊血清, 室温封闭 30 min; 吸水纸吸掉封闭液, 每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗并放入湿盒, 4°C 孵育过夜; 加荧光二抗, PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min, 吸水纸吸干爬片上多余液体后滴加稀释好的荧光二抗, 湿盒中室温孵育 1 h, PBS

浸洗切片 3 次, 每次 3 min。滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 对标本进行染核, PBS 洗去多余的 DAPI; 用吸水纸吸干爬片上的液体, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 在荧光显微镜下观察采集图像。

2.1.4 Western blotting 检测 RAW264.7 细胞中 Akt、mTOR、p-Akt、p-mTOR、LC3-II 蛋白的表达 收集“2.1.2”项下细胞, PBS 洗涤 3 次, 用试剂盒提取蛋白后, 采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。6%~15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳, 蛋白分离后恒定电流 200 mA 转膜至 PVDF 膜上。室温下 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 用相应的一抗 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 洗涤后换 HRP 标记二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h。洗涤后采用化学发光试剂盒在 GE ImageQuant LAS 4000mini 超灵敏化学发光成像仪显影, 使用 Image J 的软件分析条带灰度值^[8]。

2.1.5 qRT-PCR 检测 Akt、mTOR 和 Beclin1 的 mRNA 表达 收集“2.1.2”项下细胞, 分离提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 采用 SYBR Green 进行 qRT-PCR 反应; 反应参数: 95 °C、30 s, 1 个循环; 95 °C、5 s, 55 °C、10 s, 40 个循环^[8], 样本中目的基因的计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。GAPDH 为内参, 引物序列见表 1。

2.1.6 RAW264.7 细胞分泌炎症因子测定 取“2.1.2”项下细胞上清液, 用酶联免疫吸附实验测定

表 1 Akt、mTOR 和 Beclin1 的引物序列
Table 1 Primer sequences of Akt, mTOR, and Beclin1

基因	正向引物	反向引物
Akt	5'-ACTCGCCACTCTCGACTCAAG-3'	5'-GACGGTGCCCGAGGCCAGAC-3'
mTOR	5'-CACTTCGCGAGAACAAGTCT-3'	5'-GCTGCTCGGTA TCCATGGCTG-3'
Beclin1	5'-GTGCACCCTCGAGCGGCTCTG-3'	5'-CAGTTGCCAGTCGTCGAGGTCA-3'
GAPDH	5'-AGCTCGCTGTGAGCTGCTGAC-3'	5'-TGACACATGTATTACAGTCTG-3'

IL-4、IL-10、IL-2 和 IFN- γ 的水平。严格按照 ELISA 试剂盒说明操作, IL-4、IL-10、IFN- γ 和 IL-2 的可测范围分别为 4~500、30~4 000、15~2 000 和 2~200 ng/L, 重复 3 次实验, 各组上清液标本平行检测 3 次^[8]。

2.2 体内实验

2.2.1 造模与给药 所有小鼠适应性饲养 1 周, C57BL/6J 小鼠 12 只作为对照组, ApoE^{-/-}小鼠给予高脂饲料 (含脂肪 21%、胆固醇 0.15%); 各组均予以自由饮水。饲养 4 周造模成功 (主动脉壁可见明

显的斑块形成) 后将 48 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、黄芪甲苷组、康士得组、雷帕霉素组, 每组 12 只。对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 其余各组分别 ig 黄芪甲苷 (40 mg/kg, 按中等剂量, 1 倍成人临床等效量)、康士得 (1.0 mg/kg, 1 倍成人临床等效量)、雷帕霉素 (0.5 mg/kg, 1 倍成人临床等效量), 每日给药 1 次, 持续给药 4 周。

2.2.2 样品采集与处理 动物处死前禁食 12 h, 经眼眶采血, 分离血清。脱颈椎处死, 分离主动脉, 用 10%多聚甲醛固定 6 h, 经脱水、透明、浸蜡、

石蜡包埋处理后切片。

2.2.3 病理形态学观察 将主动脉经 10% 甲醛缓冲液固定, 75% 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 厚度为 4 μm , 常规苏木素-伊红 (HE) 染色, 光学显微镜观察。

2.2.4 qRT-PCR 检测各组小鼠主动脉 mTOR、Akt 基因表达水平 将小鼠主动脉组织称取质量后, 加入适量的 Trizol, 按试剂盒说明书提取总 RNA。逆转录得到 cDNA。以 cDNA 为模板, PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 40 个循环; 79 $^{\circ}\text{C}$ 测荧光; 55 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$, 每个循环加 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 检测熔解曲线^[8]。样本中目的基因的计算方法为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。GAPDH 为内参, 引物序列见表 1。

2.2.5 Western blotting 检测各组小鼠主动脉 mTOR、Akt 蛋白表达水平 取小鼠主动脉, PBS 冲洗 3 次, 洗去残血, 磨碎匀浆后加入蛋白裂解液裂解蛋白, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 200 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清液, 用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白定量后, 加入适量上样缓冲液, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 使蛋白质变性, 于 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 用恒定电流转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭, 加入相应一抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次。加入二抗 (1:5 000), 室温孵育, TBST 洗涤 3 次。用碱磷酶化学发光进行显色, 观察 PI3K、Akt

蛋白表达的变化, 以 GAPDH 为内参^[2]。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 透射电镜观察超微结构

RAW264.7 细胞经药物处理 48 h 后, 透射电镜观察各组细胞自噬体的变化。与对照组比较, 黄芪甲苷组、康士得组、雷帕霉素组及 siRNA 组的自噬体均显著增加, 见图 1。

3.2 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞 LC3-II 蛋白表达的影响

免疫荧光结果显示, 与对照组相比, 黄芪甲苷组、康士得组、雷帕霉素组及 siRNA 组的微管相关蛋白 LC3-II 的表达均增加, 结果见图 2。

3.3 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞 Akt、mTOR、p-Akt、p-mTOR 及 LC3-II 蛋白表达的影响

与对照组相比, 黄芪甲苷组、康士得组、雷帕霉素组及 siRNA 组的微管相关蛋白 LC3-II 表达均显著增加 ($P < 0.05$), 而 p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达均显著减少 ($P < 0.05$); Akt 蛋白表达均未见显著差异; mTOR 蛋白表达在黄芪甲苷组和 siRNA 组显著减少 ($P < 0.05$), 而在康士得组和雷帕霉素组未见显著差异。结果见表 2 和图 3。

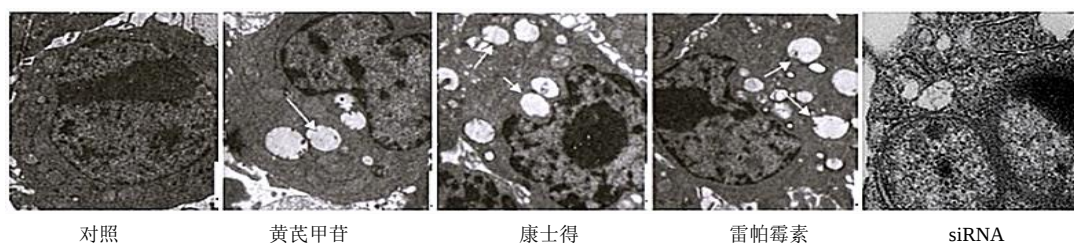


图 1 透射电镜观察各组 RAW264.7 细胞超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of RAW264.7 cells in each group observed by TEM

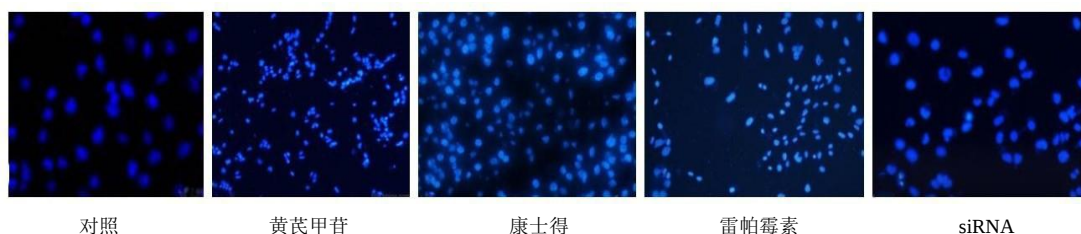


图 2 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞 LC3-II 蛋白表达的影响 (免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 2 Effects of astragaloside IV on expression of LC3-II protein in RAW264.7 cells (immunofluorescence, $\times 200$)

表 2 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞 Akt、mTOR、p-Akt、p-mTOR 及 LC3-II 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of astragaloside IV on expression of Akt, mTOR, p-Akt, p-mTOR, and LC3-II proteins in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	相对表达量				
	LC3-II	p-Akt	Akt	mTOR	p-mTOR
对照	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
黄芪甲苷	2.98±0.72*	0.56±0.07*	0.96±0.14	0.27±0.18*	0.52±0.14*
康士得	2.32±0.55*	0.37±0.06*	1.07±0.16	1.09±0.48	0.37±0.16*
雷帕霉素	2.85±0.72*	0.44±0.07*	0.94±0.17	1.14±0.37	0.28±0.08*
siRNA	2.93±0.63*	0.48±0.08*	1.03±0.27	0.24±0.16*	0.27±0.07*

与对照组比较: * $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs control group, same as below

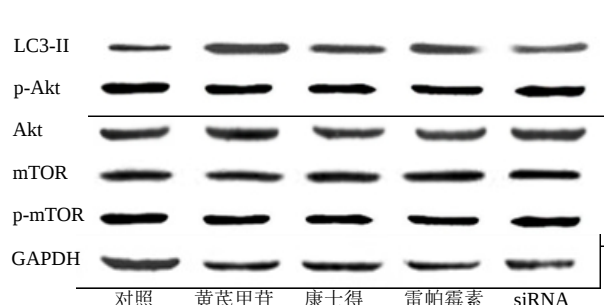


图 3 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞 Akt、mTOR、p-Akt、p-mTOR 及 LC3-II 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of astragaloside IV on expression of Akt, mTOR, p-Akt, p-mTOR, and LC3-II proteins in RAW264.7 cells

3.4 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞 Beclin1、Akt 及 mTOR mRNA 表达的影响

与对照组相比, 黄芪甲苷组、康士得组、雷帕霉素组及 siRNA 组的自噬相关蛋白 Beclin1 mRNA 相对表达水平显著上调 ($P < 0.05$), Akt、mTOR mRNA 相对表达水平显著下调 ($P < 0.05$), 结果见表 3。

3.5 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞分泌炎症因子 IL-4、IL-10、IL-2 和 IFN- γ 的影响

与对照组相比, 黄芪甲苷组、康士得组、雷帕霉素组及 siRNA 组巨噬细胞分泌的炎症因子 IL-10 水平明显降低 ($P < 0.05$), IL-4 及 IL-2 的分泌未见显著差异; 黄芪甲苷组、雷帕霉素组及 siRNA 组的

表 3 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞 Beclin1、Akt 及 mTOR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of astragaloside IV on expression of Beclin1, Akt, and mTOR mRNA in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	相对表达量		
	Beclin1	Akt	mTOR
对照	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
黄芪甲苷	2.36±0.34*	0.36±0.46*	0.25±0.12*
康士得	1.87±0.26*	0.82±0.14*	0.49±0.42*
雷帕霉素	3.58±0.42*	0.64±0.32*	0.22±0.14*
siRNA	3.87±0.47*	0.73±0.82*	0.21±0.16*

IFN- γ 水平显著增加 ($P < 0.05$), 康士得组 IFN- γ 水平未见显著差异 (表 4)。

3.6 体内实验

3.6.1 一般情况 饲养和给药过程中 C57BL/6/J 小鼠死亡 2 只 (因相互撕咬致死), ApoE^{-/-}小鼠死亡 5 只 (ig 不当致死), 剔除离群值, 最后进入统计的各组小鼠数量均为 10 只。

3.6.2 各组小鼠主动脉病理形态观察 光学显微镜观察, 对照组小鼠主动脉壁厚薄均匀, 内膜光滑平整, 内膜、中膜及外膜清晰, 各层结构正常, 无动脉粥样硬化病灶。模型组小鼠光镜下可见管腔内膜显著增厚、弹性纤维层结构不清, 内皮下大量泡沫细胞形成, 富含脂质, 可见胆固醇结晶; 中膜平滑

表 4 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞分泌炎症因子 IL-4、IL-10、IL-2 和 IFN- γ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of astragaloside IV on secretion of IL-4, IL-10, IL-2 and IFN- γ in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IL-4/(ng·L ⁻¹)	IL-10/(ng·L ⁻¹)	IL-2/(ng·L ⁻¹)	IFN- γ /(ng·L ⁻¹)
对照	40.76±4.14	220.76±24.17	5.92±0.63	11.43±0.82
黄芪甲苷	38.38±5.52	111.38±10.54*	6.05±0.76	16.95±1.84*
康士得	39.87±4.95	161.87±12.25*	5.98±0.82	11.47±1.43
雷帕霉素	38.58±6.09	113.58±9.49*	6.16±0.78	18.25±1.94*
siRNA	39.89±5.83	112.89±11.43*	5.96±0.64	17.99±1.75*

肌明显萎缩、细胞排列紊乱、纤维组织增生,病灶表面由纤维细胞、胶原纤维构成薄的纤维帽,病变区域可见浅染无定形物、钙化颗粒物;管壁厚度、斑块截面积显著大于对照组。黄芪甲苷组小鼠主动脉各层结构正常,排列整齐,局部有小灶性的钙化颗粒物沉积,病变轻,斑块小,泡沫细胞和脂质减少,弹力板基本完整,病变程度明显轻于模型组、

康士得组和雷帕霉素组,结果见图 4,

3.6.3 黄芪甲苷对小鼠主动脉 Akt、mTOR mRNA 表达水平的影响 与模型组相比,黄芪甲苷组小鼠主动脉的 Akt、mTOR mRNA 相对表达量均较低,有统计学意义 ($P<0.05$);康士得组 Akt mRNA 相对表达量较低 ($P<0.05$),雷帕霉素组 mTOR mRNA 相对表达量较低 ($P<0.05$,表 5)。

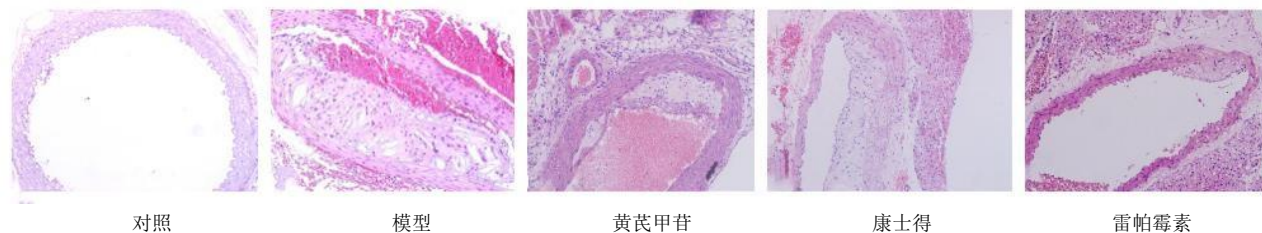


图 4 各组小鼠主动脉病理学改变 (HE 染色, ×200)

Fig. 4 Histopathological changes of aorta observed in each group (optical microscope, HE staining, × 200)

表 5 黄芪甲苷对小鼠主动脉 Akt、mTOR mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of astragaloside IV on mRNA expression of Akt and mTOR in aorta of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	mRNA 相对表达量	
	Akt	mTOR
对照	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01
模型	6.99 ± 0.78*	8.14 ± 0.59*
黄芪甲苷	3.06 ± 0.38* [△]	3.19 ± 0.47* [△]
康士得	2.15 ± 0.18* [△]	8.28 ± 1.48*
雷帕霉素	6.44 ± 0.84*	2.59 ± 0.92* [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [△] $P<0.05$, 下同

* $P<0.05$ vs control group; [△] $P<0.05$ vs model group, same as below

3.6.4 黄芪甲苷对小鼠主动脉 Akt、mTOR 蛋白表达水平的影响 与模型组相比,黄芪甲苷组小鼠主动脉的 Akt、mTOR 蛋白相对表达量均较低,有统计学意义 ($P<0.05$);康士得组 Akt 蛋白相对表达量较低 ($P<0.05$),雷帕霉素组 mTOR 蛋白相对表达量较低 ($P<0.05$),见表 6 和图 5。

4 讨论

AS 是一个与内皮细胞损伤、脂质紊乱、血流动力学异常有关的极其复杂的慢性炎症过程。现有的一些学说并不能很好地概括 AS 的病理机制,AS 发病机制和病理的复杂性给临床的治疗和预防带来一定的困难。研究表明,低密度脂蛋白、炎症以及代谢性应激可以促进 AS 斑块中细胞的自噬。斑块细胞的自噬是斑块细胞通过降解损伤的细胞器从而防止外部氧化应激损害,氧化应激能够引起斑块细

表 6 黄芪甲苷对小鼠主动脉 Akt、mTOR 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of astragaloside IV on protein expression of Akt and mTOR in mouse aorta ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	蛋白相对表达量	
	Akt	mTOR
对照	1.00 ± 0.01*	1.00 ± 0.01*
模型	2.23 ± 0.48*	2.88 ± 0.28*
黄芪甲苷	1.08 ± 0.28* [△]	1.16 ± 0.15* [△]
康士得	1.38 ± 0.37* [△]	2.96 ± 0.23*
雷帕霉素	2.43 ± 0.33*	1.26 ± 0.23* [△]

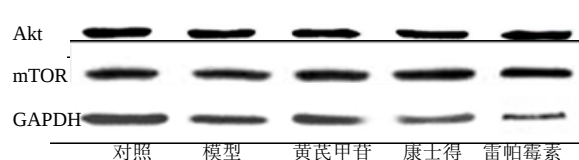


图 5 黄芪甲苷对小鼠主动脉 Akt、mTOR 蛋白表达水平的影响

Fig. 5 Effect of astragaloside IV on protein expression of Akt and mTOR in mouse aorta

胞的自噬,其中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路起到关键的调节作用^[9-10]。

通过对 AS 患者的尸检中发现冠状动脉斑块中存在大量的巨噬细胞、淋巴细胞和肥大细胞,其中巨噬细胞是破裂斑块中细胞的主要成分。斑块的纤维帽中侵入的巨噬细胞越多,斑块就越脆弱,这与巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶,降解细胞外基质导致纤维帽变薄有关。同时,巨噬细胞分泌大量的炎症因子,促进斑块向不稳定方向转化^[11]。在 AS 早

期,巨噬细胞的自噬减少了泡沫细胞的积聚,抑制了斑块的形成和发展。在AS的中晚期,巨噬细胞的自噬减少斑块中的炎症反应,起到稳定斑块的作用,而平滑肌细胞的自噬促进纤维帽变薄,使斑块向不稳定方向发展^[12-13]。因此,斑块中的巨噬细胞是斑块不稳定的关键因素,如何减少斑块中的巨噬细胞浸润,促进易损斑块的稳定已引起国内外学者的高度重视。研究发现,PI3K/Akt/mTOR信号通路是AS形成的重要信号传导通路,PI3K/Akt/mTOR信号传导通路的激活,在自噬中发挥关键的调节作用,通过对该信号通路选择抑制性药物能够有效抑制AS的进程^[3]。Beclin1基因是第1个确认的哺乳动物的自噬基因,也是第1个确认的在自噬溶酶体降解途径中起肿瘤抑制作用的基因,对自噬体的形成至关重要。微管相关蛋白前体LC3被裂解产生一种活跃的细胞溶质形式被称为LC3-I。然后被催化和结合成LC3-II。LC3-II的相对量反映了自噬体的量,这种LC3亚型是目前最广泛用来检测自噬体的分子标记^[14]。

前期研究表明,黄芪甲苷具有改善脂质代谢紊乱,抑制动脉粥样斑块SDF-1、CXCR4 mRNA和蛋白表达,以及抑制骨髓源性内皮祖细胞CXCR4基因和蛋白表达的作用^[6]。本实验的创新点在于通过观察黄芪甲苷对PI3K/Akt/mTOR信号通路的调控,从分子、细胞、组织以及动物水平等多层次揭示中药复方黄芪甲苷防治AS的分子机制,为AS相关疾病的防治提供新思路。研究结果显示,利用黄芪甲苷含药血清、Akt抑制剂康士得、mTOR抑制剂雷帕霉素及mTOR-siRNA干预RAW264.7细胞后,Akt及mTOR的表达明显减少,细胞自噬现象明显增强,透射电镜下观察自噬体明显增多,LC3-II和Beclin 1蛋白的表达水平明显上调。RAW264.7细胞分泌的IL-10明显降低,而IFN- γ 的分泌显著增加,表明炎症反应明显降低。说明黄芪甲苷含药血清可以有效地阻断PI3K/Akt/mTOR信号转导通路,抑制炎症反应。体内实验显示,黄芪甲苷组小鼠血管各层结构正常,排列整齐,局部有小灶性的钙化颗粒物沉积,病变轻,斑块小,泡沫细胞和脂质减少,弹力板基本完整,病变程度明显轻于模型组,并较抑制剂组轻。与模型组比较,黄芪甲苷组小鼠主动脉组织Akt、mTOR mRNA和蛋白表达量均较低。本研究结果充分说明,选择性抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路能诱导巨噬细胞自噬、减

少斑块巨噬细胞的浸润、抑制炎症反应进而稳定动脉粥样硬化易损斑块,黄芪甲苷抑制动脉粥样硬化斑块的形成机制可能与调控PI3K/Akt/mTOR信号通路,抑制炎症反应有关。

参考文献

- [1] Lievens D, von Hundelshausen P. Platelets in atherosclerosis [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 106(5): 827-838.
- [2] Martinet W, De Meyer G R. Autophagy in atherosclerosis: A cell survival and death phenomenon with therapeutic potential [J]. *Circ Res*, 2009, 104(3): 304-317.
- [3] 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.
- [4] 刘天一, 何观虹, 姚 丽. 黄芪甲苷治疗心血管疾病研究进展 [J]. *中医药信息杂志*, 2013, 30(2): 117-120.
- [5] 曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(5): 954-960.
- [6] Qin H W, Liu P, Lin S C, et al. Effects of astragaloside IV on the SDF-1/CXCR4 expression in atherosclerosis of apoE^{-/-} mice induced by hyperlipaemia [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2015, doi: 10.1155/2015/385154
- [7] 陈 宁, 宋冬雪, 凌 娜, 等. 中药血清药理学方法的研究进展 [J]. *北京联合大学学报*, 2014, 28(1): 40-43.
- [8] 秦合伟, 刘 萍. 冠心病抗动脉粥样硬化作用机制与SDF-1/CXCR4生物轴失衡相关性的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(5): 1558-1562.
- [9] Verheye S, Martinet W, Kockx M M, et al. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophag [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(6): 706-715.
- [10] Altman J K, Yoon P, Katsoulidis E, et al. Regulatory effects of mammalian target of rapamycin-mediated signals in the generation of arsenic trioxide responses [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(4): 1992-2001.
- [11] 肖 钰, 郭熙泽, 徐红薇, 等. 巨噬细胞及巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中的作用研究 [J]. *国际免疫学杂志*, 2016, 39(1): 61-66.
- [12] Moore K J, Sheedy F J, Fisher E A. Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance [J]. *Nat Rev*, 2013, 13(10): 709-721.
- [13] Nagareddy P R, Murphy A J, Stirzaker R A, et al. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis [J]. *Cell Metab*, 2013, 17(5): 695-708.
- [14] 晏 浩, 徐建军, 李文林, 等. MicroRNA-30a 调控Beclin-1对缺氧复氧乳鼠心肌细胞的保护效应 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(4): 583-588.