

激活 $\alpha 7$ nAChR改善氯化钙诱导的小鼠腹主动脉瘤损伤研究

张文静, 付慧, 郭小彬, 郭浩

Amelioration chloride-induced abdominal aortic aneurysm injury by activation of $\alpha 7$ nAChR s calcium in mice

ZHANG Wenjing, FU Hui, GUO Xiaobin, GUO Hao

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202409045>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

Keap1-Nrf2通路在炎症疾病中的研究进展

Research progresses on Keap1-Nrf2 pathway in inflammatory diseases

药学实践与服务. 2025, 43(3): 97-108, 116 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202405013](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202405013)

新斯的明与山莨菪碱联合应用对肺型氧中毒的保护作用及其机制的研究

Protective effect and mechanisms of neostigmine in combination with anisodamine against pulmonary oxygen toxicity

药学实践与服务. 2024, 42(10): 433-438, 444 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202310049](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202310049)

脓毒症治疗的研究进展

Progress on the treatment of sepsis

药学实践与服务. 2024, 42(11): 457-460, 502 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202405059](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202405059)

米格列醇激活UCP1介导棕色脂肪改善冷暴露小鼠损伤的研究

Anti-frostbite effect of miglitrol on cold-exposed mice through UCP1-mediated thermogenic activation

药学实践与服务. 2025, 43(1): 1-5, 16 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202404005](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202404005)

一种中药组合物对ANIT诱导的小鼠胆汁淤积肝损伤的保护作用研究

The protective effect of a traditional chinese medicine composition on ANIT induced liver injury in mice with cholestasis

药学实践与服务. 2024, 42(12): 508-511, 519 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202305008](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202305008)

MT-1207对小鼠血糖、血脂和动脉粥样硬化的作用

Effects of MT-1207 on blood glucose, blood lipids and atherosclerosis in mice

药学实践与服务. 2024, 42(11): 487-494 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202306011](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202306011)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

激活 $\alpha 7nAChR$ 改善氯化钙诱导的小鼠腹主动脉瘤损伤研究

张文静¹, 付 慧², 郭小彬¹, 郭 浩¹ (1. 内蒙古自治区人民医院药学处, 内蒙古 呼和浩特 010017; 2. 同济大学附属第十人民医院药学部, 上海 200072)

[摘要] 目的 探讨激活 $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7nAChR$)对氯化钙($CaCl_2$)诱导的小鼠腹主动脉瘤(AAA)损伤的影响。方法 采用 $CaCl_2$ 诱导野生型(WT)小鼠及 $\alpha 7nAChR$ 敲除($\alpha 7nAChR^{-/-}$)小鼠形成 AAA 模型。通过 HE 染色、EVG 染色及 IHC 染色评估敲除 $\alpha 7nAChR$ 对 $CaCl_2$ 诱导的小鼠 AAA 组织学损伤及炎症因子表达的影响。以肿瘤坏死因子- α (TNF- α)刺激大鼠来源原代血管平滑肌细胞(VSMC)模拟 AAA 炎症微环境, 采用蛋白质印迹(Western-blot, WB)法检测 PNU-282987 激活 $\alpha 7nAChR$ 后其炎症相关蛋白表达的变化。结果 $CaCl_2$ 处理后, 模型组小鼠主动脉扩张明显且腹主动脉结构被破坏, 敲除 $\alpha 7nAChR$ 进一步加重损伤, 并且显著上调 AAA 小鼠炎症相关蛋白的表达。体外实验结果表明 TNF- α 刺激 VSMC 后增加炎症相关蛋白表达, 而激活 $\alpha 7nAChR$ 可阻断这一现象。结论 激活 $\alpha 7nAChR$ 可能通过抑制炎症应答减轻 $CaCl_2$ 诱导的小鼠 AAA 损伤。

[关键词] $\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体; 炎症; 氯化钙; 腹主动脉瘤

[文章编号] 2097-2024(2026)08-0400-08

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202409045

Amelioration chloride-induced abdominal aortic aneurysm injury by activation of $\alpha 7nAChR$ s calcium in mice

ZHANG Wenjing¹, FU Hui², GUO Xiaobin¹, GUO Hao¹ (1. Department of Pharmacy, Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Hohhot 010017, China; 2. Department of Pharmacy, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200072, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of activating $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7nAChR$) on calcium chloride ($CaCl_2$)-induced abdominal aortic aneurysm (AAA) injury in mice. **Methods** AAA model was induced by $CaCl_2$ in wild type (WT) mice and $\alpha 7nAChR$ knockout ($\alpha 7nAChR^{-/-}$) mice. The effects of knockout of $\alpha 7nAChR$ on histological damage in $CaCl_2$ -induced AAA mice and expression of inflammatory factors were assessed by HE staining, Elasticvan Gieson (EVG) staining and IHC staining. Rat-derived primary vascular smooth muscle cells (VSMC) were stimulated with tumor necrosis factor- α (TNF- α), which mimicked the inflammatory environment of AAA. The expressions of inflammation-related proteins were detected by using Western-blot (WB) with or without PNU-282987 to activate $\alpha 7nAChR$. **Results** Aortic dilatation was obvious, and the aortic structure was disrupted in $CaCl_2$ -induced AAA mice. Knockout of $\alpha 7nAChR$ further exacerbated the histological injury and significantly up-regulated the expression of inflammation-related proteins in aorta of AAA mice. It was showed that TNF- α stimulation of VSMC increased inflammation-related protein expression, whereas activation of $\alpha 7nAChR$ prevented the phenomenon. **Conclusion** Activation of $\alpha 7nAChR$ could attenuate $CaCl_2$ -induced AAA injury in mice by suppressing the inflammatory response.

[Key words] $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor; inflammation; $CaCl_2$; abdominal aortic aneurysm

腹主动脉瘤(AAA)是一种严重的慢性炎症性

退行性主动脉疾病,特征是腹主动脉壁进行性病理性扩张^[1-2]。当局部扩张的腹主动脉直径>正常值的 50%时(人体中,最大直径 ≥ 30 mm),即可诊断为 AAA^[3]。大多数 AAA 患者没有症状,通常缓慢发展,然而也可能迅速进展为大 AAA 并破裂,死亡率极高^[4]。研究表明,每年全球约 20 万人死于腹主动脉瘤体破裂^[5]。高龄、男性、高血压、吸烟、动脉粥样硬化、家族史和环境污染均会增加 AAA 的患病风险^[6-9]。目前大 AAA(人体中,最大直

[基金项目] 内蒙古卫生健康科技计划(2025NMWJKJXM0312); 上海青年药学历提升项目 A 类(SPAQNRC2025A02); 第九届中国科协青年人才托举工程(2023QNRC001); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(22120240303)

[作者简介] 张文静, 硕士, 主管药师, 研究方向: 心血管药理研究, Email: 15771377891@163.com

[通信作者] 郭 浩, 博士, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 药事管理, Email: guohao19870323@yeah.net

径 ≥ 50 mm)的唯一治疗方法就是开放性或血管内动脉修补术,而对于小 AAA(人体中,最大直径 < 50 mm),尚无明确可以延缓其进展的药物^[5]。因此进一步明确 AAA 的分子调控机制,寻找潜在的药理学干预靶点至关重要。

$\alpha 7$ 烟碱乙酰胆碱受体($\alpha 7$ nAChR)是一种由 5 个相同的 $\alpha 7$ 亚单位组成的配体门控离子通道型受体^[10]。作为“胆碱能抗炎通路(CAP)”的核心,参与了机体的急慢性炎症过程^[11-12]。研究表明,激活 $\alpha 7$ nAChR 在多种心脑血管疾病(如心肌缺血再灌注、缺血性脑卒中)中发挥保护作用^[13-14]。主动脉细胞外基质(ECM)降解、血管平滑肌细胞(VSMC)凋亡和血管壁慢性炎症是 AAA 发病机制的重要病理过程^[15-17]。炎症细胞释放的细胞因子不仅会加剧 ECM 降解,还会导致 VSMC 细胞凋亡。多种抗炎药物如塞来昔布、c-Jun N-末端激酶抑制剂和缓激肽 2 受体拮抗剂等均已被证明可以减缓小鼠 AAA 的进展并降低其破裂的风险^[18]。因此抑制炎症反应已被推测是治疗 AAA 的可行手段^[1]。

由此,推设激活 $\alpha 7$ nAChR 可通过抑制炎症反应减轻 CaCl_2 诱导的小鼠 AAA 损伤。本研究通过构建 CaCl_2 诱导的小鼠 AAA 模型及体外细胞实验来研究激活 $\alpha 7$ nAChR 对 AAA 的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞

$\alpha 7$ nAChR 基因敲除($\alpha 7$ nAChR^{-/-})和野生型(WT)小鼠由同济大学附属第十人民医院赠送,其饲养与繁育工作于内蒙古医科大学 SPF 级实验动物室完成。SD 大鼠购买自内蒙古医科大学实验动物中心,用于 VSMC 的提取。实验进行期间,动物房温度维持在 22 ~ 25℃,湿度保持在 70% 左右,且保持 7:00 ~ 19:00 的照明状态。所有动物均能够自由饮水、饮食,且笼内能够循环通风。本实验过程中所有动物操作,均符合内蒙古医科大学动物中心的管理规范。

1.1.2 试剂

肿瘤坏死因子- α 抗体(TNF- α , BA0131, Boster 公司);白细胞介素 1 β 抗体(IL-1 β , ab205924)、Gasdermin D(GSDMD)抗体(ab209845)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinases2, MMP2)MMP2 抗体(ab92536)(Abcam 公司);NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3(NLRP3)抗体(#15101)、cleaved Caspase 1 抗体(#89332)

(CST 公司);GAPDH 抗体、 β -actin 抗体、DAPI 染色液(碧云天生物技术公司);Donkey anti-mouse 荧光二抗、Donkey anti-rabbit 荧光二抗(LI-COR 公司);PNU-282987、戊巴比妥钠、氯化钙(Sigma 公司);动物组织 DNA 抽提试剂盒、琼脂糖、 $\alpha 7$ nAChR 敲除鼠鉴定引物、胶原酶(II 型)(上海生工生物公司);Taq 酶(Takara 公司);NaRed 染料(北京派拓科技有限公司);组化试剂盒 DAB 显色剂(Dako 公司);OCT 包埋剂(Sakura 公司);EVG 染液套装(Service Biology 公司);蛋白 Marker、BCA 蛋白测定试剂盒(Thermo Scientific 公司);伊红染液、苏木精染液(武汉谷歌生物公司);PBS 缓冲液、50 X TAE 溶液(上海博光生物有限公司);FBS、胰蛋白酶(Gibco 公司);高糖 DMEM 培养基(Hyclone 公司);TNF- α 重组蛋白(Peprotech 公司)。

1.1.3 实验仪器

Odssey 红外荧光显像系统(LI-COR 公司);全自动酶标仪、二氧化碳细胞培养箱(Thermo Scientific 公司);包埋机、切片机(武汉俊杰电子有限公司);超净工作台(苏州净化有限公司);台式离心机、普通 PCR 仪(Eppendorf 公司);琼脂糖凝胶电泳仪(Tanon 公司);生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 组织中 DNA 提取及扩增

剪取小鼠鼠尾约 4 mm,加入组织裂解液,56℃ 水浴 1 ~ 3 h 使鼠尾裂解完全。用动物组织 DNA 抽提试剂盒进行小鼠 DNA 的提取。将 DNA 溶液与 Taq 酶、 $\alpha 7$ nAChR 的 3 种引物及水配制成扩增体系,于 PCR 仪上扩增。

1.2.2 琼脂糖凝胶电泳

称取适量琼脂糖,加入 1 XTAE 溶液后于微波炉加热使其完全溶解,在冷却之前加入 NaRed 染料,混匀,倒入配胶装置并插入加样孔梳。待完全冷却后拔出梳子,加样后开始电泳。电泳结束后在生物电泳图像分析系统仪器上成像并拍照分析。

1.2.3 氯化钙诱导小鼠 AAA 模型及标本获取

7 ~ 8 周龄的雄性 WT 小鼠及 $\alpha 7$ nAChR^{-/-}小鼠随机分为 4 组,分别为野生型对照组(WT)、敲除鼠对照组($\alpha 7$ nAChR^{-/-})、野生型模型组(WT+ CaCl_2)和敲除鼠模型组($\alpha 7$ nAChR^{-/-}+ CaCl_2)。使用戊巴比妥钠(50 mg/kg, i.p.)麻醉小鼠后,开腹,充分暴露腹主动脉。对肾动脉分支以下至髂总动脉段的腹主动脉进行充分游离,用生理盐水(对照组)或 0.5 mol/L 的 CaCl_2 溶液(模型组)浸泡后的无菌纱

布完全包裹腹主动脉外膜 15 min, 随后将残留的 CaCl_2 溶液使用生理盐水冲洗, 关腹, 缝合。术后 3 d 内于腹部伤口处涂抹青霉素以防感染。28 d 后麻醉处死小鼠, 获取主动脉标本。小鼠主动脉最大直径扩张 1.5 倍即判定主动脉瘤形成, 即造模成功。

1.2.4 小鼠主动脉石蜡切片的制备及 HE 染色、EVG 染色

固定后的主动脉标本, 使用梯度酒精脱水后进行石蜡包埋, 切片连续切片, 厚度约 $4\text{ }\mu\text{m}$ /片。将石蜡切片脱蜡处理后再水化, 进行 HE 染色; 染色封片后置于显微镜下观察, 评估组织学特征。对脱蜡后再水化的切片进行 EVG 染色以评估主动脉壁的弹性蛋白完整性。

1.2.5 免疫组化染色

将石蜡切片脱蜡处理后与一抗($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, NLRP3 , GSDMD ; 按照说明书推荐比例配制成相应溶液)于 4°C 孵育过夜, PBS 缓冲液洗涤切片, 随后加入相应二抗孵育 1 h, 再次用 PBS 缓冲液洗涤后用 DAPI 对细胞核进行染色。染色结束后将切片置于显微镜下观察并评估抗体表达水平。

1.2.6 大鼠来源原代 VSMC 的提取

SD 大鼠麻醉后开腹获取主动脉。转移至超净台, 用胶原酶溶液于 37°C 细胞培养箱中消化 30 min, 取出主动脉用 PBS 缓冲液清洗后置于含 20% FBS 的高糖 DMEM 培养基中, 于 37°C 细胞培养箱中培养 24 h。随后用 PBS 缓冲液清洗后将其置于含有胶原酶和胰蛋白酶的混合消化液中, 37°C 反应 2 h。终止消化后收集组织细胞悬液, 离心弃上清液, 加入含 20% FBS 的高糖 DMEM 培养基重悬细胞, 置于 37°C 继续培养, 2~3 d 后换液并传代。选用第 3~8 代细胞用于后续实验。

1.2.7 细胞实验

探究 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激 VSMC 不同时间点(0、3、6、12、24、48 h)的炎症因子表达, 分为 6 组, 分别为对照组(Con, 即 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激细胞 0 h)、3 h 处理组(3 h)、6 h 处理组(6 h)、12 h 处理组(12 h)、24 h 处理组(24 h)和 48 h 处理组(48 h)。探究 PNU-282987 激活 $\alpha 7\text{nAChR}$ 对 VSMC 炎症因子表达的影响, 分为对照组(Con)、模型组($\text{TNF-}\alpha$, TNF)和模型加药组($\text{TNF-}\alpha$ +PNU-282987, $\text{TNF} + \text{PNU}$)。

1.2.8 蛋白质印迹法实验

取各组处理后 VSMC 细胞, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜, 封闭后与一抗 NLRP3 , MMP2 于 4°C 孵育过夜, 洗涤后加入荧光二抗孵育液, 室温避光孵育 2 h 后重复洗涤 3 次。用 Odyssey 红外成像系统成像并

拍照, 结合 Quantity One 软件分析蛋白表达水平, 以 $\beta\text{-actin}$ 或 GAPDH 为内参。

1.2.9 统计学处理

计量资料以均数 $\pm$ 标准误($\text{means}\pm\text{SEM}$)表示。利用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 两组间比较采用非配对 T 检验, 多组之间选用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $\alpha 7\text{nAChR}$ 基因敲除鼠的生理指标

根据以下小鼠繁育模式, 将 $\alpha 7\text{nAChR}^{-/-}$ 小鼠与 WT 小鼠配种, 可得到 $\alpha 7\text{nAChR}^{-/-}$ 小鼠、 $\alpha 7\text{nAChR}$ 杂合子($\alpha 7\text{nAChR}^{+/+}$)小鼠、WT 小鼠; 通过获取小鼠尾部 DNA 并进行琼脂糖凝胶电泳, 判定子代小鼠基因型。若在小分子量处出现一条带(187 bp), 则为 $\alpha 7\text{nAChR}^{-/-}$ 小鼠; 若在大分子量处出现一条带(390 bp), 则为 WT 小鼠; 若有两个条带(390 bp 和 187 bp)出现, 则为 $\alpha 7\text{nAChR}^{+/+}$ 小鼠, 见图 1。

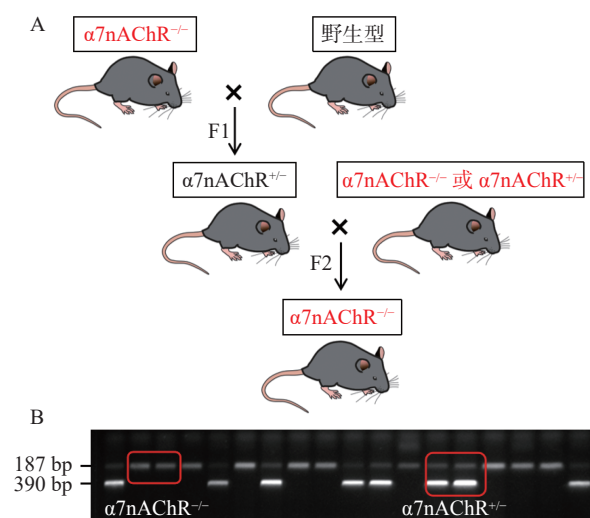


图 1 $\alpha 7\text{nAChR}$ 基因敲除鼠的繁育
A. $\alpha 7\text{nAChR}^{-/-}$ 小鼠的繁育模式图; B. $\alpha 7\text{nAChR}^{-/-}$ 小鼠基因型鉴定的琼脂糖凝胶电泳结果

为明确敲除 $\alpha 7\text{nAChR}$ 对小鼠基本生理指标是否有影响, 同步记录 $\alpha 7\text{nAChR}^{-/-}$ 小鼠和 WT 小鼠(8~12 周龄)的进食、饮水量及体重变化; 同时选用 8 周龄 $\alpha 7\text{nAChR}^{-/-}$ 小鼠与 WT 小鼠, 检测两者心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺与体重的比值, 见图 2。结果发现: 两组小鼠的体重、进食饮水量及重要脏器体重比均无显著差异。以上结果提示敲除 $\alpha 7\text{nAChR}$ 对小鼠基本生理体征无明显影响。

2.2 敲除 $\alpha 7\text{nAChR}$ 加重 CaCl_2 诱导的小鼠 AAA 损伤与其他啮齿类动物 AAA 模型相比, CaCl_2 诱

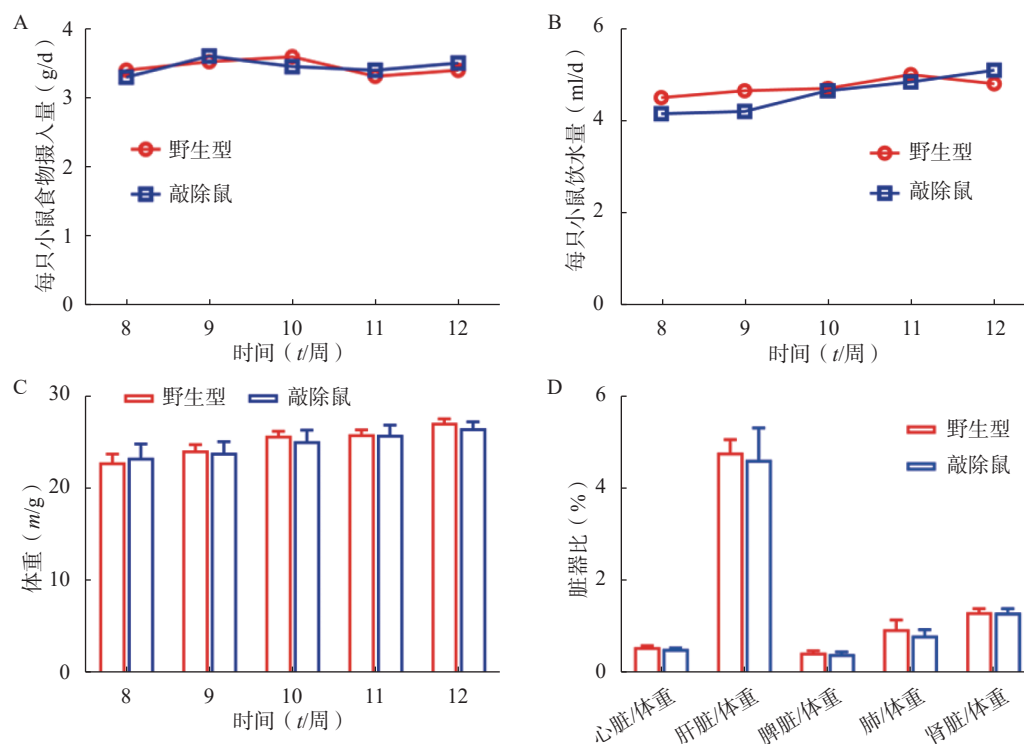


图 2 野生型及敲除鼠的基本生理指标 ($n=6$)

A-B. 野生型小鼠与敲除鼠(8~12 周龄)的进食饮水量; C. 野生型小鼠与敲除鼠(8~12 周龄)的体重;
D. 8 周龄野生型小鼠与敲除鼠的组织体重比

导的 AAA 小鼠模型病变部位常位于肾动脉分支下段的腹主动脉, 与人类 AAA 相似^[19]。故选用 CaCl_2 诱导小鼠形成 AAA 模型。如图 3 所示, 对照组的 WT 与 $\alpha 7\text{nAChR}^{-/-}$ 小鼠主动脉壁的 3 层组织结构即内膜、中膜和外膜均清晰可见, 弹性纤维结构完整, 走行规则, 厚度均匀。与对照组相比, CaCl_2 孵育后的 AAA 小鼠主动脉壁组成结构明显被破坏,

中膜的弹性纤维层显著变薄, 甚至断裂、消失, 中膜部分僵直并失去正常的波浪状结构, 有的呈烧焦状。值得注意的是, 敲除 $\alpha 7\text{nAChR}$ 的小鼠 CaCl_2 孵育后其主动脉的损伤更为严重。

对 HE 染色结果进行统计分析发现: WT 和 $\alpha 7\text{nAChR}^{-/-}$ 小鼠的主动脉直径及中膜厚度, 无明显差异; CaCl_2 孵育后, 模型组小鼠主动脉明显扩张,

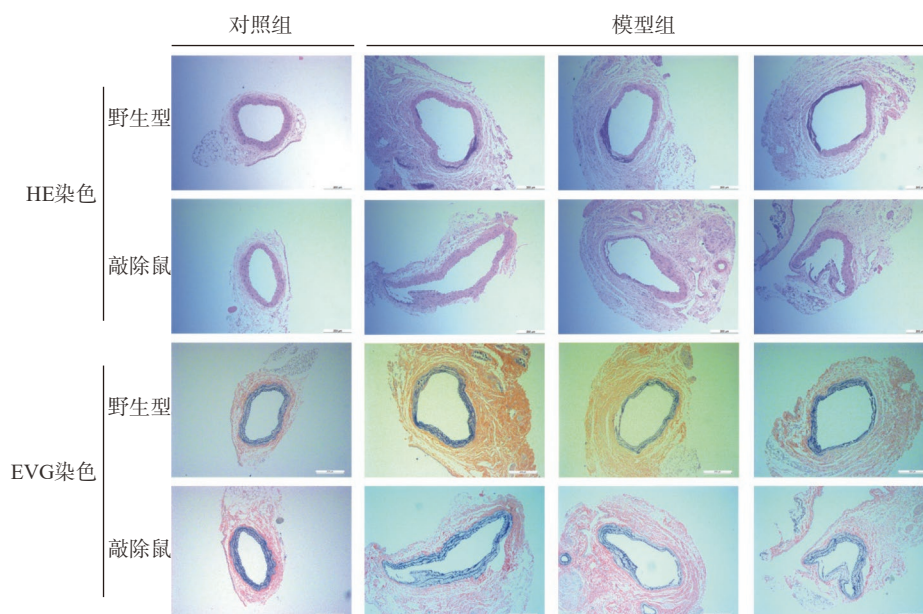


图 3 各组小鼠主动脉 HE 染色及 EVG 染色结果 ($\times 200 \mu\text{m}$)

中膜明显变薄, 证明成功构建小鼠 AAA 模型; 与 WT+CaCl₂ 小鼠相比, $\alpha 7nAChR^{-/-}$ +CaCl₂ 小鼠主动

脉进一步扩张, 中膜厚度进一步减小, 即 $\alpha 7nAChR^{-/-}$ 小鼠 AAA 模型中腹主动脉损伤更严重, 见图 4。

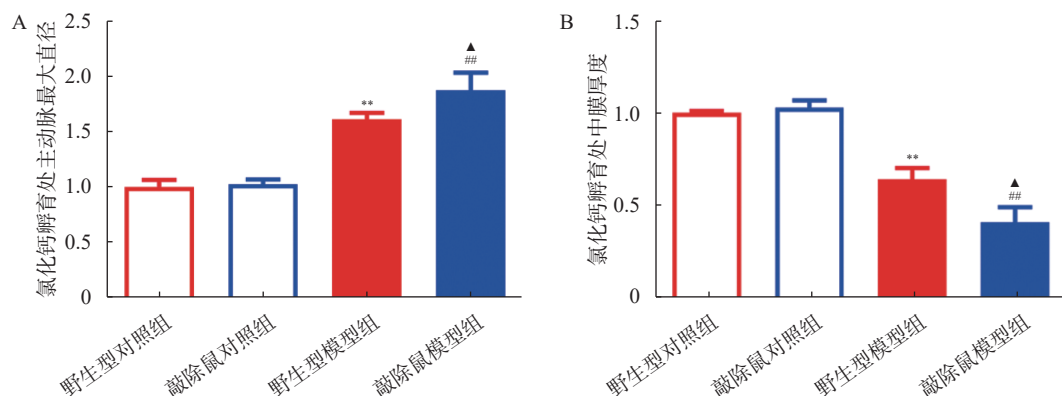


图 4 各组小鼠氯化钙孵育处主动脉最大直径及中膜厚度统计图 ($n=7$)

A. 主动脉最大直径统计; B. 中膜厚度统计

注: 野生型对照组均一化为 1; ** $P<0.01$, 与野生型对照组比较; ## $P<0.01$, 与敲除鼠对照组比较; ▲ $P<0.05$, 与野生型模型组比较。

2.3 敲除 $\alpha 7nAChR$ 进一步加重 CaCl₂ 诱导的 AAA 小鼠主动脉炎症反应

研究认为, 血管慢性炎症是腹主动脉瘤形成的核心因素之一^[20]。前面的研究证明敲除 $\alpha 7nAChR$ 明显加重了 AAA 小鼠的主动脉损伤。为了验证这一

结果是否与加重小鼠血管壁炎症反应相关, 通过 IHC 染色检测了各组小鼠主动脉中炎症因子的表达情况。结果显示, CaCl₂ 诱导后, 与 WT+CaCl₂ 小鼠相比, 敲除 $\alpha 7nAChR$ 显著增加了 AAA 小鼠主动脉中炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 的表达, 见图 5。

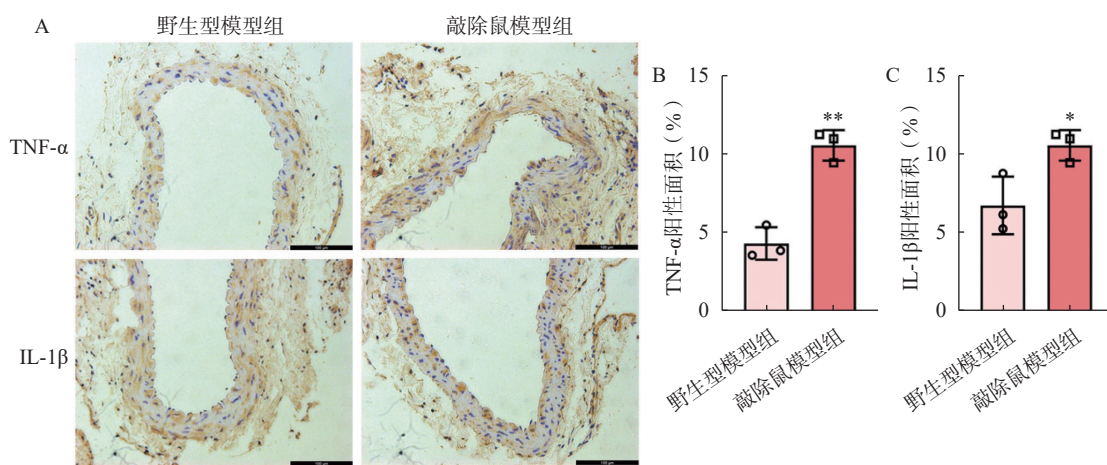


图 5 CaCl₂ 诱导的 AAA 小鼠主动脉中炎症因子的表达 ($n=3$, $\times 100 \mu m$)

A. TNF- α 及 IL-1 β 免疫组化染色图; B. TNF- α 免疫组化统计; C. IL-1 β 免疫组化统计

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与野生型模型组比较。

2.4 敲除 $\alpha 7nAChR$ 显著上调 CaCl₂ 诱导的 AAA 小鼠主动脉中 NLRP3 及 GSDMD 的蛋白表达

近来, 许多研究表明 NLRP3 炎症小体与 AAA 的发生发展有一定相关性^[21-22]。NLRP3 的激活可以促进 pro-Caspase-1 的自我剪切, GSDMD 可以被激活的 Caspase-1 切割, N-GSDMD 通过在细胞膜上形成寡聚孔从而引发细胞焦亡^[23]。因此, 评估 NLRP3 和 GSDMD 在 AAA 中的表达。IHC 染色结果显示, 与 WT+CaCl₂ 小鼠相比, 小鼠缺失 $\alpha 7nAChR$ 后, 其主动脉中 NLRP3 和 GSDMD 的表达水平明

显上调, 见图 6。这一结果提示敲除 $\alpha 7nAChR$ 使 AAA 小鼠主动脉损伤更严重, 可能是通过激活 NLRP3 及下游 GSDMD 进一步促进炎症因子释放所致。

2.5 激活 $\alpha 7nAChR$ 抑制大鼠原代 VSMC 中 NLRP3 蛋白的表达

选用 100 ng/ml 的 TNF- α 刺激大鼠原代 VSMC 模拟 AAA 血管慢性炎症的微环境^[24]。首先在大鼠来源的原代 VSMC 上, 明确了 TNF- α 刺激细胞不同时间对 MMP2、cleaved Caspase1 和 NLRP3 蛋白

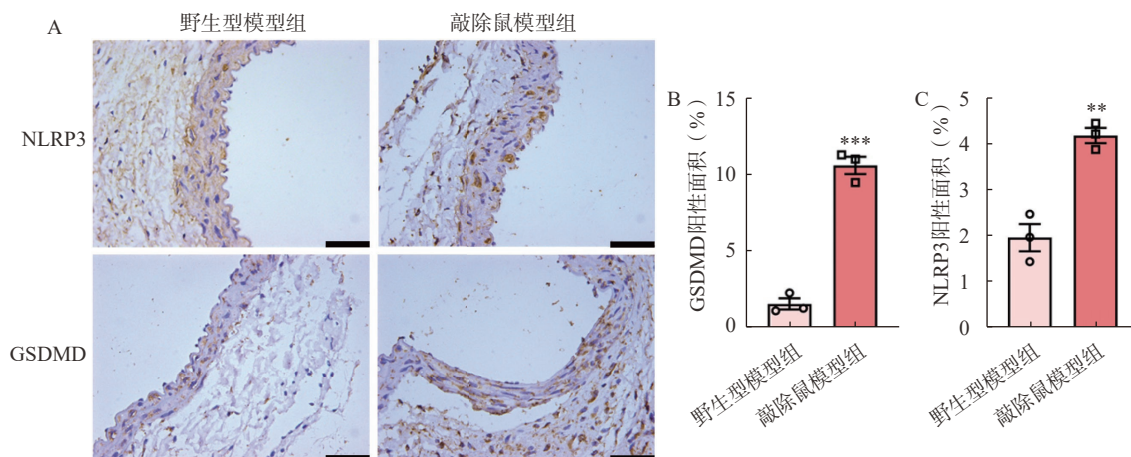


图6 CaCl_2 诱导的 AAA 小鼠主动脉中 NLRP3/GSDMD 的表达 ($n=3$, $\times 50 \mu\text{m}$)

A. NLRP3 和 GSDMD 免疫组化染色图; B. GSDMD 免疫组化统计; C. NLRP3 免疫组化统计

** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与野生型模型组比较。

表达的影响。结果表明:随着 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激 VSMC 时间的增加, MMP2、cleaved Caspase1 和 NLRP3 的

蛋白表达逐渐增多, 在 24 h 时达到峰值, 见图 7。因此后续实验选择的 $\text{TNF-}\alpha$ 给药时间点为 24 h。

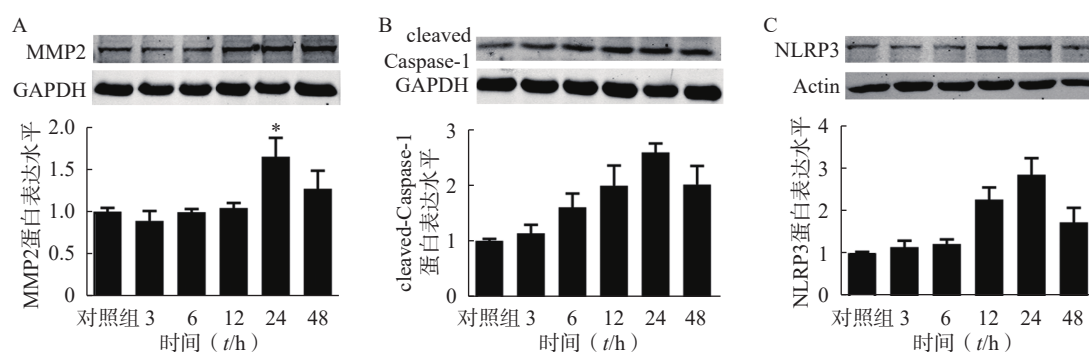


图7 不同时间的 $\text{TNF-}\alpha$ 刺激下大鼠原代 VSMC 细胞中 MMP2、cleaved Caspase1、NLRP3 蛋白的表达 ($n=6$)

A. MMP2 蛋白表达及统计; B. cleaved Caspase1 蛋白的表达及统计; C. NLRP3 蛋白的表达及统计

注: 对照组均一化为 1; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。

上述体内实验已证明敲除 $\alpha 7\text{nAChR}$ 可能通过激活 NLRP3 炎症小体进一步促进炎症因子的释放而加重 AAA 小鼠主动脉损伤。因此猜测激活 $\alpha 7\text{nAChR}$ 能够抑制 NLRP3 炎症小体的激活。通过蛋白质印迹 (Western blot, WB) 法检测 PNU-

282987 (10 $\mu\text{mol/L}$) 激活 $\alpha 7\text{nAChR}$ 对 NLRP3 表达的影响。结果显示, 与对照组相比, $\text{TNF-}\alpha$ 模型组 NLRP3 的表达明显上调, 与 AAA 小鼠中 NLRP3 表达增加一致; 激活 $\alpha 7\text{nAChR}$ 能够显著抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的 NLRP3 表达上调, 见图 8。

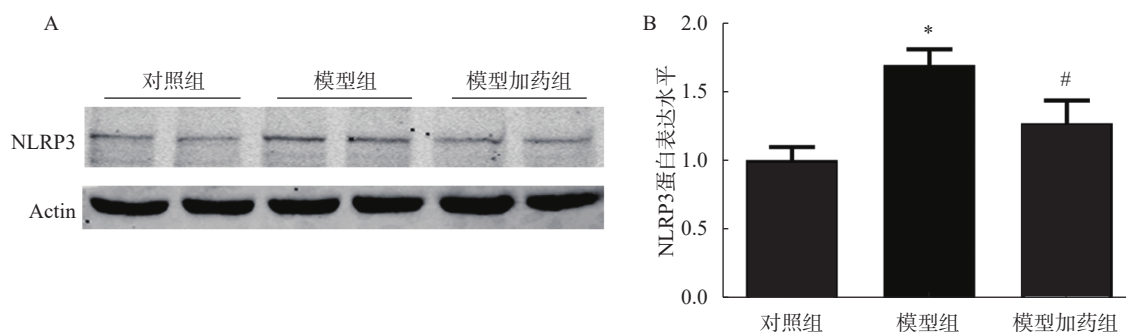


图8 激活 $\alpha 7\text{nAChR}$ 抑制大鼠原代 VSMC 中 NLRP3 蛋白的表达 ($n=4$)

A. NLRP3 蛋白表达; B. NLRP3 蛋白表达统计

注: 对照组均一化为 1; * $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与模型组比较。

3 讨论

AAA 一旦破裂,其致死率高达 80% 以上^[25]。近年来,我国逐步迈入老龄化社会,随着人口老龄化的加剧,AAA 的患病率也逐年增加^[26]。因此探寻减慢 AAA 扩张、延缓 AAA 病理进程的药理学干预靶点迫在眉睫。

血管壁慢性炎症在 AAA 发生发展过程中发挥着十分重要的作用。不论是在动物 AAA 模型还是人体病变的 AAA 组织中,均能检测到炎症细胞的浸润,如 CD4⁺T 细胞和巨噬细胞^[26]。Ang II 诱导 ApoE^{-/-}小鼠形成 AAA 模型是目前应用最广泛的造模方式,但该模型更接近主动脉夹层的病理特征,且瘤体多发生在肾动脉分支以上部位的主动脉处,与人类不同^[19]。而 CaCl₂ 诱导的小鼠 AAA 模型的病变部位常位于肾动脉分支下段的腹主动脉,正是人类 AAA 的常见部位,且该模型与人类 AAA 疾病相似的病理特征包括主动脉组织钙化、平滑肌细胞凋亡、蛋白酶活性增强、弹性蛋白被吸收、中膜变薄等^[20]。因此,选用 CaCl₂ 诱导小鼠 AAA 模型来探究 $\alpha 7$ nAChR 在 AAA 中的作用。结果表明, CaCl₂ 孵育成功诱导小鼠 AAA 模型,且与 WT 小鼠 AAA 组相比, $\alpha 7$ nAChR 敲除鼠 AAA 组的主动脉损伤更为严重, $\alpha 7$ nAChR 的缺失也进一步加重了 AAA 小鼠的炎症反应。

最近研究报道显示, $\alpha 7$ nAChR 可通过抑制小胶质细胞的 NLRP3 炎症小体对小鼠缺血性脑卒中起保护作用^[13]。MCC950 通过阻断巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体激活而抑制小鼠 AAA 的形成^[27]。众所周知, NLRP3 炎症小体的激活可以促进 pro-Caspase-1 的自我剪切, GSDMD 可以被活化的 Caspase-1 切割, N-GSDMD 通过在细胞膜上形成寡聚孔促使炎症因子释放从而引发细胞焦亡^[23], 猜测 NLRP3 炎症小体的激活参与了 AAA 的病理生理进程,并评估了 NLRP3 及 GSDMD 在 AAA 中的表达。研究发现,敲除 $\alpha 7$ nAChR 显著增加了 AAA 中 NLRP3 及 GSDMD 蛋白的表达;激活 $\alpha 7$ nAChR 可抑制 TNF- α 诱导的 VSMC 中 NLRP3 表达的上调。

综上所述,敲除 $\alpha 7$ nAChR 促使炎症因子增多加重 CaCl₂ 诱导的小鼠 AAA 损伤,而激活 $\alpha 7$ nAChR 可减少炎症因子释放减轻小鼠 AAA 损伤,其机制可能与调控 NLRP3/GSDMD 通路相关。本实验对激活 $\alpha 7$ nAChR 减轻 CaCl₂ 诱导小鼠 AAA 损伤的可能机制进行了初步探索,相关作用机制仍需更深入的研究。

【参考文献】

- [1] GOLLEDGE J, THANIGAIMANI S, POWELL J T, et al. Pathogenesis and management of abdominal aortic aneurysm[J]. *Eur Heart J*, 2023, 44(29): 2682-2697.
- [2] BAMAN J R, ESKANDARI M K. What is an abdominal aortic aneurysm?[J]. *JAMA*, 2022, 328(22): 2280.
- [3] FENTON C, TAN A R, ABARAOGU U O, et al. Prehabilitation exercise therapy before elective abdominal aortic aneurysm repair[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 7(7): CD013662.
- [4] BOSSONE E, EAGLE K A. Epidemiology and management of aortic disease: aortic aneurysms and acute aortic syndromes[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(5): 331-348.
- [5] GOLLEDGE J, MOXON J V, SINGH T P, et al. Lack of an effective drug therapy for abdominal aortic aneurysm[J]. *J Intern Med*, 2020, 288(1): 6-22.
- [6] ZHANG S M, LIU J, JIA X, et al. Investigating the inverse association between glycaemia and abdominal aortic dilatation in a large Chinese hypertensive population: a cross-sectional study[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(7): 419.
- [7] BECKMAN J A, SULLIVAN A E. Lipoprotein(a), peripheral artery disease, and abdominal aortic aneurysm: the next frontier or another risk enhancer?[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2023, 82(24): 2277-2279.
- [8] KUGO H, MORIYAMA T, ZAIMA N. Nicotine induces Vasa vasorum stenosis in the aortic wall[J]. *Biotech Histochem*, 2024, 99(4): 197-203.
- [9] MA Y, LI D K, CUI F P, et al. Air pollutants, genetic susceptibility, and abdominal aortic aneurysm risk: a prospective study[J]. *Eur Heart J*, 2024, 45(12): 1030-1039.
- [10] SINCLAIR P, KABBANI N. Ionotropic and metabotropic responses by alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 197: 106975.
- [11] WANG H, YU M, OCHANI M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation[J]. *Nature*, 2003, 421(6921): 384-388.
- [12] ALLEN N V. The cholinergic anti-inflammatory pathway in humans: state-of-the-art review and future directions[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2022, 136: 104622.
- [13] XIA X M, DUAN Y, WANG Y P, et al. Vagus nerve stimulation as a promising neuroprotection for ischemic stroke via $\alpha 7$ nAChR-dependent inactivation of microglial NLRP3 inflammasome[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(7): 1349-1365.
- [14] WEN C, XUE F S, WANG Y H, et al. Hypercholesterolemia attenuates cardioprotection of ischemic preconditioning and post-conditioning with $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist by enhancing inflammation and inhibiting the PI3K/Akt/ENOS pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(5): 342.
- [15] LIN W H, LUO S Y, LI W, et al. Association between the non-HDL-cholesterol to HDL-cholesterol ratio and abdominal aortic aneurysm from a Chinese screening program[J]. *Lipids Health Dis*, 2023, 22(1): 187.
- [16] SUN L K, LI X, LUO Z C, et al. Purinergic receptor P2X7 contributes to abdominal aortic aneurysm development via modulating macrophage pyroptosis and inflammation[J]. *Transl Res*, 2023, 258: 72-85.
- [17] WANG S F, WANG J F, CAI D H, et al. Reactive oxygen species-induced long intergenic noncoding RNA p21 accelerates

- abdominal aortic aneurysm formation by promoting secretory smooth muscle cell phenotypes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2023, 174: 63-76.
- [18] PHIE J, THANIGAIMANI S, GOLLEDGE J. Systematic review and meta-analysis of interventions to slow progression of abdominal aortic aneurysm in mouse models[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(4): 1504-1517.
- [19] GOLLEDGE J, LU H S, CURCI J A. Small AAAs: recommendations for rodent model research for the identification of novel therapeutics[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2024, 44(7): 1467-1473.
- [20] 付慧, 周灿灿, 李冬洁, 等. 腹主动脉瘤的研究进展: 病理机制及动物模型 [J]. 中国医学科学院学报, 2022, 44(3): 516-520.
- [21] HU J X, XU J M, ZHAO J L, et al. Colchicine ameliorates short-term abdominal aortic aneurysms by inhibiting the expression of NLRP3 inflammasome components in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 964: 176297.
- [22] LIU S, XUE Y J, YIN R P, et al. 3, 4-Benzopyrene (Bap) aggravated abdominal aortic aneurysm formation by targeting pyroptosis in smooth muscle cells through ET-1 mediated NLRP3-inflammasome activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt A): 110851.
- [23] LIU X, ZHANG Z B, RUAN J B, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 153-158.
- [24] ZHAI M C, GUO J Y, MA H Y, et al. Ursolic acid prevents angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E-knockout mice[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 271: 128-135.
- [25] CHEN W L, KAN C D, HUANG Y T, et al. Influence of endovascular surgery on abdominal aortic aneurysm management strategies from a national health insurance database survey[J]. *J Chin Med Assoc*, 2024, 87(12): 1060-1067.
- [26] ANAGNOSTAKOS J, LAL B K. Abdominal aortic aneurysms[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2021, 65: 34-43.
- [27] REN P P, WU D, APPEL R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome with inhibitor MCC950 prevents aortic aneurysms and dissections in mice[J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(7): e014044.
- [收稿日期] 2024-09-20 [修回日期] 2025-04-16
[本文编辑] 崔俐俊

(上接第 399 页)

- [14] 滕晓焕, 杜淑霞, 柯剑丽, 等. 离子液体-酶辅助水提紫苏叶挥发油工艺优化及成分分析 [J]. 广东轻工职业技术大学学报, 2024, 23(5): 19-25.
- [15] 郭群群. 紫苏抗菌活性成分研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2002.
- [16] 褚宏叶, 杨仕梅, 商志伟, 等. 两种紫苏挥发油体外抑菌效果评价 [J]. 山地农业生物学报, 2021, 40(5): 34-39.
- [17] 张杨, 李晓明, 胡芬, 等. 静电纺丝紫苏醛/甲基- β -环糊精包合物纳米纤维的制备与表征 [J]. 精细化工, 2024, 41(4): 820-828.
- [18] 智亚楠, 赵筱岑, 常卫格, 等. 罗勒和紫苏挥发油的化学组分及其抑菌活性分析 [J]. 信阳农林学院学报, 2022, 32(2): 92-97.
- [19] WANG D B, SUN Z L, SUN J Y, et al. Preparation and characterization of polylactic acid nanofiber films loading *Perilla* essential oil for antibacterial packaging of chilled chicken[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 192: 379-388.
- [20] 莫启进, 朱广通, 张丽霞. 紫苏醇硒氨酸酯化合物的合成及抗菌活性研究 [J]. 南宁师范大学学报(自然科学版), 2024, 41(4): 172-176.
- [21] 冯劼, 王薇, 余陈欢. 紫苏叶挥发油化学成分分析及其抗炎机制研究 [J]. 海峡药学, 2011, 23(5): 45-48.
- [22] CHEN L, QU S, YANG K L, et al. Perillaldehyde: a promising antifungal agent to treat oropharyngeal candidiasis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 180: 114201.
- [23] 张彦, 郭增军, 张寒, 等. 八种植物挥发油的抗氧化活性比较研究 [J]. 中国食品添加剂, 2017, 28(8): 49-54.
- [24] 曾燕茹, 陈少美, 徐陞梅. PK 型紫苏叶精油 GC-MS 成分分析及抗氧化活性研究 [J]. 福建农业科技, 2024, 55(9): 44-50.
- [25] MASAHIRO T, RISA M, HARUTAKA Y, et al. Novel Antioxidants Isolated from *Perilla frutescens* Britton var. *crispa* (Thunb.) [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60(7): 1093-1095.
- [26] JI W W, LI R P, LI M, et al. Antidepressant-like effect of essential oil of *Perilla frutescens* in a chronic, unpredictable, mild stress-induced depression model mice[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2014, 12(10): 753-759.
- [27] NGUYEN L T H, NGUYEN N P K, TRAN K N, et al. Intranasal administration of the essential oil from *Perillae Folium* ameliorates social defeat stress-induced behavioral impairments in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 324: 117775.
- [28] 袁芑, 牛晓涛, 宋梦薇, 等. 紫苏挥发油对人肺癌细胞的体外抑制作用研究 [J]. 食品科技, 2017, 42(2): 235-238.
- [29] ZHANG Y, LIU S S, FENG Q, et al. Perillaldehyde activates AMP-activated protein kinase to suppress the growth of gastric cancer via induction of autophagy[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(2): 1716-1725.
- [30] 张媛. 载紫苏醇 DSPE-PEG-TPP 脂质体的制备及体外抑瘤评价 [D]. 桂林: 桂林医学院, 2022.
- [31] 刘蓉, 唐方, 凌海慧, 等. 紫苏叶油对结肠平滑肌细胞钙离子和膜电位的作用 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1302-1304.
- [32] YU Y N, REN Y Y, SHAO Z L, et al. Perillaldehyde improves diabetic cardiomyopathy by upregulating miR-133a-3p to regulate GSK-3 β [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 953: 175836.
- [收稿日期] 2024-12-27 [修回日期] 2025-02-27
[本文编辑] 陈盛新