

补阳还五汤加味预防动脉粥样硬化形成机制

柴毅, 吴颢昕*, 陈刚, 凌云
(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] **目的:**探究补阳还五汤加味对动脉粥样硬化(AS)形成的预防及机制研究。**方法:**将30只雄性载脂蛋白E基因敲除小鼠(ApoE^{-/-}小鼠)随机分为ApoE^{-/-}小鼠组、模型组、补阳还五汤加味组和辛伐他汀组,另以正常雄性C57BL/6J小鼠设组。模型组、补阳还五汤加味组和辛伐他汀组采用高脂饮食造模。第4周后,补阳还五汤加味组和辛伐他汀组分别灌以补阳还五汤20 g·kg⁻¹ + 水蛭粉0.46 g·kg⁻¹,辛伐他汀3 mg·kg⁻¹。第9周后,检测血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)值,取动物主动脉根部经苏木素-伊红(HE)常规染色后观察组织形态变化并测量纤维帽厚度和内-中膜厚度、检测主动脉p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)和细胞外信号调节激酶5(ERK5)蛋白表达变化。**结果:**血脂水平,与C57BL/6J小鼠正常组比较,ApoE^{-/-}小鼠组和模型组TC,TG,LDL-C均升高且HDL-C均降低($P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤加味组与辛伐他汀组均能降低ApoE^{-/-}小鼠TC,TG,LDL-C水平,同时升高HDL-C($P < 0.05, P < 0.01$)。HE染色,C57BL/6J小鼠正常组主动脉管壁无斑块形成,ApoE^{-/-}小鼠组管壁有极少斑块形成,内-中膜略有增厚。模型组斑块形成明显,内-中膜明显增厚。补阳还五汤加味组与辛伐他汀组较模型组斑块减少,内-中膜厚度减少。蛋白表达,与C57BL/6J小鼠正常组比较,模型组主动脉组织中p38MAPK的蛋白表达量增多($P < 0.01$),ERK5的蛋白表达量减少($P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤加味组和辛伐他汀组均能降低p38MAPK蛋白的表达量($P < 0.01$),增加组织中ERK5蛋白的表达($P < 0.01$)。**结论:**补阳还五汤加味与辛伐他汀均有预防AS的作用。补阳还五汤加味预防AS发生的机制可能与干预MAPK信号通路中的p38MAPK,ERK5途径有关。

[关键词] 补阳还五汤加味; 动脉粥样硬化; 主动脉; p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK); 细胞外信号调节激酶5(ERK5)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0114-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070114

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1336.036.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 13:36

Preventive Effect of Modified Buyang Huanwu Tang on Formation of Atherosclerosis

CHAI Yi, WU Hao-xin*, CHEN Gang, LING Yun
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the preventive mechanism of modified Buyang Huanwu Tang on formation of atherosclerosis. **Method:** Thirty male ApoE^{-/-} mice were randomly divided into four groups: ApoE^{-/-} mice blank group, model group, modified Buyang Huanwu Tang group and simvastatin group. Normal male C57BL/6J mice were used as a normal group. High-fat diet was given for modeling in model group, modified Buyang Huanwu Tang group and simvastatin group. 4 weeks later, the mice in Buyang Huanwu Tang group or simvastatin group were intragastrically administrated with Buyang Huanwu Tang (20 g·kg⁻¹) + leech powder (0.46 g·kg⁻¹) or simvastatin (3 mg·kg⁻¹). After 9 weeks, the total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein

[收稿日期] 20160914(004)

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81503485);江苏省高校优势学科建设工程项目(161014);江苏省教育厅研究生创新课题(JGZZ12-052)

[第一作者] 柴毅,在读硕士,从事中医心脑血管脑疾病研究,Tel:15195750013,E-mail:chinachaiyi@163.com

[通讯作者] *吴颢昕,教授,博士生导师,从事中医心脑血管脑疾病研究,Tel:13813910523,E-mail:wuhaoxin@sohu.com

cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in serum were detected. In addition, aorta segment was taken from the experiment animals to observe morphological changes by HE staining, measure fiber-cap thickness and vascular intima-media thickness. Western blot was used to determine the expression levels of aortic p38 mitogen activated protein kinase (p38MAPK) and extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5). **Result:** As compared with the normal group, TC, TG and LDL-C levels were significantly increased in the ApoE^{-/-} mice blank group and model group, while HDL-C level was significantly decreased ($P < 0.01$). As compared with the model group, TC, TG and LDL-C levels were decreased in the modified Buyang Huanwu Tang group and simvastatin group, while HDL-C level was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). HE staining showed no aortic plaque formation in C57BL/6J mice normal group, few aortic plaque formation and slightly increased vascular intima-media thickness in ApoE^{-/-} mice blank group, significant aortic plaque formation and increased vascular intima-media thickness in model group. As compared with the model group, aortic plaque formation and vascular intima-media thickness was reduced in both modified Buyang Huanwu Tang group and simvastatin group. The protein expression level of aortic p38MAPK in model group was higher while protein expression level of ERK5 was lower than those in C57BL/6J normal group ($P < 0.01$). In addition, the protein expression level of aortic p38MAPK was significantly decreased while the protein expression level of ERK5 was increased in both modified Buyang Huanwu Tang group and simvastatin group as compared with model group ($P < 0.01$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Both modified Buyang Huanwu Tang and simvastatin have an effect in preventing the development of atherosclerosis, and the potential mechanism could be related to intervening p38MAPK and ERK5 in MAPK signal pathway.

[**Key words**] modified Buyang Huanwu Tang; atherosclerosis; aortic; p38 mitogen activated protein kinase (p38MAPK); extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5)

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重危害人类健康的疾病。近年来,随着人民生活质量的提高,我国 AS 的发病率呈现上升趋势,用于 AS 的经济耗资越来越重。有数据显示,在 2030 年,全球预计将有 2 360 万人死于心血管相关的疾病;在 2010 年,心血管疾病及其并发症的总耗资约 3 154 亿美元^[1]。由此可见,预防 AS 发生发展药物的选择与开发、探究 AS 的防治机制,具有极其重要的意义和必要性。现代医学认为,AS 的发生发展与血脂异常、内皮细胞损伤和血管内炎症反应等有关。中医学虽无动脉粥样硬化的病名,但现今学者大多认为 AS 基本病变性质多属本虚标实,本虚为气虚,标实为血瘀。气虚血瘀是 AS 临床常见证型,因此目前临床多用益气活血法之代表方补阳还五汤治疗 AS。刘康等^[2]临床运用补阳还五汤治疗动脉粥样硬化性疾病使患者临床症状和临床检查指标均得到了改善。梁志敏等^[3]对颈动脉斑块患者的研究发现补阳还五汤具有一定的消斑作用。补阳还五汤对 AS 虽有一定疗效,但仍存在诸多不足。一方面,吴颢昕教授经过多年临床观察,发现单用补阳还五汤治疗 AS 常取效较慢,对病理产物的兼顾治疗效果有所欠佳,特别瘀血之征有时仍固着难除,标实不化病情又

容易复发,因此治疗当益气活血与祛瘀三者并重,不可偏废。观之补阳还五汤补气药的用量几乎为活血药量的 5 倍,此方虽为益气活血之代表方,但其活血之力略显薄弱。水蛭为水蛭科动物蚂蟥、水蛭或柳叶蚂蟥的干燥全体,功用破血逐瘀消癥,研究表明水蛭具有抗凝血、抗血栓、抗炎和抗纤维化等作用^[4],可用于 AS 的治疗。然水蛭破血祛瘀之力虽强而单用又常无法兼顾气虚之体,故于临证中吴颢昕教授以补阳还五汤加水蛭粉共同治疗 AS,气虚之本与血瘀之标双管齐下,常获佳效,且应用便捷;另一方面,目前大多数研究多集中于探讨中医药对 AS 的治疗作用和机制,中医药在 AS“未病先防、既病防变”学术领域在丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)家族中的研究则相对欠缺。此外,国外已陆续广泛开展 MAPK 家族中细胞外信号调节激酶 5(extracellular signal-regulated kinase 5, ERK5)信号通路在 AS 中的机制探究,如 Moonen 等^[5]研究发现内皮-间充质细胞转化有助于血管内膜增生并诱发内皮细胞向动脉粥样硬化分化,这种分化依赖于 ERK5 的调控,而中医药预防 AS 在 ERK5 方面的机制探究亦相对欠缺。因此,本实验在益气活血化痰治法的指导下,应用补阳还五汤加

水蛭粉对高脂饮食诱导建立的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(ApoE^{-/-}小鼠)AS 模型进行干预,研究其对 AS 的预防作用,并用蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测 p38MAPK, ERK5 蛋白的表达,探究补阳还五汤加味预防 AS 可能的机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 C57BL/6J 小鼠 10 只,健康雄性 ApoE^{-/-}小鼠 30 只,7~8 周龄,体重 20~30 g,购自江苏常州卡文斯实验动物有限公司,合格证号 SCXK(苏)2011-0003。于 SPF 级动物房饲养,自由饮食饮水。实验过程中依据动物医学伦理学对动物进行处置。

1.2 药物及试剂 补阳还五汤由黄芪 120 g,当归 6 g,赤芍 4.5 g,地龙 3 g,川芎 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g 组成,另水蛭粉 2 g(以上药材均购自南京中医药大学国医堂,批号分别为 160201, 160201, 160101, 151201, 160201, 151201, 151201, 160201;经南京中医药大学药学院中药鉴定教研室吴德康教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》要求)。除水蛭粉外,所有药材水煎 2 次,浓缩至含生药 2 g·mL⁻¹ 的药液,放入 -20 ℃ 的冰箱储存备用,由南京中医药大学中医脑病实验室自制。辛伐他汀片(舒降之,美国 Merck Sharp & Dohme Limited 公司,杭州默沙东制药有限公司分装,国药准字 J20130068)。磷酸盐缓冲液干粉(PBS,北京索莱宝科技有限公司,批号 P1010-2L),Heidenhain 铁苏木素染色液及伊红染色液(南京金益柏生物科技有限公司,批号分别为 JRS0364, JRS0371),RIPA 裂解液及 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天公司,批号分别为 P0013B, P0015B),蛋白酶抑制剂 Cocktail 及 p38MAPK(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 #5871S, #8690),蛋白 Marker(美国 Thermo 公司,批号 00222891),兔抗小鼠 ERK5 一抗(英国 Abcam 公司,批号 ab40809), β -微管蛋白(β -Tubulin)兔抗小鼠一抗及羊抗兔二抗(美国 Proteintech 公司,批号分别为 10094-1-AP, SA00001-2),ECL 显色液(康为世纪公司,批号 2514K)。

1.3 仪器 RE-52C 型旋转蒸发器(河南巩义予华仪器设备有限公司),cobasc 701 型罗氏全自动生化检测仪(罗氏诊断产品有限公司),ND2000 型分光光度计(美国 Thermo 公司),PowerPac 型蛋白电泳以及 Mini-PROTEAN 型转膜系统(美国 Bio-Rad 公司),2500 型凝胶成像及分析系统(上海天能科技有限公司),RM2016 型轮转式切片机(德国 Leica 公司),SL

16R 型低温超速离心机(美国 Thermo Scientific 公司),BX51 型显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动脉粥样硬化动物模型的建立 采用高脂饮食法建立动物模型。ApoE^{-/-}小鼠普通饲料适应性喂养 1 周,之后每日不限量以高脂饲料(含 1.25% 胆固醇,20% 脂肪,其余成分与普通饲料相同)喂养 8 周,共 9 周。

2.2 分组与干预 所有小鼠适应性喂养 1 周后,采用随机数表进行分配。分组及干预如下:① C57BL/6J 小鼠正常组:普通饲料 + C57BL/6J 小鼠 + 生理盐水;② ApoE^{-/-}小鼠组:普通饲料 + ApoE^{-/-}小鼠 + 生理盐水;③ 模型组:高脂饲料 + ApoE^{-/-}小鼠 + 生理盐水;④ 补阳还五汤加味组:高脂饲料 + ApoE^{-/-}小鼠 + 补阳还五汤 20 g·kg⁻¹(按小鼠 20 g,人 60 kg 的等效剂量折算,辛伐他汀组同) + 水蛭粉 0.46 g·kg⁻¹;⑤ 辛伐他汀组:高脂饲料 + ApoE^{-/-}小鼠 + 辛伐他汀 3 mg·kg⁻¹。第 4 周后,所有小鼠均在同一时刻同一环境下予以灌胃,每日 1 次,连续 5 周。

2.3 标本取材及制备 9 周后各组随机选取部分小鼠,禁食不禁水 12 h 以上,用 7.5% 水合氯醛按小鼠体重确定麻醉剂量后麻醉,开胸,经左心室注入灭菌 PBS 液冲洗,随后灌注 4% 多聚甲醛内固定,取出心脏和主动脉浸泡于 4% 多聚甲醛外固定,进行石蜡切片。其余动物处死前禁食不禁水 12 h 以上,采用眼球摘除术取血,随后开胸剪取小鼠主动脉,以灭菌 PBS 液冲洗主动脉后迅速置于液氮中冷冻,转移至 -80 ℃ 冰箱中保存,用于 p38MAPK 和 ERK5 分子蛋白的 Western blot 检测。

2.4 血脂检测 9 周后,将小鼠眼部周围毛发及胡须完全剔除,摘除眼球收集血液,采集时确保血液沿管壁顺流而下。随后置于 4 ℃,2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后吸取上层血清约 0.4 mL,用干化学法在全自动生化仪上检测血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。

2.5 病理形态学检查 剪去心脏,分离主动脉予以常规处理,脱水、浸石蜡、包埋、切片,切片厚度设置 4 μ m。苏木素-伊红(HE)染色,显微镜观察组织形态学变化。实验结果用 100 倍镜下观察,经 Image-Pro Plus 6.0 软件测定纤维帽厚度和血管内-中膜的厚度。

2.6 Western blot 检测 p38MAPK, ERK5 的表达

2.6.1 提取蛋白 取出 -80 ℃ 冰箱的血管组织,

称质量,计算并加入 RIPA, PMSF 和 Cocktail, 研碎组织, 于 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 小心吸取上清液, 经 Nanodrop 仪器测定浓度后, 加入 PBS 及 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (2 ×), 混匀, 100 °C 加热变性, 分装保存于 -80 °C 冰箱。

2.6.2 检测蛋白 依据 p38MAPK 和 ERK5 的相对分子质量选择聚丙烯酰胺凝胶 (分别为 10% 和 8% 的胶) 电泳分离蛋白质, 上样, 电泳 (电泳条件为浓缩胶 80 V, 30 min, 分离胶 100 V, 60 min), 然后转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 将 PVDF 膜放入一抗封闭缓冲液中室温摇床震荡 1 h, 分别放入加有 p38MAPK, ERK5 和 Tubulin 抗体的抗体盒中, 4 °C 过夜。缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min, 将 PVDF 膜分别放入加有羊抗兔二抗的抗体盒中, 室温孵育 1 h, 缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min, ECL 显影。采集 p38MAPK, ERK5 及 Tubulin 条带灰度值, 得到各

样本 p38MAPK, ERK5 与 Tubulin 的灰度比值。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理, 所有计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于正态分布且方差齐同的资料, 采用单向分类的方差分析; 对于非正态分布或 (和) 方差不齐的资料, 经数据转换后使方差齐性。所有检验中, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 ApoE^{-/-} 小鼠血脂 TC, TG, HDL-C, LDL-C 的影响 与 C57BL/6J 小鼠正常组比较, ApoE^{-/-} 小鼠组和模型组 TC, TG, LDL-C 均升高且 HDL-C 均降低 ($P < 0.01$); 与 ApoE^{-/-} 小鼠正常组比较, 模型组 TC, LDL-C 升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤加味组与辛伐他汀组均能降低 ApoE^{-/-} 小鼠 TC, TG, LDL-C 水平, 同时升高 HDL-C ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 补阳还五汤加味对 ApoE^{-/-} 小鼠 TC, TG, HDL-C, LDL-C 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

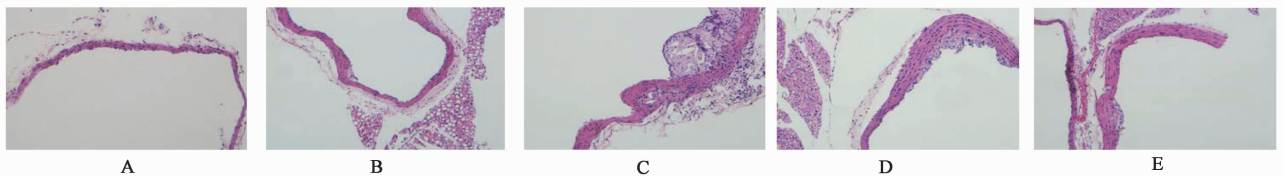
组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL-C	LDL-C
C57BL/6J 小鼠正常	-	2.34 ± 0.35	1.06 ± 0.35	2.27 ± 0.14	0.38 ± 0.11
ApoE ^{-/-} 小鼠	-	18.25 ± 1.05 ^{2,6)}	2.13 ± 0.88 ²⁾	1.58 ± 0.46 ²⁾	11.74 ± 0.35 ^{2,6)}
模型	-	20.67 ± 1.11 ^{2,4)}	2.39 ± 0.64 ²⁾	1.54 ± 0.30 ²⁾	18.04 ± 0.44 ^{2,4)}
补阳还五汤加味	20.46	17.33 ± 0.72 ⁶⁾	1.69 ± 0.39 ⁵⁾	1.99 ± 0.27 ⁵⁾	11.23 ± 0.23 ⁶⁾
辛伐他汀	0.003	14.01 ± 0.59 ⁶⁾	1.65 ± 0.49 ⁵⁾	2.35 ± 0.51 ⁶⁾	10.80 ± 0.32 ⁶⁾

注: 与 C57BL/6J 小鼠正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 ApoE^{-/-} 小鼠组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

3.2 对 ApoE^{-/-} 小鼠血管的形态学影响 C57BL/6J 小鼠正常组主动脉血管粗细均匀, 管壁细胞排列整齐, 管壁无斑块形成, 无炎症细胞浸润。ApoE^{-/-} 小鼠组主动脉血管粗细较均匀, 管壁有极少斑块形成的痕迹, 有极少量炎症细胞浸润, 内-中膜略有增厚。模型组主动脉血管各部位粗细不均, 斑块形成明显, 细胞间大量炎症细胞浸润, 组织发生炎症反应并伴有内-中膜明显增厚。补阳还五汤加味组较模型组斑块减少, 主动脉血管细胞排列较整齐, 炎症细胞浸润减轻, 内-中膜厚度减少。辛伐他汀组较模型组

斑块明显减少, 主动脉血管细胞排列较整齐, 炎症细胞浸润明显减轻, 内-中膜厚度明显减少。见图 1。

3.3 对 ApoE^{-/-} 小鼠纤维帽厚度和血管内-中膜厚度的影响 与 C57BL/6J 小鼠正常组比较, ApoE^{-/-} 小鼠组的主动脉纤维帽厚度与血管内-中膜厚度有所增厚, 但差异不具有统计学意义, 模型组小鼠主动脉纤维帽厚度和血管内-中膜厚度均有明显增厚 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 补阳还五汤加味组与辛伐他汀组小鼠的主动脉纤维帽厚度和血管内-中膜厚度均有明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。



A. C57BL/6J 小鼠正常组; B. ApoE^{-/-} 小鼠组; C. 模型组; D. 补阳还五汤加味组; E. 辛伐他汀组 (图 2, 3 同)

图 1 补阳还五汤加味对 ApoE^{-/-} 小鼠血管的形态学影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of modified Buyang Huanwu Tang on vascular morphology in ApoE^{-/-} mice (HE, ×100)

表 2 补阳还五汤加味对 ApoE^{-/-} 小鼠纤维帽厚度和血管内-中膜厚度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	纤维帽厚度	血管内-中膜厚度
C57BL/6J 小鼠正常	-	5.56 ± 2.91	81.58 ± 10.78
ApoE ^{-/-} 小鼠	-	8.48 ± 2.51	87.14 ± 10.35
模型	-	9.88 ± 6.92 ¹⁾	92.24 ± 12.03 ¹⁾
补阳还五汤加味	20.46	6.24 ± 3.08 ⁵⁾	74.00 ± 13.95 ⁶⁾
辛伐他汀	0.003	5.93 ± 2.56 ⁵⁾	72.30 ± 10.38 ⁶⁾

3.4 免疫印迹法检测补阳还五汤加味对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 p38MAPK, ERK5 的表达

3.4.1 p38MAPK 蛋白表达情况 与 C57BL/6J 小鼠正常组比较, ApoE^{-/-} 小鼠组中 p38MAPK 的蛋白表达量有所增多, 但不具有统计学意义, 模型组主动脉组织中 p38MAPK 的蛋白表达量明显增多 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤加味组和辛伐他汀组均能降低 p38MAPK 蛋白的表达量 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 3。

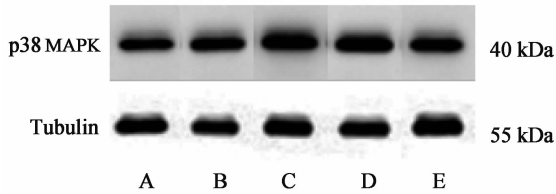


图 2 补阳还五汤加味对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 p38MAPK 表达水平的影响

Fig. 2 Effect of modified Buyang Huanwu Tang on expression level of aortic p38MAPK in ApoE^{-/-} mice

表 3 补阳还五汤加味对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 p38MAPK, ERK5 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of modified Buyang Huanwu Tang on expression level of aortic p38MAPK and ERK5 in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p38MAPK/Tubulin	ERK5/Tubulin
C57BL/6J 小鼠正常	-	0.194 ± 0.027	0.609 ± 0.026
ApoE ^{-/-} 小鼠	-	0.227 ± 0.024	0.553 ± 0.049
模型	-	0.355 ± 0.063 ²⁾	0.341 ± 0.078 ²⁾
补阳还五汤加味	20.46	0.263 ± 0.033 ⁶⁾	0.567 ± 0.024 ⁶⁾
辛伐他汀	0.003	0.261 ± 0.030 ⁶⁾	0.574 ± 0.051 ⁶⁾

下有脂质沉着(主要是胆固醇及胆固醇脂), 同时伴有中层平滑肌细胞移行至内膜下增生, 使内膜增厚, 形成黄色或灰黄色状如粥样物质的斑块^[6]。早在 1986 年, Ross 教授^[7]明确提出 AS 是一种炎症性疾病, 是对损伤的一种过度防御反应。AS 的发生过程主要表现为血管壁的炎症^[8], 其中斑块的主要病理特征表现在脂质核心的大小、纤维帽厚薄和炎性细胞的浸润程度。脂质核心的形成则与脂质摄取的增加、脂质的分解和清除的下降导致的血脂异常有关。

3.4.2 ERK5 蛋白表达情况 与 C57BL/6J 小鼠正常组比较, ApoE^{-/-} 小鼠组中主动脉 ERK5 的蛋白表达量有所减少, 但不具有统计学意义, 模型组主动脉组织中 ERK5 的蛋白表达量明显减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤加味组和辛伐他汀组均能增加组织中 ERK5 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 3。

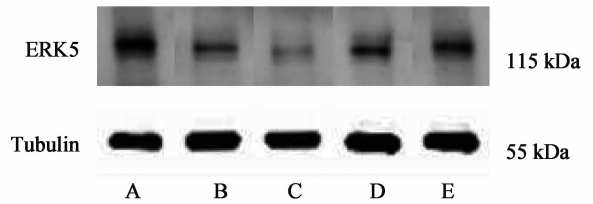


图 3 补阳还五汤加味对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 ERK5 表达水平的影响

Fig. 3 Effect of modified Buyang Huanwu Tang on expression level of aortic ERK5 in ApoE^{-/-} mice

4 讨论

AS 是指在动脉及其分支的动脉壁内膜及内膜

此外, 脂质核心的大小与斑块内局部炎症反应的程度又有一定相关性。流行病学资料提示, 血清胆固醇水平的升高与 AS 的发生呈正相关, 高血脂成为了 AS 的始动因素^[9]。MAPK 信号通路是哺乳动物内广泛存在的一类丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 是参与炎症病理反应调节的重要信号通路。目前在哺乳动物细胞中已经鉴定了 4 条 MAPK 信号转导通路: ERK1/2 通路, c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK, 包括 JNK1/2/3) 通路, p38MAPK (包括

p38 α , p38 β , p38 γ 和 p38 δ) 通路, ERK5 通路。p38 是 MAPK 家族控制炎症反应重要的成员。有研究发现, p38MAPK 抑制剂可减轻球囊损伤后大鼠颈动脉新生内膜的形成^[10]。ERK5 信号通路亦是细胞内重要的信号通路, 它在个体生长发育以及疾病的发生发展中起着重要的桥梁作用, Regan 等^[11] 研究发现, ERK5 缺陷小鼠模型可形成复杂的血管并且出现胚胎心血管发育迟缓, 表明 ERK5 在心血管形成中起着极其重要的作用。然而, 由于 ERK5 信号通路是 MAPK 信号通路中最晚发现的, 目前对 ERK5 信号通路的研究较少, 特别是中医药在 AS 中对 ERK5 信号通路的研究少有开展。

3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂已被确定为高胆固醇血症的首选药物^[12]。辛伐他汀是 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 它具有减轻动脉粥样硬化^[13]、稳定斑块、减少心血管事件的作用^[14], 是公认推荐的降脂药物^[15]。此外, 临床实践已证明辛伐他汀不良反应相对较少, 长期应用耐受性良好, 具有较好的治疗成本效益比。据此, 本实验选用辛伐他汀为阳性药物。补阳还五汤出自王清任之《医林改错》, 功用益气活血通络, 为益气活血代表方。方中重用生黄芪补益元气, 意在气旺则血行, 瘀去络通, 瘀消而不伤正, 为君药。配以当归活血和血通络, 且有化瘀不伤血之妙, 是为臣药。川芎、赤芍、桃仁、红花助归活血祛瘀通络; 地龙通经活络, 力专善走, 周行全身, 以行药力, 均为佐药。但从剂量上看, 其活血药物的运用略显力薄。针对 AS 的中医药治疗, 现代医家大多认为气虚血瘀是 AS 的重要病机, 遂以益气活血之补阳还五汤方治疗最为切合。然而, 吴颢昕教授于多年临证中除了应用补阳还五汤外, 还认为 AS 的病理应当重视血瘀。AS 的病理产物瘀血较为固着难除, 应用一般的活血化瘀药见效较慢, 有甚者难以破除此陈年痼疾, 因此治疗亦当加以虫类活血祛瘀破瘀之药, 搜刮经络之瘀血。张锡纯在《医学衷中参西录》中谓: 水蛭“其原为噬血之物, 故善破血…但破瘀血而不伤新血。”其不伤新血之特性亦可兼顾 AS 正虚之体; 现代研究表明水蛭具有抗凝血、抗血栓、抗炎和抗纤维化等作用^[4], 因此选择加水蛭应用于 AS 的临床防治, 用药精简力专。吴颢昕教授临证将水蛭研粉装胶囊吞服防治 AS, 效果较入水煎剂更佳、起效更速、口感更适。因此导师临床常采用补阳还五汤加水蛭粉, 益气活血祛瘀三者并重治疗 AS, 常收到满意疗效。

目前的实验研究和临床资料表明高脂血症是

形成动脉粥样硬化的重要危险因素之一, 所以高脂血症是大多数动脉粥样硬化模型的基础。但小鼠的脂质处理系统与人类完全不同, 不易形成高脂血症, 一般情况下很难发生动脉粥样硬化。ApoE 在脂蛋白代谢中起着重要的作用, 由于介导含有 ApoE 的脂蛋白可与细胞表面的低密度脂蛋白受体或者残余乳糜微粒的受体高亲和力结合, 因此 ApoE 在把血液中胆固醇运送至肝脏代谢清除的过程中扮演重要角色; 此外, ApoE 还具有抑制低密度脂蛋白氧化, 阻止血小板聚集, 减少血管平滑肌细胞增殖, 抑制血管内皮细胞增殖等作用。如今通常采用 C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞同源重组的方法构建 ApoE^{-/-} 小鼠, 建立人类脂质代谢紊乱和动脉粥样硬化的疾病模型, 高脂饮食则能够加快小鼠动脉粥样硬化病变的进展^[16]。因而 ApoE^{-/-} 小鼠已成为研究 AS 的重要模型。本实验中, 通过 9 周的饲养, 在血脂方面, C57BL/6J 小鼠正常组各项指标均正常, 而模型组出现了明显的增高或降低; 病理学观察结果直观地体现出模型组动脉粥样硬化斑块和组织炎症浸润程度的异常。据此, 本实验基于高脂饮食建立的 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型研究补阳还五汤加味在动脉粥样硬化形成过程中的预防作用, 并以 MAPK 信号通路中的 p38MAPK, ERK5 信号通路为靶点, 研究补阳还五汤加味对 p38MAPK 的调节机制, 探究其在 ERK5 信号通路的作用。

本实验结果表明, 补阳还五汤加味可降低高脂饮食诱导 AS 的 ApoE^{-/-} 小鼠 TC, TG, LDL-C 水平, 同时升高 HDL-C, 提示补阳还五汤加味可能通过对血脂异常的改善, 降低脂质核心大小, 从而减少斑块的形成。此外, 病理学观察结果显示, 补阳还五汤加味能够减少动脉粥样硬化斑块大小和组织炎症浸润程度。补阳还五汤加味可减少 ApoE^{-/-} 小鼠病变主动脉的炎症浸润和纤维帽厚度及血管内-中膜厚度, 表明补阳还五汤加味一方面减少了病变组织的炎症浸润, 另一方面对血管形态学功能有一定的改善作用。对其可能的机制进行探究, 本实验通过 Western blot 发现, 与 C57BL/6J 小鼠正常组比较, ApoE^{-/-} 小鼠组的 p38MAPK 和 ERK5 蛋白水平没有变化, 说明 ApoE^{-/-} 小鼠本身没有因载脂蛋白 E 基因的敲除而对 p38MAPK 和 ERK5 蛋白表达产生影响; 与模型组比较, 补阳还五汤加味组的 p38MAPK 蛋白表达水平明显减少。p38 在炎症反应中承担重要角色, 它可因生理性应激、脂多糖、渗透性应激和紫外线照射而激活。补阳还五汤加味可能通过

p38MAPK 途径抑制 p38 的激活,减少血管组织炎症浸润、降低斑块内炎症反应程度,表明补阳还五汤加味可能通过抗炎反应减少组织炎症浸润,从而减少斑块大小。在本次实验中,与 C57BL/6J 小鼠正常组比较,模型组主动脉 ERK5 蛋白的表达水平明显减少;与模型组比较,补阳还五汤加味组小鼠主动脉 ERK5 蛋白表达水平明显升高。细胞外信号调节激酶 5 (MEK5) 是目前 ERK5 唯一的上游激酶,MEK5 对 ERK5 有高度特异性,它不会引起 MAPK 家族的其他成员激活^[17]。大 MAPK 通路 (BMK1) 基因敲除鼠会陷于胚胎早期致命性伤害,说明 ERK5 具有保护内皮细胞和维持血管形态的功能^[18],而 ERK5 缺陷小鼠模型可形成复杂的血管并且出现胚胎心血管发育迟缓,ERK5 的缺失会进一步加重重管系统中平滑肌细胞的损伤^[10]。本实验说明了补阳还五汤加味预防 AS 的另一条途径可能是于 ERK5 信号通路途径上调 ERK5 蛋白的表达,一方面通过 ERK5 保护血管内皮细胞的作用,协同 p38MAPK 的直接抗炎作用,共同减少炎症因子对血管的损害,防止 AS 的病理进程;另一方面,通过 ERK5 在血管发育中维护其正常形态学功能,减少血管组织厚度的变化,保护 AS 发生发展过程中对血管的改变。

综上所述,补阳还五汤加味可降低高脂饮食诱导 AS 的 ApoE^{-/-} 小鼠 TC, TG, LDL-C 水平,同时升高 HDL-C,减少 ApoE^{-/-} 小鼠病变主动脉的炎症浸润和纤维帽厚度及血管内-中膜厚度,并降低小鼠主动脉 p38MAPK 蛋白表达水平,升高小鼠主动脉 ERK5 蛋白表达。通过本次实验推测补阳还五汤加味一方面可能通过改善血脂的作用,减少脂质核心和斑块的大小;另一方面可能通过 MAPK 信号通路中的 p38MAPK, ERK5 途径对动脉粥样硬化病变血管发挥抗炎和血管内皮保护作用以及维持在 AS 中血管发育的正常功能,从而预防 AS 的发生发展,为补阳还五汤加味预防 AS 提供了新思路、新靶点、新方向。但阐明补阳还五汤加味在 p38MAPK, ERK5 途径中具体的分子机制,仍需进一步深入研究完善。

[参考文献]

[1] Go A S, Mozaffarian D, Roger V L, et al. Heart disease and stroke statistics-2014 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2014, 129 (3): 399-410.
[2] 刘康,范小宇. 浅谈补阳还五汤治疗冠心病的临床体会[J]. *光明中医*, 2011, 26(10): 2100-2102.
[3] 梁志敏,杨以超,杨柳,等. 高频彩超对补阳还五汤治疗颈动脉斑块的疗效观察[J]. *中国医学创新*, 2010, 7(23): 25-27.

[4] 袁红霞,张莉芹,马瑾,等. 水蛭药用成分及主要药理功效研究进展[J]. *甘肃医药*, 2013, 32(4): 270-273.
[5] Moonen J R, Lee E S, Schmidt M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to fibro-proliferative vascular disease and is modulated by fluid shear stress [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 108(3): 377-386.
[6] 王浩然,于春江. 动脉粥样硬化发生机制及治疗药物的研究进展[J]. *首都医科大学学报*, 2010, 31(6): 828-833.
[7] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update [J]. *New Engl J Med*, 1986, 314(8): 488-500.
[8] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2015, 36(2): 141-152.
[9] Skålén K, Gustafsson M, Rydberg E K, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, 417(6890): 750-754.
[10] López-Franco O, Hernández-Vargas P, Ortiz-Muñoz G, et al. Parthenolide modulates the NF-κB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(8): 1864-1870.
[11] Regan C P, Li W, Boucher D M, et al. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(14): 9248-9253.
[12] 方圻,王钟林,宁田海,等. 血脂异常防治建议[J]. *中华心血管病杂志*, 1997, 25(3): 169-172.
[13] 孙晓,佟浩,张曼,等. 瑞舒伐他汀和辛伐他汀对急性冠脉综合征颈动脉内中膜厚度影响对比研究[J]. *中国实用内科杂志*, 2012, 32(6): 452-454.
[14] 李京晔,赵玉兰,董静. 辛伐他汀对动脉粥样硬化大鼠内脏脂肪组织中内脂素及瘦素 mRNA 表达的影响[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2012, 47(4): 518-521.
[15] Ray K K, Kastelein J J, Boekholdt S M, et al. The ACC/AHA 2013 guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults: the good the bad and the uncertain: a comparison with ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias 2011 [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(15): 960-968.
[16] Coleman R, Hayek T, Keidar S, et al. A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice [J]. *Acta Histochemica*, 2006, 108(6): 415-424.
[17] 盛晓赞,夏亚一. MAPK 家族 ERK5 信号通路的研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 18(19): 3145-3147.
[18] Hayashi M, Lee J D. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice [J]. *J Mol Med*, 2004, 82(12): 800-808.

[责任编辑 周冰冰]