

绞股蓝总甙调控 mTOR/ULK1 通路对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的影响

宋 囡^{1,2}, 杨 芳³, 曹慧敏^{1,2}, 张 妮^{1,2}, 贾连群^{1,2}, 陈文娜^{1,2}, 杨关林^{1,2}

(1. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室,

2. 辽宁省中医转化医学研究中心, 3. 辽宁中医药大学附属第二医院, 辽宁省沈阳市 110847)

[关键词] 绞股蓝总甙; 动脉粥样硬化; 自噬; mTOR/ULK1 通路

[摘要] **目的** 基于 mTOR/ULK1 自噬信号通路探讨绞股蓝总甙改善动脉粥样硬化模型小鼠主动脉脂质沉积的作用机制。**方法** 30 只健康 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型对照组、绞股蓝总甙组和辛伐他汀组, 每组 10 只。10 只 C57BL/6J 小鼠作为正常组。模型对照组、绞股蓝总甙组和辛伐他汀组采用高脂饲料喂养 4 周, 绞股蓝总甙组和辛伐他汀组分别采用绞股蓝总甙 2.973 g/(kg·d)、辛伐他汀 2.275 mg/(kg·d) 灌胃 8 周, 模型对照组、正常组予等量生理盐水灌胃。HE 染色观察小鼠动脉粥样硬化斑块形成情况, 全自动生化分析仪检测血脂水平, Western blot 检测主动脉 ULK1、Beclin1、LC3、p-mTOR 的蛋白表达。**结果** 与正常组相比, 模型对照组 TG、TC 和 LDLC 水平升高 ($P < 0.05$), HDLC 水平降低 ($P < 0.05$), 主动脉管腔见较大粥样斑块, ULK1、Beclin1、LC3 蛋白表达水平下调 ($P < 0.01$), p-mTOR 蛋白表达水平上调 ($P < 0.01$); 与模型对照组相比, 绞股蓝总甙组和辛伐他汀组 TG、TC 和 LDLC 水平降低 ($P < 0.05$), HDLC 水平升高 ($P < 0.05$), 主动脉管腔粥样斑块明显减少, ULK1、Beclin1、LC3 蛋白表达水平上调 ($P < 0.01$), p-mTOR 蛋白表达水平呈下调趋势 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论** 绞股蓝总甙可能通过调控自噬缓解动脉粥样硬化斑块形成, 进而防治动脉粥样硬化。

[中图分类号] R2

[文献标识码] A

Gypenoside influences the progression of atherosclerosis in the ApoE^{-/-} mouse through mTOR/ULK1 pathway

SONG Nan^{1,2}, YANG Fang³, CAO Hui-Min^{1,2}, ZHANG Ni^{1,2}, JIA Lian-Qun^{1,2}, CHEN Wen-Na^{1,2}, YANG Guan-Lin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2. Translational Medicine Research Center of Traditional Chinese Medicine in Liaoning Province, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 3. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China)

[KEY WORDS] Gypenosides; Atherosclerosis; Autophagy; mTOR/ULK1 pathway

[ABSTRACT] **Aim** Based on the mTOR/ULK1 autophagy signaling pathway to discuss the mechanism of gypenoside improving aorta lipid deposition of ApoE^{-/-} mice. **Methods** 30 healthy ApoE^{-/-} mice were randomly divided into the model control group and the gypenoside group, and the simvastatin group, 10 mice in each group. 10 C57BL/6J mice were used as the normal control group. The model control group, the gypenoside group and the simvastatin group were fed with high-fat diet for 4 weeks. The gypenoside group and simvastatin group were treated with gypenoside 2.973 g/(kg·d) and simvastatin 2.275 mg/(kg·d) by gastrogavage for 8 weeks, respectively. The normal control group and the model control group were given by gastrogavage with the normal saline of the same volume. The formation of atherosclerotic plaque of the mice was detected by HE staining, and the blood lipid level was detected by the fully automatic biochemical analyser. The expressions of ULK1, Beclin1, LC3 and p-mTOR proteins were detected by the Western blot.

[收稿日期] 2017-07-14

[修回日期] 2017-08-20

[基金项目] 辽宁省教育厅一般项目(L201613);第 60 批中国博士后科学基金面上资助项目(2016M601331);国家自然科学基金青年基金项目(81300229)

[作者简介] 宋囡, 博士, 研究方向为中西医结合基础, E-mail 为 1135843243@qq.com。通讯作者杨关林, 博士研究生导师, 研究方向为中西医结合防治心血管疾病, E-mail 为 yang_guanlin@163.com。

Results Compared with normal control group, in the model control group, TG, TC and LDLC were significantly increased ($P<0.05$), HDLC was significantly decreased ($P<0.05$), large atheromatous plaques could be seen in aortic canal, ULK1, Beclin1 and LC3 were significantly decreased ($P<0.01$), p-mTOR was significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model control group, in the gypenoside group and the simvastatin group, TG, TC and LDLC were significantly decreased ($P<0.05$), HDLC was significantly increased ($P<0.05$), atheromatous plaques in aortic canal were significantly decreased, ULK1, Beclin1 and LC3 were significantly increased ($P<0.01$), p-mTOR was significantly decreased ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** Gypenosides could relieve the formation of atherosclerotic plaques and prevent atherosclerosis possibly through regulating the autophagy.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是动脉管壁内膜的一种慢性炎症性疾病,血管壁产生粥样斑块为其特征,是许多心脑血管疾病的病理基础,发病率高且严重危害健康。自噬是细胞利用溶酶体系统降解细胞毒性蛋白、自身受损的细胞器及大分子物质的过程,并能产生为细胞提供能量的氨基酸等物质,使机体能够更好的适应各种应激或饥饿等状态,它不同于细胞凋亡和坏死,是受管家基因调控的细胞主动性“自食”过程,缺氧或炎症等应激均可增强自噬活性^[1-3]。近年研究发现细胞自噬与As紧密相关,自噬参与调控着As的发生发展进程^[4-5]。中医认为As的病机多以虚损为本,痰瘀为标。因此,针对As的防治补虚不容忽视。绞股蓝之健脾补气之力较为突出,而且目前研究发现绞股蓝能够通过调节脂质代谢,抑制过氧化物产生;拮抗内皮素,保护内皮细胞等多方面途径起到拮抗As的作用^[6]。其主要有效成分绞股蓝总甙对As有明显的预防作用^[7],但分子生物学机制尚不完全明确,故本课题以自噬为切入点,进一步探讨绞股蓝总甙对As的防治作用,揭示中医健脾益气治则在防治As方面的重要性。本研究通过观察绞股蓝总甙通过调控自噬效应对ApoE^{-/-}小鼠粥样斑块的影响,探讨绞股蓝总甙抗As作用及可能的机制,为该类药物在临床上应用于防治As相关性疾病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

30只健康ApoE^{-/-}小鼠,10只C57BL/6J小鼠作为正常组,体重 20 ± 2 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2012-0001。动物饲养于辽宁中医药大学实验动物中心,SPF级,环境温度为 $(22\pm 1)^{\circ}\text{C}$,湿度 $50\%\pm 5\%$,自然光照,正常饲料喂饲,自由饮食饮水,适应性喂养7天后,将30只健康ApoE^{-/-}小鼠随机分为3组:模型对照组、绞股蓝总甙组、辛伐他汀组,每组10只。As模型制备采用ApoE^{-/-}

小鼠给予高脂饲料喂饲,每日给予高脂饲料(含0.15%胆固醇、21%脂肪)喂饲8周。造模8周后,绞股蓝总甙组和辛伐他汀组分别按照 $2.973\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 绞股蓝总甙和 $2.275\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 辛伐他汀灌胃,正常组和模型对照组给予等体积生理盐水灌胃,灌胃4周,均为每天两次(上午8点和下午4点)。

1.2 试剂、药物与仪器

总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)测定试剂盒(四川迈新生物技术有限公司);HE染色液(北京鼎国生物技术公司);一抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司);ULK1、Beclin1、mTOR、p-mTOR及LC3抗体(Cell Signal, 美国); β -actin(Santa, 美国);绞股蓝总甙(西安天丰生物科技有限公司);辛伐他汀(浙江海正药业股份有限公司);全自动生化分析仪(日本东芝);垂直板电泳装置、Trans-Blot SD半干转印(美国, Bio-Rad);多色荧光、高性能发光凝胶成像系统(美国, FluorChem Q)。

1.3 样品收集

实验前禁止进食12h,不禁水,称体重,10%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血约5~10mL,静置1~2h,3000r/min离心30min,分离血清,取上清液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取大鼠肝组织并切成小块,分别用4%多聚甲醛固定及冷冻。

1.4 血脂检测

按生化试剂盒说明书采用全自动生化分析仪检测大鼠血清TC、TG、LDLC、HDLC含量。

1.5 HE染色观察主动脉病理形态

将主动脉置于4%多聚甲醛溶液中固定24h,按HE染色常规方法进行。70%~100%梯度酒精脱水、二甲苯透明,石蜡包埋、切片(切片厚度 $5\mu\text{m}$)、贴片、烤片后,用二甲苯脱蜡、70%~100%梯度酒精复水、苏木精染色、70%盐酸酒精分色、伊红复染后,再用70%~100%梯度酒精脱水、二甲苯透明,中性

树脂封片,石蜡包埋,光学显微镜下观察小鼠主动脉组织形态。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测 ULK1、Beclin1 mRNA 表达

利用引物 Premier 5.0 软件设计 PCR 引物,大连 TaKaRa 公司合成,ULK1 上游为 5'-CCT TGT GTT CTG CAA GTG GC-3',下游为 5'-AAG GTG TCT GTG TGC TCT CG-3',扩增片段长度为 205 bp;Beclin1 上游为 5'-ACC CTA CGG CTC AGC TTC TA-3',下游为 5'-TTT GCT CTC CCA CCT GGA TG-3',扩增片段长度为 342 bp; β -actin 上游为 5'-AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT-3',下游为 5'-GGA AAA GAG CCT CAG GGC AT -3',扩增片段长度为 172 bp。Trizol 处理各组肝脏组织,提取总 RNA,逆转录成 cDNA,设定 PCR 反应条件,用 SYBR Green Mater Mix 试剂检测待测基因的 mRNA 水平,共重复检测 3 次。用 $\Delta\Delta C_t$ 法对实时荧光定量 PCR 结果进行相对定量分析。 ΔC_t 值为目的基因 Ct 值与管家基因 (β -actin) Ct 值的差值, $\Delta\Delta C_t$ 为各实验组 ΔC_t 与空白对照组 ΔC_t 的差值,平均相对含量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$,为相对于正常组 mRNA 的水平。

1.7 Western blot 检测 LC3、ULK1、Beclin1、mTOR 及 p-mTOR 蛋白表达

提取主动脉蛋白,利用蛋白质测定试剂盒检测

蛋白含量。以 60 μ g 蛋白/泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳后,半干转膜至 PVDF 膜,按比例配制 LC3、ULK1、Beclin1、mTOR、p-mTOR 及 β -actin 一抗,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入二抗。按 1:1 比例配制化学发光液,将膜放在曝光板上,膜上滴适量的发光液,应用全自动荧光与可见光凝胶成像分析系统曝光分析图片。

1.8 统计学分析

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,多组间比较采用 ANOVA 方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 绞股蓝总甙对 ApoE^{-/-} 小鼠血脂水平的影响

与正常组相比,模型对照组血清 TG、TC、LDLC 水平均显著升高,HDLC 水平显著下降 ($P<0.01$);与模型对照组相比,辛伐他汀组和绞股蓝总甙组血清 TG、TC、LDLC 水平显著降低,辛伐他汀组优于绞股蓝总甙组 ($P<0.01$),同时血清 HDLC 水平显著升高 ($P<0.01$),但辛伐他汀组与绞股蓝总甙组之间无显著差异(表 1)。

表 1. 各组小鼠血清 TG、TC、LDLC、HDLC 水平比较($\bar{x}\pm s$, mmol/L, $n=10$)

Table 1. Comparison of serum TG, TC, LDLC and HDLC levels in each group($\bar{x}\pm s$, mmol/L, $n=10$)

分 组	TG	TC	LDLC	HDLC
正常组	1.14 \pm 0.07	3.09 \pm 0.24	0.69 \pm 0.08	1.02 \pm 0.07
模型对照组	3.39 \pm 0.11 ^a	18.60 \pm 0.40 ^a	2.54 \pm 0.06 ^a	0.66 \pm 0.07 ^a
辛伐他汀组	1.70 \pm 0.09 ^b	9.36 \pm 0.60 ^b	1.13 \pm 0.07 ^b	0.83 \pm 0.06 ^b
绞股蓝总甙组	2.18 \pm 0.08 ^{bc}	11.62 \pm 0.26 ^{bc}	1.27 \pm 0.09 ^{bc}	0.76 \pm 0.05 ^b

a 为 $P<0.01$,与正常组比较;b 为 $P<0.01$,与模型对照组比较;c 为 $P<0.01$,与辛伐他汀组比较。

2.2 绞股蓝总甙对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉病理形态的影响

正常组小鼠主动脉管腔中未见粥样斑块,模型对照组小鼠主动脉管腔中形成较大粥样斑块,绞股蓝总甙组和辛伐他汀组小鼠主动脉管腔中粥样斑块面积明显减小(图 1)。

2.3 绞股蓝总甙对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 ULK1、Beclin1 mRNA 表达的影响

与正常组相比,模型对照组主动脉 ULK1、Beclin1 mRNA 表达均显著下降 ($P<0.01$);与模型对照组相比,辛伐他汀组和绞股蓝总甙组主动脉

ULK1、Beclin1 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$),但辛伐他汀组与绞股蓝总甙组之间无显著差异(图 2)。

2.4 绞股蓝总甙对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 LC3、p-mTOR、ULK1 及 Beclin1 蛋白表达的影响

与正常组相比,模型对照组主动脉 LC3、ULK1 及 Beclin1 蛋白表达显著下降,p-mTOR 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$);与模型对照组相比,辛伐他汀组和绞股蓝总甙组主动脉 LC3、ULK1 及 Beclin1 蛋白表达显著升高,p-mTOR 蛋白表达显著下降 ($P<0.01$),但辛伐他汀组与绞股蓝总甙组之间无显著差异(图 3)。

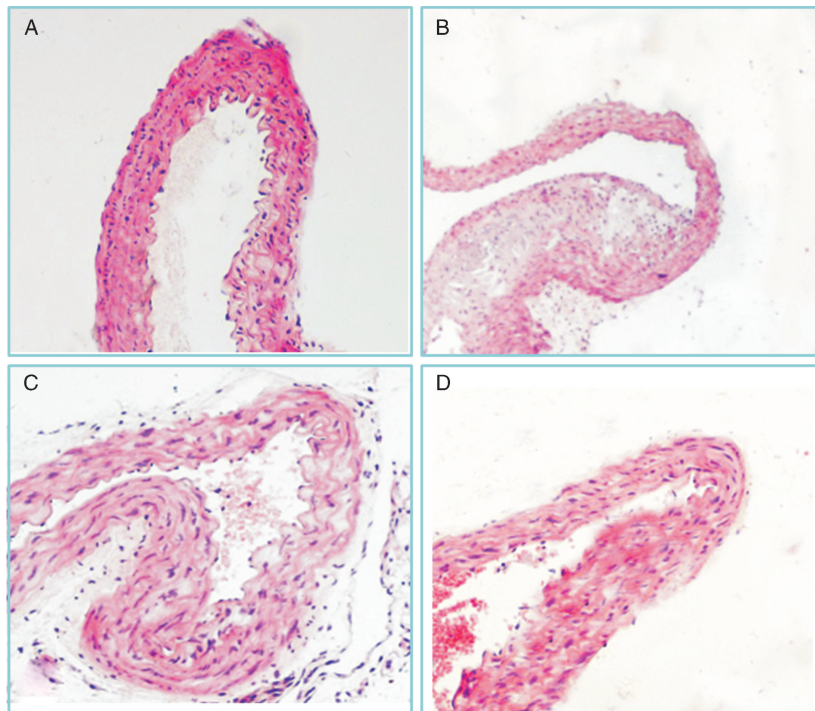


图 1. 小鼠主动脉根石蜡切片 HE 染色(400×) A 为正常组, B 为模型对照组, C 为辛伐他汀组, D 为绞股蓝总皂苷组。

Figure 1. HE staining of aortic root paraffin sections(400×)

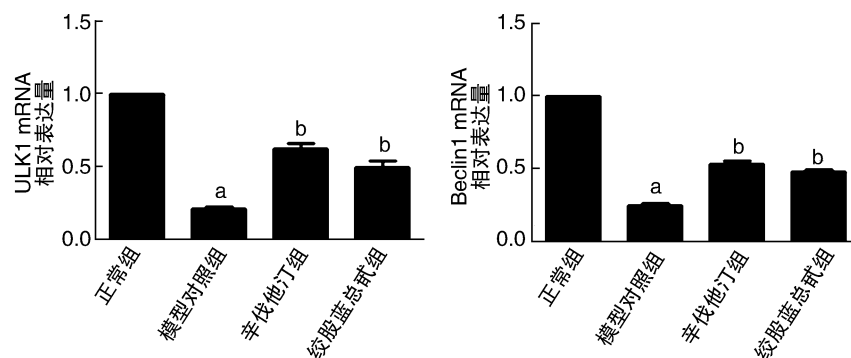


图 2. 小鼠主动脉 ULK1、Beclin1 mRNA 的表达 a 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型对照组比较。

Figure 2. Expression of ULK1 and Beclin1 mRNA in mouse aorta

3 讨论

中医认为 As 是一种全身性疾病,其病因病机为本虚标实,标实为瘀和痰。若脾胃功能失司,水湿聚而成痰,痰阻则气滞,气滞则血瘀,这些病理产物相互胶结,阻塞脉络,导致 As 发生。根据以上中医理论,可见健脾益气可谓防治 As 的重要治则。绞股蓝系葫芦科绞股蓝属多年生草质藤本植物。绞股蓝全草入药,性凉,味苦、微甘,归肺、脾、肾经,其健脾补气之力较为突出^[8]。绞股蓝总皂苷是从绞股蓝中提取的有效成分群,含有 80 余种人参皂苷类成分,所有绞股蓝皂苷的苷元部分都为达玛烷型四环

三萜类,对治疗和预防 As、高血压等心血管疾病有显著功效^[9]。寿迪飞等^[10]研究发现绞股蓝总皂苷可以通过调节 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇平衡防治 As。明确了绞股蓝总皂苷防治 As 的作用,并且探讨其部分机制。

近年研究发现细胞自噬与 As 关系密切,参与并调控着 As 的发生发展,适度自噬能抑制 As 的形成和发展,对 As 具有防治作用^[11-12]。血管内皮结构和功能的异常,是导致 As 发生发展的重要因素。血管内皮细胞受损是 As 发生的重要起始环节,细胞自噬可降解细胞内受损的细胞器,能减轻炎症、氧化应激和缺氧等诱导的内皮细胞凋亡和坏死^[13]。而

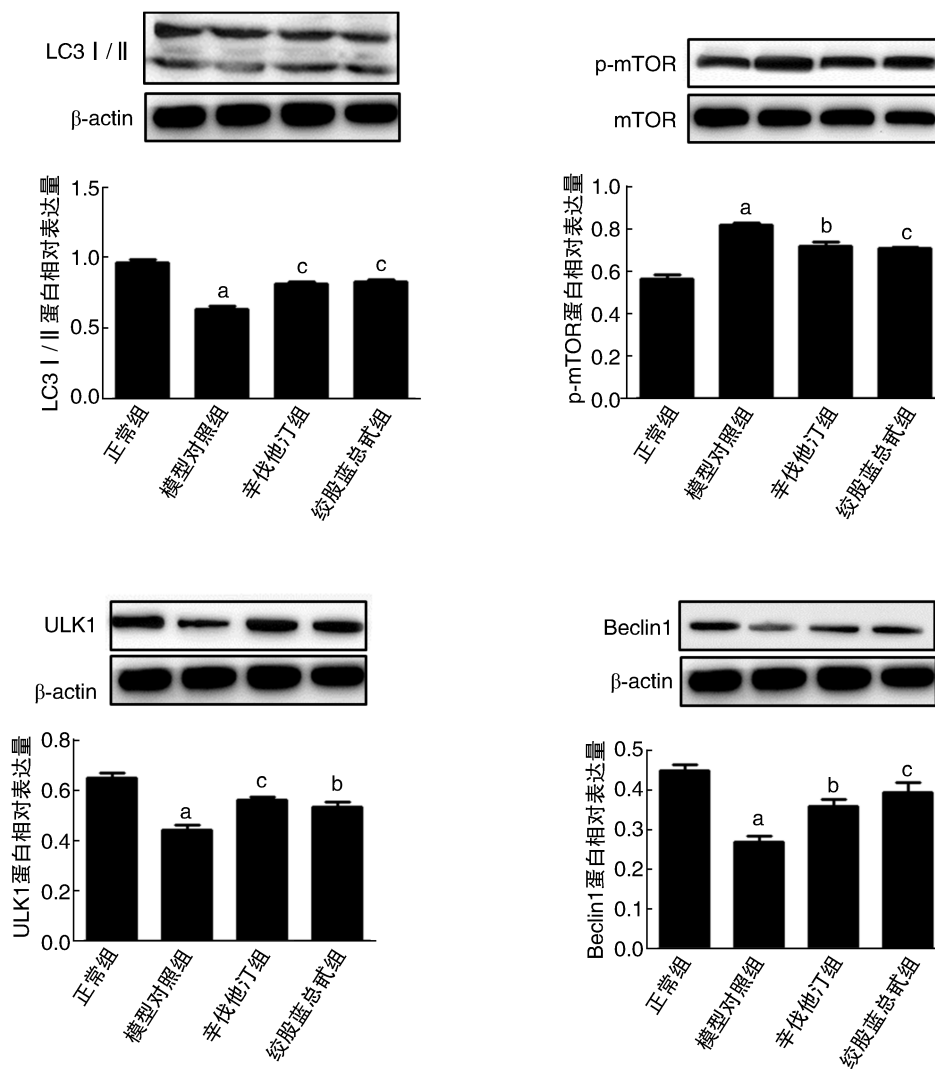


图 3. 小鼠主动脉 LC3、p-mTOR、ULK1 及 Beclin1 蛋白的表达 a 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与模型对照组比较。

Figure 3. Expression of LC3, p-mTOR, ULK1 and Beclin1 proteins in mouse aorta

关于绞股蓝总皂苷是否可以通过调控自噬防治 As 研究尚少。故课题组以自噬为切入点, 观察绞股蓝总皂苷对 ApoE^{-/-}小鼠粥样斑块的影响, 探讨绞股蓝总皂苷抗 As 作用及可能的机制。

根据文献及课题组前期研究, 本研究选用经典 As 模型鼠 ApoE^{-/-}小鼠作为研究对象^[1], 通过喂饲 ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食成功建立小鼠高脂 As 模型, 正常组小鼠主动脉管腔中未见粥样斑块, 模型对照组小鼠主动脉管腔中形成较大粥样斑块, 采用绞股蓝总皂苷与阳性对照药辛伐他汀干预后, 绞股蓝总皂苷组和辛伐他汀组小鼠主动脉管腔中粥样斑块面积明显减小, 这一点与既往文献报道相一致, 进一步明确了绞股蓝总皂苷防治 As 的作用。

研究发现, 2-脱氧-D-葡萄糖 (2-deoxy-D-glucose, 2-DG) 在内皮细胞上可通过 ROS/AMPK 途径触发自

噬, 增加内皮细胞在应激状态下的生存能力^[11]。敲除小鼠自噬相关基因 ATG5 和 Beclin1 后, 自噬水平降低, 斑块中的炎症因子增加, 促进 As 的发生发展^[14]。LC3 和 Beclin1 作为自噬检测的 Marker 蛋白, 是检测自噬发生的金标准。而 mTOR 可通过 mTOR/ULK1 通路来抑制自噬, 参与多种病理和生理过程^[15]。我们的研究发现 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 LC3、Beclin1 蛋白表达显著下降, p-mTOR 蛋白表达显著升高, ULK1 蛋白表达显著下降, 自噬水平降低, 小鼠主动脉管腔中形成较大粥样斑块; 辛伐他汀及绞股蓝总皂苷干预处理后, LC3、Beclin1 蛋白表达显著升高, p-mTOR 蛋白表达显著下降, ULK1 蛋白表达显著升高, 自噬水平有所上升; 小鼠主动脉管腔中粥样斑块面积明显减小。综上, 绞股蓝总皂苷可能通过调控 mTOR/ULK1 自噬信号通路增强 As 模型小鼠主动脉自噬水

平,缓解主动脉粥样斑块的形成。本研究为绞股蓝总甙防治 As 提供了一定的实验依据,也为抗 As 的新药开发提供了线索。

[参考文献]

- [1] 贾连群, 杨关林, 陈文娜, 等. 化痰祛痰方通过调节 ApoE^{-/-}小鼠胆固醇代谢相关基因表达抗动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(1): 1-6.
- [2] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.
- [3] Tiwari RV, Parajuli P, Sylvester PW. Synergistic anticancer effects of combined γ -tocotrienol and oridonin and treatment is associated with the induction of autophagy[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 408(1/2): 123-137.
- [4] Cao B, Fan L, Xiang R. Crosstalk between autophagy and apoptosis in endoplasmic reticulum during atherosclerosis[J]. Acta Biophysica Sinica, 2013, 29(12): 911-918.
- [5] Razani B, Feng C, Coleman T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression[J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 534-544.
- [6] 谭华炳, 贺琴, 赵琴. 绞股蓝对动脉粥样硬化形成的拮抗作用[J]. 中国全科医学, 2007, 10(6): 476-478.
- [7] 权媛, 钱民章. 绞股蓝总甙对高脂诱导动脉粥样硬化大鼠炎症分子表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(4): 403-406.
- [8] 史琳, 赵红, 张璐雅, 等. 绞股蓝药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(2): 125-129.
- [9] 雷婧, 许韩婷, 苏洁, 等. 不同含量绞股蓝皂苷对高脂血症大鼠血脂的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(2): 60-64.
- [10] 寿迪飞, 卢德赵, 王萍儿, 等. 绞股蓝总皂苷调节 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇平衡的作用机制[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(2): 297-300.
- [11] Wang Q, Liang B, Shirwany NA, et al. 2-deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17234.
- [12] Zhang YL, Cao YJ, Zhang X, et al. The autophagy-lysosome pathway: a novel mechanism involved in the processing of oxidized LDL in human vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(2): 377-382.
- [13] Li S, Wang L, Hu Y, et al. Autophagy regulators as potential cancer therapeutic agents: a review[J]. Curr Top Med Chem, 2015, 15(8): 720-744.
- [14] Razani B, Feng C, Coleman T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression [J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 534-544.
- [15] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of ULK1[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(2): 132-141.

(此文编辑 文玉珊)