

双氢青蒿素通过抑制炎症反应在血管重塑中的作用机制研究

李永章, 杨冰琦*, 高丽敏(河北省中医院, 石家庄 050011)

摘要: 目的 探究双氢青蒿素通过抑制炎症反应对血管重塑的抑制作用。方法 采用贴块法培养小鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs), 以 TNF- α 诱导建立体外平滑肌细胞增殖模型, 通过手术剥夺动脉方式建立小鼠股动脉损伤模型, 并采用双氢青蒿素干预细胞及股动脉损伤小鼠。采用 CCK-8 法检测细胞增殖; H&E 染色评价股动脉组织病理变化情况并测量中膜厚度; ELISA 法检测细胞中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCR8 及小鼠股动脉组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、TGF- β 1 的含量; 免疫组织化学法检测股动脉组织 NF- κ B p65、CCR8 表达; qRT-PCR 分析细胞及股动脉组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CCR8、NF- κ B p65、TGF- β 1、MCP-1 mRNA 表达; Western blotting 分析细胞及股动脉组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、CCR8、TGF- β 1、MCP-1 蛋白表达。结果 在 TNF- α 诱导的 VSMCs 增殖及股动脉损伤小鼠模型中, VSMCs 增殖及 TNF- α 、IL-6 含量明显升高, IL-1 β 、IL-6、IL-8 mRNA 表达明显升高, IL-6、CCR8、NF- κ B p65 蛋白表达明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 双氢青蒿素可明显降低 TNF- α 诱导的 VSMCs 中 IL-1 β 、IL-8 mRNA 及股动脉损伤小鼠 IL-1 β mRNA 表达和 IL-1 β 、p-NF- κ B p65 蛋白表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 双氢青蒿素能降低血管炎症, 延缓损伤血管的重塑, 表明其为经皮冠状动脉介入治疗(如支架植入)的潜在治疗药物。

关键词: 双氢青蒿素; 血管平滑肌细胞; 炎症反应; 血管重塑

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)09-1174-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.09.007

引用本文: 李永章, 杨冰琦, 高丽敏. 双氢青蒿素通过抑制炎症反应在血管重塑中的作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(9): 1174-1181.

Study on the Mechanism of Dihydroartemisinin in Vascular Remodeling by Inhibiting Inflammation

LI Yongzhang, YANG Bingqi*, GAO Limin(Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the inhibitory effect of dihydroartemisinin on vascular remodeling by inhibiting inflammation. **METHODS** The patch method was used to culture mouse vascular smooth muscle cells(VSMCs), an *in vitro* smooth muscle cell proliferation model was established by TNF- α induction, a mouse femoral artery injury model was established by surgical deprivation of the artery, and dihydroartemisinin was used to interfere with cell and femoral artery injury in mice. The cell proliferation was detected by CCK-8 method, the pathological changes of femoral artery was evaluated by H&E staining and the thickness of media was measured, and the contents of IL-1 β , TNF- α , IL-6, CCR8 in cells and IL-1 β , TNF- α , IL-6, TGF- β 1 in mouse femoral artery tissue were detected by ELISA method. The expression of NF- κ B p65 and CCR8 in femoral artery tissue was detected by immunohistochemical method, and the expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, CCR8, NF- κ B p65, TGF- β 1 and MCP-1 mRNA in cells and femoral artery tissue was analyzed by qRT-PCR. Western blotting was used to analyze the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, p-NF- κ B p65, NF- κ B p65, CCR8, TGF- β 1, MCP-1 protein in cells and femoral artery tissue. **RESULTS** In the models of TNF- α -induced VSMCs proliferation and femoral artery injury of mice, the proliferation of VSMCs, the content of TNF- α and IL-6, the expression of IL-1 β , IL-6, IL-8, NF- κ B p65 and TGF- β 1 mRNA were significantly increased, and the expression of IL-6, CCR8 and NF- κ B p65 protein was significantly increased($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Dihydroartemisinin could significantly reduce the expression of IL-1 β and IL-8 mRNA of VSMCs induced by TNF- α , and reduce the expression of IL-1 β mRNA and IL-1 β , p-NF- κ B p65 protein of femoral artery injury in mice($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSION** Dihydroartemisinin can reduce vascular inflammation and delay remodeling of injured vessels, indicating that dihydroartemisinin can be used as a potential therapeutic drug for percutaneous coronary intervention(such as stent implantation).

KEYWORDS: dihydroartemisinin; vascular smooth muscle cells; inflammatory response; vascular remodeling

经皮冠状动脉介入治疗通常用于治疗冠状动脉疾病。虽然药物洗脱支架和抗血小板治疗得到了广泛应用, 但支架再狭窄仍是一个主要的临床问题^[1]。病理上支架内再狭窄的特征是一系列事

件, 涉及血管炎症, 血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)迁移/增殖和细胞外基质沉积^[2]。血管损伤后, VSMCs 被诱导分泌促炎性细胞因子和趋化因子, 例如 TNF- α 、单核细

基金项目: 河北省中医药类科研计划课题(2020013); 河北中医学院 2019 年校内科技能力提升项目(KTY2019015)

作者简介: 李永章, 男, 副主任医师 E-mail: liyz@hebcm.edu.cn

*通信作者: 杨冰琦, 女, 主管护师 E-mail: hbszyangbingqi@163.com

胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)等, 这些细胞还表达细胞黏附分子, 例如血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule, VCAM)和细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM), 它们有助于炎症细胞的募集、迁移和分化^[3]。VSMCs 的这些变化是血管重塑相关疾病, 如高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等发生发展的基本细胞病理学基础^[4]。由于这种与炎症反应的密切联系, 已经提出了各种全身性抗炎方法来预防临床血管再狭窄。目前已上市多种防止血管再狭窄的药物, 包括抗凝、抗炎、抗细胞增殖和抗血小板等药物。但由于药物在血管内皮损伤局部药物浓度较低等原因, 导致仍然有约 5%~10% 的患者会发生血管再狭窄^[5]。因此, 有效抑制 VSMCs 的增殖成为防止血管再狭窄发生的重要途径。

青蒿素是一种从植物青蒿(黄花蒿叶)中分离出来的倍半萜烯内酯, 可用于治疗 20 多种疾病^[6]。双氢青蒿素是青蒿素的半合成衍生物, 除了其突出的抗疟疾作用外, 双氢青蒿素在抗炎^[7]、免疫调节^[8]、抑制肿瘤新生血管生成^[9]和抑制氧化应激^[10]中也起作用。据报道, 双氢青蒿素在治疗多种肿瘤^[11]、器官纤维化^[12]、自身免疫性甲状腺炎^[13]、关节炎^[14]、系统性红斑狼疮^[15]等方面均具有有益作用。本研究旨在探讨双氢青蒿素对血管重塑的潜在抑制作用, 并研究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

C57BL/6 小鼠 30 只, ♂, 10~12 周龄, 体重(25±2)g, 购自河北省中西医结合医药研究院, 生产许可证号: SCXK(冀)2020-001; 动物使用许可证号: SYXK(冀)2020-006; 伦理批号: HBZY2021-KY-136-02。小鼠置于温度和湿度可控制的环境中[(22±2)℃, 相对湿度 60%~70%], 光照/黑暗周期 12 h, 并予以充足的食料和洁净饮水。

1.2 试剂及仪器

双氢青蒿素(上海阿拉丁生化科技, 批号: D1613085); 胎牛血清(美国 HyClone, 批号: GMS12051.1); DMEM 培养基(Gibco BRL, 批号: 11966025); TNF- α (美国 Sigma, 批号: SRP3177); 苏木素染液(批号: C200301)、伊红染液(批号: C200403)购自珠海贝索生物; IL-1 β (货号: ZC-37974)、TNF- α (货号: ZC-37624)、IL-6(货号: ZC-36404)、CC 趋化因子受体 8(CC chemokine

receptor 8, CCR8, 货号: ZC-38780)、转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1, 货号: ZC-39043)ELISA 试剂盒均购自上海茁彩生物; 相关一抗 IL-1 β (货号: #12703)、IL-6(货号: #12912)、TNF- α (货号: #11948)、IL-8(货号: #376750)、磷酸化核转录因子- κ B p65(phosphorylated nuclear transcription factor- κ B p65, p-NF- κ B p65, 货号: #8242)、核转录因子- κ B p65(nuclear transcription factor- κ B p65, NF- κ B p65, 货号: #8242)、CCR8(货号: #12199)、TGF- β 1(货号: #84912)、MCP-1(货号: #81559)购自 CST; 生物素化山羊抗兔 IgG(H+L)(英国 Abcam, 货号: ab6721); RNA Trizol Reagent(合肥博美生物, 批号: vs18061730); TB GreenTM Premix Ex TaqTM II(宝日医生物, 货号: RR820A); 细胞裂解液(货号: P0013)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号: P0009)均购自 Beyotime; ECL 发光试剂盒(Affinity, 货号: KF001); Immobilon-PSQ PVDF 膜(Sigma Aldrich, 货号: ISEQ00010); CCK-8 试剂盒(深圳 Biosharp, 货号: BS350A); PBS 缓冲液干粉(上海远慕生物科技有限公司, 货号: 201201A17; 规格: 每袋 1 L)。

PIKORed 96 实时荧光定量(RT-PCR)仪、MK3 多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher); BMJ-A 型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂); BA210 Digital 数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司); JY-SCZ4+垂直电泳槽、JY200C 电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司); 5200 化学发光凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)。

1.3 细胞培养

健康小鼠 6 只, 戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉, 取小鼠的胸腹主动脉血管, 采用贴块法培养 VSMCs。VSMCs 置于含有胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37℃, 5% CO₂ 湿润条件下孵育, 取 5~8 代的 VSMCs 用于进一步试验。将同步静止期的 VSMCs 分为 PBS 组、TNF- α 组(100 μ g·L⁻¹)、PBS+双氢青蒿素组(200 μ mol·L⁻¹)、TNF- α (100 μ g·L⁻¹)+双氢青蒿素组(200 μ mol·L⁻¹)。TNF- α +双氢青蒿素组加入双氢青蒿素预处理 VSMCs 15 h 后, 加入终浓度为 100 μ g·L⁻¹ TNF- α 。不同处理组作用 24 h 后, 收集细胞。

1.4 小鼠股动脉损伤模型的建立及治疗

24 只小鼠适应性饲养 1 周后, 将小鼠随机分为假手术 I 组、股动脉损伤 I 组[造模后灌胃给予

PBS($10\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 假手术 II 组、股动脉损伤 II 组[造模后灌胃给予双氢青蒿素($10\text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)], 每组 6 只。造模方法: 通过腹膜注射 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 麻醉后固定小鼠于无菌玻璃板上, 并放置于手术显微镜下进行监测, 使用钝器解剖暴露股动脉, 用 5-0 尼龙缝线将动脉的远端环绕后, 在腹股沟韧带附近放置无血管钳, 通过动脉切开术将一根导丝(直径 0.38 mm)插入动脉腔, 以剥夺动脉。去除丝线后, 可恢复丝线缝合, 恢复血液流动, 撒上青霉素粉末, 并用 6-0 丝线缝合闭合皮肤切口, 术后将小鼠置于无菌热垫上苏醒后置入动物房单笼喂养。假手术组同法处理, 但不进行动脉剥夺。造模后连续给药 14 d。其中双氢青蒿素的给药剂量参考闫思超等^[16]的研究。

1.5 样本采集

通过吸入二氧化碳的方法将小鼠处死, 收集股动脉组织, 将股动脉组织分为 2 份, 一份用 4% 多聚甲醛固定, 用于后续病理分析; 剩余部分保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 用于后续 qRT-PCR 和 Western blotting 分析。

1.6 指标检测

1.6.1 CCK-8 检测细胞增殖 根据 CCK-8 说明书进行细胞增殖试验, 将细胞接种到 96 孔板中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\%\text{ CO}_2$ 条件下进行培养, 每 24 h 加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK-8 溶液与无血清培养基混合。孵育 2 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 的测试波长和 630 nm 的参考波长下检测吸光度, 重复 3 次。

1.6.2 HE 染色观察组织病理变化 将多聚甲醛固定的股动脉组织石蜡包埋, 连续切片, 厚度 $5\text{ }\mu\text{m}$, 用 HE 染色评价股动脉组织病理变情况。使用 Image Pro Plus 6.0 在每张切片上选取 10 个等距点分别测量中膜厚度, 并取得平均值。

1.6.3 ELISA 法检测细胞及股动脉组织炎症因子 按照 ELISA 试剂盒说明操作, 检测 VSMCs

细胞中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCR8 及小鼠股动脉组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、TGF- β 1 的含量, 重复 3 次。

1.6.4 免疫组织化学法检测股动脉组织 NF- κ B p65 CCR8 表达 股动脉组织切片脱蜡复水, 用 $3\%\text{ H}_2\text{O}_2$ 室温孵育 30 min, 滴加正常山羊血清后 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 滴加一抗[NF- κ B p65($1:1\text{ }000$)、CCR8($1:300$)] $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。然后用山羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶($1:200$)室温孵育 2 h。用 DAB 试剂显示阳性细胞, 苏木精复染、酒精盐酸分化、脱水、中性树胶封片, 显微镜观察, 并用 Image Pro Plus 6.0 软件对 NF- κ B p65、CCR8 进行定量分析, 重复 3 次。

1.6.5 qRT-PCR 检测股动脉中相关炎症因子 mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂盒按照制造商说明从细胞培养物和股动脉组织中提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 用 Takara TB Green™ PreMix Ex Taq™ 定量基因表达水平, 以 GAPDH 内参。qRT-PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 初始变性 10 min, 随后 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 45 个循环, 记录 CT 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 分析相对表达水平。试验重复 3 次, 引物序列见表 1。

1.6.6 Western blotting 分析细胞及股动脉组织中相关炎症蛋白表达 采用裂解缓冲液从细胞培养物和股动脉组织中提取蛋白质, 冰上孵育离心后, 收集上清液, 用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。然后, 将上清液与 SDS-PAGE 样品加载缓冲液混合, 并转移到 PVDF 膜上, 在 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h 后, 将膜与抗 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、CCR8、TGF- β 1、MCP-1($1:500$)或 β -actin($1:2\text{ }500$)的一抗在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。然后随后与辣根过氧化物酶偶联的二级抗体孵育($1:3\text{ }000$)室温孵育 1 h。使用化学发光检测试剂盒(ECL 试剂盒)暗室显色, 显色后的蛋白

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
IL-1 β	ATCCTCTCCAGTCAGGCTTCCTTGTG	AGCTCTTGTCGAGATGCTGCTGTGA
TNF- α	GCCTCAGCCTCTTCTCCTTCCTCCT	GGTTGTCTTCCAGCTTCACACCGTTG
IL-6	CACGAGGATACCCACAACAGACC	CGGAAGCTCCAGAAGACCAGAGCAGAT
IL-8	GGACCACACTGCGCCAACACAGAA	GGCAACCCTACAACAGACCCACACAA
CCR8	CTACGCCCTTTGTTGGTGAGAGGTTCC	GAGAGCATCAGCATTGCATGGAGAGT
NF- κ B p65	GCCAGCACCAAGACCGAAGCAATT	TACCGCCAGCAGCATCTTCACATCTC
TGF- β 1	GGACCGCAACAACGCCATTGAGA	TCTGGCACTGCTTCCCGAATGTCTGA
MCP-1	CCAGCCCAGAAACAGCCAACTCTC	GCCAGTGAATGAGAAGCAGCAGGTGA
GAPDH	GACTTATGACCACCGTCCACGCCATC	CGCTGCGCTCACCACCTTCTTGATCT

使用成像系统采集图像, Image Pro Plus 6.0 分析光密度, 以 β -actin 为内参, 对照组目标蛋白质相对含量为 1, 计算各组蛋白质的相对表达量, 重复 3 次。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件分析, 符合正态分布的试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据统计采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双氢青蒿素抑制由 TNF- α 促进的细胞炎症及增殖

与 PBS 组比较, TNF- α 组 TNF- α 、IL-6 含量明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 TNF- α 组比较, PBS+双氢青蒿素组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 含量明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); TNF- α +双氢青蒿素组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCR8 均降低, 但差异无统

计学意义, 结果见图 1A。

qRT-PCR 检测结果显示, 与 PBS 组比较, TNF- α 组 IL-1 β 、IL-6、IL-8、NF- κ B p65、TGF- β 1 mRNA 表达明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 TNF- α 组比较, PBS+双氢青蒿素组 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CCR8、NF- κ B p65、TGF- β 1 mRNA 表达明显降低($P < 0.01$); TNF- α +双氢青蒿素组 IL-1 β 、IL-8 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$), TNF- α 、IL-6、CCR8、NF- κ B p65、TGF- β 1 mRNA 表达降低, 但差异无统计学意义, 结果见图 1B。

CCK-8 检测细胞增殖结果显示, 与 PBS 组比较, TNF- α 组细胞增殖明显增加($P < 0.05$); 与 TNF- α 组比较, PBS+双氢青蒿素组和 TNF- α +双氢青蒿素组均抑制细胞增殖, 且 PBS+双氢青蒿素组差异具有统计学意义($P < 0.01$), 结果见图 1C。

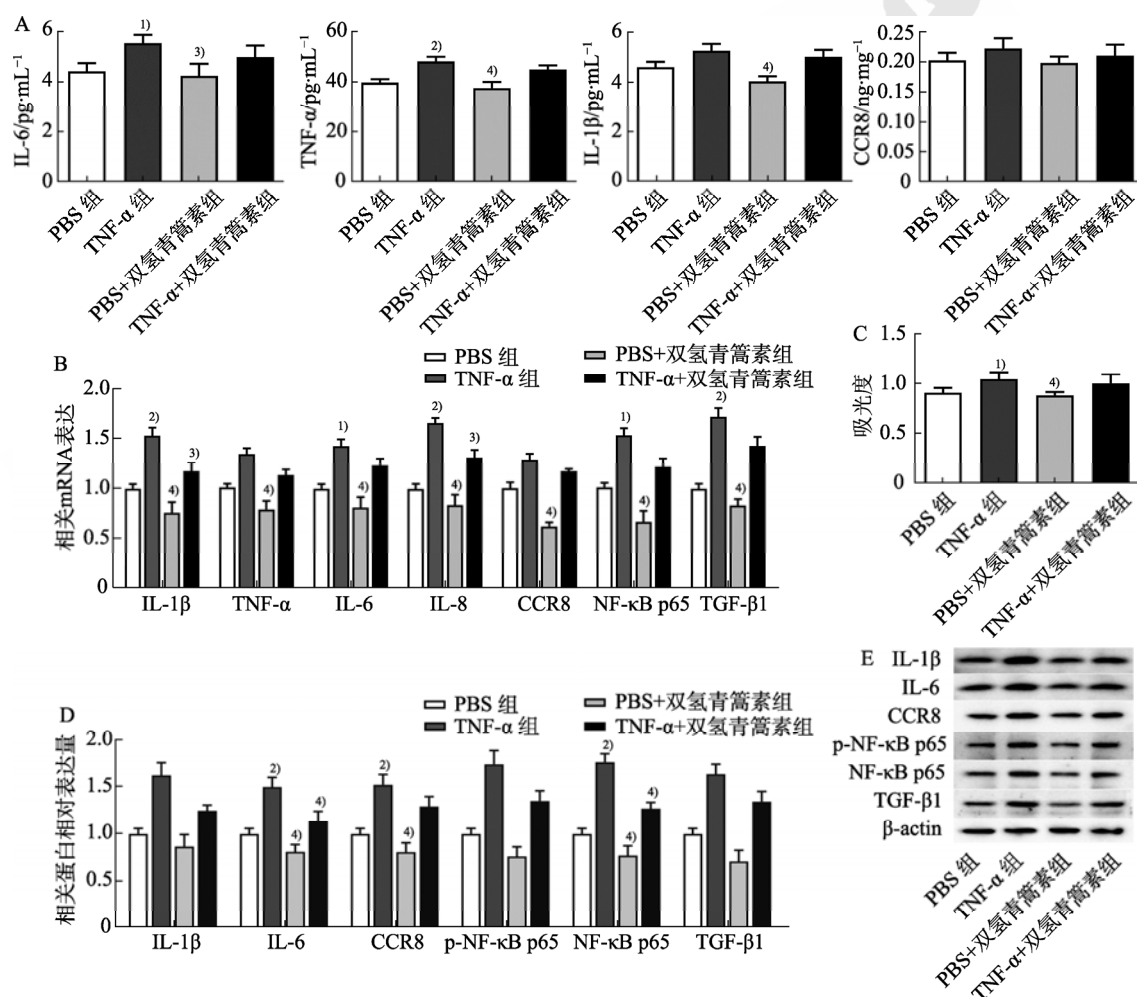


图 1 双氢青蒿素抑制由 TNF- α 促进的细胞炎症及增殖($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A-细胞 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、CCR8 含量; B-相关因子 mRNA 表达量; C-细胞增殖分析; D-相关因子蛋白相对表达量; E-蛋白表达条带; 与 PBS 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 TNF- α 组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Dihydroartemisinin inhibits cell inflammation and proliferation promoted by TNF- α ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A-contents of IL-6, TNF- α , IL-1 β and CCR8 in cells; B-mRNA expression levels of related factors; C-cell proliferation analysis; D-relative expression levels of related factor proteins; E-protein expression bands; compared with PBS group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with TNF- α group, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Western blotting 检测结果显示, 与 PBS 组比较, TNF- α 组 IL-6、CCR8、NF- κ B p65 蛋白表达明显升高($P<0.01$)。与 TNF- α 组比较, PBS+双氢青蒿素组 IL-6、CCR8、NF- κ B p65 蛋白表达明显降低($P<0.01$); TNF- α +双氢青蒿素组 IL-6、NF- κ B p65 蛋白表达明显降低($P<0.01$), IL-1 β 、CCR8、p-NF- κ B p65、TGF- β 1 蛋白表达降低, 但差异无统计学意义, 结果见图 1D~E。

2.2 双氢青蒿素对股动脉损伤后组织病理的影响

假手术 I 组: 股动脉组织内膜、中膜和外膜 3 层结构完整清晰, 未见明显坏死或炎细胞浸润。假手术 II 组: 内膜较薄, 仅可见单层、波浪状排列, 内皮细胞呈扁平状, 少量内皮细胞受损, 胞核固缩; 中膜层由弹性膜和平滑肌组成, 中膜层弹性膜相对紧密; 外膜层较厚, 未见明显坏死或炎细胞浸润。股动脉损伤 I 组: 股动脉组织内膜、中膜和外膜 3 层结构模糊。内膜层较多内皮细胞受损, 受损的内皮细胞脱落; 中膜层大量弹性纤维坏死, 胞核溶解脱落; 外膜层较厚, 结缔组织以胶原纤维为主, 可见少量的炎细胞浸润。股动

脉损伤 II 组: 股动脉组织内膜、中膜和外膜 3 层结构较完整。内膜层部分内皮细胞受损, 见受损的内皮细胞脱落于管腔; 中膜层较多的弹性纤维坏死, 胞核溶解脱落, 胶原纤维较少; 外膜层较厚, 未见明显坏死或炎细胞浸润。双氢青蒿素处理干预后中膜厚度增厚, 结果见图 2。

2.3 双氢青蒿素对股动脉损伤后 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、TGF- β 1 水平的影响

与假手术 I 组比较, 股动脉损伤 I 组可明显升高 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、TGF- β 1 水平($P<0.05$); 与股动脉损伤 I 组比较, 股动脉损伤 II 组可明显降低 TNF- α 、TGF- β 1 水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 降低 IL-1 β 、IL-6 水平, 但差异无统计学意义, 结果见表 2。

2.4 双氢青蒿素抑制股动脉损伤后炎症及血管重塑

qRT-PCR 检测结果显示, 与假手术 I 组比较, 股动脉损伤 I 组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8、CCR8 mRNA 表达明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与股动脉损伤 I 组比较, 股动脉损伤 II 组可明显降低

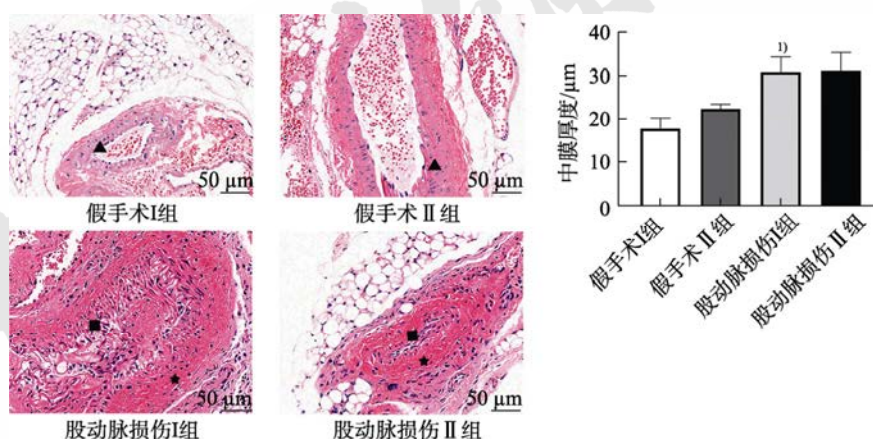


图 2 组织病理学观察($\bar{x} \pm s$, $n=6$, HE, 400 $\times$)

▲—中膜层; ★—中膜层弹性纤维坏死; ■—内皮细胞脱落; 与假手术 I 组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Histopathological observation($\bar{x} \pm s$, $n=6$, HE, 400 $\times$)

▲—Middle membrane layer; ★—elastic fiber necrosis of middle membrane layer; ■—endothelial cell shedding; compared with sham operation I group, ¹⁾ $P<0.05$.

表 2 股动脉组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、TGF- β 1 含量变化($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 2 Changes of the contents of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and TGF- β 1 in femoral artery tissue($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	IL-1 β /pg·mL ⁻¹	TNF- α /pg·mL ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹	TGF- β 1/ng·mL ⁻¹
假手术 I 组	10.50 $\pm$ 0.32	97.09 $\pm$ 5.35	13.24 $\pm$ 0.97	21.17 $\pm$ 0.50
假手术 II 组	9.71 $\pm$ 1.02	96.95 $\pm$ 2.99	11.89 $\pm$ 0.49 ¹⁾	20.61 $\pm$ 0.40
股动脉损伤 I 组	12.25 $\pm$ 0.52 ¹⁾	106.82 $\pm$ 3.68 ¹⁾	14.75 $\pm$ 0.47 ¹⁾	24.61 $\pm$ 1.21 ¹⁾
股动脉损伤 II 组	11.43 $\pm$ 0.93	99.18 $\pm$ 2.49 ²⁾	13.72 $\pm$ 0.57	22.24 $\pm$ 0.75 ³⁾

注: 与假手术 I 组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与股动脉损伤 I 组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with sham operation I group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the femoral artery injury I group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达($P<0.05$),降低 IL-6、IL-8、NF- κ B p65、CCR8、MCP-1 mRNA 表达,但差异无统计学意义。Western blotting 检测结果显示,与假手术 I 组比较,股动脉损伤 I 组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、CCR8、MCP-1 蛋白表达均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与股动脉损伤 I 组比较,股动脉损伤 II 组可明显降低 IL-1 β 、IL-8、CCR8、p-NF- κ B p65、MCP-1 蛋白表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$),降低 TNF- α 、IL-6、NF- κ B p65 蛋白表达,但差异无统计学意义,结果见图 3。

2.5 双氢青蒿素抑制股动脉损伤后 NF- κ B p65、CCR8 表达

免疫组织化学染色显示,股动脉损伤 I 组 NF- κ B p65、CCR8 核位置的细胞数量大大增加,双氢青蒿素处理明显阻断了 NF- κ B p65、CCR8 核定位。与假手术 I 组比较,股动脉损伤 I 组 NF- κ B p65、CCR8 蛋白表达明显更高($P<0.05$);与股动脉损伤 I 组比较,股动脉损伤 II 组可明显降低 NF- κ B p65、CCR8 蛋白表达($P<0.05$),结果见图 4。

3 讨论

双氢青蒿素是青蒿素的半合成衍生物,主要存在于中草药青蒿中^[6]。本研究结果显示,双氢青蒿素通过抑制炎症反应在防止损伤引起的血管重

塑中具有明显作用。从机制上讲,双氢青蒿素通过抑制 NF- κ B 的激活而抑制了损伤触发的炎症。此外,双氢青蒿素还抑制 VSMCs 的增殖。因此,双氢青蒿素可能代表经皮冠状动脉介入治疗的潜在疗法。血管损伤,如球囊血管成形术和支架置入术,可引起复杂的炎症反应,导致新内膜生长和管腔受损^[17]。血管重塑是血管腔狭窄和支架内再狭窄的重要病理过程,然而其机制尚未完全了解,内皮细胞的损伤启动血管重塑,而 VSMCs 表型参与血管新生内膜增生^[18]。研究显示,炎症是内皮细胞最常见的损伤之一,炎症因子会破坏内皮细胞的功能并导致细胞死亡^[19]。机械损伤还导致内皮层的破坏或剥落以及许多细胞黏附分子,特别是在再生内皮中的表达上调,如动物球囊损伤模型,P-选择素、ICAM 和 VCAM-1 均在血管系统中高度诱导,P-选择蛋白、ICAM-1 和 VCAM-1 的配体 PSGL-1、LFA-1 和 VLA-4 在中性粒细胞和单核细胞中高度表达^[20]。这些黏附分子和趋化因子受体的阻滞减弱了白细胞浸润并减少了损伤引起的血管重塑。VSMCs 被诱导分泌促炎性细胞因子和趋化因子,例如 TNF- α 、MCP-1 等^[3]。动脉损伤后 VSMCs 中趋化因子的产生上调,导致 T 细胞的局部募集^[21]。T 细胞募集对动脉伤口修复具有重要作用,趋化因子促进 T 细胞以渗出的方式

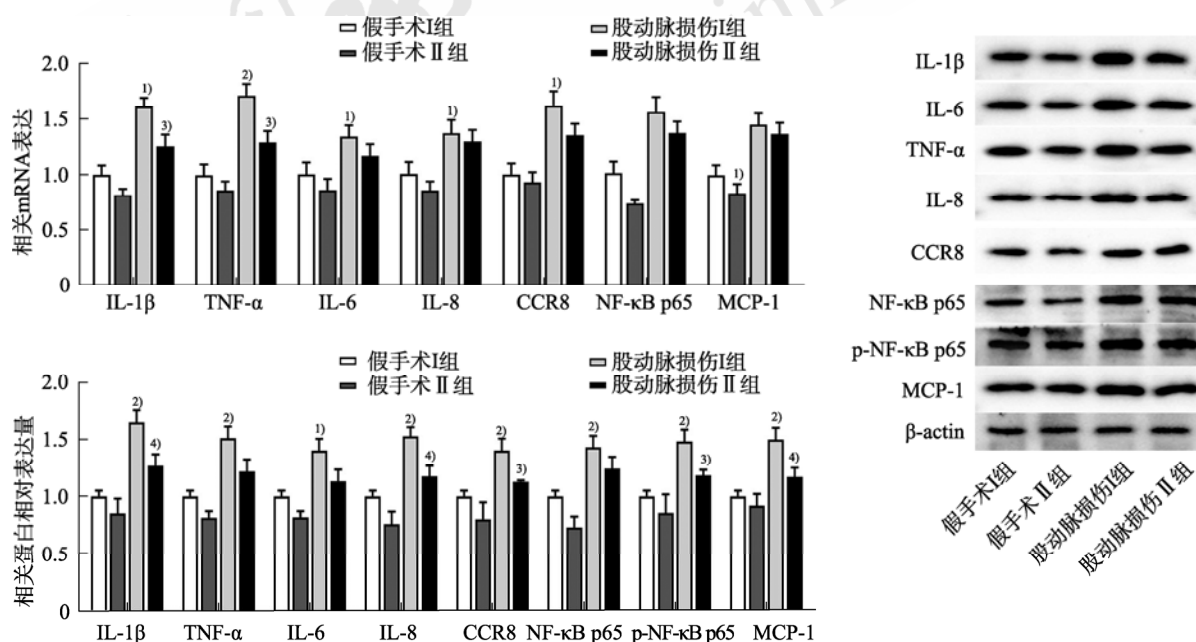


图3 双氢青蒿素抑制股动脉损伤后炎症及血管重塑($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

与假手术 I 组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与股动脉损伤 I 组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Dihydroartemisinin inhibits inflammation and vascular remodeling after femoral artery injury($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with sham operation I group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the femoral artery injury I group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

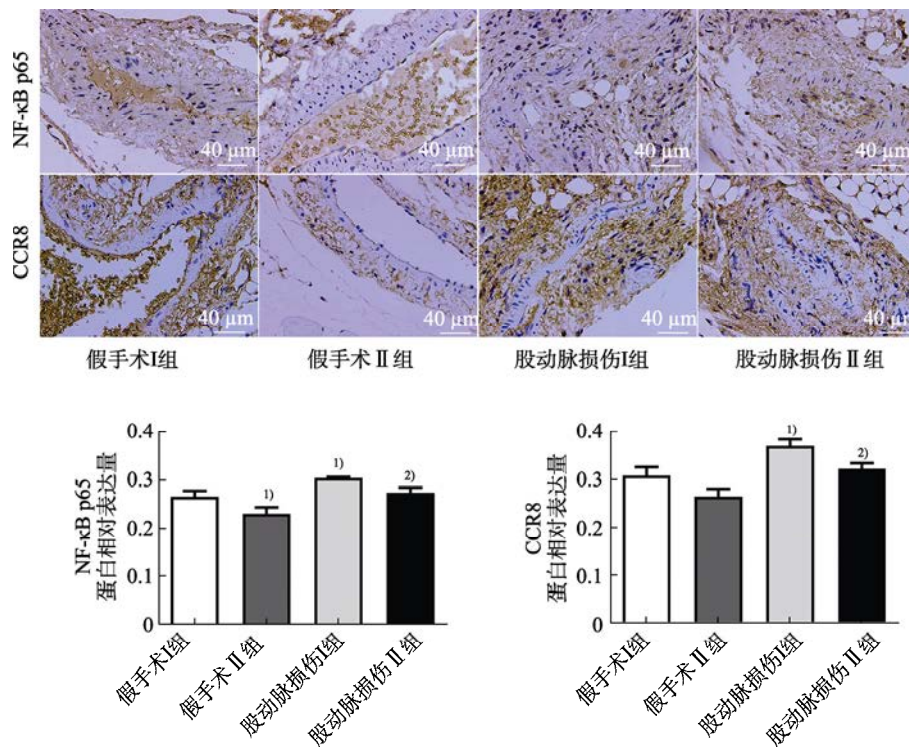


图4 双氢青蒿素抑制股动脉损伤后 NF-κB p65、CCR8 表达($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ICH)

与假手术 I 组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与股动脉损伤 I 组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Dihydroartemisinin inhibits the expression of NF-κB p65 and CCR8 after femoral artery injury($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ICH)

Compared with sham operation I group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the femoral artery injury I group, ²⁾ $P<0.05$.

透过内皮细胞层进入内皮下, 参与炎症反应, 而 IL-6 则可刺激这一炎症反应中所有相关急性期蛋白的合成并可对内皮细胞及脉管系统的其他组分产生影响^[22]。提示 MCP-1、TNF- α 、IL-6 等炎症因子在动脉损伤的发生发展过程中起着重要的作用。与既往的研究一致, 本研究结果显示, TNF- α 诱导后, VSMCs 可大量表达 TNF- α , 股动脉损伤小鼠 MCP-1 蛋白表达明显升高, 双氢青蒿素可减少受损后 TNF- α 、MCP-1 的表达, 此外, 双氢青蒿素可降低股动脉损伤小鼠 CCR8 蛋白表达, 说明双氢青蒿素在股动脉损伤后抑制炎症反应。

研究报道 VSMCs 从介质向内膜的增殖至迁移, 是损伤后动脉狭窄的最终结果^[23]。先前的体内实验表明, Resolvin E1 可以逆转 TNF- α 和 IL-6 预处理的人肺动脉和培养的人隐静脉平滑肌细胞中收缩率和 VSMCs 的增殖^[24]。与本研究结果一致, 表明双氢青蒿素可减轻损伤后动脉狭窄。内皮损伤启动血管重塑, 而损伤通过激活特定通路(如 NF-κB)等参与炎症反应, 抑制 NF-κB 激活可降低 IL-1 β 和 IL-8 的表达水平, 从而共同阻断单核细胞-内皮细胞的相互作用, 进而抑制血管重塑^[25]。另一方面, NF-κB 通路被认为是 NLRP3 炎性小体

活化的基础, 可激发炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 的产生, 在免疫和炎症中起着至关重要的作用^[26-27]。此外, 研究显示与动脉粥样硬化模型小鼠相比, 长期给予青蒿素可导致 AMPK 磷酸化增加, 进而减少 NF-κB 的激活^[28]。本研究结果显示, 股动脉损伤小鼠和 TNF- α 诱导引起了 NF-κB 激活及其下游炎症因子表达的明显变化, 双氢青蒿素干预后 NF-κB 的激活及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 的表达被抑制。因此, 本研究初步认为双氢青蒿素是通过抑制炎症反应对血管重塑具有潜在抑制作用, 且可能是通过 NF-κB 途径实现的。

综上所述, 双氢青蒿素抑制炎症反应和 VSMCs 增殖来减轻对损伤的新内膜形成。鉴于双氢青蒿素具有多种保护作用, 双氢青蒿素可作为将来预防支架内再狭窄的可行药物。

REFERENCES

- [1] HU X X, HAN S F, LI Q M, et al. Effect of recombinant human brain natriuretic peptide combined with irbesartan on patients with myocardial infarction after PCI and the effects on HCY, IMA and lp-PLA2[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(22): 2848-2852.

- [2] SUNA G, WOJAKOWSKI W, LYNCH M, et al. Extracellular matrix proteomics reveals interplay of aggrecan and aggrecanases in vascular remodeling of stented coronary arteries[J]. *Circulation*, 2018, 137(2): 166-183.
- [3] YONEDA S, ABE S, KANAYA T, et al. Late-phase inflammatory response as a feature of in-stent restenosis after drug-eluting stent implantation[J]. *Coron Artery Dis*, 2013, 24(5): 368-373.
- [4] SMIRNOVA N F, GAYRAL S, PEDROS C, et al. Targeting PI3K γ activity decreases vascular trauma-induced intimal hyperplasia through modulation of the Th1 response[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(9): 1779-1792.
- [5] HABIB A, FINN A V. Antiproliferative drugs for restenosis prevention[J]. *Interv Cardiol Clin*, 2016, 5(3): 321-329.
- [6] KLAYMAN D L. Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China[J]. *Science*, 1985, 228(4703): 1049-1055.
- [7] YIN J, XIA W, ZHANG Y, et al. Role of dihydroartemisinin in regulating prostaglandin E₂ synthesis cascade and inflammation in endothelial cells[J]. *Heart Vessels*, 2018, 33(11): 1411-1422.
- [8] ZHAO Y G, WANG Y, GUO Z, et al. Dihydroartemisinin ameliorates inflammatory disease by its reciprocal effects on Th and regulatory T cell function via modulating the mammalian target of rapamycin pathway[J]. *J Immunol*, 2012, 189(9): 4417-4425.
- [9] WANG W, SHENG Q S. The research on the anti-angiogenic activity of dihydroartemisinin contained serum[J]. *J Tradit Chin Med(中国中医基础医学杂志)*, 2017, 23(11): 1635-1638.
- [10] YANG D X, QIU J, ZHOU H H, et al. Dihydroartemisinin alleviates oxidative stress in bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Life Sci*, 2018(205): 176-183.
- [11] LIU Y, GAO S, ZHU J, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer via inhibition of the hedgehog signaling pathway[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(11): 5704-5715.
- [12] ZHANG Z, YAO Z, ZHAO S, et al. Interaction between autophagy and senescence is required for dihydroartemisinin to alleviate liver fibrosis[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6): e2886.
- [13] LIU H, TIAN Q, AI X, et al. Dihydroartemisinin attenuates autoimmune thyroiditis by inhibiting the CXCR3/PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 115028-115040.
- [14] FAN M, LI Y, YAO C, et al. Dihydroartemisinin derivative DC32 attenuates collagen-induced arthritis in mice by restoring the Treg/Th17 balance and inhibiting synovitis through down-regulation of IL-6[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018(65): 233-243.
- [15] HUANG X Q, XIE Z J, LIU F F, et al. Dihydroartemisinin inhibits activation of the Toll-like receptor 4 signaling pathway and production of type I interferon in spleen cells from lupus-prone MRL/lpr mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22(1): 266-272.
- [16] YAN S C. Study on the mechanism of dihydroartemisinin for modulating Th/treg balance in mouse models of inflammatory bowel disease[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2019.
- [17] AIZIK G, GRAD E, GOLOMB G. Monocyte-mediated drug delivery systems for the treatment of cardiovascular diseases[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2018, 8(4): 868-882.
- [18] YIN J, XIA W, LI Y, et al. COX-2 mediates PM2.5-induced apoptosis and inflammation in vascular endothelial cells[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(9): 3967-3976.
- [19] WU Y J, SU J, HUANG P J, et al. Buddleioside prevents TNF- α -induced human aortic endothelial cells inflammatory injury through inhibiting TLR4/I κ B α /NF- κ B signaling pathway[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2017, 34(5): 637-643.
- [20] YE Z, ZHONG L, ZHU S, et al. The P-selectin and PSGL-1 axis accelerates atherosclerosis via activation of dendritic cells by the TLR4 signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 507.
- [21] ZHAO J, NISHIMURA Y, KIMURA A, et al. Chemokines protect vascular smooth muscle cells from cell death induced by cyclic mechanical stretch[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16128.
- [22] WEI Q, JIN Q X, JIN L B, et al. Dihydroartemisinin alleviates psoriasis-like skin inflammation in mice by inhibiting proliferation of keratinocytes and expression of pro-inflammatory cytokines[J]. *Chin J Immunol(中国免疫学杂志)*, 2020, 36(5): 543-548.
- [23] DURHAM A L, SPEER M Y, SCATENA M, et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: Implications in atherosclerosis and arterial stiffness[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 590-600.
- [24] JAMINON A, REESINK K, KROON A, et al. The role of vascular smooth muscle cells in arterial remodeling: Focus on calcification-related processes[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5694.
- [25] HAN S, XU S, ZHOU J, et al. Sam68 impedes the recovery of arterial injury by augmenting inflammatory response[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019(137): 82-92.
- [26] HIRAM R, RIZCALLAH E, MAROUAN S, et al. Resolvin E1 normalizes contractility, Ca²⁺sensitivity and smooth muscle cell migration rate in TNF- α -and IL-6-pretreated human pulmonary arteries[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(8): L776-L788.
- [27] JIANG Y, DU H, LIU X, et al. Artemisinin alleviates atherosclerotic lesion by reducing macrophage inflammation via regulation of AMPK/NF- κ B/NLRP3 inflammasomes pathway[J]. *J Drug Target*, 2020, 28(1): 70-79.
- [28] WANG K S, LI J, WANG Z, et al. Artemisinin inhibits inflammatory response via regulating NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2017, 39(1): 28-36.

收稿日期: 2021-04-25
(本文责编: 陈怡心)