

· 经典名方 ·

## 抵挡汤对糖尿病大血管病变小鼠主动脉NLRP3炎症小体活化炎症级联反应的作用机制

傅红敏<sup>1</sup>, 任秋月<sup>2</sup>, 常柏<sup>1\*</sup>

(1. 天津医科大学朱宪彝纪念医院, 天津市内分泌研究所, 国家卫健委激素与发育重点实验室, 天津市代谢性疾病重点实验室, 天津 300314; 2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

**【摘要】** 目的:观察糖尿病大血管病变进程,探讨不同剂量抵挡汤对糖尿病大血管病变的影响。方法:选取4周龄雄性载脂蛋白E敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠,采用高脂喂养联合链脲佐菌素(STZ)诱导制备糖尿病大血管病变模型,并随机分为模型组、抵挡汤高、中、低剂量组和辛伐他汀组;并以同批次同周龄ApoE<sup>-/-</sup>小鼠仅高脂喂养,作为ApoE<sup>-/-</sup>组;取相同遗传背景的C57BL/6小鼠常规喂养作为正常组。分别于实验第8,20周取材。观察不同时期各组小鼠主动脉病理特点及斑块面积占比,比较各组小鼠血糖、血脂、氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测主动脉NOD样受体3(NLRP3),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)蛋白表达,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),白细胞介素-18(IL-18),白细胞介素-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )炎症因子。结果:与正常组比较,ApoE<sup>-/-</sup>组、模型组内斑块占比显著增高( $P<0.01$ ),与模型组比较,各给药组能明显降低血管内斑块占比( $P<0.05$ );与正常组比较,ApoE<sup>-/-</sup>组、模型组主动脉NLRP3,Caspase-1蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ ),血清中IL-1 $\beta$ ,IL-18,IL-1 $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ 显著升高( $P<0.01$ ),与模型组比较,各给药组能够明显抑制主动脉NLRP3,Caspase-1蛋白的表达,降低血清中IL-1 $\beta$ ,IL-18,IL-1 $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ 等炎症因子水平( $P<0.05$ ),且以中剂量组抑制作用最强( $P<0.05$ )。结论:抵挡汤能独立于降糖、降脂之外改善糖尿病大血管病变,这可能与下调NLRP3,Caspase-1蛋白表达,减轻炎症级联反应相关。

**【关键词】** 糖尿病; 大血管病变; NOD样受体3(NLRP3)炎症小体; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)

**【中图分类号】** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2021)11-0001-08

**【doi】** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211005

**【网络出版地址】** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210331.1309.002.html>

**【网络出版日期】** 2021-3-31 14:53

## Mechanism of Didangtang in Inhibiting Aortic NLRP3 Inflammasome Cascade of Mice with Diabetic Macrovascular Disease

FU Hong-min<sup>1</sup>, REN Qiu-yue<sup>2</sup>, CHANG Bai<sup>1\*</sup>

(1. Tianjin Medical University Chu Hsien-I Memorial Hospital, Tianjin Institute of Endocrinology, NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin 300314, China; 2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China)

**【Abstract】** **Objective:** To explore the progression of diabetic macrovascular disease and the effects of Didangtang at different doses on it. **Method:** Four-week-old male apolipoprotein-E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) mice with diabetic macrovascular disease induced by exposure to high-fat diet combined with streptozotocin (STZ) were randomly divided into the model, simvastatin, as well as high-, medium-, and low-dose Didangtang groups. The age-matched ApoE<sup>-/-</sup> mice of the same batch only fed with a high-fat diet were classified into the

**【收稿日期】** 20210207(001)

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81973614)

**【第一作者】** 傅红敏,在读硕士,从事中西医结合治疗糖尿病研究,E-mail:varesmile@163.com

**【通信作者】** \*常柏,博士生导师,主任医师,从事糖尿病大血管病变有关课题研究,E-mail:changbai1972@126.com

ApoE<sup>-/-</sup> (model control) group, and C57BL/6 mice with the same genetic background receiving a regular diet into the normal group. The sampling was conducted at the 8th and 20th weeks of the experiment for observing the pathological characteristics of the aorta and the proportion of plaque area in mice of each group at different time points, followed by the comparison of blood glucose, blood lipid, and oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) levels. The aortic NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) and cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 (Caspase-1) protein expression was detected by Western blot assay, and the serum interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-18 (IL-18), interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** The comparison with the normal group revealed that the proportions of plaque area in the ApoE<sup>-/-</sup> group and the model group were increased ( $P<0.01$ ), while the proportion of plaque area in each administration group was significantly reduced in contrast to that of the model group ( $P<0.05$ ). The aortic NLRP3 and Caspase-1 protein expression levels as well as the serum IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , and TNF- $\alpha$  levels in the ApoE<sup>-/-</sup> group and the model group were significantly higher than those in the normal group ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, each administration group exhibited a significant reduction in aortic NLRP3 and Caspase-1 protein expression and serum IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , and TNF- $\alpha$  levels ( $P<0.05$ ), with the strongest inhibitory effect detected in the medium-dose Didangtang group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Didangtang directly alleviates diabetic macrovascular disease possibly by down-regulating NLRP3 and Caspase-1 protein expression and easing the inflammatory cascade.

**[Key words]** diabetes; macrovascular disease; NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome; cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 (Caspase-1)

糖尿病大血管病变是糖尿病的主要并发症之一,主要发生在心、脑及下肢血管,以动脉粥样硬化(AS)为病理基础。大量的实验和临床证据显示AS是一种慢性炎症性疾病<sup>[1]</sup>。糖尿病状态下的血脂、血糖代谢异常,氧化应激增加以及炎症反应会加重AS<sup>[2]</sup>。与非糖尿病人群相比,糖尿病患者发生大血管病变的风险增加2~4倍<sup>[3]</sup>,且具有发病年龄更早、病变进展更快、程度更严重、范围更广泛等特点<sup>[4-5]</sup>。

相关文献表明,NOD样受体3(NLRP3)炎症小体激活后,能够引起半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)的活化,后者可进一步导致白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),白细胞介素-18(IL-18)等炎症因子释放,并引起炎症级联反应,造成细胞损伤。多项研究证实,NLRP3炎症小体在糖尿病、动脉粥样硬化等疾病中高表达,抑制糖尿病主动脉NLRP3炎症小体的表达,能够改善糖尿病血管的损伤<sup>[6-10]</sup>。

糖尿病大血管病变属于中医“消渴”变证,气阴两虚,阴损及阳,渐致痰浊瘀毒等病理产物积聚,络瘀脉损。瘀血贯穿于糖尿病大血管病变的始终,故治疗上应把握脉络瘀阻的主要病机。抵挡汤方出于《金匮要略》,功效破血逐瘀,荡涤邪热,推陈出新。基于前期临床及动物实验研究证实<sup>[11-14]</sup>,抵挡汤通过抑制血小板黏附、血管内皮细胞的炎症,增强糖尿病大鼠的血管内皮防御功能,从而改善糖尿

病大血管病变。关于抵挡汤是否抑制NLRP3炎症小体的活化,减轻炎症级联反应,从而延缓糖尿病大血管病变的进展尚不明确。本文通过复制糖尿病大血管病变动物模型,分别在早期泡沫细胞聚集的脂质条纹期(实验第8周)及后期粥样斑块期(实验第20周)取材,纵向观察糖尿病大血管病变进展,同期横向对比明确抵挡汤对糖尿病大血管病变的治疗作用,分析其对糖尿病大血管病变小鼠主动脉NLRP3活化炎症级联反应的作用机制,为临床防治糖尿病大血管病变提供新思路和新靶点。

## 1 材料

**1.1 动物与饲料** 4周龄雄性载脂蛋白E敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)健康小鼠60只,8只同遗传背景、同周龄的雄性C57BL/6小鼠,体质量(16 $\pm$ 1.16)g,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008。饲养于天津医科大学朱宪彝纪念医院内分泌研究所实验中心SPF级动物房,温度(24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度60% $\pm$ 10%,明暗周期12h/12h,自由进食及饮水。高脂饲料(21%脂肪和0.15%胆固醇),购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008。本实验已通过天津医科大学实验动物伦理委员会审批。

**1.2 药物与试剂** 抵挡汤(桃仁5g,水蛭3g,熟大黄10g,虻虫1.5g)颗粒剂(广州一方制药有限公

司,批号分别为0032063,9110823,9126163,9230426);辛伐他汀(20 mg/片,杭州默沙东制药有限公司,批号S020473);链脲佐菌素(STZ,北京金泰宏达生物科技有限公司,批号S0130);小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),IL-1 $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,IL-18酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为m1002095,m1002273,m1063132,m1002294);氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号H248-1-2); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国Abcam公司,批号ab79823);NLRP3,Caspase-1抗体(美国Proteintech公司,批号分别为19771-1-AP,22915-1-AP);辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,辣根酶标记山羊抗鼠IgG,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,中性树脂胶(北京Solarbio公司,批号分别为ZB-2301,ZB-2305,G1120,G8590)。

**1.3 仪器** GA-3型血糖仪及血糖试纸(长沙三诺生物传感股份有限公司);BS-240VET型动物专用全自动生化仪(深圳迈瑞医疗电子股份有限公司);DNM-9602型酶标检测仪(北京普朗科技有限公司);DNM-9602型包埋机,KD-2258型病理切片机,KD-P型推片机,KD-BL型冻台(金华科迪仪器设备有限公司);PHG-9070A型烤箱(上海精宏实验设备有限公司);OLYMPUS CK31型正置光学显微镜(日本奥林巴斯有限公司);TVO.63XC-MO成像系统(广州明美MSHOT有限公司);DYY-6C型电泳仪,DY CZ-40D型电泳槽,DY CZ-40G型转膜槽(北京六一生物科技有限公司);Champchemi 610 plus型全自动化学/荧光/凝胶成像分析(北京赛智创业科技有限公司);IMS-50型雪科制冰机(常熟雪科电器有限公司);GTR16-2型低温高速离心机(北京新时代北利医疗器械有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物模型的制备及分组** 实验共分7组。4周龄ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,适应性喂养1周后,采用高脂饲料喂养,以150 mg·kg<sup>-1</sup> STZ,每3 d注射1次,连续注射2次,测随机血糖>16.7 mmol·L<sup>-1</sup>的小鼠视为糖尿病大血管病变动物模型成功复制,随机分为5组,分别为模型组、辛伐他汀组(阳性药组)、抵挡汤低、中、高剂量组。另外,选取ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,适应性喂养1周后,予高脂饲料喂养,作为ApoE<sup>-/-</sup>组。选取相同遗传背景的C57BL/6小鼠适应性喂养1周后,给予常规喂养,作为正常组。分别于实验8,20周取材。

**2.2 动物实验给药方法** 根据人鼠等效剂量,计算

动物灌胃给药量,人鼠等效剂量为3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>作为中剂量组,等效剂量的1/2倍作为低剂量组,2倍剂量作为高剂量组。辛伐他汀组人鼠等效剂量为2 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。ApoE<sup>-/-</sup>组和模型组给予等体积生理盐水。小鼠灌胃体积0.02 mL·g<sup>-1</sup>,每日1次灌胃,连续灌胃19周。

**2.3 全自动生化仪检测血清指标及ELISA检测血清炎症因子水平** 小鼠禁食不禁水12 h,摘取小鼠眼球取血,少许血液检测血糖,静置30 min,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径15.3 cm),取上层血清于离心管中,-80 °C冰箱保存待测。血清解冻后,用动物专用全自动生化仪测量甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),LDL水平。采用ELISA法检测ox-LDL,IL-1 $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,IL-18,TNF- $\alpha$ 水平,按照ELISA试剂盒说明书进行操作。

**2.4 HE染色观察胸主动脉病理学变化** 取胸主动脉约0.5 cm,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,4%甲醛固定24 h以上,脱水石蜡包埋切片。常规HE染色,中性树脂封片。应用Image Pro Plus6.0软件对血管内斑块面积占比进行测量,血管内斑块面积占比=主动脉斑块面积/管腔横截面面积×100%。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠主动脉Caspase-1,NLRP3蛋白的表达水平** 称取主动脉组织50 mg于离心管中,加入RIPA缓冲液裂解主动脉,冰上裂解1 h,摇匀,4 °C下12 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,取上清液-80 °C保存。用Bradford法蛋白定量,根据蛋白定量结果,加入相应体积的总蛋白样品与蛋白质凝胶电泳上样缓冲液,轻轻混合,95 °C变性10 min。将样品轻轻加至凝胶孔中,电泳仪设置成稳压状态,使样品通过浓缩胶与分离胶(电压约8 V·cm<sup>-1</sup>)。将凝胶上分离到的蛋白条带通过转移电泳方式转印至PVDF膜上,封闭1 h,将封闭后的膜直接放入一抗工作液(NLRP3 1:800,Caspase-1 1:1 000, $\beta$ -actin 1:5 000)中,4 °C反应过夜。TBST洗涤3次后加入二抗工作液(1:5 000),室温、避光缓慢摇动60 min,TBST洗涤3次,曝光洗片。Image J进行灰度值分析。

**2.6 统计学分析** 采用SPSS 26.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用One-way ANOVA和最小显著性差异法(LSD)-*t*检验进行组间比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

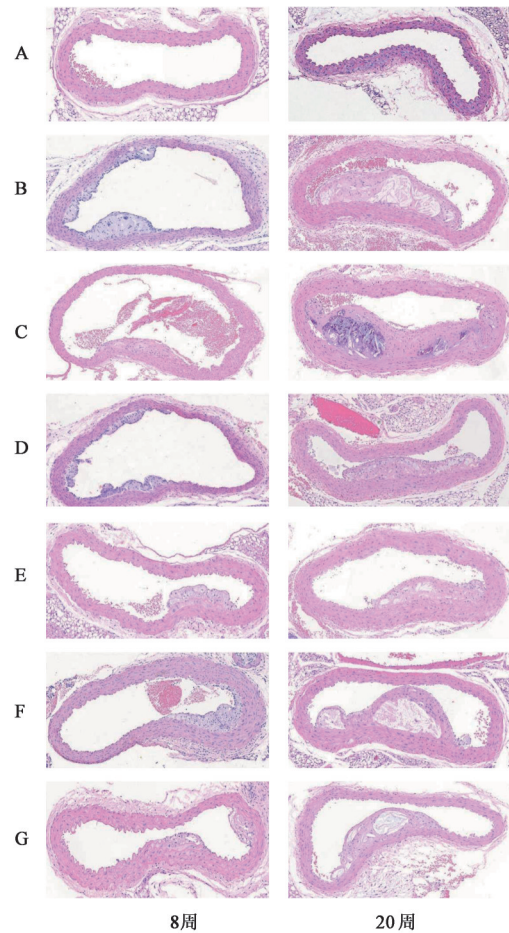
**3.1 对糖尿病大血管病变小鼠不同时期主动脉病变的影响** 正常组小鼠血管内未见病变。8周时,

ApoE<sup>-/-</sup>组小鼠可见内膜下大量泡沫细胞、单核细胞聚集,模型组小鼠可见脂质斑块形成;与正常组比较,ApoE<sup>-/-</sup>组、模型组小鼠血管内斑块面积占比显著增加( $P<0.01$ ),ApoE<sup>-/-</sup>组与模型组两者之间比较差异无统计学意义;与模型组比较,各给药组仅有泡沫细胞沉积在血管内膜,未见明显脂质斑块,血管内斑块面积占比明显降低( $P<0.05$ ),各治疗组之间两两比较差异无统计学意义。20周时,与8周时比较,ApoE<sup>-/-</sup>组小鼠斑块面积较前明显增加( $P<0.05$ ),可见粥样斑块形成,斑块内有较大空泡,斑块表面有泡沫细胞聚集,血管中膜、内膜增厚,模型组血管内斑块面积占比前明显增加( $P<0.05$ ),可见中膜平滑肌萎缩,中膜、内膜变薄,较大的粥样斑块,斑块内有较大脂质核,胆固醇结晶、钙化灶、纤维帽;与正常组比较,ApoE<sup>-/-</sup>组、模型组小鼠主动血管内斑块面积占比显著增加( $P<0.01$ ),与模型组比较,ApoE<sup>-/-</sup>组血管内斑块面积占比较小( $P<0.05$ ),各给药组血管内斑块面积占比明显减轻( $P<0.05$ ),其中抵挡汤中剂量组血管内斑块占比最小,各治疗组两两相比血管内斑块占比差异无统计学意义。见图1,表1。

### 3.2 对糖尿病大血管病变小鼠血脂、血糖的影响

8周时,与正常组比较,ApoE<sup>-/-</sup>组、模型组血脂均显著升高( $P<0.01$ ),ApoE<sup>-/-</sup>组血糖差异无统计学意义,模型组血糖显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,抵挡汤高、中、低剂量组在血糖、血脂均差异无统计学意义,辛伐他汀组TC,LDL水平明显降低( $P<0.05$ ),TG,血糖差异无统计学意义。20周时,与正常组比较,ApoE<sup>-/-</sup>组、模型组血脂均显著升高( $P<0.01$ ),ApoE<sup>-/-</sup>组血糖差异无统计学意义,模型组血糖显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,抵挡汤高、中、低剂量组血糖、血脂差异无统计学意义,辛伐他汀组TC,LDL水平明显降低( $P<0.05$ ),TG,血糖差异无统计学意义。见表2。

3.3 对糖尿病大血管病变小鼠不同时期血清中ox-LDL水平的影响 8周时,与正常组比较,ApoE<sup>-/-</sup>组、模型组血清中ox-LDL水平均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,辛伐他汀组小鼠血清中ox-LDL水平明显降低( $P<0.05$ ),抵挡汤高、中、低剂量组差异无统计学意义。20周时,与正常组比较,ApoE<sup>-/-</sup>组、模型组ox-LDL水平均显著升高( $P<0.01$ ),且同组较8周时明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,辛伐他汀组小鼠血清中ox-LDL水平显著降低( $P<0.05$ ),抵挡汤高、中、低剂量组差异无统计学意义。见表3。



A. 正常组;B. ApoE<sup>-/-</sup>组;C. 模型组;D. 抵挡汤高剂量组;E. 抵挡汤中剂量组;F. 抵挡汤低剂量组;G. 辛伐他汀组(图2同)

图1 抵挡汤对糖尿病大血管病变小鼠主动脉斑块形成的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Didangtang on aortic plaque formation in mice with diabetic macroangiopathy (HE, ×100)

表1 抵挡汤对糖尿病大血管病变小鼠血管内斑块面积占比的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of Didangtang on area of intravascular plaque area ratio in mice with diabetic macroangiopathy ( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) %

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	8周血管内斑块 面积占比	20周血管内斑块 面积占比
正常		0	0
ApoE <sup>-/-</sup>		14.2±6.0 <sup>1)</sup>	46.2±15.3 <sup>1,2,4)</sup>
模型		23.0±12.4 <sup>1)</sup>	66.3±13.1 <sup>1,4)</sup>
抵挡汤	6	11.4±3.0 <sup>2)</sup>	21.4±9.1 <sup>2)</sup>
	3	4.7±2.3 <sup>2)</sup>	15.2±8.8 <sup>2)</sup>
	1.5	8.3±3.5 <sup>2)</sup>	33.6±10.0 <sup>2)</sup>
辛伐他汀	0.002	7.3±2.4 <sup>2)</sup>	18.3±3.5 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ;与抵挡汤中剂量组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ;与8周时同组比较<sup>4)</sup> $P<0.05$ (表2~5同)。

表 2 抵挡汤对糖尿病大血管病变小鼠血糖、血脂的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	8 周				20 周			
		TG	TC	LDL	血糖	TG	TC	LDL	血糖
正常		0.8±0.3	2.1±0.2	0.3±0.1	5.1±0.5	0.8±0.1	2.2±0.4	0.3±0.1	5.3±0.5
ApoE <sup>-/-</sup>		2.9±0.4 <sup>1)</sup>	38.8±3.0 <sup>1,2)</sup>	19.9±1.2 <sup>1,2)</sup>	5.0±0.8 <sup>2)</sup>	3.3±0.4 <sup>1,2)</sup>	43.4±2.0 <sup>1,2)</sup>	30.2±4.1 <sup>1,2)</sup>	5.2±0.9 <sup>2)</sup>
模型		3.1±0.2 <sup>1)</sup>	53.0±2.6 <sup>1)</sup>	26.3±7.3 <sup>1)</sup>	18.6±1.7 <sup>1)</sup>	4.3±0.5 <sup>1)</sup>	59.8±5.2 <sup>1)</sup>	35.6±3.4 <sup>1)</sup>	18.5±4.9 <sup>1)</sup>
抵挡汤	6	2.7±0.2	52.4±4.9	20.4±1.9	18.9±3.7	4.2±0.2	56.9±2.8	34.4±3.8	16.6±2.5
	3	3.1±0.6	48.4±4.2	21.3±4.4	19.1±2.4	4.0±0.2	54.8±5.6	35.1±3.7	15.5±5.4
	1.5	3.0±0.2	52.8±9.3	20.9±3.7	19.5±4.6	4.1±0.3	53.7±3.8	37.3±6.7	15.6±4.3
辛伐他汀	0.002	2.7±0.4	27.2±5.0 <sup>2)</sup>	13.9±3.8 <sup>2)</sup>	20.6±4.5	4.1±0.5	40.4±3.0 <sup>2)</sup>	21.2±2.3 <sup>2)</sup>	20.7±4.0

表 3 抵挡汤对糖尿病大血管病变小鼠血清中 ox-LDL 水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	8 周	20 周
正常		73.7±12.5	59.5±14.8
ApoE <sup>-/-</sup>		190.0±8.7 <sup>1,2)</sup>	254.5±37.8 <sup>1,2,4)</sup>
模型		275.7±20.9 <sup>1)</sup>	364.3±29.8 <sup>1,4)</sup>
抵挡汤	6	291.3±27.3	370.5±19.3
	3	284.3±49.8	315.9±90.9
	1.5	286.7±48.8	336.9±50.0
辛伐他汀	0.002	190.5±14.8 <sup>2)</sup>	213.0±37.5 <sup>2)</sup>

**3.4 对糖尿病大血管病变小鼠不同时期主动脉 NLRP3, Caspase-1 蛋白表达的影响** 8 周时,与正常组比较, ApoE<sup>-/-</sup>组、模型组小鼠主动脉 NLRP3, Caspase-1 蛋白均显著升高 ( $P<0.01$ ); 与 ApoE<sup>-/-</sup>组比较, 模型组主动脉 NLRP3, Caspase-1 蛋白表达水平均明显升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 各给药组均可明显抑制主动脉 NLRP3, Caspase-1 蛋白的表达 ( $P<0.05$ ), 其中在抑制 NLRP3 蛋白表达方面, 各给药组之间两两相比, 差异无统计学意义; 抵挡汤中剂量组对 Caspase-1 蛋白表达抑制最强 ( $P<0.05$ ), 其余各组之间未见明显差别。20 周时, 与正常组比较, ApoE<sup>-/-</sup>组、模型组小鼠主动脉 NLRP3, Caspase-1 蛋白均显著升高 ( $P<0.01$ ); 与 ApoE<sup>-/-</sup>组比较, 模型组主动脉 NLRP3, Caspase-1 蛋白表达水平均明显升高 ( $P<0.05$ ), 与模型组比较, 各给药组均可明显降低主动脉 NLRP3, Caspase-1 蛋白的表达 ( $P<0.05$ ), 其中抵挡汤中剂量组对 NLRP3, Caspase-1 蛋白抑制作用最强 ( $P<0.05$ ), 其余各组之间差异无统计学意义。见图 2, 表 4。

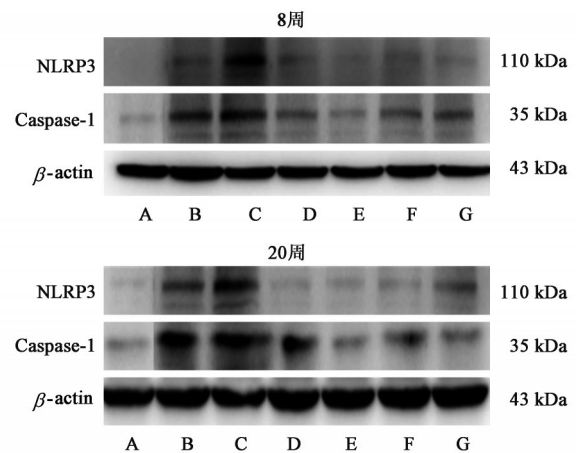


图 2 小鼠主动脉 NLRP3 及 Caspase-1 蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of NLRP3 and Caspase-1 protein expression in aorta of mice

**3.5 对糖尿病大血管病变小鼠不同时期血清中 IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  炎症因子水平的影响** 与正常组比较, ApoE<sup>-/-</sup>组与模型组血清中 IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  水平在不同时期均显著升高 ( $P<0.01$ ); 随着病程进展, 20 周时 ApoE<sup>-/-</sup>组与模型组血清中 IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  水平较 8 周时均明显增加 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 各给药组在不同时期均可明显降低 IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  水平 ( $P<0.05$ )。其中, 在 8 周时, 抵挡汤中剂量组在抑制 IL-18, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  水平方面优于抵挡汤高低剂量组 ( $P<0.05$ ), 与辛伐他汀组差别无统计学意义, 在抑制 IL-1 $\beta$  水平上各给药组差异无统计学意义; 在 20 周时, 抵挡汤中剂量组对 IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  的抑制作用明显优于抵挡汤高、低剂量组及辛伐他汀组 ( $P<0.05$ )。见表 5。

#### 4 讨论

糖尿病大血管病变的病理基础是动脉粥样硬化。动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病, 其病变

表 4 抵挡汤对糖尿病大血管病变小鼠主动脉 NLRP3 及 Casapase-1 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Didangtang on expression of NLRP3 and Casapase-1 protein of aorta in mice with diabetic macroangiopathy ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	8 周		20 周	
		NLRP3/ $\beta$ -actin	Caspase-1/ $\beta$ -actin	NLRP3/ $\beta$ -actin	Caspase-1/ $\beta$ -actin
ApoE <sup>-/-</sup>		6.1±2.1 <sup>1,2)</sup>	5.1±0.1 <sup>1,2)</sup>	7.1±1.0 <sup>1,2)</sup>	6.4±1.0 <sup>1,2)</sup>
模型		9.9±1.8 <sup>1)</sup>	7.3±0.5 <sup>1)</sup>	10.8±4.1 <sup>1)</sup>	10.0±0.8 <sup>1)</sup>
抵挡汤	6	3.1±1.2 <sup>2)</sup>	3.4±0.3 <sup>2,3)</sup>	4.1±1.4 <sup>2,3)</sup>	5.9±0.5 <sup>2,3)</sup>
	3	1.4±0.4 <sup>2)</sup>	1.9±0.7 <sup>2)</sup>	1.7±0.9 <sup>2)</sup>	2.4±0.5 <sup>2)</sup>
	1.5	3.7±1.2 <sup>2)</sup>	3.9±0.9 <sup>2,3)</sup>	4.2±0.8 <sup>2,3)</sup>	5.1±0.7 <sup>2,3)</sup>
辛伐他汀	0.002	3.0±0.4 <sup>2)</sup>	3.2±0.7 <sup>2,3)</sup>	5.2±1.1 <sup>2,3)</sup>	5.1±1.0 <sup>2,3)</sup>

注: 设 8 周和 20 周时正常组各指标蛋白相对表达水平为 1。

表 5 抵挡汤对糖尿病大血管病变小鼠血清中 IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 5 Effect of Didangtang on levels of IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  of serum in mice with diabetic macroangiopathy ( $\bar{x}\pm s, n=4$ ) ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	8 周				20 周			
		IL-1 $\beta$	IL-18	IL-1 $\alpha$	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-18	IL-1 $\alpha$	TNF- $\alpha$
正常		76.9±2.2	110.8±2.8	21.8±1.6	371.7±5.9	79.5±2.9	110.2±5.5	22.5±1.9	380.4±15.3
ApoE <sup>-/-</sup>		103.1±6.5 <sup>1,2)</sup>	174.1±7.4 <sup>1,2)</sup>	42.3±2.0 <sup>1,2)</sup>	511.8±16.5 <sup>1,2)</sup>	122.8±5.6 <sup>1,2,4)</sup>	197.0±6.1 <sup>1,2,4)</sup>	55.7±7.5 <sup>1,2,4)</sup>	589.9±12.3 <sup>1,2,4)</sup>
模型		132.0±10.1 <sup>1)</sup>	207.3±4.9 <sup>1)</sup>	64.4±4.0 <sup>1)</sup>	604.2±11.7 <sup>1)</sup>	155.2±9.3 <sup>1,4)</sup>	246.6±6.9 <sup>1,4)</sup>	82.9±2.8 <sup>1,4)</sup>	669.1±17.4 <sup>1,4)</sup>
抵挡汤	6	107.6±5.0 <sup>2)</sup>	162.8±3.1 <sup>2,3)</sup>	48.6±4.2 <sup>2,3)</sup>	554.7±22.1 <sup>2,3)</sup>	118.7±3.3 <sup>2,3)</sup>	181.3±12.0 <sup>2,3)</sup>	60.3±3.1 <sup>2,3)</sup>	603.5±8.0 <sup>2,3)</sup>
	3	92.3±4.1 <sup>2)</sup>	142.2±7.2 <sup>2)</sup>	32.8±3.1 <sup>2)</sup>	498.1±14.3 <sup>2)</sup>	99.7±6.2 <sup>2)</sup>	155.6±5.2 <sup>2)</sup>	43.9±6.3 <sup>2)</sup>	529.2±12.3 <sup>2)</sup>
	1.5	109.8±3.3 <sup>2)</sup>	168.8±7.7 <sup>2,3)</sup>	48.9±4.8 <sup>2,3)</sup>	559.6±6.1 <sup>2,3)</sup>	124.9±9.7 <sup>2,3)</sup>	191.5±5.5 <sup>2,3)</sup>	62.9±10.0 <sup>2,3)</sup>	599.0±11.4 <sup>2,3)</sup>
辛伐他汀	0.002	97.6±6.3 <sup>2)</sup>	163.0±9.7 <sup>2)</sup>	38.9±5.8 <sup>2)</sup>	507.7±26.8 <sup>2)</sup>	119.2±8.3 <sup>2,3)</sup>	174.4±4.7 <sup>2,3)</sup>	60.0±3.5 <sup>2,3)</sup>	577.3±12.5 <sup>2,3)</sup>

特征是内膜增厚, 脂质、炎症细胞和纤维成分积聚, 通过斑块沉积使动脉变窄。我国一项关于动脉粥样硬化风险评估的横断面研究显示<sup>[15]</sup>, 与非糖尿病患者相比, 糖尿病患者更有可能出现伴有钙化和富含脂质的坏死核心的颈动脉斑块, 表明糖尿病可能导致更严重的动脉粥样硬化病变的发展。

抵挡汤方出于《金匱要略》, 原方由大黄、水蛭、桃仁、虻虫组成, 以善饮血之水蛭为君, 善吮血之虻虫为臣, 善破诸经瘀血之桃仁为佐, 善行君令之将军大黄为使, 破血逐瘀, 荡涤邪热, 推陈出新。相关文献综述表明, 水蛭中主要成分是水蛭素, 水蛭素具有抗血栓、改善血流变、抗炎、改善缺氧及保护血管内皮等多种作用<sup>[16]</sup>。大黄主要有效成分为蒽醌类衍生物, 包括大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄多糖等, 有文献综述表明, 大黄在治疗糖尿病及其并发症中具有调节糖脂代谢、改善胰岛素抵抗、抗炎等作用<sup>[17]</sup>; 相关动物实验表明, 大黄酸能够抑制 NLRP3/Caspase-1 通路的活化, 减轻炎症反应<sup>[18]</sup>; 大黄素能够抑制 TNF- $\alpha$  的表达改善动脉粥样硬化<sup>[19]</sup>。桃仁具有抗血小板聚集、抗炎、改善脂质代谢等作用, 其主要成分苦杏仁苷能够降低 TNF- $\alpha$ ,

IL-1 $\beta$ , IL-6 的表达, 改善动脉粥样硬化<sup>[20]</sup>。虻虫具有抗凝、抗血小板聚集、改善血流变、抗炎等作用<sup>[21-22]</sup>。基于常柏教授前期课题研究证实, 临床小剂量运用抵挡汤, 能够明显改善 2 型糖尿病患者血管内皮舒张功能, 修复内皮功能损伤, 延缓 2 型糖尿病大血管病变的发生发展; 动物实验证实小剂量抵挡汤可有效抑制糖尿病大血管病变单核/巨噬细胞的活化、迁移、黏附, 可调节血管内皮细胞的能量代谢, 改善其功能状态、调节血管内皮通透性及细胞连接信号转导通路而增强糖尿病大鼠血管内皮防御功能。辛伐他汀具有抗炎、抗氧化作用, 可延缓动脉粥样硬化进展, 是理想的阳性对照药物。

本实验研究证实糖尿病状态下血脂代谢异常加重, 抵挡汤对经 STZ 诱导后的 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血脂改善不明显。经 STZ 诱导的糖尿病 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠较非糖尿病 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠相比, 动脉粥样硬化进展更快, 血管内皮损伤更严重, 血管狭窄程度更大; 抵挡汤干预后, 可明显抑制动脉粥样硬化的进展, 且效果较阳性对照药辛伐他汀显著。

血管内皮下泡沫细胞的形成和聚集是动脉粥样硬化发展的关键<sup>[23]</sup>。ox-LDL 可诱导巨噬细胞

沫化并引起细胞焦亡。血液中的巨噬细胞摄取大量 ox-LDL 后,沉积在血管内皮下,形成泡沫细胞,进而发展为粥样斑块<sup>[24]</sup>。相关研究表明,糖尿病患者的 ox-LDL 水平较非糖尿病患者显著升高<sup>[24]</sup>,且高糖状态下会加重 ox-LDL 引起的炎症反应<sup>[26]</sup>。本实验研究发现,模型组小鼠的 LDL 及 ox-LDL 水平在不同时期均显著高于 ApoE<sup>-/-</sup>组小鼠,证明了糖尿病状态下,加重了血脂代谢异常,高糖状态下,LDL 更容易被氧化修饰为 ox-LDL。抵挡汤干预后,血脂、血糖及 ox-LDL 水平较模型组均无明显差异,阳性药辛伐他汀组可明显降低糖尿病大血管病变小鼠 TC, LDL 及 ox-LDL 水平。

巨噬细胞吞噬 ox-LDL 后,能够通过诱导 Toll 样受体 4/Toll 样受体 6 (TLR4/TLR6) 异二聚体的组装,上调核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路,或者细胞内形成胆固醇晶体,诱导 NLRP3 炎症小体的活化<sup>[26]</sup>。NLRP3 炎症小体能将细胞内无活性的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 前体 (pro-Caspase-1) 水解为活性的 Caspase-1, Caspase-1 进一步将白细胞介素 IL-1 $\beta$  前体 (pro-IL-1 $\beta$ ), 白细胞介素 IL-18 前体 (pro-IL-18) 加工为具有活性的 IL-1 $\beta$ , IL-18<sup>[27]</sup>, 分泌到细胞外,引起炎症反应。同时 Caspase-1 的活化还能够促进 IL-1 $\alpha$ <sup>[29]</sup> 和 TNF- $\alpha$ <sup>[30]</sup> 的表达, IL-1 $\alpha$  能够对病变局部产生持续性细胞浸润和组织破坏, TNF- $\alpha$  作为一种重要的炎症介质,广泛表达于血管内皮,促进内皮细胞凋亡,还可调节细胞黏附因子,平滑肌细胞迁移、增殖。这些炎症因子与糖尿病大血管病变整个病理过程密切相关。以上过程阐明了 NLRP3 炎症小体活化后能够引起炎症级联反应。本实验结果显示,模型组小鼠主动脉的 NLRP3, Caspase-1 蛋白表达及血清中 IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  炎症因子水平均显著高于 ApoE<sup>-/-</sup>组,且随着病程进展,病变程度进一步加重,提示糖尿病状态下, NLRP3 蛋白表达增加,进一步扩大了炎症级联反应;予抵挡汤或辛伐他汀干预后,无论是在大血管病变早期泡沫细胞聚集的脂质条纹期还是在后期粥样斑块期,均能显著抑制 NLRP3, Caspase-1 蛋白的表达,且显著降低了血清中 IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达水平,且以抵挡汤中剂量组效果最佳。

综上所述,本实验证明了糖尿病状态下,大血管病变发生更早,进展更快,程度更严重,这可能与糖尿病状态下, NLRP3 炎症小体活化引起炎症级联反应相关。本实验还证明抵挡汤能独立于降糖、降脂之外改善糖尿病大血管病变,这可能与下调

NLRP3, Caspase-1 蛋白表达,减轻炎症级联反应相关。为临床治疗糖尿病大血管病变提供新的切入点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 315-327.
- [2] POZNYAK A, GRECHKO A V, POGGIO P, et al. The diabetes mellitus-atherosclerosis connection: the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1835.
- [3] SARWAR N, GAO P, SESHASAI S R, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative Meta-analysis of 102 prospective studies[J]. *Lancet*, 2010, 375(9733): 2215-2222.
- [4] NING G. Risk Evaluation of cAncers in Chinese diabeTic individuals: a gitudinal (REACTION) study [J]. *J Diabetes*, 2012, 4(2): 172-173.
- [5] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 948-959.
- [6] BERGSBAKEN T, FINK S L, COOKSON B T. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(2): 99-109.
- [7] RUSSO H M, RATHKEY J, BOYD-TRESSLER A, et al. Active Caspase-1 induces plasma membrane pores that precede pyroptotic lysis and are blocked by lanthanides[J]. *J Immunol*, 2016, 197(4): 1353-1367.
- [8] YU Z W, ZHANG J, LI X, et al. A new research hot spot: the role of NLRP3 inflammasome activation, a key step in pyroptosis, in diabetes and diabetic complications[J]. *Life Sci*, 2020, 240: 117138.
- [9] SHARMA A, TATE M, MATHEW G, et al. Oxidative stress and NLRP3-inflammasome activity as significant drivers of diabetic cardiovascular complications: therapeutic implications [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 114.
- [10] DING S, XU S, MA Y, et al. Modulatory echanisms of the NLRP3 inflammasomes in diabetes [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 850.
- [11] 常柏, 潘从清, 孟东, 等. 抵挡汤对 2 型糖尿病患者血管内皮功能影响的临床研究[J]. *天津中医药*, 2011, 28(6): 457-458.
- [12] 常柏, 李巧芬, 常宝成, 等. 抵挡汤早期干预对 2 型糖尿病大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  与血管细胞黏附分子-1 表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2012, 19(10):

- 38-40.
- [13] 常柏,李巧芬,李春深,等. 抵挡汤早期干预对2型糖尿病大鼠血清IL-4、IL-13水平及主动脉TNF- $\alpha$ mRNA表达的影响[J]. 四川中医, 2013, 31(3): 48-50.
- [14] 周胜男,常柏,吴晓明,等. 抵挡汤早期干预对2型糖尿病大鼠血管内皮细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(9): 3985-3988.
- [15] GAO X, SONG J, WATASE H, et al. Differences in carotid plaques between symptomatic patients with and without diabetes mellitus [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(6): 1234-1239.
- [16] 袁红霞,张莉芹,马瑾,等. 水蛭药用成分及主要药理功效研究进展[J]. 甘肃医药, 2013, 32(4): 270-273.
- [17] 赵娟,尚文斌,于希忠. 大黄及其有效成分抗糖尿病作用机制的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1704-1706.
- [18] 姜囡. NLRP3/Caspase-1信号通路在急性胰腺炎肺损伤发病机制中的作用及大黄素干预的实验研究[D]. 大连:大连医科大学, 2020.
- [19] HEO S K, YUN H J, NOH E K, et al. Emodin and rhein inhibit LIGHT-induced monocytes migration by blocking of ROS production [J]. *Vascul Pharmacol*, 2010, 53(1/2): 28-37.
- [20] 雷甜甜. 苦杏仁苷抑制LDLR<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化的作用及机制研究[D]. 成都:电子科技大学, 2020.
- [21] 李军德,黄璐琦,陈敏,等. 中药虻虫研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 228-230.
- [22] 朱婷,冯玉. 中药虻虫研究进展[J]. 吉林中医药, 2016, 36(8): 859-862.
- [23] MAGUIRE E M, PEARCE S W A, XIAO Q. Foam cell formation: a new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease [J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, 112: 54-71.
- [24] CHISTIYAKOV D A, MELNICHENKO A A, MYASOEDOVA V A, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(11): 1153-1165.
- [25] YUAN T, YANG T, CHEN H, et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis [J]. *Redox Biol*, 2019, 20: 247-260.
- [26] LI J, CHEN S, CAI X, et al. TLR2 expression doesn't change in ox-LDL mediated inflammation in human umbilical vein endothelial cells under high glucose culture [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11): 22004-22010.
- [27] GREBE A, HOSS F, LATZ E. NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 122(12): 1722-1740.
- [28] HE Y, HARA H, NUNEZ G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [29] AIZAWA E, KARASAWA T, WATANABE S, et al. GSDME-dependent incomplete pyroptosis permits selective IL-1 $\alpha$  release under Caspase-1 inhibition [J]. *iScience*, 2020, 23(5): 101070.
- [30] XU X E, LIU L, WANG Y C, et al. Caspase-1 inhibitor exerts brain-protective effects against sepsis-associated encephalopathy and cognitive impairments in a mouse model of sepsis [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 80: 859-870.

[责任编辑 周冰冰]