

基于 CX3CL1 介导的炎症反应研究淫羊藿苷对缺氧诱导的肺动脉高压小鼠的作用

罗云梅^{1,2}, 李铭铭^{1,2,3#}, 熊乙林^{1,2}, 李利生^{1,2*}

1. 遵义医科大学 基础药理教育部重点实验室暨特色民族药教育部国际合作联合实验室, 贵州 遵义 563000

2. 遵义医科大学 贵州省基础药理重点实验室 药学院药理学教研室, 贵州 遵义 563000

3. 遵义医科大学第三附属医院(遵义市第一人民医院)药剂科, 贵州 遵义 563000

摘要:目的 研究淫羊藿苷改善缺氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)作用与趋化因子 C-X3-C 基元配体 1(chemokine C-X3-C motif ligand 1, CX3CL1)介导的炎症反应的关系。方法 将 40 只 C57BL/6J 雄性野生型(wide type, WT)小鼠随机分为对照组、WT 模型组和 WT+淫羊藿苷(10、20 mg/kg)组, 20 只雄性 CX3CL1^{-/-}小鼠分为 CX3CL1^{-/-}模型组和 CX3CL1^{-/-}+淫羊藿苷(20 mg/kg)组。除对照组外, 各组均于含氧量为 10%的低氧环境中连续饲养 21 d, 于低氧饲养 7 d 后 ig 淫羊藿苷 2 周。采用小动物超声仪检测小鼠肺动脉血流速度和右心室血流动力学, 测量右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI); 采用苏木素-伊红(HE)和 Masson 染色观察小鼠肺小动脉重构情况; 采用 ELISA 法检测小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)水平; 采用 Western blotting 检测小鼠肺组织 CX3CL1 和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路相关蛋白表达情况。结果 与对照组相比, WT 模型组小鼠肺动脉血流速度明显降低($P<0.05$), RVHI 显著增大($P<0.05$), 右心室收缩末期直径、收缩末期容积和每搏输出量升高($P<0.05$), 右心室短轴缩短率和射血分数降低($P<0.05$), 肺小动脉重构明显。与 WT 模型组相比, 淫羊藿苷能够增加 WT 小鼠肺动脉血流速度($P<0.05$), 降低 RVHI、右心室收缩末期直径、收缩末期容积和每搏输出量($P<0.05$), 升高右心室短轴缩短率和射血分数($P<0.05$), 肺小动脉重构明显改善, 同时, 淫羊藿苷降低血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平以及肺组织 CX3CL1 蛋白表达水平($P<0.05$), 抑制 NF- κ B 通路相关蛋白表达水平($P<0.05$)。与 WT 模型组相比, CX3CL1^{-/-}模型组小鼠肺动脉血流速度、肺小动脉重构、右心室血流动力学均有改善($P<0.05$), 血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平降低($P<0.05$)。敲除 CX3CL1^{-/-}后, 淫羊藿苷(20 mg/kg)对 HPH 小鼠的改善作用减弱甚至消失。结论 淫羊藿苷能够通过抑制 CX3CL1 介导的炎症反应改善小鼠 HPH。

关键词:淫羊藿苷; 趋化因子 C-X3-C 基元配体 1; 炎症; 缺氧性肺动脉高压; 小鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)04-1068-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.04.013

Effect of icariin on hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice based on CX3CL1-mediated inflammation

LUO Yun-mei^{1,2}, LI Ming-ming^{1,2,3}, XIONG Yi-lin^{1,2}, LI Li-sheng^{1,2}

1. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education and International Cooperation Joint Laboratory of Ethnomedicine of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

2. Guizhou Key Laboratory of Basic Pharmacology, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

3. Department of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University (The First People's Hospital of Zunyi), Zunyi 563000, China

收稿日期: 2021-10-13

基金项目: 遵义医科大学博士启动基金资助项目(F-951); 遵义医科大学基础药理教育部重点实验室开放课题(JCYL-K-015); 遵义市科技局与遵义医学院联合基金资助项目(遵市科合社字[2018]03 号)

作者简介: 罗云梅(1990—), 女, 实验师, 主要从事心血管药理学研究。E-mail: 15022335973@163.com

*通信作者: 李利生(1979—), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事心血管药理学研究。E-mail: medlls@qq.com

#共同第一作者: 李铭铭(1988—), 男, 主管药师, 主要从事心血管药理学研究。E-mail: 315804727@qq.com

Abstract: Objective To study the relationship between ameliorative effect of icariin on hypoxic pulmonary hypertension (HPH) and inflammation mediated by chemokine chemokine C-X3-C motif ligand 1 (CX3CL1). **Methods** Forty C57BL/6J male wild type (WT) mice were randomly divided into control group, WT model group and WT + icariin (10, 20 mg/kg) group; And twenty male CX3CL1^{-/-} mice were divided into CX3CL1^{-/-} model group and CX3CL1^{-/-} + icariin (20 mg/kg) group. Except for control group, mice were exposed to hypoxia environment with oxygen content of 10% for 21 d, and were ig icariin for two weeks after 7 d of hypoxic feeding. Pulmonary artery blood flow velocity and right ventricular hemodynamics of mice were detected by ultrasound, and right ventricular hypertrophy index (RVHI) was measured; HE and Masson staining were used to observe the remodeling of pulmonary artery; Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) levels in serum was detected by ELISA; Western blotting was used to detect CX3CL1 and nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway-related protein expressions in lung of mice. **Results** Compared with control group, pulmonary artery blood flow velocity of mice in WT model group was significantly decreased ($P < 0.05$), RVHI was significantly increased ($P < 0.05$), right ventricular end-systolic diameter, end-systolic volume and output per stroke were increased ($P < 0.05$), right ventricular short axis shortening rate and ejection fraction were decreased ($P < 0.05$), and pulmonary arteriole remodeling was obvious. Compared with WT model group, pulmonary artery blood flow velocity of mice was increased by icariin ($P < 0.05$), RVHI, right ventricular end-systolic diameter, end-systolic volume and output per stroke were reduced ($P < 0.05$), right ventricular short axis shortening rate and ejection fraction were increased ($P < 0.05$), and pulmonary arteriole remodeling was significantly improved; IL-1 β and TNF- α levels in serum and CX3CL1 protein expression in lung tissue were decreased by icariin ($P < 0.05$), NF- κ B pathway related protein expressions were inhibited ($P < 0.05$). Compared with WT model group, pulmonary artery blood flow velocity, pulmonary arteriolar remodeling, and right ventricular hemodynamics in mice of CX3CL1^{-/-} model group were improved ($P < 0.05$), IL-1 β and TNF- α levels in serum were decreased ($P < 0.05$). After knockout of CX3CL1^{-/-}, ameliorating effect of icariin (20 mg/kg) on HPH mice was attenuated or even disappeared. **Conclusion** Icariin can improve HPH in mice through inhibiting inflammation mediated by CX3CL1.

Key words: icariin; chemokine C-X3-C motif ligand 1; inflammation; hypoxic pulmonary hypertension; mice

缺氧性肺动脉高压 (hypoxic pulmonary hypertension, HPH) 是由于肺泡广泛缺氧引起的以肺小动脉收缩、重构为病理特征的肺循环疾病, HPH 病程中伴有持续的炎症反应^[1-3]。趋化因子 C-X3-C 基元配体 1 (chemokine C-X3-C motif ligand 1, CX3CL1) 是 CX3C 亚族里的唯一成员, 包括溶解型和膜结合型, 既有趋化性蛋白的功能也有细胞黏附分子的功能, HPH 患者和模型动物血管内皮细胞 CX3CL1 及趋化因子 C-X3-C 基元受体 1 (chemokine C-X3-C motif receptor 1, CX3CR1) 表达上调, 且伴随巨噬细胞等炎症细胞的浸润, 促进了 HPH 血管炎症^[4-5]; 敲除 CX3CR1 可显著改善 HPH 模型的炎症反应和肺动脉平滑肌细胞增殖^[6]; 在野百合碱诱导的肺动脉高压模型大鼠中, 甾体类抗炎药地塞米松可通过下调肺组织 CX3CL1 和 CX3CR1 mRNA 的表达, 减少炎症细胞浸润, 改善肺动脉重构^[7], 表明 HPH 与 CX3CL1/CX3CR1 有关。淫羊藿苷是淫羊藿的主要活性成分, 具有益精气、坚筋骨、补腰膝、强心力之功效^[8]。本课题组前期研究证实淫羊藿苷能够降低野百合碱诱导大鼠平均肺动脉压, 改善小鼠 HPH^[9-10], 但作用机制仍未阐明。本研究采用缺氧诱导野生型 (wild type, WT) 和 CX3CL1^{-/-} 小鼠建立 HPH 模型, 探究淫羊藿苷抗 HPH 的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠, 8 周龄, 体质量 20~25 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (京) 2016-0002; 雄性 CX3CL1^{-/-} 小鼠 (8 周龄, 体质量 20~25 g) 由上海南方模式生物科技发展有限公司提供, 生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0010。所有小鼠均饲养于遵义医科大学基础药理教育部重点实验室 SPF 级动物实验室 [使用许可证号 SYXK (黔) 2014-003], 小鼠给予标准颗粒饲料喂养, 自由进食进水。动物实验经遵义医科大学动物实验伦理委员会审查批准 (批准号 [2018]2-128)。

1.2 药品与试剂

淫羊藿苷 (质量分数 $\geq 98.6\%$) 购自南通飞宇生物科技有限公司; CX3CL1 抗体、CX3CR1 抗体、p65 抗体、磷酸化 p65 (phosphorylated p65, p-p65) 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自英国 Abcam 公司; 磷酸化核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 抑制蛋白 (phosphorylated inhibitor of NF- κ B, p-I κ B) 抗体、I κ B 抗体购自美国 Santa cruz 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、HRP 标记的山

羊抗小鼠 IgG 抗体、BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Masson 染色试剂盒、牛血清白蛋白、山羊血清购自北京索莱宝科技有限公司; 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。

1.3 仪器

Vevo 2100 型小动物超声仪 (加拿大 Visualsonics 公司); Multiskan GO 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Chemi Dos Xps 型电泳仪凝胶成像分体系统 (美国 Bio-Rad 公司); TE2000-S 型显微镜和图像分析系统 (日本 Nikon 公司); GM-8000 型低氧仓 (日本 Tokaihit 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

将 40 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为对照组、WT 模型组和 WT+淫羊藿苷 (10、20 mg/kg) 组, 每组 10 只; 20 只雄性 CX3CL1^{-/-}小鼠分为 CX3CL1^{-/-}模型组和 CX3CL1^{-/-}+淫羊藿苷 (20 mg/kg) 组, 每组 10 只。所有小鼠同室饲养, 对照组吸入空气, 其余各组小鼠置于氧浓度为 10% 的低氧仓内, 以钠石灰和无水氯化钙吸收多余的 CO₂ 和水蒸气, 每天持续低氧 24 h, 连续 3 周。于低氧 7 d 后, 各给药组 ig 淫羊藿苷 (20 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 14 d。

2.2 小动物超声仪检测肺动脉血流速度与右心室血流动力学

末次给药 2 h 后, 小鼠 ip 10% 水合氯醛 (2 mg/kg) 麻醉, 脱毛, 涂抹耦合剂, 选择 MS400 探头 (25~40 Hz), PW Mode 检测小鼠肺动脉血流速度, M Mode 检测右心室短轴缩短率、射血分数、每搏输出量、收缩末期容积和收缩末期直径。

2.3 右心室肥厚指数 (right ventricular hypertrophy index, RVHI) 的测定

分离心脏, 去除心耳, 分离右心室壁, 分别称定右心室壁、左心室与室间隔的质量, 计算 RVHI。

$$RVHI = \text{右心室壁质量} / (\text{左心室质量} + \text{室间隔质量})$$

2.4 苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色检测小鼠肺小血管病理变化

取小鼠右肺下叶肺组织, 于 4% 多聚甲醛中固定后脱水, 经石蜡包埋、切片、脱蜡、HE 染色、封片等步骤, 倒置显微镜下观察肺小动脉形态学改变

并拍照。

切片经苏木素染色、盐酸乙醇分化、Masson 蓝色液返蓝、丽春红染色、弱酸处理、磷钼酸清洗、苯胺蓝染色、无水乙醇脱水、二甲苯透明、封片等步骤, 于倒置显微镜下观察肺小动脉纤维化情况并拍照。采用 ImageJ 软件计算管腔面积与血管截面积比值和胶原面积与血管截面积比值。

2.5 ELISA 法检测小鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 含量

小动物超声检测完成后, 在麻醉状态下进行小鼠眶静脉采血, 4 °C、3000 r/min 离心 5 min, 分离血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 IL-1 β 和 TNF- α 含量。

2.6 Western blotting 法检测小鼠肺组织 CX3CL1 和 NF- κ B 通路相关蛋白表达情况

取各组肺组织, 加入 RAPI 裂解液匀浆提取蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 95 °C 加热 5 min 使蛋白变性, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后分别加入 CX3CL1、CX3CR1、p65、p-p65、p-I κ B、I κ B 和 GADPH 抗体, 4 °C 孵育 12 h; 加入 HRP 标记的山羊抗兔/小鼠 IgG 抗体, 室温孵育 2 h, 加入 ECL 发光液, 用凝胶成像系统曝光成像, 采用 Quantity One 软件分析条带灰度。

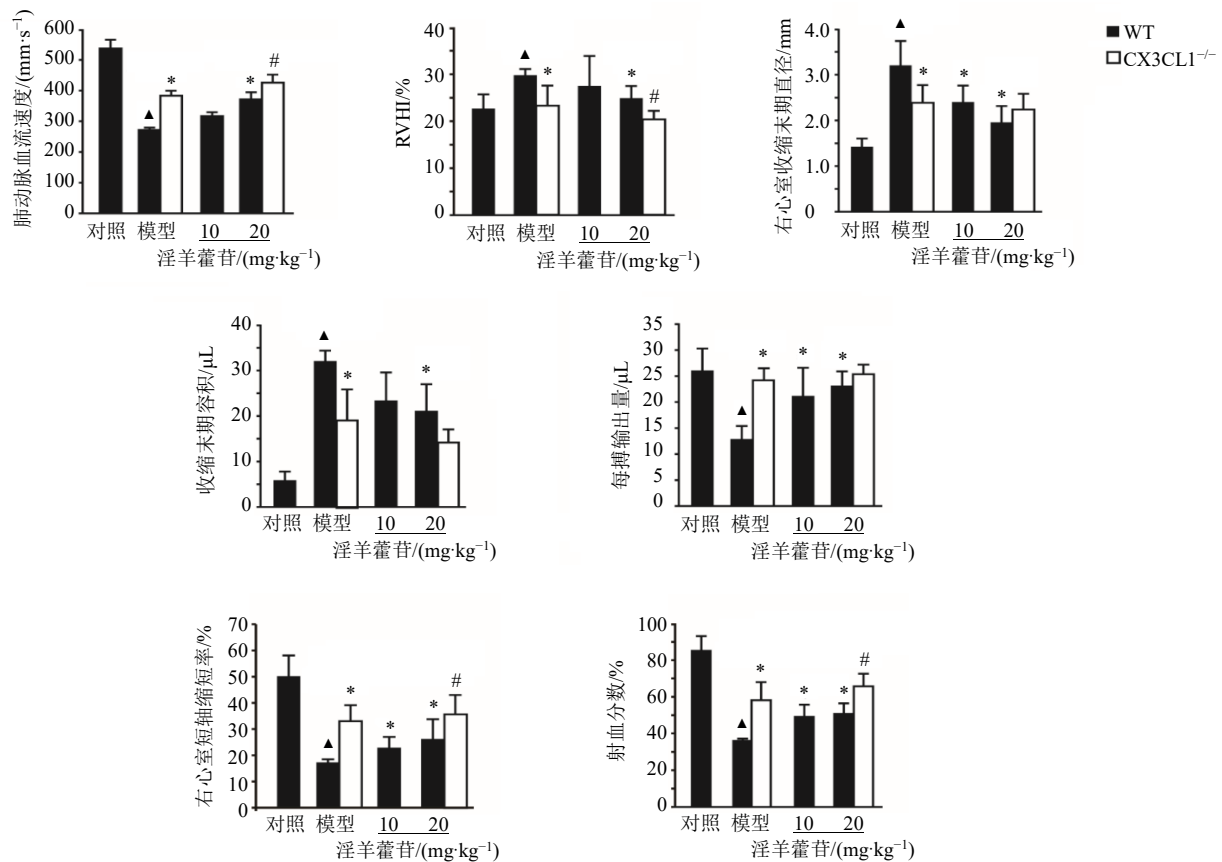
2.7 数据统计与分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析, 组间比较方差齐用 LSD 检验, 方差不齐用 Dunnett's T3 检验。

3 结果

3.1 淫羊藿苷改善 HPH 小鼠肺动脉血流速度和右心室血流动力学异常

如图 1 所示, WT 小鼠于 10% 氧浓度环境下持续低氧 21 d 后, 肺动脉血流速度明显降低 ($P < 0.05$), RVHI 增加 ($P < 0.05$), 右心室血流动力学明显异常, 右心室短轴缩短率、射血分数、每搏输出量显著降低 ($P < 0.05$), 收缩末期容积和收缩末期直径增加 ($P < 0.05$); 与对照组相比, CX3CL1^{-/-}模型组小鼠肺动脉血流速度、RVHI 以及右心室血流动力学也明显异常, 但其严重程度显著低于 WT 模型组; 淫羊藿苷 (10、20 mg/kg) 可不同程度地缓解 WT 和 CX3CL1^{-/-}模型小鼠肺动脉血流速度和右心室血流动力学异常, 但淫羊藿苷 (20 mg/kg) 对 CX3CL1^{-/-}模型小鼠各指标均未见显著影响, 表明淫羊藿苷改善 HPH 呈 CX3CL1 相关性。



与对照组比较: ▲ $P < 0.05$; 与 WT 模型组比较: * $P < 0.05$; 与 WT+淫羊藿苷 (20 mg·kg⁻¹) 组比较: # $P < 0.05$
▲ $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs WT model group; # $P < 0.05$ vs WT + icariin (20 mg·kg⁻¹) group

图 1 淫羊藿苷对 HPH 小鼠肺动脉血流速度、RVHI 和右心室血流动力学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 1 Effect of icariin on blood flow velocity of pulmonary artery, RVHI and hemodynamics of right ventricular in HPH mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.2 淫羊藿苷改善 HPH 小鼠肺血管重构

如图 2 所示, WT 和 CX3CL1^{-/-}模型组小鼠肺血管管壁显著增厚、管腔变窄, 并伴有大量胶原纤维沉积, 但后者血管重构程度明显低于前者。淫羊藿苷能够减少血管壁厚度, 缓解管腔变窄, 增大管腔面积与血管截面积比值, 并能减少肺血管周围胶原纤维的面积, 减小胶原面积与血管截面积比值。但淫羊藿苷对 CX3CL1^{-/-}模型组小鼠改善效果不及 WT 模型组明显, CX3CL1^{-/-}模型组和 CX3CL1^{-/-}+淫羊藿苷 (20 mg/kg) 组比较无显著差异。

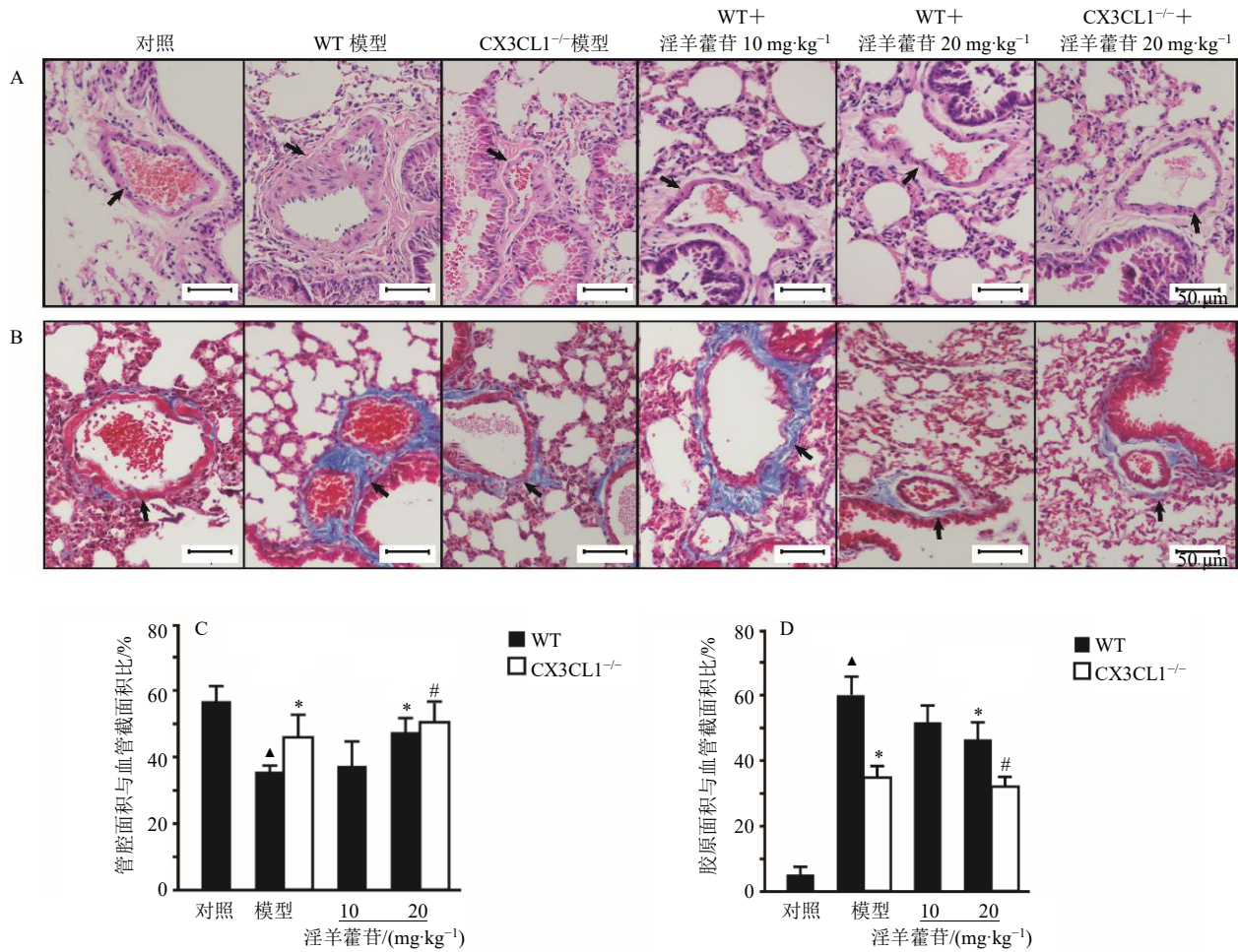
3.3 淫羊藿苷降低 HPH 小鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平

如图 3 所示, WT 模型组小鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平较对照组显著增高 ($P < 0.05$), 分别达 11、14 倍, CX3CL1 敲除后 IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 给予淫羊藿苷后, WT 小鼠 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$)。对比淫羊藿苷

处理的 CX3CL1^{-/-}与 WT 小鼠发现, 淫羊藿苷 (20 mg/kg) 能够降低 CX3CL1^{-/-}小鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平, 但其降低幅度远小于 WT 小鼠。

3.4 淫羊藿苷降低 HPH 小鼠肺组织 CX3CL1 和 NF- κ B 通路相关蛋白表达

如图 4 所示, WT 模型组小鼠肺组织 CX3CL1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 淫羊藿苷在缓解 HPH 小鼠病理改变的同时可降低 CX3CL1 蛋白表达水平, 淫羊藿苷 (20 mg/kg) 组具有显著差异 ($P < 0.05$)。WT 模型组小鼠肺组织 p-p65 和 p-I κ B 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 表明 NF- κ B 信号通路被激活, 敲除 CX3CL1 后显著抑制了 NF- κ B 信号通路的激活 ($P < 0.05$)。淫羊藿苷 (10、20 mg/kg) 对 HPH 小鼠肺组织 p-p65 和 p-I κ B 蛋白表达水平具有抑制作用, 但 CX3CL1^{-/-}模型组与 CX3CL1^{-/-}+淫羊藿苷 (20 mg/kg) 组无显著差异, 表明淫羊藿苷可以抑制 HPH 小鼠 NF- κ B 信号通路

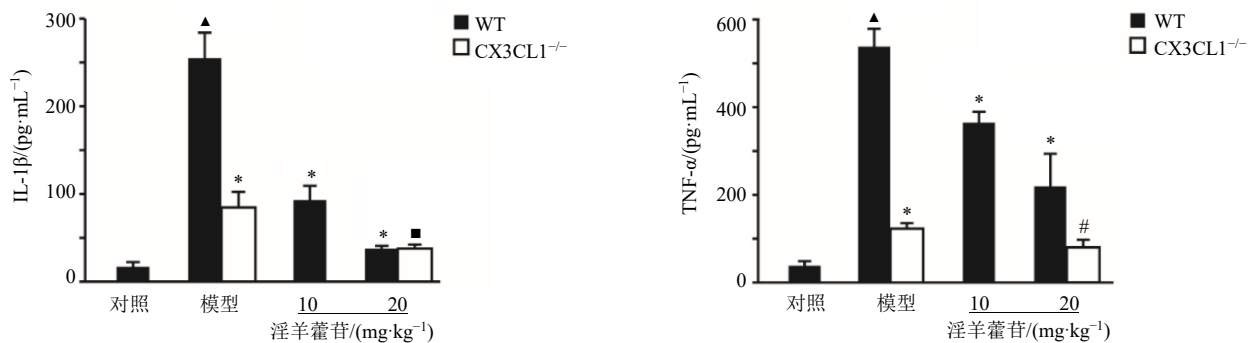


A-HE 染色 B-Masson 染色 C-HE 染色统计图 D-Masson 染色统计图 与对照组比较: [▲] $P < 0.05$; 与 WT 模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 WT+淫羊藿苷 (20 mg·kg⁻¹) 组比较: [#] $P < 0.05$

A-HE staining B-Masson staining C-HE staining statistical chart D-Masson staining statistical chart [▲] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs WT model group; [#] $P < 0.05$ vs WT + icariin (20 mg·kg⁻¹) group

图 2 淫羊藿苷对 HPH 小鼠肺动脉重构的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of icariin on pulmonary artery remodeling in HPH mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



与对照组比较: [▲] $P < 0.05$; 与 WT 模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 WT+淫羊藿苷 (20 mg·kg⁻¹) 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 CX3CL1^{-/-}模型组比较: [■] $P < 0.05$
[▲] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs WT model group; [#] $P < 0.05$ vs WT + icariin (20 mg·kg⁻¹) group; [■] $P < 0.05$ vs CX3CL1^{-/-} model group

图 3 淫羊藿苷对 HPH 小鼠血清 IL-1β 和 TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of icariin on IL-1β and TNF-α levels in serum of HPH mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

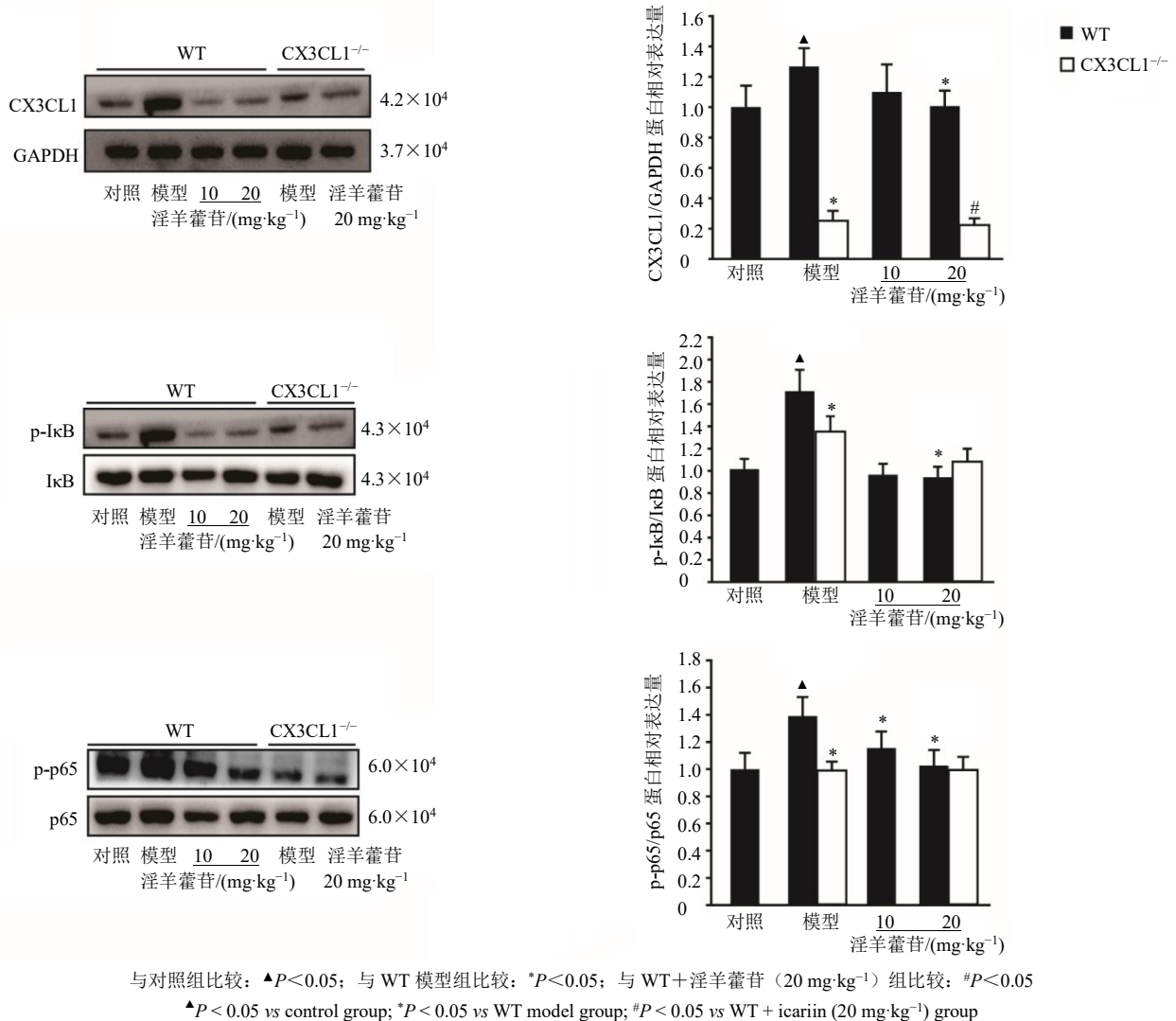


图 4 淫羊藿苷对 HPH 小鼠肺组织 CX3CL1 和 NF- κ B 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of icariin on CX3CL1 and NF- κ B pathway related protein expressions in lung of HPH mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

的激活, 敲除 CX3CL1 后淫羊藿苷对 NF- κ B 信号通路的抑制作用减弱。

4 讨论

HPH 是严重的肺循环疾病, 肺动脉紧张性的进行性增高和肺动脉重构是其主要的病理基础, 进行性增加的肺血管压力可加重右心室负荷和心力衰竭, 最终导致死亡^[11]。右心导管检查测定平均肺动脉压 (mean pulmonary artery pressure, mPAP) ≥ 25 mm Hg (1 mm Hg = 133 Pa) 是诊断肺动脉高压的金标准, 但采用右心导管术直接测定小鼠 mPAP 十分困难, 本研究采用小动物超声仪检测肺动脉血流速度和右心室血流动力学, 并结合右心室肥厚情况对 HPH 成模情况进行综合分析, 发现 WT 小鼠在含氧量为 10% 的低氧仓连续饲养 21 d 后肺小动脉管壁

肥厚、管腔狭窄, 肺动脉血流速度显著降低, 表明肺动脉阻力增高, 受此影响, 右心室每搏输出量、短轴缩短率和射血分数均显著降低, 而右心室收缩末期直径和收缩末期容积显著增高, 并导致了右心室压力负荷性的肥厚, 提示 HPH 模型建立成功。

淫羊藿苷是淫羊藿的主要有效成分, 药动学研究显示大鼠单次 *po* 给药后 1 h, 肺组织淫羊藿苷含量最高 (约为脑组织的 5 倍), 其分布特点更适用于治疗肺部疾病^[12]。近年来, 本课题组就淫羊藿苷抗肺动脉高压作用开展了系列研究, 证实淫羊藿苷能够显著改善野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压, 淫羊藿苷给药剂量为 80 mg/kg 时, mPAP 由 (53.5 ± 6.7) mm Hg 降低至 (31.6 ± 4.7) mm Hg, 降幅达 41%; 模型大鼠的存活率显著增高, 同时肺动脉重构特别

是血管中膜即平滑肌层也得到改善,管壁与血管截面积比值平均值由 49.9%降低至 26.5%^[9]。本研究采用 HPH 模型对淫羊藿苷改善肺动脉高压作用进行了重复验证,结果显示,淫羊藿苷能够改善 HPH 小鼠肺小动脉重构和右心室血流动力学异常,增加肺动脉血流速度,压力负荷性的右心室肥厚也明显缓解,进一步说明淫羊藿苷对 HPH 具有改善作用。

尽管肺动脉高压的发病机制并未完全阐明,但已有大量研究发现炎症反应是导致肺动脉重构的重要因素^[13]。在 HPH 氧供应不足导致受损的内皮细胞释放大量的细胞因子和趋化因子入血或扩散到周边组织,与循环中的单核细胞或肺泡巨噬细胞表面的相应受体结合,将其募集到损伤部位,趋化因子 CX3CL1 及其受体 CX3CR1 在炎症细胞募集过程发挥重要作用^[14]。致炎因素或炎症因子主要通过 NF- κ B 信号通路上调 CX3CL1 的表达,同时, CX3CL1 又是 NF- κ B 信号通路的激活物,二者相互作用,迅速放大炎症反应^[15]。CX3CL1 是 CX3C 趋化因子亚家族的唯一成员,具有溶解型和膜结合型 2 种形式,当受到致炎因素刺激时去整合素-金属蛋白酶 17 (a disintegrin and metalloproteinase 17, ADAM17) 被诱导并催化生成大量的溶解型和膜结合型,二者通过其高亲和受体 CX3CR1 相互作用发挥其生物学功能,膜结合型主要在血管内皮细胞表达,介导炎症细胞黏附,溶解型具有强烈的趋化功能,介导 CX3CR1 阳性细胞的趋化^[16]。在肺动脉高压患者和模型动物内皮细胞 CX3CL1 和巨噬细胞 CX3CR1 表达上调^[17]。Perros 等^[18]研究发现,大鼠 ip 野百合碱 12 h 后 CX3CL1/CX3CR1 表达便达到高峰,且始终维持在高表达状态, CX3CL1^{-/-}小鼠 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 水平明显降低,且肺血管壁炎症细胞数量减少,表明 CX3CL1 介导炎症反应与肺动脉高压关系密切^[14]。本研究发现敲除 CX3CL1 显著改善缺氧所致的肺小动脉重构、肺动脉血流速度和右心室血流动力学异常,并且 CX3CL1^{-/-}小鼠血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平明显低于 WT 小鼠, NF- κ B 活化被抑制,表明 CX3CL1 介导的炎症反应参与了 HPH 的发展过程,与文献报道^[14]一致。

已有大量研究发现淫羊藿苷具有较好的抗炎作用。淫羊藿苷能够通过抑制 NF- κ B 信号通路下调 TNF- α 、IL-6、环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 和诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide

synthetase, iNOS) mRNA 表达,缓解脂多糖诱导的肺部炎症^[8],同时淫羊藿苷可抑制 NF- κ B 活化和炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达改善缺血再灌注脑损伤模型和痴呆模型的炎症反应^[19],但淫羊藿苷改善 HPH 是否与 CX3CL1 有关尚不清楚。为此,本研究首先检测了淫羊藿苷对 WT 小鼠炎症相关指标的影响,发现淫羊藿苷能够显著降低血清中 IL-1 β 和 TNF- α 水平和肺组织 CX3CL1 蛋白表达水平,抑制 NF- κ B 信号通路的活化,初步表明淫羊藿苷抗 HPH 与 CX3CL1 有关。然后比较了淫羊藿苷 (20 mg/kg) 对 CX3CL1^{-/-}小鼠和 WT 小鼠 HPH 模型改善作用的差异,一方面, CX3CL1 敲除后淫羊藿苷改善 HPH 的作用基本消失;另一方面,与改善 WT 小鼠 HPH 模型作用相比,淫羊藿苷对 CX3CL1^{-/-}小鼠改善的幅度显著降低,表明淫羊藿苷改善 HPH 与 CX3CL1 相关。综上所述,淫羊藿苷改善 HPH 与抑制 CX3CL1 介导的炎症反应有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 颜涵,郑秋玉,杨凯,等.低氧诱导因子在肺动脉高压发病中的作用及机制[J].中华结核和呼吸杂志,2021,44(4):396-399.
- [2] Kemdem A, Lemaitre F, Lovat R, et al. Acute hypoxic pulmonary hypertension associated with right heart failure [J]. *Acta Cardiol*, 2020, 75(6): 544-548.
- [3] Tudor R M. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367(3): 643-649.
- [4] Xiao L J, Chen Y Y, Lin P, et al. Hypoxia increases CX3CR1 expression via HIF-1 and NF- κ B in androgen-independent prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(5): 1827-1836.
- [5] Zhang Y, Yan J, Hu R, et al. Microglia are involved in pruritus induced by DNFB via the CX3CR1/p38 MAPK pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(3): 1023-1033.
- [6] Zhang J L, Hu H B, Palma N L, et al. Hypoxia-induced endothelial CX3CL1 triggers lung smooth muscle cell phenotypic switching and proliferative expansion [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(10): L912-L922.
- [7] Wang W, Wang Y L, Chen X Y, et al. Dexamethasone attenuates development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(5): 3277-3284.
- [8] 路宇仁,陈映冰,崔元璐,等.淫羊藿苷药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(17):209-220.

- [9] Li L S, Luo Y M, Liu J, *et al.* Icariin inhibits pulmonary hypertension induced by monocrotaline through enhancement of NO/cGMP signaling pathway in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 7915415.
- [10] 李铭铭, 熊乙林, 罗云梅, 等. 淫羊藿苷抗缺氧诱导小鼠肺动脉高压的作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2020, 39(4): 235-240.
- [11] 冯华焯. 慢性缺氧性肺动脉高压大鼠模型肺静脉系统结构和功能改变 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2021, 44(2): 107.
- [12] Xu S J, Yu J J, Zhan J J, *et al.* Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism study of icariin in rat [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 4684962.
- [13] Rudyk O, Aaronson P I. Redox regulation, oxidative stress, and inflammation in group 3 pulmonary hypertension [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1303: 209-241.
- [14] Amsellem V, Abid S, Poupel L, *et al.* Roles for the CX3CL1/CX3CR1 and CCL2/CCR2 chemokine systems in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(5): 597-608.
- [15] Zhuang Q, Ou J, Zhang S, *et al.* Crosstalk between the CX3CL1/CX3CR1 axis and inflammatory signaling pathways in tissue injury [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(8): 844-854.
- [16] Cormican S, Griffin M D. Fractalkine (CX3CL1) and its receptor CX3CR1: A promising therapeutic target in chronic kidney disease? [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 664202.
- [17] Liu W M, Jiang L B, Bian C, *et al.* Role of CX3CL1 in diseases [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2016, 64(5): 371-383.
- [18] Perros F, Dorfmueller P, Souza R, *et al.* Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2007, 29(5): 937-943.
- [19] 刘昌雄, 黄雄杰, 肖湘君, 等. 淫羊藿苷对大鼠皮瓣缺血再灌注损伤后炎症反应的抑制作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(6): 532-535.

[责任编辑 李亚楠]