

· 基础研究 ·

通脉降浊煎剂含药血清对泡沫细胞
胆固醇流出率的影响田 苗^{1,2Δ} 王凤荣¹ 张 冰³ 王 帅¹ 刘英楠^{2▲}

摘要 **目的** 研究通脉降浊煎剂含药血清(TDMS)对泡沫细胞胆固醇流出率的影响及可能机制。**方法** 采用50 mg/L ox-LDL 诱导巨噬细胞48 h,建立巨噬细胞源泡沫细胞模型,添加TDMS,将细胞分为对照组(正常巨噬细胞),ox-LDL组(50 mg/L ox-LDL), β -环糊精(β -CD)组(50 mg/L ox-LDL + 10 mmol/L β -CD),正常血清(CS)组(50 mg/L ox-LDL + 等体积正常血清),TDMS组(50 mg/L ox-LDL + 5% TDMS)。检测细胞内总胆固醇、游离胆固醇含量和细胞胆固醇流出率;采用Western blot 方法检测细胞内三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)蛋白表达;Real-time PCR 方法检测细胞内 ABCA1、miR-33a、miR-33b mRNA 表达。**结果** 与对照组比较,ox-LDL 组细胞内总胆固醇、游离胆固醇含量和胆固醇流出率均增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),ABCA1 mRNA 和蛋白表达水平降低($P < 0.01$),miR-33a 和 miR-33b mRNA 表达水平均升高($P < 0.01$)。与 ox-LDL 组比较, β -CD 组与 TDMS 组细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量均下降,胆固醇流出率增大($P < 0.05$, $P < 0.01$),ABCA1 mRNA 和蛋白表达水平升高($P < 0.01$),细胞内 miR-33a 和 miR-33b mRNA 表达水平均降低($P < 0.01$)。**结论** TDMS通过调节 miR-33a/b 和 ABCA1 表达,从而提高胆固醇流出率,降低泡沫细胞内胆固醇含量。

关键词 通脉降浊煎剂;含药血清;泡沫细胞;胆固醇;三磷酸腺苷结合盒转运体 A1;miR-33a/b 基因

Effects of Tongmai Jiangzhuo Decoction Medicated Serum on Cholesterol Efflux in Foam Cells
TIAN Miao^{1,2}, WANG Feng-rong², ZHANG Bing³, WANG Shuai², and LIU Ying-nan¹ 1 Graduate School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110032); 2 Division of Cardiovascular Medicine, Liaoning Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110032); 3 Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing (100850)

ABSTRACT **Objective** To evaluate the effect of Tongmai Jiangzhuo Decoction medicated serum (TDMS) on cholesterol efflux in foam cells and to investigate the possible underlying mechanisms. **Methods** THP-1-derived macrophages were treated with 50 mg/L oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) for 48 h in order to obtain macrophage foam cells. The foam cells were treated with TDMS. The macrophages were assigned to control group (normal macrophages), ox-LDL group (50 mg/L ox-LDL), β -cyclodextrin (β -CD) group (50 mg/L ox-LDL and 10 mmol/L β -CD), control serum (CS) group (50 mg/L ox-LDL and the isometric normal serum) and TDMS group (50 mg/L ox-LDL and 5% TDMS). The contents of total cholesterol (TC) and free cholesterol (FC) were assessed using commercial kits. The cholesterol efflux was measured using chemiluminescence method. The protein expression level of ABCA1 was examined using Western blot analysis and the mRNA expression levels of ATP-binding cassette transporter

基金项目: 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项(No. JDZX2015049, 依托单位: 长春中医药大学附属医院); 辽宁省教育厅科学技术研究项目(No. L201622)

作者单位: 1. 辽宁中医药大学附属医院心血管内科(沈阳 110032); 2. 辽宁中医药大学研究生院(沈阳 110032); 3. 北京毒物药物研究所(北京 100850)

通讯作者: 王凤荣, Tel: 024-31961158, E-mail: wfr925@126.com

Δ 现单位辽宁中医药大学附属医院医务处(沈阳 110032)

▲ 现单位辽宁中医药大学附属医院中医住院医师规范化培训基地(沈阳 110032)

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20180816. 219

A1 (ABCA1), miR-33a and miR-33b in the cells were detected using Real-time PCR. Results Compared with the control group, the cellular contents of TC, FC and cholesteryl efflux were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ABCA1 mRNA and the protein expression levels were decreased ($P < 0.01$). Compared with the ox-LDL group, the cellular contents of TC and FC in β -CD and TDMS group were decreased, and the cholesteryl efflux was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ABCA1 mRNA and the protein expression levels were enhanced ($P < 0.01$), miR-33a and miR-33b mRNA expression levels were reduced ($P < 0.01$). Conclusion TDMS could promote cholesterol efflux and decrease cholesterol contents in the foam cells via modulating miR-33a/b and ABCA1 expressions.

KEYWORDS Tongmai Jiangzhuo Decoction; drug containing serum; foam cells; cholesterol; ATP-binding cassette transporter A1; miR-33a/b gene

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种发生于动脉血管壁上的慢性炎症性疾病, 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoproteins, ox-LDL) 在 AS 斑块的形成中有重要作用。ox-LDL 由巨噬细胞摄取, 过度的 ox-LDL 摄取以及降低胆固醇流出会导致巨噬细胞内胆固醇酯堆积, 生成泡沫细胞, 而巨噬源泡沫细胞在 AS 的发生发展中起重要作用^[1]。

通脉降浊煎剂 (Tongmai Jiangzhuo Decoction, TD) 是辽宁中医药大学附属医院王凤荣教授根据其 20 余年从事中西医结合治疗心脑血管疾病的经验, 提出“血脂异常及 AS 以痰浊、血瘀为其病理改变”的观点, 在《伤寒论》中的名方“大柴胡汤”基础上加入具有通腑泄浊、活血化瘀功效的丹参和泽泻, 成为防治 AS 的通脉降浊方。在以往的研究里发现通脉降浊制剂能够有效降低 AS 家兔模型血脂, 延缓动脉粥样斑块形成, 抑制血管炎症反应^[2], 初步证实了通脉降浊方剂在防治 AS 中的作用。本研究使用泡沫细胞模型, 采用分子生物学方法检测 TD 含药血清 (TD medicated serum, TDMS) 对 ABCA1 和 miR-33a/b 表达的影响, 在体外进一步对 TDMS 的作用机制进行研究。

材料与方法

1 动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠 (200 ~ 220 g), 由辽宁长生生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK (辽) 2015 - 0001, 在辽宁中医药大学实验动物中心 (符合《中华人民共和国卫生部实验动物环境设施标准》二级标准) 饲养, 实验前适应性饲养 1 周, 自由摄食饮水, 喂养环境温度恒定为 18 ~ 22 °C, 湿度恒定为 50% ~ 60%。此实验由辽宁中医药大学动物实验伦理委员会审查通过 (No: 21000092017067)。

2 细胞 人急性单核细胞白血病细胞系 THP-1 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库 (货号: CL-0233)。

3 药物 TD 以《伤寒论》大柴胡汤原方为基础拟方, 药物组成为柴胡 15 g 黄芩 9 g 大黄 6 g 芍药 9 g 法半夏 9 g 生姜 15 g 枳实 9 g 泽泻 9 g 丹参 9 g 大枣 9 g, 冷水浸泡 20 min, 煎药机浓煎取汁 80 mL, 由辽宁中医药大学附属医院制剂室提供。

4 主要试剂及仪器 主要试剂: RPMI-1640 培养基 (Gibco, 批号: 31800 - 014); PMA (Sigma 公司, 批号: P1585); ox-LDL (北京协生生物科技有限责任公司); β -环糊精 (上海阿达玛斯有限公司, 批号: 68168-23-0); 油红 O (上海悦耳化学用品有限公司, 批号: 26125); Sandoz58-035 (Sigma 公司, 批号: S9318); BODIPY-胆固醇 (Avanti 公司, 批号: 878557-19-8); 蛋黄卵磷脂 (Sigma 公司, 批号: P3556); ApoA-I (北京义翘神州生物技术有限公司, 批号: 10686-H02H); 总胆固醇和游离胆固醇测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: A111-1); 高纯总 RNA 快速提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司, 批号: RP1201); Super M-MLV 反转录酶 (北京百泰克生物技术有限公司, 批号: PR6502); 2 × Power Taq PCR MasterMix (北京百泰克生物技术有限公司, 批号: PR1702); SYBR Green (北京索莱宝科技有限公司, 批号: SY1020); ABCA1 一抗 [生工生物工程 (上海) 有限公司, 批号: D155299]; β -actin 一抗 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bsm-33139M); 羊抗兔 IgG-HRP (碧云天生物技术研究, 批号: A0208); 其他试剂均为国产分析纯, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

主要仪器: 紫外分光光度计 (NANO 2000, Thermo, 美国); 荧光定量 PCR 仪 (Exicycler 96, Bioneer, 韩国); 电泳仪 (DYY-7C, 北京六一仪器厂); 转移槽 (DYCZ-40D, 北京六一仪器厂); 双垂直蛋白电泳仪 (DYCZ-24DN, 北京六一仪器厂); 凝胶成

像系统(WD-9413B,北京六一仪器厂)。

5 方法

5.1 TDMS 制备 Wistar 大鼠随机分为对照组和给药组,每组 3 只。给药组大鼠灌胃给予大鼠 TD 10 mL/kg (按临床成人单位体重 6.3 倍的剂量换算^[3]),对照组大鼠相同方法给予相同体积的清水。每日 2 次,连续给药 8 日,第 8 日给药后 2 h 腹腔注射 10% 水合氯醛 3.5 mL/kg 麻醉,腹主动脉采血,于 4 ℃ 3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,合并血清,56 ℃ 灭活 30 min,微孔滤膜过滤除菌, -20 ℃ 保存。

5.2 THP-1 细胞培养及诱导分化 THP-1 细胞用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基,含 100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素,置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。用含 160 ng/mL 佛波酯(PMA)、10 % FBS 的 RPMI-1640 培养基孵育 THP-1 细胞,诱导细胞向巨噬细胞分化,72 h 后显微镜下观察并拍照。

5.3 泡沫细胞诱导培养及鉴定 取诱导分化成的巨噬细胞,将培养液换为含 0.3% BSA 的无血清 RPMI-1640,同时加入 50 mg/L ox-LDL 孵育 48 h,诱导其吞噬脂质形成巨噬细胞源性泡沫细胞。油红 O 染色观察 ox-LDL 诱导前后细胞中脂滴,显微镜下观察并拍照。

5.4 上清胆固醇含量检测 将细胞分为以下 5 组并进行相应处理:对照组:正常巨噬细胞; ox-LDL 组:50 mg/L 的 ox-LDL 孵育巨噬细胞 48 h;β-环糊精组 (β-cyclodextrin, β-CD): 50 mg/L ox-LDL 和 10 mmol/L β-环糊精共同孵育巨噬细胞 48 h;正常血清(control serum,CS)组:50 mg/L ox-LDL 和等体积正常血清共同孵育巨噬细胞 48 h; TDMS 组: 50 mg/L ox-LDL 和 5% TDMS 共同孵育巨噬细胞 48 h。用试剂盒分别检测各组细胞上清液中总胆固醇和游离胆固醇的含量。

5.5 化学荧光法检测细胞胆固醇流出率 将细胞接种于 96 孔板,向细胞中加入 2 μg/mL ACAT 抑制剂 Sandoz58-035,用含 0.025 mmol/L BODIPY-胆固醇、0.1 mmol/L 蛋黄卵磷脂的无血清培养基孵育细胞 1 h,MEM-HEPES 清洗细胞 2 次,然后加入含不同处理药物的 RPMI 培养液孵育细胞 18 h,再加入 10 mg/mL ApoA-I 继续孵育 4 h。荧光酶标仪分别检测培养基和细胞中的荧光强度。胆固醇外流率(%) = 培养基荧光强度/(培养基荧光强度 + 细胞荧光强度) × 100 %。

5.6 荧光实时定量 PCR (Real-time PCR) 检

测 ATP-结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)、miR33a、miR-33b mRNA 的表达 收集细胞,采用总 RNA 提取试剂盒提取样本总 RNA,将得到的 RNA 样本进行反转录,最后得到 20 μL cDNA 样本, -20 ℃ 保存。取 cDNA 模板 1 μL,上下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L),SYBR GREEN mastermix 10 μL 进行 PCR 反应,反应体系 20 μL。PCR 扩增程序为:95 ℃ 10 min 激活 Hot Star Taq DNA 合成酶,扩增循环 95 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s,共 40 个循环。反应体系加入 96 孔板中,每个样品设置 3 个复孔。PCR 反应在 Exicycler 96 荧光定量仪上进行。采用 β-actin 和 U6 分别作为 ABCA1 与 microRNA 的内参,根据 Ct 值计算待测样品相对值。

表 1 PCR 引物序列及产物长度

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)
ABCA1	正向序列: CCAGAGTTATTAGTGCCAAGTT	161
	反向序列: TATCAGAGGGAATCAAAGCAG	
miR-33a	正向序列: CGAGCGGTGCATTGTAGTTG	61
	反向序列: GTGCAGGGTCCGAGGTATTC	
miR-33b	正向序列: CGTTGTTAGCGGTTTACGAGTG	73
	反向序列: GTGCAGGGTCCGAGGTATTC	
U6	正向序列: CTCGCTTCGGCAGCAC	94
	反向序列: AACGCTTCACGAATTTGCGT	
β-actin	正向序列: CTTAGTTGCGTTACACCCCTTCTTG	156
	反向序列: CTGTACACCTTCACCGTTCCAGTTT	

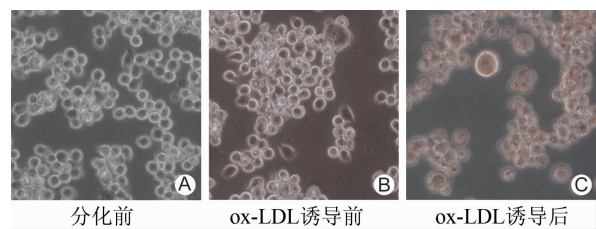
5.7 Western blot 分析 ABCA1 蛋白表达 将各组细胞用 200 μL 含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液冰上裂解 5 min,于 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min。收集上清,采用 BCA 蛋白检测试剂盒进行蛋白定量。取 20 μg 蛋白样本加入 5 × 上样缓冲液稀释蛋白样品,在沸水浴中煮沸 5 min。用 6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶在 80 V 的恒压下电泳 2.5 h,将蛋白用湿法转膜仪转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入 1:500 兔多克隆 ABCA1 一抗,4 ℃ 过夜。TBST 液洗膜 4 次,每次 5 min。加入 1:5 000 羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗,37 ℃ 孵育 45 min,TBST 洗膜 6 次,每次 5 min。ECL 化学发光试剂孵育 5 min,于暗室采用 X 光片进行曝光。显影、定影后将胶片进行扫描,用凝胶图象处理系统 (Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带的光密度值。

5.8 统计学方法 数据采用 SPSS 22.0 进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数比较采用单因素方差分析,组间差异比较采用 LSD 检验。P <

0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 TDMS 对泡沫细胞胆固醇分泌的影响(图 1, 表 2) PMA 诱导分化后,镜下观察 THP-1 细胞明显由悬浮生长转为贴壁生长,细胞长出伪足。经油红 O 染色后镜下显示:ox-LDL 诱导前的巨噬细胞无染色阳性细胞。ox-LDL 诱导后的细胞胞内脂质堆积,呈油红 O 染色阳性,表明诱导泡沫细胞成功。



注:A 为 THP-1 细胞;B 为 PMA 诱导 THP-1 细胞分化成巨噬细胞(油红 O 染色);C 为 ox-LDL 诱导巨噬细胞成为泡沫细胞(油红 O 染色)

图 1 ox-LDL 诱导的泡沫细胞 (×400)

与对照组比较,ox-LDL 组细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量均显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 ox-LDL 组比较, β -CD 组与 TDMS 组细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量均下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);CS 组细胞内胆固醇含量与 ox-LDL 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组总胆固醇、游离胆固醇及胆固醇流出率比较 ($\bar{x} \pm s$)

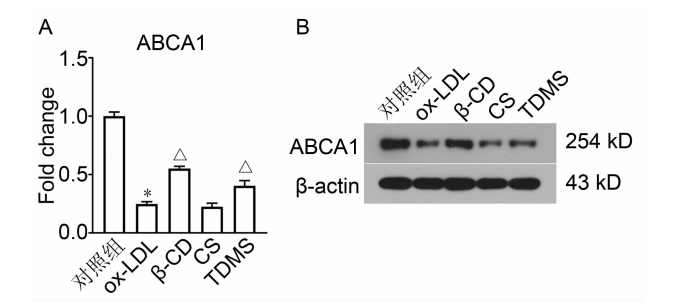
组别	n	总胆固醇 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)	游离胆固醇 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)	胆固醇流出率 (%)
对照	3	2.442 $\pm$ 0.394	1.092 $\pm$ 0.143	6.75 $\pm$ 1.09
ox-LDL	3	7.619 $\pm$ 0.705 **	3.273 $\pm$ 0.397 *	18.43 $\pm$ 2.01 **
β -CD	3	4.081 $\pm$ 0.437 $\Delta\Delta$	1.753 $\pm$ 0.243 $\Delta\Delta$	43.53 $\pm$ 5.32 $\Delta\Delta$
CS	3	8.565 $\pm$ 0.826	3.354 $\pm$ 0.463	17.83 $\pm$ 2.22
TDMS	3	5.525 $\pm$ 0.617 $\Delta\Delta$	2.648 $\pm$ 0.246 Δ	35.67 $\pm$ 2.09 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 ox-LDL 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2 各组胆固醇流出率比较(表 2) 与对照组比较,ox-LDL 组细胞胆固醇流出率增加($P < 0.01$)。与 ox-LDL 组比较, β -CD 组和 TDMS 组胆固醇流出率增大($P < 0.01$);CS 组细胞胆固醇流出率与 ox-LDL 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 各组 ABCA1 表达比较(图 2) 与对照组比较,ox-LDL 组细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白表达水平降低($P < 0.01$)。与 ox-LDL 组比较, β -CD 组和

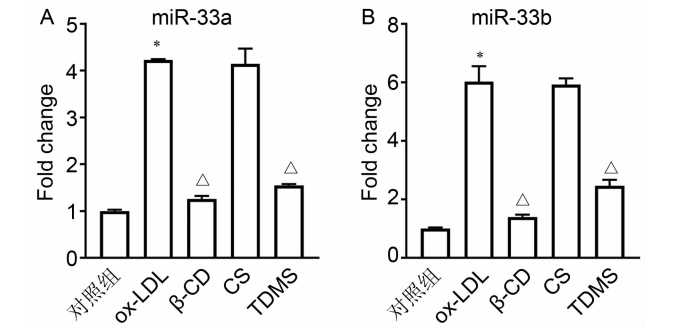
TDMS 组 ABCA1 mRNA 和蛋白表达水平均升高($P < 0.01$)。CS 组细胞 ABCA1 表达水平与 ox-LDL 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为 Real-time PCR 检测细胞内 ABCA1 mRNA 表达水平;B 为 Western blot 检测细胞内 ABCA1 蛋白表达水平;与对照组比较,* $P < 0.01$;与 ox-LDL 组比较, $\Delta P < 0.01$

图 2 各组细胞内 ABCA1 mRNA 和蛋白表达水平比较

4 各组 miR-33a、miR-33b mRNA 表达比较(图 3) 与对照组比较,ox-LDL 组细胞内 miR-33a、miR-33b mRNA 表达水平均显著升高($P < 0.01$);与 ox-LDL 组比较, β -CD 组及 TDMS 组细胞内 miR-33a、miR-33b mRNA 表达水平均显著降低($P < 0.01$)。CS 组细胞内 miR-33a、miR-33b 的表达水平与 ox-LDL 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为细胞内 miR-33a mRNA 表达;B 为细胞内 miR-33b mRNA 表达;与对照组比较,* $P < 0.01$;与 ox-LDL 组比较, $\Delta P < 0.01$

图 3 各组细胞内 miR-33a、miR-33b 表达水平比较

讨 论

通脉降浊颗粒的组方源自大柴胡汤,有疏利肝胆、通腑泄热之功效。柴胡为君药,长于宣透,助少阳之气外达;黄芩苦寒,善清胸中郁热;半夏燥湿开结,降逆止呕;大黄苦寒泻下,能泄热化瘀,化解蓄留之瘀血。诸药合用,标本同治,使脾能健运,肝得条达,湿痰无滋生之源,肝络无瘀阻之患。

ABCA1 是一种胞质膜蛋白。其能够将游离胆固

醇和磷脂从细胞转运至无脂载脂蛋白 A-I (lipid-poor A-I), 生成高密度脂蛋白 (HDL), 参与胆固醇逆向转运。大量研究表明 ABCA1 能够抑制泡沫细胞的形成^[4-6]。因此调节 ABCA1 的表达可以有效防治 AS。

microRNA 在治疗 AS 中的应用已有广泛研究^[7-10]。miR-33 在不同动物模型上都表现出显著增加高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和促进胆固醇逆向转运, 从而减少 AS 斑块的作用^[11,12]。miR-33 (在人体相对应的是 miR-33a、miR-33b) 能够靶向胆固醇转运蛋白 ABCA1 和 ABCG1 帮助促进胆固醇合成, 减少胆固醇清除^[13-15]。另外, miR-33 能够抑制脂肪酸氧化的相关基因从而限制脂肪酸氧化^[16]。有研究表明, 抑制 miR-33 表达能够增加 ABCA1 表达, 促进巨噬细胞胆固醇流出, 缓解 AS^[17], 而 miR-33a 过表达则诱导胆固醇积聚, 抑制巨噬细胞 ABCA1 表达, 加剧血管壁炎症。血浆 miR-33a 还被认为是 AS 的标志因子^[18]。

在本研究发现 TDMS 能够提高泡沫细胞胆固醇流出率, 降低细胞内胆固醇含量。同时, TDMS 还能够提高细胞内 ABCA1 表达, 降低 miR-33a 和 miR-33b 表达, 提示 TDMS 可能通过调节这些蛋白和基因而影响泡沫细胞内胆固醇含量。

泡沫细胞的形成发生在 AS 的初始阶段, 同时也是 AS 发生的标志^[19,20]。在这个过程中, 促炎症因子诱使单核细胞浸润入内膜, 分化成为巨噬细胞。大量的氧化型低密度脂蛋白被后者吞噬, 脂质在细胞内堆积。游离胆固醇是可以通过胆固醇逆向转运途径被转移出泡沫细胞, 这一途径可以最终减少泡沫细胞的形成, 从而达到抗 AS 的作用。因此, 激活这一途径就可以有效的防治 AS。在 RCT 过程中, ABCA1 是一个重要的调节蛋白。肝脏 ABCA1 缺失的小鼠 HDL-C 生成大幅降低, ABCA1 和清道夫受体 BI 基因缺失的小鼠则表现出严重的高胆固醇血症^[21]。在本实验发现, 与胆固醇流出刺激剂 β -CD 效果相似, TDMS 能够有效降低 ox-LDL 诱导的巨噬细胞源泡沫细胞内胆固醇的含量, 增大胆固醇流出率, 同时 ABCA1 的表达较 ox-LDL 组升高。这一发现表明 TDMS 可能是通过调节 ABCA1 而改变泡沫细胞内胆固醇含量的。

为了进一步揭示 TD 的抗 AS 作用机制, 本实验检测了与靶向 ABCA1 的 miR-33a/b 的表达。microRNA 是一类长度约为 22 个核苷酸的单链非编码 RNA, 其通过与靶基因 mRNA 的 3' 非编码区域结合而抑制蛋白的翻译^[22]。以往研究发现, miR-33a/b 靶向 ABCA1, 抑制 miR-33a/b 能够提高非人灵长动物血浆 HDL 并降低极低密度脂蛋白-甘油三酯含量^[23],

miR-33a/b 缺失的 ApoE (-/-) 和 Ldlr (-/-) 小鼠 AS 进程延缓^[13,24]。本研究结果显示, miR-33a/b 表达在 ox-LDL 的诱导下明显上调, 该结果与以往的报道一致^[25], 且提示 miR-33a/b 的过表达可能参与了 ABCA1 的蛋白表达抑制。同时, 结果显示 TDMS 和 β -CD 均逆转了 ox-LDL 诱导的 miR-33a/b 表达上调, 这两个小 RNA 的表达水平在 TDMS 和 β -CD 的作用下恢复至与对照组无显著差别。这一结果表明 TDMS 对 miR-33 的调节作用很可能参与了其对 AS 的治疗作用。

综上所述, TDMS 可能通过调节 miR-33a/b 和 ABCA1 表达, 从而提高泡沫细胞的胆固醇流出率, 这一机制很可能参与了通脉降浊煎剂的抗 AS 作用。本研究从分子生物学角度揭示了该中药复方的可能药理学机制。

利益冲突: 此项研究未产生任何利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Yu XH, Fu YC, Zhang DW, et al. Foam cells in atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta, 2013, 424: 245-252.
- [2] 宋筱靛, 王帅, 王凤荣. 通脉降浊颗粒对动脉粥样硬化家兔脂质代谢及相关炎症因子表达的影响[J]. 中国中医急症, 2015, 24(12): 2082-2086.
- [3] 徐舒云, 卞如濂, 陈修, 等主编. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1535-1536.
- [4] Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(1): 17-28.
- [5] Kallend DG, Reijers JA, Bellibas SE, et al. A single infusion of MDCO-216 (ApoA-1 Milano/POPC) increases ABCA1-mediated cholesterol efflux and pre-beta 1 HDL in healthy volunteers and patients with stable coronary artery disease[J]. Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother, 2016, 2(1): 23-29.
- [6] Mo ZC, Xiao J, Tang SL, et al. Advanced oxidation protein products exacerbates lipid accumulation and atherosclerosis through downregulation of ATP-binding cassette transporter A1 and G1 expression in apolipoprotein E knockout mice[J]. Circ J, 2014, 78(11): 2760-2770.
- [7] van Rooij E, Olson EN. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(11): 860-872.

- [8] Thum T. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine[J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(1): 3–14.
- [9] Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNA control of high-density lipoprotein metabolism and function [J]. *Circ Res*, 2014, 114(1): 183–192.
- [10] Nguyen MA, Karunakaran D, Rayner KJ. Unlocking the door to new therapies in cardiovascular disease: microRNAs hold the key[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2014, 16(11): 539.
- [11] Allen RM, Marquart TJ, Albert CJ, et al. miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin – and diet-induced hepatotoxicity[J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(9): 882–895.
- [12] Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(7): 2921–2931.
- [13] Horie T, Baba O, Kuwabara Y, et al. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice[J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(6): e003376.
- [14] Ouimet M, Marcel YL. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(3): 575–581.
- [15] Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, et al. miR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis [J]. *Science*, 2010, 328(5985): 1570–1573.
- [16] Davalos A, Goedeke L, Smibert P, et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(22): 9232–9237.
- [17] Karunakaran D, Thrush AB, Nguyen MA, et al. Macrophage mitochondrial energy status regulates cholesterol efflux and is enhanced by Anti-miR33 in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2015, 117(3): 266–278.
- [18] Kim SH, Kim GJ, Umemura T, et al. Aberrant expression of plasma microRNA-33a in an atherosclerosis-risk group[J]. *Mol Biol Rep*, 2017, 44(1): 79–88.
- [19] Son SH, Goo YH. Enhanced atheroprotection and lesion remodelling by targeting the foam cell and increasing plasma cholesterol acceptors[J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 109(2): 294–304.
- [20] Yu XH, Zhang J, Zheng XL, et al. Interferon- γ in foam cell formation and progression of atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 441: 33–43.
- [21] Zhao Y, Pennings M, Vrins CL, et al. Hypcholesterolemia, foam cell accumulation, but no atherosclerosis in mice lacking ABC-transporter A1 and scavenger receptor BI[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 218(2): 314–322.
- [22] Ouimet M, Ediriweera H, Afonso MS, et al. microRNA-33 regulates macrophage autophagy in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(6): 1058–1067.
- [23] Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides [J]. *Nature*, 2011, 478(7369): 404–407.
- [24] Rotllan N, Ramirez CM, Aryal B, et al. Therapeutic silencing of microRNA-33 inhibits the progression of atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice—brief report[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(8): 1973–1977.
- [25] He J, Zhang G, Pang Q, et al. SIRT6 reduces macrophage foam cell formation by inducing autophagy and cholesterol efflux under ox-LDL condition[J]. *FEBS J*, 2017, 284(9): 1324–1337.

(收稿: 2017–08–11 在线: 2018–09–05)

责任编辑: 白霞