

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.11.019

稳斑汤含药血清对巨噬细胞泡沫化自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin 1 表达的影响

赵殿臣¹, 宫丽鸿^{2*}, 肖福龙¹

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院)

摘要 目的 探讨稳斑汤防治动脉粥样硬化的可能作用机制。方法 20 只 SD 大鼠随机分为空白组及稳斑汤低、中、高浓度组各 5 只。稳斑汤低、中、高浓度组分别给予稳斑汤 4.275、8.55、17.1 g/(kg·d) 灌胃, 空白组给予 4 ml 蒸馏水灌胃, 每天 1 次, 连续灌胃 7 天。灌胃第 8 天腹主动脉取血, 离心后分离血清。体外培养小鼠巨噬细胞, 分为空白对照组、模型组、雷帕霉素组及稳斑汤低、中、高浓度组, 每组 6 孔。除空白对照组外其余各组均进行巨噬细胞泡沫化。空白对照组及模型组予 10% 大鼠空白血清培养; 雷帕霉素组用雷帕霉素 10 μ l/孔 (终浓度 10 nmol/L) 培养; 稳斑汤低、中、高浓度组分别用 10% 稳斑汤低、中、高浓度含药血清 200 μ l/孔培养。48h 后收集细胞, 在透射电镜下观察各组细胞自噬体的变化, Western Blot 法检测各组细胞 LC3B 和 Beclin 1 蛋白表达水平。结果 透射电镜下观察到, 空白对照组无明显自噬体出现, 模型组可见少量自噬体出现; 与模型组比较, 稳斑汤各浓度组与雷帕霉素组的自噬体数量均明显增加, 雷帕霉素组数量更多。与空白对照组比较, 其余各组 LC3B 和 Beclin 1 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 稳斑汤各浓度组及雷帕霉素组 LC3B 和 Beclin 1 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$); 与雷帕霉素组比较, 稳斑汤高浓度组 LC3B 和 Beclin 1 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 稳斑汤含药血清能够上调巨噬细胞泡沫化自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin 1 表达, 促进泡沫化的巨噬细胞的自噬, 从而抑制巨噬细胞泡沫化的进展, 这可能是稳斑汤防治动脉粥样硬化的分子机制之一。

关键词 动脉粥样硬化; 稳斑汤; 巨噬细胞泡沫化; 自噬

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的病变基础为脂质代谢障碍, 病变过程为动脉内膜首先受累, 脂质和复合糖类积聚, 进而纤维组织增生及钙质沉着, 动脉中层不断增生, 导致动脉管壁增厚变硬, 使血管腔狭窄^[1]。在 AS 形成早期, 血管内皮受损, 血液中的单核细胞通过内皮间隙在内膜下转化为巨噬细胞, 巨噬细胞介导渗入血管内皮下的低密度脂蛋白发生氧化修饰, 形成氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL), 并通过相关受体吞噬大量氧化型低密度脂蛋白, 导致细胞内大量脂质堆积, 形成泡沫细胞, 泡沫细胞聚集形成脂质条纹乃至脂质斑块^[2]。因此, AS 早期通过各种途径抑制泡沫细胞的形成和聚集, 可以干预 AS 的发展进程^[3]。自噬是细胞吞噬自身受损的蛋白质和细胞器, 最终将吞噬物在溶酶体内进行降解的过程^[4]。有研究发现,

自噬可促进泡沫细胞胆固醇外流, 从而延缓 AS 的发生、发展^[5]。LC3B 和 Beclin 1 作为自噬的相关蛋白, 参与自噬的触发、自噬体的形成过程, 并能反映自噬的程度, 已成为评价自噬的常用指标^[6-7]。前期体内动物实验已经证实, 搜风祛痰中药稳斑汤具有抑制 AS、稳定不稳定斑块的作用^[8]。我们在此基础上在体外细胞培养条件下, 观察稳斑汤含药血清对巨噬细胞泡沫化自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin 1 表达的影响, 从而进一步探讨稳斑汤防治 AS 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 6~8 周龄, 体重 200~250 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2016-0001。原代小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞, 通派 (上海) 生物科技有限公司。

基金项目: 辽宁省科学技术计划 (2014020055)

* 通讯作者: linda1795@sina.com, (024) 31961937

1.2 实验药品

稳斑汤: 全蝎 5 g, 蜈蚣 1 条, 地龙 15 g, 陈皮 15 g, 法半夏 15 g, 白术 15 g, 水蛭 15 g, 加工制成含生药 2 g/ml 的中药浓缩液备用, 由辽宁中医药大学附属医院中药房提供; 雷帕霉素 (粉剂, 规格: 100 mg, 碧云天生物技术研究, 批号: S1842-100)。

1.3 实验试剂及仪器

ox-LDL (批号: H7950)、脂多糖 (LPS, 批号: L2880)、油红 O 染色 (批号: 1320-06-5), Sigma 公司; 苏木素染色 (批号: 71020784)、2.5% 戊二醛 (批号: 30092436), 国药集团化学试剂有限公司; 细胞裂解液 (碧云天生物技术研究, 批号: P0013); Anti-LC3B 抗体 (批号: ab192890)、Anti-Beclin1 抗体 (批号: ab217179), Abcam 公司; HRP 标记的羊抗兔二抗 (北京中杉金桥生物科技有限公司, 批号: zb-5301); Anti- β -actin 抗体 (批号: BM0627)、SDS-Page 凝胶试剂盒 (批号: AR0138), 博士德生物工程有限公司; 蛋白定量试剂盒 (碧云天生物技术研究, 批号: P0006); 蛋白 marker (Fermentas 公司, 批号: PSC1065); ECL 发光试剂盒 (Thermo 公司, 批号: NCI4106); DMEM 培养基 (批号: AB10115023)、青链霉素双抗 (批号: J160035)、胰酶 (批号: J150037), 海克隆北京公司; 胎牛血清 (杭州四季青公司, 批号: 150315)。

二氧化碳培养箱 (美国热电公司, 3111 型); 电泳仪 (EPS300 型)、电泳槽 (HE-420 型)、凝胶成像分析系统 (Tanon-4200SF 型), 上海天能科技有限公司, 透射电子显微镜 (日本日立公司, H-7650 型)。

1.4 小鼠巨噬细胞的培养

原代小鼠巨噬细胞复苏后用培养基 (DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清 + 青链霉素双抗) 培养于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱, 24 h 后更换培养基, 细胞约 80% ~ 90% 融合度时用胰蛋白酶消化收集细胞并按 1 : 2 比例进行传代。

1.5 含药血清的制备

将 20 只大鼠按体重采用随机数字表法分为空白组及稳斑汤低、中、高浓度组各 5 只。依据成人每日用药临床推荐的常用剂量, 根据大鼠与人等剂量换算公式^[8]得出大鼠灌胃用药量, 稳斑汤低、中、高浓度组分别给予稳斑汤 4.275、8.55、17.1 g/(kg · d) 灌胃, 空白组给予 4 ml 蒸馏水灌胃, 每天 1 次, 连续灌胃 7 天。在灌胃第 8 天给药

2 h 后, 大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射进行麻醉, 腹主动脉取血, 存放于抗凝管中, 在 4 °C 环境下, 以 3000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 将同组血清收集后, 放在一起混匀, 置于 56 °C 的水浴中 30 min, 进行灭活, 用过滤器滤过血清除菌, 放置在 -80 °C 冰箱中保存, 备用。

1.6 分组及干预方法

实验分为空白对照组、模型组、雷帕霉素组及稳斑汤低、中、高浓度组, 每组 6 孔。空白对照组及模型组予 10% 大鼠空白血清培养 48 h; 雷帕霉素组用雷帕霉素 10 μ l/孔 (终浓度 10 nmol/L) 培养 48 h; 稳斑汤低、中、高浓度组分别用 10% 稳斑汤低、中、高浓度含药血清 200 μ l/孔培养 48 h。

除空白对照组外其余各组参考文献 [10] 建立巨噬细胞泡沫化, 即在含药血清干预前均同时加入 ox-LDL (终浓度为 100 mg/L) 10 μ l/孔及 LPS (终浓度 10 mg/L) 10 μ l/孔, 各组在培养箱内孵育 (泡沫化) 48 h, 细胞标本用 PBS 洗涤 2 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 油红 O 染色 10 min, 苏木素染色 5 min, 10 ml/L HCl 分化及返蓝, 水性封片剂封片。显微镜下观察显示, 模型组泡沫细胞的胞浆内存在大量红色的脂滴, 形态完整, 细胞核呈蓝色, 符合巨噬细胞泡沫化特征。

1.7 观察指标及方法

1.7.1 透射电镜下观察细胞的超微结构 各组细胞干预完成后, 常规胰酶消化法收集细胞, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 置于 1.5 ml 尖底离心管中离心, 弃去上清液, 加入 2.5% 戊二醛固定, 轻轻震荡, 使细胞团悬浮于固定液中, 4 °C 冰箱中固定 24 h 以上, 脱水, 包埋, 超薄切片, 染色后于透射电子显微镜下观察, 并采集照片。

1.7.2 Western Blot 检测细胞 LC3B 和 Beclin 1 蛋白表达水平 实验结束时收集培养的细胞, 细胞裂解液裂解细胞和抽提巨噬细胞的总蛋白, 用 Bradford 法测定蛋白浓度, 调蛋白浓度使各组一致。等量样品上样, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将蛋白转移至 PVDF 膜上电泳, 依次用一抗和二抗, 加入增强化学发光试剂 (ECL) 后用感光胶片曝光, 用图像分析系统对结果进行灰度扫描, 以目的蛋白条带灰度值和内参蛋白条带灰度值的比值作为相应样本的蛋白表达量。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞透射电镜下超微结构结果

空白对照组无明显自噬体出现；模型组可见少量自噬体出现，自噬体呈双层膜的囊泡状结构，包裹有内容物；稳斑汤各浓度组均可见较多自噬体出现，自噬体数量均高于模型组；雷帕霉素组也可见较多自噬体出现，自噬体数量高于稳斑汤各浓度组。见图 1。

2.2 各组细胞 LC3B 及 Beclin 1 蛋白表达比较

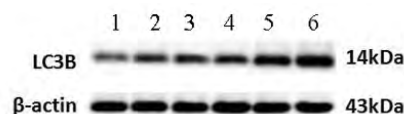
表 1 示，与空白对照组比较，其余各组细胞 LC3B 及 Beclin 1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，稳斑汤各浓度组与雷帕霉素组 LC3B 及 Beclin 1 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$)；

表 1 各组细胞 LC3B、Beclin 1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	LC3B	Beclin 1
空白对照组	6	0.190 ± 0.029	0.185 ± 0.026
模型组	6	0.254 ± 0.033*	0.234 ± 0.035*
雷帕霉素组	6	0.502 ± 0.053*△	0.490 ± 0.043*△
稳斑汤低浓度组	6	0.315 ± 0.034*△▲	0.299 ± 0.039*△▲
稳斑汤中浓度组	6	0.398 ± 0.034*△▲	0.361 ± 0.030*△▲
稳斑汤高浓度组	6	0.466 ± 0.058*△	0.451 ± 0.040*△

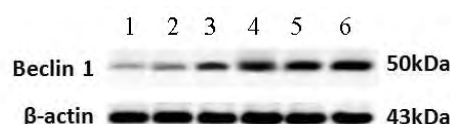
注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，△ $P < 0.05$ ；与雷帕霉素组比较，▲ $P < 0.05$

与雷帕霉素组比较，稳斑汤低、中浓度组 LC3B 及 Beclin 1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，而稳斑汤高剂量组 LC3B 及 Beclin 1 蛋白表达水平与雷帕霉素组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组细胞 LC3B 及 Beclin 1 蛋白电泳图分别见图 2、图 3。



注：1：空白对照组；2：模型组；3：稳斑汤低浓度组；4：稳斑汤中浓度组；5：稳斑汤高浓度组；6：雷帕霉素组

图 2 各组细胞 LC3B 蛋白表达电泳图



注：1：空白对照组；2：模型组；3：稳斑汤低浓度组；4：稳斑汤中浓度组；5：稳斑汤高浓度组；6：雷帕霉素组

图 3 各组细胞 Beclin 1 蛋白表达电泳图

3 讨论

巨噬细胞大量吞噬氧化修饰的脂蛋白形成泡沫细胞，是 AS 早期病变的细胞学特征，亦是 AS 初始的标志点和关键步骤^[1]。细胞自噬是溶酶体对

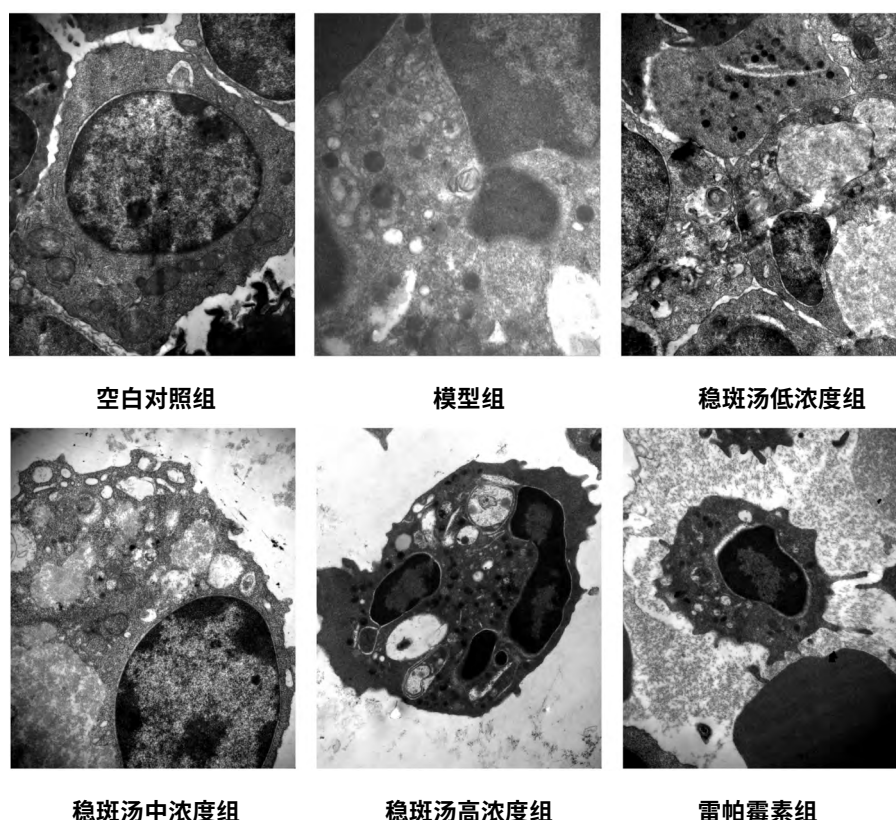


图 1 各组细胞透射电镜下超微结构 ($\times 20000$)

自噬体所包裹的内容物的降解,它既是细胞内的再循环过程,也是机体一种重要的自我防御和保护机制^[12]。有研究结果证实,细胞通过自噬清除细胞内的损伤成分,保护细胞抵御各种应激,防止细胞发生凋亡和坏死^[13]。自噬在清除脂质在细胞内的聚集、维持细胞的脂代谢平衡中发挥了重要作用^[14]。当巨噬细胞内脂蛋白大量蓄积时,自噬依赖的胆固醇外流作用增强,被看作是抑制巨噬细胞形成泡沫细胞从而早期干预 AS 进程的一种潜在途径^[15]。LC3 已成为反映自噬的常用指标之一,LC3B 是 LC3 的亚型之一,同样被用来作为自噬的分子标志^[16]。Beclin 1 是第一个经过研究公认的在哺乳动物身上发现的自噬基因,其参与自噬的诱导、自噬体的生成及成熟过程^[17],许多自噬调控蛋白通过与其不同结构域或氨基酸发生直接或间接结合,形成蛋白复合体,进而调控自噬水平^[18]。

AS 可属中医学“胸痹”“真心痛”等范畴。病因病机为素有食膏粱厚味伤脾,脾虚生痰,血滞成瘀,痰瘀互结不解而生内痛毒热,热极生内风。风邪为百病之长,善行而数变,痰为百病之祟,风痰内动,如《医方考》谓“风痰者,湿土生痰,痰生热,热生风也”,故从风从痰论治 AS 具有其可行性。稳斑汤方中全蝎熄风止痉,解毒散结;地龙清热熄风,平喘通络止痉;蜈蚣熄风止痉,解毒散结,通络止痛,三药共为君药;臣药合用陈皮、半夏、白术,既能宽胸理气,又可燥湿化痰,消痞散结;水蛭为虫类化瘀药,破血逐瘀而不伤新血,为佐药;合方共奏搜风祛痰、祛瘀通络之功效。

雷帕霉素是一种新型大环内酯类免疫抑制剂,研究证实其通过抑制细胞自噬的负调控分子 mTOR 来诱导细胞自噬^[19],故近年来作为诱导细胞自噬的常用诱导剂,因而本实验选择雷帕霉素作为西药对照药。

本研究结果表明,通过透射电镜观察,空白对照组无明显自噬体出现,说明正常条件下细胞自噬处于较低水平;与空白对照组相比,模型组有自噬体出现,说明巨噬细胞泡沫化后,ox-LDL 可以引起泡沫化的巨噬细胞应激性地启动自噬。稳斑汤各浓度组均可见较多的自噬体出现,数量均高于模型组,说明稳斑汤含药血清促进了泡沫化的巨噬细胞的自噬,减少其发生积聚;雷帕霉素组也可见较多的自噬体出现,数量高于稳斑汤各浓度组,说明雷帕霉素作为常用的细胞自噬诱导剂,其诱导自噬的作用较强。同时,与空白对照组比较,模型组、雷帕霉素组和稳斑汤各浓度组 LC3B 和 Beclin 1 蛋白

表达水平均升高,说明正常条件下细胞自噬处于一个较低的水平,故空白对照组自噬相关蛋白表达水平较低。而巨噬细胞发生泡沫化后,由于 ox-LDL 可以引起泡沫化的巨噬细胞应激性的上调自噬相关蛋白的表达而启动自噬,故使模型组的自噬相关蛋白表达水平较空白对照组有所升高。稳斑汤各浓度含药血清与雷帕霉素均可以上调泡沫化的巨噬细胞自噬相关蛋白而促进自噬,故自噬相关蛋白表达水平同样会升高。与雷帕霉素组比较,稳斑汤高浓度组 LC3B 和 Beclin 1 蛋白表达水平无明显差异,说明稳斑汤高浓度含药血清同雷帕霉素在上调巨噬细胞泡沫化自噬相关蛋白方面作用相当。

综上所述,稳斑汤含药血清能够上调巨噬细胞泡沫化自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin 1 表达,促进泡沫化的巨噬细胞的自噬,从而抑制巨噬细胞泡沫化的进展,这可能是稳斑汤早期防治 AS 的分子机制之一。

参考文献

- [1] MARTINET W, DE MEYER GR. Autophagy in atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2008, 10(3): 216-223.
- [2] NOUROOZ-ZADEH J, SMITH CC, BETTERIDGE DJ. Measures of oxidative stress in heterozygous familial hypercholesterolaemia [J]. Atherosclerosis, 2001, 156(2): 435-441.
- [3] HAN J, PAN XY, XU Y, et al. Curcumin induces autophagy to protect vascular endothelial cell survival from oxidative stress damage [J]. Autophagy, 2012, 8(5): 812-825.
- [4] LIU H, CAO Y, TONG T, et al. Autophagy in atherosclerosis: a phenomenon found in human carotid atherosclerotic plaques [J]. Chin Med J, 2015, 128(1): 69-74.
- [5] OUMET M, MARCEL YL. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(3): 575-581.
- [6] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [7] DJAVAHARI-MERGNY M, MAIURI MC, KROEMER G. Cross talk between apoptosis and autophagy by casepase-mediated cleavage of Beclin 1 [J]. Oncogene, 2010, 29(12): 1717-1719.
- [8] 倪小鸥, 宫丽鸿, 张湜, 等. 搜风祛痰中药对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化不稳定斑块自噬相关蛋白 Beclin 1 和 LC3 的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(5): 488-491.
- [9] 张君涛, 王平, 刘爱峰, 等. 中药含药血清制备方法的研究概述 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11): 4006-

4009.

薛偕华, 魏伟, 陈彤, 等. 泽泻汤对巨噬细胞泡沫化脂质沉积及其 LXR α 和 ABCA1 表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(11): 971-976.

LEY K, MILLER YI, HEDRICK CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(7): 1506-1516.

JOHANSEN T, LAMARK T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins [J]. Autophagy, 2011, 7(3): 279-296.

LIAO X, SLUIMER JC, WANG Y, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis [J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 545-553.

SINGH R, KAUSHIK S, WANG Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism [J]. Nature, 2009, 458(7242): 1131-1135.

OUI MET M, FRANKLIN V, MAK E, et al. Autophagy

regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase [J]. Cell Metab, 2011, 13(6): 655-667.

WU J, DANG Y, SU W, et al. Molecular cloning and characterization of rat LC3A, and LC3B —Two novel markers of autophagosome [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339(1): 437-442.

CAO Y, KLIONSKY DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin-1: a unique autophagy-related protein [J]. Cell Res, 2007, 17(10): 839-849.

WIRAWAN E, LIPPENS S, VANDEN BERGHE T, et al. Beclin 1: a role in membrane dynamics and beyond [J]. Autophagy, 2012, 8(1): 6-17.

FINGAR DC, BLENIS J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and co-ordinator of cell growth and cell cycle progression [J]. Oncogene, 2004, 23(18): 3151-3171.

Effect of Serum Containing *Wenban Decoction* (稳斑汤) on the Expression of Macrophage Foaming Autophagy-related Protein LC3B and Beclin 1

ZHAO Dianchen¹, GONG Lihong², XIAO Fulong¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 110847; 2. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of prevention and treatment of atherosclerosis by *Wenban Decoction* (稳斑汤). **Methods** Twenty SD rats were randomly divided into blank group and *Wenban Decoction* group of low, medium and high concentrations, with 5 rats in each group. *Wenban Decoction* low, medium, high dose groups were given *Wenban Decoction* 4. 275, 8. 55, 17. 1 g/(kg · d) gavage, and blank group was given 4ml distilled water, once a day, continuous gavage for 7 days. Eight days after intragastric gavage, blood was taken from the abdominal aorta and the serum was separated after centrifugation. Mouse macrophages were cultured in vitro and divided into blank control group, model group, rapamycin group, and low-, medium-, and high-concentration group of *Wenban Decoction*, with 6 holes in each group. Except for the blank control group, macrophage foaming was performed in all other groups. The blank control group and model group were cultured with 10% rat blank serum; the rapamycin group was cultured with 10 μ l/hole of rapamycin (final concentration of 10 nmol/L); the low, medium, and high concentrations of *Wenban Decoction* were treated with 10 % *Wenban Decoction* low, medium and high concentration of serum containing 200 μ l/hole culture. After 48 hours, the cells were collected and the autophagosomes were observed under transmission electron microscope. The expression of LC3B and Beclin 1 protein in each group was detected by Western Blot. **Results** Under transmission electron microscope, there were no obvious autophagosomes in the blank control group, and a small amount of autophagosomes were seen in the model group. Compared with the model group, the number of autophagosomes in each concentration of *Wenban Decoction* group and the rapamycin group was significantly increased, and the number was larger in rapamycin group. Compared with the blank control group, the expression of LC3B and Beclin 1 protein in the other groups increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the expression levels of LC3B and Beclin 1 protein in each group of *Wenban Decoction* and rapamycin group elevated ($P < 0.05$); Compared with rapamycin group, there was no significant difference in the expression level of LC3B and Beclin 1 protein in the high concentration group of *Wenban Decoction* ($P > 0.05$). **Conclusion** Serum containing *Wenban Decoction* can up-regulate the expression of macrophage foaming autophagy-associated proteins LC3B and Beclin 1 and promote autophagy of foamed macrophages, thereby inhibiting the progress of macrophage foaming, which may be one of the molecular mechanisms of prevention and treatment of atherosclerosis by *Wenban Decoction*.

Keywords atherosclerosis; *Wenban Decoction* (稳斑汤); macrophage foaming; autophagy

(收稿日期: 2017-12-28; 修回日期: 2018-03-23)

编辑: 邓 媛