

本文引用: 刘云霞, 杨艳, 范蕾, 等. 二甲双胍通过抑制泛素-蛋白酶体系统上调 ABCA1 表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(6): 474-480. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.06.003.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2025)33-06-0474-07

二甲双胍通过抑制泛素-蛋白酶体系统上调 ABCA1 表达

刘云霞¹, 杨艳^{1,2}, 范蕾^{1,2}, 王敏杰³, 于凌泽³, 白图雅^{1,2}, 张梦迪^{1,2}, 吕晓丽^{1,2}, 李君^{1,2}, 胡玉霞^{1,2}, 高峰^{1,2}

1. 内蒙古医科大学药学院, 2. 内蒙古自治区新药筛选工程研究中心, 3. 内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古呼和浩特市 010110

[摘要] **[目的]** 探讨二甲双胍调控 ATP 结合盒转运体 A1 (ABCA1) 表达的分子机制。**[方法]** 使用二甲双胍和放线菌酮共同或分别刺激 J774A.1 巨噬细胞, 采用蛋白免疫印迹法检测 ABCA1 的表达; 将 His-tagged ABCA1 和 HA-tagged Ub 质粒共同转染至 HEK293 细胞中, 采用二甲双胍刺激细胞, 免疫共沉淀检测 ABCA1 与泛素的结合能力; 采用基于免疫共沉淀的蛋白质组学, 寻找二甲双胍调控 ABCA1 表达的候选 E3 泛素蛋白连接酶; 构建 MIB1 过表达质粒并转染至 HEK293 细胞, 采用蛋白免疫印迹法验证二甲双胍能否通过 MIB1 调控 ABCA1 的表达。**[结果]** 二甲双胍可增加 J774A.1 巨噬细胞中 ABCA1 的表达 ($P < 0.01$), 并抑制 ABCA1 的降解 ($P < 0.05$); 二甲双胍可抑制 ABCA1 与泛素的结合 ($P < 0.05$); 二甲双胍调控 ABCA1 表达的蛋白主要富集于细胞发育、炎症和免疫防御等通路; 二甲双胍可通过 MIB1 上调 ABCA1 的表达 ($P < 0.05$)。**[结论]** 二甲双胍可通过阻断泛素-蛋白酶体系统抑制 ABCA1 的降解, MIB1 是上调 ABCA1 表达的候选 E3 泛素蛋白连接酶之一。

[关键词] 二甲双胍; ATP 结合盒转运体 A1; AMP 活化蛋白激酶; MIB E3 泛素蛋白连接酶 1; 蛋白质组学

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

Metformin upregulates ABCA1 expression via inhibiting ubiquitin-proteasome system

LIU Yunxia¹, YANG Yan^{1,2}, FAN Lei^{1,2}, WANG Minjie³, YU Lingze³, BAI Tuya^{1,2}, ZHANG Mengdi^{1,2}, LYU Xiaoli^{1,2}, LI Jun^{1,2}, HU Yuxia^{1,2}, GAO Feng^{1,2}

1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, 2. Inner Mongolia New Drug Screening Engineering Research Center, 3. School of Basic Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010110, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the potential mechanism of metformin on ATP-binding cassette transport A1 (ABCA1) expression. **Methods** J774A.1 macrophages were treated with metformin and cycloheximide, and ABCA1 expression was determined by Western blot. His-tagged ABCA1 and HA-tagged Ub plasmids were co-transferred into HEK293 cells and stimulated with metformin. Co-immunoprecipitation (Co-IP) was used to test the binding ability of ABCA1 and ubiquitin. Candidate E3 ubiquitin-protein ligases (E3) of ABCA1 were identified through Co-IP-based proteomics. The MIB1 plasmid was constructed and transferred into HEK293 cells, and Western blot was used to determine the effect of metformin and MIB1 on ABCA1 expression. **Results** Metformin increased the expression of ABCA1 in J774A.1 cells ($P < 0.01$), and inhibited ABCA1 degradation ($P < 0.05$). Metformin disrupted the binding of ABCA1 to ubiquitin ($P < 0.05$). The proteins regulated by metformin in ABCA1 expression were primarily enriched in pathways related to cell development, inflammation and immune defense. Metformin may upregulate ABCA1 protein expression via MIB1 ($P < 0.05$). **Conclusion** Metformin inhibits the degradation of ABCA1 by blocking the ubiquitin-proteasome system (UPS), and MIB1 might act as a candidate E3 ubiquitin-protein ligase (E3) for ABCA1.

[KEY WORDS] metformin; ATP-binding cassette transport A1; AMP-activated protein kinase; MIB E3 ubiquitin-protein ligase 1; proteomics

[收稿日期] 2024-07-12

[修回日期] 2024-11-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82260709); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2020BS08010); 高校青年科技英才项目(NJYT24069); 内蒙古医科大学校级项目(YKD2022MS025)

[作者简介] 刘云霞, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发生发展的分子机制, E-mail: 569006174@qq.com。通信作者高峰, 博士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发生发展的分子机制, E-mail: gaofengardota@sina.com。通信作者范蕾, 教授, 研究方向为心脑血管疾病发生发展的分子机制研究, E-mail: 13171090088@163.com。

泡沫化巨噬细胞贯穿于动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生发展的始终,是 As 的主要驱动因素^[1-2]。泡沫化巨噬细胞的形成与胆固醇吸收和胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)失衡关系密切^[3-4]。RCT 是指外周细胞中过量的胆固醇通过高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)转运到肝脏,最终排出体外的生理过程^[5-6]。ATP 结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transport A1, ABCA1)是介导 RCT 的主要转运体^[7]。上调 ABCA1 表达能有效抑制泡沫化巨噬细胞的形成,延缓 As 的进展^[8]。研究显示,AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)间接激动剂二甲双胍(metformin)能上调巨噬细胞 ABCA1 的表达,促进 RCT 抑制 As 的发展^[9],然而其分子机制尚未完全明确。因此,本研究主要通过分子生物学技术,探讨二甲双胍调控巨噬细胞 RCT 的分子机制,旨在为二甲双胍的临床使用和新适应证提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

小鼠单核巨噬细胞(J774A.1 细胞)和人胚胎肾细胞 293(HEK293 细胞)(上海富衡生物),二甲双胍(索莱宝公司,货号 D9351),放线菌酮(cycloheximide, CHX)(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号 2112S),DMEM 培养基、胰酶(美国 Gibco 公司,货号 8118165、25200-056),胎牛血清(上海富衡生物, FH100-800), MG132(Selleck 公司,货号 S2619),ABCA1 抗体、p-AMPK α 1 抗体、AMPK α 1 抗体、GAPDH 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号 E7X5G、40H9、D63G4、D16H11), β -actin 抗体(Biosharp 公司,货号 BL005B),HA-tag 抗体、His-tag 抗体(全式金公司,货号 HT301-01、HT501-01),pcDNA3.1(+)载体 His-tagged ABCA1 质粒、Flag-tagged MIB1 过表达质粒(北京睿博兴科生物技术有限公司),HA-tagged Ub 质粒(湖南丰晖生物技术有限公司,货号 BR077),反转录试剂盒、荧光定量检测试剂盒(日本 TOYOBO 公司,货号 741100、441900),Trizol(源叶公司,货号 R21086),pcDNA3.1(+)载体(ZOMANBIO 公司,货号 ZK47),GAPDH 引物(上游 5'-ACACCCACTCCTCCACCTTTG-3',下游 5'-TCCAC-CACCCTGTTGCTGTAG-3')和 ABCA1 引物(上游 5'-GAGGAGCAGGGCATTGGAGTG-3',下游 5'-ACAG-CATCATGGAGACCGAAGTG-3')(北京睿博兴科生物技术有限公司,产品编号:20231009203601702)。

1.2 细胞培养

J774A.1 细胞、HEK293 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,放入 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。隔天换液,待细胞长满后,用 1 mL 胰酶消化,按 1:3 比例传代。

1.3 蛋白免疫印迹法

弃去细胞培养基,用冷 PBS 漂洗 2 次,加入变性裂解液 150 μ L 裂解蛋白,冰上孵育 30 min,离心后取上清液,进行 BCA 定量;配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,加样后进行电泳和转膜。脱脂牛奶封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜;次日 TBST 漂洗 3 次,二抗室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次,曝光检测。

1.4 实时定量 PCR

根据 Trizol 说明书提取细胞 RNA,再根据反转录试剂盒说明书进行反转录,根据荧光定量检测(SYBR Green)试剂盒说明书配置 mix 体系,在荧光定量 PCR 仪上采集实时荧光数值进行检测。反应结束后,观察融解曲线及扩增曲线,分析实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)引物的特异性。基于 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 原理对目的基因进行相对表达量分析。

1.5 免疫共沉淀

弃细胞培养基,预冷 PBS 漂洗 2 次,加入 500 μ L 非变性裂解液,冰上孵育 30 min,离心取上清液,进行 BCA 定量;500 μ g 蛋白中加入 5 μ L 抗体和 200 μ L 抗体结合及洗涤缓冲液,4℃ 振荡旋转过夜;复合物加入磁珠,室温下旋转孵育 2 h,随后将试管放在磁铁上弃上清。200 μ L 洗涤缓冲液漂洗 3 次,用 100 μ L 洗涤缓冲液重悬,并转移到新的 EP 管中。再次弃上清,加入 20 μ L 洗脱缓冲液、10 μ L 预混 NuPAGETMLDS 样品缓冲液和 NuPAGE 样品还原剂,70℃ 加热 10 min 变性洗脱,上清液进行蛋白印迹法检测。

1.6 液相色谱-质谱联用分析

肽段用液相色谱流动相 A 相溶解后使用 EASY-nLC 1200 超高效液相系统进行分离。流动相 A 为含 0.1% 甲酸和 2% 乙腈的水溶液;流动相 B 为含 0.1% 甲酸和 90% 乙腈的水溶液。液相梯度设置:0~14.5 min,6%~22% 流动相 B;14.5~17.5 min,22%~34% 流动相 B;17.5~19 min,34%~80% 流动相 B;19~20 min,80% 流动相 B,流速维持在 700 nL/min。肽段经由超高效液相系统分离后被注入 NSI 离子源中进行电离,然后进入 Orbitrap Exploris 480 质谱进行分析。离子源电压设置为 2 300 V,FAIMS 补偿电压(CV)设置为 -45 V,肽段

母离子及其二级碎片都使用高分辨的 Orbitrap 进行检测和分析。一级质谱扫描范围设置为 350~1 400 m/z, 扫描分辨率设置为 60 000; 二级质谱扫描范围固定起点为 120 m/z, 二级扫描分辨率设置为 15 000。数据采集模式使用数据非依赖型扫描(DIA)程序, 即在一级扫描后跟随多个连续质荷比区间的肽段离子进入 HCD 碰撞池使用 27% 的碎裂能量进行碎裂, 依次进行二级质谱分析。为了提高质谱的有效利用率, 自动增益控制(AGC)设置为 1E6, 最大注入时间设置为 22 ms。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍抑制 ABCA1 降解

为了验证二甲双胍能否上调 ABCA1 的表达, 使

用 2 mmol/L 二甲双胍刺激 J774A.1 细胞 24 h, Western blot 检测 ABCA1 的表达, 结果如图 1A、1B 所示。与空白对照组相比, 二甲双胍能显著上调 J774A.1 细胞中 ABCA1 的表达(1.42 倍, $P < 0.01$); 有报道显示 AMPK 激动剂能激活 ABCA1 上游转录因子肝 X 受体(liver X receptor, LXR)/视黄醇 X 受体(retinoid X receptor, RXR), 继而上调 ABCA1 的表达^[10]。因此, 采用 RT-qPCR 检测二甲双胍是否能上调 ABCA1 的转录。出乎意料的是, 二甲双胍未能增加 ABCA1 的 mRNA 表达($P > 0.05$, 图 1C)。结合文献和前期实验结果, 推测二甲双胍可通过调控蛋白翻译后修饰抑制 ABCA1 的降解, 继而上调 ABCA1 的表达^[11]。为了验证猜想, 采用二甲双胍刺激 J774A.1 细胞 24 h, 随后使用 25 mg/L 的蛋白合成抑制剂放线菌酮分别处理细胞 0、0.5、1、2 和 3 h, 最后采用 Western blot 检测 ABCA1 的表达, 结果发现, 与空白对照组相比, 二甲双胍能显著降低 ABCA1 的降解($P < 0.05$; 图 1D 和 1E)。说明二甲双胍可通过蛋白翻译后修饰上调 ABCA1 的表达。

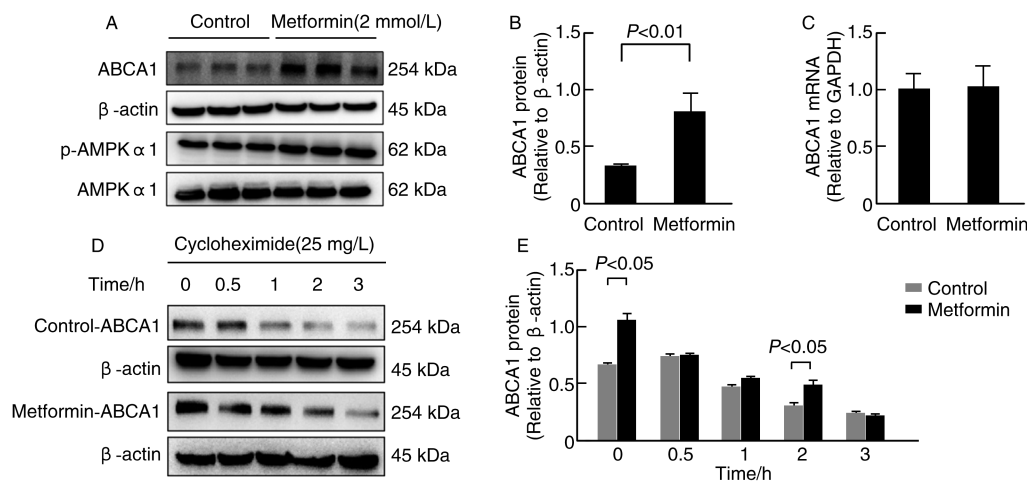


图 1. 二甲双胍抑制 ABCA1 的降解

A 为使用 2 mmol/L 二甲双胍刺激 J774A.1 细胞 24 h 后采用 Western blot 检测 ABCA1、p-AMPKα1 及 AMPKα1 的表达;

B 为图 A 中 ABCA1 蛋白表达统计结果($n=3$); C 为 RT-qPCR 检测 ABCA1 的 mRNA 水平($n=3$);

D 为使用 2 mmol/L 二甲双胍刺激 J774A.1 细胞 24 h, 随后给予 25 mg/L 放线菌酮分别处理 0、0.5、1、2 和 3 h, Western blot 检测 ABCA1 的表达; E 为图 D 中 ABCA1 蛋白表达统计结果($n=3$)。

Figure 1. Metformin inhibited ABCA1 degradation

2.2 二甲双胍通过泛素-蛋白酶体系统调控 ABCA1 的表达

蛋白降解途径主要包括泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)和溶酶体蛋白水解^[12]。为了探究调控哪条途径能有效上调 ABCA1 表达, 本实验将 His-tagged ABCA1 质粒转染入 HEK293 细胞中, 使用 5 μmol/L 的泛素-蛋白酶体抑

制剂(MG132)处理细胞 12 h, 采用 Western blot 检测 ABCA1 的表达。结果发现, 经 MG132 处理后, 与 His-tagged ABCA1 组相比, ABCA1 的表达水平升高(0.7 倍, $P < 0.05$), 说明 MG132 能够显著上调 ABCA1 的表达。提示阻断 UPS 能上调 ABCA1 的表达(图 2A 和 2B)。

为了回答二甲双胍能否通过 UPS 调控 ABCA1

的表达,本实验将 His-tagged ABCA1 和 HA-tagged Ub 质粒共同转染至 HEK293 细胞,用二甲双胍刺激细胞 24 h,采用免疫共沉淀检测泛素与 ABCA1 的结合程度。结果发现,与质粒共转染组比,二甲双胍

显著抑制 ABCA1 与泛素的结合(降低 14.8%, $P<0.05$;图 2C、2D)。说明二甲双胍可通过 UPS 调控 ABCA1 的表达。

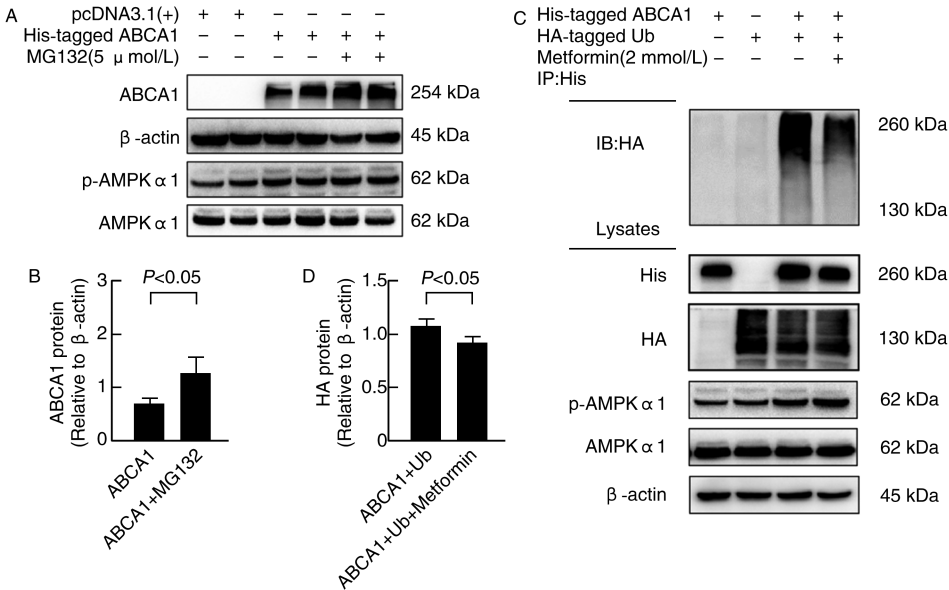


图 2. 二甲双胍抑制 ABCA1 蛋白与泛素的结合

A 为将 His-tagged ABCA1 质粒转染至 HEK293 细胞 24 h 并用 MG132 处理 12 h,随后采用 Western blot 检测 ABCA1、p-AMPKα1 及 AMPKα1 的表达;B 为图 A 中 ABCA1 蛋白表达统计结果($n=4$);C 为 His-tagged ABCA1 质粒和 HA-tagged Ub 质粒共同转染至 HEK293 细胞 24 h,二甲双胍刺激细胞 24 h,通过免疫共沉淀技术,以沉淀 ABCA1 蛋白,Western blot 检测 HA 标签的表达。D 为 ABCA1 与泛素结合(HA 蛋白)的统计结果($n=3$)。

Figure 2. Metformin inhibited ABCA1 binding to ubiquitin

2.3 基于免疫共沉淀的蛋白质组学发现候选 E3 泛素蛋白连接酶

为了寻找二甲双胍调控 ABCA1 表达的候选 E3 泛素蛋白连接酶,首先采用免疫共沉淀沉淀与 ABCA1 结合的蛋白质,随后采用差异蛋白质组学测序寻找受二甲双胍调控的并且与 ABCA1 结合的蛋白(分为 A-U-M 和 A-U 组)。对蛋白进行差异分析,以差异表达量变化超过 1.5 作为显著上调的变化阈值,小于 1/1.5 作为显著下调的变化阈值,共得到 151 个上调蛋白,249 个下调蛋白(图 3A)。对差异表达蛋白进行了 GO 分类富集分析,此处运用 Fisher's 精确检验计算显著性 P 值,目的是发现差异表达蛋白在某些功能类型有显著性的富集趋势。结果表明,差异蛋白主要富集在有机物代谢、细胞代谢、初级代谢、氮化合物代谢、多细胞发育等通路;细胞组分主要富集在细胞内解剖结构、细胞器、胞质等;分子功能主要富集在物质结合和催化活性等(图 3B)。KEGG 富集分析显示差异蛋白主要富集于补体与凝血级联、免疫球蛋白 G Fc 段受体(Fc

fragment of IgG receptor, FcγR)介导的吞噬作用和上皮细胞的细菌入侵等与炎症和免疫防御相关的功能中,以及肌动蛋白骨架调节和 hsa04530 紧密等(图 3C)。根据差异基因,发现了 9 种能与 ABCA1 结合的候选 E3 泛素蛋白连接酶。

2.4 二甲双胍可通过 MIB1 调控 ABCA1 的表达

为了验证蛋白质组学的结果,从 9 种候选 E3 泛素蛋白连接酶中选取了 MIB E3 泛素蛋白连接酶 1(MIB E3 ubiquitin protein ligase 1, MIB1)进行下游实验。His-tagged ABCA1 和 Flag-tagged MIB1 过表达质粒共同转染 HEK293 细胞 24 h,采用 2 mmol/L 二甲双胍刺激细胞,Western blot 检测 ABCA1 的表达。结果发现,与单独转染 His-tagged ABCA1 质粒相比,共转染组 ABCA1 表达显著降低(0.66 倍, $P<0.01$),说明 MIB1 能够抑制 ABCA1 表达。然而,与共转染组相比,二甲双胍组 ABCA1 的表达水平升高(0.22 倍, $P<0.05$)。说明,二甲双胍能抑制 MIB1 介导的 ABCA1 表达降低(图 4)。

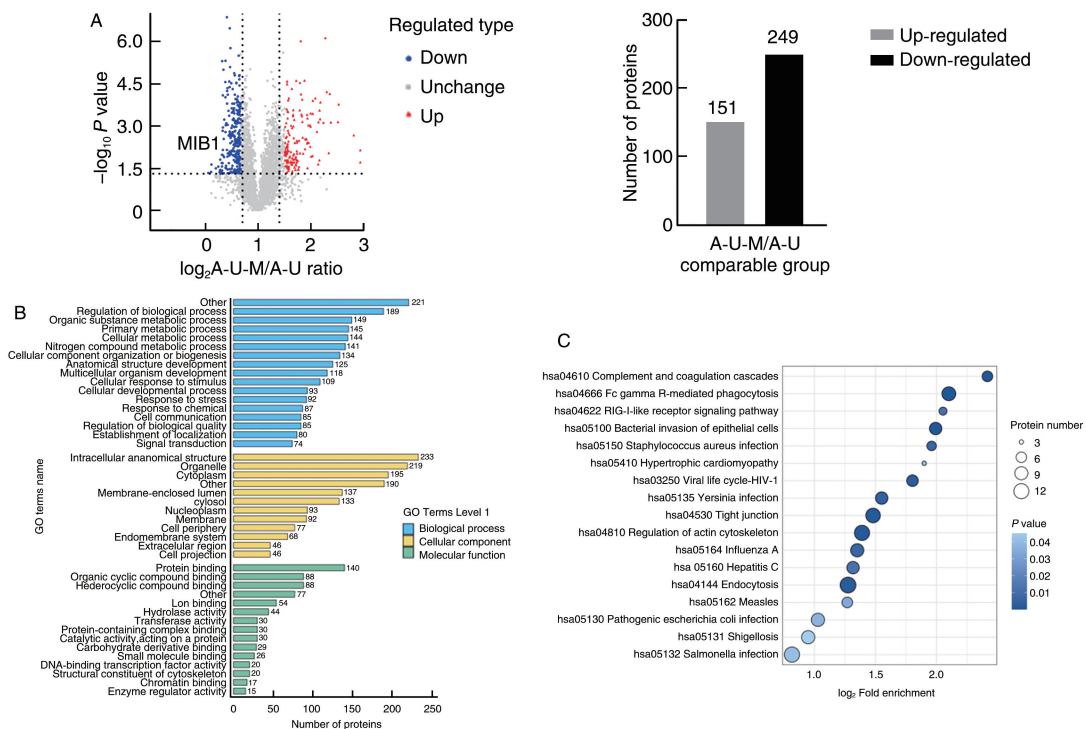


图 3. 基于免疫共沉淀的蛋白质组学结果

A 为差异蛋白火山图:横轴为比较组差异表达变化 Ratio 值经过 $\log_2$ 转换后的值;纵轴为统计检验 P 值经过 $-\log_{10}$ 转换后的值;其中红色点表示显著差异上调,蓝色点表示显著差异下调,灰色表示无显著差异。柱状图显示上调基因 151 种,下调基因 249 种。B 为 GO 富集:纵轴表示 GO 的一级分类中的二级功能分类,横轴为差异蛋白在分类中的数目,数值越大代表富集显著性越强。C 为 KEGG 富集:纵轴为 KEGG 通路描述信息,横轴为差异蛋白在该功能中经 $\log_2$ 转换后的富集程度,数值越大说明富集程度越高;点的颜色表示富集显著性 P 值,颜色越蓝代表富集显著性越强;点的大小表示 KEGG 通路中差异蛋白个数,点越大表示其中差异蛋白个数越多。

Figure 3. Proteomics based on co-immunoprecipitation

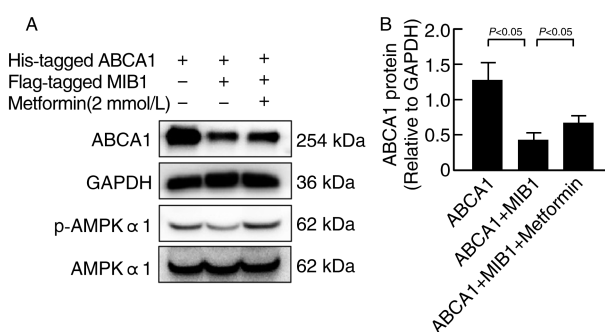


图 4. 二甲双胍通过 E3 泛素蛋白连接酶 MIB1 上调 ABCA1 表达

A 为将 His-tagged ABCA1 和 Flag-tagged MIB1 质粒共同转染至 HEK293 细胞 24 h,使用 2 mmol/L 二甲双胍刺激细胞 24 h, Western blot 检测 ABCA1、p-AMPK $\alpha 1$ 及 AMPK $\alpha 1$ 的表达; B 为 ABCA1 蛋白表达统计结果 ($n=3$)。

Figure 4. Metformin increased ABCA1 expression via MIB1

3 讨论

泡沫化巨噬细胞贯穿于 As 发生发展的始终^[13-14]。胆固醇的吸收和逆转运失衡是泡沫化巨

噬细胞形成的主要因素^[15-17]。有报道^[18-20]指出,上调胆固醇逆转运蛋白 ABCA1 能减少斑块损伤面积缓解 As 的进展。然而,激活 ABCA1 的上游转录因子 LXR/RXR 伴随着许多不良反应,如增加甘油三酯在肝脏中的累积和促进动脉瘤的形成等^[21-23]。因此,发现上调 ABCA1 表达的新机制和研发安全有效的 ABCA1 激动剂,对 As 的治疗具有十分重要的研究价值和现实意义。

二甲双胍是安全有效的抗 2 型糖尿病的临床一线用药^[24]。已有临床和基础研究显示^[25-28],二甲双胍作为 AMPK 的间接激动剂,在抗 As、降低体质指数、延缓衰老及癌症治疗中同样发挥重要作用。此外,有报道指出二甲双胍能上调 ABCA1 的表达并促进巨噬细胞的 RCT 延缓 As 的发展。因此,本实验首先采用 Western blot 检测了二甲双胍对 ABCA1 的调控作用。与之前报道一致,二甲双胍能上调 ABCA1 的表达。然而值得注意的是,二甲双胍并不能上调 ABCA1 的 mRNA 水平,说明二甲双胍调控 ABCA1 表达的机制可能通过蛋白翻译后修饰。

有报道显示^[29],二甲双胍能通过 UPS 维持胰岛素诱导基因的稳定性改善非酒精性脂肪性肝病。UPS 是维持蛋白质稳定的主要调控方式之一,在脂质代谢调控中发挥重要作用^[30]。为了探讨二甲双胍能否通过 UPS 调控 ABCA1 的表达,本实验首先使用放线菌酮处理细胞,发现二甲双胍能抑制 ABCA1 蛋白的降解。随后,为了进一步探讨 UPS 能否有效上调 ABCA1 的表达,采用 MG132 处理 ABCA1 过表达的 HEK293 细胞,发现 ABCA1 表达显著升高。最后通过免疫共沉淀实验,发现二甲双胍能有效阻断 ABCA1 与泛素的结合。上述实验说明,二甲双胍能通过 UPS 系统调控 ABCA1 的表达。与此一致,有研究显示抑制含 HECT、UBA 和 WWE 结构域的 E3 泛素蛋白连接酶 1 (HECT, UBA and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1, HUWE1) 能上调 ABCA1 的表达促进 RCT 并延缓 As^[31-32]。

为了发现二甲双胍调控 ABCA1 表达的候选 E3 泛素蛋白连接酶,进行了基于免疫共沉淀的蛋白质组学实验。结果显示,受二甲双胍调控的差异蛋白主要富集于细胞发育、炎症和免疫防御等通路。其中 MIB1 在细胞增殖、分化、凋亡等生理过程中发挥重要作用^[33],但在心血管方面却鲜有报道^[34]。随后通过 Western blot 实验验证了二甲双胍能抑制 MIB1 诱导的 ABCA1 降解。这一发现为基于蛋白泛素化设计的 ABCA1 激动剂药物研发提供理论和实验基础。本研究在分子水平证明了二甲双胍可通过 UPS 调控 ABCA1 的表达,为二甲双胍治疗 As 提供了理论依据和实验基础。MIB1 是调控 ABCA1 表达的候选 E3 泛素蛋白连接酶之一。

[参考文献]

- [1] XUE X, LI F, XU M, et al. Gastrodin ameliorates atherosclerosis by inhibiting foam cells formation and inflammation through down-regulating NF- κ B pathway [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2023, 20 (1): 9.
- [2] DAI Y, JUNHO C V C, SCHIEREN L, et al. Cellular metabolism changes in atherosclerosis and the impact of comorbidities [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1446964.
- [3] LIANG P L, LIANG Q W, HE P W, et al. Three polymethoxyflavones from the peel of citrus reticulata "Chachi" inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage-derived foam cell formation [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 924551.
- [4] CHEN S, ZHANG W, TANG C, et al. Macrophage membrane-functionalized manganese dioxide nanomedicine for synergistic treatment of atherosclerosis by mitigating inflammatory storms and promoting cholesterol efflux [J]. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22(1): 664.

- [5] TOSHESKA TRAJKOVSKA K, TOPUZOVSKA S. High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol [J]. *Anatol J Cardiol*, 2017, 18 (2): 149-154.
- [6] 吕昕儒, 魏伟, 王夏蕾, 等. 基于胆固醇逆转探讨泽泻白术配伍改善 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(4): 286-294.
- [7] LV X R, WEI W, WANG X L, et al. To explore effect of Alisma combined with Atractylodes macrocephala on atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice with reverse cholesterol transport [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(4): 286-294.
- [8] KARKEET R M, ZEKRI A N, SAYED-AHMED M M, et al. The prognosis of lipid reprogramming with the HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, in castrated Egyptian prostate cancer patients: randomized trial [J]. *PLoS One*, 2022, 17(12): e0278282.
- [9] ZHENG G, ZHAO Y, LI Z, et al. GLSP and GLSP-derived triterpenes attenuate atherosclerosis and aortic calcification by stimulating ABCA1/G1-mediated macrophage cholesterol efflux and inactivating RUNX2-mediated VSMC osteogenesis [J]. *Theranostics*, 2023, 13 (4): 1325-1341.
- [10] MA A, WANG J, YANG L, et al. AMPK activation enhances the anti-atherogenic effects of high density lipoproteins in ApoE^{-/-} mice [J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(8): 1536-1547.
- [11] KEMMERER M, WITTIG I, RICHTER F, et al. AMPK activates LXR α and ABCA1 expression in human macrophages [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 78: 1-9.
- [12] FENG X, CHEN W, NI X, et al. Metformin, macrophage dysfunction and atherosclerosis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 682853.
- [13] DE SILVA A R I, PAGE R C. Ubiquitination detection techniques [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023, 248(15): 1333-1346.
- [14] LUO S, MA X, WU W, et al. Continuous hypobaric hypoxia may promote atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Int J Med Sci*, 2023, 20(7): 849-857.
- [15] 吴亚玲, 段远慧, 孙熔, 等. 基于巨噬细胞的纳米成像及仿生技术在动脉粥样硬化斑块诊治中的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(10): 899-906.
- [16] WU Y L, DUAN Y H, SUN R, et al. Research progress of macrophage based nanoimaging and nanobiomimetic technology in the diagnosis and treatment of atherosclerotic plaque [J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(10): 899-906.
- [17] RANGARAJAN S, ORUJYAN D, RANGCHAIKUL P, et al. Critical role of inflammation and specialized pro-resolving mediators in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Biomedicines*, 2022, 10 (11): 2829.
- [18] LIU Y, TANG X, YUAN H, et al. Naringin inhibits macrophage foam cell formation by regulating lipid homeostasis and metabolic phenotype [J]. *Nutrients*, 2024, 16(9): 1321.
- [19] XU L, CHEN F, FAN W, et al. The role of $\gamma\delta$ T lymphocytes in atherosclerosis [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1369202.
- [20] WANG D, WANG X. Diosgenin and its analogs: potential protective agents against atherosclerosis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 2305-2323.
- [21] WANG T, ZHAO Y, YOU Z, et al. Endoplasmic reticulum stress

- affects cholesterol homeostasis by inhibiting LXR α expression in hepatocytes and macrophages[J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 3088.
- [20] CHEN Q, WANG S, BAO R, et al. Combination of mangiferin and T0901317 targeting autophagy promotes cholesterol efflux from macrophage foam cell in atherosclerosis[J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 5.
- [21] ZHOU L, CHOI H Y, LI W P, et al. LRP1 controls cPLA2 phosphorylation, ABCA1 expression and cellular cholesterol export[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6853.
- [22] MÜLLER F A, STAMOU M, ENGLERT F H, et al. *In vitro* to *in vivo* extrapolation and high-content imaging for simultaneous characterization of chemically induced liver steatosis and markers of hepatotoxicity[J]. *Arch Toxicol*, 2023, 97(6): 1701-1721.
- [23] GUO X, ZHONG J, ZHAO Y, et al. LXR α promotes abdominal aortic aneurysm formation through UHRF1 epigenetic modification of miR-26b-3p[J]. *Circulation*, 2024, 150(1): 30-46.
- [24] MATSUO M. ABCA1 and ABCG1 as potential therapeutic targets for the prevention of atherosclerosis[J]. *J Pharmacol Sci*, 2022, 148(2): 197-203.
- [25] CHENG F F, LIU Y L, DU J, et al. Metformin's mechanisms in attenuating hallmarks of aging and age-related disease[J]. *Aging Dis*, 2022, 13(4): 970-986.
- [26] TAI Y H, CHANG C C, YEH C C, et al. Long-term risk of stroke and poststroke outcomes in patients with heart failure: two nationwide studies[J]. *Clin Epidemiol*, 2020, 12: 1235-1244.
- [27] GUO J, HUANG X, DOU L, et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 391.
- [28] 李挺, 王德奖, 徐颖怡, 等. 二甲双胍通过激活 AMPK/STAT3 通路调控巨噬细胞分化抑制小鼠动脉粥样硬化形成[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(4): 287-294.
- LI T, WANG D J, XU Y Y, et al. Metformin regulates macrophage differentiation and inhibits formation of atherosclerosis by activating AMPK/STAT3 pathway in mice[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(4): 287-294.
- [29] HAN Y, HU Z, CUI A, et al. Post-translational regulation of lipogenesis via AMPK-dependent phosphorylation of insulin-induced gene[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 623.
- [30] LUO F, DAS A, CHEN J, et al. Metformin in patients with and without diabetes: a paradigm shift in cardiovascular disease management[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1): 54.
- [31] LIU B, MENG Q, GAO X, et al. Lipid and glucose metabolism in senescence[J]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1157352.
- [32] SARMIENTO-ORTEGA V E, BRAMBILA E, FLORES-HERNÁNDEZ J Á, et al. The Noval metformin dose is ineffective against metabolic disruption induced by chronic cadmium exposure in wistar rats[J]. *Toxics*, 2018, 6(3): 55.
- [33] LI M, RAMAGE H, CHERRY S. Deciphering flavivirus-host interactions using quantitative proteomics[J]. *Curr Opin Immunol*, 2020, 66: 90-97.
- [34] TARIGHATI E, KEIVAN H, MAHANI H. A review of prognostic and predictive biomarkers in breast cancer[J]. *Clin Exp Med*, 2023, 23(1): 1-16.
- (此文编辑 许雪梅)

(上接第 473 页)

- [24] ANBARA T, SHARIFI M, ABOUTALEB N. Endothelial to mesenchymal transition in the cardiogenesis and cardiovascular diseases [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2020, 16(4): 306-314.
- [25] FAN M, YANG K, WANG X, et al. Lactate promotes endothelial-to-mesenchymal transition via snail1 lactylation after myocardial infarction[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(5): ead9465.
- [26] 刘倩. FOXO1 乳酸化修饰在心肌缺血再灌注损伤中的作用及机制研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2023.
- LIU Q. The role and mechanism of FOXO1 lactylation in myocardial ischemia reperfusion injury[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2023.
- [27] HUANG Y, WANG C, ZHOU T, et al. Lumican promotes calcific aortic valve disease through H3 histone lactylation[J]. *Eur Heart J*, 2024, 45(37): 3871-3885.
- [28] 李敏, 朱奕, 方丽娟, 等. Wnt 信号通路在动脉粥样硬化及血管钙化中的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(11): 995-999.
- LI M, ZHU Y, FANG L J, et al. Research progress of wnt signaling pathway in atherosclerosis and vascular calcification[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(11): 995-999.
- [29] MARTÍNEZ-GONZÁLEZ J, CAÑES L, ALONSO J, et al. NR4A3: a key nuclear receptor in vascular biology, cardiovascular remodeling, and beyond[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11371.
- [30] MA W, JIA K, CHENG H, et al. Orphan nuclear receptor NR4A3 promotes vascular calcification via histone lactylation [J]. *Circ Res*, 2024, 134(11): 1427-1447.
- (此文编辑 王颖)