



槲皮素通过FOXO1介导自噬抑制 ox-LDL诱导泡沫细胞脂滴形成*

曾江琴¹⁾ 孙勤国¹⁾ 徐鸿婕¹⁾ 丁晓明¹⁾ 牟艳杰¹⁾ 蒋跃文^{2,3)**}

(¹⁾ 武汉市第三医院中医科, 武汉 430062; (²⁾ 湖北中医药大学中医学院伤寒教研室, 武汉 430061; (³⁾ 湖北时珍实验室, 武汉 430060)

摘要 **目的** 探讨槲皮素对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的泡沫细胞脂滴形成的影响及作用机制。**方法** 用50 mg/L的ox-LDL诱导小鼠RAW264.7细胞构建泡沫细胞模型, 分别用不同浓度的槲皮素处理不同时间后, 通过CCK8筛选槲皮素最佳作用浓度和时间。基于构建的泡沫细胞模型, 在添加或不添加AS1842856(FOXO1抑制剂)的情况下, 用槲皮素处理后, 通过油红O染色观察脂滴形成, 通过流式细胞术检测细胞凋亡; 通过免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞FOXO1蛋白表达水平; 通过吖啶橙染色观察自噬小体形成情况; 通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blot检测各组细胞Beclin1、LC3II和P62的mRNA和蛋白质表达水平。**结果** 100 μ mol/L槲皮素干预12 h后, 泡沫细胞脂滴形成和细胞凋亡被显著抑制($P<0.05$)。与对照组相比, 模型组细胞脂滴形成和细胞凋亡增加($P<0.05$), 自噬小体减少($P<0.05$), FOXO1蛋白表达减少($P<0.05$), Beclin1和LC3II蛋白的mRNA和蛋白质表达水平均显著下降($P<0.05$), P62的mRNA和蛋白质表达水平显著增加($P<0.05$)。与模型组相比, 槲皮素处理上调FOXO1蛋白表达($P<0.05$), 诱导自噬小体形成($P<0.05$), 促进Beclin1和LC3II的蛋白质和mRNA表达水平($P<0.05$), 抑制P62的蛋白质和mRNA表达水平($P<0.05$)。而FOXO1抑制剂会逆转槲皮素对ox-LDL诱导的泡沫细胞的作用效果。**结论** 槲皮素通过上调FOXO1的表达诱导自噬, 抑制ox-LDL诱导的脂滴形成。

关键词 槲皮素, 泡沫细胞, 脂滴, 自噬, 叉头盒转录因子O1

中图分类号 R285.5

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0323

CSTR: 32369.14.pibb.20240323

高脂血症是指脂质代谢异常导致血清中一种或多种脂质水平高于正常水平的疾病, 现代医学称之为血脂异常, 可诱发肥胖、糖尿病以及冠心病、高血压等心脑血管疾病, 每年导致全球数百万人死亡^[1]。在心血管疾病中, 动脉粥样硬化最为常见。动脉粥样硬化起始于受损的动脉壁内膜, 当受损的动脉壁发出化学信号, 血液来源的单核细胞会分化为不同的巨噬细胞亚群, 并在细胞因子的复杂环境下进一步分化为过量负载胆固醇的泡沫细胞, 进而在动脉管壁形成粥样斑块^[2]。研究表明, 自噬在维持细胞脂质稳态中起着关键作用, 其失调与动脉粥样硬化的发生发展密切相关。自噬能将多余的胆固醇以胆固醇酯的形式储存在脂滴中, 传递给溶酶体, 在溶酶体中被酸性脂肪酶水解成游离胆固醇, 并从细胞中排出, 从而防止巨噬细胞中胆固醇积聚的有害影响^[3]。

草药在抑制氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱

导的泡沫细胞形成方面具有巨大潜力。槲皮素(quercetin)是一种天然的糖基化类黄酮, 广泛存在于植物的花、果实、蔬菜、茶等多种天然植物中, 能增强肝细胞的自噬作用, 降低非酒精性因素引起的小鼠肝脏脂滴沉积^[4]。槲皮素还可以增加自噬调节的主要介体叉头盒转录因子O1(forkhead box O1, FOXO1)的表达和转录活性, 诱导自噬^[5]。Cao等^[6]通过ox-LDL诱导RAW264.7细胞建立体外泡沫细胞模型, 发现泡沫细胞中自噬相关蛋白LC3II/I、Beclin1的表达降低, 而槲皮素干预可以通过促进自噬减少脂质累积和衰

* 武汉市卫生计生委科研计划(WZ18A01, WZ24B51), 湖北省教育厅科学技术研究计划(D20202001), 李家庚全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号)和湖北省时珍人才工程科研项目(鄂卫函[2024]256号)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 027-68889093, E-mail: hbwhjyw@126.com

收稿日期: 2024-07-16, 接受日期: 2024-10-08

老表型, 但槲皮素能否通过FOXO1介导泡沫细胞的自噬作用尚未有研究。因此, 本研究用ox-LDL诱导RAW 264.7小鼠单核巨噬细胞白血病细胞构建泡沫细胞模型, 观察槲皮素对泡沫细胞模型细胞自噬及脂滴形成的影响并探究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞RAW 264.7来自中国科学院细胞库。槲皮素(中国aladdin公司), ox-LDL、抗体Beclin-1、抗体LC3II、抗体P62、抗体FOXO1、CCK8试剂盒、油红O染色液(中国Bioswamp公司), DMEM(美国Hyclone公司), 胎牛血清(美国Gibco公司), 吖啶橙荧光染色检测试剂盒(北京雷根生物技术有限公司), AnnexinV-FITC/PI凋亡检测试剂盒(美国BD公司), AS1842856(美国MCE公司)。

正置显微镜(德国Leica公司), 流式细胞仪(美国BECKMAN公司), 全自动化学发光分析仪(中国天能源科技有限公司)。

1.2 泡沫细胞模型构建

将冻存的细胞从液氮罐中取出后, 37℃水浴, 使细胞迅速融化。将细胞悬液吸至离心管中, 1 000 r/min离心3 min, 弃上清, 细胞重新悬浮于1 ml DMEM培养基中, 再转移至培养瓶中, 加入4 ml含10%血清的新鲜培养基, 置于37℃、5%CO₂的培养箱内培养。在RAW 264.7细胞培养基中, 加入ox-LDL(终浓度为50 mg/L)培养24 h, 构建泡沫细胞模型。

1.3 CCK8法

收集对数期的细胞, 分于96孔板, 细胞密度 5×10^3 /孔, 置37℃、5% CO₂培养箱中培养过夜, 使细胞贴壁。分别添加5、10、50、100、200和500 μmol/L槲皮素培养0、12、24、48 h; 取出细胞培养板, 向每孔加入10 μl CCK8溶液, 继续培养4 h。使用酶标仪在450 nm处测量各孔的吸光度值(A_{450})。

1.4 细胞处理方式

将细胞分为对照组、模型组、处理组。对照组细胞不进行干预处理, 模型组采用ox-LDL诱导, 处理组在添加或不添加FOXO1抑制剂AS1842856(100 nmol/L)的情况下, 采用100 μmol/L槲皮素干预12 h^[7]。

1.5 油红O染色

收集各组细胞, 小心倒去培养液, PBS漂洗1次, 用10%甲醛溶液固定10 min。将油红O染液置于65℃恒温箱中预热。用PBS漂洗细胞2次, 加入预热后的油红O染液, 在65℃恒温箱中染色30 min。80%丙二醇分化1 min, 在显微镜下观察, 至背景接近于无色为止。用PBS漂洗细胞3次, 于显微镜下观察染色情况。

1.6 流式细胞术

收集各组细胞, 取 1×10^6 个培养基重悬的细胞, 400g, 4℃离心5 min, 弃上清。加入1 ml预冷PBS, 轻轻吹打混匀细胞, 400g, 4℃离心5 min, 弃上清。将细胞重悬于200 μl PBS, 加入10 μl Annexin V-FITC和10 μl PI, 轻轻混匀, 4℃避光孵育30 min。加入300 μl PBS, 随即进行流式检测。

1.7 吖啶橙染色

取AO Stain Buffer和AO Stain, 按照19:1的比例配制工作液。取1 ml工作液覆盖细胞, 室温避光染色15 min。弃去染色液, PBS清洗细胞2次, 1 min/次。于激发滤光片波长488 nm, 阻断滤光片波长515 nm的荧光显微镜下观察。形成自噬小体的细胞经吖啶橙染色可观察到红黄色点状体。

1.8 免疫印迹法(Western blot)

RIPA裂解液裂解细胞, 提取细胞总蛋白质。根据BCA蛋白质定量结果上样, 10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离2.5 h, 转膜后, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h。4℃下分别孵育Beclin1、LC3II、P62和FOXO1一抗(稀释比1:1 000)过夜, PBS洗膜3次。室温孵育二抗(稀释比1:20 000)1 h, PBS洗膜3次, ECL曝光显影。

1.9 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

收集分组处理后的细胞, 使用TRIzol试剂提取总RNA, 逆转录酶试剂盒制备cDNA。使用以下热循环条件: 95℃ 3 min, 然后95℃ 5 s, 56℃ 10 s, 72℃ 25 s, 共40个循环。使用以下引物: Beclin1-F, CTGACAGACAAATCTAAGG, Beclin1-R, AGGGAAGACAAAAACG; LC3II-F, CATCCAA-CCAAAATCC, LC3II-R, TCTCACTCTCATACACCTCT; P62-F, AAGAGAAAAAAGAGTGCCG, P62-R, TCAGACAGGTGCCCGA; GAPDH-F, C-CTTCCGTGTTCTAC, GAPDH-R: GACAACCTGGTCCTCA。

1.10 统计分析

SPSS 22.0统计软件用于数据统计分析, 计量

数据 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均进行3次重复实验, 采用 Student's *t* test 分析组间差异, 单因素方差分析多组间差异, $P < 0.05$ 具有统计学意义。差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素作用浓度及作用时间筛选

如图1所示, 与0 h相比, 12、24和48 h培养条件下, ox-LDL处理的细胞增殖能力整体呈上升状态; 与48 h相比, 12和24 h培养条件下, ox-LDL处理的细胞增殖能力整体呈上升状态。采用不同浓度(5、10、50、100、200和500 $\mu\text{mol/L}$) 槲皮素处理细胞12 h后, 槲皮素作用浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞增殖能力最强。因此, 选择100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素干预12 h为后续实验条件。

2.2 槲皮素抑制ox-LDL诱导的泡沫细胞凋亡和脂滴形成

如图2所示, 相较于对照组, 模型组部分细胞

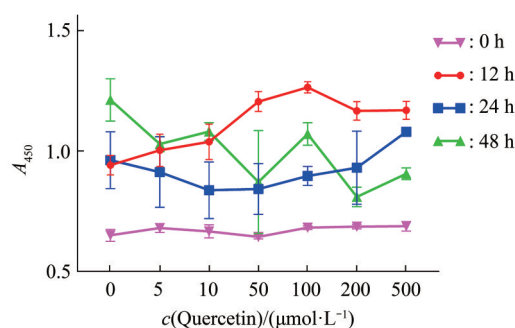


Fig. 1 Changes in cell proliferation ability after treatment with different concentrations of quercetin were detected by CCK8 assay

出现红色着色的脂滴, 细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)。而与模型组相比, 槲皮素组细胞红色着色的脂滴减少, 细胞凋亡率显著下降 ($P < 0.05$)。

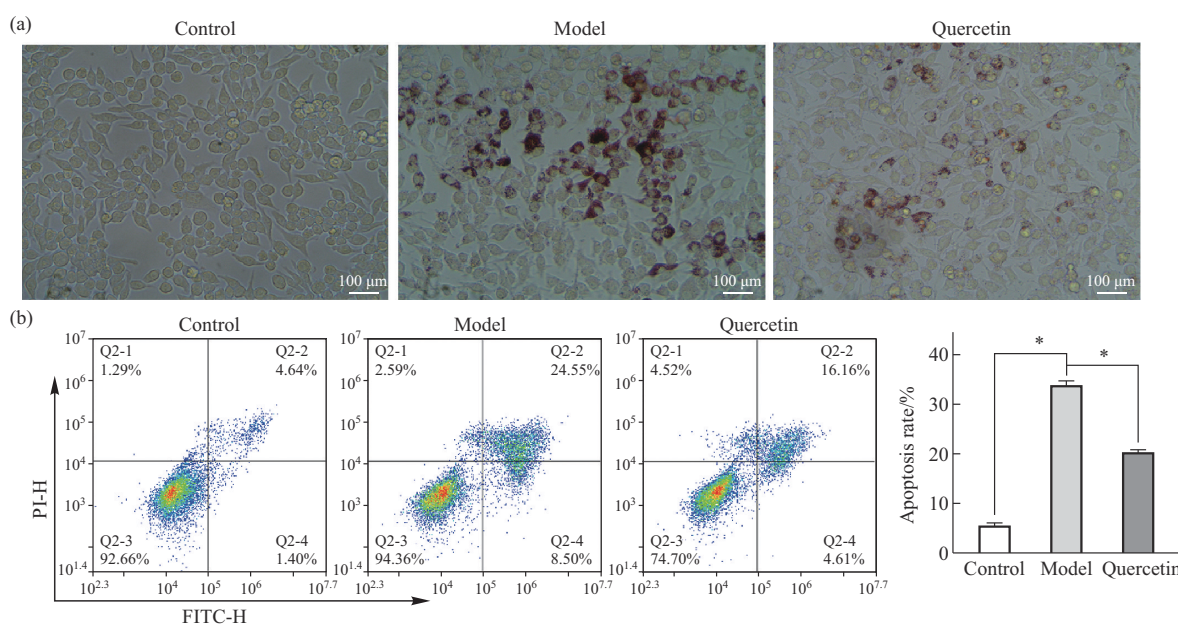


Fig. 2 Effects of quercetin on fat droplet formation and cell apoptosis

(a) Effects of quercetin on fat droplet formation in ox-LDL induced foam cells observed by oil red O staining ($\times 400$). (b) Effects of quercetin on cell apoptosis in ox-LDL induced foam cells detected by Flow cytometry. $*P < 0.05$.

2.3 槲皮素诱导ox-LDL诱导的泡沫细胞中自噬小体形成

如图3所示, 相较于对照组, 模型组细胞红黄色点状减少, 自噬小体减少, Beclin1、LC3II蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), P62蛋白表达水平

显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 槲皮素组红黄色点状体增多, 自噬小体增加, Beclin1、LC3II蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), P62蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

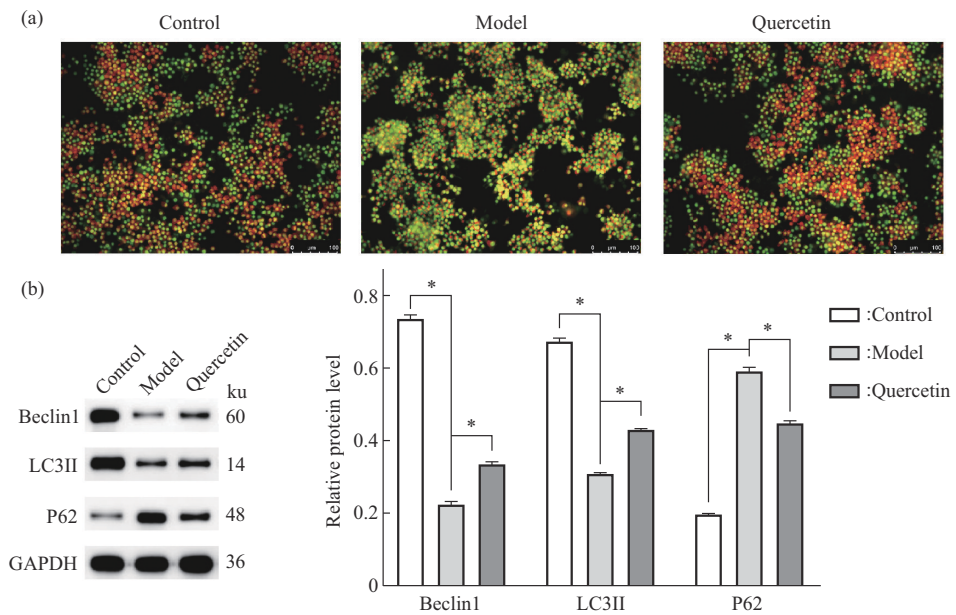


Fig. 3 Effects of quercetin on autophagosome formation and autophagy related protein expression levels
(a) Effects of quercetin on autophagosome in ox-LDL induced foam cells observed by acridine orange staining (×200). (b) Effects of quercetin on protein expression levels of Beclin1, LC3II and P62 in ox-LDL induced foam cells detected by Western blot. * $P<0.05$.

2.4 FOXO1抑制剂逆转了槲皮素处理的泡沫细胞中FOXO1的蛋白质表达水平

如图4所示, 与对照组比较, 模型组 FOXO1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较,

槲皮素组 FOXO1 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$)。与槲皮素组比较, 槲皮素与 FOXO1 抑制剂共处理后逆转了细胞中 FOXO1 的蛋白质表达水平 ($P<0.05$)。

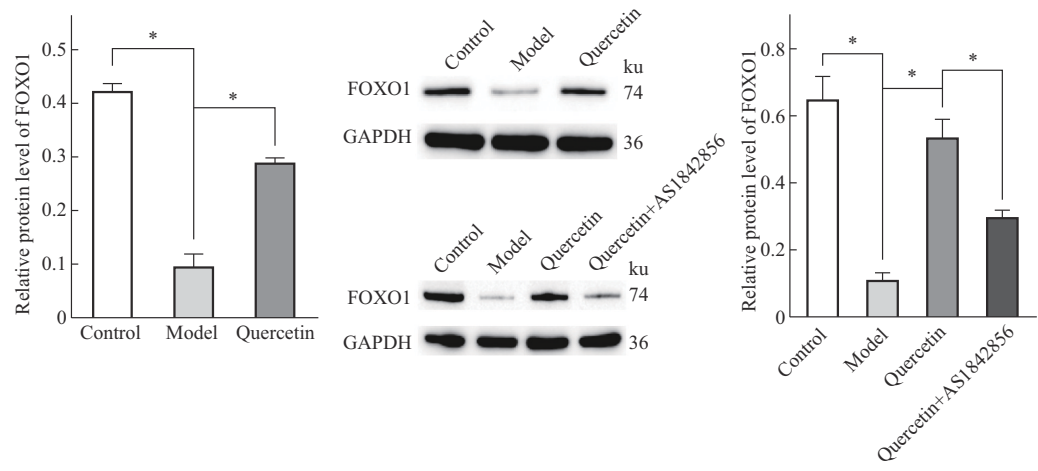


Fig. 4 Effects of quercetin with or without AS1842856 on FOXO1 protein expression in ox-LDL induced foam cells detected by Western blot
* $P<0.05$.

2.5 FOXO1抑制剂逆转了槲皮素处理的泡沫细胞中的脂滴和自噬小体形成

如图5所示, 与对照组比较, 模型组细胞脂滴增多, 自噬小体减少。与模型组比较, 槲皮素组脂

滴减少, 自噬小体增加。与槲皮素组比较, 槲皮素与 FOXO1 抑制剂共处理后细胞逆转了脂滴和自噬小体的形成。

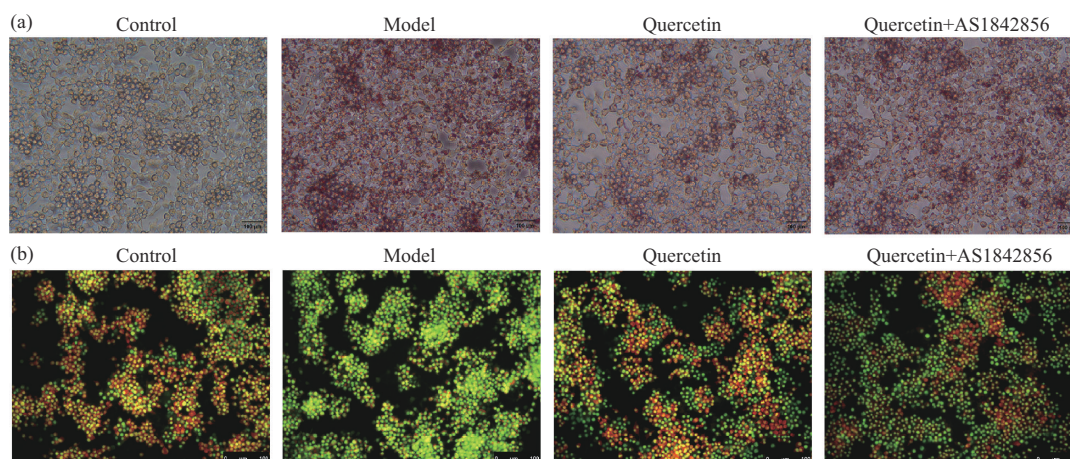


Fig. 5 Reverse effects of AS1842856 on fat droplet formation and autophagosome treated by quercetin

(a) Effects of quercetin with or without AS1842856 on fat droplet formation in ox-LDL induced foam cells observed by oil red O staining ($\times 400$).

(b) Effects of quercetin with or without AS1842856 on autophagosome in ox-LDL induced foam cells observed by acridine orange staining ($\times 200$).

2.6 FOXO1抑制剂逆转了槲皮素处理的泡沫细胞中自噬蛋白表达

如图6所示,与对照组比较,模型组 Beclin1、LC3II 的 mRNA 和蛋白质表达水平显著下降 ($P <$

0.05), P62 的 mRNA 和蛋白质表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,槲皮素组 Beclin1、LC3II 的 mRNA 和蛋白质表达水平显著升高 ($P < 0.05$), P62 的 mRNA 和蛋白质表达水平显著下降

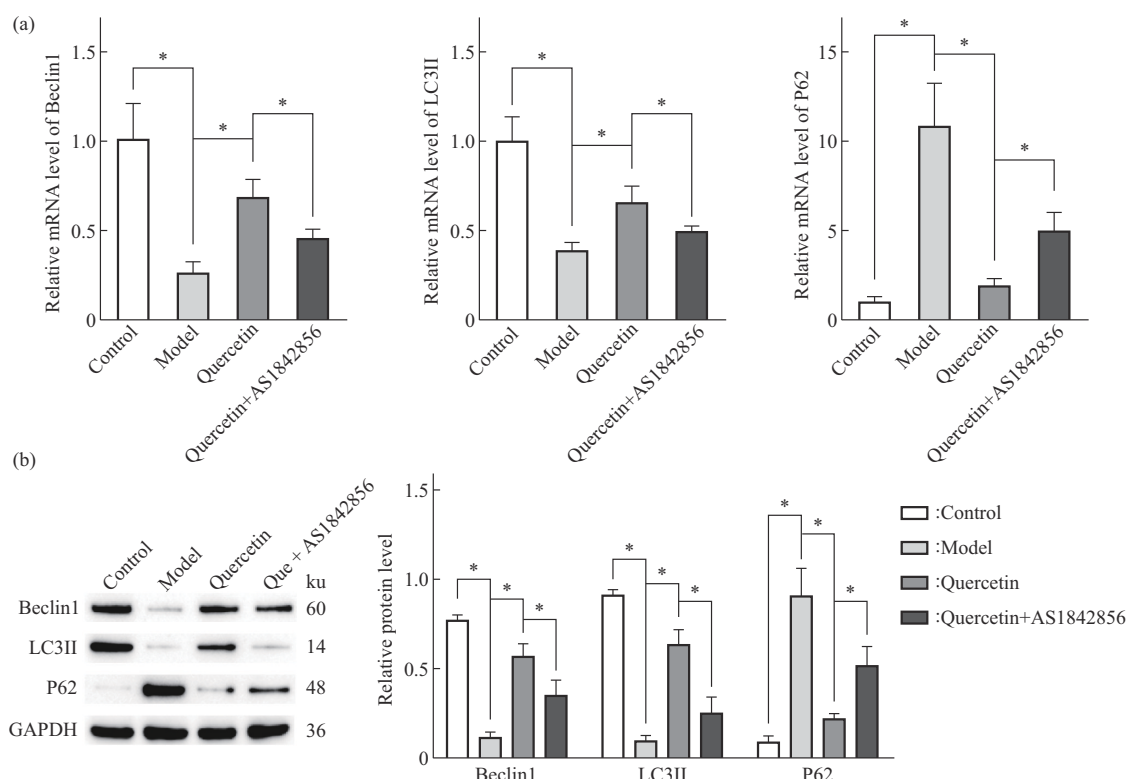


Fig. 6 Effects of quercetin with or without AS1842856 on mRNA and protein expression levels of Beclin1, LC3II and P62 in ox-LDL induced foam cells

(a) qRT-PCR, (b) Western blot. * $P < 0.05$.

($P<0.05$)。与槲皮素组比较, 槲皮素与FOXO1抑制剂共处理后逆转了细胞中Beclin1、LC3II、P62的mRNA和蛋白质表达水平($P<0.05$)。

3 讨 论

血液单核细胞进入血管内膜分化为巨噬细胞, 通过清除受体或吞噬聚集的脂蛋白, 吸收修饰的脂蛋白, 产生胆固醇充盈的巨噬细胞。而当机体出现血脂代谢异常时, ox-LDL不断被巨噬细胞摄取, 大量胆固醇会在巨噬细胞中积累并转化为泡沫细胞^[8]。在晚期动脉粥样硬化病变中, 泡沫细胞经常发生凋亡或坏死, 产生局部血栓阻碍血液流动^[9]。因此, 抑制巨噬细胞衍生泡沫细胞的形成可能是预防和减轻动脉粥样硬化的一种有前景的策略。作为可能是最广泛和已知的自然衍生的黄酮醇, 槲皮素能够逆转高脂血症的影响, 促进储存的胆固醇外排, 减少泡沫细胞的形成^[10]。本研究中, ox-LDL诱导泡沫细胞中形成的脂滴增多, 细胞凋亡率增加, 槲皮素处理逆转了ox-LDL的诱导作用。这说明槲皮素能够抑制泡沫细胞脂滴的形成和细胞凋亡, 减少动脉粥样硬化等心血管病的对机体的危害。

自噬是细胞自我修复的一种形式, 抑制冠状动脉和人脐静脉内皮细胞的异常自噬, 能减少巨噬细胞凋亡和坏死, 维持动脉斑块的稳定性^[11]。LC3和Beclin-1是监测自噬的有效生物标志物。Beclin1是自噬途径中影响自噬体形成的关键蛋白质, 定位于吞噬泡, 促进自噬体的成熟, 调控自噬的发生和发展。LC3是明确贯穿整个自噬过程并出现在晚期自噬溶酶体中的自噬相关蛋白, LC3的C端被ATG4加工生成LC3I, 进而与磷脂酰乙醇胺的结合转化为LC3II, 代表自噬的启动^[12]。P62通过偶联于LC3, 作为调节因子参与自噬体的构成, 在自噬的中晚期被降解。LC3II升高, P62同时降低, 表明自噬增强^[13]。Robichaud等^[14]研究发现, 动脉粥样硬化期间动脉泡沫细胞群的自噬受损, 但可以通过药理手段挽救, 以促进反向胆固醇转运和动脉粥样硬化斑块的消退。Zhou等^[15]通过实验发现, ox-LDL刺激下的内皮细胞中, LC3II/I比和Beclin1蛋白的表达下降, P62蛋白的表达增加, 自噬体的形成减少, 自噬途径被抑制。自噬抑制降低了槲皮素的保护作用, 而槲皮素通过下调P62和激活Beclin1和LC3II来刺激自噬^[16]。因此, 自噬可作为槲皮素在人类疾病中的保护作用的分子靶点。本

研究中, 槲皮素处理逆转了ox-LDL诱导的泡沫细胞自噬抑制, 细胞中自噬小体增多, Beclin1和LC3II蛋白表达上调, P62蛋白表达下调。这说明槲皮素在泡沫细胞自噬受到抑制时发挥促自噬作用, 调控自噬蛋白促进自噬小体生成, 减轻机体损伤。

研究表明, FOXO1是FOXO家族的一种转录因子, 是不同细胞类型和疾病条件下自噬的关键介质。在骨形成中, 过表达FOXO1启动了自噬诱导, 与自噬相关蛋白7的相互作用增强。相反, FOXO1敲除阻碍了FOXO1与自噬相关蛋白7结合, 导致自噬活性受损^[17]。此外, 激活FOXO1表达, 会上调哺乳动物脂肪细胞中溶酶体脂肪酶的表达, 以及上调小鼠脂肪细胞中脂肪甘油三酯脂肪酶的表达, 促进脂质分解代谢^[18]。AS1842856是FOXO1抑制剂, 添加AS1842856后, 细胞中FOXO1活性被抑制。FOXO1通路功能异常会导致多种代谢性疾病, 包括糖尿病、肥胖症和动脉粥样硬化等。在ox-LDL处理的血管平滑肌细胞和颈动脉粥样硬化患者的血清样本中, FOXO1 mRNA和蛋白质的表达均显著降低^[19]。本研究中, ox-LDL诱导的泡沫细胞中FOXO1蛋白表达下降, 槲皮素处理后FOXO1蛋白表达被上调。AS1842856和槲皮素共处理后, 泡沫细胞中自噬小体减少, Beclin1和LC3II蛋白表达下降, P62蛋白表达上调, 脂滴形成减少。这说明槲皮素可能通过介导FOXO1蛋白调控泡沫细胞自噬, 抑制脂滴增多。

4 结 论

自噬在动脉粥样硬化中发挥重要作用。槲皮素作为有效的治疗药物, 可通过上调FOXO1蛋白表达, 促进细胞自噬, 进而抑制ox-LDL诱导的泡沫细胞脂质过度积累。

参 考 文 献

- [1] Liu Y, Liu C, Kou X, *et al.* Synergistic hypolipidemic effects and mechanisms of phytochemicals: a review. *Foods*, 2022, **11**(18): 2774
- [2] Ding Y, Gong W, Zhang S, *et al.* Protective role of sirtuin3 against oxidative stress and NLRP3 inflammasome in cholesterol accumulation and foam cell formation of macrophages with ox-LDL-stimulation. *Biochem Pharmacol*, 2021, **192**: 114665
- [3] Ouimet M, Ediriweera H, Afonso M S, *et al.* MicroRNA-33 regulates macrophage autophagy in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, **37**(6): 1058-1067

- [4] Cao P, Wang Y, Zhang C, *et al.* Quercetin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) *via* the promotion of AMPK-mediated hepatic mitophagy. *J Nutr Biochem*, 2023, **120**: 109414
- [5] He Y, Cao X, Guo P, *et al.* Quercetin induces autophagy *via* FOXO1-dependent pathways and autophagy suppression enhances quercetin-induced apoptosis in PSMCs in hypoxia. *Free Radic Biol Med*, 2017, **103**: 165-176
- [6] Cao H, Jia Q, Yan L, *et al.* Quercetin suppresses the progression of atherosclerosis by regulating MST1-mediated autophagy in ox-LDL-induced RAW_{264.7} macrophage foam cells. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(23): 6093
- [7] Zhu Z, Li J, Zhang X. Salidroside protects against ox-LDL-induced endothelial injury by enhancing autophagy mediated by SIRT1-FoxO1 pathway. *BMC Complement Altern Med*, 2019, **19**(1): 111
- [8] Zhang C, Wu X, Shi P, *et al.* Diterpenoids inhibit ox-LDL-induced foam cell formation in RAW_{264.7} cells by promoting ABCA1 mediated cholesterol efflux. *Front Pharmacol*, 2023, **14**: 1066758
- [9] Duan H, Song P, Li R, *et al.* Attenuating lipid metabolism in atherosclerosis: the potential role of anti-oxidative effects on low-density lipoprotein of herbal medicines. *Front Pharmacol*, 2023, **14**: 1161657
- [10] Papakyriakopoulou P, Velidakis N, Khattab E, *et al.* Potential pharmaceutical applications of quercetin in cardiovascular diseases. *Pharmaceuticals*, 2022, **15**(8): 1019
- [11] Zhang Y, Zhang H. Identification of biomarkers of autophagy-related genes between early and advanced carotid atherosclerosis. *Int J Gen Med*, 2022, **15**: 5321-5334
- [12] Dai M, Hillmeister P. Exercise-mediated autophagy in cardiovascular diseases. *Acta Physiol*, 2022, **236**(3): e13890
- [13] Fan Y, Zhang Y, Zhao H, *et al.* IncR-GAS5 upregulates the splicing factor SRSF10 to impair endothelial autophagy, leading to atherogenesis. *Front Med*, 2023, **17**(2): 317-329
- [14] Robichaud S, Rasheed A, Pietrangelo A, *et al.* Autophagy is differentially regulated in leukocyte and nonleukocyte foam cells during atherosclerosis. *Circ Res*, 2022, **130**(6): 831-847
- [15] Zhou H, Jiang F, Leng Y. Propofol ameliorates ox-LDL-induced endothelial damage through enhancing autophagy *via* PI3K/Akt/m-TOR pathway: a novel therapeutic strategy in atherosclerosis. *Front Mol Biosci*, 2021, **8**: 695336
- [16] Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Farkhondeh T, *et al.* Autophagy as a molecular target of quercetin underlying its protective effects in human diseases. *Arch Physiol Biochem*, 2022, **128**(1): 200-208
- [17] Jiang Y, Luo W, Zhou F, *et al.* The role of FOXO1-mediated autophagy in the regulation of bone formation. *Cell Cycle*, 2023, **22**(7): 829-840
- [18] Zhang L, Zhang Z, Li C, *et al.* S100A11 promotes liver steatosis *via* FOXO1-mediated autophagy and lipogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, **11**(3): 697-724
- [19] Fan M, Huang Y, Li K, *et al.* Ox-LDL regulates proliferation and apoptosis in VSMCs by controlling the miR-183-5p/FOXO1. *Genes Genomics*, 2022, **44**(6): 671-681

Quercetin Inhibits Lipid Droplet Formation in ox-LDL-induced Foam Cells Through FOXO1-mediated Autophagy*

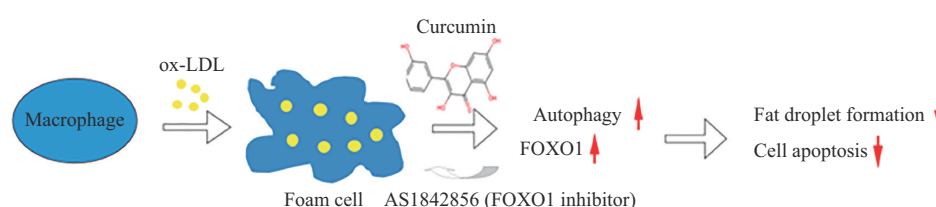
ZENG jiang-Qin¹⁾, SUN Qin-Guo¹⁾, XU Hong-Jie¹⁾, DING Xiao-Ming¹⁾,
MOU Yan-Jie¹⁾, JIANG Yue-Wen^{2,3)**}

¹⁾Department of traditional Chinese medicine, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430062, China;

²⁾Department of Shang Han, College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;

³⁾Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430060, China)

Graphical abstract



Abstract Objective The aim of this study was to investigate the effect and mechanism of quercetin on lipid droplet formation in foam cells induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** Mouse RAW264.7 cells were induced by 50 mg/L ox-LDL to construct a foam cell model. After different quercetin concentrations were treated for different time, the optimal quercetin concentration and time were screened by CCK8 assay. Based on the constructed foam cell model, the formation of fat droplets was observed by oil red O staining after quercetin treatment with or without AS1842856 (FOXO1 inhibitor). Apoptosis was detected by flow cytometry. The protein expression of FOXO1 in each group was detected by Western blot. Autophagosome formation was observed by acridine orange staining. The mRNA and protein expression levels of Beclin1, LC3II and P62 were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** After being treated with 100 μ mol/L quercetin for 12 h, the formation of fat droplets and apoptosis of foam cells were inhibited ($P<0.05$). Compared with control group, there was an increase in fat droplet formation and apoptosis ($P<0.05$), a decrease in autophagosome ($P<0.05$), a decrease in FOXO1 protein expression ($P<0.05$), a decrease in Beclin1 and LC3II protein and mRNA expression levels ($P<0.05$), and the expression levels of P62 protein and mRNA were found to be increased ($P<0.05$) in model group. Compared with model group, quercetin treatment up-regulated FOXO1 protein expression ($P<0.05$), induced autophagosome formation ($P<0.05$), promoted the protein and mRNA expression levels of Beclin1 and LC3II ($P<0.05$), and inhibited the protein and mRNA expression levels of P62 ($P<0.05$). In addition, treatment with the FOXO1 inhibitor AS1842856 reversed quercetin's effect on OX-LDL-induced foam cells. **Conclusion** Quercetin induced autophagy by upregulating FOXO1 expression and inhibited fat droplet formation induced by OX-LDL.

Key words quercetin, foam cells, fat drops, autophagy, forkhead box O

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0323

CSTR: 32369.14.pibb.20240323

* This work was supported by grants from Wuhan Health and Family Planning Commission Research Project (WZ18A01, WZ24B51), Science and Technology Research Project of Hubei Education Department (D20202001), Li Jiageng National Famous Elderly Chinese Medicine Experts Inheritance Workshop Construction Project (National TCM Human Education Document [2022] No. 75), and Shizhen Talent Program of Hubei Province for Scientific Research (Hubei Health Document [2024] No. 256).

** Corresponding author.

Tel: 86-27-68889093, E-mail: hbwhjyw@126.com

Received: July 16, 2024 Accepted: October 8, 2024