

## 异鼠李素通过上调自噬水平预防巨噬细胞脂质代谢紊乱

王婷婷, 张鹏珂, 史敏, 于倩怡, 乔娇, 薛玉刚



扫描二维码  
查看更多

**【摘要】** 目的 探讨异鼠李素预防巨噬细胞脂质代谢紊乱的可能机制。方法 本实验时间为2022年1—6月。取对数生长期的RAW264.7细胞, 将其分为对照组(不干预)、动脉粥样硬化组〔采用50  $\mu\text{g/ml}$ 的氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)干预24 h〕、动脉粥样硬化+异鼠李素组(采用20  $\mu\text{mol/L}$ 的异鼠李素孵育8 h, 之后采用50  $\mu\text{g/ml}$ 的ox-LDL干预24 h)。采用油红O染色检测各组巨噬细胞中脂质含量, Western blot法检测各组巨噬细胞中自噬标志物〔微管相关蛋白1轻链3(LC3 II)、P62〕表达水平, 透射电镜观察各组巨噬细胞中自噬小体数目。结果 油红O染色结果显示, 对照组巨噬细胞中未发现脂质沉积; 动脉粥样硬化组巨噬细胞中存在明显的脂质沉积现象; 与动脉粥样硬化组比较, 动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中脂质含量明显减少。动脉粥样硬化组、动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中LC3 II表达水平低于对照组, P62表达水平高于对照组( $P < 0.05$ ); 动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中LC3 II表达水平高于动脉粥样硬化组, P62表达水平低于动脉粥样硬化组( $P < 0.05$ )。透射电镜观察结果显示, 对照组巨噬细胞中可观察到自噬小体; 与对照组相比, 动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中自噬小体数目明显减少; 与动脉粥样硬化组相比, 动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中自噬小体数目增多。结论 异鼠李素可能通过上调自噬水平来预防巨噬细胞脂质代谢紊乱, 进而预防泡沫细胞形成。

**【关键词】** 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; 脂类代谢; 异鼠李素; 自噬

**【中图分类号】** R 543.5 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.237

**Isorhamnetin Prevents Lipid Metabolism Disorder in Macrophages by Up-regulating Autophagy Level** WANG Tingting, ZHANG Pengke, SHI Min, YU Qianyi, QIAO Jiao, XUE Yugang

Department of Cardiology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: XUE Yugang, E-mail: 26434505@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the specific mechanism of isorhamnetin in preventing lipid metabolism disorder in macrophages. **Methods** This study was conducted from January to June 2022. RAW264.7 cells in logarithmic growth phase were divided into control group (no intervention), atherosclerosis group [treated with 50  $\mu\text{g/ml}$  oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) for 24 h], atherosclerosis+isorhamnetin group (incubated with 20  $\mu\text{mol/L}$  isorhamnetin for 8 h, and then treated with 50  $\mu\text{g/ml}$  ox-LDL for 24 h). The lipid content of macrophages in each group was detected by oil red O staining. The expression level of autophagy markers [microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) II and P62] in macrophages in each group was detected by Western blot. The number of autophagosomes in macrophages in each group was observed by transmission electron microscopy. **Results** Oil red O staining showed that no lipid deposition was found in macrophages of control group; there was obvious lipid deposition in macrophages of atherosclerosis group; the lipid content of macrophages in the atherosclerosis+isorhamnetin group was significantly reduced compared with that in the atherosclerosis group. The expression level of LC3 II in macrophages of atherosclerosis group and atherosclerosis+isorhamnetin group was lower than that of control group, and the expression level of P62 was higher than that of control group ( $P < 0.05$ ). The expression level of LC3 II in macrophages of atherosclerosis+isorhamnetin group was higher than that of atherosclerosis group, and the expression level of P62 was lower than that of atherosclerosis group ( $P < 0.05$ ). The results of transmission electron microscopy showed that autophagosomes could be observed in macrophages of the control group; compared with the control group, the number of autophagosomes in the atherosclerosis group and the atherosclerosis+isorhamnetin group was significantly reduced; compared with atherosclerosis group, the number of autophagosomes in macrophages of atherosclerosis+isorhamnetin group was increased. **Conclusion** Isorhamnetin

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82200404)

作者单位: 710032陕西省西安市, 空军军医大学唐都医院心内科

通信作者: 薛玉刚, E-mail: 26434505@qq.com

can prevent the lipid metabolism disorder in macrophages by up-regulating autophagy level, and then prevent the formation of foam cells.

**【Key words】** Atherosclerosis; Macrophages; Lipid metabolism; Isorhamnetin; Autophagy

急性心肌梗死是动脉粥样硬化性心血管疾病的主要并发症,其致死率较高,为13.2%<sup>[1]</sup>。鉴于不稳定斑块的治疗策略有限,有必要开发新的治疗手段来预防斑块形成,而不是治疗已经形成的斑块<sup>[2]</sup>。动脉粥样硬化的形成主要是由于巨噬细胞中脂质代谢紊乱,导致脂质转运出巨噬细胞发生障碍及巨噬细胞中存在多余的脂质沉积,进而导致泡沫细胞的形成<sup>[3]</sup>。而泡沫细胞在血管内皮下的不断形成及积聚可促进斑块的形成和进展,且脂质核心不断扩大可导致不稳定斑块的形成<sup>[4]</sup>。因此,探讨纠正巨噬细胞中脂质代谢紊乱从而抑制泡沫细胞形成的机制有助于抑制不稳定斑块的形成,从而降低急性心血管事件的发生率。

异鼠李素是一种主要从大量果实、花等植物中提取的黄酮类化合物,研究发现,其具有降血脂、扩张冠状动脉、抗氧化等重要作用<sup>[5]</sup>。研究显示,真核细胞中维持细胞器和蛋白质稳态的一种重要的细胞过程被称为“自噬”<sup>[6]</sup>。本研究组前期研究发现,异鼠李素可通过升高SIRT6来减轻巨噬细胞脂质代谢障碍,进而抑制泡沫细胞形成<sup>[7]</sup>,但自噬是否参与这一病理过程目前尚不得而知。基于此,本研究旨在探讨异鼠李素预防巨噬细胞脂质代谢紊乱的可能机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验时间 本实验时间为2022年1—6月。

1.2 实验细胞 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7细胞)购自美国ATCC公司。

1.3 主要实验试剂与仪器 异鼠李素(批号: MED80003,纯度 $\geq 98\%$ )购自湖南康都制药有限公司,氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)购自广州市益源生物科技有限公司,微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) II抗体(货号: AB192890)、P62抗体(货号: AB109012)、GAPDH抗体(货号: #8864S)购自美国CST公司,山羊抗兔IgG二抗购自西安壮志生物科技有限公司。

## 1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养及分组 采用含有15%胎牛血清的细胞培养基培养RAW264.7细胞,培养环境为消毒灭菌细胞孵箱。取对数生长期的RAW264.7细胞,将其分为对照组(不干预)、动脉粥样硬化组(采用50  $\mu\text{g/ml}$ 的ox-LDL干预24 h<sup>[8]</sup>)、动脉粥样硬化+异鼠李素组(采用20  $\mu\text{mol/L}$ 的异鼠李素孵育8 h,之后采用50  $\mu\text{g/ml}$ 的ox-LDL干预24 h)。

1.4.2 油红O染色检测巨噬细胞中脂质含量 收集各组RAW264.7细胞,固定15 min后根据试剂盒说明书进行油红O染色,然后在倒置显微镜下观察巨噬细胞中脂质含量。实验独立重复3次。

1.4.3 Western blot法检测巨噬细胞中自噬标志物(LC3 II、P62)表达水平 收集各组RAW264.7细胞,用PBS洗涤并充分消化,提取蛋白后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上;加入LC3 II、P62、GAPDH抗体(实验所需LC3 II、P62、GAPDH抗体提前按1:100的比例配好),用脱脂奶粉封固后于4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜;滴加山羊抗兔IgG二抗孵育1 h,采用化学发光法、利用BIO-RAD凝胶成像系统检测巨噬细胞中LC3 II、P62表达水平。实验独立重复3次。

1.4.4 透射电镜观察巨噬细胞中自噬小体数目 收集各组RAW264.7细胞,送往空军军医大学口腔医院电镜室制备标本,在透射电镜下观察自噬小体数目。实验独立重复3次。

1.5 统计学方法 采用Graphpad Prism 5.01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,组间两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差有统计意义。

## 2 结果

2.1 巨噬细胞中脂质含量 油红O染色结果显示,对照组巨噬细胞中未发现脂质沉积;动脉粥样硬化组巨噬细胞中存在明显的脂质沉积现象;与动脉粥样硬化组比较,动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中脂质含量明显减少,见图1。

2.2 巨噬细胞中自噬标志物表达水平 三组巨噬细胞中LC3 II、P62表达水平比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );动脉粥样硬化组、动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中LC3 II表达水平低于对照组, P62表达水平高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中LC3 II表达水平高于动脉粥样硬化组, P62表达水平低于动脉粥样硬化组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

2.3 巨噬细胞中自噬小体数目 透射电镜观察结果显示,对照组巨噬细胞中可观察到自噬小体;与对照组相比,动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中自噬小体数目明显减少;与动脉粥样硬化组相比,动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中自噬小体数目增多,见图2。

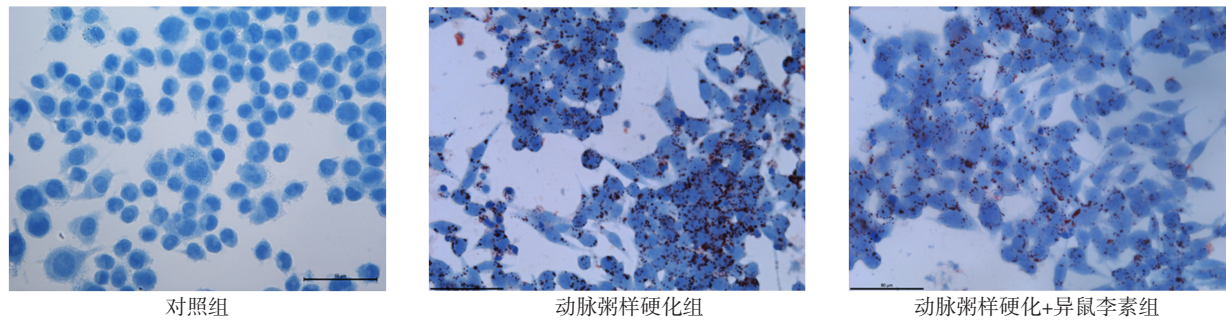


图1 油红O染色检测各组巨噬细胞中脂质含量 (×200)  
Figure 1 Lipid content of macrophages in each group detected by oil red O staining

表1 三组巨噬细胞中自噬标志物表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 1 Comparison of expression levels of autophagy markers of macrophages in three groups

组别	LC3 II	P62
对照组	1.000 ± 0.053	1.000 ± 0.062
动脉粥样硬化组	0.193 ± 0.136 <sup>a</sup>	4.086 ± 0.436 <sup>a</sup>
动脉粥样硬化+异鼠李素组	0.586 ± 0.096 <sup>ab</sup>	2.273 ± 0.105 <sup>ab</sup>
F值	159.60	351.60
P值	<0.001	<0.001

注: LC3=微管相关蛋白1轻链3; <sup>a</sup>表示与对照组比较,  $P<0.05$ ; <sup>b</sup>表示与动脉粥样硬化组比较,  $P<0.05$

### 3 讨论

心血管疾病是影响全世界人民健康的最主要问题之一, 患者死亡率很高, 因而早期预防和治疗心血管疾病尤为重要, 而动脉粥样硬化是心血管疾病最常见的原因之一<sup>[9]</sup>。众所周知, 动脉粥样硬化的形成是一个复杂的病理过程, 包括脂质代谢紊乱、炎症、氧化应激、自噬功能障碍和线粒体功能障碍, 其中脂质代谢紊乱发挥着关键作用<sup>[9]</sup>。巨噬细胞摄取脂质与清除脂质的作用失衡将导致多余的脂质积聚, 从而引发脂质代谢紊乱, 进而导致泡沫细胞形成<sup>[10-11]</sup>; 此外, 脂质超负荷会阻碍巨噬细胞从斑块中迁移, 导致其发生凋亡和坏死, 从而加重斑块的不稳定性<sup>[12]</sup>。因此, 纠正巨噬细胞脂质代谢紊乱是抑制动脉粥样硬化斑块形成的有效方法。既往研究发现, 异鼠李素具有减轻氧化应激导致的内皮功能障碍等多种生物学作用<sup>[2]</sup>, 异鼠李素抗动脉粥样硬化的作用主要体现在抑制ox-LDL形成、内皮细胞损伤、脂质堆积、平滑肌细胞增殖及迁移等<sup>[13]</sup>, 然而其具体机制尚不清楚。本研究组前期研究发现, 异鼠李素可减轻巨噬细胞脂质代谢障碍, 进而抑制泡沫细胞形成<sup>[7]</sup>。本研究旨在探讨异鼠李素预防巨噬细胞脂质代谢紊乱的具体机制。

本研究油红O染色结果显示, 对照组巨噬细胞中未发现脂质沉积; 动脉粥样硬化组巨噬细胞中存在明显的脂质沉积现象; 与动脉粥样硬化组比较, 动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中脂质含量明显减少; 提示异

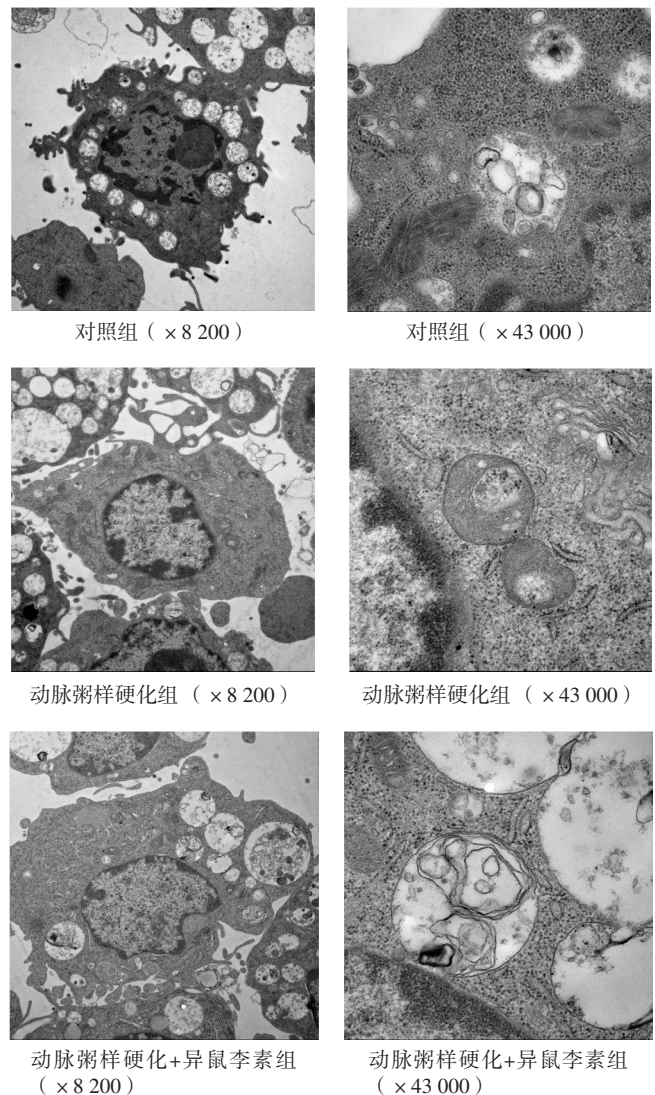


图2 透射电镜观察各组巨噬细胞中自噬小体数目  
Figure 2 The number of autophagosomes in macrophages in each group observed by transmission electron microscopy

鼠李素可以减少脂质在巨噬细胞中的沉积, 进而预防泡沫细胞的形成。

研究发现, 遗传、饮食和药物均可以激活自噬, 而自噬功能障碍会导致动脉粥样硬化, 进而引起心血管疾病<sup>[14]</sup>。自噬功能障碍可发生在各种类型细胞中, 主要

为血管平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞,其中巨噬细胞自噬功能障碍在动脉粥样硬化斑块的形成过程中发挥着重要作用<sup>[15]</sup>。研究显示,自噬底物P62可连接LC3和泛素化的底物,随后被整合到自噬体中,并在自噬溶酶体中被降解<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,动脉粥样硬化组、动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中LC3 II表达水平低于对照组,P62表达水平高于对照组;动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中LC3 II表达水平高于动脉粥样硬化组,P62表达水平低于动脉粥样硬化组,提示异鼠李素能够上调巨噬细胞中自噬水平。此外,本研究透射电镜观察结果显示,对照组巨噬细胞中可观察到自噬小体;与对照组相比,动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中自噬小体数目明显减少;与动脉粥样硬化组相比,动脉粥样硬化+异鼠李素组巨噬细胞中自噬小体数目增多,提示异鼠李素能够增加巨噬细胞中自噬小体的数目。以上研究结果表明,异鼠李素可能通过上调巨噬细胞自噬水平来促进脂质通过自噬-溶酶体途径进行降解,从而减少脂质沉积,预防脂质代谢紊乱,进而预防泡沫细胞形成。

综上所述,异鼠李素可能通过上调巨噬细胞自噬水平来预防脂质代谢紊乱,进而预防泡沫细胞形成。本研究为抑制动脉粥样硬化斑块形成、促进斑块稳定性提供了新的治疗方向。但本研究为基础研究,尚需要临床试验进一步验证本研究结论。此外,临床上冠心病合并糖尿病患者常同时存在糖脂代谢紊乱<sup>[16]</sup>,异鼠李素是否可通过上调巨噬细胞自噬水平来调控糖脂代谢紊乱还需要进一步研究。

致谢:感谢空军军医大学口腔医院的老师对本实验给予的技术支持及设备支持。

作者贡献:王婷婷、薛玉刚进行研究的构思与设计、可行性分析及文章的撰写,负责文章的质量控制及审校;王婷婷、张鹏珂进行文章的修订;于倩怡、乔娇进行数据收集、整理;史敏进行结果分析与解释;薛玉刚对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

## 参考文献

- [1] TIBAUT M, MEKIS D, PETROVIC D. Pathophysiology of myocardial infarction and acute management strategies [J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2017, 14 (3): 150-159. DOI: 10.2174/1871525714666161216100553.
- [2] KIAIE N, GORABI A M, PENSON P E, et al. A new approach to the diagnosis and treatment of atherosclerosis: the era of the liposome [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25 (1): 58-72. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.09.005.
- [3] WITZTUM J L, LICHTMAN A H. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9: 73-102. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-163936.
- [4] LUO Y T, DUAN H X, QIAN Y N, et al. Macrophagic CD146 promotes foam cell formation and retention during atherosclerosis [J]. *Cell Res*, 2017, 27 (3): 352-372. DOI: 10.1038/cr.2017.8.
- [5] 黄丽青. SIRT1信号通路介导异鼠李素抗心肌缺氧/复氧损伤机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [6] MARTINET W, DE MEYER G R Y. Autophagy in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2009, 104 (3): 304-317. DOI: 10.1161/circresaha.108.188318.
- [7] 王婷婷, 李妍, 张明明, 等. 异鼠李素通过抑制泡沫细胞形成增加动脉粥样硬化斑块稳定性的机制研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2022, 30 (2): 69-74. DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2022.00.034.
- [8] LUO Y, SUN G B, DONG X, et al. Isorhamnetin attenuates atherosclerosis by inhibiting macrophage apoptosis via PI3K/AKT activation and HO-1 induction [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (3): e0120259. DOI: 10.1371/journal.pone.0120259.
- [9] POZNYAK A V, NIKIFOROV N G, WU W, et al. Autophagy and mitophagy as essential components of atherosclerosis [J]. *Cells*, 2021, 10 (2): 443. DOI: 10.3390/cells10020443.
- [10] TALL A R, YVAN-CHARVET L, TERASAKA N, et al. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis [J]. *Cell Metab*, 2008, 7 (5): 365-375. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.03.001.
- [11] ROM O, AVIRAM M. Endogenous or exogenous antioxidants vs. pro-oxidants in macrophage atherogenicity [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2016, 27 (2): 204-206. DOI: 10.1097/MOL.0000000000000287.
- [12] LIBBY P, TABAS I, FREDMAN G, et al. Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes [J]. *Circ Res*, 2014, 114 (12): 1867-1879. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302699.
- [13] 闫姗, 南晓东, 马世杰, 等. 异鼠李素抗动脉粥样硬化作用的研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37 (14): 1771-1777. DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.14.022.
- [14] LAVANDERO S, CHIONG M, ROTHERMEL B A, et al. Autophagy in cardiovascular biology [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125 (1): 55-64. DOI: 10.1172/JCI73943.
- [15] GROOTAERT M O J, ROTH L, SCHRIJVERS D M, et al. Defective autophagy in atherosclerosis: to die or to senesce? [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 7687083. DOI: 10.1155/2018/7687083.
- [16] POZNYAK A, GRECHKO A V, POGGIO P, et al. The diabetes mellitus-atherosclerosis connection: the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (5): 1835. DOI: 10.3390/ijms21051835.

(收稿日期: 2023-03-24; 修回日期: 2023-06-02)

(本文编辑: 崔丽红)