doi:10.11659/jjssx.03E022084

·基础研究·

内皮素-1 B 型受体拮抗剂通过抑制 NLRP3/IL-1β 炎症小体通路缓解 ApoE$^{-/-}$ 小鼠的动脉粥样硬化

杜彦挺,杜光勇,夏志强,张 伟,赵振伟 (榆林市第二医院神经外科二病区,陕西 榆林 719000)

[摘 要] **目的** 探讨内皮素-1(ET-1)B 型受体拮抗剂 BQ-788 治疗动脉粥样硬化的效果及其分子机制。**方法** 使用 24 只 8 周龄 ApoE$^{-/-}$小鼠(遗传背景为 C57BL/6 小鼠)构建晚期动脉粥样硬化模型,并分为饲喂常规啮齿类动物基础饲料的正常饮食(CHOW)组、饲喂高脂饮食(HFD)饲料的 HFD 组和饲喂 HFD 饲料并给予 BQ-788 治疗的 HFD + BQ-788 组。ELISA 测定各组小鼠血清炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平。Western blot 测定小鼠胸主动脉血管 NLRP3 炎症小体相关因子 Caspase-1 p20、Caspase-1 p45、NLRP3 和 IL-1β 的表达水平。流式细胞术测定小鼠全血单核细胞及单核细胞 Ly6C^{high}、Ly6C^{low}亚型细胞数量。油红 O 染色测定小鼠胸主动脉血管动脉粥样硬化斑块面积;HE 染色测定斑块"帽"的厚度;Masson 染色观察斑块胶原沉积情况。**结果** 与 CHOW 组相比,HFD 组小鼠血清炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平显著升高($P<0.01$);炎症小体相关因子 Caspase-1 p20、NLRP3 和 IL-1β 的表达水平显著上调($P<0.01$);单核细胞及全血中促炎单核细胞 Ly6C^{high}数量显著增加($P<0.01$),全血中抗炎单核细胞 Ly6C^{low}数量显著减少($P<0.01$)。与 HFD 组相比,HFD + BQ-788 组小鼠血清炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平明显回落($P<0.05$);炎症小体相关因子 Caspase-1 p20、NLRP3 和 IL-1β 的表达水平显著下调($P<0.01$);单核细胞及全血中促炎单核细胞 Ly6C^{high}数量显著回落($P<0.01$),全血中抗炎单核细胞 Ly6C^{low}数量显著增加($P<0.01$);小鼠胸主动脉血管的油红 O 阳性着色面积占比显著较低($P<0.01$);动脉粥样硬化斑块"帽"的平均厚度显著较小($P<0.01$);斑块的胶原沉积范围明显较小。**结论** ET-1B 型受体拮抗剂 BQ-788 可通过抑制 NLRP3/IL-1β 炎症小体通路缓解 ApoE$^{-/-}$小鼠的动脉粥样硬化。

[关键词] 动脉粥样硬化;ET-1 B 型受体拮抗剂;NLRP3 炎症小体;单核细胞;Ly6C^{high};Ly6C^{low};巨噬细胞

[中图分类号] R541.4 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-03-19

Endothelin-1 B type receptor antagonists alleviate atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice by inhibiting the NLRP3/IL-1β inflammasome pathway

DU Yan-ting, DU Guang-yong, XIA Zhi-qiang, ZHANG Wei, ZHAO Zhen-wei (Second Ward of Neurosurgery, Second Hospital of Yulin City, Yulin Shaanxi 719000, China)

Abstract: Objective To explore the therapeutic effects and molecular mechanisms of endothelin-1 (ET-1) B type receptor antagonist BQ-788 in the treatment of atherosclerosis. **Methods** Twenty-four 8-week-old ApoE$^{-/-}$ mice (with a genetic background of C57BL/6 mice) were used to construct the model of advanced atherosclerosis. These mice were randomly divided into three groups, mice in the CHOW group were fed with normal rodent chow, mice in the HFD group were fed with high fat diet, and mice in the HFD + BQ-788 group were fed with HFD and treated with BQ-788. ELISA was used to determine the serum levels of inflammatory factors IL-1β, IL-6 and TNF-α in each group. Western blot was used to determine the expression levels of NLRP3 inflammasome related factors Caspase-1 p20, Caspase-1 p45, NLRP3 and IL-1β in the thoracic aorta of mice. Flow cytometry was used to determine the number of whole blood monocytes and monocytes Ly6C^{high} and Ly6C^{low} subtypes. Oil red O staining was used to determine the area of atherosclerotic plaques of the thoracic aorta of mice; HE staining was used to determine the thickness of plaque "cap" structure; and Masson staining was used to determine collagen deposition in plaques. **Results** Compared with the CHOW group, the levels of serum inflammatory factors IL-1β, IL-6 and TNF-α were significantly increased ($P<0.01$), the expression levels of inflammasome related factors Caspase-1 p20, NLRP3 and IL-1β were significantly up-regulated ($P<0.01$), the number of monocytes and proinflammatory monocytes Ly6C^{high} was significantly increased ($P<0.01$), the number of anti-inflammatory monocytes Ly6C^{low} was significantly decreased in the HFD group ($P<0.01$). Compared with the HFD group, the levels of serum inflammatory factors IL-1β, IL-6 and TNF-α were significantly decreased ($P<0.01$), the expression levels of inflammasome related factors Caspase-1 p20, NLRP3 and IL-1β were significantly down-regulated ($P<0.01$), the number of monocytes and proinflammatory monocytes Ly6C^{high} was significantly decreased ($P<0.01$), the number of anti-inflammatory monocytes Ly6C^{low} was significantly increased in the HFD + BQ-788 group ($P<0.01$). Compared with the HFD group, the proportion of oil red O positive staining area in the thoracic aorta of mice was

[基金项目] 国家自然科学基金(81671136)

[通信作者] 杜彦挺,E-mail:479188865@qq.com

significantly lower ($P<0.01$); the average thickness of atherosclerotic plaque "cap" was significantly smaller ($P<0.01$); and the extent of collagen deposition in the plaques was significantly smaller in the HFD + BQ-788 group. **Conclusion** ET-1 B type receptor antagonist BQ-788 can alleviate atherosclerosis in $ApoE^{-/-}$ mice by inhibiting NLRP3/IL1β inflammasome pathway.

Keywords: atherosclerosis; endothelin-1 B type receptor antagonist; NLRP3 inflammasome; monocyte; $Ly6C^{high}$; $Ly6C^{low}$; macrophage

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是致心血管疾病患者残疾和死亡的主要原因,动脉粥样硬化是其病理基础[1-2]。动脉粥样硬化是一种涉及大中型动脉的慢性全身性炎症性疾病,发病机制与免疫细胞激活、胆固醇积累及年龄增长等因素密切相关[3]。动脉粥样硬化斑块的特征是具有一个坏死核心,其上覆盖薄的纤维帽[4]。早期动脉粥样硬化起始于吞噬了脂质的巨噬细胞形成泡沫细胞并经历自噬,但在中晚期动脉粥样硬化中,这种泡沫细胞的自噬功能失调,凋亡细胞也不能通过正常自噬过程有效降解,从而导致炎症和斑块坏死核心的形成[5]。

动脉粥样硬化的高危因素包括动脉高血压、吸烟、糖尿病和肥胖,这些因素均会增强血管收缩,增加组织内皮素-1(endothelin-1,ET-1)的水平[6]。ET-1 是内皮素肽家族的主要成员,是一种内皮细胞衍生的血管收缩肽。目前认为 ET-1 是一种多功能肽,具有细胞因子样活性,参与几乎所有的生理过程[7]。限制内皮细胞过表达 ET-1 将导致内皮损伤,促进动脉粥样硬化进展并显著加重病变程度[8]。而使用 ET-1 A 型受体拮抗剂达鲁生坦治疗 7 个月,可改善内皮依赖性血管舒张并减缓实验性动脉粥样硬化的进展[9]。因此,使用 ET-1 受体拮抗剂(包括 ET-1 A 型受体和 B 型受体的拮抗剂)治疗动脉粥样硬化已发展为一种新兴疗法[7],但其作用的具体分子机制还有待深入研究。

一项抗炎性血栓形成的临床研究结果表明,抗 IL-1β抗体可以减少二级预防中的复发性心血管事件,从中和 IL-1β 到抑制 IL-6 分泌的途径是一个值得深入研究和临床开发的治疗靶标[10]。Caspase-1 是 IL-1β 的转化酶,也是 NLRP3 炎症小体的组成成分之一[11]。许多与动脉粥样硬化相关的刺激物(如胆固醇结晶和缺氧)均可激活 NLRP3 炎症小体[12]。NLRP3 炎症小体激活后 Caspase-1 酶活性增强,将促炎细胞因子 IL-1β从无活性的前体加工为成熟的活性形式,并分泌至胞外,从而触发炎症反应。有报道显示 ET-1 B 型受体拮抗剂 BQ-123 能够显著改善因脑血管痉挛导致的蛛网膜下腔出血后模型动物脑部微循环灌注,降低血管炎症反应[13]。因此,我们猜测 ET-1 受体拮抗剂也有可能通过抑制血管内皮细胞 NLRP3/IL-1β 炎症小体的活性发挥药效。现本研究拟使用 ET-1 B 型受体拮抗剂 BQ-788 治疗 $ApoE^{-/-}$ 小鼠晚期动脉粥样硬化,研究其对血管内皮细胞 NLRP3/IL-1β 炎症小体活性的影响,深入探讨 ET-1 B 型受体拮抗剂的药物作用机理,为其在临床的大规模应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

24 只 6~7 周龄 SPF 级雄性 $ApoE^{-/-}$ 小鼠,体质量(20.0±3.5)g,遗传背景为 C57BL/6 小鼠,实验动物购自西安交通大学实验动物中心,生产许可证号为 SCXK(陕)2003-0007。基础饲料和高脂饲料均购自北京科奥协力饲料有限公司。BQ-788(批号 B00797882)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA;批号 A00130384)、叠氮化钠(批号 S00003536)、蛋白酶抑制剂混合物粉末(批号 P00753839)、磷酸酶抑制剂混合物(批号 P00765737)购自 Sigma-Aldrich 公司(美国)。ECL 化学发光底物(批号 W00429053)购自 Merck-Millipore 公司(美国)。兔单抗 Caspase-1 p20(批号 P091799)、兔单抗 Caspase-1 p45(批号 P272322)、兔单抗 NLRP3(批号 P150107)、兔单抗 IL-1β(批号 P137040)、山羊抗兔 IgG(H + L)HRP 二抗(批号 S354028)购自 CST 公司(美国)。RIPA 裂解液(批号 17-10-2900)购自 Thermo Fisher 公司(美国)。油红 O 染色液、HE 染色液套装、Masson 染色液套装购自北京国药集团。IL-1β(批号 04-0634)、IL-6(批号 04-2639)和 TNF-α(批号 04-7441)的 ELISA 检测试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。酶标仪(美国 BioTek,型号 Synergy LX)、流式细胞仪(美国 Thermo Fisher,型号 Attune NxT),光学显微镜(日本 Nikon,型号 Ni-E)。

1.2 晚期动脉粥样硬化小鼠模型构建

24 只 6~7 周龄 SPF 级雄性 $ApoE^{-/-}$ 小鼠饲养于恒温(22~25 ℃)、恒湿(相对湿度 60%)、12 h/12 h 明暗周期的 SPF 级鼠房,自由进食、饮水。将小鼠随机分为饲喂常规啮齿类动物基础饲料的正常饮食(CHOW)组、饲喂高脂饮食(high-fat diet,HFD)饲料的 HFD 组和饲喂 HFD 饲料并给予 BQ-788 治疗的 HFD + BQ-788 组,每组 8 只。每 4 只小鼠一笼,不同分组的小鼠分别饲养于不同鼠笼。HFD 饲料含有 21% 的脂肪、0.25% 的胆固醇、78.75% 的基础饲料。小鼠适应

性饲养至第8周龄第1天开始造模:①CHOW组小鼠从第8周龄第1天开始喂食基础饲料,并于同一天开始每隔24 h腹腔注射一次0.5 mL无菌生理盐水;②HFD组小鼠从第8周龄第1天开始连续喂食16周HFD饲料,构建晚期动脉粥样硬化小鼠模型,并于同一天开始每隔24 h腹腔注射一次0.5 mL无菌生理盐水;③HFD+BQ-788组小鼠从第8周龄第1天开始,在连续喂食16周HFD饲料的同时,于同一天开始每隔24 h腹腔注射一次BQ-788,每次3 nmol。所有鼠笼、小鼠器具和饮用水均经高压灭菌处理,基础饲料和HFD饲料均经^{60}Coγ照射灭菌处理。

1.3 流式细胞术检测

在造模开始后第16周的第7天,从3组小鼠眼眶取血并加入枸橼酸钠,温和混匀数次。然后将抗CD16/32抗体加入抗凝全血中,室温避光孵育10 min,以阻断Fc-受体。接着进行如下处理:①加抗小鼠IgG-FITC和抗小鼠CD115-APC;然后加抗小鼠CD115-APC和抗小鼠Ly6C-percpcy5.5,温和混匀,室温避光孵育20 min;②加入含1.5%甲醛的OptiLyse溶血剂,温和混匀,室温避光放置10 min;③加入FACS缓冲液(含0.1% BSA、0.01%叠氮化钠的PBS,pH 7.4),混匀,300×g离心5 min,弃上清,再加入适量FACS缓冲液重悬细胞沉淀,然后立即上机流式细胞仪检测。以CD115-APC标记单核细胞,以Ly6C阳性标记单核细胞的炎症状态。

1.4 ELISA检测

从3组小鼠眼眶取血,然后使用IL-1β、IL-6和TNF-α的ELISA检测试剂盒,按照试剂盒说明书进行ELISA测定。使用酶标仪在450 nm处检测吸光值。

1.5 小鼠胸主动脉的采集

采用CO_2对小鼠实施安乐死。然后将小鼠腹部向上,固定小鼠前后肢,用手术剪从小鼠腹底部到胸顶部剪开皮肤,打开双侧胸腔,直至暴露胸腺和肺,然后移除食管和肺以暴露心脏,使用冰预冷的PBS对心脏进行灌注。用镊子夹住与胸主动脉末端相连的横膈膜,切开主动脉与胸腔肌壁之间的结缔组织,露出主动脉弓,切断左右颈动脉和左锁骨下动脉,以便分离心脏和主动脉。分离胸主动脉后将其置于解剖盘中,滴加PBS始终保持胸主动脉湿润,然后用小镊子小心地拉出外膜脂肪并丢弃,注意避免过度操作破坏胸主动脉血管组织。切断并丢弃胸主动脉的分支血管,将胸主动脉血管浸没于新鲜制备的10%中性福尔马林溶液中,于4 ℃固定48 h。

1.6 Western blot检测

向小鼠胸主动脉血管组织中加入含有蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂混合物的RIPA裂解液,然后在液氮中研磨组织,制备组织匀浆。使用BCA蛋白定量试剂盒定量总蛋白浓度。每个样本取30 μg总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,电泳条件为150 mA恒流跑积层胶,100 mA恒流跑分离胶。然后于4 ℃以80 mA恒流将PAGE胶中的蛋白通过半干转印法转印至PVDF膜上。使用含10%脱脂奶粉的TBS-T缓冲液于室温封闭PVDF膜1 h。于4 ℃孵育一抗过夜,抗体工作浓度如下:Caspase-1 p20(1∶500稀释),Caspase-1 p45(1∶1 000稀释),NLRP3(1∶500稀释),IL-1β(1∶1 000稀释)。次日加入山羊抗兔IgG(H+L)HRP二抗(1∶3 000稀释),于37 ℃孵育1 h。然后用TBS-T缓冲液洗膜;滴加ECL发光底物进行目的条带的化学发光。

1.7 油红O染色

将固定好的小鼠胸主动脉放入1.5 mL的EP管中,每管1个胸主动脉。向每管中加入1 mL新鲜配制的78%甲醇溶液,室温孵育5 min,更换新鲜甲醇溶液,重复1次。弃甲醇溶液,加入1 mL新鲜的油红O染色液,于室温孵育60 min。弃油红O染色液,加入1 mL 78%甲醇溶液清洗,室温孵育5 min,弃甲醇溶液,重复1次。随后可加入1 mL PBS,将装有胸主动脉的EP管置于4 ℃冰箱中等待观察;也可直接对动脉粥样硬化斑块进行观察。将胸主动脉置于解剖盘中,用手术剪从主动脉的升弓到左锁骨下动脉切开主动脉弓的外曲率,并纵向剖开胸主动脉;使用钢制小针将纵向剖开的胸主动脉固定,并观察、拍照,使用Image J v1.8.0进行动脉粥样硬化斑块面积的计算。动脉粥样硬化斑块面积占比(%)=动脉粥样硬化斑块面积/胸主动脉总面积×100%。

1.8 HE染色和Masson染色

将新鲜采集的小鼠胸主动脉血管浸没于新鲜制备的10%中性福尔马林溶液中,于4 ℃固定48 h,然后进行石蜡包埋并切片(5 μm)。切片经二甲苯脱蜡,重复1次;再经梯度乙醇水化。HE染色:先使用苏木精染色液对细胞核染色5 min,使用1%盐酸乙醇分化3 s,再对切片进行复蓝3 s;然后用85%和95%乙醇脱水,每次4 min;接着对切片进行伊红染色5 min;使用无水乙醇脱水5 min,重复2次;二甲苯透明化2 min,重复1次;最后,使用中性树胶封片。Masson染色:使用Masson染色液套装进行染色,操作步骤按照套装中的说明书进行,中性树胶封片。在Nikon光学显微镜

(型号 Ni-E)下观察并拍照。

1.9 统计学分析

计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。使用 GraphPad Prism v8 统计学分析软件对计量数据进行分析。2 组间比较采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析(*one way ANOVA*)。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BQ-788 能够抑制血管内皮细胞 NLRP3/IL1β 炎症小体通路的活化

ELISA 测定小鼠血清炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的水平,结果显示,与 CHOW 组小鼠相比,HFD 组小鼠上述 3 种炎症因子的水平均显著上升($P<0.01$);与 HFD 组小鼠相比,HFD + BQ-788 组小鼠上述 3 种炎症因子的水平均明显回落($P<0.05$),见图 1a。采用 Western blot 测定小鼠血管内皮细胞中炎症小体的活化水平,结果显示,与 CHOW 组小鼠相比,HFD 组小鼠 Caspase-1 p20(Caspase-1 的活性形式)、NLRP3 和 IL-1β蛋白的表达水平显著上调($P<0.01$);与 HFD 组小鼠相比,HFD + BQ-788 组小鼠上述 3 种蛋白的表达水平显著下调($P<0.01$);Caspase-1 p45(Caspase-1 的无活性形式)在 CHOW 组、HFD 组和 HFD + BQ-788 组小鼠血管内皮中的表达差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1b、c。

2.2 BQ-788 能够减少促炎单核细胞数量

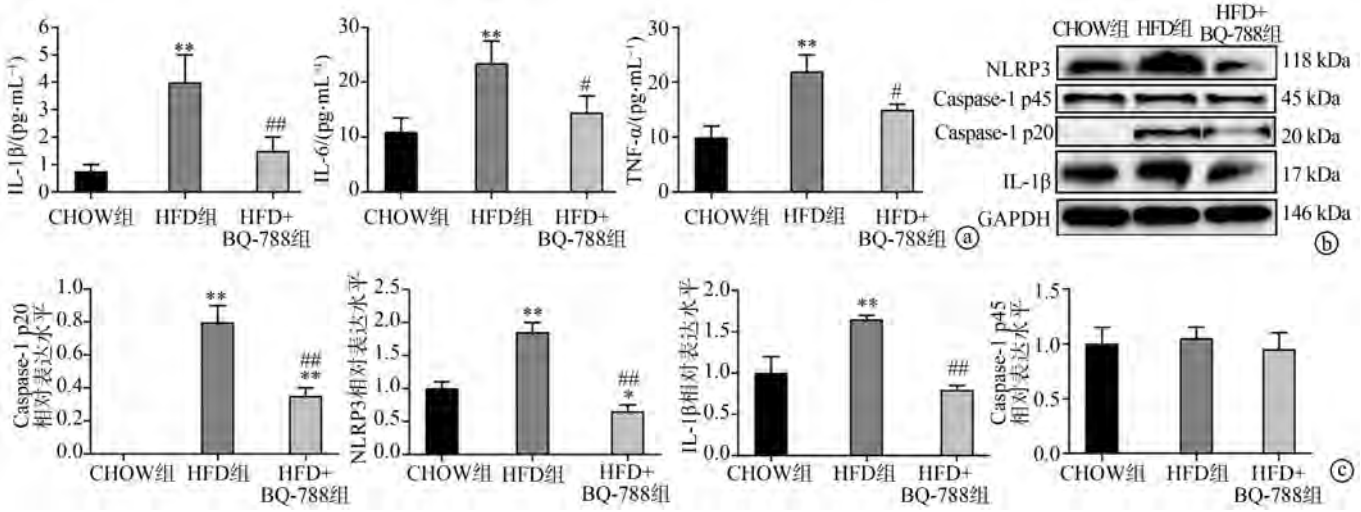
与 CHOW 组相比,HFD 组小鼠全血中的单核细胞数量显著增加($P<0.01$);与 HFD 组小鼠相比,HFD + BQ-788 组小鼠全血中的单核细胞数量显著减少($P<0.01$),见图 2a。与 CHOW 组相比,HFD 组小鼠全血中的促炎单核细胞 $Ly6C^{high}$ 数量显著增加($P<0.01$),抗炎单核细胞 $Ly6C^{low}$ 数量显著减少($P<0.01$);与 HFD 组小鼠相比,HFD + BQ-788 组小鼠全血中的 $Ly6C^{high}$ 数量显著回落($P<0.01$),$Ly6C^{low}$ 数量显著增加($P<0.01$),见图 2b。

2.3 BQ-788 能够缓解动脉粥样硬化斑块进展

油红 O 染色结果显示,CHOW 组小鼠胸主动脉血管无油红 O 染色阳性着色区域;HFD 组小鼠胸主动脉血管油红 O 阳性着色面积占比超过 30%,与 CHOW 组相比显著增高($P<0.01$);而 HFD + BQ-788 组小鼠胸主动脉血管的油红 O 阳性着色面积占比低于 20%,显著低于 HFD 组($P<0.01$),见图 3。

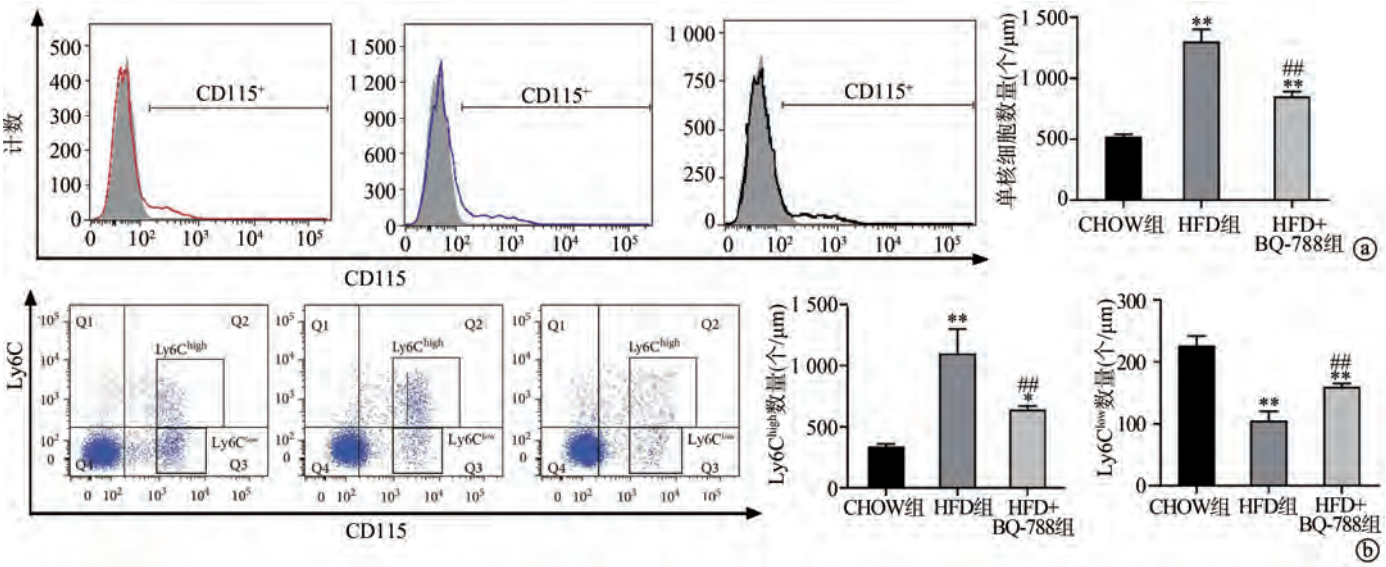
HE 染色结果显示,CHOW 组小鼠无动脉粥样硬化斑块“帽”;HFD 组小鼠动脉粥样硬化斑块“帽”的平均厚度 > 15 μm,与 CHOW 组相比显著增厚($P<0.01$);而 HFD + BQ-788 组小鼠动脉粥样硬化斑块“帽”的平均厚度 < 10 μm,显著小于 HFD 组($P<0.01$),见图 4。

Masson 染色结果显示,CHOW 组小鼠动脉血管内壁无蓝色(胶原)着色;HFD 组小鼠动脉粥样硬化斑块有较大范围的蓝色(胶原)着色,与 CHOW 组比较显著增大;HFD + BQ-788 组斑块的蓝色(胶原)着色区域范围明显缩小,见图 4。



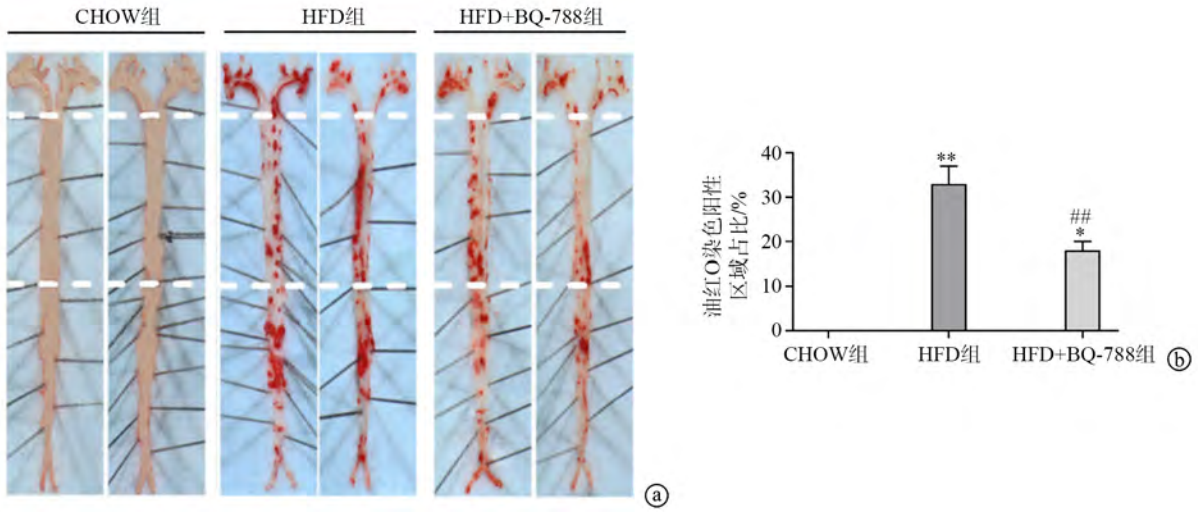
a:ELISA 测定小鼠血清炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的水平;b、c:Western blot 测定小鼠血管内皮细胞中 Caspase-1 p20、Caspase-1 p45、NLRP3 和 IL-1β 蛋白的表达水平 *:与 CHOW 组比较,$P<0.05$;**:与 CHOW 组比较,$P<0.01$;#:与 HFD 组比较,$P<0.05$;##:与 HFD 组比较,$P<0.01$

图 1 小鼠血清炎症因子及其血管内皮细胞中炎症小体的活性水平



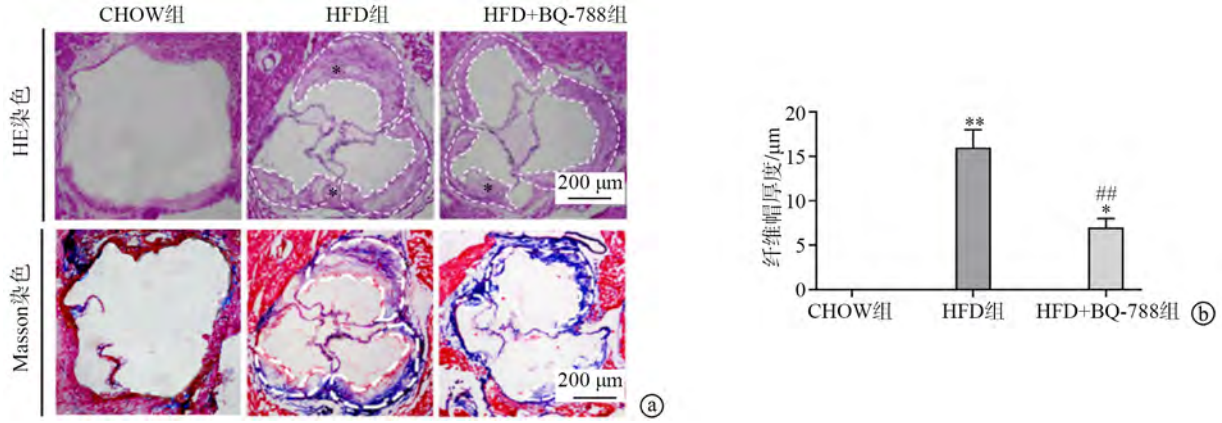
a:小鼠全血中单核细胞计数结果;b:小鼠全血中促炎和抗炎单核细胞计数结果 *:与 CHOW 组比较,$P<0.05$;**:与 CHOW 组比较,$P<0.01$;##:与 HFD 组比较,$P<0.01$

图 2 小鼠全血中单核细胞及促炎和抗炎单核细胞数量统计结果



a:小鼠胸主动脉血管油红 O 染色结果;b:油红 O 染色阳性着色区域统计结果 *:与 CHOW 组比较,$P<0.05$;**:与 CHOW 组比较,$P<0.01$;##:与 HFD 组比较,$P<0.01$

图 3 小鼠胸主动脉油红 O 染色结果



a:小鼠胸主动脉血管 HE 染色及 Masson 染色结果;b:动脉粥样硬化斑块“帽”的厚度测定结果 *:与 CHOW 组比较,$P<0.05$;**:与 CHOW 组比较,$P<0.01$;##:与 HFD 组比较,$P<0.01$

图 4 小鼠胸主动脉 HE 染色及 Masson 染色结果

3 讨论

NLRP3 与 Caspase-1 及接头蛋白共同组成了 NLRP3炎症小体。研究证明,胆固醇晶体可诱导激活人类巨噬细胞中的 NLRP3 炎症小体[14]。使用 ApoE$^{-/-}$/Caspase-1$^{-/-}$双基因敲除小鼠模型的研究表明,Caspase-1 的激活在血管炎症和动脉粥样硬化斑块形成中起着关键作用,能增强病变部位的炎症水平,进而加速动脉粥样硬化的形成和恶化;而与ApoE$^{+/+}$/Caspase-1$^{+/+}$野生型相比,ApoE$^{-/-}$/Caspase-1$^{-/-}$双基因敲除小鼠的斑块面积显著减少,血清炎症细胞因子 IL-1β、CCL2 和 TNF-α 的水平明显降低[15]。一项 LoDoCo 研究将广泛用于治疗炎症的秋水仙碱用于 ACS 的二级预防,每天剂量为 0.5 mg,在为期 3 年的随访中发现,秋水仙碱显著减少了复发性心血管事件的发生[16]。还有研究表明,秋水仙碱可抑制 NLRP3 炎症小体的激活[17]。miR-99a-5p 通过靶向 mTOR 抑制 NLRP3 炎症小体活化,从而减轻动脉粥样硬化[18]。新型 Caspase-1 抑制剂 VX765 能够通过抑制 NLRP3 炎症小体的组装减轻线粒体损伤,从而抑制动脉粥样硬化斑块的形成[19]。Thioredoxin-1 缓解动脉粥样硬化也是通过抑制 NLRP3 炎症小体的活性水平实现的[20]。本研究结果显示,ET-1 B 型受体拮抗剂 BQ-788 也能够抑制 HFD 组小鼠胸主动脉的 NLRP3 炎症小体的活化水平,并能降低 HFD 组小鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平。

此外,本研究还观察到 HFD 组小鼠循环系统中单核细胞亚群的显著变化。已知 Ly6C^{high}单核细胞是在炎症因子驱动下迁移到受伤或感染部位参与炎症反应的细胞亚群;而 Ly6C^{low}单核细胞则是在静息脉管系统中巡逻并参与炎症消退的细胞亚群[21]。由于 Ly6C^{high}单核细胞将分化为类似于 M1 型巨噬细胞(促炎)的亚型,而 Ly6C^{low}单核细胞将分化为类似于 M2 型巨噬细胞(抗炎)的亚型,这可能导致动脉粥样硬化斑块内出现不同的巨噬细胞亚型[22-23]。已知制瘤素 M 在动脉粥样硬化发展的多个阶段中发挥促进作用。最近研究发现,当暴露于氧化低密度脂蛋白后,制瘤素 M 以剂量依赖性方式在 THP-1 巨噬细胞表面被诱导高表达,并促进 THP-1 巨噬细胞活化为 M1 表型,加速动脉粥样硬化斑块的形成[24]。使用长链 3-酮酰基辅酶 A 硫解酶曲美他嗪抑制脂肪酸氧化能够抑制巨噬细胞 NLRP3的活化,减缓动脉粥样硬化的进展[25]。目前 NLRP3 炎症小体影响循环系统中单核细胞亚群的机制尚不清楚,但本研究结果显示,BQ-788 在抑制 NLRP3炎症小体的同时,也能够抑制单核细胞的增殖及向 Ly6C^{high}亚型的分化;与 HFD 组相比,HFD + BQ-788 组小鼠全血单核细胞及 Ly6C^{high}亚型细胞数量明显减少,且 Ly6C^{low}亚型细胞数量显著增加,进一步说明 BQ-788 具有显著的抗炎效果。随后本研究的油红 O 染色、HE 染色和 Masson 染色结果明确了 BQ-788 治疗 ApoE$^{-/-}$小鼠晚期动脉粥样硬化的疗效,与 HFD 组相比,HFD + BQ-788 组小鼠动脉粥样硬化斑块面积显著减少,斑块“帽”的厚度显著减小,斑块内胶原沉积也明显减少。这也进一步说明,炎症及炎症驱动激活的 Ly6C^{high}亚型单核细胞在动脉粥样硬化形成过程中的确扮演着重要的角色,以 Ly6C^{high}亚型单核细胞为治疗靶点或许能够探索一条减缓动脉粥样硬化进展的预防和治疗新策略。

本研究仅使用 ApoE$^{-/-}$小鼠构建晚期动脉粥样硬化模型这一种方式对 BQ-788 缓解动脉粥样硬化的疗效进行了评估,而未使用其他方式构建动脉粥样硬化模型,如使用 Ldlr$^{-/-}$小鼠或 Ldlr$^{-/-}$合并糖尿病小鼠等造模在多个动物模型上对 BQ-788 的疗效进行综合评估,获得的关于 BQ-788 治疗动脉粥样硬化的疗效评价结论具有一定的局限性[5,26]。但本研究发现,使用 ET-1 B 型受体拮抗剂 BQ-788 治疗动脉粥样硬化是通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活水平和降低 IL-1β 的分泌发挥功效的,这为临床上广泛使用 ET-1 B 型受体拮抗剂类药物进行 ACS 的二级预防提供了临床前研究证据。

[参考文献]

[1] Falk E, Nakano M, Bentzon JF, et al. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view[J]. Eur Heart J, 2013, 34(10): 719-728. doi: 10.1093/eurheartj/ehs411.

[2] 王言憬,勇 强,刘 欣,等. 冠状动脉病变程度与颈动脉粥样硬化斑块易损性相关性研究[J]. 中国超声医学杂志, 2019, 35(7): 601-604. doi: 10.3969/j.issn.1002-0101.2019.07.009.

[3] 浦冬青,刘 政,周 超,等. 近 10 年动脉粥样硬化发病机制研究热点的可视化分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(7): 2276-2284. doi: 10.11842/wst.20200909004.

[4] 刘 丽,张 腾,陈 瑜. 免疫系统与动脉粥样硬化发病机制的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(8): 1000-1003. doi: 10.3969/j.issn.1672-1349.2015.08.016.

[5] 陈臻毅,徐 强,梁自豪,等. 动脉粥样硬化发病机制及其动物模型研究进展[J]. 实验动物科学, 2015, 32(4): 54-58. doi: 10.3969/j.issn.1006-6179.2015.04.015.

[6] Barton M, Kiowski W. The therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular disease[J]. Curr Hypertens Rep, 2001,

3(4):322 - 330. doi:10.1007/s11906 - 001 - 0095 - 6.

[7] Matthias B, Masashi Y. Endothelin:30 years from discovery to therapy [J]. Hypertension,2019,74(6):1232 - 1265. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12105.

[8] Javeshghani D, Barhoumi T, Idris-Khodja N, et al. Reduced macrophage-dependent inflammation improves endothelin-1-induced vascular injury [J]. Hypertension, 2013, 62(1):112 - 117. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01298.

[9] Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, et al. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(24): 14367 - 14372. doi: 10.1073/pnas.95.24.14367.

[10] Ms A, Dkaa B. Atherothrombosis and the NLRP3 inflammasome: endogenous mechanisms of inhibition[J]. Transl Res,2020,215:75 - 85. doi:10.1016/j.trsl.2019.08.003.

[11] Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2018,17(9):688. doi:10.1038/nrd.2018.149.

[12] Libby P. Interleukin-1 beta as a target for atherosclerosis therapy:biological basis of CANTOS and beyond[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(18):2278 - 2289. doi:10.1016/j.jacc.2017.09.028.

[13] Wu Q, Zheng R, Wang J, et al. CT perfusion imaging of cerebral microcirculatory changes following subarachnoid hemorrhage in rabbits:specific role of endothelin-1 receptor antagonist[J]. Brain Res,2018,1701:196 - 203. doi:10.1016/j.brainres.2018.09.025.

[14] Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages:a novel link between cholesterol metabolism and inflammation[J]. PLoS One,2010,5(7):e11765. doi:10.1371/journal.pone.0011765.

[15] Usui F, Shirasuna K, Kimura H, et al. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice[J]. Biochem Biophys Res Commun,2012,425(2):162 - 168. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.058.

[16] Vaidya K, Arnott C, Martinez GJ, et al. Colchicine therapy and plaque stabilization in patients with acute coronary syndrome:a CT coronary angiography study[J]. JACC Cardiovasc Imaging,2018,11(2 Pt 2):305 - 316. doi:10.1016/j.jcmg.2017.08.013.

[17] Leung YY, Yao Hui LL, Kraus VB. Colchicine:update on mechanisms of action and therapeutic uses[J]. Semin Arthritis Rheum, 2015, 45(3):341 - 350. doi:10.1016/j.semarthrit.2015.06.013.

[18] Wang G, Jing SY, Liu G, et al. miR-99a-5p:a potential new therapy for atherosclerosis by targeting mTOR and then inhibiting NLRP3 inflammasome activation and promoting macrophage autophagy[J]. Dis Markers,2022,2022:7172583. doi:10.1155/2022/7172583.

[19] Jin Y, Liu Y, Xu L, et al. Novel role for caspase 1 inhibitor VX765 in suppressing NLRP3 inflammasome assembly and atherosclerosis via promoting mitophagy and efferocytosis[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(5):512. doi:10.1038/s41419 - 022 - 04966 - 8.

[20] Wang Y, Ji N, Gong X, et al. Thioredoxin-1 attenuates atherosclerosis development through inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. Endocrine, 2020,70(1):65 - 70. doi:10.1007/s12020 - 020 - 02389 - z.

[21] Swirski FK, Libby P, Aikawa E, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata[J]. J Clin Invest, 2007, 117(1):195 - 205. doi:10.1172/JCI29950.

[22] Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells[J]. Science, 2010, 327(5966):656 - 661. doi:10.1126/science.1178331.

[23] Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions[J]. J Exp Med, 2007, 204(12):3037 - 3047. doi:10.1084/jem.20070885.

[24] Liu C, Wu J, Jia H, et al. Oncostatin M promotes the ox-LDL-induced activation of NLRP3 inflammasomes via the NF-κB pathway in THP-1 macrophages and promotes the progression of atherosclerosis[J]. Ann Transl Med,2022,10(8):456. doi:10.21037/atm - 22 - 560.

[25] Sharma S, Fischer MB, Stojkovic S, et al. Pharmacological inhibition of fatty acid oxidation reduces atherosclerosis progression by suppression of macrophage NLRP3 inflammasome activation[J]. Biochem Pharmacol,2021,190:114634. doi:10.1016/j.bcp.2021.114634.

[26] 窦曼曼,宋晓南,陈 盈. 动脉粥样硬化实验室模型研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志,2021,38(3):265 - 267. doi:10.19845/j.cnki.zfysjjbzz.2021.0068.

(编辑:魏 源)