

本文引用: 张丽阳, 孙军, 陈迪, 等. 苦龙胆酯苷拮抗高脂饮食所致的小鼠动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(5): 399-403. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.05.005.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-05-0399-05

· 实验研究 ·

苦龙胆酯苷拮抗高脂饮食所致的小鼠动脉粥样硬化

张丽阳, 孙军, 陈迪, 张在行

(南阳市中心医院神经内科, 河南省南阳市 473000)

[摘要] **[目的]** 探究苦龙胆酯苷(MAG)对高脂饮食(HFD)所致动脉粥样硬化的拮抗作用及其机制。**[方法]** 将30只ApoE^{-/-}小鼠随机分为对照组(正常饮食)、HFD组、HFD+MAG组,每组10只小鼠,其中HFD+MAG组每日予50 mg/kg MAG灌胃,持续12周。生物化学检测仪测定血脂水平;油红O染色观察主动脉斑块沉积情况;苏木精-伊红(HE)染色观察主动脉血管病理形态表现;Mac-3免疫组织化学染色观察主动脉巨噬细胞聚集情况;免疫荧光定位染色观察NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)表达与分布;Western blot检测主动脉中NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和Caspase-1亚基p20表达水平。**[结果]** HFD+MAG组血清甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平分别降低至HFD组的88.39%、74.85%和64.97%(均 $P<0.05$),高密度脂蛋白胆固醇水平升高至HFD组的142.18%($P<0.05$),斑块面积减少至HFD组的45.16%($P<0.05$),MAG能改善主动脉病理形态表现,使巨噬细胞沉积减少,斑块内NLRP3阳性巨噬细胞比例降低,主动脉中NLRP3、ASC和Caspase-1亚基p20表达分别降低至HFD组的45.58%、53.28%和42.35%(均 $P<0.05$)。**[结论]** MAG对高脂饮食所致ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化有明显的拮抗作用,其机制可能与其抑制斑块内巨噬细胞NLRP3炎症小体的激活有关。**[关键词]** 苦龙胆酯苷; 动脉粥样硬化; 高脂饮食; NLRP3炎症小体

[中图分类号] R54;R966

[文献标识码] A

Amarogentin antagonizes atherosclerosis induced by high fat diet in mice

ZHANG Liyang, SUN Jun, CHEN Di, ZHANG Zaihang

(Department of Neurology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473000, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the antagonistic effect and mechanism of amarogentin (MAG) on atherosclerosis induced by high fat diet (HFD) in mice. **Methods** Thirty ApoE^{-/-} mice were randomly divided into control group (normal diet), HFD group and HFD+MAG group, with 10 mice in each group. HFD+MAG group was given 50 mg/kg MAG daily for 12 weeks. Blood lipid level was measured by biochemical detector. The deposition of plaque in aorta was observed by oil red O staining. The pathological morphology of aorta was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Mac-3 immunohistochemistry was used to observe the aggregation of macrophages in aorta. The expression and distribution of NOD-like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3) were observed by immunofluorescence location staining. The expression levels of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and Caspase-1 subunit p20 in aorta were detected by Western blot. **Results** The levels of triglyceride, total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol in HFD+MAG group were respectively decreased to 88.39%, 74.85% and 64.97% of HFD group ($P<0.05$), and the level of high-density lipoprotein cholesterol was increased to 142.18% of HFD group ($P<0.05$), the plaque area was reduced to 45.16% of HFD group ($P<0.05$), the pathological morphology of aorta was improved, macrophage deposition and the proportion of NLRP3 positive macrophages in plaque was reduced, and the expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 subunit p20 in aorta were respectively decreased to 45.58%, 53.28% and 42.35% of HFD group ($P<0.05$). **Conclusion** MAG has significant antagonistic effects on atherosclerosis mice induced by high fat diet, which may be related to the inhibition of NLRP3 inflammasome activation of macrophages in plaques.

[KEY WORDS] amarogentin; atherosclerosis; highfat diet; NLRP3 inflammasome

[收稿日期] 2022-06-28

[修回日期] 2022-10-12

[基金项目] 河南省科学技术厅项目(192102310349)

[作者简介] 张丽阳, 硕士, 主治医师, 研究方向为脂代谢与心脑血管疾病的防治, E-mail: zhangliyang855@tom.com。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)不仅是冠心病、心肌梗死和中风等心血管疾病发病的主要原因,并且还可能继发斑块破裂和血栓脱落进而造成急性心血管事件^[1]。目前,尽管对As的防治能力已经得到很大提高,但其效果仍不完全令人满意^[2]。因此,寻找其他防治As的药物仍十分必要。

苦龙胆酯苷(amarogentin, MAG)是一种存在于龙胆科植物中的裂环烯醚萜苷类化合物。现代药理学证明,MAG具有抗癌、抗炎、改善胰岛素抵抗和糖代谢等作用^[3-5]。且已有研究表明,MAG能抑制血小板源生长因子BB诱导的血管平滑肌细胞增殖^[6]以及改善糖尿病模型小鼠的脂代谢^[7],据此推测MAG可能在抗As进程中扮演重要角色。本研究通过构建高脂饮食诱导的动脉粥样硬化小鼠模型,观察MAG对As的影响并分析其相关机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

MAG(纯度 $\geq 98\%$,货号:K-027,成都瑞芬思生物科技有限公司);甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDLC)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司);小鼠白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司);油红O染色试剂盒、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒、Alexa Fluor 488或Alexa Fluor 647或辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔IgG(北京索莱宝生物科技有限公司);Mac-3、CD68和NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3)抗体(英国Abcam公司);凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、Caspase-1亚基p20(Caspase-1 subunit p20, Caspase-1 p20)和GAPDH抗体(美国Bioworld公司);SP法免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 实验动物与分组

30只雄性SPF级载脂蛋白E基因敲除(apolipoprotein E-knockout, ApoE^{-/-})小鼠(6~7周龄,18~21g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将小鼠饲养在恒湿恒温控制的动物饲养房[湿

度:60%,温度:(25 \pm 2)℃],控制照明(12h明暗周期),小鼠可自由获取食物和水。该研究过程符合《实验动物护理和使用指南》。将小鼠随机分为3组(每组10只):对照组、高脂饮食组(high fat diet, HFD)和HFD+MAG组。对照组小鼠喂食正常饲料,HFD组及HFD+MAG组喂食高脂肪饮食(含10%猪油、1%胆固醇、0.2%胆盐、10%蛋黄粉和78.8%正常饲料),其中HFD+MAG组另外每日予50mg/kg MAG灌胃(MAG的剂量参考文献^[8-9]),时间持续12周。

1.3 试剂盒法测定血脂水平

12周后,小鼠禁食6h,采集尾静脉血,离心分离血清。按照试剂盒制造商的说明,利用生物化学检测仪测定各组小鼠血脂水平。

1.4 ELISA法检测血清IL- 1β 水平

取血清,按照试剂盒制造商的说明,用ELISA法测定各组小鼠血清IL- 1β 水平。

1.5 油红O染色检测As斑块面积

小鼠安乐死后,立即剖开腹腔与胸腔,用预冷的PBS灌流后,取整个主动脉并将其平钉在黑色胶平板上,用4%多聚甲醛固定后,按照试剂盒说明进行油红O染色。使用Image J软件对斑块(油红O染色)面积进行量化。

1.6 HE染色观察主动脉组织形态表现

取小鼠主动脉弓,用4%甲醛固定72h,然后,对样品进行常规处理和石蜡包埋。从左心室和主动脉交界处开始,连续切6 μ m厚的切片,并选取每组第6~10层切片行HE染色,400倍光学显微镜下观察并采集图像。

1.7 免疫组织化学染色

取主动脉切片,常规脱蜡、复水、阻断过氧化氢酶和抗原修复后,按照SP法免疫组织化学试剂盒说明进行Mac-3免疫组织化学染色,400倍显微镜下观察染色情况。

1.8 免疫荧光分析

对各组小鼠主动脉切片进行免疫荧光分析。按照前述方法进行复水和抗原修复后,用5%牛血清白蛋白封闭载玻片30min,并在4℃下分别与CD68和NLRP3抗体(均1:200稀释)孵育过夜,PBS洗涤后,然后分别孵育Alexa Fluor 488或647标记羊抗兔IgG二抗(均1:500稀释),洗涤后,用DAPI复染。荧光显微镜下观察染色情况。

1.9 Western blot检测

取新鲜主动脉组织,在冰上用RIPA裂解液提取组织中蛋白质,对蛋白定量后,按照常规Western blot

步骤进行蛋白电泳和转印。用 5% 脱脂奶粉封闭膜上蛋白 1 h 后, 4 °C 孵育 NLRP3、ASC、Caspase-1 p20 和 GAPDH 一抗(均 1:1 000 稀释)过夜, 洗膜后, 室温孵育 HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000 稀释)1 h, 再次洗涤后, 用电化学发光法显像。用 Image J 软件对条带的光密度值进行半定量分析。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAG 降低 As 模型小鼠的血脂水平

与对照组比较, HFD 组小鼠血清中 TG、TC 和 LDLC 水平分别升高至对照组的 2.09、2.08 和 3.18 倍($P < 0.05$), HDLC 水平降低至对照组的 73.68% ($P < 0.05$); 与 HFD 组相比, HFD+MAG 组小鼠血清中 TG、TC 和 LDLC 水平分别降低至 HFD 组的 88.39%、74.85% 和 64.97% ($P < 0.05$), HDLC 水平升高至 HFD 组的 142.18% ($P < 0.05$; 表 1)。

表 1. 各组小鼠血脂水平情况 ($n = 10$)

Table 1. Serum lipid levels of mice in various groups ($n = 10$)
单位: mmol/L

| 分组 | TG | TC | HDLC | LDLC |
|-----------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 1.94±0.23 | 47.26±5.89 | 12.84±1.53 | 14.89±2.45 |
| HFD 组 | 4.05±0.39 ^a | 98.63±14.36 ^a | 9.46±1.34 ^a | 47.33±6.04 ^a |
| HFD+MAG 组 | 3.58±0.42 ^{ab} | 73.82±8.69 ^{ab} | 13.45±2.16 ^b | 30.75±4.56 ^{ab} |

注: a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 HFD 组比较。

2.2 MAG 降低 As 模型小鼠主动脉斑块面积

HFD 组小鼠主动脉 As 斑块面积为对照组的 6.76 倍($P < 0.001$); 与 HFD 组比较, HFD+MAG 组小鼠主动脉 As 斑块面积减少至 HFD 组的 45.16% ($P < 0.05$; 图 1)。

2.3 MAG 可改善血管形态并减少斑块中巨噬细胞的聚集

HE 染色结果(图 2A)显示, 对照组主动脉平滑肌细胞形态正常、排列紧密有序, 内膜下无泡沫细胞或脂质堆积; HFD 组血管内膜出现 As 斑块, 泡沫细胞聚集, 有部分破裂斑块; HFD+MAG 组血管内斑块较 HFD 组小, 且 As 病变较轻。免疫组织化学染色结果(图 2B)显示, 对照组 Mac-3 阳性细胞较少; HFD 组 As 斑块中可见大量 Mac-3 阳性细胞堆积;

HFD+MAG 组 As 斑块中 Mac-3 阳性细胞较 HFD 组减少。

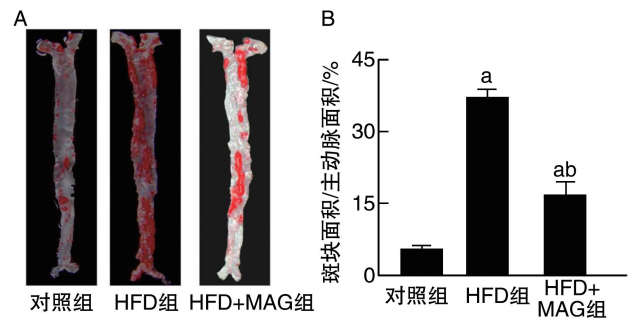


图 1. 各组主动脉斑块面积的变化 ($n = 5$)

A 为主动脉代表性油红 O 染色图像, B 为主动脉斑块面积统计结果。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 HFD 组比较。

Figure 1. Changes of aortic plaque deposition in various groups ($n = 5$)

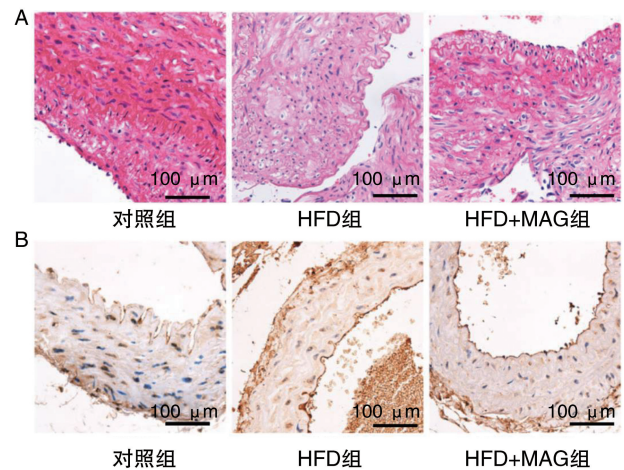


图 2. 各组主动脉血管形态和斑块中巨噬细胞聚集情况

A 为主动脉的代表性 HE 染色图像; B 为主动脉的代表性 Mac-3 免疫组织化学染色图像。

Figure 2. The morphology of the aorta and the aggregation of macrophages in plaques in various groups

2.4 MAG 可抑制 As 斑块中巨噬细胞 NLRP3 炎症小体激活

免疫荧光染色结果显示, 巨噬细胞与 NLRP3 存在共定位, 且在 HFD 组 As 斑块中 NLRP3 阳性巨噬细胞聚集, 在 HFD+MAG 组斑块中 NLRP3 阳性巨噬细胞减少(图 3)。Western blot 结果显示, 与对照组比较, HFD 组中 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 p20 表达水平增加至对照组的 4.41、4.11 和 5.62 倍($P < 0.05$); 与 HFD 组比较, HFD+MAG 组 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 p20 表达水平分别降低至 HFD 组的 45.58%、53.28% 和 42.35% ($P < 0.05$; 图 3)。ELISA 结果显

示,与HFD组比较,HFD+MAG组血清中IL-1 β 水平降低至HFD组的52.78% ($P < 0.05$;图3)。

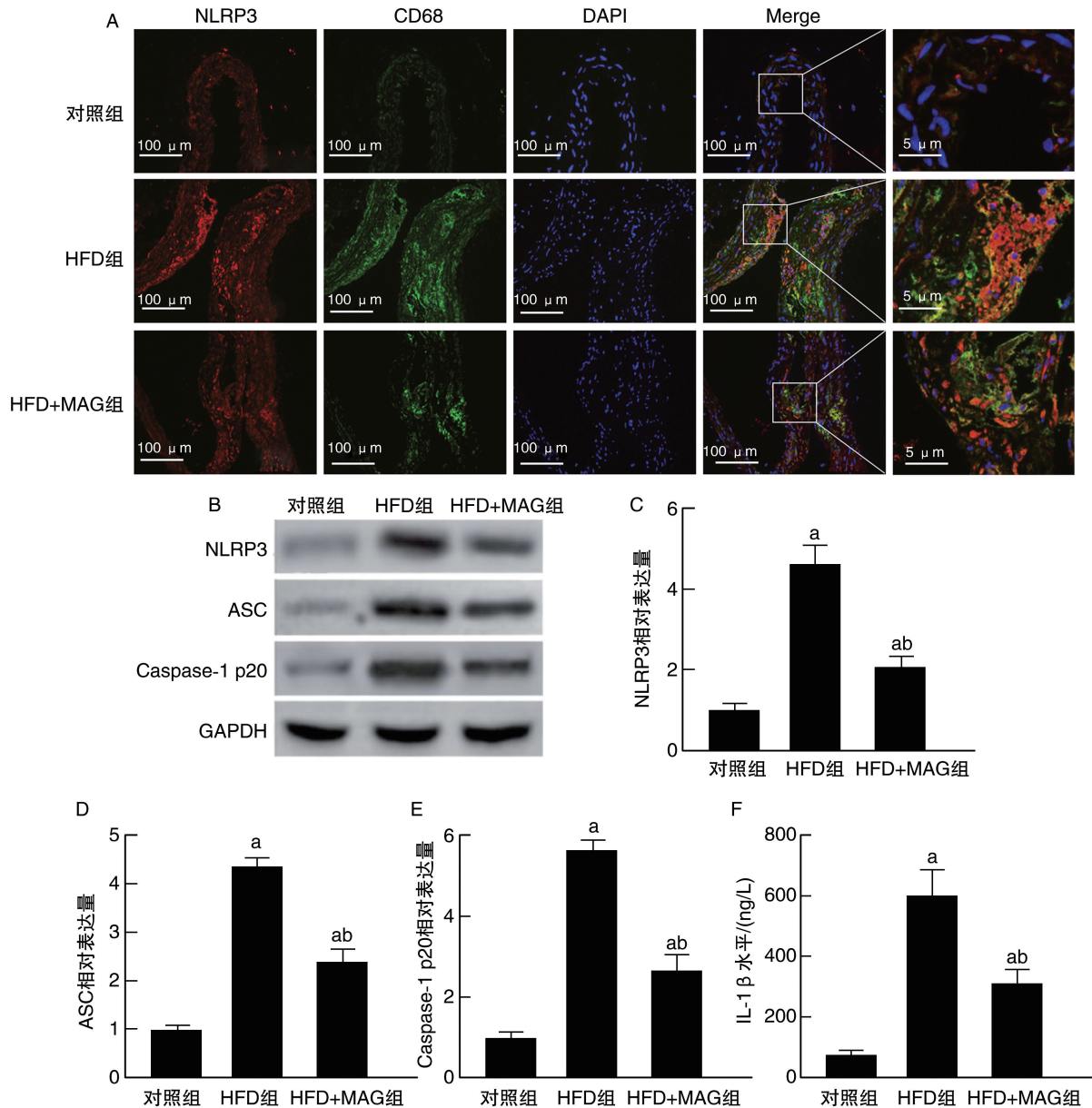


图3. MAG可抑制As斑块中巨噬细胞NLRP3炎症小体激活

A为各组主动脉代表性NLRP3和CD68共定位图像;B~E为Western blot检测各组主动脉中NLRP3、ASC和Caspase-1 p20表达水平($n=5$);F为ELISA检测血清中IL-1 β 水平($n=5$)。a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与HFD组比较。

Figure 3. MAG inhibits NLRP3 inflammasome activation of macrophages in As plaques

3 讨论

As是一种涉及包含血脂异常、炎症和氧化应激等多种因素共同参与的复杂的病理过程^[1,10]。它在血管上的主要病理表现为脂纹、纤维斑块、复合病变的形成,最终造成血管狭窄或闭塞。本研究结果显示,MAG能改善As模型小鼠的血脂水平和血管病理形态,并减小As斑块面积,提示它的抗As

潜力。

本研究对MAG抗As的机制进行了探索。炎症反应是As发生和进展重要的驱动因素,贯穿As的整个过程。巨噬细胞是炎症反应中的关键细胞,它在As的发生和进展中起着重要作用。在As的早期,发生功能障碍的血管内皮细胞招募单核巨噬细胞进入血管内膜,加剧炎症反应^[11];另外,单核巨噬细胞吞噬过量的氧化修饰的LDL等转变为泡沫细

胞,后者的蓄积最终导致 As 斑块形成^[12-13]。本研究结果显示,MAG 能降低小鼠主动脉斑块中巨噬细胞的沉积,这可能是 MAG 抗 As 的原因之一。此外,在 As 进程中,巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体激活在 As 斑块形成以及破裂的进程中发挥重要的作用^[14]。NLRP3 炎症小体激活能加剧 As 中的炎症反应^[14-15],且炎症反应能进一步募集巨噬细胞。有研究^[14,16]表明,抑制巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体的激活能降低促炎因子 IL-1 β 的分泌以及泡沫细胞的形成。本研究结果显示,在 As 斑块中 NLRP3 主要定位于巨噬细胞,且 MAG 不但能减少斑块中巨噬细胞的 NLRP3 阳性比例并同时抑制 NLRP3 炎症小体激活。

综上所述,本研究结果表明,在动物模型中,MAG 对 ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食所致 As 具有明显的拮抗作用,这一过程可能与其降低血脂以及抑制斑块内巨噬细胞 NLRP3 炎症小体的激活有关。

[参考文献]

- [1] KOBAYAMA K, LEY K. Atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2018, 123(10): 1118-1120.
- [2] LIBBY P, BORNFELDT K E, TALL A R. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 531-534.
- [3] PATEL K, KUMAR V, VERMA A, et al. Amarogentin as topical anticancer and anti-infective potential: scope of lipid based vesicular in its effective delivery[J]. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2019, 14(1): 7-15.
- [4] TAN Z, WANG W N, PENG J, et al. Impact of amarogentin on gastric carcinoma cell multiplication, apoptosis and migration via circKIF4A/miR-152-3p[J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 2156204.
- [5] NIU H S, CHAO P C, KU P M, et al. Amarogentin ameliorates diabetic disorders in animal models[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2016, 389(11): 1215-1223.
- [6] KESAVAN R, POTUNURU U R, NASTASIJEVIĆ B, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by *Gentiana lutea* root extracts[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61393.
- [7] POTUNURU U R, PRIYA K V, VARSHA M K N S, et al. Amarogentin, a secoiridoid glycoside, activates AMP-activated protein kinase (AMPK) to exert beneficial vasculo-metabolic effects[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, 1863(8): 1270-1282.
- [8] ZHANG Y, ZHAO H, LI H, et al. Protective effects of amarogentin against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice[J]. *Molecules*, 2017, 22(5): 754.
- [9] SONG B H, ZHOU W H. Amarogentin has protective effects against sepsis-induced brain injury via modulating the AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway[J]. *Brain Res Bull*, 2022, 189: 44-56.
- [10] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 315-327.
- [11] CHEN C H, GUO B C, HU P A, et al. Ractopamine at legal residue dosage accelerates atherosclerosis by inducing endothelial dysfunction and promoting macrophage foam cell formation[J]. *Environ Pollut*, 2022, 313: 120080.
- [12] WANG W, LIU W L, FIDLER T, et al. Macrophage inflammation, erythrophagocytosis, and accelerated atherosclerosis in Jak2 V617F mice[J]. *Circ Res*, 2018, 123(11): e35-e47.
- [13] LUO Y T, DUAN H X, QIAN Y N, et al. Macrophagic CD146 promotes foam cell formation and retention during atherosclerosis[J]. *Cell Res*, 2017, 27(3): 352-372.
- [14] MARTÍNEZ G J, CELERMAJER D S, PATEL S. The NLRP3 inflammasome and the emerging role of colchicine to inhibit atherosclerosis-associated inflammation[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 269: 262-271.
- [15] 曹朝晖, 吴颀, 胡小波. 细胞焦亡参与动脉粥样硬化形成的分子机制新进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(7): 560-565.
CAO Z H, WU Y, HU X B. Novel advances in the molecular mechanism of pyroptosis involved in atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(7): 560-565.
- [16] ZHUANG T, LIU J, CHEN X L, et al. Endothelial Foxp1 suppresses atherosclerosis via modulation of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Circ Res*, 2019, 125(6): 590-605.

(此文编辑 许雪梅)