

· 论著 ·

杨梅素通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路诱导 MTB 感染巨噬细胞发生自噬的研究

孙锦霞 张晴雯 李银虹 姜昕

【摘要】 目的 对杨梅素通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路诱导 MTB 感染的巨噬细胞发生自噬进行研究,从而探讨杨梅素抗结核作用的机理。**方法** 用 CCK8 法检测杨梅素对细胞增殖的影响,确定安全的用药范围;以 H37Ra 菌株感染的小鼠巨噬细胞 Raw 264.7 为模型组,并设空白组和药物处理组。按感染复数(MOI,即细菌:细胞=10:1)加入模型组、药物处理组,共孵育 4 h 后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次以弃掉未进入胞内的 MTB。药物处理组分别用不同浓度(12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)的杨梅素作用 24 h, Western blot 法检测自噬相关蛋白即“微管相关蛋白 1 轻链 3-II (LC3-II)和 p62”表达水平的变化,并以此筛选出杨梅素促进自噬的最佳作用浓度;100 $\mu\text{mol/L}$ 杨梅素作用于感染细胞 72 h 后,0.1%聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)冰上裂解细胞 10 min,菌落形成单位(CFU)法检测巨噬细胞胞内荷菌量;杨梅素作用感染细胞不同时间(30、60、180 min)后 Western blot 测定 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中 Akt、mTOR 的磷酸化水平。以 Image J 软件做蛋白定量分析,用 GraphPad Prism 7.0 制图,采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。**结果** 杨梅素在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以下细胞生存率在 90%左右,对细胞毒性较小;Western blot 结果显示:与模型组(0.52 ± 0.01)相比,杨梅素不同浓度(12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)处理均能促进 LC3 II 的表达(0.59 ± 0.02 、 0.65 ± 0.01 、 0.71 ± 0.01 、 0.83 ± 0.01),差异有统计学意义($t = 2.97$ 、 $P = 0.04$, $t = 7.91$ 、 $P = 0.00$, $t = 9.77$ 、 $P = 0.00$, $t = 16.37$ 、 $P = 0.00$);而较模型组 p62 蛋白(0.86 ± 0.02),药物处理亦能抑制 p62 的表达(0.72 ± 0.01 、 0.86 ± 0.00 、 0.60 ± 0.02 、 0.58 ± 0.01),25 $\mu\text{mol/L}$ 杨梅素处理组差异无统计学意义($t = 0.81$ 、 $P = 0.46$),12.5、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组差异均有统计学意义($t = 6.50$ 、 $P = 0.00$, $t = 9.53$ 、 $P = 0.00$, $t = 12.01$ 、 $P = 0.00$);杨梅素促进自噬的最佳药物浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$;100 $\mu\text{mol/L}$ 杨梅素作用于感染细胞 72 h 后,对胞内 MTB 的抑制率为 21.02%;模型组细胞在 MTB 感染后 30、60、180 min 时,PI3K/Akt/mTOR 通路中 Akt 蛋白的磷酸化(p-Akt)水平(1.23 ± 0.01 、 1.52 ± 0.01 、 0.74 ± 0.02)明显增加,而杨梅素作用相同的时间后,可明显抑制 Akt 蛋白的磷酸化(0.99 ± 0.01 、 0.96 ± 0.01 、 0.43 ± 0.01),差异有统计学意义($t = 27.60$ 、 $P = 0.00$, $t = 30.06$ 、 $P = 0.00$, $t = 18.60$ 、 $P = 0.00$);而模型组磷酸化 mTOR(p-mTOR)蛋白水平仅在 MTB 感染后 180 min(0.57 ± 0.00)明显增加($t = 94.61$ 、 $P = 0.00$),杨梅素作用 180 min 亦能抑制 mTOR 蛋白的磷酸化(0.46 ± 0.01),差异有统计学意义($t = 21.60$ 、 $P = 0.00$)。**结论** 杨梅素通过抑制 Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化来抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路,从而诱导 MTB 感染的巨噬细胞发生自噬来杀灭胞内的 MTB。

【关键词】 分枝杆菌,结核; 巨噬细胞; 自噬; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 杨梅素



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2020.02.005

基金项目:国家自然科学基金(81873069);上海市自然科学基金

金(18ZR1439700);上海中医药大学预算内项目(2015YSN03);“十三五”国家科技重大专项(2018ZX10725-509)

作者单位:201203 上海中医药大学基础医学院免疫学与病原生物学教研室

通信作者:姜昕,Email:jiangxingao@163.com

Study of autophagy induced by myricetin in MTB infected macrophages through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

SUN Jin-xia, ZHANG Qing-wen, LI Yin-hong, JIANG Xin. Department of Immunology and Pathology, School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Corresponding author: JIANG Xin, Email: jiangxingao@163.com

【Abstract】 Objective To explore the anti-tuberculosis mechanism of myricetin by studying the autophagy of MTB-infected macrophages induced by myricetin through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Methods** CCK8 method was used to detect the effect of myricetin on cell proliferation and determine the safe dosage range. Murine Raw 264.7 macrophages infected with H37Ra strain was used as the model group, meanwhile we set a blank group and a myricetin group. The cells were infected with MTB H37Ra (Multiplicity of infection=10). After 4 h of co-incubation, cells were washed three times with PBS to discard the MTB that did not enter the cells. In order to determine the optimal concentration of myricetin which promoted autophagy, the protein levels of LC3 II and p62 were detected by western blot in MTB-infected macrophages treated by different concentrations (12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) of myricetin for 24 h. The intracellular bacterial load of macrophages after treated with myricetin for 72 h were checked using colony-forming unit (CFU) method. Phosphorylations of Akt and mTOR in PI3K/Akt/mTOR signaling pathway were tested with western blot method for those infected macrophages treated with myricetin for 30, 60 and 180 min. Protein quantitative analysis was performed with Image J software. The results were analyzed using GraphPad Prism 7.0, one-way analysis of variance (ANOVA) was used for pairwise comparison of data, and $P < 0.05$ was considered statistically significant. **Results** The survival rate of infected macrophages treated with myricetin below 100 $\mu\text{mol/L}$ was about 90%, indicating minor toxic to cells. Western blot showed that compared with model group (0.52 ± 0.01), LC3 II expression (0.59 ± 0.02 , 0.65 ± 0.01 , 0.71 ± 0.01 , 0.83 ± 0.01) were changed significantly with different concentrations of myricetin (12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$). Differences were statistically significant ($t=2.97, P=0.04, t=7.91, P=0.00, t=9.77, P=0.00, t=16.37, P=0.00$); Comparing with the model group (0.86 ± 0.02), different concentrations of myricetin treatment also inhibited the expression of p62 (0.72 ± 0.01 , 0.85 ± 0.00 , 0.60 ± 0.02 , 0.58 ± 0.01). Differences were statistically significant ($t=6.50, P=0.00, t=9.53, P=0.00, t=12.01, P=0.00$) for concentrations of 12.5, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ respectively, while the group treated with 25 $\mu\text{mol/L}$ ($t=0.81, P=0.46$) was not statistically significant. The optimal drug concentration of myricetin to promote autophagy was 100 $\mu\text{mol/L}$. The inhibition rate of intracellular MTB was 21.02% when infected macrophages were treated with myricetin for 72 h. The phosphorylation of Akt in PI3K/Akt/mTOR pathway (1.23 ± 0.01 , 1.52 ± 0.01 , 0.74 ± 0.02) was significantly increased in the model group at 30, 60, and 180 min after MTB infection, while the phosphorylation of Akt was significantly inhibited by myricetin at the same time (0.99 ± 0.01 , 0.96 ± 0.01 , 0.43 ± 0.01), with statistically significant differences ($t=27.60, P=0.00, t=30.06, P=0.00, t=18.60, P=0.00$). However, the protein level of phosphorylated mTOR (p-mTOR) in the model group only increased significantly after MTB infection for 180 min (0.57 ± 0.00), and myricetin also inhibited the phosphorylation of mTOR protein for 180 min (0.46 ± 0.01), with a statistically significant difference ($t=21.60, P=0.00$). **Conclusion** Myricetin inhibited the PI3K/Akt/mTOR pathway by inhibiting the phosphorylation of Akt and mTOR proteins, thus inducing autophagy in MTB-infected macrophages to kill intracellular MTB.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Macrophages; Autophagy; PI3K/Akt/mTOR; Myricetin

结核病仍然是威胁全球健康的一种感染性疾病。2019 年 WHO 最新数据显示,2018 年感染 MTB 的新发患者约 1000 万例,有 55.8 万例利福平耐药新发患者,其中有 82% 是耐多药结核病患者,排名前三位的国家是印度、中国和印度尼西亚^[1]。我国的结核病防治形势依然非常严峻。耐药、潜伏感染、与 HIV 并发感染等问题是实现控制结核病面临的巨大挑战^[2]。

MTB 是胞内寄生菌,主要存在于巨噬细胞内,因此固有免疫在清除 MTB 中发挥关键的作用。自噬是存在于真核生物体内的一种高度保守的生物过程,指通过溶酶体介导的胞内组分的自我消化和再利用来维持细胞稳态的过程^[3]。自 1963 年首次提出自噬这一概念以来,自噬在抵抗、清除胞内病原体

中的重要作用也被越来越多的研究所证实^[4-8]。通过诱导或增强巨噬细胞的自噬作用来清除胞内的 MTB 在 2004 年被 Gutierrez 等^[9]首次证明。

宿主为导向的治疗策略(host-directed therapies, HDT)是一种新兴的治疗理念,通过小分子化合物对宿主免疫反应的调控来更好地控制 MTB。与抗生素作用不同的是:HDT 药物直接调节宿主细胞的免疫功能,从而避免了 MTB 耐药性的发生。在结核病治疗过程中,辅自噬诱导剂来增强宿主细胞的自噬功能,能缩短治疗周期,降低复发和再感染率^[10-11]。

杨梅素(myricetin, MYR)是一种多羟基黄酮类化合物,具有较强的抗肿瘤^[12]、抗氧化^[13]、抗炎^[14]、抗菌^[15]、抗病毒^[16]和镇痛^[17]等多种生物活性。杨

梅毒素在 MTB 感染中的作用, 还未见相关报道。本课题组在前期研究中发现了梅毒素具有一定的调控 MTB 感染巨噬细胞自噬的能力, 为此本研究以梅毒素为研究对象, 探讨经典自噬通路——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) 信号通路在梅毒素诱导 MTB 感染的巨噬细胞发生自噬中的作用。

材料和方法

一、材料及试剂

MTB H37Ra (ATCC25177)、小鼠巨噬细胞 Raw 264.7 由本实验室保存; 梅毒素购自上海同田生物技术股份有限公司; DMEM 高糖培养液购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自以色列 BI 公司; Middlebrook 7H9、7H10 培养基购自美国 BD 公司; CCK8 购自上海基剑生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 细胞裂解液购自上海碧云天公司; 兔抗鼠 LC3、p62、mTOR、p-mTOR、Akt、p-Akt 单克隆抗体购自美国 CST 公司; 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司; HRP 标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗购自美国 CST 公司。

二、方法

1. Raw 264.7 细胞的培养: Raw 264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。

2. 梅毒素对 Raw 264.7 细胞的细胞毒性实验: 梅毒素用 DMSO 溶解制备成 100 mmol/L 的药物储备液, Raw 264.7 细胞生长至对数期, 收集后铺板于 96 孔板中, 细胞浓度为 2×10^4 /孔, 加入不同浓度 (25、50、100、150、200 μ mol/L) 的梅毒素, 并设空白组、DMSO 对照组, 每组设 6 复孔。在 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24、48、72 h 后, 避光加入 CCK-8 (cell counting kit-8), 10 μ l/孔, 放入培养箱继续培养 30 min 后, 酶标仪测定各孔的吸光度值 (A_{450} 值), 根据各孔平均值, 绘制细胞的生长曲线。细胞存活率 (%) = (待测样品 - 空白组) / (对照组 - 空白组) $\times 100\%$ 。

3. MTB H37Ra 的培养: H37Ra 菌株用含有 10% 白蛋白-葡萄糖-过氧化氢酶 (albumin dextrose catalase, ADC) 营养添加剂的 Middlebrook 7H9 液体培养基, 37 °C 培养箱培养约 21 d 生长至对数期。

4. H37Ra 菌株感染 Raw 264.7 细胞模型的建立: Raw 264.7 细胞离心收集后, 铺板于 6 孔板中, 细胞浓度为 1×10^6 /孔, 设空白组、模型组、药

物处理组, 每组 3 个复孔, 37 °C 培养箱培养过夜。收集生长至对数期的 MTB, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 遍, 按感染复数 (MOI, 即细菌: 细胞 = 10: 1) 加入模型组、药物处理组, 共孵育 4 h 后, PBS 洗 3 遍, 以便弃掉未进入胞内的 MTB; 而后细胞分别采用不同浓度的梅毒素处理不同的时间, 模型组用 PBS 处理。

5. 菌落形成单位 (CFU) 法检测梅毒素对 MTB 感染的 Raw 264.7 细胞中细菌的杀灭作用: 梅毒素诱导自噬的最佳浓度 100 μ mol/L 作用于感染细胞模型, 并设空白组、模型组。37 °C、5% CO₂ 培养 72 h 后, PBS 洗 3 遍, 收集细胞中加入 100 μ l 的 0.1% Triton-100, 冰浴 10 min, 释放胞内 MTB, 各组分别用 PBS 稀释至 10^6 倍, 设 3 个复孔, 涂板于 7H10 固体培养基, 37 °C 培养 21 d 后进行菌落计数。梅毒素对胞内 MTB 的抑制率 (%) = (模型组胞内菌 - 梅毒素组胞内菌) / 模型组胞内菌 $\times 100\%$ 。

6. 蛋白免疫印迹法 (western blot, WB) 检测 Raw 264.7 细胞相关蛋白的表达水平: 在自噬相关蛋白 (LC3 和 p62) 的检测中, 以不同浓度 (12.5、25、50、100 μ mol/L) 的梅毒素处理模型组细胞 24 h; 在自噬通路相关蛋白 (p-Akt 和 p-mTOR) 检测中, 以 100 μ mol/L 梅毒素处理模型组细胞 30、60、180 min。不同处理组细胞分别用预冷的 PBS 洗 3 遍, 加入预冷的 RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min。4 °C、 $r=10$ cm, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集蛋白上清。BCA 法检测蛋白浓度, 然后将蛋白与上样缓冲液 (loading buffer) 混合后煮沸。在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) (SDS-PAGE) 上分离蛋白并转印至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 5% 脱脂牛奶封闭 2.5 h 后, 将 NC 膜转移至预先按 1: 1000 进行稀释好的兔抗 LC3、p62、mTOR、p-mTOR、Akt、p-Akt 单克隆抗体, 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体中, 4 °C 孵育过夜。TBST 洗 3 遍, 每遍 10 min 后, 将膜放入 1: 5000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔或羊抗鼠二抗中, 室温下孵育 1 h, TBST 洗 3 次。用 ECL 试剂盒在 Protein Sample 仪器上进行显影, 并通过 Image J 软件对蛋白质的表达进行像素的灰度值测定与分析。

三、制图与统计学分析

用 GraphPad Prism 7.0 软件制图并进行统计学分析。实验结果以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行数据的两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、杨梅素对 Raw 264.7 细胞活力的影响

在不同时间点(24、48、72 h)用 CCK8 法检测不同浓度(0、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)杨梅素处理后细胞的存活情况。结果显示,杨梅素作用 24 h 和 48 h 细胞的存活率均能保持在 90% 左右,200 $\mu\text{mol/L}$ 的杨梅素处理细胞 72 h 后,Raw 264.7 细胞的生存率仍能达到 $(79.65 \pm 1.36)\%$ (表 1)。为此后续实验选择 100 $\mu\text{mol/L}$ 为最大药物安全使用浓度。

二、杨梅素诱导 MTB 感染的 Raw 264.7 细胞自噬

利用 Western bolt 检测自噬相关蛋白 LC3 II 和 p62 蛋白的表达情况。以小鼠肌动蛋白(β -actin)为内参,模型组与药物处理组的 LC3 II 和 p62 蛋白的表达差异见图 1。与模型组相比,杨梅素作用 24 h 能明显诱导 MTB 感染的 Raw 264.7 细胞发生自噬,且随药物浓度的增加,呈现一定的剂量依赖性。模型组 LC3 II 蛋白的相对表达量较低,杨梅素不同浓度(12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)处理均能促进 LC3 II

的表达;相较于模型组 p62 蛋白,药物处理亦能抑制 p62 的表达,25 $\mu\text{mol/L}$ 杨梅素处理组差异无统计学意义,12.5、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组差异均有统计学意义,具体见表 2。杨梅素在最高作用浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 下,其 LC3 II 蛋白表达最高,同时 p62 蛋白表达最低。

三、杨梅素能明显杀伤 Raw 264.7 细胞内的 MTB

杨梅素能降低 Raw 264.7 细胞的荷菌量。模型组胞内的 MTB 数量为 $(39.67 \pm 2.33) \times 10^6$,100 $\mu\text{mol/L}$ 杨梅素处理 72 h 后,胞内 MTB 的数量降为 $(31.33 \pm 0.88) \times 10^6$,差异有统计学意义($t = 3.34, P = 0.03$)。杨梅素对胞内 MTB 的抑制率(%)为 21.02%(图 2)。

四、杨梅素通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导自噬

利用 Western bolt 检测自噬经典途径 PI3K/Akt/mTOR 通路中关键接头蛋白 Akt、mTOR 的磷酸化水平。以各组 p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 来表示该组 p-Akt 和 p-mTOR 蛋白的相对灰度值。与空白组相比,空白+杨梅素组 Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平没有变化,可见杨梅素本身对空白

表 1 不同浓度杨梅素作用下 Raw 264.7 细胞的存活率

杨梅素 ($\mu\text{mol/L}$)	24 h 细胞存活率 (%, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a	P 值 ^a	48 h 细胞存活率 (%, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^b	P 值 ^b	72 h 细胞存活率 (%, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^c	P 值 ^c
空白组	99.35 $\pm$ 0.76			101.90 $\pm$ 1.28			94.50 $\pm$ 2.85		
12.5	96.99 $\pm$ 3.45	0.67	0.54	92.13 $\pm$ 1.82	5.34	0.01	89.75 $\pm$ 3.36	1.08	0.34
25	90.68 $\pm$ 0.44	9.95	0.00	92.07 $\pm$ 2.00	4.13	0.02	89.54 $\pm$ 1.49	1.54	0.20
50	88.39 $\pm$ 1.26	7.45	0.00	91.57 $\pm$ 1.53	5.18	0.01	91.24 $\pm$ 0.96	1.09	0.34
100	92.40 $\pm$ 0.68	6.83	0.00	93.82 $\pm$ 0.47	5.93	0.00	86.48 $\pm$ 2.26	2.21	0.09
200	89.03 $\pm$ 0.86	9.02	0.00	92.13 $\pm$ 1.82	4.38	0.01	79.65 $\pm$ 1.36	4.71	0.01

注^a:为不同浓度杨梅素处理 24 h 组与空白组 24 h 数据的比较;^b:为不同浓度杨梅素处理 48 h 组与空白组 48 h 数据的比较;^c:为不同浓度杨梅素处理 72 h 组与空白组 72 h 数据的比较

表 2 不同浓度杨梅素处理对自噬相关蛋白 LC3 II 和 p62 表达的影响

组别	LC3 II 蛋白相对灰度值 ($\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值	p62 蛋白相对灰度值 ($\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值
空白组	0.36 $\pm$ 0.01			0.51 $\pm$ 0.02		
模型组	0.52 $\pm$ 0.01	8.85 ^a	0.00 ^a	0.86 $\pm$ 0.02	10.98 ^c	0.00 ^c
杨梅素 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.59 $\pm$ 0.02	2.97 ^b	0.04 ^b	0.72 $\pm$ 0.01	6.50 ^d	0.00 ^d
杨梅素 25 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.65 $\pm$ 0.01	7.91 ^b	0.00 ^b	0.85 $\pm$ 0.00	0.81 ^d	0.46 ^d
杨梅素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.71 $\pm$ 0.01	9.77 ^b	0.00 ^b	0.60 $\pm$ 0.02	9.53 ^d	0.00 ^d
杨梅素 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.83 $\pm$ 0.01	16.37 ^b	0.00 ^b	0.58 $\pm$ 0.01	12.01 ^d	0.00 ^d

注^a:为模型组与空白组 LC3 II 蛋白相对灰度值的比较;^b:为杨梅素处理组与模型组 LC3 II 蛋白相对灰度值的比较;^c:为模型组与空白组 p62 蛋白相对灰度值的比较;^d:为杨梅素处理组与模型组 p62 蛋白相对灰度值的比较

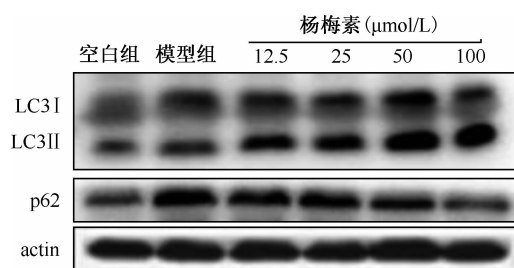


图 1 Western bolt 检测不同浓度杨梅素作用下细胞中自噬相关蛋白 LC3 II 和 p62 的表达情况。与模型组相比,不同浓度杨梅素处理组能明显促进 LC3 II 的表达,同时促进 p62 蛋白的降解

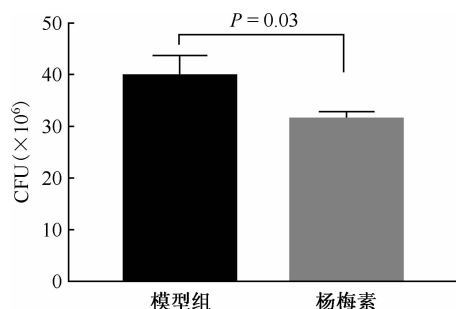
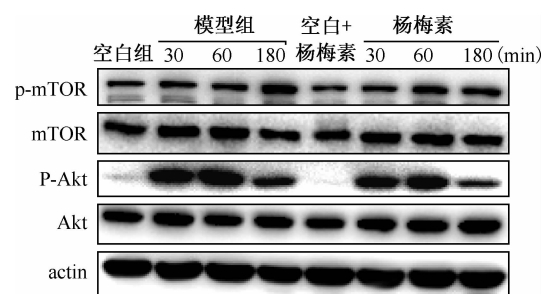


图 2 杨梅素对 Raw 264.7 细胞内 MTB 的杀伤作用

组细胞无影响。模型组与药物处理组的 p-Akt 和 p-mTOR 的表达差异见图 3。模型组细胞在 MTB 感染后 30、60、180 min 时, Akt (Ser473) 蛋白的磷酸化(p-Akt)水平明显增加,而杨梅素作用相同的时间后,可明显抑制 Akt 蛋白的磷酸化;模型组磷酸化 mTOR (Ser2448) (p-mTOR) 蛋白水平仅在 MTB 感染后 180 min 明显增加,杨梅素作用 180 min 亦能抑制 mTOR 蛋白的磷酸化,具体见表 3。



空白+杨梅素组与空白组相比,杨梅素本身对细胞的 Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化无影响。与模型组相比,在不同时间点(30、60、180 min),杨梅素均能明显抑制 Akt 蛋白的磷酸化,差异有统计学意义;模型组 p-mTOR 蛋白水平仅在 MTB 感染后 180 min 明显增加,杨梅素作用 180 min 亦能明显抑制 mTOR 蛋白的磷酸化

图 3 Western bolt 检测杨梅素对细胞中 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白磷酸化水平的影响

讨 论

目前,治疗结核病的主要手段仍然是化疗,而临床普遍使用的一线抗结核药物,仍停留在 20 世纪 90 年代研发的链霉素、异烟肼、利福平。然而由于耐药、耐多药、与 HIV 并发感染等问题的出现,使得开发新的抗结核药物成为全球结核病防治事业的当务之急。针对杀灭 MTB 的药物研发进展缓慢, HDT 疗法另辟蹊径,从宿主角度出发,通过增强宿主的免疫力来清除 MTB。MTB 是一种胞内寄生虫,通过抑制吞噬体的成熟从而在感染的巨噬细胞内长期存活。自噬是细胞自发的对胞内寄生菌的一种防御行为,已经被确认可以通过不同机制清除胞内菌。通过自噬,细胞能清除胞内受损的细胞器、蛋

表 3 杨梅素作用不同时间对 Akt 和 mTOR 蛋白磷酸化水平的影响

组别	p-Akt 蛋白相对灰度值 ($\bar{x} \pm s$)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	p-mTOR 蛋白相对灰度值 ($\bar{x} \pm s$)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
空白组	0.19 ± 0.01			0.27 ± 0.00		
模型组 30 min	1.23 ± 0.01	84.60 ^a	0.00 ^a	0.28 ± 0.01	0.60 ^f	0.58 ^f
模型组 60 min	1.52 ± 0.01	66.79 ^a	0.00 ^a	0.27 ± 0.01	0.36 ^f	0.74 ^f
模型组 180 min	0.74 ± 0.02	30.49 ^a	0.00 ^a	0.57 ± 0.00	94.61 ^f	0.00 ^f
空白+杨梅素	0.19 ± 0.00	0.92 ^b	0.41 ^b	0.29 ± 0.00	0.91 ^g	0.41 ^g
杨梅素 30 min	0.99 ± 0.01	27.60 ^c	0.00 ^c	0.29 ± 0.01	1.31 ^h	0.26 ^h
杨梅素 60 min	0.96 ± 0.01	30.06 ^d	0.00 ^d	0.33 ± 0.01	2.31 ⁱ	0.08 ⁱ
杨梅素 180 min	0.43 ± 0.01	18.60 ^e	0.00 ^e	0.46 ± 0.01	21.60 ^j	0.00 ^j

注 ^a: 为模型组与空白组数据的比较; ^b: 为空白+杨梅素组与空白组数据的比较; ^c: 为杨梅素 30 min 组与模型组 30 min 组数据的比较; ^d: 为杨梅素 60 min 组与模型组 60 min 组数据的比较; ^e: 为杨梅素 180 min 组与模型组 180 min 组数据的比较; ^f: 为模型组与空白组数据的比较; ^g: 为空白+杨梅素组与空白组数据的比较; ^h: 为杨梅素 30 min 组与模型组 30 min 组数据的比较; ⁱ: 为杨梅素 60 min 组与模型组 60 min 组数据的比较; ^j: 为杨梅素 180 min 组与模型组 180 min 组数据的比较

白聚集物及进入细胞的病原体。经典的自噬分为巨自噬、微自噬及分子伴侣介导的自噬^[18],通常所说的自噬即是巨自噬。自噬是由多种基因共同参与的渐进式的过程,以双层膜包裹的需降解的胞内成分形成的自噬体为标志,通过与溶酶体的融合来降解其内容物。自噬发生时,胞质中的 LC3 会发生酶解形成 LC3 I, LC3 I 在 ATG 帮助下与磷脂酰乙醇胺(PE)结合后形成膜型的 LC3 II, LC3 II 会与自噬体膜融合,因此,通过 LC3 II/LC3 I 比值的大小可以评估自噬水平的高低。而自噬流是否通畅,可以观察 p62 蛋白的表达水平。p62 蛋白是细胞接头蛋白,是细胞内多种蛋白复合物的主要成分^[19]。当自噬流通畅时, p62 蛋白会与 LC3 形成复合物, p62 作为自噬特异性底物与吞噬溶酶体内的其他内容物被一同降解^[20]。自噬已经成为治疗结核病的新靶标,其限制 MTB 生长的作用也被很多研究者所证实^[21-22]。

杨梅素作为一种天然的黄酮类化合物,具有广泛的药理活性,且毒性较小,具有很好的应用前景。杨梅素具有抗肿瘤、抗氧化、抗微生物、抗神经退化、抗高血压、抗过敏、抗酸、降血糖和抗炎、镇痛等多种药理作用。近年来,大量的研究聚焦在了杨梅素的抗菌、抗炎活性上。杨梅素具有抑制金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌生长的作用^[23-25]。然而结核病模型中,还未见有关杨梅素的相关报道。目前在杨梅素的作用机制研究方面, Cao 等^[26]发现杨梅素在较高浓度下可显著降低肝癌细胞 HepG2 的活力,增加自噬体形成和选择性吞噬过程中起关键作用的蛋白 LC3 的表达,降低 mTOR 及其下游信号分子的磷酸化,促使细胞的自噬过程进行。

本实验中首先通过 CCK8 法检测杨梅素对 Raw 264.7 细胞的细胞毒性,发现杨梅素在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以下作用 24、48、72 h 时细胞的存活率均在 90% 以上,可见杨梅素在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对细胞的毒性较小,因此本实验选用 100 $\mu\text{mol/L}$ 作为杨梅素的最大安全使用浓度。通过杨梅素干预 MTB 感染的小鼠 Raw 264.7 巨噬细胞, Western blot 检测发现杨梅素能明显促进自噬相关蛋白 LC3 II 的表达,与模型组 (0.52 ± 0.01) 相比, 杨梅素不同浓度 (12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 均能促进 LC3 II 的表达 (0.59 ± 0.02 , 0.65 ± 0.01 , 0.71 ± 0.01 , 0.83 ± 0.01), 差异有统计学意义 ($t = 2.97$, $P = 0.04$, $t = 7.91$, $P = 0.00$, $t = 9.77$, $P = 0.00$, $t = 16.37$, $P = 0.00$)。同时,我们发现杨梅素能促进 p62 蛋白降

解,较模型组 p62 蛋白 (0.86 ± 0.02),不同浓度的杨梅素能抑制 p62 的表达 (0.72 ± 0.01 , 0.85 ± 0.00 , 0.60 ± 0.02 , 0.58 ± 0.01);与模型组比较, 25 $\mu\text{mol/L}$ 杨梅素处理组差异无统计学意义 ($t = 0.81$, $P = 0.46$), 12.5、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组均有统计学意义 ($t = 6.50$, $P = 0.00$, $t = 9.53$, $P = 0.00$, $t = 12.01$, $P = 0.00$);从中得出杨梅素在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下 LC3 II 的表达最高,同时 p62 的表达最低,可见杨梅素诱导自噬的最佳浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。自噬是清除胞内 MTB 的一种重要手段,因此选择在自噬发生后对胞内的 MTB 数量进行了 CFU 计数,发现杨梅素在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下作用 72 h 后,能降低胞内 21.02% 的 MTB,虽然这种降低没能产生数量级上的差异,但考虑到 HDT 只是一种辅助治疗的手段,杨梅素可联合其他一线抗结核药物一起使用,以此达到降低药物剂量、缩短疗程和减少耐药性产生的目的。笔者也检测了杨梅素作用 24 h 和 48 h 后的 CFU,发现差异无统计学意义,原因可能是药物在 24 h 刚启动自噬,而自噬发生后对 MTB 的降解需要一定的时间,因此在 72 h 才产生了统计学意义上的降低。通过刃天青法检测杨梅素的体外杀菌作用,发现杨梅素本身在 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对 MTB 无杀灭作用,因此,杨梅素降低 MTB 感染的巨噬细胞中的荷菌量不是由于杨梅素本身的杀菌作用引起的,而是通过启动了自噬,从而引起细胞内 MTB 的 CFU 下降。

PI3K/Akt/mTOR 通路是最经典的自噬通路,因此笔者首先考虑杨梅素诱导自噬的机制很可能是通过抑制了这条通路启动了自噬。为了排除杨梅素本身对细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响,设立了空白+杨梅素组,与空白组相比, p-Akt 和 p-mTOR 水平差异均无统计学意义。在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 杨梅素作用不同的时间 (30、60、180 min), 与模型组相比 (1.23 ± 0.01 , 1.52 ± 0.01 , 0.74 ± 0.02), Akt 蛋白的磷酸化水平 (0.99 ± 0.01 , 0.96 ± 0.01 , 0.43 ± 0.01) 均被显著抑制,差异有统计学意义 ($t = 27.60$, $P = 0.00$, $t = 30.06$, $P = 0.00$, $t = 18.60$, $P = 0.00$);而模型组 p-mTOR 蛋白水平仅在 MTB 感染后 180 min (0.57 ± 0.00) 明显增加, 杨梅素作用 180 min 亦能抑制 mTOR 蛋白的磷酸化 (0.46 ± 0.01), 差异有统计学意义 ($t = 21.60$, $P = 0.00$)。

综上所述,杨梅素通过抑制 Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化来抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路,从而诱导 MTB 感染的巨噬细胞发生自噬来杀灭胞内的

MTB。基于本研究的实验结果,认为杨梅素有望成为新的 HDT 候选药,作为辅助用药与临床一线抗结核药物联合用于结核病的防治。本实验尚存在许多不足之处,比如:采用的无毒株、细胞模型相对单一、没有开展整体实验、没有与抗结核药物进行比较等。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019.
- [2] Zumla A, Rao M, Parida SK, et al. Inflammation and tuberculosis: host-directed therapies. J Intern Med, 2015, 277(4): 373-387.
- [3] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 814-822.
- [4] Castrejón-Jiménez NS, Leyva-Paredes K, Hernández-González JC, et al. The role of autophagy in bacterial infections. Biosci Trends, 2015, 9(3): 149-159.
- [5] Awuh JA, Flo TH. Molecular basis of mycobacterial survival in macrophages. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(9): 1625-1648.
- [6] Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. Immunol Rev, 2015, 264 (1): 182-203.
- [7] Moraco AH, Kornfeld H. Cell death and autophagy in tuberculosis (Review). Semin Immunol, 2014, 26 (6): 497-511.
- [8] Khan N, Vidyarthi A, Javed S, et al. Innate immunity holding the flanks until reinforced by adaptive immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection. Front Microbiol, 2016, 7: 328.
- [9] Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. Cell, 2004, 119(6): 753-766.
- [10] Gupta A, Misra A, Deretic V. Targeted pulmonary delivery of inducers of host macrophage autophagy as a potential host-directed chemotherapy of tuberculosis. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 102: 10-20.
- [11] Sachan M, Srivastava A, Ranjan R, et al. Opportunities and Challenges for Host-Directed Therapies in Tuberculosis. Curr Pharm Des, 2016, 22(17): 2599-2604.
- [12] Iyer SC, Gopal A, Halagowder D. Myricetin induces apoptosis by inhibiting P21 activated kinase 1 (PAK1) signaling cascade in hepatocellular carcinoma. MolCell Biochem, 2015, 407 (1/2): 223-237.
- [13] Hassan SM, Khalaf MM, Sadek SA, et al. Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. Pharm Biol, 2017, 55(1): 766-774.
- [14] Hou W, Hu S, Su Z, et al. Myricetin attenuates LPS-induced inflammation in RAW 264. 7 macrophages and mouse models. Future Med Chem, 2018, 10(19): 2253-2264.
- [15] Ren R, Yin S, Lai B, et al. Myricetin antagonizes semen-derived enhancer of viral infection (SEVI) formation and influences its infection-enhancing activity. Retrovirology, 2018, 15(1): 49.
- [16] Ortega JT, Suárez AI, Serrano ML, et al. The role of the glycosyl moiety of myricetin derivatives in anti-HIV-1 activity in vitro. AIDS Res Ther, 2017, 14(1): 57.
- [17] Tong Y, Zhou XM, Wang SJ, et al. Analgesic activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves. Arch Pharm Res, 2009, 32(4): 527-533.
- [18] 陈兰芳, 肖亮, 杨军平. 细胞自噬的分子机制及其功能. 实验与检验医学, 2014, 32(2): 157-163.
- [19] Mcmanus S, Roux S. The adaptor protein p62/SQSTM1 in osteoclast signaling pathways. J Mol Signal, 2012, 7: 1-8.
- [20] Park S, Choi SG, Yoo SM, et al. Choline dehydrogenase interacts with SQSTM1/p62 to recruit LC3 and stimulate mitophagy. Autophagy, 2014, 10: 1906-1920.
- [21] Bah A, Lacarriere C, Vergne I. Autophagy-related proteins target ubiquitin-free Mycobacterial compartment to promote killing in macrophages. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 6: 53.
- [22] Deretic V. Autophagy in tuberculosis. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 4(11): a018481.
- [23] Silva LN, Da Hora GCA, Soares TA, et al. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. Sci Rep, 2017, 7(1): 2823.
- [24] Arita-Morioka K, Yamanaka K, Mizunoe Y, et al. Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(1): 633-641.
- [25] 张莉静, 王明谦. 杨梅素体内抗菌抗炎药效学研究. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3221-3222.
- [26] Cao J, Chen H, Lu W, et al. Myricetin induces protective autophagy by inhibiting the phosphorylation of mTOR in HepG2 Cells. Anat Rec (Hoboken), 2018, 301 (5): 786-795.

(收稿日期: 2019-11-13)

(本文编辑: 范永德)