

● 实验研究 ●

月华丸(胶囊)对耐多药结核菌感染自噬相关蛋白 LC3 的影响

刘婷婷¹, 欧阳建军¹, 伍参荣¹, 王 茜¹, 陈国茜², 宁尚圣¹

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208;

2. 广州中医药大学, 广东 广州, 510403)

[摘要] 目的: 观察月华丸(胶囊)对结核分枝杆菌感染巨噬细胞自噬的影响, 探寻其抗结核分枝杆菌的药效药理作用及其机制。方法: 以月华丸(胶囊)含药血清干预感染结核分枝杆菌小鼠的单核巨噬细胞(RAW264.7), 实验共分为5组: 阴性对照组、10%月华丸(胶囊)含药血清组、自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)+月华丸(胶囊)含药血清组、自噬诱导剂雷帕霉素(Rep)组, 另设未被感染的细胞为正常组。采用免疫荧光染色法检测LC3。结果: 阴性对照组细胞胞浆中未见LC3蛋白颗粒。与阴性对照组比较, 3-MA+月华丸(胶囊)含药血清组细胞胞浆中可见少量LC3蛋白颗粒, 10%月华丸(胶囊)含药血清组及Rep组细胞胞浆LC3蛋白颗粒均明显增多, 3-MA+月华丸(胶囊)含药血清组多于10%月华丸(胶囊)含药血清组。结论: 月华丸(胶囊)含药血清能诱导被耐多药结核菌感染巨噬细胞自噬。

[关键词] 月华丸(胶囊); 耐多药结核菌; LC3; 免疫荧光染色法; 实验研究

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A DOI: 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.03.061

Effect of Yuehua pills(capsules) on the autophagy-related protein microtubule-associated protein 1 light chain 3 in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis infectionLIU tingting¹, OUYANG Jianjun¹, WU Canrong¹, WANG Qian¹, CHEN Guoqian², NING Shangsheng¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510403, Guangdong, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Yuehua pills(capsules) on the autophagy of macrophages in Mycobacterium tuberculosis infection, as well as the pharmacological action of Yuehua pills(capsules) against Mycobacterium tuberculosis and related mechanism. Methods: RAW264.7 mononuclear macrophages from mice with Mycobacterium tuberculosis infection were treated with serum containing Yuehua pills(capsules). The experiment was divided into negative control group, serum containing 10% Yuehua pills(capsules) group, autophagy inhibitor 3-methyladenine(3-MA) + serum containing Yuehua pills(capsules) group, and autophagy inducer rapamycin group, and the macrophages without infection were selected as normal group. Immunofluorescent staining was used to measure the level of microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3). Results: LC3 protein particles were not observed in the cytoplasm in the negative control group. Compared with the negative control group, the 3-MA + serum containing Yuehua pills(capsules) group had a small number of LC3 protein particles in the cytoplasm, and the serum containing 10% Yuehua pills(capsules) group and the rapamycin group had a significant increase in LC3 protein particles in the cytoplasm; the 3-MA + serum containing Yuehua pills(capsules) group had a higher number of LC3 protein particles than the serum containing 10% Yuehua pills(capsules) group. Conclusion: Yuehua pills(capsules) can induce the autophagy of macrophages with Mycobacterium tuberculosis infection.

[Key words] Yuehua pill(capsule); multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis; microtubule-associated protein 1 light chain 3; immunofluorescent staining; experimental study

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81470192); 湖南省教育厅科学研究重点项目(编号: 13A065); 湖南省重点学科开发基金(编号: 4982-0009005)

第一作者: 刘婷婷, 女, 2016级硕士研究生, 研究方向: 经方名方治疗疑难病机制研究

通讯作者: 欧阳建军, 女, 医学硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 经方名方配伍及其作用机制研究, E-mail: 1035186999@qq.com

结核病(tuberculosis, TB)作为单一病因传染病中病死率最高的疾病,一直是威胁人类健康的重要公共卫生问题^[1]。耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)的定义为:由至少对利福平和异烟肼两个关键一线抗结核药物同时耐药的结核分枝杆菌导致,是一种严重危及生命的慢性传染性疾病,具有治疗失败率和病死率更高的特点^[2-3]。细胞自噬又被称为Ⅱ型细胞程序性死亡,主要功能是将胞质中一些损坏的细胞器通过溶酶体途径降解,实现能量的再循环,以维持细胞自身的稳定^[4]。近年来,中医药抗结核的作用不可忽视,特别是针对耐多药结核病的治疗有明显的优势。本课题研究传统名方月华丸对耐多药结核菌感染自噬相关蛋白LC3的影响,以期为中医药治疗耐多药结核病提供新的切入点。

1 实验材料

1.1 细胞系、菌株 小鼠巨噬细胞(RAW264.7细胞)购于中南大学湘雅医学院医学实验细胞中心。耐多药结核菌(MDR-TB)由湖南省胸科医院提供,编号:478,于湖南中医药大学病原免疫实验室保存。

1.2 动物 健康SD大鼠,清洁级,雌雄各半,体质量(200±20)g,由湖南中医药大学实验动物中心提供,合格证号:43004700004879。

1.3 主要试剂 月华胶囊中药饮片均从湖南中医药大学第一附属医院药房一次性购回;胎牛血清、高糖DMEM培养基均购于sigma公司;Middlebrook 7H9肉汤基础、Middlebrook OADC增菌液购自青海海博生物技术有限公司;自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)、雷帕霉素(Rep)购自美国Santa Cruz;兔抗鼠LC3B单克隆抗体(Anti-LC3B)、TR-ITC标记羊抗兔二抗均购自Santa Cruz公司。

2 实验方法

2.1 月华丸(胶囊)含药血清制备

2.1.1 月华丸来源 月华丸出自清代名医程钟龄的《医学心悟·虚劳》,原方由天冬、麦冬、生地黄、熟地黄、山药、百部、沙参、川贝母、真阿胶各一两,茯苓、獭肝、广三七各五钱,白菊花二两、桑叶二两熬膏,将阿胶化入膏内,和药炼蜜为丸。

2.1.2 月华胶囊制作 考虑獭肝药源问题,月华胶囊将月华丸原方中獭肝改为白及。月华胶囊由天冬、麦冬、熟地黄、生地黄、山药、百部、沙参、川贝母、阿胶、茯苓、白及、广三七、白菊花、桑叶(比例:2:2:2:2:2:2:2:2:1:1:1:4:4)组成。药物从湖南中医药大学第一附属医院中药房一次性购回,将中药饮片除阿胶外洗净,浸泡12h,加水煎煮3次,第1次3h,第2次2h,第3次1h,合并煎液,滤过,于水浴锅浓缩至药液用玻璃棒挑起呈“挂旗状”,再将隔水炖化好的阿胶放入药液中混匀,继续搅拌浓缩,然后持续冷凝干燥至每1g相当于含生药2.43g,4℃储存备用。

2.1.3 月华胶囊含药血清制备 取实验大鼠,以人与大鼠间按体表面积换算的等效剂量为大鼠的用药量,即12.05g/(kg·d)。每天灌胃月华胶囊1次,连续7d,末次灌胃后60min处死大鼠,经腹主动脉取血5ml,血液在3000r/min条

件下离心10min,取上清液,做成含药血清。

2.2 细菌培养 于生物安全柜中将耐多药结核菌接种于Middlebrook 7H9液体培养基,接种后的培养瓶于微生物快速培养监测系统内行快速液体培养,取3周培养物,用0.05% Tween80/PBS充分吹散成菌悬液,用细菌浓度比浊仪测定其浊度,配制成 1×10^7 CFU/ml的菌悬液,备用。

2.3 细胞培养 小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)按常规方法用含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,按照 3×10^5 个/孔的密度接种到含有细胞爬片的6孔培养板中,培养过夜。37℃、5% CO₂环境中孵育12h,

2.4 分组 倒置显微镜下观察细胞生长约80%融合时进行分组:阴性对照组、10%月华丸(胶囊)含药血清组、自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤+月华丸(胶囊)含药血清组、阳性对照雷帕霉素(Rep)组、正常组。以上5组均放置于培养箱中(37℃、5% CO₂)。

2.5 给药与感染 将分组后各组RAW264.7细胞冲洗后,再分别进行给药。月华丸(胶囊)含药血清组:每孔加入1ml含10%月华胶囊含药血清的DMEM,作用8h;3-MA+月华丸(胶囊)含药血清组:每孔加浓度为10μM的3-MA和1ml含10%月华胶囊含药血清的DMEM,作用8h;阴性对照组:加不含抗生素的10%胎牛血清DMEM;Rep组:作用4h;正常组:加用含10%胎牛血清DMEM。置于37℃、5% CO₂环境中培养,按药物作用的时间,每孔分别加入 1×10^7 /ml MDR-TB感染4h后,PBS洗细胞4次,清除未被细胞吞噬的MDR-TB,加入不含抗生素DMEM培养基继续于37℃、5% CO₂环境中培养4h。

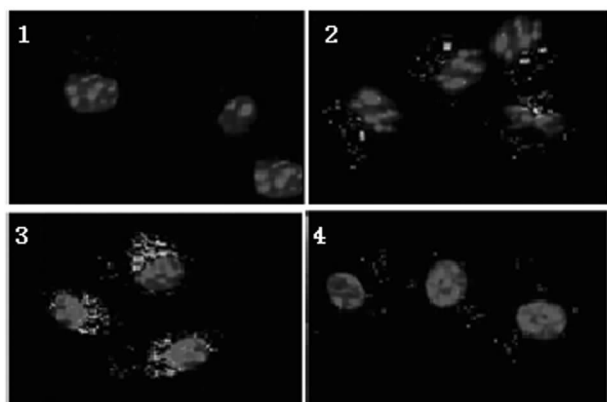
2.6 指标检测 取以上5组,每孔加入600μl封闭液,室温1h,去封闭液,用PBS洗涤后,每孔加入600μl稀释好的一抗,4℃过夜。第2天回收一抗,PBS洗涤后,加入600μl稀释好的荧光二抗,避光室温1h,回收二抗,冲洗后加入DAPI作用5min,加抗荧光淬灭剂,封片,激光共聚焦取图。

3 实验结果

阴性对照组细胞胞浆中未见LC3蛋白颗粒;与阴性对照组比较,3-MA+月华丸(胶囊)含药血清组细胞胞浆中可见少量LC3蛋白颗粒,10%月华丸(胶囊)含药血清组及Rep组细胞胞浆LC3蛋白颗粒均明显增多,3-MA+月华丸(胶囊)含药血清组多于10%月华丸(胶囊)含药血清组。(见图1)

4 讨论

自噬是细胞对持续性内外刺激的非损伤性应答反应,以维持细胞结构、代谢和功能的平衡^[5]。自噬在细胞防御中的作用之一就是清除入侵的病原体,并且能够保护机体免受细菌的侵袭^[6]。文献报道,激活自噬可有效杀灭结核菌^[7]。酵母ATG8在哺乳动物中的同源体微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1light chain 3, LC3)是第1个被发现的自噬体标志蛋白,参与自噬体隔离膜的形成,被认为是判断自噬形成的金标准^[8]。目前已经证实人类LC3有3种亚型,即LC3A、LC3B和LC3C,其中LC3B与



注:1—阴性对照组;2—10%月华丸(胶囊)含药血清组;
3—Rep组;4—3-MA+月华丸(胶囊)含药血清组

图1 各组免疫荧光染色检测结果

自噬发生相关^[9]。LC3B的含量与自噬发生程度呈正相关,故常用于衡量自噬活性^[10]。月华丸为治疗癆瘵的传统名方,其效用兼全,且独具杀癆虫之功,为治结核特效方^[11]。Wang J等^[12]报道,雷帕霉素是Ser/Thr酶受体的抑制剂,Ser/Thr酶能依据营养状况调节细胞的生长,雷帕霉素抑制其作用可以诱导自噬。3-甲基腺嘌呤是一种常用的细胞自噬抑制剂,可以通过抑制三型磷脂酰肌醇激酶3而抑制自噬体的形成^[13]。本研究采用免疫荧光染色方法检测LC3B蛋白的表达,使得这些结构呈现绿色亮点,并根据绿色亮点来反应自噬体蛋白的多少。经过Rep处理RAW264.7细胞,倒置显微镜下可见Rep组细胞胞浆LC3蛋白颗粒明显增多,以该组细胞模型为基础与3-MA+月华丸(胶囊)含药血清组、10%月华丸(胶囊)含药血清组进行比较,结果显示月华丸(胶囊)含药血清能促进被结核分枝杆菌感染的RAW264.7巨噬细胞自噬。

自噬与天然免疫反应相互调节,共同组成了机体抵御微生物感染的第一道防线^[14]。自噬是巨噬细胞执行免疫防御的重要手段,巨噬细胞通过自噬可杀灭MDR-TB^[15]。针对自噬可能是一个战略性对抗耐多药结核病的新疗法,揭示自噬相关蛋白的临床意义,明确月华丸可自噬合理发生,有望为耐多药结核病开辟新的治疗方法和治疗途径。

参考文献

- [1] 程枫,杭亚平,熊国亮.耐多药结核分枝杆菌的研究进展[J].微生物学杂志,2018,38(1):123-128.
- [2] Aziz MA,Wright A,Laszlo A,et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance(the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance):an updated analysis[J]. Lancet,2006,368(9553):2142-2154.
- [3] 江丽娜,傅衍勇.耐多药结核病的诊断方法及其新型药物概述[J].中国慢性病预防与控制,2016,24(6):470-473.
- [4] 王明洋,冯璐,范姝婕,等.复方脑脂节苷注射液激活线粒体自噬改善脑缺血再灌注损伤[J].中国康复理论与实践,2016,22(7):750-753.
- [5] Meijer AJ,Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells[J]. Int J Biochem Cell Biol,2004,36(12):2445-2462.

- [6] 张松龄,唐宏.自体吞噬——II型程序性死亡[J].生物化学与生物物理进展,2005,32(11):12-16.
- [7] Gutierrez MG,M aster SS,Singh SB,et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages[J]. Cell,2004,119(6):753-766.
- [8] Mukhopadhyay S,Panda PK,Sinha N,et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet? [J]. Apoptosis,2014,19(4):555-566.
- [9] 朱晓骏,孙学华,刘顺庆,等.人自噬相关基因LC3B真核表达载体的构建及鉴定[J].蚌埠医学院学报,2012,37(2):145-147,150.
- [10] Ladoire S,Penault-Llorca F,Senovilla L,et al. Combined evaluation of LC3B puncta and HMGB1 expression predicts residual risk of relapse after adjuvant chemotherapy in breast cancer[J]. Autophagy,2015,11(10):1878.
- [11] 许济群,王绵之.方剂学[M].北京:人民卫生出版社,1995.
- [12] Wang J,Yang K,Zhou L,et al. MicroRNA-155 promotes autophagy to eliminate intracellular mycobacteria by targeting Rheb [J]. PLoS Pathog,2013,9(10):e1003697.
- [13] Wu YT,Tan HL,Shui G,et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on Class I and III phosphoinositide 3-kinase [J]. J Biol Chem,2010,285(14):10850-10861.
- [14] 王晴,闫克芹,赵树涛,等.自噬在抵御微生物免疫反应中的功能[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2015,24(3):275-280.
- [15] 胡少婷,李升锦,黄秦.髓样分化因子88抑制剂ST2825对重组耻垢分枝杆菌感染THP-1细胞自噬的影响[J].中国医科大学学报,2015,44(6):562-564,572.

(收稿日期:2018-09-10)

晨斋枸杞一杯羹

中医学认为,枸杞性味甘、平,入肝、肾、肺经,有滋补肝肾、生精养血、明目安神、滋阴润肺、化痰止咳之功,适用于肝肾阴虚、头晕目眩、腰膝酸软等病症。枸杞具有祛疾延龄的作用,已入选国家卫健委确定的“可用于保健食品的物品名单”,为药食两用食物。根据枸杞的特点,现介绍几种简便效佳的食用方法。泡服法:把枸杞择净,放在茶杯内,用开水冲泡后当茶饮,成人用量10~15g/d。煎煮法:将枸杞择净,放入罐内,加水煎煮,煎煮3~4次。把所有煎液混合,分多次口服。泡酒法:将枸杞择净,放入白酒瓶中密封浸泡,3d后,白酒变成红色时即可饮服,也可适量加入冰糖或蜂蜜调味。煮粥法:将枸杞10~30g水煎后与大米煮粥服用,或待粥熟后调入枸杞,再煮一二沸,1次/d。入膳法:将枸杞水煎取汁,与食物做膳,或与食物同炖服食。嚼食法:将枸杞10~30g择净,每天睡前嚼食。蜜渍法:枸杞、蜂蜜各适量,将枸杞放入瓶中,用蜂蜜调匀,密封浸渍3d即成。每次1汤匙,睡前嚼食。(http://www.cntcm.com.cn/2019-02/25/content_57137.htm)