

基于AMPK/Rheb/mTOR通路探讨补阳还五汤加味含药血清对高糖下HRCECs自噬的抑制作用

曹俊昌*, 陈 胜, 叶照达, 胡 俊, 张欣豪, 林 琳, 柯发杰, 黄 雨, 胡艳红#

福建中医药大学附属第二人民医院眼科, 福建 福州

收稿日期: 2026年3月27日; 录用日期: 2026年4月22日; 发布日期: 2026年4月28日

摘 要

目的: 明确补阳还五汤加味含药血清对高糖环境下人视网膜微血管内皮细胞(HRCECs)自噬的影响, 并从AMPK/Rheb/mTOR通路探讨其机制。方法: 制备含药血清与空白血清。将HRCECs分为空白对照组、高糖模型组、空白血清组、含药血清组及多种干预组(如AMPK激动剂/抑制剂组、Rheb沉默/过表达组)。Western Blot检测p-AMPK、p-mTOR、Beclin-1等蛋白表达, RT-PCR检测相关mRNA水平。结果: 高糖模型组AMPK磷酸化水平及Beclin-1表达显著升高, mTOR磷酸化水平显著降低。与模型组相比, 含药血清组能显著抑制AMPK过度磷酸化, 恢复mTOR活性, 并下调Beclin-1表达。AMPK激动剂可逆转含药血清的上述作用; 干预Rheb表达能显著影响药物对mTOR和自噬的调控效果。结论: 补阳还五汤加味含药血清可能通过抑制AMPK过度激活、恢复Rheb/mTOR信号活性, 从而抑制高糖诱导的HRCECs过度自噬。

关键词

补阳还五汤加味, 含药血清, 糖尿病视网膜病变, 人视网膜微血管内皮细胞, 自噬, AMPK, mTOR, Rheb

Inhibitory Effect of Buyang Huanwu Decoction Modified Serum on Autophagy in HRCECs under High Glucose via AMPK/Rheb/mTOR Pathway

Junchang Cao*, Sheng Chen, Zhaoda Ye, Jun Hu, Xinhao Zhang, Lin Lin, Fajie Ke, Yu Huang, Yanhong Hu#

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 曹俊昌, 陈胜, 叶照达, 胡俊, 张欣豪, 林琳, 柯发杰, 黄雨, 胡艳红. 基于 AMPK/Rheb/mTOR 通路探讨补阳还五汤加味含药血清对高糖下 HRCECs 自噬的抑制作用[J]. 医学诊断, 2026, 16(2): 277-289.

DOI: 10.12677/md.2026.162037

Abstract

To investigate the effect of Buyang Huanwu Decoction Modified (BYHWD-M) serum on autophagy in human retinal microvascular endothelial cells (HRCECs) under high glucose conditions and explore its mechanism via the AMPK/Rheb/mTOR pathway. Methods: Drug-containing serum and blank serum were prepared. HRCECs were divided into control, high glucose model, blank serum, drug-containing serum, and various intervention groups. Western Blot was used to detect p-AMPK, p-mTOR, Beclin-1, and other proteins; RT-PCR was used to detect mRNA levels. Results: The high glucose model group showed increased AMPK phosphorylation and Beclin-1 expression, while mTOR phosphorylation decreased. Compared with the model group, BYHWD-M serum significantly inhibited AMPK overactivation, restored mTOR activity, and downregulated Beclin-1. AMPK agonist reversed these effects, and Rheb modulation influenced drug efficacy on mTOR and autophagy. Conclusion: BYHWD-M serum may inhibit high glucose-induced excessive autophagy in HRCECs by suppressing AMPK overactivation and restoring Rheb/mTOR signaling.

Keywords

Buyang Huanwu Decoction Modified, Medicated Serum, Diabetic Retinopathy, HRCECs, Autophagy, AMPK, mTOR, Rheb

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

糖尿病视网膜病变(Diabetic Retinopathy, DR)是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症之一,其病理核心在于长期高糖环境下视网膜微血管系统的进行性损伤与功能紊乱[1]。作为血-视网膜屏障的主要构成者,视网膜微血管内皮细胞(HRCECs)是高糖损伤的首要靶点。高糖可诱导 HRCECs 发生氧化应激、炎症反应、凋亡及异常增殖,最终导致血管渗漏、缺血乃至病理性新生血管形成,造成不可逆的视力丧失[2]。因此,深入探讨高糖诱导 HRCECs 损伤的分子机制,是防治 DR 的关键切入点。自噬是细胞内一种高度保守的分解代谢过程,通过降解受损细胞器和错误折叠蛋白以维持内环境稳态。在 DR 发生发展中,自噬扮演着复杂的“双刃剑”角色。适度的自噬作为一种保护性机制,可清除高糖累积的毒性物质;然而,慢性的代谢应激会导致自噬失调或过度激活,反而促进细胞功能障碍和死亡,加速 DR 进展[3]。研究表明,DR 患者及动物模型的视网膜组织中,自噬标志物显著上调,且抑制过度自噬能有效减轻血管损伤[4]。因此,调控自噬平衡,抑制其过度激活,已成为 DR 干预研究的新兴策略。

细胞自噬受到多条信号通路的精密调控,其中 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)构成的信号轴居于核心地位。AMPK 是细胞的能量传感器,在能量匮乏(如高糖早期引发的代谢应激)时被激活;而 mTOR 是合成代谢的关键调控因子,促进细胞生长并抑制自噬。经典的调控路径为:AMPK 激活后,可通过磷酸化下游靶点(如 TSC2)抑制 mTOR 复合物 1 (mTORC1)的活性,

从而解除对自噬起始的抑制, 诱导自噬发生[5]。Ras 同系物 enriched in brain (Rheb)作为一个小 GTP 酶,是连接 AMPK 与 mTOR 的关键节点。活化的 Rheb (Rheb-GTP)可直接强力激活 mTORC1,而 AMPK 则通过激活 TSC2 (Rheb 的 GAP 蛋白)促进 Rheb 失活, 形成级联调控[6]。然而, 在 DR 的持续性高糖环境下, AMPK/mTOR/Rheb 这一核心调控网络如何动态变化、其失衡的具体机制为何, 尚不完全清楚。

中医药在防治 DR 方面具有独特优势。补阳还五汤作为益气活血的经典名方, 其加味方在临床治疗气阴两虚、络脉瘀阻型 DR 中显示出良好疗效[7]。前期研究提示, 该方可能通过抗炎、抗氧化及调控血管生成等途径发挥作用[8], 但其是否以及如何通过调节 AMPK/mTOR/Rheb 信号轴与自噬, 来保护 HRCECs, 目前尚无系统研究。此外, 现有实验多采用中药粗提物直接干预细胞, 未能充分反映药物经体内代谢后的真实活性成分群效应。因此, 采用更贴近临床的含药血清研究方法, 系统揭示补阳还五汤加味对高糖下 HRCECs 自噬的抑制作用及其上游的 AMPK/Rheb/mTOR 通路机制, 对于阐明该方药的微观作用机理、发现新的治疗靶点具有重要的科学意义。

2. 材料与方法

2.1. 含药血清制备

补阳还五汤加味的临床人用剂量参考第五版《方剂学》, 根据“动物与人的每千克体重剂量折算系数表”, 成人与大鼠的折算系数为 6.25, 换算成大鼠的剂量, 补阳还五汤加味灌胃剂量为 $3.45 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。实验药物补阳还五汤由黄芪 125 g, 当归 6 g, 赤芍 5 g, 地龙 3 g, 川芎 3 g, 焯山桃仁 3 g, 红花 3 g 组成, 均购自福建中医药大学附属第二人民医院中药房。采用水提醇沉法制备补阳还五汤加味水提液: 称取 4 倍量的各味药, 浸泡 0.5 h, 加水煎煮 2 次。第 1 次 15 倍量水, 煎煮 1.5 h; 第 2 次加 10 倍量水, 煎煮 1 h, 分别用滤布滤过, 合并滤液, 补水, 得质量浓度为 0.1 g/mL 的补阳还五汤水提液, 快速搅拌并缓慢加入乙醇使乙醇体积分数为 60%, 冷藏, 静置 14 h, 滤过, 挥发至无醇味后, 用水补足减失的质量, 备用。

含药血清的制备: 30 只 WISTAR 大鼠称体质量, 随机分为 2 组, 每组 15 只, 分别为补阳还五汤加味组($13.66 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和空白对照组, 标准饲料与饮水, 适应性饲养 3 d, 第 4 天起分别按 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量给予补阳还五汤加味含药混悬液及生理盐水溶液给药灌胃, 每天 2 次, 时间为上午 9 点和下午 3 点, 以维持一定的血药浓度, 且灌胃前后 2 h 禁止饮食, 其余时间正常喂养。共用药 7 d, 最后一次灌胃后 1 h, 将待麻醉大鼠称重, 采用 0.3%戊巴比妥钠溶液, 以 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 以无菌注射器经腹主动脉采血, 立即注入干燥离心管内, 垂直静置至其自然凝血 20~30 min, 然后取血液离心($3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 15 \text{ min}$), 用无菌注射器抽取血清, 滤过后用冻存管分装, 之后 -80°C 冰箱保存备用。

2.2. 细胞培养与模型建立

2.2.1. 细胞培养

人视网膜微血管内皮细胞(HRCECs)复苏后, 使用含 10%胎牛血清、 $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养基, 在 37°C 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中常规培养。细胞生长至 80%~90%融合时, 用 0.25%胰酶(含 EDTA)消化传代。

2.2.2. 高糖模型建立与实验分组

为构建高糖损伤模型, 将 HRCECs 置于含 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-葡萄糖的 DMEM 完全培养基中培养。实验共设 9 组: ① 空白对照组: 正常糖($5.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-葡萄糖)培养基; ② 高糖模型组: 高糖($25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-葡萄糖)培养基; ③ 空白血清组: 高糖培养基作用 4 h 后, 加入终浓度为 10%的空白大鼠血清; ④ 含

药血清组：高糖培养基作用 4 h 后，加入终浓度为 10% 的补阳还五汤加味含药血清；⑤ AMPK 抑制剂组：高糖培养基作用 4 h 后，加入 AMPK 抑制剂；⑥ Rheb 沉默组：转染 Rheb siRNA 的 HRCECs，于高糖培养基中作用 4 h 后，加入 10% 空白血清；⑦ 含药血清 + AMPK 激动剂组：高糖培养基作用 4 h 后，同时加入 10% 含药血清与 AMPK 激动剂；⑧ Rheb 沉默 + AMPK 激动剂组：转染 Rheb siRNA 的 HRCECs，于高糖培养基中作用 4 h 后，加入 AMPK 激动剂；⑨ Rheb 过表达 + 含药血清组：转染 Rheb 过表达质粒的 HRCECs，于高糖培养基中作用 4 h 后，加入 10% 含药血清。(AMPK-IN-3, 货号：CM07927, 厂家：Proteintech, 100 nM, AMPK activator 4, 货号：CM07147, 厂家：Proteintech, 15 μ M; Rheb 过表达质粒来源：Zolgene 载基生物, siRNA 目的基因信息：Rheb (Human gene) NCBI 基因 ID: 6009)。

2.3. 检测指标与方法

2.3.1. 实时荧光定量 PCR 检测相关 mRNA 的表达

使用 TRIzol 试剂提取各组 HRCECs 的总 RNA。通过超微量分光光度计测定 RNA 浓度与纯度 (A260/A280 比值介于 1.8~2.0 视为合格)。取 1 μ g 总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。qRT-PCR 反应在 ABI Prism 7300 系统上进行。反应体系 (20 μ L) 包含: SYBR Green Premix Ex TaqTM 10 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 0.8 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 加 RNase-free 水补足体积。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 随后进行 40 个循环 (95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s)。反应结束后绘制熔解曲线以验证产物的特异性。以 GAPDH 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因 (AMPK、mTOR、Rheb、Beclin-1 等) mRNA 的相对表达量。所有实验独立重复 3 次。

从 NCBI 上查找 homo 的 AMPK、TSC2、TSC1、ULK1、Beclin-1、Rheb、mTOR 基因 mRNA 序列, 并以相应种属的 GAPDH 作为内参基因, 根据引物设计的原则, 用 Primer Premier 5.0 设计目标基因和内参基因的特异性引物, 由福州尚亚生物技术有限公司进行合成。扩增片段大小: AMPK (106 bp)、TSC2 (182 bp)、TSC1 (135 bp)、ULK1 (156 bp)、Beclin-1 (121 bp)、Rheb (146 bp)、mTOR (161 bp)、GAPDH (123 bp); 引物序列如下表 1 (按 5'-3'排列):

Table 1. Primer sequences

表 1. 引物序列

目标基因	引物方向	引物序列(5' → 3')
AMPK	正向(F)	CAACTATCGATCTTGCCAAAGG
	反向(R)	AACAGGAGAAGAGTCAAGTGAG
TSC2	正向(F)	AGGTTACACCATCTCCGACTC
	反向(R)	GCAGGATTGGCTTGTTTGACT
TSC1	正向(F)	AGAAAGGCTTGACTGTTGTAATGA
	反向(R)	CCACCTCTGCTTCCACTACT
ULK1	正向(F)	CTGCCCTGGACGAGATGTTC
	反向(R)	CCGAGAGTCTCCGCTCAATG
Beclin-1	正向(F)	GGTGTCTCTCGAGATTCATC
	反向(R)	TCAGTCTTCGGCTGAGGTTCT
Rheb	正向(F)	GCTTTGGCAGAATCTTGGAATG
	反向(R)	ATCACCGAGCATGAAGACTTG

续表

mTOR	正向(F)	TTATCATGTGTTCCGACGAATCTC
	反向(R)	GTGCTATGGACTGAATGCGAAT
GAPDH	正向(F)	GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA
	反向(R)	GAGTCCTTCCACGATACCAAAG

2.3.2. Western Blot 检测相关蛋白的表达

收集细胞, 用 RIPA 裂解液(含 PMSF)提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品(通常 30 μg)进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 随后通过湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液室温封闭 2 小时。随后, 膜与相应的一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。次日, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 分钟, 然后与对应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000 稀释)室温孵育 2 小时。再次洗膜后, 使用 ECL 超敏化学发光试剂盒在成像系统上显影。采用 Image J 软件对条带进行灰度值分析, 以目的蛋白与内参 β -actin 的灰度值比值作为其相对表达量。检测指标如下表 2。

Table 2. Primary antibodies used in Western Blot

表 2. Western Blot 检测一抗指标

名称	试剂编号
AMPK Alpha Polyclonal antibody	10929-2-AP
Phospho-AMPK Beta 1 (Ser182) Recombinant monoclonal antibody	83924-1-RR
Hamartin/TSC1 Polyclonal antibody	29906-1-AP
Tuberin/TSC2 Polyclonal antibody	24601-1-AP
RHEB Polyclonal antibody	15924-1-AP
mTOR Monoclonal antibody	66888-1-Ig
Phospho-mTOR (Ser2448) Monoclonal antibody	67778-1-Ig
ULK1 Polyclonal antibody	20986-1-AP
Beclin 1 Polyclonal antibody	11306-1-AP
GAPDH Monoclonal antibody	60004-1-Ig
HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H + L)	SA00001-2
HRP-conjugated Goat Anti-Mouse IgG(H + L)	SA00001-1

2.4. LC3 双标腺病毒细胞实验检测自噬和自噬流

提前从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出病毒原液, 放冰上融化, 使用前离心; 将爬好的细胞爬片放入 6 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 保证第二天进行病毒感染的时候细胞汇合率在 40%~50% 左右; 按最佳的 MOI 值(30 50 100), 取适量病毒原液加入已含有 1 mL 完全培养液的 EP 管中混匀, 感染前, 吸去原培养基, 沿壁加入上述稀释后的病毒稀释液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育; 感染 4~6 h 后, 吸去含病毒培养基, 加入 2 mL 新鲜培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养; 感染 24~48 h 后, 在荧光显微镜下观察荧光表达情况, 检测自噬和自噬流改变。

2.5. 统计学分析

所有数据均以均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS 29.0 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分

析, 若方差齐性, 组间两两比较采用 LSD 检验; 若方差不齐, 则采用 Dunnett's T3 检验。两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 补阳还五汤加味含药血清抑制高糖诱导的自噬相关蛋白 Beclin-1 表达

为明确药物对细胞自噬的影响, 我们检测了自噬关键蛋白 Beclin-1 的表达。Western Blot 结果表明(图 1(a)), 与空白对照组相比, 高糖模型组 HRCECs 中 Beclin-1 蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$)。而经补阳还五汤加味含药血清干预后, Beclin-1 的表达被显著抑制($P < 0.05$)。空白血清组的 Beclin-1 表达与高糖模型组相比无统计学差异, 表明药物效应源于其活性成分而非血清本身。

qPCR 检测结果(图 1(b))显示, Beclin-1 mRNA 表达变化趋势与 Western Blot 结果基本一致。与空白对照组相比, 高糖模型组 HRCECs 中 Beclin-1 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$), 提示高糖刺激可在转录水平上诱导自噬相关基因表达。经补阳还五汤加味含药血清干预后, Beclin-1 mRNA 表达明显下降($P < 0.05$), 接近空白对照组水平, 表明该药物可能通过抑制 Beclin-1 转录活性从而减弱自噬反应。空白血清组 Beclin-1 mRNA 表达与高糖模型组相比无显著差异($P > 0.05$), 证实血清本身对 Beclin-1 表达无明显影响。

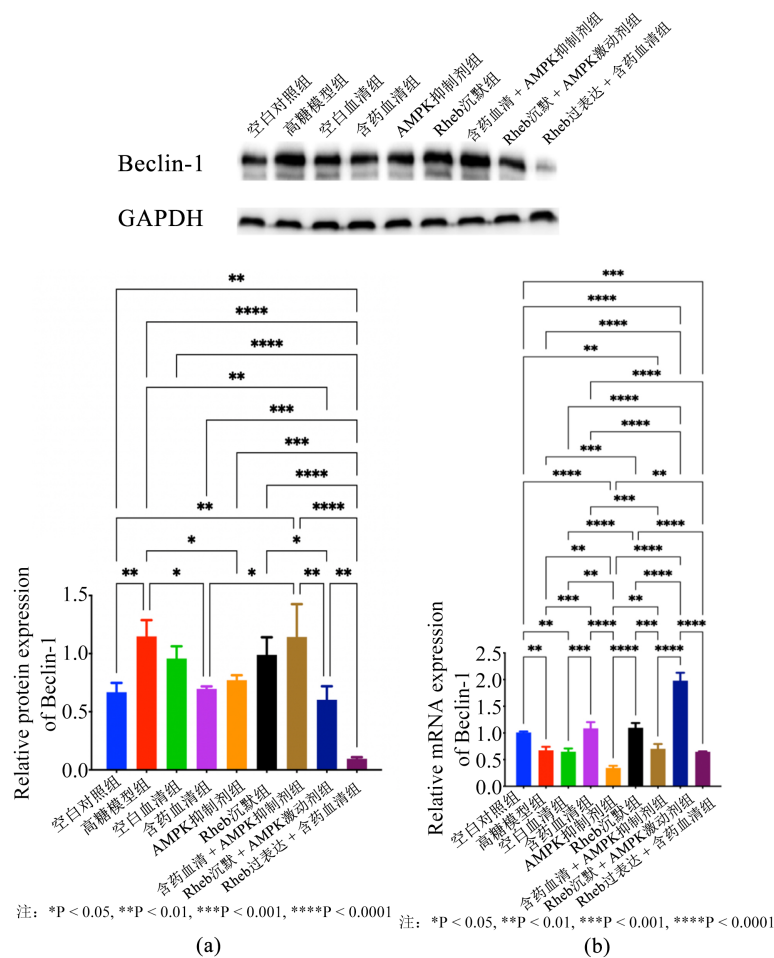


Figure 1. (a) and (b): Western Blot and qPCR analysis of autophagy-related protein Beclin-1 expression
图 1. (a)和(b): Western Blot、qPCR 检测自噬相关蛋白 Beclin-1 表达情况

3.2. 补阳还五汤加味含药血清对 AMPK 磷酸化水平的影响

为了探究补阳还五汤加味调控自噬的上游机制,我们采用 Western Blot 检测了各组细胞中 AMPK 的磷酸化水平(p-AMPK/AMPK 比值),结果如图 2(a)所示。高糖激活 AMPK:与空白对照组相比,高糖模型组的 p-AMPK/AMPK 比值显著升高($P < 0.01$),提示高糖应激激活了 AMPK 信号通路,这与模型组 Beclin-1 表达升高(自噬激活)相一致。与高糖模型组相比,补阳还五汤加味含药血清组的 p-AMPK/AMPK 比值显著降低($P < 0.05$),降至接近空白对照水平。同时,空白血清组与模型组相比无显著性差异($P > 0.05$),证实补阳还五汤加味能够特异性抑制高糖诱导的 AMPK 过度活化。AMPK 抑制剂组的 p-AMPK/AMPK 比值较模型组显著降低($P < 0.01$),验证了抑制剂的有效性。含药血清联合 AMPK 抑制剂组与单独含药血清组相比无显著差异($P > 0.05$)。qPCR 检测结果如图 2(b)所示,各组 HRCECs 中 AMPK mRNA 表达水平总体变化不明显。与空白对照组相比,高糖模型组 AMPK mRNA 表达略有下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与高糖模型组相比,补阳还五汤加味含药血清组 AMPK mRNA 表达水平未见显著变化($P > 0.05$),空白血清组亦无明显差异($P > 0.05$)。在信号通路干预实验中,AMPK 抑制剂及 AMPK 激动剂处理均未显著改变 AMPK mRNA 表达水平($P > 0.05$)。此外,在 Rheb 沉默或 Rheb 过表达条件下,AMPK mRNA 表达亦未发生明显变化($P > 0.05$)。综上结果表明,各组间 AMPK mRNA 表达基本稳定,而 Western Blot 检测到的 p-AMPK 水平变化提示补阳还五汤加味含药血清对 AMPK 信号通路的调控主要发生在蛋白磷酸化水平的翻译后修饰阶段,而非转录水平。

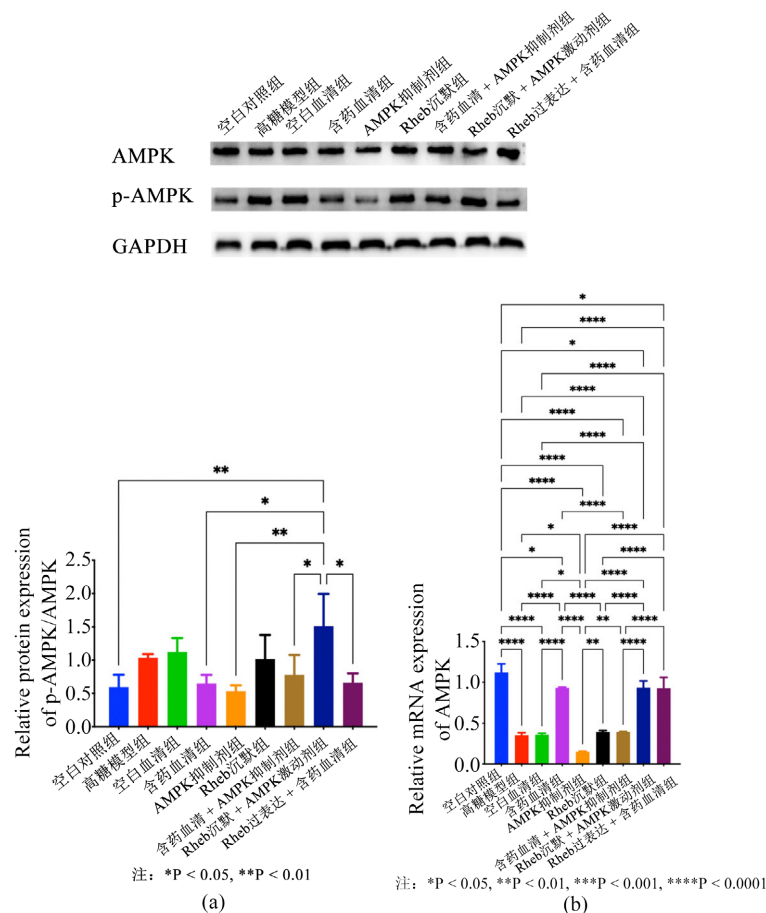


Figure 2. (a) and (b): Western Blot and qPCR analysis of AMPK phosphorylation level
图 2. (a)和(b): Western Blot 检测和 qPCR 检测 AMPK 的磷酸化水平情况

3.3. 补阳还五汤加味含药血清对 mTOR 磷酸化水平的影响

为进一步验证 AMPK/mTOR 通路在补阳还五汤加味调控自噬中的作用,我们检测了各组细胞中 mTOR 的磷酸化水平(p-mTOR/mTOR 比值),结果如图 3(a)所示。高糖抑制 mTOR 活性:与空白对照组相比,高糖模型组 p-mTOR/mTOR 比值显著降低($P < 0.001$),表明高糖环境下 mTOR 通路被抑制,这与 AMPK 活化、自噬启动的病理状态一致。含药血清恢复 mTOR 活性:与高糖模型组相比,补阳还五汤加味含药血清组 p-mTOR/mTOR 比值显著升高($P < 0.05$),提示药物可恢复 mTOR 活性,从而抑制过度自噬。AMPK 抑制剂激活 mTOR: AMPK 抑制剂组 p-mTOR/mTOR 比值较模型组显著升高($P < 0.01$),证实抑制 AMPK 可解除其对 mTOR 的抑制。与高糖模型组相比, Rheb 沉默组的 p-mTOR/mTOR 比值显著降低至 0.3 ($P < 0.001$)。在 Rheb 沉默的基础上联合 AMPK 激动剂处理后, p-mTOR/mTOR 比值进一步下降 ($P < 0.001$)。另一方面, Rheb 过表达联合含药血清处理组 p-mTOR/mTOR 比值升至 1.9 ($P < 0.001$),显著高于单独含药血清组($P < 0.01$)。qPCR 检测结果如图 3(b)所示,各组 HRCECs 中 mTOR mRNA 表达水平存在一定变化。与空白对照组相比,高糖模型组 mTOR mRNA 表达略有升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。空白血清组与高糖模型组相比亦未见显著差异($P > 0.05$)。与高糖模型组相比,补阳还五汤加味含药血清组 mTOR mRNA 表达水平变化不明显($P > 0.05$)。然而, AMPK 抑制剂处理后 mTOR mRNA 表达显著升高($P < 0.05$),提示 AMPK 信号可能对 mTOR 转录具有一定调节作用。在 Rheb 相关干预实验中, Rheb 沉默组 mTOR mRNA 表达较模型组略有下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$);而 Rheb 过表达联合含药血清处理后 mTOR mRNA 表达明显升高($P < 0.01$)。此外,在 Rheb 沉默基础上加入 AMPK 激动剂处理后, mTOR mRNA 表达水平未见明显恢复。总体而言, mTOR mRNA 表达变化趋势与蛋白磷酸化水平并不完全一致,提示补阳还五汤加味含药血清对 mTOR 信号通路的调控可能主要发生在蛋白磷酸化等翻译后修饰水平,而非单纯通过调节 mTOR 基因转录实现。

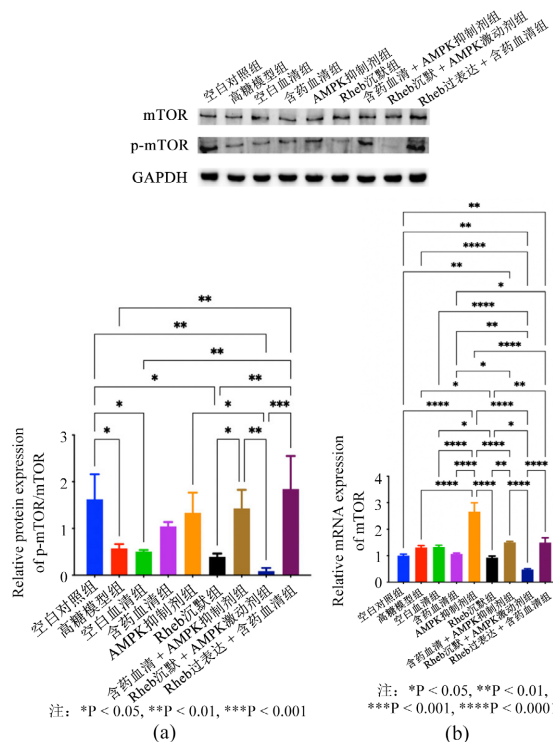


Figure 3. (a) and (b): Western Blot and qPCR analysis of mTOR phosphorylation level
图 3. (a)和(b): Western Blot、qPCR 检测 mTOR 的磷酸化水平情况

3.4. Rheb 在介导含药血清效应中的关键作用

为进一步观察 Rheb 在该信号调控过程中的作用，我们进行了功能增益与缺失实验。Western Blot 结果(图 4(a))显示，在 Rheb 沉默条件下，含药血清对 p-mTOR 恢复及 Beclin-1 下调的作用明显减弱；而 Rheb 过表达联合含药血清处理组则表现出更高的 p-mTOR 水平及更低的 Beclin-1 表达。此外，在 Rheb 沉默的细胞中，外源性 AMPK 激动剂处理后 mTOR 磷酸化水平未见明显恢复。上述现象提示，Rheb 表达状态参与了含药血清对 mTOR 信号及自噬相关蛋白的调节过程。qPCR 检测结果如图 4(b)所示，各组 HRCECs 中 Rheb mRNA 表达水平存在明显差异。与空白对照组相比，高糖模型组 Rheb mRNA 表达水平略有升高，但差异无统计学意义($P > 0.05$)；空白血清组与高糖模型组相比亦未见显著变化($P > 0.05$)。在 Rheb 功能干预实验中，与高糖模型组相比，Rheb 沉默组中 Rheb mRNA 表达显著降低($P < 0.01$)，表明 siRNA 转染能够有效抑制 Rheb 基因表达。在 Rheb 沉默的基础上给予 AMPK 激动剂处理，Rheb mRNA 表达仍维持较低水平($P < 0.01$)，提示 AMPK 信号激活并不能逆转 Rheb 沉默所导致的表达下调。相反，在 Rheb 过表达联合含药血清处理组中，Rheb mRNA 表达显著升高($P < 0.001$)，表明 Rheb 过表达质粒转染成功，并显著增强 Rheb 的转录水平。上述结果从转录水平验证了 Rheb 沉默及过表达实验的有效性，并为进一步分析 Rheb 在补阳还五汤加味含药血清调控 AMPK/mTOR 信号通路中的作用提供了实验依据。

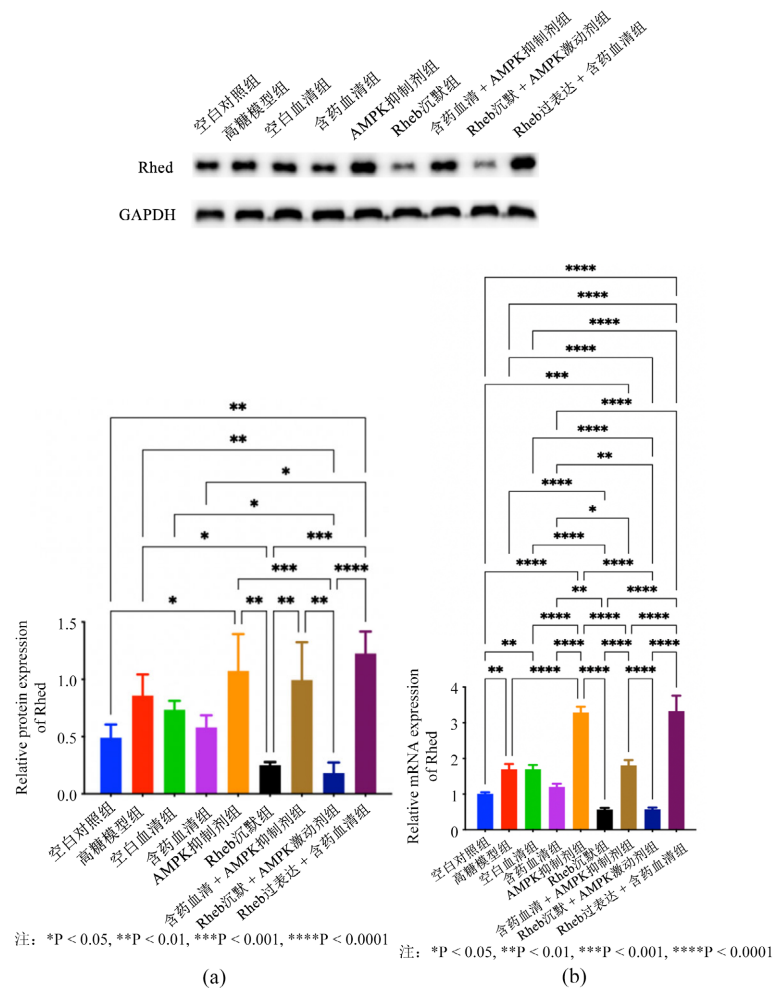


Figure 4. (a) and (b): Western Blot and qPCR analysis of the key role of Rheb in mediating the effect of medicated serum
图 4. (a)和(b): Western Blot、qPCR 检测 Rheb 在介导含药血清效应中的关键作用情况

3.5. LC3 双标腺病毒细胞实验检测自噬和自噬流

为直观评估补阳还五汤加味含药血清对自噬流的动态影响,我们采用 mRFP-GFP-LC3 双标腺病毒感染 HRCECs, 通过荧光共聚焦显微镜观察 LC3 斑点的形成与分布。在该系统中, GFP 荧光对酸性环境敏感, 自噬溶酶体中 GFP 淬灭而仅显红色荧光; 自噬体则同时呈现黄色荧光(GFP 与 mRFP 共定位)。结果如图 5 所示: 空白对照组细胞内可见少量黄色斑点(自噬体)和红色斑点(自噬溶酶体), 代表基础自噬水平。高糖模型组中, 黄色及红色斑点数量均显著增加($P < 0.01$), 提示高糖诱导自噬流增强, 自噬体形成与降解均处于活跃状态。与高糖模型组相比, 补阳还五汤加味含药血清组细胞内黄色及红色斑点数量均显著减少($P < 0.05$), 表明药物可抑制高糖诱导的过度自噬激活。定量分析显示(图 6): 含药血清干预后, 平均每个细胞的 LC3 斑点总数较高糖模型组减少约 60% ($P < 0.01$), 其中自噬体(黄色斑点)与自噬溶酶体(红色斑点)的比例无明显改变, 提示药物主要作用于自噬流的整体水平, 而非单纯影响自噬体的形成或降解某一环节。这一结果与 Beclin-1 表达下调相一致, 共同证实补阳还五汤加味能够有效抑制高糖诱导的 HRCECs 过度自噬。

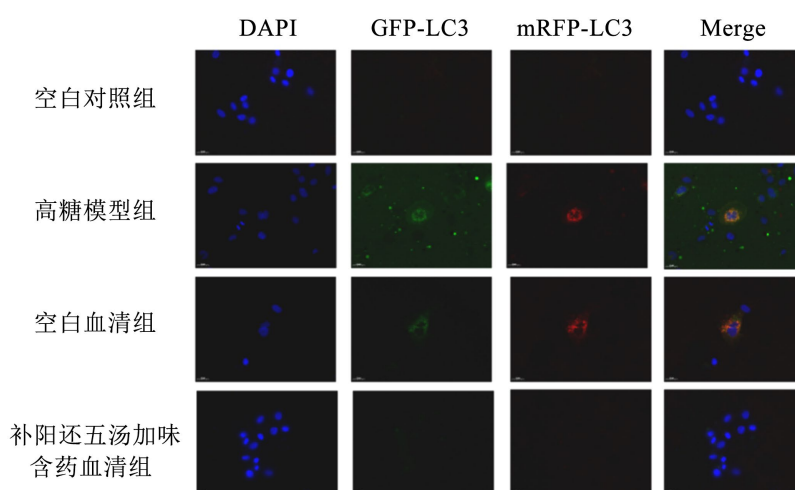
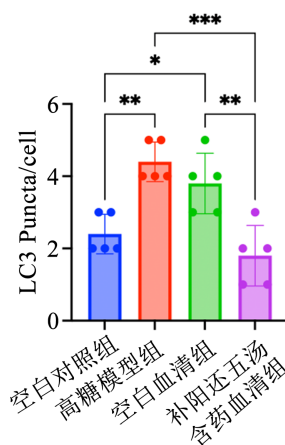


Figure 5. Detection of autophagy and autophagic flux by LC3 double-labeled adenovirus
图 5. LC3 双标腺病毒检测自噬和自噬流



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 6. Detecting the effects of autophagy and autophagic flux using a dual-labeled LC3 adenovirus
图 6. LC3 双标腺病毒检测自噬和自噬流的影响

4. 讨论

本研究通过制备补阳还五汤加味含药血清,系统探讨了其对高糖环境下 HRCECs 的保护作用及机制。主要发现该含药血清能通过抑制 AMPK 的过度磷酸化,经 Rheb 节点恢复 mTOR 信号活性,最终下调自噬关键蛋白 Beclin-1 的表达。这一“抑制 AMPK-恢复 mTOR-抑制自噬”的作用链条,为理解该经典方剂防治 DR 提供了新的微观机制解释。

本研究采用含药血清作为干预介质,与多数直接使用中药水提液的研究在方法学上形成互补。水提液含有大量未经代谢的原始成分,其效应可能更直接、强烈,但难以反映药物在体内的真实代谢转化与多成分协同过程[9]。本研究发现,补阳还五汤加味的含药血清对 AMPK/mTOR 通路具有恢复平衡的调节作用。这一发现提示,该复方经体内代谢后产生的活性成分群,其作用方式可能更为复杂,涉及多靶点的网络化调节。这种基于体内代谢的药理特点,能够较好地解释含药血清研究与单纯水提液研究的结果差异,也使其研究结论更具临床参考价值。

尤为值得探讨的是,本研究发现补阳还五汤加味含药血清抑制了高糖诱导的 AMPK 过度激活,凸显了中药复方多靶点、系统性调节的独特优势。在 DR 的持续高糖应激状态下,AMPK 的持续过度活化可能是驱动细胞损伤的病理因素之一。补阳还五汤加味可能并非简单地抑制 AMPK,而是通过方中多组分协同,将失衡的 AMPK/mTOR 信号网络恢复至生理稳态,体现了中药“以平为期”的治疗思想[10]。这提示,对同一通路的“激活”或“抑制”并非绝对,关键在于其对调节细胞的稳态。在实验结果中,含药血清联合 AMPK 抑制剂处理后,其 p-AMPK 水平与单独含药血清组相比未见显著差异,提示两者可能同一信号轴上发挥调节作用,有待未来在实验中进一步明确具体原因。

本研究通过 siRNA 沉默与过表达实验,观察到 Rheb 表达变化与 mTOR 活性及自噬相关蛋白表达呈一致性改变,提示 Rheb 可能在该信号调控过程中发挥重要调节作用。在 AMPK 与 mTOR 这对经典拮抗分子的相互作用中,Rheb 扮演着核心“阀门”的角色。我们的数据显示,无论 AMPK 状态如何(被药物抑制或被激动剂激活),只要 Rheb 功能缺失,mTOR 活性就无法恢复,药物的保护效应也随之消失。这些结果支持 Rheb 可能在含药血清调控 mTOR 信号及自噬过程中发挥重要作用。这一发现将药物效应的机制定位从相对宽泛的“AMPK/mTOR 通路”进一步聚焦至 Rheb 这个关键靶点,为后续精准靶标研究提供了明确方向。

本研究首次采用 mRFP-GFP-LC3 双标腺病毒技术,直观评估了补阳还五汤加味含药血清对高糖下 HRCECs 自噬流的影响。结果显示,含药血清干预后 LC3 荧光斑点数量显著减少,自噬体与自噬溶酶体的比例未见明显偏移,提示药物并非单纯阻断自噬体的形成或降解,而是整体抑制了过度活跃的自噬流。这一发现与 Beclin-1 表达下调的结果相互印证,共同构建了从自噬启动(Beclin-1)到自噬流动态(LC3 斑点)的完整证据链。LC3 双标技术的应用克服了传统 Western Blot 仅能检测瞬时蛋白水平的局限,更真实地反映了药物对自噬过程的动态调控效应。

从 DR 的临床病理进程来看,视网膜微血管内皮细胞的进行性损伤是血-视网膜屏障破坏的始动环节。自噬的过度激活是此过程的重要推手。本研究首次将补阳还五汤加味的保护作用与“AMPK/Rheb/mTOR-自噬”轴明确关联,从细胞能量代谢与自噬稳态调控的角度,为其临床疗效提供了创新的实验依据。这不仅深化了对益气活血法防治 DR 科学内涵的理解,更重要的是,Rheb 作为连接能量感应与细胞生长信号的关键分子,其本身可能成为一个具有潜力的微血管保护干预新靶点,为中西医结合在 DR 防治领域的机制交叉与药物研发提供了新思路。值得注意的是,在 Rheb 过表达联合含药血清处理的条件下,虽然 p-mTOR 水平显著升高,但 p-AMPK 水平亦出现一定程度的上调。按照经典 AMPK/mTOR 拮抗模型,mTOR 激活理论上应抑制自噬并减轻 AMPK 激活。然而,本研究中观察到 AMPK

存在代偿性升高的现象,提示在高糖应激背景下,AMPK与mTOR之间可能并非简单的线性抑制关系,而存在复杂的动态调控机制。

本研究同步检测了各关键分子的mRNA水平。结果显示,AMPK、mTOR的mRNA表达在各组间无明显差异,而其磷酸化水平显著改变,提示补阳还五汤加味主要调控这些核心激酶的翻译后修饰,而非转录水平。这一特点使得药物能够快速响应细胞代谢状态的变化,实现对自噬的精细调节。相比之下,Beclin-1的mRNA与蛋白表达呈一致性变化,提示药物可能通过影响其转录活性或mRNA稳定性参与自噬调控。上述多层次、多节点的调控模式,体现了中药复方多靶点作用的独特优势。

既往研究表明,AMPK与mTORC1之间存在双向负反馈调节环路,在能量稳态受到扰动时,mTOR活性的增强可能通过代谢需求增加或ROS变化反向刺激AMPK激活,从而形成稳态调节机制。因此,本研究所观察到的AMPK上调现象,可能反映了细胞在能量与合成代谢之间维持平衡的代偿性响应。该推测仍需进一步通过能量代谢检测或时间序列实验加以验证。

本研究亦存在一定局限。首先,结论源自细胞模型,虽能阐明直接机制,但无法完全模拟体内复杂的神经血管单元微环境。未来需在DR动物模型中验证此通路在体内是否同样关键。其次,自噬是一个动态过程,本研究主要检测了Beclin-1这一自噬启动标志物,未来结合LC3-II/I转换率检测、自噬流示踪及电镜观察,将能更完整地刻画药物对自噬“流”的影响。此外,补阳还五汤加味如何具体调控Rheb的活性(如影响其GTP/GDP结合状态)尚不清楚,值得深入探究。最后,方中药效物质基础复杂,究竟是何种成分或成分组合主导了该通路调节作用,是极具挑战性但也极具价值的后续研究方向。

5. 结论

本研究结果提示,补阳还五汤加味含药血清可能通过调节AMPK/Rheb/mTOR信号轴,参与高糖诱导HRCECs自噬过程的调控。这一发现从细胞自噬稳态调控的角度,揭示了该方防治糖尿病视网膜病变的潜在机制。

声 明

本研究涉及的所有动物实验操作程序均严格遵守中国实验动物管理与使用的相关规定。本实验方案已通过福建中医药大学实验动物伦理委员会的审查。伦理批准号:FJSPH-IAEC202200x。

基金项目

福建省卫生健康科技计划项目青年科研课题(2022QNA080)。

参考文献

- [1] Wang, T., Li, H., Wang, C., Li, X., Deng, A. and Jiao, X. (2025) Diabetic Retinopathy as a Sentinel of Systemic Vascular Dysfunction: Shared Molecular Mechanisms with Cardiovascular Disease. *Experimental Eye Research*, **261**, Article ID: 110644. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2025.110644>
- [2] 张浩, 方新梅, 张玛丽, 等. 微小核糖核酸 7641/沉默信息调节因子 1 途径参与高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞损伤的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2023, 31(11): 845-849.
- [3] Lin, S., Ji, Z., Gao, J., Fan, J., Hou, J., Liu, S., et al. (2025) Poldip2 Aggravates Inflammation in Diabetic Retinopathy by Impairing Mitophagy via the AMPK/ULK1/PINK1 Pathway. *Life Sciences*, **373**, Article ID: 123681. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123681>
- [4] Geng, Z., Tan, J., Xu, J., Chen, Q., Gu, P., Dai, X., et al. (2023) ADAMTS5 Promotes Neovascularization via Autophagic Degradation of PEDF in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Experimental Eye Research*, **234**, Article ID: 109597. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109597>
- [5] Holczer, M., Hajdú, B., Lőrincz, T., Szarka, A., Bánhegyi, G. and Kapuy, O. (2019) A Double Negative Feedback Loop between Mtorc1 and AMPK Kinases Guarantees Precise Autophagy Induction Upon Cellular Stress. *International*

Journal of Molecular Sciences, **20**, Article 5543. <https://doi.org/10.3390/ijms20225543>

- [6] Zhao, Y., Hu, X., Liu, Y., Dong, S., Wen, Z., He, W., *et al.* (2017) ROS Signaling under Metabolic Stress: Cross-Talk between AMPK and AKT Pathway. *Molecular Cancer*, **16**, Article No. 79. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0648-1>
- [7] 李英, 高娜, 黄群, 等. 补阳还五汤加减辅助治疗气阴两虚兼血瘀型非增殖期糖尿病视网膜病变[J]. 国际眼科杂志, 2022, 22(1): 99-103.
- [8] 陈凯铭, 陈子扬, 石颖, 等. 补阳还五汤对高糖培养的人视网膜微血管内皮细胞自噬和血管形成的干预作用[J]. 中国中医眼科杂志, 2023, 33(2): 105-110.
- [9] 曹俊昌, 石颖, 胡艳红, 等. 基于正交实验设计补阳还五汤水提液对高糖培养视网膜微血管内皮细胞活性影响[J]. 福建中医药, 2023, 54(11): 55-58.
- [10] 谭开云, 孙光荣. 国医大师孙光荣“以平为期”学术思想论要[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2289-2293.