

# STAT3介导AngII诱导的血管平滑肌细胞自噬

魏海凉<sup>1</sup> 欧阳恩鸿<sup>1</sup> 封芬<sup>1</sup> 李勇杰<sup>1</sup> 李帅<sup>2</sup> 秦旭平<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>邵阳学院药理教研室, 邵阳 422000; <sup>2</sup>南华大学药物药理研究所血管生物学实验室, 衡阳 421000)

**摘要** 该文旨在探讨信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)在血管紧张素II(Angiotensin II, AngII)诱导的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)自噬中的作用。体外培养VSMCs, 经STAT3磷酸化抑制剂预处理以及小干扰RNA技术沉默STAT3基因后检测AngII对其自噬活性的影响。LC3蛋白turnover实验检测自噬流, Western blot检测通路蛋白ph-STAT3<sup>(Tyr705)</sup>、STAT3及自噬标志性蛋白LC3-II、Beclin1的表达。结果显示, AngII促进自噬标志性蛋白LC3-II、Beclin1的表达, 且呈AngII浓度和时间依赖性, 以 $10^{-7}$  mol/L AngII刺激VSMCs 24 h后LC3-II、Beclin1增加最明显( $P < 0.01$ )。Chloroquine(氯喹)的预处理能进一步增加AngII诱导的LC3-II表达( $P < 0.05$ )。STAT3磷酸化抑制剂Cryptotanshinone(隐丹酮)和STAT3-siRNA都能逆转AngII诱导的自噬标志性蛋白LC3-II、Beclin1的表达( $P < 0.05$ )。该项研究结果表明, AngII诱导的VSMCs自噬与STAT3信号通路活化有关, 抑制STAT3的磷酸化及基因沉默STAT3可逆转AngII诱导的VSMCs自噬。

**关键词** 自噬; 信号转导和转录激活因子3; 血管紧张素II; 血管平滑肌细胞

## STAT3 Involvement in AngII-Induced Autophagy in Vascular Smooth Muscle Cells

WEI Hailiang<sup>1</sup>, OUYANG Enhong<sup>1</sup>, FENG Fen<sup>1</sup>, LI Yongjie<sup>1</sup>, LI Shuai<sup>2</sup>, QIN Xuping<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Shaoyang University, Shaoyang 422000, China; <sup>2</sup>Laboratory of Vascular Biology, Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421000, China)

**Abstract** This study aimed to explore the effect of STAT3 on AngII (Angiotensin II)-induced autophagy in VSMCs (vascular smooth muscle cells). The AngII-induced autophagy in VSMCs was detected after STAT3 phosphorylation inhibitor pretreatment or STAT3 gene silencing. Autophagy flow was detected by LC3 protein turnover experiment, and the expression levels of ph-STAT3<sup>(Tyr705)</sup>, STAT3, LC3II, Beclin1 were detected by Western blot. The results showed that the expression of autophagy marker proteins LC3-II, Beclin1 in an AngII concentration and treatment time-dependent manner. LC3-II and Beclin1 increased most significantly after VSMCs stimulated by  $10^{-7}$  mol/L AngII for 24 h ( $P < 0.05$ ). Pretreatment of Chloroquine could further increase AngII-induced LC3-II ( $P < 0.05$ ). The expression levels of LC3II and Beclin1 were reversed by STAT3 phosphorylation inhibitor of Cryptotanshinone and STAT3 gene silencing ( $P < 0.05$ ). It is possibly that AngII promotes autophagy in VSMCs by activating STAT3 signaling pathway and AngII-induced autophagy can be reversed by STAT3 phosphorylation inhibitor or STAT3 gene silencing.

**Keywords** autophagy; signal transducer and activator of transcription 3; Angiotensin II; vascular smooth muscle cells

收稿日期: 2020-06-13 接受日期: 2020-10-13

国家自然科学基金(批准号: 81173060)、湖南省教育厅科学研究项目(批准号: 16C1446)和邵阳市科技计划项目(批准号: 2017FJ12)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0734-8160781, E-mail: qinxp333@hotmail.com

Received: June 13, 2020 Accepted: October 13, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81173060), Foundation of Scientific Research Project of Education Department of Hunan Province (Grant No.16C1446), and Foundation of Science and Technology Planning Project of Shaoyang (Grant No.2017FJ12)

\*Corresponding author. Tel: +86-734-8160781, E-mail: qinxp333@hotmail.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5401>

自噬是细胞通过降解自身成分(蛋白质、核酸、脂类、糖类等)实现细胞器更新以维持细胞内稳态的管家机制,也是细胞适应外源性刺激的应激和防御机制,是多种自噬基因和信号通路参与的一种细胞分解代谢过程<sup>[1]</sup>。研究发现,自噬参与了肿瘤<sup>[2-3]</sup>、神经退行性疾病<sup>[4]</sup>、感染<sup>[5]</sup>、心血管<sup>[6]</sup>等多种疾病的病理过程。在心血管疾病发生和发展进程中,自噬通过调控血管细胞的增殖、迁移、凋亡、衰老<sup>[7-9]</sup>等生物学过程影响血管功能从而参与心血管疾病的病理进程。

介导自噬的因素众多,涉及多条信号通路和多种蛋白质分子的变化,主要包括:mTOR复合体、Beclin1复合体、Src家族激酶、AMPK、Ras/PKA等<sup>[10-11]</sup>。STAT3为细胞内重要的信号转导因子。近年的研究发现,在肿瘤病理进程中,肿瘤细胞中存在STAT3和自噬水平的改变和异常,如细胞核中磷酸化的STAT3通过上调唯BH3域自噬蛋白BNIP3的表达促进细胞自噬<sup>[12]</sup>。而胞质中的STAT3磷酸后,触发自噬相关蛋白去磷酸化后转移入核,最终上调*ULK2*、*Beclin1*等自噬基因的表达诱发自噬<sup>[13]</sup>。因此,STAT3的磷酸化在调节肿瘤细胞的自噬中发挥重要作用。

对血管细胞的研究证实,自噬参与了多种细胞因子、血管活性物质等诱导的VSMCs增殖<sup>[14]</sup>。血管活性物质AngII在多种心血管重构性疾病的病变组织中都有高表达。研究发现,AngII通过自噬途径影响血管内皮细胞<sup>[15]</sup>、心肌细胞<sup>[16-17]</sup>、巨噬细胞凋亡<sup>[18]</sup>及心肌成纤维细胞的增殖和迁移<sup>[19]</sup>。AngII对自噬的调控机制包括NADPH氧化酶-ROS和ROCK(RhoA/Rho Kinase)等途径<sup>[20-21]</sup>。AngII与AT1受体结合后启动酪氨酸磷酸化的级联反应,使STAT3酪氨酸残基磷酸化而活化。那么STAT3的磷酸化是否介导AngII诱导的血管细胞自噬?因此,本研究以VSMCs为研究对象,检测AngII对VSMCs自噬活性的影响及探讨STAT3信号途径在其中发挥的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人主动脉血管平滑肌细胞株(human aortic vascular smooth muscle cells, HASMCs)购于ATCC,由南华大学药物药理研究所血管生物学实验室常规保存。

### 1.2 实验试剂及仪器

胎牛血清DMEM高糖培养基购自Gibco公司。AngII购自Sigma公司。Cryptotanshinone(隐丹酮)、Chloroquine(氯喹)购自MCE公司。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自上海索莱宝生物科技有限公司(用于配制)。SDA-PAGE凝胶配制试剂盒、蛋白裂解液RIPA、BCA蛋白定量试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。ECL发光试剂盒及PVDF膜购自美国Millipore公司。STAT3、ph-STAT3一抗购自CST公司。 $\beta$ -actin一抗购自Proteintech公司。Beclin1、LC3一抗均购自Abcam公司。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗和山羊抗鼠二抗均购自武汉三鹰生物技术公司。STAT3低表达质粒及空载体质粒均由上海吉玛公司合成。Lipofectamine™ 3000 DNA转染试剂购自Invitrogen公司。

仪器包括:Forma 3111 CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo公司)、超净工作台(苏净集团,苏州安泰空气净化有限公司)、小型垂直电泳仪(美国BIO-RAD公司)、半干转膜仪(美国BIO-RAD公司)、Alpha-mager TM2200凝胶成像系统(Alpha Innotech Corporation公司)。

### 1.3 细胞培养

细胞用含10%胎牛血清、DMEM高糖培养基放置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。细胞融合度达到80%左右时传代,传代后生长至对数成长期的细胞用于后继实验。

### 1.4 Western blot检测蛋白表达水平

收集的细胞经4℃预冷的PBS洗涤3次,加入按RIPA(强):PMSF(100 mmol/L)=6:1配制的细胞裂解液充分裂解细胞,提取总蛋白质,BCA法测蛋白浓度。取40  $\mu$ g煮沸变性的蛋白质样品上样,经12% SDS-PAGE凝胶电泳分离后,通过半干转仪将蛋白质转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,分别加入一定稀释比例的Beclin1、LC3、STAT3、ph-STAT3和 $\beta$ -actin抗体,4℃孵育过夜,次日用TBST洗膜3次,每次15 min,接着加入相应的二抗室温孵育45 min,重复上述洗膜步骤。最后用ECL化学发光试剂凝胶成像显影。以 $\beta$ -actin为内参,使用Alpha-mager 2200图像分析软件进行半定量统计分析。实验重复3次。

### 1.5 STAT3抑制剂实验

将对数生长期的细胞消化接种到6孔板中,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,待细胞处于对数

生长期时加入STAT3磷酸化抑制剂Cryptotanshinone预处理30 min后,再加入 $10^{-7}$  mol/L AngII处理24 h,同时设立阴性对照和溶剂DMSO对照组,每组设3个复孔。收集细胞,Western blot法检测STAT3、ph-STAT3及自噬相关蛋白LC3B、Beclin1的表达情况。

### 1.6 LC3蛋白turnover实验

将处于对数生长期细胞用50  $\mu$ mol/L Chloroquine预处理30 min后加入 $10^{-7}$  mol/L AngII处理24 h,收集细胞,Western blot法检测LC3-II蛋白表达量。实验重复3次。

### 1.7 细胞转染

以每孔 $1 \times 10^6$ 个VSMCs细胞接种于6孔板,采用Lipofectamine™ 3000 DNA转染试剂将STAT3干扰质粒和相应空载转染VSMCs细胞,每组设3个复孔,转染操作按说明书进行。细胞转染48 h后加入 $10^{-7}$  mol/L AngII继续培养24 h,收集细胞用于后续实验。

### 1.8 统计学分析

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Graphpad prism 5软件分析,两组之间的比较使用*t*检验,多组之间的比较采用单因素的方差分析(One-Way ANOVA)来进

行检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

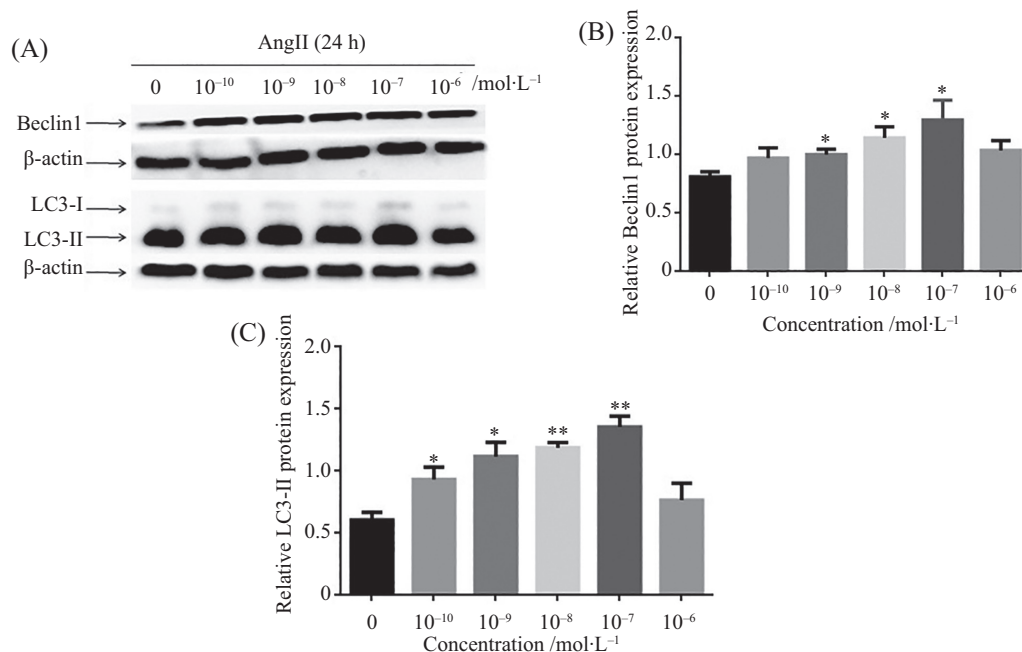
## 2 结果

### 2.1 AngII浓度、时间依赖性上调VSMCs自噬标志性蛋白的表达

以不同浓度AngII( $10^{-10}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  mol/L)孵育VSMCs 24 h及选取 $10^{-7}$  mol/L的AngII孵育VSMCs不同时间(0、6、12、24、36 h),Western blot法检测自噬相关蛋白的表达水平。实验结果显示,在 $10^{-10}$ ~ $10^{-7}$  mol/L的浓度范围内,LC3-II、Beclin1的蛋白表达量呈AngII浓度依赖性。与对照组相比,从 $10^{-9}$  mol/L浓度开始LC3-II、Beclin1蛋白表达明显增多,具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图1A~图1C)。经 $10^{-7}$  mol/L AngII孵育VSMCs 6、12、24 h,LC3-II、Beclin1蛋白的表达呈时间依赖性地上调,与对照组相比,从6 h开始LC3-II、Beclin1蛋白的表达明显增多,具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图2A~图2C)。经 $10^{-7}$  mol/L AngII处理36 h后LC3-II、Beclin1蛋白表达呈下降趋势。

### 2.2 AngII诱发VSMCs自噬流

LC3蛋白turnover实验进一步检测AngII对



A: Western blot检测以不同浓度AngII处理24 h后VSMCs的Beclin1、LC3-II蛋白水平; B、C: 不同浓度AngII处理24 h后VSMCs的Beclin1、LC3-II蛋白水平的半定量分析结果; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与0 mol/L组比较。

A: levels of Beclin1, LC3-II in VSMCs treated with AngII at different concentrations were detected by Western blot, normalized to  $\beta$ -actin; B,C: semi-quantitative analysis of Beclin1, LC3-II levels in VSMCs treated with AngII at different concentrations, normalized to  $\beta$ -actin; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with 0 mol/L group.

图1 AngII与自噬相关蛋白的量效

Fig.1 Dose relationship between AngII and autophagy proteins

VSMCs自噬活性的影响。结果显示, Chloroquine的预处理不仅使VSMCs基础的LC3-II水平升高, 而且在AngII存在的条件下, Chloroquine的预处理也增加了VSMCs的LC3-II表达, 结果具有统计学意义( $P<0.05$ )(图3A和图3B)。

### 2.3 STAT3Y705的磷酸化参与了AngII诱导的VSMCs自噬

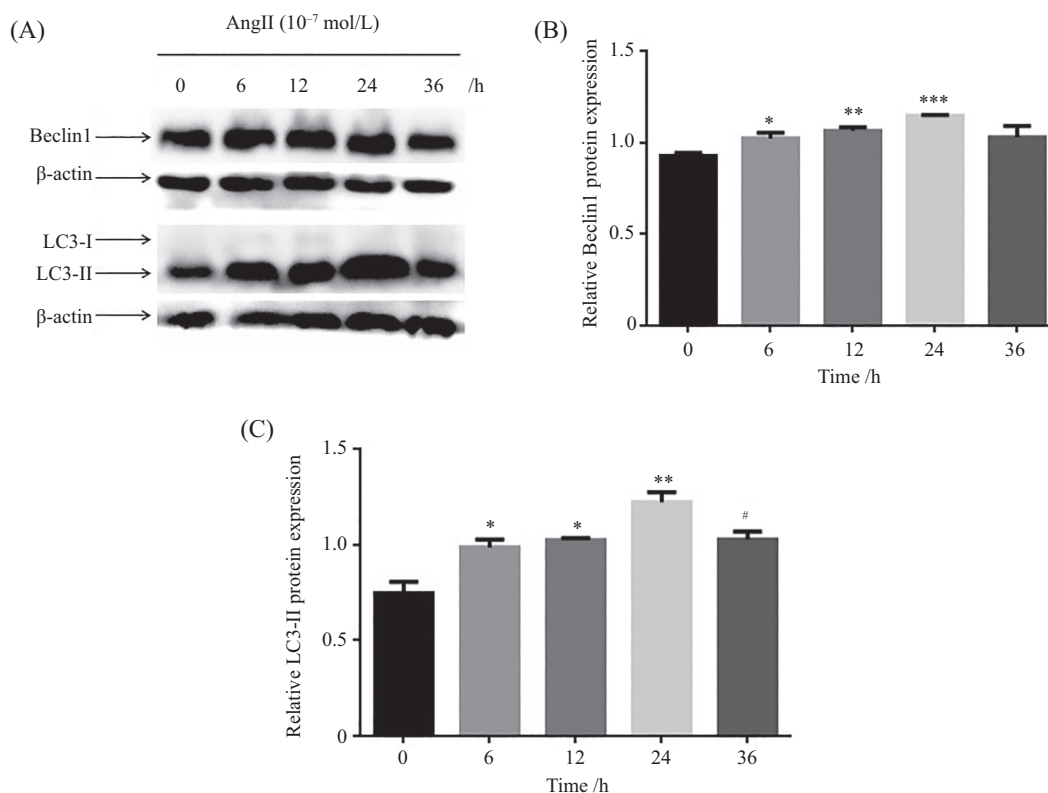
**2.3.1 AngII促进STAT3Y705磷酸化** 不同浓度AngII( $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$  mol/L)孵育VSMCs 24 h后Western blot法检测STAT3、ph-STAT3<sup>(Tyr705)</sup>表达水平。结果显示, 在 $10^{-10}$ ~ $10^{-7}$  mol/L的浓度范围内, ph-STAT3<sup>(Tyr705)</sup>表达量呈AngII浓度依赖性地上调, 具有统计学意义( $P<0.05$ )(图4A和图4B)。与 $10^{-7}$  mol/L相比,  $10^{-6}$  mol/L AngII使ph-STAT3<sup>(Tyr705)</sup>表达下降。而AngII的浓度并未影响STAT3的表达。

**2.3.2 STAT3<sup>(Tyr705)</sup>磷酸化抑制剂Cryptotanshinone抑制AngII诱导的VSMCs自噬** STAT3抑制剂实验

结果显示, 与AngII组相比, AngII+Cryptotanshinone组ph-STAT3<sup>(Tyr705)</sup>的表达明显下降, 具有统计学意义( $P<0.05$ )(图5A和图5B), STAT3的表达均无变化。同时AngII+Cryptotanshinone组自噬相关蛋白Beclin1、LC3-II的表达明显减少, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ )(图5A、图5C~图5E)。

### 2.4 siRNA-STAT3逆转AngII诱导的自噬

采用小干扰技术沉默STAT3基因, 观察STAT3信号通路在AngII诱导VSMCs自噬中的作用。结果显示, siRNA NC组和siRNA STAT3组的细胞发出大量绿色荧光(图6A和图6B), 说明质粒转染成功。与Control相比, siRNA NC组STAT3的表达没有明显变化, 而siRNA STAT3组STAT3蛋白的表达明显减少, 具有统计学意义( $P<0.05$ )(图7A和图7B)。与AngII组相比, AngII+siRNA STAT3组STAT3、LC3-II、Beclin1蛋白的表达明显下降, 具有统计学意义( $P<0.05$ )(图8A~图8D)。而与AngII组相比, 空载体组的STAT3、LC3-II、

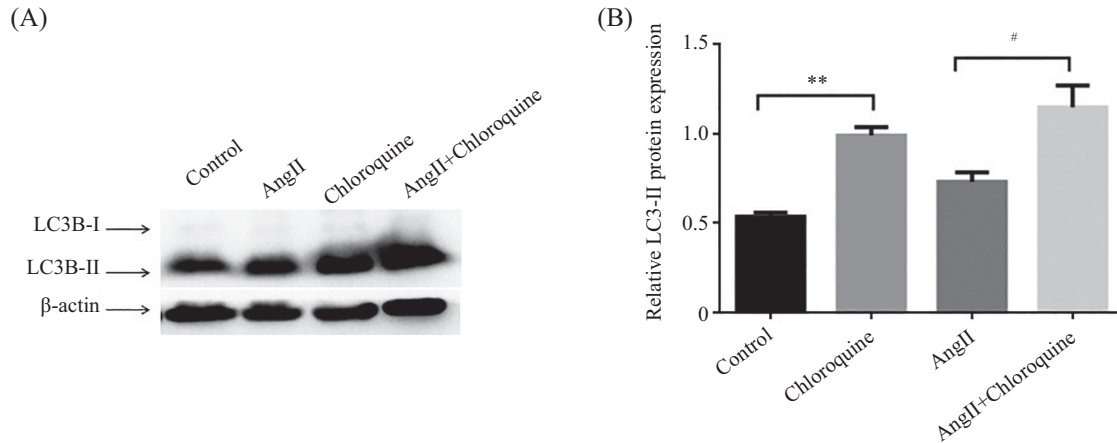


A: Western blot检测 $10^{-7}$  mol/L AngII处理不同时间后VSMCs的Beclin1、LC3-II蛋白水平; B、C:  $10^{-7}$  mol/L AngII处理不同时间后VSMCs的Beclin1、LC3-II蛋白水平的半定量分析结果; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与0 h组比较; # $P<0.05$ , 与24 h组比较。

A: levels of Beclin1, LC3-II in VSMCs treated with  $10^{-7}$  mol/L AngII at different time were detected by Western blot, normalized to  $\beta$ -actin; B,C: semi-quantitative analysis of Beclin1, LC3-II levels in VSMCs treated with  $10^{-7}$  mol/L AngII at different points, normalized to  $\beta$ -actin; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with 0 h group; # $P<0.05$  compared with 24 h group.

图2 AngII与自噬相关蛋白的时效关系

Fig.2 Time relationship between AngII and autophagy proteins

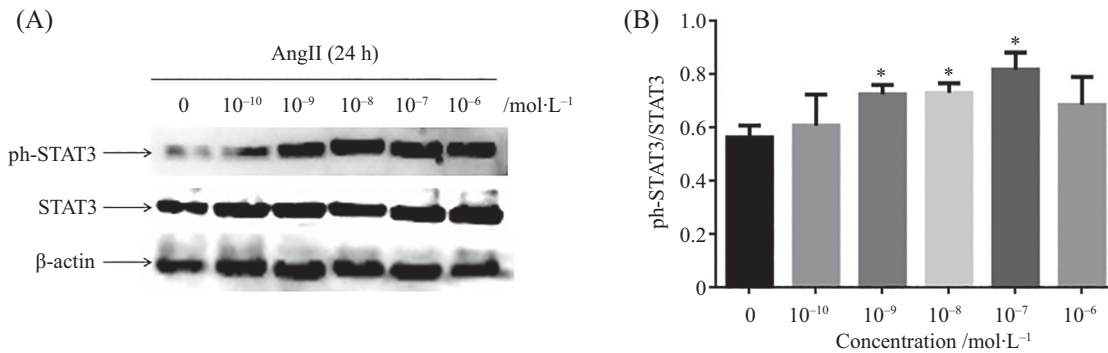


A: Western blot检测Chloroquine(50  $\mu\text{mol/L}$ )处理后VSMCs的LC3-II蛋白水平; B: Chloroquine(50  $\mu\text{mol/L}$ )处理后VSMCs的LC3II蛋白水平的半定量分析结果; \*\* $P < 0.01$ , 与control组比较; # $P < 0.05$ , 与AngII组比较。

A: level of LC3-II in VSMCs treated with Chloroquine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) was detected by Western blot, normalized to  $\beta$ -actin; B: semi-quantitative analysis of LC3-II level in VSMCs treated with Chloroquine (50  $\mu\text{mol/L}$ ), normalized to  $\beta$ -actin; \*\* $P < 0.01$  compared with the control group; # $P < 0.05$  compared with the AngII group.

图3 AngII增加VSMCs自噬流

Fig.3 AngII increases the autophagic flux in VSMCs



A: ph-STAT3、STAT3蛋白检测条带; B: ph-STAT3、STAT3蛋白水平的半定量分析结果; \* $P < 0.05$ , 与0 mol/L组比较。

A: ph-STAT3, STAT3 detection bands; B: semi-quantitative analysis of ph-STAT3, STAT3 protein levels; \* $P < 0.05$  compared with the 0 mol/L group.

图4 AngII诱导STAT3酪氨酸705位点磷酸化

Fig.4 AngII induces STAT3 phosphorylation at Y705

Beclin1蛋白的表达量并无明显变化。

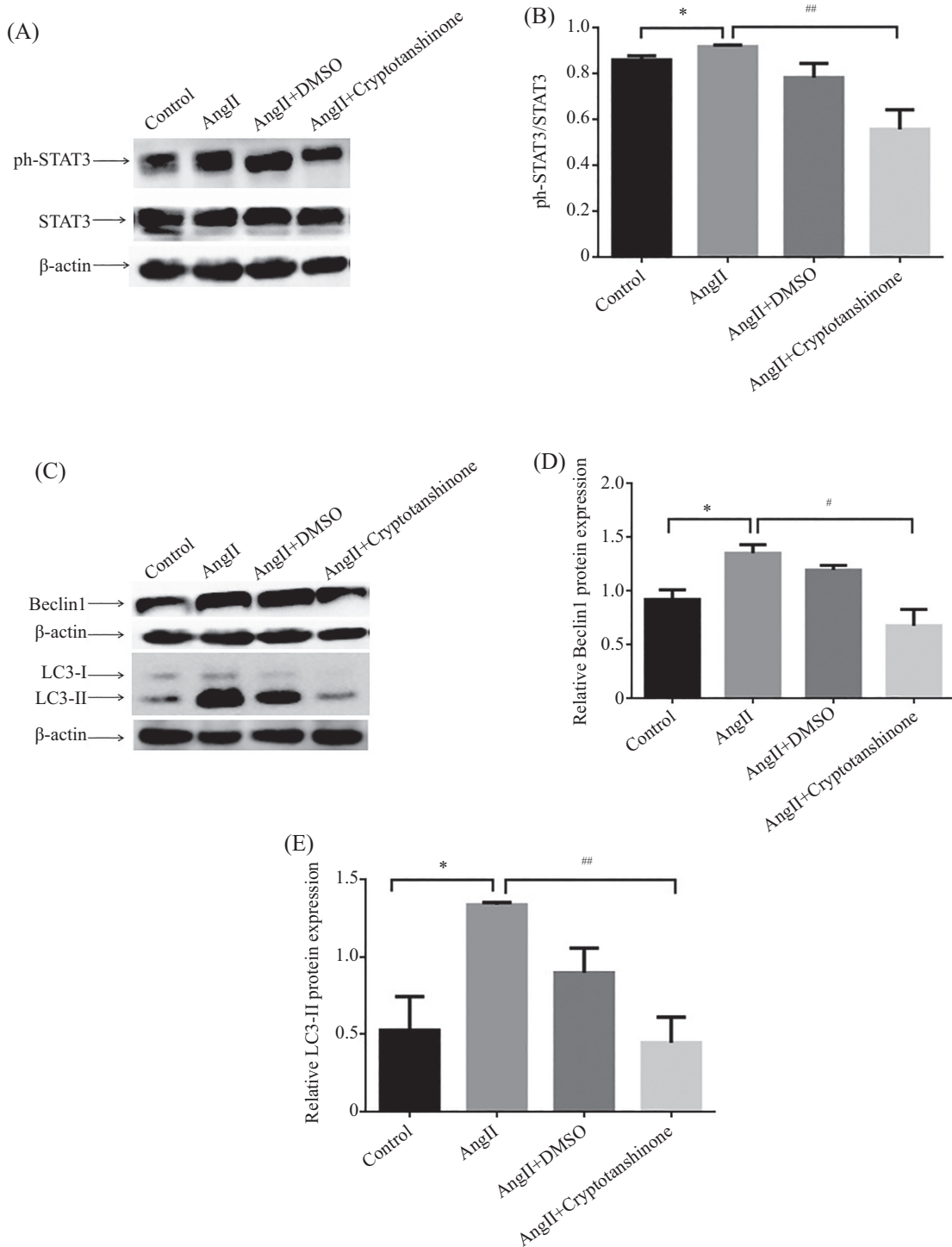
### 3 讨论

STAT3被认为是血管病理性重塑的关键信号通路,参与调节细胞的生长、增殖和迁移。STAT3可被AngII、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、白介素等多种细胞因子和生长因子调控。多项研究发现,AngII可通过多条信号通道诱导VSMCs自噬,然而目前对AngII是否可通过调控STAT3信号通路诱导VSMCs自噬的研究尚少见,因此,本文主要探讨STAT3在AngII诱导的VSMCs自噬中的作用。

首先我们以不同浓度的AngII处理VSMCs以及 $10^{-7}$  mol/L的AngII处理VSMCs不同时间,实验结果

显示,在 $10^{-10}$ ~ $10^{-7}$  mol/L的浓度范围和0~24 h的时间范围内,自噬标志性蛋白Beclin1、LC3-II的表达呈AngII浓度和时间依赖性(正向)。过高浓度( $10^{-6}$  mol/L)的AngII和过长时间(36 h)的AngII处理均使Beclin1、LC3-II表达量下降。由此说明,AngII使VSMCs自噬体形成增多,自噬上游表达增强,与MONDACA-RUFF<sup>[21]</sup>的研究结果一致。其后的LC3蛋白turnover实验进一步证实了AngII促进VSMCs自噬。

既往的研究证实,STAT3不仅调控胶质瘤干细胞<sup>[22]</sup>、骨肉瘤<sup>[23]</sup>、胃癌<sup>[11]</sup>等多种肿瘤细胞自噬,而且同样参与了VSMCs自噬,如miR-17-5p通过负向靶向调节STAT3,诱发低氧条件下VSMCs的自噬<sup>[12]</sup>。为了探讨STAT3是否同样介导了AngII诱导的VSMCs自噬,我们接下来以STAT3Y705磷酸化抑制剂Crypto-



A, C: Western blot检测Cryptotanshinone(50  $\mu\text{mol/L}$ )处理后VSMCs的ph-STAT3、STAT3、Beclin1、LC3-II蛋白水平; B, D, E: Cryptotanshinone(50  $\mu\text{mol/L}$ )处理后VSMCs的Beclin1、LC3-II蛋白水平的半定量分析结果; \* $P$ <0.05、\*\* $P$ <0.01, 与control组比较; # $P$ <0.05、## $P$ <0.01, 与AngII组比较。

A,C: levels of ph-STAT3, STAT3, Beclin1, LC3-II in VSMCs treated with Cryptotanshinone (50  $\mu\text{mol/L}$ ) were detected by Western blot, normalized to  $\beta$ -actin; B,D,E: semi-quantitative analysis of ph-STAT3, STAT3, Beclin1, LC3-II levels in VSMCs treated with Cryptotanshinone (50  $\mu\text{mol/L}$ ), normalized to  $\beta$ -actin; \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 compared with the control group; # $P$ <0.05, ## $P$ <0.05 compared with the AngII group.

图5 STAT3Y705磷酸化抑制剂Cryptotanshinone对AngII诱导的VSMCs自噬的影响

Fig.5 Effects of STAT3Y705 phosphorylation inhibitor Cryptotanshinone on AngII-induced autophagy in VSMCs

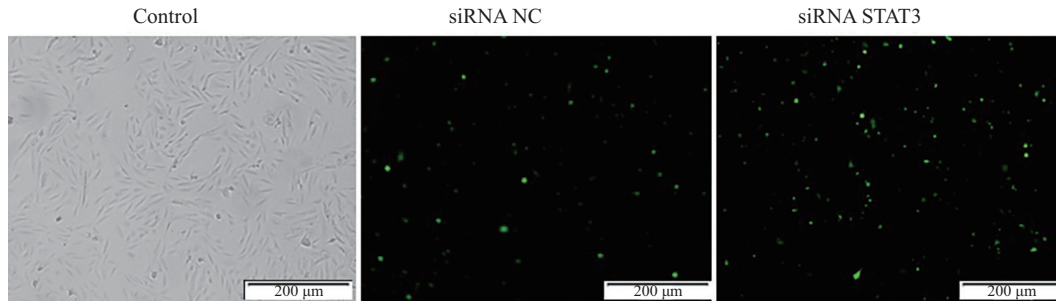
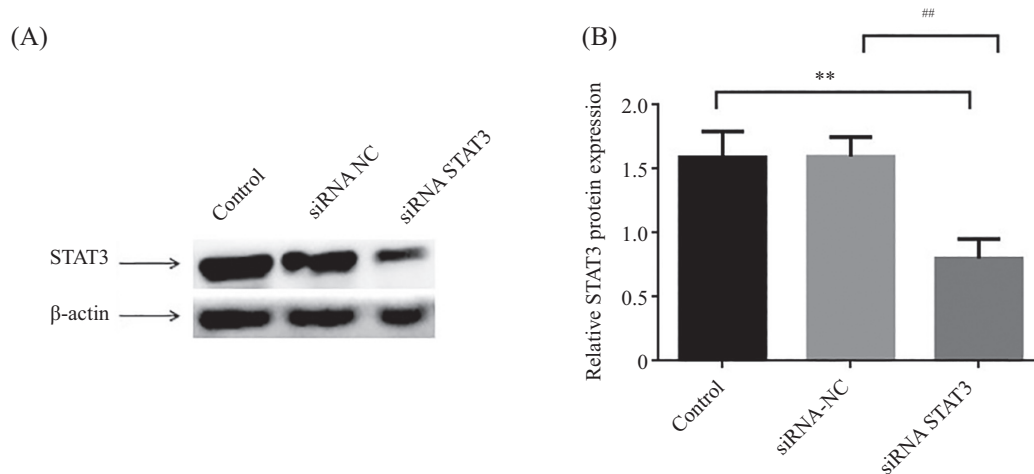


图6 Lipofectamine™ 3000转染后各组VSMCs在荧光倒置显微镜下的图像

Fig.6 Images of VSMCs in each group after transfection with Lipofectamine™ 3000 under fluorescence inversion microscope



A: STAT3蛋白检测条带; B: STAT3蛋白水平的半定量分析结果; \*\* $P < 0.01$ , 与control组比较; ## $P < 0.05$ , 与siRNA-NC组比较。

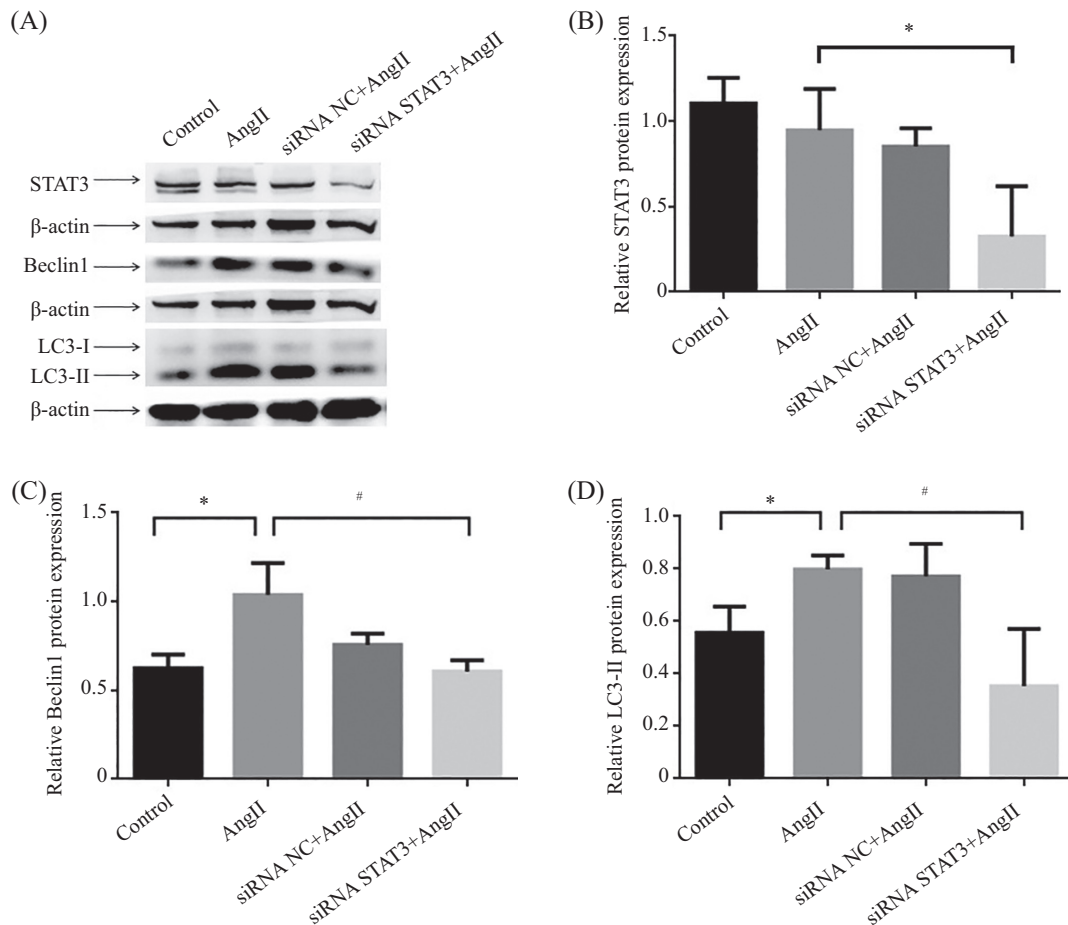
A: STAT3 detection bands; B: semi-quantitative analysis of STAT3 protein levels; \*\* $P < 0.01$  compared with the control group; ## $P < 0.05$  compared with the siRNA-NC group.

图7 小干扰细胞模型中STAT3的干扰效率

Fig.7 Interference efficiency of STAT3 in its interference cells model

tanshinone预处理和小干扰技术基因沉默 *STAT3* 后再用  $10^{-7}$  mol/L的AngII处理VSMCs 24 h。实验结果显示, 在AngII诱导VSMCs的自噬过程中, *STAT3* Y705磷酸化水平与自噬标志性蛋白的表达水平变化趋势一致。而*STAT3* Y705磷酸化抑制剂Cryptotanshinone逆转了AngII诱导的VSMCs自噬, 表现为Cryptotanshinone的预处理使自噬标志性蛋白Beclin1、LC3-II的表达明显下降, 具有统计学意义( $P < 0.05$ )。由此推测, 第705位酪氨酸磷酸化导致的*STAT3*活化在AngII诱导的VSMCs自噬中发挥了关键作用。与AngII相比, 溶剂DMSO对照组的Beclin1、LC3-II表达减少, 这与既往的研究结果DMSO可以通过介导氧化应激、内质网应激等促进人肝细胞自噬和小鼠早期胚胎自噬不太一致<sup>[24-25]</sup>, 可能是因为所研究的细胞种类不同。继而利用小干扰技术沉默 *STAT3* 基因后, AngII诱导的VSMCs自噬同样被逆转, 因此进一步证实了*STAT3*介导了AngII诱导的VSMCs自噬。

本研究结果证实, 在血管活性物质AngII的刺激下, VSMCs细胞内*STAT3*的酪氨酸705位点磷酸化, 磷酸化的*STAT3*介导AngII诱导的VSMCs自噬。但*STAT3*调控细胞自噬的机制目前并没有完全阐明, *STAT3*是作为转录因子通过调节自噬相关基因转录还是作为信号通路调控下游信号通路蛋白的表达来调节自噬目前尚不太清楚。在肿瘤细胞中, *STAT3*对自噬的调控很复杂, 不仅与*STAT3*是处于胞质内还是细胞核内有关, 而且与*STAT3*是否磷酸化有关。如GONG<sup>[26]</sup>的研究发现, *STAT3*可能通过下调自噬标志性蛋白LC3B的转录抑制胰腺癌细胞自噬。而SHEN<sup>[27]</sup>的研究表明, 胞质内的*STAT3*抑制蛋白激酶R(protein kinase R, PKR)的磷酸化, 从而抑制人骨肉瘤U2OS细胞自噬。*STAT3*主要通过调节自噬相关基因的转录调节自噬, 而磷酸化的*STAT3*通过触发自噬相关蛋白的去磷酸化, 进而上调自噬相关基因的表达。在VSMCs中, 磷酸化的*STAT3*介导AngII诱



A: Western blot检测相关蛋白表达水平条带图; B~D: Western blot蛋白半定量统计图。\* $P < 0.05$ , 与control组比较; # $P < 0.05$ , 与AngII组比较。

A: the expression of proteins was detected by Western blot; B-D: the statistical results of Western blot. \* $P < 0.05$  compared with the control group; # $P < 0.05$  compared with the AngII group.

图8 siRNA-STAT3对AngII诱导的VSMCs自噬的影响

Fig.8 Effects of siRNA-STAT3 on AngII-induced autophagy in VSMCs

导的VSMCs自噬的具体作用机制是什么? 这将是本课题接下来要探讨的问题。

### 参考文献 (References)

- [1] 林超, 刘兆国, 钱星, 等. 自噬在心血管疾病中的作用研究进展 [J]. 中国药理学通报 (LIN C, LIU Z G, QIAN X, et al. Autophagy in cardiovascular disease [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2014, 30(10): 1347-9.
- [2] AMARAVADI R, KIMMELMAN A C, WHITE E. Recent insights into the function of autophagy in cancer [J]. Genes Dev, 2016, 30(17): 1913-30.
- [3] 许琳婉, 刘革力, 苟茜, 等. UHRF1通过miR-206调控ER $\alpha$ 表达促进甲状腺乳头状癌细胞增殖、侵袭和迁移 [J]. 中国细胞生物学学报 (XU L W, LIU G L, GOU X, et al. UHRF1 promotes proliferation, invasion and migration of papillary thyroid carcinoma cells by mir-206 regulated ER $\alpha$  [J]. Chin J Cell Biol, 2020, 42(2): 248-55.
- [4] LEE W, KIM S H. Autophagy at synapses in neurodegenerative diseases [J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(5): 407-15.
- [5] HAFFER L. Out with the bad: studying autophagy to fight infectious disease [J]. Nat Med, 2016, 22(4): 334-45.
- [6] ZECH A T L, SINGH S R, SCHLOSSAREK S, et al. Autophagy in cardiomyopathies [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020, 1867(3): 118432.
- [7] GROOTAERT M O, DA COSTA MARTINS P A, BITSCH N, et al. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis [J]. Autophagy, 2015, 11(11): 2014-32.
- [8] PARK H S, HAN J H, JUNG S H, et al. Anti-apoptotic effects of autophagy via ROS regulation in microtubule-targeted and PDGF-stimulated vascular smooth muscle cells [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2018, 22(3): 349-60.
- [9] SALABEI J K, HILL B G. Autophagic regulation of smooth muscle cell biology [J]. Redox Biol, 2015, doi: 10.1016/j.redox.2014.12.007.
- [10] 张秀春, 李丹妮, 李丰. 自噬的调控通路和肿瘤 [J]. 生命科学 (ZHANG X C, LI D N, LI F. A regulatory pathway of autophagy and tumor [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(1): 19-25.
- [11] HWANG S T, KIM C, LEE J H, et al. Cycloastragenol can negate



- constitutive STAT3 activation and promote paclitaxel-induced apoptosis in human gastric cancer cells [J]. *Phytomedicine*, 2019, doi: 10.1016/j.phymed.2019.152907.
- [12] YOU L, WANG Z, LI H, et al. The role of STAT3 in autophagy [J]. *Autophagy*, 2015, 11(5): 729-39.
- [13] 周唯, 许言午, 潘一滨. STAT3与肿瘤自噬[J]. 生命的化学 (ZHOU W, XU Y W, PAN Y B. STAT3 and tumor autophagy [J]. *Chemistry of Life*), 2016, 36(1): 66-70.
- [14] HAGA M, YAMASHITA A, PASZKOWIAK J, et al. Oscillatory shear stress increases smooth muscle cell proliferation and Akt phosphorylation [J]. *J Vasc Surg*, 2003, 37(6): 1277-84.
- [15] SHAN H, GUO D, LI X, et al. From autophagy to senescence and apoptosis in Angiotensin II-treated vascular endothelial cells [J]. *Apmis*, 2014, 122(10): 985-92.
- [16] WANG X, DAI Y, DING Z, et al. Regulation of autophagy and apoptosis in response to Angiotensin II in HL-1 cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(4): 696-700.
- [17] CHENG Z, ZHANG M, HU J, et al. Mst1 knockout enhances cardiomyocyte autophagic flux to alleviate Angiotensin II-induced cardiac injury independent of Angiotensin II receptors [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.08.028.
- [18] 赵伟, 李玉琳, 贾立昕, 等. 自噬相关基因5下调抑制血管紧张素II介导的巨噬细胞凋亡[J]. 中国分子心脏病学杂志 (ZHAO W, LI Y L, JIA L X, et al. Atg5 deficiency inhibited macrophage apoptosis in response to Angiotensin II [J]. *Molecular Cardiology of China*), 2014, 14(1): 807-11.
- [19] 邹刚玲, 柳玉梅, 张海宁. 自噬对AngII诱导的心肌成纤维细胞增殖及迁移的影响及机制[J]. 广东药学院学报 (ZOU G L, LIU Y M, ZHANG H N. Effect of autophagy on AngII-induced proliferation and migration of cardiac fibroblasts [J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*), 2015, 31(3): 407-11.
- [20] YU K Y, WANG Y P, WANG L H, et al. Mitochondrial KATP channel involvement in Angiotensin II-induced autophagy in vascular smooth muscle cells [J]. *Basic Res Cardiol*, 2014, 109(4): 416
- [21] 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*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01553.
- [22] LIU K, REN T, HUANG Y, et al. Apatinib promotes autophagy and apoptosis through VEGFR2/STAT3/BCL-2 signaling in osteosarcoma [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e3015.
- [23] 赛克, WK A Y, HOWARD C, 等. STAT3信号转导通路抑制剂诱导胶质瘤干细胞产生自噬的研究[J]. 中国神经肿瘤杂志 (SAI K, WK A Y, COLMAN H, et al. Induction of autophagy in GSC by a STAT3 pathway inhibitor [J]. *Chinese Journal of Neuro-Oncology*), 2011, 9(2): 88-92.
- [24] SONG Y M, SONG S O, JUNG Y K, et al. Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction [J]. *Autophagy*, 2012, 8(7): 1085-97.
- [25] KANG M H, DAS J, GURUNATHAN S, et al. The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: a mechanistic study [J]. *Theranostics*, 2017, 7(19): 4735-52.
- [26] GONG J, MUNOZ A R, CHAN D, et al. STAT3 down regulates LC3 to inhibit autophagy and pancreatic cancer cell growth [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(9): 2529-41.
- [27] SHEN S, NISO-SANTANO M, ADJEMIAN S, et al. Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity [J]. *Mol Cell*, 2012, 48(5): 667-80.