

汉黄芩素缓解高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化和 NF- κ B 介导的动脉炎症反应

韦磊¹, 王绚¹, 陈雄², 湛雯¹, 韩望^{1*}

¹南京医科大学附属儿童医院药学部, 南京 210008; ²温州医科大学附属第一医院内分泌科, 温州 325006

摘要:为探究汉黄芩素对高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化和炎症的影响,本研究将 ApoE^{-/-}小鼠分为正常饮食组、高脂饮食组、高脂饮食 + 汉黄芩素 10 mg/kg 组、高脂饮食 + 汉黄芩素 20 mg/kg 组,高脂饮食和药物同时给予,12 周后收集动脉组织。采用 RT-qPCR 法检测 IL-6、TNF- α 、ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 表达;油红 O 染色和 HE 染色检测主动脉根部油脂变化和病理变化;免疫荧光染色检测 Moma-2 和 VCAM-1 表达;生化试剂盒检测血液中的血脂水平;Western blot 法检测动脉的 NF- κ B 的磷酸化和 I κ B- α 的表达变化。结果显示,与高脂饮食组比较,汉黄芩素治疗组动脉粥样硬化斑块面积减少($P < 0.05$),但血脂水平无变化;汉黄芩素治疗组动脉中单核/单核巨噬细胞浸润,TNF- α 、IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1 的 mRNA 表达水平,VCAM-1 的蛋白表达水平和 NF- κ B 信号通路的激活均显著降低($P < 0.05$)。提示汉黄芩素有效缓解高脂饮食喂养诱导的小鼠动脉粥样硬化,并伴随抑制 NF- κ B 介导的动脉炎症。

关键词:汉黄芩素;动脉粥样硬化;炎症反应;NF- κ B

中图分类号:R966

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)5-0750-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.5.005

Wogonin alleviates atherosclerosis and NF- κ B-mediated inflammatory response in ApoE^{-/-} mice fed with high fat diet

WEI Lei¹, WANG Xuan¹, CHEN Xiong², ZHAN Wen¹, HAN Wang^{1*}

¹Department of Pharmacy, Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China;

²Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325006, China

Abstract: In order to investigate the effect of wogonin on atherosclerosis and arterial inflammation in ApoE^{-/-} mice fed with high fat diet, ApoE^{-/-} mice were divided into normal diet group (ND), high-fat diet group (HFD), high-fat diet + wogonin (10 mg/kg) group (HFD + wogonin 10 mg/kg) and high-fat diet + wogonin (20 mg/kg) group (HFD + wogonin 20 mg/kg). Mice were given high-fat diet and wogonin for 12 weeks and then the arterial tissues were collected. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of IL-6, TNF- α , ICAM-1 and VCAM-1. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of Moma-2 and VCAM-1 in the aortic root. Oil red O staining and HE staining were used to detect the changes of the lipid deposition and pathological changes in the aortic root. Biochemical kits were used to detect the serum lipid levels. Western blot was used to detect the phosphorylation of NF- κ B and the expression of I κ B- α . The results showed that compared with HFD group, the area of atherosclerotic plaque in HFD + wogonin group was decreased ($P < 0.05$), but the serum lipid levels do not change; moreover, monocyte/monocyte macrophage infiltration, the protein expression of VCAM-1, the mRNA expression level of TNF- α , IL-6, ICAM-1 and VCAM-1 and the activation of NF- κ B signal pathway in HFD + wogonin group were significantly reduced ($P < 0.05$). These findings indicated that wogonin could effectively alleviate arterial atherosclerosis and inhibit NF- κ B-mediated arterial inflammation in ApoE^{-/-} mice induced by high-fat diet.

Key words: wogonin; atherosclerosis; inflammation; NF- κ B

收稿日期:2020-11-23 接受日期:2021-04-08

基金项目:浙江省自然科学基金(LWY20H20001);“十三五”南京市卫生青年人才培养工程项目(QRX17173)

*通信作者 Tel:86-013805163087; E-mail: hw_chloe@163.com

动脉粥样硬化是一种脂质驱动的慢性炎症性疾病,主要发生在中、大动脉的分支或弯曲部位,是导致心血管疾病的发病率和死亡率增加的主要原因^[1]。动脉粥样硬化是一种多因素疾病,涉及慢性

炎症、氧化应激、遗传易感性、代谢紊乱、表观遗传学和各种非遗传危险因素(环境污染、吸烟、心理健康、饮食和生活方式)等^[2,3]。当内皮功能发生障碍时,单核细胞粘附于内皮并迁移至内皮下随后分化为单核巨噬细胞,摄取脂质从而形成脂肪条纹^[3-5]。随后,中层血管平滑肌细胞向内皮下间隙迁移,形成粥样斑块。当纤维帽覆盖的坏死核增多时,斑块容易破裂,导致缺血性中风和心肌梗死等危险事件^[4,6]。其中,炎症在动脉粥样硬化的发生和发展过程中占据着主导作用^[7]。无论在内皮功能障碍和脂纹形成期间,还是在粥样斑块形成和斑块破裂时期,炎症因子均有着不同程度的释放^[8,9],但至今具体的机制还未被研究清晰,且临床缺乏治疗方案。汉黄芩素(wogonin)是从黄芩根中提取的一种有效成分,被证明具有多种生物活性,包括抗肿瘤、抗炎、抗菌、心脏保护和神经保护作用等^[10-12]。先前有研究报道汉黄芩素可抑制炎症缓解异丙肾上腺素诱导的心脏损伤^[12];虽然汉黄芩素抗炎活性的作用机制仍不清晰,但细胞核因子 κ B 蛋白(nuclear factor- κ B, NF- κ B)驱动的炎症可能是其抗炎的作用靶点^[13,14]。为了研究汉黄芩素对动脉粥样硬化的可能作用与机制,本项目拟观察汉黄芩素干预治疗高脂饮食(high-fat diet, HFD)喂养 ApoE^{-/-}小鼠 12 周后动脉粥样硬化斑块发展程度,动脉炎症以及 NF- κ B 信号通路的激活情况。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

汉黄芩素(批号:632-85-9,南京春秋生物工程有限公司);油红 O 染色试剂盒(美国 sigma 公司,批号:MKCG9293);HE 染色试剂盒(批号:G1005-500,武汉塞维尔生物科技有限公司);高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein, HDL)检测试剂盒(批号:20190809,南京建成生物工程研究院);低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein, LDL)检测试剂盒(批号:20190813,南京建成生物工程研究院);总胆固醇(total cholesterol, TCH)检测试剂盒(批号:20190814,南京建成生物工程研究院);甘油三酯(triglyceride, TG)检测试剂盒(批号:20190813,南京建成生物工程研究院);逆转录试剂盒(批号:H6906340,上海 Yeasen 公司);实时定量 PCR 试剂盒(批号:H7825250,上海 Yeasen 公司);Trizol(批号:A161056A,大连 Takara 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物

选择 8 周龄的雄性 ApoE^{-/-}小鼠(购自集萃药康

生物有限公司,生产许可证号:SCXK(苏)2018-0008), 18 ~ 22 g, SPF 级。在本研究中,48 只 C57BL/6J 背景的 ApoE^{-/-}小鼠在实验室驯化 2 周后开展实验。

1.2.2 动脉粥样硬化动物模型建立

将 ApoE^{-/-}小鼠随机分为 3 组:(1)高脂饮食(能量配比:40% 脂肪,40% 碳水化合物,20% 蛋白质)喂养 ApoE^{-/-}小鼠,同时根据文献^[11,12]灌胃给予汉黄芩素(以 1% CMC-Na 溶液配置成悬浊液,浓度为 2 mg/mL),剂量为 10 mg/kg/天,持续 12 周(HFD + wogonin 10 mg/kg 组, $n = 12$);(2)高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠,同时根据文献^[11,12]灌胃给予汉黄芩素(以 1% CMC-Na 溶液配置成悬浊液,浓度为 4 mg/mL),剂量为 20 mg/kg/天,持续 12 周(HFD + wogonin 20 mg/kg 组, $n = 12$);(3)高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠(HFD 组, $n = 12$),同时灌胃给予与给药组等体积的 1% CMC-Na 溶液;(4)正常饮食(normal diet, ND)(能量配比:10% 脂肪,70% 碳水化合物,20% 蛋白质)喂养 ApoE^{-/-}小鼠(ND 组, $n = 12$),同时灌胃给予与给药组等体积的 1% CMC-Na 溶液;连续喂养 12 周。

动物在戊巴比妥钠麻醉下被处死。小鼠死亡后,解剖动脉并拍照,将动脉组织置于液氮中快速冷冻,进行基因和蛋白质表达分析和/或放入 4% 多聚甲醛中进行病理分析。此外,在死亡前,用含肝素的注射器从右心室采集血液。

1.2.3 生化指标测定

动物在戊巴比妥钠麻醉下,收集小鼠血液,用相应的试剂盒根据说明书提示步骤进行实验,检测血液中的高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)、总胆固醇(TCH)和甘油三酯(TG)水平。

1.2.4 油红 O 染色

处死小鼠后每组收集 6 只 ApoE^{-/-}小鼠整主动脉,对于整主动脉中动脉粥样硬化斑块的 analysis,取心脏主动脉弓至髂总动脉的整个主动脉,将其剥离出并至于封口膜上铺平后于 4% 多聚甲醛中固定过夜。次日,先于纯水中清洗 5 min 后,首先用异丙醇配置 0.5% 的油红 O 染液,以纯水:0.5% 油红 O 染液为 2:3 的比例配置油红 O 工作液,60% 异丙醇预处理动脉 1 min,于油红 O 工作液染色 15 min,再于 60% 异丙醇浸泡 1 min,纯水清洗至没有油红 O 染液残余,观察主动脉中动脉粥样硬化斑块情况,利用 Image J 分析斑块面积,斑块面积 = (斑块面积/铺平的动脉总面积) \times 100%。

1.2.5 HE 染色

处死小鼠后每组收集 6 只 ApoE^{-/-} 小鼠心脏和近端主动脉,于 4% 多聚甲醛中固定过夜,次日用 20% 蔗糖脱水 12 h 后利用冰冻包埋剂制备心脏冰冻切片样本,切至主动脉根部并收取主动脉三尖瓣切片(8 μm)。将收集主动脉根部的 8 μm 厚度的冰冻切片于苏木精染色 5 min 后,含 1% HCL 的无水乙醇分化 1 min,再于 1% 氨水的纯水返蓝 1 min,纯水清洗 5 min,于 80% 无水乙醇和 90% 无水乙醇脱水后置于伊红染色 5 min 后,继续后续脱水程序,100% 无水乙醇 2 次,每次 5 min,最后于二甲苯浸泡 2 次,每次 5 min 后封片观察组织病理学变化,利用 Image J 分析斑块绝对面积与相对面积,相对面积计算方式为斑块面积 = (斑块面积/动脉管腔总面积) × 100%。

1.2.6 实时定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

每组收集 6 只 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织由 Trizol 提取 RNA。根据逆转录试剂盒操作说明利用 2 × SuperMix 将 RNA 以 25 °C, 5 min; 42 °C, 30 min; 85 °C, 5 min 的程序逆转录成 cDNA。通过 SYBR Green 以 1 μL cDNA + 2 μL 10 μM 引物双链 + 5 μL SYBR Green + 2 μL RNase free ddH₂O 的体系和 95 °C, 3 min; 95 °C, 10 s; 60 °C, 30 s, × 40 循环;溶解曲线的程序检测 cDNA 的白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 和血管细胞粘附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 的 mRNA 水平,引物序列见表 1。

表 1 实时定量聚合酶链式反应的引物序列
Table 1 Primer sequence of real-time quantitative PCR

基因 Gene	种属 Species	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
TNF-α	小鼠	TGATCCGCGACGTGGAA	ACCGCCTGGAGTCTGGAA
IL-6	小鼠	GAGGATACCACITCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTITTCATACA
β-actin	小鼠	CCGTGAAAAGATGACCCAGA	TACCACCAGAGGCATACAG
ICAM-1	小鼠	GCCTTGCTAGACGTGACTGAG	GACCCGAGCTGAAAAGTTCTA
VCAM-1	小鼠	GCCGAGCTAAATTACACATTG	CCTTGTGGAGGGATGTACAGA

1.2.7 蛋白免疫印迹 (Western blot)

每组收集 6 只 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织,利用蛋白裂解液裂解组织提取组织总蛋白,通过 BCA 测蛋白浓度并将每个样本的上样总蛋白量保持一致。利用 10% SDS 胶将所有样本的蛋白进行分级分离,随后将蛋白湿转至 PVDF 膜上(0.2 μm 孔径的膜用于小分子量蛋白,0.45 μm 孔径的膜用于分子量大的蛋白)。湿转达 90 min 后停止然后用 5% 脱脂牛奶孵育 2 h 起封闭作用,待封闭结束后 TBST 洗涤,随后加入一抗(抗 p-NF-κB 兔单克隆抗体,抗 NF-κB 兔单克隆抗体,抗 IκB-α 鼠单克隆抗体和抗 β-actin 兔单克隆抗体,均以 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液稀释 1 000 倍)孵育,于摇床室温孵育 2 h 后放至 4 °C 过夜处理。第二日 TBST 洗涤后,用 HRP 结合的二抗(均为 1:5 000 稀释)孵育 1 h,二抗孵育结束后用 TBST 洗涤 3 次。利用 ECL 发光液(A 液:B 液 = 1:1)与发光成像仪收集图像并用 ImageJ 进行灰度分析。

1.2.8 组织免疫荧光染色

每组收集 6 只 ApoE^{-/-} 小鼠心脏和近端主动脉,

同“1.2.5”方法得 8 μm 厚度的冰冻切片用以免疫荧光染色分析。首先用 5% 驴血清白蛋白封闭切片 45 min。随后,将冰冻切片与一抗(抗 VCAM-1 兔单克隆抗体、抗 Moma-2 大鼠单克隆抗体,均为 1:200 稀释)在 4 °C 下孵育过夜。之后,PBS 清洗三次,每次 5 min,将带有 Alexa Fluor 488 标记的二抗(1:200 稀释)在室温下孵育 1 h。然后,利用 DAPI 染色 5 min 后,PBS 清洗三次,每次 5 min,封片后显微镜下观察并收集图像。

1.2.9 统计学处理

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Graphpad prism 软件进行统计分析,两组间的比较采用单因素方差分析和多重比较检验,并进行 Bonferroni 校正。 $P < 0.05$ 认为组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 汉黄芩素缓解高脂饮食喂养 ApoE^{-/-} 小鼠的动脉粥样硬化发展

首先我们探究了汉黄芩素对高脂饮食喂养 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的影响。高脂饮食喂养

ApoE^{-/-}小鼠 12 周后处死小鼠,小鼠解剖图可观察到高脂饮食喂养可促使 ApoE^{-/-}小鼠主动脉弓处动脉粥样硬化斑块的形成(见图 1A),而根据文献^[11,12]选用

汉黄芩素(10 mg/kg 和 20 mg/kg)处理后主动脉弓分叉处动脉粥样硬化病变面积减少。此外,通过 HE 染色观察高脂饮食喂养可促使 ApoE^{-/-}小鼠主动

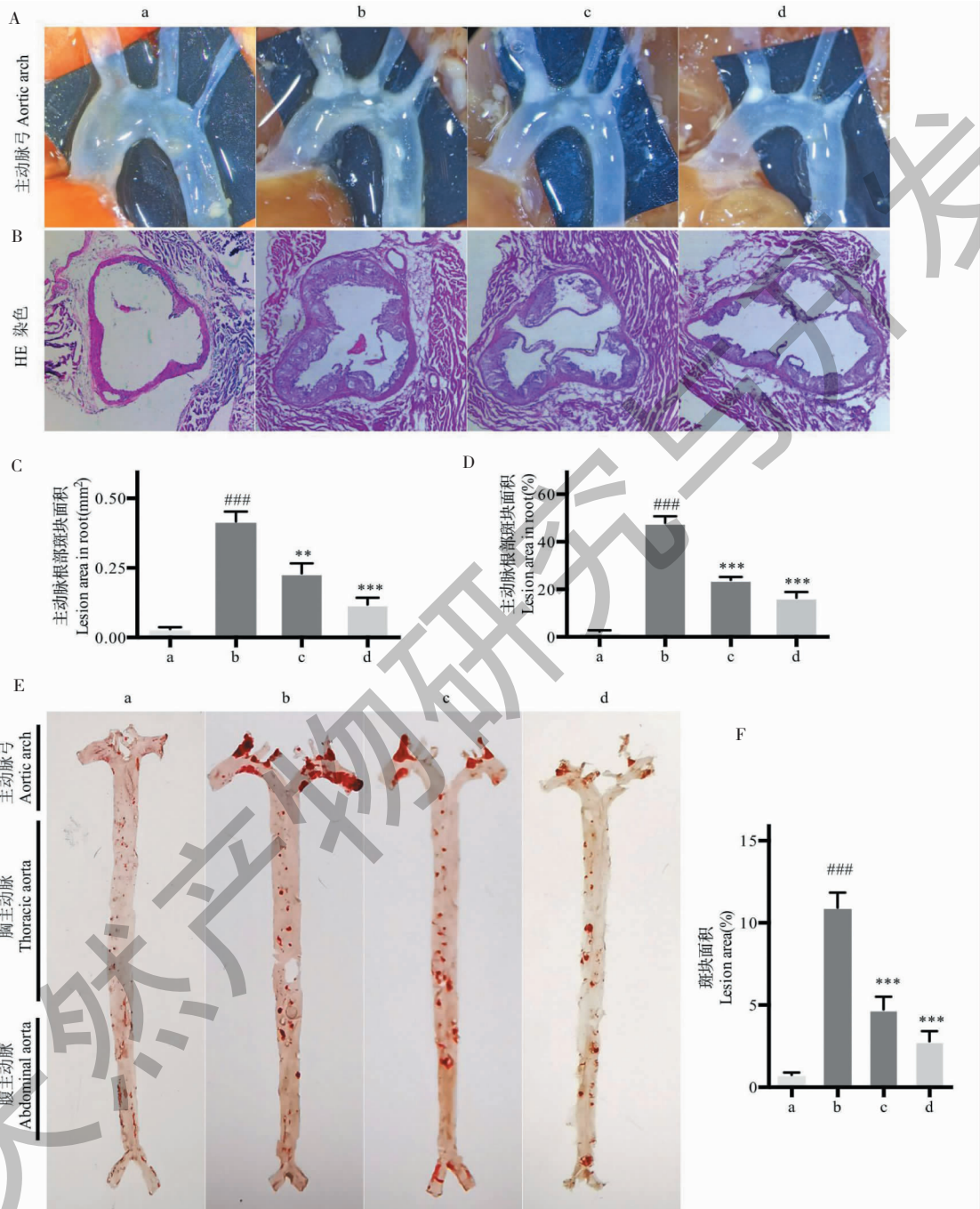


图 1 给予汉黄芩素显著缓解高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化的发展

Fig. 1 Administration of wogonin significantly alleviated the development of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice fed with high-fat diet
 注:A:主动脉弓;B~D:主动脉根部组织切片的 HE 染色图与定量分析,50 \times ;E~F:整主动脉的油红 O 染色与定量分析。a:正常饮食组;b:高脂饮食组;c:高脂饮食+汉黄芩素 10 mg/kg 组;d:高脂饮食+汉黄芩素 20 mg/kg 组,下同;每组 $n=6$;与正常饮食组比较,^{###} $P < 0.001$;与高脂饮食组比较,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。Not: A: Representative pictures of the aortic arch; B-D: Representative pictures of H&E staining of aortic root and oil red O staining area analysis of aortic root,50 \times . a: ND group; b: HFD group; c: HFD + wogonin 10 mg/kg group; d: HFD + wogonin 20 mg/kg group, the same below; $n=6$ in each group; Compared with ND group,^{###} $P < 0.001$; Compared with HFD group,

^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$.

脉根部斑块的形成,而给予汉黄芩素后主动脉根部的斑块绝对面积与相对面积均有显著降低($P < 0.05$,图 1B~D)。整主动脉的油红染色结果显示与 HFD 组比较,HFD + wogonin 组 ApoE^{-/-}小鼠整主动脉的斑块的相对面积明显较低($P < 0.05$,图 1E-F)。以上结果表明,在高脂饮食喂养诱导动脉粥样硬化的 ApoE^{-/-}小鼠模型中,汉黄芩素能有效缓解动脉粥样硬化的发展。

表 2 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Serum lipid levels in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别 Group	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	TCH (mmol/L)	TG (mmol/L)
a	1.70 ± 0.20	9.30 ± 0.84	9.50 ± 1.56	2.51 ± 0.30
b	2.76 ± 0.60	23.33 ± 1.05 ^{###}	24.66 ± 1.98 ^{###}	5.22 ± 0.73 [#]
c	2.77 ± 0.42 ^{ns}	21.01 ± 2.62 ^{ns}	24.05 ± 1.83 ^{ns}	4.41 ± 0.71 ^{ns}
d	2.93 ± 0.25 ^{ns}	21.37 ± 1.62 ^{ns}	22.87 ± 1.37 ^{ns}	4.40 ± 0.65 ^{ns}
P	0.250 3	0.000 9	0.000 1	0.049 4

注:与正常饮食组比较,[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.001$;与高脂饮食组比较,^{ns}无显著性差异。

Note: Compared with ND group,[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.001$; Compared with HFD group,^{ns} no significant difference.

2.3 汉黄芩素缓解高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠的动脉炎症

炎症反应贯穿于动脉粥样硬化发生与发展的整个过程中^[10]。我们进一步研究汉黄芩素对高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠动脉炎症的影响。主动脉根部

2.2 汉黄芩素不影响高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠的血脂

随后我们探讨汉黄芩素对高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠斑块的缓解作用是否与血脂有关。在小鼠处死前收集了血清以检测血脂水平。如表 2 所示,HFD 组与 HFD + wogonin 组 ApoE^{-/-}小鼠的血脂水平(TG/TC/LDL/HDL)的差异无统计学意义,表明汉黄芩素对动脉粥样硬化的缓解作用不是通过影响血脂水平。

的抗 Moma-2 免疫荧光染色实验结果显示,高脂饮食喂养可引起动脉粥样硬化斑块内单核/单核巨噬细胞的招募与浸润,经过汉黄芩素处理后,斑块内单核/单核巨噬细胞的浸润显著减少($P < 0.05$,图 2)。另外,RT-qPCR 分析显示,与 HFD 组相比,汉黄芩素

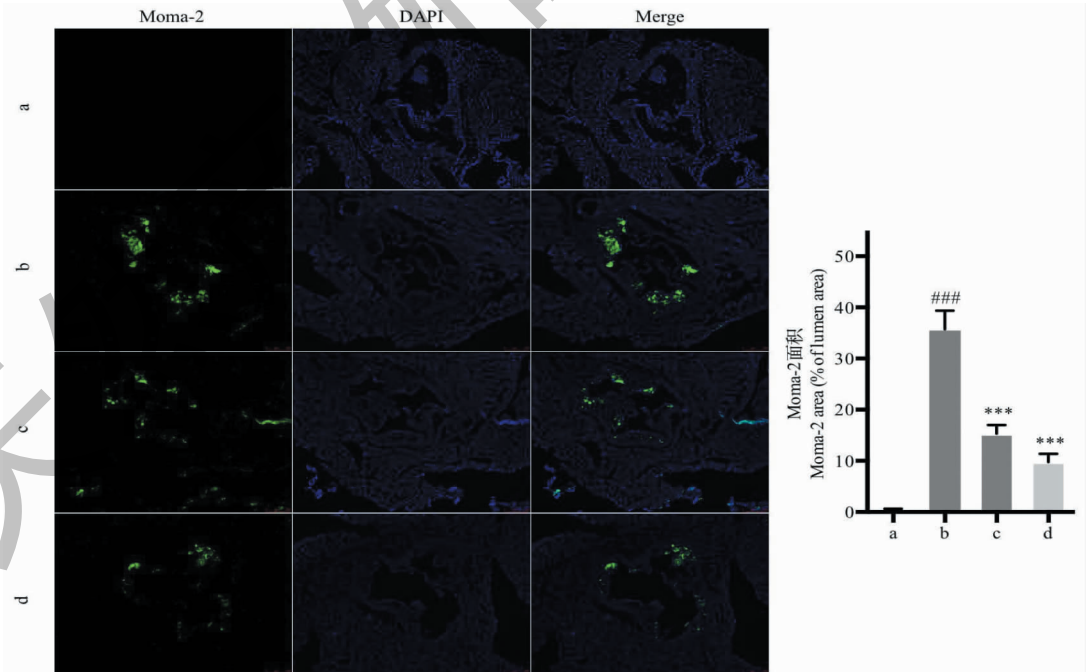


图 2 ApoE^{-/-}小鼠的主动脉根部抗 Moma-2 免疫荧光染色(50 ×)

Fig. 2 Anti-Moma-2 immunofluorescence staining of aortic root in ApoE^{-/-} mice (50 ×)

注:每组 $n = 6$,与正常饮食组比较,^{###} $P < 0.001$;与高脂饮食组比较,^{***} $P < 0.001$ 。Note: $n = 6$ in each group; Compared with ND group,^{###} $P < 0.001$; Compared with HFD group,^{***} $P < 0.001$.

处理后,炎症因子(TNF-α 和 IL-6)和粘附分子(ICAM-1 和 VCAM-1)在动脉中的 mRNA 表达显著降低($P < 0.05$,表 3)。与此同时,抗 VCAM-1 免疫荧光染色实验结果显示高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉根部 VCAM-1 表达明显增多,而汉黄芩素

处理后,VCAM-1 表达有所减少($P < 0.05$,图 3)。以上结果表明汉黄芩素显著抑制高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠的动脉炎症,且这可能与其抗动脉粥样硬化的作用有关。

表 3 ApoE^{-/-}小鼠动脉炎症因子的 mRNA 水平($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 mRNA levels of arteries in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Group	ICAM-1	VCAM-1	IL-6	TNF-α
a	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.31	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.21
b	2.74 ± 0.22 ^{###}	4.08 ± 0.57 ^{###}	5.49 ± 0.83 ^{###}	2.88 ± 0.60 ^{##}
c	1.10 ± 0.19 ^{***}	2.20 ± 0.33 [*]	2.20 ± 0.44 ^{**}	1.15 ± 0.29 [*]
d	0.52 ± 0.03 ^{***}	1.14 ± 0.04 ^{***}	1.37 ± 0.38 ^{**}	0.75 ± 0.06 ^{**}
P	0.000 1	0.000 1	0.000 1	0.001 0

注:与正常饮食组比较,^{###} $P < 0.01$;与高脂饮食组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。Note: Compared with ND group,^{###} $P < 0.01$; Compared with HFD,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。

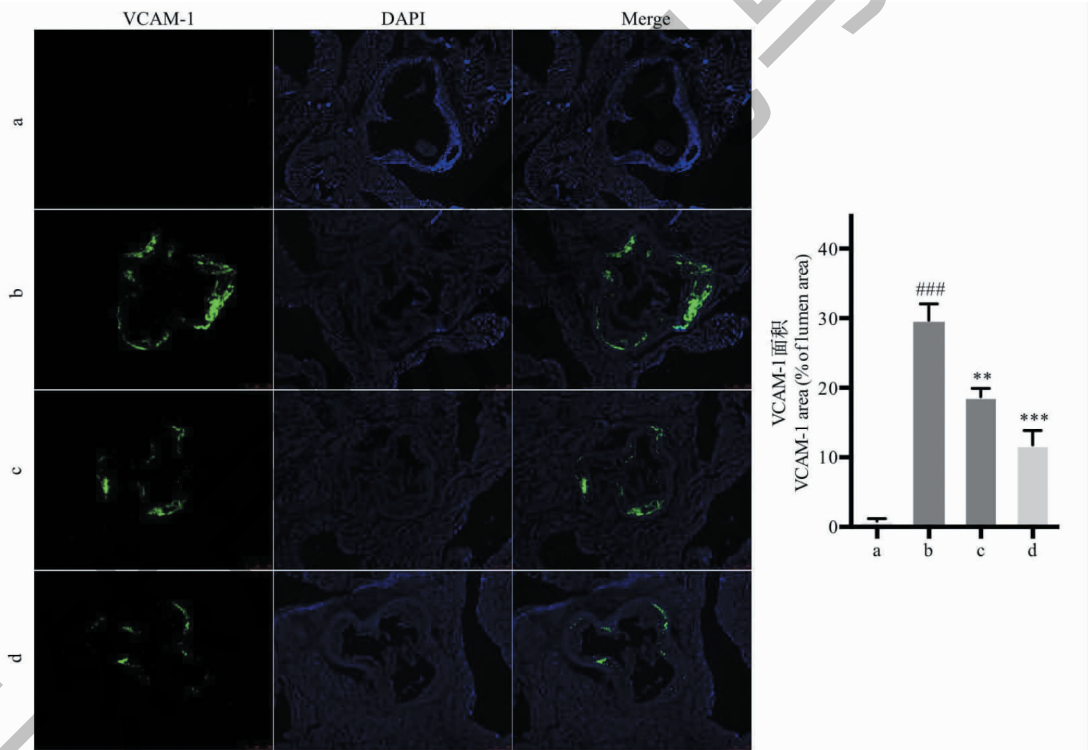


图 3 ApoE^{-/-}小鼠的主动脉根部抗 VCAM-1 免疫荧光染色(50 ×)

Fig 3 Anti-VCAM-1 immunofluorescence staining of aortic root in ApoE^{-/-} mice (50 ×)

注:每组 $n = 6$,与正常饮食组比较,^{###} $P < 0.001$;与高脂饮食组比较,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。Note: $n = 6$ in each group; Compared with ND group,^{###} $P < 0.001$; Compared with HFD group,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。

2.4 汉黄芩素抑制高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠动脉中 NF-κB 信号通路的激活

为进一步研究汉黄芩素的作用机制,我们检测了炎症信号通路 NF-κB 信号通路的激活。如图 4 所示,与 HFD 组相比,汉黄芩素处理可抑制高脂饮

食喂养 ApoE^{-/-}小鼠主动脉中的 NF-κB 的磷酸化和 NF-κB 抑制蛋白 α(IκB-α)的降解($P < 0.05$,图 4),表明其抗炎作用可能是通过抑制 NF-κB 信号通路的激活所实现的。

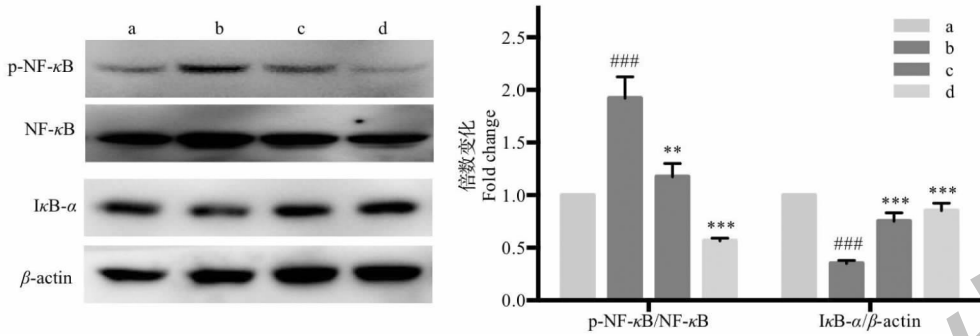


图4 汉黄芩素对高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-}小鼠动脉中 NF-κB 的磷酸化与 IκB-α 的表达的影响

Fig. 4 The effect of wogonin on the phosphorylation of NF-κB and expression of IκB-α in arterial tissues of ApoE^{-/-} mice induced by high-fat diet

注: 每组 $n=6$, 与正常饮食组比较, ### $P < 0.001$; 与高脂饮食组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note: $n=6$ in each group; Compared with ND group, ### $P < 0.001$; Compared with HFD group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3 讨论

动脉粥样硬化是一种动脉慢性炎症疾病,是目前世界范围内导致心血管疾病发病和死亡的主要原因之一^[1,3]。血管炎症的持续存在被认为是动脉粥样硬化发生发展的动力^[8,9]。然而,现今对慢性低度炎症的发生机制缺乏认识,同样地,当前临床治疗方案也相对缺乏^[15],因此,进一步揭示炎症相关机制对动脉粥样硬化的治疗干预具有重要意义。

迄今为止,许多因素与动脉粥样硬化的发病有关,这些因素不仅包括血脂异常、肥胖、糖尿病、高血压、衰老和吸烟等传统危险因素,还包括感染和慢性炎症等非经典危险因素^[16]。单核细胞/巨噬细胞作为炎症性动脉粥样硬化的中枢介质发挥着重要作用^[1]。当脂质积累于血管内膜后,循环单核细胞被活化的血管内皮细胞招募并迁移至内皮下层,然后分化为巨噬细胞,巨噬细胞随后摄取氧化低密度脂蛋白等修饰脂蛋白,而富含胆固醇的巨噬细胞将形成泡沫细胞(动脉粥样硬化发生发展的一个标志),然后一系列复杂的炎症级联被触发,从而促进动脉粥样硬化病变的发展,最终导致斑块破裂及其相关的心血管事件发生^[17-19]。近期针对炎症干预的临床实验显示心血管风险患者的心血管结局显著改善,进一步证明炎症在动脉粥样硬化性心血管疾病中的因果作用^[20,21]。因此,靶向炎症的治疗方案被认为是一种有前景的治疗动脉粥样硬化的策略^[18,22]。汉黄芩素是一种天然黄酮化合物,具有显著的抗炎的作用,此研究利用高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠的动物模型研究汉黄芩素对动脉粥样硬化的影响。研究发现汉黄芩素可有效缓解高脂饮食喂养

ApoE^{-/-}小鼠主动脉弓、根部和整主动脉中的动脉粥样硬化斑块的形成,提示汉黄芩素可能是一种潜在治疗动脉粥样硬化的天然药物。而后进一步发现高脂饮食喂养可引起单核/单核巨噬细胞招募与浸润增加,动脉炎症因子(TNF-α 和 IL-6)和粘附因子(ICAM-1 和 VCAM-1)的 mRNA 水平和主动脉根部 VCAM-1 蛋白水平升高,而给予汉黄芩素可有效改善以上变化。NF-κB 信号通路是经典的炎症信号通路,在此研究中,高脂饮食喂养可增加 NF-κB 的磷酸化和 IκB-α 的降解,而汉黄芩素处理后 NF-κB 的磷酸化和 IκB-α 的降解明显被抑制。这些结果表明汉黄芩素可能通过抑制 NF-κB 调控的炎症反应缓解动脉粥样硬化的发展。

综上,汉黄芩素抗动脉粥样硬化的作用可能依赖于其对 NF-κB 调控的炎症反应的抑制活性,并且汉黄芩素可能是治疗动脉粥样硬化的有效单体。

参考文献

- 1 Moore K, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Cell, 2011, 145: 341-355.
- 2 Nahrendorf M, Swirski F. Immunology. Neutrophil-macrophage communication in inflammation and atherosclerosis [J]. Science, 2015, 349: 237-238.
- 3 Lusis A. Atherosclerosis [J]. Nature, 2000, 407: 233-241.
- 4 Stary H, Chandler A, Dinsmore R, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association [J]. Circulation, 1995, 92: 1355-1374.

- 5 Patel K, Strong A, Tohyama J, et al. Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2015, 116:789-796.
- 6 Allahverdian S, Chehroudi A, McManus B, et al. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2014, 129:1551-1559.
- 7 Sadat U, Jaffer F, van Zandvoort M, et al. Inflammation and neovascularization intertwined in atherosclerosis: imaging of structural and molecular imaging targets [J]. *Circulation*, 2014, 130:786-794.
- 8 Hansson G, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability [J]. *J Intern Med*, 2015, 278:483-493.
- 9 Hansson G, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12:204-212.
- 10 Hong M, Almutairi M, Li S, et al. Wogonin inhibits cell cycle progression by activating the glycogen synthase kinase-3 beta in hepatocellular carcinoma [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68:153174.
- 11 Wang L, Li C, Sreeharsha N, et al. Neuroprotective effect of wogonin on rat's brain exposed to gamma irradiation [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2020, 204:111775.
- 12 Bei W, Jing L, Chen N. Cardio protective role of wogonin loaded nanoparticle against isoproterenol induced myocardial infarction by moderating oxidative stress and inflammation [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 185:110635.
- 13 Huang Y, Guo L, Chitti R, et al. Wogonin ameliorate complete Freund's adjuvant induced rheumatoid arthritis via targeting NF-kappaB/MAPK signaling pathway [J]. *Biofactors*, 2020, 46:283-291.
- 14 Jiao D, Jiang Q, Liu Y, et al. Nephroprotective effect of wogonin against cadmium-induced nephrotoxicity via inhibition of oxidative stress-induced MAPK and NF- κ B pathway in Sprague Dawley rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2019, 38:1082-1091.
- 15 Zhong C, Yang X, Feng Y, et al. Trained immunity: an underlying driver of inflammatory atherosclerosis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:284.
- 16 Christ A, Bekkering S, Latz E, et al. Long-term activation of the innate immune system in atherosclerosis [J]. *Semin Immunol*, 2016, 28:384-393.
- 17 Moore K, Sheedy F, Fisher E. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13:709-721.
- 18 Williams J, Huang L, Randolph G. Cytokine circuits in cardiovascular disease [J]. *Immunity*, 2019, 50:941-954.
- 19 Zhang C, Syed T, Liu R, et al. Role of endoplasmic reticulum stress, autophagy, and inflammation in cardiovascular disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4:29.
- 20 Ridker P, Everett B, Thuren T, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377:1119-1131.
- 21 Tardif J, Kouz S, Waters D, et al. Efficacy and safety of low-dose colchicine after myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381:2497-2505.
- 22 Lin XL, Zhang LY. Rosmarinic acid attenuates atherosclerosis [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2020, 32:115-121.