

李欣欣,张宁,冯光玲,等. 基于 IL-23/Th17 炎症通路探讨司库奇尤单抗对钙化性主动脉瓣膜病的影响及作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 78-86.

Li XX, Zhang N, Feng GL, et al. Exploring the effect and mechanism of action of secukinumab on calcific aortic valve disease based on the IL-23/Th17 inflammatory pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 78-86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.009

基于 IL-23/Th17 炎症通路探讨司库奇尤单抗对钙化性主动脉瓣膜病的影响及作用机制

李欣欣¹, 张 宁², 冯光玲², 兰真真², 郭 娇², 刘新灿^{2*}

(1. 宁德师范学院附属宁德市医院 消化内科, 福建 宁德 352000;

2. 河南中医药大学第一附属医院 心脏中心, 郑州 450000)

【摘要】 目的 观察 IL-23/Th17 炎症通路是否参与钙化性主动脉瓣膜病的发生发展, 司库奇尤单抗是否可以通过抑制 IL-23/Th17 炎症通路延缓钙化性主动脉瓣膜病的进展。**方法** 按随机数字表法将 47 只小鼠分为空白对照组、模型组和司库奇尤单抗组。空白对照组给予正常饲料喂养, 模型组、司库奇尤单抗组给予促钙化饲料喂养 16 周后建立钙化性主动脉瓣膜病模型, 司库奇尤单抗对司库奇尤单抗组小鼠干预 4 周后, 在多普勒超声下检测所有小鼠主动脉瓣峰值流速变化; 采用 HE 染色、Von Kossa 染色、免疫组化染色、ELISA 和实时荧光定量 PCR 进行相关指标测定。**结果** 与模型组相比, 司库奇尤单抗组药物干预 4 周后, 能够显著降低主动脉瓣膜的峰值流速 ($P < 0.05$), 降低血清 IL-6、IL-17、IL-23 水平 ($P < 0.05$); 与司库奇尤单抗组相比, 模型组瓣叶厚度明显增加且有更多的钙盐沉积; 免疫组化结果显示司库奇尤单抗组与模型组相比, 瓣叶中巨噬细胞 ($P < 0.05$)、IL-17A ($P < 0.05$)、IL-23 ($P > 0.05$) 浸润均减少。PCR 结果提示, 与模型组相比, 司库奇尤单抗组的 STAT3、BMP-2 及 α -SMA mRNA 的表达均显著减少 ($P < 0.05$)。**结论** IL-23/Th17 炎症通路参与了钙化性主动脉瓣膜病的发病过程, 经司库奇尤单抗干预后小鼠瓣膜的炎症、纤维化、成骨分化及钙化情况均有所缓解, 司库奇尤单抗可能通过抑制 IL-23/Th17 炎症通路而延缓疾病进展。

【关键词】 IL-23/Th17; 钙化性主动脉瓣膜病; 炎症; 司库奇尤单抗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0078-09

Exploring the effect and mechanism of action of secukinumab on calcific aortic valve disease based on the IL-23/Th17 inflammatory pathway

LI Xinxin¹, ZHANG Ning², FENG Guangling², LAN Zhenzhen², GUO Jiao², LIU Xincan^{2*}

(1. Department of Gastroenterology, Ningde Municipal Hospital of Ningde Normal University, Ningde 352000, China.

2. Heart Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of CM, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Objective To observe whether the IL-23/Th17 inflammatory pathway is involved in the development of calcific aortic valve disease, and whether secukinumab can delay the progression of calcific aortic valve disease by inhibiting this pathway. **Methods** Forty-seven mice were divided into a blank control group, model group, and secukinumab group according to the random number table method. The blank control group was fed normal chow, while the

【作者简介】 李欣欣 (1995—), 女, 硕士, 住院医师, 研究方向: 心血管疾病及消化道肿瘤相关医学研究。E-mail: 923686954@qq.com

【通信作者】 刘新灿 (1965—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 心血管疾病防治及介入医学研究。E-mail: liuxincan103@163.com

model group and secukinumab group were fed pro-calcification chow for 16 weeks to establish a calcific aortic valve disease model. After intervention with secukinumab for 4 weeks, peak flow velocity changes in the aortic valves were detected under Doppler ultrasonography in all mice. Relevant indexes were determined by hematoxylin and eosin staining, Von Kossa staining, immunohistochemical staining, ELISA, and qPCR. **Results** Compared with the model group, the secukinumab group showed significantly reduced peak flow velocity ($P<0.05$) and serum IL-6, IL-17, and IL-23 levels ($P<0.05$) in the aortic valve. Compared with the secukinumab group, the model group's leaflet thickness was significantly increased, and there were more calcium deposits. Immunohistochemical result showed that macrophage infiltration ($P<0.05$), IL-17A ($P<0.05$) and IL-23 ($P>0.05$) levels in the valve leaflets were reduced in the secukinumab group compared with the model group. PCR result suggested that the expression of STAT3, BMP-2, and α -SMA mRNA was significantly lower in the secukinumab group than the model group ($P<0.05$). **Conclusions** The IL-23/Th17 inflammatory pathway is involved in the pathogenesis of calcific aortic valve disease. The inflammation, fibrosis, osteogenic differentiation, and calcification of mouse valves were alleviated after intervention with secukinumab, which may delay disease progression by inhibiting the IL-23/Th17 inflammatory pathway.

【Keywords】 IL-23/Th17; calcific aortic valve disease; inflammation; secukinumab
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

钙化性主动脉瓣膜病 (calcific aortic valve disease, CAVD) 是继冠心病和动脉高血压之后第三大常见心血管疾病^[1]。它是一种动态疾病,主动脉瓣叶根部的初始细胞转变为能使瓣膜增厚的纤维化样细胞,称为动脉硬化,而后瓣膜小叶发生钙化和重塑致使瓣膜结构改变、功能受损,最终发展为主动脉瓣狭窄 (aortic stenosis, AS) 并伴有不稳定的血流动力学^[2]。CAVD 的患病率在 60 岁以上的人群中超过了 2%,动脉硬化患病率在 65 岁以上人群中则超过 25%,后者虽无明显狭窄,但增加了与心梗、心血管事件相关的死亡风险^[3-4]。CAVD 患者会经历漫长渐进的无症状期,一旦出现晕厥、心绞痛等症状时,手术是这类患者唯一的治疗方式,且价格昂贵,也不是所有患者都能满足治疗条件^[5]。出现症状的患者若未及时手术治疗,其 2 年生存率仅为 50%,5 年生存率仅为 20%^[6-7]。全球目前尚无可以治疗或者延缓 CAVD 的上市药物,因此,探索早期的药物干预对于预防或减缓 CAVD 进展具有重要意义。

有回顾性和前瞻性研究显示,年龄、性别糖尿病、肥胖、高血压、吸烟、血浆脂蛋白 (Lp(a))、低密度脂蛋白胆固醇水平及遗传等因素均与 CAVD 的发病风险相关^[8]。CAVD 的发病机制涉及异常基质沉积、纤维化、炎症、脂质积累等,其中,炎症反应的激活作为最重要的部分贯穿整个发病过程^[9]。已有研究表明,IL-23/Th17 炎症通路在动脉血管粥样硬化、银屑病和炎性肠病等多种炎症相关性疾病中都起着关键作用,但其在 CAVD 中的作用机制尚不明确^[10-11]。有研究发现,在主动脉瓣钙化小鼠模型

中,敲除 IL-17A 基因的小鼠较未敲除该基因的小鼠主动脉瓣钙化程度及免疫炎症反应都有所减轻,说明 IL-17A 在钙化性主动脉瓣膜病中起到了重要作用,但 IL-23/Th17 炎症通路中 IL-17A 的上游炎症因子 IL-23 表达状态并不清楚^[12]。司库奇尤单抗作为 IL-17A 的抑制剂,目前临床已被用于治疗银屑病,疗效良好且安全性高,临床研究显示司库奇尤单抗可改善斑块状银屑病患者的血管内皮功能^[13]。因此,本研究建立主动脉瓣狭窄小鼠模型,通过检测 IL-23/Th17 炎症通路相关因子在病变瓣膜的表达情况及司库奇尤单抗对小鼠瓣膜病变干预效果,探讨 IL-23/Th17 炎症通路钙化性主动脉瓣膜病之间的关系,以及司库奇尤单抗对 CAVD 的影响与潜在机制,为主动脉瓣钙化的发病机制提供新的理论依据,为临床防治提供新的方向和靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

47 只 20 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 (26±2)g,购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场 [SCXK(豫)2019-0002],饲养于河南中医药大学第一附属医院动物实验研究中心动物房 [SYXK(豫)2022-0004],本研究已通过河南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会的审查及批准 (DWLL202203004),实验动物饲养及实验过程严格遵循 3R 原则进行。

1.2 主要试剂与仪器

司库奇尤单抗 (2230584,瑞士诺华制药公司);小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (A30610736,Servicebio);山

羊抗兔 IgG (CR2109125, Servicebio); Anti-IL-23 单克隆抗体 (AC3560961007, Servicebio); Anti-IL-17A 单克隆抗体 (AC220211006, Servicebio); Anti-CD68 单克隆抗体 (AC220117031, Servicebio); 促钙化饲料 (南通特洛菲饲料科技有限公司)。台式高速冷冻型微量离心机 (Dragon Lab); 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad); 研磨仪 (Servicebio); 全自动洗板机 (雷杜生命科技有限公司); 酶标检测仪 (BioTeK); 组织脱水机 (DIAPATH); 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); 病理切片机 (上海徠卡仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型构建

动物模型根据 Tandon 等^[14]创造的一种基于促钙化饮食的非转基因小鼠模型,能够模拟 CAVD 小鼠主动脉狭窄、钙化、基质重塑等病变过程,其克服了传统饮食诱导及基因修饰模型的周期长、成功率低、成本高等不足,是一种新兴动物实验模型^[15]。小鼠进入实验室 1 周,待其适应实验室各方面后,开始给予促钙化饲料(成分:胆固醇:2.07% w/w+总维生素 D3:75 042 IU/kg+钙:0.99% w/w+磷:0.75% w/w),动物自由采食与饮水。喂养 16 周后,小鼠行彩超多普勒检测主动脉瓣峰值流速,对比基线增加 15%以上(说明小鼠出现主动脉瓣狭窄)即为造模成功^[15-16]。

1.3.2 实验分组及给药

按随机数字表法将 47 只小鼠分为 3 组:空白对照组(15 只)、模型组(16 只)和司库奇尤单抗组(16 只)。空白对照组平时给予正常饲料喂养,模型组、司库奇尤单抗组给予促钙化饲料。司库奇尤单抗组小鼠从第 16 周开始每周通过腹腔注射司库奇尤单抗(剂量为 20 mg/kg),同样时间按照体重以同样方式给予对照组和模型组小鼠生理盐水(10 mL/kg),连续给药 4 周,每周 1 次,给药同时保持原饮食不变。

1.3.3 多普勒超声心动图检测

彩色多普勒超声用于检测主动脉瓣狭窄的情况。彩色多普勒超声在胸骨旁长轴和胸骨上切面对主动脉瓣峰值血流速度及反流进行成像,超声探头角度校正范围为 40°~50°。为减少操作差异,整个操作均由同一人完成,以上操作和检测结果均在超声科老师的指导下完成。

1.3.4 HE 染色及 Von Kossa 染色

HE 染色用于观察瓣膜形态结构改变, Von

Kossa 染色用于观察瓣膜钙盐沉积水平。取主动脉瓣组织于 10%中性福尔马林固定,顺乙醇梯度脱水后石蜡包埋,经组织切片机切 3 μm 超薄石蜡切片后脱蜡复水,进行 HE 染色和 Von Kossa 染色。

1.3.5 免疫组化检测

检测 3 组瓣膜小叶上巨噬细胞、IL-17A 和 IL-23 阳性细胞表达情况。取 3 μm 超薄主动脉瓣组织的石蜡切片,经脱蜡复水抗原修复、封固后,一抗孵育过夜,二抗孵育显色。

1.3.6 ELISA 检测血清 IL-6、IL-17、IL-23 表达

ELISA 检测血清中炎症因子 IL-6、IL-17、IL-23 的表达水平,按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.7 实时荧光定量 PCR 检测

实时荧光定量 PCR 检测主动脉瓣组织 IL-23/Th17 通路中 STAT3、成骨通路关键位点 BMP-2 及纤维化相关的 α-SMA mRNA 表达情况。提取瓣膜 RNA 后,对其纯度和浓度进行测定,再将 RNA 逆转录,引物设计完成后,经预变性、变性、退火、延伸进行 PCR 扩增,行 40 个循环,各引物序列见表 1。PCR 扩增以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因为内对照,计算出样本以上 3 种基因表达的相对值。

1.4 统计学方法

实验结果采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数间比较采用方差分析,方差分析两两比较时选用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。采用 Image J 对免疫组化图片进行定量分析,采用 Graph Pad Prism 7 软件制作统计图。

2 结果

2.1 一般情况

经过模型建立和药物腹腔注射后,各组实验小鼠具体数量如下:空白对照组 15 只,模型组 14 只,司库奇尤单抗组 14 只。模型组及司库奇尤单抗组

表 1 实时荧光定量 PCR 相关引物
Table 1 Primers used for the qPCR

名称 Name	引物序列 Primer sequence
STAT3	S:5'-TGCGGAGAAGCATTGTGAGTG-3'
	A:5'-TCTTAATTTGTTGGCGGGTCT-3'
BMP-2	S:5'-GCTGACCACCTGAAGTCCACT-3'
	A:5'-CCTCCACAACCATGTCTGATAA-3'
α-SMA	S:5'-GTACCACCATGTACCCAGGC-3'
	A:5'-GAAGGTAGACAGCGAAGCCA-3'
GAPDH	S:5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3'
	A:5'-TGAGGTCAATGAAGGGCTCGT-3'

在造模期间因小鼠相互打斗致死各 1 只,模型组在第 10 周时有 1 只小鼠可能因个体差异不喜促钙化饲料而导致过于消瘦死亡,司库奇尤单抗组有 1 只小鼠在第 16 周后超声检测未达到造模成功标准,将其排除。

2.2 多普勒超声心动图检测结果

在小鼠开始造模前、造模第 16 周及第 20 周(即给药 4 周后)时,对所有小鼠进行主动脉瓣峰值血流速度的检测。造模前 3 组间该指标均无统计学意义($P>0.05$)。造模 16 周时,除空白对照组及司库奇尤单抗组的 1 只小鼠之外,其余小鼠的主动脉瓣峰值流速均较基线增加大于 15% ($P<0.05$)。给药 4 周后,司库奇尤单抗组的主动脉瓣峰值流速与模型组相比有所降低 ($P<0.05$)。空白对照组小鼠的主动脉瓣峰值流速在造模前、造模第 16 周及第 20 周均未表现出差异性 ($P>0.05$);而模型组及司库奇尤单抗组小鼠的主动脉瓣峰值流速在造模前、造模第 16 周及第 20 周均表现出差异性 ($P<0.05$,表 2)。

2.3 主动脉瓣膜组织的 HE 染色及 Von Kossa 染色结果

通过 HE 染色观察主动脉瓣的形态变化。结果

显示,与空白对照组相比,另两组的瓣膜各层结构紊乱且厚度增大,其中模型组瓣膜增厚明显,司库奇尤单抗组瓣膜厚度较模型组减小(图 1)。

通过 Von Kossa 染色观察钙盐沉积情况,黑色颗粒即为钙盐沉积。结果显示,空白对照组小鼠的主动脉瓣未见异常,而模型组瓣膜出现了许多黑色颗粒沉积,司库奇尤单抗组也存在少量黑色颗粒沉积,主要出现于病变瓣膜的边缘且分布相对集中,说明瓣膜组织发生了钙化(图 1)。

2.4 主动脉瓣膜免疫组织化学染色结果

CD68 抗体用于检测病变瓣膜组织炎症巨噬细胞的浸润情况。空白对照组中瓣膜小叶未发现表达强度高的阳性细胞,仅发现很少的零散弱阳性细胞于瓣膜边缘;在模型组中,阳性细胞主要分布于病变部位的瓣膜内皮细胞附近,阳性表达强度高;而司库奇尤单抗组瓣膜可见阳性巨噬细胞标记物 CD68 的表达量明显低于模型组 ($P<0.05$,图 2)。

IL-17A 用于检测瓣膜组织中 IL-17A 的表达情况。镜下观察主动脉瓣组织,空白对照组中瓣膜小叶发现有微量 IL-17A 的表达;而在模型组中发现了 IL-17A 的大量聚集表达,且主要分布于病

表 2 各组小鼠不同时期的主动脉瓣峰值流速($\bar{x}\pm s$)

Table 2	Aortic valve peak flow velocity in various groups of mice at different times		
组别 Groups	空白对照组 Blank control group	模型组 Model group	司库奇尤单抗组 Secukinumab group
造模前主动脉瓣峰值流速/(mm/s) Pre-modelling AV peak flow velocity	581.03±39.00	578.02±39.51	594.92±41.81
造模第 16 周主动脉瓣峰值流速/(mm/s) AV peak flow velocity at week 16 of modelling	597.07±42.47	833.94±56.08 ^{*&}	850.30±47.74 ^{*&}
造模第 20 周主动脉瓣峰值流速/(mm/s) AV peak flow velocity at week 20 of modelling	615.68±43.91	922.80±45.62 ^{*&+}	768.34±42.53 ^{*#&+}

注:与同一时期空白对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与同一时期模型组相比, [#] $P<0.05$;与同组间造模前相比, [&] $P<0.05$;与同组间第 16 周相比, ⁺ $P<0.05$ 。

Note. Compared with blank control group in the same period, ^{*} $P<0.05$. Compared with model group in the same period, [#] $P<0.05$. Compared with pre-modelling in the same group, [&] $P<0.05$. Compared with week 16 of modelling in the same group, ⁺ $P<0.05$.

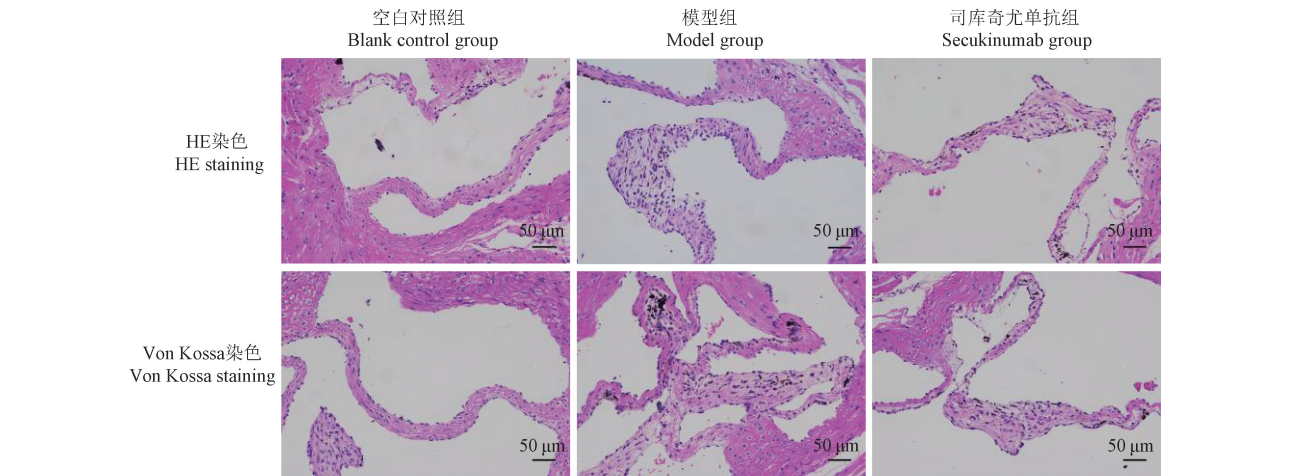


图 1 主动脉瓣膜组织 HE 及 Von Kossa 染色

Figure 1 HE and Von Kossa staining of aortic valve tissue

变部位的瓣膜内皮细胞附近且阳性表达强度强;司库奇尤单抗组瓣膜的 IL-17A 表达量明显低于模型组并且表达强度一般,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 2)。

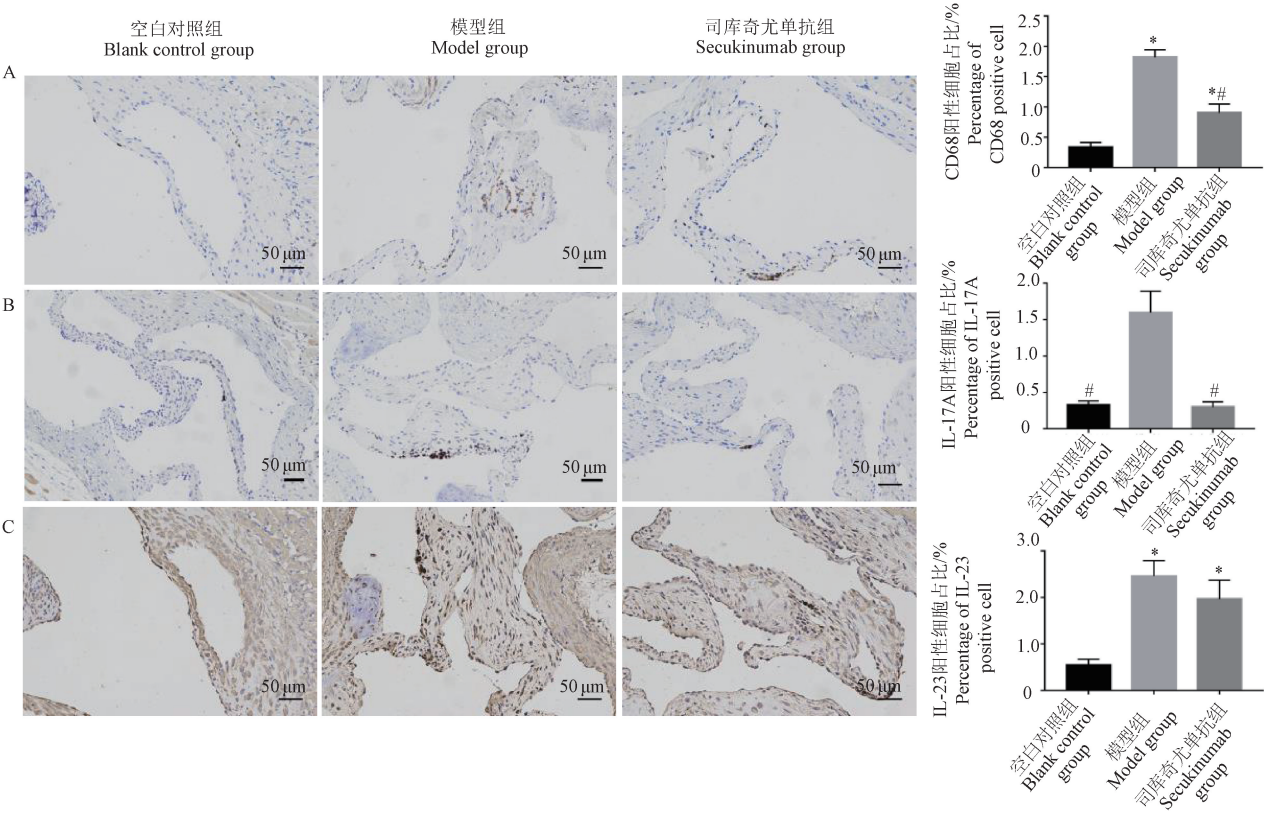
IL-23 抗体用于检测瓣膜组织中 IL-23 的表达情况。镜下观察主动脉瓣组织,发现空白对照组中瓣膜仅出现少量 IL-23 的表达;模型组中 IL-23 大量聚集并且表达强度高;司库奇尤单抗组瓣膜的 IL-23 表达量同样高度密集,仅稍低于模型组,但差异无统计学意义($P>0.05$),三组的 IL-23 分布主要集中在病变处的瓣膜内皮细胞附近(图 2)。

2.5 ELISA 检测血清 IL-6、IL-17、IL-23 结果

结果显示,模型组与空白对照组相比较,血清中 IL-6、IL-17、IL-23 浓度明显上升,而司库奇尤单抗组与模型组比较,血清中 IL-6、IL-17、IL-23 较低于模型组($P<0.05$);司库奇尤单抗组小鼠的血清 IL-6 浓度稍低于空白对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$),司库奇尤单抗组小鼠的血清 IL-17、IL-23 浓度高于空白对照组($P<0.05$,表 3)。

2.6 实时免疫荧光定量检测结果

STAT3 是 IL-23/Th17 炎症通路中的关键分子。图 3 结果显示,与空白对照组相比,模型组的 STAT3



注:A:巨噬细胞;B:IL-17A;C:IL-23。与空白对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 2 主动脉瓣膜组织中巨噬细胞、IL-17A、IL-23 免疫组化染色

Note. A, Macrophages. B, IL-17A. C, IL-23. Compared with blank control group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

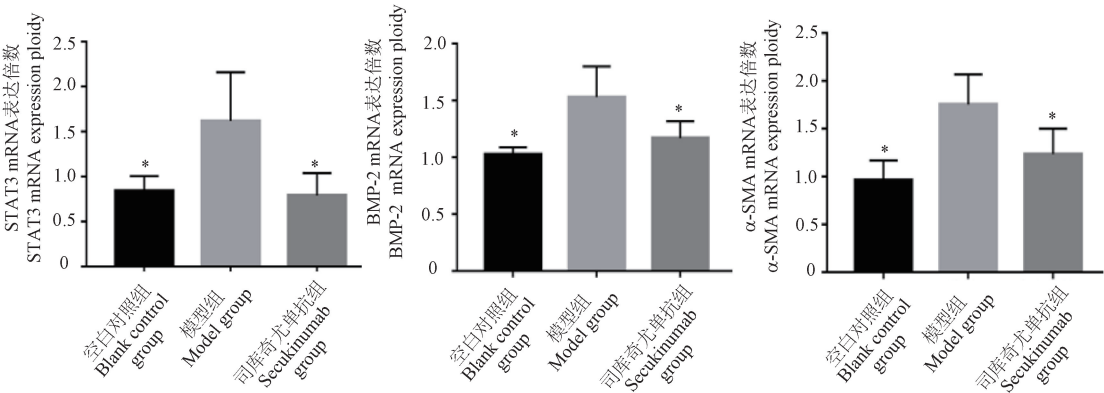
Figure 2 Immunohistochemical staining of macrophages, IL-17A, IL-23 in aortic valve tissue

表 3 各组小鼠血清 IL-6、IL-17 和 IL-23 水平($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Serum IL-6, IL-17 and IL-23 levels in mice of each group

组别 Groups	空白对照组 Blank control group	模型组 Model group	司库奇尤单抗组 Secukinumab group
白介素-6 IL-6	19.51±12.54	36.44±16.79 *	13.93±12.96 **
白介素-17 IL-17	52.07±12.47	174.94±36.08 *	131.30±21.74 **
白介素-23 IL-23	45.68±13.91	128.80±25.62 *	87.34±22.53 **

注:与空白对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with blank control group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.



注:与模型组相比, * $P<0.05$ 。

图3 主动脉瓣中病变形成相关蛋白的 mRNA 表达倍数

Note. Compared with model group, * $P<0.05$.

Figure 3 Expression ploidy of mRNA for lesion formation-associated proteins in the aortic valve

mRNA 表达倍数明显增加($P<0.05$),司库奇尤单抗组的 STAT3 mRNA 表达倍数较模型组显著减少($P<0.05$)。

BMP-2 是成骨分化的标志。结果显示,与空白对照组相比,模型组的 BMP-2 mRNA 表达倍数明显增加($P<0.05$),与模型组相比,司库奇尤单抗组的 BMP-2 mRNA 表达倍数显著减少($P<0.05$)。

α -SMA 主要反应了瓣膜的纤维化程度。结果显示,模型组的 α -SMA mRNA 表达倍数较空白对照组明显增加($P<0.05$),而司库奇尤单抗组小鼠的 α -SMA mRNA 表达倍速较模型组则显著减少($P<0.05$)。

3 讨论

近年来,CAVD 已代替风湿性瓣膜病成为发达国家最常见的心脏瓣膜疾病,因此,探索 CAVD 相关的生物分子机制、寻找潜在的治疗靶点将推动人类对 CAVD 的认知,有利于开辟诊断及治疗的新途径。

CAVD 与动脉粥样硬化性心脏病拥有共同的危险因素,如收缩期高血压、高胆固醇和吸烟习惯等,虽两者有一定的相似之处,但瓣膜与血管壁有着不同的特性,主动脉瓣上的组织、细胞以及血流动力学应力与脉管系统均存在显著差异^[17]。诱导降低低密度脂蛋白胆固醇的他汀类药物是二级预防动脉粥样硬化性心脏病非常有效的药物,但其对 CAVD 患者的病情无明显改善作用^[18]。关于目前研究 CAVD 的治疗靶点,大致可分为 4 大类:第一

类,Notch1 通路的治疗靶点:钙粘蛋白-11、lncRNA H19、miRNA-34a、RANKL;第二类,动脉粥样硬化或血管病的治疗靶点:脂蛋白 a(Lp(a))、前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 型(PCSK9)、基质 Gla 蛋白(MGP)、组织蛋白酶 S(Cathepsin S)、Sortilin;第三类,代谢相关靶点:可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)、P2Y 型紫癜受体 2、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)、钠依赖性磷酸盐转运体 1(NPT1)、肌醇六磷酸六钠盐(INSP6)、二肽酰基酶 4(DPP-4);第四类,G 蛋白偶联受体靶点:血管紧张素 II 受体 2 型、血清素 2B 受体^[19-21]。虽然近些年临床及科研人员在寻找治疗 CAVD 的潜在靶点上有一定进展,但是目前仍没有治疗 CAVD 的临床药物,因此,对于 CAVD 疾病机制的探索仍需继续。

CAVD 不再认为是随年龄增长而发生的简单被动钙沉积过程,而是多因素复杂的主动调节结果,其中,炎症反应贯穿了 CAVD 形成的各个环节,对疾病发生发展起到了至关重要的作用^[9]。IL-23 和 IL-17 在免疫反应中有关键作用,若两者失调会加剧慢性免疫介导的炎症,其通路的激活则会加剧多种炎症性疾病(如动脉粥样硬化、银屑病、强直性脊柱炎等)的发展^[22]。因此,近些年出现了许多阻断 IL-23/Th17 的临床研究,IL-23/Th17 成为了部分自身免疫性疾病有希望的治疗靶点。IL-23 是促炎性细胞因子,主要由巨噬细胞和树突状细胞产生,响应外源性或内源性信号,驱动 Th17 细胞的分化和活化产生 IL-17A、IL-17F、IL-6、IL-22 和 TNF- α ^[22]。IL-17 是重要的炎症介质,主要来源于 Th17 细胞,由 IL-

17A 至 IL-17F 组成,可以与特异性受体结合刺激相应靶细胞释放大量前炎症因子并活化中性粒细胞,使炎症因子水平上升引发一系列炎症反应^[23]。而 CD4⁺T 细胞是 Th17 的前体细胞,TGF-β、IL-6 和 IL-21 等可以激活 T 淋巴细胞并促进 Th0 细胞向 Th17 细胞的分化,从而导致 Th17 细胞对 IL-23 有反应,是 Th17 细胞稳定和扩增至关重要的步骤^[24-29]。在 Th17 细胞分化过程中,RORγt 是最为关键的转录因子之一,与 IL-17 共同参与了多种自身免疫病的病理过程^[30]。IL-23 和 Th17 受体相结合后,胞内信号转导及 STAT3 被活化而使 RORγt 表达增加,并且与 IL-17 基因特异性的 RORE 结合从而促进 Th17 细胞分泌并释放 IL-17C,同时与 IL-23 结合后的 Th17 细胞能够通过 TNF-α 及 NF-κB 通路等多渠道分泌 IL-17 而进一步引起炎症的发生^[31]。JAK2-STAT3 炎症通路可以诱导成骨细胞的分化增值,还能增加化学趋化因子(如 IL-6、IL-8 等)的表达导致瓣膜损伤,并提高细胞外基质钙盐沉积相关因子表达^[32-34]。

基于以上,本研究通过促钙化饲料喂养小鼠来建立 CAVD 模型,并在早期阶段给予司库奇尤单抗干预 CAVD 小鼠。结果发现,在 CAVD 模型小鼠中,IL-23/Th17 炎症通路中相关因子表达增高,巨噬细胞募集增多,瓣膜处的 STAT3、BMP-2、α-SMA 及血清中 IL-6、IL-17、IL-23 水平均升高,并且在病变处出现大量钙盐沉积,说明钙化瓣膜中 IL-23/Th17 炎症通路被激活,瓣膜出现了不同程度的炎症、纤维化、成骨分化及钙化。早期阶段对 CAVD 小鼠进行司库奇尤单抗的干预,小鼠的主动脉瓣峰值血流速度及 IL-6、IL-17、IL-23 有所降低,瓣膜处募集的巨噬细胞及钙盐沉积减少,司库奇尤单抗对瓣膜的炎症、纤维化、成骨分化及钙化情况均有所改善,说明司库奇尤单抗可能阻断了 IL-23/Th17 炎症通路,减轻了炎症反应,延缓了瓣膜钙化的进程。其可能是在 IL-23 与 Th17 的结合后,STAT3 被活化而使 RORγt 表达增加,导致 Th17 细胞释放大量 IL-17A、IL-17F、IL-6、IL-22 和 TNF-α 等炎症因子,IL-17A 炎症因子通过 IL-17RA 和 IL-17RC 的异二聚体复合物发出信号,以诱导反应细胞产生如 IL-6 等促炎细胞因子,导致瓣膜炎症反应的发生,从而加快瓣膜钙化。而司库奇尤单抗作为 IL-17A 的抑制剂,可以选择性结合细胞因子 IL-17A,从而直接使血清 IL-17 减少,可能是 IL-23 的减少抑制了初始 T 细胞分化

成 Th17,从而进一步抑制了 IL-17、IL-6、TNF-α 的释放,减缓了一系列炎症反应。也可能是释放的 IL-17 激活了 JAK2-STAT3 信号传导,从而导致瓣膜细胞外基质钙盐大量沉积和 IL-6、BMP-2 的表达增高。巨噬细胞在衰老和主动脉瓣狭窄患者的钙化瓣叶上显着存在,与瓣膜炎症及钙化程度直接相关,现已被用于评估瓣膜的钙化程度,因此确定其在 CAVD 中的作用至关重要^[35-36]。促炎性 M1 巨噬细胞作为主要存在于 CAVD 的巨噬细胞亚群,在 CAVD 病程中逐渐增强,并不断积累引发炎症级联反应,从而促进免疫细胞浸润和疾病进展。M1 巨噬细胞可能通过分泌 TNF-α 和 IL-1β 促炎细胞因子浸润纤维化的瓣叶使 VIC 的肌成纤维细胞失活并高度增殖,再通过分泌 IL-6 促进失活的肌成纤维细胞向成骨细胞样分化,从而介导瓣膜从纤维化转变到钙化^[37-38]。

本研究也存在一定局限性。第一,本模型与人 CAVD 的发病机制具有一定的差异。第二,由于小鼠主动脉瓣膜组织较小,样本量较少,未行蛋白质印迹分析。第三,CAVD 目前仍没有批准上市的治疗药物,本研究无法设置阳性对照。

迄今为止,CAVD 对于人类来说仍是一种挑战性疾病,是现代医学的难点及研究热点,全球为此探索过各种治疗药物,虽暂无延缓疾病进展或改善预后的上市药物,但已经发现潜在的治疗靶点。本研究虽然已经验证了 IL-23/Th17 炎症通路参与 CAVD 的病变过程,但是 IL-23/Th17 炎症通路下具体机制仍需要后期实验去探索验证。随着医学界对 CAVD 的关注度越来越高,相信不久的将来一定能对疾病有更全面的认识,寻找到早期干预的有效治疗药物,为 CAVD 患者带来福音。

参考文献:

[1] GO A S, MOZAFFARIAN D, ROGER V L, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2013, 127(1): 143-152.

[2] VAN DER VEN C F, WU P J, TIBBITT M W, et al. *In vitro* 3D model and miRNA drug delivery to target calcific aortic valve disease [J]. Clin Sci, 2017, 131(3): 181-195.

[3] NIGHTINGALE A K, HOROWITZ J D. Aortic sclerosis: not an innocent murmur but a marker of increased cardiovascular risk [J]. Heart, 2005, 91(11): 1389-1393.

[4] PELTONEN T, OHUKAINEN P, RUSKOAHO H, et al. Targeting vasoactive peptides for managing calcific aortic valve

- disease [J]. *Ann Med*, 2017, 49(1): 63–74.
- [5] BAUMGARTNER H, FALK V, BAX J J, et al. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(36): 2739–2791.
- [6] OSNABRUGGE R L, MYLOTTE D, HEAD S J, et al. Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(11): 1002–1012.
- [7] THADEN J J, NKOMO V T, ENRIQUEZ-SARANO M. The global burden of aortic stenosis [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2014, 56(6): 565–571.
- [8] MONCLA L M, BRIEND M, BOSSÉ Y, et al. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(8): 546–559.
- [9] NEWBY D E, COWELL S J, BOON N A. Emerging medical treatments for aortic stenosis: statins, angiotensin converting enzyme inhibitors, or both? [J]. *Heart*, 2006, 92(6): 729–734.
- [10] XU D, FU J, JIN L, et al. Circulating and liver resident CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B [J]. *J Immunol*, 2006, 177(1): 739–747.
- [11] SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Human Th17 cells in infection and autoimmunity [J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(5): 620–624.
- [12] 黄丽丹. 白细胞介素-17A 基因敲除抑制主动脉瓣钙化研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(3): 571.
HUANG L D. Interleukin-17A deficiency alleviates the progress of aortic valve calcification in ApoE^{-/-} mice [J]. *Chin J Exp Surg*, 2019, 36(3): 571.
- [13] VON STEBUT E, REICH K, THAÇI D, et al. Impact of secukinumab on endothelial dysfunction and other cardiovascular disease parameters in psoriasis patients over 52 weeks [J]. *J Invest Dermatol*, 2019, 139(5): 1054–1062.
- [14] TANDON I, JOHNS S, WOESSNER A, et al. Label-free optical biomarkers detect early calcific aortic valve disease in a wild-type mouse model [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2020, 20(1): 521.
- [15] 宗永辉, 刘新灿. 钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型比较及应用研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(11): 133–139, 145.
ZONG Y H, LIU X C. Comparison and applications of mouse models in research on calcific aortic valve disease [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(11): 133–139, 145.
- [16] NIEPMANN S T, STEFFEN E, ZIETZER A, et al. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype [J]. *Clin Res Cardiol*, 2019, 108(8): 847–856.
- [17] COTÉ N, MAHMUT A, BOSSE Y, et al. Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease [J]. *Inflammation*, 2013, 36(3): 573–581.
- [18] CAPOULADE R, CLAVEL M A, DUMESNIL J G, et al. Insulin resistance and LVH progression in patients with calcific aortic stenosis: a substudy of the ASTRONOMER trial [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2013, 6(2): 165–174.
- [19] LINDMAN B R, MERRYMAN W D. Unloading the stenotic path to identifying medical therapy for calcific aortic valve disease: barriers and opportunities [J]. *Circulation*, 2021, 143(15): 1455–1457.
- [20] KRALER S, BLASER M C, AIKAWA E, et al. Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(7): 683–697.
- [21] MARTIN M, MOTTA S E, EMMERT M Y. Have we found the missing link between inflammation, fibrosis, and calcification in calcific aortic valve disease? [J]. *Eur Heart J*, 2023, 44(10): 899–901.
- [22] SCHINOCCA C, RIZZO C, FASANO S, et al. Role of the IL-23/IL-17 pathway in rheumatic diseases: an overview [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 637829.
- [23] PATEL D D, KUCHROO V K. Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions [J]. *Immunity*, 2015, 43(6): 1040–1051.
- [24] IVANOV I I, ZHOU L, LITTMAN D R. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation [J]. *Semin Immunol*, 2007, 19(6): 409–417.
- [25] BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 235–238.
- [26] VELDHOEN M, HOCKING R J, ATKINS C J, et al. TGFβ₂ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports *de novo* differentiation of IL-17-producing T cells [J]. *Immunity*, 2006, 24(2): 179–189.
- [27] HUBER M, BRÜSTLE A, REINHARD K, et al. IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(52): 20846–20851.
- [28] WILSON N J, BONIFACE K, CHAN J R, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(9): 950–957.
- [29] MORISHIMA N, MIZOGUCHI I, TAKEDA K, et al. TGF-β is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(1): 105–110.
- [30] IVANOV I I, MCKENZIE B S, ZHOU L, et al. The orphan nuclear receptor RORγ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells [J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1121–1133.
- [31] XIA L, TIAN D, HUANG W, et al. Upregulation of IL-23 expression in patients with chronic hepatitis B is mediated by the HBx/ERK/NF-κB pathway [J]. *J Immunol*, 2012, 188(2): 753–764.
- [32] KATSUYAMA T, COMOGLIO F, SEIMIYA M, et al. During *Drosophila* disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell

proliferation with Dilp8-mediated developmental delay [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(18): E2327-E2336.

[33] VOSS A, BODE G, KERKHOFF C. Double-stranded RNA induces IL-8 and MCP-1 gene expression via TLR3 in HaCaT-keratinocytes [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012, 11(5): 397-405.

[34] LUO Y P, ZHOU H, KRUEGER J, et al. The role of proto-oncogene Fra-1 in remodeling the tumor microenvironment in support of breast tumor cell invasion and progression [J]. *Oncogene*, 2010, 29(5): 662-673.

[35] HJORTNAES J, BUTCHER J, FIGUEIREDO J L, et al. Arterial and aortic valve calcification inversely correlates with osteoporotic bone remodelling: a role for inflammation [J]. *Eur*

Heart J, 2010, 31(16): 1975-1984.

[36] ANSTINE L J, HORNE T E, HORWITZ E M, et al. Contribution of extra-cardiac cells in murine heart valves is age-dependent [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(10): e007097.

[37] LI G, QIAO W, ZHANG W, et al. The shift of macrophages toward M1 phenotype promotes aortic valvular calcification [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 153(6): 1318-1327.

[38] GRIM J C, AGUADO B A, VOGT B J, et al. Secreted factors from proinflammatory macrophages promote an osteoblast-like phenotype in valvular interstitial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(11): e296-e308.

[收稿日期]2024-03-26

(上接第 77 页)

[5] 管颜青. 2040 年全球肝癌新发病例将增 55% [N]. *医师报*, 2022-10-13(B02).

GUAN Y Q. The number of new liver cancer cases worldwide will increase by 55% in 2040 [N]. *Medical newspaper*, 2022-10-13(B02).

[6] CHEN B, ZHOU S, ZHAN Y, et al. Dioscin inhibits the invasion and migration of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by reversing TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2222.

[7] 梁玉琼, 黄庆, 陈梁可, 等. 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞增殖的抑制作用 [J]. *现代食品科技*, 2021, 37(8): 62-66, 213.

LIANG Y Q, HUANG Q, CHEN L K, et al. Inhibitory effects of dioscin on the proliferation of HepG2 cells [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(8): 62-66, 213.

[8] 梁玉琼, 黄庆, 梁天坚, 等. 薯蓣皂苷对肝癌细胞 Bel-7402 和正常人肝细胞 LO2 增殖和凋亡的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(3): 30-35.

LIANG Y Q, HUANG Q, LIANG T J, et al. Proliferation and apoptosis of dioscin in Bel-7402 and LO2 cells [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(3): 30-35.

[9] 李岩溪. 天然产物蟛蜞菊内酯靶向 β-catenin 诱导结肠癌细胞凋亡的作用机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.

LI Y X. The effect and mechanism of natural product wedelolactone inducing apoptosis of colorectal cancer cells by targeting β-catenin [D]. Shenyang: China Medical University, 2022.

[10] MA Q, YU J, ZHANG X, et al. Wnt/β-catenin signaling pathway-a versatile player in apoptosis and autophagy [J]. *Biochimie*, 2023, 211: 57-67.

[11] TONG Q, YI M, KONG P, et al. TRIM36 inhibits tumorigenesis through the Wnt/β-catenin pathway and promotes caspase-dependent apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 278.

[收稿日期]2024-03-01