

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0431-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240216

沉默FOXO1基因对人主动脉血管平滑肌细胞自噬和凋亡的影响

王琳茹, 张晶, 赵冬婵, 王晋军, 胡文贤

(青岛大学附属青岛市海慈医院 青岛市中医医院血管外科, 山东 青岛 266000)

[摘要] **目的:** 探讨叉头框转录因子O1 (FOXO1) 基因对腹主动脉瘤 (AAA) 血管平滑肌细胞自噬和凋亡的影响, 阐明其可能的作用机制。**方法:** 收集19例AAA患者动脉瘤组织 (AAA组) 及邻近正常主动脉组织 (对照组), 采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测2组研究对象动脉瘤组织中FOXO1 mRNA表达水平, 透射电镜观察2组研究对象动脉瘤组织中自噬溶酶体形成情况; Western blotting法检测2组研究对象动脉瘤组织中FOXO1及自噬相关蛋白卷曲螺旋肌球蛋白样B细胞淋巴瘤2 (Bcl-2) 结合蛋白 (Beclin1)、微管相关蛋白1轻链3 α (LC3) 和P62蛋白表达水平。体外培养人主动脉血管平滑肌细胞 (hVSMCs), 并采用FOXO1 siRNA (si-FOXO1) 及其阴性对照 (si-NC) 慢病毒感染hVSMCs, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 血管紧张素II (Ang II) 联合自噬激活剂雷帕霉素 (Rap) 进行干预, 将细胞分为空白对照组、Ang II组、Ang II + si-NC组、Ang II + si-FOXO1组、Ang II + si-NC + Rap组和Ang II + si-FOXO1 + Rap组。CCK-8法检测各组细胞增殖活性, 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平, ELISA法检测各组细胞上清中基质金属蛋白酶2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶9 (MMP-9) 水平, RT-qPCR法检测各组细胞中FOXO1 mRNA表达水平, Western blotting法检测各组细胞中FOXO1、Bcl-2、Bcl-2相关X蛋白 (Bax)、剪切型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3 (Cleaved caspase-3)、Beclin1、LC3和P62蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, AAA组动脉瘤组织中FOXO1 mRNA表达水平升高 ($P < 0.05$), 自噬溶酶体数量增多 ($P < 0.05$), Beclin1蛋白表达水平和LC3 II/LC3 I比值升高 ($P < 0.05$), P62蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。与空白对照组比较, Ang II组hVSMCs增殖活性降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 细胞上清中MMP-2和MMP-9水平升高 ($P < 0.05$), 细胞中Bax、Cleaved caspase-3和Beclin1蛋白表达水平及LC3 II/LC3 I比值升高 ($P < 0.05$), Bcl-2和P62蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与Ang II + si-NC组比较, Ang II + si-FOXO1组hVSMCs增殖活性升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), 细胞上清中MMP-2和MMP-9水平降低 ($P < 0.05$), 细胞中Bax、Cleaved-caspase-3和Beclin1蛋白表达水平及LC3 II/LC3 I比值降低 ($P < 0.05$), Bcl-2和P62蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。与Ang II + si-FOXO1组比较, Ang II + si-FOXO1 + Rap组细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 细胞上清中MMP-2和MMP-9水平升高 ($P < 0.05$), 细胞中Beclin1蛋白表达水平和LC3 II/LC3 I比值降低 ($P < 0.05$), P62蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。**结论:** FOXO1基因沉默可能通过降低自噬水平来提高Ang II暴露下hVSMCs增殖活性, 并抑制其凋亡, 从而参与AAA的发病。

[关键词] 腹主动脉瘤; 人血管平滑肌细胞; 叉头框转录因子O1; 自噬; 细胞凋亡

[中图分类号] R732.2 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-05-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82172095); 山东省科技厅自然科学基金项目 (ZR2022ME083); 山东省卫健委中医药科技发展计划项目 (2019-WJZD045); 山东省卫健委医药卫生科技发展项目 (202104130109)

[作者简介] 王琳茹 (1991-), 女, 山东省青岛市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事腹主动脉瘤基础和临床方面的研究。

[通信作者] 胡文贤, 主任医师 (E-mail: 17669757218@163.com)

Effect of silencing FOXO1 gene on autophagy and apoptosis of human aortic vascular smooth muscle cells

WANG Linru, ZHANG Jing, ZHAO Dongchan, WANG Jinjun, HU Wenxian

(Department of Vascular Surgery, Affiliated Hister Hospital of Qingdao City, Qingdao University, Traditional Chinese Medicine Hospital of Qingdao City, Qingdao 266000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of forkhead box O1 (FOXO1) gene on the autophagy and apoptosis of the vascular smooth muscle cells in abdominal aortic aneurysm (AAA), and to clarify its possible mechanism. **Methods:** The aneurysm tissue of nineteen AAA patients (AAA group) and adjacent normal aortic tissue of nineteen AAA patients (control group) were collected. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression level of FOXO1 mRNA in aneurysm tissue of the subjects in two groups; transmission electron microscope was used to observe the autophagolysosome formation in aneurysm tissue of the subjects in two groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of FOXO1 and autophagy-related proteins B cell lymphoma-2 (Bcl-2)-binding protein (Beclin1), microtubule-associated protein 1 light chain 3 α (LC3), and P62 proteins in aneurysm tissue of the subjects in two groups. The human aortic vascular smooth muscle cells (hVSMCs) were cultured *in vitro* and infected with FOXO1 siRNA (si-FOXO1) and its negative control (si-NC) lentivirus, then treated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ angiotensin II (Ang II) combined with autophagy activator rapamycin (Rap). The cells were divided into blank control group, Ang II group, Ang II + si-NC group, Ang II + si-FOXO1 group, Ang II + si-NC + Rap group, and Ang II + si-FOXO1 + Rap group. CCK-8 assay was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups; ELISA method was used to detect the levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the cell supernatant in various groups; RT-qPCR method was used to detect the expression level of FOXO1 mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of FOXO1, Bcl-2, Bcl-2 associated X protein (Bax), Cleaved-cysteiny aspartate specific proteinase-3 (Cleaved caspase-3), Beclin1, LC3, and P62 proteins in the cells in various groups. **Results:** Compared with control group, the expression level of FOXO1 mRNA in aneurysm tissue of the subjects in AAA group was increased ($P<0.05$), the number of autophagolysosomes was increased ($P<0.05$), the levels of Beclin1 protein and the ratio of LC3 II / LC3 I were increased ($P<0.05$), and the expression level of P62 protein was decreased ($P<0.05$). Compared with blank control group, the proliferation activity of the hVSMCs in Ang II group was decreased ($P<0.05$), the apoptotic rate of the cells was increased ($P<0.05$), the levels of MMP-2 and MMP-9 in the cell supernatant were increased ($P<0.05$), the expression levels of Bax, Cleaved caspase-3, and Beclin1 proteins in the cells and the ratio of LC3 II / LC3 I were increased ($P<0.05$), and the expression levels of Bcl-2 and P62 proteins were decreased ($P<0.05$). Compared with Ang II + si-NC group, the proliferation activity of the hVSMCs in Ang II + si-FOXO1 group was increased ($P<0.05$), the apoptotic rate of the cells was decreased ($P<0.05$), the levels of MMP-2 and MMP-9 in the cell supernatant were decreased ($P<0.05$), the expression levels of Bax, cleaved caspase-3, and Beclin1 proteins in the cells and the ratio of LC3 II / LC3 I were decreased ($P<0.05$), and the expression levels of Bcl-2 and P62 proteins were increased ($P<0.05$). Compared with Ang II + si-FOXO1 group, the apoptotic rate of the hVSMCs in Ang II + si-FOXO1 + Rap group was increased ($P<0.05$), the levels of MMP-2 and MMP-9 in the cell supernatant were increased ($P<0.05$), the

expression level of Beclin1 protein in the cells and the ratio of LC3 II/LC3 I were decreased ($P<0.05$), and the expression level of P62 protein was increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Silencing the FOXO1 gene may increase the proliferation activity of the hVSMCs exposed to Ang II by reducing the autophagy level and inhibiting the apoptosis, thus participating in the pathogenesis of AAA.

KEYWORDS Abdominal aortic aneurysm; Human vascular smooth muscle cell; Forkhead box transcription factor O1; Autophagy; Apoptosis

腹主动脉瘤 (abdominal aortic aneurysm, AAA) 是常见的慢性主动脉退行性疾病, 具有高发病率和高病死率, 是导致65岁以上老年人死亡的一个主要原因^[1-2]。随着我国人口老龄化严重以及整体寿命延长, AAA发病率逐年升高, 且瘤体一旦发生破裂其死亡率高达90%, 严重危害中老年人生命健康^[3]。目前尚无明确有效药物防治AAA, 故临床广泛采用外科手术和血管修复治疗AAA, 但仍存在瘤体破裂导致患者死亡的风险^[4]。因此, 阐明AAA的潜在分子机制十分迫切。血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 是血管壁的重要组成部分, 其增殖抑制、凋亡促进和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 降解是促进AAA发生发展的关键因素^[5]。叉头框转录因子O1 (forkhead box transcription factor O1, FOXO1) 是人体内重要的转录调控因子, 属于叉头框转录因子 (forkhead box transcription factor, FOX) 家族的重要成员, 参与调节机体葡萄糖代谢、脂质代谢、氧化应激、凋亡、自噬和内质网应激等多种生物学过程^[6]。刘娇等^[7] 研究结果显示: 小檗碱可通过沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1) / FOXO1通路介导的凋亡与自噬抑制卵巢颗粒细胞。WANG等^[8] 研究结果显示: FOXO1在氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 处理的VSMCs中表达下调, 其过表达可逆转ox-LDL对VSMCs增殖的促进作用。WAN等^[9] 研究显示: FOXO1与AAA密切相关, 且对AAA有潜在的诊断价值, 但具体作用机制尚不明确。因此, 本研究通过检测AAA组织及邻近正常主动脉组织中FOXO1表达水平, 并采用血管紧张素II (angiotensin II, Ang II) 诱导VSMCs建立体外腹主动脉瘤细胞模型, 探讨FOXO1基因沉默对Ang II暴露下VSMCs增殖和凋亡的影响及其作用机制, 以期为AAA的治疗和药物开发提供新的靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2020年4月—2022年5月在本院经手术切除的19例AAA患者的腹主动脉组织 (AAA组) 及邻近正常主动脉组织 (对照组, 距离肿瘤边缘2~3 cm), 其中男性14例, 女性5例, 年龄 (67.1±4.6) 岁。本研究获得本院伦理委员会批准, 伦理批号: 201901005, 术前均告知患者并签署知情同意书。

1.2 细胞、主要试剂和仪器 人主动脉血管平滑肌细胞 (human vascular smooth muscle cells, hVSMCs) 及配套专用培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司。胰蛋白酶购自美国Gibco公司, Ang II和雷帕霉素 (rapamycin, Rap) 购自美国MCE公司, si-FOXO1 (靶序列: 5'-CAATTCGTCATAATCTGTCCCTACA-3') 及其阴性对照 si-NC (靶序列: 5'-CAATGCTACTAAGTCCC-TTCTTACA-3') 慢病毒购自上海吉玛制药技术有限公司, 含DPAI抗荧光淬灭封片液、CCK-8细胞增殖与细胞毒性检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒和BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 基质金属蛋白酶 (matrix metallo-protein, MMP) -2和MMP-9 ELISA试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 反转录试剂盒和实时荧光定量PCR (real-time quantitative fluorescence PCR, RT-qPCR) 试剂盒购自日本TaKaRa公司; FOXO1抗体、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体、B细胞淋巴瘤2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体、Bcl-2相关X蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体、剪切型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3 (Cleaved-cysteinyl aspartate specific proteinase-3, Cleaved-caspase-3) 抗体、卷曲螺旋肌球蛋白样 Bcl-2 结合蛋白 (coiled-coil myosin-like Bcl-2 interacting protein, Beclin-1) 抗体、微管相关蛋白1轻链3 α (microtubule-associated proteins light chain 3 α , LC3)、死骨片1 (sequestosome 1, P62) 和GAPDH抗体购自美国Affinity公司, FITC-

HRP 标记的山羊抗兔二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。超净工作台(型号: SW-CJ-2D)购自苏州净化设备有限公司, 荧光定量 PCR 仪(型号: LEIA-X4)购自山东博科生物产业有限公司, 酶标分析仪(型号: AMR-100)购自杭州奥盛仪器有限公司, 流式细胞仪(型号: NovoCyte 2040R)购自美国 ACEA 公司, 倒置荧光显微镜(型号: XD-202)购自南京江南永新光学有限公司, 透射电子显微镜(型号: HITACHI HT7800)购自日本日立公司。

1.3 细胞培养 采用配套专用培养基培养 hVSMCs, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞生长密度达 90% 时, 使用胰蛋白酶进行消化传代处理。hVSMCs 专用培养基成分: Ham's F-12K+0.05 g·L⁻¹ 维生素 C+0.01 g·L⁻¹ 胰岛素+0.01 g·L⁻¹ 转铁蛋白+10 μg·L⁻¹ 亚硒酸钠+0.03 g·L⁻¹ 内皮细胞生长补充剂 ECGs+10% 胎牛血清+10 mmol·L⁻¹ 4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸 [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES] 缓冲液+10 mmol·L⁻¹ N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙烷磺酸 [N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid, TES] 缓冲液+1% 双抗。hVSMCs 无血清培养 12 h 后, 添加含 10 μmol·L⁻¹ Ang II 的培养液置于培养箱孵育 48 h 建立体外 AAA 细胞模型^[10], 用于后续实验。

1.4 免疫荧光法鉴定 hVSMCs 取对数生长期 hVSMCs, 以每孔 1×10⁵ 个细胞密度接种至 24 孔细胞培养板中, 过夜, 取出培养板去除培养基, PBS 缓冲液清洗 1 次, 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, PBS 缓冲液清洗 3 次, 加入 0.2% Triton X-100 室温通透 10 min, PBS 缓冲液清洗 3 次, 加入 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h, 加入一抗 α-SMA 抗体 (1:200), 4 °C 孵育过夜, PBS 缓冲液清洗 3 次, 加入 FITC 标记的山羊抗兔二抗 (1:200), 室温孵育 1 h, PBS 缓冲液清洗 3 次, 加入 DAPI 缓冲液, 室温孵育 10 min。采用荧光显微镜观察细胞荧光染色情况, α-SMA 阳性表达为 hVSMCs。

1.5 细胞转染及分组处理 取对数生长期 hVSMCs, 以每孔 5×10⁵ 个细胞的密度接种至 6 孔细胞培养板中培养过夜。次日, 更换新鲜完全培养基, 以病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 200 加入 si-FOXO1 及其阴性对照 si-NC

慢病毒, 18 h 后更换新鲜完全培养基, 72 h 后采用 RT-qPCR 法和 Western blotting 法检测感染效率, 收集细胞进行后续实验。采用 CCK-8 法、流式细胞术和 Western blotting 法检测 hVSMCs 增殖、凋亡及自噬, 实验分组: 空白对照组、Ang II 组、Ang II + si-NC 组和 Ang II + si-FOXO1 组, 10 μmol·L⁻¹ Ang II 干预各组细胞 48 h。采用流式细胞术检测 hVSMCs 凋亡, 实验分组: Ang II + si-NC 组、Ang II + si-FOXO1 组、Ang II + si-NC+Rap 组和 Ang II + si-FOXO1+Rap 组, 10 μmol·L⁻¹ Ang II 和 100 μg·L⁻¹ Rap 干预各组细胞 48 h^[11]。

1.6 CCK-8 法检测各组细胞存活率 取病毒感染后的对数生长期 hVSMCs, 以每孔 2×10⁵ 个细胞的密度接种至 96 孔细胞培养板中培养过夜, 处理细胞 48 h, 另设调零孔 (只加培养基), 提前 2 h 取出培养板, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 置于 37 °C 培养箱中避光孵育 2 h, 采用酶标仪检测 450 nm 处吸光度 (A) 值。细胞存活率 = (实验组 A 值 - 调零组 A 值) / (对照组 A 值 - 调零组 A 值) × 100%。

1.7 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 取病毒感染后的对数生长期 hVSMCs, 以每孔 5×10⁵ 个细胞密度接种至 6 孔细胞培养板中培养过夜, 处理细胞 48 h。收集各组细胞, PBS 缓冲液清洗 1 次, 加入 200 μL PBS 缓冲液重悬细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC 染液, 轻吹混匀, 加入 5 μL PI 染液, 轻吹混匀, 4 °C 避光 20 min, 上机检测。

1.8 ELISA 法检测各组 hVSMCs 培养上清中基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 水平 取病毒感染后的对数生长期 hVSMCs, 以每孔 5×10⁵ 个细胞的密度接种至 6 孔细胞培养板中培养过夜, 处理细胞 48 h。收集各组细胞上清, 4 °C、1 000 g 离心 20 min, 取上清严格按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行实验操作, 酶标仪在 450 nm 处检测各组样本 A 值, 绘制标准曲线, 并根据标准曲线计算各组样本中 MMP-2 和 MMP-9 水平。

1.9 RT-qPCR 法检测动脉瘤组织及各组细胞中 FOXO1 mRNA 表达水平 收集 AAA 组织和邻近正常主动脉组织及处理后的各组细胞, 采用 TRIzol 法提取组织 (匀浆仪充分研磨) 和细胞中总 RNA, 并采用紫外分光光度计检测 RNA 的

浓度。采用 RT-qPCR 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 之后进行 RT-qPCR 反应, 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 25 s, 70 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, FOXO1 上游引物: 5'-AGGGTTAGTGAGCAGGTTACAC-3', FOXO1 下游引物: 5'-TGCTGCCAAGTCTGACGAAA-3'; GAPDH 上游引物: 5'-AATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3', GAPDH 下游引物: 5'-GCCCAATACGACCAAATCAGAG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中 FOXO1 mRNA 表达水平。

1.10 Western blotting 法检测动脉瘤组织和各组细胞中 FOXO1、Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3、Beclin1、LC-3 及 P62 蛋白表达水平 收集 AAA 组织及邻近正常主动脉组织以及处理后的各组细胞, 加入裂解液冰上提取组织 (匀浆仪充分研磨) 和细胞中总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。每组样本取 30 μ g 蛋白上样, 行电泳、转膜、封闭处理, 加入 FOXO1 抗体 (1:1 000)、Bcl-2 抗体 (1:1 000)、Bax 抗体 (1:1 000)、Cleaved-caspase-3 抗体 (1:1 000)、Beclin1 抗体 (1:1 000)、LC-3 抗体 (1:1 000)、P62 抗体 (1:1 000) 和 GAPDH 抗体 (1:5 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:2 000) 室温孵育 2 h, TBST 清洗 3 次, 滴加 ECL 显影液, 采用凝胶成像仪曝光采集图像; 采用 Image J 软件分析条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 蛋白条带灰度值。

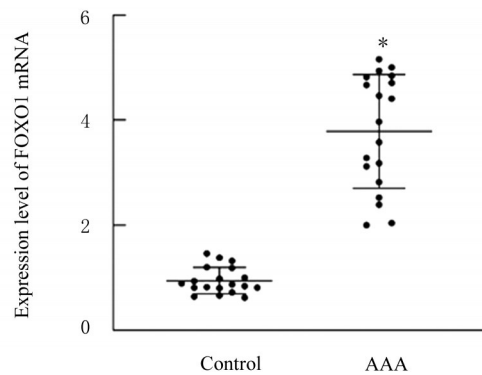
1.11 透射电镜观察动脉瘤组织超微形态表现 将 AAA 组织及邻近正常主动脉组织修切体积为 1 mm³, 固定在 2.5% 戊二醛中 1 h, 然后使用 1% 四氧化锇进行处理, 脱水并包埋至 Durcupan 水溶性包埋树脂中, 将样品切成厚度为 60 nm 薄片, 安装于铜格栅上, 用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色, 通过电子显微镜观察样品形态结构。

1.12 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。AAA 组织中 FOXO1 mRNA 和蛋白表达水平, 各组细胞存活率和凋亡率, 细胞上清中 MMP-2 和 MMP-9 水平, 细胞中 FOXO1 mRNA 表达水平及 FOXO1、Bcl-2、Cleaved-caspase-3、Beclin1、LC-3 和 P62 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素

方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

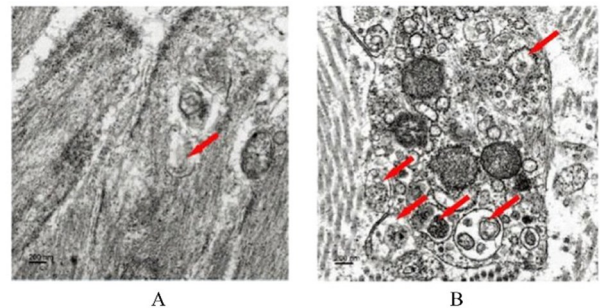
2.1 动脉瘤组织中 FOXO1 mRNA 表达水平、动脉瘤组织超微形态表现及动脉组织中 FOXO1 和自噬相关蛋白表达水平 RT-qPCR 法检测结果显示: 与对照组 (0.94 \pm 0.25) 比较, AAA 组患者动脉瘤组织中 FOXO1 mRNA 表达水平 (3.79 \pm 1.09) 升高 ($P<0.05$), 见图 1。透射电子显微镜检测结果显示: 与对照组比较, AAA 组患者动脉瘤组织中自噬溶酶体形成数量增多, 见图 2。Western blotting 法检测结果显示: 与对照组比较, AAA 组患者动脉瘤组织中 FOXO1 和 Beclin1 蛋白表达水平及 LC3 II/LC3 I 比值升高 ($P<0.05$), P62 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), 见图 3。



* $P<0.05$ compared with control group.

图 1 AAA 组织中 FOXO1 mRNA 表达水平

Fig. 1 Expression levels of FOXO1 mRNA in AAA tissue

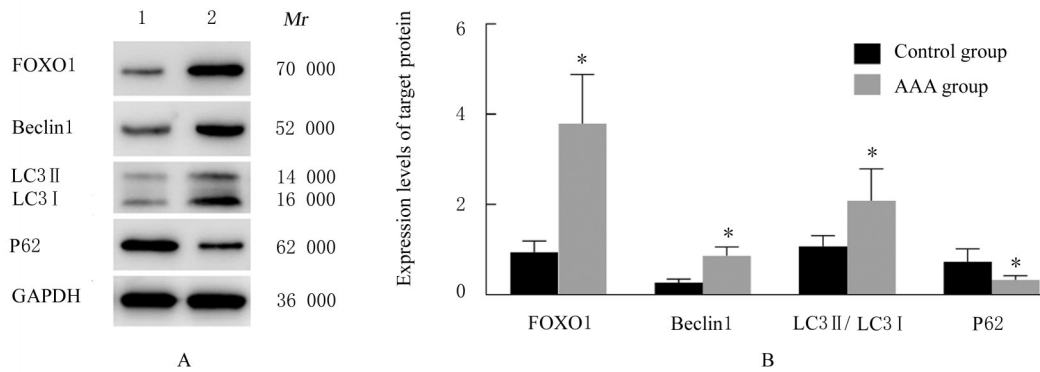


A: Control group; B: AAA group; Red arrow: Autophagosome.

图 2 AAA 组织超微形态表现

Fig. 2 Ultramorphology of AAA tissue

2.2 hVSMCs 鉴定及感染效率验证 免疫荧光法检测结果显示: α -SMA 呈阳性表达, 提示细胞鉴



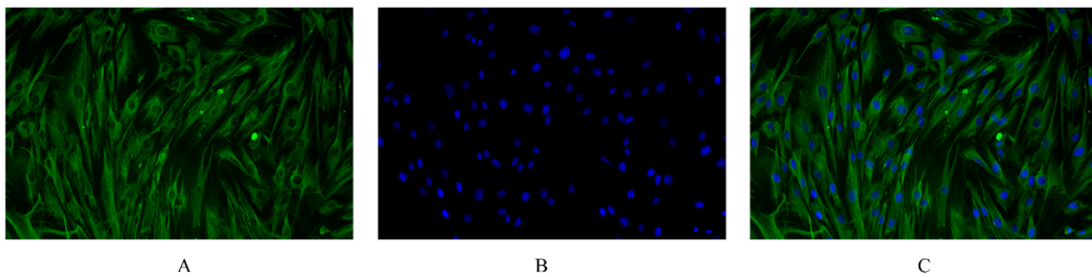
Lane 1:Control group;Lane 2:AAA group. * $P<0.05$ compared with control group.

图3 AAA组织中FOXO1和自噬相关蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 3 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of FOXO1 and autophagy related proteins in AAA tissue

定为hVSMCs,见图4。RT-qPCR法和Western blotting法检测结果显示:与空白对照组比较,si-NC组hVSMCs细胞中FOXO1 mRNA和蛋白表

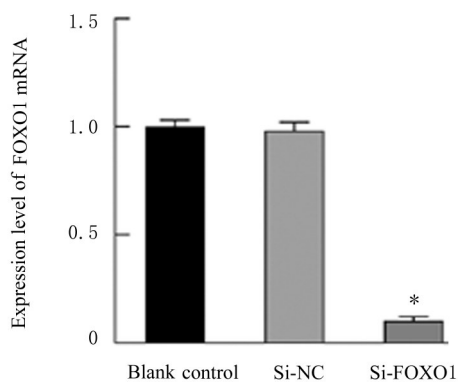
达水平差异无统计学意义($P>0.05$);与si-NC组比较,si-FOXO1组细胞中FOXO1 mRNA和蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),见图5和6。



A: α -SMA;B:DAPI;C:Merge.

图4 hVSMCs中 α -SMA的表达

Fig. 4 Expression of α -SMA in hVSMCs



* $P<0.05$ compared with si-NC group.

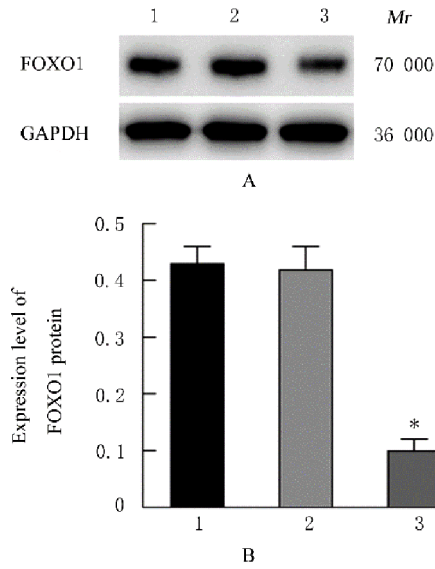
图5 各组hVSMCs中FOXO1 mRNA表达

Fig. 5 Expression of FOXO1 mRNA in hVSMCs in various groups

2.3 各组hVSMCs存活率和细胞凋亡率 CCK-8法检测结果显示:与空白对照组(100.00%±2.12%)比较,Ang II组hVSMCs增殖率

(55.12%±6.28%)降低($P<0.05$);与Ang II组比较,Ang II+si-NC组hVSMCs增殖率(57.24%±5.36%)差异无统计学意义($P>0.05$);与Ang II+si-NC组比较,Ang II+si-FOXO1组hVSMCs增殖率(90.03%±3.21%)升高($P<0.05$)。流式细胞术检测结果显示:与空白对照组比较,Ang II组hVSMCs凋亡率升高($P<0.05$);与Ang II组比较,Ang II+si-NC组hVSMCs凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$);与Ang II+si-NC组比较,Ang II+si-FOXO1组hVSMCs凋亡率降低($P<0.05$)。见图7和8。

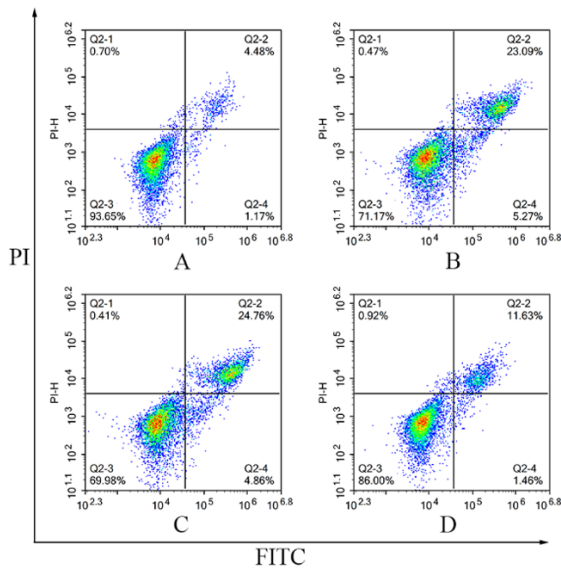
2.4 各组hVSMCs培养上清中MMP-2和MMP-9水平 ELISA法检测结果显示:与空白对照组比较,Ang II组hVSMCs上清中MMP-2和MMP-9水平升高($P<0.05$);与Ang II组比较,Ang II+si-NC组hVSMCs上清中MMP-2和MMP-9水平差



Lane 1: Blank control group; Lane 2: Si-NC group; Lane 3: Si-FOXO1 group. * $P < 0.05$ compared with si-NC group.

图6 各组hVSMCs中FOXO1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expression of FOXO1 protein in hVSMCs in various groups

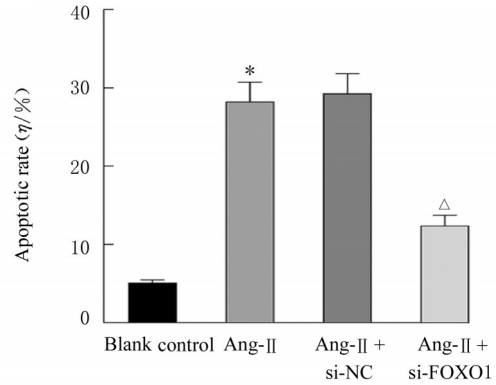


A: Blank control group; B: Ang II group; C: Ang II + si-NC group; D: Ang II + si-FOXO1 group.

图7 流式细胞术检测各组hVSMCs凋亡率

Fig. 7 Apoptotic rates of hVSMCs in various groups detected by flow cytometry

异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 Ang II + si-NC 组比较, Ang II + si-FOXO1 组 hVSMCs 上清中 MMP-2 和 MMP-9 水平降低 ($P < 0.05$)。见表 1。



* $P < 0.05$ compared with blank control group; ^Δ $P < 0.05$ compared with Ang II + si-NC group.

图8 各组hVSMCs凋亡率

Fig. 8 Apoptotic rates of hVSMCs in various groups

表1 各组hVSMCs培养上清中MMP-2和MMP-9水平

Tab. 1 Levels of MMP-2 and MMP-9 in culture supernatant of hVSMCs in various groups [$n = 3, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	MMP-2 level	MMP-9 level
Blank control	1.10 ± 0.10	0.50 ± 0.04
Ang II	5.30 ± 0.40*	2.10 ± 0.20*
Ang II + si-NC	5.50 ± 0.50	2.20 ± 0.10
Ang II + si-FOXO1	1.80 ± 0.20 ^Δ	0.80 ± 0.09 ^Δ

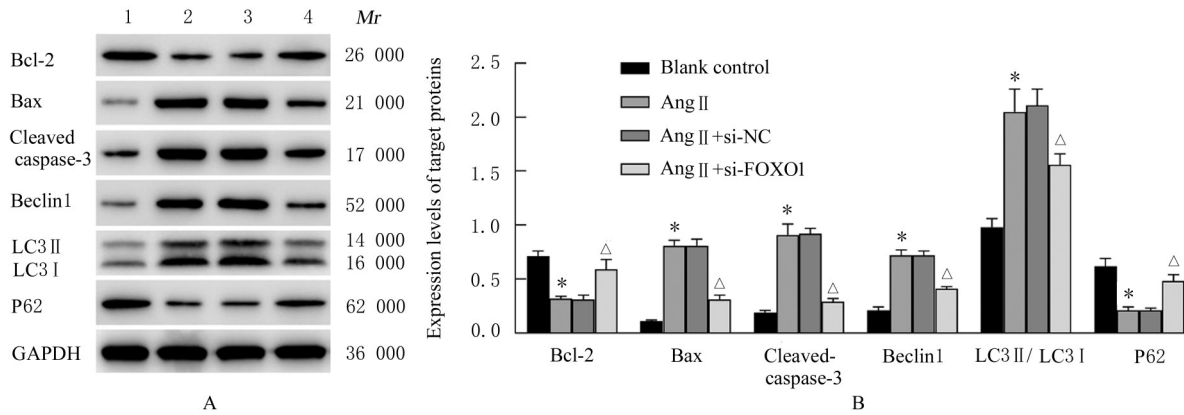
* $P < 0.05$ compared with blank control group; ^Δ $P < 0.05$ compared with Ang II + si-NC group.

2.5 各组hVSMCs中Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3、Beclin1、LC-3和P62蛋白表达水平

Western blotting 法检测结果显示: 与空白对照组比较, Ang II 组 hVSMCs 中 Bcl-2 和 P62 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), 而 Bax、Cleaved caspase-3 和 Beclin1 蛋白表达水平及 LC3 II/LC3 I 比值升高 ($P < 0.05$); 与 Ang II 组比较, Ang II + si-NC 组 hVSMCs 中 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3、Beclin1 和 P62 蛋白表达水平及 LC3 II/LC3 I 比值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 Ang II + si-NC 组比较, Ang II + si-FOXO1 组 hVSMCs 中 Bcl-2 和 P62 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), 而 Bax、Cleaved caspase-3 和 Beclin1 蛋白表达水平及 LC3 II/LC3 I 比值降低 ($P < 0.05$)。见图 9。

2.6 诱导自噬后各组hVSMCs中Beclin1、LC-3和P62蛋白表达水平

Western blotting 法检测结果显示: 与 Ang II + si-NC 组比较, Ang II + si-FOXO1 组 hVSMCs 中 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3 II/LC3 I 比值降低 ($P < 0.05$), P62 蛋白表



Lane 1: Blank control group; Lane 2: Ang II group; Lane 3: Ang II + si-NC group; Lane 4: Ang II + si-FOXO1 group. * $P < 0.05$ compared with blank control group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with Ang II + si-NC group.

图9 各组hVSMCs中Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3、Beclin1、LC-3和P62蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 9 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of Bcl-2, Bax, Cleaved caspase-3, Beclin1, LC-3, and P62 proteins in hVSMCs in various groups

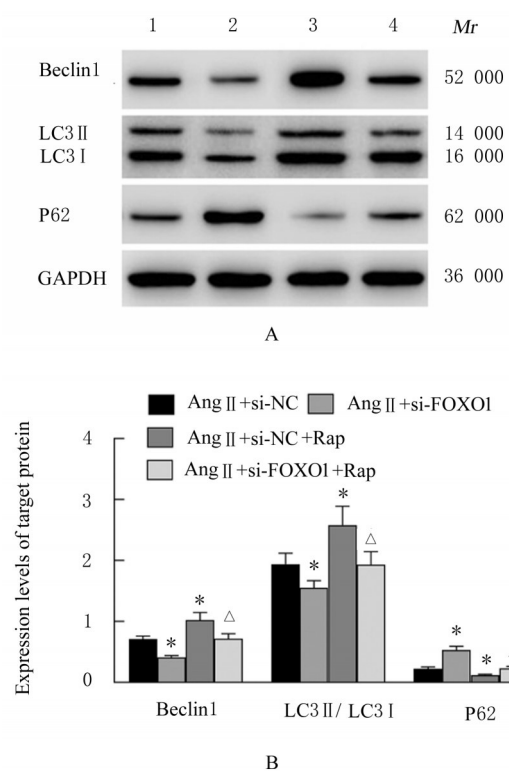
达水平升高 ($P < 0.05$), Ang II + si-NC + Rap 组 hVSMCs 中 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3 II / LC3 I 比值升高 ($P < 0.05$), P62 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 Ang II + si-FOXO1 组比较, Ang II + si-FOXO1 + Rap 组 hVSMCs 中 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3 II / LC3 I 比值降低 ($P < 0.05$), P62 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 10。

2.7 诱导自噬后各组hVSMCs凋亡率 流式细胞术检测结果显示: 与 Ang II + si-NC 组比较, Ang II + si-FOXO1 组 hVSMCs 凋亡率降低 ($P < 0.05$), Ang II + si-NC + Rap 组 hVSMCs 凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与 Ang II + si-FOXO1 组比较, Ang II + si-FOXO1 + Rap 组 hVSMCs 凋亡率升高 ($P < 0.05$)。见图 11 和 12。

2.8 诱导自噬后各组hVSMCs培养上清中MMP-2和MMP-9水平 ELISA 法检测结果显示: 与 Ang II + si-NC 组比较, Ang II + si-FOXO1 组 hVSMCs 上清中 MMP-2 和 MMP-9 水平降低 ($P < 0.05$), Ang II + si-NC + Rap 组 hVSMCs 上清中 MMP-2 和 MMP-9 水平升高 ($P < 0.05$); 与 Ang II + si-FOXO1 组比较, Ang II + si-FOXO1 + Rap 组 hVSMCs 上清中 MMP-2 和 MMP-9 水平升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

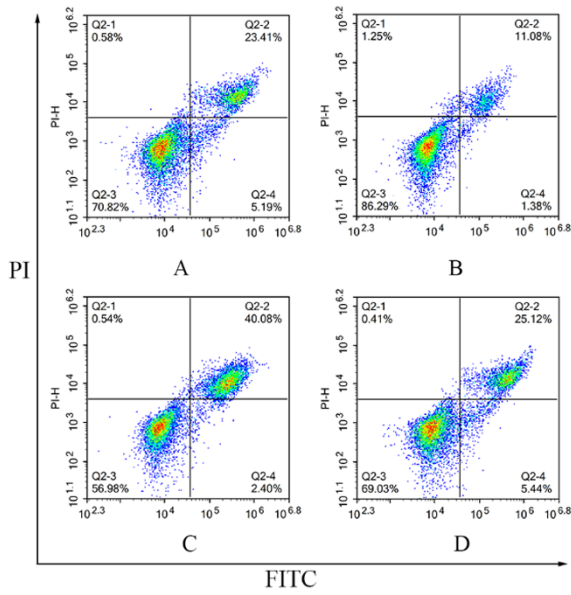
Ang II 是一种血管收缩剂, 是肾素/血管紧张素系统的主要生物活性肽, 是目前化学诱导 AAA



Lane 1: Ang II + si-NC group; Lane 2: Ang II + si-FOXO1 group; Lane 3: Ang II + si-NC + Rap group; Lane 4: Ang II + si-FOXO1 + Rap group. * $P < 0.05$ compared with Ang II + si-NC group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with Ang II + si-FOXO1 group.

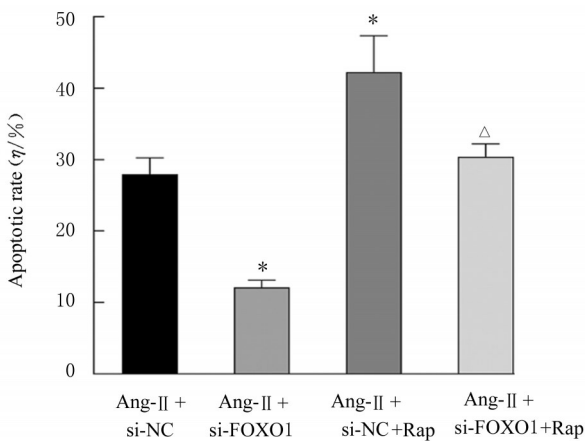
图10 诱导自噬后各组hVSMCs中Beclin1、LC-3和P62蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 10 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of Beclin1, LC-3 and P62 proteins in hVSMCs in various groups after autophagy induction



A: Ang II + si-NC group; B: Ang II + si-FOXO1 group; C: Ang II + si-NC + Rap group; D: Ang II + si-FOXO1 + Rap group.

图 11 流式细胞术检测诱导自噬后各组 hVSMCs 凋亡率
Fig. 11 Apoptotic rates of hVSMCs in various groups after autophagy induction detected by flow cytometry



* $P < 0.05$ compared with Ang II + si-NC group; $\Delta P < 0.05$ compared with Ang II + si-FOXO1 group.

图 12 诱导自噬后各组 hVSMCs 凋亡率
Fig. 12 Apoptotic rates of hVSMCs in various groups after autophagy induction

最常用的造模方式。体内输注 Ang II 可模拟 AAA 的炎症发生过程，能够促进肾上腺主动扩张、动脉粥样硬化、巨噬细胞蓄积以及血栓形成。此外，体外应用 Ang II 刺激 VSMCs 可诱导细胞自噬，抑制细胞增殖并促进细胞凋亡和 ECM 降解，可以用于模拟 AAA 平滑肌细胞 (smooth muscle cells, SMC) 损伤 [12-13]。AAA 是一种进行性主动扩张

表 2 诱导自噬后各组 hVSMCs 培养上清中 MMP-2 和 MMP-9 水平

Tab. 2 Levels of MMP-2 and MMP-9 in culture supernatant of hVSMCs in various groups after autophagy induction

[$n=3, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	MMP-2 level	MMP-9 level
Ang II + si-NC	5.80 ± 0.70	2.10 ± 0.10
Ang II + si-FOXO1	1.60 ± 0.20*	0.90 ± 0.10*
Ang II + si-NC + Rap	8.20 ± 0.60*	3.40 ± 0.30*
Ang II + si-FOXO1 + Rap	6.10 ± 0.40 ^Δ	1.00 ± 0.09 ^Δ

* $P < 0.05$ compared with Ang II + si-NC group; $\Delta P < 0.05$ compared with Ang II + si-FOXO1 group.

性疾病，其发病率占所有动脉瘤的第 1 位，其主要病理特征为 ECM 降解和血管壁中层收缩型 SMC 减少 [14]。VSMCs 作为主动脉血管壁的主要细胞成分之一，对维持主动脉结构和功能起着重要作用，其凋亡与 AAA 发生发展密切相关。

近年来研究 [15-16] 发现：FOXO1 与 Bcl-2 相互作用介导细胞死亡，可促进 Bax/Bcl-2 比值升高，从而发挥促进细胞凋亡的作用。ZHANG 等 [17] 研究发现：沉默 FOXO1 可抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖、迁移和侵袭，并促进细胞凋亡。FOXO1 和 Cleaved caspase-3 表达下调与肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCS) 的过度增殖和细胞凋亡抵抗关系密切，上调两者表达可通过抑制细胞周期进程和促进细胞凋亡来抑制 PASMCS 增殖，从而减轻实验性肺动脉高压 [18]。因此，FOXO1 可能成为靶向治疗 AAA 的潜在靶点。本研究结果显示：与对照组比较，AAA 组患者动脉瘤组织中 FOXO1 高表达，推测 FOXO1 异常高表达可能促进 AAA 发展，明确其作用机制有利于为 AAA 的治疗提供新的方向。

自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖性降解途径，也是细胞维持生存的一种重要机制。自噬是一种不同于凋亡的新的程序性死亡方式，一方面适度自噬激活可清除受损的细胞器和异常蛋白，防止蛋白聚集，从而对细胞起保护作用；另一方面过度自噬可诱导细胞自噬性死亡，并与凋亡信号存在交互作用。研究 [19-20] 表明：自噬在 AAA 的形成过程中起着关键作用。杜亚豪等 [21] 研究发现：AAA 血管平滑肌细胞中自噬和凋亡水平均升高。SALMON 等 [22] 研究发现：AAA 形成过程中会激活主动扩张 VSMCs 中的自噬相关基因。

GUO等^[23]研究显示:自噬相关蛋白在AAA患者中表达水平升高,自噬基因Atg7在Ang II处理的VSMCs中表达水平升高,其过表达可抑制VSMCs增殖并诱导细胞凋亡和自噬。本研究结果显示:与对照组比较,AAA组患者动脉瘤组织中FOXO1表达和自噬水平升高。体外细胞实验检测结果显示:Ang II处理可抑制VSMCs增殖,诱导细胞凋亡和自噬,并上调MMP-2和MMP-9水平,促进ECM降解,提示Ang II干预可促进AAA发展。但FOXO1是否通过调控自噬参与VSMCs凋亡进程尚未得到证实。本研究发现沉默FOXO1表达可促进Ang II处理的VSMCs增殖,抑制细胞凋亡、自噬和ECM降解,提示FOXO1可能是调控AAA发展的关键基因。进一步研究结果发现:自噬激动剂Rap处理后,可逆转FOXO1基因沉默对Ang II处理的hVSMCs凋亡抑制作用。由此推断,FOXO1可能通过促进自噬诱导AAA血管平滑肌细胞凋亡,其可能为AAA的效应靶点之一。

综上所述,FOXO1在AAA组织高表达,沉默FOXO1基因可能通过降低自噬水平来提高Ang II暴露下hVSMCs增殖活性,并抑制其凋亡,从而参与AAA的发病。本研究为AAA的防治和药物开发提供了一种潜在的有效靶点,但仍存在一些不足:实验仅从细胞层面探讨了FOXO1通过调控自噬参与VSMCs细胞增殖凋亡过程,本课题组后续将从动物层面入手,深入探讨体内FOXO1与AAA的关系。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

王琳茹和胡文贤负责论文的整体设计,张晶负责论文的撰写,赵冬婵和王晋军负责论文的统计学分析。

[参考文献]

- [1] NAGNOSTAKOS J, LAL B K. Abdominal aortic aneurysms[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2021, 65: 34-43.
- [2] CALGI M P, MCNEIL J S. Abdominal aortic aneurysms (etiology, epidemiology, and natural history)[J]. Anesthesiol Clin, 2022, 40(4): 657-669.
- [3] 韩晓峰,郭曦,刘光锐,等.腹主动脉瘤发病机制研究进展[J].心肺血管病杂志,2016,35(10):817-820.
- [4] SCHANZER A, ODERICH G S. Management of abdominal aortic aneurysms[J]. N Engl J Med, 2021, 385(18): 1690-1698.
- [5] ROMBOUTS K B, VAN MERRIENBOER T A R, KET J C F, et al. The role of vascular smooth muscle cells in the development of aortic aneurysms and dissections[J]. Eur J Clin Invest, 2022, 52(4): e13697.
- [6] XING Y Q, LI A, YANG Y, et al. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression[J]. Life Sci, 2018, 93: 124-131.
- [7] 刘姣,杨阳,何悦双,等.基于SIRT1/FoxO1通路探究小檗碱抑制卵巢颗粒细胞凋亡与自噬的调节机制[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(6):79-87.
- [8] WANG Q Y, YANG X, ZHOU X, et al. MiR-3174 promotes proliferation and inhibits apoptosis by targeting FOXO1 in hepatocellular carcinoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(4): 889-897.
- [9] WAN L, HUANG J Y, NI H Z, et al. Screening key genes for abdominal aortic aneurysm based on gene expression omnibus dataset [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2018, 18(1): 34.
- [10] ZHANG Z D, ZOU G Q, CHEN X S, et al. Knockdown of lncRNA PVT1 inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis and extracellular matrix disruption in a murine abdominal aortic aneurysm model[J]. Mol Cells, 2019, 42(3): 218-227.
- [11] 李丹,杨鹏,滕红丽,等.27nt-miRNA通过靶向哺乳动物雷帕霉素靶蛋白调控血管平滑肌细胞凋亡及其分子机制研究[J].中国循环杂志,2020,35(4):401-407.
- [12] MONDACA-RUFF D,RIQUELME J A,QUIROGA C, et al. Angiotensin II -regulated autophagy is required for vascular smooth muscle cell hypertrophy [J]. Front Pharmacol, 2019,9: 1553.
- [13] GUO J J, WANG Z, XUE M, et al. Metformin protects against abdominal aortic aneurysm by Atg7-induced autophagy[J]. Adv Clin Exp Med, 2022, 31(1): 59-69.
- [14] 张江锋,覃晓.腹主动脉瘤发病机制的研究[J].广西医科大学学报,2020,37(2):309-314.
- [15] NING N, ZHANG S, WU Q, et al. Inhibition of acylglycerol kinase sensitizes DLBCL to venetoclax via upregulation of FOXO1-mediated BCL-2 expression[J]. Theranostics, 2022, 12(12): 5537-5550.
- [16] 姜靖雯,陈学武,罗荣城,等.三氟拉嗪激活FOXO1相关的Bax/Bcl-2信号通道诱导肝癌细胞凋亡[J].中国药理学杂志,2019,54(11):886-893.
- [17] ZHANG L L, LIANG B, XU H, et al. Cinobufagin induces FOXO1-regulated apoptosis, proliferation, migration, and invasion by inhibiting G9a in non-small-cell lung cancer A549 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 291: 115095.

- [18] LI B B, TENG C, YU H L, et al. Alleviating experimental pulmonary hypertension via co-delivering FoxO1 stimulus and apoptosis activator to hyperproliferating pulmonary arteries [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(6): 2369-2382.
- [19] RAMADAN A, AL-OMRAN M, VERMA S. The putative role of autophagy in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 257: 288-296.
- [20] WANG L, LIU S, PAN B H, et al. The role of autophagy in abdominal aortic aneurysm: protective but dysfunctional [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(21): 2749-2759.
- [21] 杜亚豪, 郑月宏, 田 翠, 等. 腹主动脉瘤血管平滑肌细胞凋亡和自噬研究 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2010, 9(3): 217-221.
- [22] SALMON M, SPINOSA M, ZEHNER Z E, et al. Klf4, Klf2, and Zfp148 activate autophagy-related genes in smooth muscle cells during aortic aneurysm formation [J]. *Physiol Rep*, 2019, 7(8): e14058.
- [23] GUO J, WANG Z, XUE M, et al. Metformin protects against abdominal aortic aneurysm by Atg7-induced autophagy [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2022, 31(1): 59-69.