

化痰祛痰方对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

冷雪*, 李阳, 宋因, 王莹

(辽宁中医药大学 中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**探讨载脂蛋白敲除(ApoE^{-/-})小鼠主动脉丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路相关 mRNA 的表达变化及化痰祛痰方药对其的干预作用,探讨化痰祛痰方药抗 AS 作用及可能的机制。**方法:**50 只 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为模型组,丹参酮 II A 组(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹),化痰祛痰高剂量组(20 g·kg⁻¹·d⁻¹),化痰祛痰中剂量组(10 g·kg⁻¹·d⁻¹),化痰祛痰低剂量组(5 g·kg⁻¹·d⁻¹),10 只 C57BL/6/J 小鼠作为正常组。全自动生化仪检测血清甘油三酯(triglyceride, TG),胆固醇(cholesterol, TC),高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的含量;苏木素-伊红(HE)检测各组小鼠主动脉斑块情况;油红 O 检测各组小鼠肝脏脂质沉积情况;酶联免疫吸附测定(ELISA)测定各组小鼠血清中血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion protein 1, VCAM-1),细胞间黏附分子-1(ICAM-1),白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠主动脉 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK),磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK), p38 MAPK, p-p38 MAPK, 细胞外调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK),磷酸化细胞外调节激酶(extracellular regulated protein kinases, p-ERK)蛋白的表达变化。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠血清 TC, TG, LDL-C 水平明显升高, HDL-C 水平明显降低;主动脉管腔见较大粥样斑块,肝细胞中见大量脂质沉积;血清内相关炎症因子 TNF- α , IL-6, VCAM-1, ICAM-1 含量增加;血管内相关 MAPK 信号通路 p-p38, p-JNK 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,丹参酮 II A 组与化痰祛痰各组小鼠 TC, TG, LDL-C 明显下降, HDL-C 明显升高,主动脉管腔中粥样斑块面积和肝脏脂质沉积量明显减少,血清内相关炎症因子 TNF- α , IL-6, VCAM-1, ICAM-1 含量降低($P < 0.05$);血管内相关 MAPK 信号通路 p-p38, p-JNK 蛋白表达明显降低($P < 0.05$), p-ERK 表达趋势不明显。**结论:**化痰祛痰方药可抑制 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块形成,其机制可能与调控血管 MAPK 信号通路基因表达有关。

[关键词] 动脉粥样硬化;载脂蛋白 E 敲除(ApoE^{-/-})小鼠;主动脉;丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)04-0116-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190291

Effect of Huayu Qutan Recipe in Regulating Aortic MAPK Pathway-related Gene Expression in Atherosclerosis Mice

LENG Xue*, LI Yang, SONG Nan, WANG Ying

(Key Laboratory of Ministry of Education for Traditional Chinese Medicine (TCM) Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression changes of mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway-related genes in ApoE^{-/-} mice and the intervention effect of Huayu Qutan recipe on them, in order to explore the anti-atherosclerotic (AS) effect and possible mechanism of Huayu Qutan recipe. **Method:** Fifty ApoE^{-/-} mice were randomly divided into model group, tanshinone IIA group (30 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and high-dose phlegm group (20 g·kg⁻¹·d⁻¹), the middle-dose group (10 g·kg⁻¹·d⁻¹), and the low-dose group

[收稿日期] 20180701(001)

[基金项目] 辽宁省自然科学基金指导计划项目(20170540592);沈阳市科技计划项目(17-139-8-00);辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2015332)

[通信作者] *冷雪, 硕士, 实验师, 从事中药防治心血管疾病分子生物学机制研究, Tel: 024-31207046, E-mail: 290404025@qq.com

($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and 10 C57BL/6/J mice were included in the blank controls group. Automated biochemical analyzer was used to detect serum triglyceride (TG), cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) content; hematoxylin-eosin (HE) was used to detect aortic plaque in each group; oil red O was used to detect liver lipid deposition in each group; enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) was used to determine vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum of each group; Western blot was performed to detect c-Jun N-terminal kinase (JNK), phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK, p-p38 MAPK, extracellular regulated protein kinases (ERK), and expression of p-ERK. **Result:** Compared with the blank control group, serum TC, TG, LDL-C levels in the model group were significantly increased, while HDL-C levels were significantly decreased; aortic plaques were observed in the aortic lumen, and lots of lipid deposition were observed in the liver cells. Serum inflammatory factors TNF- α , IL-6, VCAM-1, ICAM-1 increased ($P < 0.05$); and intravascular associated MAPK signaling pathway p-p38 MAPK, p-JNK gene expressions increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, TC, TG, LDL-C in the tanshinone IIA group and the phlegm group were significantly decreased, HDL-C was significantly increased, and atherosclerotic plaque area and liver lipid were remarkably reduced in the aortic lumen. The deposition amount was significantly reduced, and the levels of inflammatory factors such as TNF- α , IL-6, VCAM-1 and ICAM-1 were decreased. The expressions of p-p38 MAPK and p-JNK genes in intravascular associated MAPK signaling pathway were significantly decreased. p-ERK expression trend was not obvious ($P < 0.05$). **Conclusion:** Huayu Recipe can inhibit the formation of aortic plaque in ApoE^{-/-} mice, and its mechanism may be related to the regulation of vascular MAPK signaling pathway gene expression.

[**Key words**] atherosclerosis; ApoE^{-/-} mice; aorta; enzyme-linked immuno sorbent assay (MAPK) signaling pathway

动脉粥样硬化(AS)是心脑血管疾病发生的主要病理基础^[1]。随着社会的发展,我国引起的心脑血管疾病发病率和死亡率正逐年增加,越来越多 AS 相关的细胞因子及信号通路被发现,介导细胞因子活性的信号通路在 AS 的发生、发展中有重要作用,但是其影响的相关信号通路的具体机制尚不清楚。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路是细胞中一条重要的分子通路,MAPK 由多种同工酶组成,包括细胞外调节蛋白激酶(ERK),c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)/应激活化蛋白激酶(SAPK),ERK5/大丝裂素活化蛋白激酶(BMK1)和 p38MAPK^[2]。JNK 通路和 p38 MAPK 通路主要对炎症细胞因子和多种类型的细胞应激信号进行转导,而 ERK 通路主要对细胞的生长、分裂和分化信号进行转导,他们之间可以通过不同因素刺激激活,形成不同的转导通路,激活不同的转录因子,介导不同的生物学效应,通路间可产生相互协同或抑制作用^[3]。研究表明 MAPK 信号通路与 AS 的发生发展有着密切联系,炎症刺激激活内皮细胞,白细胞就迁移到内皮下,这一过程加快了 AS 损害的发生^[4]。内皮细胞中的 p38MAPK 可以被脂多糖(LPS)和肿

瘤坏死因子- α (TNF- α)激活,并以此促进前列腺素、环氧合酶 2(COX-2)等的表达, JNK 诱导肿瘤坏死因子(TNF)激活内皮细胞, E-选择素通过激活 JNK 和 p38MAPK,发生促进内皮细胞表达^[5]。ERK1/2 也能增加内皮细胞一氧化氮合酶的表达,从而增加一氧化氮的释放^[6]。中医学中无“动脉粥样硬化”这个说法,可归属“头痛”“眩晕”等范畴。其中医病机概括为脾失健运,痰瘀互结,属本虚标实,治以健脾益气、化痰祛痰,据此课题组研制化痰祛痰方。前期研究结果表明化痰祛痰方对 AS 家兔肝脏呼吸链酶复合物以及对 AS 小鼠肝脏胆固醇相关代谢 mRNA 有一定的影响,其在抗 AS 上具有一定的作用^[7-8],对于其在 MAPK 信号通路上的作用机制尚未有报道,以及 AS 小鼠主动脉在 MAPK 信号通路相关 mRNA 的变化也没有报道。因此,笔者利用 AS 关键模型 ApoE^{-/-}小鼠,来探讨 MAPK 信号通路的相关因子变化及化痰祛痰方药的干预作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 ApoE^{-/-}小鼠,雌雄各半,6~8 周龄,体质量 18~20 g,共 50 只。同龄具有相同遗传背景的 C57BL/6J 小鼠 10 只。所有动物购自

北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2012-0001,在辽宁中医药大学实验动物中心饲养,自由饮水及摄食。动物实验符合辽宁中医药大学实验动物伦理委员会标准,实验动物伦理审查编号(21000092017068)。

1.2 药物及试剂 化痰祛痰方为辽宁中医药大学杨关林教授依据中医理论,结合现代医学对 AS 的研究以及自己多年来的临床经验组方而成。其临床主要治疗对象为痰浊血瘀型 AS 患者,临床取得可喜疗效,并已经获得国家发明专利(ZL200710010845.9)由党参 30 g,黄芪 30 g,绞股蓝 30 g,丹参 15 g,茯苓 15 g,法半夏 15 g,石菖蒲 20 g,川芎 20 g,赤芍 15 g,郁金 15 g 组成^[7],以上药材均购于辽宁中医药大学附属医院,由该医院中医药实验中心副主任中药师于艳鉴定均符合 2015 年版《中国药典》的标准,以上药物由辽宁中医药大学动物实验中心统一煎煮。浸泡 1 h 后,武火煮沸,文火煮 20 min,过滤,重复煎 3 次,合并滤液,制成水煎剂,最终生药量为 $1.79 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。油红 O 染色购自上海亚培(185448);苏木素-伊红(HE)染色液,蛋白提取试剂盒,SABC 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 G112,PC0010-100T,SA0035);兔抗小鼠 p38 MAPK,p-p38 MAPK,JNK,p-JNK,ERK1/2 抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 A00176,BM4439,BM4743,BM4380,BM4326);磷酸化-ERK1/2(p-ERK1/2)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(北京盛科博源生物科技有限公司,批号分别为 BS5016,SE134);甘油三酯(TG),胆固醇(TC),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒(四川迈新生物技术有限公司,批号分别为 CH0101151,CH0101152,CH0101161,CH0101162);TNF- α ,细胞间黏附分子-1(ICAM-1),血管细胞黏附分子-1(VCAM-1),白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,Bradford 蛋白质测定试剂盒(碧云天生物技术研究,批号分别为 P0006,PT512,AF0195,AF1021,P1326)。

1.3 仪器 TBA-2000FR 型全自动生化分析仪(日本东芝公司);Vevo2100 型超高分辨率小动物超声影像系统(加拿大 VisualSonics 公司);Sub-Cell Model 192 Cell 型水平电泳仪,imark 型酶标仪,Trans-Blot SD 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);FluorChem Q 型蛋白印迹成像和定量分析系统(美国 Proteinsimple 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 50 只 ApoE^{-/-} 小鼠全程给予高脂膳食饲料(含脂肪 21%,胆固醇 0.15%),喂饲 8 周后随机分为模型组、丹参酮 II A 组、化痰祛痰方高、中、低剂量组,每组 10 只。另 10 只 C57BL/6/J 小鼠作为正常。正常组给予普通颗粒小鼠饲料,同时给予等量蒸馏水灌胃。模型组给予高脂膳食饲料,同时给予等量蒸馏水灌胃。丹参酮 II A 组在模型组基础上,给予丹参酮 II A $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。化痰祛痰组在模型组基础上,给予化痰祛痰方,含生药 20,10,5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量^[7-8]。灌胃给药,每日 1 次,继续喂养 8 周取材。

2.2 血脂检测 小鼠腹主动脉取血后放入离心机内 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,获得血清采用全自动生化分析仪检测各组家兔血清中 TC, TG, HDL-C, LDL-C 水平。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠主动脉病理变化 HE 染色,主动脉固定于 4% 多聚甲醛 24 h 以上,梯度脱水后包埋,行石蜡切片,片厚 $4 \mu\text{m}$,常规染色。封片,拍照。

2.4 油红 O 染色观察肝脏的脂质沉积情况 冰冻切片 $10 \mu\text{m}$,4% 多聚甲醛固定 5 min,60% 异丙醇浸 40 s,油红 O 染色 15 min,60% 异丙醇冲洗后蒸馏水冲洗 2 次,苏木素染色 5 min,蒸馏水冲洗 2 次,1% 盐酸-乙醇分色 1 s,封片后拍照。

2.5 ELISA 检测血清 TNF- α , VCAM-1, ICAM-1, IL-6 含量 按照 ELISA 试剂盒说明书,分别设计标准孔及对照孔,将标准曲线算出结果。具体操作严格按照试剂盒说明书步骤进行。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p38 MAPK,p-p38 MAPK,JNK,p-JNK,ERK1/2,p-ERK1/2 蛋白表达 取各组小鼠主动脉 30 mg,分别加入蛋白裂解液 300 μL 提取各组主动脉的总蛋白,采用 Bradford 蛋白质测定试剂盒对各组蛋白进行浓度测定。半干转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入兔抗小鼠 p38 MAPK(1:1 000),p-p38 MAPK(1:1 000),p-JNK(1:1 500),ERK1/2(1:1 000),p-ERK1/2(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,次日 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出后,于低速摇床上,室温,缓慢孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次/10 min,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:2 000)室温孵育 1 h,TBST 洗涤 4 次,每次 10 min。配置发光液,全自动凝胶成像分析系统曝光。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因

素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AS 小鼠血脂影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 TG, TC, LDL-C 水平明显升高 ($P < 0.05$),

HDL-C 水平明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,丹参酮 II A 组,化痰祛痰方高、中、低剂量组 TG, TC, LDL-C 水平明显降低 ($P < 0.05$), HDL-C 水平明显升高 ($P < 0.05$),化痰祛痰方高剂量组变化明显。见表 1。

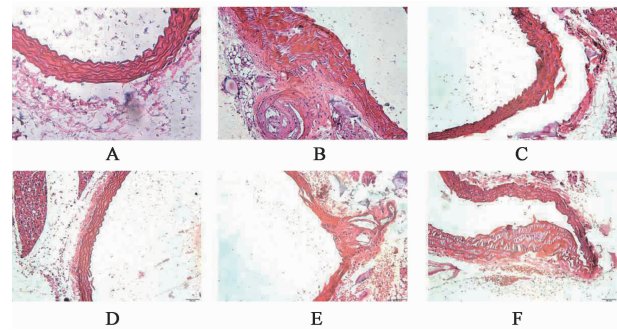
表 1 化痰祛痰方对 AS 小鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TG	TC	LDL-C	HDL-C
正常	-	1.05 ± 0.04	2.03 ± 0.05	0.18 ± 0.02	1.28 ± 0.12
模型	-	3.89 ± 0.07 ¹⁾	19.23 ± 0.06 ¹⁾	2.89 ± 0.03 ¹⁾	0.23 ± 0.06 ¹⁾
丹参酮 II A	0.03	2.23 ± 0.08 ²⁾	12.89 ± 0.07 ²⁾	1.20 ± 0.04 ²⁾	1.12 ± 0.13 ²⁾
化痰祛痰方	20	2.02 ± 0.06 ²⁾	13.04 ± 0.06 ²⁾	1.21 ± 0.05 ²⁾	1.07 ± 0.08 ²⁾
	10	2.45 ± 0.07 ²⁾	13.89 ± 0.05 ²⁾	1.39 ± 0.06 ²⁾	0.78 ± 0.07 ²⁾
	5	2.89 ± 0.08 ²⁾	15.22 ± 0.07 ²⁾	1.53 ± 0.05 ²⁾	0.64 ± 0.03 ²⁾

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

3.2 对 AS 小鼠主动脉组织结构形态学的影响

小鼠主动脉 HE 染色结果显示,与正常组比较,模型组小鼠主动脉有明显斑块形成病变范围及程度明显较高。其他各组小鼠主动脉官腔中斑块面积不同程度减小,丹参酮 II A 及化痰祛痰方高剂量组粥样斑块面积明显减小。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 丹参酮 II A 组; D. 化痰祛痰方高剂量组; E. 化痰祛痰方中剂量组; F. 化痰祛痰方低剂量组(图 2,3 同)

图 1 化痰祛痰方对 AS 小鼠主动脉组织形态学的影响(HE, ×200)
Fig.1 Effect of Huayu Qutan recipe on morphology of aortic tissue in AS mice(HE, ×200)

3.3 对 AS 小鼠肝脏脂质沉积情况的影响 小鼠肝脏油红 O 染色结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝脏脂质沉积明显。与模型组比较,其他各组小鼠肝脏脂质沉积不同程度降低,丹参酮 II A 及化痰祛痰方高剂量组肝脏脂质沉积情况明显降低。见图 2。

3.4 对 AS 小鼠血清 TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, IL-6 含量变化的影响 血清 TNF- α , ICAM-1, VCAM-1,

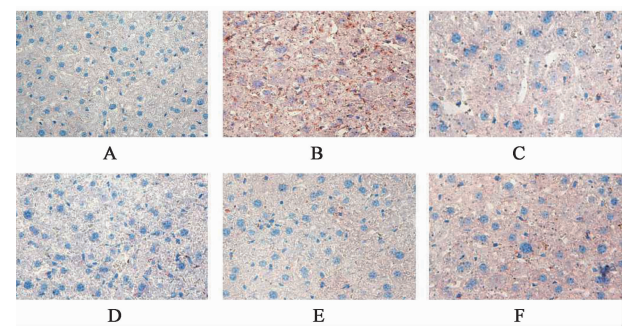


图 2 化痰祛痰方对 AS 小鼠肝脏脂质沉积的影响(油红 O, ×200)
Fig.2 Effect of Huayu Qutan recipe on liver lipid deposition in AS mice(oil red O, ×200)

IL-6 水平检测结果显示,与正常组比较,模型组小鼠血清 TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, IL-6 水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,其他各组 TNF- α , IL-6, ICAM-1, VCAM-1 水平均有不同程度降低 ($P < 0.05$);化痰祛痰方高剂量组变化明显。化痰祛痰方低剂量组 ICAM-1, VCAM-1 变化无差异。见表 2。
3.5 对 AS 小鼠主动脉 MAPK 信号通路相关蛋白表达变化的影响 与正常组比较,模型组小鼠主动脉 p-p38 MAPK, p-JNK 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), p-ERK1/2 无明显变化趋势;与模型组比较其他各组 p-p38 MAPK, p-JNK 蛋白均有不同程度的降低, p-ERK1/2 变化趋势不明显,化痰祛痰方高剂量组 p-p38 MAPK, p-JNK 蛋白表达变化趋势明显 ($P < 0.05$)。见表 3,图 3。

4 讨论

AS 在中医中可归属为“胸痹”“心悸”等范畴,其发病病机多为脾虚痰浊,痰浊血瘀,针对此病机

表 2 化痰祛痰方对各组小鼠血清中炎症因子含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Huayu Qutan recipe on serum levels of inflammatory factors in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- α	ICAM-1	VCAM-1	IL-6
正常	-	280.34 \pm 24.32	30.33 \pm 4.20	22.08 \pm 1.86	33.87 \pm 2.22
模型	-	450.57 \pm 16.55 ¹⁾	50.22 \pm 3.88 ¹⁾	38.45 \pm 2.22 ¹⁾	55.23 \pm 3.35 ¹⁾
丹参酮 II A	0.03	290.38 \pm 23.22 ²⁾	33.34 \pm 2.38 ²⁾	22.34 \pm 1.56 ²⁾	35.24 \pm 3.56 ²⁾
化痰祛痰方	20	286.22 \pm 12.56 ²⁾	32.27 \pm 4.54 ²⁾	23.98 \pm 3.21 ²⁾	30.44 \pm 1.88 ²⁾
	10	323.41 \pm 35.22 ²⁾	40.11 \pm 4.76 ²⁾	28.22 \pm 1.33 ²⁾	40.33 \pm 3.95 ²⁾
	5	380.46 \pm 11.33 ²⁾	43.22 \pm 2.88	30.33 \pm 2.90	45.23 \pm 3.23 ²⁾

表 3 化痰祛痰方对各组小鼠主动脉 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Huayu Qutan recipe on expression of MAPK signaling related protein in aorta of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	p-p38 MAPK / β -actin	p38 MAPK / β -actin	p-JNK / β -actin	JNK / β -actin	p-ERK / β -actin	ERK / β -actin
正常	-	0.32 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.70 \pm 0.01
模型	-	0.68 \pm 0.07 ¹⁾	0.34 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02 ¹⁾	0.20 \pm 0.03	0.28 \pm 0.02	0.77 \pm 0.02
丹参酮 II A	0.03	0.41 \pm 0.02 ²⁾	0.34 \pm 0.03	0.13 \pm 0.02 ²⁾	0.22 \pm 0.03	0.27 \pm 0.01	0.82 \pm 0.02
化痰祛痰方	20	0.35 \pm 0.01 ²⁾	0.37 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02 ²⁾	0.23 \pm 0.12	0.26 \pm 0.03	0.92 \pm 0.01
	10	0.58 \pm 0.06 ²⁾	0.35 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01 ²⁾	0.28 \pm 0.02	0.33 \pm 0.02	0.66 \pm 0.01
	5	0.60 \pm 0.07 ²⁾	0.36 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03 ²⁾	0.20 \pm 0.06	0.15 \pm 0.01	0.67 \pm 0.02

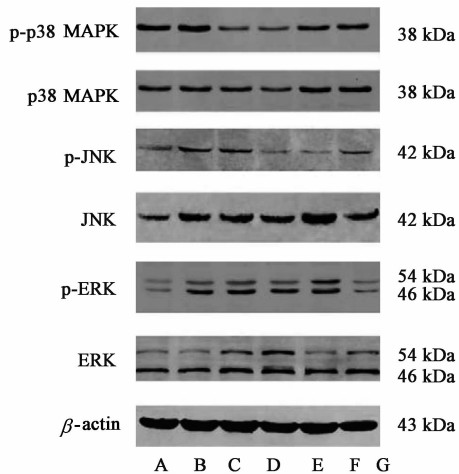


图 3 各组小鼠主动脉 MAPK 信号通路相关蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of expression of MAPK signaling related protein in aorta of mice

杨关林教授创立化痰祛痰方,临床已取得可喜疗效,所在课题组前期从炎症、自噬、氧化应激、线粒体等多方面初步阐明了化痰祛痰方防治 AS 的机制,本文则以 MAPK 炎症信号通路为新的切入点,对于化痰祛痰方防治 AS 的潜在机制进行研究。

ApoE^{-/-}小鼠形成的斑块特点与人类 AS 斑块极为相似^[9],是进行 AS 发病机制和防治研究较为理想的动物模型^[10-11]。课题组选用 ApoE^{-/-}小鼠

为研究对象,采用高脂饮食诱导的方法进行造模,以 MAPK 信号通路作为切入点,探究化痰祛痰方对 MAPK 信号通路对炎症的影响具有一定意义。本研究结果显示与正常组比较,模型组小鼠血清中 TC, TG, LDL-C 水平明显升高;HDL-C 水平明显降低,同时 HE 染色显示主动脉管腔中形成较大粥样斑块,肝脏脂质沉积明显。上述结果表明,本研究选用造模方法较为成功。对 MAPK 信号通路相关 mRNA 的研究表明与正常组比较,模型组小鼠肝脏 p-p38 MAPK, p-JNK 蛋白表达增加,同时与 AS 炎症发病机制相关因子 TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, IL-6 含量表达增加提示 ApoE^{-/-}模型小鼠可激活 MAPK 信号通路来调控相关炎症因子。

MAPK 参与内皮细胞的激活、泡沫细胞的形成、内皮祖细胞的凋亡和多种促 AS 细胞因子的表达。MAPK 信号通路以级联反应方式,活化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,将细胞外信号逐级传导到细胞内,并激活 NF- κ B,调控相关 mRNA 的表达^[12-14],并促使大量炎症因子的产生,最终使细胞骨架变化,细胞通透性提高,加速细胞的凋亡。ERK, JNK 以及 p38 MAPK 在动脉粥样硬化中具有重要作用,许多促炎因子包括编码 TNF- α , IL-6, ICAM-1, VCAM-1 等的 mRNA 表达均受到这些通路的调节。研究表明大鼠

炎症状态下, 肝脏 p38 MAPK 明显升高^[15], 所以 MAPK 信号通路与炎症反应的发展密切相关。

本研究所选用的化痰祛痰方药具有健脾益气、化痰祛痰之功效, 主治痰浊血瘀型动脉粥样硬化患者, 并已经获得国家发明专利 (No. ZL200710010845.9)。研究发现, 与模型组比较, 化痰祛痰高剂量组 ApoE^{-/-} 小鼠血清 TC, TG, LDL-C 水平明显下降, HDL-C 水平明显升高, 主动脉小鼠主动脉管腔中粥样斑块面积和肝脏质沉积量明显减少, 提示化痰祛痰方药可通过对血脂等的调节来发挥抗 AS 的作用。此外与模型组比较化痰祛痰高剂量组 MAPK 相关通路中 p-p38MAPK, p-JNK 蛋白表达明显减低, 小鼠血清内相关炎症因子 TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, IL-6 随之降低, 提示化痰祛痰方药很可能通过 MAPK 信号通路来调控相关炎症因子的含量以此来发挥抗 AS 炎症反应的作用。

综上所述, 本研究创新性地利用 ApoE^{-/-} 小鼠 AS 模型, 从 MAPK 信号通路参与调控炎症因子的方面探讨化痰祛痰方药调节炎症反应和影响 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块形成作用机制, 为 AS 类疾病炎症机制研究和临床应用提供思路及实验依据。

[参考文献]

[1] 宋磊, 钱之玉, 陈真, 等. 动脉粥样硬化与炎症的关系及相关治疗药物[J]. 药学进展, 2013, 37(2): 49-57.
[2] CHANG L, Karin M, Mammalian. MAP kinase signalling cascades [J]. Nature, 2001, 410 (6824): 37-40.
[3] CHEN J Y, WANG C, WANG J, et al. The advances of MAPK signaling pathway [J]. Chin Med Pharm, 2011, 1(8): 32-34.
[4] George J, Afek A, Abashidze A, et al. Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 2636-2641.
[5] Leor J, Marber M. Endothelial progenitors: a new tower of babel [J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48 (8): 1588-1590.
[6] Lee H S, Kim S D, Lee W M, et al. A noble function of

BAY 11-7082: inhibition of platelet aggregation mediated by an elevated cAMP-induced VASP, and decreased ERK2 / JNK1 phosphorylations [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 627(3): 85-91.
[7] 陈宁, 宋茵, 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] 贾连群, 陈文娜, 赵秋宇, 等. 化痰祛痰方药对动脉粥样硬化模型小鼠肝脏胆固醇代谢相关基因表达调控的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1): 214-218.
[9] Nagashima M, Watanabe T, Shiraishi Y, et al. Chronic infusion of salusin-alpha and -beta exerts opposite effects on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Atherosclerosis, 2010, 212(1): 70-77.
[10] 王亚红, 秦建国, 郭维琴, 等. 降脂通脉方抗高脂血症及动脉粥样硬化的实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(2): 98-100.
[11] 朱旂, 徐标, 高玲, 等. 糖尿病载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化斑块炎症反应增强 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(5): 349-352.
[12] Sen U, Moshal K S, Singh M, et al. Homocysteine induced bio-chemical stress predisposes to cytoskeletal remodeling in stretched endothelial cells [J]. Mol Cell Biochem, 2007, 302(1/2): 133-143.
[13] Tyagi N, Moshal K S, Tyagi S C, et al. gamma-aminobutyric acid: a receptor mitigates homocysteine-induced endothelial cell permeability [J]. Endothelium, 2007, 14(6): 315-323.
[14] Lecleire S, Hassan A, Marrison-Letellier R, et al. Combined glutamine and arginine decrease proinflammatory cytokine production by biopsies from Crohn's patients in association with changes in nuclear factor-kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways [J]. J Nutr, 2008, 138(12): 2481-2486.
[15] 刘倩, 范颖, 李新, 等. 黄芪葛根配伍调节糖尿病大鼠血糖血脂炎症的作用与机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 81-86.

[责任编辑 周冰冰]