

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.23.006

文章编号: 1005-8982(2017)23-0031-07

二氢杨梅素调控自噬抑制氧化低密度脂蛋白 诱导人脐静脉内皮细胞损伤的研究

钟惠娟¹, 陈璐¹, 廖慧颖², 张涛³, 王波³, 周洁⁴

(1. 广州医学院荔湾医院 心内科, 广东 广州 510000; 2. 湖南省常德市第一人民医院 神经内科, 湖南 常德 415003; 3. 南华大学附属第二医院, 湖南 衡阳 421001; 4. 解放军第一六九医院 (湖南师范大学附属湘南医院) 普外科, 湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 观察二氢杨梅素(DMY)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的影响,并探讨自噬在其中的作用。**方法** DMY(0.01、0.10、1.00 和 10.00 $\mu\text{mol/L}$)预处理 HUVECs 2 h,用 100.0 mg/L ox-LDL 继续培养细胞 24 h。以辛伐他汀作为阳性对照组。采用噻唑蓝法检测细胞活力, Hoechst 33258 染色观察细胞核形态,透射电镜观察自噬体, Western blot 检测自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、Beclin-1 和 p62/SQSTM1 的表达,观察自噬抑制剂对 DMY 作用的影响。**结果** 与对照组比较, ox-LDL 组细胞的存活率降低($P < 0.05$),细胞核呈集中高强度蓝色荧光,固缩致密浓染或碎块状致密浓染,颜色发白,细胞核较小,形态不规则,自噬体和自噬溶酶体数量增加; Beclin-1、LC3- II 的表达和 LC3- II /LC3- I 比值上调,而 p62 的表达下调($P < 0.05$)。与 ox-LDL 组比较, 0.1、1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组细胞存活率均升高;细胞核荧光强度降低,核固缩致密浓染和碎块状致密浓染减少,形态较规则; 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组的自噬体和自噬溶酶体数量增加; Beclin-1、LC3- II 的表达和 LC3- II /LC3- I 比值上调,而 p62 的表达下调($P < 0.05$)。自噬抑制剂 3-MA 部分抵消 DMY 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 存活率降低($P < 0.05$)。**结论** DMY 能抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤,其机制与诱导自噬有关。

关键词: 二氢杨梅素;氧化低密度脂蛋白;内皮细胞;自噬;自噬相关蛋白

中图分类号: R543;R363

文献标识码: A

Dihydromyricetin protects oxidized low-density lipoprotein-induced damage by inducing autophagy in human umbilical vein endothelial cells

Hui-juan Zhong¹, Lu Chen¹, Hui-ying Liao², Tao Zhang³, Bo Wang³, Jie Zhou⁴

(1. Department of Cardiology, Liwan Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 2. Department of Neurology, the First People's Hospital of Changde, Changde, Hunan 415003, China; 3. The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 4. Department of General Surgery, the 169th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Dihydromyricetin (DMY) on the damage induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and to explore the role of autophagy in this effect. **Methods** After HUVECs were pretreated with DMY (0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h, the cells were incubated with ox-LDL (100.0 mg/L) for 24 h. Simvastatin was made as a positive control. MTT was used to detect cell viability. Nuclear morphology was observed by Hoechst 33258 staining. Cell ultrastructures and autophagosomes were observed by transmission electron microscope. The

收稿日期: 2016-08-28

[通信作者] 周洁, Tel: 0734-8483223; E-mail: zhoujie7927@126.com

expressions of Beclin-1, light chain-3 of microtubule-associated protein (LC3) and the autophagy substrates p62/SQSTM1 in cells were determined by Western blot. **Results** Compared with the control group, the cell survival rate was significantly decreased ($P < 0.05$), the nuclei were smaller in the ox-LDL group. The concentrated high-intensity blue fluorescence in nuclei, nuclear condensation and dense dyeing, or nuclear chunky and dense dyeing were observed in the ox-LDL group. Compared with the control group, the number of autolysosomes was obviously increased, the expressions of Beclin-1 and LC3-II and the ratio of LC3-II/LC3-I in the cells were significantly increased and the expression of p62 in the cells was significantly decreased in the ox-LDL groups ($P < 0.05$). Compared with the ox-LDL group, the cell survival rate was significantly increased ($P < 0.05$), the fluorescence intensity of nuclei was obviously decreased, nuclear condensation and dense dyeing or nuclear chunky and dense dyeing were decreased, the nuclei were regular in the DMY (0.1, 1.0 and 10.0 $\mu\text{mol/L}$) pretreatment groups. Compared with the ox-LDL group, the number of autolysosomes was obviously increased, the expressions of Beclin-1 and LC3-II and the ratio of LC3-II/LC3-I in the cells were significantly increased while the expression of p62 in the cells was significantly decreased in the DMY (1.0 $\mu\text{mol/L}$) pretreatment group ($P < 0.05$). Autophagy inhibitor 3-MA partly abolished the effect of DMY on the cell survival rate ($P < 0.05$). **Conclusions** DMY protects ox-LDL-induced damage in HUVECs, the mechanism is associated with induction of autophagy.

Keywords: Dihydromyricetin; oxidized low-density lipoprotein; endothelial cell; autophagy; autophagy related proteins

二氢杨梅素(Dihydromyricetin, DMY)是黄酮类化合物之一,我国民间古茶藤茶中大量存在。二氢杨梅素的药理作用非常广泛,具有镇痛、止咳、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、调节血糖和血脂、调节免疫力及肝肾保护作用等^[1]。最近研究表明,二氢杨梅素能降低动脉粥样硬化(Artherosclerosis, AS)大鼠血脂水平,改善其血流动力学,抑制大鼠主动脉弓的炎症因子的表达,具有抗AS的作用^[2],然而其详细的机制还不清楚。氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是AS的独立危险因素^[3]。ox-LDL导致血管内皮细胞的损伤是AS发生的重要环节。自噬是真核生物中一种进化上高度保守,用于降解和回收利用细胞内生物大分子和受损细胞器的过程^[4]。研究发现自噬与AS关系密切,在AS中的发生、发展中具有双重作用,适度的自噬对AS具有保护作用,过度的自噬却会导致细胞死亡,降低斑块的稳定性,导致斑块破裂,发生急性临床事件^[5]。研究发现,ox-LDL能诱导内皮细胞的自噬并发生II型程序性死亡^[6]。DMY的抗AS作用是否与内皮细胞的自噬有关,目前还不清楚。因此,本研究旨在观察DMY对ox-LDL诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)损伤的影响,并探讨自噬在其中的作用,为AS的防治提供新的线索和策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

HUVECs株由中南大学湘雅医学院细胞中心提

供,二氢杨梅素为成都曼斯特生物科技有限公司产品,RPMI 1640培养基、小牛血清、胰酶、四乙酸乙二胺为美国Gibco公司产品,细胞凋亡-Hoechst33258染色试剂盒购于杭州碧云天生物技术研究,3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA)和噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]为美国Sigma公司产品,兔抗人Beclin1和微管相关蛋白1轻链3(Microtubule-associated-protein light chain-3, LC3)、p62/SQSTM1、 β -肌动蛋白一抗单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗为美国Santa Cruz公司产品。

1.2 实验仪器

二氧化碳CO₂细胞培养箱、细胞工作超净台、多功能酶标仪、低速离心机和倒置显微镜。全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司),垂直电泳仪与转膜系统(美国BioRad公司),凝胶成像分析系统(美国UVP公司),图像分析系统(武汉华海公司)。

1.3 细胞培养和实验分组

HUVECs用含10%小牛血清的RPMI 1640培养液培养,在37℃、5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中。隔天传代,处于对数生长期的细胞用于实验。实验分为6组:①对照组;②ox-LDL组:用含100.0 mg/L ox-LDL RPMI 1640培养液培养细胞24 h;③DMY单独处理组:用含1.0或100.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY培养液培养细胞26 h;④辛伐他汀预处理组:以辛伐他汀做为阳性对照组,用含1.8 mg/L辛伐他汀的培养液预处理2 h后,加入100.0 mg/L ox-LDL继续培养细胞24 h;

⑤不同浓度 DMY 预处理组:用含 0.01、0.10、1.00 和 10.00 $\mu\text{mol/L}$ DMY 的培养液预处理 2 h 后,加入 100.0 mg/L ox-LDL 继续培养细胞 24 h;⑥自噬抑制剂 3-MA 干预组:用含 5 mmol/L 3-MA 培养液预处理 30 min,用含 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 培养液预处理 2 h,加入 100.0 mg/L ox-LDL 继续培养细胞 24 h。

1.4 MTT 法

用胰酶消化后将 HUVECs 细胞制成细胞悬液,计数细胞密度,以 1×10^4 个/孔接种到 96 孔培养板内。实验结束后每孔加入 100 μl MTT,使 MTT 的终浓度为 0.5 mg/ml,继续培养 4 h,吸去培养液。加入二甲基亚砜 100 μl /孔,振荡 10 min,待结晶完全溶解后,在酶标仪上测定 570 nm 波长的吸光度值(optical density, OD),每组设重复孔 3 个。计算各组细胞的存活率,以对照组为参照(细胞存活率为 100%),计算其他各组细胞存活率=(处理组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。

1.5 Hoechst 33258 染色

HUVECs 细胞接种到 24 孔细胞培养板中,相应处理结束后,用磷酸盐缓冲溶液将细胞清洗 2 遍。然后每孔加 10 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst33258 染色液 100 μl ,在室温下避光孵育 15 min,将染色液吸去。在荧光显微镜下以 346 nm 的激发光激发,在 460 nm 的发射光下观察细胞核的形态^[7]。实验操作按试剂盒说明书进行。

1.6 Western blot 检测

提取各组 HUVECs 细胞的总蛋白,BAC 法测定蛋白浓度。取 100 μl 蛋白样本加入到 $2 \times$ 十二烷基磺酸钠凝胶加样缓冲液中,煮沸充分变性蛋白。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 1 h 分离蛋白,分离的蛋白转膜至聚偏氟乙稀膜上。5%脱脂牛奶封闭 2 h,加入兔抗人 Beclin-1(1:200)、LC3(1:200)、p62(1:200)及 β -肌动蛋白(1:400)一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜。加入鼠抗兔二抗,孵育 6 h。洗膜,显色,用凝胶图像分析系统对胶片进行扫描和半定量分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析;组间两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

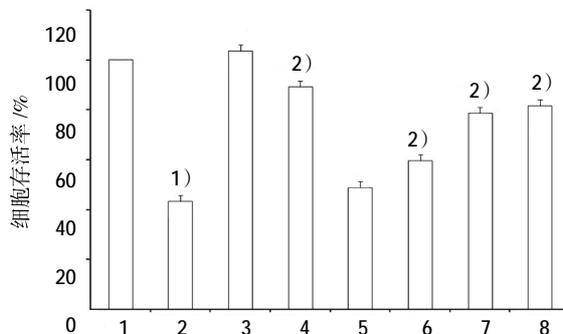
2 结果

2.1 Ox-LDL 和 DMY 对 HUVECs 细胞存活率的影响

采用 MTT 法检测 HUVECs 细胞活力,细胞的存活率组间比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F=3.872, P=0.016$)。ox-LDL 组细胞的存活率与对照组比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义($t=5.843, P=0.000$),ox-LDL 组降低;DMY 单独处理组与对照组比较,经 LSD- t 检验,差异无统计学意义($t=0.382, P=0.657$);辛伐他汀预处理组与 ox-LDL 组细胞存活率比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义($t=4.157, P=0.001$),辛伐他汀预处理组升高;0.1、1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组细胞的存活率与 ox-LDL 组比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义($t=1.463、3.051$ 和 $3.349, P=0.015、0.008$ 和 0.004),0.1、1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组均升高,其中最佳药物浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组细胞的存活率与辛伐他汀预处理组比较,经 LSD- t 检验,差异无统计学意义($t=0.627$ 和 $0.834, P=0.571$ 和 0.482)。见图 1。

2.2 ox-LDL 和 DMY 对 HUVECs 细胞核形态学的影响

对照组细胞核呈弥散较均匀低强度蓝色荧光,细胞核较大,形态规则,呈圆形或椭圆形。ox-LDL 组细胞数量明显减少,细胞核出现高强度蓝色荧光,固缩致密浓染,部分呈碎块状致密浓染,细胞核较小,形态呈不规则型。DMY 单独处理组与对照组比较,细胞核的形态无差异。辛伐他汀预处理组与 ox-LDL 组比较,细胞数量明显增加,细胞核荧光强度明显



1: 对照组;2: ox-LDL 组;3: 100.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 单独处理组;4: 辛伐他汀预处理组;5: 0.01 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组;6: 0.10 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组;7: 1.00 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组;8: 10.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组

1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 ox-LDL 组比较, $P < 0.05$

图 1 ox-LDL 和 DMY 对 HUVECs 细胞存活率的影响

降低,核固缩致密浓染和碎块状致密浓染减少。0.1、1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组与 ox-LDL 组比较,细胞数量增加,细胞核荧光强度明显降低,核固缩致密浓染和碎块状致密浓染减少,细胞形态较规则,1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组与辛伐他汀预处理组比较,细胞核形态无差异。其中 DMY 最佳药物浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$,与细胞存活率结果一致,因此后续实验中 DMY 的浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。见图 2。

2.3 HUVECs 中自噬体的观察

目前检测自噬的金标准是透射电镜观察自噬体。与对照组比较,ox-LDL 组和 DMY 单独处理组细胞自噬体和自噬溶酶体数量明显增加;与 ox-LDL 组比较,1.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组细胞自噬体和自噬溶酶体数量明显增加。见图 3。

2.4 ox-LDL 和 DMY 对 HUVECs 细胞中 Beclin1、LC3 及 p62 表达的影响

Beclin-1 和 LC3 是自噬体形成的标志蛋白,而

p62 是自噬的底物,常用来反应自噬流的水平。Beclin-1、LC3- II 的表达和 LC3- II/LC3- I 比值及 p62 的表达组间比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F=5.641, P=0.024$)。与对照组比较,ox-LDL 组和 DMY 单独处理组的 Beclin-1 ($t=2.746$ 和 $2.723, P=0.024$ 和 0.027)、LC3- II ($t=2.542$ 和 $2.521, P=0.036$ 和 0.039) 的表达、LC3- II/LC3- I 比值 ($t=2.806$ 和 $2.721, P=0.022$ 和 0.028) 比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义,ox-LDL 组和 DMY 单独处理组均上调;而 p62 表达比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义 ($t=3.149$ 和 $3.068, P=0.012$ 和 0.015),ox-LDL 组和 DMY 单独处理组均下调。与 ox-LDL 组比较,1.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组的 Beclin-1 ($t=2.957, P=0.018$)、LC3- II ($t=2.731, P=0.026$) 的表达、LC3- II/LC3- I 比值 ($t=2.958, P=0.018$) 比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义,1.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组上调;而 p62 表达比较,经 LSD- t 检验,差异有统计

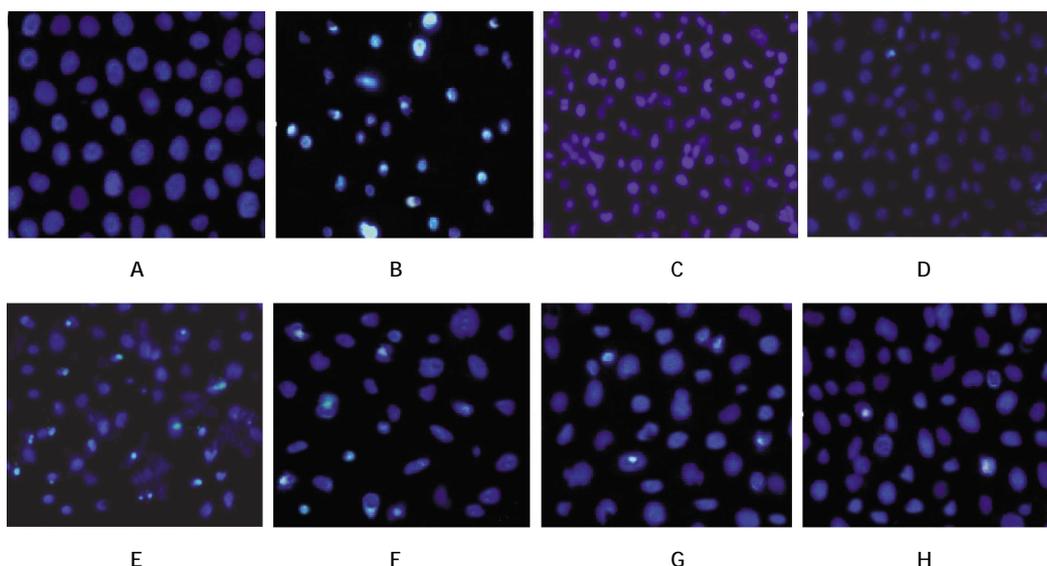


图 2 ox-LDL 和二氢杨梅素对 HUVECs 细胞核形态学的影响 ($\times 400$)
A: 对照组; B: ox-LDL 组; C: 100.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 单独处理组; D: 辛伐他汀预处理组; E: 0.01 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组; F: 0.10 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组; G: 1.00 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组; H: 10.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组

图 2 ox-LDL 和二氢杨梅素对 HUVECs 细胞核形态学的影响 ($\times 400$)

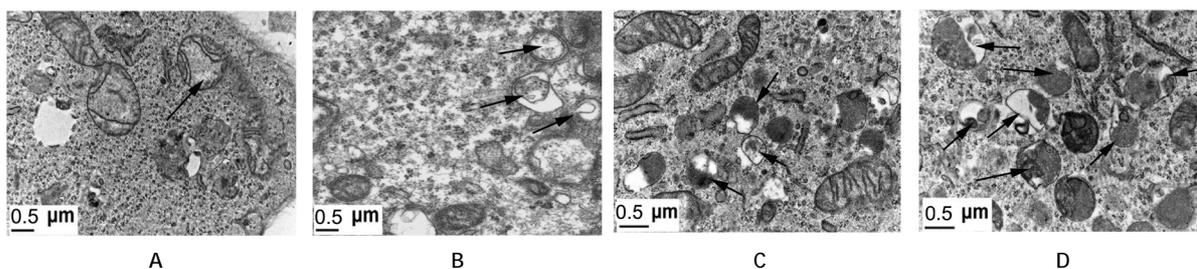


图 3 HUVECs 中自噬体 (透射电镜)
A: 对照组; B: ox-LDL 组; C: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 单独处理组; D: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组。箭头示自噬体或自噬溶酶体

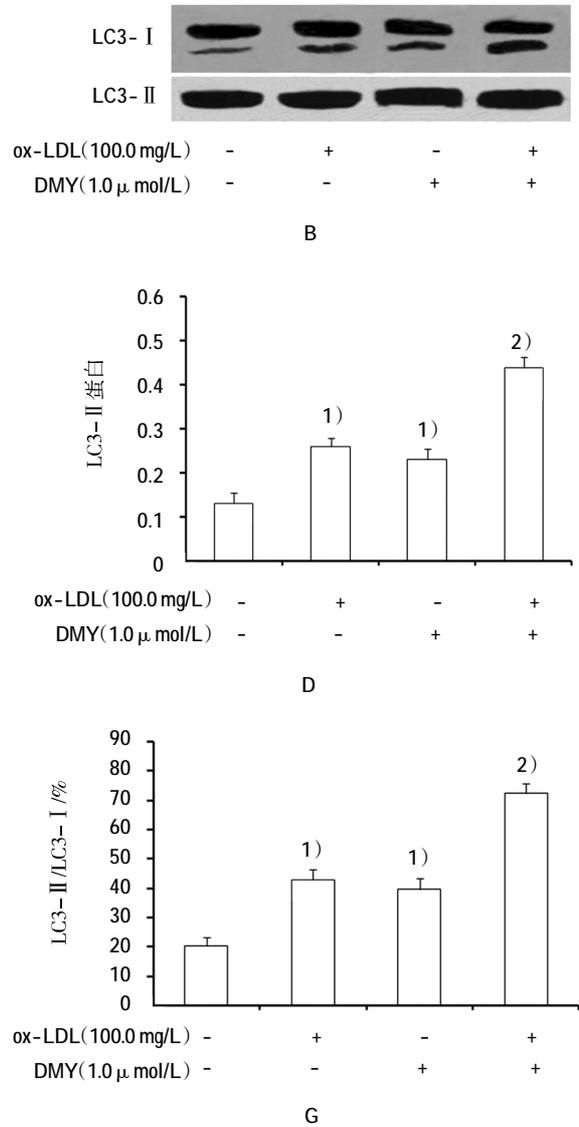
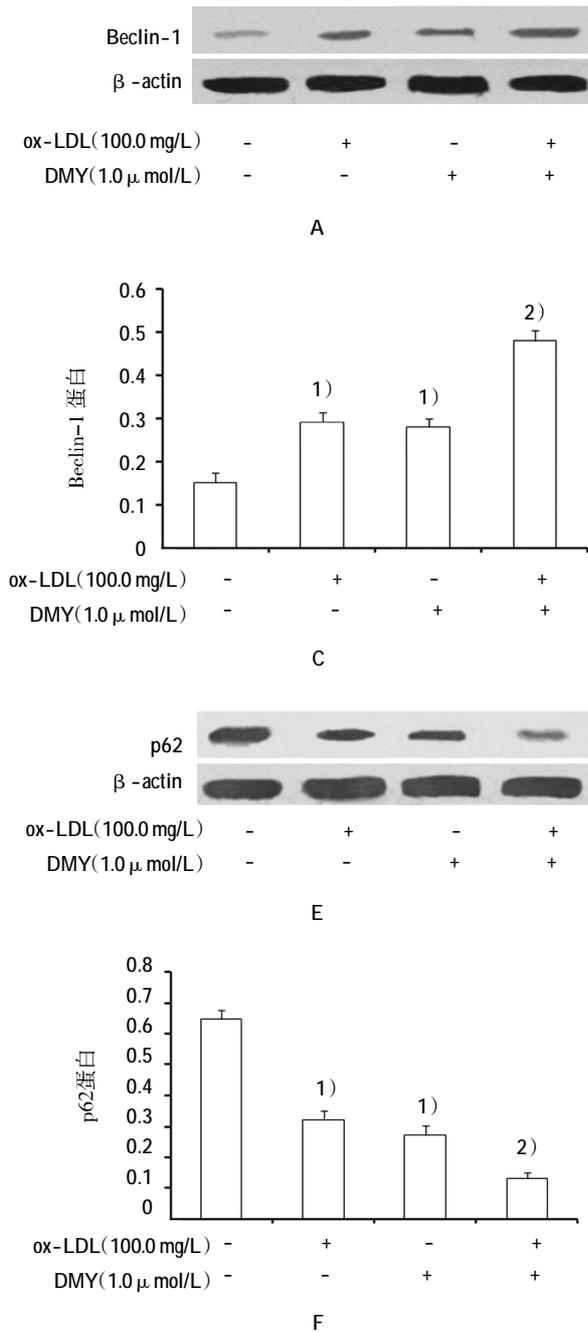
图 3 HUVECs 中自噬体 (透射电镜)

学意义($t=2.809, P=0.021$), $1.0 \mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组下调。见图 4。

2.5 自噬抑制剂对 DMY 作用的影响

采用 MTT 法检测 HUVECs 细胞活力,观察自噬抑制剂 3-MA 对 DMY 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤的影响。细胞的存活率组间比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F=5.673, P=0.002$)。ox-

LDL 组和 3-MA 组细胞存活率与对照组比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义($t=5.645$ 和 $6.817, P=0.001$ 和 0.000), ox-LDL 组和 3-MA 组均降低; $1.0 \mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组细胞存活率与 ox-LDL 组比较,经 LSD- t 检验,差异有统计学意义($t=2.958, P=0.012$), $1.0 \mu\text{mol/L}$ DMY 预处理组升高;自噬抑制剂 3-MA 部分抵消 DMY 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 存活率的降低($t=2.586, P=0.022$)。DMY 单独处理不影响 HUVECs 细胞的存活率($t=0.584, P=0.843$)。见图 5。



A: Beclin-1 蛋白的表达; B: LC3 蛋白的表达; C: Beclin-1 蛋白表达的量化图; D: LC3-II 蛋白表达的量化图; E: p62 蛋白的表达; F: p62 蛋白表达的量化图; G: LC3-II/LC3-I 的比值。1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 ox-LDL 组比较, $P < 0.05$

图 4 ox-LDL 和 DMY 对 HUVECs 细胞中 Beclin 1、LC3 及 p62 表达的影响

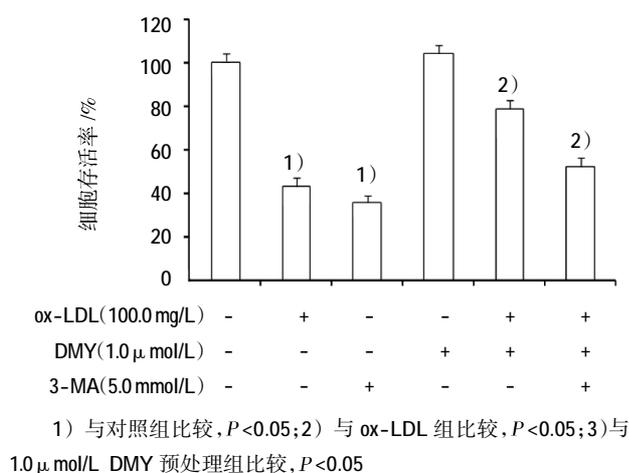


图 5 自噬抑制剂对二氢杨梅素作用的影响

3 讨论

血管内皮细胞受损是 AS 发生的始动环节, ox-LDL 是导致内皮细胞损伤的常见因素, 也是导致 AS 发生、发展的独立危险因素。ox-LDL 可刺激内皮细胞分泌多种炎症因子、黏附分子及趋化因子, 促进 T 淋巴细胞和单核细胞的黏附并向内膜下移行, 促进 AS 的形成。另一方面, ox-LDL 诱导机体产生大量的活性氧, 导致内皮细胞的脂膜、蛋白质和 DNA 的损伤, 损伤内皮细胞, 降低内皮细胞对血管的保护作用, 加速 AS 的发生。因此保护血管内皮细胞是防治 AS 的一个重要途径。

二氢杨梅素为 3,5,7,3',4',5'-6 羟基-2,3-双氢黄酮醇, 是一种常见的黄酮类化合物, 在我国民间古茶藤茶中含量较高, 在葡萄等水果和蔬菜中都大量自然存在。二氢杨梅素的药理作用非常广泛, 具有镇痛、止咳、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、护肝、调节血糖和血脂, 以及调节免疫力等作用。最近研究表明, 二氢杨梅素具有抗 AS 的作用。梁柱第等^[2]研究发现, 藤茶二氢杨梅素抑制高脂诱导 Wistar 大鼠 AS 的形成, 降低 AS 大鼠血清 C-反应蛋白、血清肿瘤坏死因子及白细胞介素-1 的水平, 显著降低 AS 大鼠主动脉弓分泌型血小板型磷脂酶 A2 的表达, 提示藤茶二氢杨梅素具有防治 AS 的作用。其作用机制是通过改善 AS 大鼠炎症因子水平, 抑制分泌型血小板型磷脂酶 A2 的表达。研究发现, 藤茶总黄酮(主要成分为 DMY)可显著降低 AS 大鼠的血清低密度脂蛋白、三酰甘油及总胆固醇水平, 升高高密度脂蛋白水平; 显著降低 AS 大鼠血浆黏度、全血黏度和红细胞压积, 提示藤茶总黄酮可改善 AS 大鼠血脂水平和

血流动力学, 具有防治 AS 的作用。血管内皮细胞的损伤是 AS 发生的始动环节, DMY 具有血管内皮细胞保护作用。刘云霄等^[9]研究发现, DMY 能抑制 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞的损伤, 其机制与清除细胞内活性氧、抑制细胞内钙离子介导的细胞凋亡相关。HOU 等^[9]研究表明, DMY 能通过线粒体凋亡途径抑制血管内皮细胞的氧化应激损伤。本研究结果显示, DMY 预处理能抑制 ox-LDL 诱导的损伤, 增加细胞的存活率, 抑制细胞的凋亡, 与以前的研究结果一致, 但其机制还不清楚。

自噬是一种真核细胞进化过程中高度保守的机制, 在自噬相关基因的调控下, 利用溶酶体降解细胞内长寿蛋白质、受损的细胞器和入侵微生物的过程, 是维持细胞内稳态必不可少的一条分解代谢途径, 是细胞应激情况下, 维持细胞内环境稳态和存活的重要途径。研究显示, 细胞自噬参与内皮细胞的保护, 细胞自噬可降解和消化内皮细胞内受损、衰老和失去功能的细胞器和变性的蛋白质, 能减轻炎症、氧化应激和缺氧等诱导的内皮细胞的凋亡和坏死。XIA 等^[10]研究发现, 飞燕草素三葡萄糖甙通过腺苷酸活化蛋白激酶/沉默信息调节因子 1 (AMP-activated-protein kinase/silent information regulator of transcription 1, AMPK/Sirt1) 信号通路上调自噬水平, 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 的损伤。研究发现, Sirt3 活化可维持细胞内的自噬水平, 而抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 的损伤^[11]。Beclin-1 和 LC3 是自噬标志性蛋白。Beclin-1 是哺乳动物体内参与细胞自噬的特异性基因, 也是酵母自噬相关蛋白 6 的同系物。Beclin-1 能与 Class III 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 形成复合物, 参与自噬前体复合物的形成和自噬小体膜的形成, 成为自噬体形成的标志性蛋白。最初合成一个未处理的 LC3 是前体 LC3, 自噬相关蛋白 4 可立即将其裂解, 产生一种活跃的细胞溶质形式被称为 LC3-I。随着自噬相关蛋白 7 的催化和 E2 酶 At93 的结合, LC3-I 和丰富的膜磷脂即磷脂酰乙醇胺相互作用产生 LC3-II。LC3-II 结合并位于胞内自噬体膜上, 其含量与自噬泡数量成正相关, 反映自噬体的含量, 因此 LC3-II 表达和 LC3-II/LC3-I 常用来反映自噬的水平。p62/SQSTM1 是自噬降解的标志物, 常用来反映自噬活性。DMY 对细胞自噬具有调节作用。XIA 等^[10]研究发现, DMY 能抑制哺乳动物雷帕霉素靶向基因 (Mammalian target of rapamycin, mTOR) 途径诱导的 HepG2

细胞自噬。研究发现,DMY 通过 AMPK 信号通路诱导自噬,改善骨骼肌细胞的胰岛素抵抗^[12]。本研究结果显示,DMY 预处理增加 ox-LDL 诱导的 HU VECs 的自噬体和自噬溶酶体的数量,上调 Beclin-1 和 LC3- II 的表达及 LC3- II /LC3- I 比值,下调 p62 的表达,而自噬抑制剂 3-MA 部分抵消 DMY 对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 的保护作用,提示 DMY 通过诱导细胞自噬,抑制 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤。细胞自噬的调控过程十分复杂,涉及 PI3K/I mTOR、PI3K III 和 AMPK/Sirt1 等信号通路,DMY 诱导血管内皮细胞自噬的详细过程有待进一步研究。

总之,DMY 能抑制 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤,其机制与促进细胞自噬水平有关。本研究证实,DMY 能通过保护血管内皮细胞而发挥抗 AS 的作用,为临床上将 DMY 用于内皮细胞损伤相关性疾病的防治,提供理论依据和实验支持。

参 考 文 献:

- [1] SHEN Y, LINDEMEYER A K, GONZALEZ C, et al. Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(1): 390-401.
- [2] 梁柱第,曾宪彪,韦桂宁,等. 藤茶双氢杨梅素对动脉粥样硬化大鼠的炎症因子及主动脉弓 sPLA2- II A 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(4): 120-123.
- [3] MITRA S, DESHMUKH A, SACHDEVA R, et al. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy[J]. *Am J Med Sci*, 2011, 342(2): 135-142.
- [4] 康于庆,李跃兵,黄再青,等. 盐酸戊乙奎醚对大鼠小肠组织自噬的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(9): 1-5.
- [5] PENG N, MENG N, WANG S, et al. An activator of mTOR inhibits oxLDL-induced autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells and restricts atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-}mice[J]. *Sci Rep*, 2014, 4(1): 5519.
- [6] JIN X, CHEN M, YI L, et al. Delphinidin-3-glucoside protects human umbilical vein endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by autophagy upregulation via the AMPK/SIRT1 signaling pathway[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(10): 1941-1951.
- [7] 王辉,王婧,解卫平,等. 细胞自噬与缺氧诱导的人肺动脉内皮细胞凋亡的相关性研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(24): 5-10.
- [8] 刘云霄,潘晓琼,胡臻. 二氢杨梅素对 H₂O₂ 诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤的影响[J]. *温州医科大学学报*, 2014, 44(4): 264-267.
- [9] HOU X, TONG Q, WANG W, et al. Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways[J]. *Life Sci*, 2015, 130(1): 38-46.
- [10] XIA J, GUO S, FANG T, et al. Dihydromyricetin induces autophagy in HepG2 cells involved in inhibition of mTOR and regulating its upstream pathways[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 66(1): 7-13.
- [11] ZHANG H P, ZHENG F L, ZHAO J H, et al. Genistein inhibits ox-LDL-induced VCAM-1, ICAM-1 and MCP-1 expression of HUVECs through heme oxygenase-1[J]. *Arch Med Res*, 2013, 44(1): 13-20.
- [12] SHI L, ZHANG T, LIANG X, et al. Dihydromyricetin improves skeletal muscle insulin resistance by inducing autophagy via the AMPK signaling pathway[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 409(1): 92-102.

(童颖丹 编辑)