

基于Nrf2/GPX4通路调控铁死亡探讨黄连解毒汤对 动脉粥样硬化小鼠的影响

龚兆会^{1,2}, 高黎³, 翟惠奇², 余锦紫², 褚庆民^{1,2}, 罗川晋^{1,2}, 卿立金^{1,2}, 吴伟^{1,2}, 李荣^{1,2*}
(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405;
2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405;
3. 暨南大学中医学院, 广州 510632)

[摘要] 目的:研究黄连解毒汤通过改善铁死亡治疗动脉粥样硬化(AS)小鼠的作用机制。方法:取SPF级C57BL/6J小鼠10只为正常组,另取载脂蛋白E敲除(ApoE^{-/-})小鼠50只随机分为5组,分别为模型组、黄连解毒汤低、中、高剂量组和阿托伐他汀组(ATV组)。ApoE^{-/-}小鼠采用高脂饲料喂食8周构建AS模型,并在第9周开始分别予生理盐水,黄连解毒汤低、中、高剂量(3.9、7.8、15.6 g·kg⁻¹·d⁻¹)和阿托伐他汀钙片(0.01 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,共给药8周。采用大体油红O染色和马松(Masson)染色观察小鼠主动脉斑块的形成情况,自动生化分析仪测定血脂四项总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平,透射电镜观察主动脉线粒体结构,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)水平,微板法检测血清中还原型谷胱甘肽(GSH)含量,TBA法检测血清中丙二醛(MDA)含量,蛋白免疫印迹法检测小鼠主动脉核因子E₂相关因子2(Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)信号通路蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组主动脉管腔斑块沉积,血清TC、LDL-C、TG、HDL-C、MDA含量显著升高(P<0.01),血清SOD、GSH和主动脉Nrf2、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、GPX4的表达水平均显著降低(P<0.01),主动脉线粒体碎裂、空泡化、体积萎缩,线粒体内嵴减少或者呈现松散、紊乱的形态。与模型组比较,黄连解毒汤低、中、高剂量组(ATV组)主动脉管腔斑块沉积明显减少,小鼠血清TC、LDL-C、TG和MDA含量明显降低(P<0.05, P<0.01),血清SOD、GSH水平和主动脉Nrf2、SLC7A11、GPX4的表达水平升高(P<0.05, P<0.01),主动脉线粒体空泡化症状减轻,嵴数量增多且排序整齐。结论:黄连解毒汤能减轻AS小鼠主动脉管腔斑块沉积,降低血脂和MDA表达,升高SOD和GSH表达,改善铁死亡病理改变,其作用机制与Nrf2/GPX4信号通路有关。

[关键词] 黄连解毒汤; 动脉粥样硬化; 铁死亡; 核因子E₂相关因子2(Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)信号通路

[中图分类号] R285;R289;R259 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2025)03-0022-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20241703

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20241107.1030.006>

[网络出版日期] 2024-11-07 12:19:15

Effect of Huanglian Jiedutang in Regulating Ferroptosis in Mice with Atherosclerosis Based on Nrf2/GPX4 Signaling Pathway

GONG Zhaohui^{1,2}, GAO Li³, ZHAI Huiqi², YU Jinzi², CHU Qingmin^{1,2},
LUO Chuanjin^{1,2}, QING Lijin^{1,2}, WU Wei^{1,2}, LI Rong^{1,2*}

(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. The First Clinical School of Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405,
China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[收稿日期] 2024-08-22

[基金项目] 广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515110789, 2022A1515220138, 2023A1515220158, 2022A1515220067);国家自然科学基金项目(82230126, 82105047);广州中医药大学第一附属医院中青年骨干人才培养项目;广州中医药大学青年拔尖人才(团队)培育“揭榜挂帅”项目(A1-2601-24-414-110Z77);广州市科技计划项目(2023A04J1928)

[第一作者] 龚兆会, 博士, 主治医师, 从事中西医结合防治心血管病方面研究, E-mail: gzhgztem@163.com

[通信作者] *李荣, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合防治心血管病方面研究, E-mail: lrhbs@126.com

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of Huanglian Jiedutang (HLJDT) in treating mice with atherosclerosis (AS) by improving ferroptosis. **Methods:** A total of 10 SPF C57BL/6J mice were selected as a normal group, and 50 ApoE^{-/-} mice were randomly divided into five groups: model group, low-dose group of HLJDT, medium-dose group of HLJDT, high-dose group of HLJDT, and atorvastatin (ATV) group. ApoE^{-/-} mice were fed a high-fat diet for eight weeks to establish the AS model, and at the 9th week, they were given normal saline, low, medium, and high doses of HLJDT (3.9, 7.8, 15.6 g·kg⁻¹·d⁻¹), and atorvastatin calcium tablets (0.01 g·kg⁻¹·d⁻¹), respectively, for a total of eight weeks. The formation of aortic plaque in mice was observed by gross oil red O staining and Masson staining. The levels of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglyceride (TG), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in blood fat were measured by the automatic biochemical analyzer, and the mitochondrial structure of the aorta was observed by transmission electron microscopy. The content of serum superoxide dismutase (SOD) in serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The content of reduced glutathione (GSH) in serum was detected by the microplate method, and that of malondialdehyde (MDA) in serum was detected by the TBA method. The protein expression of nuclear factor E₂-associated factor 2 (Nrf2)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway was detected by Western blot. **Results:** Compared with those of the normal group, the contents of TC, LDL-C, TG, HDL-C, and MDA in the serum and the aortic vascular plaque deposition of the model group were significantly increased ($P<0.01$), while the expression levels of SOD and GSH in serum, as well as Nrf2, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and GPX4 in aorta were significantly decreased ($P<0.01$). Mice in the model group appeared mitochondrial fragmentation and vacuolation in the aorta, volume atrophy, mitochondrial crista reduction, or a loose and disorganized form. Compared with those in the model group, the aortic vascular plaque deposition was significantly decreased in the low-dose, medium-dose, and high-dose groups of HLJDT and ATV group, and the contents of serum TC, LDL-C, TG, and MDA in serum were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The contents of serum SOD and GSH and the expression levels of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 in the aorta were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the symptoms of aortic mitochondrial vacuolation were alleviated. The number of cristae was increased, and they were ordered neatly. **Conclusion:** HLJDT can reduce aortic vascular plaque deposition, decrease blood lipid and MDA expression, increase SOD and GSH expression, and ameliorate the pathological changes of ferroptosis, the mechanism of which is related to the Nrf2/GPX4 signaling pathway.

[Keywords] Huanglian Jiedutang; atherosclerosis; ferroptosis; nuclear factor E₂-associated factor 2 (Nrf2)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway

心脑血管疾病具有高发病率、高死亡率和高致残率等特点,给国家、社会、家庭和个人带来沉重经济负担。动脉粥样硬化(AS)是心脑血管疾病共同的发病基础,是一种由脂质代谢失衡和不适当的炎症反应引起的动脉血管壁慢性炎症性疾病^[1]。

AS属于中医学“胸痹心痛”的范畴,经过多年临床实践,中医学在AS防治方面积累了丰富的经验。黄连解毒汤出自《外台秘要》,由黄连、黄芩、黄柏和栀子4味药组成,现代研究表明其对AS疗效确切,具有调脂、抗炎、改善AS进程和稳定AS斑块的作用,具备多成分、多靶点、多途径的作用特点^[2]。铁死亡是一种铁离子依赖性的、以细胞内脂质过氧化和氧化应激物堆积为特征的新型细胞程序性死亡方式。铁死亡在AS易损斑块的形成、破裂及免疫炎症反应中起着重要作用^[3-4]。核因子E₂相关因子2(Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)是调节铁死亡的关键通路,当Nrf2被激活时,可通过转移到细胞核诱导下游途径启动,促进铁的储存,减少铁的吸收和产生来抑制铁死亡,进而延缓脂质过氧化反应,缓解AS损伤^[5]。基于此,本研究拟探讨黄连解毒汤通过Nrf2/GPX4信号通路抑制铁死亡,改善AS斑块脂质沉积的新机制,为其进一步研究开发提供

实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性C57BL/6J小鼠10只和载脂蛋白E敲除(ApoE^{-/-})小鼠50只,6~8周龄,体质量(20±2)g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,动物生产合格证号SCXK(京)2020-0004。动物饲养于广州中医药大学实验动物管理中心,饲养环境温度24~27℃,湿度50%,水食自由,12h交替光照。本动物实验方案经过广州中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会审核,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定,批准编号GZTCMF1-20230546。

1.2 药物 黄连解毒汤由黄连9g(批号230601201)、黄芩6g(批号230900911)、黄柏6g(批号230501491)、栀子9g(批号230902811)组成。饮片购自康美药业股份有限公司,所有饮片经广州中医药大学第一附属医院药学部鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》相关要求。将各饮片混合后加入4倍体积双蒸水浸泡30min,煎2次,每次煎30min,去渣过滤混合,60℃水浴中浓缩至含生药2g·mL⁻¹,用时以生理盐水稀释至所需浓度。阿托伐他汀钙片(批号8154855),购自杭州默沙东制药

有限公司,使用生理盐水将阿托伐他汀钙片配制成分混悬药液,4℃储存备用。

1.3 试剂 总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A111-1-1、A113-1-1、A110-1-1、A112-1-1、A006-2-1、A003-1-2);超氧化物歧化酶(SOD)试剂(武汉华美生物工程有限公司,批号CSB-E08556m);Nrf2抗体、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)抗体、GPX4抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国CST公司,批号分别为12721、98051、52455、8457);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法蛋白定量试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔二抗、RIPA裂解液、一抗稀释液、二抗稀释液(碧云天生物技术研究所,批号分别为P0010S、A0208、P0013B、P0256、P0023D);饱和油红O和马松(Masson)三色染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1015、G1006)。

1.4 仪器 ELX808型多功能全波长酶标仪(美国BioTek公司);BS-600M型全自动生化分析仪(深圳迈瑞公司);164-5050型电泳仪(美国Bio-Rad公司);Alliance Q9型全自动化学发光和荧光凝胶成像系统(英国UVItec公司);HT7800型透射电子显微镜(日本Hitachi公司)。

2 方法

2.1 AS小鼠造模 ApoE^{-/-}小鼠予喂食高脂饲料(含15%猪油、0.5%胆酸钠、2%卵黄素、1.5%CHOL和81%基础饲料)8周后,AS小鼠模型造模成功^[6]。

2.2 分组及干预 根据完全随机设计原则,分为以下几组进行干预,分别为正常组、模型组、黄连解毒汤低、中、高剂量组和阿托伐他汀组。每组10只,给药时间第9周开始,总共8周。黄连解毒汤低、中、高剂量分别予黄连解毒汤浓缩液灌胃,剂量分别为3.9、7.8、15.6 g·kg⁻¹·d⁻¹,分别相当于临床0.5、1、2倍等效剂量,每天灌胃1次。阿托伐他汀组给予阿托伐他汀钙片0.01 g·kg⁻¹·d⁻¹,每天灌胃1次^[6]。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 体质量 造模前、造模后及取材前,使用电子天平称量并记录小鼠体质量。

2.3.2 主动脉病理变化

2.3.2.1 大体油红O染色 完整主动脉做冰冻切片,切片冷风干燥后直接油红O染色6 min,滴染,70%乙醇分色主血管与斑块,分界清晰,血管组织无着色即用水洗,苏木素复染2 min,盐酸乙醇分化

2 s,返蓝5 min,甘油明胶封片。

2.3.2.2 Masson染色 石蜡切片脱蜡至水,铬化处理,依次自来水和蒸馏水洗,Regaud苏木精染液或Weigert铁苏木素染色液染核,1%盐酸乙醇分化,水洗,加0.1%~1%碳酸锂,增加反蓝程度,水洗,用Masson丽春红酸性复红液5~10 min,水洗分化,用苯胺蓝水溶液或1%光绿水溶液染1~2 min,水洗,脱水,中性树脂胶封固。

2.3.3 自动生化分析仪、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、微板法和TBA法检测血清中TC、LDL-C、TG、HDL-C、SOD、GSH和MDA水平 自动生化分析仪测定血脂四项TC、LDL-C、TG、HDL-C水平,ELISA检测血清中SOD水平,微板法检测血清中GSH水平,TBA法检测血清中MDA水平,实验步骤均按照试剂盒操作说明进行。

2.3.4 透射电镜观测线粒体形态 小鼠主动脉组织,修整为2 mm×2 mm×2 mm,于电镜固定液内25℃避光固定2 h,饿酸固定、脱水、浸透、饱和醋酸铀及柠檬酸铅染色、包埋,制成80 nm超薄切片,于透射电镜下观察小鼠主动脉线粒体超微结构变化。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达 取小鼠主动脉组织30 mg,加入RIPA裂解液提取总蛋白。BCA测定蛋白浓度,上样、SDS凝胶电泳、湿式电转,封闭后在4℃环境下一抗(1:1 000)孵育过夜。次日,TBST洗膜、室温孵育二抗(1:1 000)后显影。使用Image J软件对条带进行测量和分析,所有指标均以 β -actin作为内参对照。

2.4 统计学分析 采用SPSS 23.0统计学软件进行数据处理,所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间样本均数比较采用 t 检验,多组间比较方差齐时采用单因素方差分析,组间多重比较采用最小显著性差异法(LSD)- t 检验,方差不齐时采用近似 F 检验Welch法,组间两两比较采用Dunnett's T_3 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄连解毒汤对AS小鼠体质量的影响 造模前各组小鼠体质量基本一致。造模后,与正常组比较,高脂饲料喂养各组小鼠体质量均显著增加($P<0.01$)。取材前,与模型组比较,黄连解毒汤各剂量组与阿托伐他汀组小鼠体质量均有不同程度的降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见表1。

3.2 黄连解毒汤对AS小鼠主动脉病理变化的影响 大体油红O染色可见模型组被染红区域密布而富集,病变面积广泛,Masson染色可见胆固醇结

表1 黄连解毒汤对AS小鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Huanglian Jiedu Tang (HLJDT) on weight of AS mice ($\bar{x}\pm s, n=10$) g

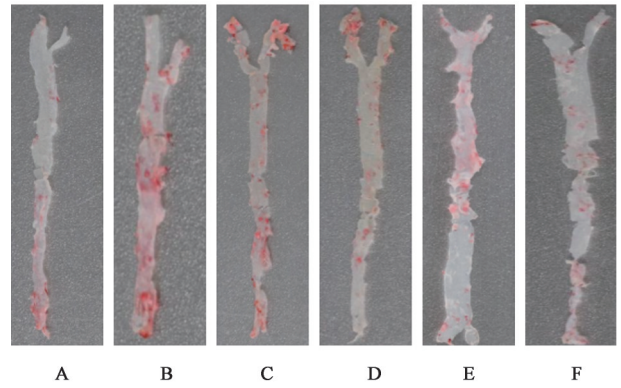
组别	剂量/g·kg ⁻¹	造模前	造模后	取材前
正常组		24.5±1.3	27.9±1.8	28.9±2.7
模型组		24.0±1.5	35.8±3.6 ¹⁾	39.2±4.5 ¹⁾
黄连解毒汤低剂量组	3.9	24.1±0.9	36.0±2.8 ¹⁾	35.3±3.6 ²⁾
黄连解毒汤中剂量组	7.8	24.6±1.1	35.9±3.2 ¹⁾	34.2±4.8 ²⁾
黄连解毒汤高剂量组	15.6	24.5±1.2	35.7±3.5 ¹⁾	31.5±3.3 ³⁾
阿托伐他汀组	0.01	24.3±1.4	36.1±2.6 ¹⁾	32.1±4.2 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表2-表5同)

晶增多,呈蓝色的纤维组织减少,纤维帽变薄,不稳定斑块特征明显。与正常组比较,模型组主动脉油红O染色面积显著增加($P<0.01$);与模型组比较,黄连解毒汤组和阿托伐他汀组被染红区域缩小,颜色变浅,斑块不稳定特征有不同程度的减轻,主动脉油红O染色面积明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见图1、表2、图2。

3.3 黄连解毒汤对AS小鼠TC、LDL-C、TG、HDL-C的影响 与正常组比较,模型组TC、LDL-C、TG、HDL-C较正常组显著升高($P<0.01$);与模型组比较,经黄连解毒汤和阿托伐他汀干预后TC、LDL-C、TG明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表3。

3.4 黄连解毒汤对AS小鼠主动脉线粒体形态的影响 正常组的小鼠主动脉组织中线粒体布满致密颗粒,几乎无空泡。与正常组比较,模型组线粒体碎裂、空泡化,且线粒体体积萎缩,线粒体内嵴减少



注:A.正常组;B.模型组;C.黄连解毒汤低剂量组;D.黄连解毒汤中剂量组;E.黄连解毒汤高剂量组;F.阿托伐他汀组(图2-图4同)

图1 黄连解毒汤对AS小鼠主动脉油红面积的影响($\times 40$)

Fig. 1 Effect of HLJDT on oil red area of AS mice aorta ($\times 40$)

表2 黄连解毒汤对AS小鼠主动脉油红面积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of HLJDT on aorta oil red area of AS mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	油红面积/%
正常组		0.73±0.71
模型组		14.44±0.73 ¹⁾
黄连解毒汤低剂量组	3.9	7.98±0.33 ²⁾
黄连解毒汤中剂量组	7.8	4.94±1.42 ²⁾
黄连解毒汤高剂量组	15.6	2.44±0.19 ³⁾
阿托伐他汀组	0.01	2.42±0.45 ³⁾

或者呈现松散、紊乱的形态,甚至嵴完全消失。黄连解毒汤各剂量和阿托伐他汀处理后,线粒体体积增大,空泡化症状减轻,嵴数量增多且排序整齐。见图3。

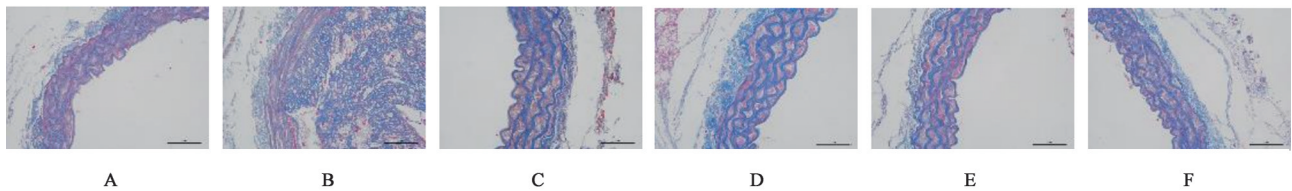


图2 黄连解毒汤对AS小鼠主动脉Masson染色的影响(Masson, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of HLJDT on masson-trichrome staining of AS mice aorta (Masson, $\times 400$)

表3 黄连解毒汤对AS小鼠TC、LDL-C、TG和HDL-C表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of HLJDT on TC, LDL-C, TG and HDL-C expression of AS mice ($\bar{x}\pm s, n=10$) mmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	LDL-C	TG	HDL-C
正常组		1.41±0.34	3.25±0.26	5.02±1.50	0.83±0.29
模型组		16.73±2.68 ¹⁾	10.42±1.00 ¹⁾	10.02±2.81 ¹⁾	1.62±0.35 ¹⁾
黄连解毒汤低剂量组	3.9	13.87±2.30 ²⁾	8.01±1.76 ³⁾	7.02±1.46 ³⁾	1.54±0.36
黄连解毒汤中剂量组	7.8	11.48±1.26 ³⁾	7.00±2.48 ³⁾	6.72±1.39 ³⁾	1.52±0.57
黄连解毒汤高剂量组	15.6	9.36±1.29 ³⁾	5.32±1.40 ³⁾	5.78±1.46 ³⁾	1.49±0.39
阿托伐他汀组	0.01	10.91±1.23 ³⁾	5.74±1.55 ³⁾	3.87±1.93 ³⁾	1.58±0.38

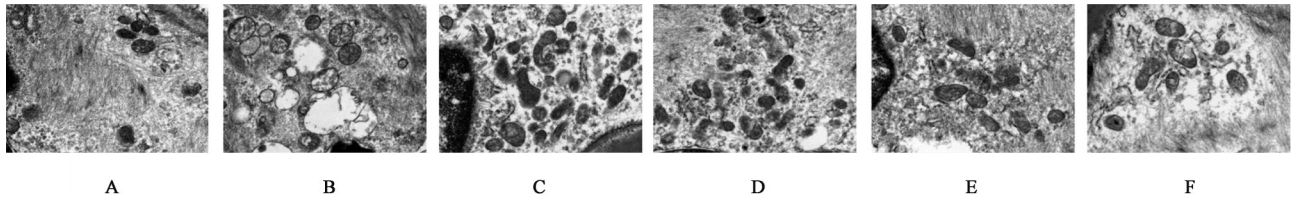


图3 黄连解毒汤对AS小鼠主动脉线粒体形态的影响(透射电镜,×1 500)

Fig. 3 Effect of HLJDT on morphology of aortic mitochondria in AS mice (TEM, ×1 500)

3.5 黄连解毒汤对AS小鼠SOD、GSH和MDA水平的影响 与正常组比较,模型组血清SOD、GSH水平显著降低($P<0.01$),MDA显著升高($P<0.01$);

与模型组比较,经黄连解毒汤和阿托伐他汀干预后SOD、GSH水平明显升高,MDA水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表4。

表4 黄连解毒汤对AS小鼠SOD、GSH和MDA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of HLJDT on SOD, GSH and MDA expression of AS mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/ng·L ⁻¹	GSH/mg·L ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹
正常组		1 034.12±112.45	83.59±12.63	3.02±0.53
模型组		373.22±104.78 ¹⁾	23.48±10.33 ¹⁾	5.99±0.45 ¹⁾
黄连解毒汤低剂量组	3.9	475.29±57.98 ²⁾	45.39±29.66 ²⁾	5.35±0.57 ²⁾
黄连解毒汤中剂量组	7.8	639.34±93.15 ³⁾	57.39±21.53 ³⁾	4.71±0.66 ³⁾
黄连解毒汤高剂量组	15.6	799.45±102.68 ³⁾	89.33±34.73 ³⁾	4.62±0.34 ³⁾
阿托伐他汀组	0.01	738.26±38.82 ³⁾	79.38±23.74 ³⁾	4.08±0.64 ³⁾

3.6 黄连解毒汤对Nrf2/GPX4信号通路的影响 与正常组比较,模型组Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,黄连解毒汤低、中、高剂量组和阿托伐他汀组均明显上调Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白的表达水平($P<0.05, P<0.01$)。见图4、表5。

表5 黄连解毒汤对AS小鼠Nrf2、SLC7A11和GPX4蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of HLJDT on Nrf2, SLC7A11 and GPX4 protein expression of AS mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nrf2/ β-actin	SLC7A11/ β-actin	GPX4/ β-actin
模型组		0.12±0.04 ¹⁾	0.11±0.05 ¹⁾	0.09±0.02 ¹⁾
黄连解毒汤低剂量组	3.9	0.25±0.07 ²⁾	0.42±0.14 ²⁾	0.18±0.05 ²⁾
黄连解毒汤中剂量组	7.8	0.33±0.10 ²⁾	0.64±0.23 ²⁾	0.35±0.11 ²⁾
黄连解毒汤高剂量组	15.6	0.65±0.29 ²⁾	0.78±0.12 ³⁾	0.77±0.31 ³⁾
阿托伐他汀组	0.01	0.77±0.32 ²⁾	0.49±0.19 ²⁾	0.83±0.19 ³⁾

注:设正常组各蛋白相对表达量为1

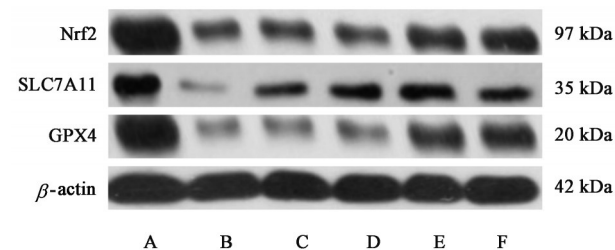


图4 各组Nrf2、SLC7A11和GPX4蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 protein expression

4 讨论

AS是一种由脂质代谢失衡和不适当的炎症反应引起的动脉血管壁慢性炎症性疾病,是心、脑、肾、外周血管疾病的共同病理基础^[7]。AS病变形成过程中是否会导致临床症状的出现,不仅取决于动脉管腔的狭窄程度,更重要的是斑块本身的性质是否稳定,是否有血栓形成等继发病变^[8-9]。因此,防止斑块破裂和血栓形成,稳定斑块已成为AS治疗

的重要目标之一。

铁死亡是一种全新的细胞死亡方式,其被定义为铁离子依赖的、脂质活性氧自由基聚集、非凋亡的细胞死亡^[10-12]。铁死亡在AS易损斑块的形成、破裂及免疫炎症反应中扮演着重要的角色。AS斑块中活性铁主要来源于斑块内的微血管破裂后出血的红细胞,红细胞进入斑块被巨噬细胞快速溶解与吞噬,导致铁过载^[13-14]。铁过载可促进氧化应激、脂质过氧化和氧化应激等病理过程,促使细胞内过量的游离铁通过芬顿反应产生大量的活性氧自由基,导致脂质过氧化和氧化应激物水平急剧升高,脂质过氧化和氧化应激终产物MDA水平随之升高从而

影响斑块的稳定性,最终引起巨噬细胞发生铁死亡,加重AS病变^[15-16]。近年研究表明,中药复方、中药单体及活性成分可特异性调节心肌细胞铁稳态影响铁死亡,起到保护心肌细胞的效果^[17-18]。

AS是临床上疑难病、常见病之一,属于中医“胸痹心痛”等范畴。黄连解毒汤出自《外台秘要》,由黄连、黄芩、黄柏、栀子4味药组成,方中集大苦大寒之连、芩、柏、栀,苦寒直折,火邪去则热毒解,全方共奏清热泻火解毒之功效。多年的临床实践和实验研究证实,黄连解毒汤治疗AS具有其独特优势^[19-20]。黄连解毒汤能显著改善AS患者的临床证候积分及体内炎症因子水平,降低超敏C反应蛋白、脂多糖水平,抑制炎症反应,具有稳定斑块的作用^[21-22],但其对于AS铁死亡的调节效应及其作用机制,迄今尚未阐明。本研究表明,与模型组比较,黄连解毒汤低、中、高剂量组和阿托伐他汀组明显降低主动脉管腔斑块沉积和小鼠血清TC、LDL-C、TG和MDA水平,同时升高血清SOD、GSH水平。在病理改变上,模型组主动脉线粒体碎裂、空泡化,且线粒体体积萎缩,线粒体内嵴减少或者呈现松散、紊乱的形态,甚至嵴完全消失,经黄连解毒汤处理后,线粒体体积增大,空泡化症状减轻,嵴数量增多且排序整齐,提示黄连解毒汤可通过有效抑制铁死亡而起到治疗AS小鼠的作用。

Nrf2/GPX4信号通路是典型的铁死亡信号通路^[23]。Nrf2可通过促进铁的储存,减少铁的吸收和产生来抑制铁死亡。GPX4是一种利用GSH作为底物的酶,其表达受Nrf2的转录调节^[24-25]。GPX4可以直接还原细胞膜中由活性氧攻击而产生的脂质过氧化和氧化应激物,当GPX4失活时,会使细胞内有害的氧化物无法及时被清除,尤其是细胞内逐渐累积的脂质过氧化和氧化应激物,脂质过氧化和氧化应激产生导致铁死亡^[26-27]。SLC7A11是一种铁死亡调节剂,Nrf2作为转录因子可增加SLC7A11和GPX4表达,是GPX4上游调节因子,激活Nrf2/GPX4信号通路可抑制铁死亡^[28-29]。本研究表明,模型组大鼠的Nrf2/GPX4信号通路中Nrf2、SLC7A11和GPX4蛋白被显著抑制,导致脂质过氧化和氧化应激物水平急剧升高,而黄连解毒汤可通过激活Nrf2/GPX4信号通路,减轻脂质过氧化和氧化应激,抑制铁死亡的发生,从而起到治疗AS小鼠的作用。

综上所述,黄连解毒汤能减轻AS小鼠的斑块形成,抑制血脂水平TC、LDL-C和TG的表达,下调MDA,上调SOD和GSH水平,改善铁死亡病理改

变,呈剂量依赖性。黄连解毒汤治疗AS的作用机制与Nrf2/GPX4信号通路有关,但更加明确的作用及其深入的作用机制还需要进一步地研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] MUNJAL A, KHANDIA R. Atherosclerosis: Orchestrating cells and biomolecules involved in its activation and inhibition [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2020, 120: 85-122.
- [2] CAI Y, WEN J, MA S, et al. Huang-Lian-Jie-Du decoction attenuates atherosclerosis and increases plaque stability in high-fat diet-induced ApoE^{-/-} mice by inhibiting M1 macrophage polarization and promoting M2 macrophage polarization [J]. *Frontiers in physiology*, 2021, 12: 666449.
- [3] XU X, XU X D, MA M Q, et al. The mechanisms of ferroptosis and its role in atherosclerosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 171: 116112.
- [4] FANG X, ARDEHALI H, MIN J, et al. The molecular and metabolic landscape of iron and ferroptosis in cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20 (1): 7-23.
- [5] YAN R, LIN B, JIN W, et al. Nrf2, a superstar of ferroptosis [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(9): 1739.
- [6] LIN J, WANG X, GU M, et al. Geniposide ameliorates atherosclerosis by restoring lipophagy via suppressing PARP1/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155617.
- [7] AHMADI A, ARGULIAN E, LEIPSIC J, et al. From subclinical atherosclerosis to plaque progression and acute coronary events: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74 (12): 1608-1617.
- [8] PUYLAERT P, ZUREK M, RAYNER K J, et al. Regulated necrosis in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022, 42 (11): 1283-1306.
- [9] UGUSMAN A, HISAM N, OTHMAN N S, et al. Pharmacological interventions for intraplaque neovascularization in atherosclerosis [J]. *Pharmacol Ther*, 2024, 261: 108685.
- [10] STOCKWELL B R, JIANG X, GU W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30 (6): 478-490.
- [11] OUYANG S, YOU J, ZHI C, et al. Ferroptosis: The potential value target in atherosclerosis [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (8): 782.
- [12] YANG Z, SHI J, CHEN L, et al. Role of pyroptosis and ferroptosis in the progression of atherosclerotic plaques [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 811196.
- [13] ZHANG M, LI J, HU W. The complex interplay between ferroptosis and atherosclerosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 178: 117183.
- [14] NI D, LEI C, LIU M Q, et al. Cell death in atherosclerosis [J]. *Cell Cycle*, 2024, 23(5): 495-518.

- [15] YANG Z, HE Y, WU D, et al. Antiferroptosis therapy alleviated the development of atherosclerosis[J]. *Med Comm* (2020),2024,5(4):e520.
- [16] ZHANG Y, JIANG C, MENG N. Targeting ferroptosis: A novel strategy for the treatment of atherosclerosis [J]. *Mini Rev Med Chem*,2024,24(13):1262-1276.
- [17] 袁子阳,张艳,张伟. 基于铁稳态代谢探讨铁死亡在心血管病中的作用及中医药治疗进展[J]. *中国实验方剂学杂志*,2023,29(18):198-208.
YUAN Z Y, ZHANG Y, ZHANG W. Role of ferroptosis in cardiovascular diseases and chinese medicine treatment based on iron homeostasis: A review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*,2023,29(18):198-208.
- [18] 周浩然,杨洁,庄欣. 铁死亡在中医药治疗心力衰竭中的机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*,2023,29(11):240-246.
ZHOU H R, YANG J, ZHUANG X. Mechanism of ferroptosis in Chinese medicine treatment of heart failure: A review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*,2023,29(11):240-246.
- [19] ZHOU G, LIN L, WANG S, et al. Huanglian Jiedutang enhances the stability of atherosclerotic plaques through SLC2A1-mediated efferocytosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024,140:112834.
- [20] LIN J, GU M, WANG X, et al. Huanglian Jiedutang inhibits vascular smooth muscle cell-derived foam cell formation by activating autophagy via suppressing P2RY12 [J]. *J Ethnopharmacol*,2024,328:118125.
- [21] LIANG J, HUANG Y, MAI Z, et al. Integrating network pharmacology and experimental validation to decipher the mechanism of action of Huanglian Jiedutang in treating atherosclerosis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 1779-1795.
- [22] 王卓溪,班纪芳,李柔乐,等. 黄连解毒汤对ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的干预作用及其机制[J]. *中国实验方剂学杂志*,2022,28(21):23-31.
WANG Z X, BAN J F, LI R L, et al. Intervention of Huanglian Jiedutang on atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice and its mechanism [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(21): 23-31.
- [23] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: Past, present and future [J]. *Cell Death Dis*,2020,11(2):88.
- [24] DODSON M, CASTRO-PORTUGUEZ R, ZHANG D D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis [J]. *Redox Biol*,2019,23:101107.
- [25] HAN H, ZHANG G, ZHANG X, et al. Nrf2-mediated ferroptosis inhibition: A novel approach for managing inflammatory diseases [J]. *Inflammopharmacology*, 2024, 32(5):2961-2986.
- [26] CHEN X, YU C, KANG R, et al. Cellular degradation systems in ferroptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(4): 1135-1148.
- [27] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPX4 [J]. *Free Radic Biol Med*,2020,152:175-185.
- [28] YU W, LIU W, XIE D, et al. High level of uric acid promotes atherosclerosis by targeting Nrf2-mediated autophagy dysfunction and ferroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*,2022, 2022:9304383.
- [29] LI C, LIU R, XIONG Z, et al. Ferroptosis: A potential target for the treatment of atherosclerosis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2024,56(3):331-344.

[责任编辑 周冰冰]