DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.05.008

血管软化丸调控AMPK/NLRP3信号通路防治动脉粥样硬化的机制研究

秦合伟[1,2],王梦楠[2],李彦杰[1,2],孙孟艳[2],高洋[2],刘丹丹[2]
(1.河南省中医院,河南 郑州 450002;2.河南中医药大学,河南 郑州 450046)

摘要:目的 探讨血管软化丸能否通过调控腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)/NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3,NLRP3)通路抑制细胞焦亡改善载脂蛋白E基因敲除(apolipoprotein E knockout,APOE$^{-/-}$)小鼠动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)。方法 10只C57BL/6J小鼠作为空白对照组,60只APOE$^{-/-}$小鼠随机分为模型组、血管软化丸低剂量组、血管软化丸高剂量组、阿托伐他汀组、血管软化丸高剂量和AMPK抑制剂联合组、AMPK抑制剂组,给予高脂饮食饲养18周建造动脉粥样硬化小鼠模型,并于第13周给予不同方法干预,干预6周后取材,分别检测各组小鼠甘油三酯(triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(low density lipoprotein-eholesterol,LDL-C)、高密度脂蛋白-胆固醇(high density lipoprotein-eholesterol,HDL-C)水平,HE和油红O染色观察小鼠主动脉组织病理形态学变化,Elisa测定主动脉组织白细胞介素(interleukin,IL)-1β和IL-18水平,Western Blot检测AMPK、P-AMPK、NLRP3、裂解的半胱氨酸天冬酶1(Cleaved-Caspase-1)、Gasdermin D(GSDMD)-N蛋白表达,免疫荧光检测P-AMPK、NLRP3蛋白在主动脉根部的分布情况,透射电子显微镜观察主动脉内皮超微结构改变情况。结果 与对照组相比,模型组大鼠血清TG、TC、LDL-C水平显著升高,HDL-C水平显著降低($P<0.01$),主动脉根部细胞排列紊乱,且脂肪空泡明显,主动脉有明显粥样斑块沉积,P-AMPK蛋白表达水平显著降低,NLRP3、Cleaved-Caspase 1、GSDMD-N蛋白表达水平及IL-1β和IL-18水平显著升高($P<0.05$或$P<0.01$);与模型组比较,血管软化丸高低剂量组及阿托伐他汀组血脂紊乱得到改善,主动脉组织及细胞病变程度减轻,P-AMPK蛋白表达水平显著升高,NLRP3、Cleaved-Caspase 1、GSDMD-N蛋白表达水平显著降低($P<0.05$或$P<0.01$),IL-1β和IL-18水平显著降低($P<0.05$或$P<0.01$);与血管软化丸高剂量+AMPK抑制剂组比较,血管软化丸高剂量组焦亡相关蛋白水平显著降低($P<0.05$或$P<0.01$),主动脉内皮细胞损伤程度减轻,而AMPK抑制剂组与之相反。结论 血管软化丸可能通过调控AMPK/NLRP3通路减轻细胞焦亡发挥对动脉粥样硬化小鼠的保护作用。

关键词:血管软化丸;动脉粥样硬化;AMPK/NLRP3信号通路;细胞焦亡
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)05-0035-08

Mechanism of Xuguan Ruanhua Pill(血管软化丸) Regulating AMPK/NLRP3 Signaling Pathway Against Atherosclerosis

QIN Hewei[1,2],WANG Mengnan[2],LI Yanjie[1,2],SUN Mengyan[2],GAO Yang[2],LIU Dandan[2]
(1. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine,Zhengzhou 450002,Henan,China;
2. Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henan,China)

Abstract:*Objective* To investigate whether Xuguan Ruanhua Pill(血管软化丸) can improve atherosclerosis in APOE-/- mice by regulating the AMP-activated protein kinase(AMPK)/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3(NLRP3) pathway and inhibiting cellular death. *Methods* Ten C57BL/6J mice were used as blank control group. Sixty apolipoprotein E knockout(APOE-/-) mice were randomly divided into model group,Xuguan Ruanhua Pill low-dose group,Xuguan Ruanhua Pill high-dose group,atorvastatin group,Xuguan Ruanhua Pill high dose+AMPK inhibitor combination group and AMPK inhibitor group,and were given high-fat diet to construct atherosclerosis(AS) mouse model for 18 weeks and were given different methods of intervention in the 13th week. Different methods of intervention were given,and the samples were taken 6 weeks after the intervention,and the levels of triglyceride(TG),total cholesterol(TC),low density lipoprotein-eholesterol(LDL-C) and high density lipoprotein-eholesterol(HDL-C) were detected respectively in each group. The pathological and morphological changes of mouse aortic tissues were observed by HE and Oil Red O staining. The levels of interleukin(IL)-1β and IL-18 in aortic tissues were determined by ELISA,and the protein expressions of AMPK,P-AMPK,NLRP3,Cleaved-Caspase 1 and GSDMD-N were detected by Western Blot. The P-AMPK and NLRP3 protein distribution in the aortic root was detected by immunofluorescence method and transmission electron microscopy was used for the observation of aortic endothelial ultrastructural changes. *Results* Compared with those in the control group,the model group had significantly higher serum levels of TG,TC and

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82374551);河南省高等学校重点科研项目(24B360003);中原英才计划中原青年拔尖人才项目(豫组通〔2021〕44号);河南省中医药拔尖人才培养项目专项(2022ZYBJ15)
作者简介:秦合伟(1982-),男,河南驻马店人,副主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:心脑血管疾病、神经系统疾病的治疗与康复。

LDL - C, significantly lower HDL - C levels ($P < 0.01$), disorganised cell arrangement in the aortic root and obvious fat vacuoles, significant atheromatous plaque deposition in the aorta, significantly lower levels of P - AMPK protein expression, and significantly lower levels of NLRP3, Cleaved - Caspase 1 and GSDMD - N proteins were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with those of the model group, the lipid disorders were improved in the high and low dose groups of Xuguan Ruanhua Pill and the atorvastatin group, and the degree of aortic tissue and cytopathic lesions were reduced, with a significant increase in the expression level of P - AMPK, and a significant decrease in the expression levels of NLRP3, Cleaved - Caspase 1 and GSDMD - N proteins ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression levels were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the levels of IL - 1β and IL - 18 were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with those of the Xuguan Ruanhua Pill high dose + AMPK inhibitor group, the level of coagulopathy - associated proteins in the Xuguan Ruanhua Pill high - dose group was significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the degree of damage to aortic endothelial cells was attenuated, while that in the AMPK inhibitor group in contrast. *Conclusion* Xuguan Ruanhua Pill may exert a protective effect on atherosclerotic mice by regulating the AMPK/NLRP3 pathway to reduce cell death.

Keywords: Xuguan Ruanhua Pill(血管软化丸); atherosclerosis; AMPK/NLRP3 signalling pathway; pyroptosis

动脉粥样硬化是指糖脂异常积聚于大中动脉内壁而导致动脉硬化及其他继发病变的慢性代谢性疾病,其病机复杂,主要涉及内皮细胞损伤、脂质沉积、血管平滑肌细胞增殖迁移等多种病理过程,缺血性心脑血管疾病发生发展的病理基础[1-2]。研究表明,氧化低密度脂蛋白(oxidized low - density lipoprotein, ox - LDL)可以促进 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD - like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体激活,NLRP3 炎症小体的激活参与 AS 的发生和发展,其含量与疾病严重程度呈正相关[3-4]。NLRP3 被广泛认为能够通过诱导 Caspase - 1 活化,加速细胞炎症因子如白细胞介素(interleukin, IL) - 1β 和 IL - 18 的分泌,加重代谢性疾病的炎症反应[5]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP - activated protein kinase, AMPK)是体内不可缺少的蛋白激酶,不仅参与糖脂代谢等多种生理过程,并能有效抑制 NLRP3 和炎症因子的表达,在动脉粥样硬化等代谢性疾病中起关键作用[6-7]。

中医药在治疗动脉粥样硬化中具有独特的优势,展现出广阔的发展前景。目前,中医药治疗动脉粥样硬化的主要作用机制主要包括调节脂质代谢、改善胰岛素抵抗、减轻氧化应激水平、调节肠道菌群失衡和抑制炎症因子释放等。研究的范围从传统方药扩展到自拟经验方,并且很多方药都经过长期临床应用实践,为中医药的辨证施治和进一步研究奠定了基础。血管软化丸是以由保和丸加减化裁而成的具有调节脂质代谢作用的中药复方,既往研究发现,血管软化丸具有明显的抑制炎症反应和调节脂质代谢的作用,可靶向脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)调控巨噬细胞,减少白细胞介素(interleukin, IL) - 6、IL - 1β、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF - α)、单核细胞趋化蛋白 - 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP - 1)等炎症因子分泌和巨噬细胞脂质蓄积[8-9]。基于血管软化丸的抗炎、降脂功能,本研究以高脂喂养 $APOE^{-/-}$ 小鼠构建动脉粥样硬化模型,基于 AMPK/NLRP3 介导的细胞焦亡途径探讨血管软化丸对动脉粥样硬化小鼠的保护作用。

1 材料

1.1 实验动物及饲料 8 周龄、体质量(20 ± 2)g、雄性载脂蛋白 E 基因敲除(apolipoprotein E knockout, $APOE^{-/-}$)小鼠购自杭州子源公司,合格证:20221012Abzz0105000687。所有动物饲养于河南中医药大学动物实验中心,(22 ± 1)℃ 恒温、60% ~75% 恒湿、12 h 循环照明,自由摄食、饮水。本研究所涉及的所有动物饲养及其他实验操作将由河南中医药大学动物实验中心伦理委员会和河南中医药大学第二临床医学院中心实验室进行审查和批准,本实验设计方案符合安全性和公平性原则,符合国家对医学实验动物的有关要求,伦理审核批准号:DWLL202209012。

1.2 试剂 AMPK 抑制剂化合物 C(Compound C)(货号:CC17243, GLPBIO);IL - 1β 试剂盒(货号:EK201BHS - AW1, MULTI SCIENCES)和 IL - 18 试剂盒(货号:EK218 - AW1, MULTI SCIENCES);HE 染色试剂盒(货号:G1120, Solarbio);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0010, Beyotime)、ECL Plus 超敏发光液(批号:PE0010, Solarbio)。油红 O 染液(货号:G1260, Solarbio)。AMPK(货号:10929 - 2 - AP, Proteintech)、P - AMPK(货号:bs - 14318R, Bioss)、NLRP3(货号:DF7438, Affinity)、Cleaved - Caspase 1(货号:AF4005, Affinity)、GSDMD - N(货号:AF4012, Affinity)、GAPDH(货号:10494 - 1 - AP, Proteintech);2.5% 电镜固定液(货号 P1126, Solarbio)。

1.3 药物 血管软化丸药物组成:山楂 30 g,陈皮 12 g,清半夏 10 g,黄芪 30 g,丹参 12 g,三七 12 g,莱菔子 15 g。方中所有中药均来自河南中医药大学第二附属医院药剂科,按照要求制为颗粒剂,按照"人和动物体表面积折算的等效剂量比率表"换算为小鼠灌胃的低、高 2 个剂量:2.34、4.68 g/kg。阿托伐他汀钙片,购于辉瑞制药有限公司,20 mg/片。

2 方法

2.1 造模与分组 Apo $E^{-/-}$ 小鼠适应性饲养 1 周后给予全程高脂饲料喂养,于第 12 周末将小鼠随机分为 6 组:模型组、血管软化丸低剂量组、血管软化丸高剂量组、阿托伐他汀组、血管软化丸高剂量和 AMPK 抑制剂联合组(联合组)、AMPK 抑制剂组,每组 10 只;另有 10 只 C57 BL/6 小鼠给予普通饲料作为对照组。

2.2 给药 饲养 12 周后开始干预,对照组、模型组给予生理盐水 10 mL/kg 灌胃,血管软化丸低、高剂量组分别给予 2.34、4.68 g/kg 血管软化丸,阿托伐他汀组给予 10 mg/kg 阿托伐他汀,联合组在血管软化丸高剂量组的基础上腹腔注射 Compound C 10 mg/kg,AMPK 抑制剂组单独腹腔注射 Compound C 10 mg/kg。1 次/d,连续干预 6 周。

2.3 样本采集 在实验最终日禁食 12 h 后,麻醉小鼠眼窝取血 1 ~1.5 mL,颈椎脱臼处死小鼠,迅速解剖心脏、主动脉。将血液置于抗凝管中,静置 3 h 后以 3000 r/min 离心 15 min,分离血清,冻存在 -80 ℃的冰箱中以备使用。

2.4 血清生化指标检测 应用全自动生化分析仪检测各组小鼠血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白 - 胆固醇(low density lipoprotein - eholesterol, LDL - C)及高密度脂蛋白 - 胆固醇(high density lipoprotein - eholesterol, HDL - C)水平。

2.5 主动脉组织病理形态学变化 HE 染色:将经 4% 多聚甲醛固定 48 h 的心脏脱水后石蜡包埋,切成 4 μm 厚的切片,贴片后烘干,经二甲苯脱蜡、梯度乙醇、蒸馏水后,苏木精 - 伊红染液染色,最后中性树脂封片于显微镜上观察。油红 O 染色:

剥离小鼠主动脉弓至髂动脉分叉处,纵向解剖并在 37 ℃水浴锅中用油红 O 染液染色 1 h,75% 乙醇洗色。使用 Image J 软件计算斑块面积。

2.6 Western Blot 检测主动脉组织 AMPK、P－AMPK、NLRP3、Cleaved－Caspase－1、GSDMD－N 的表达 剪取合适大小主动脉组织,磨碎匀浆,冰上静置 1 h 并离心,取上清,测定蛋白浓度,95 ℃变性 5 min。使用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳,并将其转至 PVDF 膜上,室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,特异性单克隆一抗 AMPK(1∶1000)、P－AMPK(1∶1000)、NLRP3(1∶1000)、Cleaved－Caspase－1(1∶1500)、GSDMD－N(1∶1500)和 GAPDH(1∶5000),4 ℃孵育过夜,洗涤后室温孵育二抗 1 h。Image Lab 软件目的条带和内参 GAPDH 的灰度值。

2.7 Elisa 法检测小鼠主动脉匀浆中 IL－1β 和 IL－18 水平 取适量主动脉组织,磨碎匀浆,采用 IL－1β 和 IL－18 试剂盒检测主动脉组织中 IL－1β 和 IL－18 的水平。

2.8 免疫荧光检测小鼠主动脉窦 P－AMPK、NLRP3 蛋白表达 主动脉窦切片经补液和抗原修复后进行免疫组织化学测定,将主动脉窦切片和封闭缓冲液一起孵育,P－AMPK 一抗 4 ℃孵育过夜(1∶1000),二抗孵育 50 min;修复后用 NLRP3(1∶200)抗体 4 ℃孵育过夜,二抗孵育 50 min;DAPI 复染,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜观察,采集图像。

2.9 透射电镜观察小鼠主动脉内皮超微结构改变 将长度约为 2 mm 的主动脉组织放入 2.5% 的戊二醛内固定,梯度脱水后用环氧树脂包埋,随后对主动脉组织进行超薄切片(70 nm),然后用饱和醋酸双氧铀水溶液和枸橼酸钠铅染色。在透射电镜下观察血管内皮细胞内超微结构。

2.10 统计学分析 用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组计量资料如正态分布且方差齐性,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血管软化丸对小鼠血清中 TC、TG、HDL－C 及 LDL－C 含量的影响 表 1 结果显示,与正常组相比,模型组小鼠血清 TC、TG 及 LDL－C 水平明显升高,HDL－C 水平明显降低;与模型组相比,血管软化丸治疗组及阿托伐他汀组小鼠 TC、TG 及 LDL－C 水平下降,HDL－C 水平上升;而与高剂量血管软化丸组相比,联合组小鼠 TC、TG 及 LDL－C 水平上升,HDL－C 水平下降,但与单纯腹腔注射 AMPK 抑制剂的小鼠相比,联合组小鼠血脂代谢紊乱的情况明显减轻(表 1)。由此可见,血管软化丸能够有效改善 AS 小鼠的血脂代谢,抑制 AMPK 的表达会减弱血管软化丸对血脂代谢的改善作用。

3.2 血管软化丸对小鼠主动脉斑块沉积的影响 如插页Ⅻ图 1 所示,血管软化丸会减轻 $APOE^{-/-}$ 小鼠主动脉粥样硬化病变,与正常组相比,模型组小鼠主动脉及其根部出现明显的斑块沉积;与模型组相比,血管软化丸高、低剂量组和阿托伐他汀组小鼠主动脉斑块沉积面积均明显减轻,其中高剂量组与低剂量组、阿托伐他汀组之间的差异均不具有统计学意义。联合组小鼠的主动脉斑块沉积情况较血管软化丸高剂量组小鼠加重,较 Compound C 组小鼠减轻(表 2)。提示血管软化丸可能在动脉粥样硬化中具有保护作用,而 Compound C 逆转了血管软化丸对动脉粥样硬化的保护作用。

3.3 血管软化丸对小鼠主动脉窦病理形态改变的影响 如插页Ⅻ图 2 所示,正常组主动脉组织结构完整,内皮细胞完整且排列有序;与正常组相比,模型组可观察到内皮细胞脱落,主动脉纤维层被破坏,出现了含脂质及胆固醇结晶的粥样斑块,胶原纤维结缔组织增生;与模型组比较,血管软化丸高、低剂量组及阿托伐他汀组的细胞病理形态改变减轻,病变区域的泡沫细胞及胶原纤维减少;与高剂量血管软化丸组相比,联合腹腔注射 AMPK 抑制剂的小鼠主动脉窦病变情况明显,但病变最严重的仍是单纯腹腔注射 AMPK 抑制剂的小鼠(表 2)。

3.4 血管软化丸对小鼠主动脉组织中 IL－1β、IL－18 表达的影响 与正常组相比,模型组小鼠主动脉中 IL－1β 和 IL－18 的表达水平明显升高;各中药、西药治疗组均显著降低了主动脉炎症因子的表达。同先前的研究结果一致,与联合组相比,血管软化丸高剂量组的小鼠 IL－1β、IL－18 水平显著降低,抑制剂组水平显著升高(表 3)。提示血管软化丸能够降低 AS 小鼠主动脉炎症因子的表达,但这种抑制作用会被 AMPK 抑制剂消除。

3.5 血管软化丸对小鼠主动脉组织 AMPK、P－AMPK、NLRP3、Cleaved－Caspase－1、GSDMD－N 蛋白表达的影响 如图 3 所示,与正常组相比,模型组小鼠主动脉组织 P－AMPK 蛋白表达量显著降低,NLRP3、Cleaved－Caspase－1、GSDMD－N 表达量均显著升高;与模型组比较,血管软化丸高、低剂量组及阿托伐他汀组小鼠主动脉组织 P－AMPK 表达均显著升高,NLRP3、Cleaved－Caspase－1、GSDMD－N 表达均显著降低;在给予高剂量血管软化丸灌胃治疗时同时腹腔注射 AMPK 抑制剂 Compound C 显著降低了 P－AMPK 的表达,提高了 NLRP3、Cleaved－Caspase－1、GSDMD－N 的表达,而单独腹腔注射 Compound C 使蛋白趋势改变更加明显(表 4)。免疫荧光共定位染色检测了 P－AMPK 和 NLRP3 在主动脉窦的表达,其结果与蛋白质印迹分析结果相对应(插页Ⅻ图 4,表 5),进一步验证了血管软化丸对 AMPK/NLRP3 信号通路的调控作用。

3.6 血管软化丸对小鼠主动脉组织超微结构的影响 透射电子显微镜结果显示,与正常组相比,模型组小鼠主动脉血管内皮细胞表现出明显的形态改变,如细胞肿胀变形,胞质空泡化并伴有内容物流出,甚至出现细胞膜破裂、细胞核溶解;相比之下,各治疗组细胞病理形态改变程度减轻;而在使用 AMPK 抑制剂干预的小鼠主动脉中,内皮细胞的形态又呈现出不同程度的病理改变,如图所示。结合前期分子检测结果,提示血管软化丸能够有效抑制高脂饮食诱导的小鼠主动脉内皮细胞焦亡,

表 1 各组小鼠血清 TC、TG、HDL－C 及 LDL－C 水平($\bar{x} \pm s$) 单位:mmol/L

组别	n	TC	TG	HDL－C	LDL－C
正常组	9	2.59 ± 1.02	0.64 ± 0.11	1.14 ± 0.15	0.32 ± 0.15
模型组	9	22.20 ± 3.91■■	1.20 ± 0.20■■	0.60 ± 0.14■■	5.22 ± 0.70■■
血管软化丸低剂量组	9	19.01 ± 3.25▲	1.03 ± 0.18▲	0.73 ± 0.12▲	3.73 ± 0.54▲▲
血管软化丸高剂量组	9	18.55 ± 2.66▲●	0.99 ± 0.20▲●	0.75 ± 0.11▲●●	3.58 ± 0.48▲▲●●
阿托伐他汀组	9	16.38 ± 3.05▲▲	1.02 ± 0.22▲	0.68 ± 0.16▲	3.47 ± 0.46▲▲
联合组	9	21.49 ± 3.69	1.16 ± 0.13	0.57 ± 0.10	4.49 ± 0.61
AMPK 抑制剂组	9	25.18 ± 2.98●	1.35 ± 0.14●	0.45 ± 0.12●	5.85 ± 0.92●●

注:■■与正常组比较,$P<0.01$;▲与模型组比较,$P<0.05$;▲▲与模型组比较,$P<0.01$;●与联合组比较,$P<0.05$;●●与联合组比较,$P<0.01$。

表 2 各组小鼠主动脉组织病变的相对定量分析($\bar{x} \pm s$)

单位:%

组别	n	主动脉窦病变面积占比	主动脉斑块面积占比
正常组	3	3.15 ± 1.78	2.65 ± 2.30
模型组	3	32.66 ± 5.34■■	32.60 ± 1.68■■
血管软化丸低剂量组	3	25.07 ± 1.69▲	20.38 ± 0.75▲▲
血管软化丸高剂量组	3	22.08 ± 2.30▲▲●	17.89 ± 1.69▲▲●
阿托伐他汀组	3	15.23 ± 7.17▲▲	14.76 ± 3.58▲▲
联合组	3	31.16 ± 0.45	24.03 ± 2.67
AMPK 抑制剂组	3	38.83 ± 4.49●	37.76 ± 3.70●●

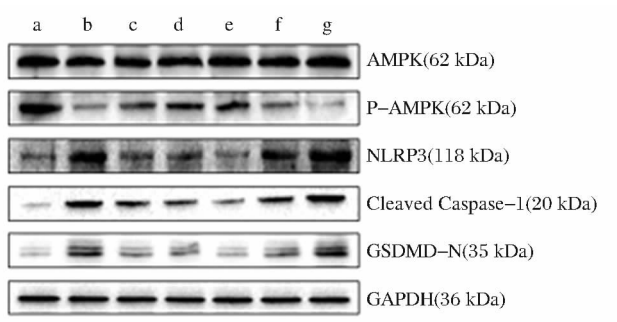
注:■■与正常组比较 $P < 0.01$;▲与模型组比较,$P < 0.05$;▲▲与模型组比较,$P < 0.01$;●与联合组比较,$P < 0.05$;●●与联合组比较,$P < 0.01$。

表 3 各小鼠主动脉组织中的 IL-1β、IL-18 表达($\bar{x} \pm s$)

单位:pg/mg

组别	n	IL-1β	IL-18
正常组	6	16.79 ± 4.18	14.95 ± 3.57
模型组	6	56.03 ± 4.75■■	56.69 ± 6.33■■
血管软化丸低剂量组	6	49.05 ± 5.05▲	48.70 ± 6.59▲
血管软化丸高剂量组	6	47.73 ± 4.90▲●	47.96 ± 6.93▲●
阿托伐他汀组	6	43.65 ± 4.82▲▲	48.71 ± 4.18▲
联合组	6	55.50 ± 4.36	55.20 ± 4.57
AMPK 抑制剂组	6	81.10 ± 18.62●●	78.83 ± 6.20●●

注:■■与正常组比较 $P < 0.01$;▲与模型组比较,$P < 0.05$;▲▲与模型组比较,$P < 0.01$;●与联合组比较,$P < 0.05$;●●与联合组比较,$P < 0.01$。



注:a 为正常组,b 为模型组,c 为血管软化丸低剂量组,d 为血管软化丸高剂量组,e 为阿托伐他汀组,f 为高剂量血管软化丸与 AMPK 抑制剂联合组,g 为 AMPK 抑制剂组。

图 3 各组小鼠主动脉组织 AMPK、P-AMPK、NLRP3、Cleaved-Caspase-1、GSDMD-N 蛋白免疫印迹

而抑制 AMPK 磷酸化会逆转此种保护作用。见插页Ⅻ图 5。

4 讨论

动脉粥样硬化是从大中动脉内膜受损开始,发生脂质代谢紊乱伴炎性细胞浸润,最终以脂质沉积形成斑块为特征的慢性炎症疾病。高血压、血脂异常等因素均有可能诱发血管内膜损伤,刺激动脉粥样硬化病变形成。目前,动脉粥样硬化的治疗策略仍以采用他汀类药物为主,但其常引起肝痛、肌损伤等不良反应[10]。

中药具有多角度、多靶点、多层次的特点,药物简便、药效平稳,能够发挥治病求本的特色,在治疗动脉粥样硬化这一疾病中有独特的优势[11]。现代中医学认为动脉粥样硬化主要病机是痰瘀互结、化热成毒与损伤络脉,“痰”“瘀”“毒”三者之间可相生或相互转化[12-13]。本研究所用血管软化丸由保和丸加减化裁而成,方中山楂消食化积、活血化瘀为君药;陈皮、半夏理气健脾、化痰散结,黄芪补气以行血,丹参、三七行气散结、活血化瘀,共为臣药;莱菔子理气消食为佐药;诸药合用,共奏消积化痰、活血化瘀之效[14]。既往临床研究表明,血管软化丸能够通过降低血清炎性因子,调节血脂代谢紊乱,改善血管内皮功能及血液流变学,抑制颈动脉粥样硬化斑块发展[15-16]。

细胞焦亡属于程序性细胞死亡方式的一种,焦亡经典途径由 NLRP3 炎症小体启动,并依赖于 Caspase-1 信号途径[17]。在生理情况下,炎症小体能够通过消除细胞损伤致病因素来保护机体免受病原体感染和氧化应激,然而,NLRP3 的过度激活则会促进 AS 的发展[18]。研究表明,NLRP3 炎症小体和 IL-1β 是 AS 发展的主要驱动因素[19]。AMPK 是细胞内调节脂质代谢的关键分子,AMPK 参与代谢相关心血管疾病的发生过程,激活 AMPK 可以通过减少泡沫细胞形成、保护血管内皮进而减少斑块形成,延缓 AS 进程。他汀类药物可以通过增加体外和体内的 Thr-172 磷酸化来快速激活 AMPK,是此类药物降低血脂,抗炎抗氧化的主要机制之一[20-21]。AMPK 活性抑制可通过激活 NLRP3 炎症小体发挥促焦亡作用,WU M 等[22]的研究表明激活 AMPK 能够抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)途径,从而抑制 NLRP3 炎症小体活化并缓解 β 细胞功能障碍中的焦亡。激活 AMPK 信号还可以通过改善自噬,减轻内质网应激,激活 SIRT1 和调节线粒体稳态,从而抑制 NLRP3 炎症小体,进一步改善炎症反应[23]。血管软化丸中的多种活性成分都可参与 AMPK 的激活,例如黄芪、三七中的黄酮类化合物槲皮素在体内和体外都能激活 AMPK/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1α(peroxlsome proliferator-activated receptor-γ coactlvator-1α,PGC-1α)途径纠正线粒体的氧化应激、ATP 生成减少[24]。山柰酚可以介导 AMPK 信号通路来调节自噬,进一步抑制细胞凋亡,以保护大脑免受缺血再灌注损伤[25]。

本研究发现,动脉粥样硬化模型小鼠主动脉组织 p-AMPK 表达明显降低,而 NLRP3、Cleaved-Caspase-1、GSDMD-N 蛋白表达水平显著升高,下调的 p-AMPK 可通过影响 NLRP3 表达进而上调 Cleaved-Caspase-1 及 GSDMD-N 的表达,主动脉焦亡相关蛋白表达升高,促进了 IL-1β、IL-18 等炎症因子的表达水平,致使血管内皮细胞形态结构不规则,内皮细胞发生肿胀、坏死,内皮下间隙增大,细胞核减小伴

表 4 各组小鼠主动脉组织 AMPK、P-AMPK、NLRP3、Cleaved-Caspase-1、GSDMD-N 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P-AMPK/AMPK	NLRP3/GAPDH	Cleaved-Caspase-1/GAPDH	GSDMD-N/GAPDH
正常组	3	1.01 ± 0.16	0.37 ± 0.06	0.21 ± 0.06	0.15 ± 0.09
模型组	3	0.48 ± 0.07■■	0.87 ± 0.11■■	0.92 ± 0.04■■	0.67 ± 0.18■■
血管软化丸低剂量组	3	0.75 ± 0.14▲	0.54 ± 0.13▲	0.55 ± 0.07▲▲	0.30 ± 0.08▲▲
血管软化丸高剂量组	3	0.77 ± 0.09▲▲●●	0.50 ± 0.21▲●	0.52 ± 0.08▲▲●●	0.33 ± 0.06▲▲●
阿托伐他汀组	3	0.78 ± 0.16▲▲	0.47 ± 0.21▲	0.41 ± 0.11▲▲	0.19 ± 0.02▲▲
联合组	3	0.48 ± 0.08	0.80 ± 0.26	0.74 ± 0.06	0.52 ± 0.06
AMPK 抑制剂组	3	0.26 ± 0.06●	1.17 ± 0.09●	1.12 ± 0.08●●	0.96 ± 0.11●●

注:■■与正常组比较 $P < 0.01$;▲与模型组比较,$P < 0.05$,与模型组比较;▲▲$P < 0.01$;●与联合组比较,$P < 0.05$;●●与联合组比较,$P < 0.01$。

表 5 各组小鼠主动脉窦 P-AMPK、NLRP3 的平均荧光强度($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P-AMPK	NLRP3
正常组	3	167.03 ± 10.89	60.45 ± 15.10
模型组	3	90.23 ± 2.60■■	121.93 ± 6.06■■
血管软化丸低剂量组	3	114.49 ± 8.60▲	102.12 ± 6.25▲
血管软化丸高剂量组	3	124.01 ± 19.02▲▲●	85.90 ± 4.10▲▲●
阿托伐他汀组	3	132.18 ± 12.22▲▲	75.55 ± 4.47▲▲
联合组	3	98.25 ± 8.90	105.47 ± 12.07
AMPK 抑制剂组	3	25.80 ± 3.89●●	173.27 ± 2.61●●

注:■■与正常组比较$P<0.01$;▲与模型组比较,$P<0.05$;▲▲与模型组比较,$P<0.01$;●与联合组比较,$P<0.05$;●●与联合组比较,$P<0.01$。

形状不规则,异染色质边集在核膜附近,细胞膜破裂,胞质空泡化伴内容物丢失,诱发炎性反应及血管内皮损伤、脂质沉积等病理改变,导致动脉粥样硬化的发生[26]。经血管软化丸治疗后,AS 小鼠血脂紊乱情况得以改善,IL-1β、IL-18 等炎症因子水平显著降低,同时主动脉内皮细胞损伤程度减轻,细胞形态基本规则,基膜较为连续,细胞核形态基本正常,染色质分布均匀,部分细胞仍出现空泡化情况,脂质沉积形成粥样斑块情况减少,证实血管软化丸对动脉粥样硬化的治疗作用,且治疗后的小鼠主动脉中 P-AMPK 表达较模型组明显升高,NLRP3、Cleaved-Caspase-1、GSDMD-N 蛋白表达水平呈降低趋势,提示血管软化丸调控 AMPK/NLRP3 信号通路基因及蛋白表达,抑制小鼠体内炎症反应和主动脉内皮细胞焦亡,延缓 AS 发展进程。为验证这一观点,在灌胃高剂量血管软化丸基础上给予 $APOE^{-/-}$ 小鼠 AMPK 抑制剂,此时血管软化丸对 AS 小鼠的保护作用被逆转,细胞损伤水平升高,再次出现基膜不连续、细胞及细胞核形态不规则、胞质空泡化的情况;与之相比,单纯使用 AMPK 抑制剂的小鼠进一步加重了内皮细胞损伤程度,促进了动脉粥样硬化进程。提示血管软化丸可通过促进 AMPK 表达抑制 NLRP3 介导的细胞焦亡,从而调节脂质代谢,抑制炎症反应,发挥动脉粥样硬化保护作用。

综上所述,血管软化丸可以减轻动脉粥样硬化小鼠的血脂紊乱和斑块沉积情况,减少血管炎症因子的产生和释放,保护血管内皮细胞,抑制炎性细胞浸润和主动脉血管壁增厚。此中药复方对动脉粥样硬化小鼠血管内皮细胞的保护作用机制可能与激活 AMPK 进而抑制 NLRP3 炎症小体介导的细胞经典焦亡途径有关。

参考文献

[1] JEBARI-BENSLAIMAN S, GALICIA-GARCÍA U, LARREA-SEBAL A, et al. Pathophysiology of atherosclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(6): 3346.
[2] FAN J L, WATANABE T. Atherosclerosis: known and unknown[J]. Pathol Int, 2022, 72(3): 151-160.
[3] BAUER S, HEZINGER L, REXHEPI F, et al. NOD-like receptors-emerging links to obesity and associated morbidities[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 8595.
[4] PARAMEL VARGHESE G, FOLKERSEN L, STRAWBRIDGE R J, et al. NLRP3 inflammasome expression and activation in human atherosclerosis[J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(5): e003031.
[5] SHI J J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. Nature, 2015, 526(7575): 660-665.
[6] YANG M, LUO S L, JIANG N, et al. DsbA-L ameliorates renal injury through the AMPK/NLRP3 inflammasome signaling pathway in diabetic nephropathy[J]. Front Physiol, 2021, 12: 659751.
[7] ZHANG Y, WANG R Q, YAO H J, et al. Mangiferin ameliorates HFD-induced NAFLD through regulation of the AMPK and NLRP3 inflammasome signal pathways[J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 4084566.
[8] 秦合伟, 牛雨晴, 宋雪梅, 等. 血管软化丸抑制血管炎症反应防治动脉粥样硬化的分子机制[J]. 实用医学杂志, 2022, 38(15): 1901-1907.
[9] QIN H W, LI Y J, GUO N, et al. Mechanism of xue guan ruan hua wan pill regulating mirna-467b in inhibiting atherosclerosis[J]. BCPT, 2020, 127(8): 262-270.
[10] WARD N C, WATTS G F, ECKEL R H. Statin toxicity[J]. Circ Res, 2019, 124(2): 328-350.
[11] 辛来运, 路迎冬, 高嘉良, 等. 黄芩苷防治动脉粥样硬化作用机制的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(3): 77-83.
[12] 于宁, 贾连群, 宋囡, 等. 基于"痰瘀毒"病机探讨细胞焦亡与动脉粥样硬化的关系[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9): 2186-2188.
[13] 张桂睿. 颈动脉易损斑块从"阳明瘀毒"论治探讨[J]. 江苏中医药, 2019, 51(11): 5-7.
[14] 秦合伟, 李彦杰, 孙孟艳, 等. 血管软化丸调控 lncRNA-TUG1 防治动脉粥样硬化的分子机制[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(3): 366-376.
[15] 徐晔, 秦合伟. 血管软化丸对颈动脉粥样硬化斑块病人内皮功能及血液流变学的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(24): 3604-3607.
[16] 刘建东, 秦合伟. 基于血脂代谢紊乱理论研究血管软化丸抗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(20): 2943-2947.
[17] CHEN W, ZHAO M J, ZHAO S Z, et al. Activation of the TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway contributes to inflammation in diabetic retinopathy: a novel inhibitory effect of minocycline[J]. Inflamm Res, 2017, 66(2): 157-166.
[18] KONG P, CUI Z Y, HUANG X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 131.
[19] CHEN X, ZHANG D X, LI Y P, et al. NLRP3 inflammasome and IL-1β pathway in type 2 diabetes and atherosclerosis: Friend or foe?[J]. Pharmacol Res, 2021, 173: 105885.
[20] SUN W, LEE T S, ZHU M J, et al. Statins activate AMP-activated protein kinase *in vitro* and *in vivo*[J]. Circulation, 2006, 114(24): 2655-2662.
[21] DEHNAVI S, KIANI A, SADEGHI M, et al. Targeting AMPK by statins: a potential therapeutic approach[J]. Drugs, 2021, 81(8): 923-933.
[22] WU M, LU L, GUO K F, et al. Vitamin D protects against high glucose-induced pancreatic β-cell dysfunction *via* AMPK-NLRP3 inflammasome pathway[J]. Mol Cell Endocrinol, 2022, 547: 111596.
[23] CORDERO M D, WILLIAMS M R, RYFFEL B. AMP-activated protein kinase regulation of the NLRP3 inflammasome during aging[J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(1): 8-17.
[24] ZHANG Q, SONG W, ZHAO B J, et al. Quercetin attenuates diabetic peripheral neuropathy by correcting mitochondrial abnormality *via* activation of AMPK/PGC-1α pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. Front Neurosci, 2021, 15: 636172.
[25] YUAN Y J, XIA F, GAO R, et al. Kaempferol mediated AMPK/mTOR signal pathway has a protective effect on cerebral ischemic-reperfusion injury in rats by inducing autophagy[J]. Neurochem Res, 2022, 47(8): 2187-2197.
[26] ZHENG D D, LIU J, PIAO H L, et al. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1039241.

血管软化丸调控 AMPK/NLRP3 信号通路防治动脉粥样硬化的机制研究

（正文见 35－39 页）

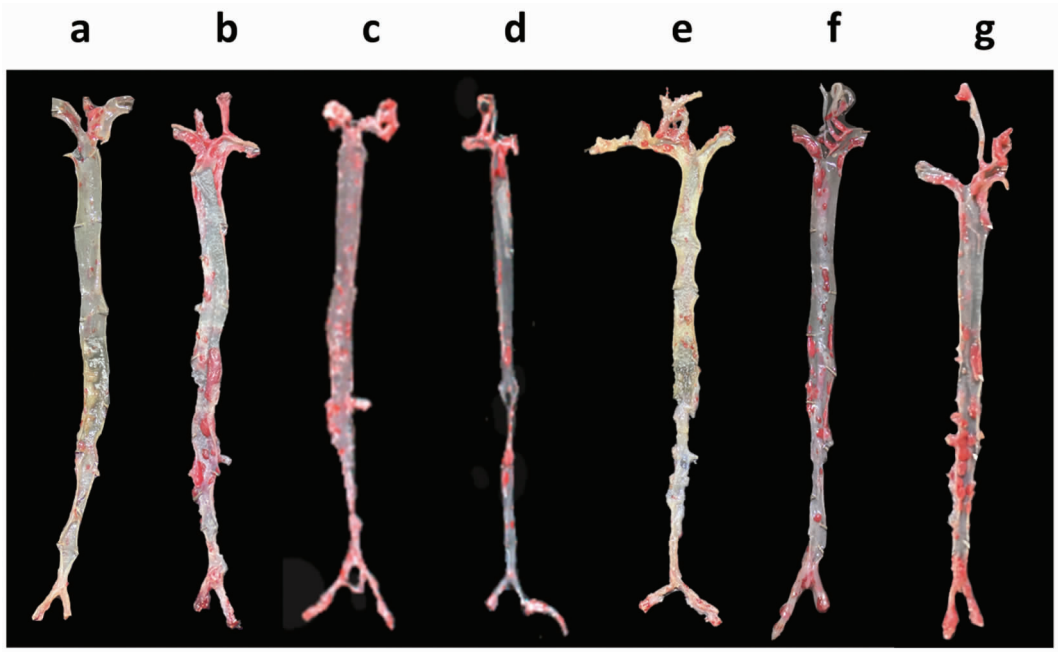
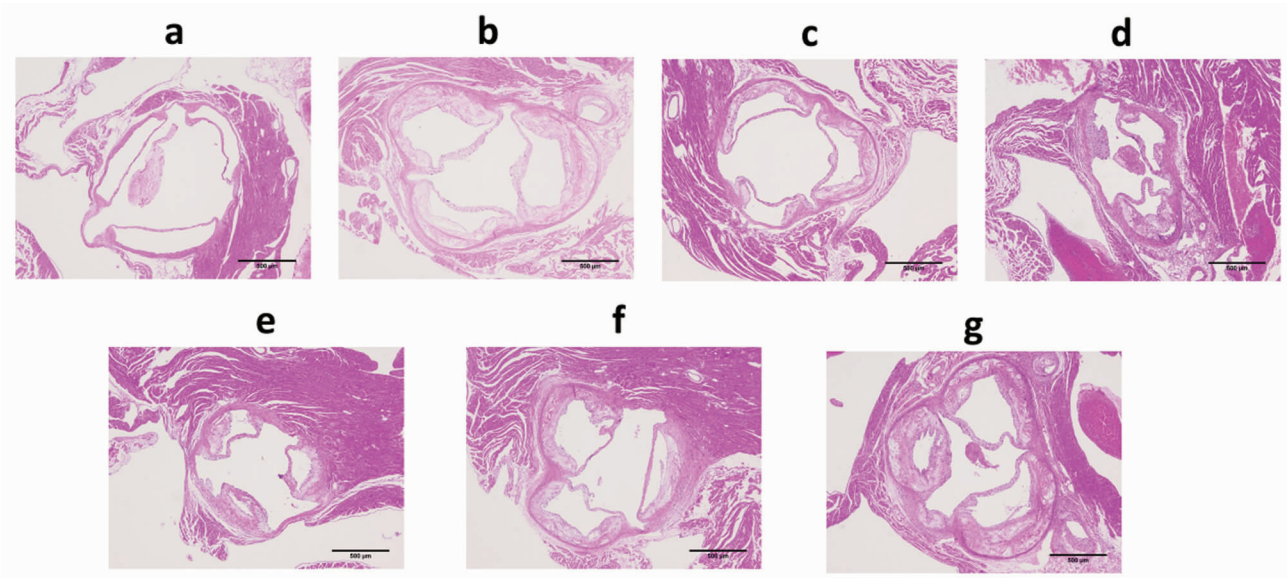
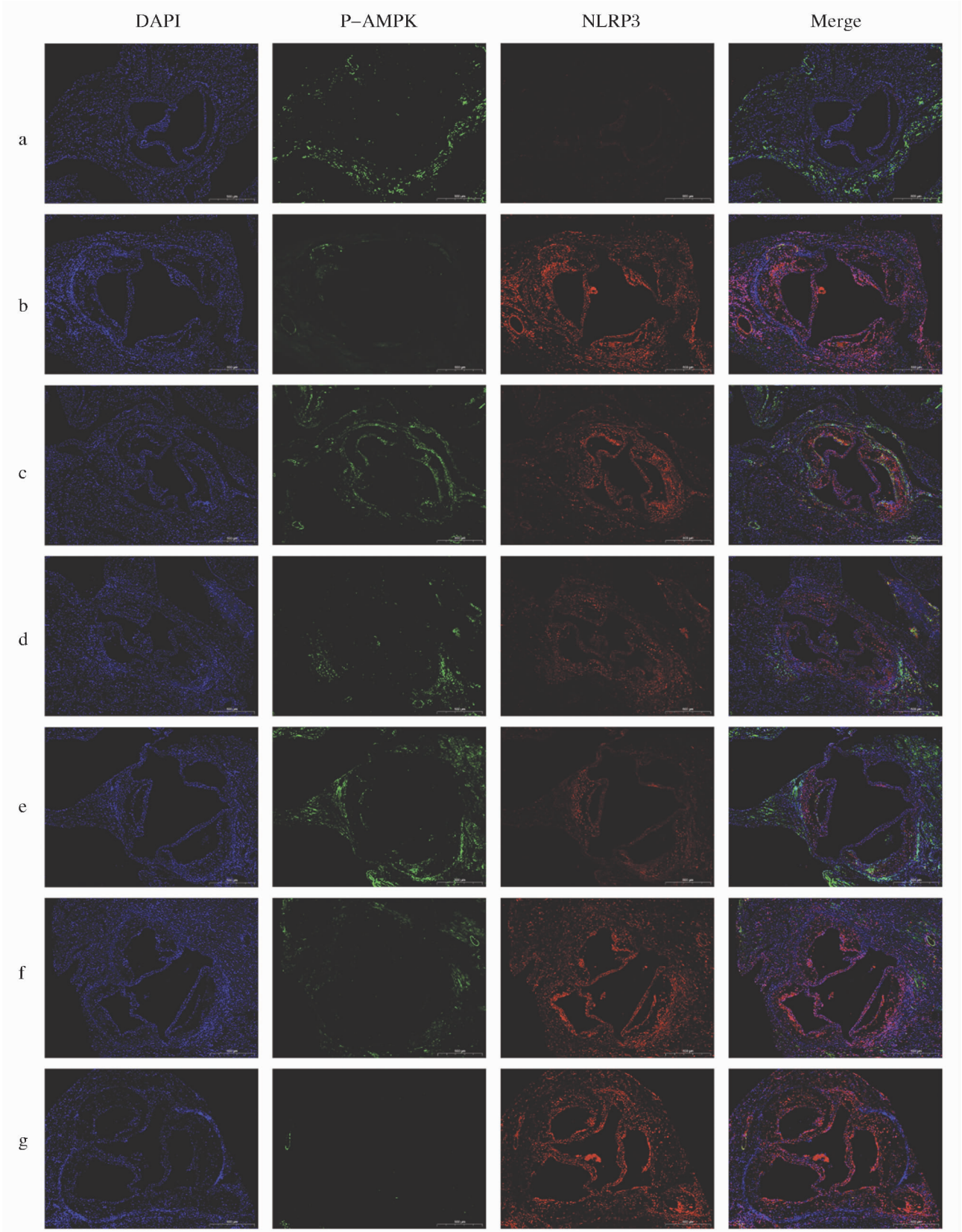


图 1　各组小鼠大体主动脉油红 O 染色



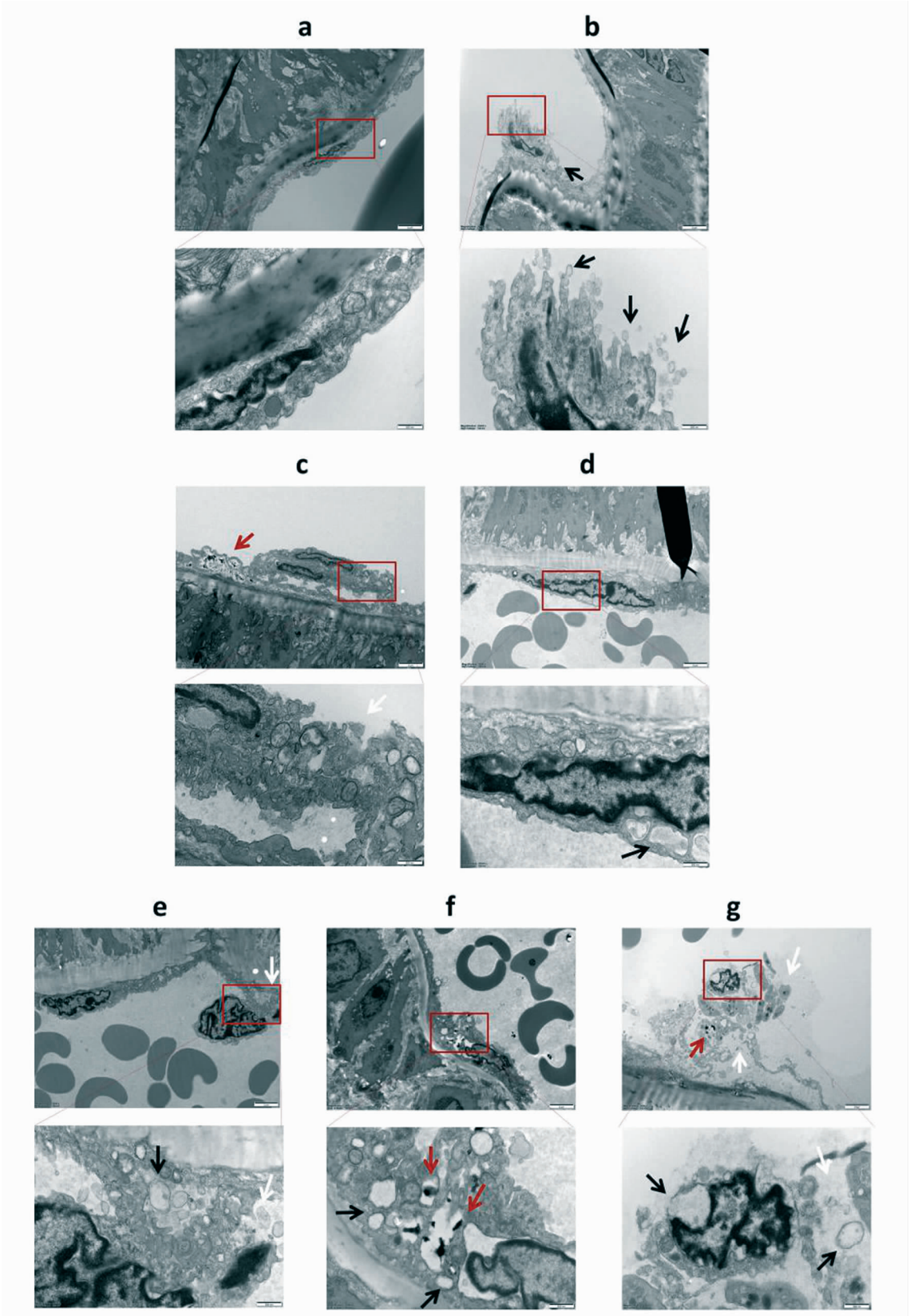
注：a 为正常组，b 为模型组，c 为血管软化丸低剂量组，d 为血管软化丸高剂量组，e 为阿托伐他汀组，f 为高剂量血管软化丸与 AMPK 抑制剂联合组，g 为 AMPK 抑制剂组。

图 2　各组小鼠主动脉窦 HE 染色（40×）



注：a 为正常组，b 为模型组，c 为血管软化丸低剂量组，d 为血管软化丸高剂量组，e 为阿托伐他汀组，f 为高剂量血管软化丸与 AMPK 抑制剂联合组，g 为 AMPK 抑制剂组。

图 4　各组小鼠 P－AMPK、NLRP3 蛋白在主动脉窦的表达（IF，40×）



注：a 为正常组，b 为模型组，c 为血管软化丸低剂量组，d 为血管软化丸高剂量组，e 为阿托伐他汀组，f 为高剂量血管软化丸与 AMPK 抑制剂联合组，g 为 AMPK 抑制剂组；黑色箭头表示胞质空泡化，红色箭头表示自噬溶酶体，白色箭头表示细胞肿胀变形、细胞膜破裂。

图 5　各组小鼠主动脉组织内皮细胞形态（5000 ×，20000 ×）