

本文引用: 胡陶, 何滢蓉, 王武帅, 等. 低压低氧导致巨噬细胞坏死性凋亡和小鼠动脉粥样斑块不稳定[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(3): 219-226. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.03.005.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-03-0219-08

· 实验研究 ·

## 低压低氧导致巨噬细胞坏死性凋亡和小鼠动脉粥样斑块不稳定

胡陶<sup>1</sup>, 何滢蓉<sup>1,2</sup>, 王武帅<sup>1,2</sup>, 杨曦<sup>1,2</sup>, 段清华<sup>1,2</sup>, 杜萱<sup>1,3</sup>, 王强<sup>1,2,3</sup>

1. 西部战区总医院心血管内科, 四川省成都市 610083; 2. 西南医科大学临床医学院心血管内科, 四川省泸州市 646000; 3. 成都医学院, 四川省成都市 610500

**[摘要]** **[目的]** 研究低压低氧对巨噬细胞坏死性凋亡和动脉粥样斑块不稳定性的影响, 并探讨其可能的机制。**[方法]** 分离、培养小鼠骨髓源性巨噬细胞, 分为对照组(21%氧浓度)和低氧组(3%氧浓度), 48 h后检测细胞坏死性凋亡, Western blot测定坏死性凋亡相关蛋白的表达。选用健康雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠, 予以高脂饮食喂养, 并随机分为对照组和低压低氧组, 16周后检测小鼠血脂和炎症因子水平, HE染色观察粥样斑块面积和坏死核心大小, Masson染色检测斑块内胶原含量, 免疫组织化学染色和 Western blot检测斑块中巨噬细胞数量和坏死性凋亡相关蛋白的表达。**[结果]** 低氧引起巨噬细胞坏死性凋亡增加( $P < 0.01$ ), 坏死性凋亡抑制剂 Necrostatin-1(Nec-1)可减少低氧导致的细胞死亡( $P < 0.05$ ); 低氧导致巨噬细胞中 RNA 特异性腺苷脱氨酶 1(ADAR1)的表达减少( $P < 0.01$ ), Z型核酸结合蛋白 1(ZBP1)、磷酸化受体结合丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(p-RIPK3)和磷酸化混合谱系激酶结构域样蛋白(p-MLKL)的表达增多(均 $P < 0.01$ )。与对照组相比, 低压低氧组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的血脂水平无显著改变( $P > 0.05$ ), 血清炎症因子水平(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和MCP-1)升高(均 $P < 0.05$ ), 动脉粥样硬化斑块面积增加( $P < 0.05$ ), 斑块内坏死核心面积增加、胶原含量减少、巨噬细胞数量增加、ADAR1表达减少、ZBP1和p-MLKL表达增多(均 $P < 0.01$ )。**[结论]** 低压低氧引起巨噬细胞中 ADAR1/ZBP1表达失衡, 激活 RIPK3/MLKL信号通路, 促进巨噬细胞坏死性凋亡, 增加斑块坏死核心面积, 导致动脉粥样硬化斑块不稳定性增加。

**[关键词]** 低压低氧; RNA 特异性腺苷脱氨酶 1; Z型核酸结合蛋白 1; 巨噬细胞; 坏死性凋亡; 动脉粥样硬化; 斑块不稳定

[中图分类号] R5; R852.11

[文献标识码] A

### Hypobaric hypoxia promotes macrophage necroptosis and atherosclerotic plaque instability in mice

HU Tao<sup>1</sup>, HE Yingrong<sup>1,2</sup>, WANG Wushuai<sup>1,2</sup>, YANG Xi<sup>1,2</sup>, DUAN Qinghua<sup>1,2</sup>, DU Xuan<sup>1,3</sup>, WANG Qiang<sup>1,2,3</sup>

1. Department of Cardiology, the General Hospital of Western Theater Command, Chengdu, Sichuan 610083, China;

2. Department of Cardiology, Clinical College of Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;

3. Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the effect of hypobaric hypoxia on macrophage necroptosis and atherosclerotic plaque instability and explore the underlying mechanisms. **Methods** Mouse bone marrow-derived macrophages were isolated and cultured, and divided into control group (21% oxygen concentration) and hypoxia group (3% oxygen concentration). After 48 hours, cell necroptosis was detected, and the expression of cell necroptosis related proteins was determined by Western blot. Healthy male ApoE<sup>-/-</sup> mice were randomly divided into control group and hypobaric hypoxia group. After the intervention for 16 weeks, the plasma lipids and inflammatory cytokines were measured, the areas of atherosclerotic plaque and necrotic core were evaluated by HE staining. The content of plaque collagen was detected by Masson staining. The number of macrophages in the plaque and the expression of necrotic apoptosis related proteins were detected by immunohistochemical staining and Western blot. **Results** Hypoxia induced increased necrotic apoptosis of macrophages ( $P < 0.01$ ), while necroptotic inhibitor necrostatin-1 (Nec-1) reduced hypoxia induced cell death ( $P <$

[收稿日期] 2024-05-23

[修回日期] 2024-08-27

[基金项目] 四川省自然科学基金项目(2022NSFSC0820);西部战区总医院院管课题(2024-YGJC-A06)

[作者简介] 胡陶, 硕士, 医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail: thu\_2024@126.com。通信作者王强, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail: qwang\_86@126.com。

0.05); hypoxia leads to a decrease in the expression of adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) in macrophages ( $P < 0.01$ ), and an increase in the expression of Z-DNA binding protein 1 (ZBP1), phosphorylated receptor-interacting serine/threonine-protein kinase (p-RIPK3), and phosphorylated mixed lineage kinase domain-like protein (p-MLKL) (all  $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the plasma lipid levels of ApoE<sup>-/-</sup> mice in the hypobaric hypoxia group did not change significantly ( $P > 0.05$ ), the plasma inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and MCP-1) increased (all  $P < 0.05$ ), the area of atherosclerotic plaque increased ( $P < 0.05$ ), the area of plaque necrotic core increased, the content of plaque collagen decreased, the number of macrophages increased, the expression of ADAR1 decreased, and the expression of ZBP1 and p-MLKL increased (all  $P < 0.01$ ).

**Conclusion** Hypobaric hypoxia causes the imbalance of ADAR1/ZBP1 expression in macrophages, activates RIPK3/MLKL signaling pathway, promotes macrophage necroptosis, increases the area of plaque necrosis core, and leads to increase instability of atherosclerotic plaque.

**[KEY WORDS]** hypobaric hypoxia; adenosine deaminase acting on RNA 1; Z-DNA binding protein 1; macrophage; necroptosis; atherosclerosis; plaque instability

动脉粥样硬化导致的冠心病、心肌梗死和缺血性脑卒中是当前严重危害人类健康的疾病,也是人口死亡的主要原因,其发病率逐年升高且趋于年轻化<sup>[1]</sup>。高原地区动脉粥样硬化性心血管疾病发病率一直居高不下,也是高原地区人口死亡的重要原因,严重危害高原人群健康,而高原缺氧是其发生发展的重要因素<sup>[2-3]</sup>。前期研究发现,高原低压低氧导致动脉粥样硬化斑块的进展和不稳定性增加,然而其具体机制有待于进一步研究<sup>[4-5]</sup>。坏死性凋亡是一种可调控的程序性坏死,表现为细胞膜完整性严重破坏,细胞、细胞器肿胀乃至崩解,释放出细胞内促炎内容物,引起广泛的炎症反应,坏死性凋亡的经典信号通路主要依赖于受体结合丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(receptor-interacting serine/threonine-protein kinase, RIPK) 1、3及其底物混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)<sup>[6]</sup>。巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块进程中的关键细胞,近来的研究证实,巨噬细胞坏死性凋亡在动脉粥样斑块坏死核心和易损斑块的发生发展中发挥重要作用<sup>[7-9]</sup>。本研究拟观察低压低氧对巨噬细胞坏死性凋亡、动脉粥样斑块坏死核心形成的影响,并探讨其可能机制,旨在为高原地区动脉粥样硬化性心血管疾病的防治提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

健康雄性 ApoE 基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠,10~12周龄,体质量约20~25 g,购自江苏集萃药康生物科技有限公司;所有实验严格按照实验动物使用的3R原则给予人道关怀。zVAD-fmk 和 Necrostatin-1

(Nec-1)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;RNA 特异性腺苷脱氢酶 1(adenosine deaminase acting on RNA 1, ADAR1)抗体、Z 型核酸结合蛋白 1(Z-DNA binding protein 1, ZBP1)抗体和 CD68 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;p-RIPK1 (Ser-166)抗体、RIPK1 抗体、p-RIPK3 (Ser-227)抗体、RIPK3 抗体、p-MLKL (Ser-345)抗体和 MLKL 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;ATP 化学发光检测试剂盒购自美国 Abcam 公司;肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒购自南京卡米洛生物工程有限公司;碘化丙啶(propidium iodide, PI)荧光染料试剂盒、Masson 三色试剂盒、HE 染色试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 动物的分组及干预

参照前期方法<sup>[10-11]</sup>, ApoE<sup>-/-</sup>小鼠采用高脂饮食喂养诱导动脉粥样硬化模型,并随机分为两组:对照组、低压低氧组,每组 10 只。对照组小鼠在常氧常温环境(温度 22~24  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度为 50%~60%)下喂养,低压低氧组小鼠置入低压低氧环境模拟舱中饲养。低压低氧环境模拟舱的参数设定:模拟海拔高度为 5 500 m,舱内压力 47~48 kpa,温度为 20~22  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度为 22%~23%,相对氧浓度为 10%~11%,确保水及饲料充足,环境模拟舱运行时间为全天 24 h,更换水、饲料及垫料的频次为 3~4 天/次,每次开舱时间为 30 min。干预 16 周后用于后续实验。

### 1.3 小鼠血清中血脂水平和炎症因子的检测

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠分别经常氧或低压低氧环境干预 16 周后,称量小鼠体质量,空腹 12 h 后经乙醚麻醉,

眼眶取血,3 000 r/min 离心 10 min 后取血清,使用全自动生化分析仪检测血脂水平,包括甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。采用 ELISA 测定血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 MCP-1 水平,按照试剂盒说明书进行操作。

#### 1.4 小鼠主动脉根部粥样斑块病理检测

参照前期方法<sup>[10,12]</sup>,经颈椎脱臼法处死小鼠,立即分离主动脉,从主动脉根部至腹主动脉,并取出保留主动脉根部的心脏,将主动脉置于-80 °C 保存,用于 Western blot 检测。将保留主动脉根部的心脏立即用 4% 多聚甲醛固定,脱水、包埋、切片,从左心室和主动脉交界处开始,连续切 5  $\mu$ m 厚的切片,并选取每组第 6~10 层切片用于病理染色,分别行 HE 染色和 Masson 染色。用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分析粥样硬化斑块面积和斑块中坏死核心面积,并进行胶原含量定量分析,胶原含量为血管斑块 Masson 染色胶原含量面积占血管斑块面积的百分比。此外,免疫组织化学染色检测主动脉中 ADAR1、ZBP1、CD68 和 p-MLKL 的表达,石蜡切片后常规脱蜡,过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,热修复抗原后,滴加一抗(ADAR1、ZBP1、CD68 和 p-MLKL 分别按 1:200、1:250、1:250、1:150 稀释),4 °C 过夜,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,37 °C 孵育 30 min, DAB 显色,封片。Image-Pro Plus 6.0 软件对图像进行分析。

#### 1.5 小鼠骨髓源性巨噬细胞的分离、培养、干预和坏死性凋亡的检测

参照前期方法<sup>[10,13]</sup>,分离和培养小鼠骨髓源性巨噬细胞(bone marrow derived macrophage, BMDM)。取小鼠新鲜股骨和胫骨,用含 20 kU/L 肝素的冰 PBS 冲洗骨髓腔,将收集到的骨髓细胞在含 0.843% 氯化铵溶液中室温下孵育 10 min 裂解红细胞,用 70  $\mu$ m 滤器将单细胞悬液过滤,得到的细胞种植于含 10  $\mu$ g/L 巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)和 10% 胎牛血清的 RPMI 培养基中,7 天后去除未贴壁细胞,即为成熟的骨髓来源巨噬细胞;倾倒入细胞培养基, PBS 清洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,使用含 1% 牛血清白蛋白和 0.1% Triton X-100 的封闭溶液处理。将细胞与抗 CD68 抗体结合,4 °C 冰箱孵育,次日加

入二抗在室温下孵育 1 h, DAPI 染色 5 min, 通过荧光显微镜采集图像,进行巨噬细胞纯度鉴定。参照前期方法<sup>[11]</sup>,将 BMDM 分为常氧对照组(21% 氧浓度)和低氧组(3% 氧浓度),于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境中培养 48 h。

参照前期方法<sup>[7-9]</sup>,分别通过 PI 荧光染色、ATP 化学发光法和细胞上清液中 LDH 释放量的测定来反映巨噬细胞坏死性凋亡情况,具体操作按照 PI 荧光染料试剂盒、ATP 化学发光检测试剂盒和 LDH 检测试剂盒的说明书进行操作。加入适量蛋白裂解液收集各组细胞,提取细胞蛋白,按照 BCA 试剂盒操作说明进行蛋白定量,进而标准化 ATP、LDH。相应分组采用凋亡抑制剂 zVAD-fmk(50  $\mu$ mol/L)或坏死性凋亡抑制剂 Nec-1(50  $\mu$ mol/L)预处理干预。

#### 1.6 RT-PCR 检测

参照前期方法<sup>[10]</sup>,提取小鼠巨噬细胞的 RNA,测定 RNA 浓度,反转录成 cDNA。ADAR1 引物:上游 5'-CCACCTCCAGTCCGGAGTAGCG-3',下游 5'-TGCCCTTGAGAAATTCTATTTGC-3';ZBP1 引物:上游 5'-AAGAGTCCCCTGCGATTATTTG-3',下游 5'-TCTGGATGGCGTTTGAATTGG-3';GAPDH 引物:上游 5'-GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTT-3',下游 5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3'。PCR 仪进行 RT-PCR 检测:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 10 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法定量分析 ADAR1 和 ZBP1 mRNA 相对表达量。

#### 1.7 Western blot 检测

参照前期方法<sup>[10-11]</sup>,使用 RIPA 裂解液提取小鼠腹主动脉或巨噬细胞的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离蛋白,每孔上样量 30~40  $\mu$ g,湿转法转移到 PVDF 膜上,用含 5% BSA 的 TBST 室温下封闭 1~2 h,滴加一抗(ADAR1、ZBP1、p-RIPK1、RIPK1、p-RIPK3、RIPK3、p-MLKL、MLKL、GAPDH 分别按 1:600、1:500、1:800、1:1 200、1:1 000、1:1 200、1:1 200、1:1 000、1:500 稀释),4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,二抗(1:4 000 稀释)室温孵育 1 h, TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次, ECL 化学发光法显色、曝光。Quantity One 图像分析系统进行蛋白条带灰度分析,测量 ADAR1、ZBP1、p-RIPK3、RIPK3、p-MLKL、MLKL 和 GAPDH 蛋白的电泳条带光密度,以目标蛋白与 GAPDH 的比值代表蛋白相对表达量。

### 1.8 统计学分析

使用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析。所有计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 低氧对巨噬细胞坏死性凋亡的影响

小鼠巨噬细胞经常氧或低氧干预 48 h 后,与对

照组相比,低氧可导致巨噬细胞死亡增加至 15.4 倍,细胞 ATP 含量减少 41.53% 和 LDH 释放量增加至 8.4 倍 ( $P < 0.01$ ),而坏死性凋亡抑制剂 Nec-1 可减少低氧导致的细胞死亡 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );凋亡抑制剂 zVAD-fmk 阻断细胞凋亡后,低氧可导致巨噬细胞坏死性凋亡增加至 22.35 倍 ( $P < 0.01$ ),而该作用可被 Nec-1 阻断 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ;图 1)。以上结果提示低氧可导致小鼠巨噬细胞坏死性凋亡。

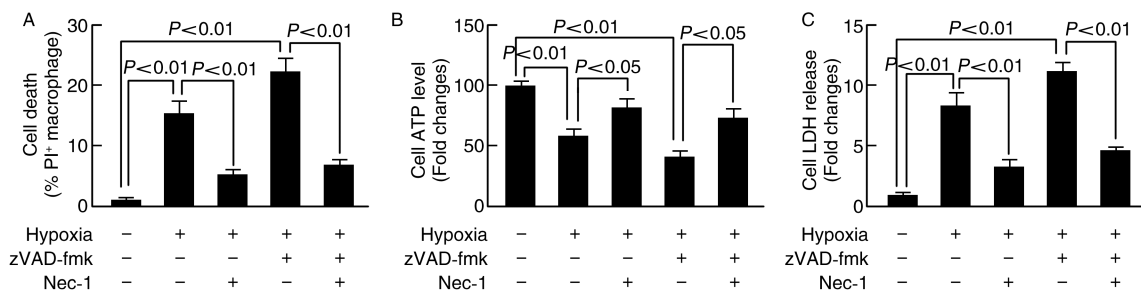


图 1. 低氧对巨噬细胞坏死性凋亡的影响 ( $n = 6$ )

A 为巨噬细胞死亡情况 (PI 荧光染色阳性率), B 为巨噬细胞 ATP 水平, C 为巨噬细胞 LDH 释放情况。

Figure 1. The effect of hypoxia on macrophage necroptosis ( $n = 6$ )

### 2.2 低氧对巨噬细胞坏死性凋亡相关蛋白表达的影响

RIPK3 及其底物 MLKL 是调节细胞坏死性凋亡的关键信号通路<sup>[6-9]</sup>。与对照组相比,低氧组巨噬细胞中 p-RIPK1、p-RIPK3 和 p-MLKL 蛋白的表达水平增加至对照组的 2.08、2.98 和 3.25 倍 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 蛋白的表达未见统计学差异,提示低氧可能通过介导蛋白磷酸化激活巨噬细胞中 RIPK3/MLKL 坏死性凋亡信号

通路。

ADAR1 和 ZBP1 是细胞质内重要的核酸感受器<sup>[14]</sup>,参与调节 RIPK3/MLKL 信号通路。与对照组相比,低氧组巨噬细胞中 ADAR1 mRNA 和蛋白表达水平分别降低至对照组的 26.06% 和 32.12%, ZBP1 mRNA 和蛋白表达水平增加至对照组的 3.86 倍和 3.11 倍 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ;图 2)。以上结果提示,低氧引起 ADAR1/ZBP1 表达失衡,从而调控 RIPK3/MLKL 信号通路和巨噬细胞坏死性凋亡。

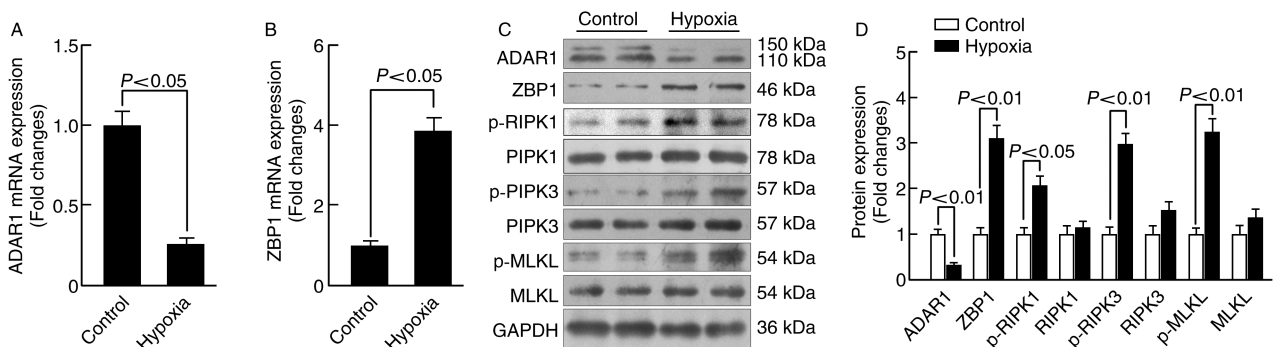


图 2. 低氧对巨噬细胞坏死性凋亡相关蛋白表达的影响 ( $n = 6$ )

A 为 RT-PCR 检测 ADAR1 mRNA 表达, B 为 RT-PCR 检测 ZBP1 mRNA 表达, C 为 Western blot 检测 ADAR1、

ZBP1、MLKL、RIPK3、p-RIPK1、p-RIPK3 及 p-MLKL 蛋白表达, D 为蛋白相对表达量柱状统计图。

Figure 2. The effect of hypoxia on the expression of necroptosis related proteins in macrophages ( $n = 6$ )

### 2.3 低压低氧对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血脂和炎症因子水平的影响

对照组与低压低氧组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的 TG、TC、HDLc 和 LDLc 水平未见统计学差异( $P>0.05$ )。与

对照组相比,低压低氧组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的血清炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 MCP-1 水平升高至对照组的 1.21 倍、1.37 倍、1.24 倍和 1.18 倍( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ;图 3)。

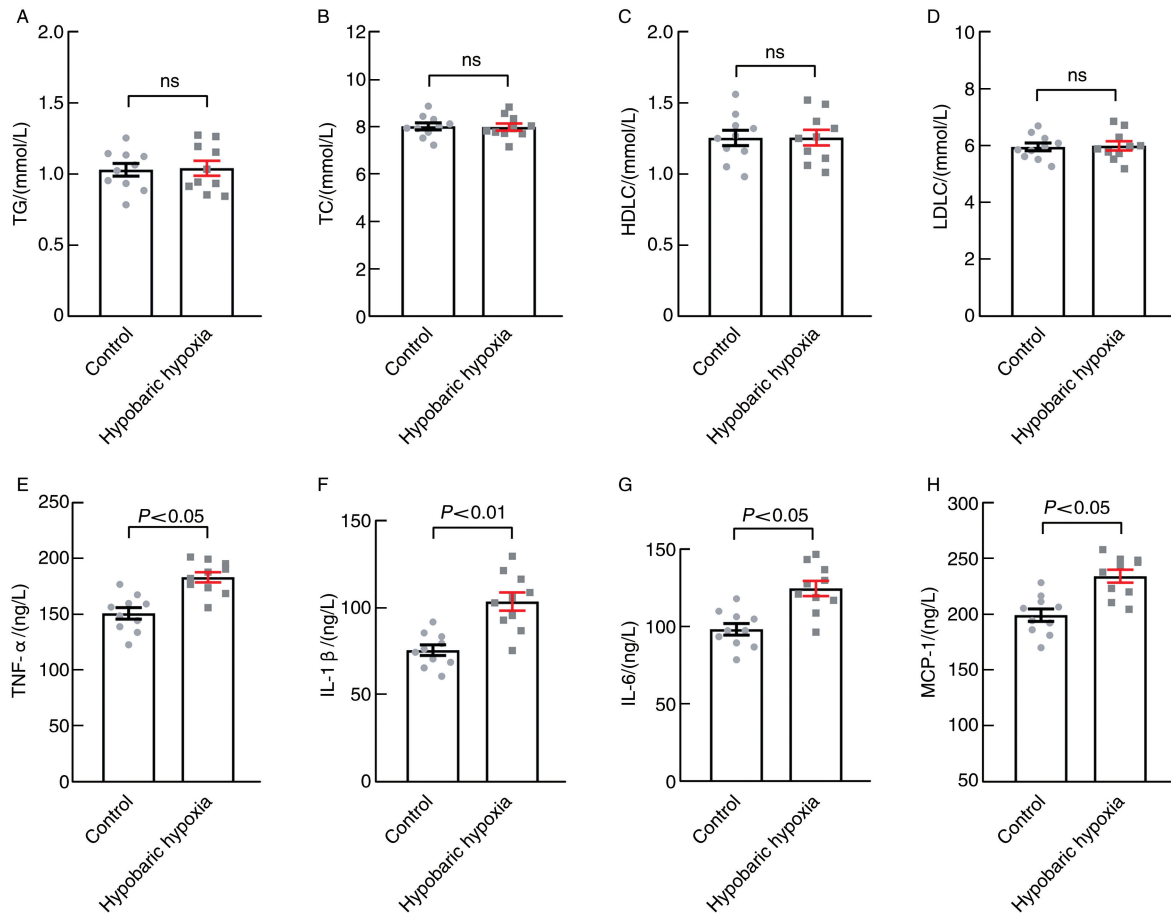


图 3. 低压低氧对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血脂和炎症因子水平的影响( $n=10$ )

A 为 TG 水平,B 为 TC 水平,C 为 HDLc 水平,D 为 LDLc 水平,E 为 TNF- $\alpha$  水平,F 为 IL-1 $\beta$  水平,G 为 IL-6 水平,H 为 MCP-1 水平。

Figure 3. The effect of hypobaric hypoxia on the levels of plasma lipids and inflammatory cytokines in ApoE<sup>-/-</sup> mice( $n=10$ )

### 2.4 低压低氧对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化斑块的影响

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠通过高脂饮食喂养诱导动脉粥样硬化,并分别经常氧或低压低氧干预 16 周,与对照组相比,低压低氧组小鼠的主动脉根部粥样斑块面积增加至对照组的 1.22 倍( $P<0.05$ ),斑块内坏死核心面积增加至对照组的 1.49 倍,纤维帽变薄( $P<0.01$ ),斑块中胶原含量减少至对照组的 54.41% ( $P<0.01$ ;图 4)。提示低压低氧引起斑块内坏死核心面积增加,导致动脉粥样硬化易损斑块形成。

### 2.5 低压低氧对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠粥样斑块中巨噬细胞数量和坏死性凋亡相关蛋白表达的影响

免疫组织化学染色显示,与对照组相比,低压低氧组小鼠主动脉根部粥样斑块中巨噬细胞数量增加,ADAR1 表达减少,ZBP1 和 p-MLKL 表达增多( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,低压低氧组小鼠主动脉中 ADAR1 蛋白表达水平降低至对照组的 39.11%,ZBP1 和 p-MLKL 蛋白表达水平增加至对照组的 3.12 倍和 2.68 倍( $P<0.01$ ;图 5)。

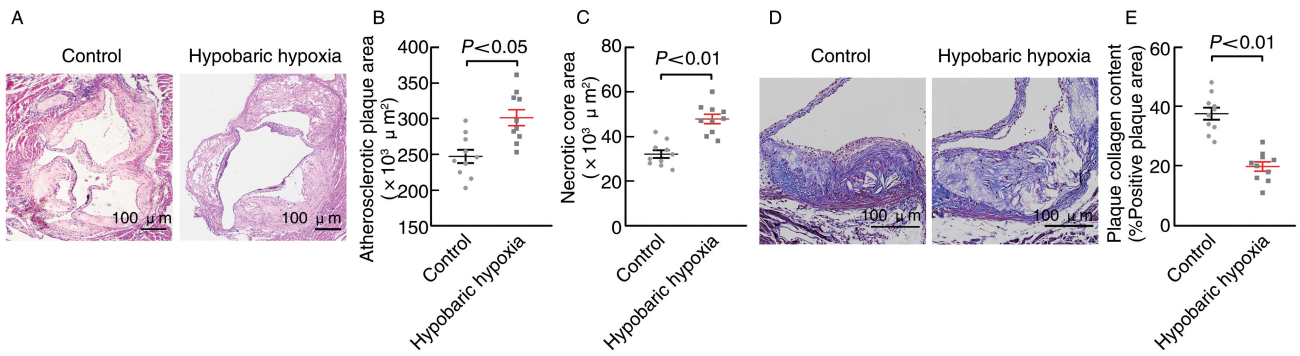


图 4. 低压低氧对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化斑块的影响 (n = 10)

A 为小鼠主动脉根部粥样斑块 HE 染色图, B 为小鼠主动脉根部粥样斑块面积, C 为小鼠粥样斑块坏死核心面积, D 为小鼠主动脉根部粥样斑块 Masson 染色图, E 为小鼠粥样斑块中胶原纤维含量。

Figure 4. The effect of hypobaric hypoxia on atherosclerotic plaque in ApoE<sup>-/-</sup> mice (n = 10)

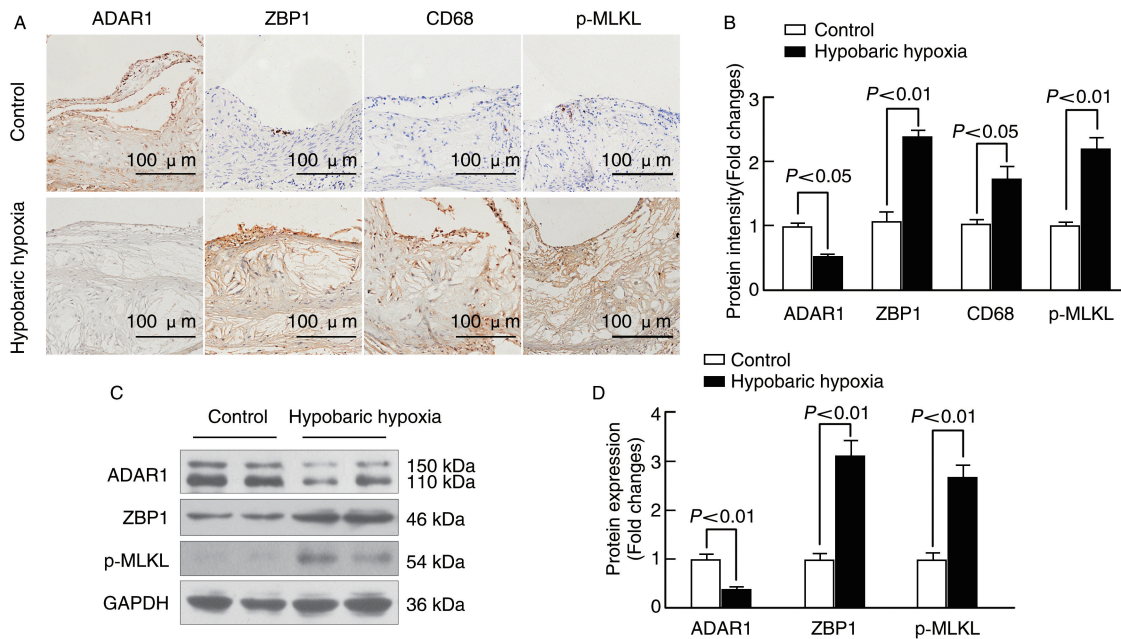


图 5. 低压低氧对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠粥样斑块中巨噬细胞数量和坏死性凋亡相关蛋白表达的影响 (n = 10)

A 为小鼠粥样斑块中 ADAR1、ZBP1、CD68 和 p-MLKL 的免疫组织化学染色, B 为免疫组织化学染色柱状统计图, C 为 Western blot 检测小鼠主动脉中 ADAR1、ZBP1 和 p-MLKL 蛋白表达, D 为蛋白相对表达量柱状统计图。

Figure 5. The effect of hypobaric hypoxia on the number of macrophages and the expression of necroptosis related proteins in atherosclerotic plaque of ApoE<sup>-/-</sup> mice (n = 10)

### 3 讨论

我国有近千万人长期居住在高原地区,随着青藏铁路和川藏铁路等重大战略工程实施,近年来大量人群前往高原、建设高原,高原地区动脉粥样硬化性心血管疾病的发病率一直居高不下,是高原地区人口死亡的主要原因,而高原缺氧是其发生发展的重要因素<sup>[2-3]</sup>。研究显示,低压低氧通过促进血管生成和炎症反应来加速动脉粥样硬化斑块进展<sup>[5]</sup>。进一步的研究发现,缺氧诱导因子 1 $\alpha$

(hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 是细胞对低氧反应的主要调节因子, HIF-1 $\alpha$  是促进动脉粥样硬化进展的重要蛋白,通过调节内皮细胞功能、血管平滑肌细胞增殖迁移、巨噬细胞胆固醇代谢及促炎表型极化参与动脉粥样硬化的发生发展过程<sup>[15]</sup>。本课题组前期发现,缺氧导致动脉粥样硬化斑块不稳定性增加,缺氧改变血管壁基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 及其组织抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 的表达平衡<sup>[4]</sup>, 然而缺氧诱导动脉粥样斑块不稳定的具体机制尚

未完全阐明。

易损斑块具有较大的坏死核心和薄纤维帽,易损斑块容易发生纤维膜破裂和血栓形成,是急性心脑血管事件真正的“始作俑者”<sup>[16]</sup>。坏死核心的形成和扩散是导致粥样斑块不稳定和易损斑块形成的主要原因<sup>[17]</sup>。研究证实,巨噬细胞坏死性凋亡在动脉粥样斑块坏死核心的形成和进展中发挥了重要作用,巨噬细胞膜通透性增高,致使细胞肿胀、细胞器变形或肿大,最后细胞破裂,引起细胞内容物释放,进一步诱发炎症反应;在粥样斑块内巨噬细胞发生坏死性凋亡的过程中,RIPK1、RIPK3 及其底物 MLKL 是参与细胞坏死性凋亡的关键分子,而 p-MLKL 易位至细胞膜的内侧并破坏细胞膜的完整性是发生坏死性凋亡的关键步骤,抑制巨噬细胞坏死性凋亡可显著减少坏死核心的形成,增加动脉粥样斑块的稳定性<sup>[6-9]</sup>。TNF- $\alpha$  通过激活 RIPK1/RIPK3/MLKL 引起细胞坏死性凋亡<sup>[6]</sup>。最近发现,缺氧可通过 EGLN1/pVHL 途径调节 RIPK1 活性,进而促进下游细胞坏死性凋亡和炎症的发生;并且缺氧对 RIPK1 活性的调控并不是通过之前发现的 TNF- $\alpha$ /肿瘤坏死因子受体 1 (tumour necrosis factor receptor 1, TNFR1) 通路来实现的<sup>[18]</sup>。本研究发现,低氧引起巨噬细胞中 p-RIPK1、p-RIPK3 和 p-MLKL 表达增加,导致巨噬细胞坏死性凋亡增加;在低压低氧环境中,ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清 TNF- $\alpha$  等炎症因子水平升高,动脉粥样硬化斑块坏死核心面积明显增加,斑块中胶原含量减少,而斑块中巨噬细胞数量和 p-MLKL 的表达也显著增加。提示低压低氧可能通过激活 RIPK3/MLKL 信号通路,调节巨噬细胞坏死性凋亡,导致动脉粥样硬化斑块不稳定性增加;TNF- $\alpha$  和 RIPK1 可能参与了低氧激活 RIPK3/MLKL 信号通路的过程,这与前期研究结果相一致<sup>[6,15,18]</sup>。

新近研究发现,核酸损伤与修复障碍、细胞质内异常的内源性核酸积累和核酸感受通路的激活在血管炎症反应、易损斑块形成和动脉粥样硬化的进展中发挥重要作用<sup>[19-21]</sup>。ADAR1 和 ZBP1 是细胞质内重要的核酸感受器,参与调控固有免疫、细胞死亡、炎症性疾病和肿瘤的发生发展<sup>[14]</sup>。ADAR1 的两种亚型 p150 和 p110 是通过使用单独的启动子和交替剪接产生的,ADAR1 p150 主要位于细胞质中,而 ADAR1 p110 主要位于细胞核中,近期研究提示,ADAR1 可能通过促进 A-to-I 调节 lncRNA NEAT1 的稳定性,参与动脉粥样硬化性心血管疾病的进程<sup>[22]</sup>。ZBP1 被细胞质内左手螺旋核酸 (Z-nucleic acid, Z-NA) 和线粒体 DNA (mitochondrial DNA,

mtDNA) 激活后,通过 RHIM 结构域与 RIPK3 相关联,介导 RIPK3/MLKL 依赖的细胞坏死性凋亡和炎症反应<sup>[14]</sup>,ZBP1 激活 RIPK3/MLKL 信号通路并不依赖于 TNF- $\alpha$  和 RIPK1 途径<sup>[6]</sup>。最新一系列研究证实,ADAR1 是细胞内 ZBP1 的负向调节因子,通过 Z $\alpha$  结构域阻止 Z-NA 激活 ZBP1 介导的细胞坏死性凋亡和炎症反应<sup>[23-25]</sup>。本研究发现,低氧导致巨噬细胞中 ADAR1 表达降低,ZBP1 表达增加;在低压低氧的环境中,ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的动脉粥样硬化斑块中 ADAR1 表达减少,而 ZBP1 表达明显增加。提示 ADAR1/ZBP1 表达失衡促进 RIPK3/MLKL 信号通路激活可能介导低压低氧导致的巨噬细胞坏死性凋亡和斑块不稳定性增加。

然而,低压低氧导致巨噬细胞 ADAR1 表达减少和 ZBP1 表达增加的具体机制尚不清楚,低压低氧对巨噬细胞质内 Z-NA 和 mtDNA 的影响如何,目前尚不清楚,本课题组将在进一步的实验中继续研究。此外,本研究仅通过细胞实验和动物模型初步探讨了高原低压低氧对动脉粥样硬化的影响及机制,后续将通过临床研究进一步研究高原低压低氧环境下动脉粥样硬化性心血管疾病的发生发展。

综上所述,除 HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  和 RIPK1 等分子机制外,本研究提示低压低氧引起巨噬细胞中 ADAR1/ZBP1 表达失衡,直接激活 RIPK3/MLKL 信号通路,调节巨噬细胞坏死性凋亡,增加斑块坏死核心面积,导致动脉粥样硬化斑块不稳定性增加。研究结果为高原地区动脉粥样硬化性心血管疾病的防治提供了理论基础。

#### [参考文献]

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要 [J]. 中国循环杂志, 2023, 38 (6): 583-612. Chinese Cardiovascular Health and Disease Report Writing Team. Report on cardiovascular health and diseases in China 2022: an updated summary [J]. Chin Circ J, 2023, 38(6): 583-612.
- [2] MACOVEI L, MACOVEI C M, MACOVEI D C. Coronary syndromes and high-altitude exposure-a comprehensive review [J]. Diagnostics (Basel), 2023, 13(7): 1317.
- [3] RICHALET J P, HERMAND E, LHUISSIER F J. Cardiovascular physiology and pathophysiology at high altitude [J]. Nat Rev Cardiol, 2024, 21(2): 75-88.
- [4] JIANG S, JIN F, LI D, et al. Intermittent hypobaric hypoxia promotes atherosclerotic plaque instability in ApoE-deficient mice [J]. High Alt Med Biol, 2013, 14(2): 175-180.

- [5] LUO S, MA X, WU W, et al. Continuous hypobaric hypoxia may promote atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Int J Med Sci*, 2023, 20(7): 849-857.
- [6] AI Y, MENG Y, YAN B, et al. The biochemical pathways of apoptotic, necroptotic, pyroptotic, and ferroptotic cell death[J]. *Mol Cell*, 2024, 84(1): 170-179.
- [7] KARUNAKARAN D, GEOFFRION M, WEI L, et al. Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis [J]. *Sci Adv*, 2016, 2(7): e1600224.
- [8] KARSHOVSKA E, WEI Y, SUBRAMANIAN P, et al. HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) promotes macrophage necroptosis by regulating miR-210 and miR-383 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3): 583-596.
- [9] JIA Y, CHENG L, YANG J, et al. miR-223-3p prevents necroptotic macrophage death by targeting Ripk3 in a negative feedback loop and consequently ameliorates advanced atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2024, 44(1): 218-237.
- [10] WANG Q, CHEN K, ZHANG F, et al. TRPA1 regulates macrophages phenotype plasticity and atherosclerosis progression[J]. *Atherosclerosis*, 2020, 301: 44-53.
- [11] 王武帅, 胡陶, 杨耀, 等. 薄荷醇对低压低氧诱导小鼠肺动脉高压的作用及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(1): 62-69.  
WANG W S, HU T, YANG Y, et al. Effect of menthol on hypobaric hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in mice and its mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(1): 62-69.
- [12] 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.  
ZHANG L Y, SUN J, CHEN D, et al. Amarogentin antagonizes atherosclerosis induced by high fat diet in mice [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(5): 399-403.
- [13] 潘显梅, 夏明峰, 李静. 丹酚酸 B 介导巨噬细胞 Piezo1/MAPK/YAP 轴对动脉粥样硬化的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(1): 17-23.  
PAN X M, XIA M F, LI J. Protective effect of salvianolic acid B mediating the macrophages Piezo1/MAPK/YAP axis in regulating atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(1): 17-23.
- [14] KARKI R, KANNEGANTI T D. ADAR1 and ZBP1 in innate immunity, cell death, and disease [J]. *Trends Immunol*, 2023, 44(3): 201-216.
- [15] 苑明川, 王莉, 王贺, 等. HIF-1 $\alpha$  在动脉粥样硬化中的作用研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(9): 815-820.  
YUAN M C, WANG L, WANG H, et al. Research progress on the role of HIF-1 $\alpha$  in atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(9): 815-820.
- [16] KWIECINSKI J, TZOLOS E, WILLIAMS M C, et al. Noninvasive coronary atherosclerotic plaque imaging [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2023, 16(12): 1608-1622.
- [17] PUYLAERT P, ZUREK M, RAYNER K J, et al. Regulated necrosis in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022, 42(11): 1283-1306.
- [18] ZHANG T, XU D, LIU J, et al. Prolonged hypoxia alleviates prolyl hydroxylation-mediated suppression of RIPK1 to promote necroptosis and inflammation [J]. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(7): 950-962.
- [19] SANTOVITO D, STEFFENS S. DNA damage and extranuclear DNA sensors: a dangerous duo in atherosclerosis [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(42): 4349-4351.
- [20] PHAM P T, FUKUDA D, NISHIMOTO S, et al. Sting, a cytosolic DNA sensor, plays a critical role in atherogenesis: a link between innate immunity and chronic inflammation caused by lifestyle-related diseases [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(42): 4336-4348.
- [21] FIDLER T P, XUE C, YALCINKAYA M, et al. The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis [J]. *Nature*, 2021, 592(7853): 296-301.
- [22] VLACHOGIANNIS N I, SACHSE M, GEORGIPOULOS G, et al. Adenosine-to-inosine Alu RNA editing controls the stability of the pro-inflammatory long noncoding RNA NEAT1 in atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 160: 111-120.
- [23] ZHANG T, YIN C, FEDOROV A, et al. ADAR1 masks the cancer immunotherapeutic promise of ZBP1-driven necroptosis [J]. *Nature*, 2022, 606(7914): 594-602.
- [24] JIAO H, WACHSMUTH L, WOLF S, et al. ADAR1 averts fatal type I interferon induction by ZBP1 [J]. *Nature*, 2022, 607(7920): 776-783.
- [25] DE REUVER R, VERDONCK S, DIERICK E, et al. ADAR1 prevents autoinflammation by suppressing spontaneous ZBP1 activation [J]. *Nature*, 2022, 607(7920): 784-789.

(此文编辑 文玉珊)