

绞股蓝总皂苷调节自噬小体对动脉粥样硬化的防治作用

张妮, 宋 囡, 曹慧敏, 贾连群, 陈文娜, 冷 雪*

辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室 辽宁省中医转化医学研究中心, 沈阳 110847

摘要: 为探究绞股蓝总皂苷调节自噬小体对动脉粥样硬化的防治作用。本研究分体内、体外实验。体内实验: 30 只健康 Apo E^{-/-} 小鼠随机分为 3 组, 模型组、绞股蓝总皂苷组和辛伐他汀组, 每组 10 只。10 只 C57BL/6J 小鼠为正常组。模型制备及给药干预完成后, 全自动生化分析仪检测各组小鼠血脂水平, Western blot 技术检测各组小鼠主动脉 Atg3、Atg4c、Atg5、Atg12 蛋白表达情况。体外实验: 培养 EA. hy926 细胞, 随机分为正常组、模型组、绞股蓝总皂苷组、人参皂苷 GRb3 组和绞股蓝皂苷 XILX 组。Western blot 技术检测各组细胞自噬小体形成信号通路相关蛋白 Atg3、Atg4c、Atg5、Atg12 的表达情况。结果发现, 绞股蓝总皂苷能够降低 ApoE^{-/-} 小鼠血清中的 TG、TC、LDL-C 水平 ($P < 0.01$), 提高血清 HDL-C 水平 ($P < 0.01$)。且绞股蓝总皂苷能够提高 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 Atg3、Atg4c、Atg5、Atg12 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。绞股蓝总皂苷、人参皂苷 GRb3 和绞股蓝皂苷 XILX 能够提高 ox-LDL 诱导的 EA. hy926 细胞自噬小体相关蛋白 Atg3、Atg4c、Atg5、Atg12 的表达水平 ($P < 0.01$)。且绞股蓝总皂苷效果最好。以上结果说明, 绞股蓝总皂苷可能通过促进自噬小体形成, 降低 ApoE^{-/-} 小鼠血清血脂水平, 保护 EA. hy926 细胞抗内皮损伤, 进而发挥其防治 AS 的生物学作用, 且在该过程中人参皂苷 GRb3 和绞股蓝皂苷 XILX 可能是绞股蓝总皂苷中发挥关键作用的有效成分。

关键词: 绞股蓝总皂苷; 人参皂苷 GRb3; 绞股蓝皂苷 XILX; 动脉粥样硬化; 自噬小体

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.12.019

Effect of Gypenosides on the Prevention and Treatment of Atherosclerosis by Autophagosome

ZHANG Ni, SONG Nan, CAO Hui-min, JIA Lian-qun, CHEN Wen-na, LENG Xue*

Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; Translational Medicine Research Center of Traditional Chinese Medicine in Liaoning Province, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: To investigate the effect of gypenosides on the prevention and treatment of atherosclerosis by autophagosome. This study was divided into *in vivo* and *in vitro* experiment. *In vivo*, thirty healthy Apo E^{-/-} mice were randomly divided into three groups, namely model group, gypenosides group and simvastatin group, each group has ten mice. Ten C57BL/6J mice were control group. After the model preparation and the drug intervention was completed, the automatic biochemical analyzer was used to test the levels of serum lipids, and western blot was used to detect the expressions of atg3, Atg4c, Atg5 and Atg12 protein in the aorta of mice. *In vitro*, EA. Hy926 cells were cultured and were randomly divided into control group, model group, gypenosides group, ginsenoside GRb3 group and gypenoside XILX group. In addition, the western blot was used to detect the expressions of Atg3, Atg4c, Atg5 and Atg12 protein of autophagosomes form signaling pathways. The results showed that, gypenosides can reduce the levels of TG, TC and LDL-C ($P < 0.01$), improve the level of HDL-C ($P < 0.01$) in serum of ApoE^{-/-} mice. Furthermore, gypenosides can increase the expression level of Atg3, Atg4c, Atg5 and Atg12 protein in the aorta of ApoE^{-/-} mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Gypenosides, ginsenoside GRb3 and gypenoside XILX can increase the expression levels of Atg3, Atg4c, Atg5 and Atg12 in ox-LDL-induced EA.

hy926 cells ($P < 0.01$), in which the effect of gypenosides was the best. The above results showed that, gypenosides may protect EA. Hy926 cells against endothelial injury by promoting the formation of autophagosome, reducing the serum lipid level of ApoE^{-/-} mice, and then play its biological role in the prevention and treatment of AS. Ginsenoside

收稿日期: 2017-07-19 接受日期: 2017-09-25

基金项目: 辽宁省科学技术计划(20170540592); 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(81300229); 沈阳市科技计划(17-139-8-00)

* 通信作者 E-mail: 290404025@qq.com

GRb3 and gypenoside XILX were possibly the active constituents of *G. pentaphyllum* in this process.

Key words: gypenosides; ginsenoside GRb3; gypenoside XILX; atherosclerosis; autophagosome

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心脑血管系统疾病的重要病理基础,是近年来基础与临床药理研究的热点问题,寻找防治AS的天然有效中药具有重要意义。课题组前期研究发现并证实,化痰祛痰方在防治AS性疾病中疗效确切^[1-3]。且基础研究亦发现化痰祛痰方能够通过提高高脂血症大鼠肝脏自噬水平,改善高脂血症大鼠肝脏脂质损伤^[4]。作为该方的君药之一,绞股蓝的健脾补气之力尤为突出,研究发现绞股蓝能够调节脂质代谢,抑制过氧化物产生;拮抗内皮素,保护内皮细胞;抑制血小板聚集,减轻动脉粥样硬化炎症反应^[5]。为进一步探讨化痰祛痰方防治AS的主要生物学活性成分,本文拟在前期研究基础上,选用益气中药绞股蓝的重要活性成分绞股蓝总皂苷及其组成成分作为探究对象,以自噬小体形成信号通路为切入点,分别构建ApoE^{-/-}小鼠AS模型和氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)诱导EA.hy926细胞内皮损伤模型,探讨绞股蓝重要活性成分对AS的防治作用,为进一步揭示化痰祛痰方中绞股蓝抗AS的药理作用机制,丰富其临床应用提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

30只SPF级健康ApoE^{-/-}小鼠,10只C57BL/6J小鼠,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±1)℃,湿度50%±5%,自然光照,正常饲料喂饲,自由饮食饮水,适应性喂养7d后,进入实验阶段。

1.2 细胞株

人脐静脉内皮细胞EA.hy926购自中国科学院上海细胞库。

1.3 药物、试剂与仪器

绞股蓝总皂苷、人参皂苷Rb3、绞股蓝皂苷XILX(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),ox-LDL(广州奕源生物科技有限公司),DMEM/高糖培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、硫酸青霉素、硫酸链霉素(赛默飞

世尔科技有限公司),胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒(四川迈新生物技术有限公司),蛋白测定试剂盒(鼎国生物技术有限公司),一抗稀释液(上海碧云天生物技术研究),Atg3、Atg4b(abcam公司),Atg5、Atg12(Novus生物制剂),β-Actin(Santa Cruz圣克鲁斯生物技术),二抗(Santa Cruz圣克鲁斯生物技术),全自动生化分析仪(日本东芝)、HERACell 150i细胞培养箱(赛默飞世尔科技有限公司)、Mini-Protean tetra型垂直板电泳装置(伯乐公司)、Trans-Blot SD型半干转膜仪(伯乐公司)、高性能发光凝胶成像系统(FluorChem Q公司)。

2 实验方法

2.1 动物分组、造模及干预

将30只SPF级健康ApoE^{-/-}小鼠随机分为3组:模型组、绞股蓝总皂苷组、辛伐他汀组,每组10只。模型制备给予高脂饲料喂饲,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,绞股蓝总皂苷组及辛伐他汀组分别按照2.973 g/kg·d和2.275 mg/kg·d灌胃,正常组和模型组给予等体积生理盐水灌胃,灌胃4周。取材实验前禁食12 h,不禁水,称体重,10%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血约5~10 mL,静置1~2 h,3000 rpm离心30 min,分离血清,取上清液,低温(4℃)保存。取大鼠主动脉组织并切成小块,冷冻保存。

2.2 细胞分组、造模及干预

培养的EA.hy926细胞分为正常组、模型组、绞股蓝总皂苷组、人参皂苷Rb3组、绞股蓝皂苷XILX组。正常组仅用DMEM完全培养基培养,不加任何药物;模型组予以100 mg/L ox-LDL诱导内皮细胞48 h;绞股蓝总皂苷组、人参皂苷Rb3组、绞股蓝皂苷XILX组在给予100 mg/L ox-LDL诱导的24 h后,分别给予100 μg/mL的绞股蓝总皂苷、人参皂苷GRb3、绞股蓝皂苷XILX作用24 h,培养结束后进行各项指标的检测。

2.3 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各组小鼠血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C含量。

2.4 Western blot 技术检测自噬小体形成信号通路相关蛋白表达情况

分别提取各组小鼠主动脉蛋白及各组细胞蛋白,利用蛋白质测定试剂盒检测蛋白含量。以 60 μg 蛋白/泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳后,半干转膜至 PVDF 膜,按比例配制 Atg3、Atg4c、Atg5、Atg12 及 β -Actin 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的二抗。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,应用高性能发光凝胶成像系统曝光分析图片。

2.5 统计分析

采用 SPSS16.0 软件处理,数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间数据比较用 ANOVA 方差分析,组间两两比

表 1 各组小鼠血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 含量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of serum TG, TC, LDL-C and HDL-C contents in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
正常组 Control group	1.19 \pm 0.05	3.11 \pm 0.06	0.61 \pm 0.07	1.03 \pm 0.04
模型组 Model group	3.19 \pm 0.08 **	18.52 \pm 0.13 **	2.55 \pm 0.07 **	0.66 \pm 0.05 **
辛伐他汀组 Simvastatin group	1.69 \pm 0.08 $\blacktriangle\triangle\triangle$	9.35 \pm 0.08 $\blacktriangle\triangle\triangle$	1.17 \pm 0.07 $\blacktriangle\triangle\triangle$	0.86 \pm 0.03 $\blacktriangle\triangle$
绞股蓝总皂苷组 Gypenosides group	2.24 \pm 0.12 $\blacktriangle\triangle$	11.59 \pm 0.11 $\blacktriangle\triangle$	1.27 \pm 0.05 $\blacktriangle\triangle$	0.83 \pm 0.04 $\blacktriangle\triangle$

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\blacktriangle\triangle\triangle P < 0.01$; 与绞股蓝总皂苷组, $\triangle\triangle P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$; Compared with the model group, $\blacktriangle\triangle\triangle P < 0.01$; Compared with simvastatin group, $\triangle\triangle P < 0.01$.

3.2 绞股蓝总皂苷对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉自噬小体相关蛋白的影响

与正常组相比,模型组 Atg3、Atg4c、Atg5、Atg12 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比,辛伐他汀组和绞股蓝总皂苷组 Atg3、Atg4c、Atg5、Atg12 蛋白表达水平明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 1)。

3.3 绞股蓝总皂苷及其主要单体对 ox-LDL 诱导的 EA.hy926 细胞自噬小体相关蛋白的影响

与正常组相比,模型组 Atg3、Atg4c、Atg5、Atg12 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比,绞股蓝总皂苷组和人参皂苷 GRb3 组 Atg3、Atg4c、Atg5、Atg12 蛋白表达水平明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。绞股蓝皂苷 XILX 组仅 Atg3、Atg4c 蛋白表达水平明显增高 ($P < 0.01$)。

4 讨论与结论

动脉粥样硬化是心脑血管疾病的重要病理基础,也是心血管系统疾病中最常见的基础疾病。对 AS 发病机理研究并对高危人群采取适当的干预措

较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 绞股蓝总皂苷对 ApoE^{-/-} 小鼠血脂的影响

与正常组相比,模型 ApoE^{-/-} 小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 水平均显著升高, HDL-C 水平显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组相比,辛伐他汀组及绞股蓝总皂苷组小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 水平均发生显著性降低,且辛伐他汀组优于绞股蓝总皂苷组 ($P < 0.01$),同时辛伐他汀组及绞股蓝总皂苷组小鼠血清中 HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$),但辛伐他汀组与绞股蓝总皂苷组之间无显著性差异 (表 1)。

施,将有助于减少心脑血管疾病的发生。课题组前期研究已证实,化痰祛痰方在防治 AS 性疾病中疗效确切^[1,2]。化痰祛痰方由 9 味中药组成,其中,绞股蓝为君药之一,其健脾补气之力尤为突出,研究发现绞股蓝能够调节脂质代谢,抑制过氧化物产生;拮抗内皮素,保护内皮细胞;抑制血小板聚集,减轻动脉粥样硬化炎症反应^[5]。绞股蓝的主要药效成分是绞股蓝总皂苷,已分离得到具有人参皂甙基本结构的单体皂甙 80 多种,但尚未明确绞股蓝总皂苷中哪种活性成分对 AS 的防治作用最强^[6]。

因此,为进一步探讨化痰祛痰方防治 AS 的主要生物学活性成分,及绞股蓝抗 AS 的药理作用机制,为丰富其临床应用提供实验依据。本研究在前期研究基础上,选取绞股蓝的重要活性成分绞股蓝总皂苷及其重要组成成分人参皂苷 GRb3、绞股蓝皂苷 XILX,探讨其对 AS 的防治作用及机制。研究结果发现,绞股蓝总皂苷能够改善 AS 小鼠血清血脂水平,表现为降低 ApoE^{-/-} AS 模型小鼠血清中的 TG、TC、LDL-C 水平,提高血清 HDL-C 水平。而高脂血症是促进 AS 斑块形成的重要因素^[7],说明绞股蓝总

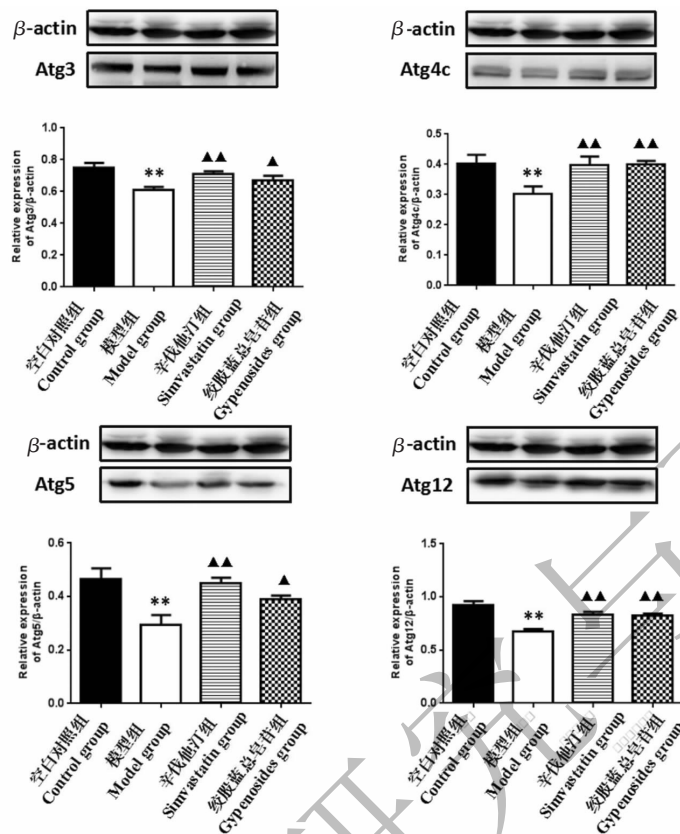


图1 各组小鼠主动脉自噬小体相关蛋白表达情况 ($n=3$)

Fig. 1 The expression of autophagosome-related proteins in aorta of mice ($n=3$)

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$; Compared with the model group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

股皂苷可能通过改善 AS 小鼠血清血脂水平, 发挥其防治 AS 发生发展的作用。

自噬是真核细胞独有的一种不同于凋亡的生命方式, 对维持细胞结构、代谢和功能的平衡发挥着重要生物学作用^[8]。在营养缺乏、低氧损伤等机体受损时自噬会促进细胞自我更新, 不同程度的自噬对机体的作用是不同的, 适度的自噬对 AS 具有保护作用, 而过度的自噬会导致细胞死亡, 不利于斑块的稳定性^[9]。自噬是多阶段连续进行的生物学过程, 主要分为自噬的诱导阶段、独立膜样结构形成阶段、自噬小体形成阶段以及自噬小体成熟降解阶段^[8]。在细胞自噬过程中, 自噬小体发挥着重要作用。且课题组前期发现化痰祛痰方可通过调节高脂血症大鼠肝脏自噬小体形成信号通路相关基因表达改善高脂血症大鼠肝脏脂质损伤^[4]。因此, 本研究以自噬小体形成信号通路为切入点, 分别构建 ApoE^{-/-} 小鼠 AS 模型和 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞内皮损伤模型, 探讨绞股蓝总皂苷及其重要组成成分人参皂苷

GRb3、绞股蓝皂苷 XILX 对 AS 的防治作用。

参与自噬小体形成最主要的两类蛋白是泛素样蛋白 LC3 家族和自噬相关蛋白 (autophagy related protein, Atg) 家族, 其生物学过程涉及到两条泛素样结合通路 Atg12-Atg5 通路和 LC3-PE 通路^[10,11]。Atg 是一类自噬组成蛋白, 参与调节自噬启动和自噬小体的形成等过程^[12]。其中 Atg12、Atg5 是参与 Atg12-Atg5 通路的关键蛋白, Atg4、Atg3 是参与 LC3-PE 通路的相关蛋白。在 Atg12-Atg5 结合的生物学过程中, Atg7 与 Atg12 的 C-末端结合, 水解 ATP 活化 Atg12。活化的 Atg12 与 Atg10 分离, Atg12 与 Atg5 共价结合, 为后续参与 LC3 的募集和分离膜的延伸过程做准备^[13]。在 LC3-PE 结合的生物学过程中, LC3-I 型被转移给 Atg3, Atg3 催化 LC3-I 与脑磷脂共价聚合, 形成 LC3-II 型, LC3-II 型以 Atg5 依赖性的方式被转运到自噬体外膜中^[11], 进而参与自噬小体的形成。本研究结果发现, 绞股蓝总皂苷能够增强 ApoE^{-/-} 小鼠自噬小体相关蛋白 Atg3、Atg4c、

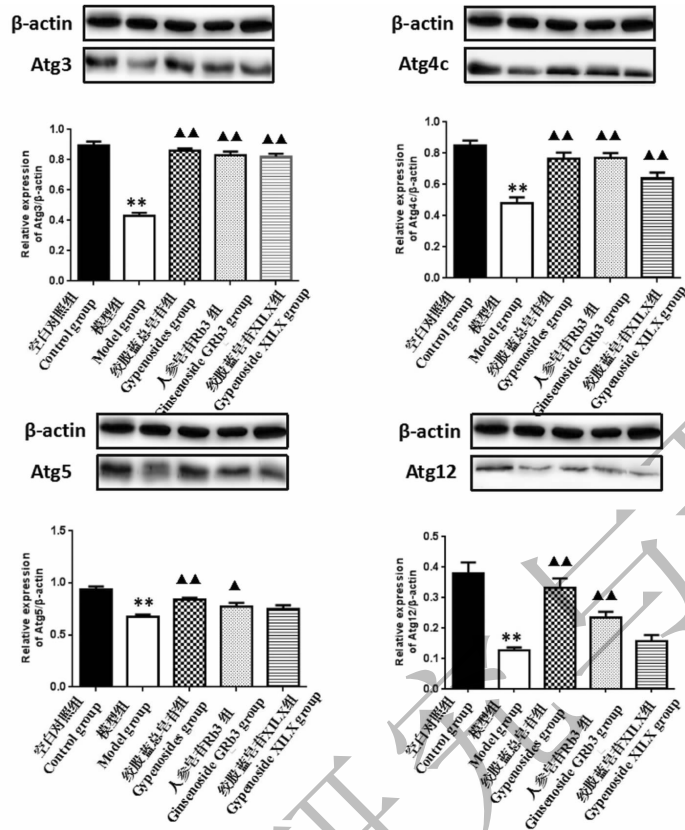


图2 各组细胞自噬小体相关蛋白表达情况 ($n = 3$)

Fig. 2 The expression of autophagosome-related proteins in each group cells ($n = 3$)

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$; Compared with the model group, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

Atg5、Atg12 的表达水平,说明绞股蓝总皂苷能够促进 ApoE^{-/-}小鼠自噬小体的形成,且与辛伐他汀作用相似。进一步利用 ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞内皮损伤模型,探讨绞股蓝总皂苷中哪种有效成分发挥了其防治 AS 的关键作用,我们选取绞股蓝总皂苷中的重要组成成分人参皂苷 GRb3、绞股蓝皂苷 XILX,探究其对血管内皮细胞的保护作用,发现人参皂苷 GRb3、绞股蓝皂苷 XILX 能够促进内皮损伤 EA. hy926 细胞自噬小体的形成,且人参皂苷 GRb3 的作用略强于绞股蓝皂苷 XILX。且课题组前期研究已证实,适度的促进自噬能够抗 EA. hy926 细胞内皮损伤^[14]。

综上,本研究说明股蓝总皂苷可能通过促进自噬小体形成,降低 ApoE^{-/-}小鼠血清血脂水平,保护 EA. hy926 细胞抗内皮损伤,进而发挥其防治 AS 的生物学作用,且在该过程中人参皂苷 GRb3 和绞股蓝皂苷 XILX 可能是绞股蓝总皂苷中发挥关键作用的有效成分。

参考文献

- Zhang QY (张秋英), Liu Y (刘影). Effect of Hua-yu Qutan decoction on Hs-CRP and E-selectin of patients with unstable angina pectoris. *Guiding J Tradit Chin Med Pharm* (中医药导报), 2014, 20(9): 8-10.
- Zhang QY (张秋英), Liu Y (刘影). Effect of removing phlegm and blood stasis decoction on serum levels of NO and PGI2 in patients with hyperlipidemia. *J Liaoning Univ TCM* (辽宁中医药大学学报), 2013, 15: 30-31.
- Liu Y (刘影), Zhang QY (张秋英), Zhang SW (张丝微). Effect of Huayu Qutan decoction in treating primary hyperlipidemia with phlegm and blood stasis. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志), 2013, 40: 114-115.
- Zhang N (张妮), Jia LQ (贾连群), Yang GL (杨关林), et al. Impact of Huayu Qutan Decoction on related genes of hepatic autophagy bodies forming signal pathways of hyperlipidemia rats. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2016, 57: 1959-1963.

(下转第 2127 页)