

三七总皂苷通过AMPK通路对PASMCs自噬的影响

施晓倩^{1#} 宋正阳^{2#} 田云娜² 王新雨² 张赛² 张聪聪³ 王万铁^{2*}

¹杭州医学院中医教研室, 杭州 310052; ²温州医科大学缺血/再灌注损伤研究所, 温州 325035;

³浙江医药高等专科学校药学院, 宁波 315000)

摘要 该文探讨了在低氧高二氧化碳条件下, 三七总皂苷对大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)自噬的调控机制及对PASMCs增殖、凋亡的干预。以大鼠PASMCs为研究对象, 饥饿处理后将随机分为五组: 正常对照组(N)、模型组(HH)、AMPK激动剂AICAR组(AI)、三七总皂苷组(PNS)和三七总皂苷联合AMPK激动剂组(PA)五组。相应处理后用CCK-8法检测各组细胞存活率; qRT-PCR法检测AMPK、mTOR、LC3、p62、Caspase-3的mRNA表达水平, Western blot检测AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、LC3、p62、Caspase-3、PCNA的蛋白表达水平。透射电镜观察自噬小体。结果显示, 与HH组相比, PNS组Caspase-3表达上调, PCNA表达下调, 提示PNS可以促进PASMCs凋亡, 抑制其增殖; PNS组AMPK-mTOR信号通路下调, 自噬水平下降, 说明PNS可以下调AMPK-mTOR通路活性, 抑制自噬; PA组与PNS组相比自噬水平上升, 增殖上调, 凋亡减少, 提示PNS对低氧高二氧化碳环境引起的大鼠PASMCs增殖的抑制作用可能是通过下调AMPK-mTOR信号通路抑制自噬, 促进凋亡发挥作用的。

关键词 低氧高二氧化碳; 肺动脉平滑肌细胞; 自噬; AMPK/mTOR信号轴; 三七总皂苷

Effects of *Panax Notoginseng* Total Saponins on PASMCs Autophagy through AMPK Pathway

SHI Xiaoqian^{1#}, SONG Zhengyang^{2#}, TIAN Yunna², WANG Xinyu², ZHANG Sai²,

ZHANG Congcong³, WANG Wantie^{2*}

¹Department of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310052, China;

²Institute of Ischemia/Reperfusion Injury, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

³School of Pharmacy, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315000, China)

Abstract This study investigated the regulation mechanism of *Panax notoginseng* total saponins on autophagy of rat PASMCs (pulmonary artery smooth muscle cells) and the intervention on PASMCs proliferation and apoptosis under hypoxia and high carbon dioxide conditions. The rat PASMCs were randomly divided into five groups after starvation treatment: normal control group (N), model group (HH), AMPK agonist AICAR group (AI), *Panax notoginseng* total saponins group (PNS) and *Panax notoginseng* total saponins combined with AMPK agonist group (PA). After corresponding treatment, cell survival rate of each group was measured by CCK-8. AMPK, mTOR, LC3, p62 and Caspase-3 were detected by qRT-PCR, and the protein expression levels of AMPK, p-AMPK,

收稿日期: 2021-10-26 接受日期: 2022-01-17

浙江省中医药科学研究基金计划项目(批准号: 2022ZA097)和浙江省介入肺脏病重点实验室建设项目(批准号: 2019E10014)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 13587688106, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

Received: October 26, 2021 Accepted: January 17, 2022

This work was supported by the Zhejiang Traditional Chinese Medicine Scientific Research Foundation (Grant No.2022ZA097) and the Key Laboratory of Interventional Pulmonary Diseases of Zhejiang Province (Grant No.2019E10014)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-13587688106, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

mTOR, p-mTOR, LC3, p62, Caspase-3 and PCNA were detected by Western blot. Autophagosomes were observed by transmission electron microscopy. The results showed that compared with HH group, the expression of Caspase-3 was up-regulated and the expression of PCNA was down-regulated in PNS group, suggesting that PNS could promote the apoptosis of PASMCs and inhibit its proliferation. In the PNS group, AMPK-mTOR signaling pathway was down-regulated and autophagy level decreased, indicating that PNS could down-regulate AMPK-mTOR pathway activity and inhibit autophagy level. Compared with PNS group, the level of autophagy in PA group was increased, the proliferation was up-regulated, and the apoptosis was decreased, suggesting that PNS might inhibit the proliferation of PASMCs induced by hypoxia and high carbon dioxide in rats by down-regulating AMPK-mTOR signaling pathway to inhibit autophagy and promote apoptosis.

Keywords low oxygen and high carbon dioxide; pulmonary artery smooth muscle cells; autophagy; AMPK/mTOR signal axis; *Panax notoginseng* total saponins

肺动脉高压(pulmonary artery hypertension, PAH)的病因复杂, 进程缓慢, 其发病率更是呈逐年增高的趋势。临床上, 在肺动脉高压的发展过程中, 病患肺泡和血液中氧分压的降低往往和二氧化碳分压升高并行。因此, 本实验室采用低氧高二氧化碳混合气体的造模环境模拟肺动脉高压患者的发病时肺部的真实情况。

低氧高二氧化碳性肺动脉高压(hypoxia-hypercapnia pulmonary hypertension, HHPH)是一个多因素参与致病的过程, 肺血管一旦发生重构便无法逆转。因此, 尽早预防肺血管重构, 对治疗肺动脉高压起到至关重要的作用。而肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)的增殖和凋亡失衡是肺血管重构发生的直接原因, 调节有关细胞增殖和凋亡信号通路的平衡也是应对新药开发的思路。

自噬在多种疾病如肿瘤、心血管疾病、神经系统疾病等中扮演了重要的角色。研究表明, 自噬在肺动脉高压的发生发展中也起着尤为重要的作用^[1]。在正常情况下, 自噬活动水平维持在一个稳态, 自噬通量过量或不足都可能导致疾病的发生。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路是最经典的也是目前研究最多的自噬通路, 最近一项研究表明, 激活mTOR和抑制自噬可能是香烟烟雾诱导的慢性阻塞性肺病的新机制^[2]。而AMPK/mTOR信号通路介导的自噬是否参与了肺动脉高压的发生发展目前尚不清楚。

我国中药资源丰富, 运用中药治疗肺动脉高压的历史极为悠久。三七(*Panax notoginseng*)作为一种活血化瘀、消肿止痛的药材, 在我国有着悠久的历史。目前国内已见关于三七总皂苷对肺动

脉高压的治疗作用的报道^[3-4], 且进一步的研究显示, 三七总皂苷(*Panax notoginseng* total saponins, PNS)还具有抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移的作用^[5]。然而, PNS是否能够通过AMPK/mTOR信号通路调控自噬进而缓解肺动脉高压的肺血管重构仍未可知。

基于此, 本实验选用低氧高二氧化碳气体环境刺激大鼠PASMCs作为肺动脉高压的体外模型, 拟探讨PNS对PASMCs增殖、凋亡的干预是否与AMPK/mTOR信号轴介导的自噬相关, 将为PNS在低氧高二氧化碳性肺动脉高压防治和临床应用中提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

大鼠PASMCs购于北京中科质检生物技术有限公司; 阿卡地新AICAR、Dorsomorphin购于MedChemExpress公司; 兔抗大鼠mTOR、p-mTOR、LC3、P62、AMPK、p-AMPK、Caspase-3、PCNA一抗均购于CST公司; 山羊抗兔IgG HRP二抗购于Biosharp公司; 高糖DMEM培养基、胰酶、胎牛血清等购自美国Gibco公司; CCK-8试剂盒购于日本同仁公司; 此外选用了酶标仪(美国Bio-Rad公司)、电泳仪(北京六一仪器厂)、荧光显微镜(日本Nikon公司)、蛋白转膜/转膜仪(美国Bio-Rad公司)、透射电镜(日本Hitachi公司)等仪器。

1.2 细胞模型制备及分组

PASMCs长至80%~90%时, 用纯高糖培养基置于常氧培养箱(21% O₂、5% CO₂、74% N₂、37 °C)饥饿处理24 h, 之后弃去旧培养液并洗涤, 根据不同实验分组加入不同的培养基混合液。其中除了

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物系列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度/bp Product size /bp
GAPDH	Forward primer: TCT CTG CTC CTC CCT GTT C	87
	Reverse primer: ACA CCG ACC TTC ACC ATC T	
AMPK	Forward primer: AGC ACA CCT CAC TGA TGA ACC C	159
	Reverse primer: AGA CAG CCT GAC ACC TAT GGA AA	
mTOR	Forward primer: AGT GAA GCC GAG AGC AAT GAG A	134
	Reverse primer: GAC AAG GAG ATA GAA CGG AAG AAG C	
LC3	Forward primer: TTG TTG TAA ATG CTG TCA GTG CCT	115
	Reverse primer: CTG TGT CTA CCT CCT AAG TGT TGG G	
p62	Forward primer: CGG GTA CTG ATC CCT GTC A	156
	Reverse primer: TTC CTC CTT GGC TTT GTC TC	

正常对照组(N)在常氧箱内培养24 h外, 模型组(HH)用DMEM高糖培养基培养, AMPK激动剂AICAR组(AI)在DMEM高糖培养基中加入1 mmol/L AICAR溶液, 三七总皂苷组(PNS)在DMEM高糖培养基中加入终浓度为200 μg/mL的三七总皂苷, 三七总皂苷联合AMPK激动剂组(PA)在DMEM高糖培养基中加入终浓度为1 mmol/L的AICAR、终浓度为200 μg/mL的三七总皂苷, 后四组均置于造模箱(5% O₂、6% CO₂、89% N₂、37 °C)内培养24 h。

1.3 CCK-8检测细胞的活力

取对数生长期的PASCs细胞按每孔1×10⁴个细胞数接种于96孔板(每组3~6个复孔), 按以上分组造模结束后, 弃去培养液并用PBS洗涤, 每孔加入110 μL CCK-8混合液, 37 °C常氧培养箱孵育1 h后, 用酶标仪测定波长在450 nm处的吸光度(D)值, 取每组平均值, 实验重复3次。细胞存活率=[(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度)]×100%。

1.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)法检测PASCs中AMPK、mTOR、LC3、p62、Caspase-3 mRNA的表达水平

造模结束的细胞去除培养液洗涤后, 10 cm培养基中加入1 mL Trizol, 祛酶Tip头刮取细胞, 加入1/5体积氯仿, 上下颠倒混匀, 静置15 min。4 °C离心机12 000 r/min离心15 min。吸取上层水相(约400 μL)加入等体积异丙醇使RNA沉于管底, 弃上清加75%乙醇使沉淀悬浮, 再次离心收集RNA。测完RNA浓度后, 进行第一链cDNA合成和gDNA去除。随后进行qRT-PCR, 所得结果以2^{-ΔΔCt}方法计算mRNA相对表达量(表1)。

1.5 Western blot检测PASCs中AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、LC3、P62、Caspase-3、PCNA的含量

造模结束的细胞用PBS清洗后加入1 mL细胞裂解混合液(PMSF:RIPA=1:100), 离心后收集上清于新的1.5 mL EP管中。用BCA试剂盒检测蛋白总浓度。每组加蛋白1/4体积的蛋白上样缓冲液, 两者混合后煮沸10 min备用。每孔30 μg的蛋白上样量进行电泳, 并转膜至PVDF膜上, 将其置于5%脱脂牛奶中室温摇晃封闭1.5 h。敷一抗(AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、LC3、P62、Caspase-3、PCNA)(稀释比例均为1:1 000) 4 °C冰箱过夜。次日洗涤后室温下孵二抗(稀释比例为1:10 000)。孵育完成后, 将漂洗后的PVDF膜置于曝光仪中, 滴加化学发光液(A:B=1:1), 曝光并保存结果。

1.6 透射电镜观察PASCs自噬小体

取长势良好的PASCs制成细胞悬液离心, 经前固定、后固定、醋酸铀块染后, 用丙酮脱水、浸透。包埋聚合后, 依次对标本进行半薄切片和超薄切片, 最后用透射电镜观察PASCs的超微结构。

1.7 统计学处理

采用GraphPad Prism 9.0软件对各组实验数据进行统计学分析。在正态性检验后, 实验数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组样本间均数比较用方差分析, 两组间数据采用t检验, P<0.05则认定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三七总皂苷浓度的确定

使用不同浓度的三七总皂苷于低氧条件下处

理细胞24 h后,与0 mg/L组相比,200 mg/L组的细胞活力明显降低($P<0.01$),400~1 600 mg/L组的细胞活力过低,说明三七总皂苷已对细胞产生较大毒害作用,因此,选择200 mg/L作为此研究中三七总皂苷的浓度(图1)。

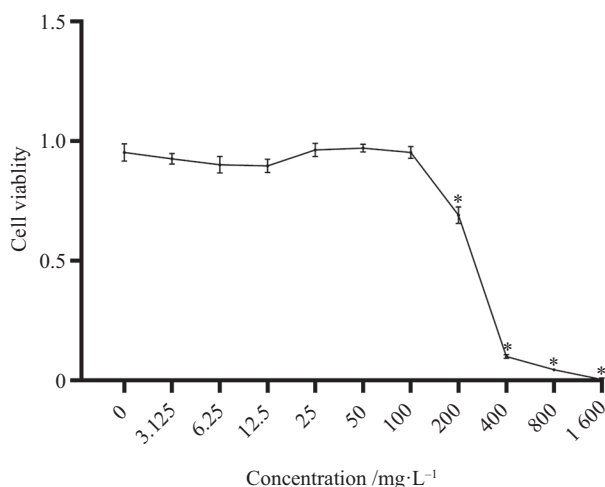
2.2 各组PASCs存活率

CCK-8结果显示,与N组相比,HH组细胞存活率上升($P<0.01$)。与HH组相比,PNS组细胞存活率下降($P<0.01$)。与PNS组相比,PA组细胞存活率上升($P<0.01$)(图2)。

2.3 各组PASCs通路指标变化

qRT-PCR结果(图3A)显示,与N组相比,HH组AMPK基因表达水平上升($P<0.01$),mTOR基因表达

水平下降($P<0.01$);PNS组AMPK基因表达水平比HH组低($P<0.01$),mTOR基因表达水平比HH组显著提高($P<0.01$);PA组AMPK基因水平与PNS组相比有所升高($P<0.01$),mTOR基因水平与PNS组相比有所下降($P<0.01$)。Western blot(图3B)显示:与N组相比,HH组p-AMPK/AMPK表达水平上升($P<0.01$),p-mTOR/mTOR表达水平下降($P<0.01$);与HH组相比,PNS组p-AMPK/AMPK蛋白表达水平下降($P<0.05$),p-mTOR/mTOR蛋白表达水平上升($P<0.01$);PA组p-AMPK/AMPK蛋白水平与PNS组相比有所上升($P<0.05$),p-mTOR/mTOR蛋白水平下降($P<0.05$)。这表明,低氧条件下AMPK通路激活,PNS能够抑制该通路的表达,并且这一作用能被AMPK激动剂部

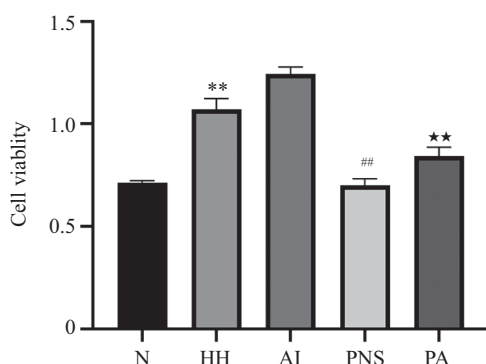


* $P<0.05$,与0 mg/L组相比。

* $P<0.05$ compared with 0 mg/L group.

图1 不同浓度三七总皂苷对PASCs活力的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of PNS on the viability of PASCs

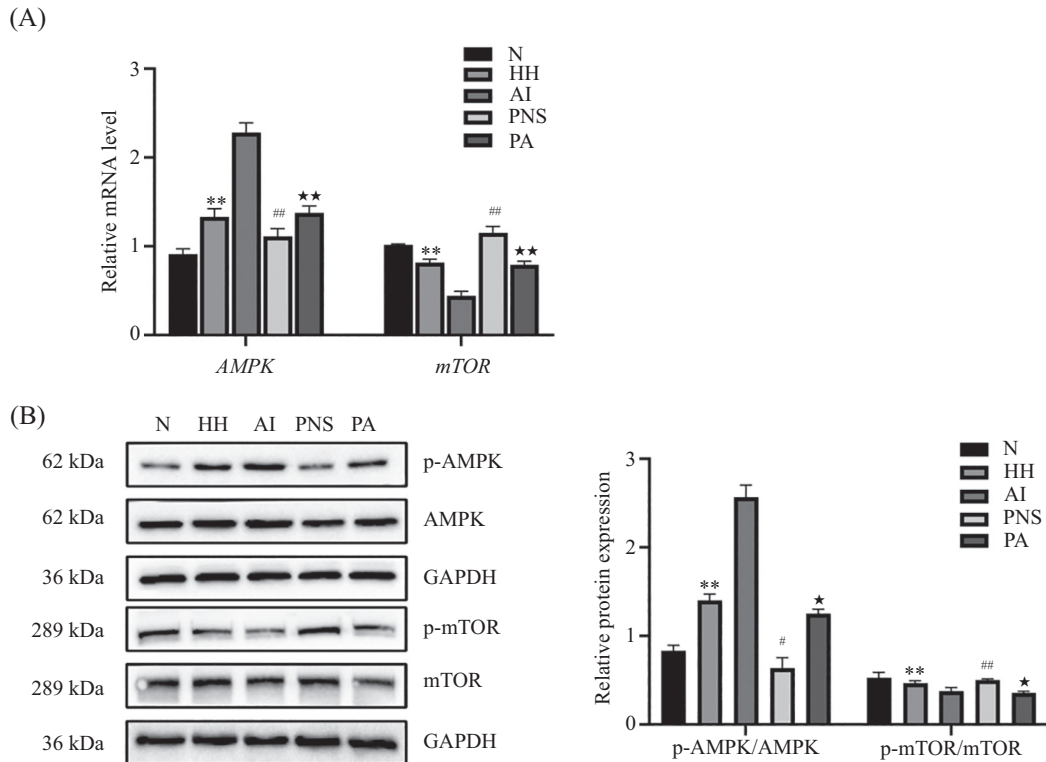


N: 常氧组; HH: 低氧高二氧化碳组; AI: AMPK激动剂AICAR组; PNS: PNS组; PA: PNS联合AMPK激动剂AICAR组。** $P<0.01$,与常氧组相比; ## $P<0.01$,与低氧高二氧化碳组相比; ** $P<0.01$,与PNS组相比。

N: normoxic group; HH: low oxygen and high carbon dioxide group; AI: AMPK agonist AICAR group; PNS: PNS group; PA: PNS combined with AMPK agonist AICAR group. ** $P<0.01$ compared with N group; ## $P<0.01$ compared with HH group; ** $P<0.01$ compared with PNS group.

图2 CCK-8法检测各组PASCs活力

Fig.2 The viability of PASCs assessed by CCK-8



A: qRT-PCR法检测AMPK、mTOR的表达水平; B: Western blot检测AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR蛋白的表达水平。N: 常氧组; HH: 低氧高二氧化碳组; AI: AMPK激动剂AICAR组; PNS: PNS组; PA: PNS联合AMPK激动剂AICAR组。** $P < 0.01$, 与常氧组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与低氧高二氧化碳组相比; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与PNS组相比。

A: the expression levels of AMPK and mTOR were detected by qRT-PCR; B: the expression levels of AMPK, P-AMPK, mTOR and p-mTOR proteins were detected by Western blot. N: normoxic group; HH: low oxygen and high carbon dioxide group; AI: AMPK agonist AICAR group; PNS: PNS group; PA: PNS combined with AMPK agonist AICAR group. ** $P < 0.01$ compared with N group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with HH group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with PNS group.

图3 各组通路指标表达水平

Fig.3 Expression levels of pathway indicators in each group

分逆转。

2.4 PNS抑制低氧诱导的PASMCs自噬

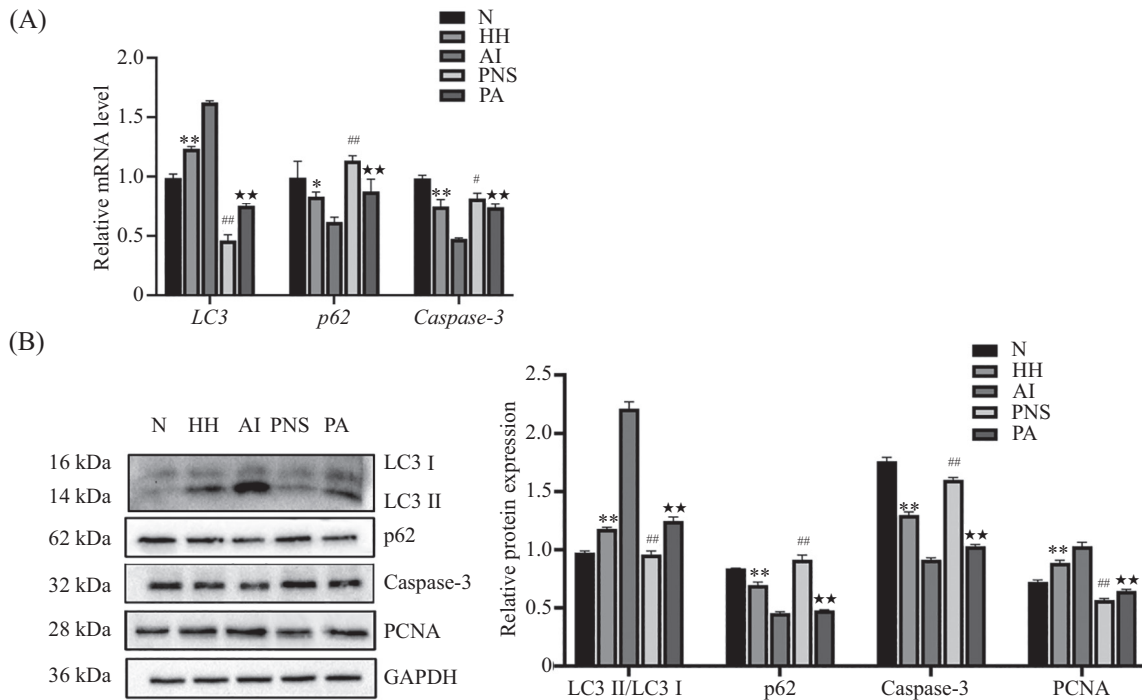
qRT-PCR结果(图4A)显示: 相比于N组, HH组LC3基因表达水平上升($P < 0.01$), p62基因表达水平下降($P < 0.05$); PNS组LC3基因表达水平比HH组降低($P < 0.01$), p62基因表达水平比HH组高($P < 0.01$), PA组LC3基因水平与PNS组相比有所升高($P < 0.01$), p62基因水平与PNS组相比有所下降($P < 0.01$), Western blot(图4B)显示: 与N组相比, HH组LC3表达水平上升($P < 0.01$), p62表达水平下降($P < 0.01$), PNS组LC3蛋白表达水平与HH组相比较低($P < 0.01$), p62蛋白表达水平上升($P < 0.01$), PA组LC3蛋白水平与PNS组相比显著提高($P < 0.01$), p62蛋白水平较低, 说明PNS可抑制低氧诱导的PASMCs自噬, 并且当使用AMPK激动剂AICAR处理细胞后, PNS对自噬的抑制作用被逆转, 表明PNS是通过抑制AMPK通路来发挥抗自噬作用的。

2.5 PNS抑制低氧诱导的PASMCs增殖, 促进凋亡

在低氧条件下使用PNS刺激PASMCs, qRT-PCR结果(图4A)显示: PNS组Caspase-3基因表达水平比HH组显著升高($P < 0.05$); PA组Caspase-3基因水平与PNS组相比有所降低($P < 0.01$)。Western blot(图4B)显示: PNS组Caspase-3蛋白表达水平与HH组相比升高($P < 0.01$), PCNA蛋白表达水平下降($P < 0.01$); PA组Caspase-3蛋白水平与PNS组相比有所降低($P < 0.01$), PCNA蛋白水平有所上升($P < 0.01$)。由此可见, PNS可通过AMPK通路缓解低氧造成的PASMCs增殖, 促进PASMCs凋亡, 改善肺血管重塑。

2.6 透射电镜观察各组大鼠PASMCs自噬小体情况

电镜结果(图5)显示: HH组相比于N组, 自噬小体数量增多, 且当用PNS处理后, 自噬小体数量减少, 表明低氧可促进PASMCs自噬, 并且这一作用可被PNS抑制; 相比于PNS组, PA组自噬小体数量增多,

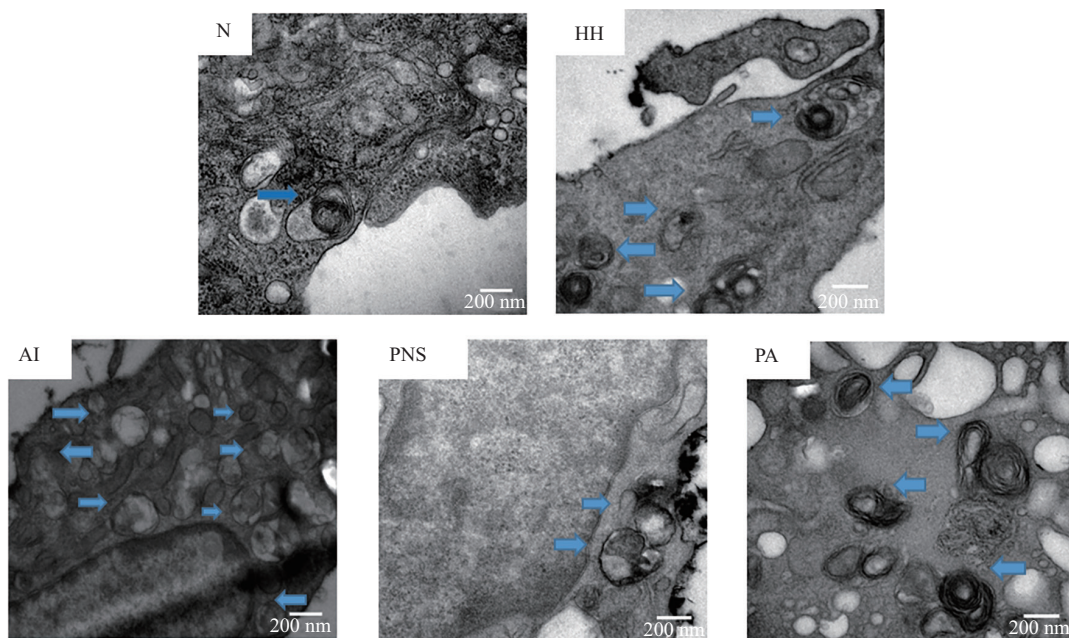


A: qRT-PCR法检测LC3、p62、Caspase-3的表达水平; B: Western blot检测LC3、p62、Caspase-3、PCNA的表达水平。N: 常氧组; HH: 低氧高二氧化碳组; AI: AMPK激动剂AICAR组; PNS: PNS组; PA: PNS联合AMPK激动剂AICAR组。** $P < 0.01$, 与常氧组相比; * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, 与低氧高二氧化碳组相比; ** $P < 0.01$ 与PNS组相比。

A: the expression levels of LC3, P62 and Caspase-3 were detected by qRT-PCR; B: the expression levels of LC3, p62, Caspase-3 and PCNA were detected by Western blot. N: normoxic group; HH: low oxygen and high carbon dioxide group; AI: AMPK agonist AICAR group; PNS: PNS group; PA: PNS combined with AMPK agonist AICAR group. ** $P < 0.01$ compared with N group; * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ compared with HH group; ** $P < 0.01$ compared with PNS group.

图4 各组LC3、p62、Caspase-3、PCNA表达水平

Fig.4 Expression levels of LC3, p62, Caspase-3 and PCNA in each group



N: 常氧组; HH: 低氧高二氧化碳组; AI: AMPK激动剂AICAR组; PNS: PNS组; PA: PNS联合AMPK激动剂AICAR组。箭头指示自噬小体。

N: normoxic group; HH: low oxygen and high carbon dioxide group; AI: AMPK agonist AICAR group; PNS: PNS group; PA: PNS combined with AMPK agonist AICAR group. Arrows indicate autophagosomes.

图5 各组PSMCs电镜观察图

Fig.5 Electron microscope observation of PSMCs in each group

说明PNS可通过抑制AMPK信号通路抑制低氧诱导的PASCs自噬。

3 讨论

临床资料表明, 某些慢性肺部疾病, 如肺部慢性阻塞性肺部疾病(COPD)、低通气综合征、呼吸睡眠暂停综合征等发生时肺部通气不畅, 肺泡内二氧化碳潴留, 氧气分压降低, 在低氧血症发生的同时往往伴随着碳酸血症的发生^[6], 因此我们认为低氧高二氧化碳性肺动脉高压模型比单纯低氧性肺动脉高压模型更符合临床实际^[7]。

三七因其具有显著的扩张血管, 改善血流的积极作用, 被中医广泛应用于心血管系统日常保护和疾病的治疗。三七总皂苷为三七中的有效成分, 其主要有效成分包括人参皂苷(Rg1、Rb1、Rb、Re)、三七皂苷(R1)^[8]。目前为止, 三七总皂苷的作用机制尚未被完全阐明, 结果分散未形成系统的网络。以往的研究表明, 三七总皂苷对动脉粥样硬化的抑制作用可能是通过抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖和高血脂对VSMC的促增殖作用来发挥效用的^[9]。也有研究表明三七总皂苷具有清除自由基、抗氧化、降血脂、促凋亡以及改善微循环等作用^[10]。最近的研究证明, 三七总皂苷能减少内质网应激和氧化应激, 并且通过AMPK通路的激活改善糖尿病的内皮功能^[11]。但其在肺动脉高压中的具体作用机制仍知之甚少。本实验使用200 mg/L的三七总皂苷干预大鼠PASCs后, 发现三七总皂苷可有效抑制低氧诱导的大鼠PASCs增殖和促进PASCs凋亡, Western blot结果显示, 三七总皂苷抑制PCNA蛋白的表达, 促进Caspase-3蛋白的表达。

正常生理状态下, 基因调控着细胞有序地增殖和凋亡, 两者保持着动态的平衡, 参与维持着内环境的稳态。除了基因调控外, 细胞的增殖和凋亡还受多种其他因素如细胞因子、微小RNA、自噬等的影响。在生理状态下, 完整的血管内皮是维持血管平滑肌细胞静息状态和正常血管结构所必需的^[12]; 在感染、炎症等免疫异常或者肺血流剪切力增加的状态下, 肺血管平滑肌细胞和内皮细胞失去控制, 不断增殖, 并出现凋亡抵抗, 引起肺血管重塑^[13]。既往研究表明, 人主动脉SMC在脂质过氧化时自噬活动增强^[14]; ZHANG等^[15]发现, 自噬生物标志物LC3B-II、BECN-1和ATG5在低氧条件下的PASCs中高表

达; LÜ等^[16]则发现, TMEM16A通过抑制SMC自噬来防止血管SMC增殖和重塑。PNS是否通过抑制PASCs自噬进而缓解低氧诱导的PASCs增殖目前尚未可知。本实验Western blot和透射电镜结果显示, 低氧高二氧化碳条件下大鼠PASCs自噬活动增强, PNS可抑制低氧诱导的PASCs自噬和增殖, 促进PASCs凋亡。

mTOR是磷脂酰肌醇3-激酶相关激酶(PIKK)家族的成员, 是翻译、细胞生长和自噬的主要调节因子。mTOR存在于两种不同的复合体(mTORC1和mTORC2)中, 它们的亚基组成不同^[17]。自噬受到多重系统调控, 其中最典型的抑制因子是mTORC1^[18]。AMPK信号通路的主要功能是在ATP供应不足时上调线粒体产生ATP的量, 而溶酶体吞噬、胞饮或是自噬中产生的营养物质的监测则是mTOR通路的关键功能^[19]。有文献报道称AMPK/mTOR/ULK1信号的激活可能参与了BPA诱导的细胞自噬^[20]; 另外也有研究发现, 在小鼠载体模型中使用AMPK的抑制剂可以抑制HPH的发生, 同时在离体实验方面, 可以通过抑制AMPK通路抑制低氧诱导的PASCs的增殖^[21]。因此AMPK-mTOR信号通路在肺动脉高压形成发展过程中的作用还未完全明确, 有待更进一步的研究。实验结果显示: PNS组AMPK-mTOR信号通路下调, 自噬水平下降, 说明PNS可以下调AMPK-mTOR通路活性, 抑制自噬水平; AMPK激动剂AICAR联合PNS用药组与PNS用药组相比, 自噬水平上升, 增殖上调, 凋亡减少, 提示PNS对低氧高二氧化碳环境引起的大鼠PASCs增殖的抑制作用可能是通过下调AMPK-mTOR信号通路抑制自噬, 促进凋亡发挥作用的, 且这种作用可被AMPK激动剂AICAR部分抑制。但是本研究仅在离体水平进行检测, PNS是否在体内发挥同样作用, 有待后续实验进一步验证。

综上所述, 低氧高二氧化碳条件下, 大鼠PASCs增殖增加、凋亡减少, 基于AMPK/mTOR信号通路的细胞自噬可能参与了PASCs的增殖、凋亡。PNS可能是通过下调AMPK/mTOR信号通路, 抑制自噬, 从而抑制PASCs增殖及促进PASCs凋亡的。

参考文献 (References)

- [1] RACANELLI A C, KIKKERS S A, CHOI A M K, et al. Au-

- tophagy and inflammation in chronic respiratory disease [J]. Autophagy, 2018, 14(2): 221-32.
- [2] WANG Y, LIU J, ZHOU J S, et al. MTOR suppresses cigarette smoke-induced epithelial cell death and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Immunol, 2018, 200(8): 2571-80.
- [3] 朱阿楠, 王园园, 王淑君, 等. ERK通路和三七总皂苷干预在低氧高二氧化碳性肺动脉高压中的作用[J]. 中国病理生理杂志 (ZHU A N, WANG Y Y, WANG S J, et al. Effects of ERK pathway and *Panax notoginseng* total saponins on hypoxia and high carbon dioxide pulmonary hypertension [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2011, 27(9): 1796-801.
- [4] 朱阿楠, 王淑君, 王园园, 等. p38-MAPK信号通路在HHPH中的作用及三七总皂苷干预[J]. 中国应用生理学杂志 (ZHU A N, WANG S J, WANG Y Y, et al. Role of P38-MAPK signaling pathway in HHPH and intervention of *Panax notoginseng* saponins [J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2012, 28(1): 79-83, 100.
- [5] FANG H H, YANG S L, LUO Y Y, et al. Notoginsenoside R1 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation, migration and neointimal hyperplasia through PI3K/Akt signaling [J]. Sci Rep, 2018, 8(Suppl A): 7595.
- [6] MYERS J L, DOMKOWSKI P W, WANG Y, et al. Sympathetic blockade blunts hypercapnic pulmonary arterial vasoconstriction in newborn piglets [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 1998, 13(3): 298-305.
- [7] 骆健峰, 吴小脉, 范小芳, 等. NO和HIF-1 α 在大鼠低氧性肺动脉高压中的作用及相互关系[J]. 中国应用生理学杂志 (LUO J F, WU X M, FAN X F, et al. Effects of nitric oxide and HIF-1 α on hypoxic pulmonary hypertension in rats [J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2006(4): 488-91.
- [8] 苏明, 温进坤, 郑斌, 等. 三七总皂苷对血管平滑肌细胞迁移的抑制作用及机制探讨[J]. 中国药理学通报 (SU M, WEN J K, ZHENG B, et al. Inhibitory effect of *Panax notoginseng* saponins on vascular smooth muscle cell migration and its mechanism [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2010, 26(10): 1326-9.
- [9] 熊敏琪, 崔金刚, 陈瑜, 等. 三七总皂苷抗动脉粥样硬化的效应研究[J]. 神经药理学报 (XIONG M Q, CUI J G, CHEN Y, et al. Effects of saponins from *Panax notoginseng* on atherosclerosis [J]. Acta Neuropharmacologica, 2018, 8(6): 55.
- [10] 安冬青. 中医药在血脂异常与动脉粥样硬化中的应用研究概述[J]. 中西医结合心脑血管病杂志 (AN D Q. Summary of application of traditional Chinese medicine in dyslipidemia and atherosclerosis [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease, 2015, 13(4): 417-21.
- [11] ZHANG X, ZHOU C, MIAO L, et al. *Panax notoginseng* protects against diabetes-associated endothelial dysfunction: comparison between ethanolic extract and total saponin [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 4722797.
- [12] 戴青原, 郭涛. 氧化应激与糖尿病及动脉粥样硬化研究进展[J]. 心血管病学进展 (DAI Q Y, GUO T. Research progress of oxidative stress and diabetes mellitus and atherosclerosis [J]. Advances in Cardiovascular Diseases, 2013, 34(5): 664-8.
- [13] HAWORTH S G. Role of the endothelium in pulmonary arterial hypertension [J]. Vascu Pharmacol, 2006, 45(5): 317-25.
- [14] LEE S J, L SMITH A, GUO L, et al. Autophagic protein LC3B confers resistance against hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(5): 649-58.
- [15] ZHANG L, MA C, WANG X, et al. MicroRNA-874-5p regulates autophagy and proliferation in pulmonary artery smooth muscle cells by targeting Sirtuin 3 [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 888: 173485.
- [16] LÜ X F, ZHANG Y J, LIU X, et al. TMEM16A ameliorates vascular remodeling by suppressing autophagy via inhibiting Bcl-2-p62 complex formation [J]. Theranostics, 2020, 10(9): 3980-93.
- [17] KAIZUKA T, HARA T, OSHIRO N, et al. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly [J]. J Biol Chem, 2010, 285(26): 20109-16.
- [18] LAPLANTE M, SABATINI D M. mTOR signaling in growth control and disease [J]. Cell, 2012, 149(2): 274-93.
- [19] GONZÁLEZ A, HALL M N, LIN S C, et al. AMPK and TOR: the Yin and Yang of cellular nutrient sensing and growth control [J]. Cell Metab, 2020, 31(3): 472-92.
- [20] LIN M, HUA R, MA J, et al. Bisphenol A promotes autophagy in ovarian granulosa cells by inducing AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. Environ Int, 2021, 147: 106298.
- [21] IBE J C, ZHOU Q, CHEN T, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase is required for pulmonary artery smooth muscle cell survival and the development of hypoxic pulmonary hypertension [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(4): 609-18.