

本文引用: 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. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.01.003.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-01-0017-07

· 机械力信号与心血管疾病专栏 ·

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

潘显梅^{1,2}, 夏明峰³, 李 静^{1,2,3}

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405; 2. 广州中医药大学岭南医学研究中心, 广东省广州市 510405;
3. 山东中医药大学中医药创新研究院, 山东省济南市 250355)

[摘要] **[目的]** 探讨丹酚酸 B 对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的泡沫细胞形成在动脉粥样硬化中的保护作用。**[方法]** 提取小鼠骨髓来源巨噬细胞(BMDM), 用 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导泡沫细胞模型, 同时加入 Piezo1 通道激动剂 Yoda1 观察与 Piezo1 相关性, 药物组加入不同浓度的丹酚酸 B 处理。采用油红 O 染色法检测各组细胞脂质含量, Western blot 法检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β) 和白细胞介素 6(IL-6)等炎症因子的蛋白表达水平, 以及 YAP 及 MAPK 级联蛋白表达水平, 免疫荧光法检测 YAP 蛋白核易位表达。**[结果]** Yoda1 干预组的泡沫细胞形成显著增加($P<0.05$); 与 Yoda1 干预组比较, SalB 组明显抑制泡沫细胞形成($P<0.05$)。与正常对照组比较, 模型组炎症因子蛋白表达升高, 而 Yoda1 干预组升高更明显, SalB 组炎症因子蛋白表达水平明显降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。此外, 模型组细胞 YAP 蛋白明显向核内易位, 而 Yoda1 干预组向核内易位更明显, 差异具有统计学意义($P<0.05$), SalB 组 YAP 蛋白向细胞核内易位明显减少。同时, 模型组和 Yoda1 干预组细胞磷酸化 P38、ERK1/2、JNK 蛋白表达升高, SalB 组磷酸化 P38、ERK1/2、JNK 蛋白表达明显降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。**[结论]** 丹酚酸 B 抑制 ox-LDL 及 Yoda1 诱导的泡沫细胞形成, 抑制炎症因子的蛋白表达水平, 从而延缓动脉粥样硬化斑块的形成, 其机制可能与丹酚酸 B 介导 Piezo1 调控 MAPK/YAP 轴相关。

[关键词] 丹酚酸 B; Piezo1 离子通道; 骨髓来源巨噬细胞; 动脉粥样硬化

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

Protective effect of salvianolic acid B mediating the macrophages Piezo1/MAPK/YAP axis in regulating atherosclerosis

PAN Xianmei^{1,2}, XIA Mingfeng³, LI Jing^{1,2,3}

(1. The First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China;
2. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China;
3. Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect and mechanism of salvianolic acid B (SalB) on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced foam cell formation in atherosclerosis. **Methods** Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were extracted from mice, and cells were induced with 50 mg/L ox-LDL. The Piezo1 channel agonist Yoda1 was added to observe the correlation with Piezo1. The drug group was treated with different concentrations of SalB. **Results** Foam cell formation was significantly increased in Yoda1+ox-LDL group ($P<0.05$). Compared with Yoda1+ox-LDL group, foam cell formation was significantly inhibited in SalB group ($P<0.05$). Compared with normal control group, the protein expressions of inflammatory factors were increased in ox-LDL group, and they were more obvious in Yo-

[收稿日期] 2022-04-30

[修回日期] 2022-06-07

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(NSFC82174196); 山东省自然科学基金重大基础研究项目(ZR2020ZD16); 山东省自然科学基金青年项目(ZR2020QH340)

[作者简介] 潘显梅, 博士, 主治医师, 研究方向为中医药防治心血管疾病, E-mail: 499190864@qq.com。通信作者李静, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为钙离子通道调控心血管疾病的机制及中医药干预, E-mail: bmsjingl@gzucm.edu.cn。

dal+ox-LDL group. The protein expression levels of inflammatory factors were significantly decreased in SalB group ($P < 0.05$). In addition, the translocation of YAP protein into the nucleus was obvious in ox-LDL group, while it was more obvious in Yoda1+ox-LDL group, and the difference was significant ($P < 0.05$). The translocation of YAP protein into the nucleus was significantly reduced in SalB group. The expressions of phosphorylated P38, ERK1/2 and JNK proteins were increased in ox-LDL group and Yoda1+ox-LDL group, while they were significantly decreased in SalB group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** SalB inhibits foam cell formation and the protein expression levels of inflammatory factors induced by ox-LDL and Yoda1, thereby delaying the formation of atherosclerotic plaques. The mechanism may be that salvianolic acid B mediate Piezo1 to regulate MAPK/YAP axis.

[**KEY WORDS**] salvianolic acid B; Piezo1 ion channel; bone marrow-derived macrophages; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是大多数血管疾病的主要原因,如冠心病、心肌梗死和中风^[1]。虽然近年来心血管疾病的诊断和治疗取得了很大进展,但它仍然是全球发病率和死亡率的主要原因^[2]。As病变的形成和发展被认为是一种慢性炎症过程^[3-6],巨噬细胞作为As病变的主要成分,在As的发生发展中起着至关重要的作用。机械敏感蛋白Piezo1是一种 Ca^{2+} 信号传导的阳离子通道膜蛋白,能够被挤压、牵张以及流体剪切力等不同形式的机械力所激活而引起钙离子进出细胞,进而诱发细胞兴奋以及信号传递^[7-10]。Piezo1在心血管领域的多种生理过程中具有广泛的作用,包括Piezo1感知血流剪切应力促进血管发育^[11-12]。研究表明Piezo1与As的发生发展有着密切关系^[13-14]。丹酚酸B(salvianolic acid B, SalB)是从中药丹参的根和茎中提取的具有高活性表达的一种水溶性物质^[15-16],通过促进血管生成改善微循环,对急性心肌梗死等缺血性心血管疾病有明显缓解作用^[17-18]。我们的研究发现丹酚酸B是Piezo1的特异性抑制剂,且能抑制As的进展^[19],但其作用的下游机制仍未明确。研究表明,MAPK信号通路在Yoda1诱发的 Ca^{2+} 内流与YAP激活和易位之间起着重要的联系^[20]。YAP被证实在As和血管生成等不同生物学功能中起着关键作用,而抑制YAP/TAZ-JNK可以抑制炎症,延缓As的发生^[21]。Yoda1是目前应用的Piezo1特异性激活剂,是研究Piezo1通道的重要工具^[22]。本研究主要探讨丹酚酸B对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)及Yoda1诱导巨噬细胞泡沫细胞形成的作用机制,为中医药治疗As提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

饱和油红O染色液购自中国索莱宝科技有限

公司;Macrophage culture supplement 购自美国细胞生物公司;ox-LDL 购自广州益元生物科技有限公司;YAP (D8H1X) XP[®] Rabbit mAb #14074 抗体、Phospho-YAP (Ser397) (D1E7Y) Rabbit mAb #13619 抗体、白细胞介素 1β (interleukin-1 beta, IL- 1β) (3A6) Mouse mAb#12242 抗体、Phospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185) (81E11) Rabbit mAb #抗体、SAPK/JNK Antibody #9252 抗体、p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb #4695 抗体、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP Rabbit mAb #4370S 抗体、P38 MAPK (D13E1) XP[®] Rabbit mAb #8690 抗体、Phospho-p38 MAPK Thr180/Tyr182) (D3F9) XP Rabbit mAb #4511D 抗体、GAPDH (D16H11) XP[®] Rabbit mAb #5174 抗体购自美国 Cell Signaling 公司;抗肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 抗体、抗 IL-6 抗体购自英国 Abcam 公司。全能型凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司;细胞培养箱购自美国赛默飞公司;激光共聚焦显微镜系统购自德国 Leica 公司。

1.2 细胞培养

C57BL/6 小鼠颈椎脱臼处死,用 75% 乙醇浸泡 5 min,在灭菌超净台中分离出小鼠股骨及胫骨,用剪刀及无菌纱布清理干净骨头周围肌肉组织。将处理干净的股骨及胫骨浸泡在 75% 乙醇 2 min 后,用 PBS 清洗一遍。随后剪断骨头两端关节,用 1 mL 注射器吸取 DMEM 完全培养基,从一端将骨髓轻轻吹出,多次冲洗直至骨髓完全吹尽即可。在培养皿中用注射器轻轻吹打至骨髓细胞吹打分开。2 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min。去上清,用含有 20% 细胞培养基补充液、1% P/S、1% 谷氨酰胺、10% FBS 的 DMEM 培养基重悬,加入培养皿中,置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。培养至第 4、5 天后换新鲜培养基,至第 7 天细胞长满即可用于实验。

1.3 实验分组及给药

实验分为 5 组:正常对照组、模型组、Yoda1 干

预组、丹酚酸 B 低浓度 (SalB-L) 组和丹酚酸 B 高浓度 (SalB-H) 组。正常对照组给予 PBS 处理,模型组给予 50 mg/L ox-LDL 干预 48 h。Yoda1 干预组给予 5 μ mol/L Yoda1 预孵育 30 min 后再用 ox-LDL 刺激 48 h。丹酚酸 B 低浓度 (10 μ mol/L) 组和丹酚酸 B 高浓度 (30 μ mol/L) 组分别给予对应浓度丹酚酸 B 和 5 μ mol/L Yoda1 处理 30 min 后再用 ox-LDL 刺激 48 h。

1.4 脂质吞噬实验

将骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDM) 种于 6 孔板中,长至 80% 时给予 50 mg/L ox-LDL、Yoda1 及相应浓度的丹酚酸 B 处理 48 h。细胞用 PBS 洗涤 2 次,室温下用 4% 多聚甲醛固定 10 min,然后用 60% 异丙醇洗涤 3 min,再用 0.6% 油红 O 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中染色 30 min,然后用 60% 异丙醇洗涤细胞 2 次,最后细胞在双蒸水中清洗干净,用奥林巴斯显微镜拍摄图像。

1.5 细胞免疫荧光检测

BMDM 接种于 24 孔板爬片中,用 ox-LDL、Yoda1 及相应浓度的 SalB 处理 48 h,细胞用 PBS 洗涤 3 遍,4% 多聚甲醛固定 10 min,PBS 洗涤 3 遍,用 0.5% Triton X-100 透膜 10 min,PBS 缓冲液洗涤 3 遍,非特异性抗原封闭:用 5% BSA 室温封闭 1 h,阴干,孵育一抗 YAP (1 : 100),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,回收一抗,PBS 洗涤 3 次,孵育相应二抗,室温避光孵育 2 h,PBS 缓冲液洗涤 3 次,DAPI 工作液染细胞核,PBS 洗涤 1 次,阴干,抗荧光淬灭剂封片,Leica 共聚焦显微镜拍照,每个细胞标本至少取 6 个视野,单位面积下计数,用 Image J 软件计数分析。

1.6 Western blot 检测相关蛋白表达

6 孔板中的细胞用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,吸干 PBS,用 MinuteTM 蛋白提取试剂盒提取蛋白,每孔加入 150 μ L 配置好的裂解液,细胞刮轻轻刮下细胞,收集于 EP 管中,冰上裂解 5 min,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,吸取上清液,置于冰上备用,长期保存置于 -80 $^{\circ}$ C。使用凯基生物的核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒 (KGP150,凯基生物) 提取 BMDM 细胞核蛋白。细胞中加入预冷的 450 μ L Buffer A 和 50 μ L Buffer B 裂解液,混匀,放置冰上 30 min,4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 10 min。收集上清至新的离心管中,即为胞浆蛋白。在离心沉淀物 (细胞核) 中加入 100 μ L 预冷的 Buffer C,剧烈振荡 15 s,冰上放置 30 min,每间隔 10 min 振荡 15 s。4 $^{\circ}$ C、14 000 g 离心 30 min,尽快将上清转入预冷的微量离心管,即得核蛋白,分装并保存于 -80 $^{\circ}$ C。BCA 法测定蛋白浓

度,电泳分离蛋白转移至 PVDF 膜,5% 牛奶封闭液室温摇床上封闭 1 h,孵育对应的一抗 (1 : 1 000) 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBS-T 洗涤 3 次,室温下孵育二抗 (1 : 2 000) 1 h,TBS-T 洗 3 遍,用 ECL 显色液 Image Lab 显影成像,Image J 软件对蛋白条带分析统计。

1.7 统计学方法

用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计学分析,所有实验数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 OriginPro 2018 软件作图。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 丹酚酸 B 通过 Piezo1 抑制 ox-LDL 诱导的 BMDM 泡沫细胞形成

油红 O 染色结果显示,正常对照组细胞未见泡沫细胞形成,与模型组相比,Yoda1 干预组泡沫细胞形成显著增加 (*P* < 0.05); 与 Yoda1 干预组比较,SalB 组明显抑制 Yoda1 和 ox-LDL 诱导的泡沫细胞形成 (图 1)。这些数据提示,Yoda1 可加重 ox-LDL 处理的 BMDM 泡沫细胞形成,而 SalB 可抑制泡沫细胞的形成,因此,SalB 可能通过介导 Piezo1 在抑制泡沫细胞的形成中起到重要的调控作用。

2.2 丹酚酸 B 通过 Piezo1 抑制 ox-LDL 诱导的 BMDM 细胞内炎症因子蛋白的表达水平

与正常对照组比较,模型组炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达升高,而 Yoda1 干预组炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达高于模型组。与 Yoda1 干预组比较,SalB 低浓度和高浓度组炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达水平明显降低,差异具有显著性 (*P* < 0.05; 图 2)。这些数据表明,Piezo1 激动剂 Yoda1 可以激活 ox-LDL 诱导的巨噬细胞内炎症因子表达,而 SalB 可以抑制炎症因子的表达。

2.3 丹酚酸 B 通过 Piezo1 调控 ox-LDL 诱导的 BMDM 细胞内 YAP 的核易位

免疫荧光检测结果发现,与正常对照组比较,模型组细胞 YAP 蛋白明显向细胞核内易位,而 Yoda1 干预组向核内易位更明显,差异有显著性 (*P* < 0.05; 图 3)。与 Yoda1 干预组比较,SalB 组 YAP 蛋白向细胞核内易位明显减少。Western blot 检测各组细胞核 YAP 蛋白表达水平,结果显示,模型组细胞核 YAP 蛋白表达水平显著升高,而 Yoda1 干预组更明显,SalB 组细胞核 YAP 蛋白表达水平降低

(图3)。这些数据表明,SalB 调控 ox-LDL 诱导的 相关。
BMDM 细胞内 YAP 核转移,且与抑制 Piezo1 激活

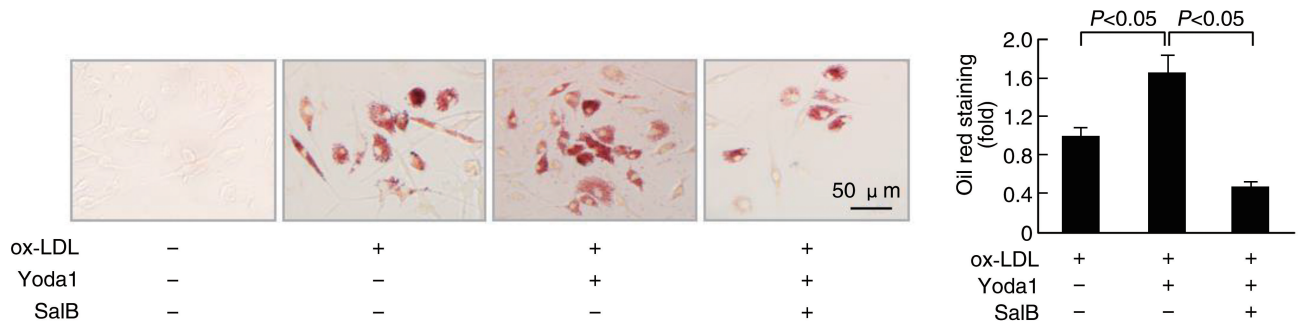


图1. 丹酚酸 B 抑制 ox-LDL 诱导的 BMDM 泡沫细胞形成 ($n=5$)

图中红色脂质沉积为泡沫细胞。

Figure 1. SalB inhibits ox-LDL-induced BMDM foam cell formation ($n=5$)

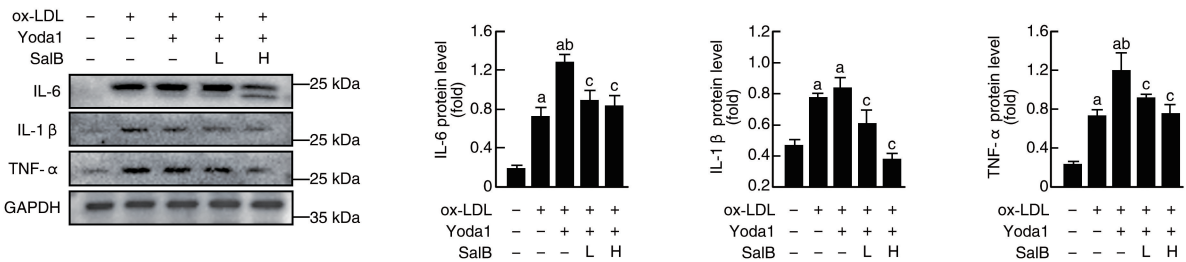


图2. 丹酚酸 B 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子蛋白表达水平的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较; c 为 $P<0.05$, 与 Yoda1 干预组比较。

Figure 2. The effect of SalB on ox-LDL-induced macrophage inflammatory factor protein levels ($n=3$)

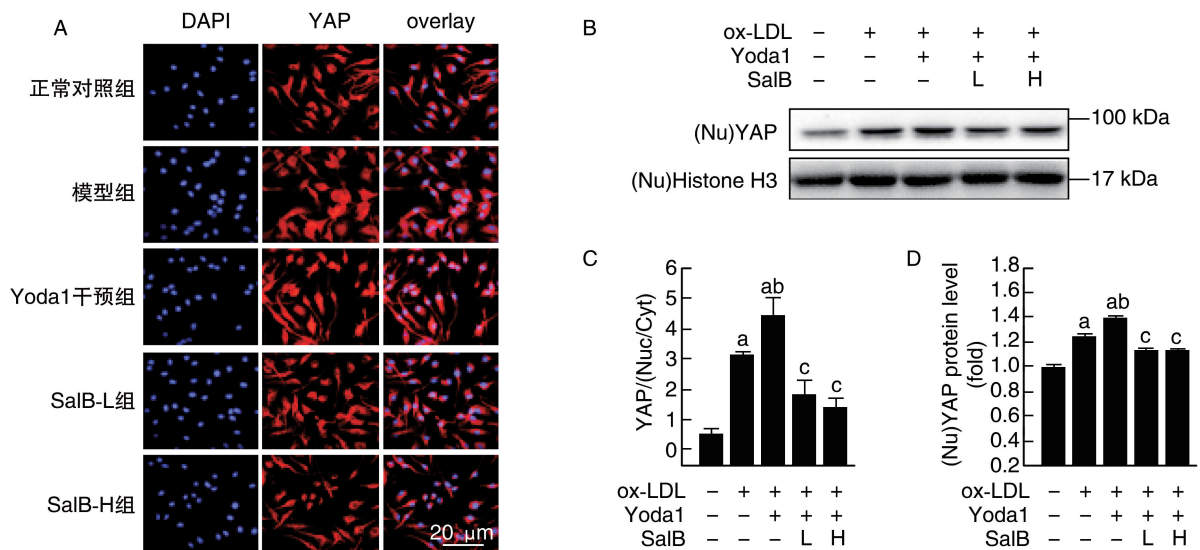


图3. 丹酚酸 B 对 BMDM 细胞 YAP 核易位的影响 ($n=3$)

A 为免疫荧光法检测各组巨噬细胞中 YAP 蛋白的核定位表达; 蓝色为 DAPI 标记的细胞核, 红色为 YAP 蛋白标记物;

B 为 Western blot 检测各组细胞核 YAP 蛋白表达水平; C 为图 A 中 YAP 蛋白核定位的统计分析, 以细胞核与细胞质的荧光强度比表示; D 为图 B 中核 YAP 蛋白条带的统计分析。

a 为 $P<0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较; c 为 $P<0.05$, 与 Yoda1 干预组比较。

Figure 3. Effect of SalB on YAP nuclear translocation in BMDM cells ($n=3$)

2.4 丹酚酸 B 通过 Piezo1 调节 ox-LDL 诱导的 BM-DM 细胞内 YAP 蛋白的表达水平

Western blot 检测巨噬细胞 YAP 和磷酸化 YAP 蛋白表达情况,结果表明,与正常对照组比较,模型组细胞磷酸化 YAP 蛋白表达量明显减少,Yoda1 干预组磷酸化 YAP 蛋白表达减少更明显,差异具有显著意义($P<0.05$);与 Yoda1 干预组相比,SalB 组磷酸化 YAP 蛋白表达显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$;图 4)。这些数据表明,SalB 调控 ox-LDL 诱导的 BMDM 细胞内磷酸化 YAP 蛋白的表达,与抑制 Piezo1 激活相关。

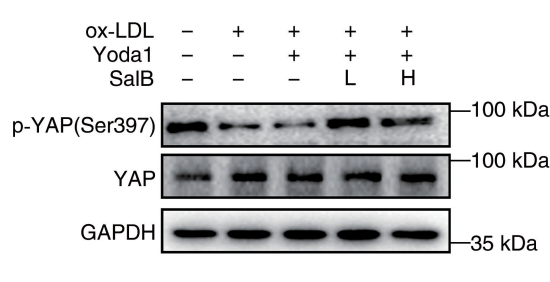


图 4. 丹酚酸 B 对巨噬细胞 YAP 蛋白及其磷酸化蛋白表达的影响($n=3$)

a 为 $P<0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.05$,与模型组比较;c 为 $P<0.05$,与 Yoda1 干预组比较。

Figure 4. Effects of SalB on the expression of YAP protein and its phosphorylated protein in macrophages ($n=3$)

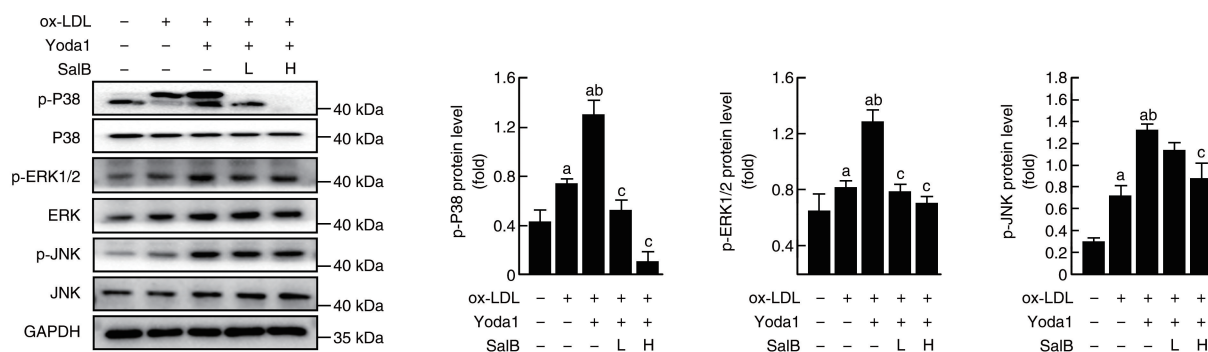


图 5. 丹酚酸 B 对巨噬细胞 MAPK 信号通路蛋白表达的影响($n=3$)

a 为 $P<0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.05$,与模型组比较;c 为 $P<0.05$,与 Yoda1 干预组比较。

Figure 5. Effects of SalB on MAPK signaling pathway protein expression in macrophages ($n=3$)

3 讨论

As 的发生发展包括一系列的病理生理过程,巨噬细胞作为 As 病变的主要参与细胞之一,在 As 的发生发展中起着至关重要的作用。在 As 形成过程中,循环中的单核细胞迁移到内膜下并分化成巨噬细胞,巨噬细胞通过清道夫受体吞噬氧化型低密度脂蛋白成为泡沫细胞,这是 As 的标志。研究表明,As 斑块好发于动脉开口、分叉和弯曲的部位^[23-24],

2.5 丹酚酸 B 抑制巨噬细胞 MAPK 信号通路级联蛋白激活依赖 Piezo1

Western blot 检测各组细胞中 MAPK 信号通路级联蛋白表达,结果发现,与正常对照组比较,模型组细胞磷酸化 P38、ERK1/2、JNK 蛋白表达升高,而 Yoda1 干预组磷酸化 P38、ERK1/2、JNK 蛋白表达升高更明显。与 Yoda1 干预组比较,SalB 组磷酸化 P38、ERK1/2、JNK 蛋白表达明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$;图 5)。这些结果表明,ox-LDL 诱导巨噬细胞激活 MAPK 信号通路蛋白,SalB 可能通过 Piezo1 抑制 MAPK 通路蛋白的活化。

而这些部位均为血流动力学改变较大的场所。Piezo1 感知血流剪切力促进血管发育^[11-12],在 As 进程中起着重要的作用^[25]。

中医药在防治心血管疾病的发生发展中起着重要的作用,治疗上以益气活血化瘀法为主。赵玉涵等^[26]研究发现,丹参-川芎配伍使用能够发挥抗 As、减轻血管内皮损伤、抗炎症反应、抗缺血再灌注损伤、抗血栓等药理作用。SalB 是活血化瘀药丹参的主要成分。研究发现,SalB 可以改善血液流变

学,减少氧化及抗炎损伤、改善血管内皮细胞功能并阻止冠状动脉疾病的发展,能降低血清和肝脏甘油三酯和总胆固醇的肝脏脂质积累水平^[27]。此外,SalB能够降低ApoE^{-/-}糖尿病小鼠血糖和血脂水平,预防并减轻As斑块的形成^[28-29]。巨噬细胞来源的泡沫细胞形成是血管As发生的重要原因,因此,抑制泡沫细胞的形成对延缓As进展有着重要意义。我们前期研究发现,SalB是Piezo1通道的特异性抑制剂,并能通过Piezo1抑制As的形成^[19],本研究结果发现SalB抑制ox-LDL诱导的BMDM泡沫细胞形成。

研究表明,Piezo1离子通道是髓系细胞循环压力的感应器,循环压力可作为免疫细胞激活的一个重要指标。体外机械刺激巨噬细胞和单核细胞,可触发选择性促炎因子和趋化因子的表达,而这种炎症机械敏感反应依赖于Piezo1^[30]。血管炎症在As进程中起重要作用。已有研究报道,SalB的保护作用是抑制活性氧和促炎细胞因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α)结合相关^[31]。此外,SalB具有抗炎作用^[32]。本研究中,我们提取骨髓来源巨噬细胞蛋白,验证SalB是否影响ox-LDL诱导巨噬细胞分泌炎症因子的表达,Yoda1干预组用ox-LDL刺激的同时加入Piezo1激动剂Yoda1,观察是否与Piezo1通道激活相关。结果表明,与正常对照组相比,模型组细胞内炎症因子蛋白水平升高,而Yoda1干预组炎症因子蛋白表达水平高于模型组;与Yoda1干预组比较,SalB组炎症因子蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。研究结果表明,SalB可能通过Piezo1通道调控炎症因子蛋白水平的表达。

血流产生的机械信号可以激活或抑制内皮细胞中的YAP活性。紊乱的血流刺激YAP/TAZ并促进As,而单向剪应力抑制YAP/TAZ,从而具有As保护作用^[21,33]。研究证实,Piezo1介导YAP/TAZ调控斑马鱼淋巴瓣膜发育、促进口腔鳞状细胞癌细胞生长^[34-35]。SalB抗As机制与抑制ox-LDL的摄取及YAP/TAZ/JNK调控的抗炎作用有关^[36]。我们用ox-LDL及Yoda1刺激BMDM细胞观察YAP蛋白核易位及磷酸化表达情况,结果发现,与正常对照组比较,模型组细胞YAP蛋白明显向细胞核内转移,而Yoda1干预组向核内易位最明显($P < 0.05$);与Yoda1干预组比较,SalB组YAP蛋白向细胞核内转移明显减少。Western blot结果提示,模型组细胞磷酸化YAP蛋白表达量明显减少,Yoda1干预组磷酸化YAP蛋白表达减少更明显;与Yoda1干预组比较,SalB组磷酸化YAP蛋白表达显著升

高。综上结果提示,SalB调控ox-LDL诱导的BMDM细胞YAP活化,可能与抑制Piezo1通道激活相关。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)主要是通过细胞外应力和细胞因子激活,激活态的MAPK使其级联激酶磷酸化,从而调控相关基因的转录和表达^[37]。研究表明ERK、JNK与p38 MAPK级联信号通路在As形成的过程中起着重要的调控作用^[38-39]。研究发现YAP/TAZ/JNK调控剪切力诱导的As形成^[21]。前期研究发现,MAPK信号通路在Yoda1诱发的Ca²⁺内流和YAP激活和易位之间起着重要的联系^[20]。为了验证SalB是否调控ox-LDL诱导的巨噬细胞MAPK信号级联蛋白表达,以及是否与Piezo1相关,本研究检测各组细胞中蛋白表达情况,与正常对照组比较,模型组细胞磷酸化P38、ERK1/2、JNK蛋白表达升高,而Yoda1干预组磷酸化P38、ERK1/2、JNK蛋白表达升高更明显;而与Yoda1干预组比较,SalB组磷酸化P38、ERK1/2、JNK蛋白表达降低。结果表明,ox-LDL诱导巨噬细胞中MAPK信号级联蛋白的激活,SalB可能通过介导Piezo1抑制MAPK级联蛋白的活化。

综上所述,活血化瘀药物SalB在As治疗中起着重要作用,前期研究证明SalB具有特异性抑制Piezo1离子通道作用。本研究证明,SalB可以介导Piezo1蛋白调控MAPK/YAP轴,从而抑制血管炎症及泡沫细胞的形成,延缓As,为中医药治疗As提供新的部分机制。但是更全面的药理机制及作用有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] ROSS R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
- [2] DAHLÖF B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment[J]. Am J Cardiol, 2010, 105(1 Suppl): 3A-9A.
- [3] LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature, 2002, 420(6917): 868-874.
- [4] HOPKINS P N. Molecular biology of atherosclerosis[J]. Physiol Rev, 2013, 93(3): 1317-1542.
- [5] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis[J]. Circ Res, 2019, 124(2): 315-327.
- [6] KOBIYAMA K, LEY K. Atherosclerosis[J]. Circ Res, 2018, 123(10): 1118-1120.
- [7] MIYAMOTO T, MOCHIZUKI T, NAKAGOMI H, et al. Functional role for Piezo1 in stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in urothelial cell cultures[J]. J Biol Chem, 2014, 289(23): 16565-16575.
- [8] ZHAO Q, ZHOU H, CHI S, et al. Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 Channel[J]. Nature, 2018, 554(7693): 487-492.

- [9] XIAO B. Levering mechanically activated Piezo channels for potential pharmacological intervention[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2020, 60: 195-218.
- [10] DE VECCHIS D, BEECH D J, KALLI A C. Molecular dynamics simulations of Piezo1 channel opening by increases in membrane tension[J]. *Biophys J*, 2021, 120(8): 1510-1521.
- [11] LI J, HOU B, TUMOVA S, et al. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force[J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 279-282.
- [12] RANADE S S, QIU Z, WOO S H, et al. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(28): 10347-10352.
- [13] WANG S, 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.
- [14] ALBARRAN J J, IRING A, WANG S, et al. Piezo1 and Gq/G11 promote endothelial inflammation depending on flow pattern and integrin activation[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(10): 2655-2672.
- [15] LIU Y, HU Y, E Q, et al. Salvianolic acid B inhibits mitochondrial dysfunction by up-regulating mortalin[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43097.
- [16] WANG Q Q, ZHAI C, WAHAFU A, et al. Salvianolic acid B inhibits the development of diabetic peripheral neuropathy by suppressing autophagy and apoptosis[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(3): 417-428.
- [17] GUO H D, CUI G H, TIAN J X, et al. Transplantation of salvianolic acid B pretreated mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction through angiogenesis and paracrine mechanisms[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 177(2): 538-542.
- [18] YANG M C, YOU F L, WANG Z, et al. Salvianolic acid B improves the disruption of high glucose-mediated brain microvascular endothelial cells via the ROS/HIF-1 α /VEGF and miR-200b/VEGF signaling pathways[J]. *Neurosci Lett*, 2016, 630: 233-240.
- [19] XIAN M P, REN T W, YU M W, et al. Salvianolic acid B inhibiting chemically and mechanically activated Piezo1 channels as a mechanism for ameliorating atherosclerosis[J]. *Br J Pharmacol*, 2022. DOI: 10.1111/bph.15826.
- [20] LIU S, XU X, FANG Z, et al. Piezo1 impairs hepatocellular tumor growth via deregulation of the MAPK-mediated YAP signaling pathway[J]. *Cell calcium*, 2021, 95: 102367.
- [21] WANG L, LUO J Y, LI B, et al. Integrin-YAP/TAZ-JNK cascade mediates atheroprotective effect of unidirectional shear flow[J]. *Nature*, 2016, 540(7634): 579-582.
- [22] LACROIX J J, BOTELLO-SMITH W M, LUO Y. Probing the gating mechanism of the mechanosensitive channel Piezo1 with the small molecule Yoda1[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2029.
- [23] LÖFFLER D, MÜLLER U, SCHEUERMANN K, et al. Serum irisin levels are regulated by acute strenuous exercise[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(4): 1289-1299.
- [24] CHIU J J, CHIEN S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(1): 327-387.
- [25] ALBARRAN J J, IRING A, WANG S, et al. Piezo1 and Gq/G11 promote endothelial inflammation depending on flow pattern and integrin activation[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(10): 2655-2672.
- [26] 赵玉涵, 肖光旭, 范斯文, 等. 丹参-川芎药对治疗心脑血管疾病的作用机制及临床研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(6): 461-469.
- ZHAO Y H, XIAO G X, FAN S W, et al. Mechanism and clinical study of Danshen-Chuanxiong herbal pair in the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(6): 461-469.
- [27] ZHANG N, HU Y, DING C, et al. Salvianolic acid B protects against chronic alcoholic liver injury via SIRT1-mediated inhibition of CRP and ChREBP in rats[J]. *Toxicol Lett*, 2017, 267: 1-10.
- [28] WANG J, XIONG X, FENG B. Cardiovascular effects of salvianolic acid B[J]. *eCAM*, 2013, 2013: 247948.
- [29] 林超, 刘兆国, 钱星, 等. 丹酚酸 B 在心血管疾病中药理作用研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(4): 449-452.
- LIN C, LIU Z G, QIAN X, et al. Progress in pharmacological effects of salvianolic acid B in cardiovascular diseases[J]. *Chin Pharmacol Bulletin*, 2015, 31(4): 449-452.
- [30] SOLIS A G, BIELECKI P, STEACH H R, et al. Mechanosensation of cyclical force by Piezo1 is essential for innate immunity[J]. *Nature*, 2019, 573(7772): 69-74.
- [31] FAN Y, LUO Q, WEI J, et al. Mechanism of salvianolic acid B neuroprotection against ischemia/reperfusion induced cerebral injury[J]. *Brain Res*, 2018, 1679: 125-133.
- [32] LV H, WANG L, SHEN J, et al. Salvianolic acid B attenuates apoptosis and inflammation via SIRT1 activation in experimental stroke rats[J]. *Brain Res Bull*, 2015, 115: 30-36.
- [33] WANG K C, YEH Y T, NGUYEN P, et al. Flow-dependent YAP/TAZ activities regulate endothelial phenotypes and atherosclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(41): 11525-11530.
- [34] DUCHEMIN A L, VIGNES H, VERMOT J. Mechanically activated Piezo channels modulate outflow tract valve development through the Yap1 and Klf2-Notch signaling axis[J]. *Elife*, 2019, 8: e44706.
- [35] HASEGAWA K, FUJII S. YAP signaling induces Piezo1 to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation[J]. *J Pathol*, 2021, 253(1): 80-93.
- [36] YANG Y, PEI K, ZHANG Q, et al. Salvianolic acid B ameliorates atherosclerosis via inhibiting YAP/TAZ/JNK signaling pathway in endothelial cells and pericytes[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(10): 158779.
- [37] RAMAN M, CHEN W, COBB M H. Differential regulation and properties of MAPKs[J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3100-3112.
- [38] RAHAMAN S O, LENNON D J, FEBBRAIO M, et al. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation[J]. *Cell Metab*, 2006, 4(3): 211-221.
- [39] ZHAO M, LIU Y, WANG X, et al. Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL[J]. *APMIS*, 2002, 110(6): 458-468.