

# 基于 PI3K/AKT/mTOR 通路的三百棒促进脂多糖诱导的 RAW 264.7 细胞自噬并抑制炎症

张宗星<sup>1,2</sup>, 江露<sup>1,2</sup>, 刘道忠<sup>1,2</sup>,  
侯孜明<sup>1,2</sup>, 田梦杰<sup>1,2</sup>, 陶柏楠<sup>1,2</sup>, 冯佳<sup>1,2</sup>, 袁林<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>湖北民族大学风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室; <sup>2</sup>湖北民族大学医学部, 恩施 445000

**摘要:** 三百棒来源于芸香科植物飞龙掌血 *Toddalia asiatica* (L.) Lam 的根, 是一种天然土家族中草药, 具有抗炎、抗风湿、抗肿瘤、抗微生物等药理活性。其毒副作用小, 疗效显著的特点使之成为当前研究热点。许多天然产物已被证明可通过靶向 PI3K/AKT/mTOR 介导的自噬来抑制炎症及自身免疫性疾病, 本研究通过调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来研究三百棒醇提取物 (*Toddalia asiatica* alcohol extract, TAAE) 对自噬的影响, 用脂多糖 (LPS) 诱导单核巨噬细胞 (RAW 264.7) 建立炎症模型, 通过细胞毒性检测试剂盒检测 TAAE 对细胞活力的影响, 并筛选出药物的浓度及干预时间, 透射电镜和单丹磺酰尸胺染色检测巨噬细胞的生物学功能, 酶联免疫吸附法检测上清液中相关炎症因子水平, Western blot 检测自噬和通路相关蛋白的表达水平; 并采用自噬早期抑制剂 (3-MA) 和通路 PI3K 激动剂 (740Y-P) 进一步验证自噬对炎症和信号通路的影响。实验结果表明 TAAE 可能通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 促进自噬泡的形成、自噬体溶酶体融合和降解, 降低 LPS 处理的 RAW 264.7 细胞中炎性细胞因子的表达和分泌。总体而言, 本研究结果为三百棒的抗炎机制的研究提供了新的线索, 并为临床更好的应用三百棒治疗炎症性疾病提供理论依据。

**关键词:** 三百棒; PI3K/AKT/mTOR 通路; 自噬; 炎症; RAW 264.7 细胞

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)4-0573-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.4.003

## *Toddalia asiatica* promotes lipopolysaccharide-induced autophagy and inhibits inflammation in RAW 264.7 cells based on the PI3K/AKT/mTOR pathway

ZHANG Zong-xing<sup>1,2</sup>, JIANG Lu<sup>1,2</sup>, LIU Dao-zhong<sup>1,2</sup>,  
HOU Zi-ming<sup>1,2</sup>, TIAN Meng-jie<sup>1,2</sup>, TAO Bo-nan<sup>1,2</sup>, FENG Jia<sup>1,2</sup>, YUAN Lin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Hubei Minzu University;

<sup>2</sup>Department of Medicine, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China

**Abstract:** The root of the Rutaceae plant *Toddalia asiatica* (L.) Lam is a natural Tujia Chinese herbal medicine with anti-inflammatory, anti-rheumatic, anti-tumor, anti-microbial and other pharmacological activities. Its characteristics of small poisonous side effects and remarkable curative effect make it a hot spot in current research. Many natural products had been shown to inhibit inflammation and autoimmune diseases by targeting PI3K/AKT/mTOR mediated autophagy. In this study, the effect of TAAE on autophagy was studied by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, and RAW 264.7 cells were induced by LPS to establish an inflammatory model. Cytotoxicity detection kit was used to detect the effect of TAAE on cell viability, the concentration and intervention time of the drug were screened out. Transmission electron microscopy and MDC staining were used to detect the biological function of macrophages. The levels of inflammatory factors in the supernatant were detected by ELISA, and the expression levels of autophagy and pathway-related proteins were detected by Western blot. The effects of autophagy on inflammation and signaling pathways were further verified by using an early autophagy inhibitor (3-

MA) and pathway PI3K agonist (740Y-P). The results indicated that TAAE may inhibit the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, promote the formation of autophagic vesicles, fusion and degradation of autophagosomal lysosomes, and reduce the expression and secretion of inflammatory cytokines in RAW 264.7 cells treated with LPS. Overall, the results of this study provide a new clue for the research of the anti-inflammatory mechanism of *Toddalia asiatica*, and provide a theoretical basis for better clinical application of *Toddalia asiatica* in the treatment of inflammatory diseases.

**Key words:** *Toddalia asiatica*; PI3K/AKT/mTOR pathway; autophagy; inflammation; RAW 264.7 cells

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是一种由革兰氏阴性细菌释放的内毒素, 在人体内革兰氏阴性菌感染引起的细菌毒性反应中, 可以刺激免疫炎症反应<sup>[1,2]</sup>。巨噬细胞常参与炎症反应和吞噬作用, LPS 处理的巨噬细胞系 RAW 264.7 是一种常用的免疫细胞炎症反应的细胞模型<sup>[3]</sup>。自噬是一种分解代谢过程, 其中细胞质内容物通过自噬体输送到溶酶体进行大量降解以维持细胞稳态<sup>[4]</sup>。自噬作为细胞重要机制, 参与了自身免疫疾病<sup>[5]</sup>、炎症性疾病<sup>[6]</sup>、肿瘤<sup>[7]</sup>等多种疾病的发生发展。炎症反应是机体组织免疫防御功能的一种, 适度的炎症反应有助于修复机体损伤, 但过度的炎症反应会导致机体发生不良反应, 引起器官、组织和细胞的变性坏死, 甚至危及生命<sup>[8]</sup>。许多研究发现自噬和炎症之间存在双向交流, 适度的自噬可减弱炎症反应, 但过度自噬会加重炎症反应, 多种免疫介质可诱导或抑制自噬, 但其稳态的恢复严重依赖于自噬<sup>[9]</sup>。因此充分了解细胞自噬对炎症的调控机制能有效治疗炎症性及自身免疫性疾病。

三百棒来源于芸香科植物飞龙掌血 *Toddalia asiatica* (L.) Lam 的根, 《土家族药物志》中明确记载其“祛风除湿, 活血舒筋, 消肿止痛”的功效<sup>[10,11]</sup>。化学成分研究表明, 三百棒的主要化学成分为生物碱和香豆素<sup>[12]</sup>。现代药理研究证实三百棒提取物具有抗风湿<sup>[13]</sup>、抗炎<sup>[14]</sup>、抗肿瘤<sup>[15]</sup>等作用。本课题组前期实验研究证明, 三百棒可通过磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (PI3K/AKT/mTOR) 信号通路阻断自噬流, 从而抑制成纤维滑膜细胞系 MH7A 细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[16]</sup>。但对三百棒醇提物 (*Toddalia asiatica* alcohol extract, TAAE) 在自噬中的作用仍不成熟, 本研究结果显示 TAAE 以浓度依赖性方式触发自噬。同时为进一步验证 TAAE 是否通过 PI3K/AKT/mTOR 通路在 RAW 264.7 巨噬细胞的自噬中发挥重要作用, 本实验以 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞为模型, 研究 TAAE 对 RAW 264.7 细胞自噬与免疫功能的影响, 探索 TAAE 调控固有免疫反应的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

小鼠单核巨噬白血病细胞 RAW 264.7 (武汉普诺塞生命科技有限公司, 货号: CL-0190); 无水乙醇 (武汉市中天化工有限责任公司, 批号: 20220228); 甲醇 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20220112); 戊二醛固定液 (福州飞净生物科技有限公司, 批号: PH9003); 胎牛血清 (FBS) (上海道鹏生物科技有限公司, 批号: 2110053); CCK-8 试剂盒、DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液、脂多糖 (均来自大连美仑公司, 批号分别为: MA0218-5、MA0212、MA0016-Apr-09E、MB5198); 青-链霉素溶液 (吉诺生物医药技术有限公司, 批号: 1712180106); PMSF 蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (均来自碧云天生物技术有限公司, 批号分别为: 101321211021、P0012S、071222220721); RIPA 裂解液 (武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号: CR2107001); 细胞自噬染色检测试剂盒 (MDC 法) (美谷生物科技有限公司, 批号: G0170); 酶联免疫试剂盒 (ELISA) (联科生物技术有限公司, 批号 A20620224); 3-MA、740Y-P (中国 MCE 公司, 批号分别为: 5142-23-4、MB4505); ECL 超敏发光液 (武汉科瑞生物技术有限公司, 批号: 2021120617)。

P62 抗体、LC3 抗体、Beclin1 抗体、Atg5 抗体、GAPDH 抗体、mTOR 抗体 (均来自美国 Proteintech 公司, 批号分别为: 18420-1-AP、18725-1-AP、12789-1-AP、10988-1-AP、60004-1-1g、66888-1-Ig); Goat Anti-Rabbit IgG、Goat Anti-Mouse IgG、p-mTOR 抗体、COX-2 抗体、TNF- $\alpha$  抗体、IL-6 抗体 (均来自 AB-clonal 生物技术有限公司, 产品批号分别为: 20000311、20000275、AP0115、A3560、A11534、A0286); AKT、p-AKT 抗体 (美国 CST 公司, 批号分别为: #4691、#4060); PI3K 抗体 (武汉华美生物工程有限公司, 批号: CSB-RA578819A0HU); p-PI3K 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: MA0334)。

## 1.2 主要仪器

FD8-8 真空冷冻干燥机(瑞士 Buchi 公司); Multiskan FC 多功能酶标仪(美国 ThermoScientific 公司); CKX41-C31B 倒置荧光显微镜(奥林巴斯有限公司); ImageQuantLAS4000mini 生物分子成像仪(日本 GE 公司); HM325 超薄切片机(奥地利维也纳 Leica 公司); HT7700 透射电子显微镜(日本 HITACHI 公司)。

## 1.3 三百棒醇提物的制备

三百棒采于湖北省恩施州咸丰县,经湖北民族学院附属民大医院制剂室张国安主任药师鉴定为飞龙掌血 *Toddalia asiatica* (L.) Lam, 药材标本(No. 20200809) 现保存于湖北民族大学医学部。

参照前期课题组处理方法<sup>[11,16]</sup>:取 100 g 粉碎过后的三百棒根皮,加入 5 倍体积 70% 的乙醇浸泡充分浸泡数小时后,85 °C 恒温加热,反复提取 5 次,合并药液并旋蒸浓缩药液,使终浓度为 1 g/mL。将浓缩过后的药液平铺分装至多个底面平整的容器内,并用保鲜膜封口,放入 -20 °C 冰箱过夜。然后 -80 °C 真空冷冻干燥 24 h,装袋、称重、标记,保存在干燥处防止受潮。

## 1.4 药物处理

### 1.4.1 TAAE 溶液配制

称取 1.5 g TAAE 冻干粉放入 50 mL 的离心管中,用 1 × PBS 溶解药粉,定容至 15 mL 封口,超声 1 h,在超净工作台中打开,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤三次,用 1.5 mL EP 管封装放入 4 °C 冰箱备用。

### 1.4.2 LPS 溶液的配制

无菌环境下,取 10 mL 无菌 PBS 溶液溶解 10 mg LPS 粉末,配制成 1 mg/mL LPS 母液,分装到 1.5 mL EP 管中,-20 °C 保存,使用时稀释至所需浓度。

### 1.4.3 3-MA 溶液的配制

将 29.83 mg 3-MA 粉末溶于 1 mL 无菌 PBS 溶液中,配制成 0.2 mol/L 的母液。3-MA 完全溶解后分装到 1.5 mL EP 管中,避光储存于 -20 °C 冰箱,使用时稀释至所需浓度。

### 1.4.4 740Y-P 溶液的配制

将 1 mg 740Y-P 粉末溶于 1 mL 无菌 PBS 溶液中,配制成 1 mg/mL 的母液。740Y-P 完全溶解后分装到 1.5 mL EP 管中,避光储存于 -20 °C 冰箱,使用时稀释至所需浓度。

## 1.5 细胞培养及分组

RAW 264.7 细胞株在 DMEM 培养液(含 10%

胎牛血清和 1% 的青霉素、链霉素双抗混悬液)中培养,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,温度为 37 °C。倒置显微镜下观察细胞生长情况,每 24 h 换一次液,当细胞生长至 80% ~ 90% 时,轻轻敲打细胞,使贴壁细胞脱落或使用细胞刮顺着方向轻轻将细胞刮下,按 1:3 的比例进行传代。

### 1.5.1 TAAE 干预 RAW 264.7 细胞的量-效实验

取对数生长期的细胞将细胞密度调整为  $2 \times 10^4$  个/mL,以每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔板。将细胞分组,分别给予不同浓度(0、0.25、0.5、1 mg/mL)TAAE,每组均设 5 个复孔。干预 24 h 后收集细胞用于后续实验。

### 1.5.2 TAAE 干预 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的量-效实验

取对数生长期细胞,将细胞密度调整为  $2 \times 10^4$  个/mL,以每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔板。将细胞分组,分别给予不同浓度(0、0.25、0.5、1 mg/mL)TAAE,每组均设 5 个复孔。药物作用 2 h 后,各药物干预组再加入 1 μg/mL LPS。干预 24 h 后收集细胞用于后续实验。

## 1.6 CCK-8 法检测 TAAE 对 RAW 264.7 细胞活力的影响

按照“1.5.1”和“1.5.2”项下进行分组与药物干预。干预 24 h 后,将含有 10% 0.5 mg/mL CCK-8 试剂的细胞培养基加入每个孔中,避光孵育 30 min。用酶标仪在 450 nm 处测量每个孔的吸光度(A),计算细胞存活率。每个实验重复 3 次。

$$\text{存活率} = (A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{0\text{加药}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

## 1.7 ELISA 检测上清液中 TNF-α、IL-6 含量

设置 3-MA 处理组(5 mmol/L)、LPS 处理组(1 μg/mL)、TAAE(0.25、0.5 和 1 mg/mL) + LPS 处理组、3-MA(提前干预 1 h) + TAAE(1 mg/mL) + LPS 处理组和空白组(DMEM 培养基)干预 24 h 后,收集细胞上清液用 ELISA 试剂盒(TNF-α、IL-6)检测细胞因子含量。设置 7 个标准品,将不同浓度标准品和实验样本每孔 100 μL 加入到 96 孔板中,37 °C 孵育 60 min,洗涤 5 次,每次震荡或静置 40 s。每孔加入 100 μL 抗体工作液,37 °C 孵育 30 min,洗涤 5 次。每孔再加入 100 μL 酶结合物工作液,37 °C 孵育 30 min,洗涤 5 次。最后每孔加入 100 μL 显色底物工作液,37 °C 孵育 15 min 后加入 100 μL 终止液混匀。使用酶标仪测量吸光度,通过样本的吸光度值计算炎症因子浓度。

## 1.8 MDC 染色法标记自噬泡

按照“1.5.2”项下进行分组与药物干预 24 h 后,吸弃培养基,1 × Wash Buffer,300 μL 洗涤 3 次,将 MDC 染液与 1 × Wash Buffer1:9 混合,每孔加入 100 μL 混合后的染液,室温避光孵育 45 min。调节荧光显微镜激发滤光片波长 355 nm,阻断滤光片波长 512 nm,高倍显微镜(×400)下观察、计数并拍照。

## 1.9 透射电子显微镜观察自噬小体

细胞分组和处理方法与“1.5.2”相同,用细胞刮刮下处理好的 RAW 264.7 细胞,用 PBS 洗涤 3 次后移置 1.5 mL 离心管中,1 200 r/min 离心 3 min,小心吸弃上清,加入 500 μL 2.5% 的戊二醛固定过夜,次日用 PBS 清洗 3 次,每次 10 min。样品置于 2.5% 戊二醛中固定 2~4 h 后琼脂预包埋,磷酸漂洗液漂洗 3 次,1% 锇酸 4 °C 固定 2 h;ddH<sub>2</sub>O 漂洗 3 次后乙醇梯度脱水,环氧丙烷过渡,812 树脂梯度渗透后包埋,60 °C 聚合,包埋块用 LeicaUC7 型超薄切片机进行超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色切片,用透射电镜观察细胞超微结构。

## 1.10 Western blot 检测相关因子表达

按照“1.5.2”项下进行分组与药物干预后。离心收集细胞,加入 RIPA 细胞裂解液,冰上裂解 30 min 后,离心收集上清,提取细胞蛋白。BCA 法测定细胞总蛋白浓度。各孔取 10 μL 蛋白上样,于 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离(浓缩胶电压 70 V,30 min;分离胶电压 110 V,60 min)。将分离后的蛋白电转移(280 mA,90 min)至 PVDF 膜。加入封闭液于摇床上室温封闭 2 h。用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;分别加入一抗抗体(体积稀释比例均为 1:

5 000),4 °C 反应过夜。次日先以 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;后加入二抗山羊抗兔 IgG(体积稀释比例为 1:10 000),室温反应 2 h;再用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。按 ECL 试剂盒说明进行曝光显影。采用 ImageJ 图像分析管理系统对蛋白条带灰度值进行分析。

## 1.11 统计学方法

采用 SPSS23.0 对实验数据进行统计分析,实验结果均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。实验数据符合正态性则用单因素方差分析,方差齐时组间比较采用 LSD 法,方差不齐时组间比较采用 Dunnett's T3 法, $P < 0.05$  具有统计学意义。实验数据不符合正态性则用 KruskalWallisH 检验, $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 对细胞活力的影响

CCK-8 实验结果显示,在 RAW 264.7 细胞 < 2 mg/mL TAAE 干预 24 h 后,细胞活力没有显著变化;2 mg/mL TAAE 干预 24 h 后,细胞活力较空白组(0 mg/mL)显著降低( $P < 0.01$ )。在 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 < 2 mg/mL TAAE + LPS 干预 24 h 后,细胞活力没有显著变化;2 mg/mL TAAE + LPS 干预 24 h 后,细胞活力较空白组(0 mg/mL)显著降低( $P < 0.01$ )。故后续实验设置 0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL 分别作为 TAAE 低、中、高剂量(见图 1)。

### 2.2 TAAE 与 LPS 干预后上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量

ELISA 实验结果显示,与空白组相比较,LPS 组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量显著升高( $P < 0.01$ );与 LPS 组相

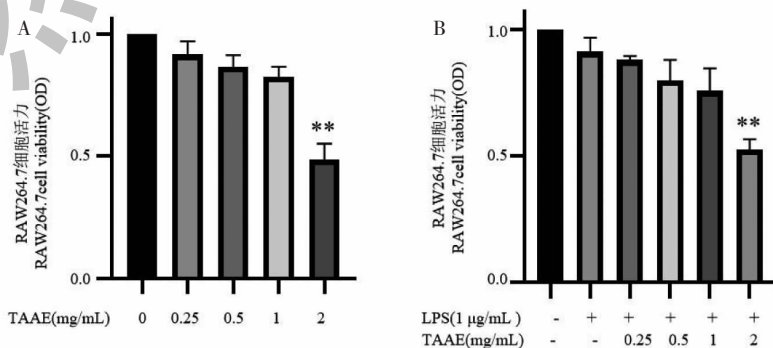


图 1 不同浓度 TAAE 和 LPS(1 μg/mL)对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of TAAE and LPS(1 μg/mL) on the viability of RAW 264.7 cells

注:与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ 。Note:Compared with blank group,\*\* $P < 0.01$ 。

比较,低、中、高剂量 TAAE 作用后可显著降低上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量,高剂量组更明显 ( $P < 0.01$ ) (见图 2)。

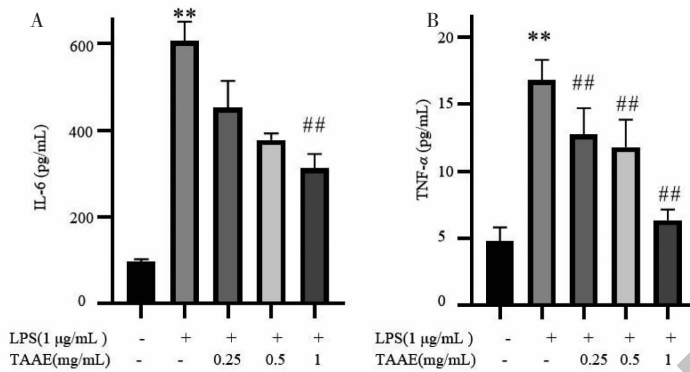


图 2 RAW 264.7 细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量

Fig. 2 Content of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the supernatant of RAW 264.7 cells

注:与空白组相比较, \*\*  $P < 0.01$ , 与 LPS 组相比较, ##  $P < 0.01$ 。Note: Compared with blank group, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with LPS group, ##  $P < 0.01$ 。

### 2.3 自噬抑制剂 3-MA 对 TAAE 减弱炎症反应的影响

与空白组相比较在没有 TAAE 的情况下, LPS 组 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) TNF- $\alpha$  和 IL-6 的含量明显升高 ( $P < 0.01$ )。与 LPS 组相比较 TAAE 的干预降低了 TNF-

$\alpha$  和 IL-6 的含量, 而加入自噬抑制剂 3-MA 后, TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌均较 TAAE 组有所升高, 表明自噬抑制剂 3-MA 减弱了 TAAE 对炎症细胞因子的抑制作用 (见图 3)。

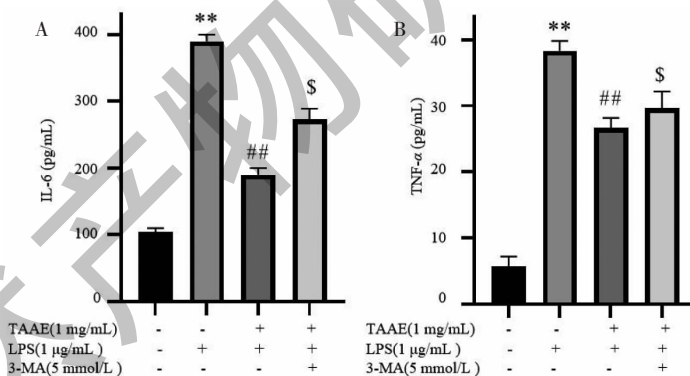


图 3 3-MA 对炎症模型 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量的影响

Fig. 3 Effect of 3-MA on the content of TNF- $\alpha$  and IL-6 in inflammation model

注:与空白组相比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组相比较, ##  $P < 0.01$ ; 与 TAAE 组相比较, \$  $P < 0.05$ 。Note: Compared with blank group, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with LPS group, ##  $P < 0.01$ ; Compared with TAAE group, \$  $P < 0.05$ 。

### 2.4 MDC 染色法标记自噬泡

用荧光显微镜观察 MDC 标记的自噬泡时, 在细胞质或细胞核周区域可见到清晰的点状结构, 可根据荧光显微镜下细胞内颗粒的变化来判断细胞内自噬水平。

与空白组 (见图 4A) 相比 LPS 组 (见图 4B) 显示出较弱的荧光, 与 LPS 组相比, TAAE 低、中、高处

理组 (见图 4C、4D、4E) 显示出更强的荧光亮度和更多的 MDC 标记的自噬颗粒, 表明 TAAE 诱导了 RAW 264.7 细胞模型中自噬的形成。

### 2.5 透射电子显微镜观察自噬小体

通过透射电子显微镜观察, 空白组 (见图 5A) 细胞染色质结构正常, 胞质中线粒体形态分布正常, 未见自噬小体, 有少许自噬溶酶体; 与空白组相比较

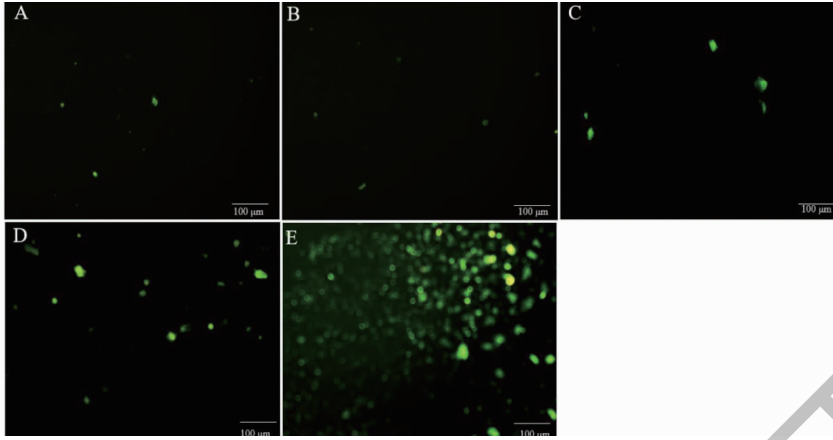


图4 采用MDC标记的RAW 264.7细胞自噬泡( $\times 100$ )

Fig. 4 MDC-labeled autophagic vacuoles in RAW 264.7 cells ( $\times 100$ )

注:A:空白组;B:LPS组;C:TAAE(0.25 mg/mL) + LPS组;D:TAAE(0.5 mg/mL) + LPS组;E:TAAE(1 mg/mL) + LPS组,下同。Note:A: Blank group;B:LPS group;C:TAAE(0.25 mg/mL) + LPS group;D:TAAE(0.5 mg/mL) + LPS group;E:TAAE(1 mg/mL) + LPS group, the same below.

LPS组(见图5B)自噬溶酶体数量减少,未见自噬小体;与LPS组相比较,经过TAAE的干预后细胞内自

噬溶酶体数量增多,自噬小体形成,高剂量组(见图5E)更明显。

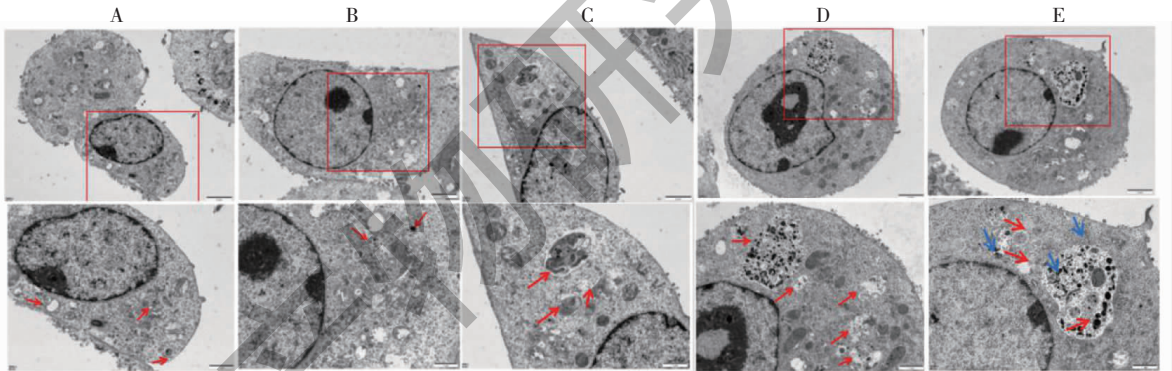


图5 TAAE对LPS诱导的RAW 264.7细胞自噬溶酶体和自噬体超微结构的影响( $\times 10\ 000$ )

Fig. 5 Effect of TAAE on LPS-induced RAW 264.7 cell autophagolysosome and autophagosome ultrastructure ( $\times 10\ 000$ )

注:红色箭头:自噬溶酶体;蓝色箭头:自噬小体。Note:Red arrow: Autophagolysosome;Blue arrow: Autophagosome.

## 2.6 对自噬和炎症相关蛋白表达的影响

与空白组相比,LPS组细胞P62、TNF- $\alpha$ 、IL-6、COX-2蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ),Beclin1、Atg5、LC3-II/LC3-I蛋白表达比值显著降低( $P < 0.05$ )。与LPS组相比,低、中、高剂量的TAAE作用后,P62蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),Beclin1、Atg5、LC3-II/LC3-I蛋白表达明显上调( $P < 0.05$ )。炎症相关蛋白TNF- $\alpha$ 、IL-6、COX-2表达明显降低( $P < 0.05$ )。提示TAAE可以促进LPS诱导

的巨噬细胞自噬,降低TNF- $\alpha$ 、COX-2、IL-6炎症因子水平,进而发挥抗炎作用(见图6)。

## 2.7 3-MA对自噬相关蛋白表达的影响

为了进一步证明TAAE的抗炎作用是否通过自噬来实现的,在加入TAAE之前先加入终浓度5 mmol/L的自噬早期抑制剂3-MA,处理1 h后加入TAAE(1 mg/mL)共同作用24 h。与空白组相比,TAAE(1 mg/mL)组LC3-II/LC3-I、Beclin1蛋白表达明显升高,P62蛋白表达降低( $P < 0.05$ );3-MA

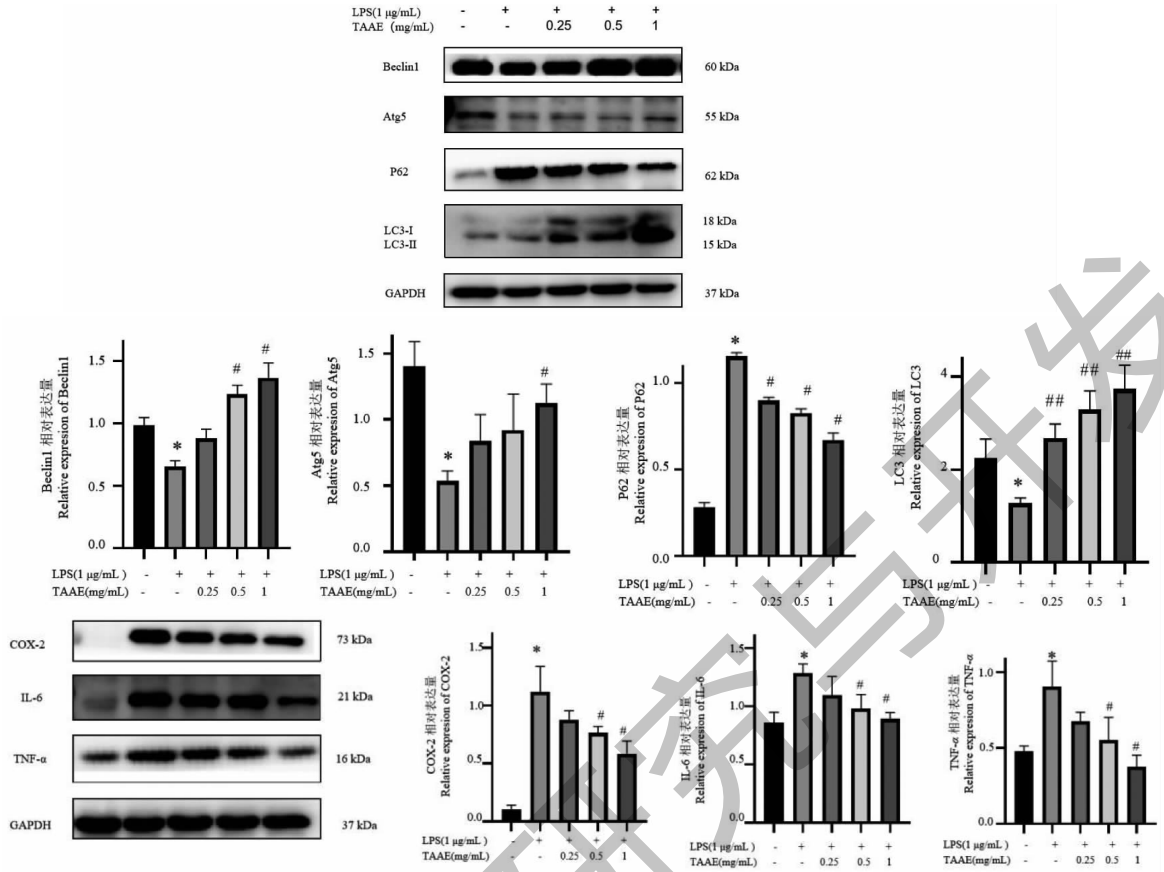


图6 TAAE对LPS诱导的RAW 264.7细胞自噬相关蛋白和炎症相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect of TAAE on the expression of autophagy and inflammation related proteins in RAW 264.7 cells induced by LPS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与空白组相比较, \*  $P < 0.05$ ; 与LPS组相比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。Note: Compared with blank group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the LP S group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

组 LC3- II/LC3- I、Beclin1 蛋白表达明显降低, P62 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。与 3-MA 组相比, 3-MA + TAAE 组增强了 Beclin1、LC3- II 蛋白表达, 降低了

P62 表达 ( $P < 0.01$ ); 与 TAAE 组相比, 3-MA + TAAE 组削弱了 Beclin1、LC3- II 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ) (见图 7)。

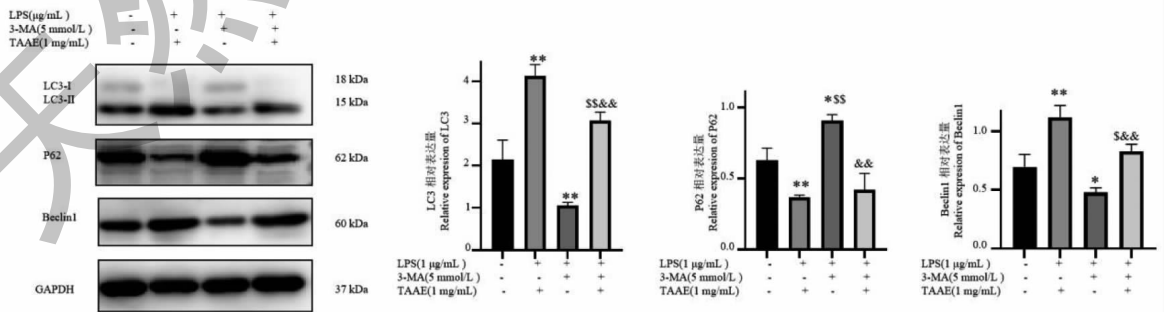


图7 3-MA对自噬相关蛋白 Beclin1、LC3、P62 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect of 3-MA on the expression of autophagy related proteins Beclin1, LC3 and P62 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与空白组相比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与TAAE组相比较,  $^S P < 0.05$ ,  $^{SS} P < 0.01$ ; 与3-MA组相比较,  $^{\&\&} P < 0.01$ 。Note: Compared with blank group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with TAAE group,  $^S P < 0.05$ ,  $^{SS} P < 0.01$ ; Compared with 3-MA group,  $^{\&\&} P < 0.01$ 。

## 2.8 对 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达的影响

为了进一步确定 PI3K/AKT/mTOR 信号传导是否参与 TAAE 诱导的自噬,我们在用 TAAE 处理 RAW 264.7 细胞后,通过蛋白质印迹确定了 PI3K/AKT/mTOR 通路中关键蛋白的表达水平。如图 8

所示,与空白组相比,LPS 组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ),与 LPS 组相比,低、中、高剂量的 TAAE 作用后,p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。提示 TAAE 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路发挥治疗作用。

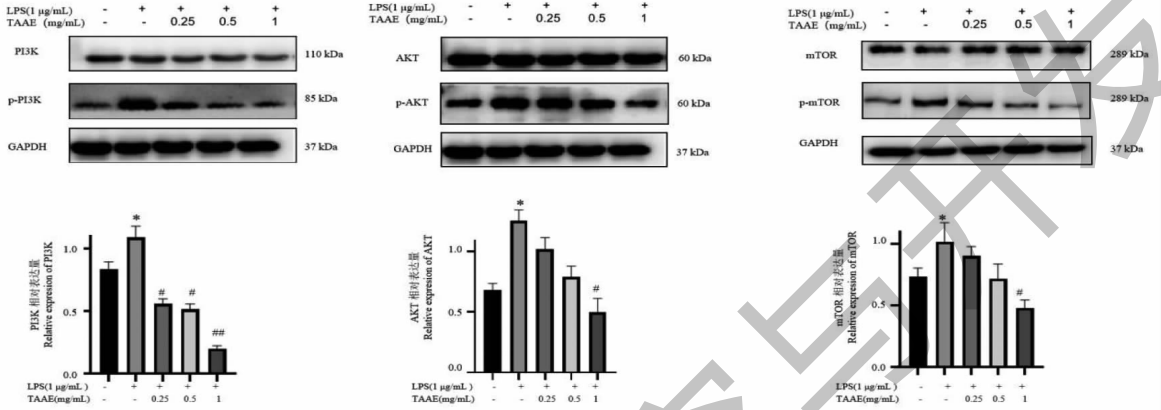


图 8 TAAE 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Effect of TAAE on the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in LPS-induced RAW 264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与空白组相比较, \*  $P < 0.05$ ;与 LPS 组相比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。Note: Compared with blank group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the LPS group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

## 2.9 740Y-P 验证 TAAE 对 RAW 264.7 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

为进一步确定 TAAE 对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路是否具有抑制作用,我们用 PI3K 激动剂 740Y-P (0.01 mmol/L)、TAAE (1 mg/mL)、TAAE (1 mg/mL) + 740Y-P (0.01 mmol/L) 干预 RAW 264.7 细胞,并检测 PI3K/AKT/mTOR 及其磷酸化蛋白的表

达。与空白组相比,740Y-P 促进了 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 的表达 ( $P < 0.01$ );TAAE 的干预降低了 p-PI3K 和 p-AKT、p-mTOR 的表达 ( $P < 0.05$ );与 740Y-P 组相比 740Y-P + TAAE 组降低了 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR ( $P < 0.05$ ),但对于它们的总蛋白 PI3K、AKT 和 mTOR 表达无明显差异。见图 9。

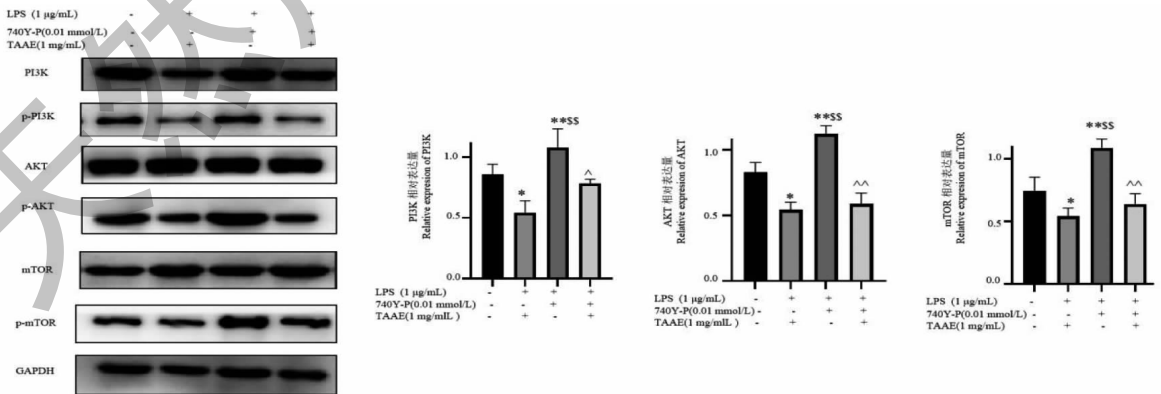


图 9 740Y-P 对 TAAE 干预的 RAW 264.7 细胞中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Effect of 740Y-P on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in RAW 264.7 cells treated with TAAE ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与空白组相比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与 TAAE 组相比较, \$  $P < 0.01$ ;与 740Y-P 组相比较, ^  $P < 0.05$ , ^^  $P < 0.01$ ,下同。Note: Compared with blank group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with TAAE group, \$  $P < 0.01$ ; Compared with 740Y-P group, ^  $P < 0.05$ , ^^  $P < 0.01$ , the same below.



## 2.10 激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对细胞自噬的影响

为了进一步证明 TAAE 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来促进自噬,我们用 PI3K 激动剂 740Y-P(0.01 mmol/L)、TAAE(1 mg/mL)、TAAE(1 mg/mL) + 740Y-P(0.01 mmol/L) 干预 RAW 264.7 细胞 24 h,并检测自噬相关蛋白 LC3、P62、Beclin1 的表达情况。与空白组相比,TAAE(1 mg/mL) 组细

胞 LC3、Beclin1 蛋白表达明显升高,P62 蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。740Y-P 组细胞 LC3、Beclin1 蛋白表达明显降低,P62 蛋白表达升高( $P < 0.05$ )。与 740Y-P 组相比较,TAAE + 740Y-P 组增强了 LC3、Beclin1 蛋白表达,降低了 P62 蛋白表达( $P < 0.01$ );与 TAAE 组相比,TAAE + 740Y-P 组削弱了 LC3、Beclin1 蛋白表达(见图 10)。

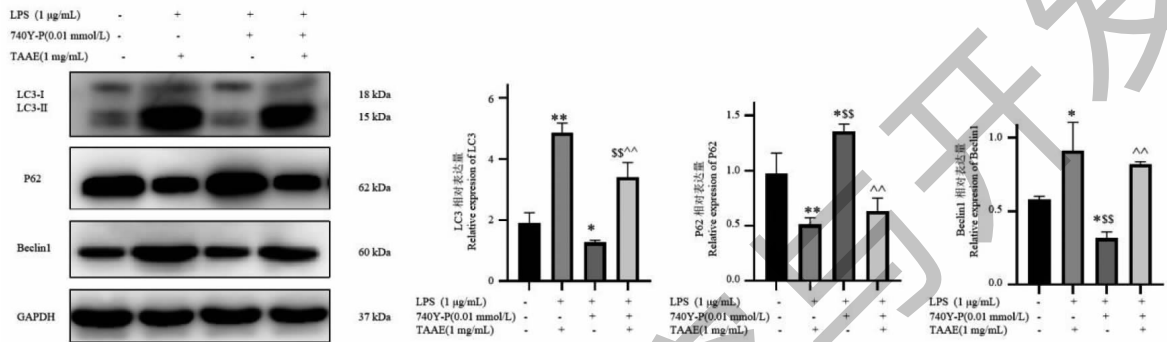


图 10 740Y-P 对 TAAE 干预的 RAW 264.7 细胞中 LC3、P62、Beclin1 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effect of 740Y-P on the expression of LC3, P62 and Beclin1 in RAW 264.7 cells treated with TAAE( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 3 讨论与结论

巨噬细胞是人体重要的免疫细胞之一,对于入侵人体组织及血液中的病原体能够快速激活应激状态,进而引发一系列炎症反应,是与炎症的发生发展密切相关的重要先天免疫细胞。炎症是一种复杂的病理反应,它是由免疫系统在暴露于外部损伤或感染时产生的多种物理反应引起的<sup>[17]</sup>,是许多慢性疾病的病理生理学中的重要组成部分,如神经退行性疾病<sup>[18]</sup>、类风湿性关节炎<sup>[19]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[20]</sup>等。有研究发现 TAAE 可抑制 Toll 样受体 4/核因子- $\kappa$ B (TLR4/NF- $\kappa$ B) 通路从而降低胶原诱导性大鼠 (CIA) 滑膜促炎细胞因子白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 及肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达,抑制类风湿关节炎滑膜炎,遏制类风湿关节炎的病情进展<sup>[11]</sup>。TAAE 还可抑制 NF- $\kappa$ B 的入核,从而达到抑制炎症因子的释放,抑制滑膜的增殖<sup>[21]</sup>。Yang 等<sup>[22]</sup>发现三百棒乙醇萃取物和乙酸乙酯萃取物可以抑制 CIA 大鼠模型的关节肿胀,降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、白细胞介素-6 (IL-6) 等促炎症因子,提高免疫抑制因子白细胞介素-10 (IL-10) 在血清中的表达。以上均体现出三百棒良好的抗炎及抗风湿作用。

自噬是真核细胞在自噬相关基因的调控下利用溶酶体降解自身细胞质蛋白和受损细胞器的过

程<sup>[23]</sup>。这一过程可以降解入侵的病原微生物、受损的细胞器和异常积累的蛋白质等,在细胞质量控制、新陈代谢以及先天和适应性免疫等生物学过程中发挥重要作用<sup>[24]</sup>。许多研究证实,自噬对炎症的影响具有双向作用<sup>[9]</sup>:一方面,自噬可能通过去除炎症蛋白聚集体和下调组织损伤的促炎细胞因子来对抗炎症反应;另一方面,自噬会激活炎症小体,产生大量炎症因子,从而加速炎症过程<sup>[25]</sup>。在平衡免疫和炎症的正反两面后,自噬可被视为感染、自身免疫和炎症的保护者。微管相关蛋白轻链 3-II (LC3-II) 是自噬的标志性蛋白,在自噬发生时 LC3-I 在 Atg5-Atg12-Atg16 复合物的帮助下连接上一个磷脂酰乙醇分子形成 LC3-II。P62 是自噬降解底物,对降解底物的识别和包裹起关键作用。Beclin1 在哺乳动物细胞中过表达时促进细胞自噬。因此 LC3、Beclin1、P62、Atg5 可以作为自噬的标志性蛋白。为了表明 TAAE 表现出的抗炎作用是否与自噬有关,本研究采用 Western blot 检测了自噬相关蛋白 P62、Beclin1、Atg5 和 LC3 的蛋白表达,同时检测了炎症相关蛋白 TNF- $\alpha$ 、IL-6、环氧合酶-2 (COX-2) 的蛋白表达。实验结果表明,TAAE 干预后 Beclin1、Atg5 和 LC3-II/LC3-I 的蛋白表达量逐渐增加,底物 P62 蛋白表达量逐渐降低,同时炎症相关蛋白表达降低。

采用 MDC 法标记自噬泡和透射电镜观看自噬小体的实验结果也表明 TAAE 促进了 RAW 264.7 细胞自噬。为了进一步论证自噬对炎症的影响,使用自噬抑制剂 3-MA,3-MA 也是 PI3K 信号通路的特异性抑制剂来控制巨噬细胞自噬,阻断自噬性整合和蛋白质降解。结果显示自噬抑制剂 3-MA 减弱了 TAAE 对细胞炎症因子的抑制作用,而 TAAE 的干预能有效降低炎症模型中细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌,再次论证了 TAAE 通过促进 RAW 264.7 细胞自噬发挥抗炎作用。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路在自噬调节中发挥重要作用,当 PI3K/AKT/mTOR 通路被抑制时自噬水平会增强。mTOR 是雷帕霉素的哺乳动物靶点,在自噬反应中起着重要的调节作用,是自噬的关键负调节轴。许多天然产物已被证明通过靶向 PI3K/AKT/mTOR 介导的自噬来抑制炎症及自身免疫性疾病。前期实验证实 TAAE 可通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路阻断自噬流促进 MH7A 细胞凋亡<sup>[16]</sup>。PI3K/AKT/mTOR 信号通路经蛋白质印迹法验证,实验数据显示,TAAE 导致磷酸化 PI3K、AKT 和 mTOR 的表达水平显著减少,表明 TAAE 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 途径触发自噬反应。同时使用 PI3K 激动剂(740Y-P)也进一步论证 TAAE 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱发自噬。此外,PI3K/AKT/mTOR 信号通路与炎症和免疫都有直接关系。本研究发现,TAAE 的治疗降低了 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中促炎细胞因子水平。本研究证明,在 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞的炎症环境中,TAAE 抑制自噬相关通路 PI3K/AKT/mTOR,调节自噬相关蛋白和炎症因子,促进自噬体-溶酶体融合和降解,影响炎症细胞的稳态,抑制炎症反应,从而发挥抗炎作用。本研究结果提示 PI3K/AKT/mTOR 是 TAAE 发挥抗炎作用和增加自噬活性的有效途径,可为临床治疗与炎症相关的自身免疫性疾病和代谢性疾病等提供新思路,值得进一步深入研究。

#### 参考文献

- 1 Wang YN. Mechanism of soybean oligopeptide QRPR activates autophagy in inhibiting inflammation of RAW 264.7 cells[D]. Changchun: Jilin University(吉林大学),2018.
- 2 Zhang CY, Miao JF, Liu X, et al. Effects of Paeonol on inflammation and autophagy of RAW 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med(中国中医基础医学杂志),2020,26:768-772.
- 3 Wang Y, Wang L, Wise J, et al. Verteporfin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by multiple functions in RAW 264.7 cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol,2020,387:114852.
- 4 Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation[J]. Nature,2011,469:323-335.
- 5 Shao X, Jiang XH, Wang R, et al. Molecular chaperones of synovial fibroblasts mediate enhanced autophagy in patients with rheumatoid arthritis and its correlation with the disease activity[J]. Chin J Allergy Clin Immunol(中华临床免疫和变态反应杂志),2022,16:3-8.
- 6 Yang WS, Wu W, Wang JL, et al. Autophagy-regulated strategies in pre-clinical studies of inflammatory bowel disease[J]. Acta Pharm Sin(药学报),2023,58:1-8.
- 7 Zhang YT, Liu YX, Jiang ZY, et al. Study of I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway about regulation of autophagy in Lewis lung cancer mice through reinforcing Shenlingbaizhu powder[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化),2022,24:1487-1494.
- 8 Li F, Bai SZ, Niu C, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of *Sophora alopecuroides* L. on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发):1-16[2023-02-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20230112.1716.002.html>.
- 9 Zhang S. Effects of fucoidan from *Apostichopus japonicus* on inflammation and autophagy in RAW 264.7 cells[D]. Xianyang: Northwest A&F University(西北农林科技大学),2021.
- 10 Wang XK, Li P, Ren YE, et al. Effects of alcohol extract of *Toddalia asiatica* on the inflammation-associated cytokines of model rats with adjuvant arthritis[J]. China Pharm(中国中药房),2016,27:3524-3527.
- 11 Nan YY. The functional mechanism of *Toddalia asiatica* inhibit extraction treatment of CIA rat's arthritis based on TLR4/NF- $\kappa$ B signal pathway[D]. Enshi: Hubei Minzu University(湖北民族大学),2019.
- 12 Zeng Z, Tian R, Feng J, et al. A systematic review on traditional medicine *Toddalia asiatica* (L.) Lam.: chemistry and medicinal potential[J]. Saudi Pharm J,2021,29:781-798.
- 13 Yang K, Tong L, Chen C, et al. Therapeutic effects of extracts from Radix Toddaliae Asiaticae on collagen-induced arthritis in Balb/c mice[J]. J Ethnopharmacol,2013,146:355-362.
- 14 Kariuki HN, Kanui TI, Yenesew A, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Toddalia asiatica* (L.) Lam.

- (Rutaceae) root extract in Swiss albino mice [J]. Pan Afr Med J, 2013, 14:133.
- 15 Iwasaki H, Oku H, Takara R, et al. The tumor specific cytotoxicity of dihydronitidine from *Toddalia asiatica* Lam [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2006, 58:451-459.
  - 16 Hong N. Based on autophagy of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway to explore the mechanism of *Toddalia asiatica* inhibiting the proliferation of MH7A cells [D]. Enshi; Hubei Minzu University (湖北民族大学), 2022.
  - 17 Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation [J]. Nature, 2008, 454:428-435.
  - 18 Cheng WY, Qian Y, Chen TY, et al. Research progress of CD4 + T cells-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases [J]. Acta Acad Med Sin (中国医学科学院学报), 2021, 43:628-633.
  - 19 Wang YX. Inhibition of rheumatoid arthritis by triptolide down regulating IL-7 [D]. Guangzhou; Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), 2021.
  - 20 Liu Y, Pan YM, Fu J, et al. The mechanism of action of NLRP3 inflammasome on atherosclerosis and related treatment strategy [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong (华中科技大学学报), 2022, 51:425-429.
  - 21 Zhang YD. Functional mechanism on Tujia medicine *Toddalia asiatica* inhibit RA synovial membrane proliferation based on TLR/NF- $\kappa$ B signal pathway [D]. Enshi; Hubei Minzu University (湖北民族大学), 2018.
  - 22 Yang K, Tong L, Chen C, et al. Therapeutic effects of extracts from Radix Toddaliae Asiaticae on collagen-induced arthritis in Balb/c mice [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 146:355-362.
  - 23 Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20:460-473.
  - 24 Tian J, Xie ZD. Interaction between autophagy and NLRP3 inflammasome [J]. Chin J Virol (病毒学报), 2023, 39:270-278.
  - 25 Wu XM. Effects of simvastatin on the autophagy of LPS-induced human neutrophils and release of inflammatory mediators [D]. Suzhou; Soochow University (苏州大学), 2017.

## 《天然产物研究与开发》青年编委会

### 青年编委 (以姓氏笔划为序)

#### Members

王 扣	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林
WANG Kou	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin
刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉
LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li
汪海波	沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊
WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun
欧阳杰	易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛
OUYANG Jie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao
夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕
XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan
曾克武	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
ZENG Kewu	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		