

本文引用: 周 慧, 于海霞, 张华屏. SIRT1/DRP1 在染料木素抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(8): 683-689. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.08.005.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-08-0683-07

• 实验研究 •

SIRT1/DRP1 在染料木素抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用

周 慧, 于海霞, 张华屏

山西医科大学转化医学研究中心, 山西省太原市 030001

[摘要] **[目的]** 阐明沉默信息调节因子 1(SIRT1)/线粒体动力相关蛋白 1(DRP1)在染料木素抑制氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的内皮细胞凋亡中的作用。**[方法]** 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC),测定线粒体裂变因子(MFF)、线粒体分裂蛋白 1(FIS1)、线粒体融合素 1(MFN1)、线粒体融合素 2(MFN2)和线粒体内膜视神经萎缩症蛋白 1(OPA1),以及线粒体凋亡关键分子 Bcl-2、Bax、细胞色素 c(Cytc)、凋亡蛋白酶激活因子 1(APAF1)、剪切的 Caspase-9、剪切的 Caspase-3、DRP1 的乙酰化和磷酸化水平,以及 DRP1 和 Bax 的相互作用。**[结果]** 染料木素活化 SIRT1,抑制 DRP1 乙酰化和磷酸化而抑制 ox-LDL 诱导的 DRP1 活性(均 $P<0.05$);抑制 MFF 和 FIS1,增加 MFN1、MFN2 和 OPA1 水平而抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞线粒体裂变(均 $P<0.05$);抑制 p-DRP1 和 Bax 复合物形成,通过促进 Bcl-2,抑制 Bax、Cytc、APAF1、剪切的 Caspase-9 和剪切的 Caspase-3 水平而抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡(均 $P<0.05$)。**[结论]** 染料木素活化 SIRT1 抑制 DRP1 活性,通过抑制内皮细胞线粒体裂变而抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡。SIRT1/DRP1 在染料木素抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡中发挥重要作用。

[关键词] 染料木素; 内皮细胞; 凋亡; 沉默信息调节因子 1; 线粒体动力相关蛋白 1

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

The role of SIRT1/DRP1 in genistein suppressing ox-LDL-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells

ZHOU Hui, YU Haixia, ZHANG Huaping

Translational Medicine Research Center, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

[ABSTRACT] **Aim** To clarify the role of sirtuin 1(SIRT1)/dynamin-related protein 1(DRP1) in genistein inhibiting oxidized low density lipoprotein(ox-LDL)-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells(HUVEC).

Methods HUVECs were cultured *in vitro*. The levels of mitochondrial fission factor(MFF), mitochondrial fission protein 1(FIS1), mitofusin 1(MFN1), mitofusin 2(MFN2), optic atrophy 1(OPA1), Bcl-2, Bax, cytochrome c(Cytc), apoptotic protease activating factor 1(APAF1), cleaved Caspase-9, cleaved Caspase-3, p-DRP1(Ser616) and acetylation-DRP1(ac-DRP1), as well as the interaction between p-DRP1 and Bax were examined. **Results** Compared with ox-LDL treatment, genistein pretreatment suppressed the activity of DRP1 through diminishing acetylation and phosphorylation, which was associated with activating SIRT1(all $P<0.05$). Genistein pretreatment inhibited mitochondrial fission by enhancing MFN1, MFN2 and OPA1, and reducing MFF and FIS1(all $P<0.05$). Genistein pretreatment suppressed apoptosis through inhibiting the interaction between p-DRP1 and Bax, accompanied with increasing Bcl-2 and decreasing Bax, Cytc, APAF1, cleaved Caspase-9 and Caspase-3(all $P<0.05$). **Conclusion** Genistein suppressed ox-LDL-induced mitochondrial fission and apoptosis through activating SIRT1 and inhibiting DRP1 in HUVEC.

Therefore, SIRT1/DRP1 had a crucial role in genistein inhibiting ox-LDL-induced apoptosis in HUVEC.

[KEY WORDS] genistein; endothelial cell; apoptosis; sirtuin 1; dynamin-related protein 1

[收稿日期] 2024-11-25

[修回日期] 2025-02-15

[基金项目] 山西省自然科学基金面上项目(202303021221138)

[作者简介] 周慧, 硕士, 实验师, 研究方向为染料木素对内皮细胞的保护作用, E-mail: 275221396@qq.com. 通信作者张华屏, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为染料木素对内皮细胞的保护作用, E-mail: zhanghuaping@sxmu.edu.cn.

动脉粥样硬化作为心血管系统的常见疾病,也是冠心病和脑卒中的主要诱因。血管内皮细胞损伤是动脉粥样硬化的起始因素和重要环节。因此,寻找预防和改善内皮细胞损伤的有效靶点对动脉粥样硬化的防治至关重要^[1-3]。流行病学研究表明,东亚人群心血管疾病的低发病率与其摄入较多的异黄酮有关;研究进一步显示,黄酮类化合物通过调节血管活性物质、炎症反应、氧化应激、自噬与凋亡等多种途径改善血管内皮细胞功能^[4-5]。我们前期研究显示,植物性食物中富含的异黄酮染料木素(genistein)通过活化沉默信息调节因子1(sirtuin 1, SIRT1),抑制氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的内皮细胞氧化损伤和老化作用^[6-9]。研究表明内皮细胞凋亡参与动脉粥样硬化的发生和发展过程,染料木素对内皮细胞的保护作用与抑制内皮细胞凋亡有关^[10-13]。SIRT1在抑制内皮细胞凋亡中发挥重要作用;研究进一步显示,SIRT1对凋亡的抑制作用与抑制线粒体动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1, DRP1)密切相关^[14-17]。然而,染料木素抑制动脉粥样硬化内皮细胞凋亡的机制尚需进一步阐明,本研究将观察SIRT1/DRP1在染料木素抑制ox-LDL诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)凋亡中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

HUVEC融合细胞EA.hy926购自中国科学院细胞库(货号GNHu39);DMEM培养基和胎牛血清购自Thermo Fisher Scientific Inc;ox-LDL购自Shanghai Yeasen Biotechnology(货号20605ES05);染料木素(货号G6649)购自Sigma公司;SIRT1 siRNA购自Thermo Fisher Scientific Inc(货号136457);Invitrogen TRIzol试剂(货号15596026CN)、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(货号K1622)和Applied Biosystems Fast SYBR 预混液(货号4385612)购自Thermo Fisher Scientific Inc;细胞线粒体分离试剂盒(货号C3601)购自碧云天生物公司;流式细胞凋亡检测试剂盒(货号556547)购自BD公司;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9(Caspase-9)活性(货号C1119)和Caspase-3活性(货号C1113)测定试剂盒购自北京普利莱生物公司;兔来源的一抗包括 β 肌动蛋白(β -actin)抗体(货号ab8227)、SIRT1抗体(货号ab189494)、细胞色素c氧化酶多肽IV(cytochrome c

oxidase IV, COXIV)抗体(货号ab202554)、线粒体裂变因子(mitochondrial fission factor, MFF)抗体(货号ab129075)、线粒体分裂蛋白1(mitochondrial fission protein 1, FIS1)抗体(货号ab156865)、线粒体融合素1(mitofusin 1, MFN1)抗体(货号ab221661)、MFN2抗体(货号ab205236)和线粒体内膜视神经萎缩症蛋白1(optic atrophy 1, OPA1)抗体(货号ab157457)、Bcl-2抗体(货号ab182858)、Bax抗体(货号ab32503)、细胞色素c(cytochrome c, Cyt c)抗体(货号ab133504)和凋亡蛋白酶激活因子1(apoptotic protease activating factor 1, APAF1)抗体(货号ab234436),以及辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(货号ab6721)购自Abcam公司;此外,兔来源的一抗包括剪切的Caspase-9抗体(货号#9505)、剪切的Caspase-3抗体(货号#9661)、DRP1抗体(货号#8570)、乙酰化赖氨酸(ac-Lysine)抗体(货号#9441)和616位丝氨酸(Ser616)磷酸化的DRP1(p-DRP1)抗体(货号#3455)购自Cell Signaling Technology。

1.2 细胞培养和基因转染

HUVEC用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的DMEM完全培养基,培养于37℃、5%CO₂培养箱中。SIRT1沉默实验:①转染前24 h,细胞以1×10⁵个/孔接种到6孔板中;②在两个1.5 mL的无酶EP管内先加入100 μ L OptiMEM培养基,再分别加入SIRT1 siRNA(100 nmol/L)及Lipofectamine 3000混匀,室温孵育5 min;③将两管液体混合后室温孵育20 min,培养HUVEC 72 h;④转染效果RT-qPCR和Western blot鉴定。DRP1过表达实验:①将含DRP1慢病毒骨架质粒载体、辅助载体和壳蛋白载体各2 μ g,用Lipofectamine 3000转染24孔板中的HEK293T细胞72 h;②收集细胞上清,经0.45 μ m滤器过滤,50 000 r/min离心2.5 h,沉淀用DMEM培养基悬浮,病毒滴度约为10¹⁰ pfu/L;③转染前24 h, HUVEC接种于6孔培养板。当HUVEC达到80%, 1.9 mL完全培养基中加入0.1 mL收集的病毒上清和终浓度8 mg/L的聚凝胺,转染6 h更换为新鲜的完全培养基继续培养72 h;④转染效果RT-qPCR和Western blot鉴定。

1.3 实验分组与处理方法

将HUVEC分为对照组、ox-LDL组、ox-LDL+染料木素组、SIRT1沉默+ox-LDL+染料木素组,以及DRP1过表达+ox-LDL+染料木素组。ox-LDL组为ox-LDL(50 mg/L)作用HUVEC 24 h;ox-LDL+染料木素组为染料木素(1 mmol/L)预处理HUVEC 30 min,再与ox-LDL(50 mg/L)共同作用24 h;

SIRT1 沉默+ox-LDL+染料木素组利用 SIRT1 沉默的 HUVEC, 予以染料木素(1 mmol/L)预处理 30 min, 再与 ox-LDL(50 mg/L)共同作用 24 h; DRP1 过表达+ox-LDL+染料木素组利用 DRP1 过表达的 HUVEC, 予以染料木素(1 mmol/L)预处理 30 min, 再与 ox-LDL(50 mg/L)共同作用 24 h。

1.4 RT-qPCR 检测 SIRT1 和 DRP1 mRNA 表达

各组收集细胞 5×10^6 个, 加入 1 mL Trizol, 按照试剂盒说明提取 RNA。取 1 μ g RNA, 按照反转录试剂盒说明, 将其反转录为 cDNA。SIRT1 引物为上游 5'-GCCGGAACAATACCTCCAC-3', 下游 5'-ACCCCAGCTCCAGTTAGAAC-3'; DRP1 引物为上游 5'-GCTGCCTCAAATCGTCGTAG-3', 下游 5'-ACCCCATTCTTGCTTCCA-3'; β -actin 引物为上游 5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3', 下游 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'。按照荧光定量 PCR 试剂盒说明, 配置反应体系。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环。反应结束后, 计算各反应 Ct 值, 以 β -actin 作为内参照, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各组 SIRT1 和 DRP1 的相对表达量。

1.5 流式细胞术测定细胞凋亡

各组利用不含 EDTA 的胰酶消化, 收集 5×10^5 个细胞, 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重悬于 100 μ L binding buffer 中, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 PI, 37 $^{\circ}$ C 避光反应 15 min, 再加入 400 μ L binding buffer, 1 h 内利用流式细胞仪检测。

1.6 Caspase-9 和 Caspase-3 活性测定

基于 Caspase-9 特异水解多肽底物 LEHD-pNA, Caspase-3 特异水解多肽底物 DEVD-pNA, 释放的游离硝基苯胺 pNA 在 405nm 有最大吸光度。按照 Caspase 酶活性测定试剂盒说明, 通过比色法测定 pNA 而最终得到 Caspase-9 和 Caspase-3 活性。

1.7 Western blot 检测各蛋白表达

各组取 20 μ g 蛋白样品, 经 SDS-PAGE 分离, 湿转移到 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 2 h, 分别于 β -actin 抗体(1:1 000 稀释)、COXIV 抗体(1:1 000 稀释)、SIRT1 抗体(1:1 000 稀释)、DRP1 抗体(1:1 000 稀释)、MFF 抗体(1:2 000 稀释)、FIS1 抗体(1:10 000 稀释)、MFN1 抗体(1:1 000 稀释)、MFN2 抗体(1:2 000 稀释)、OPA1 抗体(1:2 000 稀释)、Bax 抗体(1:5 000 稀释)、Bcl-2 抗体(1:2 000 稀释)、Cyt c 抗体(1:5 000 稀释)、APAF1 抗体(1:1 000 稀释)、剪切的 Caspase-9 抗体(1:1 000 稀释)、剪切的 Caspase-3 抗体(1:1 000 稀释)、p-DRP1

(Ser616) 抗体(1:1 000 稀释)以及 ac-Lysine 抗体(1:1 000 稀释)溶液中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜, 再经 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:5 000 稀释)室温孵育 2 h, ECL 化学发光显色, X 光片显影定影, 计算机扫描分析。在 Western blot 测定中, 对于分子量差异大的两种蛋白, 可以洗脱第一种蛋白抗体后再孵育第二种蛋白抗体检测; 而对于分子量比较接近的蛋白, 只能选用不同的膜测定。

1.8 DRP1 乙酰化水平以及 DRP1 和 Bax 相互作用分析

各组取 100 μ g 蛋白样品, 加入 1 μ g rabbit IgG 和 100 μ L Protein A+G 琼脂糖珠子, 4 $^{\circ}$ C 旋转 1 h, 离心取上清; 加入 1 μ g DRP1 抗体(用于 DRP1 乙酰化水平测定)或 1 μ g Bax 抗体(用于 DRP1 和 Bax 相互作用分析), 4 $^{\circ}$ C 旋转过夜, 再加入 100 μ L Protein A+G 琼脂糖珠子, 4 $^{\circ}$ C 旋转 2 h, 离心去除上清; 沉淀用 PBS 洗 4 次, BCA 法测定蛋白浓度。利用 DRP1 抗体和 ac-Lysine 抗体分别进行 Western blot, 以测定 DRP1 乙酰化水平; 利用 Bax 抗体和 p-DRP1 (Ser616) 抗体分别进行 Western blot, 以测定 DRP1 和 Bax 相互作用。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布和方差齐性的多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SIRT1 沉默与 DRP1 过表达 HUVEC 的鉴定

图 1A 和 1B 显示, 与空白对照组 HUVEC 相比, siRNA 阴性对照组 SIRT1 mRNA 和蛋白表达水平差异无显著性(均 $P > 0.05$); 而 SIRT1 siRNA 组 SIRT1 mRNA 和蛋白表达水平仅为空白对照组的 20% 和 30% (均 $P < 0.05$)。图 1C 和 1D 显示, 与空白对照组相比, 过表达载体阴性对照组 DRP1 mRNA 和蛋白表达水平差异无显著性(均 $P > 0.05$); 而 DRP1 过表达载体组 DRP1 mRNA 和蛋白表达水平为空白对照组的 2 倍以上(均 $P < 0.05$)。

2.2 SIRT1 在染料木素抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡中的作用

图 2A 和图 2B 显示, ox-LDL 组早期凋亡细胞 (Annexin V⁺PI⁻) 百分比为对照组的 5 倍以上 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL+染料木素组早期凋亡细胞降低 60% ($P < 0.05$); 在 SIRT1 沉默的情况下, 染料木素抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡的

作用消失($P<0.05$)。图2C显示,ox-LDL组 Caspase-3和Caspase-9活性为对照组的3倍以上(均 $P<0.05$);与ox-LDL组相比,ox-LDL+染料木素组Caspase-3和Caspase-9活性降低50%以上(均 $P<$

0.05);在SIRT1沉默的情况下,染料木素将不再抑制ox-LDL诱导的内皮细胞Caspase-3和Caspase-9活性(均 $P<0.05$)。可见,染料木素抑制ox-LDL诱导的内皮细胞凋亡与活化SIRT1密切相关。

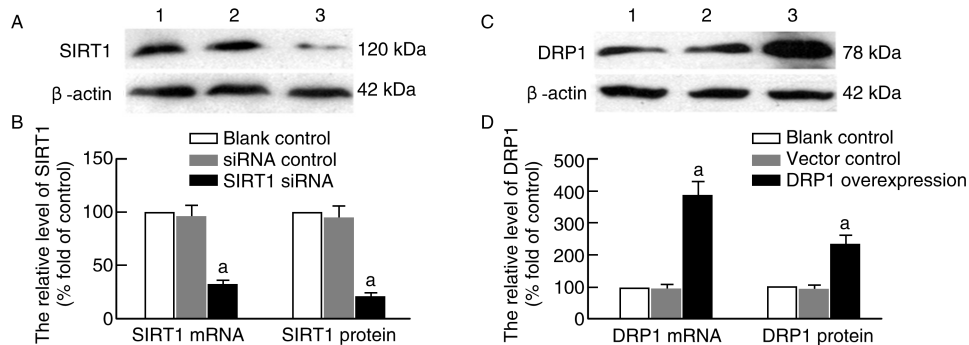


图1. SIRT1沉默与DRP1过表达HUVEC的鉴定

A为Western blot测定SIRT1蛋白表达,1为空白对照组,2为siRNA阴性对照组,3为SIRT1 siRNA组;B为SIRT1 mRNA($n=6$)和蛋白($n=3$)相对表达水平分析,a为 $P<0.05$,与空白对照组相比;C为Western blot测定DRP1蛋白表达,1为空白对照组,2为过表达载体阴性对照组,3为DRP1过表达载体组;D为DRP1 mRNA($n=6$)和蛋白($n=3$)相对表达水平分析,a为 $P<0.05$,与空白对照组相比。

Figure 1. The identification of SIRT1 siRNA and DRP1 overexpression in HUVEC

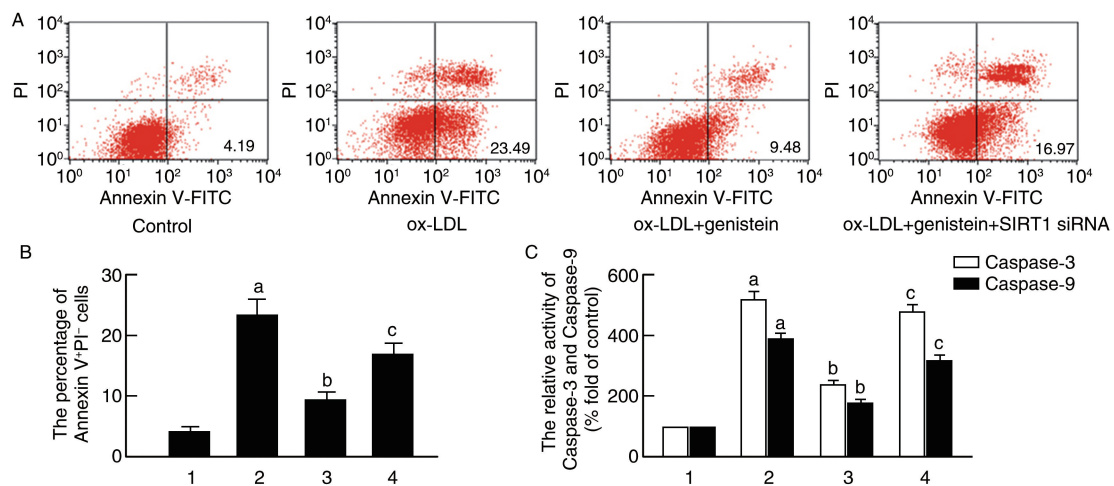


图2. SIRT1在染料木素抑制ox-LDL诱导的内皮细胞凋亡中的作用

A为流式细胞仪分析凋亡示意图;B为流式细胞仪测定Annexin V⁺PI⁻细胞百分比分析($n=6$);C为Caspase-3和Caspase-9活性分析($n=6$)。

1为对照组,2为ox-LDL组,3为ox-LDL+染料木素组,4为SIRT1沉默+ox-LDL+染料木素组。a为 $P<0.05$,与对照组相比;

b为 $P<0.05$,与ox-LDL组相比;c为 $P<0.05$,与ox-LDL+染料木素组相比。

Figure 2. The role of SIRT1 in genistein inhibiting ox-LDL-induced apoptosis of HUVEC

2.3 SIRT1/DRP1在染料木素抑制ox-LDL诱导的内皮细胞损伤中的作用

图3A和图3C显示,与对照组相比,ox-LDL组DRP1乙酰化水平增加60%,而ox-LDL+染料木素组DRP1乙酰化水平降低到接近对照组(均 $P<0.05$);在SIRT1沉默的情况下,染料木素抑制ox-LDL诱导的内皮细胞DRP1乙酰化的作用消失($P<0.05$)。图3B和图3C显示,ox-LDL组p-DRP1

(Ser616)水平与对照组相比增加50%,而ox-LDL+染料木素组p-DRP1(Ser616)水平降低到接近对照组(均 $P<0.05$);在SIRT1沉默的情况下,染料木素抑制ox-LDL诱导的内皮细胞p-DRP1(Ser616)的作用消失($P<0.05$)。可见,染料木素活化SIRT1,抑制DRP1的乙酰化和磷酸化,进而抑制ox-LDL诱导的内皮细胞DRP1活性。图3D和图3E显示,ox-LDL组p-DRP1和Bax相互作用水平与对照组相比

增加 50%, 而 ox-LDL+染料木素组 p-DRP1 和 Bax 相互作用水平降低到接近对照组 (均 $P<0.05$); 在 SIRT1 沉默的情况下, 染料木素不再抑制 ox-LDL 诱

导的内皮细胞 p-DRP1 和 Bax 相互作用 ($P<0.05$)。可见, 染料木素活化 SIRT1 抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡与抑制 DRP1 有关。

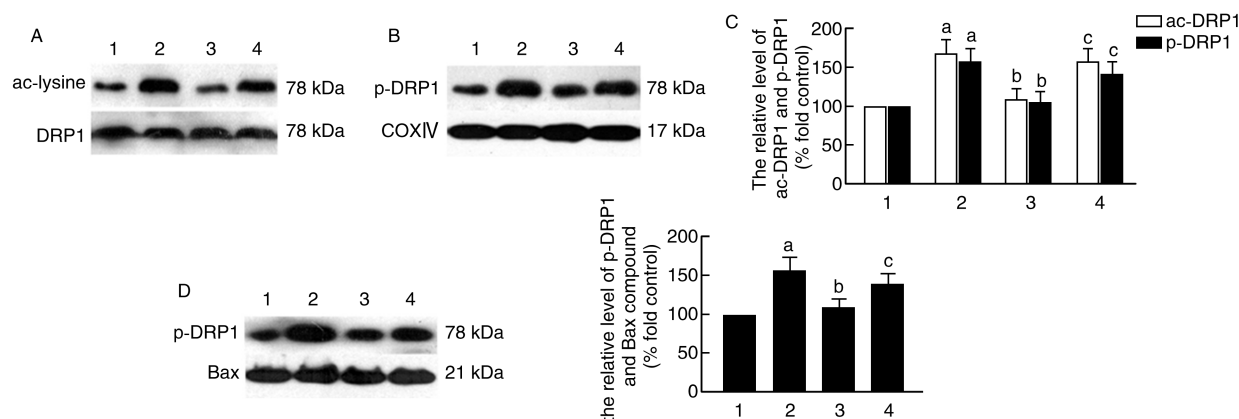


图 3. DRP1 在染料木素活化 SIRT1 抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤中的作用

A 为免疫共沉淀测定 DRP1 乙酰化; B 为 Western blot 测定 DRP1 磷酸化; C 为 DRP1 乙酰化和磷酸化相对表达水平分析 ($n=3$);

D 为免疫共沉淀测定 p-DRP1 和 Bax 相互作用及定量分析 ($n=3$)。1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组,

3 为 ox-LDL+染料木素组, 4 为 SIRT1 沉默+ox-LDL+染料木素组。a 为 $P<0.05$, 与对照组相比;

b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组相比; c 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL+染料木素组相比。

Figure 3. The role of DRP1 in genistein inhibiting ox-LDL-induced HUVEC injury by activating SIRT1

2.4 SIRT1/DRP1 在染料木素逆转 ox-LDL 对内皮细胞线粒体裂变和融合蛋白影响中的作用

图 4 显示, 与对照组相比, ox-LDL 组 MFF 增加 78%, FIS1 增加 82%, MFN1 降低 42%, MFN2 降低 38%, OPA1 降低 40% (均 $P<0.05$); ox-LDL+染料木素组 MFF、FIS1、MFN1、MFN2 和 OPA1 水平回归

到接近对照组 (均 $P<0.05$); 在 SIRT1 沉默或 DRP1 过表达的情况下, 染料木素对线粒体裂变和融合关键分子的作用消失 (均 $P<0.05$)。可见, SIRT1/DRP1 在染料木素抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞线粒体裂变中发挥重要作用。

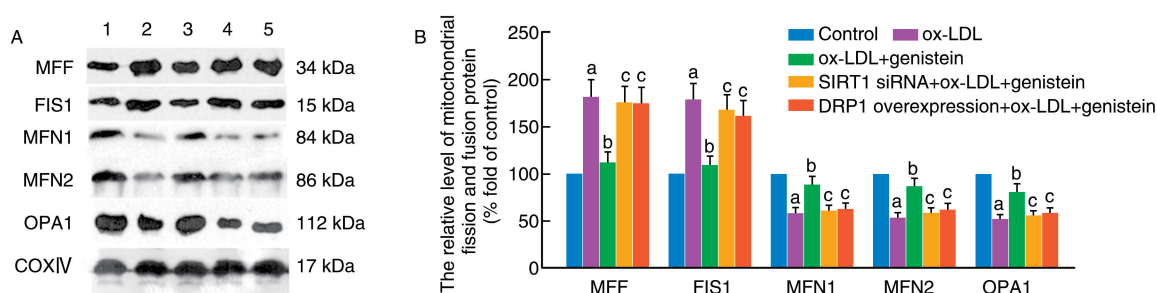


图 4. SIRT1/DRP1 在染料木素逆转 ox-LDL 对内皮细胞线粒体裂变和融合蛋白影响中的作用

A 和 B 分别为 Western blot 测定线粒体裂变和融合因子的蛋白表达及定量分析 ($n=3$)。1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组,

3 为 ox-LDL+染料木素组, 4 为 SIRT1 沉默+ox-LDL+染料木素组, 5 为 DRP1 过表达+ox-LDL+染料木素组。

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组相比; c 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL+染料木素组相比。

Figure 4. The role of SIRT1/DRP1 in genistein reversing ox-LDL-induced mitochondrial fission and fusion of HUVEC

2.5 SIRT1/DRP1 在染料木素抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡中的作用

图 5 显示, 与对照组相比, ox-LDL 组 Bcl-2 水平降低 50%, Bax、Cyt c、APAF1 和剪切的 Caspase-9 水

平增加 50% 以上, 剪切的 Caspase-3 水平增加 45% (均 $P<0.05$); ox-LDL+染料木素组 Bcl-2、Bax、Cyt c、APAF1、剪切的 Caspase-9 和剪切的 Caspase-3 水平都回归到接近对照组 (均 $P<0.05$); 在 SIRT1 沉

默或 DRP1 过表达的情况下,染料木素对线粒体凋亡关键分子的作用消失(均 $P < 0.05$)。可见,

SIRT1/DRP1 在染料木素抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡中发挥重要作用。

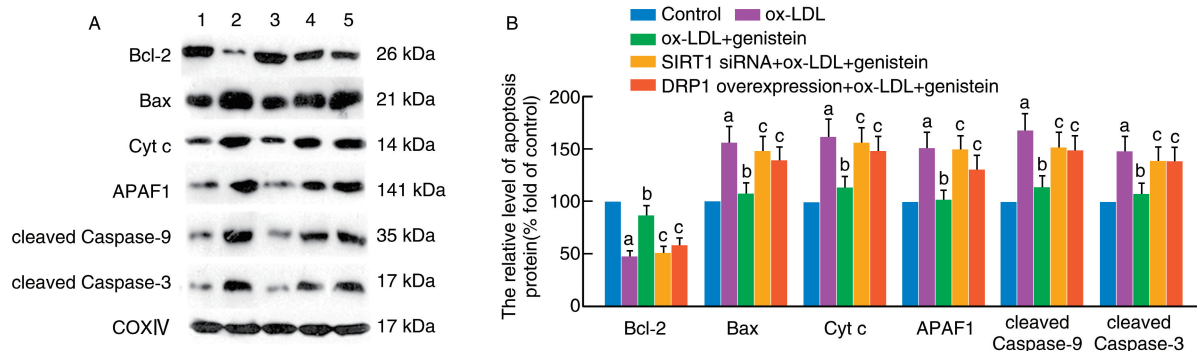


图 5. SIRT1/DRP1 在染料木素抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡中的作用

A 和 B 为 Western blot 测定凋亡关键分子的蛋白表达及定量分析($n=3$)。1 为对照组,2 为 ox-LDL 组,3 为 ox-LDL+染料木素组,

4 为 SIRT1 沉默+ox-LDL+染料木素组,5 为 DRP1 过表达+ox-LDL+染料木素组。a 为 $P < 0.05$,与对照组相比;

b 为 $P < 0.05$,与 ox-LDL 组相比;c 为 $P < 0.05$,与 ox-LDL+染料木素组相比。

Figure 5. The role of SIRT1/DRP1 in genistein inhibiting ox-LDL-induced apoptosis of HUVEC

3 讨论

研究表明 ox-LDL、高血糖和氧化损伤等动脉粥样硬化的危险因素都可诱导血管内皮细胞凋亡,导致其屏障功能受损。在动脉粥样硬化早期,内皮细胞凋亡不仅可促进管腔内血脂渗入内膜,而且引起白细胞和内皮细胞黏附、血小板聚集和炎症细胞浸润,并促进平滑肌细胞增殖,最终形成动脉粥样硬化斑块。在动脉粥样硬化晚期,内皮细胞凋亡可导致动脉粥样硬化斑块脆性增加,诱发血小板黏附聚集形成附壁血栓,继而快速加剧动脉管腔狭窄,导致不稳定型心绞痛、心肌梗死、缺血性脑卒中等急性临床事件发生。因此,阐明血管内皮细胞凋亡机制进而抑制血管内皮细胞凋亡在动脉粥样硬化防治中发挥重要作用^[1-3]。

研究显示,线粒体裂变因子 DRP1 在凋亡中发挥重要作用,抑制 DRP1 能够通过抑制线粒体裂解而抑制凋亡^[18-19]。DRP1 活性与其蛋白修饰密切相关。静息状态下 DRP1 位于胞质中,当第 616 位丝氨酸被磷酸化时 DRP1 活化、易位至线粒体外膜形成环状结构;DRP1 的第 642 位赖氨酸乙酰化不仅直接增加 DRP1 活性,还能够通过增加第 616 位丝氨酸磷酸化而进一步增加 DRP1 活性^[20-21]。活化的 DRP1 通过增强线粒体裂变因子 MFF 和 FIS1 水平,抑制线粒体融合因子 MFN1、MFN2 和 OPA1 水平而加剧线粒体裂变;同时,p-DRP1 结合 Bax 形成复合物,不仅引起线粒体膜电位降低及结构的变化,还通过抑制抗凋亡因子 Bcl-2、促进 Cyt c 和 APAF1 等

释放、活化 Caspase-9 和 Caspase-3 而激活内源性凋亡途径^[22-23]。

研究发现,去乙酰化酶 SIRT1 在染料木素抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤中发挥重要作用^[6-9]。DRP1 作为 SIRT1 的下游靶分子,异黄酮类提取物人参皂苷和红景天苷对神经细胞的保护作用、黄芩甲苷对糖尿病外周神经的保护作用,以及刺芒柄花素对肾小管上皮细胞的保护作用都与活化 SIRT1、抑制 DRP1,进而抑制线粒体裂变和凋亡有关^[14-17]。最近研究发现,增强体育锻炼改善代谢相关脂肪性肝病,与活化 SIRT1、抑制 DRP1 乙酰化而抑制 DRP1 活性,进而抑制肝细胞凋亡密切相关^[24]。然而,染料木素对 ox-LDL 诱导的内皮细胞 DRP1 活性、线粒体裂变和凋亡的影响及 SIRT1 在这个过程中作用尚不清楚。与 Liccardo 等^[13]报道的染料木素抑制甲基乙二醛诱导的内皮细胞凋亡的结果一致,染料木素同样能有效抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡。本研究结果表明,染料木素通过活化 SIRT1,降低 DRP1(K642)的乙酰化和 DRP1(S616)的磷酸化,从而抑制 ox-LDL 诱导的 DRP1 活性。此外,染料木素通过活化 SIRT1,抑制 DRP1 的作用,进而通过降低线粒体裂变因子 MFF 和 FIS1 的表达水平,同时提升线粒体融合因子 MFN1、MFN2 和 OPA1 的水平,有效抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞线粒体裂变过程。此外,染料木素还能抑制 ox-LDL 诱导的 DRP1 与 Bax 复合物的形成,并通过增加 Bcl-2 的表达,降低 Cyt c、APAF1、剪切的 Caspase-9 和剪切的 Caspase-3 的水平,从而有效抑制 ox-LDL 诱导

的内皮细胞凋亡。这一发现与 DRP1 和 Bax 相互作用诱导凋亡的研究^[20],以及 DRP1 诱导的内皮细胞线粒体裂变进而引发凋亡的研究成果^[22-23,25]相一致。然而,染料木素抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞线粒体裂变和凋亡之间的关系还需要进一步阐明。此外,本实验还需通过临床和动物实验进行更系统的验证和研究。

综上,本研究显示染料木素活化 SIRT1,降低 DRP1(K642)乙酰化和 DRP1(S616)磷酸化而抑制 DRP1 活性,通过抑制内皮细胞线粒体裂变而抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡。可见,SIRT1/DRP1 信号通路在染料木素抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡中发挥重要作用。本研究通过揭示染料木素抗内皮细胞凋亡作用,不仅有助于明确其在防治动脉粥样硬化中的分子机制,还为未来开发新型抗动脉粥样硬化药物提供了重要的理论支持。

[参考文献]

- [1] BU L L, YUAN H H, XIE L L, et al. New dawn for atherosclerosis: vascular endothelial cell senescence and death[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20): 15160.
- [2] XU S, ILYAS I, LITTLE P J, et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies[J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(3): 924-967.
- [3] 刘晨, 成姣, 刘烨, 等. 内皮细胞衰老与血管功能障碍[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(10): 916-920.
- LIU C, CHENG J, LIU Y, et al. Endothelial cell senescence and vascular dysfunction[J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(10): 916-920.
- [4] AL-KHAYRI J M, SAHANA G R, NAGELLA P, et al. Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: a review[J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2901.
- [5] WANG Q, DENG W, YANG J, et al. Association of dietary flavonoids intake with all-cause and cardiovascular disease mortality in diabetic kidney disease: a cohort study from the NHANES database[J]. *J Diabetes Res*, 2024, 2024: 8359294.
- [6] ZHANG H, YANG X, PANG X, et al. Genistein protects against ox-LDL-induced senescence through enhancing SIRT1/LKB1/AMPK-mediated autophagy flux in HUVECs[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 455(1/2): 127-134.
- [7] ZHANG H, PANG X, YU H, et al. Genistein suppresses ox-LDL-elicited oxidative stress and senescence in HUVECs through the SIRT1-p66shc-Foxo3a pathways[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(1): e22939.
- [8] ZHANG H P, ZHAO J H, YU H X, et al. Genistein ameliorated endothelial nitric oxidase synthase uncoupling by stimulating sirtuin-1 pathway in ox-LDL-injured HUVECs[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 42: 118-124.
- [9] ZHANG H, ZHAO Z, PANG X, et al. MiR-34a/sirtuin-1/FoxO3a is involved in genistein protecting against ox-LDL-induced oxidative damage in HUVECs[J]. *Toxicol Lett*, 2017, 277: 115-122.
- [10] DUAN H, ZHANG Q, LIU J, et al. Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell, the promising way for natural medicines

- to treat atherosclerosis[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 168: 105599.
- [11] 肖丽, 刘萍, 秦冰. miR-34a 通过调控 Sirt1/FoxO1 通路影响血管内皮细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(3): 193-200.
- XIAO L, LIU P, QIN B. MicroRNA-34a affects endothelial apoptosis induced by ox-LDL via regulating Sirt1/FoxO1 pathway[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(3): 193-200.
- [12] ZHAO Y, WANG L, HUANG Y, et al. Anthocyanins in vascular health and disease: mechanisms of action and therapeutic potential[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2024, 84(3): 289-302.
- [13] LICCARDO M, SAPIO L, PERRELLA S, et al. Genistein prevents apoptosis and oxidative stress induced by methylglyoxal in endothelial cells[J]. *Molecules*, 2024, 29(8): 1712.
- [14] GUO P L, WANG Z X, SUN L, et al. 20(S)-Protopanaxadiol alleviates DRP1-mediated mitochondrial dysfunction in a depressive model *in vitro* and *in vivo* via the SIRT1/PGC-1 α signaling pathway[J]. *Molecules*, 2024, 29(21): 5085.
- [15] WANG X, TANG Y, XIE N, et al. Salidroside, a phenyl ethanol glycoside from *Rhodiola crenulata*, orchestrates hypoxic mitochondrial dynamics homeostasis by stimulating Sirt1/p53/Drp1 signaling[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293: 115278.
- [16] BEN Y, HAO J, ZHANG Z, et al. Astragaloside IV inhibits mitochondrial-dependent apoptosis of the dorsal root ganglion in diabetic peripheral neuropathy rats through modulation of the SIRT1/p53 signaling pathway[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14: 1647-1661.
- [17] HUANG Q, CHEN H, YIN K, et al. Formononetin attenuates renal tubular injury and mitochondrial damage in diabetic nephropathy partly via regulating Sirt1/PGC-1 α pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 901234.
- [18] SUN F, FANG M, ZHANG H, et al. Drp1: focus on diseases triggered by the mitochondrial pathway[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2024, 82(2): 435-455.
- [19] ZERIHUN M, SUKUMARAN S, QVIT N. The Drp1-mediated mitochondrial fission protein interactome as an emerging core player in mitochondrial dynamics and cardiovascular disease therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5785.
- [20] JENNER A, PEÑA-BLANCO A, SALVADOR-GALLEGO R, et al. DRP1 interacts directly with BAX to induce its activation and apoptosis[J]. *EMBO J*, 2022, 41(8): e108587.
- [21] HU Q, ZHANG H, GUTIÉRREZ CORTÉS N, et al. Increased Drp1 acetylation by lipid overload induces cardiomyocyte death and heart dysfunction[J]. *Circ Res*, 2020, 126(4): 456-470.
- [22] CUI X, TIAN Y, ZHAO Y, et al. miR-199b-5p-AKAP1-DRP1 pathway plays a key role in ox-LDL-induced mitochondrial fission and endothelial apoptosis[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2022, 23(13): 1612-1622.
- [23] KIM D, SANKARAMOORTHY A, ROY S. Downregulation of Drp1 and Fis1 inhibits mitochondrial fission and prevents high glucose-induced apoptosis in retinal endothelial cells[J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1662.
- [24] HU Z, ZHANG H, WANG Y, et al. Exercise activates Sirt1-mediated Drp1 acetylation and inhibits hepatocyte apoptosis to improve nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Lipids Health Dis*, 2023, 22(1): 33.
- [25] QU K, YAN F, QIN X, et al. Mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells and its role in atherosclerosis[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 1084604.

(此文编辑 许雪梅)