

基于网络药理学和代谢组学探讨活心丸稳定 动脉粥样硬化易损斑块的作用机制

向姣¹, 罗洁莹¹, 廖戴源¹, 李富来¹, 易瑞¹, 梁咏^{1,2}, 莫尊汇²,
刘东岩², 王健松^{1,3*}, 王羚邴^{1*}

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广州白云山医药集团股份有限公司 白云山制药总厂,
广州 510515; 3. 广州采芝林药业有限公司, 广州 510360)

【摘要】 目的:基于网络药理学、非靶向代谢组学结合动物模型共同探讨活心丸对动脉粥样硬化(AS)易损斑块的稳定作用及分子作用机制。**方法:**将40只SPF级雄性载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠高脂饲料诱导12周建立AS模型,随机分为模型组、阿托伐他汀组(2.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、活心丸低剂量组(18.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、活心丸高剂量组(36.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组10只,另设10只C57BL/6J小鼠为正常组。模型组与正常组每日灌胃等体积生理盐水,各给药组灌胃相应剂量的药物,干预持续8周后,超声检测主动脉、颈动脉血管舒缩内径差值(Dd-Ds)和脉搏波速度(PWV);生化检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子(TNF- α)水平;通过苏木素-伊红(HE)、油红O、马松(Masson)及免疫组化染色评估主动脉根部斑块面积、脂质、胶原、巨噬细胞(CD68)及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达,并计算斑块易损指数(VI);另对肝脏进行油红O染色观察脂质沉积并测定肝脏TC含量。基于网络药理学进行药物-疾病核心靶点的预测分析,并运用非靶向代谢组学技术鉴定关键差异代谢物及其相关通路;通过蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠肝脏组织中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、肝X受体 α (LXR α)、磷酸化核转录因子- κ B p65亚基(p-NF- κ B p65)、NF- κ B p65、ATP结合盒转运体A1(ABCA1)、ATP结合盒转运体G1(ABCG1)、IL-6蛋白与mRNA的表达。**结果:**体内动物实验结果显示,活心丸可降低ApoE^{-/-}小鼠主动脉弓的PWV值($P<0.05$),增加主动脉Dd-Ds值($P<0.05$),有效改善血管弹性功能、降低动脉僵硬度;还可减少主动脉弓脂质斑块面积占比($P<0.01$),减少肝脏脂质沉积($P<0.01$);减少斑块脂质含量及巨噬细胞浸润($P<0.05$),提升胶原沉积及平滑肌细胞含量($P<0.05$),降低斑块VI($P<0.01$),并调节血脂水平($P<0.05$)。整合代谢组学与网络药理学分析揭示,活心丸通过激活PPAR γ 核受体,上调PPAR γ /LXR α /ABCA1/ABCG1信号通路的表达,从而促进巨噬细胞胆固醇外排,抑制NF- κ B/IL-6炎症表达,最终发挥稳定AS易损斑块的药理作用;Western blot和Real-time PCR结果显示活心丸可上调ApoE^{-/-}小鼠肝组织PPAR γ 、LXR α 、ABCA1及ABCG1的蛋白与mRNA表达($P<0.05$),并下调NF- κ B及IL-6的表达水平($P<0.05$)。**结论:**活心丸可能通过调控PPAR γ /LXR α /ABCA1/ABCG1信号通路并抑制炎症,减少斑块内脂质沉积与巨噬细胞浸润,从而增强AS易损斑块的稳定性。

【关键词】 动脉粥样硬化; 活心丸; 易损斑块; 代谢组学; 网络药理学; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ /肝X受体 α /ATP结合盒转运体A1/ATP结合盒转运体G1(PPAR γ /LXR α /ABCA1/ABCG1)信号通路

【中图分类号】 R242;R972;R256 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2026)16-0117-13

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20260568

【网络出版地址】 <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260602.1539.002>

【网络出版日期】 2026-06-02 17:07:53 **【增强出版附件】** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Mechanism of Huoxin Pills in Stabilizing Atherosclerotic Vulnerable Plaque Based on Network Pharmacology and Metabolomics

XIANG Jiao¹, LUO Jieying¹, LIAO Daiyuan¹, LI Fulai¹, YI Rui¹, LIANG Yong^{1,2},

【收稿日期】 2026-01-26

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(82404908)

【第一作者】 向姣,在读硕士,从事中药防治心血管疾病的药理机制研究,E-mail:xiangjiaozb@163.com

【通信作者】 *王羚邴,副教授,从事中药防治心血管疾病的药理机制研究,E-mail:wlingli@gzucm.edu.cn;

*王健松,教授级制药工程师,从事中药防治心血管疾病的药理机制研究,E-mail:wangjs@czlly.com.cn

MO Zunhui², LIU Dongyan², WANG Jiansong^{1,3*}, WANG Lingli^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Baiyunshan Pharmaceutical General Factory, Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holdings Co. Ltd., Guangzhou 510515, China; 3. Guangzhou Caizhilin Pharmaceutical Co. Ltd., Guangzhou 510360, China)

[Abstract] **Objective:** Based on network pharmacology, non-targeted metabolomics, and animal models, this study aims to investigate the stabilizing effect of Huoxin pills on atherosclerotic (AS) vulnerable plaques and the molecular mechanism of action. **Methods:** A total of 40 SPF male apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mice were fed a high-fat diet for 12 weeks to establish AS models. They were randomly divided into a model group, an atorvastatin group (2.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹), a low-dose Huoxin pill group (18.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and a high-dose Huoxin pill group (36.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹), with 10 mice in each group. Additionally, 10 C57BL/6J mice were designated as the control group. The model group and control group were administered equal volumes of saline via gavage daily, while each treatment group received the corresponding drug dose via gavage. After 8 weeks of intervention, an ultrasound was used to measure the difference between diastolic diameter and systolic diameter (Dd-Ds) of the aorta and carotid arteries, as well as pulse wave velocity (PWV). Biochemical assays were performed to measure total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels in serum. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine interleukin (IL)-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in the serum of mice. The aortic root plaque area, lipid content, collagen, macrophage (CD68), and α -smooth muscle actin (α -SMA) expression were assessed by hematoxylin and eosin (HE), oil red O, Masson, and immunohistochemical staining. The plaque vulnerability index (VI) was calculated. Additionally, oil red O staining of the liver was performed to observe lipid deposition and measure the hepatic TC contents. Predictive analysis of core targets of drugs and diseases was conducted using network pharmacology, and non-targeted metabolomics techniques were employed to identify key differentially expressed metabolites and their associated pathways. Western blot and real-time quantitative PCR (Real-time PCR) assays were employed to detect the protein and mRNA expressions of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), liver X receptor α (LXR α), phosphorylated nuclear factor- κ B p65 (p-NF- κ B p65), nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65), ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1), and IL-6 in the liver tissue of mice. **Results:** *In vivo* animal experiment results show that Huoxin pills reduce PWV values in the aortic arch of ApoE^{-/-} mice ($P<0.05$) and increase the Dd-Ds value in the aorta ($P<0.05$), effectively improving vascular elasticity and reducing arterial stiffness. Huoxin pills reduced the proportion of lipid plaque area in the aortic arch ($P<0.01$), decreased lipid deposition in the liver ($P<0.01$), reduced lipid content and macrophage infiltration in plaques ($P<0.05$), increased collagen deposition and smooth muscle cell content ($P<0.05$), lowered plaque VI ($P<0.01$), and regulated blood lipid levels ($P<0.05$). Integrated metabolomics and network pharmacology analyses reveal that Huoxin pills ultimately exert a pharmacological effect on stabilizing AS vulnerable plaques by activating the PPAR γ nuclear receptor, upregulating the expression of the PPAR γ /LXR α /ABCA1/ABCG1 pathway, thereby facilitating cholesterol efflux from macrophages and inhibiting NF- κ B/IL-6 inflammatory responses. Western blot and Real-time PCR results show that Huoxin pills can upregulate the protein and mRNA expressions of PPAR γ , LXR α , ABCA1, and ABCG1 in the liver tissue of ApoE^{-/-} mice ($P<0.05$) and downregulate the expression levels of NF- κ B and IL-6 ($P<0.05$). **Conclusion:** Huoxin pills may enhance the stability of AS vulnerable plaques by regulating the PPAR γ /LXR α /ABCA1/ABCG1 pathway and suppressing inflammation, thereby reducing lipid deposition and macrophage infiltration within the plaques.

[Keywords] atherosclerosis; Huoxin pills; vulnerable plaque; metabolomics; network pharmacology; peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)/liver X receptor α (LXR α)/ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)/ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) signaling pathway

动脉粥样硬化(AS)是一种动脉壁的慢性炎症性疾病,是心血管疾病的主要发病原因^[1]。AS斑块分为易损(不稳定)斑块和稳定斑块2种。其中易损斑块指AS斑块中发展迅速、具有破裂及血栓形成倾向的不稳定性高危斑块^[2-3]。易损斑块因具有薄纤维帽、大脂质坏死核心及活跃的炎症反应,易发生破裂并继发血栓形成,是急性冠脉综合征的关键触发因素^[4-5]。近年研究表明,易损斑块的形成与巨噬细胞介导的抗原呈递活化、T细胞免疫应答增强

密切相关,靶向斑块内特异性免疫通路已成为AS防治研究的前沿方向^[6-7]。

尽管他汀类药物作为AS防治的基石,有效延缓了斑块进展并降低了心血管事件风险,但其临床应用仍存在明显的局限性,他汀类药物强化降脂后,持续存在的炎症反应仍是导致残余心血管风险的关键因素。且该药物虽能降低低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),但对斑块内炎症、氧化应激等非脂质机制干预不足。因此,迫切需要更有效的治疗策略

弥补他汀类药物在AS综合治疗中的局限性,降低残余心血管风险。中医药在AS防治领域展现出独特优势。AS是冠心病心绞痛的主要病理基础,在中医理论中,冠心病心绞痛可归属于“胸痹心痛”范畴^[8-9]。AS所涉及的斑块形成、血管僵硬及慢性炎症等病理改变,可视为“胸痹心痛”发生发展过程中的关键病理环节^[10-11],其病机多与中医“痰浊”“瘀血”“脉痹”等密切相关。活心丸是由灵芝、人参、体外培育牛黄、红花、人工麝香、附子、蟾酥、熊胆、冰片、珍珠组成的中药复方制剂,收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第18册(标准编号WS3-B-3476-98),具有益气活血、温经通脉之功效,临床用于冠心病、心绞痛的治疗^[12-13]。“温经通脉”的传统治疗理念与现代医学中稳定AS易损斑块、改善血管功能的目标高度一致^[14-16]。近期有研究报道其可能通过下调Toll样受体4(TLR4)/肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达减轻载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠AS,提示其具有抗AS潜力^[17]。然而,活心丸如何通过其“益气活血”的功效,在分子与代谢层面实现稳定AS易损斑块的深层机制仍有待系统阐明。

基于上述背景,本研究通过构建ApoE^{-/-}小鼠AS模型,结合代谢组学与网络药理学分析,并采用蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)实验验证,系统揭示活心丸抗AS的作用靶点及信号通路机制,为其临床应用提供实验与理论依据。以期在传统复方的现代研究提供方法学借鉴,也为开发基于中药复方的AS综合治疗策略奠定理论基础。

1 材料

1.1 动物 雄性ApoE^{-/-}小鼠,8周龄,体质量18~20 g。购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SYXK(粤)2023-0342,合格证号SCXK(粤)2022-0063,动物质量合格证号110011241107463446,动物饲养于广州中医药大学动物实验中心,室温保持在22~24℃,相对湿度50%,12 h光照时间。

1.2 伦理 本研究经由广州中医药大学实验动物伦理委员会批准进行,伦理号20240808015。

1.3 药物与试剂 Research diets高脂饲料(60%脂肪热能的啮齿动物饲料,含酪蛋白、玉米淀粉、豆油、猪油、复合维生素,惠特比科技发展有限公司,货号D12492),活心丸(广州白云山制药有限公司,批号1190002,规格20 mg/丸),阿托伐他汀片(辉瑞制药有限公司,国药准字H20051408,规格10 mg×

7片/盒),小鼠白细胞介素(IL)-6试剂盒、人TNF- α 试剂盒、IL-1 β 试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号分别为202503、202410、202501),总胆固醇(TC)测定试剂盒、甘油三酯(TG)测定试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒(深圳迈瑞生物医疗有限公司,货号分别为V501668、V258422、V251566、V251565),巨噬细胞标志物分化簇68(CD68)抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、苏木素-伊红(HE)染液套装、马松(Masson)染液套装、油红O染液套装(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号分别为GB123150、GB12045、G1004、GP1032、G1015),过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)、HRP标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号分别为AF6284、S0001、S0002),ATP结合盒转运体G1(ABCG1)抗体、ATP结合盒转运体A1(ABCA1)抗体、肝X受体 α (LXR α)抗体、磷酸化核转录因子- κ B p65亚基(p-NF- κ B p65)、NF- κ B p65抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Proteintech公司,货号分别为13578-1-AP、26564-1-AP、14351-1-AP、82335-1-RR、80979-1-RR、60004-1-Ig)。

1.4 仪器 silicon wave 30型KOLO超高频超声小动物影像系统(珂纳医疗科技有限公司),Vevo LAZR型vevo2100小动物超声机(日本富士VisualSonics公司),XTS20型体视显微镜(北京泰克仪器有限公司),BS-460型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),D3024R型高速冷冻离心机(美国Scilogex公司),Triple TOF 6600型质谱仪(美国AB SCIEX公司),1290 Infinity LC型超高压液相色谱仪(美国安捷伦科技),Eppendorf 5430R型低温高速离心机(德国艾本德公司),Applied Biosystems型Real-time PCR仪、Multiskan GO型全波长酶标仪(美国Thermo公司),WIX-miniPRO4型垂直电泳槽、WIX-miniBLOT型转印槽(韦克斯科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 42只SPF级雄性ApoE^{-/-}小鼠高脂饲料饲养12周。随机取2只小鼠处死,取主动脉进行油红O染色,镜下可见主动脉内膜大面积脂质斑块形成,确认AS模型复制成功。模型复制成功后随机分为4组,每组10只,包括模型组、阿托伐他汀组和活心丸低、高剂量组;另取C57BL/6J小鼠10只作为正常组,正常饮食。动物灌胃的剂量按

照人和动物的等效剂量转换系数进行换算,参考《中药药理研究方法学》^[18]。活心丸低剂量组为等效成人每日剂量,即 $18.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,活心丸高剂量组为等效2倍剂量,即 $36.4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,阿托伐他汀组为等效的1.5倍剂量,即 $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。模型组与正常组每日灌胃等体积生理盐水,各给药组灌胃相应剂量的药物,干预持续8周。

2.2 血清样本采集与处理 实验结束时,各组小鼠禁食不禁水12 h,麻醉后经眼眶后静脉丛采血约1.0 mL,置于1.5 mL无菌离心管中。血液样本室温静置30 min,待血液自然凝固后,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1\ 000\times\text{g}$ 离心15 min,取上层血清, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.3 超声检测小鼠主动脉及颈动脉血管舒缩内径差值(Dd-Ds)和主动脉脉搏波速度(PWV) 将已麻醉的小鼠以仰卧姿势固定在动物操作平台上。将小鼠口鼻塞入麻醉面罩,以浓度为2%,流量为 $1\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的异氟烷维持麻醉。在M-Mode成像形式下,获取主动脉弓、右侧颈总动脉切面的M模式数据,通过vevo LAB分析软件对所得超声图进行分析,获取Dd-Ds值。在B-Mode成像形式下,获取主动脉弓切面的B模式数据,使用测量工具中“Traced Distance”测量主动脉弓长度;在PW-Mode成像形式下,分别采集主动脉弓长度测量的起点(近端)和终点(远端)的血流频谱。由主动脉 $\text{PWV}=\text{主动脉弓长度}/(\text{主动脉弓远端时间差}-\text{主动脉弓近端时间差})$ 计算公式获取主动脉的PWV值。每组随机选取3只小鼠进行检测。每只小鼠的主动脉弓及右侧颈总动脉均连续采集3个心动周期的图像,取均值作为该只小鼠的最终检测值。

2.4 全自动生化分析仪检测小鼠血脂水平 采用全自动生化分析仪检测血清TC、甘油三酯(TG)、LDL-C和HDL-C水平。

2.5 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠血清炎症因子 采用ELISA检测小鼠血清中IL-6、IL- 1β 、TNF- α 水平。按照说明书进行操作,制作标准曲线,并根据吸光度A计算含量。

2.6 HE染色观察主动脉根部斑块形态 主动脉根部冰冻切片采用HE染色,镜下观察斑块形态,采用Image J图像分析软件手动勾勒斑块轮廓,计算斑块横断面面积。

2.7 油红O染色评估主动脉根部斑块内脂质沉积 主动脉根部冰冻切片采用油红O工作液浸染、苏木素复染后,中性脂质呈红色,用于评估斑块内脂质沉积。采用Image J图像分析软件以色阈法识别

阳性染色区域,计算阳性面积占同一切片斑块总面积的百分比,得出斑块脂质相对含量。

2.8 Masson染色检测主动脉根部斑块内胶原含量

主动脉根部冰冻切片进行Masson三色染色,丽春红-酸性复红液染肌纤维、苯胺蓝染胶原,胶原纤维呈蓝色。采用Image J图像分析软件以色阈法识别阳性染色区域,计算阳性面积占同一切片斑块总面积的百分比,得出斑块胶原相对含量。

2.9 免疫组化染色检测主动脉根部斑块内CD68细胞及 α -SMA表达 主动脉根部冰冻切片采用过氧化物酶标记的链霉卵白素法(SP法),分别与抗CD68抗体及抗 α -SMA抗体孵育,经二抗结合、二氨基联苯胺(DAB)显色、苏木素复染后,阳性信号呈棕黄色。采用Image J图像分析软件以色阈法识别阳性染色区域,计算阳性面积占同一切片斑块总面积的百分比,得出斑块巨噬细胞相对含量及平滑肌细胞相对含量。

2.10 斑块易损指数(VI)计算 采用计算公式 $\text{VI}=(\text{巨噬细胞相对含量}+\text{脂质相对含量})/(\text{平滑肌细胞相对含量}+\text{胶原相对含量})\times 100\%$ 来计算各组小鼠主动脉斑块的VI。

2.11 油红O染色检测肝脏脂质沉积 将肝脏冰冻切片进行油红O染色,染色结果使用Image J图像分析软件以色阈法识别阳性染色区域,测量每张图片油红O阳性染色面积。

2.12 肝脏TC含量检测 按照TC测试盒说明书进行操作。称取肝脏质量,加入9倍体积的磷酸盐缓冲液,冰水浴条件下超声破碎,制备好的匀浆与TC工作液混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min,并在500 nm处测定各孔A。

2.13 网络药理学分析 采用中药系统药理学数据库与分析平台数据库(TCMSP, <http://old.tcmsp-e.com/index.php>)和中药分子机制生物信息学分析工具数据库(BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)筛选活心丸中各组分的活性成分及靶点。通过TCMSP数据库获取灵芝、人参、牛黄、红花、附子、冰片成分,设定口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、药物相似性(DL) ≥ 0.18 ;通过BATMAN-TCM数据库获取蟾酥、熊胆、珍珠成分,设定综合评分阈值(Score cutoff) ≥ 39 , $P\leq 0.05$ 。在基因名片数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)和DisGeNET(<https://www.disgenet.org/>)数据库中,设置检索词为“Atherosclerosis”,收集AS相关基因,

利用 Venny 2.1.0 平台 (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 获得活心丸与 AS 的交集靶点。将活心丸的有效成分与疾病交集靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 构建“药物-活性成分-靶点”可视化网络图。将活心丸-AS 的交集靶点提交至蛋白质相互作用分析数据库 (STRING, <http://cn.string-db.org/>), 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络图。将度值 (Degree)、介数 (Betweenness)、中心性 (Closeness) 大于均值作为筛选条件, 筛选出关键靶点, 将 PPI 网络可视化。在注释、可视化和集成发现数据库 (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) 中输入活心丸与 AS 的交集基因, 并限定物种为“homo sapiens”, 得到基因本体论 (GO) 富集数据和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集数据。选取 GO 功能富集中的生物学过程 (BP)、细胞组成 (CC) 和分子功能 (MF), 利用在线绘图网站-微生信网站 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制出 GO 功能富集条形图。选取 KEGG 信号通路分析的前 30 个条目, 利用在线绘图网站-微生信网站绘制出 KEGG 功能富集气泡图。

2.14 代谢组学分析

2.14.1 血清样本处理 血清样本于 4℃ 解冻后, 取 100 μL , 加入预冷甲醇-乙腈 (1:1) 400 μL , 涡旋混匀, -20℃ 静置 30 min, 4℃、14 000 $\times g$ 离心 20 min, 取上清真空干燥。复溶时加入 50% 乙腈水溶液 100 μL , 涡旋离心取上清进样。

2.14.2 色谱条件 采用 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统, 以 Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm) 进行分离, 柱温 25℃, 流速 0.5 mL $\cdot$ min⁻¹, 进样量 2 μL 。流动相 A 为水 + 乙酸铵 (25 mmol $\cdot$ L⁻¹) + 氨水 (25 mmol $\cdot$ L⁻¹), 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱 (0~0.5 min, 95%B; 0.5~7 min, 95%~65%B; 7~8 min, 65%~40%B; 8~9 min, 40%B; 9~9.1 min, 40%~95%B; 9.1~12 min, 95%B)。整个分析过程中样品置于 4℃ 自动进样器中, 采用随机顺序连续进样, 并在样本队列中插入质量控制 (QC) 样品以监测系统稳定性及数据可靠性。

2.14.3 质谱条件 采用 AB Triple TOF 6600 质谱仪, 在电喷雾离子源 (ESI) 正、负离子模式下进行一级和二级质谱采集。离子源参数中, 雾化气压力 60 psi (1 psi $\approx$ 6.895 kPa), 辅助气压力 60 psi, 气帘气 (CUR) 为 30 psi, 离子源温度 600℃, 喷雾电压为 $\pm$ 5 500 V, 一级质谱扫描范围 m/z 60~1 000, 累积

时间 0.20 s/spectra; 二级质谱扫描范围 m/z 25~1 000, 累积时间 0.05 s/spectra。采用信息依赖采集 (IDA) 模式获取二级质谱, 灵敏度设为 high, 去簇电压 (DP) 为 $\pm$ 60 V, 碰撞能量为 (35 $\pm$ 15) eV。IDA 设置中排除 4 Da 内的同位素, 每个循环监测 10 个候选离子。

2.14.4 数据分析 原始数据经 ProteoWizard (v3.0.6428) 转换为 .mzML 格式, 采用 XCMS 程序 (online 3.7.1) 进行峰对齐、保留时间校正和峰面积提取。将预处理后的数据导入 SIMCA-P 14.1 软件, 进行正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA)。以变量重要性投影 (VIP) 值 >1 且 $P < 0.05$ 为标准筛选差异代谢物。利用代谢物谱库 (METLIN, <https://metlin.scripps.edu/>) 和基迪奥自建代谢物数据库 (Omicsmart, <https://www.omicsmart.com/>) 进行代谢物定性, 并使用 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 进行 KEGG 代谢通路富集分析。上述代谢组学检测委托广州基迪奥生物科技有限公司完成。

2.15 Real-time PCR 检测小鼠肝脏组织中 PPAR γ 、LXR α 、ABCA1、ABCG1 和 NF- κ B mRNA 表达 使用 HiPure Total RNA Mine Kit 试剂盒从小鼠肝脏提取总 RNA, 采用超微量分光光度计测定 RNA 纯度及浓度, 使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录试剂盒合成 cDNA。Real-time PCR 反应采用 SYBR Green Premix Pro Taq HS 预混型试剂盒在 Real-time PCR 系统上进行。反应体系总体积 20 μL , 扩增程序为 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环; 溶解曲线分析条件为 65~95℃, 每升温 0.5℃ 采集 1 次荧光信号。每个样品设 3 个复孔, 以 GAPDH 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因的相对表达量。引物由生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

2.16 Western blot 检测小鼠肝脏组织中 PPAR γ 、LXR α 、ABCA1、ABCG1、IL-6、p-NF- κ B p65 和 NF- κ B p65 蛋白表达 将 RIPA-PMSF-磷酸酶抑制剂-蛋白酶抑制剂 (100:1:1:1) 的裂解缓冲液加入肝脏组织中, 用冷冻研磨仪匀浆。使用蛋白定量法 (BCA) 测定试剂盒进行上清液的蛋白定量。使用电泳装置通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行蛋白质电泳, 并通过湿转移单元将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。在室温下用快速封闭液封闭膜 20 min, TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min。分别加入单克隆抗体 PPAR γ

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 GACATGCCGCCTGGAGAAAC	101
	下游 AGCCCAGGATGCCCTTAGT	
PPAR γ	上游 AACCTGAGGAAGCCGTTCTG	149
	下游 GTTTAGAAGGCCAGGCCGAT	
LXR α	上游 GCCTCAATGCCTGATGTTTCTC	192
	下游 GCTGACTCCAACCCTATCCCTAA	
ABCA1	上游 GTGGAGGAGGACGGCTTCAATC	191
	下游 TGTACCATGTCATCACGCCATAGAG	
ABCG1	上游 CAAGACCCTTTGAAGGGATCTC	198
	下游 GCCAGAATATTCATGAGTGTGGAC	
NF- κ B	上游 CTCTGGCAGAGAAGTTGGGT	197
	下游 ATCCCGGAGTTCATCTCATAGT	

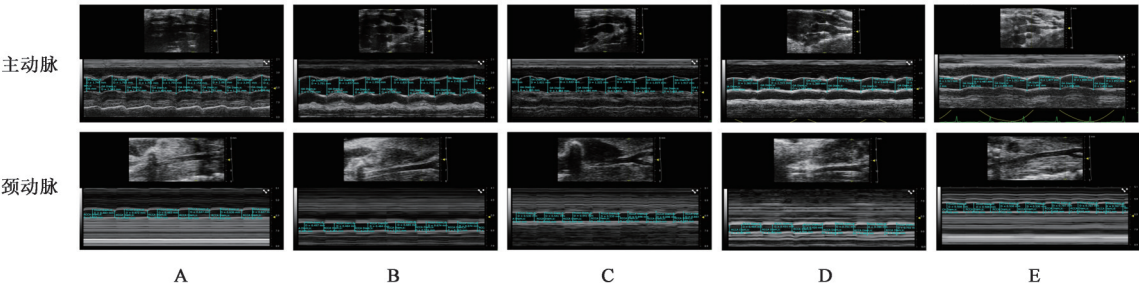
(1:1 000)、LXR α (1:1 000)、ABCA1(1:1 000)、ABCG1(1:1 000)、IL-6(1:1 000)、NF- κ B p65(1:500)、p-NF- κ B p65(1:500)和GAPDH(1:10 000)一抗4℃孵育过夜。将膜在1:5 000稀释的HRP中在室温下孵育1 h,并用增强化学发光法(ECL)试剂显色。采用Image J软件对目的条带及内参GAPDH

条带的灰度值进行定量,目的蛋白相对表达量以目的条带灰度值/GAPDH条带灰度值表示。

2.17 统计学处理方法 采用SPSS 22.0软件进行数据正态性检验和方差齐性检验及假设检验。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,若方差齐则进一步以Tukey检验进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计图的绘制,并对部分两组间比较数据进行独立样本 t 检验,其结果与SPSS计算结果相互核对一致。

3 结果

3.1 活心丸对AS小鼠血管僵硬度的影响 与正常组比较,模型组小鼠主动脉及颈动脉Dd-Ds值显著降低,PWV值显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,阿托伐他汀组与活心丸高剂量组主动脉及颈动脉Dd-Ds值显著升高,主动脉PWV值显著降低($P < 0.01$);活心丸低剂量组主动脉Dd-Ds值明显升高,PWV值明显降低($P < 0.05$),但对颈动脉Dd-Ds值的改善差异无统计学意义,见图1、图2、表2、表3。



注:A.正常组;B.模型组;C.阿托伐他汀组;D.活心丸低剂量组;E.活心丸高剂量组(图2-图6同)

图1 活心丸对AS小鼠主动脉及颈动脉Dd-Ds的影响

Fig. 1 Effect of Huoxin pills on Dd-Ds in aorta and carotid arteries of AS mice

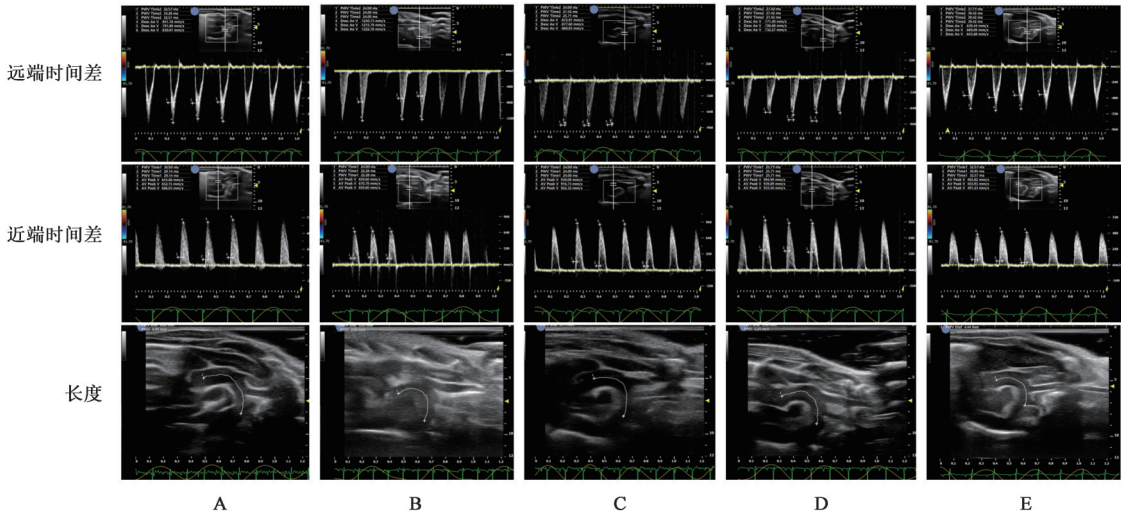


图2 活心丸对AS小鼠主动脉PWV值的影响

Fig. 2 Effect of Huoxin pills on aortic PWV in AS mice

表 2 活心丸对 AS 小鼠主动脉及颈动脉 Dd-Ds 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Huoxin pills on Dd-Ds ratio in aorta and carotid artery of AS mice ($\bar{x} \pm s, n=3$) mm

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	主动脉 Dd-Ds	颈动脉 Dd-Ds
正常组		0.281±0.017	0.100±0.006
模型组		0.072±0.018 ²⁾	0.045±0.006 ²⁾
阿托伐他汀组	2.5	0.213±0.011 ⁴⁾	0.093±0.017 ⁴⁾
活心丸低剂量组	18.2	0.125±0.006 ³⁾	0.066±0.010
活心丸高剂量组	36.4	0.224±0.030 ⁴⁾	0.091±0.007 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表 3-表 11 同)

3.2 活心丸对小鼠血脂水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平显著升高

表 4 活心丸对 AS 小鼠 TG、TC、LDL-C、HDL-C 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Huoxin pills on TG, TC, LDL-C, and HDL-C levels in AS mice ($\bar{x} \pm s, n=6$) mmol·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常组		1.715±0.306	0.768±0.084	0.230±0.062	2.588±0.618
模型组		19.613±0.018 ²⁾	2.358±0.201 ²⁾	10.963±2.429 ²⁾	1.698±0.126
阿托伐他汀组	2.5	11.382±0.789 ⁴⁾	0.748±0.068 ⁴⁾	5.243±0.755 ⁴⁾	8.372±1.293 ⁴⁾
活心丸低剂量组	18.2	15.816±0.415 ⁴⁾	1.833±0.261 ³⁾	8.878±0.529 ³⁾	5.863±1.297 ⁴⁾
活心丸高剂量组	36.4	10.600±0.795 ⁴⁾	0.798±0.039 ⁴⁾	4.898±0.068 ⁴⁾	6.643±0.688 ⁴⁾

3.3 活心丸对小鼠血清炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平显著升高($P<0.01$)。与

表 3 活心丸对 AS 小鼠主动脉 PWV 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Huoxin pills on aortic PWV in AS mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	主动脉 PWV/mm
正常组		0.993±0.041
模型组		3.194±0.065 ²⁾
阿托伐他汀组	2.5	1.494±0.391 ⁴⁾
活心丸低剂量组	18.2	2.023±0.120 ³⁾
活心丸高剂量组	36.4	1.619±0.237 ⁴⁾

($P<0.01$),HDL-C 水平差异无统计学意义。与模型组比较,阿托伐他汀组及活心丸低、高剂量组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),HDL-C 水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),见表 4。

模型组比较,阿托伐他汀组及活心丸低、高剂量组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),见表 5。

表 5 活心丸对 AS 小鼠血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Huoxin pills on changes in serum IL-6, IL-1 β , and TNF- α levels in AS mice ($\bar{x} \pm s, n=3$) ng·L⁻¹

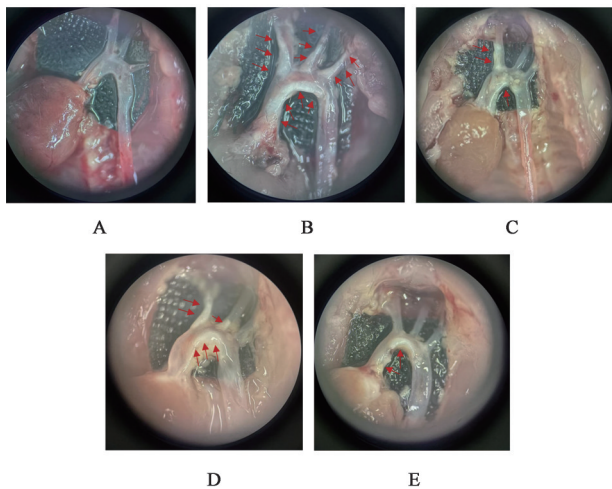
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-6	IL- β	TNF- α
正常组		0.064±0.013	84.606±15.334	627.348±17.991
模型组		0.597±0.050 ²⁾	239.860±12.274 ²⁾	875.595±25.901 ²⁾
阿托伐他汀组	2.5	0.235±0.550 ⁴⁾	180.748±6.873 ⁴⁾	775.441±28.213 ⁴⁾
活心丸低剂量组	18.2	0.328±0.027 ³⁾	210.304±3.595 ³⁾	825.442±18.026 ³⁾
活心丸高剂量组	36.4	0.258±0.003 ⁴⁾	186.489±17.015 ⁴⁾	703.303±64.579 ⁴⁾

3.4 活心丸对小鼠主动脉脂质斑块形成的影响

显微镜下观察显示,正常组小鼠主动脉弓光滑且无脂质斑块。模型组主动脉弓出现大量脂质斑块,而阿托伐他汀组及活心丸低、高剂量组斑块均不同程度减轻。HE 染色结果显示,与正常组比较,模型组主动脉出现大量脂质斑块,内膜增厚,斑块面积显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,阿托伐他汀组及活心丸低、高剂量组斑块面积均显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 3、

图 4、表 6。

3.5 活心丸对小鼠主动脉斑块内脂质、胶原、CD68、 α -SMA、VI 的影响 主动脉斑块的 Masson 染色、油红 O 染色及免疫组化 CD68、 α -SMA 染色结果显示,与模型组比较,各给药组斑块胶原含量均显著增加($P<0.01$),脂质及巨噬细胞含量明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),活心丸高剂量组 α -SMA 表达显著提升($P<0.01$),见图 5、表 7。此外,与模型组比较,阿托伐他汀组及活心丸高、低剂量组小鼠主动脉斑块 VI 均显著



注:红色箭头指示斑块位置
图3 活心丸对AS小鼠主动脉弓斑块分布的影响(体式显微镜,×20)
Fig. 3 Effect of Huoxin pills on plaque distribution in aortic arch of mice (stereomicroscope, ×20)

降低($P<0.01$),见表7。
3.6 活心丸对肝脏脂质沉积的影响 与正常组比较,模型组肝脏油红O阳性区域面积显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,阿托伐他汀组及活心丸高、低剂量组肝脏油红O阳性区域面积显著减少($P<$

表7 活心丸对AS小鼠主动脉斑块内脂质、胶原、CD68、α-SMA、VI的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Huoxin pills on lipid, collagen, CD68, α-SMA, VI in aortic plaques in AS mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)							%
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	脂质含量/斑块总面积	胶原蛋白/斑块总面积	CD68/斑块总面积	α-SMA/斑块总面积	VI	
模型组		0.780±0.096 ⁽²⁾	0.380±0.013 ⁽²⁾	0.593±0.155 ⁽²⁾	0.311±0.076 ⁽²⁾	1.994±0.172 ⁽²⁾	
阿托伐他汀组	2.5	0.306±0.098 ⁽⁴⁾	0.691±0.064 ⁽⁴⁾	0.119±0.027 ⁽⁴⁾	0.416±0.080	0.379±0.065 ⁽⁴⁾	
活心丸低剂量组	18.2	0.454±0.141 ⁽³⁾	0.548±0.017 ⁽⁴⁾	0.251±0.066 ⁽⁴⁾	0.310±0.047	0.827±0.230 ⁽⁴⁾	
活心丸高剂量组	36.4	0.273±0.111 ⁽⁴⁾	0.748±0.058 ⁽⁴⁾	0.146±0.035 ⁽⁴⁾	0.523±0.086 ⁽⁴⁾	0.332±0.110 ⁽⁴⁾	

注:正常组无斑块形成,各指标均为0

3.7 活心丸对肝脏TC含量的影响 与正常组比较,模型组肝脏TC含量显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,阿托伐他汀组及活心丸低、高剂量组肝脏TC含量均明显减少($P<0.05, P<0.01$),见表9。
3.8 活心丸抗AS的网络药理学分析 通过TCMSP和BATMAN-TCM数据库筛选,共获得活心丸活性成分126个,对应作用靶点1115个。从GeneCards、OMIM、DisGeNET数据库检索获得AS相关靶点1702个。两者取交集,得到活心丸治疗AS的潜在作用靶点332个。将332个交集靶点上传至STRING数据库,获得PPI网络图。根据Degree、Betweenness、Closeness大于均值为筛选条件,筛选出关键靶点。筛选后共获得26个核心靶点,包括蛋白激酶B1(Akt1)、TNF、表皮生长因子受体

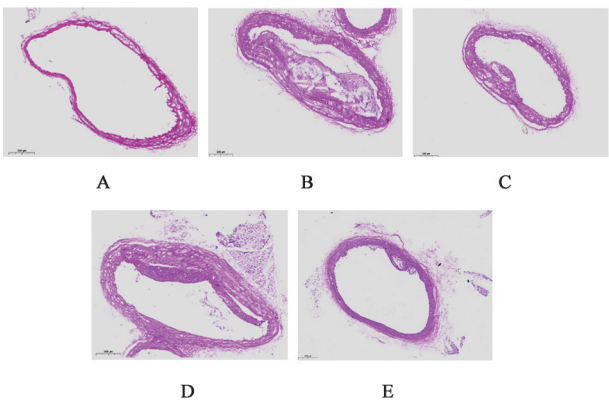


图4 活心丸对AS小鼠斑块面积的影响(HE,×100)
Fig. 4 Effect of Huoxin pills on plaque area in AS mice (HE, ×100)

表6 活心丸对AS小鼠斑块面积的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Huoxin pills on plaque area in AS mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)		
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	斑块面积占比/%
正常组		0.000±0.000
模型组		0.597±0.055 ⁽²⁾
阿托伐他汀组	2.5	0.235±0.055 ⁽⁴⁾
活心丸低剂量组	18.2	0.328±0.027 ⁽⁴⁾
活心丸高剂量组	36.4	0.258±0.003 ⁽⁴⁾

0.01),见图6、表8。

(EGFR)、SRC、PPARγ、Jun原癌基因(JUN)、雌激素受体1(ESR1)等。其中PPARγ的Degree值排名第5位。GO功能富集结果显示,BP分类显示较丰富的有炎症反应、细胞外信号调节激酶(ERK)1和ERK2级联的正调控、细胞迁移的正调控。CC分类显示较丰富的有细胞质膜、细胞外区、细胞外分泌体,MF分类显示较丰富的有蛋白质结合、相同蛋白质结合、酶结合。KEGG通路富集分析结果显示,丰富的途径包括糖尿病并发症高级糖基化终末产物/受体(AGE/RAGE)信号通路、脂质与动脉粥样硬化、癌症通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化等。见增强出版附加材料。

3.9 活心丸抗AS的血清代谢组学分析 采用非靶向代谢组学检测各组小鼠血清代谢谱。OPLS-DA

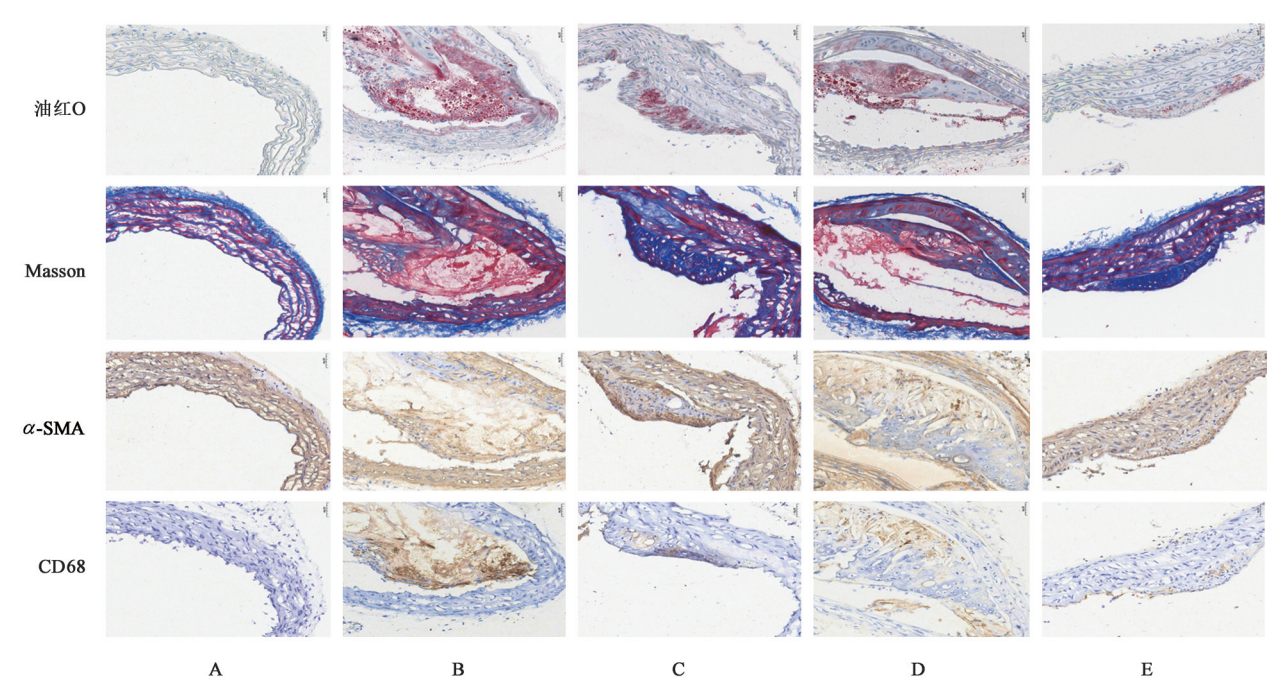


图5 活心丸对AS小鼠主动脉斑块内脂质、胶原、CD68、α-SMA含量的影响(免疫组化,×200)
Fig. 5 Effect of Huoxin pills on lipid, collagen, CD68, and α-SMA levels in aortic plaques in AS mice (IHC, ×200)

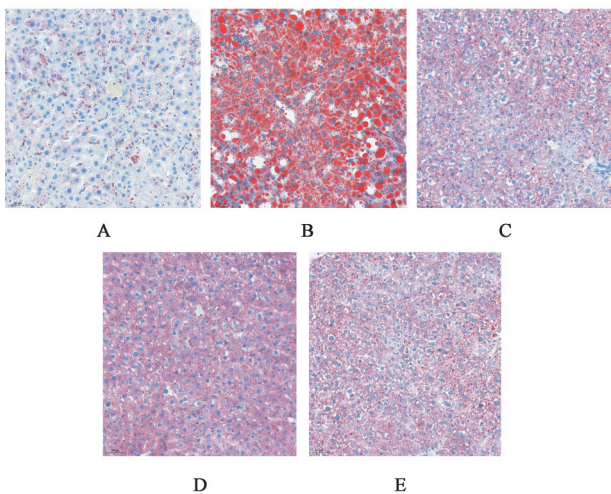


图6 活心丸对AS小鼠肝脏油红O阳性染色面积的影响(油红O,×400)
Fig. 6 Effect of Huoxin pills on oil red O-positive staining area in AS mouse livers (oil red O, ×400)

表8 活心丸对AS小鼠肝脏油红O阳性染色面积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 8 Effect of Huoxin pills on oil red O-positive staining area in AS mouse livers ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	脂滴面积
正常组		1.000±0.187
模型组		12.591±1.198 ²⁾
阿托伐他汀组	2.5	2.242±0.465 ⁴⁾
活心丸低剂量组	18.2	3.889±1.663 ⁴⁾
活心丸高剂量组	36.4	2.531±0.852 ⁴⁾

表9 活心丸对AS小鼠肝脏TC含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 9 Effect of Huoxin pills on TC levels in livers of AS mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

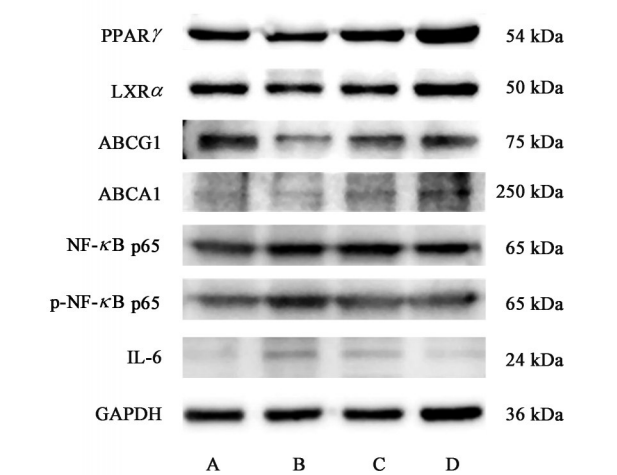
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹
正常组		0.589±0.130
模型组		1.942±0.208 ²⁾
阿托伐他汀组	2.5	0.936±0.101 ⁴⁾
活心丸低剂量组	18.2	1.576±0.100 ³⁾
活心丸高剂量组	36.4	1.212±0.055 ⁴⁾

结果显示,正常组、模型组和活心丸组之间代谢轮廓存在显著分离。为进一步验证模型可靠性,进行200次置换检验,结果显示随机模型的 R^2Y (模型对 Y 变量的解释率)=0.987和 Q^2 (模型的预测率)=0.831, Q^2 与 Y 轴相交于-0.154,表明所建模型不存在过拟合现象且具有较好的稳健性。根据筛选标准,正常组与模型组间共鉴定出226个差异代谢物,模型组与活心丸组间鉴定出125个,两者取交集得到58个活心丸回调的代谢物,其中显著上调的代谢物有32个,显著下调的代谢物有26个。与模型组比较,活心丸组显著下调的代谢物包括氧化三甲胺、肌苷和1-萘甲酸等,显著上调的代谢物包括脂肪酸羟基脂肪酸(FAHFA 36:3、FAHFA 36:2、FAHFA 34:2)、甘油磷酸胆碱等。KEGG富集分析结果表明代谢途径显著的有脂肪酸生物合成、类固醇生物合成、PPAR信号通路、鞘脂信号通路、鞘脂代谢、脂肪酸降解等。

见增强出版附加材料。结合网络药理学预测结果与上述代谢组学富集分析,两者共同指向PPAR信号通路及脂质代谢-炎症相关途径,故后续选取该通路关键节点PPAR γ 、LXR α 、ABCA1、ABCG1及炎症相关因子NF- κ B、IL-6进行Western blot验证。

3.10 活心丸对各组小鼠肝脏组织中PPAR γ 、LXR α 、ABCA1、ABCG1、p-NF- κ B p65、IL-6蛋白表达的影响 结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织中PPAR γ 、LXR α 、ABCA1及ABCG1蛋白表达水平明显下降,p-NF- κ B p65及IL-6的蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,活心丸低剂量组小鼠肝脏组织中PPAR γ 、ABCA1蛋白水平明显升高($P<0.05$),LXR α 、ABCG1蛋白表达水平差异无统计学意义,p-NF- κ B p65及IL-6的蛋白表达水平明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);活心丸高剂量组小鼠肝脏组织中PPAR γ 、LXR α 、ABCA1、ABCG1蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),p-NF- κ B p65

及IL-6的蛋白表达水平均显著下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图7、表10。



注:A.正常组;B.模型组;C.活心丸低剂量组;D.活心丸高剂量组
图7 AS小鼠肝脏PPAR γ 、LXR α 、ABCA1、ABCG1、p-NF- κ B p65、IL-6蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of hepatic PPAR γ , LXR α , ABCA1, ABCG1, p-NF- κ B p65 and IL-6 protein expression in AS mice

表10 活心丸对AS小鼠肝脏组织中PPAR γ 、LXR α 、ABCA1、ABCG1、p-NF- κ B p65、IL-6蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 10 Effect of Huoxin pills on expression of PPAR γ , LXR α , ABCA1, ABCG1, p-NF- κ B p65, and IL-6 proteins in liver tissue of AS mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	PPAR γ /GAPDH	LXR α /GAPDH	ABCG1/GAPDH	ABCA1/GAPDH	p-NF- κ B p65/NF- κ B p65	IL-6/GAPDH
正常组		1.000±0.007	1.000±0.062	1.000±0.171	1.000±0.048	1.000±0.173	1.000±0.251
模型组		0.613±0.029 ¹⁾	0.547±0.048 ²⁾	0.430±0.106 ¹⁾	0.563±0.098 ¹⁾	1.479±0.193 ¹⁾	2.023±0.138 ²⁾
活心丸低剂量组	18.2	0.947±0.022 ³⁾	0.732±0.033	0.741±0.056	1.065±0.261 ³⁾	0.725±0.143 ⁴⁾	1.512±0.074 ³⁾
活心丸高剂量组	36.4	1.226±0.243 ⁴⁾	0.956±0.188 ⁴⁾	0.983±0.294 ³⁾	1.426±0.164 ⁴⁾	0.542±0.166 ⁴⁾	1.003±0.182 ⁴⁾

3.11 活心丸对各组小鼠肝脏组织中PPAR γ 、LXR α 、ABCA1、ABCG1、NF- κ B mRNA表达的影响 结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织中PPAR γ 、LXR α 、ABCA1及ABCG1 mRNA表达水平显著下降,NF- κ B表达水平显著升高,差异具有

统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,活心丸低、高剂量组PPAR γ 、LXR α 、ABCA1及ABCG1 mRNA表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),NF- κ B表达水平显著下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表11。

表11 活心丸对AS小鼠肝脏组织PPAR γ 、LXR α 、ABCA1、ABCG1、NF- κ B mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 11 Effect of Huoxin pills on expression of PPAR γ , LXR α , ABCA1, ABCG1, and NF- κ B mRNA in liver tissue of AS mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	PPAR γ	LXR α	ABCG1	ABCA1	NF- κ B
正常组		1.000±0.051	1.000±0.018	1.000±0.007	1.000±0.029	1.000±0.099
模型组		0.374±0.120 ²⁾	0.382±0.019 ²⁾	0.502±0.007 ²⁾	0.393±0.017 ²⁾	2.992±0.447 ²⁾
活心丸低剂量组	18.2	0.842±0.089 ⁴⁾	0.951±0.194 ⁴⁾	0.758±0.021 ⁴⁾	0.767±0.127 ³⁾	1.721±0.014 ⁴⁾
活心丸高剂量组	36.4	1.181±0.038 ⁴⁾	1.973±0.057 ⁴⁾	1.074±0.027 ⁴⁾	1.465±0.076 ⁴⁾	1.384±0.086 ⁴⁾

4 讨论

活心丸由灵芝、人参、体外培育牛黄、红花、人工麝香、附子、蟾酥、熊胆、珍珠、冰片组成,具有益气活血,温经通脉之功。多项临床研究显示,活心

丸单用或联合常规西药治疗可显著改善冠心病心绞痛患者的心绞痛症状、心电图缺血表现及中医证候积分,且安全性良好,系统评价亦证实,活心丸辅助治疗冠心病心绞痛在缓解症状、改善心功能方面

具有协同增效作用^[19-20]。AS是冠心病、心绞痛等心血管疾病的主要病理基础,冠心病及心绞痛在中医理论中归属于“胸痹心痛”范畴,其核心病机为“气虚血瘀”,气虚推动无力,血行不畅,瘀阻脉道,日久形成斑块^[21]。AS的病理特征与中医“瘀阻脉道”的认识一致,活心丸益气活血之功效,与胸痹心痛、气虚血瘀的核心病机高度契合^[22-23]。

血管僵硬度增加是AS血管壁重构的典型表现,也是心血管事件的独立预测因素^[24]。本研究中活心丸降低主动脉PWV值并增加Dd-Ds值,提示其不仅能延缓斑块生长,更能改善血管壁的生物力学特性,降低血管破裂风险,从功能层面诠释了活心丸“通脉”的科学内涵。脂质代谢紊乱是AS的始动环节,HDL-C水平与胆固醇逆向转运(RCT)功能密切相关^[25-26]。本研究中活心丸对TC、TG、LDL-C及HDL-C的全面调节作用,提示其可能通过促进RCT改善全身脂质代谢,体现了活心丸“益气”以化痰浊的整体调控优势。为深入揭示其作用机制,本研究整合网络药理学、代谢组学与分子生物学验证。网络药理学预测显示,在富集得到的核心靶点中,PPAR γ 的Degree值排名第5位,PPAR γ 是调控脂质代谢、炎症反应及糖稳态的核心受体,激活后可启动RCT并抑制NF- κ B等促炎通路,这正是干预AS脂质-炎症恶性循环的理想作用点^[27]。KEGG富集结果显示,脂质与动脉粥样硬化、流体剪切应力与动脉粥样硬化富集显著,值得注意的是,PPAR γ 作为核受体家族成员,特异性富集于脂质与动脉粥样硬化通路,且PPAR γ 是该通路中的关键调控分子,连接着上游脂质感应与下游ABCA1/ABCG1等胆固醇外排基因的表达;血清代谢组学结果显示,VIP分析中显著变化的脂类代谢物提示活心丸可能通过调节脂肪酸羟基化及 β -氧化过程,减少脂质蓄积^[28]。KEGG富集的PPAR信号通路和脂肪酸降解通路进一步支持这一机制,即PPAR γ 可通过激活脂解酶,促进脂肪酸分解,降低血清游离脂肪酸水平^[29],从而抑制动脉斑块内脂核形成。此外,VIP分析中肌苷的上调可能通过激活腺苷A2A受体,进而激活下游的PPAR γ 信号通路,发挥抗炎作用^[30]。网络药理学和血清代谢组学共同指向PPAR γ 介导的脂质代谢调控。进一步通过Western blot及Real-time PCR验证表明,活心丸可显著上调ApoE^{-/-}小鼠肝脏组织中PPAR γ 、LXR α 、ABCA1及ABCG1的表达,同时抑制NF- κ B及IL-6的表达,证实了活心丸对RCT通路及炎症的双重调控作用。RCT是机体

清除外周组织过量胆固醇的唯一途径,其核心过程为外周细胞中的胆固醇经ABCA1/ABCG1转运至HDL,随血液循环抵达肝脏后被肝细胞摄取、代谢并排出体外^[31-32]。肝脏作为RCT的终点器官,其RCT通路关键分子PPAR γ /LXR α /ABCA1/ABCG1的表达水平直接反映机体整体的胆固醇外排能力。此外,活心丸可抑制肝脏NF- κ B/IL-6,并降低血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平。AS本质上是一种慢性炎症性疾病,炎症反应贯穿斑块发生、发展及破裂的全过程^[33]。NF- κ B是炎症反应的核心转录因子,激活后可促进多种炎症因子表达,加剧斑块局部炎症反应,促进巨噬细胞浸润及斑块不稳定。血清IL-6水平已被证实是预测颈动脉斑块严重程度及进展风险的独立生物标志物^[34-36]。活心丸对NF- κ B/IL-6的抑制,反映其可减轻AS状态下的全身性炎症负荷,进而间接减轻斑块局部炎症反应,减少巨噬细胞浸润,降低斑块VI。

脂质代谢紊乱与炎症反应并非孤立存在,二者在AS进程中形成相互促进的恶性循环,炎症因子可下调ABCA1表达、加速HDL降解,导致胆固醇外流受阻;而胆固醇蓄积又可激活NLRP3炎症小体,放大炎症反应^[37]。活心丸的双重调控作用恰好切断了这一恶性循环,一方面通过激活PPAR γ /LXR α /ABCA1/ABCG1通路增强RCT功能,促进胆固醇外排;另一方面通过抑制NF- κ B/IL-6减轻炎症反应,阻断炎症对RCT的负向调控。这种“代谢-炎症”协同干预的模式,使活心丸能够同时作用于AS的两大核心病理环节,是中药复方“多靶点、多途径”作用特点的集中体现。从中医理论角度审视,脂质代谢紊乱可视为“痰浊”的微观表现,炎症反应则与“热毒”“瘀血”密切相关,二者交织形成“痰瘀互结、毒损脉络”的病理状态^[38]。活心丸中人参、灵芝益气健脾以化痰浊,红花、麝香活血通络以祛瘀血,牛黄、蟾酥清热解毒以消瘀热,诸药合用恰合AS“痰瘀毒互结”之病机。本研究揭示的“代谢-炎症”双重调控机制,为活心丸“益气活血、清热解毒”的传统功效提供了现代生物学诠释,也体现了中医“整体观念”和“辨证论治”的科学内涵。

本研究通过多组学整合与实验验证,明确将活心丸的斑块稳定作用与PPAR γ /LXR α /ABCA1/ABCG1胆固醇外流通路及NF- κ B/IL-6抑制联系起来,构建了“代谢-炎症”协同调控的作用模型,深化了对该复方“多成分、多通路、多效应”特点的理解。然而,本研究仍存在一些局限性,如机制验证主要在肝脏组织中进行而非主动脉组织,一方面是考虑

到肝脏作为胆固醇逆向转运的终点器官,其通路活性直接决定全身胆固醇外排效率,优先验证肝脏可从源头上阐明活心丸调控脂质代谢的系统性机制;另一方面,网络药理学与代谢组学分析也显示活心丸回调的差异代谢物主要富集于肝脏代谢通路,从代谢层面指向了肝脏;此外,ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织量极微,难以满足多指标、多重复的 Western blot 与 Real-time PCR 检测需求;部分检测指标每组仅随机选取3只动物的样本进行分析,虽经严格随机抽样且仍能检出显著组间差异,但小样本量可能限制研究结果的推广性;未能提供完整主动脉全长的斑块分布图像,不能更直观地观察斑块空间分布情况。

综上所述,本研究证实活心丸可通过激活 PPAR γ /LXR α /ABCA1/ABCG1 信号通路增强机体 RCT 功能,同时抑制 NF- κ B/IL-6 减轻全身及局部炎症反应,二者协同作用减少斑块内脂质沉积与巨噬细胞浸润,增加胶原与平滑肌细胞含量,从而降低斑块 VI,稳定 AS 易损斑块。本研究为活心丸的临床抗 AS 应用提供了科学依据,也为从“代谢-炎症”双靶点干预 AS 的中药研发提供了新思路。

[利益冲突] 本研究中所用活心丸由广州医药集团股份有限公司白云山制药总厂提供,但研究设计、数据采集与分析均独立完成,不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis-no longer a theory [J]. Clin Chem, 2021, 67(1): 131-142.
- [2] FALK E, NAKANO M, BENTZON J F, et al. Update on acute coronary syndromes: The pathologists' view [J]. Eur Heart J, 2013, 34(10): 719-728.
- [3] SABA L, SAAM T, JAGER H R, et al. Imaging biomarkers of vulnerable carotid plaques for stroke risk prediction and their potential clinical implications [J]. Lancet Neurol, 2019, 18(6): 559-572.
- [4] VIRMANI R, BURKE A P, FARB A, et al. Pathology of the vulnerable plaque [J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(8 Suppl): C13-C18.
- [5] SAKAMATO A, SUWA K, KAWAKAMI R, et al. Significance of intra-plaque hemorrhage for the development of high-risk vulnerable plaque: Current understanding from basic to clinical points of view [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13298.
- [6] KOLTSOVA E K, GARCIA Z, CHODACZEK G, et al. Dynamic T cell-APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis [J]. J Clin Invest, 2012, 122(9): 3114-3126.
- [7] CHEN W, SCHILPEROORT M, CAO Y, et al. Macrophage-targeted nanomedicine for the diagnosis and treatment of

- atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2022, 19(4): 228-249.
- [8] 王付.《金匱要略》白話解 [M]. 鄭州:河南科學技術出版社, 2021: 200-230
WANG F. A plain language explanation of *Jingui Yaolue* [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2021: 200-230.
- [9] 余小萍,方祝元. 中醫內科學 [M]. 3版. 上海:上海科學技術出版社, 2018: 79-88
YU X P, FANG Z Y. Chinese Internal Medicine [M]. 3rd ed. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2018: 79-88.
- [10] BRAUNWALD E, LIBBY P. Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine [M]. 8th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2008: 1595-1599.
- [11] LAWTON J S, TAMIS-HOLLAND J E, BANGALORE S, et al. 2021 ACC/AHA/SCAI guideline for coronary artery revascularization: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines [J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 79(2): e21-e129.
- [12] PENG M, YANG M, LU Y, et al. Huoxin pill inhibits isoproterenol-induced transdifferentiation and collagen synthesis in cardiac fibroblasts through the TGF- β /Smads pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 275: 114061.
- [13] HE J, WO D, MA E, et al. Huoxin pill prevents excessive inflammation and cardiac dysfunction following myocardial infarction by inhibiting adverse Wnt/ β -catenin signaling activation [J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154293.
- [14] 安冬青,吳宗貴. 動脈粥樣硬化中西醫結合診療專家共識 [J]. 中國全科醫學, 2017, 20(5): 507-511.
AN D Q, WU Z G. Expert consensus on integrated traditional Chinese and western medicine diagnosis and treatment of atherosclerosis [J]. Chin Gen Pract, 2017, 20(5): 507-511.
- [15] SUN T, QUAN W, PENG S, et al. Network pharmacology-based strategy combined with molecular docking and in vitro validation study to explore the underlying mechanism of Huo Luo Xiao Ling Dan in treating atherosclerosis [J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 1621-1645.
- [16] 美麗·呼馬爾別克,李納川,吳聖賢,等. 基於“寒郁少陽”探討動脈粥樣硬化的中醫辨治 [J]. 環球中醫學, 2025, 18(11): 2302-2306.
MEILI H, LI N C, WU S X, et al. Traditional Chinese medicine diagnosis and treatment of atherosclerosis based on the pattern of "cold-depression in shaoyang" [J]. Glob Tradit Chin Med, 2025, 18(11): 2302-2306.
- [17] 鄭標,牙侯弟,余思君,等. 活心丸(濃縮丸)下调TLR4/TNF- α 表达减轻ApoE^{-/-}小鼠動脈粥樣硬化 [J]. 華夏醫學, 2024, 37(1): 61-68.
ZHENG B, YA H D, YU S J, et al. Huoxin pills (concentrated pills) downregulate TLR4/TNF- α expression and alleviate atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. Huaxia Med, 2024, 37(1): 61-68.

- [18] 陈奇,孙建宁,连晓媛,等. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2011:27-28.
- CHEN Q, SUN J N, LIAN X Y, et al. Pharmacological Research Methods of Traditional Chinese Medicine [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 27-28.
- [19] 陶锴,廖娟. 活心丸联合常规西药治疗冠心病心绞痛患者的效果[J]. 中国民康医学, 2024, 36(23): 69-73.
- TAO K, LIAO J. Effect of Huoxin pills combined with conventional western medication in treating angina pectoris in patients with coronary heart disease [J]. Chin J Folk Med, 2024, 36(23): 69-73.
- [20] 黄国明,莫海菲,陈海燕,等. 活心丸联合伊伐布雷定治疗稳定型心绞痛的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2024, 39(3): 666-669.
- HUANG G, MO H F, CHEN H Y, et al. Clinical study on Huoxin pills combined with ivabradine for the treatment of stable angina pectoris [J]. Mod Drugs Clin Pract, 2024, 39(3): 666-669.
- [21] CHEN W, WANG B, GE Y, et al. A systematic review and meta-analysis of clinical research on treating angina pectoris of coronary heart disease with traditional Chinese medicine to promote blood circulation and remove blood stasis [J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(10): 10506-10514.
- [22] WANG J, ZHANG J. A preliminary study of TCM stage-oriented treatment of atherosclerosis [J]. J Tradit Chin Med, 2009, 29(3): 201-204.
- [23] CAO C, QI Y, WANG A, et al. Huoxin pill reduces myocardial ischemia reperfusion injury in rats via TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. Chin J Integr Med, 2023, 29(12): 1066-1076.
- [24] ZHANG Z, YANG R, WU W, et al. Association of aortic pulse wave velocity with cardiovascular outcomes and all-cause mortality in diabetes: A systematic review and Meta-analysis [J]. J Diabetes Complications, 2025, 39(10): 109118.
- [25] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, et al. Atherosclerosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56.
- [26] FERENC B A, GINSBER H N, GRAHAM I, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel [J]. Eur Heart J, 2017, 38(32): 2459-2472.
- [27] HONG W, CHEN X, XIAO J, et al. Dehydrocostus lactone attenuates atherogenesis by promoting cholesterol efflux and inhibiting inflammation via TLR2/PPAR- γ /NF- κ B signaling pathway [J]. Mol Med, 2025, 31(1): 243.
- [28] REUTER S E, EVANS A M. Carnitine and acylcarnitines: Pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects [J]. Clin Pharmacokinet, 2012, 51(9): 553-572.
- [29] TSUCHIDA A, YAMAUCHI T, TAKEKAWA S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: Comparison of activation of PPAR α , PPAR γ , and their combination [J]. Diabetes, 2005, 54(12): 3358-3370.
- [30] LI D, FENG Y, TIAN M, et al. Gut microbiota-derived inosine from dietary barley leaf supplementation attenuates colitis through PPAR γ signaling activation [J]. Microbiome, 2021, 9(1): 83.
- [31] ABE R J, ABE J, NGUYEN M T H, et al. Free cholesterol bioavailability and atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2022, 24(5): 323-336.
- [32] LINTON M F, YANCEY P G, TAO H, et al. HDL function and atherosclerosis: Reactive dicarbonyls as promising targets of therapy [J]. Circ Res, 2023, 132(11): 1521-1545.
- [33] SOEHNLEIN O, LIBBY P. Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(8): 589-610.
- [34] INTHER M P J, KANTARS E, KRAAL G, et al. Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(5): 904-914.
- [35] TYRRELL D J, GOLDSTEIN D R. Ageing and atherosclerosis: Vascular intrinsic and extrinsic factors and potential role of IL-6 [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(1): 58-68.
- [36] CAU R, SABA L. Interlinking pathways: A narrative review on the role of IL-6 in cancer and atherosclerosis [J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2024, 14(6): 1186-1201.
- [37] DUEWELL P, KONO H, RAYNER K J, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. Nature, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [38] 张晓囡,吴敏,刘昕怡,等. 基于“虚为本,瘀为常,毒为变”的动脉粥样硬化防治思路[J]. 中国医药导报, 2025, 22(27): 115-118.
- ZHANG X N, WU M, LIU X Y, et al. Prevention and treatment of atherosclerosis based on the concept of "deficiency as the root, stagnation as the constant, and toxin as the variable" [J]. Chin Med Herald, 2025, 22(27): 115-118.

[责任编辑 孙丛丛]