

本文引用: 丁立丹, 徐鹏博, 鲍友利, 等. 瓜蒌-薤白对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化过程中 NLRP3 炎症小体活化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(1): 27-35.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-01-0027-09

· 实验研究 ·

瓜蒌-薤白对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化过程中 NLRP3 炎症小体活化的影响

丁立丹, 徐鹏博, 鲍友利, 黄佳静, 吴鸿飞

(安徽中医药大学药学院 中药研究与开发安徽省重点实验室, 安徽省合肥市 230012)

[关键词] 动脉粥样硬化; NLRP3 炎症小体; 瓜蒌-薤白

[摘要] 目的 通过建立 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化(As)模型,探讨 As 病程不同时间点 NOD 样受体热蛋白结构域 3(NLRP3)炎症小体表达水平的变化及瓜蒌-薤白的干预作用。方法 将高脂饲养 6、20、34 周的 ApoE^{-/-}小鼠均随机分为模型组(M1、M2、M3)和给药组[6 g/(kg·d)](GX1、GX2、GX3),每组 10 只;另设 C57BL/6J 小鼠为空白组(C1、C2、C3)。空白组及模型组小鼠给予生理盐水灌胃,给药组小鼠每日给予相应药物灌胃,共 4 周。实验结束后处死小鼠,油红 O 染色评估主动脉斑块面积及形态;HE 染色观察主动脉病理形态学变化;免疫组织化学法检测主动脉 NLRP3 表达;ELISA 法检测血清中白细胞介素 1 β (IL-1 β)和白细胞介素 18(IL-18)水平;Western blot 法检测主动脉组织中 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1(Caspase-1)的蛋白表达;qRT-PCR 检测主动脉组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 的 mRNA 表达。结果 在 As 病程进展过程中,模型组小鼠主动脉脂质累积和斑块面积显著增加,血清中 IL-1 β 和 IL-18 的表达不断升高,NLRP3 和 ASC 的蛋白及 mRNA 的表达均不断上调。Caspase-1 的蛋白表达也呈上升趋势,但 M2 与 M3 组间的比较无统计学差异。与模型组相比,给药组各时间点小鼠主动脉的脂质累积和斑块面积显著减少,血清中 IL-1 β 和 IL-18 的水平降低;主动脉组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白和 mRNA 表达显著下调。结论 NLRP3 炎症小体参与了主动脉 As 的病变过程,瓜蒌-薤白可能通过调节 As 模型小鼠主动脉不同阶段 NLRP3 炎症小体的表达,从而发挥抗 As 的作用。

[中图分类号] R285;R5

[文献标识码] A

Effects of Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus on the activation of NLRP3 inflammasomes in ApoE^{-/-} mice at different stages of atherosclerosis

DING Lidan, XU Pengbo, BAO Youli, HUANG Jiajing, WU Hongfei

(College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine & Anhui Province Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China)

[KEY WORDS] atherosclerosis; NLRP3 inflammasome; Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus

[ABSTRACT] Aim To observe the changes in the expression level of NOD-like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasomes at different stages of the course of atherosclerosis (As) and the intervention effect of Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus through establishment of the model of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. Methods High-fat-fed ApoE^{-/-} mice for 6, 20, 34 weeks were randomly divided into model groups (M1, M2, M3) and medication groups (6g/(kg·d))(GX1, GX2, GX3), 10 mice in each group. C57BL/6 mice were set as blank control group(C1, C2, C3). The mice in the blank control group and the model group were given normal saline by gavage, and the mice in the medication group were given the corresponding drugs by gavage daily for 4 weeks. After the experiment, the mice were sacrificed and the aortic plaque area and morphology were evaluated by oil red O staining. HE staining was used to observe the pathomorphological changes of the aorta. Immunohistochemical method was used to detect NLRP3 ex-

[收稿日期] 2021-04-19

[修回日期] 2021-11-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873038);安徽中医药大学研究生科技创新基金项目(2020ZC10);安徽省高校研究生科研项目(YJS20210488)

[作者简介] 丁立丹,硕士研究生,研究方向为中药心血管药理学,E-mail 为 920206728@qq.com。通信作者吴鸿飞,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为中药心血管药理学,E-mail 为 wuhongfei2009@126.com。

pression in the aorta. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18) in serum were detected by ELISA. Western blot was used to detect the protein expression of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing (ASC), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1) in aortic tissue. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of NLRP3, ASC, Caspase-1 in aortic tissue. **Results** At different stages of the course of As, lipid accumulation and plaque area in aorta of mice were significantly increased in model group, the levels of IL-1 β and IL-18 in serum was continuously increased, and the protein and mRNA expressions of NLRP3 and ASC were continuously up-regulated, the protein expression of Caspase-1 also showed an upward trend, but there was no statistical significance between M2 and M3. Compared with the model group, the lipid accumulation and plaque area in aorta of mice at different stages were significantly decreased in medication group, and the levels of IL-1 β and IL-18 in serum were decreased; The protein and the mRNA expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 in aortic tissues were significantly down-regulated. **Conclusions** NLRP3 inflammasome was involved in the pathological process of aorta As. Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus drug parican regulate the expression of NLRP3 inflammasomes at different stages in the aorta of As model mice, and thus play a role in protecting As.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种炎症和脂质蓄积为主的血管性病变,为众多心血管疾病病理基础^[1]。血管壁炎症反应在 As 病变过程中起重要作用,NLRP3 炎症小体作为炎症反应的核心部分介导 As 发生发展^[2]。NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症小体由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing, ASC)及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (cysteinyl aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)组成。活化的 NLRP3 炎症小体裂解 Caspase-1,释放成熟的白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18)等促炎因子,引发血管的炎症反应^[3]。抑制 NLRP3 炎症小体活化可减轻 As 炎症反应,NLRP3 炎症小体已成为 As 的重要治疗靶点^[4]。但在 ApoE^{-/-}小鼠 As 形成的不同阶段主动脉 NLRP3 炎症小体水平动态变化的研究尚未见全面报道。

中医古籍中无 As 的相关记载,但根据其临床表现及体征,可归属于“眩晕”、“头痛”、“胸痹”等病症^[5]。瓜蒌-薤白载于《金匮要略》治疗“胸痹”的瓜蒌薤白白酒汤、瓜蒌薤白半夏汤等经典方剂中,是用于治疗胸痹证代表方剂中的重要药对。临床实践证明,瓜蒌-薤白方能够有效治疗 As^[6]。

本课题组研究发现,瓜蒌-薤白可减轻 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块形成,显著改善小鼠体内脂质代谢紊乱及炎症反应^[7-8]。但其干预 As 小鼠主动脉炎症反应是否与调控 NLRP3 炎症小体途径有关尚不明确,本课题旨在探索 As 进展不同时间点炎症小体水平的动态变化及瓜蒌-薤白的干预作用,为 As 发病机制及瓜蒌-薤白作用机制提供新的资料参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周的雄性 ApoE^{-/-}小鼠,体质量 18~20 g,共 60 只。同龄具有相同遗传背景的雄性 C57BL/6J 小鼠 30 只。所有动物均购自常州卡文斯实验动物有限公司,许可证号为:SCXK(苏)2016-0010。

1.2 主要试剂与仪器

瓜蒌(批号 180601)、薤白(批号 190201)均购自合肥同仁堂大药房,经安徽中医药大学刘先华高级实验师鉴定,均符合 2015 版《中国药典》要求;称取瓜蒌皮 20 g、薤白 10 g,用 5 倍量的 50% 乙醇浸泡 1 h,80 ℃ 提取回流 2 h,趁热过滤,残渣再用 5 倍量的 50% 乙醇提取回流 2 h,趁热过滤,合并 2 次的滤液,减压浓缩,制备成质量浓度为 0.6 g/mL(相当于原材料)的瓜蒌-薤白药液,参考本课题组前期研究^[8]。

饱和油红 O 染色剂购自北京索莱宝科技有限公司;IL-1 β 、IL-18 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司; β -actin 抗体购自北京中杉金桥;NLRP3、ASC 和 Caspase-1 抗体均购自成都正能生物技术有限责任公司;辣根过氧化物(HRP)标记山羊抗兔二抗免疫球蛋白(Ig)G、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、超敏 ECL 化学发光检测试剂盒、RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒均购自山东思科捷生物技术有限公司。

美菱医用冷藏箱(中科美菱低温科技股份有限公司);D-37520 型低温高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);1500 型式全波长酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);AI-600 型超灵敏多功能显影仪(美国 General Electric 公司);MX3000P

型荧光定量 PCR 仪(美国安捷伦公司)

1.3 动脉粥样硬化小鼠模型建立

采用高脂饮食法建立 As 动物模型,参考本课题组前期研究^[9-10]。60 只 6~8 周龄的 ApoE^{-/-} 雄性小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为 3 组,给予含脂肪 40%、胆固醇 1.25% 的高脂饲料分别喂养 6、20、34 周,作为 As 小鼠主动脉斑块形成不同时间点。另设 30 只 C57BL/6J 小鼠为空白对照组,随机分为 3 组,普通饲料分别喂养 10、24、38 周,为 C1、C2、C3 组。

1.4 分组及给药

按 1.3 项造模后将每个时间点 As 模型小鼠分别随机分为模型组(M 组)和给药组(GX 组),每组 10 只,之后改为普通饲料喂养并给予相应药物灌胃。课题组前期实验结合瓜蒌-薤白临床用量设计瓜蒌-薤白高、中、低剂量组,其中以高剂量组[6 g/(kg·d)]效果最为明显,确定为本次实验给药组给药剂量。所有小鼠均在同时间点同一环境下操作,灌胃相应药物 4 周,给药体积为 10 mL/kg。C57BL/6J 小鼠即空白组(C1、C2、C3)和模型组(M1、M2、M3)小鼠予生理盐水灌胃;给药组(GX1、GX2、GX3)予含 0.6 g/mL 的瓜蒌-薤白药液灌胃。

1.5 油红 O 染色观察主动脉组织斑块面积

体视显微镜下清理小鼠主动脉,显微剪纵向剖开胸主动脉至腹主动脉,并固定于黑色蜡块上,按油红 O 染色试剂盒说明书操作,高分辨率相机采集图像,图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 分析各组主动脉相对斑块面积。

1.6 HE 染色观察主动脉组织病理形态学变化

取各组主动脉组织于 PBS 清洗干净,4% 多聚甲醛中固定保存 48 h 后,脱水、浸蜡、包埋、切片及脱蜡等操作后,行 HE 染色,在光学显微镜下观察病理变化并拍照,图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 分

析各组主动脉斑块面积占比。

1.7 免疫组织化学法检测主动脉组织 NLRP3 蛋白表达

石蜡切片水洗脱蜡,3% 双氧水溶液消除切片内源性过氧化物酶后血清封闭,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 30 min;DAB 显色后苏木精复染,脱水封片,光学显微镜下观察并拍照,用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 进行分析。

1.8 ELISA 法检测血清中 IL-1 β 和 IL-18 水平

ApoE^{-/-} 小鼠摘眼球取血,于 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min,收集上清,按 ELISA 试剂盒说明书操作,于 450 nm 波长处检测血清中 IL-1 β 和 IL-18 水平。

1.9 Western blot 检测主动脉组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 的蛋白表达

称取适量主动脉组织,用预冷的 PBS 洗 3 次,提取组织蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。取 10 μ g 蛋白经 SDS-PAGE 电泳,湿法转膜,5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h,PBST 摇床洗 3 次,加一抗 4 °C 过夜;PBST 摇床洗 3 次,二抗室温封闭 2 h,PBST 摇床洗 3 次;ECL 显色,置超灵敏多功能成像仪中检测,图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 进行灰度值分析。

1.10 qRT-PCR 检测主动脉组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 的 mRNA 表达

按 RNA 提取试剂盒说明书提取小鼠主动脉中的 RNA,得纯度较高的总 RNA;反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA;加入表 1 中引物进行扩增,扩增条件为 94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 20 s,55 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环;以 β -actin 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 的相对表达量。引物由上海生工生物有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequence

基因	正向引物序列	反向引物序列
NLRP3	5'-CCGTCTACGTCTTCTTCCTTTC-3'	5'-CGCAGATCACACTCCTCAAATA-3'
ASC	5'-ACCAGCCAAGACAAGATGAG-3'	5'-CCATCACCAAGTAGGGATGTATT-3'
Caspase-1	5'-TACACGTCTTGCCCTCATTATC-3'	5'-CTCCAGCAGCAACTTCATTTC-3'
β -actin	5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3'	5'-ATGTCACGCACGATTTCC-3'

1.11 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件进行实验数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差

分析(one way classification ANOVA),两组间比较方差齐性采用 LSD-t 检验,方差不齐时采用 Dunnett-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ApoE^{-/-}小鼠不同时间点主动脉斑块面积变化

油红 O 染色结果显示, C1 组小鼠主动脉相对斑块面积占比为 0.31%, M1 组小鼠主动脉相对斑块面积占比为 17.63%, 增加约 17.32 个百分点 ($P <$

0.01); M2 组相对斑块面积占比为 35.70%, 比 C1 组增加约 35.39 个百分点 ($P <$ 0.01), 比 M1 组增加约 18.07 个百分点 ($P <$ 0.01); M3 组主动脉多处出现斑块, 斑块面积占比为 67.28%, 比 C1 组增加约 66.97 个百分点 ($P <$ 0.01), 比 M2 组增加约 32.21 个百分点 ($P <$ 0.01; 图 1)。

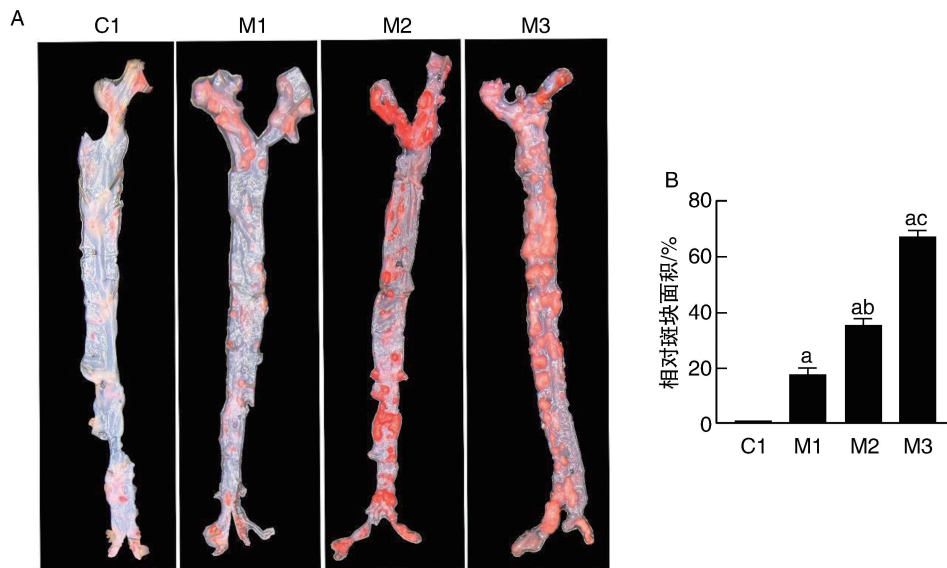


图 1. ApoE^{-/-}小鼠不同时间点主动脉斑块面积变化 ($n=3$)

A 为主动脉大体油红 O 染色; B 为主动脉大体油红 O 染色相对斑块面积统计结果。

a 为 $P <$ 0.01, 与 C1 组比较; b 为 $P <$ 0.01, 与 M1 组比较; c 为 $P <$ 0.01, 与 M2 组比较。

Figure 1. Changes of aortic plaque area at different stages of As in ApoE^{-/-} mice ($n=3$)

2.2 瓜蒌-薤白对 ApoE^{-/-}小鼠不同时间点主动脉组织病理形态学的影响

HE 染色结果显示, C1 组小鼠主动脉斑块面积占比为 0.41%, M1 组斑块面积占比为 12.12%, 比 C1 组增加约 11.71 个百分点 ($P <$ 0.01); GX1 组斑块面积占比为 3.33%, 比 C1 组增加约 2.92 个百分点 ($P <$ 0.05), 比 M1 组减少约 8.79 个百分点 ($P <$ 0.01; 图 2)。

C2 组小鼠主动脉弓处斑块面积占比为 0.77%, M2 组主动脉病变向管腔内突出, 斑块面积占比为 21.33%, 比 C2 组增加约 20.56 个百分点 ($P <$ 0.01); GX2 组斑块面积占比为 5.31%, 比 C2 组增加约 4.54 个百分点 ($P <$ 0.05), 比 M2 组减少约 16.02 个百分点 ($P <$ 0.01; 图 2)。

C3 组小鼠主动脉斑块面积占比为 0.87%, M3 组斑块面积占比为 38.25%, 比 C3 组增加约 37.38 个百分点 ($P <$ 0.01); GX3 组斑块面积占比为 32.67%, 比 C3 组增加约 31.80 个百分点 ($P <$ 0.01), 比 M3 组减少约 5.58 个百分点 ($P <$ 0.05; 图

2)。表明瓜蒌-薤白对 As 小鼠发生发展具有明显的抑制效果。

2.3 瓜蒌-薤白对 ApoE^{-/-}小鼠不同时间点主动脉组织中 NLRP3 表达的影响

C1 组小鼠主动脉 NLRP3 相对表达量 (棕色) 为 1.06%, M1 组 NLRP3 相对表达量为 7.60%, 比 C1 组增加约 6.54 个百分点 ($P <$ 0.01); GX1 组 NLRP3 相对表达量为 5.20%, 比 C1 组增加约 4.14 个百分点 ($P <$ 0.01), 比 M1 组减少约 2.40 个百分点 ($P <$ 0.05; 图 3)。

C2 组小鼠主动脉 NLRP3 相对表达量为 1.11%, M2 组 NLRP3 相对表达量为 15.42%, 比 C2 组增加约 14.31 个百分点 ($P <$ 0.01); GX2 组 NLRP3 相对表达量为 12.60%, 比 C2 组增加约 11.49 个百分点 ($P <$ 0.01), 比 M2 组减少约 2.82 个百分点 ($P <$ 0.05; 图 3)。

C3 组小鼠主动脉 NLRP3 相对表达量为 1.13%, M3 组 NLRP3 相对表达量为 21.11%, 比 C3 组增加约 19.98 个百分点 ($P <$ 0.05); GX3 组 NLRP3 相对

表达量为 13.32%, 比 C3 组增加约 12.19 个百分点 ($P < 0.01$), 比 M3 组减少约 7.79 个百分点 ($P <$

0.05; 图 3)。表明瓜蒌-薤白可减少不同时间点 As 小鼠主动脉内 NLRP3 的表达。

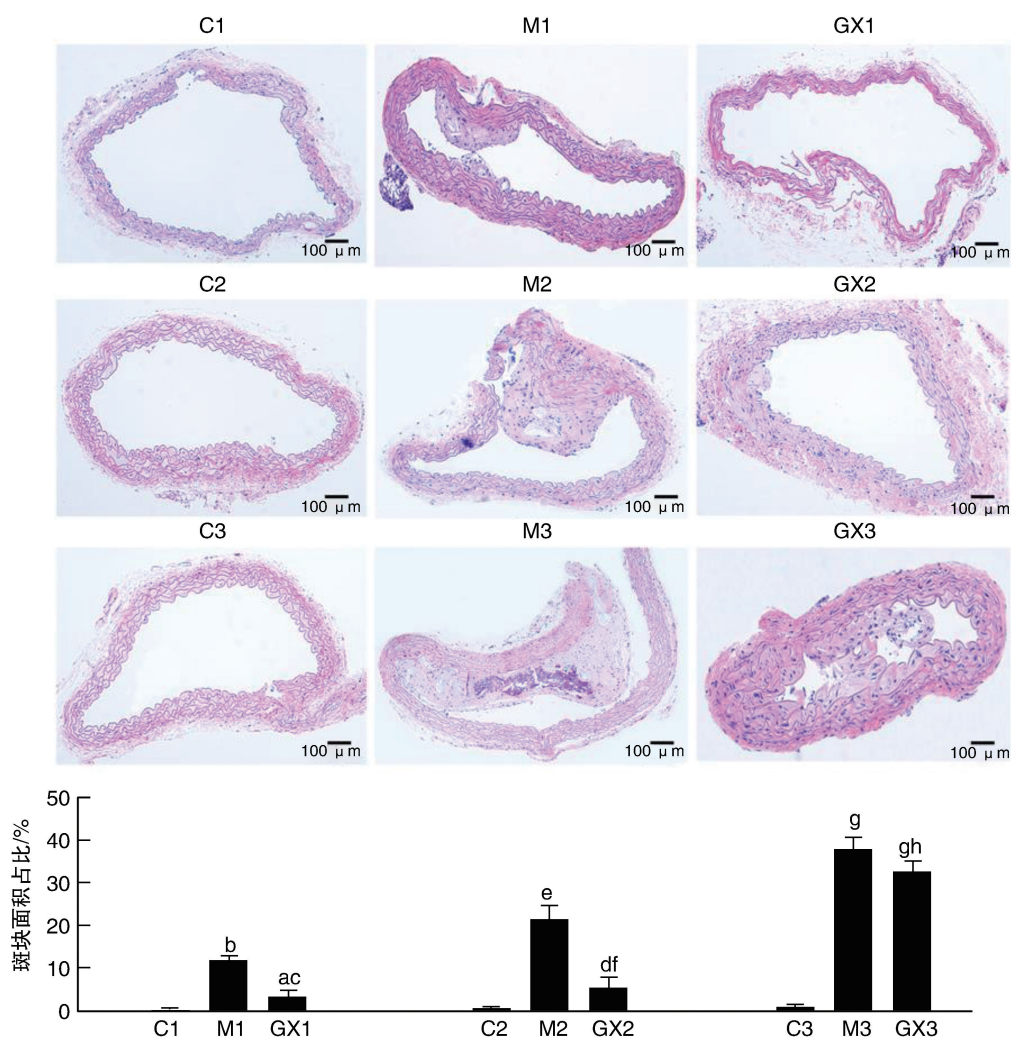


图 2. 瓜蒌-薤白对不同阶段 $ApoE^{-/-}$ 小鼠主动脉组织病理形态学的影响 ($n=3$)

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 C1 组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 M1 组比较; d 为 $P < 0.05$, e 为 $P < 0.01$, 与 C2 组比较; f 为 $P < 0.01$, 与 M2 组比较; g 为 $P < 0.01$, 与 C3 组比较; h 为 $P < 0.05$, 与 M3 组比较。

Figure 2. The effect of *Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbuson* the pathological morphology of the aorta of $ApoE^{-/-}$ mice at different stages ($n=3$)

2.4 瓜蒌-薤白对小鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 水平的影响

与 C1 组相比, M1 组小鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 水平分别增加 198.27% 和 189.59% ($P < 0.01$), GX1 组分别增加 130.06% ($P < 0.01$)、113.79% ($P < 0.05$); 与 M1 组比较, GX1 组血清 IL-1 β 和 IL-18 水平分别减少 22.87% ($P < 0.01$)、26.17% ($P < 0.05$; 表 2)。

与 C2 组小鼠相比, M2 组小鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 水平分别增加 288.25%、264.32% ($P < 0.01$), GX2 组分别增加 203.34%、117.66% ($P < 0.01$); 与 M2 组比较, GX2 组小鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 水平分别减少 21.87% ($P < 0.01$)、40.25% ($P < 0.05$; 表 2)。

与 C3 组小鼠相比, M3 组小鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 水平分别增加 257.33%、339.42% ($P < 0.01$), GX3 组分别增加 128.06% ($P < 0.01$)、125.33% ($P < 0.05$); 与 M3 组比较, GX3 组小鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 水平分别减少 36.17%、48.72% ($P < 0.01$; 表 2)。表明瓜蒌-薤白可显著减少不同时间点 As 小鼠血清炎症因子水平。

与 M1 组比较, M2 组小鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 水平分别增加 17.91%、22.31% ($P < 0.05$), M3 组分别增加 33.34%、41.67% ($P < 0.05$); 与 M2 组比较, M3 组小鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 水平分别增加 13.09%、15.83% ($P < 0.05$; 表 2)。

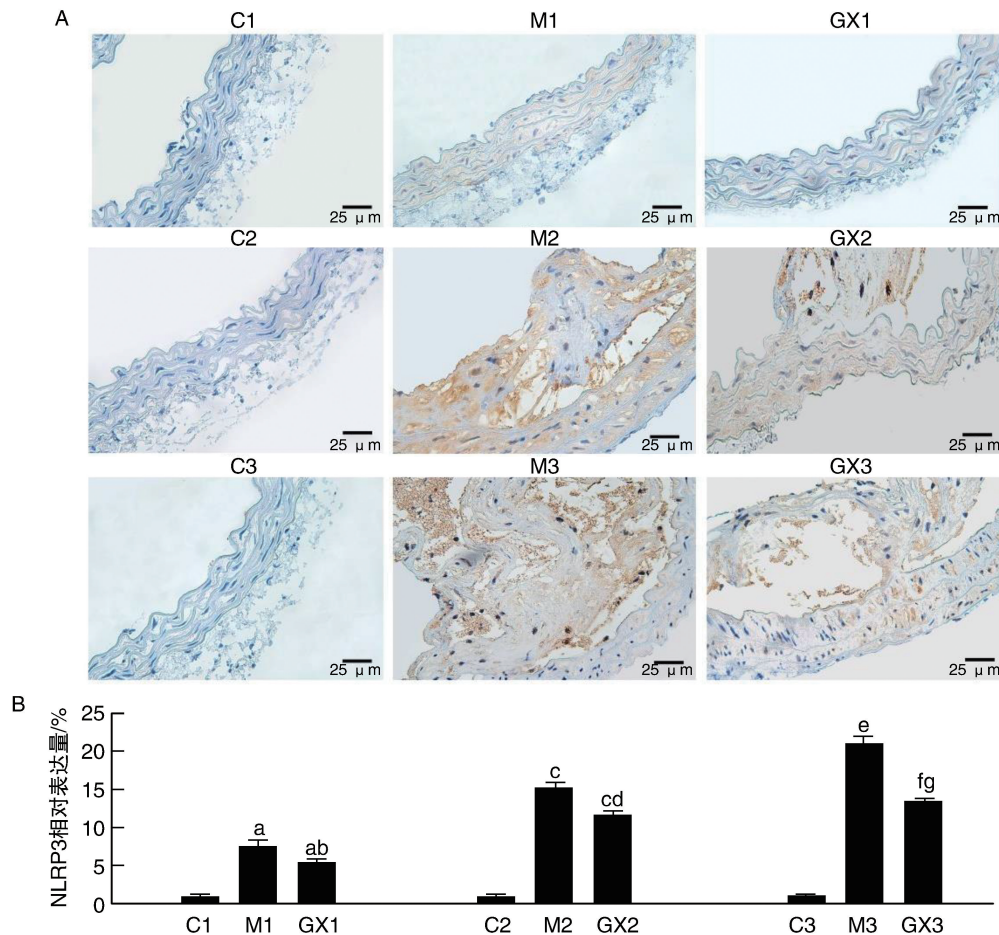


图 3. 瓜蒌-薤白对 $ApoE^{-/-}$ 小鼠不同时间点主动脉组织中 NLRP3 表达的影响 ($n=3$)

A 为主动脉 NLRP3 免疫组织化学染色, B 为主动脉 NLRP3 免疫组织化学染色相对表达量统计结果。

a 为 $P<0.01$, 与 C1 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 M1 组比较; c 为 $P<0.01$, 与 C2 组比较; d 为 $P<0.05$, 与 M2 组比较; e 为 $P<0.05$, f 为 $P<0.01$, 与 C3 组比较; g 为 $P<0.05$, 与 M3 组比较。

Figure 3. The effect of Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus on the expression of NLRP3 in the aorta of $ApoE^{-/-}$ mice at different stages ($n=3$)

表 2. 瓜蒌-薤白对不同时间点 $ApoE^{-/-}$ 小鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 水平的影响 ($n=5$)

Table 2. The effect of Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus on the levels of IL-1 β and IL-18 in $ApoE^{-/-}$ mice at different stages ($n=5$) 单位: ng/L

分组	IL-1 β	IL-18
C1 组	25.48 \pm 5.48	38.14 \pm 18.66
M1 组	76.00 \pm 4.01 ^b	110.45 \pm 12.19 ^b
GX1 组	58.62 \pm 11.56 ^{bd}	81.54 \pm 20.91 ^{ac}
C2 组	23.08 \pm 8.95	37.08 \pm 8.33
M2 组	89.61 \pm 5.22 ^{ce}	135.09 \pm 17.53 ^{ce}
GX2 组	70.01 \pm 7.39 ^{eg}	80.71 \pm 23.78 ^{ef}
C3 组	28.36 \pm 3.66	35.61 \pm 14.39
M3 组	101.34 \pm 11.58 ^{efi}	156.48 \pm 6.60 ^{efi}
GX3 组	64.68 \pm 11.81 ^{ij}	80.24 \pm 15.57 ^{hij}

注: a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 C1 组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 M1 组比较; e 为 $P<0.01$, 与 C2 组比较; f 为 $P<0.05$, g 为 $P<0.01$, 与 M2 组比较; h 为 $P<0.05$, i 为 $P<0.01$, 与 C3 组比较; j 为 $P<0.01$, 与 M3 组比较。

2.5 瓜蒌-薤白对小鼠主动脉组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达的影响

与 C1 组相比, M1 组小鼠主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达分别增加 61.25%、100%、72.86% ($P<0.01$), GX1 组分别增加约 31.79% ($P<0.01$)、38.97% ($P<0.05$)、27.03% ($P<0.05$); 与 M1 组比较, GX1 组主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达分别减少 18.60% ($P<0.01$)、30.43% ($P<0.01$)、25.83% ($P<0.05$); 图 4)。

与 C2 组相比, M2 组小鼠主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达分别增加 51.70%、37.59%、55.49% ($P<0.01$), GX2 组分别增加 31.68%、12.26%、26.42% ($P<0.05$); 与 M2 组比较, GX2 组主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达分别减少 15.73% ($P<0.05$)、18.03% ($P<0.01$)、18.50% ($P<0.05$); 图 4)。

与 C3 组相比, M3 组小鼠主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达分别增加 91.95%、50.82%、65.97% ($P < 0.01$), GX3 组分别增加 58.61% ($P < 0.01$)、14.21% ($P < 0.05$)、21.94% ($P < 0.05$); 与 M3 组比较, GX3 组主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达分别减少 17.48% ($P < 0.05$)、24.28% ($P < 0.01$)、26.36% ($P < 0.05$; 图 4)。

与 M1 组比较, M2 组小鼠主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达分别增加 106.98%、60.53%、110.74% ($P < 0.01$), M3 组分别增加 122.53%、141.41%、97.79% ($P < 0.01$); 与 M2 组比较, M3 组主动脉 NLRP3、ASC 蛋白表达分别增加 7.12%、50.82% ($P < 0.05$), 但 Caspase-1 蛋白的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 4)。

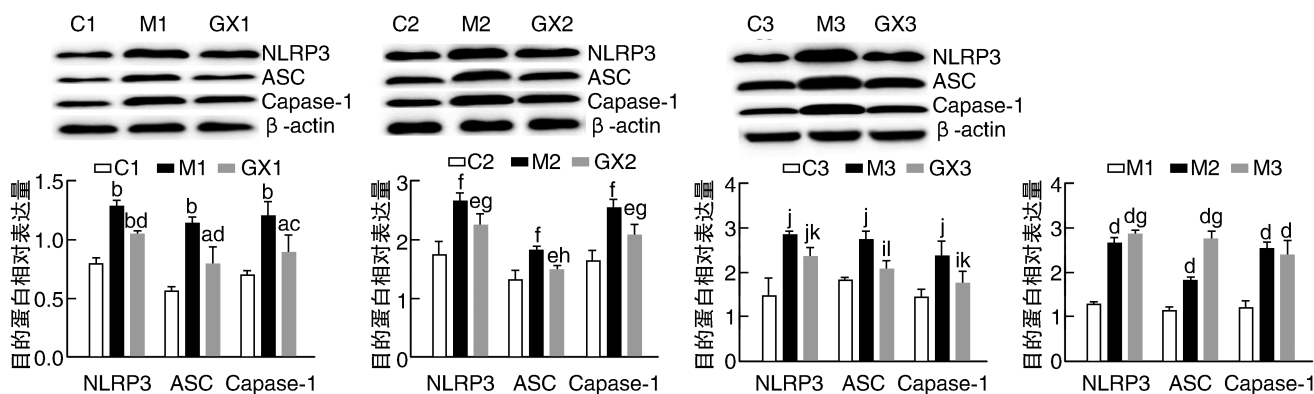


图 4. 瓜蒌-薤白对不同时间点小鼠主动脉组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达的影响 ($n=5$)

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 C1 组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 M1 组比较; e 为 $P < 0.05$, f 为 $P < 0.01$, 与 C2 组比较; g 为 $P < 0.05$, h 为 $P < 0.01$, 与 M2 组比较; i 为 $P < 0.05$, j 为 $P < 0.01$, 与 C3 组比较; k 为 $P < 0.05$, l 为 $P < 0.01$, 与 M3 组比较。

Figure 4. The effect of Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus on the expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 protein at different stages ($n=5$)

2.6 瓜蒌-薤白对小鼠主动脉组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA 表达的影响

与 C1 组相比, M1 组小鼠主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 的 mRNA 表达分别增加 117.33%、108.31%、96.34% ($P < 0.05$), GX1 组分别增加 45.67%、25.72%、53.67% ($P < 0.05$); 与 M1 组比较, GX1 组主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 的 mRNA 表达分别减少 32.97%、39.68%、21.73% ($P < 0.05$; 图 5)。

与 C2 组相比, M2 组小鼠主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 的 mRNA 表达分别增加 155.01%、146.30%、154.03% ($P < 0.01$), GX2 组分别增加 53.67% ($P < 0.05$)、87.67% ($P < 0.01$)、49.33% ($P < 0.01$); 与 M2 组比较, GX2 组主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 的 mRNA 表达分别减少 39.74% ($P < 0.05$)、23.81% ($P < 0.01$)、41.21% ($P < 0.01$; 图 5)。

与 C3 组相比, M3 组小鼠主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 的 mRNA 表达分别增加 195.67%、204.68%、154.76% ($P < 0.01$), GX3 组分别增加 68.67% ($P < 0.05$)、43.33% ($P < 0.05$)、50.33% ($P < 0.01$); 与 M3 组比较, GX3 组主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 的 mRNA 表达分别减少 42.95%、52.96%、40.97%

($P < 0.01$; 图 5)。

与 M1 组比较, M2 组主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1 的 mRNA 表达分别增加 17.33% ($P < 0.05$)、18.24% ($P < 0.05$)、29.37% ($P < 0.01$), M3 组分别增加 36.05%、46.24%、29.72% ($P < 0.01$); 与 M2 组比较, M3 组主动脉 NLRP3、ASC 的 mRNA 表达分别增加 15.94% ($P < 0.05$)、23.68% ($P < 0.01$), 但 Caspase-1 的 mRNA 表达的差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 5)。

3 讨论

As 是一种复杂的慢性炎症性病变, 动脉壁炎症反应贯穿于 As 起始、进展及斑块破裂血栓形成的全过程^[11]。As 炎症反应中涉及多种炎症因子及炎症小体, 其中 NLRP3 炎症小体为目前研究最多、最具代表性的炎症小体^[12]。因此, 补充 ApoE^{-/-} 小鼠 As 形成的不同阶段主动脉 NLRP3 炎症小体水平动态对于阐明 As 发病机制至关重要。研究表明, NLRP3 炎症小体的激活受三磷酸腺苷、活性氧、胆固醇结晶、氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein)

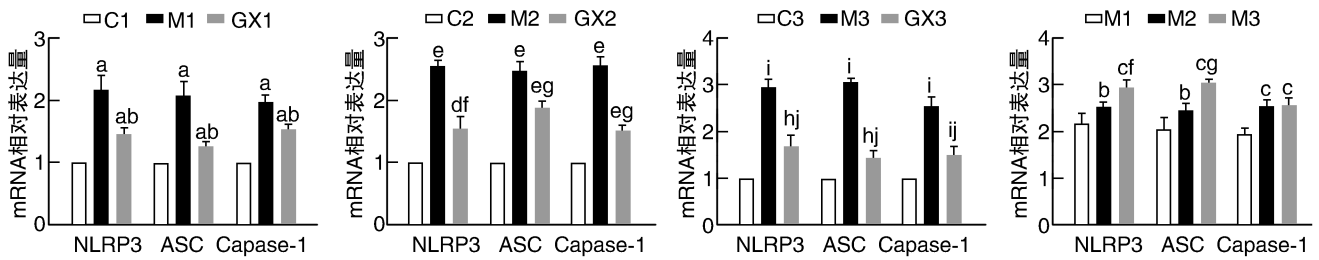


图5. 瓜蒌-薤白对不同阶段 NLRP3、ASC、Caspase-1 的 mRNA 表达的影响($n=5$)

a 为 $P<0.05$, 与 C1 组比较; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与 M1 组比较; d 为 $P<0.05$, e 为 $P<0.01$, 与 C2 组比较; f 为 $P<0.05$, g 为 $P<0.01$, 与 M2 组比较; h 为 $P<0.05$, i 为 $P<0.01$, 与 C3 组比较; j 为 $P<0.01$, 与 M3 组比较。

Figure 5. The effect of *Trichosanthis Fructus-Allii Macrostemonis Bulbus* on the mRNA expression of NLRP3, ASC, and Caspase-1 at different stages ($n=5$)

proteins, ox-LDL) 等因素的触发^[13]。本实验中高脂饲养及 ApoE 基因缺陷导致 As 小鼠主动脉内 NLRP3 炎症小体的活化, 可能与 As 小鼠体内脂质代谢紊乱, 过量的脂质如胆固醇结晶、ox-LDL 等通过影响细胞内钾外流、溶酶体破裂后释放的组织蛋白酶等机制^[14], 激活血管内 NLRP3 炎症小体, 增强血管炎症反应有关^[15]。当激活信号存在时, NLRP3 中的热蛋白结构域 (pyrin domain, PYD) 可与 ASC 中的 PYD 结合, 通过 Caspase 募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD) 相互作用与含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 前体 (precursor cysteinyl aspartate specific proteinase-1, pro-Caspase-1) 结合, 促进 pro-Caspase-1 自催化激活形成活性 Caspase-1^[16]。在 As 小鼠前两个阶段, 主动脉壁 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 表达显著增加, 表明 NLRP3 炎症小体活化贯穿于 As 小鼠主动脉的斑块形成与发展过程中。但 As 后期 (M3 组), Caspase-1 蛋白及 mRNA 的表达水平无显著变化, 可能与 Caspase-12 和 COP (card-only proteins) 等蛋白通过 CARD 相互作用抑制 ASC 与 Caspase-1 的结合, 进而抑制 Caspase-1 的活性表达有关^[17], 其确切机制值得进一步探讨。活化的 Caspase-1 将进一步切割 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, 促进炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的成熟与分泌^[18]。研究表明人 As 样本斑块内的 IL-1 β 及 IL-18 高表达, 与 As 病变程度呈正相关, 激活 NLRP3 炎症小体释放出 IL-1 β 和 IL-18, 同时又反过来促进 As 斑块破裂^[19]。在本实验中, 与 Caspase-1 活化变化不同, 随着 As 发病时间延长, 血清中 IL-1 β 、IL-18 的水平均持续显著升高, 提示血管内 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 的活化可能是 As 小鼠炎症因子分泌增加的原因之一, 是否有其他炎症机制的参与还有待进一步的研究。

调节 NLRP3 炎症小体活化可减轻 As 炎症反应, 研究表明, 敲除 NLRP3 基因^[20] 或利用 NLRP3 抑制剂^[21], 均能显著减少 ApoE^{-/-} 小鼠整个主动脉及主动脉窦部位的 As 区域面积, NLRP3 炎症小体已成为 As 的重要治疗靶点。课题组前期研究发现, 瓜蒌-薤白提取物主要有槲皮素、芹菜素、山奈酚、腺苷、薤白苷 A 等 43 个化合物^[22], 通过降低炎症反应、调节胆固醇稳态、抑制血管平滑肌细胞增殖等途径, 发挥抗 As 的作用^[8,23]。有研究报道, 槲皮素可抑制 NLRP3 炎症小体活化, 减少胆固醇晶体诱导的 IL-1 β 分泌, 抑制巨噬细胞炎症反应, 显著减少 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块面积^[24]。芹菜素减少由氧化三甲胺引起的黏附分子表达增加及 NLRP3 炎症小体活化, 改善内皮功能, 抑制 As 斑块形成^[25]。山奈酚可抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 下调尿酸钠诱导的 IL-1 β 水平, 抑制 THP-1 细胞炎症反应, 也可以抑制 NLRP3 炎症小体复合物中 ASC 的寡聚化并下调 pro-IL-1 β 水平, 减轻与 NLRP3 炎症小体激活相关的炎症反应^[26]。提示瓜蒌-薤白抑制血管 NLRP3 炎症小体活化, 减轻血管炎症反应可能与槲皮素、芹菜素、山奈酚等活性成分有关。

综上所述, NLRP3 炎症小体参与 As 的进程。瓜蒌-薤白对 ApoE^{-/-} 小鼠 As 病变的发展具有抑制作用, 其机制可能与抑制 NLRP3 炎症小体活化、下调 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白及 mRNA 的表达、降低血清 IL-1 β 、IL-18 的水平, 以及抑制血管炎症反应有关。本文从调控 NLRP3 炎症小体角度出发, 探索瓜蒌-薤白降低 As 小鼠主动脉炎症反应相关机制, 为瓜蒌-薤白类方临床应用提供参考。

[参考文献]

- [1] 解静, 程琦, 刘映佳, 等. NLRP3 炎症小体在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. 天津中医药, 2020, 37

- (4): 469-474.
- [2] DUEWELL P, KONO H, RAYNER K J, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [3] CHEN L, YAO Q, XU S, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome attenuates foam cell formation of THP-1 macrophages by suppressing ox-LDL uptake and promoting cholesterol efflux[J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2018, 495(1): 382-387.
- [4] HOSEINI Z, SEPAHVAND F, RASHIDI B, et al. NLRP3 inflammasome: its regulation and involvement in atherosclerosis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 2116-2132.
- [5] 张艺嘉, 樊珂, 崔小数, 等. 中医药治疗动脉粥样硬化临床研究进展[J]. *中医学报*, 2020, 35(9): 1908-1912.
- [6] 刘德全, 黄芳, 田广宇. 基于关联规则的国医大师运用瓜蒌-薤白药对治疗胸痹心痛病的配伍研究[J]. *湖北中医药大学学报*, 2021, 23(2): 108-111.
- [7] 黄翰文, 刘雅蓉, 施晓艳, 等. 基于血管平滑肌自噬探讨瓜蒌-薤白对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块形成的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(6): 23-29.
- [8] 徐鹏博, 丁立丹, 仇静文, 等. 基于肝脏代谢组学研究“瓜蒌-薤白”对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(20): 5320-5329.
- [9] WU H, SONG A, HU W, et al. The anti-atherosclerotic effect of paeonol against vascular smooth muscle cell proliferation by up-regulation of autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 8: 948.
- [10] SONG A W, WU H F, DAI M. Paeonol attenuates progression of atherosclerotic lesion formation through lipid regulation, anti-inflammatory and antioxidant activities[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2018, 27(8): 565-575.
- [11] 范骏, 陶蓉, 张瑞岩, 等. 炎症反应在易损斑块中的作用及其机制研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(4): 301-306.
- [12] 赵战芝, 姜志胜. 我国动脉粥样硬化基础研究几个热点领域的新进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(8): 645-654.
- [13] 池天鹤, 孙经武, 康文, 等. NLRP3 炎症小体与动脉粥样硬化相关性研究进展[J]. *中国全科医学*, 2018, 21(17): 2138-2142.
- [14] CLEMENT M, CHEN X, CHENOWETH H L, et al. MARK4 (microtubule affinity-regulating kinase 4)-dependent inflammasome activation promotes atherosclerosis-brief report[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(8): 1645-1651.
- [15] KARASAWA T, TAKAHASHI M. Role of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2017, 24(5): 443-451.
- [16] MEZZAROMA E, ABBATE A, TOLDO S. NLRP3 inflammasome inhibitors in cardiovascular diseases[J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 976.
- [17] 秦颖, 赵伟. NLRP3 炎症小体的负向调控机制[J]. *中国科学: 生命科学*, 2018, 48(11): 1187-1196.
- [18] MORETTI J, BLANDER J M. Increasing complexity of NLRP3 inflammasome regulation[J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 109(3): 561-571.
- [19] KEPING Y, YUNFENG S, PENGZHUO X, et al. Sestrin1 inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced activation of NLRP3 inflammasome in macrophages in a murine atherosclerosis model[J]. *Eur J Immunol*, 2020, 50(8): 1154-1166.
- [20] ABDERRAZAK A, COUCHIE D, MAHMOOD D F, et al. Anti-inflammatory and antiatherogenic effects of the NLRP3 inflammasome inhibitor arglabin in ApoE2. Ki mice fed a high-fat diet[J]. *Circulation*, 2015, 131(12): 1061-1070.
- [21] VAN DER HEIJDEN T, KRITIKOU E, VENEMA W, et al. NLRP3 inflammasome inhibition by MCC950 reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice-brief report[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(8): 1457-1461.
- [22] 钟华. 基于 HPLC-Q-TOF-MSE 技术与网络药理学研究瓜蒌-薤白药对抗动脉粥样硬化作用机制[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- [23] 钟华, 仇静文, 吴鸿飞, 等. 基于网络药理学研究瓜蒌-薤白药对抗高脂血症作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(18): 154-165.
- [24] LARA-GUZMAN O J, TABARES-GUEVARA J H, LEON-VARELA Y M, et al. Proatherogenic macrophage activities are targeted by the flavonoid quercetin[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 343(2): 296-306.
- [25] YAMAGATA K, HASHIGUCHI K, YAMAMOTO H, et al. Dietary apigenin reduces induction of LOX-1 and NLRP3 expression, leukocyte adhesion, and acetylated low-density lipoprotein uptake in human endothelial cells exposed to Trimethylamine-N-Oxide[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 74(6): 558-565.
- [26] LIM H, MIN D S, PARK H, et al. Flavonoids interfere with NLRP3 inflammasome activation[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 355: 93-102.

(此文编辑 许雪梅)