

三七皂苷 R₁ 调控 Nrf2 介导的铁死亡途径改善 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化

张 梦^{1,2}, 萧 闵³, 蔡 婷¹, 李晶晶¹, 全毅红², 樊光辉^{1,4*}

1. 湖北中医药大学中医临床学院, 湖北 武汉 430065

2. 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院, 湖北 武汉 430014

3. 湖北中医药大学实验动物中心, 湖北 武汉 430065

4. 深圳大学附属华南医院, 广东 深圳 518111

摘要: 目的 探究三七皂苷 R₁ 对高脂诱发的载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的治疗作用及机制。方法 高脂喂养雄性 ApoE^{-/-}小鼠 12 周建立 AS 模型, 将其随机分为模型组及三七皂苷 R₁ 低、高剂量 (25、35 mg/kg) 组和铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1, 1 mg/kg) 组。以相同周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠作为对照组, 给予普通饲料饲养。给药 5 周后采用全自动生化分析仪检测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平; 苏木素-伊红 (HE) 染色和油红 O 染色观察主动脉粥样斑块程度; 加强普鲁士蓝染色法评估斑块铁沉积; 生化试剂盒检测主动脉超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活力及谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平; 免疫组化法检测主动脉 4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE) 表达; Western blotting 检测主动脉核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 及 4-HNE 蛋白表达; qRT-PCR 法检测主动脉 Nrf2、Gpx4、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, Ptg2) mRNA 表达。结果 三七皂苷 R₁ 低、高剂量组及 Fer-1 组不同程度地影响 ApoE^{-/-}小鼠的血脂水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 明显减轻主动脉粥样斑块程度, 抑制铁沉积 ($P < 0.01$), 提高 SOD、GSH 抗氧化能力 ($P < 0.05$ 、 0.01), 减少脂质过氧化 MDA 水平和 4-HNE 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 上调铁死亡相关核 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白及 Nrf2、Gpx4 mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 下调 Ptg2 mRNA 的表达 ($P < 0.01$), 以三七皂苷 R₁ 高剂量组效果最为显著。结论 三七皂苷 R₁ 改善 ApoE^{-/-}小鼠脂代谢紊乱, 抑制动脉粥样斑块形成, 具有抗 AS 的作用, 其机制可能与减少斑块铁沉积、激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路减少脂质过氧化, 抑制铁死亡有关。

关键词: 三七皂苷 R₁; 动脉粥样硬化; 铁死亡; 核因子 E2 相关因子 2/溶质载体家族 7 成员 11/谷胱甘肽过氧化物酶 4 通路; 脂质过氧化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)15-5135-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.013

Notoginsenoside R₁ improves atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice by regulating ferroptosis mediated by Nrf2 signaling pathway

ZHANG Meng^{1,2}, XIAO Min³, CAI Ting¹, LI Jingjing¹, QUAN Yihong², FAN Guanghui^{1,4}

1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Central Hospital of Wuhan Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China

3. Laboratory Animal Center, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

4. South China Hospital, Shenzhen University, Shenzhen 518111, China

收稿日期: 2024-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104704); 湖北省教育厅科学研究计划项目重点项目 (D2022006); 武汉市卫健委青年项目 (WZ20Y07); 武汉市卫健委中医药科研面上项目 (WZ22C55)

作者简介: 张 梦, 女, 博士研究生, 从事中西医结合防治心脑血管疾病研究。E-mail: zhangmmeng2018@163.com

*通信作者: 樊光辉, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合防治心脑血管疾病研究。E-mail: whzyfan@163.com

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect and mechanism of notoginsenoside R₁ (NGR1) on ApoE^{-/-} mice with high fat diet induced atherosclerosis (AS). **Methods** Male ApoE^{-/-} mice were fed high-fat diet for 12 weeks to establish atherosclerotic model, then mice were randomly divided into model group, NGR1 low-and high dose (25, 35 mg/kg) groups, Ferrostatin-1 (Fer-1, 1 mg/kg) group. Male C57BL/6J mice of the same week age were used as control group and were fed on a general diet. After five weeks of feeding, the levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were measured by automatic biochemical analyzer; Hematoxylin-eosin (HE) and oil red O staining were used to observe the degree of aortic atherosclerotic plaque; Enhanced Prussian blue staining was used for the assessment of iron deposits in aortic plaques; The activity of super oxide dismutase (SOD) and levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) in aortic tissues were determined by biochemical assay; The expression of 4-hydroxynonenal (4-HNE) protein in aorta was detected by immunohistochemistry; Western blotting was performed to determine the protein expressions of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and 4-HNE in aortic plaques; qRT-PCR was performed to measure the mRNA expressions of *Nrf2*, *Gpx4* and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*Ptgs2*). **Results** The blood lipid level of ApoE^{-/-} mice was affected to different degrees ($P < 0.05, 0.01$), the degree of atherosclerosis plaque in aortic plaques was significantly reduced, iron deposition was inhibited ($P < 0.01$), the antioxidant capacities of SOD and GSH were improved ($P < 0.05, 0.01$), the level of lipid peroxidation MDA content and 4-HNE protein expression were reduced ($P < 0.05, 0.01$), the expressions of nuclear Nrf2, SLC7A11, GPX4 protein and *Nrf2*, *Gpx4* mRNA associated with ferroptosis were increased ($P < 0.01$), the expression of *Ptgs2* mRNA was reduced ($P < 0.01$) in NGR1 low- and high-dose groups and Fer-1 group. NGR1 high-dose group had more significant improvement effect on the above indexes. **Conclusion** NGR1 can improve lipid metabolism disorder in ApoE^{-/-} mice, reduce atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice, and has antiatherogenic effect. Its mechanism may be related to reducing iron deposition, activating Nrf2/SLC7A11/ GPX4 pathway to reduce lipid peroxidation and inhibit ferroptosis.

Key words: notoginsenoside R₁; atherosclerosis; ferroptosis; nuclear factor-erythroid 2-related factor 2/solute carrier family 7 member 11/glutathione peroxidase 4 pathway; lipid peroxidation

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是造成全球人口死亡率升高、影响生活质量的重要原因^[1-2]。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是冠心病、急性冠脉综合征、心源性猝死等急性心血管事件发生的病理基础, 在 CVD 的发生中扮演着重要角色^[3]。传统的抗血小板聚集和他汀类调血脂药物易增加出血、横纹肌溶解及转氨酶升高的风险^[4-5]。因此, 从新的角度寻找安全有效对抗 AS 的方法迫在眉睫。

三七皂苷 R₁ 是从三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 中分离提取的皂苷成分, 具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等心脑血管保护作用^[6-7]。已有研究证实, 三七皂苷 R₁ 通过沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) /腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 通路调控自噬改善 AS^[8]; 三七皂苷 R₁ 抑制核苷酸结合寡聚结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体激活改善 AS^[9]。AS 发病机制复杂, 通常被认为是一种脂代谢紊乱驱动的慢性炎症性疾病, 氧化应激反应贯穿 AS 始终^[10-11]。铁死亡是细胞铁超载导致脂质过氧化物的产生和清

除失衡造成的结果^[12]。过量 Fe²⁺ 发生芬顿反应产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是铁死亡发生的诱因, 核心机制是谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗氧化能力不足以清除、修复 ROS 催化的脂质过氧化反应^[13]。最新研究表明, 铁死亡通过诱导内皮功能障碍、平滑肌细胞增殖迁移、泡沫细胞形成及巨噬细胞表型转化等环节, 参与 AS 的发生发展^[14]。目前研究已证实三七皂苷 R₁ 具有抗氧化作用, 但三七皂苷 R₁ 能否调控铁死亡影响 AS 的发生发展尚未明确。当核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2) 被激活时, 转移至细胞核激活下游溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) /GPX4 蛋白表达, 抑制脂质过氧化反应, 负性调节铁死亡^[15]。因此, 本研究拟探讨三七皂苷 R₁ 通过 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路抑制铁死亡, 改善 AS 斑块脂质沉积的新机制, 为丰富并拓展三七皂苷 R₁ 的药理作用和临床适用范围提供新的理论支持。

1 材料

1.1 动物

7 周龄 SPF 级雄性 ApoE^{-/-} 小鼠, 体质量 (21 ±

2) g, 购自常州卡文斯实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (苏) 2021-0013; 7 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 (20 ± 2) g, 购自三峡大学实验动物中心, 许可证号 SCXK (鄂) 2023-0012。动物实验开展于湖北中医药大学动物实验中心。ApoE^{-/-}小鼠以高脂饲料喂养, C57BL/6J 小鼠以普通饲料喂养, 均饲养在温度 (23 ± 2) °C、相对湿度 (55 ± 5) %、12 h 昼夜明暗交替的环境中。动物实验经湖北中医药大学伦理委员会批准 (批准号 HUCMS-202342588), 严格按照 3R 原则开展实验。

1.2 药物与试剂

三七皂苷 R₁ (批号 M29GB150096, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司; 铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1, 批号 GC103805, 质量分数 $> 98\%$) 购自 GlpBio 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 062823230824, 质量分数 $\geq 99.9\%$)、RIPA 裂解液 (批号 P0013B)、蛋白酶抑制剂 (批号 P1046) 均购自 Beyotime 公司; 还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒 (批号 A006-2-1)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 A003-1-1)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 A001-3-2) 均购自南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 G2026)、油红 O 染色试剂盒 (批号 G1015)、苏木素-伊红 (HE) 高清恒染试剂盒 (批号 G1076)、DAB 加强普鲁士蓝染色 (批号 GP1069)、组化试剂盒 DAB 显色剂 (批号 G1212)、RNA 提取液 (批号 G3013)、氯仿 (批号 G3014)、逆转录试剂盒 (批号 G3337)、 $2 \times$ Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix (批号 G3326)、预染蛋白 Marker VII (批号 G2087) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 核蛋白提取试剂盒 (批号为 R0050) 购自北京索莱宝科技有限公司; Nrf2 抗体 (批号 80593-1-RR) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; GPX4 抗体 (批号 ab125066)、SLC7A11 抗体 (批号 ab175186)、 β -actin 抗体 (批号 ab8226)、Histone H3 抗体 (批号 ab1791) 均购自英国 Abcam 公司; 4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE) 抗体 (批号 A24456) 购自 Abclonal 公司; 山羊抗兔二抗 (批号 JAC-111-035-003)、山羊抗小鼠二抗 (批号 JAC-115-035-003) 均购自美国 Jackson 公司。

1.3 仪器

Chemray 800 型全自动生化分析仪 (深圳雷杜

生命科技有限公司); JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); CRYOSTAR NX50 型冰冻切片机、nanodrop2000 型分光光度计、ELX800 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜 (日本尼康公司); DY CZ-24DH 型电泳仪、DY CZ-40D 转膜仪 (北京六一仪器厂); KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司); ETC811 型号 PCR 扩增仪 (北京东胜创新生物科技有限公司); CFX Connect 型 qRT-PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药

小鼠适应性喂养 1 周开展实验。42 只雄性 ApoE^{-/-}小鼠高脂喂养 12 周制备 AS 模型^[16]。随机处死 2 只, 主动脉全段大体油红 O 染色可见主动脉壁粥样斑块形成, 提示造模成功。将剩余的 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组及三七皂苷 R₁ 低、高剂量 (25、35 mg/kg) 组和 Fer-1 (1 mg/kg) 组, 每组 10 只, 继续高脂喂养。取 10 只雄性 C57BL/6J 小鼠作为对照组, 给予普通饲料喂养。对照组和模型组 ip 等体积含 1% DMSO 的无菌生理盐水, 其余各组分别 ip 三七皂苷 R₁ 或 Fer-1, 药物以 DMSO 溶解后再用生理盐水稀释, 每日给药 1 次, 给药 5 周。给药结束后, 剔除各组死亡小鼠, 每组 8 只小鼠进行后续实验。

2.2 样本采集

麻醉前禁食不禁水 12 h, 3% 戊巴比妥钠麻醉小鼠后眼眶取血, 离心收集上清待测。打开小鼠胸腔, 暴露心脏, 进行心脏灌流。灌流结束后小心分离心脏和主动脉全段, 从心脏根部将升主动脉离断, 部分主动脉和心脏置于固定液中用于病理检测, 部分主动脉组织液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱冻存, 用于蛋白及 RNA 提取。

2.3 小鼠体质量测定

造模开始前、造模结束及给药期间, 使用电子天平称量并记录小鼠体质量。

2.4 小鼠血清血脂四项测定

严格按照试剂盒要求, 检测小鼠血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平。

2.5 小鼠主动脉病理学变化

2.5.1 HE 染色 取出固定的主动脉组织, 经脱水、

透明、包埋制成石蜡切片 (5 μm) 备用。切片依次经脱蜡复水、HE 染色、脱水封片步骤后在显微镜下观察拍照。Image J 软件测量斑块相对面积, 即斑块面积与管腔面积的比值。

2.5.2 油红 O 染色 将冰冻切片从 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出恢复至室温后, 经固定液固定、自来水洗晾干、油红 O 染色、背景分化、苏木素染色、返蓝液返蓝、甘油明胶剂封片等步骤后在显微镜下采集图像。Image J 软件测量并计算斑块中脂质红染面积与管腔面积的比值。

2.6 加强普鲁士蓝染色检测 AS 斑块中铁沉积

脱腊至水的石蜡切片置于 1:1 配制的 2% 亚铁氢化钾和 2% 盐酸混合液中染色 30 min, 蒸馏水洗涤后滴加 DAB 显色液, 浸洗后依次经苏木素染色、盐酸水溶液分化、氨水返蓝、脱水封片等步骤, 显微镜下观察拍照。Image J 软件计算普鲁士蓝阳性面积与视野总面积的比值来评估铁沉积程度。

2.7 生化试剂盒检测主动脉组织 SOD 活力和 GSH、MDA 水平

取适量新鲜的小鼠主动脉组织, 低温匀浆后, 严格按照 SOD、GSH 及 MDA 检测试剂盒说明书, 测定小鼠主动脉 SOD 活力和 GSH、MDA 的水平。

2.8 免疫组化法检测主动脉组织 4-HNE 蛋白表达

冰冻切片室温晾干, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱 15 min, 然后置于甲醇固定, PBS 洗涤后依次经抗原修复、3% 双氧水阻断内源性过氧化物酶、3% 牛血清白蛋白封闭、一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜、二抗室温孵育、DAB 显色、苏木素染核等步骤, 脱水封片后显微镜下观察并拍照。

2.9 Western blotting 检测主动脉组织核 Nrf2、SLC7A11、GPX4 和 4-HNE 蛋白表达

取小鼠主动脉组织, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白。参照核蛋白提取试剂盒步骤提取核蛋白。BCA 法测定蛋白浓度后, 煮沸使蛋白变性, 样本经 SDS-PAGE 电泳, 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 分别加入 Nrf2、Histone H3、SLC7A11、GPX4、4-HNE、 β -actin 抗体 (1:1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗涤, 加入二抗 (1:10 000), 化学发光法显影、成像, Image J 软件量化分析条带灰度值, 目的蛋白的相对表达量为目的蛋白灰度与内参蛋白灰度的比值。

2.10 qRT-PCR 检测主动脉组织 Nrf2、Gpx4 和 Ptgs2 mRNA 表达

取小鼠主动脉组织置于 1.5 mL 离心管中, 依次

加入 RNA 提取剂及氯仿提取总 RNA, 测定 RNA 纯度和浓度后, 使用逆转录试剂盒将其逆转录成 cDNA 后进行 qRT-PCR 扩增反应。设置条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸 30 s, 40 个循环收集荧光信号, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计并合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')	片段长度/bp
Nrf2	F: GACAGAGATGGACAGCAAT	257
	R: GACTAATGGCAGCAGAGG	
Gpx4	F: GTCTGTCTGTCTGTCTGTC	106
	R: TGATTACTTCCTGGCTCCT	
Ptgs2	F: CCATTGACCAGAGCAGAG	203
	R: AGAGGAAGAGGAGGAAGAC	
Gapdh	F: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	R: TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

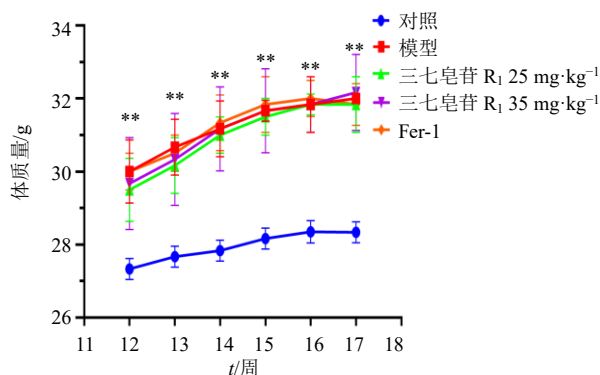
2.11 统计学分析

采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。符合正态分布和方差齐性检验时, 两组间比较采用两独立样本 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠体质量的影响

肥胖和体质量增加是 AS 发生的危险因素^[17]。造模前小鼠间体质量差异不具有统计学意义; 如图 1 所示, 高脂喂养 12 周后, C57BL/6J 及 ApoE^{-/-} 小鼠体质量呈增长趋势, 且 ApoE^{-/-} 小鼠体质量明显高



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图 1 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠体质量的影响

($\bar{x} \pm s, n = 8$)

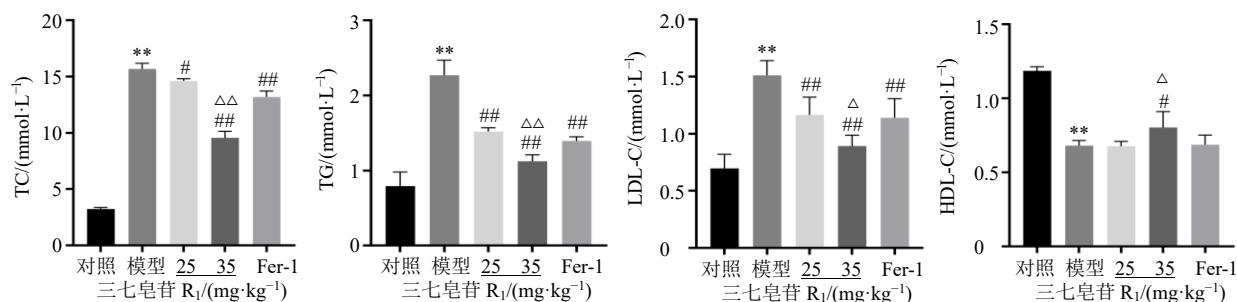
Fig. 1 Effect of notoginsenoside R₁ on body weight in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

于 C57BL/6J 小鼠 ($P < 0.01$)；给药 5 周后，与模型组比较，三七皂苷 R₁ 低、高剂量组及 Fer-1 组小鼠体质量差异无统计学意义，说明三七皂苷 R₁ 对高脂喂养的 ApoE^{-/-} 小鼠体质量无明显影响。

3.2 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠血脂的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$)，HDL-

C 水平显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，三七皂苷 R₁ 低、高剂量组及 Fer-1 组 TC、TG、LDL-C 水平均不同程度地降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，三七皂苷 R₁ 高剂量组 HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$)；与 Fer-1 组比较，NGR1 高剂量组 TC、TG、LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$)，说明三七皂苷 R₁ 能改善脂代谢异常。



与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ；与 Fer-1 组比较：△ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ ，下同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs Fer-1 group, same as below figures.

图 2 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 2 Effect of notoginsenoside R₁ on blood lipid in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

3.3 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉病理变化的影响

主动脉根部斑块的多少常用来衡量 AS 的严重程度^[18]。如图 3-A、C 所示，对照组主动脉根部内膜光滑完整，无粥样斑块形成；模型组可见大量粥样斑块形成，管腔狭窄，中膜增厚并可见大量泡沫细胞，斑块面积与管腔面积的比值明显增大 ($P < 0.01$)；与模型组比较，三七皂苷 R₁ 低、高剂量组及 Fer-1 组抑制 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉粥样斑块的形成，斑块面积与管腔面积的比值明显减小 ($P < 0.01$)；与 Fer-1 组比较，三七皂苷 R₁ 高剂量组斑块面积与管腔面积比值明显减小 ($P < 0.01$)。

油红 O 染色时，染料会转移至脂质而呈现红色。如图 3-B、D 所示，与对照组比较，模型组斑块脂质沉积严重，有大片红染成分；与模型组比较，三七皂苷 R₁ 低、高剂量组与 Fer-1 组斑块脂质红染面积明显减少 ($P < 0.01$)；与 Fer-1 组比较，三七皂苷 R₁ 高剂量组斑块脂质红染面积明显减小 ($P < 0.01$)。由此说明，三七皂苷 R₁ 具有抗 AS 的作用。

3.4 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块铁沉积的影响

如图 4 所示，与对照组比较，模型组斑块中棕褐色颗粒明显增加，普鲁士蓝阳性比例升高 ($P < 0.01$)，说明铁沉积严重；与模型组比较，三七皂苷

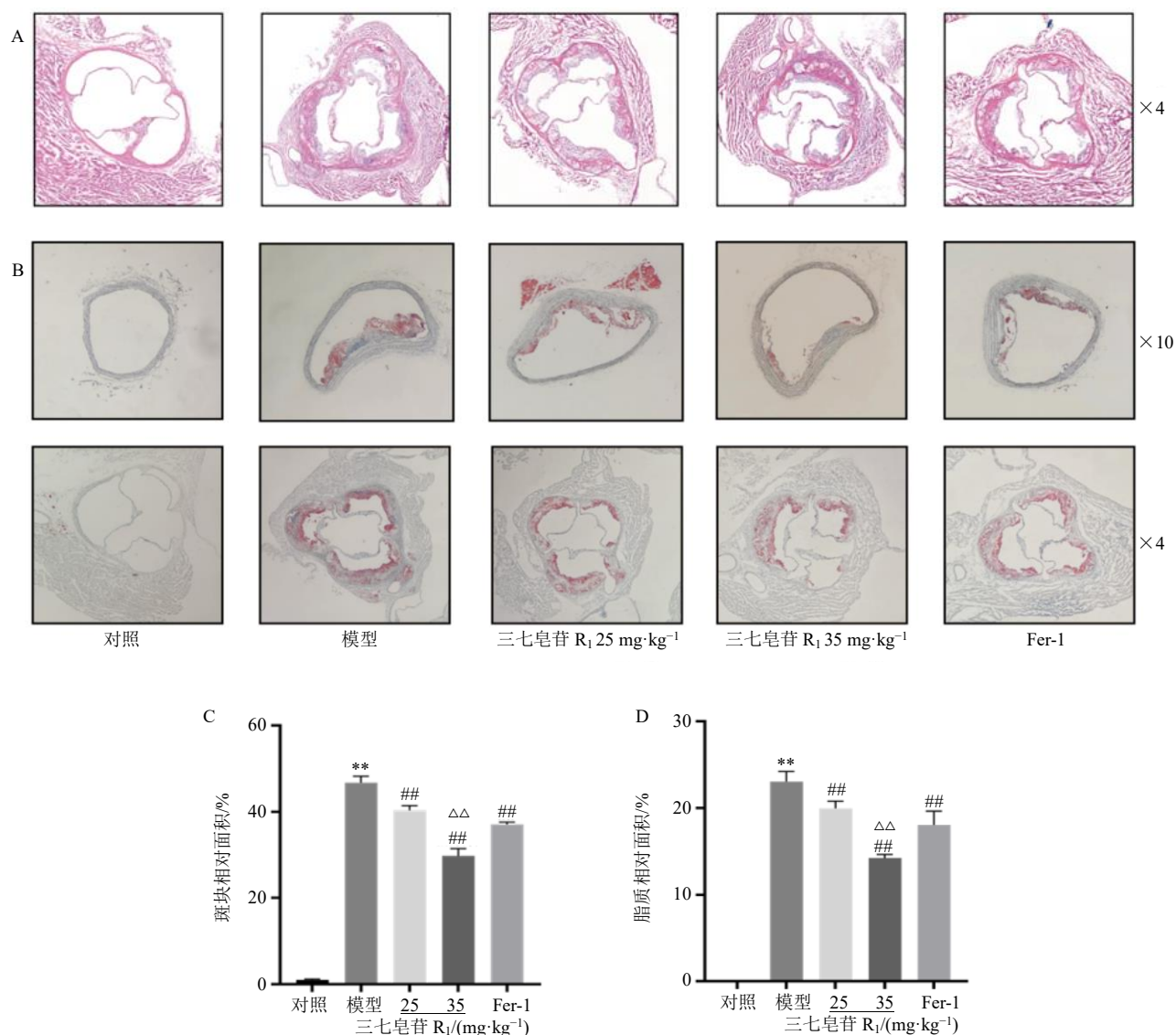
R₁ 低、高剂量组及 Fer-1 组斑块中棕褐色颗粒减少，普鲁士蓝阳性比例降低 ($P < 0.01$)；与 Fer-1 组比较，三七皂苷 R₁ 高剂量组棕褐色颗粒减少，普鲁士蓝阳性比例降低 ($P < 0.05$)。说明三七皂苷 R₁ 抑制 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块铁沉积。

3.5 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 SOD 活力及 GSH、MDA 水平的影响

如图 5 所示，与对照组比较，模型组小鼠主动脉 SOD 活力及 GSH 水平明显降低 ($P < 0.01$)，MDA 水平明显升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，三七皂苷 R₁ 低、高剂量组及 Fer-1 组小鼠主动脉 SOD 活力及 GSH 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)；与 Fer-1 组比较，三七皂苷 R₁ 高剂量组 SOD 活力及 GSH 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$)。说明三七皂苷 R₁ 提高 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉抗氧化能力，抑制脂质过氧化水平。

3.6 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉脂质过氧化 4-HNE 蛋白表达的影响

如图 6 所示，与对照组比较，模型组可见大量呈棕黄色 4-HNE 阳性细胞；与模型组比较，三七皂苷 R₁ 低、高剂量组及 Fer-1 组不同程度地下调小鼠主动脉脂质过氧化产物 4-HNE 阳性细胞的比例，且以三七皂苷 R₁ 高剂量组最为显著，Fer-1 组和三七



A-主动脉组织 HE 染色; B-主动脉组织油红 O 染色; C-HE 染色斑块相对面积; D-油红 O 染色脂质相对面积。
A-HE staining of aortic tissue; B-oil red O staining of aortic tissue; C-relative area of HE stained plaques; D-relative area of oil red O stained lipid.

图 3 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of notoginsenoside R₁ on pathological changes in aorta in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

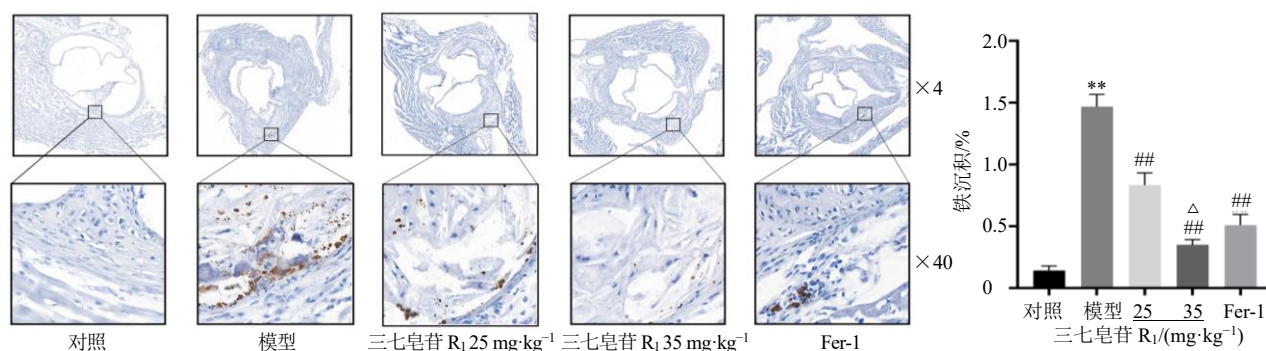


图 4 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉铁沉积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of notoginsenoside R₁ on iron deposition in aorta of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

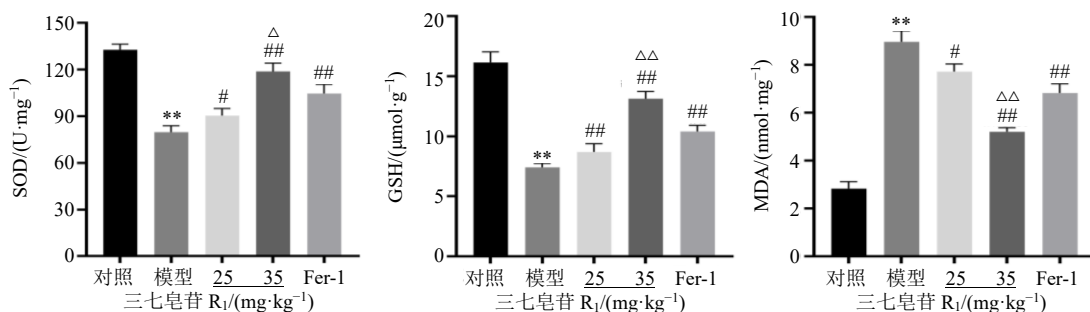


图 5 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effect of notoginsenoside R₁ on oxidative stress indicators in aorta of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

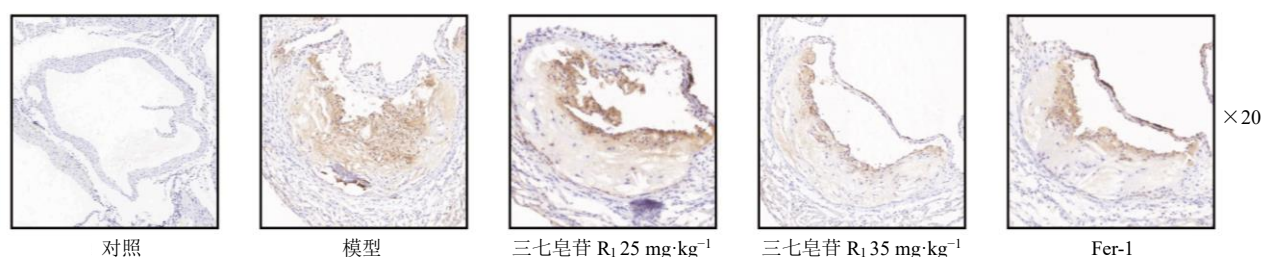


图 6 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉脂质过氧化 4-HNE 蛋白表达的影响 (×20)

Fig. 6 Effect of notoginsenoside R₁ on expression of lipid peroxidation 4-HNE proteins in aorta of ApoE^{-/-} mice (×20)

皂苷 R₁ 低剂量组次之。

3.7 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉铁死亡防御通路 Nrf2/SLC7A11/GPX4 蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠主动脉 SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$), 4-HNE 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 三七皂苷 R₁ 低、高剂量组及 Fer-1

组明显上调主动脉核 Nrf2、SLC7A11 及 GPX4 蛋白表达 ($P < 0.01$), 下调 4-HNE 蛋白表达水平 ($P < 0.01$); 与 Fer-1 组比较, 三七皂苷 R₁ 高剂量组上调核 Nrf2、SLC7A11 及 GPX4 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 下调 4-HNE 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。说明三七皂苷 R₁ 激活了 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉铁死亡防御通路, 提高抗氧化能力。

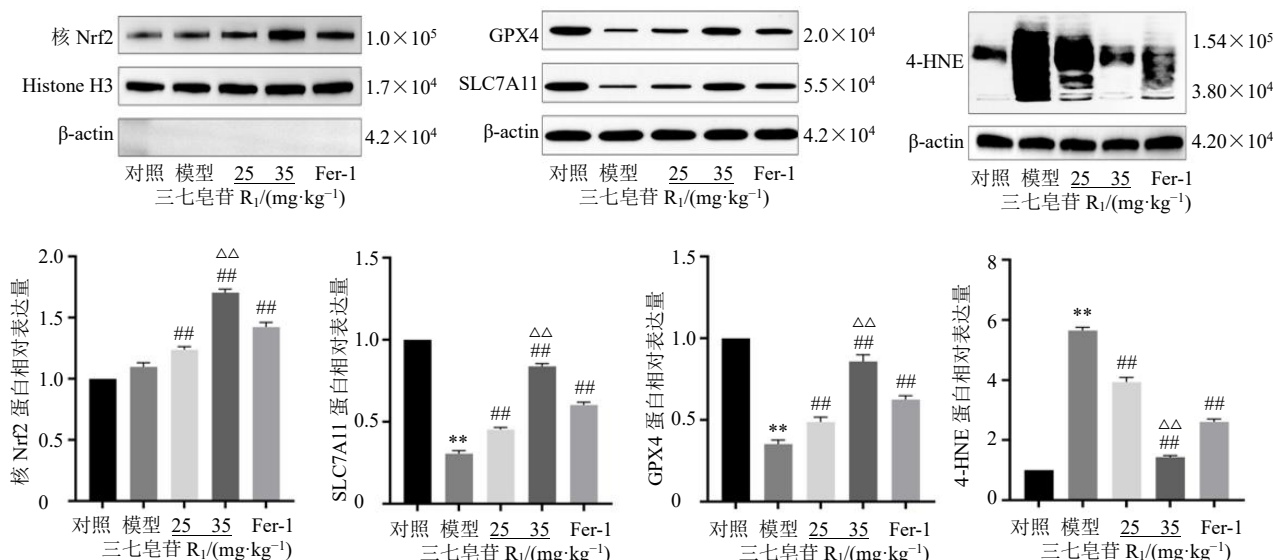


图 7 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉铁死亡通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of notoginsenoside R₁ on expressions of ferroptosis pathway-related proteins in aorta of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉铁死亡相关 mRNA 表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠主动脉 *Nrf2* 及 *Ptgs2* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), *Gpx4* mRNA 表达水平明显下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 三七皂苷 R₁ 低、高剂量组及

Fer-1 组小鼠主动脉 *Nrf2*、*Gpx4* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), *Ptgs2* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 Fer-1 组比较, 三七皂苷 R₁ 高剂量组小鼠主动脉 *Nrf2*、*Gpx4* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), *Ptgs2* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

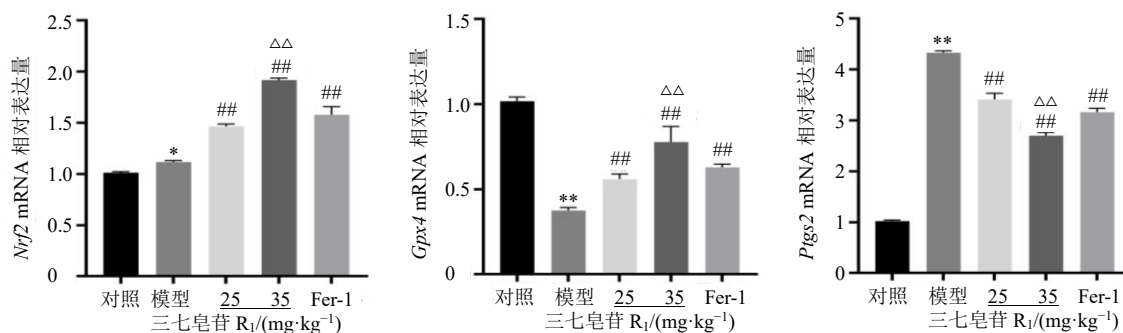


图 8 三七皂苷 R₁ 对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉铁死亡相关因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Effect of notoginsenoside R₁ on mRNA expressions of ferroptosis related factors in aorta of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

近年来, AS 的发病率呈日渐年轻化的趋势, 已成为危害人类健康、影响生活质量、导致患者死亡的重要原因^[19]。AS 属中医“脉痹”“胸痹”的范畴。“脉络癥积、瘀毒互结”是主要病机^[20]。“疏其气机, 令其条达”的活血化癥法是治疗“脉痹”“胸痹”的基本原则^[21]。三七皂苷 R₁ 是来源于活血化癥类中药三七的活性单体, 因其安全性高、不良反应少、多靶点的特性被用来防治 AS 的发生发展^[22]。本研究通过高脂喂养 ApoE^{-/-}小鼠成功构建 AS 模型, 发现与 C57BL/6J 小鼠相比, ApoE^{-/-}小鼠具有体质量增加、脂代谢紊乱及粥样斑块形成的特点。本研究结果显示, 不同剂量的三七皂苷 R₁ 能一定程度地纠正 ApoE^{-/-}小鼠脂代谢紊乱, 抑制粥样斑块形成, 且三七皂苷 R₁ 抗 AS 的机制可能不依赖调控体质量因素, 这与先前研究报道 25 mg/kg 的三七皂苷 R₁ 具有抗 AS 作用的结论基本一致^[8,23]。由此说明, 从“瘀”论治可能是三七皂苷 R₁ 从中医角度发挥抗 AS 的理论依据。

铁离子参与线粒体呼吸链电子传递、DNA 合成及酶促反应的同时, 也要避免血管铁超载诱发的脂质过氧化反应加速 AS 进程^[24]。铁死亡是一种铁依赖性脂质过氧化驱动的新型细胞死亡方式。因此, 精准调控血管铁稳态显得尤为重要^[25]。Fer-1 作为经典的铁死亡抑制剂, 发挥抗 AS 的作用主要是通过

恢复血管铁稳态, 提高抗氧化能力清除有毒的脂质过氧化物对细胞膜的损伤来实现的^[26]。清心解瘀汤、血管软化丸具有抗 AS 作用, 其机制可能与减少 AS 血管铁沉积、抑制铁死亡有关^[27-28]。由于中药方剂往往面临组方复杂、有效成分难以确定、靶点不明确等问题, 而有着明确结构的中药单体往往可以一定程度减少上述因素的干扰。本研究结果显示, AS 中存在铁超载, 这与先前文献报道一致^[26]。与 Fer-1 作用相似, 三七皂苷 R₁ 明显减少粥样斑块的铁沉积, 说明三七皂苷 R₁ 能恢复铁稳态失衡。现代药理学研究证实, 具有活血化癥作用的中药主要通过调节脂代谢、抗炎、抗氧化、抑制病理性血管重构、改善血流动力学及抗血栓方面多角度、多层次的防治 AS^[29]。最新研究表明, 铁超载与中医“血瘀”理论有异曲同工之处^[30]。故从“瘀”论治抑制铁超载可能是三七皂苷 R₁ 发挥抗 AS 作用的新机制, 这暗示着从“瘀”论治铁超载相关疾病的可行性, 为进一步丰富补充中医“活血化癥”理论的现代药理学内涵提供了实验依据。

SLC7A11/GSH/GPX4 是铁死亡防御体系的关键信号通路^[31]。分布于磷脂双分子层的 SLC7A11 通过调控细胞内外谷氨酸、胱氨酸的转运影响 GSH 的合成。GSH 抗氧化、清除自由基的同时, 脂质修复核心酶 GPX4 利用 GSH 作为底物, 将膜脂氢过氧化物 (PL-PUFA-OOH) 还原为多不饱和脂肪酸的磷

脂醇 (PL-PUFA-OH), 阻断铁死亡^[32]。脂质过氧化是铁死亡的最终执行者, 终产物 MDA 与 4-HNE 水平的高低可用来反映铁死亡的严重程度^[33]。本研究结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠主动脉 MDA 水平及 4-HNE 蛋白表达上调, SOD 活力、GSH 水平及 SLC7A11、GPX4 蛋白表达下调, 说明在 AS 的过程中, 抗氧化失衡会增加脂质过氧化水平。三七皂苷 R₁ 和 Fer-1 能一定程度地逆转这一结果, 说明三七皂苷 R₁ 发挥抗 AS 的作用与重塑氧化还原稳态, 抑制脂质过氧化有关。

转录因子 Nrf2 在机体抗氧化应答中发挥重要作用。通常情况下, Nrf2 被 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 隔离在细胞质中, 由 E3 泛素连接酶复合物 (Keap1-Cul3-E3) 泛素化快速降解。当暴露于氧化应激环境时, Nrf2 与 Keap1 分离, 转位入核同 Maf 蛋白结合形成异二聚体与目标基因启动子中的抗氧化反应元件结合, 激活下游多种抗氧化基因的转录, 发挥抗氧化作用^[34]。SLC7A11、GPX4 是受 Nrf2 直接调控的下游靶基因; Nrf2 还通过调控 SLC7A11 靶基因的表达影响 GSH 的从头合成, 间接影响 GPX4 的功能。并且与铁稳态有关的转铁蛋白、储铁蛋白也受 Nrf2 的调控^[35]。Nrf2 基因缺失会诱发铁死亡^[36]。本研究结果显示, 模型组小鼠主动脉核 Nrf2 蛋白表达水平与对照组相比虽无明显统计学差异, 但仍高于对照组, 这可能与应激反应促使 Nrf2 与 Keap1 解离并转位于细胞核有关; 核 Nrf2 表达水平虽有上调, 但其抗氧化能力仍不足以满足 AS 氧化应激压力的需求。本研究结果显示, 三七皂苷 R₁ 明显上调主动脉核 Nrf2 蛋白表达水平, 且三七皂苷 R₁ 高剂量组效果最为显著。另外, 还检测了铁死亡相关标志基因的表达情况。*Ptgs2* 是评估铁死亡是否发生的重要标志基因, 且与 AS 的严重程度呈正相关^[37]。本研究结果显示, 三七皂苷 R₁ 上调了主动脉 *Nrf2*、*Gpx4* mRNA 的表达, 下调了 *Ptgs2* mRNA 的表达。

综上, 本研究通过动物实验验证了三七皂苷 R₁ 改善 ApoE^{-/-}小鼠 AS 的病变程度, 其机制可能与改善脂代谢紊乱、恢复铁稳态、激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路减少脂质过氧化, 抑制铁死亡有关。本研究从铁死亡的角度为三七皂苷 R₁ 防治 AS 提供新的实验依据和理论支持, 丰富并拓展了 NGR1 的适用范围。在未来的研究中, 将会聚焦细胞层面研究, 深入挖掘三七皂苷 R₁ 抗 AS 的分子调控机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Isath A, Koziol K J, Martinez M W, *et al.* Exercise and cardiovascular health: A state-of-the-art review [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2023, 79: 44-52.
- [2] Qin W D, Guo J H, Gou W F, *et al.* Molecular mechanisms of isoflavone puerarin against cardiovascular diseases: What we know and where we go [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(2): 234-243.
- [3] Li J, Xu L, Zuo Y X, *et al.* Potential intervention target of atherosclerosis: Ferroptosis (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(5): 343.
- [4] Fan J L, Watanabe T. Atherosclerosis: Known and unknown [J]. *Pathol Int*, 2022, 72(3): 151-160.
- [5] Murphy E, Curneen J M G, McEvoy J W. Aspirin in the modern era of cardiovascular disease prevention [J]. *Methodist Debaque Cardiovasc J*, 2021, 17(4): 36-47.
- [6] 陈卓彬. 三七皂苷 R₁ 防治心血管疾病的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(4): 1003-1007.
- [7] 刘耀晨, 张铁军, 郭海彪, 等. 三七的研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2021, 52(9): 2733-2745.
- [8] 蔡婷. 三七皂苷 R₁ 通过 SIRT1/AMPK 调控 VSMC 自噬改善动脉粥样硬化的机制研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2023.
- [9] 蔚晶月. 基于网络药理学和实验验证探究三七皂苷 R₁ 抑制巨噬细胞 NLRP3 炎症小体激活改善动脉粥样硬化的机制 [D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2023.
- [10] Tabares-Guevara J H, Villa-Pulgarin J A, Hernandez J C. Atherosclerosis: Immunopathogenesis and strategies for immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2021, 13(14): 1231-1244.
- [11] Batty M, Bennett M R, Yu E. The role of oxidative stress in atherosclerosis [J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3843.
- [12] Wang D, Tian Z Y, Zhang P, *et al.* The molecular mechanisms of cuproptosis and its relevance to cardiovascular disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114830.
- [13] Liu J, Kang R, Tang D L. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis [J]. *FEBS J*, 2022, 289(22): 7038-7050.
- [14] Ouyang S Y, You J, Zhi C X, *et al.* Ferroptosis: The potential value target in atherosclerosis [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(8): 782.
- [15] Anandhan A, Dodson M, Schmidlin C J, *et al.* Breakdown of an ironclad defense system: The critical role of NRF2 in mediating ferroptosis [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(4): 436-447.

- [16] Li L, Zhuang S W, Jiang S Y. Muscone inhibits the progression of atherosclerotic plaques in mice aorta by inhibiting the NF- κ B/p65 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 702: 149628.
- [17] Kaneko H, Itoh H, Yotsumoto H, *et al.* Association of body weight gain with subsequent cardiovascular event in non-obese general population without overt cardiovascular disease [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 308: 39-44.
- [18] Jiang X J, Ma C Y, Gao Y B, *et al.* Tongxinluo attenuates atherosclerosis by inhibiting ROS/NLRP3/caspase-1-mediated endothelial cell pyroptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 304: 116011.
- [19] Olejars W, Sadowski K, Radoszkiewicz K. Extracellular vesicles in atherosclerosis: State of the art [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 25(1): 388.
- [20] 乐文卿. 运用“脉络癥积”探讨动脉粥样硬化病机 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(1): 22-24.
- [21] 陶修龙, 姚淮芳, 宋媛媛. 中医从“瘀”论治动脉粥样硬化 [J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(3): 366-368.
- [22] Jia C L, Xiong M Q, Wang P W, *et al.* Notoginsenoside R₁ attenuates atherosclerotic lesions in ApoE deficient mouse model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99849.
- [23] 谭亮. 基于自噬调控巨噬细胞表型转化探讨三七皂苷 R₁ 改善动脉粥样硬化的研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [24] Xu X, Xu X D, Ma M Q, *et al.* The mechanisms of ferroptosis and its role in atherosclerosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 171: 116112.
- [25] Xie L H, Fefelova N, Pamarthi S H, *et al.* Molecular mechanisms of ferroptosis and relevance to cardiovascular disease [J]. *Cells*, 2022, 11(17): 2726.
- [26] Bai T, Li M X, Liu Y F, *et al.* Inhibition of ferroptosis alleviates atherosclerosis through attenuating lipid peroxidation and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cell [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 92-102.
- [27] Zhang J, Wang X Y, Guan B Y, *et al.* Qing-Xin-Jie-Yu Granule inhibits ferroptosis and stabilizes atherosclerotic plaques by regulating the GPX4/xCT signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115852.
- [28] 孙孟艳, 秦合伟, 李彦杰, 等. 血管软化丸调控 Nrf2/xCT/GPX4 通路抑制血管内皮细胞铁死亡改善动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(3): 383-393.
- [29] 杜朝阳, 何佳, 胡业彬. 活血化瘀中药干预动脉粥样硬化作用机制研究进展 [J]. 实用中医药杂志, 2014, 30(11): 1067-1068.
- [30] 曾嘉旭, 何琪, 陈柏豪, 等. 以“血瘀”理论指导治疗: 解读膝关节炎“铁超载”的相关机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(11): 1743-1748.
- [31] Yu Y, Yan Y, Niu F L, *et al.* Ferroptosis: A cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 193.
- [32] Tang D L, Chen X, Kang R, *et al.* Ferroptosis: Molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107-125.
- [33] Zhang X, Hou L C, Guo Z, *et al.* Lipid peroxidation in osteoarthritis: Focusing on 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and ferroptosis [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 320.
- [34] He F, Ru X L, Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4777.
- [35] Wang X, Chen X X, Zhou W Q, *et al.* Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane via AMPK/NRF2 pathways [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(2): 708-722.
- [36] He R Y, Liu B H, Xiong R, *et al.* Itaconate inhibits ferroptosis of macrophage via Nrf2 pathways against sepsis-induced acute lung injury [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 43.
- [37] Zhou Y Q, Zhou H X, Hua L, *et al.* Verification of ferroptosis and pyroptosis and identification of PTGS2 as the hub gene in human coronary artery atherosclerosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 171: 55-68.

[责任编辑 李亚楠]