DOI:10.16016/j.2097-0927.202211043

二氢杨梅素通过 Sirt3 抑制 NLRP3 炎性小体活性改善血管内皮细胞损伤

刘明华,申 卉,汪小兰,周 曦,张 婷 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系军队营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆市医学营养研究中心

[**摘要**] **目的** 观察二氢杨梅素(dihydromyricetin,DHM)对通过 Sirt3 抑制棕榈酸诱导的血管内皮细胞 NLRP3 炎性小体活化,改善血管内皮细胞损伤的作用机制研究。**方法** 棕榈酸(200 μmol/L)处理人脐静脉内皮细胞建立炎症损伤模型,不同浓度 DHM(10、20、40 μmol/L)干预后检测内皮细胞活力、LDH 释放水平以及内皮细胞黏附因子表达。运用 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹法检测 NLRP3 炎性小体活化相关细胞因子的 mRNA 和蛋白表达水平。运用海马能量代谢检测平台和膜电位实验探索 DHM 对内皮细胞线粒体功能的调节作用。利用 Sirt3 特异性抑制剂 3-TYP(50 μmol/L)和 Sirt3 过表达质粒干预,探索 Sirt3 在 DHM 抑制棕榈酸诱导 NLRP3 炎性小体活化中的作用。**结果** DHM 能显著抑制棕榈酸诱导的内皮细胞活力下降、抑制 LDH 释放以及 ICAM-1 和 VCAM-1 的分泌($P<0.05$)。并且,DHM 可显著改善线粒体呼吸耗氧量下降,ATP 产量及剩余呼吸能力以及抑制线粒体膜电位升高($P<0.05$)。同时,DHM 可以抑制棕榈酸诱导的 NLRP3、IL-18 和 ASC 等的 mRNA 和蛋白表达($P<0.05$),Sirt3 过表达质粒转染可增强 DHM 这一效应,而 Sirt3 抑制剂 3-TYP 处理则显著削弱 DHM 的作用。**结论** DHM 通过激活 Sirt3 维持内皮细胞线粒体代谢,抑制 NLRP3 活化,减轻血管内皮细胞炎症损伤。

[**关键词**] 二氢杨梅素;血管内皮细胞;动脉粥样硬化;NLRP3 炎性小体;Sirt3
[**中图法分类号**] R151.2; R322.12; R329.25 [**文献标志码**] A

Dihydromyricetin ameliorates vascular endothelial damage by inhibiting NLRP3 inflammasome activity through Sirtuin 3

LIU Minghua, SHEN Hui, WANG Xiaolan, ZHOU Xi, ZHANG Ting Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing Medical Nutrition Research Center, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the inhibitory effects and mechanism of dihydromyricetin (DHM) on the activation of NLRP3 inflammasome and improvement of palmitic acid induced injury in vascular endothelial cells through Sirtuin 3 (Sirt3). **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were treated with palmitic acid (200 μmol/L) to establish an inflammatory injury model, which was subsequently intervened with different concentrations of DHM (10, 20 and 40 μmol/L). Cell viability, LDH release level and expression of endothelial cell adhesion factors were detected respectively. qRT-PCR and Western blotting were used to measure the mRNA and protein levels of cytokines related to NLRP3 inflammasome activation. The regulatory effects of DHM on mitochondrial function of endothelial cells were determined by Seahorse Extracellular Flux Platform and mitochondrial membrane potential assay. Moreover, Sirt3-specific inhibitor 3-TYP (50 μmol/L) and Sirt3 overexpression plasmid were adopted to explore the role

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81773409);重庆市自然科学基金一般项目(cstc2017jcyjAX0458)
[**通信作者**] 张 婷,E-mail:t_zhang@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

of Sirt3 in DHM inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome induced by palmitic acid. **Results** DHM significantly inhibited the decline in cell viability, release of LDH, and secretion of endothelial cell adhesion factors ICAM-1 and VCAM-1 induced by palmitic acid ($P<0.05$). Moreover, DHM remarkably improved the decrease of oxygen consumption for mitochondrial respiratory activity, enhanced ATP production and residual respiratory capacity, and suppressed the elevation of mitochondrial membrane potential ($P<0.05$). Meanwhile, DHM also suppressed the mRNA and protein levels of NLRP3, IL-18 and ASC induced by palmitic acid ($P<0.05$). Sirt3 overexpression enhanced the above effects of DHM, while the Sirt3 inhibitor 3-TYP obviously attenuated these effects. **Conclusion** DHM maintains mitochondrial metabolism of endothelial cells by activating Sirt3, inhibits the activation of NLRP3 inflammasome, and thus alleviates the inflammatory damage in HUVECs.

[**Key words**] dihydromyricetin; vascular endothelial cells; atherosclerosis; NLRP3 inflammasome; Sirt3

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81773409) and the Project of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2017jcyjAX0458). Corresponding author: ZHANG Ting, E-mail: t_zhang@hotmail.com

《中国心血管病报告2020》显示现患心血管总人数高达3.3亿,死亡率仍居首位,高于肿瘤及其他疾病[1]。预防和循证治疗是目前防治心血管疾病等非传染性疾病的主要手段,其中膳食策略在预防和辅助治疗该类疾病中具有非常重要的地位。流行病学证据表明,植物性食物的摄入可降低心血管疾病的罹患风险,因其中含有大量的植物化学物。二氢杨梅素(dihydromyricetin,DHM)是一种天然黄酮类化合物,广泛存在于葡萄科、杨梅科、大戟科等天然植物中,尤其以显齿蛇葡萄属(*Ampelopsis grossedentata*)(俗称"藤茶")含量最高,占干质量的30%左右[2]。其较强的抗炎、抗氧化活性是抗菌、降血糖、调血脂、保肝及抗肿瘤等作用的药理基础[3]。动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是心血管疾病的发病基础,目前关于DHM与AS的研究十分有限。人群研究中观察到饮用藤茶对心血管疾病有防治作用[4],且本课题组前期实验研究发现DHM喂养可以改善高脂诱导的$ApoE^{-/-}$小鼠血脂水平,并抑制动脉粥样硬化斑块面积,但具体分子机制尚未完全阐明。

Nod样受体蛋白3(nod-like receptor protein-3,NLRP3)炎性小体是机体固有免疫反应的主要途径[5]。近年来研究表明NLRP3炎性小体活化与动脉粥样硬化发生关系密切[6]。活化的NLRP3发生自身寡聚化,切割pro-caspase-1形成活化的caspase-1,caspase-1剪切催化细胞质中促炎因子pro-IL-1β的成熟释放,IL-1β随后被分泌出细胞外引起进一步的炎症级联反应如NF-κB的活化[7]和继发性炎症因子等引起内皮细胞的损伤加剧[7]。然而,目前尚无理想的防治方案,亟需寻找抑制NLRP3炎性小体活化的理想化合物。线粒体来源的ROS是NLRP3炎性小体活化所必需[8],本研究拟采用血管内皮细胞为研究对象,观察DHM对棕榈酸诱导内皮细胞NLRP3炎性小体活化的影响,重点关注定位于线粒体的Sirt3与NLRP3炎性小体活化及其细胞保护效应分子机制的探讨。本研究通过棕榈酸诱导血管内皮细胞损伤模型、质粒转染等技术方法,深入研究Sirt3在DHM减轻血管内皮细胞损伤中的作用,为动脉粥样硬化防治提供新的干预靶点,同时为DHM防治动脉粥样硬化提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell,HUVECs)和icell原代内皮细胞培养基(PriMed-iCELL-002)购自上海赛百慷生物技术股份有限公司。二氢杨梅素(42866)和棕榈酸(palmitic acid,PA)(P5585-10G)购自Sigma公司。CCK-8、LDH和JC-1线粒体膜电位试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;ELISA检测试剂盒细胞间黏附因子1(ICAM-1,KE00061)和血管黏附因子1(VCAM-1,KE00163)购自Proteintech公司。兔抗人IL-1β抗体(D3U3E)和兔抗人NLRP3抗体(D4D8T)均购自Cell Signaling Technology公司;兔抗人Sirt3抗体(ab217319)购自Abcam公司。3-TYP抑制剂(HY-108331)购自MCE公司;Sirt3过表达质粒(pcDNA3.1-EF1a-MCS-3flag-CMV-EGFP)购自汉恒生物技术有限公司;线粒体压力测定试剂盒购自Seahorse Bioscience公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 人脐静脉内皮细胞采用icell原代内皮细胞培养基培养,所有实验在细胞培养至3~6代,融合度达到80%~90%时进行。体外研究先采用DHM处理24 h后,再用棕榈酸(200 μmol/L)继续处理24 h进行各项指标的检测。3-TYP(50 μmol/L)处理1 h,后续处理同前。Sirt3过表达质粒转染5 h后换正常培养基培养16 h,后续处理同前。细胞分组:①细胞分为5组,包括CON组、PA组、L-DHM+PA组(DHM 10 μmol/L)、M-DHM+PA组(DHM 20 μmol/L)、H-DHM+PA组(DHM 40 μmol/L),用于检测细胞活力、LDH释放率以及细胞黏附分子释放,筛选DHM最适浓度。②细胞分为3组,包括CON组、PA组、DHM+PA组(DHM 40 μmol/L),用于检测血管内皮细胞NLRP3炎性小体活化以及Sirt3对DHM改善血管内皮细胞损伤的影响。③细胞分为4组,包括CON组、3-TYP组、3-TYP+PA组、3-TYP+DHM+PA组,用于检测细胞活力和LDH释放率以及验证Sirt3在DHM改善血管内皮细胞中的作用。④细胞分为4组,包括NC组(空白质粒转染)、Sirt3组、Sirt3+PA组、Sirt3+DHM+PA组,用于验证Sirt3在DHM改善血管内皮细胞中的作用。

1.2.2 细胞活力检测 CCK-8细胞毒性检测按照试剂盒说明书进行,以对照组的细胞活力减去空白对照孔为100%计算各组的细胞活力。

1.2.3 乳酸脱氢酶细胞毒性检测 按照乳酸脱氢酶细胞毒性检测(LDH)试剂盒说明书进行,以样品最大酶活性孔为分母,分别减去空白对照孔后计算得到各组的LDH释放率。

1.2.4 ELISA检测 双抗夹心酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清中的ICAM-1和VCAM-1活性,按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 JC-1线粒体膜电位检测 取HUVECs细胞,提取新鲜线粒体,采用JC-1荧光探针线粒体膜电位检测试剂盒检测线粒体膜电位。最终结果以红色/绿色相对荧光强度表示线粒体膜电位,比值高表明线粒体膜电位正常。

1.2.6 Seahorse线粒体压力测试 在XF96细胞培养板中培养HUVECs细胞,实验前1 d水化探头、预热XF96检测仪。从含CO_2孵育箱中取出XF96细胞培养板,吸弃原有培养基,换上37 ℃预温的检测培养基,随后放入37 ℃无CO_2的孵育箱中培养45 min。打开XF Software软件设置程序,开始运行,先放入装载有试剂的探头进行校准,需要15~30 min。校准完成后再将细胞培养板放入,程序自动运行。采用Wave软件导出数据进行分析。

1.2.7 Western blot检测 培养HUVECs细胞,细胞在含有1%的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的细胞裂解缓冲液(Sigma-Aldrich,美国)中裂解。用BCA试剂盒(碧云天生物技术有限公司,上海)测定蛋白质浓度。而后进行蛋白质印迹,转移到聚偏二氟乙烯膜上。用5%脱脂牛奶封闭膜1 h,然后用抗体(1∶1 000)在4 ℃过夜进行免疫印迹。用带有吐温(TBST)缓冲液清洗膜3次,在室温下用辣根过氧化物酶(碧云天生物技术有限公司,上海)标记的二抗孵育1 h,TBST洗膜3次。免疫染色条带用Fusion FX(Vilber Lourmat,法国)和Immobilon Western化学发光HRP底物(Millipore,美国)显示和测定。利用Image J软件分析蛋白表达水平,并根据内参蛋白β-actin计算蛋白相对表达量。

1.2.8 qRT-PCR检测 取HUVECs细胞加入TRIzol(TaKaRa,日本),分离总的RNA,利用NanoDrop One/OneC微量核酸蛋白浓度测定仪检测各组样本RNA浓度。用TaKaRa反转录酶试剂盒,逆转录合成cDNA。按照SYBR Green Master Mix说明书配制反应溶液,PCR反应体系为20 μL,采用PCR仪(CFX-96 realtime PCR system,Bio-Rad公司)完成反应,测定基因mRNA的表达水平。以*β-actin*作为内参,用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法分析基因的相对表达量。引物序列见表1。

表1 基因引物与产物长度

基因	引物序列(5′→3′)	扩增长度/bp
NLRP3	上游:GCCACGCTAATGATCGAC 下游:TCTGAACCCCACTTCGG	128
IL-1β	上游:TTGAGTCTGCCCAGTTCC 下游:TTTCTGCTTGAGAGGTGCT	51
Caspase-1	上游:CAAGTCAAGCCGCACAC 下游:ACGCTGTACCCCAGATTTT	129
ASC	上游:TGACGGATGAGCAGTACCA 下游:GGCCTGGAGGAGCAAGT	119
IL-18	上游:TTGTCTCCCAGTGCATTTT 下游:GGTTCCTTTCCTCTTCCC	101
NF-κB	上游:GCCCTTTTCGACTACGC 下游:CTGTCCCCATTCTCATCCT	92
β-actin	上游:CAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAG 下游:CGCAACTAAGTCATAGTCCGCCTAG	90

1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0统计学软件进行分析,数据以$\bar{x}\pm s$

表示。数据符合正态分布,多组数据比较用单因素方差分析,两组数据比较采用 LSD 法检验。$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

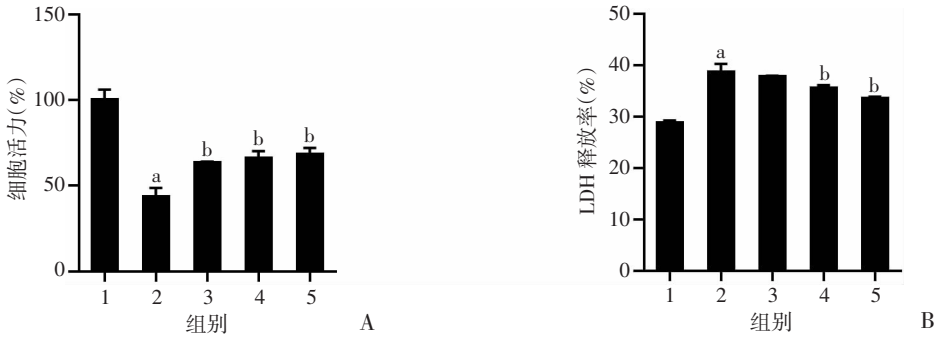
2 结果

2.1 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞活力下降和 LDH 水平的影响

与 CON 组比较,PA 组细胞活力下降至 43%($P<0.05$,图 1A),细胞明显死亡;采用 10 ~ 40 μmol/L DHM 预处理细胞可明显减轻棕榈酸诱导的细胞死亡,细胞活力分别恢复至 63.8%($P<0.05$)、66.3%($P<0.05$)、68.5%($P<0.05$),见图 1A。与 CON 组比较,PA 组细胞 LDH 释放率显著上升,由 28.3% 上升至 38.5%($P<0.05$,图 1B),而采用 10 ~ 40 μmol/L DHM 预处理细胞可降低棕榈酸诱导的 LDH 水平升高,下降至 37.8%、35.6%($P<0.05$)、33.5%($P<0.05$),见图 1B。结果表明,DHM 能抑制棕榈酸诱导的血管内皮细胞活力下降和 LDH 水平升高,且呈明显的剂量效应关系,40 μmol/L 保护效应最明显。

2.2 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞黏附因子分泌的影响

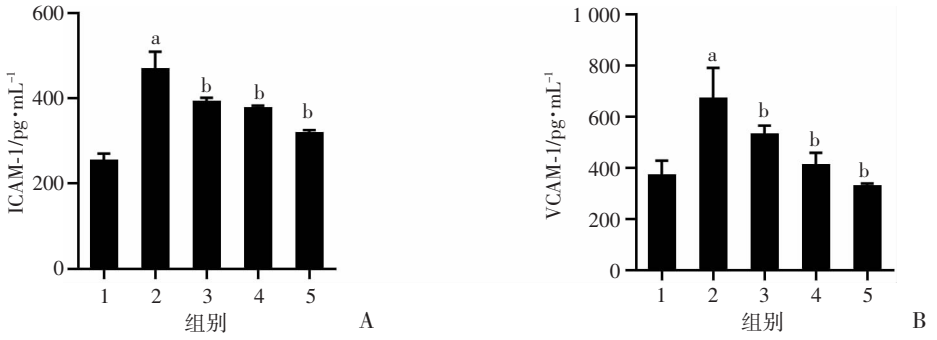
与 CON 组比较,棕榈酸处理细胞能显著刺激 ICAM-1 的分泌,由静息态的 252 pg/mL 上升至 467 pg/mL($P<0.05$,图 2A),此外,同样的处理因素使 VCAM-1 分泌也增加,由静息态的 369 pg/mL 上升至 669 pg/mL($P<0.05$,图 2B);与 PA 组比较,DHM(10~40 μmol/L)预处理组抑制了棕榈酸诱导的两种黏附因子的分泌,3 个剂量 DHM 预处理组的 ICAM-1 分别降至 391、375、317 pg/mL,VCAM-1 分别降至 530、409、320 pg/mL,均呈现明显的剂量效应关系。结果表明,DHM 能抑制棕榈酸诱导的血管内皮细胞黏附因子的分泌增加。



1:CON 组;2:PA 组;3:L-DHM+PA 组;4:M-DHM+PA 组;5:H-DHM+PA 组;a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较

A:细胞活力;B:LDH 释放率

图 1 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞活力和 LDH 的影响



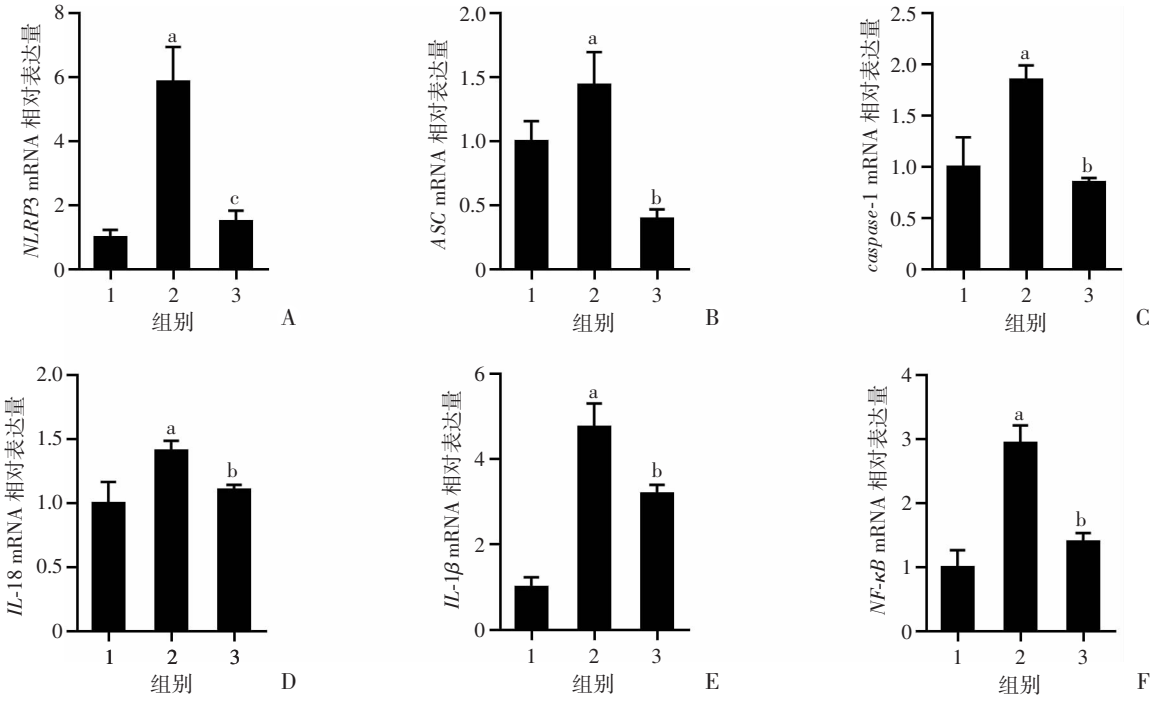
1:CON 组;2:PA 组;3:L-DHM+PA 组;4:M-DHM+PA 组;5:H-DHM+PA 组;a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较

A:ICAM-1;B:VCAM-1

图 2 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞黏附因子分泌的影响

2.3 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞 NLRP3 炎性小体活化的影响

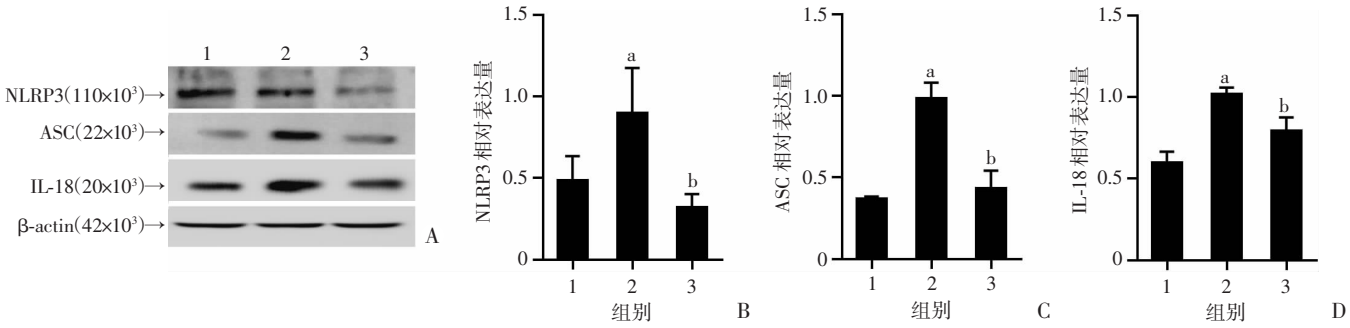
qRT-PCR 结果显示,棕榈酸处理可诱导血管内皮细胞 *NLRP3*、*ASC*、*caspase*-1、*IL*-1β、*IL*-18 和 *NF*-κ*B* mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$,图 3),DHM 预处理可明显抑制棕榈酸诱导的上述基因的 mRNA 表达上升($P<0.05$,图 3)。免疫印迹实验结果显示,与 CON 组相比,棕榈酸处理可上调 NLRP3($P<0.05$)、ASC($P<0.05$)和 IL-18($P<0.05$)蛋白表达;与 PA 组相比,采用 DHM 预处理细胞后,NLRP3($P<0.05$)、ASC($P<0.05$)和 IL-18($P<0.05$)蛋白表达水平均明显降低(图 4)。以上结果表明,DHM 能抑制棕榈酸诱导的血管内皮细胞 NLRP3 炎性小体活化。



1:CON 组;2:PA 组;3:DHM+PA 组;a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 PA 组比较

A:*NLRP3*;B:*ASC*;C:*caspase*-1;D:*IL*-18;E:*IL*-1β;F:*NF*-κ*B*

图 3 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞 NLRP3 炎性小体 mRNA 表达的影响



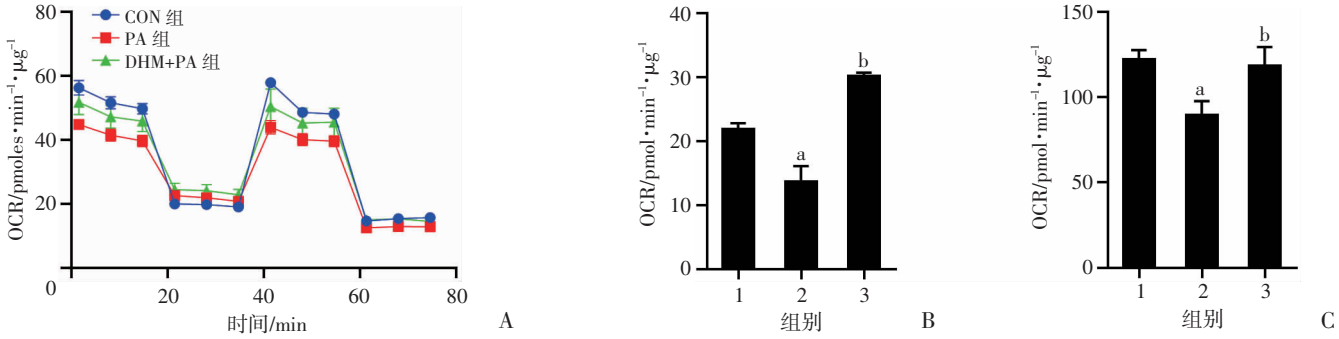
1:CON 组;2:PA 组;3:DHM+PA 组;a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较

A:Western blot 检测结果;B~D:半定量结果

图 4 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞 NLRP3 炎性小体蛋白表达的影响

2.4　DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞线粒体功能损伤的影响

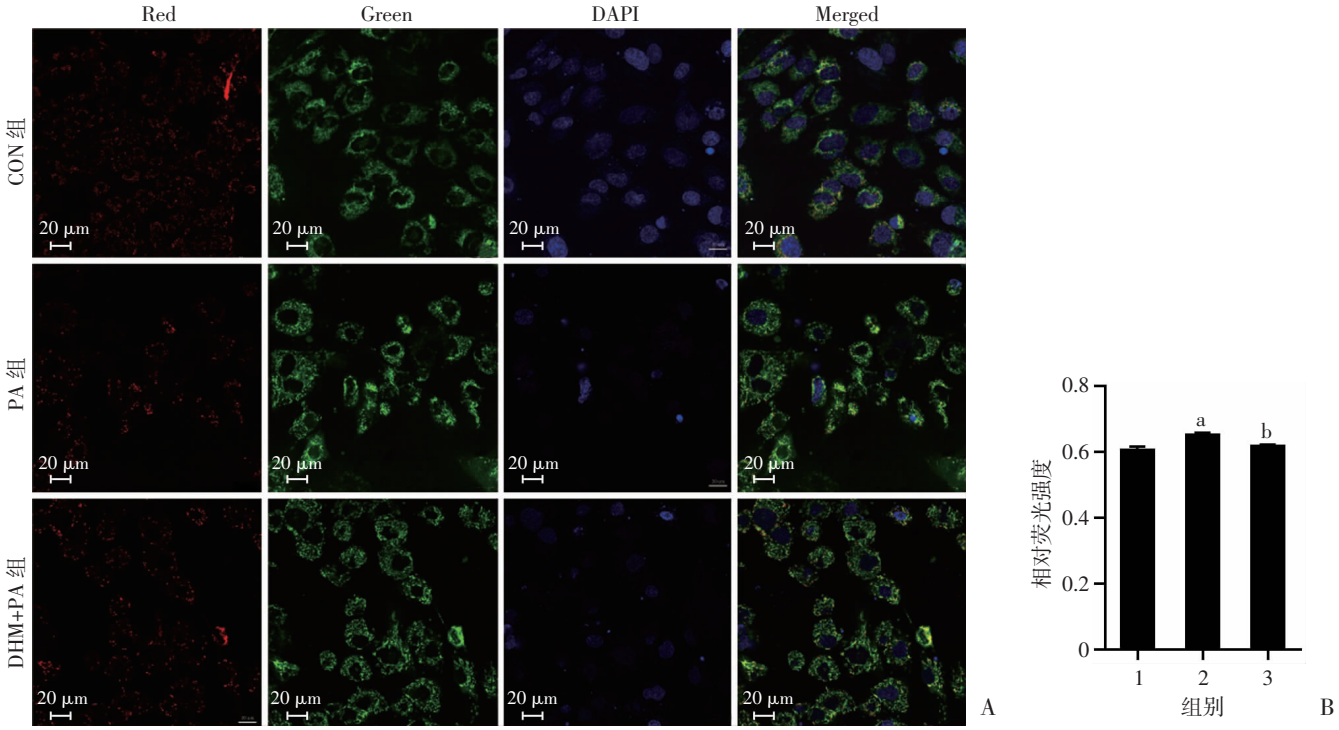
Seahorse 线粒体压力测试实验发现,棕榈酸处理诱导血管内皮细胞线粒体呼吸耗氧量下降(图 5A),通过其中 3 个时间点添加寡霉素、FCCP、鱼藤酮/抗霉素 A 后,耗氧率的变化计算出 ATP 产量(P<0.05,图 5B)及剩余呼吸能力(P<0.05,图 5C)均显著下降,采用 DHM 预处理可明显改善线粒体呼吸耗氧量下降,ATP 产量由 13.7 pmol/(min·μg)上升为 30.2 pmol/(min·μg)(P<0.05),剩余呼吸能力由 89.6 pmol/(min·μg)上升至 118 pmol/(min·μg)(P<0.05),见图 5。JC-1 线粒体膜电位检测结果显示,棕榈酸处理降低血管内皮细胞线粒体膜电位,线粒体去极化比例增加(P<0.05,图 6),DHM 预处理可明显改善棕榈酸诱导的血管内皮细胞线粒体去极化(P<0.05,图 6)。结果表明,DHM 能改善棕榈酸诱导的血管内皮细胞线粒体活性,维持线粒体稳态。



1:CON 组;2:PA 组;3:DHM+PA 组;a:P<0.05,与 CON 组比较;b:P<0.05,与 PA 组比较

A:同时间的氧消耗速率;B:ATP 产量;C:剩余呼吸能力

图 5　DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞线粒体能量代谢的影响



A:JC-1 线粒体膜电位检测　红色代表线粒体膜电位正常,绿色代表线粒体膜电位下降;B:相对荧光强度定量分析　1:CON 组;2:PA 组;3:DHM+PA 组;a:P<0.05,与 CON 组比较;b:P<0.05,与 PA 组比较

图 6　DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞线粒体膜电位的影响

2.5 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞 Sirt3 的影响

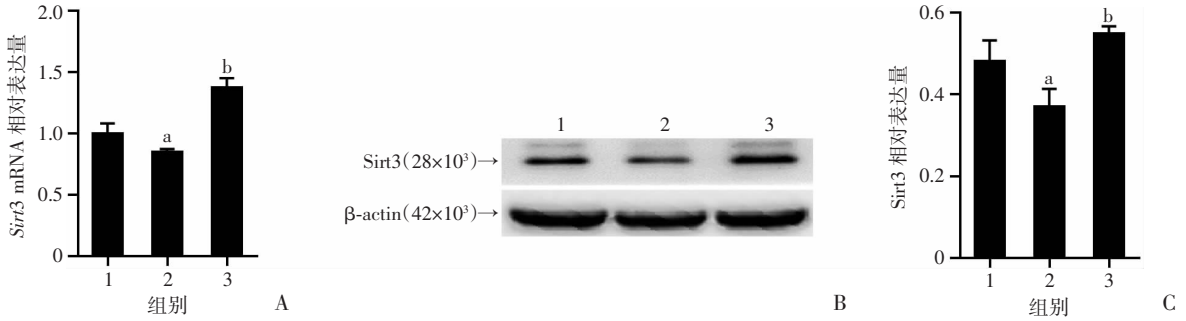
qRT-PCR 结果显示,棕榈酸处理抑制血管内皮细胞 *Sirt*3 mRNA 表达水平($P<0.05$,图 7A),DHM 预处理可明显改善棕榈酸对 *Sirt*3 mRNA 表达的抑制且上调 *Sirt*3 mRNA 水平;此外,免疫印迹结果显示,与 CON 组比较,棕榈酸处理下调血管内皮细胞 Sirt3 蛋白表达($P<0.05$,图 7B、C),DHM 预处理则明显抑制了棕榈酸对 Sirt3 蛋白下调并上调 Sirt3 蛋白水平。以上结果表明,DHM 能抑制棕榈酸诱导的血管内皮细胞 *Sirt*3 mRNA 和蛋白表达下降,并上调 *Sirt*3 mRNA 和蛋白表达水平。

2.6 Sirt3 在 DHM 抑制棕榈酸诱导血管内皮细胞活力下降和 LDH 升高中的作用

采用 Sirt3 特异性抑制剂 3-TYP 处理细胞 1 h 后,再以 DHM 预处理 24 h,此后加入棕榈酸继续处理 24 h,细胞活力检测结果显示,与 DHM+PA 组比较,3-TYP+DHM+PA 组处理削弱了 DHM 对细胞活力的恢复作用,细胞活力由 68.5% 下降至 39.6%($P<0.05$),见图 8A 和图 1A;此外,3-TYP 处理减轻了 DHM 对棕榈酸诱导 LDH 释放的抑制作用,分别由 33.5%恢复至 37.1%($P<0.05$),接近 PA 组 38.7%,见图 8B 和图 1B。提示 DHM 可能通过 Sirt3 抑制棕榈酸诱导的血管内皮细胞活力下降以及 LDH 释放率上升。

2.7 Sirt3 在 DHM 抑制棕榈酸诱导 NLRP3 炎性小体活化中的作用

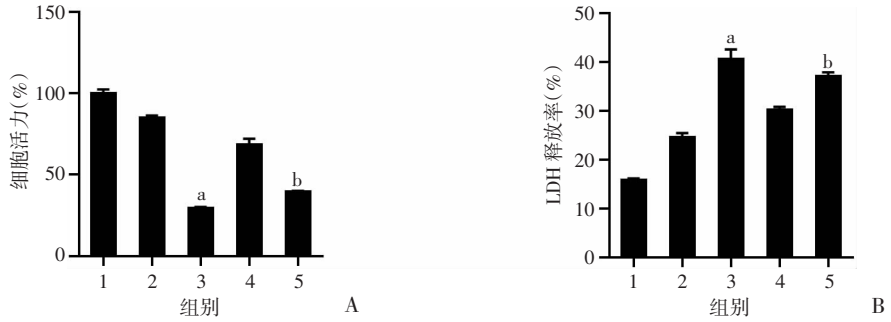
为了验证 Sirt3 是否参与调节 NLRP3 炎性小体活化,采用 Sirt3 高表达质粒转染细胞,qRT-PCR 结果提示,Sirt3 质粒转染不同程度抑制了棕榈酸对 NLRP3 炎性小体活化;而与 Sirt3+PA 组比较,DHM 均非常显著地抑制 *NLRP*3、*caspase*-1、*IL*-1β、*IL*-18、*ASC* 和 *NF*-κ*B* mRNA 的表达($P<0.05$,图 9),且与未转染质粒比较(图 3),转染使所有基因的抑制效应被放大;此外,采用 Sirt3 特异性抑制剂 3-TYP 处理细胞后,qRT-PCR 结果提示,DHM 失去对棕榈酸诱导 *caspase*-1 mRNA 的活化抑制效应(图 10B),虽仍能抑制 *NLRP*3、*ASC*、*IL*-1β、*IL*-18 和 *NF*-κ*B* mRNA 的活化(图 10A、C~F),但与 3-TYP 未处理组比较(图 3),其对上述基因的活化抑制作用明显削弱。结果表明,DHM 可能通过 Sirt3 抑制棕榈酸诱导的血管内皮细胞 NLRP3 炎性小体活化。



1:CON 组;2:PA 组;3:DHM+PA 组;a:$P<0.05$,与 CON 组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较

A:*Sirt*3 mRNA 相对表达量;B:Western blot 结果;C:蛋白相对表达量

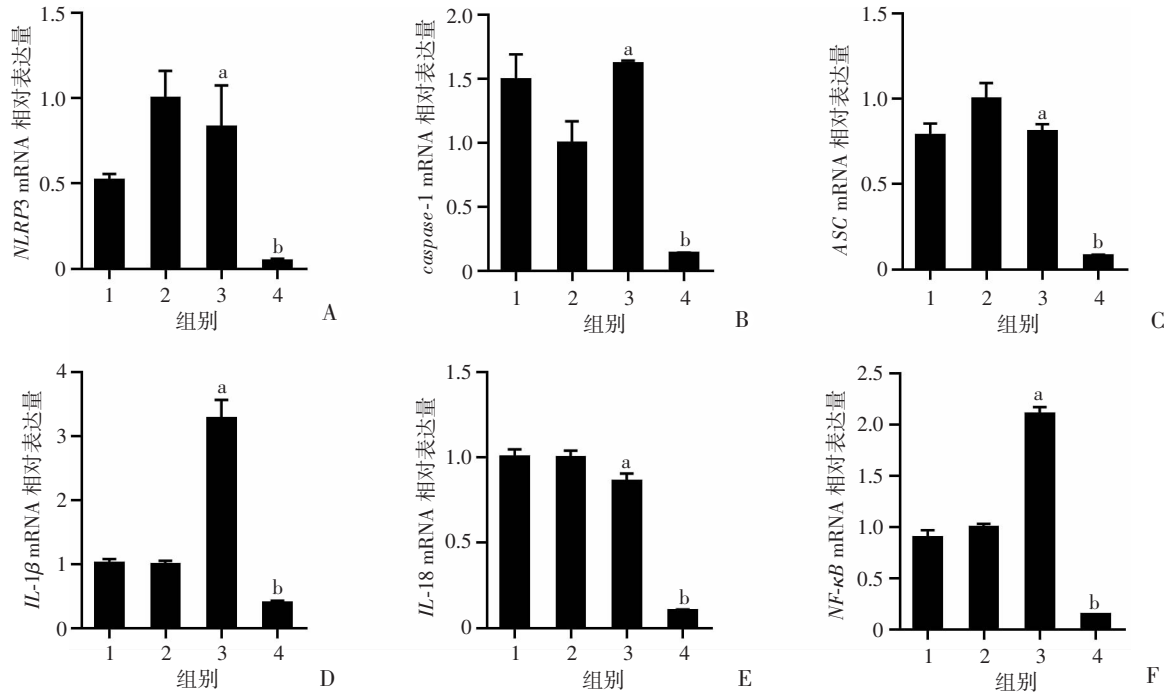
图 7 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞 Sirt3 的影响



1:CON 组;2:3-TYP 组;3:3-TYP+PA 组;4:DHM+PA 组;5:3-TYP+DHM+PA 组;a:$P<0.05$,与 3-TYP 组比较;b:$P<0.05$,与 DHM+PA 组比较

A:细胞活力;B:LDH 释放率

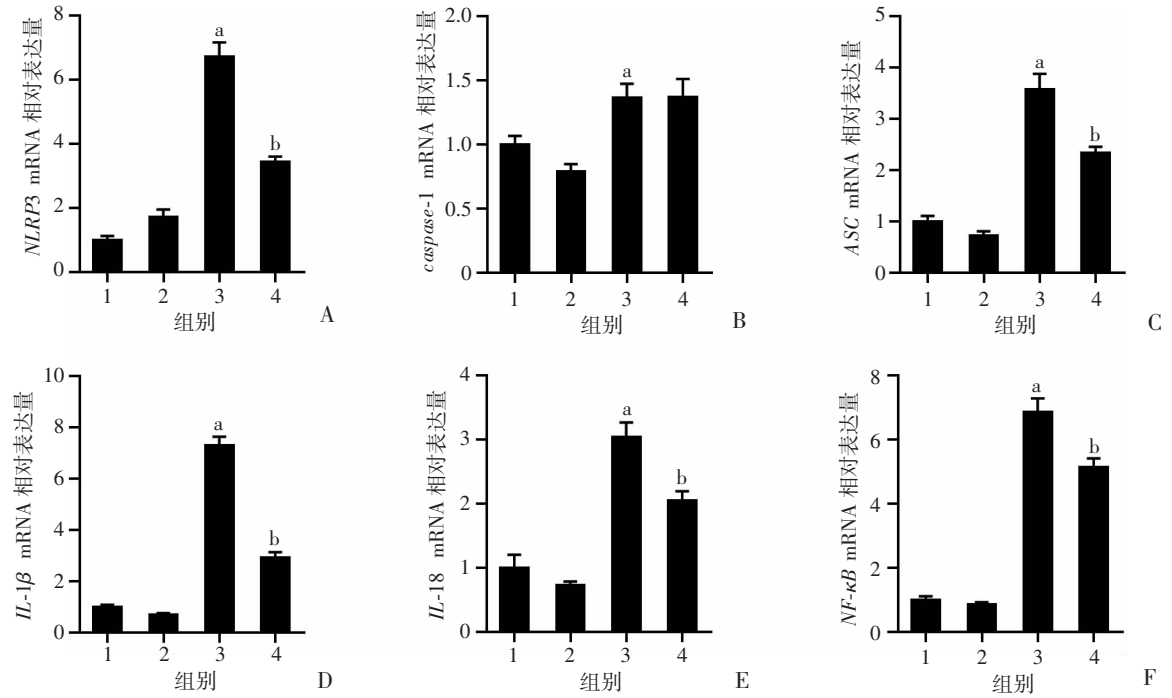
图 8 Sirt3 对 DHM 抑制棕榈酸诱导的细胞活力和 LDH 的影响



1:NC 组;2:Sirt3 组;3:Sirt3+PA 组;4:Sirt3+DHM+PA 组;a:$P<0.05$,与 Sirt3 组比较;b:$P<0.05$,与 Sirt3+PA 组比较

A:*NLRP3*;B:*caspase*-1;C:*ASC*;D:*IL*-1β;E:*IL*-18;F:*NF*-κ*B*

图 9 Sirt3 质粒转染对 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞 NLRP3 炎性小体活化的影响



1:CON 组;2:3-TYP 组;3:3-TYP+PA 组;4:DHM+PA 组;a:$P<0.05$,与 3-TYP 组比较;b:$P<0.05$,与 3-TYP+PA 组比较

A:*NLRP3*;B:*caspase*-1;C:*ASC*;D:*IL*-1β;E:*IL*-18;F:*NF*-κ*B*

图 10 Sirt3 特异性抑制剂处理对 DHM 对棕榈酸诱导血管内皮细胞 NLRP3 炎性小体活化的影响

3 讨论

血管内皮细胞损伤是动脉粥样硬化发生的起始环节[9],内皮"应激损伤"假说目前仍然是以 AS 为基础的心血管疾病发病机制的主流学说[9],随着研究的深入发现除传统应激因子外,固有免疫因素对内皮细胞功能障碍的影响以及在 AS 发生中的作用逐渐引起重视[10]。本研究结果显示 DHM 抑制棕榈酸诱导的内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 黏附相关分子分泌和 NLRP3 活化,与 NLRP3 炎性小体活化相关内皮细胞功能障碍机制的研究相对较少,LIU 等[11]以二氧化硅纳米颗粒诱导人脐静脉内皮细胞的促炎反应,发现其可上调 NLRP3 炎性小体以及 ICAM-1 和 VCAM-1 表达。HU 等[12]发现红景天苷可通过 AMPK/NF-κB/NLRP3 信号通路减轻 AGEs 诱导的内皮细胞炎症和氧化应激反应,降低 ICAM-1 和 VCAM-1 表达。结合本研究观察到 DHM 对棕榈酸诱导细胞活力和细胞毒性的抑制作用,提示 NLRP3 炎性小体活化在内皮细胞损伤和内皮功能障碍中的关键作用。

关于 NLRP3 炎性小体活化负调控机制的研究较少,CHEN 等[13]对一种新的动脉粥样硬化的独立风险因素三甲胺(trimethylamine-N-oxide,TMAO)的致病机制研究发现,TMAO 通过抑制 Sirt3-SOD2-mtROS 通路激活 NLRP3 炎性小体诱导血管炎症,与本研究对 DHM 的细胞保护效应机制研究结论一致,在棕榈酸损伤因素存在时,DHM 非常明显地上调 Sirt3 mRNA 和蛋白表达水平,进一步采用质粒和特异性抑制剂对 Sirt3 基因进行调控发现,NLRP3 炎性小体相关基因表达发生相应的抑制和激活,结果证明 DHM 对 Sirt3-NLRP3 负反馈机制具有明显的调节作用。HE 等[14]的研究认为 NLRP3 炎性小体的乙酰化开关调节衰老相关的慢性炎症和胰岛素抵抗。与 Sirt-NLRP3 炎性小体相关发病机制和治疗靶点的研究主要在脑血管疾病[15]和Ⅱ型糖尿病[16]中展开,且多集中于对 Sirt1[17]的调控。围绕心血管疾病,少量的研究在心肌细胞、巨噬细胞中开展,JIN 等[18]发现氧化苦参碱通过激活 Sirt1/Nrf2 信号通路抑制 NLRP3 炎性小体介导的热降解,减轻氧化低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞损伤。DING 等[19]发现 Sirt3 对氧化应激和 NLRP3 炎性小体的抑制在氧化低密度脂蛋白刺激下巨噬细胞胆固醇积累和泡沫细胞形成中有保护作用。YU 等[20]对脓毒症的研究发现 Sirt3 通过抑制 NF-κB 和 NLRP3 信号通路对早期内皮功能障碍有保护作用。在对 27 名健康志愿者的研究发现[21],营养水平影响 NLRP3 的活化,从这些志愿者的血液分离得到的单核细胞和白细胞进行的实验表明,24 h 禁食可激活 Sirt3 抑制 NLRP3,禁食后的重新进食则会增加与 NF-κB 信号通路有关的炎性小体活化易感性,而该效应可被 Sirt3 的激动剂烟酰胺核糖核苷所抑制。结合本研究结论,提示去乙酰化酶依赖的炎性小体失活缓解炎症反应可能作为心血管疾病治疗的新途径。

本室前期围绕 DHM 在不同疾病状态下对 Sirt3 调控分子机制展开了较多研究,发现 DHM 可通过激活 AMPK-PGC-1α-Sirt3 通路减轻非酒精性脂肪肝损伤[22],诱导自噬改善骨骼肌胰岛素抵抗[23],Sirt3 在 DHM 改善低氧缺氧诱导的记忆障碍中发挥了重要作用[24],DHM 通过促进 ILC3 细胞产生 IL-22,进而抑制 Sirt3 介导的肠屏障功能障碍,减轻高糖血症[25]。本研究进一步在心血管系统中观察到 DHM 的保护效应,并发现 DHM 对血管内皮细胞 Sirt3 显著的调节作用,特别是在损伤因素存在的情况下,是前期研究发现 DHM 可抑制内皮细胞焦亡机制[26]的深入探索。此外,研究还发现相对于 HepG2 细胞,人脐静脉内皮细胞中 Sirt3 基因应答对于 DHM 相同浓度的刺激应答更加敏感。HUA 等[27]对糖尿病小鼠的研究发现 DHM 通过 Sirt3 依赖性的氧化应激抑制改善内皮功能障碍。近年来,越来越多的研究开始关注 Sirt3 与心血管疾病的关系,但报道多集中对心肌细胞的研究[28],对血管内皮功能障碍研究知之甚少。本研究发现 DHM 通过改善内皮细胞线粒体呼吸耗氧量下降,ATP 产量及剩余呼吸能力以及线粒体膜电位,维持内皮细胞线粒体功能稳态。$Sirt3^{-/-}$ 小鼠胆固醇积累泡沫细胞形成明显,DHM 通过改善线粒体功能,减少氧化应激,并降低氧化低密度脂蛋白刺激的巨噬细胞中 NLRP3 的激活[19]。Sirt3 主要定位于线粒体,动脉粥样硬化患者中多伴有线粒体功能障碍,本研究前期在多种心血管(独立)风险因素如高糖、棕榈酸、过氧化氢、LPS 等对内皮细胞损伤模型中观察到了 DHM 的细胞保护效应,并在高脂诱导 $ApoE^{-/-}$ 小鼠体内观察到其改善血清和斑块 NLRP3 炎性小体活化的证据,Sirt3 如何通过去乙酰化调节 NLRP3 活化水平,DHM 的抗氧化能力对 Sirt3 基因修饰调控的影响尚需进一步研究。本研究证明,DHM 防治动脉粥样硬化的健康效应与其抑制 NLRP3 炎性小体活化有关,该抑制作用可能与 Sirt3 表达有关。该研究对于进一步揭示 DHM 的抗动脉粥样硬化作用机制具有重要意义,为从营养途径防治心

血管疾病提供膳食策略。下一步研究将重点围绕DHM的体外实验展开,进一步探讨NLPR3炎性小体活化在DHM通过Sirt3改善棕榈酸诱导的内皮细胞功能障碍中的作用机制以及DHM的抗炎抗氧化效应。

参考文献:

[1]《中国心血管健康与疾病报告》编写组.《中国心血管健康与疾病报告2020》概述[J].中国心血管病研究,2021,19(7):582-590. DOI:10.3969/j.issn.1672-5301.2021.07.002.
The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Key Points of Report on Cardiovascular Health and Diseases in China 2020[J]. Chin J Cardiovasc Res, 2021, 19(7): 582-590. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5301.2021.07.002.

[2] 陈亚丽,尹跃霏,李赟,等.二氢杨梅素药理作用研究进展[J].中国新药杂志,2019,28(2):173-178.
CHEN Y L, YIN Y F, LI Y, *et al*. Advances in pharmacological study of dihydromyricetin[J]. Chin J New Drugs, 2019, 28(2): 173-178.

[3] ZHANG J Y, CHEN Y, LUO H Q, *et al*. Recent update on the pharmacological effects and mechanisms of dihydromyricetin[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1204. DOI: 10.3389/fphar.2018.01204.

[4] CHEN S H, ZHAO X L, WAN J, *et al*. Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial[J]. Pharmacol Res, 2015, 99: 74-81. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.05.009.

[5] ZHANG Y W, YANG W L, LI W G, *et al*. NLRP3 inflammasome: checkpoint connecting innate and adaptive immunity in autoimmune diseases[J]. Front Immunol, 2021, 12: 732933. DOI: 10.3389/fimmu.2021.732933.

[6] GREBE A, HOSS F, LATZ E. NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis[J]. Circ Res, 2018, 122(12): 1722-1740. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.311362.

[7] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y H, *et al*. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): 3328. DOI: 10.3390/ijms20133328.

[8] SWANSON K V, DENG M, TING J P Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(8): 477-489. DOI: 10.1038/s41577-019-0165-0.

[9] GIMBRONE M A Jr, GARCÍA-CARDEÑA G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis[J]. Circ Res, 2016, 118(4): 620-636. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

[10] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis[J]. Herz, 2019, 44(2): 107-120. DOI: 10.1007/s00059-019-4790-y.

[11] LIU X T, LU B, FU J L, *et al*. Amorphous silica nanoparticles induce inflammation *via* activation of NLRP3 inflammasome and HMGB1/TLR4/MYD88/NF-kb signaling pathway in HUVEC cells[J]. J Hazard Mater, 2021, 404(Pt B): 124050. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124050.

[12] HU R, WANG M Q, NI S H, *et al*. Salidroside ameliorates endothelial inflammation and oxidative stress by regulating the AMPK/NF-κB/NLRP3 signaling pathway in AGEs-induced HUVECs[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 867: 172797. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172797.

[13] CHEN M L, ZHU X H, RAN L, *et al*. Trimethylamine-N-oxide induces vascular inflammation by activating the NLRP3 inflammasome through the SIRT3-SOD2-mtROS signaling pathway[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(9): e006347. DOI: 10.1161/JAHA.117.006347.

[14] HE M, CHIANG H H, LUO H Z, *et al*. An acetylation switch of the NLRP3 inflammasome regulates aging-associated chronic inflammation and insulin resistance[J]. Cell Metab, 2020, 31(3): 580-591.e5. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.01.009.

[15] BAI R R, LANG Y, SHAO J, *et al*. The role of NLRP3 inflammasome in cerebrovascular diseases pathology and possible therapeutic targets[J]. ASN Neuro, 2021, 13: 17590914211018100. DOI: 10.1177/17590914211018100.

[16] ROVIRA-LLOPIS S, APOSTOLOVA N, BAÑULS C, *et al*. Mitochondria, the NLRP3 inflammasome, and sirtuins in type 2 diabetes: new therapeutic targets[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29(8): 749-791. DOI: 10.1089/ars.2017.7313.

[17] CUI Z F, ZHAO X T, AMEVOR F K, *et al*. Therapeutic application of quercetin in aging-related diseases: SIRT1 as a potential mechanism[J]. Front Immunol, 2022, 13: 943321. DOI: 10.3389/fimmu.2022.943321.

[18] JIN X, FU W, ZHOU J X, *et al*. Oxymatrine attenuates oxidized low-density lipoprotein-induced HUVEC injury by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis *via* the activation of the SIRT1/Nrf2 signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2021, 48(4): 187. DOI: 10.3892/ijmm.2021.5020.

[19] DING Y, GONG W W, ZHANG S P, *et al*. Protective role of sirtuin3 against oxidative stress and NLRP3 inflammasome

in cholesterol accumulation and foam cell formation of macrophages with ox-LDL-stimulation [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 192: 114665. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114665.

[20] YU H L, LIU Q, CHEN G D, *et al*. SIRT3-AMPK signaling pathway as a protective target in endothelial dysfunction of early sepsis [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 106: 108600. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.108600.

[21] TRABA J, KWARTENG-SIAW M, OKOLI T C, *et al*. Fasting and refeeding differentially regulate NLRP3 inflammasome activation in human subjects [J]. J Clin Invest, 2015, 125(12): 4592-4600. DOI: 10.1172/JCI83260.

[22] ZENG X L, YANG J N, HU O, *et al*. Dihydromyricetin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by improving mitochondrial respiratory capacity and redox homeostasis through modulation of SIRT3 signaling[J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 30(2): 163-183. DOI: 10.1089/ars.2017.7172.

[23] SHI L Y, ZHANG T, ZHOU Y, *et al*. Dihydromyricetin improves skeletal muscle insulin sensitivity by inducing autophagy *via* the AMPK-PGC-1α-Sirt3 signaling pathway [J]. Endocrine, 2015, 50(2): 378-389. DOI: 10.1007/s12020-015-0599-5.

[24] LIU P, ZOU D, CHEN K, *et al*. Dihydromyricetin improves hypobaric hypoxia-induced memory impairment *via* modulation of SIRT3 signaling[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(10): 7200-7212. DOI: 10.1007/s12035-015-9627-y.

[25] ZHOU J, HOU P F, YAO Y, *et al*. Dihydromyricetin improves high-fat diet-induced hyperglycemia through ILC3 activation *via* a SIRT3-dependent mechanism[J]. Mol Nutr Food Res, 2022, 66(16): e2101093. DOI: 10.1002/mnfr.202101093.

[26] HU Q, ZHANG T, YI L, *et al*. Dihydromyricetin inhibits NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis by activating the Nrf2 signaling pathway in vascular endothelial cells [J]. Biofactors, 2018, 44(2): 123-136. DOI: 10.1002/biof.1395.

[27] HUA Y Y, ZHANG Y, GONG W W, *et al*. Dihydromyricetin improves endothelial dysfunction in diabetic mice *via* oxidative stress inhibition in a SIRT3-dependent manner [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6699. DOI: 10.3390/ijms21186699.

[28] SUN W, LIU C X, CHEN Q H, *et al*. SIRT3: a new regulator of cardiovascular diseases [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7293861. DOI: 10.1155/2018/7293861.

(**收稿**:2022-11-08;**修回**:2023-01-09)

(编辑 邓强庭)