

基于 p-Akt/eNOS 信号的阿司匹林对 ox-LDL 诱导的人主动脉内皮细胞损伤的保护作用*

令狐克刚^{1,2**}, 曾 玉^{1,2}, 张彦燕², 陶 玲², 林 丹^{1,2}, 沈祥春^{1,2***}

(1. 贵州医科大学 中药药理教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 天然药物资源优效利用重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 研究阿司匹林对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人主动脉内皮细胞(HAEC)损伤的保护作用及对 p-Akt/eNOS 信号系统的影响。方法: 体外传代培养 HAEC, 分为空白对照组、模型组及阿司匹林组, 建立 ox-LDL (150 mg/L, 24 h) 诱导的 HAEC 细胞损伤模型, 阿司匹林组在建模前用阿司匹林预处理 1 h, 利用 MTT 法检测 HAEC 存活率、LDH 外漏率分析细胞损伤, 测定细胞培养上清液一氧化氮(NO)含量, 蛋白印迹法及 RT-PCR 方法检测 p-Akt、eNOS 蛋白及 mRNA 表达。结果: 与空白对照组比较, ox-LDL 诱导损伤后细胞 MTT 值显著降低, LDH 外漏明显增加, 内皮细胞 NO 分泌与释放减少, p-Akt、eNOS 的蛋白及 mRNA 表达下调, 阿司匹林干预后能显著改善上述指标。结论: 阿司匹林对 ox-LDL 诱导的 HAEC 损伤具有保护作用, 其机制可能与其调控激活 p-Akt/eNOS 信号通路密切相关。

[关键词] 阿司匹林; 蛋白激酶类; 一氧化氮合酶; 信号传导; 主动脉; 内皮, 血管; 氧化低密度脂蛋白

[中图分类号] R972.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)08-0785-04

Protective Effects of p-Akt/eNOS Based Aspirin on ox-LDL Induced Human Aortic Endothelial Cells Injury

LINGHU Kegang^{1,2}, ZENG Yu^{1,2}, ZHANG Yanyan², TAO Ling², LIN Dan^{1,2}, SHEN Xiangchun^{1,2}

(1. Department of Pharmacology of Chinese Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of p-Akt/eNOS based aspirin on ox-LDL induced HAEC injury, and the mechanism involving in p-Akt/eNOS signal pathway. **Methods:** The HAEC injury model was reproduced *in vitro* and divided into control group, model group and aspirin group. Establishing ox-LDL (150 mg/L, 24 h) induced HAEC cell injury model. Aspirin group were pretreated by Aspirin for 1 hour before modeling, then analyzing cell injury by MTT for HAEC Survival rate and LDH releasing for cell injury; determining the supernatant liquid NO content. Western blot and RT-PCR were used to test p-Akt, eNOS protein and mRNA expression. **Results:** Comparing with control group, MTT value was significantly lowered, LDH releasing obviously increased, secretion and release of NO were reduced; p-Akt, eNOS protein and mRNA expression were lowered, which indicated aspirin intervention can improve these indexes. **Conclusion:** Aspirin could protect against ox-LDL-induced endothelial dysfunction, the mechanism maybe involve in modulating p-Akt/eNOS pathway.

[Key words] aspirin; protein kinases; nitric-oxide synthase; signal transduction; aorta; endothelium, vascular; oxidized low density lipoprotein

*[基金项目] 国家自然科学基金(No 81360650, 81102664); 贵州省留学人员科技活动项目经费[黔人项目资助合同(2013)02号]; 贵阳市科技局现代药业计划[筑科合同 No. 2011204-17]; 大学生创新创业项目(No. 021203102); 贵州省 2011 计划[黔教合协同创新字(2013)04]; 贵州省普通高等学校创新团队[黔教合人才团队字(2014)31号]; 贵州省高层次人才培养[黔科合人才(2015)4029号]; 贵州省科技青年英才[黔省专合字(2012)161号]

** 贵州医科大学 2014 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: 369745641@qq.com

网络出版时间: 2015-07-12 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150712.0936.032.html>

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种常见的血管疾病,血管内皮受损为其起始环节^[1]。研究表明脂质的沉积和随后发生的氧化反应可以导致内皮功能紊乱^[2]。一氧化氮(nitric oxide, NO)是体内脂质调节过程的一种重要的信号分子,内皮型的NO产生不足是动脉粥样硬化和血管损伤的早期且持续出现的特点^[3]。丝/苏氨酸蛋白激酶(AKT)是蛋白激酶家族中的一种,激活的AKT通过磷酸化内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS)上的丝氨酸177位点而使其激活,最终引起内皮细胞源性一氧化氮的释放,产生抗动脉粥样硬化的效应^[4]。

阿司匹林是一种水杨酸复合物,临床初步研究显示其可以通过提高内皮依赖型动脉松弛来维持血管平衡,其机制可能和诱导血管内皮NO的释放有关^[5]。因此本研究通过氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导损伤人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cell, HAEC),探讨分析阿司匹林对ox-LDL诱导血管内皮损伤的保护作用及其对p-Akt/eNOS信号通路的影响,为其临床应用提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人动脉内皮细胞株,购于美国 Science Cell 公司,ELX800 型酶联免疫检测仪(美国 GE 公司),垂直电泳仪及转膜系统(Biorad 公司),阿司匹林(aspirin, Asp)购自中国医药公司上海分公司,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL,批号:20120212)购自北京协生生物科技公司,内皮细胞培养基、胰酶、冻存液购于美国 Science Cell 公司,LDH 试剂盒购于南京建成生物工程研究所,一氧化氮(NO)试剂盒购于广州碧云天试剂公司,p-Akt、eNOS 一抗购于 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 本室传代培养 HAEC,常规方法复苏,加入内皮细胞培养基后于 37℃、5% CO₂ 的湿热培养箱中培养。视具体情况换液及传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 ox-LDL 诱导的 HAEC 损伤模型 对数生长期的细胞消化后以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔培养板中培养,待细胞基本长至融合后进行实验。150 mg/L ox-LDL 孵育 24 h 建立 ox-LDL 诱导

HAEC 损伤模型。

1.2.3 实验分组 实验分为 3 组,即空白对照组(Control)、模型组(Model)和阿司匹林组(Asp, 1 mM)。ASP 组于造模前给予 ASP 干预保护 1 h 后,再加入 ox-LDL 复制 HAEC 损伤模型。

1.2.4 MTT 法检测 HAEC 细胞存活率 取对数生长期细胞接种于 96 孔细胞培养板,于对数生长期移除培养液。应用 MTT 法,酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测定吸光度值,每组重复 6 个复孔,实验重复 3 次。细胞活力 = 实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.5 乳酸脱氢酶(LDH)活性 细胞接种于 24 孔板,各组按前述处理方法处理后,按照试剂盒说明书测定各组培养上清液 LDH 含量;超声法碎裂细胞,测定细胞内 LDH 含量,计算 LDH 活性。LDH 活性(U/L) = 培养液 LDH/(培养液 LDH + 细胞内 LDH) $\times 100\%$ 。

1.2.6 NO 含量 细胞悬液接种于 24 孔板,给药处理后按照试剂盒说明书(南京建成)检测培养上清液中 NO 含量。

1.2.7 p-Akt、eNOS 蛋白表达 用冷 PBS 冲洗细胞 3 次,加入预冷的细胞裂解液(含 100 mmol/L PMSF)提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 30 g 蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,分离并转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶(TBST 配制)室温封闭 1 h。加入一抗(p-Akt, 1:500; eNOS, 1:500)4℃孵育过夜,加入 HRP 偶联的二抗(1:5000),室温孵育 1 h, ECL 发光暗室显影。蛋白条带用 ImageJ 软件进行灰度分析。

1.2.8 p-Akt、eNOS mRNA 表达 用 Trizol 法裂解细胞提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,加入上游及下游引物进行 PCR 反应。P-Akt: 5'-AGGAGGAG-GAGGAGATGGA-3', 5'-GGTCGTGGTCTGGAAAG-3'。eNOS: 5'-TGTATGGCTCCGAGACCG-3', 5'-GGCAGGTGGATTGCTTGA-3'。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶溶液,10 g/L 溴化乙锭染色。以 β -actin 为内参对照物, BIO-RAD 凝胶成像系统成像并保存。

1.3 统计学处理

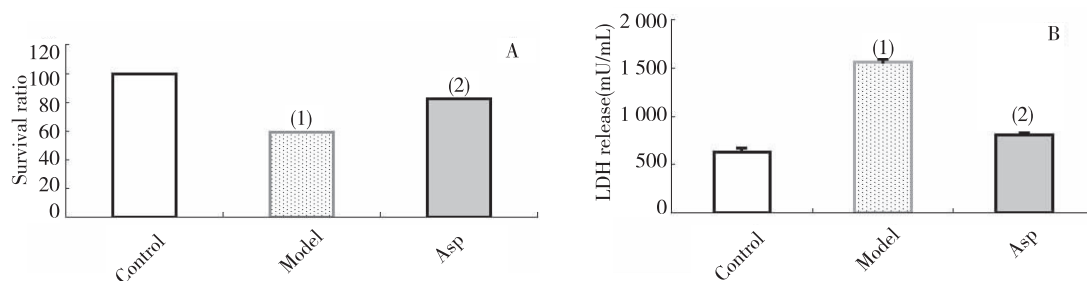
实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HAEC 存活率及 LDH 活性

存活率反应细胞生存指标。与 Control 组比较,模型组 HAEC 存活率明显降低($P < 0.05$),预

先给予 Asp 干预后,Asp 组的 HAEC 存活率显著增加($P < 0.05$);LDH 外漏是细胞膜损伤的生物标志物,与 Control 组比较,模型组 LDH 的活力明显增加($P < 0.05$);给予 Asp 干预的 Asp 组上清培养液中 LDH 活力明显降低($P < 0.05$),提示 Asp 可有效降低 ox-LDL 对 HAEC 的损伤。见图 1。



注:A 为细胞存活率,B 为 LDH 活性

⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.05$

图 1 Asp 对 OX-LDL 诱导 HAEC 细胞损伤的保护作用

Fig. 1 Protective effect of Asp on OX-LDL induced HAEC cell injury

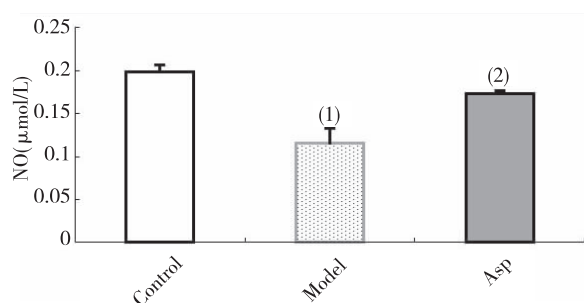
2.2 NO 含量

ox-LDL 作用于 HAEC 后,显著减少 NO 的分泌,而 Asp 可显著抑制 ox-LDL 所致 HAEC NO 分泌减少($P < 0.05$)。见图 2。

增加 p-Akt 和 eNOS mRNA 的表达。见图 4。

3 讨论

近年来,心脑血管疾病已成为人类健康的第一大杀手,引起人们越来越多的关注。As 是目前公认导致心血管系统疾病高死亡率的首要原因,是多种心脑血管疾病的共同病理基础^[6]。导致 As 的众多病因中,高脂血症是主要原因之一,而氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞 NO 合成和释放的影响是目前人们关注的热点。研究表明 As 疾病普遍存在的内皮功能障碍是导致或加重 As 的重要因素之一,其中内皮介导的 NO 合成障碍和 NO 平衡失调是内皮功能障碍的主要原因之一^[7]。调节 NO 平衡,有利于维持血管的功能正常及结构完整,从起始环节干预 As 的形成,可有效防治 As 导致的心脑血管疾病。阿司匹林是一种水杨酸复合物,是临床常用的抗炎、抗血栓药物,其作用主要是通过抑制前列腺素(PGE)的合成及环氧化酶(Cox)的激活而实现的。最新的研究显示阿司匹林还具有对抗过氧化物的损伤、保护血管内皮细胞完整性的功能,其作用可能与诱导某种保护性基因表达有关^[8]。



⁽¹⁾ 与对照组比较, $p < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $p < 0.05$

图 2 Asp 对 OX-LDL 诱导 HAEC 细胞损伤后 NO 分泌的影响

Fig. 2 The ameliorated effect of Asp on NO content of HAEC injury induced by OX-LDL

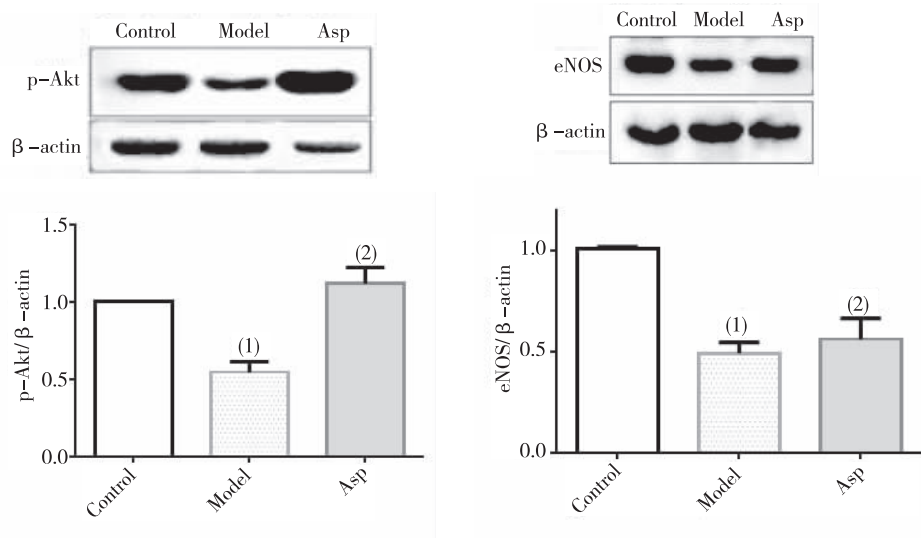
2.3 p-Akt、eNOS 蛋白表达

与 Control 组比较,ox-LDL 作用于 HAEC 后,p-Akt 和 eNOS 的蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$),Asp 对 ox-LDL 所致 HAEC p-Akt、eNOS 的下调有显著抑制作用($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 p-Akt mRNA 和 eNOS 表达水平

采用 RT-PCR 检测 p-Akt 和 eNOS 信号分子的基因表达,ox-LDL 作用于 HAEC 后,p-Akt 和 eNOS mRNA 表达水平显著降低,预先给予 Asp 可以明显

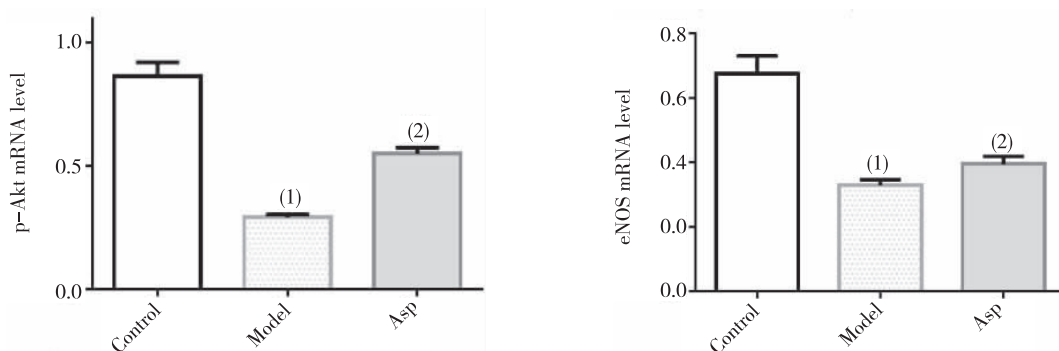
Akt/eNOS 信号通路有多种信号分子,而 Akt 位于这一通路的中心环节,也是最为主要的靶酶。磷酸化的 Akt 具有抗凋亡、促进蛋白合成等活



⁽¹⁾ 与对照组相比, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组相比, $P < 0.05$

图 3 Asp 对 ox-LDL 诱导 HAEC 细胞损伤后 p-Akt、eNOS 蛋白表达的影响

Fig. 3 The effects of Asp on p-Akt and eNOS protein expression levels in HAEC injury induced by ox-LDL



⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.05$

图 4 阿司匹林对 ox-LDL 诱导 HAEC 损伤后 p-Akt mRNA 和 eNOS mRNA 表达水平的影响

Fig. 4 Effects of Asp on p-Akt and eNOS mRNA levels in ox-LDL induced HAEC injury

性^[9]。NOS 分为结构型 (eNOS、nNOS) 和诱导型 (iNOS)。应激状态下, eNOS 可抑制血管痉挛, 减少炎性细胞的浸润, eNOS 在钙/钙调蛋白的调节下催化 L-精氨酸生成内源性 NO, 后者具有扩张血管、抗凝、抑制血小板聚集等作用。本研究结果显示, 阿司匹林可显著抑制 HAEC 损伤, 激活 p-Akt 的磷酸化, 上调 P-Akt 蛋白及 mRNA 表达, 同时上调 eNOS 的活性, 增加 NO 的分泌与释放。这些结果表明阿司匹林对血管内皮的保护作用可能与其上调或/和激活 p-Akt/eNOS 信号通路, 诱导 NO 的分泌和释放密切相关。但对于 p-Akt/eNOS 信号通路是通过何种机制被激活以及其与 Cox 信号的关系, 还有待进一步研究。

本实验对阿司匹林的心血管药效机制进行更进一步研究, 为其在心血管疾病的临床防治方面提供了实验基础。

4 参考文献

- [1] 徐佳杨, 蔡辉. 氧化低密度脂蛋白与动脉粥样硬化的研究[J]. 安徽医药, 2011(2): 228 - 230.
- [2] Nima M. Gharavi, Nancy A. Baker, Kevin P. Mouillessieux, et al. Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Regulation of SREBP Activation by Oxidized Phospholipids[J]. Circulation Research, 2006(98): 768 - 776.

(下转第 792 页)

细胞受到损伤后,从细胞内释放到细胞膜外,通过测定其在细胞外的含量,能反应细胞受损程度。本实验给予 ox-LDL 后,细胞存活率显著下降,细胞发生严重的病理形态学改变,NO 含量降低,LDH 外漏量明显增加。采用 CAR 预保护 1 h,细胞存活率显著增加,细胞逐渐恢复至正常形态,NO 含量增加,LDH 外漏量明显减少。

综上所述,CAR 能改善内皮功能状态,对 ox-LDL 诱导的 HAECs 氧化损伤具有保护作用,其作用可能与 NO 系统有关。

4 参考文献

- [1] 王道艳,王志,张峥,等. 齐墩果酸对 ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 青岛大学医学院学报, 2014(6):487-489.
 - [2] Vogiatzis, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis [J]. Hellenic J Cardiol, 2009(5):402-409.
 - [3] 吕铁伟,孙慧超,张蕾,等. ox-LDL 抑制大鼠骨髓间充质干细胞的体外增殖和 Oct-4 表达[J]. 重庆医学, 2014(14):1737-1740.
 - [4] Chu L, Hao H, Luo M, et al. Ox-LDL modifies the behaviour of bone marrow stem cells and impairs their endothelial differentiation via inhibition of Akt phosphorylation [J]. J Cell Mol Med, 2011(2):423-432.
 - [5] Charo I F, Taub R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis [J]. Nat Rev Drug Discov, 2011(5):365-376.
 - [6] Kosior DA, Brodowski K, Krzykwa A, et al. Role of inflammation in etiology of atrial fibrillation-is lone arrhythmia really alone [J]. Wiad Lek, 2012(4):255-258.
 - [7] 刘淑萍. β 受体阻滞剂在急性心肌梗死中的应用[J]. 中国老年学杂志, 2013(12):2995-2998.
 - [8] La Mura V, Colombo M. Bacterial translocation and non-selective β -blockers in portal hypertension: Where we are, What still we need [J]. Gastroenterology, 2014; Epub ahead of print.
 - [9] 李露. β 受体阻滞剂预防心力衰竭患者心脏性猝死的研究进展[J]. 重庆医学, 2012(17):1768-1771.
 - [10] 胡和生, 闫素华. 室性心律失常的交感神经机制诊疗进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013(23):10861-10863.
 - [11] 张健, 魏欣冰, 丁华, 等. 卡维地洛对过氧化氢致血管内皮细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2006(5):620-624.
 - [12] 张霞, 金惠敏. 慢性肾脏病与血管内皮细胞功能的研究进展[J]. 上海交通大学学报, 2012(4):528-532.
 - [13] 薛建峰, 赵成军, 贾如意. 血管内皮损伤标志物[J]. 医学综述, 2006(8):461-463.
 - [14] 邱雅慧. 血管内皮细胞的功能以及损伤修复与动脉粥样硬化[J]. 中国组织工程研究与临床康复综述, 2007(11):1927-1929.
 - [15] 王桂霞. 血管内皮细胞损伤机制及其药物保护作用的研究进展[J]. 辽宁医学院学报, 2008(5):466-468.
 - [16] Grassi D, Desideri G, Ferri C. Cardiovascular risk and endothelial dysfunction: the preferential route for atherosclerosis [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011(9):1343-1353.
 - (2015-04-07 收稿, 2015-06-15 修回)
 - 中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅
-
- (上接第 788 页)
- [3] 李博, 李卫华. SREBPs 信号转导途径与动脉粥样硬化研究进展[J]. 心血管病学进展, 2011(6):876-879.
 - [4] Ning Sun, Hui Wang, Lin Wang, et al. aspirin alleviates dysfunction of endothelial progenitor cells induced by high glucose via PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015(1):482-489.
 - [5] Sarah Kraus PhD, Inna Naumov PhD, Shiran Shapira PhD, et al. aspirin but not meloxicam attenuates early atherosclerosis in apolipoprotein e knockout mice [J]. 2014(16):233-238.
 - [6] 李敏, 蒋兴亮. 痛风与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010(10):1133-1135.
 - [7] Hou HF, Yuan N, Guo Q, et al. Citreoviridin Enhances Atherogenesis in Hypercholesterolemic ApoE-Deficient Mice via Upregulating Inflammation and Endothelial Dysfunction[J]. PLOS ONE, 2015(5):1-13.
 - [8] Muhammad R. Marwali, Chang-Ping Hu, Bhavna Mohandas, et al. Modulation of ADP-Induced Platelet Activation by Aspirin and Pravastatin: Role of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-I, Nitric Oxide, Oxidative Stress, and Inside-Out Integrin Signaling [J]. THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 2007(3):1324-1332.
 - [9] 张新金, 马业新, 文渊, 等. 促红细胞生成素通过 PI3-K/Akt 信号通路抑制血管紧张素 II 诱导的新生大鼠心脏成纤维细胞增殖[J]. 中国病理生理杂志, 2009(2):293-298.
 - (2015-05-10 收稿, 2015-06-12 修回)
 - 中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅