

白藜芦醇调控 NLRP3 炎症小体介导的血管平滑肌细胞焦亡抗动脉粥样硬化研究

李世环^{1,2}, 李清洁^{1,2}, 周 驰^{1,2}, 周巧逢^{1,2}, 欧阳昌汉¹, 李敏才^{2,3*}

1. 湖北科技学院 药学院, 湖北 咸宁 437100

2. 湖北科技学院 医药研究院, 湖北 咸宁 437100

3. 湖北科技学院 基础医学院, 湖北 咸宁 437100

摘要: 目的 探讨白藜芦醇对动脉粥样硬化(AS)中血管钙化的影响及机制。方法 将雄性健康SD大鼠随机分为对照组、模型组、白藜芦醇(5 mg·kg⁻¹)组,每组10只。造模前ip预给药21 d,每天1次。模型组、白藜芦醇组均制备AS模型:sc 5 mg·kg⁻¹维生素D₃ 5 d后,分离并结扎左颈动脉,0.12 mmol·L⁻¹的CaCl₂溶液湿敷30 min,随即缝合,对照组湿敷生理盐水。造模后继续给药,1周后所有大鼠同时禁食24 h后处死,取大鼠左颈动脉进行苏木精-伊红(HE)染色和Von Kossa染色。体外钙化培养基诱导CRL-1999细胞钙化,给予白藜芦醇(10 μmol·L⁻¹)干预,茜素红S染色检测钙盐沉积;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blotting法检测钙化指标骨形态发生蛋白-2(BMP2)、转录因子2(Runx2),炎症小体NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3),细胞焦亡相关指标天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)、Gasdermin-D(GSDMD)、白细胞介素(IL)-1β、IL-18蛋白和mRNA表达变化;免疫荧光检测Runx2、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1β蛋白表达;分子对接验证白藜芦醇与靶蛋白NLRP3、Caspase-1、GSDMD、BMP2、Runx2结合活性。结果 HE与Von Kossa染色显示模型组血管壁结构紊乱、钙盐沉积,白藜芦醇缓解钙盐沉积。体外实验表明钙化结节可被白藜芦醇缓解;与对照组比较,模型组BMP2、Runx2、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18 mRNA和蛋白表达均显著上升(P<0.05、0.01、0.001);经白藜芦醇处理后,上述指标的mRNA和蛋白表达均显著下降(P<0.05、0.01、0.001)。白藜芦醇与Runx2、NLRP3分别形成2、3个氢键,对接活性较好。结论 白藜芦醇抑制AS中血管钙化,机制可能与抑制NLRP3/Caspase-1信号通路,进而抑制细胞焦亡有关。

关键词: 白藜芦醇; 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞; NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3); 细胞焦亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)10-1972-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.10.006

Study on mechanism of resveratrol regulation of NLRP3 mediated pyroptosis of vascular smooth muscle cells resistance to atherosclerosis

LI Shihuan^{1,2}, LI Qingjie^{1,2}, ZHOU Chi^{1,2}, ZHOU Qiaofeng^{1,2}, OUYang Changan¹, LI Mincai^{2,3}

1. College of Medicine, Hubei Science and Technology University, Xianning 437100, China

2. Institute of Medicine, Hubei Science and Technology University, Xianning 437100, China

3. School of Basic Medical Science, Hubei Science and Technology University, Xianning 437100, China

Abstract: Objective To investigate the effect of resveratrol on vascular calcification in atherosclerosis (AS) and its mechanism. **Methods** Male healthy SD rats were randomly divided into control group, model group and resveratrol (5 mg·kg⁻¹) group, with 10 rats in each group. Resveratrol was ip preadministered for 21 days, once a day, before modeling. AS model was prepared in the model group and the resveratrol group: sc 5 mg·kg⁻¹ vitamin D₃ for five days, the left carotid artery was isolated and ligated, and 0.12 mmol·L⁻¹ CaCl₂ solution was wet applied for 30 min, and then sutured. The control group was wet applied normal saline. One week later, all rats were sacrificed after fasting for 24 h at the same time. The left carotid arteries of the rats were taken for HE staining and Von Kossa staining. The calcification of CRL-1999 cells was induced by calcification medium *in vitro*, and resveratrol (10 μmol·L⁻¹) was administered. Alizarin red S staining was used to detect calcium salt deposition. The expression of calcium markers BMP2, Runx2, inflammasome NLRP3, pyroptosis related indicators aspartic acid proteolytic enzyme 1 (Caspase-1),

收稿日期: 2022-07-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(8207131747);湖北省卫生健康委中医药科研立项项目(ZY2021F007)

第一作者: 李世环,女,在读硕士,研究方向为动脉粥样硬化及其药物研究。E-mail:1334234430@qq.com

*通信作者: 李敏才,男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为心血管病理及药物研发。E-mail:mincaili@163.com

Gasdermin-D (GSDMD), interleukin (IL) -1 β and IL-18 were detected by Quantitative real-time PCR(qRT-PCR) and Western blotting. The expressions of Runx2, NLRP3, Caspase-1, GSDMD and IL-1 β were detected by immunofluorescence. The binding activity of resveratrol to target protein was verified by molecular docking. **Results** HE and Von Kossa staining showed vascular wall structure disorder and calcium salt deposition in the model group, which was alleviated by resveratrol pretreatment. VSMCs *in vitro* showed that calcified nodules could be alleviated by resveratrol. The expressions of BMP2, Runx2, inflammasome NLRP3, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18 in model group were increased ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001). After resveratrol treatment, the mRNA and protein expressions of the above indexes were decreased ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001). Resveratrol formed two and three hydrogen bonds with Runx2 and NLRP3, respectively, showing good docking activity. **Conclusion** Resveratrol inhibits vascular calcification in AS, and the mechanism may be related to the inhibition of NLRP3/Caspase-1 signaling pathway and the inhibition of pyroptosis.

Key words: resveratrol; atherosclerosis; vascular smooth muscle cells; nod-like receptor thermoprotein domain-associated protein 3 (NLRP3); pyroptosis

动脉粥样硬化(AS)严重危害人类健康,随着现代社会发展,其发病率逐年上升。AS病变引起血管壁增厚、管腔狭窄,导致心肌梗死、脑卒中等发生^[1]。目前研究表明AS是一种慢性炎症性疾病,与血管平滑肌细胞(VSMCs)氧化应激、炎性反应、细胞死亡、钙盐沉积等病变有关^[2-4]。

细胞焦亡是程序性细胞死亡的形式,伴随大量炎症因子释放,由炎性小体激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase-1)信号通路激活。炎性小体NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、NLRP1、黑素瘤缺乏2(AIM2)等受体蛋白被激活后与ASC结合,激活pro-Caspase-1,将白细胞介素-1 β 前体(pro-IL-1 β)和白细胞介素-18前体(pro-IL-18)蛋白水解为促炎因子IL-1 β 、IL-18,诱发细胞焦亡^[5-6]。NLRP3炎性小体是NOD样受体家族成员的一类,介导炎性介质激活的胞质信号复合体。Gasdermin-D(GSDMD)是介导细胞焦亡的关键执行者,Caspase-1蛋白水解活化GSDMD,引起细胞肿胀,胞膜破裂^[7]。调节NLRP3引起VSMCs焦亡诱导的AS病变,有助于缓解AS。

白藜芦醇是一种天然植物多酚,广泛存在于多种植物中,如葡萄、花生、大豆等,因其具有抗炎、抗氧化、调节脂质水平、促进血管舒张等药理作用^[8-9],被广泛用于如炎症肠病、糖尿病等各种慢性疾病。但白藜芦醇对AS中VSMCs细胞焦亡的影响及机制尚未见报道,本研究通过体内实验观察白藜芦醇对AS血管钙化的影响,探讨白藜芦醇对VSMCs焦亡的作用及其调控机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性SD大鼠30只,6~8周龄,体重(220 $\pm$ 20)g,购自湖北省实验动物研究中心,实

验动物生产许可证号SCXK(鄂)2020-0018。动物实验经湖北科技学院药学院动物伦理委员会批准,合格证书No.42000600044150。

人血管平滑肌细胞株(CRL-1999)购自美国模式培养物集存库(ATCC)。

1.2 主要试剂

DMEM培养基、胎牛血清均购自美国Gibco公司;白藜芦醇(批号D10291,质量分数99.5%,1 g)购自北京博奥森生物科技有限公司;Caspase-1、NLRP3、GAPDH抗体、HE染色试剂盒、细胞裂解液RIPA、BCA蛋白定量检测试剂盒,均购自碧云天生物技术有限公司;IL-1 β 、IL-18、GSDMD抗体购自ABclonal公司;骨形态发生蛋白-2(BMP2)、Runx2相关转录因子2(Runx2)抗体购自美国Santa Cruz公司;CCK-8试剂盒购自美伦生物技术有限公司;茜素红S染色液购自北京索莱宝科技有限公司;RNA isolater Total RNA Extraction Reagent、逆转录试剂盒HiScript III RT SuperMix for qPCR、荧光定量试剂盒AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix均购自诺唯赞生物;VON KOSSA染液、FITC标记的山羊抗兔IgG、DAPI染色试剂购自武汉塞维尔生物科技有限公司;Western blotting封闭液购自科瑞生物有限公司。

1.3 主要仪器

冷冻离心机(Eppendorf公司,型号22331);酶标仪(芬兰BioTek公司,型号ELX800);倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司,型号BX53);CO₂培养箱(ESCO公司,型号CCL-170T-8);超净工作台(Biobase公司,型号BBS-V1300);电泳转印槽(Bio-Rad公司,型号1645052);实时荧光定量PCR(qRT-PCR)仪(美国ABI公司,型号7500)。

2 方法

2.1 AS模型制备、分组及给药

将雄性健康SD大鼠随机分为对照组、模型组、

白藜芦醇($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [10])组,每组10只。白藜芦醇组造模前ip 预给药21 d,每天1次,对照组与模型组ip 生理盐水。然后进行AS模型制备:模型组、白藜芦醇组均sc $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 维生素D₃(VD₃)5 d后,分离并结扎左颈动脉, $0.12\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CaCl₂溶液湿敷30 min,随即缝合[10-11],对照组湿敷生理盐水。造模后继续给药,1周后所有大鼠同时禁食24 h后处死,取大鼠左颈动脉进行检测。

2.2 HE染色

各组取4只大鼠左颈动脉,4%多聚甲醛固定,冰冻石蜡切片,苏木素染色5 min,1%盐酸乙醇分化,酒精梯度脱水,伊红染色5~10 s,中性树胶封片,显微镜下观察左颈动脉形态变化。

2.3 Von Kossa染色

颈动脉切片,常规脱蜡脱水,超纯水浸洗5次,加入Von Kossa染液,紫外灯照射4 h,苏木素复染5 min,分化、脱水,伊红染色5 min,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察动脉管壁钙盐变化。

2.4 CCK-8法检测白藜芦醇对CRL-1999细胞活性的影响

取对数生长期CRL-1999细胞,以每孔1 000个接种于96孔板内,每组设5个复孔,待细胞接种24 h贴壁生长后,分别给予终浓度为0、10、20、25、50、75、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的白藜芦醇,24 h后每孔加入10 μL CCK-8溶液,避光孵育30 min后,450 nm处检测吸光度(A)值。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.5 细胞钙化模型的制备及分组、给药

取对数生长期CRL-1999细胞,利用含EDTA胰酶消化,加入培养基终止消化,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃上清,新鲜培养基重悬细胞,按每孔5 000个接种于6孔板内。待细胞接种24 h贴壁生长后,分为对照组(10%胎牛血清的DMEM培养基)、模型组(钙化培养基)、白藜芦醇组(钙化培养基+白藜芦醇 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。钙化培养基:10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -甘油磷酸钠、8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钙、抗坏血酸50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、地塞米松10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、胰岛素1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [12];钙化培养基诱导细胞7~10 d,白藜芦醇预孵育40 min,钙化期间一直给药,随后收集细胞进行后续实验。

2.6 细胞茜素红S染色

细胞经4%多聚甲醛固定15 min,加入茜素红S染液,室温孵育30 min,PBS洗涤3次,每次1~2 min,观察橘红色钙结节情况。

2.7 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测

提取总RNA:加入RNA isolater、氯仿、异丙醇

等提纯,离心数次,留取沉淀,75%乙醇溶解沉淀。PCR扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 退火10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算mRNA相对表达量。引物(序列见表1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')
<i>Runx2</i>	F:GAGTGGACGAGGCAAGAGTT R:GGATGAGGAATGCGCCCTAA
<i>NLRP3</i>	F:ATGTGGGGGAGAATGCCTTG R:TTGTCTCCGAGAGTGTGTC
<i>Caspase-1</i>	F:TTTCCGCAAGGTTTCGATTTTCA R:GGCATCTGCGCTCTACCATC
<i>IL-1β</i>	F:AGCTACGAATCTCCGACCAC R:CGTTATCCCATGTGTGTCGAAGAA
<i>GSDMD</i>	F:GCCTCCACAACCTTCCTGACAGATG R:GGTCTCCACCTCTGCCCGTAG
<i>GAPDH</i>	F:GAAGACGGGCGGAGAGAAAC R:GCCCAATACGACCAATCCGT

2.8 Western blotting检测

提取CRL-1999细胞总蛋白,配制10% SDS-PAGE凝胶,电泳、转膜,含5%脱脂奶粉TBST溶液封闭1 h及一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,二抗室温孵育1 h,ECL液显影,经凝胶图形分析系统Image Lab 3.0进行拍照,采用Image J软件测定每个蛋白条带灰度值,以目的蛋白与GAPDH条带灰度值的比值表示其相对表达量。

2.9 免疫荧光检测 Runx2、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 蛋白表达

将CRL-1999细胞以每孔 2×10^3 个接种于24孔板,分组、造模及给药操作同“2.5”项。4%多聚甲醛固定15 min,0.3%Triton X-100透膜15 min,5% BSA封闭1 h,加入含Runx2、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入FITC标记的二抗室温避光孵育1 h,DAPI染核10 min,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片。荧光显微镜下采集图像。

2.10 分子对接验证

将白藜芦醇与NLRP3、Caspase-1、GSDMD、BMP2、Runx2进行分子对接。通过PDB数据(<http://www1.rcsb.org/>)以靶点蛋白全称获取蛋白质模型文件,通过Pub Chem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)以Pub Chem CID获取小分子配体文件,使用Auto Dock Vina进行分子对接,Py MOL软件作图及绘制氢键。

2.11 统计学处理

使用SPSS 25.0软件进行统计分析, GraphPad Prism 8.0软件绘图, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 白藜芦醇缓解AS病变

左颈动脉HE染色结果(图1)显示, 对照组血管壁结构完整; 模型组血管壁结构紊乱, 可见紫蓝色钙盐沉积; 白藜芦醇组血管壁结构尚完整, 部分钙盐沉积, 提示白藜芦醇缓解AS血管壁钙盐沉积。

3.2 白藜芦醇抑制AS钙化沉积

如图2所示, 组织中钙盐采用Von Kossa染色呈黑色, 对照组血管未见钙盐沉积; 模型组血管壁周围钙盐沉积明显; 与模型组比较, 白藜芦醇组钙盐沉积减少, 提示白藜芦醇抑制AS钙盐沉积。

3.3 白藜芦醇抑制CRL-1999细胞增殖

如图3所示, 当白藜芦醇浓度高于 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞存活率逐渐降低, 因此采用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行后续研究。

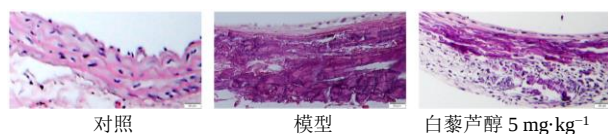


图1 大鼠的血管病理改变(HE染色, $\times 400$)

Fig. 1 Vascular changes in rats (HE staining, $\times 400$)

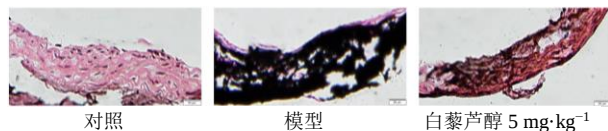


图2 大鼠血管的钙盐沉积(Von Kossa染色, $\times 400$)

Fig. 2 Calcium salt deposition in rat blood vessels (Von Kossa staining, $\times 400$)

3.4 白藜芦醇抑制CRL-1999细胞钙化

茜素红S染色结果如图4所示, 对照组未见红色颗粒, 模型组橘红色钙盐颗粒增多, 并呈现橘红色钙化结节; 与模型组比较, 白藜芦醇组红色颗粒减少, 钙化结节消退。

3.5 白藜芦醇对钙化、焦亡、炎症相关基因mRNA表达的影响

qRT-PCR结果(图5)显示, 与对照组比较, 模型组钙化培养基成功诱导成骨分化指标Runx2的

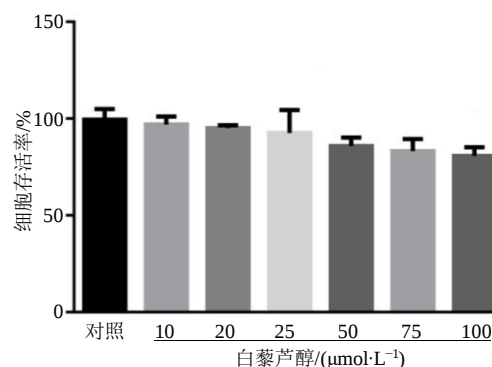


图3 不同浓度白藜芦醇对VSMCs存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 Effects of different concentration of resveratrol on survival rate of VSMC cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

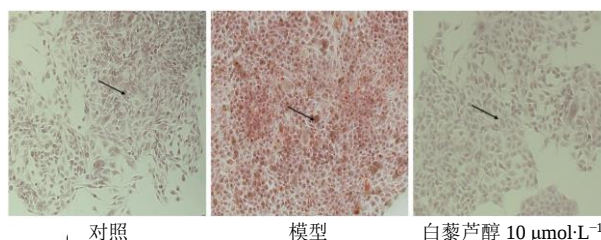
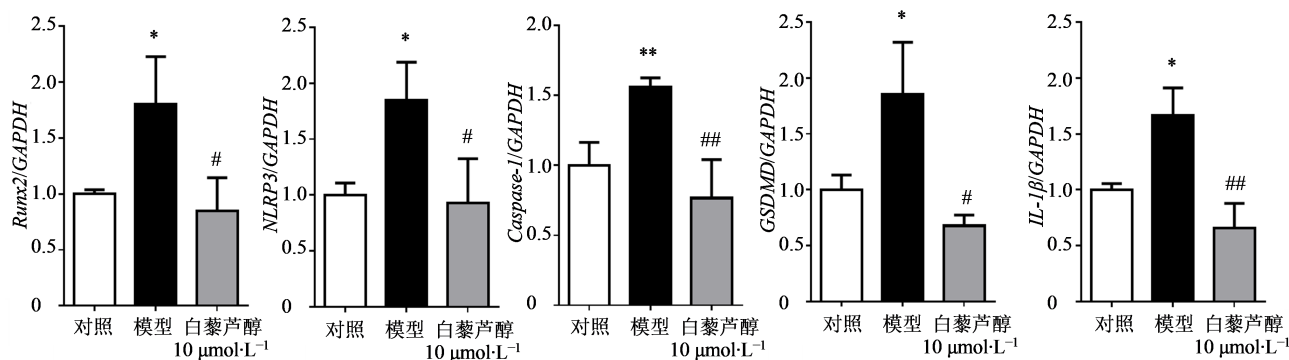


图4 茜素红S染色结果

Fig. 4 Alizarin red S staining results



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

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

图5 白藜芦醇对Runx2、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effects of resveratrol on mRNA expression of Runx2, NLRP3, Caspase-1, GSDMD and IL-1 β ($\bar{x} \pm s, n=3$)

mRNA 表达上调 ($P < 0.05$), 同时上调炎症指标 *NLRP3*、*IL-1 β* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 上调凋亡指标 *Caspase-1*、*GSDMD* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 白藜芦醇组 *Runx2*、*NLRP3*、*IL-1 β* 、*Caspase-1*、*GSDMD* mRNA 表达下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.6 白藜芦醇下调钙化指标 BMP2、Runx2 蛋白表达

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组 BMP2、Runx2 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 白藜芦醇组 BMP2、Runx2 表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.7 白藜芦醇对 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 白藜芦醇组 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。

3.8 白藜芦醇对 GSDMD、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组 GSDMD、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 白藜芦醇组 GSDMD、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.9 免疫荧光

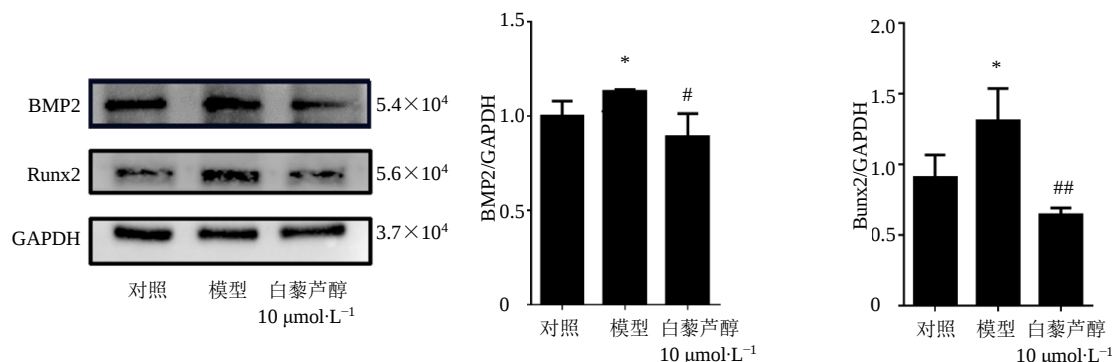
如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组 Runx2、NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 白藜芦醇组 Runx2、NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.001)。

3.10 分子对接结果

分子对接结果显示, 与白藜芦醇有结合意义的靶点为 Runx2、NLRP3, PDB ID 分别为 6VG8、7AIV, 结合能分别为 -17.79 、 -28.67 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。氢键数是评估靶点蛋白-分子配体结合能力的重要指标, 白藜芦醇与 Runx2、NLRP3 分别形成 2、3 个氢键, 表明对接质量较好 (图 10、表 2)。

4 讨论

血管钙化是心血管疾病危险因素之一, 是 AS 严重病变表现。本实验构建左颈动脉血管钙化模型, 显示动脉管壁结构紊乱、钙盐沉积; 给予白藜芦醇处理, 改善血管结构紊乱、减少钙盐沉积。体外实验 CRL-1999 细胞经钙化液孵育后, 可见钙化结节, 钙化指标 BMP2、Runx2 表达上调, NLRP3 炎症

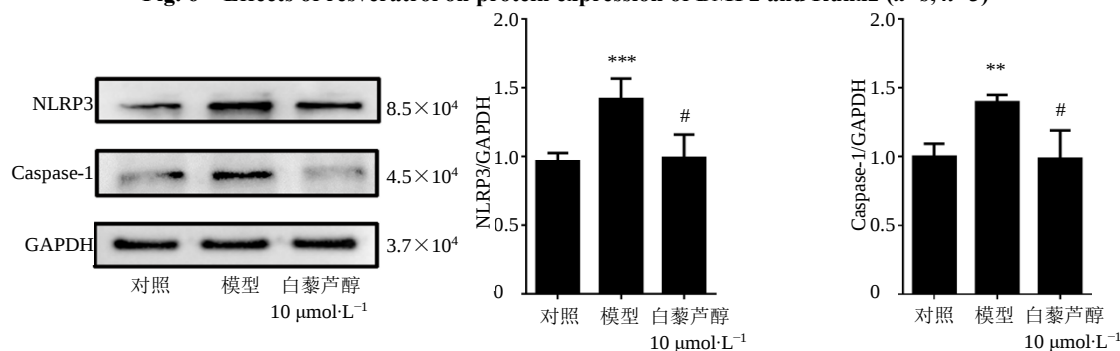


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

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

图 6 白藜芦醇对 BMP2、Runx2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effects of resveratrol on protein expression of BMP2 and Runx2 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

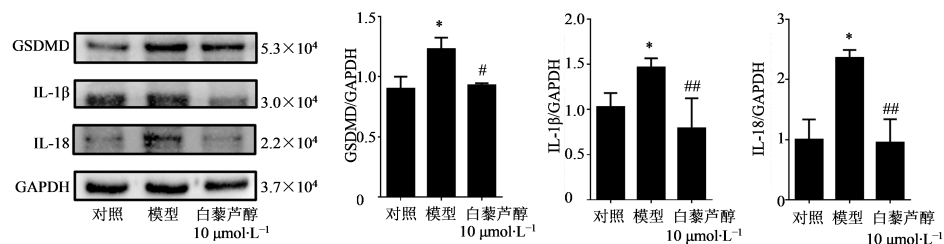


与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

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

图 7 白藜芦醇对 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effects of resveratrol on protein expression of NLRP3 and Caspase-1 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

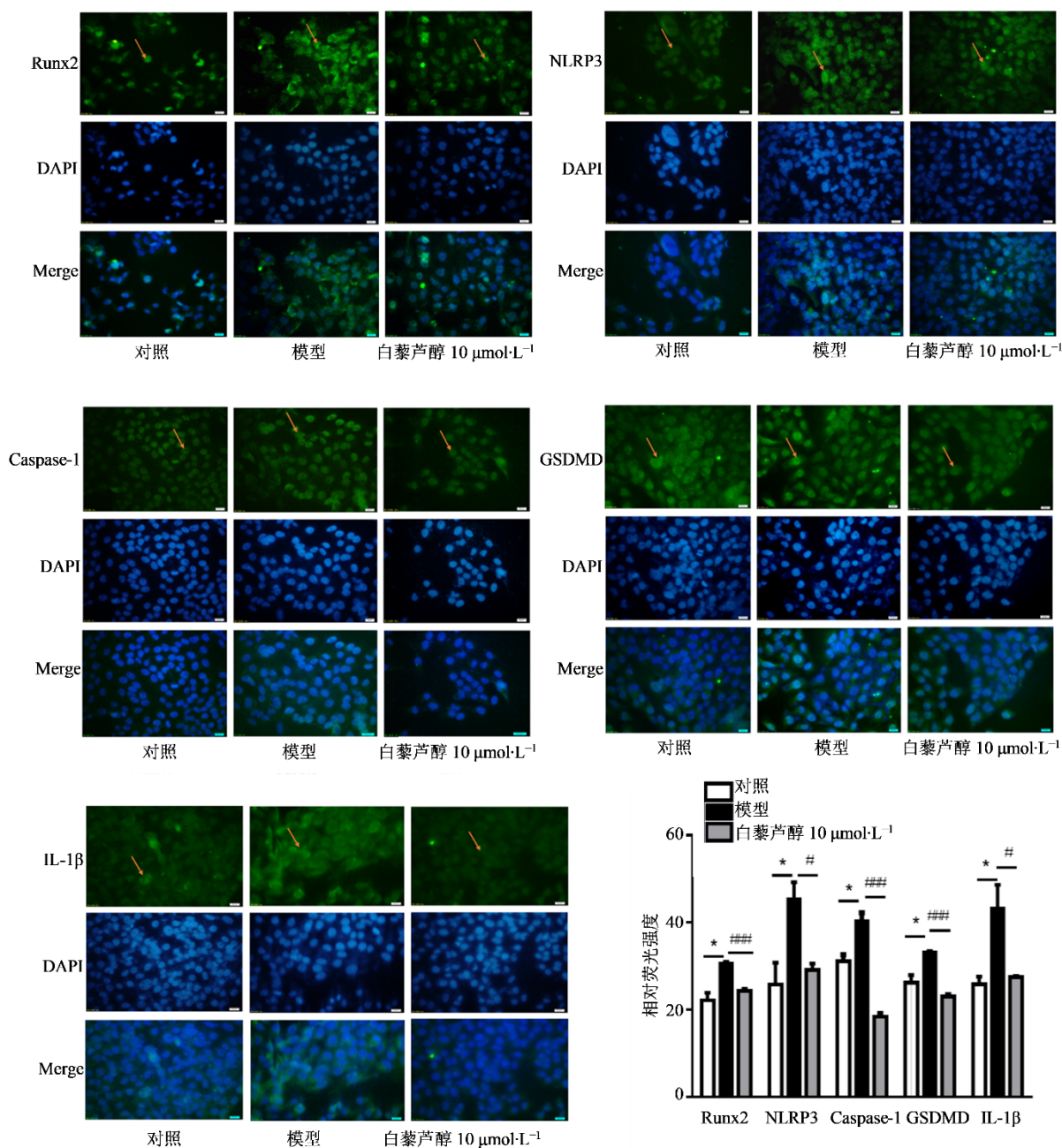


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

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

图8 白藜芦醇对GSDMD、IL-1 β 、IL-18蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effects of resveratrol on protein expression of GSDMD, IL-1 β , and IL-18 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group

图9 Runx2、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 免疫荧光蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3, \times 400$)

Fig. 9 Immunofluorescent protein expression level of Runx2, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, and IL-1 β ($\bar{x} \pm s, n=3, \times 400$)

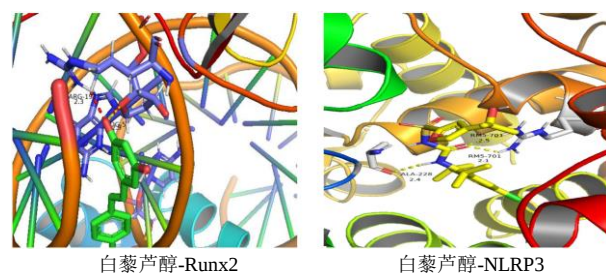


图10 Runx2、NLRP3与白藜芦醇对接示意图

Fig. 10 Docking diagram of Runx2 and NLRP3 with resveratrol

表2 Runx2、NLRP3与白藜芦醇对接结果

Table 2 Docking results of Runx2 and NLRP3 with resveratrol

靶点	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	氢键数
Runx2	-17.79	2
NLRP3	-28.67	3

小体、Caspase-1等细胞焦亡指标上调;给予白藜芦醇处理后,钙化结节减少,BMP2、Runx2钙化指标被抑制,NLRP3炎性小体、Caspase-1等细胞焦亡相关蛋白下调,为白藜芦醇抗AS效应提供解释的机制,相关机制见图11。

VSMCs是AS病变的关键细胞,VSMCs由收缩表型向分泌表型转化是AS关键环节。成骨样细胞关键调节因子Runx2,可以调控BMP2表达,从而介导VSMCs钙化^[13-14]。本研究采用茜素红S染色,显示白藜芦醇能减少VSMCs钙化结节,减少钙盐在VSMCs内沉积。与此前报道的白藜芦醇抑制高钙、高磷条件诱导hVSMCs发生钙化、并与其浓度呈正相关^[10]的结果相一致,此外研究还发现白藜芦醇能通过抑制血管钙化降低血压、改善心脏功能等^[15]。

VSMCs增殖促进AS发展过程,VSMCs死亡激活炎症反应,炎症因子触发炎症级联反应,导致大量炎症细胞聚集,促进AS斑块增大,纤维帽脱落,诱发斑块破裂出血^[16]。当VSMCs受到各种刺激后,氧化应激、线粒体功能紊乱、溶酶体破坏,产生大量ROS,促进炎性小体活化,诱发细胞焦亡^[17-18]。本研究发现VSMCs钙化后NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 的mRNA和蛋白表达上调,表明VSMCs存在炎症反应、细胞焦亡的发生。经白藜芦醇处理后表达明显下降,BMP2、Runx2表达也下降,证明白藜芦醇处理后抑制上述过程的发生,抑制VSMCs向成骨样细胞转化。这些结果与白藜芦醇通过调控NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路抑制肝纤维化^[19]相一致,说明白藜芦醇可能通过调控NLRP3/Caspase-1通路抑制钙化,从而降低Runx2

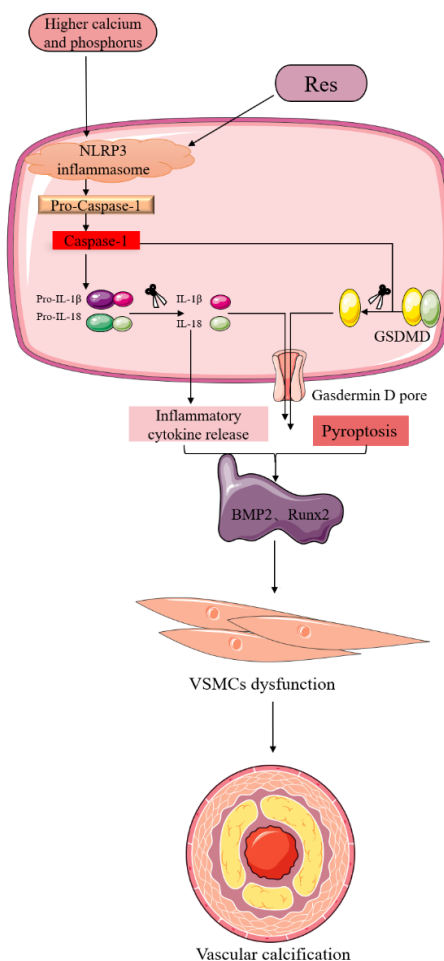


图11 白藜芦醇在血管钙化中对VSMCs的保护作用机制

Fig. 11 Protective mechanism of resveratrol on VSMCs in vascular calcification

水平,减少VSMCs增殖、分化等,缓解AS病变。

通过分子对接验证发现小分子白藜芦醇与Runx2、NLRP3靶蛋白结合活性较好,结合氢键多,佐证了白藜芦醇拮抗AS分子结合位点。后续本课题组将继续进行动物实验,将AS大鼠颈动脉取材通过免疫荧光进一步验证分子对接结果。

AS中VSMCs钙化与细胞焦亡及其伴随的大量炎症反应有关,本研究结果表明,白藜芦醇能抑制炎症反应和细胞焦亡,抑制VSMCs钙盐沉积,可能与调控NLRP3/Caspase-1信号轴有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Durham A L, Speer M Y, Scatena M, et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: Implications in atherosclerosis and arterial stiffness [J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(4): 590-600.
- [2] 余 锋, 黄 娜, 卢建辉, 等. 中医药调控细胞焦亡稳定动脉粥样硬化易损斑块研究现状与述评 [J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(12): 2785-2789.

- Yu F, Huang N, Lu J H, et al. Research status and review of Chinese medicine in stabilizing the atherosclerotic vulnerable plaque through regulating the pyroptosis [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2021, 38(12): 2785-2789.
- [3] Voelkl J, Luong T T, Tuffaha R, et al. SGK1 induces vascular smooth muscle cell calcification through NF- κ B signaling [J]. J Clin Invest, 2018, 128(7): 3024-3040.
- [4] 徐洪远, 朱晨柳, 杨洁净, 等. NLRP3 炎性小体研究进展及与消化系统疾病关系 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(1): 151-155.
- Xu H Y, Zhu C L, Yang J J, et al. Research progress of NLRP3 inflammasome and its relationship with digestive system diseases [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2022, 24(1): 151-155.
- [5] Chen X L, Liu G L, Yuan Y Y, et al. NEK7 interacts with NLRP3 to modulate the pyroptosis in inflammatory bowel disease via NF- κ B signaling [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(12): 906.
- [6] 章 康, 赵 婷, 夏 丹, 等. 白头翁汤正丁醇提取物通过下调 NLRP3 炎症小体及相关信号通路治疗小鼠外阴阴道念珠菌病的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2516-2524.
- Zhang K, Zhao T, Xia D, et al. Butyl alcohol extract of Baitouweng Decoction alleviates vulvovaginal candidiasis in mice by downregulating NLRP3 inflammasome and related signal pathways [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(9): 2516-2524.
- [7] Zeng Z L, Li G H, Wu S Y, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular disease [J]. Cell Prolif, 2019, 52(2): e12563.
- [8] 王 瑛, 张莹楠, 常新捷, 等. 白藜芦醇调控 miR-223 对坏死性小肠结肠炎小鼠细胞焦亡的作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(9): 1245-1250.
- Wang Y, Zhang Y N, Chang X J, et al. Study on mechanism of resveratrol regulating miR-223 on pyroptosis in mice with necrotizing enterocolitis [J]. Chin Pharmacol Bull, 2021, 37(9): 1245-1250.
- [9] 王 川, 王钰莹, 王 婷, 等. 基于 SIRT1-ERK1/2 通路研究白藜芦醇对环孢菌素 A 诱导高血压的作用及机制 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2723-2730.
- Wang C, Wang Y Y, Wang T, et al. Effect and mechanism of resveratrol on cyclosporin A-induced hypertension based on SIRT1-ERK1/2 pathway [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(9): 2723-2730.
- [10] Deng Z Y, Hu M M, Xin Y F, et al. Resveratrol alleviates vascular inflammatory injury by inhibiting inflammasome activation in rats with hypercholesterolemia and vitamin D₂ treatment [J]. Inflamm Res, 2015, 64(5): 321-332.
- [11] Marshall A P, Luo W F, Wang X L, et al. Medial artery calcification increases neointimal hyperplasia after balloon injury [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 8193.
- [12] 郑星星. FoxO3a/p27kip1 信号轴在白藜芦醇抑制 AngII 诱导 HA-VSMC 增殖机制中的作用 [D]. 长沙: 中南大学, 2014.
- Zheng X X. Effect of FoxO3a/ P27KIP1 signaling axis on the mechanism of resveratrol inhibiting Ang ii - induced proliferation of HA-VSMC [D]. Changsha: Central South University, 2014.
- [13] Zhao G X, Xu M J, Zhao M M, et al. Activation of nuclear factor-kappa B accelerates vascular calcification by inhibiting ankylosis protein homolog expression [J]. Kidney Int, 2012, 82(1): 34-44.
- [14] 邹 飏, 江 川, 刘 翔, 等. 氯化镧对 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞作用的实验研究 [J]. 重庆医学, 2014, 43(26): 3480-3482.
- Zou Y, Jiang C, Liu X, et al. Experimental study on effect of lanthanum chloride on RAW264.7 cells differentiating into osteoclasts [J]. Chongqing Med, 2014, 43(26): 3480-3482.
- [15] 刘国栋. 白藜芦醇抑制维生素 D₃ 和尼古丁诱导大鼠血管钙化的作用及机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2015.
- Liu G D. The inhibition effect and mechanisms of resveratrol on vascular calcification induced by vitamin D₃ plus nicotine in rats [D]. Beijing: PLA Medical College, 2015.
- [16] Kufer T A, Nigro G, Sansonetti P J. Multifaceted functions of NOD-like receptor proteins in myeloid cells at the intersection of innate and adaptive immunity [J]. Microbiol Spectr, 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0021-2015.
- [17] An Y N, Zhang H F, Wang C, et al. Activation of ROS/ MAPKs/NF- κ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis [J]. FASEB J, 2019, 33(11): 12515-12527.
- [18] 孙 伟, 刘彬彬, 陆安法, 等. 细胞焦亡在肝脏损伤中的作用研究进展 [J/OL]. 中国免疫学杂志, 2021-09-24, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.R.20210923.1809.002.html>
- Sun W, Liu S S, Lu A F, et al. Research Progress on the role of pyroptosis in liver injury [J/OL]. Chin J Immunol, 2021-09-24, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.R.20210923.1809.002.html>.
- [19] 李 凡. 白藜芦醇调控 NLRP3 炎症小体及其在肝纤维化小鼠中的作用研究 [D]. 桂林: 桂林医学院, 2019.
- Li F. Resveratrol regulates NLRP3 inflammasome and its role in liver fibrosis mice [D]. Guilin: Guilin Medical University, 2019.