

· 经典名方 ·

基于 Treg 细胞探讨补阳还五汤对动脉粥样硬化斑块的影响及机制

庞晓丽, 王青龙, 陈淑静, 李虎虎, 范英昌, 刘建卫*
(天津中医药大学, 天津 301617)

[摘要] **目的:** 从调节性 T 细胞(Treg)细胞和炎症角度探讨补阳还五汤(BYHWT)对动脉粥样硬化斑块影响及具体作用机制。**方法:** 8 周龄 50 只 ApoE 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠随机分为模型组, BYHWT 组低、中、高剂量, 雷帕霉素组, 以 C57/BL 小鼠作为正常组。模型组, BYHWT 组给予高脂饮食造模 12 周, 正常组给予正常饮食。造模成功后, BYHWT 低、中、高剂量组分别给予 5, 10, 20 g·kg⁻¹ BYHWT 灌胃, 雷帕霉素组给予促进 Treg 细胞增殖剂-雷帕霉素(4 mg·kg⁻¹), 正常组和模型组给予等剂量生理盐水灌胃, 所有组灌胃 4 周; 4 周后取心脏主动脉窦, 制备成石蜡组织切片, 采用苏木素-伊红(HE)染色法评价斑块面积, 采用免疫组化评估斑块内 Treg 细胞表达数量。眼内眦取血, 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测外周血炎症因子表达, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测外周血叉状头转录因子 p3(Foxp3) mRNA 表达。**结果:** 与正常组比较, 模型组动脉粥样硬化斑块面积显著增加($P < 0.01$), 外周血中肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6(IL-6)含量均显著升高($P < 0.05$), 转化生长因子- β (TGF- β), 白细胞介素-10(IL-10)明显降低($P < 0.05$), 外周血 Foxp3 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$); 与模型组相比, BYHWT 中、高剂量组斑块面积明显减小($P < 0.05$), 外周血 TNF- α , IL-6 含量降低($P < 0.01$), BYHWT 高剂量组 TGF- β , IL-10 表达增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), 高剂量组斑块内 Treg 细胞表达增加($P < 0.01$), 各剂量组外周血 Foxp3 mRNA 表达增加($P < 0.01$)。**结论:** BYHWT 具有抗动脉粥样硬化作用, 该作用可能与增加 Treg 细胞数量, 进而抑制体内炎症反应有关。

[关键词] 补阳还五汤; 动脉粥样硬化; 调节性 T 细胞

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)05-0001-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200201

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191008.1802.006.html>

[网络出版时间] 2019-10-09 09:06

Effect and Mechanism of Buyang Huanwu Tang on Atherosclerotic Plaque Based on Treg Cells

PANG Xiao-li, WANG Qing-long, CHEN Shu-jing, LI Hu-hu, FAN Ying-chang, LIU Jian-wei*
(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanisms of Buyang Huanwu Tang (BYHWT) on atherosclerotic plaque based on regulatory T cells (Treg) and inflammation. **Method:** Totally 50 ApoE knockout (ApoE^{-/-}) mice aged 8 weeks were randomly divided into model group, low, medium, high-dose BYHWT groups, positive control group, and C57/BL mice were taken as control group. The model group and the BYHWT group were given high-fat diet for 12 weeks, while the control group was given normal diet. After successful modeling, BYHWT groups were given drugs (5, 10, 20 g·kg⁻¹) through intragastric administration, the positive control group was given rapamycin (4 mg·kg⁻¹), while the control group and the model group were given equal doses normal saline through intragastric administration for 4 weeks. Four weeks later, the mice were sacrificed.

[收稿日期] 20190701(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603565)

[第一作者] 庞晓丽, 博士, 副教授, 从事中西医结合基础研究, E-mail:403033115@qq.com

[通信作者] * 刘建卫, 硕士, 讲师, 从事中西医结合基础研究, E-mail:908560645@qq.com

Manufactured paraffin sections were prepared for the aortic sinus of the heart. The plaque area was evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining, and the number of Treg cells in immunohistochemical staining plaque was detected. Blood was collected from eye canthus of mice, the expression of inflammatory factors in peripheral blood was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the forkhead box P3 (Foxp3) gene expression in peripheral blood was detected by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR). **Result:** Compared with the control group, the area of atherosclerotic plaques in the model group was significantly increased ($P < 0.01$), the contents of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were significantly increased ($P < 0.05$), and transforming growth factor- β (TGF- β) and interleukin-10 (IL-10) were significantly decreased ($P < 0.05$), and the peripheral blood Foxp3 mRNA expression was decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the plaque areas in middle-dose and high-dose BYHWT groups were significantly reduced ($P < 0.05$), the peripheral blood TNF- α and IL-6 contents were decreased ($P < 0.01$), the TGF- β and IL-10 expressions were increased in the high-dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the number of Treg cells in the plaque was increased in the high-dose group ($P < 0.01$), and the peripheral blood Foxp3 mRNA expression was increased in each BYHWT group ($P < 0.01$). **Conclusion:** BYHWT has an anti-atherosclerosis effect, which may be related to the increase of the number of Treg cells and thereby inhibiting the inflammatory response *in vivo*.

[**Key words**] Buyang Huanwu Tang (BYHWT); atherosclerosis; Treg

动脉粥样硬化(AS)是导致心脑血管疾病的重要因素,以脂质异常沉积于血管内皮细胞下为主要病理特征,临床上多以他汀类药物治AS引发的疾病^[1]。近年来AS属于慢性免疫性炎症性疾病已被很多研究证实^[2],研究显示CD4⁺T淋巴细胞在参与AS慢性免疫炎症反应,表现为促炎反应的效应性T细胞增多和抗炎反应的调节T细胞(Treg)减少,两者失衡,导致促炎因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)等表达增多,抗炎因子转化生长因子- β (TGF- β),白细胞介素-10(IL-10)等表达减少,炎症反应放大,斑块进行性发展^[2-3]。因此,从免疫角度切入,纠正CD4⁺T细胞亚群失衡,进而控制炎症反应已成为当前抗AS研究的热点之一^[2-4]。补阳还五汤(BYHWT)为清代王清任所注《医林改错》中经典益气活血方剂^[5-6],具有扩张血管、降血脂、抗氧化、抗炎等作用,临床上被广泛用于治疗AS造成的脑血管疾病^[7-8]。但其具体机制尚未阐明,从免疫炎症方面探讨其抗动脉粥样硬化的机制更罕有报道。故本研究以AS小鼠为研究对象,基于Treg细胞探讨BYHWT对AS斑块影响及机制,为临床多靶点入手抗AS提供新思路。

1 材料

1.1 动物 ApoE^{-/-}小鼠,C57BL/6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,合格证号SCXK(京)2016-0006,依据动物医学伦理学对动物进行处置(TCM-LAEC2019024)。

1.2 药物与试剂 BYHWT(组成为黄芪120g,当归6g,赤芍4.5g,川芎3g,桃仁3g,红花3g,地龙3g),饮片购自北京同仁堂,由天津中医药大学中药学院马琳教授鉴定为正品。水煎2次,旋转蒸发浓缩成1g·mL⁻¹,冷却后放入-4℃冰箱储存备用。雷帕霉素(西罗莫司,美国惠氏公司,批号T34280),购自天津市第一中心医院。TNF- α ,IL-6,TGF- β ,IL-10酶联免疫吸附剂测定(ELISA)试剂盒(武汉云克隆科技股份有限公司,批号分别为SEA133Mu,SEA079Mu,SEA124Mu,SEA056Mu);免疫组化叉状头转录因子P3(Foxp3)抗体(美国eBioscience公司,批号14-4774-82);逆转录(RT)提取试剂盒,聚合酶链式反应(PCR)试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为B600005,B532501];引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计;苏木素-伊红(HE)染液试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号G1120)。

1.3 仪器 DM3000B型倒置显微镜,CM1905型石蜡切片机(德国Leica公司);Pico21型离心机(美国Thermo公司);7500型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国ABI公司)。

2 方法

2.1 动物模型复制与给药 雄性8周龄ApoE^{-/-}小鼠50只,采用高脂饲料(脂肪21%,胆固醇0.15%)饲养12周,复制AS模型^[9]。继而随机分为4组,分别为模型组和BYHWT低、中、高剂量组($n = 10$),C57/BL小鼠作为正常组给予正常饮食。

造模成功后,依据人和小鼠用药等效剂量换算结果(20 g 小鼠对应 70 kg 成人的体表面积系数 0.002 6,成人一付中药剂量为 142.5 g,故 20 g 小鼠每天服用生药量为 0.370 5 g),按照低、中、高剂量分别为等效剂量的 0.5,1,2 倍的计算标准,对 BYHWT 低、中、高 3 个剂量组分别按 5,10,20 g·kg⁻¹ 进行灌胃,阳性药物组给予雷帕霉素 4 mg·kg⁻¹ 灌胃,正常组和模型组给予等剂量生理盐水灌胃,持续 4 周。

2.2 HE 染色观察主动脉窦内斑块病理变化 各组小鼠处死后,将包含主动脉窦的心脏固定于 4% 多聚甲醛 72 h 以上,采用石蜡包埋,以 5 μm 厚度连续切片 20 张,每隔 5 张取 1 张进行 HE 染色。在倒置显微镜 40 倍镜下观察斑块组织学特点。利用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件测量模块,计算每一切面横截面斑块面积和管壁面积及其比值并记数。

2.3 ELISA 检测外周血炎症因子表达 取小鼠眼内眦血约 0.8 mL,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清,ELISA 评价外周血中 TNF-α,IL-6,TGF-β,IL-10 炎症因子含量。

2.4 免疫组化检测斑块内 Treg 细胞情况 固定包埋主动脉窦,间隔 5 μm 进行石蜡连续切片 20 张,每隔 5 张取 1 张,丙酮固定,BSA 封闭,滴加 Foxp3 抗体(1:400)50 μL 于组织上,加二抗工作液(1:400),DAB 显色,脱水、透明、封片,显微镜下阳性表达定位于细胞核,为棕黄褐色。显微镜下每张切片选择 1~3 个视野,放大 100 倍下观察视野中阳性细胞表达个数,取多个视野阳性细胞数平均值评价各组斑块内 Treg 细胞数量。

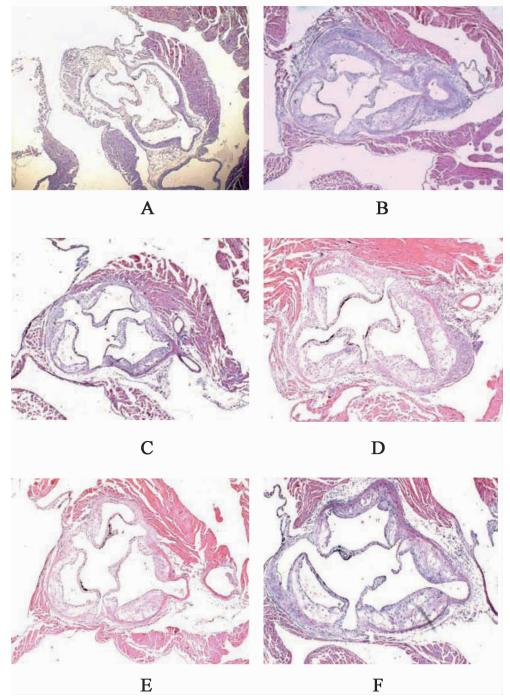
2.5 Real-time PCR 检测外周血 Foxp3 mRNA 表达情况 各组小鼠眼内眦取血 0.8 mL,采用淋巴细胞分离液分离细胞后加入 trizol 100 μL,吹打 1~2 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃沉淀,加入三氯甲烷、异丙醇等提取各组 RNA。参照逆转录试剂盒步骤翻转成 cDNA,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,引物序列 GAPDH(136 dp):上游 5'-TTTGGCATTGTGGAAGGGCTCAT-3',下游 5'-CAC CAGTGGATGCAGGGATGATGT-3'; Foxp3 (79 dp):上游 5'-GGCAGAGAGGTATTGA GGGTG-3',下游 5'-CTTCTTCTGTCTGGAGTGGC-3',按照 20 μL 反应体系进行 40 个循环的扩增,设置条件为,95 °C 预变性 2 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 30 s。据 2^{-ΔΔC_t} 法进行结构计算,评价 Foxp3 mRNA 表达情况。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件,数据以

$\bar{x} \pm s$ 表示;多组间采用单因素方差分析,两两比较方差齐采用 LSD 检验或两独立样本 *t* 检验,方差不齐采用 Tamhane's T2 进行分析,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 与正常组比较,模型组动脉粥样硬化斑块面积显著增加(*P* < 0.01),造模成功;与模型组比较,雷帕霉素组斑块面积显著缩小(*P* < 0.01),BYHWT 中、高剂量组能减小斑块面积(*P* < 0.05);经两两比较发现,随着药物剂量的增加,斑块有减小的趋势,说明具有量效关系,但中、高剂量组之间差异不明显。见图 1,表 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 雷帕霉素组; D. BYHWT 低剂量组; E. BYHWT 中剂量组; F. BYHWT 高剂量组

图 1 BYHWT 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉窦内斑块的影响(HE, ×100)

Fig.1 Effect of Buyang Huanwu Tang (BYHWT) on plaque in aortic sinus of ApoE^{-/-} mice(HE, ×100)

3.2 对 ApoE^{-/-} 小鼠外周血炎症因子表达的影响 与正常组比较,模型组外周血 TNF-α,IL-6 含量均显著升高,TGF-β,IL-10 明显降低(*P* < 0.05,*P* < 0.01);与模型组比较,雷帕霉素组 TNF-α,IL-6 含量降低,TGF-β,IL-10 表达增加(*P* < 0.05,*P* < 0.01)。BYHWT 组 TNF-α,IL-6 含量降低,TGF-β,IL-10 表达增加(*P* < 0.05,*P* < 0.01)。见表 2。

表 1 BYHWT 对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉组织内斑块面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of BYHWT on plaque area of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s$) mm²

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	$\bar{x} \pm s$
正常	-	9	-
模型	-	9	651.30 ± 145.81 ²⁾
BYHWT	5	8	717.49 ± 27.66
	10	8	571.14 ± 57.22 ³⁾
	20	9	547.31 ± 68.88 ³⁾
雷帕霉素	4 × 10 ⁻³	8	502.32 ± 197.80 ⁴⁾

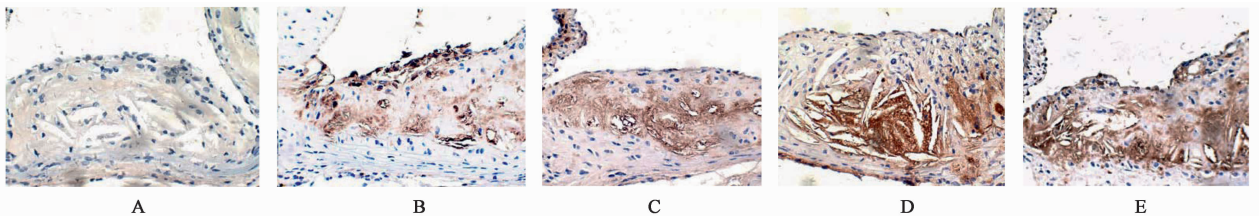
注:与正常组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01;与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01(表 2~4 同)。

表 2 BYHWT 对 ApoE^{-/-} 小鼠外周血炎症因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of BYHWT on expression of inflammatory cytokines in peripheral blood of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF-α	IL-6	IL-10	TGF-β
正常	-	1 237.18 ± 331.84	1 341.82 ± 336.34	553.23 ± 126.18	3 510.10 ± 479.70
模型	-	2 438.26 ± 920.70 ¹⁾	1 963.73 ± 387.36 ¹⁾	411.43 ± 20.98 ¹⁾	1 967.95 ± 493.65 ¹⁾
BYHWT	5	1 799.57 ± 718.68	1 731.61 ± 347.43	398.13 ± 94.91	2 811.58 ± 719.16
	10	833.45 ± 225.83 ⁴⁾	1 012.19 ± 242.97 ^{4,5)}	503.86 ± 115.78	2 808.88 ± 900.96
	20	1 164.33 ± 376.33 ⁴⁾	1 328.76 ± 336.34 ⁴⁾	680.90 ± 207.23 ³⁾	3 609.25 ± 150.06 ³⁾
雷帕霉素	4 × 10 ⁻³	1 054.38 ± 273.69 ⁴⁾	1 541.07 ± 107.77 ³⁾	481.23 ± 38.21 ³⁾	3 781.31 ± 489.90 ³⁾

注:与 BYHWT 低剂量比较⁵⁾ P < 0.05。



A. 模型组; B. 雷帕霉素组; C. BYHWT 低剂量组; D. BYHWT 中剂量组; E. BYHWT 高剂量组

图 2 BYHWT 对 ApoE^{-/-} 小鼠斑块内 Foxp3 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of BYHWT on expression of Foxp3 in plaque of ApoE^{-/-} mice(IHC, ×400)

表 3 BYHWT 对 ApoE^{-/-} 小鼠斑块内 Foxp3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of BYHWT on expression of Foxp3 in plaque of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	表达数量/个/视野
模型	5	1.20 ± 0.58
BYHWT	10	1.55 ± 0.44
	20	2.61 ± 0.49
	5	5.86 ± 2.11 ⁴⁾
雷帕霉素	4 × 10 ⁻³	3.69 ± 1.80 ³⁾

3.3 对 ApoE^{-/-} 小鼠斑块内 Foxp3 表达的影响
与正常组比较,模型组斑块内罕见阳性细胞;而与模型组比较,雷帕霉素组斑块内 Fxop3 表达增加(P < 0.05)。BYHWT 高剂量组斑块内 Fxop3 表达增加(P < 0.01)。见图 2 和表 3。

3.4 对 ApoE^{-/-} 小鼠外周血中 Foxp3 mRNA 表达的影响
与正常组比较,模型组 Fxop3 mRNA 明显降低(P < 0.05);与模型组比较,雷帕霉素组和 BYHWT 组 Fxop3 mRNA 明显增高(P < 0.01)。见表 4。

4 讨论

中医认为 AS 证候要素主要有血瘀、痰浊、

表 4 BYHWT 对 ApoE^{-/-} 小鼠外周血中 Foxp3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of BYHWT on mRNA expression of Foxp3 in peripheral blood of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Fxop3
正常	-	1.08 ± 0.36
模型	-	0.57 ± 0.26 ¹⁾
BYHWT	5	6.01 ± 2.54 ⁴⁾
	10	7.40 ± 2.91 ⁴⁾
	20	7.44 ± 2.56 ⁴⁾
	雷帕霉素	4 × 10 ⁻³

气虚,为本虚标实之病,标实为血瘀、痰浊,本虚为气虚,故临床上常以补气、活血药物治疗此病^[11]。BYHWT 为益气活血之名方,全方由黄芪、当归(尾)、赤芍、地龙、川芎、西红花、桃仁组成,对心脑血管疾病疗效确切^[7]。本研究结果证明 BYHWT 能有效缩小斑块面积,具有抗 AS 之功效,这与刘玉晖等^[5] 研究结果一致。

众所周知,AS 属于慢性炎症性疾病,慢性炎症反应因子,如 TNF- α 、IL-6 等促进斑块的进行性发展,是造成急性心脑血管事件的主要原因之一^[12]。本研究结果显示与正常组比较,AS 小鼠体内 TNF- α 、IL-6 表达明显增加,而抗炎因子 TGF- β 、IL-10 表达明显降低;给予 BYHWT 干预后,可明显降低促炎因子 TNF- α 、IL-6 表达,增加抗炎因子 TGF- β 、IL-10 表达,说明 BYHWT 抗 AS 与抑制炎症反应有关。

近几年研究显示,AS 机体内的炎症反应属于免疫性炎症,斑块内有大量淋巴细胞浸润,其中 CD4⁺ T 细胞在免疫性炎症反应中发挥重要作用^[2-3]。研究证明,CD4⁺ T 细胞亚群——Treg 细胞可通过抑制炎症反应发挥保护斑块作用,如诱导抗炎巨噬细胞 M2 型的形成,减少促炎 M1 型数量,进而降低 TNF- α 、IL-6 等因子表达;分泌抗炎因子 TGF- β 、IL-10 等^[10]。因此,选择合适药物增加 Treg 细胞数量可达到抗 AS 作用。故本研究检测了各组小鼠 AS 斑块、外周血 Treg 细胞表达情况。结果显示,与模型组比较,BYHWT 各组均可在斑块内见到 Treg 细胞标记物——Foxp3 的表达,尤以高剂量最为明显,且外周血中 Foxp3 mRNA 表达明显增加。由此推测,BYHWT 能通过增加 Treg 细胞数量(斑块和外周血),进而抑制炎症反应达到抗 AS 作用。

总之,本研究显示 BYHWT 具有抗 AS 之功效,这可能与增加 AS 小鼠体内 Treg 细胞数量,进而抑制免疫炎症反应有关。但该方剂增加 Treg 细胞的机制还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 赵帅,张烈元,冯文伟,等. 疏肝温胆汤对动脉粥样硬化家兔 LXR α 、NF- κ B 及内皮功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(15):108-115.
- [2] MITEVA K, MADONNA R, DE CATERINA R, et al. Innate and adaptive immunity in athero-sclerosis [J]. Vascu Pharmacol, 2018,107:67-77.
- [3] ADBOLMALEKI F, GHEIBI HAYAT S M, BIANCONI V, et al. Atherosclerosis and immunity: a perspective [J]. Trends Cardiovasc Med,2018,8:1-9.
- [4] SIMA P, VANNUCCI L, VETVICKA V. Atherosclerosis as autoimmune disease [J]. Ann Transl Med, 2018,6(7):1-6.
- [5] 刘玉晖,侯贝贝,游宇,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(15):112-119.
- [6] 刘楠,姜云耀,黄婷婷,等. 基于网络药理学方法研究补阳还五汤治疗脑梗死的作用机制[J]. 中国中药杂志,2018,43(11):2190-2198.
- [7] 黄兴,李艳芬,寇冠军,等. 补阳还五汤抗动脉粥样硬化作用机制研究进展[J]. 中华中医药杂志,2017,32(3):1187-1190.
- [8] 路永坤,杨海燕,刘向哲,等. 补阳还五汤佐治超早期脑梗死患者对静脉溶栓后出血性转化的影响[J]. 中国中药杂志,2019,44(8):1696-1703.
- [9] 万强,刘中勇. 定心方通过上调 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞表达对 PM2.5 所致动脉粥样硬化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(17):139-144.
- [10] AMANDA C F, ANDREW H L, JOHAN K. Treating atherosclerosis with regulatory T cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2015,35(2):280-287.
- [11] 邓中甲. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社,2011:240-241.
- [12] ZHU Y H, XIAN X M, WANG Z Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J]. Biomolecules, 2018,8(3): 1-11.

[责任编辑 周冰冰]