

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

赵帅, 张烈元, 冯文伟, 张为章, 郭永宁, 赵子聪, 陈伯钧*
(广州中医药大学第二附属医院, 广州 510006)

[摘要] **目的:** 基于肝 X 受体 α /核转录因子- κ B (LXR α /NF- κ B) 通路探讨疏肝温胆汤对家兔动脉粥样硬化的作用及机制。**方法:** 采用小牛血清白蛋白免疫损伤、高脂饲养和束缚情志应激的方法建立肝郁型的新西兰兔动脉粥样硬化模型。随机分为 6 组, 分别为正常组, 模型组, 阿托伐他汀组, 疏肝温胆汤低、中、高剂量组 (2.18, 6.54, 19.62 g·kg⁻¹·d⁻¹)。造模成功后, 分别给予阿托伐他汀、疏肝温胆汤低、中、高剂量灌胃, 正常组和模型组均予同浓度生理盐水灌胃。连续灌胃 6 周。给药结束后, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法检测各组主动脉的病理变化; 分别采用酶法、硝酸还原酶法和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测各组血清中总胆固醇 (TC), 甘油三酯 (TG), 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C), 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C), 一氧化氮 (NO) 和内皮素-1 (ET-1) 的水平; 采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测主动脉组织中 C 反应蛋白 (CRP), 白细胞介素-1 β (IL-1 β), 白细胞介素-6 (IL-6) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) mRNA 的表达; 采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测主动脉组织的 LXR α /NF- κ B 信号通路蛋白的表达。**结果:** 与正常组比较, 模型组血管腔明显狭窄, 粥样斑块形成明显, 可见大量的细胞内泡沫样改变, 而阿托伐他汀组和疏肝温胆汤高、中、低剂量组的血管狭窄、粥样斑块及泡沫样改变的程度均较模型组低。与正常组比较, 模型组的 TG, TC 和 LDL-C 升高 ($P < 0.05$), HDL 降低 ($P < 0.05$), 血清中 NO 明显降低 ($P < 0.05$), ET-1 明显升高 ($P < 0.05$), hs-CRP, IL-1 β , IL-6 和 MMP-9 的表达均明显升高 ($P < 0.05$), LXR α 的蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), NF- κ B 的蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阿托伐他汀及疏肝温胆汤低、中、高剂量组的 TG, TC 和 LDL-C 含量明显降低 ($P < 0.05$), 阿托伐他汀组和疏肝温胆汤高剂量组血清中 NO 明显升高 ($P < 0.05$), ET-1 明显降低 ($P < 0.05$), 阿托伐他汀组及疏肝温胆汤低、中、高剂量组中 CRP, IL-1 β , IL-6 和 MMP-9 的表达量均降低 ($P < 0.05$), 阿托伐他汀组、疏肝温胆汤各剂量组中 LXR α 的蛋白表达量均升高 ($P < 0.05$), NF- κ B 的蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:** 疏肝温胆汤通过调控 LXR α /NF- κ B 信号通路改善血管内皮细胞功能和动脉粥样斑块的稳定性, 从而发挥抗动脉粥样硬化效应。

[关键词] 疏肝温胆汤; 动脉粥样硬化; 肝 X 受体 α ; 核转录因子- κ B; 信号通路

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5; R318.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0108-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191639

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190505.0956.026.html>

[网络出版时间] 2019-05-08 9:09

Effect of Shugan Wendan Decoction on LXR α , NF- κ B and Endothelial Function in Atherosclerosis Rabbits

ZHAO Shuai, ZHANG Lie-yuan, FENG Wen-wei, ZHANG Wei-zhang,
GUO Yong-ning, ZHAO Zi-cong, CHEN Bo-jun*

(The Second Clinical Medicine School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Shugan Wendan decoction in treating atherosclerosis based on liver X receptor α (LXR α) /nuclear factor- κ B (NF- κ B) signal. **Method:** A New Zealand rabbit model of atherosclerosis with liver-Qi stagnation was established by using calf serum albumin immune

[收稿日期] 20190223(004)

[基金项目] 广东省中医院中医药科学技术研究专项(YN2015MS11); 广东省中医药局科研项目(20191168)

[第一作者] 赵帅, 在读博士, 主治医师, 从事中西医结合心血管内科研究, E-mail: 531522885@qq.com

[通信作者] * 陈伯钧, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合心血管内科研究, E-mail: gzcjbj@163.com

injury, high fat feeding and bondage emotional stress method. These rabbits are randomly divided into 6 groups, control group, model group, atorvastatin group, Shugan Wendan decoction low, medium and high dose group ($2.18, 6.54, 19.62 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). After successful modeling, the rabbits were treated by injecting drugs with Atorvastatin and low, middle and high dose Shugan Wendan decoction to gastric. The control group and the model group were given intragastric administration of saline in the same volume. The period of gavage is 6 weeks. The pathological changes of the rabbits were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum levels of totalcholesterol (TC), triglyceride (TG), low density extremityprotein (LDL-C), high density extremity protein (HDL-C), nitric oxide (NO), and endothelin-1 (ET-1) of the rabbits were detected by enzyme method, nitrate reductase method, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. The gene expression of CRP, IL-1 β , IL-6 and MMP-9 in the aorta was detected by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) method. The protein expression of LXR α /NF- κ B signaling pathway was detected by Western blot. **Result:** Compared with normal control group, in model group, the lumen of the blood vessels was significantly narrowed, atheromatous plaques were formed, and a large number of intracellular foam-like changes were seen. In atorvastatin group and Shugan Wendan decoction group, the blood vessels in high, middle, and low concentration groups were narrowed. Atherosclerotic plaques and foam-like changes were all lower than the model group. Compared with the normal control group, the TG, TC, and LDL-C levels in the model group increased ($P < 0.05$), HDL decreased ($P < 0.05$), NO decreased ($P < 0.05$), ET-1 increased ($P < 0.05$), the expression levels of hs-CRP, IL-1 β , IL-6 and MMP-9 all increased ($P < 0.05$), the expression of LXR α protein in the model group was decreased ($P < 0.05$), and the protein expression of NF- κ B was increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the levels of TG, TC and LDL-C the atorvastatin group and low, medium, and high dose Shugan Wendan decoction group decreased, ($P < 0.05$), NO in the atorvastatin group and the high dose Shugan Wendan decoction group increased and ET-1 decreased ($P < 0.05$). In group comparison, the expression levels of CRP, IL-1 β , IL-6 and MMP-9 in the atorvastatin group, the low, middle and high dose Shugan Wendan decoction groups all decreased ($P < 0.05$). The expression of LXR α protein in the group was increased ($P < 0.05$) and the protein expression of NF- κ B was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shugan Wendan decoction can enhance the function of vascular endothelial cells and the stability of atherosclerotic plaque by regulating LXR α /NF- κ B signaling pathway.

[**Key words**] Shugan Wendan decoction; atherosclerosis; liver X receptor α ; nuclear factor- κ B; signaling pathway

近年来,随着人类生活水平的不断提高,饮食结构、生活习惯的改变,动脉粥样硬化的发病率逐年升高且趋于年轻化,严重影响人类的生命健康和生活质量^[1]。目前,临床治疗动脉粥样硬化的主要药物是他汀类药物。但是此类药物临床有副作用,对肝肾功能也有影响,所以对其整体治疗效果需要进行评价。研发新的抗动脉粥样硬化药物具有极大医学意义。近年来,中药在防治动脉粥样硬化的形成方面具有良好的效果^[2-6],且随着动脉粥样硬化机制研究的深入,目前越来越多的研究证明,中药可能从多个靶点对动脉粥样硬化的发展机制进行干预。如刘学谦等^[7]应用清心通脉饮进行细胞研究,证实其可降低巨噬细胞凋亡率,可能通过调控相关促凋亡蛋白、抗凋亡蛋白的表达进而起到治疗动脉粥样

硬化的作用。殷小杰等^[8]的研究表明三黄泻心汤活血化痰优势方具有抑制细胞凋亡、减轻炎症反应和抗氧化的作用,可能与抗动脉粥样硬化有密切关系。中药作用温和持久,作用机制具有多效应、多位点等特征,这些都预示中药在防治动脉粥样硬化方面将会有广阔的开发应用前景。

疏肝温胆汤是广东省中医院陈伯钧教授根据《三因极一病证方论》中的温胆汤,并结合多年的临床经验及相关证候调查结果拟定而成。但疏肝温胆汤在动脉粥样硬化的机制尚不清晰,因此本研究通过制备家兔动脉粥样硬化模型,然后用疏肝温胆汤作用于家兔动脉粥样硬化模型,进一步探讨疏肝温胆汤在防治动脉粥样硬化方面的作用机制,为治疗动脉粥样硬化提供理论依据。

1 材料

1.1 药物及试剂 疏肝温胆汤由法半夏 9 g, 竹茹 20 g, 枳实 12 g, 陈皮 12 g, 炙甘草 6 g, 茯苓 20 g, 柴胡 12 g, 白芍 20 g, 丹参 20 g 组成。上述所有中药为配方颗粒制剂, 购自广东一方制药有限公司, 批号分别为 7021871, 7011781, 6123421, 6070921, 7011071, 6121011, 6100131, 6121391, 7010781, 按比例均匀混合调配。小牛血清蛋白(广州威佳生物有限公司, 批号 20160725); 戊巴比妥钠, 二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司, 批号分别为 209H1343, 212H1121); 无水乙醇, 二甲苯(中国国药集团化学试剂有限公司, 批号分别为 F20151101, F20151203); 苏木素-伊红(HE)染色液(北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1125); 一氧化氮(NO)测试盒(硝酸还原酶法)(南京建成生物工程研究所, 批号 20160812); 内皮素-1(ET-1)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海古朵生物科技有限公司, 批号 20150212); 酶比色法总胆固醇(TC), 甘油三酯(TG), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(罗氏诊断产品有限公司, 批号分别为 768532-31, 768342-22, 778241-06, 758342-13); BCA 蛋白定量试剂盒(美国密理博公司, 批号 20150304012); 羊抗小鼠肝 X 受体 α (LXR α) 抗体, 羊抗小鼠核转录因子- κ B (NF- κ B) 抗体, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体, 核纤层蛋白 B(Lamin B)抗体(美国圣克鲁兹生物技术公司, 批号分别为 NI129023, NI321045, NI432032, NI543142)。

1.2 动物 48 只清洁级 3 月龄新西兰家兔, 购自广州市花都区花东信华实验动物养殖场, 体质量 2.0 ~ 3.0 kg, 许可证号 SYXK(粤)2017-0012, 在广东省中医院动物实验中心饲养。适应性喂养 10 d, 饲养条件: 室温(22 ± 4) °C, 相对湿度(58 ± 6)%, 光照与黑暗循环时间为 12 h, 饮水不限; 饮水经过 121 °C 高温灭菌 30 min, 自由摄取。本研究通过广东省中医院动物伦理委员会审查, 伦理号 2017002。

1.3 仪器 H1850R 型台式冷冻高速离心机(中国湖南湘仪集团); COBAS C311 型全自动生化分析仪(瑞士罗氏诊断有限公司); 752 型紫外可见分光光度计(上海奥谱勒仪器有限公司); Eclipse E100 型正置光学显微镜(日本尼康仪器有限公司); MP-4 型电泳仪, Trans-Blot Turbo 型全能型蛋白快速转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); RM2015 型病理切片机, EG1150H 型包埋机, HI1220 型烘片机, HI1210 型摊

片机(德国徕卡仪器有限公司); ABI 9700 型基因扩增仪, ABI 9700 型 Real-time PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

2 方法

2.1 造模 48 只新西兰家兔自由饲养 10 d 后称体质量, 随机抽取 6 只作为正常组, 一次性耳缘静脉注射 0.25 g·kg⁻¹ 的生理盐水, 喂普通饲料, 其余 42 只新西兰家兔, 分别各给予一次性耳缘静脉注射牛血清白蛋白 0.25 g·kg⁻¹, 喂高脂饲料(2% 胆固醇, 4% 猪油, 10% 蛋黄粉及 84% 基础饲料)诱导建立 AS 兔模型, 在此基础上, 采用束缚情志应激法干预, 将实验组家兔钻进束缚筒并调整好适当的活动空间, 水平地板上进行建模。每次束缚 30 min, 每隔 1 h 束缚 1 次, 每天束缚 4 次。各组动物每日进食总量相等, 限制为 100 g, 分 2 次, 1 次/12 h。动物分笼饲养, 每周测体质量 1 次, 实验周期为 12 周。各组动物分别于 12 周末行血管超声检测及血脂检测, 根据动脉内膜是否形成粥样斑块为造模是否成功标准, 未达到模型标准者予以剔除。

2.2 分组和给药 成模的 30 只新西兰兔随机分为 5 组, 分别为模型组、阿托伐他汀组、疏肝温胆汤低、中、高剂量组。各组新西兰家兔采用灌胃给药。阿托伐他汀组: 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 溶解于 0.9% 生理盐水中, 每日灌胃量约为 4 mL·kg⁻¹。根据《药理实验方法学》^[9] 中人与动物的等效剂量换算标准, 家兔每日等效用药剂量按成人用量的 3.27 倍计算, 将该剂量定为中剂量, 设定疏肝温胆汤低、中、高剂量分别为 2.18, 6.54, 19.62 g·kg⁻¹。取相应剂量的疏肝温胆汤配方颗粒制剂, 以相应容积的温水溶解, 每日灌胃量约为 4 mL·kg⁻¹。正常组和模型组给予同体积生理盐水。各组动物每日进食普通饲料。限制为 100 g, 分 2 次, 1 次/12 h。动物分笼饲养, 每周测体质量 1 次, 给药周期为 6 周。实验过程中正常组、模型组、阿托伐他汀组、疏肝温胆汤低、中剂量组各有 1 只兔子死亡。

2.3 标本获取 耳中动脉采血, 装置于非抗凝的采血管, 静置 0.5 h 后于 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取血清存于 -20 °C 冰箱中待用。再予戊巴比妥麻醉过量处死, 解剖取出主动脉, 然后根据主动脉各节段斑块情况, 剪取斑块较为明显的血管段, 使用生理盐水反复冲洗, 用 10% 甲醛中固定。另外一部分放入 -80 °C 冰箱中保存。

2.4 HE 染色观察家兔动脉内皮病理变化 取 10% 甲醛固定好的组织标本, 选择组织标本的最大

切面来进行修整,将包好的组织标本置于 75% 的乙醇中浸泡过夜,95% 乙醇脱水、二甲苯透明处理,将透明后的组织标本放入盛有溶蜡的浸蜡缸中,浸蜡 3 h,然后包埋、切片,将制作好的切片放入玻片架上,置于 38 ℃ 的温箱内过夜,取出放入玻片盒中并于室温保存,进行脱蜡水化,后用苏木素染液及伊红染液染色,染色后脱水中性树胶封片,显微镜下镜检并拍照。

2.5 全自动生化检测仪检测血清 TC, TG, LDL-C 和 HDL-C 水平 采集血样, 3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 分离血清,按照生化试剂说明书和仪器操作流程将检测试剂和待检测样本分别加入仪器试剂瓶和待测样本区中进行检测。

2.6 硝酸基还原酶法检测血清 NO 的水平 采集血样, 3000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 分离血清, 配置显色剂及标准应用液, 于分光光度计 550 nm 处测各管的吸光度 A。NO 含量 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) = (测定样品管的 A - 空白管的 A) / (标准品管的 A - 空白管的 A) × 标准品浓度 ($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) × 样品检测前的稀释倍数。

2.7 ELISA 检测 ET-1 的水平 采集血样, 3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 分离血清, 设置好标准品孔和样品孔, 取 50 μL 不同浓度的标准品加入到标准品孔中, 样品孔中先加入样本稀释液 40 μL , 随后再加入 10 μL 血清样品, 空白孔不加任何东西, 除去空白孔外, 标准品孔和样品孔中每孔加入二抗 100 μL , 用封板膜封住反应孔, 于 37 ℃ 恒温箱中温育 60 min; 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液, 静置 1 min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 5 次; 每孔中加入底物 A, B 各 50 μL , 于 37 ℃ 恒温箱中避光孵育 15 min; 每孔中加入终止液 50 μL , 15 min 内于酶标仪 450 nm 处检测各孔的吸光度 A。根据标准品浓度及 A 做标准曲线, 并根据标准曲线得出的公式计算各样品的 ET-1 的含量。

2.8 Real-time PCR 检测 CRP, IL-1 β , IL-6 和 MMP-9 的 mRNA 含量 提取组织样品中的总 RNA, 提取后应用紫外分光光度计等检测总 RNA 的纯度、浓度及完整性。根据引物设计检测其基因表达。PCR 反应按以下程序进行: 95 ℃ 120 s (预变性), 95 ℃ 15 s (变性), 60 ℃ 30 s (退火), 72 ℃ 60 s (延伸), 72 ℃ 300 s (最后延伸), 总共做 40 个循环。以 β -actin 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算靶基因的 mRNA 相对表达水平, 所有靶基因的表达在正常组都设为 1。每个样品都做 3 次重复。定量结果和数据都是根据

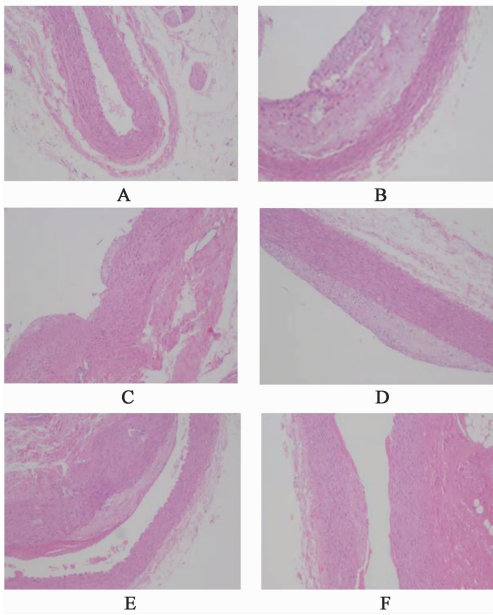
GraphPad Prism 软件统计。

2.9 Western blot 检测 LXR α , NF- κ B 蛋白的表达 提取组织样品的总蛋白, 并进一步提取组织核蛋白, 使用 BCA 法对蛋白进行定量, 行 SDS-PAGE 电泳、转膜、免疫反应 (从转膜槽中取出转好的膜并浸泡于 5% 的脱脂牛奶, 置于脱色摇床上, 室温封闭 1 h; 分别采用 5% 脱脂牛奶稀释羊抗小鼠 LXR α 抗体一抗 (1:1 000), 羊抗小鼠 NF- κ B 抗体一抗 (1:1 000), 于 4 ℃ 摇床上孵育过夜; 取出膜, 用 TBST 洗膜 3 遍, 每遍 5 min, 用 5% 脱脂牛奶稀释二抗 (1:1 万), 室温下摇床上孵育 30 min 后, 用 TBST 洗膜 3 遍, 每遍 5 min), 化学发光等一系列程序后采用 Image J 图像分析软件进行结果分析, 测得条带的灰度值, 并计算各组目的蛋白和内参蛋白条带的灰度值的比值, 分析各组蛋白的相对表达量。

2.10 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行统计分析。计量资料符合正态分布的使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不符合正态分布则用中位数 (四分位间距) 表示。计量资料符合正态分布的两组数据进行独立样本 t 检验, 多组资料则进行单因方差分析检验, 不符合正态分布的计量资料使用 Kruskal-Wallis 秩和检验, 具有统计学差异的组间进行两两比较, 采用 Bonferroni 法校正 P 值, P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对家兔动脉粥样硬化模型病理变化的影响 正常家兔主动脉内膜光滑且平坦, 内皮细胞呈现扁平形态, 平滑肌细胞呈现长梭形且排列整齐, 细胞核大小均匀, 细胞膜和细胞核膜清晰且完整, 细胞浆染色均匀, 胞内未见没有泡沫状改变, 管壁没有脂质沉积, 管腔没有看见明显狭窄。模型组家兔主动脉内膜明显增厚, 管壁有大量脂质沉积, 形成非常明显的粥样斑块, 并能够看见大量的胞内泡沫样改变, 从而导致管腔明显变的狭窄或闭塞, 有的斑块与管壁黏附不紧密, 可以看见脱落和破裂的斑块; 阿托伐他汀组家兔主动脉内膜局部轻度增厚, 管壁有少量脂质沉积, 形成少量粥样斑块, 并能够看见少许泡沫样改变, 管腔稍有狭窄, 其病变程度轻于模型组; 疏肝温胆汤低剂量组主动脉内膜增厚, 管壁有脂质沉积, 有粥样斑块形成并可以看见泡沫样改变, 管腔狭窄, 未看见闭塞, 病变程度较模型组正常组有很大程度上的减轻; 随着疏肝温胆汤剂量的增加, 病变程度较模型组正常组越来越轻。此结果表明阿托伐他汀和疏肝温胆汤对动脉粥样硬化有抑制作用, 见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 阿托伐他汀组; D. 疏肝温胆汤低剂量组; E. 疏肝温胆汤中剂量组 F. 疏肝温胆汤高剂量组(图 2 同)

图 1 疏肝温胆汤对动脉粥样硬化家兔内皮病理变化的影响(HE, ×100)

Fig.1 Effect of Shugan Wendan decoction on pathological changes in atherosclerosis of rabbits(HE, ×100)

表 1 疏肝温胆汤对动脉粥样硬化家兔血脂的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常	-	5	1.57 ± 0.16	0.55 ± 0.09	0.61 ± 0.11	1.39 ± 0.18
模型	-	5	25.37 ± 2.19 ¹⁾	1.58 ± 0.12 ¹⁾	30.38 ± 2.83 ¹⁾	0.75 ± 0.14 ¹⁾
阿托伐他汀	-	5	10.23 ± 1.62 ²⁾	0.88 ± 0.11 ²⁾	12.02 ± 1.65 ²⁾	1.02 ± 0.18
疏肝温胆汤	2.18	5	16.25 ± 1.87 ^{2,3,5)}	1.13 ± 0.11 ^{2,3)}	20.23 ± 1.88 ^{2,3)}	0.86 ± 0.19
	6.54	5	14.04 ± 1.91 ^{2,3,4)}	1.01 ± 0.14 ²⁾	18.71 ± 2.41 ^{2,3)}	0.90 ± 0.17
	19.62	6	12.70 ± 1.98 ^{2,3,4)}	0.94 ± 0.13 ²⁾	14.35 ± 2.57 ^{2,4,5)}	0.95 ± 0.16

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与阿托伐他汀组比较³⁾ $P < 0.05$;与疏肝温胆汤低剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$;与疏肝温胆汤中剂量组比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

表 2 疏肝温胆汤对动脉粥样硬化家兔 NO, ET-1 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Shugan Wendan decoction on NO and ET-1 in atherosclerosis of rabbits($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ET/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	5	56.8 ± 2.2	42.4 ± 2.1
模型	-	5	23.5 ± 1.9 ¹⁾	122.9 ± 5.8 ¹⁾
阿托伐他汀	-	5	49.0 ± 3.8 ²⁾	53.5 ± 2.5 ²⁾
疏肝温胆汤	2.18	5	36.7 ± 3.7	66.6 ± 2.9 ^{2,5)}
	6.54	5	39.8 ± 3.8	61.4 ± 3.4 ^{2,4)}
	19.62	6	47.1 ± 2.1 ²⁾	59.8 ± 2.4 ^{2,4)}

3.2 对动脉粥样硬化家兔血脂的影响 与正常组比较,模型组 TC, TG, LDL-C 明显升高, HDL-C 明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,阿托伐他汀组、疏肝温胆汤各剂量组的 TC, TG, LDL-C 明显下降($P < 0.05$);与阿托伐他汀组比较,疏肝温胆汤低剂量组的 TC, TG, LDL-C 均明显升高($P < 0.05$);与阿托伐他汀组比较,疏肝温胆汤中剂量组的 TC, LDL-C 明显升高($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 对动脉粥样硬化家兔主动脉内皮细胞功能的影响 与正常组比较,模型组中的血清 NO 含量明显降低($P < 0.05$), ET-1 含量明显增多($P < 0.05$);与模型组比较,阿托伐他汀组血清 NO 含量明显升高($P < 0.05$), ET-1 含量明显降低($P < 0.05$),疏肝温胆汤高剂量组血清 NO 含量明显上调($P < 0.05$),疏肝温胆汤低、中、高剂量组血清 ET-1 含量明显下调($P < 0.05$);与疏肝温胆汤各剂量组比较,阿托伐他汀组 ET-1 水平较低($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 对家兔动脉粥样硬化模型中的细胞因子 mRNA 的影响 与正常组比较,模型组中的 CRP, IL-1 β , IL-6 和 MMP-9 mRNA 明显增加($P < 0.05$);

与模型组比较,阿托伐他汀组、疏肝温胆汤低、中、高剂量组中 CRP, IL-1 β , IL-6 和 MMP-9 mRNA 都有降低($P < 0.05$)。见表 3。

3.5 对家兔动脉粥样硬化模型中的 LXR α , NF κ B 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组中的 LXR α 的蛋白表达明显下调($P < 0.05$),然而 NF κ B 的蛋白表达明显上调($P < 0.05$)。与模型组比较,阿托伐他汀组、疏肝温胆汤低剂量组、中剂量组和高剂量组中 LXR α 的蛋白表达均明显升高($P < 0.05$),而 NF- κ B 的蛋白表达都明显降低($P < 0.05$)。见图 2,表 4。

表 3 疏肝温胆汤对家兔动脉粥样硬化模型中 CRP, IL-1 β , IL-6 和 MMP-9 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Shugan Wendan decoction on CRP, IL-1 β , IL-6 and MMP-9 in atherosclerosis of rabbits ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	CRP/ β -actin	IL-1 β / β -actin	IL-6/ β -actin	MMP-9/ β -actin
正常	-	5	1.00 \pm 0.03	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.05	1.02 \pm 0.23
模型	-	5	9.27 \pm 0.52 ¹⁾	5.90 \pm 0.23 ¹⁾	4.52 \pm 0.27 ¹⁾	7.11 \pm 1.52 ¹⁾
阿托伐他汀	-	5	1.74 \pm 0.22 ²⁾	1.35 \pm 0.45 ²⁾	1.82 \pm 0.35 ²⁾	2.24 \pm 0.32 ²⁾
疏肝温胆汤	2.18	5	5.43 \pm 0.47 ²⁾	4.24 \pm 0.16 ²⁾	4.14 \pm 0.48 ²⁾	4.18 \pm 0.62 ²⁾
	6.54	5	4.09 \pm 1.64 ²⁾	3.14 \pm 0.24 ²⁾	2.96 \pm 0.82 ²⁾	3.95 \pm 0.82 ²⁾
	19.62	6	2.35 \pm 0.78 ²⁾	1.96 \pm 0.17 ²⁾	2.07 \pm 0.31 ²⁾	2.66 \pm 0.37 ²⁾

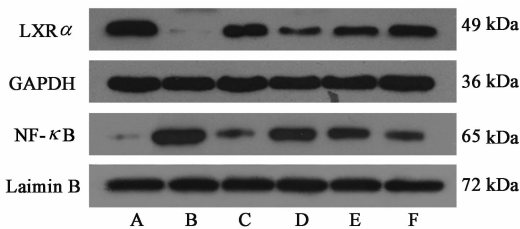


图 2 LXR α 和 NF- κ B 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of LXR α and NF- κ B protein expression

表 4 疏肝温胆汤对家兔动脉粥样硬化模型中的 LXR α /NF- κ B 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of Shugan Wendan decoction on LXR α /NF- κ B signal in atherosclerosis of rabbits ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	LXR α /GAPDH	NF- κ B/Lamin B
正常	-	5	1.00 \pm 0.08	0.31 \pm 0.03
模型	-	5	0.02 \pm 0.01 ¹⁾	0.81 \pm 0.13 ¹⁾
阿托伐他汀	-	5	0.74 \pm 0.12 ²⁾	0.38 \pm 0.11 ²⁾
疏肝温胆汤	2.18	5	0.37 \pm 0.13 ²⁾	0.56 \pm 0.08 ²⁾
	6.54	5	0.57 \pm 0.09 ²⁾	0.50 \pm 0.10 ²⁾
	19.62	6	0.67 \pm 0.12 ²⁾	0.35 \pm 0.06 ²⁾

4 讨论

动脉粥样硬化是心脑血管疾病极为重要的始动因素,动脉粥样硬化的成因涉及多种危险因素的综合作用,包括内皮细胞的损伤,血管平滑肌细胞的过度增殖、向内膜迁移,纤维组织增生,细胞凋亡等^[10]。目前普遍认为,动脉粥样硬化是一个慢性炎症的病理过程,其主要以血管内皮功能性损伤为基础,引起血管内膜脂质浸润和血管壁炎症病变。多种危险因素能够引起血管内皮损伤和紊乱,使其分泌生长因子,并能引起单核细胞黏附并迁移入内皮下间隙摄取脂质,逐渐聚集而形成脂质条纹,粥样斑块和继发性病变;同时也可以释放血小板源性生长

因子(PDGF)等炎性介质和促进血小板聚集,从而引起血管壁炎症病变,最终导致动脉粥样硬化病变^[11-12]。目前西药治疗动脉粥样硬化以降脂药为首选,主要为他汀类药物,选择单一,且药物副作用目前仍是一大难以解决的难题。就目前医疗现状,中药治疗动脉粥样硬化存在极大的发展空间。

目前大量研究实践表明,动脉粥样硬化的病因病机与痰、瘀、虚有关,痰热互结、结于血脉是动脉粥样硬化的关键病机。疏肝温胆汤是由温胆汤联合柴胡疏肝散化裁而成,有化痰祛瘀、疏肝理气的功效。已有实验研究表明温胆汤不仅可以降低血脂水平,还可以缩小动脉粥样硬化斑块面积和减轻动脉硬化病变^[13-14]。这一理论与本实验结果相一致。本实验通过高脂饲料喂养家兔,结果表明模型组家兔动脉粥样硬化斑块病变主要表现为动脉内膜明显增厚,管壁有大量脂质沉积,形成非常明显的粥样斑块,并能够看见大量胞内泡沫样改变的细胞聚集,从而导致管腔明显变的狭窄或闭塞,然而正常组并没有看见明显变化,可见家兔的动脉粥样硬化模型构建成功。

血脂代谢异常是动脉粥样硬化的始动因素,在动脉粥样硬化的发生和发展过程中起着重要作用^[15]。诸多流行病学资料表明,TC 水平与动脉粥样硬化的发生呈正相关。本研究结果表明,喂饲高脂饲料后,家兔血清 TC, TG 和 LDL-C 水平显著升高,而 HDL-C 水平明显降低;疏肝温胆汤低、中、高剂量组的 TC, TG 和 LDL-C 水平明显降低,此结果表明疏肝温胆汤能明显降低血脂水平,对动脉粥样硬化的发生发展具有防治作用。NO 可以阻碍血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和迁移、降低血小板聚集和防止血栓形成、削弱单核细胞黏附能力和抑制炎症反应和氧化应激^[16]。许多研究表明血管内皮功能受损时,内皮源性 NO 表达水平下调,导致血管舒张

功能下降、加速平滑肌增生和单核细胞黏附迁入内膜下并聚集氧化的脂质形成泡沫细胞,促进血小板黏附和聚集,从而导致了动脉粥样硬化病变^[17]。本研究结果表明,动脉粥样硬化模型组家兔血清 NO 含量明显低于正常家兔,说明了动脉粥样硬化模型组家兔体内存在着一定的内皮细胞功能性损伤。ET 与多种心血管异常疾病有关,含有 ET-1, ET-2, ET-3 3 种异构体^[18]。其中 ET-1 被认为是目前最强的内皮源性血管收缩肽,其不仅能够促进血管收缩,血小板聚集, VSMC 增殖,而且能与脂质过氧化物以及血小板衍生生长因子等相互影响,从而构成动脉粥样硬化病发的重要因素^[19]。也有研究表明, ET-1 的抑制可以逆转 NO 介导的内皮功能紊乱,从而阻碍动脉粥样硬化的发生^[20]。本研究结果表明,与正常组比较,模型组家兔血清中的 ET-1 含量明显上调,而疏肝温胆汤组家兔血清 ET-1 含量较模型组明显下降,提示阿托伐他汀和疏肝温胆汤下调 ET-1 表达水平对动脉粥样硬化有一定的防止作用。CRP 是非特异性炎症反应过程中主要的和最敏感的炎症因子。诸多研究表明 CRP 在动脉粥样硬化的病理过程中起到非常重要的作用。CRP 可以通过激活补体,促进细胞黏附分子和组织因子的表达,诱导巨噬细胞摄取 LDL,刺激 MCP-1 的产生和诱导单核细胞募集,也可以阻碍内皮细胞分泌 NO,从而参与动脉粥样硬化的形成^[21]。本研究结果表明,与正常组比较,模型组家兔组织中的 CRP 表达量显著上调,而疏肝温胆汤组家兔组织 CRP 表达量与模型组比较明显降低。此结果表明阿托伐他汀和疏肝温胆汤抑制 CRP 表达量对动脉粥样硬化的发生发展起到延迟作用。IL-6 与机体炎症和组织损伤等密切相关。在动脉粥样硬化的初始阶段, IL-6 能够促进血管内皮 ROS 产生,使内皮细胞受损,诱导黏附分子表达,使单核细胞与内皮细胞之间黏附能力增强,且刺激基质降解酶和巨噬细胞表面受体 LDL 的合成以及巨噬细胞对 LDL 的摄入,从而加速了脂质的沉积和斑块的形成^[22]。IL-6 还可以激活巨噬细胞产生趋化蛋白,使单核细胞进入血管内皮,加速 VSMC 向内膜下迁移和增殖,最终促进动脉粥样硬化的形成^[23]。本研究结果表明,与正常组比较,模型组家兔组织 IL-6 表达水平显著提高,而疏肝温胆汤组家兔组织 IL-6 表达水平与模型组比较明显下调,此结果表明阿托伐他汀和疏肝温胆汤降低 IL-6 表达水平对动脉粥样硬化的发生发展起到抑制作用。IL-1 β 是一类敏感的、特异的急性期炎症因子,主要是

由单核细胞和巨噬细胞合成^[24]。IL-1 β 参与调控血管内皮功能,包括加速血管平滑肌增生,诱导白细胞黏附于内皮,调控低密度脂蛋白代谢,促进 IL-6 等细胞因子的合成,提高血管通透性和促凝活性等^[25]。IL-1 β 可以通过诱导 VSMC 产生 MCP-1,从而参与动脉粥样硬化斑块形成。有研究表明抑制 IL-1 β 表达后,动脉粥样硬化斑块明显减少^[26]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组家兔组织 IL-1 β 水平显著增高。而阿托伐他汀组和疏肝温胆汤组家兔组织 IL-1 β 水平与模型组比较明显下降。此结果表明阿托伐他汀和疏肝温胆汤能够抑制 IL-1 β 水平来抗动脉粥样硬化疾病。MMP-9 是一种锌离子依赖的蛋白酶超家族成员。大量研究表明, MMP-9 参与了一系列动脉粥样硬化形成过程,如动脉粥样硬化斑块的形成、斑块纤维帽的变薄和破裂、动脉重构等^[27]。抑制 MMP-9 的分泌可以使动脉粥样硬化的进程和新生内膜的形成受到抑制^[28]。本研究结果显示,模型组组织中 MMP-9 的表达明显高于正常组、阿托伐他汀和疏肝温胆汤,提示阿托伐他汀和疏肝温胆汤对动脉粥样硬化的进程有一定的抑制效果。

另外,笔者研究发现模型组组织中 LXR α 的 mRNA 和蛋白表达水平都显著地高于正常组、阿托伐他汀和疏肝温胆汤,然而模型组组织中 NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达水平都明显的低于正常组、阿托伐他汀和疏肝温胆汤组。研究表明 LXR α 低表达能够加速 Ldlr^{-/-} 和 Apoe^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的形成,然而 LXR α 高表达能够改善小鼠动脉粥样硬化病变^[29]。由此表明 LXR α 具有抗动脉粥样硬化效果。另有研究发现 NF- κ B 是 LXR α 的一个下游靶基因,且与上述细胞因子有一个或多个结合位点^[30]。因此,笔者推测疏肝温胆汤可能是通过调控 LXR α /NF- κ B 信号通路来发挥其抗动脉粥样硬化效果。

[参考文献]

- [1] 苏兆铎. 调脂通脉颗粒对兔动脉粥样硬化模型血管重塑影响的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [2] 张璐. 调脂通脉颗粒对动脉粥样硬化兔模型炎症因子表达影响的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [3] YAN R, WEI Q, FU D L, et al. Traditional chinese medicine protects against cytokine production as the potential immunosuppressive agents in atherosclerosis [J]. Immunol Res, 2017, 20(10): 7-15.

- [4] LIU Q, LI J, Hartstone-Rose A, et al. Chinese herbal compounds for the prevention and treatment of atherosclerosis: experimental evidence and mechanisms [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 12 (7):123-129.
- [5] 吴晶魁, 杨乔, 李洋洋, 等. 水蛭通过 p38MAPK 信号通路对早期动脉粥样硬化大鼠 VSMCs 的影响[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(16):3191-3197.
- [6] 李彤, 赵明镜, 韩小婉, 等. 豁痰解毒通络饮通过抑制 eNOS 解耦联途径减轻兔早期动脉粥样硬化[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(21):4305-4310.
- [7] 刘学谦, 王静, 曹守沛, 等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3):59-65.
- [8] 殷小杰, 马晓静, 王岚, 等. 三黄泻心汤活血化痰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.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. *药理实验方法学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982:1-699.
- [10] 伍志学, 张韧, 林锐珊, 等. 白藜芦醇调节 STIM1 抗动脉粥样硬化的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(15):148-153.
- [11] Bursill C, Channon K, Greaves D. The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2004, 15(2):145-154.
- [12] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2):115-126.
- [13] 吴欣芳, 李树斌, 谢相智, 等. 通脉温胆汤对颈动脉粥样硬化 IMT 及血脂的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(13):165-168.
- [14] 燕珊, 陈群, 王剑, 等. 黄连温胆汤对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2014, 28(5):61-65.
- [15] Schafers M, Schober O, Hermann S. Matrix-metalloproteinases as imaging targets for inflammatory activity in atherosclerotic plaques[J]. *Nucl Med*, 2010, 51(5):663-668.
- [16] 李卫红, 高美常. 糖尿病血管内皮功能损伤的发病机制研究进展[J]. *泰山医学院学报*, 2004, 25(6):685-687.
- [17] Papaharalambus C, Griendling K. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(2):48-54.
- [18] Bkaily G, Avedanian L, Al-Khoury J, et al. Nuclear membrane receptors for ET-1 in cardiovascular function [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 300(2):251-263.
- [19] Anggrahini D, Emoto N, Nakayama K, et al. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(1):143-151.
- [20] Yokota J, Kawana M, Hidai C, et al. Retinoic acid suppresses endothelin-1 gene expression at the transcription level in endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2001, 159(2):491-496.
- [21] 何海刚. 甲氨嘌呤对兔动脉粥样硬化模型干预效果的实验研究[D]. 扬州:扬州大学, 2009.
- [22] Musiał J, Pajak A, Undas A, et al. Thrombin generation markers and coronary heart disease risk factors in a Polish population sample[J]. *Thromb Haemost*, 1997, 77(4):697-700.
- [23] 徐晓娜. 普罗布考对兔动脉粥样硬化模型中斑块稳定性及热休克蛋白 60 表达的影响[D]. 天津:天津医科大学, 2008.
- [24] Sardella G, Mariani P, Alessandro M, et al. Early elevation of interleukin-1beta and interleukin-6 levels after bare or drug-eluting stent implantation in patients with stable angina [J]. *Thromb Res*, 2006, 117(6):659-664.
- [25] 钟诚. 冠心病患者白细胞介素族的变化及其关系探讨[J]. *心血管康复医学杂志*, 2005, (3):220-221.
- [26] Kirii H, Niwa T, Yamada Y, et al. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(4):656-670.
- [27] 蒋群龙. HCY、MMP-9/TIMP-1 失衡与颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系[D]. 泰安:泰山医学院, 2013.
- [28] Yamamoto D, Takai S. Pharmacological implications of MMP-9 inhibition by ACE inhibitors [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(11):1349-1354.
- [29] Lee S D, Tontonoz P. Liver X receptors at the intersection of lipid metabolism and atherogenesis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 242(1):29-36.
- [30] Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling [J]. *Clin Invest*, 2006, 116(3):607-614.

[责任编辑 孙丛丛]