

补阳还五汤苷类组分介导 NF- κ B 通路抗动脉粥样硬化炎症反应的机制研究

傅馨莹¹, 孙正骥², 龙清吟¹, 谭维¹, 李艳军¹, 吴露³, 何清湖^{4*}, 张伟^{1*}

(1. 湖南中医药大学 中西医结合心脑血管防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208;

2. 岳阳市中医医院, 湖南 岳阳 414021; 3. 浏阳市中医医院, 湖南 浏阳 410399;

4. 湖南医药学院, 湖南 怀化 418000)

摘要 探讨补阳还五汤苷类组分调节核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路对载脂蛋白 E^{-/-} (apolipoprotein E^{-/-}, ApoE^{-/-}) 小鼠及 RAW264.7 细胞炎症反应的影响。体内实验, 采用高脂饲料连续喂养 ApoE^{-/-} 小鼠 12 周, 建立动脉粥样硬化动物模型, 75 μ g·mL⁻¹ 氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, Ox-LDL) 孵育 RAW264.7 细胞 24 h 建立动脉粥样硬化细胞模型, 利用全自动生化分析仪、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色、酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、Western blot 及 droplets digital PCR 方法, 检测血脂水平、主动脉内膜厚度、炎症因子含量及 NF- κ B 通路相关蛋白及 mRNA 表达水平, 评价动脉粥样硬化病变情况、药物抗动脉粥样硬化作用机制。结果表明, ApoE^{-/-} 小鼠高脂饲料连续喂养 12 周后成功建立动脉粥样硬化模型。与对照组比较, 模型组小鼠血浆中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 含量显著升高, 血管内膜增厚, 炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 含量增加, NF- κ B 及 I κ B α 蛋白及 mRNA 表达显著增加; 与模型组相比, 补阳还五汤苷类组分高剂量组显著降低小鼠血浆中 TC、TG、LDL-C 含量, 减轻斑块面积和厚度, 减少炎症因子 TNF- α 的含量, 抑制 NF- κ B、I κ B α 蛋白及 mRNA 表达, 且作用与补阳还五汤一致。体外实验, 采用 75 μ g·mL⁻¹ Ox-LDL 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 成功建立泡沫细胞模型。与对照组相比, 模型组细胞 NF- κ B 的入核量、I κ B α 蛋白及相关 mRNA 的表达增加; 与模型组比较, 补阳还五汤苷类组分中、高剂量组减少 NF- κ B 的入核量、I κ B α 蛋白及相关 mRNA 的表达。以上结果表明, 苷类组分是补阳还五汤抗动脉粥样硬化的主要有效成分, 可抑制 NF- κ B 通路, 减轻炎症反应, 发挥母方补阳还五汤同效的抗动脉粥样硬化炎症反应的作用。

关键词 补阳还五汤; 苷类组分; 动脉粥样硬化; 炎症反应; NF- κ B 信号通路

Mechanism of Buyang Huanwu Decoction glycosides against atherosclerotic inflammation through NF- κ B signaling pathway

FU Xin-ying¹, SUN Zheng-ji², LONG Qing-yin¹, TAN Wei¹, LI Yan-jun¹, WU Lu³, HE Qing-hu^{4*}, ZHANG Wei^{1*}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Cardiovascular and Cerebrovascular Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Yueyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yueyang 414021, China;

3. Liuyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuyang 410399, China;

4. Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China)

收稿日期 2022-07-12

基金项目 国家自然科学基金项目 (81774032, 82174218); 湖南省自然科学基金杰出青年基金项目 (2020JJ2024); 湖南省自然科学基金项目 (2018JJ3391); 湖南省教育厅科学研究重点项目 (19A374)

通信作者 * 张伟, E-mail: zhangwei1979@hnucm.edu.cn; * 何清湖, E-mail: hqh19651111@163.com

作者简介 傅馨莹, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合防治心脑血管疾病, E-mail: 793927811@qq.com

[Abstract] This study aims to explore the effect of Buyang Huanwu Decoction glycosides on the inflammatory response of apolipoprotein E^{-/-} (ApoE^{-/-}) mice and RAW264.7 cells through nuclear factor kappa-B (NF- κ B) signaling pathway. In the *in vivo* experiment, ApoE^{-/-} mice were fed with high-fat diets for 12 weeks to induce the animal model of atherosclerosis, and 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) incubated RAW264.7 cells for 24 h to establish the atherosclerosis cell model. Automatic biochemical analyzer, hematoxylin-eosin (HE) staining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot, and droplet digital polymerase chain reaction (PCR) were used to determine the blood lipid levels, aortic intimal thickness, inflammatory factor content, NF- κ B pathway-related proteins, and mRNA expression levels, and evaluate arterial atherosclerotic lesions and anti-atherosclerotic mechanisms of the drug. The model of atherosclerosis was successfully established in ApoE^{-/-} mice after 12 weeks of feeding with high-fat diets. In the model group, the plasma levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were increased ($P<0.01$), the intima of the blood vessels was thickened, the levels of inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were increased, and the protein and mRNA expressions of NF- κ B and inhibitor of NF- κ B (I κ B α) were significantly increased as compared with the control group. Compared with the model group, the high-dose Buyang Huanwu Decoction glycoside group decreased the plasma levels of TC, TG, and LDL-C, reduced the plaque area and thickness and the content of inflammatory factor TNF- α , and inhibited the protein and mRNA expressions of NF- κ B and I κ B α , with the effect same as Buyang Huanwu Decoction. In the *in vivo* experiment, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ox-LDL stimulated RAW264.7 cells for 24 h to successfully establish a foam cell model. As compared with the control group, the nuclear amount of NF- κ B and the protein and mRNA expressions of I κ B α in the model group increased. Compared with the model group, the middle-dose and high-dose Buyang Huanwu Decoction glycoside groups decreased the nuclear amount of NF- κ B and the protein and mRNA expressions of I κ B α . The above results show that the glycosides are the main effective substances of Buyang Huanwu Decoction against atherosclerosis, which inhibit the NF- κ B pathway and reduce the inflammatory response, thus playing the role against atherosclerotic inflammation same as Buyang Huanwu Decoction.

[Key words] Buyang Huanwu Decoction; glycosides; atherosclerosis; inflammatory response; NF- κ B signaling pathway

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20220905.703

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)是中国乃至全球致死/致残的首要原因。长期不健康生活方式和饮食习惯等引发的动脉粥样硬化型心血管疾病(atherosclerosis CVD, ASCVD)是CVD的主要致死类型(占61%)^[1]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)作为CVD早期病理基础,以CVD治疗窗口前移为切入点,针对AS的研究成为CVD防治的关键。慢性炎症贯穿AS始终,与机体脂质代谢紊乱、氧化应激反应、内皮损伤及功能障碍等多种生物进程相互交协而共为病^[2-3]。研究发现^[4],AS始于血管炎症,在损伤部位巨噬细胞吞噬氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, Ox-LDL)后释放肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等炎症因子,巨噬细胞发生泡沫化并激活核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路,促进血管结构的二次损伤,血管壁中形成脂质条纹,血管失去弹性,最终形成AS斑块。

AS炎症反应是血管结构和功能改变的主要病理过程,目前尚无靶向AS炎症反应的药物获得临床转化,因此寻求有效治疗AS的药物刻不容缓。中药具有多成分、多靶点、多途径的药物效应特

点,在整体观念、辨证论治理论指导下,具有巨大的药物开发潜能和临床转化价值。补阳还五汤是益气活血经典方剂,具有降低斑块内巨噬细胞含量、抑制泡沫细胞形成、抑制斑块中脂质蓄积及炎症因子分泌、抑制炎症反应、加速脂质代谢的作用^[5-7],临床疗效显著^[8]。团队前期研究发现^[9],补阳还五汤苷类组分抑制血管内膜增生,具有修复内皮的作用,可能与调节血脂水平、改善局部微环境有关,但补阳还五汤苷类组分抗炎的作用机制尚不明确。

基于此,针对CVD前期AS炎症反应病理阶段,结合前期实验研究,以NF- κ B经典炎症通路为导向,探讨补阳还五汤抗AS炎症反应的主要有效物质,及补阳还五汤主要有效物质抗AS炎症反应的药理作用,为防治CVD的发生发展提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 25只6~8周龄SPF级雄性ApoE^{-/-}小鼠,体质量18~22g,购自北京维通利华实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(京)2016-0006。5只6~8周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠,体质量18~22g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物

合格证号 SCXK(湘) 2019-0004。20 只 5~6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物合格证号 SCXK(湘) 2019-0004。

动物均饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心, 昼夜交替各 12 h (6:00 开灯), 温度(22±2)℃, 湿度 50%±10%。动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理审核批号 LL2019102503)。

1.2 细胞 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购中国科学院上海生命科学研究院细胞库(目录号 SCSP-5036)。

1.3 动物饲料 高脂饲料配方(3%胆固醇, 0.5%胆酸钠, 2%丙基硫氧嘧啶, 5%白糖, 10%猪油, 5%牛奶, 74.5%普通饲料) 购于北京科奥协力饲料有限公司, 许可证号 SCXK(京) 2019-0003。普通饲料购于湖南斯莱克景达动物实验有限公司, 许可证号 SCXK(湘) 2020-0006。

1.4 药物 补阳还五汤由黄芪 60 g、赤芍 9 g、川芎 6 g、当归 9 g、地龙 9 g、红花 9 g、桃仁 9 g 组成。购自湖南中医药大学第一附属医院中药房, 经湖南中医药大学第一附属医院左亚杰教授鉴定。阿托伐他汀片(批号 H20133127, 10 mg/片) 购自浙江乐普药业股份有限公司。

1.5 试剂 HE 染色试剂盒(批号 BL700B) 购自上海白鲨生物科技有限公司; TNF-α、IL-6 ELISA 试剂盒(批号 E-EL-M0049c、E-EL-M0044c) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; DMEM 高糖培养基、特级胎牛血清(批号 PM150210、164210-500) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; Ox-LDL(批号 YB-002) 购自广州奕源生物科技有限公司; NF-κB p65 抗体、IκBα 抗体(批号 ab32536、ab32518) 购自英国 Abcam 公司; p-NF-κB p65 抗体(批号 93H1) 购自美国 CST 公司; β-actin 抗体(批号 02536-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; RNA 提取试剂盒(批号 DP419) 购自北京天根生化科技有限公司; 逆转录试剂盒(批号 E047) 购自上海近岸科技有限公司; 微滴生成油、微滴读取油、2×Target Super Mix for Probes(批号分别为 1863005、1863004、1863010) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.6 仪器 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司, 型号 BB15); 超净工作台(苏州苏净仪器自控设备有限公

司, 型号 SW-CJ-1FD); 多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司, 型号 Cytation3); 凝胶成像系统、Mini-PROTEIN Tetra 电泳槽、Mini Trans-Blot 转印槽、液滴生成仪+数字 PCR 仪+数字 PCR 读取系统(美国 Bio-Rad 公司, 型号分别为 Chemi Doc™ XRS +、1658001、1703939、QX200)。

2 方法

2.1 补阳还五汤制备及苷类组分提取 参考课题组前期方法^[14], 取原方药材浸泡 30 min 后煎煮 2 次, 煎煮时间分别为 2、1.5 h, 合并 2 次滤液, 浓缩成补阳还五汤浸膏(21.32 g/付); 补阳还五汤浸膏经大孔树脂方法提取苷类组分浸膏(1.286 6 g/付)。

2.2 含药血清制备 参考课题组前期方法^[14], 按体表面积换算, 药物组以人 10 倍量灌胃相应药物, 对照组灌胃等体积生理盐水, 2 次/d, 连续 7 次。末次给药 2 h 后, 麻醉腹主动脉取血, 脱颈椎处死。离心取上层血清, 56℃ 灭活, 过滤分装, -80℃ 保存。

2.3 动物分组及处理 采用 ApoE^{-/-} 基因敲除小鼠, 适应性喂养后予以高脂饲料连续喂养 12 周, 建立动脉粥样硬化动物模型^[15]。将 C57BL/6J 小鼠为对照组, 普通饲料喂养。将模型制备成功后的 ApoE^{-/-} 基因敲除小鼠, 采用随机数表法随机分成模型组、补阳还五汤组、补阳还五汤苷类组分高剂量组、补阳还五汤苷类组分低剂量组、阿托伐他汀组, 每组各 5 只。随机分组后(即 13 周后), 各组小鼠均予以普通饲料喂养, 同时予以药物干预。各组药物溶于 0.9% 氯化钠溶液中, 配制成药液备存, 连续 4 周予以等体积(0.01 mL·g⁻¹·d⁻¹) 药液灌胃, 具体给药剂量见表 1。

表 1 动物分组及药物干预

Table 1 Animal grouping and drug intervention

分组	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹
对照	-
模型	-
补阳还五汤	2.772
补阳还五汤苷类组分高剂量	0.167
补阳还五汤苷类组分低剂量	0.084
阿托伐他汀	0.012

2.4 细胞分组及处理 参考课题组前期方法^[14], 75 μg·mL⁻¹ Ox-LDL 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 为建立动脉粥样硬化泡沫细胞模型。设置对照组、

模型组、补阳还五汤组、补阳还五汤苷类组分高剂量组、补阳还五汤苷类组分中剂量组、补阳还五汤

苷类组分低剂量组及阿托伐他汀组,具体分组及给药见表 2。

表 2 细胞分组及药物干预

Table 2 Cell grouping and drug intervention

分组	药物干预
对照	10%空白血清预处理 3 h, 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ox-LDL 干预 24 h
模型	10%空白血清预处理 3 h, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ox-LDL 干预 24 h
补阳还五汤	10%补阳还五汤血清预处理 3 h, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ox-LDL 干预 24 h
补阳还五汤苷类组分高剂量	10%补阳还五汤苷类组分血清预处理 3 h, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ox-LDL 干预 24 h
补阳还五汤苷类组分中剂量	5%空白血清+5%补阳还五汤苷类组分血清预处理 3 h, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ox-LDL 干预 24 h
补阳还五汤苷类组分低剂量	7.5%空白血清+2.5%补阳还五汤苷类组分血清预处理 3 h, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ox-LDL 干预 24 h
阿托伐他汀	10%阿托伐他汀血清预处理 3 h, 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ox-LDL 干预 24 h

2.5 标本采集 用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠。在充分麻醉后,沿腹中线开腹使腹主动脉充分暴露,用 EDTA-K2 抗凝管腹主动脉采血,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h 后,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 15 min,上层即为血浆,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取血后脱颈椎处死,沿胸中线开胸,使心脏、胸主动脉充分暴露,用 0.9% 氯化钠溶液从心尖处进行灌注,将主动脉从主动脉根部至膈总动脉分支处完整剥离,主动脉弓部浸泡于 4% 多聚甲醛中固定,余下部分-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.6 小鼠血脂水平检测 用全自动生化分析仪检测小鼠血浆中总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) 含量。

2.7 HE 染色评价小鼠主动脉病变情况 小鼠主动脉弓部经石蜡包埋,切片,脱腊至水后进行 HE 染色: 苏木素 4 min,洗 15 s,酸性乙醇 5 s,流水返蓝 5 min,伊红 2 min,洗 15 s,梯度乙醇脱水,二甲苯浸泡 2 次,4 min/次。封片,显微镜采集图片。用显微图像分析软件(Image Pro Plus 6.0) 测量小鼠主动脉内外弹力膜和管腔的内膜面积及其周长。参考课题组以往方法计算^[12],内膜面积(intimal area, IA) = 内弹力膜的膜内面积-管腔面积; 中膜面积(media area, MA) = 外弹力膜内面积-内弹力膜膜内面积; 内膜厚度(intima thickness, IT) = (内弹力膜周长-管腔周长) /2 π ; 中膜厚度(media thickness, MT) = (外弹力膜周长-内弹力膜周长) /2 π ; 内膜增生率(hyperplasia rate of intimal area, HRIA) = IA/(IA+MA) $\times$ 100%; 内膜厚度增生率(hyperplasia rate of in-

timal thickness, HRIT) = IT/(IT+MT) $\times$ 100%。

2.8 ELISA 检测小鼠血浆中 TNF- α 、IL-6 表达 按 ELISA 试剂盒说明书测定小鼠血浆中 TNF- α 和 IL-6 水平。

2.9 Western blot 检测小鼠主动脉及 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 通路相关蛋白表达 小鼠主动脉及 RAW264.7 细胞用含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的 RIPA 匀浆提取蛋白。BCA 法测蛋白浓度。变性后的蛋白样本经电泳,转至 PVDF 膜,加入 5% 牛奶或牛血清白蛋白室温封闭 90 min,分别加入 β -actin (1:8 000)、NF- κ B p65(1:5 000)、I κ B α (1:10 000) 和 p-NF- κ B p65(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min; 采用 ECL 高效化学发光试剂盒显影,并用 Image Lab 4.0 软件进行定量分析。由于 NF- κ B 入核后才能启动下游炎症因子的表达,因此参考课题组前期评价 NF- κ B 活化情况方法^[13],NF- κ B 活化率=胞核相对表达量/(胞核相对表达量+胞质相对表达量)。其他目的蛋白的表达情况均以 β -actin 为内参。

2.10 droplets digital PCR 检测小鼠主动脉及 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 通路相关蛋白 mRNA 表达 按照试剂盒说明书提取小鼠主动脉及 RAW264.7 细胞总 RNA 并合成 cDNA,进行 PCR 扩增。droplets digital PCR 在 QX200 droplets digital PCR 系统上进行。反应混合物含有 10 μL 2 $\times$ ddPCR SupeMix for Probes、2 μL cDNA Temple、900 nmol $\cdot\text{L}^{-1}$ PCR 引物和 250 nmol $\cdot\text{L}^{-1}$ PCR 探针,最终体积为 20 μL 。在液滴发生器制备液滴,15 000 液滴/样本。PCR 的热循环条件如下: 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性

1 min, 然后进行 3 步 40 个循环。每个循环由 95 ℃ 变性 20 s、58 ℃ 退火 20 s 和 72 ℃ 延伸 30 s 组成。然后 12 ℃ 保温。在 QX200 Droplet Reader 上单独检测液滴, 自动对数据进行计算, 给出每个反应和每微升的反应液中目的基因的拷贝数。引物和探针由 Sangon Biotech 设计和合成, 见表 3。

表 3 droplets digital PCR 引物及探针序列

Table 3 Droplets digital PCR primers and probe sequences

目的基因	引物序列(5'-3')
NF-κB	上游引物: CCAGCTTCCGTGTTTGTTC
	下游引物: TCAGGGTAGTAGAGAAAGGGTTTCG
	探针: 6FAM-CAGACCTGGAAGACTAGTG-MGB
IkBα	上游引物: GCTGTATCCACAAAGATGCA
	下游引物: CACGTAGGCTCCGGTTTATTG
	探针: 6FAM-CTCAGGGATGCCGAG-MGB

表 4 小鼠血浆中 TG、TC、HDL-C、LDL-C 含量($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Contents of TG, TC, HDL-C and LDL-C in the plasma of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

mmol·L⁻¹

分组	TG	TC	HDL-C	LDL-C
对照	0.86±0.06	2.10±0.05	1.06±0.08	0.41±0.05
模型	2.30±0.26 ¹⁾	9.82±1.92 ¹⁾	0.89±0.04 ¹⁾	6.03±0.45 ¹⁾
补阳还五汤	1.12±0.08 ²⁾	6.09±0.30 ²⁾	0.83±0.10	3.60±0.51 ²⁾
补阳还五汤苷类组分高剂量	1.41±0.18 ^{2,3)}	7.13±0.24 ²⁾	1.20±0.15 ^{2,3)}	3.92±0.75 ²⁾
补阳还五汤苷类组分低剂量	1.70±0.04 ^{2,3)}	7.03±0.52 ²⁾	1.16±0.08 ^{2,3)}	4.17±0.66 ²⁾
阿托伐他汀	1.50±0.08 ²⁾	5.57±0.42 ²⁾	0.79±0.04	2.70±0.15 ²⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较²⁾ $P<0.01$; 与补阳还五汤比较³⁾ $P<0.01$ (表 5 同)。

3.2 补阳还五汤及苷类组分对小鼠主动脉病变的影响 小鼠主动脉 HE 染色观察主动脉病变情况, 见图 1、表 5。对照组小鼠主动脉内膜完整, 中层平滑肌细胞排列整齐, 内膜下未见泡沫细胞; 模型组小鼠主动脉内膜增厚, 平滑肌细胞增殖且排列紊乱, 内皮下脂质沉积可见大量泡沫细胞; 药物干预后减轻模型组小鼠主动脉内膜厚度, 泡沫细胞数量及脂质

2.11 统计学分析 所有统计分析均使用 SPSS 23.0 软件进行, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较若符合正态性且方差齐性时, 采用单因素方差分析 LSD 法进行两两比较; 方差不齐时, 采用 Tamhane's T2 法进行两两比较; 若不符合正态性时, 采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。

3 结果

3.1 补阳还五汤及苷类组分对小鼠血脂水平的影响 小鼠血浆中血脂相关指标 TG、TC、HDL-C、LDL-C 检测结果见表 4。模型组小鼠血浆中 TG、TC、LDL-C 含量均明显高于对照组小鼠 ($P<0.01$), 药物干预后可降低模型组小鼠血脂水平; 补阳还五汤苷类组分高剂量组可显著降低 TC、TG、LDL-C 含量 ($P<0.01$), 其中降低 TC 和 LDL-C 作用与补阳还五汤组相当, 差异无统计学意义。

沉积情况; 补阳还五汤苷类组分高剂量组可显著降低模型组小鼠主动脉的 IA、IT、HR1A 和 HR1T ($P<0.01$), 且在减轻 IA 和 IT 方面效果与补阳还五汤组相当, 差异无统计学意义; 高脂饲料喂养导致 ApoE^{-/-} 基因敲除小鼠血脂紊乱, 主动脉内膜明显增厚, 斑块沉积, 动脉粥样硬化病变发生, 提示动脉粥样硬化动物模型构建成功。

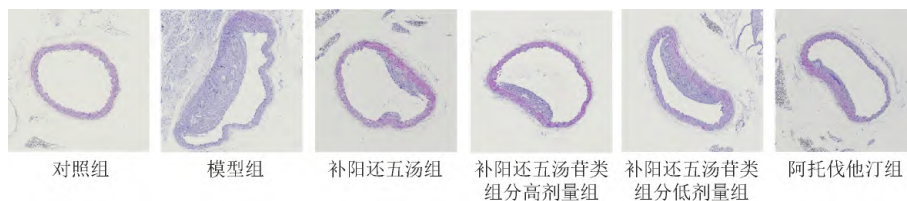


图 1 小鼠主动脉 HE 染色($\times 40$)

Fig.1 HE staining of the aorta of mice ($\times 40$)

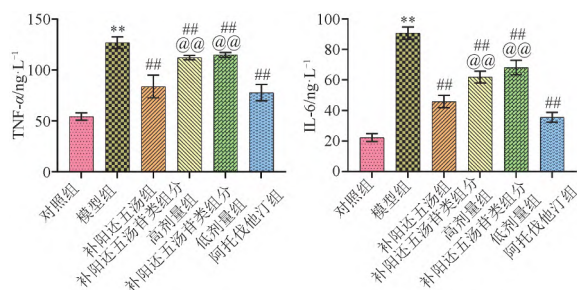
表 5 小鼠主动脉 IA、IT、HRIA 及 HRIT ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 IA, IT, HRIA and HRIT in the aorta of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	IA/ μm^2	IT/ μm	HRIA/%	HRIT/%
对照	0	0	0	0
模型	44 567.20 $\pm$ 26 429.74 ¹⁾	42.46 $\pm$ 19.54 ¹⁾	46.37 $\pm$ 12.02 ¹⁾	49.12 $\pm$ 11.59 ¹⁾
补阳还五汤	10 389.80 $\pm$ 12 803.80 ²⁾	7.65 $\pm$ 8.22 ²⁾	11.53 $\pm$ 6.89 ²⁾	12.37 $\pm$ 7.47 ²⁾
补阳还五汤苷类组分高剂量	3 400.40 $\pm$ 3 421.43 ²⁾	8.22 $\pm$ 5.56 ²⁾	20.21 $\pm$ 4.76 ²⁾	22.19 $\pm$ 6.08 ²⁾
补阳还五汤苷类组分低剂量	15 927.60 $\pm$ 13 160.69 ²⁾	18.32 $\pm$ 6.22 ²⁾	28.17 $\pm$ 10.11 ^{2,3)}	30.65 $\pm$ 10.20 ^{2,3)}
阿托伐他汀	6 226.00 $\pm$ 4 487.39 ²⁾	5.91 $\pm$ 3.92 ²⁾	7.87 $\pm$ 4.77 ²⁾	8.81 $\pm$ 4.90 ²⁾

注: IA. 内膜面积; IT. 内膜厚度; HRIA. 内膜增生率; HRIT. 内膜厚度增生率。

3.3 补阳还五汤及苷类组分对小鼠血浆中炎症因子 TNF- α 、IL-6 的影响 通过 ELISA 法检测小鼠血浆中炎症因子 TNF- α 与 IL-6 表达情况, 见图 2。与对照组相比, 模型组血浆中炎症因子 TNF- α 、IL-6 含量明显增加 ($P<0.01$); 补阳还五汤及补阳还五汤苷类组分高剂量组均能抑制炎症因子 TNF- α 、IL-6 的表达 ($P<0.01$)。



与对照组比较 ** $P<0.01$; 与模型组比较 # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与补阳还五汤比较 @ $P<0.05$, @@ $P<0.01$ (图 3~5 同)。

图 2 小鼠血浆中炎症因子 TNF- α 、IL-6 含量 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig.2 Contents of inflammatory factors TNF- α and IL-6 in the plasma of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

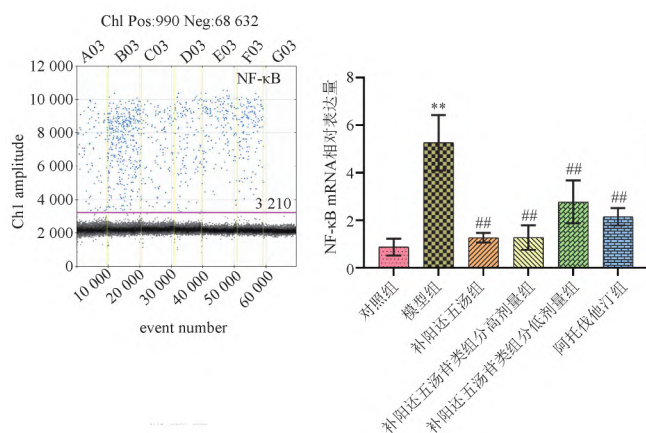


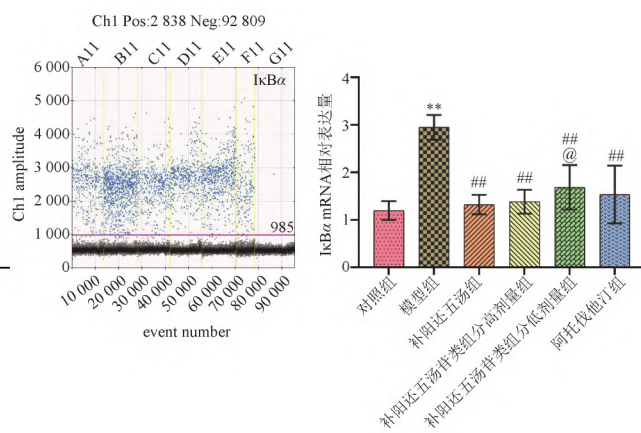
图 3 小鼠主动脉 NF- κ B 通路相关基因 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

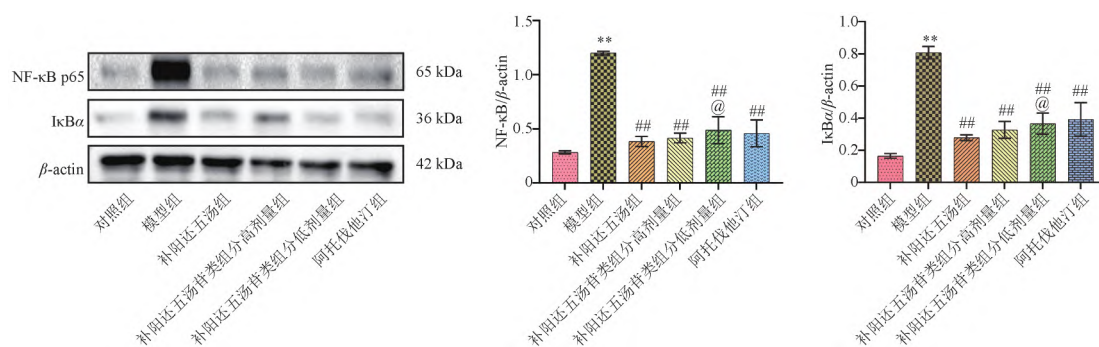
Fig.3 mRNA expression of NF- κ B pathway-related genes in the aorta of mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 补阳还五汤及苷类组分对小鼠主动脉 NF- κ B 通路相关基因 mRNA 的影响 通过 droplets digital PCR 法检测小鼠主动脉 NF- κ B 相关通路蛋白 mRNA 表达情况, 见图 3。与对照组相比, 模型组主动脉 NF- κ B 及 I κ B α mRNA 表达明显增加 ($P<0.01$); 补阳还五汤苷类组分高剂量组能抑制主动脉 NF- κ B 及 I κ B α mRNA 表达 ($P<0.01$), 且作用与补阳还五汤一致, 差异无统计学意义。

3.5 补阳还五汤及苷类组分对小鼠主动脉 NF- κ B 通路相关蛋白的影响 通过 Western blot 法检测小鼠主动脉 NF- κ B 通路相关蛋白表达情况, 见图 4。与对照组相比, 模型组主动脉 NF- κ B 及 I κ B α 蛋白表达明显增加 ($P<0.01$); 补阳还五汤苷类组分高剂量组能抑制主动脉 NF- κ B 及 I κ B α 蛋白表达 ($P<0.01$), 且在抑制 NF- κ B 及 I κ B α 蛋白表达作用与补阳还五汤组一致, 差异无统计学意义。

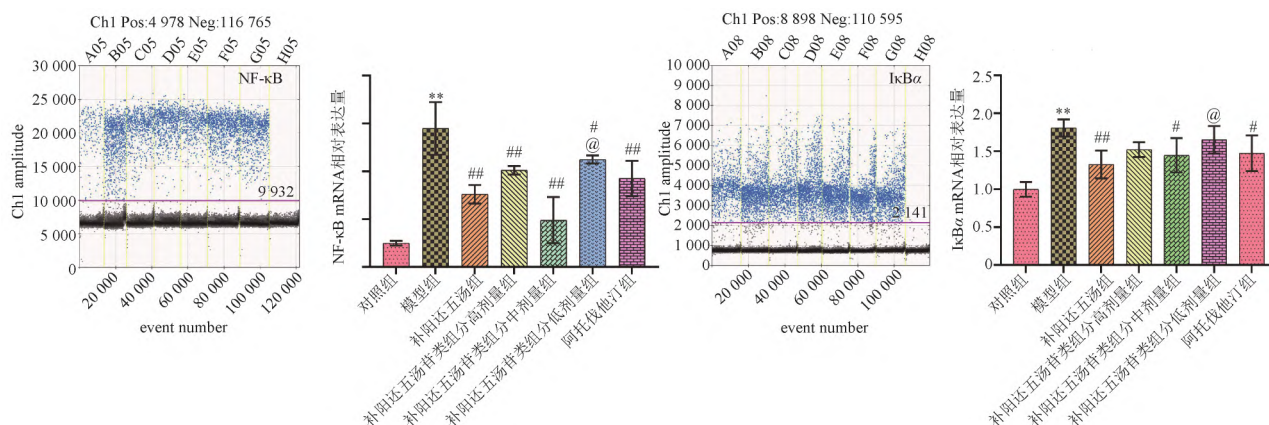
3.6 补阳还五汤及苷类组分对 RAW264.7 细胞 NF- κ B 通路相关基因 mRNA 的影响 通过 droplets digital PCR 法检测 RAW264.7 细胞 NF- κ B 相关通



图 4 小鼠主动脉 NF-κB 通路相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig.4 Expression of NF-κB pathway-related proteins in the aorta of mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

路蛋白 mRNA 表达情况,见图 5。与对照组相比,模型组 NF-κB 及 IκBα mRNA 表达明显增加 ($P < 0.01$); 补阳还五汤苷类组分中剂量组能抑制

RAW264.7 细胞 NF-κB 及 IκBα 蛋白 mRNA 表达 ($P < 0.01$),且在抑制 IκBα 蛋白表达作用与补阳还五汤组一致,差异无统计学意义。

图 5 RAW264.7 细胞 NF-κB 通路相关基因 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig.5 mRNA expression of NF-κB pathway-related genes in RAW264.7 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.7 补阳还五汤及苷类组分对 RAW264.7 细胞 NF-κB 通路相关蛋白的影响 参考课题组前期实验结果^[14], $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ox-LDL 刺激 RAW264.7 细胞 24 h,细胞体积增大,多呈圆形,细胞内胆固醇含量增加,培养上清中炎症因子含量增多。通过 Western blot 法检测 RAW264.7 细胞 NF-κB 通路相关蛋白表达情况,见图 6。与对照组相比,模型组 NF-κB 入核量明显升高、IκBα 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$); 补阳还五汤苷类组分高剂量组、中剂量组均能抑制 NF-κB 入核及 IκBα 蛋白表达 ($P < 0.01$),且与补阳还五汤组作用相当,差异无统计学意义。

4 讨论

AS 是由长期不合理饮食结构、生活方式及某些

疾病等危险因素导致局部血管缺血,出现责任器官缺血症状的一种临床常见病理基础。AS 的起始及进展是由血管内皮损伤、炎症反应、脂质浸润、血小板聚集及平滑肌细胞克隆等作用综合交互产生。AS 起始期,局部血流紊乱致内皮损伤及其功能障碍,进而 LDL-C 在血管内皮沉积,脂质浸润后激发炎症反应;进展期,巨噬细胞、平滑肌细胞及 T 细胞可能增殖、迁移及程序性坏死,导致 AS 斑块形成及坏死。因此,针对 AS 的早期防治当以炎症反应和脂质浸润为要。

AS 归属于中医“眩晕”“胸痹”“真心痛”等范畴,因先天禀赋、饮食、情志等因素,以气血阴阳亏虚为本,痰、瘀、气滞、热毒、寒凝等病理实邪为标,机体

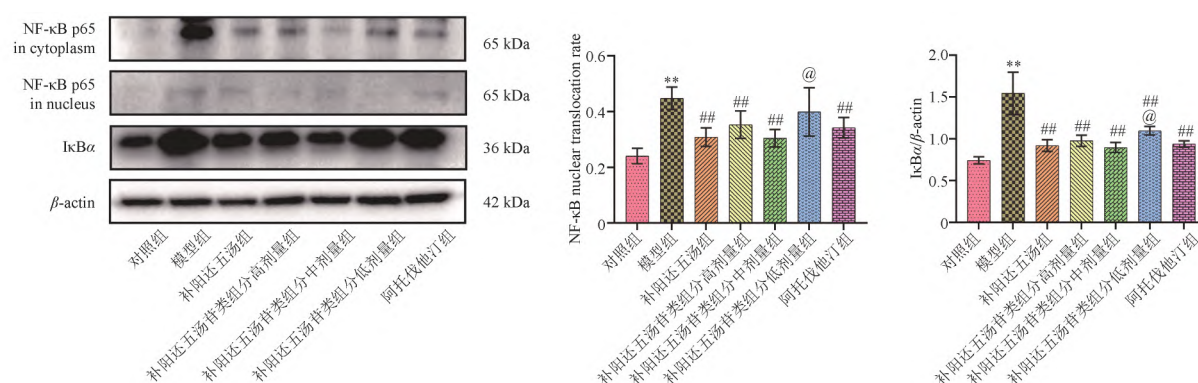


图6 RAW264.7 细胞 NF- κ B 通路相关蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.6 Expression of NF- κ B pathway-related proteins in RAW264.7 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

本虚,邪气内生,虚实错杂,脉络阻滞,胶着脉管,聚块不散,久病脉阻,络毛瘀塞,脉络臃癥,气血不通,脏腑无养,虚者更虚,实者更甚,以正反馈形式促进 AS 进程。气为血之帅,气行则血行,气血本虚则脉中血行无力,痰浊、瘀血内生,阻滞脉络,发为 AS,气虚者,夹瘀、夹痰者多,气虚血瘀为 AS 主要病机,故益气则血助,血行于脉中而得力助,瘀滞通畅,脏腑荣充,本虚补养,循环以解,益气活血为 AS 气虚血瘀证主要治法。补阳还五汤出自《医林改错》,具有益气活血功效,常用于治疗气虚血瘀型疾病^[14]。课题组多年来延续性开展中西医结合防治心脑血管疾病的工作,综合同行研究得出补阳还五汤具有抗脑缺血、促进神经再生,保护血管、抗内膜增生、抑制血管平滑肌细胞增殖等多种药理作用^[15-17],且其苷类组分具有抑制球囊损伤后血管平滑肌细胞增殖,抗动脉血栓形成和减轻动脉内膜增厚的母方同效性^[13]。基于此,本研究为深入研究补阳还五汤及其苷类组分抗 AS 炎症反应的机制,以经典炎症相关 NF- κ B 信号通路为落脚点,从体内、体外实验全面研究补阳还五汤及其苷类组分干预后 ApoE^{-/-}小鼠与巨噬细胞血脂及炎症反应情况,为中医药早期防治 AS 提供坚实的实验基础。

ApoE 是一种分泌蛋白,参与脂质调节,ApoE 缺失,易发高胆固醇症、AS 等疾病。ApoE^{-/-}基因敲除小鼠最常用于建立 AS 模型。因此,本研究采用高脂饲料连续喂养 ApoE^{-/-}基因敲除小鼠 12 周构建 AS 动物模型,发现 AS 小鼠血脂紊乱,以 TC、TG、LDL-C 含量显著升高,HDL-C 含量显著降低为主,同时大中动脉中出现明显的粥样斑块,而补阳还五

汤及其苷类组分干预后可减轻此病理变化。

炎症是 AS 斑块形成、斑块破裂及动脉血栓形成的关键^[18]。为进一步明确补阳还五汤及其苷类组分抗 AS 的药理机制,本研究采用 ELISA 检测炎症因子的表达,发现补阳还五汤及其苷类组分能有效抑制血浆中炎症因子 TNF- α 、IL-6 的表达($P<0.01$)。NF- κ B 信号通路的激活被广泛认为是炎症反应的关键通路,为进一步探讨补阳还五汤及其苷类组分抗 AS 的药理作用的分子机制,采用 Western blot 和 droplets digital PCR 法检测 NF- κ B 信号通路相关蛋白、mRNA 的表达,发现补阳还五汤及其苷类组分有效抑制 AS 小鼠 NF- κ B、I κ B α 蛋白及其 mRNA 的表达($P<0.01$),提示补阳还五汤及其苷类组分可抑制 NF- κ B 信号通路,减轻炎症反应,发挥抗 AS 的作用。

巨噬细胞泡沫化是在 AS 发生发展的起始病理阶段^[9],本部分采用 Ox-LDL 诱导巨噬细胞泡沫化。NF- κ B 信号通路是经典的炎症信号通路,受多种细胞因子调控,包括炎症因子 TNF- α 、IL-6 等。静息状态下,NF- κ B 与 I κ B α 以二聚体失活状态存在于细胞核中,细胞因子等信号分子刺激,I κ B α 与 NF- κ B 解离,后者迅速移位至细胞核,启动靶基因的转录,完成信号转导。Western blot 结果表明,含苷血清可以抑制 Ox-LDL 介导的 NF- κ B 入核及 I κ B α 蛋白表达($P<0.01$),提示苷类组分通过抑制 NF- κ B 通路的激活发挥抗 AS 的作用。体外实验 droplets digital PCR 结果与体内实验部分相互佐证,苷类组分抑制 NF- κ B 信号通路相关蛋白 mRNA 的表达($P<0.01$),且作用与补阳还五汤相当。

在本研究中,高脂饲料喂养 ApoE^{-/-} 基因敲除小鼠建立 AS 动物模型、Ox-LDL 干预巨噬细胞建立 AS 细胞模型后,小鼠血浆中、主动脉上及细胞培养上清中,炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达增加,通过 NF- κ B 入核分别激活 NF- κ B 信号通路。补阳还五汤及其苷类组分能够抑制在这 2 条通路的激活,减轻炎症反应,起到抗 AS 的作用。

综上所述,适宜剂量的苷类组分在减轻炎症反应方面与补阳还五汤作用相当,可代表母方抑制 NF- κ B 信号通路,发挥 AS 的作用,提示苷类组分有望成为 AS 的有效药物。

利益冲突 本研究不存在利益冲突。

参考文献

- [1] ZHAO D, LIU J, WANG M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications [J]. Nat Rev Cardiol, 2019,16(4): 203.
- [2] LIBBY P, RIDKER P M, HANSSON G K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [J]. Nature, 2011,473(7347): 317.
- [3] LIBBY P, CREA F. Clinical implications of inflammation for cardiovascular primary prevention [J]. Eur Heart J, 2010,31(7): 777.
- [4] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. Circ Res, 2019,124(2): 315.
- [5] BACK M, YURDAGUL A J, TABAS I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(7): 389.
- [6] 刘玉晖, 侯贝贝, 游宇, 等. 补阳还五汤稳定 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化易损斑块的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018,24(15): 112.
- [7] 庞晓丽, 王青龙, 陈淑静, 等. 基于 Treg 细胞探讨补阳还五汤对动脉粥样硬化斑块的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020,26(5): 1.
- [8] 商丹, 彭飞. 补阳还五汤对气虚血瘀型冠心病患者左室重构的影响 [J]. 世界中医药, 2020,15(15): 2275.
- [9] 张伟, 贺冰, 李亮, 等. 补阳还五汤促进内皮祖细胞修复损伤血管内皮 [J]. 中国病理生理杂志, 2017,33(11): 1969.
- [10] 傅馨莹, 杨仁义, 孙正骥, 等. 补阳还五汤苷类组分调控动脉粥样硬化炎症反应及脂质代谢的作用机制 [J]. 中草药, 2021,52(14): 4221.
- [11] PARK S J, KIM B, CHOI S, et al. Imaging inflammation using an activated macrophage probe with Slc18b1 as the activation-selective gating target [J]. Nat Commun, 2019,10(1): 1111.
- [12] WU L, ZHANG W, LI H, et al. Inhibition of aortic intimal hyperplasia and cell cycle protein and extracellular matrix protein expressions by BuYang HuanWu Decoction [J]. J Ethnopharmacol, 2009,125(3): 423.
- [13] 黄小平, 卢金冬, 丁煌, 等. 黄芪和三七的主要有效成分配伍对脑缺血/再灌注小鼠 NF- κ B 信号通路及炎症因子表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2015,31(1): 141.
- [14] 聂颖, 范瑜洁, 王泉冶, 等. 补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤气虚血瘀证的疗效 [J]. 神经损伤与功能重建, 2021,16(12): 714.
- [15] 郭春兰, 钟秉知, 王青, 等. 补阳还五汤含药鼠血清对 Rho 激酶介导的血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019,37(11): 2625.
- [16] 陈博威, 唐荣梅, 易健, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠海马组织 circRNA-miRNA-mRNA 转录网络的影响 [J]. 中草药, 2022,53(1): 143.
- [17] 曹浪, 邓常清. 补阳还五汤苷类有效组分及其有效成分配伍对血管平滑肌细胞增殖及相关信号转导通路的影响 [J]. 中国中药杂志, 2016,41(10): 1889.
- [18] 刘雅蓉, 邵倩, 张慧慧, 等. 丹皮酚上调小凹蛋白-1 抑制 NF- κ B 通路减轻动脉粥样硬化模型大鼠主动脉血管内皮炎症的作用 [J]. 中国中药杂志, 2020,45(11): 2578.

责任编辑 陈玲