

基于 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路的羟基红花黄色素 A 抑制血管紧张素 II 诱导的血管外膜成纤维细胞迁移研究

李伟慷¹, 崔清卓^{1#}, 郑玉光¹, 张一昕³, 郭炳颜⁴, 赵京山^{1,2,3*}, 刘琳^{2*}

1. 河北中医学院药学院, 河北省中药炮制创新中心, 河北 石家庄 050020

2. 河北中医学院基础医学院, 河北 石家庄 050020

3. 河北省中药资源利用与质量评价国际联合研究中心, 河北 石家庄 050020

4. 河北医科大学第二附属医院, 河北 石家庄 050020

摘要: 目的 基于通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 通路探讨羟基红花黄色素 A (hydroxysafflower yellow A, HSYA) 抑制血管紧张素 II (angiotensin II, ANG II) 诱导的血管外膜成纤维细胞 (vascular adventitial fibroblasts, VAFs) 迁移作用。方法 组织贴块法培养大鼠胸主动脉 VAFs, 免疫荧光实验检测细胞中 Vimentin 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 蛋白表达, 鉴定 VAFs。设置对照组、ANG II 组、HSYA 组、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 组和 LPS+HSYA 组, 对照组 VAFs 给予培养基正常培养, 其余各组给予 1×10^{-7} mol/L ANG II 处理 24 h, 然后更换为含 100 nmol/L LPS 或 40 μ mol/L HSYA 的培养基, 继续培养 24 h, 划痕实验检测 VAFs 的迁移能力; CCK-8 法检测细胞活力; Western blotting 检测 TLR4、NF- κ B 和 p-NF- κ B 蛋白表达; 免疫荧光实验检测 NLRP3 炎症小体相关蛋白 NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 及凋亡斑点样蛋白 (apoptotic spot-like protein, ASC) 共表达情况。结果 免疫荧光结果证实 VAFs 培养成功。划痕实验结果显示, ANG II 能够显著增加细胞的迁移率 ($P < 0.01$), LPS 刺激进一步提高 VAFs 的迁移率 ($P < 0.01$), HSYA 能够抑制 ANG II 及 LPS 对 VAFs 迁移的促进作用 ($P < 0.01$)。Western blotting 结果显示, ANG II 显著提高细胞内 TLR4 和 p-NF- κ B 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.001), 并促进 NF- κ B 入核 ($P < 0.001$); HSYA 显著抑制 ANG II 诱导的细胞内 TLR4 和 p-NF- κ B 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 并抑制 NF- κ B 入核 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。免疫荧光实验结果表明, ANG II 及 LPS 促进 NLRP3 炎症小体相关蛋白 NLRP3、Caspase-1 及 ASC 共表达, HSYA 可减少 ANG II 及 LPS 诱导 NLRP3、Caspase-1 及 ASC 蛋白共表达, 抑制 NLRP3 炎症小体的组装。结论 HSYA 通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路减少 ANG II 诱导的 VAFs 迁移。

关键词: 羟基红花黄色素 A; 血管外膜成纤维细胞; 血管紧张素 II; 脂多糖; TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)05-1478-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.014

Inhibitory effect of hydroxylsafflower yellow A on migration of vascular adventitial fibroblasts induced by angiotensin II based on TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway

LI Wei-kang¹, CUI Qing-zhuo¹, ZHENG Yu-guang¹, ZHANG Yi-xin³, GUO Bing-yan⁴, ZHAO Jing-shan^{1,2,3}, LIU Lin²

1. School of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Hebei TCM Processing Innovation Center, Shijiazhuang 050020, China

收稿日期: 2022-11-13

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (H2020423061); 河北省高等学校科学技术研究项目重点计划项目 (ZD2017056); 河北省重点研发计划项目中医药创新专项 (223777149D); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2017009, 2022080); 河北省教育厅青年基金资助项目 (QN2022092)

作者简介: 李伟慷, 硕士研究生, 研究方向为活血化瘀中药作用机制。E-mail: 13832172031@139.com

*通信作者: 赵京山, 教授, 研究方向为心血管疾病分子生物学、中药药效物质及作用机制。Tel: (0311)89926035 E-mail: zjs10@sina.com

刘琳, 博士, 副教授, 研究方向为重要系统脂代谢细胞生物学。E-mail: liulin1234@163.com

#共同第一作者: 崔清卓, 硕士研究生, 研究方向为活血化瘀中药作用机制。E-mail: 18731186853@163.com

2. Basic Medical College, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050020, China
3. International Joint Research Center on Resource Utilization and Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine of Hebei Province, Shijiazhuang 050020, China
4. The Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050020, China

Abstract: Objective To investigate the effect of hydroxysafflower yellow A (HSYA) on migration of adventitial fibroblasts (VAFs) induced by angiotensin II (ANG II) based on Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B)/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) pathway. **Methods** VAFs were cultured from rat thoracic aorta by tissue patch method, protein expressions of Vimentin and α -smooth muscle actin (α -SMA) was detected by laser confocal assay for identification of VAFs. Control group, ANG II group, HSYA group, lipopolysaccharide (LPS) group and LPS + HSYA group were set up. VAFs in control group were given normal culture medium, and the other groups were given 1×10^{-7} mol/L ANG II for 24 h, and then changed to contain 100 nmol/L LPS or 40 μ mol/L HSYA medium, continue to culture for 24 h, and migration ability of VAFs was tested by scratch test; CCK-8 method was used to detect cell viability; Western blotting was used to detect TLR4, NF- κ B and p-NF- κ B protein expression; The co-expression of NLRP3 inflammatory corpuscle-associated protein NLRP3, cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1) and apoptotic spot-like protein (ASC) were detected by immunofluorescence assay. **Results** The results of immunofluorescence confirmed that VAFs were successfully cultured. The scratch test results showed that ANG II could significantly increase the cell migration rate ($P < 0.01$), LPS stimulation can further increase the migration of VAFs ($P < 0.01$), HSYA can inhibit the promotion of ANG II and LPS on VAFs migration ($P < 0.01$). Western blotting results showed that ANG II significantly increased intracellular TLR4 and p-NF- κ B expressions ($P < 0.05, 0.001$), and promoted NF- κ B entry ($P < 0.001$); HSYA significantly inhibited the intracellular TLR4 and p-NF- κ B expressions induced by ANG II ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and inhibited NF- κ B entered the nucleus ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The results of immunofluorescence test showed that ANG II and LPS promoted the co-expression of NLRP3, Caspase-1 and ASC proteins associated with NLRP3 inflammatory bodies, and HSYA could reduce the co-expression of NLRP3, Caspase-1 and ASC proteins induced by ANG II and LPS, and inhibited the assembly of NLRP3 inflammatory bodies. **Conclusion** HSYA can inhibit TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway to reduce the migration of VAFs induced by ANG II.

Key words: hydroxysafflower yellow A; vascular adventitial fibroblasts; angiotensin II; lipopolysaccharide; TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是冠心病、卒中、心肌梗死等多种心血管疾病的主要原因,也是造成全球人口死亡最主要的病因。AS 表现为细胞和富含脂质的斑块沉积于内膜下,浸润的白细胞和巨噬细胞促进血管炎症、斑块生长和破裂,最终导致动脉血栓形成,堵塞动脉血管。因此,传统理论认为 AS 源于内皮损伤,是“由内到外”的反应过程。然而,支架置入或球囊血管成形术损伤内皮后,在新生内膜产生之前,血管外膜成纤维细胞 (vascular adventitial fibroblasts, VAFs) 早已开始增殖并迁移到内膜区域,分泌细胞外基质蛋白产生新生内膜^[1]。近一半的新生内膜细胞来源于增殖的外膜成纤维细胞,表明动脉外膜参与血管重构反应。因此,越来越多的研究证实,AS 的发生发展可能是“由外而内”的过程^[1],构成外膜的 VAFs 发挥着重要作用。中医对心血管疾病的研究在不断深入,吴以岭院士的络脉学说为心血管疾病的防治提供了理论依据,其核心理论为营卫承制调平。营气与血管

内膜,卫气与血管外膜具有相关性。营行脉中,卫行脉外,卫外固护,阻邪于外,营卫调和,才能发挥血管舒缩功能;反之,“营卫不通,血凝不流。”心血管病在中医中归属“胸痹”的范畴,卫气失常是胸痹的始动因素,卫失固护,腠理疏松,痰瘀邪气入脉,久而脉积^[2],这与近年来医学对血管外膜的研究成果相一致。

炎症是 AS 及其相关的心血管疾病的主要驱动因素,抑制炎症能够治疗 AS。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的单克隆抗体 canakinumab 可降低患者心血管事件复发的风险^[3]。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症小体由 NLRP3、凋亡斑点样蛋白 (apoptotic spot-like protein, ASC) 及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 组成,ASC 可以通过与 pro Caspase-1 结合激活 Caspase-1,进而促进 IL-1 β 、IL-18 及下游炎症通路的激活^[4]。Toll

样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 及核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 为 NLRP3 炎性小体的上游分子。研究表明, TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路在心肌缺血/再灌注损伤及心肌损伤中发挥重要作用^[5-6]。然而, TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路在血管重塑及 AS 中对血管外膜的作用有待进一步研究。

心血管疾病在中医中统称为“胸痹”, 常以活血化瘀药治疗。中医认为胸痹主要病位在心和血脉, 血液浓稠、凝固, 心脉瘀阻而“胸痹”, 当以活血化瘀、宣痹通脉。红花是我国应用广泛的活血化瘀药, 红花及其水提物常用于辅助治疗冠心病、脑梗死、冠状 AS。羟基红花黄色素 A (hydroxylsafflower yellow A, HSYA) 是红花的主要活性成分, 在心血管疾病中发挥重要保护作用^[7-8]。研究发现, HSYA 能够通过 AMP 依赖的蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) /NF- κ B/NLRP3 信号通路抑制支气管炎, 从而减轻小鼠的哮喘症状^[9], 还可通过抑制 NLRP3 炎症小体激活保护心肌缺血/再灌注损伤^[10]。课题组前期研究发现, HSYA 能够通过调控自噬抑制血管紧张素 II (angiotensin II, ANG II) 诱导的 VAFs 迁移, 改善血管重塑^[11]。然而, HSYA 在 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路中的作用目前尚未被研究。本研究主要探讨 HSYA 是否通过调控 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路抑制 ANG II 诱导的 VAFs 迁移, 为 HSYA 改善血管重塑及治疗 AS 提供实验基础和理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 160~200 g, 6 周龄, 购自河北省实验动物中心, 动物合格证号 IP08169。动物饲养于河北中医学院动物房, 遵循 SPF 级动物饲养条件, 环境温度稳定为 24 °C, 相对湿度为 45%, 通风, 12 h/12 h 光照/黑暗交替, 自由饮食。动物实验遵循实验动物护理原则, 并经河北中医学院动物保护委员会批准 (批准号 DWLL202203044)。

1.2 药品与试剂

羟基红花黄色素 A (批号 2021100361, 质量分数为 99%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 批号 2022060581)、血管紧张素 II (批号 2022031156) 购自北京索莱宝科技有限公司; DMEM/F12 培养基 (批号 2022011271) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 2021051623) 购自杭州四

季青生物科技有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 兔抗大鼠抗体 (批号 2022061362) 购自英国 Abcam 公司; α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 兔抗大鼠抗体 (批号 2022040511)、波形蛋白 (Vimentin) 兔抗大鼠抗体 (批号 CY5134)、NLRP3 兔抗大鼠抗体 (批号 2022030316)、Caspase-1 兔抗大鼠抗体 (批号 202205187)、HRP 标记的 IgG 二抗 (批号 2022040315)、山羊抗兔 488 荧光二抗 (批号 2022032619)、山羊抗兔 594 荧光二抗 (批号 2022050106) 购自上海泊湾生物科技有限公司; ASC 兔抗大鼠抗体 (批号 2022020817) 购自美国 Affinity Biosciences 公司; TLR4 抗体、NF- κ B 抗体、p-NF- κ B 抗体、核质蛋白提取试剂盒 (批号 2022180627) 购自上海泊湾生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒 (批号 2022060721) 购自上海圣尔生物有限公司。

1.3 仪器

SW-CJ-2FD 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 311 型细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); VICTOR Nivo 型多功能微孔读数仪 (德国 Perkin Elmer 公司); ECLIPSE Ti2 型倒置相差显微镜、ECLIPSE TS2 型荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); 5804 型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 1645050 型电泳、电转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); Fusion FX5 Spectra 型多功能成像系统 (法国 Vilber 公司)。

2 方法

2.1 原代 VAFs 培养

大鼠 ip 25%乌拉坦 (10 mL/kg) 麻醉, 固定, 75%乙醇消毒, 打开胸腔, 取出胸主动脉。PBS 清洗主动脉后, 去除血管外膜周围的脂肪组织, 纵切面剪开血管, 清洗管腔, 去除血管内皮细胞和中层平滑肌细胞, 将剩余的血管外膜剪成小块 (1 mm²/块), 用含 15%胎牛血清的完全培养基贴壁培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

组织贴壁培养 1 周后, 用 0.25%胰酶消化组织贴块周围的细胞, 待细胞由梭形变圆时, 去除胰酶, 并用培养基终止消化过程。收集细胞悬液, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 获得 P0 代 VAFs。细胞按 1:3 传至 P3 代, 获得实验用 VAFs。通过免疫荧光实验鉴定 VAFs。

2.2 ANG II 及 HSYA 的量效、时效关系确定

将细胞按 3000 个/孔接种于 96 孔板, 待细胞处

于对数生长期时,在无血清的培养基中培养 12 h,然后添加 100 μL 含不同浓度梯度的 ANG II (0 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} mol/L) 或 HSYA (0 、 5 、 10 、 20 、 40 、 80 、 $160 \mu\text{mol/L}$) 的培养基刺激细胞,并设置对照组(无细胞培养基),细胞继续培养 24 h,采用 CCK-8 法检测细胞活力。确定 ANG II 及 HSYA 作用浓度后,将细胞接种于 96 孔板,接种密度和培养条件相同。细胞饥饿刺激后,将 ANG II 或 HSYA 的作用时间设置为 0 、 12 、 24 、 48 h,并设置对照组,采用倒序给药法对细胞给予 ANG II 或 HSYA 刺激。最后一次给药即为 0 h,给药结束后,CCK-8 法检测细胞活力,平行测定 6 次,实验重复 3 次,取平均值。

2.3 CCK-8 法测定 VAFs 活力

将对数生长期的细胞接种于 96 孔板,待细胞稳定生长时,用无血清培养基培养 12 h,给予 ANG II 或 HSYA 刺激,每组设置 6 个复孔,继续培养 24 h,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后,酶标仪检测 490 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞活力。实验重复 3 次。

2.4 Western blotting 检测 ANG II 诱导的 VAFs 中 TLR4 和 NF- κB 蛋白表达

VAFs 以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,待细胞对数生长后,设置对照组、ANG II 组和 HSYA (20 、 40 、 $60 \mu\text{mol/L}$) 组,对照组给予培养基正常培养,其余各组给予 1×10^{-7} mol/L ANG II 处理 24 h 构建 ANG II 诱导的 VAFs 迁移模型。然后更换为含不同浓度 HSYA 的培养基,继续培养 24 h。收集各组细胞,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。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,用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加入二抗孵育后,利用化学发光法将蛋白印迹显色。

2.5 免疫荧光实验

VAFs 以 1×10^4 个/孔接种于放置无菌爬片的 24 孔板,培养 48 h。设置对照组、ANG II 组、HSYA 组、LPS 组和 LPS+HSYA 组,对照组给予培养基正常培养,其余各组给予 1×10^{-7} mol/L ANG II 处理 24 h 构建 ANG II 诱导的 VAFs 迁移模型。然后更换为含 100 nmol/L LPS 或 40 $\mu\text{mol/L}$ HSYA 的培养基,继续培养 24 h。取出爬片,使用 0.25% Triton X 100 打孔,滴加 37 $^{\circ}\text{C}$ 山羊血清封闭 30 min,滴加兔抗鼠 NLRP3、Vimentin、 α -SMA、ACS 抗体 ($1:200$),

37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;滴加山羊抗兔 594 荧光二抗,避光封闭 30 min,滴加 DAPI 封片,于荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 划痕实验

VAFs 以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,待细胞对数生长,更换无血清培养基培养 12 h 后,用无菌枪头在细胞上划线,按“2.5”项下方法分组,LPS 提前 3 h 预处理细胞,再加入相应浓度的 ANG II 和 HSYA。拍照记录给药 0 h 细胞状态,更换为含 15% 胎牛血清的完全培养基,继续培养 24 h,随机选取 3 个划痕视野拍照记录 24 h 细胞状态,计算细胞迁移率。

迁移率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度

2.7 统计学分析

采用 Graphpad Prism 5 软件对实验数据进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,One-way ANOVA 用于多组比较分析, t 检验用于两两比较分析。

3 结果

3.1 原代 VAFs 的形态及鉴定

VAFs 形态为梭形,大鼠胸主动脉血管外膜组织贴块爬出的细胞形态符合 VAFs (图 1-A)。免疫荧光染色检测 VAFs 的标志蛋白 Vimentin 及血管平滑肌细胞的标志蛋白 α -SMA,如图 1-B 所示,Vimentin 呈阳性表达,未见 α -SMA 表达,进一步证实 VAFs 培养成功。

3.2 ANG II 的剂量及作用时间确定

利用 CCK-8 法检测 ANG II 处理 VAFs 后细胞活力的变化,确定 ANG II 的作用浓度和刺激时间。如图 2 所示, 1×10^{-7} mol/L ANG II 促进细胞生长的

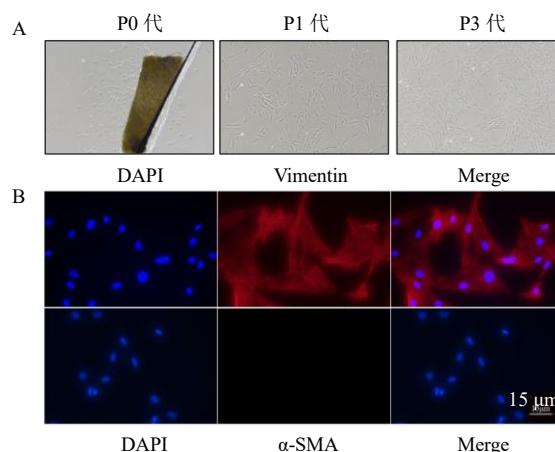


图 1 VAFs 形态 (A, $\times 100$) 及 α -SMA、Vimentin 蛋白表达 (B, $\times 400$)

Fig. 1 Morphology (A, $\times 100$), α -SMA and Vimentin protein expressions (B, $\times 400$) of VAFs

作用最强 ($P < 0.01$), 因此, 选用 1×10^{-7} mol/L 的 ANG II 进行后续实验。进一步的作用时效结果显示, ANG II 的作用时效呈钟形, 即细胞活力随着作用时间增加显著增强, 24 h 作用最强 ($P < 0.01$), 24 h 后随时间延长细胞活力逐渐降低, 因此后续 ANG II 作用时间选择 24 h。

3.3 HSYA 的剂量及作用时间确定

利用 CCK-8 法检测 HSYA 处理 VAFs 后细胞活力的变化, 确定 HSYA 的作用浓度和刺激时间, 如图 3 所示, HSYA 能够显著抑制 VAFs 活力 ($P <$

0.05、0.01), 当作用浓度达到 $40 \mu\text{mol/L}$, 细胞抑制率达到 50%, 当作用浓度达到 $80 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞出现萎缩。因此, 选用 $40 \mu\text{mol/L}$ 的 HSYA 进行后续实验。进一步的作用时效结果显示, 随着 HSYA 作用时间延长至 24 h, 细胞活力显著下降 ($P < 0.01$); 继续延长至 48 h, 细胞活力下降 50%, 但出现皱缩, 因此后续 HSYA 作用时间选择 24 h。

3.4 HSYA 抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路

如图 4 所示, 与对照组比较, ANG II 组 TLR4 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), p-NF- κ B 和核

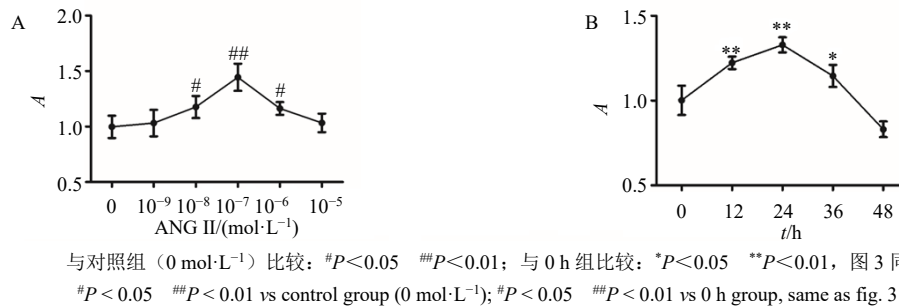


图 2 ANG II 对 VAFs 活力的量效 (A) 和时效 (B) 关系 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Dose-effect (A) and time-dependent (B) of ANG II on cell viability of VAFs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

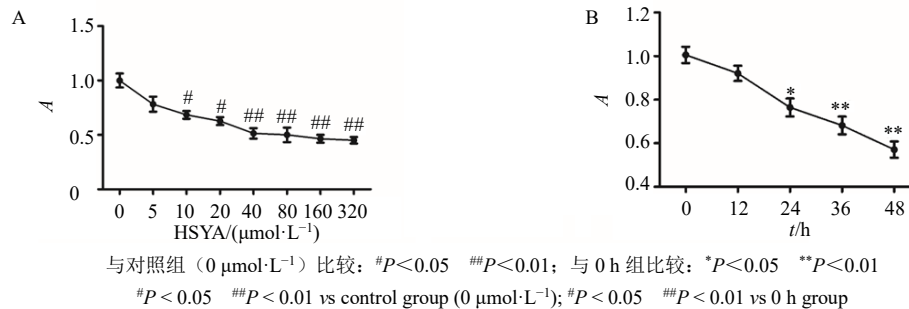


图 3 HSYA 对 VAFs 活力的量效 (A) 和时效 (B) 关系 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Dose-effect (A) and time-dependent (B) of HSYA on cell viability of VAFs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

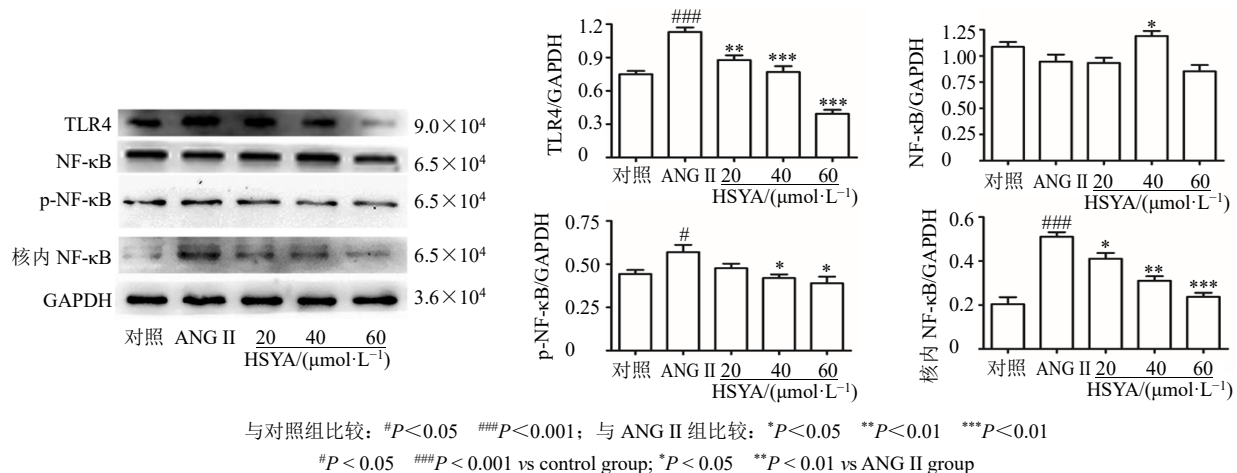


图 4 HSYA 抑制 ANG II 诱导的 VAFs 中 TLR4、NF- κ B 和 p-NF- κ B 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 4 HSYA inhibited the expression of TLR4, NF- κ B and p-NF- κ B protein expressions ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

内 NF- κ B 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)；与 ANG II 组比较，HSYA 组 TLR4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)，HSYA (40、60 μ mol/L) 组 p-NF- κ B 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，HSYA 各剂量组核内 NF- κ B 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，表明 HSYA 能够抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路，并且可以抑制 NF- κ B 的磷酸化和入核。

3.5 HSYA 抑制 NLRP3 和 ASC 共表达

如图 5 所示，与对照组比较，ANG II 组 NLRP3 和 ASC 荧光强度增加，NLRP3 和 ASC 共表达增加，提示 ANG II 促进 NLRP3 炎症小体激活和组装。与 ANG II 组比较，HSYA 组 NLRP3 和 ASC 荧光强度减弱，NLRP3 和 ASC 共表达减少，表明 HSYA 能够抑制 NLRP3 炎症小体的组装和激活。

3.6 HSYA 抑制 ANG II 及 LPS 诱导的 VAFs 迁移

LPS 能够激活 TLR4/NF- κ B 信号通路，课题组前期研究发现 HSYA 能够抑制 ANG II 诱导的 VAFs 的迁移^[11]。为了确定 HSYA 抑制 VAFs 的迁移作用与 TLR4/NF- κ B 有关，在 ANG II 诱导的 VAFs 迁移

模型上对细胞进行 LPS 刺激，通过划痕实验检测细胞迁移情况，如图 6 所示，与对照组比较，ANG II 组细胞迁移率显著增加 ($P < 0.01$)；与 ANG II 组比较，HSYA 组细胞迁移率显著降低 ($P < 0.01$)，LPS 组细胞迁移率增加；与 LPS 组比较，LPS+HSYA 组细胞迁移率显著降低 ($P < 0.01$)，表明 HSYA 能够逆转 LPS 对 VAFs 迁移的促进作用。

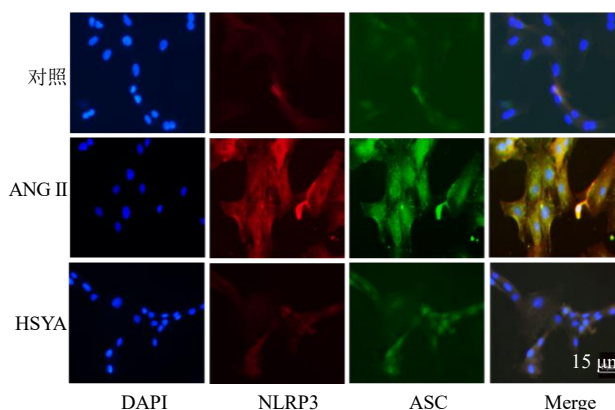
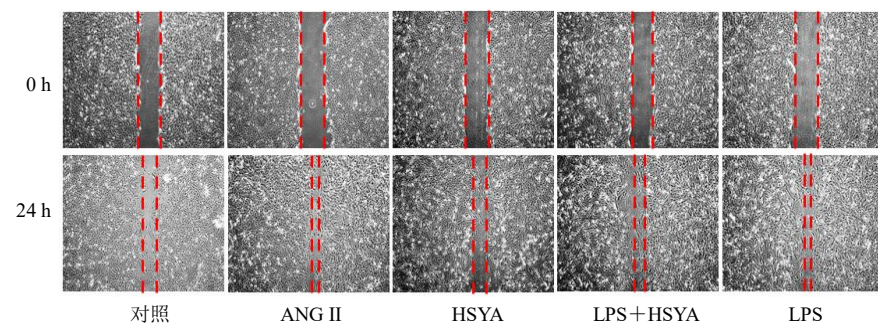


图 5 HSYA 抑制 NLRP3 和 ASC 共表达 ($\times 400$)

Fig. 5 HSYA inhibited the co-expression of NLRP3 and ASC ($\times 400$)



与对照组比较：## $P < 0.01$ ；与 ANG II 组比较：** $P < 0.01$ ；与 LPS 组比较：&& $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs ANG II group; && $P < 0.01$ vs LPS group

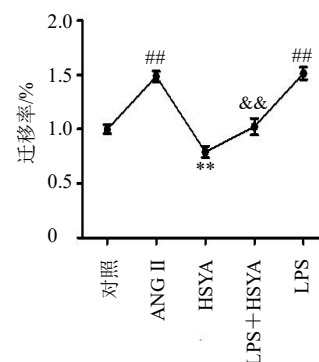
图 6 HSYA 对 LPS 诱导的 VAFs 迁移的作用 ($\times 40$, $\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 6 Effect of HSYA on LPS-induced VAFs migration ($\times 40$, $\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

3.7 HSYA 抑制 LPS 诱导的 VAFs 中 NLRP3 和 ASC 共表达

为了进一步确定 HSYA 可通过调控 TLR4/NF- κ B 通路抑制 NLRP3 炎症小体的激活，检测 LPS 刺激的 VAFs 细胞中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的共表达。如图 7 所示，与对照组比较，ANG II 组 NLRP3 和 ASC 蛋白共表达增加；与 ANG II 组比较，HSYA 组 NLRP3 和 ASC 蛋白共表达降低，LPS 组 NLRP3 和 ASC 蛋白共表达增加；与 LPS 组比较，LPS+

HSYA 组 NLRP3 和 ASC 蛋白共表达降低，HSYA 逆转了 LPS 对 VAFs 中 Caspase-1 和 ASC 的共表达，表明 HSYA 靶向抑制 NLRP3 炎症小体组装。LPS 为 TLR4/NF- κ B 通路及 NLRP3 炎症小体的激活的上游刺激物质，能够激活 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路，HSYA 能够抑制 LPS 刺激的 NLRP3 炎症小体的组装及 VAFs 的迁移。以上结果表明 HSYA 通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路抑制 LPS 诱导 NLRP3 炎症小体激活。



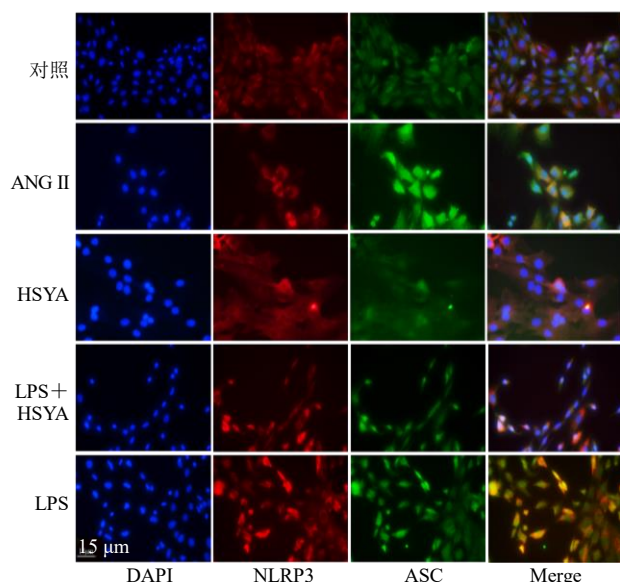


图 7 HSYA 对 LPS 诱导的 NLRP3 和 ASC 共表达的作用 ($\times 40$)

Fig. 7 Effect of HSYA on LPS-induced co-expression of NLRP3 and ASC ($\times 40$)

4 讨论

动脉血管由以内皮细胞为主的内膜、以血管平滑肌细胞为主的中膜以及富含胶原纤维的外膜组成。内皮细胞和血管平滑肌细胞已受到血管生物学家的广泛关注，而构成外膜的主要细胞类型——外膜成纤维细胞在很大程度上被忽视。然而，越来越多的实验数据表明，血管外膜在 AS 和高血压等血管疾病中发挥关键调节作用^[12-13]。外膜作为血管壁的主要“损伤感知组织”，在内膜发生改变之前，VAFs 早已对缺氧、血管膨胀、损伤及炎症等环境压力做出反应，表现为 VAFs 激活、增殖并迁移至内膜和中膜，进而导致血管重构^[14]。另外，迁移的 VAFs 能够增加细胞因子的分泌，直接影响血管平滑肌细胞张力，促进血管炎症发生，从而影响整个血管张力和血管壁结构^[15-16]。因此，VAFs 能够“由外而内”调节血管的功能和结构。抑制 VAFs 的迁移，能够改善血管纤维化、AS 及其相关的心血管疾病。

心血管疾病在中医中属“脉络-系统性疾病”，从《络病学》的“络病证治”到《脉论》的“络脉学说”，其核心理论为营卫承制调平。卫气失常，卫外不固，腠理疏松，痰浊瘀血邪气易侵，久则脉积，易发中风、胸痹等。脉积与西医中 AS 相关，是心血管疾病的发病基础。血管外膜护卫不利，外膜滋养血管增多，招募炎症细胞^[17]，促进成纤维细胞活化，发生表型转化，向内膜迁移，造成内膜增

生增厚^[18]，导致血液瘀阻，从而促进心血管疾病的发生发展。中医卫营调平与血管外内膜稳态具有相关性，固卫外，消瘀堵，在疾病早期抑制血管外膜重构或可成为潜在治疗靶点。

持续的炎症免疫反应在动脉硬化不稳定斑块的形成、发展和破裂过程中发挥重要作用。TLR4 是一种跨膜转导受体，能够与 LPS 结合，NF- κ B 及其转录调控的各种炎性细胞因子，在 AS 的发展过程中发挥关键作用^[19]。抑制 TLR4/NF- κ B 通路可减轻 AS^[20]。因此，TLR4/NF- κ B 通路在 LPS 感染中起重要作用。除 TLR4/NF- κ B 通路外，NLRP3 炎症小体的激活在 AS 的发展过程发挥重要作用^[21]。NLRP3 可调节 IL-1 β 和 IL-18 的生成，参与炎症介导的斑块的形成与发展^[21]。因此 TLR4、NF- κ B、NLRP3 炎症小体是 AS 等炎症性疾病的有前景的药理靶点。

红花是经典的活血化瘀药，常用于治疗多种心脑血管疾病。HSYA 为红花最主要的有效成分，在多种疾病中发挥重要作用^[7-8]。研究表明，HSYA 可通过抑制炎症减轻小鼠的哮喘症状^[9]，HSYA 还可通过蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路抑制内皮损伤及血管平滑肌细胞的迁移减轻 AS^[22-23]。然而，HSYA 能否通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路抑制 ANG II 诱导的 VAFs 的迁移，改善血管重构，目前尚未被研究。本研究利用 ANG II 诱导 VAFs 的增殖和迁移，并给予细胞 LPS 刺激，探究 HSYA 在 LPS 诱导的 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症通路中的作用。通过免疫荧光实验鉴定大鼠主动脉组织贴块法培养的细胞为 VAFs。ANG II 及 HSYA 的量效、时效结果确定 ANG II 和 HSYA 的最佳作用浓度分别为 1×10^{-7} mol/L 和 40 μ mol/L，作用时间均为 24 h。Western blotting 结果显示，ANG II 刺激显著增加 VAFs 中 TLR4 及 NF- κ B 的磷酸化水平，还能升高核内 NF- κ B 含量；HSYA 能够显著抑制 ANG II 诱导的 TLR4 及 NF- κ B 的磷酸化水平升高，抑制效果与作用浓度正相关。NLRP3 炎症小体的激活在血管重塑中发挥重要作用，为了明确 HSYA 对 ANG II 诱导的 VAFs 迁移的抑制作用与 NLRP3 炎症小体有关，检测细胞中 NLRP3 炎症小体的组装情况，结果显示，与对照组比较，ANG II 组细胞中 NLRP3 和 ASC 荧光重合后，荧光强度增加，提示 ANG II 促进 NLRP3 和 ASC 的共表达，以上结果表明，ANG II 促进 NLRP3 炎症小体组装。与 ANG II 组比较，随着 HSYA 剂量增加，VAFs 中 NLRP3 和 ASC 的共

表达逐渐降低,表明 ANG II 诱导的 VAFs 中 NLRP3 炎性小体的激活被 HSYA 显著抑制。划痕实验结果表明, HSYA 能够显著抑制 ANG II 及 LPS 诱导的 VAFs 迁移。LPS 为 NLRP3 炎性小体的上游,能够激活 NLRP3 炎性小体^[24]。对细胞进行 LPS 刺激,检测 HSYA 对 LPS 诱导的 NLRP3 炎性小体激活的作用。采用免疫荧光双染实验同时检测 ASC 和 NLRP3 蛋白,免疫荧光结果显示 LPS 诱导 ASC 和 NLRP3 共表达增加,提示 LPS 促进 NLRP3 炎性小体的组装,而 HSYA 逆转了这一作用,表明 HSYA 通过抑制 NLRP3 炎性小体的组装和激活抑制 ANG II 诱导的 VAFs 迁移。

无菌性炎症在早期和晚期 AS 的发展中起着重要作用^[25]。TLR4 信号参与 AS 的进展^[20], NLRP3 炎性小体激活 pro Caspase-1 的切割,促进炎症细胞因子的 IL-1 β 成熟与释放,加剧血管重构。VAFs 作为血管损伤响应的前哨细胞,启动并参与 AS 相关的血管重构。因此,进一步探究 HSYA 对 ANG II 诱导的 TLR4/NF- κ B 通路及 NLRP3 炎性小体组装的影响。发现 ANG II 刺激能够激活 TLR4/NF- κ B 通路,促进 NF- κ B 的磷酸化与入核、NLRP3 炎性小体的组装,从而激活 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路的炎症反应; HSYA 能够抑制 LPS 诱导的 NLRP3 炎性小体组装及 VAFs 的迁移和增殖,进而抑制血管重塑及其相关的心血管疾病。以上结果表明 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路在 VAFs 迁移和表型转化中起重要作用,进一步证实了 HSYA 通过影响 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路,抑制 ANG II 诱导的 VAFs 迁移。

本研究发现, HSYA 能够通过 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路抑制 ANG II 诱导的 VAFs 迁移。然而, HSYA 具有半衰期短、体内消除速度、口服生物利用度较低的特点^[26-27]。HSYA 在体内是否能够显著改善 ANG II 诱导的血管重塑,需要进一步的动物实验来验证。另外, HSYA 在临床上常以血必净注射液或丹红注射液等复方制剂形式用药。因此,在研究 HSYA 调控 VAFs 迁移相关的血管重塑的作用机制的基础上,还应结合 HSYA 在体内的代谢方式,选择合适的药用辅料,延长药物在体内的半衰期,为其临床治疗血管重塑性疾病提供实验基础依据。综上, HSYA 通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路抑制 ANG II 诱导的 VAFs 迁移,改善血管重塑。HSYA 可能是治疗血管重塑性疾病的一个潜在的治疗候选药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Maiellaro K, Taylor W R. The role of the adventitia in vascular inflammation [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(4): 640-648.
- [2] Liu L, Ning S B, Fu S, *et al*. Effects of lncRNA ANRIL on proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells by regulating TGF- β /Smad pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(14): 6194-6201.
- [3] Ridker P M, Everett B M, Thuren T, *et al*. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(12): 1119-1131.
- [4] Dinarello C A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 519-550.
- [5] Xu M Y, Ye Z S, Zhao X, *et al*. Deficiency of tenascin-C attenuated cardiac injury by inactivating TLR4/NLRP3/caspase-1 pathway after myocardial infarction [J]. *Cell Signal*, 2021, 86: 110084.
- [6] Bai Y J, Li Z G, Liu W H, *et al*. Biochanin A attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. *Acta Cir Bras*, 2019, 34(11): e201901104.
- [7] 冯晓腾, 杜敏, 张一凡, 等. 羟基红花黄色素 A 心血管保护作用及机制 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(6): 77-80.
- [8] 汪洁, 陈纶华, 李涵乔, 等. 羟基红花黄色素 A 对缺血再灌注损伤保护机制的研究进展 [J]. *医学综述*, 2022, 28(14): 2739-2745.
- [9] 李先燕, 朴艺花, 宋艺兰, 等. 羟基红花黄色素 A 通过 AMPK/NF- κ B/NLRP3 对哮喘小鼠气道炎症的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(3): 594-597.
- [10] Ye J X, Lu S, Wang M, *et al*. Hydroxysafflor yellow A protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via suppressing NLRP3 inflammasome and activating autophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1170.
- [11] 崔清卓, 刘博宇, 李颖云, 等. 羟基红花黄色素 A 通过激活自噬抑制 ANG II 诱导的 VAFs 迁移 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(12): 1680-1687.
- [12] Mitchell R N, Libby P. Vascular remodeling in transplant vasculopathy [J]. *Circ Res*, 2007, 100(7): 967-978.
- [13] Strauss B H, Rabinovitch M. Adventitial fibroblasts: Defining a role in vessel wall remodeling [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22(1): 1-3.
- [14] Majesky M W, Dong X R, Hoglund V, *et al*. The adventitia: A dynamic interface containing resident progenitor cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(7): 1530-1539.

- [15] Fu C H, Liu P, Li P L, *et al.* FSP1 promotes the biofunctions of adventitial fibroblast through the crosstalk among RAGE, JAK2/STAT3 and Wnt3a/ β -catenin signalling pathways [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7246-7260.
- [16] Tong Y, Ye C, Ren X S, *et al.* Exosome-mediated transfer of ACE (angiotensin-converting enzyme) from adventitial fibroblasts of spontaneously hypertensive rats promotes vascular smooth muscle cell migration [J]. *Hypertension*, 2018, 72(4): 881-888.
- [17] 滕亮, 李蒙华, 马桂芝. 意大利牛舌草总黄酮及四种化学成分对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(3): 409-416.
- [18] 张颖, 肖骏, 徐艺, 等. 羟基红花黄色素 A 对缺氧/复氧心肌细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(24): 3995-3998.
- [19] Li N, Wang W, Jiang W Y, *et al.* Cytosolic DNA-STING-NLRP3 axis is involved in murine acute lung injury induced by lipopolysaccharide [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(7): e228.
- [20] Zhou Z B, Yang B, Li X H, *et al.* Lysophosphatidic acid promotes expression and activation of matrix metalloproteinase 9 (MMP9) in THP-1 cells via toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B (TLR4/NF- κ B) signaling pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 4861-4868.
- [21] Sharma A, Choi J S Y, Stefanovic N, *et al.* Specific NLRP3 inhibition protects against diabetes-associated atherosclerosis [J]. *Diabetes*, 2021, 70(3): 772-787.
- [22] Song Y M, Long L L, Zhang N, *et al.* Inhibitory effects of hydroxysafflor yellow A on PDGF-BB-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via mediating Akt signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(3): 1555-1560.
- [23] Ye F, Wang J H, Meng W, *et al.* Proteomic investigation of effects of hydroxysafflor yellow A in oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial injury [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17981.
- [24] Yu R Q, Jiang S Y, Tao Y Q, *et al.* Inhibition of HMGB1 improves necrotizing enterocolitis by inhibiting NLRP3 via TLR4 and NF- κ B signaling pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 13431-13438.
- [25] Truong R, Thankam F G, Agrawal D K. Immunological mechanisms underlying sterile inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis: Potential sites for intervention [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2021, 17(1): 37-50.
- [26] 熊全美, 闵旻, 刘英, 等. 羟基红花黄色素 A 在大鼠体内药代动力学研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(4): 228-230.
- [27] 张海防, 郭健新, 黄罗生, 等. 羟基红花黄色素 A 在大鼠体内的药代动力学 [J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(5): 456-460.

[责任编辑 李亚楠]