

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.14.015

NCX-4016 通过下调终末化糖基产物受体表达抑制高糖内环境诱导的动脉粥样硬化

寇 进¹, 尹 锐², 任 锋^{1△}

1. 武警陕西省总队医院心血管内科, 陕西西安 710054; 2. 成都医学院第二附属医院心血管内科, 四川成都 610057

摘 要:目的 探讨一氧化氮(NO)供体药物 NCX-4016 在 2 型糖尿病动脉粥样硬化模型小鼠中的保护作用, 并研究其与终末化糖基产物受体(RAGE)表达相关的分子机制。方法 10 只 apoE^{-/-}小鼠和 db/db 杂交后的 2 型糖尿病动脉粥样硬化模型小鼠给予高脂饮食诱导动脉粥样硬化形成后, 均分为实验组和对照组。实验组给予 NO 供体药物 NCX-4016, 对照组给予等量生理盐水, 处理 4 周后, 油红染色检测主动脉根部动脉粥样硬化斑块面积, Western bolt 法检测 RAGE 及炎症信号通路蛋白高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、核转录因子-κB(NF-κB)p65、RAGE 和炎症因子表达水平。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测模型小鼠可溶性晚期糖基化终末产物受体(sRAGE)的血清学水平。人脐静脉内皮细胞(hUVECs)经 NCX-4016 加或不加 eNOS 合酶抑制剂、PKG 抑制剂诱导后, 观察炎症通路信号蛋白和炎症因子的表达水平。结果 与对照组比较, 实验组小鼠主动脉根部动脉粥样硬化斑块面积明显减小, 差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组与对照组小鼠 ELISA 检测的血清 sRAGE 水平比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较, 实验组主动脉根部斑块组织内 RAGE 和 NF-κB p65 相对表达水平明显减少, eNOS 相对表达水平增加, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。同时, 与对照组比较, 实验组小鼠主动脉根部斑块组织内 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平明显减少, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。与单独 NCX-4016 处理比较, eNOS 抑制剂+NCX-4016 处理 hUVECs 中 IL-6 表达水平无明显改变($P>0.05$), 但 NF-κB p65、RAGE、IL-1β、TNF-α 表达水平明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$), PKG 抑制剂+NCX-4016 处理细胞中 NF-κB p65、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 表达水平均明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 NCX-4016 可以明显在体外抑制 hUVECs 中 RAGE 的表达, 在体外高糖刺激环境下抑制炎症反应, 在体内对糖尿病动脉粥样硬化模型小鼠的血管发挥保护作用。

关键词: NCX-4016; 动脉粥样硬化; 终末化糖基化产物受体

中图法分类号: R543.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2022)14-1934-06

NCX-4016 represses the atherosclerosis in diabetic atherosclerotic mouse through inhibition of RAGE

KOU Jin¹, YIN Rui², REN Feng^{1△}

1. Department of Cardiology, Shaanxi Armed Police Corps Hospital, Xi'an, Shaanxi 710054, China; 2. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610057, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of NCX-4016 as nitric oxide (NO) donor in type 2 diabetic atherosclerosis model mice and explore the underlying molecular mechanism associated with the receptor of advanced glycation end products (RAGE). **Methods** A total of 10 type 2 diabetic atherosclerosis model mice were obtained by crossing apoE^{-/-} mice and db/db mice. Atherosclerosis induced by high fat diet, and all the mice were divided into experimental group and control group. Experimental group was given NO donor drug NCX-4016, control group was given equivalent normal saline. The area of aortic root atherosclerotic plaques in type 2 diabetic atherosclerosis mice were observed by oil red staining after 4 weeks. Western blot analysis was used to detect the expression levels of HMGB1, NF-κB p65, RAGE and inflammatory factors. Serological levels of sRAGE in model mice were determined by ELISA. Human umbilical vein endothelial cells (hUVECs) were treated by NCX-4016 with or without inhibitor of eNOS, PKG. Then, inflammatory signaling pathway proteins, inflammatory factors were determined. **Results** Compared with that in control group, the area of atherosclerotic plaque in the aortic root in experimental group reduced significantly ($P<0.05$). There was no significant difference on serum sRAGE level between the two groups detected by ELISA. Compared with the control group, the expression of RAGE and NF-κB p65 in aortic root plaque tissue in experimental

group decreased significantly, and the expression of eNOS increased, with statistical significance ($P < 0.05$). At the same time, the expression of local inflammatory factors TNF- α , IL-6 and IL-1 β decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with NCX-4016 alone, expression of NF- κ B p65, RAGE, IL-1 β , TNF- α increased significantly ($P < 0.05$), whereas no difference on IL-6 was observed after eNOS inhibitor + NCX-4016 treatment ($P > 0.05$). Expression of NF- κ B p65, IL-1 β , IL-6 and TNF- α increased significantly after PKG inhibitor + NCX-4016 treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** NCX-4016 could significantly inhibit the expression of RAGE in hUVECs in vitro, which could repress inflammatory responses under high glucose stimulating conditions, and play a protective effects in diabetic atherosclerotic model mice.

Key words: NCX-4016; atherosclerosis; advanced glycation end products

近年来,我国冠心病发病率快速增长^[1]。目前,尽管临床上对冠心病采取了有效的二级预防及介入治疗措施,但其发病率及病死率在西方国家仍居高不下^[1]。动脉粥样硬化是一种由脂代谢异常和血管壁斑块脂质沉积介导的慢性炎症性疾病^[2]。近年来,终末化糖基产物受体(RAGE)作为天然免疫中的一种模式识别受体,其在动脉粥样硬化进程中的作用及机制已被广泛深入地研究,已被证实不仅参与了动脉粥样硬化的早期形成,也促进了晚期斑块的进展^[2-3]。研究发现,通过基因敲除或给予竞争性拮抗剂等方法降低 RAGE 表达,可明显抑制动脉粥样硬化斑块的形成,并稳定晚期斑块^[4],这说明 RAGE 是防治动脉粥样硬化的潜在关键靶点。内皮功能不全常常与动脉粥样硬化合并发生,既是冠状动脉粥样硬化的起始阶段,也是血管壁炎症反应激活状态下血管内皮细胞的损伤性反应^[5]。一氧化氮(NO)作为一种重要的血管舒张因子,通过鸟苷酸环化酶途径促进环磷酸鸟苷(cGMP)的生成,其减少将抑制 cGMP 形成,导致血管收缩,进一步加重血管内皮功能障碍。因此,NO 是一种抗动脉粥样硬化和抗血栓形成的内源性物质^[6]。有学者在动物实验中已经发现 NO 供体药物 NCX-4016 对脂多糖(LPS)介导的大鼠内毒素血症具有明显的抗炎作用,但没有对其是否可以明显抑制或逆转动脉粥样硬化斑块的形成做出解答^[7]。从机制上来说,虽然目前已有研究发现在慢性肾脏病和糖尿病肾病患者中,AGEs/RAGE 通路通过抑制内皮型一氧化氮合酶(eNOS),影响内源性 NO 的产生,从而使正常的抗炎和细胞保护效应丧失。但是否存在 RAGE-eNOS 的正反馈环路,即外源性补充 NO 分子是否能够通过抑制 RAGE 介导的固有免疫炎症通路同时促进下游 eNOS 表达的增加,从而发挥抗炎和抗动脉粥样硬化作用仍然不得而知^[8-9]。因此,本研究提出了 NO 可以直接影响血管 RAGE 表达水平,发挥抗炎作用,进而抑制动脉粥样硬化进程的假设,希望证实并阐明 NO 对动脉粥样硬化及损伤内皮细胞中 RAGE 表达的调节作用及机制,为动脉粥样硬化的防治提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物来源 2 型糖尿病动脉粥样硬化模型小鼠

为 apoE^{-/-}小鼠和 db/db 小鼠模型杂交鼠 10 只,购自南京大学模式动物研究所,给予高脂饮食喂养诱导动脉粥样硬化模型,分为实验组和对照组,每组 5 只。实验组根据小鼠体质量,给予 5 mg/g 尾静脉注射 NCX-4016,2 d 1 次,持续 4 周。对照组给予等量生理盐水注射,2 d 1 次,持续 4 周。

1.2 主要试剂 人脐静脉内皮细胞系(hUVECs)购自上海复祥生物科技有限公司。NO 供体药物 NCX-4016 由纽约大学 STEFANO FIORUCCI 教授实验室馈赠,RAGE、白细胞介素(IL)-1 β 、高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、核转录因子- κ B(NF- κ B) p65、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等抗体均购自 Abcam 公司(美国)。PKG 抑制剂 TK5823 购自碧云天生物技术有限公司。小鼠血清可溶性晚期糖基化终末产物受体(sRAGE)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自默沙克生物科技有限公司。晚期糖基化终末分化产物标准品 AGE-BSA 购自 BioVision(丹麦)生物技术有限公司。

1.3 ELISA 检测 sRAGE 水平 给予两组小鼠相应处理 4 周后,采集小鼠血液标本。按照 ELISA 检测试剂盒说明书对小鼠血清 sRAGE 水平进行检测,利用标准品设立标准曲线后,采用双抗夹心法标记生物素,加入辣根过氧化物酶结合物工作液,37 ℃ 孵育 30 min,加入 TMB 显色试剂进行显色反应后立即在酶标仪上测量吸光度(A)值,根据 A 值在标准曲线上求出相应的血清 sRAGE 水平。

1.4 主动脉根部油红,染色和斑块面积评估 在分别给予实验组 NCX-4016 治疗和对照组生理盐水注射 4 周后,处死两组小鼠,暴露胸腔,切除心脏,取主动脉根部组织包埋于-20 ℃ OCT 包埋剂中,从心底朝主动脉开口方向连续切片,自出现主动脉瓣膜开始,每隔 80 μ m 取一张切片,连续取 6 张贴于同一载玻片上,切片于-80 ℃ 冰箱中保存。主动脉根部粥样硬化斑块油红染色步骤如下:(1)冰冻切片取出后室温干燥 1 h;(2)4%中性甲醛溶液固定 10 min,去离子水洗 2 次,每次 5 min;(3)60%异丙醇洗 30 s;(4)油红 O 染液染色 18 min;(5)60%异丙醇洗 30 s,去离子水洗 2 次,每次 5 min;(6)苏木素染液染核 10 min;(7)自来水冲洗 5 min,去离子水洗 5 min;(8)亮绿染

液染 4 min, 去离子水洗 1 min; (9) 干燥后纯甘油封片; (10) Leica 光学显微镜下观察并拍照后, 采用 Image Pro Plus 图像软件计算斑块面积。

1.5 免疫组化染色 为了观察动脉粥样硬化斑块内 RAGE 表达情况, 采用免疫荧光染色法检测主动脉根部组织冰冻切片中 RAGE 相对表达水平及部位, 步骤如下: (1) 主动脉根部组织冰冻切片取出后室温干燥 1 h; (2) 4% 中性甲醛溶液固定 10 min, 去离子水洗 2 次, 每次 5 min; (3) 5% 山羊血清封闭 1 h; (4) 加一抗 4 ℃ 孵育过夜; (5) 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 每次 5 min, 加红色荧光二抗 (1:500) 室温孵育 1 h; (6) PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加 DAPI (1 μg/mL) 染核 10 min; (7) PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 并采用纯甘油封片; (8) Leica 荧光显微镜下观察并拍照, 采用 Ipp6.0 图像软件进行灰度值计算。

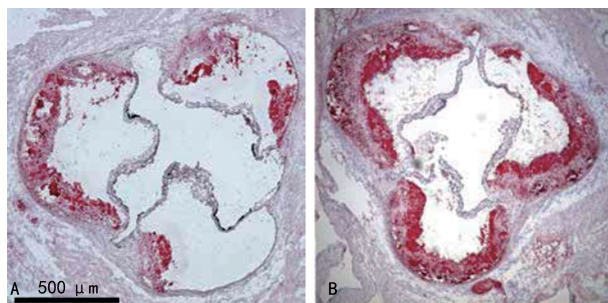
1.6 细胞培养及处理 hUVECs 于 25 mmol/L DMEM 高糖培养基中加 20% 胎牛血清混合后分别培养, 加 1% 链霉素防止细胞污染。传代两次且待细胞融合度至 80% 左右, 加入 1 μg/mL LPS 诱导炎症损伤反应 6 h 后, 分为 4 组, 按如下方法进行不同干预: (1) PBS 处理组采用 PBS 进行处理; (2) NCX-4016 组采用 5 μmol/L NCX-4016 进行处理; (3) eNOS 抑制剂 + NCX-4016 组采用 100 μmol/L eNOS 抑制剂, 5 μmol/L NCX-4016 进行处理; (4) PKG 抑制剂 + NCX-4016 组采用 1 μmol/L KT5823 和 5 μmol/L NCX-4016 进行处理。所有细胞实验均进行 3 次独立重复实验。

1.7 Western blot 法检测 采用 Western blot 法检测两组小鼠主动脉根部组织和 hUVECs 中 RAGE、NF-κB p65、eNOS、IL-1β、IL-6、TNF-α 等相对表达水平。采用 RIPA 裂解液提取血管组织总蛋白, 并用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后将相同质量蛋白上样至 10% SDS-PAGE 分离胶中, 按 60 V 40 min, 90 V 150 min 的条件进行蛋白电泳, 电泳完成后利用湿转仪, 以 350 mA、120 min 的条件将蛋白湿转至 PVDF 膜上, 以 5% BSA 封闭液将 PVDF 膜室温孵育 1 h, 按最佳浓度配制一抗工作液进行一抗孵育, 4 ℃ 过夜。弃去一抗工作液, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min 后, 按 1:4 000 比例加入相应二抗, 室温孵育 1 h。弃去二抗工作液, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 取出 PVDF 膜并用吸水纸吸取膜表面水分, 将其浸入 ECL 工作液中 (A 及 B 液等体积混匀即可), 室温孵育 2 min 后曝光, 采用 QUANTITY ONE 软件分析蛋白条带灰度值, 以 β-actin 作为内参计算蛋白质相对表达量。

1.8 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组与实验组主动脉根部斑块面积的比较 对照组小鼠主动脉根部动脉粥样硬化斑块面积明显大于实验组, 见图 1。对照组和实验组小鼠动脉粥样硬化斑块面积占主动脉根部面积比分别为 $(25.62 \pm 3.34)\%$ 、 $(37.43 \pm 3.56)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



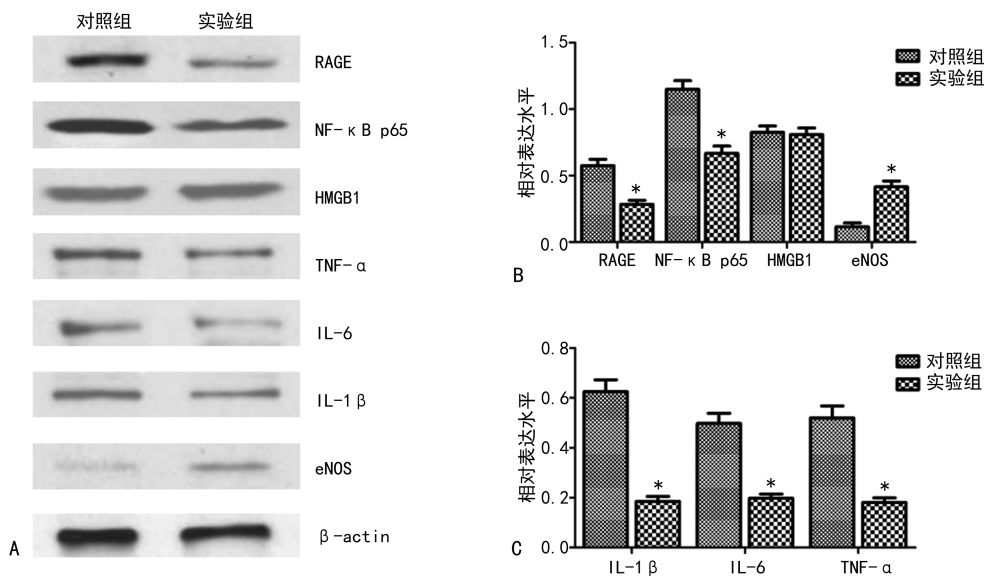
注: A 为对照组; B 为实验组。

图 1 两组小鼠主动脉根部油红染色图

2.2 对照组与实验组主动脉根部斑块组织内 RAGE、炎症信号通路蛋白和炎症因子水平比较 Western blot 检测结果显示, 与对照组比较, 实验组小鼠主动脉根部 RAGE 及其下游炎症信号通路蛋白和炎症因子相对表达水平明显降低, 见图 2A。与对照组比较, 实验组主动脉根部斑块组织内 RAGE 和 NF-κB p65 相对表达水平明显减少, eNOS 相对表达水平增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组 HMGB1 蛋白表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2B。同时, 与对照组比较, 实验组 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平明显减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2C。

2.3 糖尿病动脉粥样硬化小鼠的 sRAGE 血清学水平 ELISA 检测结果显示, 实验组与对照组血清 sRAGE 水平分别为 (2.82 ± 0.19) 、 (2.44 ± 0.20) ng/mL, 两组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 NCX-4016 处理对高糖刺激联合 LPS 诱导后的 hUVECs 的细胞炎症信号通路蛋白、炎症因子表达水平的影响 与 PBS 处理组比较, NCX-4016 组中, NCX-4016 处理接受高糖刺激及 LPS 诱导的 hUVECs 后, 采用 Western bolt 法检测细胞炎症信号通路蛋白和炎症因子的表达情况, 其中 HMGB1 表达无明显改变 ($P > 0.05$), RAGE 及 NF-κB p65 表达明显降低 ($P < 0.05$, 图 3), 炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 表达明显降低 ($P < 0.05$, 图 4)。与 NCX-4016 组比较, eNOS 抑制剂 + NCX-4016 组 IL-6 表达水平无明显改变 ($P > 0.05$), 但 NF-κB p65、RAGE、IL-1β、TNF-α 表达水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5、6)。与 NCX-4016 组比较, PKG 抑制剂 + NCX-4016 组 NF-κB p65、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 表达水平均明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5、6)。



注:A为各项指标 Western blot 检测结果;B为对照组与实验组主动脉根部斑块组织内 RAGE、炎症信号通路蛋白比较;C为对照组与实验组主动脉根部斑块组织内炎症因子比较;与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 对照组与实验组主动脉根部组织 RAGE、炎症信号通路蛋白和炎症因子水平比较

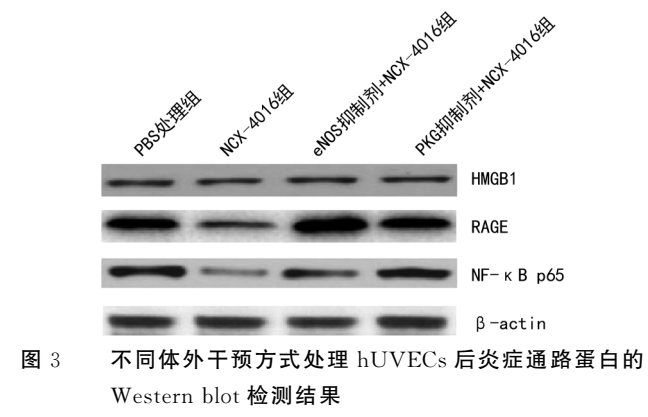
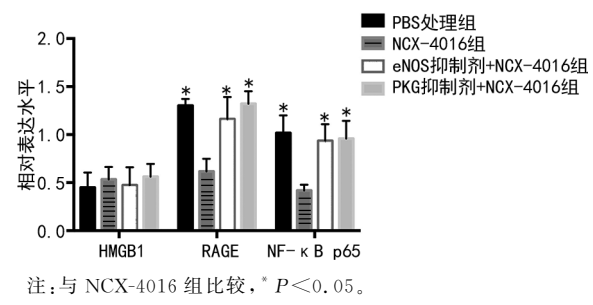


图 3 不同体外干预方式处理 hUVECs 后炎症通路蛋白的 Western blot 检测结果



注:与 NCX-4016 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 6 不同体外干预方式处理 hUVECs 后炎症通路蛋白水平比较

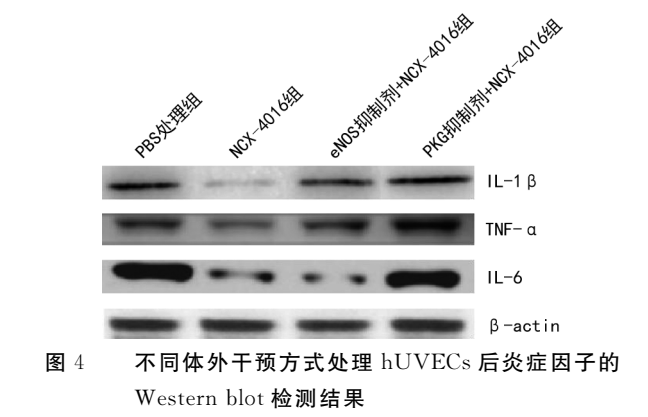
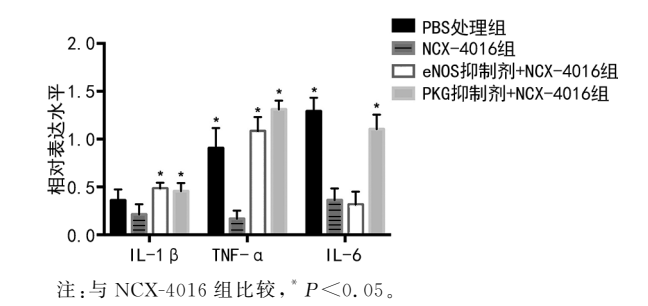


图 4 不同体外干预方式处理 hUVECs 后炎症因子的 Western blot 检测结果



注:与 NCX-4016 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 不同体外干预方式处理 hUVECs 后炎症因子水平比较

3 讨 论

近年来 RAGE 在动脉粥样硬化进程中的作用引发了极大关注。RAGE 可与 HMGB1、晚期糖基化终末产物 (AGEs)、S100/钙颗粒素、 β -淀粉样蛋白及两性蛋白多个配体结合,从而活化 P38、NF- κ B 等信号通路,进而上调细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 及 TNF- α 等炎症因子水平^[10-11]。在糖尿病致动脉粥样硬化斑块形成和进展的过程中,内源性生成增加的 AGEs 通过与其在炎症细胞和内皮细胞上的 RAGE 相结合,激活炎症通路并释放炎症因子,这些炎症因子可活化单核/巨噬细胞等炎症细胞,促进其黏附、浸润至血管内膜下,进一步促进局部炎症反应及动脉粥样硬化的发生、发展^[8-9]。已有研究证实, RAGE 与 apoE 基因双敲除小鼠动脉粥样硬化斑块面积明显低于 apoE^{-/-}小鼠,同时,采用 sRAGE 对 apoE^{-/-}小鼠进行干预,通过其竞争性抑制 RAGE 的作用可以明显抑制动脉粥样硬化斑块的形成及晚期斑块的进展^[12]。此外,临床研究发现低血浆 sRAGE 水平与非糖尿病男性冠心病心血管事件发生相关^[13]。这些研究提示 RAGE 在动脉粥样硬化的进展中起了关键作用。因此,阐明动脉粥样硬化中 RAGE 的表达

机制,从而探索调节 RAGE 水平的方法已成为防治动脉粥样硬化的一条可行途径。

RAGE 有组成型和诱导型两种,组成型 RAGE 主要表达于胚胎发育时期,成年后除肺与皮肤外,其他组织、细胞表达均下调,而诱导型 RAGE 在单核/巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等多种细胞内正常生理条件下表达很低,只有在 RAGE 的配体增多或者其转录因子(包括 SP-1 与 NF- κ B)活化时,诱导型 RAGE 才表达增多^[14-15]。RAGE 还可分为细胞表面的膜 RAGE 和 sRAGE,前者为 AGEs 的模式识别受体,激活后可以介导炎性反应,后者为可溶性分子形式,由 RAGE 的 mRNA 剪接演变而来,可以在循环血中捕获 AGEs,竞争性拮抗经典性受体控制的炎症信号通路。RAGE 信号通路激活后可介导活性氧(ROS),活化下游 NF- κ B,促进炎性反应的发展,而炎症细胞可直接释放 HMGB1 与 S100/钙颗粒素,这些因子均可诱导 RAGE 表达增加^[14,16]。本研究发现,对照组的 apoE^{-/-}小鼠和 db/db 小鼠模型杂交鼠主动脉内膜上已有明显的炎症细胞黏附、浸润,表明本研究处理之前已经发生了内皮功能不全;同时,对照组 apoE^{-/-}小鼠和 db/db 小鼠模型杂交鼠主动脉根部斑块组织内的 RAGE 表达明显升高。故内皮功能不全可能参与了 RAGE 的表达调节。

内皮功能不全以内皮源性 NO 减少为主要特点,通过减少内皮源性 NO、增加 ROS 水平、上调内皮细胞表面黏附分子、增加内皮细胞通透性、促进炎症细胞黏附浸润等促进动脉粥样硬化的发生、发展,是动脉粥样硬化的起始阶段^[17]。NO 供体药物已经被证实可以在动物模型中抑制 LPS 介导的内毒素血症和炎性反应。NO 供体及其他改善内皮功能不全的药物(如他汀类药物)均可通过抗炎效应抑制动脉粥样硬化的进程^[18]。近年来,研究发现他汀类及血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)类药物可抑制动脉粥样硬化斑块中 RAGE 的表达,且对 RAGE 的抑制作用在此类药物改善动脉粥样硬化中发挥了重要作用,说明 RAGE 作为一种重要的炎症信号通路在冠状动脉粥样硬化形成中具有重要意义^[19-20]。本研究进一步研究发现,NO 供体药物抑制了具有 2 型糖尿病背景的模式小鼠动脉粥样硬化的进展,同时也降低了血管中 RAGE 的蛋白表达,但不影响 RAGE 上游的 HMGB1。此外 NO 供体药物可以通过抑制 RAGE 表达,减轻 RAGE 对 eNOS 表达的负调控作用,促进 eNOS 表达增加,从而产生 NO 内源性合成的正反馈效应。而上述作用在体外诱导 hUVECs 实验中均被 NO 抑制剂和 PKG 抑制剂所逆转。NO 供体药物可以通过抑制 RAGE 表达,减轻 RAGE 对 eNOS 表达的负调控作用,促进 eNOS 表达增加,从而产生 NO 内源性合成的正反馈效应^[21]。另外,本研究还发现 NCX-4016 抑制 RAGE 蛋白表达的同时,并未增加血

清 sRAGE 水平,说明 NO 供体药物和外源性 NO 通过直接抑制 RAGE 的转录而非其他转录后调控机制(RNA 剪接)发挥抗炎作用。此外本研究发现与抑制 eNOS 相比,直接抑制 PKG 信号通路,将会导致 IL-1 β 的表达更加明显增加,且二者差异有统计学意义($P<0.05$),说明抑制 PKG 信号通路将会更明显地抑制 NCX-4016 的抗炎保护作用。可能原因为 NCX-4016 作为 NO 供体,增加了外源性 NO 的补充,从而部分抵消了 eNOS 抑制所导致的 NO 生成不足,而 PKG 抑制剂则直接抑制了 NO 的下游信号途径,导致 NO 失能,因此更加彻底地消除了 NO 的抗炎效应。

综上所述,本研究发现了 NCX-4016 可以作为 NO 供体药物在 2 型糖尿病动脉粥样硬化模型小鼠中发挥动脉粥样硬化保护作用。外源性 NO 分子可以作为上游信号分子,以 cGMP/PKG 依赖的途径负调控 RAGE 的转录和表达,同时抑制 RAGE 下游对于 eNOS 表达的负性作用,形成内源性 NO 分子的正反馈环路,最终发挥抗炎抗动脉粥样硬化作用。该研究进一步明确了 NO 在抗炎和抗动脉粥样硬化中的重要作用,说明了 NO 可以依赖于 cGMP/PKG 途径同时发挥舒血管作用与抗炎作用,在糖尿病动脉粥样硬化模型中抑制血管壁 RAGE 的表达发挥保护作用,为 RAGE 作为靶点的抗动脉粥样硬化治疗提供了理论基础。

参考文献

- [1] WRITING G M, DONALD L J, ROBERT J A, et al. Heart disease and stroke statistics—2010 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2010, 121(2): e46-e215.
- [2] HARJA E, BU D X, HUDSON B I, et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(1): 183-194.
- [3] PARK S, YOON S J, TAE H J, et al. RAGE and cardiovascular disease[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011, 16(2): 486-497.
- [4] BUCCIARELLI L G, WENDT T, QU W, et al. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice [J]. *Circulation*, 2002, 106(22): 2827-2835.
- [5] YANG Z, MING X F. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis[J]. *Clin Med Res*, 2006, 4(1): 53-65.
- [6] LI H U, HORKE S, FÖRSTERMANN U, et al. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237(1): 208-219.
- [7] FIORUCCI S, MENCARELLI A, MENEGUZZI A, et al. NCX-4016 (NO-aspirin) inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in vivo: role of nitric oxide

[J]. *Circulation*, 2002, 106(24): 3120-3125.

[8] HUANG J S, WANG K, ZHANG J, et al. Effects of nitric oxide and antioxidants on advanced glycation end products-induced hypertrophic growth in human renal tubular cells[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 111(1): 109-119.

[9] LINDEN E, CAI W J, HE J C, et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008, 3(3): 691-698.

[10] KIERDORF K, FRITZ G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond[J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 94(1): 55-68.

[11] ROUHIAINEN A, KUJA-PANULA J, TUMOVA S, et al. RAGE-mediated cell signaling[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 963(3): 239-263.

[12] WU F, FENG J Z, QIU Y H, et al. Activation of receptor for advanced glycation end products contributes to aortic remodeling and endothelial dysfunction in sinoaortic denervated rats[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 229(2): 287-294.

[13] LAZO M, HALUSHKA M K, SHEN L, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products and the risk for incident heart failure: the atherosclerosis risk in communities study[J]. *Am Heart J*, 2015, 170(5): 961-967.

[14] BRETT J, SCHMIDT A M, YAN S D, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues [J]. *Am J Pathol*, 1993, 143(6): 1699-1712.

[15] BIERHAUS A, HUMPERT P M, MORCOS M, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products[J]. *J Mol Med*, 2005, 83(11): 876-886.

[16] LEWIS P, STEFANOVIC N, PETE J, et al. Lack of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase-1 accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein e-deficient mice [J]. *Circulation*, 2007, 115(3): 2178-2187.

[17] GRUTZMACHER C, PARK S Y, ZHAO Y, et al. Aberrant production of extracellular matrix proteins and dysfunction in kidney endothelial cells with a short duration of diabetes [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(1): F19-F30.

[18] HERMAN A G, MONCADA S. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis [J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(19): 1945-1955.

[19] LI H, FÖRSTERMANN U. Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system[J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(27): 3133-3145.

[20] 王华, 胡铂, 唐兆生, 等. 糖尿病冠状动脉粥样硬化与外周血单个核细胞糖基化终产物受体表达的关系及他汀类药物对其影响的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(5): 412-416.

[21] CALKIN A C, GIUNTI S, SHEEHY K J, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin and the angiotensin receptor antagonist candesartan attenuate atherosclerosis in an apolipoprotein E-deficient mouse model of diabetes via effects on advanced glycation, oxidative stress and inflammation[J]. *Diabetologia*, 2008, 51(9): 1731-1740.

(收稿日期: 2021-11-23 修回日期: 2022-03-25)

(上接第 1933 页)

nancy; setting the stage for mother and infant[J]. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81(5): 1218S-1222S.

[10] BOTHWELL T H. Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them[J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72(1 Suppl): 257S-264S.

[11] SHAN Z, CHEN L, LIAN X, et al. Iodine status and prevalence of thyroid disorders after introduction of mandatory universal salt iodization for 16 years in China: a cross-sectional study in 10 cities[J]. *Thyroid*, 2016, 26(8): 1125-1130.

[12] HE L, SHEN C, ZHANG Y, et al. Evaluation of serum ferritin and thyroid function in the second trimester of pregnancy[J]. *Endocr J*, 2018, 65(1): 75-82.

[13] ZIMMERMANN M B, BURGI H, HURRELL R F. Iron deficiency predicts poor maternal thyroid status during pregnancy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(9): 3436-3440.

[14] YU X, SHAN Z, LI C, et al. Iron deficiency, an independent risk factor for isolated hypothyroxinemia in pregnant and nonpregnant women of childbearing age in China[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(4): 1594-1601.

[15] 单忠艳, 滕卫平. 《妊娠和产后甲状腺疾病诊治指南》(第 2 版)要点解读[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2019, 35(8): 632-635.

[16] 单忠艳, 滕卫平. 碘充足地区妊娠妇女碘营养的思考[J]. *中华内科杂志*, 2015, 54(1): 4-5.

[17] UNUANE D, VELKENIERS B, ANCKAERT E, et al. Thyroglobulin autoantibodies; is there any added value in the detection of thyroid autoimmunity in women consulting for fertility treatment? [J]. *Thyroid*, 2013, 23(8): 1022-1028.

[18] ZHANG Y, HUANG X, CHEN Z, et al. Iron deficiency, a risk factor for thyroid autoimmunity during second trimester of pregnancy in china[J]. *Endocr Pract*, 2020, 26(6): 595-603.

[19] 中华医学会围产医学分会. 妊娠期铁缺乏和缺铁性贫血诊治指南[J]. *中华围产医学杂志*, 2014, 17(7): 451-454.

[20] WEETMAN A P. The immunopathogenesis of chronic autoimmune thyroiditis one century after hashimoto[J]. *Eur Thyroid J*, 2013, 1(4): 243-250.

(收稿日期: 2021-11-12 修回日期: 2022-04-03)