

· 论 著 ·

葛根素通过 AMPK-mTOR-ULK1 通路激活自噬改善
大鼠激素性股骨头坏死的研究贾岩波¹, 张田宇², 任逸众^{1*}, 郝记睿²

(1. 内蒙古医科大学第二附属医院 运动医学中心, 内蒙古 呼和浩特 010030;

2 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010059)

【摘要】目的 探讨葛根素通过 AMPK-mTOR-ULK1 信号通路对激素性股骨头坏死早期血管内皮细胞自噬的干预作用。**方法** 将 48 只雄性 SD 大鼠按随机数表法分成 4 组(每组 12 只)。对照组:单纯肌肉注射生理盐水, 2 mL/次, 共 3 次, 间隔 24 h。模型组:肌肉注射甲基强的松龙, 20 mg/kg, 共 3 次, 间隔 24 h。葛根素干预组:同模型组方法造模, 在最后 1 次臀肌注射完甲基强的松龙后给予葛根素 100 mg/(kg·d)腹腔注射。雷帕霉素干预组:同模型组方法造模, 在最后 1 次臀肌注射完甲基强的松龙后同时给予雷帕霉素[1.2 mg/(kg·d), 自噬特异性激动剂]腹腔注射。造模后 2 周、4 周后处死实验动物, 取出双侧后肢的股骨头及主要供血血管。HE 染色光镜下观察股骨头坏死情况;利用免疫组化法和 RT-PCR 方法检测 Beclin1、LC3、P62、AMPK、mTOR 和 ULK1 的 mRNA 与蛋白的表达;采用 ELISA 法检测血管内皮损伤标记物 6-keto-PGF1a 的表达。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠骨细胞坏死加重, 血管内皮细胞 6-keto-PGF1a 的表达增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 血管内皮细胞中自噬相关蛋白 AMPK、ULK1、Beclin1、LC3 表达降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), mTOR、P62 表达增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较, 雷帕霉素干预组大鼠的骨坏死程度明显改善, 6-keto-PGF1a 的表达降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 自噬相关蛋白 AMPK、ULK1、Beclin1、LC3 表达增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), mTOR、P62 表达降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 葛根素可能通过 AMPK-mTOR-ULK1 信号通路激活血管内皮细胞的自噬, 从而减轻激素所造成的股骨头坏死。

【关键词】 葛根素;糖皮质激素类;股骨头坏死;自噬;AMPK-mTOR-Ulk1 信号通路

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2023)02-0113-05

PUERARIN ACTIVATES AUTOPHAGY THROUGH
AMPK-MTOR-ULK1 PATHWAY TO IMPROVE STEROID
INDUCED FEMORAL HEAD NECROSIS IN RATSJIA Yanbo¹, ZHANG Tianyu², REN Yizhong^{1*}, HAO Jirui²

(1. Department of Sports Medicine, The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China;

2. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China)

【Abstract】Objective To investigate the intervention effect of puerarin on autophagy of vascular endothelial cells in the early stage of steroid-induced femoral head necrosis through AMPK-mTOR-ULK1 signaling pathway. **Methods** Forty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups (12 rats per group). Control group: normal saline was injected intramuscularly, 2 mL/ time, 3 times in total, with a week interval of 24 h; Model group: intramuscular injection of methylprednisolone 20 mg/kg for 3 times at an interval of 24 h. Model + puerarin group: the model was made by the same method as model group, and puerarin 100 mg/(kg·d) was injected intraperitoneally after the last injection of methylprednisolone into gluteus muscle. Model + rapamycin group: the model was made by the same method as model group, and rapamycin 1.2 mg/(kg·d), autophagy

收稿日期: 2022-03-08; 修回日期: 2023-02-14

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2020MS08140); 内蒙古医科大学科技百万工程项目(YKD2018KJBW(LH)031); 内蒙古医科大学“善学”人才培养计划项目(ZY0202028)

第一作者: 贾岩波(1983—), 男, 博士, 副主任医师。研究方向: 骨与关节疾病。E-mail: kmygyt@163.com

*通信作者: 任逸众, 男, 医学博士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 骨与关节疾病。E-mail: 328523202@qq.com

specific agonist) was injected intraperitoneally after the last injection of methylprednisolone into gluteus muscle. Two and four weeks after modeling, the experimental animals were sacrificed, and the femoral head and the main blood supply vessels of the bilateral hind limbs were removed. The necrosis of femoral head was observed under light microscope with HE staining. The mRNA and protein expressions of Beclin1, LC3, P62, AMPK, mTOR and ULK1 were detected by immunohistochemistry and RT-PCR. The expression of 6-Keto-PGF1A, a marker of vascular endothelial injury, was detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, osteocyte necrosis in model group was aggravated, the expression of 6-Keto-PGF1A in vascular endothelial cells was increased ($P < 0.05$), the expression of autophagy related proteins AMPK, ULK1, Beclin1 and LC3 in vascular endothelial cells was decreased ($P < 0.05$), and the expression of mTOR and P62 were increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the degree of osteonecrosis of rats in puerarin group was significantly improved, the expression of 6-keto-PGF1A was decreased ($P < 0.05$), the expression of autophagy related proteins AMPK, ULK1, Beclin1, LC3 were increased ($P < 0.05$), and the expression of mTOR and P62 were decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Puerarin may activate autophagy of vascular endothelial cells through AMPK-mTOR-ULK1 signaling pathway, so as to reduce hormone induced necrosis of the femoral head.

【Keywords】 Puerarin; Glucocorticoids; Femoral head necrosis; Autophagy; AMPK-mTOR-ULK1 signaling pathway

激素性股骨头坏死 (steroid-induced necrosis of femoral head, SANFH) 的发病率已占非创伤性骨坏死的首位^[1], 致残率高, 预后较差^[2]。其具有复杂的生物学过程, 发病机制尚不清楚, 且缺乏有效的治疗方法。近年来的研究表明, SANFH 中存在着细胞自噬现象^[3]。葛根素是葛根的主要有效成分之一, 临床应用广泛, 已被证实具有自噬调控作用。但葛根素的自噬调控作用与 SANFH, 特别葛根素对 SANFH 血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VEC) 自噬调控的影响, 目前尚无相关报道。我们通过制备 SANFH 的大鼠模型, 利用葛根素进行干预, 观察其是否通过腺苷一磷酸活化蛋白激酶 (AMPK)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)-Unc-51 样激酶 1 (ULK1) (AMPK-mTOR-ULK1) 信号通路影响 VEC 自噬并观察葛根素对于 VEC 的保护作用, 为探讨 SANFH 的发病机制及防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 制备动物模型

选健康清洁级 SD 大鼠 48 只, 雄性, 标准饮食, 7 周龄, 体质量 (250 ± 20) g, 分笼饲养。按随机数表法分成 4 组, 每组 12 只。对照组: 单纯肌肉注射生理盐水, 2 mL/次, 共 3 次, 间隔 1 周; 模型组: 肌肉注射甲基强的松龙, 20 mg/kg, 共 3 次, 间隔 24 h。葛根素干预组: 肌肉注射甲基强的松龙, 20 mg/kg, 共 3 次, 间隔 24 h, 肌注甲基强的松龙同时给予葛根素 100 mg/(kg·d) 腹腔注射。雷帕霉素干预组: 肌肉注射甲基强的松龙, 20 mg/kg, 共 3 次, 间隔 24 h, 肌注甲基强的松龙同时给予雷帕霉素 1.2 mg/(kg·d) 腹腔注射。除对照组外大鼠每天均肌肉注射 10 万 U 青霉素, 预防感染。

1.2 标本的制作

造模后 2 周、4 周麻醉后处死实验动物, 每次处死 6 只, 无菌条件下取双侧后肢的股骨头及主要供血血管。

1.3 观测指标

1.3.1 一般情况 观察各组实验动物饮食、活动、体质量等一般情况。

1.3.2 组织学观察 各时间点, 取各组大鼠股骨头标本, 经 40% 中性甲醛固定、脱水、15% EDTA 脱钙、梯度酒精脱水, 浸蜡包埋, 切片, HE 染色后光镜观察用; 观察骨和骨髓组织的病理改变。

1.3.3 提取 VEC 对 VEC 中 Beclin1、LC3、P62、AMPK、mTOR、ULK1 的 mRNA 采用 RT-PCR 法检测: 将提取组织加入 Trizol 裂解液, 按 Trizol 试剂盒说明进行总 RNA 提取, 按逆转录合成试剂盒说明合成 cDNA, GAPDH 作为内参照, PCR 扩增, PCR 条件: 94 °C 1 min, 55 °C 1.5 min, 72 °C 0.5 min, 共 30 个循环。以阳性条带与 GAPDH 光密度比值作为阳性条带的相对表达值。

1.3.4 采用免疫组化法检测 各组 VEC 中 Beclin1、LC3、P62、AMPK、mTOR、ULK1 的表达。

1.3.5 采用 ELISA 法检测 6-keto-PGF1a 的表达。6-keto-PGF1a 是血管内皮细胞损伤的标记物, 分离提取股骨头供血血管的内皮细胞, ELISA 法检测按照试剂说明执行。

1.4 统计学方法

实验数据用 SPSS 19.0 软件包进行处理。各组的 Beclin1、LC3、P62、AMPK、mTOR、ULK1、p-AMPK、p-mTOR 的 mRNA 含量比较应用 χ^2 检验 (ANOVA), 并进行相关分析, $-1 \leq r \leq +1$ 表示两个变量呈直线相关关系, r 为正数表示正相关, r 为负数表示负相关, 检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

模型组、葛根素干预组、雷帕霉素干预组在造模中共死亡5只大鼠,均予以补齐。1周模型组40%大鼠活动量减少,体质量减轻;葛根素干预组、雷帕霉素干预组大鼠活动尚可,体质量略有减轻。对照组大鼠食欲正常,状态良好,体质量增加。

2.2 组织病理学结果

2周时:对照组大鼠股骨头骨小梁形态结构正常,骨髓腔内各种血细胞丰富,脂肪细胞未见增多;模型组骨小梁变窄或断裂,骨髓腔内血细胞减少,脂肪细胞明显增多;葛根素干预组相较于模型组脂肪细胞数量减少;雷帕霉素干预组和模型组相比脂肪细胞数量也有所减少。4周时:对照组大鼠股骨头骨小梁形态结构正常,骨髓腔内各种血细胞丰富,脂肪细胞未见增多;模型组骨小梁变窄或断裂,骨髓腔内血细胞减少,脂肪细胞明显增多;葛根素干预组相较于模型组脂肪细胞数量减少;雷帕霉素干预组和模型组相比脂肪细胞数量也有所减少。4组HE染色结果见图1。

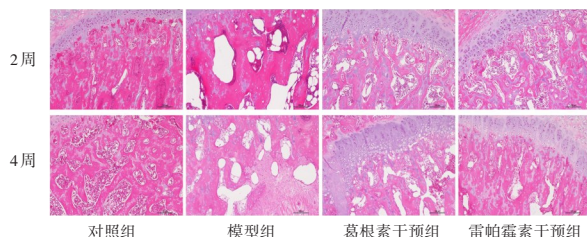


图1 2周、4周时各组大鼠股骨头HE染色比较

Fig.1 Comparison of HE staining of femoral heads of rats in each group at 2 and 4 weeks

2.3 免疫组化结果

2.3.1 AMPK表达结果 2周时:对照组大鼠股骨头AMPK表达较高;模型组相较于对照组表达减少;与对照组相比,葛根素干预组以及雷帕霉素干预组未见明显差异。4周时:对照组大鼠股骨头AMPK表达较高;模型组相较于对照组表达减少;和对照组相比,葛根素干预组以及雷帕霉素干预组AMPK表达略有降低。

2.3.2 Beclin1蛋白表达结果 2周时:对照组大鼠股骨头Beclin1表达较高;相较于对照组,模型组表达减少;和对照组相比,葛根素干预组以及雷帕霉素干预组未见明显差异。4周时:对照组大鼠股骨头Beclin1表达较高;相较于对照组,模型组表达减少;和对照组相比,葛根素干预组以及雷帕霉素干预组略有降低。

2.3.3 LC3表达结果 2周时:对照组大鼠股骨头LC3表达较高;相较于对照组,模型组表达减少;和对照组相比,葛根素干预组以及雷帕霉素干预组情况基本相同。4周时:对照组大鼠股骨头LC3表达较高;模型组相较于对照组表达减少;葛根素干预组以及雷帕霉素干预组和对照组表达情况基本相同。

2.3.4 mTOR表达情况 2周时:对照组大鼠股骨头mTOR几乎不表达;模型组相较于对照组表达升高;葛根素干预组以及雷帕霉素干预组和对照组表达情况基本相同。4周时:对照组大鼠股骨头mTOR几乎不表达;相较于对照组模型组表达升高;相较于模型组,葛根素干预组以及雷帕霉素干预组表达降低。

2.3.5 P62表达情况 2周时:对照组大鼠股骨头P62几乎不表达;相较于对照组,模型组表达升高;葛根素干预组以及雷帕霉素干预组和对照组表达情况基本相同。4周时:对照组大鼠股骨头P62几乎不表达;相较于对照组,模型组表达升高;相较于模型组,葛根素干预组以及雷帕霉素干预组表达降低。

2.3.6 ULK1表达结果 2周时:对照组大鼠股骨头ULK1表达较高;相较于对照组,模型组表达略有减少;和对照组相比,葛根素干预组以及雷帕霉素干预组未见明显差异。4周时:对照组大鼠股骨头ULK1表达较高;相较于对照组,模型组表达减少;和对照组相比,葛根素干预组以及雷帕霉素干预组表达略有降低。

2.4 ELISA法检测6-keto-PGF1a的表达的结果如图2。

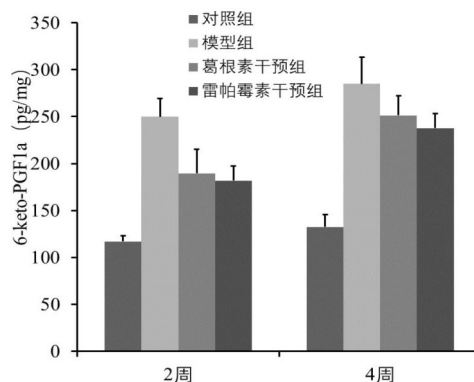


图2 各组2周与4周时6-keto-PGF1a的表达结果

Fig.2 Expression results of 6-keto-PGF1a at 2 and 4 weeks in each group

2.5 RT-PCR法检测VEC中AMPK、Beclin1、LC3、P62、mTOR、ULK1 mRNA的表达结果,各组2周与4周的表达结果见图3~8。

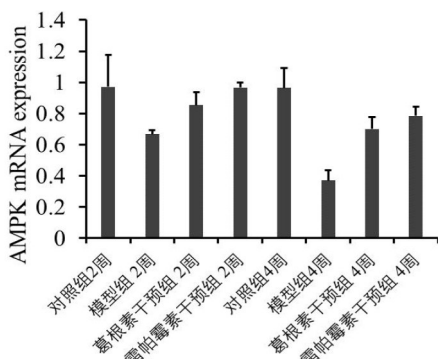


图3 各组2周与4周时AMPK mRNA的表达结果
Fig.3 Expression results of AMPK mRNA at 2 and 4 weeks in each group

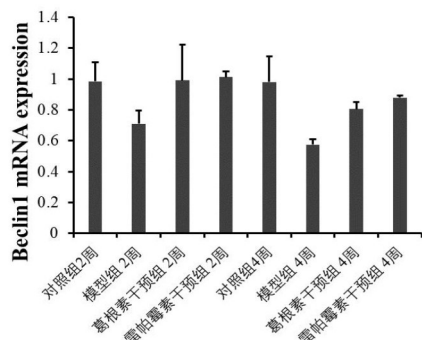


图4 各组2周与4周时 Beclin1 mRNA的表达结果
Fig.4 Expression results of Beclin1 mRNA at 2 and 4 weeks in each group

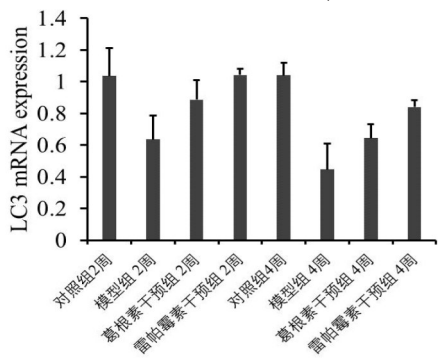


图5 各组2周与4周时 LC3 mRNA的表达结果
Fig.5 Expression results of LC3 mRNA at 2 and 4 weeks in each group

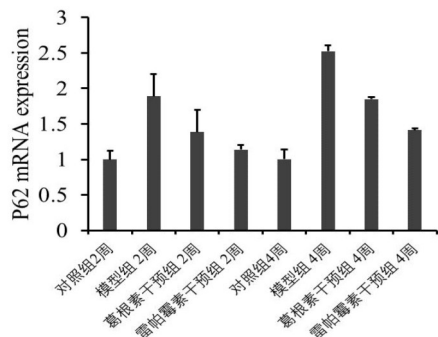


图6 各组2周与4周时 P62 mRNA的表达结果
Fig.6 Expression results of P62 mRNA at 2 and 4 weeks in each group

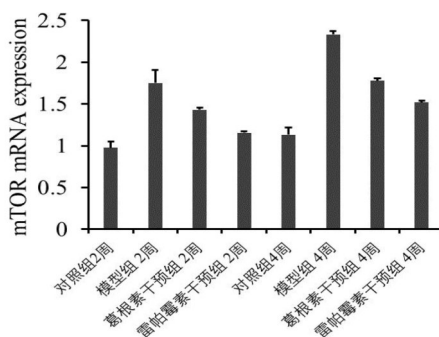


图7 各组2周与4周时 mTOR mRNA的表达结果
Fig.7 Expression results of mTOR mRNA at 2 and 4 weeks in each group

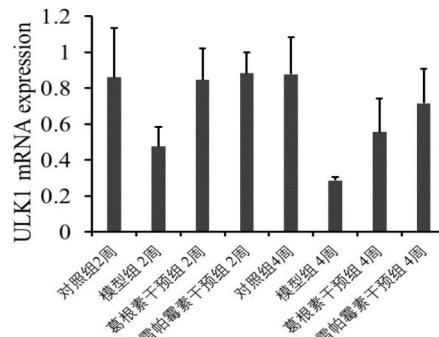


图8 各组2周与4周时 ULK1 mRNA的表达结果
Fig.8 Expression results of ULK1 mRNA at 2 and 4 weeks in each group

3 讨论

自噬是细胞在应激情况下所做出的一种非损伤性应答反应。机体在生理和病理过程中都存在自噬,基础状态下的自噬对细胞具有保护和修复作用^[4],而自噬过度激活会引起细胞的损伤及死亡。Viry等^[5]的研究证实,激素性股骨头坏死中存在着细胞自噬现象。激素是自噬的重要诱因^[6]。Zhang等^[7]的研究表明血管内皮细胞损伤是激素导致股骨头血供受损的主要病理改变。但关于VEC与自噬的关系及其调控机制尚不明确。在本实验中,我们通过实验数据发现:与对照组相比,模型组血管内皮细胞中自噬相关蛋白AMPK、ULK1、Beclin1、LC3表达降低($P < 0.05$),mTOR、P62表达增高($P < 0.05$) (见图3~8),血管内皮细胞标记物6-keto-PGF1a(见图2)的表达增加($P < 0.05$)。我们推测激素可能是通过AMPK-mTOR-ULK1自噬调控信号通路干预了VEC的自噬过程,导致了VEC损伤,进而引起股骨头发生缺血坏死。

葛根素(Puerarin)是葛根的主要有效成分之一,其化学名称为4',7-二羟基-8-P-D-葡萄糖异黄酮。临床研究已表明^[8,9],葛根素具有保护血管内皮与神经组织、抗氧化应激、抗炎、抗过敏、改善微循环等多种药理作用。其药源丰富、安全范围广。刘

北^[10]发现葛根素能够诱导细胞自噬,可通过 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬,发挥对心肌肥厚的保护作用。Wang 等^[11]发现在 MPP(+)诱导的神经元细胞损伤模型中,葛根素可通过分子伴侣介导的自噬调控,减少 ROS 生成,抑制细胞的氧化损伤。在酒精性肝细胞疾病模型中^[12],葛根素可通过激活自噬抑制肝细胞内脂肪积聚,继而改善细胞活力。黄亚光等^[13]的研究发现葛根素可能通过调控 AMPK-mTOR-Ulk1 信号通路抑制自噬的过度发生,从而减轻大鼠脑缺血再灌注损伤。

王少华等^[14]的研究表明葛根素可对抗酒精的毒性作用,抑制酒精诱导骨髓基质细胞的成脂分化,维持其成骨分化,预防小鼠酒精性股骨头缺血性坏死的发生。Zhang 等^[15]的研究证实葛根素可促进破骨细胞自噬,促进体外大鼠成骨细胞的增殖和分化,可预防骨质疏松^[16]。汪瑜等^[17]发现葛根素联合阿托伐他汀用药可抑制 SANFH 中的 Hedgehog 信号通路,促进骨细胞增殖及骨形成,促进股骨头坏死区的修复。曾锁林等^[18]的研究也表明,葛根素可升高 SANFH 大鼠血清中促进血管新生活性因子(如 VEGF 和 NO)水平,促进坏死部位新骨生成。但葛根素的自噬调控作用与 SANFH,特别葛根素对 SANFH 血管内皮细胞自噬调控的影响,既往研究尚无相关报道。

在本实验中,我们以自噬激活剂雷帕霉素^[19]作为参照,实验分组为对照组、模型组、葛根素干预组、雷帕霉素干预组,发现与模型组对比,血管内皮细胞损伤标记物 6-keto-PGF1a 的表达降低($P < 0.05$)(见图 2),AMPK、ULK1、Beclin1、LC3 表达增高($P < 0.05$),mTOR、P62 表达降低($P < 0.05$)(见图 3~8)。我们推测葛根素和雷帕霉素类似,发挥了激活自噬的作用,减轻了激素对于 VEC 的损伤,影响了 VEC 自噬相关蛋白 AMPK、mTOR、ULK1、LC3、Beclin1、P62 的表达。

综上所述,通过本次研究我们推测作为自噬活性药物的葛根素,可能是通过 AMPK-mTOR-ULK1 信号通路重新激活了 VEC 自噬,逆转了激素对 VEC 自噬的抑制作用,起到了延缓或修复股骨头缺血坏死的作用。但葛根素干预的最佳剂量、疗程以及葛根素是否还通过其他的信号通路调控自噬等问题仍需要进一步探讨。

参考文献

- [1]关飞,毛碧峰. 465 例非创伤性股骨头坏死发病规律回顾性研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(9):170-173
- [2]张宏健,张国梁,张伟,等. HCD 和 CD 不同减压通道治疗股骨头坏死的生物力学研究[J]. 内蒙古医科大学学报,2021,43(5):500-503+507
- [3]陈俊名,刘又文,何沛霖,等. 激素性股骨头坏死中细胞自

噬的作用[J]. 中国老年学杂志,2021,41(23):5430-5434

- [4]Li M, Gao P, Zhang J. Crosstalk between autophagy and apoptosis: potential and emerging therapeutic targets for cardiac diseases[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17: 332-337
- [5]Viry E, Baginska J, Berchem G, et al. Autophagic degradation of GZMB/granzyme B: a new mechanism of hypoxic tumor cell escape from natural killer cell-mediated lysis[J]. Autophagy, 2014, 10(1):173-175
- [6]Zhao ZQ, Bai R, Liu WL, et al. Role of oxidative DNA damage of bone marrow hematopoietic cells in steroid-induced avascular necrosis of femoral head[J]. Genet Mol Res, 2016, 15(1): e15017706
- [7]Zhang Y, Yin J, Ding H, et al. Vitamin K2 ameliorates damage of blood vessels by glucocorticoid: a potential mechanism for its protective effects in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in a rat model[J]. Int J Biol Sci, 2016, 12(7):776-785
- [8]曾祥伟,冯倩,张莹莹,等. 葛根素对炎症相关疾病研究进展[J]. 中国药理学通报,2018,34(1):8-11
- [9]杨勇晖,陈平洋. 葛根素防治骨质疏松的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(3):376-378
- [10]刘北. 葛根素通过 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬发挥对心肌肥厚的保护作用[D]. 广州:南方医科大学,2016
- [11]Wang XC, Wang X, Li QL. Effect of chaperone-mediated autophagy in MPP(+)-induced SH-SY5Y cells and interventional effect of puerarin[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2014, 39(1):106-112
- [12]Noh BK, Lee JK, Jun HJ, et al. Restoration of autophagy by puerarin in ethanol-treated hepatocytes via the activation of AMP-activated protein kinase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 414(2):361-366
- [13]黄亚光,王金凤,杜利鹏,等. 葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究[J]. 中草药,2019,50(13):3127-3133
- [14]王少华,王义生. 酒精性股骨头坏死的发病机理与防治研究新进展[J]. 中国骨与关节外科,2011,4(1):60-64
- [15]Zhang G, Wang Y, Tang G, et al. Puerarin inhibits the osteoclastogenesis by inhibiting RANKL-dependent and -independent autophagic responses[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1):269-270
- [16]Li K, Qin R, Shao JL, et al. Preventive effect and mechanism of puerarin on rat models of disuse osteoporosis[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2019, 44(3):535-540
- [17]汪瑜,熊德建,罗梅懿,等. 葛根素联合阿托伐他汀用药对激素性股骨头缺血性坏死 Hedgehog 信号通路的影响[J]. 四川医学,2019,40(6):552-557
- [18]曾锁林,施能兵,刘异. 葛根素对激素性股骨头坏死大鼠骨组织及 PI3K/Akt 信号转导通路的影响[J]. 蚌埠医学院学报,2019,44(11):1441-1444
- [19]Kuzman JA, Connell TD, Gerdes AM. Rapamycin prevents thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy[J]. Endocrinology, 2007, 148(7):3477-3484