DOI:10.16016/j.2097-0927.202301066

人参皂苷衍生物 CK201 抗动脉粥样硬化活性及其机制的实验研究

冉晓冬[1],罗明明[1],王嘉维[2],黄 琰[1],李晓辉[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系药物研究所[1];400054 重庆,重庆理工大学药学与生物工程学院[2]

[摘要] **目的** 使用 ApoE$^{-/-}$小鼠和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)研究人参皂苷衍生物 CK201 抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)活性及其初步机制。**方法** 体内实验:30 只 6 周龄雄性 ApoE$^{-/-}$小鼠通过完全随机分组法分为 5 组:溶剂对照组、模型组、compound K(CK)组、阿托伐他汀钙组及 CK201 组。除溶剂对照组,其余每组给予高脂饲料喂养,同时 CK 组、阿托伐他汀钙组和 CK201 组分别灌胃 3 mg/kg 对应化合物。主动脉油红 O 染色评估 CK201 及阿托伐他汀钙对动脉粥样硬化斑块形成的影响;检测血浆 TC、TG 水平,考察 CK201 及阿托伐他汀钙对小鼠血脂的影响;Western blot 分析 CK201 及阿托伐他汀钙对主动脉 IL-6、TNF-α 表达水平的影响;肝组织切片 HE 和油红 O 染色评估 CK201 及阿托伐他汀钙对肝脏脂质堆积的影响;检测小鼠肝、肾功能和血常规以初步评估 CK201 对相关指标的影响。体外实验:Western blot 分析 CK201 对棕榈酸(palmitic acid, PA)刺激 HUVECs 细胞产生 IL-6、TNF-α 水平的影响;HUVECs 细胞划痕愈合实验、单核细胞(THP-1)与 HUVECs 细胞黏附实验分析 CK201 对 HUVECs 细胞迁移、募集单核细胞能力的影响。**结果** CK201 比同剂量的阳性对照药阿托伐他汀钙(斑块抑制率 62.4% *vs* 26.6%)更显著地抑制高脂喂养的 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉粥样硬化斑块的形成($P<0.05$);CK201 可以显著减少肝脏脂质沉积,明显优于阿托伐他汀钙($P<0.05$)。CK201 能显著降低血浆中 TC 含量、抑制主动脉炎症因子 IL-6 和 TNF-α 的表达($P<0.05$),抑制 PA 刺激的 HUVECs 细胞炎症因子 IL-6 和 TNF-α 的表达、减少 THP-1 细胞对 HUVECs 细胞的黏附、促进 HUVECs 细胞迁移($P<0.05$)。肝功能和血常规检测表明,实验剂量的 CK201 对小鼠肝功能和血常规均无明显影响。**结论** 人参皂苷衍生物 CK201 具有显著的抗 AS 作用,其机制可能与其降低血浆 TC 水平、抑制主动脉炎症反应、抑制单核细胞与内皮细胞的黏附等有关。

[关键词] 人参皂苷衍生物;抗动脉粥样硬化;ApoE$^{-/-}$小鼠;降脂作用;人脐静脉内皮细胞
[中图法分类号] R282.71; R285.5; R543.5 [文献标志码] A

Anti-atherosclerotic activity and mechanism of a ginsenoside derivative CK201

RAN Xiaodong[1], LUO Mingming[1], WANG Jiawei[2], HUANG Yan[1], LI Xiaohui[1] [1]Institute of Materia Medica, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]College of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing, 400054, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the anti-atherogenic activity and mechanism involved of ginsenoside derivative CK201 by ApoE$^{-/-}$ mouse and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** *In vivo* experiment: 6-week-old male ApoE$^{-/-}$ mice ($n=30$) were randomly divided into 5 groups: the solvent control group, the model group, the ginsenoside compound K (CK) group, the atorvastatin calcium group and the CK201 group. Except the solvent control group, mice in other groups were fed high-fat diet. At the same time, mice in the CK group, the atorvastatin calcium group and the CK201 group were administrated intragastrically 3 mg/kg compound, respectively. The effect of CK201 and atorvastatin calcium on the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81773742)
[通信作者] 李晓辉,E-mail: lpsh008@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

formation of AS plaque was evaluated by aorta oil red O staining. The plasma levels of TC and TG were detected, and the effects of CK201 and atorvastatin calcium on blood lipid in mice were investigated. Western blot assay was used to analyze the effects of CK201 and atorvastatin calcium on the expression of inflammatory factors IL-6 and TNF-α of the aorta. The effects of CK201 and atorvastatin calcium on liver lipid accumulation were evaluated by HE and oil red O staining in liver sections. Liver and kidney function tests and blood routine tests of mice were performed to evaluate the effect of CK201 on related indicators. *In vitro* experiments: Western blot assay was used to analyze the effects of CK201 on the levels of IL-6 and TNF-α in HUVECs cells stimulated by palmitic acid. The effects of CK201 on the migration and recruitment of monocytes of HUVECs were analyzed by the scratch healing experiment of HUVECs cells and the adhesion experiment between monocytes (THP-1) and HUVECs cells. **Results** The CK201 group significantly inhibited the formation of atherosclerotic aortic plaques in $ApoE^{-/-}$ mice fed with high-fat diet, compared with the atorvastatin calcium group (plaque inhibition rate: 62.4% *vs* 26.6%, $P<0.05$). The CK201 group had significantly reduced hepatic lipid accumulation, which had significantly better effect than those in the atorvastatin calcium group ($P<0.05$). In the CK201 group, TC content in plasma was significantly decreased, the expressions of IL-6 and TNF-α in aorta were inhibited ($P<0.05$), the expression of palmitic acid-stimulated inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α in HUVECs cells was inhibited, the adhesion of THP-1 cells to HUVECs cells was reduced, and the migration of HUVECs cells was promoted ($P<0.05$). In addition, the experimental dose of CK201 had no significant effect on the liver function and blood routine tests. **Conclusion** CK201, a ginsenoside derivative, has a significant anti-atherosclerosis effect, and the mechanism involved may be related to the reduction of plasma TC level, inhibition of aortic inflammation, inhibition of cell adhesion of monocyte and endothelial cells.

[**Key words**] ginsenoside derivative; anti-atherosclerosis; $ApoE^{-/-}$ mice; hypolipidemic effects; human umbilical vein endothelial cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81773742). Corresponding author: LI Xiaohui, E-mail: lpsh008@aliyun.com

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的发病率和致残率高,是全球死亡的主要原因[1-2]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)则是心血管疾病的主要病理基础和重要环节[3]。除了广泛认知的致病因素高血脂外,内皮功能障碍被认为是 AS 发病的又一重要因素,并且一直伴随 AS 的发展[4]。内皮功能障碍会释放炎症因子 IL-6、TNF-α,促进白细胞与内皮细胞黏附并移位到内皮下,其中单核细胞在内皮下分化为巨噬细胞,巨噬细胞吞噬大量脂质进一步形成泡沫细胞,逐步形成粥样斑块,持续的脂质和泡沫细胞累积,动脉粥样斑块进一步发展,导致动脉管腔逐渐狭窄,甚至斑块破裂,引起动脉阻塞,最终引发一系列心血管严重并发症[5-6]。目前治疗 AS 仍以降脂药物他汀类为主,通过降低胆固醇水平来实现其降脂作用,但是部分患者使用他汀类药物后会出现肝毒性和肌毒性等不良反应[7-8];尤其是在他汀类降脂药物广泛使用的情况下,AS 发病率仍居高不下,表明亟须寻找新的 AS 防治药物。人参是古老的中药之一[9]。人参皂苷 CK(compound K)是人参的有效代谢产物,具有抗炎、抗肿瘤、治疗糖尿病和抗 AS 作用[10-13],但其水溶性较差,影响药物吸收[14]。为了改善人参皂苷 CK 的水溶性,提高其成药性,课题组前期研究中自主合成了一系列衍生物,通过体外活性筛选发现人参皂苷 CK 衍生物 CK201 水溶性显著提高且能有效抑制泡沫细胞的形成[15],目前 CK201 已获得国内外多项专利[16-20]。但是 CK201 是否具有 AS 防治作用尚未明确。本研究使用 $ApoE^{-/-}$ 敲基因小鼠和人脐静脉内皮细胞 HUVECs,观察人参皂苷衍生物 CK201 的 AS 防治作用,初步探索其作用机制及安全性,以期获得一个既具有良好 AS 防治作用,又具有一定安全性的人参皂苷衍生物,为进一步开发 CK201 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

阿托伐他汀钙购自上海赛默飞世尔科技有限公司(纯度:>95%);人参皂苷 CK 购自成都瑞芬思生物科技有限公司(纯度:>98%);CK201 由课题组制备(分子量:874,纯度:>98%);棕榈酸购自北京百灵威科技有限公司;BCECF-AM 荧光探针染料、GAPDH 小鼠单

克隆抗体、IL-6 小鼠单克隆抗体和 TNF-α 兔多克隆抗体购自上海碧云天生物技术有限公司;高脂饲料购自睿迪生物科技有限公司。迈瑞兽用全自动血液细胞分析仪型号为 BC-2800vet;全自动生化分析仪型号为 Chemray 240、Chemray 800(深圳雷杜生命科技公司);石蜡切片机型号为 HistoCore BIOCUT;冷冻切片机型号为 Leica CM1950;显影仪型号为 GelView 6000 Pro。

1.2 实验细胞和动物

人脐静脉内皮细胞 HUVECs 和人单核细胞 THP-1 来源美国 ATCC 公司。本研究符合陆军军医大学实验动物福利伦理委员会制定的伦理学标准(AMUWEC20203377)。6 周龄雄性 ApoE$^{-/-}$小鼠 30 只,体质量为 20~23 g,购自成都药康生物科技有限公司,实验动物生产许可证号为 SCXY(川)2020-034,使用许可证号为 SYXK(渝)2017-0002。小鼠均在陆军军医大学动物实验中心 SPF 级动物房饲养以及给药处理,室内温度为(22±2)℃,湿度为 50%~70%,昼夜交替时间为 12 h/12 h。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 6 周龄雄性 ApoE$^{-/-}$小鼠 30 只,基因鉴定合格后,于陆军军医大学动物实验中心 SPF 级动物房适应饲养 1 周后,通过完全随机分组法分为 5 组(n=6)。①溶剂对照组:普通维持饲料喂养,灌胃溶剂(30%丙二醇+70%生理盐水);②模型组:高脂饲料喂养,灌胃溶剂(30%丙二醇+70%生理盐水);③CK 组:高脂饲料喂养,灌胃人参皂苷 CK 溶液(3 mg/kg);④阿托伐他汀钙组:高脂饲料喂养,灌胃阿托伐他汀钙溶液(3 mg/kg);⑤CK201 组:高脂饲料喂养,灌胃人参皂苷 CK 衍生物 CK201 溶液(3 mg/kg)。每次给药前称取小鼠体质量,根据体质量计算给药体积,连续给药 12 周,每周 6 次。小鼠于样本采集前禁食 12 h,采集全血,随后行安乐死。解剖小鼠,取主动脉血管,用于油红 O 染色,统计斑块面积;取肝脏固定,用于 HE 染色和油红 O 染色观察肝脏病变情况。

1.3.2 油红 O 染色 取 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉,剥离脂肪组织和筋膜,纵切主动脉,内膜面朝上,用油红 O 染液染色 20 min,弃去染液,75%乙醇洗去多余油红 O 染液,显微镜下采集图片。分析斑块面积与主动脉血管总面积之比;进一步分析斑块抑制率,用(模型组斑块面积之比-各组斑块面积之比)/模型组斑块面积之比表示。

取 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏,4%多聚甲醛固定 24 h,蔗糖溶液梯度脱水 24 h,将组织置于包埋剂中冷冻凝固,待冷冻切片机降温至-20 ℃后,将肝脏组织切为 10 μm 薄片,粘贴于载玻片上,室温放置 1 h,蒸馏水洗去包埋剂,滴加油红 O 染液染色 8 min,随后用 PBS 洗去多余染色剂,再用 75%乙醇分化,蒸馏水清洗,待切片稍干后,甘油明胶封片,显微镜下采集图片。

1.3.3 HE 染色 取 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏,经 4%多聚甲醛固定 24 h,梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,随后使用石蜡切片机将组织切为 5 μm 薄片。将切片粘贴于载玻片上,烤片过夜,梯度复水,用苏木精染色 10 min,自来水反蓝,伊红(水溶)染色 1 min,自来水适当冲洗,梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下采集图片。

1.3.4 血脂及生化指标检测 使用全自动生化分析仪 Chemray 240 和 Chemray 800 检测 ApoE$^{-/-}$小鼠血浆中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)和尿酸(UA)含量。使用迈瑞兽用全自动血液细胞分析仪分析 ApoE$^{-/-}$小鼠血常规:白细胞、中性粒细胞、红细胞数量,血红蛋白、血小板含量。

1.3.5 Western blot 检测 ApoE$^{-/-}$小鼠腹主动脉炎症因子 IL-6、TNF-α 表达 取 ApoE$^{-/-}$小鼠腹主动脉,0 ℃加入适当裂解液研磨裂解 20 min,离心(10 000 r/min,4 ℃,10 min)取上清。用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度,将浓度调至 2 μg/μL,加入蛋白上样缓冲液,金属浴 100 ℃变性 10 min。冷却至室温后,上样 SDS 凝胶电泳,转膜,封闭,PBST 洗 3 次。用一抗稀释液按照比例稀释 TNF-α 兔多克隆抗体(1∶200),IL-6 小鼠单克隆抗体(1∶500),GADPH 小鼠单克隆抗体(1∶2 000),4 ℃孵育过夜。PBST 洗去多余一抗后,加入相应二抗,室温孵育 1 h,PBST 洗 3 次,在现配制的显影液中孵育 5 min,显影,采集目标蛋白灰度值图片。

1.3.6 Western blot 检测 HUVECs 细胞炎症因子 IL-6、TNF-α 表达 将 HUVECs 细胞以 5×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,2 mL/孔,培养过夜。弃去旧培养基,空白对照组、模型组加入空白完全培养基,另外 3 个组分别加入 CK201(3、10、30 μmol/L),培养 24 h。除空白对照组外,其余组加入 100 μmol/L 的棕榈酸(palmitic acid, PA),培养 24 h。弃细胞完全培养基,用 PBS 洗 2 次,加入细胞裂解液,冰上裂解 10 min,离心(10 000 r/min,4 ℃,10 min),取上清。后续总蛋白浓度检测及 Western blot 实验方法同于 1.3.5。

1.3.7 THP-1 细胞与 HUVECs 细胞黏附实验 将 HUVECs 细胞以 8×10^4 个/mL 的密度接种于 24 孔板中,培养过夜。弃去旧培养基,空白对照组、模型组加入空白完全培养基,另外 3 个组分别加入 CK201(3、

10、30 μmol/L)培养 24 h。除对照组外,其余组加入 100 μmol/L 的 PA 培养 24 h。向细胞密度为 2×10^5 个/mL 的 THP-1 中加入 2 μmol/L BCECF-AM 荧光探针,避光孵育 30 min,离心(常温,1 200 r/min,5 min),去上清,加入完全培养基重悬 THP-1。弃去上述 HUVECs 细胞原培养基,加入孵育过 BCECF-AM 荧光探针的 THP-1 细胞悬液,共孵育 1 h,然后 PBS 洗 5 次。倒置荧光显微镜下采集图片。

1.3.8　HUVECs 细胞划痕愈合实验　　将 HUVECs 细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 24 孔板中培养过夜。弃去旧培养基,空白对照组、模型组加入空白完全培养基,另外 3 个组分别加入 CK201(3、10、30 μmol/L)培养 24 h。弃去原培养基后划痕,用灭菌 PBS 洗去脱落细胞,在倒置显微镜下采集细胞划痕图片。弃去 PBS,对照组加入空白培养基,模型组加入 PA(100 μmol/L),各实验组分别加入对应浓度的 CK201 和 PA(100 μmol/L)培养 24 h。弃去原培养基,灭菌 PBS 洗去漂浮细胞,在倒置显微镜下采集图片。

1.4　统计学分析

所有实验结果使用 Graghpad Prism 8.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉粥样硬化斑块形成的影响

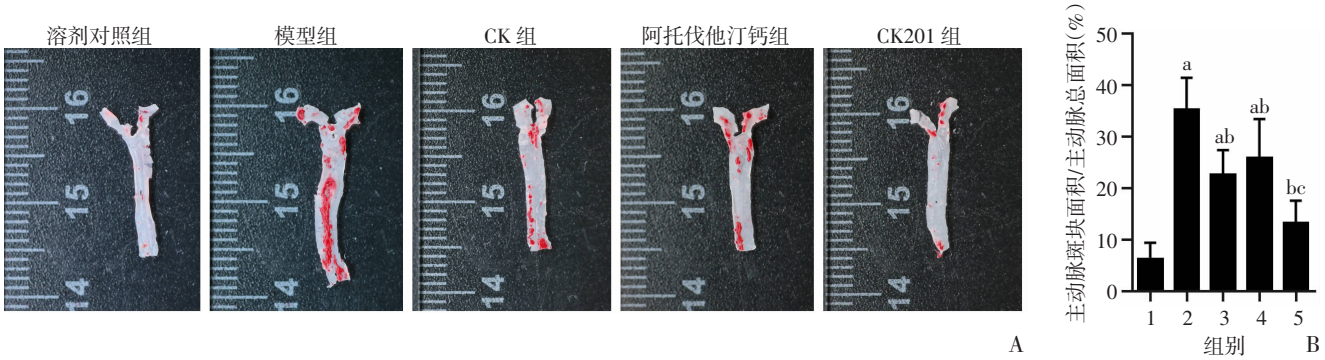
小鼠主动脉粥样硬化斑块油红 O 染色显示,与溶剂对照组比较,模型组斑块面积显著增加($P<0.05$);与模型组比较,CK 组、阿托伐他汀钙组和 CK201 组均有效抑制 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉斑块的形成($P<0.05$),主动脉粥样硬化斑块抑制率分别为 35.9%、26.6%、62.4%;与阳性药物阿托伐他汀钙组比较,CK201 组能更显著地抑制主动脉粥样硬化斑块的形成($P<0.05$,图 1)。实验结果表明 CK201 能显著抑制主动脉粥样硬化斑块形成作用,且效果优于临床使用的一线药物阿托伐他汀钙。

2.2　CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏组织脂质堆积的影响

为了评估 CK201 对小鼠肝脏组织脂质堆积的影响,对肝脏组织 HE 染色和油红 O 染色的病理切片进行分析。肝脏组织切片 HE 染色结果显示,与溶剂对照组比较,模型组肝组织出现明显脂肪样变;与模型组比较,各组肝组织脂肪样变明显减少,其中 CK201 组肝组织脂肪样变的减少比 CK 组和阿托伐他汀钙组更显著(图 2A)。肝脏组织切片油红 O 染色结果显示,与溶剂对照组比较,模型组肝组织出现显著脂质沉积($P<0.05$);与模型组比较,原型药物 CK 组、阳性药物阿托伐他汀钙组和 CK201 组肝脏脂质堆积均减少($P<0.05$),其中 CK201 组脂质沉积最少($P<0.05$,图 2B、C)。

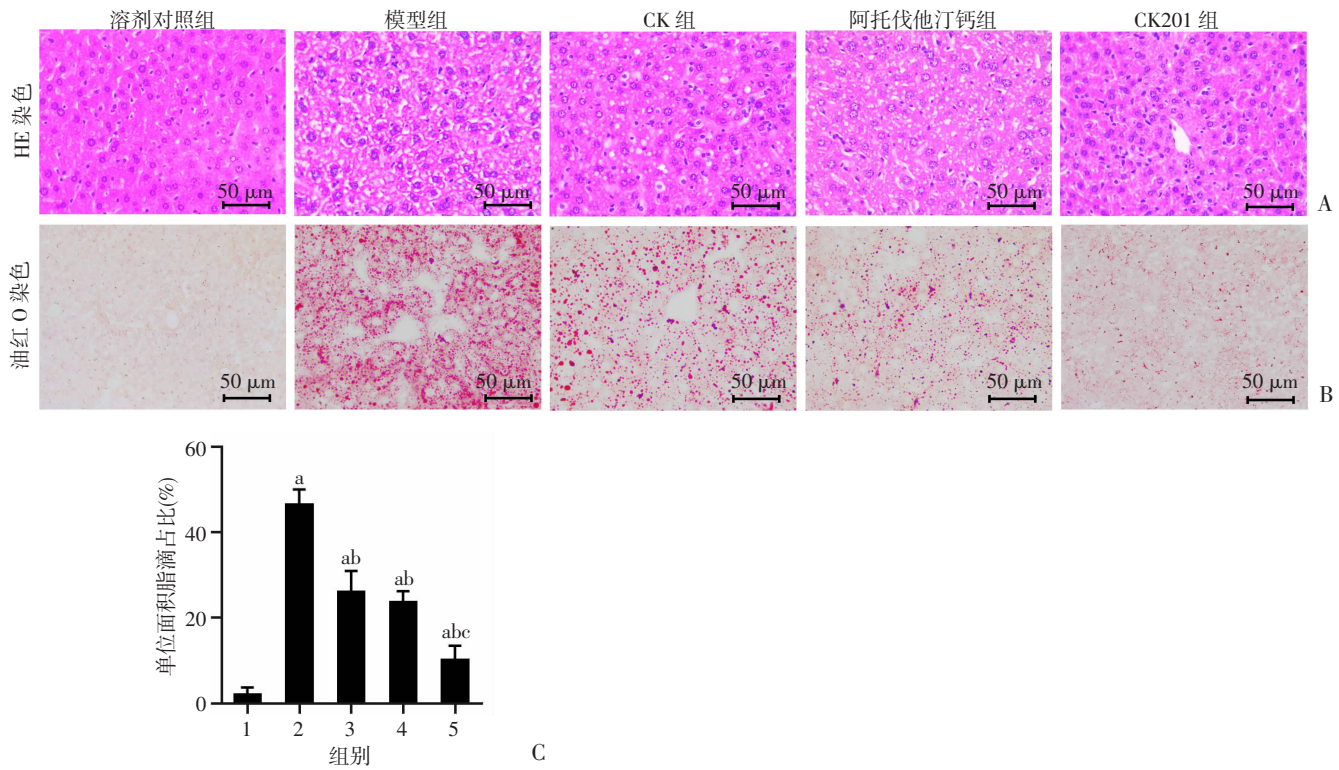
2.3　CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠血脂的影响

ApoE$^{-/-}$小鼠血浆 TC、TG 检测结果显示:与溶剂对照组比较,模型组小鼠血浆中 TC、TG 升高($P<0.05$);与模型组相比,阿托伐他汀钙、CK 和 CK201 组 ApoE$^{-/-}$小鼠血浆中的 TC 水平均降低,对 TG 没有明显调节作用($P<0.05$,图 3)。结果表明,CK201 具有降低小鼠血浆总胆固醇含量的作用,且作用效果与阿托伐他汀钙相当。



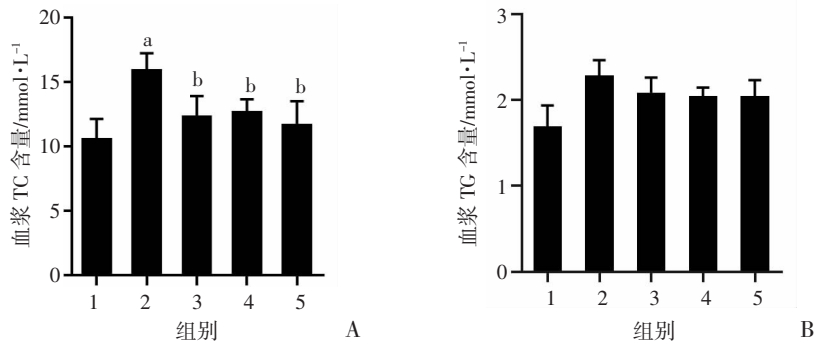
A:各组 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉斑块油红 O 染色;B:各组 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉斑块面积/主动脉总面积　a:$P<0.05$,与溶剂对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;c:$P<0.05$,与阿托伐他汀钙组比较;1:溶剂对照组;2:模型组;3:CK 组;4:阿托伐他汀钙组;5:CK201 组

图 1　CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉粥样硬化斑块形成的影响　($n=6$)



A:ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏组织病理切片 HE 染色;B:ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏组织病理切片油红 O 染色;C:ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏组织病理切片油红 O 染色单位面积脂滴占比 a:$P<0.05$,与溶剂对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;c:$P<0.05$,与阿托伐他汀钙组比较;1:溶剂对照组;2:模型组;3:CK 组;4:阿托伐他汀钙组;5:CK201 组

图 2 CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏组织脂质堆积的影响 ($n=6$)



A:ApoE$^{-/-}$小鼠血浆 TC 含量;B:ApoE$^{-/-}$小鼠血浆 TG 含量 a:$P<0.05$,与溶剂对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;1:溶剂对照组;2:模型组;3:CK 组;4:阿托伐他汀钙组;5:CK201 组

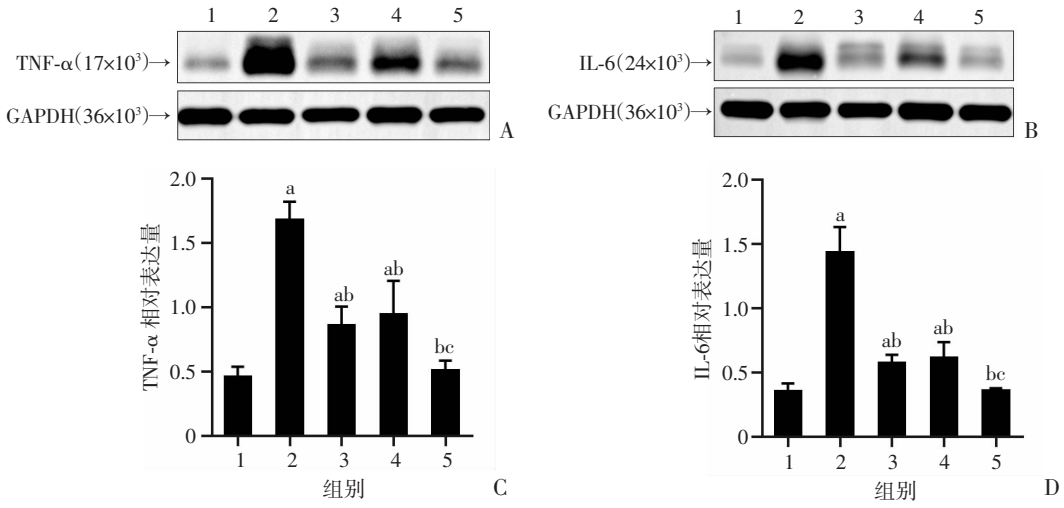
图 3 CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠血脂的影响 ($n=6$)

2.4 Western blot 检测 ApoE$^{-/-}$小鼠腹主动脉炎症因子 IL-6、TNF-α 表达

ApoE$^{-/-}$小鼠腹主动脉 IL-6、TNF-α 的 Western blot 检测结果显示,与溶剂对照组比较,模型组小鼠腹主动脉 IL-6、TNF-α 表达显著增加($P<0.05$);与模型组比较,阿托伐他汀钙、CK 和 CK201 组 IL-6、TNF-α 的表达均降低($P<0.05$);与阿托伐他汀钙比较,CK201 能更有效抑制 IL-6、TNF-α 的表达(图 4)。结果表明,CK201 能显著抑制主动脉炎症因子 IL-6、TNF-α 的表达。

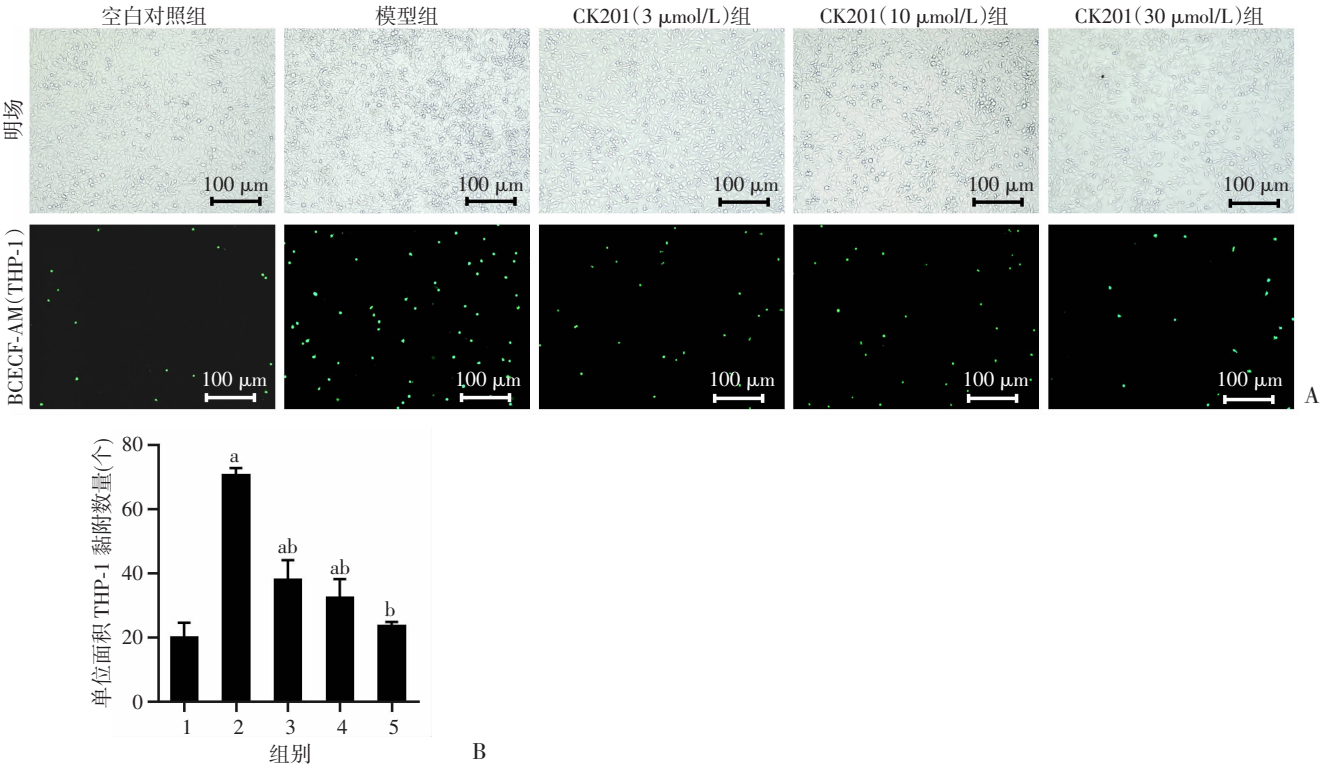
2.5 CK201 对 HUVECs 细胞募集 THP-1 细胞的影响

HUVECs 细胞募集 THP-1 细胞实验结果显示,与空白对照组相比,模型组 HUVECs 内皮细胞与 THP-1 单核细胞的黏附显著增加($P<0.05$);与模型组比较,CK201 低、中、高剂量呈浓度依赖性降低 HUVECs 内皮细胞与 THP-1 单核细胞的黏附($P<0.05$,图 5),表明 CK201 可有效抑制 HUVECs 细胞募集 THP-1 细胞。



A:Western blot 检测 ApoE$^{-/-}$小鼠腹主动脉中 TNF-α 表达;B:Western blot 检测 ApoE$^{-/-}$小鼠腹主动脉中 IL-6 表达;C:TNF-α 相对表达量(TNF-α/GAPDH);D:IL-6 相对表达量(IL-6/GAPDH) a:$P<0.05$,与溶剂对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;c:$P<0.05$,与阿托伐他汀钙组比较;1:溶剂对照组;2:模型组;3:CK 组;4:阿托伐他汀钙组;5:CK201 组

图 4 CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉根 IL-6 和 TNF-α 表达的影响 ($n=6$)



A:荧光染料 BCECF-AM 染色 THP-1,观察其对内皮细胞 HUVECs 的黏附;B:THP-1 细胞对 HUVECs 细胞的黏附量 a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;1:空白对照组;2:模型组(100 μmol/L PA 刺激);3~5:分别为 CK201(3 μmol/L)、CK201(10 μmol/L)、CK201(30 μmol/L)组

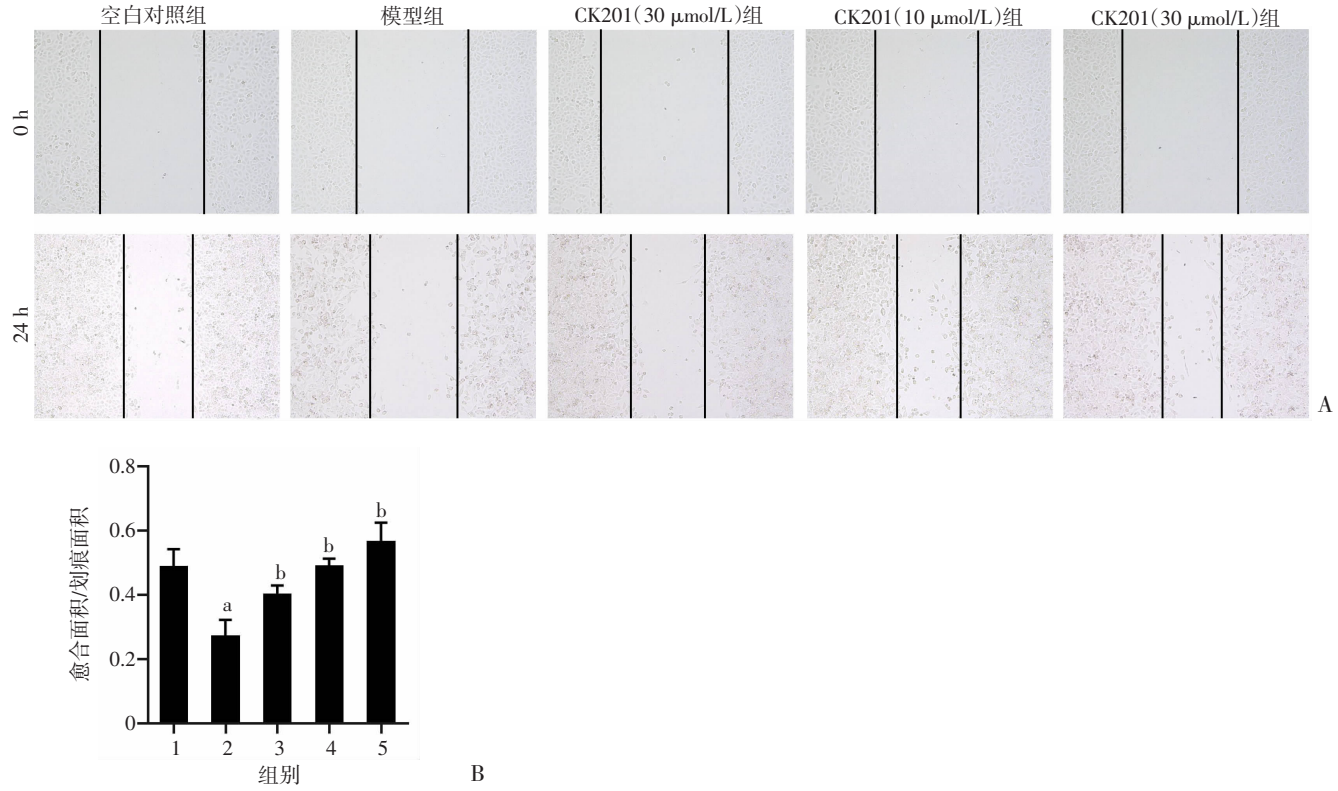
图 5 CK201 对 HUVECs 细胞募集单核细胞 THP-1 的影响 ($n=3$)

2.6 CK201 对 HUVECs 细胞迁移能力的影响

HUVECs 划痕愈合实验结果显示,与空白对照组相比,模型组愈合面积显著减少($P<0.05$);与模型组比较,CK201 低、中、高剂量组可呈浓度依赖性的增加内皮细胞的愈合面积($P<0.05$,图 6)。结果表明,CK201 能有效增强 HUVECs 细胞迁移能力。

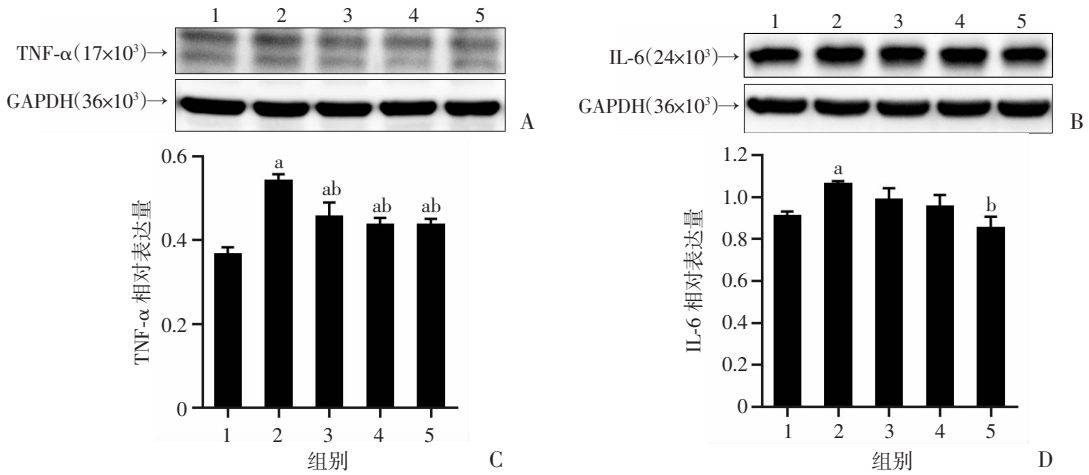
2.7 Western blot 检测 HUVECs 细胞炎症因子 TNF-α、IL-6 表达

Western blot 检测 HUVECs 细胞 TNF-α、IL-6 表达,结果显示,与空白对照组比较,模型组 TNF-α 和 IL-6 表达水平均升高($P<0.05$);与模型组比较,CK201 低、中、高剂量均降低了 TNF-α 的表达($P<0.05$);CK201 高剂量可显著降低 IL-6 的表达($P<0.05$,图 7)。结果表明,CK201 可抑制 HUVECs 细胞炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的表达。



A:HUVECs 细胞划痕后 0 h 和 24 h 空白区域面积;B:HUVECs 细胞划痕后 24 h 愈合面积与划痕面积的比值 a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;1:空白对照组;2:模型组(100 μmol/L PA 刺激);3~5:分别为 CK201(3 μmol/L)、CK201(10 μmol/L)、CK201(30 μmol/L)组

图 6 CK201 对 HUVECs 细胞迁移能力的影响 ($n=3$)



A:Western blot 检测 HUVECs 细胞中 TNF-α 表达;B:Western blot 检测 HUVECs 细胞中 IL-6 表达;C:TNF-α 相对表达量(TNF-α/GAPDH);D:IL-6 相对表达量(IL-6/GAPDH) a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;1:空白对照组;2:模型组(100 μmol/L PA 刺激);3~5:分别为 CK201(3 μmol/L)、CK201(10 μmol/L)、CK201(30 μmol/L)组

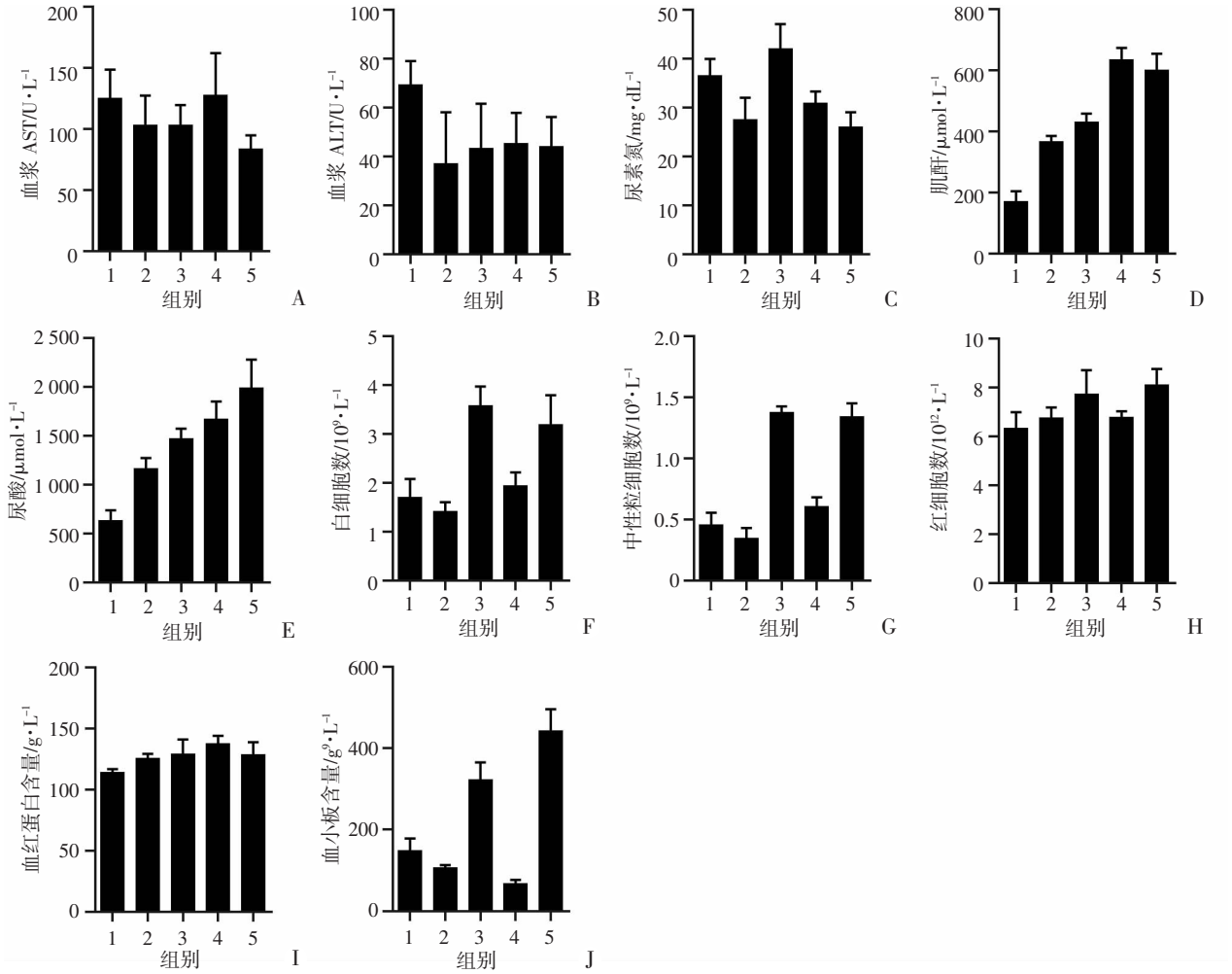
图 7 CK201 对 HUVECs 细胞中 IL-6 和 TNF-α 表达的影响 ($n=3$)

2.8　CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠肝功能、肾功能和血常规的影响

小鼠血浆中 AST 和 ALT 含量检测结果显示,各组指标无异常(图 8A、B)。小鼠血浆中尿素氮结果显示,各组指标无显著异常(图 8C)。各组血液白细胞、中性粒细胞、红细胞数量和血红蛋白结果都在正常值范围内(图 8F~I)。肝功能和血常规结果提示 CK201 不会导致高脂饲料喂养的 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏和外周血指标异常。

3　讨论

AS 是一种慢性炎症疾病,是最基础和最危险的心血管疾病[21]。AS 的特征是动脉血管壁内的慢性炎症和脂质堆积导致动脉血管堵塞,甚至阻断血液流向其他动脉,最终导致心脏病和缺血性卒中等 AS 性心血管疾病的发生[3]。AS 的发病机制涉及炎症反应、脂质浸润、内皮功能损伤等。目前临床治疗 AS 的首选药物仍是胆固醇合成限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂他汀类降脂药物[22]。但研究发现服用他汀类药物后,患者会出现肌肉疼痛、关节炎、横纹肌溶解和肝毒性等不良反应,甚至给患者带来生命威胁,而且在广泛使用他汀类药物后,AS 导致的心血管疾病发病率依旧很高[7-8]。因此亟待开发不良反应更少、抗 AS 效果更好的药物。本课题组前期研究中发现自主合成化合物 CK201 能抑制泡沫细胞的形成[15],泡沫细胞是形成 AS 的关键,提示 CK201 可能具有 AS 防治作用,本研究进一步阐明了 CK201 具有抗 AS 作用,且初步探讨了其作用机制。



A:ApoE$^{-/-}$小鼠血浆 AST 含量;B:ApoE$^{-/-}$小鼠血浆 ACT 含量;C:ApoE$^{-/-}$小鼠血浆尿素氮含量;D:ApoE$^{-/-}$小鼠血浆肌酐含量;E:ApoE$^{-/-}$小鼠血浆尿酸含量;F:ApoE$^{-/-}$小鼠血液白细胞数量;G:ApoE$^{-/-}$小鼠血液中性粒细胞数量;H:ApoE$^{-/-}$小鼠血液红细胞数量;I:ApoE$^{-/-}$小鼠血液血红蛋白含量;J:ApoE$^{-/-}$小鼠血液血小板含量　1:溶剂对照组;2:模型组;3:CK 组;4:阿托伐他汀钙组;5:CK201 组

图 8　CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠的初步安全性评价　(n=6)

3.1 CK201 具有显著的抗 AS 作用

本研究通过体内整体动物实验来评价 CK201 抗 AS 作用。AS 斑块是判定其防治作用的重要指标,本研究使用高脂饲料喂养 ApoE$^{-/-}$小鼠 12 周,发现小鼠主动脉出现明显 AS 斑块,斑块面积占血管总面积的(35.17±6.22)%;同时口服 3 mg/kg 原型化合物 CK、阳性药物阿托伐他汀钙和自主合成化合物 CK201,AS 斑块面积均显著下降,斑块抑制率分别是 35.9%、26.6%、62.4%。以上结果证明 CK201 能有效抑制 AS 斑块的形成,优于阳性药物阿托伐他汀钙及其原型化合物 CK。肝脏是脂肪主要代谢场所,而过度的脂质堆积在肝细胞则会引起脂肪肝病变,通过肝脏病理学切片 HE 和油红 O 染色考察了在 3 mg/kg 的剂量下 CK201 对小鼠肝脏脂质堆积的影响,发现 CK201 并未影响肝细胞正常形态,并且与阳性药物阿托伐他汀钙相比,CK201 能显著地抑制肝脏脂肪堆积。提示 CK201 具有防治脂肪肝的潜在作用。

3.2 CK201 抗 AS 作用机制

高血脂是导致 AS 发生发展的重要因素,降脂疗法是目前治疗 AS 的主要方式,血脂检测结果显示,CK201 具有与阿托伐他汀钙相当的降 TC 的作用,课题组前期研究结果提示可能与 LXRα-ABCA1 信号通路相关[13,15]。但是 CK201 抑制斑块形成的作用却显著强于阿托伐他汀钙,提示除降脂外,CK201 可能通过其他作用机制抑制斑块形成。研究表明内皮是血管壁上的单层细胞,具有维持多器官健康和动态平衡的关键作用[5];而内皮功能损伤是 AS 的早期事件,当内皮细胞暴露在游离脂肪酸、胆固醇结晶、炎症刺激和血流变化等危险因素中被激活,使内皮细胞通透性增加,并释放白细胞介素 IL-6 和肿瘤坏死因子 TNF-α 等炎症因子,募集单核细胞附着在活化的内皮细胞上,接着穿过动脉壁,引发局部炎症,同时更多的脂质也会穿过内皮细胞进入动脉内壁,形成脂质堆积[5,23]。内皮功能障碍的加重还是斑块不稳定而破裂的因素之一[24]。在本研究中,通过评估 CK201 对主动脉炎症因子 IL-6、TNF-α 表达的影响,CK201 对人脐静脉内皮细胞 HUVECs 迁移能力、募集单核细胞的作用和炎症因子 IL-6、TNF-α 表达的影响,进一步探索 CK201 防治 AS 的作用机制。本实验结果表明 CK201 可显著抑制主动脉 IL-6、TNF-α 的表达,提示 CK201 可通过抑制主动脉炎症反应减少斑块的生成。PA 可诱导内皮细胞的脂毒性[25],引起内皮细胞损伤。在 PA 刺激下,测定 HUVECs 细胞中炎症因子的表达,发现 PA 可以诱导 IL-6、TNF-α 蛋白表达,经过 CK201 处理后,HUVECs 细胞的 IL-6、TNF-α 表达均下降,表明 CK201 可抑制 HUVECs 细胞的炎症反应;且发现 CK201 能有效减少单核细胞 THP-1 对 PA 刺激的 HUVECs 细胞的黏附;通过体外模拟血管内皮损伤修复过程,划痕处理单层 HUVECs 细胞,发现在 PA 刺激下 HUVECs 细胞迁移能力显著下降,而通过 CK201 的干预,能明显改善 PA 刺激的 HUVECs 细胞迁移能力,证明 CK201 可促进内皮细胞迁移。以上实验结果表明 CK201 可通过抑制内皮细胞炎症反应和单核细胞与内皮细胞的黏附,促进内皮细胞迁移,抑制内皮功能损伤,起到保护内皮作用。

3.3 CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏和血液系统无显著影响

肝脏是药物代谢的主要场所,化合物 CK201 本身或其代谢产物对肝脏可能具有未知毒性,而血浆中 AST 和 ALT 水平是评价肝脏功能的直接指标,本研究发现 CK201 未导致小鼠血浆中 AST 和 ALT 水平异常,表明以 3 mg/kg 的 CK201 处理 ApoE$^{-/-}$小鼠 12 周不会导致小鼠肝功能异常。血常规检测发现小鼠口服 CK201 后,外周血中白细胞、中性粒细胞、红细胞和血红蛋白水平并未异常,提示 CK201 不会导致小鼠外周血液异常。以上结果提示 CK201 对 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏和血液系统无显著影响。

综上所述,本研究发现人参皂苷衍生物 CK201 可显著降低 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉粥样硬化斑块形成,明显优于目前临床使用药物阿托伐他汀钙。与阿托伐他汀钙相比,CK201 还能有效地减少 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏脂质堆积。经初步机制探索发现,CK201 对 AS 防治作用可能与降低血浆 TC、保护内皮细胞、抑制主动脉血管炎症反应有关。尽管本研究对 CK201 的具体分子机制尚未进行系统性研究,但研究结果提示其通过下调饱和脂肪酸触发的内皮细胞炎症反应从而抑制动脉粥样硬化斑块的形成。研究表明饱和脂肪酸能触发 TLR4(toll like receptor 4)介导的炎症反应[26],CK201 下调内皮细胞炎症反应可能与 TLR4 信号通路有关,课题组将开展进一步的研究。

参考文献:

[1] VIRANI SALIM S, ALVARO A, APARICIO HUGO J, *et al*. Heart disease and stroke statistics—2021 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2021, 143(8): e254-e743.

[2] ZHAO D, LIU J, WANG M, *et al*. Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications[J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(4): 203-212. DOI: 10.1038/s41569-018-0119-4.

[3] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, *et al*. Atherosclerosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56. DOI: 10.

1038/s41572-019-0106-z.

[4] GUTIERREZ E, FLAMMER A J, LERMAN L O, *et al*. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease[J]. Eur Heart J, 2013, 34(41): 3175-3181. DOI: 10.1093/eurheartj/eht351.

[5] XU S W, ILYAS I, LITTLE P J, *et al*. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies [J]. Pharmacol Rev, 2021, 73(3): 924-967. DOI: 10.1124/pharmrev.120.000096.

[6] GLASS C K, WITZTUM J L. Atherosclerosis. the road ahead [J]. Cell, 2001, 104(4): 503-516. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00238-0.

[7] LU B, SUN L, SERAYDARIAN M, *et al*. Effect of SLCO1B1 T521C on statin-related myotoxicity with use of lovastatin and atorvastatin[J]. Clin Pharmacol Ther, 2021, 110(3): 733-740. DOI: 10.1002/cpt.2337.

[8] ZHANG H P, WU J N, ZHANG Z L, *et al*. Association of atorvastatin with the risk of hepatotoxicity: a pilot prescription sequence symmetry analysis[J]. Ther Clin Risk Manag, 2019, 15: 803-810. DOI: 10.2147/TCRM.S204860.

[9] BAI L T, GAO J L, WEI F, *et al*. Therapeutic potential of ginsenosides as an adjuvant treatment for diabetes[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 423. DOI: 10.3389/fphar.2018.00423.

[10] CHEN J Y, WANG Q T, WU H X, *et al*. The ginsenoside metabolite compound K exerts its anti-inflammatory activity by down-regulating memory B cell in adjuvant-induced arthritis[J]. Pharm Biol, 2016, 54(7): 1280-1288. DOI: 10.3109/13880209.2015.1074254.

[11] CHEN H F, WU L X, LI X F, *et al*. Ginsenoside compound K inhibits growth of lung cancer cells *via* HIF-1α-mediated glucose metabolism[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2019, 65(4): 48-52.

[12] SHAO X T, LI N, ZHAN J Z, *et al*. Protective effect of compound K on diabetic rats[J]. Nat Prod Commun, 2015, 10(2): 243-245.

[13] ZHOU L, ZHENG Y, LI Z Y, *et al*. Compound K attenuates the development of atherosclerosis in ApoE $^{(-/-)}$ mice via LXRα activation[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(7): 1054. DOI: 10.3390/ijms17071054.

[14] ZHANG Y W, TONG D Y, CHE D B, *et al*. Ascorbyl palmitate/d-α-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate monoester mixed micelles for prolonged circulation and targeted delivery of compound K for antilung cancer therapy in vitro and in vivo[J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 605-614. DOI: 10.2147/IJN.S119226.

[15] HUANG Y, LIU H M, ZHANG Y X, *et al*. Synthesis and biological evaluation of ginsenoside compound K derivatives as a novel class of LXRα activator[J]. Molecules, 2017, 22(7): 1232. DOI: 10.3390/molecules22071232.

[16] 李晓辉,贾乙,黄琰. 二醇型人参皂苷衍生物及其制备方法和应用: ZL201610828140.7[P]. 2018-07-17.
LI X H, JIA Y, HUANG Y. Panaxdiol-type Ginsenoside derivative, preparation method therefor and use thereof: ZL 201610828140.7[P]. 2018-07-17.

[17] LI X H, JIA Y, HUANG Y. Panaxdiol-type Ginsenoside derivative, preparation method therefor and use thereof: RU 2730495C1[P]. 2020-08-24.

[18] LI X H, JIA Y, HUANG Y. Panaxdiol-type Ginsenoside derivative, preparation method therefor and use thereof: US11091511B2[P]. 2021-08-17.

[19] 李晓辉,贾乙,黄琰. パナキシジオール型ギンセノシド誘導体、その製造方法およびその使用:特願 2019-536633[P]. 2021-04-13.

[20] LI X H, JIA Y, HUANG Y. Panaxdiol-type Ginsenoside derivative, preparation method therefor and use thereof: IN 388081[P]. 2022-01-31.

[21] SIEGEL D, DEVARAJ S, MITRA A, *et al*. Inflammation, atherosclerosis, and psoriasis [J]. Clinic Rev Allerg Immunol, 2013, 44(2): 194-204. DOI: 10.1007/s12016-012-8308-0.

[22] ENDO A. A gift from nature: the birth of the statins[J]. Nat Med, 2008, 14(10): 1050-1052. DOI: 10.1038/nm1008-1050.

[23] CHISTIAKOV D A, MELNICHENKO A A, GRECHKO A V, *et al*. Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis[J]. Exp Mol Pathol, 2018, 104(2): 114-124. DOI: 10.1016/j.yexmp.2018.01.008.

[24] RAJENDRAN P, RENGARAJAN T, THANGAVEL J, *et al*. The vascular endothelium and human diseases[J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(10): 1057-1069. DOI: 10.7150/ijbs.7502.

[25] LUO R X, LI L Z, LIU X H, *et al*. Mesenchymal stem cells alleviate palmitic acid-induced endothelial-to-mesenchymal transition by suppressing endoplasmic reticulum stress[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020, 319(6): E961-E980. DOI: 10.1152/ajpendo.00155.2020.

[26] ROCHA D M, CALDAS A P, OLIVEIRA L L, *et al*. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response[J]. Atherosclerosis, 2016, 244: 211-215. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015.

(**收稿**:2023-01-12;**修回**:2023-03-08)

(编辑 张 维)