

本文引用: 吴方圆, 李艳, 宁大晟, 等. TSB2 通过减少脱偶联内皮型一氧化氮合酶氧自由基生成抑制动脉粥样硬化形成[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(10): 833-840. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.10.002.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-10-0833-08

· 冠状动脉解剖意义及 As 防治专栏 ·

## TSB2 通过减少脱偶联内皮型一氧化氮合酶氧自由基生成抑制动脉粥样硬化形成

吴方圆<sup>1,2#</sup>, 李艳<sup>2,3#</sup>, 宁大晟<sup>2,3</sup>, 陈靖<sup>1,2</sup>, 李尚宣<sup>1,2</sup>,  
彭月明<sup>2,3</sup>, 何诗慧<sup>2,3</sup>, 闫凤侠<sup>2,3</sup>, 区景松<sup>2,3#</sup>, 欧志君<sup>1,2#</sup>

(1. 中山大学附属第一医院高血压血管病科, 2. 血管疾病诊治技术国家地方联合工程实验室(广东) 国家卫健委辅助循环重点实验室(中山大学) 广东省血管疾病诊治工程技术研究中心 广东省脑功能与脑疾病重点实验室, 3. 中山大学附属第一医院心脏外科, 广东省广州市 510080)

**[摘要]** **[目的]** 观察 TSB2 抑制热休克蛋白 90(HSP90)与内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的结合对动脉粥样硬化形成的影响。**[方法]** 用 TSB2 处理人脐静脉内皮细胞, 用免疫共沉淀法检测 HSP90 与 eNOS 的结合情况。利用 C57BL/6 小鼠和低密度脂蛋白受体敲除(LDLR<sup>-/-</sup>)小鼠, 普通饮食(ND)或高脂饮食(HFD)喂养 12 周, 同时腹腔注射 PBS 或 TSB2, 分为 4 组: C57BL/6+ND+PBS 组、LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS 组、LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS 组、LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2 组。提取主动脉检测 HSP90 与 eNOS 的结合情况, 检测主动脉和主动脉窦的粥样硬化斑块情况、一氧化氮(NO)和氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-·</sup>)生成情况, 同时使用左旋精氨酸的竞争性底物 L-单甲基-精氨酸(L-NMMA)明确 NO 的生成和一氧化氮合酶抑制剂左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)明确 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>的生成。**[结果]** 与对照组相比, 加入 TSB2 处理的人脐静脉内皮细胞后, HSP90 与 eNOS 的结合水平减少 41.06% ( $P < 0.05$ )。与 LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS 组相比, LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2 组小鼠主动脉中 HSP90 与 eNOS 的结合水平减少 40.95% ( $P < 0.05$ ), 主动脉内皮细胞 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>生成水平减少 63.73% ( $P < 0.05$ ) (L-NAME 明显抑制 LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS 组 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>的生成), 但 NO 生成量未见明显变化(L-NMMA 抑制所有组 NO 的生成), 同时主动脉及主动脉窦的斑块形成水平分别减少 59.39% 和 68.86% ( $P < 0.05$ )。**[结论]** TSB2 通过抑制主动脉血管内皮细胞 HSP90 与 eNOS 的结合, 减少血管内皮细胞脱偶联 eNOS 的 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>生成, 最终抑制动脉粥样硬化形成。

**[关键词]** 动脉粥样硬化; 血管内皮细胞; 内皮型一氧化氮合酶; 热休克蛋白 90

**[中图分类号]** R363;R5

**[文献标识码]** A

### TSB2 inhibits atherosclerosis by reducing the production of superoxide anion of uncoupled endothelial nitric oxide synthase

WU Fangyuan<sup>1,2#</sup>, LI Yan<sup>2,3#</sup>, NING Dasheng<sup>2,3</sup>, CHEN Jing<sup>1,2</sup>, LI Shangxuan<sup>1,2</sup>, PENG Yueming<sup>2,3</sup>, HE Shihui<sup>2,3</sup>, YAN Fengxia<sup>2,3</sup>, OU Jingsong<sup>2,3#</sup>, OU Zhijun<sup>1,2#</sup>

(1. Division of Hypertension and Vascular Diseases, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. National-Guangdong Joint Engineering Laboratory for Diagnosis and Treatment of Vascular Diseases, NHC Key Laboratory of Assisted Circulation (Sun Yat-sen University) & Guangdong Provincial Engineering and Technology Center for Diagnosis and Treatment of Vascular Diseases & Guangdong Provincial Key Laboratory of Brain Function and Disease, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 3. Division of Cardiac Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

**[ABSTRACT]** **Aim** To observe the effect of TSB2 inhibiting the combination of heat shock protein 90 (HSP90)

**[收稿日期]** 2022-06-29

**[修回日期]** 2023-02-19

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2021YFA0805100);国家自然科学基金面上和重点项目(81970363、81830013、81370370);广东省基础与应用基础研究基金项目重点项目(2019B1515120092);广州市重点领域研发计划项目(202103000016);中山大学临床医学研究 5010 计划项目(2014002)

**[作者简介]** 吴方圆, 博士研究生, 研究方向为趋炎脂质与血管内皮功能, E-mail: wufy5@mail2.sysu.edu.cn. 通信作者欧志君, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为趋炎脂质与血管内皮功能, E-mail: zhijunou@163.com. #为同等贡献。

and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) on the formation of atherosclerosis. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were treated with TSB2 and the combination between HSP90 and eNOS was detected by co-immunoprecipitation. C57BL/6 mice and low density lipoprotein receptor knockout (LDLR<sup>-/-</sup>) mice were fed with normal diet (ND) or high fat diet (HFD) for 12 weeks while injected with phosphate buffered saline (PBS) or TSB2 intraperitoneally. The mice were divided into four groups: C57BL/6+ ND+PBS group, LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS group, LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS group, LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2 group. Then the aorta was isolated. The combination between HSP90 and eNOS in aorta was measured. The atherosclerotic plaque in aorta and aortic sinus were determined. The production of nitric oxide (NO) and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) were also detected. At the same time, L-monomethyl-arginine (L-NMMA), a competitive substrate of L-arginine, was used to determine the production of NO, and L-nitroarginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase inhibitor, was used to determine the production of O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. **Results** Compared with control group, the combination between HSP90 and eNOS was decreased by 41.06% ( $P < 0.05$ ) in cultured HUVEC treated with TBS2. Compared with LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS group, the combination between HSP90 and eNOS in the mouse aortas was decreased by 40.95% ( $P < 0.05$ ) in LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2 group, and the production of O<sub>2</sub><sup>·-</sup> was decreased by 63.73% ( $P < 0.05$ ) (L-NAME significantly inhibited the production of O<sub>2</sub><sup>·-</sup> in LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS group), while the production of NO had no significant change in the mouse aortic endothelial cells (L-NMMA inhibited NO production in all groups), and the formation of atherosclerotic lesions in aortas and aortic sinus were significantly decreased by 59.39% and 68.86% ( $P < 0.05$ ) respectively in LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2 group. **Conclusion** TSB2 can reduce the O<sub>2</sub><sup>·-</sup> production of uncoupled eNOS in vascular endothelial cells by inhibiting the combination of HSP90 and eNOS in aortic endothelial cells, and finally inhibits the formation of atherosclerosis.

[**KEY WORDS**] atherosclerosis; vascular endothelial cells; endothelial nitric oxide synthase; heat shock protein 90

动脉粥样硬化是一种复杂的代谢相关性血管病变,内皮功能受损是动脉粥样硬化的早期表现<sup>[1]</sup>。内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)是负责血管内皮细胞产生一氧化氮(nitric oxide, NO)的关键分子,主要调节血管的舒张功能<sup>[2]</sup>,是内皮功能的重要衡量标志<sup>[3-4]</sup>。eNOS在偶联的同源二聚体状态下,可以将来自烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化产生的电子从还原域传递至氧化域,氧化域血红素铁与氧结合后进一步催化底物L-精氨酸而产生NO<sup>[5]</sup>。而在辅因子缺乏等病理情况下,如四氢生物喋呤(tetrahydrobiopterin, BH4)缺乏或与热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)结合减少,或结合后HSP90不产生构像变化,eNOS二聚体将解偶联成两个单体,此时eNOS不能将电子转移到精氨酸,而是将电子传递给O<sub>2</sub>产生大量超氧阴离子(superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>·-</sup>),而不是NO<sup>[6-7]</sup>,此即eNOS脱偶联现象,会导致和加重内皮功能障碍<sup>[8]</sup>。HSP90对eNOS的功能状态有着重要的调控作用。在生理状况下,当HSP90结合eNOS,同时HSP90发生构像变化时会促进eNOS偶联,产生NO<sup>[9]</sup>。

Xu等<sup>[10]</sup>前期研究发现eNOS蛋白的SB2结构域(eNOS氨基酸310~323序列)是eNOS与HSP90蛋白结合的重要区域,包含14个氨基酸残基(ELV-

LEVPLEHTPLE),在肽链N端通过丙氨酸残基连接TAT蛋白转导结构域(RKKRRQRRR)合成一段新的重组诱饵肽段,称作TSB2,并证明TSB2能有效抑制正常培养内皮细胞中的HSP90与eNOS结合,减少NO生成,增加O<sub>2</sub><sup>·-</sup>生成。然而,也有研究显示,在病理状况下,如在糖尿病模型小鼠中,HSP90水平的升高能增加动脉粥样硬化的斑块体积<sup>[11]</sup>。HSP90抑制剂可以减少动脉粥样硬化中炎症反应,因此,在疾病状态下HSP90被认为可能是一种促动脉粥样硬化分子<sup>[12]</sup>。本课题组最近研究也证明高脂诱导动脉粥样硬化形成的低密度脂蛋白受体敲除(low density lipoprotein receptor knockout, LDLR<sup>-/-</sup>)小鼠的主动脉中HSP90与eNOS的结合不是减少,而是增加,但eNOS脱偶联<sup>[13]</sup>。eNOS和HSP90在高脂诱导的动脉粥样硬化中的相关性变化对动脉粥样硬化形成的影响尚未完全清楚。另外,TSB2是HSP90与eNOS结合位点的抑制剂,在高脂诱导动脉粥样硬化的病理模型下,通过TSB2抑制HSP90与eNOS结合对动脉粥样硬化形成的影响尚未清楚,本研究将对此进行探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与试剂

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endo-

thelial cells, HUVEC) 和内皮细胞培养基 (endothelial cell medium, ECM) 购自美国 ScienCell 公司; 胰酶、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 和汉克平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) 购自美国 Gibco 公司; RIPA 缓冲液购自美国 Sigma-Aldrich 公司; TSB2 购自上海强耀生物; LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠购自美国 Jackson 实验室; C57BL/6 小鼠购自中山大学动物实验中心; 高脂饲料购自美国 Highlight 公司; L-单甲基-精氨酸 (L-monomethyl-arginine, L-NMMA)、4,5-二氨基乙酰乙酸荧光素 (4,5-diaminofluorescein diacetate, DAF-2DA)、二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE) 和 A23187 购自美国 Merck 公司; 左旋硝基精氨酸甲酯 (L-nitroarginine methyl ester, L-NAME)、油红 O 和 Protein A-Sepharose 购自美国 Sigma 公司; eNOS、HSP90 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

## 1.2 细胞培养

用含 5% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、1% 内皮细胞生长因子和 1% 抗生素的 ECM 培养 HUVEC, 在 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 和 21% O<sub>2</sub> 的恒温细胞培养箱中孵育。所有实验均使用第 3 ~ 5 代的 HUVEC, 将细胞接种在 6 孔板、12 孔板或 24 孔板中培养, 达到 90% 汇合时, 更换饥饿培养基 (含 0.5% FBS、1% 内皮细胞生长因子和 1% 抗生素的 ECM) 处理 12 h, 使细胞同步化, 供后续实验使用。

## 1.3 动物饲养及分组

对照组采取 SPF 级 C57BL/6 野生型小鼠, 雌雄各半, 普通饮食 (normal diet, ND) 喂养 12 周。实验组采用 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠, 雌雄各半, 随机分组后分别给以普通饮食和高脂饮食 (high fat diet, HFD) 喂养 12 周, 其中高脂饮食组随机取一半小鼠腹腔注射 PBS, 另一半小鼠腹腔注射 TSB2 [10 mg/(kg · d)], TSB2 序列为 RKKRRQRRR-A-ELVLEVPLEHPTLE, 纯度超过 98%。实验共分为四组: C57BL/6 + ND + PBS 组、LDLR<sup>-/-</sup> + ND + PBS 组、LDLR<sup>-/-</sup> + HFD + PBS 组、LDLR<sup>-/-</sup> + HFD + TSB2 组。以上所有动物实验得到中山大学实验动物伦理委员会批准, 符合美国国立卫生研究院出版的实验动物饲养管理和使用指南。

## 1.4 主动脉大体及主动脉斑块油红 O 染色

到达实验终点时, 用腹腔注射过量戊巴比妥钠麻醉处死小鼠后, 用 10 mL 预冷的 PBS 冲洗主动脉内残余血液, 体视显微镜下分离整条主动脉及心脏, 在主动脉根部上方横断主动脉。在体视显微镜

下使用精细镊除去主动脉外膜脂肪组织, 使用弹簧剪将主动脉纵向剪开, 展开后用显微细针固定到胶盘上, 用油红 O 避光染色 1 h, 倒掉染液, 加入 PBS 清洗 2 次, 用体视显微镜拍照, 在计算机上测量斑块面积。沿心脏长轴垂直方向切除心尖部 2/3, 剩余部分切面向下加入 OCT 冰冻包埋, 使用冰冻切片机行 6 μm 厚度连续切片; 切取主动脉窦, 使用油红 O 染色后, 用显微镜拍照, 在计算机上测量斑块面积。

## 1.5 主动脉血管内皮细胞 NO 染色

麻醉处死小鼠后分离主动脉, 将主动脉立即置于预冷的 Kerbs-Ringer 缓冲液 (含 118 mmol/L NaCl、4.7 mmol/L KCl、2.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、1.2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、25 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>、1.2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、11.1 mmol/L D-Glucose、0.026 mmol/L EDTA) 中, 除去血管周围的组织, 将管腔内血液冲洗干净, 随后切成 3 mm 片段, 然后将主动脉片段转移到装有 Kerbs-Ringer 缓冲液和使用 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 充气的器官浴槽中孵育 30 min。随机分成两组, 使用或不用 L-精氨酸模拟物 (NO 抑制剂) L-NMMA (1 mmol/L) 预处理 30 min, 再用 NO 荧光检测试剂 DAF-2DA (1 μmol/L) 孵育 30 min。最后将主动脉血管内膜朝上平铺到载玻片上, 加入含有 DAPI 的封片剂封片, 共聚焦显微镜下拍照。

## 1.6 主动脉血管内皮细胞 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 染色

麻醉处死小鼠后分离的主动脉处理同 1.5, 随机分成两组, 一半主动脉使用或不用 NOS 抑制剂 L-NAME (1 mmol/L) 预处理 30 min, 再用超氧阴离子自由基荧光检测试剂 DHE (1 μmol/L) 继续孵育 30 min。最后将主动脉血管内膜朝上平铺到载玻片上, 加入含有 DAPI 的封片剂封片, 共聚焦显微镜下拍照。

## 1.7 免疫共沉淀检测 eNOS 与 HSP90 结合水平

血管内皮细胞 eNOS 与 HSP90 结合水平免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, IP) 检测: 将 1.2 培养的 HUVEC 分为 4 组: 未使用 TSB2 或钙离子载体 A23187 处理的对照组、单独加入 A23187 组 (eNOS 是钙离子/钙调蛋白依赖的酶, A23187 可把钙离子转入细胞, 激活钙调蛋白以增加 eNOS 活性, 该组作为阳性对照组)、单独加入 TSB2 组、TSB2 与 A23187 共处理组。加入 RIPA 缓冲液裂解, 用刮棒刮取细胞裂解液至 EP 管中。4 °C、14 000 ×g 离心 10 min, 吸取上清蛋白提取液备用。

小鼠主动脉 eNOS 与 HSP90 结合水平免疫共沉



淀检测:将上述4组小鼠麻醉处死后分离主动脉,使用生理盐水冲洗残余血液,滤纸吸干水分后,将血管组织用显微剪剪碎,放入研磨管中,加入研磨球及裂解液,使用冷冻研磨仪研磨得到组织匀浆,将组织匀浆转移至新EP管中。4℃、14 000×g离心10 min,吸取上清蛋白提取液备用。

将 Protein A-Sepharose 溶解在 0.1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液中,3 000×g 离心 2 min,用 RIPA 缓冲液重悬。将 Protein A-Sepharose 加入到上清蛋白提取液中,于 4℃ 预澄清 2 h,然后 4℃、2 800×g 离心 2 min,取上清,加入抗 eNOS 抗体 NOS3 (SC-136977) 后孵育过夜,再加入 Protein A-Sepharose 混匀,于 4℃ 混合 2 h 后离心,取沉淀加入 Laemmli 缓冲液重悬,95℃ 加热 5 min,在冰上冷却 2 min 后,取上清液进行蛋白电泳、转膜以及用 eNOS 和 HSP90 抗体孵育检测 eNOS 和 HSP90 的表达情况。

### 1.8 统计学分析

使用 Image J 软件处理实验中的条带和图像,使用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组独立样本均数比较采用单因素方差分析,进一步使用 Tukey's 检验确定两两差异的显著性。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TSB2 抑制血管内皮细胞 HSP90 与 eNOS 结合

为了探究 TSB2 在细胞水平对 HSP90 与 eNOS 结合的影响,利用 TSB2 处理血管内皮细胞,免疫共沉淀检测结果显示,对照组血管内皮细胞中 HSP90 与 eNOS 结合比较少;与对照组相比,单独加入 A23187 组 HSP90 与 eNOS 的结合水平增加 1.28 倍 ( $P < 0.05$ ),单独加入 TSB2 组 HSP90 与 eNOS 的结合水平降低 41.06% ( $P < 0.05$ );与单独加入 A23187 组相比,TSB2 与 A23187 共处理组 HSP90 与 eNOS 的结合水平下降 80.03% ( $P < 0.05$ ),进一步说明在细胞水平中 TSB2 可以显著抑制 HSP90 与 eNOS 的结合(图 1)。

### 2.2 TSB2 对动脉粥样硬化小鼠主动脉 HSP90 与 eNOS 结合的影响

为了进一步探究 TSB2 在组织水平对 HSP90 与 eNOS 结合的影响,对小鼠主动脉组织进行免疫共沉淀检测,结果显示,对照组 (C57BL/6+ND+PBS 组)小鼠主动脉中可见少量 HSP90 与 eNOS 结合;

与对照组和  $\text{LDLR}^{-/-}$ +ND+PBS 组相比, $\text{LDLR}^{-/-}$ +HFD+PBS 组主动脉中 HSP90 与 eNOS 的结合水平分别增加 1.22 倍和 0.54 倍(均  $P < 0.05$ ),说明在动脉粥样硬化模型中有更多的 HSP90 与 eNOS 结合;与  $\text{LDLR}^{-/-}$ +HFD+PBS 组相比, $\text{LDLR}^{-/-}$ +HFD+TSB2 组主动脉中 HSP90 与 eNOS 的结合水平下降 40.95% ( $P < 0.05$ ;图 2)。

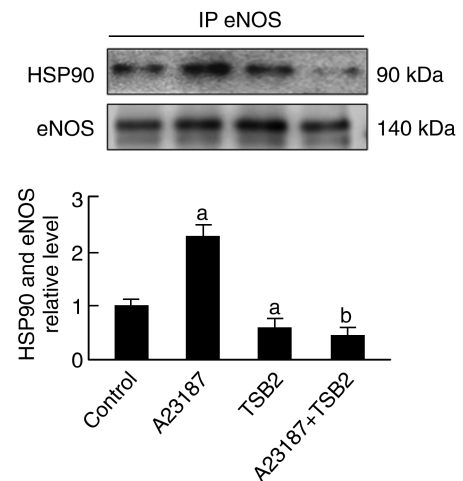


图 1. TSB2 对血管内皮细胞 HSP90 与 eNOS 结合的影响 ( $n=8$ )

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与单独加入 A23187 组比较。

Figure 1. Effect of TSB2 on the combination of HSP90 and eNOS in vascular endothelial cells ( $n=8$ )

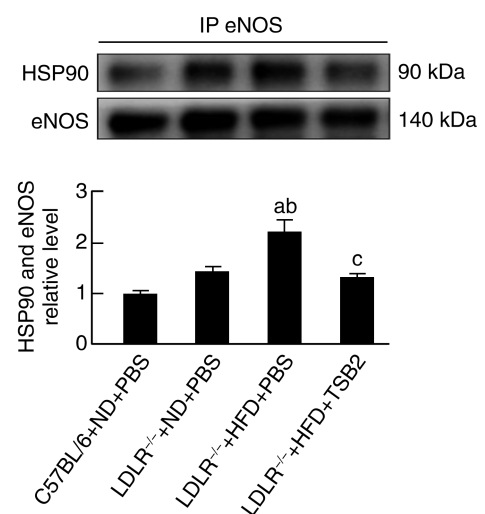


图 2. TSB2 对动脉粥样硬化小鼠主动脉 HSP90 与 eNOS 结合的影响 ( $n=8$ )

a 为  $P < 0.05$ ,与 C57BL/6+ND+PBS 组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与  $\text{LDLR}^{-/-}$ +ND+PBS 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与  $\text{LDLR}^{-/-}$ +HFD+PBS 组比较。

Figure 2. Effect of TSB2 on the combination of HSP90 and eNOS in the aorta of atherosclerotic mice ( $n=8$ )



### 2.3 TSB2 抑制小鼠动脉粥样硬化形成

主动脉大体油红 O 染色显示,LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS 组主动脉斑块面积较 C57BL/6+ND+PBS 组和 LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS 组分别增加 29.85 倍和 3.61 倍 (均  $P<0.05$ ),LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2 组主动脉斑块面积较 LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS 组下降 59.39% ( $P<0.05$ )。主动脉根部切片油红 O 染色显示,LDLR<sup>-/-</sup>

+HFD+PBS 组小鼠主动脉窦斑块面积较 C57BL/6+ND+PBS 组和 LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS 组分别增加 20.59 倍和 3.04 倍 (均  $P<0.05$ ),而 LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2 组小鼠斑块病变面积较 LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS 组下降 68.86% ( $P<0.05$ )。结合主动脉大体及主动脉窦切片染色结果,说明 TSB2 可显著抑制动脉粥样硬化斑块形成(图 3)。

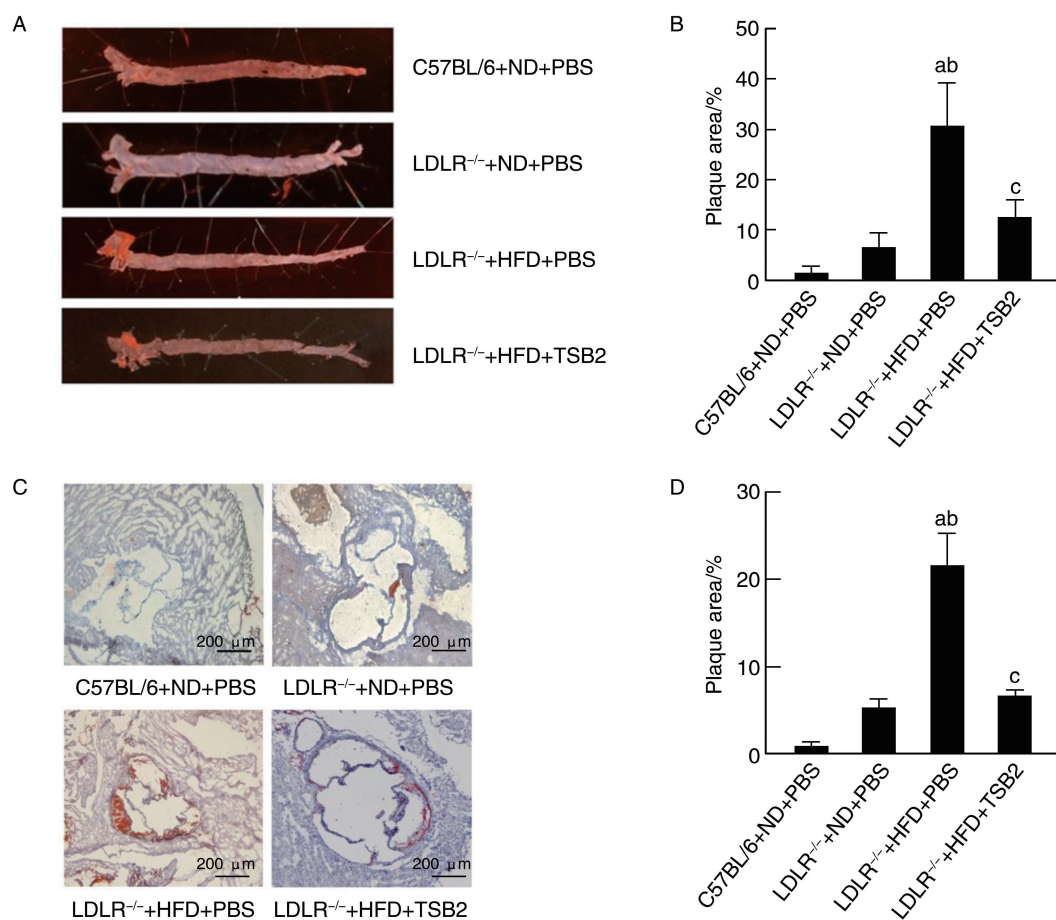


图 3. TSB2 在 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化模型中的作用 ( $n=8$ )

A 为小鼠主动脉大体油红 O 染色, B 为大体主动脉斑块面积定量分析, C 为小鼠主动脉窦切片油红 O 染色, D 为主动脉窦斑块面积定量分析。

a 为  $P<0.05$ , 与 C57BL/6+ND+PBS 组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与 LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS 组比较。

Figure 3. Effect of TSB2 in LDLR<sup>-/-</sup> mouse model of atherosclerosis ( $n=8$ )

### 2.4 TSB2 对动脉粥样硬化小鼠血管内皮细胞 NO 生成的影响

为进一步研究 TSB2 在动脉粥样硬化中对内皮功能的影响,测量了小鼠主动脉内皮细胞 NO 生成量(绿色荧光),结果显示,LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS 组小鼠主动脉内皮细胞 NO 生成量较 C57BL/6+ND+PBS 组和 LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS 组分别减少 46.85% 和

27.24% (均  $P<0.05$ ),LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2 组小鼠主动脉内皮细胞 NO 生成量与 LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS 组相比稍微升高,但差异没有统计学意义 ( $P>0.05$ ),提示 TSB2 没有明显影响 NO 的生成。采用 L-NMMA 预处理后,血管内皮细胞绿色荧光的表达明显减少(均  $P<0.05$ ),提示 NO 的生成受到抑制(图 4)。

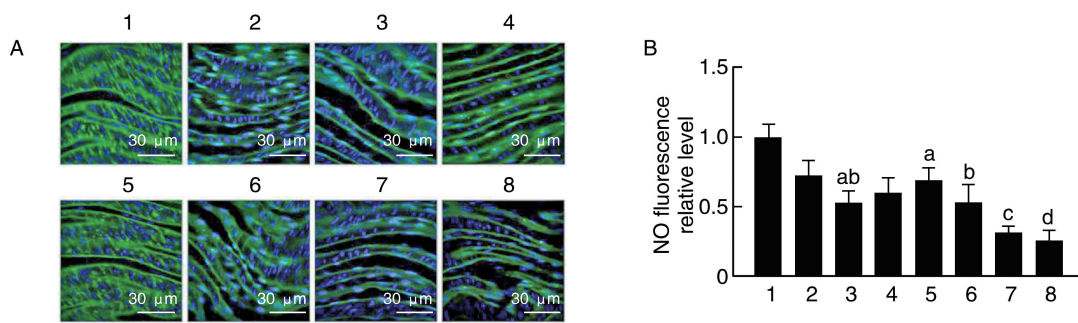


图4. TSB2对动脉粥样硬化小鼠内皮细胞NO生成的影响( $n=8$ )

A为小鼠主动脉内皮用DAF-2DA染色后共聚焦显微镜检测NO生成,B为小鼠主动脉内皮细胞NO生成定量分析。

1-4分别为C57BL/6+ND+PBS组、LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS组、LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS组和LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2组,5-8分别为L-NMMA预处理后的C57BL/6+ND+PBS组、LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS组、LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS组和LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2组。  
a为 $P<0.05$ ,与C57BL/6+ND+PBS组比较;b为 $P<0.05$ ,与LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS组比较;  
c为 $P<0.05$ ,与LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS组比较;d为 $P<0.05$ ,与LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2组比较。

Figure 4. Effect of TSB2 on NO production in LDLR<sup>-/-</sup> mouse model of atherosclerosis( $n=8$ )

### 2.5 TSB2对动脉粥样硬化小鼠血管内皮细胞O<sub>2</sub><sup>·-</sup>生成的影响

为了进一步探讨TSB2抑制动脉粥样硬化形成的机制,利用DHE染色检测O<sub>2</sub><sup>·-</sup>的生成(红色荧光)情况,结果显示,LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS组小鼠主动脉血管内皮细胞O<sub>2</sub><sup>·-</sup>生成量较C57BL/6+ND+PBS组和LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS组分别增加1.77倍和0.81倍(均 $P<0.05$ ),LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2组小鼠

主动脉血管内皮细胞O<sub>2</sub><sup>·-</sup>生成量与LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS组相比下降63.73%( $P<0.05$ )。用L-NAME预处理后,C57BL/6+ND+PBS组和LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2组O<sub>2</sub><sup>·-</sup>的生成量没有明显变化,但LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS组和LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS组O<sub>2</sub><sup>·-</sup>的生成量分别下降54.59%( $P<0.05$ )和71.63%( $P<0.05$ )。提示TSB2可抑制动脉粥样硬化小鼠血管内皮细胞O<sub>2</sub><sup>·-</sup>生成(图5)。

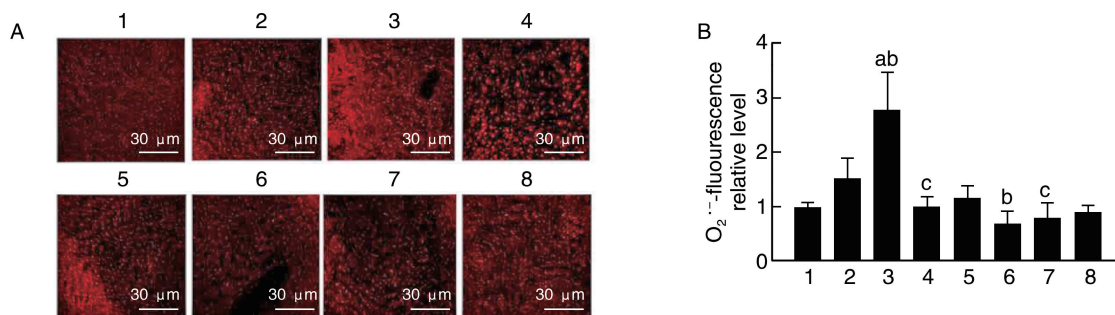


图5. TSB2对动脉粥样硬化小鼠内皮细胞O<sub>2</sub><sup>·-</sup>生成的影响( $n=8$ )

A为小鼠主动脉内皮用DHE染色后共聚焦显微镜检测O<sub>2</sub><sup>·-</sup>的生成,B为小鼠主动脉内皮细胞O<sub>2</sub><sup>·-</sup>生成定量分析。

1-4分别为C57BL/6+ND+PBS组、LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS组、LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS组和LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2组,5-8分别为L-NAME预处理后的C57BL/6+ND+PBS组、LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS组、LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS组和LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+TSB2组。  
a为 $P<0.05$ ,与C57BL/6+ND+PBS组比较;b为 $P<0.05$ ,与LDLR<sup>-/-</sup>+ND+PBS组比较;c为 $P<0.05$ ,与LDLR<sup>-/-</sup>+HFD+PBS组比较。

Figure 5. Effect of TSB2 on O<sub>2</sub><sup>·-</sup> production in LDLR<sup>-/-</sup> mouse model of atherosclerosis( $n=8$ )

## 3 讨论

在内皮细胞中,eNOS是影响NO和O<sub>2</sub><sup>·-</sup>平衡的主要合成酶。本课题组之前的研究<sup>[13]</sup>和其他学

者的研究<sup>[14]</sup>已经证明,eNOS功能受激活状态和偶联状态的调节。如使用钙离子载体(A23187)可以增加细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度,促进eNOS与Caveolin解离,使eNOS在细胞内发生转位并激活,增加NO生

成<sup>[15-16]</sup>。多种体外实验均证实 HSP90 作为伴侣蛋白对调节 eNOS 偶联状态具有重要作用。生理状况下,当 HSP90 与 eNOS 结合增加,并产生构像变化时,促进激活状态的 eNOS 偶联产生 NO。如使用格尔德霉素或根赤壳菌素特异性抑制 HSP90 的 ATP 酶活性<sup>[17]</sup>,可明显减少 A23187 刺激下 eNOS 依赖的 NO 生成,增加  $O_2^{\cdot-}$  生成<sup>[18]</sup>。Pritchard 等<sup>[9]</sup> 研究证明 HSP90 与 eNOS 的结合减少使 eNOS 脱偶联。本课题组先前研究也表明 LDL 可以通过降低 HSP90 与 eNOS 结合,导致 NO 生成减少, $O_2^{\cdot-}$  生成增加<sup>[19]</sup>。病理情况下 HSP90 被认为可能是一种促动脉粥样硬化分子,使用 HSP90 抑制剂可以减少动脉粥样硬化中的炎症反应<sup>[20]</sup>。本研究也支持这一结论,在高脂血症条件下动脉粥样硬化小鼠主动脉中 HSP90 和 eNOS 之间的结合不是减少,而是明显增加,同时血管内皮中的  $O_2^{\cdot-}$  生成增加,NO 表达减少。使用 L-NAME 可以抑制高脂状态下血管内皮  $O_2^{\cdot-}$  生成,使用 L-NMMA 可以阻断 NO 的生成,这表明高脂诱导的动脉粥样硬化小鼠主动脉内皮细胞中 eNOS 仍然处于脱偶联状态,提示在高脂诱导的动脉粥样硬化状态下,尽管主动脉内皮细胞中 HSP90 与 eNOS 结合增加,但 HSP90 可能没有产生构像变化,所以 eNOS 处于脱偶联状态,不产生 NO,而产生  $O_2^{\cdot-}$ 。此外,eNOS 的偶联状态还受四氢生物喋呤、血红素铁和精氨酸等多种辅因子影响<sup>[21]</sup>。本课题组最近发现,在高脂血症主动脉中四氢生物喋呤的表达水平下降。所以,尽管 eNOS 与 HSP90 结合增加,但 eNOS 仍然处于脱偶联状态,使处于高度激活的 eNOS 产生大量的  $O_2^{\cdot-}$ ,而非 NO<sup>[22]</sup>。这个发现进一步支持本课题组目前的研究发现。

生理状态下,使用 TSB2 可抑制内皮细胞中 HSP90 与 eNOS 的结合水平,使 NO 生成减少和  $O_2^{\cdot-}$  生成增多。本研究发现,在高脂诱导的动脉粥样硬化模型小鼠中,TSB2 也可抑制主动脉内皮细胞中 HSP90 与 eNOS 的结合,这与体外细胞实验结果一致。但此时小鼠主动脉内皮细胞不是 NO 产生减少和  $O_2^{\cdot-}$  生成增多,而是明显抑制了  $O_2^{\cdot-}$  的生成,这与体外细胞实验不一致。这可能与高脂血症时主动脉内皮细胞中 HSP90 与 eNOS 结合后 HSP90 没有产生构像变化,同时四氢生物喋呤的表达水平下降,导致 eNOS 脱偶联有关。在这种病理状态下,TSB2 抑制了 HSP90 与 eNOS 的结合实际上是减少脱偶联状态 eNOS 的激活,进一步使脱偶联 eNOS 产生的  $O_2^{\cdot-}$  减少。所以,出现 TSB2 抑制 HSP90 与

eNOS 的结合后小鼠主动脉内皮细胞  $O_2^{\cdot-}$  产生减少的现象。这与近年来一些关于脱偶联 eNOS 激活的负面作用的报道是相符合的。例如, Potje 等<sup>[23]</sup> 研究显示 eNOS 的过度激活会增加活性氧的产生,而不是 NO 的产生。Ozaki 等<sup>[24]</sup> 研究也发现 eNOS 的过度表达会加速 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化病程进展。而 Shi 等<sup>[25]</sup> 研究发现 eNOS 的缺失可以减少脂肪条纹的形成,并抑制高胆固醇血症诱导的动脉粥样硬化形成。Siragusa 等<sup>[26]</sup> 研究表明 eNOS 偶联不仅需要 HSP90 结合,还需要 HSP90 构像变化。所以,TSB2 可以通过抑制 HSP90 与 eNOS 的结合,使脱偶联 eNOS 激活减少,从而减少  $O_2^{\cdot-}$  的产生,抑制动脉粥样硬化的形成。

综上所述,使用诱导肽 TSB2 可明显抑制高脂诱导的动脉粥样硬化小鼠主动脉内皮中 HSP90 与 eNOS 的结合,明显减少脱偶联状态 eNOS 所产生的  $O_2^{\cdot-}$ ,从而减轻内皮细胞的氧化应激,抑制动脉粥样硬化形成。因此,TSB2 有可能作为抑制高脂诱导的动脉粥样硬化形成的化合物。

#### [参考文献]

- [1] GIMBRONE M A J, GARCÍA-CARDEÑA G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-636.
- [2] JIN Y J, CHENNUPATI R, LI R, et al. Protein kinase N<sub>2</sub> mediates flow-induced endothelial NOS activation and vascular tone regulation[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(21): e145734.
- [3] 彭智华, 古钊林, 黄振华, 等. 高血压急症患者血管功能异常及与循环内皮祖细胞功能变化的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(6): 507-512.  
PENG Z H, GU Q L, HUANG Z H, et al. The relationship between vascular dysfunction and change of functional activities of circulating endothelial progenitor cells in hypertensive urgency[J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(6): 507-512.
- [4] XU S W, ILYAS I, LITTLE P J, et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies[J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(3): 924-967.
- [5] NAGARKOTI S, SADAF S, AWASTHI D, et al. L-arginine and tetrahydrobiopterin supported nitric oxide production is crucial for the microbicidal activity of neutrophils[J]. *Free Radic Res*, 2019, 53(3): 281-292.
- [6] 李苗, 王丽丽, 常冰梅. 血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(8): 730-736.  
LI M, WANG L L, CHANG B M. Advances in research on the mechanism of vascular endothelial cell function injury



- [J]. *Chin J Arterioscler*, 2019, 27(8): 730-736.
- [7] GUERBY P, TASTA O, SWIADER A, et al. Role of oxidative stress in the dysfunction of the placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia [J]. *Redox Biol*, 2021, 40: 101861.
- [8] REIDY K, KANG H M, HOSTETTER T, et al. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(6): 2333-2340.
- [9] PRITCHARD K A, ACKERMAN A W, OU J S, et al. Native low-density lipoprotein induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction: role of heat shock protein 90 and caveolin-1 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33(1): 52-62.
- [10] XU H, SHI Y, WANG J L, et al. A heat shock protein 90 binding domain in endothelial nitric-oxide synthase influences enzyme function [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(52): 37567-37574.
- [11] LAZARO I, OGUIZA A, RECIO C, et al. Targeting HSP90 ameliorates nephropathy and atherosclerosis through suppression of NF- $\kappa$ B and STAT signaling pathways in diabetic mice [J]. *Diabetes*, 2015, 64(10): 3600-3613.
- [12] MADRIGAL-MATUTE J, LÓPEZ-FRANCO O, BLANCO-COLIO L M, et al. Heat shock protein 90 inhibitors attenuate inflammatory responses in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 330-337.
- [13] NING D S, MA J, PENG Y M, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide inhibits atherosclerosis by increasing tetrahydrobiopterin via regulation of GTP-cyclohydrolase 1 and reducing uncoupled endothelial nitric oxide synthase activity [J]. *Atherosclerosis*, 2021, 328: 83-91.
- [14] YAN F X, LI H M, LI S X, et al. The oxidized phospholipid POVPC impairs endothelial function and vasodilation via uncoupling endothelial nitric oxide synthase [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 112: 40-48.
- [15] FUJIMURA N, JITSUIKI D, MARUHASHI T, et al. Geranylgeranylacetone, heat shock protein 90/AMP-activated protein kinase/endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide pathway, and endothelial function in humans [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(1): 153-160.
- [16] AMARI K, KAJIHARA R, ARAI N, et al. Portal blood flow-dependent NO-mediated lymph formation in rat jejunum [J]. *Pflugers Arch*, 2022, 474(5): 541-551.
- [17] AZEMI A K, MOKHTAR S S, RASOOL A H G. Clinacanthus nutans leaves extract reverts endothelial dysfunction in type 2 diabetes rats by improving protein expression of eNOS [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7572892.
- [18] ARDESTANI M, KHORSANDI Z, KESHAVARZPOUR F, et al. Heterocyclic compounds as HSP90 inhibitors: a perspective on anticancer applications [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(10): 2220.
- [19] OU J S, OU Z J, ACKERMAN A W, et al. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) in proliferating endothelial cells uncouples endothelial nitric oxide synthase activity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(2): 269-276.
- [20] OU Z J, OU J S, ACKERMAN A W, et al. L-4F, an apolipoprotein A-I mimetic, restores nitric oxide and superoxide anion balance in low-density lipoprotein-treated endothelial cells [J]. *Circulation*, 2003, 107(11): 1520-1524.
- [21] DING X Y, MENG C Z, DONG H M, et al. Extracellular HSP90 $\alpha$ , which participates in vascular inflammation, is a novel serum predictor of atherosclerosis in type 2 diabetes [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2022, 10(1): e002579.
- [22] SERRELI G, DEIANA M N A. Role of dietary polyphenols in the activity and expression of nitric oxide synthases: a review [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(1): 147.
- [23] POTJE S R, CHEN Z L, OLIVEIRA S D S, et al. Nitric oxide donor [Ru(terpy)(bdq)NO]<sup>3+</sup> induces uncoupling and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase promoting oxidant production [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 112: 587-596.
- [24] OZAKI M, KAWASHIMA S, YAMASHITA T, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(3): 331-340.
- [25] SHI W, WANG X, SHIH D M, et al. Paradoxical reduction of fatty streak formation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase [J]. *Circulation*, 2002, 105(17): 2078-2082.
- [26] SIRAGUSA M, FRÖHLICH F, PARK E J, et al. Stromal cell-derived factor 2 is critical for HSP90-dependent eNOS activation [J]. *Sci Signal*, 2015, 8(390): ra81.

(此文编辑 文玉珊)