

· 基础研究 ·

芪丹通脉片对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化易损斑块 TLR4/NF-κB 信号转导通路的影响王南丁¹ 王文杰² 王新冰¹ 李成龙¹ 王志梅² 郝伟¹ 马振¹

摘要 目的 观察芪丹通脉片对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化易损斑块 TLR4/NF-κB 信号通路的影响。

方法 采用右侧颈总动脉外置管术(PCCP)加高脂喂养制备易损斑块模型小鼠。将手术成功的 60 只小鼠随机分为模型组(B 组)、黄芪甲苷组[C 组,黄芪甲苷 40 mg/(kg·d)]、丹参酮ⅡA 组[D 组,丹参酮ⅡA 90 mg/(kg·d)]、益气活血组[E 组,黄芪甲苷 40 mg/(kg·d) + 丹参酮ⅡA 90 mg/(kg·d)]、芪丹通脉片组[F 组,芪丹通脉片浸膏干粉 700 mg/(kg·d)],每组 12 只;同时设 12 只 ApoE^{-/-} 小鼠为对照组(A 组)。于手术后当天开始,各药物干预组按上述剂量分别溶于同等体积生理盐水灌胃,A、B 组给予同等体积生理盐水灌胃,每日 1 次。A 组给予普通饲料,其余五组给予高脂饲料。共计 12 周。常规 HE 染色检测各组小鼠动脉内斑块情况,常规生化法检测 TC、TG、HDL、LDL;ELISA 法检测 TNF-α、IL-6、C-反应蛋白(CRP)表达水平;RT-PCR 检测 Toll 样受体 4(TLR4)、核转录因子(NF-κB)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9) mRNA 的表达量及 Western-Blot 法检测斑块中 TLR4、NF-κB 蛋白相对表达水平。

结果 HE 结果显示:A 组小鼠动脉管腔内壁光滑,无斑块附着;B 组小鼠可见大量斑块沉积于动脉内壁,斑块内可见到较大的脂质池,斑块结构较不稳定;与 B 组比较,C 组及 D 组小鼠动脉内斑块减小,斑块内脂质池缩小,斑块结构趋向稳定,其中 C、D 两组比较,D 组小鼠动脉斑块结构较 C 组稳定;E、F 组小鼠动脉内壁基本光滑,少量斑块附着,结构较 B、C、D 组稳定。与 A 组比较,B 组 TC、TG、LDL、TNF-α、IL-6、CRP 水平升高,TLR4、NF-κB、MMP-9 mRNA 及 TLR4、NF-κB 蛋白表达水平亦升高($P < 0.01$),HDL 水平降低($P < 0.01$)。与 B 组比较,C 组 TC 降低,D、E、F 组 TC、TG、LDL 水平及 NF-κB、MMP-9 mRNA 表达量均降低,E、F 组 HDL 水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);C、D、E、F 组 TNF-α、IL-6、CRP 水平降低,TLR4 mRNA 及 TLR4、NF-κB 蛋白表达亦降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 C 组比较,D 组 TC 降低,E、F 组 TC、LDL 水平降低,F 组 TG 水平降低,HDL 水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);D、E、F 组 TNF-α、IL-6、CRP 水平降低,NF-κB、MMP-9 mRNA 表达量及 TLR4、NF-κB 蛋白表达水平亦降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),E、F 组 TLR4 mRNA 表达量降低($P < 0.01$);与 D 组比较,E、F 组 TNF-α、IL-6、CRP 水平、MMP-9 mRNA 表达量及 TLR4、NF-κB 蛋白表达水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),E 组 TG、LDL 水平及 NF-κB mRNA 表达量降低($P < 0.05$),F 组 TLR4 mRNA 表达量降低($P < 0.05$)。

结论 芪丹通脉片可能通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路,降低 TNF-α、IL-6、CRP 水平及 MMP-9 mRNA 的表达量而发挥抗易损斑块的作用。其中丹参酮ⅡA 抑制易损斑块的作用可能优于黄芪甲苷,益气活血药单体配伍使用具有明显的协同作用。

关键词 益气活血;易损斑块;动脉粥样硬化;Toll 样受体 4;芪丹通脉片

Effect of Qidan Tongmai Tablet on TLR4/NF-κB Signaling Pathway in ApoE^{-/-} Mice with Atherosclerotic Vulnerable Plaque WANG Nan-ding¹, WANG Wen-jie², WANG Xin-bing¹, LI Cheng-long¹, WANG Zhi-mei², HAO Wei¹, and MA Zhen¹ 1 Department of Cardiovasculology, Xi'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Xi'an (710021); 2 First Clinical Medical College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi (712046)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81503444)

作者单位:1.西安市中医医院心血管病科(西安 710021);2.陕西中医药大学第一临床医学院(陕西 712046)

通讯作者:马振, Tel: 029-89626510, E-mail: mazhenyisheng@163.com

DOI: 10.7661/j. cjm. 20190621. 055

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Qidan Tongmai Tablet (QDTMT) on TLR4/NF- κ B signaling pathway in ApoE^{-/-} Mice with atherosclerotic vulnerable plaque. **Methods** Unstable plaque model mice were prepared by perivascular carotid collar placement (PCCP) plus high fat diet feeding. Totally 60 successfully operated mice were randomly divided into model group (group B), Astragaloside IV group (group C, Astragaloside IV 40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹), Tanshinone IIA group (group D, Tanshinone IIA 90 mg · kg⁻¹ · d⁻¹), invigorating qi and activating blood group (group E, Astragaloside IV 40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ + Tanshinone IIA 90 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) and QDTMT group (group F, QDTMT extract dry powder 700 mg · kg⁻¹ · d⁻¹), 12 in each group. At the same time, 12 ApoE^{-/-} mice were also set as the control group (group A). From the day of operation, the drugs in each intervention group were dissolved in the same volume of physiological saline to give gastric gavage. The mice in group A and group B were given the same volume normal saline, once a day. The mice in group A were given normal diet, and the mice in the other five groups were given high-fat diet for 12 weeks. The intra-arterial plaques in each group of mice was detected by HE staining. The levels of total cholesterol(TC), triglycerides(TG), high-density lipoprotein(HDL) and low-density lipoprotein(LDL) were analyzed, the expression levels of inflammatory factors TNF- α , IL-6 and C-reactive protein(CRP) were detected by ELISA, and the expression levels of Toll like receptor 4(TLR4) and NF- κ B factors were detected by real-time PCR and Western Blot, the matrix metalloproteinase-9(MMP-9) mRNA level were detected by real-time PCR. **Results** HE results displayed: The inner wall of arterial lumen of group A was smooth and no plaque was attached; in group B, a large number of plaques were deposited on the inner wall of the artery, and a large lipid pool was observed in the plaque, and the plaque structure was unstable; compared with group B, the intra-arterial plaques in group C and group D decreased, the lipid pool in the plaque narrowed, and the plaque structure tends to be stable. Among them, the C and D groups were compared, and the arterial plaque structure of group D was stable compared with group C; In the E and F groups, the inner wall of the artery was basically smooth, a small amount of arterial plaque adhered, and the structure was more stable than group B, C and D. Compared with group A, the levels of TC, TG, LDL, TNF- α , IL-6 and CRP were increased in group B, and the expression levels of TLR4, NF- κ B, MMP-9 were also increased ($P < 0.01$), however, the level of HDL was decreased ($P < 0.01$). Compared with group B, the level of TC was decreased in group C, the levels of TC, TG, LDL and the expression levels of NF- κ B and MMP-9 were decreased in groups D, E and F. The levels of TNF- α , IL-6, CRP and the expression levels of TLR4 and NF- κ B were decreased in groups C, D, E and F ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but the level of HDL was increased in group E and F ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with group C, the level of TC was decreased in group D, the levels of TC and LDL were also decreased in group E and F. The level of TG was decreased in group F, but the level of HDL was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The levels of TNF- α , IL-6, CRP and the expression levels of TLR4, NF- κ B, MMP-9 were also decreased compared with group C ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with group D, the levels of TNF- α , IL-6, CRP, MMP-9 mRNA and the protein expression levels of TLR4, NF- κ B were decreased in group E and F ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the levels of TG, LDL and the expression level of NF- κ B mRNA were decreased in group E ($P < 0.05$). In addition, the expression level of TLR4 mRNA was decreased in group F ($P < 0.05$). **Conclusions** QDTMT may play an anti-vulnerable plaque role through inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway and reducing TNF- α , IL-6, CRP level and the MMP-9 mRNA expression. The results show that the role in stabilizing plaques of tanshinone IIA may be superior to astragaloside IV, and the most significant role was made by the combination of qi-invigorating and blood-activating herbs.

KEYWORDS invigorating qi and activating blood; vulnerable plaque; atherosclerosis; Toll-like receptors 4; Qidan Tongmai Tablet

易损斑块(vulnerable plaque, VP)破裂、脱落诱发的急性冠脉综合征(acute coronary syndrome,

ACS)是心血管病科的危急重症之一。近年来炎症学说在VP的发病机制中备受关注,尤其是TLR4/NF-

κB 信号通路介导的炎症反应在 VP 的进展中占据主要地位^[1]。有研究发现 TLR4/ApoE^{-/-} 基因双敲除小鼠动脉斑块内的巨噬细胞水平、VP 数量较 ApoE^{-/-} 基因敲除小鼠显著降低^[2]。中医学认为气虚血瘀是心血管疾病的基本病机,是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的始动因素^[3]。芪丹通脉片是第四军医大学西京医院王宗仁教授的经验用方,Ⅱ期及Ⅲ期临床研究均证实芪丹通脉片能显著改善冠心病心绞痛气虚血瘀证患者的相关临床症状,且安全性良好^[4,5]。相关实验提示芪丹通脉片可能通过下调炎性水平抑制 AS 斑块形成^[6]。本实验将从炎症角度,基于 TLR4/NF- κB 信号通路,探讨益气活血复方芪丹通脉片抑制 AS 斑块易损的作用机制,同时通过拆方研究揭示益气活血配伍治疗 VP 的科学内涵。

材料与方法

1 动物 72 只 ApoE^{-/-} 小鼠, SPF 级, 雄性, 6 周龄, 体重为 (19~21) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2012—0001, 标准化饲养, 自由饮水。适应性饲养 1 周, 本实验通过陕西中医药大学动物伦理委员会批准 (No. SUTCM-LAC2016—0312)。

2 药物 芪丹通脉片浸膏干粉 (黄芪 30 g 丹参 30 g 当归 15 g 红花 30 g 桂枝 10 g, 按比例制成芪丹通脉片浸膏干粉, 由第四军医大学西京医院制剂室提供, 具体制备方法与芪丹通脉片制备工艺相同, 详细制备方法参照参考文献[7], 1 g 芪丹通脉片浸膏干粉相当于生药 2.86 g, 批号 2002ZL068)、黄芪甲苷干粉 (每瓶 500 mg, 纯度 $\geq 98\%$, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 货号 A111275)、丹参酮 II A 干粉 (每瓶 1 g, 纯度 $\geq 98\%$, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 货号 T109795)。

3 主要试剂与仪器 苏木素 (Sigma, 批号: H9627), 水溶伊红 Y (国药集团, 批号: 71014544), TNF- α 、CRP、IL-6 ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 批号分别为: E-EL-M0049c、E-EL-M0053c、E-EL-M0044c); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: P0010); 胞浆核蛋白提取试剂盒 (江苏凯基生物科技股份有限公司, 货号: KGP150); 兔多抗 GAPDH (杭州贤至生物科技有限公司, 货号: AB-P-R 001); 过氧化物酶标记羊抗兔二抗、兔多抗 LaminB (武汉博士德生物工程有限公司, 货号: BA1054、BA1228); 兔多抗 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4, 武汉三鹰生物技术有限公司,

货号: 19811-1-AP); 兔多抗 NF- κB (北美 Affinity 公司, 货号: AF0874); 兔多抗基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9, 英国 Abcam 公司, 货号: ab38898); Trizol (中国 Aidlab 生物技术有限公司, 货号: 252250AX); 逆转录试剂盒 (美国 GeneCopoeia 公司, 货号: R101-01/02); SYBR Green 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司, 货号: Cat.#D01010A); 引物合成 (北京擎科新业生物技术有限公司); 切片机 (德国 Leica 轮转式切片机, 型号: RM 2016); 显微镜 (奥林巴斯生物显微镜, 型号: BX53 型); 酶标仪 (美国 Thermo 公司, 型号: Multiskan MK3); 电转仪 (北京六一仪器厂, 型号: DYCZ-40); 磁力搅拌器 (江苏省金坛市中大仪器厂, 型号: T8-1); 实时荧光定量 PCR 仪 ABI7900 (美国 ABI 公司, 型号: ABI7900); 水平电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司, 型号: JY300)。

4 方法

4.1 造模与分组 将 60 只 ApoE^{-/-} 小鼠实行右侧颈总动脉置管术 (perivascular carotid collar placement, PCCP) 术, 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠, 颈部脱毛备皮, 消毒, 颈部正中切开皮肤, 寻找右颈总动脉, 将内径为 0.3 mm 的硅胶管植入颈动脉周围, 用 6-0 丝线分别于鞘管上中下三段固定鞘管, 复位颈总动脉, 关闭切口, 归笼^[8]。造模后鼠按随机数字表法分为模型组 (B 组)、黄芪甲苷组 (C 组)、丹参酮 II A 组 (D 组)、益气活血配伍组 (E 组)、芪丹通脉片组 (F 组), 每组 12 只。另取同龄 12 只 ApoE^{-/-} 小鼠为对照组 (A 组)。

4.2 干预方法 手术后当天开始药物干预, C 组给予黄芪甲苷 40 mg/(kg·d)^[9], D 组给予丹参酮 II A 90 mg/(kg·d)^[10], E 组给予黄芪甲苷 40 mg/(kg·d) + 丹参酮 II A 90 mg/(kg·d), F 组给予芪丹通脉片浸膏干粉 700 mg/(kg·d) (2 g 生药/kg, 相当于临床成人一日用量的 13.6 倍)^[7,11], 将以上药物分别溶于同等体积生理盐水后灌胃, A、B 组给予同等体积生理盐水灌胃, 每日 1 次。手术后当天给予饮食干预, A 小鼠给予普通饲料饲养, 其余 5 组给予高脂饲料 (普通颗粒饲料中添加 1.25% 的胆固醇、15% 脂肪的高脂饲料喂养)。共计 12 周。

5 标本采集 各组小鼠于 12 周后摘眼球取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, -20℃ 冰箱保存待测 TC、TG、HDL、LDL 及 TNF- α 、IL-6、CRP; 随后剖开胸腔, 暴露心脏, 用注射器将 PBS 液体注入左心室尖部并剪开右心房以利于全身血管灌注, 5 min 后暴露右颈总动脉, 截取完整的右颈总动脉并分成两部

分,一部分待做 HE 染色分析动脉内斑块情况,一部分立即放入 -80°C 冰箱保存,待做实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 和 Western Blot 分析^[12]。

6 检测指标及方法

6.1 HE 染色 组织经常规脱水,透明,浸蜡,包埋,切片厚度 $4\ \mu\text{m}$,烤片,脱蜡程序,常规进行 HE 染色,镜检。

6.2 血脂水平 TC、TG、HDL、LDL 由西安市中医医院检验科 (Olympus Au2700 全自动生化分析仪) 检测。

6.3 炎症因子水平 TNF- α 、IL-6、CRP 水平采用 ELISA 法检测,实验步骤严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

6.4 Real-time PCR 检测 TLR4、NF- κ B、MMP-9 mRNA 表达 Trizol 法提取组织 RNA,逆转录成 cDNA,应用荧光定量 PCR 方法测定 TLR4、NF- κ B、MMP-9 基因表达。PCR 反应条件:扩增条件: 50°C 2 min, 95°C 10 min; 95°C 30 s, 60°C 30 s,40 cycles。以 β -actin 表达水平作为内参。引物从 Gene Bank 获得,Primer 5.0 设计引物,北京擎科新业生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。由计算机自动计算得出 CT 值,最终数据以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行分析。

表 1 RT-PCR 引物序列表

基因	引物序列	引物长度 (bp)
β -actin	正:5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3'	240
	反:5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'	
TLR4	正:5'-TGGGTCAAGGAACAGAAGCA-3'	151
	反:5'-TCACACTGACCACTGACACA-3'	
NF- κ B P65	正:5'-CACCGGATTGAAGAGAAGCG-3'	194
	反:5'-AAGTTGATGGTGTGCTGAGGA-3'	
MMP-9	正:5'-AAAACCTCCAACCTCACGGA-3'	190
	反:5'-GTGGTGTTCGAATGGCCTTT-3'	

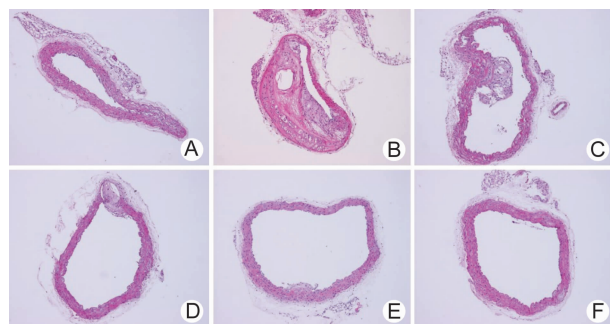
6.5 Western Blot 检测 TLR4、NF- κ B 蛋白相对表达水平 将少量组织块裂解后匀浆,取上清,由 BCA 法检测蛋白浓度,以 $40\ \mu\text{g}$ 蛋白/每泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转膜至 PVDF 膜,分别加入兔多抗 TLR4 (1:1 000)、NF- κ B (1:800) 及 GADPH (1:1 000) 一抗, 4°C 孵育过夜。TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5~6 次,5 min/次。用封闭液稀释相应的 HRP 标记二抗 1:5 000 稀释,使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中, 37°C 摇床孵育 2 h。TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5~6 次,5 min/次。显色曝光,用 Band-Scan 5.0 分析胶片灰度值。

7 统计学方法 应用 SPSS 22.0 统计学软件

分析数据。计量资料以均数 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠动脉 HE 染色结果(图 1) A 组小鼠动脉管腔内壁光滑,无斑块附着;B 组小鼠可见大量斑块沉积于动脉内壁,斑块内可见到较大的脂质池,斑块结构较不稳定;与 B 组比较,C 组及 D 组小鼠动脉内斑块减小,斑块内脂质池缩小,斑块结构趋向稳定,且 D 组小鼠动脉斑块结构较 C 组稳定;E、F 组小鼠动脉内壁基本光滑,少量斑块附着,结构较 B、C、D 稳定。



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为黄芪甲苷组;D 为丹参酮 II A 组;E 为益气活血配伍组;F 为芪丹通脉片组;图 2、3 同

图 1 各组小鼠颈总动脉 HE 染色结果 ($\times 100$)

2 各组小鼠血脂水平比较(表 2) 与 A 组比较,B 组 TC、TG、LDL 均升高 ($P < 0.01$),HDL 降低 ($P < 0.01$);与 B 组比较,C、D、E、F 组 TC 水平均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),D、E、F 组 TG、LDL 水平均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),E、F 组 HDL 均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 C 组比较,D、E、F 组 TC 均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),E 组 TG、LDL 均降低 ($P < 0.01$),HDL 升高 ($P < 0.05$),F 组 LDL 降低 ($P < 0.05$);与 D 组比较,E 组 TG、LDL 均明显降低 ($P < 0.05$);E、F 组间比较,TC、TG、LDL、HDL 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-6、CRP 表达水平比较(表 3) 与 A 组比较,B 组 TNF- α 、IL-6、CRP 水平均升高 ($P < 0.01$);与 B 组比较,C、D、E、F 组 TNF- α 、IL-6、CRP 水平均降低 ($P < 0.01$),其中 E、F 组低于 D 组,D 组低于 C 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);E、F 组间比较,TNF- α 、IL-6、CRP 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 各组小鼠 TLR4、NF- κ B、MMP-9 mRNA 表达水平(表 4) 与 A 组比较,B 组 TLR4、NF- κ B、MMP-9 mRNA 表达量均升高 ($P < 0.01$);与 B 组比较,D、E、

表 2 各组小鼠血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC	TG	HDL	LDL
A	12	1.81 ± 0.25 **	1.18 ± 0.19 **	0.168 ± 0.024 **	0.125 ± 0.009 **
B	12	12.34 ± 1.38	5.08 ± 0.50	0.118 ± 0.018	0.991 ± 0.117
C	12	10.94 ± 1.25 *	4.59 ± 0.70	0.122 ± 0.009	0.881 ± 0.144
D	12	9.01 ± 0.65 **△△	4.38 ± 0.54 *	0.131 ± 0.019	0.829 ± 0.116 *
E	12	8.71 ± 1.25 **△△	3.64 ± 0.54 **△△▲	0.147 ± 0.010 **△	0.657 ± 0.108 **△△▲
F	12	9.53 ± 1.30 **△	3.96 ± 0.72 **	0.141 ± 0.022 *	0.728 ± 0.147 **△

注:与 B 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 C 组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$;与 D 组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$;下表同

表 3 各组小鼠 TNF-α、IL-6、CRP 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	CRP (ng/mL)
A	12	66.19 ± 14.69 **	100.56 ± 18.83 **	1.25 ± 0.17 **
B	12	164.69 ± 10.95	340.54 ± 29.12	2.82 ± 0.20
C	12	137.14 ± 11.32 **	279.42 ± 21.82 **	2.53 ± 0.12 **
D	12	121.90 ± 6.31 **△	242.22 ± 11.73 **△△	2.29 ± 0.10 **△
E	12	97.25 ± 9.83 **△△▲▲	197.03 ± 10.85 **△△▲▲	2.03 ± 0.19 **△△▲▲
F	12	108.70 ± 9.47 **△△▲	216.08 ± 14.65 **△△▲	1.84 ± 0.16 **△△▲▲

表 4 各组小鼠 TLR4、NF-κB、MMP-9 mRNA 的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR4	NF-κB	MMP-9
A	12	1.046 ± 0.133 **	1.198 ± 0.172 **	0.986 ± 0.105 **
B	12	2.151 ± 0.073	2.362 ± 0.191	2.380 ± 0.091
C	12	1.791 ± 0.170 **	2.086 ± 0.164	2.207 ± 0.038
D	12	1.591 ± 0.111 **	1.754 ± 0.095 **△	1.879 ± 0.051 **△△
E	12	1.406 ± 0.112 **△△	1.469 ± 0.086 **△△▲	1.589 ± 0.169 **△△▲▲
F	12	1.275 ± 0.178 **△△▲	1.479 ± 0.188 **△△	1.520 ± 0.097 **△△▲▲

F 组 TLR4、NF-κB、MMP-9 mRNA 表达量均降低 ($P < 0.01$), C 组 TLR4 mRNA 表达量降低 ($P < 0.01$);与 C 组比较, D、E、F 组 NF-κB、MMP-9 mRNA 表达量均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), E、F 组 TLR4 mRNA 表达量均降低 ($P < 0.01$);与 D 组比较, E 组 NF-κB、MMP-9 mRNA 表达量均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), F 组 TLR4、MMP-9 mRNA 表达量均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);E、F 组间比较, TLR4、NF-κB、MMP-9 mRNA 表达量无统计学意义 ($P > 0.05$)。

5 各组小鼠 TLR4、NF-κB 蛋白表达相对水平比较 (图 2~5) 与 A 组比较, B 组 TLR4、NF-κB 蛋白相对表达水平均升高 ($P < 0.01$);与 B 组比较, C、D、E、F 组 TLR4、NF-κB 蛋白相对表达水平均降低, 其中 E、F 组低于 D 组, D 组低于 C 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);E、F 组间比较, TLR4、NF-κB 蛋白相对表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

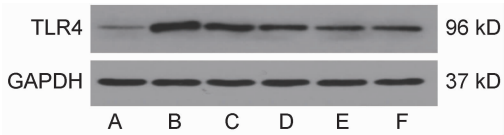


图 2 各组 TLR4 蛋白相对表达水平

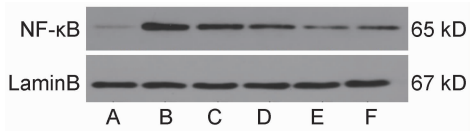
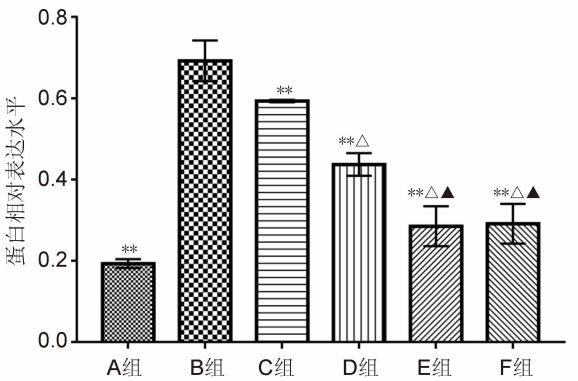


图 3 各组 NF-κB 蛋白相对表达水平



注:与 B 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 C 组比较, △ $P < 0.01$;与 D 组比较, ▲ $P < 0.01$;图 5 同

图 4 各组小鼠 TLR4 蛋白相对表达水平比较

讨 论

随着我国生活水平的提高,冠心病的发病率也在逐年提升,分析 2013—2018 年发布的《中国心血管病

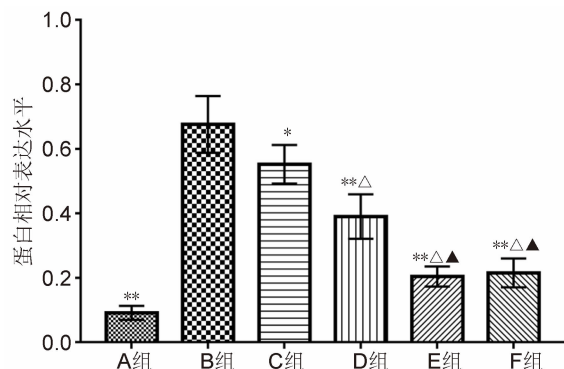


图5 各组小鼠 NF-κB 蛋白相对表达水平比较

报告》^[13-18]发现,心血管疾病在我国城市及农村居民主要疾病死因构成比中占据首要地位,且呈上升趋势,因此尽早干预 AS 斑块的易损化进程是防治 ACS 的重要措施。目前越来越多的学者认为炎症反应是斑块易损的主要驱动力,而调节炎症的最重要转录因子是 NF-κB,且 NF-κB 的活化是 TLR4/NF-κB 信号通路介导炎症反应的关键环节^[19,20]。

当氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)等内源性配体激活 TLR4 后,最终引起 NF-κB 活化并移至核内,启动促炎细胞因子的转录和表达,促使炎症因子大量释放^[21]。炎症因子 TNF-α、CRP、IL-6 可引起巨噬细胞分化和浸润,诱导 LDL 氧化、平滑肌细胞迁移和增殖,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)表达增加,进而加强斑块内炎症,诱发 ACS 的发生^[22,23]。MMP-9 可由巨噬细胞转化而来的泡沫细胞和病理状态下的血管平滑肌细胞持续分泌,使斑块纤维帽变薄,进一步减弱斑块的稳定性,最终导致斑块破裂^[24,25]。本实验中模型组小鼠在造模 12 周后血脂、TNF-α、CRP、IL-6 水平及 TLR4、NF-κB、MMP-9 基因表达量和 TLR4、NF-κB 蛋白表达水平较对照组均显著提高。

目前关于 AS 动物模型的制备大多采用较经典的 ApoE^{-/-}鼠,ApoE^{-/-}鼠发生 AS 的机制可能与体内 LDL 代谢障碍,血浆胆固醇、hs-CRP 浓度升高,斑块内炎症细胞因子表达增多有关,与人类斑块破裂的情况相似^[26]。有研究分析发现,颈总动脉与冠状动脉的粥样硬化程度具有显著的相关性^[27],因此本实验选用颈总动脉作为病理研究对象。同时采用 ApoE^{-/-}小鼠颈总动脉外置管术加高脂饮食的方法快速诱导 AS 并导致斑块易损,这也可能与改变颈总动脉内径,改变血液流变学中的血流剪切力有关^[28]。本研究结果提示,与 A 组相比,B 组小鼠动脉内斑块较不稳定,提示斑块易损,通过前期研究证

实,该模型制备成功^[29]。

中医学认为气虚血瘀是冠心病的病机关键,有研究人员运用 Meta 分析发现气虚血瘀是冠心病最主要的病因,益气活血法应作为冠心病的主要治疗策略,益气活血药具有显著的抗炎作用,能显著降低血清 CRP、TNF-α 等相关炎症因子的水平^[30]。芪丹通脉片由黄芪、丹参、当归、红花、桂枝组成,黄芪、丹参为君,益气活血,气足则血行,臣以当归、红花,助君药活血养血,化瘀止痛,桂枝佐使,温经通脉,全方共奏益气活血,通脉止痛之功。相关实验表明芪丹通脉片能够保护血管内皮、抑制平滑肌细胞的增殖与迁移、抑制 AS 斑块形成^[31]。本研究结果表明芪丹通脉片能降低 TNF-α、IL-6、CRP 水平,抑制 TLR4、NF-κB、MMP-9 mRNA 表达量及 TLR4、NF-κB 蛋白表达水平,结合 HE 染色结果,提示芪丹通脉片抗 AS 斑块可能与抑制 TLR4/NF-κB 信号通路,下调炎症水平有关。

黄芪、丹参是中医治疗气虚血瘀型疾病常用对药。相关研究发现丹参酮 II A 可能通过干预 TLR4/NF-κB 信号转导起到抗 AS 斑块的作用,黄芪甲苷可通过降低 NF-κB p65 表达,减轻炎症反应,从而保护血管内皮^[9,10]。C 组与 D 组均能降低 TNF-α、IL-6、CRP 水平、TLR4 mRNA 的表达量及抑制 TLR4、NF-κB 蛋白表达,D 组还能降低 NF-κB、MMP-9 mRNA 的表达量,结合 HE 染色结果,提示黄芪甲苷及丹参酮 II A 均能抑制 TLR4/NF-κB 信号通路,这可能是其发挥抗炎作用、抑制易损斑块的机制之一。通过组间比较发现,D 组在降低 TNF-α、IL-6、CRP 水平,抑制 NF-κB、MMP-9 mRNA 表达量及 TLR4、NF-κB 蛋白表达水平上均优于 C 组,结合 HE 染色结果,提示活血药抑制 VP 的作用可能优于益气药。

益气和活血配伍可使气足血行,从而产生协同增效作用。研究表明黄芪甲苷与丹参酮 II A 合用在降低易损斑块 TNF-α、IL-6、CRP 水平、抑制 TLR4、NF-κB 蛋白表达方面均优于单味药,在降低 TLR4、NF-κB、MMP-9 mRNA 表达量上优于黄芪甲苷,在降低 TLR4、MMP-9 mRNA 表达量上优于丹参酮 II A,这可能是其产生协同作用的原因之一。

综上所述,在 AS 进程中 TLR4/NF-κB 信号转导通路介导的炎症反应扮演着重要角色,且 TLR4/NF-κB 信号转导通路水平越活跃,AS 内斑块的易损性越高,益气活血药芪丹通脉片可能通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路,下调炎症因子 TNF-α、IL-6、CRP 以及 MMP-9 mRNA 的表达水平,发挥其抗炎、稳定斑块的作用,这与相关研究结果具有一致性^[32,33]。另外通过拆方研究发现

活血药抑制 VP 的作用可能优于益气药,且益气药与活血药合用能起到明显的协同作用,提示临床实践中,将益气活血药配伍、适当提高活血药在复方中的比例可能发挥更优的抑制 VP 的作用,这也可能是益气活血法治疗动脉粥样硬化易损斑块的科学内涵。但 VP 发病机制复杂,如何通过中药稳定易损斑块甚至逆转斑块形成,还需后期通过优化实验方案进一步验证。

利益冲突:无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 王文杰,王南丁,郝伟. 基于 TLR4 途径探讨益气活血药干预易损斑块的抗炎机制[J]. 环球中医药, 2018, 11(4): 580-582.
- [2] Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(29): 10679-10684.
- [3] 叶天龙,周时高,魏华凤. 夏翔教授益气活血法治疗心脑血管疾病的组方规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(18): 169-175.
- [4] 马可. 芪丹通脉片治疗冠心病心绞痛气虚血瘀证的 II 期临床研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.
- [5] 魏裕红. 芪丹通脉片治疗冠心病心绞痛(气虚血瘀证)的 III 期临床研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008.
- [6] 郑瑾. 芪丹通脉片对实验性动脉粥样硬化大鼠 tPA、PAI-1、LOX1、CD40 mRNA 表达的影响[D]. 西安: 第四军医大学, 2004.
- [7] 谢娟. 益气活血中药对骨髓间充质干细胞向缺血心肌迁移的影响及其机制研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2012.
- [8] 闫浩. 胰岛素对不稳定斑块形成的影响及机制的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2013.
- [9] 战云,张英杰,冷彬. 黄芪甲苷通过 TLR4/NF- κ B 通路改善脂多糖诱导的急性血管内皮损伤[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3): 77-80.
- [10] 陈卓. 从 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路探讨丹参酮 II A 干预动脉粥样硬化易损斑块的抗炎及免疫调节机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [11] 李晶华,王睿,王晓华. 芪丹通脉片治疗老年高粘血症临床观察[J]. 保健医学研究与实践, 2013, 10(1): 53-54.
- [12] 马湑. 不同 CD4⁺T 细胞亚群对动脉粥样硬化斑块易损性和斑块破裂的影响及其机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [13] 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.
- [14] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2016》概要[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(6): 521-530.
- [15] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2015》概要[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(6): 521-528.
- [16] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2014》概要[J]. 中国循环杂志, 2015, 30(7): 617-622.
- [17] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等. 中国心血管病报告 2013 概要[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(7): 487-491.
- [18] 王文,朱曼璐,王拥军,等.《中国心血管病报告 2012》概要[J]. 中国循环杂志, 2013, 28(6): 408-412.
- [19] 李红梅,王显. TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路与动脉粥样硬化性心血管疾病的相关性研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2017, 9(9): 1132-1134.
- [20] 钟金鹏,杨莉,程彬,等. NF- κ B 对动脉粥样硬化斑块易损性作用的研究[J]. 海南医学, 2018, 29(16): 2221-2225.
- [21] 张文将,易健,刘柏炎. 动脉粥样硬化炎症相关信号转导通路的研究进展[J]. 中国医药导报, 2018, 15(27): 30-33, 37.
- [22] 陈磊磊,王泽穆,陈波,等. 血清胆固醇与炎症因子和冠心病斑块稳定性的相关性分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2014, 34(9): 1224-1227.
- [23] 何华亮,王芬,张页,等. 血管炎性反应在急性冠脉综合征发病机制中的作用[J]. 武警医学, 2014, 25(9): 875-877.
- [24] 张作念,王志晔,倪梦园,等. 急性缺血性卒中患者血清促炎性细胞因子水平与颈动脉粥样硬化斑块稳定性的相关性[J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(9): 6-9.
- [25] 孙煌,杨宏波,潘家华,等. OCT 检测冠状动脉斑块特征及其与基质金属蛋白酶相关性研究[J]. 重庆医学, 2017, 46(17): 2309-2312.
- [26] 陈文强,张运. 动脉粥样硬化易损斑块的动物模型和检测技术[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(7): 649-656.
- [27] 闫虹宇,郭靖涛,周江,等. 颈动脉易损斑块与冠脉 SYNTAX 积分的相关性研究[J]. 河北医学, 2018, 24(1): 163-167.
- [28] Olivon VC, Fraga-Silva RA, Segers D, et al. Arginase inhibition prevents the low shear stress-induced development of vulnerable atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 227(2): 236-243.
- [29] 王南丁,王文杰,朱建粉,等. 芪丹通脉片对动脉粥样硬化小鼠易损斑块及炎症因子的影响[J]. 四川中医, 2019, 37(1): 75-78.
- [30] 刘振,李七一. 益气活血法对冠心病炎症反应干预的研究进展[J]. 吉林中医药, 2013, 33(2): 214-216.
- [31] 龙钢. 王宗仁教授治疗冠心病的学术经验研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2009.
- [32] 吴同启. 宁心痛颗粒干预模型兔动脉粥样硬化易损斑块的作用及机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2011.
- [33] 姜华,姜玉姬. 益气活血复方对 Toll 样受体 4 信号转导通路及下游炎症因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(2): 219-223.

(收稿: 2018-02-23 在线: 2019-07-29)

责任编辑: 白霞