

· 药理 ·

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

刘玉晖^{1*}, 侯贝贝¹, 游宇², 曾兰芳¹, 徐伟¹

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 南昌大学第一附属医院, 南昌 330006)

[摘要] **目的:**探究补阳还五汤(BYHWT)对高脂饮食的载脂蛋白 E 敲除(ApoE^{-/-})小鼠动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)易损斑块的影响及其相关的作用机制。**方法:**8周龄 ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食喂养12周复制 AS 易损斑块模型,以 C57/BL-6J 小鼠作为正常组给予正常饮食饮水。随机取4只小鼠中头臂动脉与主动脉弓制作病理切片,通过计算斑块面积及其易损指数判定模型复制成功。72只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为6组,分别为正常组、模型组、自噬诱导剂组及 BYHWT 低、中、高剂量组, BYHWT 低、中、高剂量组分别给予 5, 10, 20 g·kg⁻¹ BYHWT 灌胃8周,自噬诱导剂组给予雷帕霉素 4 mg·kg⁻¹灌胃8周,正常组继续给予正常饮食饮水。8周后,小鼠处死,游离胸主动脉到腹主动脉末端,制备血管组织标本用于斑块的易损指数测定,采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)分析血管组织中自噬体形成。**结果:**ApoE^{-/-}小鼠成功诱导 AS 易损斑块模型,模型组 AS 斑块形成明显,斑块易损指数显著大于正常组($P < 0.01$);补阳还五汤各剂量组明显缩小斑块面积,易损指数与模型组比较有不同程度的降低($P < 0.05$)。模型组斑块血管组织中基质金属蛋白酶(MMP)-1, 2, 3 mRNA 水平明显高于正常组;与模型组比较,补阳还五汤、雷帕霉素组的 MMP-1, 2, 3 mRNA 的水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与正常组比较,模型组的微管轻链蛋白 3(LC3-II/LC3-I)含量显著降低,高、中、低剂量的补阳还五汤及其雷帕霉素组可以明显升高 LC3-II/LC3-I 含量($P < 0.05$)。**结论:**补阳还五汤具有缩小 AS 斑块面积、降低血管中的基质金属蛋白酶的表达,调节斑块内巨噬细胞自噬从而降低斑块的易损指数,提高 AS 斑块的稳定性的作用。

[关键词] 补阳还五汤; 动脉粥样硬化; 易损斑块; 自噬; 基质金属蛋白酶(MMPs)

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)15-0112-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181423

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180427.1815.003.html>

[网络出版时间] 2018-04-28 14:24

Effect of Buyang Huanwu Tang in Stabilizing Vulnerable Plaques of ApoE^{-/-} Mice Atherosclerosis

LIU Yu-hui^{1*}, HOU Bei-bei¹, YOU Yu², ZENG Lan-fang¹, XU Wei¹

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Buyang Huanwu Tang (BYHWT) on the vulnerable plaques in atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice with high-fat diet. **Method:** The 8-week-old ApoE^{-/-} mice were fed with high-fat diet for 12 weeks to reproduce the atherosclerosis (AS) vulnerable plaque model, and C57/BL-6J mice were used as normal control group and given normal drinking water. A total of four mice were randomly selected to make pathological sections of the brachiocephalic arteries and the aortic arch. The successful modeling was verified by calculating the plaque area and its vulnerability index. 72 ApoE^{-/-} mice were randomly divided into the following groups: model group, low-dose BYHWT group: 5 g·kg⁻¹ BYHWT for 8 weeks, middle-dose

[收稿日期] 201801023(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460612)

[通信作者] *刘玉晖, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理学研究, E-mail: liuyuhui77@126.com

BYHWT group: $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ BYHWT for 8 weeks, high-dose BYHWT group: $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ BYHWT for 8 weeks, autophagy inducer group: rapamycin $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 8 weeks, control group: continue to give normal diet drinking water. After 8 weeks, the mice were put to death, and the thoracic aorta was dissociated to the end of the abdominal aorta. Some prepared vascular tissue samples were used for the determination of the vulnerability index of the plaque. PCR analysis and Western blot were used to analyze the formation of autophagosomes. **Result:** ApoE^{-/-} mice were fed with high-fat diet for 16 weeks to successfully induce the AS vulnerable plaque model. The model group showed obvious AS plaque formation. The index of plaque vulnerability was significantly higher than that in the normal group ($P < 0.01$). Each dose of BYHWT significantly reduced the plaque area, and the index of vulnerability was decreased to some extent compared with that of model group ($P < 0.05$). The levels of matrix metalloproteinase (MMP) -1, MMP-2 and MMP-3 mRNA in the model group were significantly higher than those in the blank group. The levels of MMP-1, MMP-2 and MMP-3 mRNA in different doses of BYHWT and rapamycin group were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The level of LC3-II/LC3-I in the model group was significantly lower than that in the blank group; compared with the model group, different doses of BYHWT and rapamycin group significantly increased LC3-II/LC3-I level ($P < 0.05$). **Conclusion:** BYHWT can reduce the area of AS plaque, decrease the expression of matrix metalloproteinase in blood vessel, and regulate macrophage autophagy in plaque, thus reducing the vulnerability index of plaque and improving the stability of AS plaque.

[**Key words**] Buyang Huanwu Tang; atherosclerosis; vulnerable plaque; autophagy; matrix metalloproteinase

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重危害人类健康的一类疾病,而 AS 斑块本身性质是否稳定及继发病变等是急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)及冠心病死亡的主要原因。易损斑块(vulnerable plaque, VP)的内在特征为纤维帽薄、脂质核心大,大量的巨噬细胞浸润,平滑肌细胞和胶原的减少,表达水平升高的炎性标志物,基质降解酶增加等^[1-2]。中医认为 AS 病因有实虚 2 方面,实为心脉寒凝气滞、血瘀痰浊;虚为心肾脾肝等脏腑亏虚,心络失养,两者均可导致络脉瘀阻与拙急,进而引起疼痛的产生。清代王清任所注《医林改错》中的补阳还五汤是经典的益气活血方剂,研究发现,补阳还五汤具有减慢心率、降低血压、扩张冠状动脉、减少心肌耗氧、改善心肌缺血、血液流变性等作用^[3],本课题组前期研究证实,补阳还五汤可通过抗内皮细胞损伤,改善内皮细胞通透性,抑制血管平滑肌细胞增殖等多方面作用,抑制 AS 的形成^[4-6]。

AS 斑块内细胞具有一定程度的自噬,细胞自噬是决定其进程的重要影响因素。自噬(autophagy)是广泛存在于真核细胞内的一种以细胞质空泡自噬化为特征的溶酶体依赖性降解途径,与细胞的存活、分化、发育和内环境稳态的维持密切相关。自噬过程的关键是自噬体的形成,其与多个自噬相关基因 Atg 相关。Atg6(Beclin-1)与胞浆内隔膜结合后,通

过 Atg12-Atg5-Atg16 复合物形成前自噬泡,自噬泡招集 Atg8[微管轻链蛋白 3(microtubule-associated protein 1 light chain3, LC3)]结合到隔膜上,当 Atg12-Atg5-Atg16 复合物脱落下来后便形成成熟的自噬体。细胞内 LC3 含量以及 LC3-I 向 LC3-II 的转化明显增加,LC3-II 含量的多少反映了细胞的自噬活性^[7]。AS 斑块中,巨噬细胞通常集中在脂质核心周围或在斑块肩部,而斑块肩部是斑块中易于破裂的位置,与易损斑块有很大的关系;在斑块纤维帽中巨噬细胞密度越高导致纤维帽更易于破裂,而巨噬细胞分泌大量基质金属蛋白酶(MMPs,诸如 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9)同时导致 MMP 的天然特异性抑制剂基质金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP1)与 TIMP2 分泌减少,破坏 MMPs 与 TIMP 平衡,降解胶原和弹力纤维等基质成分,增加易损斑块的不稳定性^[8]。

本研究用高脂饮食载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(ApoE^{-/-}小鼠)复制 AS 易损斑块模型,研究补阳还五汤对提高斑块稳定性与巨噬细胞自噬及其基质金属蛋白酶之间的关系,为治疗 AS 提供新思路。

1 材料

1.1 动物 ApoE^{-/-}小鼠, C57BL/6J-12 小鼠, SPF 级, 雄性, 8 周龄, 体质量(20 ± 2) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物合格证号

SCXK(京)2014-0004,本研究动物实验部分均符合江西中医药大学动物伦理委员会要求。

1.2 药物及试剂 补阳还五汤(黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 5 g,川芎 3 g,红花 3 g,桃仁 3 g),所有药材均由江西中医药大学附属中医院提供,由江西中医药大学药学院付小梅教授鉴定为正品,按实验室常规方法煎煮浓缩至 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,冷却后放入 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗、山羊抗鼠 HRP 标记二抗(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 7074S,7076P2);LC3 I/LC3 II 抗体,抗单核巨噬细胞 2(MOMA-2), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 GR252926-8, ab33451, ab5694, ab42541);MMP-1, MMP-2, MMP-3 及 GAPDH 引物均由上海生工合成;trizol, Reagent 两步逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)(北京全式金公司,批号分别为 k10526, k10418);苯甲基磺酰氟(PMSF),苏木素-伊红(HE)染液,天狼星红染液,油红 O 染液(北京索莱宝公司,批号分别为 20141110, G1120, G1471, G1260);电泳缓冲液,转膜缓冲溶液(上海碧云天公司,批号分别为 P0014A, P0021A);Immobilon Western 化学发光底物(美国 Millipore 公司,批号 1505101);显影粉,定影粉(北京康为世纪公司,批号分别为 10122, 00041510);BCA 蛋白浓度测定试剂盒,高灵敏度化学发光底物(美国 Thermo 公司,批号分别为 PC200898, MD158290)。

1.3 仪器 S40-SLIDER 型倒置荧光显微镜, CM1905 型冰冻切片(德国 Leica 公司);IN cell Analyze6000 BK03048 型激光共聚焦显微镜(美国 GE 公司);AllegraTMX-12R 型离心机(美国 BECskman 公司);2K15 型台式高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);AG22331 型 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);DYCP-31DN 型 PCR 电泳槽(北京市六一仪器厂);552BR 型电泳仪、电转槽及伯乐凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 模型的复制 采用 8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠 76 只高脂饮食喂养 12 周复制 AS 易损斑块模型^[8],以 C57/BL-6J 小鼠作为正常组给予正常饮食饮水,实验过程中依据动物医学伦理学对动物进行处置。ApoE^{-/-}小鼠饲喂高脂饲料 12 周后,毛发油亮有光泽,部分小鼠背部毛发出现脱落现象。饲喂高脂饲料 12 周,取正常组和模型组各 2 只小鼠,解剖剥

离主动脉弓及头臂动脉,进行 HE 染色,血管内膜上未见明显斑块沉积;延长饲养 4 周,再次取模型组小鼠 2 只进行鉴定,HE 染色显示主动脉弓血管内膜有明显斑块沉积,显示模型成功。

2.2 分组及给药 造成易损斑块模型后的 ApoE^{-/-}小鼠 72 只,每组 12 只小鼠,随机分为 5 组,分别为正常组、模型组、补阳还五汤低、中、高剂量组、自噬诱导剂雷帕霉素组。模型组继续高脂饮食喂养 8 周;补阳还五汤低、中、高剂量组分别高脂饮食喂养 8 周,同时 $5, 10, 20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 补阳还五汤灌胃 8 周;自噬诱导剂雷帕霉素组高脂饮食喂养 8 周同时雷帕霉素 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃 8 周^[6];C57/BL-6J 小鼠作为正常组给予正常饮食饮水。

2.3 标本收集与处理 小鼠处死,游离胸主动脉到腹主动脉末端,取出整段血管,经无 RNA 酶的磷酸缓冲液洗涤后,一部分血管组织经 10% 甲醛固定,石蜡包埋、切片用于 HE 染色;一部分血管组织经 OTC 包埋、冰冻切片用于油红 O 染色观察动脉组织内斑块脂质含量、天狼星红染色观察动脉组织内斑块胶原含量、免疫组化观察 MOMA-2 和 α -SMA 的表达情况。一部分血管组织经 trizol 试剂分离总 RNA,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.4 观察指标与方法

2.4.1 HE 染色、油红 O 染色、天狼星红染色观察血管动脉斑块情况 血管固定包埋后间隔 $4\text{ }\mu\text{m}$ 进行石蜡连续切片 30 张,每间隔 10 张取 1 张进行 HE 染色,细胞核呈蓝色,细胞浆、结缔组织等其他的组织呈不同程度的红色。使用荧光显微镜观察不同切面的斑块形成情况,显微镜下分别选取切片 HE 染色的动脉壁,实验结果经数码相机采集,Image Pro Plus 6.0(IPP 6.0)图像分析软件测量模块计算动脉根部每一切面横截面斑块面积和管壁面积及其比值并记数。200 倍镜下观察斑块组织学特点。另一部分经 OTC 包埋、冰冻切片 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 迅速切片,厚度 $4\sim 5\text{ }\mu\text{m}$,每隔 10 张取一张进行油红 O 染色,IPP6.0 软件计算各组织切片斑块内脂肪面积和斑块面积,并计算脂质含量 = 油红 O 阳性染色面积/斑块面积 $\times 100\%$,取相邻切片进行天狼星红染色,IPP6.0 软件计算各组织切片斑块内胶原面积,并计算胶原含量 = 天狼星红阳性染色面积/斑块面积 $\times 100\%$ 。求出斑块内脂质及胶原占斑块面积百分率。

2.4.2 免疫组化检测巨噬细胞和平滑肌细胞水平 切片厚度 $4\sim 5\text{ }\mu\text{m}$,切片置于 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚赖氨酸包被过的载玻片上,丙酮固定,BSA 封闭内源

性过氧化物酶,分别滴加 MOMA-2 抗体(1:200 稀释)和 α -SMA 抗体(1:200 稀释) 50 ~ 100 μ L 于组织上,加二抗工作液(1:1 000 稀释)。DAB 显色,苏木素复染 1 min,脱水,透明,封片,最后显微镜下观察并照相。显微镜下观察,每张免疫组化切片随机选择 1 ~ 3 个不同的视野($\times 200$)观察,并判读斑块内 MOMA-2 和 α -SMA 占整个斑块的阳性表达率。MOMA-2 和 α -SMA 免疫阳性分别表示巨噬细胞与平滑肌细胞主要定位均在胞浆,呈黄色至褐色。分别计算巨噬细胞和平滑肌细胞百分比。与 2.4.1 项结果结合计算易损斑块的易损指数。易损指数 = (巨噬细胞的阳性百分比 + 脂质的阳性百分比) / (胶原的阳性百分比 + 平滑肌细胞的阳性百分比)^[9]。

2.4.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 MMP-1, MMP-2, MMP-3 mRNA 水平 所用引物由上海生工生物工程公司提供(表 1)。采用 trizol 试剂分离提取总 RNA,参照逆转录试剂盒操作逆转录为 cRNA,设置反应条件,42 $^{\circ}$ C 130 min,85 $^{\circ}$ C 5 min;按 RT-PCR 参照说明书进行,配置加入荧光素的定量体系,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,循环扩增 35 次,上机检测后进行数据分析。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 primer sequences of PCR

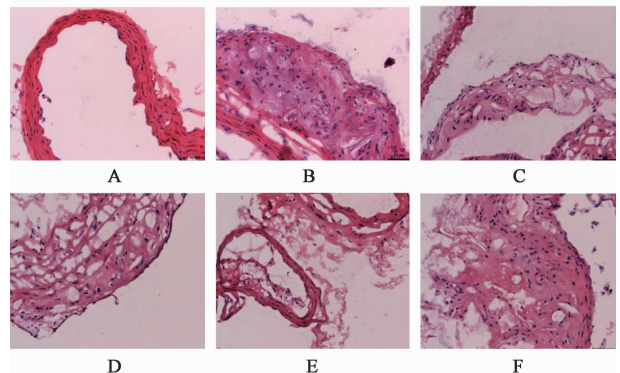
基因	引物序列	长度/bp
MMP-1	上游 5'-ACAGATAAAGGAAATGCCTA-3'	176
	下游 5'-CATAGCCTTGAGTAATGACCA-3'	
MMP-2	上游 5'-GACCCCGGTTCCCTAAGCTC-3'	248
	下游 5'-TGCTTCCAAACTTCACGCTCT-3'	
MMP-3	上游 5'-CCTAGAAACTACTATGG-3'	225
	下游 5'-ACACCTGGGCTTATGCATC-3'	
GAPDH	上游 5'-TTTGCCATTGTGAAGGGCTCAT-3'	136
	下游 5'-CACCAGTGGATGCAGGGATGATGT-3'	

2.4.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 LC3-II/LC3-I 的变化以评价自噬体的形成 使用 RIPA 高效裂解液和苯甲基磺酰氟(PMSF)制备蛋白样品,取 30 μ L 用于 BCA 试剂盒测蛋白浓度,其余加入 6 \times 蛋白上样缓冲液,分装保存。制胶,上样,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,5% BSA 室温封闭 2 h,目的蛋白与 LC3 I/LC3-II 抗体(1:1 000)抗体特异性结合过夜,化学发光显影,拍照保存,用 Quantity One 图像分析软件测定条带的灰度值,计算目的蛋白的相对表达量。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用单因素方差分析进行多样本间的均数比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内斑块面积的影响 病理结果显示除正常组外,各组别各张切片均有 AS 斑块形成,其中模型组可见胆固醇结晶形成较多,模型组可见明显斑块纤维帽形成,且较其他组明显增厚,其次是雷帕霉素组,其余组纤维帽较薄,且部分切片无纤维帽结构形成。与正常组比较,模型组 AS 斑块形成显著($P < 0.01$);与模型组比较,不同剂量的补阳还五汤组斑块面积明显减少($P < 0.05$),雷帕霉素组显著减少($P < 0.01$),AS 病变程度明显减轻。见图 1,表 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 补阳还五汤 5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 补阳还五汤 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 补阳还五汤 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 雷帕霉素组(图 2 ~ 7 同)

图 1 补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内斑块的影响(HE, $\times 200$)

Fig.1 Effect of Buyang Huanwu Tang on plaque in arterial tissue of ApoE^{-/-} mice(HE, $\times 200$)

表 2 补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内斑块面积的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of Buyang Huanwu Tang on plaque area in arterial tissue of ApoE^{-/-} mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	斑块面积
正常	-	0
模型	-	177 025.63 \pm 22 344.95 ²⁾
补阳还五汤	5	83 339.13 \pm 9 195.13 ³⁾
	10	81 878.38 \pm 5 953.28 ³⁾
	20	71 118.88 \pm 7 530.07 ³⁾
雷帕霉素	4 $\times 10^{-3}$	13 792.88 \pm 10 788.68 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 ~ 8 同)。

3.2 对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内脂质含量的影响

油红 O 染色结果显示脂肪呈红色,细胞核呈蓝色,与正常组比较,模型组 AS 斑块形成明显,脂质含量显著升高($P < 0.01$),超过 40%,认为初步符合易损斑块的特征。与模型组比较,补阳还五汤高、中、低剂量组、雷帕霉素组脂质含量明显减少($P < 0.05$)。见图 2 及表 3。

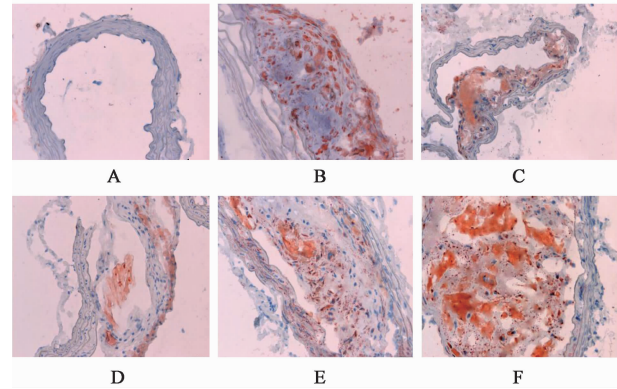


图 2 各组小鼠动脉组织内斑块脂质的表达(油红 O, ×200)
Fig.2 Expression of plaque lipid content in mice arterial tissues of each group(oil red O, ×200)

表 3 补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内脂质含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of Buyang Huanwu Tang on lipid content in arterial tissue of ApoE^{-/-} mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	脂质质量分数/%
正常	-	0
模型	-	47.83 ± 9.49 ²⁾
补阳还五汤	5	33.59 ± 5.75 ³⁾
	10	33.38 ± 7.78 ³⁾
	20	25.18 ± 5.17 ³⁾
雷帕霉素	4 × 10 ⁻³	38.45 ± 7.37 ³⁾

3.3 对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内胶原含量的影响

天狼星红染色显示胶原纤维呈红色,细胞核呈蓝色。与正常组比较,模型组 AS 斑块形成明显,胶原含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤中、高剂量组胶原含量明显增加($P < 0.05$)。自噬诱导剂雷帕霉素组胶原含量无明显差异。见图 3 和表 4。

3.4 对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内斑块 MOMA-2 和 α-SMA 蛋白表达的影响 显微镜下观察, MOMA-2 和 α-SMA 免疫阳性分别表示巨噬细胞与平滑肌细胞主要定位在均为胞浆表达,呈黄色至褐色。与正常组比较,模型组 AS 斑块形成显著, MOMA-2 表达

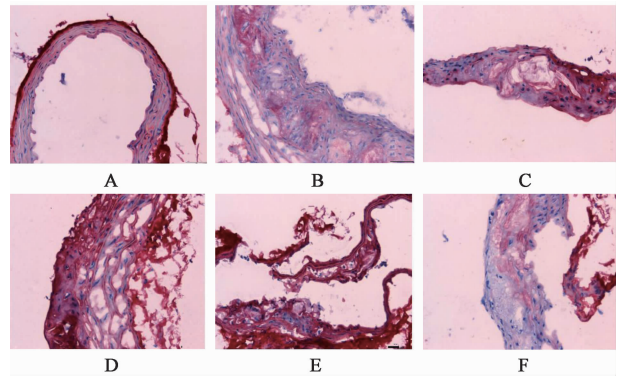


图 3 各组小鼠动脉组织内斑块胶原表达(天狼星红, ×200)
Fig.3 Expression of plaque collagen content in arterial tissues of each group(sirius red, ×200)

表 4 补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内胶原含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of Buyang Huanwu Tang on plaque collagen content in arterial tissue of ApoE^{-/-} mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	胶原质量分数/%
正常	-	0
模型	-	30.54 ± 5.91 ²⁾
补阳还五汤	5	38.23 ± 5.38
	10	56.12 ± 6.21 ³⁾
	20	58.79 ± 4.79 ³⁾
雷帕霉素	4 × 10 ⁻³	36.83 ± 4.89

较高($P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤组有降低趋势,其中补阳还五汤高剂量组 MOMA-2 表达显著降低($P < 0.01$)。与正常组比较,模型组 α-SMA 表达较低($P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤高剂量组 α-SMA 表达显著升高($P < 0.01$),自噬诱导剂雷帕霉素组 MOMA-2 和 α-SMA 含量无明显差异。见图 4,5 及表 5。

3.5 对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内 AS 斑块的易损指数的影响

与正常组比较,模型组 AS 斑块形成明显,斑块易损指数显著升高, AS 斑块出现明显地不稳定性,而补阳还五汤及其雷帕霉素、均能降低易损指数,其中补阳还五汤中、高剂量组易损指数降低显著($P < 0.01$)。见表 6。

3.6 对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内 MMP-1, MMP-2, MMP-3 mRNA 表达的影响

与正常组比较,模型组血管组织中 MMP-1, MMP-2, MMP-3 mRNA 水平明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),与模型组比较,不同剂量补阳还五汤、雷帕霉素明显抑制 MMP-1, MMP-2, MMP-3 mRNA 的表达($P < 0.05, P < 0.01$)。结果表明补阳还五汤稳定易损斑块与调节 MMP 的表达有

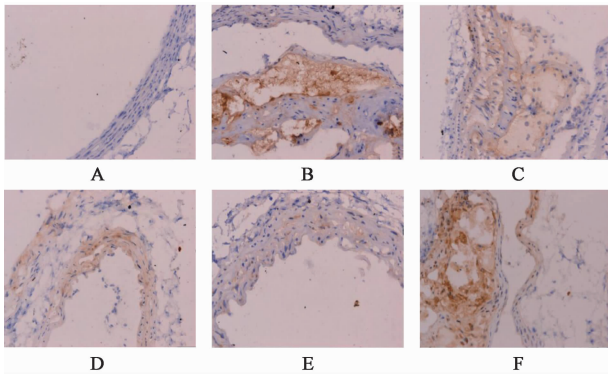


图 4 各组小鼠动脉组织内斑块 MOMA-2 蛋白的表达 (免疫组化, ×200)

Fig. 4 Expression of MOMA-2 in arterial tissues of each group (IHC, ×200)

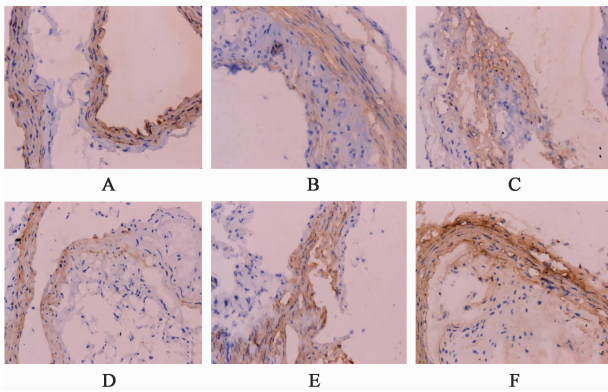


图 5 各组小鼠动脉组织内斑块 α-SMA 蛋白的表达 (免疫组化, ×200)

Fig. 5 Expression of α-SMA in arterial tissues of each group (IHC, ×200)

表 5 补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内斑块 MOMA-2 和 α-SMA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effect of Buyang Huanwu Tang on level of plaque MOMA-2 and α-SMA in ApoE^{-/-} mice arterial tissue ($\bar{x} \pm s, n = 12$) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MOMA-2	α-SMA
正常	-	0	0
模型	-	43.34 ± 8.25 ²⁾	16.63 ± 2.73 ²⁾
补阳还五汤	5	34.19 ± 5.51	21.49 ± 3.19
	10	33.74 ± 6.48	19.84 ± 3.71
	20	26.46 ± 4.37 ⁴⁾	25.05 ± 4.37 ⁴⁾
雷帕霉素	4 × 10 ⁻³	38.56 ± 6.78	21.73 ± 4.68

关。见图 6, 表 7。

3.7 对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内 LC3 蛋白表达的影响 正常情况下, 哺乳动物发生自噬时, 细胞内 LC3 含量以及 LC3-I 向 LC3-II 的转化明显增加, LC3-II 含量的多少反映了细胞的自噬活性。与正常

表 6 补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内 AS 斑块的易损指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 6 Effect of Buyang Huanwu Tang on vulnerability index of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	易损指数
正常	-	0
模型	-	1.94 ± 0.065 ²⁾
补阳还五汤	5	1.13 ± 0.028
	10	0.88 ± 0.013 ⁴⁾
	20	0.37 ± 0.011 ⁴⁾
雷帕霉素	4 × 10 ⁻³	1.35 ± 0.022

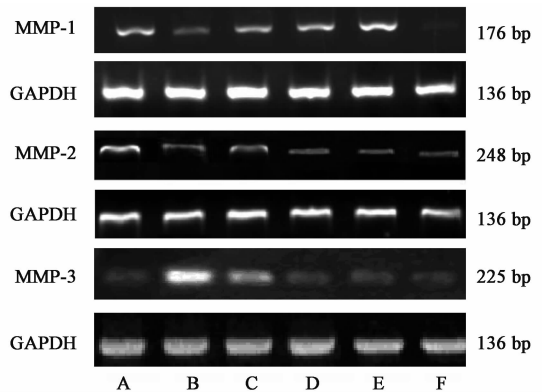


图 6 各组小鼠动脉组织内斑块 MMP-1, MMP-2, MMP-3 mRNA 的表达

Fig. 6 Expression of MMP-1, MMP-2, MMP-3 mRNA in arterial tissues of each group

表 7 补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内 MMP-1, MMP-2, MMP-3 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of Buyang Huanwu Tang on MMP-1, MMP-2, MMP-3 mRNA of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MMP-1 /GAPDH	MMP-2 /GAPDH	MMP-3 /GAPDH
正常	-	0.66 ± 0.29	0.47 ± 0.05	0.78 ± 0.18
模型	-	1.03 ± 0.32 ²⁾	0.89 ± 0.46 ¹⁾	1.08 ± 0.33 ¹⁾
补阳还五汤	5	0.49 ± 0.19 ³⁾	0.46 ± 0.39 ⁴⁾	0.05 ± 0.03 ⁴⁾
	10	0.68 ± 0.20 ³⁾	0.30 ± 0.07 ⁴⁾	0.33 ± 0.45 ³⁾
	20	0.84 ± 0.30	0.22 ± 0.12 ⁴⁾	0.06 ± 0.04 ⁴⁾
雷帕霉素	4 × 10 ⁻³	0.32 ± 0.09 ⁴⁾	0.21 ± 0.20 ⁴⁾	0.03 ± 0.04 ⁴⁾

组比较, 模型组的 LC3-II / I 含量显著降低 ($P < 0.01$), 高、中、低剂量的补阳还五汤及其雷帕霉素组可以明显升高 LC3-II / I 含量 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 7, 表 8。

4 讨论

传统观点认为, AS 是一个进行性的发展过程,

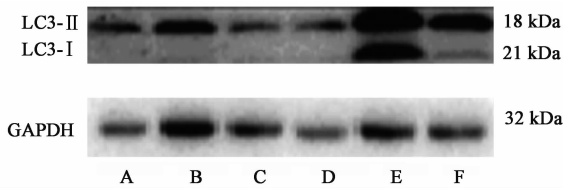


图 7 各组小鼠动脉组织内斑块 LC3 的表达

Fig. 7 Expression of LC3 in arterial tissues of each group

表 8 补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内 LC3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of Buyang Huanwu Tang on protein expression of LC3 of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	(LC3-II/LC3-I)/GAPDH
正常	-	1.0 ± 0.00
模型	-	0.85 ± 0.06 ²⁾
补阳还五汤	5	0.92 ± 0.10 ³⁾
	10	1.07 ± 0.09 ³⁾
	20	1.22 ± 0.07 ³⁾
雷帕霉素	4 × 10 ⁻³	1.31 ± 0.12 ⁴⁾

由于脂质的沉积,动脉内膜下的斑块逐渐增大并突入管腔,造成管腔狭窄和组织缺血,最终导致急性心脑血管事件的发生,因此治疗的重点是斑块的消退。然而,近年来的研究发现,急性冠脉综合症,多发生于冠脉轻、中度狭窄的患者中,导致急性心血管病事件的主要原因是斑块破裂和血栓形成。斑块的稳定性比其大小具有更重要的临床意义^[9]。

VP 原来称之为不稳定斑块,现代医学特别是 Naghavi 等^[1-2] 提出其内在特征包括斑块的功能变化,即活动性炎症、氧化应激、细胞凋亡和斑块的形态变化,即斑块偏心分布、脂核大、纤维帽薄、细胞外基质胶原含量少、局部炎性细胞浸润明显。研究发现,在炎症因子的作用下,巨噬细胞将分泌大量的 MMPs, MMPs 能水解几乎所有的细胞外基质成分,参与了 AS 等许多疾病的病理过程。相当多的实验数据支持, MMPs 与 AS 发生、发展、预后有关联^[10]。MMPs 分泌增加, MMPs 与天然 MMPs 抑制剂 (TIMPs) 之间的平衡被破坏, MMPs 可通过削弱血管内皮细胞屏障功能,促进中层血管平滑肌细胞迁移和增殖,加重血管的结构改变,进一步促进炎性细胞浸润,导致斑块不稳定性增加^[11]。来自巨噬细胞和内皮细胞的 MMPs 可分解胶原,削弱纤维帽,促进易损斑块破裂^[12-13]。研究发现, AS 发展的过程中细胞死亡十分频繁,细胞死亡的结果很大程度上取决于斑块所处的时期以及涉及到的细胞类型^[14-15]。平

滑肌细胞可以分泌胶原基质形成斑块纤维帽,厚的斑块纤维帽可以保护斑块,防止斑块破损而诱发心血管事件,因此,平滑肌细胞的死亡可以导致斑块的不稳定甚至破裂,增加心血管事件发生的风险,而巨噬细胞受到刺激而活化时,分泌 MMPs 降解胶原基质,导致斑块纤维帽变薄,同时活化的巨噬细胞可以分泌大量炎症因子,促进平滑肌细胞的死亡,将导致 AS 斑块的不稳定甚至破裂,增加心血管事件的发生^[16]。

AS 斑块内的细胞存在一定程度的自噬,细胞自噬极大的影响着 AS 的进程。基础或适度性自噬是 AS 斑块内细胞对抗炎症反应、氧化应激等的重要保护措施;细胞发生过度自噬,大量释放炎症因子如白细胞介素 (IL)-1 β , IL-6, 肿瘤坏死因子 (TNF)- α 等,加重炎症反应的发生,引起细胞自噬性死亡,并引起易损斑块的不稳定性。研究发现,巨噬细胞基础性自噬是抗凋亡作用的,保护斑块内巨噬细胞免受各种应激物的影响;而 AS 晚期,斑块内巨噬细胞自噬异常,导致巨噬细胞活性改变,促进斑块内炎症因子释放从而促进 AS 发展^[17]。PI3K-Akt-mTOR 通路是研究自噬最经典的通路之一。雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,相对分子质量大小为 298 kDa。细胞中的 mTOR 常以 mTORC1, mTORC2 两种复合物的形式而存在,其中 mTORC1 是营养与能量的传感器,收各种信号,如氨基酸,生长因子等的调控。研究发现, mTOR 通过介导磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt), 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK), 分泌型糖蛋白 (Wnt)/糖原合成酶激酶 3 (GSK3) 等信号通路,调控细胞生长、代谢、自噬、增殖等生理过程的中枢分子^[18]。

中医对于 VP 破裂没有直接阐述,本病在中医临床多属于胸痹的范畴,认为其病因有虚实两方面:实为寒凝气滞血瘀痰浊等阻于心之络脉;虚为心肝脾肾等脏腑亏虚,心络失养,二者均可导致络脉瘀阻和络脉拙急,从而导致疼痛的产生。从络病学说角度看,络虚不荣是胸痹心痛之原因,络脉瘀阻是胸痹心痛之渐进过程,络脉拙急是胸痹心痛之急性状态,因此治则可以采用益气活血通络法。本实验中使用的补阳还五汤是经典的益气活血方剂,结果表明,补阳还五汤与自噬诱导剂雷帕霉素组具有降低 AS 斑块面积、可改善斑块的易损特征,显著降低斑块内巨噬细胞含量,减少平滑肌细胞纤维化,降低斑块的易损指数,降低基质金属蛋白酶 MMP-1, 2, 3 mRNA 水平,减少胶原的降解,稳定变薄的纤维帽,发挥其稳

定 AS 易损斑块的作用;补阳还五汤与雷帕霉素组明显调节斑块内巨噬细胞自噬体的形成,因此补阳还五汤的稳定斑块作用可能与调节斑块内巨噬细胞的自噬有关,为进一步研究补阳还五汤稳定 AS 斑块的内部机制奠定了基础。

[参考文献]

[1] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient; a call for new definitions and risk assessment strategies; part I [J]. *Circulation*, 2003, 108 (14): 1664-1672.

[2] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient; a call for new definitions and risk assessment strategies; part II [J]. *Circulation*, 2003, 108 (15): 1772-1778.

[3] 刘发益, 文志斌, 尚改革, 等. 补阳还五汤抗家兔动脉粥样硬化形成的实验研究 [J]. *湖南医科大学学报*, 2000, 25 (1): 33-35.

[4] 刘玉晖, 易文凤, 游宇. 补阳还五汤抗动脉粥样硬化作用与紧密连接蛋白的关系 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20 (24): 155-159.

[5] 刘志勇, 游宇, 刘玉晖, 等. 补阳还五汤通过调节 MAPK 信号通路抗内皮细胞损伤的作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32 (22): 2098-2103.

[6] 游宇, 刘志勇, 肖雄, 等. 补阳还五汤通过调节血管平滑肌细胞 Cx43 作用于动脉粥样硬化的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32 (6): 6-10.

[7] Sciarretta S, Forte M, Frati G, et al. New insights into the role of mTOR signaling in the cardiovascular system [J]. *Circ Res*, 2018, 122 (3): 489-505.

[8] Moore K J, Sheedy F J, Fisher E A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (10): 709-721.

[9] WU M Y, LI C J, HOU M F, et al. New insights into the role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (10): 2034.

[10] 李启玉, 李芳, 徐丽, 等. 益气滋阴、活血通络方干预动脉粥样硬化相关炎症因子的表达 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22 (2): 156-159.

[11] Amin M, Pushpakumar S, Muradashvili N, et al. Regulation and involvement of matrix metalloproteinases in vascular diseases [J]. *Front Biosci*, 2016, 21: 89-118.

[12] Camici P G, Rimoldi O E, Gaemperli O, et al. Non-invasive anatomic and functional imaging of vascular inflammation and unstable plaque [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33 (11): 1309-1317.

[13] Clarke M C, Figg N, Maguire J J, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2006, 12 (9): 1075-1080.

[14] Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (11): 2255-2264.

[15] Blander J M. The many ways tissue phagocytes respond to dying cells [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277 (1): 158-173.

[16] Chistiakov D A, Myasoedova V A, Revin V V, et al. The phenomenon of atherosclerosis reversal and regression: lessons from animal models [J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 102 (1): 138-145.

[17] Dijk R A V, Duiniveld A J F, Schaapherder A F, et al. A change in inflammatory footprint precedes plaque instability: a systematic evaluation of cellular aspects of the adaptive immune response in human atherosclerosis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4 (4): e001403.

[18] ZHAI C, CHENG J, Mujahid H, et al. Selective inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway regulates autophagy of macrophage and vulnerability of atherosclerotic plaque [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (3): e90563.

[责任编辑 周冰冰]