

本文引用: 李江涛, 张德宝, 陈俊羽, 等. 恩格列净通过抑制 EGFR 信号通路减轻 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(9): 772-780. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.09.005.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2025)33-09-0772-09

## 恩格列净通过抑制 EGFR 信号通路减轻 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞损伤

李江涛<sup>1</sup>, 张德宝<sup>1</sup>, 陈俊羽<sup>2</sup>, 柯晓<sup>2</sup>, 黄于朗<sup>1</sup>

1. 深圳市前海蛇口自贸区医院心内科, 广东省深圳市 518067; 2. 中国医学科学院阜外医院深圳医院心内科, 广东省深圳市 518057

**[摘要]** [目的] 研究恩格列净修复氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤的作用机制。[方法] 体外培养原代 HUVEC; 用 ox-LDL 诱导 HUVEC 损伤, CCK-8 法测定细胞存活率; EDU 法检测细胞增殖; Western blot 法检测 HUVEC 中 Ki-67、Bcl-2、cleaved Caspase-3、Bax、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)和表皮生长因子受体(EGFR)的蛋白表达水平; RT-qPCR 检测 HUVEC 中白细胞介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的 mRNA 表达水平; 利用 Swiss targets、Gene Cards databases、GO 和 KEGG、蛋白质网络互作分析(PPI)、分子对接(Click Docking, <https://mcule.com/apps/1-click-docking/>)进行恩格列净作用靶标预测。[结果] CCK-8 结果表明, 0.025  $\mu\text{mol/L}$  恩格列净可明显减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤( $P < 0.01$ )。EDU 结果表明, ox-LDL 处理 HUVEC 24 h 后, 细胞增殖受到明显抑制( $P < 0.01$ ), 而加入恩格列净后可明显缓解细胞增殖抑制情况( $P < 0.01$ )。Western blot 结果显示, HUVEC 经 ox-LDL 处理后, Ki-67、Bcl-2 和 eNOS 的蛋白表达水平显著减少, cleaved Caspase-3、Bax、ICAM-1 和 VCAM-1 的蛋白表达水平明显增加( $P < 0.05$ ); 加入恩格列净后, 上述蛋白表达趋势被逆转( $P < 0.05$ ); RT-qPCR 结果表明, HUVEC 经 ox-LDL 处理后, IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平上升( $P < 0.01$ ), 加入恩格列净后, IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平有所下降( $P < 0.05$ ); 而加入 EGFR 激动剂 NSC 228155 后, 恩格列净拮抗 ox-LDL 介导的内皮细胞损伤作用被明显逆转( $P < 0.05$ )。[结论] 恩格列净可显著减轻 ox-LDL 所致的 HUVEC 损伤, 该作用机制可能涉及 EGFR 信号通路。

**[关键词]** 动脉粥样硬化; 恩格列净; 表皮生长因子受体; 氧化型低密度脂蛋白; 人脐静脉内皮细胞

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Empagliflozin alleviates ox-LDL-induced injury of human umbilical vein endothelial cells by inhibiting the EGFR signaling pathway

LI Jiangtao<sup>1</sup>, ZHANG Debao<sup>1</sup>, CHEN Junyu<sup>2</sup>, KE Xiao<sup>2</sup>, HUANG Yulang<sup>1</sup>

1. Department of Cardiology, Shenzhen Qianhai Shekou Free Trade Zone Hospital, Shenzhen, Guangdong 518067, China; 2. Department of Cardiology, Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen, Guangdong 518057, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the protective and reparative effect of empagliflozin on oxidized-low density lipoprotein (ox-LDL)-induced injury in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and its mechanism of action.

**Methods** Primary HUVEC were cultured in vitro. ox-LDL was used to induce HUVEC injury model, and the cell survival rate was measured by CCK-8 assay. EDU method was used to detect cell proliferation. Western blot was used to detect the protein levels of Ki-67, Bcl-2, cleaved Caspase-3, Bax, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in HUVEC. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in HUVEC. Using Swiss targets, GeneCards databases, gene ontology (GO) and Kyoto encyclope-

[收稿日期] 2025-02-21

[修回日期] 2025-06-23

[基金项目] 深圳市科技计划项目(JCYJ20220531091611026); 深圳市南山区卫生科技计划项目(NS2022090); 广东省自然科学基金面上项目(2021A1515010178)

[作者简介] 李江涛, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的分子调控机制, E-mail: 61616630@qq.com. 通信作者黄于朗, 硕士, 副主任医师, 研究方向为干细胞调控血管修复及心肌纤维化的分子机制, E-mail: m13723713101@163.com.

dia of genes and genomes (KEGG), protein-protein interaction (PPI) network analysis, and ClickDocking (<https://mcule.com/apps/1-click-docking/>) to predict the target of empagliflozin. **Results** CCK-8 results showed that 0.025  $\mu\text{mol/L}$  empagliflozin significantly alleviated ox-LDL-induced HUVEC injury ( $P < 0.01$ ). EDU results showed that ox-LDL treatment for 24 h significantly inhibited the proliferation of HUVEC ( $P < 0.01$ ), while empagliflozin treatment significantly alleviated the inhibition of cell proliferation ( $P < 0.01$ ). The results of Western blot showed ox-LDL treatment significantly decreased the protein expression levels of Ki-67, Bcl-2, and eNOS, and increased the protein expression levels of cleaved Caspase-3, Bax, ICAM-1, and VCAM-1 in HUVEC (all  $P < 0.05$ ). However, empagliflozin treatment reversed these changes (all  $P < 0.05$ ). RT-qPCR results showed that ox-LDL treatment increased the mRNA expression levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in HUVEC ( $P < 0.01$ ), while empagliflozin treatment decreased their expression levels ( $P < 0.05$ ). However, after adding EGFR agonist NSC 228155, the protective effect of empagliflozin against ox-LDL-mediated HUVEC injury was significantly reversed ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Empagliflozin can significantly reduce ox-LDL-induced HUVEC injury, which may be related to EGFR signaling pathway.

[**KEY WORDS**] atherosclerosis; empagliflozin; epidermal growth factor receptor; oxidized-low density lipoprotein; human umbilical vein endothelial cell

动脉粥样硬化性心血管疾病 (atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD) 是一种慢性免疫炎症性疾病, 严重威胁全球人类健康, 在总死亡病因中居首位。根据《中国心血管健康与疾病报告 2023》<sup>[1]</sup>, 心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 除了本身的高死亡率, 还可引起多种重要的并发症, 给社会和居民造成沉重压力, 因此加强政府主导的 CVD 防治工作迫在眉睫<sup>[2]</sup>。ASCVD 的病理生理过程较为复杂, 涉及血管局部免疫反应和脂质浸润, 纤维组织的增生及钙沉积, 这些因素可导致斑块破裂和血栓形成, 最终引起血管狭窄和闭塞。这种现象可能累及多条血管或血管的多个部位, 进而引发靶器官的缺血性病变<sup>[3-5]</sup>。在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的病理过程中, 血管内皮细胞完整性的破坏是关键性的始动环节。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized-low density lipoprotein, ox-LDL) 对 CVD 具有早期预警作用。其特异性自身抗体的产生可直接导致内皮细胞功能紊乱, 在 As 的病理进程中起着决定性作用<sup>[6-7]</sup>。因此, 如何修复 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤是当前治疗 ASCVD 的热点问题。

恩格列净 (empagliflozin) 作为一类高选择性、强效型钠-葡萄糖共转运蛋白 2 (sodium-dependent glucose transporters 2, SGLT-2) 抑制剂, 主要作用于肾脏近曲小管上皮细胞表面的 SGLT-2 受体, 该受体在生理条件下负责约 90% 的肾小球滤过葡萄糖重吸收过程。通过抑制 SGLT-2 受体功能, 恩格列净可显著降低肾脏对葡萄糖的再吸收能力, 促使过量葡萄糖通过尿液排出体外, 从而达到调控血糖水平的效果, 已在 2014 年被美国及欧洲药物管理局批准用于口服药物治疗 2 型糖尿病<sup>[8-9]</sup>。近年来, 多项大型随机对照临床试验表明<sup>[10-12]</sup>, SGLT-2 抑制剂, 如鲁

格列净 (luseogliflozin)、依格列净 (ipragliflozin) 和恩格列净有着显著的抗氧化和抗炎作用, 可使心力衰竭患者因 CVD 死亡或心力衰竭发病住院的比例降低。然而, 研究表明 SGLT-2 主要表达于肾脏组织中, 几乎不在心肌组织表达, SGLT-2 抑制剂通过降糖或非降糖途径改善心血管事件的具体机制仍需进行深入探究。本研究通过 ox-LDL 处理人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 建立内皮细胞损伤模型, 初步探索恩格列净对 ox-LDL 引起的 HUVEC 损伤的作用及相关机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞来源与试剂

原代 HUVEC (WARNER, WN-10112)、HUVEC 专用培养基 (WARNER, WN-10112A)、ox-LDL (Biolong, YB-002)、青霉素-链霉素溶液 (Biosharp, BL505A)、CCK-8 (Beyotime, C0038)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Biosharp, BL521A)、ECL 发光液 (Thermo Scientific, 34080)、TBS 缓冲液 (Servicebio, G0001)、10% PAGE 胶快速制备试剂盒 (Servicebio, G2177)、RIPA 裂解液 (强) (Servicebio, G2002)、蛋白酶抑制剂 PMSF (Servicebio, G2008)、磷酸化蛋白酶抑制剂 (Servicebio, G2006)、5 $\times$  SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (Beyotime, P0015L)、PageRuler 预染蛋白 Marker (Thermo Scientific, 26616)、4% 多聚甲醛 (Biosharp, BL539A)、BSA Fraction V (Beyotime, ST023)、BD 脱脂奶粉 (BD, 232100)、细胞计数板 (Invitrogen, C10228)、EDU 细胞增殖检测试剂盒 (Beyotime, C0085S)。

### 1.2 细胞培养

原代 HUVEC 通过免疫荧光鉴定。HUVEC 用

含 10% 胎牛血清、1% 内皮细胞生长因子、1% 双抗的内皮细胞培养基进行培养;用于培养细胞的培养箱需设定 37 °C 恒温、5% CO<sub>2</sub>。当细胞融合度超过 80% 时按 (1:2) 或 (1:3) 的比例进行传代培养。在后续实验研究中,将细胞传代至第 3~5 代时,铺板后随机分为对照组、模型组 (ox-LDL 组)、ox-LDL+恩格列净组、ox-LDL+表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 激动剂 NSC 228155 组、ox-LDL+NSC 228155+恩格列净组。

### 1.3 CCK-8 法评估 ox-LDL 对 HUVEC 细胞活力的影响

将 HUVEC 用胰蛋白酶消化成单细胞悬液后,以  $8 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中,使用正常或 100 mg/L ox-LDL 处理 24 h,再使用不同剂量恩格列净处理 24 h。采用 CCK-8 法检测细胞活力:每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液,置于恒温培养箱中反应 2 h,随后采用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度值。

### 1.4 EDU 法检测 ox-LDL 对 HUVEC 细胞增殖能力的影响

共聚焦小皿中每皿  $1 \times 10^5$  个细胞。实验组分别采用 100 mg/L ox-LDL、100 mg/L ox-LDL 与二甲基亚砜 (DMSO) 的混合溶液及 100 mg/L ox-LDL 与恩格列净处理 24 h,随后加入 10  $\mu$ mol/L EDU、并在培养箱中孵育 2 h;移除含 EDU 的培养基,每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛溶液 (PFA) 进行室温固定 15 min;固定完成后,移除 PFA,使用 1 mL 洗涤缓冲液对细胞进行 3 次清洗,每次 5 min;随后,每孔加 1 mL 通透液室温孵育 15 min;洗涤 2 次,每次 5 min;为阻断内源性过氧化物酶活性,每孔加入 1 mL 封闭液室温处理 20 min,随后洗涤 3 次,每次 2 min;每孔加 0.5 mL Click 反应液,进行 30 min 室温暗孵育,随后洗涤 3 次,每次 5 min;最后,每孔加 1 mL Hoechst 染色工作液,在避光条件下进行 10 min 室温孵育,洗涤 3 次,每次 2 min;使用激光共聚焦显微镜进行观察和图像采集。

### 1.5 Western blot 检测蛋白表达水平

在 10 cm 细胞培养皿中每孔接种  $5 \times 10^5$  个细胞。经药物干预 24 h 后,采用胰酶消化法收集细胞,离心后以 PBS 缓冲液洗涤 3 次。随后,每孔加入 250  $\mu$ L 裂解液,于冰上裂解 30 min,期间每隔 5~10 min 进行吹打混匀;4 °C 离心收集上清液,BCA 试剂盒检测各个样品的蛋白质浓度,并使用裂解液将样品调整至相同浓度,加入 5 $\times$ Loading buffer 充分混匀后,100 °C 变性 10 min,随后置于 -80 °C 冰箱保存。SDS-PAGE 电泳,每泳道上样量为 10~15  $\mu$ g。电泳结束后转膜至

0.45  $\mu$ m PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜,1:10 000 稀释二抗室温孵育 1 h 后显影成像。

### 1.6 恩格列净作用靶标预测

用 Swiss targets 预测恩格列净的目标靶点,并与 Gene Cards databases 检索 HUVEC 损伤相关基因以及 GSE206927 获得的差异基因取交集,获得恩格列净调控 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤潜在目标靶点;利用 GO 和 KEGG 对获得的目标靶点进行富集分析;利用蛋白质网络互作分析 (protein-protein interaction network, PPI) 对获得的目标靶点进行蛋白互作分析;利用分子对接 (Click Docking, <https://mucle.com/apps/1-click-docking/>) 模拟恩格列净与目标靶点的相互作用<sup>[13]</sup>。

### 1.7 RT-qPCR 检测 mRNA 水平

6 孔板每孔  $1 \times 10^5$  个 HUVEC。加药处理 24 h 后,预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,提取细胞 RNA, Nano Drop 对 RNA 进行定量,Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒进行反转录,产物 cDNA 应用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒对靶基因进行定量检测。使用 GAPDH 作为内参,mRNA 表达量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算。引物序列见表 1。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequences used for RT-qPCR

基因名称	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
IL-6	AGTGAGGAACAAGC-CAGAGC	AGCTGCGCAGAAT-GAGATGA
TNF- $\alpha$	CTTCTCGAAC-CCCGAGTGAC	TGAGGTACAGGC-CCTCTGAT
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTC-CAAAAT	GGCTGTTGTCTACT-TCTCATGG

### 1.8 数据统计方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 GraphPad Prism 9.0 进行数据可视化与统计分析。针对两组数据的差异性检验,运用独立样本 *t* 检验进行对比分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 恩格列净拮抗 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤安全且有效剂量

在 PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 中检索获得的恩格列净的 2D 和 3D 分子结构式 (图 1A);正常或 100 mg/L ox-LDL 诱导

HUVEC 24 h 后使用不同剂量的恩格列净处理 24 h, 通过 CCK-8 检测恩格列净对 HUVEC 细胞活力的影响。结果表明, 与对照组相比, 100 mg/L ox-LDL 使

HUVEC 细胞活力降低 32.91%, 而 0.025  $\mu\text{mol/L}$  的恩格列净可恢复细胞活力 ( $P < 0.01$ ), 后续实验选用 0.025  $\mu\text{mol/L}$  恩格列净进行 (图 1B)。

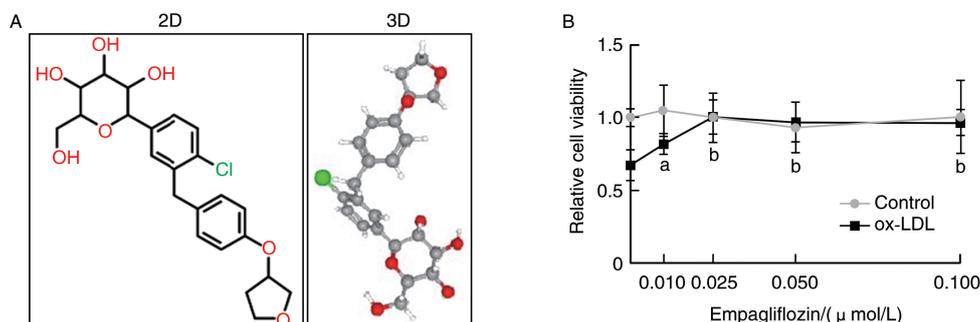


图 1. 恩格列净安全且有效剂量

A 为恩格列净的 2D 和 3D 分子结构式; B 为 CCK-8 检测不同剂量恩格列净对正常或 100 mg/L ox-LDL 诱导的 HUVEC 的影响 ( $n = 3$ )。

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与 ox-LDL 处理下 0  $\mu\text{mol/L}$  恩格列净组比较。

Figure 1. Safe and effective dose of empagliflozin

## 2.2 恩格列净改善 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤

EDU 结果表明, ox-LDL 抑制 HUVEC 增殖 ( $P < 0.01$ ), 而恩格列净干预可以显著逆转以上现象 ( $P < 0.01$ , 图 2A)。Western blot 检测细胞增殖和凋亡标志蛋白 (Ki-67、Bcl-2、cleaved Caspase-3 和 Bax) 表达, 结果表明, ox-LDL 可使 HUVEC 中 Ki-67 的蛋白表达下调 58.85%, Bcl-2 的蛋白表达下调 49.63% ( $P < 0.01$ ), cleaved Caspase-3 的蛋白表达上调 165.13%, Bax 的蛋白表达上调 141.60% ( $P < 0.05$ ), 而恩格列净的干预能够有效逆转上述改变 ( $P < 0.05$ , 图 2B), 提示恩格列净可改善 ox-LDL 导致的 HUVEC 细胞增殖抑制和凋亡增加现象。最后, 通过 Western blot 检测细胞炎症相关标志蛋白 (eNOS、ICAM-1 和 VCAM-1) 的表达, RT-qPCR 检测炎症因子 (IL-6 和 TNF- $\alpha$ ) 的 mRNA 表达水平来评估细胞炎症状态。结果表明, ox-LDL 可使 HUVEC 中 eNOS 的蛋白表达减少 50.22% ( $P < 0.01$ ), ICAM-1 和 VCAM-1 的蛋白表达分别增加 98.50% 和 136.16% ( $P < 0.01$ ), 而以上作用可以被恩格列净显著抑制 ( $P < 0.05$ , 图 2C); RT-qPCR 结果表明, ox-LDL 可使 HUVEC 中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达水平分别上升 477.80% 和 47.93% ( $P < 0.01$ ), 该现象可被恩格列净抑制 ( $P < 0.05$ , 图 2D), 提示恩格列净可抑制 ox-LDL 导致的细胞炎症状态。以上结果表明, 恩格列净具有拮抗 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤作用。

## 2.3 恩格列净对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤的调控机制

用 Swiss targets 预测恩格列净的目标靶点, 并与

Gene Cards databases 检索 HUVEC 损伤相关基因以及 GSE206927 获得的差异基因取交集, 获得恩格列净调控 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤的 22 个潜在目标靶点 (图 3A 和 3B)。接着, 对以上获得的 22 个目标靶点进行 GO 和 KEGG 分析, 发现其主要富集在缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)、Rap1、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH)、叉头盒 O (forkhead box O, FoxO) 等信号通路 (图 3C)。随后, 对 22 个目标靶点进行 PPI 分析, 发现 EGFR、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、热休克蛋白家族 A 成员 5 (heat shock protein family A member 5, HSPA5)、MAP2K1、MAPK11、MAPK9 和溶质载体家族 2 成员 1 (solute carrier family 2 member 1, SLC2A1) 为恩格列净调控 ox-LDL 诱导的 HUVEC 的关键基因 (图 4A)。进一步进行分子对接 (Click Docking, <https://mcule.com/apps/1-click-docking/>), 发现 EGFR、HSPA5、MAP2K1、MAPK11、MAPK9 与恩格列净的对接分子评价较高 (图 4B)。此外, KEGG 富集分析表明, EGFR、MAP2K1、MAPK11、MAPK9 主要富集在 MAPK 信号通路, 且 EGFR 在 MAP2K1、MAPK11、MAPK9 的上游。因此, 我们推测 EGFR 可能是恩格列净改善 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤的关键效应分子。我们进一步在体外细胞模型中验证恩格列净在拮抗 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤后对 EGFR 蛋白表达的影响。Western blot 结果表明, ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤中 EGFR 蛋白表达增加

112.06% ( $P < 0.05$ ), 而给予恩格列净处理可显著抑制 EGFR 蛋白表达 ( $P < 0.05$ , 图 4C), 进一步提示

EGFR 可能是恩格列净调控 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤的关键靶点。

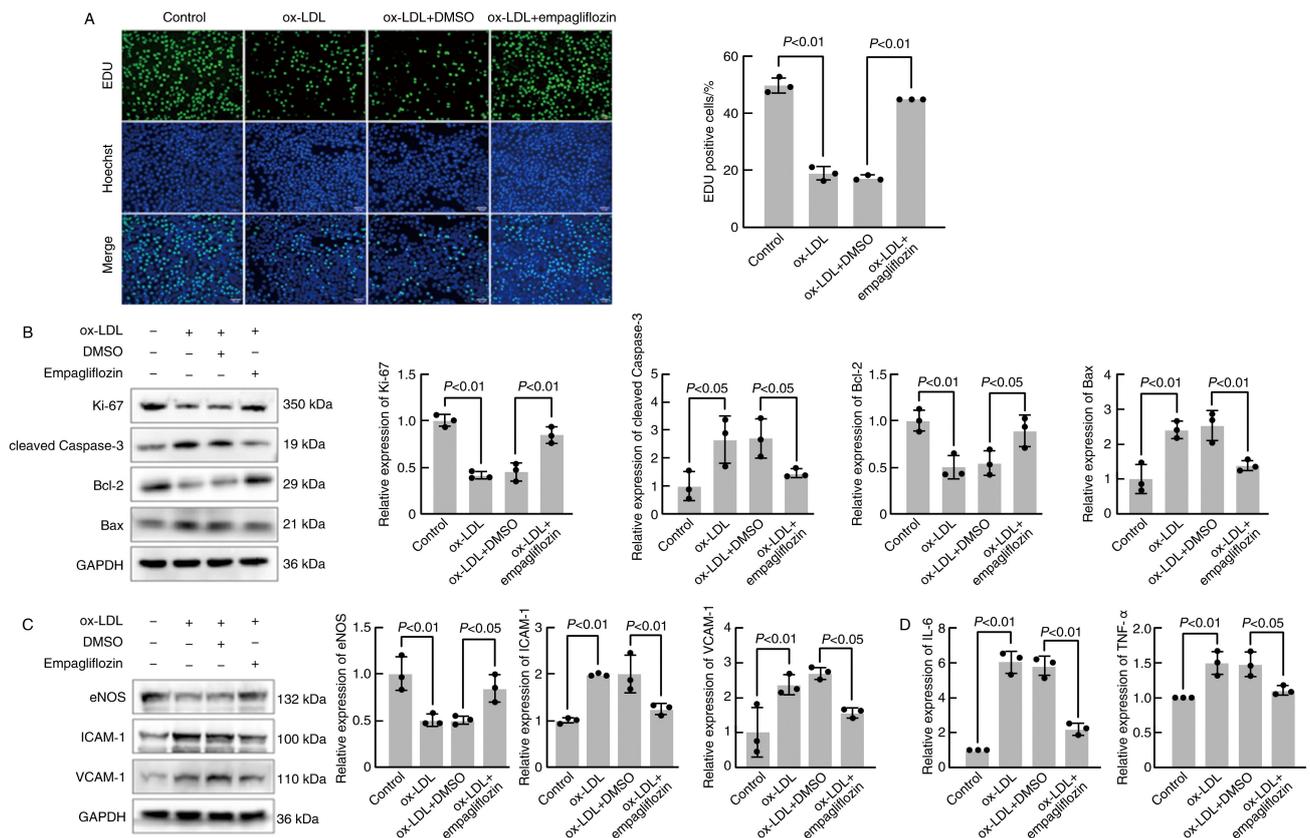


图 2. 恩格列净对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤的影响 ( $n=3$ )

A 为 EDU 法检测恩格列净对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖能力的影响; B 为 Western blot 检测细胞增殖和凋亡标志蛋白的表达水平; C 为 Western blot 检测细胞炎症相关标志蛋白的表达水平; D 为 RT-qPCR 检测细胞中炎症因子的表达水平。

Figure 2. Effect of empagliflozin on ox-LDL-induced HUVEC injury ( $n=3$ )

#### 2.4 恩格列净通过抑制 EGFR 信号通路减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤

用 EGFR 激动剂 (10  $\mu\text{mol/L}$  NSC 228155) 处理恩格列净干预或未干预的 ox-LDL 损伤的 HUVEC, Western blot 检测 EGFR 信号通路中蛋白表达量变化, 结果表明, NSC 228155 可显著增加磷酸化细胞外调节激酶 (p-extracellular regulated kinase, p-ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, p-JNK) 和丝裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14/p-p38) 的蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 而且可以拮抗恩格列净对 ox-LDL 诱导的 p-ERK、p-JNK 和 p-p38 蛋白表达的抑制作用 ( $P < 0.05$ , 图 5A)。随后, EDU 染色结果表明, NSC 228155 加剧 ox-LDL 对 HUVEC 增殖能力的抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 而且可以逆转恩格列净对 HUVEC 的保护作用 ( $P < 0.01$ , 图 5B)。接着, 通过 Western blot 检测细胞增殖和凋亡标志蛋白 (Ki-67、Bcl-2、cleaved Caspase-3

和 Bax) 表达来评估细胞增殖和凋亡情况。结果表明, NSC 228155 处理使 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 Ki-67 和 Bcl-2 蛋白的表达水平分别降低 54.05% 和 44.53% ( $P < 0.05$ ), 使 cleaved Caspase-3 和 Bax 的蛋白表达分别增加 47.21% 和 59.99% ( $P < 0.05$ ), 同时可以拮抗恩格列净对以上蛋白的调控作用 ( $P < 0.05$ , 图 6A)。最后, 通过 Western blot 检测细胞炎症相关标志蛋白 (eNOS、ICAM-1 和 VCAM-1) 表达, RT-qPCR 检测炎症因子 (IL-6 和 TNF- $\alpha$ ) 的表达水平来评估细胞炎症状态。结果表明, 给予 NSC 228155 可使 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 eNOS 蛋白表达减少 53.77% ( $P < 0.01$ )、ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达分别增加 26.91% 和 62.93% ( $P < 0.05$ ), 且 NSC 228155 可以显著逆转恩格列净对以上蛋白的调控作用 ( $P < 0.05$ , 图 6B); RT-qPCR 结果表明, 给予 NSC 228155 可使 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达水平分别增加 58.36% 和

97.45% ( $P < 0.05$ ), 且 NSC 228155 可以显著逆转恩格列净对以上 mRNA 的调控作用 ( $P < 0.01$ , 图 6C)。

以上结果表明, 恩格列净通过抑制 EGFR 信号通路减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤。

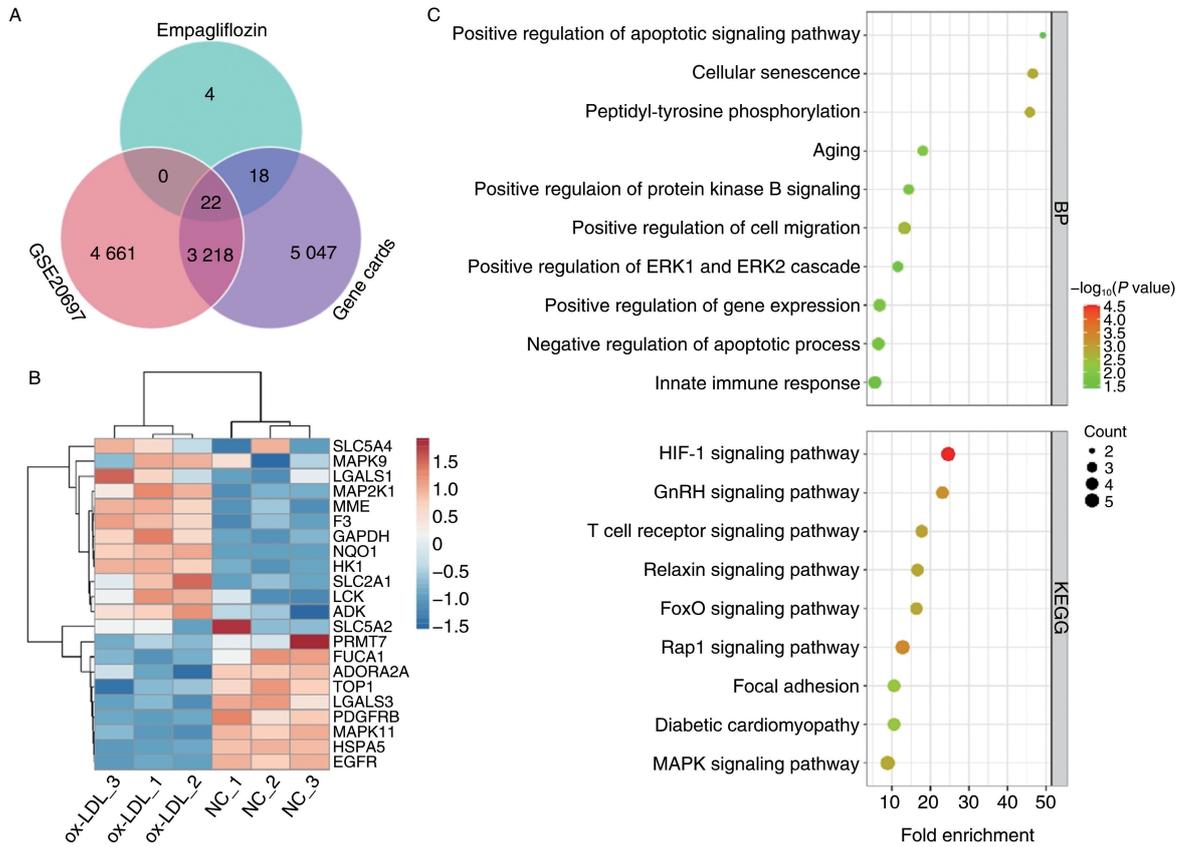


图 3. 恩格列净作用靶点分析

A、B 为 Swiss targets、Gene Cards databases、GSE206927 预测的恩格列净的目标靶点；C 为 GO 和 KEGG 分析目标靶点的富集通路。

Figure 3. Empagliflozin target analysis

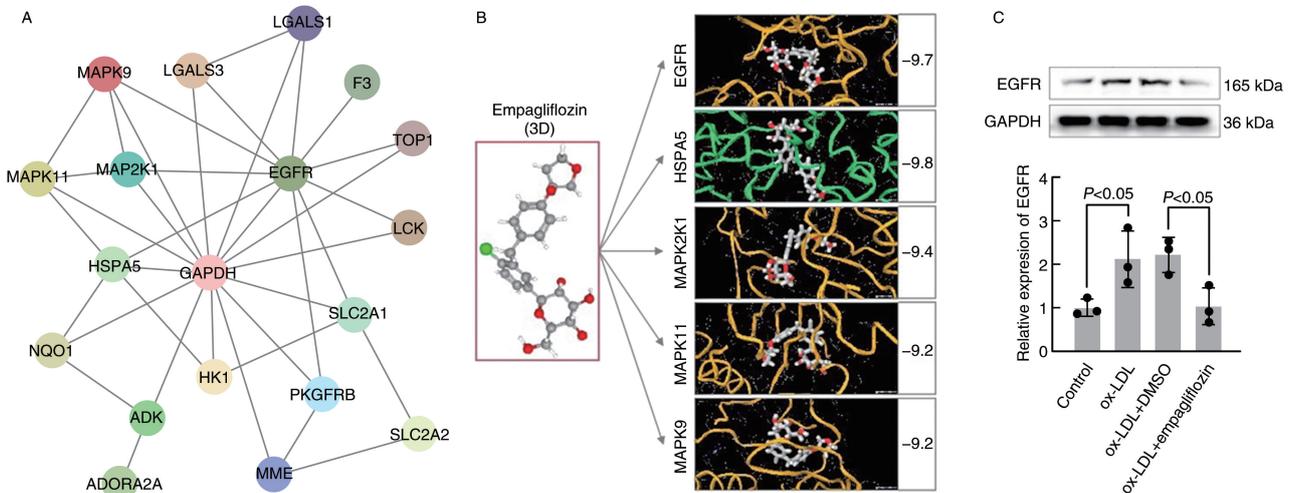


图 4. 恩格列净作用通路预测

A 为目标靶点的 PPI 分析; B 为恩格列净与目标靶点的分子对接预测; C 为 Western blot 检测细胞 EGFR 蛋白的表达水平 ( $n = 3$ )。

Figure 4. Pathway prediction of empagliflozin

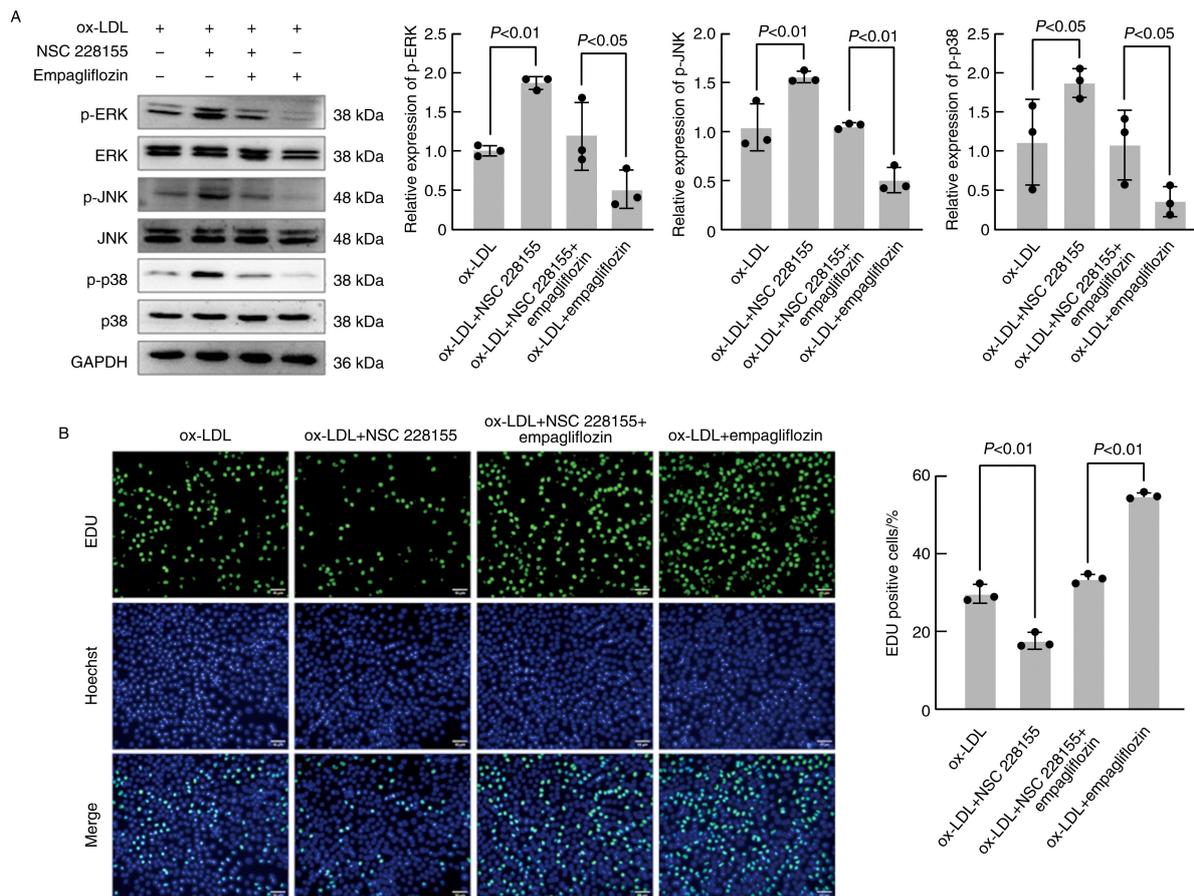


图5. 恩格列净通过抑制 EGFR 信号通路修复 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖能力下降 ( $n=3$ )  
A 为 Western blot 检测细胞 EGFR 信号通路中蛋白的表达水平; B 为 EDU 法检测 NSC 228155 对恩格列净修复 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖能力的影响。

Figure 5. Empagliflozin can restore the decreased proliferation of HUVEC induced by ox-LDL inhibiting EGFR signaling pathway ( $n=3$ )

### 3 讨论

As 作为一种慢性炎症性病变,主要累及大中动脉,被视为心脑血管疾病的主要病理基础。由 As 引发的心血管系统疾病已成为我国居民死亡的重要诱因,对公众健康构成了严重威胁。流行病学、遗传学和临床循证医学证据充分证实,低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 是 ASCVD 的致病性危险因素<sup>[14]</sup>。ox-LDL 是 LDLC 的氧化形式,作为致 As 的关键分子,在损伤内皮细胞、诱导泡沫细胞和血栓形成等方面发挥重要作用。既往研究表明,ox-LDL 促进内皮细胞 ICAM-1、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 等黏附分子表达,促进免疫细胞转移至内皮下组织间隙,启动 As 斑块的形成过程<sup>[15]</sup>。本研究使用 ox-LDL 构建 HUVEC 损伤模型,观察 SGLT-2 抑制剂恩格列净对 ox-LDL 引起的 HUVEC 损伤的

保护作用。实验中 ox-LDL 干预 HUVEC 后,细胞活性和增殖能力显著下降,内皮细胞黏附分子 (ICAM-1/VCAM-1) 和凋亡蛋白 (Bax/cleaved Caspase-3) 表达水平显著升高,炎症因子 (IL-6 和 TNF- $\alpha$ ) 的 mRNA 表达水平显著升高;而给予恩格列净处理后,可以显著恢复内皮细胞 eNOS 表达水平,降低上述黏附分子、凋亡蛋白和炎症因子水平。

SGLT-2 抑制剂作为新一代口服降糖药物,通过抑制肾小管对葡萄糖的再摄取发挥降糖作用<sup>[16]</sup>。自 SGLT-2 抑制剂被用作降糖药物以来,其展现出显著的多效性作用,尤其在非糖尿病患者的心血管疾病领域具有保护作用。例如,Long 等<sup>[17]</sup>发现卡格列净能显著下调实验性自身免疫性心肌炎小鼠模型中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症复合体及其相关因子的表达,同时降低下游炎症介质 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的水平,

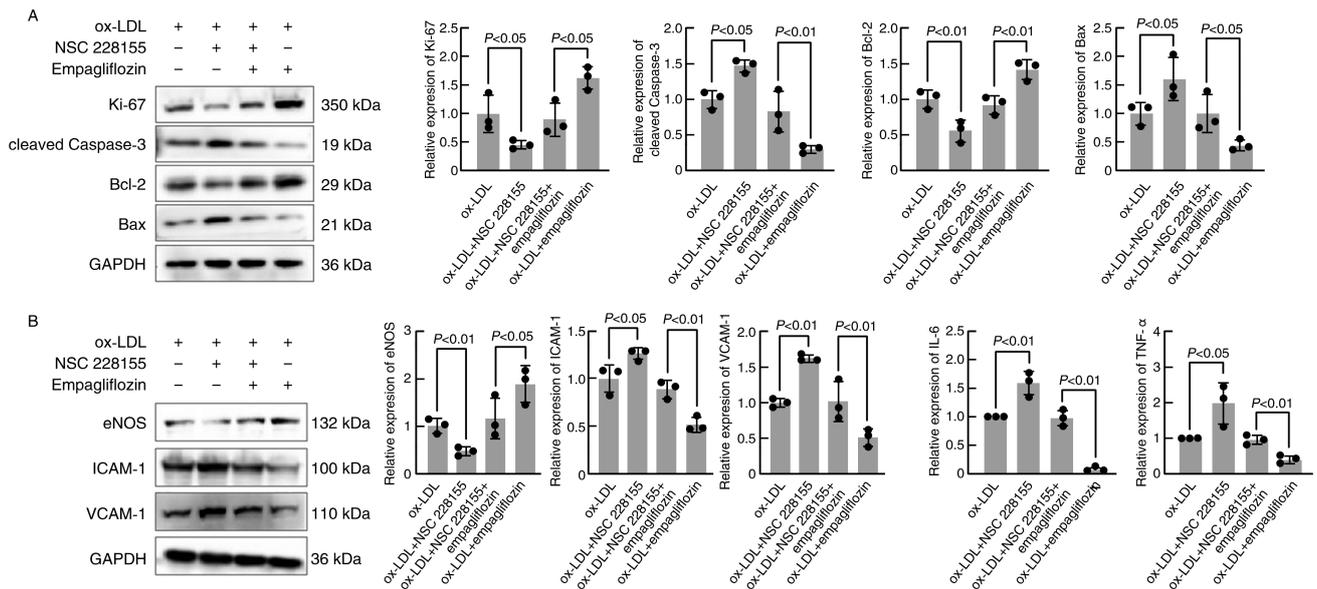


图 6. 恩格列净通过抑制 EGFR 信号通路修复 ox-LDL 诱导的细胞凋亡和细胞炎症 ( $n=3$ )

A 为 Western blot 检测细胞增殖和凋亡标志蛋白的表达水平; B 为 Western blot 检测细胞炎症相关标志蛋白的表达水平;

C 为 RT-qPCR 检测细胞中炎症因子的 mRNA 表达水平。

Figure 6. Empagliflozin reduced ox-LDL-induced apoptosis and cellular inflammation by inhibiting EGFR signaling pathway ( $n=3$ )

从而缓解心脏炎症,发挥心脏保护作用; Nakao 等<sup>[18]</sup>观察到恩格列净可激活内皮细胞中的蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt)/eNOS/一氧化氮 (nitric oxide, NO) 通路,抑制内皮细胞凋亡,维持主动脉弓缩窄模型小鼠心脏组织的血管生成。多项研究表明, SGLT-2 抑制剂可通过改变血流动力学、减轻炎症反应、减少氧化应激、改善心脏代谢等途径维护心血管健康<sup>[19-22]</sup>。因此,深入阐明 SGLT-2 抑制剂的心血管保护机制,对于推动其从降糖药物向心血管疾病治疗药物拓展具有重大意义。

本研究利用 Swiss Target Prediction、PPI 分析及 Click Docking 分子对接等技术工具,推测恩格列净通过 EGFR 信号通路改善 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤。EGFR 作为位于细胞质膜上的酪氨酸激酶受体<sup>[23]</sup>,在肿瘤细胞增殖、迁移及凋亡过程中发挥关键作用。相关研究证实,EGFR 信号通路的异常活化可加剧炎症反应<sup>[24]</sup>。本研究发现,经 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 EGFR 蛋白水平显著升高,而恩格列净干预能有效抑制其表达;同时,ox-LDL 可诱导 HUVEC 中 Ki-67 和 Bcl-2 蛋白表达明显减少,内皮细胞黏附分子(ICAM-1/VCAM-1)与凋亡蛋白(Bax/cleaved Caspase-3)表达水平显著升高,炎症因子(IL-6 和 TNF- $\alpha$ )的 mRNA 表达水平也急剧上升。恩格列净则能逆转 ox-LDL 引起的上述蛋白及

mRNA 异常表达,修复 HUVEC 细胞损伤,而 EGFR 激动剂 NSC 228155 可显著抑制这种修复作用。这表明恩格列净通过抑制 EGFR 信号通路改善 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤。

本研究阐明了恩格列净对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤的修复作用及其分子机制,为 ASCVD 的防治提供了新的理论依据。然而,本研究仅就 HUVEC 进行相关实验,研究范围存在一定的局限性,后续可对其他内皮细胞,如人主动脉内皮细胞等进行进一步的研究;同时,恩格列净的体内效应仍是未知的,作者团队后续计划深入研究恩格列净在体内 As 模型中的作用及机制探索。

#### [参考文献]

- [1] 国家心血管病中心. 中国心血管健康与疾病报告 2023 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2024. National Center for Cardiovascular Disease. Annual report on cardiovascular health and diseases in China 2023 [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2024.
- [2] HAN C, LIU F, YANG X, et al. Ideal cardiovascular health and incidence of atherosclerotic cardiovascular disease among Chinese adults: the China-PAR project [J]. Sci China Life Sci, 2018, 61(5): 504-514.
- [3] BJÖRKEGREN J L M, LUSIS A J. Atherosclerosis: recent developments [J]. Cell, 2022, 185(10): 1630-1645.

- [4] ANAND S K, GOVERNALE T A, ZHANG X, et al. Amino acid metabolism and atherosclerotic cardiovascular disease[J]. *Am J Pathol*, 2024, 194(4): 510-524.
- [5] PENG X, WU H. Inflammatory links between hypertriglyceridemia and atherogenesis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2022, 24(5): 297-306.
- [6] 石萌萌, 黄锐, 黄子乐, 等. 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞泡沫化和氧化应激的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(9): 747-755.
- SHI M M, HUANG R, HUANG Z L, et al. Effects of theaflavin on ox-LDL-induced foam cell formation and oxidative stress in THP-1 derived macrophages [J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(9): 747-755.
- [7] HOOGEVEEN R C, BALLANTYNE C M. Residual cardiovascular risk at low LDL: remnants, lipoprotein(a), and inflammation[J]. *Clin Chem*, 2021, 67(1): 143-153.
- [8] CAI X, CAO H, WANG M, et al. SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates tubulointerstitial fibrosis in DKD by downregulating renal tubular PKM2 [J]. *Life Sci*, 2025, 82(1): 159.
- [9] FRAMPTON J E. Empagliflozin: a review in type 2 diabetes [J]. *Drugs*, 2018, 78(10): 1037-1048.
- [10] JOHANSEN M E, ARGYROPOULOS C. The cardiovascular outcomes, heart failure and kidney disease trials tell that the time to use sodium glucose cotransporter 2 inhibitors is now[J]. *Clin Cardiol*, 2020, 43(12): 1376-1387.
- [11] SANTOS-GALLEGO C G, VARGAS-DELGADO A P, REQUENA-IBANEZ J A, et al. Randomized trial of empagliflozin in nondiabetic patients with heart failure and reduced ejection fraction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 77(3): 243-255.
- [12] FILIPPATOS G, FARMAKIS D, BUTLER J, et al. Empagliflozin in heart failure with preserved ejection fraction with and without atrial fibrillation[J]. *Eur J Heart Fail*, 2023, 25(7): 970-977.
- [13] 王晨, 朱爱松. 基于网络药理学及分子对接探讨当归补血汤治疗动脉粥样硬化的机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(9): 754-761, 778.
- WANG C, ZHU A S. Mechanism of danggui buxuetang in treating atherosclerosis based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(9): 754-761, 778.
- [14] FERENCZ B A, GINSBERG H N, GRAHAM I, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European atherosclerosis society consensus panel[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(32): 2459-2472.
- [15] GAO Y, YUE J, HUANG Z. LncRNA MIAT mediates ox-LDL induced endothelial cell injury via miR-206/RAB22A axis[J]. *J Surg Res*, 2021, 265: 303-312.
- [16] DAI Z C, CHEN J X, ZOU R, et al. Role and mechanisms of SGLT-2 inhibitors in the treatment of diabetic kidney disease[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1213473.
- [17] LONG Q, LI L, YANG H, et al. SGLT2 inhibitor, canagliflozin, ameliorates cardiac inflammation in experimental autoimmune myocarditis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 110: 109024.
- [18] NAKAO M, SHIMIZU I, KATSUUMI G, et al. Empagliflozin maintains capillarization and improves cardiac function in a murine model of left ventricular pressure overload [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 18384.
- [19] LAHWONG S, CHATTIPAKORN S C, CHATTIPAKORN N. Potential mechanisms responsible for cardioprotective effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 17(1): 101.
- [20] LYTVYN Y, BJORNSTAD P, UDELL J A, et al. Sodium glucose cotransporter-2 inhibition in heart failure: potential mechanisms, clinical applications, and summary of clinical trials[J]. *Circulation*, 2017, 136(17): 1643-1658.
- [21] KOUNATIDIS D, VALLIANOU N, EVANGELOPOULOS A, et al. SGLT-2 inhibitors and the inflammasome: what's next in the 21st century? [J]. *Nutrients*, 2023, 15(10): 2294.
- [22] WANG Y, WANG Z, GUO X, et al. Empagliflozin attenuates DOX-induced cardiotoxicity by inhibiting RIPK1-mediated endoplasmic reticulum stress and autophagy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2025, 1871(6): 167898.
- [23] GUGLIANDOLO A, SILVESTRO S, SINDONA C, et al. MiRNA: involvement of the MAPK pathway in ischemic stroke. A promising therapeutic target[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(10): 1053.
- [24] ESCOTO A, HECKSEL R, PARKINSON C, et al. Nuclear EGFR in breast cancer suppresses NK cell recruitment and cytotoxicity[J]. *Oncogene*, 2025, 44(5): 288-295.
- (此文编辑 许雪梅)