

# 葛根素通过 Pink1/Parkin 通路影响动脉粥样硬化中巨噬细胞极化分析

倪小芬<sup>1\*</sup>, 陈佳君<sup>2</sup>, 胡臻<sup>3</sup>

(1. 温州医科大学附属第一医院, 温州 325000; 2. 浙江中医药大学附属温州市中医院, 温州 325000;

3. 温州医科大学附属第二医院, 温州 325000)

**摘要:** **目的** 探究葛根素是否通过线粒体自噬通路调控巨噬细胞极化, 进而改善动脉粥样硬化。 **方法** 以 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠高脂饮食构建动脉粥样硬化模型, 葛根素干预 12 周后采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法和油红 O (oil red O, ORO)染色法观察主动脉斑块; 蛋白质免疫印迹检测(western blot, WB)蛋白表达。以 RAW264.7 巨噬细胞构建 M1 极化模型, 实时荧光定量聚合酶链反应检测和 WB 验证巨噬细胞极化表型及线粒体自噬相关蛋白表达, 透射电镜观察线粒体自噬形态。 **结果** 葛根素显著减小主动脉斑块面积, 降低脂质沉积; 上调主动脉组织磷酸酶张力蛋白同源物诱导的激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, Pink1)、帕金森蛋白(Parkin E3 泛素连接酶)(Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, Parkin)蛋白表达及微管相关蛋白 1 轻链 3-II/I (microtubule-associated protein 1 light chain 3-II/I, LC3 II/I), 下调隔离体蛋白 1 (sequestosome 1, p62); 抑制 M1 型, 促进 M2 型基因表达。而沉默 Pink1 后, 葛根素对巨噬细胞极化的调控作用及抗炎效应显著减弱, 线粒体自噬激活受阻。 **结论** 葛根素可激活由 Pink1/Parkin 所介导的线粒体自噬通路, 使巨噬细胞向抑制炎症方向极化(M2), 改善动脉粥样硬化。本研究通过线粒体自噬调控巨噬细胞极化, 丰富了葛根素抗 AS 的作用机制, 并为靶向 Pink1/Parkin 通路干预其炎症进展提供实验依据和潜在治疗思路。

**关键词:** 葛根素; 动脉粥样硬化; Pink1/Parkin 通路; 线粒体自噬; 巨噬细胞极化

## 0 引言

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是全球心血管疾病的主要病理基础, 本质为血管壁慢性炎症性病变, 免疫炎症失衡是其核心致病机制<sup>[1]</sup>。巨噬细胞作为关键调控细胞, 存在 M1/M2 双向极化特性: M1 型分泌肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素- $1\beta$  (interleukin- $1\beta$ , IL- $1\beta$ ) 等促炎因子, 加速斑块形成与破裂; M2 型分泌白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)等抗炎因子, 维持斑块稳定, 因此调控巨噬细胞极化成为 AS 防治的重要靶点<sup>[2]</sup>。线粒体自噬通过选择性降解受损线粒体维持细胞稳态, 是调控巨噬细胞极化的关键环节, 而磷酸酶张力蛋白同源物诱导的激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, Pink1)/帕金森蛋白(Parkin E3 泛素连

接酶)(Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, Parkin)通路是线粒体自噬的核心调控通路<sup>[3-4]</sup>。葛根素作为天然异黄酮类化合物, 已被证实通过保护血管内皮、抗高血脂等发挥抗 AS 作用<sup>[5]</sup>, 但能否通过 Pink1/Parkin 通路调控巨噬细胞极化, 尚未明确。现有研究虽分别揭示了巨噬细胞极化、线粒体自噬及葛根素与 AS 的关联, 但缺乏“葛根素-Pink1/Parkin 通路-线粒体自噬-巨噬细胞极化”的完整调控链验证, 机制研究存在明显缺口。本研究创新点即聚焦这一空白, 通过高脂饮食喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠构建 AS 动物模型, 结合 ox-LDL 诱导 RAW264.7 巨噬细胞构建 M1 极化模型, 采用病理染色、分子检测及 Pink1 沉默实验, 系统探究葛根素对 AS 斑块、通路相关蛋白及巨噬细胞极化的影响。研究首次阐明葛根素抗 AS 的全新分子机制, 为其临床应用提供坚实实验依据,

基金项目: 温州市科技局基础性科研项目(Y2023248)

第一作者/通信作者: 倪小芬, 硕士研究生, 主要研究方向为中医学。E-mail: nxf2016@126.com

同时为 AS 靶向治疗提供新靶点与研究范式。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠、野生型小鼠(无特定病原体级, 中国江苏模式动物中心); RAW264.7 巨噬细胞(中国科学院细胞库); 葛根素(纯度≥98%)、辛伐他汀(纯度≥97%)(中国阿拉丁试剂有限公司); 高脂饲料、普通饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司); 戊巴比妥钠(纯度≥98%)、2.5%戊二醛(pH 7.4)(中国麦克林生化科技有限公司); 多聚甲醛、乙醇、5%脱脂奶粉(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 油红 O 染色液(分析纯)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色溶液(G1261)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.2, 分析纯)、氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)(纯度 98%)、聚凝胺(纯度≥98%)(中国索莱宝科技有限公司); 3%醋酸铀、2.7%柠檬酸铅(纯度 97.0%, 德国默克集团); 达尔伯克改良伊格培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); Pink1 敲低核糖核酸干扰(ribonucleic acid, RNAi)慢病毒(MOI=20, 中国源井生物科技有限公司); 反转录试剂盒(11155ES60, 中国翌圣生物科技股份有限公司); 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)试剂盒(E096, 中国诺唯赞生物科技股份有限公司); RNA 提取试剂盒(R0018S)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗(1:2000)、放射免疫沉淀试验(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液(含蛋白酶抑制剂)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司); Pink1 抗体、Parkin 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体、隔离体蛋白 1 (sequestosome 1, p62)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(1:1000, 英国 Abcam 公司)。

### 1.2 仪器与设备

JEM-2100Plus 透射电子显微镜(日本电子株式会社); CO<sub>2</sub> 培养箱(5% CO<sub>2</sub>, 美国赛默飞世尔科技有限公司); 6 孔细胞培养板、细胞培养皿(中国康宁公司); JA3003 分析天平(精度 0.01 mg, 中国上海力辰仪器科技有限公司); 电泳仪、PowerPac HC 转膜仪、ChemiDoc MP 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); H1750R 高速冷冻离心机(12000×g, 中国湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); HWS-24 恒温水浴锅(精度±0.5 °C, 中国上海一恒科学仪器有限公司); SW-CJ-1D 超净工作台(中国苏州净化设备有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验动物分组与干预

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 30 只, 均给予高脂饲料喂养, 随机分为 3 组:

葛根素组[600 mg/(kg·d)], 采用灌胃方式给药; 阳性药组[辛伐他汀, 5 mg/(kg·d)], 同法灌胃; 模型组, 灌胃等剂量生理盐水。另设野生型小鼠为对照组, 给予普通饲料喂养, 各组持续干预 12 周。

#### 1.3.2 AS 斑块测定

取样前对小鼠进行戊巴比妥钠麻醉(50 mg/kg), 分离主动脉并去除周围多余脂肪组织, 放入多聚甲醛中固定 10 min, 取出后用生理盐水清洗, 分别采用油红 O 染色和 HE 染色溶液可视化斑块形态。

#### 1.3.3 透射电子显微镜样本制备与观察

取小鼠主动脉组织, 用磷酸盐缓冲液清洗后, 加入 2.5% 戊二醛(pH 7.4)固定, 再用 pH 7.2 的 PBS 清洗 3 次, 4 °C 下固定 2 h, 经梯度浓度乙醇脱水、切片后, 用 3% 醋酸铀和 2.7% 柠檬酸铅复染, 通过透射电子显微镜拍照观察线粒体自噬形态。

#### 1.3.4 细胞培养与处理

RAW264.7 巨噬细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 48 h, 向培养基中添加 50 μg/mL 的 ox-LDL 诱导 M1 极化。加入含 10% 葛根素的血清孵育 12 h 后, 将细胞接种到 6 孔板中, 次日添加 Pink1 敲低 RNAi 慢病毒和聚凝胺(5 μg/mL)进行转染。

#### 1.3.5 实时荧光定量聚合酶链反应检测

按照 RNA 提取试剂盒说明书提取组织或细胞总 RNA, 采用反转录试剂盒将 RNA 反转录为互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。按 qPCR 试剂盒配置反应体系, 检测巨噬细胞极化标志物信使 RNA (messenger RNA, mRNA)表达。引物序列如下: iNOS-F: GAG ACA GGG AAG TCT GAA GCA C, iNOS-R: CCA GCA GTA GTT GCT CCT CTT C; COX2-F: GCG ACA TAC TCA AGC AGG AGC A, COX2-R: AGT GGT AAC CGC TCA GGT GTT G; Mrc1-F: GTT CAC CTG GAG TGA TGG TTC TC, Mrc1-R: AGG ACA TGC CAG GGT CAC CTT T; Arg1-F: CAT TGG CTT GCG AGA CGT AGA C, Arg1-R: GCT GAA GGT CTC TTC CAT CAC C; GAPDH-F: CAT CAC TGC CAC CCA GAA GAC TG, GAPDH-R: ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AG。

#### 1.3.6 蛋白质免疫印迹检测

取组织或细胞样本, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上充分裂解 10 min, 120×g 离心 15 min, 吸取上清液即为总蛋白提取液, 利用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白样品按顺序加入上样孔, 先以恒压 80 V 进行浓缩胶电泳; 冰浴条件下, 恒流 200 mA 转膜 90 min, 使蛋白从凝胶转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上; 用 5% 脱脂奶粉封闭液封闭 2 h, 加入稀释好的一抗(Pink1、Parkin、LC3、p62、GAPDH), 4 °C 摇床孵育过夜, 次日加入 HRP 标记的二抗, 经孵育后进行化学发光显影。

1.4 数据处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以“均数±标准差”表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 葛根素对小鼠 AS 斑块形成的影响

葛根素显著减少了 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 斑块的面积和厚度。HE 切片显示病变面积减少但胶原纤维面积增加(图 1)。

2.2 葛根素对主动脉组织巨噬细胞极化影响

葛根素组与对照组相比, 主动脉组织中 Pink1、Parkin

蛋白表达水平及 LC3 II/I 比值均显著升高, 而 p62 蛋白表达降低(图 2a,  $P < 0.05$ )。qPCR 结果(图 2b)显示, 与模型组相比, 葛根素组 M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 与 COX2 表达下降, M2 型巨噬细胞 Mrc1 及 Arg1 表达上调。

2.3 葛根素促进小鼠巨噬细胞极化

葛根素处理后, 小鼠巨噬细胞的 Parkin 蛋白表达及 LC3 II/I 比值上调, p62 蛋白水平下降(图 3a)抑制 M1 型标志物 iNOS、COX2 mRNA 表达, 促进 M2 型标志物 Mrc1、Arg-1 mRNA 表达(图 3b)。葛根素处理和阳性药处理组中观察到的线粒体形成明显多于模型组(图 4a)。通过 RNAi 干扰慢病毒在体外敲除 Pink1, ox-LDL+ 葛根素 +RNAi-Pink1 组中 Pink1 的蛋白水平较低(图 4b)。

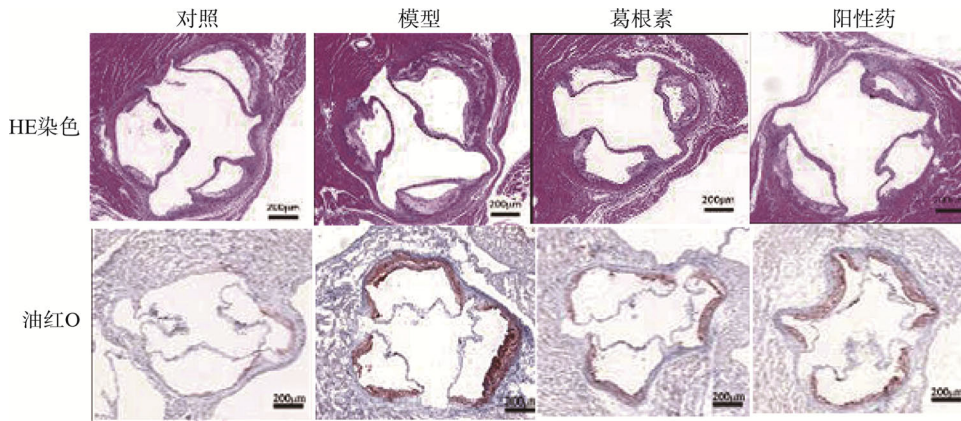
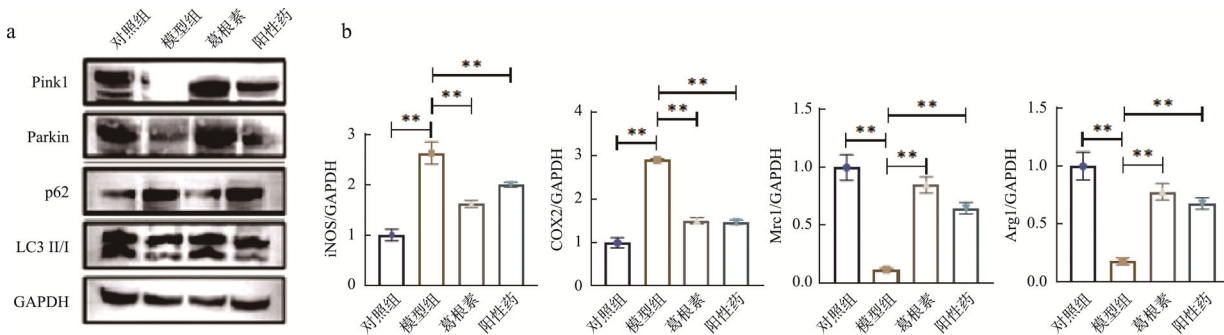
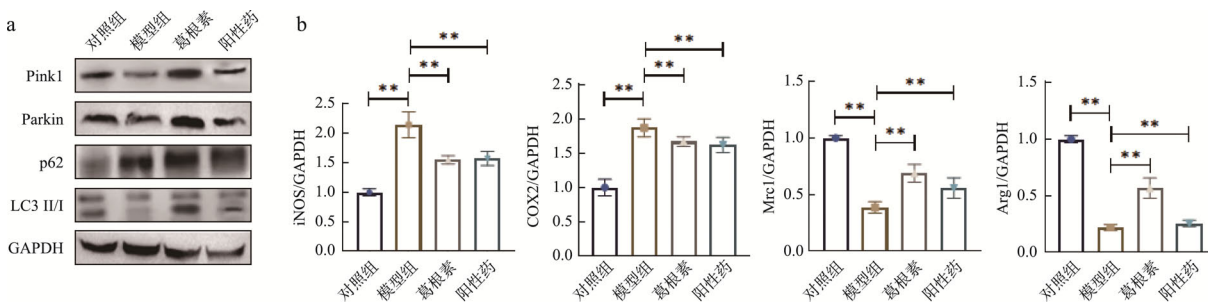


图 1 HE 染色图与油红 O 染色图



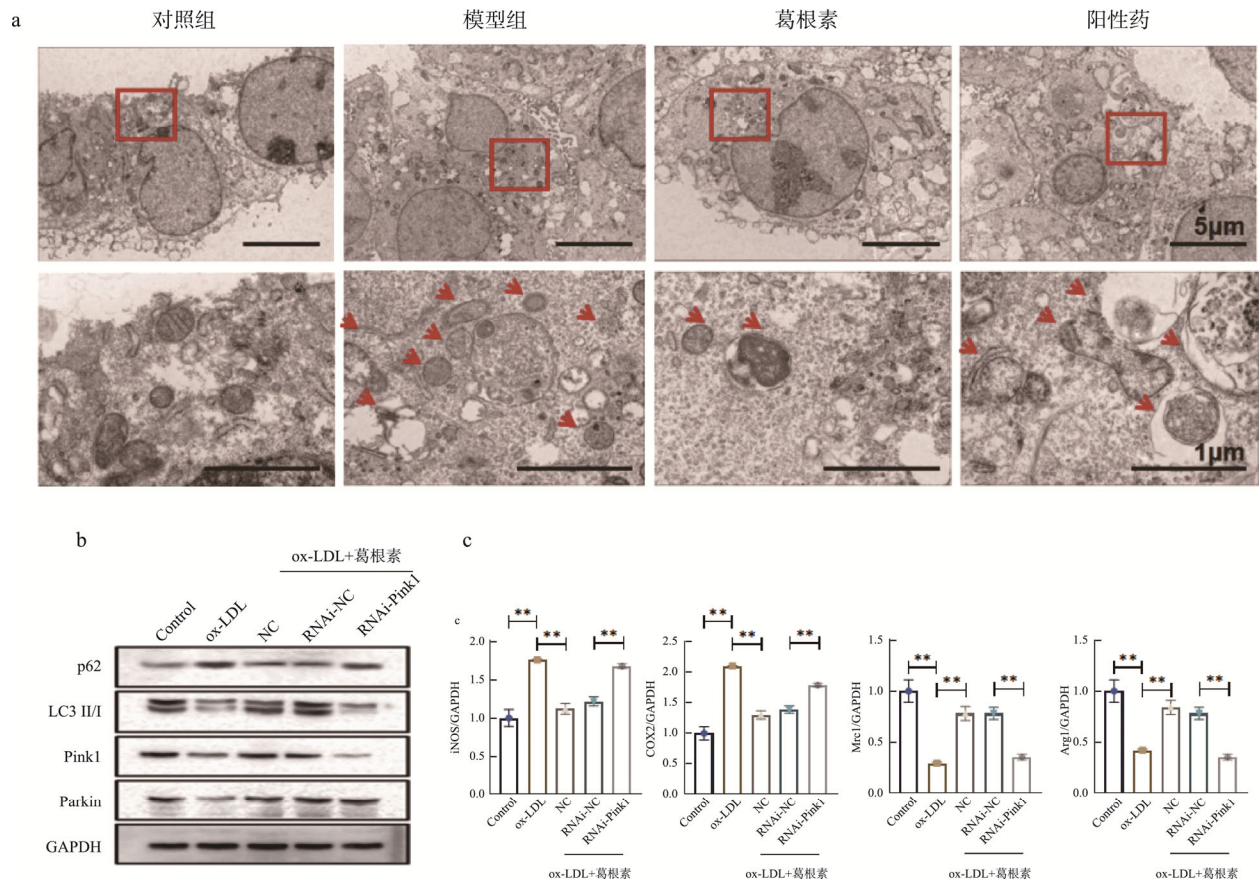
注: a. 免疫印迹检测蛋白表达; b. qPCR 检测巨噬细胞极化标志物 mRNA 表达; \*\* $P < 0.01$ 。

图 2 免疫印迹检测主动脉组织蛋白表达图及 qPCR 检测主动脉巨噬细胞标志物表达图



注: a. 免疫印迹检测蛋白表达; b. qPCR 检测小鼠巨噬细胞极化标志物 mRNA 表达; \*\* $P < 0.01$ 。

图 3 免疫印迹检测小鼠巨噬细胞蛋白表达图及 qPCR 检测小鼠巨噬细胞标志物表达图



注: a. 线粒体自噬电镜图; b. 免疫印迹检测蛋白表达; c. qPCR 检测巨噬细胞标志物表达。

图 4 线粒体自噬、免疫印迹检测蛋白表达和 qPCR 检测巨噬细胞标志物结果图

### 3 讨论与结论

本研究证实葛根素可激活 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬通路, 上调主动脉组织及巨噬细胞中 Pink1、Parkin 蛋白表达与 LC3 II/I 比值, 下调 p62 蛋白水平, 进而调控巨噬细胞极化方向, 抑制促炎的 M1 型巨噬细胞表型、促进抗炎的 M2 型巨噬细胞表型, 降低外周血及细胞上清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等促炎因子水平, 升高 IL-4 抗炎因子水平, 最终减小 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主 AS 斑块面积、减少脂质沉积, 发挥抗 AS 作用; 而沉默 Pink1 后, 葛根素的上述调控作用与抗炎效应均显著减弱, 进一步验证了 Pink1/Parkin 通路在该过程中的核心介导作用。线粒体可通过自噬机制包裹和降解受损或功能失调的线粒体, 从而恢复线粒体的质量<sup>[6]</sup>。根据环境不同, 巨噬细胞存在着不同的极化方向, 其中 M1 型主要起促炎作用, M2 型主要起抗炎作用<sup>[7]</sup>。线粒体自噬及巨噬细胞极化和 AS 密切相关<sup>[8]</sup>。Pink1/Parkin 信号通路是调控线粒体自噬的核心通路, 介导损伤线粒体被自噬体吞噬降解。LC3 II 会特异性定位于自噬体膜上, 随自噬体与溶酶体融合后被降解<sup>[9]</sup>;

葛根素的调脂作用机制是防止脂质过氧化<sup>[10]</sup>。一方面, 本研究通过联合检测主动脉组织及巨噬细胞中自噬相关分子的表达水平, 能更精准地判断病变部位的免疫炎症状态与线粒体自噬活性, 为 AS 的病情分层提供实验室依据。另一方面, 明确了葛根素对 Pink1/Parkin 通路-巨噬细胞极化调控轴的干预作用, 为开发 AS 靶向治疗的伴随诊断方案奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] LIBBY P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2021, 592 (7855): 524-533.
- [2] ZHANG Y, WENG J, HUAN L, *et al.* Mitophagy in atherosclerosis: From mechanism to therapy [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 116550.
- [3] LI J, ZHANG L, PENG J, *et al.* Mitochondrial metabolic regulation of macrophage polarization in osteomyelitis and other orthopedic disorders: Mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2025, 13: 1604320.
- [4] 刘璐菘, 刘文俊, 许欣竹. 脾气虚大鼠胃黏膜细胞线粒体自噬相关蛋白表达的研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(9): 3089-3093.

- [5] LI J, LI Y, YUAN X, *et al.* The effective constituent puerarin, from *Pueraria lobata*, inhibits the proliferation and inflammation of vascular smooth muscle in atherosclerosis through the miR-29b-3p/IGF1 pathway [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2023, 61(1): 1-11.
- [6] TANG M, RONG D, GAO X, *et al.* A positive feedback loop between SMAD3 and PINK1 in regulation of mitophagy [J]. *Cell Discovery*, 2025, 11(1): 22.
- [7] GUAN F, WANG R, YI Z, *et al.* Tissue macrophages: Origin, heterogeneity, biological functions, diseases and therapeutic targets [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2025, 10(1): 93.
- [8] 刘理, 谢燕飞, 余军. 巨噬细胞极化与动脉粥样硬化斑块稳定性的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(10): 2115-2121.
- [9] WANG JR, ZHU MJ. LC3 相关吞噬作用与动脉粥样硬化[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(22): 2756-2760.
- [10] DENG ZY, ZHU SM, WANG D, *et al.* 葛根素对高脂血症大鼠血脂、血凝及血小板聚集的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2011, 28(7): 589-592.