

## 基础研究

## 论著

## 山楂来源外泌体样纳米囊泡对TMAO诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的影响及其机制

肖子杰<sup>1</sup>, 陈史钰<sup>2</sup>, 黄于朗<sup>1</sup>, 阮焕钧<sup>2</sup>, 柯晓<sup>2</sup>, 王小庆<sup>2\*</sup><sup>1</sup>深圳市前海蛇口自贸区医院心内科, 广东深圳 518067; <sup>2</sup>中国医学科学院阜外医院深圳医院心内科, 广东深圳 518057

[中图分类号] R54 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1544.2026.0203

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 肖子杰, 陈史钰, 黄于朗, 等. 山楂来源外泌体样纳米囊泡对TMAO诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(5): 736-747.

[收稿日期] 2025-08-04 [录用日期] 2025-09-12 [上线日期] 2026-02-03

**[摘要]** **目的** 探讨山楂来源外泌体样纳米囊泡(HDELNs)对氧化三甲胺(TMAO)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的影响及其机制。**方法** HUVECs专用培养基培养原代HUVECs; 采用差速离心法和蔗糖密度梯度离心法从山楂中提取HDELNs, 采用透射电子显微镜观察、纳米颗粒跟踪分析技术、考马斯亮蓝染色和Western blotting对HDELNs进行鉴定。(1)设置对照组(正常培养的HUVECs)、TMAO浓度梯度组(150、300、600、900、1800、3600  $\mu\text{mol/L}$  TMAO处理HUVECs 24 h)、时间梯度组(900  $\mu\text{mol/L}$ 的TMAO处理HUVECs 4、8、12、24、48 h)、HDELNs浓度梯度组( $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  粒子数/ml的HDELNs处理HUVECs 24 h)。采用CCK-8法测定各组细胞存活率; Western blotting检测HUVECs中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的蛋白表达水平。(2)设置对照组、TMAO组(TMAO处理HUVECs 24 h)、HDELNs组(HDELNs处理HUVECs 24 h)、TMAO+HDELNs组(TMAO和HDELNs共同处理HUVECs 24 h)。采用CCK-8法测定各组细胞存活率; Western blotting检测HUVECs中ICAM-1、VCAM-1、MMP-9、IL-1 $\beta$ 、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )的蛋白表达水平; RT-qPCR检测HUVECs中PPAR- $\gamma$  mRNA的表达水平; 荧光素酶法检测细胞内的ATP含量; WST-8法检测细胞内超氧化物歧化酶(SOD)的活性; 荧光探针法检测细胞中的线粒体膜电位、活性氧(ROS)和超氧化物含量。(3)设置对照组、TMAO组、HDELNs组、TMAO+HDELNs组、TMAO+HDELNs+不同浓度PPAR- $\gamma$ 抑制剂T0070907组(TMAO、HDELNs和1、3、10、30  $\mu\text{mol/L}$  T0070907共同处理24 h)、TMAO+HDELNs+不同浓度PPAR- $\gamma$ 激动剂罗格列酮组(TMAO、HDELNs和20、30、50  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮共同处理24 h), 采用CCK-8法测定各组细胞存活率。(4)设置对照组、TMAO组、HDELNs组、TMAO+HDELNs组、TMAO+HDELNs+PPAR- $\gamma$ 激动剂/抑制剂组(TMAO、HDELNs和PPAR- $\gamma$ 激动剂/抑制剂共同处理24 h)。采用CCK-8法测定各组细胞存活率; Western blotting检测HUVECs中ICAM-1、VCAM-1、MMP-9、IL-1 $\beta$ 和eNOS的蛋白表达水平; 荧光素酶法检测各组细胞内的ATP含量; WST-8法检测细胞内SOD的活性; 荧光探针法检测细胞中的线粒体膜电位、ROS和超氧化物含量。**结果** 差速离心法和蔗糖密度梯度离心法可从山楂中提取到大小均一、具有双层膜结构的外泌体样纳米囊泡。考马斯亮蓝染色可视化HDELNs中的蛋白条带。CCK-8法检测结果显示, 900  $\mu\text{mol/L}$ 的TMAO处理24 h可使HUVECs的细胞活力明显下降( $P < 0.01$ ),  $1 \times 10^7$ 粒子数/ml的HDELNs能恢复HUVECs的细胞活力( $P < 0.01$ )。Western blotting检测结果显示, TMAO处理可使HUVECs中的ICAM-1、VCAM-1、MMP-9和IL-1 $\beta$ 蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ), eNOS蛋白表达水平明显下降( $P < 0.01$ ), HDELNs可逆转以上蛋白的异常表达( $P < 0.05$ )。荧光素酶法检测结果显示, TMAO可诱导HUVECs中的ATP含量下降( $P < 0.0001$ ), 而HDELNs可恢复细胞中的ATP含量( $P < 0.0001$ ); WST-8法检测结果显示, TMAO诱导可降低HUVECs中的SOD酶活性( $P < 0.01$ ), 而HDELNs可恢复细胞中的SOD酶活性( $P < 0.001$ )。荧光探针检测结果显示, TMAO可诱导HUVECs中的ROS和线粒体超氧

[基金项目] 广东省自然科学基金(2021A1515010178); 深圳市科技计划项目(JCYJ20230807150802005, JCYJ20230807150803007); 深圳市南山区卫生科技计划项目(NS2024060, NSZD2025027)

[作者简介] 肖子杰, 副主任医师, 主要从事冠心病的诊断和治疗方面的研究

[通信作者] 王小庆, E-mail: XQwangsysu@163.com

化物的含量增加, 线粒体膜电位降低( $P<0.01$ ), 而HDELNs可逆转以上结果( $P<0.001$ )。Western blotting和RT-qPCR检测结果显示, TMAO可引起HUVECs中PPAR- $\gamma$ 表达水平下降( $P<0.01$ ), 而HDELNs可恢复PPAR- $\gamma$ 的表达水平( $P<0.05$ )。CCK-8法、荧光素酶法、WST-8法、Western blotting和荧光探针检测结果显示, 30  $\mu\text{mol/L}$  PPAR- $\gamma$ 拮抗剂T0070907能拮抗HDELNs对HUVECs细胞损伤的修复作用( $P<0.05$ ), 50  $\mu\text{mol/L}$  PPAR- $\gamma$ 激动剂罗格列酮能促进HDELNs的修复能力( $P<0.05$ )。结论 HDELNs可明显减轻TMAO所致的HUVECs损伤, 其机制可能涉及PPAR- $\gamma$ 信号通路。

[关键词] 动脉粥样硬化; 植物源性外泌体; 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$

## Effect and mechanism of hawthorn-derived exosome-like nanovesicles on TMAO-induced human umbilical vein endothelial cell injury

Xiao Zi-Jie<sup>1</sup>, Chen Shi-Yu<sup>2</sup>, Huang Yu-Lang<sup>1</sup>, Ruan Huan-Jun<sup>2</sup>, Ke Xiao<sup>2</sup>, Wang Xiao-Qing<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiology, Shenzhen Qianhai Shekou Free Trade Zone Hospital, Shenzhen, Guangdong 518067, China

<sup>2</sup>Department of Cardiology, Fuwai Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen, Guangdong 518057, China

\*Corresponding author, E-mail: XQwangsysu@163.com

This work was supported by the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2021A1515010178), the Shenzhen Science and Technology Program (JCYJ20230807150802005, JCYJ20230807150803007), and the Health Science and Technology Program of Nanshan District, Shenzhen (NS2024060, NSZD2025027)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects and underlying mechanisms of hawthorn-derived exosome-like nanovesicles (HDELNs) on trimethylamine N-oxide (TMAO)-induced injury in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** Primary HUVECs were cultured in HUVECs-specialized medium; HDELNs were isolated from hawthorn using differential centrifugation and sucrose density gradient centrifugation, and characterized by transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA), Coomassie brilliant blue staining and Western blotting. (1) The following groups were established: control group (HUVECs cultured under normal conditions), TMAO concentration gradient subgroups (HUVECs treated with 150, 300, 600, 900, 1800, or 3600  $\mu\text{mol/L}$  TMAO for 24 h), TMAO time gradient subgroups (HUVECs treated with 900  $\mu\text{mol/L}$  TMAO for 4, 8, 12, 24, 48 h), and HDELNs concentration gradient subgroups (HUVECs treated with  $1\times 10^6$ ,  $1\times 10^7$ ,  $1\times 10^8$ ,  $1\times 10^9$ ,  $1\times 10^{10}$ ,  $1\times 10^{11}$  particles/ml HDELNs for 24 h). Cell viability of each group was assessed using the CCK-8 assay, and the protein expression levels of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in HUVECs were determined by Western blotting. (2) Four independent groups were set up: control group, TMAO group (HUVECs treated with TMAO for 24 h), HDELNs group (HUVECs treated with HDELNs for 24 h) and TMAO+HDELNs group (HUVECs co-treated with TMAO and HDELNs for 24 h). Cell viability of each group was measured by the CCK-8 assay. The protein expression levels of ICAM-1, VCAM-1, MMP-9, IL-1 $\beta$ , endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) in HUVECs were detected by Western blotting. The mRNA expression level of PPAR- $\gamma$  in HUVECs was quantified using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) content was determined by luciferase assay. Intracellular superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated using the WST-8 assay. Mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial superoxide contents were detected by fluorescent probe assays. (3) The following groups were designed: control group, TMAO group, HDELNs group, TMAO+HDELNs group, TMAO+HDELNs+PPAR- $\gamma$  inhibitor T0070907 subgroups (HUVECs co-treated with TMAO, HDELNs and 1, 3, 10, 30  $\mu\text{mol/L}$  T0070907 for 24 h) and TMAO+HDELNs+PPAR- $\gamma$  agonist rosiglitazone subgroups (HUVECs co-treated with TMAO, HDELNs and 20, 30, 50  $\mu\text{mol/L}$  rosiglitazone for 24 h). Cell viability was assessed by the CCK-8 assay. (4) Five independent groups were established: control group, TMAO group, HDELNs group, TMAO+HDELNs group, and TMAO+HDELNs+PPAR- $\gamma$  agonist/inhibitor groups (HUVECs co-treated with TMAO, HDELNs and the PPAR- $\gamma$  agonist or inhibitor for 24 h). Cell viability of each group was measured using the CCK-8 assay. The protein expression levels of ICAM-1, VCAM-1, MMP-9, IL-1 $\beta$  and eNOS in HUVECs were detected by Western blotting. Intracellular ATP content of each group was determined by the luciferase assay. Intracellular SOD activity was measured by the WST-8 assay. Mitochondrial membrane potential, ROS and mitochondrial superoxide content in cells were examined by fluorescent probe assays. **Results** HDELNs with uniform size and double-layer membrane structure were isolated from hawthorn by differential centrifugation and sucrose density gradient centrifugation. Protein bands in HDELNs were visualized by Coomassie brilliant blue staining. CCK-8 results demonstrated that treatment with 900  $\mu\text{mol/L}$  TMAO for 24 h significantly decreased HUVEC viability ( $P<0.01$ ), while  $1\times 10^7$  particles/ml HDELNs markedly restored cell viability ( $P<0.01$ ). Western blotting results showed that TMAO treatment significantly increased the protein levels of ICAM-1, VCAM-1, MMP-9 and IL-1 $\beta$  ( $P<0.05$ ), and decreased the expression level of eNOS ( $P<0.01$ ), whereas HDELNs reversed these abnormal protein expression ( $P<0.05$ ). Luciferase assay results indicated that TMAO significantly reduced



intracellular ATP content ( $P<0.0001$ ), while HDELNs restored the ATP content ( $P<0.0001$ ). WST-8 assay results revealed that TMAO treatment significantly decreased SOD activity ( $P<0.01$ ), while HDELNs restored SOD activity ( $P<0.001$ ). Fluorescence probe assays showed that TMAO increased the ROS and mitochondrial superoxide contents and decreased the mitochondrial membrane potential ( $P<0.01$ ), and these effects were reversed by HDELNs ( $P<0.001$ ). Western blotting and RT-qPCR results showed that TMAO significantly downregulated PPAR- $\gamma$  expression in HUVECs ( $P<0.01$ ), while HDELNs restored PPAR- $\gamma$  expression ( $P<0.05$ ). CCK-8, luciferase assay, WST-8 assay, Western blotting and fluorescence probe method results showed that 30  $\mu\text{mol/L}$  PPAR- $\gamma$  antagonist T0070907 antagonized the protective effect of HDELNs on TMAO-induced HUVECs' injury ( $P<0.05$ ), while 50  $\mu\text{mol/L}$  PPAR- $\gamma$  agonist rosiglitazone enhanced the protective efficacy of HDELNs ( $P<0.05$ ). **Conclusion** HDELNs can significantly alleviate TMAO-induced injury in HUVECs, and the underlying mechanism may be associated with the activation of the PPAR- $\gamma$  signaling pathway.

**[Key words]** atherosclerosis; plant-derived exosome-like nanovesicle; peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$

动脉粥样硬化(AS)是心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的关键因素。炎症信号转导引起动脉壁中内皮细胞和平滑肌细胞障碍,并进一步募集炎症细胞,内皮细胞的长期和过度炎症促使动脉壁中形成AS斑块,进而导致血管狭窄和继发性缺血,临床表现为心力衰竭、卒中和高血压等<sup>[1-2]</sup>。血浆氧化三甲胺(TMAO)被确定为促进AS性CVD的独立危险因素<sup>[3]</sup>。TMAO的产生离不开红肉、鸡蛋和鱼类里的膳食胆碱与肉碱。这些成分先在肠道菌群的作用下变成三甲胺,之后三甲胺在肝脏黄素单加氧酶FMO3的催化下完成氧化,最终形成TMAO<sup>[4]</sup>。研究发现,TMAO可通过影响胆固醇代谢和血管炎症促进AS发展<sup>[5-7]</sup>。然而,TMAO对血管内皮细胞的影响和确切分子机制仍有待进一步确定。

外泌体(exosome)是包含双层磷脂膜的小的细胞外囊泡,直径30~150 nm,可来源于各种类型的真核细胞,通过胞吐作用释放,包含大量蛋白质、脂质、DNA和非编码RNA等物质。越来越多的证据表明,植物来源的外泌体样纳米囊泡在结构和功能方面与哺乳动物来源的外泌体具有相似之处<sup>[8-9]</sup>。已有多项研究证实山楂提取物可通过抑制氧化应激损伤和细胞凋亡,以及改善肝脏胆固醇分解代谢发挥肝保护作用<sup>[10-11]</sup>;山楂植物中的类黄酮与血管舒张和抗心律失常作用以及改变血脂谱以降低血脂水平有关,且能够通过扩张血管来降低血压和改善冠状动脉血流<sup>[12-13]</sup>。由此可见,山楂在心血管疾病治疗领域的巨大潜力。本研究通过TMAO干预人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)建立内皮细胞损伤模型,差速离心法和蔗糖梯度离心法提取山楂来源外泌体样纳米囊泡(hawthorn-derived exosome-like nanovesicles, HDELNs),初步探索HDELNs对TMAO引起的HUVECs损伤的影响及其相关机制,以期对CVD的治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞来源与试剂 原代HUVECs(WN-10112)、

HUVECs专用培养基(WN-10112A)购自武汉华尔纳生物科技有限公司, TMAO(53330ES80)购自上海翌圣生物科技有限公司,青霉素-链霉素溶液(BL505A)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(BL521A)购自北京白鲨生物科技有限公司, CCK-8(C0038)、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(WST-8法, S0101S)、活性氧检测试剂盒(S0033S)、ATP检测试剂盒(S0026)、线粒体膜电位检测试剂盒(TMRE, C2001S)购自上海碧云天生物科技有限公司, ECL发光液(34080)、MitoSOX<sup>TM</sup>线粒体超氧化物指示剂(M36007)购自上海赛默飞生物科技有限公司, TBS缓冲液(G0001)、10% PAGE胶快速制备试剂盒(G2177)、RIPA裂解液(强, G2002)、山羊抗兔二抗(GB23303)、山羊抗鼠二抗(GB23301)、考马斯亮蓝超快染色液(G2059)购自武汉塞维尔生物科技有限公司, 细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)抗体(60299-1-Ig)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)抗体(10375-2-AP, 1:3000)、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ )抗体(16643-1-AP, 1:5000)、热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)抗体(10995-1-AP, 1:10 000)、肿瘤易感性基因101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)抗体(28283-1-AP, 1:10 000)购自武汉三鹰生物科技有限公司, 血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)抗体(100507-T38, 1:2000)、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1  $\beta$ , IL-1 $\beta$ )抗体(108698-MM05T, 1:2000)购自北京义翘神州科技股份有限公司, 内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)抗体(abs128837, 1:1000)购自爱必信(上海)生物科技有限公司。

**1.2 细胞培养及分组** 原代HUVECs在含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中进行培养。当细胞融合度>80%时按1:2~1:3的比例进行传代培养,随后将HUVECs按以下4种情况分组。(1)对照组、TMAO浓度梯度组(150、300、

600、900、1800、3600  $\mu\text{mol/L}$  处理 HUVECs 24 h)、时间梯度组(900  $\mu\text{mol/L}$  的 TMAO 处理 HUVECs 4、8、12、24、48 h)、HDELNs 浓度梯度组( $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  粒子数/ml 的 HDELNs 处理 HUVECs 24 h)。采用 CCK-8 法检测细胞存活率, Western blotting 检测 ICAM-1、VCAM-1、MMP-9、IL-1 $\beta$  蛋白的表达水平, 探究 TMAO 和 HDELNs 的最佳作用浓度和时间, 后续以最佳浓度及时间进行培养。(2)对照组、模型组(TMAO 组)、HDELNs 组、TMAO+HDELNs 组。采用 CCK-8 法测定各组细胞存活率, Western blotting 检测 HUVECs 中 ICAM-1、VCAM-1、MMP-9、IL-1 $\beta$ 、eNOS 和 PPAR- $\gamma$  的蛋白表达水平, qPCR 检测 HUVECs 中 PPAR- $\gamma$  的表达水平, 荧光素酶法检测各组细胞内的 ATP 含量, WST-8 法检测细胞内 SOD 的活性, 荧光探针法检测细胞中的线粒体膜电位、活性氧和超氧化物含量, 以探究 HDELNs 对 TMAO 诱导的 HUVECs 损伤的治疗作用。(3)对照组、模型组(TMAO 组)、HDELNs 组、TMAO+HDELNs 组、TMAO+HDELNs+不同浓度 PPAR- $\gamma$  拮抗剂 T0070907(1、3、10、30  $\mu\text{mol/L}$ )组、TMAO+HDELNs+不同浓度 PPAR- $\gamma$  激动剂罗格列酮(20、30、50  $\mu\text{mol/L}$ )组。采用 CCK-8 法测定各组细胞存活率, 以探究 T0070907 和罗格列酮作用的最佳浓度。(4)对照组、模型组(TMAO 组)、HDELNs 组、TMAO+HDELNs 组、TMAO+HDELNs+T0070907 组、TMAO+HDELNs+PPAR- $\gamma$  激动剂罗格列酮组。采用 CCK-8 法测定各组细胞存活率, Western blotting 检测 HUVECs 中 ICAM-1、VCAM-1、MMP-9、IL-1 $\beta$  和 eNOS 的蛋白表达水平, 荧光素酶法检测各组细胞内的 ATP 含量, WST-8 法检测细胞内 SOD 的活性, 荧光探针法检测细胞中的线粒体膜电位、活性氧和超氧化物含量, 以探究 HDELNs 治疗作用涉及的机制。

**1.3 CCK-8法检测细胞存活率** 将 HUVECs 按  $8 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板中, 采用 CCK-8 法检测各组的细胞存活率: 每孔加入 10  $\mu\text{l}$  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各组 450 nm 波长处的吸光度(OD)值。

**1.4 Western blotting 检测 ICAM-1、VCAM-1、MMP-9、IL-1 $\beta$ 、PPAR- $\gamma$ 、eNOS、HSP70、TSG101 的蛋白表达水平** 10 cm 细胞培养皿中加入 500  $\mu\text{l}$  裂解液, HDELNs 溶液与裂解液 1:1 混合均匀, 于冰上裂解 30 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  离心收集各组上清液, BCA 试剂盒检测各样品的蛋白质浓度, 加入 5 $\times$  上样缓冲液充分混匀后, 100  $^{\circ}\text{C}$  金属浴变性 10 min, 随后置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。SDS-PAGE 电泳每泳道上样量为 10~15  $\mu\text{g}$ 。电泳结束后转至 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭

1 h, 加入相应的 ICAM-1(1:10 000)、VCAM-1(1:2000)、MMP-9(1:3000)、IL-1 $\beta$ 、PPAR- $\gamma$ (1:5000)、eNOS(1:1000)、HSP70(1:10 000)、TSG101(1:10 000)抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 内参对照使用 GAPDH(1:10 000 稀释), 山羊抗兔二抗或山羊抗鼠二抗(1:10 000)室温孵育 1 h 后显影成像。

**1.5 差速离心法和蔗糖密度梯度离心法提取外泌体** 250 g 新鲜山楂去除果柄和果核, 超纯水浸泡多次去除杂质, 剪刀剪碎, 加预冷 PBS, 用破壁机破壁。滤网过滤去除残渣, 分装滤液至 50 ml 离心管, 4  $^{\circ}\text{C}$  下 300 $\times g$  离心 10 min, 取上清; 4  $^{\circ}\text{C}$  下 2000 $\times g$  离心 20 min, 取上清; 上清转移至超速离心管, 4  $^{\circ}\text{C}$  下 10 000 $\times g$  离心 30 min, 取上清, 用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器过滤, 4  $^{\circ}\text{C}$  下 135 000 $\times g$  离心 70 min, 除去上清, 加入 20 ml PBS 重悬沉淀。用 20 mmol/L Tris-HCl 分别配制 8%、20%、30%、50% 的蔗糖。4  $^{\circ}\text{C}$  150 000 $\times g$  离心 120 min, 抽取各分层区的液体, 加适量 PBS 稀释后, 4  $^{\circ}\text{C}$  下 135 000 $\times g$  离心 70 min, 弃上清, 沉淀加 1 ml PBS 重悬, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。透射电子显微镜观察 HDELNs 表面形貌, 纳米颗粒跟踪分析技术检测 HDELNs 的粒径并定量。

**1.6 考马斯亮蓝染色** 将 1.5 中得到的外泌体裂解液于 SDS-PAGE 凝胶中电泳分离后, 凝胶于纯水中清洗 20 s $\times$ 3 次, 再将凝胶浸没于考马斯亮蓝染色液中震荡染色 1~2 h, 随后纯水脱色 30 min, 白光灯下观察并拍摄图像。

**1.7 ATP 含量测定** 于 6 孔板中加入  $2 \times 10^5$  个 HUVECs/孔, 按相应分组加入药物处理后加 200  $\mu\text{l}$  裂解液, 充分裂解后 4  $^{\circ}\text{C}$  12 000 $\times g$  离心 5 min, 取上清。加 100  $\mu\text{l}$  ATP 检测工作液到检测孔内, 室温放置 3~5 min, 加 20  $\mu\text{l}$  样品或标准品, 迅速混匀, 至少间隔 2 s 后, 用化学发光仪测定 OD 值。

**1.8 SOD 酶活性测定** 6 孔板中加入  $2 \times 10^5$  个 HUVECs/孔, 按相应分组加入药物处理后加 200  $\mu\text{l}$  SOD 样品制备液, 充分裂解后 4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 $\times g$  离心 5 min, 取上清。BCA 法测定蛋白浓度。每孔加 20  $\mu\text{l}$  样品或对照、160  $\mu\text{l}$  酶工作液、20  $\mu\text{l}$  反应启动工作液, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后, 测定 450 nm 处的 OD 值。各组 SOD 酶活性 (%) =  $(\text{OD}_{\text{空白对照1}} - \text{OD}_{\text{样品}}) / (\text{OD}_{\text{空白对照1}} - \text{OD}_{\text{空白对照2}}) \times 100\%$ 。

**1.9 活性氧、线粒体膜电位、线粒体超氧化物含量检测** 共聚焦皿每皿铺  $2.5 \times 10^5$  个 HUVECs, 待细胞充分贴壁后加入相应药物处理 24 h 后, 去除培养基, 加入 DCFH-DA 或 TMRE 或 MSR 染色工作液, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 4% PFA 室温固定 20 min, PBS 洗 3 次, 滴加含 DAPI 的封片剂, 共聚焦显微镜观察并拍摄图像。



**1.10 RT-qPCR 检测 mRNA 水平** 于6孔板中加入  $1 \times 10^5$  个 HUVECs/孔。按相应分组加入药物处理后, 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 作为内参对照, mRNA 表达量以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  公式计算。引物序列见附表1。

**1.11 统计学处理** 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据可视化与统计分析。本研究均为计量资料, 且符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。采用双侧检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 确定 TMAO 和 HDELNs 处理 HUVECs 细胞的最佳浓度和最佳时间** CCK-8 法检测结果显示, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  TMAO 组比较, 150、300 和 600  $\mu\text{mol/L}$  TMAO 处理组细胞存活率无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 900、1800 和 3600  $\mu\text{mol/L}$  TMAO 处理组 HUVECs 细胞存活率下降 ( $P < 0.01$ ), 且 900、1800 和 3600  $\mu\text{mol/L}$  TMAO 3 个组间差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 1A); 此外, 与 0  $\mu\text{mol/L}$  TMAO 组比较, 900  $\mu\text{mol/L}$  TMAO 组处理 HUVECs 中 ICAM-1、VCAM-1、MMP-9、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 150、300 和 600  $\mu\text{mol/L}$  TMAO 处理组相关蛋白表达水平有升高的趋势, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 1B)。根据以上结果选取 900  $\mu\text{mol/L}$  的 TMAO 处理进行后续实验。CCK-8 法检测显示, 与处理 0 h 组比较, HUVECs 处理 4~48 h 组的细胞存活率均明显降低 ( $P < 0.01$ ), 而 4~48 h 组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 1C); Western blotting 检测显示, 与处理 0 h 组比较, 900  $\mu\text{mol/L}$  的 TMAO 处理 24 h 组时 HUVECs 中 ICAM-1、VCAM-1、MMP-9 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平均升高 ( $P < 0.05$ ) (图 1D), 因此选择用 900  $\mu\text{mol/L}$  TMAO 处理 HUVECs 24 h 进行后续实验。

采用差速离心法和蔗糖密度梯度离心法分离和提纯得到 HDELNs, 透射电子显微镜下可见 HDELNs 呈现典型的茶托形双层囊泡状 (图 1E); 纳米颗粒跟踪分析技术检测结果显示 HDELNs 颗粒大小较为均一, 集中在 50~200 nm 区间, 250 g 山楂可提取  $10^{12}$  粒子数/ml 颗粒 HDELNs (图 1F); 通过考马斯亮蓝染色, 可视化 HDELNs 中蛋白质的组成及分子量分布 (图 1G); Western blotting 可检测出 HDELNs 中的 TSG101 和 HSP70 条带 (图 1H)。可见, HDELNs 是大小均一、具有双层膜结构、富含蛋白质的外泌体样纳米囊泡。使用不同浓度的 HDELNs ( $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、

$1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  粒子数/ml) 处理 HUVECs, CCK-8 法检测结果显示, 与 0 粒子数/ml 组比较, 随着 HDELNs 浓度的升高, HUVECs 的细胞活力呈先上升后下降的趋势, 其中  $1 \times 10^7$  粒子数/ml HDELNs 对 HUVECs 细胞活力的增强作用最明显 ( $P < 0.01$ , 图 1I), 后续选取  $1 \times 10^7$  粒子数/ml 的 HDELNs 进行实验。Western blotting 检测结果显示, 与 0 粒子数/ml 组比较,  $1 \times 10^7$  粒子数/ml HDELNs 组 HUVECs 中 ICAM-1、MMP-9、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平有所降低 ( $P < 0.05$ , 图 1J)。

**2.2 HDELNs 对 TMAO 处理的 HUVECs 细胞活力、活性氧和线粒体超氧化物含量的影响** 与对照组比较, TMAO 组 HUVECs 的细胞存活率、ATP 含量及 SOD 酶活性降低 ( $P < 0.0001$  或  $P < 0.01$ ), 而 HDELNs 组上述指标差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 TMAO 组比较, TMAO+HDELNs 组 HUVECs 细胞存活率增高 ( $P < 0.0001$ ), ATP 含量增加 ( $P < 0.0001$ ), SOD 酶活性降低 ( $P < 0.001$ , 图 2A)。荧光探针检测结果显示, 与对照组比较, TMAO 组 HUVECs 细胞内活性氧及线粒体超氧化物含量增加 ( $P < 0.001$  或  $P < 0.0001$ ), HDELNs 组上述指标差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而与 TMAO 组比较, TMAO+HDELNs 组中活性氧和线粒体超氧化物含量减少 ( $P < 0.001$ , 图 2B、C)。

**2.3 HDELNs 对 TMAO 处理的 HUVECs 线粒体膜电位和蛋白表达的影响** 荧光探针检测结果显示, 与对照组比较, TMAO 组 HUVECs 细胞中线粒体膜电位丢失 ( $P < 0.01$ ), HDELNs 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而与 TMAO 组比较, TMAO+HDELNs 组线粒体膜电位恢复 ( $P < 0.001$ ) (图 3A)。Western blotting 检测结果显示, 与对照组相比, TMAO 组 HUVECs 中 ICAM-1、VCAM-1、MMP-9 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), eNOS 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01$ ), HDELNs 组上述蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而与 TMAO 组比较, TMAO+HDELNs 组 HUVECs 中 ICAM-1、VCAM-1、MMP-9 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), eNOS 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ ) (图 3B)。

**2.4 PPAR- $\gamma$  拮抗剂 T0070907 和激动剂罗格列酮的最佳浓度的确定** RT-qPCR 和 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, TMAO 组 HUVECs 中 PPAR- $\gamma$  mRNA 及蛋白表达水平下降 ( $P < 0.01$ ), HDELNs 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 TMAO 组比较, 而 TMAO+HDELNs 组 HUVECs 中 PPAR- $\gamma$  mRNA 及蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ) (图 4A、B)。CCK-8 法检测结果显示, 与对照组比较, TMAO 组 HUVECs 细胞存活率降低 ( $P < 0.01$ ), HDELNs 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 TMAO 组比较, TMAO+HDELNs 组

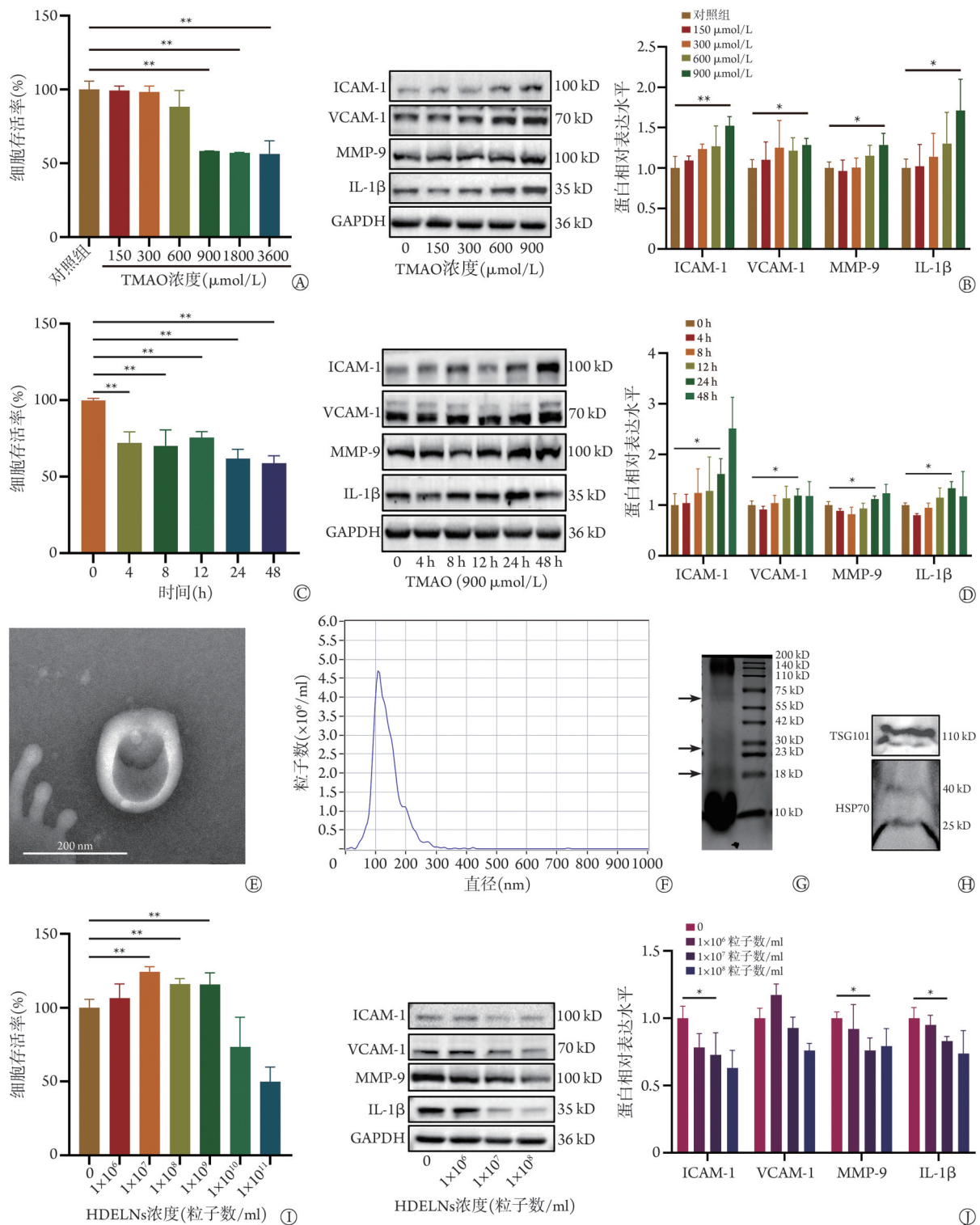


图1 TMAO和HDELNs处理HUVECs细胞的最佳浓度和时间

Fig.1 Optimal concentration and time of TMAO and HDELNs treatment of HUVECs

A. CCK-8法检测不同浓度TMAO处理组的HUVECs细胞存活率；B. Western blotting检测不同浓度TMAO组HUVECs中ICAM-1、VCAM-1、MMP-9、IL-1β蛋白表达水平；C. CCK-8法检测900 μmol/L TMAO处理不同时间组的HUVECs细胞存活率；D. Western blotting检测900 μmol/L TMAO处理不同时间组HUVECs中ICAM-1、VCAM-1、MMP-9、IL-1β蛋白表达水平；E. HDELNs的电镜照片；F. HDELNs的粒径和浓度；G. 考马斯亮蓝染色的HDELNs的蛋白带谱；H. Western blotting检测HDELNs中的外泌体标志性蛋白TSG101和HSP70；I. CCK-8法检测不同浓度HDELNs组的HUVECs细胞存活率；J. Western blotting检测不同浓度HDELNs组HUVECs中ICAM-1、VCAM-1、MMP-9、IL-1β蛋白表达水平。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。TMAO. 氧化三甲胺；HDELNs. 山楂来源外泌体样纳米囊泡；HUVECs. 人脐静脉内皮细胞；ICAM-1. 细胞间黏附分子-1；VCAM-1. 血管细胞黏附分子-1；MMP-9. 基质金属蛋白酶9；IL-1β. 白细胞介素-1β；TSG101. 肿瘤易感性基因101；HSP70. 热休克蛋白70

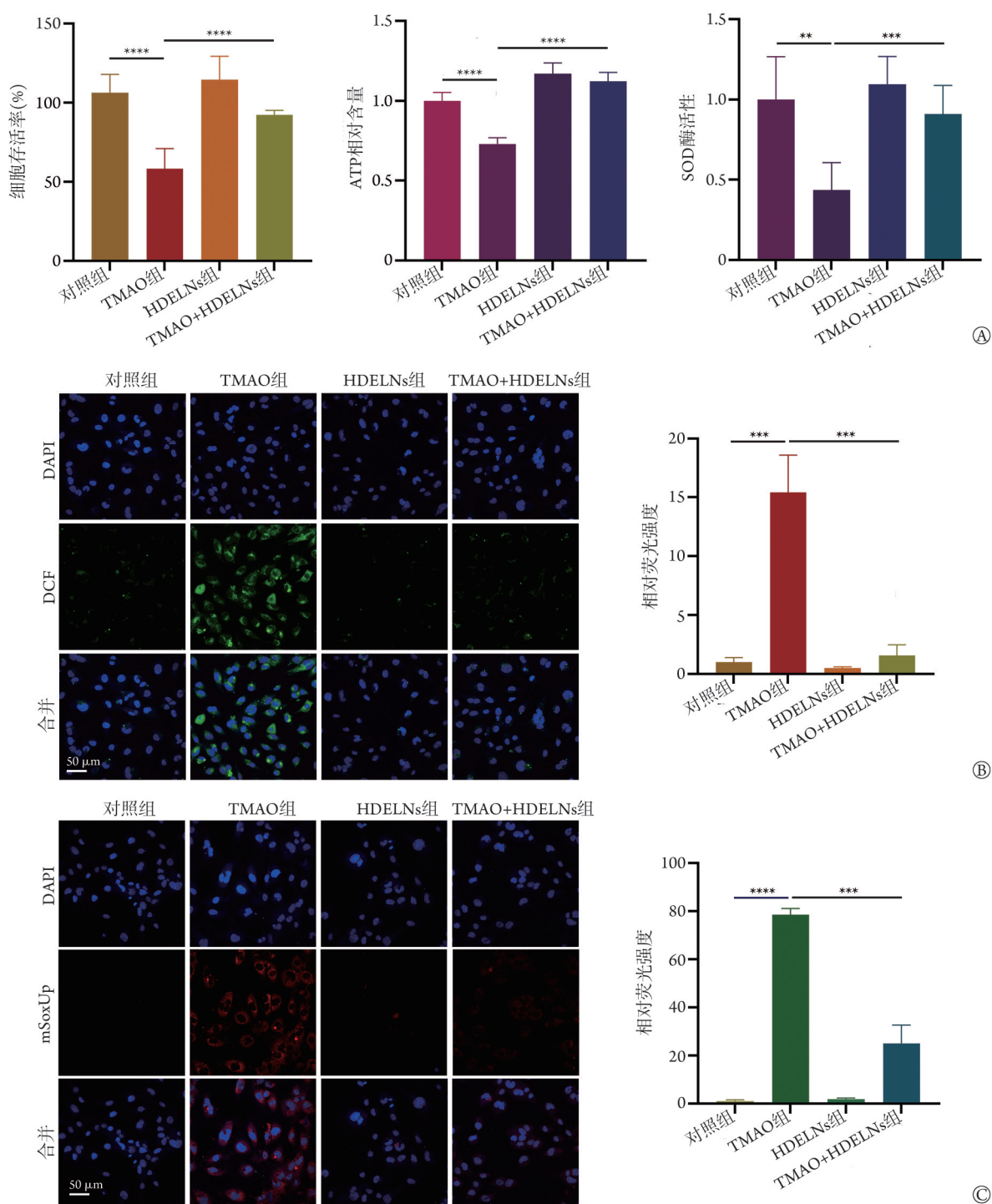


图2 HDELNs对TMAO处理的HUVECs细胞活力、活性氧和线粒体超氧化物含量的影响

Fig.2 Effects of HDELNs on cell viability, reactive oxygen species and mitochondrial superoxide in TMAO-treated HUVECs

A. 各组HUVECs的细胞存活率、ATP含量及SOD酶活性比较；B. DCFH-DA荧光探针检测各组HUVECs中活性氧的含量；C. mSoxUp荧光探针检测各组HUVECs中线粒体超氧化物的含量。 $^{**}P<0.01$ ,  $^{***}P<0.001$ ,  $^{****}P<0.0001$ 。SOD. 超氧化物歧化酶；TMAO. 氧化三甲胺；HDELNs. 山楂来源外泌体样纳米囊泡；HUVECs. 人脐静脉内皮细胞；DCF. 2',7'-二氯荧光素

的细胞存活率增高( $P<0.05$ )；而与TMAO+HDELNs组比较，TMAO+HDELNs+T0070907各浓度组细胞存活率降低，且细胞存活率与T0070907浓度呈反比( $P<0.001$ )(图4C)，后续选择细胞活力降低最明显的30  $\mu\text{mol/L}$  T0070907进行实验。相反，与TMAO+

HDELNs组比较，TMAO+HDELNs+50  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮组细胞存活率增高( $P<0.05$ )，而20和30  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮组差异无统计学意义( $P>0.05$ )(图4C)，后续选择50  $\mu\text{mol/L}$ 的罗格列酮进行实验。

## 2.5 PPAR- $\gamma$ 激动剂和抑制剂对HUVECs中ATP含



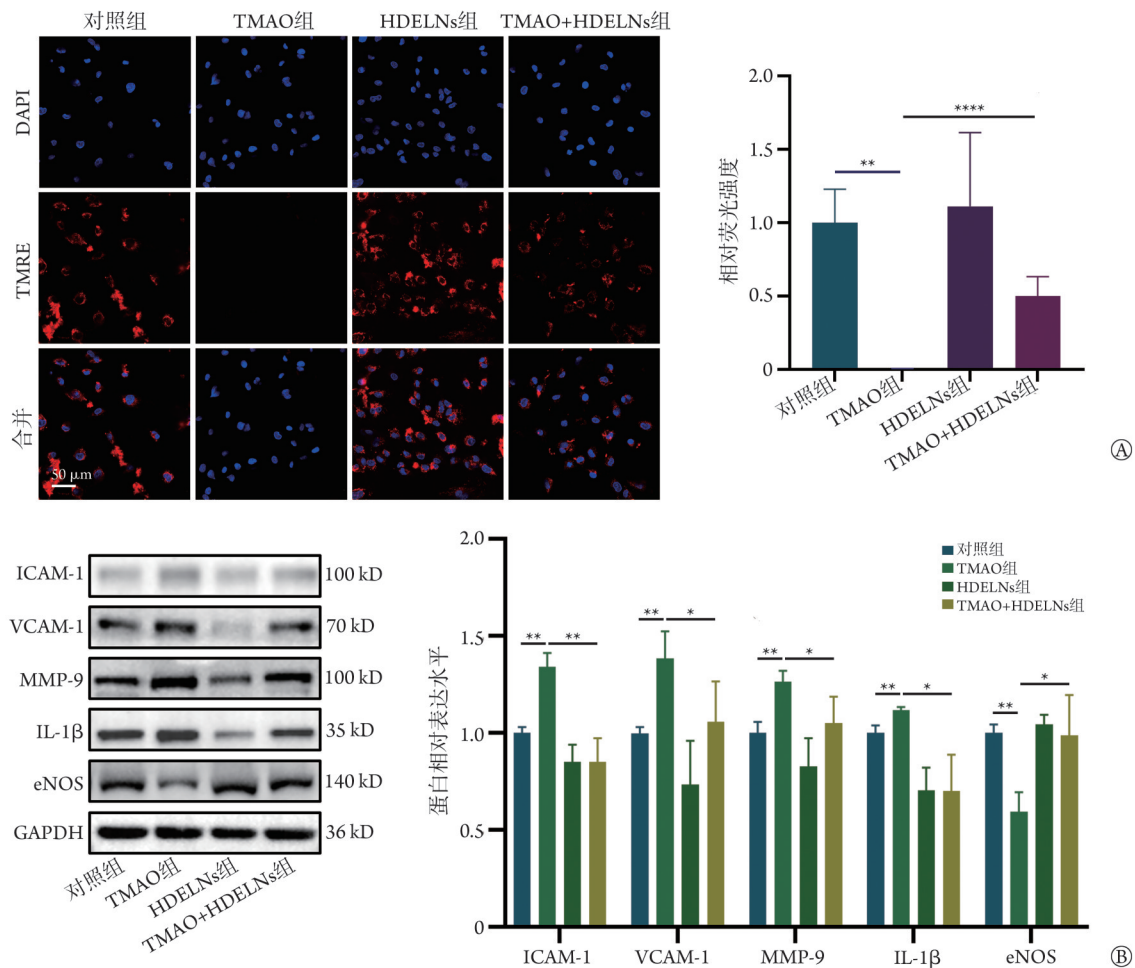


图3 HDELNs对TMAO处理的HUVECs线粒体膜电位和蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of HDELNs on mitochondrial membrane potential and protein expression in TMAO-treated HUVECs

A. TMRE荧光探针检测各组HUVECs的线粒体膜电位；B. Western blotting检测各组HUVECs的ICAM-1、VCAM-1、MMP-9和IL-1β蛋白表达水平。 $P<0.05$ ， $**P<0.01$ ， $***P<0.0001$ 。TMAO. 氧化三甲胺；HDELNs. 山楂来源外泌体样纳米囊泡；HUVECs. 人脐静脉内皮细胞；ICAM-1. 细胞间黏附分子-1；VCAM-1. 血管细胞黏附分子-1；MMP-9. 基质金属蛋白酶9；IL-1β. 白细胞介素-1β；TMRE. 四甲基罗丹明乙酯

量、SOD酶活性和蛋白表达的影响。与对照组比较，TMAO组ATP含量和SOD酶活性明显下降( $P<0.0001$ )，HDELNs组差异无统计学意义( $P>0.05$ )；与TMAO组比较，TMAO+HDELNs组HUVECs中ATP含量和SOD酶活性上升；与TMAO+HDELNs组比较，TMAO+HDELNs+T0070907组ATP含量和SOD酶活性下降，而TMAO+HDELNs+罗格列酮组ATP含量和SOD酶活性上升( $P<0.05$ ) (图5A)。Western blotting检测结果显示，与对照组比较，TMAO组ICAM-1、VCAM-1、MMP-9和IL-1β蛋白表达水平升高，eNOS蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )，而HDELNs组差异无统计学意义( $P>0.05$ )；与TMAO组比较，TMAO+HDELNs组ICAM-1、VCAM-1、MMP-9和IL-1β蛋白表达水平降低，eNOS蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )；与TMAO+HDELNs组比较，TMAO+HDELNs+T0070907组ICAM-1、VCAM-1、MMP-9和

IL-1β蛋白表达水平升高，eNOS蛋白表达水平降低( $P<0.05$ )，而TMAO+HDELNs+罗格列酮组ICAM-1、VCAM-1、MMP-9和IL-1β蛋白表达水平降低，eNOS蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ) (图5B)。

**2.6 PPAR-γ激动剂和抑制剂对HUVECs中活性氧、线粒体超氧化物含量和线粒体膜电位的影响** 与对照组比较，TMAO组的活性氧和线粒体超氧化物含量上升，线粒体膜电位丢失( $P<0.01$ )，HDELNs组差异无统计学意义( $P>0.05$ )；与TMAO组比较，TMAO+HDELNs组活性氧和线粒体超氧化物含量下降，线粒体膜电位恢复( $P<0.05$ )；与TMAO+HDELNs组比较，TMAO+HDELNs+T0070907组活性氧和线粒体超氧化物含量上升，线粒体膜电位降低，而TMAO+HDELNs+罗格列酮组活性氧和线粒体超氧化物含量降低，线粒体膜电位恢复(图6A-C)。



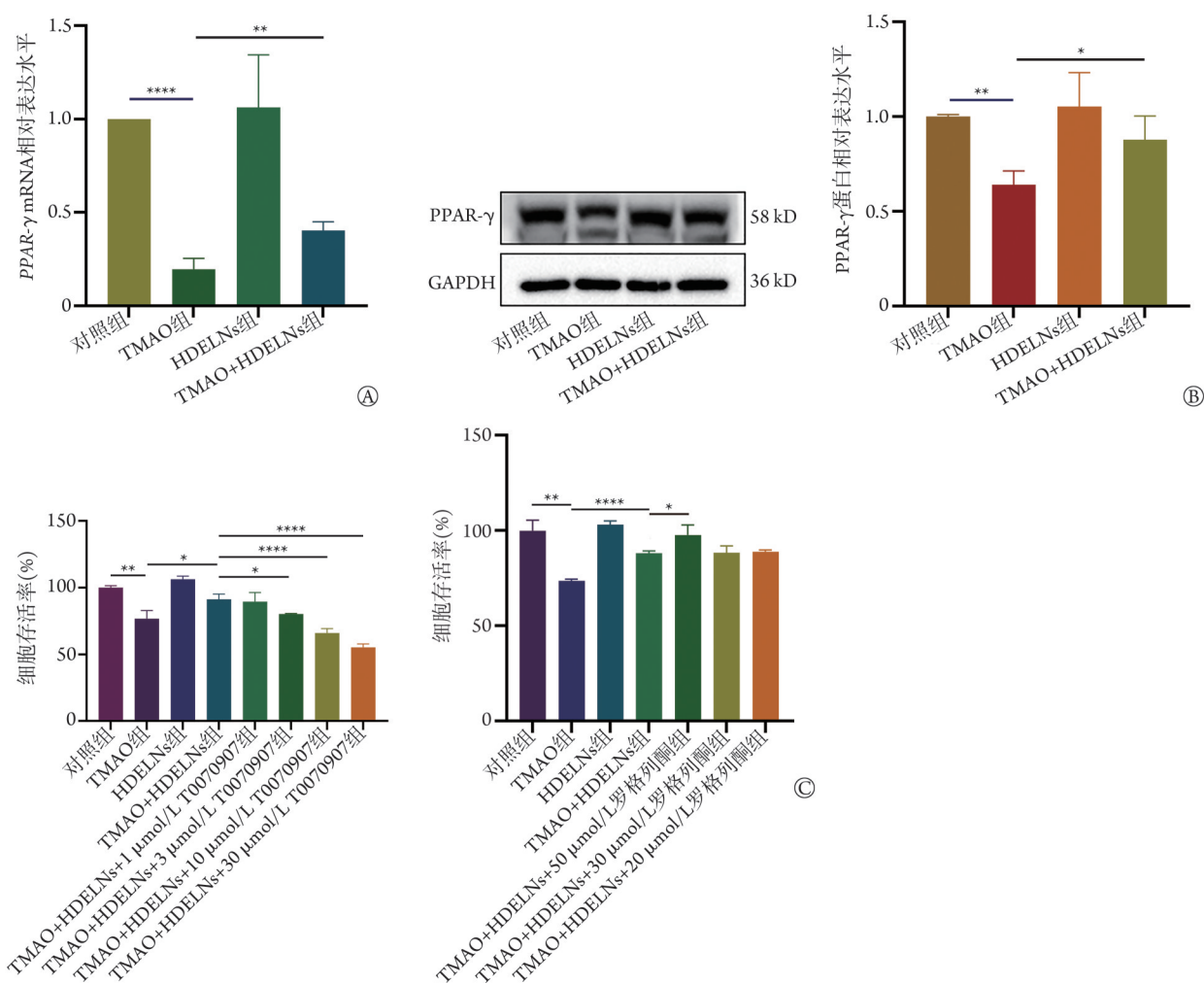


图4 T0070907和罗格列酮对TMAO诱导的HUVECs细胞损伤作用的最佳浓度

Fig.4 Optimal concentrations of T0070907 and rosiglitazone for attenuating TMAO-induced injury in HUVECs

A. qPCR检测各组HUVECs中PPAR-γ mRNA水平; B. Western blotting检测各组HUVECs中PPAR-γ蛋白表达水平; C. CCK-8法检测各不同分组HUVECs的细胞存活率。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。TMAO.氧化三甲胺; HDELNs.山楂来源外泌体样纳米囊泡; HUVECs.人脐静脉内皮细胞; PPAR-γ.过氧化物酶体增殖物激活受体γ; T0070907.一种PPAR-γ拮抗剂

### 3 讨论

有研究发现,生理水平的TMAO可在体内和体外激活细胞炎症通路导致动脉粥样斑块的形成和发展<sup>[14]</sup>;TMAO可增加炎症因子在巨噬细胞中的表达,从而促进巨噬细胞炎症和炎症性血管疾病的发生<sup>[15]</sup>。随着研究发现TMAO与心血管疾病的关系愈发密切,如何治疗TMAO引起的心血管损伤已成为研究热点。本研究使用900 μmol/L TMAO处理HUVECs 24 h,与对照组比较,TMAO组HUVECs细胞存活率明显降低( $P<0.01$ );且TMAO可使HUVECs中IL-1β、ICAM-1、VCAM-1和MMP-9的表达水平明显升高( $P<0.05$ ),提示TMAO可促进HUVECs细胞炎症和活化,提升血管生成能力。

中医“药食同源”的理念历史悠久,在长期的社会实践中,劳动人民不断探索食物与药物之间的

关系,总结出食物与药物一样具有性味理论,包括四气五味、归经、升降浮沉等<sup>[16]</sup>。许多常见的食材都有其药用价值,如芹菜提取物左旋芹菜甲素人工合成物丁苯酞已成为急性脑梗死的一线用药<sup>[17]</sup>;广泛存在于多种植物中的白藜芦醇可通过多种途径发挥心血管保护作用<sup>[18]</sup>。然而从众多提取物中筛选出合适的药用成分是一项程序烦琐、耗费人力的工程。HDELNs因其提取简单、产量高、低免疫原性、生物毒性低、高递送效率和良好的生物相容性而备受关注。优异的分子转运特性和生物相容性使其有望用于细胞间和物种间通讯<sup>[19-20]</sup>。山楂具有的丰富的植物化学成分有着广泛的治疗作用,尤其对心血管疾病方面。山楂的主要生物活性化合物包括类黄酮、低聚原花青素和三萜酸,均对心脏和血管具有保护作用<sup>[21-22]</sup>。本研究采用差速离心法和蔗糖密度梯度离心法提取HDELNs,透射电镜可见典型的茶托形

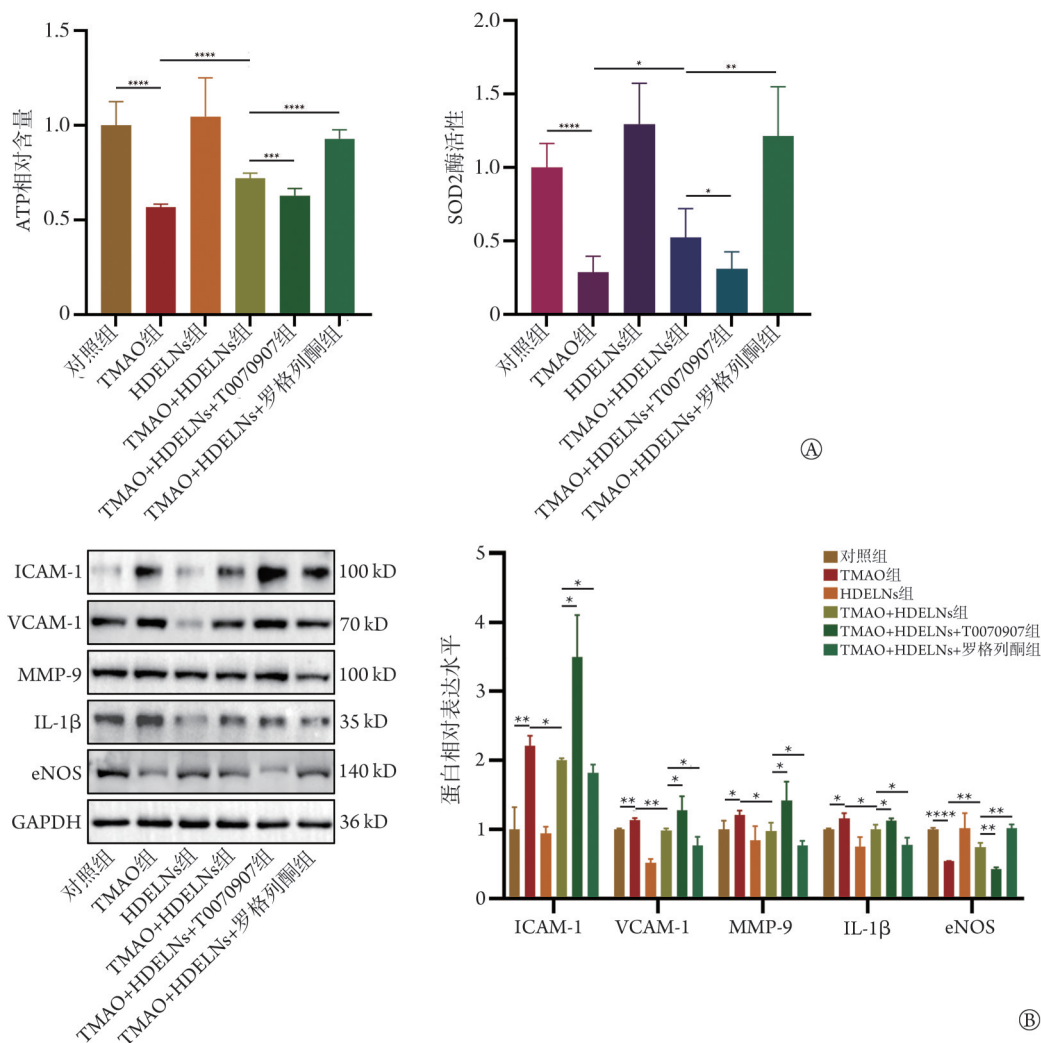


图5 PPAR-γ激动剂和抑制剂对HUVECs中ATP含量、SOD酶活性和蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of PPAR-γ agonists and inhibitors on ATP content, SOD enzyme activity and protein expression levels in HUVECs

A. 各组HUVECs中ATP含量及SOD酶活性比较；B. Western blotting检测T0070907或罗格列酮对HDELNs治疗效果的影响。\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ，\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。SOD. 超氧化物歧化酶；TMAO. 氧化三甲胺；HDELNs. 山楂来源外泌体样纳米囊泡；HUVECs. 人脐静脉内皮细胞；ICAM-1. 细胞间黏附分子-1；VCAM-1. 血管细胞黏附分子-1；MMP-9. 基质金属蛋白酶9；IL-1β. 白细胞介素-1β；eNOS. 内皮型一氧化氮合酶；PPAR-γ. 过氧化物酶体增殖物激活受体γ

双层囊泡状，250 g的山楂可提取出 $1 \times 10^{12}$ 粒子数/ml的HDELNs。本研究发现， $1 \times 10^7$ 粒子数/ml的HDELNs可逆转TMAO引起的HUVECs细胞活力降低，IL-1β、ICAM-1、VCAM-1和MMP-9蛋白表达水平的异常升高，以及eNOS蛋白表达水平的下降。TMAO可诱导HUVECs中的ATP含量和SOD酶活性下降，而HDELNs可恢复细胞中的ATP含量和SOD酶活性；TMAO可诱导HUVECs中的活性氧和线粒体超氧化物的含量升高，线粒体膜电位降低，而HDELNs可逆转以上结果，提示HDELNs可通过抗炎、抗氧化作用修复TMAO引起的HUVECs细胞损伤。

PPAR是调节能量代谢的核激素受体超家族的脂肪酸激活转录因子。目前已鉴定出3种PPAR亚型：

PPAR-α、PPAR-γ和PPAR-β/δ。PPAR-γ可通过调节各种细胞的分化或功能来控制免疫系统的稳态。近年来，多项研究发现，PPAR信号通路在癌症中存在异常激活，如结直肠癌<sup>[23]</sup>、胰腺癌<sup>[24]</sup>和肺癌<sup>[25]</sup>。此外，PPAR-γ的激活具有抑制血管生成和心血管保护作用，如PPAR-γ的激活可促进一氧化氮(NO)的生成，激活细胞凋亡从而发挥抗血管生成作用<sup>[26]</sup>；PPAR-γ可抑制HUVECs对外源性生长因子的增殖反应，并通过降低血管内皮细胞生长因子受体2(Flk-1)的表达及增加纤溶酶原激活抑制剂PAI-1的表达而抑制血管生成<sup>[27-28]</sup>。本研究采用TMAO诱导HUVECs细胞损伤，结果发现，TMAO可使HUVECs中PPAR-γ表达水平下降，而HDELNs可恢复PPAR-γ的表达水平。同时，T0070907可拮抗HDELNs的治疗作用，



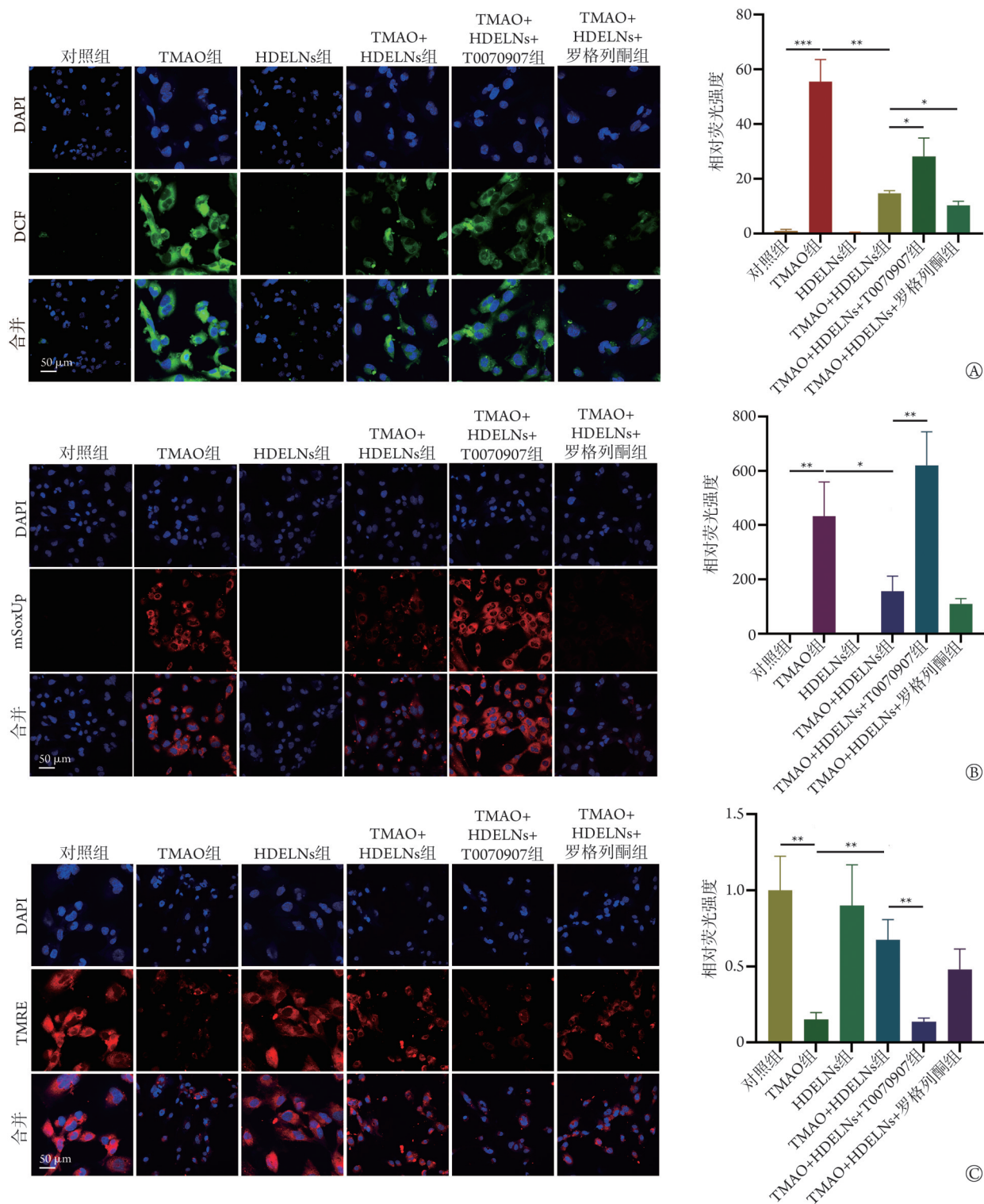


图6 PPAR- $\gamma$ 激动剂和抑制剂对HUVECs中线粒体超氧化物、活性氧和线粒体膜电位的影响

**Fig.6** Effects of PPAR- $\gamma$  agonists and inhibitors on mitochondrial superoxide, reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in HUVECs

A. Rosup 检测各组细胞中活性氧的含量; B. mSoxUp 检测各组细胞中线粒体超氧化物的含量; C. TMRE 检测各组细胞的线粒体膜电位。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。TMAO. 氧化三甲胺; HDELNs. 山楂来源外泌体样纳米囊泡; HUVECs. 人脐静脉内皮细胞; TMRE. 四甲基罗丹明乙酯; DCF. 2',7'-二氯荧光素; PPAR- $\gamma$ . 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$

表现为细胞活力降低, IL-1 $\beta$ 、ICAM-1、VCAM-1 和 MMP-9 表达水平升高, eNOS 表达水平下降, HUVECs 细胞内 ATP 含量、SOD2 酶活性和线粒体膜

电位的降低, 活性氧和线粒体超氧化物的含量增加; 而罗格列酮可协同促进 HDELNs 的治疗作用。因此, 笔者认为 HDELNs 可通过激活 PPAR- $\gamma$  信号通路修复

TMAO引起的HUEVCs细胞损伤。

综上所述, 本研究发现, HDELNs通过激活PPAR- $\gamma$ , 抑制TMAO诱导的HUEVCs中的氧化和炎症反应, 从而缓解动脉粥样硬化。这一发现为CVD的防治提供了新的理论依据。然而, HDELNs中的活性成分及作用靶点均较多, 在本研究聚焦的PPAR- $\gamma$ 信号通路以外, 可能还存在遗漏其他潜在的调控机制, 未来可结合网络药理学深入探讨HDELNs治疗动脉粥样硬化的作用机制; 此外, 本研究仅进行了体外实验, HDELNs在体内的作用仍有待探索, 团队后续计划用载脂蛋白E(ApoE)基因敲除小鼠构建动脉粥样硬化性心血管疾病模型, 以深入研究HDELNs在体内动脉粥样硬化模型中的作用及机制。

#### 【附加材料】

附表1 见 <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1544.2026.0203FJ>。

请扫描右方二维码获取。



#### 【参考文献】

- [1] Sorokin V, Vickneson K, Kofidis T, *et al.* Role of vascular smooth muscle cell plasticity and interactions in vessel wall inflammation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 599415.
- [2] Brunham LR, Lonn E, Mehta SR. Dyslipidemia and the current state of cardiovascular disease: epidemiology, risk factors, and effect of lipid lowering[J]. *Can J Cardiol*, 2024, 40(8S): S4-S12.
- [3] Jaworska K, Kopacz W, Koper M, *et al.* Microbiome-derived trimethylamine N-oxide (TMAO) as a multifaceted biomarker in cardiovascular disease: challenges and opportunities[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(23): 12511.
- [4] Caradonna E, Abate F, Schiano E, *et al.* Trimethylamine-N-oxide (TMAO) as a rising-star metabolite: implications for human health [J]. *Metabolites*, 2025, 15(4): 220.
- [5] Skagen K, Trosheid M, Ueland T, *et al.* The Carnitine-butylrobutate-trimethylamine-N-oxide pathway and its association with cardiovascular mortality in patients with carotid atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 247: 64-69.
- [6] Luqman A, Hassan A, Ullah M, *et al.* Role of the intestinal microbiome and its therapeutic intervention in cardiovascular disorder[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1321395.
- [7] Hong S, Lu J, Li J, *et al.* Protective role of (-)-epicatechin on trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced cardiac hypertrophy via SP1/SIRT1/SUMO1 signaling pathway[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2024, 24(12): 1335-1347.
- [8] Kantarcioglu M. New therapeutic players on the horizon: Edible plant derived exosomes[J]. *Hepatol Forum*, 2021, 2(3): 89-90.
- [9] Bai C, Liu J, Zhang X, *et al.* Research status and challenges of plant-derived exosome-like nanoparticles[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116543.
- [10] Zhou Z, Nan Y, Li X, *et al.* Hawthorn with "homology of medicine and food": a review of anticancer effects and mechanisms[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1384189.
- [11] Gao Z, Xie M, Zhou R, *et al.* Ameliorative effects of *Monascus*-fermented hawthorn extract on a high-fat diet-induced rat model of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Heliyon*, 2024, 10(18): e37354.
- [12] Li D, Li Y, Yang S, *et al.* Polydatin combined with hawthorn flavonoids alleviate high fat diet induced atherosclerosis by remodeling the gut microbiota and glycolipid metabolism[J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1515485.
- [13] Bai X, Wang S, Shu L, *et al.* Hawthorn leaf flavonoids alleviate the deterioration of atherosclerosis by inhibiting SCAP-SREBP2-LDLR pathway through sPLA2-IIA signaling in macrophages in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 327: 118006.
- [14] Querio G, Antoniotti S, Geddo F, *et al.* Modulation of endothelial function by TMAO, a gut microbiota-derived metabolite[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5806.
- [15] Liu MH, Lin XL, Xiao LL. Hydrogen sulfide attenuates TMAO-induced macrophage inflammation through increased SIRT1 sulphydration[J]. *Mol Med Rep*, 2023, 28(1). DOI: 10.3892/mmr.2023.13016.
- [16] Chen J. Essential role of medicine and food homology in health and wellness[J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(3): 347-348.
- [17] Zhang H, Wang L, Yang Y, *et al.* DL-3-n-butylphthalide (NBP) alleviates poststroke cognitive impairment (PSCI) by suppressing neuroinflammation and oxidative stress[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 13: 987293.
- [18] Breuss JM, Atanasov AG, Uhrin P. Resveratrol and its effects on the vascular system[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1523.
- [19] Dad HA, Gu TW, Zhu AQ, *et al.* Plant exosome-like nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplateforms[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(1): 13-31.
- [20] Huang F, Du J, Liang Z, *et al.* Large-scale analysis of small RNAs derived from traditional Chinese herbs in human tissues[J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(3): 321-332.
- [21] Lu M, Zhang L, Pan J, *et al.* Advances in the study of the vascular protective effects and molecular mechanisms of hawthorn (*Crataegus anamesa* Sarg.) extracts in cardiovascular diseases[J]. *Food Funct*, 2023, 14(13): S870-S890.
- [22] Liu T, Ma Y, Zhao H, *et al.* Hawthorn leaves flavonoids attenuate cardiac remodeling induced by simulated microgravity[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 683-695.
- [23] Wang R, Li J, Zhou X, *et al.* Single-cell genomic and transcriptomic landscapes of primary and metastatic colorectal cancer tumors[J]. *Genome Med*, 2022, 14(1): 93.
- [24] Liu X, Qian D, Liu H, *et al.* Genetic variants of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling pathway genes and risk of pancreatic cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(8): 930-939.
- [25] Zhang Y, Xiao B, Liu Y, *et al.* Roles of PPAR activation in cancer therapeutic resistance: Implications for combination therapy and drug development[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 964: 176304.
- [26] Wagner N, Wagner KD. Pharmacological utility of PPAR modulation for angiogenesis in cardiovascular disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2345.
- [27] Xin X, Yang S, Kowalski J, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(13): 9116-9121.

(责任编辑: 张小利)