

本文引用: 赵芮琪, 单诗淇, 金越. 灯盏花乙素调控 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路拮抗 AAPH 诱导的人主动脉内皮细胞损伤 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(3): 227-234. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.03.006.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-03-0227-08

· 实验研究 ·

## 灯盏花乙素调控 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路拮抗 AAPH 诱导的人主动脉内皮细胞损伤

赵芮琪, 鲍柳池, 单诗淇, 金越

大连医科大学药学院, 辽宁省大连市 116044

**[摘要]** **[目的]** 探讨灯盏花乙素(Scu)调控蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)-核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/激活转录因子 4(ATF4)-C/EBP 同源蛋白(CHOP)通路拮抗 2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)诱导的人主动脉内皮细胞(HAEC)损伤的具体机制。**[方法]** 用 Scu 对 HAEC 进行预保护,再用 AAPH 诱导 HAEC 损伤,探究 Scu 对 HAEC 损伤的具体分子机制。将细胞分为对照组、AAPH 组、AAPH+Scu 低、中、高剂量组,测定细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽-S 转移酶(GSH-ST)的含量,荧光探针检测细胞内活性氧(ROS)含量,Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡率,RT-qPCR 检测细胞中 PERK、真核起始因子 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ ) mRNA 的表达,Western blot 测定细胞中葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、p-PERK、PERK、eIF2 $\alpha$ 、p-eIF2 $\alpha$ 、ATF4、CHOP、Nrf2、Bcl-2、Caspase-3 及 Caspase-12 蛋白的表达。为了进一步探究 Scu 拮抗 HAEC 损伤的分子机制,采用基因沉默技术抑制 HAEC 中 PERK 的表达。将细胞分为五组,分别为对照组、AAPH+si-con 组、AAPH+Scu+si-con 组、AAPH+si-PERK 组、AAPH+si-PERK+Scu 组,采用 RT-qPCR 检测 si-PERK 干扰后细胞中 PERK、eIF2 $\alpha$  mRNA 的表达,Western blot 测定 si-PERK 干扰后细胞中 PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、eIF2 $\alpha$ 、ATF4、CHOP、Nrf2、Bcl-2、p53 正向调节因子(PUMA)、Caspase-3 及 Caspase-12 蛋白的表达。**[结果]** Scu 干预后细胞内 ROS 含量及细胞凋亡率显著降低( $P < 0.01$ )。Scu 可下调 PERK、eIF2 $\alpha$  mRNA 的表达,并下调 GRP78、p-PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、ATF4、CHOP、PUMA、Caspase-3、Caspase-12 以及上调 Nrf2、Bcl-2 蛋白的表达( $P < 0.01$ )。用 si-PERK 干扰后,细胞中 PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、ATF4、CHOP、Nrf2、Bcl-2、PUMA、Caspase-3、Caspase-12 蛋白的表达以及 PERK 和 eIF2 $\alpha$  mRNA 的表达与未干扰前有显著差异( $P < 0.01$ ),证明 Scu 发挥抗内质网应激及细胞凋亡与其调控 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路密切相关。**[结论]** Scu 通过调控 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路抗内质网应激及细胞凋亡,从而有效减轻 AAPH 诱导的 HAEC 损伤。

**[关键词]** 灯盏花乙素; PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路; 人主动脉内皮细胞; 细胞损伤; 2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

### Scutellarin antagonizes AAPH induced injury to human aortic endothelial cells by regulating the PERK-Nrf2/ATF4-CHOP pathway

ZHAO Ruiqi, BAO Liuchi, SHAN Shiqi, JIN Yue

College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To explore the specific mechanism by which scutellarin (Scu) antagonizes the injury of human aortic endothelial cells (HAEC) induced by 2,2-azobis(2-methylpropylimidate) dihydrochloride (AAPH) by regulating the protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)/activating transcription factor 4 (ATF4)-C/EBP homology protein (CHOP) pathway. **Methods** HAEC were pre-protected by Scu and then injured by AAPH to explore the molecular mechanism of Scu on HAEC injury. The cells were divided into control group, AAPH group, AAPH+Scu low, medium and high groups. The contents of superoxide dismutase

[收稿日期] 2024-07-01

[修回日期] 2024-08-14

[基金项目] 辽宁省教育厅面上项目(LJKMZ20221260)

[作者简介] 赵芮琪,硕士研究生,研究方向为心血管药理学,E-mail:1585284314@qq.com。通信作者金越,教授,硕士生导师,研究方向为心血管药理学,E-mail:2810760@qq.com。

(SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione S-transferase (GSH-ST) in the cells were measured. The content of reactive oxygen species (ROS) in cells was detected by fluorescent probe, and the apoptosis rate was detected by Annexin V-FITC/PI method. The mRNA expression of PERK and eIF2 $\alpha$  in cells was detected by RT-qPCR. The protein expression of glucose regulated protein 78 (GRP78), PERK, p-PERK, eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), p-eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP, Nrf2, Bcl-2, p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA), Caspase-3 and Caspase-12 in cells was detected by Western blot. In order to further study the molecular mechanism of Scu against HAEC injury, gene silencing technology was used to inhibit the expression of PERK in HAEC. The cells were divided into five groups: control group, AAPH+si-con group, AAPH+Scu+si-con group, AAPH+si-PERK group, AAPH+si-PERK+Scu group. The mRNA expression of PERK and eIF2 $\alpha$  in cells after si-PERK interference was detected by RT-qPCR. The protein expression of PERK, p-eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP, Nrf2, Bcl-2, PUMA, Caspase-3 and Caspase-12 in cells after si-PERK interference was detected by Western blot. **Results** The content of ROS and the rate of apoptosis were significantly reduced after Scu intervention ( $P < 0.01$ ). Scu could down-regulate the mRNA expression of PERK and eIF2 $\alpha$ , and down-regulate the protein expression of GRP78, p-PERK, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP, PUMA, Caspase-3, Caspase-12 and up-regulate the protein expression of Nrf2 and Bcl-2 ( $P < 0.01$ ). After interference with si-PERK, there were significant differences in the protein expression of PERK, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP, Nrf2, Bcl-2, PUMA, Caspase-3, Caspase-12, as well as the mRNA expression of PERK and eIF2 $\alpha$  in cells compared to before interference ( $P < 0.01$ ). It is proved that Scu could anti-endoplasmic role in reticulum stress and apoptosis, which is closely associated with the regulation of the PERK-Nrf2/ATF4-CHOP pathway. **Conclusion** Scu can effectively alleviate AAPH-induced injury to HAEC by regulating PERK-Nrf2/ATF4-CHOP pathways to inhibit endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis. **[KEY WORDS]** scutellarin; PERK-Nrf2/ATF4-CHOP pathway; human aortic endothelial cell; cell injury; 2,2-azobis(2-methylpropylimidate) dihydrochloride

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是以血管壁炎症和粥样硬化斑块的形成为特征的复杂动脉疾病。世界卫生组织统计结果显示,As已成为全球最常见的死亡原因之一。然而As的发病原因及病理生理过程复杂,As的发病机制至今仍无统一定论<sup>[1-2]</sup>。在As发病过程中,血管内皮细胞凋亡与细胞内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)密切相关<sup>[3-4]</sup>。As发病过程中的危险因素可以诱导内皮细胞凋亡,而As斑块中大量表达ERS标志物,促进细胞凋亡并最终导致As血栓形成<sup>[5]</sup>。因此,通过抑制ERS预防内皮细胞凋亡作为治疗As的一种策略受到广泛关注,研究药物对血管内皮细胞的保护作用也成为近年来的热点领域。

在哺乳动物细胞中,未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)由三种跨膜蛋白控制:蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、肌醇需要酶1 $\alpha$ (inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$ )和激活转录因子(activating transcription factor, ATF)<sup>[6]</sup>。在生理条件下,它们的结构域与内质网分子伴侣结合,保持无活性状态<sup>[7]</sup>。在ERS下,PERK被激活并发生磷酸化,进一步上调Bcl-2和p53正向调节因子(p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA)等凋亡相关因子的表达<sup>[8-9]</sup>。核因子E2相关因子2(nuclear

factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是一种可调节多种抗氧化及解毒基因的转录因子,也是PERK的下游底物<sup>[10]</sup>。在UPR和氧化应激期间,PERK信号传导激活Nrf2,使Nrf2从其负调节因子Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1)中解离,转移到细胞核中,与抗氧化反应元件(antioxidant reaction element, ARE)结合,并诱导一组II期解毒酶的表达,发挥抗氧化、抗凋亡的作用<sup>[11]</sup>。

黄酮类化合物具有抑菌、抗肿瘤、抗炎、抗氧化等能力。大量研究证实,很多黄酮类化合物可防治心血管疾病<sup>[12]</sup>。灯盏花乙素(scutellarin, Scu)是一种从植物灯盏花中提取的黄酮类化合物,其结构式为4',5,6-三羟基黄酮-7-葡萄糖醛酸甙,作为天然小分子化合物,目前已制成注射剂,具有良好的临床应用前景,是肿瘤、As、心脑血管缺血损伤、糖尿病微血管病变、高尿酸血症、阿尔茨海默病等潜在的治疗药物<sup>[13-14]</sup>。本课题组发现,在NALFD小鼠模型中Scu可上调Nrf2从而发挥降脂、保肝及抗氧化作用,Scu对As有治疗效果,但是关于Scu抗As的机制尚未明确<sup>[15-16]</sup>。结合已有关于Scu的相关报道,推测其具有较强的抗氧化活性,可以对抗2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐[2,2-azobis(2-methylpropylimidate) dihydrochloride, AAPH]诱导的人主动脉

内皮细胞(human aortic endothelial cell, HAEC)损伤过程中的 ERS 及内皮细胞凋亡。本研究旨在探讨 Scu 调控 PERK-Nrf2/ATF4-C/EBP 同源蛋白(C/EBP homology protein, CHOP)通路拮抗 AAPH 诱导的 HAEC 损伤机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株

HAEC 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.2 实验试剂

AAPH(纯度 $\geq 97\%$ )购自上海阿拉丁生化科技有限公司;Scu(纯度 $\geq 98\%$ )购自成都生物技术有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GSH-ST)试剂盒购自南京建成生物公司;PERK si-RNA 序列购自苏州吉玛公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;PERK、真核起始因子 2 $\alpha$ (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ )、CHOP、Caspase-3、 $\beta$ -actin、Nrf2、PUMA 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;GRP78、ATF4、Bcl-2、Caspase-12 抗体购自沈阳万类生物技术有限公司;p-PERK 购自英国 Abclonal 公司;p-eIF2 $\alpha$  抗体购自英国 Abcom 公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Lipofectamine3000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司。

### 1.3 实验仪器

UVP 凝胶成像系统;TS10 倒置显微镜;CF16RX 高速冷冻离心机;酶标仪;3366 型二氧化碳培养箱;流式细胞仪;ABI 7500 型 real time PCR 仪;PCR 扩增仪。

### 1.4 HAEC 的培养及分组

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 HAEC,当细胞长满瓶底时,用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化、传代、冻存。实验分组:对照组、AAPH 组(2 mmol/L AAPH)、AAPH+Scu 低剂量组(2 mmol/L AAPH+50  $\mu$ mol/L Scu)、AAPH+Scu 中剂量组(2 mmol/L AAPH+100  $\mu$ mol/L Scu)、AAPH+Scu 高剂量组(2 mmol/L AAPH+200  $\mu$ mol/L Scu),将细胞按照分组给药后置于孵箱中培养 24 h。

### 1.5 细胞中氧化相关酶 MDA、SOD、GSH-Px 及 GSH-ST 含量检测

按照 1.4 分组处理后,严格按照试剂盒说明书

操作步骤测定 MDA、SOD、GSH-Px、GSH-ST 的含量。

### 1.6 流式细胞术检测细胞活性氧含量和细胞凋亡率

按照 1.4 分组处理后,用 PBS 清洗细胞 2 次,胰蛋白酶消化细胞并离心,加入 10 mmol/L DCFH-DA 置于孵箱 30 min,每隔 5 min 上下颠倒混匀,PBS 清洗 2 次后,用荧光探针检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量。并参照 Annexin V-FITC 试剂盒说明书,利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

### 1.7 RT-qPCR 检测细胞中 PERK、eIF2 $\alpha$ mRNA 表达

用 Trizol 试剂提取总 RNA,根据说明书,使用 TransStart First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒进行操作,在 Applied Biosystem 仪上进行反转录扩增与实时定量 PCR。PERK 引物序列:上游 5'-ATCCCCATGGAACGACCTG-3',下游 5'-ACTCTGT-GCTCCCTGTCTCCAT-3';eIF2 $\alpha$  引物序列:上游 5'-TATGGTTTTATGCCTGCCAAAG-3',下游 5'-GTTTTT-CACATCCCACACTTCC-3'; $\beta$ -actin 引物序列:上游 5'-TCCTTCCTGGGCATGGAGT-3',下游 5'-CAGGAG-GAGCAATGATCTTGAT-3'。以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 PERK 和 eIF2 $\alpha$  mRNA 相对表达量。

### 1.8 Western blot 检测 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路相关蛋白表达

将细胞在 RIPA 裂解液中裂解,按照 BCA 法计算出待测样品的蛋白浓度,加入 2 $\times$ Loading buffer,放入沸水中煮 5 min 使蛋白样品变性。根据目的蛋白分子量配制不同浓度分离胶,电泳、转膜、封闭,将 PVDF 膜放入一抗[GRP78(1:1 000)、p-PERK(1:1 000)、PERK(1:500)、p-eIF2 $\alpha$ (1:1000)、eIF2 $\alpha$ (1:5 000)、ATF4(1:500)、CHOP(1:500)、Nrf2(1:500)、Bcl-2(1:500)、PUMA(1:500)、Caspase-3(1:1 000)、Caspase-12(1:1 000)]中,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日放入对应的二抗(1:3 000)中,置于摇床上 2 h,最后用自动凝胶系统成像,ECL 试剂盒显色,使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以  $\beta$ -actin 的灰度值为内参,并对结果进行归一化处理。

### 1.9 沉默 PERK 后检测 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路相关蛋白及 PERK、eIF2 $\alpha$ mRNA 表达

在 6 孔板中接种 HAEC,细胞密度为  $0.5 \times 10^5$  个/mL,置于 37  $^{\circ}$ C、含 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。24 h 后取出 6 孔板使用 Lipofectamine3000 试剂将 si-PERK 转染入细胞后继续培养 24 h,次日给予药物干预并进行后续实验。采用 Western blot 检测细胞中各蛋白的表达,RT-qPCR 测定细胞中 PERK、eIF2 $\alpha$  mRNA

表达。细胞分组:对照组、AAPH(2 mmol/L)+si-con组、AAPH(2 mmol/L)+Scu(200 μmol/L)+si-con组、AAPH(2 mmol/L)+si-PERK组、AAPH(2 mmol/L)+si-PERK+Scu(200 μmol/L)组。

1.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism 软件进行统计分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。所有实验中  $n = 3$ 。

2 结果

2.1 Scu 对 AAPH 诱导的细胞中 MDA、SOD、GSH-Px 及 GSH-ST 含量的影响

与对照组相比,AAPH 组 MDA 含量显著增高,SOD、GSH-Px、GSH-ST 含量显著降低 ( $P < 0.01$ );与 AAPH 组相比,Scu 干预后 MDA 含量显著降低,SOD、GSH-Px、GSH-ST 含量显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),说明 Scu 具有较好的抗氧化能力(图 1)。

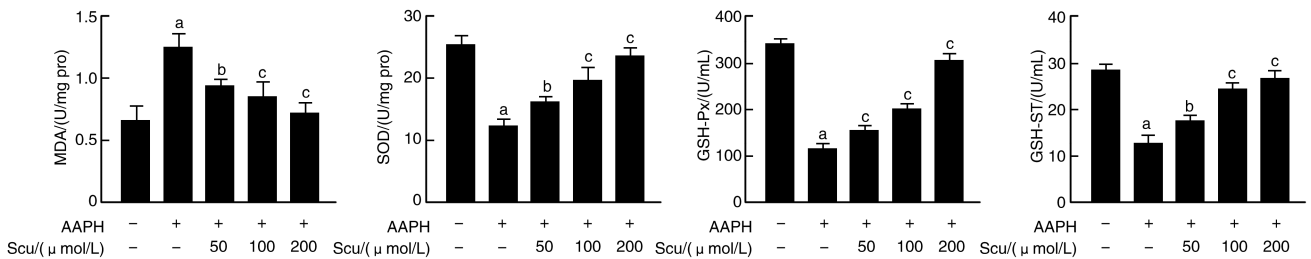


图 1. Scu 对 AAPH 诱导的细胞中 MDA、SOD、GSH-Px、GSH-ST 含量的影响

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,c 为  $P < 0.01$ ,与 AAPH 组比较。

Figure 1. The effect of Scu on the content of MDA, SOD, GSH Px and GSH-ST in AAPH induced cells

2.2 Scu 对 AAPH 诱导的细胞中 ROS 含量及细胞凋亡率的影响

与对照组相比,AAPH 组 ROS 含量、细胞凋亡

率显著升高 ( $P < 0.01$ );与 AAPH 组相比,Scu 干预后 ROS 含量、细胞凋亡率显著降低 ( $P < 0.01$ ;图 2)。

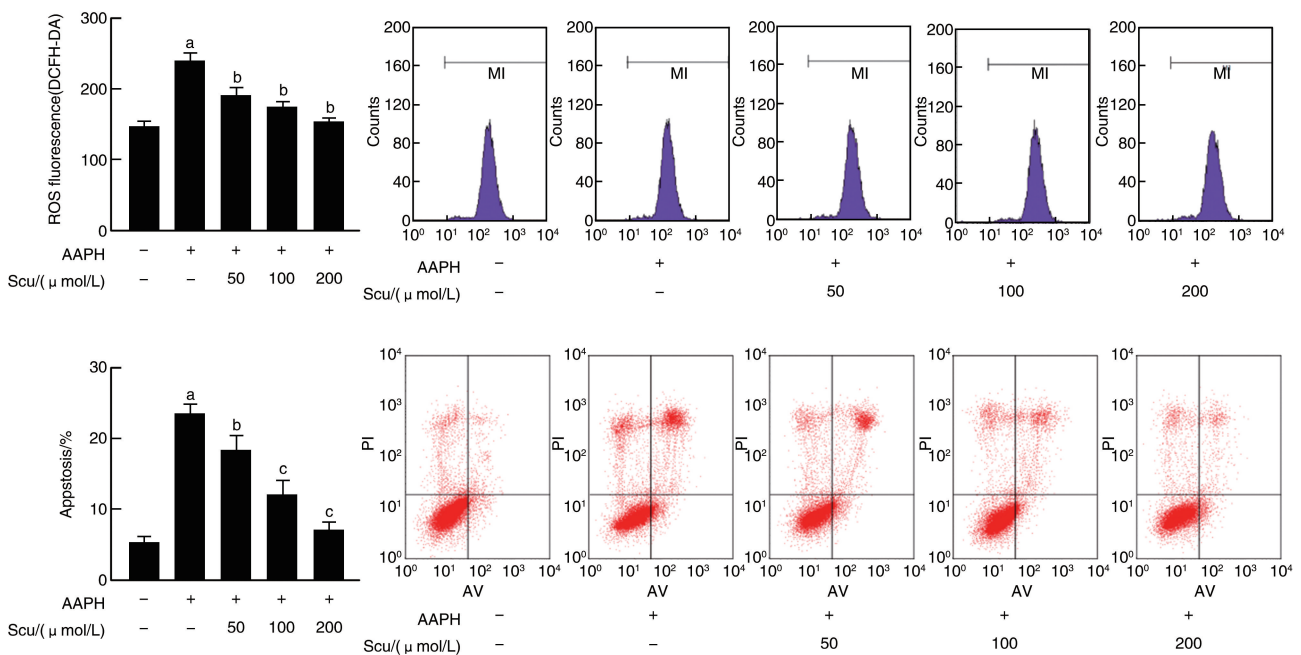


图 2. 流式细胞仪检测细胞 ROS 含量及凋亡率

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,c 为  $P < 0.01$ ,与 AAPH 组比较。

Figure 2. The content of ROS and apoptosis rate measured by flow cytometry

2.3 Scu 对 AAPH 诱导的细胞中 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路相关蛋白表达的影响

与对照组相比, AAPH 组 GRP78、p-PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、ATF4 及 CHOP 蛋白的表达显著升高 ( $P <$

0.01), Nrf2 蛋白的表达轻微升高 ( $P <$  0.05); Scu 干预后 GRP78、p-PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、ATF4 及 CHOP 蛋白的表达显著降低 (均  $P <$  0.01), Nrf2 蛋白的表达显著升高 ( $P <$  0.05 或  $P <$  0.01; 图 3)。

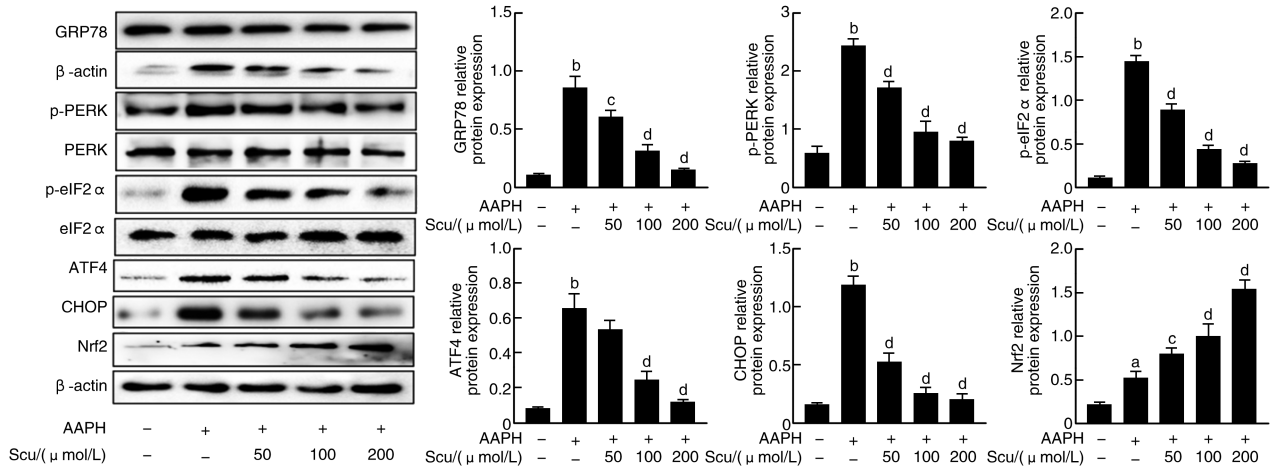


图 3. Scu 对 AAPH 诱导的细胞中 GRP78、p-PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、ATF4、CHOP 及 Nrf2 蛋白表达的影响  
a 为  $P <$  0.05, b 为  $P <$  0.01, 与对照组比较; c 为  $P <$  0.05, d 为  $P <$  0.01, 与 AAPH 组比较。

Figure 3. The effect of Scu on the protein expression of GRP78, p-PERK, p-eIF2 $\alpha$ , ATF4, CHOP and Nrf2 in AAPH induced cells

2.4 Scu 对 AAPH 诱导的细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组相比, AAPH 组 Bcl-2 蛋白的表达显著降低, PUMA、Caspase-3 及 Caspase-12 蛋白的表达显

著升高 ( $P <$  0.01); Scu 干预后 Bcl-2 蛋白的表达显著升高, PUMA、Caspase-3 及 Caspase-12 蛋白的表达显著降低 ( $P <$  0.01; 图 4)。

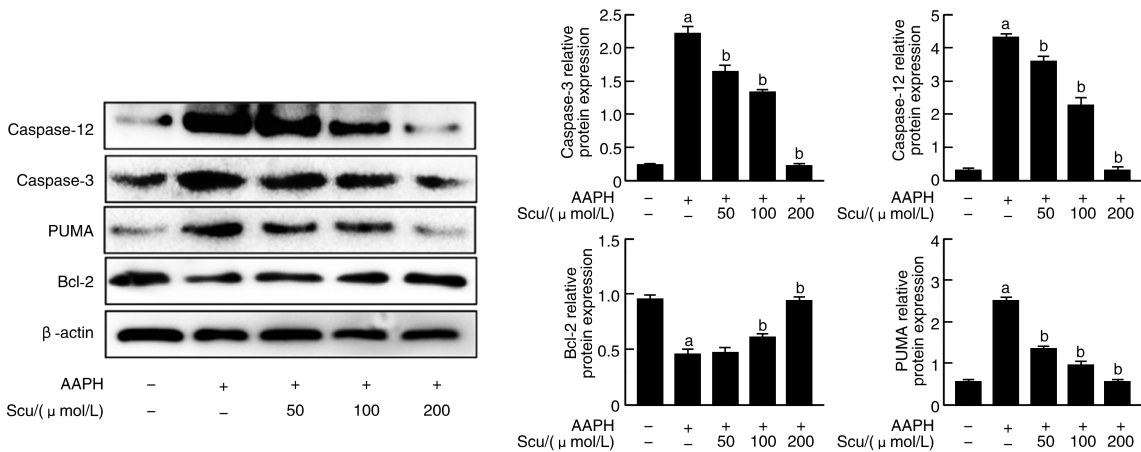


图 4. Scu 对 AAPH 诱导的细胞中 Bcl-2、PUMA、Caspase-3 及 Caspase-12 蛋白表达的影响  
a 为  $P <$  0.01, 与对照组比较; b 为  $P <$  0.01, 与 AAPH 组比较。

Figure 4. The effect of Scu on the protein expression of Bcl-2, PUMA, Caspase-3 and Caspase-12 in AAPH induced cells

2.5 沉默 PERK 后 Scu 对 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路相关蛋白表达的影响

与 AAPH+si-con 组相比, 沉默 PERK 或给予 Scu 后均可抑制 PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、ATF4、CHOP、Nrf2、

PUMA、Caspase-3、Caspase-12 蛋白的表达, 升高 Bcl-2 蛋白的表达 ( $P <$  0.01); 而用 Scu 处理 si-PERK 转染的细胞后, Scu 对 PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、ATF4、CHOP、Nrf2、PUMA、Caspase-3、Caspase-12 蛋白表达的抑制

作用以及对 Bcl-2 蛋白表达的升高作用明显减弱,甚至消失。进一步证明 Scu 是通过调控 PERK-

Nrf2/ATF4-CHOP 通路发挥抗氧化、抗凋亡作用的 ( $P < 0.01$ ; 图 5)。

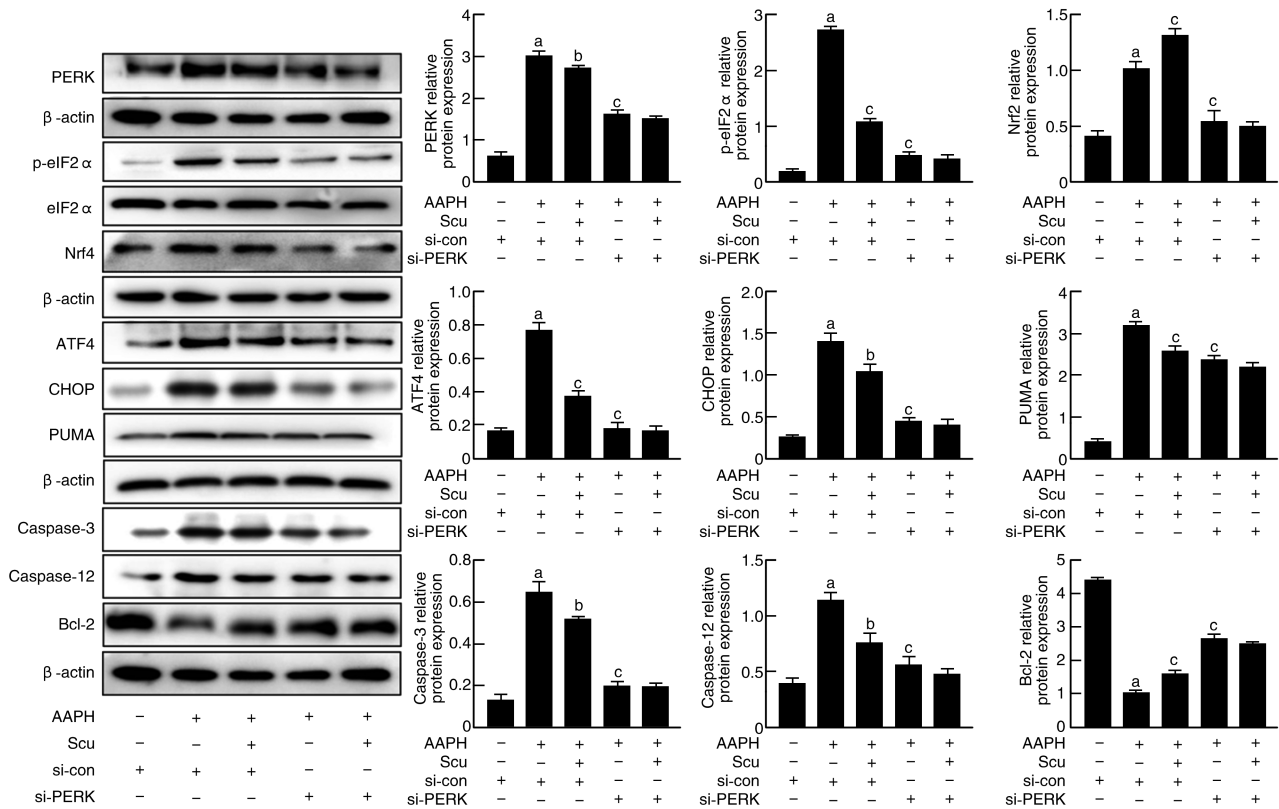


图 5. Scu 对 si-PERK 转染细胞后 PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、eIF2 $\alpha$ 、Nrf2、ATF4、CHOP、PUMA、Bcl-2、Caspase-3 及 Caspase-12 蛋白表达的影响

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与 AAPH+si-Con 组比较。

Figure 5. The effect of Scu on the protein expression of PERK, p-eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ , Nrf2, ATF4, CHOP, PUMA, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-12 after si-PERK transfected cells

### 2.6 Scu 对 AAPH 诱导的细胞中 PERK 和 eIF2 $\alpha$ mRNA 表达的影响

RT-qPCR 检测结果显示,与对照组相比,AAPH 组 PERK 和 eIF2 $\alpha$  mRNA 的表达显著增高 ( $P < 0.01$ );与 AAPH 组相比,Scu 干预后 PERK 和 eIF2 $\alpha$  mRNA 的表达显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与

AAPH 组相比,沉默 PERK 或给予 Scu 后均可抑制 PERK 和 eIF2 $\alpha$  mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ),而用 Scu 处理 si-PERK 转染的细胞后,Scu 对 PERK 和 eIF2 $\alpha$  mRNA 表达的抑制作用减弱甚至消失(图 6),进一步证明 Scu 通过调控 PERK 拮抗 AAPH 诱导的 HAEC 损伤。

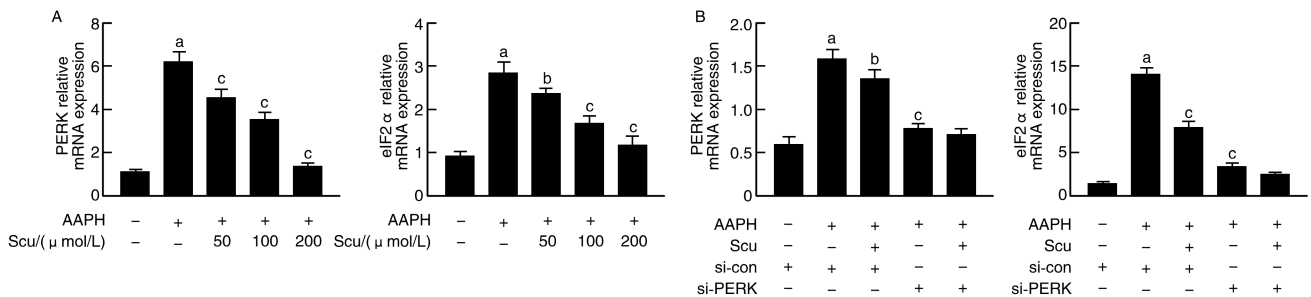


图 6. Scu 对细胞中 PERK 和 eIF2 $\alpha$  mRNA 表达的影响

a 为  $P < 0.01$  与,对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与 AAPH 组比较。

Figure 6. The effect of Scu on the mRNA expression of PERK and eIF2 $\alpha$  in cells

### 3 讨论

As 是一种慢性炎症性疾病,伴有脂质负荷病变,其诱因复杂,发病过程涉及多种类型细胞和细胞因子,是心脏病、中风和脑血栓等疾病的潜在病理基础<sup>[17]</sup>。关于 As 的发病机制目前仍不是十分明确,但大量证据表明,过量 ROS 产生引起的氧化应激在 As 的发病中具有重要作用。氧化应激和 ERS 诱导的内皮细胞损伤及凋亡与 As 的发生发展密切相关<sup>[18-19]</sup>。内皮细胞凋亡可能导致内皮细胞失去调节脂质稳态、免疫功能和炎症的能力,破坏内皮细胞的完整性和屏障功能,促进脂质沉积,导致 As 的发生<sup>[20-21]</sup>。

内质网是真核生物中重要的细胞器,为蛋白质的合成、折叠和组装提供了环境,并为钙的储存提供场所<sup>[22]</sup>。内质网稳态的破坏会导致未折叠或错误折叠的蛋白质积累,从而引发内质网应激。为了恢复内质网稳态,机体会激活 UPR 的适应性信号级联<sup>[23]</sup>。然而,在持续的 ERS 状况下,UPR 可导致内皮细胞凋亡<sup>[24]</sup>。

在正常的生理条件下,伴侣蛋白有助于新生蛋白质的折叠,从而阻止蛋白质在内质网中的聚集。GRP78,又称为免疫球蛋白重链结合蛋白,是一种重要的伴侣蛋白,GRP78 的上调可以作为内质网压力水平的判断指标<sup>[25-26]</sup>。通常情况下,GRP78 与跨膜传感器蛋白 PERK、ATF6 和 IRE1 $\alpha$  结合,使其处于不活跃状态<sup>[27]</sup>。然而,当机体受到氧化应激等诱发因素刺激时,内质网腔内未折叠蛋白质越积越多,以上三种跨膜蛋白从 GRP78 中分离出来,此时三种跨膜蛋白就处于激活状态并启动 UPR,而腔内未折叠蛋白则与 GRP78 结合<sup>[28]</sup>。

活化的 PERK 磷酸化下游底物 eIF2 的  $\alpha$  亚基<sup>[29]</sup>。eIF2 $\alpha$  的磷酸化通过改变其 mRNA 内的阅读框诱导 ATF4 的特异性翻译<sup>[30]</sup>。ATF4 是一种转录因子,可与启动子区结合,增强 CHOP mRNA 的表达,提高蛋白质水平<sup>[31]</sup>。CHOP 的增加导致抗凋亡蛋白 Bcl-2 基因表达下调并破坏氧化还原稳态,导致细胞凋亡<sup>[32]</sup>。

Nrf2 是 PERK 下游的重要细胞保护转录因子,PERK 介导的 Nrf2 磷酸化导致 Nrf2 与胞质抑制蛋白 KEAP1 解离<sup>[33-34]</sup>。这种解离释放 Nrf2 以促进核易位,进入细胞核后,Nrf2 就会结合抗启动子区的 ARE,在细胞抵御氧化应激中起着至关重要的作用<sup>[35-36]</sup>。

Scu 具有多种药理活性,已被证明具有抗炎、抗纤维化、免疫调节等功效<sup>[13]</sup>。在临床上,Scu 可有效治疗缺血性心脑血管疾病等<sup>[37]</sup>。在前期实验中,

本课题组发现 Scu 能够上调 Nrf2 从而保护肝脏,结合先前的报道,推测 Scu 可能调控 ERS 及细胞凋亡信号通路中的重要靶蛋白,抑制细胞凋亡。

本研究采用 AAPH 诱导 HAEC 损伤进行造模,并对氧化/抗氧化相关因子如 SOD、GSH-Px、GSH-ST 和 MDA 进行了检测。结果表明,Scu 能够降低 MDA 含量并升高 SOD、GSH-Px、GSH-ST 含量。同时,ROS 含量在经过 Scu 处理后也显著降低。这些结果证明,Scu 具有降血脂、抗氧化等作用。

为了研究 Scu 对抗 ERS 的分子机制,采用 Western blot 检测 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路相关蛋白的表达。结果显示,Scu 能抑制 PERK 和 eIF2 $\alpha$  的磷酸化,下调 GRP78、ATF4、CHOP 以及促凋亡蛋白 PUMA、Caspase-3、Caspase-12 的表达,并上调 Nrf2 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。另外,还采用了 RT-qPCR 检测 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路关键分子 PERK 和 eIF2 $\alpha$  mRNA 的表达。结果显示,Scu 能够显著下调 PERK 和 eIF2 $\alpha$  mRNA 的表达。此外,采用流式细胞术进一步证明了 Scu 能够抑制细胞凋亡。以上结果表明,Scu 可通过抑制 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路拮抗 AAPH 诱导的 HAEC 损伤。

为了进一步研究 Scu 调控 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 通路的具体机制,使用 RNA 干扰技术沉默关键因子 PERK 并检测下游蛋白的变化。结果发现,在干扰关键因子 PERK 后,PERK、p-eIF2 $\alpha$ 、ATF4、CHOP、PUMA、Caspase-3、Caspase-12 和 Bcl-2 蛋白的表达及 mRNA 水平与未干扰前有显著差异,并且 Scu 对蛋白和 mRNA 的调节作用也与未干扰前有显著差异。这说明 Scu 对 HAEC 的保护作用与其调控 PERK-Nrf2/ATF4-CHOP 信号传导途径密切相关。

#### [参考文献]

- [1] GORELOVA A, BERMAN M, AL GHOULEH I. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary arterial hypertension[J]. Antioxid Redox Signal, 2021, 34(12): 891-914.
- [2] LI X, QI H, CUI W, et al. Recent advances in targeted delivery of non-coding RNA-based therapeutics for atherosclerosis[J]. Mol Ther, 2022, 30(10): 3118-3132.
- [3] YU D, HUANG C, ZHU L, et al. In-depth analysis of prognostic markers associated with the tumor immune microenvironment and genetic mutations in breast cancer based on an NK cell-related risk model[J]. Heliyon, 2024, 10(1): e23930.
- [4] LEGEAY S, FAUTRAT P, NORMAN J B, et al. Selective deficiency in endothelial PTP1B protects from diabetes and endoplasmic reticulum stress-associated endothelial dysfunction via preventing endothelial cell apoptosis[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 127: 110200.
- [5] ZHOU Z, CHEN Y, NI W, et al. Upregulation of nuclear factor IA suppresses oxidized low-density lipoprotein-induced endoplasmic re-

- ticulum stress and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1009-1016.
- [6] 蔡佳伦, 刘双全. 内质网应激与病理性血管生成相关疾病[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(4): 342-348.  
CAI J L, LIU S Q. Endoplasmic reticulum stress and pathological angiogenesis related diseases [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(4): 342-348.
- [7] DIREITO I, GOMES D, MONTEIRO F L, et al. The clinicopathological significance of BiP/GRP-78 in breast cancer: a Meta-analysis of public datasets and immunohistochemical detection[J]. *Curr Oncol*, 2022, 29(12): 9066-9087.
- [8] SUN X, SUN Y, LIN S, et al. Histone deacetylase inhibitor valproic acid attenuates high glucose-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in NRK-52E cells[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(5): 4041-4047.
- [9] YOU C, ZHANG Z, YING H, et al. Blockage of calcium-sensing receptor improves chronic intermittent hypoxia-induced cognitive impairment by PERK-ATF4-CHOP pathway[J]. *Exp Neurol*, 2023, 368: 114500.
- [10] TAO T, WANG J, WANG X, et al. The PERK/Nrf2 pathway mediates endoplasmic reticulum stress-induced injury by upregulating endoplasmic reticulophagy in H9c2 cardiomyoblasts[J]. *Life Sci*, 2019, 237: 116944.
- [11] DONG L, XU M, LI Y, et al. SMURF1 attenuates endoplasmic reticulum stress by promoting the degradation of KEAP1 to activate NRF2 antioxidant pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(6): 361.
- [12] CIUMĂRNEAN L, MILACIU M V, RUNCAN O, et al. The effects of flavonoids in cardiovascular diseases [J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4320.
- [13] XIE Y, SUN G, TAO Y, et al. Current advances on the therapeutic potential of scutellarin: an updated review[J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2024, 14(1): 20.
- [14] ZHANG S, WEI D, LV S, et al. Scutellarin modulates the microbiota-gut-brain axis and improves cognitive impairment in APP/PS1 mice[J]. *J Alzheimers Dis*, 2022, 89(3): 955-975.
- [15] FAN H, MA X, LIN P, et al. Scutellarin prevents nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and hyperlipidemia via PI3K/AKT-dependent activation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) in rats[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 5599-5612.
- [16] MO J, YANG R, LI F, et al. Scutellarin protects against vascular endothelial dysfunction and prevents atherosclerosis via antioxidation [J]. *Phytomedicine*, 2018, 42: 66-74.
- [17] LIU F, WANG Y, YU J. Role of inflammation and immune response in atherosclerosis: mechanisms, modulations, and therapeutic targets [J]. *Hum Immunol*, 2023, 84(9): 439-449.
- [18] KANAMARU H, SUZUKI H. Potential therapeutic molecular targets for blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(7): 1138-1143.
- [19] JI C, YI H, HUANG J, et al. Propofol alleviates inflammation and apoptosis in HCY-induced HUVECs by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5): 333.
- [20] ZHANG Q, WEN X H, TANG S L, et al. Role and therapeutic potential of gelsolin in atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2023, 178: 59-67.
- [21] DUAN H, ZHANG Q, LIU J, et al. Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell, the promising way for natural medicines to treat atherosclerosis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 168: 105599.
- [22] YANG M, LUO S, WANG X, et al. ER-phagy: a new regulator of ER homeostasis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 684526.
- [23] FU F, DOROUDGAR S. IRE1/XBP1 and endoplasmic reticulum signaling-from basic to translational research for cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Physiol*, 2022, 28: 100552.
- [24] SOKOŁOWSKA P, SIATKOWSKA M, JÓŹWIAK-BEBENISTA M, et al. Diclofenac diminished the unfolded protein response (UPR) induced by tunicamycin in human endothelial cells [J]. *Molecules*, 2022, 27(11): 3449.
- [25] BONSIGNORE G, MARTINOTTI S, RANZATO E. Endoplasmic reticulum stress and cancer: could unfolded protein response be a druggable target for cancer therapy? [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1566.
- [26] LIU Z, LIU G, HA D P, et al. ER chaperone GRP78/BiP translocates to the nucleus under stress and acts as a transcriptional regulator [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(31): e2303448120.
- [27] KAPADIA P, BIKKINA P, LANDICHO M A, et al. Effect of anti-hyperglycemic drugs on endoplasmic reticulum (ER) stress in human coronary artery endothelial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 907: 174249.
- [28] CHEN L W, WANG S S, HUNG C H, et al. The Epstein-Barr virus lytic protein BMLF1 induces upregulation of GRP78 expression through ATF6 activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4024.
- [29] WU L, LIANG C, HUANG X, et al. Salubrinal regulates the apoptosis of adrenocortical carcinoma cells via the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 signaling pathway [J]. *Int J Endocrinol*, 2021, 2021: 5038130.
- [30] PATHAK S S, LIU D, LI T, et al. The eIF2 $\alpha$  kinase GCN2 modulates period and rhythmicity of the circadian clock by translational control of ATF4 [J]. *Neuron*, 2019, 104(4): 724-735.
- [31] KASPAR S, OERTLIN C, SZCZEPANOWSKA K, et al. Adaptation to mitochondrial stress requires CHOP-directed tuning of ISR [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(22): eab0971.
- [32] DE JONG M R W, LANGENDONK M, REITSMA B, et al. Heterogeneous pattern of dependence on anti-apoptotic BCL-2 family proteins upon CHOP treatment in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 6036.
- [33] SARCINELLI C, DRAGIC H, PIECYK M, et al. ATF4-dependent NRF2 transcriptional regulation promotes antioxidant protection during endoplasmic reticulum stress [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(3): 569.
- [34] WANG J, LU L, CHEN S, et al. Up-regulation of PERK/Nrf2/HO-1 axis protects myocardial tissues of mice from damage triggered by ischemia-reperfusion through ameliorating endoplasmic reticulum stress [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(3): 500-511.
- [35] ZHANG X, YU Y, LEI H, et al. The Nrf-2/HO-1 signaling axis: a ray of hope in cardiovascular diseases [J]. *Cardiol Res Pract*, 2020, 2020: 5695723.
- [36] 李军芳, 来利红. 柚皮素对高糖诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡及 Nrf2/ARE 信号通路的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(12): 1040-1044.  
LI J F, LAI L H. Effects of naringin on apoptosis and Nrf2/ARE signaling pathway of H9c2 cardiomyocytes induced by high glucose [J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(12): 1040-1044.
- [37] HUANG H, GENG Q, YAO H, et al. Protective effect of scutellarin on myocardial infarction induced by isoprenaline in rats [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(3): 267-276.