

基于TLR4/NF- κ B途径探究左西孟旦调控巨噬细胞极化减轻动脉粥样硬化的作用

冯伟¹, 魏海燕¹, 师艳艳^{2*}

1. 喀什地区第一人民医院 冠心病二科, 新疆 喀什 844000

2. 喀什地区第一人民医院 药学部, 新疆 喀什 844000

摘要: 目的 通过探究左西孟旦对巨噬细胞极化的影响, 观察其抗动脉粥样硬化(AS)的作用机制。方法 将45只健康清洁级ApoE^{-/-}小鼠按照数字表法随机分为模型组、左西孟旦(2 mg/kg)组、左西孟旦(2 mg/kg)+脂多糖[LPS, 2 mg/kg, Toll样受体4(TLR4)激动剂]组, 每组15只, 以高脂饲料喂养; 取15只健康清洁级C57BL/6小鼠作为对照组, 以普通饲料喂养。喂养8周后, ip给药, 模型组和对照组ip等体积生理盐水, 每天1次, 持续4周。全自动生化仪检测血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平; HE染色与Masson染色观察主动脉组织形态变化与纤维化水平, 油红O染色检测主动脉及主动脉根部动脉斑块形成情况; 免疫组织化学染色检测主动脉M1型标记蛋白诱导型一氧化氮合酶(iNOS)与M2型标记蛋白分化群206(CD206)的表达; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测主动脉M1型巨噬细胞相关基因肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-6)与M2型巨噬细胞相关基因转化生长因子- β (TGF- β)、精氨酸-1(Arg-1)的表达; Western blotting检测主动脉TLR4与磷酸化的核转录因子 κ B p65(p-NF- κ B p65)蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组小鼠血清TG、TC和LDL-C水平显著升高, HDL-C水平显著降低($P<0.05$); 主动脉内膜增厚, 斑块面积显著增加, 伴随大量纤维化($P<0.05$); iNOS阳性细胞比例显著升高, CD206阳性细胞比例显著下降($P<0.05$); TNF- α 、IL-6 mRNA水平显著上调, TGF- β 、Arg-1 mRNA水平显著下调($P<0.05$); 同时TLR4、p-NF- κ B p65蛋白表达显著上调($P<0.05$)。与模型组比较, 左西孟旦组小鼠血清TG、TC和LDL-C水平显著降低, HDL-C水平显著升高($P<0.05$); 主动脉病理现象减轻, 斑块面积显著减小, 纤维化程度显著变小($P<0.05$); iNOS阳性细胞比例显著下降而CD206阳性细胞比例显著升高($P<0.05$); TNF- α 、IL-6 mRNA水平显著下调, TGF- β 、Arg-1 mRNA水平显著上调($P<0.05$); TLR4、p-NF- κ B p65蛋白表达显著下调($P<0.05$)。与LPS联用基本抵消左西孟旦对上述病理现象的改善作用。结论 左西孟旦能够抑制TLR4的表达, 阻止下游NF- κ B信号途径的激活, 调控巨噬细胞极化状态, 从而发挥抗AS的作用。

关键词: 动脉粥样硬化; 巨噬细胞极化; 左西孟旦; TLR4/NF- κ B信号通路

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)12-2578-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.12.008

Exploring effect of levosimendan in regulating macrophage polarization and reducing atherosclerosis based on TLR4/NF- κ B pathway

FENG Wei¹, WEI Haiyan¹, SHI Yanyan²

1. Department of Coronary Heart Disease, The First People's Hospital of Kashgar, Kashgar 844000, China

2. Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Kashgar, Kashgar 844000, China

Abstract: Objective By exploring the effect of levosimendan on the polarization of macrophages, observe its anti-atherosclerosis (AS) mechanism. **Methods** Forty-five healthy and clean ApoE^{-/-} mice were randomly divided into model group, levosimendan (2 mg/kg) group, levosimendan (2 mg/kg)+LPS [2 mg/kg, Toll-like receptor 4 (TLR4)] group with 15 mice in each group according to the number table method, and fed with high-fat diet. Fifteen healthy and clean C57BL/6 mice were taken as control group and fed with ordinary diet. After eight weeks of feeding, the model group and the control group were ip given equal volume of normal saline once

收稿日期: 2021-05-18

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2019D01C005)

第一作者: 冯伟(1985—),男,主治医师,本科。Tel:15099012662 E-mail:frenchsunshine@163.com

*通信作者: 师艳艳,女,主管药师,本科。E-mail:514472168@qq.com

a day for four weeks. Automatic biochemical analyzer was used to detect serum total cholesterol (TC), hyperlipidemia (TG), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels. HE staining and Masson staining were used to observe the changes of aortic tissue morphology and fibrosis level. Oil red O staining was used to detect the formation of plaque in the whole aorta and the aortic root. immunohistochemical staining was used to detect the expression of aortic M1 marker protein inducible nitric oxide synthase (iNOS) and M2 marker protein differentiation group 206 (CD206). Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL-6) in M1 macrophage-related gene and transforming growth factor- β (TGF- β) and arginine-1 (Arg-1) in M2 macrophage-related gene. Western blotting was used to detect TLR4 and nuclear transcription factor κ B p65 (p-NF- κ B p65) protein expression. **Results** Compared with control group, the serum TG, TC and LDL-C levels of model group were significantly increased, and HDL-C levels was significantly reduced ($P < 0.05$). The aortic intima was thickened, and the plaque area was significantly increased ($P < 0.05$). The proportion of iNOS positive cells was significantly increased, and the proportion of CD206 positive cells was significantly decreased ($P < 0.05$). The mRNA levels of TNF- α and IL-6 were significantly increased, and the mRNA levels of TGF- β and Arg-1 were significantly down-regulated ($P < 0.05$). At the same time, the expression protein of TLR4 and p-NF- κ B p65 were significantly up-regulated ($P < 0.05$). Compared with model group, the serum TG, TC and LDL-C levels of the levosimendan group mice were significantly reduced, and the HDL-C level was significantly increased ($P < 0.05$). The pathological phenomenon of the aorta was reduced, and the plaque area was significantly reduced, the degree of fibrosis became smaller ($P < 0.05$). The proportion of iNOS positive cells was significantly decreased while the proportion of CD206 positive cells was significantly increased ($P < 0.05$). The mRNA levels of TNF- α and IL-6 were significantly down-regulated, the mRNA levels of TGF- β and Arg-1 were significantly increased ($P < 0.05$). The expression protein of TLR4 and p-NF- κ B p65 were also suppressed ($P < 0.05$). Compared with levosimendan group, the mice that were treated with levosimendan after the TLR4 agonist effect showed no significant improvement in the above-mentioned pathological phenomena. **Conclusion** Levosimendan can inhibit the expression of TLR4, prevent the activation of the downstream NF- κ B signaling pathway, and regulate the polarization state of macrophages, thereby exerting an anti-atherosclerotic effect in mice.

Key words: atherosclerosis; macrophage polarization; levosimendan; TLR4/NF- κ B signaling pathway

心血管疾病是一类高发病率和高死亡率的疾病,据统计,每年约有2 000万人死于心血管疾病^[1]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)作为慢性血管炎性疾病之一,是脑卒中和心律不齐等心脑血管疾病的主要原因。AS可以被免疫细胞、巨噬细胞等识别^[2],在病理生理条件下,脂质代谢紊乱会引起胆固醇在动脉壁中的积聚,从而促进AS斑块的形成,而巨噬细胞在脂质代谢中起关键作用,其中单核细胞衍生的巨噬细胞通过吞噬过量的脂蛋白,例如氧化型低密度脂蛋白,而造成胞内脂质的大量堆积,并诱发巨噬细胞炎症反应^[3-4]。

左西孟旦是一种非儿茶酚胺钙增敏剂,ATP敏感的钾通道开放剂,可稳定肌钙蛋白C,改善心肌收缩力,而不增加心肌耗氧量与 Ca^{2+} 浓度^[5],此外,在心脏手术期间,左西孟旦还具有保护心脏和舒张血管的特性,促进血液动力学稳定性^[6]。目前,左西孟旦已在60多个国家或地区用于预防和治疗低心输出量综合征。但其抗AS的作用及机制尚不完全清楚。目前,研究中构建AS模型使用最广泛的是载脂蛋白E(ApoE)敲除的小鼠,ApoE是参与脂蛋白识别和清除的脂蛋白受体的配体,其介导肝脏受体

对乳糜微粒、低密度脂蛋白及其残留物的摄取。因此,ApoE^{-/-}小鼠显示出脂蛋白清除延迟的特性,从而能够引发高脂蛋白血症、异常脂蛋白血症、高胆固醇血症以及AS病变。本研究通过诱导建立ApoE^{-/-}小鼠AS模型,观察左西孟旦对小鼠AS的影响,并探究所涉及的分子机制。

1 材料

1.1 实验动物

8周龄、健康清洁级的ApoE^{-/-}小鼠和野生型C57BL/6小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0009。均饲养在温度为(23±2)℃、12 h/12 h的光照/黑暗周期的无菌饲养箱中,期间自由饮水与摄食。本研究获医院动物伦理委员会批准(伦理批号20190822035)。

1.2 药物与主要试剂

左西孟旦(山东齐鲁制药有限公司,国药准字H20100042,规格5 mL,批号20190801);脂多糖(LPS,美国Sigma公司,规格1 mg,质量分数≥99%,批号STBB1011);血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)及高密度

脂蛋白胆固醇(HDL-C)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号1509018、1850021、1841523、1967854);苏木精-伊红(HE)染色试剂与免疫组织化学染色试剂(北京索莱宝生物科技有限公司,批号G1120、SW1030);油红O染色液、ECL超敏发光液以及二辛可宁酸法(BCA)蛋白检测试剂盒(上海碧云天生物研究所,批号C0158M、P0018S、P0012);Masson染色试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号D026-1-2);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司,批号15596-018);反转录与实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂盒(日本Takara公司,批号D2639A、DRR420A);抗体诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、分化群206(CD206)、Toll样受体4(TLR4)以及磷酸化核转录因子 κ B p65(p-NF- κ B p65)(英国Abcam公司,批号ab178945、ab64693、ab22048、ab239882);抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(美国Cell Signaling Technology公司,批号14C10、98164S);其他试剂均为国产市售分析纯。

1.3 主要仪器

BK-280全自动生化分析仪和XSP-3CA立式显微镜(山东博科生物产业有限公司);EG1160型石蜡包埋机和CM1850型冰冻切片机(德国Leica公司);CX41型光学显微镜(日本Olympus公司);Veriti型聚合酶链反应(PCR)仪(美国ABI公司);Mini-Protean凝胶电泳装置和ChemiDoc XRS化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司);Tanon5200 Multi紫外凝胶成像系统(上海天能科技有限公司电泳仪)。

2 方法

2.1 AS动物模型的制备与分组给药

将45只健康清洁级ApoE^{-/-}小鼠按照数字表法随机分为模型组、左西孟旦(2 mg/kg^[7])组、左西孟旦(2 mg/kg)+LPS(2 mg/kg,TLR4激动剂^[8])组,每组15只,以高脂饲料喂养;取15只健康清洁级C57BL/6小鼠作为对照组,以普通饲料喂养。连续饲养8周后,各组ip给药,模型组和对照组的小鼠均ip等体积生理盐水,每天1次,连续4周。注射结束后,麻醉各组小鼠,心脏穿刺收集血液,并分离腹主动脉至主动脉,将其中一部分组织固定于4%多聚甲醛溶液中,剩余部分在液氮迅速冷冻后置于-80℃超低温冰箱中保存。

2.2 血清TC、TG、LDL-C、HDL-C水平测定

给药结束后,小鼠禁食12 h后通过ip 50 mg/kg

戊巴比妥钠将其麻醉,心脏穿刺收集各组小鼠血液,室温静置,并以4 000 r/min离心10 min,获取血清,利用全自动生化分析仪检测血清TC、TG、LDL-C、HDL-C水平,具体操作步骤严格按照市售试剂盒说明书执行。

2.3 HE染色

取出在4%多聚甲醛中固定好的各组小鼠主动脉组织,进行修剪包埋,利用梯度乙醇脱水,二甲苯透明,冰冻切片机上制备厚度为5 μ m的石蜡组织切片。常规脱蜡与复水,通过HE染色观察主动脉组织的病理形态学变化,苏木精染色5 min,流水下冲洗干净,伊红染色液染色3 min,经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片,于光学显微镜下观察并采集图像。

2.4 油红O染色

通过4%多聚甲醛溶液固定好主动脉组织后,使用PBS缓冲液冲洗组织,在体式显微镜下将整个主动脉血管内壁切开,固定,60%异丙醇浸泡后,置于油红O工作溶液中,室温下避光染色30 min,弃去染液,60%异丙醇漂洗主动脉,直至斑块呈现红色,背景近乎透明。将主动脉固定于黑色蜡皿上,采用立式显微镜观察染色情况并采集图像,通过Image J软件测量主动脉斑块(红色)面积占总主动脉面积的比例。

将主动脉根部置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h,脱水,在冰冻切片包埋剂(OCT)中进行常规包埋,冰冻切片机上制备厚度为7 μ m的连续冷冻切片,PBS缓冲液浸泡洗涤5 min后,用油红O工作溶液染色30 min,60%异丙醇漂洗切片,蒸馏水冲洗,光学显微镜下观察脂质沉积并拍摄图像,通过Image J软件测量主动脉根部斑块(红色)面积占总主动脉根部面积的比例。

2.5 Masson染色

取制备好的主动脉根部组织石蜡切片,进行常规脱蜡分化,用weigert铁苏木素液染处理10 min,滴加1%盐酸乙醇分化数秒,流水冲洗,Masson染液染色3 min,丽春红酸性品红液染色5 min,再使用1%磷钼酸水溶液分化,加入苯胺蓝染液染色5 min,1%冰醋酸水溶液浸泡洗涤后,使用梯度乙醇进行脱水处理,二甲苯透明,中性树胶封片。于光学显微镜下观察主动脉斑块纤维化程度并拍摄图像,通过Image J软件测量主动脉根部斑块纤维化占总主动脉根部面积的比例。

2.6 免疫组织化学染色

取制备好的主动脉根部组织石蜡切片,将切片分别用梯度乙醇和二甲苯进行脱蜡水化透明处理,将切片置于柠檬酸盐缓冲液中煮沸 15 min(温度为 93~95 °C),进行抗原修复。加入 3% H₂O₂ 去除组织内源性过氧化物酶,室温下采用 5% 山羊血清进行封闭处理。封闭 1 h 后,取出切片,分别与兔抗 iNOS(1:500)、兔抗 CD206(1:100)一抗抗体稀释液共同置于 4 °C 下孵育过夜。次日,弃去一抗工作液,PBS 缓冲液将切片冲洗干净后,与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(1:1 000)二抗抗体稀释液在室温下共同孵育 1 h,PBS 缓冲液冲洗干净,使用 DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片。于光学显微镜下观察组织中的阳性表达情况,胞质染成黄色至棕色即为阳性细胞,随机选择 5 个视野进行计数,计算蛋白阳性表达率为阳性的细胞数占总细胞数的百分率。

2.7 qRT-PCR 检测主动脉肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-6)、转化生长因子- β (TGF- β)、精氨酸-1(Arg-1)基因表达水平

在无菌环境下将各组小鼠主动脉组织剪碎,加入液氮快速研磨匀浆,采用 TRIzol 试剂提取组织总 RNA,Nanodrop 检测总 RNA 的浓度与纯度,均符合要求后,按照反转录试剂盒说明书操作合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 实验以检测各组样本中 TNF- α 、IL-6、TGF- β 、Arg-1 基因的表达水平,操作步骤严格按照 SYBR Green qPCR Mixes 试剂盒说明书执行,以 GAPDH 作为内参基因。反应程序设置为:95 °C、3 min,循环 1 次;95 °C、10 s,60 °C、30 s,72 °C、10 s,循环 35 次。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析计算各组小鼠主动脉组织中以上基因 mRNA 相对表达量,具体引物序列见表 1。

2.8 Western blotting 检测主动脉 TLR4、p-NF- κ B p65 蛋白表达水平

在无菌环境下将各组小鼠主动脉组织剪碎,加入 RIPA 裂解液后置于冰上裂解 30 min,离心并收集上清液,通过 BCA 蛋白检测试剂盒检测各样品蛋白浓度。通过 10% SDS-PAGE 电泳分离各组蛋白样品,并电转移到 PVDF 膜上。TBST 缓冲液洗膜后,置于 5% 脱脂牛奶中,室温下封闭 1 h,加入稀释后的兔抗 TLR4(1:1 000)、p-NF- κ B p65(1:1 000)一抗,放置在 4 °C 下孵育过夜。次日,弃去一抗工作液,TBST 缓冲液将膜清洗干净后,加入稀释后的过氧化物酶标记的山羊抗兔(1:5 000)二抗,室温下继续孵育

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物	序列(5'-3')
TNF- α	上游	TCTTCTCATTCCTGCTTGTTGG
	下游	GGTCTGGGCCATAGAACTGA
IL-6	上游	GGAGCCCACCAAGAACGATAG
	下游	GTGAAGTAGGGAAGGCCGTG
TGF- β	上游	ACCTCGGCTGGAAGTGGATC
	下游	CCTTGCTGTACTGCGTGTCC
Arg-1	上游	AGACAGCAGAGGAGGTGAAGAGTAC
	下游	GGTAGTCAGTCCCTGGCTTATGGT
β -actin	上游	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC
	下游	ATGGAGCCACCGATCCACA

2 h。TBST 缓冲液再次洗膜,利用 ECL 超敏发光液曝光,Image J 软件分析各蛋白条带灰度值,并以 GAPDH 为内参,计算各蛋白的表达水平。

2.9 统计学分析

实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析,利用 GraphPad Prism 8.3 软件绘制统计图,计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。

3 结果

3.1 各组小鼠 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 水平比较

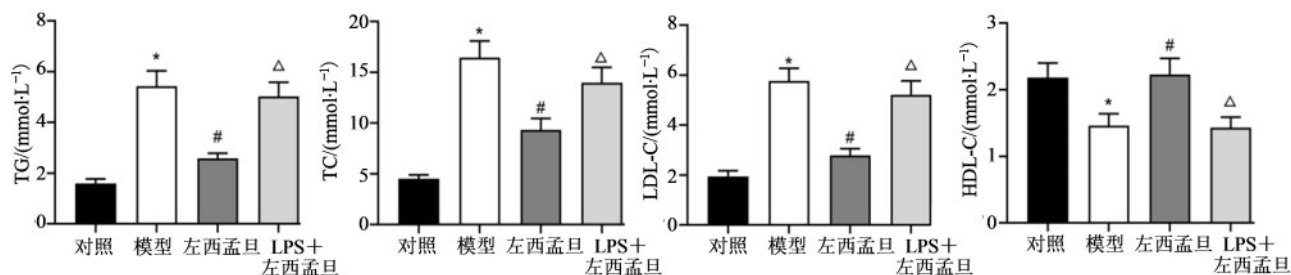
与对照组比较,模型组小鼠血清中 TG、TC 和 LDL-C 水平均显著升高,HDL-C 水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,左西孟旦组小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 水平均显著降低,HDL-C 水平显著升高($P < 0.05$);与左西孟旦组比较,左西孟旦+LPS 组 TG、TC 和 LDL-C 水平显著升高,HDL-C 水平显著降低($P < 0.05$),见图 1。

3.2 各组小鼠主动脉组织形态学变化

通过 HE 染色检测各组小鼠主动脉组织形态学变化,可观察到对照组小鼠的主动脉内膜结构完好无损,未出现增生或管腔狭窄的现象;模型组小鼠主动脉内膜明显增厚,有斑块形成,且斑块面积较大;左西孟旦组小鼠主动脉内膜增生程度较模型组有所改善,斑块面积也明显减少,管腔狭窄程度降低;而左西孟旦+LPS 组小鼠主动脉内膜病理学改善并不明显,主动脉病理现象大体与模型组一致。见图 2。

3.3 各组小鼠主动脉斑块纤维化面积大小比较

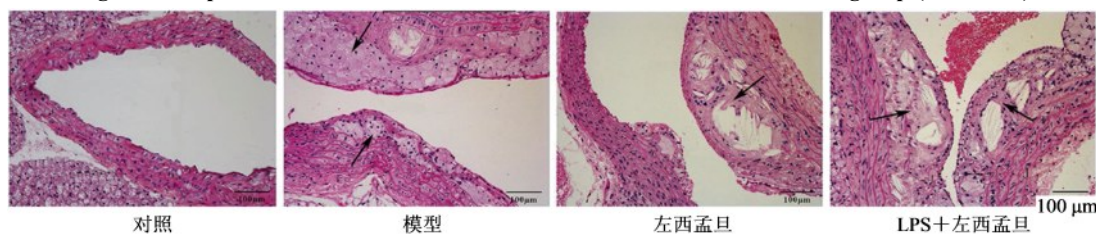
如图 3 所示,Masson 染色检测各组小鼠主动脉斑块纤维化情况,可见对照组动脉内膜结构完整,出现极少量纤维化;模型组主动脉内膜明显增厚,



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与左西孟旦组比较: Δ $P < 0.05$
 * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; Δ $P < 0.05$ vs levosimendan group

图1 各组小鼠TG、TC、LDL-C和HDL-C水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

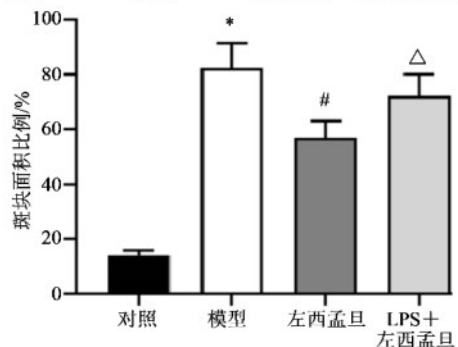
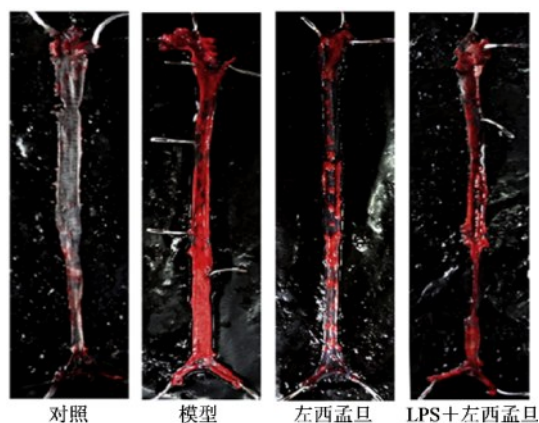
Fig. 1 Comparison of TG, TC, LDL-C and HDL-C levels of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)



箭头所指为主动脉内膜病理变化区域
 Arrow points to area of pathological changes in intima of aorta

图2 HE染色检测各组小鼠主动脉组织形态学变化

Fig. 2 Morphological changes of mouse aorta in each group detected by HE staining



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与左西孟旦组比较: Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; Δ $P < 0.05$ vs levosimendan group

图3 Masson染色检测各组小鼠主动脉斑块纤维化面积($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

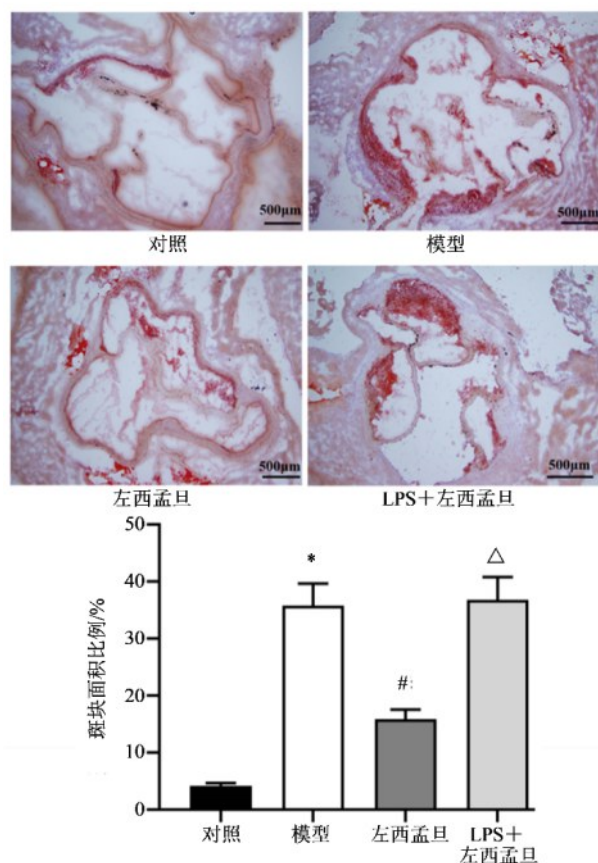
Fig. 3 Area of aortic plaque fibrosis in each group of mice detected by masson staining ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

有纤维帽形成斑块,其下可见坏死崩解物质与泡沫细胞、炎细胞,斑块面积比例较对照组显著增加($P < 0.05$);左西孟旦组主动脉斑块纤维化较模型组显著减少($P < 0.05$),其下泡沫细胞及炎细胞减少;相较于左西孟旦组,左西孟旦+LPS组主动脉斑块纤维化程度显著增加($P < 0.05$),病理现象与模型组相似。

3.4 各组小鼠全主动脉及根部粥样硬化斑块形成面积变化

油红O染色结果显示,对照组小鼠的主动脉脂质积聚少,斑块面积比例小;模型组主动脉脂质积聚明显,红色覆盖范围较大,斑块面积比例较对照组显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,左西孟旦组主动脉脂质蓄积明显减少,斑块面积比例也显著减小($P < 0.05$);而左西孟旦+LPS组主动脉脂质蓄积较左西孟旦组明显增加,斑块面积比例也显著增加($P < 0.05$)。见图4。

通过对主动脉根部进行油红O染色检测脂质沉积来量化AS斑块形成情况,可见对照组主动脉内膜无增厚,染色斑块少;模型组主动脉内膜增厚,且有大量红色染色斑块,斑块区域面积较模型组显著增加($P < 0.05$);左西孟旦组主动脉也有呈红色染色斑块,但较模型组明显减少,斑块区域面积也显著减小($P < 0.05$);与左西孟旦组比较,左西孟旦+LPS组红色染色斑块区域面积又显著增加($P < 0.05$),见图5。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与左西孟旦组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs levosimendan group

图4 油红O染色检测小鼠全主动脉粥样硬化斑块形成($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

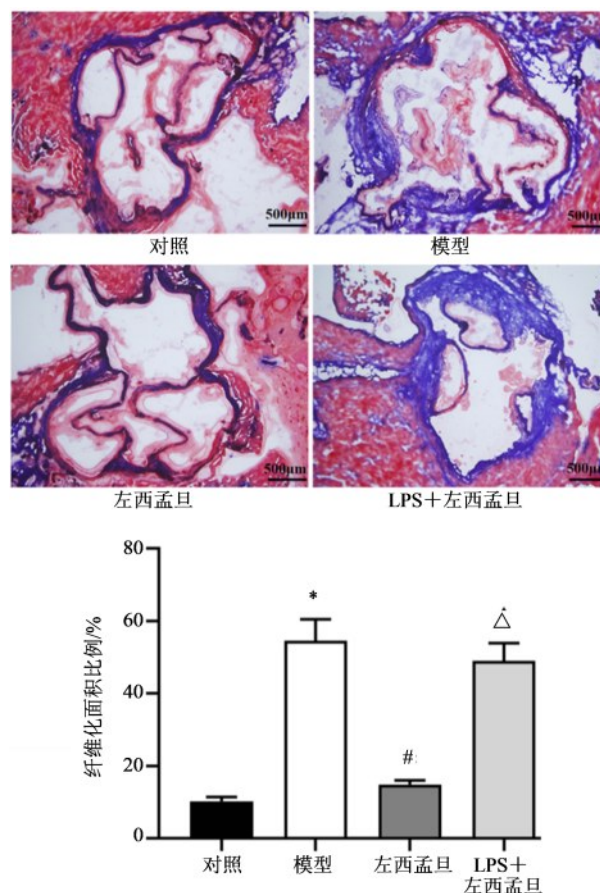
Fig. 4 Formation of atherosclerotic plaque in whole aorta of mice in each group detected by oil red O staining ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.5 各组小鼠主动脉iNOS和CD206表达比较

免疫组织化学染色检测各组小鼠主动脉组织中巨噬细胞标记物表达,与对照组比较,模型组主动脉组织中M1型标记物iNOS阳性细胞比例显著升高,M2型标记物CD206阳性细胞比例显著下降($P < 0.05$);与模型组比较,左西孟旦组主动脉组织中iNOS阳性细胞比例显著下降,CD206阳性细胞比例显著升高($P < 0.05$);与左西孟旦组比较,左西孟旦+LPS组主动脉组织中iNOS阳性细胞比例显著升高,CD206阳性细胞比例显著下降($P < 0.05$),见图6。

3.6 各组小鼠主动脉TNF- α 、IL-6、TGF- β 及Arg-1的mRNA表达水平比较

qRT-PCR检测各组小鼠主动脉组织中TNF- α 、IL-6、TGF- β 及Arg-1的mRNA表达水平,如图7所示,与对照组比较,模型组主动脉组织中TNF- α 、IL-6



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与左西孟旦组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs levosimendan group

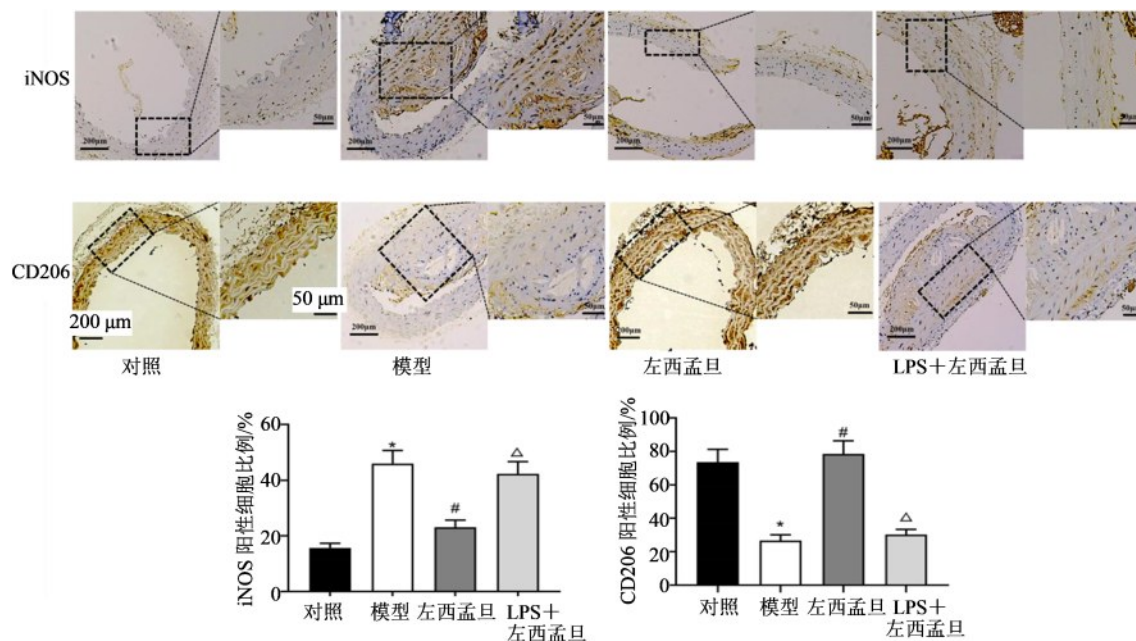
图5 油红O染色检测各组小鼠主动脉根部粥样硬化斑块形成($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Oil red O staining detection of atherosclerotic plaque formation on aortic roots of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

mRNA表达水平显著上调,TGF- β 、Arg-1 mRNA表达水平显著下调($P < 0.05$);与模型组比较,左西孟旦组主动脉组织中TNF- α 、IL-6 mRNA表达水平显著下调,TGF- β 、Arg-1 mRNA表达水平则显著上调($P < 0.05$);与左西孟旦组比较,左西孟旦+LPS组主动脉组织中TNF- α 、IL-6 mRNA表达水平显著上调,而TGF- β 、Arg-1 mRNA表达水平显著下调($P < 0.05$)。

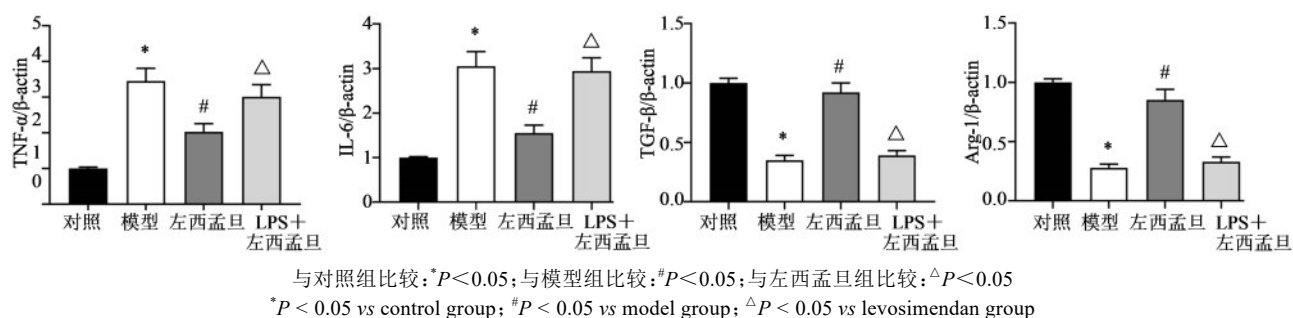
3.7 各组小鼠TLR4/NF- κ B信号通路相关蛋白表达比较

Western blotting实验检测各组小鼠主动脉组织中TLR4/NF- κ B信号通路相关蛋白表达水平变化,模型组主动脉组织中TLR4、p-NF- κ B p65蛋白表达较对照组显著上调($P < 0.05$);与模型组比较,左西孟旦组主动脉组织中TLR4、p-NF- κ B p65蛋白表达



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与左西孟旦组比较: $\Delta P < 0.05$
 $^*P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs levosimendan group
 图6 免疫组织化学染色检测各组小鼠主动脉iNOS和CD206水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 iNOS and CD206 in aorta of mice in each group detected by immunohistochemical staining ($\bar{x} \pm s, n=3$)



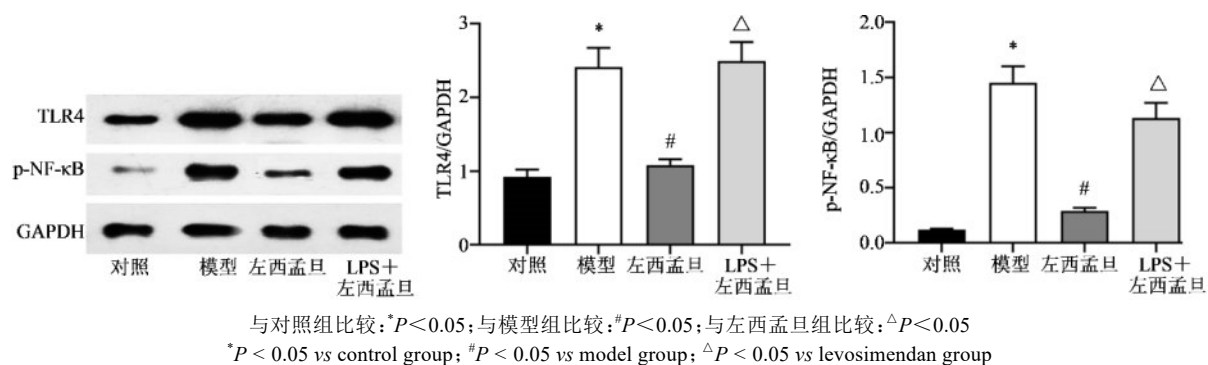
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与左西孟旦组比较: $\Delta P < 0.05$
 $^*P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs levosimendan group

图7 qRT-PCR法检测各组小鼠主动脉TNF- α 、IL-6、TGF- β 及Arg-1的mRNA表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

显著下调($P < 0.05$);左西孟旦+LPS组小鼠主动脉组织中TLR4、p-NF- κ B p65蛋白表达较左西孟旦组显著上调($P < 0.05$)。见图8。

4 讨论

AS是导致心血管疾病发生发展的重要病理过程,也是世界范围内引起死亡的常见原因之一,给



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与左西孟旦组比较: $\Delta P < 0.05$
 $^*P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs levosimendan group

图8 Western blotting检测各组小鼠主动脉TLR4/NF- κ B信号通路蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Western blotting detection of protein expression level of TLR4/NF- κ B signaling pathway in aorta in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

患者和社会造成了巨大的经济负担,许多因素如高血压、糖尿病、高脂血症和吸烟等均会促进AS发展^[3]。AS病理机制尚未完全明确,为一个长期综合性过程,该过程主要包括刺激血管发生损伤、跨血管内皮迁移募集、循环炎症细胞(包括内皮细胞、巨噬细胞和淋巴细胞)的活化、各种抗炎物质的释放以及血管平滑肌细胞的表型转化^[9],而针对以上过程,探究有效新的药物或靶标是目前治疗AS的主要研究方向。

左西孟旦可通过与心肌细胞内的肌钙蛋白C结合而增强独立于肾上腺素系统的心脏收缩能力,能够打开血管平滑肌中ATP依赖的钾离子通道,从而使得静脉、动脉和冠状动脉血管舒张。鉴于以上作用,左西孟旦对心力衰竭缺血性休克患者的心脏功能和组织灌注产生积极影响^[10]。此外,体外和体内研究均表明左西孟旦还具有抗炎特性。例如,Huang等^[11]研究发现内毒素血症大鼠模型经过左西孟旦治疗,可显著减轻消耗性凝血病,并改善肺、肝、肾器官功能损伤,其发挥保护作用的机制可能是左西孟旦对炎症反应的抑制效果。此外,Bent等^[12]与Plaschke等^[13]均指出左西孟旦是一种有效的磷酸二酯酶III(PDE-III)抑制剂,可导致细胞内cAMP水平升高,从而调节血小板功能。本研究结果显示,AS小鼠经过左西孟旦治疗后,血清中TG、TC、LDL-C水平均降低,HDL-C水平升高,主动脉病理改变明显减轻,斑块区域面积也减少,纤维化程度变小。由此说明,左西孟旦可能具有改善ApoE^{-/-}小鼠AS的作用。

AS的发展过程涉及许多细胞,例如内皮细胞、血管平滑肌细胞、巨噬细胞等,其中免疫细胞中的巨噬细胞在AS的整个过程中表现出高度异质性。在斑块中的微环境因素刺激后,巨噬细胞表现出不同的极化状态,而巨噬细胞极化意味着相关基因和蛋白质的多样化表达模式。人或小鼠斑块中主要有2种巨噬细胞表型:一种是经典激活的巨噬细胞,即M1型巨噬细胞,表现为促炎表型,可使促炎因子高表达从而使得人和小鼠动脉粥样斑块生长和不稳定;另一种是交替激活的巨噬细胞,即M2型巨噬细胞,在人和小鼠AS的发展中发挥预防作用,能够减少噬斑大小和增强噬斑稳定性,与其抗炎表达模式密切相关^[14-15]。通过AS疗法的研究表明,斑块尺寸的减小和稳定性的提高归因于对巨噬细胞极化的调节作用^[16]。因此,调节巨噬细胞极化状态和改变巨噬细胞表型比例是一种有效的AS治疗方法。

鉴于此,目前关于这方面的研究也在逐渐增加,在中药中番红花和姜黄素均可发挥抗AS作用,作用都是通过诱导巨噬细胞向M2型巨噬细胞分化实现的^[17-18]。还有一些化合物,如口服阿司匹林12周后ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样斑块变少,M1型巨噬细胞降低^[19];Kallistatin是一种组织激肽释放酶结合蛋白和丝氨酸蛋白酶抑制剂,可通过调节巨噬细胞极化来降低ApoE^{-/-}小鼠斑块形成的速率^[20]。在本研究中,左西孟旦作用后的主动脉中M1型巨噬细胞标志物iNOS阳性细胞比例下降,TNF- α 、IL-6 mRNA表达水平下调,同时,M2型巨噬细胞标志物CD206阳性细胞比例升高,TGF- β 、Arg-1 mRNA表达水平上调,由此推测,左西孟旦可能通过调控巨噬细胞向M2型表型极化而抑制ApoE^{-/-}小鼠AS进程。

TLR4是Toll样受体(TLR)家族的成员,作为一种模式识别受体可触发自身免疫反应,这种反应与炎症反应、肿瘤发展和AS等密切相关。细胞内TLR4激活能够触发下游信号转导途径中NF- κ B核转位,导致NF- κ B从I κ B α 释放,使NF- κ B从细胞质转移至细胞核,并在其中介导炎症因子及趋化因子如IL-6、TNF- α 和ICAM-1的产生和分泌。已知TLR4在AS病变的血管平滑肌细胞(VSMCs)中高表达,且在细胞的增殖和迁移中起关键作用,如Bhaskar等^[21]已证实槲皮素通过抑制TLR4/NF- κ B p65信号通路来下调氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的TLR4 mRNA表达上调,并抑制人外周血单核细胞中的细胞炎症因子的产生。因此,推测左西孟旦可能通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路来发挥抗AS作用,经检测该途径中相关蛋白表达发现左西孟旦治疗的ApoE^{-/-}小鼠主动脉中TLR4、p-NF- κ B p65蛋白表达均下调,而在使用左西孟旦的同时给予TLR4激动剂作用后TLR4、p-NF- κ B p65蛋白表达又明显升高,同时左西孟旦并没有发挥出抗AS的作用。

左西孟旦能够调控巨噬细胞极化状态并诱导向M2型分化,减轻AS,其作用机制可能是通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路实现的。本研究为进一步探究左西孟旦治疗AS的作用奠定了实验基础,并为AS治疗提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li B W, Xia Y P, Hu B. Infection and atherosclerosis:

- TLR-dependent pathways [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (14): 2751-2769.
- [2] Hafiane A. Vulnerable plaque, characteristics, detection, and potential therapies [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2019, 6 (3): E26.
- [3] Pigarevsky P V, Snegova V A, Nazarov P G. Macrophages and their role in destabilization of an atherosclerotic plaque [J]. *Kardiologiia*, 2019, 59(4): 88-91.
- [4] Stremmel C, Stark K, Schulz C. Heterogeneity of macrophages in atherosclerosis [J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119(8): 1237-1246.
- [5] Masarone D, Valente F, Verrengia M, et al. Efficacy and safety of repeated infusion of levosimendan in outpatients with advanced heart failure: A real-world experience [J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2020, 21(11): 919-921.
- [6] Juguet W, Fard D, Faivre L, et al. Levosimendan plus dobutamine in acute decompensated heart failure refractory to dobutamine [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(11): E3605.
- [7] Li L L, Wei L, Zhang N, et al. Levosimendan protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PTEN/Akt pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8593617.
- [8] 颜宗海, 王兴兵, 汪健, 等. TLR2和TLR4激动剂对人骨髓来源的间充质干细胞迁移能力的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(1): 183-186.
- Yan Z H, Wang X B, Wang J, et al. Influence of TLR2 and TLR4 agonists on migration of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Exp Hematol*, 2014, 22(1): 183-186.
- [9] Wang Y H, Smith W, Hao D J, et al. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70: 459-466.
- [10] 董菲, 郭牧, 张云强, 等. 左西孟旦治疗心源性休克的近期临床疗效及安全性 [J]. *中华心力衰竭和心肌病杂志*, 2019, 3(4): 209-214.
- Dong F, Guo M, Zhang Y Q, et al. Recent clinical efficacy and safety of levosimendan in the treatment of cardiogenic shock [J]. *Chin J Heart Fail Cardiom*, 2019, 3 (4): 209-214.
- [11] Huang H C, Tsai H J, Wang C C, et al. Levosimendan mitigates coagulopathy and organ dysfunction in rats with endotoxemia [J]. *J Chin Med Assoc*, 2017, 80(7): 432-441.
- [12] Bent F, Plaschke K. Levosimendan's effect on platelet function in a rat Sepsis model [J]. *Platelets*, 2013, 24(3): 189-193.
- [13] Plaschke K, Bent F, Rosenhagen C, et al. The inhibitory in-vitro effect of high-dose levosimendan on platelet function may be mediated through its action as a phosphodiesterase inhibitor [J]. *Coron Artery Dis*, 2012, 23(3):215-220.
- [14] Decano J L, Aikawa M. Dynamic macrophages: Understanding mechanisms of activation as guide to therapy for atherosclerotic vascular disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5: 97.
- [15] Rinne P, Guillaumat-Prats R, Rami M, et al. Palmitoylethanolamide promotes a proresolving macrophage phenotype and attenuates atherosclerotic plaque formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(11): 2562-2575.
- [16] 张群辉, 马骏, 郭琰, 等. 巨噬细胞极化在心血管疾病中的作用及应用研究进展 [J]. *现代免疫学*, 2020, 40 (1): 52-56.
- Zhang Q H, Ma J, Guo Y, et al. Advances in the role and application of macrophage polarization in cardiovascular diseases [J]. *Curr Immunol*, 2020, 40(1): 52-56.
- [17] Li J, Lei H T, Cao L, et al. Crocin alleviates coronary atherosclerosis via inhibiting lipid synthesis and inducing M2 macrophage polarization [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 120-127.
- [18] Zhou Y Y, Zhang T T, Wang X F, et al. Curcumin modulates macrophage polarization through the inhibition of the toll-like receptor 4 expression and its signaling pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36 (2): 631-641.
- [19] Zhou Y, Chen R, Liu D, et al. Asperlin inhibits LPS-evoked foam cell formation and prevents atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15(11): E358.
- [20] Li B, Sheng Z L, Liu C, et al. Kallistatin inhibits atherosclerotic inflammation by regulating macrophage polarization [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(3): 339-351.
- [21] Bhaskar S, Shalini V, Helen A. Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF- κ B signaling pathway [J]. *Immunobiology*, 2011, 216(3): 367-373.

[责任编辑 兰新新]