

凉血散瘀法通过抑制巨噬细胞凋亡抗动脉粥样硬化的作用

刘学谦^{1,2}, 王静^{1,3}, 曹守沛^{2*}, 宋耀鸿^{2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210023; 2. 南京中医药大学附属南京中医院, 南京 210001;
3. 南京市红十字医院, 南京 210001)

[摘要] **目的:**观察凉血散瘀法清心通脉饮含药血清对乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein, ac-LDL)诱导的小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 凋亡率及 A 型清道夫受体(type A scavenger receptor, SR-A), B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax), 肌醇需要酶 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α)表达的影响, 探讨清心通脉饮治疗动脉粥样硬化可能的作用机制。**方法:**8 只新西兰兔采用随机数字法分为阿托伐他汀组(2.6 g·kg⁻¹), 清心通脉饮低、中、高剂量组(3.33, 6.66, 13.32 mg·kg⁻¹), 灌胃 7 d 后颈动脉采血收集含药血清。各组用 2.5, 5, 10, 20% 体积分数的含药血清培养液分别刺激 RAW264.7 细胞系 6, 12, 24 h, 采用细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)法观察细胞增殖率。体外培养 RAW264.7 细胞系, 分为空白组、模型组、阿托伐他汀组、清心通脉饮低、中、高剂量组。空白组用牛血清白蛋白(BSA)培养细胞, 模型组用 BSA + 50 mg·L⁻¹ ac-LDL 刺激细胞 24 h, 其他组用 BSA + 50 mg·L⁻¹ ac-LDL + 10% 含药血清刺激细胞 24 h。流式细胞技术检测每组 RAW264.7 细胞系凋亡率和 SR-A 的表达, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bcl-2, Bax, IRE1 α 蛋白的表达。**结果:**与空白组比较, 模型组可显著增加 RAW264.7 细胞凋亡率($P < 0.01$), 并增加 Bax, SR-A 蛋白表达($P < 0.01$), 减少 Bcl-2 蛋白表达($P < 0.05$)。与模型组比较, 清心通脉饮低、中、高剂量组均可降低 RAW264.7 细胞系凋亡率($P < 0.05$), 减少 SR-A 和 IRE1 α 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。清心通脉饮低、高剂量组可降低 Bax 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$); 清心通脉饮中、高剂量组可降低 Bcl-2 表达($P < 0.05$)。**结论:**清心通脉饮可降低巨噬细胞凋亡率, 其治疗动脉粥样硬化机制可能与调控相关促凋亡蛋白 Bax, IRE1 α , SR-A 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达有关。

[关键词] 凉血散瘀法; 清心通脉饮; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; 凋亡

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0059-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190336

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181115.1022.031.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 15:08

Effect of Cooling Blood Method in Inhibiting Macrophage Apoptosis Against Atherosclerosis

LIU Xue-qian^{1,2}, WANG Jing^{1,3}, CAO Shou-pei^{2*}, SONG Yao-hong^{2*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Nanjing Chinese Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, China;

3. Nanjing Red Cross Hospital, Nanjing 210001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of serum-containing Qingxin Tongmai decoction (QXTMD) on the apoptosis rate of mouse mononuclear macrophage cell line RAW264.7 induced by Acetylated low density lipoprotein (ac-LDL) and the expressions of type A scavenger receptor (SR-A), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2),

[收稿日期] 20180709(030)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273716);江苏省“六大人才高峰”资助项目(WSN-067);南京市医学科技发展项目(YKK15119)

[第一作者] 刘学谦, 在读硕士, 从事中西医心血管方面研究, E-mail: liuxueqian1753@163.com

[通信作者] *曹守沛, 博士, 副主任医师, 从事中西医心血管病临床研究, Tel: 025-52276242, E-mail: caosp336@126.com;

*宋耀鸿, 博士, 副主任医师, 从事中医心血管病临床研究, Tel: 025-52276242, E-mail: tcmantichf@126.com

Bcl-2-associated X protein (Bax), inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), exploring the possible mechanism of QXTMD in the treatment of atherosclerosis. **Method:** Eight New Zealand rabbits were randomly divided into the atorvastatin group (2.6 g·kg⁻¹) low, medium and high-dose QXTMD groups (3.33, 6.66, 13.32 mg·kg⁻¹). After 7 days of gavage, the carotid blood was collected to prepare drug-containing serum. The RAW264.7 cell line was stimulated with 2.5%, 5%, 10%, and 20% drug-containing serum culture for 6, 12, and 24 h, respectively. The cell proliferation rate was observed by cell counting kit-8 (CCK-8) method. The RAW264.7 cell line was cultured *in vitro* and divided into blank group, model group, atorvastatin group, and low, medium and high-dose QXTMY groups. The cells in blank group were cultured with bovine serum albumin (BSA). The model group was stimulated with BSA + 50 mg·L⁻¹ ac-LDL for 24 h. The other groups were stimulated with BSA + 50 mg·L⁻¹ ac-LDL + 10% drug-containing serum for 24 h. The apoptosis rate and SR-A expression of RAW264.7 cells were detected by flow cytometry. The expressions of Bcl-2, Bax and IRE1 α protein were detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the model group could increase the apoptosis rate of RAW264.7 cells ($P < 0.01$) and the expressions of Bax and SR-A protein ($P < 0.01$), but decrease the expression of Bcl-2 protein ($P < 0.05$). Compared with the model group, low, medium and high-dose QXTMD groups could decrease the apoptosis rate of RAW264.7 cell line ($P < 0.05$) and the expressions of SR-A and IRE1 α ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The low-dose QXTMD group and the high-dose QXTMD group could decrease the expression of Bax ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The middle-dose group and the high-dose group could decrease the expression of Bcl-2 ($P < 0.01$). **Conclusion:** QXTMD can reduce the apoptosis rate of macrophages. The mechanism of atherosclerosis may be related to the expressions of Bax, IRE α , SR-A and anti-apoptotic protein Bcl-2.

[Key words] cool blood method; Qingxin Tongmai decoction; atherosclerosis; macrophage; apoptosis

心血管病目前已成为我国城乡人群的第 1 位死亡原因。《中国心血管病报告 2017》指出;心血管病死亡占居民疾病死亡构成 40% 以上,中国心血管病患病率处于持续上升阶段。今后 10 年心血管病患者人数仍将快速增长^[1]。我国居民所患心血管病以缺血性心血管病(包括冠心病和脑血栓)为主,其病理基础是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)。现代医学认为,AS 病理过程涉及到脂质沉积、内皮损伤、泡沫细胞堆积、斑块形成破裂等^[2],其中,巨噬细胞凋亡在 AS 进展中发挥着重要的作用^[3]。巨噬细胞的跨膜蛋白—A 型清道夫受体(type A scavenger receptors, SR-A),可摄取被修饰的低密度脂蛋白,如氧化低密度脂蛋白、乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein, ac-LDL)可诱导巨噬细胞凋亡,促使泡沫细胞形成,这是早期 AS 形成的标志^[4],大量的巨噬细胞凋亡也可促进斑块的不稳定性^[5],增加心血管事件发生的风险。因此抑制巨噬细胞的凋亡有利于减缓 AS 的进展。

传统中医并无 AS 病名,与其相关论述主要集中在“胸痹”“心悸”等部分,其病机多认为是有形之邪,如痰浊、瘀血、痰热等相互交织,结于脉道所致。因此,现代临床多从清热化痰、活血化瘀等方面治疗 AS。如殷小杰等^[6]研究发现三黄泻心汤活血化瘀

优势方可增加 B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)的表达,降低 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)的表达,减轻氧化低密度脂蛋白诱导损伤的血管内皮细胞凋亡,治疗 AS;陈宁等^[7]发现化痰祛瘀方可调控线粒体呼吸链酶复合物,降低脂质沉积,减缓 AS 的发展。清心通脉饮是依据周仲瑛教授提出的“瘀热学说”,根据凉血化痰的治疗大法拟定的用于治疗不稳定型心绞痛气阴两虚、瘀热互结证的基础方^[8],它主要由太子参、麦冬、赤芍、金银花、甘松、生地黄组成。临床上运用清心通脉饮治疗不稳定性心绞痛具有良好的效果,但其治疗机制仍不明确,笔者通过 ac-LDL 对巨噬细胞进行脂质负荷,建立巨噬细胞凋亡模型,观察清心通脉饮对巨噬细胞凋亡率,SR-A 表达及相关蛋白 Bax, Bcl-2, 肌醇需要酶 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α)的影响,为清心通脉饮治疗 AS 提供可能的治疗靶点,为以后的临床研究提供依据。

1 材料

1.1 动物与细胞 雄性新西兰大耳白兔 8 只,体质量(2.5 ± 0.5) kg,由南京青龙山动物繁殖场提供,合格证号 SCXK(苏)2012-0008。动物实验经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理编号 ACU160808)。RAW264.7 细胞系由南京中医药

大学第一临床分子生物学实验室王礼宁老师赠予。

1.2 药物与制备 清心通脉饮由太子参、麦冬、赤芍、金银花、甘松、生地黄组成,由南京中医药大学第三附属医院制剂室制备。各药物均由南京中医药大学第三附属医院购买,由南京中医药大学第三附属医院谈宣忠教授鉴定均为正品,符合 2015 年版《中国药典》规范。取太子参、麦冬、赤芍、金银花、甘松、生地黄各等分,加水浸泡 30 min,开始煎煮时加水高于药物 3 cm,武火煮沸后文火继续煎煮 30 min,合并 3 次液,浓缩制成水煎剂,含 $2.56 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,放 $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存。阿托伐他汀钙片剂(辉瑞制药有限公司,商品名立普妥,批号 H20051408),使用时制备成 $2.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量的阿托伐他汀钙混悬液灌胃。

1.3 试剂 β -肌动蛋白(β -actin), IRE1 α , Bcl-2, Bax 兔单克隆抗体,二抗山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国 CST 公司,批号均为 03/2017);BCA 蛋白浓度定量试剂盒,ac-LDL,高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液,细胞增殖的活性检测-8(CCK-8)试剂盒(北京 Solarbio 公司,批号分别为 20170327,20170629,20170330,4071012);DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司,批号 AB10131152);胎牛血清(美国 Gemini 公司,批号 AB0E00G);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 Roche 生物有限公司,批号 21901900);大鼠抗小鼠 CD204 抗体(美国 Roche 生物有限公司,批号 219001900);青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司,批号 1768986)。

1.4 仪器 HWS-26 型电热恒温水浴锅(上海一恒公司);C6 型流式细胞仪,HERAcell 150i 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司);CKX41 型倒置式生物显微镜(日本 Olympus 公司);ACB-4A 型垂直流超净工作台(新加坡 Esco 公司);MB100-4A 型微孔板恒温振荡器(中国杭州奥盛仪器有限公司);Enspire 型酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司);Image quant las 4000 型超灵敏化学发光成像仪(美国通用公司);CIIB-100 型恒温金属水浴,HZL-X160 型恒温振荡培养箱,TS-1000 型摇床(中国海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Bio-Rad 型蛋白电泳仪/伯乐小型垂直电泳槽,Mini-protean Tetra Cell 型蛋白转印槽,Powerpac Basic 型湿转印系统(美国伯乐公司);5417R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 将 8 只成年雄性新西兰兔随

机分为 4 组,分别为阿托伐他汀混悬液组($2.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),清心通脉饮低、中、高剂量组($3.33, 6.66, 13.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。每日 1 次,连续 7 d,于末次灌胃后 2 h 颈动脉采血,以 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 分离血清, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 再次离心 5 min,合并同组含药血清,所取血清于 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅灭活 30 min, $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.2 CCK-8 确定含药血清刺激细胞浓度与时间 接种 1.5×10^5 个对数生长期的巨噬细胞 RAW264.7 于 96 孔板上,按照 2.5%, 5%, 10%, 20% 的含药血清配置培养液,对每孔细胞分别刺激 6, 12, 24 h 进行检测。向各孔中加入培养基体积 10% 的 CCK-8 溶液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱孵育 1 h,酶标仪读取波长 450 nm 下的吸光度 A,根据公式计算细胞活力 = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.3 分组及干预 取对数生长期的 RAW264.7 细胞系 1.2×10^6 个接种于 6 孔板,分为 6 组,分别为空白组、模型组、阿托伐他汀组、清心通脉饮低、中、高剂量组,待细胞贴壁后,用含有 10% BSA 的 DMEM 培养液预处理细胞 6 h 后,各组分别用以下方法干预,正常组给予含 10% BSA 的 DMEM 培养液;模型组给予 10% BSA 的 DMEM 培养液 + $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ac-LDL;西药组给予 10% 阿托伐他汀含药血清的 DMEM 培养液 + $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ac-LDL;清心通脉饮低剂量组给予 10% 清心通脉饮低剂量含药血清的 DMEM 培养液 + $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ac-LDL;清心通脉饮中剂量组给予 10% 清心通脉饮中剂量含药血清的 DMEM 培养液 + $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ac-LDL;清心通脉饮高剂量组给予 10% 清心通脉饮高剂量含药血清的 DMEM 培养液 + $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ac-LDL。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bax, Bcl-2, IRE1 α 蛋白的表达 提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测试总蛋白浓度,加入 4 \times 蛋白上样缓冲液煮沸 5 min,使蛋白变性;配制 10% 的分离胶和 5% 浓缩胶,蛋白上样 $40 \text{ }\mu\text{g}$ /孔;蛋白电泳,湿转 70 min 到 PVDF 膜上,室温封闭 2 h,孵育一抗(β -actin, Bax, Bcl-2, IRE1 α , 1:1 000),用 5% BSA 配制, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜;用 5% BSA 稀释(1:1 000)标记有辣根过氧化物酶二抗,放置摇床常温孵育 2 h;滴加曝光液,进行曝光,用 Image J 软件分析灰度值,每组分别用药物刺激 24 h。

2.5 流式细胞技术检测细胞的凋亡率 取对数生长期的细胞接种在 6 孔板上,按照实验需要处理后,

以不含 EDTA 的胰酶消化和收集细胞至 1.5 mL 离心管中,300 r·min⁻¹离心 10 min,去上清,以 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒的染色工作液重新悬浮细胞(PI 2 μL + FITC 2 μL + binding buffer 染色液 100 μL),常温避光孵育 1 h,上机前用磷酸盐缓冲液(PBS)溶液补足到 1 mL 吹打均匀,上机测试。

2.6 流式细胞技术检测细胞 SR-A 的表达 取对数生长期的细胞接种在 6 孔板上,按照实验需要处理后,以不含 EDTA 的胰酶消化和收集细胞至 1.5 mL 离心管中,300 r·min⁻¹离心 10 min,去上清,以 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒的染色工作液重新悬浮细胞(含 PI 2 μL + FITC 2 μL + binding buffer 染色液 100 μL),用含 0.2% BSA 的 PBS 加 CD204-PE 抗体配制抗体工作液(1:25)4 μL,比例按照每毫升抗体工作液孵育 1 × 10⁵ 个细胞,常温避光孵育 1 h,上机前用 PBS 溶液补足到 1 mL 吹打均匀,上机测试。

2.7 统计学方法 数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,所有结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度清心通脉饮含药血清对 RAW264.7 细胞系增殖的影响 每组分别用 2.5%,5%,10%,20% 这 4 个体积分数梯度的含药血清分别刺激 RAW264.7 细胞系 3 个时间段(6,12,24 h),与空白组比较,清心通脉饮低剂量组 10% 浓度含药血清刺激细胞 6 h 可明显增加细胞活力($P < 0.05$),清心通脉饮中剂量组 2.5% 浓度含药血清刺激细胞 24 h 可明显降低细胞活力($P < 0.05$),阿托伐他汀组 2.5%,5%,20% 浓度含药血清刺激细胞 24 h 可降低细胞活力($P < 0.05, P < 0.01$),抑制细胞增殖。见表 1。与空白组比较,实验组 10% 浓度含药血清刺激细胞 24 h,细胞活力无统计学意义。

表 1 不同浓度清心通脉饮含药血清对 RAW264.7 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

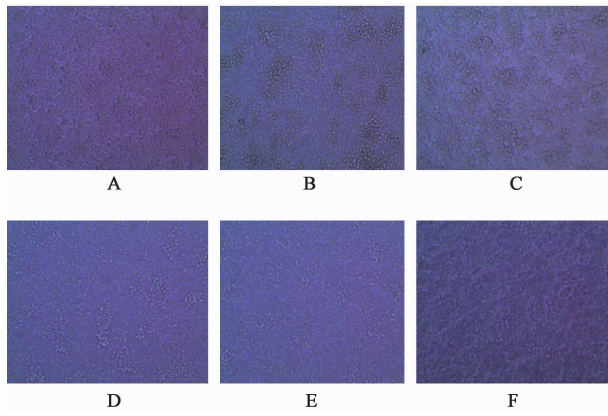
Table 1 Effect of different concentrations of Qingxin Tongmai decoction containing serum on activity of RAW264.7 cell line($\bar{x} \pm s, n = 6$) %

药物	体积分数/%	6 h	12 h	24 h
空白	-	100.00	100.00	100.00
	-	100.00	100.00	100.00
	-	100.00	100.00	100.00
	-	100.00	100.00	100.00
清新通脉饮低剂量	2.5	104.02 ± 15.77	101.83 ± 4.16	104.23 ± 0.68
	5	110.07 ± 16.90	103.64 ± 6.67	107.78 ± 8.60
	10	115.95 ± 7.51 ¹⁾	102.27 ± 5.65	97.22 ± 5.70
	20	98.69 ± 6.54	108.26 ± 5.62	104.85 ± 1.63
清新通脉饮中剂量	2.5	103.50 ± 7.95	99.35 ± 3.20	84.90 ± 5.49 ¹⁾
	5	104.63 ± 4.81	108.86 ± 5.22	92.42 ± 9.43
	10	109.64 ± 6.25	101.79 ± 6.05	92.62 ± 4.85
	20	110.46 ± 8.51	110.10 ± 4.49	91.38 ± 3.85
清新通脉饮高剂量	2.5	110.70 ± 4.29	107.25 ± 5.18	87.28 ± 0.34 ¹⁾
	5	101.71 ± 6.22	108.62 ± 7.01	98.91 ± 5.89
	10	110.77 ± 4.28	107.39 ± 6.26	94.26 ± 3.14
	20	103.62 ± 8.27	102.97 ± 1.23	97.94 ± 1.78
阿托伐他汀	2.5	98.48 ± 10.78	104.04 ± 1.52	89.23 ± 4.39 ¹⁾
	5	98.01 ± 13.26	102.23 ± 4.96	88.64 ± 3.22 ¹⁾
	10	106.63 ± 9.33	108.10 ± 3.76	95.24 ± 3.83
	20	103.15 ± 6.40	98.05 ± 7.04	53.05 ± 3.41 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 RAW264.7 细胞系形态的变化 各组含药血清刺激细胞 24 h 后 RAW264.7 细胞体积增大,细胞

由圆形分化成梭形,并伴有多个触角,且贴壁能力增强。见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 阿托伐他汀组; D. 清心通脉饮低剂量组; E. 清心通脉饮中剂量组; F. 清心通脉饮高剂量组(图 2 同)

图 1 RAW.264.7 细胞形态的变化(倒置显微镜, ×10)
Fig.1 RAW.264.7 cell morphology changes(inverted microscope, ×10)

3.3 清心通脉饮对 RAW264.7 细胞系凋亡的影响
与空白组比较,模型组的凋亡率显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,清心通脉饮低、中、高剂量组可明显降低 RAW264.7 细胞系的凋亡($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 清心通脉饮对 RAW264.7 细胞系凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effect of Qingxin Tongmai decoction on apoptosis rate of RAW264.7 cell line($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	凋亡率/%
空白	-	4.6 ± 0.07
模型	-	48.7 ± 0.06 ²⁾
阿托伐他汀	10	19.7 ± 0.11 ⁴⁾
清心通脉饮低剂量	10	25.4 ± 0.02 ³⁾
清心通脉饮中剂量	10	25.2 ± 0.12 ³⁾
清心通脉饮高剂量	10	24.1 ± 0.08 ³⁾

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

表 4 清心通脉饮对 RAW264.7 细胞 Bax, Bcl-2, IRE1 α 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4 Effect of Qingxin Tongmai decoction on Bax, Bcl-2, IRE1 α protein expression of RAW264.7 cell($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	IRE1 α / β -actin
正常	-	0.15 ± 0.01	0.67 ± 0.06	0.84 ± 0.07
模型	-	1.78 ± 0.23 ²⁾	0.30 ± 0.06 ¹⁾	0.99 ± 0.07
阿托伐他汀	10	0.85 ± 0.07 ⁴⁾	0.50 ± 0.14	0.55 ± 0.07 ⁴⁾
清心通脉饮低剂量	10	1.24 ± 0.25 ³⁾	0.58 ± 0.11	0.75 ± 0.14 ³⁾
清心通脉饮中剂量	10	1.54 ± 0.07	0.81 ± 0.16 ⁴⁾	0.71 ± 0.07 ³⁾
清心通脉饮高剂量	10	0.95 ± 0.22 ⁴⁾	0.97 ± 0.16 ⁴⁾	0.63 ± 0.08 ⁴⁾

3.4 清心通脉饮对 RAW264.7 细胞 SR-A 表达率的影响
与空白组比较,模型组可显著增加 SR-A 表达($P < 0.01$);与模型组比较,清心通脉饮低、中、高剂量组可明显降低 SR-A 受体的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 清心通脉饮对 RAW264.7 细胞 SR-A 表达率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of Qingxin Tongmai decoction on SR-A frequency of RAW264.7 cell($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	SR-A 表达率/%
空白	-	19.69 ± 6.33
模型	-	52.28 ± 3.89 ²⁾
阿托伐他汀	10	27.86 ± 3.59 ⁴⁾
清心通脉饮低剂量	10	25.64 ± 8.38 ⁴⁾
清心通脉饮中剂量	10	39.06 ± 2.38 ³⁾
清心通脉饮高剂量	10	30.05 ± 4.23 ⁴⁾

3.5 清心通脉饮对 RAW264.7 细胞 Bax, Bcl-2, IRE1 α 蛋白表达的影响
与正常组比较,模型组可显著增加 Bax 蛋白表达($P < 0.01$),降低 Bcl-2 蛋白表达($P < 0.05$);与模型组比较,清心通脉饮低、高剂量组可明显降低 Bax 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$);中、高剂量组可显著增加 Bcl-2 蛋白表达($P < 0.01$)。与空白组比较,模型组可增加 IRE1 α 蛋白表达,但差异无统计学意义;与模型组比较,清心通脉饮低、中、高剂量组均可降低 IRE1 α 蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 4,图 2。

4 讨论

清心通脉饮立足于痰浊、瘀血这些 AS 的基本病机,通过益气养阴,凉血化瘀治疗 AS。其中太子参、麦冬益气养阴;赤芍活血通脉,阻断瘀热再生,生地黄滋阴清热,凉血活血;银花清热解毒,除热毒

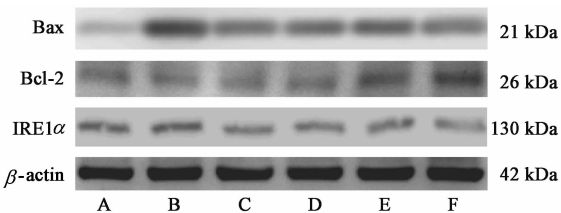


图 2 RAW264.7 细胞 Bax, Bcl-2, IRE1 α 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of Bax, Bcl-2, IRE1 α protein expression of RAW264.7 cell

滋生之源,防止痰瘀热毒胶结为患,甘松行气止痛,诸药配伍,具有益气养阴,凉血化瘀的功效。AS 病变进展是不稳定型心绞痛发病的重要机制之一,AS 的发展,可引起进行性冠状动脉狭窄。同时大量临床实践发现^[9-11],AS 的病因病机与痰、瘀、虚有关,痰热互结,结于血脉是 AS 的关键病机。

巨噬细胞凋亡在 AS 中起到关键作用^[3,12]。巨噬细胞凋亡在病变早期可以抑制 AS 的进展,晚期则加剧 AS^[5]。巨噬细胞可表达多种清道夫受体,如 SR-A,凝素样氧化低密度脂蛋白受体(SR-B),脂肪酸转运蛋白(FATP)等^[13]。清道夫受体是拥有不同结构模式的识别受体,根据其识别和去除脂蛋白的能力被鉴定,它们的功能包括病原体清除、细胞内物质运载、脂质运输,甚至作为味觉受体等^[14]。SR-A 是一种细胞表面糖蛋白,SR-A 在巨噬细胞中高度表达并介导经修饰的低密度脂蛋白胆固醇的摄入,其表达水平可被多种药物上调,有研究表明将 ac-LDL 加入被氧化低密度脂蛋白预处理过的 TPH-1 细胞中温育,可明显增加 SR-A 表达^[15]。巨噬细胞中 SR-A 的抑制显著改善 ApoE 小鼠的泡沫细胞形成和 AS 发展^[16]。

SR-A 摄取 ac-LDL 导致过量的胆固醇脂在细胞内聚集和泡沫细胞的形成^[15],IRE1 α 在负载脂质的巨噬细胞中被激活^[17]。IRE1 α 是巨噬细胞内质网跨膜感受蛋白之一,也是未折叠蛋白的主要调节因子^[18],可介导非折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)触发内质网应激,导致细胞凋亡。IRE1 α 的激增可激活 c-Jun 氨基端激酶的(JNK)并磷酸化,引起一系列 IRE1 级联反应^[19],诱导巨噬细胞凋亡,其中包括下调 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族中抗凋亡因子 Bcl-2 表达,上调促凋亡因子 Bak 和 Bax 表达来启动细胞凋亡程序^[20]。

清心通脉饮在临床上治疗不稳定性心绞痛具有良好的疗效^[20],课题组通过 CCK-8 法观察实验组含

药血清对 RAW264.7 细胞系增殖的影响,筛选合适的给药浓度和时间。将各组含 2.5%,5%,10%,20% 浓度含药血清培养液分别刺激 RAW264.7 细胞系 6,12,24 h,结果显示与空白组比较,清心通脉饮低剂量组 10% 浓度含药血清刺激细胞 6 h 可明显增加细胞活力,清心通脉饮中剂量组 2.5% 浓度含药血清刺激细胞 24 h 可明显降低细胞活力,阿托伐他汀组 2.5%,5%,20% 浓度含药血清刺激细胞 24 h 可降低抑制细胞增殖,抑制细胞增殖。实验组 4 种药物 10% 浓度含药血清在刺激细胞 12 h 和 24 h 对细胞的增殖抑制率均无统计学意义,说明该浓度的药物细胞毒性较小。考虑临床清心通脉饮治疗周期较长,笔者最终选用 10% 浓度的含药血清刺激细胞 24 h 进行实验。

课题组运用流式细胞技术观察各组细胞凋亡率,结果显示与空白组比较,模型组细胞明显增高 RAW264.7 细胞系的凋亡率,与模型组比较,清心通脉饮低、中、高剂量组可明显降低细胞凋亡率,说明 ac-LDL 可诱导巨噬细胞 RAW264.7 细胞系凋亡,清心通脉饮低、中、高剂量组可降低 RAW264.7 细胞系的凋亡。笔者进一步观察了清心通脉饮对相关凋亡蛋白的影响,实验结果显示,与空白组比较,模型组可明显增加 SR-A 表达;与模型组比较,清心通脉饮低、中、高剂量组均可明显降低 SR-A 表达,说明 SR-A 可摄取 ac-LDL 诱导巨噬细胞凋亡,清心通脉饮可降低 SR-A 的表达,减少巨噬细胞凋亡,这与之前人们研究的结果一致^[13]。与模型组比较,清心通脉饮低、中、高剂量组均能降低 IRE1 α 的表达;清心通脉饮低、高剂量组可降低促凋亡蛋白 Bax 的表达,清心通脉饮中、高剂量组可增加促凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。清心通脉饮中剂量组可降低 Bax 表达,但与模型组比较,差异无统计学意义,考虑与样本量较小有关。

综上所述,清心通脉饮可降低巨噬细胞凋亡,其抗动脉粥样硬化的机制可能与降低 SR-A, IRE1 α , Bax 的表达,增加 Bcl-2 的表达有关。但其具体机制仍需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J].中国循环杂志,2018,33(1):1-8.
- [2] Perrotta P, Veseli B E, Van der Veken B, et al. Pharmacological strategies to inhibit intra-plaque angiogenesis in atherosclerosis[J]. Vascul Pharmacol,

- 2018, doi:10.1016/j.vph.2018.06.014.
- [3] Andres V, Pello O M, Silvestre-Roig C. Macrophage proliferation and apoptosis in atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(5) : 429-438.
- [4] Orekhov A N. LDL and foam cell formation as the basis of atherogenesis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2018, 29(4) : 279-284.
- [5] Gonzalez L, Trigatti B L. Macrophage apoptosis and necrotic core development in atherosclerosis; a rapidly advancing field with clinical relevance to imaging and therapy [J]. *Can J Cardiol*, 2017, 33(3) : 303-312.
- [6] 殷小杰, 马晓静, 王岚, 等. 三黄泻心汤活血化瘀优势方抗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(22) : 83-88.
- [7] 陈宁, 宋囡, 贾连群, 等. 化痰祛痰方对 AS 家兔肝脏线粒体呼吸链酶复合物的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(7) : 171-176.
- [8] 周仲瑛. 瘀热相搏证的系列研究(一) [J]. *天津中医药大学学报*, 2008, 27(3) : 151-155.
- [9] 刘美之, 郎艳松, 张鑫月, 等. 从痰、瘀、毒论治动脉粥样硬化研究进展 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(9) : 800-803.
- [10] 孙少卫, 童文娟, 谢雪娇, 等. 动脉粥样硬化的中西医观 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(5) : 524-528.
- [11] 钟伟, 王永刚, 于远望, 等. 中医防治颈动脉粥样硬化的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(8) : 2043-2045.
- [12] 伦琦星, 刘炳琳, 李军, 等. 猫耳刺皂苷 ilexpernoside C 抑制低密度脂蛋白多聚体诱导泡沫细胞形成的活性及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(3) : 498-503.
- [13] Kzhyshkowska J, Neyen C, Gordon S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis [J]. *Immunobiology*, 2012, 217(5) : 492-502.
- [14] Tsuzuki S, Kimoto Y, Lee S, et al. A novel role for scavenger receptor B1 as a contributor to the capture of specific volatile odorants in the nasal cavity [J]. *Biomed Res*, 2018, 39(3) : 117-129.
- [15] ZHU G Y, ZHU X L, LI R T, et al. Atorvastatin inhibits scavenger receptor A and monocyte chemoattractant protein-1 expressions in foam cell [J]. *Chin J Cardiol Med*, 2007, 35(7) : 666-669.
- [16] DAI X Y, CAI Y, MAO D D, et al. Increased stability of phosphatase and tensin homolog by intermedin leading to scavenger receptor A inhibition of macrophages reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(4) : 509-520.
- [17] To M, Peterson C W, Roberts M A, et al. Lipid disequilibrium disrupts ER proteostasis by impairing ERAD substrate glycan trimming and dislocation [J]. *Mol Biol Cell*, 2017, 28(2) : 270-284.
- [18] Abdullah A, Ravanan P. The unknown face of IRE1 alpha-Beyond ER stress [J]. *Eur J Cell Biol*, 2018, 97(5) : 359-368.
- [19] 刘斯文, 郭晓辰, 张军平. 内质网应激中 IRE1 级联反应对动脉粥样硬化的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(6) : 1147-1152.
- [20] ZHOU X, Tabas I. The UPR in atherosclerosis [J]. *Semin Immunopathol*, 2013, 35(3) : 321-332.

[责任编辑 周冰冰]