

本文引用: 付傲妮, 刘婉婷, 李 婧, 杨皓天, 李朝荃, 谢玉鑫, 雷 偲, 易光辉. 小檗碱通过 SPHK2/S1P/ERK5 通路对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞胞葬功能障碍的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(5): 889–897.

小檗碱通过 SPHK2/S1P/ERK5 通路对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞胞葬功能障碍的影响

付傲妮¹, 刘婉婷^{1,2}, 李 婧³, 杨皓天¹, 李朝荃¹, 谢玉鑫^{1,2}, 雷 偲¹, 易光辉^{1,2,3*}

1. 南华大学衡阳医学院心血管疾病研究所, 湖南省动脉硬化重点实验室, 湖南动脉硬化疾病国际科技合作基地, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学湖南省分子靶向新药研究合作创新中心药物与药理研究所, 湖南 衡阳 421001; 3. 南华大学衡阳医学院基础医学院, 湖南 衡阳 421001

〔摘要〕 **目的** 探究小檗碱(BBR)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的巨噬细胞胞葬功能障碍及炎症反应的作用及机制。**方法** 以 ox-LDL 诱导人 THP-1 巨噬细胞胞葬功能障碍为模型。将细胞分为对照组、ox-LDL 组、ox-LDL+BBR(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)组、ox-LDL+BBR+ABC294640 组、ox-LDL+BBR+ABC294640+S1P 组、ox-LDL+BBR+BIX02189 组, ox-LDL 组用 80 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL 处理 24 h, 其他组用 80 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL 处理 2 h 后, 根据实验需要加入 BBR、SPHK2 抑制剂 ABC294640(25 $\mu\text{mol/L}$)、外源性 S1P(80 nmol/L)或 MEK5 抑制剂 BIX02189(100 nmol/L)共同孵育 24 h。通过荧光实验和流式细胞术检测巨噬细胞胞葬效率; 用 ELISA 检测 S1P 含量; 通过 Western blot 检测 MerTK、AXL、TYRO3、SPHK1/2、MEK5、ERK5 和 p-ERK5 蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比, ox-LDL 组胞葬效率降低($P<0.01$, $P<0.001$), MerTK、AXL、TYRO3、MEK5、p-ERK5/ERK5、SPHK2 蛋白表达水平降低($P<0.01$, $P<0.001$), S1P 含量降低($P<0.01$)。与 ox-LDL 组相比, 20 $\mu\text{mol/L}$ BBR 处理组胞葬效率显著增加($P<0.01$), MerTK、AXL、TYRO3、MEK5、p-ERK5/ERK5、SPHK2 蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 ox-LDL+20 $\mu\text{mol/L}$ BBR 组相比, 加入 ABC294640 后胞葬效率降低($P<0.01$), MerTK、AXL、TYRO3、MEK5、p-ERK5/ERK5、SPHK2 蛋白表达水平下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与 ox-LDL+20 $\mu\text{mol/L}$ BBR+ABC294640 组相比, 加入 S1P 后胞葬效率增加($P<0.01$, $P<0.05$), MerTK、AXL、TYRO3、MEK5、p-ERK5/ERK5、SPHK2 蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 ox-LDL+20 $\mu\text{mol/L}$ BBR 组相比, 加入 BIX02189 后胞葬效率降低($P<0.01$), MerTK、AXL、TYRO3、MEK5、p-ERK5/ERK5 蛋白表达水平下降($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** BBR 可能通过 SPHK2/S1P/ERK5 途径发挥作用, 减轻 ox-LDL 诱导的巨噬细胞胞葬功能障碍。

〔关键词〕 小檗碱; 胞葬作用; 巨噬细胞; 鞘氨醇激酶 2; 细胞外信号调节激酶 5; 1-磷酸鞘氨醇

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.05.003

Effects of berberine on low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced efferocytosis dysfunction in macrophages via the SPHK2/S1P/ERK5 pathway

FU Aoni¹, LIU Wanting^{1,2}, LI Jing³, YANG Haotian¹, LI Chaoquan¹, XIE Yuxin^{1,2}, LEI Cai¹, YI Guanghui^{1,2,3*}

1. Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province, Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Institute of Pharmacy and Pharmacology, Hunan Province Cooperative Innovation Center for Molecular

〔收稿日期〕 2025-12-11

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81770490); 湖南省科技计划项目(2020JJ4535)。

〔通信作者〕 * 易光辉, 男, 博士, 教授, E-mail: ghyi6108@163.com。

Target New Drug Study, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

[Abstract] Objective To investigate the effects and mechanisms of berberine (BBR) on oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced macrophage efferocytosis dysfunction and inflammatory response. **Methods** Using an ox-LDL-induced efferocytosis dysfunction model in human THP-1-derived macrophages, the cells were divided into the following groups: control, ox-LDL, ox-LDL+BBR (5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$), ox-LDL+BBR+ABC294640, ox-LDL+BBR+ABC294640+S1P, and ox-LDL+BBR+BIX02189 groups. The ox-LDL group was treated with 80 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL for 24 h. In other groups, cells were pretreated with 80 $\mu\text{mol/L}$ ox-LDL for 2 h, followed by co-incubation for 24 h with BBR, the SPHK2 inhibitor ABC294640 (25 $\mu\text{mol/L}$), exogenous S1P (80 nmol/L), or the MEK5 inhibitor BIX02189 (100 nmol/L), as required. Macrophage efferocytosis efficiency was assessed using fluorescence microscopy and flow cytometry. S1P levels were measured by ELISA. Protein expression levels of MerTK, AXL, TYRO3, SPHK1/2, MEK5, ERK5, and p-ERK5 were determined by Western blot. **Results** Compared with the control group, the ox-LDL group exhibited decreased efferocytosis efficiency ($P<0.001$, $P<0.01$), reduced protein expression levels of MerTK, AXL, TYRO3, MEK5, p-ERK5/ERK5, and SPHK2 ($P<0.01$, $P<0.001$), and decreased S1P levels ($P<0.01$). Compared with the ox-LDL group, treatment with 20 $\mu\text{mol/L}$ BBR significantly increased efferocytosis efficiency ($P<0.01$) and elevated protein expression levels of MerTK, AXL, TYRO3, MEK5, p-ERK5/ERK5, and SPHK2 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the ox-LDL+20 $\mu\text{mol/L}$ BBR group, the addition of ABC294640 decreased efferocytosis efficiency ($P<0.01$) and reduced protein expression levels of MerTK, AXL, TYRO3, MEK5, p-ERK5/ERK5, and SPHK2 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the ox-LDL+20 $\mu\text{mol/L}$ BBR+ABC294640 group, the addition of S1P increased efferocytosis efficiency ($P<0.01$, $P<0.05$) and elevated protein expression levels of MerTK, AXL, TYRO3, MEK5, p-ERK5/ERK5, and SPHK2 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the ox-LDL+20 $\mu\text{mol/L}$ BBR group, the addition of BIX02189 decreased efferocytosis efficiency ($P<0.01$) and reduced protein expression levels of MerTK, AXL, TYRO3, MEK5, and p-ERK5/ERK5 ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** BBR may exert its effects through the SPHK2/S1P/ERK5 pathway to alleviate ox-LDL-induced macrophage efferocytosis dysfunction.

[Keywords] berberine; efferocytosis; macrophage; sphingosine kinase 2; extracellular signal-regulated kinase 5; sphingosine-1-phosphate

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病,其发病机制复杂且现阶段的治疗手段有待提升,需要深入探索 AS 的发病机制以寻找治疗新靶点。胞葬作用是指吞噬细胞对凋亡细胞及其相关碎片的清除过程^[1]。胞葬作用的识别、结合、吞噬和消化 4 个阶段完成后,吞噬体和溶酶体会融合形成吞噬溶酶体,促进凋亡细胞的降解,除降解物质被外排外,糖、核苷酸、脂质等成分还会被吞噬细胞重新捕获并再次利用,主要用于恢复细胞骨架成分和补充能源,以确保持续性的吞噬活动^[2]。吞噬细胞主要分为专业吞噬细胞(巨噬细胞和单核细胞)和非专业吞噬细胞(内皮细胞、平滑肌细胞等)两大类^[3]。巨噬细胞被视为 AS 的重要治疗靶点,在 AS 初期,巨噬细胞通过分泌多种抗炎因子,避免凋亡细胞释放的胞内物质引发炎症^[4]。随着 AS 的进展,巨噬细

胞葬功能发生障碍,进而促进 AS 的进展^[5]。因此,提高巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬效率来抑制 AS,可能是治疗 AS 的一个可行策略。

神经酰胺在神经酰胺酶的作用下代谢为鞘氨醇,再由两种鞘氨醇激酶异构体(sphingosine kinase 1, SPHK1; sphingosine kinase 2, SPHK2)磷酸化合成 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)^[6]。S1P 影响炎症的发生和消退过程^[7]。SPHK1/2 激酶双缺陷的突变小鼠受到促炎因子刺激后,可加重炎症反应^[8]。此外, S1P 轴可以参与调控巨噬细胞的胞葬作用,TRAN 等^[9]发现, S1P 及其类似物可以逆转 SPHKs 信号失调导致的 THP-1 巨噬细胞胞葬作用减弱。细胞外调节蛋白激酶 5(extracellular signal regulated kinase 5, ERK5)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的成员,具有

调控细胞增殖、分化、凋亡等多种功能^[10]。MEK5 是 ERK5 的唯一上游激酶^[11]。HEO 等^[12]发现, ERK5 不仅能通过调节胞葬作用相关基因(c-mer proto-oncogene tyrosine kinase, MerTK; milk fat globule egr factor VIII, Mfg-e8; complement c1q subcomponent A, C1qA)的表达来调控巨噬细胞的胞葬作用,还能调节 M1/M2 极化产生抗炎的作用。ERK5 缺失的 LDLR^{-/-}小鼠 AS 形成加快,这说明 ERK5 的缺失可加重 AS^[13-14]。

小檗碱(berberine, BBR)是一种从中草药黄连和其他小檗属植物中分离出来的异喹啉生物碱,具有广泛的药理特性^[15]。研究发现, BBR 具有抗炎、调节血脂等多种生物学功能,在心血管疾病的治疗方面有着重要的应用^[16-18]。BBR 能改善心血管血流动力学,调节脂质代谢,抑制血管内皮炎症,从而减轻 AS^[19-20]。BBR 抑制 AS 发展的药理作用机制仍不完全清楚。因此,本研究用 ox-LDL 诱导构建人 THP-1 源性巨噬细胞胞葬功能障碍模型,探究 BBR 是否通过 SPHK2/S1P/ERK5 途径发挥作用,从而减轻 ox-LDL 诱导的巨噬细胞胞葬功能障碍。

1 实验材料

1.1 细胞来源

人 THP-1 单核细胞(THP-1 monocytes, iCell h213)购自赛百康生物科技有限公司, Jurkat 细胞(CL-0129)购自普诺赛生命科技有限公司。

1.2 主要药品与试剂

BBR(HY-18258)、PKH26 红色荧光染料(HY-D1451)、BIX02189(HY-12056)均购自上海皓元生物医药科技有限公司;人 S1P ELISA 试剂盒(ml038623)购自上海酶联生物技术有限公司;CellTracker™ Deep Red 染色试剂(A66433, 美国 Invitrogen 公司);CFSE 细胞增殖检测试剂(423801, 美国 BioLegend 公司);p-ERK5(TA8146S, 中国艾比玛特公司);AXL(ab259831)、TYRO3(ab109231)、MerTK(AB52968)均购自英国 Abcam 公司;ERK(10036-2-AP)、MEK5(15758-1-AP)、SPHK1(10670-1-AP)、SPHK2(17096-1-AP)和 β -actin(81115-1-RR)均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

酶标仪(型号:PT-3502G, 美国 BIO-RAD 公司); CO₂ 细胞培养箱(型号:DH-160I, 上海三腾仪器有限公司);流式细胞仪(型号:FACSCalibur, 美国 BD Biosciences 公司);正置倒置一体荧光显微镜[型号:AMF5000, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司];垂直电泳仪(型号:EPS300)、半干转印槽(型号:VE-180B)、全自动化学发光图像分析仪(型号:Tanon-5200)均来自上海天能科技有限公司;脱色摇床(型号:KB-2A, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司);小型冷冻离心机(型号:5424R, 德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与处理

将 THP-1 单核细胞置于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 1640 培养基中,于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱内培养。参考 SHEN 等^[21]的实验方法,采用 ox-LDL 构建氧化损伤模型以模拟胞葬损伤, THP-1 单核细胞用 PBS 缓冲液洗涤后,加入含有 80 μ mol/L ox-LDL 的培养基培养 24 h 制备氧化损伤模型。后续根据实验需求,用 80 μ mol/L ox-LDL 处理 2 h 后加入 BBR(5、10、20 μ mol/L)、SPHK2 抑制剂 ABC294640(25 μ mol/L)、外源性 S1P(80 nmol/L)或 MEK5 抑制剂 BIX02189(100 nmol/L)共同孵育 24 h。

2.2 Jurkat 细胞凋亡模型的构建

Jurkat 细胞用紫外灯照射 60 min 诱导细胞凋亡。取 1×10^5 个凋亡细胞转移至避光 EP 管,弃上清液,加入 195 μ L 结合液重悬,加入 5 μ L AnnexinV-FITC,加入 10 μ L 碘化丙啶,在室温下避光孵育 20 min,期间重悬 2~3 次改善染色效果。染色结束后上机检测,结果用 FlowJo 10.8 软件进行分析。

2.3 Western blot 检测

将蛋白质样品经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上。膜用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,然后用一抗孵育,放置于 4 ℃摇床上过夜。根据说明书配制一抗工作液:SPHK1(1:1 000)、SPHK2(1:3 000)、MerTK(1:3 000)、AXL(1:3 000)、TYRO3(1:6 000)、p-ERK5(1:1 000)、ERK(1:500)、MEK5(1:1 000)、 β -actin(1:10 000)。孵育后,用对应的二抗在室温下

孵育 1 h。用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。配制 eECL 显影液,用全自动化学发光图像分析系统进行曝光,保存图像并用 ImageJ 软件分析。

2.4 ELISA 检测

将细胞经反复冻融裂解后,离心收集上清液备用。使用 ELISA 试剂盒检测 S1P 含量。用酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔的 OD 值。

2.5 荧光实验检测胞葬效率

细胞根据实验需求处理后,加入配好的 PKH26 染色液,避光孵育 30 min。离心后重悬,加入 CFSE 后室温避光染色 20 min。加入培养基淬灭染色,1 000 r/min 离心 5 min。用培养基重悬后孵育 10 min。将 CFSE 标记的凋亡细胞以 5:1 的比例与巨噬细胞共孵育 2 h。孵育后,加入 4%多聚甲醛处理 15 min,用 PBS 缓冲液清洗。在荧光显微镜下观察并保存图像。

2.6 流式细胞术检测胞葬效率

细胞中加入配制好的 CellTracker™ Deep Red 染色液,孵育 30 min。以 5:1 的比例加入用 CFSE 标记的凋亡细胞,孵育 2 h。加入经 37 °C 预热的胰蛋白酶消化细胞后,轻轻吹打细胞。将消化后的细胞以 1 000 r/min 离心 5 min。弃去上清液,加入 PBS 重悬,用流式细胞仪检测胞葬效率。

2.7 统计学分析

所有实验均重复 3 次及以上,使用 ImageJ、FlowJo 10.8 对数据进行分析,利用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计学分析。数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,经正态性及方差齐性检验符合条件者,运用单因素方差分析和 q 检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 抑制 SPHK2 对巨噬细胞胞葬功能的影响

与对照组相比,ox-LDL 组胞葬效率降低($P < 0.01$, $P < 0.001$),MerTK、AXL、TYRO3、SPHK1、SPHK2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$),S1P 含量降低($P < 0.01$);相比 ox-LDL 组,ox-LDL+20 $\mu\text{mol/L}$ BBR 组 SPHK2 蛋白表达水平增加($P < 0.01$),但 SPHK1 蛋白表达水平无显著差异,S1P 含量增加($P < 0.01$)。用 SPHK2 抑制剂 ABC294640(25 $\mu\text{mol/L}$)对细胞进行处理。与 ox-LDL+BBR 组相比,ox-LDL+BBR+ABC294640 组 SPHK2 蛋白表达水平降低($P < 0.01$),MerTK、AXL 和 TYRO3 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),胞葬效率下降($P < 0.01$)。用外源性 S1P(80 nmol/L)对细胞进行处理,与 ox-LDL+BBR+ABC294640 组相比,ox-LDL+BBR+ABC294640+S1P 组 SPHK2、MerTK、AXL 和 TYRO3 蛋白表达水平增加($P < 0.05$),胞葬效率增加($P < 0.01$, $P < 0.05$)。详见图 1—2。

3.2 抑制 ERK5 对巨噬细胞胞葬功能的影响

与对照组相比,ox-LDL 组的 MEK5 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),p-ERK5/ERK5 的比值降低($P < 0.01$)。相比 ox-LDL 组,ox-LDL+20 $\mu\text{mol/L}$ BBR 组 MEK5 的蛋白表达水平和 p-ERK5/ERK5 比值均增加($P < 0.05$)。用 MEK5 抑制剂 BIX02189(100 nmol/L)对细胞进行处理。与 ox-LDL+BBR 组相比,ox-LDL+BBR+BIX02189 组 MEK5 表达水平和 p-ERK5/ERK5 比值均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),MerTK、AXL、TYRO3 的表达降低($P < 0.05$),胞葬效率降低($P < 0.01$)。详见图 3—4。

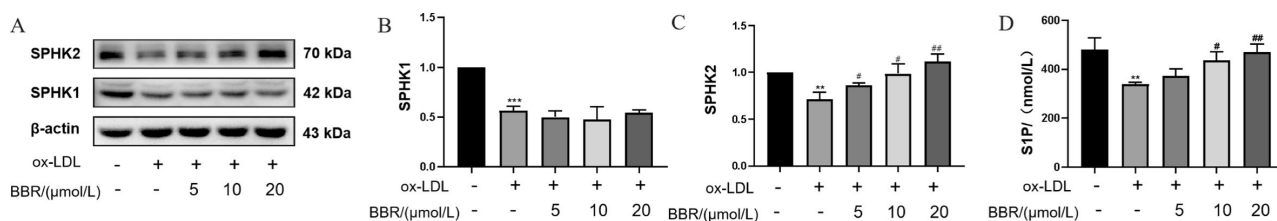
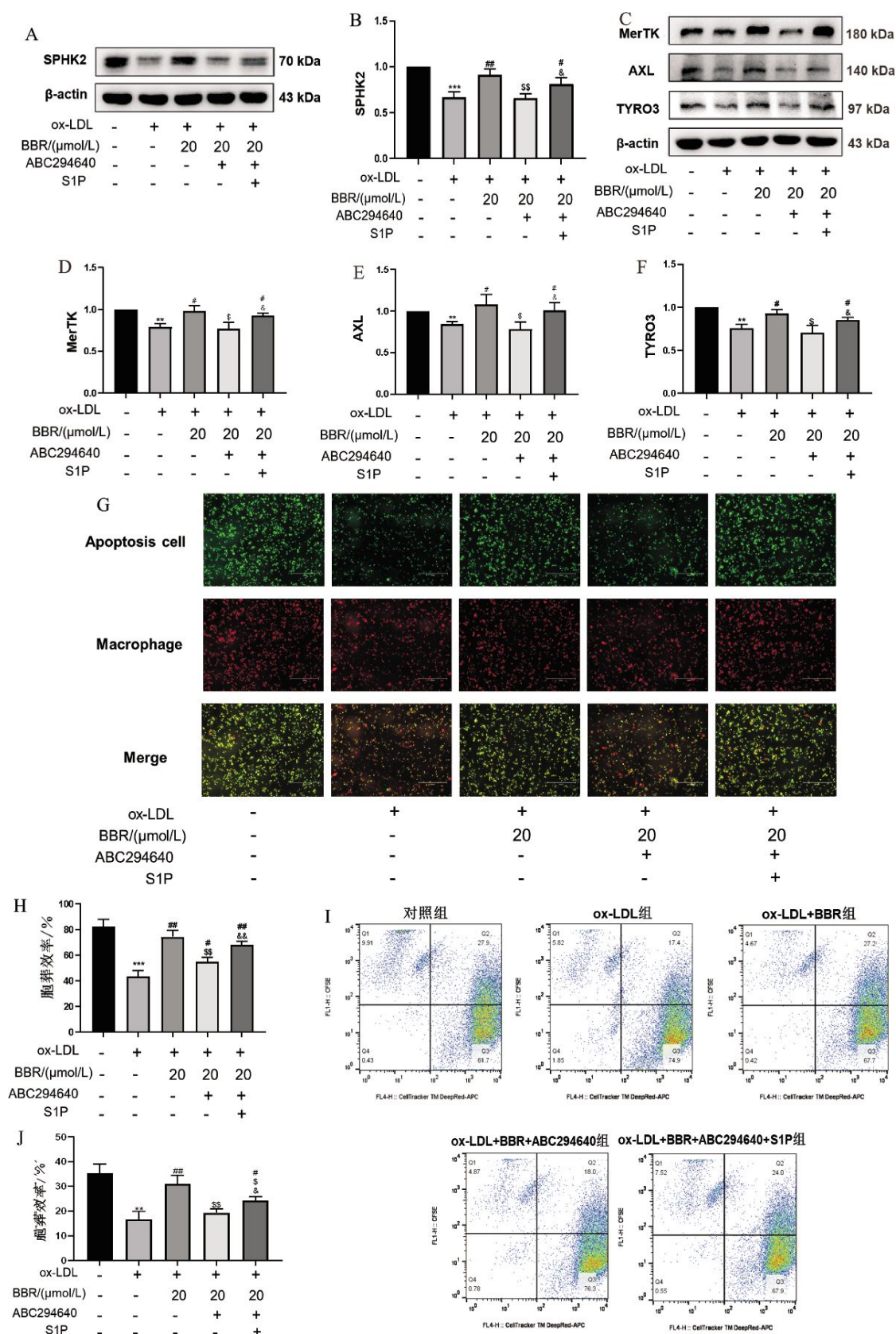


图 1 BBR 处理后巨噬细胞 SPHK1/2 的蛋白表达和 S1P 含量($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.1 Protein expression of SPHK1/2 and S1P levels in macrophages after BBR treatment ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

注:A. Western blot 检测 SPHK1/2 的蛋白表达水平;B、C 为 A 的定量分析;D. ELISA 检测细胞分泌 S1P 的水平。与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 ox-LDL 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图2 抑制SPHK2对巨噬细胞胞葬功能的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)**Fig.2** Effects of SPHK2 inhibition on macrophage efferocytosis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A. Western blot检测SPHK2的蛋白表达水平;B. A的定量分析;C为Western blot检测MerTK、AXL和TYRO3的蛋白表达水平;D、E、F为C的定量分析;G. 巨噬细胞清除凋亡细胞的荧光图,凋亡细胞被CFSE染色(绿色),巨噬细胞被PKH26染色(红色)(比例尺=300 μm);H. G的定量分析;I. 巨噬细胞清除凋亡细胞的流式图,凋亡细胞被CFSE标记,巨噬细胞被CellTracker™ Deep Red标记;J. L的定量分析。与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与ox-LDL组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与ox-LDL+BBR组相比, § $P<0.05$, §§ $P<0.01$, §§§ $P<0.001$;与ox-LDL+BBR+ABC294640组相比, § $P<0.05$, §§ $P<0.01$ 。

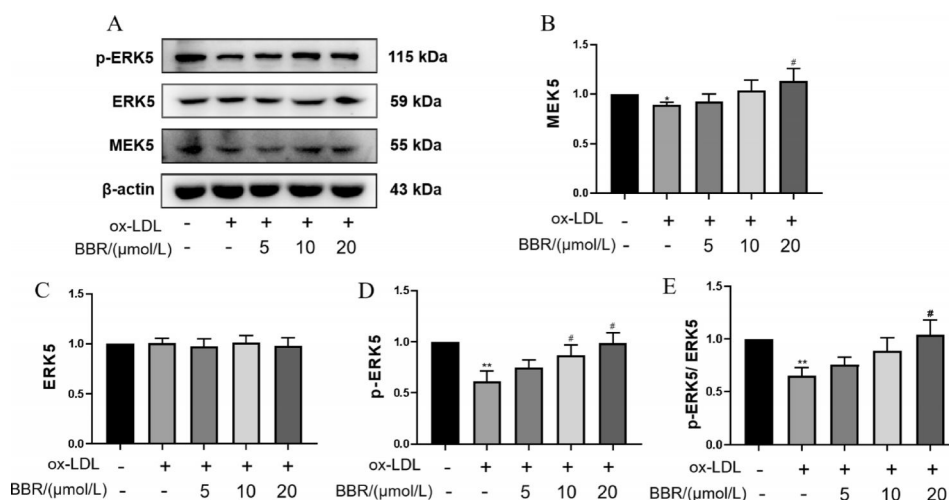


图3 BBR处理后巨噬细胞 MEK5、ERK5 和 p-ERK5 的蛋白表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.3 Protein expression of MEK5, ERK5, and p-ERK5 in macrophages after BBR treatment ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

注:A为Western blot检测MEK5、ERK5和p-ERK5的蛋白表达水平;B、C、D、E为A的定量分析。与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与ox-LDL组相比,# $P < 0.05$ 。

3.3 抑制 SPHK2 对 MEK5、ERK5 和 p-ERK5 蛋白表达的影响

用 SPHK2 抑制剂 ABC294640 (25 $\mu\text{mol/L}$) 对细胞进行处理。与 ox-LDL+BBR 组相比,ox-LDL+BBR+ABC294640 组 MEK5 蛋白表达和 p-ERK5/ERK5 的比值均降低($P < 0.01$)。用外源性 S1P (80 nmol/L) 对细胞进行处理。相比 ox-LDL+BBR+ABC294640 组,ox-LDL+BBR+ABC294640+S1P 组 MEK5 蛋白表达增加($P < 0.01$),p-ERK5/ERK5 的比值增加($P < 0.05$)。详见图 5。

4 讨论

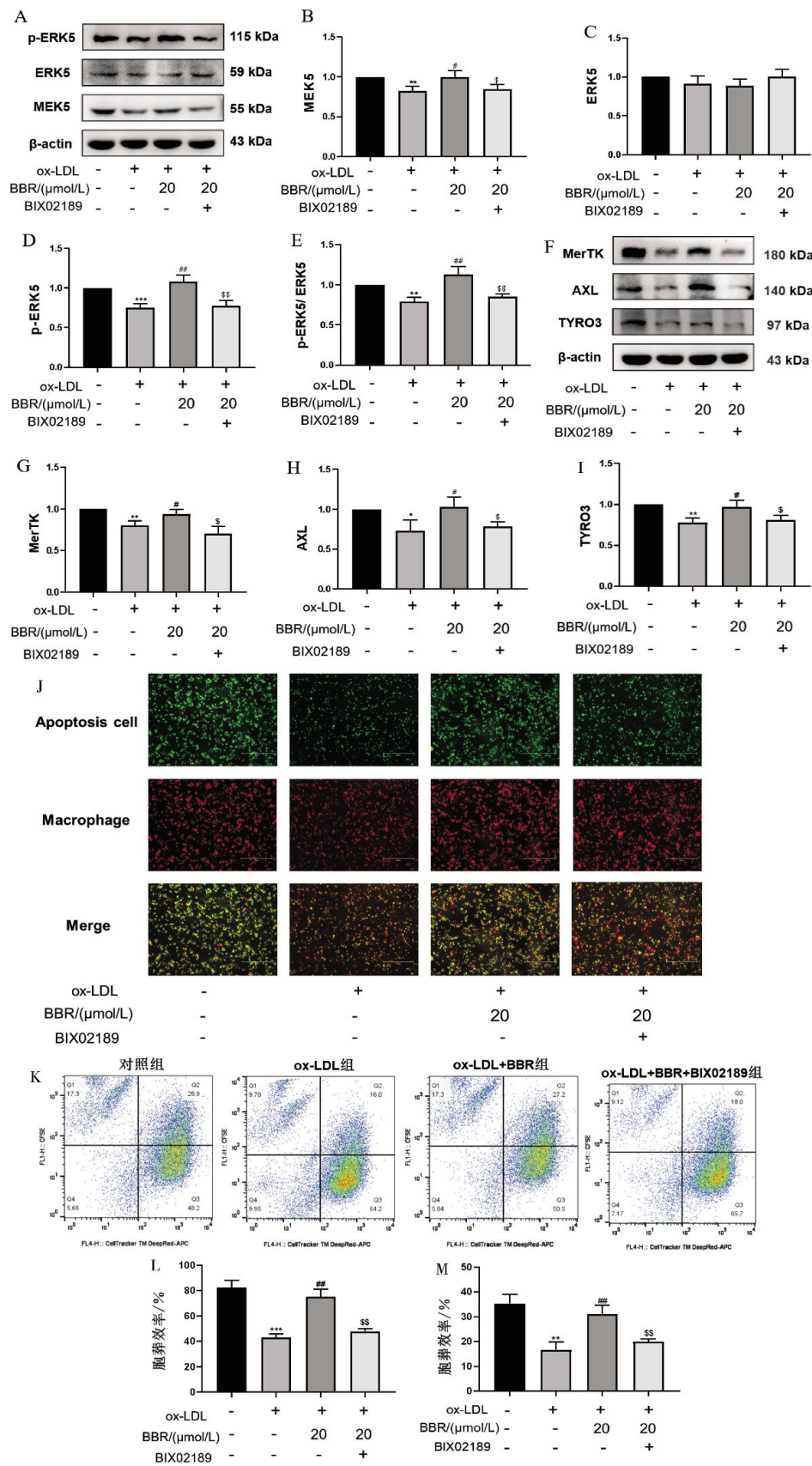
受损的巨噬细胞胞葬作用与多种慢性炎症性疾病(如 AS、神经退行性疾病等)的发生发展有关^[22]。提高胞葬效率可能是治疗胞葬损伤相关疾病的可行策略。巨噬细胞表达的识别受体的缺失会降低其胞葬作用,而高表达则会增强胞葬作用。酪氨酸蛋白激酶受体(MerTK、AXL 和 TYRO3)是巨噬细胞表面关键吞噬受体,也是胞葬关键分子,其缺失会导致巨噬细胞胞葬功能障碍^[23]。因此,检测巨噬细胞胞葬关键分子的蛋白表达情况能够评估胞葬作用的强弱。本研究采用 ox-LDL 诱导巨噬细胞构建胞葬损伤细胞模型,其中 ox-LDL 组巨噬细胞对凋亡细胞的清除速度下降。

BBR 是一种从中草药黄连和其他小檗属植物

中分离出来的异喹啉类生物碱,具有抗炎、降血脂等药理学作用^[24]。BBR 可以减轻 NLRP3 炎症小体激活诱导的巨噬细胞 M1 极化^[25]和抑制巨噬细胞中 p300 表达^[26],发挥抗炎作用。研究表明,BBR 对 AS 斑块的形成和扩大表现出抑制作用^[18]。用 20 $\mu\text{mol/L}$ BBR 处理巨噬细胞,能够逆转 ox-LDL 造成的胞葬功能损伤并降低促炎因子分泌,这说明 BBR 可以减轻巨噬细胞胞葬功能障碍。

S1P 是由 SPHK1/2 合成的一种信号脂质,其通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 提高巨噬细胞对凋亡细胞的清除速率^[27]。SPHK2 缺失的巨噬细胞内溶酶体蛋白水解酶活性降低,可导致溶酶体降解功能缺陷,进而加重 ApoE 敲除小鼠 AS 病变的形成^[28]。SPHK/S1P 可能会影响巨噬细胞内化凋亡细胞后吞噬溶酶体的形成,以及溶酶体对凋亡相关产物的降解能力。BBR 处理后 SPHK2 蛋白表达水平显著上升,但 SPHK1 蛋白表达无显著差异。SPHK2 抑制剂 ABC294640 减弱了 BBR 保护胞葬功能和减轻炎症的作用,加入外源性 S1P 可以部分恢复 BBR 的保护作用,这提示 SPHK2/S1P 与 BBR 减轻 ox-LDL 诱导的巨噬细胞胞葬功能损伤有关。

ERK5 是参与调节胞葬过程的关键分子,其通过促进 MerTK 的表达来增强巨噬细胞对凋亡中性粒细胞的吞噬作用^[29]。ERK5 能提高胞葬效率,巨噬细胞中 ERK5 缺陷会使胞葬功能损伤^[12],MEK5 是

图 4 抑制 ERK5 对巨噬细胞胞葬功能的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig.4 Effects of ERK5 inhibition on macrophage efferocytosis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: A. Western blot 检测 p-ERK5、ERK5 和 MEK5 的蛋白表达水平; B、C、D、E 为 A 的定量分析; F. Western blot 检测 MerTK、AXL 和 TYRO3 的蛋白表达水平; G、H、I 为 F 的定量分析; J. 巨噬细胞清除凋亡细胞的荧光图, 凋亡细胞被 CFSE 染色(绿色), 巨噬细胞被 PKH26 染色(红色)(比例尺=300 μ m); K. 巨噬细胞清除凋亡细胞的流式图, 凋亡细胞被 CFSE 标记, 巨噬细胞被 CellTracker™ Deep Red 标记; L. J 的定量分析; M. K 的定量分析。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与 ox-LDL 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与 ox-LDL+BBR 组相比, \$ $P<0.05$, \$\$ $P<0.01$ 。

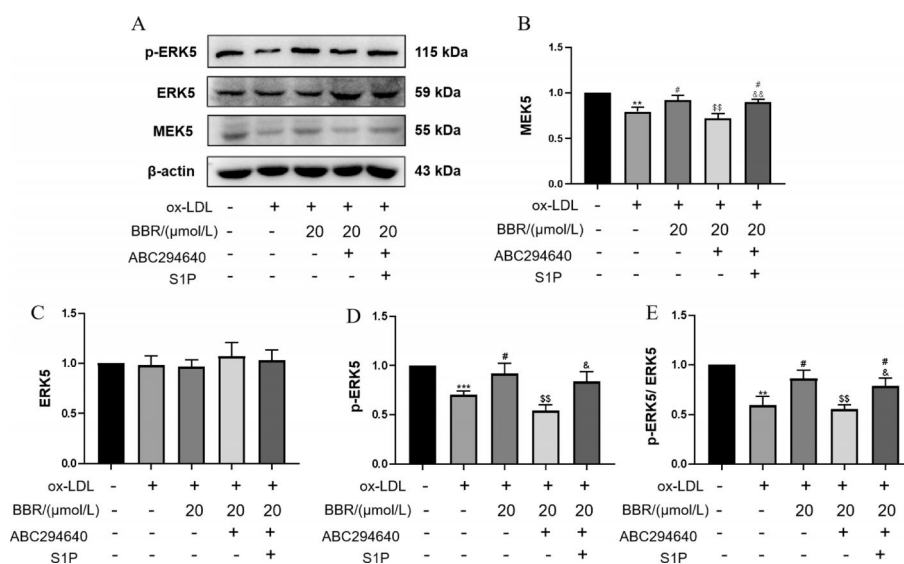


图5 抑制 SPHK2 后巨噬细胞 MEK5、ERK5 和 p-ERK5 的蛋白表达($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.5 Protein expression of MEK5, ERK5, and p-ERK5 in macrophages after SPHK2 inhibition ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

注:A. Western blot 检测 MEK5、ERK5 和 p-ERK5 的蛋白表达水平;B、C、D、E 为 A 的定量分析。与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与 ox-LDL 组相比, # $P<0.05$; 与 ox-LDL+BBR 组相比, & $P<0.01$; 与 ox-LDL+BBR+ABC294640 相比, & $P<0.05$, && $P<0.01$ 。

ERK5 的唯一上游激酶。SPHK2 参与调节细胞内的 ERK 磷酸化^[30]。上调 ERK5 可以提高巨噬细胞对凋亡细胞的清除效率,抑制 AS 的进程^[12]。本研究结果发现使用 MEK5 抑制剂 BIX02189 减弱了 BBR 保护胞葬功能和减轻炎症的作用,这提示 ERK5 参与 BBR 减轻 ox-LDL 诱导的巨噬细胞胞葬功能障碍。用 SPHK2 抑制剂 ABC294640 处理后 MEK5 的蛋白表达和 p-ERK5/ERK5 比值显著降低,加入外源性 S1P 可以部分抵消 ABC294640 的抑制作用,这说明 BBR 可能通过激活 SPHK2/S1P/ERK5 通路发挥减轻胞葬功能障碍的作用。

本研究存在一定局限性,主要关注 BBR 减轻 ox-LDL 诱导的巨噬细胞胞葬功能损伤,但没有深入探究巨噬细胞内哪些具体生物功能可以影响其胞葬过程,BBR 是否可以通过改善内质网应激、线粒体功能障碍等发挥作用尚不明确。同时,研究主要基于 SPHK2 抑制剂 ABC294640、MEK5 抑制剂 BIX02189 和外源性 S1P 的补充为全部药理学证据,还缺乏遗传手段验证,未来可以开展 SPHK2 或 ERK5 siRNA/shRNA 敲低实验进行下一步探索。

综上,BBR 可能通过激活 SPHK2/S1P/ERK5 通路减轻 ox-LDL 诱导的巨噬细胞胞葬功能障碍。这不仅丰富了 BBR 的药理作用,还为其在心血管疾病中的研究提供了新思路。

参考文献

- [1] ZHANG M, WEI J, SUN Y, et al. The efferocytosis process in aging: Supporting evidence, mechanisms, and therapeutic prospects for age-related diseases[J]. *Journal of Advanced Research*, 2025, 69: 31-49.
- [2] SAAS P, VETTER M, MARAUX M, et al. Resolution therapy: Harnessing efferocytic macrophages to trigger the resolution of inflammation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1021413.
- [3] BOADA-ROMERO E, MARTINEZ J, HECKMANN B L, et al. The clearance of dead cells by efferocytosis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(7): 398-414.
- [4] LIN J T, XU A K, JIN J K, et al. MerTK-mediated efferocytosis promotes immune tolerance and tumor progression in osteosarcoma through enhancing M2 polarization and PD-L1 expression[J]. *OncoImmunology*, 2022, 11(1): 2024941.
- [5] HE X L, LI Z R, LI S J, et al. Huoxue Tongluo tablet enhances atherosclerosis efferocytosis by promoting the differentiation of Trem2+ macrophages via PPAR γ signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2025, 140: 156579.
- [6] BRAVO G Á, CEDEÑO R R, CASADEVALL M P, et al. Sphingosine-1-phosphate (S1P) and S1P signaling pathway modulators, from current insights to future perspectives[J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2058.
- [7] WANG M. Targeting perivascular S1P attenuates inflammation[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2022, 18(11): 679.
- [8] OBINATA H, HLA T. Sphingosine 1-phosphate and inflammation[J]. *International Immunology*, 2019, 31(9): 617-625.
- [9] TRAN H B, BARNAWI J, WEEN M, et al. Cigarette smoke inhib-

- its efferocytosis via deregulation of sphingosine kinase signaling: Reversal with exogenous SIP and the SIP analogue FTY720[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2016, 100(1): 195–202.
- [10] TUSA I, MENCONI A, TUBITA A, et al. Pathophysiological impact of the MEK5/ERK5 pathway in oxidative stress[J]. *Cells*, 2023, 12(8): 1154.
- [11] POON I K H, RAVICHANDRAN K S. Targeting efferocytosis in inflammaging[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2024, 64: 339–357.
- [12] HEO K S, CUSHMAN H J, AKAIKE M, et al. ERK5 activation in macrophages promotes efferocytosis and inhibits atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2014, 130(2): 180–191.
- [13] ZHANG Y F, DING J, WANG Y R, et al. Guanxinkang decoction attenuates the inflammation in atherosclerosis by regulating efferocytosis and MAPKs signaling pathway in LDLR^{-/-} mice and RAW264.7 cells[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 731769.
- [14] PAUDEL R, FUSI L, SCHMIDT M. The MEK5/ERK5 pathway in health and disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(14): 7594.
- [15] CUI Y L, ZHOU Q Y, JIN M, et al. Research progress on pharmacological effects and bioavailability of berberine[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2024, 397(11): 8485–8514.
- [16] CAI Y, XIN Q Q, LU J J, et al. A new therapeutic candidate for cardiovascular diseases: Berberine[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 631100.
- [17] XING L, ZHOU X, LI A H, et al. Atheroprotective effects and molecular mechanism of berberine[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 762673.
- [18] FENG X J, SUREDA A, JAFARI S, et al. Berberine in cardiovascular and metabolic diseases: From mechanisms to therapeutics[J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1923–1951.
- [19] SONG D Y, HAO J Y, FAN D M. Biological properties and clinical applications of berberine[J]. *Frontiers of Medicine*, 2020, 14(5): 564–582.
- [20] JIA D D, ZHANG X Y, GUO Q Q, et al. Efficacy and underlying mechanism of berberine against atherosclerosis: A meta-analysis in preclinical animal studies[J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2022, 80(3): 476–488.
- [21] SHEN X L, CHEN Y S, YU L L, et al. Berberine improves ox-LDL-induced macrophage efferocytosis dysfunction and alleviates inflammation via the PPAR γ /LXR α pathway[J]. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2025, 267 (2): 185–201.
- [22] ZHANG J S, DING W, ZHAO M M, et al. Mechanisms of efferocytosis in determining inflammation resolution: Therapeutic potential and the association with cardiovascular disease [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2022, 179(23): 5151–5171.
- [23] MYTYCH J S, PAN Z J, LOPEZ-DAVIS C, et al. Peptidoglycan from *Bacillus anthracis* inhibits human macrophage efferocytosis in part by reducing cell surface expression of MERTK and TIM-3[J]. *ImmunoHorizons*, 2024, 8(3): 269–280.
- [24] PANG B, YU X T, ZHOU Q, et al. Effect of *Rhizoma coptidis* (Huang Lian) on treating diabetes mellitus[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 2015: 921416.
- [25] SUN J, ZENG Q H, WU Z M, et al. Berberine inhibits NLRP3 inflammasome activation and proinflammatory macrophage M1 polarization to accelerate peripheral nerve regeneration[J]. *Neurotherapeutics*, 2024, 21(4): e00347.
- [26] ZHANG S C, XU P Y, ZHU Z W, et al. Acetylation of p65Lys310 by p300 in macrophages mediates anti-inflammatory property of berberine[J]. *Redox Biology*, 2023, 62: 102704.
- [27] LUO B W, GAN W T, LIU Z W, et al. Erythropoietin signaling in macrophages promotes dying cell clearance and immune tolerance[J]. *Immunity*, 2016, 44(2): 287–302.
- [28] ISHIMARU K, YOSHIOKA K, KANO K, et al. Sphingosine kinase-2 prevents macrophage cholesterol accumulation and atherosclerosis by stimulating autophagic lipid degradation[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 18329.
- [29] LI J J, SHAO R G, XIE Q W, et al. Ulinastatin promotes macrophage efferocytosis and ameliorates lung inflammation via the ERK5/Mer signaling pathway[J]. *FEBS Open Bio*, 2022, 12(8): 1498–1508.
- [30] DAI L, WANG C, WANG W J, et al. Activation of SphK2 contributes to adipocyte-induced EOC cell proliferation[J]. *Open Medicine*, 2022, 17(1): 229–238.

(本文编辑 苏 维)