

黄芪甲苷通过 NF- κ B/NLRP3 信号通路减轻肺动脉高压大鼠的炎症反应

孙洋, 王洪新*

(锦州医科大学心脑血管药物研究重点实验室, 辽宁 锦州 121001)

摘要: **目的** 探讨黄芪甲苷对野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠的保护作用及潜在机制。**方法** 大鼠随机分为对照组、模型组、MCC950组(10 mg/kg)、Bay11-7082组(5 mg/kg)、黄芪甲苷组(40、80 mg/kg), 大鼠通过单次腹腔注射野百合碱(60 mg/kg)建立肺动脉高压模型, 黄芪甲苷组灌胃相应剂量药物28 d, MCC950组和Bay11-7082组腹腔注射相应剂量药物, 右心室导管插管测定右心室收缩压和平均肺动脉压, ELISA法检测大鼠血清炎症因子TNF- α 水平, 免疫组化法观察大鼠肺组织中IL-6蛋白表达情况, 免疫荧光检测大鼠肺组织NLRP3、NF- κ B表达情况。人肺动脉内皮细胞(HPAECs)随机分为对照组、模型组、MCC950组(10 μ mol/L)、Bay11-7082组(10 μ g/mL)、黄芪甲苷组(50、100 μ mol/L), EdU-488增殖试剂盒检测细胞增殖情况, ELISA法检测细胞TNF- α 、IL-6水平, 免疫蛋白印迹(Western blot)法检测细胞NLRP3、NF- κ B蛋白表达。**结果** 与模型组比较, MCC950组、Bay11-7082组和黄芪甲苷组能够降低肺动脉高压大鼠右心室收缩压、平均肺动脉压和右心肥厚指数($P < 0.01$), 下调肺组织和细胞IL-6、TNF- α 水平和NF- κ B、NLRP3蛋白表达($P < 0.01$), 改善HPAECs细胞增殖情况($P < 0.01$)。**结论** 黄芪甲苷能够减轻肺动脉高压大鼠的炎症反应, 可能是通过NF- κ B/NLRP3信号通路发挥作用。

关键词: 黄芪甲苷; 肺动脉高压; 野百合碱; 炎症; NLRP3; NF- κ B

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)02-0578-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.02.042

肺动脉高压的特征是血管过度收缩和闭塞性血管重塑, 其组织病理学特征包括肺血管的内膜和外膜层增厚, 以及血管闭塞和丛状病变^[1-2], 研究表明, 在其肺血管系统和右心室中, 炎症因子水平有所增加^[3], 提示炎症在肺动脉高压中发挥着重要作用。NLRP3炎性小体是一种多蛋白促炎复合物, 由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和位于细胞质中的caspase-1组成^[4]。在肺动脉高压大鼠的肺组织中, NF- κ B的表达增加, 此外, 终末期特发性肺动脉高压患者的肺血管中NF- κ B也被激活, 这说明NF- κ B的激活可能促进了该疾病的发展^[5]。

黄芪是我国传统珍贵药材, 具有抗菌、止汗、消炎、利尿和滋补的作用, 皂苷、类黄酮和多糖等成分被认为是黄芪的主要活性成分^[6]。黄芪甲苷是从黄芪中提取的四环三萜皂苷, 对多种心血管疾病具有保护作用^[7], 已有研究表明, 黄芪甲苷对肺动脉高压具有保护作用^[8], 但具体改善机制尚不清楚。因此, 本实验在体内和体外水平上, 分别探讨黄芪甲苷对肺动脉高压的保护作用和潜在机制。

1 材料

1.1 试剂与药物 黄芪甲苷(纯度 $\geq 98.0\%$, 南京景竹生物科技有限公司)。野百合碱、炎症小体NLRP3抑制剂

MCC950、核转录因子NF- κ B抑制剂Bay11-7082(美国Sigma公司, 货号315220、538120、B5556); GAPDH、NLRP3、NF- κ B抗体(美国Proteintech公司, 货号60004-1-Ig、19771-1-AP、14220-1-AP); FITC荧光染料(北京鼎国生物技术有限责任公司, 货号CSB-L05598m); Alexa Fluor 488荧光二抗、BeyoClick™ EdU-488细胞增殖检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 货号A0423、C0071S)。

1.2 仪器 半干转膜仪、化学发光成像仪(美国Bio-Rad公司); NM-9602G型酶标分析仪(美国Thermo Fisher Scientific公司); DMI3000B型显微镜(德国Leica公司); 制冰机(日本大阪松下电器产业株式会社)。

1.3 动物和细胞 健康雄性SD大鼠60只, 体质量(200 \pm 10)g, 由锦州医科大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号SCXK(辽)2014-0004。人肺动脉内皮细胞(HPAECs), 购自通派(上海)生物科技有限公司。

2 方法

2.1 分组和给药 将60只大鼠随机分为对照组、模型组、MCC950组(10 mg/kg)、Bay11-7082组(5 mg/kg)、黄芪甲苷组(40、80 mg/kg), 通过单次腹腔注射野百合碱建立肺动脉高压模型, 黄芪甲苷组大鼠连续灌胃40、80 mg/kg

收稿日期: 2021-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973553)

作者简介: 孙洋(1994—), 女, 硕士生, 研究方向为心血管药理学。E-mail: 15846570429@163.com

*通信作者: 王洪新(1964—), 男, 博士, 教授, 研究方向为心血管药理学及天然药物。E-mail: jyhxwang@163.com

黄芪甲苷 28 d, MCC950 组 (10 mg/kg) 和 Bay11-7082 组 (5 mg/kg) 大鼠腹腔注射相应剂量药物。

HPAECs 细胞在含 10% 胎牛血清的 ECM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。HPAECs 细胞用野百合碱吡咯诱导 24 h, 然后用 MCC950 (10 μmol/L)、Bay 11-7082 (10 μg/mL)、黄芪甲苷 (50、100 μmol/L) 分别处理 30 min。

2.2 右心室导管插管法检测血流动力学 使用 BL-420S 生物信号采集和分析系统, 通过右心室导管插管测定右心室收缩压和平均肺动脉压。分别测定左心室壁 (LV)、室间隔 (S) 和右心室壁 (RV), 右心肥厚指数表示为右心室与左心室加上隔膜的重量比, 公式为右心肥厚指数 = RV / (LV+S)。

2.3 ELISA 法检测大鼠血清 TNF-α 水平以及 HPAECs 细胞 IL-6、TNF-α 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书测定大鼠血清 TNF-α 水平以及 HPAECs 细胞 IL-6、TNF-α 水平。

2.4 免疫组化法检测大鼠肺组织 IL-6 蛋白表达 4% 多聚甲醛固定肺组织, 石蜡包埋, 切片, 经热修复、封闭后, IL-6 抗体 4 °C 孵育过夜, 滴加二抗, DAB 显色, 苏木素染核, 透明后中性树脂封片。在显微镜下观察到有棕黄色颗粒沉淀即为 IL-6 表达, 通过 Image-Pro Plus 软件进行分析, 蛋白表达为阳性表达面积/总细胞面积。

2.5 免疫荧光法检测大鼠肺组织 NLRP3、NF-κB 蛋白表达 4% 多聚甲醛固定肺组织, 石蜡包埋, 高压抗原修复, 滴加 NLRP3、NF-κB 一抗, 4 °C 过夜后滴加荧光二抗, DAPI 染核, 在荧光倒置显微镜下观察, 通过 Image-Pro Plus 软件进行分析, 蛋白表达为荧光光密度总和/面积总和。

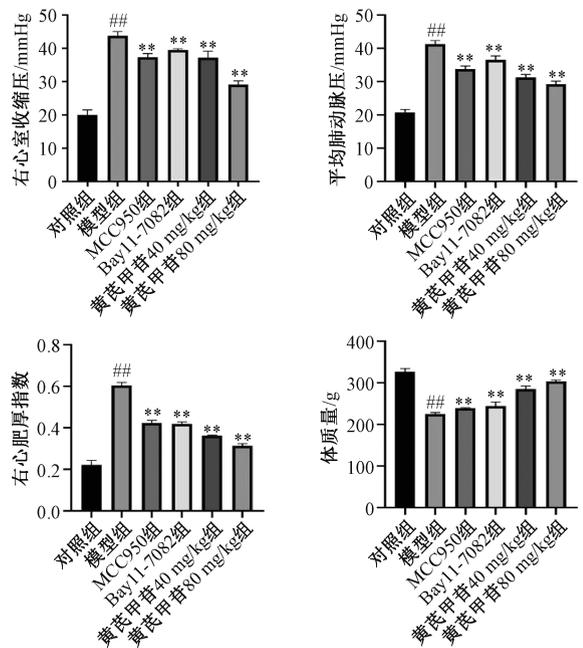
2.6 EdU-488 增殖试剂盒检测 HPAECs 细胞增殖情况 按照试剂盒说明书进行操作, 通过 Image-Pro Plus 软件进行分析, 细胞增殖率为 EdU-488 光密度总和/面积总和。

2.7 Western blot 法检测 HPAECs 细胞 NLRP3、NF-κB 蛋白表达 提取细胞总蛋白后 BCA 法测定浓度, 将样品蛋白通过 SDS-PAGE 凝胶进行分离, 并转移至 PVDF 膜上, 封闭 1.5 h, 然后与 NLRP3、NF-κB 抗体 4 °C 孵育过夜, 与二抗室温孵育 2 h, ECL 法显色, 曝光, 用 Image J 软件分析结果。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理, 符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪甲苷对肺动脉高压大鼠血流动力学和体质量的影响 与对照组比较, 模型组大鼠右心肥厚指数、右心室收缩压和平均肺动脉压均升高 (P < 0.01), 体质量降低 (P < 0.01); 与模型组比较, 黄芪甲苷组、MCC950 组和 Bay11-7082 组大鼠右心肥厚指数、右心室收缩压和平均肺动脉压均降低 (P < 0.01), 体质量升高 (P < 0.01), 说明黄芪甲苷对肺动脉高压大鼠的肺动脉高压有改善作用, 见图 1。



注: 与对照组比较, ^{##}P < 0.01; 与模型组比较, ^{**}P < 0.01。

图 1 黄芪甲苷对肺动脉高压大鼠血流动力学和体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 6, 1 mmHg = 0.133 kPa)

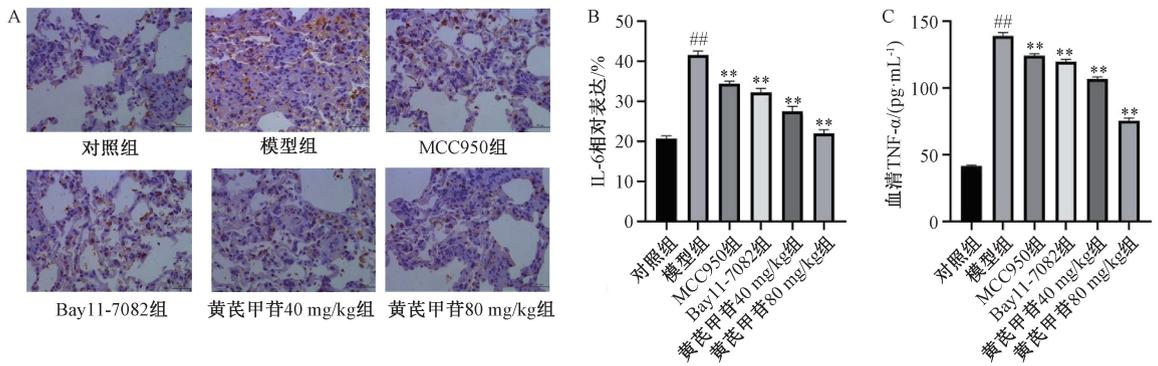
3.2 黄芪甲苷对肺动脉高压大鼠血清 TNF-α 水平和肺组织 IL-6 表达的影响 与对照组比较, 模型组大鼠血清 TNF-α 水平和肺组织 IL-6 表达均升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 黄芪甲苷组、MCC950 组和 Bay11-7082 组大鼠血清 TNF-α 水平和肺组织 IL-6 表达均降低 (P < 0.01), 说明黄芪甲苷能够减轻肺动脉高压大鼠炎症反应, 见图 2。

3.3 黄芪甲苷对肺动脉高压大鼠 NF-κB/NLRP3 信号通路的影响 与对照组比较, 模型组大鼠肺组织 NLRP3、NF-κB 蛋白表达升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 黄芪甲苷组、MCC950 组和 Bay11-7082 组大鼠肺组织 NLRP3、NF-κB 蛋白表达均降低 (P < 0.01), 说明黄芪甲苷对肺动脉高压大鼠的保护作用可能通过抑制 NF-κB/NLRP3 信号通路, 见图 3。

3.4 黄芪甲苷对 HPAECs 细胞增殖的影响 与对照组比较, 模型组 HPAECs 细胞增殖率升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 黄芪甲苷组、MCC950 组和 Bay11-7082 组 HPAECs 细胞增殖率降低 (P < 0.01), 说明黄芪甲苷能改善 HPAECs 细胞增殖情况, 见图 4。

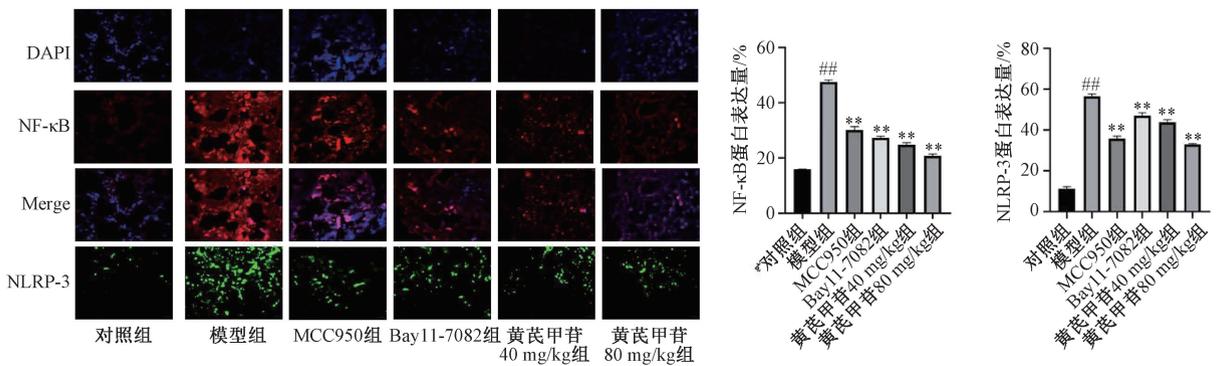
3.5 黄芪甲苷对 HPAECs 细胞炎症因子 TNF-α、IL-6 水平的影响 与对照组比较, 模型组 HPAECs 细胞 TNF-α、IL-6 水平升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 黄芪甲苷组、MCC950 组和 Bay11-7082 组 HPAECs 细胞 TNF-α、IL-6 水平降低 (P < 0.01), 见图 5。

3.6 黄芪甲苷对 HPAECs 细胞 NF-κB/NLRP3 信号通路的影响 与对照组比较, 模型组 HPAECs 细胞 NF-κB、NLRP3 蛋白表达升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 黄芪甲苷组、MCC950 组和 Bay11-7082 组 HPAECs 细胞 NF-κB、



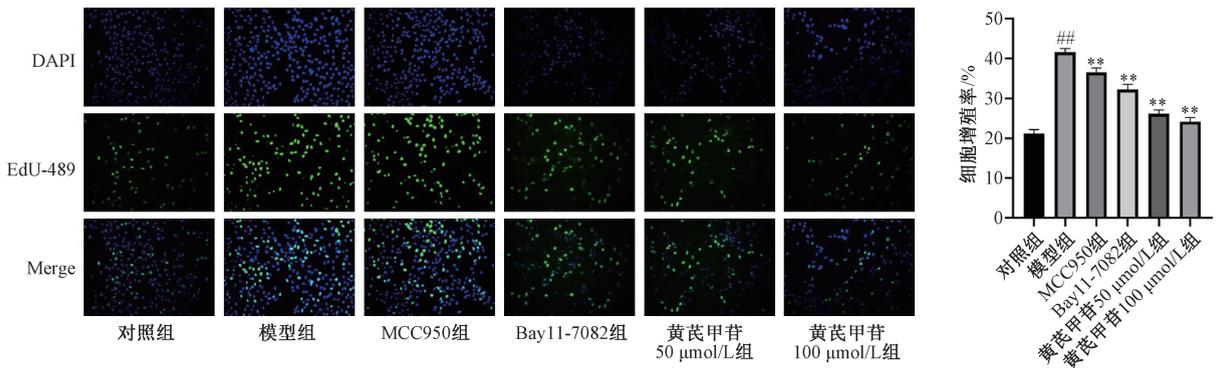
注：A为各组大鼠肺组织IL-6免疫组化染色图（×400），B为各组大鼠肺组织IL-6表达统计图，C为各组大鼠血清TNF-α水平。与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图2 黄芪甲苷对肺动脉高压大鼠血清TNF-α水平和肺组织IL-6表达的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ ）



注：与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图3 黄芪甲苷对肺动脉高压大鼠NF-κB/NLRP3信号通路的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 6$, ×400）



注：与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图4 黄芪甲苷对HPAECs细胞增殖的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 6$, ×400）

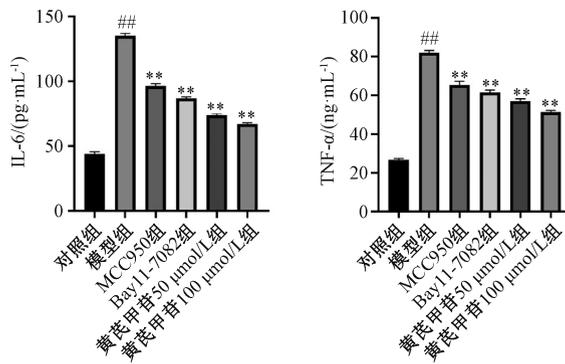
NLRP3蛋白表达降低（ $P < 0.01$ ），见图6。

4 讨论

野百合碱可引起肺动脉高压，单次腹腔注射可建立肺动脉高压动物模型。在细胞色素P-450（CYP3A4）的作用下，野百合碱在肝脏代谢为吡咯烷（野百合碱吡咯），选择性地损伤肺动脉内皮细胞，最终引起肺动脉高压^[9]。内皮细胞增殖和炎症参与了肺动脉高压疾病发展的进程^[10]。临床前研究和人体试验表明，炎症在肺动脉高压中发挥着重要作用。细胞炎症因子水平的升高与肺动脉高压患者不良预后有关^[11]，在肺动脉高压患者的血清中，TNF-α、IL-

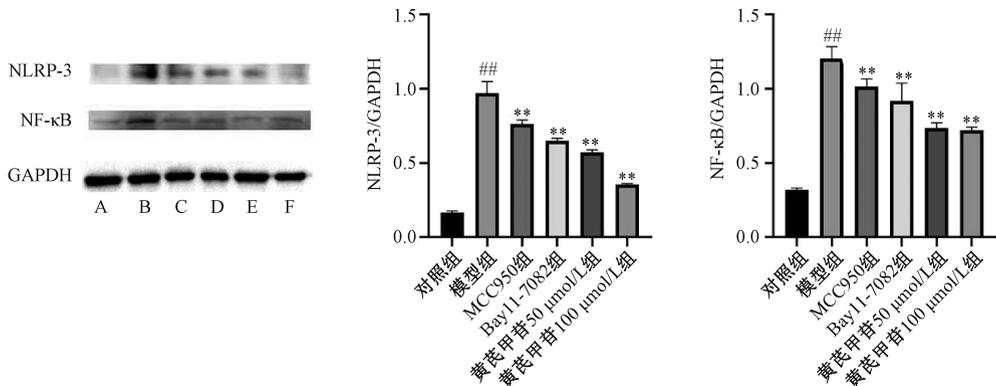
6水平升高^[12-13]；在肺动脉高压大鼠的肺组织中，NF-κB表达增加，而NF-κB的激活可能促进了该疾病的发展^[14]。NF-κB的活化能激活NLRP3炎性小体，并能诱导NLRP3和pro-IL-1β的转录^[13]，研究证实，NLRP3在肺动脉高压起着重要作用，参与了肺动脉高压的疾病发展^[15]。由此推测黄芪甲苷可能通过NF-κB/NLRP3信号通路来减轻肺动脉高压大鼠的炎症反应。

实验结果表明，黄芪甲苷组能够降低肺动脉高压大鼠右心室收缩压、平均肺动脉压和右心肥厚指数，改善肺动脉高压大鼠体质量降低情况，说明黄芪甲苷可以改善肺动



注：与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图5 黄芪甲苷对HPAECs细胞TNF- α 、IL-6水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



注：A为对照组，B为模型组，C为MCC950组，D为Bay11-7082组，E为黄芪甲苷组50 $\mu\text{mol/L}$ 组，F为黄芪甲苷组100 $\mu\text{mol/L}$ 组。与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图6 黄芪甲苷对HPAECs细胞NF- κ B/NLRP3信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

脉高血压大鼠血流动力学和生活质量。实验还发现，黄芪甲苷可以改善HPAECs细胞的增殖情况，下调肺动脉高压大鼠血清、肺组织和HPAECs细胞中IL-6、TNF- α 水平和NF- κ B、NLRP3表达，说明黄芪甲苷可在体内和体外减轻野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠或HPAECs细胞的炎症反应。进一步实验表明，与模型组比较，MCC950组和Bay11-7082组IL-6、TNF- α 水平和NF- κ B、NLRP3蛋白表达降低，提示MCC950和Bay11-7082能够减轻肺动脉高压大鼠和HPAECs细胞中的炎症反应，并且这种作用与黄芪甲苷类似。

综上所述，黄芪甲苷能够减轻肺动脉高压大鼠的炎症，其机制可能是通过NF- κ B/NLRP3信号通路发挥作用。

参考文献：

[1] Dai Z Y, Zhu M M, Peng Y, *et al.* Therapeutic targeting of vascular remodeling and right heart failure in pulmonary arterial hypertension with a HIF-2 α inhibitor[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198(11): 1423-1434.

[2] Hambly N, Alawfi F, Mehta S. Pulmonary hypertension; diagnostic approach and optimal management [J]. *Can Med Assoc J*, 2016, 188(11): 804-812.

[3] Bello-Klein A, Mancardi D, Araujo A S, *et al.* Role of redox homeostasis and inflammation in the pathogenesis of pulmonary

arterial hypertension [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(11): 1340-1351.

[4] Boxberger N, Hecker M, Zettl U K, *et al.* Dysregulation of inflammasome priming and activation by micromas in human immune-mediated diseases [J]. *Immunol*, 2019, 202(8): 2177-2187.

[5] Li Y, Yang L, Dong L, *et al.* Crosstalk between the Akt/mTORC1 and NF- κ B signaling pathways promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension by increasing DPP4 expression in PASMCs [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(10): 1322-1333.

[6] Li X X, Qu L, Dong Y Z, *et al.* A review of recent research progress on the astragalus genus [J]. *Molecules*, 2014, 19(11): 18850-18880.

[7] Tan Y Q, Chen H W, Li J. Astragaloside IV: An effective drug for the treatment of cardiovascular diseases [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3731-3746.

[8] Zhang X Z, Chen J, Xu P, *et al.* Protective effects of astragaloside IV against hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Medchemcomm*, 2018, 9(10): 1715-1721.

[9] Sun Y, Lu M L, Sun T, *et al.* Astragaloside IV attenuates inflammatory response mediated by NLRP-3/calpain-1 is involved in the development of pulmonary hypertension [J].

- J Cell Mol Med*, 2021, 25(1): 586-590.
- [10] Hudalla H, Michael Z, Christodoulou N, et al. Carbonic anhydrase inhibition ameliorates inflammation and experimental pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 61(4): 512-524.
- [11] Groth A, Vrugt B, Brock M, et al. Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension[J]. *Respir Res*, 2014, 16(15): 47.
- [12] Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, et al. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension[J]. *Circ Res*, 2014, 115(1): 165-175.
- [13] Li Y, Yang L, Dong L, et al. Crosstalk between the Akt/mTORC1 and NF- κ B signaling pathways promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension by increasing DPP4 expression in PASMCs [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(10): 1322-1333.
- [14] Fu Y, Wang Y, Du L Q, et al. Resveratrol inhibits ionising irradiation-induced inflammation in MSCs by activating SIRT1 and limiting NLRP-3 inflammasome activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7): 14105-14118.
- [15] Pasqua T, Pagliaro P, Rocca C, et al. Role of NLRP3 inflammasome in hypertension: A potential therapeutic target [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2018, 19(9): 708-714.

补虚解毒化痰方通过调控 NCC/HIF-1 α 信号通路对梗阻性肾病大鼠的作用

赵绮悦¹, 高晓萌¹, 刘令令¹, 刘子骞¹, 陈格格¹, 许庆友^{1,2,3*}

(1. 河北中医学院研究生学院, 河北 石家庄 050091; 2. 河北省中西医结合肝病证研究重点实验室, 河北 石家庄 050091; 3. 河北中医学院中西医结合学院, 河北 石家庄 050091)

摘要: 目的 探究补虚解毒化痰方对梗阻性肾病大鼠对侧肾脏肾小管上皮细胞表型转化的作用。方法 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组、依普利酮组和中药(补虚解毒化痰方)组, 采用单侧输尿管结扎法制备梗阻性肾病大鼠模型, 给予相应药物干预后, 采用 Masson 染色观察肾脏病理形态, Western blot、免疫组化和免疫荧光法检测血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶-1 (SGK-1)、钠氯协同转运蛋白 (NCC)、低氧诱导因子 (HIF-1 α)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、波形蛋白 (Vimentin)、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达, RT-qPCR 法检测 SGK-1、TGF- β 1 mRNA 表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠肾小管间质炎性细胞浸润和局灶性胶原纤维沉积增加 ($P < 0.01$), SGK-1、NCC、HIF-1 α 、TGF- β 1、Vimentin、 α -SMA 蛋白表达和 SGK-1、TGF- β 1 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 给予中药治疗后可改善以上指标 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 大鼠单侧输尿管梗阻可以上调对侧肾组织 NCC 表达, 刺激 HIF-1 α 表达并诱导小管上皮细胞表型转化, 而补虚解毒化痰方可调控 NCC/HIF-1 α 信号通路抑制细胞表型转化。

关键词: 补虚解毒化痰方; 梗阻性肾病; 单侧输尿管梗阻; 肾小管上皮细胞表型转化; 钠氯协同转运蛋白 (NCC); 低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)02-0582-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.02.043

目前, 梗阻性肾病在我国农村慢性肾脏病中发病率居首位^[1], 可表现为双侧或单侧梗阻, 单侧梗阻进展为肾衰竭与对侧肾脏的失代偿有关。既往研究表明, 单侧肾梗阻刺激醛固酮的过度分泌, 激活盐皮质激素受体介导另一侧肾损伤^[2], 课题组研究也发现肾小管上皮细胞-肌成纤维化转变也参与这一过程。肾小管上皮细胞表型转化与钠氯协同转运蛋白 (NCC) 的过表达、醛固酮诱导的组织缺血缺氧有关^[3-4], 低氧诱导因子刺激转化

生长因子- β 1 (TGF- β 1) 分泌增多会进一步诱导小管上皮细胞转化^[5]。

补虚解毒化痰方是本课题组多年来用于治疗慢性肾脏病的经验方, 前期研究已经证实该方具有改善梗阻性肾病对侧肾脏肾小球硬化, 减缓肾脏纤维化发生发展的作用^[6]。本实验旨在观察该方调控 NCC/HIF-1 α 信号通路对单侧输尿管梗阻大鼠对侧肾脏小管上皮细胞表型转化的作用, 以期为中医药防治慢性肾脏病提供新思路。

收稿日期: 2021-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81873251); 河北省科技计划资助项目 (20567624H); 河北中医学院科技能力提升项目 (3010105231005)

作者简介: 赵绮悦 (1995—), 女, 硕士生, 从事中西医结合治疗肾病研究。E-mail: 1207444358@qq.com

* 通信作者: 许庆友 (1958—), 男, 博士, 教授, 从事肾脏病纤维化机制研究。Tel: (0311) 89926298, E-mail: qingyouxu@sohu.com