基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003906

机械拉伸通过Piezo1/ESR1信号通路调控缓解动脉粥样硬化的体内外研究

魏敏倩[1]，吴绪波[2]

（1.上海中医药大学附属第七人民医院康复治疗科，上海 200137；2.上海市浦东新区人民医院康复医学科，上海 201799）

【摘 要】**目的：**本研究旨在探讨运动对动脉粥样硬化的影响及循环性机械拉伸对在氧化低密度脂蛋白（oxidized low-density lipoprotein，Ox-LDL）刺激下血管内皮细胞中Piezo型机械敏感离子通道组分1（piezo-type mechanosensitive ion channel component 1，Piezo1）的反应，阐明介导抗氧化和抗凋亡效应的机械传导信号通路。**方法：**基于运动干预，将20只雄性载脂蛋白E（apolipoprotein E，ApoE）敲除小鼠分为无运动组和运动组，以评估运动在体内对动脉粥样硬化的影响。体外采用对Ox-LDL诱导的人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells，HUVECs）施加10%拉伸（1 Hz，24 h）的循环性机械拉伸，以模拟运动所引起的血管张力对内皮功能障碍的影响。评估指标包括HUVECs管腔形成、Piezo1表达、氧化应激指标、活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平、Hoechst 33342染色、凋亡蛋白表达以及雌激素受体1（estrogen receptor 1，ESR1）、雌激素受体2（estrogen receptor 2，ESR2）和G蛋白偶联雌激素受体（G-protein coupled estrogen receptor，GPER）的表达。**结果：**与无运动组相比，运动组小鼠主动脉粥样硬化斑块面积显著减小。同时，循环性机械拉伸不仅增强了Ox-LDL处理HUVECs的管腔形成能力，而且降低了Ox-LDL诱导的氧化应激。研究发现，在Ox-LDL存在下机械拉伸增加了细胞内ROS水平，并下调了Ox-LDL所引起的Piezo1表达。内源性Piezo1拮抗剂Dooku1模拟了循环性机械拉伸的作用，缓解了Ox-LDL诱导的细胞凋亡。Piezo1的抑制还在Ox-LDL刺激的HUVECs中下调了ESR1、ESR2和GPER的表达，且该效应在机械拉伸条件下进一步增强。**结论：**运动在体内对动脉粥样硬化具有保护作用。同时本研究在体外揭示了通过抑制Piezo1/ESR1信号通路缓解动脉粥样硬化相关内皮损伤的潜在治疗策略。

【关键词】动脉粥样硬化；循环性机械拉伸；内皮损伤；Piezo型机械敏感离子通道组分1/雌激素受体；脂质过氧化

【中图分类号】R3 【文献标志码】A

Mechanical stretch alleviates atherosclerosis by regulating the Piezo1/ESR1 signaling pathway：an *in vitro* and *in vivo* investigation

Wei Minqian[1]，*Wu Xubo*[2]

（*1.Departmental of Rehabilitation，The Seventh People's Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine；2.Department of Rehabilitation Medicine，Pudong New Area People's Hospital*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the effect of exercise on atherosclerosis and the response of Piezo1 to cyclic mechanical stretch in vascular endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein（Ox-LDL），and to clarify the mechanotransduction pathways mediating antioxidative and antiapoptotic responses. ***Methods***：Based on the method of exercise intervention，20 male ApoE-knockout mice were divided into no-exercise group and exercise group to assess the impact of exercise on atherosclerosis *in vivo*. In the *in vitro* experiment，cyclic mechanical stretch（10% elongation，1 Hz，24 hours）was exerted on Ox-LDL-induced human umbilical vein endothelial cells（HUVECs）to simulate the effect of exercise-induced vascular tension on endothelial dysfunction. The assessment indicators included HUVEC lumen formation，Piezo1 expression，oxidative stress markers，the level of reactive oxygen species（ROS），Hoechst 33342 staining，and the expression of apoptosis protein，estrogen receptor 1（ESR1），estrogen receptor 2（ESR2），and G-protein coupled estrogen receptor（GPER）. ***Results***：The exercise group had a significant reduction in aortic atherosclerotic plaque area compared with the no-exercise group. Meanwhile，cyclic mechanical stretch increased lumen formation ability of HUVECs treated by Ox-LDL and reduced oxidative stress induced by Ox-LDL. In the presence of Ox-LDL，cyclic mechanical stretch in-

作者介绍：魏敏倩，Email：mqweinine@163.com，研究方向：运动与心血管。

通信作者：吴绪波，Email：wuxubo320@163.com。

基金项目：上海市浦东新区卫生健康委员会青年科研资助项目（编号：PW2022B-01）上海市浦东新区卫生健康委员会青年人才资助项目（编号：PWRq2023-04）。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250728.1047.002（2025-07-28）

creased the level of ROS in cells and downregulated the increased expression of Piezo1 induced by Ox-LDL. Dooku1, an endogenous Piezo1 antagonist, simulated the role of cyclic mechanical stretch and mitigated cell apoptosis induced by Ox-LDL. Piezo1 inhibition also downregulated the expression levels of ESR1, ESR2, and GPER in HUVECs stimulated by Ox-LDL, and such effect was further enhanced by cyclic mechanical stretch. ***Conclusion***: Exercise has a protective effect against atherosclerosis *in vivo*, and this study reveals the potential treatment strategy of alleviating atherosclerosis-related endothelial injury by inhibiting the Piezo1/ESR1 signaling pathway.

【Key words】atherosclerosis; cyclic mechanical stretch; endothelium injury; Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1/estrogen receptor; lipid peroxidation

血管内皮在维持血管健康和调节血流动力学方面起着至关重要的作用，其功能障碍是动脉粥样硬化发展的重要驱动因素[1]。内皮细胞通过分泌多种血管活性物质来调节血流，以适应机体的代谢需求[2-3]。已有研究表明，相较于层流区域，血流紊乱的血管区域对动脉粥样硬化的易感性明显更高[4-5]。适量的体育锻炼可以通过诱导循环性机械刺激（包括剪切应力和拉伸）来抑制动脉粥样硬化的进展[6-7]。1项研究发现，每周3次、每次30 min的中等强度骑行能够显著提高内皮一氧化氮合酶（endothelial nitric oxide synthase，eNOS）的表达，同时降低氧化应激标志物水平[8]。

循环性机械拉伸（cyclic mechanical stretch，CS）指因血管腔内压力变化而导致的血管壁反复伸展和松弛，其伸长率通常不超过10%~12%，持续时间可从数分钟至数小时不等[9]。生理性CS有助于维持血管内皮稳态，而病理性CS则可能诱导氧化应激，并激活促炎转录因子[8]。尽管机械力在血管功能调控中具有重要作用，但其涉及的具体信号通路仍未被完全解析。Piezo1/2离子通道在血管内皮中起着机械传感器的作用，其激活可引发Ca^{2+}内流并导致细胞去极化[10]。Piezo1主要表达于血管内皮和动脉平滑肌细胞，并已被证实可调节基质金属蛋白酶-2（activates matrix metalloproteinase-2，MMP-2）及膜型1基质金属蛋白酶（membrane-type 1 matrix metalloproteinase，MT1-MMP）的活性，而这些酶在血管结构重塑和毛细血管生成过程中发挥关键作用[11-12]。近期研究表明，Piezo1在血管周围脂肪组织（perivascular adipose tissue，PVAT）中高表达，但其对有无PVAT存在下的主动脉收缩功能未表现出直接影响[13]。然而，机械刺激如何激活Piezo离子通道及其在内皮功能障碍中的具体作用机制仍有待进一步探讨。

雌激素受体（estrogen receptor，ESR）信号通路在动脉粥样硬化中的保护作用已逐步被证实，并能够通过降低病变进展风险来发挥心血管保护作用[14-16]。G蛋白偶联雌激素受体（G protein-coupled estrogen receptor，GPER）能够通过抑制Piezo1活性来缓解机械应激诱导的细胞凋亡，这提示二者可能存在直接的调控关系[17]。此外，在成骨细胞中，雌激素缺乏诱导的骨质疏松可通过压电微振动得到缓解，这一过程伴随着Piezo1信号的激活，以及microRNA-29a和Wnt3a的上调，提示机械信号与雌激素信号通路可能协同促进骨健康[18]。雌激素可间接增强剪切应力，从而激活Piezo1通道及连接蛋白43（Connexin 43），进而促进细胞内钙浓度和一氧化氮的产生[17]。在血管平滑肌细胞中，Piezo1受雌激素受体调控，其激活可降低肌原性紧张度，并增强eNOS介导的舒张反应[19]。这些研究结果均强调了在机械拉伸和氧化应激的背景下，探讨Piezo1与ESR相互作用的重要性。

基于上述背景，本研究探讨了Piezo1和ESR信号通路在循环性机械拉伸条件下的相互作用，并评估其在氧化低密度脂蛋白（oxidized low-density lipoprotein，Ox-LDL）诱导的HUVECs细胞凋亡中的作用。研究结果表明，机械拉伸可通过ESR信号抑制Piezo1介导的细胞凋亡，而规律运动可在体内降低Piezo1的表达水平，这提示运动可能具有类似雌激素的内皮保护效应。这些发现为靶向Piezo1/ESR信号通路提供了新的治疗策略，以缓解动脉粥样硬化相关的血管损伤。

1 材料与方法

1.1 动物实验设计

本研究采用20只7~8周龄的雄性ApoE$^{-/-}$小鼠，购自北京维通利华实验动物技术有限公司（Beijing Vital River Labo-

ratory Animal Technology Co.,Ltd.,中国北京），并饲养于特定病原体自由（specific pathogen free，SPF）环境。所有实验均符合实验动物护理和使用指南，并经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准。实验动物的饲养环境温度维持在22±2 ℃，湿度控制在稳定范围内，并采用12 h光暗交替周期。所有小鼠均喂养高脂饮食（每kg饲料含150 g猪油、20 g胆固醇、5 g胆酸和825 g普通饲料），自由饮水。

小鼠被随机分为无运动组（n=10）和运动组（n=10）。运动组小鼠接受跑步机运动干预，具体参数为：速度12 m/min、坡度0°，每日30 min，持续8周。实验结束后，小鼠采用二氧化碳（CO_2）快速窒息法处死，并进行颈椎脱臼以确保无痛安乐死。随后采集血液样本进行血脂分析（采用Cayman Chemical公司的商业试剂盒），并收集主动脉组织，固定于4%多聚甲醛中或保存于-80 ℃供后续实验使用。

1.2 组织学分析

主动脉组织石蜡包埋及冷冻切片，随后进行苏木精-伊红（hematoxylin and eosin staining，HE）染色（HE试剂盒：Abcam ab245880，英国Cambridge），并按照生产商说明书操作。切片在400倍下使用Image-Pro Plus 6.0软件进行图像分析，并计算平均光密度（mean optical density，MOD）以评估组织病变程度。

1.3 免疫组织化学和免疫荧光分析

本研究采用免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）和免疫荧光（immunofluorescence，IF）检测Piezo1的表达情况。对于IHC分析，首先对石蜡包埋的组织切片进行3%过氧化氢处理，以抑制内源性过氧化物酶活性。随后，切片在柠檬酸缓冲液（pH 6.0）中高温高压加热进行抗原修复，并使用山羊血清封闭以减少非特异性结合。随后，切片与Piezo1一抗（1∶50，NOVUS）在4 ℃下孵育过夜，并在次日37 ℃孵育1 h后，与山羊抗小鼠IgG二抗（Alexa Fluor® 488，1∶10 000，A28175）反应。切片经DAPI核染色10 min后，使用Image-Pro Plus 6.0软件进行平均光密度分析，以评估Piezo1的表达水平。对于IF分析，首先固定接受机械拉伸刺激的HUVECs于4%多聚甲醛中，并使用0.25% Triton X-100进行细胞膜透化，随后在PBS中用3% BSA进行封闭。细胞与Piezo1一抗（1∶200）在4 ℃孵育过夜，PBS冲洗后，37 ℃孵育1 h，与相同的二抗（Alexa Fluor® 488，1∶10 000）反应。最后，DAPI（10 min）进行核染色，并使用Leica SP5激光共聚焦显微镜进行荧光信号检测和成像分析。

1.4 HUVECs细胞培养及Ox-LDL处理

人脐静脉内皮细胞（HUVECs）购自上海优佰生物科技有限公司（中国，上海），经鉴定确认其纯度和无污染状态。细胞培养于内皮细胞培养基（ECM，Sciencell），培养基中补充5% 胎牛血清（FBS，Gibco）和1%内皮细胞生长补充剂（ECGS，Gibco）。培养基每48 h更换1次，细胞培养至80%~90%后用于实验。实验均采用第5至7代细胞，因这些代次可维持最佳的内皮细胞表型稳定性。实验中，将HUVECs细胞（7×10⁶个细胞/孔）接种于Bioflex细胞培养板（flexcell international corporation，Burlington，North Carolina），培养板基底预涂I型胶原，随后根据实验要求分为以下实验组：①对照组（Control）：α-MEM+2% FBS；②Ox-LDL处理组（Ox-LDL）：α-MEM+2% FBS+50 μg/mL Ox-LDL；③机械拉伸组（Stretch）：α-MEM+2% FBS+50 μg/mL机械拉伸（10%伸长率，1Hz，24 h）；④Ox-LDL+机械拉伸组（Ox-LDL+Stretch）：α-MEM+2% FBS+50 μg/mL Ox-LDL+机械拉伸；⑤Piezo1抑制组（Dooku1）：α-MEM+2% FBS+50 μg/mL Ox-LDL+机械拉伸+10 μmol/L Dooku1（Piezo1选择性拮抗剂）。实验中，采用50 μg/mL氧化低密度脂蛋白（Ox-LDL）（购自上海晶科化学科技有限公司，中国，上海）处理细胞6 h，以模拟动脉粥样硬化的病理环境。

1.5 循环性机械拉伸实验

HUVECs细胞培养至80%~90%后，使用BioPress™ Flexcell FX-5000™机械拉伸系统（flexcell international corporation）施加循环性机械拉伸。细胞培养板固定在系统加载平台上，该平台由6个平面支柱组成，可模拟接近生理条件的动态机械应力。细胞暴露于10%伸长率、1 Hz（60次/min）的机械拉伸刺激，持续24 h。

1.6 Piezo1抑制实验

为探究Piezo1在循环性机械拉伸诱导细胞凋亡中的作用，实验采用Dooku1（Piezo1选择性拮抗剂，#HY-126010，MCE）。在Ox-LDL处理前20 min，加入10 nmol/L Dooku1，孵育20 min后更换新鲜培养基，再进行Ox-LDL处理。

1.7 血管生成实验

采用Matrigel管腔形成实验评估HUVECs细胞的血管生成能力[20]。实验流程如下：在6孔板（TissueTrain®，Flexcell International）中加入0.5 mL/孔 Matrigel（BD Biosciences），并在37 ℃预孵育30 min形成基质层；HUVECs（1.4×10⁵细胞/孔）悬浮于VEGF（100 ng/mL）+EGM-2培养基中，实验分组如下：①对照组：未处理；②Ox-LDL处理组：100 μg/mL Ox-LDL处理；③机械拉伸组：10%伸长率、1Hz机械拉伸（处理1 h后接种）；细胞培养6~8 h后，在Olympus IX73倒置显微镜（100×）下成像分析。

1.8 油红O染色

体外实验：HUVECs细胞固定后，使用0.15%油红O溶液（60%异丙醇-PBS稀释）染色10 min，随后进行苏木精复染（1 min），PBS洗涤2次，Olympus IX73（100×）观察脂滴累积情况。

体内实验：小鼠主动脉固定于4%多聚甲醛（4 ℃，16 h），依次用水（10 min）和60%异丙醇（预处理）冲洗后，采用油红O溶液染色15 min。随后依次用60%异丙醇冲洗，PBS洗涤3次，最终观察动脉粥样硬化斑块面积。

1.9 活性氧水平检测

HUVECs细胞经冷PBS洗涤后，加入5 umol/L Dihydroethidium（DHE）溶液（J&L Biological，China），37 ℃避光孵育60 min。随后使用Olympus IX73（100×）进行荧光检测，以评估细胞内ROS水平。

1.10 氧化应激生物化学检测

在循环性机械拉伸处理后，收集细胞培养上清液进行生物化学分析。采用南京建成生物工程研究所（Jiancheng，Nanjing，China）提供的检测试剂盒，分别检测丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）和乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）水平，实验均严格按照制造商提供的实验操作流程进行。实验过程中，细胞培养上清液经 12 000 ×g 离心（4 ℃，10 min）收集，并采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。MDA 和 LDH 分别在 532 nm 和 560 nm 处测定吸光度；SOD 活性通过 NBT/酶工作液反应后，在 560 nm 处测定吸光度；仪器检测采用 SynergyHTX 微孔板读数仪（Gene Company Limited）。

1.11 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡

采用 Hoechst 33342 染色试剂盒（Beyotime，Shanghai，China）对细胞凋亡情况进行检测，实验严格按照制造商提供的实验操作流程进行。实验过程中，接受循环性机械拉伸处理的 HUVECs 细胞用冷 PBS 洗涤，随后加入 10 μL/mL Hoechst 33342 染色液，37 ℃避光孵育 10 min。染色完成后，细胞用 PBS 洗涤 2 次，并在 Olympus IX73 荧光显微镜（100×）下观察细胞核形态，评估凋亡细胞的核固缩和断裂情况。最终，细胞凋亡率（%）计算方式为：凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。

1.12 Piezo1 和 ESR 免疫共沉淀（Co-IP）实验

HUVECs 细胞培养于 37 ℃、5% CO_2 环境中，并进行 3 次重复实验。在免疫共沉淀实验前，细胞先接受 Ox-LDL 处理，随后 6 h 后施加循环性机械拉伸刺激。实验结束后，细胞用冰 PBS 洗涤 2 次以去除残留培养基和细胞碎片。随后，细胞在冰浴条件下使用免疫共沉淀裂解液（Beyotime Institute of Biotechnology，China）裂解，并补充蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂。裂解液经预清除处理，加入蛋白 A/G Sepharose 微珠（Santa Cruz，CA，USA），按 10∶1（v/v）比例混匀，4 ℃，14 000 r/min 离心 5 s。预清除后的裂解液在 4 ℃过夜孵育，分别加入 Piezo1 一抗、ESR 一抗，同时设立 IgG 作为对照。随后，使用 Pierce® Protein A/G Agarose 进行 2 h 室温孵育，回收免疫复合物。免疫复合物经 3 次洗涤后，进行 SDS-PAGE 电泳，并采用 Western blot 分析 Piezo1 和 ESR 的表达情况。

1.13 Western blot 检测

本研究采用 RIPA 裂解液（Cell Signaling Technologies）提取 HUVECs 细胞总蛋白，并使用 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离。随后，将蛋白转移至 PVDF（Millipore），并在室温下使用 5% 脱脂奶粉溶解于 TBST（Tris 缓冲盐溶液+Tween 20）进行封闭 1 h，以减少非特异性结合。封闭后，膜分别加入以下一抗，于 4 ℃孵育 18 h，分别包括抗 GAPDH（1∶1 000，#5174S，CST），抗 Bax（1∶1 000，#50599-2-1g，Proteintech），抗 BCL-2（1∶1 000，#12789-1-AP，Proteintech），抗 ESR1（1∶1 000，ab271815，Abcam），抗 ESR2（1∶1 000，ab196787，Abcam），抗 GPER（1∶1 000，ab260033，Abcam），抗 Piezo1（1∶1 000，#NBP-75617，NOVUS），抗 Caspase-3（1∶1 000，#9661，Cell Signaling Technology）。孵育完成后，膜用 TBST 洗涤 3 次，每次 5 min。然后，将膜在室温孵育 1 h，与 HRP 标记的山羊抗兔二抗（1∶10 000，Eubiotech®）结合。洗涤后，采用增强化学发光（ECL）试剂进行显色，并使用 Image J 软件进行条带定量分析，以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.14 统计学方法

所有数据均来源于至少 3 次独立实验，并以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）的形式表示。统计学分析采用 GraphPad Prism 6（GraphPad，CA，USA）进行计算，主要采用非配对 Student's t 检验用于两组间比较，单因素方差分析和双因素方差分析用于多组间比较，并在方差分析后进行 Tukey 事后检验以确定组间差异。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 循环性机械拉伸缓解 Ox-LDL 诱导的 HUVECs 氧化应激

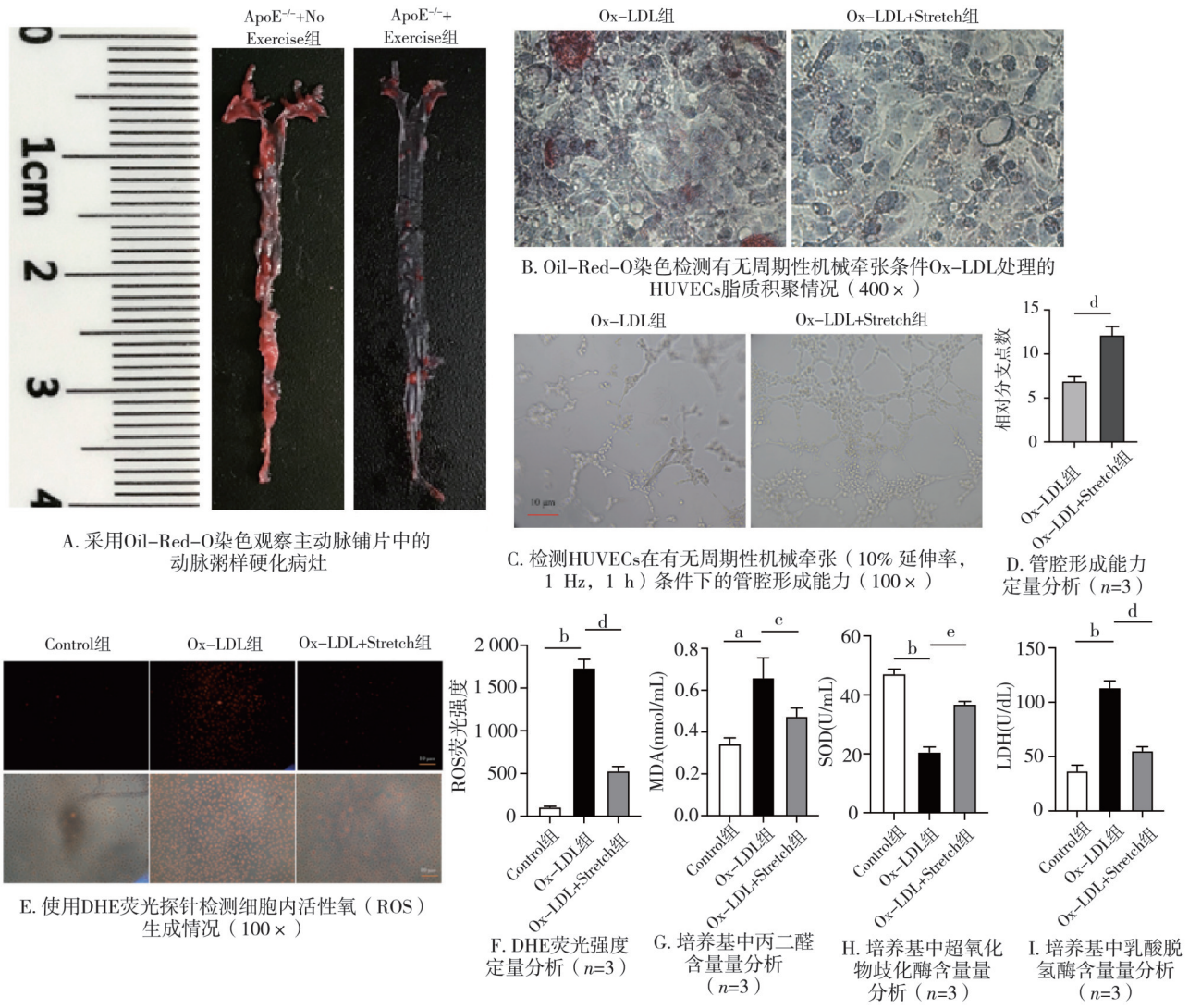
Oil-Red-O 染色结果显示，与无运动组相比，运动组小鼠的主动脉粥样硬化斑块面积显著减少（图 1A）。进一步在体外模型中模拟周期性机械牵张，观察 HUVECs 在 Ox-LDL 处理后的脂质积聚情况。结果表明，Ox-LDL 处理诱导大量脂质积聚，而周期性机械牵张可显著减少脂质沉积（图 1B）。随后，通过中性脂滴积累实验评估 HUVECs 细胞在不同处理条件下的变化，结果显示循环性机械拉伸（10% 伸长率，1 Hz）显著增强了 Ox-LDL 诱导的 HUVECs 血管生成能力（图 1C）。进一步的定量分析发现，与单独 Ox-LDL 处理组相比，Ox-LDL+机械拉伸组的细胞网络分支显著增加（t=8.230，P=0.001 2）（图 1D）。

此外，通过荧光显微镜观察 ROS 生成情况，发现 Ox-LDL 处理可显著增加 ROS 产生（F=493.2，P<0.001），而循环性机械拉伸可有效降低 ROS 水平（F=493.2，P<0.001）（图 1E、F）。同时，Ox-LDL 处理后培养液中 MDA（F=19.28，P=0.002）和 LDH（F=172.4，P<0.001）水平显著升高，而 SOD（F=251.0，P<0.001）水平下降，但机械拉伸可有效逆转这一趋势（MDA F=19.28，P=0.026）（LDH F=251.0，P<0.001）（SOD F=172.4，P<0.001）（图 1G~I）。这些数据表明，循环性机械拉伸可能通过调控 ROS 生成，提高细胞对氧化应激的耐受性，从而缓解 Ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤。

2.2 循环性机械拉伸通过 Piezo1 激活促进 HUVECs 血管生成

HUVECs 在 Ox-LDL 诱导下其 Piezo1 表达显著上调（F=20.39，P=0.002）。然而，当细胞受到循环性机械拉伸刺激后，Piezo1 荧光强度明显低于单独 Ox-LDL 处理组（F=20.39，P=0.012）（图 2A、B）。进一步分析证实，Ox-LDL 单独处理可显著增加 Piezo1 表达（F=380.7，P<0.001），而 Ox-LDL+机械拉伸组可有效降低 Piezo1 水平（F=380.7，P=0.001）（图 2C、D）。

在粥样硬化小鼠模型中，Piezo1 水平也表现出相似的变



A. 采用Oil-Red-O染色观察主动脉铺片中的动脉粥样硬化病灶

B. Oil-Red-O染色检测有无周期性机械牵张条件Ox-LDL处理的HUVECs脂质积聚情况（400×）

C. 检测HUVECs在有无周期性机械牵张（10% 延伸率，1 Hz，1 h）条件下的管腔形成能力（100×）

D. 管腔形成能力定量分析（n=3）

E. 使用DHE荧光探针检测细胞内活性氧（ROS）生成情况（100×）

F. DHE荧光强度定量分析（n=3）

G. 培养基中丙二醛含量量分析（n=3）

H. 培养基中超氧化物歧化酶含量量分析（n=3）

I. 培养基中乳酸脱氢酶含量量分析（n=3）

注：a，与 Control 组比较，P<0.01；b，与 Control 组比较，P<0.001；c，与 Ox-LDL 组比较，P<0.05；d，与 Ox-LDL 组比较，P<0.01；e，与 Ox-LDL 组比较，P<0.001

图 1　周期性机械牵张对 Ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤的影响

化趋势。免疫组化实验结果显示，与无运动组小鼠相比，运动干预可显著降低主动脉组织 Piezo1 的表达水平，这一结果通过平均光密度测量得到定量确认（图 2E）。这些结果表明，运动可能通过调节 Piezo1 这一机械敏感蛋白的表达，对粥样硬化发挥保护作用。

2.3　循环性机械拉伸抑制 Ox-LDL 诱导的细胞凋亡

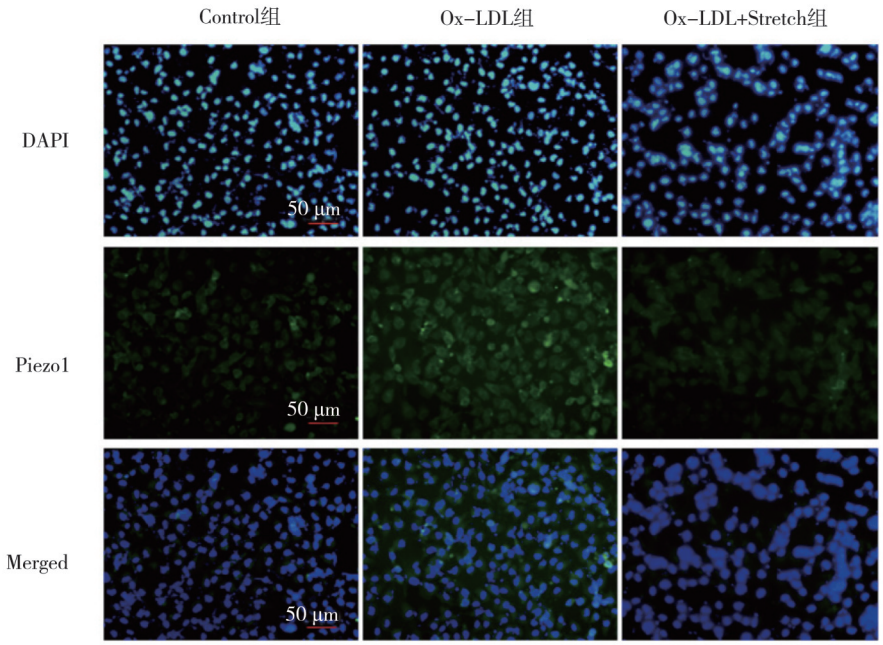
在管腔形成实验中，Ox-LDL 显著抑制血管形成能力，而 Piezo1 抑制剂 Dooku1 和循环性机械拉伸均能部分逆转该抑制作用（图 3A）。管腔分支点定量分析显示，Ox-LDL 组的分支点数显著低于 Ox-LDL+Dooku1 组（F=43.85，P=0.039）和 Ox-LDL+Dooku1+Stretch 组（F=43.85，P=0.002）（图 3B）。

Hoechst 33342 染色结果进一步表明，Ox-LDL 可诱导明显的细胞核浓缩和凋亡细胞增多，而机械拉伸处理明显缓解凋亡（图 3C）。定量分析显示，Ox-LDL 组凋亡细胞比例显著高于对照组（F=345.2，P<0.001），而 Dooku1（F=345.2，P<0.001）和机械拉伸（F=345.2，P<0.001）干预均可有效降低凋亡率（图 3D）。表明 Dooku1 和机械拉伸在抑制 Ox-LDL 诱导的细胞凋亡方面具有协同保护作用

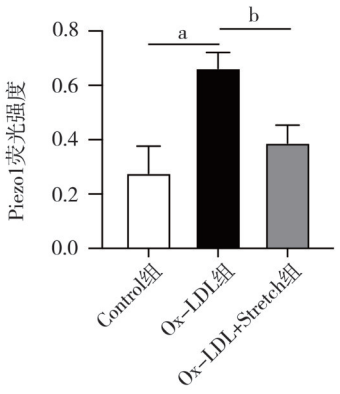
Western blot 结果进一步验证了上述结论，Ox-LDL 处理显著上调凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 和 Bax，同时下调 Bcl-2 表达；而 Dooku1 或机械拉伸可显著逆转这些变化（图 3E）。定量分析表明，caspase-3 表达在 Ox-LDL 组显著上调（F=51.92，P=0.044），在 Dooku1（F=51.92，P=0.001）和机械拉伸组（F=51.92，P=0.032）均有所下降（图 3F）；Bax 表达呈相同趋势（F=68.94，P<0.001，P=0.005 和 P<0.001）（图 3G），而 Bcl-2 则呈现相反的表达趋势（F=193.5，P<0.001，P<0.001 和 P<0.001）（图 3H~J）。

2.4　循环性机械拉伸对 HUVECs Piezo1/ESR1 的调控作用

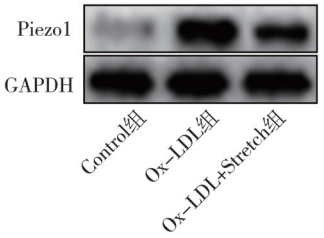
已有研究表明，ESR 可通过调控细胞内 Ca^{2+} 和 K^{+} 通道来维持血管内皮功能[21]。然而，关于 Piezo1/ESR1 轴的相互作



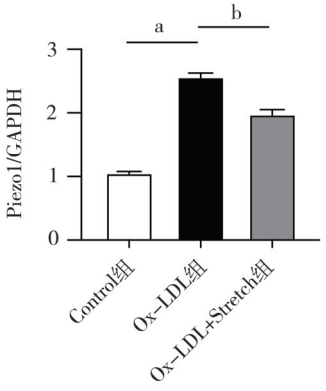
A. 在循环机械牵张后免疫荧光观察HUVECs中Piezo1的定位和表达，显示代表性图像（200×）



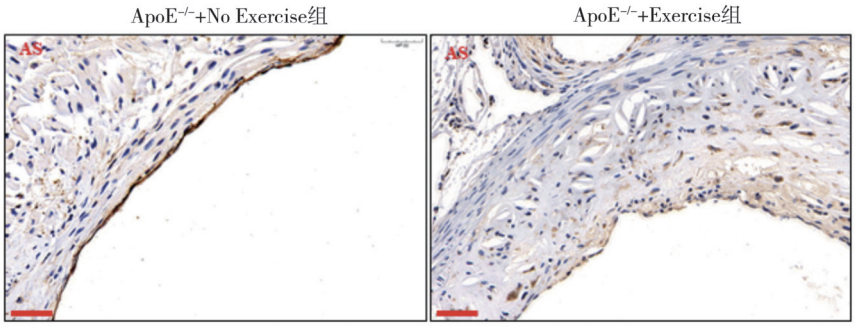
B. 荧光成像结果定量分析（n=3）



C. 通过Western blot检测并分析了施加牵张后HUVECs的Piezo1表达水平



D. 图C中Western blot 定量分析（n=3）



E. 采用免疫组织化学方法对牵张联合Ox-LDL诱导的动脉粥样硬化APOE小鼠主动脉组织中Piezo1的免疫染色情况进行了分析

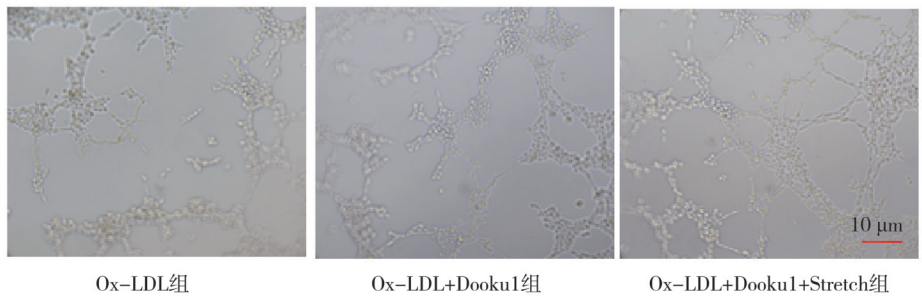
注：a，与Control组比较，P<0.01；b，与Ox-LDL组比较，P<0.001

图2　Piezo1参与周期性机械牵张介导的HUVECs管腔形成过程

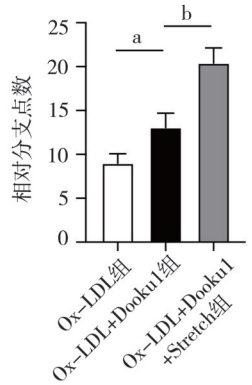
用及其在循环性机械拉伸中的作用机制研究较少。因此，本研究进一步探讨了机械拉伸对Ox-LDL诱导的HUVECs细胞中Piezo1/ESR1轴的调节作用。

实验结果显示，Ox-LDL处理后ESR1表达水平显著升高（F=2.076，P<0.001），而Piezo1选择性抑制剂Dooku1可降低ESR1的表达水平（F=2.076，P<0.001），提示Piezo1与ESR1之间可能存在正向调控关系（图4A~D）。此外，在未使用Dooku1的情况下，机械拉伸可显著降低ESR1表达（F=2.076，P=0.002），而在Dooku1存在时，ESR1表达进一步下降（F=2.076，P<0.001），表明机械拉伸可能通过抑制Piezo1通道来降低Ox-LDL诱导的ESR1表达（图4A、B）。进一步分析发现，Ox-LDL亦可上调ESR2（F=44.62，P=0.002）与GPER（F=62.91，P<0.001）的表达水平，而Dooku1干预（F=44.62，P=0.002和F=62.91，P=0.015）及机械拉伸（F=287，P=0.029和F=62.91，P=0.035）均可抑制其表达，二者联合作用时抑制效应更为显著（F=44.62，P<0.001和F=62.91，P<0.001）（图4C、D），提示Piezo1可能不仅影响ESR1，还可调控ESR2和GPER的表达，共同介导内皮细胞对机械刺激与脂质氧化应激的反应。

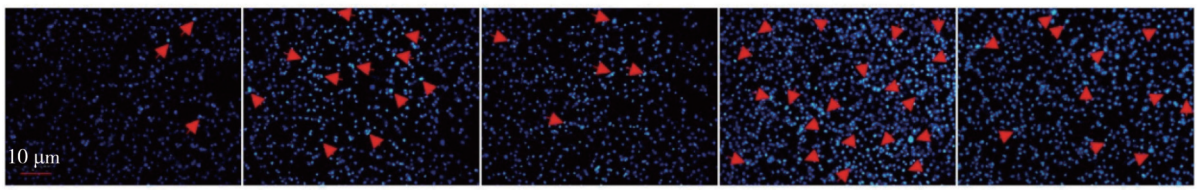
为了进一步确定Piezo1是否通过调控ESR参与粥样硬化的发生，本研究采用免疫共沉淀（CoIP）实验进行验证。结果显示，在接受Ox-LDL和机械拉伸处理的小鼠主动脉组织中，内源性Piezo1与ESR之间存在显著相互作用（图4E）。此外，在Piezo1抗体免疫沉淀的复合物中检测到ESR，而在ESR抗体免疫沉淀的复合物中也检测到Piezo1，进一步证明两者之间可能存在直接或间接的相互作用。



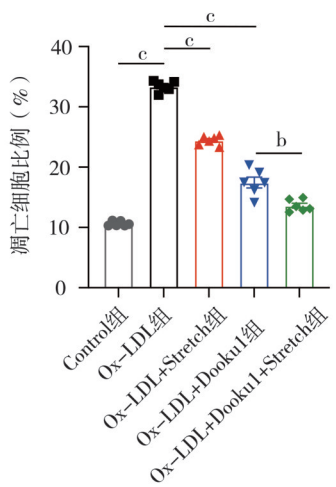
A. 在Ox-LDL、Dooku1组和牵张组进行管腔形成实验



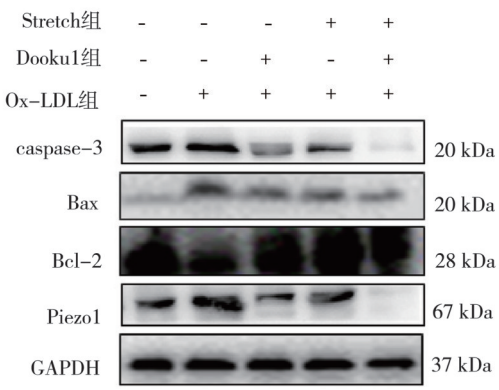
B. 管腔形成能力定量分析（n=3）



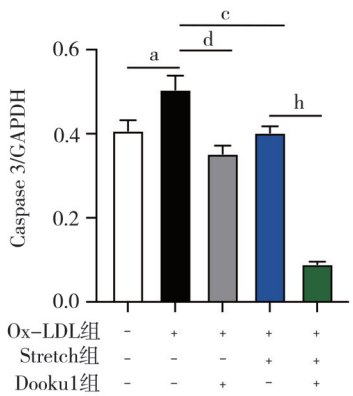
C. 使用Hoechst 33342染色检测ox-LDL刺激下循环机械牵张处理HUVECs的阳性凋亡细胞，并显示代表性图像（100×）



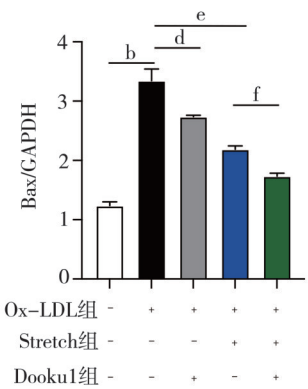
D. 凋亡HUVECs数量的定量分析（n=6）



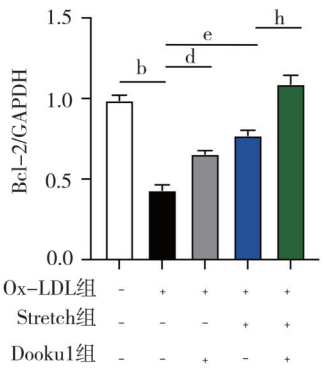
E. 检测凋亡执行蛋白caspase-3、促凋亡蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-2、Piezo1的表达和Ox-LDL刺激和/或牵张HUVECs的相关性



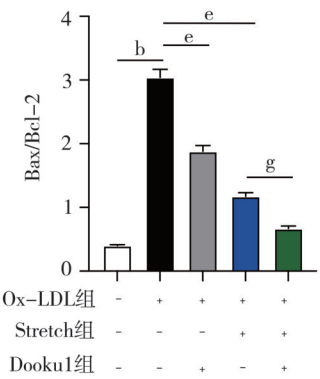
F. 凋亡执行蛋白caspase-3 Western blot定量分析（n=4）



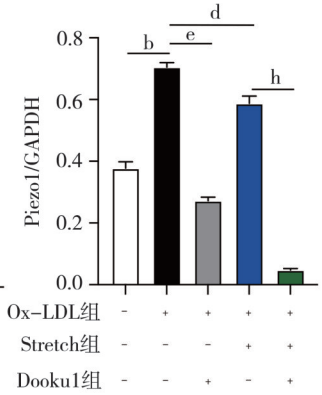
G. 促凋亡蛋白Bax Western blot定量分析（n=4）



H. 抗凋亡蛋白Bcl-2 Western blot定量分析（n=4）



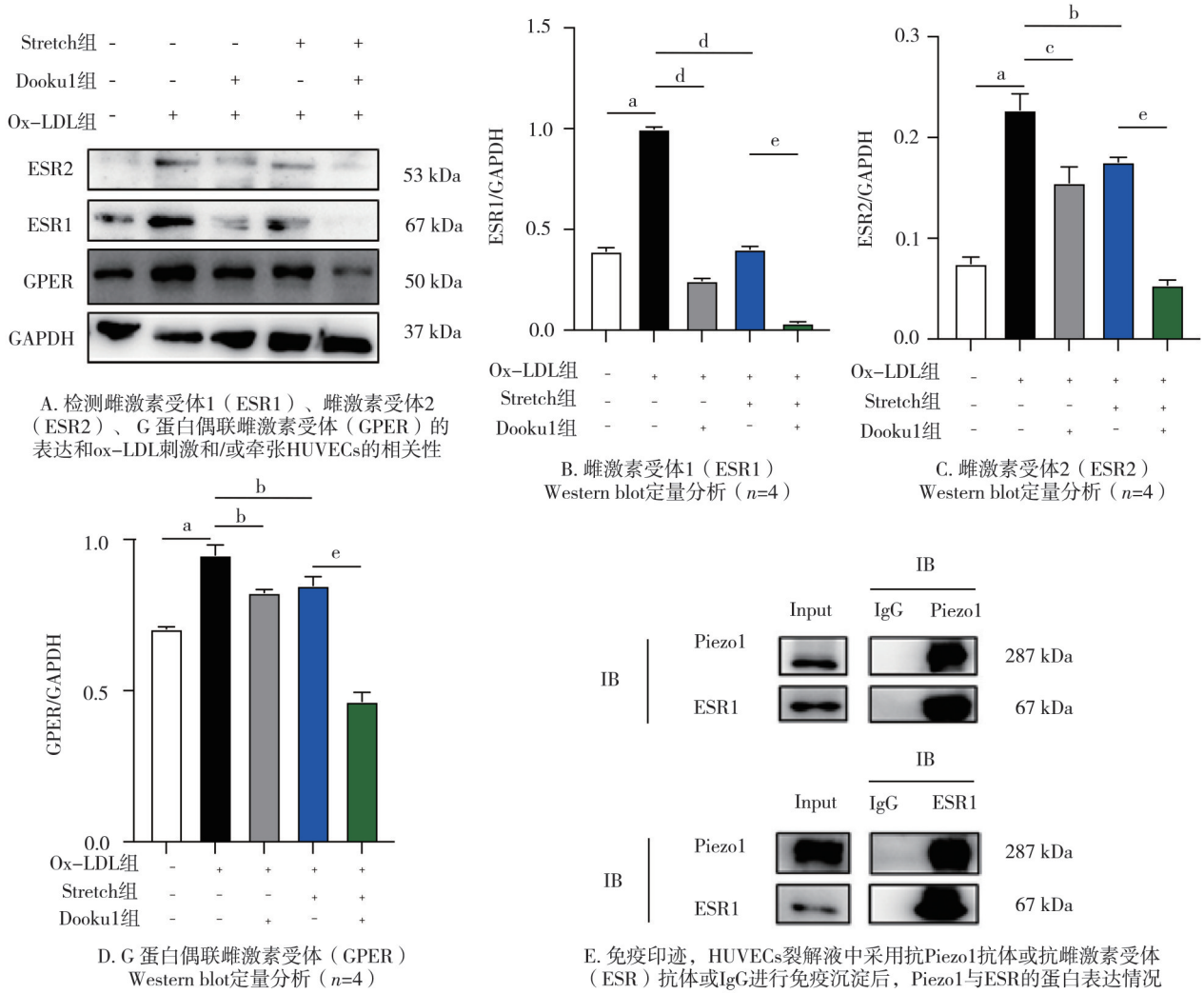
I. 促凋亡蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-2定量比值（n=4）



J. Piezo1蛋白Western blot定量分析（n=4）

注：a，与Control组比较，P<0.05；b，与Control组比较，P<0.001；c，与Ox-LDL组比较，P<0.05；d，与Ox-LDL组比较，P<0.01；e，与Ox-LDL组比较P<0.001；f，与Ox-LDL+Stretch组比较，P<0.05；g，与Ox-LDL+Stretch组比较，P<0.01；h，与Ox-LDL+Stretch组比较，P<0.001

图3　周期性机械牵张对Ox-LDL刺激下HUVECs的抗凋亡作用



A. 检测雌激素受体1（ESR1）、雌激素受体2（ESR2）、G蛋白偶联雌激素受体（GPER）的表达和ox-LDL刺激和/或牵张HUVECs的相关性

B. 雌激素受体1（ESR1）Western blot定量分析（n=4）

C. 雌激素受体2（ESR2）Western blot定量分析（n=4）

D. G蛋白偶联雌激素受体（GPER）Western blot定量分析（n=4）

E. 免疫印迹，HUVECs裂解液中采用抗Piezo1抗体或抗雌激素受体（ESR）抗体或IgG进行免疫沉淀后，Piezo1与ESR的蛋白表达情况

注：a，与Control组比较，P<0.001；b，与Ox-LDL组比较，P<0.05；c，与Ox-LDL组比较，P<0.01；d，与Ox-LDL组比较，P<0.001；e，与Ox-LDL+Stretch组比较，P<0.001

图4　周期性机械牵张抑制Piezo1/ESR1信号通路的激活

3　讨　论

本研究表明，双模式的剪切应变可缓解动脉粥样硬化，首先通过HUVECs中的周期性拉伸（CS）作用，其次在体内实验中通过运动干预，突出了机械应力在血管病理学中的复杂作用。该效应主要由机械敏感离子通道Piezo1及其下游ESR信号通路介导。Dooku1抑制Piezo1可模拟周期性拉伸干预，并通过降低Piezo1水平逆转氧化低密度脂蛋白（Ox-LDL）诱导的凋亡增加，强调了Piezo1在调控动脉粥样硬化斑块形成过程中细胞对机械刺激应答中的关键作用。进一步阐明Piezo1调控的复杂机制，可能为动脉粥样硬化相关并发症的治疗提供新的策略。

细胞凋亡通常伴随胞内钾离子（$[K^+]$）浓度下降，但研究发现，离子通道抑制剂可通过独立于K^+损失的机制阻断caspase-3的激活[22]。近年来，Piezo离子通道因其在心血管发育及动脉粥样硬化中的作用而备受关注[23-24]，但关于Piezo1在动脉粥样硬化中的研究仍较为有限。本研究发现，在体外实验中，Ox-LDL诱导后Piezo1表达水平升高，而在体内实验中，运动干预同样增加Piezo1表达，这一结果与既往研究相一致[25]。

暴露于Ox-LDL的HUVECs经历了氧化应激损伤，活性氧（ROS）水平升高，导致内皮细胞完整性丧失、炎症反应增强及细胞凋亡增加[26]。此外，氧化应激可促进LDL氧化，进而对内皮细胞产生细胞毒性[27]。本研究观察到Ox-LDL暴露后HUVECs的ROS水平升高，并检测到Hoechst 33342阳性细胞增加，与此前研究结果相符[26]。运动训练可通过降低氧化应激和ROS生成提高一氧化氮（NO）生物利用

度[28]。此外，周期性拉伸对内皮细胞功能的调控不仅依赖于应力信号，如细胞外基质重塑、内皮通透性调节及血管舒张调控[29]，还涉及代谢组学变化，包括氧化应激及ROS生成[30]。本研究表明，周期性机械拉伸可减少Ox-LDL诱导的ROS生成及细胞凋亡，提示该干预措施可能有助于改善血管健康，预防心血管疾病。一般而言，适量的ROS可促进细胞增殖，而过量的ROS则具有细胞毒性[31]。然而，也有研究表明ROS积累与细胞增殖密切相关，可能通过MAPK信号通路促进滋养层细胞的增殖与分化[32-33]。本课题组推测，周期性机械拉伸可能通过抑制ROS生成和激活促存活/抗凋亡信号发挥保护作用，这一机制尚需进一步研究。

近年来，内皮细胞被认为是评估运动对动脉粥样硬化影响的重要传感器[34]，而Piezo1作为关键的机械传感器，可通过介导Ca^{2+}内流响应机械力，调控多种细胞行为[35]，包括胚胎期血管成熟[36]、血压调控[37]、血管通透性[38]、动脉粥样硬化进程[39]及剪切应力反应[40]。本研究表明，运动不仅能够恢复因动脉粥样硬化干预而改变的Piezo1水平，还可通过降低氧化应激、增加内皮祖细胞数量及调控血管反应来改善内皮功能[41-42]。此外，Ox-LDL诱导的Piezo1表达可加剧炎症反应[43]并激活线粒体依赖的细胞凋亡通路，这对于血管损伤的发生至关重要[44]。本研究的体外实验发现，Ox-LDL诱导的Piezo1表达升高与细胞凋亡增加呈正相关，而机械拉伸或Piezo1抑制剂Dooku1均可有效逆转这一变化，进一步支持Piezo1在动脉粥样硬化中的保护性作用。

在确定Piezo1在动脉粥样硬化进程中的作用后，本研究进一步探讨了其潜在的调控机制。已有研究表明，雌激素通过调控离子通道的表达及功能，在血管收缩及抗炎反应中发挥重要作用[45]。机械拉伸可引起胞质Ca^{2+}水平升高，促进细胞骨架重塑及毛细血管细胞的定向排列，从而影响血管完整性[46-47]。此外，Piezo1介导的内皮细胞ATP释放可激活下游效应分子，如VE-cadherin及VEGFR2，进而促进内皮一氧化氮合酶（eNOS）磷酸化[41]。本研究首次鉴定了机械刺激诱导Piezo1激活的新型受体，并进一步阐明了Piezo1/ESR信号通路在Ox-LDL诱导的内皮损伤中的作用，显著提升了对血管病理生理学的理解。本研究发现，周期性机械拉伸可显著抑制Ox-LDL诱导的ESR1激活，无论是否存在Dooku1，均可降低Ox-LDL导致的ESR1表达升高。此外，共免疫沉淀（Co-IP）分析证实了内源性Piezo1与ESR之间的相互作用，表明Piezo1可能是ESR的新型受体。

总而言之，本研究表明周期性机械拉伸可抑制Ox-LDL刺激下HUVECs的细胞凋亡，并揭示了Piezo1/ESR1介导的机械感知在抗氧化应激中的作用。值得注意的是，尽管已有研究证实Piezo1在感知血流剪切力、介导血流紊乱区域内皮功能障碍中发挥关键作用，但其与内分泌信号通路特别是雌激素受体（ESR）之间的调控机制尚未明确。本研究首次提出并实验证实Piezo1与ESR1存在物理互作，系统阐明了Piezo1/ESR1信号轴在循环性机械拉伸干预中的作用机制。通过体内运动与体外HUVECs模型验证了该信号轴在缓解内皮氧化应激和凋亡中的关键调控功能，丰富了对Piezo1在血管病理生理过程中的认识，为动脉粥样硬化的力学-激素联合干预提供了新的理论依据和潜在靶点。但进一步研究仍需验证Piezo1/ESR1激活在运动血流动力学增强中的内皮保护作用。此外，运动干预在体内实验中对动脉粥样硬化具有积极影响，但Piezo1与ESR1之间的具体调控机制及相互作用仍需进一步阐明。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 魏敏倩：研究方案设计、研究实施、数据分析及论文撰写；吴绪波：研究方案设计及论文修改

参 考 文 献

[1] Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium-Gatekeeper of vessel health[J]. Atherosclerosis, 2016, 248: 97-109.

[2] Khaddaj Mallat R, Mathew John C, Kendrick DJ, et al. The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2017, 54(7/8): 458-470.

[3] Filippini A, Tamagnone L, D'Alessio A. Endothelial cell metabolism in vascular functions[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(8): 1929.

[4] Xu SW, Ilyas I, Little PJ, et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies[J]. Pharmacol Rev, 2021, 73(3): 924-967.

[5] Niu N, Xu SW, Xu YN, et al. Targeting mechanosensitive transcription factors in atherosclerosis[J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40(4): 253-266.

[6] Zhang X, Gao F. Exercise improves vascular health: Role of mitochondria[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 177: 347-359.

[7] Lee YH, Tsai TH, Chen JH, et al. Machine learning of treadmill exercise test to improve selection for testing for coronary artery disease[J]. Atherosclerosis, 2022, 340: 23-27.

[8] Birukov KG. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(7): 1651-1667.

[9] Koller A. Signaling pathways of mechanotransduction in arteriolar endothelium and smooth muscle cells in hypertension[J]. Microcirculation, 2002, 9(4): 277-294.

[10] Douguet D, Patel A, Xu AM, et al. Piezo ion channels in cardiovascular mechanobiology[J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40(12): 956-970.

[11] Shah V, Patel S, Shah J. Emerging role of Piezo ion channels in cardiovascular development[J]. Dev Dyn, 2022, 251(2): 276-286.

[12] Nonomura K, Lukacs V, Sweet DT, et al. Mechanically activated ion channel PIEZO1 is required for lymphatic valve formation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(50): 12817-12822.

[13] Miron TR, Flood ED, Tykocki NR, et al. Identification of Piezo1

channels in perivascular adipose tissue (PVAT) and their potential role in vascular function[J]. Pharmacol Res, 2022, 175: 105995.
[14] Silva H. The vascular effects of isolated isoflavones-a focus on the determinants of blood pressure regulation[J]. Biology (Basel), 2021, 10(1): 49.
[15] Feng Z, Wang CY, Yue, et al. Kaempferol-induced GPER up-regulation attenuates atherosclerosis *via* the PI3K/AKT/Nrf2 pathway[J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 1106-1116.
[16] Sun K, Guo XL, Zhao QD, et al. Paradoxical role of autophagy in the dysplastic and tumor-forming stages of hepatocarcinoma development in rats[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(2): e501.
[17] De Belly H, Paluch EK, Chalut KJ. Interplay between mechanics and signalling in regulating cell fate[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(7): 465-480.
[18] Wu RW, Lian WS, Chen YS, et al. Piezoelectric microvibration mitigates estrogen loss-induced osteoporosis and promotes Piezo1, MicroRNA-29a, and Wnt3a signaling in osteoblasts[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9476.
[19] Asunción-Alvarez D, Palacios J, Ybañez-Julca RO, et al. Calcium signaling in endothelial and vascular smooth muscle cells: sex differences and the influence of estrogens and androgens[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2024, 326(4): H950-H970.
[20] Daugherty A, Puré E, Delfel-Butteiger D, et al. The effects of total lymphocyte deficiency on the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice[J]. J Clin Invest, 1997, 100(6): 1575-1580.
[21] McRobb LS, McGrath KCY, Tsatralis T, et al. Estrogen receptor control of atherosclerotic calcification and smooth muscle cell osteogenic differentiation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(6): 1127-1137.
[22] Benítez-Rangel E, García L, Namorado MC, et al. Ion channel inhibitors block caspase activation by mechanisms other than restoring intracellular potassium concentration[J]. Cell Death Dis, 2011, 2(1): e113.
[23] Naik R, Won M, Kim BK, et al. Synthesis and structure-activity relationship of (E)-phenoxyacrylic amide derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF) 1α inhibitors[J]. J Med Chem, 2012, 55(23): 10564-10571.
[24] Costarelli L, Giacconi R, Malavolta M, et al. Different transcriptional profiling between senescent and non-senescent human coronary artery endothelial cells (HCAECs) by Omeprazole and Lansoprazole treatment[J]. Biogerontology, 2017, 18(2): 217-236.
[25] Yang Y, Wang DY, Zhang CX, et al. Piezo1 mediates endothelial atherogenic inflammatory responses *via* regulation of YAP/TAZ activation[J]. Hum Cell, 2022, 35(1): 51-62.
[26] Widlansky ME, Hill RB. Mitochondrial regulation of diabetic vascular disease: an emerging opportunity[J]. Transl Res, 2018, 202: 83-98.
[27] Zhang HP, Pang XF, Yu HX, et al. Genistein suppresses ox-LDL-elicited oxidative stress and senescence in HUVECs through the SIRT1-p66shc-Foxo3a pathways[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36(1): e22939.
[28] Lavier J, Beaumann M, Menétrey S, et al. High-intensity exercise in hypoxia improves endothelial function *via* increased nitric oxide bioavailability in C57BL/6 mice[J]. Acta Physiol (Oxf), 2021, 233(2): e13700.
[29] Zemskov EA, Lu Q, Ornatowski W, et al. Biomechanical forces and oxidative stress: implications for pulmonary vascular disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 31(12): 819-842.
[30] Lee DY, Chiu JJ. Atherosclerosis and flow: roles of epigenetic modulation in vascular endothelium[J]. J Biomed Sci, 2019, 26(1): 56.
[31] Tian T, Li JJ, Li YZ, et al. Melatonin enhances sorafenib-induced cytotoxicity in FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells by redox modification[J]. Theranostics, 2019, 9(13): 3768-3779.
[32] Im JH, Lee H, Kim J, et al. Soybean MAPK, GMK1 is dually regulated by phosphatidic acid and hydrogen peroxide and translocated to nucleus during salt stress[J]. Mol Cells, 2012, 34(3): 271-278.
[33] Hernandez I, Fournier T, Chissey A, et al. NADPH oxidase is the major source of placental superoxide in early pregnancy: association with MAPK pathway activation[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 13962.
[34] Joyner MJ, Casey DP. Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs[J]. Physiol Rev, 2015, 95(2): 549-601.
[35] Eisenhoffer GT, Loftus PD, Yoshigi M, et al. Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia[J]. Nature, 2012, 484(7395): 546-549.
[36] Li J, Hou B, Tumova S, et al. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force[J]. Nature, 2014, 515(7526): 279-282.
[37] Rode B, Shi J, Endesh N, et al. Piezo1 channels sense whole body physical activity to reset cardiovascular homeostasis and enhance performance[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 350.
[38] Friedrich EE, Hong ZG, Xiong SQ, et al. Endothelial cell Piezo1 mediates pressure-induced lung vascular hyperpermeability *via* disruption of adherens junctions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(26): 12980-12985.
[39] Albarrán-Juárez J, Iring A, Wang SP, et al. Piezo1 and G_q/G_{11} promote endothelial inflammation depending on flow pattern and integrin activation[J]. J Exp Med, 2018, 215(10): 2655-2672.
[40] Wang Y, Shi RT, Zhai R, et al. Matrix stiffness regulates macrophage polarization in atherosclerosis[J]. Pharmacol Res, 2022, 179: 106236.
[41] Wang SP, Chennupati R, Kaur H, et al. Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release [J]. J Clin Invest, 2016, 126(12): 4527-4536.
[42] Duan XY, Liu RH, Xi Y, et al. The mechanisms of exercise improving cardiovascular function by stimulating Piezo1 and TRP ion channels: a systemic review[J]. Mol Cell Biochem, 2025, 480(1): 119-137.
[43] Tang Y, Zhao CX, Zhuang Y, et al. Mechanosensitive Piezo1 protein as a novel regulator in macrophages and macrophage-mediated inflammatory diseases[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1149336.
[44] Yin Q, Zang GY, Li NN, et al. Agonist-induced Piezo1 activation promote mitochondrial-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2022, 22(1): 287.
[45] Kow LM, Pfaff DW. Rapid estrogen actions on ion channels: A survey in search for mechanisms[J]. Steroids, 2016, 111: 46-53.
[46] Ito S, Suki B, Kume H, et al. Actin cytoskeleton regulates stretch-activated Ca^{2+} influx in human pulmonary microvascular endothelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43(1): 26-34.
[47] Miroshnikova YA, Manet S, Li XP, et al. Calcium signaling mediates a biphasic mechanoadaptive response of endothelial cells to cyclic mechanical stretch[J]. Mol Biol Cell, 2021, 32(18): 1724-1736.

（收稿：2025-04-11；修回：2025-06-17；录用：2025-06-19）
（责任编辑：李青颖）

本文引用格式：
魏敏倩，吴绪波. 机械拉伸通过Piezo1/ESR1信号通路调控缓解动脉粥样硬化的体内外研究[J]. 重庆医科大学学报，2026，51(10)：1462-1471.