

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cxyb.003276

# 补骨脂酚启动自噬减轻 $\beta$ -GP诱导的小鼠主动脉中膜钙化

何虎强,朱俊龙,李勤,罗泽恩,代江红,胥雄飞,曾宏,刘勇

(西南医科大学附属医院血管外科、西南医科大学心血管医学研究所、医学电生理学教育部重点实验室、四川心血管病防治协同创新中心,泸州 646000)

**【摘要】目的:**在选定的36种中药单体中筛选能够启动细胞自噬的药物;探究补骨脂酚对小鼠血管平滑肌细胞自噬的影响以及对血管平滑肌细胞钙化的影响。**方法:**从中草药中提取的黄酮类化合物以不同浓度处理人脑胶质瘤细胞(human glioma cells, U87)72 h,用MTT法得到药物对U87细胞的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>),并以小于IC<sub>50</sub>浓度的条件下以不同浓度梯度处理U87细胞,观察U87细胞GFP-LC3(微管相关蛋白1轻链3(Microtubule-associated protein light chain 3, LC3))的荧光信号和Western blot检测自噬指标LC3从而观察细胞自噬活动激活情况,以筛选出能够启动自噬的药物。后续选取补骨脂酚进行进一步实验,探究药物启动自噬后对血管平滑肌细胞钙化的影响。使用 $\beta$ -GP构建小鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)钙化模型,分为对照组(C-CTR组)和钙化组(C-CAL组),并通过Western blot检测Runx2、BMP2及LC3的表达。使用补骨脂酚干预后,分为对照组(C-CTR组)、钙化组(C-CAL组)、钙化+补骨脂酚组(C-CAL+Administration组)、对照+补骨脂酚组(C-CTR+Administration组)4组,分别用Western blot检测LC3、Runx2和BMP2,用茜素红染色观察细胞钙化结节的形成。在动物实验中使用高脂饮食同时在腹腔注射维生素D的方式构建小鼠主动脉钙化模型,使用腹腔注射补骨脂酚的方式对小鼠进行干预,分为对照组(CTR组)、钙化组(CAL组)、钙化+补骨脂酚组(CAL+Administration组)、对照+补骨脂酚组(CTR+Administration组)4组。通过冯库萨染色观察主动脉中膜钙沉积情况,使用HE染色法观察小鼠主动脉中膜的厚度。**结果:**观察LC3的荧光强度和Western blot提示:细辛脂素(Asarinim)、补骨脂甲素(Bavachin)、灯心草酚(Juncusol)、桑黄酮(Mullberrin)、地榆皂苷2(Ziyuglycoside 2)、补骨脂酚(Bakuchiol)、补骨乙素(Corylifolinin)、五味子甲素(Schisandrin A)、五味子乙素(Schisandrin B)可以显著增加自噬小体的表达( $P<0.05$ )。Western blot结果提示,在钙化的血管平滑肌细胞中,BMP2、Runx2以及LC3的表达显著增加( $P<0.05$ )。使用补骨脂酚干预后Western blot结果提示BMP2和Runx2表达降低( $P<0.05$ ),LC3-II表达显增加( $P<0.05$ )。茜素红结果显示钙结节沉积也显著降低( $P<0.05$ )。动物实验中,补骨脂酚干预后HE结果显示中膜厚度较钙化组显著增厚,冯库萨染色结果提示补骨脂酚可以显著减轻钙沉积。**结论:**补骨脂酚可以激活VSMCs的自噬,并减缓小鼠主动脉钙化的进程。

**【关键词】**补骨脂酚;自噬;血管平滑肌细胞;动脉中膜钙化**【中图分类号】**R114**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2022-11-23

## Bakuchiol initiates autophagy to reduce $\beta$ -phosphoglycerol-induced calcification of mouse vascular smooth muscle cells

He Huqiang, Zhu Junlong, Li Qin, Luo Zeen, Dai Jianghong, Xu Xiongfei, Zeng Hong, Liu Yong

(Vascular Surgery Department, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University; Institute of Cardiovascular Research, Key Laboratory of Medical Electrophysiology of Ministry of Education, Medical Electrophysiological Laboratory of Sichuan Province)

**[Abstract]** **Objective:** To screen drugs that can initiate cellular autophagy among 36 selected monomers of traditional Chinese medicine, and to explore the effects of Bakuchiol on mouse vascular smooth muscle cell autophagy and calcification. **Methods:** The human brain glioma cells (U87) were treated at different concentrations by flavonoids extracted from Chinese herbal medicine for 72 hours, the semi-inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) of U87 cells were treated by MTT method, and U87 cells were treated at different concentration gradients under conditions less than IC<sub>50</sub> concentration. The activation of cellular autophagy activity was observed by observing the fluorescent signals of U87 cell GFP-LC3 [microtubule-related protein

作者介绍:何虎强,Email:huhubaby216@163.com,

研究方向:周围血管疾病的基础与临床研究。

通信作者:刘勇,Email:lyong74@163.com。

基金项目:泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作资助项目(编号:2021LZXNYD-D11);古蔺县人民医院-西南医科大学附属医院科技战略合作资助项目(编号:2022GLXNYDFY06)。

优先出版:[\(2023-07-18\)](https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1046.R.20230717.1546.024.html)IC<sub>50</sub>) of U87 cells were treated by MTT method, and U87 cells were treated at different concentration gradients under conditions less than IC<sub>50</sub> concentration. The activation of cellular autophagy activity was observed by observing the fluorescent signals of U87 cell GFP-LC3 [microtubule-related protein

1 light chain 3(LC3) ] and the method of Western blots(WB) to detect autophagy activity and to screen for drugs that can initiate autophagy. Further experiments were conducted to explore the effects of Bakuchiol initiation on vascular smooth muscle cell calcification after autophagy. The calcification model of vascular smooth muscle cells(VSMCs) in mice was constructed using  $\beta$ -GP, involving control group(CTR) and calcification group(CAL), and the expression of Runx2, BMP2 and LC3 was detected by WB. After intervention with Bakuchiol, they were divided into 4 groups: CTR, CAL, calcification with Bakuchiol group(CAL + Administration), and control with Bakuchiol group(CTR + Administration), respectively, with WB detection for LC3, Runx2 and BMP2, and with Alizarin red to observe the formation of cell calcification nodules. In animal experiments, a high-fat diet was used to build a calcification model of the aorta in mice using vitamin D through intraperitoneal injection, and interventions were made in mice using intraperitoneal injection of Bakuchiol. The mice were divided into four groups: CTR, CAL, CTR + Administration and CTR + Administration. The deposition calcium in the artery medium membrane was observed via Von Kossa staining, and the thickness of the membrane in the aorta in mice was observed using the hematoxylin-eosin(HE) staining method. **Results:** The observed fluorescence intensity and WB cues of LC3 showed that: Asarinim, Bavachin, Juncusol, Mullberrin, Ziyuglycoside 2, Bakuchiol, Corylifolinin, Schisandrin A, and Schisandrin B could significantly increase the expression of autophagy ( $P<0.05$ ). WB results suggested a significant increase in the expression of BMP2, Runx2, and LC3 in calcified vascular smooth muscle cells ( $P<0.05$ ). WB results after intervention with Bakuchiol suggested a decrease in BMP2 and Runx2 expression ( $P<0.05$ ), and an increase in expression of LC3-II ( $P<0.05$ ). The results showed a significant decrease in calcium nodule deposition ( $P<0.05$ ). In animal experiments, the results of HE staining after the intervention of Bakuchiol showed a significant increase in the thickness of the medium membrane than the CAL group, and the Von Kossa results hinted that the Bakuchiol could significantly reduce calcium deposition. **Conclusion:** Bakuchiol can activate the autophagy of VSMCs and affect the process of aortic calcification in mice.

**[Key words]** Bakuchiol; autophagy; vascular smooth muscle cell; artery medium calcification

动脉中膜钙化(artery medium calcification, AMC)可以导致全身动脉狭窄、闭塞,最终导致血供不足。越来越多的研究表明,慢性肾功能衰竭、糖尿病、高血压患者的发生AMC的风险远高于健康人群<sup>[1-2]</sup>。血管平滑肌细胞作为动脉中膜的重要组成细胞,在AMC过程中发挥重要作用,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的钙化主要以BMP2和Runx2的高表达为标志,即VSMCs向成骨细胞表型转化。虽然目前通过腔内血管治疗在一定程度上可以缓解缺血症状,但是AMC的发病机制和病理生理过程仍然不明确。近年来的研究发现,自噬作为细胞的一种细胞自我调控现象越来越受到关注,在AMC的研究中发现自噬既可以促进AMC的发生也可以抑制AMC的进展<sup>[3-5]</sup>。自噬是一种细胞更新自己体内细胞器的过程,其特异性标志是LC3-I向LC3-II的转化加强,LC3-II的表达显著增加。由此可见自噬这一细胞学行为对AMC是有着某种影响的。既往有研究表明某些中药提取物可以加强细胞自噬活动,但是这些药物启动的自噬对VSMCs钙化的作用并不明确。本研究探讨中药提取物单体补骨脂酚能否启动VSMCs的自噬活动以及对VSMCs以及小鼠主动脉中膜钙化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和化学品

中药单体均购自成都普思生物科技股份有限公司(四川)。3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二甲基四唑溴(MTT)购自Sigma Aldrich(美国密苏里州圣路易斯)。Milli-Q水是由Milli-Q一体化净水系统Millipore在本实验室制备的。乙醇和甲醇从Anaqua Chemicals Supply(美国得克萨斯州休斯顿)购买。

### 1.2 36种中药单体配置及选择

药物单体用DMSO溶解,配成终浓度50 mmol/L,直到进一步使用。根据以下原则购买代表性中药单体进行生物测定:①选择含有黄酮类的药物,据报道,黄酮类药物可以启动自噬<sup>[6]</sup>。②选择富含植物激素的单体分类:近年来对激素研究较多,大多数研究显示激素能够启动自噬<sup>[7]</sup>。中药单体中文名及分子式见表1。

### 1.3 细胞培养及处理

在添加10%胎牛血清、50U/mL青霉素和50  $\mu$ g/mL链霉素的高糖DMEM培养基中培养稳定转染GFP-LC3的U87(Invitrogen, 苏格兰, 英国),以此来筛选能够启动U87自噬的药物。在添加10%胎牛血清、50 U/mL青霉素和50  $\mu$ g/mL链霉素的DMEM-F12培养基中培养VSMCs,在钙化培养基(5%胎牛血清、10 mmol/L $\beta$ -GP(购自西格玛, 美国密苏里州圣路易斯)、50 U/ml青霉素和50  $\mu$ g/mL链霉素的DMEM-F12)。

表 1 中药单体对应的中文名、英文名及分子式

中药中文名	中药英文名	分子式
O-Methylvisammioside	5-O 甲基维斯阿米醇苷	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub>
SEC-O-Glucosythamaudol	亥茅酚苷	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>
Valtrate	缬草三酯	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>
Valechlorine	氯化缬草素	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> ClO <sub>8</sub>
Rosmarinic acid	迷迭香酸	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>
Terrestrosin K	蒺藜皂苷 K	C <sub>51</sub> H <sub>82</sub> O <sub>24</sub>
Juncusol	灯心草酚	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
2,3,5,4-Tetrahydroxy	2,3,5,4-羟基二苯乙烯	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>
Terrestrosin D	蒺藜皂苷 D	C <sub>50</sub> H <sub>80</sub> O <sub>23</sub>
Chikusetsusaponin V	竹节参皂苷 V	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>19</sub>
Bavachin	补骨脂甲素	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>
Osthole	蛇床子素	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>
Mulberrin	桑黄酮	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>
Lobetyolin	党参炔苷	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>
Daucosterol	胡萝卜甙	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> O <sub>13</sub>
Ziyuglycoside1	地榆皂苷 1	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>13</sub>
Ziyuglycoside2	地榆皂苷 2	C <sub>35</sub> H <sub>56</sub> O <sub>8</sub>
Vaccarin	王不留行黄酮苷	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>19</sub>
Syringing	刺五加苷 B	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>
Przewalskinic acid	甘西鼠尾草酸甲	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>
Bakuchiol	补骨脂酚	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O
Erioclitrin	圣草次苷	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>
Eleutheroside E	刺五加苷 E	C <sub>34</sub> H <sub>46</sub> O <sub>18</sub>
Ligustrolavone	女贞苷	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>18</sub>
Corylifolinin	补骨脂乙素	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>
SchisandrinB	五味子乙素	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>
Schisandrin	五味子醇甲	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>
Schisandrol B	五味子醇乙	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>
Schisantherin B	五味子酯乙	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>
Schisantherin A	五味子酯甲	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>
Schisandrin A	五味子甲素	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>
Eriodictyol	圣草酚	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Corydaline	延胡索甲素	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>
Tetrahydropalmatine	延胡索乙素	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>
Asarinim	细辛脂素	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>
genistein	燃料木素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
Nuezhenide	女贞子苷	C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> O <sub>17</sub>

GFP-LC3 质粒由日本大阪大学 Tamotsu Yoshimori 提供, 使用慢病毒包装质粒后, 构建 GFP-LC3 稳转 U87 细胞株。用上述单体药物处理后, 用 4% 多聚甲醛在室温下固定 20 min, 然后用 PBS 冲洗 2 次。用荧光显微镜检查。在 Nikon Eclipse 80i 显微镜下观察 GFP-LC3 点状结构的阳性细胞。采用 CCD 数码相机 SPOT RT3™(美国纽约梅尔维尔诊断仪器公司) 拍摄代表性图像。通过观察细胞自噬小体的数量进一步初步判定自噬的发生。分别添加药物于 U87 细胞培养基中培养 72 h 后提取细胞蛋白, 进行蛋白印迹实验。后续实验选取补骨脂酚(25 mmol/L) 验证其对血管平滑细胞钙化的影响。10 mmol/L 的 β-GP 处理 72 h 以构建细胞钙化模型, 同时

使用补骨脂酚进行干预。细胞被分为 4 个组: 空白对照组 (CTR 组)、钙化组 (CAL 组)、予以补骨脂酚处理的钙化组 (CAL+Administration 组) 以及予以补骨脂酚处理的空白对照组 (CTR+Administration 组)。

#### 1.4 细胞毒性分析

用 MTT 法(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二甲基四唑溴化铵)法测定细胞活力(索莱宝; K002960P-100ul)。培养 4 h, 用 DMSO 溶解结晶紫。然后用分光光度计在 570 nm 处测定溶质混合物的比色读数。细胞存活率采用以下公式计算: 细胞存活率(%)=处理细胞数/细胞数 DMSO 对照×100。资料来自 3 个独立样本。

#### 1.5 动物实验

使用 8 周龄 C57 雄性小鼠, 分别予以普通饮食或者高脂饮食搭配腹腔注射维生素 D 来构建主动脉中膜钙化模型<sup>[8]</sup>; 模型构建第一周后开始予以药物干预, 药物干预组按照 10 mg/kg, 200 μL/次的剂量腹腔注射, 连续注射一周。造模成功后, 解剖小鼠, 获取小鼠主动脉组织, 小鼠根据不同的处理方式被分为 4 个组: 空白对照组 (CTR 组)、钙化组 (CAL 组)、予以补骨脂酚处理的钙化组 (CAL+Administration 组) 以及予以补骨脂酚处理的空白对照组 (CTR+Administration 组)。

#### 1.6 Western blot

在草药提取物处理后, 使用 Cell Signaling Technologies Inc. (Beverly, MA, USA) 的 100 μL RIPA 裂解液 (1×) 提取 VSMCs 蛋白。检测 LC3(兔抗 LC3 单克隆抗体, CST, 4599)、Runx2(兔抗 Runx2 单克隆抗体, CST, 12556)、BMP2(兔抗 BMP2 单克隆抗体, abcam, ab214821) 以及 β-actin(兔抗 β-actin 多克隆抗体 abcam, ab8227)。用 SDS-PAGE 蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 60 min, 用一抗在 4 °C 条件下孵育过夜, 持续轻微震荡。然后用 TBST 清洗膜 3 次, 然后用山羊抗兔 IgG 二抗(Li-Cor 公司, 925-68071) 孵育 1 h。用 TBST 清洗 3 次后, 使用 Odyssey CLx 成像系统(Li-Cor 公司) 观察蛋白条带。对于蛋白质的定量, 使用 Image Studio 软件(Li-cor 公司) 测量蛋白条带灰度值。

#### 1.7 染色

细胞茜素红染色: 将茜素红染料粉末使用双蒸水制成浓度为 0.2% 的溶液备用。将处理好的细胞用 PBS 洗涤 3 次后, 使用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 继续使用 PBS 洗涤 3 次, 使用配置好的染液进行染色 10~30 min 后, 用双蒸水洗尽后肉眼及显微镜下观察拍照。钙沉积区域呈现红色或者桔红色。组织冯库萨切片染色: 小鼠主动脉组织经包埋、切片后, 进行脱脂脱水后, 按 GENMED 石蜡切片组织冯库萨试剂盒说明书操作(GMS80045.3) 操作。组织 HE 切片染色: 小鼠主动脉组织经包埋、切片后, 进行脱脂脱水后, 按照索莱宝 HE 染色试剂盒说明书进行操作(G1120)。

#### 1.8 统计学处理

使用统计学软件 SPSS 25.0 统计数据。计量资料采用 t 检验或单因素方差分析。检验水准 α=0.05。

## 2 结 果

### 2.1 MTT 测定所选取的中药单体的细胞毒性

在测定这些药物的自噬作用前,采用 MTT 法测定其对 U87 的细胞毒性。给予不同浓度的药物干预,计算这些提取物的  $IC_{50}$  值并在图 1 和表 2 中显示,在荧光显微镜下观察细胞自噬小体形成的情况,通过观察自噬小体,筛选出自噬明显的干预药物的浓度。MTT 结果显示其中有 26 种单体的  $IC_{50}>100 \text{ mmol/L}$ ,剩余的 10 种单体  $IC_{50}$  分别是:缬草三酯 (1.56  $\mu\text{mol/L}$ )、氯化缬草素 (3.2  $\mu\text{mol/L}$ )、蒺藜皂苷 D (9.4  $\mu\text{mol/L}$ )、补骨脂甲素 (67.4  $\mu\text{mol/L}$ )、桑黄酮 (86.7  $\mu\text{mol/L}$ )、地榆皂苷 1 (21.33  $\mu\text{mol/L}$ )、地榆皂苷 2 (10.98  $\mu\text{mol/L}$ )、补骨脂酚 (37.63  $\mu\text{mol/L}$ )、补骨脂酚 (37.63  $\mu\text{mol/L}$ )、补骨脂乙素 (48.86  $\mu\text{mol/L}$ ) 及五味子酯乙 (89.26  $\mu\text{mol/L}$ )。

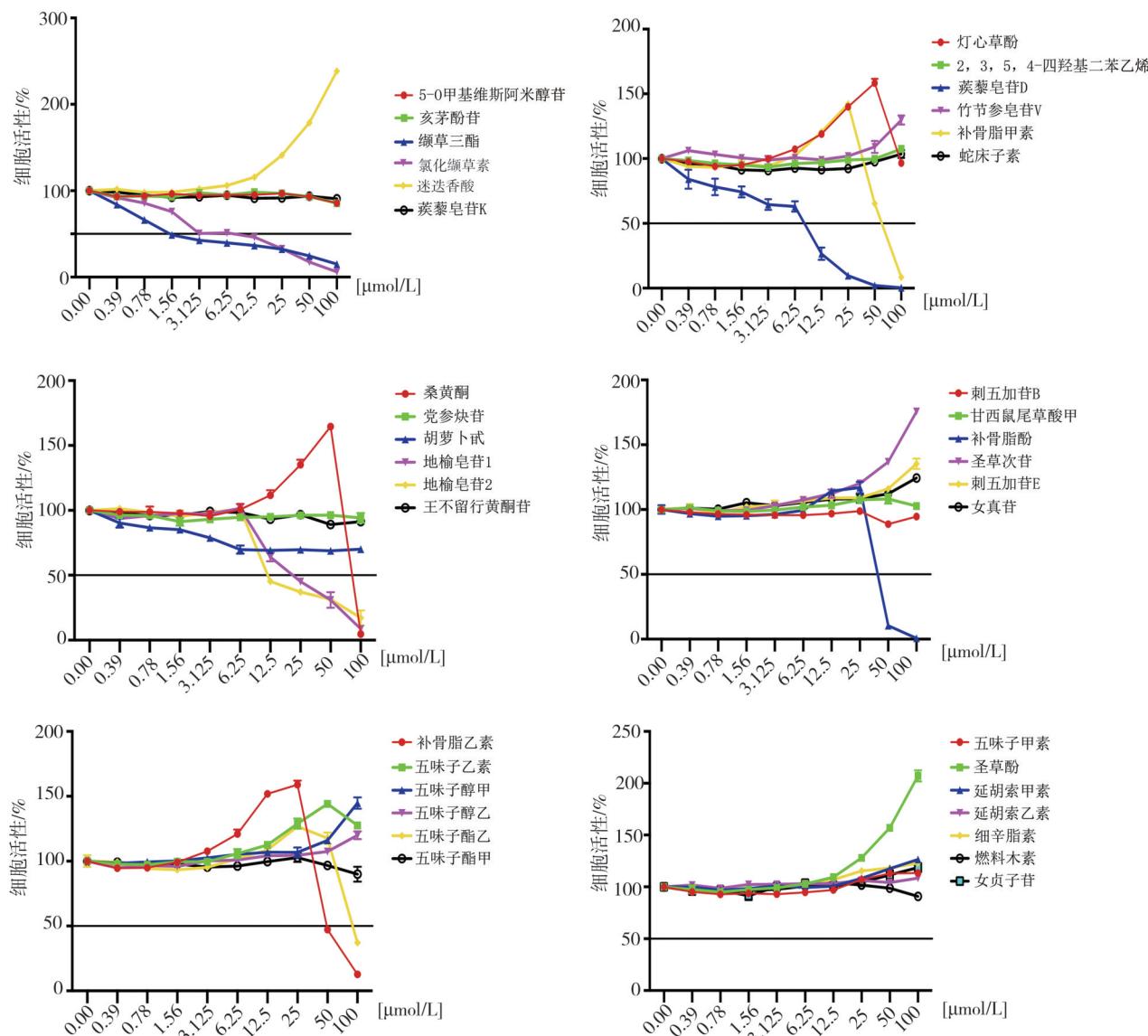


图 1 通过 MTT 法测定的个药物在 U87 细胞的  $IC_{50}$

### 2.2 荧光法测定 36 种中药单体的自噬效应

在稳定的 GFP-LC3-II-U87 中检测这些单体的自噬作用(图 2)。其中一些化合物如细辛脂素(Asarinim)、补骨脂甲素(Bavachin)、灯心草酚(Juncusol)、桑黄酮(Mullberrin)、地榆皂苷 2(Ziyuglycoside2)、补骨脂酚(Bakuchiol)、补骨乙素(Corylifolinin)、五味子甲素(SchisandrinA)、五味子乙素(SchisandrinB)可以显著增加自噬小体的表达。同时,发现来自于同一植物的化合物补骨脂甲素、补骨乙素以及补骨脂酚均可以诱导自噬小体的发生,同时具有浓度依赖性。

### 2.3 Western blot 测定 36 种中药单体的自噬效应

通过 Western blot 测定 LC3 II/ $\beta$ -actin 比值,发现补骨脂甲素、补骨脂乙素、补骨脂酚、细辛脂素、迷迭香酸、五味子酯甲、五味子甲素、圣草次苷、核茅酚苷、甘西鼠尾草酸、五味子醇乙、紫丁香苷和女真苷显著增加( $P<0.05$ )(图 3)。结合前期的荧光观察结果,补骨脂甲素、补骨脂乙素、补骨脂酚启动自噬的能力较强而且具有浓度依赖性。为了探究药物单体对 VSMCs 钙化的影响,后续采用补骨脂酚进行实验。

表2 不同中药单体在U细胞中的IC<sub>50</sub>值

药物名称	计量单位	IC <sub>50</sub> 值	药物名称	计量单位	IC <sub>50</sub> 值
5-O 甲基维斯阿米醇苷	mmol/L	>100	甘西鼠尾草酸甲	mmol/L	>100
亥茅酚苷	mmol/L	>100	补骨脂酚	mmol/L	37.63
缬草三酯	mmol/L	1.56	圣草次苷	mmol/L	>100
氯化缬草素	mmol/L	3.2	刺五加苷 E	mmol/L	>100
迷迭香酸	mmol/L	>100	女真苷	mmol/L	>100
蒺藜皂苷 K	mmol/L	>100	补骨脂乙素	mmol/L	48.86
灯心草酚	mmol/L	>100	五味子乙素	mmol/L	>100
2,3,5,4-四羟基二苯乙烯	mmol/L	>100	五味子醇甲	mmol/L	>100
蒺藜皂苷 D	mmol/L	9.4	五味子醇乙	mmol/L	>100
竹节参皂苷 V	mmol/L	>100	五味子酯乙	mmol/L	89.26
补骨脂甲素	mmol/L	67.4	五味子酯甲	mmol/L	>100
蛇床子素	mmol/L	>100	五味子甲素	mmol/L	>100
桑黄酮	mmol/L	86.7	圣草酚	mmol/L	>100
党参炔苷	mmol/L	>100	延胡索甲素	mmol/L	>100
胡萝卜甙	mmol/L	>100	延胡索乙素	mmol/L	>100
地榆皂苷 1	mmol/L	21.33	细辛脂素	mmol/L	>100
地榆皂苷 2	mmol/L	10.98	女贞子苷	mmol/L	>100
王不留行黄酮苷	mmol/L	>100	燃料木素	mmol/L	>100
刺五加苷 B	mmol/L	>100			

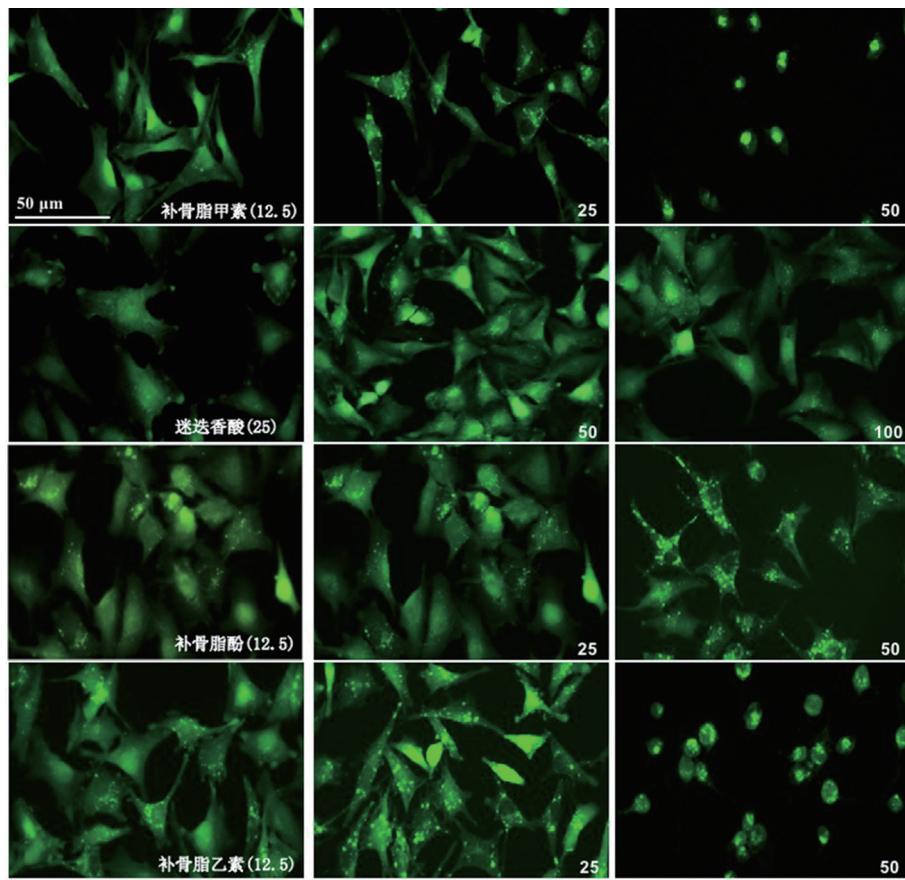


图2 稳定的 GFP-LC3 U87 细胞中中药单体的自噬小体的表达情况(200×)(标尺:50 μm;单位:mmol/L)

#### 2.4 $\beta$ -GP 处理后血管平滑肌细胞后,BMP2、Runx2 和 LC3-II 表达增加

构建细胞钙化模型后,发现相对于对照组(CTR),钙化组(CAL)的 BMP2、Runx2 的水平(图 4)显著高于对照组( $P <$

0.05)。这一结果表明, $\beta$ -磷酸甘油处理后的血管平滑肌细胞已经启动细胞钙化的进程。在这一进程中,我们发现自噬水平的标志物 LC3-II 的表达也显著升高(图 4),因此进一步探索自噬对血管平滑肌细胞钙化的影响。

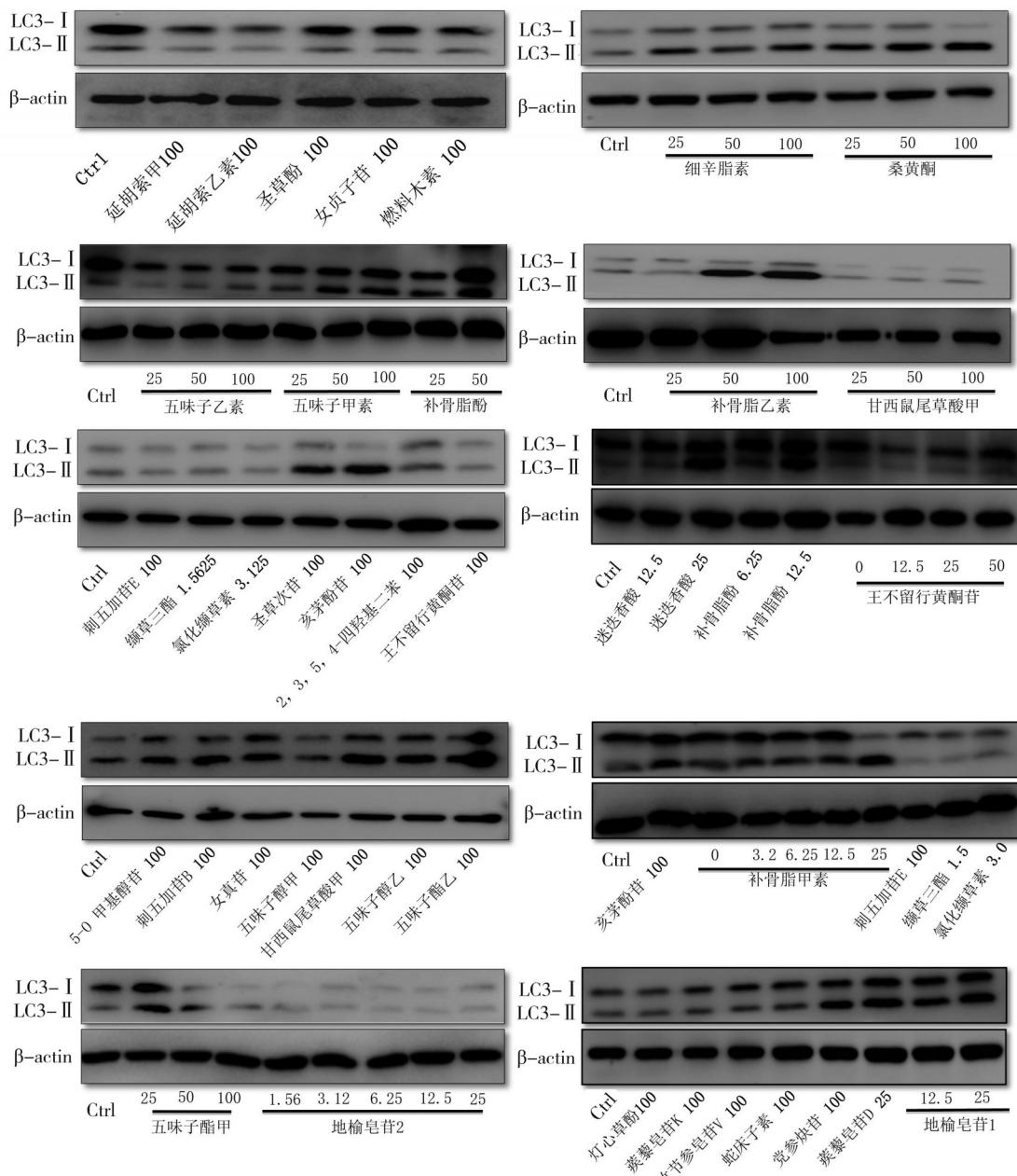
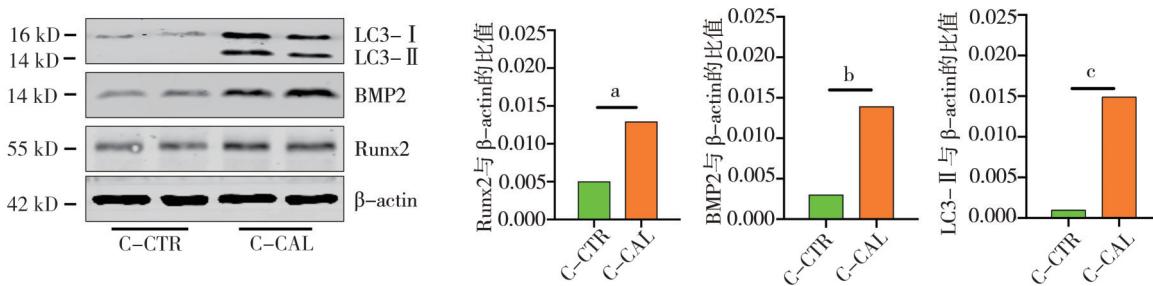


图3 用免疫印迹法测定36种中药单体在U87中的LC3-II的表达



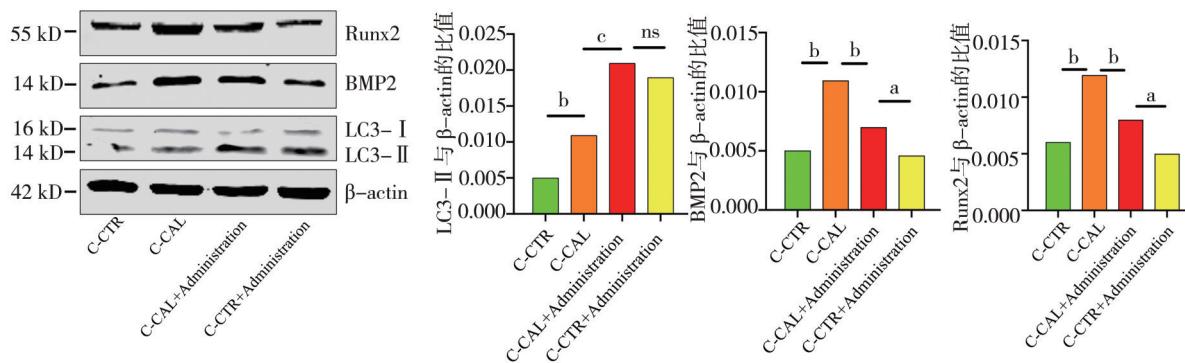
注:a, P&lt;0.01;b, P&lt;0.001;c, P&lt;0.0001

图4 通过免疫印迹实验检测钙化相关蛋白BMP2和Runx2以及自噬相关蛋白LC3-II的表达

2.5 补骨脂酚处理血管平滑肌细胞后减轻钙化  
以补骨脂酚干预钙化血管平滑肌细胞后, LC3-II 的表

达显著高于未处理组(图5),表明25 mmol/L的补骨脂酚可以启动血管平滑肌细胞的自噬。添加补骨脂酚的钙化组

(C-CAL+Administration)的BMP2和Runx2的表达水平低于普通钙化组(C-CAL)( $P<0.05$ ),但是添加补骨脂酚的对照组(C-CTR+Administration)的BMP2和Runx2的水平相对于普通对照组(C-CTR)无显著差异。茜素红染色结果提示,相对于钙化组,使用补骨脂酚处理组颜色较钙化组浅,表明钙化程度减轻(图6)。



注:a, $P<0.01$ ;b, $P<0.001$ ;c, $P<0.0001$

图5 通过免疫印迹实验检测Runx2、BMP2、LC3-II的表达

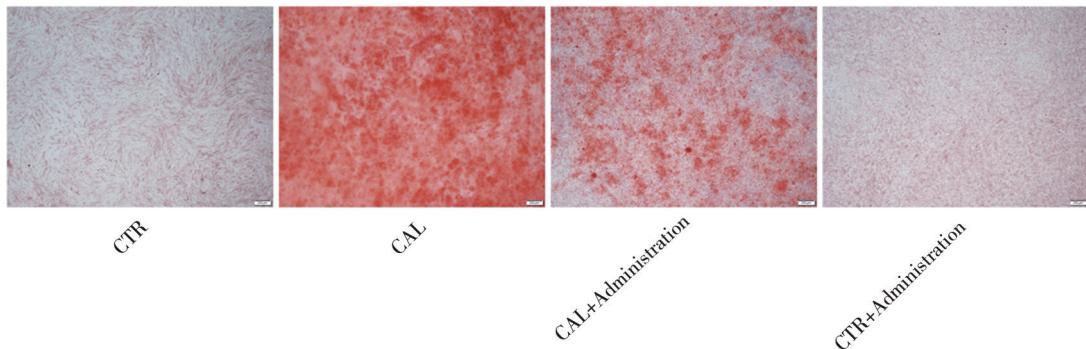


图6 茜素红染色检测血管平滑肌细胞钙结节沉积

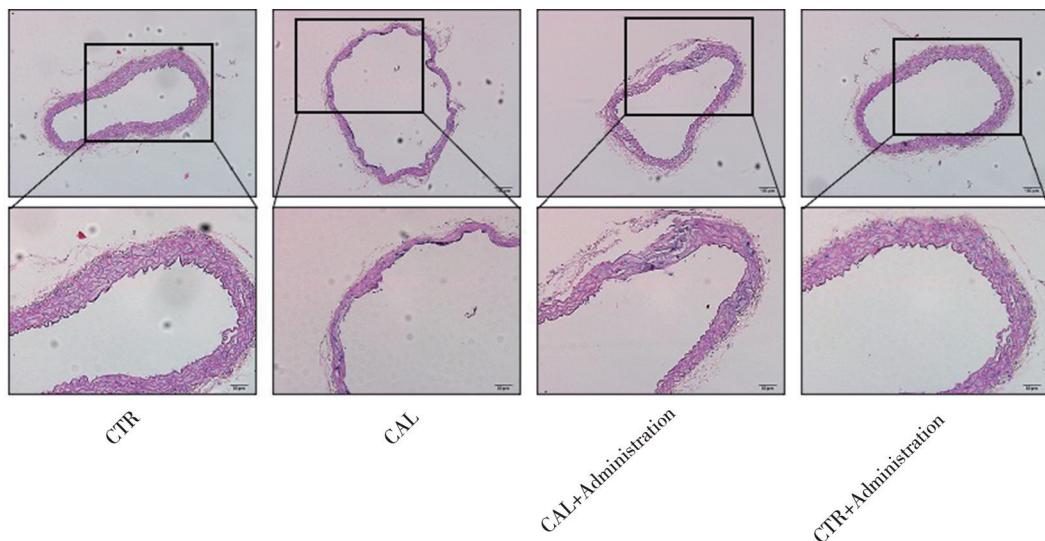


图7 H-E检测小鼠主动脉中膜变化

## 2.6 小鼠腹腔注射补骨脂酚后主动脉钙化程度降低

按照上述方法处理后,经HE染色显示,钙化小鼠主动脉中膜变薄,管腔扩大,中膜弹力纤维断裂,药物干预组的中膜较单纯钙化组增厚,弹性纤维断裂较单纯钙化组减少(图7)。冯库萨染色显示干预组的钙化沉积较单纯钙化组显著减少(图8)。

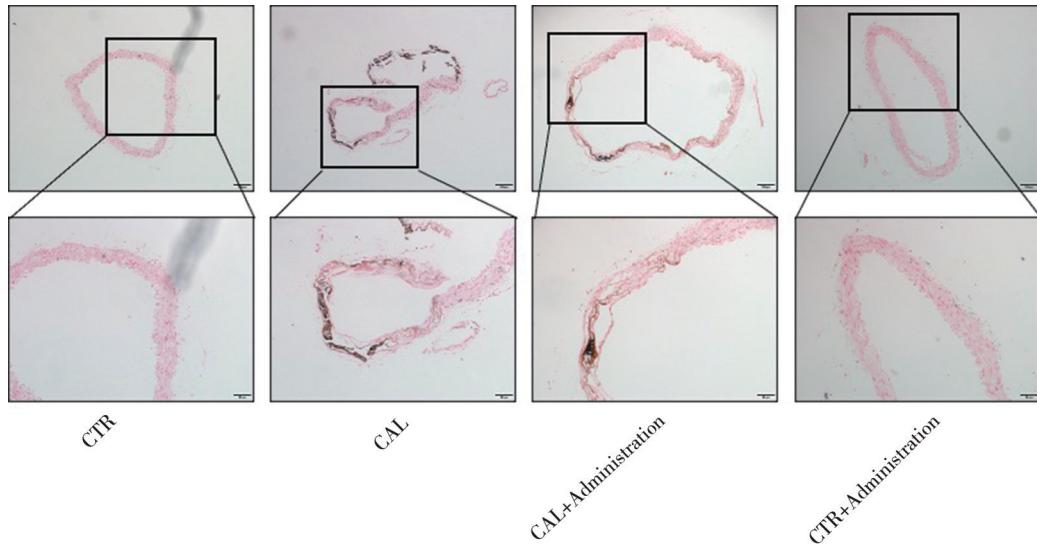


图8 冯库萨染色检测小鼠主动脉中膜钙结节

### 3 讨 论

血管钙化是人群中的心血管疾病的临床特征之一。除慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)外,高血压、糖尿病、血脂异常、肥胖和吸烟也可能导致血管钙化<sup>[9]</sup>。血管钙化与心血管疾病发病率和死亡率增加呈正相关,造成了主要的公共卫生负担<sup>[10-11]</sup>。众所周知的钙化类型是动脉粥样硬化,其特征是内膜斑块形成,并可能导致梗死或缺血。第二类钙化是动脉中膜的Monckeberg硬化,其特点是中层钙化,这可能导致血管僵硬和弹性降低。动脉硬化的发展是基于类似成骨作用的生物矿化过程。这涉及到动脉细胞外基质的广泛重塑,例如胶原成分的改变、弹性纤维的降解和血管平滑肌细胞(VSMC)从收缩到分化样的表型转化<sup>[12]</sup>。同时,血管钙化涉及到众多分子机制及信号通路,目前许多机制的研究仍然不清楚,需要我们进一步去探索。

动脉中膜钙化在动脉粥样硬化的发病机制中属于一种常见的早期事件。钙化经常出现在衰老、糖尿病和尿毒症患者的血管中膜。研究发现冠状动脉严重钙化的患者,其发生心肌梗塞及冠心病的风险增加,更加容易导致术后的夹层形成,所以在治疗上带来很多的困境。对于下肢动脉硬化性闭塞症以及糖尿病足的患者,由于其本身的动脉中膜的钙化,治疗后往往表现出较低的一期通畅率。很多患者在植入支架后很快发生血管再次闭塞或狭窄,严重影响患者的生活品质,截肢率明显升高。血管钙化也是无症状患者未来心血管事件的一个

有效预测因素<sup>[13]</sup>,但是如何通过药物来早期干预动脉硬化及相关的药物有无作用靶点,目前的研究甚少。既往体内及体外研究发现雌激素具有降低动脉硬化的作用<sup>[14]</sup>,而这种作用是通过启动自噬产生。在美国进行的一项大型预防性试验未能证实单独使用雌激素或雌激素联合孕激素治疗对冠心病的保护作用。亚组分析显示,在更年期(50~59岁)或更年期后开始接受激素治疗的女性患冠心病和总死亡率的风险降低<sup>[15]</sup>。一项辅助性随机研究发现,与接受安慰剂的女性相比,50~59岁这组人群接受雌激素治疗的女性冠状动脉钙化评分显著降低,表明钙化斑块负担减轻。

通过MTT实验进行药物筛选和GFP-LC3-U87细胞毒性试验,然后通过相关的统计分析计算出药物的IC<sub>50</sub>。并且通过免疫荧光筛选出该药物诱导自噬发生的基本浓度,通过免疫印迹测定LC3 I / II蛋白表达及转化率显示:补骨脂甲素,补骨脂乙素,补骨脂酚,细辛酯素,迷迭香酸,五味子酯甲,五味子甲素,圣草次苷,核茅酚苷,甘西鼠尾,五味子醇乙,五味子酯乙,紫丁香苷,女贞苷可以启动LC3-II,并诱导自噬的发生。结合免疫荧光研究结果发现,来自于同一植物,且化合物结构非常近似的补骨脂酚启动自噬的能力较强,而且具有浓度依赖性,所以后续的研究选择补骨脂酚类化合物来进行。而补骨脂酚是一类黄酮类化合物,广泛分布于多种植物中,以往的研究表明其抗氧化活性与抗菌活性之间存在一定的联系<sup>[16]</sup>,同时,补骨脂酚对三种临床细菌具有一定的抗菌作用<sup>[17]</sup>,但是具体的机制还不清楚。那么这种从传统医学提取的植物激素,是否具有雌

激素一样的作用呢,我们对它进行了研究。

在本研究中,研究了补骨脂酚类化合物对 $\beta$ -GP诱导的血管平滑肌细胞钙化的影响。结果表明,补骨脂酚类化合物能抑制 $\beta$ -GP诱导的人主动脉平滑肌细胞钙化及其相关的表达。此外,补骨脂酚启动了自噬作用。在既往的研究中,未能够明确自噬与血管钙化的关系,有的研究表明启动自噬能够缓解血管钙化<sup>[18-19]</sup>,也有研究表明启动自噬能够加重钙化<sup>[20]</sup>。自噬在不同研究中体现出对血管钙化不同的作用,这种现象的出现我们猜测可能是启动自噬的不同的因素而产生的,也可能是产生自噬的时期不同,可能是早期的自噬是有保护作用的,或者说晚期的自噬有保护作用。本项研究未能进行如此深入的研究,这也是后续的研究方向。但是也会出现一个新的问题,何为自噬的早期发生,何为自噬的晚期发生呢?这个需要查阅更多的文献来支撑。根据我们本项研究结果来看,在人血管平滑肌细胞中培养72 h,进行取材,得出实验结果。研究结果表明,补骨脂酚处理72h后,可能通过自噬途径和下调BMP2,RUNX2蛋白来保护HASMC免受钙化。为进一步验证补骨脂酚在体内对主动脉中膜钙化的影响,进一步设计动物实验来进行验证体外实验结果。结果发现补骨脂酚的干预也能够减轻小鼠主动脉中膜钙化的钙沉积。基于上述的实验结果,推断补骨脂酚可能启动血管平滑肌细胞的自噬,并且可以减轻血管平滑肌细胞以及小鼠主动脉中膜钙化。但是具体的补骨脂酚启动的自噬是否影响BMP2和Runx2的表达需要进一步的研究证明。就目前的结果而言,补骨脂酚可能有助于预防或治疗血管钙化,这为药物减轻血管钙化提供了理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] Li ZH, Wu J, Zhang XL, et al. CDC42 promotes vascular calcification in chronic kidney disease[J]. *J Pathol*, 2019, 249(4):461-471.
- [2] Lee SJ, Lee IK, Jeon JH. Vascular calcification-new insights into its mechanism[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8):2685.
- [3] Phadwal K, Feng D, Zhu DX, et al. Autophagy as a novel therapeutic target in vascular calcification[J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 206:107430.
- [4] Ma WQ, Sun XJ, Zhu Y, et al. PDK4 promotes vascular calcification by interfering with autophagic activity and metabolic reprogramming [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11):991.
- [5] Han T, Zhao HM, Xie LJ, et al. Deacetylation of cGAS by HDAC1 regulates vascular calcification by promoting autophagy[J]. *Life Sci*, 2020, 2020:118930.
- [6] 刘永强,刘辉,韩培立,等.银杏总黄酮抑制心肌细胞过度自噬对缺血性心力衰竭大鼠心肌重塑和内质网应激的调节[J].中国免疫学杂志,2020,36(12):1457-1461.
- Liu YQ, Liu H, Han PL, et al. Regulation of total flavone of *Ginkgo biloba* on myocardial remodeling and endoplasmic reticulum stress in rats with ischemic heart failure by inhibiting excessive autophagy of cardiomyocytes[J]. *Chin J Immunol*, 2020, 36(12):1457-1461.
- [7] Liao CY, Wang P, Yin YH, et al. Interactions between autophagy and phytohormone signaling pathways in plants[J]. *FEBS Lett*, 2022, 596(17):2198-2214.
- [8] Li Y, Sun W, Saaoud F, et al. MiR155 modulates vascular calcification by regulating Akt-FOXO3a signalling and apoptosis in vascular smooth muscle cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(1):535-548.
- [9] Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling[J]. *Biochem J*, 2010, 429(3):403-417.
- [10] Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization[J]. *Circ Res*, 2011, 109(1):e1-e12.
- [11] Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RA, et al. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect[J]. *Nat Med*, 2003, 9(8):1033-1038.
- [12] Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(7):1453-1464.
- [13] Hu C, Zou MJ, Zhao L, et al. E Platinum, a newly synthesized platinum compound, induces autophagy via inhibiting phosphorylation of mTOR in gastric carcinoma BGC-823 cells[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 210(1):78-86.
- [14] Stather PW, Sidloff DA, Dattani N, et al. Meta-analysis and meta-regression analysis of biomarkers for abdominal aortic aneurysm [J]. *Br J Surg*, 2014, 101(11):1358-1372.
- [15] Webber JL, Tooze SA. Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP[J]. *EMBO J*, 2010, 29(1):27-40.
- [16] Yin HC, Zhao LL, Jiang XJ, et al. DEV induce autophagy via the endoplasmic reticulum stress related unfolded protein response[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12):e0189704.
- [17] Kim DS, Kim JH, Lee GH, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase is involved in endoplasmic reticulum stress-induced cell death and autophagy in human gingival fibroblasts[J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(4):545-549.
- [18] Liu Q, Luo Y, Zhao Y, et al. Nano-hydroxyapatite accelerates vascular calcification via lysosome impairment and autophagy dysfunction in smooth muscle cells[J]. *Bioact Mater*, 2021, 8:478-493.
- [19] Pang Q, Wang PW, Pan YJ, et al. Irisin protects against vascular calcification by activating autophagy and inhibiting NLRP3-mediated vascular smooth muscle cell pyroptosis in chronic kidney disease[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(3):283.
- [20] Yang P, Zang GY, Yan Y, et al. CD137-CD137L aggravates calcification of vascular smooth muscle cell and vasculature of ApoE<sup>-/-</sup> mice via Rab7-mediated autophagy[J]. *J of Cardiovasc Trans Res*, 2022, 15(6):1297-1314.

(责任编辑:唐秋姗)