

本文引用:颜佳博,邓奕辉,廖俞强,李钰佳,李定祥.基于 RAGE/NF- $\kappa$ B/mTOR 信号通路探讨滋阴活血解毒方对 AGEs 诱导 VEC 损伤的干预作用[J].湖南中医药大学学报,2017,37(7):719-722.

## 基于 RAGE/NF- $\kappa$ B/mTOR 信号通路探讨滋阴活血 解毒方对 AGEs 诱导 VEC 损伤的干预作用

颜佳博,邓奕辉,廖俞强,李钰佳,李定祥\*  
(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

**[摘要]** **目的** 观察滋阴活血解毒方对糖基化终末产物(advanced glycosylation end products,AGEs)诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell,HUVEC)损伤的影响及 RAGE/NF- $\kappa$ B/mTOR 信号通路的变化,探讨该方对 AGEs 诱导静脉内皮细胞(vein endothelial cell,VEC)损伤的保护作用。**方法** 培养的 HUVEC 细胞以 100 mg/ml 的 AGEs 诱导损伤,随机分为 7 个组,除空白组外,其中 3 组分别加入 RAGE 抑制剂 FPS-ZM1、NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC 和 mTOR 抑制剂雷帕霉素(RAP),余下 3 组加入各种抑制剂后加入 50 mg/mL 滋阴活血解毒方浓缩药液。以 western-blot 法检测 RAGE 和 mTOR 的表达,以免疫组化方法检测 NF- $\kappa$ B 核转移状况。**结果** 细胞添加 AGEs 后细胞内出现异常增殖,细胞数量明显增多,多数细胞变形皱缩,胞膜轮廓模糊,细胞内出现粗糙样颗粒变化;抑制剂组及抑制剂加中药组都表现出不同程度的逆转这种损伤的作用,特别是抑制剂加中药组,见梭形正常细胞较多,圆缩形细胞减少。中药加抑制剂组 RAGE 表达量比单纯抑制剂组显著降低( $P<0.01$ );中药加抑制剂组 mTOR 表达量比单纯抑制剂组显著降低( $P<0.01$ );中药加抑制剂 NF- $\kappa$ B 的核转移阳性检测率比单纯抑制剂组显著降低( $P<0.01$ )。**结论** 滋阴活血解毒方能降低 AGEs 对 VEC 的损伤,降低 RAGE、NF- $\kappa$ B、mTOR 的表达。

**[关键词]** 滋阴活血解毒方;AGEs;内皮细胞损伤;RAGE;mTOR;NF- $\kappa$ B

**[中图分类号]**R285.5;R587.1

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.07.006

### Effect of Ziyin Huoxue Jiedu Decoction on VEC Injury Induced by AGEs Based on RAGE / NF- $\kappa$ B / mTOR Signaling Pathway

YAN Jiabo, DENG Yihui, LIAO Yuqiang, LI Yujia, LI Dingxiang\*

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of Ziyin Jiedu decoction on the damage of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) induced by AGEs and the change of RAGE/NF- $\kappa$ B/mTOR pathway, and to explore the protective effect of this prescription on AGEs-induced VEC injury. **Methods** The damage of HUVEC cells were induced by 100 mg/mL AGEs and randomly divided into seven groups. Three of these groups excepted blank group were added RAGE inhibitors FPS-ZM1, NF- $\kappa$ B inhibitor PDTC and mTOR inhibitor rapamycin (RAP) respectively, and the remaining three groups were treated with RAGE inhibitor FPS-ZM1, NF- $\kappa$ B inhibitor PDTC and mTOR inhibitor rapamycin (RAP) then added 50mg/mL concentrated Ziyin Huoxue Jiedu decoction to test. The expression of RAGE and mTOR was detected by Western-blot, and NF- $\kappa$ B nuclear translocation was detected by immunohistochemistry. **Results** The cells added with AGEs show abnormal growth, such as metamorphosis and shrink cells, membrane with hazy outline, roughness particles, which increase obviously. with increased cells. Inhibitor group and inhibitor added with Chinese medicine group could reverse this lesion with different degree. Inhibitor added with Chinese medicine group showed many fusiform normal cells and few round and shrink cells. The expression of RAGE in inhibitor added with Chinese medicine group showed an obvious increase than inhibitor group ( $P<0.01$ ). The expression of mTOR in inhibitor added with Chinese medicine group showed a significant increase than inhibitor group ( $P<0.01$ ). The positive detection rate of NF- $\kappa$ B drug-containing inhibitor was significantly lower than that of inhibitor group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Ziyin Huoxue Jiedu decoction could reduce VEC damage induced by AGEs, and also could decrease the expression of RAGE, NF- $\kappa$ B, mTOR.

**[Keywords]** Ziyin Huoxue Jiedu decoction; AGEs; endothelial cell injury; RAGE; mTOR; NF- $\kappa$ B

**[收稿日期]**2017-02-17

**[基金项目]**湖南省教育厅项目(16K063);湖南省中医药科研基金(201606);中西医结合基础湖南省重点学科资助。

**[作者简介]**颜佳博,女,在读硕士研究生,研究方向:神经内科及内分泌疾病研究。

**[通讯作者]**\*李定祥,男,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail,ldxlzy@hotmail.com。

近年来,糖尿病的发病率呈上升趋势<sup>[1]</sup>,预防相关并发症、延长患者寿命和提高患者生活质量是糖尿病治疗的主要目的<sup>[2]</sup>。长期糖尿病可导致晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)生成增加,AGEs与糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end-products, RAGE)结合,并激活下游信号传导途径,促进糖尿病并发症如动脉粥样硬化、肾脏病变的发生与发展。RAGE/NF- $\kappa$ B/mTOR三条信号通路在糖尿病并发脑血管疾病中起到了关键性的作用<sup>[3-5]</sup>。滋阴活血解毒方在临床上有广泛应用,并已得到证实,对糖尿病并发脑血管疾病有显著疗效<sup>[6-7]</sup>。本实验以RAGE和mTOR的表达,和NF- $\kappa$ B核转移状况为观察目标,研究滋阴活血解毒方对AGEs诱导静脉内皮细胞(vein endothelial cell,VEC)损伤的影响,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

SW-CJ-1FD型超净工作台(苏净安泰公司)、752-P型紫外分光光度计(上海现科仪器有限公司)、WD-9405A型脱色摇床(北京六一仪器厂)、DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂)、JY3002型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)等。

### 1.2 药物与试剂

滋阴活血解毒方(由熟地黄20g,黄芪30g,枸杞子12g,山萸肉12g,黄连10g,地龙12g,丹参20g,川芎12g,水蛭8g,石菖蒲8g组成)药材由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供。中药用水浸泡30min后,煎煮2次,每次30min,将2次药液混匀,浓缩成每毫升含生药量1g,PBS、透析袋、胰蛋白酶(solarbio)、D-无水葡萄糖、氨苄青霉素、硫酸庆大霉素(Amresco)、DMEM高糖培养基、胎牛血清(Hyclone)、吩嗪硫酸甲酯、人血清白蛋白、NF- $\kappa$ B抑制剂PDTC(sigma)RAGE抑制剂FPS-ZM1、和mTOR抑制剂雷帕霉素RAP(selleck)。

### 1.3 细胞株

人脐静脉内皮细胞株HUVEC购于吉满生物科技(上海)有限公司(货号GM-070036H),复苏后传3~4代。

### 1.4 糖基化终末产物

体外制备AGEs-HSA,按糖孵育法进行孵育<sup>[8]</sup>。以1.75g/L的人血清白蛋白(Human Serum Albumin,HSA)在含100mmol/L的D-葡萄糖、200mg/L的青霉素、70 $\mu$ g/L庆大霉素和1.5mmol/L吩嗪硫酸甲酯(PMS)的磷酸缓冲液(100mmol/L)中,于37 $^{\circ}$ C孵育8周。以相同条件但不含葡萄糖的缓冲液孵育的HSA作为对照。孵育结束后以无菌的磷酸盐缓冲液(pH7.4)透析除去未结合的葡萄糖,用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存备用。

### 1.5 细胞培养与分组

HUVE细胞复苏后,将瓶中废液吸出PBS冲洗两遍,加入1mL胰酶轻晃使胰酶覆盖瓶底,至细胞回缩呈圆形,加入2mL完全培养基(含10%胎牛血清)终止消化,轻轻吹打至全部脱落,加入15mL离心管中,1000r/min、5min离心。去上层清液后,加入2mL完全培养基,吹打制成细胞悬液,加入2个培养瓶中,放入培养箱中培养。48h换液1次,72h传代1次,连续传四代后,选择80%融合、生长良好的细胞进行试验。根据前期研究,100mg/mL的AGEs浓度能最大程度损伤细胞,加入100mg/mL的AGEs于37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳无菌培养箱中孵育,同时用显微镜观察细胞形态,当细胞出现收缩变圆,胞体变小,进行处理。将细胞随机分为7组,一组为空白组,另外三组为抑制剂组:分别加入RAGE抑制剂FPS-ZM1、NF- $\kappa$ B抑制剂PDTC和mTOR抑制剂雷帕霉素(rapamycin,RAP),余下三组为中药加相应的抑制剂组:根据本实验相关文献资料<sup>[9]</sup>,加入上述抑制剂的同时加入50mg/mL滋阴活血解毒方浓缩药液。干预12h后观察指标。

### 1.6 各组HUVEC细胞的形态学观察

在光学显微镜下,观察各组细胞形态变化。

### 1.7 检测RAGE、mTOR、NF- $\kappa$ B

提取各组样品后,严格按照试剂盒说明操作步骤,经电泳、转膜、封闭、孵育、显色曝光后,以western-blot法检测各组RAGE和mTOR的蛋白表达,用quantity one专业灰度分析软件进行分析;将各组爬片经冲洗、固定、再次冲洗、灭活内源性酶、孵育、显色、复染、脱水处理后,用中性树胶封片,光学显微镜下观察各组核转移情况。

1.8 统计学方法

数据使用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。所有数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。多组间均数比较使用单因素方差分析;组间两两比较方差齐者 LSO 检验,方差不齐者用 Dunnet T<sup>3</sup> 检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义,与空白组相比, $P < 0.01$  表示差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态和结构的观察

光学显微镜下观察,细胞添加 AGEs 前表现为梭形单层生长,镶嵌排列,彼此不重叠,胞膜明显,细胞明亮,融合后的细胞镜下为单层鹅卵石状排列;细胞添加 AGEs 后 12 h 细胞内出现异常增殖,细胞数量明显增多,多数细胞变形皱缩,胞膜轮廓模糊,细胞内出现粗糙样颗粒变化;抑制剂组及抑制剂加中药组都表现出不同程度的逆转这种损伤的作用,特别是抑制剂加中药组,见梭形正常细胞较多,圆缩形细胞减少。结果见图 1。

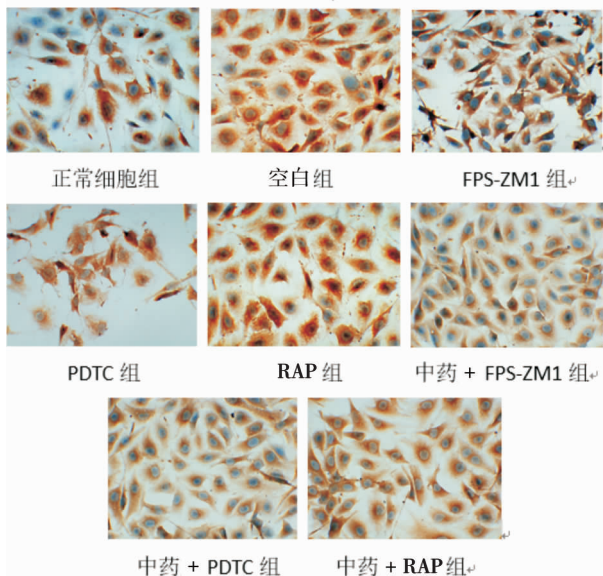


图 1 各组内皮细胞形态光镜图 (IHC 染色×400)

2.2 各组 HUVEC 中 RAGE、mTOR、NF-κB 表达量对比

与空白组相比,各中药加抑制剂 RAGE、mTOR、NF-κB 表达有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),与单纯抑制剂组相比,各中药加抑制剂组 RAGE、mTOR、NF-κB 表达量有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1,图 2-4。

表 1 各组 HUVEC 细胞 RAGE、mTOR 灰度值及

组别	NF-κB 核转移阳性率 ( $\bar{x} \pm s, n=5, \%$ )		
	RAGE	mTOR	NF-κB
空白组	0.80±0.028	0.76±0.02	30.19±0.021
FPS-ZM1 组	0.29±0.02*	0.28±0.02*	19.29±0.005*
PDTC 组	0.47±0.02*	0.30±0.03*	17.96±0.013*
RAP 组	0.56±0.01*	0.14±0.01*	24.23±0.010*
中药+FPS-ZM1 组	0.23±0.01* <sup>△</sup>	0.14±0.01* <sup>△</sup>	15.02±0.003* <sup>△</sup>
中药+PDTC 组	0.36±0.01* <sup>△</sup>	0.20±0.01* <sup>△</sup>	17.42±0.006* <sup>△</sup>
中药+RAP 组	0.33±0.02* <sup>△</sup>	0.05±0.01* <sup>△</sup>	14.42±0.007* <sup>△</sup>
F 值	1 186	1 952	128 882
P 值	0.00	0.00	0.00

注:与空白组相比,\* $P < 0.01$ ,与单纯抑制剂组相比, $\Delta P < 0.01$ 。

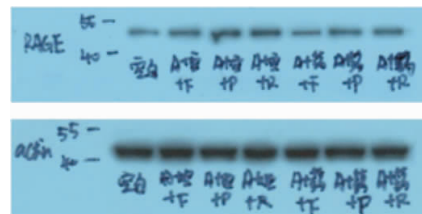
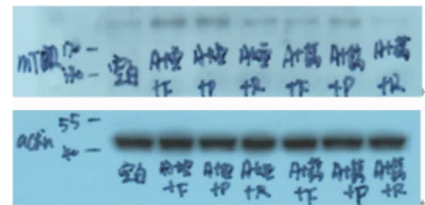


图 2 各组 HUVEC 细胞 RAGE 表达电泳图



注:从左至右分别为空白组、FPS-ZM1 组、PDTC 组、RAP 组、中药+FPS-ZM1 组、中药+PDTC 组、中药+RAP 组。

图 3 各组 HUVEC 细胞 mTOR 表达电泳图

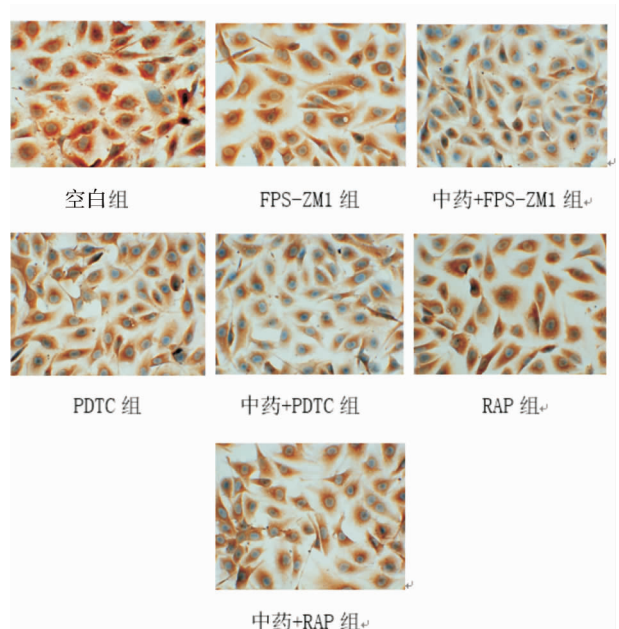


图 4 各组 HUVEC 细胞 NF-κB 核转移情况 (IHC 染色 ×400)

### 3 讨论

糖尿病是一组由多病因引起的以慢性高血糖为特征的终身性代谢性疾病,是继心脑血管、癌症之后的严重危害人类健康的第三大疾病。历代及现代医家多数认为糖尿病的发病原因与饮食失节、劳欲过度、五志过极、先天禀赋不足有关,近年来逐渐发展了脾虚论、肾虚论、肝郁论等。滋阴活血解毒方由熟地黄、黄芪、枸杞子、山茱萸、黄连、地龙、丹参、川芎、水蛭、石菖蒲组成,方中熟地黄、黄芪益气健脾,滋阴养肾为君,臣以枸杞子,山茱萸肉滋补肾阴,佐以地龙、丹参、川芎、水蛭活血通络,黄连清热解毒,石菖蒲开窍化痰。诸药并行,达到滋阴益气活血解毒的功效,扶正祛邪并行,祛邪不伤正,扶正不留邪。本课题组前期大量研究发现,此方能显著改善糖尿病并发脑血管疾病患者的临床症状,改善神经功能缺损程度,提高生活质量。

晚期 AGEs 可引起体内组织一系列病理生理改变,是导致糖尿病慢性并发症的重要致病因素。AGE 受体(RAGE)存在于很多细胞表面,其与 AGE 的结合可导致细胞内氧化应激和 NF- $\kappa$ B 通路的激活。NF- $\kappa$ B 及其下游细胞因子的激活在糖尿病大血管及微血管并发症的发展中起重要作用。研究证实哺乳类雷帕霉素靶 mTOR 蛋白活化,引起下游信号分子的磷酸化及促细胞周期运转因子的过度表达,诱发平滑肌细胞增殖。同时 NF- $\kappa$ B 与 mTOR 存在着复杂的交互作用。据此推断 AGE-RAGE/NF- $\kappa$ B/mTOR 通路可能在糖尿病大血管并发症的发生发展中具有重要意义。在糖尿病患者体内,AGEs 的含量与糖尿病并发症的发生及其严重程度呈正相关。AGEs 可通过对细胞外基质和血管壁产生直接作用,使血管壁增厚和血管通透性增加;也可通过与其受体 RAGE 结合,引起氧化应激并激活多条细胞信号转导通路<sup>[10]</sup>。本实验从 AGEs 入手,通过对 RAGE/NF- $\kappa$ B/mTOR 信号通路及细胞形态学的研究,发现,加入 100 mg/mL 的 AGEs 后,细胞数量明显增多,变形收缩,细胞内出现粗糙样颗粒变化,细胞异常增殖。细胞增生导致血管壁增厚,血管弹性降低,导致血管损伤。加入 50 mg/mL 的滋阴活血解毒方药液后,VEC 异常增殖有明显改善。加入滋阴

活血解毒方和仅加入抑制剂组对比,RAGE及 mTOR 蛋白表达有明显降低( $P<0.01$ ),NF- $\kappa$ B 核转移阳性检出率明显降低( $P<0.01$ )。关于滋阴活血解毒方对于黏附分子及凝血相关因子相关研究,由本实验同期实验完成<sup>[11]</sup>。

综上所述,滋阴活血解毒方能有效改善 AGEs 诱导 VEC 损伤,起到保护 VEC 的作用,特别是与抑制剂合用,能有显著的效果。这种保护作用可能跟滋阴活血解毒方对于 AGE-RAGE/NF- $\kappa$ B/mTOR 信号通路的抑制作用有关。滋阴活血解毒方与 AGE-RAGE/NF- $\kappa$ B/mTOR 信号通路的抑制剂合用,为今后中西医结合防治糖尿病并发脑血管疾病提供了一个研究方向与应用前景。

### 参考文献:

- [1] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(1): 4-14.
- [2] 范慧.现代糖尿病管理的必然发展趋势——个体化治疗——写在联合国糖尿病日前夕[J].*首都医药*,2012,11(上):42.
- [3] 张颖.mTOR Complex1-S6K1 信号通路在 2 型糖尿病发生发展中的作用[J].*重庆医学*,2012,41(31):3333-3335.
- [4] 王华,胡铂,唐兆生,等.糖尿病冠状动脉粥样硬化与外周血单个核细胞糖基化终产物受体表达的关系及他汀类药物对其影响的研究[J].*中国糖尿病杂志*,2014,22(5):412-416.
- [5] 刘承灵,韩江全,胡泳涛,等.糖尿病通过炎症反应加重大鼠脑缺血再灌注损伤[J].*国际脑血管病杂志*,2015,23(5):349-353.
- [6] 郑承红.降糖通脉方对糖尿病大鼠纤溶活性的表达及干预作用研究[C].//2010 中国医师协会中西医结合医师大会论文集,2010:57.
- [7] 邓奕辉,崔莲珠,喻嵘,等.降糖通脉方治疗糖尿病合并脑梗死 32 例临床观察[J].*湖南中医学院学报*,2004,24(5):40-42.
- [8] Cooke JP. Dose ADMA cause endothelial dysfunction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(9):2032-2037.
- [9] 邓奕辉,李定祥,成细华,等.滋阴活血解毒中药对血管内皮细胞损伤的保护作用[J].*中国中医药信息杂志*,2008,15(6):27-29.
- [10] Haslbeck KM, Schleicher E, Bierhaus A, et al. The A4GE/RAGE/NF-(kappa)B pathway may contribute to the pathogenesis of polyneuropathy in impaired glucose (IGT)[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2005, 113(50): 288-291.
- [11] 廖俞强,邓奕辉,颜佳博,等.滋阴活血解毒方对 AGEs 诱导 VEC 损伤黏附分子及凝血相关因子表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2016,37(5):485-488.

(本文编辑 杨 瑛)