

黄芪赤风汤对小鼠脑微血管内皮损伤细胞脂质及炎症因子损伤的影响和非靶向代谢组学研究

陈平平, 梁玉琴, 付佳琪, 卢芳, 于栋华, 刘树民*

黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要:目的 基于代谢组学探讨黄芪赤风汤对内皮细胞损伤的保护作用及其机制。方法 通过氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导小鼠脑微血管内皮 bEnd.3 细胞建立体外内皮细胞损伤模型。bEnd.3 细胞随机分为对照组、模型组和黄芪赤风汤低、中、高剂量组。CCK-8 法分别检测不同浓度 ox-LDL 和黄芪赤风汤对 bEnd.3 细胞活力的影响;油红 O 染色评估 bEnd.3 细胞内脂质聚积情况;酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 bEnd.3 细胞总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)、胆固醇酯(CE)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)水平和 CE/TC;非靶向代谢组学分析 bEnd.3 细胞的代谢物谱,以鉴定筛选出与内皮损伤相关的差异代谢物,从而探究黄芪赤风汤保护内皮损伤的代谢通路及潜在作用机制。结果 CCK-8 结果确定 50 μ g/mL 为 ox-LDL 的造模浓度,50、100 和 200 μ g/mL 为黄芪赤风汤干预 bEnd.3 细胞的低、中、高剂量。与模型组比较,黄芪赤风汤能有效改善 bEnd.3 细胞的泡沫化程度,脂滴蓄积明显减少,黄芪赤风汤各剂量组 TC、CE 和 TNF- α 水平显著下调($P<0.05$ 、 0.01),黄芪赤风汤中、高剂量组 FC、IL-6、VCAM-1 水平和 CE/TC 显著下调($P<0.05$ 、 0.01),黄芪赤风汤高剂量组 IL-1 β 和 ICAM-1 水平显著下调($P<0.05$ 、 0.01)。代谢组学鉴定出 15 种差异代谢产物,包括 5-羟基吡啶乙醛、同型半胱氨酸、花生四烯酸、鞘氨醇-1-磷酸、苯丙酮酸、谷胱甘肽、氧化谷胱甘肽和 L-磷酸精氨酸等,主要富集于谷胱甘肽代谢、烟酸和烟酰胺代谢、苯丙氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢等代谢途径。结论 黄芪赤风汤可有效改善内皮细胞损伤,抑制 ox-LDL 诱导的 bEnd.3 细胞内脂质蓄积、炎症因子和黏附分子表达,其机制可能与调节受损内皮细胞内的代谢功能,调节细胞内氨基酸等物质代谢相关。

关键词: 黄芪赤风汤;内皮细胞损伤;脂质蓄积;炎症;黏附分子;非靶向代谢组学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)01-0044-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.01.007

Effects of Huangqi Chifeng Tang on lipid and inflammatory factor damage in mouse brain microvascular endothelial injury cells and study on non-targeted metabolomics

CHEN Pingping, LIANG Yuqin, FU Jiaqi, LU Fang, YU Donghua, LIU Shumin

Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Huangqi Chifeng Tang on endothelial cell injury and its mechanism based on metabolomics. **Methods** An *in vitro* endothelial cell injury model was established by ox-LDL induced mouse brain endothelial bEnd.3 cells. bEnd.3 cells were randomly divided into control group, model group and Huangqi Chifeng Tang low, medium, and high dose groups. Cell counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the effects of different concentrations of ox LDL and Huangqi Chifeng Tang on bEnd.3 cell viability. Oil red O staining was used to evaluate the intracellular lipid accumulation in bEnd.3 cells. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), cholesterol esters (CE), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in bEnd.3 cells, as well as CE/TC. Non-targeted metabolomics analysis of the metabolite profile of bEnd.3 cells to identify and screen differential metabolites related to endothelial injury, in order to explore the metabolic pathways and

收稿日期: 2024-10-05

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(PL2024H239)

作者简介: 陈平平, 博士, 主要从事中药药性理论及药效物质基础方面的研究。E-mail: ivy.xfs@163.com

*通信作者: 刘树民, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药性理论及药效物质基础方面的研究。E-mail: keji-liu@163.com

potential mechanisms of Huangqi Chifeng Tang in protecting endothelial injury. **Results** CCK-8 determined 50 $\mu\text{g/mL}$ as the modeling concentration for ox-LDL, and 50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$ were the low, medium, and high dose of Huangqi Chifeng Tang intervention in bEnd.3 cells. Compared with the modal group, Huangqi Chifeng Tang can effectively improve the foam degree of bEnd.3 cells, and significantly reduced the accumulation of lipid droplets. Compared with the modal group, the levels of TC, CE, and TNF- α were significantly decreased in each dose group of Huangqi Chifeng Tang ($P < 0.05, 0.01$), the levels of FC, IL-6, VCAM-1, and CE/TC were significantly decreased in the middle and high dose groups of Huangqi Chifeng Tang ($P < 0.05, 0.01$), and the levels of IL-1 β and ICAM-1 were significantly decreased in the high dose group of Huangqi Chifeng Tang ($P < 0.05, 0.01$). Metabolomics results showed that a total of 15 differential metabolites were identified, including 5-hydroxyindolealdehyde, homocysteine, arachidonic acid, sphingosine-1-phosphate, phenylpyruvic acid, glutathione, oxidized glutathione and L-Phosphoarginine, mainly enriched in metabolic pathways such as glutathione metabolism, niacin and nicotinamide metabolism, phenylalanine metabolism, cysteine and methionine metabolism. **Conclusion** Huangqi Chifeng Tang can effectively improve endothelial cell damage, inhibit ox-LDL induced lipid accumulation, inflammatory factors, and adhesion molecule expression in bEnd. 3 cells. Its mechanism may be related to regulating the metabolic function of damaged endothelial cells and regulating the metabolism of intracellular amino acids and other substances.

Key words: Huangqi Chifeng Tang; endothelial cell injury; lipid accumulation; inflammation; adhesion molecule; non-targeted metabolomics

动脉粥样硬化 (AS) 是一种发生在动脉内膜的慢性炎症性疾病, 其发病初期通常由脂质代谢紊乱条件下的内皮细胞功能障碍和血管炎症引起的^[1-2]。血管内皮是阻止血浆中的脂蛋白和白细胞进入血管壁的第一道屏障, 可控制诱发 AS 的 2 个关键病理驱动因素, 包括血管内皮细胞的炎症活化和功能障碍, 对于维持血管稳态和正常血液循环至关重要^[3]。当血管稳态遭到破坏时, 血管壁容易发生脂质浸润、单核细胞募集、血管收缩、血小板活化和氧化应激障碍, 进而诱发炎症, 血管内皮的脂质沉积与黏附的炎症细胞形成脂质条纹, 促进内皮损伤部位粥样硬化斑块的形成^[4]。黄芪赤风汤是治疗瘫腿、因病虚弱的经典方剂, 最早记载于清代王清任所著的《医林改错》, 由黄芪、赤芍、防风 3 味药组成, 功在益气补虚、活血化瘀。本课题组前期对黄芪赤风汤体内抗 AS 药理作用机制进行了深入的研究^[5-6], 但黄芪赤风汤在体外受损内皮细胞中的作用尚未明确。本研究通过体外实验建立了氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的内皮细胞损伤模型, 从细胞代谢组学的角度探究黄芪赤风汤保护内皮细胞的相关机制, 为后续机制研究奠定靶向基础。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠脑微血管内皮 bEnd.3 细胞购自赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司, 货号为 iCell-m009, 经上海翼和应用生物技术有限公司进行细胞遗传质量鉴定检测。

1.2 试剂

黄芪、赤芍和防风中药饮片 (批号分别是 20220527、20220520、20220515, 黑龙江修生堂药业有限公司); ox-LDL (货号 YB-002, 广州奕源生物科技有限公司); 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8, 货号 C0038, 碧云天生物技术有限公司); 总胆固醇 (TC)、游离胆固醇 (FC) 和胆固醇酯 (CE) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (货号 ml037202、ml037374、ml037158, 上海酶联生物科技有限公司); 白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 和血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) ELISA 试剂盒 (货号 ml098416、ml098430、mlC50536-1、ml002280、ml002068, 上海酶联生物科技有限公司); 油红 O 染色试剂盒 (货号 C0158S, 碧云天生物技术有限公司); Dulbecco's 改良培养基 (DMEM, 货号 C11995500BT, 美国 Gibco 公司); 0.25% 胰酶 (货号 C3530-0500, 美国赛默飞世尔科技公司); 胎牛血清 (FBS, 货号 04-002-1A, 上海 VivaCell 公司); 青霉素-链霉素溶液 (货号 15070063, 美国赛默飞世尔科技公司)。

1.3 仪器

M200pro 型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); KDC-160HR 高速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司); AcquityTM UPLC 液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Synapt G2-Si 质谱分析系统 (美国 Waters 公司); LUC-15-00269 型细胞计数仪 (韩国 LUNA-II 公司); BB150 型 CO₂ 培养箱 (美国赛默飞世尔科技公司);

JY92-11N 型超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); Life EVOS FL Auto 型电子显微镜(美国赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 药物制备

按照 10:3:2 的质量比分别称取黄芪、赤芍、防风 3 种中药饮片,置于蒸馏水(质量浓度 10%)中浸泡 1 h 后回流 3 次,每次 1.5 h,合并 3 次的滤液。滤液浓缩并进行冷冻干燥,然后储存在 -20°C 。黄芪赤风汤的水提提取率为 37.78%。本课题组前期通过指纹图谱建立,检测芍药内酯苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷的含量对黄芪赤风汤进行质量控制^[7]。通过外观均匀度和水分检查进行黄芪赤风汤冻干粉末的质控,外观颜色为淡黄色或类黄色、形态呈细腻粉末状,颗粒度均匀,含水分不超过 5.0%的黄芪赤风汤冻干粉末用于后续实验。无菌环境下,精密称取灭菌后的黄芪赤风汤冻干粉末溶解在 DMEM 完全培养基中,冰浴超声 10 min,过 0.22 μm 微孔滤膜,制备成 25、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 黄芪赤风汤溶液。

ox-LDL 溶液的制备:无菌环境下,精密吸取 2.0 mg/mL 的 ox-LDL 母液与 DMEM 完全培养基充分混匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,制备成 25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 溶液。

2.2 细胞培养与传代

bEnd.3 细胞在补充有 10%热灭活 FBS 和 1%青霉素混合液的 DMEM 中培养,置于含有 5% CO_2 、 37°C 的细胞培养箱中。后续实验均在细胞密度约为 90%时进行。倒置显微镜下观察细胞生长至 85%左右时,使用含有 EDTA 的 0.25%的胰酶进行细胞消化,细胞间隙变大但未完全脱落时加入完全培养基终止消化,根据细胞生长状态按 1:2 或 1:3 的比例进行传代培养。

2.3 CCK-8 法检测细胞活力

使用胰酶消化 bEnd.3 细胞后离心收集细胞,再利用培养基重悬细胞制备细胞悬液。bEnd.3 细胞混悬液按照 4×10^4 个/孔的密度均匀接种于 96 孔的细胞培养板中并置于 37°C 恒温培养箱培养 24 h。通过 CCK-8 试剂盒分别测定黄芪赤风汤和 ox-LDL 的安全干预浓度。每孔分别加入 25、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 黄芪赤风汤溶液,分别孵育 12、24、48 h,均设置复孔;参考前期文献中方法^[8],每孔加入 25、

50、75、100 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 溶液,分别孵育 12、24、48 h,均设置复孔。药物干预细胞结束后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,随后把 96 孔板放到培养箱中孵育 1 h。使用多功能酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(A)值。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 ox-LDL 诱导内皮细胞损伤模型的建立

bEnd.3 细胞随机分为对照组、模型组和黄芪赤风汤低、中、高剂量组。将对数生长期的 bEnd.3 细胞混悬液以 1×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔细胞培养板中,适应性培养 24 h 后。对照组仅更换培养基,其余组均用 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 刺激以构建内皮细胞损伤模型,以 bEnd.3 细胞中 TC、FC 和 CE 水平显著性升高判断造模成功。黄芪赤风汤组在加入 ox-LDL 溶液的同时加入对应质量浓度的黄芪赤风汤溶液,共同孵育 24 h 后进行后续实验。

2.5 油红 O 染色

收集对数生长期的 bEnd.3 细胞以 2×10^5 个/孔的密度均匀接种于 24 孔板中,放至 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱适应性培养 24 h 后更换培养基。干预结束后弃去细胞培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,加入 4%多聚甲醛室温固定 20 min。弃掉固定液,用 PBS 清洗 2 次,加入 Triton-100,静置 20 min。弃掉,用 PBS 清洗。加入异丙醇内浸洗 20 s。加入新配置好的油红 O 染色液,静置染色 15 min。弃去染色液,入 60%异丙醇稍洗以去除余下染色液。最后加入 PBS 清洗,显微镜下镜检拍照。

2.6 细胞内脂质和胆固醇的含量测定

收集对数生长期的 bEnd.3 细胞以 1×10^6 个/孔的密度均匀接种于 6 孔板中,至 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱适应性培养 24 h 后弃去培养基。药物干预结束后,弃掉培养基后收集细胞沉淀,通过冰浴超声波破碎细胞, 4°C 以 1000 r/min 离心(离心半径 8 cm)10 min 去除颗粒和聚合物收集上清液置于冰上待测。采用 ELISA 试剂盒检测各组 bEnd.3 细胞中 TC、CE 和 FC 水平并计算 CE/TC。

2.7 细胞内炎性和黏附因子含量测定

收集对数生长期的 bEnd.3 细胞以 1×10^6 个/孔的密度均匀接种于 6 孔板中,至 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱适应性培养 24 h 后弃去培养基。参照 2.6 项下操作步骤制备细胞样品,采用 ELISA 试剂盒检测各组 bEnd.3 细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、ICAM-1 和 VCAM-1 水平。

2.8 bEnd.3 细胞代谢组学分析

2.8.1 样品制备 bEnd.3 细胞以 1×10^6 个/孔的密度均匀接种于 6 孔板中, 至 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱适应性培养 24 h 后弃去培养基, 按照对照组、模型组和黄芪赤风汤高剂量 (200 μg/mL) 组进行干预, 每组 5 个样本, 在培养箱孵育 24 h 后, 弃取培养基, 每孔加入 4 ℃ 预冷的 PBS 快速冲洗细胞表面 2 次。然后将 6 孔板转移至冰上, 6 孔板底部接触液氮来淬灭细胞 1 min。每孔加入预冷的 80% 甲醇-水溶液 (4:1 250), 使用细胞刮刀刮取细胞并将细胞悬液转移到离心管中, 再加入 250 μL 80% 甲醇水溶液冲洗 6 孔板合并细胞悬液。对样品进行涡旋 1 min, 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 (离心半径 8 cm) 10 min, 吸取上清 200 μL 通过 0.22 μm 微孔滤膜后转移至进样内衬管中进行上样, 剩余上清转移至新的离心管中保存于-80 ℃ 中备用。

2.8.2 检测条件 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相: A 为水 (含 0.1% 甲酸), B 为乙腈。洗脱梯度程序见表 1。自动进样器温度: 4 ℃; 样品仓温度: 4 ℃; 进样量: 3 μL。使用配备有加热电喷雾离子源 (ESI) 的 Q-Exactive Plus 四极杆高分辨率质谱仪, 在正负离子模式下进行采集分析。采集范围 m/z 50~1 500。ESI⁺ 与 ESI⁻ 模式下喷雾电压分别为 3 500、3 000 V, 脱溶剂气温度 350 ℃, 脱溶剂气流量 700 L/h。

2.8.3 数据处理与分析 采集的原始数据使用 Progenesis QI 软件进行分析处理, 包括基线滤波、峰鉴定、积分、保留时间校准、峰比对和归一化。利用人类代谢组数据库 (HMDB), 基于精确的 m/z 、二级片段和同位素分布进行化合物的定性与定量。利用 EZinfo 2.0 软件进行主成分分析 (PCA) 和偏

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Mobile phase gradient elution program

流动相比例	t/min
95% A	0~0.5
95%~65% A	0.5~5
65%~45% A	5~8
45%~2% A	8~10
2%~95% A	10~12
95% A	12~15

最小二乘判别分析 (PLS-DA), 观察样品间代谢物的整体分布和聚合状态; 采用变量投影重要度 (VIP) >1 和 $P<0.05$ 的候选代谢物作为潜在的生物标志物。通过 MetaboAnalyst 6.0 数据库对已鉴定的差异代谢物进行代谢途径富集分析。

2.9 统计学分析

使用 Graph Pad Prism 9.5 软件进行统计分析, 数据以平均值±标准差表示。采用单因素方差分析评估对照组与实验组之间的差异, Kruskal-Wallis 检验用于非靶向细胞代谢组学数据的分析。当 $P<0.05$ 时, 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ox-LDL 对 bEnd.3 细胞活力的影响

与对照组相比, 25、50、75、100 μg/mL ox-LDL 干预 12 h 后 bEnd.3 细胞存活率无明显变化; 当干预 24 h 时, ox-LDL 质量浓度达到 75 μg/mL 后, bEnd.3 细胞活力显著降低 ($P<0.05$ 、0.01); 当干预 48 h 时, ox-LDL 质量浓度达到 50 μg/mL 后, bEnd.3 细胞活力显著降低 ($P<0.01$)。因此, 后续实验选择 24 h 为造模时间, 50 μg/mL 为 ox-LDL 造模浓度, 见表 2。

表 2 ox-LDL 对 bEnd.3 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 2 Effect of ox-LDL on viability of bEnd. 3 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%		
		12 h	24 h	48 h
对照	0	100.00±1.74	100.00±2.80	100.00±2.17
ox-LDL	25	98.93±2.43	102.59±2.69	96.25±3.28
	50	101.28±2.39	99.57±1.44	91.79±2.23**
	75	99.65±2.46	93.74±3.6*	77.21±3.72**
	100	98.75±1.04	84.21±4.22**	60.73±4.23**

与对照组比较, * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

3.2 黄芪赤风汤对 bEnd.3 细胞活力的影响

与对照组相比, 25、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 黄芪赤风汤干预 12 h 后的 bEnd.3 细胞存活率无明显变化; 当干预 24 h 时, 黄芪赤风汤质量浓度达到 400 $\mu\text{g/mL}$ 后, bEnd.3 细胞活力显著降低 ($P<0.05$); 当干预 48 h 时, 黄芪赤风汤质量浓度达到 200 $\mu\text{g/mL}$ 后, bEnd.3 细胞活力显著降低 ($P<0.01$)。因此, 后续实验设置 24 h 为干预时间, 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 为黄芪赤风汤低、中、高剂量组的给药浓度, 见表 3。

3.3 油红 O 染色

与对照组相比, 模型组 bEnd.3 细胞内内皮细胞体积进一步增大, 胞浆疏松化并存在大量的红色脂滴; 与模型组相比, 黄芪赤风汤低、中、高剂量组

可见红色脂滴生成明显减少, 且随着黄芪赤风汤质量浓度的增大, 作用越明显。提示黄芪赤风汤可减少 ox-LDL 诱导的 bEnd.3 细胞内脂滴数量, 见图 1。

3.4 黄芪赤风汤对 bEnd.3 细胞内脂质含量的影响

与对照组相比, 模型组细胞中 TC、FC、CE 水平和 CE/TC 均显著升高 ($P<0.01$), 且 CE/TC $> 50\%$, 表明成功建立了内皮细胞源泡沫细胞模型; 与模型组相比, 黄芪赤风汤各剂量组细胞中 TC 和 CE 水平显著降低 ($P<0.01$), 在黄芪赤风汤中、高剂量组中, bEnd.3 细胞中 FC 水平和 CE/TC 随黄芪赤风汤给药剂量的增加而逐渐降低 ($P<0.01$), 且 CE/TC 低于 50%, 表明黄芪赤风汤可以抑制 ox-LDL 诱导的 bEnd.3 细胞脂质积累, 见表 4。

表 3 黄芪赤风汤对 bEnd.3 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 3 Effect of Huangqi Chifeng Tang on viability of bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%		
		12 h	24 h	48 h
对照	0	100.00 $\pm$ 1.87	100.00 $\pm$ 1.90	100.00 $\pm$ 2.88
黄芪赤风汤	25	101.09 $\pm$ 1.59	99.71 $\pm$ 1.88	104.25 $\pm$ 1.52
	50	99.50 $\pm$ 2.16	102.25 $\pm$ 2.09	98.58 $\pm$ 1.69
	100	102.26 $\pm$ 1.76	98.79 $\pm$ 2.48	99.63 $\pm$ 2.15
	200	99.78 $\pm$ 2.93	99.21 $\pm$ 1.06	87.05 $\pm$ 3.74**
	400	98.34 $\pm$ 3.39	94.52 $\pm$ 2.19*	75.77 $\pm$ 3.43**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

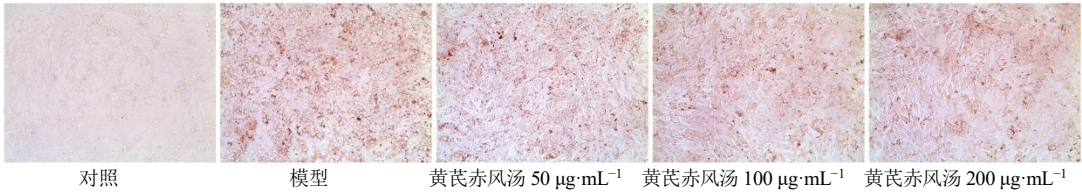


图 1 油红 O 染色 ($\times 100$)
Fig. 1 Oil red O staining ($\times 100$)

表 4 黄芪赤风汤对 bEnd.3 细胞内脂质含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 4 Effect of Huangqi Chifeng Tang on intracellular lipid content of bEnd. 3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	TC/ $(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ prot})$	FC/ $(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ prot})$	CE/ $(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ prot})$	CE/TC/%
对照	—	0.18 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	43.08 $\pm$ 2.65
模型	—	0.86 $\pm$ 0.03**	0.41 $\pm$ 0.02**	0.44 $\pm$ 0.03**	51.27 $\pm$ 2.41**
黄芪赤风汤	50	0.71 $\pm$ 0.05##	0.37 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.02##	46.94 $\pm$ 1.97
	100	0.52 $\pm$ 0.04##	0.32 $\pm$ 0.01##	0.23 $\pm$ 0.02##	41.21 $\pm$ 2.33##
	200	0.41 $\pm$ 0.02##	0.25 $\pm$ 0.03##	0.17 $\pm$ 0.02##	39.54 $\pm$ 1.69##

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ## $P<0.01$ 。
* $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs model group.

3.5 黄芪赤风汤对 bEnd.3 细胞内炎症因子和黏附分子水平的影响

与对照组比较, 模型组 bEnd.3 细胞促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比, 黄芪赤风

汤高剂量组 bEnd.3 细胞 IL-1 β 和 ICAM-1 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 黄芪赤风汤中、高剂量组 bEnd.3 细胞 IL-6 和 VCAM-1 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 黄芪赤风汤各剂量组 bEnd.3 细胞 TNF- α 水平显著下降 ($P<0.01$), 见表 5。

表 5 黄芪赤风汤对 bEnd.3 细胞内炎症因子和黏附分子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Huangqi Chifeng Tang on content of inflammatory factors and adhesion molecules in bEnd. 3 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IL-1 β /(pg·mL $^{-1}$)	IL-6/(pg·mL $^{-1}$)	TNF- α /(pg·mL $^{-1}$)	ICAM-1/(ng·mL $^{-1}$)	VCAM-1/(ng·mL $^{-1}$)
对照	—	37.65 $\pm$ 4.46	103.39 $\pm$ 7.55	62.01 $\pm$ 4.80	34.90 $\pm$ 4.13	31.85 $\pm$ 4.20
模型	—	82.31 $\pm$ 5.68**	188.03 $\pm$ 9.24**	167.22 $\pm$ 12.53**	65.33 $\pm$ 5.00**	67.53 $\pm$ 6.63**
黄芪赤风汤	50	74.31 $\pm$ 5.90	173.66 $\pm$ 8.81	108.99 $\pm$ 9.43##	60.29 $\pm$ 5.86	62.04 $\pm$ 4.93
	100	72.27 $\pm$ 6.13	150.79 $\pm$ 7.76##	91.47 $\pm$ 8.06##	57.47 $\pm$ 4.52	56.35 $\pm$ 5.08#
	200	64.28 $\pm$ 4.83#	147.05 $\pm$ 7.90##	89.59 $\pm$ 8.54##	51.73 $\pm$ 4.34##	48.26 $\pm$ 4.45##

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。

* $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group.

3.6 代谢组学分析

3.6.1 PCA、PLS-DA 分析 PCA 评分图显示, 对照组与模型组样本的代谢物轮廓在 ESI $^{+}$ 和 ESI $^{-}$ 2 种模式下分离趋势明显, 提示 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤模型的构建干扰了内皮细胞的正常代谢; 模型组和黄芪赤风汤组的样本代谢物轮廓在 ESI $^{+}$ 和 ESI $^{-}$ 2 种模式下明显分离, 并有向对照组回调的趋势, 提示黄芪赤风汤干预改变了 ox-LDL 诱导的内皮细胞的代谢特征, 修复损伤内皮细胞的代谢紊乱 (图 2)。

PLS-DA 得分图显示对照组与模型组代谢轮廓显著分离, 提示 ox-LDL 的诱导显著改变了 bEnd.3 细胞内源性小分子代谢物轮廓且可能有利于内皮细胞功能状态的判断。黄芪赤风汤组与模型组代谢轮廓也能明显分开, 提示黄芪赤风汤对 ox-LDL 诱导的内皮细胞代谢轮廓有一定的调控作用; PLS-DA 模型检验图显示 ESI $^{+}$ 模式参数: $R^2=0.8370$, $Q^2=$

0.8391, ESI $^{-}$ 模式参数: $R^2=0.8336$, $Q^2=0.7475$, 提示 PLS-DA 模型过拟合风险较低, 具有较好的区分和预测能力, 见图 3。

3.6.2 差异代谢物筛选 3 组 bEnd.3 细胞样本中共筛选出 15 个潜在生物标志物, 其中 ESI $^{+}$ 模式下 8 个, ESI $^{-}$ 模式下 7 个, 见图 4。聚类分析显示, 与对照组比较, 模型组细胞代谢物水平发生了明显变化, 其中 7 种显著上调, 8 种显著下调; 黄芪赤风汤干预后显著上调 5-羟基吡啶乙醛、3-甲基二氧吡啶、磷酸、棕榈酸、乙酰乙酸、吡啶乙酸、烟酸单核苷酸和谷胱甘肽等代谢物, 明显下调了 1-磷酸鞘氨醇、同型半胱氨酸、花生四烯酸、苯基丙酮酸、氧化型谷胱甘肽、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADP $^{+}$) 和 L-磷酸精氨酸等代谢物。黄芪赤风汤的生物标志物主要与苯丙氨酸代谢、谷胱甘肽代谢、烟酸和烟酰胺代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢途径密切相关, 见图 5 和表 6。

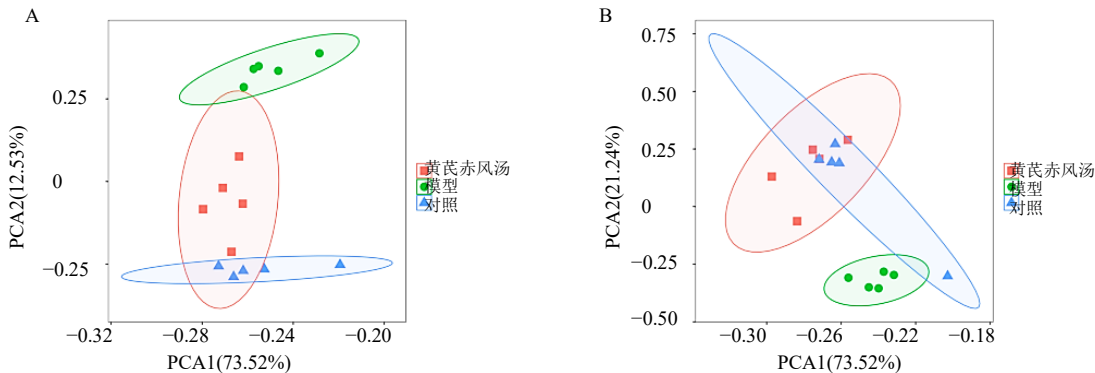


图 2 各组 bEnd.3 细胞代谢产物在 ESI $^{+}$ (A) 和 ESI $^{-}$ (B) 模式下的 PCA 分析

Fig. 2 PCA analysis of metabolic products of bEnd. 3 cells in ESI $^{+}$ (A) and ESI $^{-}$ (B) modes in each group

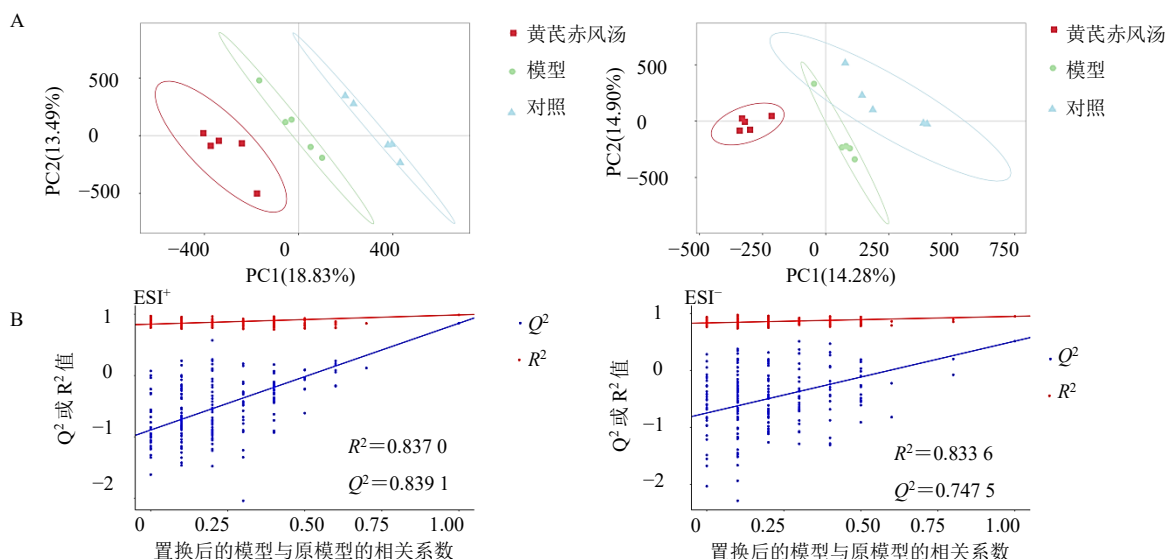


图 3 各组 bEnd.3 细胞代谢产物在 ESI⁺和 ESI⁻模式下的 PLS-DA 得分图 (A) 和 PLS-DA 模型检验图 (B)

Fig. 3 PLS-DA scores map (A) and model test map (B) of metabolites from bEnd.3 cells in ESI⁺ and ESI⁻ modes in each group

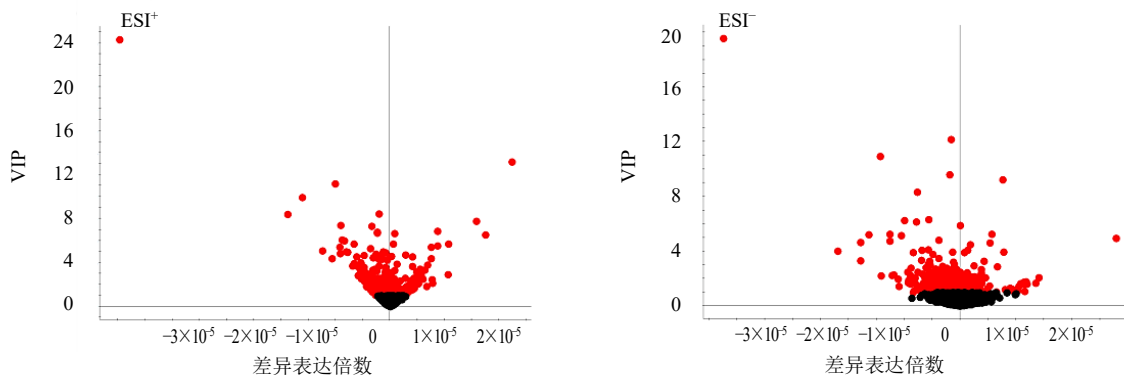


图 4 各组 bEnd.3 细胞代谢物 VIP 分析

Fig. 4 VIP analysis of bEnd.3 cell metabolites in each group

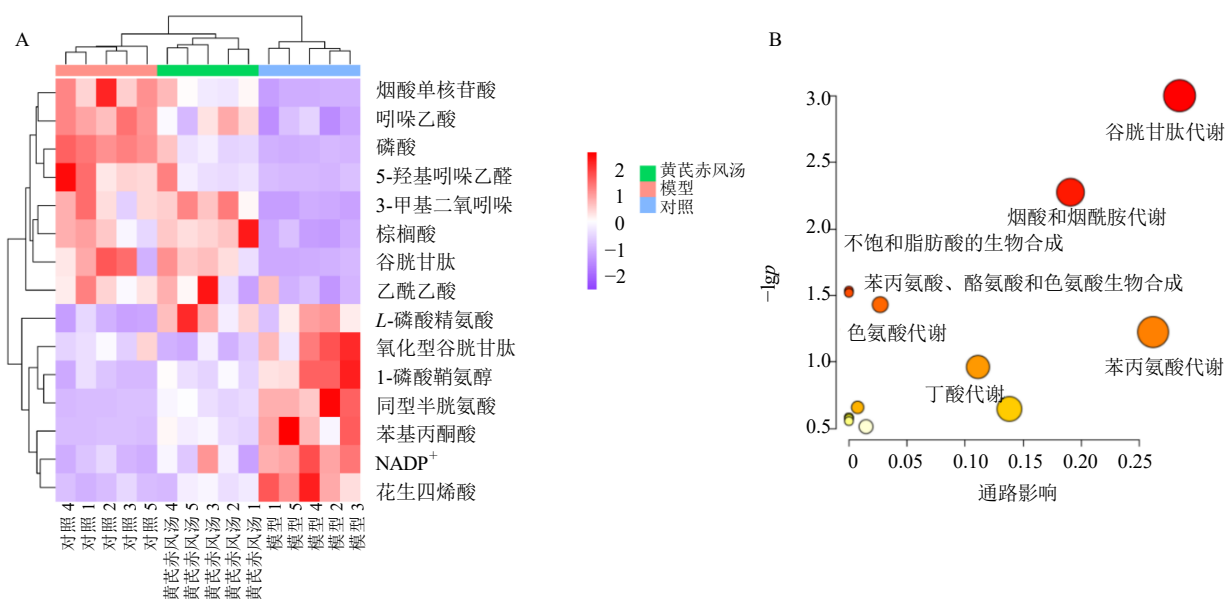


图 5 各组 bEnd.3 细胞代谢物聚类分析 (A) 和代谢通路分析 (B)

Fig. 5 Cluster analysis (A) and metabolic pathway analysis (B) of bEnd.3 cell metabolites in each group

表 6 差异代谢物表
Table 6 Table of differential metabolites

编号	离子模式	代谢物	化学式	VIP	<i>m/z</i>	NC vs ox-LDL	HQCFT vs ox-LDL
1	正	5-羟基吡啶乙醛	C ₁₀ H ₉ NO ₂	4.891 53	176.072 2	↓	↑
2	正	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	2.494 46	274.275 7	↓	↑
3	正	1-磷酸鞘氨醇	C ₁₈ H ₄₀ NO ₅ P	1.205 06	399.308 5	↑	↓
4	正	花生四烯酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	1.289 50	330.337 5	↑	↓
5	正	3-甲基二氧吡啶	C ₉ H ₉ NO ₂	2.596 55	146.061 3	↓	↑
6	正	棕榈酸	H ₃ O ₄ P	1.452 80	98.985 4	↓	↑
7	正	苯基丙酮酸	C ₉ H ₈ O ₃	3.394 43	165.055 8	↑	↓
8	正	乙酰乙酸	C ₄ H ₆ O ₃	5.272 74	120.082 2	↓	↑
9	负	吡啶乙酸	C ₁₀ H ₉ NO ₂	4.891 53	176.072 2	↓	↑
10	负	氧化型谷胱甘肽	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	1.425 36	611.146 3	↑	↓
11	负	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₇ P ₃ ⁺	1.390 54	789.083 1	↑	↓
12	负	同型半胱氨酸	C ₄ H ₉ NO ₂ S	1.023 53	269.064 3	↑	↓
13	负	<i>L</i> -磷酸精氨酸	C ₆ H ₁₅ N ₄ O ₅ P	5.239 99	299.075 2	↑	↓
14	负	烟酸单核苷酸	C ₁₁ H ₁₆ NO ₉ P	1.405 56	336.050 9	↓	↑
15	负	谷胱甘肽	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	3.918 56	306.069 1	↓	↑

↓: 下调; ↑: 上调。
↓: downward; ↑: increase.

4 讨论

在血管稳态条件下, 内皮细胞通过分泌一氧化氮、组织型纤溶酶原激活物、抗凝血酶Ⅲ、管紧张素 2 和前列环素等多种血管活性介质来调节血管舒张、血小板活化、凝血和白细胞黏附、浸润^[9]。然而, 一旦存在脂质沉积、血流紊乱等干扰因素, 内皮细胞就会增加黏附分子的分泌, 包括 E-选择素、ICAM-1 和 VCAM-1, 从而诱导内皮炎症, 促使单核细胞黏附到内皮细胞^[10]。内皮稳态紊乱会增加血管通透性, 导致血管屏障功能减弱, 使血液中的脂质和单核细胞更容易沉积在血管内膜中, 会促进 AS 斑块的积聚、破裂和糜烂。不稳定的斑块容易破裂并促进凝块形成, 导致危及生命的血栓栓塞并发症^[11]。泡沫细胞是 AS 斑块的主要细胞成分, 它通过试图去除脂蛋白和胆固醇过剩, 也参与斑块的形成和破裂^[12]。脂蛋白的内化作用是 AS 发病机制的标志性事件之一。在促 AS 的病理条件下, 沉积在内皮细胞中的脂蛋白很容易被氧化修饰为 ox-LDL。ox-LDL 不限量的摄取、胆固醇酯化过多或胆固醇释放受损会导致 CE 的积累, CE 将以细胞质脂滴的形式储存, 进而触发内皮部位脂肪条纹和泡沫细胞的形成^[13-14]。巨噬细胞源泡沫细胞是目前研究最广泛且最深入的泡沫细胞, 但事实上, 血管壁的巨噬细胞、

平滑肌细胞、树突状细胞、干细胞和内皮细胞均可通过清道夫受体家族将脂蛋白内化为泡沫细胞, 加速斑块形成^[15-16]。血管壁的内皮细胞是最早受到血脂代谢紊乱影响的细胞, 负责 ox-LDL 的摄取和转吞作用^[17]。异常增加的血脂刺激内皮细胞对 ox-LDL 的渗透性增强, 导致内皮细胞积累越来越多的脂滴, 进而转化为泡沫细胞, 这一过程被认为是 AS 发病初期的关键步骤^[18-19]。此外, ox-LDL 被吞噬后还会触发一系列炎症信号通路, 促进大量炎症因子和内皮黏附因子的分泌^[20]。因此, 抑制内皮细胞对 ox-LDL 的摄取和转吞作用, 改善内皮损伤, 可能对于预防 AS 的发生进展尤为重要, 并为预防 AS 的抗泡沫细胞疗法定义了新的靶点。本研究通过 50 μg/mL ox-LDL 诱导 bEnd.3 细胞构建内皮细胞损伤模型, 通过油红 O 染色、细胞内脂质、炎症因子和黏附分子水平测定来探究黄芪赤风汤对内皮细胞损伤的作用, 并结合代谢组学分析, 初步探讨了黄芪赤风汤抑制 bEnd.3 细胞泡沫化作用的代谢途径, 为后续机制研究奠定靶向基础。

油红 O 染色结果表明, 与对照组相比, ox-LDL 诱导的模型组 bEnd.3 细胞中可观察到大量红色脂滴, 并呈现泡沫细胞形态, 提示可成功建立内皮细胞损伤模型; 黄芪赤风汤干预后, bEnd.3 细胞中红

色脂滴生成明显减少,并呈现出黄芪赤风汤的剂量依赖性减少。与对照组相比,模型组 bEnd.3 细胞 TC、FC、CE 水平和 CE/TC 显著上调,并且 CE/TC>50%,成功验证了油红 O 染色结果所得出的成功建立内皮细胞损伤模型的结论;黄芪赤风汤干预后, bEnd.3 细胞 TC、FC、CE 水平和 CE/TC 呈现不同程度的下调。此外,黄芪赤风汤干预后可有效逆转 ox-LDL 诱导的 bEnd.3 细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、ICAM-1 和 VCAM-1 水平的显著上调。结果表明,黄芪赤风汤可有效抑制内皮细胞对 ox-LDL 的摄取和转吞作用,并抑制炎症因子和内皮黏附因子的分泌。

非靶向代谢组学结果显示, bEnd.3 细胞差异代谢物可能通过谷胱甘肽代谢、苯丙氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢途径参与黄芪赤风汤对 ox-LDL 诱导的 bEnd.3 细胞损伤的保护机制。谷胱甘肽是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽,主要以还原型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽的形式出现。谷胱甘肽及其氧化形式的相对水平可以维持内皮细胞氧化还原稳态和抗氧化防御^[21]。本研究结果显示, ox-LDL 导致 bEnd.3 内皮细胞内还原型谷胱甘肽水平降低,氧化型谷胱甘肽水平显著升高,进一步引起还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽比值显著下降,说明 ox-LDL 诱导可导致 bEnd.3 细胞处于高度氧化应激状态。黄芪赤风汤能有效回调两者水平,升高还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽比值,提示黄芪赤风汤在 bEnd.3 细胞的抗氧化防御系统中起重要作用。有研究证实,苯丙氨酸代谢紊乱可导致其下游代谢物苯丙酮酸的异常累积,参与 AS 的发展,可作为心血管疾病早期诊断的有效标志物^[22-23]。乙酰乙酸进入细胞线粒体后,首先被琥珀酰 CoA 转移酶活化,催化生成乙酰 CoA,乙酰 CoA 在硫解酶分解下生成乙酰 CoA,随后进入三羧酸循环。一项队列研究结果表明,冠心病患者血浆中乙酰乙酸含量显著增加,而在脑卒中患者和心脑血管共患人群中显著下降^[24]。另有研究表明,血清代谢物中乙酰乙酸的含量与 AS 的发展呈负相关^[25]。本研究结果显示,与对照组相比,模型组 bEnd.3 细胞乙酰乙酸含量降低和苯丙酮酸含量升高,这可能是由于 ox-LDL 引起乙酰乙酸含量降低,抑制三羧酸循环,导致体内苯丙酮酸大量积累。黄芪赤风汤可以提高乙酰乙酸含量,降低苯丙酮酸含量。

烟酰胺可以转化为烟酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷

酸(NAD⁺)和 NADP⁺等生物活性物质,它参与调节细胞能力代谢的多种氧化还原和非氧化还原反应。烟酸单核苷酸(NaMN)是 NAD⁺生物合成过程的中间底物之一,主要通过转化为 NAD⁺发挥作用。研究发现机体中 NAD⁺水平的下降与糖尿病、心血管疾病和认知障碍等年龄相关的慢性疾病显著性正相关^[26]。本研究结果发现,经 ox-LDL 诱导后,细胞内的 NaMN 明显减少,细胞氧化还原状态失衡,促进脂质蓄积。此外, NAD⁺通过 NAD 激酶(NADK)、NADP⁺依赖性脱氢酶等催化成 NADP⁺和 NADPH,共同参与包括线粒体中的电子传递等多种氧化还原反应的辅因子^[27]。NADP⁺与 NADPH 的比值对于维持细胞内还原性环境有重要意义。结果显示,在 ox-LDL 干预的条件下, NADP⁺含量升高,推测可能是内皮细胞泡沫化的过程中 NADPH/NADP⁺值降低,细胞内氧化还原系统失衡,导致细胞代谢障碍。黄芪赤风汤能有效提高 NaMN 含量,降低 NADP⁺的水平,使细胞的物质代谢和能量转化正常进行。

此外,本研究还发现 ox-LDL 诱导的 bEnd.3 细胞中 Hcy 含量增加。Hcy 是甲硫氨酸和半胱氨酸在体内的中间代谢物。但甲硫氨酸负荷或代谢酶功能缺陷均可导致 Hcy 水平升高。高同型半胱氨酸血症(HHcy)是 AS、高血压、血管钙化、动脉瘤等多种血管疾病的独立危险因素^[28-29]。伴有 HHcy 的 AS 性心血管疾病患者比无 HHcy 的患者有更不稳定的斑块,更复杂的冠状 AS 病变,预后更差^[30]。HHcy 通过抑制 LXR α -ABCA1 和 ABCG1 通路介导的胆固醇外排来加速脂质积累和 AS 病变^[31]。除了 Hcy 与 Cys 相互作用形成二硫键外, Hcy 还直接抑制抗氧化剂的活性,从而破坏 SOD,激活 NADPH 氧化酶(NOXs),进而产生超氧阴离子,导致 ROS 的积累,并导致内皮细胞功能障碍^[32-33]。ox-LDL 作用于内皮细胞后导致的 ROS 积累可能也是 Hcy 含量蓄积的原因。而黄芪赤风汤能有效降低 Hcy 的含量,维持细胞代谢功能。

综上所述,本研究表明黄芪赤风汤可抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞源泡沫细胞的产生与发展,调节细胞内胆固醇代谢紊乱,抑制炎症因子和黏附因子的表达,从而改善内皮细胞损伤。此外,结合代谢组学分析,初步探讨了黄芪赤风汤保护内皮细胞损伤的特性与其对细胞内多种氨基酸代谢的调控作用密切相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, *et al.* Pathophysiology of atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3346.
- [2] Björkegren J L M, Lusis A J. Atherosclerosis: Recent developments [J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1630-1645.
- [3] Botts S R, Fish J E, Howe K L. Dysfunctional vascular endothelium as a driver of atherosclerosis: Emerging insights into pathogenesis and treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 787541.
- [4] Sun H J, Wu Z Y, Nie X W, *et al.* Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The link between inflammation and hydrogen sulfide [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1568.
- [5] Fu J Q, Liang Y Q, Shi Y H, *et al.* Huangqi ChiFeng Decoction maintains gut microbiota and bile acid homeostasis through FXR signaling to improve atherosclerosis [J]. *Heliyon*, 2023, 9(11): e21935.
- [6] Fu J Q, Liang Y Q, Yu D H, *et al.* Radix Saposhnikovia enhancing Huangqi Chifeng Decoction improves lipid metabolism in AS mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 320: 117479.
- [7] 袁晋, 王秋月, 刘树民. 黄芪赤风汤指纹图谱建立及主要成分含量测定 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(1): 69-73.
- [8] Zhang G T, He C, Wu Q Q, *et al.* Impaired autophagy induced by oxLDL/ β 2GPI/anti- β 2GPI complex through PI3K/Akt/mTOR and eNOS signaling pathways contributes to endothelial cell dysfunction [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6662225.
- [9] Michiels C. Endothelial cell functions [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 196(3): 430-443.
- [10] Mussbacher M, Schossleitner K, Kral-Pointner J B, *et al.* More than just a monolayer: The multifaceted role of endothelial cells in the pathophysiology of atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2022, 24(6): 483-492.
- [11] Tamargo I A, Baek K I, Kim Y, *et al.* Flow-induced reprogramming of endothelial cells in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(11): 738-753.
- [12] Maguire E M, Pearce S W A, Xiao Q Z. Foam cell formation: A new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease [J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, 112: 54-71.
- [13] Jones N L, Allen N S, Willingham M C, *et al.* Modified LDLs induce and bind to membrane ruffles on macrophages [J]. *Anat Rec*, 1999, 255(1): 44-56.
- [14] Kattoor A J, Kanuri S H, Mehta J L. Role of ox-LDL and LOX-1 in atherogenesis [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(9): 1693-1700.
- [15] Yu X H, Fu Y C, Zhang D W, *et al.* Foam cells in atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 424: 245-252.
- [16] Kloc M, Kubiak J Z, Ghobrial R M. Macrophage-, dendritic-, smooth muscle-, endothelium-, and stem cells-derived foam cells in atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14154.
- [17] Frank P G, Pavlides S, Lisanti M P. Caveolae and transcytosis in endothelial cells: Role in atherosclerosis [J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 335(1): 41-47.
- [18] Puddu A, Montecucco F, Maggi D. Caveolin-1 and atherosclerosis: Regulation of LDLs fate in endothelial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 8869.
- [19] Zhang X B, Ramírez C M, Aryal B, *et al.* Cav-1 (caveolin-1) deficiency increases autophagy in the endothelium and attenuates vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(6): 1510-1522.
- [20] Liu C, Wu J, Jia H Y, *et al.* Oncostatin M promotes the ox-LDL-induced activation of NLRP3 inflammasomes via the NF- κ B pathway in THP-1 macrophages and promotes the progression of atherosclerosis [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(8): 456.
- [21] Espinosa-Díez C, Miguel V, Vallejo S, *et al.* Role of glutathione biosynthesis in endothelial dysfunction and fibrosis [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 88-99.
- [22] Tzoulaki I, Castagné R, Boulangé C L, *et al.* Serum metabolic signatures of coronary and carotid atherosclerosis and subsequent cardiovascular disease [J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(34): 2883-2896.
- [23] Würtz P, Havulinna A S, Soininen P, *et al.* Metabolite profiling and cardiovascular event risk: A prospective study of 3 population-based cohorts [J]. *Circulation*, 2015, 131(9): 774-785.
- [24] 张梦吉, 黄琳, 李峥, 等. 基于人群大队列探索心脑血管疾病相关血浆代谢组学特征 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2022, 42(3): 259-266.
- [25] Liu C Y, Li B Y, Liang Y H, *et al.* The association between circulating 25-hydroxyvitamin D and carotid intima-media thickness is mediated by gut microbiota and fecal and serum metabolites in adults [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2023, 67(17): e2300017.
- [26] Soma M, Lalam S K. The role of nicotinamide mononucleotide (NMN) in anti-aging, longevity, and its potential for treating chronic conditions [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(10): 9737-9748.
- [27] Chini C C S, Zeidler J D, Kashyap S, *et al.* Evolving

- concepts in NAD⁺ metabolism [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(6): 1076-1087.
- [28] Sreckovic B, Sreckovic V D, Soldatovic I, *et al*. Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2017, 11(3): 179-182.
- [29] Chen A, Wu W B, Gong J, *et al*. Association of homocysteine with carotid atherosclerosis in hypertension [J]. *J Hum Hypertens*, 2023, 37(3): 227-234.
- [30] Xu H P, Liu C M, Wang Q H. Plaque image characteristics, hyperhomocysteinemia, and gene polymorphism of homocysteine metabolism-related enzyme (MTHFR C677T) in acute coronary syndrome [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 66(2): 403-407.
- [31] Jin P, Bian Y T, Wang K, *et al*. Homocysteine accelerates atherosclerosis via inhibiting LXR α -mediated ABCA1/ABCG1-dependent cholesterol efflux from macrophages [J]. *Life Sci*, 2018, 214: 41-50.
- [32] Lee S J, Kim K M, Namkoong S, *et al*. Nitric oxide inhibition of homocysteine-induced human endothelial cell apoptosis by down-regulation of p53-dependent Noxa expression through the formation of S-nitrosohomocysteine [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(7): 5781-5788.
- [33] Ke X D, Foucault-Bertaud A, Genovesio C, *et al*. Homocysteine modulates the proteolytic potential of human arterial smooth muscle cells through a reactive oxygen species dependant mechanism [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 335(1/2): 203-210.

[责任编辑 金玉洁]