

竹叶黄酮通过调节抗氧化通路和自噬缓解奶牛乳腺上皮细胞氧化应激的作用机制

牛浩羽 詹经纬 谭 健 赵玉超* 蒋林树*

(北京农学院动物科学技术学院,奶牛营养学北京市重点实验室,北京 102206)

摘要: 本试验旨在探究竹叶黄酮(BLF)对氧化应激的奶牛乳腺上皮细胞自噬和抗氧化通路的影响,并通过添加自噬抑制剂 Mdivi-1 探究自噬与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)-核因子 E2 相关因子 2(Nrf2) 信号通路的关联性。以奶牛乳腺上皮细胞 MAC-T 细胞系为研究对象,将维持培养基中处理的 MAC-T 设为对照组,经含 BLF(80 $\mu\text{g/mL}$) 的维持培养基处理的 MAC-T 设为 BLF 组,经含过氧化氢(H_2O_2 , 800 $\mu\text{mol/L}$) 的维持培养基处理的 MAC-T 设为 H_2O_2 组(诱导氧化应激),经含 BLF(80 $\mu\text{g/mL}$) 的维持培养基和含 H_2O_2 (800 $\mu\text{mol/L}$) 的维持培养基处理的 MAC-T 设为 BLF+ H_2O_2 组,经含 BLF(80 $\mu\text{g/mL}$) 的维持培养基、含 Mdivi-1 (1 $\mu\text{mol/L}$) 的维持培养基以及含 H_2O_2 (800 $\mu\text{mol/L}$) 的维持培养基处理的 MAC-T 设为 BLF+ H_2O_2 +Mdivi 组,经含 Mdivi-1 (1 $\mu\text{mol/L}$) 的维持培养基处理的 MAC-T 设为 Mdivi 组。培养结束后,采用实时荧光定量 PCR 检测自噬和 Keap1-Nrf2 信号通路相关基因的相对表达量,免疫印迹法检测自噬及 Keap1-Nrf2、胞外信号调节激酶(MAPK) 信号通路相关蛋白的表达量,免疫荧光技术检测转录因子 EB(TFEB)、Nrf2 蛋白表达及核移位情况。结果显示:1) BLF 预处理能显著增加氧化损伤细胞中自噬标志物 Beclin1、Parkin 蛋白的表达量($P<0.05$),显著增加溶酶体功能相关蛋白组织蛋白酶 D(CTSD)和溶酶体关联膜蛋白 1(LAMP1)蛋白的表达量($P<0.05$),显著增加腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)蛋白的磷酸化程度和 TFEB 蛋白的表达量($P<0.05$),并促进 TFEB 核转位,显著升高溶酶体相关基因囊泡型 ATP 酶 H 亚基(ATP6V1H)、组织蛋白酶 B(CTSB)、三肽基肽酶 1(TPP1)和自噬相关基因微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)的相对表达量($P<0.05$)。2) BLF 预处理能显著减少氧化损伤细胞中 Keap1 蛋白的表达量($P<0.05$),导致 Nrf2 蛋白在细胞质内稳定并大量转移到细胞核内,激活下游 Nrf2 靶基因血红素加氧酶-1(HO-1)和 NAD(P)H:醌氧化还原酶 1(NQO1)的转录与翻译。但是,通过 Mdivi-1 抑制自噬将抑制 BLF 对 Keap1-Nrf2 信号通路的促进作用。综上所述,本研究发现 BLF 通过促进细胞自噬和溶酶体功能,激活 Keap1-Nrf2 信号通路来缓解奶牛乳腺上皮细胞的氧化应激,并且自噬与抗氧化信号通路之间存在相互串扰。

关键词: 竹叶黄酮;氧化应激;自噬;奶牛乳腺上皮细胞

中图分类号:S823

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2024)07-4677-16

需氧生物体在氧化代谢过程中会产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),正常情况下,ROS 的产生和消除处于相对平衡的状态。然而,在内部或外部环境压力下,如高葡萄糖水平或紫外线

收稿日期:2024-01-30

基金项目:家畜产业技术体系北京市创新团队(BAIC05);乳业全产业链“绿色数智”技术集成创新与产业化应用[SNSPKJ(2022)]

作者简介:牛浩羽(2000—),男,河南安阳人,硕士研究生,研究方向为奶牛营养与免疫。E-mail: nhaoyv@163.com

* 通信作者:赵玉超,讲师,E-mail: zhaoyuchao2019@126.com;蒋林树,教授,博士生导师,E-mail: jls@bua.edu.cn

辐射,生物体产生的 ROS 显著增加,导致氧化应激^[1]。在围产期,奶牛乳腺上皮细胞代谢旺盛,产生大量 ROS,导致氧化应激^[2]。此外,奶牛产热大于散热能力时会发生热应激,尤其是处于高温高湿条件下时,严重的热应激可引起泌乳奶牛氧化应激^[3]。而氧化应激是导致奶牛酮症、脂肪肝、乳腺炎等多种产后疾病或失调的因素之一,在奶牛生产中造成巨大的经济损失^[4]。

竹叶黄酮(bamboo leaf flavonoids, BLF)作为一种天然抗氧化剂,具有抗菌、抗炎、降脂、抗辐射、抗衰老等多种生物学作用^[5]。曹洪志等^[6]在肉牛饲料中添加黄酮含量为 41.2%的竹叶提取物,发现 80 g/d 的添加量可以显著提高肉牛的干物质采食量和日增重。栗明月等^[7]在奶牛饲料中分别添加 30、60 和 90 g/d 黄酮含量为 40%的竹叶提取物,发现可以提高乳蛋白率和乳糖率,降低体细胞数以及血清中超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性。李义等^[8]报道,热应激奶牛饲料中添加 1.3 g/kg DM 黄酮含量为 41.2%的竹叶提取物,发现在提高热应激奶牛的产奶量和乳脂率的同时还可以提高热应激奶牛血清超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性,降低血清丙二醛含量,并能提高热应激奶牛血清免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 G 和白细胞介素-2 含量。侯昆等^[9]研究表明,在乳房炎奶牛饲料中添加 30 g/d 的 BLF 能够提高奶牛产奶性能和血清中超氧化物歧化酶活性,降低血清中丙二醛含量和乳中体细胞数。由以上研究可见,BLF 具有改善奶牛泌乳性能、机体免疫功能和抗氧化的作用。此外,有研究发现,在体外培养条件下,添加 BLF 可以抑制过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)诱导的 MAC-T 凋亡和 ROS 生成,缓解线粒体损伤^[10]。但 BLF 缓解奶牛乳腺上皮细胞氧化应激的作用机制还不清楚。

Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)-核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)信号通路是至今研究发现的生物体内最重要的抗氧化通路,当细胞自由基浓度过高时,机体会发动防御机制来抵抗过量 ROS 和氧化损伤,这些协调反应行为大部分受该通路调节^[11]。研究表明黄酮类化合物可以通过激活细胞内 Keap1-Nrf2 信号通路发挥抗氧化作用。李建凤等^[12]在体外培养条件下发现 BLF 可通过 Nrf2 信号通路的调节有效减轻热应激诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤。Yu 等^[13]建立了油酸诱

导的 HepG2 细胞氧化应激模型,发现 BLF 可通过上调 Nrf2、血红素加氧酶-1(HO-1)和 NAD(P)H:醌氧化还原酶 1(NQO1)的表达量,缓解氧化应激。Yang 等^[14]证明 4,4'-二甲氧基查尔酮通过泛素-蛋白酶体系统诱导 Keap1 降解,导致 Nrf2 核转位,上调 Nrf2 靶基因 *Homx1* (HO-1 的编码基因)的表达量来诱导铁下垂,从而抑制癌细胞生长。

自噬是细胞对胞质大分子和受损细胞器的降解和循环回收过程^[15-16],以应对不同的应激条件,如营养不足、病毒感染和基因毒性应激。氧化应激是多种刺激的汇聚点,ROS 是维持细胞自噬的关键胞内信号转导分子^[17]。当细胞自噬功能受损时更易发生氧化应激^[18]。BLF 在缓解奶牛乳腺上皮细胞氧化应激中,抗氧化通路和自噬可能发挥着重要作用,因此,本研究采用 BLF 和自噬抑制剂 Mdivi-1 对 H_2O_2 诱导的奶牛乳腺上皮细胞的氧化应激模型进行处理,旨在揭示 BLF 对氧化损伤细胞 Keap1-Nrf2 抗氧化通路和自噬的作用,为 BLF 在缓解奶牛乳腺氧化应激中的应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

奶牛乳腺上皮细胞 MAC-T 细胞系由东北农业大学动物生物化学与分子生物学实验室馈赠;BLF 由浙江大学张英教授馈赠,总黄酮含量为 98%,主要成分包括荭草苷、异荭草苷、牡荆苷和异牡荆苷,剩余的 2%为粗灰分、粗蛋白质以及水溶性多糖;DMEM/F12 培养基、澳洲胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸购自美国 Gibco 公司;氯仿、异丙醇、无水乙醇、甲醇购自北京化学工业集团有限责任公司;Tris、甘氨酸、5×TBST、牛血清白蛋白(BSA)、4%多聚甲醛、4',6-二脒基-2 苯基吲哚(DAPI)溶液购自 Solarbio 公司;RIPA 裂解液(强)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶配制试剂盒、脱脂奶粉、ECL 化学发光试剂盒、抗荧光淬灭封片液购自碧云天生物技术有限公司;Trizol、细胞爬片购自北京博尔优生物技术有限公司;焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水购自天根生化科技(北京)有限公司;核酸酶清除剂购自北京百奥莱博科技有限公司;TaKaRa cDNA 反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司

公司;SDS 购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 试验设计

利用 H₂O₂ 诱导奶牛乳腺上皮细胞氧化应激模型的方法参考本实验室前期研究结果^[10]。将 MAC-T 接种于培养皿中,放置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞融合度为 80%左右时分为 6 组,分别为 CON 组、BLF 组、H₂O₂ 组、BLF+H₂O₂ 组、BLF+H₂O₂+Midiv 组、Midiv 组,细胞重悬后接种于 6 孔板中培养。其中,CON 组细胞接种于维持培养基培养 31 h;BLF 组细胞接种于含 BLF 的维持培养基中培养 24 h 后,更换为维持培养基继续培养 7 h;H₂O₂ 组细胞接种于维持培养基中培养 25 h 后,更换为含 H₂O₂ 的维持培养基继续培养 6 h;BLF+H₂O₂ 组细胞接种于含 BLF 的维持培养基中培养 24 h 后,更换为维持培养基继续培养 1 h,再更换为含 H₂O₂ 的维持培养基中继续培养 6 h。BLF+H₂O₂+Midiv 组细胞接种于含 BLF 的维持培养基中培养 24 h 后,更换为含 Mdivi-1 的维持培养基继续培养 1 h,再更换为含 H₂O₂ 的维持培养基继续培养 6 h。Midiv 组细胞接种于维持培养基中培养 24 h 后,更换为含 Mdivi-1 的维持培养基继续培养 1 h,再更换为维持培养基继续培养 6 h。含 BLF 的维持培养基中含 80 μg/mL BLF,

含 H₂O₂ 的维持培养基中含 800 μmol/L H₂O₂,含 Mdivi-1 的维持培养基中含 1 μmol/L Mdivi-1。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞培养

将 MAC-T 放入含有 DMEM/F12 培养基和 1%的青霉素/链霉素溶液以及 10%胎牛血清的完全营养液中,于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱内培养。待细胞融合度达到 80%时,进行细胞传代操作,连续传代 3 次之后,进行后续试验。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测自噬和 Keap1-Nrf2 信号通路相关基因以及 Nrf2 靶基因的相对表达量

按 1.2 步骤将 MAC-T 进行培养和处理后,利用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,之后采用 cDNA 合成试剂盒反转录为 cDNA,反应条件为:37 ℃,15 min;85 ℃,5 s。将反转录成功的 ATP 酶 H⁺转运 V1 亚基 H(ATP6V1H)、组织蛋白酶 B(CTSB)、三肽基肽酶 1(TPP1)和微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、HO-1 和 NQO1 的 cDNA 样品分别配制 PCR 反应系统。实时荧光定量 PCR 反应条件:95 ℃预变性 30 s,1 个循环;60 ℃退火 30 s,60 ℃延伸 5 s,60 个循环。引物序列见表 1。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'—3')
ATP 酶 H ⁺ 转运 V1 亚基 H ATP6V1H	F:GGAAGTGTCTCAGATGATCCCCA R:CCGTTTGCCTCGTGGATAAT
组织蛋白酶 B CTSB	F:AGTGGAGAATGGCACACCCTA R:AAGAGCCATTGTCACCCCA
三肽基肽酶 1 TPP1	F:GATCCCAGCTCTCCTCAATAC R:GCCATTTTTCACCGTGTG
微管相关蛋白 1 轻链 3 LC3	F:CAGCATGGTGAGTGTGTCCA R:GCAGCTCAGTTCAGGAACCA
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	F:GCCTCCTGCACCACCAACT R:TCTTCTGGGTGGCAGTGATG
血红素氧合酶-1 HO-1	F:GGCAGCAAGGTGCAAGA R:GAAGGAAGCCAGCCAAGAG
NAD(P)H:醌氧化还原酶 1 NQO1	F:GGTGCTCATAGGGGAGTTCCG R:GGGAGTGTGCCCAATGCTAT

1.3.3 免疫印迹法检测自噬及 Keap1-Nrf2、胞外信号调节激酶 (MAPK) 信号通路相关蛋白的表达量

- 1) 制备细胞总蛋白样品: 将 RIPA 裂解液 (强)、PMSF 和磷酸酶抑制剂按照 100:1:2 的比例混合, 然后将其置于 4 ℃ 的环境中进行预冷, 以备后续使用。取出细胞, 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 清洗 2 次后每皿加入 1 mL 裂解液, 具体方法参考本实验室前期研究^[19], 将最终得到的蛋白样本放入沸水浴 10 min 后用流水快速冷却, 置于 -80 ℃ 下储存。
- 2) 电泳: 按照表 2 配制分离胶 (12%) 和浓缩胶 (5%); 各孔添加 10 μL 样品, 每板加入 5 μL Marker; 电泳时浓缩胶电压 80 V (30 min), 分离胶电压 120 V, 根据目的蛋白大小控制时间。
- 3) 转膜: 切去浓缩胶, 根据 Marker 标准保留需要检测的蛋白, 将胶切至合适大小; 打开夹子, 制作转膜“三明治”, 将黑色的一面置于底部, 从下

- 到上依次为海绵垫、厚滤纸 (或 3 层薄滤纸)、电泳完成的分离胶、PVDF 膜 (使用前在甲醇中浸泡 30 s)、厚滤纸和海绵垫, 全程注意不要产生气泡; 闭合夹子放入转膜设备中; 倒入转膜液没过厚滤纸最上层; 采用标准湿式转膜法 (350 mA, 70 min) 转膜, 转膜过程防止水温过高。
- 4) 封闭: 转膜结束后, 避免 PVDF 膜干燥, 立刻放入 1×TBST 洗涤液漂洗 2~3 min, 弃去洗涤液, 转移 PVDF 膜到 5% 封闭液, 37 ℃ 封闭 1 h。
- 5) 一抗孵育: 将 PVDF 膜放入稀释后的一抗中, 4 ℃ 过夜。
- 6) 二抗孵育: 将 PVDF 膜放入稀释后的二抗中, 37 ℃ 孵育 1 h。
- 7) 显影: 从二抗中取出 PVDF 膜用 1×TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 按照说明书调配 Beyo ECL Plus 超敏发光液 (A 液:B 液 = 1:1); 将洗涤完成的 PVDF 膜置于天能化学发光成像仪中, 在表面均匀滴加发光液, 随后进行曝光检测。

表 2 分离胶和浓缩胶的配方
Table 2 Formula of separating glue and concentrated glue mL

项目 Items	12%分离胶 12% separating glue	5%浓缩胶 5% concentrated glue
蒸馏水 Distilled water	5.3	2.7
30%丙烯酰胺溶液 30% acrylamide solution	6.7	0.67
1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)		0.5
1 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)	7.6	
10%十二烷基硫酸钠溶液 10% SDS solution	0.2	0.04
10%过硫酸铵溶液 10% ammonium persulfate solution	0.2	0.04
四甲基乙二胺 TEMED	0.008	0.004

1.3.4 免疫荧光技术检测转录因子 EB (TFEB)、Nrf2 蛋白表达及核移位情况

- 1) 收集及固定细胞: 弃各培养孔上清, 将细胞用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 4% 多聚甲醛浸泡细胞 20 min。
- 2) 通透及封闭: 弃去培养孔内的多聚甲醛, 将细胞用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 之后用 0.3% Triton X-100 作用于细胞 5 min, 穿透细胞膜; 弃去培养孔内的 Triton X-100, 将细胞用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入 5% BSA 在 37 ℃ 孵育 30 min。
- 3) 一抗孵育: 向培养孔内滴加提前用 2% BSA 稀释好的一抗, 利用封口膜缠绕 4 孔板边缘防止

- 液体挥发, 在 37 ℃ 孵育 2 h (或 4 ℃ 过夜)。
- 4) 二抗孵育: 回收孔板内一抗; 将细胞用 PBS 漂洗 5 次, 每次 3 min, 滴加用 PBS 稀释的异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记山羊抗鼠 (兔) 免疫球蛋白 G (IgG) (二抗), 在 37 ℃ 避光孵育 1 h。
- 5) 染核并封片: 弃去培养孔内的二抗, 将细胞用 PBS 漂洗 5 次, 每次 3 min, 滴加 DAPI 作用 5 min 染核; 滴加 20 μL 封片液于载玻片上, 从孔板取出细胞爬片, 并将有细胞的那面贴于载玻片上 (注意封片时避免产生气泡或滑动), 于荧光显微镜下观察并采集图像。

1.4 数据分析

试验数据利用 SPSS 21.0 软件的 ANOVA 程序进行单因素方差分析, 并采用 Duncan 氏法进行多重比较。以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。将试验结果通过 Origin 2023 进行绘图展示。

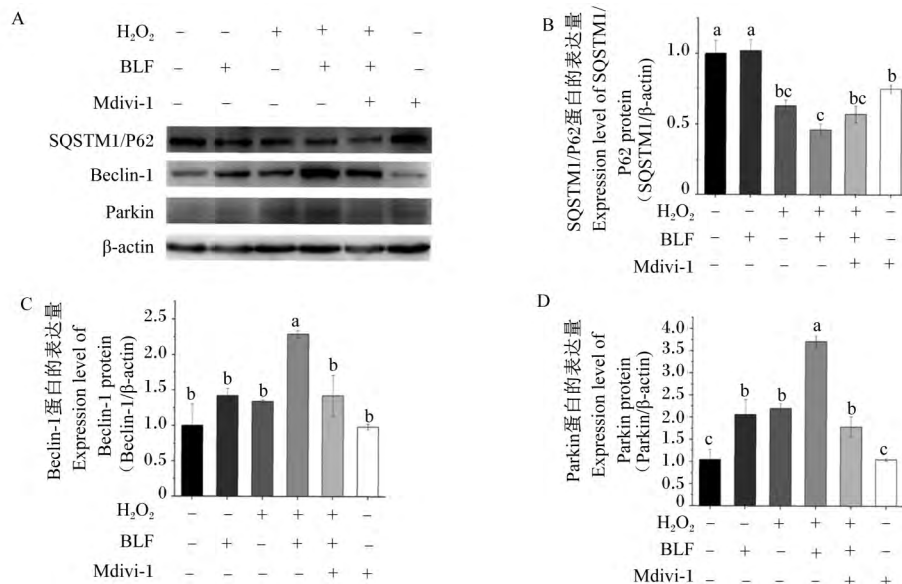
2 结果与分析

2.1 BLF 对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞自噬的影响

2.1.1 BLF 对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞自噬通量和溶酶体功能的影响

由图 1-A 和图 1-B 可知, 与 CON 组相比,

H_2O_2 处理显著降低了 SQSTM1/P62 蛋白的表达量 ($P < 0.05$), BLF+ H_2O_2 处理后进一步降低了 SQSTM1/P62 蛋白的表达量 ($P < 0.05$)。由图 1-A、图 1-C 和图 1-D 可知, 与 CON 组相比, H_2O_2 组 Beclin1 蛋白的表达量差异不显著 ($P > 0.05$), Parkin 蛋白的表达量显著增加 ($P < 0.05$), 而 BLF+ H_2O_2 组 Beclin1 和 Parkin 蛋白的表达量均显著增强 ($P < 0.05$), 同时 BLF+ H_2O_2 +Mdivi-1 组 Beclin1 和 Parkin 蛋白的表达量显著低于 BLF+ H_2O_2 组。上述结果说明 BLF 能显著增强 H_2O_2 处理后 MAC-T 中自噬标记物的合成, Mdivi-1 则抑制这一作用。



H_2O_2 : 过氧化氢 hydrogen peroxide; BLF: 竹叶黄酮 bamboo leaf flavonoids; β -actin: β -肌动蛋白。下图同 the same as below。

数据柱标注不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下图同。Data columns with different lowercase letters showed significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

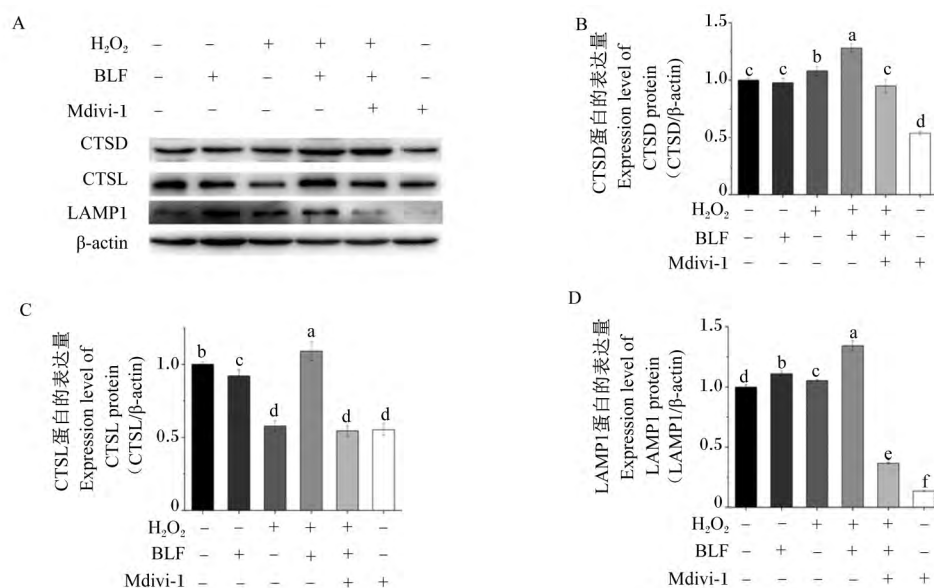
图 1 BLF 对 H_2O_2 诱导的氧化应激 MAC-T 自噬通量的影响

Fig.1 Effects of BLF on autophagic flux in oxidative stressed MAC-T induced by H_2O_2

由图 2-A、图 2-B、图 2-C 可知, 与 CON 组相比, H_2O_2 处理显著增加了组织蛋白酶 D (CTSD) 和溶酶体关联膜蛋白 1 (LAMP1) 蛋白的表达量 ($P < 0.05$), 显著降低了组织蛋白酶 L (CTSL) 蛋白的表达量 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, BLF+ H_2O_2 处理显著增加 CTSD、CTSL 和 LAMP1 蛋白的表

达量 ($P < 0.05$), 而加入 Mdivi-1 则会显著抑制这一作用 ($P < 0.05$)。

上述结果证明, H_2O_2 处理可以激活细胞自噬, 但一定程度上损伤溶酶体功能; BLF 预处理可以增强细胞的自噬通量, 并缓解溶酶体的损伤; Mdivi-1 能抑制 BLF 预处理对细胞氧化损伤的缓解作用。



CTSD:组织蛋白酶 D cathepsin D;CTSL:组织蛋白酶 L cathepsin L;LAMP1:溶酶体关联膜蛋白 1 lysosomal associated membrane protein 1。

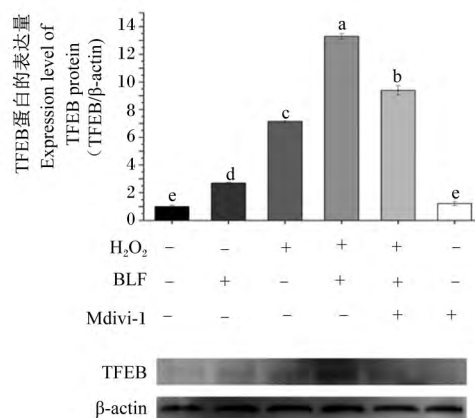
图 2 BLF 对 H₂O₂ 诱导的氧化应激 MAC-T 溶酶体功能的影响

Fig.2 Effects of BLF on lysosome formation in oxidative stressed MAC-T induced by H₂O₂

2.1.2 BLF 对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞中 TFEB 核移位及靶基因表达的影响

如图 3 所示,与 CON 组相比,H₂O₂ 处理显著提高了 TFEB 蛋白的表达量 ($P<0.05$),BLF+H₂O₂ 处理使 TFEB 蛋白的表达量进一步提高 ($P<0.05$),加入 Mdivi-1 则抑制了这一作用 ($P<0.05$)。相对于 CON 组,H₂O₂ 处理使 TFEB 蛋白的荧光强度升高,BLF+H₂O₂ 处理进一步提升了 TFEB 蛋白的荧光强度,且使 TFEB 蛋白向细胞核内转移,加入 Mdivi-1 则会抑制 TFEB 蛋白免疫荧光的表达及核移位(图 4)。

qPCR 结果(图 5)显示,与 CON 组相比,H₂O₂ 处理对 *ATP6V1H*、*CTSB*、*TPP1* 基因的相对表达量的影响不显著 ($P>0.05$),可使 *LC3* 基因的相对表达量显著升高 ($P<0.05$);与 H₂O₂ 组相比,BLF+H₂O₂ 处理显著升高了溶酶体相关基因 *ATP6V1H*、*CTSB* 和 *TPP1* 和自噬相关基因 *LC3* 的相对表达量 ($P<0.05$),而加入 Mdivi-1 则显著抑制了 BLF 预处理的作用 ($P<0.05$)。



TFEB:转录因子 EB transcription factor EB。

图 3 BLF 对 H₂O₂ 诱导的氧化应激 MAC-T 中 TFEB 蛋白表达的影响

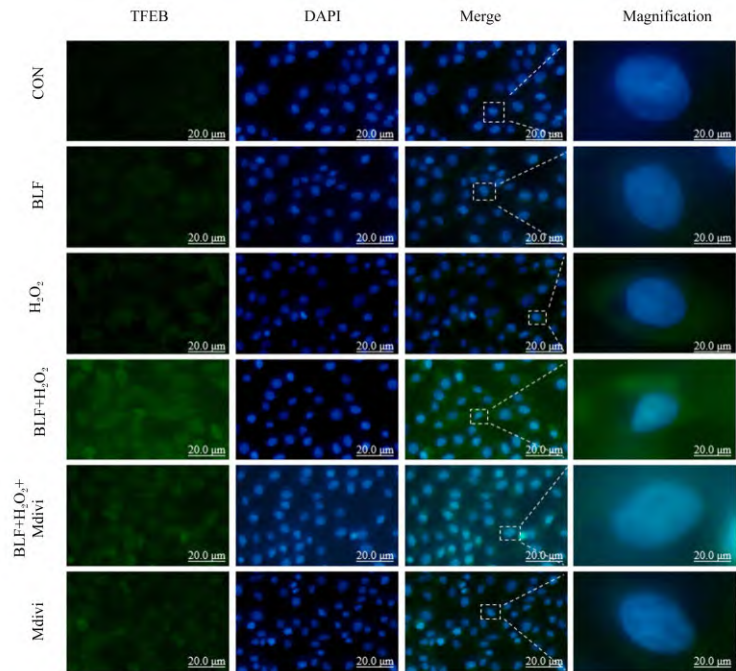
Fig.3 Effects of BLF on protein expression of TFEB in oxidative stressed MAC-T induced by H₂O₂

2.1.3 BLF 对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)-TFEB 信号通路的影响

为进一步探讨 BLF 调控细胞氧化损伤后自噬的机制,本试验对 AMPK-TFEB 信号通路进行了研究。由图 6-A、图 6-B 和图 6-C 可知,与 CON 组相比,H₂O₂ 处理显著增加了细胞核内 AMPK 蛋

白的磷酸化程度和 TFEB 蛋白的表达量 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, BLF+ H_2O_2 处理进一步增加 AMPK 蛋白的磷酸化程度和 TFEB 蛋白的表达

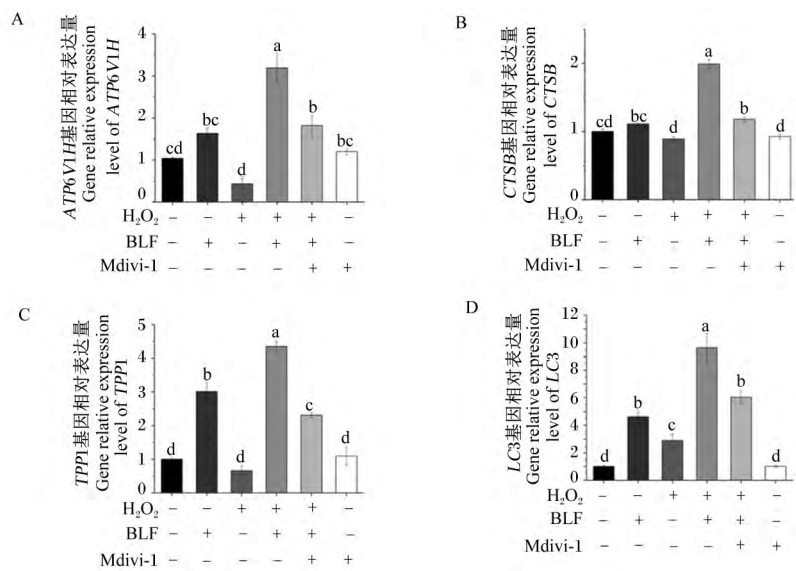
量 ($P < 0.05$)。上述结果说明 BLF 预处理增加了 AMPK-TFEB 信号通路相关的细胞自噬的发生。



TFEB: 转录因子 EB transcription factor EB; DAPI: 4',6-二脒基-2 苯基吲哚 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; Merge: 合并; Magnification: 放大。

图 4 BLF 对 H_2O_2 诱导的氧化应激 MAC-T 中 TFEB 蛋白免疫荧光表达的影响

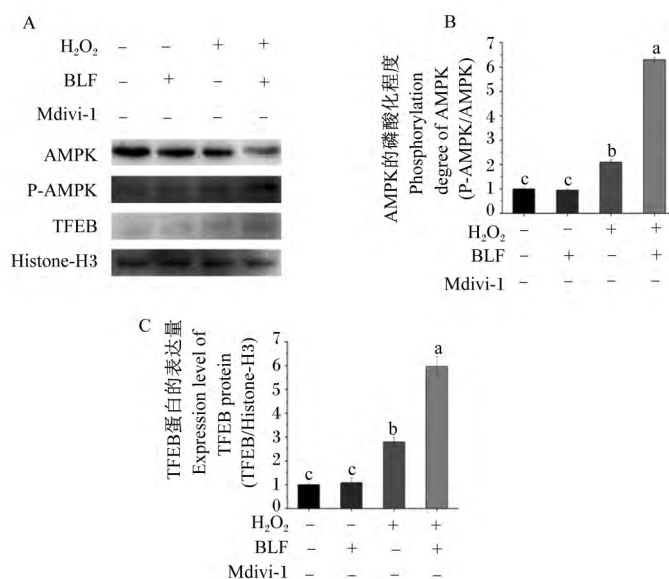
Fig.4 Effects of BLF on immunofluorescence expression of TFEB protein in oxidative stressed MAC-T induced by H_2O_2



ATP6V1H: ATP 酶 H 亚基 ATPase H^+ transporting V1 subunit H; CTSB: 组织蛋白酶 B cathepsin B; TPP1: 三肽基肽酶 1 tripeptidyl peptidase 1; LC3: 微管相关蛋白 1 轻链 3 microtubule-associated protein 1 light chain 3。

图 5 BLF 对 H_2O_2 诱导的氧化应激 MAC-T 中 TFEB 靶基因表达的影响

Fig.5 Effects of BLF on expression of TFEB target genes in oxidative stressed MAC-T induced by H_2O_2



AMPK:腺苷酸活化蛋白激酶 adenosine monophosphate activated protein kinase;P-AMPK:磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 phosphorylated adenosine monophosphate activated protein kinase;TFEB:转录因子 EB transcription factor EB;Histone-H3:组蛋白 H3。

图6 BLF对H₂O₂诱导的氧化应激MAC-T中AMPK-TFEB信号通路的影响

Fig.6 Effects of BLF on AMPK-TFEB signaling pathway in oxidative stressed MAC-T induced by H₂O₂

2.2 BLF对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞中抗氧化信号通路的影响

2.2.1 BLF对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞中Nrf2靶基因及蛋白表达的影响

由图7可知,与CON组相比,H₂O₂处理能显著增加HO-1和NQO1基因的相对表达量($P<0.05$),并能显著增加HO-1和NQO1蛋白的表达量($P<0.05$);与H₂O₂组相比,BLF+H₂O₂处理能显著增加氧化损伤细胞中HO-1和NQO1的基因相对表达量和蛋白的表达量($P<0.05$)。上述结果说明BLF能通过激活Nrf2下游抗氧化基因的表达来抵御细胞氧化损伤。

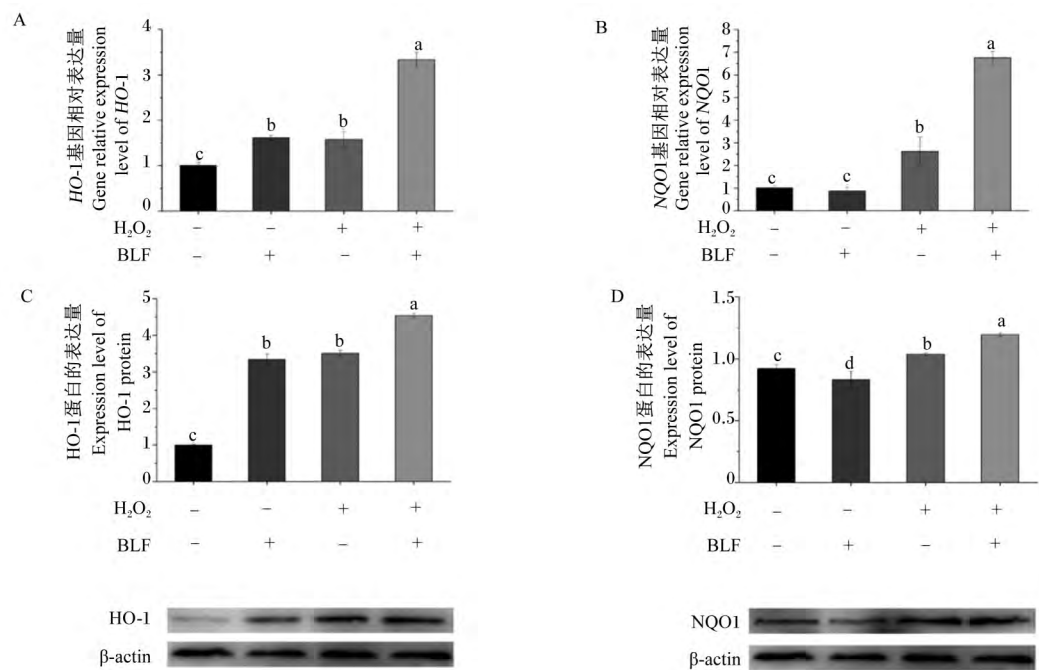
2.2.2 BLF对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞中MAPK信号通路相关蛋白表达的影响

与CON组相比,H₂O₂处理显著促进了细胞中P38蛋白的磷酸化($P<0.05$)(图8-A和图8-E),显著抑制了细胞外调节蛋白激酶(ERK)蛋白的磷酸化($P<0.05$)(图8-A和图8-C),对c-Jun氨基端激酶(JNK)蛋白的磷酸化程度没有显著影响($P>0.05$)(图8-A和图8-D);与H₂O₂组相比,BLF+H₂O₂处理显著抑制了氧化损伤细胞中

ERK、P38和P65蛋白的磷酸化($P<0.05$)(图8-A、图8-C、图8-E和图8-B),但是显著促进了JNK蛋白的磷酸化($P<0.05$)(图8-A、图8-D)。

2.2.3 BLF对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞中Keap1-Nrf2信号通路相关蛋白表达的影响

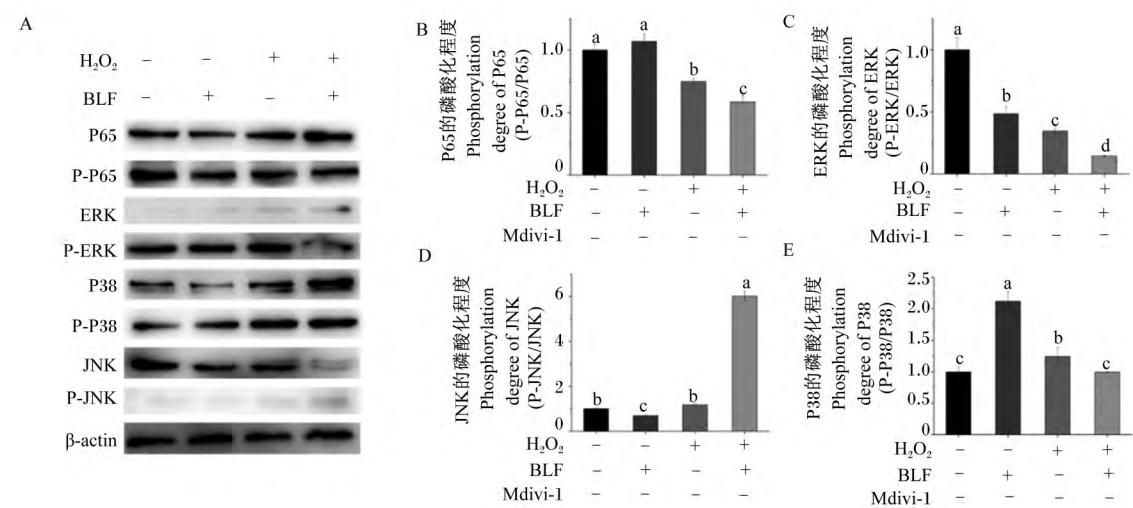
与CON组相比,H₂O₂处理显著降低细胞中Keap1蛋白的表达量($P<0.05$)(图9-A),显著增加了Nrf2蛋白的表达量($P<0.05$)(图9-B),Nrf2蛋白的荧光强度增加,但未见明显的核移位发生(图10)。与H₂O₂组相比,BLF+H₂O₂处理显著降低Keap1蛋白的表达量(图9-A)($P<0.05$),显著增加了Nrf2蛋白的表达量($P<0.05$)(图9-B),Nrf2蛋白的荧光强度明显增加,并且能清晰地看见Nrf2蛋白转移进入细胞核内(图10),说明BLF+H₂O₂处理激活了氧化损伤细胞的Keap1-Nrf2信号通路。与BLF+H₂O₂组相比,加入Mdivi-1显著增加了Keap1蛋白的表达量($P<0.05$)(图9-A),显著降低Nrf2蛋白的表达量($P<0.05$)(图9-B),并且抑制了Nrf2蛋白的免疫荧光表达及核移位(图10),说明抑制细胞自噬会抑制BLF诱导的氧化损伤细胞中Nrf2-Keap1信号通路的激活。



HO-1: 血红素加氧酶-1 heme oxygenase-1; NQO1: NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1 NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1。

图 7 BLF 对 H₂O₂ 诱导的氧化应激 MAC-T 中 Nrf2 靶基因及蛋白表达的影响

Fig.7 Effects of BLF on expression of Nrf2 target genes and proteins in oxidative stressed MAC-T induced by H₂O₂



P65: P65 蛋白 protein P65; P-P65: 磷酸化 P65 蛋白 phosphorylated protein P65; ERK: 细胞外调节蛋白激酶 extracellular regulated protein kinase; P-ERK: 磷酸化细胞外调节蛋白激酶 phosphorylated extracellular regulated protein kinase; P38: P38 蛋白 protein P38; P-P38: 磷酸化 P38 蛋白 phosphorylated protein P38; JNK: c-Jun 氨基端激酶 c-Jun N-terminal kinase; P-JNK: 磷酸化 c-Jun 氨基端激酶 phosphorylated c-Jun N-terminal kinase。

图 8 BLF 对 H₂O₂ 诱导的氧化应激 MAC-T 中 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig.8 Effects of BLF on expression of proteins related MAPK signaling pathway in oxidative stressed MAC-T induced by H₂O₂

3 讨 论

3.1 BLF 对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞自噬通量和溶酶体功能的影响

SQSTM1/P62 作为一种相对蛋白质,介导其识别底物的降解,但 SQSTM1/P62 的过量积聚可以隔离 Keap1^[20]。而 Keap1 是 Nrf2 的 E3-泛素连接酶复合体的适配器^[21]。且 SQSTM1/P62 蛋白通过与 LC3-II 的直接结合选择性地结合到自噬小体中,在自溶酶体中被有效地降解。因此,总的 SQSTM1/P62 蛋白的表达量与自噬呈负相关^[22]。在本研究中,H₂O₂ 处理显著降低 SQSTM1/P62 蛋白的表达量,且 BLF 预处理后进一步降低 SQSTM1/P62 蛋白的表达量。Beclin-1 蛋白是自噬标记物蛋白,在自噬小体形成中起关键作用,通过形成隔离膜在自噬的起始阶段起作用^[23]。Cao 等^[24]的研究结果表明,姜黄素预处理能提高氧化损伤后 Beclin-1 和 LC3-II 的水平,降低 SQSTM1/P62 的水平,这意味着经姜黄素预处理的细胞具有更高的自噬水平。在本试验中,BLF 预处理也显著增加 Beclin-1 蛋白的表达量。SQSTM1/P62 和 Beclin-1 蛋白表达量被显著改变,均说明 BLF 预处理能增强氧化损伤后细胞自噬的发生。Narendra 等^[25]研究发现,Parkin 被选择性地招募到哺乳动物细胞中具有低膜电位的功能障碍的线粒体中后,Parkin 介导自噬小体吞噬线粒体,并选择性地消除受损的线粒体。有相关研究以 Parkin 作为一种细胞溶质 E3 泛素连接酶作为切入点,探究其在去极化线粒体中泛素化线粒体外膜蛋白的作用,该研究在 IPEC-J2 细胞中转染 GFP-Parkin ΔUBL [GFP-Parkin ΔUBL 是一种遗传工程改造的蛋白质,它是结合了绿色荧光蛋白(GFP)和 Parkin 蛋白的一种特定变体,这种形式的 Parkin 蛋白缺少了其 N 端的泛素样蛋白(UBL)结构域,因此,GFP-Parkin ΔUBL 失去了正常的泛素 E3 连接酶活性],在转染组与对照组细胞诱导氧化应激后用姜黄素处理,发现转染组细胞失去诱导细胞自噬和恢复活力的功能,说明 Parkin 的 E3 泛素连接酶是姜黄素抵御氧化应激不可缺少的^[24]。本试验发现 BLF 或 H₂O₂ 单独处理奶牛乳腺上皮细胞都引起 Parkin 蛋白表达量增多,说明氧化损伤后,细胞仍然有募集 Parkin,通过自噬清除受损线粒体的能力;经 BLF 预处理后能进一步提升细胞中 Parkin

蛋白表达量,证明 BLF 通过增强自噬以保护细胞过程中 Parkin 的作用,然而,Parkin 中的哪种结构参与 BLF 的保护功能有待进一步探索。溶酶体需要各种蛋白酶来完成它们的功能,组织蛋白是参与自噬降解的主要溶酶体蛋白,其中 CTSD 和 CTSL 是 2 种含量丰富的溶酶体酶。CTSD 可以参与溶酶体隔间的细胞内分解代谢^[26]。细胞通过激活 CTSL 分解蛋白质和激素,还被证明通过降解溶酶体内容物来促进自噬^[27]。在 Thirusangu 等^[28]的研究中,将细胞的 *CDSL* 基因敲除后用奎纳克林(QC)处理,发现敲除 *CDSL* 基因后的细胞中 SQSTM1/P62 的水平显著高于对照组,而 LC3-B 水平低于对照组,表明 *CTSL* 基因敲除阻止 QC 诱导的自噬通量,而 *CTSL* 基因表达上调或 QC 处理也增加了早期自噬小体的发育,证明 *CTSL* 是细胞发生自噬所必需的。*LAMP1* 和溶酶体膜相关蛋白 2(*LAMP2*)约占溶酶体膜蛋白的 50%,保护溶酶体膜免受水解酶的作用。*LAMP1* 是晚期核内体和溶酶体的标记蛋白,在 Li 等^[29]的试验中,利用萝卜硫素处理 Hela 细胞 0~9 h 后,*LAMP1* 蛋白的表达量和荧光嗜酸探针的染色逐渐升高,说明萝卜硫素促进了细胞溶酶体的功能。本试验中,H₂O₂ 处理减少了 *CTSL* 蛋白的表达量,说明对溶酶体产生了负面的影响,而 BLF 预处理恢复了 *CTSL* 蛋白的表达量,并且显著提升了 *CTSD* 和 *LAMP1* 蛋白的表达量,从而减少溶酶体受到的氧化损伤。

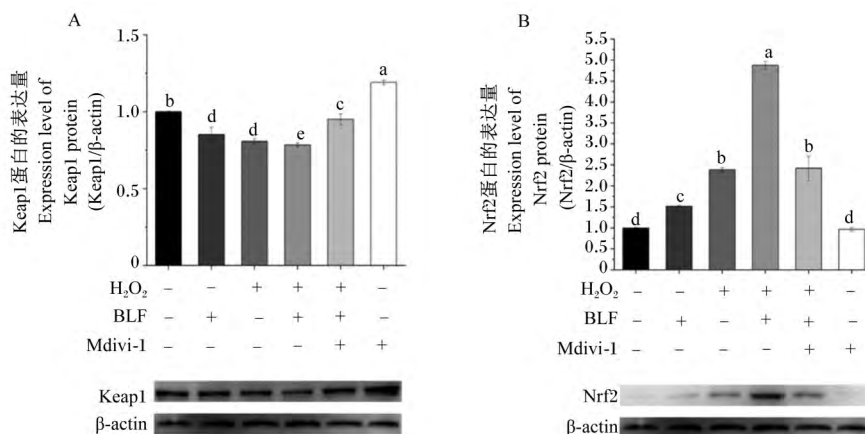
3.2 BLF 对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞中 TFEB 核移位及靶基因表达的影响

转录因子 EB(TFEB)是一种螺旋-环-螺旋结构转录因子,在许多细胞类型中调节溶酶体的生物发生和自噬功能^[30],并且 TFEB 还可以通过增加 *HO-1* 和超氧化物歧化酶-2(*SOD-2*)等抗氧化基因的丰度来减轻细胞内 ROS 的产生^[31]。

AMPK 是在氧化应激条件下激活自噬的关键调节因子,在该系统中细胞能量的变化可以导致 ATP/ADP 比值降低和 AMPK 激活^[32]。AMPK 可能通过直接磷酸化 Raptor 或通过激活结节性硬化症 2(*TSC2*)间接参与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的抑制^[33]。当 mTOR 的激活被抑制时,激活 TFEB 导致其去磷酸化转移到细胞核后^[34]。TFEB 识别溶酶体和自噬基因如 *LC3*、*Beclin-1*、*ATG3*、*CTSD* 和 *LAMP2* 等,以及具有一个或多个

10 碱基对基序 (GTCACGTGAC) 的 CLEAR 原件^[31], 进而促进基因转录, 因此 TFEB 的核移位导致自噬水平上调^[35]。本试验中, H_2O_2 刺激细胞后引起细胞质中 TFEB 蛋白的表达量升高, 促进 LC3 基因的转录, 但未促进溶酶体相关基因 *ATP6V1H*、*CTSB* 和 *TPP1* 的转录; 而经 BLF 预处理后, 显著

提升了 TFEB 的核移位及其靶基因的转录, 说明细胞氧化损伤后有一定的自噬能力, 但溶酶体合成受损, 无法快速清除受损线粒体, BLF 通过增强 TFEB 的激活及核转位促进细胞自噬与溶酶体生物合成。



Keap1: Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 Kelch-like ECH-associated protein 1; Nrf2: 核因子 E2 相关因子 2 nuclear factor erythroid-2-related factor 2。

图 9 BLF 对 H_2O_2 诱导的氧化应激 MAC-T 中 Keap1-Nrf2 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig.9 Effects of BLF on expression of proteins related Keap1-Nrf2 signaling pathway in oxidative stressed MAC-T induced by H_2O_2

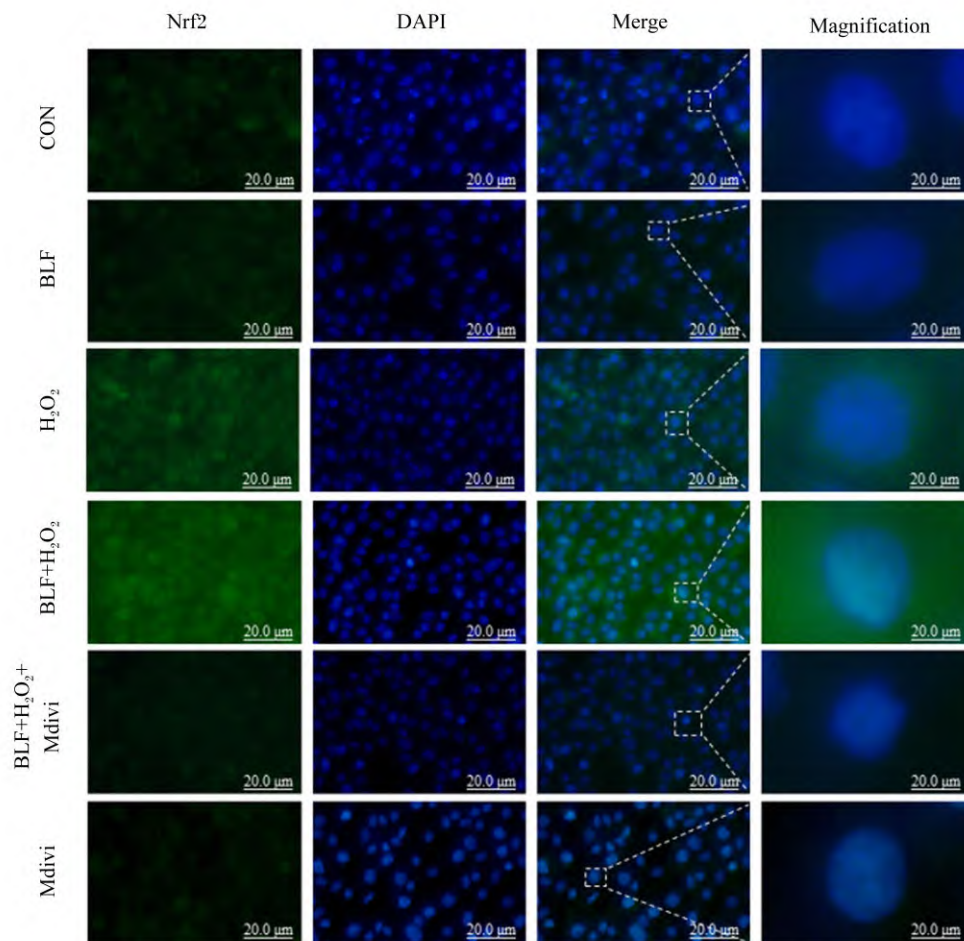
3.3 BLF 对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞中 AMPK-TFEB 信号通路的影响

研究表明 AMPK 在减轻氧化损伤和调节线粒体功能方面发挥重要保护作用^[36-37]。AMPK 通过磷酸化一些转录因子 (包括溶酶体基因的主要转录调节因子 TFEB) 参与氧化应激的调节。Wu 等^[38]在二甲双胍治疗皮瓣缺血的试验中证明二甲双胍通过激活 AMPK-mTOR-TFEB 信号通路促进血管生成, 抑制细胞凋亡, 减轻氧化应激, 但利用 shRNA 腺相关病毒 (AAV) 载体抑制 AMPK, 会下调 AMPK-mTOR-TFEB 信号通路, 降低自噬水平。本试验结果与此一致, BLF 预处理可以促进氧化损伤的 MAC-T 中 AMPK 的磷酸化, 提升细胞核内 TFEB 蛋白水平, 说明 BLF 缓解细胞氧化损伤是由激活 AMPK-TFEB 信号通路介导的自噬增加所致。

3.4 BLF 对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞中 MAPK 信号通路的影响

研究发现 MAPK 信号通路与 Nrf2 的激活息

息相关, ERK、JNK 或 P38 的激活或抑制直接影响 Nrf2 的活性水平, 进而诱导细胞发生相关反应^[39]。Xu 等^[40]在探究利福平 (RFP) 与氧化应激对 HepG2 细胞影响的研究中发现, RFP 和 H_2O_2 都能显著增加蛋白激酶 C (PKC) α 、PKC δ 、PKC ϵ 蛋白的表达量, 显著提高 JNK、P38 和 ERK 蛋白的磷酸化程度, 显著降低磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 蛋白的磷酸化程度; 添加缓解氧化应激的试剂还原型谷胱甘肽乙酯 (GSH-MEE) 能抑制 JNK、P38 和 ERK 的激活, 并抑制 PI3K 磷酸化的减少, 说明 RFP 通过氧化应激激活 PKC-ERK/JNK/P38 信号通路。然而, 有些研究结果表明, 发挥抗氧化作用需要抑制 ERK1/2、JNK 或 P38 信号通路^[41-43]。此外, 在自噬诱导中, MAPK 已被证明是 ROS 的下游效应因子, ROS 可以通过激活细胞中 ERK 和 JNK 来诱导自噬^[44]。



Nrf2:核因子 E2 相关因子 2 nuclear factor erythroid-2-related factor 2; DAPI: 4',6-二脒基-2 苯基吡啶 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; Merge: 合并; Magnification: 放大。

图 10 BLF 对 H_2O_2 诱导的氧化应激 MAC-T 中 Nrf2 蛋白免疫荧光表达的影响

Fig.10 Effects of BLF on immunofluorescence expression of Nrf2 protein in oxidative stressed MAC-T induced by H_2O_2

3.5 BLF 对氧化应激奶牛乳腺上皮细胞中 Keap1-Nrf2 信号通路的影响

Keap1-Nrf2 系统是机体对抗环境伤害的主要防御机制,它是一个典型的双组分系统:Keap1 是一种富含半胱氨酸硫醇的氧化还原损伤传感器,Nrf2 为发挥保护作用的协同效应器。细胞质中,Keap1、泛素化连接酶 E3 蛋白(Chu3)和多泛素化 Nrf2 组成泛素 E3 连接酶复合物,这意味着 Nrf2 会通过蛋白酶体系统快速降解,因此,在非应激状态下,Nrf2 翻译后便被不断泛素化降解。然而,当细胞内 ROS 大量产生时或有大量亲电物质时,直接修饰 Keap1 的活性半胱氨酸残基,降低 E3 连接酶复合物的活性,导致 Nrf2 不再被泛素化降解,生成的 Nrf2 可以直接转移到细胞核中,与一种小肌

肉腱膜纤维蛋白(Smaf)异源二聚体结合到抗氧化反应元件/亲电响应元件(ARE/EpRE)并迅速激活一组 II 期基因,因此 Nrf2 是一个主要的调控转录因子^[45]。本试验中,检测 Keap1-Nrf2 信号通路最下游靶基因及蛋白的表达情况后发现,BLF 显著增加了氧化损伤细胞中 *HO-1* 及 *NQO1* 基因及蛋白的表达量,说明 ARE 原件被大量激活。对通路上游进行检测,发现 BLF 显著激活了氧化损伤细胞的 Keap1-Nrf2 信号通路,表现为 Keap1 蛋白表达量显著减少,Nrf2 蛋白表达量显著升高,并且免疫荧光检测结果显示大量 Nrf2 蛋白转移进入细胞核。 H_2O_2 刺激细胞虽然也能激活 Nrf2,清除 ROS,但这种代偿机制无法满足缓解氧化损伤的需要,因此需要使用药物进一步加强 Nrf2 对 MAC-T

的保护作用^[46]。

3.6 BLF 通过自噬影响奶牛乳腺上皮细胞的抗氧化通路

本试验结果表明, BLF 预处理可以减少氧化损伤细胞中 Keap1 蛋白的表达量, 并增加 Nrf2 蛋白的表达量及核转位, 激活 Nrf2 靶基因的转录, 证明 BLF 通过激活 Keap1-Nrf2 信号通路发挥抗氧化作用。但是, 加入 Mdivi-1 后, Keap1 蛋白的表达量恢复, Nrf2 蛋白的表达量也显著降低, 说明加入 Mdivi-1 后 BLF 激活氧化损伤细胞中 Keap1-Nrf2 信号通路的效果被抑制。结合上一部分的结果, 加入 Mdivi-1 后细胞自噬标记物的表达量显著改变, 标志自噬通量的减少, 由此推测, BLF 在促进氧化损伤细胞自噬和激活抗氧化通路之间有较强的关联性, 当 BLF 促进细胞自噬被抑制后, 会在一定程度上抑制抗氧化通路。

4 结 论

在体外培养条件下, BLF 通过激活奶牛乳腺上皮细胞中 AMPK-TFEB 信号通路, 促进 TFEB 核移位, 激活其靶基因的转录, 增强细胞的自噬发生和溶酶体功能, 保护细胞抵御氧化损伤, 且抑制细胞自噬会抑制 Keap1-Nrf2 信号通路的激活。此外, BLF 通过增加 JNK 蛋白的磷酸化促进 Keap1-Nrf2 信号通路的激活, 减少氧化应激的奶牛乳腺上皮细胞中 Keap1 蛋白的表达量, 激活 Nrf2 并促进其核转位, 激活下游靶基因及蛋白的表达, 从而缓解氧化应激。

参考文献:

- [1] ZHU Y Y, WANG K, JIA X Y, et al. Antioxidant peptides, the guardian of life from oxidative stress [J]. Medicinal Research Reviews, 2024, 44 (1) : 275-364.
- [2] LYU C C, YUAN B, MENG Y, et al. Puerarin alleviates H₂O₂-induced oxidative stress and blood-milk barrier impairment in dairy cows [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24 (9) : 7742.
- [3] LI H, ZHANG Y F, LI R, et al. Effect of seasonal thermal stress on oxidative status, immune response and stress hormones of lactating dairy cows [J]. Animal Nutrition, 2021, 7 (1) : 216-223.
- [4] ABUELO A, HERNÁNDEZ J, BENEDITO J L, et al. The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2015, 99 (6) : 1003-1016.
- [5] GU Y P, XUE F, XIAO H R, et al. Bamboo leaf flavonoids suppress oxidative stress-induced senescence of HaCaT cells and UVB-induced photoaging of mice through p38 MAPK and autophagy signaling [J]. Nutrients, 2022, 14 (4) : 793.
- [6] 曹洪志, 李成贤, 李雪梅, 等. 竹叶提取物对肉牛生产性能、瘤胃发酵特征及微生物数量的影响 [J]. 饲料研究, 2022, 45 (1) : 15-19.
CAO H Z, LI C X, LI X M, et al. Effects of bamboo leaf extract on production performance, rumen fermentation characteristics and rumen microbial populations of beef cattle [J]. Feed Research, 2022, 45 (1) : 15-19. (in Chinese)
- [7] 栗明月, 方洛云, 苏汉书, 等. 竹叶提取物对奶牛泌乳性能、血液常规指标、免疫和抗氧化性能的影响 [J]. 动物营养学报, 2019, 31 (7) : 3302-3309.
LI M Y, FANG L Y, SU H S, et al. Effects of bamboo leaf extracts on lactation performance, blood routine indexes and immune and antioxidant ability of dairy cows [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31 (7) : 3302-3309. (in Chinese)
- [8] 李义, 童津津, 栗明月, 等. 竹叶提取物对热应激奶牛泌乳性能及血清生化、抗氧化和免疫指标的影响 [J]. 动物营养学报, 2021, 33 (2) : 900-912.
LI Y, TONG J J, LI M Y, et al. Effects of bamboo leaf extract on lactation performance and indexes of biochemical, antioxidant and immune in serum of dairy cows during heat stress [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33 (2) : 900-912. (in Chinese)
- [9] 侯昆, 童津津, 楚康康, 等. 竹叶黄酮与青蒿提取物对患隐性乳房炎奶牛产奶性能、乳中体细胞数及血清免疫和抗氧化相关指标的影响 [J]. 动物营养学报, 2019, 31 (9) : 4286-4295.
HOU K, TONG J J, CHU K K, et al. Effects of bamboo leaf flavonoids and *Artemisia annua* extract on milk performance, milk somatic cell count and serum immune and antioxidant related indexes of dairy cows with subclinical mastitis [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31 (9) : 4286-4295. (in Chinese)
- [10] 詹经纬, 李欣, 关淑文, 等. 竹叶黄酮对过氧化氢诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 动物营养学报, 2023, 35 (4) : 2616-2628.
ZHAN J W, LI X, GUAN S W, et al. Protective effect of bamboo leaf flavonoids on oxidative damage of bovine mammary epithelial cells induced by hydrogen

- peroxide[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2023, 35(4): 2616–2628. (in Chinese)
- [11] MAGESH S, CHEN Y, HU L Q. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents[J]. Medicinal Research Reviews, 2012, 32(4): 687–726.
- [12] 李建凤, 赵佳桢, 沈义媛, 等. 竹叶黄酮对热应激诱导奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 动物营养学报, 2022, 34(1): 626–639.
- LI J F, ZHAO J Z, SHEN Y Y, et al. Protective effects of bamboo leaf flavonoids on oxidative damage of bovine mammary epithelial cells induced by heat stress[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(1): 626–639. (in Chinese)
- [13] YU Y, LI Z M, CAO G T, et al. Bamboo leaf flavonoids extracts alleviate oxidative stress in HepG2 cells via naturally modulating reactive oxygen species production and Nrf2-mediated antioxidant defense responses[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(6): 1609–1620.
- [14] YANG C M, WANG T X, ZHAO Y J, et al. Flavonoid 4,4'-dimethoxychalcone induced ferroptosis in cancer cells by synergistically activating Keap1/Nrf2/HMOX1 pathway and inhibiting FECH[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2022, 188: 14–23.
- [15] KLIONSKY D J, EMR S D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation[J]. Science, 2000, 290(5497): 1717–1721.
- [16] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728–741.
- [17] FILOMENI G, DE ZIO D, CECCONI F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs[J]. Cell Death and Differentiation, 2015, 22(3): 377–388.
- [18] 高婷, 王子旭, 陈祝茗, 等. ROS 介导的氧化应激与自噬[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3): 656–662.
- GAO T, WANG Z X, CHEN Z M, et al. Oxidative stress and autophagy mediated by reactive oxygen species[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(3): 656–662. (in Chinese)
- [19] 牛慧. 苦参碱对无乳链球菌诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症反应的保护机制研究[D]. 硕士学位论文. 北京: 北京农学院, 2022.
- NIU H. Study on the protective mechanism of matrine against bovine mammary epithelial cells inflammation induced by *Streptococcus agalactiae* [D]. Master's Thesis. Beijing: Beijing University of Agriculture, 2022. (in Chinese)
- [20] GOODE A, BUTLER K, LONG J, et al. Defective recognition of LC3B by mutant SQSTM1/p62 implicates impairment of autophagy as a pathogenic mechanism in ALS-FTLD[J]. Autophagy, 2016, 12(7): 1094–1104.
- [21] TAN C T, CHANG H C, ZHOU Q L, et al. MOAP-1-mediated dissociation of p62/SQSTM1 bodies releases Keap1 and suppresses Nrf2 signaling[J]. EMBO Reports, 2021, 22(1): e50854.
- [22] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, LEVINE B. Methods in mammalian autophagy research[J]. Cell, 2010, 140(3): 313–326.
- [23] CHANG C C, HUANG T Y, CHEN H Y, et al. Protective effect of melatonin against oxidative stress-induced apoptosis and enhanced autophagy in human retinal pigment epithelium cells[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 2018: 9015765.
- [24] CAO S T, WANG C C, YAN J T, et al. Curcumin ameliorates oxidative stress-induced intestinal barrier injury and mitochondrial damage by promoting Parkin dependent mitophagy through AMPK-TFEB signal pathway[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2020, 147: 8–22.
- [25] NARENDRA D, TANAKA A, SUEN D F, et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy[J]. The Journal of Cell Biology, 2008, 183(5): 795–803.
- [26] HAIDAR B, KISS R S, SAROV-BLAT L, et al. Cathepsin D, a lysosomal protease, regulates ABCA1-mediated lipid efflux[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(52): 39971–39981.
- [27] DENNEMÄRKER J, LOHMÜLLER T, MÜLLER S, et al. Impaired turnover of autophagolysosomes in cathepsin L deficiency[J]. Biological Chemistry, 2010, 391(8): 913–922.
- [28] THIRUSANGU P, PATHOULAS C L, RAY U, et al. Quinacrine-induced autophagy in ovarian cancer triggers cathepsin-L mediated lysosomal/mitochondrial membrane permeabilization and cell death[J]. Cancers, 2021, 13(9): 2004.
- [29] LI D, SHAO R, WANG N, et al. Sulforaphane activates a lysosome-dependent transcriptional program to mitigate oxidative stress[J]. Autophagy, 2021, 17(4): 872–887.
- [30] SETTEMBRE C, DI MALTA C, POLITO V A, et al.

- TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis [J]. *Science*, 2011, 332(6036): 1429–1433.
- [31] LU H C, FAN Y B, QIAO C Z, et al. TFEB inhibits endothelial cell inflammation and reduces atherosclerosis [J]. *Science Signaling*, 2017, 10(464): eaah4214.
- [32] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(2): 132–141.
- [33] TRIPATHI D N, CHOWDHURY R, TRUDEL L J, et al. Reactive nitrogen species regulate autophagy through ATM-AMPK-TSC2-mediated suppression of mTORC1 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(32): E2950–E2957.
- [34] YOUNG N P, KAMIREDDY A, VAN NOSTRAND J L, et al. AMPK governs lineage specification through Tfeb-dependent regulation of lysosomes [J]. *Genes & Development*, 2016, 30(5): 535–552.
- [35] POPP L, GOMEZ E, ORJI W, et al. TFEB-mediated activation of the lysosome-autophagy system affects the transduction efficiency of adeno-associated virus 2 [J]. *Virology*, 2017, 510: 1–8.
- [36] JEON S M, CHANDEL N S, HAY N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress [J]. *Nature*, 2012, 485(7400): 661–665.
- [37] WU S B, WU Y T, WU T P, et al. Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1840(4): 1331–1344.
- [38] WU H Q, DING J, LI S H, et al. Metformin promotes the survival of random-pattern skin flaps by inducing autophagy via the AMPK-mTOR-TFEB signaling pathway [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2019, 15(2): 325–340.
- [39] BUELNA-CHONTAL M, ZAZUETA C. Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: a double end sword? [J]. *Cellular Signalling*, 2013, 25(12): 2548–2557.
- [40] XU B Y, TANG X D, CHEN J, et al. Rifampicin induces clathrin-dependent endocytosis and ubiquitin-proteasome degradation of MRP2 via oxidative stress-activated PKC-ERK/JNK/p38 and PI3K signaling pathways in HepG2 cells [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2020, 41(1): 56–64.
- [41] 金晓露. 白藜芦醇抵御奶牛乳腺上皮细胞氧化应激的作用机制研究 [D]. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2016.
- JIN X L. Mechanisms underlying the cytoprotective effects of resveratrol against oxidative stress in bovine mammary epithelial cells [D]. Ph. D. Thesis. Hangzhou: Zhejiang University, 2016. (in Chinese)
- [42] HSU W H, HSIEH Y S, KUO H C, et al. Berberine induces apoptosis in SW620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNK/p38 MAPK and FasL [J]. *Archives of Toxicology*, 2007, 81(10): 719–728.
- [43] HUANG Z Q, WANG C Q, WEI L, et al. Resveratrol inhibits EMMPRIN expression via P38 and ERK1/2 pathways in PMA-induced THP-1 cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 374(3): 517–521.
- [44] SÁNCHEZ-ÁLVAREZ M, STRIPPOLI R, DONADELLI M, et al. Sestrins as a therapeutic bridge between ROS and autophagy in cancer [J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1415.
- [45] YAMAMOTO M, KENSLER T W, MOTOHASHI H. The KEAP1-NRF2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis [J]. *Physiological Reviews*, 2018, 98(3): 1169–1203.
- [46] 李文娟. Nfr2 激动剂通过促进自噬对泛素化蛋白聚合物的清除保护氧化应激诱导的胰岛 β 细胞损伤的作用及机制 [D]. 博士学位论文. 济南: 山东大学, 2014.
- LI W J. NRF2 activator enhances autophagic clearance and viability of beta-cells in a setting of oxidative stress [D]. Ph. D. Thesis. Jin'an: Shandong University, 2014. (in Chinese)

Mechanism of Bamboo Leaf Flavonoids Regulating Antioxidant Pathway and Autophagy to Alleviate Oxidative Stress in Dairy Cow Mammary Epithelial Cells

NIU Haoyu ZHAN Jingwei TAN Jian ZHAO Yuchao* JIANG Linshu*

(Key Laboratory of Dairy Cow Nutrition, College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to explore the effect of bamboo leaf flavonoids (BLF) on the autophagy and antioxidant pathway of dairy cow mammary epithelial cells under oxidative stress, and to explore the correlation between autophagy and Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)-nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway by adding autophagy inhibitor Mdivi-1. The MAC-T cell line of dairy cow mammary epithelial cells was used as the research object. The MAC-T treated in the maintenance medium was set as the control group. The MAC-T treated with the maintenance medium containing (80 µg/mL) BLF was set as the BLF group. The MAC-T treated with the maintenance medium containing (800 µmol/L) hydrogen peroxide (H₂O₂) was set as the H₂O₂ group (induced oxidative stress). The MAC-T treated with the maintenance medium containing (80 µg/mL) BLF and the maintenance medium containing (800 µmol/L) H₂O₂ were set as the BLF+H₂O₂ group. The MAC-T treated with the maintenance medium containing (80 µg/mL) BLF, (1 µmol/L) Mdivi-1 and (800 µmol/L) H₂O₂ was set as BLF+H₂O₂+Mdivi group. The MAC-T treated with the maintenance medium containing (1 µmol/L) Mdivi-1 was set as Mdivi group. After the culturing, real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of autophagy and Keap1-Nrf2 signaling pathway-related genes, Western blot was used to detect the expression of autophagy-related proteins, Keap1-Nrf2 and extracellular signal-regulated kinase (MAPK) signaling pathway-related proteins, and immunofluorescence technique was used to detect transcription factor EB (TFEB) protein expression, Nrf2 protein expression and nuclear translocation. The results showed as follows: 1) BLF pretreatment could significantly increase the expression levels of autophagy markers Beclin1 and Parkin proteins in oxidative damaged cells ($P<0.05$), significantly increase the expression levels of lysosomal function-related proteins cathepsin D (CTSD) and lysosomal associated membrane protein 1 (LAMP1) ($P<0.05$), significantly increase the phosphorylation degree of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) protein and the expression level of TFEB protein ($P<0.05$), promote TFEB nuclear translocation, and significantly increase the relative expression levels of lysosomal-related genes such as ATPase H⁺ transporting V1 subunit H (ATP6V1H), cathepsin B (CTSB) and tripeptidyl peptidase 1 (TPP1) and autophagy-related gene microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) ($P<0.05$). 2) BLF pretreatment significantly reduced the expression level of Keap1 protein in oxidative damaged cells ($P<0.05$), resulting in the stabilization of Nrf2 protein in the cytoplasm and the transfer of Nrf2 protein to the nucleus, which activated the transcription and translation of downstream Nrf2 target genes heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1). However, inhibition of autophagy by Mdivi-1 inhibited the promotion of BLF on the Keap1-Nrf2 signaling pathway. In summary, this study found that BLF alleviates the oxidative stress of dairy cow mammary epithelial cells by promoting autophagy and lysosomal function and activating Keap1-Nrf2 signaling pathway, and there is a crosstalk between autophagy and antioxidant signaling pathways. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2024, 36(7):4677-4692]

Key words: bamboo leaf flavonoids; oxidative stress; autophagy; dairy cow mammary epithelial cells

* Corresponding authors; ZHAO Yuchao, lecturer, E-mail: zhaoyuchao2019@126.com; JIANG Linshu, professor, E-mail: jls@bua.edu.cn

(责任编辑 菅景颖)