

## · 基础研究 ·

人参皂苷 Re 对氧化低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞 MEK/ERK/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

陈 莉 史大卓 别玉龙 黄弘博 魏康康 马晓娟

**摘要** 目的 基于丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶/核因子- $\kappa$ B (MEK/ERK/NF- $\kappa$ B) 信号通路探讨人参皂苷 Re (G-Re) 对氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 炎症反应的影响。方法 体外培养 HUVECs, 分别设置空白对照组、模型组 (ox-LDL 150  $\mu$ g/mL)、G-Re 组 (20  $\mu$ mol/L)、G-Re 加 MEK 抑制剂组 (G-Re 20  $\mu$ mol/L + U0126-EtOH 10  $\mu$ mol/L)。采用 CCK8 法检测细胞活力; ELISA 检测细胞上清液炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平; 免疫荧光检测 NF- $\kappa$ B 蛋白的荧光强度; Western Blot 和 RT-PCR 检测 MEK、ERK 和 NF- $\kappa$ B 蛋白和基因表达。结果 与空白对照组比较, 模型组细胞活力减弱 ( $P < 0.01$ ), 炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达升高 ( $P < 0.05$ ), NF- $\kappa$ B 蛋白的荧光强度增加 ( $P < 0.05$ ), MEK、ERK 和 NF- $\kappa$ B 蛋白及基因表达上调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较, G-Re 组干预后细胞活力增强 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), NF- $\kappa$ B 蛋白的荧光强度降低 ( $P < 0.05$ ), MEK、ERK 和 NF- $\kappa$ B 蛋白及基因表达下调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与 G-Re 组比较, G-Re 加 MEK 抑制剂组 ERK 和 NF- $\kappa$ B 基因和蛋白表达上调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论 G-Re 能够减轻 ox-LDL 诱导的 HUVECs 的炎症反应和内皮损伤, 其作用机制可能与抑制 MEK/ERK/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活有关。

**关键词** 人参皂苷 Re; 炎症反应; 丝裂原活化蛋白激酶; 细胞外调节蛋白激酶; 核因子- $\kappa$ B; 中药单体

**Effects of Ginsenoside Re on Ox-LDL-Induced MEK/ERK/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Human Umbilical Vein Endothelial Cells** CHEN Li, SHI Da-zhuo, BIE Yu-long, HUANG Hong-bo, WEI Kang-kang, and MA Xiao-juan *National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)*

**ABSTRACT Objective** To explore the effects of Ginsenoside Re (G-Re) on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced inflammatory response via mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated protein kinases/nuclear factor kappa-B (MEK/ERK/NF- $\kappa$ B) signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs were cultured *in vitro*. The experiments were divided into 4 groups, including control group, model group (ox-LDL 150  $\mu$ g/mL), ox-LDL + G-Re group (G-Re 20  $\mu$ mol/L), ox-LDL + G-Re + MEK inhibitor group (G-Re 20  $\mu$ mol/L + U0126-EtOH 10  $\mu$ mol/L). Cell viability was measured by CCK-8 assay, the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  were detected with enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), the protein expression of NF- $\kappa$ B was detected by immunofluorescence staining (IF). The mRNA and protein expression of MEK, ERK and NF- $\kappa$ B were respectively measured by Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. **Results** Compared with the control group, cell viability declined ( $P < 0.01$ ), the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  increased ( $P < 0.05$ ), the fluorescence intensity of NF- $\kappa$ B protein increased ( $P < 0.05$ ), the mRNA and protein expression of MEK, ERK and NF- $\kappa$ B increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in the model group. Compared with the model group, cell viability increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the levels of IL-6, and TNF- $\alpha$

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 82174214)

作者单位: 中国中医科学院西苑医院心血管中心 (北京 100091)

通讯作者: 马晓娟, Tel: 010-62835037, E-mail: abc\_mxj@aliyun.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20220615.225

reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the fluorescence intensity of NF- $\kappa$ B decreased ( $P<0.05$ ), the mRNA and protein expression of MEK, ERK and NF- $\kappa$ B decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) in the G-Re group. Compared with G-Re group, protein and mRNA expression of ERK and NF- $\kappa$ B decreased in ox-LDL + G-Re + MEK inhibitor group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** G-Re reduced inflammatory response and endothelial injury of HUVECs induced by ox-LDL, and the mechanism might be related to inhibit the activation of MEK/ERK/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**KEYWORDS** Ginsenoside Re; inflammation; mitogen-activated protein kinase kinase; extracellular regulated protein kinases; nuclear factor kappa-B; Chinese herbal monomer

动脉粥样硬化是一种主要累及大中动脉内膜为特征的慢性炎症性疾病,炎症反应伴随着动脉粥样硬化病变的始终<sup>[1]</sup>。动脉粥样硬化斑块的形成以脂质和复合糖类积聚沉积、血管炎症反应、平滑肌细胞增殖和迁移、细胞凋亡、坏死以及纤维化和钙质沉着为特征,导致动脉壁增厚变硬、血管腔狭窄<sup>[1-3]</sup>。内皮细胞损伤后引发的炎症细胞活化、炎症因子表达增加和一系列慢性炎症反应,是动脉硬化斑块形成的主要原因<sup>[4,5]</sup>。既往研究证明丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶/核因子- $\kappa$ B (mitogen-activated protein kinase / extracellular regulated protein kinase / nuclear factor kappa-B, MEK/ERK/NF- $\kappa$ B) 信号通路的激活与炎症反应密切相关,促进了动脉粥样硬化的形成<sup>[6,7]</sup>。MEK/ERK 信号通路是由激酶级联反应介导的信号传导通路,能够通过一系列的级联反应,激活靶基因转录,参与细胞的炎症反应、增殖、迁移和凋亡等过程,与动脉粥样硬化密切相关<sup>[7,8]</sup>。NF- $\kappa$ B 是炎症反应中的一个主要转录因子,以同源二聚体或异源二聚体的形式存在于胞质中,在受到细胞外刺激时被激活<sup>[9]</sup>。活化的核因子 NF- $\kappa$ B 诱导大量基因转录,包括炎症因子、黏附分子、趋化因子和急性期蛋白等,直接或间接地参与了动脉粥样硬化的过程<sup>[9,10]</sup>。因此,研究 MEK/ERK/NF- $\kappa$ B 信号通路对于防治动脉粥样硬化具有重要意义。

人参皂苷 Re (Ginsenoside Re, G-Re) 是中药人参和西洋参的主要皂苷成分,一种固醇类化合物。研究发现 G-Re 对心血管系统具有保护作用,如抗炎、抑制细胞凋亡、改善心肌再灌注损伤、和促进血管生成等<sup>[11,12]</sup>。研究表明, G-Re 可以通过抑制 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路的活化减轻炎症反应<sup>[13,14]</sup>,但其具体作用机制仍有待进一步探索。故本研究利用氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 损伤模型,通过检测细胞上清液炎症因子和炎症相关基因及蛋白表达变化,

探讨 G-Re 对血管内皮细胞的保护作用及对 MEK/ERK/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响,为中医药治疗动脉粥样硬化性疾病提供客观依据。

### 材料与方法

1 细胞 HUVECs 购自国家干细胞转化资源库。由中国中医科学院西苑医院基础所研究中心复苏、培养、传代、冻存。

2 药物 G-Re (批号: HY-N0044, 纯度为 98.15%) 购自 MedChemExpress 公司,取 9.48 mg G-Re 定溶于 125  $\mu$ L 的 DMSO 中,充分溶解,过滤,再加入 875  $\mu$ L 的培养基配成 9.48 mg/mL 母液, -20 $^{\circ}$ C 冰箱分装保存备用。氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 购自北京协生生物科技有限公司 (批号: UBC-ox-LDL5, 纯度 >97%), 4 $^{\circ}$ C 冰箱储存。MEK 抑制剂 U0126-EtOH (批号: HY-12031, 纯度为 99.41%) 购自 MedChemExpress 公司,取 10 mg 定溶于 325  $\mu$ L 的 DMSO 中,充分溶解,过滤,配成 30.7 mg/mL 母液, -20 $^{\circ}$ C 冰箱分装保存备用。

3 主要试剂及仪器 主要试剂: 内皮细胞培养基 (批号: 33406), 胎牛血清 (批号: 33266), 内皮细胞生长因子添加物 (批号: 33590), 青链霉素 (批号: 33688) 均购自美国 ScienCell 公司。PBS 缓冲液 (批号: YZH-0001) 购自北京索莱宝科技有限公司。IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 ELISA 试剂盒 (批号: EK106HS-96 和 EK182HS-96) 购自联科生物科技有限公司。BCA 蛋白测定试剂盒 (批号: P0012) 购自碧云天生物技术有限公司。细胞毒性活性检测试剂盒 (CCK-8, 批号: SY501) 购自东仁化学科技 (上海) 有限公司。Trizol Reagent (批号: 15596018) 购自美国 Invitrogen 公司。Anti-MEK 抗体 (9124S)、Anti-ERK1/2 抗体 (4695S)、Anti-NF- $\kappa$ B 抗体 (8242S) 购自美国 Cell Signaling Technology 生物科技有限公司。M-MLV 反转录试剂盒 (批号: RP1105) 购自北京索莱宝科技有限公司。Real-time PCR 扩增试剂盒

(批号: SR1110) 购自北京索莱宝科技有限公司。

主要仪器: Real-time PCR 仪: ABI7500 型, 美国 Applied Biosystems 公司。FC 型酶标仪: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。DOC XR+ 型全自动凝胶成像系统、计算机图像分析仪、半干转电转印仪、1658033 型垂直电泳槽: 美国 Bio-Rad 公司。SpectroFlex6100 型核酸紫外分光光度计: 德国 Eppendorf 公司。AE2000 型倒置相差显微镜及成像系统: 中国麦克奥迪实业集团有限公司。WHT20M 型恒温水浴箱: 美国 SHELLAB 公司。

#### 4 方法

4.1 细胞培养 将冻存的 HUVECs 置于 37 °C 恒温水浴锅, 迅速摇晃 EP 管进行解冻后, 800 r/min 离心 3 min, 弃掉冻存液后, 加入含 5% 胎牛血清的完全培养基中, 放置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。当细胞处于对数生长期且待细胞生长融合达 90% 左右时, 加胰蛋白酶消化细胞后, 收集细胞, 加入适量完全培养基混匀, 按 1:2 比例进行传代。实验用 4~6 代对数生长期细胞。

4.2 HUVECs 的体外干预诱导 取对数生长期的 HUVECs, 消化离心后计数, 调整细胞悬液密度为  $5 \times 10^3$  个/孔细胞, 完全培养基孵育 24 h。首先分别予以不同浓度的 ox-LDL 和 G-Re 干预 24 h 后, CCK-8 法检测细胞活力, 确定 ox-LDL 的造模浓度和 G-Re 的干预浓度。然后检测不同浓度 G-Re 对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 活力的影响, 实验分为空白对照组、ox-LDL 组、ox-LDL+G-Re (5  $\mu$ mol/L)、ox-LDL+G-Re (10  $\mu$ mol/L) 组、ox-LDL+G-Re (20  $\mu$ mol/L) 组、ox-LDL+G-Re (40  $\mu$ mol/L) 组, 确定 G-Re 后续实验的浓度。最后探讨 G-Re 对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 保护作用的机制, 实验分为 4 组: 空白对照组、ox-LDL 组、ox-LDL+G-Re 组、ox-LDL+G-Re+U0126-EtOH 组。药物组提前 2 h 分别给予 G-Re (20  $\mu$ mol/L) 和 LY294002 (10  $\mu$ mol/L) 预处理, 再加 ox-LDL 150  $\mu$ g/mL 继续孵育 24 h, 进行后续实验。

4.3 CCK8 法检测细胞活力 取对数生长期 HUVECs, 以  $5 \times 10^3$  个/mL 细胞密度接种于 96 孔板中, 按照分组进行药物处理 24 h 后, 每孔中加入混匀的 90  $\mu$ L 新的培养基和 10  $\mu$ L CCK-8 的混悬液, 培养箱内孵育 2 h, 酶标仪 450 nm 波长检测 OD 值。

4.4 ELISA 检测细胞上清液中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量 根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作。实验前从冰箱取出试剂盒和待检测样本, 回温; 按照浓度梯度稀释标准品, 每孔分别加入 100  $\mu$ L 稀释后的标准品

及样本, 封板后室温摇床 200 转摇晃 90 min; 洗液拍板清洗 5 次; 每孔加入 100  $\mu$ L 稀释的检测抗体, 封板后室温摇床 200 转摇晃 60 min; 洗液拍板清洗 5 次; 再加入 100  $\mu$ L 稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉素, 封板后室温摇床 200 转摇晃 45 min; 洗液拍板清洗 5 次; 每孔加入显色底物 TMB 50  $\mu$ L, 室温避光孵育 10 min; 每孔加终止液 50  $\mu$ L, 待颜色由蓝色变成黄色之后, 15 min 内酶标仪 450 nm 波长检测 OD 值。

4.5 免疫荧光检测 NF- $\kappa$ B 蛋白表达 将 HUVECs 以  $5 \times 10^4$  细胞/孔接种于覆盖有 24 mm  $\times$  24 mm 的方盖玻片的 6 孔板中。按照上述分组处理细胞后, 用 37 °C 预温的 PBS 洗 3 次, 加入预冷的组织固定液, 置于 4 °C 冰箱固定 15 min; PBS 清洗 3 次后, 0.5% Triton X-100 室温通透 30 min; PBS 清洗 3 次后, 在玻片上滴加正常山羊血清, 室温封闭 30 min; 将稀释好的 NF- $\kappa$ B 一抗加入载玻片中, 装进湿盒, 4 °C 孵育过夜; PBS 清洗 3 次后, 加入荧光二抗, 装进湿盒, 避光孵育 2 h; PBS 清洗 3 次后, 滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 观察并采集图像。

4.6 Western Blot 检测 MEK、ERK、NF- $\kappa$ B 蛋白表达 以 T75 的培养瓶培养细胞, 按照上述分组处理细胞 24 h 后, PBS 清洗细胞 3 次后, 胰酶消化后收集细胞于 EP 管中, 每管加入 50  $\mu$ L 的细胞裂解液, 冰上裂解 20 min 后, 10 000 r/min 离心 10 min, 将上清移至另一预冷的 EP 管中。BCA 蛋白测定试剂盒对蛋白进行定量, 调整蛋白浓度保持每组上样量一致。每孔取相等蛋白样品 (10  $\mu$ g/孔), 进行电泳及转膜实验后, WB 封闭液封闭 1 h, PVDF 浸泡于稀释后的一抗 MEK、ERK 和 NF- $\kappa$ B (1:2 000) 及 GAPDH (1:3 000) 中, 4 °C 冰箱摇床孵育过夜后, 漂洗 PVDF 膜; 再加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (1:3 000), 摇床孵育 1 h, 漂洗 PVDF 膜; 在 PVDF 膜上滴加配置好的显影液, 然后置于凝胶图像分析仪进行曝光。分析图片目的条带的灰度值。

4.7 RT-PCR 检测 MEK、ERK、NF- $\kappa$ B 基因表达 以 T25 培养瓶培养细胞, 按照上述分组处理细胞 24 h 后, PBS 清洗 3 次, 然后每瓶加入 1 mL Trizol, 吹打裂解细胞后, 收集细胞到 EP 管中。每管分别加入氯仿 200  $\mu$ L、异丙醇 500  $\mu$ L 提取细胞中 RNA, 核酸紫外分光光度计测定 RNA 纯度及浓度。M-MLV 反转录试剂盒进行反转录。引物序列见表 1。计算方法: 相对定量  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析结果,  $\Delta Ct$  等于样本目的基因的 Ct 值 - 样本管家基因的 Ct 值;  $\Delta\Delta Ct$  (- $\Delta\Delta Ct$ ) 等于  $\Delta Ct$  - 对照组的均值。

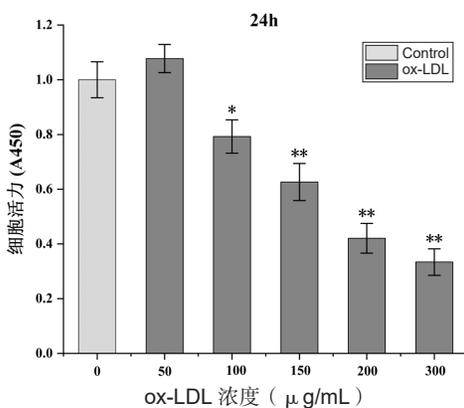
表 1 引物序列

基因名称	引物序列	产物 (bp)
ERK	正向: 5'-TTCCAAGGGTTATACCAAGTCC-3'	110
	反向: 5'-TCAGCTGGTCAAGGTAATGC-3'	
MEK	正向: 5'-GGTGGAGTGGTCTTCAAGGT-3'	67
	反向: 5'-GGTGGATCAGCTTTCTAGCC-3'	
NF-κ B	正向: 5'-GCTACACAGAGGCCATTGAA-3'	142
	反向: 5'-TCCCGGAGTTCATCTATGTG-3'	
GAPDH	正向: 5'-TGCCCCATGTTTGTGATG-3'	151
	反向: 5'-TGTGGTCATGAGCCCTTCC-3'	

4.8 统计学方法 数据统计分析采用 SPSS 27.0 软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 同时进行方差齐性检验, 方差齐采用 LSD-t 检验, 不齐采用 Tamhane-t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

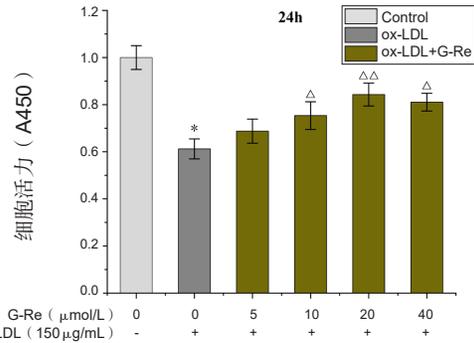
1 ox-LDL 对 HUVECs 活力的影响 (图 1) 与空白对照组比较, 50  $\mu\text{g/mL}$  的 ox-LDL 作用于细胞 24 h 后, 对细胞活力无明显影响 ( $P > 0.05$ ), 100、150、200、300  $\mu\text{g/mL}$  ox-LDL 作用于细胞 24 h 后, 细胞活力下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 分别下降了 21%、37%、58% 和 67%。根据实验结果选定 150  $\mu\text{g/mL}$  的 ox-LDL 干预 24 h 后进行后续实验。



注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 1 ox-LDL 对 HUVECs 活力的影响

2 G-Re 对 ox-LDL 诱导 HUVECs 活力的影响 (图 2) 与空白对照组比较, ox-LDL (150  $\mu\text{g/mL}$ ) 明显降低了细胞活力 ( $P < 0.01$ )。与 ox-LDL 组比较, 浓度为 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  的 G-Re 增加了细胞活力 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 其中 20  $\mu\text{mol/L}$  促细胞活力作用最显著; 后续实验选用浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  的 G-Re 进行干预。



注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 ox-LDL 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

图 2 G-Re 对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 活力的影响

3 各组 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平比较 (表 2) 与空白对照组比较, 150  $\mu\text{g/mL}$  的 ox-LDL 干预后明显促进了炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平 ( $P < 0.01$ )。与 ox-LDL 组比较, 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  的 G-Re 抑制了 ox-LDL 诱导的炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表 2 各组 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平比较 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

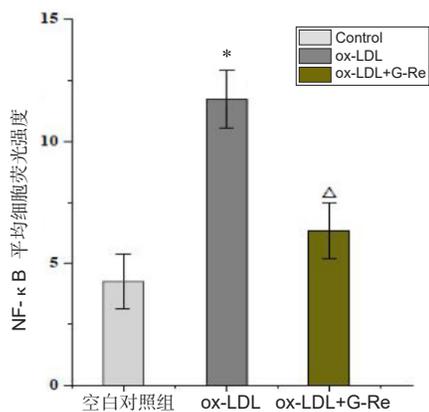
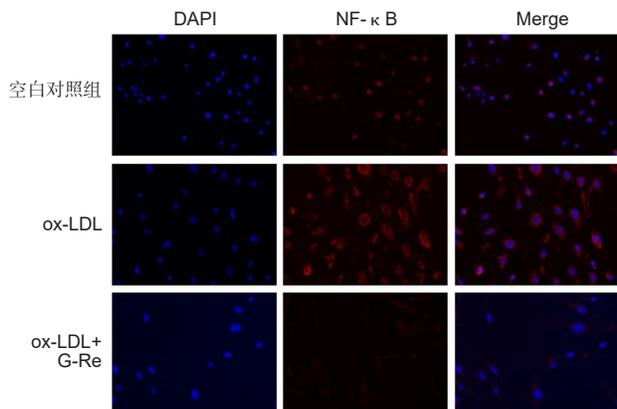
组别	n	IL-6	TNF- $\alpha$
空白对照	6	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.11
ox-LDL	6	2.25 $\pm$ 0.18*	1.97 $\pm$ 0.17*
ox-LDL+G-Re (10 $\mu\text{mol/L}$ )	6	1.94 $\pm$ 0.15 $\Delta$	1.61 $\pm$ 0.19 $\Delta$
ox-LDL+G-Re (20 $\mu\text{mol/L}$ )	6	1.68 $\pm$ 0.17 $\Delta\Delta$	1.50 $\pm$ 0.13 $\Delta\Delta$
ox-LDL+G-Re (40 $\mu\text{mol/L}$ )	6	1.31 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$	1.37 $\pm$ 0.14 $\Delta\Delta$

注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 ox-LDL 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

4 各组 NF- $\kappa$ B 蛋白荧光表达比较 (图 3) 与空白对照组比较, ox-LDL 明显增加了 NF- $\kappa$ B 蛋白荧光强度 ( $P < 0.05$ )。与 ox-LDL 组比较, G-Re 干预后降低了 NF- $\kappa$ B 蛋白荧光强度 ( $P < 0.05$ )。

5 各组 MEK、ERK、NF- $\kappa$ B 蛋白表达比较 (图 4, 表 3) 与空白对照组比较, ox-LDL 组 MEK、ERK、NF- $\kappa$ B 蛋白表达上调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与 ox-LDL 比较, G-Re 组 MEK、ERK、NF- $\kappa$ B 蛋白表达下调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与 ox-LDL+G-Re 组比较, 加用 MEK 抑制剂 U0126-EtOH 后, 部分拮抗了 G-Re 抑制 ERK 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的作用 ( $P < 0.05$ )。

6 各组 MEK、ERK、NF- $\kappa$ B 基因表达水平比较 (表 4) 与空白对照组比较, ox-LDL 组 MEK、ERK、NF- $\kappa$ B 基因表达均上调 ( $P < 0.01$ )。与 ox-LDL 组比较, G-Re 组 MEK、ERK、NF- $\kappa$ B 基因表达下调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与 ox-LDL+G-Re 组比较, 加用 MEK 抑制剂 U0126-EtOH 后, 部分拮抗了 G-Re 抑制 ERK 和 NF- $\kappa$ B 基因表达的作用 ( $P < 0.05$ )。

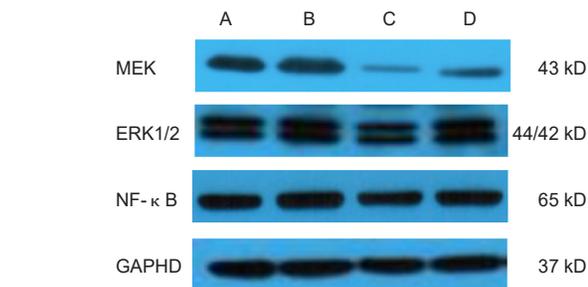


注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较,  $\Delta P < 0.05$

图 3 各组 NF- $\kappa$  B 蛋白荧光表达比较

### 讨论

动脉粥样硬化是严重危害人类健康的慢性炎症性疾病, 是缺血性心血管疾病的病理基础。炎症反应贯穿于动脉粥样硬化发生、发展的各个病理环节, 与斑块的形成和稳定性密切相关<sup>[1]</sup>。动脉粥样硬化的发病机制十分复杂, “脂质氧化修饰学说”和“内皮损伤学说”都阐释了动脉粥样硬化的形成过程<sup>[14]</sup>。



注: A 为空白对照组; B 为 ox-LDL 组; C 为 ox-LDL+G-Re 组; D 为 ox-LDL+G-Re+U0126-EtOH 组

图 4 各组 MEK、ERK 和 NF- $\kappa$  B 蛋白印迹图

ox-LDL 可诱导巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞表达黏附分子、趋化因子、炎症因子和其他炎症介质, 触发动脉粥样硬化的炎症反应<sup>[14-16]</sup>。因此, 研究 ox-LDL 诱导的内皮炎症反应和损伤机制, 并予以中药有效成分进行干预, 有助于中医药在心血管疾病临床治疗中的运用。

动脉粥样硬化发生早期, 各种危险因素导致内皮功能障碍, 内皮通透性增加, 低密度脂蛋白胆固醇和其他含载脂蛋白 B 的脂蛋白跨受损的内膜, 沉积在内膜下, 经氧化修饰成 ox-LDL<sup>[15, 16]</sup>。巨噬细胞吞噬 ox-LDL, 在炎症因子和其他介质的作用下, 最终演变为泡沫细胞, 形成脂肪条纹, 这是动脉粥样硬化最早见的病理改变。随着病变进展, 炎性细胞分泌更多的炎性因子, 加剧炎症反应, 进一步促进了斑块的进展和血栓形成。因此, 本研究选用 ox-LDL 诱导内皮细胞的炎症反应, 能更有效的模拟 ox-LDL 对内皮的损伤作用。不同内皮细胞的选择对于内皮损伤模型的成功构建起着重要作用, 本研究选择人脐静脉内皮细胞进行研究, 主要原因在于人脐静脉内皮细胞在传代和培养的过程中具有稳定的特性, 能够维持内皮细

表 3 各组 MEK、ERK、NF- $\kappa$  B 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MEK	ERK	NF- $\kappa$ B
空白对照	3	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.18
ox-LDL	3	3.68 ± 0.47**	1.97 ± 0.32**	1.54 ± 0.26*
ox-LDL+G-Re	3	1.19 ± 0.26 $\Delta\Delta$	1.13 ± 0.21 $\Delta$	0.82 ± 0.15 $\Delta$
ox-LDL+G-Re+U0126-EtOH	3	1.44 ± 0.23	1.85 ± 0.22 $\Delta$	1.27 ± 0.23 $\Delta$

注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 ox-LDL 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与 ox-LDL+G-Re 组比较,  $\Delta P < 0.05$

表 4 各组 MEK、ERK、NF- $\kappa$  B 基因表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MEK	ERK	NF- $\kappa$ B
空白对照	6	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.14
ox-LDL	6	3.31 ± 0.27*	2.58 ± 0.24*	2.93 ± 0.22*
ox-LDL+G-Re	6	1.75 ± 0.18 $\Delta$	1.43 ± 0.21 $\Delta$	1.89 ± 0.16 $\Delta$
ox-LDL+G-Re+U0126-EtOH	6	1.64 ± 0.25	1.96 ± 0.19 $\Delta$	2.35 ± 0.20 $\Delta$

注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 ox-LDL 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与 ox-LDL+G-Re 组比较,  $\Delta P < 0.05$

胞的功能和结构<sup>[17]</sup>。

人参皂苷是人参和西洋参的主要皂苷成分，是一种固醇类化合物。G-Re 是人参皂苷的重要组成部分，属于四环三萜类的衍生物<sup>[11, 12]</sup>。研究证实，G-Re 对心血管系统、中枢神经系统和免疫系统均有一定的保护作用。特别是在心血管疾病的防治上具有重要作用，如可以促进血管舒张和血管生成、改善心肌再灌注损伤、抗炎和抑制细胞凋亡<sup>[11, 12]</sup>。Lee IA 等<sup>[14]</sup>发现 G-Re 可以抑制巨噬细胞中脂多糖与 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的结合而减轻炎症反应，其机制与抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化相关。Yang K 等<sup>[18]</sup>发现 G-Re 联合丹酚酸 B 可以减轻 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡，其机制与抑制氧化应激和炎症反应有关。Gao C 等<sup>[19]</sup>发现 G-Re 通过抑制 Ras/ERK1/2 通路的活化，减轻血管内膜增生和损伤。因此，本研究选用 G-Re 干预 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症反应，通过探讨其对 MEK/ERK/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响，以期发现 G-Re 抗动脉粥样硬化的作用机制。研究发现，予以不同浓度的 G-Re 干预 ox-LDL 诱导的 HUVECs 后显著增加了内皮细胞的活力，特别是 20  $\mu$ mol/L 的 G-Re 较 10  $\mu$ mol/L 和 40  $\mu$ mol/L 效果最佳。其可能原因是随着 G-Re 浓度的增加，会对细胞产生一定的毒性作用，因此 20  $\mu$ mol/L 的 G-Re 可能是最佳干预浓度。

炎症反应不仅可以促进斑块的形成，对心血管事件的发生也起着重要作用。IL-6 属于促炎因子，是预测动脉粥样斑块的炎性标志物<sup>[20]</sup>。研究发现在急性心肌梗死和不稳定型心绞痛的患者中，血浆 IL-6 水平升高<sup>[21]</sup>。此外，IL-6 还可刺激血小板聚集、促进超敏 C 反应蛋白、纤维蛋白原和其他炎症因子的表达。TNF- $\alpha$  是参与动脉粥样硬化进展的炎性细胞因子之一，可以诱导肝细胞急性期蛋白的合成和刺激其他细胞产生 IL-6<sup>[22]</sup>。本研究通过 ELISA 检测了 G-Re 对 ox-LDL 诱导的炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平的影响。研究发现，同空白对照组比较，ox-LDL 增加 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平，予以 G-Re 处理后，明显降低 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平，减轻了内皮细胞的炎症反应。

MEK 和 ERK 是重要的细胞内信号转导激酶，能将细胞外信号转导至细胞核，以应对各种不同的刺激，如细胞增殖、炎症反应及应激反应等<sup>[7, 8]</sup>。MEK/ERK 信号通路的激活与炎症反应密切相关，可以促进炎症小体的生成和加剧炎症反应。NF- $\kappa$ B 二聚体通过与抑制剂  $\kappa$ B 结合，以未活化状态存在于胞质中。多种危险因素诱导 NF- $\kappa$ B 的激活主要是

通过核因子  $\kappa$ B 抑制因子  $\alpha$  (inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ ) 降解后，NF- $\kappa$ B 复合物，包括 p50/p65 二聚体随即进入细胞核，与 DNA 上的 NF- $\kappa$ B 结合位点结合并启动基因表达，诱导炎症或免疫反应<sup>[9, 10]</sup>。吴雨潇等<sup>[23]</sup>发现 MAPK/ERK/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活与炎症因子的表达和炎症反应密切相关。Song J 等<sup>[7]</sup>发现在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症反应过程中，MicroRNA-181a 高表达可以抑制 MEK/ERK/NF- $\kappa$ B 通路的活化和炎症小体的形成，发挥抑制炎症反应的作用。本研究发现，同空白对照组相比，ox-LDL 组中 MEK、ERK、NF- $\kappa$ B 的基因和蛋白表达水平都明显增加；予以 G-Re 干预了，降低了 MEK、ERK、NF- $\kappa$ B 基因和蛋白表达；同 ox-LDL+G-Re 组较，加用 MEK 的抑制剂 U0126-EtOH 后，部分拮抗了 G-Re 抑制 ERK 和 NF- $\kappa$ B 表达的作用。说明 G-Re 可以抑制 MEK/ERK/NF- $\kappa$ B 通路的活化，减低炎症因子的表达，发挥抗炎和保护血管内皮的作用。

综上所述，G-Re 可通过降低炎症因子的表达，减轻内皮细胞的炎症反应和改善内皮损伤，其机制与抑制 MEK/ERK/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。本研究是基于体外实验阐释 G-Re 抗炎的作用，后续可以通过在体实验进一步研究 G-Re 的抗炎作用及机制，为动脉粥样硬化的治疗奠定基础。

**利益冲突：**本论文所涉及各方面均无任何利益方面的冲突。

#### 参 考 文 献

- [1] Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2018, 123 (10): 1118-1120.
- [2] Taleb S. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2016, 109 (12): 708-715.
- [3] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. *Nature*, 2021, 592 (7855): 524-533.
- [4] Gimbrone MJ, García-Cardeña G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118 (4): 620-636.
- [5] Xu S, Ilyas I, Little PJ, et al. Endothelial Dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies[J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73 (3): 924-967.
- [6] Peng Q, Yin R, Zhu X, et al. miR-155 activates the NLRP3 inflammasome by regulating the MEK/ERK/

- NF- $\kappa$ B pathway in carotid atherosclerotic plaques in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. 2022, 78 (2): 365–375.
- [ 7 ] Song J, Yang S, Yin R, et al. MicroRNA-181a regulates the activation of the NLRP3 inflammatory pathway by targeting MEK1 in THP-1 macrophages stimulated by ox-LDL[J]. J Cell Biochem, 2019, 120 (8): 13640–13650.
- [ 8 ] Siasos G, Tousoulis D, Siasou Z, et al. Shear stress, protein kinases and atherosclerosis [J]. Curr Med Chem, 2007, 14 (14): 1567–1572.
- [ 9 ] Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease[J]. Cell Metab, 2011, 13 (1): 11–22.
- [ 10 ] Niu N, Xu S, Xu Y, et al. Targeting Mechanosensitive Transcription Factors in Atherosclerosis[J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40 (4): 253–266.
- [ 11 ] Peng L, Sun S, Xie LH, et al. Ginsenoside Re: pharmacological effects on cardiovascular system [J]. Cardiovasc Ther, 2012, 30 (4): e183–e188.
- [ 12 ] Lim KH, Lim DJ, Kim JH. Ginsenoside-Re ameliorates ischemia and reperfusion injury in the heart: a hemodynamics approach[J]. J Ginseng Res, 2013, 37 (3): 283–292.
- [ 13 ] Madhi I, Kim JH, Shin JE, et al. Ginsenoside Re exhibits neuroprotective effects by inhibiting neuroinflammation via CAMK/MAPK/NF- $\kappa$ B signaling in microglia[J]. Mol Med Rep, 2021, 24 (4): 698.
- [ 14 ] Lee IA, Hyam SR, Jang SE, et al. Ginsenoside Re ameliorates inflammation by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to TLR4 on macrophages[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60 (38): 9595–9602.
- [ 15 ] 胥雪莲, 何川. 炎症与动脉粥样硬化 [J]. 心血管病学进展, 2015, 36 (5): 634–637.
- [ 16 ] Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 152786.
- [ 17 ] Mineo C. Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis[J]. Cardiovasc Res, 2020, 116 (7): 1254–1274.
- [ 18 ] 王刚, 张凯伦. 人脐静脉内皮细胞的研究和应用 [J]. 医学综述, 2011, 17 (7): 972–975.
- [ 19 ] Yang K, Luo Y, Lu S, et al. Salvianolic acid B and Ginsenoside Re synergistically protect against Ox-LDL-induced endothelial apoptosis through the antioxidative and antiinflammatory mechanisms[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 662.
- [ 20 ] Gao C, Zhang K, Liang F, et al. Inhibition of the Ras/ERK1/2 pathway contributes to the protective effect of ginsenoside Re against intimal hyperplasia[J]. Food Funct, 2021, 12 (15): 6755–6765.
- [ 21 ] Tyrrell DJ, Goldstein DR. Ageing and atherosclerosis: vascular intrinsic and extrinsic factors and potential role of IL-6[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18 (1): 58–68.
- [ 22 ] Ridker PM, Rane M. Interleukin-6 signaling and anti-interleukin-6 therapeutics in cardiovascular disease[J]. Circ Res, 2021, 128 (11): 1728–1746.
- [ 23 ] Farmer JA, Torre-Amione G. Atherosclerosis and inflammation[J]. Curr Atheroscler Rep, 2002, 4 (2): 92–98.
- [ 24 ] 吴雨潇. 黄芪甲苷经 p38MAPK/ERK/NF- $\kappa$ B 信号通路调控 PM2.5 诱导肺损伤中炎症因子和氧化应激的表达 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.

(收稿: 2022-04-01 在线: 2023-11-01)

责任编辑: 白 霞