DOI:10.16016/j.2097-0927.202107159

二氢杨梅素通过 Prohibitin 2 增强血管内皮细胞线粒体自噬

胡 琴[1],申 卉[2],张 婷[2],李亚斐[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系:军队流行病学教研室[1],营养与食品卫生学教研室[2]

[摘要] **目的** 观察二氢杨梅素对血管内皮细胞线粒体自噬的影响,并探讨 Prohibitin 2 在其中的作用。**方法** 用不同浓度(0、0.1、1、10、100 μmol/L)二氢杨梅素处理人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)12 h 后,流式细胞术和荧光显微镜观测 MitoTracker® Deep Red(MTDR)荧光强度,RT-PCR 和 Western blot 分别检测 Prohibitin 2 mRNA 及其蛋白表达。用氯喹预处理 HUVECs 1 h 后,再用不同浓度二氢杨梅素处理 12 h 或 10 μmol/L 羰基氰化物间氯苯腙(线粒体自噬激动剂)处理 6 h,流式细胞术检测线粒体自噬。另用 control siRNA 或 Prohibitin 2 siRNA 转染 HUVECs 后,再用二氢杨梅素处理 12 h,流式细胞术检测细胞线粒体自噬。**结果** 与无二氢杨梅素(0 μmol/L)处理相比,≥0.1 μmol/L 二氢杨梅素处理显著降低血管内皮细胞 MTDR 荧光强度;同时,二氢杨梅素处理可明显增加 Prohibitin 2 mRNA 和蛋白表达水平($P<0.05$);当以氯喹预处理抑制溶酶体功能后,与无二氢杨梅素处理相比,≥10 μmol/L 二氢杨梅素处理可以显著增加血管内皮细胞线粒体自噬,与羰基氰化物间氯苯腙效应相一致($P<0.05$)。与 control siRNA 处理组相比,以 siRNA 转染沉默 Prohibitin 2 后二氢杨梅素对线粒体自噬的诱导作用被明显抑制($P<0.05$)。**结论** 二氢杨梅素可通过调控 Prohibitin 2 增强血管内皮细胞线粒体自噬。

[关键词] 血管内皮细胞;二氢杨梅素;Prohibitin 2;线粒体自噬

[中图法分类号] R285.5; R322.12; R329.25 [文献标志码] A

Dihydromyricetin induces mitophagy by regulating Prohibitin 2 pathway in vascular endothelial cells

HU Qin[1], SHEN Hui[2], ZHANG Ting[2], LI Yafei[1] [1]Department of Epidemiology, [2]Department of Nutrition and Food Hygiene, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the effects of dihydromyricetin on mitophagy in vascular endothelial cells, and to clarify the underlying role of Prohibitin 2 in the process. **Methods** After human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were treated with different concentrations of dihydromyricetin (0, 0.1, 1, 10, 100 μmol/L) for 12 h, intensity of MitoTracker® Deep Red (MTDR, a widely used mitochondria-selective probe) was determined for mitochondrial staining by fluorescence microscopy and flow cytometry, and the expression of Prohibitin 2 at mRNA and protein levels as determined by qRT-PCR and Western blotting, respectively. Furthermore, after treatment with of without control/Prohibitin 2 siRNA, HUVECs were incubated with dihydromyricetin for 12 h or carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazone (CCCP) for 6 h in the presence of the lysosomal blocker chloroquine, and then subjected to flow cytometry

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81803229);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0105)

[通信作者] 李亚斐,E-mail:liyafei2008@hotmail.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/)

analysis to determine mitophagy. **Results** As compared with the non-dihydromyricetin group, dihydromyricetin (≥ 0.1μmol/L) treatment markedly decreased MTDR fluorescence levels ($P<0.05$), and meanwhile, the treatment significantly increased the mRNA and protein levels of Prohibitin 2 ($P<0.05$). After pretreated with chloroquine, dihydromyricetin (≥10 μmol/L) significantly enhanced mitophagy in HUVECs, which was consistent with the effect of CCCP ($P<0.05$). After Prohibitin 2 siRNA transfection, mitophagy induced by dihydromyricetin was significantly suppressed when compared with the control siRNA treatment group ($P<0.05$). **Conclusion** Dihydromyricetin enhances mitophagy in vascular endothelial cells by regulating Prohibitin 2.

[**Key words**] vascular endothelial cells; dihydromyricetin; Prohibitin 2; mitophagy

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81803229) and the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0105). Corresponding author: LI Yafei, E-mail: liyafei2008@hotmail.com

线粒体自噬(mitochondrial autophagy,mitophagy)是一种基于自噬体的线粒体降解过程,是目前唯一已知的清除细胞应激(营养缺乏、活性氧、细胞衰老等)后受损或功能失调线粒体的途径,以有效调节细胞内线粒体数量和维持线粒体正常功能[1]。细胞具有多种线粒体自噬调控机制,不同的刺激可以通过不同细胞环境中的多个信号级联反应促进线粒体自噬,其调控通路主要分为泛素依赖性或非依赖性[2],前者如PINK1-Parkin 通路。近期研究发现位于线粒体内膜上的一种蛋白受体——抗增殖蛋白 2(Prohibitin 2,PHB2)在线粒体外膜破裂时被暴露,随后与在自噬体外部起监视作用的自噬蛋白 LC3-Ⅱ相互作用,以此激活线粒体自噬[3]。随着对线粒体自噬研究的深入,研究者发现线粒体自噬与衰老以及大量的病理过程有关,如神经退行性疾病、肌病、代谢疾病、炎症和癌症[4]。因此,针对线粒体自噬的干预措施可能具有治疗潜力,一些合成或天然的化合物已被证明可以调节线粒体自噬[4-5]。二氢杨梅素(dihydromyricetin),又名双氢杨梅树皮素、白蔹素,1940 年由 KOTAKE 和 KUBOTA 首次分离得到并命名为蛇葡萄素(ampelopsin)[6],是显齿蛇葡萄茎叶(藤茶)中含量极高的一类黄酮类化合物,在藤茶叶中含量可达 30%[7]。二氢杨梅素具有明显的抗炎、抗氧化、抗菌、降脂、心血管保护等生物学活性[8],但其机制尚未明确。近年来,研究证实二氢杨梅素可参与多种细胞自噬信号通路的调控[9-11],另外,前期研究发现二氢杨梅素通过活化 AMPK 通路激活细胞自噬,上调 LC3 的表达,增加自噬体的形成,这将有助于 PHB2 暴露时与 LC3 相互作用激活线粒体自噬[12]。然而,二氢杨梅素能否通过 PHB2 调控血管内皮的线粒体自噬活性,进而维持线粒体稳态有待进一步研究。本研究以人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)为研究对象,观察二氢杨梅素对线粒体自噬的影响,探讨 PHB2 在其中的作用,从新的角度阐明二氢杨梅素的药理作用机制,为心血管疾病防治研究提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉血管内皮细胞 HUVECs 和 iCell 原代内皮细胞培养体系购自上海赛百慷生物技术股份有限公司。二氢杨梅素(使用二甲基亚砜 DMSO 配成 100 mmol/L 的储备液)、氯喹(溶酶体抑制剂)和 DMSO 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。胎牛血清(FBS)购自美国 HyClone 公司;胰蛋白酶购自以色列 Biological Industries(BI)公司。Prohibitin 2 抗体、Prohibitin 2 siRNA 和 control siRNA 购自美国 Santa Cruz 公司。羰基氰化物间氯苯腙(carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone,CCCP,线粒体自噬激动剂)购自美国 MedChemExpress 公司。MitoTracker® Deep Red FM(MTDR)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。Opti-MEM™ I 减血清培养基购自美国 Gibco 公司。Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司。β-actin 抗体购自北京中杉金桥公司。

1.2 细胞培养与处理

HUVECs 用含体积分数 10% FBS 和 1%双抗的 iCell 培养基于 37 ℃、5% CO_2、100%湿度培养箱中培养,当 HUVECs 融合达 80%~90%时,用胰蛋白酶消化传代。为探索二氢杨梅素对血管内皮细胞线粒体自噬的调控作用,根据文献[13-14]结果,以不同浓度(0、0.1、1、10、100 μmol/L)二氢杨梅素处理 HUVECs 12 h,另以氯喹(25 μmol/L)预处理 1 h 后,再用不同浓度二氢杨梅素处理 12 h 或 CCCP(10 μmol/L)处理 6 h。

1.3 siRNA 转染

将 HUVECs 以 1×10^5/孔接种于 12 孔板,细胞贴壁且生长达 50%~70%时根据 siRNA 转染说明书完成转染。转染 4~6 h 后,更换为含 10% FBS 的 iCell 完全培养基,继续培养 24 h 后按分组进行处理。实验分为 4 组:control siRNA+氯喹组、control siRNA+氯喹+二氢杨梅素组、Prohibitin 2 siRNA+氯喹组、Prohibitin 2 siRNA+氯喹+二氢杨梅素组。

1.4 线粒体自噬检测

将对数增长期的 HUVECs 以 1×10^5/孔接种于 12 孔板。细胞贴壁且生长达 70%~80%时,不同浓度二氢杨梅素(0、0.1、1、10、100 μmol/L)处理细胞或氯喹(25 μmol/L)预处理 12 h 后,采用一种基于流式细胞技术检测 MTDR 荧光强度的方法评估线粒体自噬水平[15]。具体方法如下:用胰蛋白酶消化细胞 5 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 37 ℃预热的 MTDR(一种广泛使用的线粒体特异性探针)染色工作液(细胞完全培养基稀释至工作浓度 25 nmol/L),轻吹重悬细胞,置于细胞培养箱中孵育 15 min。离心后弃上清,PBS 洗涤细胞 3 次,最后每管用 150 μL 37 ℃预热的 PBS 重悬混匀,过滤后运用流式细胞仪检测 MTDR 荧光强度。MTDR 的最大激发波长和最大发射波长分别为 644、665 nm。

1.5 荧光显微镜检测 MTDR 水平

将 HUVECs 按 1×10^5/孔接种于 12 孔板。细胞贴壁生长达 70%~80%后,以不同浓度二氢杨梅素处理细胞。处理结束后,吸弃培养液,用 37 ℃预热的 PBS 清洗 1 次,加入 37 ℃的 MTDR 染色工作液,放置于细胞培养箱中孵育 20 min。孵育结束后,吸弃染液,PBS 清洗 3 次,最后每孔加入 1 mL PBS,置于倒置荧光显微镜观察并拍照。

1.6 qRT-PCR 检测 Prohibitin 2 mRNA 表达

①设计 Prohibitin 2 引物,正义链为 5′-CTACGGTGTGCGCGAATCTGTGTT-3′,反义链为 5′-CACCACACTCTTGAGCACCTCGTT-3′。②使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。运用 NanoDrop One/OneC 微量核酸蛋白浓度测定仪(Thermo Scientific,美国)检测各组 RNA 浓度和 $D(260)/D(280)$ 比值。③逆转录合成 cDNA,按照逆转录试剂盒 RevertAid first strand cDNA synthesis Kit 说明书进行 RNA 逆转录,获得 cDNA,存于 -20 ℃备用。④real-time PCR 反应,按照 SYBR Green Master Mix 说明书配制反应溶液,采用 CFX-96 real-time PCR system(Bio Rad)完成反应,条件:预变性 95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s,循环 40 次,随后 95 ℃ 1 min,60 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s。对所得结果运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析基因的相对表达量。

1.7 Western blot 检测

以不同浓度二氢杨梅素处理细胞后,提取细胞总蛋白,利用 BCA 法检测蛋白浓度。根据蛋白浓度,以 40 μg 蛋白置于 95 ℃中 10 min 变性,配制 12%(质量分数)聚丙烯酰胺凝胶,完成蛋白上样、电泳,用半干式转膜法将蛋白转移至 PVDF 膜(0.22 μmol/L)。以 TBST 漂洗后置于 5%的脱脂奶粉(TBST 配制)中室温封闭 1~2 h,转于 Prohibitin 2、β-actin 一抗(一抗稀释液 1∶1 000 稀释)中 4 ℃孵育过夜,用 TBST 振摇洗膜 10 min×3 次;随后,将 PVDF 膜置于 TBST 稀释的二抗(1∶5 000)中,室温振荡孵育 1 h,再用 TBST 振摇洗膜 3 次后,加入化学发光液,运用 VILBER FUSION FX7 成像系统显影并拍照,利用 Image J 软件进行条带分析。

1.8 统计学分析

计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 GraphPad Prism 8 软件作图并进行统计分析,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

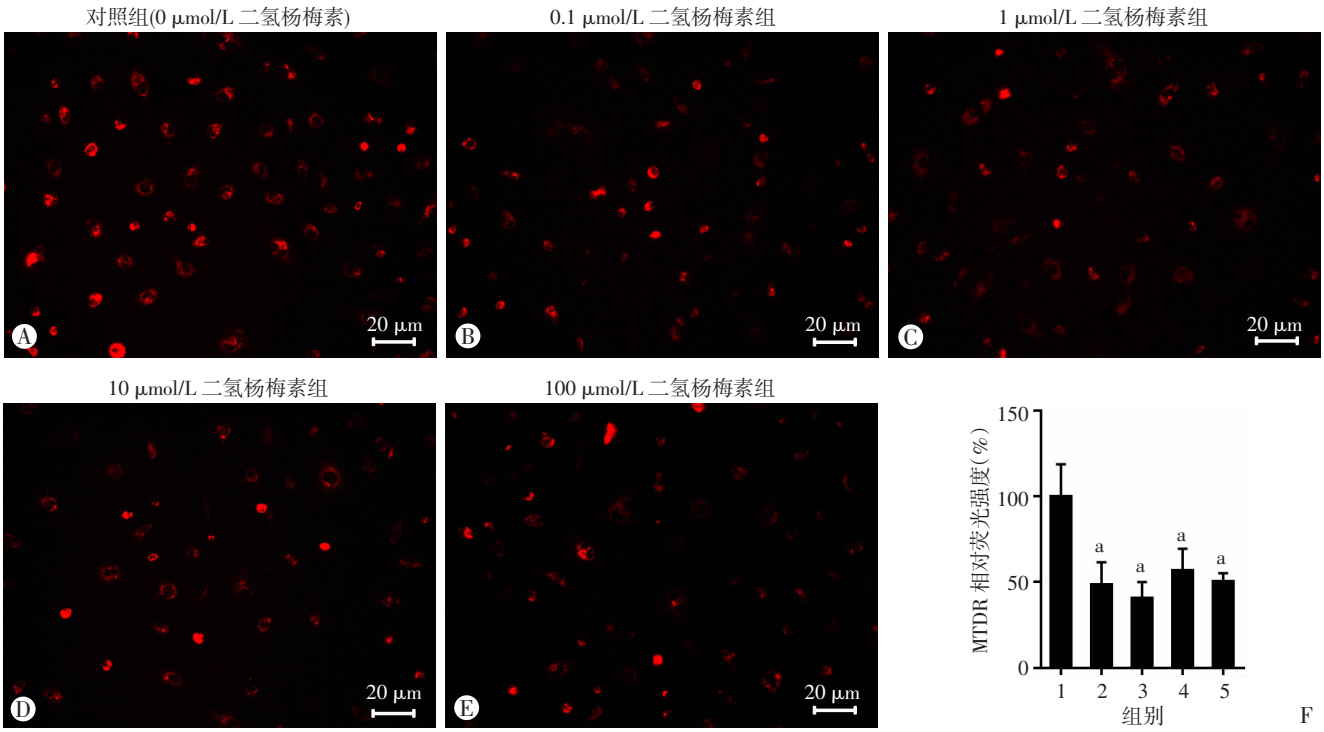
2 结果

2.1 二氢杨梅素对血管内皮细胞线粒体自噬的影响

与对照组(0 μmol/L 二氢杨梅素)相比,当二氢杨梅素浓度≥0.1 μmol/L 时,MTDR 荧光强度明显降低($P<0.05$,图 1)。同时,流式细胞术检测证实二氢杨梅素处理可以显著降低血管内皮细胞 MTDR 水平($P<0.05$,图 2)。进一步以氯喹预处理抑制溶酶体功能后,二氢杨梅素(≥10 μmol/L)处理可以显著增加血管内皮细胞 MTDR 荧光强度($P<0.05$),与线粒体自噬激动剂 CCCP 效应相一致(图 3)。以上结果说明二氢杨梅素能明显增强线粒体自噬。

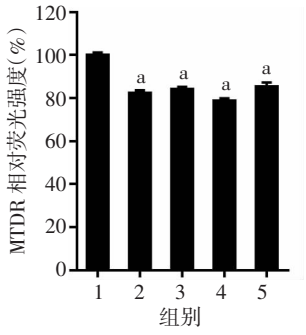
2.2 二氢杨梅素对血管内皮细胞 Prohibitin 2 的调控作用

与对照组(0 μmol/L 二氢杨梅素)相比,在较低浓度(≤10 μmol/L)二氢杨梅素处理时,Prohibitin 2 蛋白表达变化不明显($P>0.05$)。而当二氢杨梅素浓度为 100 μmol/L 时,Prohibitin 2 蛋白表达显著增加($P<0.05$,图 4)。



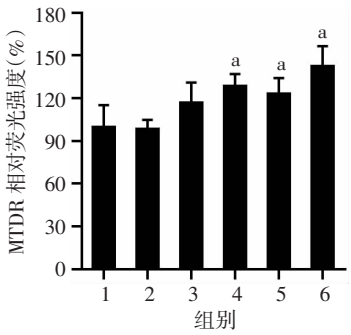
A~E:荧光显微镜观察各组 MTDR 荧光强度;F:半定量分析 1:对照组(0 μmol/L 二氢杨梅素);2:0.1 μmol/L 二氢杨梅素组;3:1 μmol/L 二氢杨梅素组;4:10 μmol/L 二氢杨梅素组;5:100 μmol/L 二氢杨梅素组;a:$P<0.05$,与对照组比较

图 1 二氢杨梅素对血管内皮细胞 MTDR 水平的影响



1:对照组(0 μmol/L 二氢杨梅素);2:0.1 μmol/L 二氢杨梅素组;3:1 μmol/L 二氢杨梅素组;4:10 μmol/L 二氢杨梅素组;5:100 μmol/L 二氢杨梅素组;a:$P<0.05$,与对照组比较

图 2 流式细胞术检测二氢杨梅素对 MTDR 水平的影响



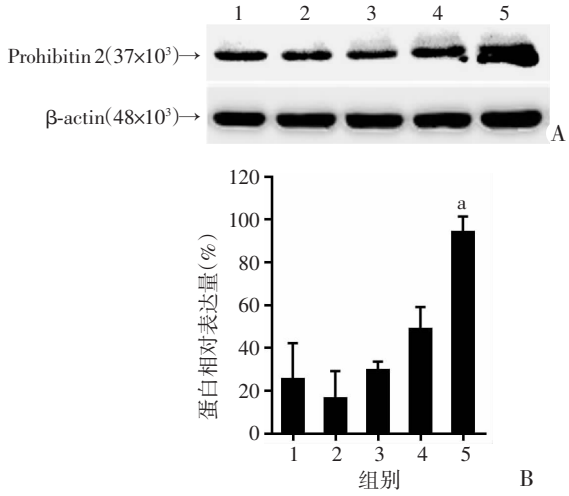
1:氯喹组;2:氯喹+0.1 μmol/L 二氢杨梅素组;3:氯喹+1 μmol/L 二氢杨梅素组;4:氯喹+10 μmol/L 二氢杨梅素组;5:氯喹+100 μmol/L 二氢杨梅素组;6:10 μmol/L CCCP+氯喹组;a:$P<0.05$,与氯喹(溶酶体抑制剂)组比较

图 3 二氢杨梅素对线粒体自噬水平的影响

同样地,与对照组(0 μmol/L 二氢杨梅素)相比,在较低浓度(0.1 μmol/L)二氢杨梅素处理时,Prohibitin 2 mRNA 表达水平增加,但差异无统计学意义($P>0.05$);当二氢杨梅素浓度≥1 μmol/L 时,Prohibitin 2 mRNA 表达水平显著增加($P<0.05$,图 5)。

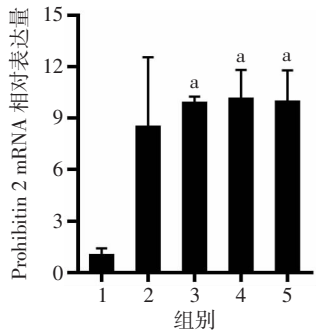
2.3 Prohibitin 2 在二氢杨梅素调控血管内皮细胞线粒体自噬中的作用

如图 6 所示,与氯喹单独处理相比,氯喹+二氢杨梅素处理可显著增加 MTDR 荧光强度($P<0.05$);而以 siRNA 转染沉默 Prohibitin 2 后,二氢杨梅素对线粒体自噬的诱导被明显抑制($P<0.05$)。



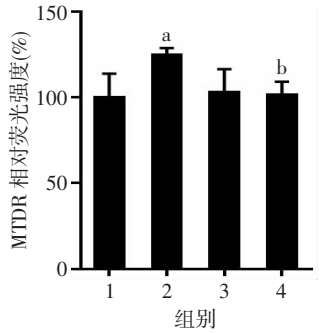
1:对照组(0 μmol/L 二氢杨梅素);2:0.1 μmol/L 二氢杨梅素组;3:1 μmol/L 二氢杨梅素组;4:10 μmol/L 二氢杨梅素组;5:100 μmol/L 二氢杨梅素组;a:$P<0.05$,与对照组比较
A:Western blot 检测 Prohibitin 2 蛋白表达;B:半定量分析

图 4 二氢杨梅素对血管内皮细胞 Prohibitin 2 蛋白表达的影响



1:对照组(0 μmol/L 二氢杨梅素);2:0.1 μmol/L 二氢杨梅素组;3:1 μmol/L 二氢杨梅素组;4:10 μmol/L 二氢杨梅素组;5:100 μmol/L 二氢杨梅素组; a:$P<0.05$,与对照组比较

图 5 二氢杨梅素对血管内皮细胞 Prohibitin 2 转录水平的影响



1:control siRNA+氯喹组;2:control siRNA+氯喹+二氢杨梅素组;3:Prohibitin 2 siRNA+氯喹组;4:Prohibitin 2 siRNA+氯喹+二氢杨梅素组;a:$P<0.05$,与 control siRNA+氯喹组比较;b:$P<0.05$,与 control siRNA+氯喹+二氢杨梅素组比较

图 6 Prohibitin 2 基因沉默对二氢杨梅素诱导血管内皮细胞线粒体自噬的影响

3 讨论

损伤的线粒体释放活性氧中间体,诱导炎性体活化,进一步促使细胞发生焦亡[13,16]。线粒体自噬对于减少损伤线粒体对细胞的不良影响以及真核生物的正常发育至关重要,越来越多的研究发现,线粒体自噬障碍与衰老和多种病理状况有关,例如神经退行性疾病、异常的炎症性疾病、癌症以及代谢紊乱等[2]。相反地,过表达自噬核心蛋白 LC3、ATG5 等能显著上调血管内皮细胞的线粒体自噬水平,并可在一定程度上延缓细胞衰老进程[17];另外,研究发现阿魏酸(Ferulic acid)能通过明显增强线粒体自噬逆转缺氧和葡萄糖剥夺导致的脑微血管内皮细胞的氧化应激,减轻线粒体功能障碍[18]。因此,积极探寻有效促线粒体自噬的药物或植物化合物具有重要的临床意义。近年来发现,二氢杨梅素能促进人脐静脉内皮细胞自噬相关蛋白 LC3 及 Beclin-1 的表达,诱导血管内皮细胞发生自噬[12],进而抑制高糖诱导的动脉粥样硬化[19];另外,二氢杨梅素可通过减少线粒体活性氧水平有效抑制血管内皮细胞 NLRP3 炎性体活化[13],然而,二氢杨梅素能否调控线粒体自噬及其机制尚不清楚。基于 MAURO-LIZCANO 等[15]开展的一项采用流式细胞技术检测线粒体自噬水平的新技术,也被用于探讨肝细胞和肾小管细胞线粒体自噬水平[20-21]。本研究首先通过荧光显微镜和流式细胞技术发现二氢杨梅素可以明显降低细胞 MTDR 荧光强度。鉴于线粒体自噬是唯一已知降解线粒体的途径[22],再结合前期研究证实二氢杨梅素可以有效增强内皮细胞 LC3-Ⅱ表达[12],提示二氢杨梅素可能诱导了细胞线粒体自噬;随后,本研究采用溶酶体抑制剂氯喹预处理后,观察到二氢杨梅素干预的细胞 MTDR 荧光水平明显更高,与 CCCP(线粒体自噬激动剂)效应相一致,进一步证实二氢杨梅素诱导了内皮细胞线粒体自噬的发生。

线粒体自噬是一种进化上保守的细胞过程,通过选择性去除功能失调或多余的线粒体,微调线粒体数量,保持能量代谢。线粒体自噬的选择性依赖于自噬受体的介导,目前已报道的线粒体自噬受体包括 OPTN、DNP52、FUNDC1、BNIP3 等[23]。这些受体主要定位于或被募集到线粒体外膜上,而后与自噬体上的 LC3-Ⅱ结合介导线粒体自噬。近年研究显示,在线粒体发生去极化和蛋白酶体依赖性外膜破裂时,位于线粒体内膜的蛋白受体 PHB2 暴露,与在自噬体外部起监视作用的 LC3-Ⅱ蛋白相互作用,激活线粒体自噬,

并证实 PHB2 是 Parkin 诱导哺乳动物细胞线粒体自噬所必需的[3]。本课题组前期研究发现二氢杨梅素能通过活化 AMPK 通路有效上调 LC3 的表达,增加自噬体的形成[11-12],这将有助于 PHB2 暴露时与 LC3 相互作用,激活线粒体自噬;另外,研究表明 AMPK 对于 PHB 发挥效应具有调控作用[24],值得注意的是,另一黄酮类化合物葡萄籽原花青素 B2 可通过上调 PHB 有效减少内皮细胞凋亡,以上研究提示二氢杨梅素可能对 PHB2 具有调控作用。本研究进一步证实二氢杨梅素可显著增强 PHB2 的转录及蛋白表达,另外,通过 siRNA 转染沉默 PHB2 后,二氢杨梅素对线粒体自噬的诱导作用被明显抑制,表明 PHB2 在二氢杨梅素诱导血管内皮细胞线粒体自噬中发挥了关键作用。

本研究存在一定的局限性和不足。首先,本研究只初步阐明 PHB2 在二氢杨梅素调控线粒体自噬中发挥作用,其具体作用机制仍需深入研究。另外,目前针对线粒体自噬水平多依赖于线粒体-自噬体共定位的荧光显微镜分析以及基于线粒体蛋白和自噬标志性蛋白的蛋白质印迹进行评估,而本研究采用了一种基于流式细胞术的新方法来定量检测线粒体自噬水平[15],虽有相关研究陆续报道[20-21],但此方法是以 MTDR 的荧光强度表示线粒体数量,再联合溶酶体抑制剂处理,来间接反映线粒体自噬的发生与否,尚需更直接定量检测线粒体自噬水平的方法验证。即使如此,本研究结果联合了荧光显微镜观察及溶酶体抑制剂的运用,可为后续研究提供一些参考。下一步,我们将在此基础上联合运用其他检测手段深入探讨,并将重点围绕二氢杨梅素对 PHB2 及其介导的线粒体自噬的具体调控机制展开研究,为二氢杨梅素的心血管干预研究提供新的实验依据。

参考文献:

[1] LAHIRI V, KLIONSKY D J. PHB_2/prohibitin 2: an inner membrane mitophagy receptor[J]. Cell Res, 2017, 27(3): 311-312. DOI: 10.1038/cr.2017.23.

[2] PALIKARAS K, LIONAKI E, TAVERNARAKIS N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(9): 1013-1022. DOI: 10.1038/s41556-018-0176-2.

[3] WEI Y J, CHIANG W C, SUMPTER R Jr, *et al*. Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor [J]. Cell, 2017, 168(1/2): 224-238. e10. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.042.

[4] PALIKARAS K, DASKALAKI I, MARKAKI M, *et al*. Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover[J]. Pharmacol Ther, 2017, 178: 157-174. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.04.005.

[5] GEORGAKOPOULOS N D, WELLS G, CAMPANELLA M. The pharmacological regulation of cellular mitophagy[J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(2): 136-146. DOI: 10.1038/nchembio.2287.

[6] 周天达, 周雪仙. 藤茶中双氢黄酮醇的分离、结构鉴定及其药理活性[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(8): 10-13.
ZHOU T D, ZHOU X X. Isolation, structure determination and pharmacological activity of flavanonol from Ampelopsis grosedentata[J]. Chin Pharm J, 1996, 31(8): 10-13.

[7] 陈夏静, 姚汉玲, 张秋琼, 等. 大叶蛇葡萄中蛇葡萄素含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1053-1054.
CHEN X J, YAO H L, ZHANG Q Q, *et al*. Content determination of ampelopsin in Ampelopsis megalophylla by HPLC [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2010, 21(5): 1053-1054.

[8] CHEN J, WANG X, XIA T, *et al*. Molecular mechanisms and therapeutic implications of dihydromyricetin in liver disease[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 142: 111927. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111927.

[9] ZHOU X, YU L, ZHOU M, *et al*. Dihydromyricetin ameliorates liver fibrosis *via* inhibition of hepatic stellate cells by inducing autophagy and natural killer cell-mediated killing effect[J]. Nutr Metab (Lond), 2021, 18(1): 64. DOI: 10.1186/s12986-021-00589-6.

[10] GUO L, TAN K, LUO Q, *et al*. Dihydromyricetin promotes autophagy and attenuates renal interstitial fibrosis by regulating miR-155-5p/PTEN signaling in diabetic nephropathy [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2020, 20(3): 372-380. DOI: 10.17305/bjbms.2019.4410.

[11] SHI L Y, ZHANG T, LIANG X Y, *et al*. Dihydromyricetin improves skeletal muscle insulin resistance by inducing autophagy *via* the AMPK signaling pathway[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 409: 92-102. DOI: 10.1016/j.mce.2015.03.009.

[12] LIANG X Y, ZHANG T, SHI L Y, *et al*. Ampelopsin protects endothelial cells from hyperglycemia-induced oxidative damage by inducing autophagy *via* the AMPK signaling pathway[J]. BioFactors, 2015, 41(6): 463-475. DOI: 10.1002/biof.1248.

[13] HU Q, ZHANG T, YI L, *et al*. Dihydromyricetin inhibits NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis by activating the Nrf2 signaling pathway in vascular endothelial cells[J].

Biofactors, 2018, 44(2): 123-136. DOI: 10.1002/biof.1395.

[14] 侯小龙. 二氢杨梅素保护内皮细胞、抑制炎症反应的抗动脉粥样硬化作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
HOU X L. Dihydromyricetin prevents atherosclerosis by protecting endothelial cells and inhibiting inflammatory reaction and the underlying mechanisms[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2015.

[15] MAURO-LIZCANO M, ESTEBAN-MARTÍNEZ L, SECO E, *et al*. New method to assess mitophagy flux by flow cytometry[J]. Autophagy, 2015, 11(5): 833-843. DOI: 10.1080/15548627.2015.1034403.

[16] ZHOU R B, YAZDI A S, MENU P, *et al*. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. Nature, 2011, 469(7329): 221-225. DOI: 10.1038/nature09663.

[17] MAI S, MUSTER B, BEREITER-HAHN J, *et al*. Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence lifespan[J]. Autophagy, 2012, 8(1): 47-62. DOI: 10.4161/auto.8.1.18174.

[18] CHEN J L, DUAN W J, LUO S, *et al*. Ferulic acid attenuates brain microvascular endothelial cells damage caused by oxygen-glucose deprivation *via* punctate-mitochondria-dependent mitophagy[J]. Brain Res, 2017, 1666: 17-26. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.04.006.

[19] 陈璐, 周洁, 廖慧颖, 等. 二氢杨梅素对高脂诱导动脉粥样硬化兔自噬相关蛋白表达的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2016, 32(6): 624-629. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1439.2016.06.021.
CHEN L, ZHOU J, LIAO H Y, *et al*. Effect of dihydromyricetin on expression of autophagy related protein in atherosclerosis rabbits[J]. J Clin Cardiol, 2016, 32(6): 624-629. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1439.2016.06.021.

[20] LU X, XUAN W, LI J, *et al*. AMPK protects against alcohol-induced liver injury through UQCRC2 to up-regulate mitophagy[J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3622-3643. DOI: 10.1080/15548627.2021.1886829.

[21] FU Z J, WANG Z Y, XU L, *et al*. HIF-1alpha-BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury[J]. Redox Biol, 2020, 36: 101671. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101671.

[22] ASHRAFI G, SCHWARZ T L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria[J]. Cell Death Differ, 2013, 20(1): 31-42. DOI: 10.1038/cdd.2012.81.

[23] YAN C J, GONG L L, CHEN L, *et al*. PHB_2(prohibitin 2) promotes $PINK_1$-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-$PINK_1$ axis[J]. Autophagy, 2020, 16(3): 419-434. DOI: 10.1080/15548627.2019.1628520.

[24] ARTAL-SANZ M, TAVERNARAKIS N. Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in C. elegans[J]. Nature, 2009, 461(7265): 793-797. DOI: 10.1038/nature08466.

(**收稿**:2021-07-26;**修回**:2021-11-04)

(编辑 汪勤俭)