

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2024.12.003

❖ 基础研究 ❖

姜黄素通过激活 Smad1/5-Smad4-β-catenin 信号通路 调控孤核受体 4A1 在易损斑块血管新生中的作用

张永霞, 陈志红, 邹润凤

(广州医科大学附属第三医院心血管内科, 广东 广州 510150)

【摘要】目的: 探究姜黄素激活 Smad1/5-Smad4-β-catenin 信号通路调控孤核受体 4A1 (NR4A1) 在易损斑块血管新生中的作用。**方法:** 体外培养人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 将 HUVEC 分为模型组、Si-NR4A1 组 (NR4A1^{-/-}-HUVEC 组)、姜黄素组 (给予姜黄素 20 μg/mL 干预处理), 每组各 10 孔。在 TNF-α 或氧化低密度脂蛋白 (oxLDL) + BMP-9 的刺激下行内皮细胞增殖、迁移、Matrigel 基质胶管腔形成实验, 并采用 Matrigel 基质胶法检测细胞管腔形成能力, 用 ELISA 法检测细胞上清液炎症因子, 用 Transwell 法检测各组迁移能力, 使用 Western blot 法检测 Smad1/5、Smad4、β-catenin 的表达水平。**结果:** RT-qPCR 结果显示, 各组 NR4A1 表达水平比较: 姜黄素组 < Si-NR4A1 组 < 模型组 ($P < 0.05$); 各组细胞迁移率、细胞迁移面积、细胞管腔形成能力、细胞增殖能力比较: 姜黄素组 < Si-NR4A1 组 < 模型组 ($P < 0.05$); 与 Si-NR4A1 组及模型组相比, 姜黄素组肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、白细胞介素 6 (IL-6)、内皮素 1 (ET-1)、白细胞介素 12 (IL-12) 水平下降 ($P < 0.05$); 各组细胞的 Smad1、Smad5、Smad4 的蛋白表达水平比较: 姜黄素组 > Si-NR4A1 组 > 模型组 ($P < 0.05$)。各组细胞的 β-catenin 蛋白表达水平比较: 姜黄素组 < Si-NR4A1 组 < 模型组 ($P < 0.05$)。**结论:** 姜黄素具有抑制细胞迁移与增殖等作用, 并对内皮细胞功能起保护作用, 其可能与通过 NR4A1 激活 Smad1/5-Smad4-β-catenin 表达有关。

【关键词】 姜黄素; 孤核受体 4A1; Smad 同源物 1/5-Smad 同源物 4-β-连环蛋白; 易损斑块; 血管新生

【中图分类号】 R543.3 **【文献标志码】** A

Curcumin regulates the role of NR4A1 in angiogenesis of vulnerable plaques by activating the Smad1/5-Smad4-β-catenin signaling pathway

ZHANG Yong-xia, CHEN Zhi-hong, ZOU Run-feng

(Department of Cardiovascular Medicine, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong, China)

【Abstract】Objective: To explore the role of curcumin in activating Smad homologous protein 1/5 (Smad1/5)-(Smad homologous 4 (Smad4) protein)-β-catenin signaling pathway in regulating the angiogenesis of the orphan nucleus receptor 4A1 (NR4A1) in vulnerable plaques. **Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured in vitro, and HUVEC was divided into model group (HUVE group), Si-NR4A1 group (NR4A1^{-/-}-HUVEC group) and curcumin group (treated with 20 μg · mL⁻¹ curcumin intervention) with 10 Wells in each group. The TNF-α or oxygenic low-density lipoprotein (oxLDL) + BMP-9 stimulation induced endothelial cell proliferation, migration and Matrigel matrix rubber tube lumen formation experiments were performed. Matrigel matrix glue method was used to detect the lumen formation ability of cells, and the inflammatory factors of cell supernatant were detected by ELISA. Transwell method was used to detect the migration ability of each group, and Western Blot method was used to detect the expression levels of Smad1/5, Smad4 and β-catenin. **Results:** RT-qPCR results showed that expression of NR4A1 in Si-NR4A1 and curcumin groups decreased compared with model group ($P < 0.05$), and NR4A1 in curcumin group was lower than Si-NR4A1 group ($P < 0.05$). Compared with model group, the cell mobility, cell migration area, cell lumen formation capacity and cell proliferation capacity of curcumin group and Si-NR4A1 group decreased ($P < 0.05$), and the curcumin group was lower than the Si-NR4A1 group ($P < 0.05$). However, compared with Si-NR4A1 group, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), endothelin-1 (ET-1), and interleukin-12 (IL-12) levels in curcumin group were decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, protein expressions of Smad1, Smad5 and Smad4 from Si-NR4A1 group and curcumin group were increased ($P < 0.05$), and curcumin group was higher than Si-NR4A1 group ($P < 0.05$). β-catenin protein expression in Si-NR4A1 group and curcumin group was lower than that of model group ($P < 0.05$), cur-

基金项目: 广东省中药局科研项目 (20222128)

作者简介: 张永霞 (1984 -), 女, 主治医师。E-mail: 13560496739@163.com

通讯作者: 邹润凤。E-mail: 1550695600@qq.com

cumin group was lower than Si-NR4A1 group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Curcumin can inhibit cell migration and proliferation, and protect endothelial cell function, which may be related to the activation of Smad1/5-Smad4- β -catenin expression through NR4A1.

【Key words】 Curcumin; NR4A1; Smad1/5-Smad4- β -catenin; Vulnerable plaque; Angiogenesis

易损斑块为有血栓形成与不稳定倾向的斑块,如侵蚀性斑块、破裂斑块和部分钙化结节性病变,由于斑块胶原纤维下降,纤维帽变薄,易损斑块不稳定,形成易损斑块^[1]。血管新生是指在原有毛细血管上,通过内皮细胞迁移、增殖,形成新的毛细血管,其生物过程分为激活与稳态阶段。血管新生在多种疾病如创伤修复、胚胎发育及肿瘤、增生性视网膜疾病等过程中起重要作用。研究^[2-3]表明在动脉粥样硬化(AS)斑块中,新生血管数量较多,且缺乏基底膜及基质,管壁较薄,缺乏平滑肌、周细胞的支持,易发生破裂,发生血栓形成,是造成斑块不稳定的重要因素,提示斑块内新生血管是 AS 的病理学基础与发展过程中关键步骤。因此,抑制斑块内血管新生是改善斑块稳定性和减少心脑血管事件的有效途径。孤核受体 4A1(NR4A1)是 AS 病变中异常高表达的一类基因,参与 AS 炎症应答,参与细胞增殖与血管新生,调控病理性血管新生,在 AS 斑块易损性中扮演着关键角色^[4-5]。Smad 介导的转化生长因子- β 途径在肾病等不同病理发生发展中起关键作用。按照其功能和结构,Smad 蛋白家族可分为三种类型,即调控蛋白、共享蛋白和抑制蛋白^[6]。Wnt/ β -catenin 信号通路活性变化与心肌损伤的发病、病因基础有关,另有研究^[7]显示药物干预可通过调控 β -catenin 信号途径延缓纤维化,从而发挥作用。姜黄素具有广泛的药理特性,包括抗炎、抗诱变和抗癌活性^[8]。本研究旨在探究姜黄素激活 Smad1/5-Smad4- β -catenin 调控 NR4A1 在易损斑块血管新生中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为上海康朗生物科技有限公司提供。

1.1.2 主要仪器与试剂 青霉素-链霉素(100 \times)、胰酶细胞消化液、胎牛血清购置于内蒙古奥普赛生物科技有限公司,二氧化碳(CO₂)培养箱购置于金属迅迪仪器科技有限公司,过氧化氢(H₂O₂)购置于天津科维诺生物科技有限公司,甲醛、甲醛胺购置于湖北兴恒业科技有限公司,钙黄绿素购置于武汉曙尔生物科技有限公司,苏木精染液购置于上海源叶生物科技有限公司,NR4A1 试剂盒购置于上海森肽生物科技有限公司,Smad1/5 试剂盒购置于上海烜雅生物科技有限公司,Smad4 试剂盒购置于上海泽

叶生物科技有限公司, β -catenin 试剂盒购置于杭州齐誉生物科技有限公司,细胞培养箱购置于河北云谱分析仪器,酶标分析仪购置于济南博坤科学仪器有限公司 BK-EL10A 型号,实时荧光定量 RT-qPCR 仪购置于山东天合环境科技有限公司 TH-H480 型号,显微镜(PZ-302DIC LED)购置于北京品智创思精密仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 HUVEC 置于含 15% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的培养基上,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。在对数生长周期中,其生长与融合达到 70%~90% 时,加入胰蛋白酶消化细胞后,将其回收,加入完全培养基混合,以 1:2 传代。选取 5~10 代的对数生长周期细胞,将传代后细胞从培养箱中取出,并将消化后的细胞悬液集中于离心管内,离心处理后加入细胞冻存液重悬细胞,促使细胞混匀,移置于细胞冻存管内,做好标记保存待测。

1.2.2 筛选敲除 NR4A1 的 HUVEC 将细胞接种至小皿内,使细胞生长至次日密度达 40%~50%,NR4A1 转染 HUVEC 6 h,然后更换完全培养基培养。提取转染后 HUVEC 总 RNA,使用荧光定量 RT-qPCR 检测验证转染效果。并将转染 NR4A1-SiRNA 的 HUVEC 标记为 Si-NR4A1 细胞。

1.2.3 分组及处理干预 (1)将 HUVEC 接种于 96 孔板,按 0、400、200、100 μ mol/L 浓度加入对应体积 H₂O₂ 处理 8、16、24 h。收集处理后的细胞提取细胞总蛋白质。将 HUVEC 分组为模型组(HUVEC 组)、Si-NR4A1 组(Si-NR4A1/-HUVEC 组)、姜黄素组,每组设置 10 个复孔。其中模型组用含 15% 胎牛血清、1% 青霉素、链霉素培养细胞,并未敲除内源性 NR4A1 及其特异性受体抑制剂处理的 HUVEC 细胞;Si-NR4A1 组为 Si-NR4A1/-HUVEC 细胞,200 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h 后收集细胞,提取 mRNA 与蛋白,后续进行 RT-qPCR 检测;姜黄素组提前 2 h 给予姜黄素(20 μ g/mL)预处理,姜黄素(湖北鸣拓生物科技有限公司),用二甲基亚砜(显天正药用辅料有限公司,纯度 98%,型号 CP2020)溶解配成 10 mg/mL 母液,避光条件下 -25 $^{\circ}$ C 保存备用,实验前配成所需浓度(20 μ g/mL),姜黄素与 HUVEC 细胞共孵育培养,24 h 后收集细胞,并进行后续实验。(2)RT-qPCR 法检测 mRNA 表达,充分裂解细胞后加入 RNase-free dd H₂O 溶解 RNA 沉淀,

分光光度计测量其浓度及纯度。将提取后 RNA 配制成 15 μL 体系后逆转录获得 cDNA、计算并配制 15 μL RT-qPCR 反应体系:2xUltraSYBRmixture, cDNA 模板,引物 R、F、双蒸水。扩增反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 变性,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 退火,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 延伸,40 个循环,获取各基因 Ct 值。以 GAPDH 内参基因为标准,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。引物序列为:NR4A1-F:CCCTGAAGT-TGTTCCCTCAC; NR4A1-R: GCC-CTCAAGGTGTG-GAGAAG; GAPDH-F: TGTGGGC. ATCAATGGATTT-GG; GAPDH-R: ACACCATGTA-TCCGGTCAAT。

1.3 观察指标

1.3.1 细胞迁移功能 将 1% 明胶处理过 Transwell 培养液与无血清 MCDB131 在培养箱孵育 1 h, 添加 110 μL 无血清 MCDB131 稀释 5×10^4 /孔 Si-NR4A1/-HUVEC、HUVEC, 及 oxLDL + BMP-9 或 TNF- α , 再加 MCDB131 培养液 0.6 mL 与 FCS 20% 诱导移行, 设正反对照, 置 CO_2 培养箱 12 h, 去除孔内培养液, 室温固定 35 min 用 90% 乙醇, 室温染色 15 min 用 0.1% 晶体紫染液, 用棉球轻拭表层未迁移细胞, 倒置显微镜下观测。

1.3.2 细胞增殖能力 细胞爬片培养, 饥饿 24 h 达到同步化。加入 BrdU 试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min, 弃培养, PBS 洗 3 遍, 甲醛固定 10 min。玻片干燥后, H_2O_2 灭活内源性氧化酶。血清封闭, 100 $^{\circ}\text{C}$ 甲醛胺, 核酸变性。PBS 洗片, 加入抗 BrdU 抗体孵育 1 h, 按 ABC 法检测阳性细胞数。

1.3.3 Matrigel 基质胶法检测细胞管腔形成能力及炎症指标检测 (1) 先将 Matrigel 基质胶 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜溶解, 保存实验中所需的枪头盒、EP 管、96 孔板放入同样温度环境中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜预冷; (2) 次日在冰盒上铺胶, 用 M200 无血清无生长因子补充物的培养基 1:1 稀释 Matrigel 基质胶, 混匀后, 取 96 孔的孔板, 将 Matrigel 取出, 待融化、稀释后, 用枪头吸取 Matrigel 注入孔中, 注意枪头要垂直于内孔, 以防有残留胶留下, 50 μL /孔加入 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱放置 30 min, 直至胶凝结; (3) 每孔接种 10 000 ~ 15 000 个细胞, 将其置培养箱中 4 ~ 6 h, 在显微镜下对管状结构观察, 随机选 5 个视野拍照, 计算形成管腔数目的平均值。用管腔数量表示细胞成管能力, 其数目愈多说明成管能力愈强。用 ELISA 方法, 试剂盒测定肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、内皮素 1 (ET-1)、IL-12 水平, 并用酶标仪在 450 nm 光下测定 OD 值。

1.3.4 Smad1/5-Smad4- β -catenin 相对表达量检测

(1) 通过 Western blot 检测 Smad1/5、Smad4、 β -

catenin 的蛋白水平, 细胞刮刀采集悬浮液, 移到 2 mL 离心管中, 加 RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 15 min, 在 5 $^{\circ}\text{C}$, 15 000 r/min 离心 20 min, 将上样缓冲液移到 2 mL 离心管中, 用 BCA 方法测量蛋白含量, 后添加上样缓冲液, 加热 10 min, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉在室温下封闭。用 TBST 溶液清洗 PVDF 薄膜 5 次, 5 $^{\circ}\text{C}$ 单抗孵育过夜, 次日在二抗摇床孵育 55 min 后用化学发光成像系统曝光成像。以 GAPDH 为内参标物, 利用 ImageJ 软件检测蛋白条带灰度值并进行比较。每组实验 3 次重复实验, 计均值。(2) Smad1/5、Smad4、 β -catenin mRNA 表达量用 RT-qPCR 检测, 提取总 RNA, 根据逆转录试剂盒操作说明, 进行逆转录合成 cDNA, 以 GAPDH 为内参, 用 Primer5.0 软件设计引物序列, 采用 PCR 仪, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算相对表达量。

1.4 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件分析处理数据。计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述, 组间比较行采用独立样本 t 检验, 组内比较采用配对样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HUVEC 细胞 NR4A1 的 mRNA 表达水平比较

与模型组相比, Si-NR4A1 组、姜黄素组 NR4A1 mRNA 水平下调 ($P < 0.05$), 且姜黄素组低于 Si-NR4A1 组 ($P < 0.05$)。见图 1。

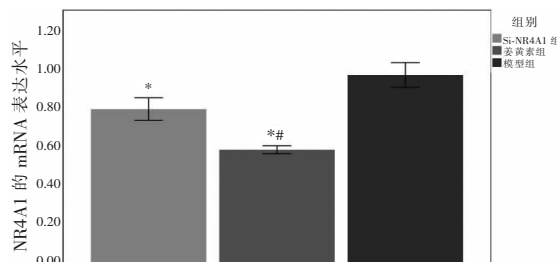


图 1 各组 HUVEC 细胞 NR4A1 mRNA 的表达水平

* $P < 0.05$, 与模型组比较; # $P < 0.05$, 与 Si-NR4A1 组比较。

2.2 各组 HUVEC 细胞的迁移功能比较

与模型组相比, Si-NR4A1 组、姜黄素组细胞迁移率、细胞迁移面积均降低 ($P < 0.05$), 且姜黄素组低于 Si-NR4A1 组 ($P < 0.05$)。见表 1 及图 2。

表 1 各组 HUVEC 细胞迁移功能比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞迁移率 (%)	细胞迁移面积 (μm^2)
模型组 ($n = 10$)	39.77 \pm 2.39	14 962 239.55 \pm 808 559.44
Si-NR4A1 组 ($n = 10$)	33.79 \pm 7.44 *	11 911 337.28 \pm 869 205.01 *
姜黄素组 ($n = 10$)	26.97 \pm 6.08 *#	10 333 508.19 \pm 377 873.05 *#
F 值	9.689	80.064
P 值	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$, 与模型组相比; # $P < 0.05$, 与 Si-NR4A1 组相比。

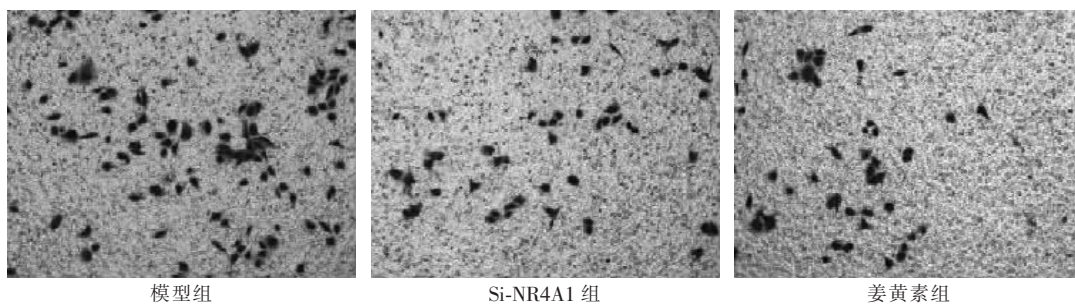


图 2 各组 HUVEC 细胞迁移功能对比图

2.3 各组 HUVEC 细胞的增殖能力比较

与模型组相比, Si-NR4A1 组、姜黄素组细胞增殖能力降低 ($P < 0.05$), 且姜黄素组低于 Si-NR4A1 组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组 HUVEC 细胞增殖能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值(450 nm)
模型组 ($n = 10$)	0.514 ± 0.004
Si-NR4A1 组 ($n = 10$)	0.472 ± 0.014 *
姜黄素组 ($n = 10$)	0.334 ± 0.012 *#
F 值	783.483
P 值	< 0.001

* $P < 0.05$, 与模型组相比; # $P < 0.05$, 与 Si-NR4A1 组相比。

2.4 各组炎症因子水平比较

姜黄素组的 TNF-α、IL-6、ET-1、IL-12 均低于模型

组和 Si-NR4A1 组 ($P < 0.05$), 但 Si-NR4A1 组与模型组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.5 各组 HUVEC 细胞管腔形成能力比较

与模型组相比, Si-NR4A1 组和姜黄素组细胞的管腔形成能力均下降 ($P < 0.05$), 且姜黄素组低于 Si-NR4A1 组 ($P < 0.05$)。见图 3 及表 4。

表 3 对比各组炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	TNF-α	IL-6	ET-1	IL-12
模型组 ($n = 10$)	1.95 ± 0.19	2.28 ± 0.22	119.05 ± 19.05	22.96 ± 5.80
Si-NR4A1 组 ($n = 10$)	2.07 ± 0.22	2.24 ± 0.21	119.28 ± 18.93	22.93 ± 5.72
姜黄素组 ($n = 10$)	1.15 ± 0.09 *#	1.09 ± 0.10 *#	76.09 ± 15.08 *#	14.05 ± 1.77 *#
F 值	81.037	133.668	19.559	11.386
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

* $P < 0.05$, 与模型组相比; # $P < 0.05$, 与 Si-NR4A1 组相比。

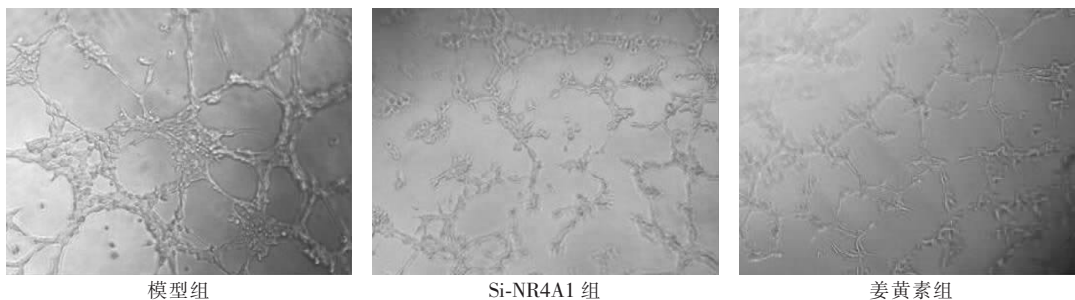


图 3 各组 HUVEC 细胞管腔形成能力比较

表 4 对比各组 HUVEC 细胞管腔形成能力 ($\bar{x} \pm s$)

组别	成管分支点数(个)	成管长度(μm)
模型组 ($n = 10$)	54.96 ± 0.14	15 766.35 ± 667.93
Si-NR4A1 组 ($n = 10$)	52.02 ± 1.70 *	14 450.72 ± 801.48 *
姜黄素组 ($n = 10$)	26.03 ± 2.41 *#	10 180.37 ± 1 302.44 *#
F 值	872.403	91.872
P 值	< 0.001	< 0.001

* $P < 0.05$, 与模型组相比; # $P < 0.05$, 与 Si-NR4A1 组相比。

2.6 各组 HUVEC 细胞 Smad1/5、Smad4、β-catenin 蛋白表达水平比较

与模型组相比, Si-NR4A1 组和姜黄素组细胞的 Smad1、Smad5、Smad4 蛋白表达均上调 ($P < 0.05$),

且姜黄素组表达水平高于 Si-NR4A1 组 ($P > 0.05$)。与模型组相比, Si-NR4A1 组和姜黄素组细胞的 β-catenin 蛋白表达水平均下降 ($P < 0.05$), 且姜黄素组低于 Si-NR4A1 组 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 各组 Smad1/5、Smad4、β-catenin 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Smad1	Smad5	Smad4	β-catenin
模型组 ($n = 10$)	0.185 ± 0.024	0.280 ± 0.020	0.457 ± 0.113	0.488 ± 0.014
Si-NR4A1 组 ($n = 10$)	0.431 ± 0.031 *	0.619 ± 0.022 *	0.893 ± 0.117 *	0.333 ± 0.011 *
姜黄素组 ($n = 10$)	0.704 ± 0.034 *#	0.990 ± 0.031 *#	1.019 ± 0.043 *#	0.286 ± 0.008 *#
F 值	750.847	2050.575	92.171	879.764
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

* $P < 0.05$, 与模型组相比; # $P < 0.05$, 与 Si-NR4A1 组相比。

3 讨论

新生血管是 AS 进展的病理变化,其核心是巨噬细胞吞噬脂质,消耗大量三磷酸腺苷,产生坏死细胞核,致细胞凋亡,局部缺氧,促进血管新生。因血管新生平滑肌细胞与管壁缺少弹性纤维维持,易发生破裂、渗漏,使斑块出血,影响稳定性。此外新生血管破裂后可使炎性细胞浸润,促使坏死核膨大,进而易损斑块进展^[9-10]。因此对炎性细胞表达调控干预是实现 AS 斑块内新生血管形成,稳定 AS 斑块的关键。而在血管新生下,细胞迁移、增殖和管腔形成等方面均被认为是评价血管形成能力的重要方式。相较其他类型血管,HUVEC 取材方便、分离难度小、来源丰富,可表达多个内皮标志分子,对低氧、脂多糖、高糖等刺激具有高度敏感性,是目前血管新生研究中常用的细胞类型。有研究^[11-12]表明,血管内皮局部炎症反应,内皮细胞迁移增殖,血小板粘附等多种因子和信号途径均参与了血管内膜新生成。另有研究^[13-14]显示,血管内皮细胞是内膜的重要组成部分,一旦内皮细胞受损,就不可避免地发生血管新生,血管内皮细胞是骨髓来源的前体细胞,可分泌造血干细胞和内皮细胞表面抗原,在缺血低氧环境中,通过诱导内皮细胞向外周循环迁移,促进血管生成修复。本研究结果显示,与模型组相比,Si-NR4A1 组和姜黄素组细胞迁移率、细胞迁移面积、细胞增殖能力及细胞管腔形成能力均降低($P < 0.05$)。且与 Si-NR4A1 组相比,姜黄素组细胞增殖能力、细胞管腔形成、细胞迁移率、细胞迁移面积下降显著($P < 0.05$)。表明姜黄素有多靶点、多通路的双重效应,可抑制内皮细胞成管、迁移、增殖等,达到促进血管新生的作用,可逆转对 HUVEC 的损伤,对 HUVEC 具有保护作用。可能是由于姜黄素中含有化学成分,有抗炎,抗肿瘤,抗氧化,促细胞凋亡等功能。具有多种恶性肿瘤有明显的放射增敏作用^[15-16]。

NR4A1 可通过降低 IRF-1 在 Caspase-1 启动子结合,降低 Caspase-1 表达,进而抑制炎症活化,发挥对血管内皮细胞的保护作用。表明 NR4A1 可抑制炎症因子释放。相关研究^[17]表示 NR4A1 基因敲除后,巨噬细胞由促炎 M1 型极化,上调 TNF- α 、IL-12 表达,加剧炎症反应。推测 NR4A1 有可能是通过调控炎症因子来抑制或延缓 AS 进程。另有研究^[18]显示 NR4A1 基因在巨噬细胞中过表达可明显抑制炎症反应。还发现 NR4A1 对 AS 的炎症反应有促/抑双重效应,与细胞表型、微环境、转染载体不同等有关。本研究结果显示,姜黄素组的 TNF- α 、IL-6、ET-1、IL-12 水平显著低于模型组和 Si-NR4A1 组,而 RT-

qPCR 的结果显示,姜黄素组 NR4A1 的 mRNA 水平显著低于 Si-NR4A1 组和模型组,提示姜黄素可能是通过 NR4A1 调节炎症因子的水平,调控炎症反应。NR4A1 还可通过抑制 β -catenin 表达,进而影响内皮细胞活力,NR4A1 可以通过调控多个血管新生相关因子表达,调控新生血管,是影响血管通透性的重要因素,在血管新生中发挥作用^[19]。Smads 蛋白是在胞内特异性传递 TGF- β 信号的重要分子,能将 TGF- β 通路从细胞膜转位到细胞核,启动靶基因的转运^[20]。有研究^[21]认为血管内皮受损是 AS 发病的始动环节,AS 则是冠状动脉病变的病理基础,而 β -catenin 信号途径在调节血管内皮细胞及维持稳态中起重要作用。miR-124-3p 抑制剂能显著下调 β -catenin 蛋白表达,并抑制细胞损伤\凋亡及炎症因子释放。Wnt/ β -catenin 与 TGF- β /Smad4 信号通路存在“串话”,用多基因共转染技术,且 Smad4 对 β -catenin 的代谢有调控作用。Smad4 在基因表达上调,激活下游 N-Cadherin 蛋白表达,促进内皮细胞间紧密连接的建立,促进新生血管成熟,抑制血管退变^[22-23]。本研究结果显示与模型组相比,Si-NR4A1 组、姜黄素组 Smad1、Smad5、Smad4 表达上调,而 β -catenin 表达下调;且与 Si-NR4A1 组相比,姜黄素组 Smad1、Smad5、Smad4 水平升高, β -catenin 水平下降。说明姜黄素通过下调 NR4A1 基因表达,激活 Smad1/5-Smad4- β -catenin 蛋白表达,从而改善易损斑块血管新生情况。

综上,姜黄素可以通过抑制 NR4A1 基因表达,激活 Smad1/5-Smad4- β -catenin,从而抑制内皮细胞的迁移、增殖及成管能力,促进易损斑块血管新生。

参考文献

- [1] Nakahara T, Strauss HW, Narula J, et al. Vulnerable plaque imaging[J]. *Seminars in Nuclear Medicine*, 2023, 53(2): 230-240.
- [2] Sun H, Feng J, Ma Y, et al. Down-regulation of microRNA-342-5p or up-regulation of Wnt3a inhibits angiogenesis and maintains atherosclerotic plaque stability in atherosclerosis mice[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2021, 16(1): 165.
- [3] Yan A, Gotlieb AI. The microenvironment of the atheroma expresses phenotypes of plaque instability[J]. *Cardiovascular Pathology*, 2023, 67: 107572.
- [4] He L, Yuan L, Yu W, et al. A regulation loop between YAP and NR4A1 balances cell proliferation and apoptosis[J]. *Cell Reports*, 2020, 33(3): 108284.
- [5] Yuan R, Xin Q, Ma X, et al. Identification of a novel angiogenesis signalling circSCRG1/miR-1268b/NR4A1 pathway in atherosclerosis and the regulatory effects of TMP-PF in vitro[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1271.
- [6] 魏军功, 单国梅, 申苗苗, 等. 癌组织血管生成素 1 和 Smad 同源物 9 基因表达与肺腺癌患者肿瘤转移侵袭行为及预后的关

- 系[J]. 中国医师进修杂志,2023,46(2):132-136.
- [7] 申晨卉,常蕊蕊,张尧,等. 基于 Wnt/β-catenin 信号通路探索芪蛭通络方对糖尿病肾病大鼠肾间质纤维化的作用机制[J]. 江苏中医药,2024,56(2):69-74.
- [8] 冯龙,李青雅,李寒冰,等. 姜黄素调控转录因子 FOXP3 影响 HIV-1 感染辅助受体 CCR5 的作用机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2024,40(4):772-779.
- [9] 翁嘉懿,殷云杰,马雪兴,等. CD137-CD137L 信号通路通过活化 TNF 受体相关因子 6 促进小鼠动脉粥样硬化斑块内血管新生[J]. 天津医药,2021,49(4):384-389.
- [10] 梁万洪,黎智文,黄瑞莉,等. 心灵丸对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块及斑块内血管新生的影响[J]. 中药新药与临床药理,2019,30(9):1088-1092.
- [11] 张森,刘成娣,孔德文,等. 丹酚酸 A 对氧糖剥夺诱导损伤的人脑微血管内皮细胞血管新生能力的保护作用及机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2022,36(3):161-169.
- [12] 伍巍兰,陈君,张在勇,等. PFKFB3 小分子抑制剂 3PO 对炎症刺激下 HUVEC 新生血管形成的影响[J]. 心血管康复医学杂志,2021,30(4):474-477.
- [13] 杨睿,程序,赵梦竹,等. 活血益气方对 miR-484 过表达脐静脉内皮细胞增殖、迁移和成管能力的影响[J]. 海南医学院学报,2023,29(9):660-665,673.
- [14] 毛羽佳,殷俏,郑琳璐,等. 松果菊苷对高糖诱导的人视网膜毛细血管内皮细胞增殖、迁移及新生血管形成的影响[J]. 眼科新进展,2022,42(4):272-277.
- [15] 吴雅莉,吴文强,李华兵,等. 姜黄素通过调控 MicroRNA-1246 激活 P53 蛋白对膀胱癌 T24 细胞进行放疗增敏的作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理,2019,30(3):319-326.
- [16] 鲁猛,王刚,贾洪艳,等. 姜黄素通过 β-Catenin/BCL9 信号通路介导的细胞自噬调节肝癌细胞的恶性生物学行为[J]. 中医药导报,2023,29(9):12-17.
- [17] 袁亚慧,袁蓉,信琪琪,等. NR4A1 在动脉粥样硬化炎症和病理性血管新生中作用的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2022,20(8):1409-1412.
- [18] 蒋玉洁,罗维贵,廖品琥. 孤儿核受体 Nur77/NR4A1 调节巨噬细胞炎症反应研究进展[J]. 右江医学,2020,48(6):401-406.
- [19] Liu Z, Gu Y, Cheng X, *et al.* Upregulation lnc-NEAT1 contributes to colorectal cancer progression through sponging miR-486-5p and activating NR4A1/Wnt/β-catenin pathway[J]. *Cancer Biomarkers*, 2021, 30(3):309-319.
- [20] 林晓芳,方芳,彭志强,等. Wnt/β-catenin 与 BMP-2/Smads 信号通路及其相互作用对骨质疏松疾病的影响[J]. 浙江中医药大学学报,2019,43(7):711-717.
- [21] Hu L, Wang Y, Wan Y, *et al.* Tangshen formula improves diabetes-associated myocardial fibrosis by inhibiting TGF-β/smads and Wnt/β-catenin pathways[J]. *Frontiers in Medicine*, 2021, 8:732042.
- [22] 张秉芬,周胜红,王哲. 延龄草皂苷通过抑制 TGF-β/Smad3 与 Wnt/β-catenin 信号通路改善大鼠肺纤维化[J]. 山东大学学报(医学版),2022,60(8):23-29.
- [23] 杨琳,卢斌,庞晓丽,等. 基于 TGF-β1/Smad4 信号探讨缺氧条件下补阳还五汤促进新生血管成熟的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(3):114-119.

(收稿日期:2024-07-09)

修回日期:2024-08-28)

(上接第 1590 页)

- [8] Arora S, Thompson PJ, Wang Y, *et al.* Invariant Natural Killer T cells coordinate removal of senescent cells[J]. *Medicine*, 2021, 2(8):938-950.
- [9] 郭旭雪,聂汉祥,陈千慧,等. iNKT 细胞联合卵清蛋白对髓源性树突状细胞表型和功能的影响[J]. 中国病理生理杂志,2019,35(8):1483-1488.
- [10] Iwamura C, Nakayama T. Role of CD1d- and MR1-restricted T cells in asthma[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9:1942.
- [11] Deng N, Chen Q, Guo X, *et al.* Blockade of CD40L inhibits immunogenic maturation of lung dendritic cells; implications for the role of lung iNKT cells in mouse models of asthma[J]. *Molecular Immunology*, 2020, 121:167-185.
- [12] Chen Q, Guo X, Deng N, *et al.* α-Galactosylceramide treatment before allergen sensitization promotes iNKT cell-mediated induction of Treg cells, preventing Th2 cell responses in murine asthma[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(14):5438-5455.
- [13] Thio CL, Lai AC, Wang JC, *et al.* Identification of a PD-L1 + Tim-1 + iNKT subset that protects against fine particulate matter-induced airway inflammation[J]. *JCI Insight*, 2022, 7(23):e164157.
- [14] Victor JR, Lezmi G, Leite-de-Moraes M. New insights into asthma inflammation: focus on iNKT, MAIT, and γδT cells[J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2020, 59(3):371-381.
- [15] 候淑婷,赵霞,陆远,等. 固本防哮饮对哮喘合并食物过敏小鼠气道上皮屏障保护作用的机制[J]. 中华中医药杂志,2022,37(7):3801-3805.
- [16] 马乙云,郑亚妹,许玉妮. MBD2 对 Th2/Th17 细胞平衡的调控及其在哮喘中的作用研究[J]. 中国免疫学杂志,2023,39(1):27-33.

(收稿日期:2024-07-15)

修回日期:2024-09-10)