基于 mTOR 通路介导的自噬探讨补阳还五汤对脊髓损伤的保护机制

卜献忠[1],张冠鹏[2],郭晓辉[3],李寒曦[3],卜保献[3*],钟远鸣[4]

[1. 广西中医药大学研究生院, 广西 南宁　530001 ;　2. 湖南中医药大学,长沙　410208 ;
3. 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院), 河南 洛阳　471002;
4. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁　530023]

摘要:目的 基于 mTOR 通路介导的自噬探讨补阳还五汤对脊髓损伤(SCI)后自噬相关蛋白的影响,从而揭示补阳还五汤对 SCI 的保护机制。**方法** 64 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,随机分为假手术组、模型组、雷帕霉素组、补阳还五汤组。除假手术组外,其余三组均采用 Allen's 打击方法制备 SCI 模型。假手术组、模型组予生理盐水灌胃,补阳还五汤组予补阳还五汤水煎液灌胃($12.73g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$),在造模前各组分别予相应处理持续 3d,雷帕霉素组在造模后 0.5h 内给予腹腔注射给药($3mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$);造模 3 h、6 h 后采用改良 Tarlov 评分、HE 染色、免疫组化实验、免疫印迹实验方法,观察补阳还五汤对下肢运动功能、脊髓前角区神经元的形态结构及 mTOR 自噬信号通路的影响。**结果** ①与假手术组比,造模后 3 h、6 h 时模型组改良 Tarlov 评分均显著降低,神经元细胞肿胀、胞核固缩严重,细胞结构完整性丧失,Beclin1、LC3 阳性细胞,LC3 - II/LC3 - I、Beclin1 蛋白表达均减少($P<0.05$),mTOR 阳性细胞及蛋白均表达增加($P<0.05$);②与模型组比,造模后 3 h、6 h 时雷帕霉素组、补阳还五汤组改良 Tarlov 评分均显著降低($P<0.05$),神经元细胞肿胀略有减轻,偶尔可见正常的神经元细胞,两组组 Beclin1、LC3 阳性细胞及 LC3 - II/LC3 - I、Beclin1 蛋白表达均升高($P<0.05$),mTOR 阳性细胞及蛋白表达均减少($P<0.05$);③与雷帕霉素组比,造模后 3 h、6 h 时补阳还五汤组改良 Tarlov 评分差异均无统计学意义($P>0.05$),细胞肿胀略减轻、正常神经元稍微增多,造模后 3 h 时 Beclin1 阳性细胞,6 h 时 LC3 阳性细胞表达均升高($P<0.05$),造模后 3h、6 h 时 LC3 - II/LC3 - I、Beclin1、mTOR 蛋白表达增加($P>0.05$)。**结论** 补阳还五汤可以有效地影响细胞自噬水平,改善大鼠下肢运动功能,有效地调控 mTOR 信号通路,其保护作用可能是通过抑制 mTOR 信号通路激活细胞自噬而实现的,这可能是其治疗 SCI 的作用机制之一。

关键词:补阳还五汤;　脊髓损伤;　雷帕霉素;　自噬;　神经元细胞

DOI 标识:doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2022.04.03

中图分类号:R285.5　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1008-0805(2022)04-0778-05

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)指脊柱遭受不同作用外力促使椎体发生爆裂、椎体移位,严重者伤及椎管内脊髓组织,从而导致脊髓神经损伤性疾病[1],通常会导致不可逆转的感觉和运动障碍。2014 年全球 SCI 发病率大约为每百万人中 15 ~ 40 例[2],同年在中国发病率为每百万人中 23.7 ~ 60.6 例[3],2018 在美国大约有 28.8 万 SCI 患者,每年发生 17000 例新的 SCI 病例,SCI 给患者带来了沉重的经济负担和心理压力[4]。SCI 包含两个阶段的病理过程即原发性损伤和继发性损伤,继发性损伤是指 SCI 发生后脊髓水肿和血肿对脊髓神经造成的二次损伤,具有可逆性和可干预性,SCI 继发性损伤过程中常伴有炎症、细胞凋亡、自噬、坏死和氧化应激,均可引起脊髓神经元损伤,尤其是前角神经元损伤,可能导致运动功能丧失[5,6]。目前,关于继发性损伤的机制尚不明确[7],但阻断或减轻继发性损伤阶段发生的神经元损伤可能会降低肢体残疾的程度。

自噬是一种普遍存在于真核细胞中"程序性死亡"的过程,具有高度保守性,其通过溶酶体降解细胞内多余的脂质、糖原等代谢物质,清除受损细胞器,为维持细胞内环境稳态和能量平衡提供保障[8]。自噬对神经退行性疾病具有保护作用[9,10]。雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种常见的自噬诱导剂,其活性对自噬体形成及成熟具有重要作用,当该通路被激活后,可抑制细胞自噬[11],而当该通路受到抑制时却可诱导细胞自噬[12]。研究表明 mTOR 在大鼠 SCI 后可促进细胞自噬并减少神经组织损伤和运动障碍[13,14]。

补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction)出自于清·王清任所著《医林改错·下卷·瘫痪论》,方剂由黄芪、当归尾、赤芍、川芎、红花、地龙组成,主要功效为益气、活血、通络,其中黄芪甲苷、芍药苷等苷类物质是补阳还五汤中重要的药效成分[15]。体外实验发现补阳还五汤通过上调自噬相关蛋白 LC3II、Beclin1 的表达,增强自噬,从而保护缺氧/复氧损伤 H9C2 心肌细胞[16]。体内实验观察到补阳还五汤激活细胞自噬后,能够调节大鼠脑卒中后皮质缺血区域自噬水平,稳定线粒体功能,降低了皮质缺血区域神经细胞的丢失,从而保护了脑神经细胞[17]。本课题组前期实验观察到补阳还五汤具有潜在防治脊髓缺血再灌注损伤(spinal cord ischemia/reperfusion injury,SCII)的作用[18]。当前基于 mTOR 通路介导的自噬探讨补阳还五汤对 SCI 的保护机制,尚未有文献报道。本研究旨在采用补阳还五汤治疗 SCI 模型大鼠,探讨 mTOR 信号通路对 SCI 发病机制的影响及补阳还五汤是否为

收稿日期:2021-07-23;　**修订日期:**2022-02-20

基金项目:国家自然科学基金(81760874);
广西重点研发计划(桂科 AB20159018);
河南省中医药科学研究专项课题(20 - 21ZY2083);
广西中医药大学 2021 年博士研究生科研创新项目(YCBXJ2021009)

作者简介:卜献忠(1989-),男(汉族),河南开封人,广西中医药大学研究生院博士研究生,主治医师,主要从事脊柱脊髓损伤、脊柱相关疾病的基础与临床研究工作.

*通讯作者简介:卜保献(1970-),男(汉族),河南开封人,河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)主任医师,教授,硕士研究生导师,博士学位,主要从事脊柱脊髓疾病的诊治研究工作.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

干预 SCI 的新靶点,为今后开发与利用中医药治疗 SCI 提供实验基础与理论依据。

1　材料与仪器

1.1　实验动物及分组　雄性 SPF 级 SD 大鼠 64 只,体重(200 ± 20)g,由郑州天池生物集团提供,实验动物使用许可证号:SCXK(豫)2020 - 0004,实验动物合格证:No.410975200100023816。64 只 SD 雄性大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为假手术组、模型组、雷帕霉素组和补阳还五汤组,每组 16 只,每组分 3 h、6 h 两个亚组,每个亚组 8 只。假手术组仅咬除椎板,暴露脊髓,但不打击脊髓。实验动物自然进食、饮水,分笼饲养,自然光照,室温 23℃左右,湿度 56%左右。实验操作按照科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》中的有关规定进行。

1.2　实验试剂　苏木素染色剂(批号:H9627,Sigma),二甲苯(批号:10023418,国药集团),包埋石蜡(批号:69019361,国药集团),无水乙醇(批号:10009218,国药集团),中性树胶(批号:10004160,国药集团),彩虹蛋白 Marke(10 - 250KD)(批号:PM302,promoton),PMSF(批号:P105539,阿拉丁公司),Tris - base(批号:1115GR500,Biofroxx),SDS(批号:30166428,国药集团),PVDF 膜(0.45μm)(批号:IPVH00010,Millipore),RIPA 裂解液(批号:P00138,中国碧云天),BCA 蛋白测定试剂(批号:P0010,中国碧云天),磷酸化蛋白酶抑制剂(批号:S1873,中国碧云天),30% Acr - Bis(批号:BL531b,Biosharp)、TEMED(批号:80125336,国药集团),兔多抗 Beclin1(批号:14600 - 1 - AP,武汉三鹰公司)、兔多抗 LC3(批号:11306 - 1 - AP,武汉三鹰公司)、小鼠单抗 mTOR(批号:66888 - 1 - Ig,武汉三鹰公司),HRP 标记羊抗小鼠二抗(批号:BA1051,武汉博士德),HRP 标记羊抗兔二抗(批号:BA1054,武汉博士德),ECL 底物液(批号:P1050,北京普利莱基因有限公司),兔多抗 GAPDH(批号:AB - P - R001,杭州贤至生物有限公司)。

1.3　实验器械　自由落体脊髓损伤模型打击器(安徽正华生物仪器设备有限公司),脱水机(武汉俊杰 JT - 12J 电脑生物组织脱水机有限公司),组织摊烤片机(武汉俊杰 JT - 12J 电脑生物组织脱水机有限公司),病理切片机(德国 Leica 公司),显微镜(奥林巴斯 BX53 型生物显微镜),电泳仪电源(北京六一仪器厂),垂直电解槽(北京六一仪器厂),电转仪(北京六一仪器厂),酶标仪(Thermo 有限公司),离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司)。

2　方法

2.1　实验药物制备　补阳还五汤购买于河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)中药房。取一剂补阳还五汤的原药材(生黄芪 120g,当归尾 6g,赤芍 5g,地龙 3g,川芎 3g,桃仁 3g,红花 3g)放入煎药壶中,在倒入 10 倍于补阳还五汤体积的水于煎药壶中,浸泡 24 h,先武火煮沸,后文火继续煮 30 min,滤出药液;在倒入约 5 倍补阳还五汤体积的水,按前法再次煎药及滤出药液。取出 2 次煎煮的补阳还五汤水煮液,并混合,再次过滤,离心,取上清液,浓缩上清液,定容至 100 mL 获得浓度为 1.43g/mL 的补阳还五汤水煎液;雷帕霉素购买于武汉斯尔曼有限责任公司,按说明书将其制备成 0.1mg/ml 的溶剂,无菌封瓶,放入 4℃冰箱保存,备用。

2.2　动物给药　参考黄继汉《药理实验中动物间和动物和人体间的等效剂量换算》,补阳还五汤的标准剂量为 143/kg,换算后大鼠的灌胃剂量为 12.73mg/kg,假手术组、模型组于造模前 3d 给予 10 mL · kg^{-1} · d^{-1}生理盐水等体积灌胃;补阳还五汤组造模前 3d 给予 12.73g · kg^{-1} · d^{-1}补阳还五汤水煮液灌胃,持续 3d 直至取材当天。雷帕霉素组在造模后 0.5 h 内给予 3mg · kg^{-1} · d^{-1}雷帕霉素腹腔注射 1 次。

2.3　SCI 大鼠模型制作　模型组、雷帕霉素组、补阳还五汤组则咬除椎板,打击 T_9 ~ T_{10}脊髓,建立 SCI 模型。10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射,麻醉后,采用改良 Allen's 重物打击法复制 SCI 模型[19]。大鼠俯卧位于操作台,备皮,消毒,铺巾,在后背部 T_9 ~ T_{10}棘突做正中切口,咬除 T_9 ~ T_{10}棘突、椎板,暴露硬脊膜,采用 5 g 重物从 5 cm 高度自由落下打击 T_9 ~ T_{10}硬脊膜。造模成功标准是:T_9 ~ T_{10}脊髓水肿或出血,硬脊膜紧张,膨大,大鼠尾巴呈现痉挛性抽动,双下肢、躯体回缩样扑动,双下肢呈迟缓性瘫痪。造模后采用生理盐水、庆大霉素冲洗切口,缝线闭合切口,敷料覆盖伤口,肌注注射庆大霉素(30mg · kg^{-1} · d^{-1})。

2.4　观察指标及检测方法

2.4.1　改良 Tarlov 评分　各组均取造模后 8 只大鼠,在造模后 3 h、6 h 时采用盲评方式对 SCI 模型进行改良 Tarlov 行为学评分[20],其评分标准如下:下肢完全软瘫,难以察觉得下肢活动为 0 分;下肢稍微挪动,但无法抵抗地心引力为 1 分;下肢水平面可以活动,但不可抵抗肢体重量为 2 分;下肢能行走或跳跃,但有明显共济失调为 3 分;下肢步态健康,能轻松地蹦跳为 4 分。0 ~ 3 分即造模成功。所有大鼠的评分在建模后和安乐死前进行评估,最终取平均值。

2.4.2　组织灌注及取材　每组选取 4 只取材新鲜脊髓组织,4 只脊髓组织进行 10% 甲醛固定。采用上述麻醉方式对动物进行麻醉,动物麻醉起效后打开胸腔,从心尖位置灌注 300 ~ 400 ml 生理盐水,待有右心耳液体呈澄清时以 T_{10}为中心,切取 1 cm 新鲜脊髓组织,存入 - 80℃冰箱,以用于完成免疫印迹实验。或待有右心耳液体呈澄清时,采用 10% 甲醛灌注直至四肢、尾巴僵硬,以 T_{10}为中心,切取 1 cm 脊髓组织,放入 10% 甲醛液中固定,脱水包埋,石蜡切片 5μm。

2.4.3　HE 染色及免疫组织化学　造模后 3 h、6 h 每组随机取 4 只,石蜡浸蜡包埋,切片,片厚 5μm、贴片、45℃烘干。切片在二甲苯、无水乙醇、梯度乙醇(95%、80%、70%)中脱蜡,依次侵入苏木素液 10 min,1% 盐酸酒精 3s,蒸馏水洗 3 min,碳酸锂 10 min,蒸馏水洗 3min,伊红 2 min,蒸馏水洗 2 次,70% 乙醇 min,90% 乙醇 1 min,无水乙醇Ⅱ 1 min,无水乙醇Ⅰ 1 min,二甲苯Ⅱ 1 min,二甲苯Ⅰ 1 min,烘干,封片,光学显微镜观察损伤区形态学改变。免疫组织化学的切片、脱蜡、脱水等过程同前,脱蜡后 60℃ 烘片 2h,枸橼酸盐高压修复 3 min,3% H_2O_2 清除内源性过氧化物酶 10min,PBS 清洗,5% BSA 封闭 10 min,滴加一抗(Beclin - 1 1:100,LC - 3 1:200,mTOR 1:100)4℃ 过夜,PBS 清洗,滴加 HRP 抗兔 Ig G 37℃ 30 min,PBS 清洗,光镜下观察 DAB 染色,苏木素复染,PBS 清洗,脱水、封片、晾干。每组切取 5 张,光学显微镜下拍摄每张切片神经前角区,蓝色为细胞核,棕黄色或棕褐色为目标蛋白,采用 Motic 软件对神经元数目及 Beclin1、LC3、mTOR 神经元进行统计,最终取平均值。

2.4.4　蛋白样品制备　脊髓组织称重后,按 1 mg 脊髓组织加入 6μl 裂解液(含 1mmol · L^{-1} PMSF)的标准进行组织匀浆、超声、离心(12000 r/min 5 min),取上清。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书要求调整各组蛋白浓度。

2.4.5　Western Blot 检测　制备 SDS - PAGE 聚丙烯酰胺凝胶(12% 分离胶,5% 积层胶),加入样品蛋白、电泳 120 V 1.5 h,取目的区域凝胶,湿转法 200mA 1.5h,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,TBST 清洗 5 min 3 次,一抗(兔抗鼠单克隆抗体 Beclin - 1 1:1000,LC - 3 1:1000,mTOR 1:5000)4℃ 过夜,TBST 清洗 3 次,5 min/次,二抗(HRP 标记羊抗小鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗 均 1:50000)室温孵育 2 h,TBST 清洗 5 次,5 min/次,显色曝光,晾干胶片,扫描胶片,用 image - pro - plus 分析胶片灰度值。

2.5　统计学处理　采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计分析,正态分布资料用($\bar{x} \pm s$)表示。经检验满足正态性及方差齐性,采用

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

单因素方差分析进行多组间比较,用 *LSD* 法进行多重比较;不满足方差齐性,用 Tamhane T ^{2}检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　改良 Tarlov 评分　与假手术组比,在造模后 3 h、6 h 时模型组改良 Tarlov 评分均明显降低($P<0.01$);与模型组比,在造模后 3 h、6 h 时雷帕霉素组、补阳还五汤组改良 Tarlov 评分均升高($P<0.05$)。与雷帕霉素组比,在造模后 3 h、6 h 时补阳还五汤组改良 Tarlov 评分差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图 1。

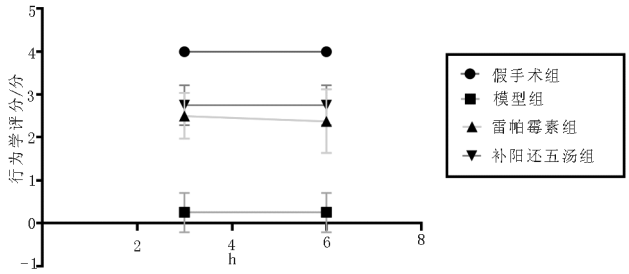


图 1　造模后各组大鼠改良 Tarlov 评分

3.2　各组小鼠脊髓组织病理改变　假手术组细胞结构完整,神经元略肿胀,细胞间隙正常,核仁、核膜均清晰可见。造模后 3 h、6 h时模型组神经元细胞出现严重肿胀,细胞间隙显著增大,胞核明显固缩、核仁、核膜均消失。雷帕霉素组神经元细胞肿胀略有减轻,细胞间隙稍有缩小,胞核固缩、核仁、核膜消失,偶尔可见相对正常的神经元细胞。补阳还五汤组神经元细胞稍微肿胀,细胞间隙稍显正常,胞核依然固缩,核仁、核膜模糊可见,偶尔可见正常神经元细胞。见图 2。

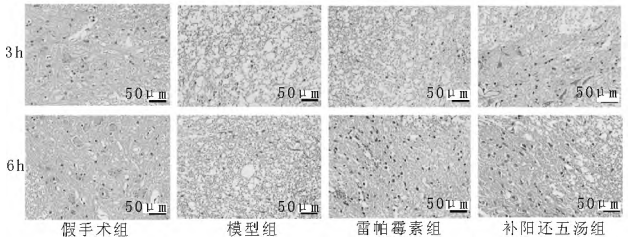
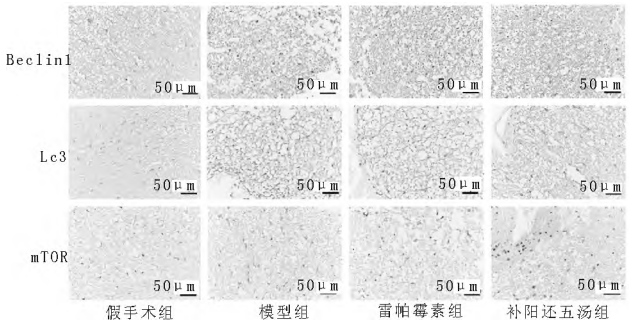
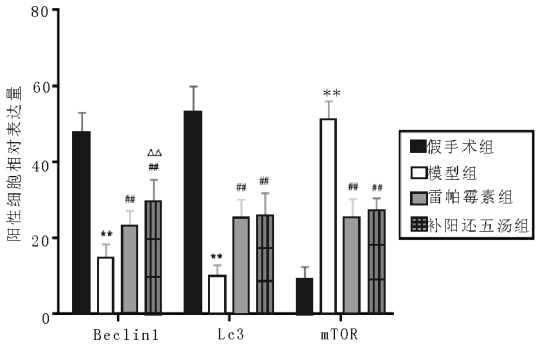


图 2　大鼠脊髓组织病理显微结构(HE 染色,400×)

3.3　免疫组化学结果　在造模后 3 h 时,与假手术组比,模型组脊髓组织中 Beclin1 、LC3 阳性细胞表达均显著下调($P<0.01$),mTOR 阳性细胞表达显著上调($P<0.01$)。与模型组比,雷帕霉素组、补阳还五汤组脊髓组织中 Beclin1 、LC3 阳性细胞表达均显著上调($P<0.01$),mTOR 阳性细胞表达均显著下调($P<0.05$)。补阳还五汤组 Beclin1 高于雷帕霉素组($P<0.01$),LC3、mTOR 阳性细胞表达均高于雷帕霉素组($P>0.05$)。见图 3。

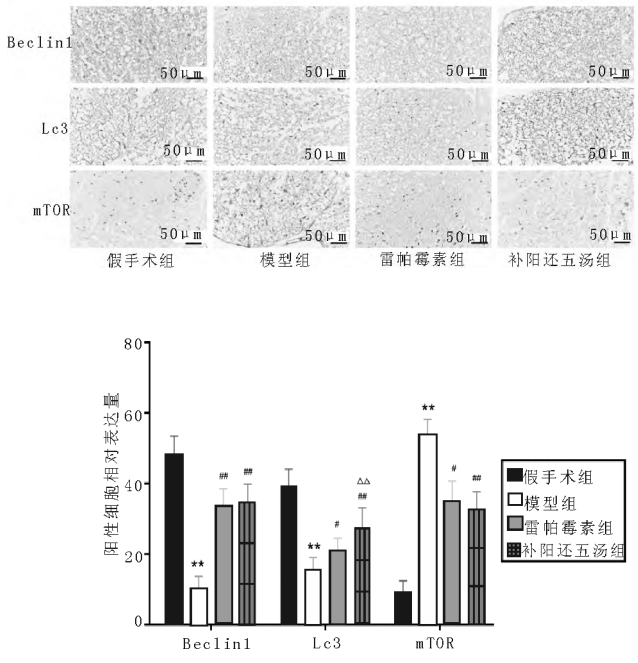




与假手术组比,$^{**}P<0.01$;$^{*}P<0.05$;
与模型组比,$^{\#\#}P<0.01$;$^{\#}P<0.05$;
与雷帕霉素组比,$^{\triangle\triangle}P<0.01$,$^{\triangle}P<0.05$

图 3　免疫组织化学检测 3h 后各组大鼠脊髓组织中 Beclin1、LC3、mTOR 阳性细胞的表达(400×)

在造模后 6 h 时,与假手术组比,模型组脊髓组织中 Beclin1 、LC3 阳性细胞表达均显著下调($P<0.01$),mTOR 阳性细胞表达显著上调($P<0.01$)。与模型组比,补阳还五汤组、雷帕霉素组脊髓组织中 Beclin1 、LC3 阳性细胞表达均上调($P<0.01$,$P<0.05$),mTOR 阳性细胞表达显著下调($P<0.01$)。补阳还五汤组 LC3 阳性细胞表达显著高于雷帕霉素组($P<0.01$),Beclin1 、mTOR 阳性细胞表达高于雷帕霉素组($P>0.05$)。见图 4。

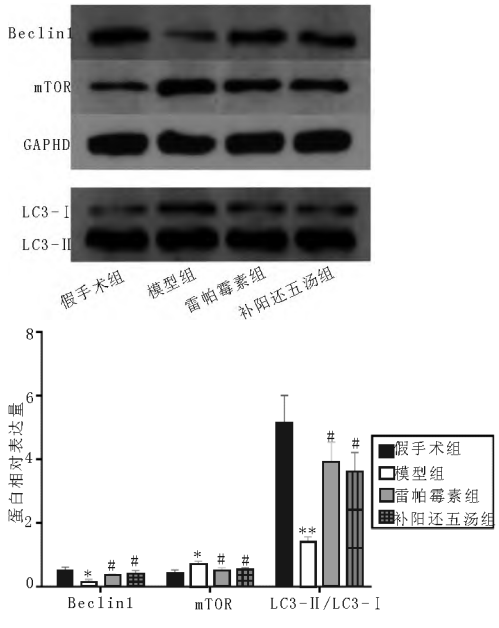


与假手术组比,$^{**}P<0.01$;$^{*}P<0.05$;
与模型组比,$^{\#\#}P<0.01$;$^{\#}P<0.05$;
与雷帕霉素组比,$^{\triangle\triangle}P<0.01$,$^{\triangle}P<0.05$

图 4　免疫组织化学检测 6h 后各组大鼠脊髓组织中 Beclin1、LC3、mTOR 阳性细胞的表达(400×)

3.4　免疫印迹实验结果　在造模后 3 h 时,与假手术组比,模型组脊髓组织中 LC3 - II/LC3 - I、Beclin1 蛋白表达均明显下调($P<0.05$,$P<0.01$),mTOR 蛋白表达上调($P<0.05$)。与模型组比,雷帕霉素组、补阳还五汤组脊髓组织中 LC3 - II/LC3 - I、Beclin1 蛋白表达均上调($P<0.05$),mTOR 蛋白表达均下调($P<0.05$)。补阳还五汤组对 LC3 - II/LC3 - I、Beclin1 蛋白上调及 mTOR 蛋白下调作用优于雷帕霉素($P>0.05$)。见图 5。

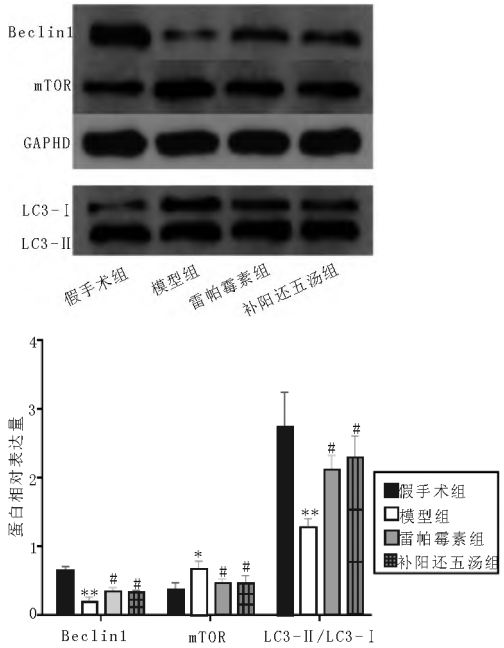
(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



与假手术组比，$^{**}P<0.01$；$^{*}P<0.05$；
与模型组比，$^{\#\#}P<0.01$；$^{\#}P<0.05$；
与雷帕霉素组比，$^{\triangle\triangle}P<0.01$，$^{\triangle}P<0.05$

图 5　免疫印迹法检测 3h 各大鼠脊髓组织中蛋白 LC3－II/LC3－I、Beclin1、mTOR 的表达

在造模后 6 h 时，与假手术组比，模型组脊髓组织中 LC3－II/LC3－I、Beclin1 蛋白表达显著下调（$P<0.01$），mTOR 蛋白表达明显著上调（$P<0.01$）。与模型组比，雷帕霉素组、补阳还五汤组脊髓组织中 LC3－II/LC3－I、Beclin1 蛋白表达均上调（$P<0.05$），mTOR 蛋白表达下调（$P<0.05$）。补阳还五汤组对 LC3－II/LC3－I、Beclin1 蛋白上调及 mTOR 蛋白下调作用优于雷帕霉素（$P>0.05$）。见图 6。



与假手术组比，$^{**}P<0.01$；$^{*}P<0.05$；
与模型组比，$^{\#\#}P<0.01$；$^{\#}P<0.05$；
与雷帕霉素组比，$^{\triangle\triangle}P<0.01$，$^{\triangle}P<0.05$

图 6　免疫印迹法检测 6h 后各大鼠脊髓组织中蛋白 LC3－II/LC3－I、Beclin1、mTOR 的表达

4　讨论

SCI 是一种严重的中枢神经系统疾病，通常由重大创伤引起，如从高处坠落和道路交通事故等，具有发病率高、致残率高等特点，给患者带来了沉重的经济负担和心理压力[4]。近年来，虽然开展了大量关于 SCI 的基础研究和临床治疗研究，但均未取得满意的治疗效果[21]。SCI 严重影响着患者运动功能的恢复，继发性 SCI 具有一定的可逆性和可干预性[5,6]，自噬参与了继发性 SCI 的病理生理过程，对这个过程的调控已被业界认为是治疗 SCI 的潜在手段。因此，通过自噬逆转继发性 SCI 的治疗方法可能会促进患者的肢体运动功能恢复。

补阳还五汤（Buyang Huanwu Decoction）出自于清・王清任所著《医林改错・下卷・瘫痪论》，主要功效为益气、活血、通络，其中黄芪甲苷、芍药苷等苷类物质是补阳还五汤中重要的药效成分[15]。本方原本用于气虚血瘀型中风所致半身不遂，现在多应用神经损伤的防治研究[16,18]。体外实验观察到补阳还五汤通过上调自噬相关蛋白 LC3II、Beclin1 的表达，增强自噬，从而保护缺氧/复氧损伤 H9C2 心肌细胞[16]。动物实验发现补阳还五汤通过激活细胞自噬能够调节大鼠脑卒中后皮质缺血区域自噬水平，降低了皮质缺血区域神经细胞的丢失，从而保护了脑神经细胞[17]。侯贝贝等[22]探讨补阳还五汤抗脂多糖（LPS）诱导巨噬细胞活化与自噬中的作用，观察到补阳还五汤可有效地促进 p－Akt，p－PI3K，p－mTOR 蛋白表达，降低 LC3－II/LC3－I、p62 自噬标志性蛋白的表达，减少自噬斑点的形成，降低自噬活性，其作用机制与调控 PI3K/Akt/m TOR 信号通路有关。本课题前期研究[18]观察到补阳还五汤预处理 SCII 大鼠可以抑制 SCI 后脊髓组织中 Beclin 1、LC3 蛋白表达，同时下调 P62 蛋白的表达，减少自噬小体的形成，促进下肢运动功能的恢复，其保护作用可能是通过抑制细胞过度自噬而实现的[18]。由此可见，补阳还五汤具有较好的促自噬、抗自噬的双重作用及促进神经修复的功能。

在细胞外信号、生长因子、细胞能量状态和应激条件下，mTOR 信号通路可作为细胞生长、增殖、存活和分化的中央控制器，在神经系统性疾病的病理生理过程中起着重要的作用[23,24]，并对神经退行性疾病的自噬具有调节作用[19,25,26]。mTOR 存在 mTOR 复合体 1（mTORC 1）和 mTOR 复合体 2（mTORC 2）两种不同的复合物[27]；mTORC 1 是细胞增殖、凋亡和自噬的主要调节因子[28]。正常情况下，通过 mTOR 信号通路的 mTORC 1 直接与自噬相关因子丝氨酸/苏氨酸激酶 1（ULK1）相互作用或使之磷酸化，从而影响 ULK 复合体的形成，从而抑制 Beclin 的活性，抑制自噬的发生[29]。Sekiguchi 等[13]通过 mTOR 处理诱导 SCI 后受损神经组织中 Beclin 1、LC3 阳性细胞及 Beclin 1、LC3 蛋白表达的上调。李喜功等[14]研究表明与假手术组比，mTOR 处理诱导 SCI 后受损神经组织中 Beclin 1、LC3 蛋白表达明显升高，脊髓坏死减轻，炎性细胞数量少，存活神经元数目增多。上述研究说明自噬的诱导剂 mTOR 增强了脊髓损伤后自噬的应激状态。本研究中观察到与假手术组比，模型组大鼠受损脊髓组织中 Beclin 1、LC3 阳性细胞及 LC3－II/LC3－I、Beclin 1 蛋白表达异常，说明自噬在 SCI 的发病中发挥了作用；同时模型组中 mTOR 阳性细胞及蛋白表达上调，提示 mTOR 通路被激活后，调控了脊髓损伤后自噬的应激状态，这与以往研究结果一致[13-14]，故本研究认为有效调控该信号通路，能调控细胞自噬，从而影响 SCI 后神经组织损伤的程度。

SCI 后脊髓神经元细胞结构发生破坏及功能出现障碍，初期轻微损伤时脊髓神经元细胞通过自身代偿作用促进自噬底物的降解，从而对神经元运动细胞具有保护作用[13,30,31]。研究表明后期细胞自噬过度激活导致自噬底物的过度堆积，超出了神经元

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

运动细胞对自噬底物降解的能力,因而对神经元运动细胞具有损伤作用[17,32]。随着病程的延长,自噬在 SCI 病程中的作用是突出的,神经元细胞的损伤程度与脊髓组织中的自噬底物的堆积水平呈正相关[14,30,33]。Beclin 1 作为自噬活化的关键因子,其主要通过与 PI3K Kinase Class III 结合形成 Atg1/ULK1 复合物,在自噬体前体的形成中起重要作用。在异常情况下,mTOR 与自噬复合体解离,失去对 Beclin 1 的活性抑制作用,诱导自噬的发生[31]。研究表明 Beclin 1 在 SCI 后激活自噬的发生与其表达量的增加有关[34,35]。自噬体膜上的微管相关蛋白 Ⅰ 轻链 3(LC 3),是哺乳动物细胞中 Atg 8 的同源物蛋白,也哺乳动物自噬诱导最重要和最可靠的指标。LC3 主要分为胞质形式 (LC3 - I) 和膜结合形式 (LC3 - II),LC3 - I 向 LC3 - II 的转化对于自噬体的形成至关重要。当自噬被诱导时,LC3 可以从细胞溶质转移到自噬体膜 ,并从 LC3I 转化为 LC3II ,LC3 - II/LC3 - I 的比值被认为是自噬诱导的标志之一,其比值大小与细胞自噬水平高低呈正相关[36,37]。Guo 等[33]研究表明二甲双胍可以下调 SCI 后受损神经组织中 mTOR 蛋白的表达,上调 Beclin 1、LC3 蛋白的表达。Fogerson 报道,增加白质中神经元的数量可以促进中枢神经系统损伤后运动神经元的功能恢复[38]。黄芪甲苷抑制 mTORC 1 信号传导,下调 SCI 后受损神经组织 mTOR 和 p70S6K 磷酸化水平,减轻 SCI 大鼠的神经元丢失,促进 SCI 大鼠的神经功能恢复[39]。锌处理 SCI 动物模型后经 AMPK/mTOR 信号通路调节自噬,减少神经细胞神经元丢失的数目,上调 Beclin 1、LC3 蛋白的表达[40]。上述研究提示抑制 mTOR 信号通路,能够增强细胞自噬,促进运动神经功能的康复。本研究发现补阳还五汤能够改善 SCI 后神经元细胞的形态结构,上调脊髓组织中 Beclin 1、LC3 阳性细胞,LC3 - II/LC3 - I、Beclin1 蛋白表达,下调 mTOR 阳性细胞及蛋白表达,促进下肢运动功能的恢复,这与先前研究相一致[33,38~40],且其疗效与雷帕霉素组相当,这可能与补阳还五汤的保护神经作用有关[41],说明补阳还五汤可以有效地抑制 mTOR 信号通路,增强细胞自噬。雷帕霉素虽可通过激活细胞自噬降低神经系统性疾病中蛋白的异常表达,却不可避免的对患者生长与发育造成一定程度的影响,并且存在一定的副作用[42]。

综上所述,mTOR 信号通路介导的细胞自噬可能参与了 SCI 的发病过程。补阳还五汤能够有效地调控 mTOR 通路,增强细胞自噬,从而减轻脊髓神经元细胞的损伤程度,改善 SCI 模型大鼠的下肢运动功能,这可能是其治疗 SCI 的作用靶点之一。

参考文献:

[1] Anjum A, Yazid MD, Fauzi Daud M, et al. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7533.

[2] Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury[J]. Spine, 2001, 26(24 Suppl): S2.

[3] Yang R, Guo L, Wang P, et al. Epidemiology of spinal cord injuries and risk factors for complete injuries in Guangdong, China: a retrospective study[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84733.

[4] Shi Z, Yuan S, Shi L, et al. Programmed cell death in spinal cord injury pathogenesis and therapy[J]. Cell Prolif, 2021, 54(3): e12992.

[5] Ray SK. Modulation of autophagy for neuroprotection and functional recovery in traumatic spinal cord injury[J]. Neural Regen Res, 2020, 15(9): 1601.

[6] Wu J, Lipinski MM. Autophagy in Neurotrauma: Good, Bad, or Dysregulated[J]. Cells, 2019, 8(7): 693.

[7] Li HT, Zhao XZ, Zhang XR, et al. Exendin - 4 Enhances Motor Function Recovery via Promotion of Autophagy and Inhibition of Neuronal Apoptosis After Spinal Cord Injury in Rats[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(6): 4073.

[8] 刘　莉,黄贵华,王德胜,等. 醒脑静调控 HMGB1 抑制自噬对脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(10): 2325.

[9] Li W, Yao S, Li H, et al. Curcumin promotes functional recovery and inhibits neuronal apoptosis after spinal cord injury through the modulation of autophagy[J]. J Spinal Cord Med, 2021, 44(1): 37.

[10] Wang P, Lin C, Wu S, et al. Inhibition of Autophagy is Involved in the Protective Effects of Ginsenoside Rb1 on Spinal Cord Injury[J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(3): 679.

[11] Tanabe F, Yone K, Kawabata N, et al. Accumulation of P62in degenerated spinal cord under chronic mechanical compression: functional analysis of P62 and autophagy in hypoxic neuronal cells[J]. Autophagy, 2011, 7(12): 1462.

[12] Chen A, Xiong LJ, Tong Y, et al. Neuroprotective effect of brain - derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(4): 1011.

[13] Sekiguchi A, Kanno H, Ozawa H, et al. Rapamycin promotes autophagy and reduces neural tissue damage and locomotor impairment after spinal cord injury in mice[J]. J Neurotrauma, 2012, 29(5): 946.

[14] 李喜功,陆　洋,林向进,等. 雷帕霉素增强自噬表达对大鼠急性脊髓损伤后神经细胞凋亡影响的实验研究[J]. 中国科技论文, 2018, 13(6): 621.

[15] 马建春,马灶亮,张昊亮,等. 补阳还五汤提取工艺的响应面法和人工神经网络模型优化[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 337.

[16] 颉志英,张志明,雍文兴,等. 补阳还五汤含药血清对缺氧/复氧心肌细胞自噬相关蛋白 LC3Ⅱ、Beclin1 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(7): 1569.

[17] 赵　欣,姬孟艳,董　强. 补阳还五汤对缺血性脑卒中大鼠神经元自噬的保护作用及机制分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(9): 910.

[18] 郭晓辉,卜保献,李艳侠,等. 补阳还五汤对脊髓缺血再灌注损伤后细胞自噬相关蛋白影响的研究[J]. 新中医, 2020, 52(7): 33.

[19] Zhang X, Jing Y, Qin C, et al. Mechanical stress regulates autophagic flux to affectapoptosis after spinal cord injury[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(21): 12765.

[20] Tarlov Eser O, Fidan H, Sahin O, et al . The influence of dexmedetomidine onischemic rathippocampus [J]. Brain Res, 2008, 1218: 250.

[21] Rouanet C, Reges D, Rocha E, et al. Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment update[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2017, 75(6): 387.

[22] 侯贝贝,游　宇,刘玉晖,等. 补阳还五汤对 LPS 诱导巨噬细胞活化与自噬的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 16.

[23] Stamateris RE, Sharma RB, Kong Y, et al. Glucose Induces Mouse β - Cell Proliferation via IRS2, MTOR, and Cyclin D2 but Not the Insulin Receptor[J]. Diabetes, 2016, 65(4): 981.

[24] Singh AK, Kashyap MP, Tripathi VK, etal. Neuroprotection Through Rapamycin - Induced Activation of Autophagy and PI3K/Akt1/mTOR/CREB Signaling Against Amyloid - β - Induced Oxidative Stress, Synaptic/Neurotransmission Dysfunction, and Neurodegeneration in Adult Rats[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(8): 5815.

[25] Munson MJ, Ganley IG. MTOR, PIK3C3, and autophagy: Signaling the beginning from the end[J]. Autophagy, 2015, 11(12): 2375.

[26] Wang H, Liu Y, Wang D, et al. The Upstream Pathway of mTOR - Mediated Autophagy in Liver Diseases[J]. Cells, 2019, 8(12): 1597.

[27] Linke M, Fritsch SD, Sukhbaatar N, et al. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity[J]. FEBS Lett. 2017 Oct, 591(19): 3089.

[28] Jhanwar - Uniyal M, Amin AG, Cooper JB, et al. Discrete signaling

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

mechanisms of mTORC1 and mTORC2: Connected yet apart in cellular and molecular aspects[J]. Adv Biol Regul,2017,64:39.
[29] Russel RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling[J]. Cell Res,2014,24(1):42.
[30] Chen HC, Fong TH, Hsu PW, et al. Multifaceted effects of rapamycin on functional recovery after spinal cord injury in rats through autophagy promotion, antiinflammation, and neuroprotection[J]. J Surg Res, 2013,179:e203.
[31] Lipinski MM, Wu J, Faden AI, et al. Function and Mechanisms of Autophagy in Brain and Spinal Cord Trauma[J]. Antioxid Redox Signal,2015,23(6):565.
[32] Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease[J]. Nature Med,2013,19(8): 983.
[33] Guo Y, Wang F, Li H, et al. Metformin Protects Against Spinal Cord Injury by Regulating Autophagy via the mTOR Signaling Pathway[J]. Neurochem Res,2018,43(5):1111.
[34] Chen G, Li J, Wang Z,etal. Ezetimibe protects against spinal cord injury by regulating autophagy and apoptosis through inactivation of PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(6): 2685.
[35] Rong Y, Liu W, Lv C, et al. Neural stem cell small extracellular vesicle - based delivery of 14 - 3 - 3t reduces apoptosis and neuroinflammation following traumatic spinal cord injury by enhancing autophagy by targeting Beclin - 1[J]. Aging (Albany NY),2019,11(18):7723.
[36] Shi J, Shi S, Wu B, et al. Autophagy protein LC3 regulates the fibrosis of hypertrophic scar by controlling Bcl - xL in dermal fibroblasts [J]. Oncotarget,2017,8: 93757.
[37] Taguchi - Atarashi N, Hamasaki M, Matsunaga K, et al. Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy[J]. Traffic,2010,11(4):468.
[38] Fogerson SM, van Brummen AJ, Busch DJ, et al. Reducing synuclein accumulation improves neuronal survival after spinal cord injury[J]. Exp Neurol,2016,278:105.
[39] Lin J, Pan X, Huang C, et al. Dual regulation of microglia and neurons by Astragaloside IV - mediated mTORC1 suppression promotes functional recovery after acute spinal cord injury[J]. J Cell Mol Med, 2020,24(1):671.
[40] Lin S, Tian H, Lin J, et al. Zinc promotes autophagy and inhibits apoptosis through AMPK/mTOR signaling pathway after spinal cord injury [J]. Neurosci Lett,2020,736:135263.
[41] 楚灿星,刘　泰. 补阳还五汤治疗脑出血急性期的实验研究进展[J]. 医药导报,2018,37(6):718.
[42] 吴伯艳,刘新光,陈维春. 雷帕霉素诱导细胞自噬在衰老相关疾病中的作用[J]. 中国药理学通报,2015,31(1):11.

蜥蜴胃康方对胃癌浸润转移的干预作用及机制研究

景燕燕[1],白　星[1],李卫强[1,2*]
(1. 宁夏医科大学中医学院,宁夏 银川　750004;
2. 回医药现代化教育部重点实验室,宁夏 银川　750004)

摘要:目的 研究不同浓度蜥蜴胃康方对胃癌肝转移模型裸鼠上皮间质转化(EMT)相关蛋白的影响,探讨蜥蜴胃康方对胃癌肝转移的调控机制。**方法** 70 只 SPF 级 BALB/c 裸鼠,随机分为空白对照组、模型对照组、5 - FU 对照组、华蟾素片对照组以及蜥蜴胃康方高、中、低浓度组。除空白对照组外,其余各组均采用人胃癌 HGC - 27 细胞悬液脾脏注射制备胃癌肝转移裸鼠模型,造模成功后,药物治疗组分别以 5 - FU,华蟾素,蜥蜴胃康方高、中、低浓度中药汤剂连续治疗 4 周。HE 染色观察胃癌肝转移模型裸鼠肝组织病理学变化;免疫组化法检测肝组织 MUC - 5A 表达水平;Western - blot 检测 EMT 相关蛋白 E - cadherin、Integrinβ1、MMP9 的表达情况。**结果** 蜥蜴胃康方可以降低胃癌肝转移裸鼠肝组织中 MUC - 5A 表达水平($P<0.05$),抑制其肝脏中 Integrinβ1、MMP9 蛋白表达($P<0.05$),促进 E - cadherin 蛋白表达($P<0.05$),对胃癌肝转移模型裸鼠的肝脏组织有一定修复作用。**结论** 蜥蜴胃康方可以通过调控胃癌肝转移裸鼠肝组织中 E - cadherin、Integrin、MMP - 9 蛋白表达而抑制 EMT,从而达到有效干预胃癌肝转移的目的。

关键词:胃癌;　肝转移;　蜥蜴胃康方;　上皮间质转化
DOI 标识:doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2022.04.04
中图分类号:R285.5　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1008-0805(2022)04-0783-04

Effect of the Lizard Weikang prescription on the expression of EMT related protein in nude mice with liver metastasis of gastric cancer

JING Yan-yan[1], BAI Xing[1], LI Wei-qiang[1,2*]
(1. *Department of Traditional Chinese Medicine*, *Ningxia Medical University*, *Yinchuan* 750004, *China*; 2. *Key Laboratory of Modernization of Ministry of Education of Hui Nationality Medicine*, *Yinchuan* 750004, *China*)

Abstract: Objective To study the effects of different concentrations of Lizard Weikang decoction on EMT related proteins in nude mice with liver metastasis of gastric cancer, and to explore the regulatory mechanism of Lizard Weikang decoction on liver

收稿日期:2021-08-31;　**修订日期:**2022-02-11
基金项目:国家自然科学基金(81860807)
作者简介:景燕燕,(1994-),女(汉族),宁夏吴忠人,宁夏医科大学中医学院硕士研究生,主要从事肝病和脾胃病的基础与临床研究工作.
*通讯作者简介:李卫强(1974-),男(汉族),陕西凤翔人,宁夏医科大学教授,博士研究生导师,硕士学位,主要从事中医药治疗脾胃病研究工作.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net