

· 基础研究 ·

三七总皂甙调控内皮 Vps34 自噬通路减轻慢性间歇性缺氧诱导的内皮-血小板黏附机制研究

王铭铭^{1, 2} 王彦辉² 张红丽² 史大卓³ 李 平¹

摘要 目的 通过内皮 Vps34 自噬通路,探讨三七总皂甙(PNS)抑制慢性间歇性缺氧(CIH)诱导内皮-血小板黏附的作用机制。方法 采用随机数字表法将 90 只大鼠分为对照组($n=10$)、CIH 组($n=20$)、阿司匹林组($n=20$)、PNS 低剂量组($n=20$)及 PNS 高剂量组($n=20$)。除对照组外,通过控制动物饲养箱中氧气浓度,建立 CIH 大鼠模型。造模成功率为 51%,CIH 组 10 只,阿司匹林组 10 只,PNS 低剂量组 12 只,PNS 高剂量组 9 只。阿司匹林组给予阿司匹林肠溶片 12 mg/(kg·d),PNS 低、高剂量组分别灌胃给予血塞通软胶囊 80、160 mg/(kg·d),对照组和 CIH 组给予等量生理盐水,均持续 3 周。采用流式细胞术(FCM)检测大鼠主动脉内皮细胞(AEC)凋亡率,FCM 及免疫荧光法检测大鼠 AEC 表面血管血友病因子(VWF)表达,Western Blot 法检测 AEC 中 Vps34 自噬通路相关蛋白表达水平。细胞研究采取正常大鼠 AEC,分为无抑制剂对照组、CIH 组、PNS 组、SAR405(简称抑制剂)对照组、抑制剂 CIH 组及抑制剂 PNS 组。所有抑制剂组细胞采用 SAR405 预孵育 1 h,PNS 组细胞加入 PNS 标准品(160 μ g/mL)。除对照组外余组均建立间歇性低氧 AEC 模型。在 AEC 中加入正常大鼠血小板,诱导 AEC-血小板黏附。采用 FCM 观察 AEC 凋亡率、VWF 表达率及 AEC-血小板黏附程度。结果 动物实验部分:与对照组比较,CIH 组大鼠 AEC 凋亡率、VWF 表达率及 AEC 中 Beclin-1、Vps34、自噬相关蛋白(Atg)14 及微管相关蛋白轻链 3 II(LC3 II)表达均增加($P<0.05$)。与 CIH 组比较,阿司匹林组、PNS 高、低剂量组大鼠 AEC 凋亡率、VWF 表达、Vps34、Atg14 及 LC3 II 蛋白表达降低($P<0.05$)。细胞研究部分:与空白对照组比较,CIH 组 AEC 凋亡率、VWF 表达率及血小板黏附均升高($P<0.05$);与 CIH 组比较,PNS 组 AEC 凋亡率、VWF 表达率及血小板黏附均降低($P<0.05$)。用特异性抑制剂 SAR405 抑制 Vps34 自噬通路后,PNS 减少 AEC 凋亡率、VWF 表达及血小板黏附的作用消失。结论 PNS 可减轻 CIH 诱导的内皮-血小板黏附,其作用机制与 PNS 抑制内皮细胞 Vps34 自噬通路有关。

关键词 三七总皂甙;慢性间歇性缺氧;血小板;内皮细胞;自噬;中药

Mechanism of *Panax Notoginseng* Saponins Alleviating Endothelial Cell-Platelet Adhesion Induced by Chronic Intermittent Hypoxia via Modulation of Endothelial Vps34 Autophagy Pathway

WANG Ming-ming^{1, 2}, WANG Yan-hui², ZHANG Hong-li², SHI Da-zhuo³, and LI Ping¹ 1 Department of Cardiology, Beijing University of Chinese Medicine Third Affiliated Hospital, Beijing (100029); 2 Department of Cardiology, Beijing First Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Beijing (100026); 3 Institute of Cardiovascular Diseases of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)

ABSTRACT Objective To explore the inhibitory mechanisms of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on endothelial cell-platelet adhesion induced by chronic intermittent hypoxia (CIH) based on the endothelial Vps34 autophagy pathway. **Methods** Ninety rats were randomly divided into control group ($n=10$), CIH group ($n=20$), aspirin group ($n=20$), low-dose PNS group ($n=20$), and high-

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81803949)

作者单位:1. 北京中医药大学第三附属医院心内科(北京 100029);2. 北京市第一中西医结合医院心内科(北京 100026);3. 中国中医科学院心血管病研究所(北京 100091)

通讯作者:李 平, Tel: 010-52075376, E-mail: pear112008@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230403.041

dose PNS group ($n=20$) using random number table. The CIH rat model was established by controlling the oxygen levels in the rat feeding box. The overall modelling success rate was 51%; 10 in the CIH group, 10 in the aspirin group, 12 in the low-dose PNS group, and 9 in the high-dose PNS group. At the same time, the aspirin group was administered aspirin enteric-coated tablets $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, the low-dose PNS group was administered Xuesaitong soft Capsules $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and the high-dose PNS group was administered Xuesaitong soft Capsules $160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, the control group and CIH group were administered with equal volume saline by gastrogavage. Flow cytometry (FCM) was used to detect the apoptosis rates of aortic endothelial cell (AEC). The von-Willebrand factor (VWF) expression in AEC was determined by FCM and immunofluorescence method respectively. The levels of protein expression of the Vps34 autophagy pathway were detected by Western Blot. For the *in vitro* experiments, AEC from normal rats were divided into no inhibitor control, CIH, PNS, SAR405 (named inhibitor) control, inhibitor CIH, and inhibitor PNS groups. Cells in all the inhibitor groups were pre-incubated with SAR405 for 1 h. The PNS standards were added to the PNS groups at a final concentration of $160 \mu\text{g/mL}$. Except for control groups, all other groups were cultured in an intermittent hypoxia cell incubator. The AEC were co-incubated with platelets from normal rats to induce AEC-platelet adhesion. The apoptosis rates of AEC, VWF expression, and AEC-platelet adhesion were detected using FCM. **Results** For the *in vivo* experiment, compared with the control group, AEC apoptosis, VWF expression, and protein expression of Beclin-1, Vps34, autophagy-related gene (Atg), and microtubule-associated protein light chain 3 II (LC3 II) increased in CIH group ($P<0.05$). Compared with the CIH group, AEC apoptosis, VWF expression, and protein expression of Vps34, Atg14, and LC3 II decreased in aspirin group, low- and high-dose PNS groups ($P<0.05$). In the *in vitro* experiment, compared with the vacant control group, AEC apoptosis, VWF expression, and platelet adhesion increased in the CIH group ($P<0.05$). Compared with the CIH group, AEC apoptosis, VWF expression, and platelet adhesion decreased in the PNS group ($P<0.05$). When Vps34 was inhibited by SAR405, the effects of PNS on AEC apoptosis, VWF expression, and platelet adhesion were abrogated. There was no statistical difference between the inhibitor PNS group and inhibitor CIH group ($P>0.05$). **Conclusion** PNS could alleviate CIH-induced endothelial-platelet adhesion, and its mechanism might be related with inhibiting of the endothelial cell Vps34 autophagy pathway by PNS.

KEYWORDS *Panax notoginseng* saponins; chronic intermittent hypoxia; platelet; endothelial cell; autophagy; Chinese herbal medicine

慢性间歇性缺氧 (chronic intermittent hypoxia, CIH) 是阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS) 的主要临床特征, 也是 OSAHS 相关血栓并发症发生的主要原因^[1]。CIH 诱导内皮细胞自噬, 过度的自噬引起内皮细胞损伤及颗粒释放增加^[2]。其中韦伯小体 (Weibel-Palade body) 释放增加可引起内皮细胞表面血管血友病因子 (von-Willebrand factor, VWF) 高表达^[1], 促进内皮-血小板黏附, 增加病理性血栓形成的风险^[3]。因此, 抑制 CIH 诱导的内皮细胞自噬及 VWF 表达、减少内皮细胞和血小板黏附, 对降低 OSAHS 患者血栓形成风险具有重要意义。

Vps34 是介导内皮细胞自噬的主要蛋白^[4], 通过与 Beclin-1 结合形成 Beclin-1/Vps34 复合物, 激活下游自噬相关蛋白 (Atg), 促进细胞内颗粒释放^[5]。

Vps34 蛋白与 CIH 诱导的内皮细胞 VWF 高表达是否相关? 目前尚缺乏研究。本课题组前期研究发现, 三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 可有效降低氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 损伤的内皮细胞与血小板黏附, 其机制与 PNS 上调内皮细胞磷脂酰肌醇三激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Phosphoinositide-3 kinase/serine/threonine protein kinase, PI3K/Akt) 通路相关^[5]。PI3K/Akt 是内皮细胞 Vps34 的上游通路, PI3K/Akt 活化可抑制 Vps34 介导的内皮细胞自噬^[6]。PNS 对 CIH 损伤内皮细胞的 Vps34 自噬通路是否有抑制作用, 目前尚未见有研究。因此, 本研究采用 CIH 大鼠模型及 CIH 损伤内皮-血小板共孵育的方法, 观察 PNS 对 CIH 诱导的内皮细胞凋亡、内皮细胞表面 VWF 表达和内皮-血小板黏附的作用, 并基于内皮细胞 Vps34 自噬通路探讨 PNS 作用分子机

制, 以为 PNS 防治 OSAHS 患者血栓性疾病提供实验依据。

材料与方法

1 动物 清洁级 Wistar 雄性大鼠, 7~10 周龄, 体重 200~250 g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[动物许可证: SCXK(京)2019-0010]。大鼠先于 SPF 级动物房基础饲料适应性喂养 7 天, 随后进行分组及造模。实验方案获得康泰医学检验服务有限公司动物伦理委员会审批(No. MDL2022-11-14-01)。

2 药物 动物实验用血塞通软胶囊, 购自云南昆明圣火药业有限公司(0.33 g/粒, 批号: 20210901, 每粒药含 PNS 60 mg); 阿司匹林肠溶片, 100 mg/片, 购自拜耳医药保健有限公司(批号: BJ46121)。细胞实验用 PNS 标准品, 购自云南昆明圣火药业有限公司(批号: 20210810); 阿司匹林标准品, 购自中国药品生物制品检定所(批号: 100113-201405); Vps34 特异性抑制剂 SAR405 购自 Merck 公司(批号: HY-12481A)。

3 主要试剂及仪器 流式细胞学(flow cytometry, FCM)检测用抗 VWF 抗体、Annexin V-PI 凋亡试剂盒, 均购自百奥斯科生物医学有限公司(批号分别为: 101128、309810); FCM 检测用抗 CD61 抗体购自 BioLegend 公司(批号: 104315), 抗 CD144 抗体购自百奥斯科生物医学有限公司(批号: 109010); 免疫荧光检测用抗 VWF 抗体购自百奥斯科生物医学有限公司(批号: 100931); Western Blot 检测用抗 Beclin1、Vps34、Atg14 和微管相关蛋白轻链 3 II(microtubule-associated protein light chain 3 II, LC3 II)抗体, 均购自 Abcam 公司(批号分别为: ab76021, ab207612, ab124905, ab63817)。流式细胞仪(NAVIOS, Beckman Coulter, 美国), 三气培养箱(HF100, Heal Force, 中国), CO₂ 细胞培养箱(Thermo, 美国), I 级 2 型生物安全柜(ESCO, 新加坡), 倒置荧光显微镜(BDS400FL, 奥特光学, 中国), 氧气控制器(Biospherix OxyCycler A84, USA), 酶标仪(Bio-Rad, 美国), 垂直电泳槽(Bio-Rad, 美国), 低温高速离心机(3-30K, Sigma, 美国), PVDF 膜(0.22 μm, Millipore, 美国), SDS-PAGE 电泳系统(Bio-Rad, 美国), 凝胶成像系统(GelDoc-It310, UVP, 美国), ChemiDoc MP 化学发光成像系统(170-8280, Bio-Rad, 美国), 细胞培养瓶、100、60 mL 细胞培

养皿、15、50 mL 离心管(Corning, 美国), 枪头(Eppendorf, 美国)。

4 动物及细胞造模、分组及干预

4.1 动物分组 本实验共购入 90 只大鼠, 将全部大鼠进行 1~90 编号, 随后利用随机数字表法对大鼠进行随机编号, 将随机编号从小到大排序, 选取编号为前 10 位的大鼠作为空白组。剩余 80 只大鼠进行造模, 采用随机数字表法对 80 只大鼠重新进行随机编号, 将随机编号除以 4, 按照所得余数依次将大鼠分为 CIH 组、阿司匹林组、PNS 低剂量组、PNS 高剂量组。当 4 组间动物数量不均衡时, 选取数量最多的一组, 按照随机数字编号从小到大进行排序, 将前 20 位保留至原组, 余下动物按照随机序号由小到大依次调整至 CIH 组、阿司匹林组、PNS 低剂量组、PNS 高剂量组。重复上述分组方法, 最终使得每组间动物数量均衡, 均为 20 只。

4.2 动物造模 参考文献[7]报道方法制作 CIH 大鼠模型: 将大鼠置于培养箱中, 培养箱光照模式设置为 6: 00-18: 00 给予持续光照, 模拟白昼环境; 18: 00-6: 00 保持无光状态, 模拟夜间环境。每天于 8: 00-16: 00 予间歇性低氧刺激: 设置 6% O₂ 15 s+空气 15 s(通过调整 N₂ 进入箱内的浓度使氧浓度下降至 6%, 持续 15 s 后, 改为空气输入, 继续维持 15 s)为一个低氧周期。每分钟予两个周期, 每日持续 8 h, 共持续 4 周。间歇性低氧刺激期间不提供水和食物。动物血氧饱和度监测仪(Rocsea, 中国)监测大鼠缺氧期间血氧饱和度波动在 65% 以下, 为造模成功。对照组使用空气与空气交换模拟间歇性缺氧气体交换的噪音对大鼠的刺激。CIH 组、阿司匹林组、PNS 低剂量组、PNS 高剂量组造模成功率分别为: 50%(10 只)、50%(10 只)、60%(12 只)、45%(9 只)。对照组动物无死亡、疾病等情况发生, 血氧饱和度未见异常。造模成功的大鼠及空白组大鼠纳入后续指标检测。

4.3 动物给药 造模第 1 天给大鼠灌胃, 按动物体表面积比率换算临床的等效剂量^[8]。阿司匹林临床用量为 100 mg/d; 血塞通软胶囊每天 660 mg 对应实验低剂量; 每天 1 320 mg 对应实验高剂量^[9]。大鼠药物剂量约为临床成人剂量的 6.3 倍, 换算动物等效剂量如下: 阿司匹林肠溶片 12 mg/kg, 每天 1 次; PNS 低剂量组给予血塞通软胶囊每天总剂量为 80 mg/kg, 每天分 3 次给药; PNS 高剂量组给予血塞通软胶囊每天总剂量为 160 mg/kg, 每天 3 次; 对照组和 CIH 组给予等量生理盐水, 每天 3 次, 连续

4 周。大鼠灌胃时间分别为 8:00、16:00 及 24:00。

4.4 内皮细胞培养 大鼠麻醉后,分离主动脉,置于无菌操作台(ESCO,新加坡)。PBS 缓冲液反复冲洗直至主动脉管腔无残留血液,加入预温至 37℃ 的 0.25% 胰蛋白酶消化 20 min,收集消化液,150×g 离心 10 min,弃上清,获得主动脉内皮细胞(aortic endothelial cell, AEC)。将获取的 AEC 重悬于 ECM 培养基,调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种于 T25 细胞培养瓶(Corning,美国)中,每瓶加入 5 mL 细胞悬液,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱(Thermo,美国)培养。细胞培养液 2~3 天更换 1 次,待细胞铺满瓶底的 70% 时进行传代。

4.5 CIH 损伤内皮细胞模型 参考 Vladislav V 的方法^[10],选取 3~4 代 AEC,重悬于 ECM 培养基,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL。取 5 mL 细胞悬液接种于 1 个 60 mm 细胞培养皿(Corning,美国)中,待细胞铺满皿底,分组加入相应药物。其中抑制剂组的细胞,先加入 SAR405 预孵育 1 h,再加入 PNS。然后将细胞置于 37℃、5%CO₂ 的间歇性低氧细胞培养箱中培养,空气流速设置为 2.4 L/min,低氧气体及空气的进入由电子阀门控制,以 1.5% O₂ 3 min 和 21% O₂ 3 min 为一个周期,每个周期持续 360 s,共进行 60 个周期。对照组采用 21% O₂ 3 min 和 21% O₂ 3 min 为一个周期模式。60 个低氧周期完毕,CIH 损伤 AEC 模型构建成功。

4.6 细胞分组及给药 细胞分为空白对照组、CIH 组、PNS 组、抑制剂对照组、抑制剂 CIH 组、抑制剂 PNS 组。其中空白对照组、CIH 组不给任何药物,PNS 组予 PNS 标准品 160 μg/mL;抑制剂对照组、抑制剂 CIH 组、抑制剂 PNS 组均预先予 SAR405 预孵育 1 h(SAR405 终浓度为 1 μmol/L),其中抑制剂 PNS 组再加入 PNS 标准品,终浓度为 160 μg/mL。每组均设置 9 个独立样本,每个独立样本均来自不同健康大鼠。

4.7 内皮细胞-血小板共孵育 取各组大鼠腹主动脉血 5 mL,注入含 3.8% 枸橼酸钠的抗凝管中,上下颠倒充分摇匀。立即室温下 300×g 离心 15 min,获得富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)。PRP 室温下 900×g 离心 10 min,弃上清获得血小板沉淀,重悬于台氏液中,调整血小板计数为 $1 \times 10^8/\text{mL}$ 。取 100 μL 血小板悬液,加入 CIH 损伤的 AEC 中,置于细胞培养箱孵育 5 min,以观察内皮细胞和血小板的黏附变化。

5 检测指标及方法

5.1 FCM 检测大鼠内皮细胞凋亡率及 VWF 表达率 获取大鼠 AEC,将 AEC 重悬于 PBS 中,调整细胞计数为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。检测内皮细胞凋亡率时,取 100 μL 细胞悬液于 5 mL 流式管中,加入 5 μL Annexin V/FITC 混匀后于室温避光孵育 5 min,再加入 10 μL 20 μg/mL 的碘化丙锭溶液(PI)和 400 μL PBS,进行 FCM 检测;检测内皮细胞 VWF 表达率时,取 100 μL 细胞悬液于 5 mL 流式管中,加入 5 μL 抗 VWF 抗体,行 FCM 检测。

5.2 免疫荧光法观察大鼠内皮细胞 VWF 表达 获取大鼠 AEC,重悬于 PBS 中,调整细胞计数为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取 100 μL 细胞悬液,将细胞种植于盖玻片上,置于细胞培养箱,4 h 后,镜下观察细胞贴壁情况。待盖玻片上细胞贴壁超过 80%,取出盖玻片,PBS 冲洗 3 遍,4% 多聚甲醛固定,干燥 10 min 后,3% BSA 孵育标本 20 min。加入兔抗大鼠 VWF 抗体为 I 抗,室温孵育 60 min,PBS 冲洗 3 遍。然后加入山羊抗鼠 Cy3 荧光素标记的 IgG 作为 II 抗,37℃ 孵育 30 min。PBS 冲洗 3 遍,DAPI 浸染 1 min,50% 缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察 AEC 表面 VWF 的表达。

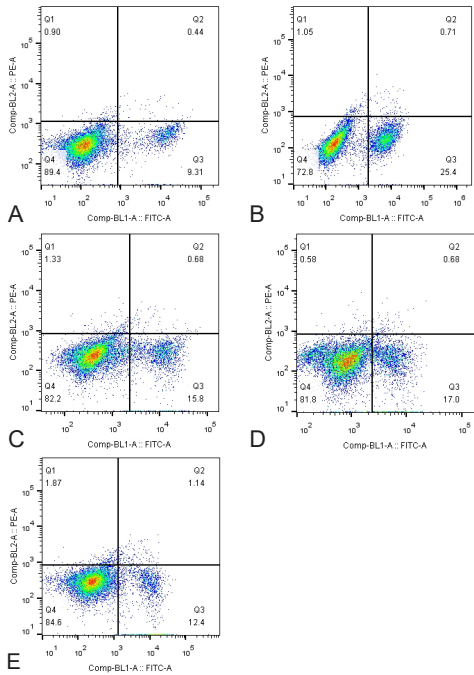
5.3 Western Blot 检测大鼠内皮细胞 Beclin-1、Vps34、Atg14、LC3 II 蛋白表达 获取大鼠 AEC,RIPA 裂解内皮细胞提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。根据测定结果确定所有蛋白为相同浓度后,进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭硝酸纤维素膜的免疫球蛋白结合位点,加入相应蛋白一抗孵育,4℃ 反应过夜,洗膜;加二抗孵育 60 min,洗膜,显影曝光,成像后经扫描仪扫描,以 Gel-Pro31 分子生物学专用图像分析软件进行灰度对比分析。内参蛋白为 β-Actin。

5.4 FCM 检测内皮细胞-血小板黏附程度 CD144 和 CD61 分别为内皮细胞和血小板的标志物^[11]。参考本课题组既往报道的实验方法^[5],AEC 与血小板共孵育结束后,弃培养皿上清液,PBS 冲洗培养皿 3 次,除去未黏附及黏附不牢固的血小板。加入预温至 37℃ 的 0.25% 胰蛋白酶消化 20 min,获取 AEC 及黏附在内皮细胞上的血小板,重悬于 PBS 中,调整内皮细胞计数至 1×10^6 个/mL,加入抗 CD144、抗 CD61 抗体进行 FCM 检测。每个样本分析约 10 000 个 CD144⁺ 的细胞,以 CD61 阳性率作为衡量血小板黏附程度的指标。

6 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件 (IBM, Chicago, USA) 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间定量数值比较采用独立样本 t 检验, 多组之间定量数值比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠内皮细胞凋亡率比较 (图 1, 表 1) 与对照组比较, CIH 组大鼠 AEC 的凋亡率升高 ($P < 0.05$)。与 CIH 组比较, 阿司匹林组, PNS 高、低剂量组大鼠 AEC 的凋亡率均下降 ($P < 0.05$)。与阿司匹林组比较, PNS 高剂量组 AEC 的凋亡率下降 ($P < 0.05$)。



注:A为对照组;B为CIH组;C为阿司匹林组;D为PNS低剂量组;E为PNS高剂量组;使用Annexin-FITC/PI染色方法检测细胞凋亡率,散点图中Q1为坏死细胞;Q2为晚期凋亡细胞;Q3为早期凋亡细胞;Q4为活细胞;Q2+Q3细胞群所占比例为AEC凋亡率

图 1 各组内皮细胞凋亡比较

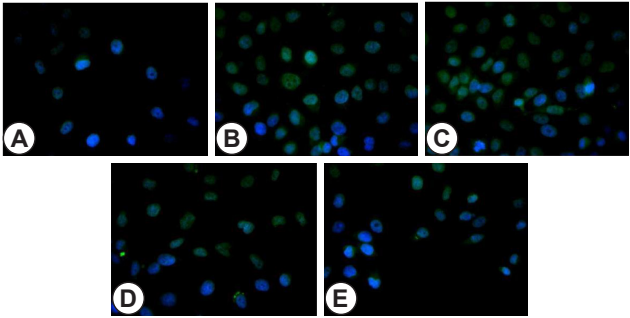
表 1 各组大鼠 AEC 凋亡率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AEC 凋亡率
对照	10	6.66 ± 0.53
CIH	10	24.90 ± 1.08*
阿司匹林	10	18.36 ± 0.29 [△]
PNS 低剂量	12	17.74 ± 0.23 [△]
PNS 高剂量	9	14.29 ± 0.72 ^{△▲}

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 CIH 组比较, [△] $P < 0.05$; 与阿司匹林组比较, [▲] $P < 0.05$

2 各组大鼠内皮细胞 VWF 表达比较 (图 2, 表 2) 与对照组比较, CIH 组大鼠 AEC 表面 VWF

表达升高 ($P < 0.05$)。与 CIH 组比较, 阿司匹林组, PNS 高、低剂量组大鼠 AEC 表面 VWF 表达均下降 ($P < 0.05$)。与阿司匹林组比较, PNS 高剂量组大鼠 AEC 表面 VWF 表达下降 ($P < 0.05$)。



注:A为对照组;B为CIH组;C为阿司匹林组;D为PNS低剂量组;E为PNS高剂量组;VWF阳性细胞被标记为绿色

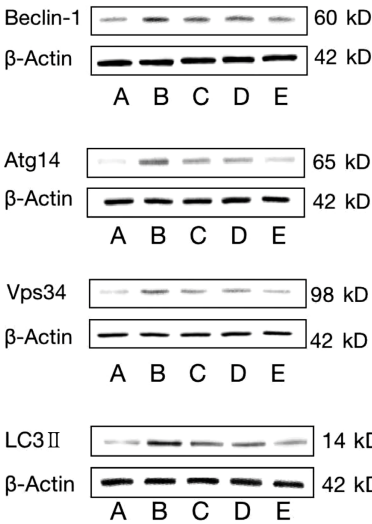
图 2 各组 VWF 阳性的内皮细胞表达 (× 400)

表 2 各组大鼠 AEC 表面 VWF 表达率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	VWF 表达率
对照	10	6.20 ± 0.26
CIH	10	18.55 ± 0.98*
阿司匹林	10	14.46 ± 0.23 [△]
PNS 低剂量	12	10.86 ± 0.28 [△]
PNS 高剂量	9	10.63 ± 0.78 ^{△▲}

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 CIH 组比较, [△] $P < 0.05$; 与阿司匹林组比较, [▲] $P < 0.05$

3 各组大鼠内皮细胞 Beclin-1、Vps34、Atg14、LC3 II 蛋白表达比较 (图 3, 表 3) 与对照组比较, CIH 组 AEC 中 Beclin-1、Vps34、Atg14 及 LC3 II 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$)。与 CIH 组比较, 阿司匹林组、PNS 高低剂量组 Vps34、Atg14



注:A为对照组;B为CIH组;C为阿司匹林组;D为PNS低剂量组;E为PNS高剂量组

图 3 各组内皮细胞 Beclin-1、Vps34、Atg14、LC3 II 蛋白表达

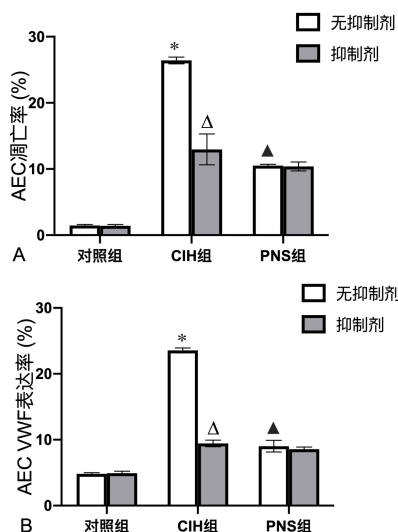
表 3 各组大鼠 AEC 中 LC3 II、Beclin-1、Vps34、Atg14 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LC3 II	Beclin-1	Vps34	Atg14
对照	3	0.16 ± 0.06	0.15 ± 0.08	0.21 ± 0.05	0.17 ± 0.06
CIH	3	0.52 ± 0.12*	0.48 ± 0.10*	0.52 ± 0.06*	0.38 ± 0.06*
阿司匹林	3	0.42 ± 0.10 [△]	0.39 ± 0.05	0.37 ± 0.10 [△]	0.51 ± 0.03 [△]
PNS 低剂量	3	0.42 ± 0.09 [△]	0.39 ± 0.07	0.38 ± 0.10 [△]	0.36 ± 0.06 [△]
PNS 高剂量	3	0.32 ± 0.07 ^{△▲}	0.28 ± 0.05 ^{△▲}	0.28 ± 0.07 ^{△▲}	0.33 ± 0.03 ^{△▲}

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 CIH 组比较, [△] $P < 0.05$; 与阿司匹林组比较, [▲] $P < 0.05$

及 LC3 II 蛋白表达均下降 ($P < 0.05$), PNS 高剂量组 Beclin-1 蛋白表达下降 ($P < 0.05$)。与阿司匹林组比较, PNS 高剂量组 Beclin-1、Vps34、Atg14 及 LC3 II 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$)。

4 各组 CIH 损伤的内皮细胞凋亡率及 VWF 表达率比较 (图 4) 在无抑制剂的情况下, 与无抑制剂空白对照组比较, CIH 组 AEC 凋亡率及 VWF 表达率均升高 ($P < 0.05$); 与 CIH 组比较, PNS 组 AEC 凋亡率及 VWF 表达率降低 ($P < 0.05$)。加入抑制剂后, 与无抑制剂对照组比较, 抑制剂对照组 AEC 凋亡率及 VWF 表达率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与无抑制剂 CIH 组比较, 抑制剂 CIH 组 AEC 凋亡率及 VWF 表达率均降低 ($P < 0.05$)。

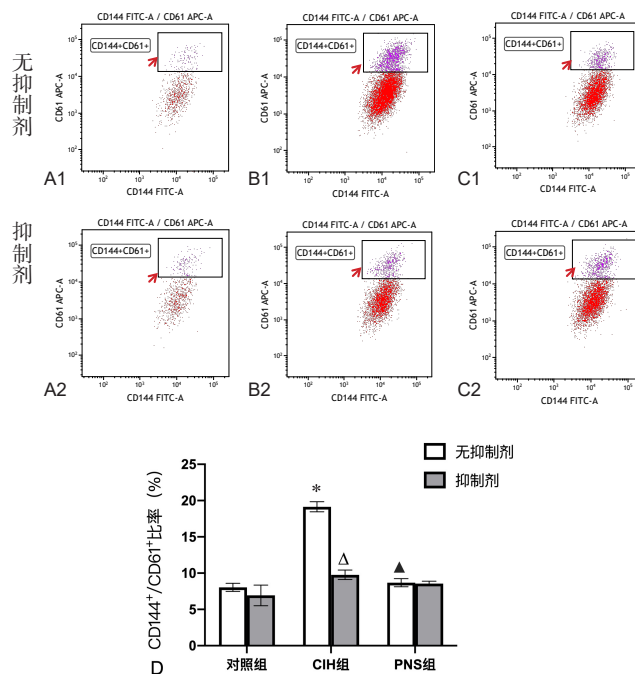


注: A 为 AEC 凋亡率组间比较; B 为 AEC 表面 VWF 表达率组间比较; 抑制剂为指 Vps34 特异性抑制剂 SAR405; 与无抑制剂对照组比较, * $P < 0.05$; 与抑制剂对照组比较, [△] $P < 0.05$; 与无抑制剂 CIH 组比较, [▲] $P < 0.05$

图 4 各组 CIH 损伤内皮细胞凋亡率及 VWF 表达率比较

5 CIH 损伤内皮细胞诱导的血小板黏附 (图 5) 在无抑制剂的情况下, 与无抑制剂对照组比较, CIH 组 CD44/CD61 双阳性 (CD144⁺/CD61⁺) 率增加 ($P < 0.05$)。与 CIH 组比较, PNS 组 CD144⁺/CD61⁺ 率下降 ($P < 0.05$)。加入抑制剂后, 与抑制

剂对照组比较, 抑制剂 CIH 组 CD144⁺/CD61⁺ 率升高 ($P < 0.05$); 与抑制剂 CIH 组比较, 抑制剂 PNS 组 CD144⁺/CD61⁺ 率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: A1 为空白对照组; B1 为 CIH 组; C1 为 PNS 组; A2 为抑制剂对照组; B2 为抑制剂 CIH 组; C2 为抑制剂 PNS 组; D 为 CD144⁺/CD61⁺ 率组间比较; 抑制剂指 Vps34 特异性抑制剂 SAR405; 每个样本分析约 10 000 个 CD144⁺ 的细胞; 散点图中红色箭头所指为 CD144⁺/CD61⁺ 细胞群; 与无抑制剂对照组比较, * $P < 0.05$; 与抑制剂对照组比较, [△] $P < 0.05$; 与无抑制剂 CIH 组比较, [▲] $P < 0.05$

图 5 FCM 检测内皮细胞 - 血小板黏附程度

讨 论

本研究表明, CIH 诱导的内皮细胞黏附性增加与 Vps34 自噬通路活化相关; PNS 可降低 CIH 诱导的内皮细胞黏附, 其机制与抑制内皮细胞 Vps34 自噬通路相关蛋白表达有关。

VWF 是增加内皮细胞黏附性, 促进内皮 - 血小板黏附, 加速血栓形成的关键蛋白^[12]。研究已经发现 OSA 患者内皮细胞释放 VWF 明显增加^[13], 基础研究证实 CIH 可诱导 EC 表面 VWF 表达增加^[14]。Solh AEE 等^[15]报道 OSA 患者血循环中凋亡内皮细胞明显增

加, 血液循环中凋亡内皮细胞水平与 VWF 表达水平明显相关。不仅如此, 有研究报道 OSA 患者夜间 VWF 水平变化与 OSA 缺氧程度、甚至血栓倾向均相关^[16]。这些研究均提示 CIH 诱导内皮细胞损伤、凋亡以及 VWF 表达是 OSA 患者形成血栓倾向的潜在机制。本项研究观察了 CIH 对内皮细胞凋亡率及 VWF 表达的影响, 与既往研究报道是一致的。然而, 关于 CIH 诱导 VWF 表达的分子机制, 尚不十分清楚。近年来, 越来越多的研究开始关注细胞自噬在 OSA 相关血栓并发症发生机制中的作用, 尤其是缺氧诱导的细胞自噬对内皮功能障碍的影响^[17]。自噬是细胞降解老化、损伤细胞器的途径。生理状态下, 细胞存在较低水平的基础自噬, 对于维持细胞稳态具有重要作用^[18]。在缺氧、饥饿等应激状态下, 细胞自噬通路被激活, 过度的自噬可引起细胞损伤、诱导细胞凋亡^[19]。同时, 细胞在自噬过程中形成自噬小体、自噬溶酶体, 促进细胞颗粒释放^[20]。颗粒释放的增强或细胞凋亡均可增加内皮细胞表面 VWF 表达, 增加内皮细胞黏附性^[21], 介导内皮细胞 - 血小板黏附, 促进血栓形成。本研究发现 CIH 诱导内皮细胞凋亡及 VWF 表达与上调内皮 Vps34 自噬通路相关, 抑制内皮 Vps34 自噬通路可明显降低 CIH 诱导的内皮凋亡及黏附性, 这提示 Vps34 是 CIH 介导内皮细胞黏附性增加的重要蛋白, 抑制 Vps34 自噬通路可能是干预 OSAHS 血栓并发症的一个重要方法。

PNS 可显著降低 CIH 诱导的 Vps34 自噬通路相关蛋白表达, 降低 CIH 诱导的内皮细胞凋亡、VWF 表达及血小板黏附。在阻断了 Vps34 蛋白的内皮细胞中, PNS 对 CIH 诱导的内皮细胞凋亡、VWF 表达及内皮 - 血小板黏附的抑制作用均消失, 证实 PNS 的上述作用呈内皮细胞 Vps34 蛋白依赖性。课题组前期研究证实, PNS 可减轻 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤, 降低内皮细胞 - 血小板黏附, 其机制与 PNS 上调内皮细胞 PI3K/Akt 通路相关^[6, 22], 而 PI3K/Akt 是 Vps34 蛋白的上游通路^[23], 与本项研究的结果基本一致。

本研究还发现, 阿司匹林对 CIH 诱导的内皮细胞自噬具有一定抑制作用。阿司匹林调节自噬通路的作用为近年来研究的热点, 但阿司匹林对细胞自噬的具体调控机制尚存在争议。Hernández C 等^[24]报道, 阿司匹林通过抑制上皮细胞自噬介导胃黏膜损伤; Liu PP 等^[25]报道, 阿司匹林通过抑制心肌成纤维细胞自噬通路减轻心肌纤维化; 也有研究报道, 阿司匹林可上调细胞自噬通路, 如何志旭等^[26]报道, 阿司

匹林通过诱导冠状动脉内皮细胞自噬通路活化减轻 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤。这些不同细胞自噬调控机制的原因可能与细胞的种类或细胞自身的基础自噬水平等有关。

本研究虽然证实, CIH 诱导内皮细胞 Vps34 自噬通路活化, 引起 VWF 表达增加, 但未能具体明确是哪一个囊泡相关膜蛋白, 如 VAMP2, VAMP3 或 VAMP8 在韦伯小体的释放中发挥了主要作用, 需要进一步研究。PNS 可通过抑制 CIH 诱导的内皮细胞 Vps34 自噬通路, 减轻内皮细胞损伤、VWF 表达, 抑制内皮 - 血小板黏附, 为其临床用于 OSAHS 血栓并发症的防治提供了一定的实验依据。

利益冲突: 所有作者声明无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Torisu T, Torisu K, Lee IH, et al. Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor[J]. *Nat Med*, 2013, 19 (10): 1281-1287.
- [2] He XM, Wu F, Zhou Y, et al. miR-4463 regulates hypoxia-induced autophagy and apoptosis by targeting ULK1 in endothelial cells[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2022, 27 (6): 175.
- [3] Kanaji S, Fahs S, Shi Q, et al. Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis[J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10 (8): 1646-1652.
- [4] Lv X, Wang K, Tang W, et al. miR-34a-5p was involved in chronic intermittent hypoxia-induced autophagy of human coronary artery endothelial cells via Bcl-2/beclin 1 signal transduction pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (11): 18871-18882.
- [5] Wang MM, Xue M, Xu YG, et al. *Panax notoginseng* saponin is superior to aspirin in inhibiting platelet adhesion to injured endothelial cells through COX pathway *in vitro*[J]. *Thromb Res*, 2016, 141: 146-152.
- [6] Yu XL, Long YC, Shen HM. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11 (10): 1711-1728.
- [7] Dunleavy M, Dooley M, Cox D, et al. Chronic

- intermittent asphyxia increases platelet reactivity in rats[J]. *Exp Physiol*, 2005, 90 (3): 411–416.
- [8] 许静芬, 黄芝瑛. 用 Excel 软件计算动物的体表面积及对用药剂量的换算 [J]. *上海实验动物科学*, 1999, 19 (1): 55–56.
- [9] 王文婷. 三七总皂苷和阿司匹林基于花生四烯酸通路相互作用的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [10] Vladislav M, Peter U, Yuan GX, et al. Intermittent hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction requires ROS-dependent MAP kinase activation[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 306 (8): C745–C752.
- [11] Marijke T, Murielvan S, Marina M, et al. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia[J]. *Haematologica*, 2009, 94 (7): 911–918.
- [12] Doddapattar P, Dhanesha N, Chorawala MR, et al. Endothelial cell-derived von Willebrand factor, but not platelet-derived, promotes atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38 (3): 520–528.
- [13] Gao S, Emin M, Thoma T, et al. Complement promotes endothelial von Willebrand factor and angiotensin-2 release in obstructive sleep apnea[J]. *Sleep*, 2021, 44 (4): zsa286.
- [14] Zhu J, Kang J, Li X, et al. Chronic intermittent hypoxia vs chronic continuous hypoxia: effects on vascular endothelial function and myocardial contractility[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2020, 74 (4): 417–427.
- [15] Solh AAE, Akinnusi ME, Berim IG, et al. Hemostatic implications of endothelial cell apoptosis in obstructive sleep apnea[J]. *Sleep Breath*, 2008, 12 (4): 331–337.
- [16] Koyama N, Matsumoto M, Tamaki S, et al. Reduced larger von Willebrand factor multimers at dawn in OSA plasmas reflect severity of apnoeic episodes[J]. *Eur Respir J*, 2012, 40 (3): 657–664.
- [17] Ding H, Guo H, Cao J. The importance of autophagy regulation in obstructive sleep apnea[J]. *Sleep Breath*, 2021, 25 (3): 1211–1218.
- [18] Hughes WE, Beyer AM, Guterman DD. Vascular autophagy in health and disease[J]. *Basic Res Cardiol*, 2020, 115 (4): 41.
- [19] Ikeda S, Zablocki D, Sadoshima J. The role of autophagy in death of cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2022, 165: 1–8.
- [20] Fader CM, Sanchez DG, Mestre MB, et al. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793 (12): 1901–1916.
- [21] Mojzisch A, Brehm MA. The manifold cellular functions of von Willebrand factor[J]. *Cells*, 2021, 10 (9): 2351.
- [22] 王铭铭, 薛梅, 杨琳, 等. 益气活血中药配伍双联抗血小板药物对人脐静脉内皮细胞损伤和内皮血小板黏附的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36 (7): 842–848.
- [23] Yang G, Wang N, Seto SW, et al. Hydroxysafflor yellow A protects brain microvascular endothelial cells against oxygen glucose deprivation/reoxygenation injury: involvement of inhibiting autophagy via class I PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Brain Res Bull*, 2018, 140: 243–257.
- [24] Hernández C, Barrachina MD, Vallecillo-Hernández J, et al. Aspirin-induced gastrointestinal damage is associated with an inhibition of epithelial cell autophagy[J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51 (7): 691–701.
- [25] Liu PP, Liu HH, Sun SH, et al. Aspirin alleviates cardiac fibrosis in mice by inhibiting autophagy[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38 (4): 488–497.
- [26] 何志旭, 廖清奎, 徐学聚, 等. 阿司匹林在内皮细胞抗氧化损伤中的作用 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2000, 39 (6): 255–261.
- (收稿: 2022–11–03 在线: 2023–05–23)
- 责任编辑: 白 霞