

委陵菜酸、蔷薇酸对缺氧诱导内皮细胞损伤的保护作用及机制

张 晶¹, 苏 畅², 郭 卿³, 吕 琪⁴, 李灵芝^{5*}, 张 磊^{1*}

1. 武警特色医学中心 药剂科, 天津 300162

2. 空军军医大学唐都医院 药剂科, 陕西 西安 710038

3. 武警特色医学中心 心血管病科, 天津 300162

4. 天津大学应急医学研究院, 天津 300072

5. 武警后勤学院卫生勤务系 军事药学教研室, 天津 300309

摘 要: 目的 研究委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的内皮细胞损伤的保护作用, 并探究其抗凋亡的机制。方法 将人脐静脉内皮细胞(EA.hy926)置于 37 ℃、95% N₂、5% CO₂ 的培养箱培养 2 h, 建立缺氧损伤模型。给予委陵菜酸和蔷薇酸干预后, 采用 MTT 法检测细胞增殖活力; 检测细胞上清液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性; 检测细胞内丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活力; 采用台盼蓝染色观察细胞存活率; 采用 Hoechst/PI 双染观察细胞形态学变化; 采用流式细胞术检测细胞凋亡率; 采用 Western blotting 检测凋亡相关蛋白[B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、细胞色素 C(cytochrome-C, Cyt-C)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(cystein-aspartate protease-9, Caspase-9)、cleaved Caspase-3、pro-Caspase-3]及蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)通路相关蛋白(Akt、p-Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路相关蛋白[胞外信号调节激酶 1/2(extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)、p-ERK1/2、p38、p-p38、Janus 激酶(Janus kinase, JNK)、p-JNK]的表达。结果 与模型组比较, 委陵菜酸和蔷薇酸显著提高缺氧诱导的细胞活力($P<0.05$ 、 0.01), 降低 LDH 释放量及 MDA 水平($P<0.05$ 、 0.01), 升高 SOD、CAT 活性及 GSH 水平($P<0.05$ 、 0.01), 减少台盼蓝染色蓝染细胞数($P<0.05$), 减少细胞膜破裂及 Hoechst/PI 双染红染的细胞数, 降低细胞凋亡率($P<0.05$)。Western blotting 结果显示, 委陵菜酸和蔷薇酸显著上调 Bcl-2、pro-Caspase-3 表达($P<0.01$), 下调 Bax、Cyt-C、cleaved-Caspase-3、Caspase-9、p-p38、p-JNK 表达($P<0.01$); 委陵菜酸显著上调 p-ERK1/2 表达($P<0.01$), 蔷薇酸对 p-ERK1/2 表达无明显影响。结论 委陵菜酸和蔷薇酸可显著改善缺氧诱导的血管内皮细胞缺氧损伤, 抑制细胞凋亡。其抗凋亡机制均涉及线粒体凋亡信号途径, 委陵菜酸的抗凋亡机制可能与调控 ERK1/2、p38、JNK 信号通路有关, 蔷薇酸的抗凋亡机制可能与调控 p38、JNK 信号通路有关。

关键词: 委陵菜酸; 蔷薇酸; 内皮细胞; 抗缺氧; 细胞凋亡; 丝裂原活化蛋白激酶信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2025)17 - 6264 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.17.016

Protective effect and mechanism of tormentic acid and euscaphic acid on hypoxia-induced endothelial cell injury

ZHANG Jing¹, SU Chang², GUO Qing³, LYU Qi⁴, LI Lingzhi⁵, ZHANG Lei¹

1. Department of Pharmacy, Characteristic Medical Center of the Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

2. Department of Pharmacy, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, China

3. Department of Cardiovascular Diseases, Characteristic Medical Center of the Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

4. Institute of Disaster and Emergency Medicine, Tianjin University, Tianjin 300072, China

5. Military Pharmacy Teaching and Research Office, Department of Health Service Science, Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

收稿日期: 2025-04-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073152); 天津市自然科学基金资助项目(20JCQNJC01260)

作者简介: 张 晶(1985—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为药理学、临床药学。E-mail: 15122198211@163.com

*通信作者: 李灵芝, 女, 博士, 教授, 主要从事缺血缺氧损伤及防治研究。E-mail: 13682196000@163.com

张 磊, 男, 硕士, 主任药师, 主要从事药理学、制剂学研究。E-mail: 13821329588@163.com

Abstract: Objective To study the protective effects of tormentic acid (TA) and euscaphic acid (EA) on hypoxia-induced endothelial cell damage, and explore the mechanism of anti-apoptosis. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (EA.hy926) were cultured in 37 °C, 95% N₂ and 5% CO₂ incubator for 2 h to establish an hypoxia injury model. After intervention with TA and EA, the cell proliferation activity was detected by MTT assay; The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the cell supernatant was detected; The levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) in cells were detected; Trypan blue staining was used to observe cell survival rate; Cellular morphological changes were observed by Hoechst/PI double staining; Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate; Western blotting was used to detect the expressions of apoptosis related proteins [B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cytochrome C (Cyt-C), cysteine aspartate protease-9 (Caspase-9), cleaved Caspase-3, pro-Caspase-3], as well as protein kinase B (Akt) pathway related proteins (Akt, p-Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway related proteins [extracellular regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2), p-ERK1/2, p38, p-p38, Janus kinase (JNK) and p-JNK]. **Results** Compared with model group, TA and EA significantly increased hypoxia induced cell viability ($P < 0.05, 0.01$), reduced LDH release and MDA level ($P < 0.05, 0.01$), increased activities of SOD, CAT and GSH level ($P < 0.05, 0.01$), reduced the number of cells stained with trypan blue ($P < 0.05$), decreased cell membrane rupture and the number of cells with Hoechst/PI double staining, and reduced cell apoptosis rate ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that TA and EA significantly up-regulated the expressions of Bcl-2 and pro-Caspase-3 ($P < 0.01$), down-regulated the expressions of Bax, Cyt-C, cleaved-Caspase-3, Caspase-9, p-p38 and p-JNK ($P < 0.01$); TA significantly up-regulated p-ERK1/2 expression ($P < 0.01$), while EA had no significant effect on p-ERK1/2 expression. **Conclusion** TA and EA could significantly improve hypoxia injury of vascular endothelial cells and inhibit cell apoptosis. The anti-apoptotic mechanism is involved the mitochondrial apoptosis signaling pathway. The anti-apoptotic mechanism of TA may be related to the regulation of ERK1/2, p38 and JNK signaling pathways, while the anti-apoptotic mechanism of EA may be related to the regulation of p38 and JNK signaling pathways.

Key words: tormentic acid; euscaphic acid; endothelial cells; anti-hypoxia; apoptosis; mitogen-activated protein kinase signaling pathway

缺氧会引起机体功能、代谢、形态等多方面损伤,是引发诸多疾病的关键因素。蕨麻 *Potentilla anserine* L.又名人参果,是生长在青藏高原地区的药食同源性天然植物,具有提高免疫力、抗氧化、抗缺氧等广泛的生物活性和药理作用。课题组前期研究发现,蕨麻的正丁醇部位对多种缺氧损伤模型具有保护作用^[1-2],并从中分离出 4 种三萜类单体化合物(野蔷薇苷、刺梨苷、委陵菜酸和蔷薇酸),其中委陵菜酸和蔷薇酸分别是野蔷薇苷和刺梨苷的苷元,二者互为差向异构体。本研究利用人脐静脉内皮细胞(EA.hy926)建立内皮细胞缺氧损伤模型,观察委陵菜酸和蔷薇酸对内皮细胞缺氧损伤的保护作用,并探讨其抗缺氧损伤机制,为后续蕨麻的开发研究提供参考依据。

1 材料

1.1 细胞

EA.hy926 细胞购自美国 ATCC 细胞库,用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,用于后续实验。

1.2 药品与试剂

委陵菜酸和蔷薇酸由本实验室提取制备,质量分数>98%;盐酸维拉帕米(批号 X19990002,质

量分数>99%)购自天津市药品检验所;MTT 试剂盒(批号 M1020)、BCA 试剂盒(批号 PC0020)购自北京索莱宝科技有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(批号 A020-2-2)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号 A003-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 A001-3)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(批号 A006-2)、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒(批号 A007)购自南京建成生物科技有限公司;β-actin 抗体(批号 ab179467)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(批号 ab194583)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(批号 ab32503)、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C) 抗体(批号 ab133504)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (cystein-aspartate protease-9, Caspase-9) 抗体(批号 ab202068)、cleaved Caspase-3 抗体(批号 ab32042)、pro-Caspase-3 抗体(批号 ab32150)、p38 抗体(批号 ab170099)、p-p38 抗体(批号 ab4822)、细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK1/2) 抗体(批号 ab184699)、p-ERK1/2 (批号 ab201015)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体(批号 ab8805)、p-Akt 抗体(批

号 ab81283)、Janus 激酶 (Janus kinase, JNK) 抗体 (批号 ab199380)、p-JNK 抗体 (批号 ab47337) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

Thermo 371 型 CO₂ 培养箱、Thermo 3111 型三气培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); U-RFLT50 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); Western blotting 电泳仪及转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); Tanon 5200 型凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); BD FACSCanto II 型高端流式细胞分析仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 MTT 检测细胞活力

取对数生长期的 EA.hy926 细胞, 以 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 过夜培养。设置对照组、模型组及委陵菜酸 (0.100、0.010、0.001 nmol/L) 组以及蔷薇酸 (0.100、0.010、0.001 nmol/L) 组和阳性对照药维拉帕米 (0.01 nmol/L) 组 (剂量设置参考前期研究^[3])。对照组细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h, 其余各组更换为 D-Hank's 缓冲液, 并加入相应药物, 置于 37 °C、95% N₂、5% CO₂ 培养箱中缺氧培养 2 h。各孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 孵育 4 h。弃去上清液, 每孔加入二甲苯亚砷 150 μ L 充分溶解甲瓏结晶, 采用酶标仪测定各孔 490 nm 处的吸光度 (*A*) 值。

2.2 细胞培养液中 LDH 活力的检测

取对数生长期的 EA.hy926 细胞, 以 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔板中, 过夜培养。按“2.1”项下进行分组及给药后, 各孔吸取细胞培养液 20 μ L, 按试剂盒说明书测定 LDH 活力。

2.3 细胞内 MDA、GSH 水平及 SOD、CAT 活力的测定

取对数生长期的 EA.hy926 细胞, 以 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔板中, 过夜培养。按“2.1”项下进行分组及给药后, 收集细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 0.01 mol/L PBS 500 μ L 制成细胞悬液, 采用超声破碎仪破碎细胞, 5 s/次, 每次间隔 10 s, 共 20 次。按试剂盒说明书测定 MDA、GSH 水平和 SOD、CAT 活力。

2.4 台盼蓝染色检测细胞存活率

取对数生长期的 EA.hy926 细胞, 以 5×10^4 个/mL 接种于 24 孔板中, 过夜培养。设置对照组、模型组、委陵菜酸 (0.1 nmol/L) 组和蔷薇酸 (0.1 nmol/L)

组。按“2.1”项下进行给药后, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞, 加入 0.4% 台盼蓝染液染色 5 min, 用 0.01 mol/L PBS 冲洗细胞 2 次, 于显微镜下观察并拍照, 计算细胞存活率。

2.5 Hoechst/PI 双染观察细胞形态变化

按“2.4”项下方法进行分组和给药, 0.01 mol/L PBS 洗涤后, 每孔加入 500 μ L PBS、5 μ L Hoechst 染液、5 μ L PI 染液, 4 °C 避光染色 15 min, PBS 清洗细胞 2 次, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

按“2.4”项下方法进行分组和给药, 胰酶消化后, 收集细胞至 EP 管中, 1 000 r/min 离心 10 min; 弃去上清液, PBS 冲洗后离心, 加入 binding buffer, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。吸取 500 μ L 细胞悬液, 依次加入 2.5 μ L Annexin V 和 5 μ L PI, 避光孵育 15 min, 经 300 目筛网滤过制备单细胞悬液, 上机检测, 使用 FlowJo 7.6 软件分析结果。

2.7 Western blotting 检测凋亡、Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路相关蛋白的表达

按“2.4”项下方法进行分组和给药, 收集细胞, 用 PBS 清洗后, 加入裂解液于冰上裂解, 离心收集上清液, 采用 BCA 法测定蛋白含量。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 室温封闭 1 h; 加入相应一抗, 37 °C 孵育 1 h 后, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤后, 加入二抗, 37 °C 孵育 1 h。加入 ECL 化学发光试剂显影, 采用 Tanon Gis 软件分析条带灰度值。

2.8 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 Graphpad 制作图表, 数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞增殖和氧化应激水平的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组细胞活力、GSH 水平及 SOD、CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$), LDH 释放量和 MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 委陵菜酸各剂量组和蔷薇酸各剂量组细胞活力及 SOD、CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), LDH 释放量显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 委陵菜酸各剂量组和蔷薇酸 (0.1、0.01 nmol/L) 组细胞 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$), 委陵菜酸 (0.1

表 1 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞增殖和氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of tormentic acid and euscaphic acid on proliferation and oxidative stress level of hypoxia-induced EA.hy926 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (nmol·L ⁻¹)	A 值	LDH/(U·L ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	GSH/(mg·L ⁻¹)
对照	—	0.361 3±0.015 6	40.62±1.67	60.48±3.46	24.93±0.63	1.410±0.128	65.43±7.68
模型	—	0.170 2±0.008 0 [#]	89.24±3.64 [#]	16.77±2.33 [#]	13.40±0.48 [#]	3.718±0.462 [#]	17.61±2.51 [#]
委陵菜酸	0.100	0.256 8±0.018 2 ^{**}	71.57±5.05 [*]	29.78±2.63 ^{**}	17.93±0.73 ^{**}	1.282±0.449 ^{**}	42.78±4.81 ^{**}
	0.010	0.235 0±0.006 1 ^{**}	67.23±4.28 ^{**}	27.07±2.45 [*]	19.04±0.61 ^{**}	1.692±0.377 ^{**}	22.65±4.82
	0.001	0.241 8±0.021 0 [*]	75.23±4.18 [*]	29.66±4.29 [*]	17.19±0.54 ^{**}	1.385±0.288 ^{**}	25.16±2.25
蔷薇酸	0.100	0.236 3±0.019 9 ^{**}	62.69±4.21 ^{**}	34.03±3.05 ^{**}	17.39±0.69 ^{**}	1.410±0.236 ^{**}	36.91±3.36 ^{**}
	0.010	0.231 8±0.008 9 ^{**}	67.20±3.69 ^{**}	30.47±3.07 ^{**}	17.40±0.48 ^{**}	1.667±0.309 ^{**}	55.36±4.31 ^{**}
	0.001	0.235 5±0.004 3 ^{**}	73.97±3.73 [*]	25.47±2.48 [*]	15.81±0.76 [*]	2.692±0.329	34.22±5.13 ^{**}
维拉帕米	0.010	0.276 1±0.008 3 ^{**}	63.59±6.22 ^{**}	30.80±2.54 ^{**}	18.23±0.93 ^{**}	1.538±0.344 ^{**}	46.97±7.20 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

nmol/L) 组和蔷薇酸各剂量组 GSH 水平显著升高 ($P < 0.01$)。故选择 0.1 nmol/L 委陵菜酸和蔷薇酸进行后续实验。

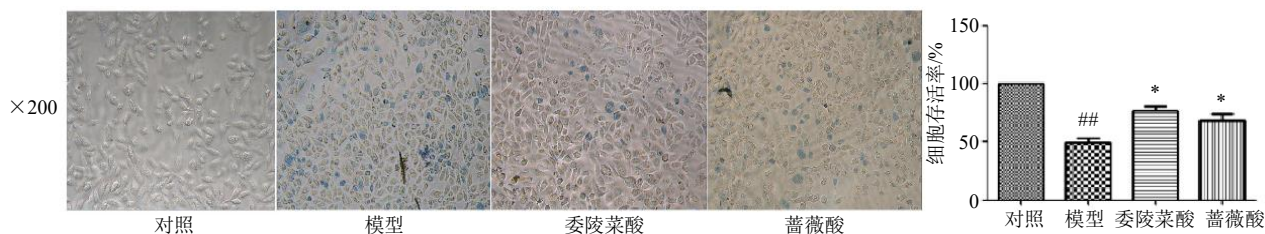
3.2 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞存活率的影响

如图 1 所示, 对照组几乎无蓝染细胞, 细胞生长状态良好, 呈规则梭形, 细胞核完整; 模型组蓝染细胞数量增多, 细胞间隙大、形态差, 部分细胞核皱缩呈深蓝色, 部分细胞核肿胀呈淡蓝色, 部分细胞坏死脱落并呈深蓝色, 细胞存活率显著降低 ($P <$

0.01); 与模型组比较, 委陵菜酸组和蔷薇酸组蓝染细胞数量减少, 细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$)。

3.3 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞形态的影响

如图 2 所示, 对照组细胞生长状态良好, 细胞间隙小, 细胞及细胞核形态完整, 细胞核呈蓝染, 无红染细胞。模型组大量细胞破裂, 红染细胞数增加。与模型组比较, 委陵菜酸组和蔷薇酸组细胞破裂的数量明显减少, 细胞间隙变小, 且细胞核被红染的数量明显减少。



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下图同。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of tormentic acid and euscaphic acid on survival rate of hypoxia-induced EA.hy926 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

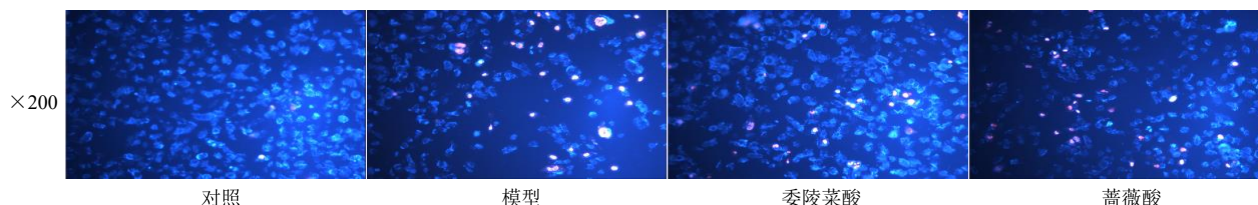


图 2 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞形态的影响 (×200)

Fig. 2 Effects of tormentic acid and euscaphic acid on morphology of hypoxia-induced EA.hy926 cells (× 200)

3.4 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞凋亡率的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组细胞凋亡率明显升高 ($P<0.01$);与模型组比较,委陵菜酸组和蔷薇酸组细胞凋亡率明显降低 ($P<0.05$)。

3.5 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞凋亡、Akt 和 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

3.5.1 委陵菜酸、蔷薇酸对 Bcl-2、Bax、Cyt-C 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), Bax、Cyt-C 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), Bcl-2/Bax

值明显下降 ($P<0.01$);与模型组比较,委陵菜酸组和蔷薇酸组 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$), Bax、Cyt-C 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), Bcl-2/Bax 值明显升高 ($P<0.01$)。

3.5.2 委陵菜酸、蔷薇酸对 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组 pro-Caspase-3 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), cleaved Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$);与模型组比较,委陵菜酸组和蔷薇酸组 pro-Caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), cleaved Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。

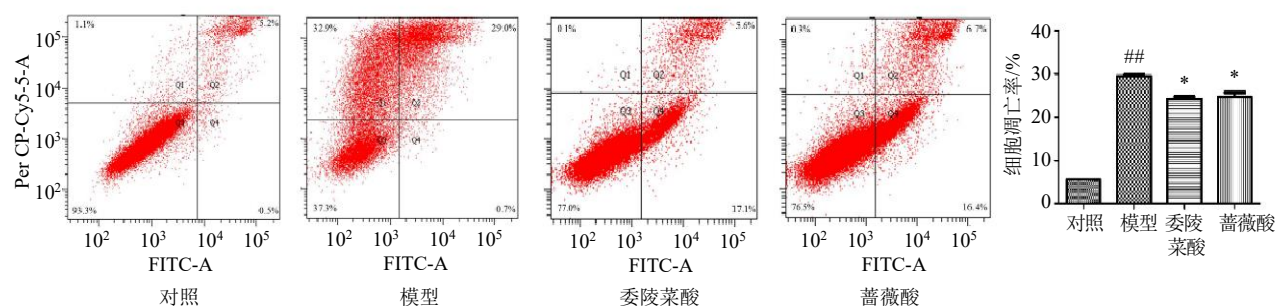


图 3 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of tormentic acid and euscaphic acid on apoptosis rate of hypoxia-induced EA.hy926 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

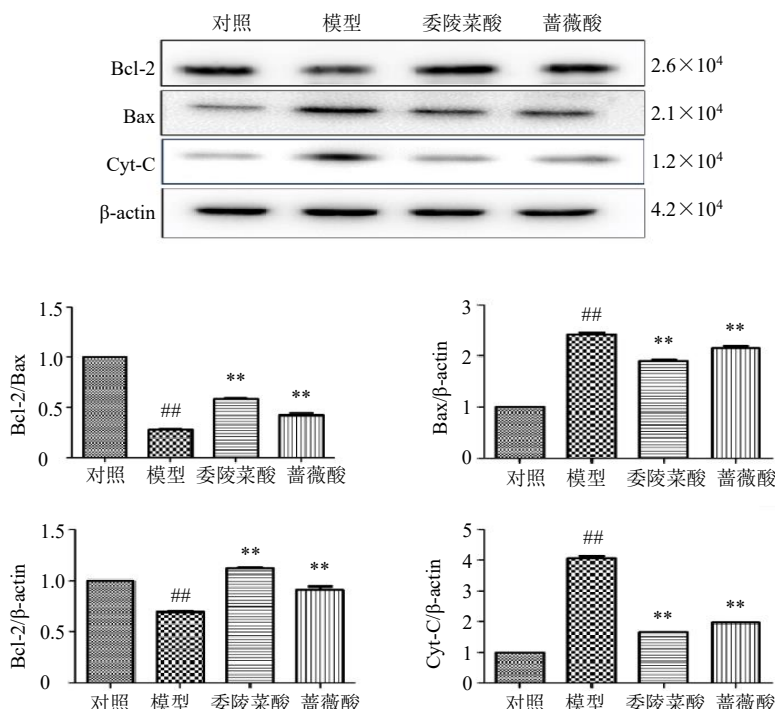


图 4 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞 Bcl-2、Bax、Cyt-C 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effects of tormentic acid and euscaphic acid on expressions of Bcl-2, Bax and Cyt-C protein in hypoxia-induced EA.hy926 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

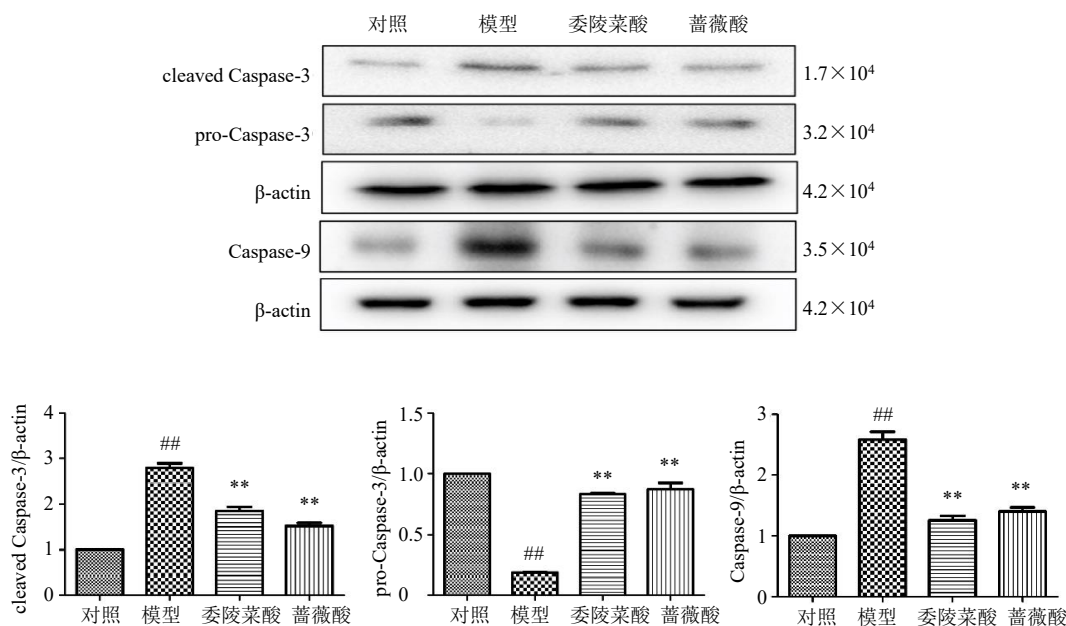


图 5 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞 cleaved Caspase-3、pro-Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of tormentic acid and euscaphic acid on expressions of cleaved Caspase-3, pro-Caspase-3 and Caspase-9 protein in hypoxia-induced EA.hy926 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5.3 委陵菜酸、蔷薇酸对 Akt 通路相关蛋白的影响 如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组 p-Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 p-Akt 蛋白表达水平无统计学差异。各组 Akt 蛋白表达水平无统计学差异。

3.5.4 委陵菜酸、蔷薇酸对 MAPK 信号通路相关蛋

白表达的影响 如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组 p38、ERK1/2、JNK 的磷酸化水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 委陵菜酸组和蔷薇酸组 p38 和 JNK 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.01$), 委陵菜酸组 ERK1/2 的磷酸化水平显著升高 ($P < 0.01$)。各组 p38、JNK、ERK1/2 蛋白表达水平平均无统计学差异。

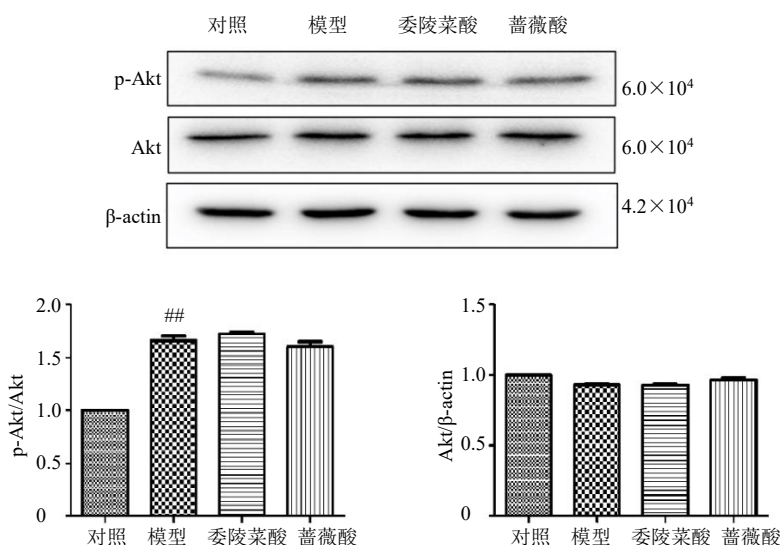


图 6 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞 p-Akt、Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of tormentic acid and euscaphic acid on expressions of p-Akt and Akt protein in hypoxia-induced EA.hy926 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

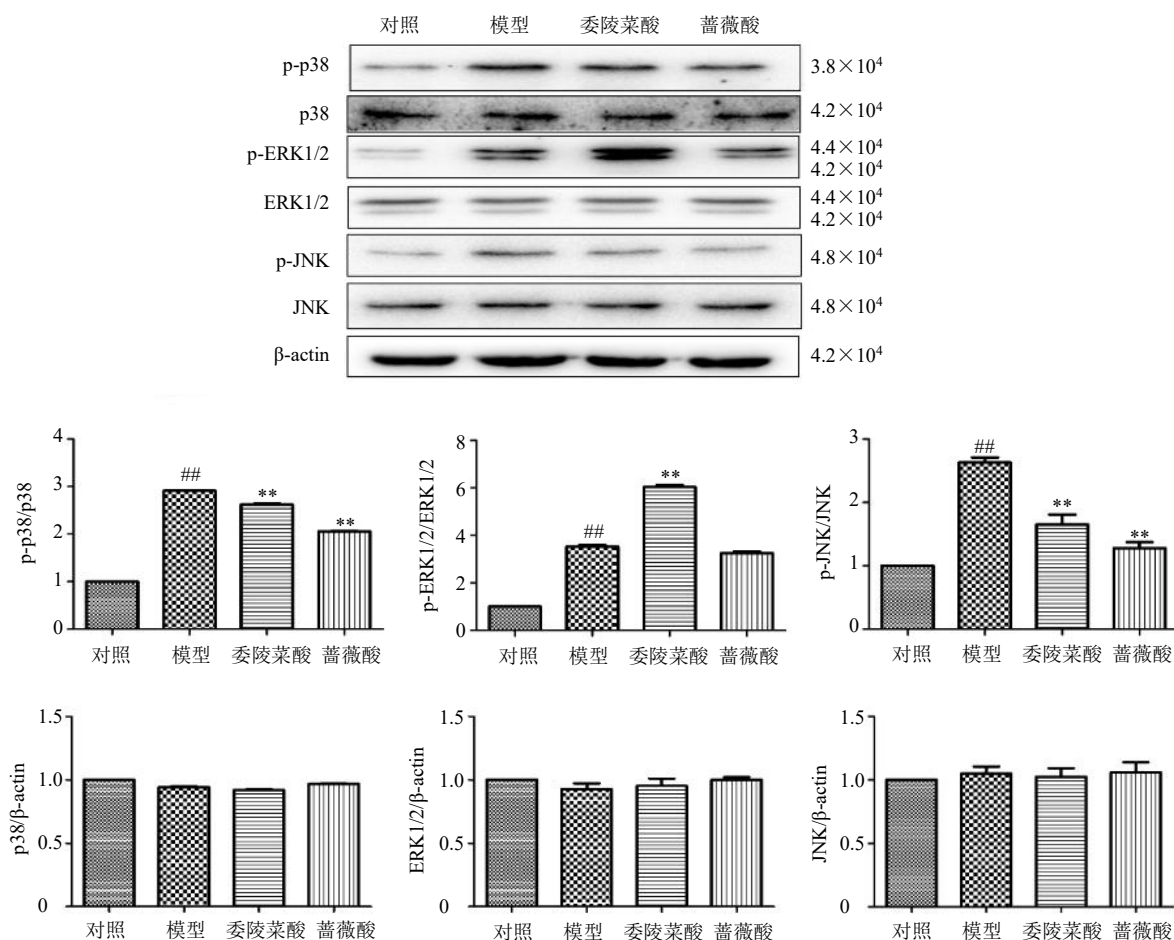


图 7 委陵菜酸和蔷薇酸对缺氧诱导的 EA.hy926 细胞 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of tormentic acid and euscaphic acid on expressions of MAPK signaling pathway related protein in hypoxia-induced EA.hy926 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

缺氧是导致血管内皮细胞功能障碍、结构破坏以及凋亡的常见诱因。本研究结果显示缺氧环境下，内皮细胞的增殖能力显著下降，细胞结构完整性和氧化/抗氧化平衡均受到破坏，缺氧启动并加速了内皮细胞的凋亡。委陵菜酸、蔷薇酸干预可明显改善缺氧诱导的细胞损伤，抑制细胞凋亡，表明委陵菜酸、蔷薇酸对内皮细胞缺氧损伤具有保护作用。研究显示，委陵菜酸、蔷薇酸在其他损伤或疾病模型中也显示出较好的抗炎、抗凋亡等作用^[4-6]。

凋亡是细胞自发的一种程序性死亡形式，是细胞对环境和刺激产生的应答。缺氧诱导的凋亡可通过多种途径激活 Caspase 级联反应，导致细胞凋亡^[7-9]。通过药物干预影响凋亡相关蛋白表达、抑制凋亡进程，可能达到减轻缺氧损伤的效果^[10]。本研究结果显示，与模型组比较，委陵菜酸、蔷薇酸干预后细胞凋亡率明显降低。Western blotting 结果显

示，委陵菜酸、蔷薇酸抑制了促凋亡蛋白 Bax、Cyt-C、cleaved Caspase-3、Caspase-9 表达，并上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 pro-Caspase-3 表达，表明委陵菜酸、蔷薇酸可以通过调控 Bcl-2 蛋白的表达发挥抗凋亡作用。

MAPK 是细胞氧感应的重要信号通路家族，包括 ERK1/2、p38、JNK 等多条信号通路，它们可被体内、体外等多种因素磷酸化而激活成 p-ERK1/2、p38、p-JNK，参与细胞增殖、活化、凋亡等多种生物学反应。缺氧可通过激活 p38、JNK 通路产生损伤、凋亡等生物学效应，在肝细胞^[11]、心肌细胞^[12]、肺动脉平滑肌细胞^[13]等细胞损伤模型中表现基本一致。本研究结果显示，缺氧诱导后血管内皮细胞 p-p38、p-JNK 表达显著升高，经委陵菜酸、蔷薇酸处理后 p-p38 和 p-JNK 的表达降低，表明委陵菜酸、蔷薇酸可能通过抑制 p38、JNK 信号通路活化发挥抗凋亡作用。研究发现，通过外源性表皮生长因子

受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 干预可激活 ERK1/2 通路, 对缺氧诱导的脑微血管内皮细胞损伤产生促进增殖、抑制凋亡的生物学效应^[14]。本研究结果显示, 委陵菜酸干预后缺氧内皮细胞 p-ERK1/2 表达上调, 增强了其抗凋亡效应, 与上述文献结果相符, 但蔷薇酸干预后并未影响缺氧内皮细胞 p-ERK1/2 表达, 提示委陵菜酸抗凋亡可能与 ERK1/2 信号通路激活有关, 而蔷薇酸的抗凋亡作用与之无关。Akt 是细胞在缺氧条件下存活的重要蛋白, 细胞缺氧时 Akt 被活化成 p-Akt, 可特异性抑制细胞缺氧损伤^[15]。本研究结果显示, 模型组 p-Akt 表达显著升高, 给予蔷薇酸、委陵菜酸处理后, p-Akt 表达水平均未受影响, 提示蔷薇酸、委陵菜酸可能不是通过 Akt 信号通路发挥抗凋亡损伤作用的。

综上, 委陵菜酸、蔷薇酸能够通过抗氧化应激和抗凋亡, 对缺氧诱导的血管内皮细胞损伤发挥保护作用。其抗凋亡机制可能与线粒体凋亡信号途径有关, 委陵菜酸可能参与调控了 ERK1/2、p38、JNK 信号通路, 蔷薇酸可能参与调控了 p38、JNK 信号通路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang L, Jian L L, Li J Y, *et al.* Possible involvement of alpha B-crystallin in the cardioprotective effect of *n*-butanol extract of *Potentilla anserina* L. on myocardial ischemia/reperfusion injury in rat [J]. *Phytomedicine*, 2019, 55: 320-329.
- [2] 陈晔, 李霞, 肖泽云, 等. 刺梨苷和野蔷薇苷对急性高原缺氧脑损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中药材*, 2024, 47(9): 2350-2354.
- [3] 苏畅. PI3K/Akt 通路介导野蔷薇苷对抗急性缺氧性脑水肿及血管内皮细胞损伤的机制研究 [D]. 河北: 河北医科大学, 2017.
- [4] Yang Y, Wang Y W, Zhao M, *et al.* Tormentic acid inhibits IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4753-4758.
- [5] Cui W G, Sun C L, Ma Y Q, *et al.* Neuroprotective effect of tormentic acid against memory impairment and neuroinflammation in an Alzheimer's disease mouse model [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2): 739-750.
- [6] Jeong N H, Lee S, Choi Y A, *et al.* Inhibitory effects of euscaphic acid in the atopic dermatitis model by reducing skin inflammation and intense pruritus [J]. *Inflammation*, 2022, 45(4): 1680-1691.
- [7] Liang H Q, Li F J, Li H X, *et al.* Overexpression of lncRNA hulk attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rat models and apoptosis of hypoxia/reoxygenation cardiomyocytes via targeting miR-377-5p through NLRP3/Caspase-1/IL-1 β signaling pathway inhibition [J]. *Immunol Invest*, 2021, 50(8): 925-938.
- [8] Zhang J, Long K, Wang J, *et al.* Yak miR-2285o-3p attenuates hypoxia-induced apoptosis by targeting caspase-3 [J]. *Anim Genet*, 2022, 53(1): 49-57.
- [9] Zhang J W, Zhou X K, Sun J, *et al.* miR-361-3p mitigates hypoxia-induced cardiomyocyte injury via targeting apoptosis initiators Caspase-2/-8/-9 [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2022, 58(2): 116-123.
- [10] 胡婷. 三七皂苷 R₁ 通过调控 PI3K/Akt 通路抑制线粒体途径凋亡对抗心肌缺血再灌注损伤的研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [11] Yu Q W, Li J Y, Cui M W, *et al.* 6-Gingerol attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury through regulating MKP5-mediated P38/JNK pathway [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 7747.
- [12] Wang Y, Gao H, Cao X H, *et al.* Role of GADD45A in myocardial ischemia/reperfusion through mediation of the JNK/p38 MAPK and STAT3/VEGF pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2022, 50(6): 144.
- [13] 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.
- [14] Wang J N, Wu X, Fang J C, *et al.* Intervention of exogenous VEGF protect brain microvascular endothelial cells from hypoxia-induced injury by regulating PLC γ /RAS/ERK and PI3K/AKT pathways [J]. *Exp Gerontol*, 2024, 192: 112452.
- [15] Naryzhnaya N V, Ma H J, Maslov L N. The involvement of protein kinases in the cardioprotective effect of chronic hypoxia [J]. *Physiol Res*, 2020, 69(6): 933-945.

[责任编辑 李亚楠]