

芒果苷对高糖诱导下系膜细胞自噬的影响

王晓丹^{1,2}, 高丽辉¹, 林 华¹, 王晋文², 牛艳芬¹, 李 玲^{1*}

¹昆明医科大学生物医学工程研究中心, 昆明 650500; ²昆明医科大学附属延安医院, 昆明 650051

摘要: 本文旨在探讨芒果苷对高糖诱导系膜细胞增殖的抑制作用, 并从自噬角度阐述可能的机制。采用 CCK8 法检测芒果苷对高糖诱导系膜细胞增殖的抑制作用, Western blot 检测芒果苷给药 24 h 后 LC3-II 蛋白的表达, 采用 GFP-LC3 绿色荧光追踪检测芒果苷对系膜细胞自噬体数量的影响。结果表明: 与高糖组相比, 芒果苷 5×10^{-5} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-6} mol/L 能明显改善系膜细胞增殖 ($P < 0.01$)。与高糖组相比, 芒果苷给药 24 h 后 5×10^{-5} 、 1×10^{-5} mol/L 组 LC3-II 蛋白的表达升高 ($P < 0.05$)。芒果苷给药组 (1×10^{-5} 、 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L) 1 h、3 h GFP-LC3 绿色点状荧光明显增多。提示芒果苷具有抑制高糖诱导下系膜细胞的增殖作用, 其机制可能是通过提高系膜细胞自噬水平, 从而维持细胞内环境的稳定。

关键词: 芒果苷; 自噬; 系膜细胞; 糖尿病肾病

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.12.021

Effects of Mangiferin on Autophagy in Mesangial Cell with High Glucose Condition

WANG Xiao-dan^{1,2}, GAO Li-hui¹, LIN Hua¹, WANG Jin-wen², NIU Yan-fen¹, LI Ling^{1*}

¹Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

²Affiliated Yanan Hospital Kunming Medical University, Kunming 650051, China

Abstract: To study the anti-proliferative effect of mangiferin on mesangial cell with high glucose condition, and its role on mesangial cell autophagy. CCK8 method was used to detect the anti-proliferative effect of mangiferin on mesangial cell with high glucose condition. After treatment with 24 h, the expression levels of autophagy marker LC3-II protein in these five groups were detected by western blot. The GFP-LC3 green fluorescent trace method was used to detect autophagy of mesangial cells. The results showed that compared with high glucose group, Mangiferin treatment group (5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 5×10^{-6} mol/L) can significantly inhibit mesangial cell proliferation ($P < 0.01$). Compared with high glucose group, LC3-II protein expression level of mangiferin treatment group (5×10^{-5} , 1×10^{-5} mol/L) was higher ($P < 0.05$). Mangiferin treatment group (1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5} mol/L), the green fluorescent dot significantly increased. Mangiferin can inhibit the proliferation of mesangial cells with high glucose condition, its mechanism may be through improving the autophagy level of mesangial cell, maintaining the stability of environment in mesangial cell.

Key words: mangiferin; autophagy; mesangial cell; diabetic nephropathy

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 最常见的微血管并发症及主要的死亡原因, 临床治疗棘手, 迫切需要新的延缓 DN 的药物。DN 的主要病理改变为系膜细胞增殖及系膜基质增多积聚。改善系膜细胞增殖及系膜基质产生增多是缓解 DN 的关键。芒果苷 (Mangiferin) 又名芒果素、知母宁, 广泛分布于百合科植

物知母, 漆树科植物芒果树、扁桃树, 龙胆科植物东北龙胆、川西獐芽菜和水龙骨科植物光石韦等中^[1], 芒果苷具有抗氧化^[2]、抗肿瘤^[3,4]、免疫调节作用^[5]及降尿酸等^[6-8]作用。近年的研究表明芒果苷能改善 DN 大鼠肾小球系膜细胞增殖及系膜基质的增生, 降低蛋白尿, 延缓 DN 的进展, 但机制尚不明确。目前研究发现, 系膜细胞自噬失调可能是 DN 发病机制之一, 本研究将从细胞水平探讨芒果苷对高糖诱导系膜细胞增殖的抑制作用, 并从自噬角度探讨其机制, 为芒果苷治疗 DN 提供理论依据。

收稿日期: 2017-07-07 接收日期: 2017-10-30

基金项目: 国家自然科学基金 (81660615); 云南省基金重点项目 (2017FE467-004)

* 通信作者 Tel: 86-871-65922743; E-mail: kmli62@163.com

1 材料与方法

1.1 试验药物

芒果苷:分子量为 422.33,根据文献描述的方法从芒果叶中提取^[9],用高效液相色谱法测定纯度 >90%。

1.2 细胞株及质粒

大鼠系膜细胞(RMC)株:中国科学院昆明动物所赠予。重组质粒 pEGFP-LC3,由 Frederick W. Alt、In Hye Lee 和 Toren Finkel 等学者馈赠,经 addgene 公司提供,货号:24920。

1.3 试剂

小牛血清(美国 Front 公司)、胰蛋白、d-葡萄糖(美国 Sigma 公司)、DMEM 培养基干粉(美国 Gibco 公司)、细胞计数 Kit8 (CCK 8)试剂盒(日本同仁化学研究所)、质粒提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司 货号:DP117]、脂质体 2000 转染试剂盒(英杰公司,美国)、兔抗鼠 LC3B 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国)、羊抗兔二抗(南京凯基)、 β -actin(巴奥德公司,美国)。

1.4 仪器

BB 5060UV 二氧化碳细胞培养箱(德国 Heraeus 公司)、倒置光显微镜、光学显微镜(日本 Olympus 公司)、Bio-Rad Chemi Doc MP 多功能成像系统、全波长紫外-可见光酶标仪 Bio-Tek 型号:PowerWave XS、美国 ND-2000 超微量核酸蛋白测定仪。

1.5 实验方法

1.5.1 CCK 8 法测定芒果苷对高糖诱导下的系膜细胞的抗增殖作用

大鼠系膜细胞用 DMEM 低糖培养基(葡萄糖浓度为 5.6 mmol/L),37 °C,5% CO₂ 条件下培养。细胞长至 70%,加 0.25% 胰酶消化,调整细胞浓度为 6×10^7 个/L,加入 96 孔板中,每孔 100 μ L,37 °C、5% CO₂ 孵育箱中孵育过夜,换用无血清的基础培养基培养 24 h 行同步化生长,然后将细胞分为 8 组:对照组(葡萄糖浓度为 5.6 mmol/L)、高糖组(葡萄糖浓度为 30 mmol/L)、高糖 + 芒果苷组(芒果苷浓度分别为 5×10^{-5} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-6} 、 1×10^{-6} 、 5×10^{-7} 、 1×10^{-7} mol/L)。根据不同浓度使用高糖培养基稀释芒果苷后分别加入 96 孔板,每孔 100 μ L,另设空白对照,每组设 6 个复孔,培养 48 h 后加入 CCK8 试剂 10 μ L 继续培养 2 h,酶标仪测定 450 nm 处吸光度的 OD 值。实验重复 3 次。

1.5.2 Western blot 检测高糖诱导 24 h 后芒果苷不同浓度组自噬标志蛋白 LC3-II 的表达

将 6 孔板上的 5 组细胞:①正常组(葡萄糖浓度为 5.6 mmol/L)②高糖组(葡萄糖浓度为 30 mmol/L)③高糖 + 芒果苷治疗组(5×10^{-5} mol/L)④高糖 + 芒果苷治疗组(1×10^{-5} mol/L)⑤高糖 + 芒果苷治疗组(5×10^{-6} mol/L)加胰酶消化后 1000 转,5 min 离心,弃上清,每组加 100 μ L 裂解液(含蛋白酶及磷酸酶抑制剂),混匀后冰上静置 30 min,4 °C、12000 rpm 离心 30 min,取上清为总蛋白。BCA 法进行蛋白定量。总蛋白上样量为 50 μ g,聚丙烯酰胺凝胶电泳后转印至 0.22 μ m PVDF 膜(LC3),5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入用 5% 脱脂奶粉稀释的 LC3B(1:1000)、及标准内参 β -actin(1:1000)4 °C 孵育过夜。一抗孵育后用 TBST 洗膜,15 min \times 3 次,再用 5% 脱脂奶粉稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(1:2000)、羊抗兔抗体(1:1000),37 °C 孵育 1 h, TBST 洗膜 15 min \times 3 次,洗膜后加 ECL 试剂,于 Bio-Rad Chemi Doc MP 多功能成像系统显影,用该系统软件对 Western blot 条带进行定量分析,读取灰度值。

1.5.3 倒置荧光显微镜下观察系膜细胞转染 GFP-LC3 绿色荧光蛋白后,高糖诱导下芒果苷对系膜细胞自噬的影响

1.5.3.1 提取质粒 DNA,酶切鉴定

将 LB 固体培养基(含卡那霉素 30 μ g/mL)倒入培养皿中,每个培养皿 25 mL,凝固后,放入装有 3 mL LB 液体培养基(含卡那霉素 50 μ g/mL)的摇菌管中,37 °C 摇床 220 rpm 震荡培养 12 ~ 16 h,收集菌落用无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒 DNA(步骤略),取 2.5 μ L 质粒 DNA 样品,在 ND-2000 超微量核酸蛋白测定仪中测浓度。将重组表达的载体 pEGFP-LC3 进行酶切鉴定,加入相应的限制内切酶和反应缓冲液,于 37 °C 恒温孵育 2.5 h,体系如下:质粒 DNA :1 μ g、10 \times Buffer3:2 μ L、0.1% BSA:2 μ L、EcoRI:0.5 μ L、BamHI:0.5 μ L、加入 AddRNase-free ddH₂O 使总量达到 20 μ L。琼脂糖凝胶电泳观察条带位置。

1.5.3.2 倒置荧光显微镜观察芒果苷对系膜细胞的自噬的影响

将质粒转染进入系膜细胞,使用脂质体 2000 转染试剂盒,按照说明书:24 孔板每孔 0.5 μ g 质粒,每孔转染试剂 1.5 μ L(1:3 的比例),用 OPTI-MEM

培养基稀释质粒及转染试剂,混匀后室温静置 5 min,滴入相应的孔,每孔 50 μL 。24 h 后,将转染的细胞用胰酶消化,从新收集细胞,再接种在另外一个新的 24 孔板中,细胞贴壁后,更换含不同浓度芒果苷的高糖培养基,共分 6 个组:正常组 (GLU:5.6 mmol/L),高糖组 (GLU:30 mmol/L),高糖加芒果苷 (1×10^{-5} 、 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L)。给药后立即在倒置荧光显微镜下观察,设为 0 h,随后给药后 1、3、24 h 分别观察计数 GFP-LC3 绿色点状荧光数量并拍照。

1.6 统计学分析方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数的比较采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析,采用 LSD 法进行两两比较,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 不同浓度芒果苷对高糖诱导下系膜细胞增殖的影响

如表 1 所示,与正常组相比,高糖组系膜细胞明显增殖 ($P < 0.01$),与高糖组相比,芒果苷治疗组中 (5×10^{-5} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-6} mol/L) 3 组能明显改善高糖诱导下的系膜细胞增殖 ($P < 0.01$),但芒果苷治疗组中 (1×10^{-6} 、 5×10^{-7} 、 1×10^{-7} mol/L) 3 组对高糖诱导下的系膜细胞无明显抗增殖作用 ($P > 0.05$)。

表 1 芒果苷对高糖诱导的系膜细胞抗增殖作用

Table 1 Mangiferin inhibit the proliferation of mesangial cells with high glucose condition

组别 Group	n	$\bar{x} \pm s$ (OD 值)
正常组 Control Group	6	1.28 \pm 0.16
高糖组 High Glucose Group	6	2.98 \pm 0.17 **
芒果苷 Mangiferin (5×10^{-5})	6	2.37 \pm 0.14##
芒果苷 Mangiferin (1×10^{-5})	6	2.50 \pm 0.14##
芒果苷 Mangiferin (5×10^{-6})	6	2.61 \pm 0.14##
芒果苷 Mangiferin (1×10^{-6})	6	2.87 \pm 0.16
芒果苷 Mangiferin (5×10^{-7})	6	2.85 \pm 0.20
芒果苷 Mangiferin (1×10^{-7})	6	2.80 \pm 0.20

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与高糖组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, ** $P < 0.01$; Compare with High Glucose Group, ## $P < 0.01$.

2.2 Western blot 检测高糖诱导 24 h 后芒果苷各组 LC3-II 蛋白的表达

如图 1 所示,与正常组比较,高糖组 LC3-II 的表达明显减少 ($P < 0.05$)。与高糖组相比,芒果苷治疗组 5×10^{-5} 、 1×10^{-5} mol/L LC3-II 蛋白的表达水

平升高 ($P < 0.05$)。

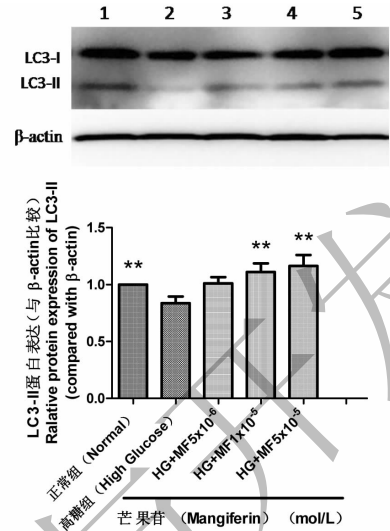


图 1 芒果苷上调高糖诱导下的 LC3-II 蛋白的表达

Fig. 1 Mangiferin enhances the expression level of LC3-II with high glucose condition

注:1、正常组,2、高糖组,3、高糖 + 芒果苷 5×10^{-6} 组,4、高糖 + 芒果苷 1×10^{-5} 组,5、高糖 + 芒果苷 5×10^{-5} 组 (单位 mol/L); 与高糖组比较, * $P < 0.05$

Note: 1. normal group, 2. high glucose group, 3. high glucose + mangiferin group (5×10^{-6}), 4. high glucose + mangiferin group (1×10^{-5}), 5. high glucose + mangiferin group (5×10^{-5}) (mol/L); Compare with High Glucose Group, * $P < 0.05$

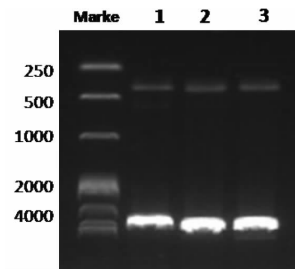


图 2 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of recombinant plasmid

注:1, 2, 3 均为重组质粒 pEGFP-LC3

Note: 1, 2 and 3 are recombinant plasmid pEGFP-LC3

2.3 重组质粒 pEGFP-LC3 酶切鉴定的结果

将酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示, pEGFP-LC3 被切出两个条带,位于 500 bp 和 4000 bp 左右,与预期的 DNA 389 bp 和 4731 bp 一致 (图 2)。

2.4 GFP-LC3 瞬时转染观察芒果苷对高糖诱导的系膜细胞自噬的影响

如图 3 所示,与正常组相比,高糖组 1、3 h 绿色

荧光蛋白明显减少,与高糖组相比,芒果苷治疗组(1×10^{-5} 、 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L)给药后 1、3 h 的绿色点状荧光增多。尤其是高剂量组 $4 \times$

10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L 组绿色点状荧光在 3 h 明显增多。各组在处理 24 h 观察绿色点状荧光明显消失。

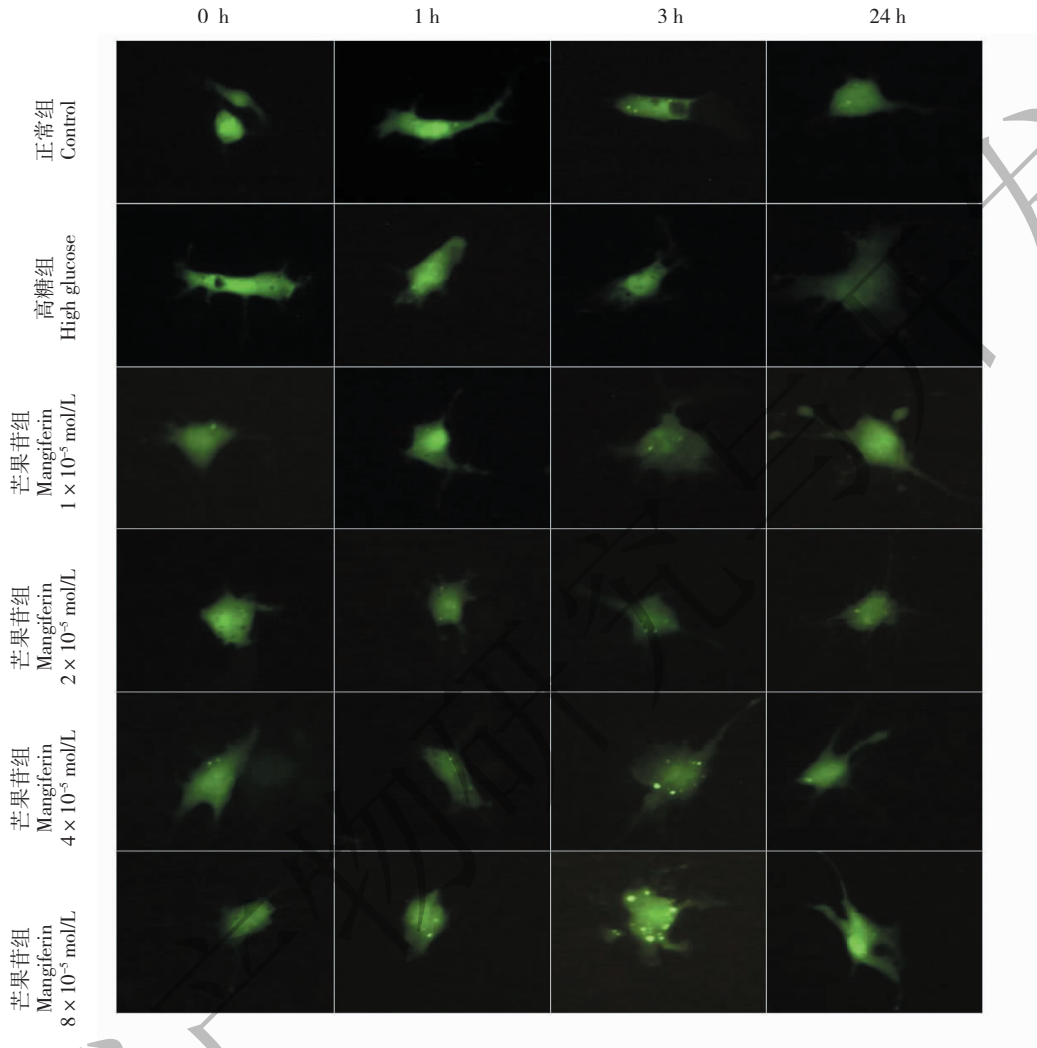


图3 芒果苷提高高糖诱导下的系膜细胞的自噬水平

Fig. 3 Mangiferin enhances the autophagy level of mesangial cells with high glucose condition

3 讨论与结论

本实验使用 CCK8 法检测系膜细胞在高糖诱导下的增殖情况。与正常组相比,高糖培养 48 h 后系膜细胞出现明显的增殖作用,系膜细胞增多与系膜基质增多是 1 型及 2 型糖尿病肾病患者共同的病理变化。高糖模型建立成功。

我们的结果显示与高糖组相比,芒果苷(5×10^{-5} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-6} mol/L)3 个高浓度组可以明显抑制高糖诱导下的系膜细胞的增殖作用,该实验结果与 Li X 的研究结果一致^[12]。而芒果苷 3 个低浓

度组(1×10^{-6} 、 5×10^{-7} 、 1×10^{-7} mol/L)对高糖诱导下的系膜细胞无明显抗增殖作用,表明芒果苷抑制高糖诱导下的系膜细胞的增殖作用具有明显的浓度依赖性。

近年研究发现自噬在 DN 发生发展的机制中有重要作用。高血糖、高血压等应激因素往往会导致细胞内受损的蛋白和细胞器积聚,产生细胞毒性,若不能及时清除就会诱发不可逆性的细胞损伤。自噬能够通过细胞内的溶酶体有效清除受损物质,受损物质首先在细胞质内被包裹形成自噬体,之后溶酶体会与自噬体融合并降解自噬体内的成分,降解产

物送至细胞质再利用。所以自噬对维持细胞内环境稳态和细胞生存至关重要。

为了研究芒果苷对高糖诱导下系膜细胞抗增殖作用是否与自噬相关,我们选用了以上3个有抗增殖作用的芒果苷浓度(5×10^{-5} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-6} mol/L),处理高糖作用下的系膜细胞24 h,随后提取蛋白,western blot检测自噬标志物LC3-II的蛋白表达。提示芒果苷 5×10^{-5} 、 1×10^{-5} mol/L组可能具有增强高糖诱导下系膜细胞自噬的作用,随后我们使用4个不同的浓度分别是: 1×10^{-5} 、 2×10^{-5} 、 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L,使用GFP-LC3绿色荧光视踪的方法检测自噬体数量的变化。

微管相关蛋白轻链3(MAP-LC3),简称LC3,参与了自噬的形成,并被证明是哺乳动物细胞中常见的自噬小体标记蛋白之一。自噬形成时,胞浆型LC3会酶解掉一小段多肽形成LC3-I,LC3-I跟磷脂酰乙醇胺即脑磷脂(PE)结合转变为(自噬体)膜型(即LC3-II),这两种形式在正常细胞中都是存在的,而发生自噬的细胞中LC3-II会增加。目前使用Western blot检测到LC3-II蛋白的表达来判断自噬的发生。检测自噬的方法包括使用GFP-LC3绿色荧光视踪的方法,无自噬发生时,GFP-LC3融合蛋白弥散在胞浆中;自噬形成时,GFP-LC3融合蛋白转位至自噬体膜,在荧光显微镜下形成多个明亮的绿色荧光斑点,一个斑点相当于一个自噬体,可以通过计数来评价自噬活性的高低。自噬过程很快,一个自噬体从产生到降解仅需2~3 h或更短,其中自噬体形成阶段更迅速,数分钟即可完成,而溶酶体降解阶段耗时相对较长。因此,设置多个检测时间点是至关重要的。本研究采用Western blot检测到LC3-II蛋白的表达,并将GFP-LC3质粒转染进入系膜细胞,通过检测芒果苷不同浓度给药0、1、3、24 h后的绿色荧光斑点来监测高糖诱导下自噬的发生。结果显示:与正常组相比,高糖诱导下系膜细胞的LC3-II的表达减少,高糖诱导下系膜细胞的GFP-LC3绿色荧光点数量明显减少,表明高糖诱导下系膜细胞的自噬减弱。

我们对于糖尿病条件下的肾小球系膜细胞的自噬功能知之甚少。Ding等人在无血清条件下,利用TGF β 1通过TAK11和PI3K-Akt依赖途径诱发系膜细胞自噬,通过自噬阻止了系膜细胞凋亡,增加系膜细胞存活率^[10]。Kim等报道自噬负调控系膜细胞产生细胞外基质,主要通过细胞内1型胶原降

解^[11]。以上研究表明在病理条件下,机体可能通过提高自噬水平来保护系膜细胞。Fiorentino等通过敲除Timp3的小鼠系膜细胞,证明通过Timp3降低了FoxO1表达,从而阻止系膜细胞自噬水平,促进糖尿病肾病发展^[12]。我们的研究结果提示高糖诱导下系膜细胞的自噬减弱,可能是DN的发病机制之一。我们需要更多的高糖条件下的系膜细胞自噬水平及调控机制的研究。

我们的研究中,与高糖组相比,给药24 h后芒果苷治疗组(5×10^{-5} 、 1×10^{-5} mol/L)LC3-II蛋白的表达水平较高糖组升高,提示芒果苷可能有增强自噬的作用。芒果苷治疗组给药后1、3 h的绿色点状荧光明显增多。尤其是高剂量组 4×10^{-5} 、 8×10^{-5} mol/L组。在给药24 h观察绿色点状荧光明显消失,也验证了自噬过程很快,一个自噬体从产生到降解仅需2~3 h。提示芒果苷能提高高糖诱导下的系膜细胞自噬水平,从而维持系膜细胞内环境稳定,减少了高糖诱导下的系膜细胞的病理损伤。

近年的研究发现在链脉佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型中研究发现,芒果苷可以减轻系膜细胞增殖及系膜基质增多,减轻肾脏病理损伤,减少蛋白尿,延缓DN进展,其机制可能是通过抑制NF- κ B^[13]和TGF- β 1^[13,14]从而抑制炎症反应,抑制骨调蛋白^[15]的过表达,及抑制血管紧张素II/AT1信号通路^[16]等机制,但具体的机制还在研究中。我们的研究表明芒果苷可能通过增加自噬水平来改善系膜细胞增殖,我们期待更多的芒果苷对糖尿病肾病自噬调控的研究。

参考文献

- 1 Gold-Smith F, Fernandez A, Bishop K. Mangiferin and Cancer: Mechanisms of Action. *Nutrients*, 2016, 28(7): E396.
- 2 Dar A, Faizi S, Naqvi S, et al. Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28: 596-600.
- 3 Guha S, Ghosal S, Chattopadhyay U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy*, 1996, 42: 443-451.
- 4 García-Rivera D, Delgado R, Bougarne N, et al. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of *Mangifera indica* L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells. *Cancer Lett*, 2011, 305: 21-31.
- 5 Duang XY, Wang Q, Zhou XD, et al. Mangiferin: a possible

- strategy for periodontal disease to therapy. *Med Hypotheses*, 2011, 76:486-488.
- 6 Niu Y, Lu W, Gao L, *et al.* Reducing effect of mangiferin on serum uric acid levels in mice. *Pharm Biol*, 2012, 50: 1177-1182.
 - 7 Yang H, Gao L, Niu Y, *et al.* Mangiferin inhibits renal urate reabsorption by modulating urate transporters in experimental hyperuricemia. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38:1591-1598.
 - 8 Niu Y, Liu J, Liu HY, *et al.* Hypouricaemic action of mangiferin results from metabolite norathyriol via inhibiting xanthine oxidase activity. *Pharm Biol*, 2016, 54:1680-1686.
 - 9 Ge DD, Zhang Y, Liu EW, *et al.* Chemical constituents of *Mangifera indica* leaves. *Chin Trad Herb Drugs*, 2011, 42: 428-431.
 - 10 Ding Y, Kim JK, Kim SI, *et al.* TGF- β 1 protects against mesangial cell apoptosis via induction of autophagy. *J Biol Chem*, 2010, 285:37909-37919.
 - 11 Kim SI, Na HJ, Ding Y, *et al.* Autophagy promotes intracellular degradation of type I collagen induced by transforming growth factor (TGF)- β 1. *J Biol Chem*, 2012, 287:11677-11688.
 - 12 Fiorentino L, Cavallera M, Menini S, *et al.* Loss of TIMP3 underlies diabetic nephropathy via FoxO1/STAT1 interplay. *EMBO Mol Med*, 2013, 5:441-455.
 - 13 Pal PB, Sinha K, Sil PC. Mangiferin attenuates diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress mediated signaling cascade, TNF α related and mitochondrial dependent apoptotic pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One*, 2014, 9:e107220.
 - 14 Li X, Cui X, Sun X, *et al.* Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res*, 2010, 24:893-899.
 - 15 Zhu X, Cheng YQ, Du L, *et al.* Mangiferin attenuates renal fibrosis through down-regulation of osteopontin in diabetic rats. *Phytother Res*, 2015, 29:295-302.
 - 16 He L, Qi Y, Rong X, *et al.* The Ayurvedic Medicine *Salacia oblonga* Attenuates Diabetic Renal Fibrosis in Rats; Suppression of Angiotensin II/AT1 Signaling. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011:807451.

(上接第 2116 页)

- 5 Li X (李露), Fan HY (范红艳), Dai T (戴婷), *et al.* Advances in pharmacological effects of gypenosides. *J Jilin Med Coll* (吉林医药学院学报), 2015, 36:147-150.
- 6 Zhang RQ (张若青), Zhang JH (张继洪), Zhang GW (张国伟). Pharmacological effects of gypenoside and its clinical application. *J Clin Med* (临床合理用药杂志), 2015, 8: 174-176.
- 7 Zhou XH (周晓欢), Yang YC (杨玉春), Zhang YM (张源明), *et al.* Analysis of the relationship between hypertension, hyperlipidemia and carotid artery atherosclerosis. *Med J West China* (西部医学), 2014, 26:1645-1647.
- 8 Liu H (刘虹), Shao RG (邵荣光). The regulatory role of autophagy in tumor process. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2016, 51(1):23-28.
- 9 Yu HH (于红红), Wu ML (吴玛莉), Leng L (冷冷), *et al.* Relationship between autophagy and atherosclerosis and modulation of traditional Chinese medicine. *Chin J Arterioscler*, 2014, 22:736-740.
- 10 Otomo C, Metlagel Z, Takaesu G, *et al.* Structure of the human ATG12-ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20:59-66.
- 11 Martinez J, Malireddi RK, Lu Q, *et al.* Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat Cell Biol*, 2015, 17:893-906.
- 12 Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science*, 2010, 330:1344-1348.
- 13 Li D (李冬), Liu XH (刘秀华), Shi DZ (史大卓). Autophagy and cardiovascular diseases. *Int J Pathol Clin Med* (国际病理科学与临床杂志), 2013, 33:431-436.
- 14 Zhang N (张妮), Cao HM (曹慧敏), Song N (宋囡), *et al.* The protective effect of Tanshinone II A on ox-LDL induced endothelial cell oxidative stress injury through regulating autophagosome. *Chin J Arterioscler* (中国动脉硬化杂志), 2017, 25:244-249.