

# 基于NLRP3炎症小体探讨地奥心血康抗动脉粥样硬化作用机制

何祥, 李国莺, 汪丹丹, 陈光亮\*

(安徽中医药大学 中西医结合学院, 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012)

**[摘要]** 目的:研究地奥心血康(Di'ao Xinxuekang, DXXK)对小鼠RAW264.7巨噬细胞和动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)大鼠胸主动脉NOD样受体3(NLRP3)炎症小体的影响,探讨其抗AS的作用机制。方法:氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激RAW264.7细胞建立体外模型, MCC950和DXXK干预,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测NLRP3,衔接蛋白凋亡相关斑点样蛋白(ASC)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1) mRNA和蛋白的表达。60只雄性SD大鼠随机分为正常组,模型组,阿托伐他汀组( $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), DXXK高、中、低剂量组( $100, 30, 10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 每组10只。采用高脂饲料+维生素D<sub>2</sub>建立AS模型,全自动生化分析仪检测血脂水平,计算AS指数(AI); ELISA检测血清TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 含量; Real-time PCR和Western blot检测胸主动脉NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA和蛋白的表达; 苏木素-伊红(HE)染色和天狼星红染色观察腹主动脉及主动脉窦病理形态学变化。结果:与正常组比较,模型组RAW264.7细胞TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 与NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA和蛋白表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各药物组上述指标明显降低( $P<0.05, P<0.01$ )。与模型组比较, DXXK组大鼠胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), AI显著降低,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),血清TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 与胸主动脉NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA和蛋白表达明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),腹主动脉病变及主动脉窦纤维增生明显改善。结论: DXXK具有显著的抗AS作用,抑制NLRP3炎症小体可能是其作用机制之一。

**[关键词]** 地奥心血康; NOD样受体3(NLRP3)炎症小体; 动脉粥样硬化; 作用机制

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)20-0055-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211904

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210812.1656.009.html>

**[网络出版日期]** 2021-08-13 9:16

## Investigation on Anti-atherosclerosis Mechanism of Di'ao Xinxuekang Based on NLRP3 Inflammasome

HE Xiang, LI Guo-ying, WANG Dan-dan, CHEN Guang-liang\*

(Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Di'ao Xinxuekang (DXXK) on NLRP3 inflammasome in mouse RAW264.7 macrophages and thoracic aorta of rats with atherosclerosis (AS), so as to explore its anti-AS mechanism. **Method:** RAW264.7 cells were stimulated with oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and then intervened with MCC950 and DXXK. The contents of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expression levels of Nod-like receptor protein 3 (NLRP3), inflammasome adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), and cysteine-dependent aspartate-directed protease-1

**[收稿日期]** 20210615(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81573670);地奥集团创新课题(XXX-E190105A)

**[第一作者]** 何祥,在读硕士,从事药物防治代谢性疾病研究, E-mail: 1430682903@qq.com

**[通信作者]** \* 陈光亮,博士,教授,从事药物防治代谢性疾病研究, E-mail: chguangl@163.com

(Caspase-1) were detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blotting. Sixty male SD rats were randomly divided into the normal group, model group, atorvastatin group ( $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), as well as high-, medium-, and low-dose ( $100, 30, \text{ and } 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) DXKK groups, with 10 rats in each group. The rats were exposed to the high-fat diet and vitamin  $D_2$  for inducing AS. The blood lipid level was measured using an automatic biochemical analyzer, followed by the calculation of AS index (AI). The contents of serum TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were determined by ELISA, and the mRNA and protein expression levels of NLRP3, ASC, and Caspase-1 in thoracic aorta were assayed by Real-time PCR and Western blotting. HE staining and Sirius red staining were conducted to observe the pathomorphological changes in the abdominal aorta and aortic sinus. **Result:** Compared with the normal group, the model group exhibited significantly increased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  contents and up-regulated NLRP3, ASC, and Caspase-1 mRNA and protein expression in RAW264.7 cells ( $P < 0.01$ ). The above indexes in each drug administration group were significantly reduced in contrast to those in the model group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The comparison with the model group showed that cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and AI in each DXKK group significantly declined, while the high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was significantly elevated ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The levels of serum TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and the mRNA and protein expression levels of NLRP3, ASC, and Caspase-1 in the thoracic aorta were decreased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Abdominal aortic lesions and fibrous hyperplasia of aortic sinus were significantly improved. **Conclusion:** DXKK has a significant anti-AS effect, which is possibly related to the inhibition of NLRP3 inflammasome.

**[Keywords]** Di'ao Xinxuekang (DXKK); NLRP3 inflammasome; atherosclerosis (AS); mechanism of action

动脉粥样硬化(AS)是一个以血管内皮细胞损伤为基础、以脂质浸润和血管壁炎症为特征的病理过程,是心脑血管疾病的病理基础,严重威胁人类健康<sup>[1-2]</sup>。炎症反应参与了AS发生发展的全过程,巨噬细胞是斑块炎症反应的关键因素,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激巨噬细胞加速泡沫细胞的形成,触发炎症通路的激活,如NOD样受体3(NLRP3)炎症小体。NLRP3炎症小体能激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1),诱导前体(pro)-白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 成为成熟的IL-1 $\beta$ ,在此过程产生的蛋白和炎性因子能影响AS的进程<sup>[3-4]</sup>。

地奥心血康(DXKK)的成分是从薯蓣科植物黄山药、穿龙薯蓣根茎中提取的甾体总皂苷,具有活血化瘀,行气止痛,扩张冠脉血管,改善心肌缺血等功效,用于预防和治疗冠心病、心绞痛等疾病<sup>[5-6]</sup>。课题组前期研究表明DXKK具有抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ 表达,抗AS作用<sup>[7]</sup>。由于NLRP3炎症小体主要负责对前体IL-1 $\beta$ 的剪切及激活,使其成为有活性的IL-1 $\beta$ ,因此DXKK可能通过抑制NLRP3炎症小体的组成、装配和活化,从而抑制炎性因子IL-1 $\beta$ 等的表达发挥抗AS作用<sup>[8-9]</sup>。本文采用氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激小鼠RAW264.7巨噬细胞建立细胞模型,高脂饲料加维

生素 $D_2$ (VD<sub>2</sub>)复制AS大鼠模型,从体内和体外两方面探讨DXKK通过调节NLRP3炎症小体发挥抗AS的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物与细胞株** 60只SD雄性大鼠,7周龄,体质量( $200 \pm 20$ )g,购于山东省实验动物中心,动物合格证号SCXK(鲁)2019-0003,所有动物实验部分均经过安徽中医药大学动物伦理委员会审批。大鼠在12h明暗交替的环境中饲养,温度( $22 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 $50\% \pm 10\%$ 。小鼠单核巨噬细胞株RAW264.7购自中国科学研究院上海细胞库。

**1.2 药物与试剂** 地奥心血康胶囊和原料药(成都地奥制药集团有限公司,批号1901045);阿托伐他汀钙片(辉瑞制药有限公司,批号CG7097);阿托伐他汀钙对照品(上海源叶生物技术有限公司,批号B09A7R12611);VD<sub>2</sub>注射液(江西赣南海欣药业股份有限公司,批号19122801);ox-LDL(广州奕元生物技术有限公司,批号YB-002);MCC950(美国AbMole公司,批号M8083);胎牛血清(FBS)进口血清(美国Gbico公司,批号42Q6291K);DMEM培养基(美国SparkJade公司,批号ATNPW);苏木素,伊红,天狼星红染色试剂,小鼠TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ELISA检测试剂盒, NLRP3抗体,凋亡相关斑点样蛋白

(ASC)抗体, Caspase-1 抗体,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体, 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G, HRP 标记山羊抗小鼠 IgG, HRP 标记山羊抗大鼠 IgG(武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号分别为 CR2002143, ZH201412, CR2005052, GM1150, GM1152, LS203752, LS203745, LS203831, GB12001, GB23303, GB23301, GB23302); 大鼠 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(武汉博士德生物公司, 批号分别为 EK0526, EK0393); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术公司, 批号 102517180413); RNA 提取液, Servicebio<sup>®</sup> RT First Strand cDNA Synthesis Kit, 2 $\times$ SYBR Green 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix (Low ROX)(武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号分别为 G3013, G3330, G3321)。高脂饲料配方<sup>[10]</sup>: 0.15% 胆固醇, 21% 猪油, 78.85% 基础饲料。

**1.3 仪器** Foran370 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司); SW-CJ-IFD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); URIT-8200 型全自动生化分析仪(广西桂林优利特集团有限公司); NOVA 型超薄切片机(瑞典 LKB 公司); 164-5050 型基础电源电泳仪, Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); LAS4000 GE 型凝胶成像系统(美国 GE 公司); RT-6000 型酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司); BX51 型倒置显微镜, BX43 型正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** RAW264.7 细胞培养于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中。当单层细胞融合度达 80% 以上时用 0.25% 胰蛋白酶进行消化, 每周传代培养 2~3 次。

**2.2 细胞分组及干预** 取对数生长期 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中, 分为正常组, 模型组, MCC950 组(12 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>), DXXK 组(10 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 及 MCC950+DXXK 组, 每组设 3 个平行组, 于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后, 除正常组外, 其余各组加入 80 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> ox-LDL 刺激, 培养 24 h, 药物剂量参考文献方法制定<sup>[11-12]</sup>; MCC950 组和 MCC950+DXXK 组加入 MCC950 干预, DXXK 组及 MCC950+DXXK 组加入 DXXK 共作用 24 h; 细胞转移至无菌离心管内, 1 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 5 min(离心半径 8 cm, 下同)后收集细胞上清液待测, 细胞沉淀用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次, 弃去 PBS 后收集细胞沉淀

待测。

**2.3 动物分组、造模与给药** 60 只 7 周龄雄性 SD 大鼠, 适应性饲养 1 周, 随机分成正常组、模型组、阿托伐他汀钙组(2 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), DXXK 高、中、低(100, 30, 10 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>) 剂量组, 每组 10 只, 药物剂量、随机分组及造模方法参考课题组前期研究<sup>[7]</sup>, 正常组大鼠饲喂普通饲料, 其他组大鼠饲喂高脂饲料+VD<sub>2</sub> 腹腔注射, 实验开始前腹腔注射 VD<sub>2</sub> 6.0 $\times$ 10<sup>5</sup> U $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 实验第 3, 6, 9 周分别注射 VD<sub>2</sub> 1.0 $\times$ 10<sup>5</sup> U $\cdot$ kg<sup>-1</sup>。第 10 周开始灌胃给药, 连续 8 周。末次给药后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 随后取出各组大鼠腹主动脉至心脏部位的主动脉, 以及心脏, 分离出腹主动脉和靠近心脏的主动脉窦部于 4% 多聚甲醛中固定, 后续用于病理形态学检测<sup>[13-14]</sup>, 胸主动脉保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中, 用于基因和蛋白检测。血液样本在室温下静置 1 h, 3 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 分离血清, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中以待检测。

**2.4 大鼠血脂检测** 用全自动生化分析仪检测血清中总胆固醇(TC), 甘油三酯(TG), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量; 计算 AS 指数<sup>[15]</sup>(AI); AI=(TC-HDL-C)/HDL-C。

**2.5 ELISA 检测血清与细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的水平** 按照 ELISA 试剂盒说明书, 分别设计标准孔及对照孔, 根据 ELISA 试剂盒说明书步骤进行, 在 450 nm 波长下分别检测血清与细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的吸光度 *A*, 由标准曲线算出结果。

**2.6 Real-time PCR 检测 NLRP3, ASC 及 Caspase-1 mRNA 表达** 按照试剂盒说明书采用 TRIzol 法分别提取胸主动脉匀浆和细胞沉淀总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。胸主动脉匀浆逆转录条件为 65 $^{\circ}$ C, 5 min; 42 $^{\circ}$ C, 60 min; 70 $^{\circ}$ C, 5 min; 引物序列由武汉赛维尔生物科技有限公司合成, 扩增反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环, 每个样品重复 3 次。细胞沉淀逆转录条件为 25 $^{\circ}$ C, 10 min; 50 $^{\circ}$ C, 30 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 min; 引物序列由南京奥青生物技术有限公司合成, 扩增反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 25 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环, 每个样品重复 3 次。Real-time PCR 检测 NLRP3, ASC 及 Caspase-1 mRNA 表达, 以 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  相对定量法进行统计分析<sup>[16]</sup>。PCR 引物序列见表 1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	胸主动脉PCR引物序列(5'-3')	长度/bp	细胞PCR引物序列(5'-3')	长度/bp
NLRP3	上游 AACTGTTCTACTGCCTGTACGA	113	上游 TCTTTGCGGCTATGTACTATCT	115
	下游 TGTCTGGGAAAACACACTGAAC		下游 TTCTAATAGGACCTTCACGT	
ASC	上游 CAGTCTCCCAAATGTCCATCC	95	上游 CTGTGCTTAGAGACATGGGCA	106
	下游 CAGACATCGGCATTCTCTGTTT		下游 AGGGACACTGGTTGCAGTAG	
Caspase-1	上游 CACGTCTTGCCCTCATTACTCTG	132	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	136
	下游 TTCACCTCTTTCACCATCTCCA		下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
GAPDH	上游 TGTTACCAACTGGGACGACA	138	上游 TGCCTGGTCTGTGACTTGGAG	142
	下游 CTGGGTCATCTTTCACGGT		下游 TGTCTGGGAAGAGGTAGAAACG	

**2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白的表达** 胸主动脉研磨成匀浆,细胞沉淀经 PBS 洗涤后收集,分别提取胸主动脉和细胞总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。制备 10% SDS-PAGE 胶,每孔加入等量蛋白样品进行电泳;转移蛋白至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜后与一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜;洗膜后加入相应二抗(1:5 000)室温下摇床孵育 1.5 h;洗膜后于暗室滴加 ECL 化学发光试剂显影<sup>[17]</sup>。使用 Image J 软件,对蛋白条带进行灰度值计算,与内参比较,分析相对蛋白表达量。

**2.8 苏木素-伊红(HE)染色观察腹主动脉及主动脉窦的组织结构改变** 取出腹主动脉及主动脉窦,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,经过脱水、透明、常规石蜡包埋、切片,腹主动脉经 HE 染色,主动脉窦进行天狼星红染色,于显微镜下观察大鼠腹主动脉病

理变化及主动脉窦胶原纤维变化。

**2.9 统计学处理** 采用 SPSS 23.0 进行统计学分析,计量资料均采用  $\bar{x} \pm s$  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(LSD)检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  含量及 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 和蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组细胞 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  含量及 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 和蛋白表达均显著升高( $P < 0.01$ );经 MCC950 和 DXXK 干预后,与模型组比较,各药物干预组 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  含量及 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 和蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ ),差异有显著统计学意义;且 MCC950+DXXK 组效果优于 DXXK 组和 MCC950 组。见表 2~4,图 1。

表2 DXXK对RAW264.7细胞TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ 的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of DXXK on TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
正常		60.31±12.22	25.26±8.75
模型		222.82±27.89 <sup>1)</sup>	126.29±22.27 <sup>1)</sup>
DXXK	10	171.18±15.40 <sup>2)</sup>	61.09±13.90 <sup>3)</sup>
MCC950	12	156.83±14.92 <sup>3)</sup>	53.03±15.54 <sup>3)</sup>
MCC950+DXXK	12+10	141.57±22.93 <sup>3)</sup>	35.44±14.30 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (表 3~8 同)。

**3.2 对 AS 大鼠血脂及 AI 的影响** 与正常组比较,模型组大鼠血清 TC, TG, LDL-C 的含量及 AI 显著升高, HDL-C 含量显著下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,阿托伐他汀组和 DXXK 各剂量组血清 TC, TG, LDL-C 含量及 AI 明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ), HDL-C 含量明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 5。

**3.3 对 AS 大鼠血清 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  含量及胸主动脉**

NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 和蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  含量及胸主动脉 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较, DXXK 各剂量组和阿伐他汀组大鼠血清 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  含量及胸主动脉 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 和蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 3 DXXK 对 RAW264.7 细胞 ASC, NLRP3, Caspase-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

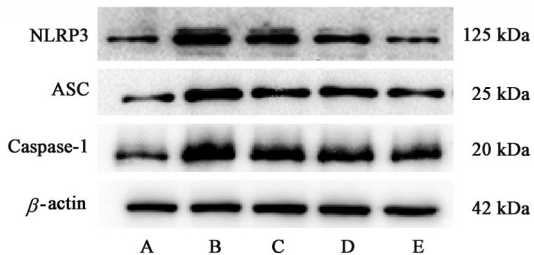
Table 3 Effect of DXXK on mRNA expression of ASC, NLRP3 and Caspase-1 in RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	NLRP3	ASC	Caspase-1
正常		1.00±0.02	1.00±0.12	1.00±0.10
模型		3.09±0.31 <sup>1)</sup>	2.54±0.11 <sup>1)</sup>	2.59±0.31 <sup>1)</sup>
DXXK	10	2.31±0.07 <sup>3)</sup>	1.97±0.12 <sup>3)</sup>	1.94±0.22 <sup>3)</sup>
MCC950	12	1.65±0.17 <sup>3)</sup>	1.71±0.21 <sup>3)</sup>	1.74±0.14 <sup>3)</sup>
MCC950+DXXK	12+10	1.63±0.13 <sup>3)</sup>	1.58±0.03 <sup>3)</sup>	1.46±0.17 <sup>3)</sup>

表 4 DXXK 对 RAW264.7 细胞 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of DXXK on the expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 protein in RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	NLRP3/ $\beta$ -actin	ASC/ $\beta$ -actin	Caspase-1/ $\beta$ -actin
正常		0.44±0.06	0.58±0.05	0.79±0.09
模型		1.21±0.03 <sup>1)</sup>	1.43±0.11	1.81±0.08 <sup>1)</sup>
DXXK	10	0.89±0.05 <sup>3)</sup>	1.04±0.08 <sup>3)</sup>	1.46±0.08 <sup>3)</sup>
MCC950	12	0.74±0.13 <sup>3)</sup>	1.06±0.10 <sup>3)</sup>	1.31±0.03 <sup>3)</sup>
MCC950+DXXK	12+10	0.44±0.07 <sup>3)</sup>	0.87±0.09 <sup>3)</sup>	1.22±0.09 <sup>3)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. DXXK 组; D. MCC950 组; E. MCC950+DXXK 组

图 1 RAW264.7 细胞 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白表达电泳  
Fig. 1 Electrophoresis of NLRP3, ASC and Caspase-1 in RAW264.7 cell

见表 6~8, 图 2。

**3.4 对 AS 大鼠腹主动脉病理变化及主动脉窦胶原纤维的影响** HE 染色光镜下, 正常组大鼠腹主动脉壁结构完整, 内膜光滑无中断, 纹理清晰, 薄厚均匀, 未见明显异常; 模型组大鼠腹主动脉壁粗糙, 内膜明显增厚, 内皮断损不连续, 平滑肌细胞增生, 排列紊乱, 内见泡沫细胞; 与模型组比较, DXXK 各剂

量组和阿托伐他汀组大鼠主动脉病变程度明显减轻。见图 3。天狼星红染色光镜下, 正常组大鼠主动脉窦部未见胶原纤维增生; 模型组大鼠主动脉窦部红色部分为胶原纤维, 其显著增加; 与模型组比较, DXXK 各剂量组和阿托伐他汀组大鼠主动脉窦部胶原纤维减少。见图 4。

#### 4 讨论

高脂饲料喂养建立 AS 大鼠模型, 可使模型大鼠产生脂质代谢紊乱, 导致血浆中的脂质在主动脉内膜下沉积并伴随内膜增厚, 炎性浸润等。联合腹腔注射 VD<sub>2</sub> 可使血钙升高, 加速 AS 的形成<sup>[18]</sup>。在 AS 病变中, 主动脉根部、主动脉弓的小弯曲处、主动脉的主要分支以及肺动脉和颈动脉容易出现病变, 主动脉窦是位于主动脉弓内的压力感受器, 研究证实 AS 发病过程中, 主动脉窦胶原纤维会增加<sup>[13-14]</sup>, 为保证组间检测相同指标所用动脉部位相同, 因此选择主动脉和主动脉窦进行病理观察。在本实验中, 造模后大鼠腹主动脉病理切片显示腹主

表 5 DXXK 对 AS 大鼠血清 TC, TG, HDL-C, LDL-C, AI 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effect of DXXK on serum levels of TC, TG, HDL-C, LDL-C and AI in AS rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TC/mmol·L <sup>-1</sup>	TG/mmol·L <sup>-1</sup>	HDL-C/mmol·L <sup>-1</sup>	LDL-C/mmol·L <sup>-1</sup>	AI
正常	10		2.44±0.42	0.93±0.19	1.33±0.18	1.21±0.31	0.88±0.40
模型	8		7.53±1.57 <sup>1)</sup>	1.95±0.31 <sup>1)</sup>	0.79±0.08 <sup>1)</sup>	3.58±0.39 <sup>1)</sup>	8.58±1.78 <sup>1)</sup>
阿托伐他汀	10	2	3.87±0.85 <sup>3)</sup>	1.20±0.23 <sup>3)</sup>	1.27±0.18 <sup>3)</sup>	1.53±0.14 <sup>3)</sup>	2.04±0.43 <sup>3)</sup>
DXXK	9	100	4.39±0.34 <sup>3)</sup>	1.33±0.36 <sup>3)</sup>	1.17±0.17 <sup>3)</sup>	1.54±0.25 <sup>3)</sup>	2.78±0.97 <sup>3)</sup>
	9	30	5.88±1.17 <sup>2)</sup>	1.70±0.37	1.16±0.15 <sup>3)</sup>	2.31±0.57 <sup>3)</sup>	4.12±1.04 <sup>3)</sup>
	8	10	6.44±1.36	1.73±0.46	1.03±0.23 <sup>2)</sup>	2.78±0.65	5.54±1.62 <sup>3)</sup>

表6 DXXK对AS大鼠血清TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Table 6 Effect of DXXK on serum TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in AS rats ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
正常	10		36.35±10.37	7.82±2.78
模型	8		160.60±40.39 <sup>1)</sup>	24.94±4.40 <sup>1)</sup>
阿托伐他汀	10	2	62.69±20.22 <sup>3)</sup>	10.98±2.13 <sup>3)</sup>
DXXK	9	100	121.58±17.88 <sup>3)</sup>	15.51±3.47 <sup>3)</sup>
	9	30	122.41±20.77 <sup>3)</sup>	17.40±3.11 <sup>2)</sup>
	8	10	142.00±27.50	22.09±5.65

表7 DXXK对AS大鼠胸主动脉ASC, NLRP3, Caspase-1 mRNA表达的影响( $\bar{x}\pm s$ )

Table 7 Effect of DXXK on mRNA expression of ASC, NLRP3 and Caspase-1 in thoracic aorta of AS rats ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	NLRP3	ASC	Caspase-1
正常		1.00±0.19	1.00±0.06	1.00±0.21
模型		4.47±0.20 <sup>1)</sup>	5.07±0.46 <sup>1)</sup>	4.97±0.34 <sup>1)</sup>
阿托伐他汀	2	1.28±0.25 <sup>3)</sup>	2.56±0.29 <sup>3)</sup>	1.25±0.37 <sup>3)</sup>
DXXK	100	1.41±0.33 <sup>3)</sup>	2.41±0.15 <sup>3)</sup>	1.91±0.31 <sup>3)</sup>
	30	1.97±0.42 <sup>3)</sup>	3.36±0.24 <sup>3)</sup>	2.30±0.48 <sup>3)</sup>
	10	2.67±0.34 <sup>3)</sup>	4.03±0.33 <sup>3)</sup>	3.35±0.34 <sup>3)</sup>

表8 DXXK对AS大鼠胸主动脉NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of DXXK on protein expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 in thoracic aorta of AS rats ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	NLRP3 / $\beta$ -actin	ASC / $\beta$ -actin	Caspase-1 / $\beta$ -actin
正常		0.11±0.03	0.08±0.03	0.12±0.02
模型		0.88±0.06 <sup>1)</sup>	0.52±0.03 <sup>1)</sup>	0.35±0.03 <sup>1)</sup>
阿托伐他汀	2	0.37±0.03 <sup>3)</sup>	0.11±0.04 <sup>3)</sup>	0.18±0.03 <sup>3)</sup>
DXXK	100	0.31±0.02 <sup>3)</sup>	0.17±0.07 <sup>3)</sup>	0.20±0.03 <sup>3)</sup>
	30	0.60±0.04 <sup>3)</sup>	0.30±0.07 <sup>3)</sup>	0.29±0.04 <sup>2)</sup>
	10	0.73±0.07 <sup>3)</sup>	0.34±0.04 <sup>3)</sup>	0.32±0.03

动脉壁粗糙,内膜明显增厚,平滑肌细胞增生,排列紊乱,内见泡沫细胞聚集,表明AS模型建立成功。阿托伐他汀通过抑制HMG-CoA还原酶发挥调脂作用,且具有抑制NLRP3炎症小体减轻炎症反应发挥抗AS的作用,DXXK也具有调脂和抗炎作用。在DXXK和阿托伐他汀药物干预后,腹主动脉病变得到不同程度改善,主动脉窦胶原纤维也不同程度减少,表示阿托伐他汀和DXXK均可减轻AS大鼠腹主动脉病变,发挥抗AS作用。

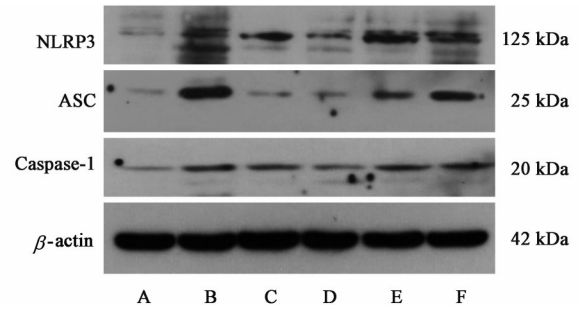


图2 DXXK对AS大鼠胸主动脉NLRP3, ASC和Caspase-1蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of NLRP3, ASC and Caspase-1 protein expression in thoracic aorta of AS rats

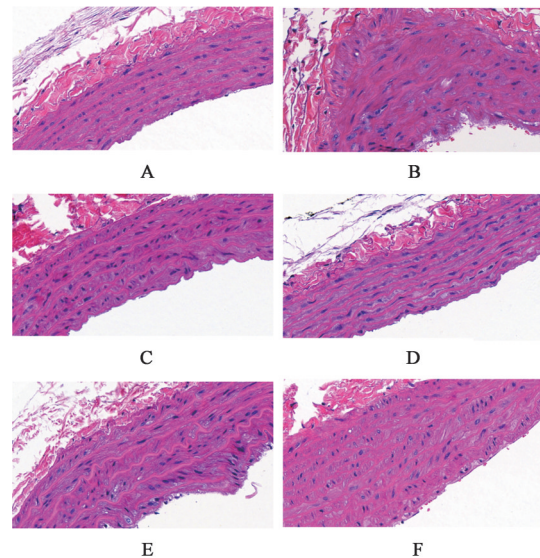


图3 DXXK对AS大鼠腹主动脉组织结构的影响(HE, ×400)

Fig. 3 Effect of DXXK on tissue structure of abdominal aorta in AS rats (HE, ×400)

AS是一个以血管内皮细胞损伤为基础、以脂质浸润和血管壁炎症为特征的病理过程<sup>[1]</sup>。当促炎单核细胞被募集到动脉的内膜层时,单核细胞分化为巨噬细胞;当发生脂质代谢障碍后,体内TC, TG和LDL-C含量会升高,进而产生的ox-LDL促进巨噬细胞转化为泡沫细胞,释放的促炎细胞因子导致一系列炎症反应,使脂质沉积在血管壁上形成AS斑块,而高密度脂蛋白(HDL)则能对抗这一病理过程,抑制泡沫细胞产生炎症因子<sup>[19-21]</sup>。NLRP3炎症小体参与AS,是AS中炎症和脂质代谢之间的联系, NLRP3炎症小体由NLRP3, 凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1前体(pro-Caspase-1)组成<sup>[22-23]</sup>。NLRP3炎症小体被AS病变中丰富存在的各种内源性危险信号激活,如

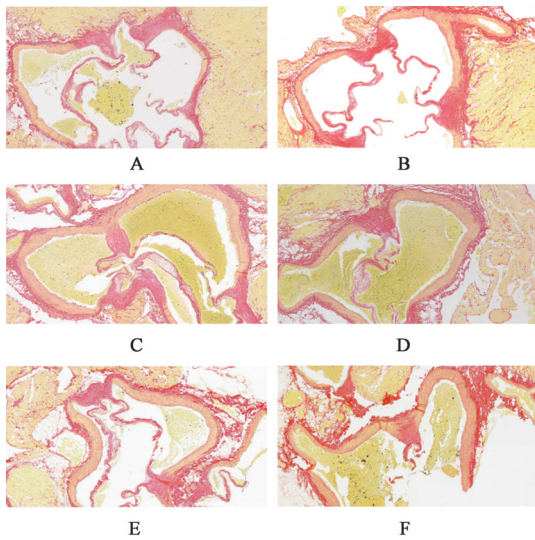


图4 DXXK对AS大鼠主动脉窦部胶原纤维的影响(天狼星红,×50)

Fig. 4 Effect of DXXK on collagen fibers in aortic sinus of AS rats (Sirius red,×50)

ox-LDL和胆固醇晶体与动脉血管内巨噬细胞膜上的NLRs和TLRs受体相连,导致巨噬细胞的蓄积并形成泡沫细胞,大量泡沫细胞沉积在内膜上形成AS斑块;TLRs受体被刺激会激活NF- $\kappa$ B以增加TNF- $\alpha$ ,IL-6,pro-IL-1 $\beta$ ,pro-IL-18的表达;NLRs受体被刺激使NLRP3炎症小体完成组装,使pro-Caspase-1水解成活性的Caspase-1,活化后的Caspase-1剪切pro-IL-1 $\beta$ ,pro-IL-18使其成为成熟的IL-1 $\beta$ ,IL-18,从而增强炎症反应,推动AS的发生和发展<sup>[24-26]</sup>。本研究特色之一是通过体内和体外实验同时探讨DXXK抗AS的作用是否与调节NLRP3炎症小体有关。采用ox-LDL刺激小鼠RAW264.7细胞建立细胞模型,用DXXK或(和)NLRP3炎症小体特异性抑制剂MCC950干预。ox-LDL刺激RAW264.7细胞,使其生成泡沫细胞进而释放炎症因子,是目前常用的复制AS细胞模型的方法。结果显示RAW264.7细胞经ox-LDL刺激后,NLRP3炎症小体被激活,IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 表达增加;用DXXK或MCC950干预,均发现NLRP3炎症小体活性被抑制,有效地降低RAW264.7细胞中NLRP3,ASC及Caspase-1 mRNA和蛋白的表达,减少细胞上清液中炎症因子IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 的含量,并且DXXK与MCC950合用效果呈现协同作用,表明DXXK可以靶向作用于NLRP3炎症小体,抑制其活性,降低炎症因子的表达,从而减轻炎症反应。体内实验结果显示,DXXK显著降低AS大鼠血清中TC,TG,LDL-C,升高HDL-C,且AI显著降低,AI是一个衡量动脉硬化程度的指标,数

值越高则代表硬化的程度越严重;这些结果表明DXXK具有调节AS大鼠的血脂异常以及改善腹主动脉病变的功能。对AS大鼠血清中炎症因子含量和胸主动脉中的NLRP3炎症小体相关基因和蛋白进行了检测,发现DXXK可有效的抑制NLRP3炎症小体活性,降低炎症因子的表达,减轻AS大鼠炎症反应,发挥抗AS的作用。

综上所述,本研究表明DXXK可以调节AS大鼠的血脂,降低AI,改善腹主动脉病变,抑制AS大鼠胸主动脉和ox-LDL刺激的RAW264.7细胞中NLRP3炎症小体的活性,下调IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达,减轻炎症反应,发挥明显抗AS作用,抑制NLRP3炎症小体可能是其作用机制之一。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] GISTERÅ A, HANSSON G K. The immunology of atherosclerosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13 (6) : 368-380.
- [2] 王淼,刘静,赵冬. 中国心血管病预防指南(2017)动脉粥样硬化性心血管病发病危险评估方法概述[J]. 中国循环杂志,2018,33(S2):10-13.
- [3] ZHU Y, XIAN X, WANG Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation[J]. Biomolecules, 2018, 8(3):80.
- [4] KARASAWA T, TAKAHASHI M. Role of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis [J]. J Atheroscler Thromb, 2017, 24(5):443-451.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:862.
- [6] ZHANG S, LI L, DENG M, et al. Di'ao Xinxuekang: therapeutic potential in cardiovascular diseases [J]. Curr Mol Pharmacol, 2021, doi: 10.2174/1874467214666210203212341.
- [7] 章维志,李国莺,祁芹,等. 地奥心血康对动脉粥样硬化大鼠TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B信号通路的调节作用[J]. 中国中药杂志,2020,45(3):602-608.
- [8] MANGAN M S J, OLHAVAL E J, ROUSH W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17 (8) : 588-606.
- [9] SU M, WANG W, LIU F, et al. Recent progress on the discovery of NLRP3 inhibitors and their therapeutic potential[J]. Curr Med Chem, 2021, 28(3):569-582.
- [10] 王东风,张瑞芬. 两种不同高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型的比较[J]. 湖北中医杂志,2019,41(4):9-11.

- [11] 刘爱敏. 多巴胺经 NLRP3 炎症小体抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [12] 秦江瑜, 康毅, 张真, 等. 地奥心血康对培养 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护机制[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(1): 37-39.
- [13] NAKASHIMA Y, PLUMP A S, RAINES E W, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14(1): 133-140.
- [14] YU P, XIONG T, TENEDERO C B, et al. Rosuvastatin reduces aortic sinus and coronary artery atherosclerosis in SR-B1 (scavenger receptor class B type 1)/ApoE (apolipoprotein E) double knockout mice independently of plasma cholesterol lowering[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(1): 26-39.
- [15] 郑琴, 黄波, 孙燕淑, 等. 动态动脉硬化指数与老年冠心病的相关性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(5): 470.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] 王创畅, 吴伟, 魏伟超, 等. 清热、活血中药调控 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号干预动脉粥样硬化大鼠模型的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(3): 576-580.
- [18] LEONG X F, NG C Y, JAARIN K. Animal models in cardiovascular research: hypertension and atherosclerosis [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 528757.
- [19] KOBAYAMA K, LEY K. Atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 123(10): 1118-1120.
- [20] 邓艳, 许晓婷, 雷霆雯, 等. phiC31 整合酶介导的低密度脂蛋白受体基因治疗对小鼠动脉粥样硬化病变的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(6): 572-576.
- [21] LUO J, WANG X, JIANG X, et al. Rutaecarpine derivative R3 attenuates atherosclerosis via inhibiting NLRP3 inflammasome-related inflammation and modulating cholesterol transport [J]. *FASEB J*, 2020, 34(1): 1398-1411.
- [22] 王璐, 李璐, 陈光亮. NALP3 炎症小体在痛风发病中的作用与药物治疗研究进展 [J]. 生命科学, 2016, 28(3): 405-408.
- [23] 王文文, 韩文贝, 万毅刚, 等. 糖尿病肾病 NLRP3 炎症小体活化的分子调控机制及中药的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(1): 7-13.
- [24] 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.
- [25] GREBE A, HOSS F, LATZ E. NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 122(12): 1722-1740.
- [26] KOUSHKI K, SHAHBAZ S K, MASHAYEKHI K, et al. Anti-inflammatory action of statins in cardiovascular disease: the role of inflammasome and toll-like receptor pathways [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2021, 60(2): 175-199.

[责任编辑 周冰冰]