

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.24.012

实验研究

健脾补肾方对辐射损伤模型小鼠脾脏自噬小体及 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响

肖静静, 何东初[✉], 张梦云, 张勇, 丁晓娟, 伍伟, 杨文超

中部战区总医院, 湖北省武汉市武昌区武珞路 627 号, 430070

[摘要] **目的** 探讨健脾补肾方对辐射所致免疫功能损伤的影响和可能作用机制。**方法** 50 只昆明种小鼠随机分为正常组、模型组、胸腺肽组和健脾补肾方大、小剂量组, 每组 10 只。除正常组外其余各组小鼠采用 6.0 Gy X 线一次性全身照射建立辐射损伤小鼠模型。造模成功后健脾补肾方小、大剂量组小鼠分别给予 13 g/(kg·d)、26 g/(kg·d) 健脾补肾方灌胃, 胸腺肽组小鼠给予胸腺肽肠溶片 11.7 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组、模型组小鼠用 0.9% 氯化钠溶液 0.1 ml/(10 g·d) 灌胃。各组均每日灌胃 1 次, 连续 7 天。最后一次灌胃后, 小鼠称重, 处死后分离小鼠脾脏, 称重并计算脾脏指数; ELISA 法检测脾脏组织干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 2 (IL-2) 含量; 透射电镜观察脾脏自噬小体; 实时荧光定量 PCR 检测脾脏磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) mRNA 表达水平; Western blot 法检测并计算脾脏 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达及自噬相关蛋白微管相关轻链蛋白 3 (LC3)、Beclin1、p62 蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠体重、脾脏指数均显著下降 ($P < 0.01$), 脾脏 IFN- γ 、IL-2 含量显著降低 ($P < 0.01$), 脾脏 PI3K、Akt、mTOR mRNA 及蛋白表达水平均显著下降 ($P < 0.01$), Beclin1 蛋白表达、LC3-II/LC3-I 值显著升高 ($P < 0.01$), p62 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$), 透射电镜显示脾脏自噬小体数量明显增多, 细胞结构损伤程度重。与模型组比较, 各药物干预组小鼠上述各指标均显著改善 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 健脾补肾方大剂量组小鼠脾脏线粒体可见部分完整脊, 自噬体较多; 健脾补肾方小剂量组、胸腺肽组小鼠脾脏线粒体结构较完整, 自噬体较少。健脾补肾方小剂量组各指标改善效果优于健脾补肾方大剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且与胸腺肽组各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 健脾补肾方可能通过增强脾脏 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 抑制辐射诱导的自噬过度活化, 从而减轻脾脏结构损伤, 促进免疫功能的恢复, 并以小剂量效佳。

[关键词] 辐射损伤; 健脾补肾方; 自噬; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白激酶 B; 雷帕霉素靶蛋白

随着现代科技的发展以及辐射诊疗疾病、辐射治疗肿瘤的广泛应用, 辐射损伤的发病率也随之增加。辐射可导致机体多种组织器官损伤, 其中免疫系统对辐射极度敏感^[1]。临床上许多接受放射治疗的肿瘤患者常因辐射造成的免疫功能损伤而影响正常治疗, 这也是放射治疗的棘手问题。脾脏是机体重要的免疫器官, 主要由淋巴细胞构成, 对于维持机体免疫功能起着重要作用, 辐射损伤后脾脏功能

受损是影响患者预后的重要原因之一。近年来研究显示, 自噬对淋巴细胞稳态、存活及功能至关重要, 一定程度的自噬是一种内源性细胞保护机制; 而自噬不足或过度可造成细胞稳态失调, 加剧或导致细胞死亡^[2]。磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路在自噬过程中发挥关键的调节作用, 通过增强该信号通路能够有效抑制自噬水平^[3-4]。

健脾补肾方 (原名地甘口服液) 是课题组防治辐射损伤的经验方, 前期临床研究表明该方能预防及治疗肿瘤放疗患者外周血象的下降, 升高淋巴细

基金项目: 国家自然科学基金 (81873153, 81273905); 湖北省中医药管理局 2023-2024 年度中医药重点项目 (ZY2023Z010)

✉ 通讯作者: hdc98@sina.com

胞百分率、补体及免疫球蛋白水平,从而提高患者的免疫功能^[5],可改善骨髓造血功能,升高白细胞水平^[6]。基础研究表明,健脾补肾方能够调控脾脏细胞周期素基因(cyclinD1)及凋亡相关基因 bcl-2、bax 表达,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,从而改善辐射免疫功能损伤^[7-8]。在此基础上,本实验观察健脾补肾方对辐射损伤模型小鼠脾脏 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及自噬的调控作用,从而为其临床应用提供实验依据。本研究经本院医学实验动物福利伦理委员会审查通过[伦理审查编号:武总动(福)第2018003号]。

1 材料与方法

1.1 动物

选取 SPF 级昆明种小鼠 50 只,6~8 周龄,体质量 18~22 g,雌雄各半,购买于湖北省实验动物研究中心,实验动物合格证号:42000600035569。

1.2 药物制备

健脾补肾方组成:熟地黄 24 g,炙甘草 15 g,当归 12 g,黄芪 30 g,泽泻 9 g,陈皮 10 g,由本院中药制剂室制备,经水煎、过滤、浓缩为 1.3 g/ml 浓度的水煎液分装备用。胸腺肽肠溶片(批号:H19991177,规格:30 mg/片),西安迪赛生物药业有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

小鼠单抗 β -actin (货号 BM0627)、HRP 标记羊抗小鼠二抗(货号 BA1051)、HRP 标记羊抗兔二抗(货号 BA1054),武汉博士德生物工程有限公司;兔多抗磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K,货号 4292)、兔多抗磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(p-PI3K,货号 4228)、兔多抗磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR,货号 2971),CST 公司;兔多抗 Akt (货号 AF6261)、兔多抗磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt,货号 AF0016)、兔多抗 mTOR (货号 AF6308)、兔多抗微管相关轻链蛋白 3 (LC3,货号 AF5402)、兔多抗 Beclin1(货号 AF5128)、兔多抗 p62(货号 AF5384),Affinity 公司;ECL 底物液(货号 P1050),北京普利莱基因技术有限公司;Trizol (货号 252250AX),北京艾德莱生物科技有限公司;PMSF (货号 P105539),阿拉丁公司;RIPA 裂解液(货号 P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号 P0010),上海碧云天生物技术有限公司;干扰素 γ (IFN- γ ,货号 E-EL-M0048c)、白细胞介素 2 (IL-2,货号 E-EL-M0042c) ELISA 试剂盒,武汉伊莱瑞特公司;

柠檬酸铅(货号 L885990),MACKLIN 公司;醋酸铀(货号 PA39584),广东翁江化学试剂有限公司。

EDC-810 型 PCR 仪,东胜创新生物科技有限公司;Quant Studio 6 型实时荧光定量 PCR 仪,美国 ABI 公司;JY300 型水平电泳仪、JY02S 型紫外分析仪,北京君意东方电泳设备有限公司;m μ lIS-KANMK3 型酶标仪,美国 Thermo 公司;HT7700-SS 型透射电子显微镜,日本 HITACHI 公司。

1.4 动物分组、造模及干预方法

将 50 只小鼠适应性喂养 1 周,采用抽签法进行简单随机抽样,随机选择 10 只作为正常组。根据我们前期实验^[9]及预实验结果,其余小鼠采用一次性给予直线加速器 6.0 Gy X 线全身照射,剂量率 300 MU/min,建立辐射损伤小鼠模型。造模成功标准为小鼠食欲下降,活动减少,白细胞计数与正常小鼠比较明显下降,差异有统计学意义^[9]。将造模成功的 40 只小鼠按随机数字表法分为模型组、胸腺肽组及健脾补肾方小、大剂量组,每组 10 只。正常组、模型组小鼠用 0.9% 氯化钠溶液 0.1 ml/(10 g·d) 灌胃。健脾补肾方小剂量组按成人每日中药常规剂量通过人鼠体表面积等效剂量进行换算^[10],小鼠的用药剂量为 13 g/(kg·d),健脾补肾方大剂量组为临床等效剂量的 2 倍[26 g/(kg·d)],胸腺肽组小鼠给予胸腺肽肠溶片,用药剂量为换算成人临床等效剂量的 11.7 mg/(kg·d),均每日灌胃 1 次,连续 7 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况及脾脏指数 实验期间观察各组小鼠饮食、饮水、精神、活动、毛发及死亡情况。最后一次灌胃后,小鼠称重,分离小鼠脾脏并称重,计算脾脏指数,脾脏指数(mg/g)=脾脏质量(mg)/体质量(g)。

1.5.2 ELISA 法检测脾脏组织 IFN- γ 、IL-2 含量

取 1 mm×1 mm×1 mm 大小脾脏组织固定于 2.5% 戊二醇中,4℃保存,电镜备用。剩余的脾脏冻存备用。小鼠脾脏组织 100mg 匀浆离心后取上清液,ELISA 法检测 IFN- γ 、IL-2 的 OD 值,绘制标准曲线,换算出各样品中各细胞因子的浓度。具体步骤参照试剂盒说明书进行。

1.5.3 透射电镜观察脾脏自噬小体 将冻存脾脏组织置于 2.5% 的戊二醛(4℃)固定 4 h 后,0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 15 min,1% 的锇酸室温(20℃)固定 2 h,0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次,不同梯度乙醇中进行脱水,每次 15 min,

丙酮：812包埋剂1：1混合液渗透过夜，60℃聚合48 h后60~80 nm超薄切片，然后铀铅双染色（2%醋酸铀饱和水溶液，枸橼酸铅，各染色15 min）切片室温干燥过夜，电镜观察。

1.5.4 实时荧光定量PCR法检测脾脏PI3K/Akt/mTOR信号通路相关分子mRNA表达 取各组小鼠脾脏组织100 mg，分离提取总RNA，逆转录成cDNA，然后以cDNA为模板，采用SYBR Green法进行实时荧光定量PCR，反应参数50℃ 2 min，95℃ 10 min，95℃ 30 s，60℃ 30 s，40个循环，样本中目的基因的计算方式按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行，分析脾脏PI3K、Akt、mTOR mRNA表达，内参为β-actin。PI3K：上游5'-AATGCACGGCGATTACACTC-3'，下游5'-GGACACTGGGTAGAGCAACT-3'，产物长度199 bp；Akt：上游5'-CTGCCCTTCTACAACCAGGA-3'，下游5'-CATACACATCCTGCCACACG-3'，产物长度214 bp；mTOR：上游5'-CGCTACTGTGTCTTGGCATC-3'，下游5'-GGTTCATGCTGCTTAGTCGG-3'，产物长度154 bp；β-actin：上游5'-CACGATGGAGGGGCGG-GACTCATC-3'，下游5'-TAAAGACCTCTATGCCAA-CACAGT-3'，产物长度240 bp。

1.5.5 Western blot法检测脾脏自噬相关蛋白及PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达 取冻存脾脏组织，PBS清洗表面血渍，裂解液裂解提取蛋白后，采用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度，6%~12%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，室温摇床5%脱脂奶粉的TBST封闭2 h用相应的一抗（PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、LC3，1：1000；β-actin，1：500）4℃孵育过夜，TBST洗涤后换HRP标记二抗（1：50 000）室温摇床孵育2 h，洗涤后ECL试剂显色曝光，晾干胶片，扫描胶片，用BandScan分析Beclin1、LC3、p62、PI3K、Akt、mTOR蛋白表达灰度值。

1.6 统计学方法

应用SPSS 23.0统计软件处理数据，计量资料均符合正态分布且方差齐性，以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，各组间差异采用单因素方差分析，采用LSD-*t*检验法进行多重比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况及脾脏指数比较

各组小鼠均存活。正常组小鼠食欲旺盛，精力

充沛，活泼好动，毛发柔软密集有光泽。与正常组比较，模型组小鼠饮食饮水明显减少，精神不振，活动减少，毛发黯淡稀疏。与模型组比较，健脾补肾方大、小剂量组及胸腺肽组小鼠饮食饮水量增多，精神状态、毛发及活动情况均明显改善。健脾补肾方小剂量组小鼠饮食饮水、精神、活动状况均优于健脾补肾方大剂量组，与胸腺肽组小鼠一般情况无差异。表1示，各组小鼠体质量及脾脏指数比较差异有统计学意义($P<0.01$)。与正常组比较，模型组小鼠体质量及脾脏指数降低($P<0.01$)；与模型组比较，健脾补肾方大、小剂量组及胸腺肽组小鼠体质量及脾脏指数增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与健脾补肾方小剂量组比较，健脾补肾方大剂量组小鼠体质量及脾脏指数降低($P<0.05$)；健脾补肾方小剂量组与胸腺肽组小鼠体质量及脾脏指数差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 各组小鼠体质量及脾脏指数比较
Table 1 Comparison of body weight and spleen index in each group of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体质量/g	脾脏指数/mg·g ⁻¹
正常组	10	30.750±1.624	5.727±0.948
模型组	10	20.983±0.873 ^{a)}	4.048±0.473 ^{a)}
健脾补肾方大剂量组	10	22.933±1.306 ^{b) d)}	4.821±0.628 ^{b) d)}
健脾补肾方小剂量组	10	26.000±0.841 ^{c)}	5.709±0.386 ^{c)}
胸腺肽组	10	26.400±1.378 ^{c)}	5.689±0.451 ^{c)}
<i>F</i> 值		54.022	9.021
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注：a)与正常组比较， $P<0.01$ ；b)与模型组比较， $P<0.05$ ；c)与模型组比较， $P<0.01$ ；d)与健脾补肾方小剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠脾脏IFN-γ、IL-2含量比较

表2示，各组小鼠脾脏IFN-γ、IL-2含量比较

表2 各组小鼠脾脏IFN-γ、IL-2含量比较
Table 2 Comparison of IFN-γ and IL-2 levels in the spleens of mice in each group (pg·ml⁻¹, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IFN-γ	IL-2
正常组	10	155.061±10.645	89.444±5.442
模型组	10	76.185±8.722 ^{a)}	40.957±4.809 ^{a)}
健脾补肾方大剂量组	10	116.640±3.237 ^{b) c)}	55.704±8.648 ^{b) c)}
健脾补肾方小剂量组	10	137.253±11.523 ^{b)}	79.941±9.805 ^{b)}
胸腺肽组	10	135.168±12.287 ^{b)}	79.047±9.519 ^{b)}
<i>F</i> 值		55.914	38.225
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注：IFN-γ，干扰素γ；IL-2，白细胞介素2。
a)与正常组比较， $P<0.01$ ；b)与模型组比较， $P<0.01$ ；c)与健脾补肾方小剂量组比较， $P<0.01$ 。

差异有统计学意义 ($P<0.01$)。与正常组比较,模型组小鼠脾脏 IFN- γ 、IL-2 含量降低 ($P<0.01$);与模型组比较,健脾补肾方大剂量组、健脾补肾方小剂量组、胸腺肽组小鼠脾脏 IFN- γ 、IL-2 含量均升高 ($P<0.01$);与健脾补肾方小剂量组比较,健脾补肾方大剂量组小鼠脾脏 IFN- γ 、IL-2 含量降低 ($P<0.01$);健脾补肾方小剂量组和胸腺肽组比较,小鼠脾脏 IFN- γ 、IL-2 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

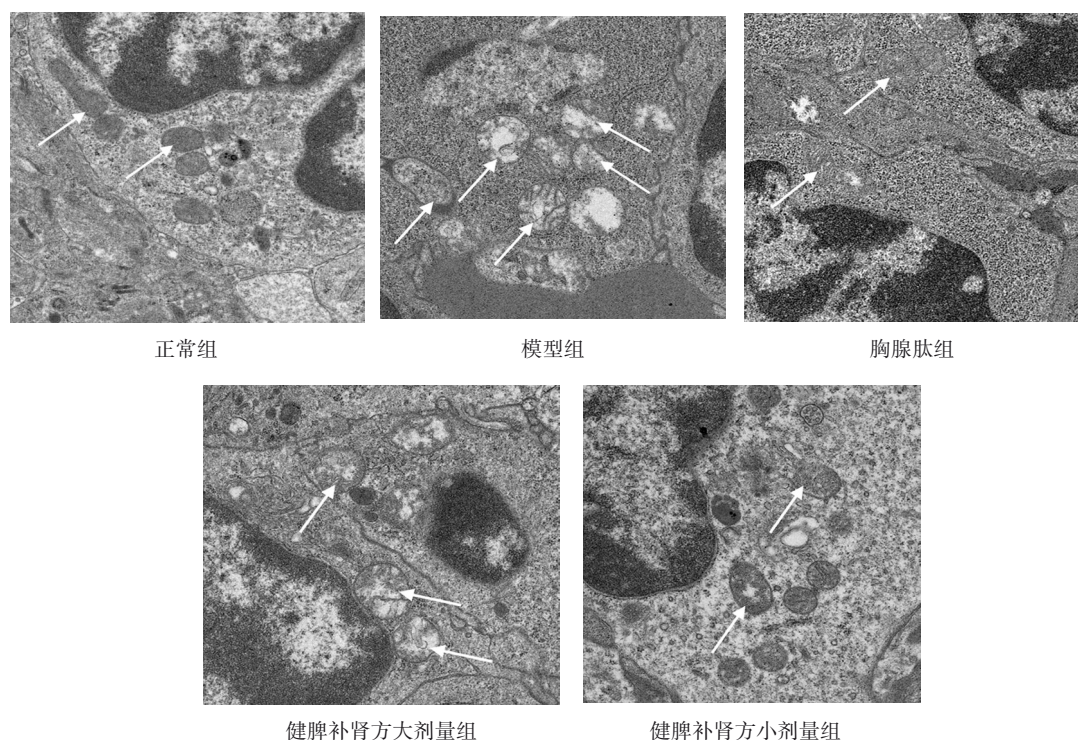
2.3 各组小鼠脾脏自噬小体比较

图 1 示,正常组小鼠脾脏细胞膜、线粒体、内

质网、细胞核等细胞器超微结构完整,自噬小体少量存在。与正常组比较,模型组小鼠脾脏细胞内质网减少,线粒体脊断裂,自噬小体明显增多;健脾补肾方大剂量组小鼠脾脏线粒体可见部分完整脊,自噬小体较多;健脾补肾方小剂量组、胸腺肽组小鼠脾脏线粒体结构较完整,自噬小体较少。

2.4 各组小鼠脾脏自噬相关蛋白表达比较

表 3 示,各组小鼠脾脏 Beclin1 蛋白、p62 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 值差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。与正常组比较,模型组小鼠脾脏 Beclin1 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 值显著升高, p62 蛋



注:图中白色箭头指示为自噬小体。

图 1 各组小鼠脾脏自噬小体透射电镜观察结果 (×5000)

Figure 1 Transmission electron microscope observation results of autophagosomes in the spleens of mice in each group (×5000)

表 3 各组小鼠脾脏自噬相关蛋白表达比较

Table 3 Autophagy-related protein expression in the spleens of mice in each group

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Beclin1/ β -actin	LC3-II/LC3-I	p62/ β -actin
正常组	10	0.172 $\pm$ 0.023	0.185 $\pm$ 0.012	0.652 $\pm$ 0.078
模型组	10	0.655 $\pm$ 0.017 ^{a)}	0.840 $\pm$ 0.041 ^{a)}	0.172 $\pm$ 0.048 ^{a)}
健脾补肾方大剂量组	10	0.507 $\pm$ 0.023 ^{b) c)}	0.550 $\pm$ 0.070 ^{b) d)}	0.357 $\pm$ 0.042 ^{b) c)}
健脾补肾方小剂量组	10	0.456 $\pm$ 0.016 ^{b)}	0.273 $\pm$ 0.021 ^{b)}	0.508 $\pm$ 0.063 ^{b)}
胸腺肽组	10	0.399 $\pm$ 0.018 ^{b)}	0.341 $\pm$ 0.044 ^{b)}	0.507 $\pm$ 0.066 ^{b)}
F 值		244.577	111.986	26.791
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:LC3,微管相关轻链蛋白3。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与健脾补肾方小剂量组比较, $P<0.05$; d) 与健脾补肾方小剂量组比较, $P<0.01$ 。

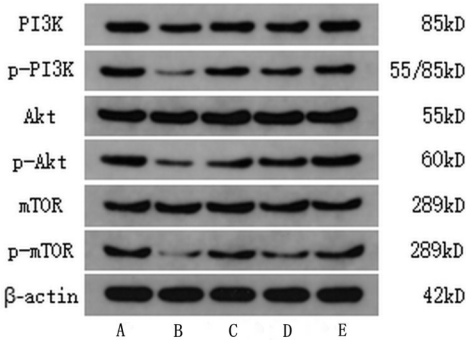
白表达水平显著下降 ($P<0.01$)。与模型组比较, 健脾补肾方大剂量组、健脾补肾方小剂量组、胸腺肽组小鼠脾脏 Beclin1 蛋白表达水平、LC3-II/LC3-I 值均明显降低, p62 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$)。与健脾补肾方小剂量组比较, 健脾补肾方大剂量组小鼠脾脏 Beclin1 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 值明显升高, p62 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与胸腺肽组比较, 健脾补肾方小剂量组小鼠脾脏 Beclin1 蛋白、p62 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 值差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组小鼠脾脏 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达比较

表 4 示, 各组小鼠脾脏 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达比较差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。与正常组比较, 模型组小鼠 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 值均显著下降 ($P<0.01$); 与模型组比较, 健脾补肾方大剂量组、健脾补肾方小剂量组、胸腺肽组小鼠脾脏 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 值均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与健脾补肾方小剂量组比较, 健脾补肾方大剂量组小鼠脾脏 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 值均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与胸腺肽组比较, 健脾补肾方小剂量组小鼠脾脏 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 值差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠脾脏 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白电泳图见图 2。

2.6 各组小鼠脾脏 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关分子 mRNA 表达比较

表 5 示, 各组小鼠脾脏 PI3K/Akt/mTOR 信号通



注: p-PI3K, 磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶; PI3K, 磷脂酰肌醇 3-激酶; p-Akt, 磷酸化蛋白激酶 B; Akt, 蛋白激酶 B; p-mTOR, 磷酸化雷帕霉素靶蛋白; mTOR, 雷帕霉素靶蛋白; A, 正常组; B, 模型组; C, 健脾补肾方小剂量组; D, 健脾补肾方大剂量组; E, 胸腺肽组。

图 2 各组小鼠脾脏 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达电泳图

Figure 2 Electropherogram of protein expression related to the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the spleens of mice in each group

路相关分子 mRNA 表达比较差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。与正常组比较, 模型组小鼠脾脏 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达水平显著下降 ($P<0.01$); 与模型组比较, 健脾补肾方大剂量组、健脾补肾方小剂量组、胸腺肽组小鼠脾脏 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与健脾补肾方小剂量组比较, 健脾补肾方大剂量组小鼠脾脏 mTOR mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$), PI3K、Akt mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与胸腺肽组比较, 健脾补肾方小剂量组小鼠脾脏 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 4 各组小鼠脾脏 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达比较

Table 4 Comparison of protein expression related to the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the spleens of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
正常组	10	0.844±0.046	0.778±0.096	1.279±0.188
模型组	10	0.389±0.050 ^{a)}	0.312±0.075 ^{a)}	0.443±0.032 ^{a)}
健脾补肾方大剂量组	10	0.501±0.014 ^{b) d)}	0.446±0.084 ^{b) d)}	0.736±0.030 ^{c) e)}
健脾补肾方小剂量组	10	0.595±0.060 ^{c)}	0.588±0.033 ^{c)}	1.041±0.057 ^{c)}
胸腺肽组	10	0.594±0.067 ^{c)}	0.604±0.051 ^{c)}	1.032±0.092 ^{c)}
F 值		32.637	18.313	31.724
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: p-PI3K, 磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶; PI3K, 磷脂酰肌醇 3-激酶; 磷酸化蛋白激酶 B, p-Akt; 蛋白激酶 B, Akt; p-mTOR, 磷酸化雷帕霉素靶蛋白; mTOR, 雷帕霉素靶蛋白。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与健脾补肾方小剂量组比较, $P<0.05$; e) 与健脾补肾方小剂量组比较, $P<0.01$ 。

表 5 各组小鼠脾脏 PI3K/Akt/mTOR 信号通路分子 mRNA 表达比较

Table 5 Comparison of mRNA expression related to the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the spleens of mice in each group

(2^{-△△△}, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PI3K	Akt	mTOR
正常组	10	1.109±0.165	1.902±0.198	1.196±0.306
模型组	10	0.666±0.105 ^{a)}	1.357±0.323 ^{a)}	0.440±0.058 ^{a)}
健脾补肾方大剂量组	10	0.985±0.158 ^{b)}	1.697±0.438 ^{b)}	0.789±0.034 ^{b) d)}
健脾补肾方小剂量组	10	1.039±0.175 ^{b)}	1.743±0.082 ^{b)}	1.135±0.134 ^{c)}
胸腺肽组	10	1.029±0.120 ^{b)}	1.798±0.038 ^{b)}	1.137±0.128 ^{c)}
F 值		4.162	3.991	11.747
P 值		0.031	0.035	0.001

注: PI3K, 磷脂酰肌醇 3-激酶; Akt, 蛋白激酶 B; mTOR, 雷帕霉素靶蛋白。

a) 与正常组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与健脾补肾方小剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

辐射损伤属中医学“虚劳”“血虚证”范畴,大多数医家认为辐射损伤的内因是脾肾气血亏虚^[11]。辐射易损伤人体正气,造成脏腑气血亏虚,日久不复。肾为先天之本,生髓藏精,肾精是促进人体生长发育、维持人体基本生命活动的物质基础;脾脏为后天之本,气血生化之源。脾肾健旺与否直接影响着机体的生理功能。健脾补肾方以大剂量熟地黄、甘草为君药,熟地黄入肝、肾经,可滋阴养血,填精益髓,补先天肾元;甘草补益脾气,益气复脉,补后天脾胃元气。黄芪补气健脾、益卫固表,当归补血活血,二者共为臣药,加强益气生血功效。佐以陈皮理气健脾,以补后天之本,同时行气导滞,以防补益药之滋腻及滞气之弊。以泽泻为使药,宣泄肾浊,引药归经。全方补益脾肾先后天之本,升提阳气,使精气血生化有源。

脾脏是机体重要的免疫器官,在维持机体免疫功能方面发挥着重要作用,脾脏指数可在一定程度上体现机体免疫功能的强弱。本研究中采用 6.0 Gy X 射线一次性全身照射后,虽未造成小鼠死亡,但小鼠脾脏指数明显下降,说明辐射已造成小鼠免疫器官的损伤。健脾补肾方大、小剂量及胸腺肽干预后小鼠脾脏指数均明显升高,说明健脾补肾方和胸腺肽均抑制了辐射对免疫器官的损伤,从而提高机体防御力和免疫力。另外,健脾补肾方小剂量组在升高脾脏指数方面优于健脾补肾方大剂量组,并与胸腺肽组效果相当,提示健脾补肾方临床等效剂量在改善脾脏损伤方面效果更佳。

细胞因子是机体免疫调节的关键因子,IL-2、IFN- γ 可作为衡量机体免疫功能尤其是细胞免疫水平的重要标志^[12]。IL-2 是 T 细胞生长因子,可刺激

T 细胞、自然杀伤细胞的增殖、活化以及细胞因子的产生,从而发挥免疫调节、免疫应答等作用;IFN- γ 可诱导细胞因子、黏附因子的表达,具有免疫调节作用^[13]。本研究中,辐射后小鼠脾脏 IL-2、IFN- γ 含量明显降低,说明辐射抑制了小鼠免疫应答能力,致使免疫功能下降。而健脾补肾方各剂量和胸腺肽干预后均可显著提高辐射损伤小鼠脾脏中 IL-2 的分泌,诱导 IFN- γ , 显著提高免疫应答能力,促进辐射后免疫功能的恢复,且健脾补肾方小剂量和胸腺肽效果相当。

自噬是广泛存在于真核细胞中的一种正常的生理降解机制,可主动清除细胞内多余、受损、衰老的蛋白质与细胞器以维持细胞稳态和细胞完整性,是维持细胞自身生存的关键细胞修复途径之一^[14]。正常生理状态下,细胞自噬维持较低的水平,当受到营养不足、缺氧、氧化应激及炎症等刺激时,自噬可被适度激活,从而促进细胞修复,避免细胞死亡,是细胞在应激条件下生存的策略和机制^[15-16]。Beclin 1 是酵母自噬相关蛋白 6 (Atg6) 的同源物,是形成自噬体的必需蛋白,参与自噬相关蛋白定位于吞噬泡过程,从而调控自噬体的形成与成熟,是自噬启动的一个重要标志^[17]。LC3 为自噬的标志分子,自噬发生时 LC3 脱去羟基端变成 LC3-I,随后被酯化形成 LC3-II,定位于自噬体的内膜和外膜,参与自噬体的形成^[18],因此 LC3-II 与 LC3-I 的相对表达量是评估自噬水平高低的重要指标。p62 蛋白也叫选择性自噬体膜受体蛋白 (SQSTM1),是连接 LC3 与待降解泛素化底物的重要桥梁,是反映自噬降解活性的重要指标, p62 的表达水平与自噬活性呈负相关^[19]。本研究中,小鼠在辐射后 Beclin1 蛋白表达水平、LC3-II/LC3-I 值升高, p62 表达水平下降,透射电镜显示自噬小体明显增多,自噬程度

强, 细胞结构损伤重; 通过健脾补肾方各剂量和胸腺肽干预后, Beclin1 蛋白表达水平、LC3-II/LC3-I 值显著降低, p62 蛋白表达水平升高, 透射电镜显示自噬小体明显减少, 自噬程度减弱, 细胞结构损伤减轻。说明健脾补肾方和胸腺肽能够抑制辐射后过高的自噬水平, 减轻免疫细胞损伤, 促进辐射后免疫功能的恢复, 且健脾补肾方小剂量和胸腺肽在降低细胞自噬水平方面效果相当, 健脾补肾方小剂量改善效果优于大剂量。

自噬的发生发展接受胞内多种信号分子的调节, 其中比较肯定的有 PI3K/Akt/mTOR 负调节信号途径^[20]。PI3K、Akt 及 mTOR 是自噬发生的上游负调节信号通路中的关键蛋白, PI3K 信号活化后, 激活 Akt, 活化的 Akt 通过调控多种转录因子磷酸化 mTOR, 使其活性增强, 从而抑制自噬^[21]。本研究中, 小鼠在辐射后 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 值显著降低, 自噬程度强; 通过健脾补肾方各剂量和胸腺肽干预后, p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 值显著升高, 自噬程度减弱, 说明健脾补肾方可能通过促进 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的转录与翻译, 从而抑制辐射诱导的过度自噬。

综上所述, 本研究证实了健脾补肾方可能通过促进 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的转录与翻译, 抑制辐射后过高的自噬水平, 减轻脾脏组织损伤, 加快辐射后免疫器官的恢复, 从而改善辐射后免疫功能损伤。健脾补肾方小剂量组改善效果优于大剂量组, 可能与健脾补肾方中小剂量为临床等效剂量, 而健脾补肾方大剂量组中大剂量熟地黄、甘草滋腻之性影响胃肠道吸收有关, 这说明健脾补肾方在治疗辐射免疫功能损伤时非剂量越大越好。自噬是一个动态变化的过程, 本研究仅在一个时间点对于辐射后免疫功能的变化及其与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控细胞自噬的关系进行了探索, 今后可进行多个时间点的观察, 或许可选择到中药适度调控自噬抗辐射免疫功能损伤的最佳时间点。

参考文献

- [1] LUMNICZKY K, IMPENS N, ARMENGOL G, et al. Low dose ionizing radiation effects on the immune system[J]. Environ Int, 2021, 149: 106212. doi: 10.1016/j.envint.2020.106212.
- [2] 郭晗, 郑全辉. 自噬在 T 淋巴细胞中的调控作用[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(17): 2166-2169.
- [3] 孙睿婕. 自噬异常在免疫性血小板减少症发病机制中的作用探讨[D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [4] YANG J, PI C, WANG G. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 699-707. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.072.
- [5] 何东初, 吴江平, 陈如泉, 等. 地甘口服液对肿瘤患者辐射损伤血液和免疫功能的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2005, 25(2): 139-140.
- [6] 何东初, 肖静静, 林惠. 健脾补肾方治疗白细胞减少症 121 例疗效观察[J]. 中国医药导报, 2012, 9(34): 101-102, 107.
- [7] HE DC, XIAO JJ, ZHANG Y, et al. Effect of the Jianpi Bushen Prescription on expressions of the Wnt3a and Cyclin D1 genes in radiation-damaged mice[J]. Genet Mol Res, 2013, 12(4): 4137-4146.
- [8] 潘琦, 何东初, 吴江平, 等. 中药复方对辐射损伤小鼠脾细胞凋亡及 mRNA 表达的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2003, 23(5): 34-35.
- [9] 何东初, 肖静静, 张梦云, 等. 健脾补肾方对辐射损伤小鼠全血细胞及免疫器官的治疗作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(22): 3067-3073.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [11] 高明泽, 徐文慧, 王天琪, 等. 急性辐射损伤的中医病因学探讨[J]. 中医杂志, 2016, 57(6): 454-457.
- [12] ZHENG Y, REN W, ZHANG L, et al. A review of the pharmacological action of astragalus polysaccharide[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 349. doi: 10.3389/fphar.2020.00349.
- [13] 尤平洪, 李令勋, 段小波, 等. IL-2、IFN- γ 、TNF- α 在膀胱癌患者中的水平变化及意义[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(22): 4303-4306.
- [14] DERETIC V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism[J]. Immunity, 2021, 54(3): 437-453.
- [15] MIZUSHIMA N, LEVINE B. Autophagy in Human Diseases[J]. N Engl J Med, 2020, 383(16): 1564-1576.
- [16] ASHRAFIZADEH M, AHMADI Z, FARKHONDEH T, et al. Autophagy as a molecular target of quercetin underlying its protective effects in human diseases[J]. Arch Physiol Biochem, 2022, 128(1): 200-208.
- [17] KLIONSKY DJ, PETRONI G, AMARAVADI RK, et al. Autophagy in major human diseases[J]. EMBO J, 2021, 40(19): e108863. doi: 10.15252/embj.2021108863.
- [18] MA Y, LI C, HE Y, et al. Beclin-I/LC3-II dependent macroautophagy was uninfluenced in ischemia-challenged vascular endothelial cells[J]. Genes Dis, 2022, 9(2): 549-561.

- [19] AGROTIS A, PENG N, BURDEN JJ, et al. Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells [J]. *Autophagy*, 2019, 15(6):976-997.
- [20] SUN D, WU R, ZHENG J, et al. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation[J]. *Cell Res*, 2018, 28(4):405-415.
- [21] 邹春阳, 陈晨, 王凤秋, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的自噬调节剂研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2021, 31(10):825-833.

Effects of *Jianpi Bushen Formula* (健脾补肾方) on the Autophagosomes and PI3K/Akt/mTOR Pathway in Radiation Injured Model Mice

XIAO Jingjing, HE Dongchu, ZHANG Mengyun, ZHANG Yong, DING Xiaojuan, WU Wei, YANG Wenchao
General Hospital of Central Theatre Command, Wuhan, 430070

ABSTRACT **Objective** To explore the effects and possible mechanisms of *Jianpi Bushen Formula* (健脾补肾方) on radiation-induced immune function damage of mice. **Methods** Fifty mice were randomly divided into four groups: normal group, model group, thymosin group, high- and low-dose groups of *Jianpi Bushen Formula*, with 10 mice in each group. Except for the normal group, the mice in the other groups were irradiated with a single whole-body dose of 6.0 Gy X-rays to establish a radiation-injured mouse model. After the successful modeling, the low- and high-dose groups of the *Jianpi Bushen Formula* were given respectively 13 g/(kg·d)、26 g/(kg·d) of the formula by gavage, while the thymosin group was given 11.7 mg/(kg·d) of thymosin by gavage, and the normal group and model group were given 0.1 ml/(10g·d) of 0.9% sodium chloride solution by gavage. Each group was administered once a day for 7 consecutive days. After the last gavage, the mice were weighed, and their spleens were separated and weighed to calculate the spleen index. The levels of interferon gamma (IFN- γ) and interleukin 2 (IL-2) in the spleen tissue were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The autophagosomes in the spleen were observed by transmission electron microscopy. The mRNA expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), and mammalian target of rapamycin (mTOR) in the spleen were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The protein expression of PI3K, Akt, and mTOR in the spleen, as well as the expression of autophagy-related proteins microtubule-associated light chain protein 3 (LC3), Beclin1, and p62 were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the model group showed significant decreases in body weight, spleen index, and levels of IFN- γ and IL-2 in the spleen ($P < 0.01$); the mRNA and protein expression levels of PI3K, Akt, and mTOR in the spleen were also significantly reduced ($P < 0.01$); the expression of Beclin1 protein, the ratio of LC3-II/LC3-I significantly increased ($P < 0.01$), while the level of p62 protein expression significantly decreased ($P < 0.01$). And transmission electron microscopy showed a significant increase in the number of autophagosomes in the spleen and severe cell structure damage in the model group. Compared with the model group, all the above indicators in each medication group were significantly improved ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the high-dose *Jianpi Bushen Formula* group, partial intact cristae were visible in the fine mitochondria of the spleen, and there were more autophagosomes. In the low-dose *Jianpi Bushen Formula* group and thymosin group, the structure of the fine mitochondria in the spleen was relatively intact, and there were fewer autophagosomes. The improvement effect of the low-dose *Jianpi Bushen Formula* group was better than that of the high-dose group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and there was no significant difference between the low-dose group and the thymosin group in terms of each indicator ($P > 0.05$). **Conclusion** *Jianpi Bushen Formula* may alleviate the structural damage of the spleen, promote the recovery of immune function, and achieve a best effect at a low dose by enhancing the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the spleen and inhibiting the over-activation of autophagy induced by radiation.

Keywords radiation damage; *Jianpi Bushen Formula* (健脾补肾方); autophagy; PI3K; Akt; mTOR

(收稿日期: 2023-08-11; 修回日期: 2023-10-17)

[编辑: 邓媛]