

本文引用: 史欣兴, 杨 栋, 郝小夏. 基于 JNK/Nrf2/HO-1 通路探讨芝麻酚对 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(7): 640-649. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.07.006.

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2026)34-07-0640-10

## 基于 JNK/Nrf2/HO-1 通路探讨芝麻酚对 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤的影响

史欣兴<sup>1</sup>, 杨 栋<sup>2</sup>, 郝小夏<sup>1</sup>

山西医药学院 1. 医学检验系, 2. 护理系, 山西省汾阳市 032200

**[摘要]** **[目的]** 探讨芝麻酚对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的内皮细胞损伤的拮抗作用,并阐明其是否通过 JNK/Nrf2/HO-1 通路发挥抗氧化应激、抑制异常血管生成及阻断内皮-间充质转化(EndMT)的分子机制。**[方法]** 以人脐静脉内皮细胞和人主动脉内皮细胞为研究对象,建立 75  $\mu\text{mol/L}$  ox-LDL 诱导的内皮损伤模型。采用 CCK-8 法、DCFH-DA 荧光探针及 Annexin V/PI 凋亡检测法,评估芝麻酚的安全性及其对细胞活力的影响,以及对氧化应激和细胞凋亡的保护作用;通过 Matrigel 小管形成实验、Transwell 迁移/侵袭实验、RT-qPCR、免疫荧光及 Western blot 技术,检测芝麻酚对异常血管生成、内皮屏障功能及 EndMT 的影响;通过时间梯度 Western blot、JNK 抑制剂 SP600125 干预及免疫荧光实验,验证 JNK/Nrf2/HO-1 信号通路的激活情况及其作用的必要性。**[结果]** 采用 75  $\mu\text{mol/L}$  ox-LDL 刺激 24 h 可成功建立内皮细胞氧化应激模型,具体表现为:活性氧(ROS)水平显著升高,炎症/黏附分子表达上调,内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)表达下调,细胞凋亡率升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。芝麻酚( $\leq 50 \mu\text{mol/L}$ )对正常内皮细胞无毒性;其中 50  $\mu\text{mol/L}$  芝麻酚可显著恢复 ox-LDL 诱导的细胞活力下降,抑制 ROS 生成及细胞凋亡( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );同时能显著抑制异常小管支形成与细胞迁移,下调血管内皮生长因子/血管内皮生长因子受体 2 及基质金属蛋白酶 9 的表达,上调紧密连接蛋白 1、闭合蛋白 5 及 VE-cadherin 的表达,并恢复一氧化氮生成( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );此外,该浓度芝麻酚还可逆转 EndMT 相关表型,降低 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白、波形蛋白等间充质标志物的表达,同时恢复 CD31 与 VE-cadherin 的表达水平( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。机制研究显示,芝麻酚可呈时间依赖性激活 p-JNK、核 Nrf2 及其下游 HO-1 的表达( $P<0.01$ );而 JNK 抑制剂 SP600125 能够阻断 Nrf2 的核转位,并抑制芝麻酚的保护效应( $P<0.01$ )。**[结论]** 芝麻酚可显著拮抗 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤,其作用机制与激活 JNK/Nrf2/HO-1 通路、抑制 ox-LDL 引发的氧化应激、异常血管生成及 EndMT 有关,为其作为防治动脉粥样硬化的潜在天然药物提供了重要实验依据。**[关键词]** 芝麻酚; 动脉粥样硬化; 氧化型低密度脂蛋白; 血管内皮细胞; JNK/Nrf2/HO-1 通路**[中图分类号]** R5;R363**[文献标识码]** A

### Effects of sesamol on ox-LDL-induced vascular endothelial cell injury via the JNK/Nrf2/HO-1 pathway

Shi Xinling<sup>1</sup>, Yang Dong<sup>2</sup>, Hao Xiaoxia<sup>1</sup>

1. Department of Medical Laboratory, 2. Department of Nursing, Shanxi Medical College, Fenyang, Shanxi 032200, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To explore the antagonistic effect of sesamol on endothelial cell injury induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), and elucidate its molecular mechanism of exerting antioxidant stress, inhibiting abnormal angiogenesis and blocking endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) through the JNK/Nrf2/HO-1 pathway.

**Methods** Human umbilical vein endothelial cells and human aortic endothelial cells were used to establish an endothelial cell injury model induced by 75  $\mu\text{mol/L}$  ox-LDL. The CCK-8 method, DCFH-DA fluorescent probe and Annexin V/PI apoptosis detection method were used to evaluate the safety of sesamol and its effects on cell viability, as well as its protective effects against oxidative stress and cell apoptosis; Matrigel tubular formation experiment, Transwell migration/invasion

[收稿日期] 2026-01-16

[修回日期] 2026-05-11

[基金项目] 山西省高等学校科技创新项目(2023L486);山西医科大学汾阳学院校级科研项目(2022A06);山西省高等学校大学生创新训练计划项目(FDC2025075)

[作者简介] 史欣兴,硕士,讲师,研究方向为心血管疾病、血流动力学及生物信号传导,E-mail:ShiXinling\_1990@163.com。

experiment RT-qPCR, immunofluorescence and Western blot techniques were used to detect the effects of sesamol on abnormal angiogenesis, endothelial barrier function and EndMT; time gradient Western blot, JNK inhibitor SP600125 intervention and immunofluorescence experiments were used to verify the activation and necessity of the JNK/Nrf2/HO-1 pathway.

**Results** The oxidative stress model of endothelial cells was successfully established by stimulating with 75  $\mu\text{mol/L}$  ox-LDL for 24 hours, which showed a significant increase in reactive oxygen species (ROS) levels, upregulation of inflammation/adhesion molecule expression, downregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and vascular endothelial cadherin expression, and an increase in cell apoptosis rate ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Sesamol ( $\leq 50 \mu\text{mol/L}$ ) was non-toxic to normal endothelial cells; among them, 50  $\mu\text{mol/L}$  sesamol could significantly restore the decrease in cell viability induced by ox-LDL, inhibit ROS generation and cell apoptosis ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); simultaneously, it could significantly inhibit the formation of abnormal tube branching points and cell migration, downregulate the expression of vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor 2 and matrix metalloproteinase-9, upregulate the expression of zonula occludens-1, claudin-5, and VE-cadherin, and restore nitric oxide production ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); in addition, this concentration of sesamol could reverse EndMT-related phenotypes, reduce the expression of mesenchymal markers such as  $\alpha$ -smooth muscle actin and vimentin, and restore the expression levels of CD31 and VE-cadherin ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Mechanism studies showed that sesamol could time-dependently activate the expression of p-JNK, nuclear Nrf2, and downstream HO-1 ( $P<0.01$ ); the JNK inhibitor SP600125 could block the nuclear translocation of Nrf2 and inhibit the protective effect of sesamol ( $P<0.01$ ).

**Conclusion** Sesamol can significantly antagonize the injury of vascular endothelial cells induced by ox-LDL, and its mechanism is related to the activation of JNK/Nrf2/HO-1 pathway, inhibition of oxidative stress, abnormal angiogenesis and EndMT induced by ox-LDL, which provides an important experimental basis for its use as a potential natural drug to prevent and treat atherosclerosis.

[**KEY WORDS**] sesamol; atherosclerosis; oxidized low density lipoprotein; vascular endothelial cell; JNK/Nrf2/HO-1 pathway

氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是公认的动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)关键致病因子,可诱导血管内皮细胞产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),引发氧化应激、炎症反应、异常血管生成及内皮-间充质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT),最终导致内皮屏障破坏和 As 斑块形成<sup>[1-2]</sup>。研究表明,ox-LDL 不仅可促进内皮细胞凋亡,并诱导血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)等炎症因子过度表达,还能异常激活血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)/血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)及基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)等血管生成信号通路,加速斑块内新生血管形成,增加斑块不稳定性<sup>[3-4]</sup>。更重要的是,ox-LDL 诱导产生的持续氧化应激可通过激活转化生长因子  $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )/Smad 通路及 Snail/Slug 等转录因子驱动 EndMT,使内皮细胞向成纤维细胞样表型转变,具体表现为  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、波形蛋白高表达,而血管内皮钙黏蛋白(vascular endothelial cadherin, VE-cadherin)、CD31 低表达,进而加剧血管纤

维化与重塑<sup>[5-6]</sup>。因此,寻找可同时抑制氧化应激、异常血管生成及 EndMT 的天然活性成分,已成为 As 防治研究的热点。

芝麻酚是芝麻木脂素中最具生物活性的酚类化合物,具有强抗氧化、抗炎和血管保护作用。多项研究证实,芝麻酚可显著清除 DPPH、ABTS 自由基,抑制脂质过氧化,并通过上调 Nrf2/HO-1 通路来减轻高脂饮食诱导的氧化应激和炎症反应<sup>[7-8]</sup>。有报道芝麻酚可保护人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)免受过氧化氢或 ox-LDL 诱导的损伤,不仅能降低 ROS 和丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平,还可恢复超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的活性<sup>[9]</sup>。研究发现,芝麻酚可通过激活 JNK 信号促进 Nrf2 核转位,进而上调血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)、NAD(P)H 醌氧化还原酶 1 等 II 相解毒酶的表达,形成 JNK/Nrf2/HO-1 正反馈轴,有效对抗氧化应激介导的细胞损伤<sup>[10-11]</sup>。有研究表明,芝麻酚在高糖诱导的内皮细胞中可显著抑制凋亡和小管形成异常,并逆转 EndMT 相关标志物表达<sup>[12]</sup>,提示其在 As 防治中的潜在价值。然而,目前尚无研究系统探讨芝麻酚是否通过 JNK/Nrf2/HO-1 通路同时调控 ox-LDL 诱导的氧化应激、异常血管生成及

EndMT 这一完整病理过程。基于此,本研究以 HUVEC 和人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cell, HAEC)为研究对象,构建 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤模型,系统探究芝麻酚对内皮细胞的保护作用及其分子机制。本研究有望为芝麻酚作为新型抗 As 天然药物提供充分的体外实验依据,并为 JNK/Nrf2/HO-1 通路在 As 内皮保护中的关键作用提供新的实验证据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞来源与主要试剂

HUVEC 和 HAEC 购自澳睿赛生物科技(上海)有限公司。胎牛血清、青霉素-链霉素购自 NCM 公司;ECM 完全培养基购自上海语纯生物科技有限公司;ox-LDL 购自北京协生生物科技有限公司;芝麻酚(纯度 $\geq 98\%$ )、JNK 特异性抑制剂 SP600125 购自 MCE 公司;DCFH-DA 荧光探针、CCK-8 试剂盒及 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Matrigel 基质胶购自 Corning 公司;血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)、VEGF、MMP-9、闭合蛋白 5、 $\alpha$ -SMA、纤连蛋白、Nrf2 及 HO-1 抗体购自 Abcam 公司;VCAM-1、ICAM-1、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、VE-cadherin、VEGFR2、 $\alpha$ -波形蛋白、p-JNK 及 JNK 抗体购自 CST 公司;单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、紧密连接蛋白 1(zonula occludens-1, ZO-1)、CD31 及 GAPDH 抗体购自 Proteintech 公司。

### 1.2 细胞培养

HUVEC 和 HAEC 用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 ECM 完全培养基于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,实验选用第 4~8 代细胞。

### 1.3 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤模型的建立

取对数生长期的 HUVEC 和 HAEC,分别以  $3 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板,培养过夜至细胞贴壁后,加入 0、25、50、75 及 150  $\mu\text{mol/L}$  的 ox-LDL 继续培养 24 h。随后采用 CCK-8 法检测细胞活力,若细胞增殖能力受损,即可表明内皮细胞损伤模型建模成功。选取细胞活力抑制率为 20%~30% (即 IC<sub>20</sub>~IC<sub>30</sub>) 对应的 75  $\mu\text{mol/L}$  ox-LDL 浓度,作为后续实验的造模浓度。实验中设置的细胞分组:(1) 对照组、ox-LDL(75  $\mu\text{mol/L}$ ) 组;(2) 对照组、ox-LDL(75  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、ox-LDL(75  $\mu\text{mol/L}$ ) + 芝麻酚

(50  $\mu\text{mol/L}$ ) 组;(3) ox-LDL(75  $\mu\text{mol/L}$ ) + 芝麻酚(50  $\mu\text{mol/L}$ ) + DMSO 组、ox-LDL(75  $\mu\text{mol/L}$ ) + 芝麻酚(50  $\mu\text{mol/L}$ ) + SP600125(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组。

### 1.4 细胞活力检测

取对数生长期的 HUVEC 和 HAEC,以  $3 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板。实验分为两种处理方式:一是用 0~100  $\mu\text{mol/L}$  芝麻酚单独处理细胞 24 h;二是先用 10、20 及 40  $\mu\text{mol/L}$  芝麻酚预处理细胞 1 h,再加入 75  $\mu\text{mol/L}$  ox-LDL 共同孵育 24 h。采用 CCK-8 法检测细胞活力,使用酶标仪在 450 nm 波长下读取吸光度值。

### 1.5 细胞内 ROS 水平检测

取对数生长期的 HUVEC 和 HAEC,以  $2 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板,次日按实验分组完成相应处理后,弃去培养基,用无血清 ECM 培养基轻柔洗涤 2 次。随后每孔加入含 10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA 荧光探针的无血清培养基 1 mL,置于 37℃ 避光条件下孵育 20 min,期间每 5 min 轻柔摇晃培养板 1 次,确保探针与细胞充分接触。随后弃去含探针培养基,用预冷 PBS 轻柔洗涤 3 次,以充分去除未进入细胞的 DCFH-DA 探针。加入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液(不含酚红)1 mL/孔,37℃ 消化 1~2 min,镜下观察细胞变圆后立即加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的完全培养基终止消化,反复轻柔吹打使细胞完全脱离孔底,收集细胞悬液至 15 mL 离心管,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。用预冷 PBS 重悬细胞并调整体积至 1 mL,过 200 目细胞筛网去除细胞团块,转移至流式上样管中,使用流式细胞仪(FITC 通道)检测平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)。

### 1.6 细胞凋亡检测

取对数生长期的 HUVEC 和 HAEC,以  $2 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板,次日按实验分组完成相应处理后,经胰蛋白酶消化并收集细胞。用预冷 PBS 轻柔重悬细胞,以 800 $\times$ g、4℃ 离心 5 min 进行洗涤,重复该洗涤步骤共 2 次,以彻底去除残余培养基和胰酶。弃去上清后,每管加入 200  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Binding Buffer 轻柔重悬细胞,调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/mL。向每管细胞悬液中依次加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 染色液和 5  $\mu\text{L}$  PI 染色液,轻柔涡旋混匀后,于室温下避光孵育 15 min。染色结束后,每管补加 300  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Binding Buffer 并轻轻混匀,经 200 目细胞筛网过滤去除细胞团块后转移至流式上样管中,于 1 h 内使用流式细胞仪检测凋亡率。



### 1.7 Matrigel 小管形成实验

预冷的 96 孔板每孔加入 50  $\mu\text{L}$  于 4  $^{\circ}\text{C}$  预液化的 Matrigel, 随后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 使其凝固。将预处理后的对数生长期 HUVEC 和 HAEC 以  $2 \times 10^4$  个/孔的密度接种, 培养 8~12 h 后在显微镜下拍照, 采用 Image J 软件分析分支点数。

### 1.8 Transwell 迁移与侵袭实验

迁移实验: 采用 8  $\mu\text{m}$  孔径的 Transwell 小室, 上室加入  $2 \times 10^4$  个无血清培养的对数生长期 HUVEC 和 HAEC, 下室加入含 20% FBS 的培养基。侵袭实验: 上室预先铺制 50  $\mu\text{L}$  按 1:8 稀释的 Matrigel。培养 24 h 后固定细胞, 用 0.1% 结晶紫染色, 在显微镜下拍照并计数穿膜细胞数量。

### 1.9 免疫荧光染色

将对数生长期 HUVEC 和 HAEC 爬片固定后, 依次经 0.5% Triton X-100 通透、5% BSA 封闭处理; 随后加入 1:200 稀释的  $\alpha$ -SMA 及波形蛋白一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 再加入 1:500 稀释的 Alexa Fluor 488/594 二抗, 室温孵育 1 h; 最后用 DAPI 复染细胞核, 在荧光显微镜下观察并拍照。

### 1.10 Western blot 检测

采用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 核浆分离试剂盒提取核蛋白, 经 BCA 法完成蛋白定量, 通过 12% SDS-PAGE 分离后转 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 LOX-1(1:1 000)、VCAM-1(1:2 000)、ICAM-1(1:1 000)、MCP-1(1:1 000)、eNOS(1:1 000)、VE-cadherin(1:2 000)、GAPDH(1:10 000)、VEGF(1:1 000)、VEGFR2(1:1 000)、MMP-9(1:1 000)、ZO-1(1:1 000)、闭合蛋白 5(1:1 000)、 $\alpha$ -SMA(1:2 000)、波形蛋白(1:1 000)、纤连蛋白(1:1 000)、CD31(1:1 000)、p-JNK(1:1 000)、JNK(1:2 000)、Nrf2(1:2 000)、HO-1(1:1 000), 于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 加入二抗室温孵育 1 h, 使用 ECL 化学发光显影, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

### 1.11 一氧化氮含量检测

取对数生长期的 HUVEC 和 HAEC, 以  $2 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板, 培养过夜贴壁后按实验分组进行相应处理。处理结束后, 收集各孔细胞培养上清液至 1.5 mL 无酶离心管中, 于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 $\times g$  条件下离心 10 min, 以彻底去除细胞碎片及悬浮死细胞。采用 Griess 法检测上清液中一氧化氮(nitric oxide, NO)含量, 操作步骤严格遵循试剂盒说明书, 于 562 nm 波长下测定吸光度值。

### 1.12 统计学分析

实验均独立重复 3 次, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用

GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤模型的建立

为建立稳定的内皮细胞损伤模型, 首先采用不同浓度 ox-LDL(0、25、50、75、及 150  $\mu\text{mol/L}$ ) 刺激 HUVEC 和 HAEC 24 h。CCK-8 法检测结果显示, ox-LDL 对细胞活力呈浓度依赖性抑制作用; 当浓度为 50~75  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞活力较 0  $\mu\text{mol/L}$  组显著下降。因此, 后续建模选取 75  $\mu\text{mol/L}$  作为 ox-LDL 的作用浓度(图 1A;  $P < 0.05$ )。随后采用 75  $\mu\text{mol/L}$  ox-LDL 刺激细胞不同时间, DCFH-DA 流式检测结果显示, ROS 水平随刺激时间的延长显著升高, 并于 24 h 达到峰值( $P < 0.05$ ; 图 1B 和 1C)。

Western blot 检测结果显示, 与对照组相比, ox-LDL 组的 LOX-1、VCAM-1、ICAM-1 及 MCP-1 的表达显著上调, 而 eNOS、VE-cadherin 的表达则显著下调( $P < 0.05$ ; 图 1D)。Annexin V/PI 双染结果显示, 经 ox-LDL 处理 24 h 后, 细胞凋亡率较对照组显著升高(图 1E;  $P < 0.05$ )。以上结果在 HUVEC 与 HAEC 中表现一致, 证实采用 75  $\mu\text{mol/L}$  ox-LDL 刺激细胞 24 h 可成功建立内皮细胞损伤模型。

### 2.2 芝麻酚对 ox-LDL 诱导内皮细胞损伤的保护作用及安全性评价

用 0~100  $\mu\text{mol/L}$  的芝麻酚单独处理 HUVEC 和 HAEC 24 h, CCK-8 法检测结果显示, 当芝麻酚浓度  $\leq 50$   $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞活力  $\geq 95\%$ , 因此确定其安全浓度为  $\leq 50$   $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.05$ ; 图 2A)。随后用 50  $\mu\text{mol/L}$  芝麻酚与 75  $\mu\text{mol/L}$  ox-LDL 共同孵育 24 h, CCK-8 法检测结果显示, 与 ox-LDL 组相比, 芝麻酚可逆转 ox-LDL 诱导的细胞活力下降( $P < 0.05$ ; 图 2B)。流式细胞术检测结果显示, 与 ox-LDL 组相比, 芝麻酚可显著降低细胞内 ROS 水平( $P < 0.05$ ; 图 2C)。Annexin V/PI 双染结果显示, 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL+芝麻酚组凋亡率下降( $P < 0.01$ ; 图 2D)。上述结果表明, 芝麻酚在安全浓度范围内可显著抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞氧化应激与凋亡。

### 2.3 芝麻酚对异常血管生成及内皮功能紊乱的抑制作用

Matrigel 小管形成实验结果显示, 与对照组相比, ox-LDL 可显著促进内皮细胞异常血管生成, 小管支点数量明显增加; 而经芝麻酚处理后, 上述指标



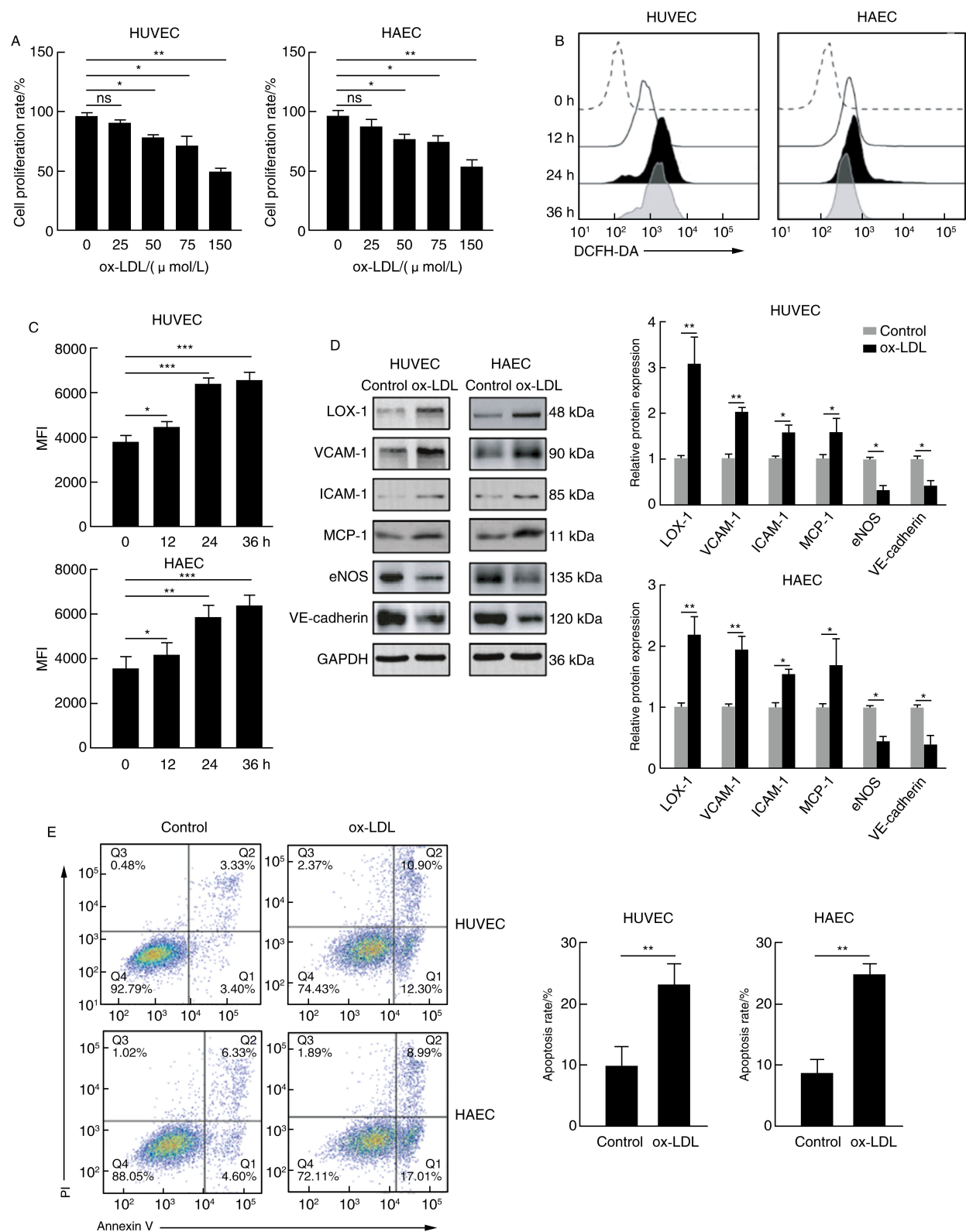


图 1. ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤模型的建立

A: CCK-8 法检测细胞增殖; B: 细胞内 ROS 水平检测; C: 细胞内 ROS 水平统计图; D: 细胞中蛋白表达水平检测; E: 流式细胞术检测细胞凋亡。n=3, \* 为  $P<0.05$ , \*\* 为  $P<0.01$ , \*\*\* 为  $P<0.001$ 。

Figure 1. Establishment of an ox-LDL-induced endothelial cell injury model

则有所下降 ( $P<0.01$ ; 图 3A)。Transwell 迁移实验进一步证实, 与对照组相比, ox-LDL 处理后迁移细胞数显著

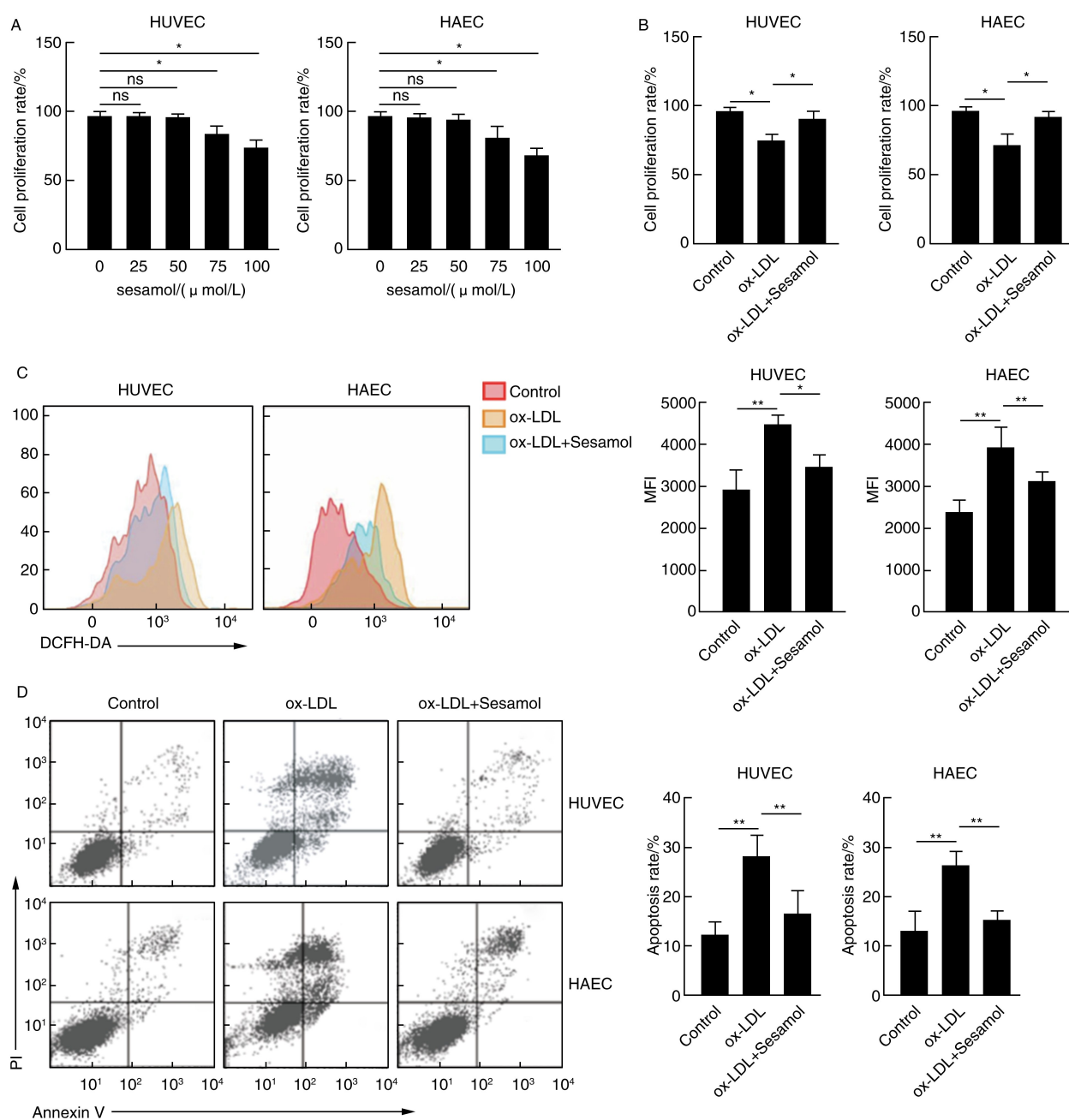


图 2. 芝麻酚对 ox-LDL 诱导内皮细胞氧化应激损伤的保护作用及安全性评价

A、B; CCK-8 法检测细胞增殖; C; 细胞内 ROS 水平检测; D; 流式细胞术检测细胞凋亡。n=3, \* 为  $P<0.05$ , \*\* 为  $P<0.01$ 。

Figure 2. Safety evaluation and protective effects of sesamol on ox-LDL-induced oxidative stress injury in endothelial cells

增加; 而经芝麻酚处理后, 迁移细胞数则得到明显改善 ( $P<0.01$ ; 图 3B)。Western blot 检测结果显示, 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL+芝麻酚处理可显著下调促血管生成因子 VEGF、VEGFR2、MMP-9 的蛋白表达, 同时上调内皮屏障分子 ZO-1、闭合蛋白 5、VE-cadherin 的蛋白表达 ( $P<0.05$ ; 图 3C)。Griess 法检测结果显示, 与对照组相比, ox-LDL 处理使 NO 生成量减少; 而经 ox-LDL+芝麻酚处理后, NO 生成量可恢复至正常水平 ( $P<0.01$ ; 图 3D)。以上结果表明, 芝麻酚可有效抑制 ox-LDL 诱导

的异常血管生成, 并恢复内皮屏障功能。

## 2.4 芝麻酚抑制 ox-LDL 诱导的 EndMT

Western blot 检测结果显示, 与对照组相比, ox-LDL 组的  $\alpha$ -SMA、波形蛋白及纤连蛋白表达显著上调, CD31 表达则显著下调; 而芝麻酚能够有效逆转 ox-LDL 诱导的上述蛋白表达变化 (均  $P<0.05$ ; 图 4A)。Transwell 侵袭实验显示, 与对照组相比, ox-LDL 组穿膜细胞数显著增加, 在芝麻酚处理后的穿膜细胞数基本恢复至对照组水平 ( $P<0.01$ ; 图 4B)。

这些结果充分表明,芝麻酚能够有效抑制 ox-LDL 诱导的 EndMT 进程。

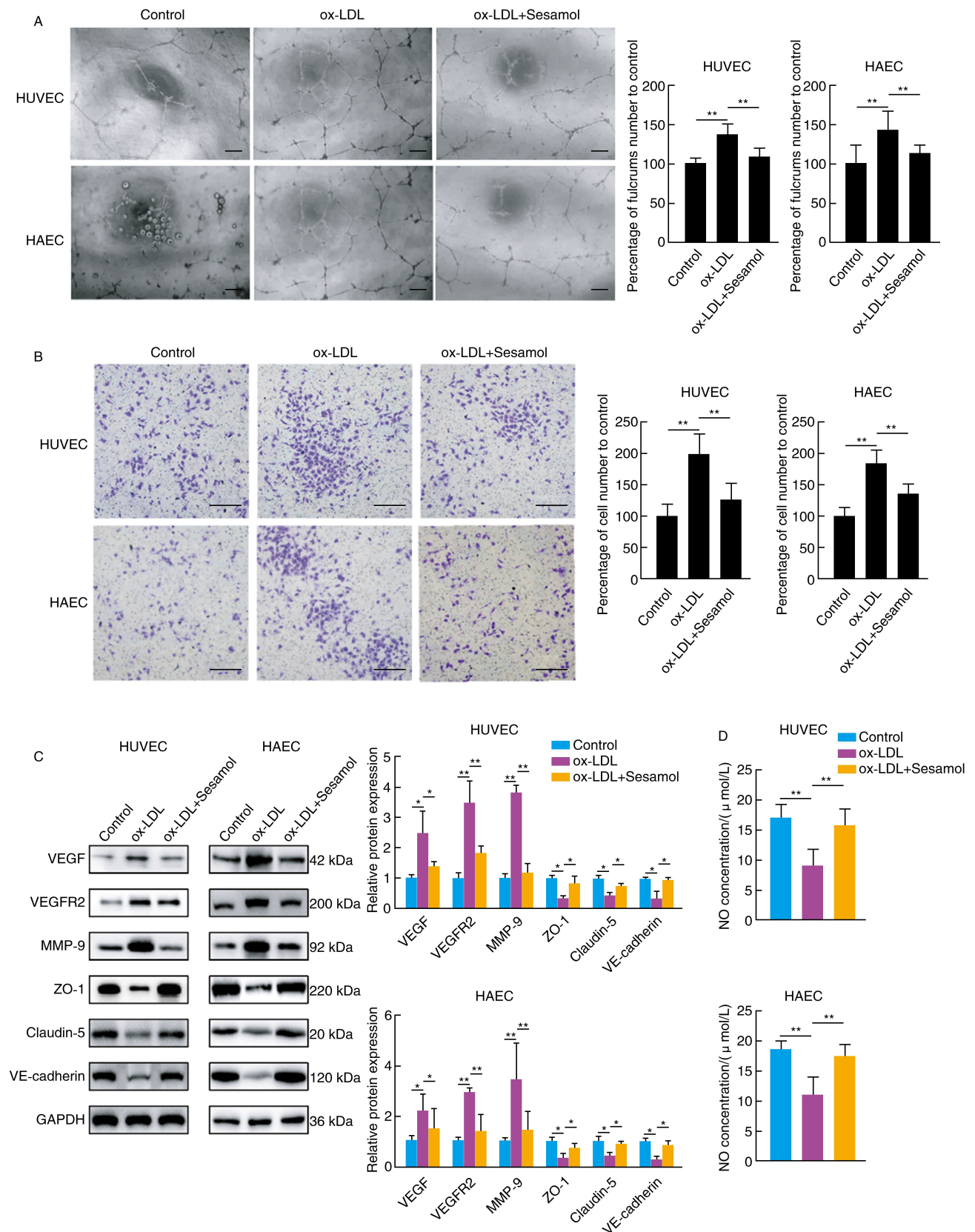


图 3. 芝麻酚对异常血管生成及内皮功能紊乱的抑制作用

A: Matrigel 小管形成实验检测血管生成, Bar=250  $\mu$ m; B: Transwell 实验检测细胞迁移; Bar=50  $\mu$ m; C: 细胞中蛋白表达水平检测;

D: NO 生成量检测。n=3, \* 为  $P<0.05$ , \*\* 为  $P<0.01$ 。

Figure 3. Inhibitory effects of sesamol on abnormal angiogenesis and endothelial dysfunction



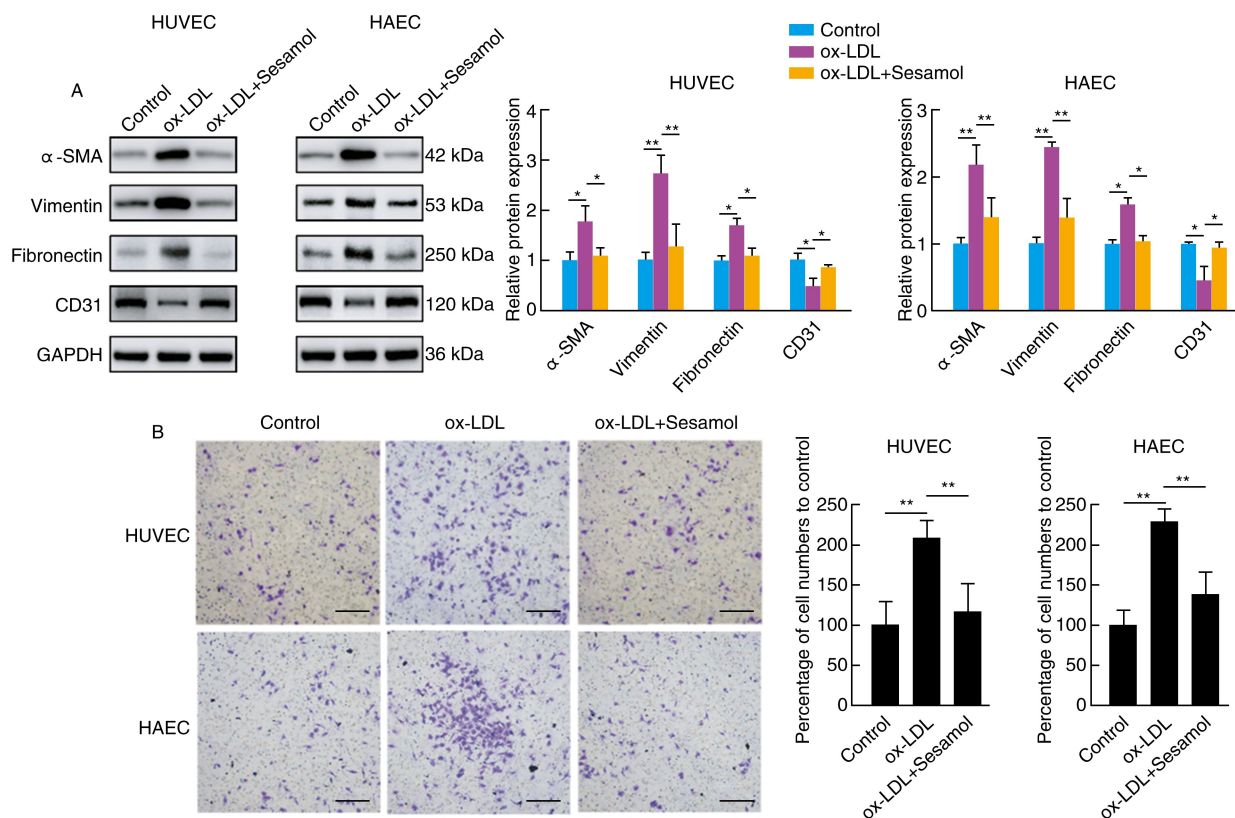


图 4. 芝麻酚抑制 ox-LDL 诱导的 EndMT

A: 细胞中蛋白表达水平检测; B: Transwell 实验检测细胞侵袭, Bar = 50 μm。n = 3, \* 为  $P < 0.05$ ; \*\* 为  $P < 0.01$ 。

Figure 4. Sesamol inhibits ox-LDL-induced EndMT

## 2.5 芝麻酚通过激活 JNK/Nrf2/HO-1 通路发挥保护作用

为阐明相关分子机制, 首先开展时间梯度实验。结果显示, 经 ox-LDL+芝麻酚处理后, p-JNK/JNK 表达在 6 h 时显著升高, 核内 Nrf2 表达在 12 h 时显著增加, HO-1 表达则于 24 h 达到高峰 ( $P < 0.05$ ; 图 5A 和 5B)。经 JNK 特异性抑制剂 SP600125 预处理 1 h 后, Nrf2 核转位被显著阻断 ( $P < 0.05$ ; 图 5C)。功能恢复实验进一步证实, SP600125 预处理可显著减少小管支点的生成数量 ( $P < 0.05$ ; 图 5D)。这些结果共同表明, 芝麻酚可通过激活 JNK/Nrf2/HO-1 信号通路, 在 ox-LDL 诱导的内皮损伤中发挥保护作用。

## 3 讨论

As 的核心病理过程始于血管内皮细胞在 ox-LDL 等危险因素刺激下发生的氧化应激与功能紊乱, 进而引发炎症反应放大、异常血管生成及 EndMT, 最终加速 As 斑块的形成与破裂<sup>[13-14]</sup>。本研究以 HUVEC 和 HAEC 两种内皮细胞系构建 ox-LDL

诱导的内皮细胞损伤模型, 结果显示: 75 μmol/L ox-LDL 处理 24 h 可显著诱导 ROS 生成, 促使炎症黏附分子 LOX-1、VCAM-1、ICAM-1 及 MCP-1 高表达, 并导致 eNOS/VE-cadherin 下调及细胞凋亡, 这与多项研究报道的 ox-LDL 致内皮损伤表型高度一致<sup>[15-16]</sup>。

芝麻酚是芝麻中生物活性最强的木脂素类化合物, 被证实具有强大的抗氧化活性和心血管保护作用<sup>[7]</sup>。本研究证实, 在 ≤50 μmol/L 的安全浓度下, 芝麻酚对正常内皮细胞无毒性, 却可呈剂量依赖性逆转 ox-LDL 诱导的细胞活力下降、ROS 过度生成及细胞凋亡。这一结果与 2025 年报道的“芝麻酚通过 Nrf2/HO-1 通路减轻 HUVEC 氧化损伤”的结论相一致<sup>[17]</sup>。更重要的是, 本研究进一步发现芝麻酚可显著抑制 ox-LDL 诱导的异常血管生成(小管形成、迁移)和内皮屏障破坏(NO 生成减少、ZO-1/闭合蛋白 5/VE-cadherin 表达下调), 这与 2021 年报道的“高脂模型中芝麻酚的抗血管新生效应”一致<sup>[18]</sup>。

EndMT 是近年来 As 研究的新热点, 被认为是斑块内成纤维细胞的重要来源, 且会加剧纤维化进程<sup>[19]</sup>。本研究报道, ox-LDL 可显著诱导内皮细胞发生 EndMT, 表现为 α-SMA、波形蛋白、纤连蛋白及

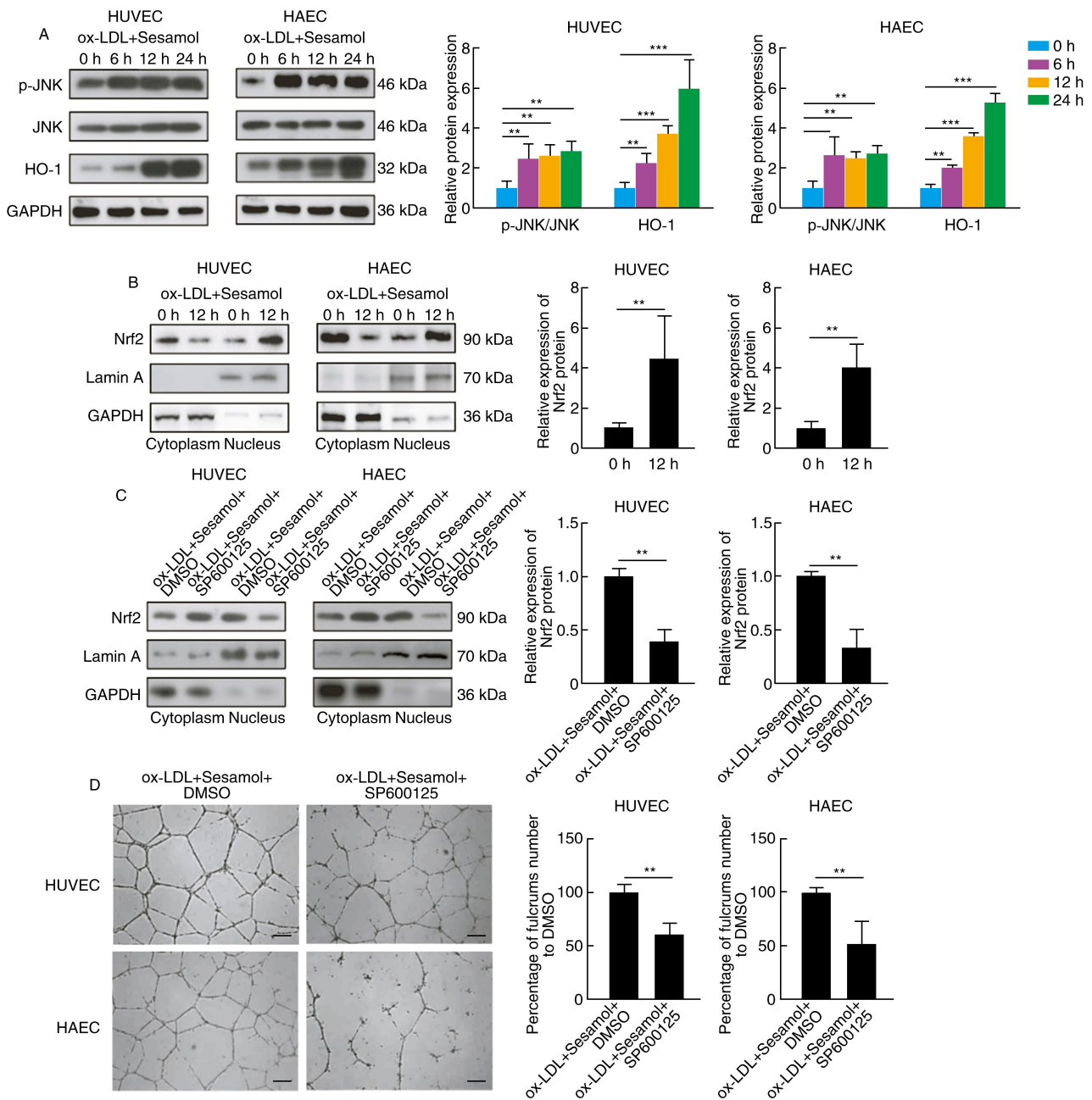


图 5. 芝麻酚通过激活 JNK/Nrf2/HO-1 信号通路发挥保护作用

A: 细胞中蛋白表达水平检测; B: 核浆分离检测 Nrf2 蛋白分布; C: JNK 特异性抑制剂处理后核浆分离检测 Nrf2 蛋白分布;

D: 小管形成实验检测血管生成。Bar=250  $\mu$ m; n=3, \* 为  $P<0.05$ , \*\* 为  $P<0.01$ , \*\*\* 为  $P<0.001$ 。

Figure 5. Sesamol exerts protective effects by activating the JNK/Nrf2/HO-1 signaling pathway

转录因子 Snail/Slug/Twist 表达上调,同时 CD31/VE-钙黏蛋白表达下调,而 40  $\mu$ mol/L 的芝麻酚可有效逆转这一病理转化过程。已有研究发现,在高糖诱导的内皮损伤模型中,芝麻酚同样可抑制 EndMT 并改善血管功能<sup>[20]</sup>,提示芝麻酚在多种代谢应激条件下均具有广泛的内皮保护作用。

研究发现,芝麻酚呈时间依赖性激活 JNK 磷酸化、促进 Nrf2 核转位并上调 HO-1、NQO1、GCLC 等抗氧化酶表达;JNK 特异性抑制剂 SP600125 可完全

阻断 Nrf2 核转位及下游抗氧化基因表达,并逆转芝麻酚对氧化应激、细胞凋亡、异常血管生成及 EndMT 的全部保护效应。这明确了 JNK 作为上游关键激酶激活 Nrf2/HO-1 轴的必要性,与 Liang 等<sup>[21]</sup>在心肌细胞中报道的“JNK-Nrf2-HO-1”正反馈环路高度一致,也与 Zhang 等<sup>[18]</sup>研究中芝麻酚通过相同通路缓解高脂诱导 As 的机制相符。

尽管本研究揭示了芝麻酚通过 JNK/Nrf2/HO-1 信号通路对 ox-LDL 诱导内皮细胞损伤的多重保护

作用,但仍存在以下不足:首先,本研究仅采用 HUVEC 和 HAEC 两种内皮细胞系进行体外验证,缺乏原代内皮细胞或患者来源内皮细胞的进一步验证,结果的普适性有待确认;其次,虽然使用 JNK 特异性抑制剂 SP600125 完成了通路阻断实验,但未结合 siRNA 或 CRISPR-Cas9 基因敲除技术进一步验证 JNK/Nrf2/HO-1 信号通路的必要性;第三,本研究均为细胞水平实验,缺乏 ApoE<sup>-/-</sup>或 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠等动物模型及临床样本的体内外验证,难以充分模拟 As 的复杂病理微环境;最后,芝麻酚的体内代谢动力学、生物利用度及长期给药安全性仍需进一步评估。未来计划从以下方向深化研究:(1)在高脂饮食诱导的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠模型中验证芝麻酚的体内抗 As 疗效,以及其对斑块内 EndMT 的逆转作用;(2)结合单细胞测序技术,探讨芝麻酚对斑块微环境中内皮细胞异质性的调控机制;(3)开发纳米递药系统,以提高芝麻酚的靶向性和生物利用度;(4)开展临床队列研究,检测 As 患者血浆中的芝麻酚血药浓度,并分析其与 JNK/Nrf2/HO-1 信号通路活性、内皮功能标志物的相关性。上述工作将为芝麻酚最终转化为临床防治 As 的新型天然药物奠定更坚实的基础。

综上所述,本研究系统揭示了芝麻酚拮抗 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤的作用机制,其核心在于激活 JNK/Nrf2/HO-1 信号通路,通过多靶点协同效应抑制 ox-LDL 诱导的氧化应激、异常血管生成及 EndMT 过程。这一发现不仅深化了对芝麻酚抗 As 分子机制的认知,也为其作为新型天然抗 As 药物的后续开发提供了坚实的体外实验依据。未来可进一步在 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠或 LDLR<sup>-/-</sup>模型中验证其体内疗效,并探索与现有他汀类药物联合应用的潜力。

#### [参考文献]

- [1] Reddy T K, Littman E, Elder-Odame P, et al. Sex differences in atherosclerosis and its clinical complications[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2026, 28(1): 12.
- [2] Xu S, 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.
- [3] Baratzadeh F, Butler A E, Kesharwani P, et al. Effects of curcumin on low-density lipoprotein oxidation: from experimental studies to clinical practice[J]. *EXCLI J*, 2022, 21: 840-851.
- [4] Bai R, Guo J, Ye X Y, et al. Oxidative stress: the core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 77: 101619.
- [5] Hao Y M, Yuan H Q, Ren Z, et al. Endothelial to mesenchymal transition in atherosclerotic vascular remodeling[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 490: 34-38.
- [6] Huang Q, Gan Y, Yu Z, et al. Endothelial to mesenchymal transi-

tion: an insight in atherosclerosis[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 734550.

- [7] Li J, Wang T, Liu P, et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD[J]. *Food Funct*, 2021, 12(9): 3898-3918.
- [8] Jameel F, Irfan F, Salim A, et al. Alpha terpineol preconditioning enhances regenerative potential of mesenchymal stem cells in full thickness acid burn wounds[J]. *Regen Ther*, 2024, 26: 188-202.
- [9] Liu S, Yan W, Hu Y, et al. Shikonin alleviates endothelial cell injury induced by ox-LDL via AMPK/Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5881321.
- [10] Yu Z, Ren Q, Yu S, et al. Sevoflurane protects cardiomyocytes against hypoxia/reperfusion injury via LINC01133/miR-30a-5p axis[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(12): BSR20200713.
- [11] Li Q, Xiang Y, Chen Y, et al. Ginsenoside Rg1 protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury via activation of Nrf2/HO-1 signaling and inhibition of JNK[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(1): 21-37.
- [12] Peerapen P, Boonmark W, Chantarasaka S, et al. Trigonelline prevents high-glucose-induced endothelial-to-mesenchymal transition, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impaired angiogenic activity in human endothelial EA.hy926 cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 179: 117320.
- [13] Heo K S, Phan L P, Le N T T, et al. Mechanistic insights and emerging therapeutic strategies targeting endothelial dysfunction in cardiovascular diseases[J]. *Arch Pharm Res*, 2025, 48(4): 305-332.
- [14] Satny M, Hubacek J A, Vrablik M. Statins and inflammation[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2021, 23(12): 80.
- [15] Tang C, Deng L, Luo Q, et al. Identification of oxidative stress-related genes and potential mechanisms in atherosclerosis[J]. *Front Genet*, 2023, 13: 998954.
- [16] Shimizu W, Shoji Y, Ohkubo K, et al. Antioxidant activity of planar catechin conjugated with trolox[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(10): 1165.
- [17] Tovilović-Kovačević G, Zogović N, Ignjatović D, et al. Endothelial-protective actions of diethylether extract from gentiana kochiana and xanthone gentiacaulein against oxidized LDL-induced injury-*in vitro* evaluation[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(3): 1351.
- [18] Zhang Q, Liu J, Duan H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress[J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43-63.
- [19] Mussbacher M, Schossleitner K, Kral-Pointner J B, et al. More than just a monolayer: the multifaceted role of endothelial cells in the pathophysiology of atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2022, 24(6): 483-492.
- [20] Singh A, Bhatt K S, Nguyen H C, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular pathophysiology[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 6180.
- [21] Liang Z, Chen Y, Wang Z, et al. Protective effects and mechanisms of psoralidin against adriamycin-induced cardiotoxicity[J]. *J Adv Res*, 2022, 40: 249-261.

(此文编辑 文玉珊)