

刺囊酸对于氧化型低密度脂蛋白诱导的血管内皮祖细胞损伤的保护作用及机制

赖 朋^{1*}, 刘怡欣²

¹西华大学生物工程学院, 成都 610039; ²四川大学华西医院老年病科, 成都 610041

摘要: 血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一种具有分化为内皮细胞能力的前体细胞,对于维持血管内皮完整性和血管生成具有极其重要的作用。高血脂状态下的氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)增加严重影响 EPCs 的作用与功能,这也是高血脂诱发动脉粥样硬化(AS)的机制之一。在此之前的体内研究表明,从皂荚中提取的刺囊酸(echinocystic acid, EA)有较好的抗粥样硬化作用,但具体机制尚未得到阐述。鉴于 EPCs 在 AS 发病过程中的重要性,本论文研究了 EA 对于 EPCs 的保护作用。本研究采用 oxLDL 造成体外培养分化的 EPCs 数量和功能损伤,给药组经不同剂量的 EA 处理,通过 TUNEL、Transwell 小室等手段观察凋亡、粘附、迁移、一氧化氮(NO)释放等数量与功能指标。通过设置药理抑制组和 Western blot 考察了 EA 对于 PI3K/Akt/eNOS 通路的作用。结果显示 oxLDL 明显增加 EPCs 的凋亡, TUNEL 阳性率为 35.2%, 为正常组的 5.5 倍; oxLDL 还抑制了 EPCs 的粘附(200 倍视野下从正常的 24 个减少到 14 个),使细胞迁移率从 11% 降至 6.6%、NO 的合成从 18.37 μM 降到 7.97 μM ; oxLDL 抑制 eNOS 的表达和 Akt 及 eNOS 的磷酸化,抑制率均在 50% 以上。高剂量的 EA 显著改善了上述结果, TUNEL 阳性率为 14.7%、EPCs 的粘附恢复为 20 个、细胞迁移率为 10.2%、NO 的合成成为 19.28 μM , EA 虽然对 eNOS 的表达没有影响,但却显著激活了 eNOS(p-eNOS/eNOS 为 1.33, 模型组为 0.82),并将 oxLDL 抑制的 Akt 磷酸化恢复至正常的 76%。另外, PI3K 抑制剂能部分抵消 EA 的作用。结果表明刺囊酸对于 oxLDL 诱导的 EPCs 的损伤具有保护作用,机制为直接增加 Akt 和 eNOS 的磷酸化。

关键词: 血管内皮祖细胞; 刺囊酸; 氧化型低密度脂蛋白; Akt/eNOS 通路

中图分类号: R966

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.05.007

Echinocystic Acid, Extracted from *Gleditsia sinensis* Fruit, Protects Endothelial Progenitor Cell from Damage Caused by OxLDL, through the Akt/eNOS pathway

LAI Peng^{1*}, LIU Yi-xin²

¹School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China; ²Department of Geriatrics, West China hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: Our previous studies revealed that echinocystic acid (EA) showed obvious attenuation of atherosclerosis in rabbits fed a high-fat diet. However, the underlying mechanisms remain to be elucidated. Considering the importance of endothelial progenitor cells (EPCs) in atherosclerosis, we hypothesise that EPCs may be one of the targets for the anti-atherosclerotic potential of EA. After *in vitro* cultivation, EPCs were exposed to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oxidised low-density lipoprotein (oxLDL) and incubated with or without EA (5 and 20 μM) for 48 h. An additional two groups of EPCs (oxLDL + 20 μM EA) were pre-treated with either wortmannin, an inhibitor of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway, or nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), an endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-specific inhibitor. Assessment of EPC apoptosis, adhesion, migration and nitric oxide (NO) release was performed using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) staining, cell counting, caspase-3 activity assay, transwell chamber assay and Griess reagent, respectively. The protein expression of protein kinase B (Akt) and eNOS was detected using western blot. Treatment of EPCs with oxLDL induced significant apoptosis (Model, 35.2%, vs. Control, 6.4%) and impaired adhesion (Model, 14, vs. Control, 24), migration (Model, 6.6%, vs. Control, 11%) and NO production (Model, 7.97 μM , vs. Control, 18.37 μM). The deleterious effects of oxLDL on EPCs were attenuated by EA (apoptosis

收稿日期: 2014-09-04

接受日期: 2015-03-19

基金项目: 四川省教育厅自然科学重点项目(14ZB0134); 西华大学人才引进项目(Z1220529)

* 通讯作者 Tel: 86-28-87720552; E-mail: lai211@sina.com

ratio:14.7%, adhesion cells:20, migration ratio:10.2%, NO production:19.28 μ M). However, when EPCs were pre-treated with wortmannin or l-NAME, the effects of EA were abrogated. Additionally, oxLDL significantly downregulated eNOS protein expression, as well as repression of eNOS and Akt phosphorylation. The inhibitory effect of oxLDL on Akt/eNOS phosphorylation was attenuated by EA. Taken together, the results indicated that EA protects EPCs from damage caused by oxLDL, via the Akt/eNOS pathway.

Key words: endothelial progenitor cells; echinocystic acid; oxidized low density lipoprotein; Akt/eNOS

血管内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 对于维持血管内皮完整性和血管生成具有极其重要的作用。作为一种祖细胞, EPCs 为成熟血管内皮细胞的前体细胞, 具有分化能力, 能通过再内皮化 (Re-endothelialization) 或再血管化 (Re-vascularization) 发挥其保护血管内皮的功能^[1]。研究表明, 骨髓中生成的 EPCs 能够延缓脉粥样硬化 (AS) 的发病历程, 改善缺血灶的血液供应^[2]。因此, EPCs 被认为是心脑血管疾病新的治疗策略, 包括动冠心病、心肌梗死、缺血性卒中等^[3,4]。临床上已在小范围开展应用 EPCs 移植治疗缺血性疾病的实践^[5]。然而, 有证据表明, 如高血脂、高血糖等心血管危险因素能减少循环中 EPCs 的数量并削弱其功能^[6,7], 其中 oxLDL 作为独立的心脑血管事件的危险因素, 在体内和体外都能影响 EPCs 的数量与功能^[8,9]。因此, 对抗在高浓度 oxLDL 环境下所造成的 EPCs 损伤将成为治疗动脉粥样硬化等心脑血管缺血性疾病的方法之一^[10]。

蔷薇目, 豆科落叶乔木皂荚 (*Gleditsia sinensis* Lam.) 广泛分布于中国各地, 其果实含有三萜、黄酮、低聚糖等多种类型的化合物。研究显示皂荚具有多种生理活性^[11]。近年来有报道显示其中的三萜类化合物具有保护缺血心肌的作用^[12]。此前的研究也发现皂荚水提物中的三萜酸 (主要为刺囊酸和齐墩果酸) 具有明显的降血脂和抗 AS 作用^[13]。进一步研究发现, 其中刺囊酸的降脂能力来源于其对两种脂代谢酶: 酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 和 二脂酰甘油酰基转移酶 (DGAT) 的抑制^[14], 但抗 AS 的作用机制并未得到充分揭示。本研究考察了刺囊酸在体外对于 oxLDL 诱导的 EPCs 损伤的保护作用, 并揭示其部分作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, G1312A 二元泵, 二极管阵列检测器 (DAD, 美国 Agilent 公司); IX71 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 680 酶标仪、

硝酸纤维素薄膜 (美国 Bio-Rad 公司); Wistar 大鼠 [四川省实验动物专委会, 许可证号: SCXK (川) 2013-14]; 皂荚 (成都中医药大学); 人纤连蛋白、异硫氰酸荧光素、荆豆凝集素、低密度脂蛋白、Wortmannin、硝基-L-精氨酸甲酯、二氢二苯吡啶、血管内皮生长因子 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 内皮细胞生长培养基及补充剂 EGM-2-MV-Single Quots (美国 Clonetics 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号: 1221109); DiI 标记乙酰化低密度脂蛋白 (美国 Molecular Probes 公司); eNOS 抗体 (批号: sc-8904)、Ser1177 磷酸化 eNOS 抗体 (批号: sc-3452)、Akt 抗体 (批号: sc-9005)、Ser473 磷酸化 Akt 抗体 (批号: sc-2511) (美国 Santa Cruz 公司); 抗 VEGFR-2 抗体 (批号: 121126)、抗 CD133 抗体 (批号: 120831) (北京中杉金桥公司); 辣根过氧化物酶结合的 IgG (武汉博士德公司, 批号: 2012.06); TUNEL 试剂盒 (美国 Promega 公司); Caspase-3 活性检测试剂盒 (海门碧云天公司, 批号: 20120128); Transwell 板 (美国 Corning 公司)。

1.2 刺囊酸的分离

皂荚水提物的提取方法参照文献报道^[13], 随后通过柱层析分离得刺囊酸 (echinocystic acid, EA)。HPLC 检测其纯度 $\geq 98\%$, 色谱条件为: 固定相, 40 \times 500 mm 反相 C₁₈ 硅胶柱, 粒径 5 μ m; 流动相, 甲醇: 水 = 8:2; 检测器, DAD, 215 nm 处检测出峰。结构经 ESI-MS 和 ¹H NMR 确认为 EA (参见图 1)。

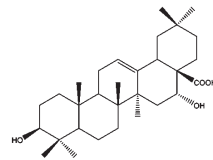


图 1 刺囊酸的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of echinocystic acid (EA)

1.3 EPCs 的分离、培养及鉴定

EPCs 的分离和培养参照以前的方法^[15]。3 到 4 周龄的 Wistar 大鼠处死并分离股骨和胫骨骨髓, Ficoll 密度梯度离心法 (密度: 1.083) 提取单个核细

胞并接种于人纤连蛋白涂层 (FN) 的培养皿中培养, 培养基使用内皮细胞生长培养基 (EGM-2) 并补加 EGM-2-MV-Single Quots 和 20% 胎牛血清 (FBS), 4 d 后洗去未贴壁细胞, 此后每 3 d 更换新鲜培养基, 给药前换为无血清培养基休眠培养 24 h。

贴壁的单核细胞培养 7 d 后用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的荆豆凝集素 (UEA-1) 和 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白 (DiI-acLDL) 进行荧光染色。细胞先与 DiI-acLDL (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 共培养 4 h, 2% 的多聚甲醛固定 15 min 后再与 UEA-1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 共培养 1 h, 倒置荧光显微镜观察, 双阳性细胞鉴定为 EPCs^[16]。EPCs 表面表达血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2) 和 CD133 等标志性抗原, 通过免疫荧光染色法标记 VEGFR-2 和 CD133, 双阳性可确认 EPCs。

1.4 OxLDL 的制备

参考以前方法制备 oxLDL^[8]。正常低密度脂蛋白 (nLDL) 37 $^{\circ}\text{C}$ 下与 CuSO_4 (10 μM) 共培养 24 h, 用含 NaCl (150 mM)、乙二胺四乙酸 (1 mM)、多粘菌素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的无菌溶液透析过夜。制备的 oxLDL 可用测定硫代巴比妥酸反应产物的含量及琼脂糖凝胶电泳的方法验证。

1.5 EPCs 的处理

单个核细胞培养 7 d 后, 胰酶消化后收集制成细胞悬液并计数, 等细胞数接种于 24 孔板并分为 4 组: 正常组 (Control, 培养基 + 0.1% DMSO)、模型组 (Model, 培养基 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oxLDL)、高剂组 (HEA, 培养基 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oxLDL + 20 μM EA)、低剂组 (LEA, 培养基 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oxLDL + 5 μM EA)。另外, 为研究 PI3K/Akt/eNOS 信号通路在 EA 作用中的作用, 再设置两组药理抑制组: PI3K 抑制组 (Wort, 高剂组 + 100 nM Wortmannin 预处理) 和 eNOS 抑制组 (L-NAME, 高剂组 + 100 nM L-NAME 预处理)。Wortmannin 为 PI3K 抑制剂, 硝基-L-精氨酸甲酯 (L-NAME) 为 eNOS 抑制剂。

1.6 凋亡检测

采用末端脱氧核苷酸转移酶介导 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 测定法和 Caspase-3 活性检测法测定 oxLDL 诱导的 EPCs 凋亡。按 TUNEL 试剂盒说明书操作, EPCs 用二氨基二苯吡啶 (DAPI) 反染。TUNEL 染色阳性细胞为凋亡细胞, 以盲法计数并计算阳性率 (凋亡率)。Caspase-3 活性检测试剂盒同样按说明书操作, 最后使用酶标仪在 405 nm 处检测

对硝基苯胺的量, 计算 Caspase-3 活性。

1.7 细胞粘附测定

经过相应处理之后的 EPCs 用 DiI-acLDL 染色 (方法见 1.2), 消化、离心之后重悬于含 0.5% FBS 的 EGM-2 培养基, 计数后等量接种于 FN 涂层的 24 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 60 min 后轻轻洗去未贴壁细胞。倒置荧光显微镜 200 倍视野下, 每孔随机选取 6 个视野盲法计数贴壁细胞并计算平均贴壁细胞数。

1.8 细胞迁移测定

单个核细胞培养 7 d 后, 无添加的 EGM-2 培养基培养 12 h 后进行 Transwell 小室实验。5 $\times 10^4$ 个细胞重悬于 100 μL 趋化缓冲液中, 接种于 8.0 μm 微孔的 Transwell 上室, 下室加入含 100 ng/mL VEGF 的 600 μL 趋化缓冲液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下在 5% CO_2 中培养 8 h, 用棉签从上表面擦去未迁移细胞, 0.1% 结晶紫染色下室迁移细胞。在光镜下每孔选取 10 个随机视野计数迁移细胞, 并计算迁移率 (对比总细胞数)。

1.9 NO 产量测定

EPCs 的 NO 产量可通过相应试剂盒测定。EPCs 产生的 NO 转化为亚硝酸盐和硝酸盐, 后者又被还原为前者, 总亚硝酸盐用 Griess 试剂通过测定 550 nm 处的吸光度定量。

1.10 相关蛋白表达测定

为揭示 EA 的作用机制, 采用 Western blot 对细胞 Akt/eNOS 蛋白及其磷酸化形式进行了测定。Triton X-100 缓冲液中裂解 EPCs 1 h, 离心除去细胞核及碎片, 蛋白由 SDS-PAGE 分离并印记于硝酸纤维素薄膜上, Tris 缓冲液中以脱脂牛奶封闭薄膜并清洗, 加入特异性抗体 [eNOS 抗体 (1: 2500)、Ser1177 磷酸化 eNOS 抗体 (1: 500)、Akt 抗体 (1: 1000)、Ser473 磷酸化 Akt 抗体 (1: 500)] 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶结合的 IgG (1: 40000) 室温孵育 1 h, 增强化学发光显示印记并分析结果。

1.11 统计方法

所有实验数据用 $\bar{x} \pm S. D.$ 表示, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 Dunnett's 检验, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 实验结果

2.1.1 EPCs 的鉴定

单个核细胞经过 7 d 的培养分化形成纺锤形外

观(早期 EPCs 的形态),约 90% 以上的贴壁细胞在 DiI-acLDL 摄取和 UEA-1 结合实验中呈双阳性(参见图 2A、B 和 C)。免疫荧光染色的结果显示

CD133 + 和 VEGFR-2 + 细胞占了细胞总数的绝大部分(参见图 2D),这进一步确定了这些细胞正是 EPCs。

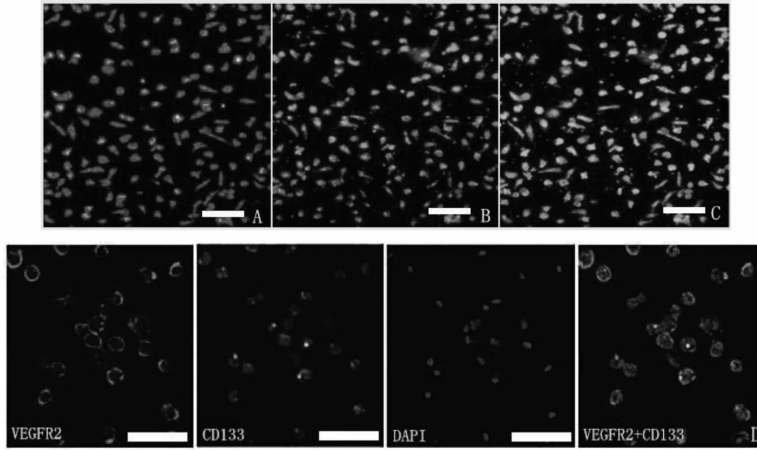


图 2 200 倍荧光显微镜下 EPCs 的鉴定。A、B、C 分别代表 DiI-acLDL 摄取阳性细胞、FITC-UEA-1 结合阳性细胞及双阳性细胞;D 为分化培养 7 天后的单个核细胞进一步进行免疫荧光染色的情况,同样,VEGFR2 和 CD133 双阳性鉴定为 EPCs;图中显示早期 EPCs 为纺锤形而晚期 EPCs 为卵石型。A、B、C 中白色横条代表 50 μm ,D 中代表 20 μm 。

Fig. 2 Characterisation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) at $\times 200$ magnification. (A) Red fluorescence represents cells positive for DiI-acLDL uptake. (B) Green fluorescence represents cells positive for FITC-UEA-1 binding. (C) Yellow fluorescence represents differentiated endothelial progenitor cell-like adherent cells that were double-positive for uptake of DiI-acLDL and binding with FITC-UEA-1. (D) The cultured mononuclear cells were further characterized by immunofluorescent staining using the EPC-specific markers, VEGFR-2 and CD133, and the nuclear marker DAPI. The cells further differentiated to cobblestone-like late EPCs. Bars in A, B, and C = 50 μm . Bars in D = 20 μm

2.1.2 EA 抑制 oxLDL 诱导的 EPCs 凋亡

如图 3A-F 所示, TUNEL 染色与 DAPI 复染使凋亡细胞呈现出绿色,而 TUNEL 阴性的活细胞为蓝色。在模型组中, oxLDL 阳性细胞对比正常组大大增加(模型组: $35.2 \pm 6.4\%$, 正常组: $6.4 \pm 2.0\%$; $P < 0.05$); 而 EA 明显降低了 TUNEL 阳性细胞的比例(高剂组: $14.7 \pm 5.3\%$, 低剂组: $22.9 \pm 7.2\%$; 对比模型组 $P < 0.05$), 而且此效果呈现出剂量依赖性; 经过药理抑制剂 Wortmannin 或 L-NAME 预处理后, 凋亡细胞的数量对比 EA 高剂组明显上升(PI3K 抑制组: $30.3 \pm 6.9\%$, eNOS 抑制组: $28.1 \pm 5.8\%$, 对比高剂组 $P < 0.05$; 参见图 3G)。Caspase-3 作为细胞凋亡通路中的关键蛋白, 其活性在模型组中明显升高(模型组: $670 \pm 89\%$, 正常组: $100\% \pm 13\%$; $P < 0.05$; 参见图 3H); EA 存在下, Caspase-3 活性收到明显的剂量依赖性的抑制(高剂组: $224 \pm 70\%$, 低剂组: $339 \pm 59\%$; 对比模型组 $P < 0.05$); 同样, Wortmannin 和 L-NAME 使 Caspase-3 活性再次上升(PI3K 抑制组: $405 \pm 44\%$, eNOS 抑制组: $619 \pm 107\%$, 对比高剂组 $P < 0.05$)。

2.1.3 EA 改善 EPCs 粘附及迁移功能

EPCs 的粘附能力对于其附着于内皮和细胞外基质, 形成新生血管极其重要。本研究中, oxLDL 显然明显削弱了 EPCs 的粘附能力(模型组: 14 ± 1 , 正常组: 24 ± 3 ; $P < 0.05$; 参见图 4A-F); EA 部分恢复了 EPCs 的正常粘附功能(高剂组: 20 ± 2 , 低剂组: 17 ± 2 ; 对比模型组 $P < 0.05$); 而两个抑制剂显著抵消了 EA 的作用(PI3K 抑制组: 13 ± 3 , eNOS 抑制组: 15 ± 2 , 对比高剂组 $P < 0.05$, 参见图 4G)。

迁移能力对于 EPCs 发挥功能同样重要, Transwell 小室测试的结果如预计的一样(参见图 5A、C、D), 模型组迁移率远低于正常组(6.6 ± 0.9 对 $11.0 \pm 1.4\%$); 高剂量的 EA 明显改善了这种情况(高剂组: $10.2 \pm 2.0\%$; 对比模型组 $P < 0.05$), 而低剂未见明显效果(低剂: $8.0 \pm 2.4\%$; 对比模型 $P > 0.05$); Wortmannin 和 L-NAME 显著抑制了高剂 EA 对于 EPCs 迁移能力的恢复(PI3K 抑制组: $6.9 \pm 2.2\%$, eNOS 抑制组: $7.4 \pm 1.6\%$, 对比高剂组 $P < 0.05$)。

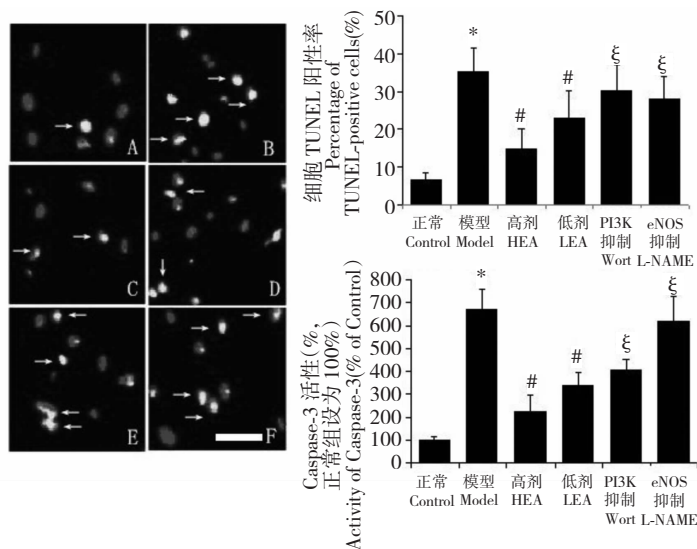


图 3 A 到 F 为 TUNEL 凋亡检测结果图 (依次为正常组、模型组、高剂组、低剂组、PI3K 抑制组和 eNOS 抑制组), 说明了 EA 抑制 EPCs 凋亡的作用, 白色箭头代表阳性即凋亡细胞; G 为各组的 TUNEL 检测阳性率统计; H 为 Caspase-3 活性统计图。A 到 F 中白色横条代表 25 μm ; G、H 中 * 代表相对于正常组 $P < 0.05$; # 代表相对于模型组 $P < 0.05$; § 代表相对于高剂组 $P < 0.05$ 。

Fig. 3 A representation illustrating TUNEL-positive EPCs (A-F). White arrows show dual staining of EPCs (apoptosis). TUNEL-positive EPCs were examined and counted in a blinded manner, and the percentage of apoptotic cells was calculated (G). Caspase-3 activity was measured by a caspase-3 activity assay kit, as described under Materials and methods (H). Data are shown as mean \pm SD ($n = 6$). * $P < 0.05$ versus Control; # $P < 0.05$ versus Model; § $P < 0.05$ versus High-dose (G and H). The Bar = 25 μm

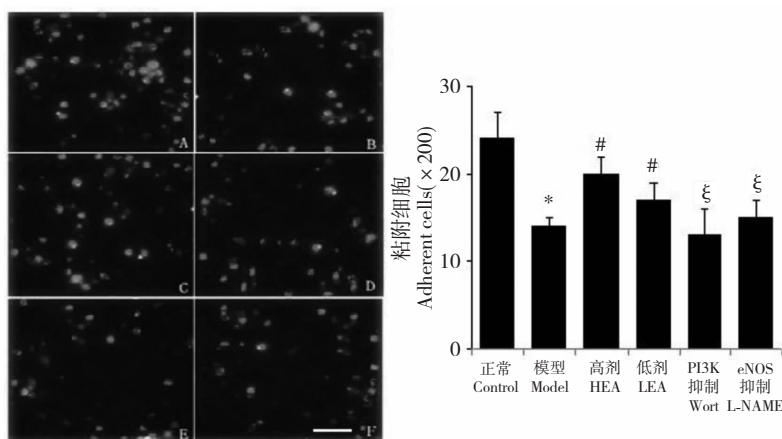


图 4 A 到 F 表示各组 EPCs 的粘附能力 (依次为正常组、模型组、高剂组、低剂组、PI3K 抑制组和 eNOS 抑制组)。红色为 DiI-acLDL 标记的粘附于 FN 涂层培养板上的 EPCs, 其中白色横条代表 50 μm 。G 为 200 倍视野下粘附细胞数的统计图, 每组随机取 6 个视野做统计, 其中 * 代表相对于正常组 $P < 0.05$; # 代表相对于模型组 $P < 0.05$; § 代表相对于高剂组 $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Effects of EA on endothelial progenitor cell (EPC) adhesion. Identical numbers of cells were re-plated onto FN-coated culture plates. After removal of non-adherent cells, the adherent cells were counted. Data are shown as mean \pm SD ($n = 6$). * $P < 0.05$ versus Control; # $P < 0.05$ versus Model; § $P < 0.05$ versus High-dose (G). The Bar = 50 μm

2.1.4 EA 增加 EPCs 一氧化氮的产量

作为 eNOS 的产物,NO 在心脑血管系统有广泛的活性,对于 EPCs 也有重要的影响^[9]。oxLDL 大大降低 EPCs 中 NO 的产量(模型组:7.97 ± 1.56 μM,正常组:18.37 ± 2.52 μM;P < 0.05);EA 在这方面也发挥了较好的作用(高剂组:19.28 ± 3.27

μM,低剂组:10.6 ± 0.84;对比模型组 P < 0.05);但是,随着对 PI3K/Akt/eNOS 通路的抑制,NO 的产量再次降低(PI3K 抑制组:11.09 ± 2.31 μM,eNOS 抑制组:8.23 ± 0.9 μM,对比高剂组 P < 0.05;参见图 5B)。

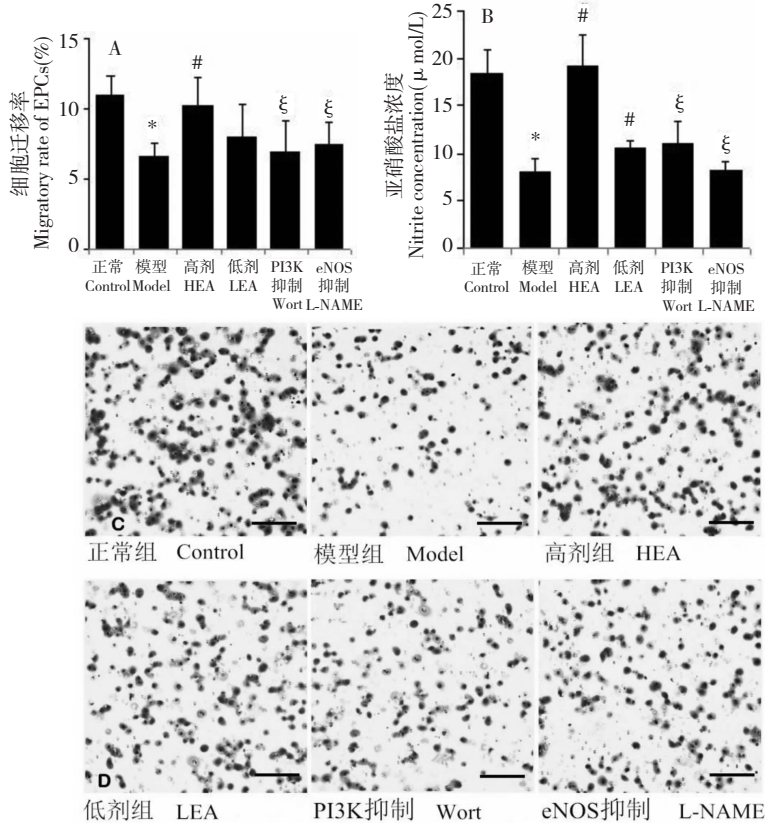


图 5 图 A、C 和 D 表示各实验组中 EPCs 的迁移能力, A 为迁移率(相对于总细胞数)统计图, C、D 中紫色代表迁移至 Transwell 下层的细胞(结晶紫染色), 数量越多即迁移能力越强, 其中黑色横条代表 50 μm; 图 B 统计了 EA 对 EPCs 合成 NO 能力的影响, 其中*代表相对于正常组 P < 0.05; #代表相对于模型组 P < 0.05; §代表相对于高剂组 P < 0.05。

Fig. 5 The effects of echinocystic acid (EA) on the migration and nitric oxide (NO) production of endothelial progenitor cells (EPCs). Oxidised low-density lipoprotein (oxLDL) inhibited the migration capacity of EPCs compared with the control. Treatment of EPCs with 20 μM EA significantly decreased the inhibitory effect on EPCs. The beneficial effect of EA was abrogated by Wortmannin or nitro-L-arginine methyl ester (A, C and D); Nitrite production (as NO content) in EPC culture medium was measured by Griess reagent. Treatment of EPCs with oxLDL decreased NO generation, which was restored by co-incubation with EA. Pretreatment of EPCs with Wortmannin or L-NAME also decreased NO production (B). Data are shown as mean ± SD (n = 6). * P < 0.05 versus Control; # P < 0.05 versus Model; § P < 0.05 versus High-dose. Bars = 50 μm

2.1.5 EA 对激活 Akt/eNOS 通路

鉴于 PI3K/Akt/eNOS 信号通路在 EPCs 存活、功能中的关键性作用, 假设 EA 将对此条通路具有调节作用并通过免疫印迹法进行了验证(参见图 6)。本研究设定正常组磷酸化 Akt (p-Akt) 或磷酸化 eNOS (p-eNOS) 蛋白水平为 100%。结果发现 ox-

LDL 并未使 Akt 的表达量减少, 但却显著抑制了 Akt 的磷酸化激活(模型组: 47 ± 5%; 对比正常组 P < 0.05); 而模型组的 eNOS 表达受到明显抑制(模型组 eNOS: 39 ± 6%, 对比正常组 P < 0.05); EA 显著增加了 Akt 的磷酸化(高剂组 p-Akt: 76 ± 6%, 低剂组 p-Akt: 55 ± 3%; 对比模型组 P < 0.05); 然而,

EA 并不能恢复 oxLDL 造成的 eNOS 表达下降,却剂量依赖性的提高了 p-eNOS 与 eNOS 的比例,激活了 eNOS(高剂组 p-eNOS/eNOS:1.33 ± 0.15,低剂组 p-eNOS/eNOS:1.07 ± 0.3;对比模型组 0.82 ± 0.05; $P < 0.05$); Wormannin 作为信号通路上游的 PI3K 抑

制剂造成 p-Akt 的下调而对 p-eNOS/eNOS 没有太大的影响(PI3K 抑制组 p-Akt:49 ± 6%;PI3K 抑制组 p-eNOS/eNOS:对比高剂组 $P < 0.05$)。L-NAME 作为 eNOS 的直接抑制剂对蛋白表达并没有明显影响^[17]。

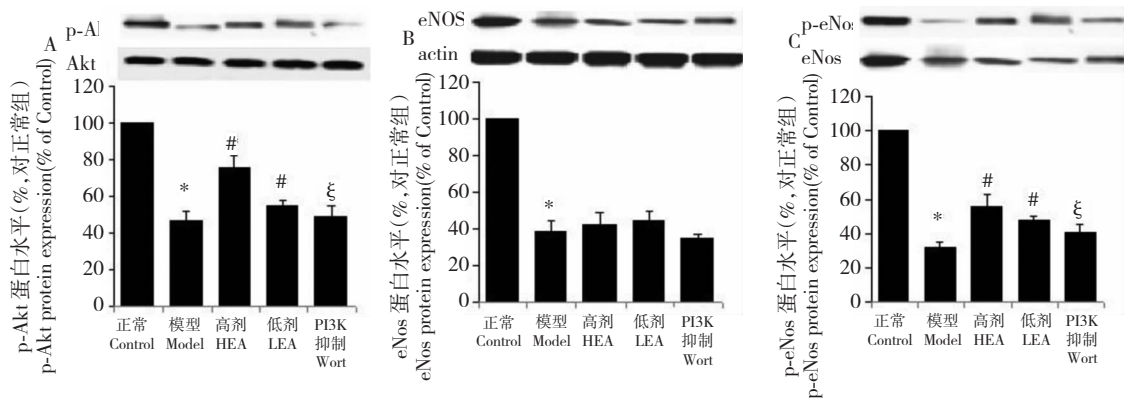


图 6 A 和 C 表示各实验组 Akt 和 eNOS 蛋白磷酸化的水平, B 为各实验组 eNOS 的表达水平。EA 并未提升 oxLDL 降低的 eNOS 表达,却增强了 eNOS 的磷酸化。其中 * 代表相对于正常组 $P < 0.05$; # 代表相对于模型组 $P < 0.05$; \$ 代表相对于高剂组 $P < 0.05$ 。

Fig. 6 Effect of EA on Akt phosphorylation and eNOS phosphorylation. Western blot analysis was performed on EPCs in five experimental groups. A: Expression of phosphorylated Akt (p-Akt). B: Expression of eNOS protein. C: Ratio of p-eNOS/total eNOS in EPC lysates. Densities of the eNOS bands were corrected with respect to β -actin and then the p-eNOS/total eNOS expression ratio was calculated. The ratio of Control group was assigned a value of 1.0 for statistical analysis. Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$). * $P < 0.05$ versus Control; # $P < 0.05$ versus Model; \$ $P < 0.05$ versus High-dose.

2.2 讨论

总结本研究的结果可以得到两个主要发现:首先是确定了刺囊酸确实具有独立于降脂作用之外的抗 AS 机制。之前的体内研究发现皂荚水提取物(含 80% 的 EA)能显著降低高脂饲料喂养的家兔的血脂,包括甘油三酯及总胆固醇,另外也观察到治疗组斑块面积的大幅度缩小,这证实 EA 具有抗 AS 能力,但这是否完全来自于其降血脂作用并未得到揭示^[13]。其次,本研究证实了最初的设想,即 EPCs 是 EA 的作用靶点,而且 EA 通过对 PI3K/Akt/eNOS 信号通路的激活发挥保护 EPCs 的作用,尤其是在高浓度 oxLDL 存在的情况下。EPCs 在防止斑块形成,改善 AS 造成的组织缺血方面发挥出重要的作用^[18],但高脂血症或糖尿病状态下 oxLDL 增加将损伤 EPCs 的数量与功能,加速 AS 的发病过程^[19,20]。本研究通过体外模拟高 oxLDL 环境所造成的 EPCs 损伤模型,证实了 EA 对 EPCs 的保护作用起码是其抗 AS 能力的机制之一。另外,本研究还证明 PI3K/Akt/eNOS 信号通路在此过程中发挥重要作用,其中 Akt 和 eNOS 更是调节 EPCs 存活与功能的关键分

子^[20-23]。因此,本研究特地考察了细胞中 Akt 与 eNOS 在 oxLDL 环境中加入 EA 后的状态,结果发现 oxLDL 抑制了这两种蛋白的磷酸化激活,从而促进了 EPCs 的凋亡和功能紊乱,而 EA 虽然对 Akt 与 eNOS 的表达量没有影响,但却增加了磷酸化。药理抑制组的结果也从侧面印证了 PI3K/Akt/eNOS 通路对于 EA 发挥作用的重要性。总之,这些机制研究结果与细胞数量及功能的指标结果一致,表明了对于 Akt 和 eNOS 磷酸化的调节可能是 EA 的主要作用机制。

本研究的结果还表明 EA 的作用具有剂量依赖性,然而,预实验却表明剂量在 20 μM 以上时这种依赖性变得并不明显,而且更高剂量的 EA (> 80 μM)甚至会诱导 EPCs 的凋亡。因此,根据预实验的结果,实验设置了 20 μM 和 5 μM 的高、低剂量组。虽然包括 EA 及齐墩果酸在内的三萜酸具有细胞毒性^[24,25],但在体内试验中,起码在药效剂量水平上却未见明显毒性反应,而且血清转氨酶水平也远低于阿托伐他汀对照组。总之,通过更为深入的药效及毒理研究,刺囊酸有望成为新的抗缺血药

物或先导化合物。

3 结论

研究表明, oxLDL 在体外诱导 EPC 的凋亡, 并且显著降低细胞粘附、迁移和合成 NO 的能力, 考虑到 EPC 在体内发挥内皮修复、血管发生等重要作用, oxLDL 对细胞数量及功能的损伤是其引起并加速动脉粥样硬化形成的重要机制之一。刺囊酸能够减轻 oxLDL 对 EPC 的损伤, 包括抑制细胞凋亡, 部分恢复细胞粘附、迁移、NO 合成等功能。本研究还探索了刺囊酸的作用机制, 结果表明 oxLDL 抑制 Akt 及 eNOS 的磷酸化, 而刺囊酸有效对抗了 oxLDL 的作用, 药理对照组的实验证实了激活 Akt/eNOS 通路的确是刺囊酸的主要作用机制。结合之前的体内研究中, 刺囊酸可能通过降血脂和维持 EPC 数量及功能的方式发挥抗动脉粥样硬化的作用。由于在较高剂量表现出的细胞毒的作用, 刺囊酸作为药物应用还需要更加深入的研究工作。

参考文献

- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Cir Res*, 1999, 85:221-228.
- Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*, 2008, 78:413-421.
- Georgescu A. Vascular dysfunction in diabetes: The endothelial progenitor cells as new therapeutic strategy. *World J Diabetes*, 2011, 2:92-97.
- Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*, 2011, 17:1359-1370.
- Yang Y (杨彦), Chen Q (陈庆伟). Endothelial progenitor cells: progress in cardiovascular disease. *Adv Cardiovasc Dis (心血管病学进展)*, 2010, 31:893-896.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 2001, 89:e1-e7.
- Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 2002, 106:2781-2786.
- Tie G, Yan J, Yang Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis in endothelial progenitor cells by inactivating the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Vasc Res*,

- 2010, 47:519-530.
- Hamed S, Brenner B, Roguin A. Nitric oxide: a key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus type-2. *Cardiovasc Res*, 2011, 91:9-15.
- Stancu CS, Toma L, Sima AV. Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis. *Cell Tissue Res*, 2012, 349:433-446.
- Wang JH (王蓟花), Tang J (唐静), Li D (李端), et al. Chemical constituents and bioactivity of *Gleditsia* plants. *Chin Wild Plant Res (中国野生植物资源)*, 2008, 37:1-3.
- Wu J, Li J, Zhu Z, et al. Protective effects of echinocystic acid isolated from *Gleditsia sinensis* Lam. against acute myocardial ischemia. *Fitoterapia*, 2010, 81:8-10.
- Lai P, Du J, Zhang M, et al. Aqueous extract of *Gleditsia sinensis* Lam. fruits improves serum and liver lipid profiles and attenuates atherosclerosis in rabbits fed a high-fat diet. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137:1061-1066.
- Han L, Lai P, Du JR. Deciphering molecular mechanism underlying hypolipidemic activity of echinocystic Acid. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014:1-8.
- Kobayashi K, Imanishi T, Akasaka T. Endothelial progenitor cell differentiation and senescence in an angiotensin II-infusion rat model. *Hypertension Res*, 2006, 29:449-455.
- Lefèvre J, Michaud Sé, Haddad P, et al. Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. *FASEB J*, 2007, 21:3845-3852.
- Gao F, Gao E, Yue TL, et al. Nitric oxide mediates the anti-apoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation*, 2002, 105:1497-1502.
- Zhou X (周晓峰), Wang Z (王佐). The effects of endothelial progenitor cell in process of arteriosclerosis. *Chin J Arterioscler (中国动脉硬化杂志)*, 2008, 15:940-942.
- Ma FX, Zhou B, Chen Z, et al. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Lipid Res*, 2006, 47:1227-1237.
- Everaert BR, Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, et al. Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on PI3K/AKT/eNOS pathway. *Int J Cardiol*, 2010, 144:350-366.
- Llavadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 2001, 108:399-405.