

网络出版时间:2024-04-11 21:54:00 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1009.008

雷帕霉素上调人脐静脉内皮细胞自噬活性抑制细胞增殖

王雅雯,程亚楠,杨 宾,苏碧昊,徐 普

摘要 目的 探讨人脐静脉内皮细胞(HUVECs)自噬激活对细胞增殖的影响。方法 使用雷帕霉素(Rapa)处理 HUVECs,Western blot 法检测微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、Beclin 1 和 unc-51 样激酶 1(ULK1)的表达,透射电镜(TEM)检测自噬小体,丹酰尸胺染色(MDC)检测自噬荧光;CCK-8 法和 EdU 法检测自噬激活对细胞增殖的影响;血管形成实验检测成管能力。结果 Rapa 处理后,与对照组相比,LC3、Beclin 1 和 ULK1 表达增强,实验组绿色自噬荧光表达强于对照组,TEM 可见自噬小体;CCK-8 和 EdU 结果显示,与对照组相比,实验组细胞自噬活化后细胞增殖能力减弱,成管能力降低。结论 在一定时间内,Rapa 上调 HUVECs 自噬活性抑制细胞增殖。

关键词 雷帕霉素;人脐静脉内皮细胞;自噬;自噬活性;自噬蛋白;细胞增殖

中图分类号 R 783.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0605-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.008

骨重建中新生血管生成主要涉及以内皮细胞为主的血管再生,血管内皮细胞作为血管再生的主要参与者,细胞的增殖、迁移和分化是骨再生的重要促进因素^[1-2]。有研究^[3-5]表明,在新生骨形成的微环境中,新生血管与骨组织之间相辅相成,内皮细胞分泌的血管内皮生长因子有利于骨重建的发生。自噬通过吞噬并溶解多余或受损的细胞器为细胞供能,是维持细胞正常生长发育的有利因素。雷帕霉素(rapamycin, Rapa)通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)达到激活细胞自噬的目的,是研究自噬较为成熟的自噬激活剂^[6-7]。

课题组前期研究^[8-9]结果表明,氧浓度的改变

会影响成骨细胞的自噬活性,进而改变细胞的增殖和分化能力。但内皮细胞的自噬活性改变对局部成骨造成影响目前少见报道。该研究通过 Rapa 作用于人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)建立细胞自噬模型,探讨 Rapa 上调 HUVECs 自噬对细胞增殖的影响,为后续血管再生与骨重建相关性研究提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 HUVECs 购自中国典型培养物保藏中心。Rapa 购自美国 MCE 公司,人脐静脉血管内皮细胞完全培养基购自中国典型培养物保藏中心(F-12K + 0.1 mg/ml heparin + ECGS + 10% FBS),PBS 磷酸钾缓冲液、青链霉素购自美国 Gibco 公司,微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)、unc-51 样激酶 1(unc-51-like kinase 1, ULK1)和 mTOR 一抗购自美国 CST 公司,Beclin1 一抗、GAPDH 一抗、Goat Anti-Rabbit IgG 二抗购自英国 Abcam 公司,CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司,自噬染色检测试剂盒(MDC 法)、EdU-488 细胞增殖检测试剂盒购自中国碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和实验分组 HUVECs 常规培养,每 2 d 换液 1 次。待细胞生长达合适密度时进行相关实验。以正常培养(10% FBS 培养)为对照组,以 10% FBS 培养液中加入终浓度 100 nmol/L 的 Rapa 为实验组,作用于 HUVECs,3、6、12、24 h 收集细胞进行实验检测。

1.2.2 Western blot 检测自噬相关蛋白表达 细胞常规培养,以 50% 的密度接种于 10 cm² 培养皿中,待细胞生长融合至 85% 时加入终浓度为 100 nmol/L 的 Rapa 分别处理 3、6、12、24 h。加入 RIPA 细胞裂解液 1 ml,4 ℃、12 140 r/min 离心 5 min,BCA 蛋白定量后加上样缓冲液,95 ℃ 蛋白变性 5 min, -20 ℃ 冰箱保存备用。将 10 μg 蛋白样品加入 4% ~ 20% 梯度胶上样孔中,依次 120 V 恒压 50 min 蛋白电泳,冰上 300 mA 恒流 30 min 转膜,封闭后分别加

2024-02-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82060194);海南省重点研发计划项目(编号:ZDYF2022SHFZ119);海南省自然科学基金高层次人才项目(编号:821RC727,821RC725)

作者单位:中南大学湘雅医学院附属海口医院口腔中心·海南省口腔医学中心口腔综合科,海口 570208

作者简介:王雅雯,女,硕士研究生;

徐 普,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:hnxupu@163.com

入一抗 LC3(1 : 1 000)、Beclin 1(1 : 3 000)、ULK1(1 : 1 000)和 GAPDH(1 : 2 000),4 ℃ 孵育过夜;室温下孵育二抗(1 : 2 000 和 1 : 10 000)1 h,化学发光 1 min 后拍照。Image J 软件进行灰度值测量,相对蛋白表达强度以目标条带与内参蛋白的灰度比值表示。

1.2.3 透射电镜(transmission electron microscope, TEM)检测自噬小体 细胞处理 24 h 后取 1 ml 电镜固定液加入皿中,室温固定 5 min,随后细胞刮轻轻刮下细胞置于 1.5 ml EP 管,1 200 r/min 离心 3 min,加入新固定液 1 ml,室温固定 30 min,4 ℃ 备测。

1.2.4 MDC 法检测自噬荧光表达 细胞常规培养后,以 1×10^4 /孔接种于 24 孔板中,24 h 后吸净培养液。每孔加入 250 μ l MDC 染色液,培养箱避光孵育 1 h;吸净 MDC 染色液,使用 Assay Buffer 洗涤 3 次,更换新 Assay Buffer,荧光显微镜下拍摄绿色荧光,荧光强度用 Image J 进行统计。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖情况 细胞常规培养后,以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中,设置 4 个复孔,按实验分组分别于 3、6、12、24、48 h 加入 10 μ l CCK-8 液,37 ℃ 继续孵育 1 h,酶标仪 450 nm 测光密度(optical density, OD)值,计算抑制率,抑制率(%) = (1 - 实验组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。

1.2.6 EdU 检测细胞增殖 细胞以 2×10^4 /孔接种于 24 孔板中,处理 24 h;去除 50% 原培养基,加入等体积 EdU 工作液进行细胞标记;37 ℃ 继续孵育细胞 2 h;4% 多聚甲醛室温固定 15 min,洗涤液洗 3 次;加入通透液室温孵育 15 min,洗涤液洗 2 次;每孔加入 100 μ l 的 Click 反应液,室温避光孵育 30 min,洗涤液洗 3 次;每孔加入 100 μ l Hoechst 33342

溶液,室温孵育 10 min 进行细胞核染色,荧光倒置显微镜进行荧光检测。Hoechst 33342 为蓝色荧光,EdU 染色为绿色荧光。

1.2.7 血管形成实验检测细胞管腔形成能力 Matrigel 提前 4 ℃ 过夜,所需枪头、EP 管及 24 孔板 4 ℃ 过夜预冷。培养基和 Matrigel 配比 2 : 1 配置实验用胶,96 孔板内加入 50 μ l/孔实验用胶铺胶,培养箱中固化。细胞消化离心后依据分组选用相对应的培养基进行重悬, 2×10^4 /孔加入细胞悬液,37 ℃ 培养箱静置 2 h 后,观察血管形成情况,并于最佳时间点进行拍照。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,结果以均数 \pm 标准差表示,组间比较用单因素方差分析,两组间比较用独立样本 *t* 检验,各组实验均重复 3 次, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rapa 上调 HUVECs 自噬活性

2.1.1 自噬蛋白表达上调 经过 Rapa 处理后,自噬蛋白相对蛋白表达高于对照组,自噬活性增强。LC3-II/LC3-I 相对比值的蛋白表达在起始 3 h 时出现明显升高($P < 0.001$),随后蛋白表达强度减弱,但在作用的 24 h 时又明显增强($P < 0.001$)。Beclin1 的相对蛋白表达均高于对照组,最高值出现在作用后的 6 h($P < 0.001$),而 ULK1 的相对蛋白量同样呈现不断升高的趋势,最高值出现在作用后的 24 h($P < 0.001$)。见图 1。

2.1.2 自噬小体形成 TEM 检测观察自噬小体形成情况,结果显示,对照组和实验组均可见自噬小体及自噬溶酶体,自噬体融合变成单层膜结构的自噬溶酶体,其内可见已溶解的细胞器,见图 2。

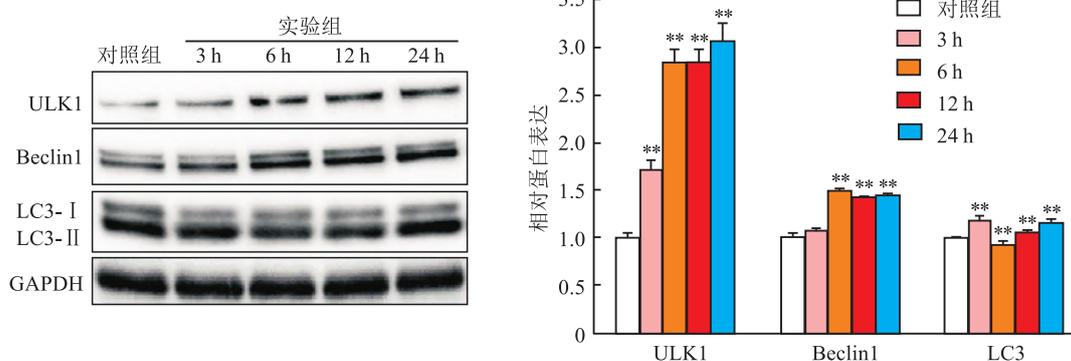


图 1 Western blot 法检测 Rapa 分别处理 HUVECs 3、6、12、24 h 后自噬蛋白表达水平

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

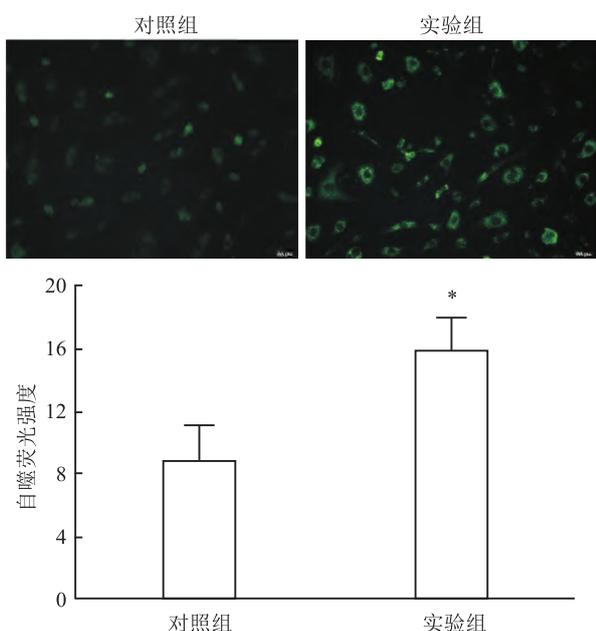


图2 TEM观察Rapa作用后自噬体形成

A:对照组 $\times 2500$; B:实验组 $\times 2500$; C: B图红框部分放大图 $\times 20000$ 表1 Rapa处理HUVECs后OD₄₅₀值($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 0 h | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h | 48 h |
|----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 对照 | 0.156 \pm 0.007 | 0.158 \pm 0.004 | 0.205 \pm 0.011 | 0.272 \pm 0.015 | 0.586 \pm 0.029 | 0.623 \pm 0.009 |
| 实验 | 0.165 \pm 0.011 | 0.157 \pm 0.007 | 0.203 \pm 0.004 | 0.235 \pm 0.002 | 0.260 \pm 0.003 | 0.297 \pm 0.013 |

2.1.3 自噬荧光表达增强 MDC法检测结果显示,经过Rapa处理的实验组,HUVECs的自噬荧光表达较强,荧光强度为 15.706 ± 2.776 ,高于对照组的 8.782 ± 2.310 ($F=0.162, P=0.029$),见图3。

图3 MDC法检测Rapa作用后自噬荧光表达 $\times 200$ 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 Rapa上调HUVECs自噬活性抑制细胞增殖

2.2.1 HUVECs的增殖能力减弱 CCK-8法检测结果显示,随着细胞培养时间延长,OD值不断增加,在6h前,实验组与对照组OD值的差值虽随着时长增大,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。与对照组相比,在处理24h时细胞抑制率值最高,为 $(55.56 \pm 1.30)\%$ ($F=109.069, P=0.001$)。见

图4。

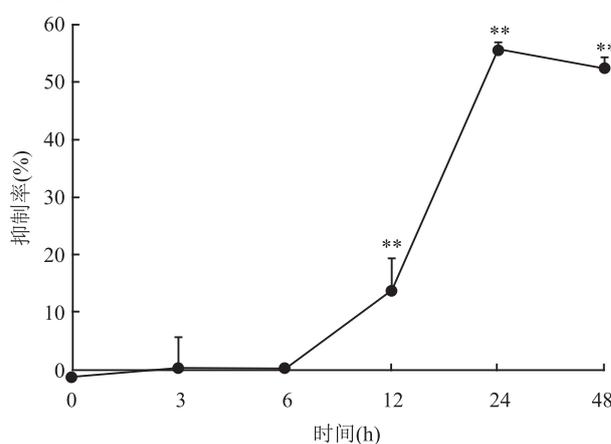


图4 CCK-8法检测Rapa作用后细胞增殖抑制率

与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2.2 增殖细胞减少 EdU法检测结果显示,实验组可观察到EdU绿色荧光细胞数减少,平均每视野 (9 ± 1) 个,明显低于对照组 (21 ± 3) 个 ($F=1.160, P=0.001$),见图5。

2.3 HUVECs管腔形成能力减弱 与对照组相比,实验组未能很好地形成完整的管腔样结构,管腔壁连续性破坏,出现残缺、断裂等表现,细胞血管形成能力减弱,见图6。

3 讨论

局部新生微血管作为影响种植区域良好骨结合的重要因素,是促进种植成功的关键基础^[10]。自噬是细胞生活的基础,自噬活性的改变引发一系列的细胞功能变化,而过度的自噬则会抑制细胞生长^[11]。细胞自噬的过程受自噬相关基因所调控,目

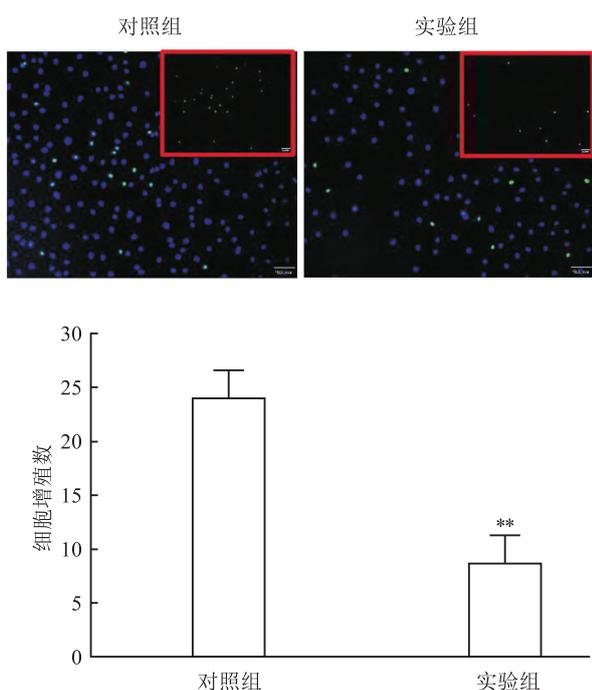


图5 EdU法检测自噬上调后细胞增殖水平 ×200
与对照组比较: ** $P < 0.01$

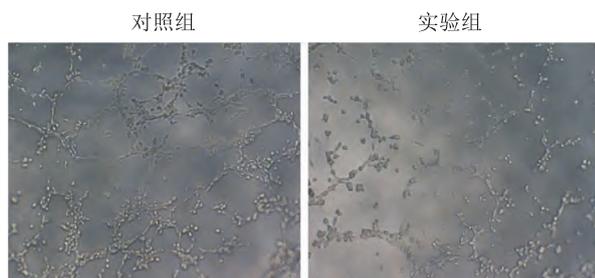


图6 血管形成实验检测自噬活性上调对 HUVECs
管腔形成的影响 ×100

前发现的自噬相关基因约 31 个, Beclin1 是首个被学者所熟悉的关键自噬启动基因, ULK1 能促进 Beclin1 的磷酸化诱导自噬, 而 LC3 是自噬体膜形成的关键蛋白^[12]。因此, 本研究通过 Rapa 诱导 HUVECs 构建自噬模型, 探讨 HUVECs 自噬活性改变对细胞增殖的影响, 为骨修复材料促血管化提供一定的理论依据。

mTOR 是一种调节细胞生长的丝氨酸苏氨酸激酶, 是细胞自噬活化的核心, mTOR 信号通路是氧感受重要自噬信号通路, 对细胞的生长、分化和增殖起着重要调控作用, Rapa 通过降低 mTOR 的稳定性和转录活性, 上调细胞自噬活性^[13-15]。既往研究^[13, 16-22]表明, Rapa 作为 mTOR 蛋白的抑制剂能有效降低 mTOR 的表达, mTOR 作为许多疾病, 如卵巢癌、乳腺癌、肝损伤、视网膜病变、阿尔茨海默病及

心血管疾病潜在治疗靶点, 在血管形成中起着重要的作用。ULK1 是自噬启动的关键因子, 通过磷酸化 Beclin1 参与自噬体膜的延伸, 同时也是 mTOR 的负调控蛋白^[23]。本研究中, 经 Rapa 处理 HUVECs 后 ULK1 表达上调, 细胞自噬启动, 提示 ULK1 可能参与 Rapa 对 HUVECs 的自噬调控, 但 mTOR 作为治疗的靶点及 ULK1 在其中的调控作用可能需要更多的研究证据。

细胞受到外界刺激后由 Beclin1 启动自噬反应, LC3 由非脂质型的 LC3-I 转变为脂质型 LC3-II 参与构成自噬小体双层膜结构, 进而包裹并溶解受损细胞器或衰老蛋白, 释放能量维持细胞稳定^[6, 23]。本研究结果显示, 与对照组相比, Beclin1 和 LC3-II 的蛋白表达升高, 提示自噬已被激活, 即 Rapa 能上调 HUVECs 的自噬活性。同时, 透射电镜和 MDC 自噬荧光检测的结果也显示, 细胞胞质内可见自噬小体形成, 自噬荧光表达增强, 进一步证实 Rapa 能增强 HUVECs 自噬活性。这与其他学者关于 Rapa 能上调 HUVECs 的自噬活性的研究结果一致^[20, 24]。

自噬作为维持细胞内环境稳定的重要因素, 其活性的改变对细胞功能产生的影响已成为研究的焦点。众多学者研究结果显示, 自噬活性改变对细胞功能的调控受疾病种类、治疗方式以及种属差异所影响。本课题研究的结果初步显示, 在一定的时间内, 激活 HUVECs 的自噬活性, 细胞的增殖能力减弱, 增殖受到抑制, 同时细胞管腔形成能力降低。有研究提示, 内皮细胞自噬活性对细胞增殖的调控具有双面性, 处理的方式、作用时间都是可能的影响因素。上调 HUVECs 自噬活性能增强过氧化氢处理后细胞的增殖能力, 而敲低 GRB2 关联结合蛋白 1 (Grb2-associated binder1, GAB1) 表达同样如此^[25-26], 但缺血环境下, 自噬活性的改变则对细胞增殖起反作用^[27]。而在本研究中, Rapa 作用 48 h 后, 细胞的抑制率下调, 其中的原因仍需要深入研究。

自噬是细胞选择性降解过程, 能消除异常积累的蛋白质和受损细胞器, 增加细胞在低氧环境存活概率^[28]。骨重建中新生血管生成是促进新骨形成的重要因素, 自噬在种植骨结合过程中对新生血管及新生骨形成的调控, 以及两者之间的关系目前仍不清楚。本研究结果提示, 上调 HUVECs 自噬活性能抑制细胞增殖, 在此基础上, 仍需继续探讨在骨组

织工程中自噬活性介导血管内皮细胞增殖可能的分子机制,为骨生物材料血管化研究提供新的理论依据。

参考文献

- [1] Kwon O S, Jeong M S, Kim B, et al. Antiangiogenic effect of ethanol extract of *Vigna angularis* via inhibition of phosphorylation of VEGFR2, Erk, and Akt [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 371368.
- [2] Barrasa-Ramos S, Dessalles C A, Hautefeuille M, et al. Mechanical regulation of the early stages of angiogenesis [J]. *J R Soc Interface*, 2022, 19(197): 1–23.
- [3] Guo L, Liang Z, Yang L, et al. The role of natural polymers in bone tissue engineering [J]. *J Control Release*, 2021, 338: 571–82.
- [4] Hu L, Ge Y, Cao Z, et al. Strontium-modified porous polyetheretherketone with the triple function of osteogenesis, angiogenesis, and anti-inflammatory for bone grafting [J]. *Biomater Adv*, 2022, 143: 213160.
- [5] Parkhideh S, Calderon G A, Janson K D, et al. Perfusable cell-laden matrices to guide patterning of vascularization *in vivo* [J]. *Biomater Sci*, 2023, 11(2): 461–71.
- [6] Ganesh S K, Subathra Devi C. Molecular and therapeutic insights of rapamycin: A multi-faceted drug from *Streptomyces hygroscopicus* [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(4): 3815–33.
- [7] Yamamoto H, Zhang S, Mizushima N. Autophagy genes in biology and disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(6): 382–400.
- [8] 王雅雯, 陈灼庚, 王彬娉, 等. 缺氧下激活成骨细胞自噬对细胞增殖的影响 [J]. *口腔医学*, 2018, 38(10): 876–80.
- [9] 王雅雯, 陈灼庚, 程亚楠, 等. 低氧条件下自噬激活对成骨细胞分化的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2021, 38(8): 1524–7.
- [10] 向琳, 陈晖璐, 袁影, 等. 降钙素基因相关肽对种植体周围神经、血管再生及骨结合的作用 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2018, 45(5): 509–15.
- [11] Li J, Gong S H, He Y L, et al. Autophagy is essential for neural stem cell proliferation promoted by hypoxia [J]. *Stem Cells*, 2022, 41(1): 77–92.
- [12] Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 12.
- [13] Li C, Men C, Yang W, et al. Repressing IRS1/2 by NT157 inhibits the malignant behaviors of ovarian cancer through inactivating PI3K / AKT / mTOR pathway and inducing autophagy [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2023, 39(4): 377–89.
- [14] Lu H, Yang H L, Zhou W J, et al. Rapamycin prevents spontaneous abortion by triggering decidual stromal cell autophagy-mediated NK cell residence [J]. *Autophagy*, 2020, 17(9): 2511–27.
- [15] Wang Y, Tao T Q, Song D D, et al. Calreticulin ameliorates hypoxia/reoxygenation-induced human microvascular endothelial cell injury by inhibiting autophagy [J]. *Shock*, 2018, 49(1): 108–16.
- [16] Chen X, Jin G, Luo H, et al. Effect of Gubeniyiliu formula II and its disassembled prescriptions on cell autophagy in breast cancer through PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Anticancer Drugs*, 2023, 34(6): 725–34.
- [17] Yi K, Yang Y, Yuan Y, et al. Impaired autophagy causes severe corneal neovascularization [J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3895.
- [18] Han X, Goh K Y, Lee W X, et al. The importance of mTORC1-autophagy axis for skeletal muscle diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 297.
- [19] Jia H-J, Zhou M, Vashisth M K, et al. Trifluridine induces HU-VECs senescence by inhibiting mTOR-dependent autophagy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 610: 119–26.
- [20] Carosi J M, Sargeant T J. Rapamycin and Alzheimer disease: a double-edged sword? [J]. *Autophagy*, 2019, 15(8): 1460–2.
- [21] Carosi J M, Sargeant T J. Rapamycin and Alzheimer disease: A hypothesis for the effective use of rapamycin for treatment of neurodegenerative disease [J]. *Autophagy*, 2023, 19(8): 2386–90.
- [22] Ponticelli C, Moroni G, Reggiani F. Autophagy and podocytopathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2023, 38(9): 1931–9.
- [23] Li J, Zhang T, Ren T, et al. Oxygen-sensitive methylation of ULK1 is required for hypoxia-induced autophagy [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1172.
- [24] Wang P, Huang Y, Ren J, et al. Large-leaf yellow tea attenuates high glucose-induced vascular endothelial cell injury by up-regulating autophagy and down-regulating oxidative stress [J]. *Food Funct*, 2022, 13(4): 1890–905.
- [25] Song S, Wu S, Wang Y, et al. 17 β -estradiol inhibits human umbilical vascular endothelial cell senescence by regulating autophagy *via* P53 [J]. *Exp Gerontol*, 2018, 114: 57–66.
- [26] Qian X, Wang H, Wang Y, et al. Enhanced autophagy in GAB1-deficient vascular endothelial cells is responsible for atherosclerosis progression [J]. *Front Physiol*, 2021, 11: 559396.
- [27] Ma Y, Li C, He Y, et al. Beclin-1/LC3-II dependent macroautophagy was uninfluenced in ischemia-challenged vascular endothelial cells [J]. *Genes Dis*, 2022, 9(2): 549–61.
- [28] Fan D, Liu H, Zhang Z, et al. Resveratrol and angiogenin-2 combined with PEGDA/TCS hydrogel for the targeted therapy of hypoxic bone defects *via* activation of the autophagy pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 618724.

网络出版时间:2024-04-12 14:27:42 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1009.009

糖尿病肾病核心基因的筛选与鉴定

吴晓俊^{1,2*},倪飞雪^{1,2*},徐玉雪^{1,2,3}

摘要 目的 基于生物信息学筛选糖尿病肾病(DKD)核心基因,探究 DKD 的治疗靶点,讨论其可能的调控机制。方法 提取 GEO 数据库(GSE30528,GSE47183)DKD 患者肾小球转录组表达数据矩阵,采用生物信息学方法对差异表达基因(DEGs)进行筛选,鉴定出核心差异基因,对核心差异基因进

行基因表达与富集分析(GSEA),预测有效靶点。结果 通过对 DKD mRNA 表达矩阵的筛选和鉴定,共筛选出 5 个核心基因,其中 Clorf21、NPHS1 表达显著下调,CD48、COL1A2、TGFB1 表达上调,研究得知,NPHS1、CD48 与免疫差异、细胞间交流及细胞表面相互作用等有显著相关性。通过受试者工作特征曲线(ROC)分析、GSEA 分析及药物靶点与 miRNA 预测显示,这些差异基因可能对 DKD 的治疗具有重要意义。结论 该研究筛选的核心基因与 DKD 具有显著相关性,有可能作为糖尿病治疗有效标志物,为 DKD 的治疗与鉴定提供理论依据。

关键词 糖尿病肾病;GEO 数据库;转录组;生物信息学;基因筛选;药物靶点

中图分类号 R 341.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)04-0610-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.009

2024-02-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31800985);山东省医药卫生科技发展计划项目(编号:2017WS694);烟台市科技创新发展计划基础研究类项目(编号:2023JCYJ072);滨州医学院科研启动基金(编号:BY2017KYQD09)

作者单位:¹滨州医学院药学院,烟台 264003

²滨州医学院山东省分子靶向智能诊疗技术创新中心,烟台 264003

³滨州医学院烟台市干细胞与再生医学重点实验室,烟台 264003

作者简介:吴晓俊,男,硕士研究生;

徐玉雪,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:xuyuxue@bzmc.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病发展的常见并发症,主要特征是尿蛋白、肾小球过滤功能障碍,是终末期肾病的主要原因,严重

Rapamycin upregulates autophagy inhibits cell proliferation in human umbilical vein endothelial cells

Wang Yawen, Cheng Yanan, Yang Bin, Su Bihao, Xu Pu

(Dept of Stomatology, Haikou Hospital, Hainan Stomatological Center, Central South University Xiangya School of Medicine Affiliated Haikou Hospital, Haikou 570208)

Abstract Objective To investigate the effect of autophagy activation on cell proliferation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs were treated with rapamycin (Rapa). Western blot assay was performed to examine the expression of protein of microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3), Beclin 1 and unc-51-like kinase 1 (ULK1). Autophagosomes were detected by transmission electron microscopy (TEM), and autophagy fluorescence was detected by monodansylcadaverine staining (MDC) assay. The effect of autophagy activation on cell proliferation was assessed by CCK-8 assay and EdU assay. Vascular formation experiments were used to detect vasculogenic ability. **Results** After Rapa treatment, LC3, Beclin1 and ULK1 expressions were enhanced, while the green autophagy fluorescence expression in the experimental group was stronger than that in the control group, and autophagosomes were visible by TEM; CCK-8 and EdU results showed that compared with the control group, the cell proliferation ability was weakened and tubes formation ability was reduced after the activation of autophagy in experimental cells. **Conclusion** Rapa upregulates autophagy activity in HUVECs to inhibit cell proliferation under certain time.

Key words rapamycin; HUVECs; autophagy; autophagic activity; autophagic protein; cell proliferation