

三黄泻心汤抑制危险脂肪因子 7-keto 诱导血管内皮 NLRP3 活化引起的功能紊乱的机制分析

林逸科¹, 谢银燕², 骆林喆¹, 郑新月¹, 郑怡佳¹, 陈扬^{1*}

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学 基础医学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:** 研究三黄泻心汤(SHXXT)能否通过抑制 7-酮基胆固醇(7-keto)诱导的血管内皮细胞 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)活化恢复内皮功能。**方法:** 培养小鼠主动脉血管环组织,实验组分为正常组,模型 7-keto 组,三黄泻心汤含药血清 1%,2%,5% 不同浓度给药组,观察小鼠血管舒张功能;培养微血管内皮细胞,按照上述实验分组,另设置 NLRP3 抑制剂异甘草素(ISO),通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测内皮一氧化氮合酶(eNOS),NLRP3,含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1),白细胞介素-1 β (IL-1 β)蛋白表达量的变化,除此之外,利用一氧化氮(NO)定量试剂盒检测 NO 的浓度。**结果:** 与正常组比较,模型组显著降低血管环内皮依赖性舒张功能($P < 0.01$),给药组明显恢复内皮依赖性血管舒张功能,且成浓度依赖性($P < 0.05, P < 0.01$);同时研究显示,与正常组比较,模型组微血管内皮细胞 eNOS 蛋白表达明显降低($P < 0.05$),NLRP3, Caspase-1, IL-1 β 蛋白表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),NO 浓度显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,给予三黄泻心汤血清治疗后,明显升高 eNOS 蛋白表达和 NO 浓度,明显降低 NLRP3, Caspase-1, IL-1 β 蛋白表达($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:** 三黄泻心汤能改善 7-keto 引起的内皮依赖性血管功能损伤,且是通过抑制内皮 NLRP3 炎症小体活化介导的 NO 信号通路实现的。

[关键词] 高血脂; 内皮; 三黄泻心汤; NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3); 内皮一氧化氮合酶 (eNOS); 血管舒张

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0031-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192401

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190905.1735.003.html>

[网络出版时间] 2019-09-06 09:12

Effect of Sanhuang Xiexintang in Inhibiting 7-Ketocholesterol-induced Endothelial Disfunctional by NLRP3 Inflammasome Pathway

LIN Yi-ke¹, XIE Yin-yan², LUO Lin-zhe¹, ZHENG Xin-yue¹, ZHENG Yi-jia¹, CHEN Yang^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study whether Sanhuang Xiexintang (SHXXT) can restore endothelial function by inhibiting the activation of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) induced by 7-ketocholesterol (7-keto) in vascular endothelial cells. **Method:** The aortic rings of mice were cultured in normal group, model (7-keto) group, SHXXT groups (1%, 2% and 5% drug-containing serum). Vasodilation function of mice was observed. Microvascular endothelial cells were cultured according to the above experimental groups, and NLRP3 inhibitor isoglycyrrhizin (ISO) group, was also set. Western blot was used to detect the expressions of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), NLRP3, cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1), interleukin-1 β (IL-1 β)

[收稿日期] 20190515(014)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81603587);广东省杰出青年科学基金项目(2018B030306027);“攀登计划”广东大学生科技创新培育专项(pjhb0122,pjhb0123);国家大学生创新训练项目(201810572026,S201910572006)

[第一作者] 林逸科,在读硕士,从事心血管药理研究,E-mail:linyinke9527@163.com

[通信作者] * 陈扬,博士,研究员,从事心血管药理研究,E-mail:yuchen8@gzucm.edu.cn

protein. In addition, nitric oxide (NO) quantitative kit was used to detect the concentration of NO. **Result:** Compared with the normal group, the endothelium-dependent vasodilation function of vascular rings was significantly reduced in model group ($P < 0.01$), and the drug group significantly restored the endothelium-dependent vasodilation function in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Meanwhile, microvascular endothelial cells were also studied. Compared with the normal group, the content of eNOS protein in the model group decreased ($P < 0.05$), while the concentration of NO decreased significantly ($P < 0.01$). After treatment with SHXXT serum, eNOS and NO could be restored, with significant differences in the concentration of NO with 5% ($P < 0.05$) and 10% ($P < 0.01$) SHXXT serum. At the same time, the expressions of NIRP3 ($P < 0.05$), cle-Caspase-1 activation ($P < 0.01$) and IL-1 β production ($P < 0.01$) in endothelium were significantly increased under 7-keto stimulation, and the SHXXT serum could significantly inhibit the expression and activation of relevant proteins. Subsequently, endothelial cells were treated with NIRP3 inhibitor ISO. Compared with the model group, eNOS expression increased, and NO concentration increased significantly ($P < 0.01$) after treatment with ISO, but ISO had no synergistic effect on SHXXT serum. **Conclusion:** SHXXT can improve endothelium-dependent vascular dysfunction induced by 7-keto, which is achieved by NO signaling pathway mediated by inhibiting the activation of endothelial NIRP3-related proteins.

[Key words] hyperlipidemia; endothelium; Sanhuang Xiexintang; NOD-like receptor protein 3 (NLRP3); endothelial nitric oxide synthase (eNOS); vasodilation

心血管疾病有很高的死亡率^[1],而高脂血症与心血管病关系密切。临床研究证实,在高血脂影响下,血管内皮细胞释放的一氧化氮(NO)与氧离子间的平衡被打破,常致使血管内皮细胞发生功能障碍。同时最新研究证明,内皮细胞的早期损伤不需要炎性细胞的侵蚀,而是当内皮细胞自身受到高血脂的刺激时,内皮炎症小体被激活,其中 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)相关蛋白尤为突出,最终导致内皮细胞连接蛋白功能性受损^[2-3]。由此不难看出,高脂引起的血管病变可以通过抑制血管内皮炎症发生来控制疾病的发展过程。高脂血症病人血管内会累积脂质而造成血管堵塞,最终导致血流凝滞不畅,引起疾病加重,恶性循环,而中医则称此类疾病病证为“痰浊血瘀”^[4]。

三黄泻心汤作为经典的中医方剂,是由大黄、黄芩和黄连片 3 味药配伍组成,在东汉时期张仲景《金匮要略》首次记载,其主要功效是清热解毒^[5],临床上主要用于治疗心胃火邪内炽证。现代研究结果也表明此方可改善血液的高凝状态,对缺血性脑血管疾病有一定疗效^[6],具有降脂,减轻动脉粥样硬化斑块的形成及血管内皮细胞保护作用^[7]。但其对血管内皮细胞 NLRP3 炎症小体的作用机制尚不清楚。因此,本文在三黄泻心汤具有降脂保护血管损伤的药效研究基础上,探讨三黄泻心汤能否通过抑制 7-酮基胆固醇(7-keto)诱导的血管内皮 NLRP3 炎症小体活化及相关通路,从而恢复内

皮功能。这为阐明三黄泻心汤改善高脂血症的作用机制,为合理利用三黄泻心汤及揭示该方的科学内涵,探索中药复方配伍研究的新模式提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞和动物 小鼠微血管内皮细胞购自上海 ATCC 公司。动物购自广东省动物中心,本课题经过广州中医药大学伦理委员会批准,批准号为 2016046。

1.2 药物 三黄泻心汤由黄芩(批号 170901),黄连(批号 170804),大黄(批号 170801)组成,饮片购自广东至信药业,质量符合实验要求,均由广州中医药大学中药学院黄海波副教授鉴定均为正品。

1.3 试剂 NLRP3 抑制剂异甘草素(ISO)(北京 Solarbio 公司,货号 SI8220);BCA,NO 试剂盒(碧云天生物技术研究所,货号分别为 P0028, S0021);胰酶,DMEM 培养基,胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号分别为 25200056, 111995065, 16140071);7-keto(德国 Cayman Chemical 公司,货号 0460384-17);乙酰胆碱(Ach,美国 Sigma 公司,货号 A2661); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,货号 BMO627);半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)抗体(美国 Santa Cruz 公司,货号 sc-56036);白细胞介素-1 β (IL-1 β),NLRP3 抗体(英国 Abcam 公司,货号分别为 ab9722, ab91413);一氧化氮合酶(eNOS),兔抗免疫球蛋白(Ig)G,鼠抗兔 IgG(美国 CST 公司,货号分别为 32027s, 7074s,

7076s); 硝普钠(Snp, 上海麦克林生化科技有限公司, 货号 S817931)。

1.4 仪器 TANON5200 型发光成像分析系统(上海天能科技有限公司); DMT620M 型微血管张力测量系统(丹麦 Danish Myo Technology A/S 公司); 1645070 型凝胶电泳仪, 1703930 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); Multiskan Sky 型全波长酶标仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 按照参考文献[8]方法, 煎好三黄泻心汤, 用三黄泻心汤灌胃 4 只大鼠 1 周, 每天 1 次, 每次 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。最后 1 次灌胃后 60 min 进行腹主动脉取血, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 置于 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min, 冷却后用微孔滤头过滤密封冷冻备用。

2.2 细胞培养和给药 小鼠微血管内皮细胞用 DMEM 完全培养基在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 恒温培养箱中培养, 每 3 d 传代。7-keto 配成 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为储备液, 用 DMEM 空白培养基按体积比例加入含药血清配制含药血清浓度为 1%, 2%, 5%, 10% 的含药培养基; 正式实验时, 分为正常组, 模型组(终浓度 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 7-keto), 给药组(含药血清浓度为 1%, 2%, 5%, 10%), ISO 组($4.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISO), 细胞在上述环境中培养 24 h。

2.3 血管张力检测 在洁净工作台取正常野生型 C57 小鼠主动脉, 剪成 2~3 mm 长的血管环, 同上述细胞实验分组, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中体外培养 1 d。1 d 后用不同浓度的 Ach 和 Snp 通过微血管张力测量系统检验血管功能。血管舒张率 = (血管最大张力 - 每次加入 Ach 或 Snp 后的血管张力) / (血管最大张力 - 基线张力)。一般以 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ach 和 Snp 作用下的最大舒张率为各组主要比较和考量指标。

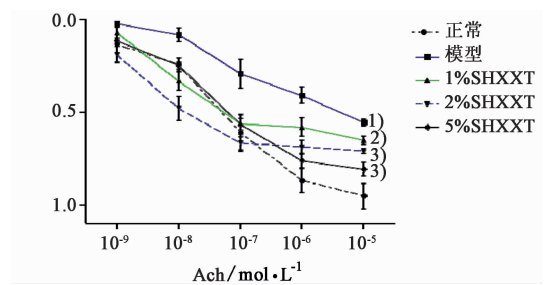
2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测内皮细胞蛋白的表达 用 RIPA 法提取总蛋白质, 并用 BCA 法测蛋白浓度。加入适量蛋白上样缓冲液并在 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 min, 随后可随即上样跑凝胶电泳, 也可 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。凝胶电泳设置 100 V 恒压分离 SDS-PAGE 凝胶, 之后 120 V 恒压转膜。利用 5% 脱脂牛奶(TBST 溶解)封闭 1.5 h。相应 NLRP3, 剪切(Cle)-Caspase, 前体(pro)-Caspase, cle-IL- 1β , pro-IL- 1β , β -actin 一抗(1:1 000)在室温下孵育 30 min 后转移至 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 第 2 天回收一抗, 用二抗(1:1 500)室温孵育 2 h。用 TANON 化学发光成像系统曝光蛋白条带并采集图像, 分析灰度值。

2.5 NO 浓度测定 收集上述不同组细胞的培养基, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液做 NO 浓度测试。

2.6 统计学分析 采用统计软件 GraphPad prism 5.0 处理数据, 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验用于评估两组之间的差异, 当自变量中有两组以上时, 采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠血管舒张功能与保护血管内皮的影响 与正常组比较, 7-keto 处理小鼠主动脉环造模 24 h 后, 内皮依赖性血管舒张功能明显受损, 在 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ach 作用下的最大血管舒张率较正常组降低了约 40%, 有较明显的统计学差异($P < 0.01$)。与模型组比较, 而在使用不同浓度三黄泻心汤含药血清处理后, 血管舒张功能明显恢复, 在 5% 血清处理时血管舒张功能恢复最为明显, 与模型组相比有显著的统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 1。然而, 使用 Snp 检测的非内皮依赖性血管舒张功能在用 7-keto 造模后无显著差异, 且用不同浓度含药血清处理后也无明显变化, 血管舒张率基本一致。见图 2。



与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$

图 1 三黄泻心汤对 7-keto 造模的主动脉环内皮依赖性舒张功能的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig.1 Effect of Sanhuang Xiexin Tang (SHXXT) on endothelium-dependent diastolic function of aortic rings treated by 7-keto ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.2 对血管功能与调节内皮细胞 eNOS/NO 系统的影响 与正常组比较, 7-keto 刺激造模的 eNOS 表达量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与模型组比较, 5% 和 10% 含药血清处理后 eNOS 表达量明显升高($P < 0.05$)。用相应的培养基上清液检测 NO 浓度, 结果显示与正常组比较, 模型组 NO 浓度显著降低($P < 0.01$), 与模型组比较, 用三黄泻心汤含药血清处理后 NO 浓度明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 3, 表 1。

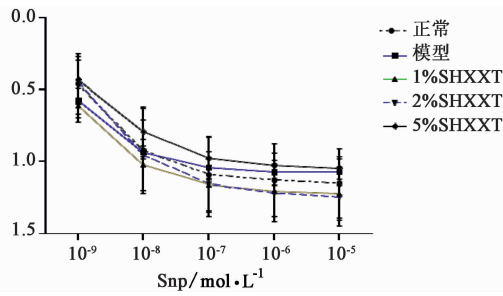
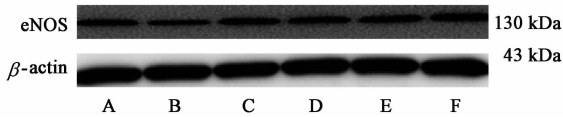


图 2 三黄泻心汤对 7-keto 造模的主动脉环非内皮依赖性舒张功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 2 Effect of SHXXT on endothelium-independent diastolic function of aortic rings treated by 7-keto ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)



A. 正常组; B. 模型组; C. 1% SHXXT 组; D. 2% SHXXT 组; E. 5% SHXXT 组; F. 10% SHXXT 组(图 4 同)

图 3 各组内皮细胞 eNOS 蛋白表达的电泳

Fig. 3 Electrophoresis of eNOS protein expression in endothelial cells

表 1 三黄泻心汤对 7-keto 造模的内皮细胞 eNOS 和 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of SHXXT on eNOS and NO of endothelial cells treated by 7-keto ($\bar{x} \pm s$)

组别	体积分数 / %	eNOS / β -actin ($n = 3$)	NO / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n = 6$)
正常	-	1	1
模型	-	0.68 \pm 0.15 ¹⁾	0.55 \pm 0.10 ²⁾
SHXXT	1	0.95 \pm 0.26	0.54 \pm 0.12
	2	0.99 \pm 0.31	0.64 \pm 0.10
	5	1.16 \pm 0.09 ³⁾	0.82 \pm 0.17 ³⁾
	10	1.29 \pm 0.21 ³⁾	1.12 \pm 0.18 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 对内皮细胞 NLRP3 炎症小体活化相关蛋白的影响 与正常组比较, 在 7-keto 刺激下模型组的 NLRP3 蛋白表达量明显升高 ($P < 0.05$), 模型组的 Caspase-1, IL-1 β 各自的 cle/pro 比值显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 用三黄泻心汤含药血清处理后, NLRP3 表达量和 Caspase-1, IL-1 β 的 cle/pro 比值均明显下降, 其中 NLRP3 蛋白的表达量随着含药血清浓度升高而有较为明显的浓度依赖性下降趋势 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 Caspase-1 和 IL-1 则无明显的浓度依赖性变化趋势。见图 4 和表 2。

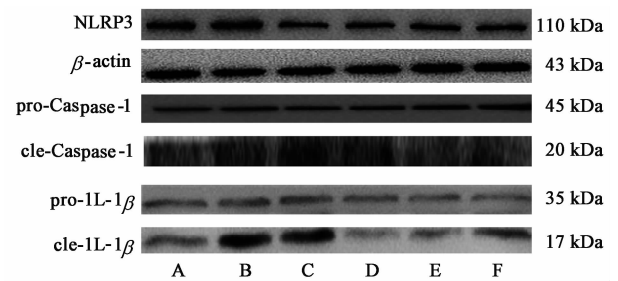


图 4 各组内皮细胞 NLRP3, Caspase-3, IL-1 β 蛋白表达的电泳

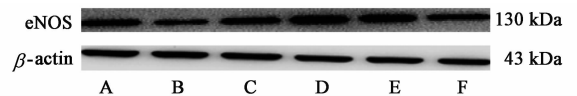
Fig. 4 Electrophoresis of NLRP3, Caspase-3, IL-1 β protein expression in endothelial cells

表 2 三黄泻心汤对 7-keto 造模的内皮细胞炎症蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of SHXXT on inflammatory protein of endothelial cells treated by 7-keto ($\bar{x} \pm s$)

组别	体积分数 / %	NLRP3 / β -actin ($n = 4$)	cle-Caspase-1 / pro-Caspase-1 ($n = 3$)	cle-IL-1 β / pro-IL-1 β ($n = 4$)
正常	-	1	1	1
模型	-	1.57 \pm 0.64 ¹⁾	1.42 \pm 0.13 ²⁾	1.64 \pm 0.37 ²⁾
SHXXT	1	1.47 \pm 0.41	1.33 \pm 0.34	1.54 \pm 0.59
	2	0.75 \pm 0.23 ³⁾	1.44 \pm 0.25	0.74 \pm 0.17 ⁴⁾
	5	0.74 \pm 0.32 ³⁾	1.21 \pm 0.21	0.84 \pm 0.14 ⁴⁾
	10	0.57 \pm 0.23 ³⁾	0.88 \pm 0.16 ⁴⁾	1.00 \pm 0.45 ⁴⁾

3.4 对抑制内皮 NLRP3 活化起到恢复内皮 NO 的影响 与模型组比较, 有效浓度的 ISO 能使受 7-keto 刺激而降低的 eNOS 表达量和 NO 浓度恢复 ($P < 0.01$), 接近正常组水平, 与上述 5% 含药血清作用效果相近; 而未经造模即加入 ISO 或 5% 含药血清不会引起 eNOS 和 NO 水平的变化。用 ISO 和 5% 三黄泻心汤含药血清同时处理内皮细胞, eNOS 表达和 NO 浓度与 ISO 和 5% 三黄泻心汤含药血清相比没有明显升高。见图 5 和表 3。



A. 正常组; B. 7-keto 组; C. ISO 组; D. ISO + 7-keto 组; E. SHXXT 组; F. SHXXT + ISO + 7-keto 组

图 5 NLRP3 抑制剂 ISO 处理后各组内皮细胞 eNOS 蛋白表达的电泳

Fig. 5 Electrophoresis of eNOS protein expression in endothelial cells were treated with NLRP3 inhibitor ISO

4 讨论

本实验证明三黄泻心汤含药血清能有效恢复 7-keto 引起的内皮依赖性血管舒张功能损伤, 其作

表 3 三黄泻心汤对 NLRP3 抑制剂 ISO 处理后内皮细胞 eNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of SHXXT on eNOS protein expression in endothelial cells were treated with NLRP3 inhibitor ISO ($\bar{x} \pm s$)

组别	体积分数 /%	ISO / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	eNOS / β -actin (n = 3)	NO / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (n = 6)
正常	-	-	1	1
7-keto	-	-	0.64 \pm 0.23 ¹⁾	0.51 \pm 0.06 ²⁾
ISO	-	4.4	0.90 \pm 0.17	1.01 \pm 0.14
ISO + 7-keto	-	4.4	0.96 \pm 0.41	0.75 \pm 0.07 ^{2,3)}
SHXXT	5	-	1.09 \pm 0.54	1.05 \pm 0.13
SHXXT + 7-keto + ISO	5	4.4	0.99 \pm 0.62	1.00 \pm 0.10 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 7-keto 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

用可能是通过抑制内皮 NLRP3 炎症小体活化介导的 NO 信号通路实现的。

三黄泻心汤由大黄、黄连和黄芩组成,首载于东汉时期张仲景《金匮要略》,研究显示此方具有降血压,改善血黏度及抗动脉粥样硬化的作用^[9]。另有研究表明该复方能够显著降低 AS 大鼠血清 TG,TC 和 LDL 水平,升高 HDL 水平,影响 NO 的水平^[10]。而 7-keto 作为一种氧化型胆固醇,是动脉粥样硬化常见的标志物,是研究高血脂和动脉粥样硬化常用的造模试剂。离体血管由 Ach 和 Snp 介导的在微血管张力测试系统体现的血管舒张水平是经典的血管功能评价指标,其中 Ach 是血管内皮 eNOS 特异性刺激剂,而 Snp 则是 NO 的化学供体,能直接产生 NO,分别称为内皮依赖性和非内皮依赖性血管舒张功能检测。根据实验结果,7-keto 刺激下小鼠离体主动脉血管环的内皮依赖性舒张功能明显降低,不同浓度三黄泻心汤含药血清处理后,血管舒张率较模型组显著恢复,且有浓度依赖性趋势,5% 含药血清处理的血管舒张率恢复最为明显。非内皮依赖性血管舒张功能无明显变化,说明造模和药物治疗可能直接通过影响内皮细胞实现。由此可推断该中药复方能有效地抑制 7-keto 造成的内皮细胞功能紊乱,恢复 eNOS 的活性,从而恢复内皮依赖性血管舒张功能。

接下来进一步探究 eNOS 和 NO 在 7-keto 造模和给药处理后的变化趋势。众所周知,NO 对血液循环系统的正常功能起着重要的调节作用^[11-13],NO 合成不足可引起高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病。催化 NO 生物合成的酶成为 NOS,eNOS 广泛分

布于动脉、静脉和毛细血管网络,提高 eNOS 的活性可减缓和减少内皮细胞的衰老^[14],改善血管内皮功能对于维持血管张力、防治高脂血症引起的心血管疾病发生发展至关重要^[15],因此本实验将 eNOS 表达和 NO 生成量作为检测指标。实验结果显示,模型组的 eNOS 表达量显著低于正常组,而模型组内皮细胞培养基上清液的 NO 浓度也显著低于正常组。用不同浓度含药血清处理后,eNOS 表达量明显恢复;而 NO 浓度随着三黄泻心汤含药血清浓度增加而恢复显著,具有浓度依赖性。此结果表明上述内皮依赖性血管舒张功能在 7-keto 造模后受到损伤而用三黄泻心汤给药处理后显著恢复,其可能是通过影响 eNOS/NO 通路实现的。

文献报道在高脂血症时 7-keto 浓度的上升常伴随着不同程度的血管炎症反应,各类炎症因子会损伤血管舒张功能,降低 eNOS 表达量,但其中 7-keto 与 NLRP3 炎症小体的相关研究较少,是否 7-keto 激活了 NLRP3 炎症小体进而降低 eNOS 表达量和损伤血管舒张功能还有待探究。新近研究指明 NLRP3 炎症小体的活化与脂质代谢疾病的病理过程密切相关^[16],NLRP3 炎症小体是 NOD 样受体家族炎症小体中的一个重要的成员,其能够识别人体内各种危险因子产生的危险信号并被激活^[17],NLRP3 炎症小体的各组成部分分布相当广泛^[18],主要分布在巨噬细胞等免疫细胞,但在血管内皮细胞和平滑肌细胞等功能性细胞中也有表达。NLRP3 活化后,凋亡相关斑点样蛋白(ASC) C 端 Caspase 募集域 CARD 与细胞凋亡蛋白(Caspase-1) CARD 结构域结合形成一种多聚复合体^[19],与此同时,NLRP3 炎症小体复合体进一步活化并激活 Caspase-1,促进 IL-1 β 的成熟及释放^[2,20-22],极有可能介导 7-keto 诱导的内皮功能紊乱。由此推论,NLRP3 炎症小体通路是抗炎药物的潜在靶点,用以治疗高脂作用下的血管内皮功能损伤^[23],因此在本研究中,将探究三黄泻心汤含药血清是否能抑制 7-keto 诱导的 NLRP3 相关蛋白的表达。实验结果显示,模型组 NLRP3 表达量明显大于正常组,同时模型组的 Caspase-1,IL-1 β 各自的 cle/pro 比值明显高于正常组,而用三黄泻心汤含药血清处理后则明显下降,证明 7-keto 确实能够激活和增加 NLRP3 相关炎症蛋白的表达,而三黄泻心汤含药血清能够抑制上述炎症蛋白的表达。

最后,笔者探究使用抑制剂抑制 NLRP3 表达之后,是否能恢复 eNOS 活性和 NO 生成量。为验证

假设,笔者使用 NLRP3 抑制剂 ISO 和 5% 有效浓度的三黄泻心汤含药血清来进行实验。结果显示,ISO 处理后,eNOS 表达量较用 7-keto 造模时有显著增加,其水平与用 5% 有效浓度含药血清组处理后的结果相似,NO 含量也在加入 ISO 处理后显著恢复。而若未添加 7-keto,仅加入 ISO 或 5% 含药血清,则并不会引起 eNOS 表达和 NO 浓度过度增加。使用 ISO 和 5% 三黄泻心汤含药血清共同处理内皮细胞,eNOS 表达量和 NO 浓度与单独用一种试剂处理相比没有明显升高,无协同作用。所以笔者认为,三黄泻心汤可能通过抑制血管内皮 NLRP3 炎症小体的活化和表达,进而一定程度恢复 eNOS 活性和 NO 生成水平。

综上所述,7-keto 通过激活 NLRP3 炎症小体,切割 pro-Caspase-1,活化 IL-1 β ,同时可以抑制 eNOS 活性,导致 NO 生成量减少和内皮功能紊乱。而三黄泻心汤含药血清则可以抑制 NLRP3 相关炎症蛋白的表达和激活,从而部分恢复 eNOS 活性,进而促进 NO 生成,保护血管内皮功能。

[参考文献]

[1] 孟焕,宋洁,孙彦平,等.老年心血管病患者衰弱现状、影响因素及干预的研究进展[J].现代临床护理,2017,16(9):69-73.

[2] CHEN Y, Pitzer A L, LI X, et al. Instigation of endothelial Nlrp3 inflammasome by adipokine visfatin promotes inter-endothelial junction disruption; role of HMGB1 [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19 (12): 2715-2727.

[3] CHEN Y, LI X, Boini K M, et al. Endothelial Nlrp3 inflammasome activation associated with lysosomal destabilization during coronary arteritis [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1853 (2): 396-408.

[4] 林巧云.周仲瑛教授从“痰瘀”辨治高脂血症的临床经验及学术思想研究[D].南京:南京中医药大学,2017.

[5] 王钰雄,刘伟伟,李雪萍,等.三黄泻心汤体外抑制耐药金黄色葡萄球菌活性测定[J].实用中医药杂志,2018,34(4):500-501.

[6] 殷小杰,马晓静,王岚,等.三黄泻心汤“炮制配伍”活血化瘀优势方抗大鼠动脉粥样硬化作用的研究[J].中国药物警戒,2017,14(9):518-522,526.

[7] 马晓静,王岚,殷小杰,等.三黄泻心汤“炮制配伍”解热优势方药效及其作用机制研究[J].中国药物警戒,2016,13(8):449-451,463.

[8] 邓翀,张艺,孟宪丽,等.三黄泻心汤血清药物化学初步研究[J].陕西中医学院学报,2009,32(6):57-59.

[9] 殷小杰,马晓静,王岚,等.三黄泻心汤活血化瘀优势方抗动脉粥样硬化的作用机制[J].中国实验方剂学

杂志,2018,24(22):83-88.

[10] 潘祥龙,郝二伟,谢金玲,等.活血化瘀中药调节血瘀证的分子机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(24):227-234.

[11] Manicam C, Ginter N, LI H, et al. Compensatory vasodilator mechanisms in the ophthalmic artery of endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):7111.

[12] 王红梅,周建明,吕耀中,等.龙血通络胶囊对氧化低密度脂蛋白损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用[J].中国中药杂志,2018,43(6):1241-1246.

[13] 卢文丹,李莉,申艳佳,等.基于血管舒缩相关 GPCR 靶点的小续命汤网络药理学研究[J].中国中药杂志,2018,43(23):4698-4708.

[14] Suvorava T, Pick S, Kojda G. Selective impairment of blood pressure reduction by endothelial nitric oxide synthase dimer destabilization in mice[J]. J Hypertens, 2017,35(1):76-88.

[15] Guzik T J, Touyz R M. Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension [J]. Hypertension, 2017, 70(4):660.

[16] Dinh Q N, Drummond G R, Sobey C G, et al. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension [J]. Biomed Res Int, 2014, doi: 10.1155/2014/406960.

[17] Montezano A C, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, et al. Oxidative stress and human hypertension; vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies[J]. Can J Cardiol, 2015, 31(5):631-641.

[18] ZHOU R, Yazdi A S, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. Nature, 2011, 475(7354):122-122.

[19] Luís E P, Diego C L, Elisabet A G, et al. NLRP3-inflammasome inhibition prevents high fat and high sugar diets-induced heart damage through autophagy induction [J]. Oncotarget, 2017, 8(59):99740-99756.

[20] Furuoka M, Ozaki K I, Sadatomi D, et al. TNF- α induces Caspase-1 activation independently of simultaneously induced NLRP3 in 3T3-L1 cells [J]. J Cell Physiol, 2016, 231(12):2761-7.

[21] YAO S T, CAO F, CHEN J L, et al. NLRP3 is required for complement-mediated Caspase-1 and IL-1 β Activation in ICH [J]. J Mol Neurosci, 2017, 61(3):385-395.

[22] SONG E, Jahng J W, CHONG L P, et al. Lipocalin-2 induces NLRP3 inflammasome activation via HMGB1 induced TLR4 signaling in heart tissue of mice under pressure overload challenge [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(6):2723-2735.

[23] 王雪,修成奎,杨静,等.人参-三七-川芎提取物对高糖高脂诱导血管内皮细胞衰老的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):124-129.

[责任编辑 周冰冰]