

· 药理 ·

连豆清脉颗粒对日本大耳白兔 AS 斑块的 干预作用及对 PARP-1 的影响

朱红俊, 陆曙*, 苏伟, 龚少愚

(南京中医药大学 无锡附属医院, 江苏 无锡 214071)

[摘要] **目的:**研究连豆清脉颗粒对日本大耳白兔动脉粥样硬化(AS)斑块的干预作用及多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶-1 (poly adenosine diphosphate ribose polymerase-1, PARP-1)的影响。**方法:**取健康清洁级雄性日本大耳白兔 40 只,随机抽取 8 只日本大耳白兔为空白组,以标准饲料喂养。其余 32 只日本大耳白兔采用高脂饲料喂养及牛血清白蛋白静脉注射建立 AS 斑块模型,成功建模的兔按照随机数字表,随机分成高脂组 11 只(实验过程中死亡 2 只)、连豆清脉方组 8 只,辛伐他汀组 8 只,分别予以高脂、连豆清脉方药物、辛伐他汀药物饲料喂养,给药剂量为辛伐他汀 $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,连豆清脉方 $3.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,8 周后,检测兔 AS 斑块面积,PARP-1 阳性表达及 Toll 样受体-4 (Toll like receptor-4, TLR-4) mRNA,核转录因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B),血清白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平。**结果:**空白组没有出现 AS 斑块,连豆清脉方组 AS 斑块明显,但是明显低于高脂组;与空白组比较,连豆清脉方组主动脉 AS 斑块面积比例,组织 PARP-1 阳性细胞表达率,TLR-4 mRNA 表达, NF- κ B 及 IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.01$)。与高脂组比较,连豆清脉方组主动脉 AS 斑块面积比例,组织 PARP-1 阳性细胞表达率,TLR-4 mRNA 表达, NF- κ B 及 IL-6 水平显著下降 ($P < 0.01$)。**结论:**连豆清脉方可抑制 AS 斑块的增生;其机制可能与抑制 PARP-1 表达等炎症反应有关。

[关键词] 动脉粥样硬化斑块; 连豆清脉颗粒; 多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶-1; Toll 样受体-4 mRNA; 核转录因子- κ B; 白细胞介素-6

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0129-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190129

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170629.0901.004.html>

[网络出版时间] 2017-06-29 9:01

Effect of Liandou Qingmai Recipe on Atherosclerosis Plaques of Rabbit and PARP-1

ZHU Hong-jun, LU Shu*, SU Wei, GONG Shao-yu

(Wuxi Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Wuxi 214071, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Liandou Qingmai recipe on atherosclerosis (AS) plaques of Japanese rabbits and poly adenosine diphosphate ribose polymerase-1 (PARP-1). **Method:** Totally 40 healthy male Japanese white rabbits were randomly divided into two groups. Among them, 8 rabbits were randomly selected into blank group (Bg). The remaining 32 rabbits, according to the literature method, were selected to establish AS plaque model through feeding high fat diet and intravenous injection with bovine serum albumin. Finally, 27 rabbits were successfully modeled and randomly divided into 3 groups: high-fat group included 11 rats (2 rats died during the experiment, HFg), Liandou Qingmai recipe treatment group (LTg) included 8 rats, and simvastatin treatment

[收稿日期] 20170102(004)

[基金项目] 江苏省中医药管理局项目(HZ07097);无锡市医院管理中心医学科研项目(YGZX14043)

[第一作者] 朱红俊,博士,副主任中医师,从事心血管病中西医结合防治研究, Tel:0510-88859999

[通讯作者] *陆曙,博士,博士生导师,主任中医师,从事心血管病中西医结合防治研究, E-mail:z7h6j@163.com

group (STg) included 8 rats, which were given high-fat diet, Liandou Qingman recipe drug diet, simvastatin diet respectively, with the doses of $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for simvastatin, and $3.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for Liandou Qingman recipe. After 8 weeks, AS plaques, PARP-1 positive expression, Toll like receptor-4 (TLR-4) mRNA expression, nuclear factor-kappa B (NF- κ B), serum interleukin-6 (IL-6) were detected. **Result:** The Bg did not appear AS plaque. The LTg's AS plaque significantly lower than that of the high-fat group. Compared with the Bg, the LTg's AS plaque area, aortic and tissue expressions of PARP-1 and TL-4 mRNA, levels of NF- κ B and IL-6 increased. But compared with the HFg, the LTg's figures decreased. The differences were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** Liandou Qingmai recipe can inhibit the proliferation of AS plaque; the mechanism may be related to inhibition of the expression of PARP-1 and other inflammatory reactions.

[**Key words**] atherosclerosis; Liandou Qingmai recipe; poly adenosine diphosphate ribose polymerase-1; Toll like receptor-4; nuclear factor-kappa B; interleukin-6

多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)广泛参与动脉粥样硬化(AS),心肌梗死,心力衰竭等心血管疾病的发生和发展,在 DNA 的损伤修复,DNA 复制,细胞增殖分化调控,细胞凋亡,基因组的稳定方面发挥着重要的作用^[1]。PARP 抑制剂可以减少糖尿病患者的缺血心肌细胞的坏死和凋亡^[2]。在 AS 致病机制中,PARP 起着重要的作用^[3]。PARP 可促进核转录因子- κ B(NF- κ B)从细胞浆向细胞核内的转移,促进炎症因子表达,从而促进 AS 斑块发展^[4-5]。研究证实,通过抑制 PARP 表达,可以抑制 AS 的进展。对于糖尿病大鼠,应用艾塞那肽可以部分通过抑制聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 1 途径,减少 AS 斑块的面积,增加斑块的稳定性^[6]。目前国内有关 PARP 与 AS 方面的研究尚比较少。PARP 促进 AS 的发展和炎症反应机制有关。中医药干预 AS 炎症反应的机制已经被许多研究所证实。采用中药提取剂物如桑色素,可以下调脑缺血再灌注损伤大鼠 PARP 和 NF- κ B 表达而抑制炎症反应,保护脑细胞^[7]。本研究采用中药复方连豆清脉方治疗 AS 患者,可降低冠心病患者 C 反应蛋白,白细胞介素-6(IL-6)等炎症指标^[8-9],降低大鼠 NF- κ B, Toll 样受体-4(TLR-4) mRNA 等表达;且抑制 PARP-1 等表达可以预防 SD 大鼠 AS 斑块的形成^[10]。但已经形成 AS 斑块的动物模型能否通过抑制 PARP 等表达抑制炎症反应,达到干预 AS 斑块的作用尚不清楚。

本研究通过建立清洁级雄性日本大耳白兔 AS 斑块模型,采用连豆清脉方对已经形成的 AS 斑块的干预作用,观察其对 AS 斑块面积,PARP-1 阳性表达及 TLR-4 mRNA, NF- κ B, IL-6 水平的影响;探讨连豆清脉方对 AS 斑块的治疗作用及机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性日本大耳白兔 40 只,体重

2.0 ~ 2.5 kg,月龄 3 ~ 4 月。由南京医科大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(苏)2010-0007,该实验经南京中医药大学无锡附属医院实验动物伦理委员会审核通过,符合实验动物伦理学指导原则。

1.2 药物及试剂 连豆清脉颗粒(连翘 15 g,黄连 3 g,野料豆 15 g,牡丹皮 10 g,知母 10 g,赤芍 10 g,莱菔子 10 g 等,江阴天江药业有限公司,批号 20120412);辛伐他汀(舒降之,杭州默沙制药有限公司,批号 09470);牛血清白蛋白(美国 Sigma 公司,批号 A3912);胆固醇(加拿大 BBI 公司,批号 1229S11);蛋黄粉(安徽省亳州市众意蛋业有限公司,批号 20120426);氨基甲酸乙酯(乌拉坦,中国国药化学试剂公司,批号 T20110915);IL-6, NF- κ B 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(Blue Gene 公司,批号分别为 E02I0006, E02N0011); anti-PARP-1 antibody(美国 Abcam 公司,批号 AB6079); SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II 试剂盒(日本 Takara 公司,批号 DRR083S); trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 15596026); 3 s 柱式细胞和组织总 RNA 抽提试剂盒(上海博彩生物科技有限公司,批号 K362);引物序列由上海博彩生物科技有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
TLR-4	上游 5'-GAACTTCTAAACCACTCAGCCCTTG-3' 下游 5'-GAGCACCTGGACCTTTCAAATAAC-3'	235
GAPDH	上游 5'-CATCATCCCTGCCTCCACT-3' 下游 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTT-3'	180

1.3 仪器 SHH-W21 型电热恒温水箱(上海跃进医疗器械有限公司);micro 200R 型冷冻高速离心机(日本 Hettich 公司);ix51 型光学显微镜, pm-20 型自动显微摄影系统(日本 Olympus 公司);ELX800

型酶标仪(美国 Biotek 公司);LightCycler480 型 PCR 扩增仪(德国 Roche 公司);Image-Pro Plus Version 6.0 病理图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司)。

2 方法

2.1 建模^[11]与分组 日本大耳白兔 40 只,适应性喂养 1 周。随机抽取 8 只(空白组),采用标准饲料喂养。将剩下的 32 只日本大耳白兔建立 AS 模型,采用高脂饲料(88% 标准饲料,2% 胆固醇,5% 猪油,5% 蛋黄粉^[11])喂养,并予牛血清白蛋白 250 mg·kg⁻¹于建模开始当日 1 次静脉注射。8 周后随机抽取 2 只日本大耳白兔(模型组),取主动脉壁见 AS 斑块形成,确认建模成功。剩下 27 只 AS 模型兔(建模过程中死亡 3 只)随机分为 3 组,连豆清脉方组 8 只,用含连豆清脉方的高脂饲料喂养;辛伐他汀组 8 只,用含辛伐他汀的高脂饲料喂养;高脂组 11 只,用高脂饲料喂养。连续喂养 8 周后取材检测。给药剂量按动物体表面积比率换算等效剂量法^[12],辛伐他汀 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹,连豆清脉方 3.7 g·kg⁻¹·d⁻¹。

2.2 样本采集 采用乌拉坦腹腔注射麻醉,采集腹主动脉血液样本;组织样本选取左心室(保留冠状动脉)及大动脉(升主动脉、主动脉弓、降主动脉),甲醛固定,血清置于 -80 ℃ 保存。10% 甲醛固定的大血管、左心室组织进行包埋、切片。

2.3 HE 染色检测病理学改变 石蜡切片 HE 染色,显微镜下测定 AS 斑块面积和主动脉管腔横截面积,并计算 AS 斑块面积比例,取 5 张连续切片中的最大值为测量值。

2.4 免疫组化检测相关蛋白表达 左心室及主动脉组织石蜡切片,参考文献[13],采用 ElivisionTM 染色法切片脱蜡至水,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,抗

原修复,过氧化氢孵育,加抗 PARP-1 多克隆抗体(1:200)4 ℃ 过夜。PBS 冲洗;按试剂盒说明书依次加二抗,DAB 显色,复染,常规脱水、透明、封片、镜下观察、照相。每个标本随机观察相互不重叠的视野各 4 个,取平均值。

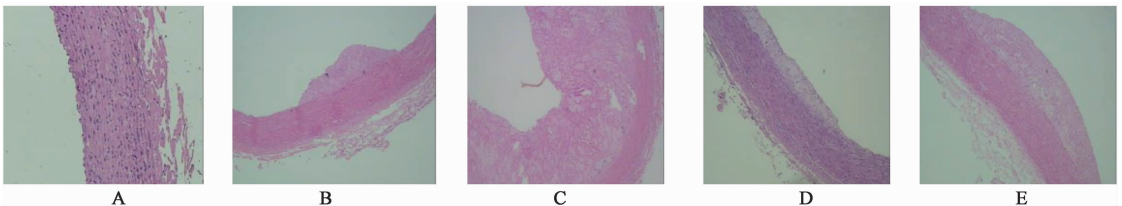
2.5 实时荧光定量 PCR 检测 TLR-4 mRNA 表达 液氮保护下,根据试剂说明书,采用 invitrogen trizol 制备组织匀浆,提取组织 RNA。根据文献[14]检测方法进行。cDNA 合成条件:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s;PCR 循环条件:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火/延伸 20 s,共 40 个循环。通过溶解曲线,2% 琼脂糖凝胶电泳和基因测序确定产物表达的准确性,TLR-4 mRNA 的表达程度采用相对定量计算,标准化比值计算公式采用 2^{-ΔΔCt}法^[15],以空白兔组为标准,采用 GAPDH 作为内参。

2.6 ELISA 检测组织 NF-κB 及血清 IL-6 水平 液氮保护下,制备组织匀浆,并分离血清。加样顺序及检测流程严格按照试剂说明书进行。在波长 450 nm 处检测吸光度 A,计算 NF-κB,IL-6 水平。

2.7 统计学方法 所有数据采用 SPSS 22.0 软件包进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;疗效分析多组间整体比较采用单因素方差分析;组内两两比较采用最小显著差数法(LSD)分析。以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 连豆清脉方对兔主动脉 AS 斑块的影响 空白组主动脉动脉结构完整,层次清晰,没有 AS 斑块形成。模型组主动脉内膜增厚,形成明显的 AS 斑块。高脂组主动脉内膜明显增厚,结构紊乱,形成明显的大片 AS 斑块。与高脂组比较,连豆清脉方组、辛伐他汀组 AS 斑块程度明显减轻。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 高脂组;D. 连豆清脉组;E. 辛伐他汀组(图 2,3 同)

图 1 连豆清脉方对兔主动脉 AS 斑块的影响(HE, ×100)

Fig.1 Effect of Lian Dou Qing Mai recipe on AS plaque of rabbits' aortic pathology(HE, ×100)

3.2 连豆清脉方对 PARP-1 蛋白表达的影响 左室组织、主动脉内膜组织中,空白组偶见黄褐色的 PARP-1 阳性细胞表达,模型组则可见 PARP-1 阳性细胞散在表达。高脂组 PARP-1 阳性细胞表达

明显,部分区域呈带状分布。与高脂组比较,连豆清脉方组、辛伐他汀组的黄褐色 PARP-1 阳性细胞表达明显降低。见图 2。

3.3 连豆清脉方对 TLR-4 mRNA 的影响 TLR-4

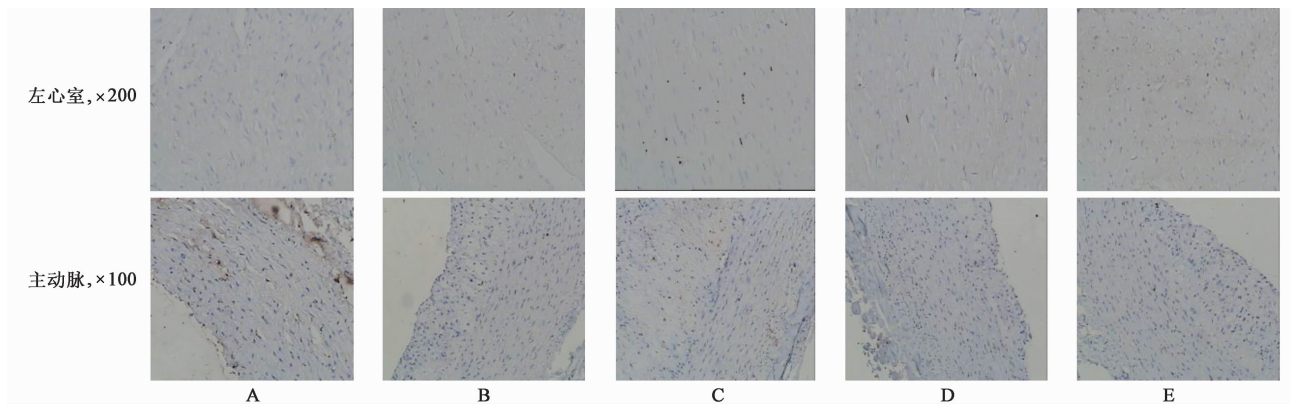


图 2 连豆清脉方对兔 PARP-1 蛋白表达的影响(免疫组化)

Fig. 2 Effect of Liandou Qingmai recipe on PARP-1 expression of rabbits(immunohistochemistry)

mRNA 凝胶电泳测定显示,模型组、空白组、高脂组、连豆清脉方组及辛伐他汀组各组测定的表达产物大小和引物扩增片段完全一致。见图 3。

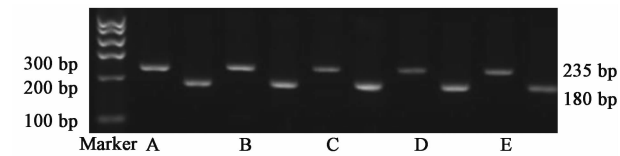


图 3 连豆清脉方对兔 TLR-4 mRNA 表达电泳的影响

Fig. 3 Effect of Liandou Qingmai recipe on TLR-4 mRNA gel electrophoresis

3.4 连豆清脉方对 TLR-4 mRNA TA 克隆测序的影响 TA 克隆测序证明实验表达产物序列和引物序列完全一致。见图 4。

3.5 连豆清脉方对 AS 斑块面积, PARP-1 阳性

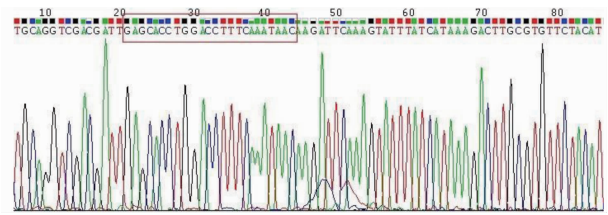


图 4 日本大耳白兔 TLR-4 mRNA TA 克隆测序

Fig. 4 TA clone sequencing of Japanese white rabbits' TLR-4 mRNA

细胞, TLR-4 mRNA 表达及 NF- κ B, IL-6 水平的影响与空白组比较, 高脂组、连豆清脉方组、辛伐他汀组 AS 斑块面积均显著增加 ($P < 0.01$)。与高脂组比较, 连豆清脉方组 AS 斑块面积, PARP-1 阳性细胞表达率, TLR-4 mRNA 表达及 NF- κ B, IL-6 水平均显著下降 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 连豆清脉方对兔 AS 斑块面积, PARP-1 阳性细胞, TLR-4 mRNA 表达及 NF- κ B, IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Liandou Qingmai recipe on AS plaque area, expressions of PARP-1, TLR-4 mRNA, levels of NF- κ B, IL-6 in rabbits ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	斑块面积比/%	阳性细胞表达率		TLR-4 mRNA	NF- κ B/ng·L ⁻¹	IL-6/ μ g·L ⁻¹
				左心室	主动脉			
空白	9	-	0.00 \pm 0.00	1.13 \pm 0.88	0.76 \pm 0.50	1.00 \pm 0.00	28.96 \pm 10.39	43.18 \pm 3.42
高脂	9	-	53.28 \pm 8.77 ¹⁾	4.11 \pm 1.76 ¹⁾	9.22 \pm 2.82 ¹⁾	2.99 \pm 1.95 ¹⁾	68.56 \pm 13.32 ¹⁾	79.11 \pm 7.31 ¹⁾
连豆清脉方	8	3.7	21.99 \pm 16.55 ^{1,2)}	2.13 \pm 1.25 ^{1,2)}	1.88 \pm 0.83 ^{1,2)}	0.77 \pm 0.53 ^{1,2)}	33.73 \pm 8.21 ^{1,2)}	54.97 \pm 4.24 ^{1,2)}
辛伐他汀	8	0.001	27.80 \pm 14.22 ^{1,2)}	2.75 \pm 1.58 ^{1,2)}	2.13 \pm 0.53 ^{1,2)}	0.92 \pm 0.50 ^{1,2)}	39.01 \pm 13.27 ^{1,2)}	53.00 \pm 3.44 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与高脂组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

中医药在治疗 AS 方面具有良好效果, 相关研究证实, 丹参与川芎均可明显减小动脉硬化灶面积, 并抑制血栓形成^[16]。芪丹煎可抑制动脉粥样硬化斑块的形成, 其作用机制和调节 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)/Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 表达有关^[17]。从滋肾养肝、化痰消瘀法组方, 可减轻人颈部 AS 斑块^[18]。因此, 采用中医药干预 AS 斑块具有坚实的

理论、实验和临床基础。本课题组前期研究已经证实, 连豆清脉方可预防 SD 大鼠 AS 斑块的形成^[10]。本文研究结果进一步证实, 连豆清脉方对日本大耳白兔 AS 斑块发展也具有良好地抑制作用。

相关研究证实, PARP 可以通过促进 NF- κ B 从细胞浆向细胞核内的转移, 促进炎症因子表达, 从而促进 AS 斑块发展^[5]。本文结果显示, 通过高脂饲料喂养和牛血清白蛋白注射, 可以使得日本大耳

白兔的主动脉形成明显的粥样斑块。且随着 AS 斑块发展, PARP-1 表达相应增高, 提示了 PARP-1 表达程度和 AS 斑块严重程度的相关性。同时, 本研究也提示, PARP-1 表达增高时, 组织中 TLR-4 mRNA 表达和 NF- κ B 水平增高, 血清中 IL-6 水平相应增加, 证实了 PARP-1 促进 AS 斑块发展的机制和调节 NF- κ B, IL-6 等炎症因子有关, 且调节 NF- κ B 的机制和 TLR-4 mRNA 表达有密切关系。

本研究中, 连豆清脉方组 AS 斑块面积明显低于高脂组, 充分说明了连豆清脉方对 AS 斑块增殖的抑制作用。在对 PARP-1 阳性细胞表达的干预方面, 本实验结果显示, 连豆清脉方组左心室组织及主动脉组织的 PARP-1 阳性细胞表达均明显低于高脂组, 连豆清脉方组 TLR-4 mRNA 表达, NF- κ B 水平和血清 IL-6 水平也明显低于高脂组。说明连豆清脉方抑制 AS 斑块增殖, 其作用机制和抑制 PARP-1 表达, 从而干预 TLR-4 mRNA 表达和 NF- κ B 水平, 降低血清中 IL-6 炎症因子水平有密切关系。这与本课题组前期临床研究连豆清脉方降低冠心病患者的血清 IL-6, IL-10, 高敏 C 反应蛋白浓度, 改善冠心病患者的生存质量^[19-20], 可以抑制 NF- κ B 炎症信号通路, 预防大鼠 AS 形成的研究结果相一致。

连豆清脉方含连翘、黄连、野料豆、赤芍等药物, 其中黄连的提取物有助于稳定 ApoE 基因敲除小鼠易损斑块, 显著减少主动脉粥样斑块破裂次数^[21]。这也部分提示了连豆清脉方抑制 PARP-1 表达, 从而干预 NF- κ B 炎症信号通路, 抑制 AS 斑块增殖, 但具体有效成分尚待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Gero D, Szabó C. Poly (ADP-ribose) polymerase: a new therapeutic target [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2008, 21(2):111.

[2] Chowdhry M F, Vohra H A, Galifianes M. Diabetes increases apoptosis and necrosis in both ischemic and nonischemic human myocardium: role of caspases and poly adenosine diphosphate ribose polymerase [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 134(1):124-131.

[3] 霍清伟, 李东风, 龙程. 多聚二磷酸腺苷聚合酶 1 与动脉粥样硬化[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(5):423-428.

[4] 魏述建, 王白璐, 陈玉国, 等. 多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶在心血管疾病中的研究进展[J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 39(1):91-93.

[5] Kraus W L, Lis J T. PARP goes transcription[J]. *Cell*, 2003, 113(6):677-683.

[6] 张津晶, 季晓平, 张运, 等. 艾塞那肽部分通过抑制聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 1 途径延缓糖尿病动脉粥样

硬化的发展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(4):335-341.

[7] 王莹, 丁利, 李文媛, 等. 桑色素对脑缺血再灌注损伤大鼠多聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶和核因子- κ B 表达的影响[J]. *安徽中医学院学报*, 2012, 31(1):43-47.

[8] 朱红俊, 陆曙, 苏伟, 等. 连豆清脉方对冠心病患者血浆致动脉粥样硬化指数及高敏 C 反应蛋白的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(4):361-364.

[9] ZHU H J, LU S, SU W, et al. Effects of Liandou Qingmai recipe on endothelin-1, nitric oxide, interleukin-6 and interleukin-10 levels in patients with coronary heart disease[J]. *J Tradit Chin Med*, 2011, 31(3):173-177.

[10] 朱红俊, 陆曙, 苏伟, 等. 连豆清脉方对 SD 大鼠动脉粥样硬化形成的预防作用及 NF- κ B 信号通路的影响[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(4):601-605.

[11] 李琳, 窦健霖, 楚天舒, 等. 高脂饲料喂养加静脉注射小牛血清白蛋白建立兔动脉粥样硬化模型[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(20):3691-3693.

[12] 陈奇. *中药药理研究方法学*[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010:520.

[13] 郭闯, 张宇新, 刘学均, 等. 大鼠视网膜缺血再灌注后多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶的表达变化[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2005, 8(5):526-528.

[14] ZHOU M L, SHI J X, HANG C H, et al. Expression of Toll-like receptor 4 in the brain in a rabbit experimental subarachnoid haemorrhage model [J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(3):93-97.

[15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Method*, 2001, 25(4):402-408.

[16] 郑娟, 王凤荣. 中医药防治动脉粥样硬化的研究进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2006, 33(5):636-637.

[17] 周玲生, 包东武. 芪丹煎干预兔动脉粥样斑块形成的分子机制[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(7):1395-1397.

[18] 周仲瑛, 金妙文, 吴敏, 等. 滋肾养肝化痰消瘀法治疗动脉粥样硬化 42 例的临床研究[J]. *江苏中医药*, 2003, 24(2):13-15.

[19] ZHU H J, LU S, SU W, et al. Effect of Liandouqingmai recipe on life quality and vascular endothelial injury in patients with coronary heart disease[J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(4):529-533.

[20] ZHU H J, SHU L, WEI S, et al. Effect of Liandouqingmai recipe on quality of life and inflammatory reactions of patients with coronary heart disease [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(5):539-543.

[21] 周明学, 徐浩, 陈可冀, 等. 黄连提取物对 ApoE 基因敲除小鼠主动脉易损斑块 Perilipin 和 PPAR- γ 基因表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(6):532-536.

[责任编辑 张丰丰]