DOI:10.16016/j.2097-0927.202112106

巨自噬和分子伴侣介导自噬在内皮细胞氧化应激损伤中的特点

王正力[1],訾亚飞[1],刘杨东[2],傅麒宁[1],王学虎[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血管外科[1];518111 广东 深圳,深圳大学附属华南医院血管外科[2]

[摘要] **目的** 探究巨自噬和分子伴侣介导自噬(chaperone-mediated autophagy,CMA)这两种自噬途径在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)氧化应激损伤中特点。**方法** 通过不同浓度(0、20、50、100、200 μg/mL)氧化低密度脂蛋白(oxidation low lipoprotein,OX-LDL)作用 HUVECs 后产生的活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平筛选诱导 HUVECs 氧化应激的适宜浓度。设立空白对照组(不做任何处理)、单纯抑制巨自噬组(10 mmol/L 3-MA)、氧化应激组(50 μg/mL OX-LDL)和抑制巨自噬-氧化应激组(10 mmol/L 3-MA+50 μg/mL OX-LDL),检测各组细胞增殖标志蛋白 PCNA、凋亡标志蛋白 Caspase-3、巨自噬标志蛋白 Beclin-1、分子伴侣介导自噬两种标志蛋白 Hsc70 和 Lamp-2 蛋白表达,评估不同处理下 HUVECs 增殖、凋亡及两种自噬的变化。其中氧化应激组和抑制巨自噬-氧化应激组处理不同时间(1、3、6、12、48 h)后,采用 CCK-8 检测细胞增殖抑制率,Annexin-V/PI 双染检测凋亡,Western blot 检测两种自噬途径蛋白 Beclin-1、Hsc70、Lamp-2 表达,评估巨自噬抑制前后氧化应激下 HUVECs 的增殖、凋亡及两种自噬的时间调控特点。**结果** OX-LDL 诱导氧化应激下 ROS 浓度呈递增关系,选择 50 μg/mL 为适宜浓度进行后续实验。与空白对照组比较,氧化应激组 HUVECs Caspase-3、Beclin-1、Hsc70、Lamp-2 上调,PCNA 下调($P<0.05$),同时随处理时间延长,48 h 内细胞增殖抑制率、全期凋亡率及 Lamp-2 递增,Hsc70 在 6 h 后递增,12 h 内 Beclin-1 水平递增($P<0.05$);与氧化应激组比较,抑制巨自噬-氧化应激组 Caspase-3、Hsc70、Lamp-2 上调,PCNA 下调($P<0.05$),随处理时间延长,同时段 Hsc70、Lamp-2 上调,且 Hsc70 在 3 h 后递增($P<0.05$)。**结论** 巨自噬和分子伴侣介导自噬在内皮细胞氧化应激过程中先后激活,巨自噬抑制后提高分子伴侣介导自噬水平,并提前激活时间,减轻氧化应激对内皮细胞的损伤。

[关键词] 分子伴侣介导自噬;巨自噬;氧化应激;人脐静脉内皮细胞
[中图法分类号] R322.123; R329.25; R363.21 [文献标志码] A

Characteristics of macroautophagy and molecular chaperone-mediated autophagy in oxidative stress injury of endothelial cells

WANG Zhengli[1], ZI Yafei[1], LIU Yangdong[2], FU Qining[1], WANG Xuehu[1] [1]Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Vascular Surgery, South China Affiliated Hospital, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong Province, 518111, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the characteristics of macroautophagy and molecular chaperone-mediated autophagy (CMA) in the oxidative stress injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** After HUVECs were treated with oxidized low density lipoprotein (OX-LDL) at different concentrations(0、20、50、100、200 μg/mL), the production of reactive oxygen species (ROS) was measured to screen the optimal concentration to induce HUVECs oxidative stress. The cells were divided into 4 groups: control group (without any treatment), macroautophagy inhibition group (treated with 10 mmol/L 3-MA, specific inhibitor of macroautophagy), oxidative stress group (treated with 50 μg/mL OX-LDL), and macroautophagy inhibition-oxidative stress group (treated with 10 mmol/L 3-MA+50 μg/mL OX-LDL). The

[通信作者] 王学虎,E-mail: 184038696@qq.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

expression levels of proliferation marker protein PCNA, apoptosis marker Caspase-3, macroautophagy marker Beclin-1, and CMA markers Hsc70 and Lamp-2 were detected in each group with Western blotting. The proliferation, apoptosis, 2 kinds of autophagy under different treatments were evaluated respectively. After the cells of the oxidative stress group and macroautophagy inhibition-oxidative stress group were treated for different duration (1, 3, 6, 12 and 48 h), the proliferation and apoptosis of HUVECs were tested by CCK-8 assay and Annexin-V/PI double staining, respectively. Western blotting was adopted to determine the protein levels of Beclin-1, Hsc70 and Lamp-2. Finally, the time regulation characteristics of the 2 autophagy pathways before and after macroautophagy inhibition were analyzed. **Results** Under OX-LDL induced oxidative stress, the ROS level was elevated with the increase of OX-LDL concentration, and 50 μg/mL was finally selected as the appropriate concentration for subsequent experiments. As compared with the control group, the levels of Caspase-3, Beclin-1, Hsc70 and Lamp-2 were up-regulated, while that of PCNA was down-regulated in the oxidative stress group ($P<0.05$). With the prolongation of treatment time, proliferation inhibition rate, overall apoptotic rate and Lamp-2 level were increased within 48 h, Hsc70 level was elevated after 6 h, and that of Beclin-1 was improved within 12 h in the oxidative stress group ($P<0.05$). In the macroautophagy inhibition-oxidative stress group, the expression levels of Caspase-3, Hsc70 and Lamp-2 were also up-regulated, that of PCNA down-regulated ($P<0.05$), those of Hsc70 and Lamp-2 were increased at the same time and that of Hsc70 was in an elevation after 3 h of treatment ($P<0.05$). **Conclusion** Macroautophagy and CMA are activated successively during the process of oxidative stress, and CMA can be enhanced after macroautophagy inhibition. The early activation contributes to attenuate oxidative stress-induced damage to endothelial cells.

[**Key words**] chaperone-mediated autophagy; macroautophagy; oxidative stress; human umbilical vein endothelial cells

Corresponding author: WANG Xuehu, E-mail: 184038696@qq.com

内膜增生是导致多种血管疾病的病理基础。原因为多种刺激因素导致内皮细胞损伤并发生凋亡坏死,同时肌成纤维细胞向损伤处迁移并增殖[1]。内皮细胞损伤不仅是内膜增生的始动因素,更在整个病理过程中具有重要作用[2],而氧化应激是作为内皮细胞损伤的重要因素[3],主要通过升高细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平产生病理的损伤。过量 ROS 可经 NADPH 氧化酶(NOX)等多种途径调控蛋白表达及造成细胞器的损伤[4]。其中氧化低密度脂蛋白(oxidation low lipoprotein,OX-LDL)不仅是 ROS 作用细胞的产物,同时还对细胞内的 ROS 水平有反向调控作用。

自噬是一种广泛存在于真核生物体内的生命活动,是细胞在饥饿、应激、毒物损伤等条件下加速代谢和获得能量的重要方式[5],既可维持正常的细胞生理状态,也可在病理状态下发挥作用[6]。细胞自噬目前分为 3 种:巨自噬、分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy,CMA)和微自噬。其中巨自噬标志蛋白包括 Beclin-1、LC3 蛋白[7-8],而 3-MA 是靶向阻断Ⅲ型 P13K 路径的特异性巨自噬抑制剂[9]。CMA 是分子伴侣介导识别具备特定氨基酸序列的底物蛋白转运入自噬溶酶体降解的自噬方式,热休克蛋白家族 Hsc70 及 Lamp-2a 蛋白参与识别过程[10-11]。微自噬由溶酶体膜杯状凹陷内表面包裹吞噬物后形成小泡进入溶酶体降解。在哺乳动物中主要发生的是巨自噬和 CMA。有研究发现自噬参与内皮细胞损伤导致的内膜增生过程[12],然而,关于两种自噬方式在氧化应激导致内皮细胞损伤中的作用特点尚不清楚。因此,本研究通过观测氧化应激条件下抑制巨自噬途径前后在时间层面内皮细胞巨自噬和分子伴侣介导自噬与细胞增殖凋亡水平,探究两种自噬途径在内皮细胞氧化应激损伤中的作用特点,阐明巨自噬和分子伴侣介导自噬对氧化应激内皮细胞损伤具有保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料及分组

1.1.1 试剂与设备 活性氧检测试剂盒(碧云天生物技术研究所),3-MA(MCE)、BCA 快速蛋白定量试剂盒(贝博生物),各种兔源性一抗均来至于美国 CST 公司。全自动细胞计数仪、酶标仪(Bio-Rad),超净工作台(苏州净化),CCK-8 检测试剂盒(碧云天),Annexin-V/PI 凋亡双染试剂盒(贝博生物),氧化性低密度脂蛋白(奕源生物),HRP 标记山羊抗兔二抗(碧云天)。

1.1.2　细胞分组及处理　　人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelialcells,HUVECs)原代细胞株购自深圳豪地华拓生物。HUVECs 细胞株传代培养,取对数生长期细胞分为 4 组,空白对照组(Ctl):不做其他处理;单纯抑制巨自噬组(3-MA):10 mmol/L 3-MA 处理细胞;氧化应激组(OX-LDL):50 μg/mL OX-LDL 处理细胞;抑制巨自噬-氧化应激组(3-MA+OX-LDL):10 mmol/L 3-MA 和 50 μg/mL OX-LDL 处理细胞。各组均处理 6 h;另外,氧化应激组和抑制巨自噬-氧化应激组每组各处理 1、3、6、12、48 h。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养及不同浓度 OX-LDL 对 ROS 水平影响的测定　　HUVECs 细胞用含 10%胎牛血清的 HDMEM 培养基在恒温 37 ℃、含 5%二氧化碳细胞孵箱中培养。将不同浓度(0、20、50、100、200 μg/mL)OX-LDL 加入 HUVECs 作用 6 h 后,行 ROS 检测。带 DCFH-DA 探针的 ROS 检测剂与细胞共培养 2 h 后,进行流式细胞仪检测。

1.2.2　流式细胞仪检测细胞凋亡　　HUVECs 细胞在含 10%血清的完全培养基培养,根据分组分别加入 PBS、10 mmol/L 3-MA 及 50 μg/mL OX-LDL 继续培养 1、3、6、12、48 h。胰酶消化获取细胞悬液,采用 Annexin-V/PI 双染法,进行流式细胞仪凋亡检测。

1.2.3　CCK-8 检测细胞增殖和细胞毒性　　取对数生长期细胞按照 5 000/孔种入 96 孔板,根据分组分别加入 10 mmol/L 3-MA 及 50 μg/mL OX-LDL 继续培养 1、3、6、12、48 h。细胞去除培养液使用 PBS 缓冲液清洗后加入 10 μL/孔 CCK-8 溶液孵育,使用酶标仪在 450 nm 检测波长下检测光密度值[D(450)]。计算细胞增殖抑制率=1-{[实验组 D(450)-空白对照组 D(450)]/[对照组 D(450)-空白对照组 D(450)]}×100%。

1.2.4　Western blot 检测蛋白表达　　RIPA 裂解液裂解细胞提取蛋白,BCA 蛋白定量后,酶标仪在 562 nm 波长下测定,根据标准曲线得出目的蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白后转至 PVDF 膜。采用 250 mA 恒流转膜。将各个 PVDF 膜条带分别对应浸入 beclin-1(1∶1 000)、Hsc70(1∶1 000)、Lamp-2a(1∶1 000)、PCNA(1∶1 000)、Caspase-3(1∶1 000)的一抗孵育。HRP 标记二抗处理后,ECL 显影及采集图形和数据分析。

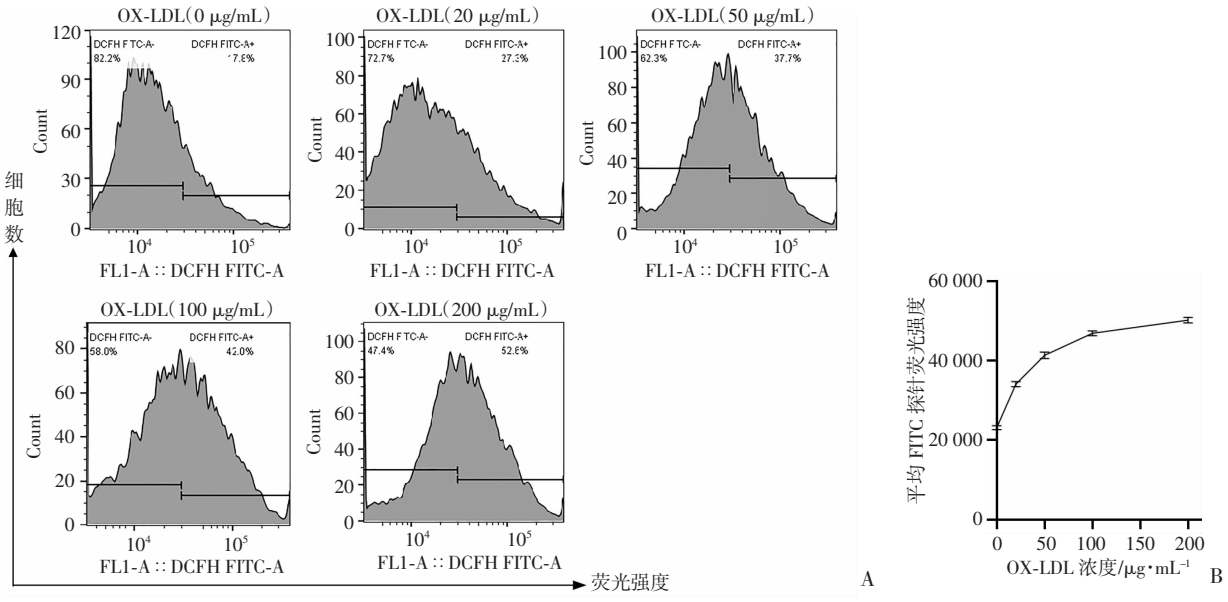
1.3　统计学分析

每组实验均重复至少 3 次,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。流式检测结果使用 FlowJo v10 软件编辑分析,Western blot 条带使用 Image J 软件进行量化分析。采用 GraphPad Prism 8 进行统计分析及制图。两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析 Dunnet-t 检验。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　OX-LDL 诱导 HUVECs 细胞 ROS 水平变化

不同浓度 OX-LDL 作用后均引起 HUVECs 细胞内 ROS 水平上调,并且上调水平随 OX-LDL 浓度升高而升高,浓度在 20~100 μg/mL 上升趋势明显,提示此区间浓度诱导最为灵敏(图 1)。取趋势明显区间的中间值为诱导最佳浓度,后续实验采取 50 μg/mL 为适宜浓度。

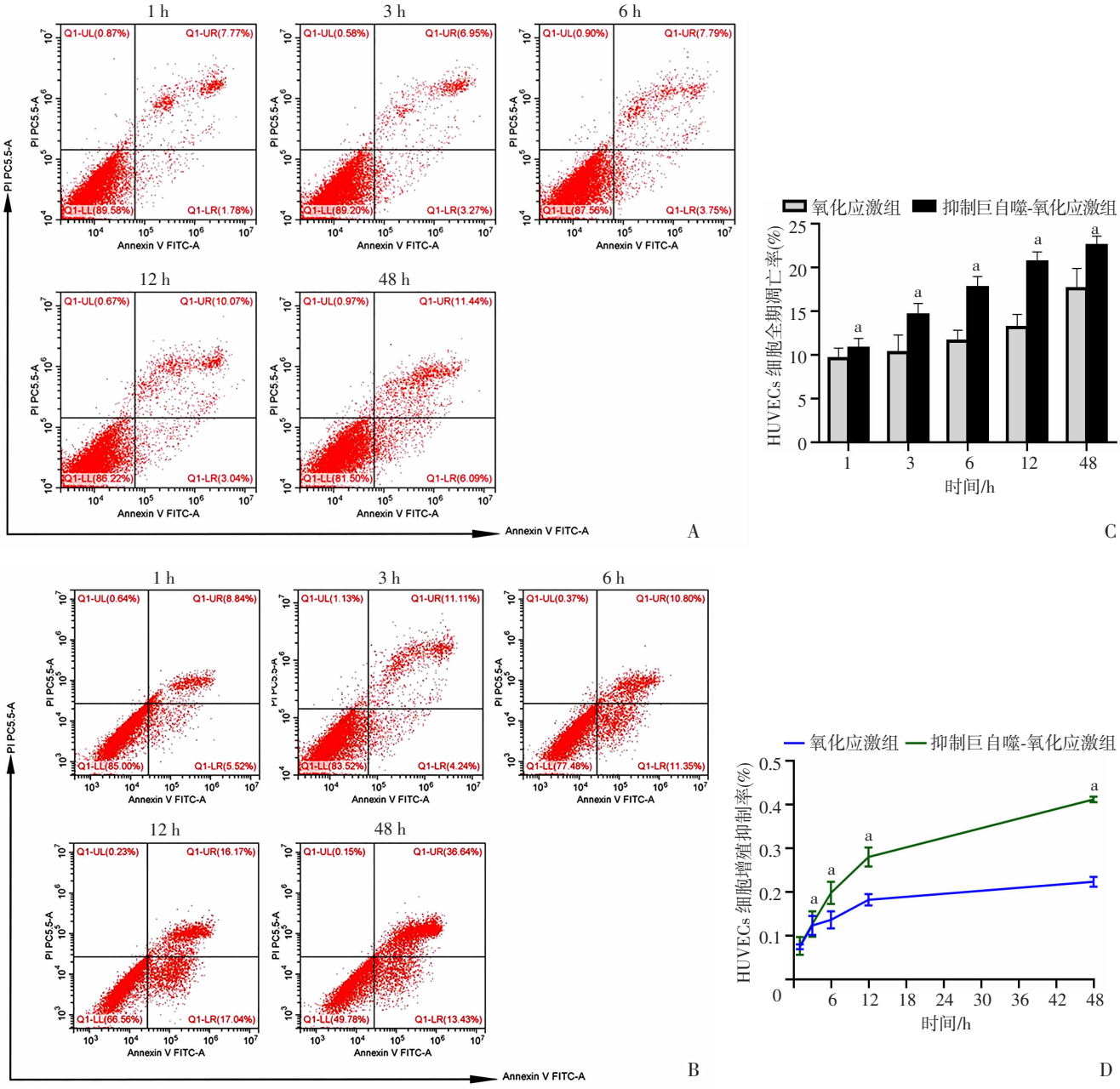


A:不同浓度 OX-LDL 作用 HUVECs 6 h ROS 荧光强度细胞分布;B:不同浓度 OX-LDL 作用 HUVECs 6 h 平均 ROS 荧光强度

图 1　不同浓度 OX-LDL 作用 HUVECs 6 h ROS 水平的变化　(n=3)

2.2　使用 3-MA 抑制巨自噬前后 OX_LDL 诱导氧化应激 HUVECs 不同时间内细胞增殖和凋亡情况

氧化应激组及抑制巨自噬-氧化应激组分别作用不同时间(1、3、6、12、48 h)后行 CCK-8 细胞增殖及流式凋亡检测。结果显示(图 2):不同时间对 HUVECs 细胞增殖抑制率和凋亡率均有显著影响($P<0.05$),随时间延长,增殖抑制率上升,凋亡率上升。与氧化应激组比较,同时段抑制巨自噬-氧化应激组增殖抑制率水平更高($P<0.05$),凋亡率更高($P<0.05$)。表明 HUVEVCs 细胞在 OX_LDL 诱导氧化应激 48 h 内随时间延长细胞增殖率下降,凋亡率上升,抑制巨自噬可以进一步抑制细胞的增殖并促进凋亡。



A:氧化应激组不同时间 HUVECs 凋亡流式图;B:抑制巨自噬-氧化应激组不同时间 HUVECs 凋亡流式图;C:氧化应激组及抑制巨自噬-氧化应激组不同时间 HUVECs 全期凋亡率比较　a:$P<0.05$,与同时间点氧化应激组比较;D:氧化应激组及抑制巨自噬-氧化应激组不同时间 HUVECs 增殖抑制率比较　a:$P<0.05$,与同时间点氧化应激组比较

图 2　氧化应激组及抑制巨自噬-氧化应激组 HUVECs 凋亡率和增殖抑制率　($n=3$)

2.3　不同处理下 HUVECs 两种自噬、增殖及凋亡相关蛋白的表达

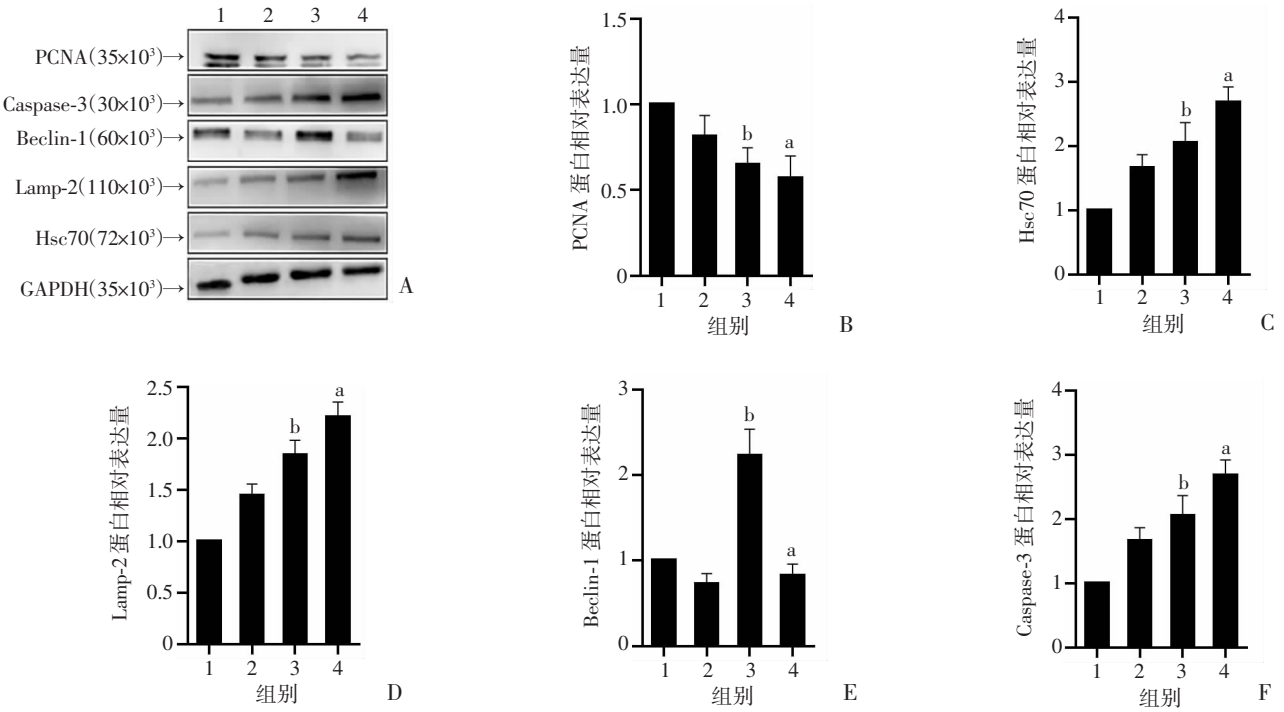
将 4 组细胞作用 6 h 后,行 Western blot 检测增殖、凋亡和两种自噬相关蛋白表达。结果显示(图 3):与空白对照组比较,OX-LDL 诱导氧化应激可以提高 HUVECs 细胞 Caspase-3、Beclin-1、Hsc70、Lamp-2 水平($P<0.05$),同时降低 PCNA 水平($P<0.05$);与氧化应激组比较,抑制巨自噬-氧化应激组 HUVECs Caspase-3、Hsc70、Lamp-2 水平上升,同时 PCNA 下降($P<0.05$),3-MA 可以显著抑制 OX-LDL 对 HUVECs 细胞巨自噬的升高作用($P<0.05$)。表明氧化应激本身可促进内皮细胞凋亡和自噬并抑制增殖,氧化应激下抑制巨自噬进一步增加内皮细胞凋亡,减少增殖活性,并伴随有 CMA 途径的强化激活。

2.4　OX_LDL 诱导 HUVECs 氧化应激下细胞两种自噬途径蛋白的时间表达特点

Western blot 检测氧化应激组和抑制巨自噬-氧化应激组在不同时间点(1、3、6、12、48 h)巨自噬途径标志蛋白 Beclin-1 及分子伴侣介导自噬途径重要参与蛋白 Hsc70 和 Lamp-2 的表达。结果显示(图 4):OX_LDL 诱导氧化应激 HUVECs 细胞时间在 12 h 内 Beclin-1 水平升高($P<0.05$),12 h 后有所下降,巨自噬抑制剂 3-MA 可以全时段抑制 Beclin-1 蛋白表达。48 h 内氧化应激组 Lamp-2 蛋白表达水平上升($P<0.05$),且同时段抑制巨自噬-氧化应激组 Lamp-2 蛋白水平更高($P<0.05$)。氧化应激组 Hsc70 蛋白 1 h 和 3 h 内表达无明显差异,在 6 h 后开始升高($P<0.05$),抑制巨自噬后 Hsc70 蛋白表达在 3 h 后开始升高($P<0.05$)。表明内皮细胞巨自噬在氧化应激早期即开始激活,随时间延长降低,分子伴侣介导自噬两种标志蛋白略有差异,其中 Hsc70 在氧化应激中后期开始升高,Lamp-2 则随时间缓慢增加,氧化应激下抑制巨自噬后均可见两种标志蛋白水平上升,同时有 Hsc70 蛋白激活时间的提前。

3　讨论

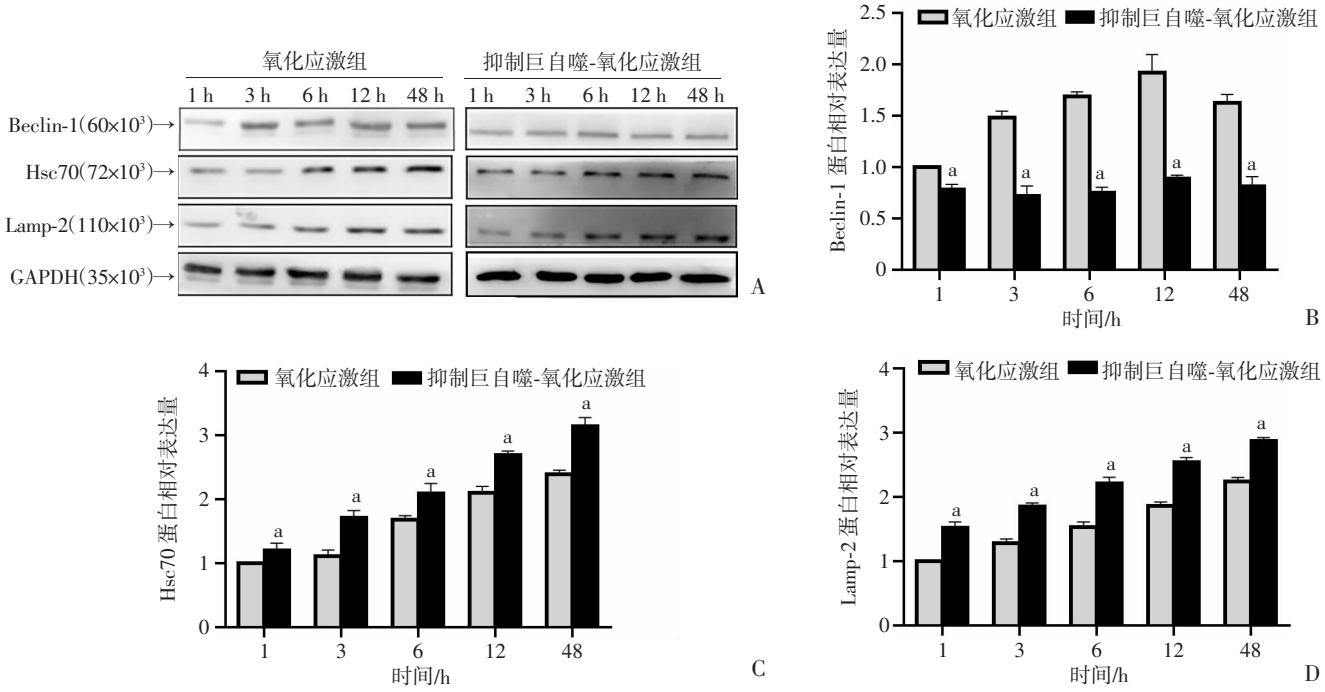
氧化应激所致的内皮细胞损伤是引起多种血管疾病内膜增生的重要因素之一[13],其对内皮细胞的损伤以 ROS 的产生活化对胞内蛋白核酸等大分子的氧化以及特定通路的激活为主要途径[14]。OX-LDL 可通过内皮细胞表面的 OX-LDL 依赖的类凝集素受体(LOX-1)进入细胞内[15],激活细胞内NADPH氧化酶升高进而



1:空白对照组;2:单纯巨自噬抑制组;3:氧化应激组;4:抑制巨自噬-氧化应激组; a:$P<0.05$,与氧化应激组比较;b:$P<0.05$,与空白对照组比较

A:Western blot 检测各组 HUVECs PCNA、Hsc70、Lamp-2、Beclin-1、Caspase-3 蛋白表达;B:各组 PCNA 蛋白相对表达量;C:各组 Hsc70 蛋白相对表达量;D:各组 Lamp-2 蛋白相对表达量;E:各组 Beclin-1 蛋白相对表达量;F:各组 Caspase-3 蛋白相对表达量

图 3　各组 HUVECs PCNA、Caspase-3、Hsc70、Lamp-2、Beclin-1 蛋白表达分析　($n=3$)



A: Western blot 检测氧化应激组和抑制巨自噬-氧化应激组 HUVECs 不同时间 Beclin-1、Lamp-2、Hsc70 蛋白表达;B~D:分别为 Beclin-1、Hsc70、Lamp-2 蛋白相对表达量 a:$P<0.05$,与同时间点氧化应激组比较

图 4 氧化应激组和抑制巨自噬-氧化应激组不同时间 HUVECs Beclin-1、Lamp-2、Hsc70 表达分析 ($n=3$)

引起 HUVECs 细胞内 ROS 升高,本研究即利用 OX-LDL 可调控内皮细胞 ROS 模拟氧化应激,流式检测结果显示 OX-LDL 可以在实验浓度下诱导内皮细胞 ROS 水平的升高,并且不同浓度 OX-LDL 诱导相同时间 ROS 水平呈现低浓度高敏感、高浓度低敏感的特点,实验采取中间浓度诱导构建出内皮细胞氧化应激模型,可很好模拟内皮细胞氧化应激的特点。

自噬是真核细胞内广泛存在的一种重要的生命活动,经典自噬即巨自噬主要特征为自噬小体形成,最终形成自噬溶酶体并在溶酶体内完成对小体内包裹底物的消化和降解,涉及多个 ATG 基因调控不同蛋白结合形成自噬前体,其中 ATG 基因调控的Ⅲ型 P13K 路径与 ATG14L 形成的复合体参与自噬前体形成[16],Ⅲ型 P13K 路径与 ATG14L 形成的复合体再结合被 ULK1 磷酸化的 Beclin-1 参与到自噬前体的延伸及定位[17],自噬前体延伸结合磷脂双分子膜包裹底物形成经典大自噬特征结构自噬小体[18],其中 3-MA 可特异性靶向阻断Ⅲ型 P13K 路径从而抑制自噬前体形成使细胞应对刺激维持生理功能出现障碍,同时,自噬小体通过微丝蛋白、小体膜蛋白和溶酶体膜蛋白的引导与溶酶体结合形成自噬溶酶体,从而完成底物蛋白的降解。分子伴侣介导自噬主要特征为分子伴侣蛋白 Hsc70 识别特定氨基酸基序 KFERQ 介导底物蛋白转运进入溶酶体,其过程涉及 Lamp 蛋白。Lamp-2 蛋白定位于溶酶体膜,是一种单次跨膜蛋白,识别 Hsc70-底物复合体蛋白并转运底物进入溶酶体内降解同时释放 Hsc70[19],CMA 途径没有自噬小体形成,底物以细胞内长寿蛋白质为主[20]。作为两种不同的细胞自噬方式,尽管在底物选择、调控机制等多方面存在不同,在细胞面对各种外在刺激情况时,二者共同参与维持细胞内微环境的稳定。目前关于巨自噬的研究较多,但 CMA 相关功能及两种自噬途径间关系的研究则相对较少。有研究发现:在饥饿诱导的肿瘤细胞中,巨自噬活性下降后,分子伴侣介导自噬会开始活化增强细胞的自噬功能从而为细胞的生存提供必需的能源物质[21],这说明在肿瘤细胞中两种自噬途径间相互关联。然而,在内皮细胞尤其氧化应激引起内皮细胞的损伤中,这两种自噬途径的表现特点目前尚不清楚,因此,本研究探究了氧化应激两种自噬途径在内皮细胞损伤中特点。本研究采用抑制巨自噬观测分子伴侣介导自噬方式试图阐明二者表现特点。基于巨自噬早期激活的Ⅲ型 P13K 路径涉及 Beclin-1 的复合体形成,本研究使用 3-MA 作为巨自噬早期激活的特异性抑制剂,Beclin-1 作为巨自噬特异性标志蛋白分子。CMA 途径以涉及底物蛋白识别及转运的 Hsc70 及 Lamp-2 蛋白作为分子伴侣介导自噬的标志蛋白。

氧化应激可通过多种方式引起内皮细胞的损伤,其中最直接可引起内皮细胞形态及功能变化的指标包括细胞的增殖和凋亡水平。本研究采用经典 CCK-8 细胞增殖毒性实验检测内皮细胞增殖以及 Annexin-V/PI 双染法检测凋亡,同时配合免疫印迹检测增殖相关蛋白 PCNA 及凋亡蛋白 Caspase-3 评估细胞损伤水平。发现诱导氧化应激后内皮细胞巨自噬和分子伴侣介导自噬相关蛋白表达均增加,同时伴随细胞增殖抑制率及凋亡增加,在抑制巨自噬后 Beclin-1 水平明显抑制,细胞凋亡率及增殖抑制率进一步上升,同时观察到抑制巨自噬后分子伴侣介导自噬水平升高。CMA 途径重要参与蛋白 Hsc70 和 Lamp-2 水平提高,提示巨自噬和分子伴侣介导自噬间存在关联,当巨自噬途径受阻后,分子伴侣介导自噬水平会有明显提高,以增强细胞自噬水平减轻细胞氧化应激损伤。

进一步在时间层面上阻断巨自噬途径研究两种自噬水平变化发现:巨自噬在细胞氧化应激状态的 1、3、6、12 h 内水平随时间推迟升高,作用 12 h 开始下降。其在 12 h 内水平持续升高与 OX-LDL 依赖 LOX-1 受体缓慢进入细胞以及细胞内 ATP 能量供应有关,12 h 后 Beclin-1 水平有所下降,提示细胞内巨自噬水平开始降低,可能与细胞内能量耗竭及 ROS 对内皮细胞线粒体损伤有所关联,巨自噬涉及细胞内吞转运、细胞器膜流动重利用等需要大量耗能运动因而不能持久发生。Hsc70 属于热休克同源蛋白,介导识别含特定氨基酸基序(KFERQ)的底物蛋白并转运进入自噬溶酶体,完成包括部分长寿蛋白质在内的蛋白降解[22]。Lamp-2 蛋白定位于溶酶体膜,是一种单次跨膜蛋白,参与 Hsc70 结合的底物蛋白形成的复合体蛋白结合,从而转运底物蛋白进入溶酶体内降解,因此,Lamp-2 也可以作为一种重要的溶酶体膜蛋白。作为分子伴侣介导自噬途径重要的两种参与蛋白,本研究中发现两者的作用方式仍有所不同。在 HUVECs 细胞氧化应激状态下,Hsc70 蛋白在作用时间 1、3 h 内未见明显升高,在 6 h 后蛋白表达量开始上升,且在作用 48 h 仍有提高,可能与细胞内长寿蛋白质不易发生损伤有关。长寿蛋白质性质较稳定,而细胞内 ROS 水平依赖 OX-LDL 转运进入细胞内。Lamp-2 蛋白则在作用时间内其水平与作用时间呈正比,没有类似 Hsc70 蛋白的窗口反应期,可能与 Lamp-2 蛋白本身是溶酶体膜蛋白,随着巨自噬的激活,自噬小体形成,自噬溶酶体活化水平增高伴随溶酶体蛋白增加有关联[23]。在巨自噬抑制后,两种 CMA 标志蛋白均呈现时间相关性水平增加,说明在抑制巨自噬后分子伴侣介导自噬可以激活某些特定的途径从而增加 CMA 途径自噬水平,其中 Hsc70 蛋白可以在巨自噬抑制后早期就开始激活,时间由 6 h 提前到 3 h,具体方式有待继续探究。

本研究在分子层面上抑制了巨自噬的表达,如果同时抑制 CMA 途径,观测氧化应激下内皮细胞相关增殖凋亡以及两种自噬水平与时间的关系,可以从另一方面阐明自噬在内皮氧化应激损伤中的特点。有学者研究发现,使用 SB203580(吡啶异咪哒化合物)抑制内皮祖细胞(EPCs)CMA 途径后可以观测到 EPCs 巨自噬的增强及凋亡增加、增殖抑制[24]。提示两种自噬途径在细胞内相互关联,均可通过减轻内皮细胞损伤发挥保护作用。

综上所述,本研究结果显示:巨自噬和分子伴侣介导自噬在内皮细胞氧化应激中先后激活,巨自噬抑制后可提高分子伴侣介导自噬水平,提前激活时间以减轻氧化应激对内皮细胞的损伤。

作者贡献声明 王正力负责内容构思和实验方法设计、实验数据分析和撰写初稿;訾亚飞负责内容整理,参与实验研究及数据采集,参与文章内容撰写指导及提供实验技术材料支持;刘杨东参与酝酿和设计实验,核对实验进展及指导实验进行,并给予研究经费支持;傅麒宁参与选题方向确定及指导实验方案的设计;王学虎负责实验工作支持,全程参与论文内容修改指导并审核全文

参考文献:

[1] 靖永胜, 王小平, 刘芳, 等. 动静脉内瘘功能障碍病理及发病机制的研究进展[J]. 中华肾脏病杂志, 2017, 33(4): 318-320. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2017.04.015.
JING Y S, WANG X P, LIU F, *et al*. Research progress on dysfunction and pathogenesis of arteriovenous fistula [J]. Chin J Nephrol, 2017, 33(4): 318-320. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2017.04.015.

[2] OWENS C D, WAKE N, KIM J M, *et al*. Endothelial function predicts positive arterial-venous fistula remodeling in subjects with stage Ⅳ and Ⅴ chronic kidney disease[J]. J Vasc Access, 2010, 11(4): 329-334. DOI: 10.5301/jva.2010.5833.

[3] EGOROVA A D, VAN DER HEIDEN K, POELMANN R E, *et al*. Primary Cilia as biomechanical sensors in regulating endothelial function[J]. Differentiation, 2012, 83(2): S56-S61. DOI: 10.1016/j.diff.2011.11.007.

[4] DUNN S, VOHRA R S, MURPHY J E, *et al*. Thelectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease[J]. Biochem J, 2008, 409(2): 349-355. DOI: 10.1042/BJ20071196.

[5] FURLONG K, HWANG S. Autophagy and noroviruses[J]. Viruses, 2019, 11(3): 244. DOI: 10.3390/v11030244.

[6] MIALET-PEREZ J, VINDIS C. Autophagy in health and disease: focus on the cardiovascular system[J]. Essays Bio-

chem, 2017, 61(6): 721-732. DOI: 10.1042/EBC20170022.

[7] 蒋琦炜, 张德宇, 石烟祝, 等. 细胞自噬与肿瘤发生发展[J]. 军事医学, 2021, 45(3): 234-241.
JIANG Q W, ZHANG D Y, SHI Y Z, *et al*. Autophagy and tumor development and progression[J]. Mil Med Sci, 2021, 45(3): 234-241.

[8] DANCOURT J, MELIA T J. Lipidation of the autophagy proteins LC3 and GABARAP is a membrane-curvature dependent process[J]. Autophagy, 2014, 10(8): 1470-1471. DOI: 10.4161/auto.29468.

[9] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, LEVINE B. Methods in mammalian autophagy research[J]. Cell, 2010, 140(3): 313-326. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.028.

[10] 李钰. 分子伴侣介导自噬[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(A3): 20364-20365.
LI Y. Molecular chaperone mediated autophagy [J]. J Clin Med Lit, 2017, 4(A3): 20364-20365.

[11] ARIAS E, CUERVO A M. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control[J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(2): 184-189. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.10.009.

[12] 杨雄. 兔自体动静脉瘘术后内膜增生中的自噬现象[D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
YANG X. Autophagy in endometrial hyperplasia after autogenous arteriovenous fistula surgery in rabbits[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2019.

[13] 孔淑君, 陈卫东. 慢性肾脏病氧化应激的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2020, 40(4): 759-762.
KONG S J, CHEN W D. Research progress of oxidative stress in chronic kidney disease[J]. Int J Urol Nephrol, 2020,40(4): 759-762.

[14] KIHARA A, KABEYA Y, OHSUMI Y, *et al*. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network[J]. EMBO Rep, 2001, 2(4): 330-335. DOI: 10.1093/embo-reports/kve061.

[15] 和晓莹, 秦智琦, 段琦, 等. 氧化低密度脂蛋白激活 PYHIN1/Caspase 1 炎症复合体信号通路增强主动脉内皮细胞黏附的机制研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2021, 21(5): 4248-4252. DOI: 10.16563/j.cnki.1671-6272.2021.10.021.
HE X Y, QIN Z Q, DUAN Q, *et al*. Mechanism of oxidized low density lipoprotein promotes PYHIN1/caspase 1 inflammatory complex signaling pathway and enhances aortic endothelial cell adhesion[J]. Mol Cardiol China, 2021, 21(5): 4248-4252. DOI: 10.16563/j.cnki.1671-6272.2021.10.021.

[16] ZABIRNYK O, LIU W, KHALIL S, *et al*. Oxidized low-density lipoproteins upregulate proline oxidase to initiate ROS-dependent autophagy[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3): 446-454. DOI: 10.1093/carcin/bgp299.

[17] ZHANG Y L, CAO Y J, ZHANG X, *et al*. The autophagy-lysosome pathway: a novel mechanism involved in the processing of oxidized LDL in human vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(2): 377-382. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.03.026.

[18] 朱琪, 林芳. 自噬的分子标志物[J]. 药学学报, 2016, 51(1): 33-38. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2015-0634.
ZHU Q, LIN F. Molecular markers of autophagy[J]. Acta Pharm Sin, 2016, 51(1): 33-38. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2015-0634.

[19] NAZIO F, BORDI M, CIANFANELLI V, *et al*. Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications[J]. Cell Death Differ, 2019, 26(4): 690-702. DOI: 10.1038/s41418-019-0292-y.

[20] 王海杰, 谭玉珍. 细胞自噬的形态学特征和功能意义[J]. 解剖学报, 2009, 40(5): 844-849.
WANG H J, TAN Y Z. Morphological features and functional implications of autophagy[J]. Acta Anat Sin, 2009, 40(5): 844-849.

[21] 李彩丽, 辛英, 魏虎来, 等. 巨自噬与分子伴侣介导的自噬在饥饿诱导的 Raji 细胞中相继顺序被激活[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(7): 958-961. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2019.07.014.
LI C L, XIN Y, WEI H L, *et al*. The sequential switch from macroautophagy to chaperone-mediated autophagy in Raji cells induced by starvation[J]. Chin Pharmacol Bull, 2019, 35(7): 958-961. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2019.07.014.

[22] 曾欣程. 二甲双胍诱导分子伴侣介导自噬的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
ZENG X C. Study of metformin induced chaperone mediated autophagy[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018.

[23] 孙乐平. 分子伴侣介导自噬在甲基苯丙胺诱导的 α-突触核蛋白相关神经毒性中的作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
SUN L P. The role of chaperone-mediated autophagy in neurotoxicity induced by alpha-synuclein after METH exposure[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2019.

[24] 赵彬. 通过激活和抑制 EPCs 的 CMA 探讨 CMA 和大自噬相互关系的实验研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
ZHAO B. Research interaction of CMA and macroautophagy through inhibition and activation CMA in EPCs [D]. Suzhou: Soochow University, 2012.

(**收稿**:2021-12-13;**修回**:2022-01-28)

(编辑 汪勤俭)