

本文引用: 柳新媛, 杨惠, 姚童, 等. 先导化合物 NHWL06031 通过抑制 METTL3/NF- κ B 轴阻止内皮细胞焦亡和改善内皮功能[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(8): 727-735. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.08.003.

[文章编号] 1007-3949(2026)34-08-0727-09

· 实验研究 ·

先导化合物 NHWL06031 通过抑制 METTL3/NF- κ B 轴阻止内皮细胞焦亡和改善内皮功能

柳新媛¹, 杨惠¹, 姚童², 谭慧琳², 贾哲¹, 胡军³, 李国华^{1,2}

1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技创新合作基地, 湖南省衡阳市 421001; 2. 南华大学附属第七医院 湖南省荣军优抚医院, 湖南省长沙市 410118; 3. 南华大学附属第二医院心血管外科, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] **[目的]** 观察 NHWL06031 对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的血管内皮细胞焦亡和功能障碍的影响,同时探究甲基转移酶样蛋白 3/核因子 κ B(METTL3/NF- κ B)轴在其中的作用。**[方法]** 采用 ox-LDL 处理人脐静脉内皮细胞(HUVEC)24 h,并分别给予 NHWL06031 及 MCC950 干预。通过 CCK-8 法和乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测细胞活力和损伤程度,Hoechst33342/DCFH-DA 双染法检测活性氧(ROS)的生成水平,细胞划痕实验评估内皮细胞迁移能力,Western blot 检测焦亡相关蛋白及内皮功能相关蛋白表达。结合 METTL3、NF- κ B 慢病毒过表达及 METTL3 siRNA、NF- κ B siRNA 转染,检测细胞焦亡及内皮功能相关指标,明确 NHWL06031 对 METTL3/NF- κ B 轴的调控作用。**[结果]** 与对照组相比,ox-LDL 处理 24 h 的 HUVEC 细胞活力显著降低,LDH 释放增加($P < 0.01$),NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、Gasdermin 家族成员 D N 端结构域(GSDMD-N)、cleaved Caspase-1、白细胞介素 18(IL-18)及细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)蛋白表达上调($P < 0.05$),细胞迁移受到抑制,ROS 生成增多;NHWL06031 及 MCC950 可显著逆转 ox-LDL 的上述作用($P < 0.05$)。ox-LDL 处理上调 METTL3 及 NF- κ B p-p65 的表达($P < 0.05$),NHWL06031 干预下调二者水平($P < 0.01$);过表达 METTL3、NF- κ B 均加重细胞损伤及焦亡相关蛋白表达,NHWL06031 可部分逆转前述作用($P < 0.05$);si-NF- κ B 显著阻止 ox-LDL 诱导的细胞活力下降、LDH 释放及 ROS 生成($P < 0.001$),明显下调焦亡和内皮功能相关蛋白表达($P < 0.05$),并恢复细胞迁移能力。**[结论]** 先导化合物 NHWL06031 通过抑制 METTL3/NF- κ B 轴,阻止 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞焦亡,从而改善内皮功能。

[关键词] 先导化合物 NHWL06031; 动脉粥样硬化; 细胞焦亡; 内皮功能; 甲基转移酶样蛋白 3; 核因子 κ B

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

The lead compound NHWL06031 inhibits endothelial cell pyroptosis and improves endothelial function via the METTL3/NF- κ B axis

Liu Xinyuan¹, Yang Hui¹, Yao Tong², Tan Huilin², Jia Zhe¹, Hu Jun³, Li Guohua^{1,2}

1. Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. The Seventh Affiliated Hospital, Hunan Provincial Veterans Administration Hospital, University of South China, Changsha, Hunan 410118, China; 3. Department of Cardiovascular Surgery, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To examine the effect of NHWL06031 on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced pyroptosis and vascular endothelial dysfunction, and to explore the role of methyltransferase-like 3/nuclear factor-kappa B (METTL3/NF- κ B) axis in this process. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were treated with oxLDL for 24 h, followed by intervention with NHWL06031 or MCC950. CCK-8 assay and lactate dehydrogenase

[收稿日期] 2026-04-24

[修回日期] 2026-05-02

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2025JJ70115)、湖南省教育厅重点科研项目(24A0314);湖南省卫生健康委员会卫生科研课题(C202304027603)

[作者简介] 柳新媛,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础,E-mail:carrieliu@foxmail.com。李国华,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化及心肌缺血损伤的病因发病学与防治研究,E-mail:ghli@usc.edu.cn。

(LDH) detection kits were used to evaluate cell viability and cellular injury. Hoechst 33342/DCFH-DA double staining was applied to detect reactive oxygen species (ROS) production. Cell scratch assay assessed endothelial migratory capacity, and Western blot was performed to detect pyroptosis- and endothelial function-related proteins. By combining lentiviral overexpression of METTL3 or NF- κ B with transfection of METTL3 siRNA and NF- κ B siRNA, we detected indicators related to cell pyroptosis and endothelial function to clarify the regulatory effect of NHWL06031 on the METTL3/NF- κ B axis.

Results Compared with the control group, ox-LDL treatment for 24 h significantly reduced cell viability, increased LDH release ($P < 0.01$), upregulated protein expression of NOD-like receptors protein 3 (NLRP3), gasdermin D N-terminal domain (GSDMD-N), cleaved Caspase-1, interleukin-18 (IL-18), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ($P < 0.05$), inhibited cell migration, and promoted ROS production in HUVEC. These effects were significantly reversed by NHWL06031 and MCC950 ($P < 0.05$). ox-LDL increased METTL3 and NF- κ B p-p65 expression ($P < 0.05$), which were downregulated by NHWL06031 intervention ($P < 0.01$). Overexpression of METTL3 or NF- κ B aggravated cell injury and pyroptosis-related protein expression, and these effects were partially reversed by NHWL06031 ($P < 0.05$). Knockdown of NF- κ B significantly prevented ox-LDL-induced reduction in cell viability, LDH release and ROS production ($P < 0.001$), downregulated pyroptosis and endothelial function-related proteins ($P < 0.05$), and restored cell migration.

Conclusion The lead compound NHWL06031 protects against ox-LDL-induced vascular endothelial cell pyroptosis and improves endothelial function by inhibiting the METTL3/NF- κ B axis.

[**KEY WORDS**] lead compound NHWL06031; atherosclerosis; pyroptosis; endothelial function; methyltransferase-like 3; nuclear factor-kappa B

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种累及大中动脉的慢性炎症性病变,以血管内皮损伤、脂质沉积及纤维斑块形成为特征,是冠心病和脑卒中等心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 的共同病理基础^[1-3]。尽管降脂与抗血小板治疗是临床一线策略,但其长期应用的安全性和出现的耐受问题,促使学界不断探索新型靶向药物^[4-6]。因此,深入阐明 As 发病的分子机制,并研发靶向性强、耐受性良好的新型药物,具有重要的临床意义。

血管内皮细胞功能障碍是 As 发生的始动环节^[7]。在氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 等危险因素刺激下,内皮细胞发生一种由 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体介导、以 Gasdermin 家族成员 D (gasdermin D, GSDMD) 成孔及促炎因子释放为特征的程序性死亡,即内皮细胞焦亡,显著放大局部炎症并加速斑块恶化^[8-10]。因此,阐明内皮细胞焦亡的上游调控机制对于干预 As 进展至关重要。表观遗传研究表明,甲基转移酶样蛋白 3 (methyltransferase-like 3, METTL3) 在 ox-LDL 刺激下表达上调,通过增强 N⁶-甲基腺苷 (N⁶-methyladenosine, m⁶A) 修饰提高 NLRP3 mRNA 稳定性^[11-12],并与核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 协同驱动促焦亡因子转录^[13-14]。因此, METTL3/NF- κ B 轴很可能是直接调控血管内皮细胞焦亡的重要上游机制。通过干预细胞焦亡相关信号通路可能为 As 的防治提供新的策略。

大量研究表明,炎症、氧化应激是 As 和细胞焦亡的共同病理基础^[15],同时抗炎、抗氧化已成为防

治 As 的重要手段。近年来,褪黑素、水杨酸及其衍生物在 As 防治领域的研究日益增多。褪黑素通过其抗炎特性及对细胞死亡进程的调节作用,可有效减轻血管内皮损伤并延缓 As 演变;水杨酸则通过拮抗炎症、清除氧化应激及改善脂质代谢等途径发挥血管保护作用^[16-17]。王震等基于药物拼合原理,合成了一系列褪黑素与水杨酸衍生物^[18-19]。其中,先导化合物 NHWL06031 兼具优异的抗炎、抗氧化活性及药代动力学特性。前期实验发现, NHWL06031 可减轻 ox-LDL 诱导的内皮损伤并抑制 METTL3/NF- κ B 表达。基于此,先导化合物 NHWL06031 能否通过抑制 METTL3/NF- κ B 轴,阻止 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞焦亡,从而改善内皮功能,仍有待进一步研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) (中国科学院细胞生物所); DMEM 高糖培养基 (Gibco); 过表达慢病毒 (吉凯生物); siRNA (汉恒生物); RIPA 裂解液 (康为世纪); NLRP3 抗体、GSDMD 抗体、Caspase-1 抗体、白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18) 抗体、细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 抗体、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 抗体和 GAPDH 抗体 (ProteinTech); cleaved Caspase-1 抗体、METTL3 抗体、NF- κ B p65 抗体、NF- κ B p-p65 抗体和 GSDMD-N 抗体 (Cell Signaling

Technology); CCK-8 检测试剂盒(李记生物)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(Beyotime); Hoechst33342 染液(Solarbio); 二氯二氢荧光素二乙酸酯(dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)(Solarbio)。先导化合物 NHWL06031 由王震教授惠赠^[18-19], 分子结构见图 1。

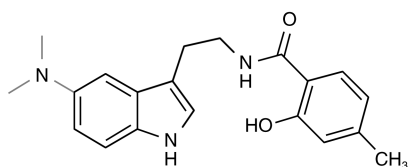


图 1. NHWL06031 分子结构图

Figure 1. Molecular structure diagram of NHWL06031

1.2 细胞培养与处理

HUVEC 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 培养条件为 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 待细胞融合达 80% ~ 90% 时传代, 选取第 3 ~ 5 代细胞用于实验。HUVEC 转染 Lv-METTL3、METTL3 siRNA、Lv-NF-κB、NF-κB siRNA 后, 在规定时间内继续培养, 开展后续实验。

1.3 Western blot 检测

细胞经 PBS 洗涤 3 次后, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min。裂解产物于 4 °C 以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为蛋白样品。样品经 10% SDS-PAGE 分离后, 转移至 PVDF 膜。膜用 5% 脱脂奶粉封闭, 室温 2 h 或 4 °C 过夜, 随后与一抗 4 °C 孵育过夜。次日 PBS 洗膜 3 次, 加入二抗室温孵育 1 ~ 2 h。最后通过化学发光法检测蛋白表达, 成像系统采集信号。

1.4 细胞活力测定

将状态良好的 HUVEC 消化后制成单细胞悬液, 以每孔 2×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 设置 3 ~ 5 个复孔, 置于培养箱中培养; 待细胞贴壁且密度达 50% ~ 60% 时, 按实验分组加药干预; 检测时每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 溶液的无血清培养基, 避免产生气泡, 于培养箱内孵育 1 ~ 4 h, 使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。

1.5 LDH 测定

细胞经分组处理 24 h 后, 收集各组培养上清液; 每组取 50 μL 上清液加入 96 孔板, 随后加入等体积 LDH 检测工作液, 混匀后室温避光孵育 30 min; 每孔再加入 50 μL 终止液, 使用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度。

1.6 活性氧检测

将 DCFH-DA 与无血清培养基按 1 : 1 000 比例

稀释配制工作液, 现用现配; 弃去 24 孔板中培养基, PBS 清洗 3 次, 每孔加入 250 μL Hoechst33342 染液, 37 °C 避光孵育 30 min; 弃染液, PBS 清洗 3 次, 加入 250 μL DCFH-DA 工作液, 37 °C 避光孵育 30 min; 弃染液, PBS 清洗 3 次, 保留少量 PBS 维持渗透压, 荧光显微镜下观察并拍照。全程避光操作。

1.7 细胞划痕实验

HUVEC 消化计数后以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板, 过夜培养细胞融合率达到 90% ~ 100%; 用 200 μL 无菌枪头垂直于 6 孔板背面的标记线和板面划痕, PBS 洗去脱落细胞, 换 1% FBS 低血清培养基或含药培养基; 按标记位置拍照记录 0 h 划痕宽度, 每孔取 ≥ 3 个固定视野。根据实验需要, 在划痕后 12、24、48 h, 在同一位置进行拍照。

1.8 慢病毒转染

本研究所采用的人源 METTL3 过表达慢病毒、NF-κB 过表达慢病毒及其空载体对照 (NC) 均购自上海吉凯基因科技有限公司。

取对数生长期 HUVEC 消化后计数并接种于 6 孔板, 培养细胞次日融合度达 30% ~ 50%; 更换培养基, 每孔加 2 mL 无血清 DMEM, 按最佳 MOI 加入慢病毒液及转染增强液, 轻摇混匀, 培养箱孵育; 24 h 后换含血清完全培养基, 继续培养使其稳定表达。Western blot 检测 METTL3 及 NF-κB 蛋白表达评估过表达效果。

1.9 siRNA 转染

人源 si-METTL3 RNA、si-NF-κB RNA 及对照 si-NC 均购自汉恒生物科技(上海)有限公司。

取对数生长期 HUVEC 接种于 6 孔板, 培养细胞次日融合度达 30% ~ 50%; 每孔取 125 μL 无血清 DMEM 分别稀释 9 μL RNAiMAX 与 3 μL siRNA, 轻吹混匀后室温静置 5 min, 两液混合后再静置 10 min; 将 250 μL 复合物滴加入孔, 轻晃混匀, 4 ~ 6 h 后换完全培养基, 继续培养 48 ~ 72 h, Western blot 筛选干扰效率最高序列。引物设计如下: METTL3 正向引物为 5'-GCUGCACUUCAGACGAAUUAUUT-3', 反向引物为 5'-AUAAUUCGUCUGAAGUGCAGCTT-3'; NF-κB 正向引物为 5'-GGAUUGAGGAGAAACGUAATT-3', 反向引物为 5'-UUACGUUUCUCCUCAAUCCTT-3'。

1.10 统计学分析

数据分析采用 GraphPad Prism 9.0 软件系统, 经 Shapiro-Wilk 检验, 本研究中所有进行统计学分析的计量资料均符合正态分布, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。在统计检验上, 两组数据差异分析选用 Student's *t* 检验方法, 多组比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NHWL06031 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 焦亡和内皮细胞功能障碍

基于课题组前期研究,本研究采用 32 $\mu\text{mol/L}$ 的 NHWL06031 探讨其对 HUVEC 的保护作用。为评估 NHWL06031 改善 100 mg/L ox-LDL 处理的 HUVEC 活力是否与细胞焦亡相关,本研究选择 NLRP3 特异性抑制剂 MCC950 作为阳性对照^[20]。CCK-8 检测结果显示,与对照组相比,ox-LDL 处理使细胞活力降低 31.3%;相较于 ox-LDL 组,NHWL06031 与 MCC950 干预可使细胞活力分别升高 32.2% 和 22.7% (均 $P < 0.01$; 图 2A); LDH 检测结果显示,与 ox-LDL 组相比,NHWL06031 和 MCC950 可使 LDH 释放水平分别减少 35.2% 和 48.1% (均 $P < 0.01$; 图 2B)。Western blot 结果显示,与对照组相

比,ox-LDL 分别使焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、Caspase-1、cleaved Caspase-1、IL-18 及内皮细胞黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 分别上调 46.1%、23.4%、95.6%、52.4%、116.1%、69.3%、114.0%、102.9%;而 NHWL06031 可使上述分子较 ox-LDL 组分别下调 33.3%、40.9%、21.4%、51.5%、38.8%、50.4%、56.8%、57.6%,与 MCC950 作用趋势一致 (均 $P < 0.05$; 图 2C、D、E)。Hoechst33342/DCFH-DA 检测结果显示,NHWL06031 和 MCC950 明显减少 ox-LDL 处理的细胞 ROS 水平 (图 2F)。细胞划痕实验结果表明,与正常对照组相比,ox-LDL 组细胞迁移能力明显降低,而 NHWL06031 和 MCC950 的干预随着培养时间延长,细胞迁移能力逐渐得到恢复,在培养 48 h 尤为明显 (图 2G)。上述结果表明,NHWL06031 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 焦亡与氧化应激,缓解内皮功能障碍。

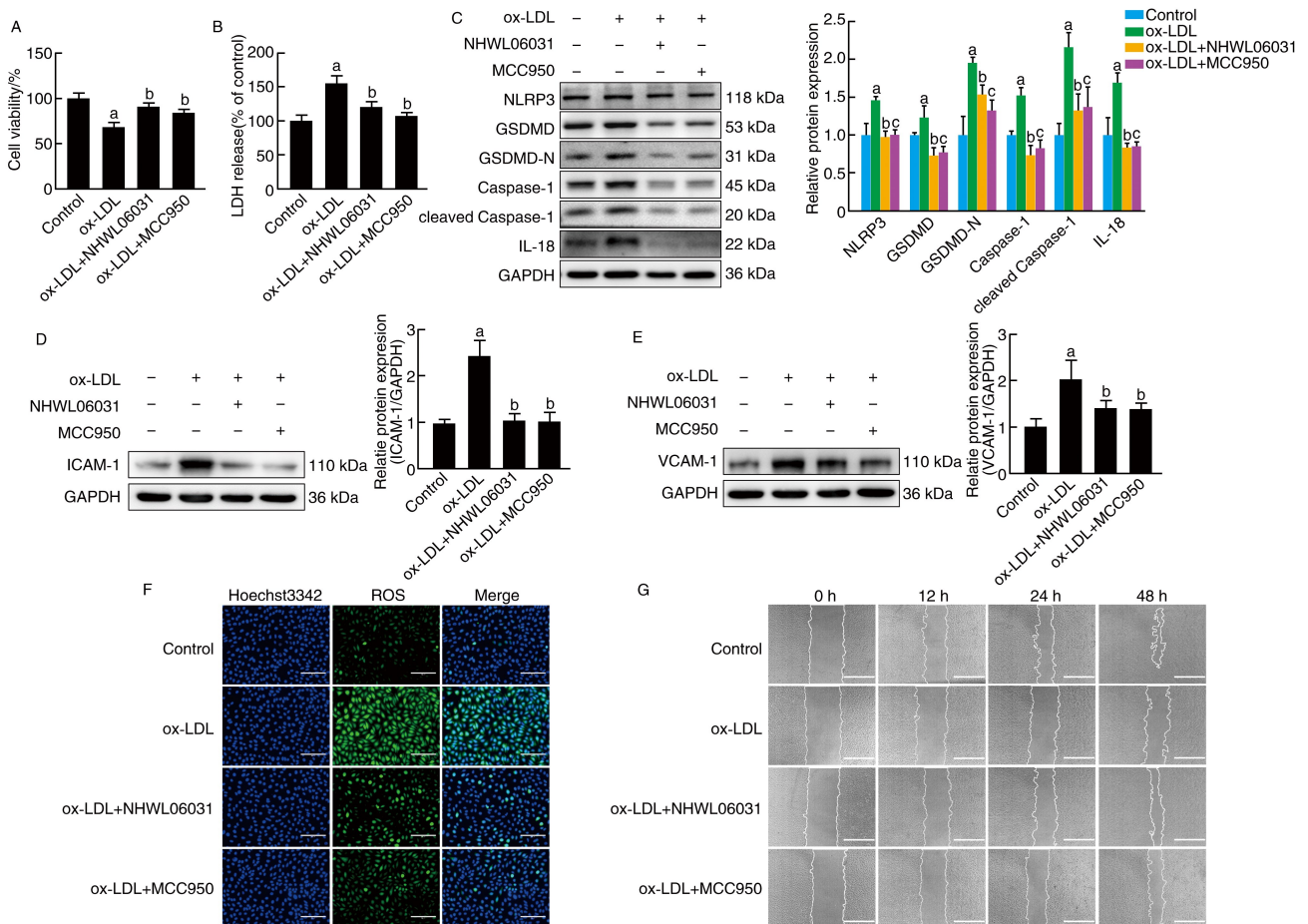


图 2. NHWL06031 对 HUVEC 细胞活力、焦亡及内皮功能的影响

A 为 CCK-8 检测 NHWL06031 和 MCC950 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 细胞活力的影响 ($n=3$); a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。B 为 LDH 检测 NHWL06031 和 MCC950 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 LDH 释放水平的影响 ($n=5$); a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。C 为 Western blot 检测 NHWL06031 和 MCC950 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、Caspase-1、cleaved Caspase-1 和 IL-18 蛋白表达的影响及定量分析 ($n=3$); a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。D、E 分别为 Western blot 检测 NHWL06031 和 MCC950 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达的影响及定量分析 ($n=3$); a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。F 为荧光显微镜观察 NHWL06031 和 MCC950 干预下 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 ROS 水平的变化 ($n=3$) (比例尺 = 150 μm)。G 为细胞划痕实验观察 NHWL06031 和 MCC950 对 ox-LDL 处理的内皮细胞迁移能力的影响 ($n=3$) (比例尺 = 750 μm)。

Figure 2. Effects of NHWL06031 on HUVECs' viability, pyroptosis, and endothelial function

2.2 NHWL06031 抑制过表达 METTL3 诱导的 HUVEC 焦亡

为验证 NHWL06031 是否通过调控 METTL3 发挥抗细胞焦亡作用,实验分组同 2.1,Western blot 结果显示,与对照组相比,ox-LDL 使 HUVEC 中 METTL3 的表达水平上调了 26.8% ($P<0.01$);与 ox-LDL 组相比,NHWL06031、MCC950 分别使 METTL3 的表达水平下调 37.9% 和 38.9% (均 $P<0.01$;图 3A)。以上结果表明,ox-LDL 可促进 HUVEC 的 METTL3 表达,而 NHWL06031、MCC950 能有效抑制 METTL3 表达。接着,采用慢病毒构建过表达 METTL3 的 HUVEC 模型,观察 NHWL06031 的干预效果。Western blot 结果显示 METTL3 过表达效率达 373.1%,过表达效果良好 ($P<0.01$;图 3B)。CCK-8 与 LDH 检测结果表明,与空载体(lentivirus-negative control,Lv-NC)组相比,过表达

METTL3 使 HUVEC 活力降低 31.7%、LDH 释放水平提升 79.4%;相较于过表达 METTL3 组,NHWL06031 干预可使细胞活力提升 21.1%、LDH 释放水平降低 25.4% (均 $P<0.05$;图 3C 和 3D)。Western blot 结果显示,与 Lv-NC 组相比,过表达 METTL3 分别使 NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、Caspase-1、cleaved Caspase-1 及 IL-18 的表达上调了 78.2%、38.9%、52.0%、48.2%、51.7% 和 51.5%;而 NHWL06031 使上述蛋白表达较 METTL3 过表达组分别下调 57.5%、38.2%、16.1%、25.8%、19.0% 和 20.1% (均 $P<0.05$;图 3E)。Hoechst33342/DCFH-DA 检测结果显示,METTL3 过表达促进细胞内 ROS 生成,NHWL06031 干预则可有效减少 ROS 水平(图 3F)。上述结果表明,NHWL06031 抑制过表达 METTL3 诱导的 HUVEC 焦亡。

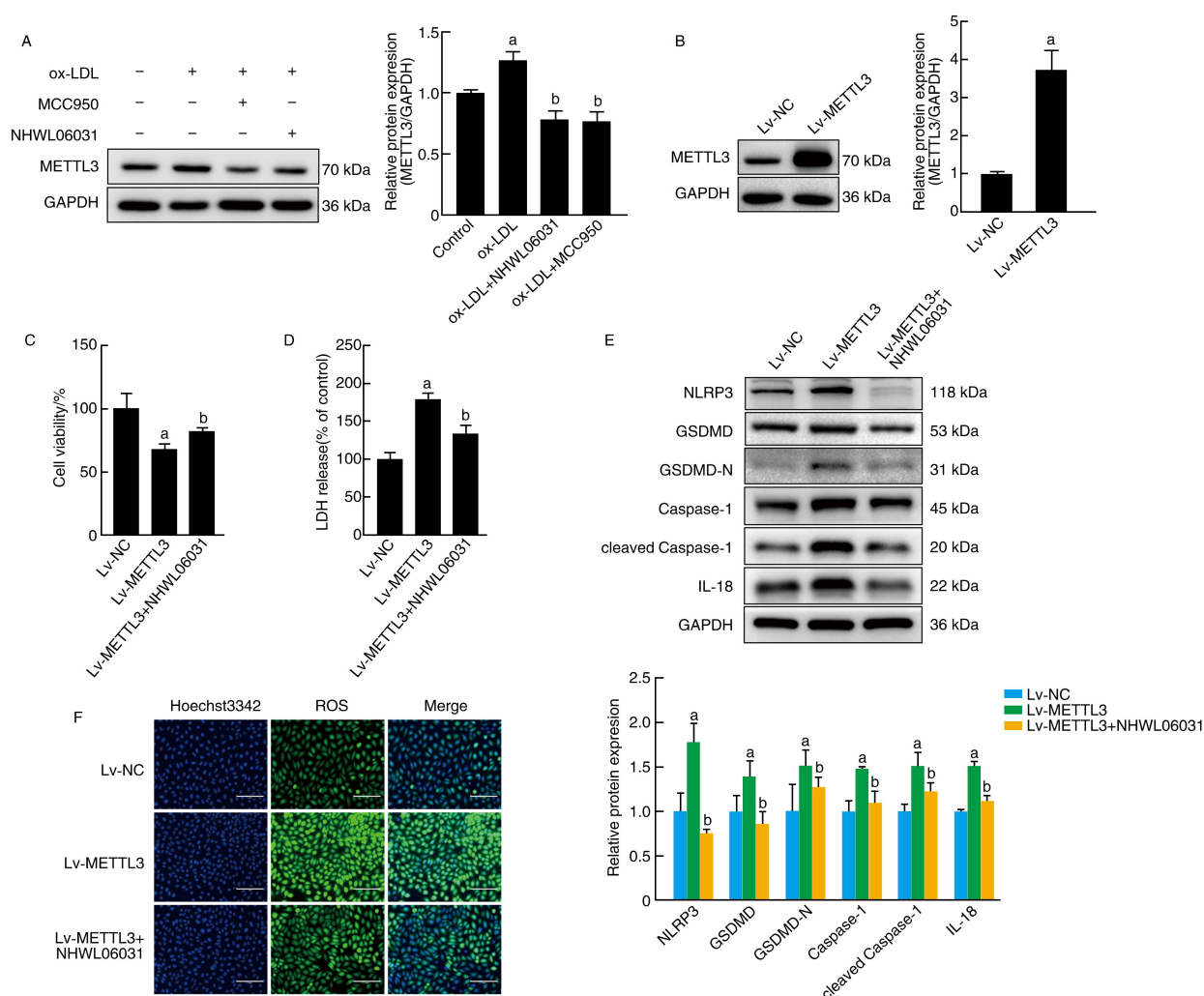


图 3. NHWL06031 对过表达 METTL3 的 HUVEC 活力和细胞焦亡的影响

A 为 Western blot 检测 NHWL06031 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 METTL3 蛋白表达的影响 ($n=3$); a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组比较。B 为 Western blot 检测提示过表达 METTL3 细胞模型构建成功 ($n=3$); a 为 $P<0.01$, 与 Lv-NC 组比较。C 和 D 分别为 CCK-8、LDH 检测 NHWL06031 对过表达 METTL3 的 HUVEC 活力及 LDH 释放水平的影响 ($n=5$); a 为 $P<0.01$, 与 Lv-NC 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 Lv-METTL3 组比较。E 为 Western blot 检测 NHWL06031 干预下过表达 METTL3 的 HUVEC 焦亡相关蛋白表达变化及定量分析 ($n=3$); a 为 $P<0.05$, 与 Lv-NC 组比较; b 为 $P<0.5$, 与 Lv-METTL3 组比较。F 为荧光显微镜观察 NHWL06031 干预下过表达 METTL3 的 HUVEC 总 ROS 水平的变化 ($n=3$) (比例尺=150 μm)。

Figure 3. Effects of NHWL06031 on the viability and pyroptosis of METTL3-overexpressing HUVEC

2.3 过表达 METTL3 促进 NF- κ B 表达

为探究 METTL3 与 NF- κ B 之间的调控关系,实验构建了 si-METTL3 的细胞模型,并分析 si-METTL3 和过表达 METTL3 对 NF- κ B 表达的影响。Western blot 结果显示,si-METTL3-002 号链干扰效率达 66.5%,效果最佳($P<0.01$;图 4A),因而被选用于后续实验。Western blot 结果显示,与对照组相比,过表达 METTL3 后,NF- κ B p65 表达上调了 90.2% ($P<0.01$),而 si-METTL3 可使 NF- κ B p65 的表达较对照组降低 30.7%,但差异无显著性($P>0.05$,图 4B)。上述结果表明,过表达 METTL3 促进 NF- κ B 表达。

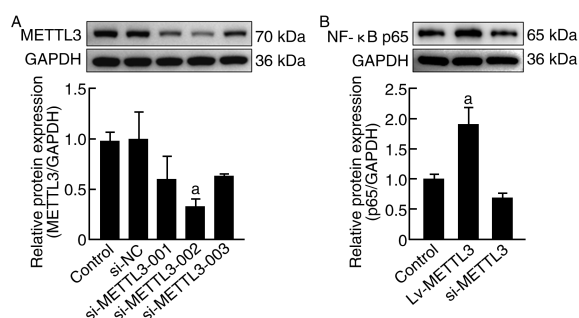


图 4. METTL3 对 HUVEC 中 NF- κ B 表达的影响

A 为 Western blot 检测 siRNA 干预后 METTL3 蛋白的表达水平($n=3$);a 为 $P<0.01$,与 si-NC 组相比。B 为 Western blot 检测 HUVEC 过表达及敲低 METTL3 后 NF- κ B p65 的表达水平($n=3$);a 为 $P<0.01$,与对照组相比。

Figure 4. Effects of METTL3 on NF- κ B expression in HUVEC

2.4 NHWL06031 抑制过表达 NF- κ B 诱导的 HUVEC 焦亡

已有研究表明,通过检测胞内 p65 和 p-p65 总量可证明 NF- κ B 激活^[21-22]。为明确 NF- κ B 在 NHWL06031 抗 HUVEC 焦亡中的作用,实验分组同 2.1,Western blot 结果显示,与对照组相比,ox-LDL 使 HUVEC 中 NF- κ B p-p65 的表达上调了 60.0%;而与 ox-LDL 组相比,NHWL06031 和 MCC950 分别使 NF- κ B p-p65 的表达下调了 43.6% 和 43.0% (均 $P<0.05$;图 5A)。以上结果表明,ox-LDL 可促进 HUVEC 中 NF- κ B 表达,而 NHWL06031 和 MCC950 能有效抑制该作用。接着,采用慢病毒构建过表达 NF- κ B 的 HUVEC 模型,观察 NHWL06031 的干预效果,Western blot 结果证实 NF- κ B 过表达效率达 323.3%,过表达效果良好($P<0.01$;图 5B)。CCK-8 与 LDH 结果表明,与对照组相比,过表达 NF- κ B 使 HUVEC 活力降低了 31.0%,LDH 释放水平升高了 86.6%;相较于过表达 NF- κ B 组,NHWL06031 干预可使细胞活力升高 26.6%,LDH 释放水平降低 24.3% (均 $P<0.01$;图 5C 和 5D)。Western blot 结果显示,过

表达 NF- κ B 使 NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、Caspase-1、cleaved Caspase-1 及 IL-18 的表达分别上调 56.1%、29.7%、68.3%、135.4%、65.9% 和 45.6%;而与过表达 NF- κ B 组相比,NHWL06031 可使上述蛋白分别下调 49.1%、27.7%、30.1%、49.0%、24.1% 和 25.6% (均 $P<0.05$;图 5E)。Hoechst33342/DCFH-DA 检测结果显示,过表达 NF- κ B 促进细胞内 ROS 生成,NHWL06031 干预则可有效减少 ROS 水平(图 5F)。上述结果提示,NHWL06031 抑制过表达 NF- κ B 诱导的 HUVEC 焦亡。

2.5 si-NF- κ B 促进 ox-LDL 诱导的 HUVEC 焦亡及内皮功能障碍

为明确 NF- κ B 在 ox-LDL 诱导内皮损伤中的作用,采用 siRNA 敲低 NF- κ B 表达,观察其对 ox-LDL 处理的 HUVEC 焦亡及功能障碍的影响。Western blot 筛选结果显示,三条候选 siRNA 中 si-NF- κ B-001 敲低效率达 84.8% ($P<0.01$;图 6A),用于后续实验。CCK-8 和 LDH 检测结果显示,与 ox-LDL 组相比,si-NF- κ B 使细胞活力升高了 24.4%,LDH 释放水平降低了 21.9% (均 $P<0.01$;图 6B 和 6C)。Western blot 结果显示,与 ox-LDL 组相比,si-NF- κ B 使 NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、Caspase-1、cleaved Caspase-1、IL-18 及内皮细胞黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 分别下调 40.7%、21.2%、48.7%、26.9%、48.7%、43.6%、44.8% 和 37.0% (均 $P<0.05$;图 6D 和 6E)。Hoechst33342/DCFH-DA 染色显示,si-NF- κ B 明显降低 ox-LDL 诱导的细胞 ROS 水平(图 6F)。划痕实验结果显示,ox-LDL+si-NF- κ B 组细胞迁移能力在 48 h 时较 ox-LDL 组明显恢复(图 6G)。上述结果表明,si-NF- κ B 能抑制氧化应激,有效对抗 ox-LDL 诱导的 HUVEC 焦亡并缓解内皮功能障碍。

3 讨论

As 是一种慢性炎症性血管病变,涉及内皮损伤、炎症反应和脂质沉积等病理过程^[1,15]。炎症反应在 As 中扮演着至关重要的角色,炎症细胞释放细胞因子,使白细胞趋化、聚集于血管壁,加剧氧化应激和氧化脂质形成^[3]。在炎症环境中,低密度脂蛋白胆固醇可被摄取并氧化形成 ox-LDL^[23],后者在动脉壁聚集不仅加剧 ROS 爆发,还持续激活 NLRP3 炎症小体,招募并活化 Caspase-1。活化的 Caspase-1 促进 IL-1 β 和 IL-18 成熟,并剪切 GSDMD 释放 GSDMD-N,导致细胞膜穿孔及内容物释放,引发细胞焦亡^[24]。研究表明,As 病变部位存在大量细胞焦亡,内皮细胞焦亡加速 As 进程,抑制焦亡则展现抗 As 作用^[15]。

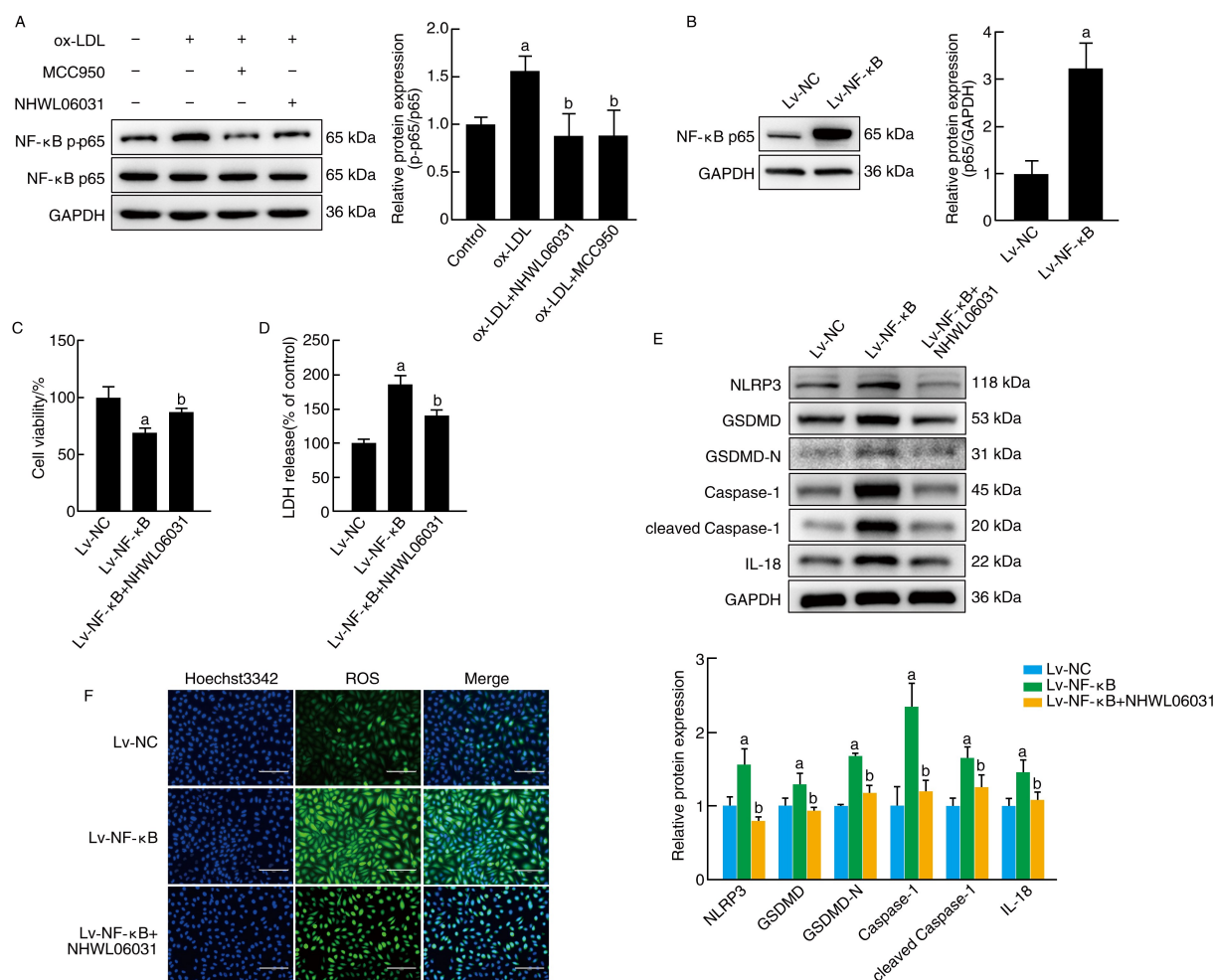


图 5. NHWL06031 对过表达 NF-κB HUVEC 细胞活力和细胞焦亡的影响

A 为 NHWL06031 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 NF-κB p-p65 和 NF-κB p65 蛋白表达的影响 ($n=3$) ; a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组比较。B 为 Western blot 检测过表达 NF-κB 细胞模型构建成功 ($n=3$) ; a 为 $P<0.01$, 与 Lv-NC 组比较。C 和 D 分别为 CCK-8 和 LDH 检测 NHWL06031 对过表达 NF-κB 的 HUVEC 活力及 LDH 释放水平的影响 ($n=3$) ; a 为 $P<0.01$, 与 Lv-NC 组比较; b 为 $P<0.01$, 与 Lv-NF-κB 组比较。E 为 NHWL06031 对过表达 NF-κB 的 HUVEC 焦亡相关蛋白表达的影响 ($n=3$) ; a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 Lv-NF-κB 组比较。F 为荧光显微镜观察 NHWL06031 干预下过表达 NF-κB 的 HUVEC 中总 ROS 水平的变化 ($n=3$) (比例尺 = 150 μm)。

Figure 5. Effects of NHWL06031 on cell viability and pyroptosis of NF-κB-overexpressing HUVEC

因此,靶向内皮细胞焦亡或为抗 As 新策略。

王震等前期设计合成了系列 N-水杨酰色胺衍生物,具有良好药代特性及抗炎抗氧化活性,并筛选出先导化合物 NHWL06031^[17-18]。本研究以 ox-LDL 诱导 HUVEC 焦亡,并以 NLRP3 抑制剂 MCC950 为阳性对照,探究 NHWL06031 在其中的作用及相关机制。发现 ox-LDL 降低内皮细胞活力,增加 LDH 释放及 ROS 大量产生,上调 NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N、IL-18 及 ICAM-1、VCAM-1 蛋白表达,抑制细胞迁移。NHWL06031 干预后上述损伤均获得减轻,效应与 MCC950 相似。表明 NHWL06031 抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞焦亡与功能障碍。

METTL3 是 m⁶A 甲基转移酶核心亚基,调控

mRNA 甲基化修饰,影响靶基因稳定性与翻译效率,在心血管病理重塑中具有重要作用^[12,24]。METTL3 表达与活性受精细的调控,对维持内皮稳态、抑制炎症细胞死亡至关重要。As 中 METTL3 功能呈细胞特异性,在巨噬细胞中介导促炎极化^[25],在平滑肌细胞中驱动表型转化促进斑块进展^[26]。内皮细胞中 METTL3 对剪切力敏感,通过上调己糖激酶 1 (hexokinase-1, HK1) 与果糖-2,6-二磷酸酶 3 (fructose-2,6-biphosphatase 3, PFKFB3) 引发糖酵解重排及功能障碍,并调节对炎症氧化应激的响应^[27]。本研究发现 ox-LDL 上调 METTL3 表达, NHWL06031 与 MCC950 均能逆转该变化。为验证 METTL3 是否介导 NHWL06031 的作用,本研究构建过表达 METTL3 的 HUVEC。结果显示,过表达 METTL3 降低细胞活力、升高 LDH 释放及

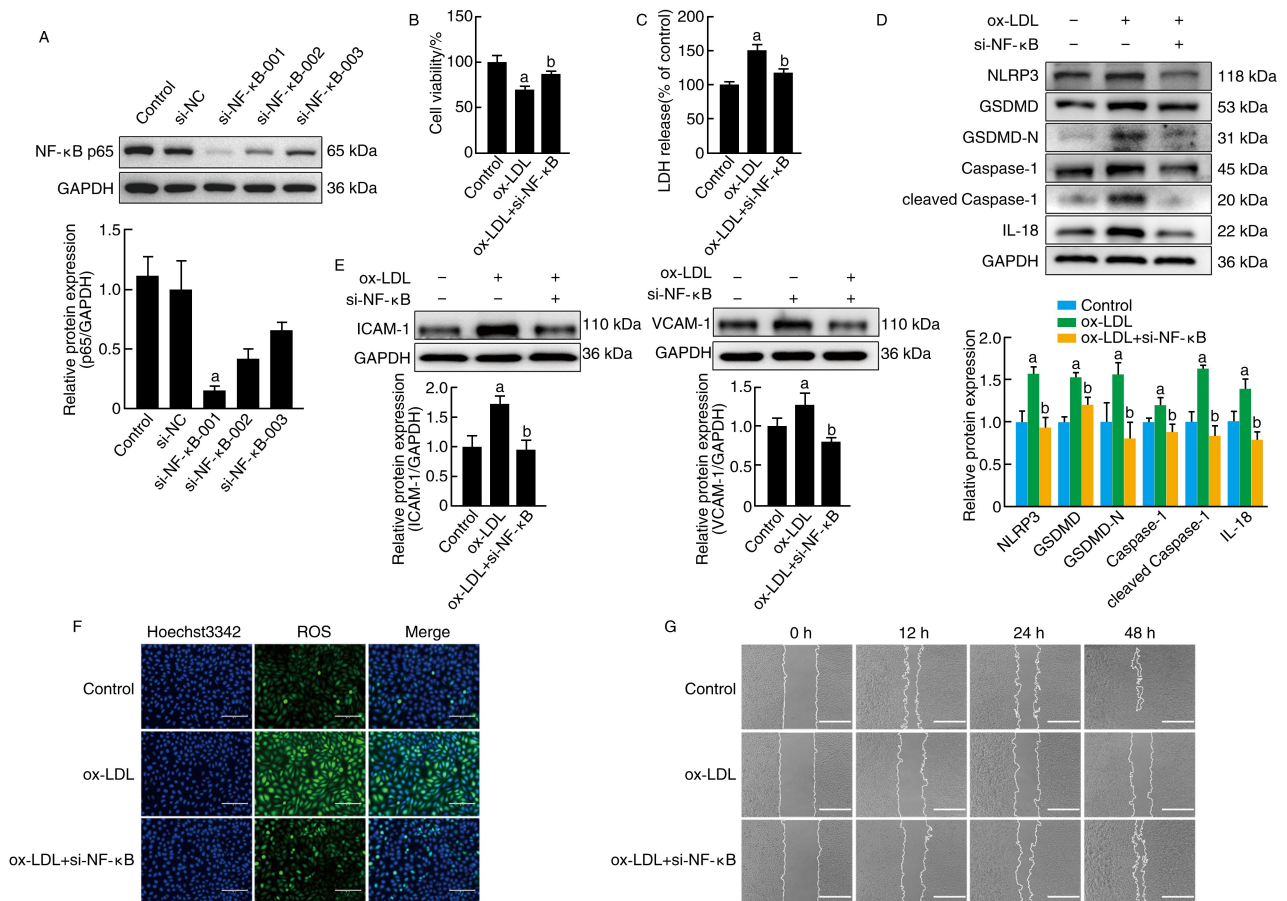


图 6. si-NF-κB 恢复 HUVEC 细胞活力并阻止细胞焦亡和内皮功能障碍

A 为 Western blot 检测 siRNA 干预后 NF-κB 蛋白的表达水平 ($n=3$): a 为 $P<0.01$, 与 si-NC 组比较。B 和 C 分别为 si-NF-κB 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 活力及 LDH 释放水平的影响 ($n=5$): a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组比较。D 为 si-NF-κB 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 焦亡相关蛋白表达的影响 ($n=3$): a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组比较。E 为 si-NF-κB 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达水平的影响 ($n=3$): a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组比较。F 为荧光显微镜观察 si NF-κB 干预及 ox-LDL 处理后总 ROS 水平变化 ($n=3$) (比例尺 = 150 μm)。G 为细胞划痕观察 si-NF-κB 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 迁移能力的影响 ($n=3$) (比例尺 = 750 μm)。

Figure 6. NF-κB knockdown restores HUVECs' viability and prevents pyroptosis and endothelial dysfunction

ROS 水平,促进焦亡相关蛋白表达,而 NHWL06031 可逆转上述效应。表明 NHWL06031 抑制过表达 METTL3 诱导的 HUVEC 焦亡,但深入机制有待进一步探索。

本研究还发现,过表达 METTL3 促进 NF-κB 表达, NHWL06031 抑制 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 NF-κB 表达。NF-κB 是关键炎症转录因子,其激活驱动 NLRP3 组装及下游促炎因子转录^[28]。构建过表达 NF-κB 的 HUVEC,结果显示细胞活力降低、LDH 释放及 ROS 产生增加,细胞焦亡相关蛋白表达上调, NHWL06031 可拮抗该效应。进一步敲低 NF-κB 的表达,则 ox-LDL 诱导的细胞活力下降、LDH 释放及 ROS 生成增加均获改善,细胞焦亡相关蛋白及黏附分子表达回落,细胞迁移能力得到恢复。上述结果表明, NHWL06031 对抗过表达 NF-κB 诱导的焦亡, NF-κB 促进 ox-LDL 诱导的 HUVEC 焦亡及内皮功能障碍。

值得注意的是, ox-LDL 发挥上述生物学效应通

常依赖于其特异性受体。凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized-lowdensity lipoprotein receptor-1, LOX-1) 是内皮细胞中摄取 ox-LDL 的主要清道夫受体。大量报道证实 ox-LDL 通过结合 LOX-1 激活 NF-κB 通路,进而上调 ICAM-1、VCAM-1 等黏附分子表达,触发炎症反应与细胞死亡^[29-30]。本研究中, ox-LDL 诱导 NF-κB 磷酸化及焦亡相关蛋白表达,而 NHWL06031 的干预可逆转这些改变并改善内皮功能。然而,本研究并未直接评价 LOX-1 在其中的作用及对 METTL3/NF-κB 轴的影响。因此,不能排除 ox-LDL 通过 LOX-1 信号激活 NF-κB 的可能,这需要在后续实验进一步明确。

本研究也存在一定局限性。首先,结论主要基于 HUVEC 体外实验,难以完全反映体内复杂性,尚需动物模型及临床研究进一步验证。其次, METTL3 介导的 m⁶A 甲基化修饰具体的 mRNA 尚未明确。

第三,如上所述,未排除 LOX-1 介导的 NF- κ B 激活对研究结果的影响。最后,NHWL06031 抑制 METTL3 表达及 METTL3 调控 NF- κ B 的具体分子机制仍需进一步阐明。综上,本研究表明,先导化合物 NHWL06031 通过抑制 METTL3/NF- κ B 轴,阻止 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞焦亡,从而改善内皮功能。本研究揭示了 NHWL06031 在 As 中的应用潜力及作用机制,为 As 的干预提供可能的新途径和候选药物。

[参考文献]

- [1] Hernandez M S, Griendling K K. RNA sequencing atherosclerosis data sets: expanding potential therapeutic targets [J]. *Circ Res*, 2024, 134(11): 1424-1426.
- [2] 国家心血管病中心. 中国心血管健康与疾病报告-2024[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2025.
National Center for Cardiovascular Diseases. Annual report on cardiovascular health and diseases in China 2024[M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2025.
- [3] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 524-533.
- [4] Xiaoyang C, Yijun C, Chenguang Z, et al. Resibufogenin protects against atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice through blocking NLRP3 inflammasome assembly [J]. *J Adv Res*, 2026, 80: 1045-1062.
- [5] Dai Y, Yang L, Cao G, et al. Combination therapy and drug co-delivery systems for atherosclerosis [J]. *J Control Release*, 2025, 381: 113543.
- [6] 代雪琦, 张冠杰, 李晶, 等. EGCG 在动脉粥样硬化防治中的作用机制及展望 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(9): 803-809.
Dai X Q, Zhang G J, Li J, et al. Mechanisms and prospects of EGCG in the prevention and treatment of atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(9): 803-809.
- [7] Xu S, Ilyas I, Little P J, et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies [J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(3): 924-967.
- [8] Liang B, Liu F, Fu C, et al. ABCA1-targeting peptide alleviates atherosclerosis via counteracting endothelial dysfunction [J]. *Cardiovasc Res*, 2026, 122(4): 438-441.
- [9] Xiang Q, Geng Z X, Yi X, et al. PANoptosis: a novel target for cardiovascular diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2024, 45(8): 739-756.
- [10] Zhou B, Abbott D. Executors of pyroptosis: a decade in perspective [J]. *Annu Rev Pathol*, 2026, 21(1): 163-184.
- [11] Newton K, Strasser A, Kayagaki N, et al. Cell death [J]. *Cell*, 2024, 187(2): 235-256.
- [12] Dong Z, Jin Y, Shen Y, et al. Methyltransferase-like 3-catalysed N⁶-methyladenosine methylation facilitates the contribution of vascular smooth muscle cells to atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2025, 121(4): 568-584.
- [13] Liu D, Ye Y, Lan Z, et al. Ultrasmall Cu_{2-x}Se nanoparticles alleviate vascular calcification through inhibiting oxidative stress and NF- κ B/NLRP3-mediated inflammation [J]. *Redox Biol*, 2026, 89: 103961.
- [14] Shamas S, Rahil R R, Kaushal L, et al. Pyroptosis in endothelial cells and extracellular vesicle release in atherosclerosis via NF- κ B-caspase-4/5-GSDM-D pathway [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, 17(12): 1568.
- [15] Björkegren J L M, Lusis A J. Atherosclerosis: recent developments [J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1630-1645.
- [16] Li H, Qin Y, Zhang J, et al. A foam cell-targeted lipophagy restoration strategy stabilizes vulnerable atherosclerotic plaques [J]. *Bioact Mater*, 2026, 61: 879-899.
- [17] Cao L, Ding Y, Li L, et al. N-salicyloyl tryptamine derivative exerts antiatherosclerotic effects by ameliorating endothelial inflammation and apoptosis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2026, 78(3): rgaf116.
- [18] Fan X, Li J, Deng X, et al. Design, synthesis and bioactivity study of N-salicyloyl tryptamine derivatives as multifunctional agents for the treatment of neuroinflammation [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 193: 112217.
- [19] Bai Y, Liu D, Zhang H, et al. N-salicyloyl tryptamine derivatives as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease with neuroprotective effects [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 115: 105255.
- [20] Coll R C, Hill J R, Day C J, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(6): 556-559.
- [21] Zhao Q, Li H, Liu D, et al. The SGLT2 inhibitor dapagliflozin suppresses endothelial cell pyroptosis mediated by the NF- κ B/NLRP3 pathway through downregulation of CTSB [J]. *Biochem Pharmacol*, 2025, 236: 116857.
- [22] Sun S, Duan X, Wu Q, et al. FABP4 inhibitor alleviates Lipopolysaccharide-induced HUVEC injury by inactivating NF- κ B and activating PPAR γ [J]. *Int Heart J*, 2024, 65(6): 1153-1160.
- [23] Schwab R D, Degaramo D, Hong S J, et al. Chimeric antigen receptor regulatory T cells targeted against oxidized low-density lipoprotein reduce atherosclerotic plaque development [J]. *Circulation*, 2026, 153(5): 319-337.
- [24] Kumari R, Ranjan P, SULEIMAN Z G, et al. mRNA modifications in cardiovascular biology and disease: with a focus on m⁶A modification [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(7): 1680-1692.
- [25] Yuan Z, Li H, Ruan B X, et al. Macrophage-derived galectin-3 contributes to pyroptosis, apoptosis and necroptosis through TLR4/MyD88/NF- κ B/NLRP3 during atherosclerosis [J]. *Clin Transl Med*, 2026, 16(3): e70637.
- [26] Stuck J, Osman I. Novel role of vascular smooth muscle cell-expressed METTL3 in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2025, 121(4): 526-527.
- [27] Zhao G J, Han S Y, Li Y, et al. METTL3 mediates atheroprone flow-induced glycolysis in endothelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2025, 122(19): e2424796122.
- [28] Sun C, Tian Y, Zheng Y, et al. KuiAnNingFang alleviates ulcerative colitis by modulating gut microbiota and NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2026, 150: 157677.
- [29] Liu Z, Li X, Pan J, et al. Oxidized low-density lipoprotein induced ferroptosis in nucleus pulposus cell contributes to intervertebral disc degeneration via LOX-1/NF- κ B/NOX signal [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 153: 114455.
- [30] Duprat F, Robles C, Castillo M P, et al. LOX-1 activation by ox-LDL induces AR and AR-V7 expression via NF- κ B and STAT3 signaling pathways reducing enzalutamide cytotoxic effects [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5082.

(此文编辑 许雪梅)