

丁苯酞修饰新型自组装短肽对氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的影响

朱凌波 龚心琰 龚剑萍 倪市毛 宣云岗

[摘要] 目的 研究丁苯酞修饰新型自组装短肽(NBP-SAP)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)损伤血管内皮细胞的影响及与信号通路关系。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs)并分为NBP-SAP+LY组、NBP-SAP组、ox-LDL组和对照组,分别给予NBP-SAP+LY450139+ox-LDL、NBP-SAP+ox-LDL、ox-LDL及对照处理。Realtime-qPCR法检测不同措施处理后HUVECs中血管内皮生长因子(VEGF)/血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)-Notch1/DLL4通路相关基因表达,Western blot法检测VEGF/VEGFR2-Notch1、DLL4通路相关蛋白表达量,CCK-8法、Annexin-V/PI双染法、Transwell法分别检测各组细胞活力、细胞凋亡率及细胞侵袭力等。结果 NBP-SAP组较ox-LDL组48 h细胞活力及细胞侵袭力增强,细胞凋亡率下降(t 分别=3.59、2.91、2.44, P 均 <0.05), VEGFR-2、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白表达量上调(t 分别=12.57、14.49, P 均 <0.05), Notch1、Bax蛋白表达量和DLL4、Notch1、Bax基因mRNA表达下调(t 分别=11.30、12.41、13.08、13.16、6.96, P 均 <0.05)。NBP-SAP+LY组较NBP-SAP组48 h时改善损伤细胞活力、侵袭力的作用减弱,细胞凋亡率升高(t 分别=4.38、3.92、4.07, P 均 <0.05), Notch1、Bax的蛋白表达量上调(t 分别=8.59、20.18, P 均 <0.05), VEGFR-2、Bcl-2蛋白表达量和VEGF、VEGFR-2、Bcl-2基因mRNA表达下调(t 分别=14.18、11.23、12.96、19.93、20.33, P 均 <0.05)。结论 NBP-SAP能够激活VEGF/VEGFR2-Notch1/DLL4信号通路,减轻ox-LDL损伤血管内皮细胞的作用。

[关键词] 自组装短肽; 氧化低密度脂蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 血管内皮生长因子; 信号通路

Effect of novel self-assembled peptide modified by butylphthalide on ox-LDL-induced vascular endothelial cell injury ZHU Lingbo, GONG Xinyan, GONG Jianping, et al. Department of Cardiovascular Medicine, Yiwu Central Hospital, Yiwu 322000, China.

[Abstract] **Objective** To evaluate the role of novel self-assembled peptide modified by butylphthalide (NBP-SAP) in the injury of vascular endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), and its relationship with vascular endothelial growth factor (VEGF)/Notch1 signaling pathway. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into NBP-SAP+LY group, NBP-SAP group, ox-LDL group and control group and treated with NBP-SAP plus LY450139 plus ox-LDL, NBP-SAP plus ox-LDL, ox-LDL, phosphate buffer solution. Real-time-qPCR method was used to detect the expression of genes related to VEGF/Notch1 pathway in HUVECs treated with different and Western blot method were used to detect the expression of proteins related to VEGF/Notch1 pathway, CCK-8 method, Annexin-V/PI double staining method and Transwell method were used to detect the cell viability, apoptosis rate and cell invasion and migration of each group. **Results** Compared to the ox-LDL group, NBP-SAP treatment can improve the damage caused by ox-LDL, enhance the cell vitality and migration, while decrease the apoptosis rate at 48 h ($t=3.59, 2.91, 2.44, P<0.05$). The protein expression of VEGFR-2 and Bcl-2 in cells were also increased ($t=12.57, 14.49, P<0.05$). The protein expression of Notch1 and Bax and the mRNA levels of DLL4, Notch1 and Bax genes was down-regulated ($t=11.30, 12.41, 13.08, 13.16, 6.96, P<0.05$).

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.003.004

基金项目:义乌市科技计划项目(19-3-117);金华市科技计划项目(2019-4-136)

作者单位:322000 浙江义乌,义乌市中心医院心血管内科

ed ($t=11.30, 12.41, 13.08, 13.16, 6.96, P<0.05$). Compared with the NBP-SAP group at 48 h, the NBP-SAP+LY group weakened the effect of improving the viability and invasiveness of injured cells, and the apoptosis rate increased ($t=4.38, 3.92, 4.07,$

$P < 0.05$), the protein expression of Notch1, Bax increased ($t=8.59, 20.18, P < 0.05$), and the protein expression of VEGFR-2, Bcl-2 were up-regulated and the mRNA levels of VEGFR-2, VEGF, Bcl-2 were down-regulated at 48 h ($t=14.18, 11.23, 12.96, 19.93, 20.33, P < 0.05$). **Conclusion** NBP-SAP can alleviate the injury of vascular endothelial cells induced by ox-LDL by activating VEGF/VEGFR2-Notch1/DLL4 pathway.

[Key words] self-assembling peptide; oxidized low density lipoprotein; human umbilical vein endothelial cells; vascular endothelial growth factor; notch signaling pathway

动脉粥样硬化是心脑血管病主要始动因素之一。氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)可损伤血管内皮细胞,启动动脉粥样硬化过程。研究发现丁苯酞(butylphthalide, NBP)可促进血管新生,改善血管内皮的损伤^[1]。新型自组装短肽(self-assembling peptide, SAP)可自主形成三维结构,于炎性细胞黏附、迁移,血管新生等过程中发挥作用^[2,3]。相较于传统药物,丁苯酞修饰新型自组装短肽(self-assembled peptide modified by butylphthalide, NBP-SAP)对 ox-LDL 损伤血管内皮细胞的影响未见报道。本次研究主要探索 NBP-SAP 促进血管内皮修复、血管形成与再生的机制。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养与分组处理 本次研究于 2020 年 3 月至 2020 年 10 月进行。SAP 由成都赛思贝生物科技有限公司生产。人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)购自中科院上海生命科学院细胞中心。HUVECs 细胞传代扩增后分四组处理。NBP-SAP+LY 组加入 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ox-LDL 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NBP-SAP 和 20 nmol/ml LY450139 共同培养; NBP-SAP 组加入 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ox-LDL 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NBP-SAP 共同培养; ox-LDL 组加入 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ox-LDL 共同培养; 对照组用 DMEM 完全培养基(由 Gibco 公司生产)培养。

1.2 细胞活力(细胞增殖)检测 HUVECs 细胞接种培养板内, 8 h 后观察细胞贴壁, 按分组加入 ox-LDL、NBP-SAP、LY450139 等, 分别在 0 h、24 h、36 h、48 h 及 72 h 时培养孔内加入 CCK-8 试剂盒检测液, 入 CO_2 培养箱培养 4 h 后, 测波长 450 nm 记录对应吸光度(optical density, OD)值。

1.3 细胞凋亡率检测 采用 Annexin V-PI 双染法。HUVECs 细胞经接种、贴壁, 融合度为 80% 后, 按分组加入 ox-LDL、NBP-SAP、LY450139 等试剂干预 48 h, 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次, 250 μl 0.25% 无

EDTA 胰酶消化, 离心后弃上清液, 磷酸盐缓冲液重悬并计数。取 1×10^5 个重悬细胞离心弃上清液, 加入 195 μl Annexin V-PI 结合液重悬细胞, 加入 5 μl Annexin V-PI 和 10 μl 碘化丙啶染色液, 室温避光孵育 15 min, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.4 细胞侵袭力检测 采用 Transwell 法。制备 Transwell 小室, 消化细胞, 1% FBS 低血清培养基制备终浓度为 1×10^5 个/ml 的细胞悬浮母液, 加入小室的上室面, 每孔 200 μl , 下室按分组加入 500 μl 含有 ox-LDL、NBP-SAP、LY450139 等试剂的培养基。培养板放入培养箱 48 h 取出, 棉球擦去上室面细胞, 结晶紫染色, 倒置拍照。每组均设置三次重复, 随机每孔选取三个视野, 统计平均值。

1.5 蛋白表达检测 采用 Western Blotting 法。HUVECs 细胞经接种、贴壁后, 融合度为 60% 时, 按分组加入 ox-LDL、NBP-SAP、LY450139 等试剂干预 48 h。PMSF 的蛋白裂解液处理后使用 BCA 试剂盒测蛋白量, 加入对应浓度 SDS-PAGE 胶, marker 及待测样品入凝胶电泳, 蛋白转膜导入 PVDF 膜, 加 Bcl-2、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)-2、Bax、 β -actin、Notch1 一抗孵育过夜后回收一抗, 加入相应的二抗, 回收二抗, 显影液显影。扫描各条带灰度值, 计算蛋白表达量。

1.6 基因表达检测 采用实时定量荧光 PCR 检测。HUVECs 经接种、贴壁后, 融合度为 80% 时, 按分组加入 ox-LDL、NBP-SAP、LY450139 等试剂干预 48 h; TriZOL 法提取细胞总 RNA, 检测 RNA 浓度及 A_{260}/A_{280} 。确认样本合格后进行反转录 PCR, 得到 cDNA 后进行 qPCR。相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行测定。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 和 Graph-Pad Prism 8.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间计量资料比较采用 LSD- t 检验; 计数资料比较采用 χ^2 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同时点的细胞活力OD值比较见表1

表1 各组不同时点的细胞活力OD值比较

组别	n	0 h	24 h	36 h	48 h	72 h
NBP-SAP+LY组	9	0.41 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.76 ± 0.04	1.31 ± 0.04 [△]	1.98 ± 0.08
NBP-SAP组	9	0.38 ± 0.01	0.72 ± 0.01	0.99 ± 0.06	1.93 ± 0.12 [*]	2.63 ± 0.04
ox-LDL组	9	0.38 ± 0.02	0.52 ± 0.02	0.72 ± 0.02	1.25 ± 0.03 [*]	1.66 ± 0.11
对照组	9	0.38 ± 0.02	0.81 ± 0.02	1.07 ± 0.07	2.06 ± 0.14	2.84 ± 0.15

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与 ox-LDL 组比较, $P < 0.05$; [△]: 与 NBP-SAP 组比较, $P < 0.05$ 。

由表1可见,干预0 h时各组细胞活力OD值比较,差异无统计学意义($F=2.01, P > 0.05$)。干预24 h、36 h、48 h、72 h时,各组的细胞活力OD值比较,差异均有统计学意义(F 分别=147.7、33.53、57.79、88.19, P 均 < 0.05)。干预48 h时,ox-LDL组较对照组的OD值下降($t=2.98, P < 0.05$),NBP-SAP组较ox-LDL组的OD值上升($t=3.59, P < 0.05$),NBP-SAP+LY组较NBP-SAP组的OD值下降($t=4.38, P < 0.05$)。

2.2 各组细胞干预48 h时培养孔内的细胞数量比较见图2

由封二图1可见,干预48 h时,ox-LDL组较对照组培养孔内细胞数量减少,NBP-SAP组较ox-LDL组培养孔内细胞数量增加;NBP-SAP+LY组较NBP-SAP组培养孔内细胞数量减少。

2.3 各组细胞干预48 h时凋亡率和细胞侵袭能力比较见表2

由表2可见,干预48 h时,各组细胞凋亡率和细胞侵袭能力比较,差异均有统计学意义(F 分别=226.80、208.50, P 均 < 0.05),其中ox-LDL组较对照组细胞凋亡率增高,细胞侵袭力减弱(t 分别=3.14、2.67, P 均 < 0.05);NBP-SAP组较ox-LDL组细胞凋

亡率降低,细胞侵袭力增强(t 分别=2.44、2.91, P 均 < 0.05);NBP-SAP+LY组较NBP-SAP组的细胞凋亡率增高,细胞侵袭力减弱(t 分别=4.07、3.92, P 均 < 0.05)。

表2 各组细胞干预48 h时凋亡率和细胞侵袭能力比较

组别	n	细胞凋亡率/%	侵袭细胞数量
NBP-SAP+LY组	9	61.17 ± 3.00 [△]	27.33 ± 5.13 [△]
NBP-SAP组	9	21.43 ± 2.67 [#]	126.00 ± 7.00 [#]
ox-LDL组	9	67.07 ± 1.71 [*]	37.67 ± 6.03 [*]
对照组	9	18.83 ± 3.03	155.00 ± 11.79

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与 ox-LDL 组比较, $P < 0.05$; [△]: 与 NBP-SAP 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 各组细胞干预48 h时细胞侵袭能力比较见图3

由封三图2可见,干预48 h时,ox-LDL组较对照组穿透细胞基质膜的细胞数量减少,细胞侵袭力减弱;NBP-SAP组较ox-LDL组穿透细胞基质膜的细胞数量增加,细胞侵袭力有所增强;NBP-SAP+LY组较NBP-SAP组穿透细胞基质膜的细胞数量有所减少,表明阻断信号通路后,细胞侵袭力减弱。

2.5 各组细胞干预48 h时蛋白表达量比较见图1

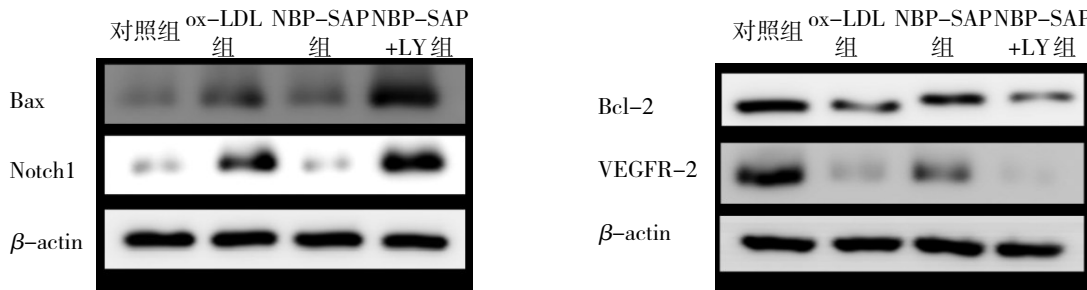


图1 各组细胞干预48 h时蛋白表达量比较

由图1可见,干预48 h时,ox-LDL组较对照组细胞中Bax、Notch1的蛋白表达量上调,Bcl-2、VEGFR-2的蛋白表达量下调(t 分别=8.59、13.93、10.00、28.83, P 均 < 0.05);NBP-SAP组较ox-LDL

组VEGFR-2、Bcl-2的蛋白表达量上调,Bax、Notch1的表达量下调(t 分别=12.57、14.49、12.41、11.30, P 均 < 0.05);NBP-SAP+LY组较NBP-SAP组细胞中Bax、Notch1的蛋白表达量上调,Bcl-2、

VEGFR-2的蛋白表达量下调(t 分别=20.18、8.59、11.23、14.18, P 均 <0.05)。

2.6 各组细胞干预48 h时 VEGF/Notch 通路相关基因 mRNA 相对表达量的比较见表3

表3 各组细胞干预48 h时 VEGF/Notch 通路相关基因 mRNA 相对表达量的比较

组别	Bax	Notch1	DLL4	Bcl-2	VEGF	VEGFR-2
NBP-SAP+LY 组	9.84 ± 0.63	9.63 ± 0.70	20.84 ± 1.11	0.31 ± 0.02 [#]	0.24 ± 0.03 [#]	0.13 ± 0.01 [#]
NBP-SAP 组	0.93 ± 0.10 [*]	1.14 ± 0.12 [*]	0.91 ± 0.08 [*]	1.06 ± 0.11	0.93 ± 0.06	0.95 ± 0.07
ox-LDL 组	12.66 ± 1.54	10.57 ± 1.22	20.66 ± 2.01	0.24 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.10 ± 0.01

注:*,与 ox-LDL 组比较, $P < 0.05$; #,与 NBP-SAP 组比较, $P < 0.05$ 。

由表3可见,以对照组为基线,干预48 h时, NBP-SAP 组较 ox-LDL 组 DLL4、Notch1、Bax 基因 mRNA 表达下调(t 分别=13.08、13.16、6.96, P 均 <0.05)。NBP-SAP+LY 组较 NBP-SAP 组 VEGF、VEGFR-2、Bcl-2 基因 mRNA 表达下调(t 分别=12.96、19.93、20.33, P 均 <0.05)。

3 讨论

超分子学科是近年来的前沿及热点研究方向。SAP 基于分子自组装原理,具有生物相容性和生物活性良好,且易于修饰改造^[4]的优点,因此成为了基因工程和组织工程的新兴研究热点。SAP 以非共价键结合排列成特定纳米结构,响应环境能力极高,负载药物能力良好,可应用于药物精确递送^[5]。

NBP 具有保护血管内皮细胞、促血管新生与形成、改善缺血组织的微循环和抑制炎症反应等作用^[6]。预防和治疗性的 NBP 给药能够增强损伤后的血管内皮细胞修复,增加脑微动脉管径和血流速度,从而改善软脑膜的微循环^[7,8]。NBP 可增强血管内皮屏障功能,维持血流动力和血管应力,减少“失巢凋亡”,其特征为内皮细胞脱落^[9,10]。而因 NBP 物理特性及分子结构差异,其在免疫调节、抗炎、细胞凋亡、细胞增殖等方面作用受限^[11,12],而 NBP-SAP 可能借助 SAP 的特性而发挥药物的优点。

本次实验研究 NBP-SAP 对 ox-LDL 损伤血管内皮的影响,通过检测不同药物处理后的细胞活力及细胞凋亡,可观察到人脐静脉内皮细胞在 ox-LDL 损伤后细胞凋亡率升高、细胞活力减弱,细胞中 Bax、Notch1 的基因及蛋白表达量上调,VEGFR-2、Bcl-2 的基因及蛋白表达量下调。而 NBP-SAP 组较 ox-LDL 组细胞活力增强,凋亡率下降,细胞 VEGFR-2、Bcl-2 的蛋白和 mRNA 表达上调,而 Notch1、Bax 蛋白和 mRNA 表达下调,提示 NBP-SAP 改善了 ox-LDL 引起的内皮细胞损伤,减轻其引起的凋亡。

本次实验进一步研究了这一改善作用的机制。减少血管内皮损伤有赖于血管的新生与形成,而血管的新生和形成是一个极其复杂的过程。VEGF/VEGFR2-Notch1 通路在其中扮演重要角色。VEGF 是目前公认的在血管再生全过程中发挥作用的一种生长因子,它由8个外显子和7个内含子组成,主要通过激动 VEGF 受体(VEGF receptor, VEGFR)而发挥作用,VEGFR 有3种亚型,分别是 VEGFR-1、VEGFR-2 和 VEGFR-3,它们均属于酪氨酸激酶受体家族。在血管新生的过程中,VEGF 与 VEGFR-2 结合后激活下游信号,促进血管内皮细胞上的整合素与配体分离,使得局部血管基底膜发生分解,此时内皮细胞可以增殖并向外迁移^[13,14]。另有报道指出,VEGF 能通过 Notch1/DLL4 信号促内皮细胞形成顶端细胞,继而形成血管芽,顶端细胞形成伪足,有利于细胞迁移、黏附及形成网络状微血管^[15]。本次实验结果显示,ox-LDL 组细胞中 Bax、Notch1 表达上调,NBP-SAP 组较 ox-LDL 组 Bax、Notch1 表达下调,提示 NBP-SAP 可能激活人脐静脉内皮细胞中被 ox-LDL 抑制的 VEGF/Notch1 通路,可能是 NBP-SAP 减轻 ox-LDL 所致细胞损伤的机制。课题组进一步用 VEGF/Notch1 信号通路抑制剂 LY450139 与 NBP-SAP 联合处理 HUVECs,较 NBP-SAP 不联合 LY450139 组比较,结果显示增强细胞活力、降低细胞凋亡率效应减弱,相应基因的表达均下调,进一步印证 NBP-SAP 可能激活 VEGF/VEGFR2-Notch1/DLL4 信号通路,减轻 ox-LDL 损伤血管内皮细胞的效应。

综上所述,NBP-SAP 可能激活 VEGF/VEGFR2-Notch1/DLL4 通路减轻 ox-LDL 损伤血管内皮细胞,其主要作用机制为促进血管的形成与新生,提示 NBP-SAP 可能具有治疗心脑血管疾病的新潜力。但本次研究局限于体外实验,对 NBP-SAP 是否能在体内发挥作用尚不明确,仍需进一步动物实验深入验证。

参考文献

- 1 Nakanishi K, Jin Z, Homma S, et al. Association between heart rate and subclinical cerebrovascular disease in the elderly[J]. *Stroke*, 2018, 49(2):319-324.
- 2 Huang LC, Wang HC, Chen LH, et al. Bioinspired self-assembling peptide hydrogel with proteoglycan-assisted growth factor delivery for therapeutic angiogenesis[J]. *Theranostics*, 2019, 9(23):7072-7087.
- 3 Subramaniam S, Kandiah K, Thayalasekaran S, et al. Haemostasis and prevention of bleeding related to ER: The role of a novel self-assembling peptide[J]. *United Eur Gastroent*, 2019, 7(1):155-162.
- 4 Lee S, Trinh THT, Yoo M, et al. Self-assembling peptides and their application in the treatment of diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23):5850.
- 5 Doberdoli D, Bommer C, Begzati A, et al. Randomized clinical trial investigating self-assembling peptide P₁₁₋₄ for treatment of early occlusal caries[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):4195.
- 6 Yang CS, Guo A, Li Y, et al. DL-3-n-butylphthalide reduces neurovascular inflammation and ischemic brain injury in mice[J]. *Aging and Disease*, 2019, 10(5):964-976.
- 7 Moazzami K, Shao IY, Chen LY, et al. Atrial fibrillation, brain volumes, and subclinical cerebrovascular disease from the atherosclerosis risk in communities neurocognitive study[J]. *Am J Cardiol*, 2020, 125(2):222-228.
- 8 Lu MM, Yuan SF, Li SC, et al. The exosome-derived biomarker in atherosclerosis and its clinical application[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2019, 12(1):68-74.
- 9 Wu F, Xu K, Xu K, et al. DL-butylphthalide improves traumatic brain injury recovery via inhibiting autophagy induced blood-brain barrier disruption and cell apoptosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(2):1220-1232.
- 10 Chen D, Yin Y, Shi J, et al. DL-3-n-butylphthalide improves cerebral hypoperfusion in patients with large cerebral atherosclerotic stenosis: A single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. *BMC Neurol*, 2020, 20(1):212.
- 11 Qin C, Zhou P, Wang L, et al. DL-3-N-butylphthalide attenuates ischemic reperfusion injury by improving the function of cerebral artery and circulation[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(10):2011-2021.
- 12 Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development[J]. *Cell*, 2019, 176(6):1248-1264.
- 13 Suresh V, West JL. 3D culture facilitates VEGF-stimulated endothelial differentiation of adipose-derived stem cells[J]. *Ann Biomed Eng*, 2020, 48(3):1034-1044.
- 14 Kivelä R, Hemanthakumar KA, Vaparanta K, et al. Endothelial cells regulate physiological cardiomyocyte growth via VEGFR2-mediated paracrine signaling[J]. *Circulation*, 2019, 139(22):2570-2584.
- 15 Zhu F, Cheng H, Lei R, et al. Effects of cooking oil fume derived fine particulate matter on blood vessel formation through the VEGF/VEGFR2/MEK1/2/ERK1/2/mTOR pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019, 69:112-119.

(收稿日期 2021-11-20)

(本文编辑 高金莲)