

基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨黄芩苷对动脉粥样硬化大鼠模型炎症反应的影响

蒲 晨, 张志鑫, 王国荣, 万晓斌, 杨兴龙, 赵艳平*

南昌大学第一附属医院, 江西 南昌 330006

摘要:目的 基于 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路探讨黄芩苷对动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)大鼠模型炎症反应的影响。方法 SD 大鼠随机分为对照组、模型组及黄芩苷低、中、高剂量(50、100、150 mg/kg)组和黄芩苷(150 mg/kg)+ β -catenin 激动剂 SKL2001(10 mg/kg)组, 每组 14 只。通过喂养高脂饲料与 ip 维生素 D₃ 的方法建立 AS 大鼠模型。给予药物干预 4 周后, 采用苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色观察各组大鼠胸主动脉组织病理学形态; 油红 O 染色观察各组大鼠胸主动脉斑块变化; 检测各组大鼠血脂、炎症因子和内皮细胞因子水平; Western blotting 检测各组大鼠胸主动脉组织中 Wnt5a、 β -catenin、糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)和 p-GSK-3 β 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠 AS 斑块面积、血清中低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)水平及主动脉 Wnt5a、 β -catenin、p-GSK-3 β 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), 血清中高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、一氧化氮(nitric oxide, NO)水平及主动脉 GSK-3 β 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷低、中、高剂量组大鼠 AS 斑块面积、血清 LDL-C、TG、TC、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ET-1、ICAM-1 水平及主动脉 Wnt5a、 β -catenin、p-GSK-3 β 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), 血清中 HDL-C、NO 水平及主动脉 GSK-3 β 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), 且呈剂量相关性; SKL2001 显著逆转黄芩苷对 AS 大鼠的作用($P<0.05$)。结论 黄芩苷可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 AS 大鼠模型炎症反应。

关键词: 黄芩苷; 动脉粥样硬化; Wnt/ β -catenin 信号通路; 炎症反应; 内皮细胞因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)13-4724-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.13.016

Effect of baicalin on inflammatory response in arteriosclerosis rat model based on Wnt/ β -catenin signaling pathway

PU Chen, ZHANG Zhixin, WANG Guorong, WAN Xiaobin, YANG Xinglong, ZHAO Yanping

The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To investigate the effect of baicalin on inflammation in atherosclerotic (AS) rat model based on Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, baicalin low-, medium-, high-dose (50, 100, 150 mg/kg) groups, and baicalin (150 mg/kg) + β -catenin agonist SKL2001 (10 mg/kg) group, with 14 rats in each group. An AS rat model was established by feeding high-fat diet and ip vitamin D₃. After four weeks of drug intervention, the pathological morphology of thoracic aorta tissue in each group of rats was observed using hematoxylin eosin (HE) staining; Oil red O staining was used to observe the changes in thoracic aortic plaques of rats in each group; Levels of blood lipids, inflammatory factors and endothelial cytokines in serum of rats in each group were detected; Western blotting was used to detect the protein expressions of Wnt5a, β -catenin, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and p-GSK-3 β in thoracic aortic tissues of rats in each group. **Results** Compared with control group, AS plaque area, levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , endothelin-1 (ET-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in serum and protein

收稿日期: 2025-02-06

基金项目: 江西省卫生健康委科技计划项目(202130277)

作者简介: 蒲 晨, 硕士, 住院医师, 研究方向为血管动脉粥样硬化。Tel: 15879216726 E-mail: 1796329445@qq.com

*通信作者: 赵艳平, 博士, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化。Tel: 18179133883 E-mail: 870839598@qq.com

expression levels of Wnt5a, β -catenin, p-GSK3 β in aortic tissues of rats in model group were significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), nitric oxide (NO) in serum and GSK-3 β protein expression in aortic tissues were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, AS plaque area, levels of LDL-C, TG, TC, TNF- α , IL-6, IL-1 β , ET-1, ICAM-1 in serum and protein expression levels of Wnt5a, β -catenin, p-GSK3 β in aortic tissues of rats in baicalin low-, medium- and high-dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$), levels of HDL-C, NO in serum and GSK-3 β protein expression in aortic tissues were significantly increased ($P < 0.05$), with a dose-dependent manner. SKL2001 significantly reversed the effect of baicalin on AS rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Baicalin may inhibit the inflammatory response of AS rats model by down-regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: baicalin; atherosclerosis; Wnt/ β -catenin signaling pathway; inflammatory response; endothelial cytokine

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种慢性炎症性疾病, 也是众多心血管疾病的病理基础, 其特征是脂质和炎症细胞在受损的动脉血管壁内积累^[1-2]。AS 发生的潜在机制非常复杂, 主要通过内皮损伤、脂质浸润、炎症反应和血栓形成等因素来解释这种疾病^[3]。炎症是 AS 血管内皮损伤发生发展及恶化的重要推动因素, 也是刺激巨噬细胞活化产生炎症应答、形成泡沫细胞, 从而导致血管内皮脂质沉积及斑块形成的关键因素^[4]。研究表明, 抑制炎症信号的生成、传导及扩大, 是延缓 AS 发生及恶化的关键机制^[5]。针对 AS 发生、发展机制进行深入探索, 寻找有效的治疗药物具有重要意义。中药及其活性成分在 AS 治疗中作用显著, 具有不良反应低和协同作用。黄芩具有抗炎、抗菌、抗氧化等作用, 而黄芩苷作为黄芩的主要有效成分之一, 在缓解 AS、保护心肌细胞和内皮细胞等方面也发挥了重要的作用^[6-7]。近年来, 大量研究发现, 黄芩苷具有抗 AS 作用^[8-10]。然而黄芩苷抗 AS 的作用机制尚不明确。经典的 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号转导改变与 AS 和其他炎症性疾病有关^[11]。Wnt/ β -catenin 信号抑制剂 iCRT-14 可以通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路而减少炎症细胞因子产生和单核细胞黏附, 恢复正常内皮功能^[12]。基于此, 本研究旨在探讨黄芩苷通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对 AS 大鼠模型炎症反应的影响。

1 材料

1.1 动物

SFP 级雄性 SD 大鼠 84 只, 6~8 周龄, 体质量 200~250 g, 购自常州卡文斯实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (苏) 2021-0013。动物于温度 20~25 °C, 相对湿度 40%~70%, 定期紫外线消毒, 12 h 恒定昼夜交替光照条件下适应性饲养 1 周。动物实验经南昌大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准 (批准号 CDYFY-IACUC-202501GR059)。

1.2 药品与试剂

黄芩苷 (质量分数为 98%, 批号 CHB201101) 购自成都克洛玛生物科技有限公司; RPMI-1640 培养基 (批号 12633020)、胎牛血清 (批号 A5256501) 购自美国 Gibco 公司; β -catenin 激动剂 SKL2001 (批号 681667) 购自美国 Millipore 公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 试剂盒 (批号分别为 ml002953、ml106838、ml107050、ml002890、ml202830、ml106964) 购自上海酶联生物科技有限公司; 兔抗人 β -catenin、Wnt5a、糖原合酶激酶-3 β (lycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、p-GSK-3 β 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号分别为 ab246504、ab227229、ab93926、ab75814、ab181602) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

BS-600 型全自动生化仪 (北京迈瑞医疗公司); Zeiss Axio Image 光学显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司); SPecraMax i3X 型多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Amersham Imager600RGB 型超灵敏多功能成像仪 (美国 GE Healthcare 公司); JEM-1400 型透射电镜 (日本 JEOL 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

84 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组及黄芩苷低、中、高剂量 (50、100、150 mg/kg, 分别相当于临床等效剂量的 1、2、3 倍)^[13]组和黄芩苷 (150 mg/kg) + SKL2001 (10 mg/kg) 组, 每组 14 只。通过喂养高脂饲料 (10%猪油、5%白糖、0.2%丙基硫氧嘧啶、3.5%胆固醇、0.5%胆酸钠和基础饲料) 与 ip 维生素 D₃ (2 周 1 次, 每次注射 7×10^5 U/kg)

的方法建立 AS 大鼠模型^[14]。对照组大鼠给予正常饲料喂养并 ip 等体积的生理盐水。造模 3 个月后, 每组随机选择 2 只大鼠处死, 与对照组相比, 造模大鼠血清中低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平显著升高且主动脉组织发生明显脂质沉积, 则表明大鼠造模成功^[15]。各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 4 周。

2.2 生化指标检测

末次给药后麻醉各组大鼠, 经腹主动脉取血, 离心后置于 -80 °C 中待测, 通过全自动生化仪检测大鼠血清中高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、LDL-C、TC、三酰甘油 (triglyceride, TG) 水平。按照试剂盒说明书测定大鼠血清中炎症因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 水平和内皮细胞因子 (ET-1、ICAM-1、NO) 水平。

2.3 苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色观察主动脉组织病理变化

大鼠麻醉后, 仰卧固定, 取主动脉组织, 用 4% 多聚甲醛溶液固定后, 常规石蜡包埋, 连续 5 μ m 切片, 载玻片用甲苯脱蜡 2 次、乙醇脱水、蒸馏水洗涤, 然后用苏木素染色; 洗涤后用 1% 盐酸乙醇分色、伊红染色、蒸馏水洗涤 10 min; 二甲苯脱水并用中性胶密封, 经 HE 染色后, 于显微镜下观察腹主动脉组织病理学变化并拍照。

2.4 油红 O 染色观察主动脉斑块变化

大鼠主动脉用生理盐水浸洗, 用 4% 多聚甲醛固定后制成厚度为 5 μ m 的石蜡切片, 置于 60% 异丙醇溶液中静置 15 min 后, 油红 O 染液染色 2 h,

再用 60% 异丙醇溶液进行漂洗, 蒸馏水洗涤 2 min, 于显微镜下观察并拍照, 使用 Image-Pro Plus 软件对图像进行分析并计算切片中斑块总面积百分比。

2.5 透射电镜观察主动脉组织超微结构变化

取各组大鼠胸主动脉, 浸没于 2.5% 戊二醛电镜固定液中 6 h, 用磷酸盐缓冲溶液冲洗, 再用 1% 四氧化锇磷酸缓冲液固定, 丙酮脱水, 环氧树脂 618 原位包埋, 切片后用枸橼酸铅和醋酸双氧铀染色, 采用透射电镜观察主动脉内皮细胞、内膜和内弹性膜以及平滑肌细胞的超微结构变化。

2.6 Western blotting 检测主动脉组织 Wnt5a、 β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达

取各组大鼠胸主动脉, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白并定量, 加入缓冲液煮沸变性, 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, 于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h; 洗膜后分别加入 Wnt5a (1:1000)、 β -catenin (1:1000)、GSK-3 β (1:1000)、p-GSK-3 β (1:1000)、GAPDH (1:2000) 一抗, 4 °C 孵育过夜; 用 TBST 缓冲液洗涤后, 加入二抗 (1:3000), 室温孵育 1 h; 洗涤后, 加入 ECL 发光试剂显影, 置于多功能成像仪下成像, 以 GAPDH 为内参蛋白, 采用 Image J 5.0 软件分析各目的蛋白的相对表达水平。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件处理数据, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用多因素方差分析, 两组间比较用 LSD- t 检验。

3 结果

3.1 黄芩苷对 AS 大鼠主动脉组织脂质沉积的影响

油红 O 染色 (图 1) 结果显示, 对照组大鼠主

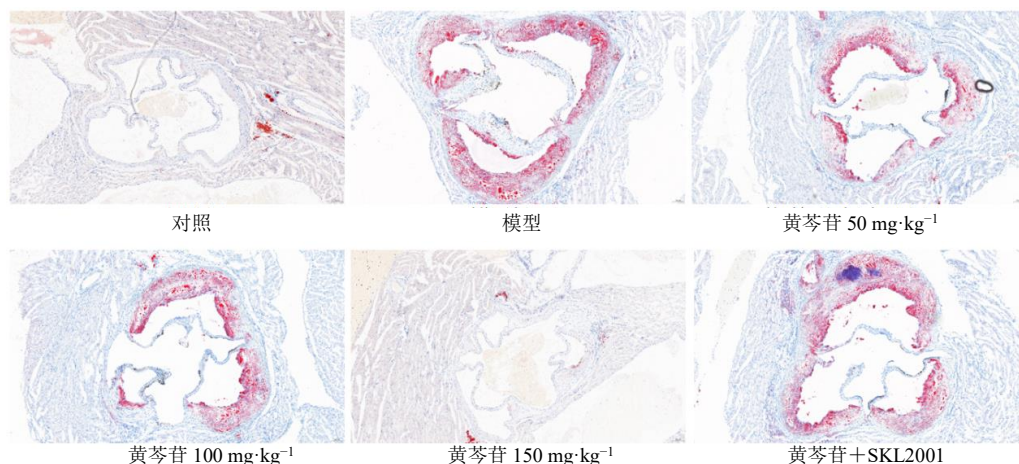


图 1 各组大鼠 AS 斑块的变化情况 (油红 O 染色, $\times 40$)

Fig. 1 Changes in AS plaques of rats in each group (oil red O staining, $\times 40$)

动脉内壁无 AS 斑块；模型组和黄芩苷+SKL2001 组大鼠主动脉斑块脂质含量增多，可见斑块处内膜结构破坏，动脉壁变形，巨噬细胞吞噬脂滴形成泡沫细胞，大量积聚于动脉内膜；黄芩苷低、中、高剂量组大鼠主动脉斑块脂质含量降低，病变程度均有所减轻。如表 1 所示，与对照组比较，模型组大鼠 AS 斑块面积明显增加 ($P<0.05$)；与模型组比较，黄芩苷低、中、高剂量组大鼠 AS 斑块面积明显减少 ($P<0.05$)，且呈剂量相关性；与黄芩苷高剂量组比较，黄芩苷+SKL2001 组大鼠 AS 斑块面积显著增加 ($P<0.05$)。

3.2 黄芩苷对 AS 大鼠血脂水平的影响

如表 2 所示，与对照组比较，模型组大鼠血清

表 1 各组大鼠 AS 斑块面积和脂质含量的比较

($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Comparison of area of AS plaques and lipid content of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	斑块面积/%	脂质含量/%
对照	—	1.00±0.12	0.00±0.00
模型	—	47.53±3.90 [#]	53.29±4.28 [#]
黄芩苷	50	26.19±2.68 [*]	34.73±2.53 [*]
	100	14.57±1.83 [*]	27.69±2.10 [*]
	150	7.92±0.97 [*]	10.62±1.29 [*]
黄芩苷+SKL2001	150+10	31.64±2.85 ^{*▲}	40.68±3.71 ^{*▲}

与对照组比较：[#] $P<0.05$ ；与模型组比较：^{*} $P<0.05$ ；与黄芩苷高剂量组比较：[▲] $P<0.05$ ，下表同。

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs baicalin high-dose group, same as below tables.

表 2 各组大鼠血脂水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Comparison of blood lipid levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	0.53±0.10	1.47±0.19	0.74±0.12	1.50±0.22
模型	—	1.40±0.21 [#]	0.81±0.09 [#]	2.13±0.28 [#]	2.88±0.34 [#]
黄芩苷	50	1.25±0.16 [*]	1.06±0.12 [*]	1.82±0.26 [*]	2.54±0.29 [*]
	100	1.09±0.13 [*]	1.23±0.16 [*]	1.54±0.20 [*]	2.23±0.26 [*]
	150	0.83±0.12 [*]	1.39±0.18 [*]	1.09±0.15 [*]	1.87±0.24 [*]
黄芩苷+SKL2001	150+10	1.31±0.18 [▲]	0.92±0.10 [▲]	1.97±0.21 [▲]	2.70±0.32 [▲]

中 HDL-C 水平显著降低 ($P<0.05$)，LDL-C、TG、TC 水平显著升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，黄芩苷低、中、高剂量组大鼠血清中 HDL-C 水平显著升高 ($P<0.05$)，LDL-C、TG、TC 水平显著降低 ($P<0.05$)，且呈剂量相关性；与黄芩苷高剂量组比较，黄芩苷+SKL2001 组大鼠血清中 HDL-C

水平显著降低 ($P<0.05$)，LDL-C、TG、TC 水平显著升高 ($P<0.05$)。

3.3 黄芩苷对 AS 大鼠主动脉组织病理变化的影响

HE 染色 (图 2) 显示，对照组大鼠胸主动脉管壁结构清晰，内膜光滑、形态正常；模型组和黄芩苷+SKL2001 组大鼠胸主动脉管壁明显增厚，内皮

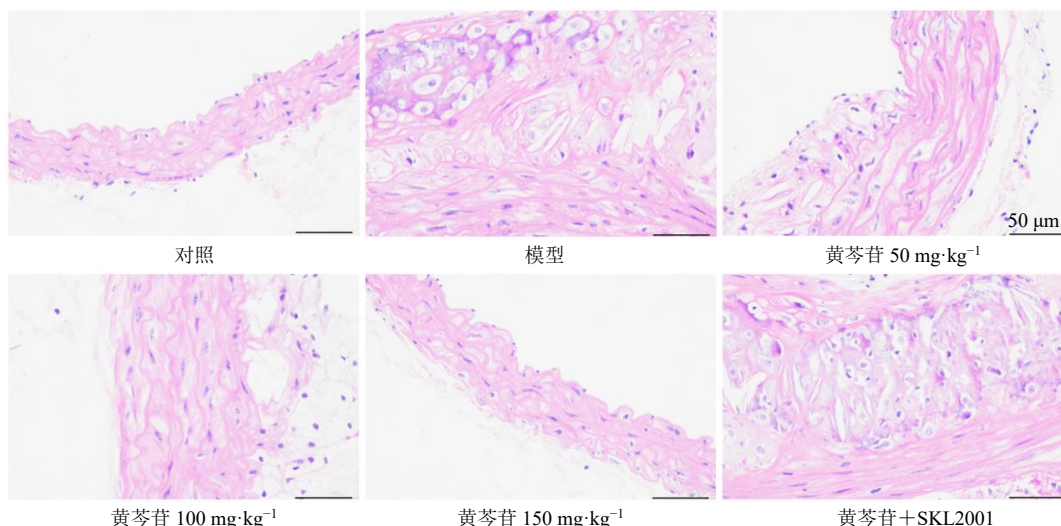


图 2 各组大鼠主动脉组织病理学变化 (HE 染色, ×400)

Fig. 2 Histopathological changes in aorta of rats in each group (HE staining, × 400)

细胞脱落结构不完整,内膜下可见大量炎症细胞浸润和泡沫细胞堆积;与模型组相比,黄芩苷低、中、高剂量组大鼠胸主动脉管壁增厚有所减轻,内皮细胞较为完整,内膜下存在少量炎症细胞浸润和泡沫样细胞聚集,其中黄芩苷高剂量组大鼠胸主动脉组织病理变化改善最明显。

3.4 黄芩苷对 AS 大鼠血清中炎症因子水平的影响

如表 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,黄芩苷低、中、高剂量组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低 ($P<0.05$),

且呈剂量相关性;与黄芩苷高剂量组比较,黄芩苷+SKL2001 组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高 ($P<0.05$)。

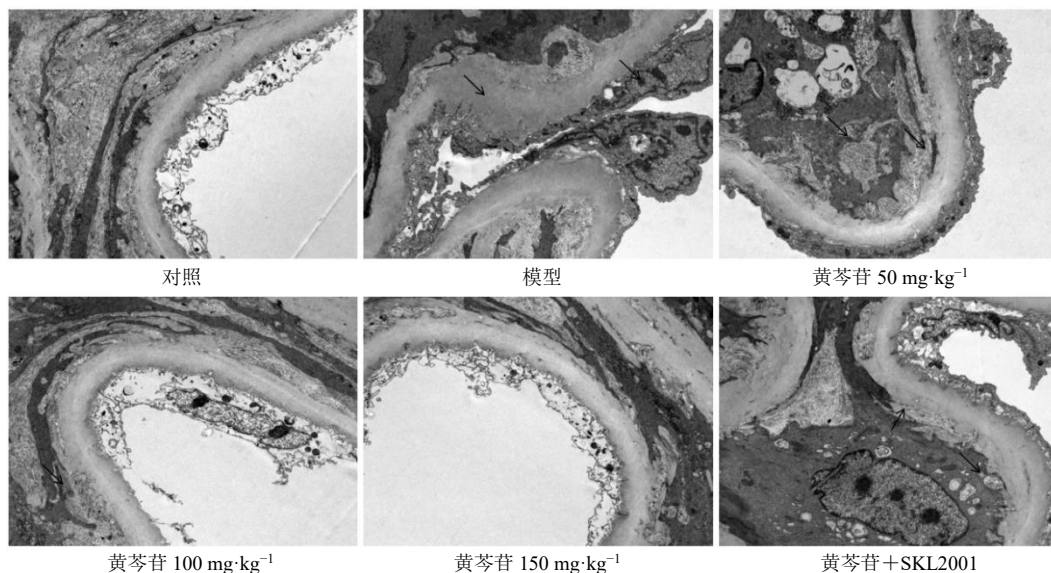
3.5 黄芩苷对 AS 大鼠主动脉组织内皮细胞超微结构变化的影响

如图 3 所示,模型组和黄芩苷+SKL2001 组大鼠主动脉组织内皮细胞肿胀和突出、弹性膜缺失,伴有结缔组织疏松和平滑肌细胞层完整性破坏。经黄芩苷治疗后,胸主动脉膜无明显突出和/或增厚,内皮细胞、弹性膜和平滑肌细胞的完整性无明显破坏,其中黄芩苷高剂量组改善作用最为明显。

表 3 各组大鼠血清中炎症因子水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Comparison of levels of inflammatory factors in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	53.83 $\pm$ 5.67	42.53 $\pm$ 6.53	102.58 $\pm$ 18.75
模型	—	226.49 $\pm$ 30.41 [#]	193.47 $\pm$ 21.57 [#]	187.56 $\pm$ 25.62 [#]
黄芩苷	50	186.72 $\pm$ 25.93 [*]	165.60 $\pm$ 18.48 [*]	158.82 $\pm$ 23.77 [*]
	100	137.53 $\pm$ 22.68 [*]	121.79 $\pm$ 13.92 [*]	139.17 $\pm$ 15.67 [*]
	150	89.67 $\pm$ 12.17 [*]	70.55 $\pm$ 10.56 [*]	113.49 $\pm$ 14.50 [*]
黄芩苷+SKL2001	150+10	201.74 $\pm$ 26.54 ^{*▲}	178.32 $\pm$ 19.69 ^{*▲}	170.65 $\pm$ 21.83 ^{*▲}



箭头表示结缔组织疏松和平滑肌细胞层完整性被破坏。

Arrows indicate that connective tissue is loose and integrity of smooth muscle cell layer is damaged.

图 3 各组大鼠主动脉组织内皮细胞超微结构变化 ($\times 10\ 000$)

Fig. 3 Ultrastructural changes in aortic endothelial cells of rats in each group ($\times 10\ 000$)

3.6 黄芩苷对 AS 大鼠血清中内皮细胞因子水平的影响

如表 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 NO 水平显著降低 ($P<0.05$), ET-1、ICAM-1 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,黄芩苷低、

中、高剂量组大鼠血清中 NO 水平显著升高 ($P<0.05$), ET-1、ICAM-1 水平显著降低 ($P<0.05$), 且呈剂量相关性;与黄芩苷高剂量组比较,黄芩苷+SKL2001 组大鼠血清中 NO 水平显著降低 ($P<0.05$), ET-1、ICAM-1 水平显著升高 ($P<0.05$)。

表 4 各组大鼠血清中内皮细胞因子水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Comparison of endothelial cytokine levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NO/(μmol·L ⁻¹)	ET-1/(pg·mL ⁻¹)	ICAM-1/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	38.17±4.08	108.94±20.16	15.75±2.94
模型	—	16.93±2.51 [#]	206.73±23.83 [#]	56.68±5.83 [#]
黄芩苷	50	23.54±2.77 [*]	177.54±26.41 [*]	45.56±4.17 [*]
	100	27.67±3.26 [*]	151.23±19.75 [*]	32.82±4.59 [*]
	150	32.57±3.54 [*]	126.53±20.32 [*]	21.34±3.76 [*]
黄芩苷+SKL2001	150+10	19.53±2.28 ^{*▲}	189.68±21.96 [▲]	50.22±4.92 ^{*▲}

3.7 黄芩苷对 AS 大鼠主动脉组织 Wnt5a、β-catenin、GSK-3β、p-GSK-3β 蛋白表达的影响

Western blotting 结果如图 4 和表 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠主动脉组织 GSK-3β 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), Wnt5a、β-catenin、p-GSK-3β 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷低、中、高剂量组大鼠主动脉组织 GSK-3β 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), Wnt5a、β-catenin、p-GSK-3β 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$), 且呈剂量相关性; 与黄芩苷高剂量组比较, 黄芩苷+SKL2001 组大鼠主动脉组织 GSK-3β 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), Wnt5a、β-catenin、p-GSK-3β 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$)。

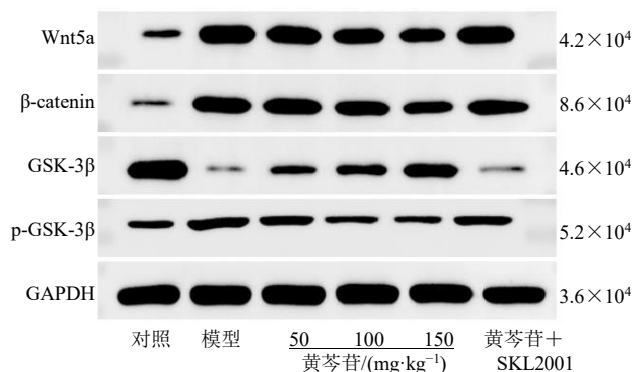


图 4 各组大鼠主动脉组织 Wnt5a、β-catenin、GSK-3β、p-GSK-3β 蛋白表达

Fig. 4 Wnt5a, β-catenin, GSK-3β and p-GSK-3β protein expressions in aorta of rats in each group in each group

表 5 各组大鼠主动脉组织 Wnt5a、β-catenin、GSK-3β、p-GSK-3β 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Comparison of protein expression levels of Wnt5a, β-catenin, GSK-3β and p-GSK-3β in aorta of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Wnt5a/GAPDH	β-catenin/GAPDH	GSK-3β/GAPDH	p-GSK-3β/GAPDH
对照	—	0.61±0.07	0.47±0.06	0.87±0.09	0.12±0.02
模型	—	1.28±0.13 [#]	1.08±0.15 [#]	0.36±0.03 [#]	0.31±0.04 [#]
黄芩苷	50	1.02±0.14 [*]	0.86±0.12 [*]	0.49±0.05 [*]	0.24±0.03 [*]
	100	0.88±0.10 [*]	0.71±0.09 [*]	0.62±0.07 [*]	0.20±0.03 [*]
	150	0.76±0.08 [*]	0.55±0.06 [*]	0.74±0.08 [*]	0.14±0.02 [*]
黄芩苷+SKL2001	150+10	1.13±0.11 ^{*▲}	0.97±0.10 ^{*▲}	0.41±0.04 [▲]	0.27±0.04 [▲]

4 讨论

AS 主要表现为机体中动脉粥样斑块产生且弹性降低, 进而引发管腔狭窄, 严重者甚至出现闭塞^[16]。在引起 AS 形成的众多机制中, 炎症占据重要地位。在 AS 各个阶段中, 与炎症相关的趋化因子、促炎细胞因子、黏附分子和炎症信号转导通路等驱动因素起着关键作用^[17]。因此, 抑制促炎细胞因子、阻断关键的炎症信号通路和促进炎症消退等可以为 AS 的治疗提供有效策略^[18]。黄芩苷是一种从黄芩的干燥根中提取的黄酮类化合物, 具有抗炎、抗凋亡、抗氧化、抗癌以及改善平滑肌细胞功能等作用^[19-21]。研究表明, 黄芩苷可通过抑制 NF-

κB 活性来降低高糖诱导的血管炎症反应, 也可以通过靶向细胞黏附分子表达预防 AS 病变, 表明黄芩苷在治疗血管炎性疾病、缓解 AS 进展中具有较大的潜力^[22-23]。本研究通过油红 O 染色检测各组大鼠胸主动脉 AS 斑块形成情况, 与对照组相比, 模型组大鼠胸主动脉斑块脂质含量增多, AS 斑块面积明显增大, 表明 AS 大鼠模型构建成功。

研究表明, 脂质代谢紊乱可导致机体中的炎症细胞等聚集在血管内皮表面, 促进炎症介质及黏附因子大量形成, 进而导致机体炎症反应及血管内皮损伤, 加剧 AS 斑块形成, 最终引起心血管事件的发生^[24-25]。本研究结果显示, 经黄芩苷干预后, AS

大鼠血脂水平得到改善,且呈剂量相关性。研究发现,炎症是促进 AS 脂质沉积及斑块形成的关键因素,AS 患者机体中存在促炎因子升高的现象^[26]。单核细胞成熟为巨噬细胞,吸收脂质成为泡沫细胞,是 AS 病变的标志。有研究表明,黄芩苷可以抑制巨噬细胞中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、环氧合酶-2 的表达,导致巨噬细胞从 M1 型极化为 M2 型,从而抑制了 AS 过程中的炎症反应^[27]。本研究结果显示,经黄芩苷干预后,AS 大鼠胸主动脉组织病理变化逐渐好转,血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平明显降低,且呈剂量相关性。表明黄芩苷可以有效改善 AS 大鼠的炎症反应和血脂水平。内皮功能障碍是 AS 病变发生和发展的重要组成部分,且来源于内皮细胞和巨噬细胞的促炎信号也会刺激内侧血管平滑肌细胞的迁移和增殖,最终导致内膜增生^[28]。血管内皮细胞可以感知炎症、压力等刺激;也可以释放一些活性物质如 ET-1、NO 等来调节血管张力,维持血管稳态^[29]。NO 是最强大的血管扩张剂,可抑制白细胞黏附、血小板聚集和血管平滑肌细胞增殖,NO 功能障碍会导致脂质过氧化和血管内皮细胞损伤^[30]。ET-1 是内皮细胞分离出的具有强烈的收缩血管功能的活性肽,当 ET-1 释放增加时,提示血管内皮细胞受损^[31]。本研究结果显示,经黄芩苷干预后,AS 大鼠胸主动脉膜无明显突出和/或增厚,内皮细胞、弹性膜和平滑肌细胞的完整性无明显破坏,血清 ET-1、ICAM-1 水平降低,血清 NO 水平升高,且呈一定的剂量相关性,表明黄芩苷可以有效改善 AS 大鼠的血管内皮功能。

Wnt 信号转导通路分为经典和非经典分支,Wnt/ β -catenin 信号通路也称为经典 Wnt 信号通路,可以调节细胞增殖和分化,控制脂质稳态和储存,与 AS 严重程度密切相关^[32-33]。在 Wnt “关闭”状态下,细胞质中的 β -catenin 水平较低,游离 β -catenin 被 GSK-3 β 有效磷酸化,并靶向蛋白酶体降解。GSK-3 β 介导 β -catenin 依赖性和非依赖性级联,对 Wnt 信号通路具有负调节作用。在细胞内信号传导过程中,Wnt 配体与 LDLR 基因家族成员的卷曲受体和 LRP5 或 LRP6 结合,导致 β -catenin 易位到细胞核中,从而触发靶基因的转录^[34]。研究表明,Wnt/ β -catenin 信号传导具有多种抗炎的作用,包括减少炎性细胞因子的产生、减少单核细胞募集和恢复血管完整性^[12]。詹萍等^[35]研究发现,通过抑制 AS 模型中 Wnt、 β -catenin 的表达,可以抑制平滑肌细胞迁

移,降低主动脉中膜面积和血管壁厚度。本研究结果显示,经黄芩苷干预后,大鼠主动脉 Wnt5a、 β -catenin、p-GSK3 β 蛋白表达水平降低,且呈剂量相关性。本研究采用 β -catenin 激动剂 SKL2001 与黄芩苷联合干预,结果显示,与黄芩苷高剂量组相比,黄芩苷+SKL2001 组大鼠 AS 斑块面积,血清中 LDL-C、TG、TC、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ET-1、ICAM-1 水平及主动脉 Wnt5a、 β -catenin、p-GSK3 β 蛋白表达水平明显升高,血清 HDL-C、NO 水平及主动脉 GSK-3 β 蛋白表达水平明显降低。表明黄芩苷可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对 AS 大鼠的炎症反应产生影响,而 SKL2001 可以逆转黄芩苷对 AS 大鼠的作用。

综上,黄芩苷可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 AS 大鼠模型炎症反应。本研究为找寻有效治疗 AS 的靶点研究提供策略,为开发出更具针对性和有效性的中药活性成分提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 曾清华,尹紫薇,黄爱思,等.心痛泰颗粒对动脉粥样硬化 ApoE^{-/-}小鼠 ox-LDL、ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志,2024,40(6): 989-996.
- [2] 郑学斌,黄玉艳.香菇多糖对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块形成及 AMPK 信号通路的影响 [J]. 中国免疫学杂志,2024,40(7): 1411-1415.
- [3] Zeng W Y, Wu D B, Sun Y X, *et al.* The selective NLRP3 inhibitor MCC950 hinders atherosclerosis development by attenuating inflammation and pyroptosis in macrophages [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 19305.
- [4] Pedro-Botet J, Climent E, Benaiges D. Atherosclerosis and inflammation. New therapeutic approaches [J]. *Med Clin*, 2020, 155(6): 256-262.
- [5] Poznyak A V, Kashirskikh D A, Postnov A Y, *et al.* Sialic acid as the potential link between lipid metabolism and inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2023, 56: e12972.
- [6] Si L J, Lai Y. Pharmacological mechanisms by which baicalin ameliorates cardiovascular disease [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1415971.
- [7] Paudel K R, Kim D W. Microparticles-mediated vascular inflammation and its amelioration by antioxidant activity of baicalin [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(9): 890.
- [8] Zhao J F, Wang Z T, Yuan Z L, *et al.* Baicalin ameliorates atherosclerosis by inhibiting NLRP3 inflammasome in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Diab Vasc Dis Res*,

- 2020, 17(6): 1479164120977441.
- [9] Li M S, Ren C L. Exploring the protective mechanism of baicalin in treatment of atherosclerosis using endothelial cells deregulation model and network pharmacology [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 257.
- [10] Xin L Y, Gao J L, Lin H C, *et al*. Regulatory mechanisms of baicalin in cardiovascular diseases: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 583200.
- [11] Oliveira-Paula G H, Liu S, Maira A, *et al*. The β -catenin C terminus links Wnt and sphingosine-1-phosphate signaling pathways to promote vascular remodeling and atherosclerosis [J]. *Sci Adv*, 2024, 10(11): eadg9278.
- [12] Wadey K S, Somos A, Leyden G, *et al*. Pro-inflammatory role of Wnt/ β -catenin signaling in endothelial dysfunction [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 9: 1059124.
- [13] 孙治中, 江艳君, 纪树亮, 等. 黄芩苷治疗小鼠动脉粥样硬化模型的作用与机制 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(19): 3037-3043.
- [14] 赵娟, 李相军, 孙波, 等. 维生素 D₃ 联合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(21): 3569-3571.
- [15] 宋明箫, 陈君顺子, 王宁伟, 等. 耐力训练大鼠抗动脉粥样硬化线粒体自噬通路中抗增殖蛋白 2 的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(11): 2294-2300.
- [16] 张志勇, 田辉. 虎杖苷通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路改善动脉粥样硬化大鼠动脉粥样硬化斑块和内皮炎症反应 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(6): 1228-1233.
- [17] Song B C, Bie Y L, Feng H X, *et al*. Inflammatory factors driving atherosclerotic plaque progression new insights [J]. *J Transl Int Med*, 2022, 10(1): 36-47.
- [18] Soehnlein O, Libby P. Targeting inflammation in atherosclerosis: From experimental insights to the clinic [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 589-610.
- [19] Singh S. Exploring the Cardiovascular Protective Effects of Baicalin: A Pathway to New Therapeutic Insights [J]. *Curr Top Med Chem*, 2025, 25(2): 163-171.
- [20] 李克亚, 肖金银, 罗雯鹏, 等. 黄芩苷调控 TUG1/PTBP1/NLRP3 分子网络抑制巨噬细胞焦亡治疗溃疡性结肠炎的机制 [J]. 中草药, 2025, 56(5): 1667-1681.
- [21] 侯晓杰, 张建锋, 侯长周, 等. 黄芩苷药理活性和作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(11): 2688-2696.
- [22] Wang G, Liang J X, Gao L R, *et al*. Baicalin administration attenuates hyperglycemia-induced malformation of cardiovascular system [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 234.
- [23] Ku S K, Bae J S. Baicalin, baicalein and wogonin inhibits high glucose-induced vascular inflammation *in vitro* and *in vivo* [J]. *BMB Rep*, 2015, 48(9): 519-524.
- [24] 陈苑, 黎宝留, 许二中, 等. 基于血流剪切力与炎症反应探讨当归补血汤治疗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(6): 786-793.
- [25] 范鸿儒, 王栋, 张帆, 等. 葱白提取物通过 PPAR γ /HO-1 途径对动脉粥样硬化大鼠血脂异常和炎症反应的调节作用 [J]. 检验医学与临床, 2024, 21(9): 1208-1213.
- [26] Libby P. Inflammation and the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Vascul Pharmacol*, 2024, 154: 107255.
- [27] Wang L, Huang S Y, Liang X L, *et al*. Immuno-modulatory role of baicalin in atherosclerosis prevention and treatment: Current scenario and future directions [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1377470.
- [28] Zhang Q, Ma S, Kang X, *et al*. A dual-targeting bioliposomes nanodrug repair endothelial cell dysfunction and restore macrophage cholesterol flow homeostasis to treat early atherosclerosis [J]. *J Nanobiotechnology*, 2025, 23(1): 365.
- [29] Chen S, Xie J D, Xie M T, *et al*. Przewaquinone A inhibits Angiotensin II-induced endothelial diastolic dysfunction activation of AMPK [J]. *Phytomedicine*, 2024, 133: 155885.
- [30] Li T D, Li D M, Xu H, *et al*. Wen-Xin Decoction ameliorates vascular endothelium dysfunction via the PI3K/AKT/ENOS pathway in experimental atherosclerosis in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 27.
- [31] Fan M Q, Bai J, Ding T, *et al*. Adipose-derived stem cell transplantation inhibits vascular inflammatory responses and endothelial dysfunction in rats with atherosclerosis [J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(11): 1036-1044.
- [32] Boucher P, Matz R L, Terrand J. Atherosclerosis: Gone with the wnt? [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 301: 15-22.
- [33] Weinstock A, Rahman K, Yaacov O, *et al*. Wnt signaling enhances macrophage responses to IL-4 and promotes resolution of atherosclerosis [J]. *eLife*, 2021, 10: e67932.
- [34] Lorzadeh S, Kohan L, Ghavami S, *et al*. Autophagy and the Wnt signaling pathway: A focus on Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, 1868(3): 118926.
- [35] 詹萍, 熊尚全, 柴大军, 等. 和厚朴酚通过 Wnt/ β -连环蛋白通路抗动脉粥样硬化 [J]. 中华高血压杂志, 2022, 30(2): 153-160.

[责任编辑 李亚楠]