

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.36.005

## 坎地沙坦抑制内毒素诱导的 VSMCs 炎症因子释放的作用研究

于新辉<sup>1</sup>, 闫超<sup>2</sup>, 孟哲<sup>2</sup>

(1. 苏州大学医学院附属太仓人民医院胸外科, 江苏太仓 215400;

2. 郑州大学第一附属医院心内科, 郑州 450003)

**摘要:**目的 研究坎地沙坦对内毒素(LPS)诱导血管平滑肌细胞(VSMCs)炎症因子释放的影响,探讨 Toll 样受体 4 (TLR4)介导的信号通路在这一过程中的作用。方法 原代培养大鼠 VSMCs, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定不同浓度坎地沙坦对 VSMCs 活性的影响。将细胞分为 5 组: A 组(对照组)、B 组(LPS 干预组)、C 组(LPS+ $10^{-7}$  mol/L 坎地沙坦)、D 组(LPS+ $10^{-6}$  mol/L 坎地沙坦)和 E 组(LPS+ $10^{-5}$  mol/L 坎地沙坦)。实时定量 PCR 和 Western blot 测定各组细胞 TLR4、髓样分化因子 88(Myd88) mRNA 和蛋白的表达、NF- $\kappa$ B(p65)的核转位水平; ELISA 测定各组细胞上清液白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )分泌水平; DCFH-DA 氧化法测定细胞内活性氧(iROS)含量。使用 TLR4 阻滞剂 TLR4 抗体、NADPH 氧化酶阻滞剂二联苯基碘(DPI)、NF- $\kappa$ B 阻滞剂 PDTC 或坎地沙坦与阻滞剂联用预处理细胞, ELISA 法测定 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 分泌水平。结果 坎地沙坦在  $10^{-8}$ ~ $10^{-3}$  mol/L 浓度范围内对 VSMCs 活性没有显著影响。同对照组相比,坎地沙坦可以有效抑制 LPS 诱导 VSMCs IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的释放,减少 TLR4、Myd88 mRNA 和蛋白的表达以及 iROS 的生成,抑制 NF- $\kappa$ B(p65)的核转位,并具有剂量依赖性。TLR4 抗体、DPI、PDTC 均能有效地抑制 LPS 诱导的炎症因子释放,坎地沙坦与阻滞剂联用显示出更强的抗炎作用。结论 坎地沙坦能够减少 LPS 诱导的 VSMCs 炎症因子 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 的分泌,这一作用可能是通过抑制 TLR4/Myd88-iROS-NF- $\kappa$ B 信号通路而实现的。

**关键词:**坎地沙坦;血管平滑肌细胞;Toll 样受体-4;白细胞介素-1 $\beta$ ;肿瘤坏死因子- $\alpha$

**中图分类号:**R541.4

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-8348(2014)36-4860-04

## Candesartan inhibits LPS-induced inflammatory cytokines release in VSMCs via TLR4-mediated signaling pathway

Yu Xinhui<sup>1</sup>, Yan Chao<sup>2</sup>, Meng Zhe<sup>2</sup>

(1. Department of Thoracic Surgery, Taicang People's Hospital, School of Medicine, Suzhou University,

Taicang, Jiangsu 215400, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated

Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450003, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of candesartan (Can) on the LPS-induced proinflammatory cytokines release in VSMCs, and to explore the role of TLR4-mediated signaling pathway in this process. **Methods** Rat VSMCs were primarily cultured, and the effect of different concentrations of Can on VSMCs activity was observed by MTT assay. The cells were divided into 5 groups: A (control), B (LPS intervention), C (LPS+ $10^{-7}$  mol/L Can), D (LPS+ $10^{-6}$  mol/L Can) and E (LPS+ Can  $10^{-5}$  mol/L Can). mRNA and protein levels of Toll-like receptor-4 (TLR4), myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) nuclear translocation were determined by real-time PCR and Western blot, respectively; IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  concentration were detected by ELISA. The production of intercellular reactive oxygen species (iROS) was measured by the DCFH-DA assay. Pretreating VSMCs with the inhibitors against TLR4, NADPH oxidase, and NF- $\kappa$ B, or a combination with candesartan and these inhibitors, and then the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was measured by ELISA. **Results** Can in the concentration range of  $10^{-8}$ ~ $10^{-3}$  mol/L had no significant effect on VSMCs activity. Compared with the control group, Can could effectively inhibit LPS-induced VSMCs, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  release, decreased the mRNA and protein expression of TLR4, Myd88, reduced the production of iROS, inhibited the NF- $\kappa$ B(p65) nuclear translocation with a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Anti-TLR4 antibody, DPI, and PDTC all inhibited LPS-induced inflammatory cytokines release in VSMCs, and the combination of Can and these blockers showed stronger anti-inflammatory effect. **Conclusion** Can can decrease the release of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in VSMCs stimulated by LPS, which is realized by inhibiting the signaling pathway of TLR4/Myd88-iROS-NF- $\kappa$ B.

**Key words:** candesartan; vascular smooth muscle cells; Toll-like receptor 4; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$

低度的持续性炎症反应对动脉粥样硬化的发展具有显著的促进作用<sup>[1-2]</sup>。病理状态下,血管平滑肌细胞(VSMCs)通过过度增殖及释放包括白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )在内的多种细胞因子、趋化因子、黏附分子,促进动脉粥样斑块的形成和发展,诱发斑块不稳<sup>[3]</sup>。Toll 受体 4 是最早发现的 Toll 样受体家族(TLRs)成员,它广泛分布于包括巨噬细胞、内皮细胞及 VSMCs 在内的多种具有心血管活性的细胞

表面<sup>[4-5]</sup>。TLR4 在与其特异性配体 LPS 结合后,通过上调 NF- $\kappa$ B(p65)等转录因子的表达,显著增加 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)等多种炎症因子的释放,从而诱发炎症级联反应<sup>[6-7]</sup>。已有研究表明:在动脉粥样硬化、原发性高血压和 2 型糖尿病等慢性炎症反应相关性疾病的靶器官(主要为心脏、血管、肾脏)内,TLR4 mRNA 和蛋白的表达均有明显升高<sup>[8]</sup>。坎地沙坦属于血管紧张素 II 1 型受体(AT1 受体)拮抗

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物
TLR4	5'-GCTTTCACCTCTGCCTTAC-3'	5'-CGAGGCTTTTCCATCCAATA-3'
Myd88	5'-AAGAAAGTGAGTCTCCCCTC-3'	5'-TCCCATGAAACCTCTAACAC-3'
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

剂类药物,被广泛应用于原发性高血压<sup>[9]</sup>、糖尿病肾病<sup>[10]</sup>和慢性心力衰竭的临床治疗<sup>[11]</sup>。坎地沙坦已被证明能够有效地抑制 LPS 诱发的脑部及脾脏炎症反应<sup>[12-13]</sup>,逆转高脂饮食诱导的动脉粥样硬化病变<sup>[14]</sup>。本研究着眼于坎地沙坦对 LPS 诱导 VSMCs 炎症因子释放的影响及这种作用与 TLR4 介导的信号通路间的关系,以寻求坎地沙坦改善动脉粥样斑块病变的分子机制,为其用于冠心病的治疗提供一定的依据。

## 1 材料与与方法

**1.1 实验动物** 雄性 SD 大鼠,体质量 150~180 g,购于西安交通大学医学院实验动物中心。

**1.2 药品及试剂** 坎地沙坦(Wako 公司,日本),DMEM 高糖培养液(Gibco 公司,美国),胎牛血清及实时定量 PCR 试剂盒(TransGen 公司,北京),四甲基偶氮唑蓝(MTT)、DPI、PDTC 和 LPS(Sigma 公司,美国),TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒(BioSource International 公司,美国),兔抗大鼠 TLR4、Myd88、NF- $\kappa$ B(p65)、TLR4 抗体和  $\beta$ -actin(Santa Cruz 公司,美国),DCFH-DA 活性氧测定试剂(碧云天生物,北京)。

## 1.3 方法

**1.3.1 VSMCs 原代培养** 30%水合氯醛腹腔麻醉大鼠,快速分离胸主动脉,仔细剥离血管内膜及外膜,剪碎至 1~2 mm<sup>3</sup> 大小组织块,使用贴壁法培养。将细胞置于含 200 mL/L 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,其中含有 100 U/mL 的青霉素和 100  $\mu$ g/mL 的链霉素,然后放入 37  $^{\circ}$ C、50 mL/L CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中。使用相差显微镜和  $\alpha$ -actin 对 VSMCs 进行形态学和免疫组织化学鉴定。取第 3~6 代细胞,用于后续实验。

**1.3.2 实验分组** 将 VSMCs 分为 5 组:A 组(对照组)、B 组(LPS 干预组)、C 组(LPS+10<sup>-7</sup> mol/L 坎地沙坦)、D 组(LPS+10<sup>-6</sup> mol/L 坎地沙坦)和 E 组(LPS+10<sup>-5</sup> mol/L 坎地沙坦)。以上 B~E 组中 LPS 的浓度均为 500 ng/mL。

**1.3.3 MTT 比色法测定不同浓度坎地沙坦对 VSMCs 活性的影响** 将 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/孔 VSMCs 接种于 96 孔板,按照上述细胞培养条件培养 24 h,改用 20 mL/L 低血清培养基培养 12 h 后,给予坎地沙坦 10<sup>-8</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> 和 10<sup>-4</sup> mol/L 孵育 24 h。吸去培养液,每孔加入 MTT(5 g/L)20  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入二甲亚砷 100  $\mu$ L,微微振荡数次后,在全自动酶标仪上于 570 nm 处测定各组吸光度值。

**1.3.4 实时定量 PCR 检测各组 VSMCs TLR4 和 Myd88 mRNA 的表达** 以 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔的密度将细胞接种于 6 孔板中,坎地沙坦(10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L)预处理 1 h 后,加入 LPS (500 ng/mL)孵育 6 h,按照说明书使用 Trizol 提取各组细胞总 RNA。10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性,分光光度计在 260 nm 处检测 RNA 的纯度。按照逆转录试剂盒(TransGen 公司,北京)操作步骤,将各组 mRNA 反转录为 cDNA。使用 Primer7.0 软件设计荧光定量 PCR 引物,由南京金兹瑞公司合成,序列如表 1 所示。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 15 s,55  $^{\circ}$ C 退火 15 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共计 40 个循环。使用 Bio-Rad IQ5 荧光 PCR 仪自带分析软件对实时定量

PCR 结果进行分析。

**1.3.5 DCFH-DA 氧化法测定细胞内 ROS 生成** 取生长状态良好的 VSMCs,以 2 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/孔的密度种植于 96 孔板中,生长 24 h 后,给予坎地沙坦(10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L)预处理 1 h。弃去细胞上清液,加入 25  $\mu$ mol/L 的 DCFH-DA 溶液,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h。仔细漂洗干净后,再给予含有 500 ng/mL LPS 高糖 DMEM 培养基刺激 2 h。酶标仪在 485 nm 激发波长和 528 nm 发射波长条件下,测定各组吸光度值。

**1.3.6 Western blot 检测各组 VSMCs TLR4、Myd88 和 NF- $\kappa$ B(p65)蛋白的表达** 以 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔的密度将细胞接种于 6 孔板中,10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L 坎地沙坦孵育 1 h 后,加入 LPS (500 ng/mL)刺激 9 h。每孔使用 150  $\mu$ L RIPA 裂解液提取蛋白。核蛋白使用核蛋白提取试剂盒(Pierce NE-PER kit)进行提取。BCA 蛋白定量试剂盒测定各组样品蛋白浓度。加入蛋白上样缓冲液并煮沸后,制作 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳,半干转膜仪转膜。一抗浓度为:TLR4(1:200)、Myd88(1:500)、NF- $\kappa$ B(p65)(1:200)和  $\beta$ -actin(1:2000)。以  $\beta$ -actin 作为内参照。化学发光法检测,采集图像,利用 Quantity one 软件进行图像分析。

**1.3.7 ELISA 测定上清液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达** 将各组 VSMCs 以 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种于 96 孔板中,不同浓度坎地沙坦预处理 1 h,再给予 500 ng/mL 的 LPS 刺激 24 h。使用 TLR4 抗体(5  $\mu$ g/mL)、DPI(20  $\mu$ mol/L)、PDTC(80  $\mu$ mol/L)或联合坎地沙坦(10<sup>-5</sup> mol/L)预处理细胞 1 h,再给予 500 ng/mL 的 LPS 刺激 24 h。收集各孔内细胞上清液,依据操作说明,使用 ELISA 试剂盒测定 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌。使用自动酶联免疫吸附仪在 450 nm 处读取数值,绘制 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的标准曲线,并据此计算各实验组结果。

**1.4 统计学处理** 使用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较使用单因素方差分析,多重均数比较使用 SNK 检验, $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

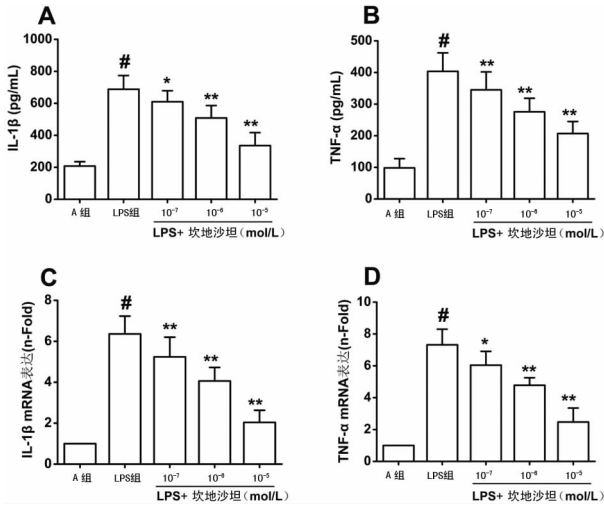
## 2 结果

**2.1 不同浓度坎地沙坦对 VSMCs 活性的影响** 为了明确不同浓度坎地沙坦有无细胞毒性作用,使用 MTT 对不同浓度坎地沙坦干预的 VSMCs 活性进行测定。结果显示:在 10<sup>-8</sup>~10<sup>-4</sup> mol/L 范围内,坎地沙坦对细胞活性均无明显影响。因此,以下实验选用 10<sup>-7</sup>~10<sup>-5</sup> mol/L 这一中间浓度进行干预。

**2.2 不同浓度坎地沙坦对 VSMCs IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白表达的影响** 见图 1,如图 1A、1B 所示,500 ng/mL LPS 刺激 24 h 后,LPS 组细胞上清液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分泌明显增多,分别为 675.15、401.26 pg/mL( $P<0.01$ )。给予不同浓度坎地沙坦(10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L)预处理 1 h 后,IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分泌显著下降,并呈现剂量依赖性( $P<0.05$ )。在 mRNA 水平,坎地沙坦也可以有效抑制 LPS 诱导的 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达升高( $P<0.05$ ),见图 1C、1D。

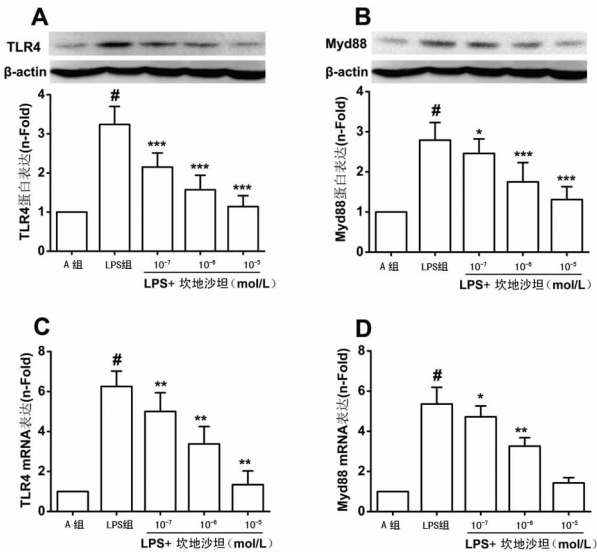
**2.3 不同浓度坎地沙坦对 TLR4、Myd88 mRNA 和蛋白表达的影响** 500 ng/mL LPS 刺激 4 h 后,TLR4 和 Myd88 蛋白表

达明显增加( $P < 0.01$ )。使用  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L 坎地沙坦预处理 1 h 后,再给予相同浓度 LPS 刺激 24 h,与 LPS 组比较,TLR4 和 Myd88 蛋白表达显著减少,并呈现剂量依赖性( $P < 0.05$ ),见图 2A、2B。坎地沙坦也能够显著抑制 LPS 诱导的 TLR4 和 Myd88 mRNA 表达的升高,并具有浓度依赖性( $P < 0.05$ ),见图 2C、2D。



A: LPS 对 IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响; B: LPS 对 TNF- $\alpha$  蛋白表达的影响; C: LPS 对 IL-1 $\beta$  mRNA 表达的影响; D: LPS 对 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响。#:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , 与 LPS 组比较。

图 1 不同浓度坎地沙坦对 LPS 诱导的 VSMCs IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  mRNA 和蛋白表达的影响

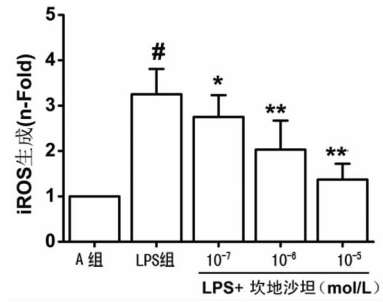


A: LPS 对 TLR4 蛋白表达的影响; B: LPS 对 Myd88 蛋白表达的影响; C: LPS 对 TLR4 mRNA 表达的影响; D: LPS 对 Myd88 mRNA 表达的影响。#:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , 与 LPS 组比较。

图 2 不同浓度坎地沙坦对 VSMCs TLR4、Myd88 mRNA 和蛋白表达的影响

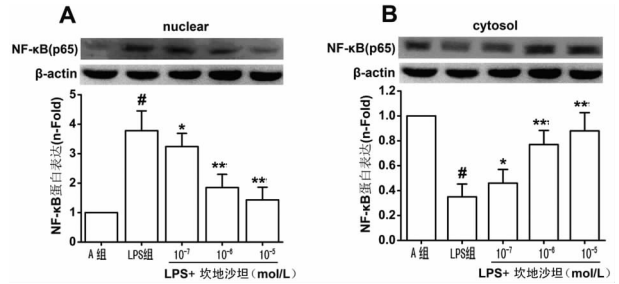
**2.4 不同浓度坎地沙坦对 iROS 生成的影响** 如图 3 所示,与对照组相比,LPS(500 ng/mL)显著增加 iROS 的生成( $P < 0.01$ ),使用  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L 坎地沙坦预处理 1 h,能够有效抑制 LPS 诱导的 VSMCs 内 iROS 的生成,并具有浓度依赖性( $P < 0.05$ )。提示坎地沙坦能够有效地抑制 LPS 诱导的 VSMCs iROS 生成。见图 3。

**2.5 不同浓度坎地沙坦对 NF- $\kappa$ B(p65)核转位的影响** NF- $\kappa$ B 为核转录因子,细胞核内的 NF- $\kappa$ B(p65)含量可以间接反映 NF- $\kappa$ B 的活化。500 ng/mL LPS 刺激 24 h 后,细胞核内 NF- $\kappa$ B(p65)的蛋白表达明显上升( $P < 0.01$ ),而细胞质内 NF- $\kappa$ B(p65)的含量则显著降低( $P < 0.01$ )。使用坎地沙坦( $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L)预处理 1 h 后,再给予相同浓度 LPS 刺激 9 h,较 LPS 组,NF- $\kappa$ B(p65)核转位水平明显下降,并呈现剂量依赖性(图 4)。结果表明坎地沙坦能够有效抑制 LPS 诱导的 VSMCs NF- $\kappa$ B 活化。



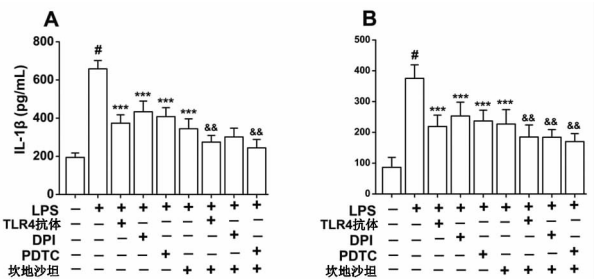
#:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , 与 LPS 组比较。

图 3 不同浓度坎地沙坦对 iROS 生成的影响



A: LPS 对细胞核内 NF- $\kappa$ B(p65)蛋白含量的影响; B: LPS 对胞质 NF- $\kappa$ B(p65)蛋白含量的影响。#:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , 与 LPS 组比较。

图 4 不同浓度坎地沙坦对 LPS 诱导的 VSMCs NF- $\kappa$ B(p65)核转位的影响



A: 阻滞剂对 LPS 诱导的 VSMCs IL-1 $\beta$  分泌的影响; B: 阻滞剂对 LPS 诱导的 VSMCs TNF- $\alpha$  分泌的影响。\*:  $P < 0.01$ , 与 A 组比较; &#:  $P < 0.01$ , 与坎地沙坦组比较。

图 5 坎地沙坦通过 TLR4/Myd88-iROS-NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 LPS 诱导的 VSMCs IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分泌

**2.6 TLR4/Myd88-iROS-NF- $\kappa$ B 信号通路在坎地沙坦抑制 LPS 诱导的 VSMCs IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分泌中的作用** TLR4 抗体、NADPH 氧化酶抑制剂 DPI、NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC 均可以部分抑制 LPS(500 ng/mL)诱导的 VSMCs IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白表达( $P < 0.01$ ),联用坎地沙坦( $10^{-5}$  mol/L)可以显著加强这种抑制作用( $P < 0.01$ ),见图 5。结果提示,坎地沙坦可能通

过 TLR4/Myd88-iROS-NF- $\kappa$ B 信号通路起到对 LPS 诱导的 VSMCs 炎症反应的抑制作用。

### 3 讨 论

低度的持续性炎症反应已被证实能够促进动脉粥样斑块发展和失稳<sup>[1-2]</sup>。TLR4 与 LPS 等配体结合后,通过诱发相关炎症通路激活,上调多种炎症因子、趋化因子和黏附分子的表达,触发炎症级联反应<sup>[8]</sup>。此外,TLR4 还具有显著的天然免疫和获得性免疫调节功能<sup>[5]</sup>。TLR4 能够通过 Myd88 依赖性传导通路诱发 NF- $\kappa$ B 核转位,增加 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  等炎症因子的分泌;也可通过非 Myd88 依赖性传导通路诱发干扰素调节因子 3(IRF3)核转位,继而增加干扰素的分泌。以上两种途径均能够显著促进斑块的形成和失稳<sup>[15]</sup>。在人类及动物模型的粥样斑块内,TLR4 的表达均有明显升高<sup>[16]</sup>。同时给予 TLR4 基因敲除和非敲除 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 12 周高脂饮食后发现,TLR4 基因敲除 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样斑块面积明显减小,同时稳定性增强<sup>[15]</sup>。据此可知,TLR4 及其下游通路的激活是动脉粥样硬化疾病进展的一个重要促进因素。此外,炎症反应常伴有 iROS 生成增加,iROS 不仅造成细胞亚结构的损伤和信号通路的传导异常,同时也可以作为第二信使,参与信号传导。本实验发现:给予 VSMCs LPS 刺激后,TLR4 及 Myd88 mRNA 和蛋白表达均明显增加;伴随 iROS 合成增加和 NF- $\kappa$ B(p65)核转位水平升高,下游 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌亦显著增加。使用 TLR4 特异性抗体、NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 和 NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC 预处理 VSMCs,能够显著抑制 LPS 诱导的 VSMCs IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌。上述结果提示:TLR4/Myd88-iROS-NF- $\kappa$ B 信号通路的激活参与了 LPS 诱导的 VSMCs 炎症因子分泌过程。

坎地沙坦是临床常用的 ARB 类降血压药物。最近,坎地沙坦已被证实可通过下调氧化应激、改善内皮功能等机制,抑制高糖诱导的血管和肾小球细胞炎症反应<sup>[9,11]</sup>。此外,坎地沙坦亦可通过降低 TLR4 信号通路激活、下调天然免疫,减轻 LPS 引起的小鼠脾脏和肾上腺炎症反应<sup>[13,17]</sup>。临床研究也表明,轻中度的慢性心功能不全和高血压患者服用坎地沙坦干预后,血浆中 C 反应蛋白、IL-6 及 MCP-1 等炎症因子水平明显下降<sup>[18]</sup>。在本实验中,坎地沙坦可以剂量依赖性地降低 VSMCs TLR4 mRNA 和蛋白表达;抑制 iROS 的生成和 NF- $\kappa$ B 激活;进而减少炎症因子的释放,起到有效的抗炎作用。此外,坎地沙坦和 TLR4 特异性抗体、NADPH 抑制剂 DPI 和 NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC 联用,显示出更显著的炎症因子表达抑制作用。据此可知,坎地沙坦能够有效抑制 LPS 诱导的 VSMCs IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  分泌,这可能与坎地沙坦对 TLR4/Myd88-iROS-NF- $\kappa$ B 信号通路的抑制作用有关。上述研究结果为坎地沙坦应用于动脉粥样硬化的治疗提供了一定的实验依据。

### 参考文献:

[1] Siegel D, Devaraj S, Mitra A, et al. Inflammation, atherosclerosis, and psoriasis[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013, 44(2):194-204.

[2] Manduteanu I, Simionescu M. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders[J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(9):1978-1990.

[3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 11(2):801-809.

[4] Bruce A. TLRs and innate immunity[J]. *Blood*, 2009, 113(7):1399-1407.

[5] Himanshu K, Taro K, Shizuo A. Toll-like receptors and innate immunity[J]. *BBRC*, 2009, 338(4):621-625.

[6] Hang S, Maia V, Kokoeva, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(11):3015-3025.

[7] Jeongmin S, Matthew J, Duncan, et al. A Novel TLR4-Mediated Signaling Pathway Leading to IL-6 Responses in Human Bladder Epithelial Cells[J]. *Plos One*, 2007, 3(4):541-552.

[8] O'Neill LA. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3(4):396-403.

[9] Heeneman S, Sluimer JC, Daemen MJ. Angiotensin converting enzyme and vascular remodeling[J]. *Circ Res*, 2007, 101(3):441-454.

[10] Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist decreases plasma levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and soluble adhesion molecules in patients with chronic heart failure[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 35(3):714-721.

[11] Donaire JA, Ruilope LM. Angiotensin receptor blockade in diabetic renal disease focus on candesartan[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2007, 76(1):22-30.

[12] Benicky J, Sanchez-Lemus E, Pavel J, et al. Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(6/7):781-792.

[13] Sanchez-Lemus E, Murakami Y, Larrayoa-Roldan IM, et al. Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(10):5177-5188.

[14] Johnstone MT, Perez AS, Nasser I, et al. Angiotensin receptor blockade with candesartan attenuates atherosclerosis, plaque disruption, and macrophage accumulation within the plaque in a rabbit model[J]. *Circulation*, 2004, 110(14):2060-2065.

[15] Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Toll-like receptors and atherosclerosis: key contributors in disease and health[J]. *Immunol Res*, 2006, 34(3):193-209.

[16] Li H, Sun B. Toll-like receptor 4 in atherosclerosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(1):88-95.

[17] Sánchez-Lemus E, Benicky J, Pavel J, et al. Angiotensin II AT1 blockade reduces the lipopolysaccharide-induced innate immune response in rat spleen[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 296(5):1376-1384.

[18] Dohi Y, Ohashi M, Sugiyama M, et al. Candesartan reduces oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension[J]. *Hypertens Res*, 2003, 26(9):691-697.