• 药理与临床 •

莪术奥酮二醇通过 Cav-1 和 KLF4 抑制白细胞介素-1β 诱导的巨噬细胞样血管平滑肌细胞表型转化

王楠楠[1, 2]，袁　娉[1]，刘剑刚[1]，崔源源[1, 3*]

1. 中国中医科学院西苑医院，国家中医心血管病临床医学研究中心，北京　100091
2. 中国中医科学院研究生院，北京　100700
3. 中医证候全国重点实验室，广东 广州　510006

摘　要：目的　探讨莪术奥酮二醇（zedoarondiol，Zed）抑制白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）诱导的巨噬细胞样血管平滑肌细胞（vascular smooth muscle cells，VSMCs）表型转化的作用及分子机制。**方法**　构建大鼠腹主动脉球囊损伤模型，设置对照组、模型组、Zed（20 mg/kg）组、普伐他汀（10 mg/kg）组和 Zed＋甲基-β-环糊精（methyl-β-cyclodextrin，MβCD，20 mg/kg）组，尾 iv 给药 4 周后，取腹主动脉，通过苏木素-伊红染色观察血管新生内膜面积与中膜面积比值变化，免疫组化法检测 VSMCs 表型标记物的表达。体外采用 IL-1β 建立巨噬细胞样大鼠冠状动脉平滑肌细胞表型模型，给予药物干预后，采用 Transwell 实验检测 VSMCs 迁移能力，免疫荧光染色观察 α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）、CD68 的表达及细胞表型变化，ELISA 检测胶原、基质金属蛋白酶及炎症因子的水平，qRT-PCR 和 Western blotting 检测 VSMCs 表型相关基因和蛋白的表达。**结果**　动物实验结果显示，与模型组比较，Zed 可显著降低大鼠腹主动脉球囊损伤后的血管新生内膜面积与中膜面积比值（$P<0.01$），上调平滑肌肌球蛋白重链（smooth-muscle myosin heavy chain，SM-MHC）表达（$P<0.01$），下调 S100 钙结合蛋白 A4（S100 calcium-binding protein A4，S100A4）的表达（$P<0.01$）；给予小窝蛋白-1（caveolin-1，Cav-1）抑制剂 MβCD 干预后，可逆转 Zed 对血管内膜增生及表型标记物 SM-MHC、S100A4 的调控作用（$P<0.01$）。细胞实验结果显示，IL-1β 显著增强 VSMCs 迁移能力（$P<0.01$），上调促炎黏附因子、促炎趋化因子、促炎细胞因子、基质金属蛋白酶水平（$P<0.01$），下调收缩表型标志蛋白 α-SMA、SM-MHC 表达（$P<0.01$），诱导 VSMCs 向巨噬细胞样表型转化；Zed 干预后可降低炎症因子与基质金属蛋白酶表达（$P<0.05$、0.01），提升胶原含量及收缩表型蛋白表达（$P<0.01$），抑制 VSMCs 异常表型转化。进一步机制研究显示，过表达 Krüppel 样因子 4（Krüppel-like factor 4，KLF4）或沉默 Cav-1 可显著逆转 Zed 对 VSMCs 的巨噬细胞样表型转化作用（$P<0.05$、0.01）。**结论**　Cav-1 与 KLF4 均是 Zed 发挥保护作用的必要分子，Zed 可抑制 IL-1β 诱导的巨噬细胞样 VSMCs 表型转化与炎症反应，减轻血管内膜增生，提高胶原含量。

关键词：莪术奥酮二醇；血管重构；血管平滑肌细胞；表型转化；Cav-1；KLF4

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2026)22 - 8939 - 15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.22.011

Zedoarondiol inhibits interleukin-1β-induced phenotypic transformation of macrophage-like vascular smooth muscle cells via Cav-1 and KLF4

WANG Nannan[1, 2], YUAN Ping[1], LIU Jiangang[1], CUI Yuanyuan[1, 3]

1. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China
2. Graduate School of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China
3. State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510006, China

收稿日期：2026-05-28

基金项目：国家自然科学青年基金项目（82104668）；中国中医科学院优秀青年科技人才（创新类）培养专项（ZZ14-YQ-009）；山西省中医药管理局科研项目（2022ZYYC032）

作者简介：王楠楠（2001—），女，硕士研究生，从事中西医结合心血管疾病的防治。E-mail: wangnannan07@163.com

***通信作者：**崔源源（1986—），女，博士，硕士生导师，副主任医师，从事中西医结合心血管疾病基础和临床的研究。E-mail: cuiyuanyuan59@yeah.net

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of zedoarondiol (Zed) in inhibiting interleukin-1β (IL-1β)-induced phenotypic transformation of macrophage-like vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** A rat abdominal aortic balloon injury model was established. Control group, model group, Zed (20 mg/kg) group, pravastatin (10 mg/kg) group and Zed + methyl-β-cyclodextrin (MβCD, 20 mg/kg) group were set up. After four weeks of tail iv administration, the abdominal aorta was taken and the ratio of neointimal area to media area was observed by hematoxylin-eosin staining. The expressions of VSMC phenotype markers were detected by immunohistochemistry. *In vitro*, a macrophage-like rat coronary artery smooth muscle cell phenotype model was established using IL-1β. After drug intervention, the migration ability of VSMCs was detected by Transwell assay, the expressions and phenotype changes of α-smooth muscle actin (α-SMA) and CD68 were observed by immunofluorescence staining. The levels of collagen, matrix metalloproteinases and inflammatory factors were detected by ELISA, the expressions of phenotype-related genes and proteins in VSMCs was detected by qRT-PCR and Western blotting. **Results** Animal experiment results showed that compared with model group, Zed significantly reduced the ratio of neointimal area to media area in abdominal aorta of rat after balloon injury ($P < 0.01$), upregulated the expression of smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) ($P < 0.01$), and downregulated the expression of S100 calcium binding protein A4 (S100A4) ($P < 0.01$). After intervention with caveolin-1 (Cav-1) inhibitor MβCD, the regulatory effects of Zed on vascular intimal hyperplasia and phenotype markers SM-MHC and S100A4 were reversed ($P < 0.01$). The cell experiment results showed that IL-1β significantly enhanced the migration ability of VSMCs ($P < 0.01$), upregulated the levels of pro-inflammatory adhesion factors, pro-inflammatory chemokines, pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases ($P < 0.01$), downregulated the expressions of contraction phenotype marker proteins α-SMA and SM-MHC ($P < 0.01$), and induced VSMCs to transform into macrophage-like phenotype. Zed intervention could reduce the expressions of inflammatory factors and matrix metalloproteinases ($P < 0.05$, 0.01), increase collagen content and contractile phenotype protein expressions ($P < 0.01$), and inhibit abnormal phenotype transformation of VSMCs. Further mechanistic studies showed that Krüppel-like factor 4 (KLF4) overexpression or Cav-1 silencing significantly reverse the protective effect of Zed on VSMCs phenotypic transformation ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Both Cav-1 and KLF4 are essential molecules for Zed to exert its protective effects. Zed could inhibit IL-1β-induced phenotypic transformation and inflammatory response of macrophage-like VSMCs, reduce vascular intimal hyperplasia, increase collagen content.

Key words: zedoarondiol; vascular remodeling; vascular smooth muscle cells; phenotype transformation; Cav-1; KLF4

血管损伤后的炎症反应被认为是驱动血管重构的关键因素[1-2]，血管平滑肌细胞（vascular smooth muscle cells，VSMCs）参与血管损伤后重构的多个关键阶段。VSMCs 是构成血管中膜的主要细胞，在维持血管结构与功能稳态中具有关键作用[3-4]。在炎症信号刺激下，VSMCs 发生表型去分化，由收缩表型进一步转分化为成纤维细胞样、巨噬细胞样、成骨样和脂肪细胞 VSMCs 等多种表型[5-6]，对血管重构具有重要影响。研究证实，巨噬细胞样 VSMCs 表型可促进血管炎症反应，表现为收缩表型相关基因的表达下调、合成型相关蛋白上调及血管炎症反应加剧[7-8]。因此，抑制巨噬细胞样 VSMCs 表型转化成为防治血管炎症性疾病的一个新途径。

小窝蛋白-1（caveolin-1，Cav-1）是细胞膜上的关键蛋白之一[9-10]，是调节炎症和逆转胆固醇运输的关键因素[11-12]。Cav-1 参与血管损伤后炎症反应与重构的多个关键环节[13]。多项研究表明 Cav-1 表达下调是 VSMCs 发生表型转换的核心机制，Cav-1 可通过调控活性氧、细胞外信号调节激酶信号通路介导 VSMCs 表型转换，导致收缩表型标志物表达显著降低，细胞形态发生明显改变[14-16]。因此，调控 Cav-1 信号通路、减少 VSMCs 表型转换已成为延缓血管重构进展的重要靶点。

莪术奥酮二醇（zedoarondiol，Zed）是莪术 *Curcumae Rhizoma* 的关键活性成分，已被证实具有显著的血管保护作用[17]。Zed 通过调节 CXC 趋化因子配体 12（chemokine CXC motif ligand 12，CXCL12）/CXC 趋化因子受体 4（CXC chemokine receptor 4，CXCR4）通路抑制单核细胞向内皮细胞的迁移和黏附，发挥血管保护作用[18]。此外 Zed 还可显著降低氧化应激诱导的内皮细胞细胞间黏附分子（intercellular adhesion molecule，ICAM）和血管细胞黏附分子（vascular cell adhesion molecule，VCAM）的表达水平[19]。然而，关于 Zed 能否通过调控巨噬细胞样 VSMCs 表型转化，发挥血管保护作用，目前尚无系统研究报道。为此，本研究采用球囊损伤诱导大鼠腹主动脉血管内膜增生，通过大鼠腹主动脉球囊损伤模型及白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）诱导的巨噬细胞样 VSMCs 表型模型，探讨 Zed 对巨噬细胞样 VSMCs 表型转化的作用及分子机制。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠，10～11 周龄，体质量 350～400 g，购自北京华阜康生物技术股份有限公司，许可证号 SCXK（京）2016-0022，动物质量合格证号 11401300053531。动物饲养于中国中医科学院西苑医院屏障级动物室内，按照实验动物标准化条件进行饲养。所有大鼠分笼饲养，环境条件为 12 h 明暗循环，温度 22～26 ℃，相对湿度（50±10）%。所有大鼠均采用高脂饲料（基础饲料 78.8%、胆固醇 3.5%、猪油 12%、丙基硫氧嘧啶 0.2%、胆酸钠 0.5%、白糖 5%）适应性喂养 1 周后开展造模手术。动物实验经中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会的批准（批准号 2023XLC005-2）。

本实验所用 VSMCs 为冠状动脉平滑肌细胞（coronary artery smooth muscle cells，CASMCs，CP-R079），购自普诺赛生命科技有限公司，在专用培养基（CM-R079-1）中培养。

1.2 药品与试剂

Zed（质量分数为 98.43%，批号：20150806）由中国科学院大连化学物理研究所梁鑫淼研究员实验室提供，称取 40 mg Zed 溶于 20 mL 双蒸水，超声助溶配制为 2 mg/mL 混悬液，现配现用；普伐他汀钠片（批号 H20040101）购自第一三共制药（上海）有限公司，取 20 mg 普伐他汀钠片溶于 20 mL 双蒸水，配制成 1 mg/mL 母液，实验前以双蒸水稀释至 0.25 mg/mL，−20 ℃分装保存，每周重新配制；甲基-β-环糊精（methyl-β-cyclodextrin，MβCD，批号 C4555，质量分数≥98%）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；Cav-1 沉默小干扰 RNA（siCav-1）、Krüppel 样因子 4（Krüppel-like factor 4，KLF4）过表达质粒（KLF4-OE）由江苏赛索飞生物科技有限公司构建；IL-1β（批号 HY-30003）购自美国 MedChemExpress 公司，IL-1β 用双蒸水配制成 10 μg/mL 母液，−20 ℃分装保存；大鼠 CC 趋化因子配体 2（chemokine C-C motif ligand 2，CCL2）ELISA 试剂盒（批号 JL11450）、大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒（批号 JL20896）购自江莱生物工程有限公司；大鼠 ICAM-1 ELISA 试剂盒（批号 PI495）购自碧云天生物技术有限公司；大鼠 VCAM-1 ELISA 试剂盒（批号 D731131）购自上海生工生物工程股份有限公司；大鼠 I 型胶原（collagen-I，COL-I）ELISA 试剂盒（批号 MD120019）、大鼠 COL-III ELISA 试剂盒（批号 MD120029）、大鼠基质金属蛋白酶-2（matrix metalloproteinase-2，MMP-2）ELISA 试剂盒（批号 MD123299）、大鼠 MMP-9 ELISA 试剂盒（批号 MD130278）购自北京百奥思科生物医学技术有限公司；兔抗 α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA/Acta2）单克隆抗体（批号 ab124964）、小鼠抗 CD68 单克隆抗体（批号 ab31630）、兔抗 Cav-1 单克隆抗体（批号 ab32577）、兔抗 KLF4 单克隆抗体（批号 ab214666）、Alexa Fluor-594 标记的山羊抗兔 IgG 二抗（批号 ab150080）、Alexa Fluor-488 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗（批号 ab150113）购自英国 Abcam 公司；小鼠抗平滑肌肌球蛋白重链（smooth-muscle myosin heavy chain，SM-MHC/Myh11）单克隆抗体（批号 4629-MSM3-P1）、兔抗 S100 钙结合蛋白 A4（S100 calcium-binding protein A4，S100A4）单克隆抗体（批号 MA5-35267）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；兔抗 β-actin 单克隆抗体（批号 AC026）、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗（批号 AS014）、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗（批号 AS003）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 仪器

BeamCyte-1026 流式细胞仪（常州必达科生物科技有限公司）；SpectraMax-M5 型全波长酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；Nikon Elcipse-Ci 型激光共聚焦显微镜、Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜（日本尼康公司）；Mini-PROTEAN® Tetra Cell 型蛋白电泳系统、EPS300 型电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；ChemiScope6100 型化学发光成像仪（上海勤翔科学仪器有限公司）；JY02S 型凝胶成像仪（北京君意东方电泳设备有限公司）；Q2000B 型荧光定量 PCR 仪（杭州朗基科学仪器有限公司）；37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；RM2245 型半自动石蜡切片机、ASP200S 型全自动脱水机、EG1150C 型自动包埋机、LEICA AUTO STAINER-XL 型自动染色封片工作站（德国 Leica 公司）；BH-2 型光学显微镜（日本 Olympus 公司）；−80℃超低温冰箱（日本 SANYO 公司）；CF1524R 型台式高速冷冻离心机（北京兰杰柯科技有限公司）；QL-902 型涡旋振荡器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；Unano-1000 型分光光度计（杭州优米仪器有限公司）；611VF 型纯水机（德国 Sartorius 公司）。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 大鼠球囊损伤模型建立　球囊损伤所致血管新生内膜增生是血管损伤后 VSMCs 异常表型转化的重要病理基础[20]。大鼠术前禁食不禁水 12 h 后称定质量，ip 2%戊巴比妥钠（50 mg/kg）麻醉，刺激大鼠右侧后肢无肌张力反应后，常规消毒备皮后分离右侧股动脉、股静脉及神经。显微血管夹夹闭股动脉近心端，穿刺针穿刺股动脉，若出现血管收缩反应则滴加利多卡因注射液，导丝伸入腹主动脉处并利用导丝为牵引将塑料球囊导管送至腹主动脉段，抽出导丝，压力泵控制水压 4～6 atm（1 atm＝101.3 kPa，观察主动脉扩张至动脉外径 2 倍），每次 30 s 反复 3 次实现血管内膜机械剥离；对照组不置入球囊导管，其余手术操作相同。术后逐层缝合肌肉及皮肤组织，肌肉连续注射青霉素（2.5×10^4 IU/只），1 次/d，连续 3 d，所有动物按照饲养标准条件给予高脂饲料对其进行单独饲养。

2.1.2 分组与给药　采用随机数字表法将大鼠分为对照组、模型组、Zed 组、普伐他汀组和 Zed＋MβCD 组，每组 5 只。普伐他汀在血管机械损伤模型中可同时发挥全身抗炎与血管内皮保护作用[21]；MβCD 可抑制 Cav-1 表达及功能活性[22]。对照组和模型组尾 iv 生理盐水；Zed 组尾 iv Zed 混悬液（20 mg/kg，给药剂量参考本课题组前期相关药效学研究确定[18,23]）；普伐他汀组尾 iv 普伐他汀溶液（10 mg/kg，成人临床普伐他汀口服剂量 40 mg/d，大鼠给药剂量均依据人与动物体表面积换算公式[23]计算）；Zed＋MβCD 组尾 iv Zed 混悬液（20 mg/kg）和 MβCD 溶液（20 mg/kg，双蒸水稀释）。所有大鼠均按 10 mL/kg 尾 iv 给药，1 次/d，连续给药 28 d，期间密切观察大鼠一般状态。给药第 28 天，大鼠禁食禁水 12 h，ip 过量戊巴比妥钠处死后，迅速分离腹主动脉，截取损伤段血管组织，PBS 缓冲液冲洗 3 次，立即置于 4%多聚甲醛中固定 24 h 备用。

2.1.3 苏木素-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色观察腹主动脉组织病理变化　取腹主动脉损伤处相同位置（距髂动脉 1 cm 处），组织经 4 %多聚甲醛固定、脱水、透明、浸蜡包埋成蜡块；切片脱蜡至水，苏木素染核 5～10 min，伊红进行细胞质染色 1～2 min；盐酸乙醇分化、氨水返蓝，脱水透明封片，在光学显微镜下观察并拍照，采用 Image J 软件分析血管新生内膜面积与中膜面积比。

2.1.4 免疫组化检测腹主动脉组织 S100A4 和 SM-MHC 表达　腹主动脉损伤组织切片脱蜡至水，并将内源性过氧化物酶阻断剂（3% H_2O_2）滴加在组织上，微波热修复后滴加 5%牛血清白蛋白封闭，分别滴加兔抗大鼠 S100A4、SM-MHC，4 ℃孵育过夜。次日滴加二抗、DAB 显色液反应并在显微镜下观察，控制反应时间。随后滴加 Mayer's 苏木素复染细胞核，封片后于显微镜下观察并拍照，采用 Image J 软件分析平均 *A* 值。

2.2 细胞实验

2.2.1 流式细胞术检测巨噬细胞样 VSMCs 表型　采用 6 孔板接种 VSMCs，待细胞贴壁后，给予不同质量浓度（0、10、20、30、50、100 ng/mL）的 IL-1β 干预 VSMCs 24 h；收集细胞制备单细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL，每孔 100 μL。经固定、破膜处理后，加入 α-SMA（1∶150）、CD68（1∶50）一抗，室温避光孵育，PBS 洗涤后加入 Alexa Fluor 标记二抗（1∶500），避光孵育 30 min，洗涤后重悬，流式细胞仪检测 α-SMA 及 CD68 阳性细胞比例，确定后续使用 20 ng/mL IL-1β 构建巨噬细胞样 VSMCs 模型。

2.2.2 CCK-8 法检测细胞活力　VSMCs 以 5×10^3 个/孔接种在 96 孔板中，每孔加入 100 μL 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养。设置对照组、模型组和 Zed（10、20、50、100 μg/mL）组，待细胞贴壁后，弃去培养基，对照组加入不含药物的培养基，模型组加入含 20 ng/mL IL-1β 的培养基，Zed 组加入含 20 ng/mL IL-1β 和不同质量浓度 Zed 的培养基，干预 24 h。另设置未接种细胞的空白孔，仅加入培养基。加入 CCK-8 试剂，于培养箱中孵育 1 h，采用酶标仪测定 450 nm 处的 *A* 值，计算细胞活力。

$$细胞活力=(A_{实验}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})$$

2.2.3 ELISA 检测上清液中 VCAM-1、ICAM-1、CCL2、IL-6 水平　按“2.2.2”项下方法处理后，收集细胞上清液，按照试剂盒说明书检测上清液中 VCAM-1、ICAM-1、CCL2、IL-6 水平。

2.2.4 Transwell 实验检测细胞迁移能力　设置对照组、模型组、Zed（20 μg/mL）组和普伐他汀（50 μmol/L[21]）组。对照组加入不含药物的培养基，模型组加入含 20 ng/mL IL-1β 的培养基，Zed 组加入含 20 ng/mL IL-1β 和 20 μg/mL Zed 的培养基，普伐他汀组加入含 20 ng/mL IL-1β 和 50 μmol/L 普伐他汀的培养基，干预 24 h。各组处理后的 VSMCs 用

无血清培养基进行饥饿培养 12 h，随后用胰酶消化细胞，终止消化后，1 000 r/min 离心 3 min，弃上清液，PBS 洗涤细胞 1 次，离心弃上清后用含 0.1%牛血清白蛋白的无血清培养基重悬细胞，细胞计数后，将细胞悬液加入 Transwell 上室（每孔 200 μL，5×10^4 个/mL），下室加入含血清培养基 600 μL，培养 24 h 后，PBS 冲洗，将小室底面浸入 10%甲醇中固定细胞 30 min，转移至纯净水中，洗去甲醇，再把小室底面浸入结晶紫染液中染色 5 min，用纯净水清洗至背景清晰，光学显微镜下拍照，采用 Image J 软件计数穿过膜细胞数。

2.2.5 ELISA 检测细胞裂解液中 COL-I、COL-III 以及细胞上清液 MMP-2、MMP-9、IL-6 水平 设置对照组、模型组、Zed（20 μg/mL）组和普伐他汀（50 μmol/L）组。对照组加入不含药物的培养基，模型组加入含 20 ng/mL IL-1β 的培养基，Zed 组加入含 20 ng/mL IL-1β 和 20 μg/mL Zed 的培养基，普伐他汀组加入含 20 ng/mL IL-1β 和 50 μmol/L 普伐他汀的培养基，干预 24 h。收集细胞，加入裂解液裂解细胞，收集裂解液，按照试剂盒说明书检测细胞裂解液中 COL-I、COL-III 水平；收集细胞上清液，按照试剂盒说明书检测上清液中 MMP-2、MMP-9、IL-6 水平。

2.2.6 免疫荧光检测 CD68 和 α-SMA 表达 取对数生长期的 VSMCs 接种于细胞爬片上，按照“2.2.5”项下方法进行分组与给药，弃去培养基，4%多聚甲醛室温固定 15 min，0.1% Triton X-100 室温通透 10 min；加入 5%牛血清白蛋白于室温封闭 1 h，阻断非特异性结合。弃去封闭液，滴加兔源 α-SMA（1∶500）、小鼠源 CD68（1∶500）一抗，4 ℃孵育过夜。次日用含 0.1%聚山梨酯-20 的 PBS 充分洗涤后，加入 Alexa Fluor 594 标记的山羊抗兔 IgG（1∶500）、Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG（1∶500）荧光二抗混合液，室温避光孵育 1 h。洗涤后加入 DAPI 染液于室温染核，抗荧光淬灭封片剂封片，利用激光共聚焦显微镜观察并采集图像。

2.2.7 KLF4-OE 和 siCav-1 转染

（1）KLF4-OE 构建：扩增全长 1 467 bp *KLF4* 序列，采用 KpnI-XhoI 双酶切后克隆至 pcDNA3.1(+)载体；连接产物导入 TOP10 感受态细胞，挑取单克隆菌株测序验证序列正确性。采用 Lipofectamine® RNAiMAX 将 KLF4-OE 转染 VSMCs，转染 12 h 更换完全培养基，继续培养 12 h 后开展后续干预；转染效率通过 qRT-PCR 检测 *KLF4* mRNA 表达水平进行验证。

（2）siCav-1 构建：靶向 *Cav-1* 的 3 组 siRNA 序列（102、269、490 位点）及阴性对照 si-NC 由 Genecefe Biotechnology Corporation 合成；以 50 nmol/L 终浓度转染细胞，48 h 后检测 *Cav-1* mRNA 表达水平筛选干扰效率最优片段。

（3）分组与给药：设置对照组、模型组、Zed（20 μg/mL）组、普伐他汀（50 μmol/L）组、Zed＋siCav-1 组和 Zed＋KLF4-OE 组，分别转染 siCav-1 及 KLF4-OE 质粒后给予 Zed 或普伐他汀干预 24 h。除对照组外，其余各组均给予 20 ng/mL IL-1β 诱导 VSMCs 发生巨噬细胞样转化。按“2.2.5”项下方法检测细胞裂解液中 COL-I、COL-III 以及细胞上清液 MMP-2、IL-6 水平，按“2.2.6”项下方法检测 CD68 和 α-SMA 表达。

2.2.8 qRT-PCR 检测相关基因表达 按“2.2.7”项下方法进行分组和给药，收集细胞，按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。引物由 Genecefe Biotechnology Corporation 合成，引物序列见表 1，将 *β-actin* 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5’-3’)
Cav-1	F: ACGTAGACTCCGAGGGACAT
	R: TCGTCGTTGAGATGCTTGGG
KLF4	F: GGGAGAAGACACTGCGTCCA
	R: GGTAGGGCCGGGTTGTTAC
β-actin	F: ACCCAGATCATGTTTGAGACCT
	R: GACCAGAGGCATACAGGGACAAC

2.2.9 Western blotting 检测相关蛋白表达 按“2.2.7”项下方法进行分组和给药，收集细胞，加入裂解液提取蛋白。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 1 h 后，分别加入 Cav-1（1∶1 000）、KLF4（1∶1 000）、α-SMA（1∶1 000）、SM-MHC（1∶1 000）、β-actin（1∶5 000）抗体，4 ℃摇床孵育过夜；次日滴加 HRP 标记的二抗（1∶5 000），室温孵育 1 h，采用增强化学发光试剂显色，化学发光成像仪采集蛋白条带，以 β-actin 为内参蛋白，Image J 软件分析条带灰度值。

2.3 统计学分析

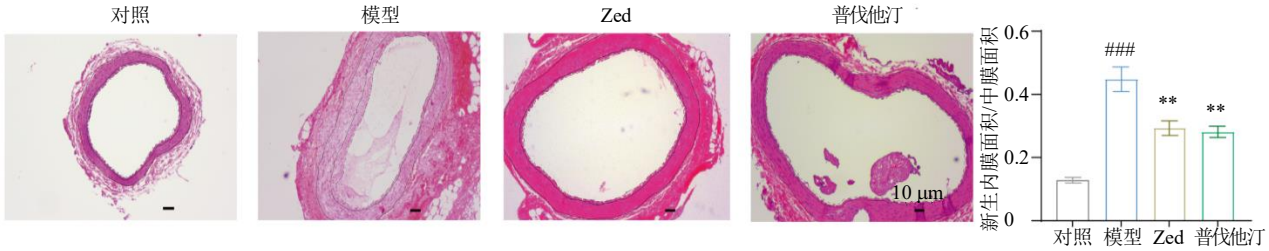
所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。采用 Shapiro-Wilk 检验验证数据正态性，Levene 检验验证方差齐性。两组间比

较：符合正态分布且方差齐采用独立样本 *t* 检验，非正态分布采用 Mann-Whitney U 检验，符合正态分布但方差不齐，采用 Welch *t* 检验。多组间比较：符合正态分布且方差齐采用单因素方差分析（One-way ANOVA），后续采用 Tukey's HSD 法进行多重比较；非正态分布采用 Kruskal-Wallis H 检验，后续采用 Dunn's 法进行多重比较。

3　结果

3.1　Zed 抑制球囊损伤模型大鼠血管新生内膜增生及 VSMCs 表型转化

如图 1 所示，与对照组比较，模型组大鼠血管新生内膜面积与中膜面积比值显著增加（$P<0.001$），提示球囊损伤模型构建成功；与模型组比较，Zed 组和普伐他汀组大鼠血管新生内膜面积与中膜面积比值均显著降低（$P<0.01$）。进一步采用免疫组化检测 VSMCs 表型相关蛋白表达，结果如图 2 所示，与对照组比较，模型组大鼠腹主动脉组织 S100A4 阳性表达显著增加（$P<0.01$），SM-MHC 阳性表达显著减少（$P<0.01$），表明 VSMCs 发生表型转化；与模型组比较，Zed 组 S100A4 阳性表达显著降低（$P<0.01$），SM-MHC 阳性表达显著升高（$P<0.01$），提示 Zed 抑制 VSMCs 表型转化。



与对照组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$　$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$，图 2～5 同。

$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$　$^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* control group; $^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* model group, same as figs. 2—5.

图 1　Zed 对球囊损伤模型大鼠血管重构的影响（HE，×150；$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Fig. 1　Effect of Zed on vascular remodeling in balloon-injured rats model (HE, × 150; $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

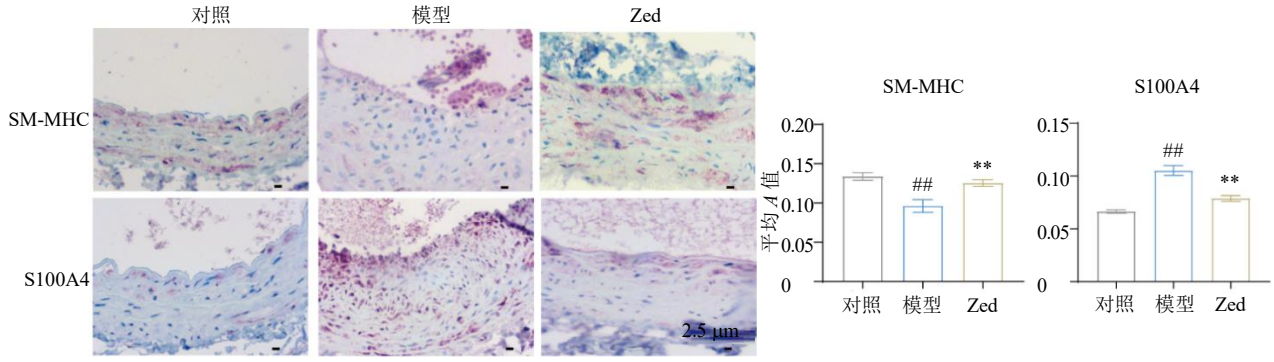
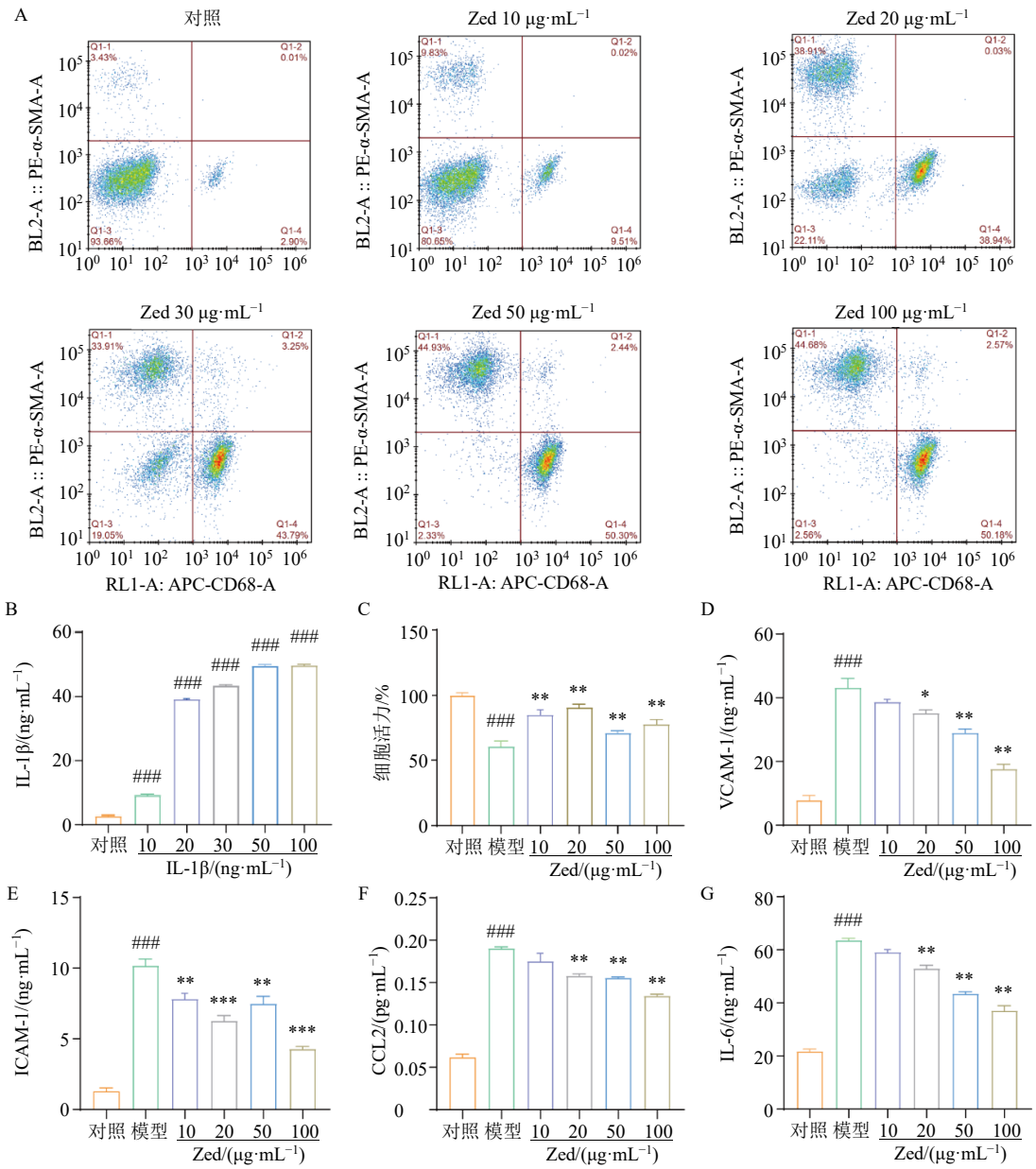


图 2　Zed 对球囊损伤模型大鼠 VSMCs 表型相关蛋白表达的影响（×600；$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Fig. 2　Effect of Zed on VSMCs phenotype-related protein expressions in balloon-injured rats model (× 600; $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

3.2　Zed 抑制 IL-1β 诱导的巨噬细胞样 VSMCs 表型转化

如图 3-A、B 所示，采用 10、20、30、50、100 ng/mL IL-1β 处理 VSMCs 24 h 后，α-SMA^{-}CD68^{+}细胞比例显著升高（$P<0.01$、0.001），提示 VSMCs 向巨噬细胞样表型转化。结合既往研究结果[23]，采用 20 ng/mL IL-1β 建立巨噬细胞样 VSMCs 表型模型。采用不同质量浓度（10、20、50、100 μg/mL）的 Zed 干预 VSMCs，CCK-8 检测结果（图 3-C）显示，与模型组比较，Zed 呈剂量相关性地逆转 IL-1β 诱导的 VSMCs 活力降低（$P<0.01$），其中 20 μg/mL 改善作用最强。ELISA 检测结果（图 3-D～G）显示，与对照组比较，模型组促炎黏附因子 VCAM-1、ICAM-1 及促炎细胞因子 CCL2、IL-6 的水平显著升高（$P<0.001$）；与模型组比较，20、50、100 μg/mL Zed 可显著降低上述因子的表达水平（$P<0.05$、



A、B-VSMCs 给予 IL-1β 处理后，采用流式细胞术检测 α-SMA⁻CD68⁺细胞比例；C-Zed 对 IL-1β 诱导 VSMCs 细胞活力的影响；D～G-Zed 对 IL-1β 诱导 VSMCs 细胞上清液中 VCAM-1、ICAM-1、CCL2 和 IL-6 水平的影响。

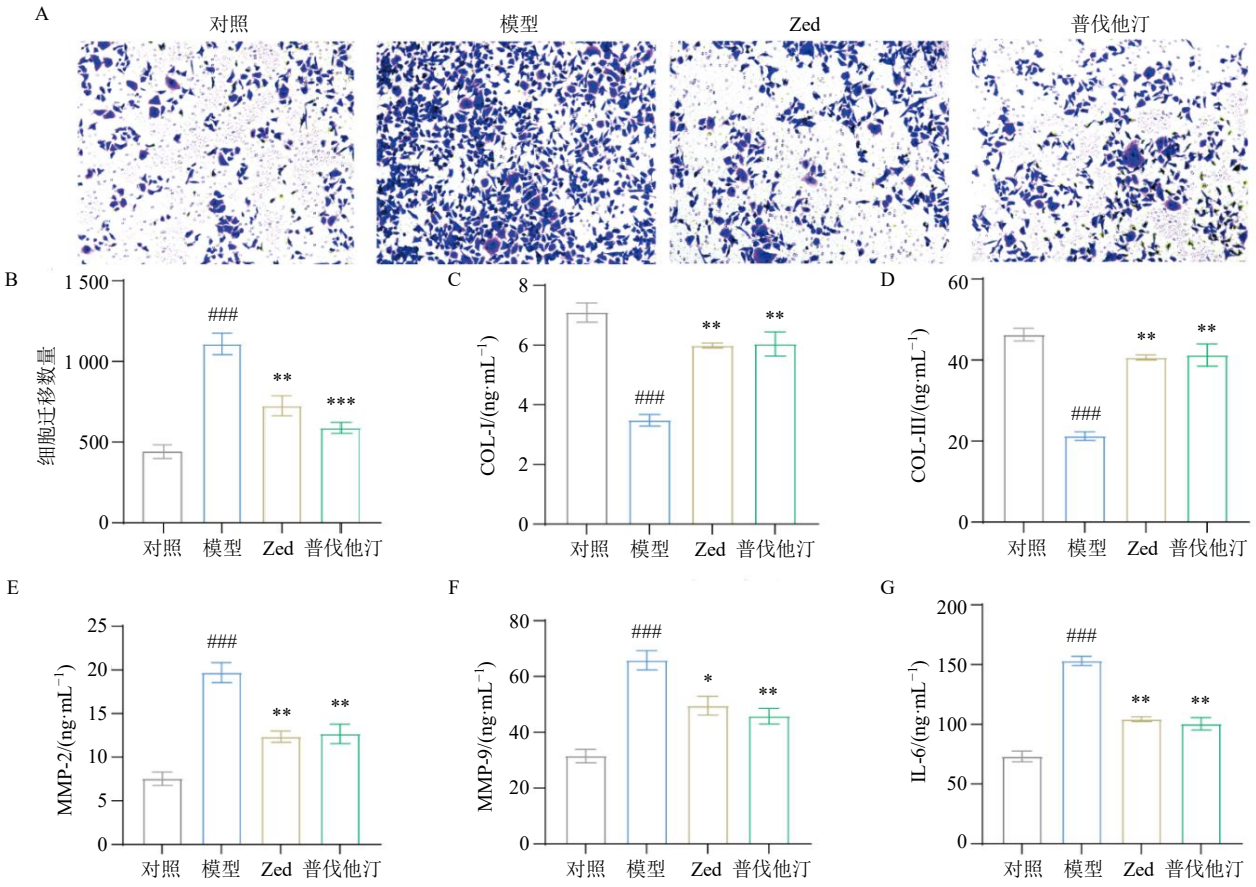
A, B-after treatment with IL-1β in VSMCs, proportion of α-SMA⁻CD68⁺ cells was detected by flow cytometry; C-effect of Zed on cell viability of IL-1β-induced VSMC; D—G-effect of Zed on levels of VCAM-1, ICAM-1, CCL2 and IL-6 in supernatant of IL-1β-induced VSMCs.

图 3　Zed 抑制 IL-1β 诱导的巨噬细胞样 VSMCs 促炎黏附因子及促炎细胞因子的表达（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 3　Zed inhibits expressions of pro-inflammatory adhesion factors and pro-inflammatory cytokines in IL-1β-induced macrophage-like VSMCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

0.01、0.001），10 μg/mL Zed 亦可显著降低 ICAM-1 的表达水平（$P<0.01$）。综合以上结果，选择 20 μg/mL Zed 进行细胞功能与分子表型验证。

Transwell 迁移实验结果（图 4-A、B）显示，与对照组比较，模型组 VSMCs 迁移数量显著增加（$P<0.01$）；与模型组比较，Zed 组和普伐他汀组 VSMCs 迁移数量显著减少（$P<0.01$、0.001）。ELISA 检测结果（图 4-C～G）显示，与对照组比较，模型组细胞裂解液中 COL-I、COL-III 水平显著降低（$P<0.01$），细胞上清液中 MMP-2、MMP-9、IL-6 水平显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，Zed 组和普伐他汀组细胞裂解液中 COL-I、COL-III 水平显著升高（$P<0.01$），细胞上清液中 MMP-2、MMP-9、IL-6 水平显著降低（$P<0.05$、0.01）。



A、B-Zed 对 IL-1β 诱导 VSMCs 细胞迁移的影响（×100）；C～G-Zed 对 IL-1β 诱导 VSMCs 细胞裂解液中 COL-I、COL-III 和上清液中 MMP-2、MMP-9、IL-6 水平的影响。

A, B-effect of Zed on cell migration of IL-1β-induced VSMC (× 100); C—G-effect of Zed on levels of COL-I, COL-III in cell lysate and MMP-2, MMP-9, IL-6 in supernatant of IL-1β-induced VSMC.

图 4　Zed 抑制 IL-1β 诱导的 VSMCs 表型转化、迁移及炎症因子分泌（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 4　Zed inhibits IL-1β-induced VSMCs phenotypic switching, migration and pro-inflammatory activation ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

免疫荧光染色结果（图 5）显示，对照组 VSMCs 高表达平滑肌标记 α-SMA，低表达巨噬细胞标记 CD68；IL-1β 刺激可明显下调 α-SMA 的表达（$P < 0.01$），上调 CD68 的表达（$P < 0.05$）；与模型组比较，Zed 和普伐他汀均可显著上调 α-SMA 的表达（$P < 0.01$），下调 CD68 的表达（$P < 0.05$），表明 Zed 可抑制 VSMCs 向巨噬细胞样表型转化。

3.3　Zed 调控巨噬细胞样 VSMCs 表型转化的机制

MβCD 可抑制 Cav-1 表达及功能活性[22]，球囊损伤模型大鼠同时给予 MβCD 和 Zed 干预，采用免疫组化染色检测 VSMCs 表型相关蛋白表达。如图 6 所示，与 Zed 组比较，Zed＋MβCD 组大鼠 S100A4 阳性表达显著升高（$P < 0.01$），SM-MHC 阳性表达显著降低（$P < 0.01$），提示 Zed 可通过 Cav-1 参与 VSMCs 表型转化。

KLF4 是参与 VSMCs 表型转化的关键蛋白之一，为进一步明确 Cav-1 和 KLF4 是否参与 Zed 调控 VSMCs 表型转化的作用，构建 siCav-1 与 KLF4-OE 细胞模型，通过 qRT-PCR 验证转染效率。Cav-1 的 siRNA 筛选结果（图 7-A）显示，与 si-NC 组相比，序列 269 的干扰效率最高（$P < 0.01$），因此后续实验选用 siCav-1-269 序列进行 Cav-1 沉默干预。KLF4-OE 验证结果（图 7-B）显示，与对照组比较，阴性对照组的 *KLF4* mRNA 表达水平无显著差异，而 KLF4-OE 组的 *KLF4* mRNA 表达水平显著升高（$P < 0.01$），表明 KLF4-OE 构建成功。

免疫荧光染色结果（图 7-C～E）显示，siCav-1 或 KLF4-OE 可逆转 Zed 抑制 VSMCs 巨噬细胞样表型转化的作用（$P < 0.05$）。ELISA 检测结果（图 8-A～D）显示，与 Zed 组比较，Zed＋KLF4-OE 组

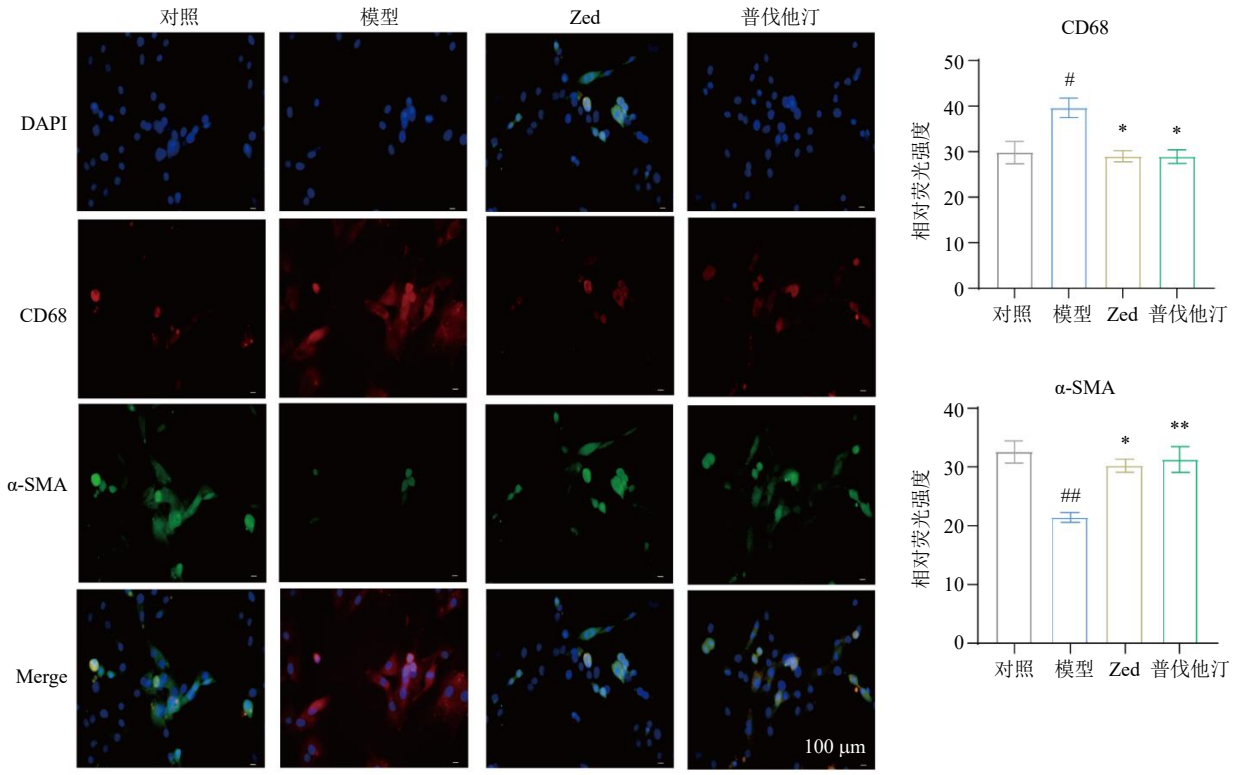
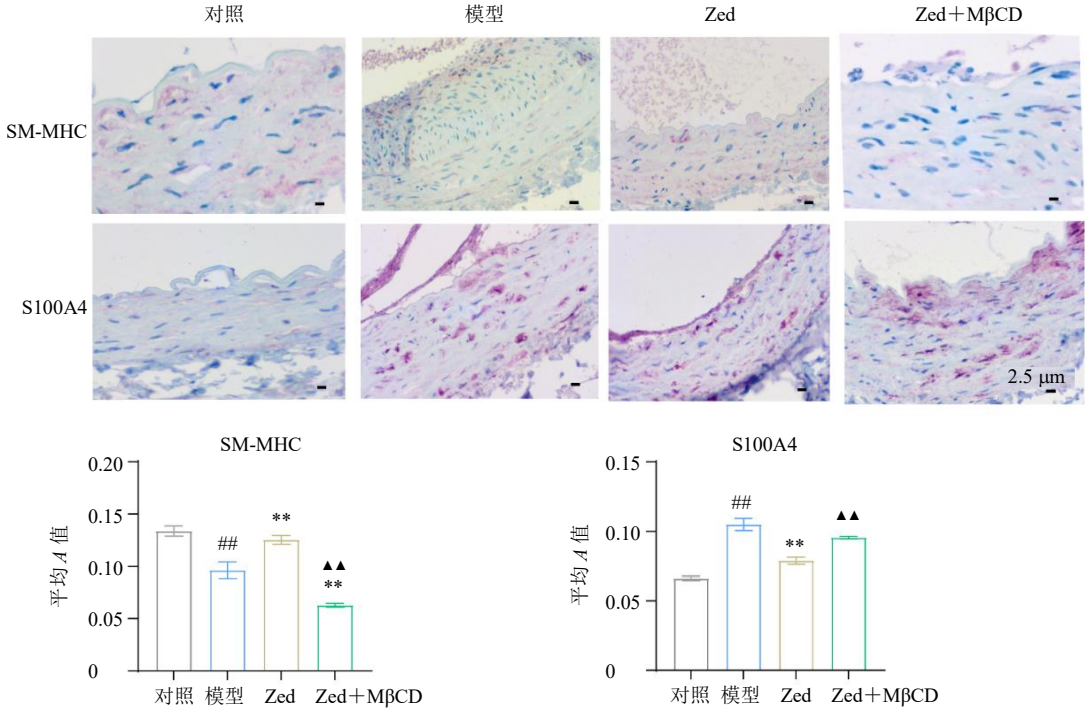


图 5　Zed 抑制 IL-1β 诱导的 VSMCs 向巨噬细胞样表型转化（×400；$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 5　Zed inhibits IL-1β-induced macrophage-like phenotypic transformation of VSMCs (× 400; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

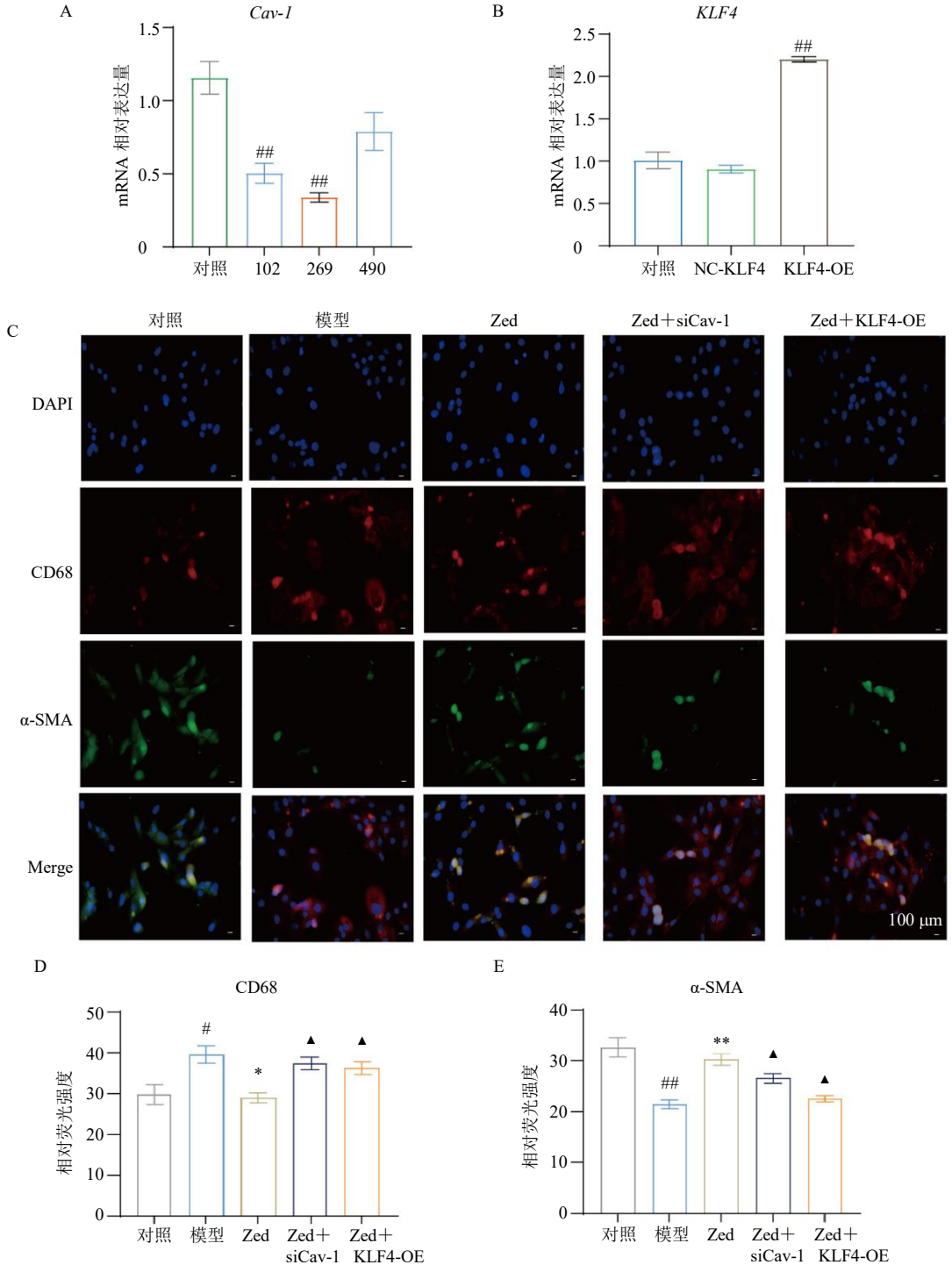


与对照组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$　$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$；与 Zed 组比较：$^{\blacktriangle}P<0.05$　$^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$，图 7～9 同。

$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$　$^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* control group; $^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$ *vs* model group; $^{\blacktriangle}P<0.05$　$^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$ *vs* Zed group, same as figs. 7—9.

图 6　抑制 Cav-1 后 Zed 对球囊损伤模型大鼠 VSMCs 表型相关蛋白表达的影响（×600；$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

Fig. 6　Effect of Zed on VSMCs phenotype-related protein expressions in balloon-injured rats model after Cav-1 inhibition (× 600; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

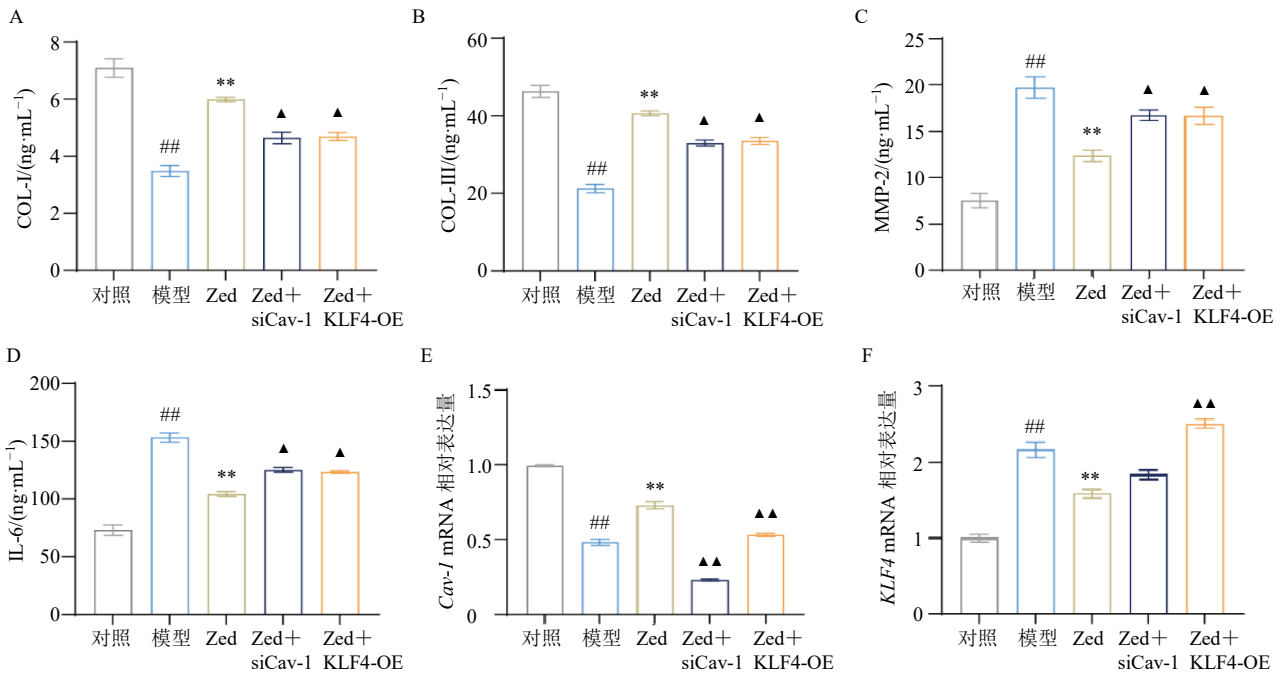


A-采用不同 siRNA 序列转染 VSMCs 后，通过 qRT-PCR 验证 Cav-1 的干扰效率；B-利用 KLF4 过表达质粒转染 VSMCs 后，通过 qRT-PCR 验证 KLF4 的过表达效率；C～E-siCav-1 或 KLF4-OE 对 VSMCs 中 CD68 和 α-SMA 表达的影响（×400）。

A-after transfecting VSMCs with different siRNA sequences, interference efficiency of Cav-1 was verified by qRT-PCR; B-after transfecting VSMCs with KLF4 overexpression plasmid, overexpression efficiency of KLF4 was verified by qRT-PCR; C—E-effect of siCav-1 or KLF4-OE on expressions of CD68 and α-SMA in VSMCs (× 400).

图 7　siCav-1 或 KLF4-OE 逆转 Zed 抑制 VSMCs 向巨噬细胞样表型转化的作用（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 7　siCav-1 or KLF4-OE reverses inhibitory effect of Zed on macrophage-like phenotypic transition of VSMCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A～D-ELISA 检测细胞裂解液中 COL-I、COL-III 和上清液中 MMP-2、IL-6 水平；E、F-qRT-PCR 检测 *Cav-1* 和 *KLF4* 的 mRNA 表达。

A—D-levels of COL-I, COL-III in cell lysate and MMP-2, IL-6 in supernatant detected by ELISA; E, F-mRNA expressions of *Cav-1* and *KLF4* detected by qRT-PCR.

图 8　siCav-1 或 KLF4-OE 逆转 Zed 对 VSMCs 的保护作用（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 8　siCav-1 or KLF4-OE reverses protective effects of Zed on VSMCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

和 Zed＋siCav-1 组细胞裂解液中 COL-I、COL-III 水平均显著降低（$P<0.05$），细胞上清液中 IL-6、MMP-2 水平均显著升高（$P<0.05$）。qRT-PCR 结果（图 8-E、F）进一步证实，与模型组比较，Zed 可显著上调 *Cav-1* mRNA 表达（$P<0.05$），下调 *KLF4* mRNA 表达（$P<0.05$）；而 siCav-1 或 KLF4-OE 可部分抵消 Zed 对 *Cav-1* 和 *KLF4* 的调控作用（$P<0.01$）。

采用 Western blotting 进一步检测 Cav-1、α-SMA、KLF4 及 SM-MHC 的蛋白表达，结果如图 9 所示，与对照组比较，模型组 Cav-1、α-SMA 和 SM-MHC 蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$），KLF4 蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，Zed 组 Cav-1、α-SMA 和 SM-MHC 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$），KLF4 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）；与 Zed 组比较，Zed＋siCav-1 组 Cav-1、α-SMA 和 SM-MHC 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$、0.01），KLF4 蛋白表达水平无显著差异；与 Zed 组比较，Zed＋KLF4-OE 组 α-SMA 和 SM-MHC 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$），KLF4 蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$），Cav-1 蛋白表达水平无显著差异，提示 KLF4-OE、siCav-1 可逆转 Zed 对 VSMCs 表型的调控作用。以上结果表明，Cav-1 与 KLF4 均为 Zed 抑制 VSMCs 巨噬细胞样转化的必需分子，KLF4-OE 或 siCav-1 可部分抵消 Zed 对 VSMCs 的保护效应。

4　讨论

VSMCs 是维持血管中膜结构与功能的重要细胞，在血管损伤后的修复与重构过程中发挥关键作用[24]。VSMCs 从收缩型（表达 α-SMA）向合成型、巨噬细胞样、泡沫细胞样等多种表型转化，其可塑性直接影响血管壁的炎症状态与脂质代谢。在持续炎症刺激下，部分 VSMCs 发生“表型转化”，转变为具有破坏性、加剧炎症的促炎巨噬细胞样状态，导致血管中膜结构紊乱、细胞外基质重塑[25-30]。深入探究 VSMCs 表型转换的调控机制，将为血管损伤后内膜增生等血管疾病的治疗策略开发提供重要分子靶点。

VSMCs 表型转化与血管炎症性疾病的发生发展紧密相关。在血管损伤组织内可检测到同时呈现平滑肌特异性蛋白 SM-MHC 与巨噬细胞特征蛋白 CD68 的双阳性细胞，这一现象支持 VSMCs 向巨噬

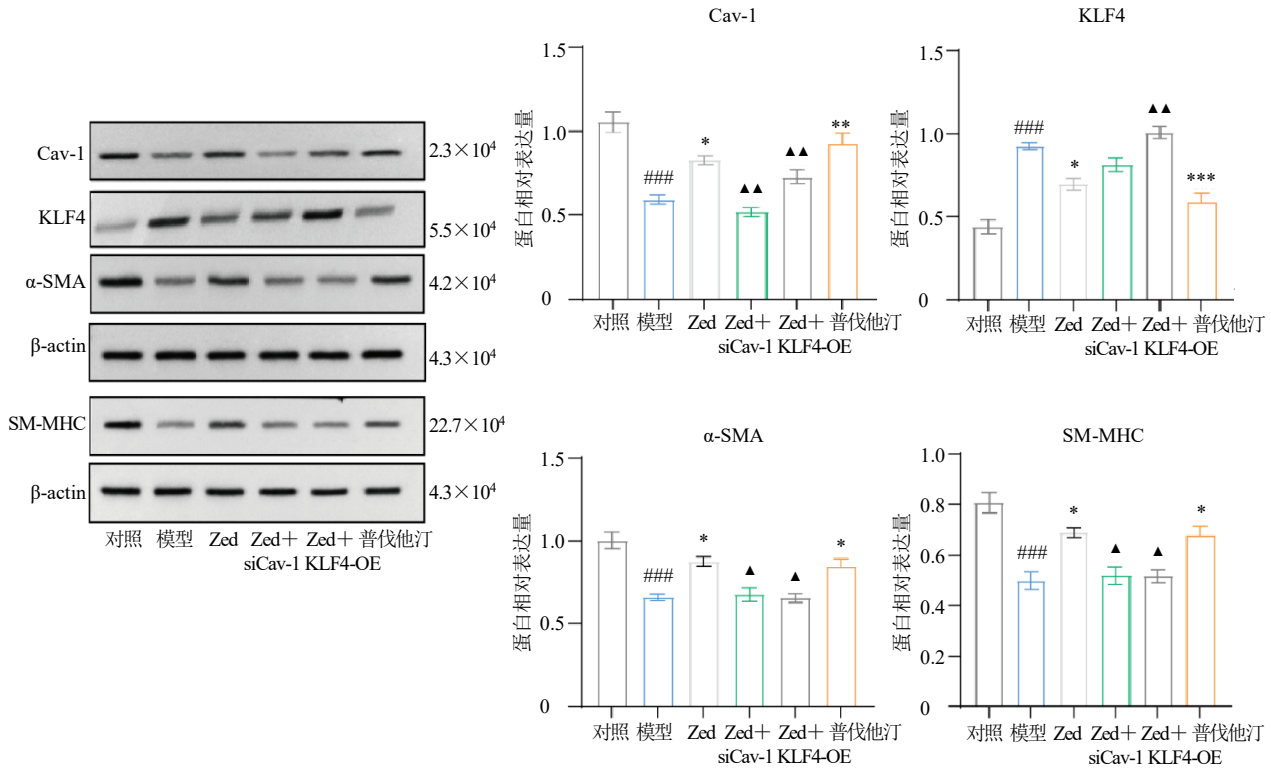


图 9　siCav-1 或 KLF4-OE 逆转 Zed 对 VSMCs 中 Cav-1、α-SMA、KLF4 及 SM-MHC 蛋白表达的调控作用（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 9　siCav-1 or KLF4-OE reverses regulatory effect of Zed on expressions of Cav-1, α-SMA, KLF4 and SM-MHC proteins in VSMCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

细胞样形态转变的假说[31]。在小鼠模型中追踪 VSMCs 在损伤血管组织中的克隆扩张轨迹，发现约 80%的 VSMCs 来源细胞失去经典标志物表达[32]。通过对人和小鼠血管损伤组织的免疫荧光染色证实，病变组中的 α-SMA、CD68 双阳性细胞数量明显多于对照组，提示巨噬细胞样 VSMCs 是血管炎症反应中的一个显著细胞学特征[33]。VSMCs 在拟时序轨迹上其收缩标志物（如 *Acta2*、*Myh11*）的表达下降，同时巨噬细胞标志物如 *Cd68*、半乳糖凝集素 3（lectin galactose-binding soluble 3，*Lgals3*）的表达则上升并富集在巨噬细胞亚群中，提示病变组织内部分巨噬细胞可能源自 VSMCs 的异常转化[34]。同样，小鼠血管损伤模型中，损伤组织内 α-SMA 阳性 VSMCs 增殖增加，VSMCs 来源的泡沫细胞（α-SMA 与脂质染色共定位）数量增多。通过 bulk RNA-seq 分析小鼠动脉组织发现合成型 VSMCs 标志物（*Lgals3*、*Cd68*）表达上调，收缩型标志物金属蛋白酶组织抑制剂 4（tissue inhibitor of metalloproteinase 4，Timp4）、心肌素（myocardin，Myocd）下调，提示损伤血管组织内含有大量巨噬细胞样 VSMCs[35]。本研究采用大鼠腹主动脉球囊损伤模型发现，血管损伤后 VSMCs 收缩表型蛋白表达下调，合成型蛋白表达增加，提示 VSMCs 表型转化，给予 Zed 干预后 VSMCs 表型相关蛋白得到逆转，提示 Zed 对调节 VSMCs 表型转化具有潜在价值，值得进一步探索。体外实验进一步发现，Zed 降低 IL-1β 诱导的 VSMCs 中 CD68 表达，减少促炎因子释放，提示 Zed 可抑制 IL-1β 诱导的巨噬细胞样 VSMCs 表型转化，有利于维持 VSMCs 收缩表型。

巨噬细胞产生细胞外诱捕网对于改变血管内微环境具有重要作用。巨噬细胞样 VSMCs 作为信号“发送者”，其发出的血小板衍生生长因子、成纤维细胞生长因子和血小板反应蛋白 1 等信号通路显著增强，促进细胞增殖、迁移和分化，其异常激活构成了血管炎症进展的细胞通讯基础[36-37]。这类 VSMCs 促进 MMP-9、MMP-12 和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）的释放，进而加剧

胶原纤维分解，导致血管壁结构破坏与重构异常。$CD68^+$ VSMCs 和衰老 SMC（有害细胞）簇的标记基因在“创伤-炎症反应”中富集，加剧局部炎症反应和血管结构紊乱[28]。研究表明，莪术及其活性成分具有抗炎、抗肿瘤、心脑血管保护及抗血栓形成等多重作用[18,38-39]。其中，蓬莪术环二烯和莪术烯能有效降低 THP-1 细胞中 TNF-α 的生成[40]。莪术醇可阻断巨噬细胞向促炎型 M1 极化，同时诱导其向抗炎型 M2 转化，通过调控巨噬细胞表型转变实现炎症抑制[41]。卿莹等[42]的研究同样证实莪术活性成分具备抗氧化及抗炎药理作用。本研究发现，Zed 能够降低球囊损伤模型大鼠血管组织以及 IL-1β 刺激 VSMCs 中 MMP-2、IL-6 水平，提高胶原含量，减轻局部炎症反应，改善损伤之后血管重构，证实了 Zed 可通过抑制巨噬细胞样 VSMCs 表型转化，减少促炎因子释放，发挥血管保护作用。

Cav-1 具有抑制细胞凋亡、抗炎作用[43-44]。Cav-1 通过调节脂质转运、血管炎症反应等途径参与血管重构过程，Cav-1 表达缺失致使低密度脂蛋白的跨内皮转运过程受阻，同时促血管重构的纤连蛋白沉积受到抑制，导致血流依赖性内皮炎症反应失衡[45]。Cav-1 整合烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶（NADPH oxidase，NOX）来源的氧化还原信号调控 VSMCs 重塑[46]。在体外研究发现，Cav-1 缺乏的主动脉 VSMCs 导致细胞外基质组成的改变，且血管壁内胶原蛋白的差异重塑[47]。在肺动脉平滑肌细胞中，Cav-1 基因修饰增加了细胞活力、抗炎细胞因子 IL-4 和 IL-10，降低炎性细胞因子 IL-1α、γ 干扰素（interferon-γ，IFN-γ）和 TNF-α 的表达，恢复细胞形态[48]。本研究动物实验发现，给予 Cav-1 抑制剂 MβCD 干预之后，Zed 对 VSMCs 表型标志物的调控作用被逆转，提示 Cav-1 可能是 Zed 介导血管重构调控的核心分子[43,49]。VSMCs 在血管损伤后重构过程中的转录异质性，*KLF4* 是关键调控基因之一[6]。作为一种可以调节细胞增殖和去分化的多能转录因子，同时可作为促炎基因的激活因子，KLF4 进一步促进 VSMCs 去分化[50]。单细胞测序与谱系追踪技术揭示靶向调节 KLF4 改善 VSMCs 去分化、增强 VSMCs 维持收缩型表型[51]。在构建 VSMCs 特异性 Kif13b 敲除小鼠中，KLF4 抑制剂可显著降低血浆促炎细胞因子水平，减少主动脉和主动脉根部的病变面积、坏死核心区域、巨噬细胞浸润和凋亡细胞，增加血管壁胶原含量，从而改善血管重构[52]。体外机制实验显示，KLF4-OE 能够拮抗 Zed 对 VSMCs 的保护效应，降低胶原合成、升高促炎因子水平，证明 KLF4 同样为 Zed 发挥作用的必要分子。本研究存在一定方法学局限：暂未开展膜结合黏附分子 VCAM-1、ICAM-1 的 mRNA 及蛋白表达检测，对血管炎症相关黏附分子的转录与蛋白水平评价尚不够全面。后续研究将补充上述指标检测，并进一步通过双荧光素酶报告基因、ChIP 实验明确 Cav-1 对 KLF4 的上下游调控关系，结合 Co-IP 及泛素化实验验证二者的蛋白相互作用与修饰调控机制。

综上，本研究证实 Cav-1 和 KLF4 均是 Zed 抑制 IL-1β 诱导巨噬细胞样 VSMCs 表型转化的必要分子；Zed 通过抑制 VSMCs 巨噬细胞样表型转化，减少促炎因子释放并提高胶原含量，减轻大鼠球囊损伤后血管新生内膜增生。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ai J, Tang X, *et al*. New insights into foam cells in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2025, 121(15): 2334-2346.

[2] Libby P, Soehnlein O. Inflammation in atherosclerosis: Lessons and therapeutic implications [J]. *Immunity*, 2025, 58(10): 2383-2401.

[3] Rykaczewska U, Suur B E, Röhl S, *et al*. PCSK6 is a key protease in the control of smooth muscle cell function in vascular remodeling [J]. *Circ Res*, 2020, 126(5): 571-585.

[4] Basatemur G L, Jørgensen H F, Clarke M C H, *et al*. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(12): 727-744.

[5] Lombardi M, Mantione M E, Baccellieri D, *et al*. P2X7 receptor antagonism modulates IL-1β and MMP9 in human atherosclerotic vessels [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 4872.

[6] Yap C, Mieremet A, de Vries C J M, *et al*. Si_x shades of vascular smooth muscle cells illuminated by KLF4 (Krüppel-like factor 4) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(11): 2693-2707.

[7] Orr A W, Hastings N E, Blackman B R, *et al*. Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis [J]. *J Vasc Res*, 2010, 47(2): 168-180.

[8] Zhang W, Zhao J J, Deng L, *et al*. INKILN is a novel long noncoding RNA promoting vascular smooth muscle inflammation via scaffolding MKL1 and USP10 [J]. *Circulation*, 2023, 148(1): 47-67.

[9] Matthaeus C, Taraska J W. Energy and dynamics of

caveolae trafficking [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 614472.

[10] Anagnostopoulou A, Camargo L L, Rodrigues D, *et al*. Importance of cholesterol-rich microdomains in the regulation of NOX isoforms and redox signaling in human vascular smooth muscle cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 17818.

[11] Qin L, Zhu N, Ao B X, *et al*. Caveolae and caveolin-1 integrate reverse cholesterol transport and inflammation in atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 429.

[12] Michell D L, Shihata W A, Andrews K L, *et al*. High intraluminal pressure promotes vascular inflammation via caveolin-1 [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 5894.

[13] Carrillo-Sepulveda M A, Matsumoto T. Phenotypic modulation of mesenteric vascular smooth muscle cells from type 2 diabetic rats is associated with decreased caveolin-1 expression [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(5): 1497-1506.

[14] Grossi M, Rippe C, Sathanoori R, *et al*. Vascular smooth muscle cell proliferation depends on caveolin-1-regulated polyamine uptake [J]. *Biosci Rep*, 2014, 34(6): e00153.

[15] Gosens R, Stelmack G L, Bos S T, *et al*. Caveolin-1 is required for contractile phenotype expression by airway smooth muscle cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(11): 2430-2442.

[16] Gao W W, Shao R X, Zhang X P, *et al*. Up-regulation of caveolin-1 by DJ-1 attenuates rat pulmonary arterial hypertension by inhibiting TGFβ/Smad signaling pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 361(1): 192-198.

[17] 崔源源, 刘剑刚, 赵福海, 等. 莪术主要化学成分预防支架后再狭窄药理作用的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1230-1234.

[18] Chai H, Qu H, He S, *et al*. Zedoarondiol inhibits atherosclerosis by regulating monocyte migration and adhesion via CXCL12/CXCR4 pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 182: 106328.

[19] Xie B L, Bie Y L, Song B C, *et al*. Zedoarondiol inhibits monocyte adhesion and expression of VCAM and ICAM in endothelial cells induced by oxidative stress [J]. *Nat Prod Res*, 2026, 40(4): 1067-1073.

[20] Kang D H, Choi M, Chang S, *et al*. Vascular proteomics reveal novel proteins involved in SMC phenotypic change: OLR1 as a SMC receptor regulating proliferation and inflammatory response [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0133845.

[21] Lavin Plaza B, Phinikaridou A, Andia M E, *et al*. Sustained focal vascular inflammation accelerates atherosclerosis in remote arteries [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(9): 2159-2170.

[22] Yan Q, Fang T A, Liu X F, *et al*. The upregulation of caveolin-1 expression via the TLR4-Myd88 pathway contributes to cerebral vasospasm [J]. *Neurol Res*, 2025, 47(7): 594-603.

[23] 袁娉. 莪术愈创木烷型倍半萜化合物稳定动脉粥样硬化斑块的作用机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2024.

[24] Owsiany K M, Deaton R A, Soohoo K G, *et al*. Dichotomous roles of smooth muscle cell-derived MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1) in development of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022, 42(8): 942-956.

[25] Wang Z Y, Liu B, Zhu J M, *et al*. Nicotine-mediated autophagy of vascular smooth muscle cell accelerates atherosclerosis via nAChRs/ROS/NF-κB signaling pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 284: 1-10.

[26] He X Q, Lian Z X, Yang Y Y, *et al*. Long non-coding RNA PEBP1P2 suppresses proliferative VSMCs phenotypic switching and proliferation in atherosclerosis [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 84-98.

[27] Tang H Y, Chen A Q, Zhang H, *et al*. Vascular smooth muscle cells phenotypic switching in cardiovascular diseases [J]. *Cells*, 2022, 11(24): 4060.

[28] Fu Z Y, Yang S, Chang X D, *et al*. Vascular smooth muscle cell metabolic reprogramming and phenotypic remodeling in atherosclerosis [J]. *Cell Death Discov*, 2025, 12(1): 64.

[29] Vajen T, Benedikter B J, Heinzmann A C A, *et al*. Platelet extracellular vesicles induce a pro-inflammatory smooth muscle cell phenotype [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6(1): 1322454.

[30] Wang J, Xie S A, Li N, *et al*. Matrix stiffness exacerbates the proinflammatory responses of vascular smooth muscle cell through the DDR1-DNMT1 mechanotransduction axis [J]. *Bioact Mater*, 2022, 17: 406-424.

[31] Cai R D, Chen X, *et al*. IRF7 orchestrates maladaptive smooth muscle cell phenotype switching in atherosclerosis [J]. *Precis Clin Med*, 2026, 9: pbaf039.

[32] Azar P, Jarr K U, Gomez D, *et al*. Smooth muscle cells in atherosclerosis: Essential but overlooked translational perspectives [J]. *Eur Heart J*, 2025, 46(45): 4862-4875.

[33] Gong X, Liu Y C, Liu H Y, *et al*. Re-analysis of single-cell transcriptomics reveals a critical role of macrophage-like smooth muscle cells in advanced atherosclerotic plaque [J]. *Theranostics*, 2024, 14(4): 1450-1463.

[34] Xu Q, Sun J S, Holden C M, *et al*. Cellular communication network factor 2 regulates smooth muscle cell transdifferentiation and lipid accumulation in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2024, 120(17): 2191-

2207.

[35] Evans B R, Schulz J, Triantafyllidou V, *et al*. ChemR23 prevents phenotypic switching of vascular smooth muscle cells into macrophage-like foam cells in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2026, 122(2): 195-213.

[36] Liu Y L, Li Y, Wang Q, *et al*. Recent advances in nanodelivery systems based on extracellular and intracellular reprogramming strategies for enhanced therapy of atherosclerosis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2026, 21: 541504.

[37] Jarad S, Gill G, Amadi P, *et al*. VSMCs in atherosclerosis: Implications on the role of inflammation and extracellular matrix remodelling [J]. *Pharmacol Res*, 2025, 218: 107833.

[38] 张浩, 林川, 周建敏, 等. 莪术二酮对增生性瘢痕成纤维细胞的作用及机制探讨 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1854-1859.

[39] 赵芃钰, 任虹, 徐李缘, 等. 姜黄属中药多糖的药理活性及其作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(14): 5276-5287.

[40] 孙秀燕, 郑艳萍, 刘志峰, 等. 温莪术环状含氧倍半萜类化学成分的研究 [J]. 分析测试学报, 2006, 25(6): 27-30.

[41] 郑洋, 王佳慧, 赵铁建, 等. 莪术醇对 RAW264.7 巨噬细胞 M1/M2 表型分化以及炎症因子分泌的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11): 77-80.

[42] 卿莹, 林薇, 陈元惠, 等. 基于文献计量学和全球专利的莪术研究进展可视化分析 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2869-2884.

[43] Zadorozny L, Du J Y, Supanekar N, *et al*. Caveolin and oxidative stress in cardiac pathology [J]. *Front Physiol*, 2025, 16: 1550647.

[44] Codrici E, Albulescu L, Popescu I D, *et al*. Caveolin-1-knockout mouse as a model of inflammatory diseases [J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 2498576.

[45] Wang L, Jia X, Bai X L, *et al*. Expression of IMD-CBM peptide induces the autophagic degradation of CAV1 (caveolin 1) to inhibit LDL transcytosis and retard diabetic atherosclerosis [J]. *Autophagy*, 2026, 22(6): 1273-1286.

[46] Wang K, Chen Y, Zhu X, *et al*. *Ginkgo biloba* extract attenuates light-induced photoreceptor degeneration by modulating CAV-1-redoxosome signaling [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(7): 1268.

[47] Curry-Koski T, Gusek B, Potter R M, *et al*. Genetic manipulation of caveolin-1 in a transgenic mouse model of aortic root aneurysm: Sex-dependent effects on endothelial and smooth muscle function [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(23): 12702.

[48] Fan J R, Zheng S P, Wang M P, *et al*. The critical roles of caveolin-1 in lung diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1417834.

[49] Stea D M, D'Alessio A. Caveolae: Metabolic platforms at the crossroads of health and disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(7): 2918.

[50] Lopacinska N, Wesoly J, Bluyssen H A R. Interplay between KLF4, STAT, IRF, and NF-κB in VSMC and macrophage plasticity during vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(20): 10205.

[51] Dubner A M, Lu S Z, Jolly A J, *et al*. Smooth muscle-derived adventitial progenitor cells direct atherosclerotic plaque composition complexity in a KLF4-dependent manner [J]. *JCI Insight*, 2023, 8(22): e174639.

[52] Miao G L, Han Y F, Chen J X, *et al*. Vascular smooth muscle cell-derived KIF13B inhibits proinflammatory responses to protect against atherosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2026, 136(6): e194175.

[责任编辑 李亚楠]