【基础研究】

川陈皮素通过调控微 RNA-374a-3p 表达抑制氧化低密度脂蛋白诱导的人脑微血管内皮细胞损伤研究

刘拥军，李　鹏*，齐兵歌
（河南省洛阳市中医院脑病科，河南洛阳 471000）

摘要：目的 研究川陈皮素对氧化低密度脂蛋白（oxidized low density lipoprotein，ox-LDL）诱导的人脑微血管内皮细胞（human brain microvascular endothelial cells，HBMECs）损伤的影响，分析其机制是否与调控微 RNA（microRNA，miR）-374a-3p 表达有关。**方法** 采用 50 μg/ml 的 ox-LDL 培养 HBMECs，建立体外细胞损伤模型。将 HBMECs 分为对照（control，Con）组、ox-LDL 组、ox-LDL ＋川陈皮素低剂量组、ox-LDL ＋川陈皮素中剂量组、ox-LDL ＋川陈皮素高剂量组、ox-LDL ＋ miR-NC 组、ox-LDL ＋ miR-374a-3p 组、ox-LDL ＋川陈皮素＋ anti-miR-NC 组、ox-LDL ＋川陈皮素＋ anti-miR-374a-3p 组。检测细胞中丙二醛（malondialdehyde，MDA）含量、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）和过氧化氢酶（catalase，CAT）活性。分析细胞凋亡率和 miR-374a-3p 表达量。**结果** 与 Con 组比较，ox-LDL 组细胞 MDA 水平、凋亡率显著升高（$P < 0.01$），SOD 和 CAT 活性、miR-374a-3p 表达显著降低（$P < 0.01$）。与 ox-LDL 组比较，ox-LDL ＋川陈皮素低剂量组、ox-LDL ＋川陈皮素中剂量组、ox-LDL ＋川陈皮素高剂量组的 MDA 水平和凋亡率显著降低（$P < 0.01$），SOD 和 CAT 活性、miR-374a-3p 表达显著升高（$P < 0.01$）。与 ox-LDL ＋ miR-NC 组比较，ox-LDL ＋ miR-374a-3p 组细胞 MDA 水平、凋亡率显著降低（$P < 0.01$），SOD 和 CAT 活性显著升高（$P < 0.01$）。与 ox-LDL ＋川陈皮素＋ anti-miR-NC 组比较，ox-LDL ＋川陈皮素＋ anti-miR-374a-3p 组细胞 MDA 水平、凋亡率显著升高（$P < 0.01$），SOD 和 CAT 活性显著降低（$P < 0.01$）。**结论** 川陈皮素通过上调 miR-374a-3p 表达，能够减轻 ox-LDL 诱导的 HBMECs 凋亡和氧化应激损伤。

关键词：川陈皮素；微RNA-374a-3p；氧化低密度脂蛋白；人脑微血管内皮细胞；氧化应激；凋亡
中图分类号：R743　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188（2022）12-1545-08
DOI：10.13683/j.wph.2022.12.005

Study on the inhibition of nobiletin on oxidized low-density lipoprotein induced human brain microvascular endothelial cells injury by regulating the expression of microRNA-374a-3p

LIU Yongjun, LI Peng*, QI Bingge
（*Department of Encephalopathy, Luoyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Luoyang 471000, Henan Province, China*）

Abstract: ***Objective*** To study the effects of nobiletin on oxidized low-density lipoprotein（ox-LDL）induced human brain microvascular endothelial cells（HBMECs）injury, and further to analyze whether its mechanism is related to the regulation of microRNA（miR）-374a-3p expression. ***Methods*** HBMECs were cultured with 50 μg/mL ox-LDL to establish an cell injury model in vitro. HBMECs were divided into control（Con）group, ox-LDL group, ox-LDL＋nobiletin low-dose group, ox-LDL＋nobiletin medium-dose group, ox-LDL＋nobiletin high-dose group, LDL＋miR-NC group, ox-LDL＋miR-374a-3p group, ox-LDL＋nobiletin＋anti-miR-NC group, ox-LDL＋nobiletin＋anti-miR-374a-3p group. The commercial kit was applied to detect the content of malondialdehyde（MDA）and the activity of superoxide dismutase（SOD）and catalase（CAT）in cells. Cell apoptosis rate and miR-374a-3p expression were analyzed. ***Results*** Compared with the Con

收稿日期：2022-06-06；**修回日期：**2022-12-02
作者简介：刘拥军，副主任医师，研究方向：脑血管病。
通信作者：李鹏，副主任医师，研究方向：中西医结合脑病。
基金项目：河南省科技发展计划项目（1603002A-1）

group, the MDA level and apoptosis rate in the ox-LDL group were significantly increased ($P<0.01$), SOD and CAT activity, and miR-374a-3p expression were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the ox-LDL group, the MDA level and apoptosis rate in the ox-LDL+nobiletin low-dose group, ox-LDL+nobiletin middle-dose group and ox-LDL+nobiletin high-dose group were significantly reduced ($P<0.01$), SOD and CAT activity, miR-374a-3p expression were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the ox-LDL+miR-NC group, the MDA level and apoptosis rate in the ox-LDL+miR-374a-3p group were significantly reduced ($P<0.01$), and SOD and CAT activity were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the ox-LDL+nobiletin+anti-miR-NC group, the MDA level and apoptosis rate of the cells in the ox-LDL+nobiletin+anti-miR-374a-3p group were significantly increased ($P<0.01$), SOD and CAT activity was significantly reduced ($P<0.01$). ***Conclusion*** Nobiletin could reduce ox-LDL induced HBMECs apoptosis and oxidative stress injury by up-regulating miR-374a-3p expression.

Key words: nobiletin; microRNA-374a-3p; oxidized low-density lipoprotein; human brain microvascular endothelial cell; oxidative stress; apoptosis

人脑微血管内皮细胞（human brain microvascular endothelial cells，HBMECs）具有屏障、分泌血管活性因子等功能，对维持脑内环境稳态至关重要[1]。氧化低密度脂蛋白（oxidized low density lipoprotein，ox-LDL）通过与内皮细胞表面的 ox-LDL 受体 -1 结合，触发活性氧（reactive oxygen species，ROS）积累，诱导内皮细胞损伤和凋亡，参与动脉粥样硬化的发生发展[2-3]。

川陈皮素是一种存在于柑橘类水果中的多甲氧基黄酮，具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和抗糖尿病等特性[4]。研究显示，川陈皮素可改善神经功能缺损，减小脑梗死面积，抑制脑缺血再灌注诱导的细胞凋亡[5]。川陈皮素还通过调节 ROS，减轻铁超载引起的血管内皮损伤[6]。此外，川陈皮素可改善高脂肪饮食引起的肠道脂质代谢失调及餐后血糖异常升高，具有抗动脉粥样硬化作用[7]。然而，川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 损伤影响并不清楚。微 RNA（microRNA，miR）-374a-3p 已被证实可抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡及炎症反应[8]。本研究以 miR-374a-3p 为切入点探讨川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 氧化应激和凋亡的影响，以期为川陈皮素用于防治动脉粥样硬化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

HBMECs 购于美国模式培养物保藏所；ox-LDL 购自杭州联科生物技术公司；川陈皮素（B20199，纯度≥ 98%）购自上海源叶生物科技公司；脂质体 2000、TRIzol 试剂购于美国英潍捷基公司；MiR-374a-3p 的模拟物（mimics）、miR 模拟物阴性对照（miR-NC）、miR-374a-3p 的抑制物（anti-miR-374a-3p）、miR 抑制物阴性对照（anti-miR-NC）、膜联蛋白 V（Annexin V）- 异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）/ 碘化丙啶（propidium iodide，PI）凋亡检测试剂盒、miR 定量反转录聚合酶链反应（quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction，qRT-PCR）试剂盒购自上海生工生物工程公司；丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）和过氧化氢酶（catalase，CAT）活性检测试剂盒均购自上海碧云天生物公司；兔源 Cleaved-caspase 9 多克隆抗体（ab2324）、兔源 Cleaved-caspase 3 多克隆抗体（ab2302）、兔源甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）多克隆抗体（ab37168）购自美国 Abcam 公司；miR 逆转录试剂盒购自美国 Gene Copoeia 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染和分组

HBMECs 接种在含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素 - 链霉素的 RPMI-1640 培养基，放入含 5% CO_2、37 ℃、饱和湿度的培养箱中培养。当细胞汇合度达

到 80% 时用 0.25% 胰蛋白酶消化，每周传代 2 ～ 3 次。取 2×10^5 个对数期 HBMECs 接种至 6 孔板，细胞 50% 融合时利用脂质体 2000 分别转染 miR-374a-3p mimics、miR-NC、anti-miR-374a-3p 和 anti-miR-NC，收集转染 48 h 后的细胞进行后续试验。

正常培养的 HBMECs 记为对照（control，Con）组；用含 50 μg/ml ox-LDL 培养液孵育 24 h 的 HBMECs[9] 记为 ox-LDL 组；用含 1、5、25 mg/L 川陈皮素[10] 与 50 μg/ml ox-LDL 培养液共孵育 24 h 的 HBMECs 依次记为 ox-LDL ＋川陈皮素低剂量组、ox-LDL ＋川陈皮素中剂量组、ox-LDL ＋川陈皮素高剂量组；用含 50 μg/ml ox-LDL 的培养液孵育转染 miR-NC 和转染 miR-374a-3p mimics 24 h 的 HBMECs 依次记为 ox-LDL ＋ miR-NC 组和 ox-LDL ＋ miR-374a-3p 组；用含 25 mg/L 川陈皮素、50 μg/ml ox-LDL 的培养液孵育转染 anti-miR-NC 和转染 anti-miR-374a-3p 的 HBMECs 24 h 依次记为 ox-LDL ＋川陈皮素＋ anti-miR-NC 组和 ox-LDL ＋川陈皮素＋ anti-miR-374a-3p 组。

1.2.2 细胞中 MDA 含量以及 SOD、CAT 活性检测

收集各组 HBMECs 细胞，向 1×10^6 个细胞中加入 0.1 ml 裂解液，裂解后离心（1 600×*g*）10 min，取上清用 MDA、SOD 和 CAT 活性检测试剂盒检测细胞中 MDA 含量以及 SOD、CAT 活性。

1.2.3 细胞凋亡检测

用预冷的磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS）洗涤各组 HBMECs 后，将细胞悬于 1× 结合缓冲液中，调整细胞密度为 1×10^6 个 /ml。将 5 μl 的 Annexin V-FITC、PI 依次添加到 100 μl 细胞悬液中，室温避光孵育 15 min。添加 400 μl 1× 结合缓冲液混匀后，流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.4 蛋白免疫印迹法检测 Cleaved-caspase 9 和 Cleaved-caspase 3 蛋白表达

用预冷的 PBS 洗涤各组 HBMECs 1 次，加入预冷的 RIPA 缓冲液裂解细胞获得细胞蛋白。BCA 蛋白测定试剂盒分析蛋白样品浓度。30 μg 变性蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移到硝基纤维素膜上。将膜置于 5% 脱脂奶粉缓冲盐水中室温封闭 2 h；将膜与一抗：Cleaved-caspase 9、Cleaved-caspase 3（1 ∶ 500）和 GAPDH（1 ∶ 1 000）4 ℃孵育过夜，GAPDH 抗体作为内源性对照；将膜与辣根过氧物酶标记的山羊抗兔二抗（1 ∶ 2 000）室温反应 2 h。采用化学发光检测试剂盒进行显色反应，凝胶成像系统拍照，用 Image J 软件检测目的蛋白条带相对灰度值，以表示目的蛋白表达水平。

1.2.5 检测 miR-374a-3p 表达

采用 TRIzol 试剂分离各组细胞的总 RNA，NanoDrop 2000 分光光度计测量 RNA 样本的纯度和浓度。采用 miR 逆转录试剂盒合成互补 DNA，再用 miR qRT-PCR 试剂盒检测 *miR-374a-3p* 表达水平。以 *U6* 为内参。*MiR-374a-3p* 上游引物 5′-CUUAUCAGAUUGUAUUGUAAUU-3′，下游引物 5′-AAUUACAAUACAAUCUGAUAAG -3′；*U6* 上游引物 5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′，下游引物 5′-AACGCTTCACGAATTTG CGT-3′。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 miR-374a-3p 表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS22.0 进行统计分析。每组设置 3 个复孔，实验独立重复 3 次，计量数据符合正态分布且方差齐性，以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示。独立样本 *t* 检验用于两组间比较。3 组及以上的组间比较采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。检验水准 $\alpha = 0.01$。

2 结果

2.1 川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 氧化应激的影响

与 Con 组比较，ox-LDL 组 HBMECs 中 MDA 含量显著升高（$P < 0.01$），SOD 和 CAT 活性显著降低（$P < 0.01$）；与 ox-LDL 组比较，ox-LDL ＋川陈皮素低剂量组、ox-LDL ＋川陈皮素中剂量组、ox-LDL ＋川陈皮素高剂量组 HBMECs 中 MDA 含量显著降低（$P < 0.01$），SOD 和 CAT 活性显著升高（$P < 0.01$）。见表 1。

表 1 川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 氧化应激的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

Table 1 Effects of nobiletin on ox-LDL induced oxidative stress in HBMECs（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

分组	MDA/nmol·mg^{-1}	SOD/U·mg^{-1}	CAT/U·mg^{-1}
Con组	4.98±0.45	46.26±4.28	12.64±1.11
ox-LDL组	25.24±2.18*	10.13±0.95*	2.52±0.27*
ox-LDL＋川陈皮素低剂量组	19.09±1.22$^{\#}$	19.28±1.87$^{\#}$	5.26±0.43$^{\#}$
ox-LDL＋川陈皮素中剂量组	13.98±1.33$^{\#\&}$	26.23±2.19$^{\#\&}$	7.33±0.64$^{\#\&}$
ox-LDL＋川陈皮素高剂量组	9.07±0.81$^{\#\&\$}$	37.64±3.36$^{\#\&\$}$	10.28±0.92$^{\#\&\$}$
*F*值	325.764	239.135	261.958
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与 Con 组比较，*$P<0.01$；与 ox-LDL 组比较，$^{\#}P<0.01$；与 ox-LDL＋川陈皮素低剂量组比较，$^{\&}P<0.01$；与 ox-LDL＋川陈皮素中剂量组比较，$^{\$}P<0.01$

Note: *vs* Con group, *$P<0.01$; *vs* ox-LDL group, $^{\#}P<0.01$; *vs* ox-LDL＋nobiletin low-dose group, $^{\&}P<0.01$; *vs* ox-LDL＋nobiletin medium dose group, $^{\$}P<0.01$

表 2 川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

Table 2 Effects of nobiletin on ox-LDL induced HBMECs apoptosis（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

分组	凋亡率/%	Cleaved-caspase 3	Cleaved-caspase 9
Con组	6.97±0.64	0.24±0.02	0.29±0.02
ox-LDL组	35.73±3.18*	0.68±0.05*	0.83±0.07*
ox-LDL＋川陈皮素低剂量组	27.21±2.22$^{\#}$	0.54±0.04$^{\#}$	0.69±0.03$^{\#}$
ox-LDL＋川陈皮素中剂量组	18.28±1.47$^{\#\&}$	0.41±0.03$^{\#\&}$	0.53±0.04$^{\#\&}$
ox-LDL＋川陈皮素高剂量组	10.29±0.96$^{\#\&\$}$	0.30±0.03$^{\#\&\$}$	0.38±0.03$^{\#\&\$}$
*F*值	343.565	228.429	251.793
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与 Con 组比较，*$P<0.01$；与 ox-LDL 组比较，$^{\#}P<0.01$；与 ox-LDL＋川陈皮素低剂量组比较，$^{\&}P<0.01$；与 ox-LDL＋川陈皮素中剂量组比较，$^{\$}P<0.01$

Note: *vs* Con group, *$P<0.01$; *vs* ox-LDL group, $^{\#}P<0.01$; *vs* ox-LDL＋nobiletin low-dose group, $^{\&}P<0.01$; *vs* ox-LDL＋nobiletin medium dose group, $^{\$}P<0.01$

2.2 川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 凋亡的影响

与 Con 组比较，ox-LDL 组 HBMECs 的凋亡率、Cleaved-caspase 3 和 Cleaved-caspase 9 蛋白表达量显著升高（$P<0.01$）；与 ox-LDL 组比较，ox-LDL＋川陈皮素低剂量组、ox-LDL＋川陈皮素中剂量组、ox-LDL＋川陈皮素高剂量组 HBMECs 的凋亡率、Cleaved-caspase 3 和 Cleaved-caspase 9 蛋白表达量显著降低（$P<0.01$）。见图 1 和表 2。

2.3 川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs miR-374a-3p 表达的影响

与 Con 组比较，ox-LDL 组 HBMECs 中 miR-374a-3p 表达量显著降低（$P<0.01$）；与 ox-LDL 组比较，ox-LDL＋川陈皮素低剂量组、ox-LDL＋川陈皮素中剂量组、ox-LDL＋川陈皮素高剂量组 HBMECs 中 miR-374a-3p 表达量显著升高（$P<0.01$）。见表 3。

2.4 过表达 miR-374a-3p 对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 损伤的影响

与 ox-LDL＋miR-NC 组比较，ox-LDL＋miR-374a-3p 组 HBMECs 中 miR-374a-3p 表达量显著升高（$P<0.01$），MDA 含量、凋亡率、Cleaved-caspase 3 和 Cleaved-caspase 9 蛋白表达量显著降低（$P<0.01$），SOD 和 CAT 活性显著升高（$P<0.01$）。见图 2 和表 4。

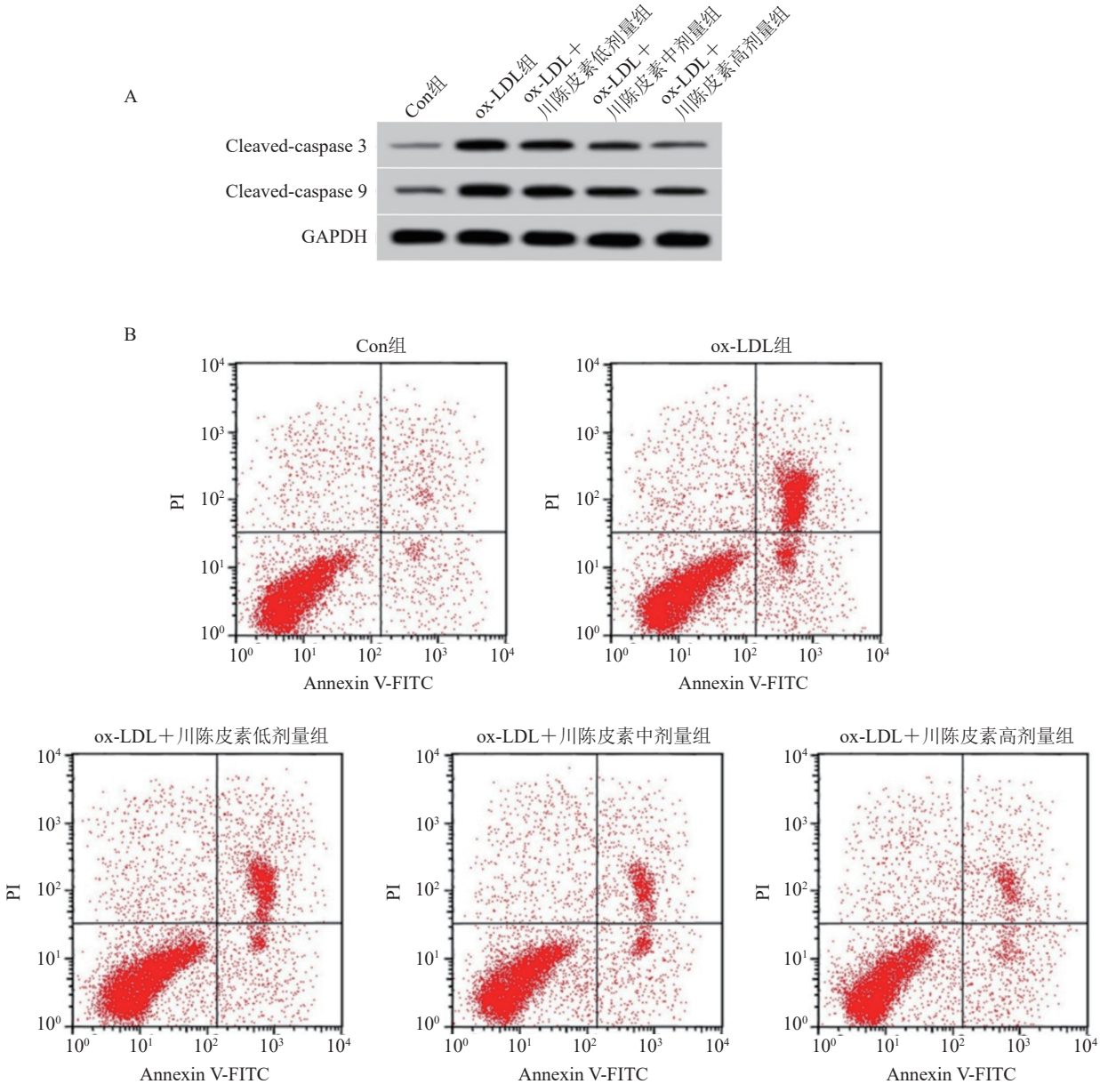
表 3 川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 中 miR-374a-3p 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

Table 3 Effects of nobiletin on miR-374a-3p expression in ox-LDL induced HBMECs（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

分组	miR-374a-3p
Con组	1.00±0.05
ox-LDL组	0.34±0.03*
ox-LDL＋川陈皮素低剂量组	0.55±0.05$^{\#}$
ox-LDL＋川陈皮素中剂量组	0.68±0.05$^{\#\&}$
ox-LDL＋川陈皮素高剂量组	0.84±0.06$^{\#\&\$}$
*F*值	308.463
*P*值	＜0.001

注：与 Con 组比较，*$P<0.01$；与 ox-LDL 组比较，$^{\#}P<0.01$；与 ox-LDL＋川陈皮素低剂量组比较，$^{\&}P<0.01$；与 ox-LDL＋川陈皮素中剂量组比较，$^{\$}P<0.01$

Note: *vs* Con group, *$P<0.01$; *vs* ox-LDL group, $^{\#}P<0.01$; *vs* ox-LDL＋nobiletin low-dose group, $^{\&}P<0.01$; *vs* ox-LDL＋nobiletin medium dose group, $^{\$}P<0.01$



A：凋亡相关蛋白表达；B：细胞凋亡流式图

A: apoptosis-related protein expression; B: flow cytometry of apoptosis

图 1　川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 凋亡的影响

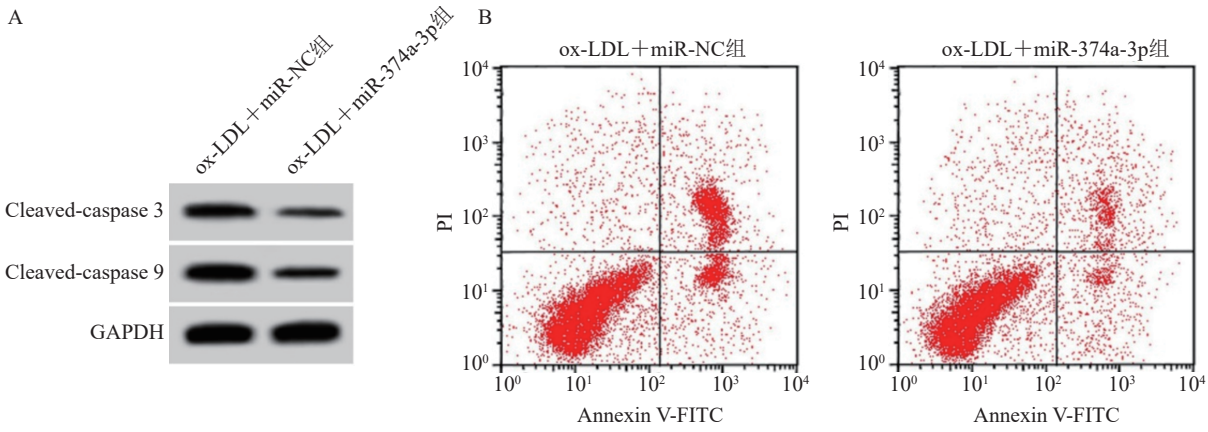
Figure 1　Effect of nobiletin on ox-LDL induced HBMECs apoptosis

2.5　干扰 miR-374a-3p 表达逆转川陈皮素（25 mg/L）对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 损伤

与 ox-LDL ＋川陈皮素＋ anti-miR-NC 组比较，ox-LDL ＋川陈皮素＋ anti-miR-374a-3p 组 HBMECs 中 miR-374a-3p 表达量显著降低（$P < 0.01$），MDA 含量、凋亡率、Cleaved-caspase 3 和 Cleaved-caspase 9 蛋白表达量显著升高（$P < 0.01$），SOD 和 CAT 活性显著降低（$P < 0.01$）。见图 3 和表 5。

3　讨论

川陈皮素通过调控氧化应激和细胞凋亡，已被证实在多种细胞损伤模型中具有保护作用。Liu 等[11]研究报道川陈皮素通过蛋白激酶 / 糖原合成酶激

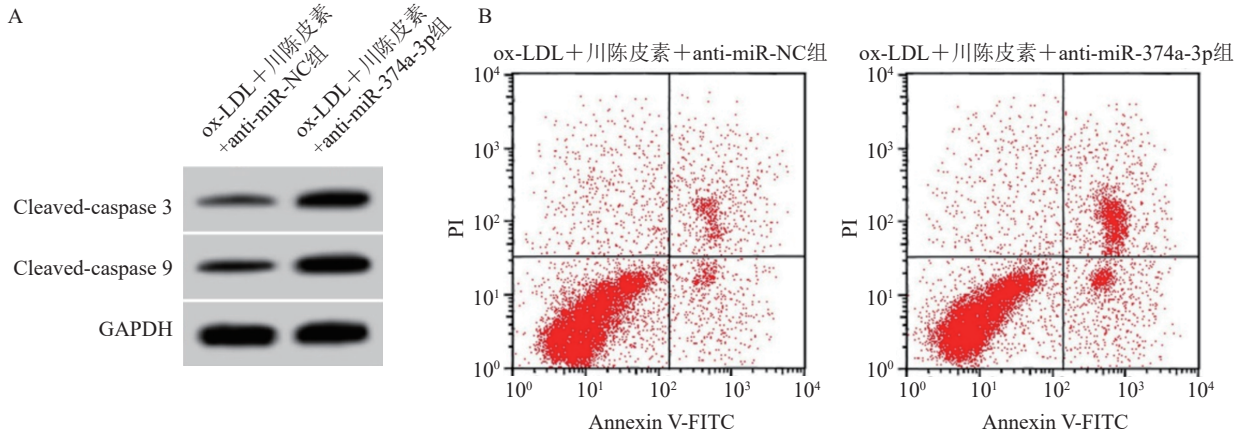


A：凋亡相关蛋白表达；B：细胞凋亡流式图

A: apoptosis-related protein expression; B: flow cytometry of apoptosis

图 2　miR-374a-3p 过表达对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 凋亡的影响

Figure 2　Effects of miR-374a-3p overexpression on ox-LDL induced HBMECs apoptosis



A：凋亡相关蛋白表达；B：细胞凋亡流式图

A: apoptosis-related protein expression; B: flow cytometry of apoptosis

图 3　干扰 miR-374a-3p 表达逆转川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 凋亡的作用

Figure 3　Interference with the expression of miR-374a-3p reversed the effect of nobiletin on ox-LDL induced apoptosis of HBMECs apoptosis

表 4　MiR-374a-3p 过表达对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 损伤的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

Table 4　Effects of miR-374a-3p over expression on ox-LDL induced HBMECs injury（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

分组	miR-374a-3p	MDA/nmol·mg^{-1}	SOD/U·mg^{-1}	CAT/U·mg^{-1}	凋亡率/%	Cleaved-caspase 3	Cleaved-caspase 9
ox-LDL＋miR-NC组	1.00±0.09	27.94±2.59	9.88±0.88	2.41±0.22	36.71±3.04	0.69±0.05	0.85±0.07
ox-LDL＋miR-374a-3p组	3.33±0.28$^{\triangle}$	12.96±1.07$^{\triangle}$	29.64±2.81$^{\triangle}$	9.27±0.82$^{\triangle}$	14.56±1.21$^{\triangle}$	0.37±0.03$^{\triangle}$	0.45±0.04$^{\triangle}$
*t*值	24.964	16.037	20.132	24.240	20.309	16.464	14.884
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与ox-LDL＋miR-NC组比较，$^{\triangle}P<0.01$

Note: *vs* ox-LDL＋miR-NC group, $^{\triangle}P<0.01$

表 5 干扰 miR-374a-3p 表达逆转川陈皮素对 ox-LDL 诱导的 HBMECs 损伤的作用（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

Table 5 Interference with the expression of miR-374a-3p reversed the effect of nobiletin on ox-LDL induced HBMECs injury（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

分组	miR-374a-3p	MDA/nmol·mg^{-1}	SOD/U·mg^{-1}	CAT/U·mg^{-1}	凋亡率/%	Cleaved-caspase 3	Cleaved-caspase 9
ox-LDL＋川陈皮素＋anti-miR-NC组	1.00±0.04	9.03±0.79	38.27±3.63	11.32±0.81	10.02±0.89	0.31±0.03	0.37±0.03
ox-LDL＋川陈皮素＋anti-miR-374a-3p组	0.24±0.02▲	18.83±1.24▲	17.99±1.66▲	4.06±0.45▲	25.58±2.51▲	0.58±0.04▲	0.71±0.05▲
*t*值	114.000	19.996	15.242	23.505	17.528	16.200	17.493
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与 ox-LDL ＋川陈皮素＋ anti-miR-NC 组比较，▲$P<0.01$

Note: *vs* ox-LDL ＋ nobiletin ＋ anti-miR-NC group, ▲$P<0.01$

酶 -3β 通路可抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡，抑制 ROS 和脂质过氧化产物 MDA 的产生，在预防心肌缺血再灌注损伤方面具有潜在应用前景。Li 等[12]发现川陈皮素通过靶向 c-Jun *N*- 端激酶减轻刀豆蛋白 A 诱导的肝细胞凋亡、促进细胞增殖，以保护急性肝损伤。ox-LDL 在诱导内皮功能障碍和氧化应激中发挥重要作用，是动脉粥样硬化发生发展的关键因素。本研究表明，ox-LDL 处理后 HBMECs 中抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性降低，MDA 水平、凋亡率升高，而加入川陈皮素处理后的 HBMECs 凋亡率、氧化应激反应明显得到抑制，这与川陈皮素在心肌缺血再灌注损伤中的保护作用一致[13]。Cleaved-caspase 9 和 Cleaved-caspase 3 是细胞凋亡发生的启动子和执行子[14]，本研究中川陈皮素明显抑制 ox-LDL 诱导的 Cleaved-caspase 9 和 Cleaved-caspase 3 蛋白表达上调，这与川陈皮素的抗凋亡作用吻合。以上表明川陈皮素对 ox-LDL 诱导 HBMECs 氧化应激和凋亡具有保护作用。

近年来，许多 miR 被报道在川陈皮素调控细胞进程中发挥重要作用。川陈皮素通过上调 miR-590 表达，降低脂蛋白脂肪酶介导的脂质积累和促炎细胞因子的表达[15]。川陈皮素通过激活 miR-200b 抑制缺氧诱导的肺癌细胞上皮 - 间充质转化[16]。本研究发现，ox-LDL 诱导后 HBMECs 中 miR-374a-3p 表达水平显著降低，而川陈皮素显著增加 miR-374a-3p 表达水平，提示 miR-374a-3p 表达上调可能介导川陈皮素对 ox-LDL 诱导 HBMECs 损伤的保护作用。据报道，miR-374a-3p 在骨关节炎软骨中表达降低，过表达 miR-374a-3p 可抑制骨关节炎软骨细胞凋亡和炎症因子分泌，而抑制 miR-374a-3p 表达则加重骨关节炎进展[17-18]。过表达 miR-374a-3p 还可提高脂多糖处理的肾小管上皮细胞活力，抑制细胞凋亡，从而缓解脓毒症诱导的急性肾损伤[19]。本研究发现，过表达 miR-374a-3p 可抑制 ox-LDL 诱导的 HBMECs 凋亡，降低 Cleaved-caspase 9 和 Cleaved-caspase 3 蛋白表达水平，抑制氧化应激损伤，这与川陈皮素对 ox-LDL 的 HBMECs 损伤的保护作用类似。进一步研究发现，抑制 miR-374a-3p 表达能够减弱川陈皮素对 ox-LDL 的 HBMECs 凋亡和氧化应激损伤的保护作用，这进一步证实川陈皮素通过上调 miR-374a-3p 表达，参与了调控 ox-LDL 诱导的 HBMECs 损伤。

4 结论

本研究证实了川陈皮素能够抑制 ox-LDL 诱导的 HBMECs 氧化应激损伤和凋亡，是通过上调 miR-374a-3p 表达实现的，初步揭示了川陈皮素的内皮保护作用机制，为川陈皮素用于防治动脉粥样硬化提供了科学依据。

参考文献：

[1] Lee CAA, Seo HS, Armien AG, *et al*. Modeling and rescue of defective blood-brain barrier function of induced brain microvascular endothelial cells from childhood cerebral adrenoleukodystrophy patients[J]. Fluids Barriers CNS, 2018,

15(1): 9.

[2] Tang Y, Zhao J, Shen L, *et al*. Ox-LDL induces endothelial dysfunction by promoting Arp2/3 complex expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 475(2): 182-188.

[3] Wang GF, Shi CG, Sun MZ, *et al*. Tetramethylpyrazine attenuates atherosclerosis development and protects endothelial cells from ox-LDL[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2013, 27(3): 199-210.

[4] Umeno A, Horie M, Murotomi K, *et al*. Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones[J]. Molecules, 2016, 21(6): 708-718.

[5] Wang T, Wang F, Yu L, *et al*. Nobiletin alleviates cerebral ischemic-reperfusion injury via MAPK signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 5967-5977.

[6] Wang Z, Yang B, Chen X, *et al*. Nobiletin regulates ROS/ADMA/DDAHII/eNOS/NO pathway and alleviates vascular endothelium injury by iron overload[J]. Biol Trace Elem Res, 2020, 198(1): 87-97.

[7] Morrow NM, Trzaskalski NA, Hanson AA, *et al*. Nobiletin prevents high-fat diet-induced dysregulation of intestinal lipid metabolism and attenuates postprandial lipemia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022, 42(2): 127-144.

[8] 冯自波, 祝友鹏, 张静. MiR-374a-3p靶向Syk对ox-LDL诱导内皮细胞损伤及炎症反应的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(2): 175-180.

[9] 杨杰. 红芪多糖对脑微血管内皮细胞氧化损伤保护作用的差异蛋白质研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 113-118.

[10] 陈俊. 川陈皮素对LPS诱导的RAW 264.7细胞损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2019, 35(10): 44-49.

[11] Liu F, Zhang H, Li Y, *et al*. Nobiletin suppresses oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 854(1): 48-53.

[12] Li M, Zhao H, Wu J, *et al*. Nobiletin protects against acute liver injury via targeting c-Jun *N*-terminal kinase(JNK)-induced apoptosis of hepatocytes[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(27): 7112-7120.

[13] 陈才, 吴继雄, 王靓, 等. 川陈皮素后处理减轻心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(7): 944-950.

[14] 吴婷玉, 周景芬. 葡萄籽原花青素对缺血性心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及MAPK/ERK1/2通路的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(16): 1951-1956.

[15] He PP, Shen QQ, Wen M, *et al*. Nobiletin reduces LPL-mediated lipid accumulation and pro-inflammatory cytokine secretion through upregulation of miR-590 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(1): 97-101.

[16] Gao XJ, Liu JW, Zhang QG, *et al*. Nobiletin inhibited hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells by inactivating of Notch-1 signaling and switching on miR-200b[J]. Pharmazie, 2015, 70(4): 256-262.

[17] Shi FL, Ren LX. Up-regulated miR-374a-3p relieves lipopolysaccharides induced injury in CHON-001 cells via regulating wingless-type MMTV integration site family member 5B[J]. Mol Cell Probes, 2020, 51(1): 101541-101551.

[18] Fu Q, Zhu J, Wang B, *et al*. LINC02288 promotes chondrocyte apoptosis and inflammation through miR-374a-3p targeting RTN3[J]. J Gene Med, 2021, 23(5): e3314.

[19] Wang M, Wei J, Shang F, *et al*. Down-regulation of lncRNA SNHG5 relieves sepsis-induced acute kidney injury by regulating the miR-374a-3p/TLR4/NF-κB pathway[J]. J Biochem, 2021, 169(5): 575-583.

(编辑：史琦琪)