

本文引用: 熊夷, 易琼, 王壮雄, 邓丽敏, 杨璐琪, 彭筱平. 祛风化痰稳斑汤抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路调控 VSMC 焦亡的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(7): 1365-1378.

祛风化痰稳斑汤抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路调控 VSMC 焦亡的机制研究

熊夷¹, 易琼², 王壮雄¹, 邓丽敏³, 杨璐琪⁴, 彭筱平^{3*}

1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;
3.湖南中医药高等专科学校第一附属医院,湖南 株洲 412000;4.丰城市中医院,江西 丰城 331100

〔摘要〕目的 在“从风论治”的中医治疗原则指导下,探讨祛风化痰稳斑汤能否通过抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3)半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)/消皮素 D(GSDMD)信号通路调控血管平滑肌细胞(VSMC)焦亡。**方法** 将 56 只新西兰兔随机分为空白组(8 只)和造模组(48 只),造模组采用高脂饮食联合牛血清白蛋白(125 mg·kg⁻¹,每天 1 次,共 3 次)、卵清白蛋白(每次 2.5 mg·kg⁻¹,每 2 天 1 次,共 5 次)注射建立动脉粥样硬化(AS)模型。造模成功后,将 48 只造模动物均分为 6 组(每组 8 只):模型组、祛风化痰稳斑汤低剂量组(5.8 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃)、祛风化痰稳斑汤中剂量组(11.6 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃)、祛风化痰稳斑汤高剂量组(23.2 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃)、阿托伐他汀钙组(1.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃)、NLRP3 抑制剂组(MCC950 首剂 31.2 mg·kg⁻¹,后续每 2 天 1 次,每次 1.5 mg·kg⁻¹腹腔注射)。空白组与模型组灌服等体积 0.9%氯化钠注射液,共干预 8 周。体外培养兔颈动脉 VSMC,设置 5 组干预:空白组以正常 DMEM 完全培养基培养 24 h;其余 4 组均采用 200 μg·mL⁻¹氧化型低密度脂蛋白(OX-LDL)处理 24 h,构建 AS 斑块 VSMC 损伤模型,在此基础上分别施加对应干预:模型组不额外给药,祛风化痰稳斑汤含药血清组加入 20%浓度的祛风化痰稳斑汤高剂量含药血清,NLRP3 激动剂组加入 1 μmol/L BMS-986299,NLRP3 抑制剂组加入 1 μmol/L MCC950。HE 染色、天狼星红染色观察主动脉组织病理形态学变化;免疫组织化学、油红 O 染色及天狼星红染色计算斑块易损指数(VI);透射电镜观察 VSMC 焦亡相关形态改变;ELISA 测定主动脉组织和 VSMC 中 I 型胶原蛋白(COL I)、Ⅲ型胶原蛋白(COL Ⅲ)表达水平及 COL I/COL Ⅲ的比值;Western Blot 检测主动脉组织和 VSMC 中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、白细胞介素(IL)-1β、IL-18、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)蛋白表达水平;qRT-PCR 检测主动脉组织和 VSMC 中 Caspase-1、IL-1β、IL-18 的 mRNA 表达水平。**结果** 体内实验结果显示,与空白组比较,模型组 VI 和 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、IL-18、ASC 蛋白表达水平以及 Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$),COL I 表达水平、COL I/COL Ⅲ比值均降低($P<0.05$)。与模型组比较,祛风化痰稳斑汤低、中、高剂量组和阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 VI 和 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 及 ASC 蛋白表达水平以及 IL-1β、IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$),祛风化痰稳斑汤中、高剂量组及 NLRP3 抑制剂组 GSDMD-N 蛋白表达水平均降低($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤中、高剂量组和阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 Caspase-1 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤低、中、高剂量组和阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平、COL I/COL Ⅲ比值均升高($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤中剂量组 COL Ⅲ表达水平降低($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤低剂量组比较,祛风化痰稳斑汤中、高剂量组和阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 VI 和 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、ASC 蛋白表达水平以及 Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤中、高剂量组、NLRP3 抑制剂组 GSDMD-N 蛋白表达水平均降低($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤中、高剂量组和阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平、COL I/COL Ⅲ均升高($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤中剂量组 COL Ⅲ表达水平降低($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤中剂量组比较,祛风化痰稳斑汤高剂量组、阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 VI 和 Caspase-1、IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);NLRP3 抑制剂组 Caspase-1、GSDMD-N、IL-1β 蛋白表达水平和 IL-1β mRNA 表达水平均降低($P<0.05$),COL I 表达水平升高($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤高剂量组比较,阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 VI、IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);NLRP3 抑制剂组 Caspase-1、GSDMD-N、ASC 蛋白表达水平和 IL-1β mRNA 表达水平均降低($P<0.05$),COL I 表达水平升高($P<0.05$)。与阿托伐他汀钙组比较,NLRP3 抑制剂组 VI 和 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、ASC 蛋白表达水平以及 IL-1β、Caspase-1 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$),COL I 表达水平、COL I/COL Ⅲ比值

〔收稿日期〕2026-03-16

〔基金项目〕湖南省中医药科研计划项目(A2023028);湖南省自然科学基金项目(2023JJ60045);湖南省“十四五”第一批中医药学科带头人项目(湘中医药函〔2022〕4 号)。

〔通信作者〕*彭筱平,男,硕士,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:hnzpxp@126.com。

均升高($P<0.05$)。体外结果显示,与空白组比较,模型组 COL I 表达水平、COL I /COL III 比值均降低($P<0.05$),COL III 表达水平和 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平以及 Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与模型组比较,祛风化痰稳斑汤含药血清组、NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平及 COL I /COL III 比值均升高($P<0.05$),COL III 表达水平和 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平以及 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);NLRP3 激动剂组 COL I 表达水平及 COL I /COL III 比值均降低($P<0.05$),COL III 表达水平和 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平以及 Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤含药血清组比较,NLRP3 激动剂组 COL I 表达水平及 COL I /COL III 比值均降低($P<0.05$),COL III 表达水平和 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平以及 Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与 NLRP3 激动剂组比较,NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平、COL I /COL III 比值均升高($P<0.05$),COL III 表达水平和 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平以及 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。结论 祛风化痰稳斑汤可能通过调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路抑制 VSMC 焦亡,为“从风论治”干预 AS 斑块形成提供了实验依据,其具体活性成分及直接靶点有待进一步阐明。

[关键词] 祛风化痰稳斑汤;动脉粥样硬化;NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路;细胞焦亡;从风论治

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.07.007

Mechanism investigation of Qufeng Huatan Wenban Decoction in regulating VSMC pyroptosis by inhibiting the NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway

XIONG Yi¹, YI Qiong², WANG Zhuangxiong¹, DENG Limin³, YANG Luqi⁴, PENG Xiaoping^{3*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007 Hunan, China; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou, Hunan 412000, China; 4. Fengcheng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fengcheng, Jiangxi 331100, China

[Abstract] **Objective** Guided by the Chinese medicine (TCM) therapeutic principle of "treating from wind", to investigate whether Qufeng Huatan Wenban Decoction (QHWD) could regulate vascular smooth muscle cell (VSMC) pyroptosis by suppressing the NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3)/Cysteine-aspartic acid protease-1 (Caspase-1)/gasdermin D (GSDMD) signaling pathway. **Methods** Fifty-six New Zealand rabbits were randomly divided into blank group ($n=8$) and model group ($n=48$). In the model group, an atherosclerosis (AS) model was established by a high-fat diet combined with injection of bovine serum albumin ($125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, once daily, 3 doses in total) and ovalbumin ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ per dose, once every 2 days, 5 doses in total). After successful modeling, the 48 modeled rabbits were equally divided into six groups ($n=8$): the model group; the low-, medium-, and high-dose QHWD groups ($5.8, 11.6$, and $23.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ by gavage, respectively); the atorvastatin calcium group ($1.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ by gavage); and the NLRP3 inhibitor group [MCC950, an initial dose of $31.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ followed by $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ per dose, injected intraperitoneally once every 2 days]. The blank group and the model group were given an equal volume of 0.9% sodium chloride injection by gavage, and the intervention lasted for 8 weeks. Rabbit carotid artery VSMCs were cultured in vitro with five intervention settings: the blank group was cultured in normal DMEM complete medium for 24 h; the other four groups were all treated with $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ oxidized low-density lipoprotein (OX-LDL) for 24 h to establish an AS plaque VSMC injury model, on the basis of which the corresponding interventions were applied: the model group received no additional drug treatment, the QHWD drug-containing serum groups were supplemented with high-dose QHWD-containing serum at a concentration of 20%, the NLRP3 agonist group was supplemented with $1 \mu\text{mol/L}$ BMS-986299, and the NLRP3 inhibitor group was supplemented with $1 \mu\text{mol/L}$ MCC950. HE staining and Sirius red staining were performed to observe the histopathological and morphological changes of the aortic tissues; immunohistochemistry, Oil Red O staining, and Sirius red staining were used to calculate the plaque vulnerability index (VI); transmission electron microscopy was used to observe the pyroptosis-related morphological changes of VSMCs; ELISA was used to determine the expression levels of collagen types I and III (COL I and COL III) and the COL I /COL III ratio in the aortic tissues and VSMCs; Western blot was used to test the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, interleukin (IL)-1 β , IL-18, and apoptosis-associated speck-like protein (ASC) in the

aortic tissues and VSMCs; and qRT-PCR was used to measure the mRNA expression levels of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 in the aortic tissues and VSMCs. **Results** The in vivo results showed that, compared with the blank group, the model group showed elevated VI, protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18, and ASC, as well as mRNA expression levels of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.05$); conversely, expression level of COL I and the COL I/COL III ratio were reduced ($P<0.05$). Compared with the model group, the low-, medium-, and high-dose QHWD groups, the atorvastatin calcium group, and the NLRP3 inhibitor group showed attenuated VI, protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , IL-18, and ASC, as well as mRNA expression levels of IL-1 β and IL-18 ($P<0.05$); the GSDMD-N protein expression level was downregulated in the medium- and high-dose QHWD groups and the NLRP3 inhibitor group ($P<0.05$); the Caspase-1 mRNA expression level was decreased in the medium- and high-dose QHWD groups, atorvastatin calcium group, and NLRP3 inhibitor group ($P<0.05$); expression level of COL I and the COL I/COL III ratio were upregulated in the low-, medium-, and high-dose QHWD groups, atorvastatin calcium group, and NLRP3 inhibitor group ($P<0.05$); the expression level of COL III in the medium-dose QHWD group was reduced ($P<0.05$). Compared with the low-dose QHWD group, the medium- and high-dose QHWD groups, atorvastatin calcium group, and NLRP3 inhibitor group exhibited lower VI, protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , and ASC as well as mRNA expression levels of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.05$); the GSDMD-N protein expression level was decreased in the medium- and high-dose QHWD groups and the NLRP3 inhibitor group ($P<0.05$); expression level of COL I and the COL I/COL III ratio were elevated in the medium- and high-dose QHWD groups and the NLRP3 inhibitor group ($P<0.05$), while expression level of COL III was dropped in the medium-dose QHWD group ($P<0.05$). Compared with the medium-dose QHWD group, the high-dose QHWD group, the atorvastatin calcium group, and the NLRP3 inhibitor group showed decreased VI and mRNA expression levels of Caspase-1 and IL-18 ($P<0.05$); the NLRP3 inhibitor group showed reduced protein expression levels of Caspase-1, GSDMD-N, and IL-1 β and mRNA expression level of IL-1 β ($P<0.05$), as well as increased expression level of COL I ($P<0.05$). Compared with the high-dose QHWD group, the atorvastatin calcium group and the NLRP3 inhibitor group showed downregulated VI and mRNA expression level of IL-18 ($P<0.05$); the NLRP3 inhibitor group demonstrated decreased protein expression levels of Caspase-1, GSDMD-N, and ASC and mRNA expression level of IL-1 β ($P<0.05$); the expression level of COL I was improved ($P<0.05$). Compared with the atorvastatin calcium group, the NLRP3 inhibitor group showed reduced VI, protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , and ASC, as well as mRNA expression levels of IL-1 β and Caspase-1 ($P<0.05$), together with high expression level of COL I and COL I/COL III ratio ($P<0.05$). The in vitro results showed that, compared with the blank group, the model group showed decreased expression of COL I and COL I/COL III ratio ($P<0.05$), together with increased expression of COL III, protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18, and ASC as well as mRNA expression levels of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.05$). Compared with the model group, the QHWD drug-containing serum group and the NLRP3 inhibitor group exhibited elevated expression of COL I and COL I/COL III ratio ($P<0.05$), and decreased expression of COL III, protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18, and ASC, as well as mRNA expression levels of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.05$); the NLRP3 agonist group showed decreased expression of COL I and COL I/COL III ratio ($P<0.05$), and enhanced expression of COL III, protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18, and ASC, as well as mRNA expression levels of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.05$). Compared with the QHWD drug-containing serum group, the NLRP3 agonist group showed decreased expression of COL I and COL I/COL III ratio ($P<0.05$), together with increased expression of COL III, protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18, and ASC, as well as mRNA expression levels of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.05$). Compared with the NLRP3 agonist group, the NLRP3 inhibitor group showed increased expression of COL I and COL I/COL III ratio ($P<0.05$), and decreased expression of COL III, protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18, and ASC, as well as mRNA expression levels of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 ($P<0.05$). **Conclusion** QHWD may inhibit VSMC pyroptosis by regulating the NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway, which provides an experimental basis for the intervention of AS plaque formation based on the principle of "treating from wind"; its specific active components and direct targets remain to be further elucidated.

[**Keywords**] atherosclerosis; Qufeng Huatan Wenban Decoction; NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway; pyroptosis; treating from wind

《中国心血管健康与疾病报告 2023》^[1]指出,我国心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)患病率处于持续上升阶段,根据患病率推算,CVD 患病人数为 3.3 亿,其中脑卒中 1 300 万,冠心病 1 139 万,在 CVD 患病总人数中占比分别为第一和第二。而针对脑卒中和冠心病的治疗,关键在于防治易损斑块(vulnerable plaque, VP)的破裂出血,进而防止急性缺血性卒中和急性心肌梗死的发生。研究表明,VP 发生与进展的核心机制包括斑块纤维帽变薄、脂质核心增大、炎症细胞浸润及血管钙化等^[2]。细胞焦亡是一种程序性细胞死亡方式,NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteine-aspartic acid protease-1, Caspase-1)/消皮素 D(gasdermin D, GSDMD)信号通路是经典的焦亡通路,参与了细胞焦亡的过程,其中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的焦亡与 VP 破裂密切相关^[3-4]。

风为百病之长,风邪入络,夹瘀血、痰湿等形成痹阻于心脉的有形实邪,继而就会出现斑块;风邪游走不定,易导致斑块破裂。祛风化痰稳斑汤由苓桂术甘汤加多味祛风药组成,胡晋婷等^[5]研究表明祛风类中药在巨噬细胞焦亡模型中表现出抗炎及细胞保护作用,而苓桂术甘汤是治疗痰饮的经典方剂,二者合用可共奏祛风化痰、健脾利湿之功。基于此,本研究以“从风论治”为理论指导,初步观察祛风化痰稳斑汤对兔动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)模型 VSMC 焦亡及 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路的影响,旨在从细胞焦亡角度为“风邪致病”的现代生物学内涵提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

56 只 10~12 周龄普通级新西兰兔,雄性,体重 2.50~3.00 kg,购自湖南太平生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2020-0005,饲养于湖南中医药大学动物实验中心,合格证号:SYXK(湘)2019-0009。每只分笼圈养,饲养温度 20~25 ℃,湿度 50%~70%,自由进食及饮水。兔实验用高脂饲料由湖南中医药大学动物实验中心加工。本实验已通过湖南中医药大学动物实验伦理委员会标准审查(伦理编号:HWUCM21-2309-40)。

1.2 实验试剂与药物

卵清白蛋白、牛血清白蛋白、伊红染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号:3231008002、A8020、G1100);MCC950 钠盐(NLRP3 炎症小体抑制剂,美国 GlpBio 科技有限公司,批号:GC10634);BMS-986299(NLRP3 激动剂,美国 MedChemExpress 有限公司,批号:A1545168);苏木素染液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZLI-9610);天狼星红染色液(北京金克隆生物技术有限公司,批号:RS1220);饱和油红 O 染液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G1015、GB23303、GB23301);兔 I 型胶原蛋白(collagen type I, COL I)、兔 III 型胶原蛋白(collagen type III, COL III)ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号:MM-031501、MM-032001);氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, OX-LDL)(上海奕元生物科技有限公司,批号:YB-002-2 mg);RIPA 细胞裂解液(北京普利莱基因技术有限公司,批号:C1053);BCA 蛋白定量试剂盒、增强型细胞活力检测试剂盒、免疫荧光染色试剂盒-抗兔[伊莱瑞特(武汉)生物科技有限公司,货号:E-BC-K318-M、E-CK-A362、FITCE-IR-R323];超纯 RNA 提取试剂盒(康为世纪科技股份有限公司,批号:CW0581M);DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素)(江苏凯基生物股份有限公司,批号:KGM12800S);PVDF 膜(美国默克密理博公司,批号:IPVH00010);超敏发光液(美国赛默飞公司,批号:RJ239676);反转录试剂盒、RT-qPCR 试剂盒(苏州近岸蛋白质科技股份有限公司,批号:E047-01B、E099-01A);阿托伐他汀钙片(辉瑞制药有限公司,批号:15837052,国药准字:H20051408,规格:20 mg/片)。兔抗 RAM11 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-21916R);小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体、兔抗白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-18 多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:67735-2-Ig、16806-1-AP、10663-1-AP);兔抗 NLRP3、GSDMD-N 多克隆抗体(英国艾博抗有限公司,批号:ab210491、ab215203);兔抗 Caspase-1 多克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号:A0964);兔抗凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)多克隆抗体

(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号:DF6304); β -actin、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体(北京全式金生物技术有限公司,批号:HC201、ZB-2301、ZB-2305)。

祛风化痰稳斑汤采取临床常用剂量,药物组成:茯苓 20 g,桂枝 10 g,白术 10 g,炙甘草 6 g,海风藤 15 g,络石藤 15 g,防风 15 g,羌活 15 g。按徐叔云等^[6]的《药理实验方法学》第 3 版中“人和动物间按体表面积折算的等效剂量比率表”,人与兔按 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 折算的等效剂量系数约为 3.9,故兔的临床等效剂量约为 $5.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。因此,本研究中将祛风化痰稳斑汤的低剂量设置为 $5.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于临床等效剂量),中剂量设置为 $11.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于 2 倍临床等效剂量)、高剂量设置为 $23.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于 4 倍临床等效剂量),以观察量效关系并覆盖临床有效剂量范围。所有中药均来自湖南中医药大学高等专科学校附属第一医院药剂科,按照要求用常规方式煎煮,制备成 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓缩液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。阿托伐他汀钙片成人临床常用剂量为 $0.286\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,按上述体表面积系数折算为兔的临床等效剂量约为 $1.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。NLRP3 抑制剂组 MCC950 给药方案参考小鼠文献常用范围($10\sim 20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[7],结合兔与小鼠的体表面积折算系数及预实验结果,调整为腹腔注射首剂量为 $31.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,之后每 2 天给药 1 次,每次 $1.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

1.3 实验仪器

切片机(德国 Leica 公司,型号:HistoCore BIO-CUT);高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机有限公司,型号:TGL-16.5M);全自动酶标仪(上海闪普公司,型号:SuPerMax 3100);蛋白垂直电泳仪(北京市六一仪器厂,型号:DYY-6C);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon-5200);旋涡混合器(常州越新仪器制造有限公司,型号:XH-C);普通 PCR 扩增仪(杭州博日科技有限公司,型号:TC-EA);荧光 PCR 仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,型号:CFX Connect™ XRS+];超高灵敏度化学发光成像系统[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,型号:ChemiDoc™ XRS+];培养箱(上海一恒科学仪器有限公司,型号:BPN-80CW);三气培养箱(长沙华曦电子科技有限公司,型号:YCP-10S);透射电镜(日本电子公司,型号:JEM-1400);光学显微镜、荧光显微镜(日本 Olympus 公司,型号:CKX53、BX43)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 AS 模型建立 实验正式开始前先适应性喂养 1 周,待新西兰兔体内代谢环境稳定后,将 58 只兔随机分为空白组($n=8$)和造模组($n=48$),空白组继续给予普通饲料喂养,造模组给予高脂饮食喂养。分别于第 1、3、5 天从耳缘静脉注射牛血清白蛋白 $125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每天 1 次,共 3 次;同时从第 1 天开始皮下注射卵清白蛋白,每次 $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每 2 天 1 次,周期为 10 d,共 5 次^[8-9]。免疫注射完成后,造模组继续予以高脂饮食喂养至第 8 周。造模成功判断标准^[9]:造模 8 周后,随机抽取造模组兔 2 只,处死,取主动脉组织,行油红 O 染色观察主动脉内膜脂质沉积情况,可见明显红色脂质斑块沉积;同时检查血脂水平,可见血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇显著升高;另取主动脉组织行 HE 染色,可见内膜增厚、泡沫细胞聚集等病理改变。

2.1.2 分组与给药 造模成功后,将造模组兔随机分为 6 组,分别为模型组,祛风化痰稳斑汤低、中、高剂量组,阿托伐他汀钙组,NLRP3 抑制剂组,每组 8 只。于造模第 1 天给予不同方法干预,各给药组分别给予相应剂量的药物进行灌胃或腹腔注射,空白组和模型组灌服同体积 0.9%氯化钠溶液。每天 1 次,连续给药 8 周。

在实验最终日禁食 12 h 后,耳缘静脉注射麻醉后行空气注射处死所有兔,迅速解剖取出主动脉弓下 $2.5\sim 4.0\text{ cm}$ 的主动脉段,将主动脉冻存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用^[9-10]。

2.1.3 主动脉组织病理形态学变化 将经 4%多聚甲醛固定 48 h 的主动脉组织脱水后石蜡包埋,切成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚的切片,常规烤片、脱蜡、水化后,分别行 HE 染色、天狼星红染色,于显微镜下观察。

2.1.4 免疫组织化学、油红 O 染色及天狼星红染色 计算斑块易损指数(vulnerability index, VI) 免疫组织化学:取主动脉组织石蜡切片,常规烤片、脱蜡、水化后,用柠檬酸缓冲液进行抗原修复。滴加一抗 RAM11(1:200)、 α -SMA(1:100), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日滴加相应辣根过氧化物酶标记二抗(1:100),室温孵育。DAB 显色后,苏木素复染,中性树胶封片,显微镜下观察并拍照。ImageProPlus 6.0 图像分析软件分析阳性区域面积,计算巨噬细胞含量和平滑肌细胞含量。

油红 O 染色:将切好的冰冻切片用 4%多聚甲醛固定 10 min,用双蒸水清洗干净。然后用 60%异丙醇漂洗 20 s,油红 O 染色液染色 10 min,60%异丙醇快速分化,双蒸水清洗,苏木精水溶液染色 3 min,盐酸乙醇分化液分化 15 s,稍水洗,返蓝液返蓝 15 s,流水冲洗,显微镜下观察并拍照,应用 ImageProPlus 6.0 软件统计红色斑块面积,计算细胞外脂质含量。

天狼星红染色:具体实验步骤同 2.1.3。Image-ProPlus6.0 图像分析软件计算胶原纤维区域面积百分比,即胶原含量。

VI 计算公式为:VI=[巨噬细胞含量(%) + 细胞外脂质含量(%)]/[平滑肌细胞含量(%) + 胶原含量(%)]。

2.1.5 ELISA 测定主动脉组织 COL I、COL III 表达水平及 COL I /COL III 比值 取兔主动脉组织,制备组织匀浆,离心后取上清液,按照试剂盒说明书进行 ELISA 检测,用酶标仪在 450 nm 处测定各孔吸光度值,以测定 COL I、COL III 表达水平,并计算 COL I /COL III 比值。

2.1.6 Western blot 检测主动脉组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平 取兔主动脉组织,加入 RIPA 裂解液,用组织研磨仪进行研磨,提取组织总蛋白。离心后取上清液,BCA 蛋白定量试剂盒对总蛋白进行定量。对蛋白样品进行变性后,进行十二烷基硫酸钠凝胶电泳 1.5 h,后用 300 mA 恒流转膜 1 h。PVDF 膜用脱脂奶粉封闭后,加入 1:1 000 稀释的 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、ASC 一抗,1:2 000 稀释的 IL-1 β 、IL-18 一抗和 1:500 稀释的 β -actin 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 PVDF 膜在室温下孵育 1:3 000 稀释的二抗 2 h。用发光液浸湿 PVDF 膜,置于超高灵敏度化学发光成像系统中进行显影。

2.1.7 qRT-PCR 检测主动脉组织 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的 mRNA 表达水平 取冻存的兔主动脉组织,按照 RNA 超纯提取试剂盒说明书提取总 RNA,利用紫外可见分光光度计测定 mRNA 的浓度和纯度,通过 RNA 反转录试剂盒合成 cDNA,采用荧光 PCR 仪进行 qRT-PCR。反应步骤如下:预变性 95 $^{\circ}$ C,10 min;变性 95 $^{\circ}$ C,10 s;退火 58 $^{\circ}$ C,30 s;延伸 72 $^{\circ}$ C,30 s;40 个循环。以 GAPDH 作为内参,基因的相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
GAPDH	正向:CCACTTTGTGAAGCTCATTTTCCT	140
	反向:TCGTCCTCCTCTGGTGCTCT	140
Caspase-1	正向:AGCCGGAAGAAGATGGTCAC	95
	反向:AGGAGGAGGATGTCCAGTC	95
IL-1 β	正向:GAAATCCTTGGTGTGTCTGGC	229
	反向:TGGGTAACGGTTGGGTCTA	229
IL-18	正向:ACCAGAAGAGGCTTGCATCAAC	86
	反向:CCAGGTCTCATCGTTTTCAGTTAT	86

2.2 体外实验

2.2.1 VSMC 的提取、传代培养及鉴定 新西兰兔腹腔注射 3%戊巴比妥钠(1.5 mL/kg)麻醉后固定于固定架上,用空气栓塞法处死,75%乙醇喷洒兔全身消毒,无菌条件下钝性分离颈动脉,放入含 1%青霉素-链霉素混合物的无菌预冷 PBS 中,转移至无菌超净工作台。于 PBS 中快速剔除血管周围的其他组织,漂洗 3 次去除残留血迹,用显微镊将外膜和中膜剥离开来,弃外膜,纵向剪开血管,轻轻刮除内膜,将中膜剪为 2 mm $\times$ 2 mm 左右的组织块,均匀贴在培养液润湿的培养瓶底面,加入 3 mL 含 20%胎牛血清及 1%青霉素-链霉素混合物的高糖 DMEM 培养基,直立培养瓶,移至 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 细胞培养箱中,放置 2~2.5 h 后,将直立的培养瓶缓慢平放于培养箱中,使得培养液浸润组织块,静置 3~4 d 后,开始换液,此后每隔 2 d 换一次液,一般在 9 d 左右有细胞爬出,18~20 d 可消化传代。

0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液消化,传代到 3~4 代时,用免疫荧光鉴定 VSMC 特异性标志物 α -SMA 的表达,具体方法:取生长良好的 VSMC,4%多聚甲醛固定 15 min,0.5% Triton X-100 室温通透 20 min,10%山羊血清室温封闭 30 min,滴加一抗 α -SMA (1:100),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 PBS 洗 3 次,每次 5 min,滴加 FITC 标记的二抗(1:200),室温避光孵育 1 h。DAPI 染核 5 min,抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并拍照。 α -SMA 阳性表达者鉴定为 VSMC,取 3~7 代生长良好的细胞用于后续实验^[10-11]。

2.2.2 含药血清的制备 12 只兔适应性喂养 1 周后,随机分为空白组、祛风化痰稳斑汤低、中、高剂量组,每组 3 只。空白组及各给药组的灌胃剂量同 2.1.2,每天灌胃 1 次,连续给药 1 周。各组于末次给药 3 h 后,腹腔注射 2%戊巴比妥麻醉,行左侧股动脉

采血,于 4 ℃静置 4 h 后,离心取血清,56 ℃水浴灭活 30 min,0.22 μm 无菌微孔过滤除菌,分装入小瓶,置于-20 ℃冰箱中保存备用。

2.2.3 OX-LDL 对 VSMC 造模的最佳浓度和时间筛选 取对数生长期的 VSMC,消化后接种至 96 孔板,用不同浓度(50、100、150、200、250 μg/mL)OX-LDL 刺激 VSMC 细胞 12、24、48 h,然后每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL,37 ℃孵育 40 min 后,用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值,以计算细胞存活率。选择能够稳定诱导细胞损伤且保留足够细胞活性的 OX-LDL 作用浓度和时间,用于后续正式造模。

2.2.4 最适含药血清浓度筛选 取对数生长期造模后的 VSMC,消化后接种至 96 孔板,将细胞分为空白组、祛风化痰稳斑汤低、中、高剂量含药血清组,分别设置 5%、10%、20%、30%共 4 个浓度,空白组培养基中加入空白血清,祛风化痰稳斑汤低、中、高剂量含药血清组培养基中按比例加入相应剂量的祛风化痰稳斑汤含药血清,培养 24 h 后,CCK-8 检测细胞存活率,方法同 2.2.3。选择能促进细胞存活率的干预浓度进行后续实验。

2.2.5 细胞分组及处理 将细胞分为空白组、模型组、祛风化痰稳斑汤含药血清组、NLRP3 激动剂组、NLRP3 抑制剂组。除空白组外,其余各组用 OX-LDL 处理以模拟 AS 斑块 VSMC 细胞损伤模型,具体方法:空白组以正常 DMEM 完全培养基培养 24 h;模型组以含 200 μg·mL⁻¹ OX-LDL 的 DMEM 培养基培养 24 h;祛风化痰稳斑汤含药血清组以含 200 μg·mL⁻¹ OX-LDL 和 20%浓度的祛风化痰稳斑汤高剂量含药血清的 DMEM 培养基培养 24 h;NLRP3 激动剂组以含 200 μg·mL⁻¹ OX-LDL 和 1 μM BMS-986299 的 DMEM 培养基培养 24 h;NLRP3 抑制剂组以含 200 μg·mL⁻¹ OX-LDL 和 1 μM MCC950 DMEM 培养基培养 24 h。

2.2.6 透射电镜观察 VSMC 焦亡相关形态改变 VSMC 用 2.5%戊二醛固定 2 h,1%锇酸固定液再次固定 2 h,4 ℃下对组织进行脱水。丙酮处理后,用环氧树脂进行组织包埋,分别在 37 ℃下孵育过夜、45 ℃下孵育 12 h、60 ℃下孵育 48 h 后,用超薄切片机进行切片,切片厚度为 70 nm。最后,用 3%醋酸铀-枸橼酸铅进行双染,在透射电镜下进行观察。

2.2.7 ELISA 检测 VSMC 中 COL I、COL III 表达水平及 COL I/COL III 比值 各组 VSMC 按 2.2.5 方法干预 24 h 后,收集细胞培养液,4 ℃离心 10 min,

取上清液,后续实验步骤同 2.1.5。

2.2.8 Western blot 检测 VSMC 中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、IL-18、ASC 蛋白表达水平 收集细胞,弃去培养基,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,4 ℃离心后取上清液,BCA 蛋白定量试剂盒对总蛋白进行定量。后续实验步骤及所用抗体同 2.1.6。

2.2.9 qRT-PCR 检测 VSMC 中 Caspase-1、IL-1β、IL-18 的 mRNA 表达水平 收集细胞,弃去培养基,按照 RNA 超纯提取试剂盒说明书提取总 RNA。后续实验步骤同 2.1.7。引物序列详见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
GAPDH	正向:ATCACCATCTTCCAGGAGCG	20
	反向:GCCTTCTCCATGCTGCTGAA	20
Caspase-1	正向:ATGCCTGGTCTTGTGATGTGGAG	23
	反向:AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	25
IL-1β	正向:CGATGCTCCCAATTACATGAAGAGC	25
	反向:CGTCTTGTCAATGTCACCCTTTTCAG	23
IL-18	正向:ACCAGAAGAGGCTTGCATCAAC	22
	反向:CCAGGTTCTCATCGTTTTTCAGTTAT	25

2.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析。符合正态分布的数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *LSD-t* 检验(方差齐)或 *Dunnett T3* 检验(方差不齐)。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 体内实验

3.1.1 祛风化痰稳斑汤对主动脉组织病理形态学的影响 空白组兔主动脉血管结构正常,血管内皮细胞及弹力纤维层完整,未见病理改变。与空白组比较,模型组血管内皮细胞严重受损,管腔内壁纤维显著增生,管腔狭窄,可见明显斑块形成。与模型组比较,祛风化痰稳斑汤低剂量组管腔内壁纤维增生轻度改善,仍可见斑块形成;祛风化痰稳斑汤中剂量组血管结构较正常,管腔内壁纤维增生改善明显,未见明显斑块;祛风化痰稳斑汤高剂量组血管结构较正常,管腔内壁可见少量纤维增生及斑块;阿托伐他汀钙组血管结构趋于正常,内皮细胞轻度增生,未见管腔内壁纤维增生及斑块;NLRP3 抑制剂组血管结构正常,内皮细胞及弹力纤维层完整,未见管腔内壁纤维

增生及斑块形成。详见图 1—2。

3.1.2 祛风化痰稳斑汤对 VI 的影响 与空白组比较,模型组 VI 升高($P<0.05$)。与模型组比较,祛风化痰稳斑汤低、中、高剂量组和阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 VI 均降低($P<0.05$);与祛风化痰稳斑汤低剂量组比较,祛风化痰稳斑汤中、高剂量组和阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 VI 均降低($P<0.05$);与祛风化痰稳斑汤中剂量组比较,祛风化痰稳斑汤高剂量组、阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 VI 均降低($P<0.05$);与祛风化痰稳斑汤高剂量组比较,阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 VI 均降低($P<0.05$);与阿托伐他汀钙组比较,NLRP3 抑制剂组 VI 降低($P<0.05$)。详见表 3。

3.1.3 祛风化痰稳斑汤对兔主动脉组织 COL I、COL III 表达水平及 COL I /COL III 比值的影响 与空白组比较,模型组 COL I 表达水平、COL I /COL III 比

值均降低($P<0.05$)。与模型组比较,祛风化痰稳斑汤低、中、高剂量组和阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平、COL I /COL III 比值均升高($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤中剂量组 COL III 降低($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤低剂量组比较,祛风化痰稳斑汤中、高剂量组 and NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平、COL I /COL III 均升高($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤中剂量组 COL III 降低($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤中剂量组比较,NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平升高($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤高剂量组比较,NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平升高($P<0.05$)。与阿托伐他汀钙组比较,NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平、COL I /COL III 比值均升高($P<0.05$)。详见表 4。

3.1.4 祛风化痰稳斑汤对兔主动脉组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达

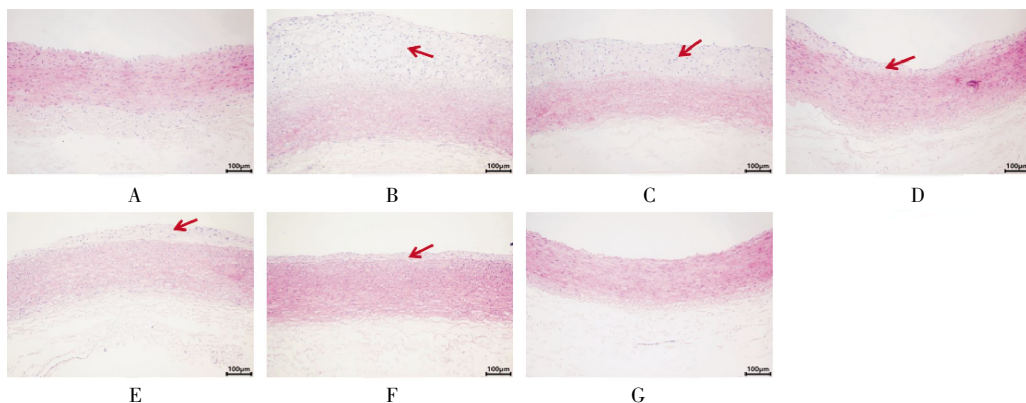


图 1 各组兔主动脉组织 HE 染色结果($\times 20$)

Fig.1 HE staining results of aorta in each group of rabbits ($\times 20$)

注:A.空白组;B.模型组;C.祛风化痰稳斑汤低剂量组;D.祛风化痰稳斑汤中剂量组;E.祛风化痰稳斑汤高剂量组;F.阿托伐他汀钙组;G.NLRP3 抑制剂组。红色箭头代表斑块形成区域。

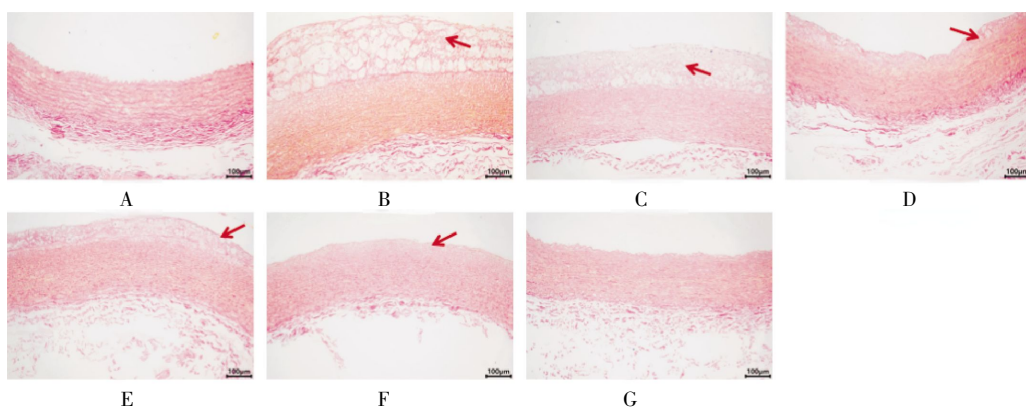


图 2 各组兔主动脉组织天狼星红染色结果($\times 20$)

Fig.2 Sirius red staining results of aorta in each group of rabbits ($\times 20$)

注:A.空白组;B.模型组;C.祛风化痰稳斑汤低剂量组;D.祛风化痰稳斑汤中剂量组;E.祛风化痰稳斑汤高剂量组;F.阿托伐他汀钙组;G.NLRP3 抑制剂组。红色箭头代表斑块形成区域。

表 3 各组兔主动脉组织中 VI 的比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Comparison of VI in aortic tissues among different groups of rabbits ($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	VI
空白组	0.15±0.03
模型组	2.71±0.09 [△]
祛风化痰稳斑汤低剂量组	1.38±0.28 ^{△*}
祛风化痰稳斑汤中剂量组	0.61±0.07 ^{△*#}
祛风化痰稳斑汤高剂量组	0.54±0.27 ^{△*##}
阿托伐他汀钙组	0.23±0.09 ^{△*##γ}
NLRP3 抑制剂组	0.05±0.02 ^{△*##γδ}

注:与空白组相比,[△] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤低剂量组相比,[#] $P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤中剂量组相比,^{*} $P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤高剂量组相比,^γ $P<0.05$;与阿托伐他汀钙组相比,^δ $P<0.05$ 。

的影响 与空白组比较,模型组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18 及 ASC 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与模型组比较,祛风化痰稳斑汤低剂量组及阿托伐他汀钙组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 及 ASC 蛋白表达水平均降低($P<0.05$),GSDMD-N 蛋白表达水平升高($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤中、高剂量组及 NLRP3 抑制剂组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18 及 ASC 蛋白表达水平均降低($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤中、高剂量组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 及 ASC 蛋白表达水平均降低($P<0.05$);阿托伐他汀钙组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 及 ASC 蛋白表达水平均降低($P<0.05$),GSDMD-N 蛋白表达水平升高($P<0.05$);NLRP3 抑制剂组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 及 ASC 蛋白表达水平均降低($P<0.05$),IL-18 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤中剂量组比较,阿托伐他汀钙组 NLRP3、

Caspase-1、GSDMD-N 及 ASC 蛋白表达水平均升高($P<0.05$);NLRP3 抑制剂组 Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 蛋白表达水平均降低($P<0.05$),IL-18 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤高剂量组比较,阿托伐他汀钙组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18 及 ASC 蛋白表达水平均升高($P<0.05$);NLRP3 抑制剂组 Caspase-1、GSDMD-N 及 ASC 蛋白表达水平均降低($P<0.05$),IL-18 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与阿托伐他汀钙组比较,NLRP3 抑制剂组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 及 ASC 蛋白表达水平均降低($P<0.05$),IL-18 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见图 3、表 5。

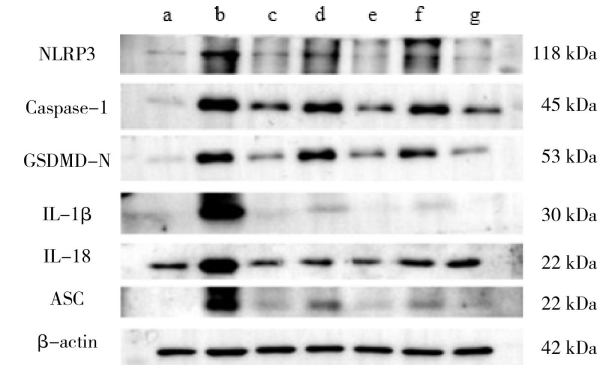


图 3 各组主动脉组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白条带图

Fig.3 Protein bands of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18, and ASC in aorta tissues of rabbits in each group

注:a.空白组;b.模型组;c.祛风化痰稳斑汤中剂量组;d.祛风化痰稳斑汤低剂量组;e.祛风化痰稳斑汤高剂量组;f.阿托伐他汀钙组;g.NLRP3 抑制剂组。

3.1.5 祛风化痰稳斑汤对兔主动脉组织 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达的影响 与空白组比较,

表 4 各组兔主动脉组织中的 COL I、COLⅢ表达水平及 COL I /COLⅢ比值的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of COL I and COLⅢ expression levels and COL I /COLⅢ ratio in aortic tissues among different groups of rabbits ($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	COL I/(ng/mL)	COLⅢ/(ng/mL)	COL I /COLⅢ
空白组	2.82±0.10	2.18±0.01	1.29±0.05
模型组	2.63±0.11 [△]	2.27±0.04	1.16±0.03 [△]
祛风化痰稳斑汤低剂量组	2.82±0.14 [*]	2.29±0.07	1.23±0.04 [*]
祛风化痰稳斑汤中剂量组	3.02±0.03 ^{△*#}	2.11±0.19 ^{△*#}	1.35±0.14 ^{△*#}
祛风化痰稳斑汤高剂量组	3.02±0.07 ^{△*#}	2.26±0.07	1.34±0.05 ^{△*#}
阿托伐他汀钙组	2.92±0.13 [*]	2.20±0.04	1.33±0.04 ^{△*}
NLRP3 抑制剂组	3.35±0.46 ^{△*##γδ}	2.18±0.14	1.55±0.31 ^{△*##}

注:与空白组相比,[△] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤低剂量组相比,[#] $P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤中剂量组相比,^{*} $P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤高剂量组相比,^γ $P<0.05$;与阿托伐他汀钙组相比,^δ $P<0.05$ 。

表 5 各组兔主动脉组织 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 5 Comparison of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18, and ASC protein expression levels in aortic tissues among different groups of rabbits ($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	NLRP3	Caspase-1	GSDMD-N	IL-1 β	IL-18	ASC
空白组	0.17 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.15	0.17 $\pm$ 0.08	0.65 $\pm$ 0.3	0.13 $\pm$ 0.07
模型组	1.14 $\pm$ 0.16 $^{\Delta}$	1.26 $\pm$ 0.19 $^{\Delta}$	1.24 $\pm$ 0.35 $^{\Delta}$	1.32 $\pm$ 0.22 $^{\Delta}$	2.12 $\pm$ 0.53 $^{\Delta}$	1.15 $\pm$ 0.05 $^{\Delta}$
祛风化痰稳斑汤低剂量组	0.90 $\pm$ 0.07 $^{\Delta*}$	1.13 $\pm$ 0.21 $^{\Delta*}$	1.32 $\pm$ 0.41 $^{\Delta*}$	0.32 $\pm$ 0.06 $^{\Delta*}$	0.72 $\pm$ 0.30 *	0.63 $\pm$ 0.06 $^{\Delta*}$
祛风化痰稳斑汤中剂量组	0.37 $\pm$ 0.06 $^{\Delta*#}$	0.60 $\pm$ 0.03 $^{\Delta*#}$	0.73 $\pm$ 0.42 $^{\Delta*#}$	0.17 $\pm$ 0.02 $^{*#}$	0.66 $\pm$ 0.30 *	0.27 $\pm$ 0.03 $^{*#}$
祛风化痰稳斑汤高剂量组	0.33 $\pm$ 0.23 $^{\Delta*#}$	0.64 $\pm$ 0.08 $^{\Delta*#}$	0.81 $\pm$ 0.40 $^{\Delta*#}$	0.12 $\pm$ 0.03 $^{*#}$	0.51 $\pm$ 0.29 *	0.31 $\pm$ 0.11 $^{\Delta*#}$
阿托伐他汀钙组	0.65 $\pm$ 0.41 $^{\Delta*#}\gamma$	0.94 $\pm$ 0.11 $^{\Delta*#}\gamma$	1.92 $\pm$ 0.41 $^{\Delta*#}\gamma$	0.22 $\pm$ 0.06 $^{*#}\gamma$	0.83 $\pm$ 0.32 $^{*}\gamma$	0.44 $\pm$ 0.05 $^{\Delta*#}\gamma$
NLRP3 抑制剂组	0.40 $\pm$ 0.27 $^{\Delta*#}\delta$	0.44 $\pm$ 0.17 $^{\Delta*#}\delta$	0.57 $\pm$ 0.38 $^{\Delta*#}\delta$	0.09 $\pm$ 0.04 $^{\Delta*#}\delta$	1.05 $\pm$ 0.35 $^{\Delta*#}\delta$	0.25 $\pm$ 0.04 $^{*#}\delta$

注:与空白组相比, $^{\Delta}P<0.05$;与模型组相比, $^{*}P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤低剂量组相比, $^{*}P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤中剂量组相比, $^{\#}P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤高剂量组相比, $^{\gamma}P<0.05$;与阿托伐他汀钙组相比, $^{\delta}P<0.05$ 。

模型组 Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与模型组比较,祛风化痰稳斑汤低剂量组 IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);祛风化痰稳斑汤中、高剂量组和阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤低剂量组比较,祛风化痰稳斑汤中、高剂量组和阿托伐他汀钙组、NLRP3 抑制剂组 Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤中剂量组比较,祛风化痰稳斑汤高剂量组、阿托伐他汀钙组 Caspase-1、IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);NLRP3 抑制剂组 Caspase-1、IL-18 及 IL-1 β mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤高剂量组比较,阿托伐他汀钙组 IL-18 mRNA 表达水平降低($P<0.05$),Caspase-1 mRNA 表达水平升高($P<0.05$);NLRP3 抑制剂组 IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。与阿托伐他汀钙组比较,NLRP3 抑制剂组 Caspase-1、IL-1 β

mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。详见表 6。

3.2 体外实验

3.2.1 免疫荧光法鉴定 VSMC 特异性标志物 α -SMA 的表达 DAPI 通道细胞核呈清晰蓝色; α -SMA 通道可见特异性绿色荧光主要分布于细胞质;合并通道可见 α -SMA 阳性荧光与核定位对应,细胞质区域绿色荧光覆盖完整,阳性率高,细胞呈典型梭形,证实所获细胞为纯度较高的 VSMC。详见图 4。

3.2.2 OX-LDL 对 VSMC 造模的最佳浓度和时间筛选 12、24、48 h 时,与 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较,200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ OX-LDL 组和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ OX-LDL 组刺激 24 h 及 48 h 后 VSMC 存活率均降低($P<0.05$),且随 OX-LDL 浓度增加与作用时间延长而递减,呈浓度和时间依赖性。由于 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ OX-LDL 刺激 24 h 后 VSMC 存活率过低,考虑可能导致细胞死亡过多,进而影响对存活抑制的评估,故后续实验选择 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ OX-LDL 刺激 24 h 作为造模条件。详见图 5。

3.2.3 最适含药血清浓度筛选 造模后加入相应血

表 6 各组兔主动脉组织 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 6 Comparison of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 mRNA expression levels in aortic tissues among different groups of rabbits ($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	Caspase-1	IL-1 β	IL-18
空白组	0.83 $\pm$ 0.33	0.77 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.01
模型组	3.85 $\pm$ 1.44 $^{\Delta}$	2.32 $\pm$ 0.43 $^{\Delta}$	3.39 $\pm$ 0.6 $^{\Delta}$
祛风化痰稳斑汤低剂量组	3.22 $\pm$ 0.85 $^{\Delta}$	1.64 $\pm$ 0.52 $^{\Delta*}$	2.91 $\pm$ 0.11 $^{\Delta*}$
祛风化痰稳斑汤中剂量组	2.63 $\pm$ 0.81 $^{\Delta*#}$	1.38 $\pm$ 0.29 $^{\Delta*#}$	1.90 $\pm$ 0.37 $^{\Delta*#}$
祛风化痰稳斑汤高剂量组	1.34 $\pm$ 0.31 $^{\Delta*#}\delta$	1.37 $\pm$ 0.17 $^{\Delta*#}$	1.71 $\pm$ 0.10 $^{\Delta*#}\delta$
阿托伐他汀钙组	1.72 $\pm$ 0.63 $^{\Delta*#}\gamma$	1.46 $\pm$ 0.48 $^{\Delta*#}$	1.40 $\pm$ 0.11 $^{\Delta*#}\gamma$
NLRP3 抑制剂组	1.27 $\pm$ 0.50 $^{\Delta*#}\delta$	0.66 $\pm$ 0.12 $^{\Delta*#}\delta$	1.50 $\pm$ 0.12 $^{\Delta*#}\gamma$

注:与空白组相比, $^{\Delta}P<0.05$;与模型组相比, $^{*}P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤低剂量组相比, $^{*}P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤中剂量组相比, $^{\#}P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤高剂量组相比, $^{\gamma}P<0.05$;与阿托伐他汀钙组相比, $^{\delta}P<0.05$ 。

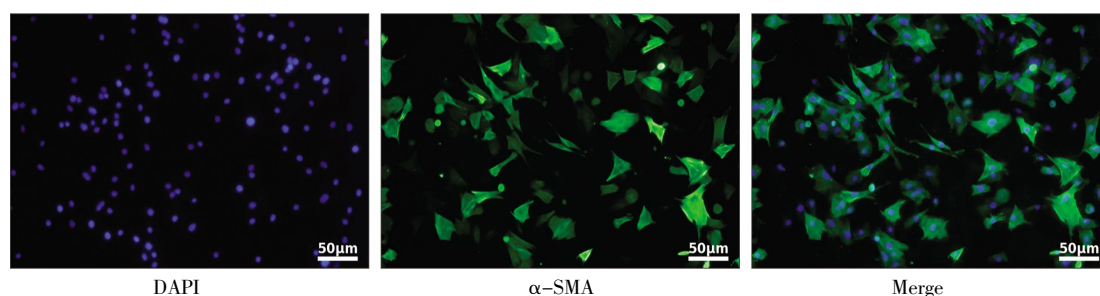
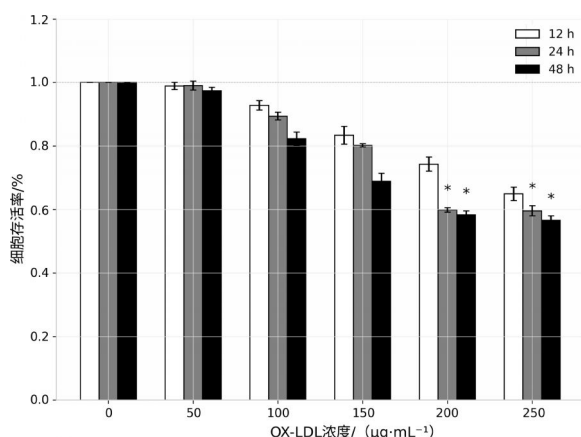
图 4 VSMC 免疫荧光鉴定($\times 200$)Fig.4 Immunofluorescence identification of VSMCs ($\times 200$)

图 5 不同浓度 OX-LDL 与不同刺激时间对 VSMC 存活率的影响

Fig.5 Effects of different OX-LDL concentrations and exposure durations on VSMC viability

注:与 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较, $*P<0.05$ 。

清 24 h 后,与同浓度空白血清组比较,祛风化痰稳斑汤中、高剂量含药血清组(当血清浓度为 20%、30% 时)VSMC 存活率均升高($P<0.05$),且鉴于 20%与 30% 浓度在有效剂量组中促增殖效果相当,结合体内实验结果,最终选择 20%浓度的祛风化痰稳斑汤高剂量含药血清作为后续实验浓度。详见图 6。

3.2.4 祛风化痰稳斑汤对 VSMC 焦亡形态的影响 空白组细胞结构完整;模型组细胞呈现典型焦亡特征,包括细胞膜多处破裂并形成气泡样凸起、核染色质凝集边缘化、线粒体肿胀空泡化、内质网扩张及细胞质疏松水肿。与模型组比较,祛风化痰稳斑汤含

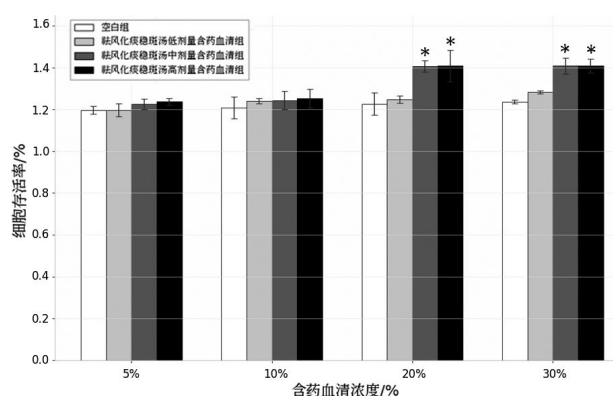


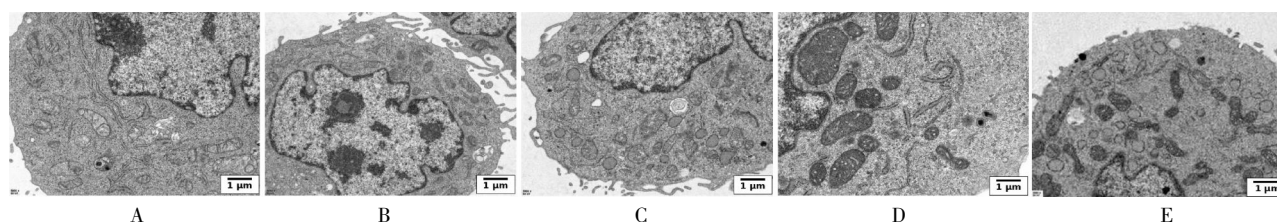
图 6 不同浓度含药血清对 VSMC 存活率的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of drug-containing serum on VSMC viability

注:与同浓度空白血清组比较, $*P<0.05$ 。

药血清组与 NLRP3 抑制剂组的上述焦亡形态学改变均显著减轻,细胞结构趋于正常;NLRP3 激动剂组细胞膜破裂及气泡样凸起更明显,线粒体肿胀空泡化程度加重,细胞焦亡形态学特征更明显。详见图 7。

3.2.5 祛风化痰稳斑汤对 VSMC 中 COL I、COL III 表达水平及 COL I/COL III 比值的影响 与空白组比较,模型组 COL I 表达水平及 COL I/COL III 比值均降低($P<0.05$),COL III 表达水平升高($P<0.05$)。与模型组比较,祛风化痰稳斑汤含药血清组及 NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平及 COL I/COL III 比值均升高($P<0.05$),COL III 表达水平降低($P<0.05$);NLRP3 激动剂组 COL I 表达水平及 COL I/COL III 比值均

图 7 透射电镜观察 VSMC 焦亡相关形态学改变($\times 5\ 000$)Fig.7 VSMC pyroptosis-related morphological changes by transmission electron microscopy ($\times 5\ 000$)

注:A.空白组;B.模型组;C.祛风化痰稳斑汤含药血清组;D.NLRP3 激动剂组;E.NLRP3 抑制剂组。

降低($P<0.05$), COLⅢ表达水平升高($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤含药血清组比较, NLRP3 激动剂组 COL I 表达水平及 COL I /COLⅢ比值均降低($P<0.05$), COLⅢ表达水平升高($P<0.05$)。与 NLRP3 激动剂组比较, NLRP3 抑制剂组 COL I 表达水平及 COL I /COLⅢ比值均升高($P<0.05$), COLⅢ表达水平降低($P<0.05$)。详见表 7。

3.2.6 祛风化痰稳斑汤对 VSMC 中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与模型组比较, 祛风化痰稳斑汤含药血清组 NLRP3 抑制剂组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平均降低($P<0.05$); NLRP3 激动剂组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤含药血清组比较, NLRP3 激动剂组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与 NLRP3 激动剂组比较, NLRP3 抑制剂组 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。详见图 8、表 8。

3.2.7 祛风化痰稳斑汤对 VSMC 中 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组

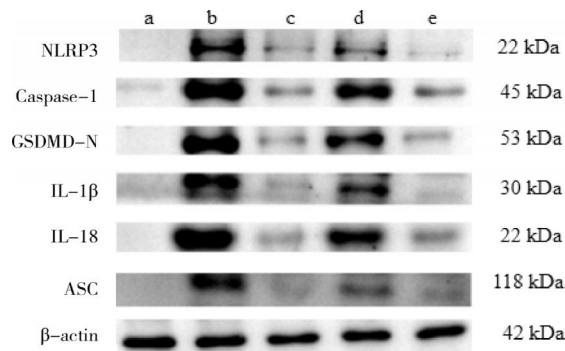


图 8 各组 VSMC 中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白条带图

Fig.8 Protein bands of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18, and ASC in VSMC of each group

注: a.空白组; b. NLRP3 激动剂组; c. 祛风化痰稳斑汤含药血清组; d. 模型组; e. NLRP3 抑制剂组。

Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 的 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与模型组比较, 祛风化痰稳斑汤含药血清组、NLRP3 抑制剂组 Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 的 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$); NLRP3 激动剂组 Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 的 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与祛风化痰稳斑汤含药血清组比较, NLRP3 激动剂组 Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 的 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与 NLRP3 激动剂组比较, NLRP3 抑制剂组 Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 的 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。详见表 9。

表 7 各组 VSMC 培养液上清中 COL I、COLⅢ表达水平及 COL I /COLⅢ比值的比较($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 7 Comparison of COL I and COLⅢ expression levels and COL I /COLⅢ ratio in VSMC culture supernatants among different groups ($\bar{x}\pm s, n=9$)

分组	COL I /(ng/mL)	COLⅢ/(ng/mL)	COL I /COLⅢ
空白组	6.71 $\pm$ 0.12	3.09 $\pm$ 0.05	2.17 $\pm$ 0.04
模型组	4.37 $\pm$ 0.08 $^{\Delta}$	4.54 $\pm$ 0.06 $^{\Delta}$	0.96 $\pm$ 0.02 $^{\Delta}$
祛风化痰稳斑汤含药血清组	5.32 $\pm$ 0.02 $^{\Delta*}$	3.49 $\pm$ 0.06 $^{\Delta*}$	1.59 $\pm$ 0.03 $^{\Delta*}$
NLRP3 激动剂组	3.83 $\pm$ 0.07 $^{\Delta*#}$	6.12 $\pm$ 0.28 $^{\Delta*#}$	0.63 $\pm$ 0.03 $^{\Delta*#}$
NLRP3 抑制剂组	5.43 $\pm$ 0.07 $^{\Delta*&}$	3.43 $\pm$ 0.06 $^{\Delta*&}$	1.58 $\pm$ 0.04 $^{\Delta*&}$

注: 与空白组相比, $^{\Delta}P<0.05$; 与模型组相比, $*P<0.05$; 与祛风化痰稳斑汤含药血清组相比, $^{\#}P<0.05$; 与 NLRP3 激动剂组相比, $^{\&}P<0.05$ 。

表 8 各组 VSMC 中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、ASC 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 8 Comparison of NLRP3, Caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , IL-18, and ASC protein expression levels in VSMCs among different groups ($\bar{x}\pm s, n=4$)

分组	NLRP3	Caspase-1	GSDMD-N	IL-1 β	IL-18	ASC
空白组	0.05 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02
模型组	0.58 $\pm$ 0.15 $^{\Delta}$	1.18 $\pm$ 0.36 $^{\Delta}$	1.07 $\pm$ 0.24 $^{\Delta}$	0.63 $\pm$ 0.08 $^{\Delta}$	0.85 $\pm$ 0.16 $^{\Delta}$	0.58 $\pm$ 0.18 $^{\Delta}$
祛风化痰稳斑汤含药血清组	0.24 $\pm$ 0.03 $^{\Delta*}$	0.41 $\pm$ 0.14 $^{\Delta*}$	0.38 $\pm$ 0.11 $^{\Delta*}$	0.19 $\pm$ 0.08 $^{\Delta*}$	0.35 $\pm$ 0.14 $^{\Delta*}$	0.15 $\pm$ 0.05 $^{\Delta*}$
NLRP3 激动剂组	0.83 $\pm$ 0.25 $^{\Delta*#}$	1.34 $\pm$ 0.47 $^{\Delta*#}$	1.40 $\pm$ 0.39 $^{\Delta*#}$	0.74 $\pm$ 0.14 $^{\Delta*#}$	1.07 $\pm$ 0.32 $^{\Delta*#}$	0.64 $\pm$ 0.29 $^{\Delta*#}$
NLRP3 抑制剂组	0.18 $\pm$ 0.08 $^{\Delta*&}$	0.35 $\pm$ 0.07 $^{\Delta*&}$	0.24 $\pm$ 0.09 $^{\Delta*&}$	0.17 $\pm$ 0.07 $^{\Delta*&}$	0.36 $\pm$ 0.13 $^{\Delta*&}$	0.18 $\pm$ 0.08 $^{\Delta*&}$

注: 与空白组相比, $^{\Delta}P<0.05$; 与模型组相比, $*P<0.05$; 与祛风化痰稳斑汤含药血清组相比, $^{\#}P<0.05$; 与 NLRP3 激动剂组相比, $^{\&}P<0.05$ 。

表 9 各组 VSMC 中 caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 9 Comparison of Caspase-1, IL-1β, and IL-18 mRNA expression levels in VSMCs among different groups ($\bar{x}\pm s, n=4$)

分组	Caspase-1	IL-1β	IL-18
空白组	1.01±0.13	1.02±0.23	1.00±0.03
模型组	1.77±0.21 [△]	1.73±0.20 [△]	1.22±0.03 [△]
祛风化痰稳斑汤含药血清组	1.39±0.20 ^{△*}	1.40±0.16 ^{△*}	1.11±0.02 [*]
NLRP3 激动剂组	2.39±0.26 ^{△*#}	2.11±0.06 ^{△*#}	1.34±0.02 ^{△*#}
NLRP3 抑制剂组	1.40±0.13 ^{△*&}	1.40±0.06 ^{△*&}	1.10±0.05 ^{△*&}

注:与空白组相比,[△] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$;与祛风化痰稳斑汤含药血清组相比,[#] $P<0.05$;与 NLRP3 激动剂组相比,[&] $P<0.05$ 。

4 讨论

痰浊是缺血性卒中发病的核心病机,其现代病理学基础与动脉粥样硬化斑块形成具有显著相关性^[12]。《诸病源候论·心痛病诸候》云“夫心痛,多是风邪痰饮,乘心之经络,邪气搏于正气交结而痛也”,表明冠心病的发生发展与风痰息息相关。现代人多食肥甘厚味,劳逸失度,情志失调,气机紊乱,易致脾失健运、痰湿内蕴,痰湿聚集于血脉则形成痹阻于脉道的有形实邪,即 AS 斑块;而内风动扰,可使已成之有形实邪由“稳定”向“不稳定”转变。风痰可导致 AS 斑块易损性增加,引发斑块破裂,造成急性心脑血管事件^[13]。研究表明,风痰是易损斑块的主要致病因素,风邪具有“善行而数变”的特点,与急性心脑血管病起病急骤,进展迅速特点相符^[14]。《金匱要略·痰饮咳嗽病脉证并治第十二》云:“病痰饮者,当以温药和之。”苓桂术甘汤为张仲景治疗痰饮的代表方,祛风化痰稳斑汤以苓桂术甘汤为底方加风药化裁。方中茯苓健脾利水、淡化痰饮,为君药;桂枝温经散寒、温阳通络,为臣药;羌活祛风解表、散寒除湿,海风藤祛风湿、通经络,防风祛外风、平内风,络石藤祛风通络并引药入心经,白术健脾燥湿,共为佐药;炙甘草调和诸药,为使药。全方共奏祛风化痰、健脾利湿之功。风药其性大多升散,善于走窜散结、疏通气机,从而通调血脉,以风药为主的祛风通络法治疗心脑血管疾病的疗效也已得到验证^[15-16]。

细胞焦亡是一种由炎症小体介导的快速程序性死亡方式,以细胞肿胀、细胞膜穿孔、促炎性细胞因子大量释放为特征,与炎症反应密切相关^[10]。其关键介导蛋白为 Caspase-1(经典途径)或 Caspase-4/5/11(非经典途径),通过裂解 GSDMD 形成膜孔,导致细胞溶解^[17]。NLRP3/Caspase-1/GSDMD 是细胞焦亡的经典通路,正常情况下,NLRP3 处于低表达水平,当存在炎症或刺激时,如胆固醇、OX-LDL 异常上调,可激活 NLRP3 炎症小体^[18]。激活的炎性小体进一步活化 Caspase-1,对 GSDMD 蛋白产生作用,生成 N 端

片段(GSDMD-N),后者作用于细胞膜形成 10~20 nm 孔洞,导致细胞内外渗透失衡、细胞肿胀破裂,并释放 IL-1β、IL-18 等促炎性细胞因子,最终导致细胞焦亡^[19-20]。

VSMC 焦亡可导致纤维帽变薄及细胞外基质减少,促进斑块破裂,同时通过释放 IL-1β、IL-18 等促炎性细胞因子加剧血管炎症反应,干扰胶原等基分子的合成与分泌,导致纤维帽不稳定,最终促进易损斑块形成^[21-22]。研究表明,当 VSMC 焦亡发生时,不稳定斑块中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18、ASC 等分子的表达水平显著升高^[20]。从机制上来看,由 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 前体蛋白共同构成的 NLRP3 炎症小体可通过活化 Caspase-1,一方面促使 IL-1β 和 IL-18 等促炎性细胞因子释放,另一方面将 GSDMD 裂解为反应性氨基(N)端和羧基(C)端,GSDMD-N 具有脂质选择性,可作用于细胞膜造成细胞膜穿膜孔,导致细胞溶解和死亡,从而促使炎症反应扩大^[21]。故通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路可进一步抑制 VSMC 的焦亡。

本研究体内实验结果显示,与空白组相比,模型组兔主动脉出现明显病理损伤,血管内皮细胞破坏、管腔狭窄,NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、IL-18 及 ASC 蛋白表达水平升高,COL I 表达水平及 COL I / COL III 比值明显降低,提示 AS 模型兔血管损伤加重、NLRP3 炎症小体激活、炎症反应增强、斑块稳定性下降。与模型组比较,祛风化痰稳斑汤各剂量组均可有效改善血管内皮损伤、减轻管腔纤维增生及抑制斑块形成,且能抑制 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18、ASC 表达水平,上调 COL I 表达水平及 COL I / COL III 比值。体外实验中,OX-LDL 诱导的 VSMC 损伤模型出现类似焦亡改变,NLRP3 激动剂 BMS-986299 可进一步加重 VSMC 焦亡及通路蛋白活化,而祛风化痰稳斑汤含药血清与 NLRP3 抑制剂均可减轻细胞焦亡特征、下调 NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N 等通路分子的表达水平。上述结果提示,祛风化痰稳斑汤可能通过抑制 NLRP3 炎症小体活化,阻断 Caspase-1 介导的 GSDMD 裂解,减少 IL-1β、IL-18 等

促炎性细胞因子释放,从而减轻 VSMC 焦亡,改善血管病理变化并促进斑块稳定。

本研究观察到,中剂量祛风化痰稳斑汤在调节胶原代谢(升高 COL I 表达水平及 COL I/COL III 比值、降低 COL III 表达水平)及下调 Caspase-1、GSDMD-N、ASC 蛋白表达方面效果优于低剂量,部分指标甚至优于高剂量;但从 VI 这一综合评价指标来看,高剂量低于中剂量,提示高剂量在稳定斑块方面仍具优势。这种“部分指标中剂量最优、整体效应高剂量更优”的现象在中药复方研究中并不罕见,可能与以下因素有关:(1)复方成分复杂,中剂量下各成分协同效应最佳,高剂量下某些成分可能产生拮抗或激活代偿性通路;(2)NLRP3 通路抑制存在最佳剂量阈值,超过后可能通过其他信号途径间接上调炎症反应;(3)高剂量长期灌胃可能影响代谢稳态或肠道菌群平衡,干扰药效发挥。体外实验中,20%浓度的高剂量含药血清对 VSMC 存活促进作用最显著,且在下调焦亡通路蛋白及 mRNA 表达方面效果确切,与体内高剂量组降低 VI 的整体优势相互印证,提示高剂量可能更接近该复方调控 VSMC 焦亡的有效浓度窗口。体内外结果的差异可能源于体内受代谢、吸收等因素影响,药物生物利用度与体外直接作用不同,且 VI 为斑块稳定性的综合反映,涉及多因素整合。鉴于本研究剂量梯度跨度较大(相邻剂量间呈 2 倍递增),未设置更精细梯度,上述推测仅为初步假说,后续需通过血清药物化学及网络药理学手段进一步验证。

综上所述,本研究基于“从风论治”理论,证实祛风化痰稳斑汤可通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路活化,下调 IL-1 β 、IL-18 等焦亡相关炎症因子表达,减轻 VSMC 焦亡,并上调 COL I 表达水平、提高 COL I/COL III 比值,从而增强斑块稳定性。该机制为“从风论治”干预 AS 易损斑块提供了细胞焦亡层面的实验依据。后续研究可进一步阐明祛风化痰稳斑汤的具体活性成分及其直接作用靶点,明确其调控炎症反应与胶原代谢的分子机制,并探索在其他心血管疾病模型中的适用性,为其临床转化提供支撑。

参考文献

- [1] 刘明波,何新叶,杨晓红,等.《中国心血管健康与疾病报告 2023》要点解读[J]. 中国心血管杂志, 2024, 29(4): 305-324.
- [2] 陈威宇,肖晗,郭丽君. 易损斑块的病理组织学特征和机制研究现状[J]. 中国心血管杂志, 2021, 26(1): 74-77.
- [3] Song W M, Gao K, Huang P H, et al. Bazedoxifene inhibits PDGF-BB induced VSMC phenotypic switch via regulating the

- autophagy level[J]. Life Sciences, 2020, 259: 118397.
- [4] 徐璐,王贺,岳珂,等. 细胞焦亡在动脉粥样硬化中的作用及其研究进展[J]. 中国医药导报, 2021, 18(31): 46-49.
- [5] 胡晋婷. 中药及其有效成分对细胞焦亡的影响研究进展[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(12): 2968-2970.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1189.
- [7] Zeng W Y, Wu D B, Sun Y X, et al. The selective NLRP3 inhibitor MCC950 hinders atherosclerosis development by attenuating inflammation and pyroptosis in macrophages[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 19305.
- [8] 常小荣,符凌,张亮,等. 隔药饼灸对兔动脉粥样硬化斑块中基质金属蛋白酶-2, 9 mRNA 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(10): 934-936, 1001.
- [9] 石晓理,郁保生,吕瑶,等. 四逆汤对实验性高脂血症合并动脉粥样硬化兔高、低密度脂蛋白及载脂蛋白 Apo-A, B 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 295-299.
- [10] 赵奇慧,张恂,申刚义,等. 组织块贴壁法和混合酶消化法分离原代血管平滑肌细胞的表型特征比较[J]. 中国医药导刊, 2019, 21(5): 294-298.
- [11] 林卓辉,谭文明,陈俊威,等. 不同贴壁法培养原代大鼠肺动脉平滑肌细胞比较[J]. 中南药学, 2018, 16(9): 1217-1220.
- [12] 解雨彤,范春香,贺艳菊,等. 风痰瘀阻证急性缺血性脑卒中患者颈动脉斑块形成驱动因素模型构建及分析[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(10): 6-10.
- [13] 向丽,宫丽鸿. 从风论治急性冠状动脉综合征不稳定斑块研究概述[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(1): 170-172.
- [14] 戴旭辉,余晓梅,梅芳,等. 脑梗死患者颈动脉粥样斑块与中医证型的相关性分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(25): 2781-2782.
- [15] 王艳,郑国庆. 风药治疗冠心病心绞痛: 张志远学术经验系列(八)[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(3): 436-438.
- [16] 郑国庆. 风药治血与冠心病心绞痛证治[J]. 中医药学报, 1999, 27(4): 14-16.
- [17] 张美娟,展淑琴. 隐源性卒中的病因综述[J]. 中风与神经疾病杂志, 2021, 38(12): 1126-1128.
- [18] 杨洋,杨思进,白雪. 缺血性中风中医证候与颈动脉彩超的相关性研究[J]. 中医临床研究, 2019, 11(6): 25-27.
- [19] 贾鸿宁. 脑梗死病人颅内血管狭窄的危险因素分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(1): 145-147.
- [20] 席俊羽,张利丹,魏瑞丽,等. 基于典型相关分析的缺血性中风患者中医证型与颈动脉斑块相关性的多中心、前瞻性研究[J]. 中医杂志, 2023, 64(10): 1028-1035.
- [21] Pan H Z, Reilly M P. A protective smooth muscle cell transition in atherosclerosis[J]. Nature Medicine, 2019, 25(8): 1194-1195.
- [22] 陈林. 平滑肌细胞焦亡在相关疾病中作用的研究进展[J]. 广西医学, 2021, 43(14): 1749-1753.
- [23] Shi X, Xie W L, Kong W W, et al. Expression of the NLRP3 inflammasome in carotid atherosclerosis[J]. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2015, 24(11): 2455-2466.
- [24] Liang H H, Liu Y F. Gasdermins pore cell membrane to pyroptosis[J]. Science China Life Sciences, 2016, 59(10): 1090-1092.

(本文编辑 陈 晨)