

网络出版时间:2026-02-09 11:26:04 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260506.1113.006

# AMPK 活化在红景天苷改善动脉粥样硬化小鼠模型内皮祖细胞功能中的作用

贾方,王梦非,费思凡,徐加怡,俞天虹,朱琳,周敏

(苏州大学附属第三医院心内科,常州 213003)

**摘要** 目的 探讨腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)活化在红景天苷(SAL)改善动脉粥样硬化(As)小鼠模型功能受损的内皮祖细胞(EPCs)生物活性中的作用。方法 通过高脂饮食喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠建立 As 模型,观察 SAL 灌胃对主动脉斑块负荷和血清一氧化氮(NO)水平的影响;分离培养骨髓来源 EPCs(BM-EPCs),观察 SAL 体内外干预后,EPCs 增殖、迁移、血管生成能力的改变;使用 AMPK 慢病毒干扰载体(AMPK-sh-RNA)或 AMPK 抑制剂 Compound C 干预体外培养的 As 模型小鼠骨髓来源 EPCs,观察 AMPK 在 SAL 调节 EPCs 生物活性中的作用。结果 SAL 组小鼠血清 NO 水平较 As 组升高;SAL 干预组主动脉根部斑块相比 As 组减少,脂核较小;As 模型小鼠 EPCs 的迁移和血管生成数量较对照小鼠下降,SAL 组 EPCs 迁移及体外血管生成数量较 As 组上升;体外试验显示经 20、40 和 80 μmol/L 的 SAL 孵育 48 h 后 EPCs 的增殖、迁移和血管生成能力提升,AMPK-sh-RNA 感染抑制了 20 μmol/L SAL 改善 EPCs 生物活性的作用;Western blot 结果显示 Compound C 抑制了 SAL 诱导的 AMPK/Akt/eNOS 活化。结论 红景天苷通过 AMPK/Akt/eNOS 信号通路上调 EPCs 的生物活性,改善 As 病理进程中的 EPCs 功能损伤。

**关键词** 红景天苷;内皮祖细胞;腺苷酸激活蛋白激酶;动脉粥样硬化;内皮型一氧化氮合酶;AMPK/Akt/eNOS 信号通路

**中图分类号** R543.1+2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2026)04-0653-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.04.009

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)在靶向治疗缺血性疾病、血管创伤愈合等过程中有着广阔的临床应用前景。然而,各种危险因素在造成内皮损伤、导致动脉粥样硬化(atherosclerotic, As)的同时,也损害了 EPCs 的数量和功能,EPCs 数量和活性的降低加速了心血管疾病进程,降低了 EPCs 在 As 性疾病中的治疗应用<sup>[1]</sup>。

课题组前期研究<sup>[2]</sup>表明红景天苷(salidroside, SAL)可以抑制同型半胱氨酸诱导的内皮细胞内质网应激,而这种保护作用是通过腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)活化介导的<sup>[3]</sup>,SAL 还可通过抗炎、增加一氧化氮(nitride oxide, NO)生成等多种方式改善内皮功能<sup>[4]</sup>,但 SAL

对 EPCs 尤其是功能受损的 EPCs 的调节及作用机制并不明确。上调 AMPK/Akt/eNOS 信号通路可以促进 EPCs 迁移和血管生成能力,改善功能受损 EPCs 的生物活性<sup>[5-6]</sup>。该实验研究 SAL 体内外干预对功能受损的 As 模型骨髓来源 EPCs 功能的影响,进一步探讨 SAL 是否通过 AMPK/Akt/eNOS 信号通路活化来拮抗 EPCs 生物活性的下降,深入了解 SAL 对 EPCs 功能和 As 血管损伤修复的调控机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 100 只 SPF 级 8 周龄雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,体质量 20~22 g,购自卡文斯实验动物有限公司[生产许可证号:SCXK(苏)2021-0013]。小鼠饲养于动物实验中心,环境温度 22~25 °C,相对湿度 50%~70%,自由进食和饮水。本研究已通过常州市第一人民医院伦理委员会科研项目伦理审查批准[批准号:(2023)科第 103 号]。

**1.2 实验仪器及主要试剂** 内皮细胞生长培养基(货号:CC-3162)购自美国 Lonza 公司;总 NO 检测试剂盒(货号:S0024)、CCK-8 试剂盒(货号:C0037)购自上海碧云天公司;p-AMPK 一抗(货号:2535)、p-Akt 一抗(货号:4060)、β-actin 一抗(货号:4970)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;p-eNOS(货

2026-01-22 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81300220);常州市卫健委重大科技项目(编号:ZD202212);常州市卫生健康人才国内外研修资助项目(编号:GN2023006);苏州工业园区东方华夏心血管健康研究院-天然调脂药物循证科研基金项目(编号:2023-CCA-NLD-431);常州市第四周期医学重点学科项目(编号:CZXX202202)

作者简介:贾方,女,博士,主任医师;

周敏,女,硕士,副主任医师,通信作者, E-mail:

vickychow1983@163.com

号: ab215717) 购自英国 Abcam 公司; 羊抗兔 IgG-HRP (货号: BL003A) 购自北京兰杰柯公司; Transwell 小室 (货号: 3422) 购自美国 Costar 公司; 4 °C 离心机 (型号: 5415R)、PCR 仪 (型号: X226488N) 均购自德国 Eppendorf 公司; 超净工作台 (型号: SW-CJ-1FD) 购自苏州净化设备有限公司; CO<sub>2</sub> 培养箱 (型号: HERAcell 150i) 购自美国 Thermo Scientific 公司; 酶标仪 (型号: RT-6000) 购自深圳雷杜生命科学股份有限公司; 光学显微镜及图像采集系统 (型号: DM2500) 购自德国 Leica 公司; 生物倒置显微镜 (型号: IX51) 购自德国 OLYMPUS。

**1.3 分组及给药** 36 只 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠接受方案随机分成 3 组: ① 对照组 12 只, 使用普通饲料喂养; ② As 模型组 (As 组) 12 只, 高脂饮食 (常规小鼠饲料 +21% 脂肪 +0.15% 胆固醇) 喂养; ③ SAL 干预组 (SAL 干预组) 12 只: 使用高脂饲料 + SAL [50 mg/(kg·d)] 灌胃。实验周期为 8 周。高脂饮食喂养 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠建立 As 模型, 8 周后麻醉处理, 取小鼠胫骨和腓骨骨髓进行后续 EPCs 的分离和培养, 将小鼠骨髓来源 EPCs (bone marrow-derived EPCs, BM-EPCs) 按照不同处理分为对照组、As 组 (As 小鼠 BM-EPCs)、20 μmol/L SAL 组 (20 μmol/L SAL 孵育 As 小鼠 BM-EPCs 48 h)、AMPK-shRNA 组 (AMPK-shRNA 感染 As 模型 BM-EPCs 后再加入 20 μmol/L SAL 处理) 或 Compound C 组 (10 μmol/L Compound C 预处理 30 min 后再加入 20 μmol/L SAL 孵育处理 As 模型 BM-EPCs)。

#### 1.4 方法

**1.4.1 血脂及 NO 水平检测** 小鼠处死前禁食 12 h, 摘眼球方式取血, 采集的血液标本离心后收集血清, 按试剂盒检测说明, 分别检测血清胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 及 NO 水平。

**1.4.2 主动脉分离及油红染色** 将小鼠置于洁净操作台上, 用眼科剪从腹部到胸部剪开, 充分暴露胸腔, 从心尖部注入生理盐水以清除血管内血液, 灌注结束后暴露整条主动脉并清除血管周围的脂肪、结缔组织, 连同心脏将整条主动脉取出, 主动脉全长油红染色, 观察血管壁斑块大小、数量。

**1.4.3 HE 和 Masson 染色** 分离主动脉根部, 将其放入 4% 多聚甲醛中固定过夜。常规脱水石蜡包埋后连续切片, 进行 HE 染色和 Masson 染色以观察主

动脉壁 As 斑块组成、纤维帽厚度等特征。

**1.4.4 BM-EPCs 的分离培养及鉴定** 无菌条件下, 取出双下肢胫骨和腓骨, 用无菌 PBS 液反复冲洗骨髓腔, 反复吹打获得单细胞悬液, 然后将骨髓单细胞悬液缓慢滴加在淋巴细胞分离液上。以密度梯度离心法 (2 000 r/min × 20 min) 分离单个核细胞, 滴管取出中间白色云雾状单个核细胞层, PBS 洗涤后用 EPC 专用培养基重悬, 接种于人纤维连接蛋白包被的 6 cm 培养皿中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、湿度 100% 条件下培养 7 d 后, 荧光检测 DiI-acLDL 与 FITC-UEA-1 双阳性细胞。

**1.4.5 EPCs 增殖活性的检测** 在 96 孔板中接种 EPCs 细胞悬液 (100 μL/孔), 将培养板放在培养箱中预培养 (37 °C、5% CO<sub>2</sub>); 按实验分组处理细胞后向每孔加入 10 μL CCK-8 反应液; 将培养板在培养箱内孵育 2 h; 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

**1.4.6 EPCs 迁移能力检测** 按实验分组处理并收集细胞, 将含 10% 血清的培养基加入 Transwell 小室的下室, 将 2 × 10<sup>5</sup>/mL EPCs 悬浮在 100 μL 培养液中注入上室, 培养 24 h, 刮去滤膜上面未移动细胞, 用甲醛固定, Giemsa 染色, 随机选择 3 个显微镜视野计数。

**1.4.7 EPCs 血管形成试验** 将 Matrigel 基质胶加入 96 孔板, 按实验分组处理 EPCs 后收集细胞, 调整细胞浓度为 1.5 × 10<sup>5</sup>/mL, 接种于 Matrigel 胶上, 于 6 h 后用倒置显微镜观察胶原表面形成小管样结构的情况, 每孔随机取 3 个视野拍照。

**1.4.8 AMPK-shRNA 构建及验证** 根据 AMPK $\alpha$ 1 基因序列分别设计并合成 shRNA 寡聚单链 DNA (表 1) 以及阴性对照, 退火配对产生双链 DNA oligo, 再通过其两端所含酶切位点将其直接连入酶切后的 RNA 干扰慢病毒载体上, 将连接产物转入制备好的细菌感受态细胞, 对长出的单克隆菌落进行测序鉴定, 将 3 组 sh-RNA 和阴性对照分别感染 EPCs, 72 h 后提取各组细胞 RNA, Real-time PCR 检测结果显示, 与 negtive control 组相比, 序列 AMPK-shRNA1 感染效果最好, 故后续实验选用 AMPK-shRNA1 来感染 EPCs。

**1.4.9 Western blot 检测** 根据试验分组处理 EPCs 后, 收集细胞提取细胞总蛋白, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度, 配制分离胶、积层胶, 上样后进行电泳, 待样品走到下端后进行转膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 4 °C 封闭 1 h, 一抗 (p-AMPK、p-Akt、

表1 shRNA oligo 序列  
Tab. 1 shRNA oligo sequences

Oligo	Sequence (5'-3')
Primer-NC-T	GATCTGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTC
Primer-NC-B	AATTGAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAACGTGACACGTTCCGAGAACA
Primer-T1	GATCCGTTGTTGGATTTCCGTAGTATTCTCGAGAATACTACGGAAATCCAACAATTTTTT
Primer-B1	AATTAATAAATGTTGGATTCCGTAGTATTCTCGAGAATACTACGGAAATCCAACAACG
Primer-T2	GATCCGAATCCTCATAGACCTTATTACTCGAGTAATAAGGTCTATGAGGATTCTTTTTT
Primer-B2	AATTAATAAAGAATCCTCATAGACCTTATTACTCGAGTAATAAGGTCTATGAGGATTCCG
Primer-T3	GATCCGACCATAAATTTACCATAAAGCTCGAGCTTTATGGTAAATTTATGGTCTTTTTT
Primer-B3	AATTAATAAAGACCATAAATTTACCATAAAGCTCGAGCTTTATGGTAAATTTATGGTCCG

p-eNOS、 $\beta$ -actin, 1:1 000 稀释)分别4 °C孵育过夜。TBS-T洗膜 10 min 共3遍,然后与二抗室温孵育 1 h,常规洗膜,ECL显色系统X光片感光显影。采用ImageJ图像分析进行半定量分析。

**1.5 统计学处理** 使用SPSS 25.0软件进行分析,计量资料经正态性和方差齐性检验,若数据符合正态分布且方差齐,两独立样本均数比较采用 *t* 检验;若数据不符合参数检验条件,则采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠血脂及NO水平比较** 与对照组比较,As组小鼠的血清TC、LDL-C水平升高( $P < 0.05$ );与As组比较,SAL干预组小鼠血清TC水平下降( $P < 0.05$ ),LDL-C水平降低,但无显著统计学差异;血清TG水平在对照组、As组、SAL干预组小鼠之间差异无统计学意义。见图1A。As组小鼠血清NO水平低于对照组,但差异无统计学意义;SAL干预组小鼠血清NO水平较As组升高( $P < 0.05$ )。见图1B。

**2.2 各组小鼠主动脉粥样斑块病理学观察** 主动脉大体油红染色显示(图2A):As组小鼠主动脉管腔内斑块占比高于对照组(31.1% vs 8.2%, $P < 0.05$ ,图2B),大量脂质堆积于管壁,脂质斑块被染为红色;与As组相比,SAL组动脉斑块相对面积较小(22.7% vs 31.1%, $P < 0.05$ ,图2B)。对主动脉根部切片进行HE和Masson染色的组织学分析显示(图2C),As组相比对照组主动脉根部粥样斑块体积更大,脂核更大,SAL干预组主动脉根部斑块相比As组减少,脂核较小(19.5% vs 28.8%, $P < 0.05$ )。

**2.3 各组小鼠BM-EPCs活性比较** 体外BM-EPC血管生成能力的分析显示(图3A):与对照组相比,As组小鼠的EPCs形成的小管样结构数量下降;与

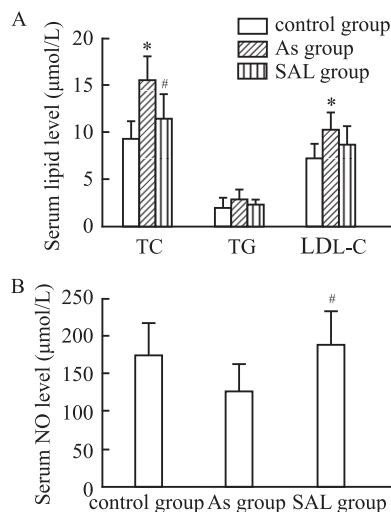


图1 各组小鼠血清TC、TG、LDL-C及NO水平比较

Fig. 1 Comparison of serum levels of TC, TG, LDL-C, and NO of mice in different groups

A: Comparison of serum lipid profiles across the groups; B: Comparison of serum NO levels across the groups; \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs As group.

As组相比,SAL干预组小鼠EPCs体外小管样结构数量提高( $P < 0.05$ );采用Transwell小室检测各组小鼠EPCs的迁移能力,显微镜下计数迁移的细胞(图3B),As组小鼠BM-EPCs迁移数量较对照组下降,SAL干预组BM-EPCs迁移数量较As组上升(均 $P < 0.05$ )。

**2.4 SAL体外干预对As小鼠模型BM-EPCs活性的影响** 分离培养As小鼠模型BM-EPCs,使用不同浓度SAL(0、5、10、20、40、80 μmol/L),采用3个时间点(24、48、72 h)分别进行干预。CCK-8检测结果显示(图4A):SAL孵育24 h后不同浓度各组间吸光度值差异无统计学意义;经20、40和80 μmol/L的SAL孵育48 h后,各组吸光度值较对照组增加( $P < 0.01$ );经10、20、40和80 μmol/L SAL孵育72 h后,各组吸光度值较对照组亦增加( $P < 0.05$ );使用不同

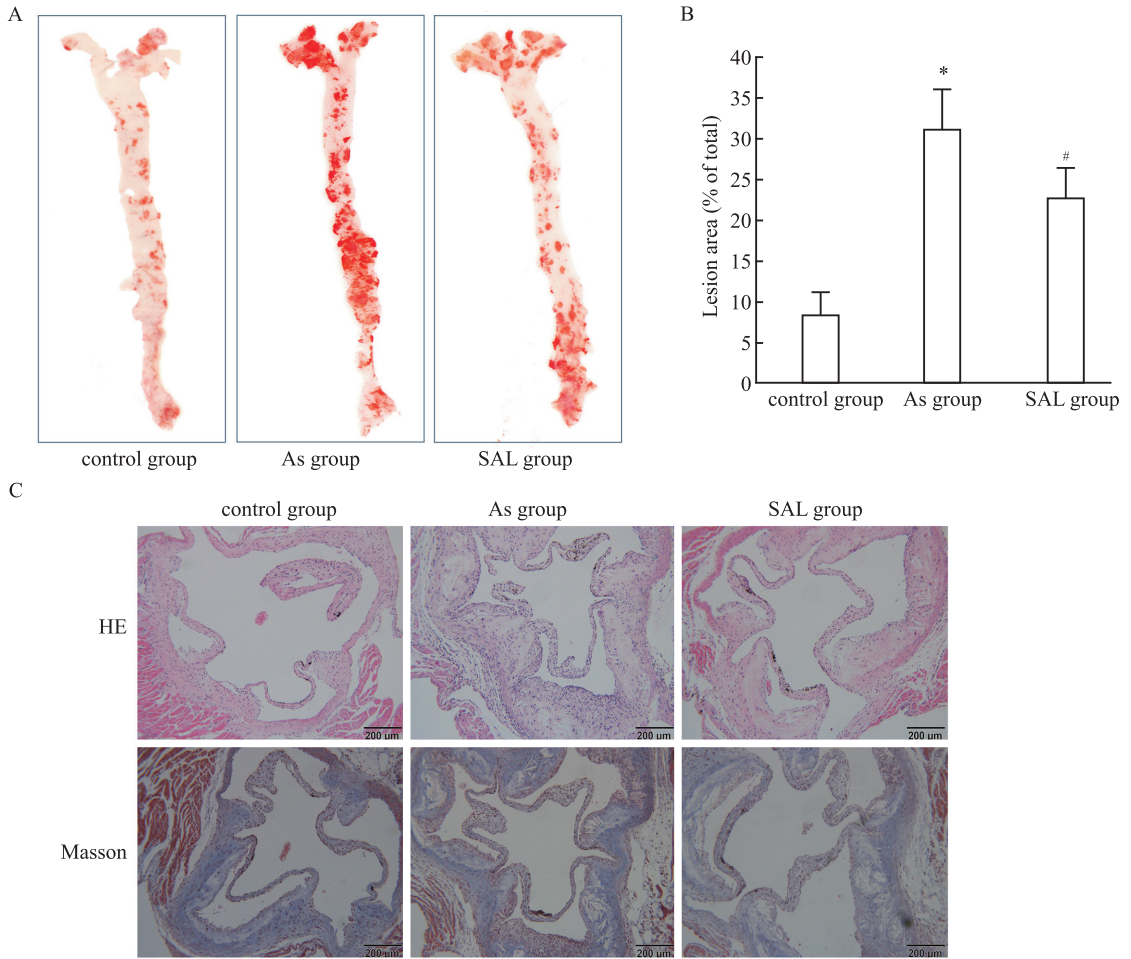


图2 SAL对As模型小鼠动脉斑块的影响

Fig. 2 The effects of SAL on arterial plaques in As model mice

A: Oil Red O staining of the aortic plaques in the control group, As group, and SAL group  $\times 10$ ; B: Quantitative analysis of the relative area of aortic plaques stained by Oil Red O in the respective groups; C: HE and Masson staining of atherosclerotic lesions in the aortic root across the different groups  $\times 100$ ; \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs As group.

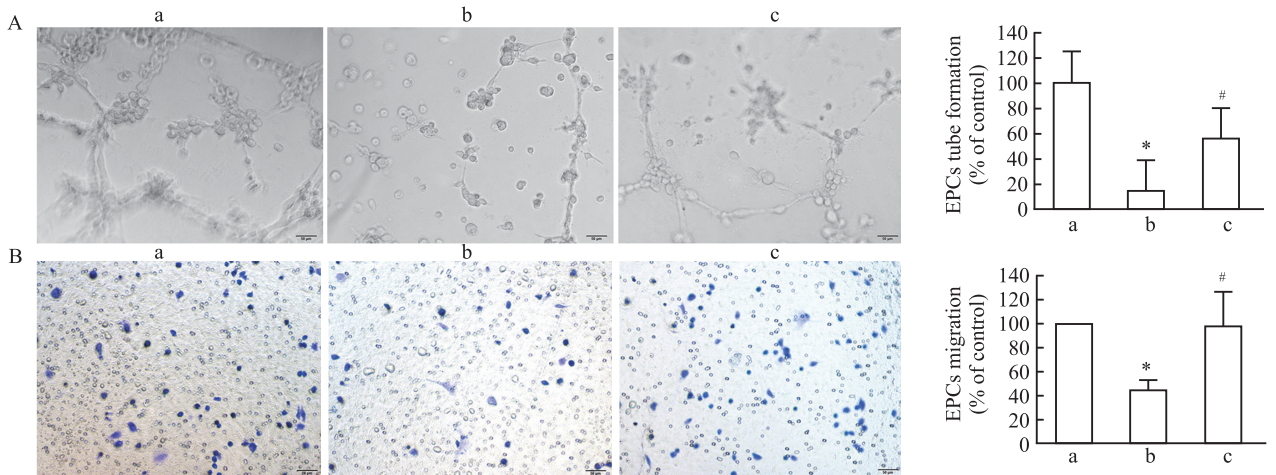


图3 各组小鼠BM-EPCs体外血管生成及迁移数量比较

Fig. 3 Comparison of *in vitro* angiogenesis and migration of BM-EPCs of mice in different groups

A: Comparison of tube-like structures formed by *in vitro* cultured EPCs from mice in each group, observed by Matrigel assay, along with the quantitative analysis  $\times 100$ ; B: Comparison of the number of migrating BM-EPCs from mice in each group  $\times 200$ ; a: control group; b: As group; c: SAL group; \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs As group.

浓度 SAL 干预 48 h, 结果显示, 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  SAL 处理组 EPCs 的迁移数量较 0  $\mu\text{mol/L}$  SAL 组增加 ( $P < 0.05$ )。见图 4B、4D。体外血管生成试验显示, 与

0  $\mu\text{mol/L}$  SAL 组相比, 干预 48 h 后 10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  SAL 处理组 EPCs 的小管样结构数量增加 ( $P < 0.05$ )。见图 4C、4E。

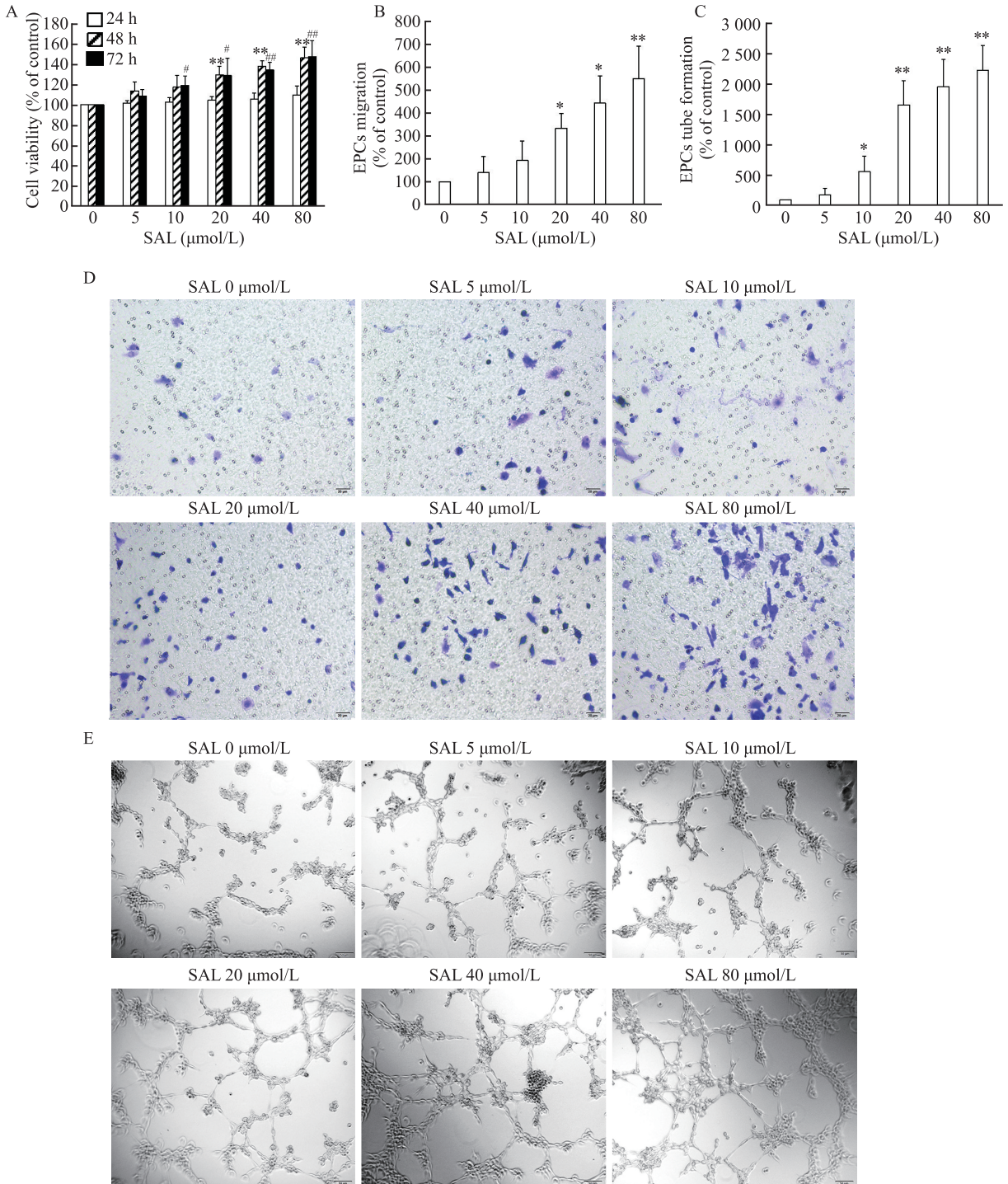


图 4 SAL 对 As 模型小鼠 BM-EPCs 生物活性的影响

Fig. 4 The effects of SAL on bioactivity of BM-EPCs derived from As model mice

A: Cell proliferation was assessed using the CCK-8 assay, at three time points after the treatment with different concentrations of SAL; B, C: Comparison of the number of migrating, the *in vitro* vasculogenic capacity of BM-EPCs, 48 hours after the treatment with different concentrations of SAL; D: Microscopic observation of the migration ability of BM-EPC from mice in each group  $\times 200$ ; E: Microscopic visualization of tube-like structures formed by EPCs with different intervention methods  $\times 100$ ; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  SAL group at 48 hours; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  SAL group at 72 hours.

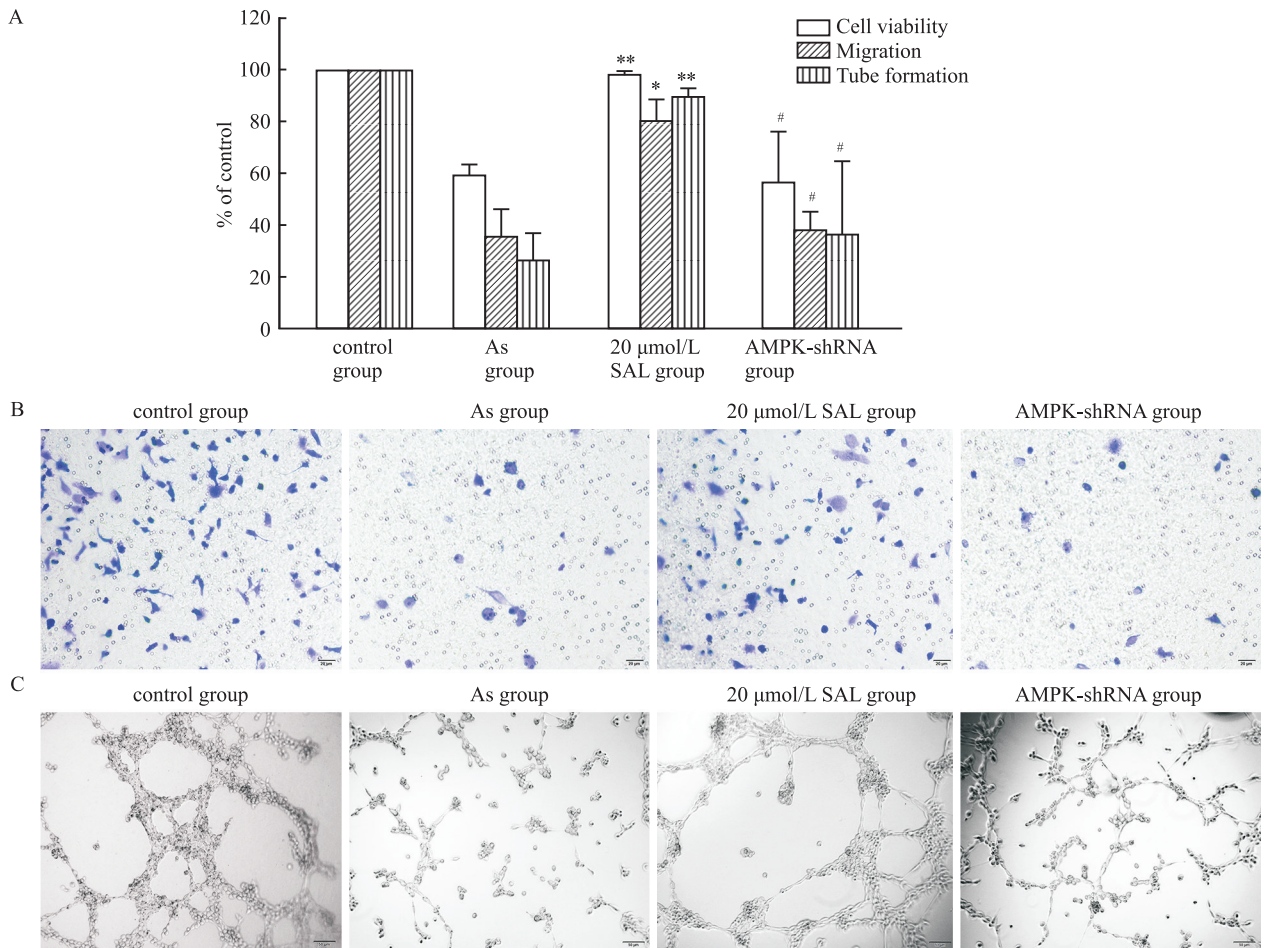


图5 AMPK-shRNA 感染后 SAL 对 As 模型来源 BM-EPCs 生物活性的影响

Fig. 5 The effects of SAL on the bioactivity of BM-EPCs derived from As model mice after the infection with AMPK shRNA

A: Comparisons of cell proliferation, migratory and *in vitro* vasculogenic capacity among groups; B: Representative microscopic images showing BM-EPC migration in each group  $\times 200$ ; C: Microscopic visualization of tube-like structures formed by EPCs with different intervention methods  $\times 100$ ; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs As group; # $P < 0.05$  vs 20  $\mu\text{mol/L}$  SAL group.

## 2.5 AMPK-shRNA 感染拮抗 SAL 调节 BM-EPCs

活性的作用 与 As 组相比, 20  $\mu\text{mol/L}$  SAL 干预 48 h 后 EPCs 经 CCK-8 检测的吸光度值增加, 镜下观察细胞迁移及小管样结构生成数量均增加 ( $P < 0.05$ ), 而 AMPK-shRNA 感染后 EPCs 的吸光度值、细胞迁移数量及小管样结构生成数量减少 ( $P < 0.05$ ), 说明 AMPK-sh-RNA 感染抑制了 20  $\mu\text{mol/L}$  SAL 改善 EPCs 增殖、迁移和血管生成能力。见图 5。

## 2.6 AMPK/Akt/eNOS 信号通路参与 SAL 诱导的 EPCs 功能调节

将小鼠 BM-EPCs 按照不同处理分为对照组、As 组、20  $\mu\text{mol/L}$  SAL 组、Compound C 组进行比较。相比对照组, As 组 EPCs 中 p-AMPK、p-Akt、p-eNOS 蛋白表达下降; 相比于 AS 组, 20  $\mu\text{mol/L}$  SAL 孵育 48 h AMPK、Akt 以及 eNOS 磷酸化增加 ( $P < 0.05$ ); 相比于 20  $\mu\text{mol/L}$  SAL 组, Compound C 预

处理 30 min 后 SAL 诱导的 EPCs 中 AMPK、Akt 及 eNOS 磷酸化下调 (图 6), 提示 SAL 通过 AMPK/Akt/eNOS 信号通路促进 EPCs 的生物活性。

## 3 讨论

EPCs 可以通过修复受损内皮、重建血管网络等途径改善内皮功能和心肌缺血。然而, 众多心血管危险因素如年龄、吸烟、高血压、糖尿病, 在造成内皮损伤、导致 As 的同时, 也影响了 EPCs 的功能, 降低 EPCs 的再生能力和治疗应用<sup>[7-8]</sup>。深入了解 EPCs 功能调节的机制、提高 EPCs 的生物学功能及靶向动员已成为防治动脉粥样硬化性心血管疾病 (atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD) 的重要策略。本研究通过高脂喂养 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠构建 As 模型, 证实了 As 模型中 BM-EPCs 的生物学活性下

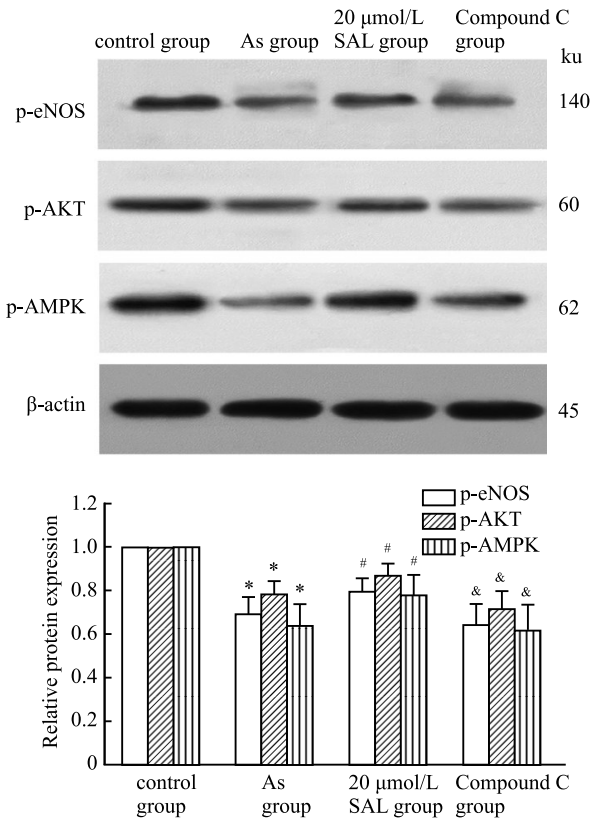


图6 SAL通过AMPK/Akt/eNOS信号通路对EPCs功能调节作用

Fig. 6 SAL regulated the function of EPCs via the AMPK/Akt/eNOS signaling pathway

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs As group; & $P < 0.05$  vs 20 μmol/L SAL group.

降, SAL灌胃及体外孵育均可促进As模型BM-EPCs增殖、迁移以及成血管能力, SAL可上调BM-EPCs中p-AMPK、p-Akt和p-eNOS表达, AMPK抑制剂逆转了SAL对EPC生物活性的保护效应, 使AMPK/Akt/eNOS磷酸化下调, 表明SAL通过AMPK/Akt/eNOS信号通路改善EPCs生物活性。

众多临床前研究<sup>[9]</sup>报道了自体BM-EPCs通过血管新生和改善心脏功能来修复缺血心脏, 同时减轻炎症、氧化应激、细胞凋亡等, 但基于骨髓干细胞治疗心血管疾病患者的临床试验并未达到预期的临床结果, 表明从患有多种合并症如糖尿病的病患获得的移植干细胞的功能可能受到损害<sup>[1]</sup>。As环境下的细胞衰老可能加速骨髓来源EPCs的消耗, 既往研究<sup>[1]</sup>确定了低循环EPCs计数或活性与ASCVD进展之间的关系, 将低EPCs水平作为不良心血管结局的相关生物标志物<sup>[10]</sup>。本研究建立As小鼠模型, 分离培养BM-EPCs, 亦发现其增殖、迁移、成血管能力的下降, 改善在ASCVD、高血压和糖尿病血管并发症等疾病中EPCs受损的生物功能, 提高其血管损伤

修复能力, 有助于预防、延迟和可能逆转As。

随着现代医学对EPCs认识的不断加深, 中医药的作用逐渐被关注, 天然药物由于副作用少、生物多样性广、多靶点干预的特点, 被认为是具有心血管保护生物活性的先导化合物的来源, 天然化合物在ASCVD和代谢性疾病的治疗中显示出巨大的前景<sup>[11]</sup>。SAL是红景天中发现的一种酚苷类物质, 在所有红景天种类中都可以发现, 可以商业化制备, SAL的作用包括增强免疫、减少炎症、防止缺氧、降低血糖水平和预防高原反应等<sup>[12]</sup>。目前已有研究<sup>[13]</sup>表明SAL可以抑制内质网应激和细胞凋亡减轻心脏缺血再灌注损伤。SAL还能通过多种信号通路和相关机制影响As, 多靶点、多途径地发挥抗As的作用<sup>[4, 12]</sup>。本研究表明SAL能减少As模型小鼠动脉斑块负荷, 增加血清NO水平, 改善As中的内皮损伤, 这与先前的动物研究结果相同, SAL改善了慢性间歇性缺氧ApoE<sup>-/-</sup>小鼠模型的内皮屏障损伤和As<sup>[14]</sup>。

SAL对EPCs尤其是功能受损的EPCs的调节及作用机制并不明确。该研究表明, SAL灌胃可改善As小鼠模型功能损伤的EPCs, 可显著促进其增殖、迁移以及成血管能力。在本研究中使用的条件下, 20、40、80 μmol/L SAL干预48 h显著促进了BM-EPCs的增殖、迁移和成血管能力。EPCs在血运重建部位的归巢和结合可能不仅取决于循环EPCs的数量, 还取决于细胞的运动性和成血管能力。既往研究<sup>[15]</sup>表明, 一些抗糖尿病药物可增加糖尿病患者外周血中EPCs的数量, 促进EPCs的增殖、迁移和血管生成能力, 上调NO水平, 降低IL-6水平, 从而改善2型糖尿病患者动脉血管的弹性。本试验证实SAL改善了As小鼠功能受损的EPCs生物活性的作用, 提示SAL在ASCVD治疗领域的应用前景。

AMPK已成为心血管疾病的治疗靶点之一<sup>[16]</sup>, AMPK作为细胞能量传感器调节心脏系统的生物能量学和能量代谢, AMPK激活通过其降压、抑制活性氧产生和提高NO生物利用度的能力来预防心脏代谢疾病。课题组先前研究也发现AMPK激活可抑制同型半胱氨酸诱导的EPCs可溶性NO合酶下调和NADPH氧化酶4衍生的活性氧蓄积, 改善EPCs的生物活性<sup>[5]</sup>。既往研究<sup>[17]</sup>提示AMPK和Akt激活在EPCs促血管生成活性中的重要性, AMPK/Akt通路参与了非诺贝特对EPCs功能的调节。此外, eNOS被认为是EPCs功能和动员的调节剂, AMPK和Akt

的磷酸化可显著上调 eNOS 活化<sup>[6]</sup>。本研究发现 SAL 对 EPCs 生物活性的保护作用可被 AMPK-shRNA 抑制, AMPK 抑制剂 compound C 使 AMPK/Akt/eNOS 信号通路下调, 表明 SAL 的促增殖、迁移和促血管生成作用与 AMPK 活化有关, SAL 通过 AMPK 介导的 Akt/eNOS 途径增加 eNOS 的活化, 改善 EPC 的生物活性, 进一步阐述了 SAL 对 EPCs 的保护效应。

本课题通过高脂饮食诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠建立 As 模型, 发现 SAL 干预除能延缓 As 进展, 改善内皮功能, 还能上调功能受损的 As 小鼠模型 EPCs, 增强其增殖、迁移以及血管生成能力, SAL 拮抗 EPCs 生物活性下降的能力是通过 AMPK/Akt/eNOS 介导的, SAL 对 EPCs 功能的调节是 SAL 在细胞水平上调节内皮功能、改善 As 的体现, 为天然药物及单体的治疗作用提供了理论基础, 也为 As 的防治提供新的见解。

### 参考文献

[1] Simoncini S, Toupance S, Labat C, et al. Functional impairment of endothelial colony forming cells (ECFC) in patients with severe atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 8969. doi:10.3390/ijms23168969.

[2] Zhu L, Jia F, Wei J, et al. Salidroside protects against homocysteine-induced injury in human umbilical vein endothelial cells *via* the regulation of endoplasmic reticulum stress [J]. *Cardiovasc Ther*, 2017, 35(1): 33-9. doi:10.1111/1755-5922.12234.

[3] 俞天虹, 朱琳, 赵蓉, 等. 腺苷酸蛋白激酶活化在红景天苷抑制同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞内质网应激中的作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(10): 2558-62. doi:10.13193/j.issn.1673-7717.2017.10.025.

[3] Yu TH, Zhu L, Zhao R, et al. Salidroside inhibits homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress through activation of AMP-activated protein kinase [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2017, 35(10): 2558-62. doi:10.13193/j.issn.1673-7717.2017.10.025.

[4] Fei S F, Tong D B, Jia F. Antiatherosclerotic effect and molecular mechanism of salidroside [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2023, 24(4): 97. doi:10.31083/j.rem2404097.

[5] Jia F, Wu C, Chen Z, et al. AMP-activated protein kinase inhibits homocysteine-induced dysfunction and apoptosis in endothelial progenitor cells [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011, 25(1): 21-9. doi:10.1007/s10557-010-6277-1.

[6] Hu Q, Qu W, Zhang T, et al. C1q/tumor necrosis factor-related protein-9 is a novel vasculoprotective cytokine that restores high glucose-suppressed endothelial progenitor cell functions by activating the endothelial nitric oxide synthase [J]. *J Am Heart*

*Assoc*, 2024, 13(4): e030054. doi:10.1161/JAHA.123.030054.

[7] Huang G, Cheng Z, Hildebrand A, et al. Diabetes impairs cardioprotective function of endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles *via* H3K<sub>9</sub>Ac inhibition [J]. *Theranostics*, 2022, 12(9): 4415-30. doi:10.7150/thno.70821.

[8] Li C, Lin L, Zhang L, et al. Long noncoding RNA p21 enhances autophagy to alleviate endothelial progenitor cells damage and promote endothelial repair in hypertension through SESN2/AMPK/TSC2 pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 173: 105920. doi:10.1016/j.phrs.2021.105920.

[9] Sellahewa S G, Li J Y, Xiao Q. Updated perspectives on direct vascular cellular reprogramming and their potential applications in tissue engineered vascular grafts [J]. *J Funct Biomater*, 2022, 14(1): 21. doi:10.3390/jfb14010021.

[10] Ye G, Chen X, Zhou Y, et al. Prognostic value of endothelial progenitor cells in acute myocardial infarction patients [J]. *Mediators Inflamm*, 2023, 2023: 4450772. doi:10.1155/2023/4450772.

[11] Cheng X, Zhao C, Jin Z, et al. Natural products: potential therapeutic agents for atherosclerosis [J]. *Chin J Nat Med*, 2022, 20(11): 830-45. doi:10.1016/S1875-5364(22)60219-X.

[12] Fei S F, Hou C, Jia F. Effects of salidroside on atherosclerosis: potential contribution of gut microbiota [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1400981. doi:10.3389/fphar.2024.1400981.

[13] 曹旭东, 张帆, 黄明月, 等. 红景天苷抑制内质网应激和细胞凋亡减轻心脏缺血再灌注损伤 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(5): 690-4. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.004.

[13] Cao X D, Zhang F, Huang M Y, et al. Salidroside ameliorates cardiac ischemia reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(5): 690-4. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.004.

[14] Li L, Yang Y, Zhang H, et al. Salidroside ameliorated intermittent hypoxia-aggravated endothelial barrier disruption and atherosclerosis *via* the cAMP/PKA/RhoA signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 723922. doi:10.3389/fphar.2021.723922.

[15] Xie D, Li Y, Xu M, et al. Effects of dulaglutide on endothelial progenitor cells and arterial elasticity in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1): 200. doi:10.1186/s12933-022-01634-1.

[16] Heidary Moghaddam R, Samimi Z, Asgary S, et al. Natural AMPK activators in cardiovascular disease prevention [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 738420. doi:10.3389/fphar.2021.738420.

[17] Huang W P, Yin W H, Chen J S, et al. Fenofibrate reverses dysfunction of EPCs caused by chronic heart failure [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2020, 13(2): 158-70. doi:10.1007/s12265-019-09889-y.

## Salidroside exerts cytoprotective effects on bone endothelial progenitor cells *via* the AMPK pathway in atherosclerotic mouse model

Jia Fang, Wang Mengfei, Fei Sifan, Xu Jiayi, Yu Tianhong, Zhu Lin, Zhou Min

(*Dept of Cardiology, The Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213003*)

**Abstract** **Objective** To investigate the effects of salidroside (SAL) on the impaired bioactivity of endothelial progenitor cells (EPCs) in atherosclerotic (As) mice and the potential mechanisms regarding AMP-activated protein kinase (AMPK). **Methods** Atherosclerosis was induced in 8-week-old male ApoE<sup>-/-</sup> mice with high-fat diet. Intra-gastric administration of SAL was given to one mice group to investigate the effects of SAL on aortic plaque burden, plasma NO level, the migration and angiogenic capabilities of bone marrow-derived EPCs (BM-EPCs). The proliferation, migration and vasculogenic properties of EPCs isolated from As mice were investigated *in vitro*. AMPK-sh-RNA or the AMPK inhibitor Compound C was used to investigate the role of AMPK/Akt/eNOS pathway in the regulatory effects of SAL. **Results** Compared with As group, NO level was significantly elevated in SAL group. The sizes of atherosclerotic plaques at the aortic root were reduced with smaller lipid cores in SAL group compared with As group. Moreover, the migration and angiogenesis capacity of EPCs markedly decreased in As mice, while SAL treatment reversed these impairments. Incubation with SAL at concentrations of 20, 40, and 80  $\mu\text{mol/L}$  for 48 hours significantly promoted the proliferation, migration, and angiogenesis of EPCs. AMPK-sh-RNA transfection abrogated the 20  $\mu\text{mol/L}$  SAL improvement in EPC biological activities. Western blot analysis further demonstrated that treatment with Compound C blocked the activation of AMPK/Akt/eNOS signaling pathway induced by SAL. **Conclusion** SAL upregulates the biological functions of EPCs through activating the AMPK/Akt/eNOS signaling pathway, thereby ameliorating EPC dysfunction during the pathological progression of atherosclerosis.

**Key words** salidroside; endothelial progenitor cells; AMP-activated protein kinase; atherosclerosis; eNOS; AMPK/Akt/eNOS pathway

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 81300220); Major Science and Technology Program of Changzhou Health Commission (No. ZD202212); Domestic and International Training Support Program for Health Talent of Changzhou (No. GN2023006); Chinese Cardiovascular Association-Natural Lipid-lowering Drugs Fund (No. 2023-CCA-NLD-431); Changzhou Key Medical Discipline Fund (No. CZXK202202)

**Corresponding author** Zhou Min, E-mail: vickychow1983@163.com