

PCSK9 抑制剂依洛尤单抗对 H₂O₂ 导致的血管内皮细胞氧化损伤的影响*

杨晓丽 申志杰 张瑶 王友明

(河北工程大学附属医院神经内科, 河北 邯郸 056002)

【摘要】 目的 探讨依洛尤单抗(Evolocumab)对过氧化氢(H₂O₂)诱导的血管内皮细胞氧化损伤的影响及发生机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs),根据前期研究用 H₂O₂ (700 μmol/L)建立 HUVECs 的氧化损伤模型,在加入 H₂O₂ 前 0.5 h,分别用 3 种剂量的依洛尤单抗(分别为:25、50 和 100 μmol/L)预孵育细胞,将细胞分为空白对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂+25 μmol/L 依洛尤单抗组、H₂O₂+50 μmol/L 依洛尤单抗组和 H₂O₂+100 μmol/L 依洛尤单抗组。用 MTS 实验检测细胞活力,流式细胞术测定细胞内活性氧(ROS)水平和线粒体膜电位(MMP)的变化,Hoechst 33258 检测凋亡细胞,Western blot 检测 Caspase-3 的蛋白表达水平,酶联免疫吸附试验(ELISA)测定丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素 6(IL-6)的水平。结果 与对照组相比,H₂O₂ 组的 ROS 和 MDA 水平升高,NO 水平下降,TNF-α 和 IL-6 水平增高,MMP 下降,Caspase-3 的表达上调(均 P<0.05),细胞明显凋亡。然而,提前加入 3 种剂量的依洛尤单抗均可减轻 H₂O₂ 引起的细胞活力下降,并且高剂量(100 μmol/L)的依洛尤单抗效果更佳。另外,依洛尤单抗可抑制 H₂O₂ 诱导的 ROS、MDA 的生成和炎症因子 TNF-α、IL-6 的释放,同时可减轻 H₂O₂ 诱导的 NO 水平下降,提升 NO 的水平,并可抑制氧化损伤导致的 MMP 下降和 Caspase-3 的表达上调,抑制细胞凋亡(均 P<0.05)。结论 依洛尤单抗可通过抗氧化,抑制炎症因子的释放和细胞凋亡,升高 NO 的水平来减轻 H₂O₂ 造成的血管内皮细胞氧化损伤。

【关键词】 依洛尤单抗;人脐静脉内皮细胞;活性氧;一氧化氮;肿瘤坏死因子-α;白细胞介素 6

【中图分类号】 R363 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2025. 02. 007

The effect of PCSK9 inhibitor-evolocumab on H₂O₂ induced oxidative damage in vascular endothelial cells

YANG Xiaoli, SHEN Zhijie, ZHANG Yao, WANG Youming

(Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Hebei Engineering University, Handan 056002, Hebei, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of evolocumab on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative damage in vascular endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in vitro. According to previous research using H₂O₂ (700 μmol/L) to establish oxidative stress injury model. The cells were pre-incubated with three dosages of evolocumab (25, 50 and 100 μmol/L) 0.5 h before exposure to H₂O₂. The cells were divided into control group, H₂O₂ group, H₂O₂+25 μmol/L evolocumab group, H₂O₂+50 μmol/L evolocumab group and H₂O₂+100 μmol/L evolocumab group. The cell viability was detected by MTS assay, intracellular reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial membrane potential (MMP) were measured using flow cytometry, apoptotic cells were detected using Hoechst 33258. Western blot was used to detect the protein expression level of Caspase-3, and malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the control group, the intracellular ROS, MDA, TNF-α and IL-6 levels in the H₂O₂ group increased, while the NO level decreased, accompanied by a de-

基金项目:河北省卫健委青年科技课题(20200585)

通信作者:王友明,E-mail:wymhsm@126.com

引用本文:杨晓丽,申志杰,张瑶,等.PCSK9 抑制剂依洛尤单抗对 H₂O₂ 导致的血管内皮细胞氧化损伤的影响[J].西部医学,2025,37(2):191-

197. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2025. 02. 007

crease in MMP, the protein expression of Caspase-3 upregulation, and cell apoptosis. However, adding evolocumab before exposure to H_2O_2 could alleviate the decrease of cell viability caused by H_2O_2 , and the high dosage (100 $\mu\text{mol/L}$) of evolocumab had better effect. Further more, this study found that evolocumab could inhibit the production of ROS and MDA, and inhibit the increase of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 levels. In addition, the addition of evolocumab could alleviate the decrease of NO level, inhibit the decrease in MMP, inhibit the protein expression of Caspase-3 upregulation and cell apoptosis. **Conclusion** Evolocumab alleviates the oxidative damage of vascular endothelial cells caused by H_2O_2 by antioxidation, inhibiting inflammation and apoptosis, and increasing the NO level.

【Key words】 Evolocumab; Human umbilical vein endothelial cells; Reactive oxygen species; Nitric oxide; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-6

脑梗死是神经科的常见病和多发病,具有高发病率和致残率的特点。动脉粥样硬化作为脑梗死的常见病因,是一种与血管内皮功能障碍密切相关的慢性血管炎性疾病^[1]。多种原因均可导致动脉粥样硬化,而其中的发生机制中大多有氧化应激的参与^[2-3]。一氧化氮(Nitric oxide, NO)可促进血管舒张,被认为可能是介导血管内皮细胞多种作用的核心。NO 信号传导可通过抑制血小板和白细胞的聚集来保护血管内皮细胞^[4],抑制动脉粥样硬化。内皮 NO 主要由 L-精氨酸通过内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase, eNOS)产生,而过量的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)可导致 eNOS 失调,最终导致内皮功能障碍^[5]。多种炎症介质如 C 反应蛋白、IL-1、IL-6、 $\text{TNF-}\alpha$ ^[6-7]等,可通过下调内皮细胞中的 eNOS 转录,导致 NO 释放减少,加重内皮功能障碍。

高脂血症是脑梗死的独立危险因素,高脂血症可通过增加 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶和髓过氧化物酶的水平,干扰氧自由基与脂蛋白之间的反应,导致炎症反应以及 ROS 生成,过多的 ROS 通过诱导脂质氧化导致血管内皮细胞损伤、坏死和凋亡。高脂血症还可通过增加小窝蛋白-1 水平导致 eNOS 活性受损^[8],导致 NO 的生物利用度降低,从而导致内皮功能障碍。前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)抑制剂可通过与肝脏中的低密度脂蛋白(LDL)受体结合,并减少细胞表面 LDL 受体的呈递,从细胞外介质中清除 LDL 颗粒^[9],起到降低血脂的作用。最近的研究^[10]表明,PCSK9 除了在肝脏中表达外,也在血管内皮细胞和平滑肌细胞当中表达。有研究^[11]表明,促炎因子如 IL-6 的刺激会诱导 PCSK9 的表达增加^[11],PCSK9 可直接诱导 ROS 的生成,导致血管内皮细胞损伤,从而促进动脉粥样硬化的发生。但目前对于 PCSK9 抑制剂对氧化应激引起的血管内皮细胞损伤的影响及发生机制的研究较少。依洛尤单抗为 PCSK9 抑制剂,在临床用于治疗高脂血症的患者。本研究主要探讨依洛

尤单抗对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞氧化损伤的影响及发生机制,旨在为保护血管内皮细胞及其功能寻找新的方法,以减少动脉粥样硬化的形成和脑梗死的发生。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)(上海吉凯基因细胞库)。

1.2 主要实验试剂 DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司);10%胎牛血清(美国 Gibco 公司);青霉素-链霉素溶液(中国北京 Solaibio 公司);0.25%胰酶(中国北京 Solaibio 公司);二甲基亚砜(DMSO)(中国北京 Solaibio 公司);磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 Sigma 公司); H_2O_2 (中国河北健宁药业有限公司);依洛尤单抗(美国 Amgen 公司);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-5-(3-羧甲基苯基)-2-(4-磺苯基)-2 氢-四唑内盐(MTS)(美国 Promega 公司);罗丹明 123(美国 Sigma 公司);DCFH-DA 探针(中国上海碧云天生物科技有限公司);Hoechst 33258(中国上海碧云天生物科技有限公司);抗-Caspase-3 抗体和抗-GAPDH 抗体(美国 Signalway Antibody 公司);MDA ELISA 试剂盒(中国上海碧云天生物科技有限公司);NO ELISA 试剂盒(中国上海碧云天生物科技有限公司); $\text{TNF-}\alpha$ ELISA 试剂盒(中国上海碧云天生物科技有限公司);IL-6 ELISA 试剂盒(中国上海碧云天生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞的培养及分组处理 将 HUVECs 培养于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素-链霉素溶液的高糖 DMEM 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 细胞培养箱中进行培养。检测单独应用依洛尤单抗对血管内皮细胞活性的影响。将细胞分为对照组和依洛尤单抗组(依洛尤单抗剂量分别为:25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$)。将细胞分为空白对照组、 H_2O_2 组、 H_2O_2 + 25 $\mu\text{mol/L}$ 依洛尤单抗组、 H_2O_2 + 50 $\mu\text{mol/L}$ 依洛尤单抗组和 H_2O_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ 依洛尤单抗组。依洛尤单抗在加 H_2O_2 前 0.5 h 加入预孵育细胞,然后各组细胞均培养 24 h。 H_2O_2 剂量为 700 $\mu\text{mol/L}$ ^[12]。

1.3.2 MTS 实验检测细胞活力 本研究应用 MTS 实验检测细胞活力,将不同处理组的细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板上,每孔 100 μL 置于培养箱中孵育 24 h。24 h 后,吸掉旧培养基,每孔加入 100 μL 无血清培养基,再加入 20 μL MTS 溶液,继续放入培养箱中孵育 4 h 后应用酶标仪检测 490 nm 波长的吸光度值。

1.3.3 流式细胞术检测血管内皮细胞内 ROS 的含量 应用流式细胞术并使用 DCFH-DA 探针检测血管内皮细胞内 ROS 的含量。将不同处理组的细胞接种在 6 孔板中,按照制造商的说明收集细胞,并加入 1 μL DCFH-DA,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下孵育 30 min 后用 PBS 洗涤 3 次,应用流式细胞仪测量荧光强度,激发波长和发射波长分别为 488,525 nm。

1.3.4 流式细胞术检测线粒体膜电位 应用流式细胞术并使用罗丹明 123 检测线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential, MMP)。将不同处理组的细胞接种在 6 孔板中,按照试剂操作说明配制细胞后加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 罗丹明 123,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中孵育 30 min 后应用 PBS 冲洗 3 次,然后立即应用流式细胞仪进行流式分析,结果用 Expo 32 ADC 软件进行处理。

1.3.5 Hoechst 33258 检测凋亡细胞 使用 Hoechst 33258 检测凋亡细胞,将盖玻片放入 24 孔培养板中,将不同处理组的细胞悬浮液移入培养板(7×10^4 /孔)中,然后将不同处理组的细胞用 10 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33258 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下染色 15 min。随后,在荧光显微镜下捕获细胞的图像,用 ImageJ 软件的细胞计数器分析细胞凋亡率。

1.3.6 Western blot 检测 Caspase-3 的蛋白表达水平 获取各培养组细胞蛋白样品,按照制造商的说明,使用总蛋白质提取试剂盒进行蛋白质提取。使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质含量。接下来,通过电泳分离 30 μg 总蛋白,并将其转移到聚偏二氟乙

烯膜上。在室温下用 5% 脱脂乳封闭 1 h 后,将膜与稀释在 5% 脱脂乳中的抗-Caspase-3(1:1 000)抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。使用多克隆抗甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(1:3 000)作为内部对照。第 2 天,将膜与荧光标记的第二抗体(Dylight 800,山羊抗小鼠 IgG,1:2 000)在室温下孵育 1 h。使用红外激光扫描成像系统进行扫膜分析。

1.3.7 ELISA 测定血管内皮细胞内 MDA、NO、TNF- α 和 IL-6 的水平 按照上述分组处理细胞,取不同处理组细胞的上清液,分别应用 MDA ELISA 试剂盒、NO ELISA 试剂盒、TNF- α ELISA 试剂盒和 IL-6 ELISA 试剂盒检测细胞内 MDA、NO、TNF- α 和 IL-6 的水平,按照试剂盒的说明进行操作。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,正态分布数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。单因素方差分析(ANOVA)用于分析 3 个或更多组之间的差异,Levene 检验用于检验方差齐性,Student-Newman-Keuls(SNK)检验用于多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单独应用依洛尤单抗对 HUVECs 的作用及依洛尤单抗对 H_2O_2 刺激 HUVECs 的影响 3 种剂量的依洛尤单抗(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)对 HUVECs 的存活率与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),说明单独应用依洛尤单抗对 HUVECs 的活性没有影响。另外,应用 3 种剂量的依洛尤单抗提前干预 HUVECs 0.5 h 后,再与 700 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 共培养 24 h 后,观察提示,与 H_2O_2 组相比,提前加入 3 种剂量的依洛尤单抗均可减轻 H_2O_2 刺激导致的细胞活力下降,并且依洛尤单抗剂量为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时效果更明显,因此在后续实验当中,选用依洛尤单抗的剂量为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。见图 1。

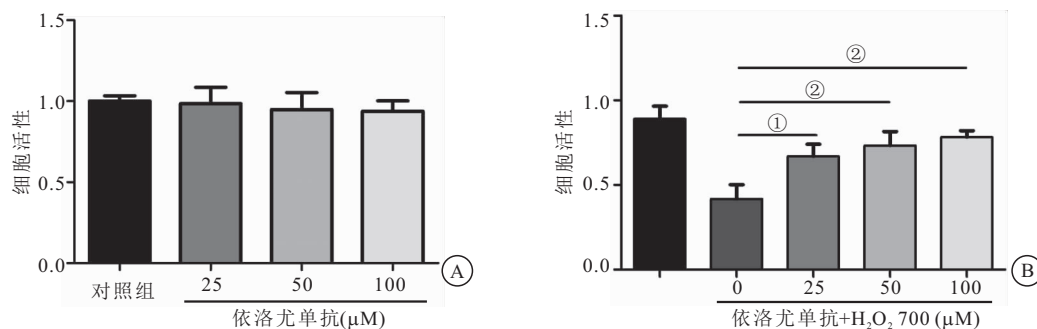


图 1 依洛尤单抗对 HUVECs 及 H_2O_2 刺激的细胞活力的影响($n=5$)

Figure 1 The effects of evolocumab on HUVECs and H_2O_2 stimulated cell viability

注:A. 3 种剂量的依洛尤单抗对 HUVECs 的活性的影响;B. 3 种剂量的依洛尤单抗对 H_2O_2 刺激导致的血管内皮细胞活力影响。组间比较,① $P < 0.01$, ② $P < 0.001$ 。

2.2 依洛尤单抗抑制 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 ROS 水平 流式细胞术检测细胞内 ROS 水平发现, 与空白对照组相比, H₂O₂ 组 ROS 水平升高 ($P < 0.05$), 而提前加入依洛尤单抗可抑制 H₂O₂ 刺激造成的细胞内 ROS 的水平升高 ($P < 0.05$)。见图 2。

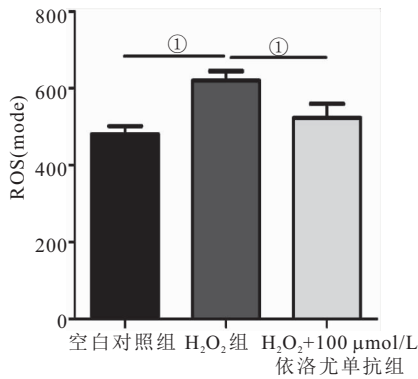


图 2 依洛尤单抗抑制 H₂O₂ 刺激导致的血管内皮细胞内 ROS 水平 ($n=5$)

Figure 2 Evolocumab inhibited intracellular ROS level in HUVECs induced by H₂O₂

注: 组间比较, ⊙ $P < 0.05$ 。

2.3 依洛尤单抗提升 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞线粒体膜电位 (Mitochondrial membrane potential, MMP) 水平 MMP 下降是细胞凋亡的早期表现, 抑制 MMP 下降就可能阻止细胞凋亡的发生。本研究使用流式细胞术检测细胞 MMP, 发现与空白对照组相比, H₂O₂ 组 MMP 下降 ($P < 0.05$), 然而提前加入依

洛尤单抗可抑制 H₂O₂ 刺激造成的 MMP 下降 ($P < 0.05$)。见图 3。

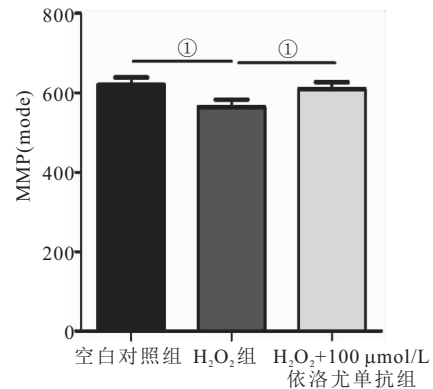


图 3 依洛尤单抗提升 H₂O₂ 刺激导致的血管内皮细胞内 MMP 水平 ($n=5$)

Figure 3 Evolocumab elevated MMP level in HUVECs induced by H₂O₂

注: 组间比较, ⊙ $P < 0.05$ 。

2.4 依洛尤单抗抑制 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞凋亡 Hoechst 33258 在凋亡细胞中的摄入增加, 可呈现出强的蓝色荧光。在本研究中, 使用 Hoechst 33258 测定不同处理组 HUVECs 的凋亡情况, 并用 ImageJ 软件的细胞计数器分析细胞凋亡率。与空白对照组相比, H₂O₂ 组可显示出较强的蓝色荧光, 导致明显的细胞凋亡 ($P < 0.001$), 而 H₂O₂ + 100 μmol/L 依洛尤单抗组可明显抑制 H₂O₂ 刺激引起的细胞凋亡 ($P < 0.001$)。见图 4。

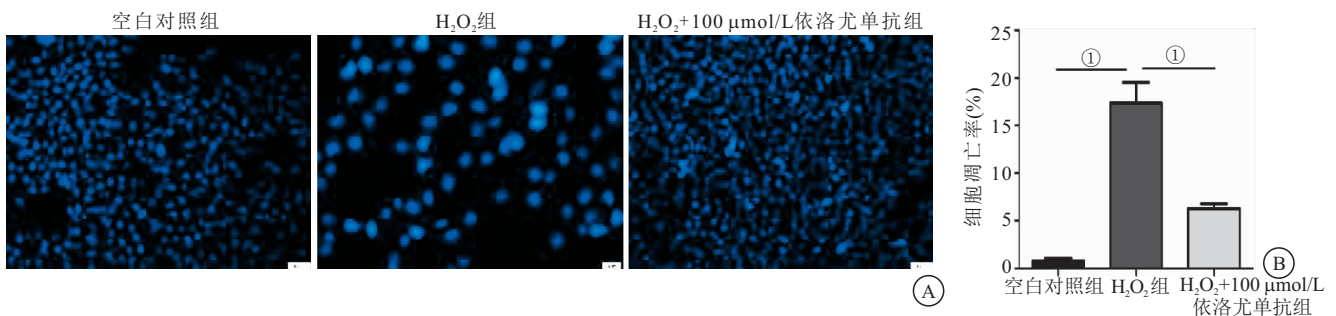


图 4 依洛尤单抗抑制 H₂O₂ 刺激导致的血管内皮细胞凋亡 ($n=3$)

Figure 4 Evolocumab inhibited the apoptosis of HUVECs induced by H₂O₂

注: A. Hoechst 33258 荧光染色测定各组细胞的凋亡情况 (400×); B. 依洛尤单抗可明显抑制 H₂O₂ 诱导的 HUVECs 凋亡。组间比较, ⊙ $P < 0.001$ 。

2.5 依洛尤单抗抑制 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 Caspase-3 的蛋白表达水平 与空白对照组相比, H₂O₂ 组 Caspase-3 的蛋白表达水平上调 ($P < 0.001$), 与 H₂O₂ 组比较, H₂O₂ + 100 μmol/L 依洛尤单抗组 Caspase-3 蛋白表达水平下降, 可抑制细胞凋亡 ($P < 0.01$), 见图 5。

2.6 依洛尤单抗提高 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 NO 水平, 抑制 MDA 水平 与空白对照组相比,

H₂O₂ 刺激可导致细胞内 NO 的水平下降, 然而提前加入依洛尤单抗可减轻 H₂O₂ 刺激造成的细胞内 NO 水平下降 ($P < 0.001$)。MDA 为自由基作用于脂质发生过氧化反应的产物, 可反映脂质过氧化的严重程度, 进而反映出内皮细胞损伤的程度。与空白对照组相比, H₂O₂ 刺激可导致细胞内 MDA 的水平升高, 然而提前加入依洛尤单抗可抑制 H₂O₂ 刺激造成的细胞内 MDA 的水平升高 ($P < 0.01$)。见图 6。

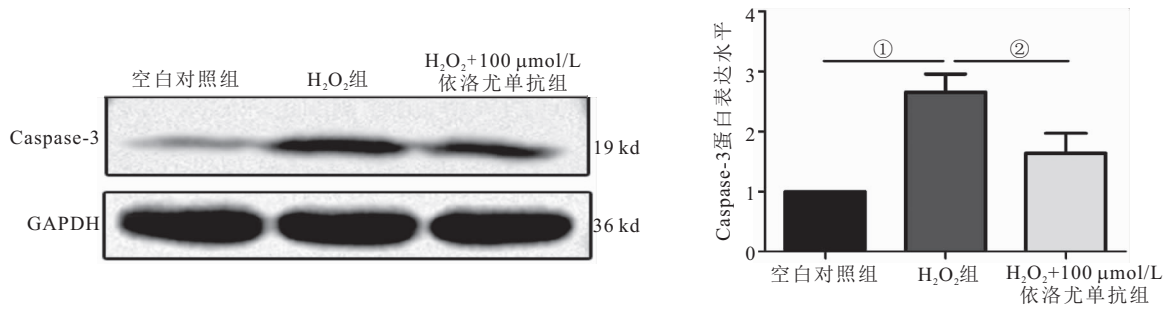


图 5 依洛尤单抗抑制 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 Caspase-3 的蛋白表达 (n=3)

Figure 5 Evolocumab inhibited H₂O₂-mediated protein expression of Caspase-3 in HUVECs

注:组间比较, ①P<0.01; ②P<0.001。

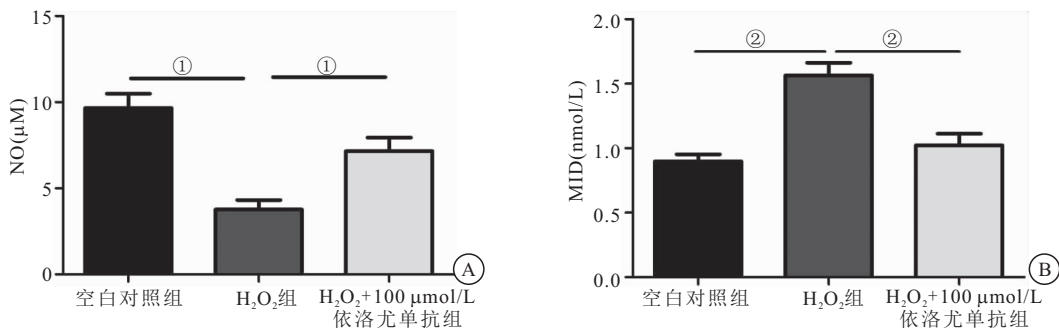


图 6 依洛尤单抗提高 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 NO 水平, 抑制 MDA 水平 (n=3)

Figure 6 Evolocumab increased NO level and inhibited MDA level in HUVECs induced by H₂O₂

注:A. 依洛尤单抗对 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 NO 水平的影响; B. 依洛尤单抗对 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 MDA 水平的影响。组间比较, ①P<0.01, ②P<0.001。

2.7 依洛尤单抗抑制 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 TNF-α 和 IL-6 的水平 与空白对照组相比, H₂O₂ 刺激可导致 TNF-α 和 IL-6 的水平升高 (P<0.001), 引

发炎症, 然而提前加入依洛尤单抗可抑制 H₂O₂ 刺激造成的 TNF-α 和 IL-6 的水平升高, 从而抑制炎症的发生 (P<0.001)。见图 7。

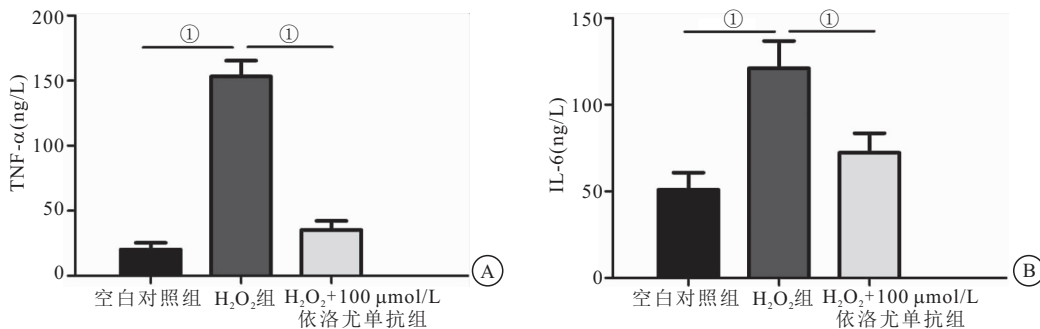


图 7 依洛尤单抗抑制 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 TNF-α 和 IL-6 的水平

Figure 7 Evolocumab inhibited the TNF-α and IL-6 levels in HUVECs induced by H₂O₂

注:A. 依洛尤单抗对 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 TNF-α 水平的影响; B. 依洛尤单抗对 H₂O₂ 介导的血管内皮细胞内 IL-6 水平的影响。组间比较, ①P<0.001。

3 讨论

存在于整个循环系统中的血管内皮由排列在血管腔表面的单层内皮细胞构成, 是血液和组织之间的物理屏障, 可通过分泌血管舒张因子如 NO 和血管收缩因子以调节血管张力并维持血管内稳态, 并具有调节血管生成, 调节血栓和凝血的功能^[13]。当血管内皮

细胞受损时, 其功能紊乱, 细胞凋亡脱落, 导致血管内膜完整性破坏, 通透性增加, 进而导致炎症因子的浸润, 脂质的沉积, 大量的脂质成分如 LDL^[14] 被单核细胞和巨噬细胞等炎症细胞吞噬, 形成泡沫细胞, 导致动脉粥样硬化的形成和脑梗死的发生。

血管内皮功能障碍在动脉粥样硬化斑块的形成

中起着核心作用,因此研究如何保护血管内皮功能对预防动脉粥样硬化的形成及进一步预防脑梗死的发生至关重要。血管内皮细胞中的 ROS 主要来源于线粒体、NADPH 氧化酶、eNOS 解偶联和黄嘌呤氧化酶^[15]。适量的 ROS 对血管内皮细胞的生理功能至关重要。但在病理条件下,过量的 ROS 可导致血管舒张因子和血管收缩因子的调节失衡,促进 LDL 发生氧化成为氧化低密度脂蛋白(Oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL),进而促使血管内皮细胞产生 TNF- α 和 IL-6 等炎性因子,导致内皮功能障碍^[16]。过量的 ROS 可导致线粒体双层膜通透孔开放,释放钙离子、细胞色素 C 和细胞凋亡诱导因子,使线粒体电子传递链解耦联,ATP 的产生减少,促凋亡蛋白的表达水平上调,最后使线粒体外膜破裂,导致细胞凋亡。Caspase-3 是 Caspase 家族在介导细胞凋亡过程中的关键执行分子,在细胞凋亡信号传导的途径中发挥重要作用。另外,ROS 可将生物膜的不饱和脂肪酸进行脂质过氧化损伤,影响细胞膜的流动性和通透性。丙二醛(Malondialdehyde, MDA)是超氧阴离子作用于脂质而产生的脂质过氧化反应的终产物,具有细胞毒性,可反映机体脂质氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度。促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-6 是重要的炎症介质。有研究表明,TNF- α 和 IL-6 可诱导血管内皮细胞发生表型和功能的改变^[17-18],诱导内皮细胞和白细胞中粘附分子如 E-选择素、P-选择素、血管细胞粘附分子-1 和细胞间粘附分子 1 释放,促进单核细胞募集和迁移到血管内膜,加重炎症反应,并促进氧化应激的产生,诱发血管内皮细胞的凋亡,导致血管内皮功能障碍,最终导致动脉粥样硬化及血栓性血管闭塞,增加发生脑梗死的风险。本研究发现,H₂O₂ 刺激导致血管内皮细胞细胞活力下降,细胞内 ROS 水平上升,线粒体膜电位下降,促凋亡蛋白 Caspase-3 的表达上调,细胞明显凋亡,同时 MDA、TNF- α 和 IL-6 的水平上升。说明 H₂O₂ 刺激可导致明显的血管内皮细胞损伤,诱发血管内皮细胞凋亡及炎症反应。

NO 为血管内皮细胞分泌的血管舒张因子,可促进血管舒张,并且还具抗炎、抗血小板聚集、抗增殖、抗迁移、减少氧自由基生成和降低 ox-LDL 水平的作用^[4,19],有助于维持血管内皮细胞的稳态环境。既往研究^[20]表明,在动脉粥样硬化、脑梗死、高血压等疾病中都涉及 NO 的改变。ROS 介导的 NO 生物利用度降低是内皮功能障碍引起脑梗死的重要机制之一,而脑梗死容易发生于老年患者、吸烟人群及患有高脂血症的人群,其潜在的发生机制与血管内皮当中 ROS 的生成过多及 NO 水平的降低造成的内皮功能障碍

密切相关。有研究^[2]表明,在衰老的内皮细胞中 ROS 产生增加引起 NO 失活和随后的血管舒缩功能障碍,NO 的生物利用度受损严重损害了循环系统中流动/剪切应力诱导的血管舒张,最终导致内皮功能障碍。吸烟诱导血管内单核细胞浸润,粘附因子升高,增加 NADPH 氧化酶介导的 ROS 生成和脂质过氧化,消耗 eNOS 的辅因子四氢生物蝶呤,使 NO 的释放减少^[21],最终导致血管内皮损伤。高脂血症可导致炎症反应以及 ROS 生成过多,诱导 eNOS 解偶联,减少 NO 的生成,从而引起内皮功能障碍。本研究结果提示,H₂O₂ 刺激导致血管内皮细胞内 ROS 水平上升,而 NO 的水平下降,从而导致血管内皮细胞损伤及功能障碍。

他汀类药物可保护血管内皮细胞,还可抑制炎症反应,保护血管内皮功能^[22]。PCSK9 抑制剂可降低 LDL,在临床上用于治疗高脂血症,尤其对于他汀类药物不敏感或者不耐受的患者可选择应用 PCSK9 抑制剂进行降脂治疗^[23-24]。有研究^[10]发现,PCSK9 除了在肝脏中表达外,也在血管内皮细胞当中表达。但 PCSK9 抑制剂是否对血管内皮也具有抗氧化等作用以及其作用机制尚未完全明确。本研究应用 H₂O₂ 作用于血管内皮细胞导致血管内皮细胞发生氧化损伤,观察 PCSK9 抑制剂依洛尤单抗对损伤的血管内皮细胞的影响及其发生机制。本研究发现,提前加入依洛尤单抗可明显减轻 H₂O₂ 引起的细胞活力下降,并且依洛尤单抗对血管内皮细胞活力的改善呈剂量依赖性,高剂量(100 μ mol/L)的依洛尤单抗效果更佳。另外,本研究发现,依洛尤单抗可抑制 H₂O₂ 诱导的细胞内 ROS 和 MDA 的生成增多,并抑制促炎因子 TNF- α 和 IL-6 的释放,同时可部分逆转 H₂O₂ 诱导的细胞内 NO 的水平下降,并可抑制线粒体膜电位的下降和 Caspase-3 的表达上调,从而抑制细胞凋亡,最终减轻氧化应激造成的血管内皮细胞损伤。这些结果表明,依洛尤单抗可通过抑制血管内皮细胞内 ROS 的生成过多及炎症反应,提高 NO 水平等机制保护血管内皮细胞,进而防止动脉粥样硬化的形成和脑梗死的发生。

4 结论

本研究结果提示,PCSK9 抑制剂—依洛尤单抗可减轻氧化应激介导的血管内皮细胞氧化损伤。依洛尤单抗可通过提高细胞活力,抑制氧化损伤及炎症反应,提高 NO 水平,抑制血管内皮细胞凋亡等途径保护血管内皮细胞,从而预防动脉粥样硬化的形成和脑梗死的发生。为临床上选择应用保护血管内皮细胞的药物,抗动脉粥样硬化的治疗及预防脑梗死的发生提供了新的治疗途径和方法。

【参考文献】

- [1] MARCHIO P, GUERRA-OJEDA S, VILA J M, *et al.* Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:8563845.
- [2] UNGVARI Z, TARANTINI S, KISS T, *et al.* Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(9):555-565.
- [3] SHAITO A, ARAMOUNI K, ASSAF R, *et al.* Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2022, 27(3):105.
- [4] CYR A R, HUCKABY L V, SHIVA S S, *et al.* Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction[J]. *Critical Care Clinics*, 2020, 36(2):307-321.
- [5] MEZA C A, LA FAVOR J D, KIM D H, *et al.* Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS? [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15):3775.
- [6] VIRDIS A, COLUCCI R, BERNARDINI N, *et al.* Microvascular Endothelial Dysfunction in Human Obesity: Role of TNF- α [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(2):341-348.
- [7] LEE J, LEE S, ZHANG H, *et al.* Interaction of IL-6 and TNF- α contributes to endothelial dysfunction in type 2 diabetic mouse hearts[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187189.
- [8] PENUMATHSA S V, KONERU S, SAMUEL S M, *et al.* Strategic targets to induce neovascularization by resveratrol in hypercholesterolemic rat myocardium: role of caveolin-1, endothelial nitric oxide synthase, hemoxygenase-1, and vascular endothelial growth factor[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(7): 1027-1034.
- [9] SAFAEIAN L, MIRIAN M, BAHRIZADEH S, *et al.* Evolocumab, a PCSK9 inhibitor, protects human endothelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2022, 128(6):1681-1686.
- [10] LI J, LIANG X, WANG Y, *et al.* Investigation of highly expressed PCSK9 in atherosclerotic plaques and ox-LDL-induced endothelial cell apoptosis[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2):1817-1825.
- [11] DONOFRIO N, PRATTICHIZZO F, MARFELLA R, *et al.* SIRT3 mediates the effects of PCSK9 inhibitors on inflammation, autophagy, and oxidative stress in endothelial cells[J]. *Theranostics*, 2023, 13(2):531-542.
- [12] 杨晓丽,王征,张艳茹,等. 丁苯酞减轻 H₂O₂ 诱导的人脐静脉和脐动脉内皮细胞氧化损伤[J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(10): 1451-1456.
- [13] KRÜGER-GENGE A, BLOCKI A, FRANKE R P, *et al.* Vascular Endothelial Cell Biology: An Update[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4411.
- [14] ZHAO Y, JIA X, YANG X, *et al.* Deacetylation of Caveolin-1 by Sirt6 induces autophagy and retards high glucose-stimulated LDL transcytosis and atherosclerosis formation [J]. *Metabolism*, 2022, 131:155162.
- [15] INCALZA M A, DORIA R, NATALICCHIO A, *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases[J]. *Vascul Pharmacol*, 2018, 100:1-19.
- [16] ZHENG D, LIU J, PIAO H, *et al.* ROS-triggered? endothelial? cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:1039241.
- [17] NALLASAMY P, KANG Z Y, SUN X, *et al.* Natural Compound Resveratrol Attenuates TNF-Alpha-Induced Vascular Dysfunction in Mice and Human Endothelial Cells: The Involvement of the NF- κ B Signaling Pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22):12486.
- [18] LEITE A R, BORGES-CANHA M, CARDOSO R, *et al.* Novel Biomarkers for Evaluation of Endothelial Dysfunction[J]. *Angiology*, 2020, 71(5):397-410.
- [19] GRESELE P, MOMI S, GUGLIELMINI G. Nitric oxide-enhancing or-releasing agents as antithrombotic drugs [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 166:300-312.
- [20] FÖRSTERMANN U, XIA N, LI H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2017, 120(4):713-735.
- [21] EL-MAHDY M A, ABDELGHANY T M, HEMANN C, *et al.* Chronic cigarette smoke exposure triggers a vicious cycle of leukocyte and endothelial-mediated oxidant stress that results in vascular dysfunction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 319(1): 51-65.
- [22] PINAL-FERNANDEZ I, CASAL-DOMINGUEZ M, MAMMEN A L. Statins: pros and cons[J]. *Med Clin (Barc)*, 2018, 150(10):398-402.
- [23] 陈瑾瑾,张倩,潘希丁,等. PCSKP 抑制药 Alirocumab 治疗血脂异常有效性的 Meta 分析[J]. *药物流行病学杂志*, 2017, 26(11): 729-735.
- [24] 雷兵团,白秋江,杨慧波. 首个新一代靶向降脂药 PCSKP 抑制药阿里罗单抗概述[J]. *药物流行病学杂志*, 2016, 25(6):591-595.

(收稿日期:2023-12-15;修回日期:2024-05-12;编辑:王小菊)