

论著

文章编号:1000-5404(2013)11-1084-04

盐酸青藤碱诱导 EA. hy926 细胞自噬及其在抗炎中的作用

杨 亭,倪振洪,龚 薇,何凤田 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室)

[摘要] **目的** 探讨中药单体提取物盐酸青藤碱诱导人内皮细胞 EA. hy926 自噬的机制及其在抗炎中发挥的作用。**方法** Western blot 检测分别以终浓度为 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的盐酸青藤碱处理 12 h 后的 EA. hy926 细胞中自噬相关蛋白 LC3 II、ERK2、磷酸化 ERK2 及炎症细胞因子 HMGB1 表达变化情况;荧光显微镜观察吖啶橙染色的经盐酸青藤碱诱导后 EA. hy926 细胞酸性小体变化情况。**结果** 经终浓度为 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的盐酸青藤碱处理 EA. hy926 细胞后,与对照组比较,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的盐酸青藤碱可使自噬相关蛋白 LC3 II 表达(0.67 ± 0.05)及 ERK2 的磷酸化水平(1.08 ± 0.05)上调($P < 0.05$),ERK 抑制剂 U0126 可使 LC3 II 表达下调($P < 0.05$)及 EA. hy926 细胞中酸性小体减少;盐酸青藤碱可抑制 EA. hy926 中 LPS 诱导的 HMGB1 表达,自噬抑制剂氯喹可逆转该细胞中盐酸青藤碱对 LPS 诱导 HMGB1 表达的抑制作用($P < 0.05$)。**结论** 盐酸青藤碱可通过 ERK 通路诱导 EA. hy926 细胞自噬,该自噬过程是盐酸青藤碱下调炎症细胞因子 HMGB1 进而发挥抗炎活性的机制之一。

[关键词] 盐酸青藤碱;自噬;HMGB1;ERK;抗炎

[中图分类号] R282.71;R285.5;R364.5

[文献标志码] A

Anti-inflammation activity of sinomenine-induced autophagy in EA. hy926 cells

Yang Ting, Ni Zhenhong, Gong Wei, He Fengtian (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the underlying mechanism of sinomenine, a traditional Chinese herb extract monomer, in inducing autophagy and its anti-inflammation activity in EA. hy926 cells. **Methods** Western blotting was taken to detect the expression of autophagic markers LC3 II, ERK2, phosphorylation ERK2 and inflammatory cytokine HMGB1 in the EA. hy926 cells after the treatment of sinomenine at 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 12 h. Acridine orange staining was used to observe the formation of acidic vesicular organelles in the cells by fluorescence microscopy. **Results** Western blotting revealed that the expression of LC3 II (0.67 ± 0.05) and phosphorylation ERK2 (1.08 ± 0.05) were remarkably increased after the treatment of sinomenine at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.05$). Autophagic vesicles were induced by sinomenine, while both LC3 II and autophagic vesicles were partially decreased by ERK-specific inhibitor U0126 ($P < 0.05$). LPS-induced HMGB1 expression could be reduced by sinomenine, which was partially reversed by autophagy inhibitor CQ ($P < 0.05$). **Conclusion** It may be one of the mechanisms of anti-inflammation activity of sinomenine that can reduce HMGB1 by promoting autophagy through the ERK pathway in EA. hy926 cells.

[Key words] sinomenine; autophagy; HMGB1; ERK; anti-inflammation activity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81001677), the Postdoctoral Science Foundation of China (2011M500153), the Natural Science Foundation of Chongqing (2010BB5171) and the Innovation Foundation for Young Talent of Third Military Medical University (2010XQN03). Corresponding author: He Fengtian, E-mail: hefengtian06@yahoo.com.cn; Gong Wei, E-mail: gongwei0851@yahoo.com.cn

青藤碱(sinomenine, SIN)是防己科植物青风藤中提取的生物碱单体,具有抗炎、免疫抑制等多种药理作

用,药用多为其盐酸盐,现广泛应用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等多种炎性、自身免疫性疾病,取得较好的临床疗效^[1-2],但其作用机制有待深入研究。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1)是一种可使炎症效应级联放大的关键炎症因子,同时与多种自身免疫性疾病密切相关,已成为实施抗炎治疗和免疫抑制极具吸引力的新靶标^[3-5]。

自噬是细胞通过对自噬底物的识别、自噬囊泡的

[基金项目] 国家自然科学基金(81001677);中国博士后科学基金(2011M500153);重庆市自然科学基金(2010BB5171);第三军医大学青年人才创新基金(2010XQN03)

[通信作者] 何凤田, E-mail: hefengtian06@yahoo.com.cn
龚 薇, E-mail: gongwei0851@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130328.0926.001.html> (2013-03-28)

形成再与溶酶体融合,清除异常积聚蛋白的过程。自噬直接参与了机体对细胞稳态的维持和对疾病的抵抗。目前已有大量研究表明,自噬与炎症的发生、发展关系密切^[6-8]。SIN 能否引起炎症效应细胞发生自噬,该自噬是否与 SIN 发挥抗炎作用有联系,目前尚不清楚。本研究旨在初步探讨 SIN 诱导内皮细胞发生自噬,并通过自噬途径减少内皮细胞炎症因子 HMGB1 的作用机制及其在抗炎中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养液(美国 HyClone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),盐酸 SIN(上海药局),吡啶橙、U0126、LPS、氯喹(chloroquine, CQ)(美国 Sigma 公司),LC3 抗体、pERK2 抗体、ERK2 抗体(美国 Cell Signaling 公司),GAPDH(美国 Santa Cruz 公司),内皮细胞株 EA. hy926 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组和给药方法 采用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养,并常规换液和传代后,待细胞进入对数生长期后铺板实验。用 PBS 按所需的浓度溶解 SIN,其在培养基中稀释后的终浓度为 50、100 μg/mL。用 DMSO 按所需的浓度溶解 U0126 和 CQ, U0126 在培养基中稀释后的终浓度为 5 μmol/L, CQ 在培养基中稀释后的终浓度为 20 μmol/L,有机溶剂 DMSO 在培养基中的最终浓度为 1%, LPS 在培养基中的最终浓度为 200 ng/mL。各实验设对照组,分别加入等体积的 PBS 或 DMSO。

1.2.2 Western blot 检测 分别以终浓度为 50、100 μg/mL 的 SIN 处理 EA. hy926 细胞 12 h,预冷 PBS 冲洗 2 次并弃尽 PBS。各孔加入总蛋白提取液(含 Roche 蛋白酶抑制剂),冰上裂解 30 min, 4 °C, 12 000 × g 离心 10 min,收集上清,并用 BCA 法测量蛋白浓度。将定量后的蛋白以每孔 50 μg 上样,在 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,半干法将蛋白转移至 PVDF 膜。含 5% 封闭蛋白干粉的 TBST 于 37 °C 孵箱封闭 PVDF 膜 1 h,其后分别以相应蛋白质的一抗 37 °C 摇床中孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次。漂洗后用相应二抗 37 °C 摇床孵育 PVDF 膜 1 h,孵育完毕后 TBST 漂洗 3 次。将化学发光底物滴至 PVDF 膜上,于暗室显影曝光。

1.2.3 荧光显微镜检测吡啶橙染色的酸性小体 将处于对数生长期的 EA. hy926 细胞接种于 6 孔板中,按相应组别给予 U0126 及 SIN 处理细胞后,加入终浓度为 100 μmol/L 的吡啶橙,于 37 °C 孵箱中避光孵育 15 min 后,用 PBS 漂洗 3 次,于荧光显微镜下观察酸性小体的变化。

1.3 统计学处理

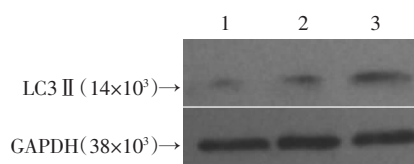
实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 盐酸 SIN 对 EA. hy926 细胞中自噬相关分子 LC3 II 蛋白表达的影响

分别以 0(对照组)、50、100 μg/mL 的 SIN 处理 EA. hy926 细胞 12 h 后,与对照组(0.35 ± 0.03)比较,100 μg/mL 的 SIN

可使自噬标志蛋白 LC3 II 表达显著上调[(0.67 ± 0.05), $P < 0.05$], 50 μg/mL 的 SIN 可使 LC3 II 蛋白表达轻微上调,但无统计学差异[(0.38 ± 0.03), $P > 0.05$]。见图 1。

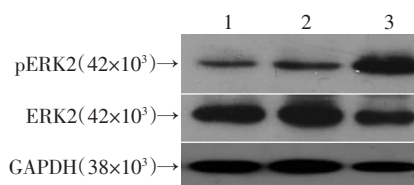


1: 对照组; 2: 50 μg/mL SIN 处理组; 3: 100 μg/mL SIN 处理组

图 1 Western blot 检测盐酸 SIN 对 EA. hy926 细胞 LC3 II 蛋白表达的影响

2.2 盐酸 SIN 对 EA. hy926 细胞中 ERK2 蛋白磷酸化水平的影响

分别以 0、50、100 μg/mL 的 SIN 处理 EA. hy926 细胞 1 h 后,与对照组(0.26 ± 0.01)比较,100 μg/mL 的 SIN 能显著提高 ERK2 磷酸化水平[(1.08 ± 0.05), $P < 0.05$], 50 μg/mL 的 SIN 可使 ERK2 磷酸化水平轻微上调,但差异无统计学意义[(0.35 ± 0.02), $P > 0.05$]。见图 2。

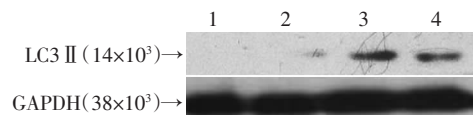


1: 对照组; 2: 50 μg/mL SIN 处理组; 3: 100 μg/mL SIN 处理组

图 2 Western blot 检测盐酸 SIN 对 EA. hy926 细胞 ERK2 蛋白磷酸化水平的影响

2.3 U0126 对盐酸 SIN 处理 EA. hy926 细胞中 LC3 II 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,与对照组(0.02 ± 0.02)及 100 μg/mL SIN 处理组(1.02 ± 0.11)比较,5 μmol/L 的 ERK 抑制剂 U0126 预处理 EA. hy926 细胞 1 h 后(0.13 ± 0.04),加入 100 μg/mL SIN 处理 12 h, U0126 有效降低了 SIN 造成的 LC3 II 升高[(0.78 ± 0.08), $P < 0.05$]。见图 3。

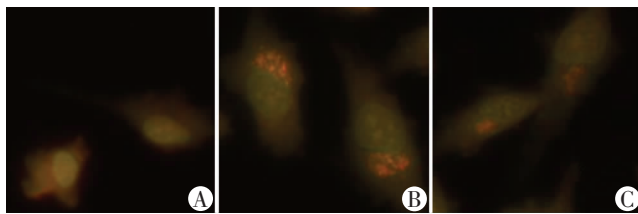


1: 对照组; 2: 5 μmol/L U0126 处理组; 3: 100 μg/mL SIN 处理组; 4: 100 μg/mL SIN + 5 μmol/L U0126 处理组

图 3 Western blot 检测 ERK 抑制剂 U0126 对盐酸 SIN 诱导 EA. hy926 细胞自噬的影响

2.4 U0126 和盐酸 SIN 对 EA. hy926 细胞中酸性小体的影响

发生自噬的细胞经吡啶橙染色,在荧光显微镜下可观察到红黄色点状体,称为酸性小体。5 μmol/L 的 ERK 抑制剂 U0126 预处理 EA. hy926 细胞 1 h 后,加入 100 μg/mL SIN 处理 12 h,荧光显微镜检测结果显示, SIN 可使 EA. hy926 细胞中酸性小体显著增多,而 U0126 可抑制 SIN 造成的酸性小体增多。见图 4。

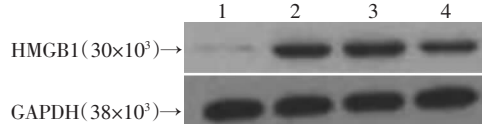


A: 对照组; B: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SIN 处理组; C: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SIN + 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ U0126 处理组

图4 荧光显微镜观察盐酸 SIN 及 ERK 抑制剂 U0126 对 EA. hy926 细胞酸性小体的影响 (标尺: 50 μm)

2.5 盐酸 SIN 对 LPS 诱导的 EA. hy926 细胞中 HMGB1 表达的影响

Western blot 检测结果显示, LPS 可诱导 EA. hy926 细胞中 HMGB1 的表达, 与对照组 (0.13 ± 0.01) 及 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SIN + 200 ng/mL LPS 处理组 (2.08 ± 0.07) 比较, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SIN 对 LPS 诱导的 HMGB1 表达有抑制作用 [200 ng/mL LPS 处理组 (1.97 ± 0.03), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SIN + 200 ng/mL LPS 处理组 (1.49 ± 0.02), $P < 0.05$]. 见图 5。

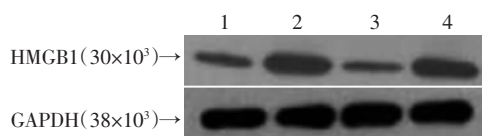


1: 对照组; 2: 200 ng/mL LPS 处理组; 3: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SIN + 200 ng/mL LPS 处理组; 4: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SIN + 200 ng/mL LPS 处理组

图5 Western blot 检测盐酸 SIN 对 LPS 诱导的 EA. hy926 细胞中 HMGB1 表达的影响

2.6 自噬抑制剂对盐酸 SIN 抑制 LPS 诱导的 EA. hy926 细胞中 HMGB1 表达的影响

Western blot 检测结果显示, 与对照组 (0.30 ± 0.01) 及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SIN + 200 ng/mL LPS 处理组 (0.26 ± 0.01) 比较, 自噬抑制剂 CQ 能够逆转 SIN 对 LPS 诱导的 EA. hy926 细胞中 HMGB1 表达的抑制作用 [200 ng/mL LPS 处理组 (0.69 ± 0.01), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SIN + 200 ng/mL LPS + 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CQ 处理组 (0.65 ± 0.01), $P < 0.05$]. 见图 6。



1: 对照组; 2: 200 ng/mL LPS 处理组; 3: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SIN + 200 ng/mL LPS 处理组; 4: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SIN + 200 ng/mL LPS + 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CQ 处理组

图6 Western blot 检测自噬抑制剂 CQ 对盐酸 SIN 抑制 LPS 诱导的 EA. hy926 细胞中 HMGB1 表达的影响

3 讨论

SIN 是从传统中药防己科植物青风藤中提取的单体化合物, 研究表明 SIN 作为吗啡结构类似物, 具有抗炎、免疫调节、镇静和止痛的功效^[1-2]。近 20 年来, 国

内外学者对 SIN 的药学价值给予了充分肯定, 对其作用的分子机制研究证实, SIN 能抑制 LPS 刺激和非 LPS 刺激的体外培养人外周血单个核细胞 (PBMC) 中白细胞介素 1β (IL- 1β)、IL-8、前列腺素 E_2 (PGE $_2$) 等炎症相关因子的表达, 它通过下调单核/巨噬细胞系统多种炎症介质和细胞因子合成发挥抗炎作用^[9]。

HMGB1 现已是公认的重要致炎细胞因子, 参与多种急慢性炎症的发生、发展。单核/巨噬细胞、内皮细胞等炎症效应细胞受 LPS 刺激后细胞内大量 HMGB1 表达, 此时 HMGB1 可通过坏死细胞释放达胞外。被释放至胞外的 HMGB1 又能反作用于炎症效应细胞刺激其他致炎因子的释放, 至此 HMGB1 使炎症效应级联放大^[10]。本实验中发现, 盐酸 SIN 能下调 LPS 诱导的内皮细胞 EA. hy926 中 HMGB1 蛋白的表达, 提供了一条研究 SIN 抗炎作用的新路径, 但其具体的作用机制尚不清。

自噬是细胞降解自身成分以维持稳态的溶酶体降解途径, 多与适应营养缺失有关, 也参与应对感染的威胁。自噬在炎症和免疫应答中扮演着调节抗原清除的免疫效应器的角色, 参与胸腺选择、抗原呈递、促进淋巴细胞的稳态和存活以及细胞因子的产生、降解等过程^[11-14]。另外有研究证实, 炎症发生后绿茶提取物儿茶素 (EGCG) 能促进巨噬细胞的自噬, 并减少细胞质内的炎症细胞因子 HMGB1^[7]。

为深入探讨 SIN 抗炎的分子机制, 本研究证实盐酸 SIN 可使内皮细胞中自噬标志性蛋白 LC3 II 表达上调、酸性小体增加, 即能促进内皮细胞 EA. hy926 发生自噬。此外, 我们发现 SIN 能显著增强 ERK2 的磷酸化, ERK 磷酸化抑制剂 U0126 可降低 SIN 诱导的 LC3 II 升高, 细胞内酸性小体也随之减少, 证明 SIN 通过 ERK 通路诱导内皮细胞自噬。SIN 能下调 LPS 诱导的内皮细胞 EA. hy926 中 HMGB1 蛋白的表达, 而自噬抑制剂 CQ 可逆转该下调作用, 说明自噬参与了 SIN 下调炎症细胞因子 HMGB1。本研究证实了 SIN 可通过 ERK 通路诱导内皮细胞 EA. hy926 发生自噬, 该自噬过程是 SIN 下调炎症细胞因子 HMGB1 进而发挥抗炎活性的机制之一, 为揭示 SIN 抗炎机制提供了新的理论依据。

参考文献:

- [1] Chen D P, Wong C K, Leung P C, et al. Anti-inflammatory activities of Chinese herbal medicine sinomenine and Liang Miao San on tumor necrosis factor- α -activated human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1): 457-468.
- [2] Wang Q, Li X K. Immunosuppressive and anti-inflammatory activities of sinomenine [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(3): 373-376.
- [3] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of en-

dotoxin lethality in mice[J]. *Science*, 1999, 285(5425): 248-251.

[4] Yanai H, Ban T, Taniguchi T. High-mobility group box family of proteins; ligand and sensor for innate immunity[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(12): 633-640.

[5] Harris H E, Andersson U, Pisetsky D S. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(4): 195-202.

[6] Wang Y, Li Y B, Yin J J, et al. Autophagy regulates inflammation following oxidative injury in diabetes[J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 272-277.

[7] Li W, Zhu S, Li J, et al. EGCG stimulates autophagy and reduces cytoplasmic HMGB1 levels in endotoxin-stimulated macrophages[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(9): 1152-1163.

[8] Li J, Liu R, Lei Y, et al. Proteomic analysis revealed association of aberrant ROS signaling with suberoylanilide hydroxamic acid-induced autophagy in Jurkat T-leukemia cells[J]. *Autophagy*, 2010, 6(6): 711-724.

[9] Teng P, Liu H L, Zhang L, et al. Synthesis and biological evaluation of novel sinomenine derivatives as anti-inflammatory agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 50: 63-74.

[10] Lu B, Wang H, Andersson U, et al. Regulation of HMGB1 release by inflammasomes[J]. *Protein Cell*, 2013, 4(3): 163-167.

[11] Levine B, Mizushima N, Virgin H W. Autophagy in immunity and inflammation[J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 323-335.

[12] Kuballa P, Nolte W M, Castoreno A B, et al. Autophagy and the immune system[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 611-646.

[13] Zhou X J, Zhang H. Autophagy in immunity: implications in etiology of autoimmune/autoinflammatory diseases[J]. *Autophagy*, 2012, 8(9): 1286-1299.

[14] Tang D, Kang R, Coyne C B, et al. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity[J]. *Immunol Rev*, 2012, 249(1): 158-175.

(收稿:2013-03-01;修回:2013-03-25)

(编辑 栾嘉)

文章编号:1000-5404(2013)11-1087-01

个案与短篇

视神经脊髓炎伴结核性脑脊髓膜炎 1 例

张刚,曹笃,秦新月 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[关键词] 视神经脊髓炎;结核性脑脊髓膜炎

[中图分类号] R744.3 [文献标志码] B

视神经脊髓炎(neuromyelitis optica, NMO)是一种以视神经与脊髓同时或相继受累的急性或亚急性脱髓鞘病变^[1]。该病属于神经科少见疾病,结合典型临床表现及体征、MRI、脑脊液等检查诊断并不困难,但该病合并结核性脑脊髓膜炎罕见,易误诊、漏诊。本科近期收治 1 例该病患者,现报告如下。

1 临床资料

患者,女性,21岁,以“纳差半个月,呕吐伴剑突下疼痛 1 周”于 2012 年 10 月 20 日入我院消化内科。住院期间长期低热,午后明显,下午体温 37.5~38.4℃。胸片提示:右肺中叶炎症。该患者于 2012 年 10 月 31 日出现右侧肢体无力、麻木,次日出现排尿困难,11 月 2 日出现左眼疼痛、左眼视力下降,双下肢无力,逐渐出现呼吸困难,转入神经内科。查体:体温 38.0℃,最高达 39.7℃,脉搏 82/min,呼吸 21/min,血压 111/70 mmHg;神志清,双侧瞳孔等大、等圆,对光反射灵敏,眼球活动可,左眼视力下降;颈抵抗可疑阳性,双上肢肌力 V 级,左下肢肌力 VI 级,右下肢肌力 III 级;右侧胸 5 水平以下、左侧胸 10 水平以下痛觉减退,右下肢、左大腿中部以下痛觉、触觉缺失,双上肢肌张力正常,双下肢肌张力低,双上肢反射对称,肱二头肌腱反射(++),桡骨膜反射(+),双侧膝反射(++),

踝反射(+),双侧病理征阳性。2012 年 11 月 2 日腰穿测颅压 170 mmH₂O;脑脊液常规:细胞总数 48×10⁶/L,有核细胞数 34×10⁶/L;脑脊液生化:糖 3.1 mmol/L,脑脊液蛋白 0.78 g/L;同期血糖 6.3 mmol/L;脑脊液抗酸染色及墨汁染色均为阴性;脑脊液寡克隆蛋白检查阴性;视觉诱发电位(VEP):左眼 P100 145 ms,右眼 P100 100 ms,提示左眼 P100 潜伏期明显延长;头颅 MRI 正常。诊断:NMO 伴结核性脑脊髓膜炎。经抗结核、糖皮质激素冲击、静滴免疫球蛋白、呼吸机辅助呼吸治疗 1 个月后呼吸机脱机,继续口服抗结核药物,病情逐渐好转。该患者于病程 2 个月后出院,遗留左眼视力下降,右侧上、下肢肌力 IV 级,双侧踝阵挛。2012 年 12 月 13 日头颈部 MRI 示延髓、颈髓及胸髓内散在不规则分布斑片状病灶较刚转入本科时缩小。肺结核治疗 1 个月后复查肺部 CT,结果显示右肺下叶病灶吸收,双肺下叶基底段粟粒样病灶增多(图 1)。

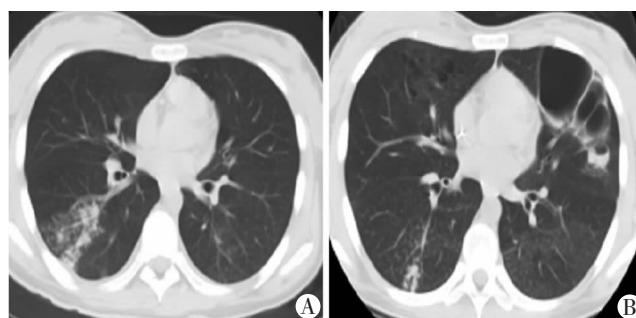


图 1 视神经脊髓炎伴结核患者治疗前(A)、治疗后(B)肺部 CT 表现 (下转 1092 页)

[通信作者] 秦新月, E-mail: qinxinyue@yahoo.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130516.1138.015.html> (2013-05-16)