

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.02.04

❖ 论著 ❖

枸杞多糖减轻 ox-LDL 诱导血管内皮细胞损伤的效应及分子机制研究

潘宋斌¹, 陈晓光¹, 潘晓峰¹, 万琳²

(1. 武汉市第一医院神经内科; 2. 武汉市中医医院内分泌科, 湖北 武汉 430022)

【摘要】目的: 研究枸杞多糖(LBP)减轻氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导血管内皮细胞损伤的效应及分子机制。**方法:** 培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs)并分为对照组(不含药物的 DMEM 处理)、ox-LDL 组(含有 150 mg/L ox-LDL 的 DMEM 处理)、LBP 组(含有 150 mg/L ox-LDL 及 100 mg/L LBP 的 DMEM 处理)、LBP + LY 组(含有 150 mg/L ox-LDL、100 mg/L LBP、20 μmol/L LY294002 的 DMEM 处理)。检测细胞活力、凋亡率、线粒体凋亡基因及 PI3K/AKT 通路基因的表达量。**结果:** ox-LDL 组的细胞活力及细胞中 Bcl-2、p-PI3K、p-AKT 的表达量明显低于对照组, 凋亡率及细胞中 Bax、Caspase-3 的表达量明显高于对照组 ($P < 0.05$); LBP 组的细胞活力及细胞中 Bcl-2、p-PI3K、p-AKT 的表达量明显高于 ox-LDL 组, 凋亡率及细胞中 Bax、Caspase-3 的表达量明显低于 ox-LDL 组 ($P < 0.05$); LBP + LY 组的细胞活力及细胞中 Bcl-2、p-PI3K、p-AKT 的表达量明显低于 LBP 组, 凋亡率及细胞中 Bax、Caspase-3 的表达量明显高于 LBP 组 ($P < 0.05$)。 **结论:** LBP 能够通过激活 PI3K/AKT 通路减轻 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤。

【关键词】 内皮细胞损伤; 氧化型低密度脂蛋白; 枸杞多糖; 线粒体途径凋亡; PI3K/AKT 通路

【中图分类号】 R657.51 **【文献标志码】** A

Effects of Lyciumbarbarum polysaccharide ameliorating ox-LDL-induced vascular endothelial cell injury and its molecular mechanism

PAN Song-bin¹, CHEN Xiao-guang¹, PAN Xiao-feng¹, WAN Lin²

(1. Department of Neurology, Wuhan First Hospital; 2. Department of Endocrinology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430022, Hubei, China)

【Abstract】 Objective: To study the effects and molecular mechanism of Lyciumbarbarum polysaccharide (LBP) ameliorating oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced vascular endothelial cell injury. **Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured and divided into control group (DMEM treatment without drugs), ox-LDL group (DMEM treatment with 150 mg/L ox-LDL), LBP group (DMEM treatment with 150 mg/L ox-LDL and 100 mg/L LBP), and LBP + LY group (DMEM treatment with 150 mg/L ox-LDL, 100 mg/L LBP, 20 μmol/L LY294002). The cell viability, apoptotic rate, mitochondrial apoptotic gene expression and PI3K/AKT pathway gene expression were detected. **Results:** The cell viability and the expression of Bcl-2, p-PI3K and p-AKT in ox-LDL group were significantly lower than those in control group, the apoptotic rate and the expression of Bax and Caspase-3 in cells were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The cell viability and the expression of Bcl-2, p-PI3K and p-AKT in LBP group were significantly higher than those in ox-LDL group, the apoptotic rate and the expression of Bax and Caspase-3 in cells were significantly lower than those in ox-LDL group ($P < 0.05$). The cell viability and the expression of Bcl-2, p-PI3K and p-AKT in LBP + LY group were significantly lower than those in LBP group, the apoptotic rate and the expression of Bax and Caspase-3 in cells of LBP + LY group were significantly higher than those in LBP group ($P < 0.05$). **Conclusion:** LBP can ameliorate ox-LDL induced vascular endothelial cells injury by activating PI3K/AKT pathway.

【Key words】 Endothelial cell injury; Oxidized low density lipoprotein; Lyciumbarbarum polysaccharide; Mitochondrial pathway apoptosis; PI3K/AKT pathway

动脉粥样硬化是心脑血管疾病发生的病理生理基础,其发生机制复杂,涉及多因素、多环节。氧化

型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是在动脉粥样硬化形成过程中起到关键作用的分子,该分子能够引起血管内皮细胞发生损伤,进而使脂质成分、炎症细胞在损伤局部浸润并逐步形成粥样斑块。因此,减轻 ox-LDL 引起的血管内皮细胞损伤是目前公认的动脉粥样硬化干预靶点^[1-2]。枸杞多糖(lyciumbarbarum polysaccharide, LBP)是从中药枸杞中提取得到的活性物质,由多聚糖与多肽、蛋白质复合而成,在细胞保护、免疫调节、抗氧化等方面均展现出积极价值。已有研究^[3]报道 LBP 对过氧化氢引起的内皮损害均具有保护作用,但 LBP 对 ox-LDL 引起的内皮细胞损伤是否具有保护作用未见报道。为此,本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为实验对象,具体分析了 LBP 减轻 ox-LDL 诱导 HUVECs 损伤的效应及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVECs 细胞株购自中科院上海细胞资源中心。枸杞多糖、ox-LDL、信号通路抑制剂 LY294002 购自 Sigma 公司,细胞培养基 DMEM、胎牛血清、0.125% 胰蛋白酶均购自 Gibco 公司,MTS 细胞活力检测试剂盒购自 Promega 公司,TUNEL 试剂盒、蛋白裂解液购自上海碧云天公司,Bcl-2、Bax、Caspase-3、p-PI3K、p-AKT 的第一抗体购自 CST 公司。多功能酶标仪购自 Bio-rad 公司,荧光显微镜购自 Nikon 公司,Western blotting 电泳系统及成像系统购自上海天能公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 HUVECs 用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 在培养瓶中贴壁培养,细胞铺满培养瓶底面 90% 后用 0.125% 的胰蛋白酶进行消化和传代,传代后的细胞继续培养扩增,得到足够数量的细胞后接种在不同规格的培养板内并进行分组处理。对照组用不含药物的 DMEM 处理,ox-LDL 组用含有 150 mg/L ox-LDL 的 DMEM 处理,LBP 组用含有 150 mg/L ox-LDL 及 100 mg/L LBP 的 DMEM 处理,LBP + LY 组用含有 150 mg/L ox-LDL、100 mg/L LBP、20 μ mol/L LY294002 的 DMEM 处理。

1.2.2 细胞活力的检测 细胞接种在 96 孔培养板后处理 24 h,向培养孔内加入 MTS 试剂盒的检测液,20 μ L/孔,继续培养 4 h 后在多功能酶标仪上测

定波长 490 nm 对应的吸光值、记录为 OD 值。

1.2.3 细胞凋亡的检测 细胞接种在 24 孔培养板后处理 24 h,弃去培养基并用磷酸盐缓冲液洗涤 1 次,加入 TUNEL 试剂盒中的固定液、固定 30 min,培养板后处理 24 h,TUNEL 试剂盒中的染色液、避光孵育 60 min,磷酸盐缓冲液洗涤 3 次后加入抗荧光猝灭封片液,在荧光显微镜下使用 450 ~ 500 nm 的激发光进行观察,在高倍视野下计数凋亡细胞和总细胞,计算凋亡率。

1.2.4 基因表达的 Western blotting 检测 细胞接种在 6 孔培养板后处理 24 h,弃去培养基后采用蛋白裂解液裂解细胞、提取蛋白样本,将蛋白样本加入聚丙烯酰胺凝胶中并进行电泳和电转膜,将聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白样本转移至 NC 膜后用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,洗膜 3 遍后用 Bcl-2、Bax、Caspase-3、p-PI3K、p-AKT 的第一抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;第 2 天,洗膜 3 遍后用第二抗体室温孵育 2 h,最后在成像仪中曝光得到蛋白条带,根据灰度值计算蛋白表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS20.0 软件录入数据,多组间计量资料的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞活力的比较

与对照组比较,ox-LDL 组的 OD 值显著下降($P < 0.05$);与 ox-LDL 组比较,LBP 组的 OD 值显著增加($P < 0.05$);与 LBP 组比较,LBP + LY 组的 OD 值显著下降($P < 0.05$)。见图 1。

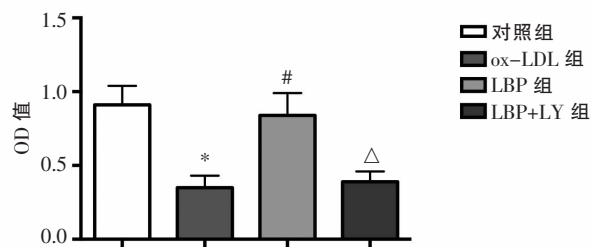


图 1 各组细胞活力 OD 值的比较

* $P < 0.05$, 与对照组比较;# $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较; $\Delta P < 0.05$, 与 LBP 组比较。

2.2 各组细胞凋亡率的比较

与对照组比较,ox-LDL 组的细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$);与 ox-LDL 组比较,LBP 组的细胞凋亡率显著下降($P < 0.05$);与 LBP 组比较,LBP + LY

组的细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)。见图 2。

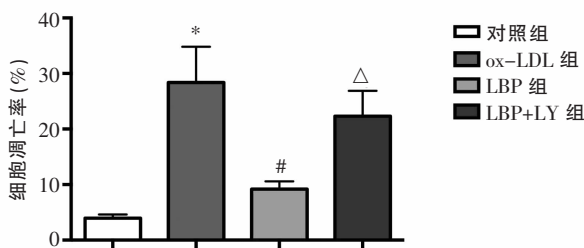


图 2 各组细胞凋亡率的比较

* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较; △ $P < 0.05$, 与 LBP 组比较。

2.3 各组细胞中线粒体凋亡基因表达的比较

与对照组比较, ox-LDL 组细胞中 Bcl-2 的表达量显著减少, Bax、Caspase-3 的表达量显著增加 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, LBP 组细胞中 Bcl-2 的表达量显著增加, Bax、Caspase-3 的表达量显著减少 ($P < 0.05$); 与 LBP 组比较, LBP + LY 组细胞中 Bcl-2 的表达量显著减少, Bax、Caspase-3 的表达量显著增加 ($P < 0.05$)。见图 3、表 1。

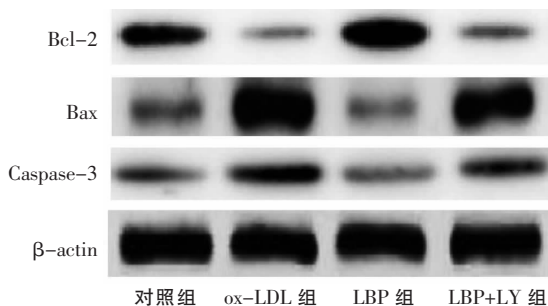


图 3 各组细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的蛋白条带图

表 1 各组细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	Caspase-3
对照组 ($n = 5$)	0.73 ± 0.11	0.45 ± 0.08	0.41 ± 0.06
ox-LDL 组 ($n = 5$)	0.25 ± 0.05*	1.13 ± 0.18*	0.81 ± 0.14*
LBP 组 ($n = 5$)	0.89 ± 0.14#	0.39 ± 0.07#	0.34 ± 0.08#
LBP + LY 组 ($n = 5$)	0.34 ± 0.06△	1.03 ± 0.18△	0.77 ± 0.12△

* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较; △ $P < 0.05$, 与 LBP 组比较。

2.4 各组细胞中 PI3K/AKT 通路基因表达的比较

与对照组比较, ox-LDL 组细胞中 p-PI3K、p-AKT 的表达量显著减少 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, LBP 组细胞中 p-PI3K、p-AKT 的表达量显著增加 ($P < 0.05$); 与 LBP 组比较, LBP + LY 组细胞中 p-PI3K、p-AKT 的表达量显著减少 ($P < 0.05$)。见图 4、表 2。

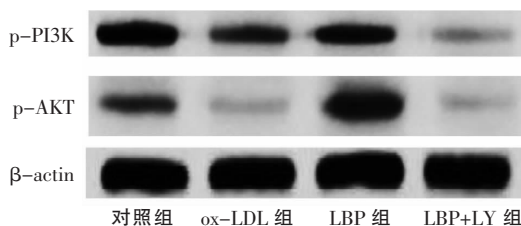


图 4 各组细胞中 p-PI3K、p-AKT 的蛋白条带图

表 2 各组细胞中 p-PI3K、p-AKT 表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-PI3K	p-AKT
对照组 ($n = 5$)	0.82 ± 0.13	0.56 ± 0.09
ox-LDL 组 ($n = 5$)	0.56 ± 0.08*	0.20 ± 0.05*
LBP 组 ($n = 5$)	0.77 ± 0.14#	0.67 ± 0.10#
LBP + LY 组 ($n = 5$)	0.32 ± 0.06△	0.23 ± 0.05△

* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较; △ $P < 0.05$, 与 LBP 组比较。

3 讨论

ox-LDL 刺激血管内皮细胞并引起内皮损伤是造成动脉粥样硬化发生及发展的关键因素, 在内皮损伤局部大量脂质沉积、炎症细胞浸润, 进而逐步形成粥样斑块^[4-5]。因此, 减轻 ox-LDL 引起的血管内皮损伤对动脉粥样硬化的防治具有重要意义。LBP 从枸杞中提取得到, 由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、鼠李糖 6 种单糖与多肽、蛋白质复合而成, 具有广泛的生物学活性。多项研究证实, LBP 对缺血再灌注的心肌组织、缺氧复氧的神经细胞均具有保护作用^[6-7]。为了明确 LBP 在 ox-LDL 诱导血管内皮损伤中的应用价值, 本实验以 ox-LDL 刺激 HUVECs 作为细胞模型, 通过分析细胞活力及凋亡可知 ox-LDL 刺激后细胞的活力明显下降、凋亡率明显增加, 说明 ox-LDL 能够引起 HUVECs 发生损伤。在 ox-LDL 刺激的基础上加用 LBP 后观察到: LBP 组的细胞活力明显高于 ox-LDL 组、凋亡率明显低于 ox-LDL 组, 说明 LBP 能够减轻 ox-LDL 引起的 HUVECs 损伤。

线粒体途径凋亡是内皮细胞在缺血缺氧、氧化应激、ox-LDL 刺激等病理条件下发生凋亡的重要机制之一, 线粒体内的细胞色素 C 释放进入细胞浆后能够启动 caspase 家族介导的线粒体凋亡途径^[8-10]。Bax 和 Bcl-2 是线粒体外膜上调节细胞色素 C 通透性的一对分子, 前者形成同源二聚体后能够成为细胞色素 C 通过线粒体膜进入胞浆的通道, 进而促进线粒体途径凋亡的级联放大激活; 后者能

够与前者形成异源二聚体并阻碍细胞色素 C 向胞浆的释放,进而阻碍线粒体途径凋亡的级联放大激活^[11-12]。线粒体凋亡途径的级联放大最终引起 caspase-3 活化并通过活化的 caspase-3 来介导细胞凋亡^[13]。本实验在 ox-LDL 刺激 HUVECs 后观察到细胞中 Bcl-2 的表达明显减少,而 Bax、Caspase-3 的表达明显增多,这一结果与 ox-LDL 刺激后细胞凋亡率的增加相吻合,说明 ox-LDL 能够促进 HUVECs 发生线粒体途径的凋亡。在 ox-LDL 刺激的同时加用 LBP 干预后观察到细胞中 Bcl-2 的表达明显增多,而 Bax、Caspase-3 的表达明显减少,说明 LBP 能够减轻 ox-LDL 引起的 HUVECs 线粒体途径凋亡。

在明确 LBP 能够减轻 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤后,本实验进一步深入探究了介导这一保护作用的分子机制。PI3K/AKT 通路是调节细胞存活、生长、增殖的重要信号通路,多种生长细胞因子能够刺激 PI3K/AKT 通路中的 PI3K、AKT 发生磷酸化,磷酸化的 PI3K、AKT 能够在细胞内传导生物学信号并使 Bcl-2 等抗凋亡基因表达增多、Bax 等促凋亡基因表达减少,最终促进细胞的生长^[14-15]。本实验的分析显示,ox-LDL 刺激后细胞中 p-PI3K、p-AKT 的表达明显减少,而加用 LBP 后细胞中 p-PI3K、p-AKT 的表达明显增多,说明 ox-LDL 能够抑制 HUVECs 中的 PI3K/AKT 通路、而 LBP 则能激活该通路,这也可能是 LBP 发挥细胞保护作用的机制。为了进一步验证这一机制,PI3K/AKT 通路的抑制剂 LY294002 与 LBP 联合用于 HUVECs 的干预,在加用 LY294002 后,LBP 增加细胞活力、降低凋亡率、调节基因表达的效应均被明显削弱,说明 PI3K/AKT 通路的激活介导了 LBP 减轻 ox-LDL 诱导 HUVECs 损伤的效应。

综上所述,LBP 能够通过激活 PI3K/AKT 通路减轻 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤,今后可进一步设计动物实验来验证 LBP 对动脉粥样硬化的预防或延缓作用。

参考文献

[1] Lara-Guzmán OJ, Gil-Izquierdo Á, Medina S, *et al.* Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages[J]. *Redox Biol*, 2018, 15(1): 1-11.

[2] Fu Z, Zhou E, Wang X, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein-induced microparticles promote endothelial monocyte adhesion via intercellular adhesion molecule 1[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,

2017, 313(5): 567-574.

- [3] 王玉林, 吕林林, 王霞, 等. 枸杞多糖减轻过氧化氢诱导的人内皮样细胞 EA.hy926 氧化损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(6): 975-981.
- [4] Markstad H, Edsfeldt A, Yao Mattison I, *et al.* High Levels of Soluble Lectinlike Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Are Associated With Carotid Plaque Inflammation and Increased Risk of Ischemic Stroke[J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(4): e009874.
- [5] Karki P, Birukov KG. Lipid mediators in the regulation of endothelial barriers[J]. *Tissue Barriers*, 2018, 6(1): e1385573.
- [6] Li Q, Zhang Z, Li H, *et al.* Lycium barbarum polysaccharides protects H9c2 cells from hypoxia-induced injury by down-regulation of miR-122[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110(1): 20-28.
- [7] Yu Y, Wu X, Pu J, *et al.* Lycium barbarum polysaccharide protects against oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis and autophagic cell death via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in primary cultured hippocampal neurons[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1187-1194.
- [8] Jiang ZF, Wang M, Xu JL, *et al.* Hypoxia promotes mitochondrial glutamine metabolism through HIF1 α -GDH pathway in human lung cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1): 32-38.
- [9] Li L, Tan H, Yang H, *et al.* Reactive oxygen species mediate heat stress-induced apoptosis via ERK dephosphorylation and Bcl-2 ubiquitination in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8): 12902-12916.
- [10] Zhaolin Z, Jiaojiao C, Peng W, *et al.* OxLDL induces vascular endothelial cell pyroptosis through miR-125a-5p/TET2 pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 7475-7491.
- [11] Liang S, Sun K, Wang Y, *et al.* Role of Cyt-C/caspases-9, 3, Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid[J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 25(258): 40-51.
- [12] Machado ART, Aissa AF, Ribeiro DL, *et al.* The toxin BjussuLAAO-II induces oxidative stress and DNA damage, upregulates the inflammatory cytokine genes TNF and IL6, and downregulates the apoptotic-related genes BAX, BCL2 and RELA in human Caco-2 cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 1(109): 212-219.
- [13] Zhou Z, Chen Y, Ni W, *et al.* Upregulation of Nuclear Factor IA Suppresses Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 5(25): 1009-1016.
- [14] Yan X, Li W, Yang L, *et al.* MiR-135a Protects Vascular Endothelial Cells Against Ventilator-Induced Lung Injury by Inhibiting PHLPP2 to Activate PI3K/Akt Pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(3): 1245-1258.
- [15] Huang JJ, Shi YQ, Li RL, *et al.* Therapeutic ultrasound protects HUVECs from ischemia/hypoxia-induced apoptosis via the PI3K-Akt pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4): 1990-1999.

(收稿日期: 2019-06-20

学术编辑: 谢勇恩)