

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research岩藻黄质靶向调控 *miR* - 483 - 3p 表达改善
冠心病内皮细胞功能研究Research of fucoxanthin targeted *miR* - 483 - 3p expression to improve
endothelial cell function in coronary heart disease曾令伟^{1a}, 杨 晶^{1b}, 王长义^{1a},
李 亮^{1a}(1. 武威市人民医院 a. 心内科; b. 急诊科,
甘肃 武威 733000)ZENG Ling - wei^{1a}, YANG Jing^{1b},
WANG Chang - yi^{1a}, LI Liang^{1a}(1. a. Department of Cardiology; b.
Emergency Department, Wuwei People's
Hospital, Wu Wei 733000, Gansu
Province, China)作者简介: 曾令伟, (1976 -), 男, 副主任医师,
主要从事冠心病、心率失常介入方面
的临床工作和研究

通信作者: 曾令伟

MP: 13830534586

E - mail: Bjcdgssgmt@163.com

摘要:目的 探讨岩藻黄质对冠心病(CHD)内皮细胞功能的影响及其作用机制。方法 在细胞实验部分,将人类冠状动脉内皮细胞(HCAEC)分为空白组、ox - LDL组($40\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、药物组(ox - LDL + $25\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 岩藻黄质)和miR - 483 - 3p inhibitor组(转染miR - 483 - 3p inhibitor + ox - LDL + $25\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 岩藻黄质);分别用实时荧光定量聚合酶链反应(RT - qPCR)及蛋白免疫印迹(WB)法检测miR - 483 - 3p基因和焦亡相关蛋白含NLR家族pyrin域蛋白3(NLRP3)相对表达水平。在动物实验部分,将大鼠分为对照组、模型组(构建CHD模型)、实验组(建模 + $30\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 岩藻黄质)和抑制剂组(建模 + 转染miR - 483 - 3p inhibitor + $30\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 岩藻黄质);分别用RT - qPCR、酶联免疫吸附测定(ELISA)法及WB法检测miR - 483 - 3p相对表达水平、内皮相关因子及焦亡相关蛋白NLRP3相对表达水平。结果 在细胞实验部分中,空白组、ox - LDL组、药物组和miR - 483 - 3p inhibitor组细胞的miR - 483 - 3p相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.39 ± 0.07 、 0.74 ± 0.06 和 0.22 ± 0.03 ;NLRP3蛋白相对表达水平分别为 0.39 ± 0.02 、 1.03 ± 0.07 、 0.52 ± 0.04 和 0.85 ± 0.10 , ox - LDL组与空白组比较,药物组与ox - LDL组比较,miR - 483 - 3p inhibitor组与药物组比较,上述指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。在动物实验部分中,对照组、模型组、实验组和抑制剂组的miR - 483 - 3p相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 0.51 ± 0.06 、 0.70 ± 0.08 和 0.31 ± 0.04 ;一氧化氮(NO)水平分别为 (46.93 ± 3.18) 、 (20.21 ± 2.43) 、 (36.13 ± 4.87) 和 $(24.43 \pm 1.60)\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;NLRP3蛋白相对表达水平分别为 0.29 ± 0.04 、 0.97 ± 0.09 、 0.56 ± 0.09 和 0.86 ± 0.08 ,模型组与对照组比较,实验组与模型组比较,抑制剂组与实验组比较,上述指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。结论 岩藻黄质可以上调miR - 483 - 3p相对表达水平,改善内皮细胞焦亡,缓解CHD炎性反应。

关键词:岩藻黄质;冠心病;内皮细胞功能;微小核糖核酸 - 483 - 3p;焦亡

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.17.013

中图分类号:R541 文献标志码:A

文章编号:1001 - 6821(2025)17 - 2471 - 06

Abstract: Objective To investigate the effects of fucoxanthin on endothelial cell function in coronary heart disease (CHD) and its mechanism. **Methods** The cell experiment section divided the human coronary artery endothelial cells (HCAEC) into blank group, ox - LDL group ($40\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), fucoxanthin group (ox - LDL + $25\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ fucoxanthin) and miR - 483 - 3p inhibitor group (transfected with miR - 483 - 3p inhibitor + ox - LDL + $25\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ fucoxanthin). The expression levels of miR - 483 - 3p and pyroptosis related proteins NLR

family pyrin domain containing 3 (NLRP3) were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blotting (WB), respectively. The animal experiment section divided the rats into control group, model group (constructed CHD model), experimental group (modeling + 30 mg · kg⁻¹ fucoxanthin) and inhibitor group (modeling + transfection of miR-483-3p inhibitor + 30 mg · kg⁻¹ fucoxanthin). The relative expression levels of miR-483-3p, endothelium-related factors and pyroptosis related proteins NLRP3 were detected by RT-qPCR, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot, respectively. **Results** In cell experiment, the relative expression levels of miRNA-483-3p in cells of blank group, ox-LDL group, fucoxanthin group and miR-483-3p inhibitor group were 1.00 ± 0.11, 0.39 ± 0.07, 0.74 ± 0.06 and 0.22 ± 0.03, respectively; NLRP3 protein relative expression levels were 0.39 ± 0.02, 1.03 ± 0.07, 0.52 ± 0.04 and 0.85 ± 0.10, respectively. ox-LDL group was compared with blank group, fucoxanthin group was compared with ox-LDL group, miR-483-3p inhibitor group was compared with fucoxanthin group, the above indicators all showed statistically significant differences. (all $P < 0.001$). In animal experiments, the relative expression levels of miR-483-3p in control group, model group, experimental group and inhibitor group were 1.00 ± 0.12, 0.51 ± 0.06, 0.70 ± 0.08 and 0.31 ± 0.04, respectively; nitric oxide (NO) levels were (46.93 ± 3.18), (20.21 ± 2.43), (36.13 ± 4.87) and (24.43 ± 1.60) μmol · L⁻¹, respectively; the NLRP3 protein relative expression levels were 0.29 ± 0.04, 0.97 ± 0.09, 0.56 ± 0.09 and 0.86 ± 0.08, model group was compared with control group, experimental group was compared with model group, inhibitor group was compared with experimental group, the above indicators all showed statistically significant differences. (all $P < 0.001$). **Conclusion** Fucoxanthin can up-regulate miR-483-3p to improve endothelial cell pyroptosis and relieve CHD inflammatory response.

Key words: fucoxanthin; coronary heart disease; endothelial cell function; micro ribose nucleic acid-483-3p; pyroptosis

冠状动脉疾病是指冠状动脉发生动脉粥样硬化的情况,脂质代谢异常导致脂质沉积,形成粥样斑块,诱发动脉粥样硬化,随着斑块的增加,血液循环被阻断,导致心肌缺血缺氧,进而诱发冠心病(coronary heart disease, CHD)^[1]。内皮细胞(endothelial cells, ECs)是心脏和血管系统的一部分,参与促进新血管的形成和维持血管张力,ECs的损伤及功能障碍是冠状动脉疾病发生发展的发病机制之一^[2],因此维持内皮细胞功能,对减缓冠心病的进展具有重要意义。岩藻黄质是一种天然的抗氧化剂类胡萝卜素,在褐海藻中含量丰富,研究表明,其在多种病理条件下发挥保护作用,前人已经证实岩藻黄质在调节脂质沉积中具有积极作用^[3-4],这提示岩藻黄质在改善内皮功能中具有较大潜力,基于此,本研究将从体内外实验探究岩藻黄质对CHD内皮功能的影响及其潜在作用机制,旨在为CHD的临床治疗提供新的依据。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞与动物

细胞 人类冠状动脉内皮细胞(human coronary

artery endothelial cells, HCAEC),购自深圳豪地华拓生物科技有限公司。

动物 50只7周龄的健康雄性SD大鼠,体质量为260~300 g,购自中国人民解放军联勤保障部队940医院,许可证号:SCXK(甘)2023-0004。所有大鼠均饲养在SPF级别动物房中,自由进食和饮水,适应性饲养1周后进行实验。本研究经武威市人民医院伦理委员会批准通过。

1.2 药物、试剂与仪器

岩藻黄质,纯度:98%,规格:每支20 mg,批号:20240425、垂体后叶素,纯度:98%,规格:每支5 mg,批号:20240111,均由上海源叶生物科技有限公司生产;杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified eagle media, DMEM),北京索莱宝科技有限公司生产;氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL),上海怡森化学科技有限公司生产;逆转录试剂盒,北京百奥创新科技有限公司生产;Lipo3000转染试剂,上海中晓生物科技有限公司生产;一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒,深圳子科生物科技有限公司生产;一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、内皮素(endothelin, ET)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、白细胞介素

(interleukin, IL) - 6 检测试剂盒, 均由上海化邦生物科技有限公司生产; IL - 1 β 、IL - 18、含 NLR 家族 pyrin 域蛋白 3 (NLR family pyrin domain containing 3, NLRP3)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 - 1 (cleaved cysteine aspartate proteinase - 1, cl - caspase - 1)、Gasdermin D 蛋白 N 端片段 (N - terminal fragment of Gasdermin D, GSDMD - N) 一抗及同种属二抗, 均由美国 Abcam 公司生产; 引物和质粒合成, 由上海吉玛生物制药有限公司完成。

SpectraMax iD3 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司产品; StepOne TM 实时荧光定量聚合酶链反应 (real - time quantitative polymerase chain reaction, RT - qPCR) 仪, 美国应用生物系统公司产品; MF53 - N 荧光显微镜, 广州明美光电技术有限公司产品。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养、分组与处理方法^[5]

将细胞培养在含有 10% 胎牛血清、1% 双抗及 89% DMEM 的培养基中, 并置于恒温培养箱中培养, 待单层细胞铺满整个培养瓶后进行消化传代。将 HCAEC 细胞随机分为空白组、ox - LDL 组、药物组、inhibitor - NC 组和 miR - 483 - 3p inhibitor 组; 其中空白组细胞进行常规培养, ox - LDL 组细胞用 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ox - LDL 处理 24 h, 药物组细胞用 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的岩藻黄质 (预实验筛选岩藻黄质对 HCAEC 细胞无毒浓度范围内的最大剂量) 联合 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ox - LDL 处理 24 h, inhibitor - NC 组细胞首先参考文献^[5]的方法, 用 Lipo3000 转染试剂将 inhibitor 对照质粒转染至细胞 48 h 后, 再用 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ox - LDL 与 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的岩藻黄质共同处理 24 h, 对应 miR - 483 - 3p inhibitor 组细胞, 首先将 miR - 483 - 3p inhibitor 质粒转染至细胞 48 h 后, 再用 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ox - LDL 与 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的岩藻黄质共同处理 24 h。

2.1.2 RT - qPCR 法检测 miR - 483 - 3p 相对表达水平

用 TRIzol 法提取 HCAEC 细胞总核糖核酸 (ribose nucleic acid, RNA), 检测质量并检测 miR - 483 - 3p 相对表达水平。

2.1.3 酶联免疫吸附实验 (enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测血清及细胞中相关指标^[6-7]

各组细胞经药物处理后离心取上清液, 然后严格根据试剂盒操作步骤说明书检测细胞 TNF - α 及

IL - 6 水平。

2.1.4 蛋白质印迹法 (Western blotting, WB) 检测细胞相关蛋白相对表达水平^[8]

用细胞裂解液裂解细胞后离心收集上清液 (即总蛋白), 检测蛋白浓度, 并进行凝胶电泳分离蛋白, 转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜后, 用 5% 脱脂奶粉进行封闭, 然后滴加 IL - 1 β 、IL - 18、NLRP3、cl - caspase - 1 和 GSDMD - N 一抗试剂 (稀释比均为 1:1 000), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 次日清洗膜后, 将膜与二抗试剂 (稀释比为 1:5 000) 在室温下孵育 2 h, 然后滴加显色液, 成像并分析灰度值。

2.1.5 免疫荧光实验法检测各组细胞 NLRP3 相对表达水平^[9]

用多聚甲醛固定细胞 30 min, 然后用 Trion - X - 100 试剂对细胞破膜 20 min, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗后用牛血清蛋白封闭 1 h, 与 NLRP3 一抗 (1:50) 孵育过夜 (4 $^{\circ}\text{C}$), 次日清洗膜后与荧光二抗 (1:200) 孵育 1 h, 4', 6 - 联脒 - 2' - 苯基吡啶 (4', 6 - diamidino - 2 - phenylindole, DAPI) 复染后封片, 用荧光显微镜观察。

2.1.6 双荧光素酶报告基因实验检测 miR - 483 - 3p 与成纤维细胞生长因子受体 2 (fibroblast growth factor receptor 2, FGFR2) 靶向结合^[10]

通过 Targetscan (<https://www.targetscan.org>) 预测 miR - 483 - 3p 与 FGFR2 的结合位点, 突变该结合位点, 将 FGFR2 基因野生型 (wild type, WT) 和突变型 (mutant type, MUT) 的 3' UTR 序列克隆到萤火虫荧光蛋白中构建质粒, 分别转染 miR - NC 和 miR - 483 - 3p 质粒构建共转染细胞, 24 h 后测定荧光素酶活性。

2.2 动物实验

2.2.1 CHD 大鼠模型构建、分组与处理方法^[11]

大鼠适应性饲养后, 用高脂饮食联合垂体素方法构建模型, 对大鼠连续高脂饲料 (3% 猪油、2% 胆固醇、0.2% 丙基硫氧嘧啶、0.5% 胆碱以及 94.3% 基础饲料) 喂养 15 周, 并在结束高脂喂养的前 3 天, 每天腹腔注射 30 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的垂体后叶素, 1 天 1 次, 心电图显示 J 点位移超过 0.2 mV 即为造模成功, 造模大鼠 J 点均明显高于基线, 位移为 (0.25 $\pm$ 0.02) mV。

将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、实验组和抑制剂组, 每组 12 只, 对照组大鼠给予普通饲料喂养并注射等量的 0.9% NaCl; 其余组均进行造模, 实验组大鼠每天灌胃 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的岩藻黄质 (根据急毒实验确定岩藻黄质半数致死量为 903.41 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 后使用 1/30 等相似剂量作为实验组剂量), 连续 6 周;

抑制剂组大鼠在建模后每隔1周尾静脉注射 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$ 的miR-483-3p inhibitor质粒 $100\text{ }\mu\text{L}$;模型组和对照组给予等剂量的0.9% NaCl。连续治疗6周后,用超声心电图检测心功能,腹主动脉采血,然后处死大鼠分离冠状动脉组织备用。

2.2.2 RT-qPCR法检测血清miR-483-3p相对表达水平

取各组大鼠血液样本,然后参考“2.1.2”中描述的步骤检测miR-483-3p相对表达水平。

2.2.3 ELISA法检测血清相关因子表达水平

取各组大鼠血液样本,然后参考“2.1.3”中方法检测NO、NOS和ET水平。

2.2.4 WB法检测冠状动脉组织相关蛋白相对表达水平

组织裂解后,离心收集总蛋白,按照“2.1.4”方法检测IL-1 β 、IL-18、NLRP3、cl-caspase-1和GSDMD-N蛋白相对表达水平。

3 统计学处理

用SPSS 23.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用LSD-t检验,用Pearson法分析相关性。

结 果

1 岩藻黄质调控miR-483-3p对ox-LDL介导的HCAEC细胞炎症反应的影响

空白组、ox-LDL组、药物组、inhibitor-NC组和miR-483-3p inhibitor组细胞miR-483-3p相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.39 ± 0.07 、 0.74 ± 0.06 、 0.72 ± 0.07 和 0.22 ± 0.03 ;TNF- α 水平分别为 (24.49 ± 1.98) 、 (63.77 ± 5.80) 、 (34.54 ± 2.07) 、 (35.26 ± 5.25) 和 $(52.17\pm 3.53)\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$;IL-6水

平分别为 (8.81 ± 0.43) 、 (39.77 ± 3.21) 、 (26.78 ± 3.39) 、 (25.13 ± 2.25) 和 $(38.81\pm 2.72)\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,ox-LDL组与空白组比较,药物组与ox-LDL组比较,miR-483-3p inhibitor组与inhibitor-NC组比较,上述指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。

2 岩藻黄质通过调控miR-483-3p对HCAEC细胞焦亡的影响

与空白组比较,ox-LDL组细胞的IL-1 β 、IL-18、NLRP3、cl-caspase-1和GSDMD-N蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P<0.001$);与Ox-LDL组相比,药物组细胞的IL-1 β 、IL-18、NLRP3、cl-caspase-1和GSDMD-N蛋白相对表达水平均显著下降(均 $P<0.001$);与inhibitor-NC组比较,miR-483-3p inhibitor组的IL-1 β 、IL-18、NLRP3、cl-caspase-1和GSDMD-N蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P<0.001$),见表1。

3 miR-483-3p靶向结合FGFR2

miR-NC和miR-483-3p分别与FGFR2-WT共转染后的相对荧光酶活性分别为 1.00 ± 0.12 和 0.31 ± 0.05 ;miR-NC和miR-483-3p分别与FGFR2-MUT共转染后的相对荧光酶活性分别为 0.99 ± 0.13 和 0.97 ± 0.14 ;与共转染miR-NC和FGFR2-WT相比,共转染miR-483-3p和FGFR2-WT的相对荧光素酶活性显著降低($P<0.001$)。

4 岩藻黄质对冠心病大鼠miR-483-3p及内皮功能指标的影响

模型组大鼠的miR-483-3p、NO、NOS及LVEF水平与对照组比较均显著降低,ET、LVEDD和LVESD水平均显著升高(均 $P<0.001$);实验组的miR-483-3p、NO、NOS及LVEF水平相比模型组均显著升高,ET、LVEDD和LVESD水平均显著下降(均

表1 各组细胞焦亡相关因子蛋白相对表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of protein relative expression levels of pyroptosis related factors in all groups($\bar{x}\pm s$)

Group	n	IL-1 β	IL-18	NLRP3	Cl-caspase-1	GSDMD-N
Blank	9	0.31 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.33 ± 0.04
ox-LDL	9	$0.86\pm 0.06^{***}$	$0.90\pm 0.12^{***}$	$1.03\pm 0.07^{***}$	$0.76\pm 0.08^{***}$	$0.85\pm 0.09^{***}$
Medicine	9	$0.47\pm 0.04^{\&\&\&}$	$0.43\pm 0.09^{\&\&\&}$	$0.52\pm 0.04^{\&\&\&}$	$0.35\pm 0.03^{\&\&\&}$	$0.42\pm 0.05^{\&\&\&}$
Inhibitor-NC	9	0.46 ± 0.07	0.40 ± 0.05	0.53 ± 0.04	0.36 ± 0.05	0.44 ± 0.05
miR-483-3p inhibitor	9	$0.81\pm 0.11^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.83\pm 0.08^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.85\pm 0.10^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.68\pm 0.08^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.74\pm 0.10^{\Delta\Delta\Delta}$

IL:Interleukin;NLRP3:NLR family pyrin domain containing 3;Cl-caspase-1:Cleaved cysteine aspartate proteinase-1;GSDMD-N:N-terminal fragment of gasdermin D;Compared with blank group, $^{***}P<0.001$;Compared with ox-LDL group, $^{\&\&\&}P<0.001$;Compared with inhibitor-NC group, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$;Blank group:Routine culture;ox-LDL group: $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ox-LDL treated cells;Medicine group: $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ fucoxanthin + $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ox-LDL;Inhibitor-NC group:Transfer inhibitor NC + $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ fucoxanthin + $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ox-LDL;miR-483-3p inhibitor group:Transfer miR-483-3p inhibitor + $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ fucoxanthin + $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ox-LDL.

$P < 0.001$); 抑制剂组的 $miR - 483 - 3p$ 、NO、NOS 及 LVEF 水平相比实验组均显著降低, ET、LVEDD 和 LVESD 水平均显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 见表 2。

5 岩藻黄质通过调控 $miR - 483 - 3p$ 对冠心病大鼠冠状动脉组织焦亡的影响

模型组大鼠的 IL - 1β 、IL - 18、NLRP3、cl - caspase - 1 和 GSDMD - N 蛋白相对表达水平与对照组比较均显著升高 (均 $P < 0.001$); 实验组大鼠的 IL - 1β 、IL - 18、NLRP3、cl - caspase - 1 和 GSDMD - N 蛋白相对表达水平相比模型组均显著下降 (均 $P < 0.001$); 抑制剂组 IL - 1β 、IL - 18、NLRP3、cl - caspase - 1 和 GSDMD - N 蛋白相对表达水平与实验组比较均显著升高 (均 $P < 0.001$), 见图 1 和表 3。

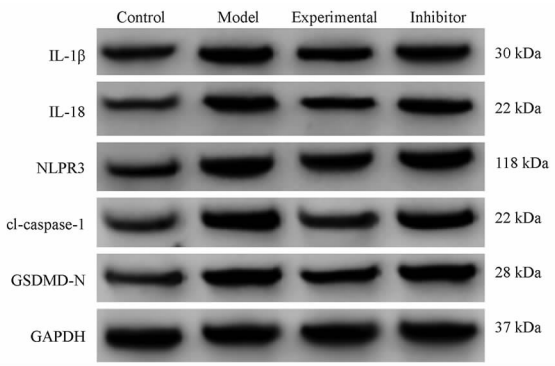


图 1 用蛋白质印迹法检测各组大鼠焦亡相关因子蛋白相对表达水平

Figure 1 The relative expression levels of pyroptosis - related proteins in rats of each group detected by Western blotting

表 2 各组大鼠血清相关指标及心功能相关指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum related indexes and cardiac function related indexes of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)								
Group	<i>n</i>	<i>miR - 483 - 3p</i>	NO ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NOS ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ET ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LVEF (%)	LVEDD (mm)	LVESD (mm)
Control	12	1.00 $\pm$ 0.12	46.93 $\pm$ 3.18	26.18 $\pm$ 2.23	15.51 $\pm$ 1.21	76.86 $\pm$ 7.78	5.57 $\pm$ 0.49	3.01 $\pm$ 0.17
Model	12	0.51 $\pm$ 0.06 ***	20.21 $\pm$ 2.43 ***	12.37 $\pm$ 1.75 ***	32.83 $\pm$ 3.28 ***	44.66 $\pm$ 3.80 ***	9.92 $\pm$ 0.82 ***	8.17 $\pm$ 0.89 ***
Experimental	12	0.70 $\pm$ 0.08 &&&	36.13 $\pm$ 4.87 &&&	21.64 $\pm$ 1.91 &&&	21.34 $\pm$ 1.51 &&&	61.12 $\pm$ 5.76 &&&	6.22 $\pm$ 0.67 &&&	5.30 $\pm$ 0.50 &&&
Inhibitor	12	0.31 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta\Delta$	24.43 $\pm$ 1.60 $\Delta\Delta\Delta$	14.92 $\pm$ 1.01 $\Delta\Delta\Delta$	26.09 $\pm$ 1.68 $\Delta\Delta\Delta$	52.13 $\pm$ 4.31 $\Delta\Delta$	8.11 $\pm$ 0.98 $\Delta\Delta\Delta$	7.21 $\pm$ 0.58 $\Delta\Delta\Delta$

NO: Nitric oxide; NOS: Nitric oxide synthase; ET: Endothelin; LVEF: Left ventricular ejection fraction; LVEDD: Left ventricular end - diastolic dimension; LVESD: Left ventricular end systolic diameters; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, &&& $P < 0.001$; Compared with experimental group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Control group: Normal saline; Model group: High fat diet + 30 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ pituitarin; Experimental group: Modeling + 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ fucoxanthin; Inhibitor group: Transfer $miR - 483 - 3p$ inhibitor + modeling + 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ fucoxanthin.

表 3 各组大鼠焦亡相关因子蛋白相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative expression levels of pyroptosis related protein in each group ($\bar{x} \pm s$)						
Group	<i>n</i>	IL - 1β	IL - 18	NLRP3	Cl - caspase - 1	GSDMD - N
Control	12	0.32 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.03
Model	12	0.83 $\pm$ 0.06 ***	0.64 $\pm$ 0.06 ***	0.97 $\pm$ 0.09 ***	0.92 $\pm$ 0.09 ***	0.77 $\pm$ 0.12 ***
Experimental	12	0.47 $\pm$ 0.05 &&&	0.32 $\pm$ 0.04 &&&	0.56 $\pm$ 0.09 &&&	0.39 $\pm$ 0.04 &&&	0.44 $\pm$ 0.07 &&&
Inhibitor	12	0.70 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta\Delta$	0.54 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta\Delta$	0.86 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta\Delta$	0.66 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta\Delta$	0.72 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta\Delta$

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, &&& $P < 0.001$; Compared with experimental group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

讨 论

CHD 的危险因素往往与大血管和微血管疾病相关,这已经在高胆固醇血症、高血压、动脉粥样硬化性疾病等患者中得到证实,内皮功能障碍是冠状动脉疾病的重要病理机制。岩藻黄质是一种主要存在于海藻、海带中的天然类胡萝卜素,研究表明,其具有抗炎、抗肥胖、细胞保护等多种药理学作用,前人已证实

岩藻黄质可通过抑制炎症反应减轻内皮祖细胞损伤^[12],提示岩藻黄质可能通过调控内皮功能障碍在 CHD 中发挥一定作用。 $miRNA$ 的异常表达与包括心血管疾病在内的各种病理过程的发生和发展密切相关, $miR - 483 - 3p$ 是由胰岛素样生长因子 2 编码的保守序列编码,其可以靶向调控结缔组织生长因子等,改善内皮功能障碍^[13]。本研究体外实验发现,ox - LDL 刺激的 HCAEC 细胞中 $miR - 483 - 3p$ 相对表达水平显著下降,岩藻黄质处理后的 HCAEC 细胞中 $miR - 483 - 3p$ 的表达上调 1.90 倍,提示 $miR - 483 - 3p$

可能是岩藻黄质改善内皮功能障碍的潜在作用机制。

NLRP3 是最典型的炎性小体,可以被晶体或颗粒状病原体损伤相关分子模式和缺血性缺氧危险相关分子模式激活,可以促进 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,通过这些机制,促进心血管疾病的发展,研究表明,NLRP3介导的内皮细胞焦亡是 CHD 发展的重要因素之一^[14],NLRP3 的上调刺激 caspase 1 和 GSDMD-N 的激活,成熟的 IL-1 β 和 IL-18 被释放,介导随后的反应。在本实验中,岩藻黄质可明显抑制 ox-LDL 诱导的细胞炎性因子及细胞焦亡相关蛋白 IL-1 β 、IL-18、NLRP3、cl-caspase-1 和 GSDMD-N 的表达。已有研究证实,抑制 NLRP3 的激活可以改善 CHD 患者的炎性反应^[15-16],与本研究结果一致。此外,本研究还发现,抑制 miR-483-3p 的表达后,岩藻黄质对焦亡和炎性反应的抑制作用均被部分削弱,提示岩藻黄质可通过调控 miR-483-3p 改善内皮细胞损伤。体内实验发现,miR-483-3p 在 CHD 大鼠血清中表达显著降低,与本研究的细胞实验一致,经岩藻黄质处理后,可以明显改善 CHD 大鼠心功能相关指标,但并未完全恢复心功能。同时,岩藻黄质可以抑制大鼠 NO、NOS、IL-1 β 、IL-18、NLRP3、cl-caspase-1 和 GSDMD-N 的相对表达水平,上调 ET 及 miR-483-3p 的相对表达水平,而岩藻黄质的这些作用均被低表达的 miR-483-3p 逆转,这与本研究体外实验一致。提示岩藻黄质可能通过上调 miR-483-3p 的表达抑制细胞焦亡和炎性反应,改善内皮功能障碍,减缓 CHD 的发展进程。

本实验在进一步探究岩藻黄质介导 miR-483-3p 改善内皮功能障碍的机制时发现,miR-483-3p 与 FGFR2 具有靶向结合位点,且双荧光素酶实验验证了 2 者具有靶向关系,这与陈礼琴^[10]的研究一致。已有研究表明,FGFR2 在 CHD 中存在差异表达,提示岩藻黄质极有可能通过 miR-483-3p 靶向调控 FGFR2 抑制细胞焦亡在 CHD 中发挥作用,但得出此结果仍需要进一步的实验证实。

本研究提示:岩藻黄质可以通过调控 miR-483-3p 表达抑制细胞焦亡、改善内皮功能障碍,在 CHD 中发挥保护作用。

参考文献:

- [1] MALAKAR A K, CHOUDHURY D, HALDERR B, *et al.* A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10):16812—16823.
- [2] PELLICCIA F, ZIMARINOO M, DE LUCA G, *et al.* Endothelial progenitor cells in coronary artery disease: From bench to bedside[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2022, 11(5):451—460.
- [3] 黄莉莉, 黄小强, 张小琴, 等. 岩藻黄质对高脂饮食诱导的肥胖小鼠胰岛素抵抗的影响[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(1):171—176.
- [4] 李方. 岩藻黄质靶向抑制 PKM 缓解棕榈酸诱导的骨骼肌细胞脂质沉积[D]. 浙江 温州:温州大学, 2023.
- [5] 张玲玉. NLRP3/Caspase-1 通路介导 H/R 诱导内皮细胞炎症反应与细胞焦亡及白皮杉醇调控作用[D]. 安徽 合肥:安徽医科大学, 2024.
- [6] 张露. miR-328 靶向调控 NEXN 促进 ox-LDL 介导的内皮细胞损伤[D]. 广东 广州:广州中医药大学, 2019.
- [7] 张志强. 通脉化斑汤对冠心病患者症状、血管内皮功能及心肺功能的影响[J]. *中医学报*, 2024, 39(12):2673—2677.
- [8] 肖贵梅, 蔡向志, 龙海洮, 等. 白术内酯Ⅲ介导的肌动蛋白相关蛋白 2/3 抑制肠上皮间质转化以缓解溃疡性结肠炎的研究[J]. *世界中医药*, 2024, 19(15):2237—2245.
- [9] 李鸿渐, 王思月. FOXO4 对脂多糖诱导的心肌细胞凋亡的抑制作用[J]. *医学分子生物学杂志*, 2024, 21(6):508—514.
- [10] 陈礼琴. miR-483-3p 靶向 FGFR2 调控细胞焦亡在心肌纤维化中的作用研究[D]. 广西 桂林:桂林医学院, 2024.
- [11] 杜睿凯, 朱浩. 金丝桃苷调节 TLR4/Myd88/NF- κ B 信号通路对冠心病大鼠内皮细胞焦亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(15):3718—3723.
- [12] 傅洁, 于洁, 张晓芸, 等. 基于转录组学研究岩藻黄质在扰动剪切应力对 EPCs 炎性及增殖影响[J]. *中国海洋药物*, 2022, 41(3):34—42.
- [13] HE M, CHEN Z, MARTIN M, *et al.* miR-483 targeting of CTGF suppresses endothelial-to-mesenchymal transition: Therapeutic implications in kawasaki disease[J]. *Circ Res*, 2017, 120(2):354—365.
- [14] QIU Y, MENG L, XING Y, *et al.* The role of pyroptosis in coronary heart disease[J]. *Anatol J Cardiol*, 2024, 28(7):318—328.
- [15] RONG J, XU J, LIU Q, *et al.* Anti-inflammatory effect of up-regulated microRNA-221-3p on coronary heart disease via suppressing NLRP3/ASC/pro-caspase-1 inflammasome pathway activation[J]. *Cell Cycle*, 19(12):1478—1491.
- [16] TONG Y, WANG Z, CAI L, *et al.* NLRP3 inflammasome and its central role in the cardiovascular diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:4293206. 2020-04-14 [2025-04-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32377298/>.

(收稿日期 2025-05-09)