当归补血汤通过调控自噬促进大鼠缺血心肌血管新生作用

孙　琳，王　瑛，刘莹莹，张子婷，裴　科，柴　智*
山西中医药大学，山西 晋中　030619

摘　要：目的　通过建立大鼠心肌缺血模型与人脐静脉内皮细胞（HUVECs）缺氧模型，探究当归补血汤（DBD）通过调控自噬促进缺血心肌血管新生的作用机制。**方法**　SD 雄性大鼠随机分为 6 组：假手术组、模型组、麝香保心丸（SBP，阳性对照，20 mg·kg^{-1}）组和 DBD 低、中、高剂量（1.56、3.12、6.24 g·kg^{-1}）组，除对照组外，采用冠状动脉左前降支结扎术制备大鼠心肌缺血模型，术后 2 d 开始 ig 给药，每天 1 次，给药 7 d；2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑（TTC）染色观察大鼠心肌梗死面积；苏木精-伊红（HE）染色法观察心肌组织病理损伤变化；酶联免疫吸附法（ELISA）检测血清中血管内皮生长因子（VEGF）及碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）的表达水平；透射电镜观察心肌超微结构及自噬小体的产生；Western blotting 测定心肌组织中自噬相关蛋白 Beclin-1、自噬微管相关蛋白轻链 3（LC3）-II/I 的表达；免疫荧光共定位法观察自噬相关蛋白 LC3 与血管因子 CD31 的阳性共表达情况。体外培养人脐静脉内皮（HUVECs）细胞，分为 6 组：对照组、单给 DBD（400 mg·L^{-1}）组、单给 DBD（400 mg·L^{-1}）＋3-MA（5 mmol·L^{-1}）组（常氧条件下培养）以及模型组、DBD 组、DBD＋3-MA 组（缺氧培养 24 h）。通过 CCK-8 法检测细胞存活率；Transwell 实验评估细胞迁移能力；Matrigel 实验检测细胞管腔形成能力；Western blotting 检测细胞中自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3-II/I的表达。**结果**　体内实验结果显示，与模型组比较，DBD 可显著缩小大鼠心肌梗死面积（P＜0.01），改善心肌组织病理损伤，显著上调血清中 VEGF 及 bFGF 的表达水平（P＜0.01）；明显改善心肌组织中线粒体受损程度、减轻空泡化，且自噬小体数量增多，心肌组织中自噬相关蛋白 LC3-II/I、Beclin-1 表达水平显著上调（P＜0.01），LC3 与 CD31 免疫荧光阳性共表达率显著提高（P＜0.01）。体外实验结果表明，与模型组相比，DBD 可显著提高缺氧条件下 HUVECs 活力、促进细胞迁移及管腔形成，并上调自噬相关蛋白 LC3-II/I、Beclin-1 的表达（P＜0.01）；加入自噬途径抑制剂 3-MA 后，DBD 的上述作用被抑制（P＜0.01）。**结论**　DBD 可促进大鼠缺血心肌血管新生，其作用机制可能与调节自噬反应有关。

关键词：当归补血汤；自噬；血管新生；心肌缺血；人脐静脉内皮细胞
中图分类号：R965　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 6376(2026)11 - 3867 - 12
DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.11.006

Promotion of vascular regeneration in ischemic rat myocardium by Danggui Buxue Decoction by regulating autophagy

SUN Lin, WANG Ying, LIU Yingying, ZHANG Ziting, PEI Ke, CHAI Zhi
Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective　To explore the mechanism of Danggui Buxue Decoction (DBD) promoting angiogenesis in ischemic myocardium through regulating autophagy by establishing a rat model of myocardial ischemia and a hypoxia model of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods**　SD male rats were randomly divided into six groups: sham operation group, model group, Shexiang Baoxin Pills (SBP, positive control, 20 mg·kg^{-1}) group, and DBD low, medium, and high dose (1.56, 3.12, and 6.24 g·kg^{-1}) groups. Except for the control group, myocardial ischemia models were established in rats by ligation of the left anterior descending coronary artery. Drug administration via ig route began two days after surgery, once daily for seven days. The rat model of myocardial ischemia was prepared by ligating the left anterior descending coronary artery. The myocardial infarct size in rats was observed by

收稿日期：2026-06-29
基金项目：国家自然科学基金青年基金项目（81303262）；山西省应用基础研究计划项目（202303021211176）；山西省重点研发计划项目（201903D321211）；山西省中医药管理局科研课题（2022ZYYC104）；黄芪资源产业化及产业国际化协同创新中心建设经费(XN2026052_090)；山西中医药大学研究生实践创新项目(X2026SJ032)
作者简介：孙　琳（1984—），女，副教授，博士，硕士生导师，研究方向为心血管疾病的中医药防治。E-mail: sunlin115@sxtcm.edu.cn
***通信作者：**柴　智（1979—），男，教授，博士，博士生导师，研究方向为中西医结合防治心脑血管疾病。E-mail: chaizhi008@126.com

2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The pathological damage of myocardial tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ultrastructure of myocardium and the generation of autophagosomes were observed by transmission electron microscopy. The expression of autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3-II/I in myocardial tissue was determined by Western blotting. The co-expression of autophagy-related protein LC3 and vascular factor CD31 was observed by immunofluorescence co-localization. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured *in vitro* and divided into six groups: control group, DBD (400 mg·L^{-1}) group, DBD (400 mg·L^{-1}) + 3-MA (5 mmol·L^{-1}) group (cultured under normoxic conditions), and model group, DBD group, DBD + 3-MA group (cultured under hypoxic conditions for 24 h). Cell viability was detected by CCK-8 assay. Cell migration ability was evaluated by Transwell assay. Cell tube formation ability was detected by Matrigel assay. The expression of autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3-II/I in cells was detected by Western blotting. **Results** *In vivo* experimental results showed that DBD could significantly reduce the myocardial infarct size in rats ($P < 0.01$), improve the pathological damage of myocardial tissue, and significantly up-regulate the expression levels of VEGF and bFGF in serum ($P < 0.01$). It could significantly improve the damage degree of mitochondria in myocardial tissue, reduce vacuolization, increase the number of autophagosomes, significantly up-regulate the expression levels of autophagy-related proteins LC3-II/I and Beclin-1 in myocardial tissue ($P < 0.01$), and significantly increase the co-expression rate of LC3 and CD31 immunofluorescence ($P < 0.01$). *In vitro* experimental results showed that compared with the normal control group, the viability of HUVECs was significantly decreased after 24 h of hypoxia treatment ($P < 0.01$). DBD could significantly improve the viability of HUVECs under hypoxic conditions, promote cell migration and tube formation, and up-regulate the expression of autophagy-related proteins LC3-II/I and Beclin-1 ($P < 0.01$). After adding the autophagy pathway inhibitor 3-MA, the above effects of DBD were inhibited. **Conclusion** DBD can promote angiogenesis in rats' ischemic myocardium, and its mechanism may be related to the regulation of autophagic response.

Key words: Danggui Buxue Decoction; autophagy; angiogenesis; myocardial ischemia; human umbilical vein endothelial cells

缺血性心脏病（IHD）是因心脏冠状动脉狭窄或堵塞，导致冠脉血流供应不足，使心脏血流不畅、功能受损，无法及时提供血氧及营养。IHD 主要表现为心律失常、心力衰竭等，严重威胁患者的健康及生命[1]。虽然 IHD 的发病率有所下降，但它仍然是全球范围内的主要死亡原因之一[2]。IHD 的治疗策略通常根据疾病严重程度确定，治疗性血管生成可以恢复缺血心脏组织的血液供应，限制梗死扩大，并减少对介入性操作的需求[3]。血管新生在缺血区域形成新的血管，为受损组织提供营养，减轻心肌损伤，这一过程可能涉及多条信号通路和分子机制。已有研究表明，细胞自噬与血管新生之间存在密切关系[4]，抑制或增强自噬分别可以抑制或促进血管新生，这表明自噬在这一过程中起着至关重要的调节作用[5-9]。

当归补血汤（DBD）是一种传统中药方剂，由黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 和当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 按 5∶1 的质量比配伍而成，广泛用于治疗心血管疾病[10-11]。DBD 的功效以补血益气见长，当归养血得黄芪生血之助，故血瘀血虚之症者，用此方益气补血，其症可解。已有研究证明，DBD 在治疗心肌缺血时，能缩小心肌缺血面积，改善心功能[12]，恢复梗死后心肌组织[13]，增加血管密度，增强皮肤创面细胞增殖，上调血管内皮生长因子[14]，这说明 DBD 能通过促进血管新生而起到治疗缺血性心脏病的作用。研究显示其促血管新生的机制与抑制可溶性蛋白表达，激活磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）/蛋白激酶 B（AKT）通路，调节缺氧诱导因子（HIF）-1α 蛋白水平等有关，但鲜有自噬方面的报道。

本研究基于 DBD 促血管新生的疗效，结合自噬与血管新生的密切关系，通过建立大鼠急性心肌缺血模型及人脐静脉内皮细胞缺氧模型，探究 DBD 能否通过调控自噬反应而发挥促血管新生的作用。

1 材料

1.1 细胞株及动物

HUVECs 细胞购自江苏凯基生物技术股份有限公司。SD 雄性大鼠 90 只，体质量 200～220 g，购于斯贝福（北京）生物技术有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（京）2019-0010，合格证号 No.110324220102652872。所用实验动物均置于温度（22±2.0）℃、湿度（50±5）%、12 h 明暗循环的环境喂养；整个操作过程均按照山西中医药大学实验动物伦理委员会的要求进行（伦理编号 AWE202403191）。

1.2　药品与主要试剂

当归（批号 230101）、黄芪（批号 230108）购于山西元和堂中药有限公司，经山西中医药大学中药与食品工程学院张朔生教授鉴定，分别为伞形科植物当归 *Angelica sinensis*（Oliv.）Diels 的干燥根、豆科植物蒙古黄芪 Astragalus membranaceus（Fisch.）Bge. var. mongholicus（Bge.）Hsiao 的干燥根。麝香保心丸（SBP，批号 C804625），购自上海和黄药业有限公司；对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷（质量分数≥98.8%，批号 111920-201907）、阿魏酸（质量分数≥99.4%，批号 110773-201915）购于中国食品药品检定研究院；乙腈、甲醇均为色谱纯。

2% TTC 染液（批号 G3005）、电镜固定液（批号 P1128）、三氯乙醛（批号 75-87-6），北京索莱宝科技有限公司；无水乙醇（批号 100092683）、二甲苯（批号 10023418）、正丁醇（批号 100052190）、丙酮（批号 1000418）、中性树胶（批号 10004160），国药集团化学试剂有限公司；戊巴比妥钠（上海曦耀生物科技有限公司，批号 Y2015012102）；812 包埋剂（SPI 公司，批号 90529-77-4）；锇酸（Ted Pella Inc 公司，批号 18456）；血管内皮生长因子（VEGF，批号 F2992-A）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF，批号 F2592-A），上海凡科维股份有限公司；通用型组织固定液（批号 G1101）、苏木素-伊红（HE）试剂盒（批号 G1076）、环保型脱蜡液（批号 G1128）、iF488-Tyramide（tsa）（批号 G1231）、FITC-Tyramide（tsa）（批号 G1222）、柠檬酸抗原修复液（批号 G1202）、EDTA 抗原修复液（批号 G1206）、牛血清白蛋白（BSA，批号 GC305010）、DAPI 染色试剂（批号 G1012）、抗荧光淬灭封片剂（批号 G1401）、CD31 抗体（批号 GB11063-2）、自噬微管相关蛋白轻链 3（LC3）抗体（批号 GB11124）、LC3I/II抗体（批号 GB113801）、Beclin-1 抗体（批号 GB112053）、β-actin 抗体（批号 GB15002），武汉赛维尔科技有限公司；CCK-8（批号 KGA317）、磷酸盐缓冲液（PBS，批号 KGB500），江苏凯基生物技术股份有限公司；96 孔板（批号 3599）、Transwell 小室（批号 3422），康宁公司；结晶紫细胞集落染色试剂盒（德国达姆施塔特默克集团，批号 C3886）；Matrigel（BD Bioscience 公司，批号 356234）；3-甲基腺嘌呤（MedChemExpress 公司，批号 110721）；F-12K 培养基（Gibco 公司，批号 21127）；10%胎牛血清（FBS，苏州依科赛生物科技股份有限公司，批号 FSS500）；兔抗 anti-β-actin 抗体（批号 ab8226）、Beclin 抗体（批号 ab207612）、LC3 抗体（批号 ab192890），Abcam 公司。

1.3　实验仪器

GZX-9140MBE 烘箱（上海博讯实业有限公司医疗设备）；JB-P5 包埋机、JB-L5 冻台（武汉俊杰电子有限公司）；RM2016 病理切片机（上海徕卡仪器有限公司）；KD-P 组织摊片机（浙江省金华市科迪仪器设备有限公司）；NIKON ECLIPSE E100 正置光学显微镜、NIKON DS-U3 成像系统（日本尼康）；RT-6100 酶标仪（Rayto 公司）；UC7 超薄切片机（Leica 公司）；HT7800 透射电子显微镜（HITACHI 公司）；18456 150 目铜网芳华膜载网（Ted Pella Inc）；D3024R 台式高速冷冻离心机（DRAGONLAB 公司）；KZ-III-FPS 低温研磨仪、MS6000 掌上离心机、SMV-4500B 涡旋混匀仪、MS-150 磁力搅拌器、DS-3D100 多功能型摇床、SVE-2 垂直电泳仪、SVT-2 转印电泳仪、SPW-6S 电泳电源（Servicebio 公司）；SPR80 制冰机（SIMAG 公司）；6100 化学发光仪（CLINX 公司）；Waters-e2695 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；SYU-10-300DT 超声波清洗机（郑州生元仪器有限公司）；AX224ZH/E 十万分之一电子天平（奥豪斯仪器有限公司）；SHZ-D 循环水真空泵（巩义市予华仪器有限责任公司）；FD-1A-50 冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）。

1.4　药液制备

DBD 水提物：分别称取黄芪 25.0 g 和当归 5.0 g，加入 10 倍量纯净水浸泡过夜，回流提取 1 h，滤过；滤渣加入 10 倍纯净水，回流提取 0.5 h，滤过后合并滤液，减压浓缩至相当于含生药量为 1 g·mL^{-1} 的浓缩液，用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过除菌，置于−20 ℃储存，长期保存放于−80 ℃冰箱，使用时用培养基稀释至所需浓度。采用相同的制备方法，减压浓缩制成生药含量 0.26、0.52、1.04 g·mL^{-1} 的药液，置于 4 ℃冰箱备用，用时 37 ℃水浴加热。毛蕊异黄酮葡萄糖苷和阿魏酸的质量分数分别为 0.836 4、0.196 9 mg·g^{-1}。

SBP 混悬液的制备：取 SBP，碾碎，加入适量温开水，制备成质量浓度为 6 mg·mL^{-1} 的混悬液，混匀后快速 ig，现用现配。

2　方法

2.1　动物分组及给药

将 90 只体质量为 200～220 g 的 SD 雄性大鼠

经 5 d 适应性喂养后，随机分为 6 组：假手术组、模型组、SBP（阳性对照，20 mg·kg^{-1}）组和 DBD 低、中、高剂量（1.56、3.12、6.24 g·kg^{-1}）组，每组各 15 只，除假手术组只穿线不结扎外，其余 5 组全部制作急性心肌缺血模型。术后 2 d 开始 ig 给药，每天 1 次，给药 7 d，假手术组与模型组均 ig 蒸馏水。

2.2 大鼠急性心肌缺血模型的制备

术前禁食 24 h，用 2%戊巴比妥钠（40 mg·kg^{-1}）ip 麻醉大鼠，仰卧位固定，颈部正中切开行气管插管，连接小动物呼吸机（潮气量 7 mL·min^{-1}，频率 70 次·min^{-1}，呼吸比为 5∶4），并借助II导联心电图（ECG）监测 ST 段和心率。胸前手术区去毛，用碘伏消毒后剪开皮肤，依次钝性分离肌肉层，于左侧胸骨旁 3、4 肋间开胸，撕开心包膜，轻压右侧胸廓，挤出心脏，用 7-0 聚丙烯缝线于左心耳下缘 2 mm、肺动脉圆锥之间结扎冠状动脉左前降支，以左前室壁变苍白，II 导联心电图 ST 段持续抬高 30 min 以上作为心肌梗死模型造模成功的标志。结扎后快速去除胸腔内的多余气体，用棉棒将胸腔内的残余血液擦拭干净，随后将胸大肌及皮肤逐一进行缝合，并用注射器吸除胸腔内空气，使胸腔内部形成负压状态，在其伤口表面涂以青霉素注射液。将大鼠放置于恒温电热毯上，慢慢减轻呼吸频率和潮气量，等到大鼠能自主呼吸，即可将气管插管拔出。待大鼠麻醉苏醒后，放回单笼喂养，于喂养 2 d 后开始 ig 给药。末次 ig 给药 1 h 后，ip 10%水合氯醛麻醉，进行取材。

2.3 TTC 染色法观察大鼠心肌梗死面积

大鼠腹主动脉取血后，迅速剪下心脏，用 PBS 冲洗，于−80 ℃冷冻 10 min 后，从心尖到心基底部平行将心脏切成约 2 mm 厚的切片（共 5～6 片），置于 37 ℃恒温的 2% TTC 染液中，染色过程中不时摇动或搅拌染色液，使之与心肌充分接触，染色 10～15 min 后取出，测量心肌梗死面积，梗死组织呈白色，非梗死组织呈红色，使用 Image Pro 软件分析梗死面积，以白色梗死面积与全切片面积的百分比作为梗死率。

2.4 HE 染色观察大鼠心肌形态学变化

快速取出心脏组织，置于 4%多聚甲醛中固定 48 h，石蜡包埋，切片。在光学显微镜 40 倍镜下进行观察并拍照。

2.5 ELISA 法测定大鼠血清 VEGF、bFGF 水平

各组大鼠麻醉后腹主动脉取血，3 000 r·min^{-1} 离心 20 min，吸取血清至无菌 EP 管，置于−80 ℃冰箱内保存。按照 ELISA 试剂盒说明书，使用酶标仪测定各组大鼠血清中 VEGF、bFGF 的吸光度（A）值，计算其表达水平。

2.6 透射电镜观察大鼠心肌组织超微结构及自噬小体

快速取出心脏，将各组的心脏样本快速切成 1 mm 厚的薄片，在戊二醛碳酸钠缓冲液中固定过夜，标本在蒸馏水中洗涤，用 2%四氧化锇和 0.5%醋酸铀酰染色，通过一系列乙醇和环氧丙烷脱水，包埋在环氧树脂中，聚合 3 d。切割成 90 nm 的超薄切片并安装在槽铜网格上，用醋酸铀酰和柠檬酸铅进行染色。使用配备 Veleta CCD 数码相机的透射电子显微镜，获取薄片图像。

2.7 Western blotting 法检测心肌组织中 Beclin-1、LC3 水平

取适量−80 ℃冻存的心脏组织，加入裂解液后进行组织匀浆，在 4 ℃条件下将其研磨粉碎，12 000 r·min^{-1} 离心 30 min，得到上清液并进行分装。取上清液，用 BCA 法对组织蛋白定量后，加入蛋白上样缓冲液混合，沸水浴加热 5～10 min 后，SDS-PAGE 法分离 30 μg 蛋白，转移到硝酸纤维素膜上，室温下封闭 2 h，然后与抗体 Beclin-1、LC3 和 β-actin 于 4 ℃孵育过夜，TBST 洗涤，与 HRP-羊抗兔 IgG 室温孵育 4 h。采用 ECL 发光试剂显影、定影，Image J 软件分析，以目标蛋白灰度值与内参的灰度值比值作为蛋白的相对表达水平。

2.8 免疫荧光共定位测定 CD31 与 LC3 的共表达

取大鼠心肌组织切片脱蜡、水化、修复组织抗原、BSA 封闭后，取 CD31 与 LC3 抗体于 4 ℃孵育过夜；洗涤切片后次日在避光条件下滴加 Alexa Flour®594 标记的驴抗大鼠 IgG（红光）和 FITC 标记山羊抗兔 IgG（绿光）的混合二抗，DAB 显色出各蛋白的阳性表达情况，所有的组化图片均于正置荧光显微镜下（×400）拍摄，采用 Image J 软件分析阳性细胞的表达。

2.9 细胞培养和缺氧细胞模型的制备

HUVECs 细胞在 F-12K 培养基中培养，培养箱中 5% CO_2 和 95%空气，温度为 37 ℃。将 HUVECs 混悬液（3×10^4 个·mL^{-1}）接种到 96 孔板中（每孔 100 μL），在无血清培养基中培养 24 h，设置对照组、

模型组、DBD（400 mg·L^{-1}）组，对照组在 37 ℃常氧（5% CO_2、95%空气）条件下培养，模型组在 37 ℃的缺氧培养箱（5% CO_2、95% N_2）中培养，DBD 组给药后在 37 ℃的缺氧培养箱（5% CO_2、95% N_2）中培养。培养 6、12、24、48 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，37 ℃避光孵育 2 h 后，使用酶标仪在 450 nm 处测量 A 值，计算细胞存活率。

设置对照组、DBD（200、400、600 mg·L^{-1}）组，在常氧和缺氧条件下培养 24 h，采用 CCK-8 法测定细胞存活率。

细胞存活率＝$A_{实验}/A_{对照}$

2.10　CCK-8 法检测细胞存活率

将 HUVECs 细胞悬液（5×10^4·mL^{-1}）接种到 96 孔板中（每孔 100 μL），在无血清培养基中孵育 24 h。细胞分为 6 组：对照组：常氧（5% CO_2、95%空气）37 ℃培养 24 h；模型组：在 37 ℃的缺氧培养箱（5% CO_2、95% N_2）中培养 24 h；单给 DBD 组：给予 400 mg·L^{-1} DBD 后，在常氧条件下培养 24 h；DBD 组：给予 400 mg·L^{-1} DBD 后，缺氧培养 24 h；单给 DBD＋3-MA 组：在常氧条件下给予 400 mg·L^{-1} DBD 和 5 mmol·L^{-1} 3-MA 培养 24 h；DBD ＋ 3-MA 组：给予 400 mg·L^{-1} DBD ＋ 5 mmol·L^{-1} 3-MA，缺氧培养 24 h。孵育结束时，采用 CCK-8 法测定细胞存活率。

2.11　Transwell 法测定细胞侵袭迁移能力

在 24 孔板中，下室中加入 500 μL 含 20% FBS 的完全培养基。将 HUVEC 悬液（每孔 1×10^4 个细胞）加入上室，分组、造模及给药同“2.10”项。37 ℃孵育 24 h 后，用棉签轻轻去除上室膜表面未迁移的细胞。将迁移的细胞用 PBS 洗涤 3 次，在多聚甲醛中固定 30 min，用 0.1%结晶紫溶液染色 30 min。在倒置显微镜下拍摄图像，随机选取 5 个视野进行细胞计数。实验重复 3 次，计算平均迁移细胞数。

2.12　Matrigel 胶辅助法测定细胞成管能力

细胞接种、造模、分组、给药操作同“2.10”项。将 Matrigel（200 μL）添加到 24 孔板的每个孔中，并在 37 ℃孵育 1 h，使其形成凝胶。将各组 HUVECs 细胞悬液（每孔 3×10^4 个细胞、500 μL）接种到 matrigel 包被的孔中。常氧条件下孵育 8 h 后，每孔拍摄 5 个随机视野，显微镜下观察管状网络形成情况。使用 Image J 软件分析每张图像中形成的管的数量。数据以相对于对照组的百分比表示。

2.13　Western blotting 检测 HUVECs 中 Beclin-1 和 LC3 蛋白的表达

细胞接种于 24 孔板（每孔 1×10^4 个细胞），分组、造模及给药操作同“2.10”项。收集细胞，在 4 ℃下涡旋 30 s，置于冰上 5 min。这一循环重复 5 次。在 4 ℃下以 12 000 r·min^{-1} 将样品离心 5 min，并收集上清液。使用 BCA 法测定蛋白浓度。等量蛋白用 5% SDS-PAGE 分离，转移到硝酸纤维素膜上。将膜置于 37 ℃、含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液中封闭 2 h，随后在 4 ℃下与 Beclin-1、LC3 和 β-actin 一抗孵育过夜。TBST 洗涤后，于室温下与 HRP 标记的抗兔 IgG 二抗孵育 4 h。采用增强化学发光（ECL）试剂显影，并用 Image J 软件分析条带。蛋白表达水平以相对于 β-actin 的灰度值比值表示。

2.14　统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD-t 检验。

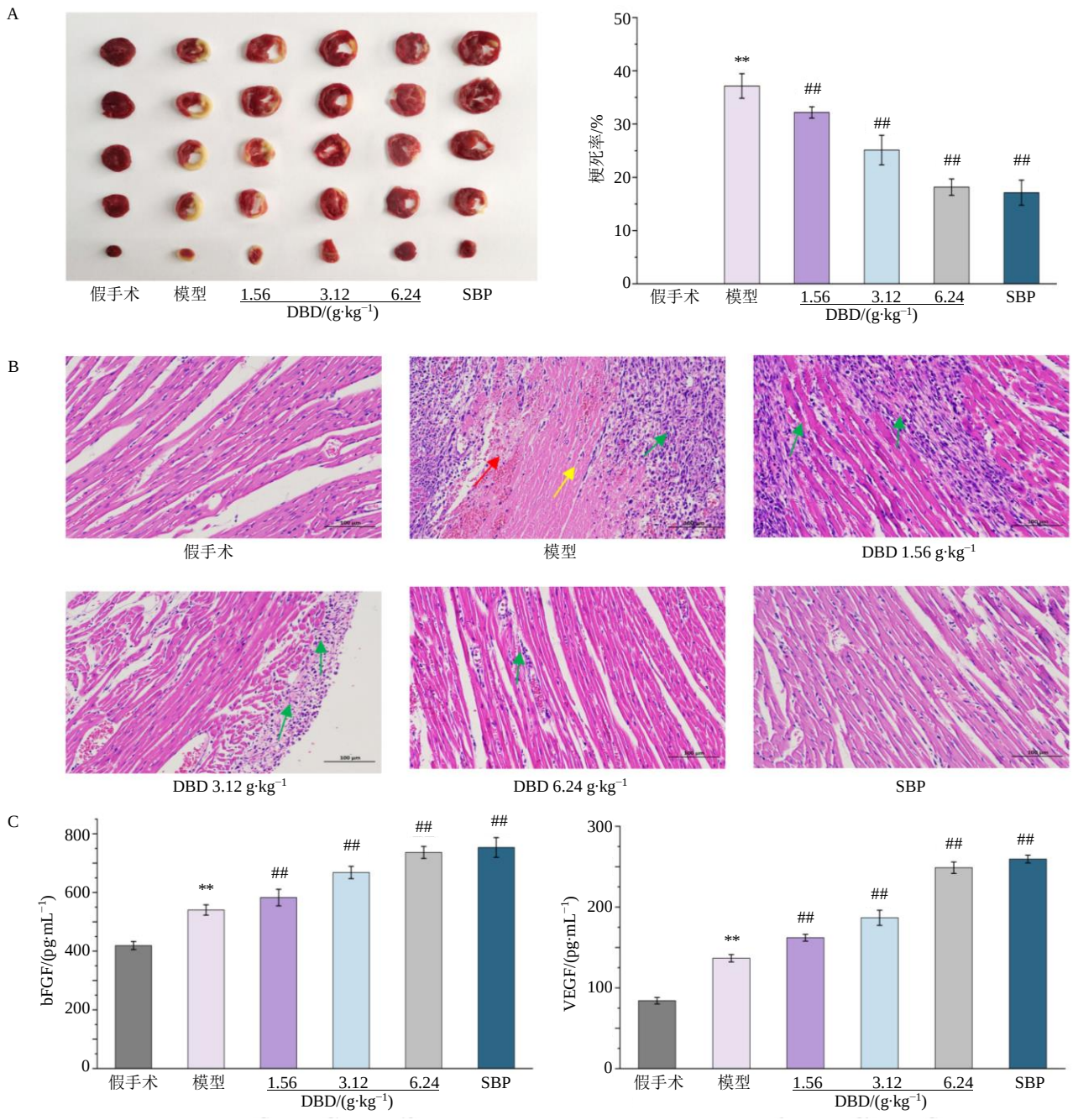
3　结果

3.1　DBD 对大鼠心肌缺血损伤及 VEGF 水平的影响

TTC 染色结果显示，心肌组织中的白色区域代表梗死区域，假手术组大鼠未发生心肌梗死，与假手术组大鼠相比，模型组梗死率显著增加（P＜0.01）；与模型组大鼠相比，经 DBD 各剂量及 SBP 给药后，心肌梗死率显著降低（P＜0.01），见图 1-A。

HE 染色结果显示，假手术组心肌组织结构正常，心肌纤维排列有序，细胞轮廓清晰，未见明显变性，组织未见明显炎症细胞浸润及纤维化；与假手术组大鼠相比，模型组大鼠心肌组织结构重度异常，大面积心肌细胞坏死变性，细胞轮廓消失，胞核碎裂，只见红色均染结构，周围可见炎症细胞灶性浸润，炎症灶中可见大量成纤维细胞增生，组织可见出血；经 DBD 各剂量及 SBP 给药后，心肌细胞均有不同程度变性，改善了部分炎症细胞浸润，可见少量纤维组织及炎症细胞增生，损伤程度较模型组减轻，见图 1-B。

ELISA 实验结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠血清中 VEGF 和 bFGF 含量显著增加（P＜0.01）；与模型组比较，经 DBD 各剂量及 SBP 给药后，VEGF 与 bFGF 含量显著增加（P＜0.01），见图 1-C。



A-各组大鼠心肌梗死面积比较，白色部分为梗死心肌（n=3）；B-DBD 对心肌缺血大鼠心肌组织形态学变化的影响（HE 染色，×200，n=3）；黄色箭头-胞核碎裂，只见红色均染结构；绿色箭头-炎症灶中成纤维细胞增生；红色箭头-组织出血；C-各组大鼠缺血损伤后血清中 VEGF、bFGF 的水平（n=6）；与假手术组比较：$^{**}P$<0.01；与模型组比较：$^{\#\#}P$<0.01。

A-comparison of myocardial infarct areas in rats of each group, the white areas represent infarcted myocardium (n = 3); B-effects of DBD on the morphological changes of myocardial tissues in myocardial ischemia rats (HE staining, ×200, n = 3); Yellow arrows-nuclear fragmentation, showing only uniformly stained red structures; Green arrows-fibroblast proliferation in the inflammatory foci; Red arrows-tissue hemorrhage; C-serum levels of VEGF and bFGF in rats of each group after ischemic injury (n = 6); $^{**}P$ < 0.01 *vs* sham group; $^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* model group.

图 1 DBD 对大鼠心肌缺血损伤及 VEGF 水平的影响（$\bar{x}\pm s$）

Fig. 1 Effects of DBD on myocardial infarction and level of VEGF in rats ($\bar{x}\pm s$)

3.2 DBD 对缺氧 HUVECs 细胞增殖、迁移及成管能力的影响

如图 2-A 所示，与对照组相比，各组细胞在缺氧 12、24、48 h 后存活率均显著下降（P<0.01）；与模型组比较，给予 DBD 后可显著抑制缺氧诱导的细胞死亡，且细胞在 24 h 时存活率达到峰值（P<

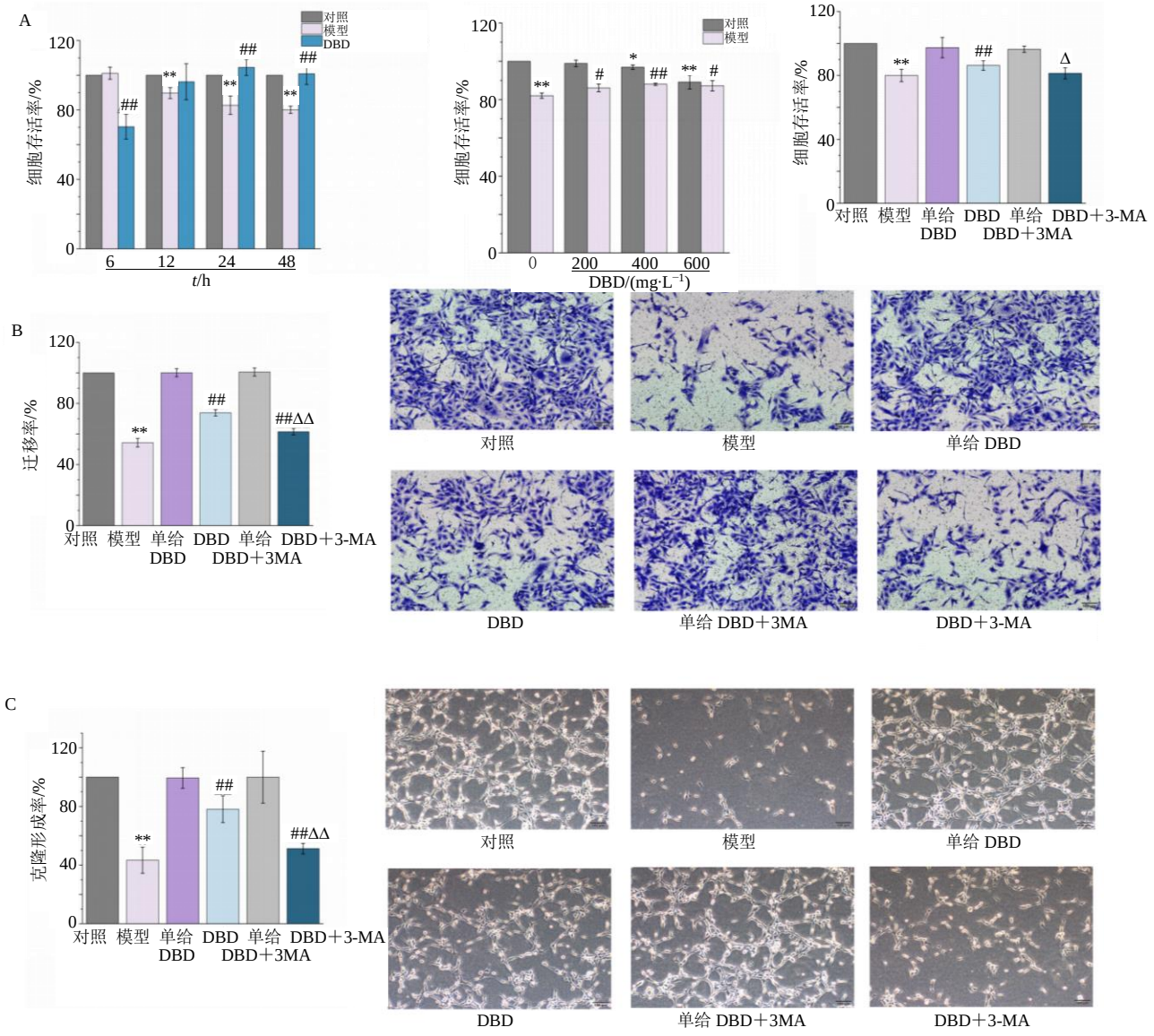
0.01）。因此，本研究选择 24 h 缺氧处理进行后续实验。

在常氧条件下，DBD 以浓度相关的方式降低细胞存活率；然而，在缺氧情况下，DBD 可显著提高细胞存活率，其中 400 mg·L^{-1} 的作用效果最强（P＜0.01），故本研究选定该浓度开展后续实验。

与对照组相比，模型组细胞存活率显著降低（P＜0.01）；与模型组比较，DBD 可显著改善缺氧条件下的细胞存活率降低（P＜0.01），3-MA 可显著抑制 DBD 的这种效应（P＜0.05）。

如图 2-B 所示，在常氧条件下，单给 DBD 可略微增加细胞迁移，但与对照组相比没有显著性差异；3-MA 对这一变化无显著影响。与对照组比较，模型组细胞迁移能力显著下降（P＜0.01），而 DBD 可恢复细胞的迁移水平（P＜0.01），且 3-MA 抑制了这一作用（P＜0.01）。

如图 2-C 所示，在常氧条件下，DBD 对细胞的管状结构形成及管长度均无显著影响；3-MA 的加入对上述指标的影响极小。与对照组比较，在缺氧条件下，模型组未见明显的管状结构，管状形成明



A-细胞存活率（n=6），；B-DBD 对缺氧 HUVECs 迁移的影响（×100，n=3）；C-DBD 对缺氧 HUVECs 管腔形成的影响（×100，n=3）；与对照组比较：$^{*}P$＜0.05　$^{**}P$＜0.01；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05　$^{\#\#}P$＜0.01；与 DBD 组比较：$^{\triangle}P$＜0.05　$^{\triangle\triangle}P$＜0.01。

A-cell viability (n = 6); B-effect of DBD on migration of hypoxic HUVECs (×100, n = 3); C-effect of DBD on tube formation of hypoxic HUVECs (×100, n = 3); $^{*}P$ < 0.05　$^{**}P$ < 0.01 *vs* control group; $^{\#}P$ < 0.05　$^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* model group; $^{\triangle}P$ < 0.05　$^{\triangle\triangle}P$ < 0.01 *vs* DBD group.

图 2　DBD 对缺氧 HUVECs 增殖、迁移及成管能力的影响（$\bar{x}\pm s$）

Fig. 2　Effects of DBD on function of endothelial cells after hypoxia ($\bar{x}\pm s$)

显减少（$P<0.01$）。经 DBD 处理后，HUVECs 开始形成管腔样结构，逐渐发展成稳定的管状网络，树干和分支清晰，与对照组比较差异有统计学意义（$P<0.01$）。3-MA 的加入抑制了这一作用，表现为管状结构的主干变短、分支数减少，且 DBD 组与 DBD＋3-MA 组间存在统计学差异（$P<0.01$）。

3.3 DBD 对缺血心肌组织及缺氧内皮细胞自噬水平的影响

透射电镜结果显示，假手术组心肌纤维结构完整，线粒体嵴界限清晰，肌丝排列有序，细胞间隙正常。相比之下，模型组心肌纤维出现严重结构异常，线粒体发生广泛损伤，具体表现为线粒体空泡化、肿胀、膜破裂、嵴断裂、基质密度降低，且可见自噬体（红色箭头标注）；与假手术组相比，该组线粒体数量亦有所减少。经 DBD 处理后，各组心肌纤维与线粒体的结构损伤均得到不同程度的缓解：其中 DBD 低、中剂量组虽观察到轻微改善，但线粒体肿胀与空泡化仍存在，且可见少量自噬体；而 DBD 高剂量组线粒体结构基本保持完整，基质密度均匀，嵴结构致密，分布规律，与模型组相比，该组线粒体与自噬体的数量均显著增加，见图 3-A。

为探究 DBD 是否通过调控心肌梗死大鼠的自噬水平来促进血管新生，本研究对自噬相关蛋白的表达情况进行了检测。通过检测 LC3-II/LC3-I与 Beclin-1 表达水平来评估自噬活性。与假手术组相比，模型组的 LC3-II/LC3-I与 Beclin-1 表达水平均显著升高（$P<0.01$）；与模型组相比，DBD 各剂量组的上述 2 项指标水平均进一步升高（$P<0.01$），见图 3-B。

采用免疫荧光共定位分析法，检测缺血心肌组织中自噬相关蛋白与血管标志物的表达情况。结果显示，假手术组中未检测到自噬活性；与假手术组相比，模型组中自噬相关蛋白 LC3 与血管内皮标志物 CD31 的共表达水平显著升高；与模型组相比，DBD 各剂量组的 LC3 与 CD31 共表达水平进一步升高，见图 3-C。

在常氧条件下，与对照组相比，单给 DBD 组 Beclin-1 表达水平及 LC3-II/LC3-I均显著升高（$P<0.01$）；加入 3-MA 可显著降低上述 2 项指标的水平（$P<0.05$、0.01）。在缺氧条件下，与对照组相比，模型组 Beclin-1 表达水平及 LC3-II/LC3-I同样显著升高（$P<0.01$）；DBD 处理可显著进一步升高上述水平（$P<0.01$），但 3-MA 抑制了这种作用（$P<0.01$）。见图 3-D。

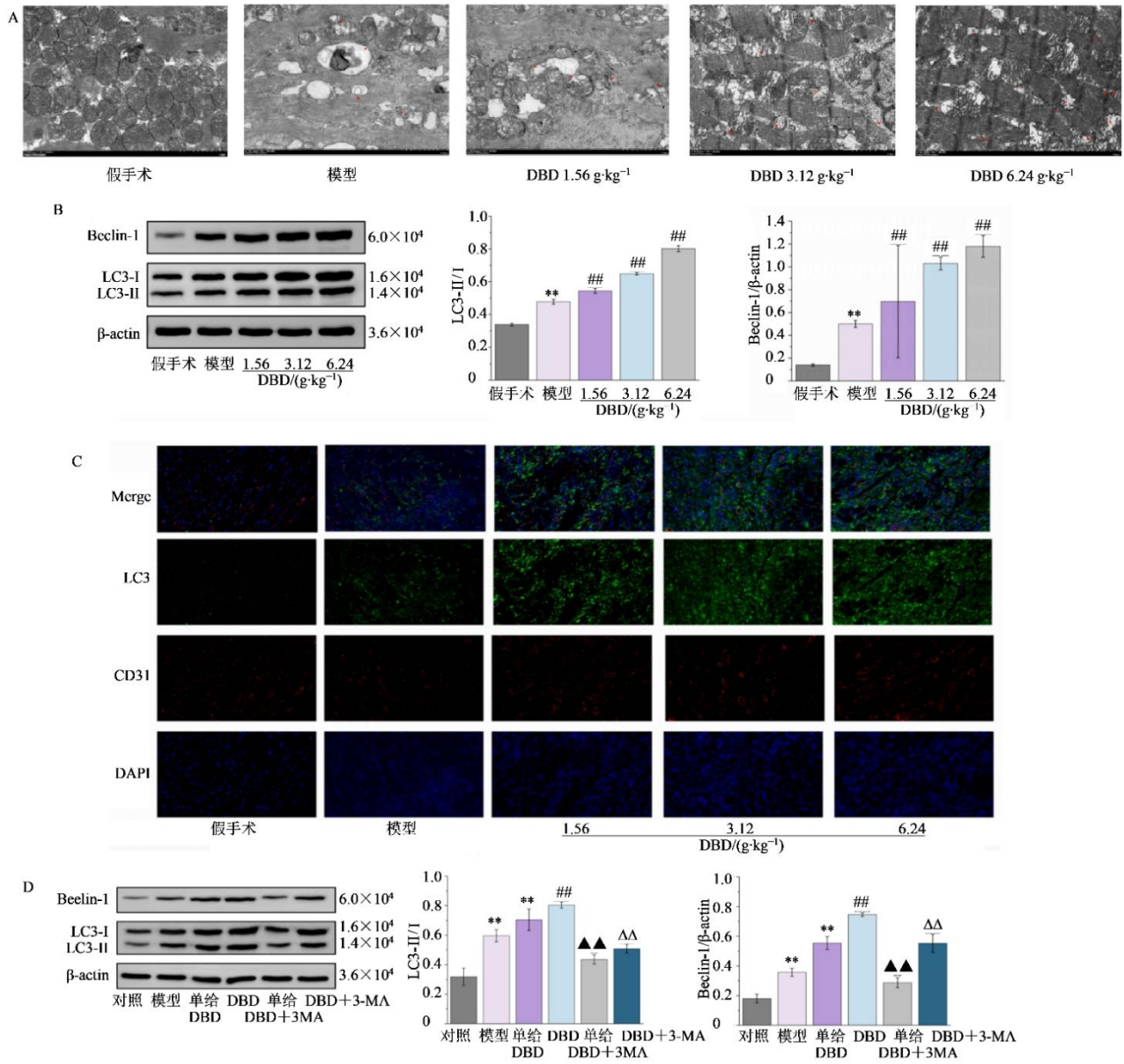
4 讨论

目前，IHD 的治疗以药物或手术恢复心肌血供为核心手段。然而，此类治疗可能增加心肌缺血、心肌梗死的发生风险，以及围手术期的发病率与死亡率。鉴于现有治疗方案的缺陷尚无理想解决策略，探索更为有效的治疗手段具有重要意义。

血管新生目前被认为是 IHD 的新型治疗途径。血管新生是指在原有血管基础上建立新的血管循环，以实现血供重建的过程。该过程涉及多种复杂的生物学行为，包括基底膜降解、内皮细胞增殖与迁移及血管结构形成等[15]，其中内皮细胞的增殖、迁移与管形成是血管新生的关键环节。近期研究发现，DBD 具有益气生血、促进造血及保护心血管系统的作用[16]；另有研究证实，DBD 可辅助急性心肌梗死患者的心室重构、改善心功能[17]，并能显著促进心肌血管新生[18]。本研究通过体内与体外联合实验，进一步探讨 DBD 是否具有促进血管新生的作用及相关机制。

在体内实验中，为明确 DBD 是否对大鼠心肌梗死具有保护作用、能否改善心肌病理功能损伤，本研究采用 TTC 染色对心肌梗死面积进行测定，采用 HE 染色对心肌组织进行测定；考虑到生长因子参与缺血组织的血管新生，影响心功能的恢复，故在病理检测中，为确定 DBD 是否会影响心肌缺血诱导的心肌血管新生，本研究采用 ELISA 法测定大鼠血清中 VEGF 及 bFGF 的表达水平。结果显示，模型组大鼠心肌梗死面积显著增大，心肌组织结构严重异常，细胞轮廓消失。经 DBD 干预后，与模型组相比，大鼠心肌梗死面积显著缩小，心肌纤维排列紊乱及心肌炎症细胞浸润等病理损伤程度均得到明显改善，且血清中 VEGF 与 bFGF 的表达水平显著升高。上述实验结果表明 DBD 可改善心肌缺血导致的心功能异常，发挥促血管新生作用。

自噬作为一种关键的生物过程，通过降解细胞内受损成分维持细胞稳态，它参与心血管等多种疾病，与心肌梗死的发生密切相关[19-20]。研究证实，机体发生心肌梗死时，自噬被激活以保护细胞，起初自噬对细胞具有保护作用，但若长期处于缺血缺氧状态，会导致线粒体功能异常，自噬通量受损，使受损蛋白质及细胞器无法降解，心肌细胞大量凋亡，而适当促进自噬可清除凋亡细胞，以达到保护



A-DBD 对心肌缺血大鼠心肌组织超微结构的影响（透射电镜，×7 000）。B-DBD 对心肌缺血大鼠 Beclin-1、LC3 蛋白表达的影响（n=3）；与假手术组比较：$^{**}P$<0.01；与模型组比较：$^{\#\#}P$<0.01。C-DBD 对 HUVECs 自噬作用的影响（免疫荧光，×400）；D-DBD 对缺氧 HUVECs 的 Beclin1 和 LC3 蛋白表达的影响（n=3）；与对照组比较：$^{**}P$<0.01；与模型组比较：$^{\#\#}P$<0.01；与 DBD 组比较：$^{\triangle\triangle}P$<0.01；与单给 DBD 组比较：$^{\blacktriangle\blacktriangle}P$<0.01。

A-Impact of DBD on the ultrastructure of myocardial tissue in myocardial ischemia rats (transmission electron microscopy, ×7 000). B- Impact of DBD on expression of Beclin-1 and LC3 proteins in myocardial ischemia rats (n = 3); $^{**}P$ < 0.01 *vs* sham group; $^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* model group. C- Impact of DBD on autophagy in HUVECs (immunofluorescence, ×400); D- Impact of DBD on the expression of Beclin1 and LC3 proteins in hypoxic HUVECs (n = 3); $^{**}P$ < 0.01 *vs* control group; $^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* model group; $^{\triangle\triangle}P$ < 0.01 *vs* DBD group; $^{\blacktriangle\blacktriangle}P$ < 0.01 *vs* DBD-only group.

图 3　DBD 对缺血心肌组织及缺氧内皮细胞自噬水平的影响（$\bar{x}\pm s$）

Fig. 3　Effects of DBD on autophagy levels in ischemic myocardial tissues and hypoxic HUVECs ($\bar{x}\pm s$)

受损心脏的作用[21-22]，因此调控自噬活性可能是保护心脏的一个重要治疗靶点。

为探究 DBD 是否通过调控血管内皮细胞自噬来改善受损心肌的超微结构，本研究采用透射电子显微镜技术与免疫荧光共定位法对受损心肌组织进行检测。实验结果显示，假手术组未出现自噬现象；大鼠发生心肌缺血损伤后，模型组血管内皮细胞自噬被激活，同时伴随线粒体数量显著减少，部分线粒体发生自噬，且整体自噬水平较低。经 DBD 处理后，大鼠心肌线粒体结构基本恢复正常，自噬

体数量较模型组显著增加，自噬相关蛋白 LC3 与血管内皮标志物 CD31 的荧光共表达率亦显著高于模型组。上述结果提示，DBD 可通过促进血管新生改善大鼠心肌缺血损伤，其机制可能与自噬调控相关。

在体外实验中，由于细胞实验浓度与动物实验浓度无法直接换算，本研究采用不同浓度的 DBD 处理 HUVECs。结果显示，常氧条件下 DBD 可抑制细胞活性，而缺氧条件下则表现为增强作用。除 200 mg·L^{-1} 外，其余质量浓度的 DBD 均对细胞活性具有显著增强效应，其中 400 mg·L^{-1} 时增强作用最为显著，因此最终选定该浓度用于后续实验。同理，在缺氧时间与细胞存活率的相关性研究中，缺氧 24 h 对细胞存活率的影响显著，且损伤程度呈中度水平，故该时间点被确定为后续实验条件。

随后，本研究在体外常氧、缺氧及自噬抑制条件下，对比分析了 400 mg·L^{-1} DBD 对 HUVECs 增殖、迁移及管腔形成能力的影响。常氧条件下，DBD 对细胞增殖、迁移及管腔形成均有促进作用，但与对照组相比差异无统计学意义；加入自噬抑制剂 3-MA 后，上述指标并没有显著变化。然而，缺氧条件下，DBD 可显著提高 HUVECs 的增殖、迁移及管腔形成能力，而 3-MA 的加入可逆转这一效应。上述结果提示，缺氧条件下 DBD 可能通过调控自噬，增强缺氧 HUVECs 的增殖、迁移与管腔形成能力，进而促进血管新生。

自噬发生的重要环节是自噬小体的形成，而自噬小体形成过程中受多种自噬相关蛋白及基因调控，其中 Beclin-1 是自噬相关基因 Atg6 同源物，对自噬体形成及成熟起着关键作用，最早由 Levine 等发现[23]。它包含 3 个主要结构域：Bcl-2 同源-3（BH3）基序，一个卷曲螺旋结构域（CCD）和一个进化保守结构域（ECD）[24]。其中，短链 BH3 基序作为促凋亡受体，在细胞凋亡调控中发挥重要作用，进化保守结构域能够与自噬调控功能蛋白 Vps34 结合。Beclin-1 通过其结构域与自噬调控蛋白相互作用，参与自噬的发生与转化过程，从而影响自噬水平[25-26]。在缺氧早期，自噬被激活以保护细胞，而在持续缺氧状态下，自噬不足则会促进细胞凋亡[27]。研究表明，缺氧缺血条件下 Beclin-1 表达水平与心肌细胞凋亡呈正相关，这提示 Beclin-1 与心肌缺血缺氧损伤密切相关[22]。LC3 是自噬体形成的标志蛋白之一，在自噬体形成早期与自噬体膜结合，参与自噬体膜结构的延伸和解体[28]，其最初在胞浆中形成 LC3-I，之后与 Atg7 反应被修饰成为自噬体膜结合物 LC3-II，LC3-I 转化为 LC3-II 的过程标志着自噬体的形成，常测定 2 者比值指示自噬水平[29]。

本研究采用 Western blotting 检测假手术组、模型组及 DBD 给药组大鼠的心肌组织，以观察 DBD 对 MI 大鼠心肌组织中 Beclin-1、LC3Ⅱ/LC3I 表达的影响。结果显示，大鼠发生急性心肌缺血后，缺血心肌细胞的自噬功能被激活；经 DBD 干预后，Beclin-1、LC3Ⅱ/LC3I 表达水平显著升高。进一步通过 Western blotting 对比分析 DBD 在常氧、缺氧及自噬抑制剂处理条件下对 HUVECs 中 Beclin-1、LC3Ⅱ/LC3I 表达的影响。结果表明，DBD 在常氧与缺氧条件下均能显著提高 Beclin-1、LC3Ⅱ/LC3I 的蛋白表达水平；而自噬抑制剂的加入则会显著抑制上述作用。这些结果表明，DBD 可通过调节自噬促进血管新生。

本研究通过体内外实验证实，DBD 可在缺血缺氧条件下促进血管新生，其作用机制与调控自噬反应密切相关。体内大鼠心肌缺血模型中，DBD 能显著缩小心肌梗死面积、改善心肌病理损伤，上调血清 VEGF 和 bFGF 表达，同时激活心肌组织自噬，增加自噬小体数量及 Beclin-1、LC3II/LC3I蛋白表达。体外 HUVECs 缺氧模型中，DBD 可提升细胞存活率、促进迁移与管腔形成，同样上调自噬相关蛋白水平；而自噬抑制剂 3-MA 能显著抑制上述作用。

本研究结果表明，DBD 通过激活自噬通路发挥促血管新生效应，为缺血性心脏病的临床治疗提供了参考。后续仍需深入探究其调控自噬的具体分子靶点，进一步完善作用机制研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Severino P, D'Amato A, Pucci M, et al. Ischemic heart disease and heart failure: Role of coronary ion channels [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3167.

[2] Virani S S, Alonso A, Benjamin E J, et al. Heart disease and stroke statistics—2020 update: A report from the American Heart Associatio [J]. Circulation, 2020, 141: e139-e596.

[3] Losordo D W, Vale P R, Isner J M. Gene therapy for myocardial angiogenesis [J]. Am Heart J, 1999, 138(2):

S132-S141.

[4] 高俪原. 莪术醇调控 LSEC 自噬与血管新生在抗肝纤维化中的作用及其分子机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
Gao L Y. Research on the role of gastrodin in regulating LSEC autophagy and angiogenesis in anti-liver fibrosis and its molecular mechanism [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2021.

[5] Sachdev U, Cui X D, Hong G Y, et al. High mobility group box 1 promotes endothelial cell angiogenic behavior *in vitro* and improves muscle perfusion in vivo in response to ischemic injury [J]. J Vasc Surg, 2012, 55(1): 180-191.

[6] Nishikawa T, Tsuno N H, Okaji Y, et al. The inhibition of autophagy potentiates anti-angiogenic effects of sulforaphane by inducing apoptosis [J]. Angiogenesis, 2010, 13(3): 227-238.

[7] Niu J L, Wang K K, Zhelyabovska O, et al. MCP-1-induced protein promotes endothelial-like and angiogenic properties in human bone marrow monocytic cells [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2013, 347(2): 288-297.

[8] Shen W L, Tian C, Chen H, et al. Oxidative stress mediates chemerin-induced autophagy in endothelial cells [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 55: 73-82.

[9] De Meyer G R Y, Grootaert M O J, Michiels C F, et al. Autophagy in vascular disease [J]. Circ Res, 2015, 116(3): 468-479.

[10] Ye T S, Zhang Y W, Zhang X M. Protective effects of Danggui Buxue Tang on renal function, renal glomerular mesangium and heparanase expression in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(6): 2477-2483.

[11] 胡静, 李科, 李爱平, 等. 当归补血汤物质基础研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5658-5663.
Hu J, Li K, Li A P, et al. Research progress on material basis of Danggui Buxue Decoction [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(21): 5658-5663.

[12] Li T T, Guo Y J, Ren J, et al. Danggui Buxue decoction improves heart function of chronic intermittent hypoxia mice by promoting mitochondrial autophagy and inhibiting cardiomyocyte apoptosis[J]. Chin J Chin Mater Med, 2022, 47(11): 3066-3072.

[13] 夏禹. 丹红注射液联合当归补血汤对急性心肌梗死患者心室重构及心功能的影响 [J]. 光明中医, 2021, 36(1): 77-79.
Xia Y. Effect of Danhong injection combined with Danggui Buxue decoction on ventricular remodeling and cardiac function in patients with acute myocardial infarction [J]. Guangming J Chin Med, 2021, 36(1): 77-79.

[14] Cui M D, Pan Z H, Pan L Q. Danggui Buxue extract-loaded liposomes in thermosensitive gel enhance *in vivo* dermal wound healing via activation of the VEGF/PI3K/Akt and TGF-β/smads signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 8407249.

[15] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine [J]. Nature, 2005, 438(7070): 932-936.

[16] Sun L, Li J H, Li J, et al. Effects and mechanism of Pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) leaves on proliferation, migration, and tube formation of hypoxic human umbilical vein endothelial cells *in vitro* [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 114394.

[17] Yuan C. Effect of Danggui Buxue Decoction on ventricular remodeling and cardiac function in patients with acute myocardial infarction [J]. Cardiovasc Dis Electron J Integr Tradit Chin West Med, 2019, 7:165.

[18] 王时光, 周婧, 高阳, 等. 当归补血汤含药血清对大鼠心肌微血管内皮细胞缺氧/复氧损伤的影响 [J]. 西部中医药, 2019, 32(9): 5-8.
Wang S G, Zhou J, Gao Y, et al. Effects of serum containing Danggui Buxue decoction on anoxia/reoxygenation injury of rat myocardial microvascular endothelial cells [J]. West J Tradit Chin Med, 2019, 32(9): 5-8.

[19] 梁荣珍, 王太成, 林德文, 等. 艾帕素 13 (apelin-13)通过阻断 PINK1/parkin 信号通路促进线粒体自噬改善大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2023, 39(11): 981-987.
Liang R Z, Wang T C, Lin D W, et al. Apelin-13 promotes mitochondrial autophagy and improves rat myocardial ischemia-reperfusion injury by blocking PINK1/parkin signaling pathway [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2023, 39(11): 981-987.

[20] Lu L, Li D X, Chen W, et al. Bradykinin-(1–9) mitigates autophagy through upregulating PI3K/Akt in rats with myocardial infarction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 660: 35-42.

[21] Klionsky D J, Petroni G, Amaravadi R K, et al. Autophagy in major human diseases [J]. EMBO J, 2021, 40(19): EMBJ2021108863.

[22] Yan H, Xu J J, Li W, L et al. Proctective effect of microRNA-30a on regulating beclin-1 expression in hypoxia-reoxygenated neonatal rat cardiomyocytes [J]. Chin J Pathophysiol, 2012, 28: 583-588.

[23] Li Z D, Chen B, Wu Y Q, et al. Genetic and epigenetic

silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 98.

[24] Fu L L, Cheng Y, Liu B. Beclin-1: Autophagic regulator and therapeutic target in cancer [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(5): 921-924.

[25] Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, et al. Beclin1: A role in membrane dynamics and beyond [J]. Autophagy, 2012, 8(1): 6-17.

[26] Sahni S, Merlot A M, Krishan S, et al. Gene of the month: BECN1 [J]. J Clin Pathol, 2014, 67(8): 656-660.

[27] Mazure N M, Pouysségur J. Hypoxia-induced autophagy: Cell death or cell survival [J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 177-180.

[28] Kaufmann A, Beier V, Franquelim H G, et al. Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly [J]. Cell, 2014, 156(3): 469-481.

[29] Wei Y, Ren J, Luan Z, et al. Effects of various autophagy modulators on the expression of autophagic markers LC3II and p62 [J]. J China Pharm Univ, 2018: 341-347.

[责任编辑 兰新新]