

缬沙坦对颈动脉粥样硬化大鼠 AT1R/PI3K/Akt/mTOR 通路及血管内皮细胞自噬的影响

吕忠俊¹, 马从乾¹, 杨 轲¹, 牛晨光²

1. 南阳市中心医院 血管外科, 河南 南阳 473000

2. 河南大学第一临床学院 心内科, 河南 开封 475004

摘要: 目的 探讨缬沙坦对颈动脉粥样硬化大鼠血管紧张素 II 1 型受体 (AT1R)/磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路及血管内皮细胞自噬的影响。方法 采用高脂饲料饲喂结合颈动脉球囊损伤法制备颈动脉粥样硬化大鼠模型, 随机分为模型组 (生理盐水), 缬沙坦低、中、高 (10、20、30 mg/kg) 剂量组和阳性对照组 (阿托伐他汀, 2.5 mg/kg), 另取假手术大鼠作为对照组 (生理盐水), 每组 15 只, 均每天 ig 给药 1 次, 连续 4 周, 给药体积 10 mL/kg。末次给药结束 24 h 后, 全自动生化分析仪检测各组大鼠血脂水平, 包括总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C); 酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测各组大鼠颈动脉血清中白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察各组大鼠颈动脉内皮组织病理学变化; 单丹磺酰尸胺 (MDC) 染色法检测各组大鼠颈动脉内皮细胞自噬率; 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测各组大鼠自噬标记蛋白 LC3-II、Beclin 1 和通路蛋白 AT1R 表达水平及 PI3K、Akt、mTOR 磷酸化水平。结果 与对照组相比, 模型组大鼠颈动脉组织内皮细胞排列紊乱, 内皮破损, 大量炎症因子浸润, TC、TG、LDL-C、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平及 AT1R 蛋白表达和 PI3K、Akt、mTOR 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$), HDL-C 水平、细胞自噬率、LC3-II 和 Beclin 1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 缬沙坦低、中、高剂量组大鼠颈动脉组织中内膜逐渐平滑, 炎症因子浸润依次减少, TC、TG、LDL-C、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平及 AT1R 蛋白表达和 PI3K、Akt、mTOR 磷酸化水平依次降低 ($P < 0.05$), HDL 水平、细胞自噬率、LC3-II 和 Beclin 1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 缬沙坦高剂量组与阳性对照组大鼠各项指标差异无统计学意义。结论 缬沙坦可能通过下调 AT1R/PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 提高 LC3-II 和 Beclin 1 自噬相关蛋白表达水平, 促进颈动脉粥样硬化大鼠血管内皮细胞自噬, 减轻炎症反应。

关键词: 缬沙坦; 颈动脉粥样硬化; 血管紧张素 II 1 型受体/磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 细胞自噬

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)04-0652-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.04.003

Effects of valsartan on AT1R/PI3K/AKT/mTOR pathway and autophagy of vascular endothelial cells in rats with carotid atherosclerosis

LÜ Zhong-jun¹, MA Cong-qian¹, YANG Ke¹, NIU Chen-guang²

1. Department of Vascular Surgery, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

2. The First Clinical College of Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of valsartan on angiotensin II type 1 receptor (AT1R)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway and the autophagy of vascular endothelial cells in carotid atherosclerosis rats. **Methods** The rat models of carotid atherosclerosis were established by high-fat diet combined with carotid balloon injury. The rats were randomly divided into model group (normal saline), low (10 mg/kg), medium (20 mg/kg), high (30 mg/kg) valsartan groups and positive control group (atorvastatin, 2.5 mg/kg), the sham operated rats were taken as the control group (normal saline), with 15 in each group, the drug was given by intragastric administration once a day for 4 weeks, with a volume of 10 mL/kg. At 24 hours after the last administration, the blood lipid levels of rats in each group were detected by automatic biochemical

收稿日期: 2020-08-31

基金项目: 河南省医药卫生计划项目 (182102310159)

作者简介: 吕忠俊 (1980—), 男, 本科, 主治医师, 研究方向为血管外科及血管瘤、血管畸形。E-mail: lvzhj1980@163.com

analyzer, including total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). The levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of carotid artery endothelium. The autophagy rate of carotid artery endothelial cells was detected by MDC staining. Western blotting was used to detect the expression levels of autophagy marker proteins LC3-II, Beclin 1, AT1R and phosphorylation levels of PI3K, Akt and mTOR. Results Compared with those in the control group, the endothelial cells of carotid artery in the model group were disorderly arranged, the endothelium was damaged and a large number of inflammatory factors were infiltrated, and TC, TG, LDL-C, IL-1 β , TNF- α , IL-6 levels, AT1R protein expression and PI3K, Akt, mTOR phosphorylation levels were significantly higher ($P < 0.05$), HDL-C level, autophagy rate, LC3-II and Beclin 1 protein expression levels were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the intima of carotid artery in the low, medium and high dose valsartan groups gradually smoothed, and the infiltration of inflammatory factors decreased in turn. TC, TG, LDL-C, IL-1 β , TNF- α , IL-6 levels, AT1R protein expression and PI3K, Akt, mTOR phosphorylation levels decreased in turn ($P < 0.05$). HDL level, autophagy rate, LC3-II and Beclin 1 protein expression levels were significantly higher ($P < 0.05$). There was no significant difference between the high dose valsartan group and the positive control group. Conclusions Valsartan may increase the expression levels of LC3-II and Beclin 1 autophagy related proteins by down-regulating AT1R/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, promote the autophagy of vascular endothelial cells in carotid atherosclerosis rats, and reduce the inflammatory reaction.

Key words: Valsartan; carotid atherosclerosis; angiotensin II type 1 receptor/phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin; autophagy

高血脂可引起动脉粥样硬化, 使心血管疾病的发病率、致死率、致残率显著增高, 动脉粥样硬化的形成是心血管疾病发生过程中的重要危险因素, 也是一种涉及氧化应激、内皮功能障碍和细胞自噬的慢性炎症性疾病^[1]。缬沙坦是血管紧张素受体的拮抗剂, 是治疗心肌梗死、心力衰竭、高血压的常规药物, 在临床上可联合曲美他嗪治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病^[2]。有研究^[3]表明血管紧张素受体拮抗剂可诱导前列腺癌细胞自噬, 其中自噬可参与多种细胞生物活动, 靶向磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 介导的自噬是多种肿瘤的重要治疗策略^[4]。但是, 缬沙坦对颈动脉粥样硬化大鼠血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT1R) /PI3K/Akt/mTOR 通路及血管内皮细胞自噬的影响, 目前尚未见相关报道。本研究通过使用高脂饲料饲喂结合颈动脉球囊损伤法制备颈动脉粥样硬化大鼠模型, 使用缬沙坦干预, 旨在从 AT1R/PI3K/Akt/mTOR 通路及自噬角度, 探究缬沙坦对颈动脉粥样硬化大鼠的治疗作用机制, 为颈动脉粥样硬化患者的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

80 只清洁级健康 SD 大鼠, 雄性, 体质量 180~

200 g, 购自重庆医科大学动物实验中心, 许可证号: SCXK (渝) 2018-0003, 符合国家实验室动物伦理保护标准及相关法律法规。按照 3R 原则给予实验动物人道的关怀照顾。饲养条件为温度 22 °C, 湿度 55%, 12 h 光暗循环。

1.2 实验药物

缬沙坦 (规格: 80 mg/粒; 产品批号: 160423) 购自北京诺华制药有限公司; 阿托伐他汀 (规格: 20 mg/片; 产品批号: 151024) 购自辉瑞制药有限公司。

1.3 主要试剂和仪器

白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司; HE 染色试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司; 单丹磺酰尸胺 (MDC) 购自上海基尔顿生物科技有限公司; 含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 GAPDH 鼠抗均购自美国 Sigma 公司; 蛋白提取试剂盒、ECL 显色试剂盒和 DAB 蛋白定量试剂盒均购自北京中山金桥生物科技有限公司; LC3-II、Beclin 1、AT1R、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR 鼠抗和辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 二抗均购自美国 Abcam 公司; 全自动生化分析仪购自美国 Beckman 公司; 酶标仪 Fax-20100 购自美国 INStat 公司; 尼康 SMZ745 光学显微镜购自上海普赫生物科技有

限公司;蛋白凝胶成像仪、转膜仪和电泳仪均购自美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 颈动脉粥样硬化大鼠模型的制备与分组

参考余晴晴等^[5]方法,使用高脂饲料饲喂结合颈动脉球囊损伤法制备颈动脉粥样硬化大鼠模型:大鼠适应性饲养1周后,造模大鼠给予高脂饲料(猪油 25%、胆固醇 2%、胆酸钠 0.10%、基础饲料 72.90%)饲喂,对照组大鼠给予基础饲料饲喂,连续饲喂4周。造模大鼠 ip 10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,以仰卧位固定于手术台上,颈部消毒后,切开皮肤,暴露出左侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉并依次分离,iv 肝素,分别用动脉夹夹住近心端的颈总动脉和远心端的颈内动脉,在远心端的颈外动脉开一切口,将球囊导管通过切口插入颈总动脉直至距离颈外动脉分叉处 2.5 cm 处,将生理盐水灌入球囊,使球囊充盈,退出球囊后,再插入球囊并注入生理盐水,连续3次(对照组仅进行假手术不插入球囊),依次缝合伤口。术后第4天将造模大鼠随机分为模型组、缙沙坦低、中、高剂量(10、20、30 mg/kg^[6])组和阳性对照组(阿托伐他汀, 2.5 mg/kg^[7]),每组15只,各组分别 ig 给予相应药物,对照组和模型组 ig 给予等体积生理盐水,每天1次,连续4周,给药体积 10 mL/kg。

2.2 全自动生化分析仪检测各组大鼠血脂水平

大鼠于末次给药24 h后,ip 10%水合氯醛(400 mg/kg)深度麻醉实施安乐死后,股动脉取血,3 000 r/min 离心 15 min 后取上清,使用全自动生化分析仪测定大鼠总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平。

2.3 ELISA 法检测各组大鼠颈动脉血清中炎症因子水平

取“2.2”项中行安乐死后各组大鼠颈动脉血液,3 500 r/min 离心 15 min,取上清液,按照试剂盒说明书,使用酶标仪分别测定并计算 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平。

2.4 HE 染色观察各组大鼠颈动脉内皮组织病理学变化

取“2.2”项中行安乐死后的大鼠,每组随机选取5只,分离出颈动脉内皮组织,迅速置于4%多聚甲醛中固定,经组织脱水、包埋、切片、烤片后,行苏木素-伊红染色,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明和

中性树胶封片后,于光学显微镜下观察颈动脉内皮组织形态学变化。

2.5 MDC 染色法检测大鼠颈动脉内皮细胞自噬率

取“2.2”项中行安乐死后的大鼠,各组分别取10只,解剖后收集大鼠颈动脉内皮组织,每组分别取0.05 g 剪碎(其余组织迅速置于-80 °C冰箱,用于后续 Western blotting 检测),用胰蛋白酶消化成单个细胞,制成细胞悬液后,转入含10% FBS 的 DMEM/F12 培养基的培养瓶中进行原代培养,取对数生长期的内皮细胞接种于96孔板,常规培养24 h后,每组设置6皿,每皿2 mL,离心后用 PBS 缓冲液洗涤3次,每孔加入1 mL 4%多聚甲醛固定10 min,弃上清,然后加入终浓度为50 μ mol/L MDC 染色,37 °C温育30 min,于倒置荧光显微镜下观察并计数 MDC 阳性细胞(核周和胞浆出现3个及以上的高密度着色点),以 MDC 阳性细胞率表示细胞自噬率,实验重复3次。

2.6 Western blotting 法检测各组大鼠自噬标记蛋白和通路蛋白表达水平

取上述“2.5”项中置于-80 °C的剩余各组大鼠颈动脉内皮组织,使用蛋白提取试剂盒提取总蛋白,BAC 蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量,然后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、转膜、抗体封闭、1:1 000 浓度稀释后的 LC3-II、Beclin 1、AT1R、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR 鼠抗4 °C过夜孵育,置于含辣根过氧化物酶缀合的二抗(1:2 000)中室温孵育2 h,用 ECL 显色试剂盒显色,凝胶成像仪拍照,以 β -actin 为参照,使用 Image-J 软件分析各组蛋白的相对表达量,每组设置3个重复。

2.7 统计学分析

数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 snk-q 检验; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血脂水平的比较

与对照组相比,模型组大鼠 TC、TG、LDL-C 水平显著升高($P < 0.05$),HDL-C 水平显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,缙沙坦低、中、高剂量组大鼠 TC、TG、LDL-C 水平依次降低($P < 0.05$),HDL-C 水平依次升高($P < 0.05$),且呈剂量相关性;缙沙坦高剂量组与阳性对照组大鼠 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平差异无统计学意义。见表1。

表 1 各组大鼠血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)Table 1 Comparison of blood lipid levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.85 ± 0.21	0.53 ± 0.07	0.22 ± 0.03	1.78 ± 0.19
模型	—	2.93 ± 0.32*	0.92 ± 0.11*	0.71 ± 0.08*	0.76 ± 0.09*
缬沙坦	10	2.81 ± 0.29 [#]	0.79 ± 0.08 [#]	0.55 ± 0.06 [#]	0.92 ± 0.11 [#]
	20	2.56 ± 0.28 ^{#△}	0.68 ± 0.07 ^{#△}	0.41 ± 0.05 ^{#△}	1.45 ± 0.15 ^{#△}
	30	2.17 ± 0.25 ^{#△▲}	0.59 ± 0.06 ^{#△▲}	0.29 ± 0.03 ^{#△▲}	1.69 ± 0.18 ^{#△▲}
阳性对照	2.5	1.96 ± 0.22 ^{#△▲}	0.57 ± 0.07 ^{#△▲}	0.25 ± 0.04 ^{#△▲}	1.71 ± 0.19 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与缬沙坦低剂量组比较: [△] $P < 0.05$; 与缬沙坦中剂量组比较: [▲] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs low-dose of valsartan group; [▲] $P < 0.05$ vs medium dose of valsartan group

3.2 各组大鼠血清中炎症因子水平比较

与对照组相比, 模型组大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 缬沙坦低、中、高剂量组大鼠血清中 IL-1 β 、

TNF- α 和 IL-6 水平依次降低 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性; 缬沙坦高剂量组与阳性对照组大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 水平差异无统计学意义。见表 2。

表 2 各组大鼠血清中炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)Table 2 Comparison of inflammatory factors in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)
对照	—	48.34 ± 5.76	82.92 ± 9.19	26.70 ± 3.91
模型	—	143.94 ± 14.68*	251.17 ± 27.20*	133.53 ± 15.13*
缬沙坦	10	125.18 ± 13.53 [#]	218.53 ± 22.36 [#]	119.47 ± 12.87 [#]
	20	96.92 ± 10.85 ^{#△}	155.63 ± 16.07 ^{#△}	82.01 ± 9.50 ^{#△}
	30	80.64 ± 8.29 ^{#△▲}	121.03 ± 13.24 ^{#△▲}	66.03 ± 7.43 ^{#△▲}
阳性对照	2.5	75.08 ± 7.73 ^{#△▲}	117.35 ± 12.98 ^{#△▲}	69.41 ± 8.32 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与缬沙坦低剂量组比较: [△] $P < 0.05$; 与缬沙坦中剂量组比较: [▲] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs low-dose of valsartan group; [▲] $P < 0.05$ vs medium dose of valsartan group

3.3 各组大鼠颈动脉组织病理学变化比较

对照组大鼠颈动脉组织由完整的单层内皮细胞构成, 紧密有序且内膜平滑; 模型组大鼠颈动脉组织内皮细胞排列紊乱, 内皮破损, 大量炎症因子浸润; 缬沙坦低、中、高剂量组大鼠颈动脉组织中内膜逐渐平滑, 炎症因子浸润依次减少; 阳性对照组与缬沙坦高剂量组形态接近。见图 1。

3.4 各组大鼠颈动脉内皮细胞自噬率比较

与对照组相比, 模型组大鼠颈动脉内皮细胞自噬率显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 缬沙坦低、中、高剂量组大鼠颈动脉内皮细胞自噬率依次升高 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性; 缬沙坦高剂量组与阳性对照组大鼠颈动脉内皮细胞自噬率差异无统计学意义。见表 3。

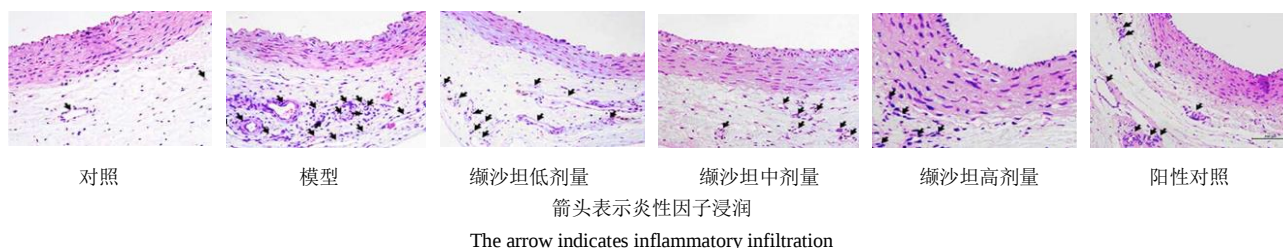


图 1 各组大鼠颈动脉组织病理学 HE 染色 (×200)

Fig. 1 Histopathological HE staining of carotid artery in each group (× 200)

表 3 各组大鼠颈动脉内皮细胞自噬率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Comparison of autophagy rate of carotid endothelial cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	颈动脉内皮细胞自噬率/%
对照	—	49.33 ± 5.02
模型	—	12.76 ± 1.38*
缬沙坦	10	26.73 ± 2.77 [#]
	20	38.73 ± 3.92 ^{#△}
	30	47.32 ± 4.83 ^{#△▲}
阳性对照	2.5	45.76 ± 4.69 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与缬沙坦低剂量组比较: [△] $P < 0.05$; 与缬沙坦中剂量组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs low-dose of valsartan group; [▲] $P < 0.05$ vs medium dose of valsartan group

3.5 各组大鼠颈动脉内皮组织中自噬标记蛋白及通路蛋白表达比较

与对照组相比, 模型组大鼠颈动脉内皮组织中 LC3-II 和 Beclin 1 蛋白表达水平显著降低, AT1R 蛋白表达水平及 PI3K、Akt、mTOR 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 缬沙坦低、中、高剂量组大鼠颈动脉内皮组织中 LC3-II 和 Beclin 1 蛋白表达水平依次升高, AT1R 蛋白表达水平及 PI3K、Akt、mTOR 磷酸化水平依次降低 ($P < 0.05$),

呈剂量相关性; 阳性对照组与缬沙坦高剂量组大鼠颈动脉内皮组织中 LC3-II、Beclin 1、AT1R 蛋白表达水平及 PI3K、Akt、mTOR 磷酸化水平差异无统计学意义。见图 2 和表 4。

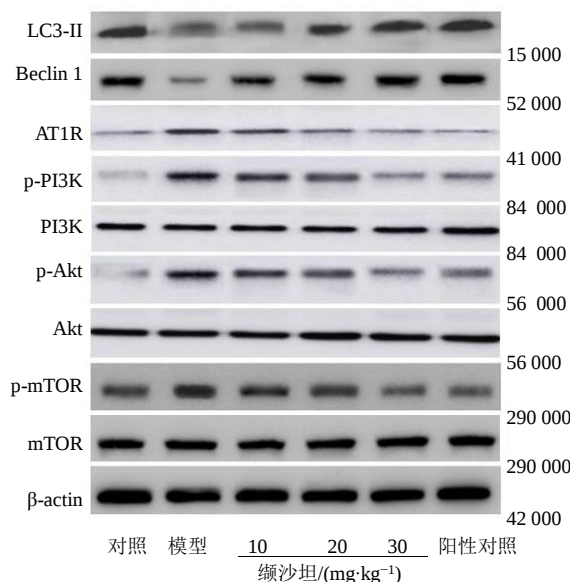


图 2 各组大鼠颈动脉内皮组织中 LC3-II、Beclin 1、AT1R、PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达

Fig. 2 Protein expression of LC3-II, Beclin 1, AT1R, PI3K, Akt and mTOR in endothelial tissue of carotid artery rats of rats in each group

表 4 各组大鼠颈动脉内皮组织自噬标记蛋白及通路蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Comparison of expression levels of autophagy marker protein and pathway protein in carotid artery endothelial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LC3-II/β-actin	Beclin 1/β-actin	AT1R/β-actin	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
对照	—	0.87 ± 0.09	0.79 ± 9.19	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.16 ± 0.02
模型	—	0.24 ± 0.03*	0.16 ± 0.02*	0.59 ± 0.06*	0.83 ± 0.09*	0.69 ± 0.07*	0.78 ± 0.08*
缬沙坦	10	0.31 ± 0.04 [#]	0.58 ± 0.06 [#]	0.43 ± 0.05 [#]	0.64 ± 0.07 [#]	0.50 ± 0.06 [#]	0.62 ± 0.07 [#]
	20	0.46 ± 0.05 ^{#△}	0.63 ± 0.07 ^{#△}	0.32 ± 0.04 ^{#△}	0.52 ± 0.06 ^{#△}	0.42 ± 0.05 ^{#△}	0.51 ± 0.06 ^{#△}
	30	0.83 ± 0.10 ^{#△▲}	0.75 ± 0.08 ^{#△▲}	0.21 ± 0.03 ^{#△▲}	0.24 ± 0.03 ^{#△▲}	0.17 ± 0.02 ^{#△▲}	0.21 ± 0.03 ^{#△▲}
阳性对照	2.5	0.92 ± 0.11 ^{#△▲}	0.81 ± 0.09 ^{#△▲}	0.17 ± 0.02 ^{#△▲}	0.13 ± 0.02 ^{#△▲}	0.10 ± 0.03 ^{#△▲}	0.19 ± 0.02 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与缬沙坦低剂量组比较: [△] $P < 0.05$; 与缬沙坦中剂量组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs low-dose of valsartan group; [▲] $P < 0.05$ vs medium dose of valsartan group

4 讨论

随着人们生活水平的提高和生活习惯的改变, 由颈动脉粥样硬化引起的脑血管疾病发生率逐年升高, 成为近年来医学研究中的重点。许多因素均可导致颈动脉粥样硬化的产生, 其中, 高血脂可使血管壁增厚, 硬度增强, 是导致动脉粥样硬化的关键

因素^[8]。本研究通过使用高脂饲料饲喂结合颈动脉球囊损伤法制备颈动脉粥样硬化大鼠模型, 结果发现, 模型组大鼠颈动脉组织内皮细胞排列紊乱, 内皮破损, 大量炎症因子浸润, TC、TG、LDL-C 水平、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 含量显著升高, HDL-C 水平和血管内皮细胞自噬率显著降低, 提示颈动脉

粥样硬化大鼠模型构建成功,且发生炎症反应,可能与血管内皮细胞自噬有关。

血管紧张素可提高 Akt 和 mTOR 的磷酸化水平,通过 AT4R 和 PI3K/Akt/mTOR 途径抑制细胞凋亡^[9]。缬沙坦是一种血管紧张素受体的拮抗剂,王晓丹等^[10]研究发现缬沙坦可能通过提高自噬水平,保护足细胞,降低蛋白尿,从而延缓糖尿病肾病进展。朱晓刚等^[11]研究发现缬沙坦可能通过调控干扰素系统蛋白及炎症反应蛋白的水平来改善小鼠动脉粥样硬化。本研究发现,经缬沙坦干预后,大鼠颈动脉组织细胞排列逐渐有序,内膜逐渐平滑,炎症因子浸润依次减少,TC、TG、LDL-C 水平及 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平显著降低,HDL-C 水平和血管内皮细胞自噬率显著升高,且呈剂量依赖性,提示缬沙坦可能通过提高血管内皮细胞自噬,缓解大鼠颈动脉粥样硬化,但其中的机制尚需进一步研究。

炎症反应是脑血管病的主要发病机制,而炎症和自噬是导致颈动脉粥样硬化发生的主要机制,雷帕霉素可能通过促进自噬的激活,延缓动脉粥样硬化斑块的发展^[12]。自噬对机械损伤后 PI3K/Akt/mTOR 介导的脊髓神经元凋亡亦具有保护作用^[13]。血管紧张素处理后的心肌细胞,钙调神经磷酸酶抑制剂可通过诱导其自噬,对其发挥保护作用^[14]。PI3K/Akt/mTOR 通路与自噬的启动密切相关,LC3-II 和 Beclin 1 为自噬标记蛋白,其表达水平可用来反映细胞自噬程度^[15]。本研究发现,与对照组相比,模型组大鼠颈动脉内皮组织中 LC3-II 和 Beclin 1 蛋白表达水平显著降低,AT1R 蛋白表达水平及 PI3K、Akt、mTOR 磷酸化水平显著升高,表明颈动脉粥样硬化大鼠内皮细胞中自噬水平较低,PI3K/Akt/mTOR 通路磷酸化程度较高。研究显示,抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可促进骨关节炎大鼠关节软骨细胞自噬,减轻炎症反应^[16],在保护肾功能和恢复自噬方面也发挥重要作用^[17]。另外,柚皮苷可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路介导的自噬,改善高糖/高脂应激诱导的内皮细胞功能障碍^[18];MicroRNA 155 可通过靶向 PI3K/Akt/mTOR 通路,促进人脐静脉内皮细胞自噬^[19];六溴环十二烷也可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路促进人肝细胞自噬^[20]。本研究发现缬沙坦能显著降低 AT1R 蛋白表达和 PI3K、Akt、mTOR 磷酸化水平,提高自噬标记蛋白 LC3-II 和 Beclin 1 表达水平,提示缬沙坦可能通过抑制 AT1R/PI3K/Akt/mTOR 通路,促进血管内皮

细胞自噬,缓解炎症反应和大鼠颈动脉粥样硬化。

本研究结果表明缬沙坦可剂量相关性地抑制颈动脉粥样硬化大鼠 AT1R 以及自噬标记蛋白 LC3-II 和 Beclin 1 表达水平,下调 PI3K/Akt/mTOR 通路,进而促进血管内皮细胞自噬,缓解颈动脉粥样硬化,为临床上使用缬沙坦治疗由颈动脉粥样硬化引起的疾病提供了理论依据,但是缬沙坦对颈动脉粥样硬化及细胞自噬的作用机制十分复杂,尚需深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lu J X, Guo C, Ou WS, et al. Citronellal prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in rats [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 3790-3800.
- [2] 朱元,吴明华,王欣彤,等.缬沙坦联合曲美他嗪治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病心力衰竭患者的临床效果[J].*中国医药*, 2018, 5(10): 1477-1480.
- [3] Woo Y, Jung Y J. Angiotensin II receptor blockers induce autophagy in prostate cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3579-3585.
- [4] Xu Z, Han X, Ou D, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2): 575-587.
- [5] 余晴晴,柏建峰,王江军.瑞舒伐他汀对颈动脉粥样硬化大鼠血管损伤及 MMP-2、MMP-9 和 PKC 表达的影响[J].*中国地方病防治杂志*, 2017, 21(11): 1986-1989.
- [6] 李礼,王彩丽,米焱.不同剂量缬沙坦对糖尿病肾病大鼠生化指标的影响[J].*临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(30): 5745-5745.
- [7] 胡武明,施振华,叶士勇,等.芪参益气滴丸通过 TRPC1/STIM1 通路调节 Ca²⁺稳态发挥抗动脉粥样硬化作用[J].*中国病理生理杂志*, 2019, 35(4): 686-691.
- [8] 孙卉娟,朱正球,栾云,等.极速脉搏波实时定量技术在高脂血症患者颈动脉粥样硬化评估中的应用[J].*山东医药*, 2018, 58(14): 53-55.
- [9] Park B M, Cha S A, Lee S H, et al. Angiotensin IV protects cardiac reperfusion injury by inhibiting apoptosis and inflammation via AT4R in rats [J]. *Peptides*, 2016, 79(10): 66-74.
- [10] 王晓丹,高丽辉,牛艳芬,等.缬沙坦对糖尿病肾病大鼠足细胞自噬的影响[J].*中国新药杂志*, 2018, 27(2): 184-189.
- [11] 朱晓刚,王丽岳,王丽江,等.缬沙坦改善小鼠动脉粥样硬化的作用机制研究[J].*基因组学与应用生物学*, 2018, 37(5): 2312-2319.
- [12] Ma J, Yang S, Ma A, et al. Expression of miRNA-155 in carotid atherosclerotic plaques of apolipoprotein E

- knockout (ApoE^{-/-}) mice and the interventional effect of rapamycin [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46(10): 70-74.
- [13] Wang Z, Zhou L, Zheng X, *et al*. Autophagy protects against PI3K/Akt/mTOR-mediated apoptosis of spinal cord neurons after mechanical injury [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 656(10): 158-164.
- [14] Duan H, Li Y, Yan L, *et al*. Rcan1-1L overexpression induces mitochondrial autophagy and improves cell survival in angiotensin II-exposed cardiomyocytes [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 335(1): 99-106.
- [15] Ding R, Zhang C, Zhu X, *et al*. ROS-AKT-mTOR axis mediates autophagy of human umbilical vein endothelial cells induced by cooking oil fumes-derived fine particulate matters in vitro [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 113(10): 452-460.
- [16] Xue J F, Shi Z M, Zou J, *et al*. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway promotes autophagy of articular chondrocytes and attenuates inflammatory response in rats with osteoarthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89(10): 1252-1261.
- [17] Wang Y, Lu Y H, Tang C, *et al*. Calcium dobesilate restores autophagy by inhibiting the VEGF/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10(1): 886-896.
- [18] Wang K, Peng S, Xiong S, *et al*. Naringin inhibits autophagy mediated by PI3K/Akt/mTOR pathway to ameliorate endothelial cell dysfunction induced by high glucose/high fat stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 874(10): 1-10.
- [19] Yin S, Yang S, Pan X, *et al*. MicroRNA-155 promotes ox-LDL-induced autophagy in human umbilical vein endothelial cells by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 2798-2806.
- [20] Jin Y, Shang Y, Zhang D, *et al*. Hexabromocyclododecanes promoted autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway in L02 cells [J]. *J Environ Manage*, 2019, 244(10): 77-82.

[责任编辑 刘东博]