

消退素 E1 调控高尔基体应激抑制低氧内皮细胞损伤的作用机制

谢晓秋^{1, 2, 3, 4}, 蔡缘缘^{1, 2, 3, 4}, 谢和兵^{2, 3}, 袁志兵^{1, 2, 3, 4*}, 龚春香^{5*}

1. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012
2. 南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133
3. 西藏神猴药业有限责任公司, 江苏 南通 226133
4. 广西医科大学 睿谷医学检验实验室, 广西 南宁 530012
5. 南京中医药大学附属常州中医医院 病理科, 江苏 常州 213003

摘要: 目的 探究高尔基体应激在低氧诱导血管内皮细胞损伤中的作用, 并探讨消退素 E1 (RvE1) 对高尔基体应激的调控作用。方法 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 分为 20.9% O₂、2% O₂、2% O₂+si-NC、2% O₂+si-GRASP65、2% O₂+RvE1、2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC、2% O₂+RvE1+OE-GRASP65 组。采用透射电镜观察 HUVEC 高尔基体形态变化, CCK-8 检测细胞活力, 流式细胞术检测活性氧 (ROS) 水平, ELISA 检测细胞培养上清内皮素 1 (ET-1)、前列环素-2 (PGI-2)、RvE1 的变化, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 及 Western blotting 检测一氧化氮合成酶 (eNOS)、高尔基体外周膜蛋白 P65 抗体 (GRASP65) mRNA 和蛋白表达。结果 与 20.9% O₂ 组比较, 低氧可致血管内皮细胞高尔基体破裂甚至重构, 显著抑制 HUVEC 活力 ($P<0.01$), 显著上调 ROS 生成 ($P<0.01$), 显著抑制 eNOS、PGI-2、RvE1 表达 ($P<0.01$), 显著促进 ET-1、GRASP65、p-GRASP65 表达 ($P<0.01$); 与 2% O₂ 组比较, si-GRASP65、RvE1 可以改善低氧 HUVEC 高尔基体应激反应, 显著增强 HUVEC 活力 ($P<0.01$), 显著下调 ROS 生成 ($P<0.01$), 显著增加 eNOS、PGI-2 表达 ($P<0.01$), 显著抑制 ET-1、GRASP65、p-GRASP65 表达 ($P<0.01$); OE-GRASP65 对 RvE1 的药效有明显的抵消作用。结论 RvE1 具有拮抗内皮细胞低氧损伤作用, 其机制可能与其抑制低氧所致高尔基体应激有关。

关键词: 消退素 E1; 低氧; 内皮细胞; 高尔基体应激; 活性氧

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 08-1776-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.011

Mechanism of RvE1 inhibiting hypoxic endothelial cell injury by regulating Golgi stress

XIE Xiaoqiu^{1, 2, 3, 4}, CAI Yuanyuan^{1, 2, 3, 4}, XIE Hebing^{2, 3}, YUAN Zhibing^{1, 2, 3, 4}, GONG Chunxiang⁵

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong 226133, China
3. Jiangsu Shenhui Pharmaceutical Research Co., Ltd., Nantong 226133, China
4. Rexplo Medical Laboratory of Guangxi Medical University, Nanning 530012, China
5. Department of Pathology, Changzhou Traditional Chinese Medicine Hospital affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Changzhou 213003, China

Abstract: **Objective** To explore the role of Golgi stress in the injury of hypoxic vascular endothelial cells, and to explore the regulatory effect of fading hormone E1 (RvE1) on Golgi stress. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were divided into 20.9% O₂, 2% O₂, 2% O₂+si-NC, 2% O₂+si-GRASP65, 2% O₂+RvE1, 2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC and 2% O₂+RvE1+OE-GRASP65 groups. The morphological changes of HUVEC Golgi apparatus were observed by transmission electron microscopy, cell viability was detected by CCK-8, reactive oxygen species (ROS) levels were detected by flow cytometry, and the changes of endothelin-1 (ET-1), prostacyclin-2 (PGI-2) and RvE1 were detected by ELISA. Real-time quantitative fluorescent PCR (qRT-PCR)

收稿日期: 2024-04-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81470247); 西藏自治区科技厅区域科技协同创新专项(QYXTZX-RKZ2022-07)

第一作者: 谢晓秋, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 19940521085@163.com

*共同通信作者: 袁志兵, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为心血管药理学。E-mail: zhibingyuan@sina.com

龚春香, 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为病理生理学。E-mail: binhe_8213@163.com

and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of nitric oxide synthetase (eNOS) and Golgi *in vitro* peripheral membrane protein P65 antibody (GRASP65). **Results** Compared with 20.9% O₂ group, hypoxia could cause rupture or even remodeling of the Golgi apparatus of vascular endothelial cells, significantly inhibit HUVEC activity ($P < 0.01$), significantly up-regulate ROS production ($P < 0.01$), and significantly inhibit the expressions of eNOS, PGI-2 and RvE1 ($P < 0.01$). Significantly promoted the expression of ET-1, GRASP65, p-GRASP65 ($P < 0.01$); Compared with 2% O₂ group, si-GRASP65 and RvE1 could improve the stress response of hypoxic HUVEC Golgi apparatus, significantly enhance HUVEC activity ($P < 0.01$), significantly down-regulate ROS production ($P < 0.01$), and significantly increase the expressions of eNOS and PGI-2 ($P < 0.01$). The expression of ET-1, GRASP65 and p-GRASP65 was significantly inhibited ($P < 0.01$). OE-GRASP65 has a significant cancelling effect on the efficacy of RvE1. **Conclusions** RvE1 can antagonize hypoxic injury of endothelial cells possibly by inhibiting hypoxia-induced Golgi stress.

Key words: resolvin E1; hypoxia; endothelial cells; Golgi stress; reactive oxygen species

低氧致血管内皮细胞活性因子水平失调,诱导血管收缩及重塑^[1-2],促进低氧性肺动脉高压(HPH)的发生,目前无特异性针对HPH治疗药物,临床治疗HPH主要采用肺动脉血管舒张药物,如前列腺素I₂受体激动剂等^[3-4],但治疗效果有限。HPH的治疗方案在不断改进,目前,细胞器应激治疗已成为HPH的新型治疗方式之一^[5],细胞器应激是影响血管壁结构功能改变的重要因素,研究表明,线粒体稳态失调和内质网应激与HPH发生发展密切相关^[6-8],高尔基体应激会影响细胞增殖、凋亡及氧化应激^[9],但有关高尔基体应激在HPH中的作用研究甚少。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路是高尔基体应激重要调控机制^[10],该通路亦参与介导了低氧所致的HPH肺血管内皮细胞损伤^[11-12]。消退素E1(RvE1)是真核细胞的1种内源性脂质分子,具有明显的抗炎、抗氧化损伤的作用^[13],RvE1可调控包括MAPK通路^[14]在内的多种通路。本研究拟探究高尔基体应激在低氧致血管内皮细胞损伤中的作用,并探讨RvE1对高尔基体应激的调控作用。

1 材料

1.1 主要仪器

FC-1100超微量核酸检测仪(中国杭州遂真生物科技有限公司); AriaMx Real-Time PCR System(美国Agilen公司); FilterMax-F3酶标仪(美国MD公司); Tanon-5200凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); Power Pac-Basic电泳仪(美国Bio-Rad公司); 5418R低温离心机(德国Eppendorf公司); Veriti™96-Well Thermal Cycler(英国Thermo Fisher公司); 流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司); 透射电子显微镜(日本Hitachi公司)。

1.2 细胞及主要试剂

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)系购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

RvE1(货号552830-51-0,美国AbMole公司,质量分数≥95.0%); CCK-8试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RvE1 ELISA试剂盒(货号BBS-DDC、BL521A、ml037571,中国Biosharp公司); 活性氧(ROS)检测试剂盒(货号S0033S,中国碧云天生物科技股份有限公司); 内皮素1(ET-1)ELISA试剂盒(货号ml025101,中国酶联生物科技有限公司); 前列环素-2(PGI-2)ELISA试剂盒(货号KS15049,中国科顺生物科技有限公司); Hieff®qPCR SYBR®Green Master Mix (No Rox)(货号11202ES03,中国翌圣生物科技有限公司); 兔一抗高尔基体外周膜蛋白P65抗体(GRASP65)、鼠一抗一氧化氮合成酶(eNOS)(货号K109895P、K000221M,中国Solarbio公司); 鼠一抗p-GRASP65(货号MABS1282,美国Sigma-Aldrich公司); 兔一抗β-actin(货号AC026,美国ABclonal公司); 山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(货号ab6721、ab6789,英国Abcam公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组、处理方法

HUVEC系用含10%胎牛血清(FBS)、1%青霉素和1%链霉素的RPMI 1640培养基于培养箱(37℃、5% CO₂)中培养,待生长至融合度为70%~80%时经0.25%的胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化后传代。

实验一设置20.9% O₂、2% O₂组。20.9% O₂组:不做处理,正常细胞培养; 2% O₂组:将融合度为60%~70%的细胞置于三气培养箱中,在37℃下93% N₂、5% CO₂和2% O₂中进行低氧处理12 h结束后正常培养。

实验二设置20.9% O₂、2% O₂、2% O₂+si-NC、2% O₂+si-GRASP65组。20.9% O₂组:不做处理,正常细胞培养; 2% O₂组:将融合度为60%~70%的细胞置于三气培养箱中,在37℃下93% N₂、5% CO₂和

2% O₂ 中进行低氧处理 12 h, 结束后正常培养; 2% O₂+si-NC 及 2% O₂+si-GRASP65 组: 低氧处理细胞 12 h 后用 Lipo6000™ 转染试剂与小干扰 RNA 混合加入细胞转染培养。

实验三设置 20.9% O₂、2% O₂、2% O₂+RvE1、2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC、2% O₂+RvE1+OE-GRASP65 组。20.9% O₂ 组: 不做处理, 正常细胞培养; 2% O₂ 组: 将融合度为 60%~70% 的细胞置于三气培养箱中, 在 37 °C 下 93% N₂、5% CO₂ 和 2% O₂ 中进行低氧处理 12 h, 结束后正常培养; 2% O₂+RvE1 组: 低氧处理细胞 12 h 后加入 RvE1 至终浓度 10 mol·L⁻¹[15]; 2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC 及 2% O₂+RvE1+OE-GRASP65 组: 低氧处理细胞 12 h 后加入 RvE1 至终浓度 10 mol·L⁻¹, 用 Lipo6000™ 转染试剂与质粒混合加入细胞转染共同培养。

2.2 CCK-8检测HUVECs活力

在 96 孔板中接种细胞悬液(每孔 100 μL)使每孔细胞数为 5 000 个, 贴壁后进行“2.1”项中 3 个实验, 操作结束后分别继续培养 24、48、72 h, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 在培养箱继续培养 4 h, 酶标仪检测 450 nm 处吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 流式细胞术检测HUVECs ROS变化

细胞调整浓度为 1×10⁶·mL⁻¹, 接种于 6 孔板, 培养 24 h。进行“2.1”项中 3 个实验, 操作结束后分别继续培养 24 h, 加入终浓度为 10 μmol·L⁻¹ DCFH-DA, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱静置 0.5 h, 混匀, 使探针和细胞充分作用。温磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞, 去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 胰酶消化后收集细胞。上机检测 ROS 水平, 激发光 488 nm, 发射光 525 nm。

2.4 透射电子显微镜观察HUVECs高尔基体形态变化

细胞接种及处理操作同“2.3”项, 离心收集细胞沉淀, 固定后用琼脂预包埋, 用磷酸缓冲液(PB, pH 值 7.4)配制 1% 锇酸避光室温固定 2 h 后漂洗脱水, 丙酮-812 包埋剂(1:1)将细胞于 37 °C 包埋 24 h。丙酮-812 包埋剂(1:2)比例再次渗透过夜, 用纯 812 包埋剂覆盖样品 6 h。将纯 812 包埋剂倒入包埋板, 样品插入包埋板后 37 °C 烤箱过夜再放于 60 °C 烤箱聚合 48 h, 切片后铜网捞片, 于 2% 醋酸铀饱和酒精溶液避光染色 8 min; 清洗 3 次, 2.6% 枸橼酸铅溶液染色 8 min; 清洗 3 次。铜网切片放入铜网盒内室温干燥过夜, 透射电子显微镜下观察, 采集图像。

2.5 ELISA法检测细胞上清ET-1、PGI-2和RvE1水平

在 96 孔板中接种细胞悬液(每孔 100 μL)使每孔细胞数为 5 000 个, 贴壁后进行“2.1”项中 3 个实验, 孵育 1 h 后 800 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集细胞上清液, 按试剂盒说明书操作, 计算 ET-1、PGI-2 和 RvE1 水平。

2.6 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测HUVECs mRNA水平

细胞接种及处理操作同“2.3”项, 收集细胞, TRIzol 法提总 RNA, 逆转录试剂盒逆转录得 cDNA。PCR 反应体系(20 μL)包括 1.0 μL cDNA 模板、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、10.0 μL Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (No Rox)、无酶水补足至 20 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 1 min; 变性: 95 °C, 5 s; 退火: 60 °C, 30 s; 延伸: 72 °C, 30 s, 共 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法进行数据分析。引物信息见表 1。

表 1 PCR引物
Table 1 Primer sequences

NCBI参考序列	基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物长度/nt
NM_000603.5	eNOS	GAGTATGACGTGGTGTCCCT	CCGAGGGGAGCTGTTGTAG	144
NM_001278789.2	GRASP65	AGTGGCAACTCCTGTTAGCT	GAACCGTGCGTGGATAGACC	164
NM_001101.5	β-actin	ACTGGAACGGTGAAGGTGAC	GGACTTCCTGTAACAACGCAT	138

2.7 Western blotting检测HUVECs蛋白表达水平

细胞接种及处理操作同“2.3”项, 收集细胞, 加 RIPA 冰浴裂解后提总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 将其余蛋白样本 100 °C 变性 10 min 置于 -20 °C 保存待用。准备聚丙烯酰胺凝胶(10% 的分离胶、5% 的浓缩胶), 混合 loading buffer 和蛋白样本, 上样后进

行 SDS-PAGE 电泳(110 V 跑胶 70 min), 使用 300 mA 恒定电流湿转 PVDF 膜 40 min。脱脂奶粉用 TBST 配制成 8% 的封闭液, 洗膜后加入封闭液摇床封闭 2 h。加一抗(eNOS 稀释比: 1:2 000, p-GRASP65 稀释比: 1:1 000, GRASP65 稀释比: 1:2 000, β-actin 稀释比: 1:50 000), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每

次15 min。加HRP标记二抗(稀释比:1:8 000),常温孵育1 h。洗膜后加ECL化学发光液显色,充分反应5 min,吸去多余ECL溶液。用Image J软件分析得到的蛋白条带的灰度值,计算eNOS、p-GRASP65、GRASP65蛋白表达。

2.8 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行数据统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2组计量资料的均数比较,符合正态分布且方差齐性,采用 t 检验。多组均数比较,符合正态分布且方差齐性,采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 低氧对HUVEC活力、RvE1表达及氧化应激反应、高尔基体变化的影响

3.1.1 低氧对HUVEC活力影响 与20.9% O₂组相比,培养48、72 h后2% O₂组细胞活力显著降低($P < 0.01$),表明低氧可抑制HUVEC细胞活力,见图1。

3.1.2 低氧对HUVEC血管活性因子及RvE1表达的影响 与20.9% O₂组相比,2% O₂组细胞上清PGI-2、RvE1水平以及细胞中eNOS mRNA和蛋白水平显著降低($P < 0.01$),ET-1水平显著升高($P < 0.01$),见表2及图2、3。

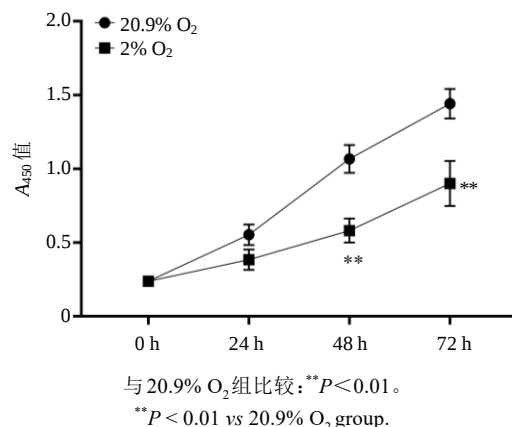


图1 低氧对HUVEC活力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of hypoxia on HUVEC activity ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表2 低氧对HUVECs培养上清ET-1、PGI-2、RvE1水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of hypoxia on levels of ET-1, PGI-2 and RvE1 in HUVECs culture supernatants ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ET-1/(pg·mL ⁻¹)	PGI-2/(ng·L ⁻¹)	RvE1/(pg·mL ⁻¹)
20.9% O ₂	10.21±1.26	22.39±1.77	858.54±29.28
2% O ₂	31.30±1.62**	9.78±0.50**	292.88±29.62**

与20.9% O₂组比较:** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group.

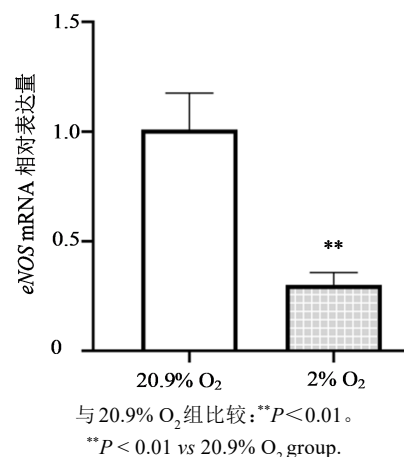


图2 低氧对HUVEC eNOS mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of hypoxia on expression of eNOS mRNA in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

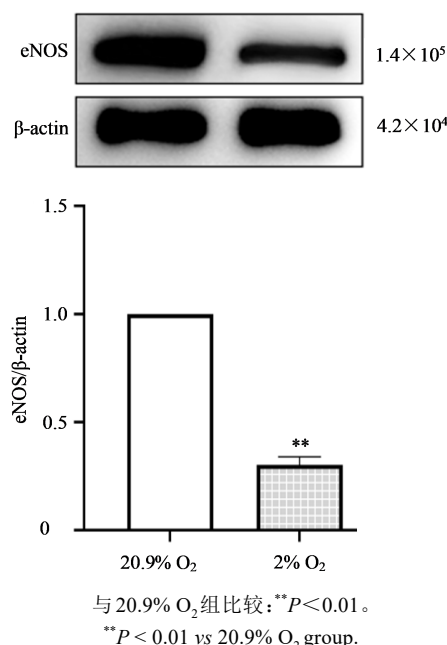
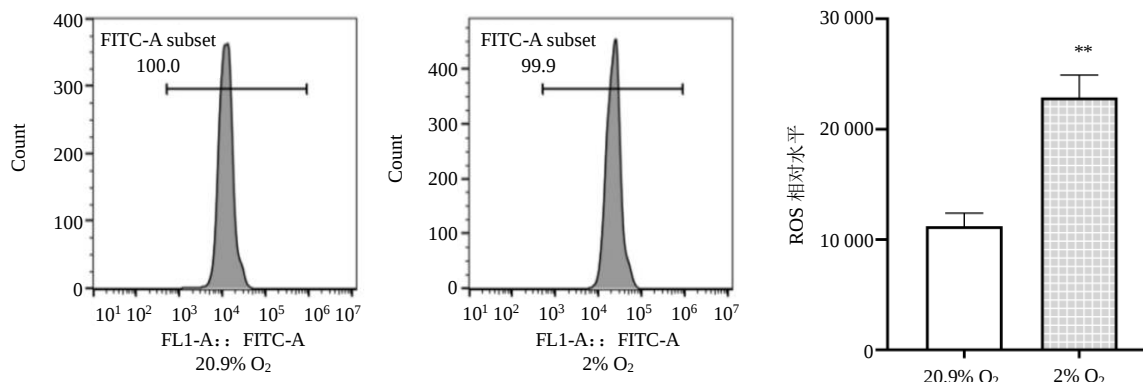


图3 低氧对HUVEC eNOS蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of hypoxia on expression of eNOS protein in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.1.3 低氧对HUVEC ROS水平的影响 与20.9% O₂组相比,2% O₂组细胞ROS水平显著上调($P < 0.01$),表明低氧促进HUVEC细胞氧化应激,见图4。

3.1.4 低氧对HUVEC高尔基体应激的影响 与20.9% O₂组相比,2% O₂组GRASP65 mRNA水平及GRASP65、p-GRASP65蛋白表达、p-GRASP65/GRASP65值显著升高($P < 0.05, 0.01$),见图5、6。采用透射电镜观察高尔基体形态,结果显示20.9% O₂组细胞形态完好,高尔基体结构清晰;2% O₂组细胞高尔基体数量减少,部分高尔基体发生重构和

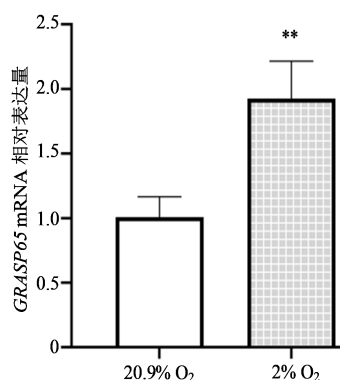


与 20.9% O₂ 组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group.

图4 低氧对HUVEC ROS水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effects of hypoxia on ROS levels in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与 20.9% O₂ 组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group.

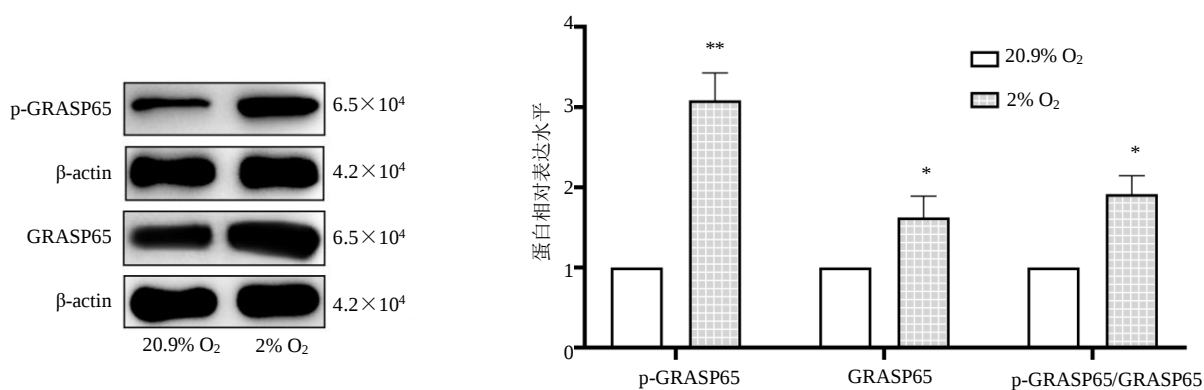
图5 低氧对HUVEC GRASP65 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effects of hypoxia on GRASP65 mRNA expression in HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分裂,表明低氧诱导血管内皮细胞发生高尔基体应激,见图7。

3.2 高尔基体应激对HUVEC活力、高尔基体形态及氧化应激反应的影响

3.2.1 敲低 GRASP65 基因对高尔基体应激的影响 与 20.9% O₂ 组相比,2% O₂ 组 GRASP65 mRNA 及蛋白水平显著升高($P < 0.01$);与 2% O₂、2% O₂ + si-NC 组比较,2% O₂ + si-GRASP65 组 GRASP65 的 mRNA 和蛋白表达显著降低($P < 0.01$),表明敲低 GRASP65 细胞造模成功,结果见图8、9。电镜观察高尔基体形态:与 20.9% O₂ 组相比,2% O₂ + si-NC 组高尔基体层囊结构破坏,发生皱缩变形,高尔基体数量明显减少;2% O₂ + si-GRASP65 组较 2% O₂ +



与 20.9% O₂ 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

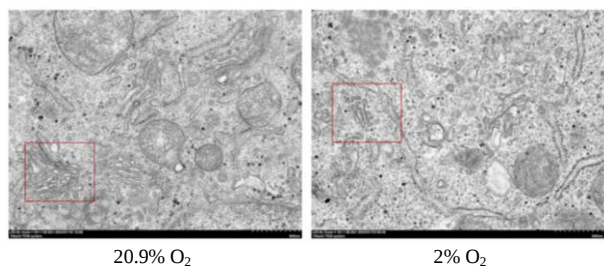
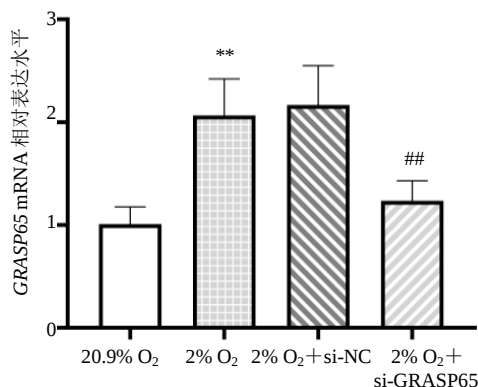
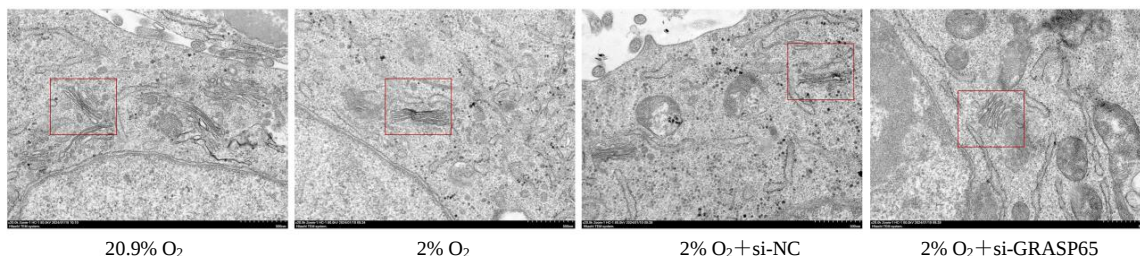
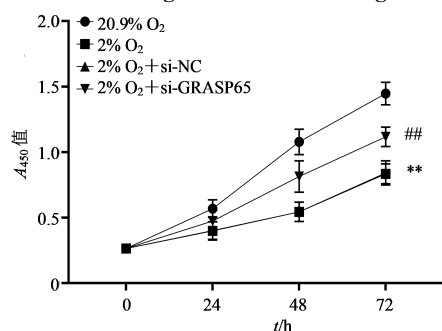
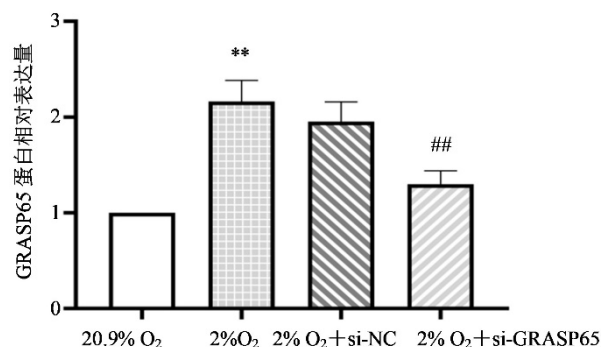
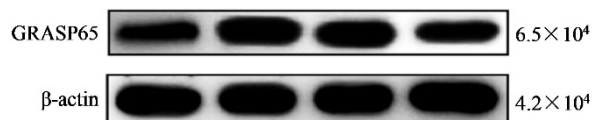
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group.

图6 低氧对HUVEC p-GRASP65、GRASP65蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effects of hypoxia on expression of p-GRASP65 and GRASP65 protein in HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

si-NC 组高尔基体破坏程度改善,高尔基体结构较完整。表明敲低 GRASP65 可改善高尔基体应激反应,见图10。

3.2.2 高尔基体应激对HUVEC活力的影响 与 20.9% O₂ 组相比,2% O₂ 组 HUVEC 活力显著降低;与 2% O₂ 组相比,2% O₂ + si-NC 组细胞活力无显著

图7 低氧对HUVEC高尔基体形态的影响($\times 20\ 000$)Fig. 7 Effect of hypoxia on morphology of HUVEC Golgi apparatus ($\times 20\ 000$)与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$ 。** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group.图8 si-GRASP65对低氧HUVEC *GRASP65* mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 8 Effect of si-GRASP65 on *GRASP65* mRNA expression in hypoxic HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)图10 高尔基体应激对低氧HUVEC高尔基体形态的影响($\times 20\ 000$)Fig. 10 Effects of Golgi stress on Golgi morphology in hypoxic HUVEC ($\times 20\ 000$)与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$ 。** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group.图11 高尔基体应激对低氧HUVEC活力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 11 Effects of Golgi stress on hypoxic HUVEC activity ($\bar{x} \pm s, n=3$)与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$ 。** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group.图9 si-GRASP65对低氧HUVEC GRASP65蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 9 Effect of si-GRASP65 on GRASP65 protein expression in hypoxic HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

变化, 2% O₂ + si-GRASP65 组细胞活力显著增强($P < 0.01$), 表明抑制高尔基体应激可上调血管内皮细胞活力, 见图11。

3.2.3 高尔基体应激对HUVEC血管活性因子的影响 与20.9% O₂组相比, 2% O₂组细胞上清ET-1含量显著上升($P < 0.01$), 上清PGI-2水平以及eNOS mRNA和蛋白水平显著下降($P < 0.01$); 与2% O₂组

比较, 2% O₂ + si-NC组各指标变化不显著, 2% O₂ + si-GRASP65组PGI-2含量及eNOS mRNA和蛋白水平显著上调($P < 0.05, 0.01$), ET-1水平显著下调($P < 0.01$)。结果见表3及图12、13。

3.2.4 高尔基体应激对HUVEC ROS水平的影响 与20.9% O₂组相比, 2% O₂组HUVEC ROS水平显著升高($P < 0.01$); 与2% O₂组相比, 2% O₂ + si-NC组ROS水平没有显著变化, 2% O₂ + si-GRASP65组ROS水平显著降低($P < 0.01$), 见图14。

3.3 RvE1对低氧HUVEC功能紊乱的影响及机制研究

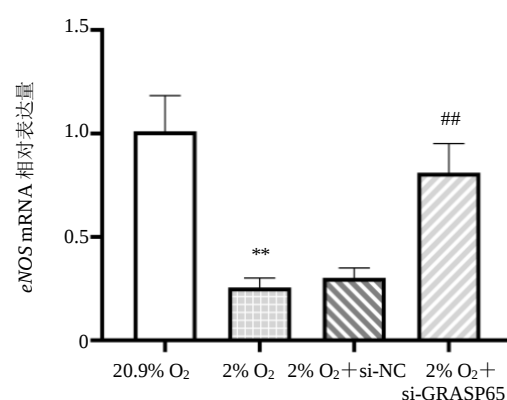
3.3.1 RvE1对低氧下HUVEC高尔基体应激的影响

表3 高尔基体应激对低氧HUVEC培养上清ET-1、PGI-2水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of Golgi stress on content of ET-1 and PGI-2 in hypoxic HUVEC culture supernatants ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ET-1/(pg·mL ⁻¹)	PGI-2/(ng·L ⁻¹)
20.9% O ₂	9.49±1.40	21.17±2.55
2% O ₂	32.89±1.55**	11.81±1.01**
2% O ₂ +si-NC	31.36±1.44	11.71±1.13
2% O ₂ +si-GRASP65	18.83±1.15##	16.37±1.05#

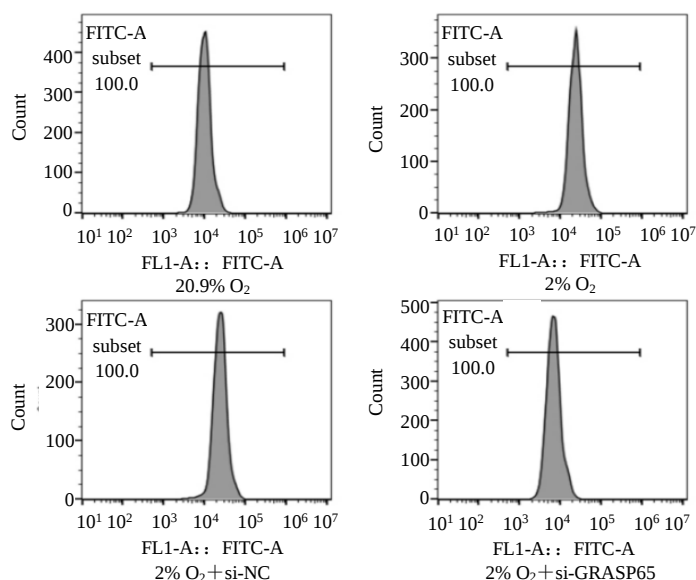
与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group.



与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group.

图12 高尔基体应激对低氧HUVEC eNOS mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

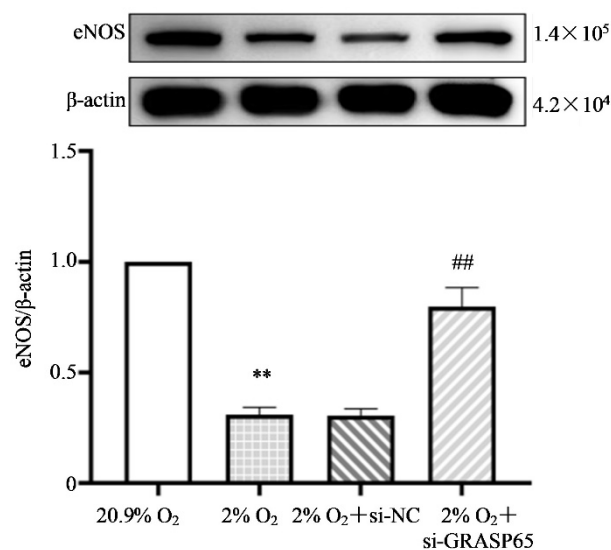
Fig. 12 Effects of Golgi stress on eNOS mRNA expression in hypoxic HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group.

图14 高尔基体应激对低氧HUVEC ROS水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 14 Effects of Golgi stress on ROS levels in hypoxic HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group.

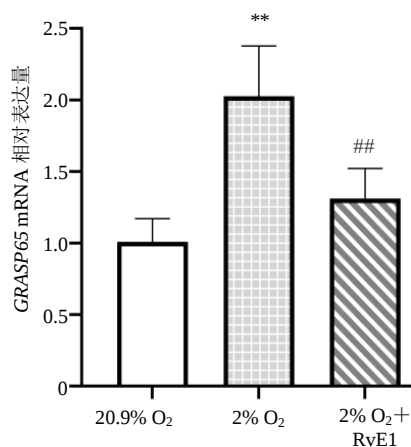
图13 高尔基体应激对低氧HUVEC eNOS蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 13 Effects of Golgi stress on eNOS protein expression in hypoxic HUVEC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

相较于2% O₂组, 2% O₂+RvE1组 GRASP65 mRNA水平及p-GRASP65、GRASP65蛋白表达及p-GRASP65/GRASP65值显著降低($P < 0.01$), 见图15、16。

电镜观察高尔基体形态: 2% O₂+RvE1组较2% O₂组高尔基体破坏程度改善, 有轻微分裂, 表明RvE1抑制低氧下高尔基体应激, 见图17。

3.3.2 RvE1对血管内皮细胞活力影响 相较于2% O₂组, 2% O₂+RvE1组细胞活力显著增强($P <$

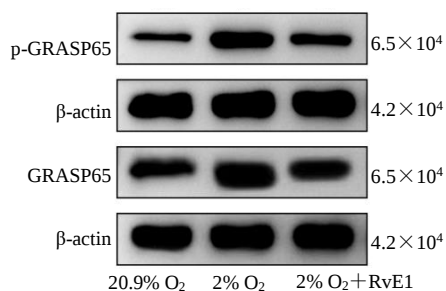


与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group.

图15 RvE1对低氧HUVEC GRASP65 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 15 GRASP65 mRNA expression in hypoxic HUVEC cells($\bar{x} \pm s, n=3$)



与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group.

图16 RvE1对低氧HUVEC p-GRASP65、GRASP65蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 16 Protein expression of p-GRASP65 and GRASP65 in hypoxic HUVEC cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

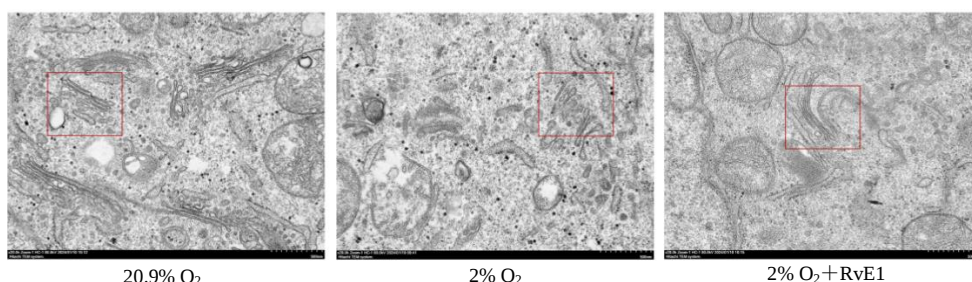
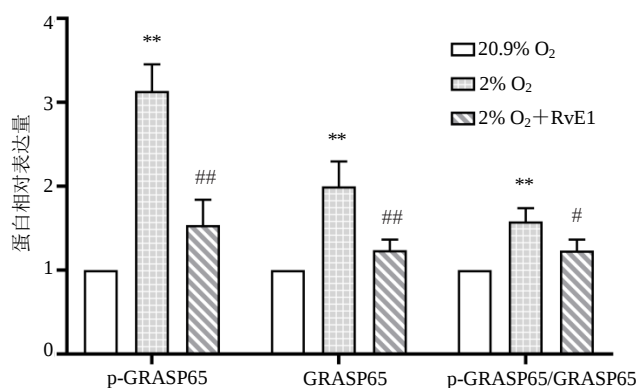


图17 RvE1对低氧HUVEC高尔基体形态的影响($\times 20\ 000$)

Fig. 17 Effect of RvE1 on morphology of hypoxic HUVEC Golgi apparatus($\times 20\ 000$)

高($P < 0.01$),表明RvE1可阻碍氧化应激发生;相较于2% O₂ + RvE1 + OE-GRASP65-NC组,2% O₂ + RvE1 + OE-GRASP65组ROS水平显著降低($P < 0.01$),表明RvE1通过抑制高尔基体应激致ROS水平降低,见图21。

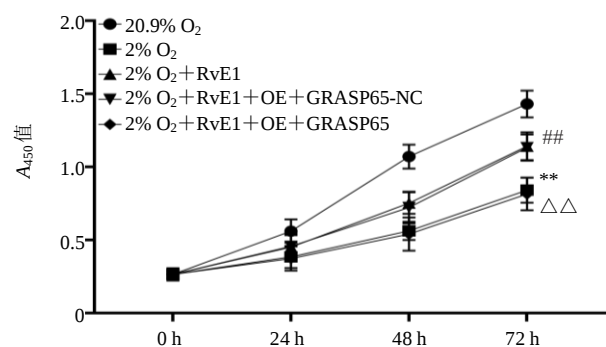
0.01),表明RvE1可抑制低氧下调血管内皮细胞活力;相较于2% O₂ + RvE1 + OE-GRASP65-NC组,2% O₂ + RvE1 + OE-GRASP65组细胞活力显著降低($P < 0.01$),表明RvE1上调细胞活力与抑制高尔基体应激有关,见图18。

3.3.3 RvE1对血管内皮细胞活性因子影响 相较于2% O₂组,2% O₂ + RvE1组PGI-2、eNOS含量显著升高($P < 0.01$),ET-1含量显著降低($P < 0.01$),表明RvE1可抑制低氧下血管内皮细胞活性因子失调;相较于2% O₂ + RvE1 + OE-GRASP65-NC组,2% O₂ + RvE1 + OE-GRASP65组PGI-2、eNOS含量显著降低($P < 0.01$),ET-1含量显著升高($P < 0.01$),表明RvE1可介导高尔基体应激改善低氧下血管内皮细胞功能紊乱,见表4,图19、20。

3.3.4 RvE1对血管内皮细胞ROS水平的影响 相较于2% O₂组,2% O₂ + RvE1组ROS水平显著升

4 讨论

机体长期缺氧可促血管内皮细胞功能紊乱,致血管内皮细胞损伤甚至血管重构,最终导致HPH^[16]。HPH在临床治疗困难,有高危残率与高病死率等特点,且现有药物治疗效果有限^[17-18],寻求特



与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$; 与2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$.
** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC group.

图18 RvE1对低氧HUVEC活力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 18 Effect of RvE1 on activity of hypoxic HUVEC($\bar{x} \pm s, n=3$)

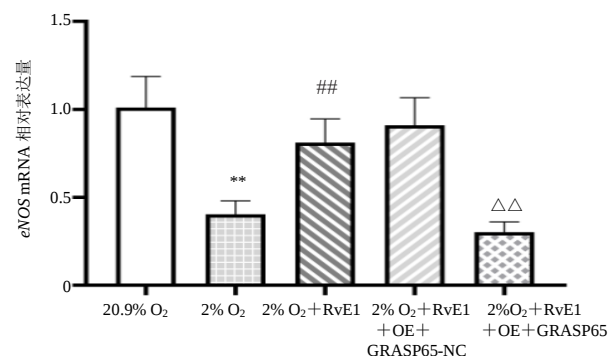
表4 RvE1对低氧HUVECs培养上清ET-1、PGI-2水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of RvE1 on levels of ET-1 and PGI-2 in hypoxic HUVECs culture supernatants ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ET-1/(pg·mL ⁻¹)	PGI-2/(ng·L ⁻¹)
20.9% O ₂	10.85±1.05	22.92±1.03
2% O ₂	33.03±1.21**	7.87±0.85**
2% O ₂ +RvE1	16.01±0.81##	16.59±0.99##
2% O ₂ +RvE1+OE-GRASP65-NC	14.51±1.12	17.70±1.53
2% O ₂ +RvE1+OE-GRASP65	25.69±0.72 $\Delta\Delta$	8.34±1.71 $\Delta\Delta$

与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$; 与2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$.

** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC group.

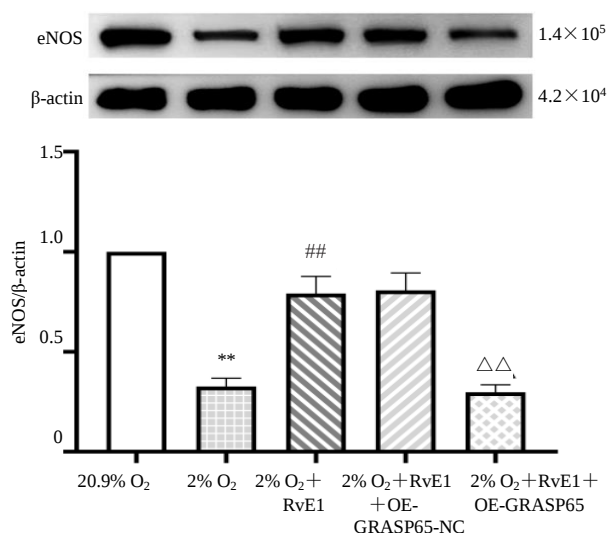


与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$; 与2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$.

** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC group.

图19 RvE1对低氧HUVEC eNOS mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 19 Effect of RvE1 on eNOS mRNA expression in hypoxic HUVEC($\bar{x} \pm s, n=3$)



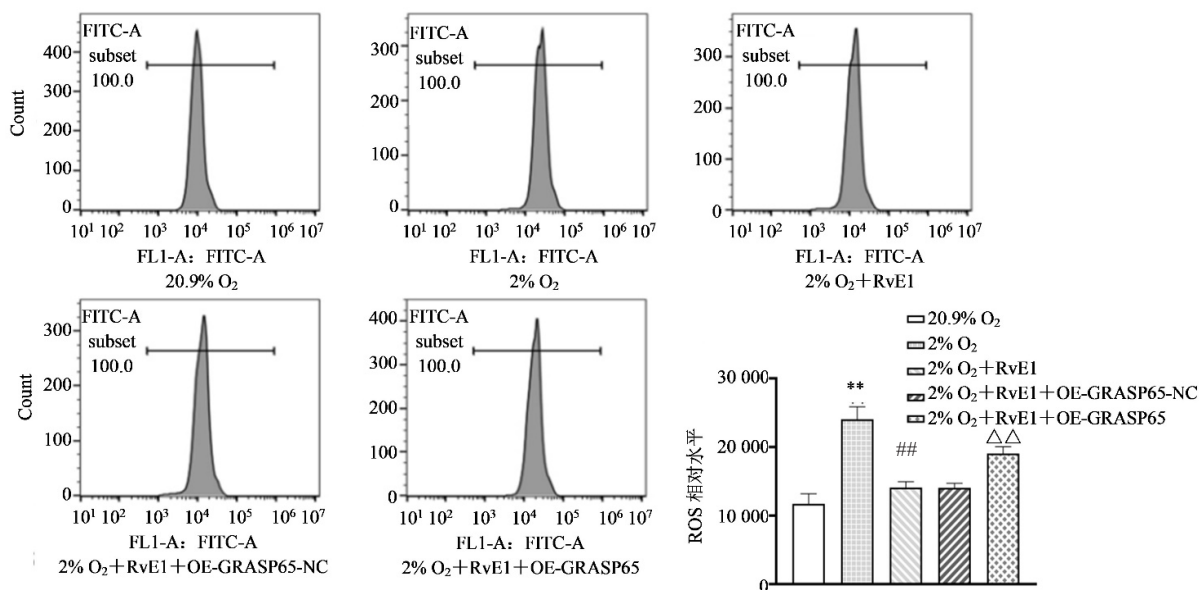
与20.9% O₂组比较: ** $P < 0.01$; 与2% O₂组比较: ## $P < 0.01$; 与2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$.

** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 2% O₂+RvE1+OE-GRASP65-NC group.

图20 RvE1对低氧HUVEC eNOS蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 20 Effect of RvE1 on expression of eNOS protein in hypoxic HUVEC($\bar{x} \pm s, n=3$)

异性针对性治疗方案显得尤为重要,当前研究热点主要集中于基因靶向治疗和细胞器应激疗法^[19],如线粒体参与缺氧性肺血管收缩和重塑,针对线粒体治疗HPH方式主要有线粒体移植、线粒体基因调节及分泌外切体^[20];内质网应激促内皮细胞向间质细胞转化,通过相关抑制剂阻碍内质网应激反应可改善血管收缩和重塑^[8]。高尔基体作为细胞物质代谢核心细胞器,在脑卒中、脊髓损伤及神经变性疾病等多种疾病发病机制中担任重要角色,GRASP65对维持高尔基体形态和功能具有重要作用,当GRASP65磷酸化时,高尔基体的层囊会去堆叠,进而导致高尔基体结构的重构与分裂^[21-22]。本研究发现低氧促GRASP65表达并促其磷酸化,且电镜观测到低氧下血管内皮细胞高尔基体发生断裂,这表明低氧促血管内皮细胞高尔基体应激。RvE1是真核细胞的一种内源性脂质分子,具有显著的抗炎、抗氧化损伤作用。低RvE1水平是诱发肺动脉高压的危险因素^[23],RvE1可减轻血管内皮细胞损伤、减轻急性肺损伤^[24]。在本研究中,低氧可促进缩血管因子ET-1上调和舒血管因子eNOS和PGI-2的表达下调、且促氧化应激发生,而RvE1可逆转这类现象,这表明RvE1可改善低氧下血管内皮细胞损伤。RvE1参与多条信号通路,其中MAPK通路^[25]以及ERK通路^[14]与高尔基体应激过程密切相关^[26],GRASP65在ERK的作用下可发生磷酸化,介导高



与 20.9% O₂ 组比较: ** $P < 0.01$; 与 2% O₂ 组比较: ## $P < 0.01$; 与 2% O₂ + RvE1 + OE-GRASP65-NC 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs 20.9% O₂ group; ## $P < 0.01$ vs 2% O₂ group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 2% O₂ + RvE1 + OE-GRASP65-NC group.

图 21 RvE1 对低氧 HUVEC ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 21 Effect of RvE1 on ROS levels in hypoxic HUVEC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

尔基体解聚、裂解^[10]。这些通路的相关性提示 RvE1 可能通过调控高尔基体应激影响内皮细胞损伤。本研究发现, RvE1 抑制 GRASP65 表达及其磷酸化, 并改善低氧下内皮细胞高尔基体的重构及分裂现象, 表明 RvE1 可抑制高尔基体应激反应。综上所述: 低氧可通过促进高尔基体应激影响细胞活性因子水平, 打破内皮功能稳态, 而 RvE1 是该过程的重要保护性因子。本研究主要证实 RvE1 介导高尔基体应激改善低氧对血管内皮细胞的损伤, 但其具体机制仍需进一步探究, 后期研究需要深入阐明及完善血管内皮损伤的分子机制, 为 HPH 等高血压疾病的防治提供新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄菲菲, 李耀浙, 张婷, 等. 红景天苷通过抑制氧化应激防治大鼠低氧性肺动脉高压 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(3): 500-506.
Huang F F, Li Y Z, Zhang T, et al. Protective effect of salidroside on rats with hypoxic pulmonary hypertension by suppressing oxidative stress [J]. Chin J Pathophysiol, 2018, 34(3): 500-506.
- [2] Bonnet S, Boucherat O. The ROS controversy in hypoxic pulmonary hypertension revisited [J]. Eur Respir J, 2018, 51(3): 1800276.
- [3] 周振, 汤锋, 格日力. 高原低氧环境下影响肺动脉压力的相关因素分析 [J]. 生理学报, 2023, 9(1): 130-136.
Zhou Z, Tang F, Ge R L. Factors affecting pulmonary

arterial pressure in response to high-altitude hypoxic stress [J]. Acta Physiol Sin, 2023, 9(1): 130-136.

- [4] 盖祥云, 赵恩麒, 何彦峰, 等. 改善肺动脉高压中肺血管重构治疗策略的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(11): 1612-1616.
Gai X Y, Zhao E Q, He Y F, et al. Research progress on therapeutic strategies for improving pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension [J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(11): 1612-1616.
- [5] 张嘉莹, 樊勇, 张卓莉. 肺动脉高压发病机制中的肺血管重塑 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2023, 17(1): 50-55.
Zhang J Y, Fan Y, Zhang Z L. Pulmonary vascular remodeling in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. Chin J Allergy Clin Immunol, 2023, 17(1): 50-55.
- [6] 赵恩麒, 盖祥云, 叶萍. 低氧性肺动脉高压中线粒体钙信号转导 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(11): 1503-1507.
Zhao E Q, Gai X Y, Ye P. Calcium signal transduction in mitochondria in hypoxic pulmonary hypertension [J]. Chin Pharmacol Bull, 2021, 37(11): 1503-1507.
- [7] 李宜桐, 李勇. 低氧性肺动脉高压肺血管重塑机制的研究 [J]. 医学信息, 2020, 33(15): 26-29.
Li Y T, Li Y. Research on mechanism of pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension [J]. J Med Inf, 2020, 33(15): 26-29.
- [8] 刘幸幸, 王威威, 袁好鑫. 内质网应激在低氧性肺动脉高压中作用的研究进展 [J]. 基础医学与临床, 2023, 43(5): 848-851.

- Liu X X, Wang W W, Yuan H X. Research progress of endoplasmic reticulum stress of hypoxic pulmonary hypertension [J]. Basic Clin Med, 2023, 43(5): 848-851.
- [9] Liu S Z, Xu J H, Ma Q J, et al. A naphthalimide-based and Golgi-targetable fluorescence probe for quantifying hypochlorous acid [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2023, 286: 121986.
- [10] 朱蓓蕾. ERK 通路介导的高尔基体应激在脑缺血再灌注损伤中的作用及机制 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- Zhu B L. Role and mechanism of Golgi stress mediated by ERK pathway in cerebral ischemia-reperfusion injury [D]. Suzhou: Soochow University, 2018.
- [11] Guo M Z, Zhang M Z, Cao X P, et al. Notch4 mediates vascular remodeling via ERK/JNK/P38 MAPK signaling pathways in hypoxic pulmonary hypertension [J]. Respir Res, 2022, 23(1): 6.
- [12] Cao X P, Fang X Y, Guo M Z, et al. TRB3 mediates vascular remodeling by activating the MAPK signaling pathway in hypoxic pulmonary hypertension [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 312.
- [13] 朱玉娟, 许灿. 消退素与炎症的研究进展 [J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(2): 240-243.
- Zhu Y J, Xu C. Research progress of regression element and inflammation [J]. J Hebei Med Univ, 2018, 39(2): 240-243.
- [14] Storniollo C E, Pequera M, Vilariño A, et al. Specialized pro-resolvin mediators induce cell growth and improve wound repair in intestinal epithelial Caco-2 cell cultures [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2022, 187: 102520.
- [15] 陈亚锋, 江洪, 龚霞, 等. 消退素 E1 对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(11): 1039-1043.
- Chen Y F, Jiang H, Gong X, et al. Resolvin E1 protects against ox-LDL-induced injury on vascular endothelial cells [J]. Chin J Cardiol, 2011, 39(11): 1039-1043.
- [16] 张思岳, 张惠雯, 夏青, 等. 缺氧损伤模型及抗缺氧药物筛选研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(9): 2037-2045.
- Zhang S Y, Zhang H W, Xia Q, et al. Research progress of hypoxic injury model and anti-hypoxic drug screening [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(9): 2037-2045.
- [17] 王建美, 袁天翊, 高丽, 等. 低氧性肺动脉高压病理机制与治疗药物研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(9): 1281-1288.
- Wang J M, Yuan T Y, Gao L, et al. Research progress on mechanisms and therapeutic drugs of hypoxic pulmonary hypertension [J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(9): 1281-1288.
- [18] 徐康乔, 夏世金. 低氧性肺动脉高压发生机制与诊治新策略 [J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2020, 6(2): 127-133.
- Xu K Q, Xia S J. Mechanism and new strategies for diagnosis and treatment of hypoxic pulmonary hypertension [J]. Chin J Lung Dis Electron Ed, 2020, 6(2): 127-133.
- [19] 滕慧芳, 秦仕虹, 符代炎. 肺动脉内皮细胞炎症反应在低氧性肺动脉高压中的作用研究进展 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2023, 31(7): 33-39, 43.
- Teng H F, Qin S H, Fu D Y. Research progress on the role of inflammatory response of pulmonary artery endothelial cells in hypoxic pulmonary hypertension [J]. Pract J Card Cereb Pneu Vasc Dis, 2023, 31(7): 33-39, 43.
- [20] 钟士杰, 邓堂, 林开文, 等. 缺氧性肺动脉高压的治疗进展 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(18): 3596-3600.
- Zhong S J, Deng T, Lin K W, et al. Progress in treatment of hypoxic pulmonary hypertension [J]. Prog Mod Biomed, 2021, 21(18): 3596-3600.
- [21] Zhang Y J, Seemann J. Rapid degradation of GRASP55 and GRASP65 reveals their immediate impact on the Golgi structure [J]. J Cell Biol, 2021, 220(1): e202007052.
- [22] Zhang X Y, Wang Y Z. Nonredundant roles of GRASP55 and GRASP65 in the Golgi apparatus and beyond [J]. Trends Biochem Sci, 2020, 45(12): 1065-1079.
- [23] Yücel H, Özdemir A T. Low LXA4, RvD1 and RvE1 levels may be an indicator of the development of hypertension [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2021, 174: 102365.
- [24] 底洪辰, 谭素, 陈子豪, 等. 消退素 D1 对急性肺损伤影响的研究进展 [J]. 中国当代医药, 2023, 30(4): 25-29.
- Di H C, Tan S, Chen Z H, et al. Research progress on the effect of resolving D1 on acute lung injury [J]. China Mod Med, 2023, 30(4): 25-29.
- [25] Zhang J S, Wang M L, Ye J, et al. The anti-inflammatory mediator resolvin E1 protects mice against lipopolysaccharide-induced heart injury [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 203.
- [26] 杨剑文, 胡治平. 高尔基体应激信号传导通路研究进展 [J]. 激光生物学报, 2016, 25(2): 112-116.
- Yang J W, Hu Z P. Research progress of signal transduction pathway in Golgi stress [J]. Acta Laser Biol Sin, 2016, 25(2): 112-116.