

加味补阳还五汤对防治动脉粥样硬化的 ApoE^{-/-}小鼠 Toll 样受体 4 及其下游主要元件的影响

朱博冉, 吴佳菲, 薛文达, 陶伟伟, 尚卫兵, 张海楼, 翟意, 吴颢昕*
(南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] **目的:**探究加味补阳还五汤对于载脂蛋白 E 基因敲除小鼠的 Toll 样受体 4 (TLR4) 及髓样分化因子 88 (MyD88), 肿瘤坏死因子受体相关因子-6 (TRAF-6), 核转录因子- κ B (NF- κ B) 表达的影响, 讨论加味补阳还五汤对于动脉粥样硬化的防治机制。**方法:**将 30 只雄性载脂蛋白 E 基因敲除小鼠随机分为模型组, 阿托伐他汀组, 加味补阳还五汤组, 每组 10 只, 以 10 只 C57BL/6J 小鼠设空白组。除空白组正常饮食饮水外, 每组给予高脂饲料喂养 8 周。空白组及模型组每日给与 0.9% NaCl 溶液灌胃, 阿托伐他汀组及加为补阳还五汤组每日以相应药物灌胃。第 9 周后采用生化检测方法检测血清总胆固醇 (TC), 甘油三酯 (TG), 高密度脂蛋白 (HDL-C) 和低密度脂蛋白 (LDL-C)。采用苏木素-伊红 (HE) 染色方法观察, 并测量斑块所占管腔面积之比。以实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 TLR4 及 MyD88, TRAF-6, NF- κ B 的 mRNA 表达; 蛋白质印迹 (Western blot) 法测定其蛋白表达的变化。**结果:**血脂水平方面, 与模型组比较加味补阳还五汤组与阿托伐他汀组均能降低载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 TC, TG, HDL-C, LDL-C 水平, 同时升高 HDL-C 水平 ($P < 0.01$); 镜下观察加味补阳还五汤组与阿托伐他汀组均能较模型组斑块有所减少, 主动脉血管细胞排列较整齐, 炎性细胞浸润减轻, 小鼠的主动脉斑块在血管的占比均有不同程度地降低 ($P < 0.01$)。mRNA 与蛋白水平上与模型组比较加味补阳还五汤与阿托伐他汀组均能有效降低 TLR4 及 MyD88, TRAF-6, NF- κ B mRNA 与蛋白的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**加味补阳还五汤对于 AS 的发生发展有预防作用, 其机制可能与抑制 TLR4 及其下游信号转导通路主要元件有关。

[关键词] 补阳还五汤; 动脉粥样硬化; Toll 样受体 4; 髓样分化因子 88; 肿瘤坏死因子受体相关因子-6; 核转录因子- κ B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0150-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200150

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1349.026.html>

[网络出版时间] 2017-07-11 13:49

Effect of Modified Buyang Huanwutang on Expression of Toll Like Receptor 4 in Apolipoprotein E Gene Knockout Mice and Its Main Downstream Components

ZHU Bo-ran, WU Jia-fei, XUE Wen-da, TAO Wei-wei, SHANG Wei-bing, ZHANG Hai-lou,
ZHAI Yi, WU Hao-xin*

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of modified Buyang Huanwutang on the expression of Toll like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 (TRAF-6), nuclear factor kappa B (NF- κ B) in the apolipoprotein E gene knockout mice (ApoE^{-/-} mice), in order to discuss the mechanism of modified Buyang Huanwutang for the prevention and treatment of atherosclerosis (AS). **Method:** Thirty male ApoE^{-/-} mice were randomly divided into three groups: model group, modified Buyang Huanwutang group and atorvastatin group, and 10 C57BL/6J mice were the control

[收稿日期] 20170517(008)

[基金项目] 江苏省高校优势学科建设工程项目(161014);2014年全国名老中医药专家传承工作室建设项目(孟景春)

[第一作者] 朱博冉, 硕士, 从事中医药对动脉粥样硬化的治则治法研究, Tel:18805190077, E-mail: zhuboran1991@sina.com

[通讯作者] * 吴颢昕, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医药对脑血管疾病的治则治法研究, Tel: 13813910523, E-mail: wuhaoxin@sohu.com

group. Model group, modified Buyang Huanwutang group and atorvastatin group were given high-fat diet. At the same time, modified Buyang Huanwutang group and simvastatin group were intragastrically administrated with modified Buyang Huanwutang ($18.69 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), leech powder ($0.39 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and atorvastatin ($1.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). After 9 weeks of treatment, cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were detected. In addition, aorta segment was taken from the experiment animals to observe morphological changes by HE, and measure the ratio of the plaque area to the intravascular space. Real-time PCR and Western blot were used to determine the expressions of aortic TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- κ B. **Result:** In terms of blood lipid levels, compared with the normal group, TC, TG and LDL-C in the model group were significantly higher, while HDL-C levels was significantly lower ($P < 0.01$). Compared with the model group, TC, TG and LDL-C in the modified Buyang Huanwutang group and the atorvastatin group were significantly lower, while HDL-C were significantly higher ($P < 0.01$). HE staining showed no aortic plaque formation in C57BL/6J mice control group, and significant aortic plaque formation and increased inflammatory cell in model group. Compared with the model group, aortic vascular cells were arranged more orderly, inflammatory cell infiltration was reduced, and the proportion of aortic plaque in blood vessels reduced to varying degrees in Buyang Huanwutang group and atorvastatin group. To compared with C57BL/6J mice in the control group, mRNA and protein expressions of aortic TLR4, MyD88, TRAF-6 and NF- κ B obviously increased in model group ($P < 0.01$). mRNA and protein expressions of aortic TLR4, MyD88, TRAF-6 and NF- κ B significantly decreased in both modified Buyang Huanwutang group and atorvastatin group, compared with model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Both modified Buyang Huanwutang and atorvastatin have an effect in preventing the development of atherosclerosis. The mechanism could be related to intervention of TLR4 and its main components of downstream signal transduction pathway.

[**Key words**] Buyang Huanwutang; atherosclerosis (AS); Toll like receptor 4 (TLR4); myeloid differentiation factor 88 (MyD88); tumor necrosis factor receptor associated factor-6 (TRAF-6); nuclear factor kappa B (NF- κ B)

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重危害人类健康的基础疾病。随着人民生活质量的逐渐提高,我国 AS 的发病率也同时呈现出上升趋势。有数据显示,在 2030 年,全球将有预计 2 360 万人死于心血管相关疾病^[1]。研究表明炎症细胞和炎症因子几乎参与了 AS 发展的全过程,现阶段的“炎症学说”已经成为了 AS 发病机制的主流学说之一^[2-3]。Toll 样受体 4 (TLR4)作为免疫反应和慢性炎症之间的一个桥梁,可以通过其下游的髓样分化因子 88 (MyD88)依赖途径[其包含 MyD88, 肿瘤坏死因子受体相关蛋白-6 (TRAF-6), 核转录因子- κ B (NF- κ B)等因子]引起 TRAF-6, NF- κ B 易位诱导免疫基因转录最终激活 NF- κ B, 诱发各种炎症反应^[4-5]。中医学虽无 AS 的病名,但其与具有气虚血瘀证病理性质的疾病有相似之处。因此本实验在中医药益气活血法的指导下,通过补阳还五汤加水蛭粉的方式对高脂饲料喂养的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 (apolipoprotein E gene knockout mice, ApoE^{-/-}小鼠) AS 模型经行干预。从而探讨,加为补阳还五汤对于

TLR4 及其下游信号转导通路主要元件的表达影响与中医中药对于 AS 的防治的可能机制。

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,8 周龄,体重 23 ~ 25 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。于南京中医药大学基础医学院中医脑病学实验中心 SPF 级动物房饲养,环境温度 22 ~ 25 °C,相对湿度 50% ~ 70%,昼夜明暗交替 12 h,换气次数 15 ~ 20 次/h。自由摄食与饮水。实验过程中依据南京中医药大学医学伦理委员会标准对动物进行处置。

1.2 药物 加味补阳还五汤由黄芪 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 与水蛭粉 3 g 组成(南京轩德堂传统中医门诊,批号分别为 160901009, 160605000, 160903009, 160801006, 160903012, 160715008, 160715002, 160301)。经南京中医药大学脑病实验室研究员陶伟伟老师鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》一部

要求)。除水蛭粉外,所有药材浸泡 30 min,水煎 2 次各 30 min 合并煎液,旋蒸浓缩至含生药质量浓度 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,放入 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱分装备用。阿托伐他汀钙片(立普妥)由辉瑞制药有限公司生产,规格 20 mg,国药准字 H20051408。

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);Z-32 型台式离心机(德国 Hermle 公司);AE100 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);SB5200-型超声清洗机(上海 Branson 公司);cobas c701 型罗氏全自动生化检测仪(罗氏诊断产品有限公司);Nanodrop2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo 公司);PowerPac 型蛋白电泳以及 Mini-PROTEAN 型电泳仪,Mini Trans-Blot 型转膜系统(美国 Bio-Rad 公司);2500 系列凝胶成像及分析系统(Tanon 公司);RM2016 型轮转式切片机(Leica 公司);SL 16R 型低温超速离心机(美国 Thermo Scientific 公司);BX51 型显微镜(日本奥林巴斯)。

1.4 试剂 PBS 磷酸盐缓冲液干粉(Solarbio 公司,批号 P1010-2L);Heidenhain 铁苏木素染色液、伊红染色液(武汉谷歌生物科技有限公司,批号分别为 JRS0364, JRS0371);RIPA 裂解液,SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液($5 \times$)(Beyotime 公司,批号分别为 P0013B, P0015B);蛋白酶抑制剂 Cocktail(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 # 5871S);蛋白 Marker(美国 Thermo 公司,批号 00295962);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,广州捷威斯生物科技有限公司,货号 ap0063);一抗均为兔抗小鼠 TLR4(批号 ab13556, 1:500),MyD88(批号 ab2068, 1:1 000),TRAF-6(批号 ab40675, 1:5 000)均购自美国 Abcam 公司; β -tubulin(美国 Proteintech 公司,批号 10094-1-AP, 1:2 000),NF- κ B(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 #8242, 1:1 000);二抗 HRP 标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)(美国 Proteintech 公司,批号 SA00001-2, 1:2 000),ECL 显色液(康为世纪,批号 2514K)。

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,模型构建方法参考本课题组柴毅等^[6]的前期研究与田迪等^[7]的模型构建方式。ApoE^{-/-}小鼠普通饲料适应性喂养 1 周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。C57BL/6J 小鼠作为空白组仍以普通饲料喂养,共 9 周。

2.2 分组与干预 所有实验小鼠适应性喂养 1 周

后,采取随机数表进行分配。分组与干预①C57BL/6J 小鼠空白组:普通饲料+等量生理盐水;②模型组:高脂饲料+等量生理盐水;④阿托伐他汀组:高脂饲料+ $1.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 阿托伐他汀(按小鼠 23 g,人 70 kg 的等效剂量折算)。⑤加味补阳还五汤组(根据前期预实验剂量按小鼠 23 g,人 70 kg 的等效剂量折算^[6]):高脂饲料+ $18.69 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 补阳还五汤+ $0.39 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 水蛭粉;所有小鼠均在同一时刻下的同一环境予以操作,除去适应性喂养阶段,连续灌胃 8 周。

2.3 标本取材及制备 9 周后各组随机选取各组小鼠,禁食 12 h,用 10% 水合氯醛按小鼠体重确定麻醉剂量后麻醉。心脏取血,分离血清后备存进行血脂生化检测。经左心室注入灭菌 PBS 液冲洗,分离主动脉弓段以下至髂动脉分叉处,并将截取的动脉分为两部分,分别置于液氮中冷冻后转至 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。用于蛋白质印迹法(Western blot)检测以及实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测。随后经左心室灌注 4% 多聚甲醛内固定,分离心脏与主动脉弓段浸泡于 4% 多聚甲醛外固定备存,进行石蜡切片以及病理观察。所有操作在均冰盒上完成。

2.4 血脂检测 心脏取血并分离血清,置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $3 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后吸取上层血清约 0.5 mL,用干化学法在全自动生化仪上检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC),甘油三酯(triglyceride, TG),高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)。

2.5 主动脉病理形态学检查 冰上无菌操作打开胸腔,分离心脏与主动脉,剪取靠近主动脉瓣环处主动脉根部约 1 cm,并予以常规处理,脱水、浸石蜡、包埋、从心脏到主动脉根部标本取 $600 \mu\text{m}$,每间隔 $4 \mu\text{m}$ 进行石蜡连续切片 50 张,每间隔 10 张取 1 张行苏木素-伊红(HE)染色,每张切片 2 个组织面。显微镜下观察组织形态学变化。实验结果用 $\times 100$ 倍镜下观察并分别选取所有斑块,经 Image-Pro Plus 6.0 软件测定 AS 斑块面积(plaque area, PA)和血管管腔面积(vascular lumen area, LA)及其比值(PA/LA)并记数。

2.6 Real-time PCR 检测 取出冻存的血管组织($25 \sim 50 \text{ mg}$),按照以下步骤进行操作:RNA 抽提采用 trizol 一步法提取总的 RNA,按照试剂盒说明进行;反转录条件为 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s;检测 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- κ B mRNA 基因表达,扩

增件为 94 °C 40 s, 94 °C 5 s, 60 °C 15 s, 72 °C 10 s, 40 个循环; 所得 C_t 值经转换后以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法获得每一个样本的基因相对表达量的数值。以 GAPDH 为内参。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。TLR4: 上游 5'-GCAGAAAATGC CAGGATGATG-3', 下游 5'-TCTGATCCATGCATT GGTAGGT-3', 扩增片长度 110 bp; MyD88: 上游 5'-TGGCATGCCTCCATCATAGTTAACC-3' 下游 5'-GTCAGAAACAACCACCACCATGC-3', 扩增片长度 198 bp; TRAF-6 上游 5'-ACAAATACCTGAGGCAGTT CCCA-3' 下游 5'-AAAGTACAGGACAA AATAGCCCAT-3', 扩增片长度 145 bp; NF- κ B p65 上游: 5'-ATA GAAGAGCAGCGTGGGGACT-3', 下游 5'-GGATGACG TAAAGGGATAGGGC-3' 扩增片长度 447 bp; 内参 GAPDH: 上游 5'-CTCATGACCACAGT CCATGC-3', 下游 5'-CACATTGGGGGTAGGAAC AC-3', 扩增片长度 201 bp。

2.7 Western blot 法检测 取出冻存的血管组织, 计算并加入 RIPA, PMSF 和 Cocktail, 混合研碎, 于 4 °C, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 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 (5 ×) 混匀, 100 °C 加热变性后分装保存于 -80 °C 冰箱。依据 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- κ B 的相对分子质量选择聚丙烯酰胺凝胶电泳分

离蛋白质, 以蛋白 3 μg 上样, 经 SDS-PAGE 电泳, 然后转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene-fluoride, PVDF) 膜上, 将 PVDF 膜放入一抗封闭缓冲液中室温摇床封闭 1 h, 分别放入加有 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- κ B 和 Tubulin 抗体的抗体盒中, 4 °C 孵育过夜。TBST 漂洗 3 次, 将 PVDF 膜分别放入加有 HRP 标记山羊抗兔 IgG (H + L) 的抗体盒中, 室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, ECL 显影。采集 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- κ B 和 β -tubulin 条带灰度值, 得到各样本 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- κ B 与 β -tubulin 的灰度值比值。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 21.0 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 (one-way classification ANOVA); 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 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠血脂 TC, TG, HDL-C, LDL-C 的影响 与空白组比较, 模型组 TC, TG, LDL-C 水平显著升高, HDL-C 水平显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 加味补阳还五汤组与阿托伐他汀组均能降低 ApoE^{-/-} 小鼠 TC, TG, LDL-C 水平, 同时升高 HDL-C 水平 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠 TC, TG, HDL-C, LDL-C 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	TC	TG	HDL-C	LDL-C
空白	-	1.93 ± 0.33	0.69 ± 0.10	2.80 ± 0.10	0.33 ± 0.03
模型	-	32.86 ± 0.27 ¹⁾	2.08 ± 0.15 ¹⁾	1.02 ± 0.13 ¹⁾	10.86 ± 0.54 ¹⁾
阿托伐他汀	0.001 3	10.95 ± 0.24 ³⁾	1.05 ± 0.15 ³⁾	2.39 ± 0.12 ³⁾	7.90 ± 0.46 ³⁾
加味补阳还五汤	19.08	14.07 ± 0.27 ³⁾	1.71 ± 0.14 ³⁾	1.81 ± 0.14 ³⁾	9.83 ± 0.44 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 4 同)。

3.2 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉的形态学影响 空白组可见主动脉壁厚薄均匀, 无 AS 斑块形成, 管壁细胞排列整齐, 无炎性细胞浸润。模型组主动脉血管各部位粗细不均, 斑块形成明显, 细胞间大量炎性细胞浸润。阿托伐他汀组较模型组斑块明显减少, 主动脉血管壁细胞排列较整齐, 炎性细胞浸润明显减轻。加味补阳还五汤组较模型组斑块减少, 主动脉血管壁细胞排列较整齐, 炎性细胞浸润减轻。见图 1。

3.3 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块的定量分析 与空白组比较, 模型组小鼠主动脉斑块的管腔占比有明显增大 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 加味补阳还五汤组与阿托伐他汀组小鼠的主动脉斑块在血管的占比均有不同程度的降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.4 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF- κ B mRNA 基因表达的影响 与空白组比较, 模型组在 TLR4, MyD88,

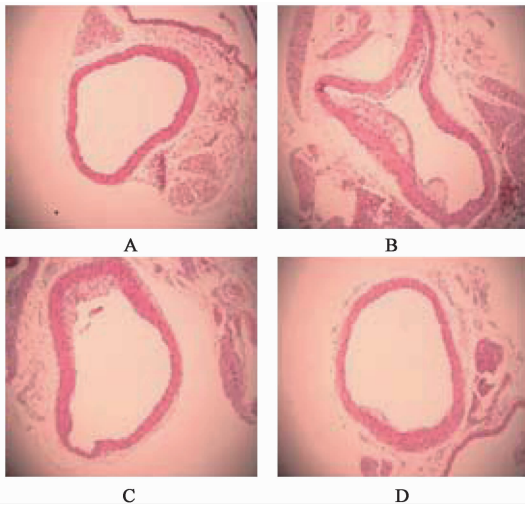


图 1 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠血管的形态学影响(HE, ×100)
Fig. 1 Effect of modified Buyang Huanwutang on vascular morphologic in ApoE^{-/-} mice(HE, ×100)

表 2 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块占比影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of modified Buyang Huanwutang on AS plaque area percentage in ApoE^{-/-} mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PA/像素	LA/像素	PA/LA/%
空白	-	0	53 916.8 ± 11 663.67	0
模型	-	37 188.8 ± 22 679.28	87 349.6 ± 35 014.94	40.77 ± 10.27 ¹⁾
阿托伐他汀	0.001 3	959.2 ± 392.72	55 813.4 ± 11 437.73	1.72 ± 0.58 ³⁾
加味补阳还五汤	19.08	10 857.4 ± 4 674.84	70 758.0 ± 20 630.46	15.12 ± 3.46 ³⁾

表 3 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF-κB mRNA 基因水平影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of modified Buyang Huanwutang on mRNA expression level of Aortic TLR4, MyD88, TRAF-6, and NF-κB in ApoE^{-/-} mice($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4	MyD88	TRAF-6	NF-κB
空白	-	0.94 ± 0.15	1.00 ± 0.06	0.83 ± 0.01	0.64 ± 0.03
模型	-	1.09 ± 0.14 ²⁾	1.19 ± 0.23 ²⁾	0.96 ± 0.06 ¹⁾	0.78 ± 0.08 ¹⁾
阿托伐他汀	0.001 3	0.99 ± 0.05 ⁴⁾	1.04 ± 0.03 ⁴⁾	0.84 ± 0.11 ³⁾	0.66 ± 0.10 ³⁾
加味补阳还五汤	19.08	1.07 ± 0.11 ⁴⁾	1.11 ± 0.08 ⁴⁾	0.91 ± 0.08 ⁴⁾	0.72 ± 0.07 ⁴⁾

表 4 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF-κB 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of modified Buyang Huanwutang on protein expression level of aortic TLR4, MyD88, TRAF-6, and NF-κB in ApoE^{-/-} mice($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4/β-tubulin	MyD88/β-tubulin	TRAF-6/β-tubulin	NF-κB/β-tubulin
空白	-	0.71 ± 0.23	0.84 ± 0.09	0.23 ± 0.03	0.12 ± 0.02
模型	-	3.66 ± 0.79 ¹⁾	2.32 ± 0.24 ¹⁾	0.74 ± 0.07 ¹⁾	0.38 ± 0.05 ¹⁾
阿托伐他汀	0.001 3	1.28 ± 0.16 ³⁾	1.05 ± 0.08 ³⁾	0.30 ± 0.02 ³⁾	0.17 ± 0.01 ³⁾
加味补阳还五汤	19.08	2.25 ± 0.30 ³⁾	1.78 ± 0.14 ³⁾	0.56 ± 0.04 ³⁾	0.30 ± 0.02 ³⁾

TRAF-6, NF-κB mRNA 基因表达方面均有显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较加味补阳还五汤与阿托伐他汀组均能有效降低 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF-κB mRNA 基因表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

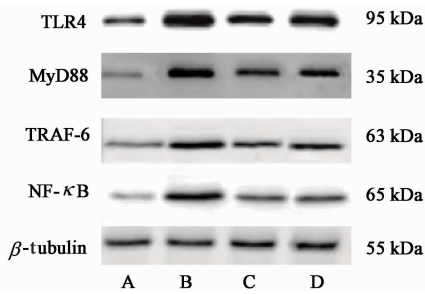
3.5 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF-κB 蛋白表达的影响 与空白比较, 模型组在 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF-κB 蛋白表达方面均有显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较加味补阳还五汤与阿托伐他汀组均能有效降低 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF-κB 的蛋白表达 ($P < 0.01$)。见表 4, 图 2。

4 讨论

AS 主要以血管脂质堆积, 炎症细胞聚集为主要特征并可关联了多种心脏疾病, 在 AS 的发生发展中炎症因素不可忽视^[8-9]。Toll 样受体 (Toll like

receptors, TLRs) 家族是重要的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 并可通过识别

病原体的内源性配体, 触发各种细胞内途径导致促炎细胞因子、趋化因子的产生, 以及共同的刺激分子



1. 空白组; 2. 模型组; 3. 阿托伐他汀组; 4. 加味补阳还五汤组

图 2 加味补阳还五汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF-κB 表达水平的影响

Fig. 2 Effect of modified Buyang Huanwutang on protein expression level of aortic TLR4, MyD88, TRAF-6 and NF-κB in ApoE^{-/-} mice

的表达^[8]。TLR4 作为 TLRs 家族中的一员,其可引起慢性炎症反应促进 AS 的形成,导致炎症的物质作为配体激活相应的受体并通过 MyD88 依赖性途径包括激活包括其下游的 TRAF-6 及 NF-κB 调节炎症因子的释放,最终诱导 AS 的发生与发展^[10-13]。

在 AS 治疗方面他汀类药物作为调脂治疗的一线药物,其除了有效降低血脂外,还具有抗炎、改善血管内皮功能等独立于降脂之外的作用^[14-15]。他汀类药物的非降脂效应特别是其抗炎作用越来越受到心血管相关领域专家的关注,其抗炎效应在降低心血管事件发生率上扮演着重要的角色^[16-18]。据此,本实验选用阿托伐他汀为阳性药物。补阳还五汤出自《医林改错》,是益气活血代表方。但从剂量上看,其益气为主而活血药物运用略显力薄。针对 AS 的中医药治疗,吴颖昕教授于多年临证中发现,除了应用补阳还五汤外,还应适当加以虫类活血祛瘀药,搜刮经络之瘀血。虫类药物水蛭以其不伤新血的特性可以兼顾 AS 患者的正虚之体。研究表明水蛭具有抗凝血、抗血栓、抗炎和抗纤维化等作用以及良好的临床疗效^[19-21],因此选择加水蛭加强补阳还五汤对于 AS 的临床防治。

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 在脂蛋白代谢中有重要的作用。其可以通过与细胞表面低密度脂蛋白受体或者残余乳糜微粒的受体的高亲和力结合,从而把血液中胆固醇运送至肝脏代谢清除;同时, ApoE 还具有抑制低密度脂蛋白氧化,血小板的聚集,血管平滑肌细胞及内皮细胞增殖等的作用。以 C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞同源重组的方法构建的 ApoE^{-/-} 小鼠模型可用以模拟出人类脂质代谢紊乱及 AS 的疾病模型,同时运用高脂饮食的喂养则能够更好的加快小鼠 AS 病变的进展^[22-23]。因此通

过参考前期实验等情况,本实验组采用 ApoE^{-/-} 小鼠模型用以模拟加味补阳还五汤对于 AS 的防治作用。并以 TLR 信号通路中的 TLR4 及其下游信号转导通路主要元件为靶点,研究加味补阳还五汤对 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF-κB 表达水平的调节作用。

本实验结果表明,加味补阳还五汤可降低高脂饮食诱导 AS 的 ApoE^{-/-} 小鼠血清中的 TC, TG, LDL-C 水平,并同时升高 HDL-C 水平。这提示加味补阳还五汤可能通过对血脂异常的改善从而控制斑块的形成。病理学观察显示,加味补阳还五汤可减少 ApoE^{-/-} 小鼠病变主动脉的炎症浸润和缩小斑块的管腔占比。这表明加味补阳还五汤可以减少病变组织的炎症浸润的同时对血管形态学功能也有一定的改善作用。对其可能的机制进行探究,本实验通过 PCR 及 Western blot 发现,比较于模型组,通过加为补阳还五汤干预后的小鼠对 TLR4, MyD88, TRAF-6, NF-κB 基因与蛋白表达水平上有不同程度地下调作用。说明加味补阳还五汤可以通过对 TLR4 通路中的 MyD88 依赖性通路干预其下游的 TRAF-6 及 NF-κB 调节炎症因子的释放,最终控制 AS 的发生与发展。但本实验无法解释加味补阳还五汤对于 MyD88 非依赖性通路干预是否起效,是否可以通过对 MyD88 非依赖性通路的干预从而调节炎症因子的释放而起到释放控制 AS 的作用,尚需要进一步的研究。

[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.
[3] 朱博冉,吴颖昕. 补阳还五汤抗动脉粥样硬化机制的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(1): 99-104.
[4] LI H. Toll-like receptor 4 and atherosclerosis[J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(1):88-99.
[5] Scholtes V P, Versteeg D, de Vries J P, et al. Toll-like receptor 2 and 4 stimulation elicits an enhanced inflammatory response in human obese patients with atherosclerosis. [J]. Clin Sci, 2011, 121(5):205-214.
[6] 柴毅, 吴颖昕, 陈刚, 等. 补阳还五汤加味预防动脉粥样硬化形成机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7):114-120.

- [7] 田迪, 秦亚飞, 应如, 等. 辛伐他汀对 apoE^{-/-} 小鼠 HDL 抗炎抗氧化功能的影响[J]. 解放军医学杂志, 2013, 38(3):195-200.
- [8] Kriszbacher I, Koppán M, Bódis J. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352(16):429-430.
- [9] Momiyama Y, Adachi H, Fairweather D L, et al. Introductory editorial inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease [J]. Clin Med Insights Cardiol, 2016, 8(S3):67-70.
- [10] Chen J Q, Szodoray P, Zeher M. Toll-like receptor pathways in autoimmune diseases[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2016, 50(1):1-17.
- [11] Dekker W K D, CHENG C, Pasterkamp G, et al. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization [J]. Atherosclerosis, 2010, 209(2):314-320.
- [12] LI L C, Varghese Z, Moorhead J F, et al. Cross-talk between TLR4-MyD88-NF- κ B and SCAP-SREBP2 pathways mediates macrophage foam cell formation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013, 304(6):874-884.
- [13] HE A, JI R, SHAO J, et al. TLR4-MyD88-TRAF6-TAK1 complex-mediated NF- κ B activation contribute to the anti-inflammatory effect of V8 in LPS-induced human cervical cancer SiHa cells[J]. Inflammation, 2016, 39(1):172-181.
- [14] Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins[J]. Circulation, 2004, 109(S1):39-43.
- [15] Rohilla A, Rohilla S, Kumar A, et al. Pleiotropic effects of statins: a boulevard to cardioprotection[J]. Arab J Chem, 2016, 9(S1):21-27.
- [16] Hoffmann R, Haager P, Suliman H. Effect of statin therapy before Q-wave myocardial infarction on myocardial perfusion[J]. Am J Cardiol, 2008, 101(2):139-143.
- [17] TANG X, YANG Y, LUO S, et al. The effect of statin therapy on plaque regression following acute coronary syndrome: a Meta-analysis of prospective trials [J]. Coron Artery Dis, 2016, 27(8):636-649.
- [18] Schaefer C A, Blatzheim A K, Passon S G, et al. Modulation of carotid strain by statin therapy in atherosclerosis patients [J]. Vasa, 2017, 46(2):108-115.
- [19] 单宇, 张伽妹, 丁月珠, 等. 水提取法和仿生提取法研究水蛭不同炮制品的体外抗凝活性[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10):1843-1848.
- [20] 高丽娟, 高娟, 胡耀红, 等. 水蛭粉对高脂血症大鼠动脉粥样硬化形成过程的干预机制[J]. 中成药, 2014, 36(9):1962-1965.
- [21] 王娥娥, 孙凡龙, 魏文亭, 等. 含水蛭的中成药干预颈动脉粥样硬化斑块的 Meta 分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(23):2519-2523.
- [22] vanRee J H, Wj V D B, Dahlmans V E, et al. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice [J]. Atherosclerosis, 1994, 111(1):25-37.
- [23] CHEN T, JIA G, WEI Y, et al. Beijing ambient particle exposure accelerates atherosclerosis in ApoE knockout mice [J]. Toxicol Lett, 2013, 223(2):146-153.

[责任编辑 邹晓翠]