

Notch 信号通路与 TLR4 相互作用对冠心病患者 CD14⁺单核细胞功能的影响

齐贵彬 高建步 张明磊 张永杰 解莉莉 李娜

(河南大学附属南阳市中心医院心血管内科,河南 南阳 473009)

[摘要] **目的** 探讨 Notch 信号通路与 Toll 样受体(TLR)4 相互作用对冠心病患者 CD14⁺单核细胞功能的影响。**方法** 选择 2019 年 4 月—2020 年 8 月我院收治的冠心病患者 101 例,根据病情分为稳定型心绞痛(SAP)组、不稳定型心绞痛(UAP)组和急性心肌梗死(AMI)组,并选择同时期体检健康者 40 例为对照组。采集各组研究对象的空腹外周静脉血并分离单个核细胞,实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)检测单个核细胞中 *Notch1*、*Notch2* 及 *TLR1~10* mRNA 表达水平。CD14 磁珠分选三组冠心病患者外周血单个核细胞中的 CD14⁺单核细胞,使用 DAPT(Notch 信号通路抑制剂)和 CRX-675(TLR4 激动剂)刺激培养后,检测 CD14⁺单核细胞中 *TLR2*、*TLR4*、*TLR9* 及 *Notch1*、*HES1*、*HES5* mRNA 表达水平;采用酶联免疫吸附实验检测三组患者细胞培养上清液中 IL-6、TNF- α 水平;采用蛋白免疫印迹实验检测 CD14⁺单核细胞中 TIR 结构域接头分子(TRIF)、抗髓样分化因子 88(MyD88)和核因子- κ B(NF- κ B)p65 亚基蛋白的相对表达水平。**结果** 三组冠心病患者的外周血单个核细胞中 *Notch1*、*TLR2*、*TLR4*、*TLR9* mRNA 表达水平均显著高于对照组,且 AMI 组患者上述 mRNA 表达水平均最高($F=10.295\sim16.558$, $t_{\text{LSD}}=7.918\sim18.271$, $P<0.05$)。DAPT 刺激后,三组冠心病患者外周血中 CD14⁺单核细胞 *TLR4* mRNA 表达水平均显著低于刺激前($t=5.871\sim9.069$, $P<0.05$),其中 AMI 组降低幅度显著高于 UAP 组和 SAP 组($F=5.522$, $t_{\text{LSD}}=2.613$ 、 2.625 , $P<0.05$);CRX-675 刺激后,三组冠心病患者外周血 CD14⁺单核细胞中 *Notch1*、*HES1*、*HES5* mRNA 表达水平均显著高于刺激前($t=9.218\sim17.483$, $P<0.05$),其中 AMI 组升高幅度显著高于 UAP 组和 SAP 组($F=30.133\sim212.120$, $t_{\text{LSD}}=4.921\sim11.107$, $P<0.05$)。CRX-675 刺激后,三组冠心病患者外周血细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6 水平均显著高于刺激前($t=5.806\sim8.129$, $P<0.05$);DAPT+CRX-675 共同刺激以后,三组冠心病患者外周血细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6 水平均显著低于 CRX-675 单独刺激后($t=5.216\sim9.063$, $P<0.05$),且 AMI 组降低幅度显著高于 UAP 组和 SAP 组($F=104.894$ 、 4.798 , $t_{\text{LSD}}=2.440\sim10.977$, $P<0.05$)。DAPT+CRX-675 共同刺激后,三组患者外周血 CD14⁺单核细胞中 TRIF、NF- κ B p65 蛋白表达水平均显著低于 CRX-675 单独刺激后($t=5.052\sim9.921$, $P<0.05$),其中 AMI 组降低幅度显著高于 UAP 组和 SAP 组($F=4.580$ 、 4.200 , $t_{\text{LSD}}=2.414\sim3.461$, $P<0.05$)。**结论** Notch 信号通路与 TLR4 相互作用或可通过影响外周血 CD14⁺单核细胞的功能,导致冠心病患者病情进展。

[关键词] 冠心病;受体,Notch;Toll 样受体 4;RNA,信使;信号传导;炎症;单核细胞

[中图分类号] R541.4

[文献标志码] A

Influence of the interaction between the Notch signaling pathway and Toll-like receptor 4 on the function of CD14⁺ monocytes in patients with coronary heart disease

QI Guibin, GAO Jianbu, ZHANG Minglei, ZHANG Yongjie, XIE Lili, LI Na (Department of Cardiology, The Affiliated Nanyang Central Hospital, Henan University, Nanyang 473009, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the influence of the interaction between the Notch signaling pathway and Toll like receptor 4 (TLR4) on the function of CD14⁺ monocytes in patients with coronary heart disease. **Methods** A total of 101 patients with coronary heart disease who were admitted to our hospital from April 2019 to August 2020 were enrolled, and according to their disease conditions, they were divided into stable angina pectoris (SAP) group, unstable angina pectoris (UAP) group, and acute myocardial infarction (AMI) group; meanwhile, 40 individuals who underwent physical examination during the same period of time were enrolled as control group. Fasting peripheral venous blood samples were collected from each group of subjects, and mononuclear cells were isolated. RT-qPCR was used to measure the mRNA expression levels of *Notch1*, *Notch2*, and *TLR1-10* in mononuclear cells. Magnetic-activated cell sorting was performed to isolate CD14⁺ monocytes from peripheral blood mononuclear cells for the three groups of patients with coronary heart disease, and after stimulation and culture with the Notch signaling pathway inhibitor DAPT and the TLR4 agonist CRX-675, the mRNA expression levels of Toll like receptor 2 (TLR2), TLR4, Toll

like receptor 9 (TLR9), *Notch1*, *HES1*, and *HES5* were measured; ELISA was used to measure the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the supernatant of cell culture; Western blotting was used to measure the relative

[收稿日期] 2025-05-12; **[修订日期]** 2025-10-27

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20191464)

[通信作者] 高建步, Email: jbgao@humb@163.com

protein expression levels of TIR domain adaptor molecule (TRIF), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 subunit in cells. **Results** Compared with the control group, the three groups of patients with coronary heart disease had significantly higher mRNA expression levels of *Notch1*, *TLR2*, *TLR4*, and *TLR9* in peripheral blood mononuclear cells, with the highest expression levels in the AMI group ($F=10.295-16.558, t_{\text{LSD}}=7.918-18.271, P<0.05$). After DAPT stimulation, all three groups of patients with coronary heart disease had a significant reduction in the mRNA expression level of *TLR4* in peripheral blood CD14⁺ monocytes ($t=5.871-9.069, P<0.05$), and the AMI group had a significantly greater reduction than the UAP group and the SAP group ($F=5.522, t_{\text{LSD}}=2.613, 2.625, P<0.05$). After CRX-675 stimulation, all three groups of patients with coronary heart disease had significant increases in the mRNA expression levels of *Notch1*, *HES1*, and *HES5* in peripheral blood CD14⁺ monocytes ($t=9.218-17.483, P<0.05$), and the AMI group had significantly greater increases than the UAP group and the SAP group ($F=30.133-212.120, t_{\text{LSD}}=4.921-11.107, P<0.05$). After CRX-675 stimulation, all three groups of patients with coronary heart disease had significant increases in the levels of TNF- α and IL-6 in the supernatant of peripheral blood cell culture ($t=5.806-8.129, P<0.05$). For all three groups of patients with coronary heart disease, the levels of TNF- α and IL-6 in the supernatant of peripheral blood cell culture after co-stimulation with DAPT and CRX-675 were significantly lower than those after CRX-675 stimulation alone ($t=5.216-9.063, P<0.05$), and the AMI group had significantly greater reductions than the UAP group and the SAP group ($F=104.894, 4.798, t_{\text{LSD}}=2.440-10.977, P<0.05$). For all three groups of patients with coronary heart disease, the protein expression levels of TRIF and NF- κ B p65 in peripheral blood CD14⁺ monocytes after co-stimulation with DAPT and CRX-675 were significantly lower than those after CRX-675 stimulation alone ($t=5.052-9.921, P<0.05$), and the AMI group had significantly greater reductions than the UAP group and the SAP group ($F=4.580, 4.200, t_{\text{LSD}}=2.414-3.461, P<0.05$). **Conclusion** The interaction between the Notch signaling pathway and *TLR4* can lead to disease progression by affecting the function of CD14⁺ monocytes in patients with coronary heart disease.

[KEY WORDS] Coronary disease; Receptors, Notch; Toll-like receptor 4; RNA, messenger; Signal transduction; Inflammation; Monocytes

冠状动脉血管长期性炎症反应可促使血小板黏附活化,同时增强免疫细胞向血管内皮的趋化效应,从而引发斑块生成、破裂乃至管腔阻塞,最终诱发稳定型心绞痛(SAP)、不稳定型心绞痛(UAP)及急性心肌梗死(AMI)等冠心病典型临床表型,其病理过程与冠脉病变进展具有显著相关性^[1]。Toll样受体(TLR)作为固有免疫系统的重要调控元件,通过辨识病原相关分子模式激活下游信号级联反应,在炎症反应调控与免疫防御机制中发挥核心作用^[2]。动物实验发现,TLR2和TLR4在急性冠脉综合症的免疫调节过程中具有特异性功能^[3-4]。Notch信号传导系统通过细胞间通讯介导组织分化与器官发育的生物学过程。最新研究揭示该通路具有显著的多效性特征,不仅参与恶性肿瘤的病理演进调控,还被证实介入手足口病和IgA肾病等多种疾病的炎症反应网络^[5-6]。同时CD14作为固有免疫识别受体,经配体激活后可触发单核-巨噬细胞、血管内皮细胞及平滑肌细胞释放大炎症介质,并诱导黏附分子表达上调,提示其在冠状动脉粥样硬化进程中发挥关键调控作用^[7]。本研究通过使用Notch信号通路抑制剂和TLR4激动剂体外刺激培养人外周血CD14⁺单核细胞,并检测细胞及其上清液中TLR及Notch信号通路相关因子表达水平,探讨Notch信号通路与TLR4相互作用对冠心病患者CD14⁺单核细胞功能的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择2019年4月—2020年8月河南大学附属南阳市中心医院心血管内科收治的冠心病患者101例。患者纳入标准:①符合第9版《内科学》^[8]中对SAP、UAP及急性ST段抬高型心肌梗死的诊断标准者;②年龄>18岁者;③近1个月内无影响血细胞的药物使用史者;④临床资料完整者。排除标准:①合并有自身免疫性疾病、感染性疾病、恶性肿瘤或者精神系统疾病者;②冠状动脉造影显示冠状动脉畸形所致狭窄者;③既往有冠状动脉手术史者;④合并急性脑卒中、肺栓塞或先天性心脏病者。所有患者中男63例,女38例,平均年龄(53.75 ± 9.40)岁,根据病情将其分为SAP组、UAP组和AMI组(均为急性ST段抬高型心肌梗死);选择同时期体检健康的志愿者40例作为对照组,其中男25例,女15例,平均年龄(52.97 ± 10.29)岁。冠心病患者与对照组受试者的性别、年龄等基线资料相比较没有显著差异($P>0.05$)。

1.2 材料与试剂

Ficoll人外周血淋巴细胞分离液购自美国GE Healthcare公司,CD14磁珠分选试剂盒购自上海嘉远生物有限公司,Notch信号通路抑制剂DAPT购自美国Sigma公司,TLR4激动剂CRX-675由中国

医学科学院药物研究所提供,RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、PCR 检测试剂盒购自上海海方生物技术有限公司,IL-6、TNF- α 酶联免疫吸附检测试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,鼠抗人 TIR 结构域接头分子(TRIF)单克隆抗体、鼠抗人抗髓样分化因子 88(MyD88)单克隆抗体和兔抗人核因子- κ B(NF- κ B)p65 亚基单克隆抗体购自杭州艾康生物技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 外周血单个核细胞分离 采集冠心病患者和对照组研究对象空腹外周静脉血 15 mL,抗凝处理后使用 Ficoll 梯度离心法^[9]分离外周血单个核细胞,置于含 10% 二甲基亚砷的胎牛血清中,液氮冻存备用。

1.3.2 CD14⁺ 单核细胞分离与刺激培养 采用免疫磁珠分选技术对外周血单个核细胞中的 CD14⁺ 单核细胞进行亚群富集,实验设置三组独立队列,每组配置 6 个复孔。将分选获得的细胞进行铺板,每孔接种 (1~2) × 10⁵ 个 CD14⁺ 单核细胞后,按实验设计实施分组干预:其中 2 个平行孔采用 80 mmol/L 的 γ -分泌酶抑制剂 DAPT 进行靶向阻断,2 个平行孔使用 300 μ g/L 的 TLR4 激动剂 CRX-675 实施特异性激活,剩余的 2 个平行孔均加入终浓度为 300 μ g/L 的 CRX-675 以及终浓度 80 mmol/L 的 DAPT 刺激培养。各组细胞经 24 h 共培养后,同步收集各处理组中的 CD14⁺ 单核细胞及细胞培养上清液,用于后续分子生物学检测及功能分析。

1.3.3 实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)法检测外周血单个核细胞 *Notch1*、*Notch2* 及 *TLR1* ~ *10* mRNA 表达水平及 CD14⁺ 单核细胞中 *Notch1*、*HES1*、*HES5* mRNA 表达水平 将 1.3.1、1.3.2 制备的对照组、SAP 组、UAP 组及 AMI 组患者外周血单个核细胞中 CD14⁺ 单核细胞的亚群富集样本,采用 TRIzol 裂解试剂提取外周血单个核细胞及 CD14⁺ 单核细胞的总 RNA。反转录得到 cDNA。PCR 采用 20 μ L 标准体系:含预混型高保真 DNA 聚合酶 Premix Ex Taq II 10 μ L,正反向引物各 1 μ L,模板 cDNA 4 μ L,补加无核酸酶双蒸水至终体积。扩增程序设置:初始阶段 94 $^{\circ}$ C 预变性处理 30 s;随后进行 40 次循环扩增,每个循环包含 95 $^{\circ}$ C 快速变性 5 s,50 $^{\circ}$ C 引物退火 30 s;最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以 GAPDH 为内部参照,采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 计算样本中相关 mRNA 的相对表达水平。引物名称及其序列详见表 1。

表 1 引物名称及其序列

名称	序列	长度(bp)
HES1	F:5'-GGTGAGCCTACGTGTCTCGTCG-3'	22
	R:5'-GCACAGGGTAGTTTTAGGACC-3'	21
HES5	F:5'-ACACGATGTAGTTCCTTGTTGG-3'	22
	R:5'-GCACAGGGTAGTTTTAGGACC-3'	21
Notch1	F:5'-CGAGAAAGTCGTAAGCCCGGG-3'	21
	R:5'-GGTGCTAGAAGTCCCGTAAGC-3'	21
Notch2	F:5'-AATCGTAGGCCGTTAGGGCCCG-3'	22
	R:5'-GCGTAGCCTTAAGCCCGTAACC-3'	22
TLR1	F:5'-CGTAGTCGTAAGTCCGTAAC-3'	22
	R:5'-GGCTGATCGTAAAGTCCCAAA-3'	22
TLR2	F:5'-GCGTAGCCGTAACGTAAAGTC-3'	22
	R:5'-CAAGTCGTAAGTCGTATGCCCG-3'	22
TLR3	F:5'-GGTCGTATTCGCCCAATTCCAA-3'	22
	R:5'-CTGTAGCTAACGCCGCCAATT-3'	22
TLR4	F:5'-ATCGTAAGCCCGTAACCAAAA-3'	22
	R:5'-TAGTCTAGCCCCCTAGGGGATG-3'	22
TLR5	F:5'-CGTAGCTCTTTGAATGCCCTA-3'	21
	R:5'-GCTAGTCGTAAGTCCATGGTT-3'	21
TLR6	F:5'-GCTGATGTCGTATTGCCCATGC-3'	22
	R:5'-CCGTAGTCCGTATGCCATGAAA-3'	22
TLR7	F:5'-CGTAGTCGTAAAGTCACGTCTC-3'	22
	R:5'-GGCTAGTCGTTTGCTACCGTGG-3'	22
TLR8	F:5'-TCGTAGTCCATAAAAGTCGTAA-3'	22
	R:5'-ATGCTGTAACGTCCCGTAGCTC-3'	22
TLR9	F:5'-CCGTAGTCGTAACGTGTCCAGG-3'	22
	R:5'-GCGTAGTCGTTTAGTCGTACGT-3'	22
TLR10	F:5'-CGTAGTGCTGTAGTCGTAAAA-3'	21
	R:5'-GGTGCCGTATGCTAGCCGTT-3'	21
GAPDH	F:5'-GCGCAGCGTAGTCGACCCGTA-3'	22
	R:5'-CGTAGCTGCAATGCCCTAGCC-3'	22

1.3.4 酶联免疫吸附法检测细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6 表达水平 取 1.3.2 中得到的三组冠心病患者 CD14⁺ 单核细胞培养上清液,严格按照酶联免疫吸附检测试剂盒说明书中操作过程检测上清液中 TNF- α 、IL-6 表达水平。

1.3.5 蛋白免疫印迹法检测 CD14⁺ 单核细胞中 TRIF、MyD88 和 NF- κ B p65 蛋白表达水平 对 1.3.2 步骤获取的三组冠心病患者 CD14⁺ 单核细胞样本进行蛋白分析:使用 50 μ L RIPA 细胞裂解缓冲液完成总蛋白提取后,通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行定量校准。取等量蛋白样本(10 μ g)上样至 SDS-PAGE 凝胶加样孔,经电泳分离后采用半干转印法将蛋白转移至 PVDF 膜。随后用 5% 脱脂牛奶封闭非特异性结合位点 2 h,TBST 缓冲液清洗 3 次。依次孵育特异性一抗:TRIF 单抗(1 : 1 000)、MyD88 单抗(1 : 500)、NF- κ B p65 单抗(1 : 1 000)及 β -actin 内参抗体(1 : 2 000),4 $^{\circ}$ C 条件下孵育 12 h。次日经洗涤后加入 HRP 标记的对应种属二

抗(1 : 2 000),室温振荡反应 2 h。通过 ECL 化学发光底物进行膜显影,然后利用 ImageJ 图像处理系统对目标蛋白条带进行灰度扫描,以目标蛋白与内参 β -actin 的灰度比值计算各蛋白的相对表达量,结果取 5 次重复实验的平均值。

1.4 统计学处理

采用 GraphPad Prism 软件对数据进行统计学分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组数据间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组受试者外周血单个核细胞中 *Notch1*、*Notch2* mRNA 表达水平比较

对照组、SAP 组、UAP 组及 AMI 组受试者外周血单个核细胞 *Notch1* mRNA 相对表达量分别为 1.63 ± 0.21 、 3.58 ± 0.19 、 3.80 ± 0.22 及 5.19 ± 0.45 ,*Notch2* mRNA 相对表达水平分别为 0.92 ± 0.34 、 0.94 ± 0.30 、 0.91 ± 0.35 及 0.95 ± 0.33 。其中三组冠心病患者 *Notch1* mRNA 表达水平均显著高于对照组,并且 AMI 组显著高于 SAP 组和 UAP 组($F = 10.295, t_{LSD} = 8.631 \sim 18.271, P < 0.05$)。

2.2 各组受试者外周血单个核细胞中 *TLR1* ~ *10*

mRNA 表达水平比较

各组受试者外周血单个核细胞当中 *TLR2*、*TLR4*、*TLR9* mRNA 的表达水平均差异显著($F = 11.706 \sim 16.558, P < 0.05$),其中三组冠心病患者 *TLR2*、*TLR4*、*TLR9* mRNA 表达水平均显著高于对照组,且 AMI 组显著高于 SAP 组和 UAP 组($t = 7.918 \sim 16.049, P < 0.05$)。见表 2。

2.3 Notch 信号通路抑制剂对冠心病患者 CD14⁺单核细胞中 *TLR* mRNA 表达水平的影响

DAPT 刺激以后,三组患者 CD14⁺单核细胞中 *TLR4* mRNA 的表达水平均显著低于刺激前($t = 5.871 \sim 9.069, P < 0.05$),其中 AMI 组的降低幅度显著高于 UAP 组以及 SAP 组($F = 5.522, t_{LSD} = 2.613、2.625, P < 0.05$)。见表 3。

2.4 *TLR4* 激动剂对冠心病患者 CD14⁺单核细胞中 Notch 信号通路相关分子 mRNA 表达水平影响

CRX-675 刺激后,三组患者 CD14⁺单核细胞中 *Notch1*、*HES1*、*HES5* mRNA 表达水平均显著高于刺激前($t = 9.218 \sim 17.483, P < 0.05$),其中 AMI 组 *Notch1*、*HES1*、*HES5* mRNA 升高幅度均显著高于 UAP 组以及 SAP 组($F = 30.133 \sim 212.120, t_{LSD} = 4.921 \sim 11.107, P < 0.05$)。见表 4。

2.5 Notch 信号通路抑制剂对 *TLR4* 激动剂介导的炎症信号通路因子水平影响

CRX-675 刺激后,三组患者细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6 水平均显著高于刺激前($t = 5.806 \sim$

表 2 各组受试者外周血单个核细胞中 *TLR1* ~ *10* mRNA 相对表达水平比较($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>TLR1</i>	<i>TLR2</i>	<i>TLR3</i>	<i>TLR4</i>	<i>TLR5</i>	<i>TLR6</i>	<i>TLR7</i>	<i>TLR8</i>	<i>TLR9</i>	<i>TLR10</i>
对照组	1.08 ± 0.21	1.04 ± 0.18	1.13 ± 0.25	1.02 ± 0.18	1.15 ± 0.24	1.45 ± 0.31	1.41 ± 0.26	1.85 ± 0.26	1.53 ± 0.21	1.16 ± 0.23
SAP 组	1.15 ± 0.24	3.17 ± 0.23	1.18 ± 0.23	3.13 ± 0.21	1.23 ± 0.21	1.36 ± 0.24	1.55 ± 0.32	1.77 ± 0.24	2.57 ± 0.27	1.21 ± 0.25
UAP 组	1.13 ± 0.22	3.11 ± 0.20	1.15 ± 0.29	3.17 ± 0.19	1.19 ± 0.27	1.34 ± 0.28	1.46 ± 0.37	1.74 ± 0.29	2.61 ± 0.36	1.23 ± 0.29
AMI 组	1.21 ± 0.28	3.29 ± 0.25	1.23 ± 0.27	4.35 ± 0.47	1.23 ± 0.19	1.42 ± 0.29	1.57 ± 0.35	1.79 ± 0.28	2.95 ± 0.29	1.18 ± 0.26

表 3 DAPT 刺激后三组患者 CD14⁺单核细胞中 *TLR* mRNA 相对表达水平比较($n = 5$)

组别	<i>TLR2</i>			<i>TLR4</i>			<i>TLR9</i>		
	刺激前 ($\bar{x} \pm s$)	刺激后 ($\bar{x} \pm s$)	差值 [$M(P_{25}, P_{75})$]	刺激前 ($\bar{x} \pm s$)	刺激后 ($\bar{x} \pm s$)	差值 ($\bar{x} \pm s$)	刺激前 ($\bar{x} \pm s$)	刺激后 ($\bar{x} \pm s$)	差值 [$M(P_{25}, P_{75})$]
SAP 组	3.35 ± 0.32	3.29 ± 0.31	$0.03(-0.59, -0.39)$	3.15 ± 0.27	1.19 ± 0.13	-1.97 ± 0.34	3.25 ± 0.42	3.21 ± 0.43	$-0.47(-0.59, 0.69)$
UAP 组	3.42 ± 0.31	3.31 ± 0.28	$0.17(-0.56, 0.21)$	3.21 ± 0.24	1.15 ± 0.11	-2.06 ± 0.18	3.11 ± 0.47	3.05 ± 0.49	$-0.18(-0.31, 0.23)$
AMI 组	3.49 ± 0.30	3.33 ± 0.32	$-0.12(-0.34, -0.01)$	4.73 ± 0.51	2.07 ± 0.41	-2.67 ± 0.49	3.31 ± 0.54	3.24 ± 0.51	$-0.19(-0.27, 0.38)$

表 4 CRX-675 刺激后三组 CD14⁺单核细胞中 Notch 信号通路相关分子 mRNA 相对表达水平比较($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>Notch1</i>			<i>HES1</i>			<i>HES5</i>		
	刺激前	刺激后	差值	刺激前	刺激后	差值	刺激前	刺激后	差值
SAP 组	3.60 ± 0.24	10.74 ± 0.35	7.15 ± 0.50	1.82 ± 0.27	6.95 ± 0.25	5.13 ± 0.44	2.59 ± 0.13	7.94 ± 0.75	5.34 ± 0.73
UAP 组	3.95 ± 0.17	11.98 ± 0.28	8.02 ± 0.39	2.06 ± 0.24	7.41 ± 0.29	5.36 ± 0.36	2.83 ± 0.15	8.05 ± 0.63	5.23 ± 0.74
AMI 组	5.06 ± 0.39	14.59 ± 0.47	9.54 ± 0.57	3.98 ± 0.28	14.16 ± 0.32	10.18 ± 0.50	9.41 ± 0.46	21.77 ± 0.82	12.36 ± 1.23

8.129, $P<0.05$); DAPT+CRX-675 共同刺激后, 三组患者细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6 水平均显著低于 CRX-675 单独刺激后 ($t=5.216\sim9.063$, $P<0.05$), 且 AMI 组降低幅度显著高于 UAP 组和 SAP 组 ($F=104.894、4.798$, $t_{LSD}=2.440\sim10.977$, $P<0.05$)。见表 5。

2.6 Notch 信号通路抑制剂对 TLR4 激动剂介导

表 5 CRX-675 及 DAPT 刺激后三组患者细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6 水平比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α ($\rho/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)				IL-6($\rho/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)			
	刺激前	CRX-675 刺激	DAPT+CRX-675 刺激	差值	刺激前	CRX-675 刺激	DAPT+CRX-675 刺激	差值
SAP 组	2.59 $\pm$ 0.11	6.13 $\pm$ 0.21	4.34 $\pm$ 0.27	-1.80 $\pm$ 0.20	4.85 $\pm$ 0.23	7.92 $\pm$ 0.45	6.45 $\pm$ 0.25	-1.47 $\pm$ 0.64
UAP 组	2.91 $\pm$ 0.13	6.48 $\pm$ 0.26	4.57 $\pm$ 0.19	-1.91 $\pm$ 0.36	5.02 $\pm$ 0.36	8.16 $\pm$ 0.39	6.75 $\pm$ 0.31	-1.42 $\pm$ 0.50
AMI 组	4.63 $\pm$ 0.18	9.81 $\pm$ 0.34	5.72 $\pm$ 0.34	-4.09 $\pm$ 0.26	6.35 $\pm$ 0.39	11.38 $\pm$ 0.53	8.92 $\pm$ 0.45	-2.45 $\pm$ 0.63

“差值”为各指标 DAPT+CRX-675 共同刺激后水平与仅 CRX-675 刺激后水平的差值

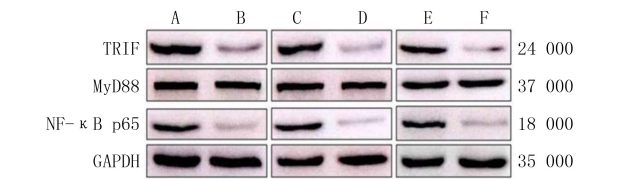
表 6 CRX-675+DAPT 共同刺激后三组患者 CD14⁺ 单核细胞中 TRIF、MyD88、NF- κ B p65 表达水平比较 ($n=5$)

组别	TRIF			
	刺激前 ($\bar{x} \pm s$)	CRX-675 刺激 ($\bar{x} \pm s$)	DAPT+CRX-675 刺激 ($\bar{x} \pm s$)	差值 ($\bar{x} \pm s$)
SAP 组	2.02 $\pm$ 0.24	1.35 $\pm$ 0.29	0.41 $\pm$ 0.06	-0.95 $\pm$ 0.29
UAP 组	2.08 $\pm$ 0.31	1.42 $\pm$ 0.34	0.46 $\pm$ 0.08	-0.97 $\pm$ 0.38
AMI 组	2.13 $\pm$ 0.35	1.95 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.09	-1.43 $\pm$ 0.11

组别	MyD88			
	刺激前 ($\bar{x} \pm s$)	CRX-675 刺激 ($\bar{x} \pm s$)	DAPT+CRX-675 刺激 ($\bar{x} \pm s$)	差值 [$M(P_{25}, P_{75})$]
SAP 组	0.92 $\pm$ 0.11	0.71 $\pm$ 0.09	0.69 $\pm$ 0.09	0.02(-0.06, 0.09)
UAP 组	0.96 $\pm$ 0.10	0.75 $\pm$ 0.09	0.74 $\pm$ 0.09	-0.01(-0.06, 0.06)
AMI 组	0.99 $\pm$ 0.13	0.79 $\pm$ 0.11	0.76 $\pm$ 0.10	-0.08(-0.12, 0.15)

组别	NF- κ B p65			
	刺激前 ($\bar{x} \pm s$)	CRX-675 刺激 ($\bar{x} \pm s$)	DAPT+CRX-675 刺激 ($\bar{x} \pm s$)	差值 ($\bar{x} \pm s$)
SAP 组	3.57 $\pm$ 0.79	2.05 $\pm$ 0.63	0.35 $\pm$ 0.03	-1.70 $\pm$ 0.62
UAP 组	3.63 $\pm$ 0.85	2.14 $\pm$ 0.71	0.38 $\pm$ 0.03	-1.77 $\pm$ 0.71
AMI 组	3.69 $\pm$ 0.82	2.98 $\pm$ 0.51	0.25 $\pm$ 0.03	-2.72 $\pm$ 0.52

“差值”为各指标 DAPT+CRX-675 共同刺激后水平与仅 CRX-675 刺激后水平的差值



A 和 B 为 SAP 组 CRX-675 刺激后和 DAPT+CRX-675 共同刺激后; C 和 D 为 UAP 组 CRX-675 刺激后和 DAPT+CRX-675 共同刺激后; E 和 F 为 AMI 组 CRX-675 刺激后和 DAPT+CRX-675 共同刺激后

图 1 蛋白免疫印迹法检测各组患者 CD14⁺ 单核细胞中 TRIF、MyD88、NF- κ B p65 表达水平

的下游信号分子表达水平影响

DAPT+CRX-675 共同刺激以后, 三组患者 CD14⁺ 单核细胞中 TRIF、NF- κ B p65 蛋白的表达水平均显著低于 CRX-675 单独刺激后 ($t=5.052\sim9.921$, $P<0.05$), 其中 AMI 组降低幅度显著高于 UAP 组和 SAP 组 ($F=4.580、4.200$, $t_{LSD}=2.414\sim3.461$, $P<0.05$)。见表 6、图 1。

3 讨 论

Notch 信号转导系统在冠状动脉疾病进程中具有双重调控作用: 一方面通过介导血管内皮细胞表型转化影响其生物学特性, 另一方面通过激活细胞程序性死亡途径及诱导炎症介质释放参与动脉粥样硬化进程^[10]。这种分子机制提示, 靶向干预 Notch 信号级联反应可能为心血管疾病治疗提供新的策略。研究显示内皮细胞来源的 Notch1 分子在机体固有性和适应性免疫调控中具有重要功能^[11], 但免疫细胞源性 Notch1 在冠心病发生发展中的作用仍需进一步研究证实。本研究结果显示, 三组冠心病患者外周血单个核细胞中 Notch1 mRNA 表达水平高于对照组, 且 AMI 组高于 SAP 组和 UAP 组, 提示免疫细胞源性 Notch1 表达的上调可能参与冠心病发生发展, 且上调程度与病情严重程度有关, 也许可以作为评估病情发展的潜在生物标志物。

另外, 本研究中 Notch 抑制剂刺激以后, 三组冠心病患者 CD14⁺ 单核细胞中 TLR4 mRNA 表达均被抑制, 且 AMI 组的抑制程度最为显著; TLR4 激动剂刺激后, 三组冠心病患者 CD14⁺ 单核细胞中 Notch1 及 Notch 信号通路相关分子 HES1、HES5 mRNA 表达水平明显升高, 且 AMI 组的升高幅度更明显, 表现出更显著的剂量依赖性增强。从病理生理机制分析, CD14⁺ 单核细胞作为动脉粥样硬化的关键效应细胞, 其表面模式识别受体可通过结合氧化型低密度脂蛋白及微生物相关分子模式, 触发炎症信号级联反应, 加速斑块形成^[12]。现有临床研究表明, 该细胞亚群的活化程度与冠状动脉狭窄程

度呈显著正相关^[13],这与本研究中发现的 Notch-TLR4 信号互作现象具有重要关联。提示 Notch1 与 TLR4 可能存在双向调控机制:一方面 Notch 信号通过表观遗传修饰影响 TLR4 转录活性,另一方面 TLR4 活化可反馈性激活 Notch 信号级联,这种交互作用可能通过调控单核细胞炎症反应参与冠状动脉粥样硬化进程。

现有研究表明,TLR 家族在哺乳动物炎症调节网络中占据核心地位^[14]。具体而言,TLR2/TLR4 可通过激活 Wnt5a 信号轴增强不稳定斑块内的炎性微环境,遗传学研究证实,敲除 *TLR2/TLR4* 基因的动脉粥样硬化模型小鼠其炎症反应显著减弱^[15-17]。研究还发现,TLR4 通过与中性粒细胞形成分子互作网络,协同调控血管内皮细胞程序性死亡及内质网应激反应,进而促进平滑肌细胞富集型斑块的病理演进^[18]。本研究结果显示,冠心病患者外周血单个核细胞中 *TLR2*、*TLR4*、*TLR9* mRNA 表达水平显著高于对照组,且 AMI 组显著高于其他两组;进一步研究显示,Notch 信号通路抑制剂可抑制冠心病患者 CD14⁺ 单核细胞中 TLR4 表达,而 TLR4 激动剂可上调冠心病患者 CD14⁺ 单核细胞分泌的 TNF- α 、IL-6 水平,但该作用在加入 Notch 信号通路抑制剂后被抑制。上述结果说明 Notch 信号通路可通过与 TLR4 相互作用,调控冠心病患者外周血炎症因子分泌水平,且患者病情严重程度可能与该相互作用呈正相关。

最新研究揭示,TLR2/TLR4 介导的信号传导网络可通过两种分子机制激活 NF- κ B 系统:既可通过 MyD88 依赖的经典途径,也可借助 MyD88 非依赖的替代途径,最终驱动炎症介质释放及免疫反应激活^[19-21]。本研究结果显示,Notch 信号通路被抑制后,三组冠心病患者 CD14⁺ 单核细胞中 TRIF、NF- κ B p65 蛋白表达水平均显著降低(即 TLR4 介导的 TRIF 和 NF- κ B 表达降低),而 MyD88 表达水平并无明显变化,提示 Notch 信号通路与 TLR4 在冠心病发生发展过程中,可能通过 MyD88 非依赖性途径调控炎症反应,且病情严重程度随上述作用强度增加而增加,但这种分子互作机制目前仅在体外实验中得到验证,其体内病理生理意义仍需构建基因编辑动物模型进行深入解析。

综上所述,Notch 信号通路与 TLR4 相互作用或可通过影响外周血 CD14⁺ 单核细胞功能,导致冠心病患者病情进展,但相关分子机制仍需进一步深入研究。

伦理批准和知情同意:本研究涉及的所有试验均已通过河南大学附属南阳市中心医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 20190112)。所有试验过程均遵照《赫尔辛基宣言》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

作者声明:齐贵彬、高建步、张明磊参与了研究设计;齐贵彬、高建步、张明磊、张永杰、解莉莉、李娜参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 高琳,郝潇,马军枝,等. 冠心病患者药物涂层球囊扩张术后 1 年发生主要不良心血管事件的影响因素分析[J]. 实用心脑血管病杂志, 2024,32(6):39-44.
- [2] 张自力,刘佳敏,曾蓉,等. 乙型肝炎病毒抑制 M1 巨噬细胞 TLR4、NLRP3 及下游因子促进免疫逃逸[J]. 中国免疫学杂志, 2024,40(9):1808-1814.
- [3] 南武娟,文申英. 急性冠脉综合征大鼠外周血巨噬细胞中脂质稳态与动脉粥样硬化指数相关性研究[J]. 陕西医学杂志, 2022,51(4):401-405.
- [4] TIPLER A, JONES H. NOTCH1 SNP in Individuals with CHD is associated with impaired invasion in a model of extra-villous trophoblast[J]. Placenta, 2023,140:e92.
- [5] GAO J M, GUO H, LI J M, et al. Buyang Huanwu decoction ameliorates myocardial injury and attenuates platelet activation by regulating the PI₃ kinase/Rap1/integrin α (IIb) β (3) pathway[J]. Chin Med, 2024,19(1):109.
- [6] 吴冰,王轩. 基于 Notch 信号通路探讨枸杞多糖对糖尿病肾病大鼠肾纤维化的改善作用[J]. 陕西医学杂志, 2023,52(3):267-272.
- [7] 吉晓理,吕有凯,罗江宾,等. 中老年冠心病患者病情发展中 Notch 信号通路 Toll 样受体 4 相互作用[J]. 中国老年学杂志, 2022,42(11):2815-2819.
- [8] 葛均波,徐永健. 内科学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013.
- [9] 吴佳妮,任晓晓,杨志良,等. 基于外周血单个核细胞转录组的冠心病 RNA N-6-甲基腺苷相关生物标志物研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2024,24(2):5978-5985.
- [10] 闫谧,马俊琦,陈胜阳. 五味子甲素调节 miR-429/Notch1 信号轴对冠心病大鼠心肌组织损伤的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024,22(18):3321-3326.
- [11] 杜建青,张弘,吴忠隐,等. 下肢静脉曲张溃疡创面病原菌感染及血管内皮生长因子/Notch 基因表达[J]. 中华实验外科杂志, 2022,39(12):2425-2428.
- [12] 侯欣,李飞飞,杨祖尉,等. 血清单核细胞趋化蛋白与下肢动脉粥样硬化风险及预后的关系[J]. 心脑血管病杂志, 2023,42(7):713-718.
- [13] 黄柳,张瑞宁,田小超,等. 内皮祖细胞与冠心病患者 CD14⁺ CD16⁺ 单核细胞共培养后移植心肌梗死大鼠对血管密度及心肌梗死面积的影响[J]. 心血管病学进展, 2020,41(2):203-207.
- [14] 李海龙,林英子. 冠心病病人外周血 sCD14、TLR4 表达与冠状动脉粥样硬化斑块稳定性的关系[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022,20(6):1058-1061.

- [2] KIM J P, HUR Y S, YANG H K. Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in early gastric cancer: Analysis of 1,136 early gastric cancers[J]. *Ann Surg Oncol*, 1995,2(4):308-313.
- [3] OKA S, TANAKA S, KANEKO I, et al. Advantage of endoscopic submucosal dissection compared with EMR for early gastric cancer[J]. *Gastrointest Endosc*, 2006,64(6):877-883.
- [4] FORBES N, ELHANAFI S E, AL-HADDAD M A, et al. American Society for Gastrointestinal Endoscopy guideline on endoscopic submucosal dissection for the management of early esophageal and gastric cancers: Summary and recommendations[J]. *Gastrointest Endosc*, 2023,98(3):271-284.
- [5] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, et al. Gastric cancer, version 2.2025, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2025,23(5):169-191.
- [6] YAMASHITA K, HOSODA K, EMA A, et al. Lymph node ratio as a novel and simple prognostic factor in advanced gastric cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2016,42(9):1253-1260.
- [7] PERSIANI R, RAUSEI S, BIONDI A, et al. Ratio of metastatic lymph nodes: Impact on staging and survival of gastric cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2008,34(5):519-524.
- [8] AMIN M B, EDGE S B, GREENE F L, et al. *AJCC cancer staging manual*. 8th ed[M]. New York: Springer, 2017.
- [9] 中华医学会外科学分会腹腔镜与内镜外科学组,中国医师协会外科医师分会上消化道外科医师专家工作组,《中华消化外科杂志》编辑委员会. 精准胃癌外科诊疗中国专家共识(2024 版)[J]. *中华消化外科杂志*, 2024,23(3):323-333.
- [10] SEEVARATNAM R, CARDOSO R, MCGREGOR C, et al. How useful is preoperative imaging for tumor, node, metastasis (TNM) staging of gastric cancer? A meta-analysis[J]. *Gastric Cancer*, 2012,15 Suppl 1:S3-S18.
- [11] LUBNER M G, SMITH A D, SANDRASEGARAN K, et al. CT texture analysis: Definitions, applications, biologic correlates, and challenges[J]. *Radiographics*, 2017,37(5):1483-1503.
- [12] KUNO H, QURESHI M M, CHAPMAN M N, et al. CT texture analysis potentially predicts local failure in head and neck squamous cell carcinoma treated with chemoradiotherapy [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2017,38(12):2334-2340.
- [13] MITTAL V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2018,13:395-412.
- [14] KARAMAN S, DETMAR M. Mechanisms of lymphatic metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2014,124(3):922-928.
- [15] FUKUYA T, HONDA H, HAYASHI T, et al. Lymph-node metastases: Efficacy for detection with helical CT in patients with gastric cancer[J]. *Radiology*, 1995,197(3):705-711.
- [16] BÜLBÜL H M, BURAKGAZI G, KESIMAL U. Preoperative assessment of grade, T stage, and lymph node involvement: Machine learning-based CT texture analysis in colon cancer[J]. *Jpn J Radiol*, 2024,42(3):300-307.
- [17] 徐江,张传玉,王刚. CT 影像特征及纹理分析对胰腺腺泡细胞癌鉴别诊断的价值[J]. *精准医学杂志*, 2024,39(01):21-24.
- [18] DIGUMARTHY S R, PADOLE A M, LO GULLO R, et al. CT texture analysis of histologically proven benign and malignant lung lesions[J]. *Medicine*, 2018,97(26):e11172.
- [19] LIU S, ZHENG H H, PAN X, et al. Texture analysis of CT imaging for assessment of esophageal squamous cancer aggressiveness[J]. *J Thorac Dis*, 2017,9(11):4724-4732.
- [20] GIGANTI F, MARRA P, AMBROSI A, et al. Pre-treatment MDCT-based texture analysis for therapy response prediction in gastric cancer: Comparison with tumour regression grade at final histology[J]. *Eur J Radiol*, 2017,90:129-137.
- [21] LIU S L, SHI H, JI C F, et al. CT textural analysis of gastric cancer: Correlations with immunohistochemical biomarkers [J]. *Sci Rep*, 2018,8(1):11844.
- [22] GIGANTI F, ANTUNES S, SALERNO A, et al. Gastric cancer: Texture analysis from multidetector computed tomography as a potential preoperative prognostic biomarker[J]. *Eur Radiol*, 2017,27(5):1831-1839.
- [23] CRAIGIE M, SQUIRES J, MILES K. Can CT measures of tumour heterogeneity stratify risk for nodal metastasis in patients with non-small cell lung cancer? [J]. *Clin Radiol*, 2017,72(10):899.e1-899.e7.
- [24] 颜智敏,冯智超,曹鹏,等. 多层螺旋 CT 图像纹理分析对直肠癌转移性淋巴结的诊断价值[J]. *中华放射学杂志*, 2017,51(6):432-436.

(本文编辑 耿波)

(上接第 45 页)

- [15] 颜荆芬,朱焱林. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路研究清营汤对 LCWE 诱导川崎病模型小鼠炎症反应与治疗作用[J]. *四川中医*, 2024,42(7):73-78.
- [16] 张琪,张利军,张雨珂,等. C-X-C 趋化因子受体 4 增强 Toll 样受体 2 在肺炎衣原体感染促进动脉粥样硬化病变形成中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024,32(2):102-108.
- [17] 张华,苗文艳,徐正伟,等. 天香丹对动脉粥样硬化模型小鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. *中国中医急症*, 2023,32(1):47-50.
- [18] OGUNLANA E, WILKINSON K, SAWYER R P, et al. Abstract 44: Soluble CD14 and risk of incident cognitive impairment: The reasons for geographic and racial differences in stroke (REGARDS) study[J]. *Circulation*, 2024,149(Suppl_1):466-486.
- [19] VIOLI F, CASTELLANI V, MENICHELLI D, et al. Gut barrier dysfunction and endotoxemia in heart failure: A dangerous connubium? [J]. *Am Heart J*, 2023, 264:40-48.
- [20] 张姗姗,刘漫,刘冬妮,等. TLR4-IN-C34 通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B/NLRP3 信号通路减轻脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞炎症反应[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021,35(10):804.
- [21] 李琳娜,李坚,贺熙乔,等. TLR4/MyD88/AMPK 通路参与调节高脂饮食诱导的肥胖小鼠脂肪组织炎症和细胞凋亡[J]. *中国免疫学杂志*, 2022,38(15):1824-1828.

(本文编辑 范睿心 厉建强)