

月华胶囊对耐多药结核分支杆菌感染自噬的影响

陈国茜^{1,2}, 伍参荣², 尹周安², 王茜², 邹俊驹³, 刘婷婷², 曾梅艳², 欧阳建军^{2*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410007;
3. 成都中医药大学, 成都 610075)

[摘要] **目的:** 以月华胶囊含药血清对耐多药结核分支杆菌感染小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)进行干预,探讨其对耐多药结核分支杆菌感染巨噬细胞自噬的作用及其机制。**方法:** 低温冷冻干燥法制备月华胶囊,大鼠按 $3.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药 7 d,制备月华胶囊含药血清。体外培养 RAW264.7,耐多药结核分子杆菌。以细胞增殖毒性检测试剂盒(CCK-8)检测含药血清对 RAW264.7 的增殖能力并选定其有效浓度。细胞分为模型组(10% 胎牛血清);月华胶囊含药血清组(10% 月华胶囊);自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA) + 月华胶囊含药血清组($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3-MA + 10% 月华胶囊含药血清);雷帕霉素(Rap)组($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Rap + 10% 胎牛血清);正常组(10% 胎牛血清)。除正常组外,各组细胞培养 24 h 后,按细胞-细菌 1:10 感染 4 h。透射电镜观察细胞自噬体的出现和形成;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中 I 型微管相关蛋白轻链 3(LC-3 I), II 型微管相关蛋白轻链 3/I 型微管相关蛋白 1 轻链 3(LC-3 II/LC-3 I),Beclin-1 蛋白的表达;间接免疫荧光染色法观察细胞中 LC3B 荧光颗粒、斑点及亮度;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞中 LC3,Beclin-1 mRNA 的表达。**结果:** 与正常组比较,模型组细胞未见自噬体,细胞中 LC-3 II,LC-3 II/LC-3 I,Beclin-1 蛋白及 LC3,Beclin-1 mRNA 的相对表达量均无显著变化,细胞无荧光颗粒、斑点,无荧光亮度。与模型组比较,月华胶囊含药血清组及 Rap 组细胞,均可观察到自噬体的形成,细胞 LC-3 II,LC-3 II/LC-3 I,Beclin-1 蛋白及 LC3,Beclin-1 mRNA 的相对表达量值均明显升高($P < 0.05$),月华胶囊含药血清组细胞荧光颗粒和荧光斑点明显增多,Rap 组细胞荧光颗粒和荧光斑点增多非常明显,荧光闪亮,可判定细胞荧光呈现为阳性;自噬抑制剂 3-MA + 月华胶囊含药血清组细胞未见自噬体,细胞中 LC-3 II,LC-3 II/LC-3 I,Beclin-1 蛋白及 LC3,Beclin-1 mRNA 的相对表达量值均无明显升高。**结论:** 月华胶囊含药血清能使耐多药结核分支杆菌感染细胞产生自噬而发挥抗结核的免疫效应,其机制是通过调控自噬相关蛋白 LC3,Beclin-1 蛋白及其 mRNA 的表达水平,促使 LC3-I 趋向 LC3-II 的转化加快而实现的。

[关键词] 月华胶囊; 含药血清; 耐多药结核分支杆菌; 巨噬细胞; 自噬

[中图分类号] R2-0;R289;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)02-0072-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20200241

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191009.1317.006.html>

[网络出版时间] 2019-10-09 16:30

Effect of Yuehua Capsule on Autophagy of Macrophage Infected with Multi-drug Resistant Mycobacterium Tuberculosis

CHEN Guo-qian^{1,2}, WU Shen-rong², YIN Zhou-an², WANG Qian², ZOU Jun-ju³,
LIU Ting-ting², ZENG Mei-yan², OUYANG Jian-jun^{2*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** This study aims to explore the effect and mechanism of Yuehua capsule serum for autophagy of macrophages infected with multi-drug resistant mycobacterium tuberculosis. **Method:** The rats were

[收稿日期] 20190917(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81470192);湖南省教育厅科学研究重点项目(13A065)

[第一作者] 陈国茜,在读博士,从事中医药防治慢性病的研究,E-mail:chenguoqian1991@163.com

[通信作者] * 欧阳建军,硕士,教授,硕士生导师,从事方剂对难治性结核疗效及其机制研究,E-mail:13469072760@163.com

undertaken intragastric gavage with Yuehua capsule by $3.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ once a day which was produced through low temperature condensation drying method. After 7 days, blood of abdominal aorta of rats was collected to prepare Yuehua capsule serum. RAW264.7 and multidrug resistant tuberculosis were cultured *in vitro*. According to cell counting kit-8 (CCK-8), 10% drug-containing serum was considered as the effective concentration. The cultured cells were divided into four groups: model groups (10% fetal bovine serum). Yuehua capsule serum (10% Yuehua capsule serum). Autophagy inhibitor group + 3-MA + Yuehua capsule medicated serum (3-MA + 10% Yuehua capsule serum). Rapamycin (Rap) positive control group ($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rap + 10% Yuehua capsule serum). Except for the normal group, the cells of each group were cultured for 24 h and infected for 4 h according to cell-bacteria 1 : 10. Testing index: observation of autophagosomes under transmission electron microscope, the test of expression of microtubule-associated protein light chain-3 II (LC-3 II), microtubule-associated protein LC3-II/microtubule-associated protein light chain 3-I (LC3-I) and Beclin-1 with Western blot, indirect immunofluorescence staining for LC3B, and mRNA of Beclin-1 as well as LC3 with real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Compared with normal group, model group did not see autophagy body cells, cells in the LC-3 II, LC-3 II/LC-3 I, Beclin-1 protein and LC3, Beclin-1 mRNA gene expression level had no significant change, the cells without fluorescent particles, spots, no fluorescence intensity. Compared with model group, Yuehua capsules serum group and Rap positive control group can be observed the formation of phage, mRNA and protein expression level of LC-3 II, LC-3 II/LC-3 I, Beclin-1 and LC3, Beclin-1 were significantly increased ($P < 0.05$). Autophagy inhibitor group + 3-MA + Yuehua capsule medicated serum did not see autophagy, the mRNA and protein expression level of LC-3 II, LC-3 II/LC-3 I, Beclin-1 and LC3, Beclin-1 were no significantly increased. **Conclusion:** Yuehua capsule medicated serum could induce autophagy of macrophages of RAW264.7. The mechanism was probably accomplished through regulating the expression level of autophagy key protein LC3, autophagosome mature protein Beclin-1 and relevant gene, meanwhile the conversion of LC3-I to LC3-II was accelerated.

[**Key words**] Yuehua capsules; medicated serum; multi-drug resistant mycobacterium tuberculosis; macrophage; autophagy

由结核分枝杆菌 (MTB) 感染的结核病 (TB) 仍然是危害人类健康的主要传染性疾病之一^[1]。耐药结核 (MDR-TB) 一直是全球结核病控制的难点^[2]。2017 年全球新发 MDR-TB 46 万例, 我国是全球 30 个 MDR-TB 高负担国家之一, MDR-TB 的治疗非常困难, 成功率仅为 50% 左右^[1,3], 因此, 抗结核新药的研制迫在眉睫。抗结核化学药物往往靶向 MTB 本身, 很容易出现耐药问题^[4-5]。加上肝损伤的发生率高, 贻误抗结核治疗致病情恶化而死亡, 或发生肝衰竭死亡的严重后果^[6]。目前, MDR-TB 的治疗陷入困境, 面临严重的挑战。细胞自噬 (Autophagy) 已成为研究的热点^[7]。巨噬细胞自噬在 MTB 感染中是一种重要的免疫调控机制^[8], 在宿主防御 TB 感染过程中发挥重要的作用^[9], 促进自噬可以产生强效杀灭 MTB 的效应, 诱导自噬可作为治疗 TB 的有效手段^[10]。这种以调节免疫应答的宿主靶向治疗方法^[11], 可以破解药物产生细菌耐药的难题^[5]。对于 MDR-TB, 能够诱导自噬的免疫治疗

提供了一种新的解决的方法。

月华胶囊源于月华丸, 月华丸是清代医家程钟龄所制, 为中医抗痨名方。由天冬、麦冬、熟地黄、生地黄、山药、百部、沙参、川贝母、阿胶各一两, 茯苓、獭肝、三七粉各五钱, 白菊花、霜桑叶各二两组成; 功用滋阴润肺, 宁嗽杀虫; 主治肺肾阴虚之由癆瘵久嗽及久咳或痰中带血而致。研究发现, 月华胶囊体外对 MDR-TB 有抑菌效力^[12]; 对 MDR-TB 鼠, 能调控 T 淋巴细胞亚群 CD4^+ , $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$, 及其 γ -干扰素 (IFN- γ), 白细胞介素 (IL)-2, IL-10 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α 的失衡^[13]; 对异烟肼、利福平合用所致的大鼠肝损伤具有保护作用^[14]。本文研究月华胶囊对 MDR-TB 巨噬细胞自噬的影响及其机制, 为月华胶囊治疗 MDR-TB 的研发利用提供依据和支持。

1 材料

1.1 动物、细胞及细菌株 12 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 10) g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK (湘) 2016-0004。

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7, 源于美国生物资源中心(ATCC), 由中南大学湘雅医学院医学实验细胞中心提供。耐多药结核分支杆菌由原湖南省结核病防治所提供, 菌型鉴定为人型, 编号 478, 药敏培养为对异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇、利福喷丁多种化疗药产生耐药, 保存于湖南中医药大学病原微生物和免疫实验室。

1.2 药物 月华胶囊与月华丸组成一致, 由天冬、麦冬、熟地黄、生地黄、山药、百部、沙参、川贝母、阿胶、茯苓、三七粉、白及、白菊花、霜桑叶组成, 依原著用量, 按 2:2:2:2:2:2:2:2:1:1:1:4:4 比例配伍。所有中药饮片均购自湖南中医药大学附属第一医院中药房同一批次, 并经湖南中医药大学中药教研室吴红娟教授做生药材鉴定。将中药饮片除阿胶外洗净, 浸泡 12 h, 加水煎煮 3 次, 中药与水的比例及煎煮的时间分别为第 1 次 1:8, 煎煮 3 h, 在煎煮完成前 20 min 时加入菊花、桑叶; 第 2 次 1:6, 煎煮 2 h; 第 3 次 1:4, 煎煮 1 h。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”, 再加入已隔水烊化好的阿胶, 搅拌均匀, 以 -20 ℃ 低温冷冻干燥至固化浸膏, 4 ℃ 储存备用, 粉碎入胶囊, 即为月华胶囊。3-甲基腺嘌呤(3-MA), 雷帕霉素(Rap)(美国 Sigma 公司, 批号分别为 IPA1009-0010MG, IPA1021-0100MG)。

1.3 试剂 无酚红高糖完全培养基(DMEM)培养液, 胰蛋白酶, 胎牛血清(美国 Gibco 公司, 批号分别为 21063-029, 25200-056, 16140-0890); 细胞增殖及毒性检测试剂盒-8(CCK-8), 免疫球蛋白(Ig)G(碧云天生物科技有限公司, 批号分别为 C0038, A0562); BCA 蛋白定量分析试剂盒, cDNA 逆转录试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 P0012, TQ2501-02); RIPA 细胞裂解液(上海奥威生物科技有限公司, 批号 P0013); Middlebrook 7H9 液体培养基, Middlebrook OADC 增菌液(美国 BD 公司, 批号分别为 271310, 212351); B 型微管相关蛋白轻链 3(LC3-II)一抗(北京百奥莱博科技有限公司, 批号 YT816); 兔抗鼠 LC3-I 单克隆抗体, 兔抗鼠 Beclin 1 单克隆抗体, 鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体, 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 公司, 批号分别为 ABM-0004, ABM-0003, ABM-0001, ABP114/103); DAB 显色试剂盒(上海贝博生物科技公司, 批号 BB-3503BestBio); trizol(上海联硕生物科技公司, 批号 15596026)。

1.4 仪器 MC0-18M 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司); BacT/ALERT MP120 型微生物快速培养监测系统(法国梅里埃公司); JEOL-1230 型透射电镜(日本电子株式会社); BX51 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Synergy 4 型全自动型酶联免疫检测仪, ELX800 型多功能酶标仪, CFX96 型荧光定量 PCR 仪, Mini-Protean TetraSDS-PAGE 型垂直电泳及转膜设备(美国 BioTek 公司); NanoDrop2000 型微量分光光度计(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 月华胶囊含药血清的制备 将实验用大鼠共 12 只, 先按体质量分层, 再按随机数字表法分为正常组和月华胶囊组, 每组 6 只。月华胶囊组大鼠, 按人与大鼠体表面积折算得临床等效剂量, 以 3.02 g·kg⁻¹ 灌胃给药; 正常组给予等溶剂量的蒸馏水。每天 1 次, 连续灌胃 7 d。大鼠第 7 天灌胃后 1 h, 无菌条件下两组动物分别腹主动脉取血, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 取血清, 同组血清混合置于离心管中, 0.22 μ m 滤器过滤, 分装, -20 ℃ 保存备用。

2.2 细胞培养 将 RAW264.7 细胞按常规复苏, 然后将混匀的细胞液移至装有 10% 胎牛血清 DMEM 培养基的细胞培养瓶中, 置 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养; 24 h 倒置式生物显微镜下观察细胞的贴壁状况, 待细胞生长融合至 80% 左右, 即传代备用。

2.3 含药血清有效浓度的选择 将所取得的月华胶囊含药血清、正常组血清, 用无酚红的高糖 DMEM 培养基分别稀释为 5%, 10%, 20%, 40% 的不同体积分数浓度组, 96 孔培养板, 分别加入各孔 RAW264.7 细胞中; 并设无细胞空白组。每组 5 个复孔, 重复 3 次。37 ℃ 5% CO₂ 孵育 24 h 后, 每孔加入 CCK-8 10 μ L, 37 ℃ 5% CO₂ 继续孵育 3 h 后, 于酶标仪 450 nm 处测定吸光度 A, 计算细胞增殖率。

2.4 菌悬液制备 在生物安全柜中, 将 MTB 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 \times 10⁵ 个/mL 的菌悬液, 备用。

2.5 细胞分组、感染及干预 将 RAW264.7 细胞调整细胞密度为 1 \times 10⁷ 个/mL, 并随机分为 5 组, 每孔 2 mL 铺于 24 孔板中, 每组 5 复孔, 重复 3 次。分别为模型组: 每孔加不含抗生素的 10% 胎牛血清 DMEM 培养液, 培养 24 h; 月华胶囊含药血清组: 每

孔以终体积分数 10% 月华胶囊含药血清的 DMEM 培养液(不加抗生素与胎牛血清)培养,作用 24 h; 自噬抑制剂 3-MA + 月华胶囊含药血清组:每孔加入配成终质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3-MA 和终体积分数 10% 月华胶囊含药血清的 DMEM(不加抗生素与胎牛血清)培养液培养,作用 24 h; Rap 组:每孔加入配成终质量浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rap 和终质量浓度 10% 胎牛血清 DMEM 培养液培养,作用 24 h。以上各组均置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 环境细胞培养箱中培养,按各组作用时间满足后,每组每孔分别按照细胞:细菌个数比为 1:10 的比例加入耐多药结核分支杆菌,感染 4 h, PBS 洗细胞 4 次,清除未被细胞吞噬的耐多药结核分支杆菌,加入不含抗生素的 10% 胎牛血清 DMEM 培养液继续 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养 4 d。依法使细胞成为均匀的单细胞悬液后,收集细胞。另设正常组,含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液,培养时间同其他组。

2.6 指标检测

2.6.1 透射电镜观察自噬体 收集待测各组细胞悬液置于洁净 1.5 mL 离心管,加入冰预冷的 PBS, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 洗涤细胞 2 次;调整细胞密度 1×10^7 个/mL,再用冰预冷的 PBS 洗涤 1 次,每管细胞加入固定液(2.5% 戊二醛)1 mL, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定过夜, JEOL-1230 透射式电镜显微镜下观测。

2.6.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 LC3, Beclin-1 蛋白的表达 分别收集各组细胞,弃去培养基,用预冷的 PBS 洗涤 1 次,收集细胞于离心管 $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,于冰上裂解细胞 10 min,裂解液转入 1.5 mL 离心管, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下 $12\ 000 \times g$ 离心 5 min,取上清。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定出蛋白浓度。将每组含 $50 \text{ } \mu\text{g}$ 蛋白质标本注入加样孔电泳,依法经 SDS-PAGE 分离,以湿转法电转移至 PVDF 膜。加入 LC3 单克隆抗体(1:1 000),兔抗鼠 Beclin-1 (1:1 000), β -actin 的一抗(1:1 000),加入二抗(1:5 000)孵育,增强型 DAB 显影液进行显色反应。使用 Image J 图象分析各条带灰度值,计算 LC3-II/LC3-I 及 Beclin-1/ β -actin 的值。

2.6.3 间接免疫荧光法观察 LC3B 的荧光颗粒或斑点 将实验各组待测细胞接种到含有细胞爬片的 6 孔培养板中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 环境中孵育 12 h,细胞生长约 80% 融合时,弃掉培养液,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,各孔分别先后依法加入多聚甲醛固定, $5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ Triton X-100 通透后,采用 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 封闭 1 h,去封闭液,洗涤后每孔加入 LC3B 一抗

(1:400), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。回收一抗,洗涤后,加入二抗(1:500),避光室温 1 h,回收二抗,洗涤。最后加入 DAPI 作用 5 min,洗涤,加抗荧光淬灭剂,封片,荧光显微镜下观察。

2.6.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 Beclin-1, LC3 mRNA 的表达 将分组的各孔培养细胞用 trizol 法提取细胞的总 RNA,以超微量分光光度计测定 RNA 浓度。按照 cDNA 逆转录试剂盒方法进行 cDNA 的合成,后加入 PCR 仪中 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 50 min, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 15 min 后终止反应。以逆转录的 cDNA 为模板,采用 Real-time PCR 反应方法,测定自噬相关基因 LC3, Beclin-1 的 mRNA 的表达,以 β -actin 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参, LC3, Beclin-1, β -actin 和 GAPDH 引物序列见表 1。PCR 反应经退火温度优化,步骤确定为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min 起始模板变性, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s 循环中模板变性, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 退火, $68 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min 延伸,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组细胞 LC3, Beclin-1 的 mRNA 表达水平。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度 /bp
LC3	上游 5'-CCACACCCAAAGTCTCTACT-3'	220
	下游 5'-CACTGCTGCTTTCCGTAACA-3'	
Beclin-1	上游 5'-ACAGTGACAGTTTGGCACA-3'	283
	下游 5'-CGGCAGCTCCTTAGATTGT-3'	
β -actin	上游 5'-TGACGGGGTACCCACACTGTGCCATCTA-3'	661
	下游 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGA-3'	
GAPDH	上游 5'-GTCTTACCACCATGGAG-3'	494
	下游 5'-CCAAGTTGTCATGGATGACC-3'	

2.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Dunnett 检验;计数资料采用完全随机设计多样本比较的秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

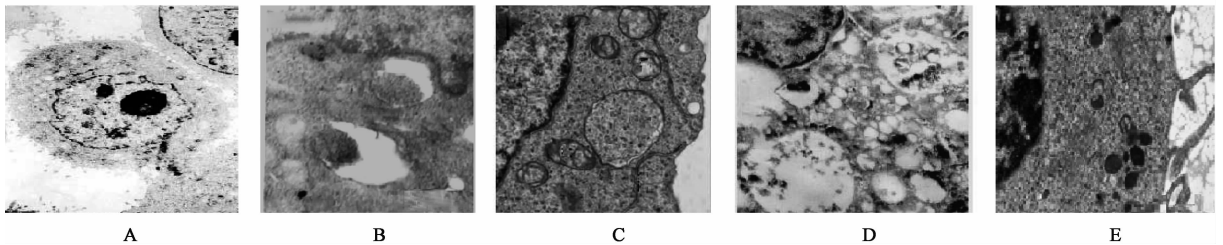
3 结果

3.1 对 RAW264.7 细胞增殖率的影响 与正常组比较,5%,10%,20%,40% 不同体积分数的月华胶囊含药血清均能使 RAW264.7 细胞增殖率有所增加,且在 5%~40% 与浓度呈正相关,无明显细胞毒性反应,其中 10%,20%,40% 浓度含药血清增殖率

明显升高 ($P < 0.05$); 月华胶囊含药血清不同体积分数组间比较, 细胞增殖率随浓度的增加而升高。考虑到血清、血药的浓度太高可能会影响到实验的客观性, 且又要与相关含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养条件中血清浓度相一致, 故选择 10% 的月华胶囊含药血清作为对 MDR-TB 感染 RAW264.7 细胞的药效干预浓度。见表 2。

3.2 对 MDR-TB 感染小鼠 RAW264.7 自噬体的影响

与正常组比较, 模型组未见有自噬体出现。与模型组比较, 10% 月华胶囊含药血清组及 Rap 组细胞中, 均可观察到自噬小体的出现和形成, 胞浆中出现闭合的双层膜的囊泡状结构, 呈杯口状或变形延伸, 包裹着线粒体、内质网等胞浆成分; 3-MA + 10% 月华胶囊含药血清组细胞, 没有发现自噬体。见图 1。



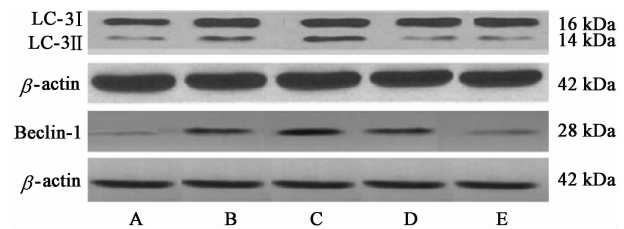
A. 正常组; B. 模型组; C. 月华胶囊含药血清组; D. 3-MA + 月华胶囊含药血清组; E. Rap 组

图 1 月华胶囊对耐药多药结核菌感染 RAW264.7 细胞自噬体的影响 (电镜, $\times 12\ 000$)

Fig. 1 Effect of Yuehua capsule on autophagosomes of RAW264.7 cells of each group (TEM, $\times 12\ 000$)

3.3 对 MDR-TB 感染 RAW264.7 细胞 LC3, Beclin-1 蛋白表达的影响

与正常组比较, 模型组细胞 LC-3 II / β -actin, LC-3 II / LC-3 I, Beclin-1 / β -actin 均无明显改变; 与模型组比较, 10% 月华胶囊含药血清组, Rap 组细胞的 LC-3 II / β -actin, LC-3 II / LC-3 I, Beclin-1 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$); 3-MA + 10% 月华胶囊含药血清组 LC-3 II, LC-3 II / LC-3 I, Beclin-1 蛋白表达均无明显增加; 与 10% 月华胶囊含药血清组比较, Rap 组 Beclin-1 / β -actin 明显增加 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 3。



A. 模型组; B. 月华胶囊含药血清组; C. Rap 组; D. 3-MA + 月华胶囊含药血清组; E. 正常组

图 2 RAW264.7 细胞 LC3, Beclin-1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of LC3 and Beclin-1 protein expression of RAW264.7 cells

表 2 月华胶囊含药血清不同体积分数对 RAW264.7 细胞增殖率的影响

Table 2 Effect of volume fraction of Yuehua capsule serum on proliferation of RAW264.7 cells

组别	体积分数 / %	$A(\bar{x} \pm s)$	增殖率 / %
正常	40	0.256 ± 0.002	-
	20	0.259 ± 0.009	-
	10	0.255 ± 0.006	-
	5	0.252 ± 0.004	-
月华胶囊含药血清	40	$0.361 \pm 0.002^{1)}$	40.58 ¹⁾
	20	$0.340 \pm 0.010^{1)}$	31.27 ¹⁾
	10	$0.280 \pm 0.007^{1)}$	9.80 ¹⁾
	5	0.254 ± 0.004	0.78

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 对 MDR-TB 感染 RAW264.7 细胞 LC3B 的影响

与正常组比较, 模型组细胞未见黄 (绿) 色荧光颗粒或斑点出现, 无荧光。与模型组比较, 10% 月华胶囊含药血清组细胞, 黄 (绿) 色荧光颗粒和荧光斑点明显增加, 荧光明亮, Rap 组细胞, 黄 (绿) 色荧光颗粒和荧光斑点增加非常明显, 荧光闪亮, 可判其细胞荧光呈现为阳性; 3-MA + 10% 月华胶囊含药血清组细胞, 未见黄 (绿) 色荧光颗粒或斑点明显增多, 极弱的可疑荧光。表明月华胶囊含药血清、自噬诱导剂 Rap 细胞浆中 LC3B 蛋白颗粒明显增加, 并进行聚集, 以斑点的形式表现出来, 斑点的数量可表示自噬体的多少。见图 3。

3.5 对 MDR-TB 感染 RAW264.7 细胞 LC3, Beclin-1 mRNA 表达的影响

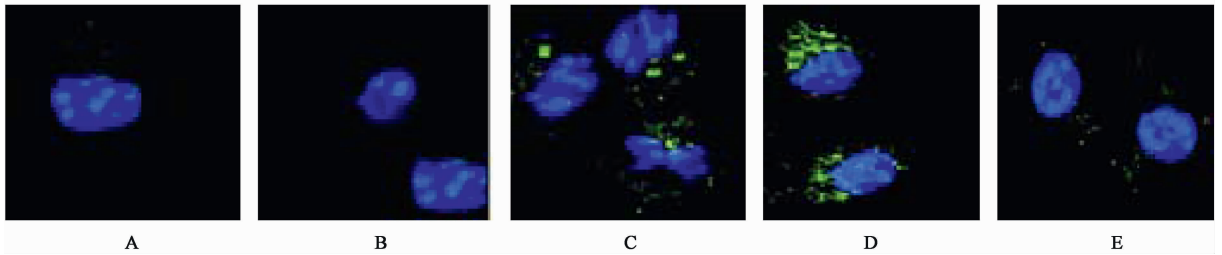
与正常组比较, 模型组细胞中 LC3, Beclin-1 mRNA 表达无明显变化; 与模型组比较, 10% 月华胶囊含药血清组, Rap 组细胞中 LC3, Beclin-1 mRNA 明显升高 ($P < 0.05$), 3-MA + 10% 月华胶囊含药血清组细胞中 LC3, Beclin-1 mRNA 无明显变化; 与月华胶囊含药血清组比较, Rap 组 Beclin-1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 月华胶囊含药血清对耐多药结核菌感染 RAW264.7 细胞 LC3, Beclin-1 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Yuehua capsule serum on expression level of LC3 and Beclin-1 in RAW264.7 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	LC-3 II / β -actin	LC-3 I / β -actin	LC-3 II / β -actin	Beclin-1 / β -actin
正常	0.90 \pm 0.02	1.51 \pm 0.04	0.59 \pm 0.03	0.93 \pm 0.08
模型	0.92 \pm 0.03	1.41 \pm 0.04	0.65 \pm 0.03	1.14 \pm 0.08
月华胶囊含药血清	1.25 \pm 0.03 ¹⁾	0.95 \pm 0.04	1.32 \pm 0.04 ¹⁾	3.19 \pm 0.10 ²⁾
Rap	1.39 \pm 0.05 ¹⁾	0.93 \pm 0.06	1.49 \pm 0.06 ¹⁾	3.87 \pm 0.14 ^{2,4)}
3-MA + 月华胶囊含药血清	1.06 \pm 0.03	1.38 \pm 0.04	0.76 \pm 0.04	1.13 \pm 0.11

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与月华胶囊含药血清组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。



A. 正常组; B. 模型组; C. 月华胶囊含药血清组; D. Rap 组; E. 3-MA + 10% 月华胶囊含药血清组

图 3 月华胶囊含药血清对耐多药结核菌感染 RAW264.7 细胞 LC3B 的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of Yuehua capsule serum on LC3B in RAW264.7 cells infected with MDR-TB in each group (IF, $\times 200$)

表 4 月华胶囊含药血清对耐多药结核菌感染 RAW264.7 细胞 LC3, Beclin-1 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Yuehua capsule serum on LC3, Beclin-1 mRNA in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	Beclin-1	LC3
正常	0.58 \pm 0.34	0.62 \pm 0.39
模型	0.74 \pm 0.50	0.79 \pm 0.54
月华胶囊含药血清	3.06 \pm 0.37 ¹⁾	3.21 \pm 0.41 ¹⁾
Rap	4.24 \pm 0.39 ^{1,2)}	3.88 \pm 0.42 ^{1,2)}
3-MA + 月华胶囊含药血清	0.92 \pm 0.54	0.89 \pm 0.47

4 讨论

自噬是一种进化上高度保守的细胞内稳态的过程,在维持细胞能量稳定、细胞分化及器官发育、炎症及免疫调节方面发挥着重要的作用^[15]。自噬可分为巨自噬、微自噬、分子伴侣介导的自噬 3 种形式,而巨自噬则指传统的细胞自噬,是最主要的自噬形式^[16]。细胞自噬分为自噬前体的形成、自噬体的形成、自噬溶酶体的形成以及自噬溶酶体的降解的系列过程,其中自噬体的形成是细胞发生自噬的标志^[17]。

自噬相关蛋白参与调节自噬起始和延伸等过程。LC3 是第一个被发现的自噬体标志蛋白,参与自噬体隔离膜的形成,是细胞自噬信号通路最为关

键的蛋白,被认为是判断自噬形成的标志^[18-19]。LC3 在细胞中以 2 种形式存在,LC3-I 存在于胞质中,自噬形成时,胞浆型 LC3-I 经泛素样加工修饰,与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺结合,会转变为自噬体膜型的 LC3-II,经过加工修饰的 LC3-II 则始终定位于自噬体膜上^[20]。因此,LC3-II 为自噬体膜特征性蛋白,其含量的多少与自噬体数量的多少成正比,LC3-II 的表达强度以及 LC3-I 向 LC3-II 转化的比例,均可以作为衡量自噬水平的高低和自噬活性的指标;又 LC3 蛋白家族包括 LC3A, LC3B, LC3C 等亚家族,其中对于 LC3B 的研究最为广泛^[21]。自噬时,LC3B 聚集在自噬体膜上,使用 LC3B 可追踪自噬过程。Beclin-1 是与酵母 ATG6 同源的哺乳动物自噬基因,是自噬体形成的必需分子,可介导其他自噬蛋白定位于吞噬泡,进而调控自噬体的形成及成熟^[22]。Rap 可通过抑制内源性 mTOR 活性而激活自噬,是常用的自噬诱导剂。3-MA 是 III 类磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂,可阻断自噬体形成,是广泛使用的自噬抑制剂。

TB 是 MTB 引起的慢性细胞内感染,MTB 是 TB 致病病原菌,其特征是高感染率和低根除率。MTB 是兼性胞内微生物,入侵机体后被巨噬细胞所吞噬,未被机体免疫系统清除而潜伏下来的 MTB 也主要寄生于巨噬细胞内长期存活。因此巨噬细胞是

MTB 的主要靶细胞,也是机体的主要应激、防御细胞。细胞自噬在胞内致病性 MTB 感染的防御机制方面发挥着重要作用,自噬体形成后可与溶酶体融合,并借助于溶酶体酸性环境降解入侵的 MTB,达到免疫防御的目的,被认为可能是对抗菌胞内感染最有效的武器之一。但细胞自噬又是一把“双刃剑”,一方面,宿主感受 MTB 感染产生调节自噬的免疫应答因子,这样胞内感染性 MTB 在逃脱非吞噬细胞的内吞作用之后,可以被自噬作用内化、降解,从而促进细胞对其的清除作用以对抗感染;另一方面,胞内感染性 MTB 通过各种因子抑制宿主细胞自噬,以达到免疫逃逸而利于其胞内生存;耐药结核菌(DR-TB)感染时,免疫应答更低^[23]。

最近针对 MDR-TB,通过调节宿主对结核病的应答反应,即宿主定向治疗,学者们开发或引进新的疗法;对于 MDR-TB 来说,自噬是一种细胞内的分解代谢过程,可以通过溶酶体降解过程帮助维持稳态并清除入侵的病原体,并通过自噬来加强对 MDR-TB 感染的抗菌防御;多种药物或药剂激活自噬可能是一种有希望的治疗 MTB 感染的策略,即使是抗药性菌株^[24-26]。

月华胶囊以天冬、麦冬、熟地黄、生地黄为君药,大力滋阴补肺,金水相生。沙参、阿胶、贝母辅以为臣,加强滋补而能止血,且润肺化痰。故以茯苓、山药健脾益中,培土生金;加上三七止血化瘀与阿胶同用而善治咳血,并使血止而不留瘀;五药共为佐药。桑叶、菊花能清肺止咳,气清上浮,主入肺经,用为佐使^[27]。全方合用共奏滋阴润燥,宁嗽止血,杀虫护肺之功,体现了“癆瘵”“一则杀其虫以绝根本,一则补其虚以复其真元”的治疗原则。相比其他同类方剂滋补养阴之力强,为治肺肾阴虚,癆瘵久嗽之要方^[28]。月华丸为传统抗癆名方,因其效用兼全,力量大,且独具有杀癆虫之功,为治结核的特效方^[29]。

本次月华胶囊含药血清对 MDR-TB 感染 RAW264.7 细胞的实验研究,结果显示月华胶囊能激发感染巨噬细胞自噬的发生,有效地促进自噬体的形成;能调控自噬相关蛋白及其基因的表达量和表达水平。促进自噬关键蛋白并定位于自噬体膜之 LC3 及其 LC3-II 表达量的增加,使 LC3-II/LC3-I 增加,LC3-I 趋向 LC3-II 的转化加快,增加其表达强度;使细胞胞浆中 LC3B 蛋白颗粒明显增多,并进行聚集。促进和提高自噬体形成和成熟的必需分子 Beclin-1 及其 mRNA 的表达水平。表明月华胶囊能提高 MDR-TB 感染巨噬细胞自噬的水平和增强细

胞自噬的活力。这种良性的、有效性的自噬可以促进感染 MTB,尤其是 MDR-TB 巨噬细胞内吞噬体的成熟,从而破坏 MTB,MDR-TB 的免疫逃逸机制,通过自噬体形成后与溶酶体的融合,并借助于溶酶体酸性环境降解入侵的 MTB,达到免疫防御的目的。

如此,月华胶囊将通过自噬定向方法的免疫有效应答作用在抗 MDR-TB 的治疗中提供创新性的改进。月华胶囊激发自噬的具体信号通路途径及对自噬流多步骤的全程跟踪及其量效探讨等还应更进一步地深入和全面展开。本研究为月华丸临床治疗难治性的耐多药结核病提供了比较好的理论基础和依据,对指导耐多药结核的中西医结合综合治疗方案中月华胶囊的运用,进行了现代研究的论证和支撑。

[参考文献]

- [1] 中华医学会结核病学分会,抗结核药物超说明书用法专家共识编写组. 抗结核药物超说明书用法专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(6): 447-460.
- [2] 范琳,肖和平. 世界卫生组织发布的耐药结核病指南带来的思考与挑战[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(1): 3-5.
- [3] 姚岚,唐神结. 浅谈世界卫生组织耐多药及利福平耐药结核病治疗药物的新分组[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42(5): 329-332.
- [4] 王涛,田彦卿,王岫崢,等. 加味升降散对饮停胸胁型结核性胸膜炎的疗效及对患者胸腔积液 ADA,免疫功能, T 淋巴细胞及炎症因子水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 169-173.
- [5] 梁乐,唐神结. 细胞自噬与抗结核分子杆菌感染免疫的研究进展[J]. 中华传染病杂志, 2015, 33(3): 181-184.
- [6] 唐神结,李亮. 加强我国抗结核药物性肝损伤的研究刻不容缓[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42(5): 323-325.
- [7] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.
- [8] Deretic V. Autophagy in infection[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 252-262.
- [9] Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(10): 767-777.
- [10] Gutierrez M G, Master S S, Singh S B, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages[J]. Cell, 2004, 119(6): 753-766.
- [11] Hawn T R, Matheson A I, Maley S N, et al. Host-

- directed therapeutics for tuberculosis; can we harness the host? [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013, 77 (4): 608-627.
- [12] 欧阳建军, 伍参荣, 白于乾. 月华胶囊对耐多药结核分枝杆菌抑菌效力的体外研究[J]. *湖南中医学院学报*, 2003, 23(5): 14-15, 22.
- [13] 欧阳建军, 伍参荣, 陈北阳, 等. 月华胶囊对耐多药结核鼠 T 淋巴细胞亚群及细胞因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(9): 28-31.
- [14] 欧阳建军, 星海霞. 月华胶囊对大鼠抗癆药物肝损害脂质过氧化的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2008, 28(4): 32-34.
- [15] Deretic V, Klionsky D J. Autophagy and inflammation: a special review issue [J]. *Autophagy*, 2018, 14 (2): 179-180.
- [16] Codogno P, Meijer A J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12 (Suppl 2): 1509-1518.
- [17] FENG Y, HE D, YAN Z, et al. The machinery of macroautophagy [J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 24-41.
- [18] Axe E L, Walker S A, Manifava M, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum [J]. *Cell Biol*, 2008, 182(4): 685-701.
- [19] 陈明, 王举涛, 吴珍妮, 等. 半枝莲总黄酮通过 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导肿瘤细胞自噬的体内实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(7): 1358-1364.
- [20] JIANG P, Mizushima N. Autophagy and human disease [J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 69-79.
- [21] Dancourt J, Melia T J. Lipidation of the autophagy proteins LC3 and GABARAP is a membrane-curvature dependent process [J]. *Autophagy*, 2014, 10 (8): 1470-1471.
- [22] SUN Q, FAN W, ZHONG Q. Regulation of Beclin1 in autophagy [J]. *Autophagy*, 2009, 5(5): 713-716.
- [23] Bah A, Vergne I. Macrophage autophagy and bacterial infections [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1483.
- [24] Kaufmann S H E, Dorhoi A, Hotchkiss R S, et al. Host directed therapies for bacterial and viral infections [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(1): 35-56.
- [25] ZumLa A, Maeurer M. Host-Directed therapies for tackling multi-drug resistant tuberculosis: learning VIRULENCE 9 from the Pasteur-Bechamp debates [J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 61(9): 1432-1438.
- [26] ZumLa A, RAO M, Dodoo E, et al. Potential of immunomodulatory agents as adjunct host-directed therapies for multidrug-resistant tuberculosis [J]. *BMC Med*, 2016, 15(14): 89.
- [27] 欧阳建军, 刘伍立, 陈国茜, 等. 月华胶囊治疗结核研究进展 [J]. *中医药导报*, 2016, 22(2): 109-112.
- [28] 谢鸣. 方剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 219.
- [29] 许济群, 王绵之. 方剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 28.

[责任编辑 孙丛丛]