

·实验研究·

本文引用: 刘婉婷, 谢玉鑫, 李 婧, 李朝荃, 姚 慧, 付傲妮, 杨皓天, 易光辉. 荷叶碱促进 S1P/S1PR1/AMPK 来减轻 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞线粒体氧化应激损伤[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(9): 1625–1635.

荷叶碱促进 S1P/S1PR1/AMPK 来减轻 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞线粒体氧化应激损伤

刘婉婷^{1,2}, 谢玉鑫^{1,2}, 李 婧³, 李朝荃², 姚 慧², 付傲妮², 杨皓天², 易光辉^{1,2,3*}

1. 南华大学湖南省分子靶向新药研究合作创新中心药物与药理研究所, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学衡阳医学院心血管疾病研究所, 湖南省动脉硬化重点实验室, 湖南动脉硬化疾病国际科技合作基地, 湖南 衡阳 421001;
3. 南华大学衡阳医学院基础医学院, 湖南 衡阳 421001

〔摘要〕 目的 探究荷叶碱(NF)对 H₂O₂ 诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)氧化应激引起的线粒体损伤的保护作用及其机制。方法 以 H₂O₂ 诱导 HUVECs 氧化损伤为实验模型, 将细胞分为对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂+NF 组、H₂O₂+NF+W146 组、H₂O₂+NF+SEW2871 组和 H₂O₂+NF+Compound C 组, 选择 S1PR1 抑制剂 W146(10 μmol/L)、S1PR1 激动剂 SEW2871(20 nmol/L)和 AMPK 抑制剂 Compound C(多索吗啡, 1 μmol/L)分别预处理 30 min、30 min 和 24 h, 然后加入 10 μmol/L NF 处理 12 h, 最后与 400 μmol/L H₂O₂ 共孵育 2 h。用 ELISA 检测 S1P 分泌水平; 通过 Western blot 检测 S1PR1、S1PR3、AMPK 和 p-AMPK 的蛋白表达情况; 通过二氢乙啶染色检测细胞中 ROS 的水平; 使用透射电镜观察线粒体的超微结构; 通过 JC-1 荧光探针和流式细胞术检测线粒体膜电位(MMP)水平; 使用 Calcein AM 荧光探针检测线粒体通透性转换孔(MPTP)的开放程度; 使用三磷酸腺苷检测试剂盒检测胞内 ATP 水平。结果 与对照组相比, H₂O₂ 组的细胞线粒体氧化应激损伤增加($P<0.01$)。与 H₂O₂ 组相比, H₂O₂+NF 组细胞活性增加($P<0.001$), ROS 水平降低、线粒体超微结构损伤和 MPTP 开放程度减轻, MMP 水平和 ATP 水平增加($P<0.05$)。同时, H₂O₂+NF 组细胞 S1P 分泌($P<0.05$)、S1PR1($P<0.05$)和 p-AMPK($P<0.01$)蛋白表达水平增加。与 H₂O₂+NF 组相比, H₂O₂+NF+SEW2871 组细胞 p-AMPK($P<0.05$)蛋白表达水平增加, 线粒体氧化应激损伤减少($P<0.05$); H₂O₂+NF+W146 组和 H₂O₂+NF+Compound C 组细胞 p-AMPK($P<0.05$)蛋白表达水平降低, 线粒体氧化应激水平增加($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 NF 促进 S1P/S1PR1/AMPK 来减轻 H₂O₂ 诱导的 HUVECs 氧化应激引起的线粒体损伤。

〔关键词〕 氧化应激; 线粒体损伤; 荷叶碱; 人脐静脉内皮细胞; 1-磷酸鞘氨醇/1-磷酸鞘氨醇受体 1; 腺苷酸活化蛋白激酶

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.09.006

Nuciferine alleviating H₂O₂-induced mitochondrial oxidative stress damage in vascular endothelial cells by promoting S1P/S1PR1/AMPK pathway

LIU Wanting^{1,2}, XIE Yuxin^{1,2}, LI Jing³, LI Chaoquan², YAO Hui², FU Aoni², YANG Haotian², YI Guanghui^{1,2,3*}

1. Institute of Pharmacy and Pharmacology, Hunan Province Cooperative Innovation Center for Molecular Target New Drug Study, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory

〔收稿日期〕 2025-06-08

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81770490); 湖南省科技计划项目(2020JJ4535)。

〔通信作者〕 * 易光辉, 男, 博士, 教授, E-mail: ghyi6108@163.com。

for Arteriosclerosis of Hunan Province, Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

[Abstract] Objective To explore the protective effects of nuciferine (NF) on mitochondrial damage caused by H_2O_2 -induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the related mechanisms. **Methods** HUVECs were subjected to oxidative damage induced by H_2O_2 as an experimental model. The cells were divided into the control group, H_2O_2 group, H_2O_2 +NF group, H_2O_2 +NF+W146 group, H_2O_2 +NF+SEW2871 group, and H_2O_2 +NF+Compound C group. They were pretreated with the S1PR1 inhibitor W146 (10 $\mu\text{mol/L}$), S1PR1 agonist SEW2871 (20 nmol/L), and AMPK inhibitor Compound C (dorsomorphin, 1 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min, 30 min, and 24 h, respectively. Subsequently, 10 $\mu\text{mol/L}$ NF was added and incubated for 12 h, followed by co-incubation with 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 2 h. The secretion level of S1P was measured using ELISA. The protein expression levels of S1PR1, S1PR3, AMPK, and p-AMPK were determined by Western blot. The intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) were measured using dihydroethidium staining. The ultrastructure of mitochondria was observed using transmission electron microscopy. The mitochondrial membrane potential (MMP) was determined using JC-1 fluorescent probes and flow cytometry. The opening degree of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) was examined using the Calcein AM fluorescent probe. The intracellular ATP levels were measured using an ATP assay kit. **Results** Compared with the control group, the H_2O_2 group exhibited increased mitochondrial oxidative stress damage ($P<0.01$). Compared with the H_2O_2 group, the H_2O_2 +NF group demonstrated enhanced cell viability ($P<0.001$), reduced ROS levels, alleviated mitochondrial ultrastructural damage, and decreased MPTP opening degree, as well as elevated MMP and ATP levels ($P<0.05$). Additionally, the H_2O_2 +NF group showed increased S1P secretion ($P<0.05$) and elevated protein expression levels of S1PR1 ($P<0.05$) and p-AMPK ($P<0.01$). Compared with the H_2O_2 +NF group, the H_2O_2 +NF+SEW2871 group exhibited increased p-AMPK protein expression level ($P<0.05$) and reduced mitochondrial oxidative stress damage ($P<0.05$). Conversely, the H_2O_2 +NF+W146 and H_2O_2 +NF+Compound C groups showed decreased p-AMPK protein expression level ($P<0.05$) and elevated mitochondrial oxidative stress level ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** NF alleviates mitochondrial damage caused by H_2O_2 -induced oxidative stress in HUVECs by promoting S1P/S1PR1/AMPK signaling pathway.

[Keywords] oxidative stress; mitochondrial damage; nuciferine; human umbilical vein endothelial cell; sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 1; adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase

心血管疾病是一类涉及心脏或血管的疾病,主要包括冠心病、动脉粥样硬化、高血压、脑血管疾病、周围动脉疾病等^[1]。大多数心血管疾病的病理基础是动脉粥样硬化,这是一种慢性动脉疾病,其特征是血管壁中脂质的积累^[2]。氧化应激是各种心血管疾病发展的病理机制之一^[3-4]。氧化应激是指体内氧化和抗氧化状态之间的不平衡,导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平增加,从而对蛋白质、脂质、核酸和其他生物分子造成氧化损伤,最终导致细胞死亡和组织损伤^[5-6]。同时,氧化应激产生的大量 ROS 会改变线粒体的形态和功能,破坏线粒体稳态,导致线粒体功能障碍^[7]。线粒体功能障碍主要包呼吸链缺陷、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)破坏、线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)开放增

加和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)合成减少^[8-9]。这些异常可以触发细胞坏死或激活凋亡信号通路^[9]。因此,维持线粒体的结构完整性和细胞稳态在心血管疾病中至关重要。

1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是一种活性脂质,被认为是心脏的保护因子^[10]。S1P 可以通过 S1P-S1PRs 轴调节血管张力、维持血管稳态以及内皮功能和完整性^[11]。在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)中,细胞表面主要表达 1-磷酸鞘氨醇受体 1-3(sphingosine-1-phosphate receptor 1-3, S1PR1、S1PR2 和 S1PR3)^[12]。S1P 可以激活 S1PR1 和 S1PR3 以维持血管稳态并增强内皮屏障功能。而激活 S1PR2 与激活 S1PR1、S1PR3 的作用相反^[12-13]。同时,S1P 对线粒体功能也起到调节作用,S1P 通过保持内皮细胞线粒

体结构完整性,减少失血性休克和复苏诱导的微血管渗漏^[13]。

腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)广泛表达于心血管系统,研究证明 AMPK 对心血管系统的不同细胞都具有保护作用^[14]。并且,AMPK 是一种参与线粒体稳态调节的重要激酶,如促进线粒体生物发生、调节线粒体动力学、线粒体自噬和线粒体 Ca^{2+} 内流等^[15]。

NF(nuciferine, NF)分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_2$,是中药荷叶中富含的一种异喹啉类生物碱,具有良好的抗氧化活性,可减轻高脂动物模型的氧化应激状态,抑制受损细胞中 ROS 的产生^[16-17]。同时,S1P 参与内皮细胞线粒体氧化应激过程。有研究表明,NF 可激活 AMPK 信号通路改善非酯化脂肪酸诱导的上皮细胞脂质积累、抑制细胞凋亡和迁移^[18]。因此,本研究用 H_2O_2 诱导 HUVECs 构建氧化损伤内皮细胞模型,探究 NF 是否通过激活 S1P/S1PR/AMPK 减轻线粒体氧化应激损伤。

1 实验材料

1.1 细胞来源

HUVECs(SCSP-5330)购自中国科学院细胞研究所。

1.2 主要药品与试剂

胎牛血清(A5670801)、DMEM(11965092)均购自赛默飞世尔科技公司;2%青霉素和链霉素(BL505A,北京兰杰柯科技有限公司);NF(HY-N0049,美迪化学有限公司);CCK-8 试剂盒(GK3607-100T,北京鼎国长生生物技术);S1PR1(NB120-11424,优宁维生物科技有限公司);S1PR3(ab217319)、AMPK(ab32047)和 β -AMPK(ab133448)均购自艾博抗贸易有限公司; β -肌动蛋白(81115-1-RR)和第二抗体(SA00001-1/2)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;二氢乙醚(dihydroethidium, DHE)(KGA7502-5)和 JC-1(KGA1904-10)均购自江苏凯基生物技术);SDS-PAGE(CW0022M,北京康威世纪生物技术有限公司);S1P 试剂盒(ml038623,上海酶联生物技术有限公司);ECL 显影剂(P0019)、MPTP 分析试剂盒(C2009S)、增强型 ATP 测试试剂盒(S0027)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 主要仪器

双人单面垂直净化工作台(SW-CJ-2D,苏州净化设备有限公司); CO_2 细胞培养箱(DH-160I,上海三腾仪器有限公司);三气细胞培养箱(CCL-170T-8,美国赛默飞公司);酶标仪(PT-3502G,美国 BIO-RAD 公司);小型冷冻离心机(5424R $r=3\text{ cm}$,德国 Eppendorf 公司);恒温水浴箱(TW20,德国 Julabo 公司);正置倒置一体荧光显微镜[AMF5000,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];垂直电泳仪(EPS300)、半干转印槽(VE-180B)和全自动化学发光图像分析系统(Tanon-5200)均来自上海天能科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

细胞在含 10%胎牛血清、2%青霉素和链霉素的 DMEM 中,在含 5% CO_2 的培养箱中于 37℃ 培养。HUVECs 用 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 2 h,以诱导 HUVECs 中的氧化应激损伤。为了探究 NF 对 HUVECs 的保护作用,先加入不同浓度的 NF 对 HUVECs 进行预处理 12 h,然后加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 与 HUVECs 共孵育 2 h,检测各组 HUVECs 氧化应激损伤程度。为进一步探究 NF 减轻 H_2O_2 诱导的 HUVECs 氧化应激损伤的具体机制,选择 S1PR1 抑制剂 W146(10 $\mu\text{mol/L}$)、S1PR1 激动剂 SEW2871(20 nmol/L)和 AMPK 抑制剂 Compound C(1 $\mu\text{mol/L}$)分别预处理 HUVECs 30 min、30 min 和 24 h,随后加入 NF 处理 12 h,最后加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 与 HUVECs 共孵育 2 h,并对 HUVECs 氧化应激状态进行评价^[19-20]。

2.2 CCK-8 分析

在培养基中制备细胞悬液,将细胞接种在 96 孔板中,空白对照组、对照组和实验组,每组重复 3 次。细胞在培养箱(37℃、5% CO_2)中培养 24 h。对实验组进行不同处理后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,放置于培养箱中孵育 2 h,用酶标仪进行检测,记录 450 nm 处的吸光度值。

2.3 Western blot

使用 SDS-PAGE 分离等量的蛋白质,并转移到聚偏氟乙烯(poly vinylidene fluoride, PVDF)膜上。将 PVDF 膜放置于 5%脱脂牛奶的培养皿中,在脱色摇床上封闭。封闭后,用 TBST 缓冲液清洗 PVDF

膜,置于相应的一抗稀释剂中,4℃摇床上放置过夜。根据抗体说明书用 TBST 缓冲液配制不同浓度的一抗稀释液:S1PR1(1:1 000),S1PR3(1:6 000),AMPK(1:3 000),p-AMPK(1:500), β -肌动蛋白(1:10 000)。一抗孵育结束后,用 TBST 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min。洗膜结束后,将目的条带放入对应二抗稀释液中,放置于室温摇床 2 h。二抗孵育结束后,用 TBST 洗涤清洗 3 次,每次 10 min。制备 ECL 显影剂,将目的条带浸泡在显影液中,用全自动化学发光图像分析系统进行曝光,保存图像,最后用 ImageJ 软件分析图像。

2.4 ROS 水平的检测

按 1.8×10^4 个/孔的比例配制细胞悬液;然后将细胞接种在 48 孔板中,每组 3 个重复,并在培养箱(37℃,5%CO₂)中培养 24 h。在对实验组进行不同处理后,用 PBS 洗涤细胞 3 次。在避光条件下,提前用 DMSO 溶解 DHE 配制浓度为 5 mmol/L 的母液,使用新鲜培养基稀释成浓度为 20 μ mol/L 的 DHE 溶液。每孔加入 200 μ L DHE 溶液,放置于 37℃水浴箱,避光孵育 40 min。用 PBS 缓冲液对细胞进行清洗,重复 3 次。在荧光显微镜下观察并保存图像,用 ImageJ 软件进行分析。

2.5 SIP 含量的检测

根据实验方法对各组细胞进行处理,收集上清液。取出 ELISA 试剂盒中酶标板,设置标准孔和样本孔,分别加入 50 μ L 标准品或样品,再加入 50 μ L 生物素标记抗体,用封板膜封住反应孔,放置于 37℃水浴箱,孵育 30 min。弃去孔中液体,吸水纸上拍干,每孔加入 350 μ L 洗涤液,静置 1 min,弃去孔中液体,吸水纸上拍干,重复洗板 5 次。每孔加入 100 μ L 辣根过氧化物酶标记抗体,用封板膜封住反应孔,放置于 37℃水浴箱,孵育 30 min。弃去孔中液体,重复洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μ L,放置于 37℃水浴箱,孵育 15 min。最后加入 50 μ L 终止液,15 min 内用酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光值。

2.6 MPTP 开放程度的检测

对实验组进行不同处理后,用 PBS 缓冲液对细胞进行清洗。每孔分别加入 100 μ L Calcein AM 染色液、荧光淬灭工作液或 Ionomycin 对照液,轻轻晃动使燃料均匀覆盖细胞,放置于 CO₂ 培养箱,避光

孵育 30 min。弃去孔中液体,加入 37℃预热培养基,放置于 CO₂ 培养箱,避光孵育 30 min。用 PBS 缓冲液对细胞进行清洗,重复 3 次,加入检测缓冲液,在荧光显微镜下观察并保存图像。

2.7 MMP 水平的检测

制备细胞悬浮液,将细胞接种在 48 孔板中,并在培养箱(37℃,5%CO₂)中培养 24 h。在不同处理后,用 PBS 洗涤细胞。向每个孔中加入 100 μ L JC-1 工作溶液,并在 CO₂ 培养箱中避光培养细胞 30 min。弃去孔中的反应混合物,用 1 $\times$ 缓冲液洗涤孔两次,加入新鲜培养基,用荧光显微镜观察图像。

按 4×10^5 个/孔的比例配制细胞悬液,6 孔板设置对照组及实验组,放置于 CO₂ 培养箱(37℃,5%CO₂)中培养 24 h。不同处理后,用 PBS 洗涤细胞。然后用 500 μ L 胰酶消化细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min,然后收集细胞沉淀。然后将细胞重新悬浮在 500 μ L JC-1 工作液中,置于 CO₂ 培养箱中,避光孵育 30 min。然后将细胞以 2 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液;分两次加入 1 mL 1 $\times$ 缓冲液,并加入 500 μ L 1 $\times$ 缓冲液用于重新悬浮。然后用流式细胞仪观察细胞。

2.8 ATP 水平的检测

对实验组进行不同处理后,吸除培养液,每孔加入 200 μ L 裂解液,晃动培养板使其充分裂解。转移液体至 EP 管,4℃12 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清。选用不透光的 96 孔板,加入 100 μ L ATP 检测工作液,室温放置 3~5 min,消耗本底的 ATP。分别加入 20 μ L 标准品或样品,用化学发光仪检测。用 BCA 试剂盒测定各组样品中的蛋白浓度,ATP 的浓度单位可换算成 nmol/mg。

2.9 线粒体超微结构观察

根据实验方法对各组细胞进行处理,处理结束后,用细胞刮刀刮下细胞,然后在 4℃下以 2 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。缓慢地沿微量离心管壁加入预冷的 2.5%戊二醛,细胞在 4℃孵育过夜用于固定。弃去上清液,沿微量离心管壁缓慢加入适量的 1 $\times$ PBS,彻底冲洗。混合物在室温下静置 15 min,重复三次。加入饿酸(1%)用于固定,细胞在 4℃保持 1~2 h,并用 1 $\times$ PBS 洗涤 3 次。在每个步骤中,使用 30% $\rightarrow$ 50% $\rightarrow$ 70% $\rightarrow$ 80% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 95%的乙醇梯

度将样品脱水 15 min,然后用 100 %乙醇处理 20 min,最后用纯丙酮处理 20 min。然后用包埋剂和丙酮的混合物处理样品 4 h,并用纯包埋剂处理过夜。包埋的样品被切成 70~90 nm 的厚度。切片分别用 50%乙醇、柠檬酸铅和二乙酸铀溶液染色 5~10 min。电镜观察线粒体超微结构。

2.10 统计学分析

经过 3 次及以上重复实验,使用 ImageJ 软件进行数据分析,使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,单因素方差分析和 q 检验用于比较组间差异。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 NF 处理 H_2O_2 诱导的 HUVECs 的最适浓度

用 2.5、5、10、20 及 40 $\mu\text{mol/L}$ NF 分别处理 HUVECs 24 h,与对照组相比,各组的细胞活力均无下降(图 1A)。用不同浓度的 NF 处理氧化应激下的 HUVECs 12 h,相比 H_2O_2 组,其他组的细胞活力增加($P < 0.05$),10 $\mu\text{mol/L}$ NF 组细胞活力增加最多($P < 0.001$)(图 1B)。

3.2 NF 减轻 H_2O_2 诱导的 HUVECs 线粒体氧化应激损伤

与对照组相比, H_2O_2 组细胞的线粒体内 ROS 含量增加、MMP 下降、MPTP 开放程度增加、ATP 含量显著降低($P < 0.001$),并且线粒体出现空泡化、线粒

体嵴尺寸减小、变短和膜破裂等超微结构损伤,线粒体受损;相比 H_2O_2 组, H_2O_2 +NF 组细胞线粒体受损程度减轻($P < 0.05$)。详见图 2A—F。

3.3 S1P/S1PR1 在 HUVECs 线粒体氧化应激的作用

使用 S1PR1 抑制剂 W146(10 $\mu\text{mol/L}$)和 S1PR1 激动剂 SEW2871(20 nmol/L)。与 H_2O_2 +NF 组相比, H_2O_2 +NF+W146 组细胞内 ROS 水平显著增加,线粒体超微结构损伤增加,MMP 降低,MPTP 开放程度增加,ATP 水平降低($P < 0.01$); H_2O_2 +NF+SEW2871 组细胞线粒体功能障碍减轻($P < 0.05$)(图 3)。与对照组相比, H_2O_2 组中 S1P 和 S1PR1 蛋白的表达水平显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);相比 H_2O_2 组, H_2O_2 +NF 组细胞 S1P 和 S1PR1 蛋白表达水平显著增加($P < 0.05$),而 S1PR3 蛋白表达水平没有显著变化(图 4)。

3.4 AMPK 磷酸化减轻 HUVECs 线粒体氧化应激损伤

与对照组相比, H_2O_2 组中的 p-AMPK 蛋白表达水平显著下降;相比 H_2O_2 组, H_2O_2 +NF 组细胞 p-AMPK 蛋白表达水平显著增加($P < 0.01$)。与 H_2O_2 +NF 组相比, H_2O_2 +NF+W146 组细胞 p-AMPK 蛋白表达水平显著下降($P < 0.05$); H_2O_2 +NF+SEW2871 组细胞 p-AMPK 蛋白表达水平增加($P < 0.05$); H_2O_2 +NF+Compound C(1 $\mu\text{mol/L}$)组细胞 p-AMPK 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),细胞内 ROS 水平显著增加,对线粒体超微结构的损伤增加,MMP 降低,MPTP 的开放程度增加,ATP 水平降低($P < 0.05$)。详见图 5 和图 6。

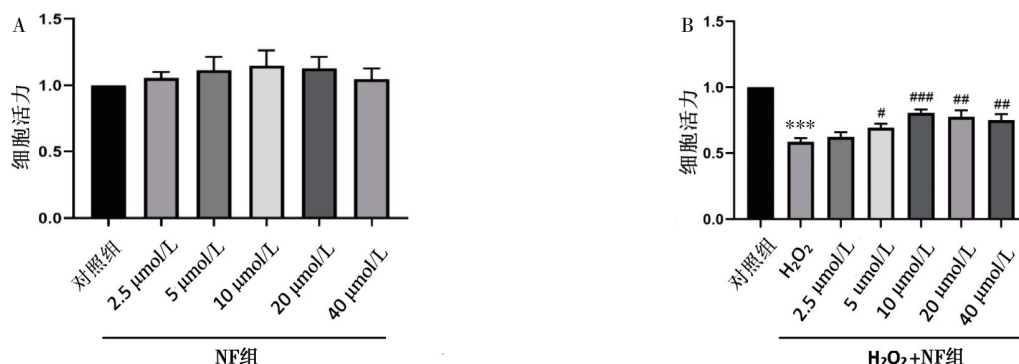


图 1 不同浓度 NF 处理 HUVECs 后细胞活性($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.1 Cell viability of HUVECs after treatment with different concentrations of NF ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

注:A. 2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ NF 分别处理 HUVECs 24 h 的细胞活性;B. 2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ NF 分别处理氧化损伤 HUVECs 12 h 的细胞活性。与对照组相比,*** $P < 0.001$;与 H_2O_2 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

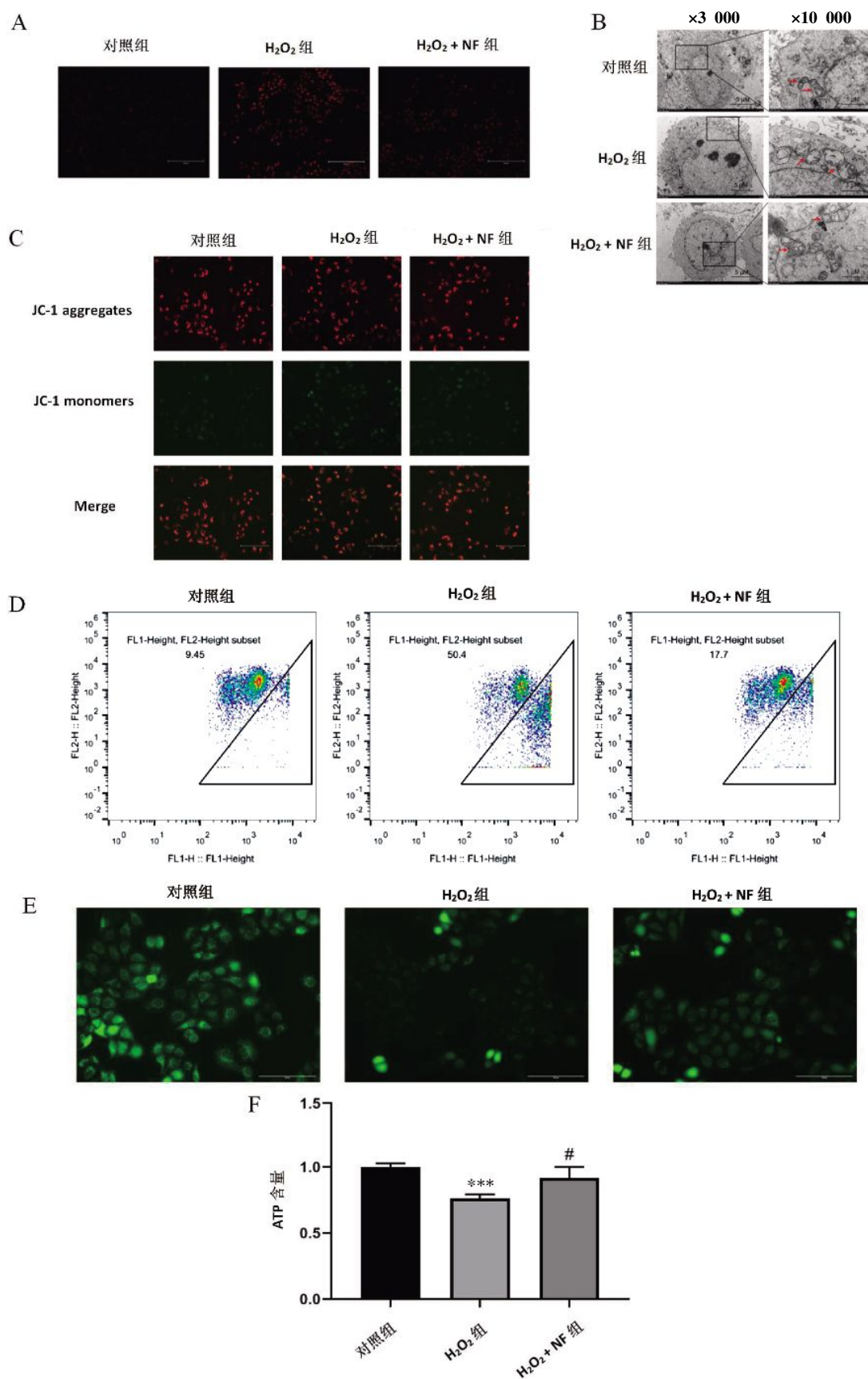
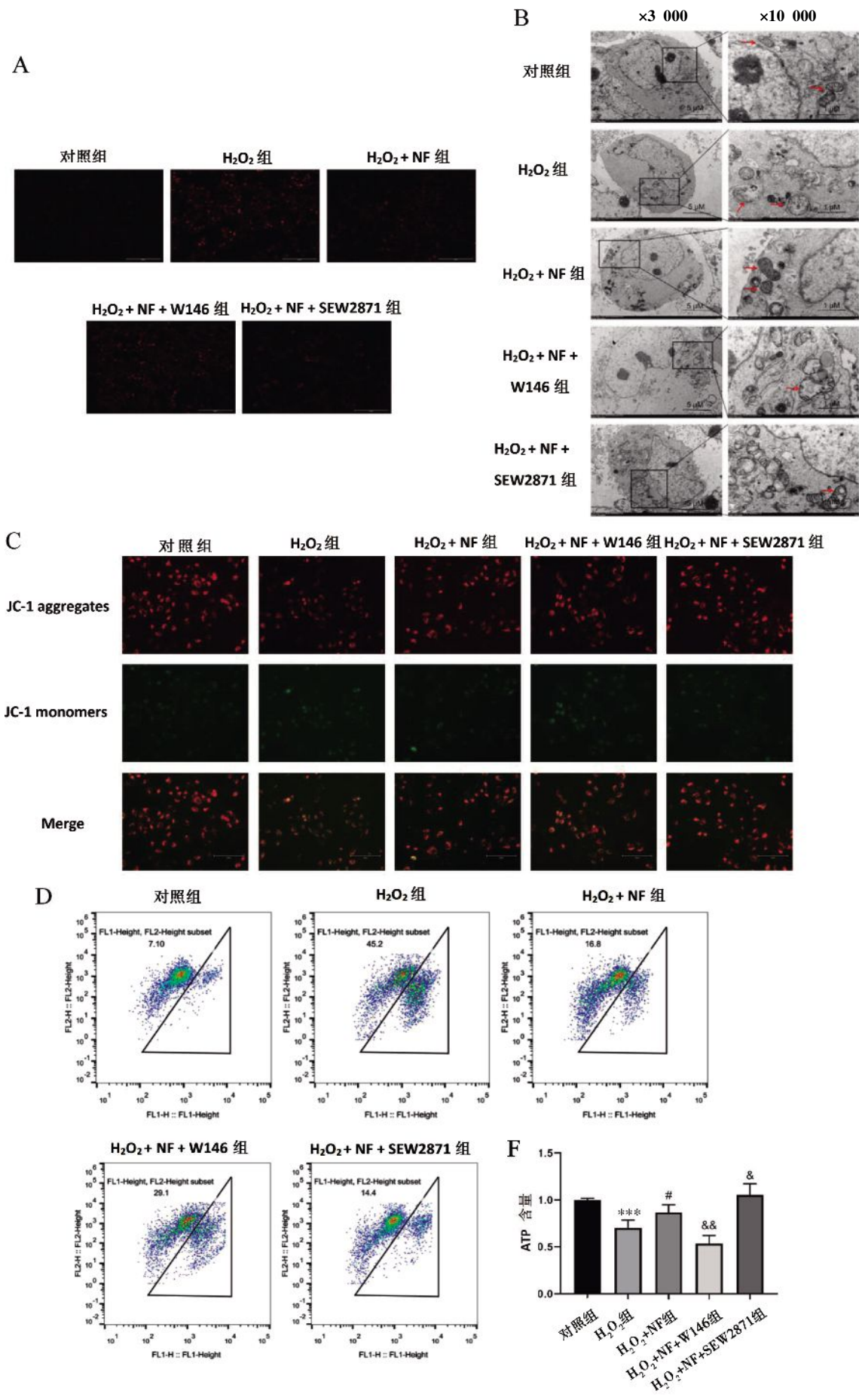


图 2 NF 减轻 H_2O_2 诱导的 HUVECs 线粒体氧化应激损伤($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.2 NF alleviating H_2O_2 -induced mitochondrial oxidative stress damage in HUVECs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A.通过 DHE 染色法测定的 ROS 水平,比例尺=300 μm ;B.透射电镜观察结果,左侧($\times 3\ 000$,比例尺=5 μm),右侧放大图像($\times 10\ 000$,比例尺=1 μm),红色箭头表示线粒体;C. JC-1 荧光探针检测 MMP 水平,比例尺=150 μm ;D. JC-1 染色后流式图细胞学分析MMP 水平;E. Calcein AM 荧光探针检测 MPTP 的开放程度,比例尺=150 μm ;F.以对照组标准化后的胞内 ATP 水平。与对照组相比,*** $P<0.001$;与 H_2O_2 组相比,# $P<0.05$ 。



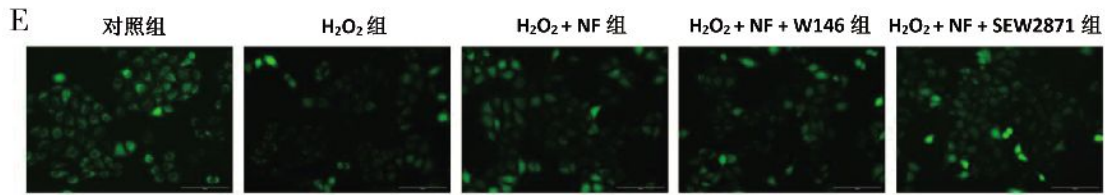


图 3 NF 促进 AMPK 磷酸化减轻 H_2O_2 诱导的 HUVECs 线粒体氧化应激损伤 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 NF promoting AMPK phosphorylation to reduce H_2O_2 -induced mitochondrial oxidative stress damage in HUVECs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: A. DHE 染色检测 ROS 水平, 比例尺=300 μm ; B. 透射电镜观察结果, 左侧($\times 3000$, 比例尺=5 μm), 右侧放大图像($\times 10000$, 比例尺=1 μm), 红色箭头指示线粒体; C. JC-1 荧光探针检测 MMP 水平, 比例尺=150 μm ; D. JC-1 染色后流式细胞学分析 MMP 水平; E. Calcein AM 荧光探针检测 MPTP 的开放程度, 比例尺=150 μm ; F. 对照组归一化后的胞内 ATP 水平。与对照组相比, $***P<0.001$; 与 H_2O_2 组相比, $^*P<0.05$; 与 H_2O_2 +NF 组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$ 。

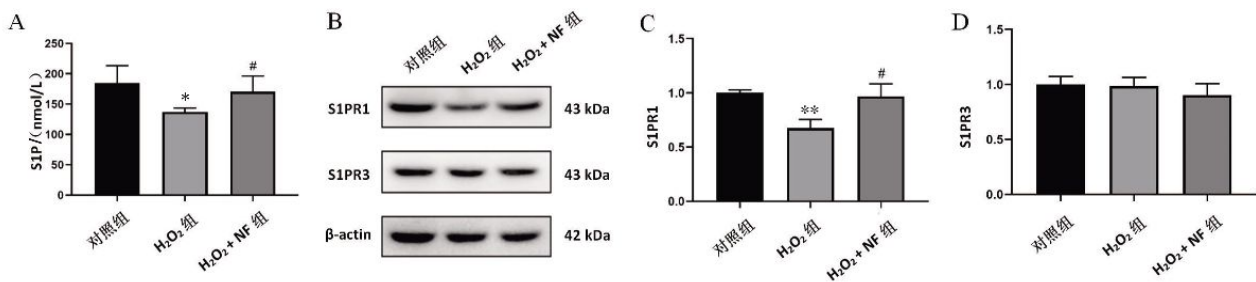


图 4 NF 促进 S1P/S1PR1 减少 H_2O_2 诱导的 HUVECs 线粒体氧化应激损伤 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 NF promoting S1P/S1PR1 to alleviate H_2O_2 -induced mitochondrial oxidative stress damage in HUVECs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: A. ELISA 检测细胞分泌 S1P 的水平; B. Western blot 检测 S1PR1、S1PR3 的蛋白表达水平; C、D. B 的定量分析。与对照组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与 H_2O_2 组相比, $^{\#}P<0.05$ 。

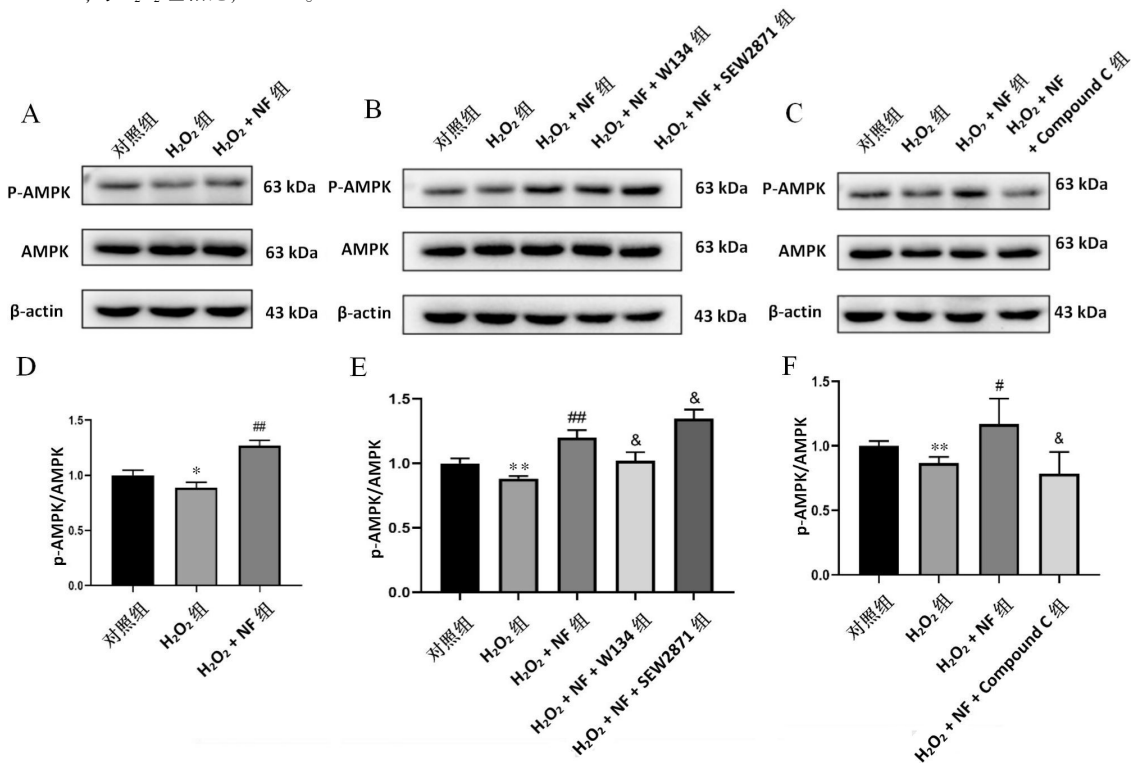


图 5 NF 通过激活 S1PR1 受体来促进 HUVECs AMPK 磷酸化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 NF promoting AMPK phosphorylation in HUVECs by activating S1PR1 receptor ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: A、B 和 C 为 FWF146、SEW2871 和 Compound C 处理 HUVECs 后 AMPK、p-AMPK 蛋白表达水平, D、E 和 F 分别为 A、B 和 C 的定量分析。与对照组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与 H_2O_2 组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$; 与 H_2O_2 +NF 组相比, $^{\&}P<0.05$ 。

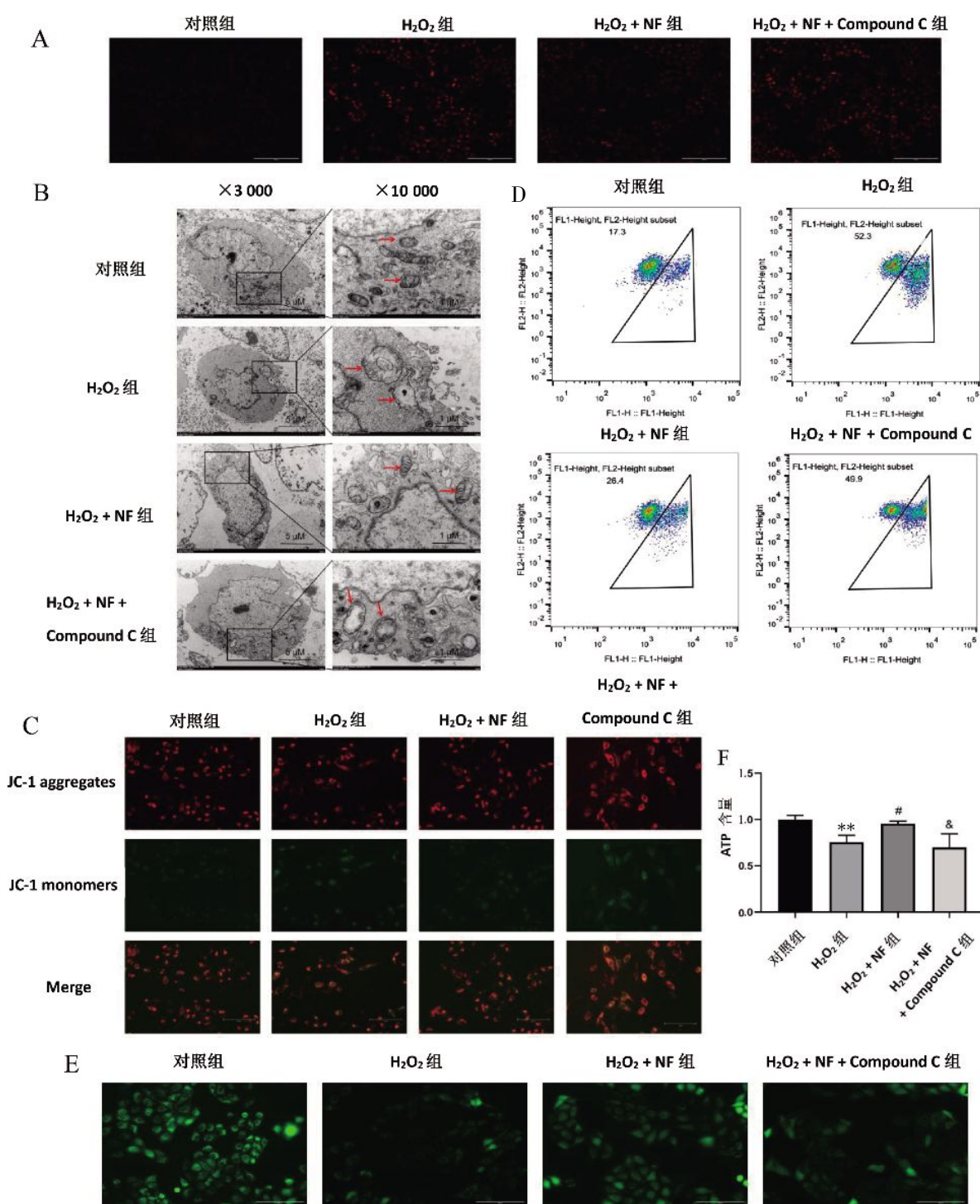


图 6 NF 促进 AMPK 磷酸化减轻 H_2O_2 诱导的 HUVECs 线粒体氧化应激损伤 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.6 NF promoting AMPK phosphorylation to reduce H_2O_2 -induced mitochondrial oxidative stress damage in HUVECs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A. DHE 染色检测 ROS 水平,比例尺=300 μm ;B.透射电镜观察结果,左侧($\times 3\ 000$,比例尺=5 μm),右侧放大图像($\times 10\ 000$,比例尺=1 μm),红色箭头指示线粒体;C.JC-1 荧光探针检测 MMP 水平,比例尺=150 μm ;D. JC-1 染色后流式细胞学分析 MMP 水平;E. Calcein AM 荧光探针检测 MPTP 的开放程度,比例尺=150 μm ;F.以对照组标准化后的胞内 ATP 水平。与对照组相比,** $P<0.01$;与 H_2O_2 组相比,* $P<0.05$;与 H_2O_2+NF 组相比,* $P<0.05$ 。

4 讨论

内源性包括代谢障碍、线粒体损伤、免疫系统障碍等,外源性包括紫外线、酒精中毒、吸烟等,它们均

可引起 ROS 病理性增加,引起氧化应激,导致各种疾病^[21]。氧化应激引起的血管内皮细胞损伤被认为是导致心血管疾病的重要危险因素之一^[22]。因此,本研究采用外源性 H_2O_2 诱导人 HUVECs 氧化应激,

构建氧化损伤的细胞模型。 H_2O_2 组细胞中的 ROS 水平显著增加,表明这些细胞中氧化和抗氧化系统的失衡,可能会进一步导致细胞氧化损伤。

NF 是从中药荷叶中提取的主要降脂活性成分,对糖尿病、肥胖、高脂血症等代谢紊乱具有多种药理作用^[18]。然而,由于 H_2O_2 诱导的氧化应激,其对线粒体损伤的作用和潜在的机制仍不清楚。在这项研究中,10 $\mu\text{mol/L}$ NF 处理 H_2O_2 诱导的 HUVECs 12 h,可以显著提高细胞活性,说明此浓度对血管内皮有保护作用。细胞发生氧化应激破坏线粒体的稳态时,会导致线粒体功能障碍和细胞命运的改变^[15]。NF 显著降低 H_2O_2 处理后 HUVECs 中的 ROS 水平和氧化应激反应。结果表明,NF 可以减轻氧化应激引起的线粒体损伤。内皮细胞衍生的 S1P 和 S1PR 的激活在维持内皮屏障和血管功能中起着重要作用^[12]。用 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 NF 处理后, H_2O_2 诱导的 HUVECs 中 S1P 的水平和 S1PR1 蛋白的表达水平显著增加。因此,NF 可能影响 S1P/S1PR1 的表达。之后,选用 S1PR1 抑制剂 W146 和 S1PR1 激动剂 SEW2871 进行干预,观察细胞观察线粒体的超微结构,检测细胞中 ROS 的水平、MMP、MPTP 的开放情况和细胞内 ATP 水平。结果表明,S1PR1 抑制剂 W146 削弱了 NF 对 HUVECs 的保护作用,而 S1PR1 激动剂 SEW2871 增强了 NF 对 HUVECs 的保护作用。这提示 S1P/S1PR1 与 NF 减弱 H_2O_2 诱导 HUVECs 线粒体氧化应激损伤有关。

AMPK 是一种独特的真核激酶,参与调节线粒体稳态。为了验证 AMPK 是否参与 NF 减轻 H_2O_2 诱导 HUVECs 线粒体氧化应激损伤,首先检测各组细胞中 AMPK 和 p-AMPK 的蛋白表达水平。结果显示 NF 处理的氧化损伤 HUVECs 的 p-AMPK 的蛋白表达水平显著升高。与 NF 组相比,W146 降低 p-AMPK 蛋白表达水平,而 SEW2871 增加 p-AMPK 蛋白水平。这表明,NF 促进 S1PR1 蛋白表达来增加 AMPK 磷酸化。同时,选用 AMPK 抑制剂 Compound C 来干预 AMPK 进行验证实验。结果表明 AMPK 抑制剂 Compound C 减弱了 NF 对氧化损伤内皮细胞的保护作用。这提示 AMPK 参与 NF 减弱 H_2O_2 诱导 HUVECs 线粒体氧化应激损伤的过程。

本研究存在一定局限性,主要关注 NF 减轻线粒体氧化应激损伤,其是否对线粒体生物发生、线粒体动力学、线粒体自噬等其他方面起作用尚不明确。同时,只检测了细胞中 ROS 的水平,未检测线粒体 ROS 的水平,其对线粒体 ROS 的影响尚不明确。细胞质 ROS 不仅可以直接破坏细胞中的重要成分,还可以间接损伤线粒体,促进线粒体 ROS 产生,加重对细胞的损害。根据相关文献报道,其机制可能为 ROS 在细胞线粒体中诱导 MPTP 的开放,进一步刺激线粒体 ROS 生成,即“ROS 诱导的 ROS 释放”。同时,线粒体 ROS 释放到细胞质中还可以影响邻近线粒体,引起一系列细胞信号反应^[23]。

综上,研究结果表明 NF 通过促进 S1P 分泌和 S1PR1 和 p-AMPK 蛋白表达减轻 H_2O_2 诱导 HUVECs 的线粒体氧化应激损伤。这不仅丰富了 NF 的药理作用及其作用机制,而且为其在心血管疾病中的应用奠定良好的基础。

参考文献

- [1] SURENDRAN A, ZHANG H, STAMENKOVIC A, et al. Lipidomics and cardiovascular disease[J]. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 2025, 1871(5): 167806.
- [2] XING Y, LIN X. Challenges and advances in the management of inflammation in atherosclerosis[J]. *Journal of Advanced Research*, 2025, 71: 317–335.
- [3] BATTY M, BENNETT M R, YU E. The Role of oxidative stress in atherosclerosis[J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3843.
- [4] JOMOVA K, ALOMAR S Y, VALKO R, et al. Flavonoids and their role in oxidative stress, inflammation, and human diseases[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2025, 413: 111489.
- [5] YAN Q, LIU S, SUN Y, et al. Targeting oxidative stress as a preventive and therapeutic approach for cardiovascular disease[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 519.
- [6] SAEDI S, TAN Y, WATSON S E, et al. Oxidative stress and pediatric diabetic cardiovascular complications: emerging research and clinical applications[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2025, 328(4): H945–H962.
- [7] FU H, CHENG J, HU L, et al. Mitochondria-targeting materials and therapies for regenerative engineering[J]. *Biomaterials*, 2025, 316: 123023.

- [8] YI X, ZHU Q X, WU X L, et al. Histone Methylation and oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 6023710.
- [9] KIM S H, KIM H. Inhibitory effect of astaxanthin on oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction: A Mini-Review[J]. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1137.
- [10] MITRA R, PENTLAND K, KOLEV S, et al. Co-therapy with SIP and heparan sulfate derivatives to restore endothelial glycocalyx and combat pro-atherosclerotic endothelial dysfunction[J]. *Life Sciences*, 2025, 377: 123662.
- [11] JOZEF CZUK E, GUZIK T J, SIEDLINSKI M. Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 156: 104793.
- [12] QIU Y, SHEN J, JIANG W, et al. Sphingosine 1-phosphate and its regulatory role in vascular endothelial cells[J]. *Histology and Histopathology*, 2022, 37(3): 213-225.
- [13] ALVES N G, TRUJILLO A N, BRESLIN J W, et al. Sphingosine-1-phosphate reduces hemorrhagic shock and resuscitation-induced microvascular leakage by protecting endothelial mitochondrial integrity[J]. *Shock (Augusta, Ga.)*, 2019, 52(4): 423-433.
- [14] LIANG X, ZHANG J, YU J, et al. Quercetin ameliorates ox-LDL-induced cellular senescence of aortic endothelial cells and macrophages by p16/p21, p53/SERPINE1, and AMPK/mTOR pathways[J]. *European Journal of Medical Research*, 2025, 30(1): 359.
- [15] YANG J, GUO Q, FENG X, et al. Mitochondrial Dysfunction in cardiovascular diseases: potential targets for treatment [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 841523.
- [16] HARISHKUMAR R, CHRISTOPHER J G, RAVINDRAN R, et al. nuciferine attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity: An in vitro and in vivo study[J]. *Cardiovascular Toxicology*, 2021, 21(11): 947-963.
- [17] ZHU X, SI F, HAO R, et al. Nuciferine protects against obesity-induced nephrotoxicity through its hypolipidemic, anti-inflammatory, and antioxidant effects[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(48): 18769-18779.
- [18] LI J, ZHAO C, LIU M, et al. Nuciferine ameliorates nonesterified fatty acid-induced bovine mammary epithelial cell lipid accumulation, apoptosis, and impaired migration via activating LKB1/AMPK signaling pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(1): 443-456.
- [19] WANG H, HUANG H, DING S F. Sphingosine-1-phosphate promotes the proliferation and attenuates apoptosis of Endothelial progenitor cells via S1PR1/S1PR3/PI3K/Akt pathway[J]. *Cell Biology International*, 2018, 42(11): 1492-1502.
- [20] ZHU L, CHEN S, DAI X. CTRP9 alleviates hypoxia/reoxygenation-induced human placental vascular endothelial cells impairment and mitochondrial dysfunction through activating AMPK/Nrf2 signaling[J]. *Tissue & Cell*, 2023, 85: 102217.
- [21] ZHANG Z, HUANG Q, ZHAO D, et al. The impact of oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction on diabetic microvascular complications[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1112363.
- [22] 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]. *Journal of Advanced Research*, 2021, 34: 43-63.
- [23] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLITT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. *Physiological Reviews*, 2014, 94(3): 909-950.

(本文编辑 苏 维)