

· 基础研究 ·

丹蒞片抗动脉粥样硬化模型小鼠主动脉平滑肌细胞增殖的机制研究

缪 静¹ 周鑫斌² 毛 威² 陈 洁² 潘孔寒¹

摘要 目的 研究丹蒞片对动脉粥样硬化(AS)模型 ApoE^{-/-}小鼠血清抵抗素水平、血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响,并探讨其可能机制。方法 32 只 ApoE^{-/-}小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、他汀组及丹蒞组,每组 8 只。正常组 ApoE^{-/-}小鼠喂饲基础饲料 12 周,余各组均采用高糖高脂饲料连续喂饲 12 周制备 AS 模型。正常组不予灌胃干预,模型组、他汀组及丹蒞组于第 5 周时分别给予生理盐水、阿托伐他汀片混悬液(1.5 mg/mL)、丹蒞片混悬液(0.34 g/mL)连续灌胃干预 8 周。干预结束后,ELISA 检测血清抵抗素水平,免疫组化染色观察主动脉细胞增殖核抗原(PCNA)阳性表达,透射电镜观察 VSMC 表型改变,Real-time PCR、Western Blot 检测 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 ERK1、ERK2 mRNA 和 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达。结果 与正常组比较,模型组血清抵抗素水平升高($P<0.05$),PCNA 阳性表达增加($P<0.01$),血管内 ERK1、ERK2 mRNA 和 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达上升($P<0.01$, $P<0.05$),透射电镜下可见主动脉 VSMC 胞浆内肌丝减少,粗面内质网、线粒体等细胞器增多,有较多的吞噬大量脂质形成的空泡,呈典型合成型改变。与模型组比较,他汀组与丹蒞组血清抵抗素水平降低($P<0.05$),PCNA 阳性表达减少($P<0.01$),血管内 ERK1、ERK2 mRNA 和 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达下降($P<0.05$, $P<0.01$),透射电镜下主动脉合成型 VSMC 明显减少。结论 丹蒞片可明显抑制 VSMC 异常增殖,其作用机制可能是通过降低血清抵抗素水平,抑制抵抗素对 ERK 信号通路的激活,减缓 VSMC 的增殖效应,从而达到抗 VSMC 增殖作用。

关键词 丹蒞片;动脉粥样硬化;ERK 信号通路;血管平滑肌细胞

Mechanism of Danlou Tablet on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells in Mice Model with Atherosclerosis MIAO Jing¹, ZHOU Xin-bin², MAO Wei², CHEN Jie², and PAN Kong-han¹

1 Department of Critical Care Medicine, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou (310016); 2 Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006)

ABSTRACT Objective To study the effect of Danlou Tablet on the serum resistin level, vascular smooth muscle cells(VSMC) proliferation in atherosclerosis(AS) model ApoE-gene knockout mice, and to explore its mechanism. **Methods** Totally 32 ApoE-gene knockout mice were assigned to the control group, the model group, the Atorvastatin group and the Danlou group by random digit table, 8 in each group. Mice in the control group were given basic forage for 12 weeks, while mice in the other three groups were given with high fat forage to establish AS model. Then mice in the normal group did not receive gavage intervention, the model group, the Atorvastatin group and the Danlou group were administered with normal saline, Atorvastatin suspension (1.5 mg/mL), and Danlou Tablet suspension (0.34 g/mL) by gastrogavage for 8 successive weeks, respectively. After intervention serum resistin level was detected by ELISA. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive expression in aorta were observed by Immunohistochemical staining. The VSMC phenotypic modulation was detected by transmission electron

基金项目:浙江省教育厅科研项目(No. Y201327471);浙江省中医药科技计划项目(No. 2014ZB043);浙江省自然科学基金(No. LY16H150004)

作者单位:1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院重症医学科(杭州 310016);2. 浙江中医药大学附属第一医院心内科(杭州 310006)

通讯作者:陈 洁, Tel: 0571-86620295, E-mail: 3316029@zju.edu.cn

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200325. 223

microscope (TEM). mRNA and protein expression levels of ERK1, ERK2 and ERK1/2, pERK1/2 in thoracic aorta were measured by Real-Time PCR and Western Blot. **Results** Compared with the control group, serum resistin level, PCNA positive expression, and expression levels of ERK1, ERK2 mRNA and ERK1/2, pERK1/2 protein significantly increased in the model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). TEM demonstrated decreased intracytoplasmic filaments, increased organelles such as rough endoplasmic reticulum and mitochondria, and vacuoles formed by phagocytosis of a large amount of lipids in aortic VSMC, synthetic transformation were showed. Compared with the model group, serum resistin level, PCNA positive expression, expression levels of ERK1, ERK2 mRNA, ERK1/2 and pERK1/2 protein significantly decreased in Atorvastatin group and Danlou group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The transform VSMC in aortic was fewer in the medicated groups than that in the model group. **Conclusions** Danlou Tablet could significantly inhibit the proliferation of VSMC. Its mechanism might be achieved through reducing serum resistin, inhibiting ERK signal pathway activation and retarding the proliferation effect of VSMC.

KEYWORDS Danlou Tablet; atherosclerosis; extracellular signal-regulated kinase pathway; vascular smooth muscle cell

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的异常增殖是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 和血管成形术后狭窄等心血管疾病的重要环节之一^[1,2]。研究发现抵抗素可通过激活胞外信号调控激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 信号通路, 促进 VSMC 的迁移和增殖, 有致 AS 作用^[3,4]。提示抵抗素可能是联系 VSMC 增殖和 AS 的纽带, 在 AS 的进展中发挥重要作用。抑制 VSMC 的异常增殖是治疗 AS 的重要措施之一, 现已证实他汀类药物可抑制炎症反应^[5]、抗 VSMC 异常增殖^[6]和稳定斑块^[7]。“从痰论治”“痰瘀同治”在中医药治疗冠心病中被越来越多应用。丹菱片是痰瘀同治的代表方药, 可以改善冠心病心绞痛患者临床症状, 减少发作次数, 改善心电图 ST 段下移程度, 具有稳定和减小粥样斑块作用^[8-10], 但其具体作用机制不明。本研究观察丹菱片对 ApoE^{-/-}小鼠血清抵抗素、AS 斑块 ERK 信号通路及 VSMC 增殖的影响, 并探讨其可能机制。

材料与方法

1 动物 8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠 32 只, 雄性, 体重 (20.90±3.03) g, 购自南京大学模式动物研究所, 动物许可证号: SCXK(苏)2015-0001; 由浙江中医药大学实验动物中心全封闭 SPF 状态下隔离饲养, 动物许可证号: SYXK(浙)2013-0184。本实验已通过浙江中医药大学实验动物管理和伦理委员会批准 (No. ZSLL-2015-45)。

2 药物 丹菱片 (栝楼皮、薤白、葛根、川芎、丹参、赤芍、泽泻、黄芪、骨碎补、郁金组成) 由吉林康乃

尔药业有限公司, 0.3 g/片, 批号: HD20141003, 用生理盐水配制成混悬液 (浓度: 0.34 g/mL); 阿托伐他汀片, 辉瑞制药有限公司, 20 mg/片, 批号: 045912K, 用生理盐水配制成混悬液 (浓度: 1.5 mg/mL)。

3 试剂及仪器 主要试剂: ERK1、ERK2、GAPDH 引物序列, 以上引物均由赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司合成; 小鼠抵抗素 ELISA 试剂盒: 中国上海西唐生物科技有限公司, 批号: RAB0416; 10% 中性甲醛: 中国杭州龙山精细化工有限公司, 批号: L00236; 25% 戊二醛: 中国杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号: G5882; RNA 提取试剂盒: Viogen 公司, 批号: AA1907-1; RNA 逆转录试剂盒: Invitrogen Life Technologies, 批号: AK3002; SYBR Green Master: 日本 TaKaRa 公司, 批号: 11610100; RIPA 蛋白裂解液: 中国江苏碧云天生物技术公司, 批号: P0013B; 抗 pERK1/2 及 ERK1/2 多克隆抗体及辣根过氧化物酶结合的鼠抗羊二抗: 美国 Cell Signaling Technology, 批号: 0043、0036、1203; 蛋白酶抑制剂: 中国北京普利莱基因技术有限公司, 批号: WB00362。

主要仪器: 全自动酶标仪: 型号: ELX808, 美国 Bio-Tek Instruments, Inc.; 透射电镜: 型号: TECNAI10, Royal Dutch Philips Electronics Ltd.; 超薄切片机: 型号: Power Tome XL, 美国 RMC 公司; 超低温冰箱: 型号: 702, 美国 Thermo Electron Corporation; 倒置生物显微镜: 型号: DS-1B, 中国重庆光电仪器有限公司; 台式冷冻多用离心机: 型号: CL31R, 美国 Thermo Electron Corporation; 微量台式冷冻离心机: 型号: CL21R, 美国 Thermo Electron Corporation; 小型垂直电泳仪: 型号: 041BR123477, 美国

Bio-Rad Laboratories; 荧光定量 PCR 检测系统: ABI7900; 紫外分光光度计: 型号: ND-1000, 美国 Nanodrop Technologies, Inc.; 蛋白印迹检测系统, 型号: ChemiDoc XRS System, 美国 Bio-Rad Laboratories。

4 动物分组及模型制备 按照随机数字表法将 ApoE^{-/-}小鼠分为正常组、模型组、他汀组和丹参组, 每组 8 只。正常组喂饲基础饲料 12 周(面粉 20%、米粉 2%、玉米 27%、麸皮 25%、豆粕 20%、骨粉 3%、鱼粉 3%)。余各组采用高糖高脂饮食(10% 蛋黄粉、10% 蔗糖、10% 猪油、1.25% 胆固醇、0.5% 胆盐、68.25% 基础饲料)按模型组计, 连续高糖高脂喂饲 12 周制备 AS 模型^[11]。

5 干预方法 根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”^[12]计算, 以 10 倍临床等效剂量给药, 模型组给予生理盐水灌胃, 各给药组以相应药物 0.2 mL/(kg·d) 灌胃, 各组连续干预 8 周^[13], 正常组不予灌胃干预。

6 检测指标及方法 干预结束后, 各组小鼠禁食不禁水 12 h, 4% 水合氯醛(1 mL/100 g)腹腔注射麻醉, 眼眶取血, 取血完毕后立即游离整段胸主动脉, 横向切取胸主动脉并分为 3 段, 升主动脉段用于免疫组化染色, 主动脉弓段标本立即置入 2.5% 戊二醛固定液固定, 用于透射电镜观察; 降主动脉段标本立即置入液氮冷冻罐中冻存, 备组织 RNA 和蛋白提取使用。

6.1 ELISA 法检测 ApoE^{-/-}小鼠血清抵抗素水平 眼眶取血后静置 30 min, 待血凝, 3 000 r/min, 离心 10 min, 提取血清, 采用 ELISA 法检测血清抵抗素水平, 具体操作按 ELISA 试剂盒说明进行。结果判定: 在波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值; 以 OD 值为纵坐标, 以标准品的浓度为横坐标, 绘制标准曲线; 根据样品 OD 值算出相应的抵抗素含量。

6.2 免疫组化染色检测 ApoE^{-/-}小鼠主动脉细胞增殖核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)阳性表达 采用特异性抗体 PCNA 行免疫组化染色, VSMC 阳性染色的细胞为围绕蓝色细胞核的胞浆呈棕黄色, 采用 Image Pro Plus 6.0 软件测量阳性细胞的平均光密度值(OD/AOI), 对阳性表达物质进行半定量分析。

6.3 透射电镜观察 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 VSMC 形态 组织样品取材后, 迅速固定于 2.5% 戊二醛中, 充分固定并经缓冲液漂洗后, 再用 1% 锇酸固定 1.5 h, 酒精逐级脱水后, 环氧树脂包埋。超薄切片机切片, 切片经醋酸铀与柠檬酸铅双重染色后, 透射电镜

观察。电镜下鉴别 VSMC 的标准: 基底膜的存在, 肌丝及相关的致密体。

6.4 Real-time PCR 检测 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 ERK1、ERK2 mRNA 表达 取出液氮冷冻罐中各组小鼠主动脉样本, 提取总 RNA, 反转录后, Real-time PCR 扩增测定 ERK1、ERK2 表达。PCR 引物见表 1。扩增条件: 95 °C 变性 5 min 后进入 30 个循环: 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 最后 72 °C 延伸 10 min。GADPH 管家基因作为内参对照, 目的基因转录水平通过公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

表 1 Real-time PCR 引物序列

基因	引物序列	引物长度(bp)
ERK1	F: 5'-CCAGAGTGGCTATCAAGAAG-3' R: 5'-GGATGTCTCGGATGCCTA-3'	123
ERK2	F: 5'-TGGAGCTGGACGACTTAC-3' R: 5'-GACACCGACATCTGAACG-3'	132
GAPDH	F: 5'-CGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC-3' R: 5'-CTCCGACGCCTGCTTACCACCTTCTT-3'	150

6.5 Western Blot 检测 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达 取出液氮冷冻罐中各组小鼠主动脉样本, 提取总蛋白, 样品蛋白通过 Bradford 法于分光光度计检测其浓度。每样品孔上样 40 μg 总蛋白, 进行 SDS-PAGE 分析。半干法将蛋白转至 PVDF 膜上, 脱脂奶粉(50 g/L)室温封闭 2 h, 分别加入 1:500 的抗 ERK1/2、pERK1/2 多克隆抗体, 4 °C 过夜, 用 TBST 洗膜 10 min, 共 5 次, 再加入 1:2 000 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1.5 h, 用 TBST 洗 10 min, 共 5 次, ECL 发光, 同时检测 GAPDH 作为内参, 凝胶成像系统对条带密度扫描, 以 GAPDH 为内参, 测定各样品的蛋白相对表达量。

7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行正态分布检验和方差齐性检验后, 多组间比较采用 One-Way-ANOVA, 两组间比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般情况比较 正常组小鼠毛发光亮, 进食正常, 体重增长稳定, 活动敏捷, 毛发光亮, 无脱毛及溃疡等, 舌苔薄白, 舌质淡红; 模型组小鼠造模 4 周后开始出现饮食减少, 精神萎靡, 反应迟钝, 颈部出现多发溃疡、结痂(实验后期尤为严重), 毛发晦暗干枯, 无光泽, 局部脱毛, 大便稀溏, 体重增长减缓, 舌苔白, 舌质暗红; 他汀组、丹参组小鼠造模 4 周后反应尚灵活, 进食较前减少, 体重增长较前减缓, 毛发尚光

亮,实验后期亦有少量脱毛,颈部局灶溃疡、结痂,舌苔白,舌质暗红。

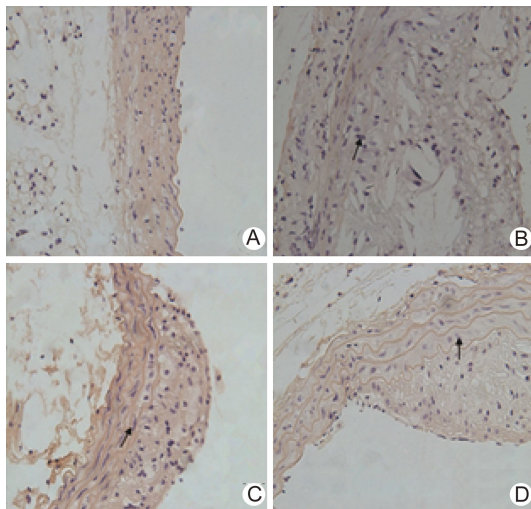
2 各组 ApoE^{-/-} 小鼠血清抵抗素水平比较(表 2) 与正常组比较,模型组血清抵抗素水平升高($P<0.05$);与模型组比较,他汀组与丹葵组血清抵抗素水平均降低($P<0.05$);他汀组与丹葵组之间血清抵抗素水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 各组 ApoE^{-/-} 小鼠抵抗素水平比较 (ng/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	抵抗素
正常	8	0.56±0.03*
模型	8	0.60±0.01
他汀	8	0.56±0.02*
丹葵	8	0.57±0.01*

注:与模型组比较, * $P<0.05$

3 各组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 PCNA 免疫组化染色(图 1) 与正常组比较,模型组 PCNA 阳性表达细胞增加;与模型组比较,他汀组及丹葵组 PCNA 阳性表达细胞减少。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为他汀组;D 为丹葵组;箭头所指为阳性细胞

图 1 各组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 PCNA 免疫组化染色结果 (×40)

4 各组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 PCNA 阳性表达比较(表 3) 与正常组比较,模型组 PCNA 阳性表达增加($P<0.01$);与模型组比较,他汀组及丹葵组 PCNA 阳性表达减少($P<0.01$);他汀组与丹葵组之间 PCNA 阳性表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

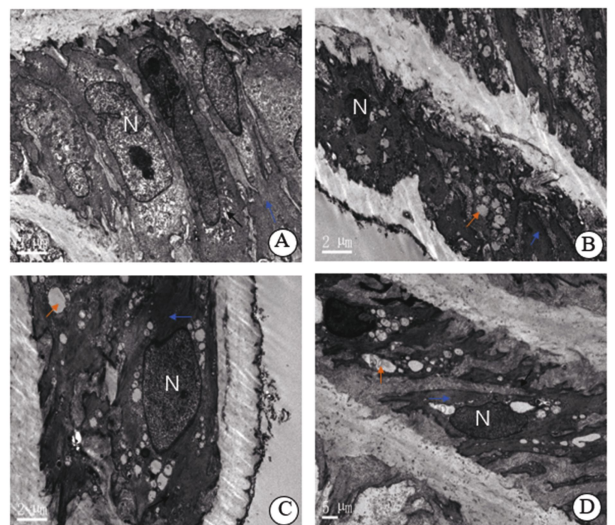
5 各组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 VSMC 形态学比较(图 2) 透射电镜观察结果显示,正常组小鼠主动脉中膜 VSMC 形态正常,细胞呈梭形,胞浆内充满大量肌丝和致密体,仅在核周围有少量粗面内质网、游离核

表 3 各组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉相关阳性表达的半定量比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	n	PCNA
正常	8	0.12±0.02*
模型	8	0.25±0.02
他汀	8	0.16±0.01*
丹葵	8	0.16±0.04*

注:与模型组比较, * $P<0.01$

糖体和线粒体,呈典型的收缩型 VSMC(图 2A);模型组中膜 VSMC 发生明显形态改变,呈短梭形,甚至圆形,并发生一系列超微结构改变,表现为胞体肥大,核浆比例增大,高尔基体十分发达,粗面内质网增多、扩张,线粒体丰富、增生、肿胀,游离核糖体增多,胞浆内肌丝减少,VSMC 呈典型合成型改变,胞浆内充满脂滴,有较多泡沫细胞存在(图 2B);他汀组和丹葵组中膜合成型 VSMC 较模型组减少,核浆比例及胞浆内高尔基体、粗面内质网、线粒体等与生物合成有关的细胞器增加亦不如模型组明显,肌丝及致密体较多,胞浆内脂质颗粒较模型组明显减少(图 2C、D)。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为他汀组;D 为丹葵组;黑色箭头所指为粗面内质网,蓝色箭头所指为肌丝,黄色箭头所指为脂质颗粒

图 2 各组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 VSMC 透射电镜结果 (×2 500)

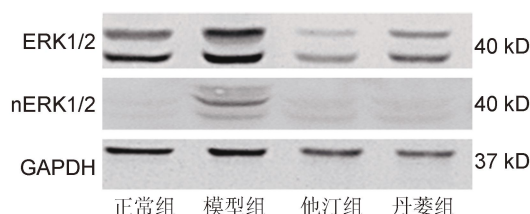
6 各组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 ERK1、ERK2 mRNA 表达(表 4) 与正常组比较,模型组 ERK1、ERK2 mRNA 表达均上升($P<0.01$);与模型组比较,他汀组和丹葵组 ERK1、ERK2 mRNA 表达下降($P<0.01$, $P<0.05$);他汀组和丹葵组之间 ERK1、ERK2 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 4 各组 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 ERK1、ERK2 mRNA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ERK1 mRNA	ERK2 mRNA
正常	8	1.03±0.26**	1.00±0.72**
模型	8	4.49±0.27	4.12±0.71
他汀	8	1.20±0.62**	2.15±0.71*
丹葵	8	0.86±0.14**	2.28±1.14*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

7 各组 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达(表 5,图 3) 与正常组比较,模型组 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达均上升($P<0.05$);与模型组比较,他汀组和丹葵组 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达下降($P<0.05$, $P<0.01$);他汀组和丹葵组之间 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达,差异无统计学意义($P>0.05$)。

图 3 各组 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达表 5 各组 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 ERK1/2、pERK1/2 蛋白比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ERK1/2	pERK1/2
正常	8	1.48±0.32*	1.26±0.20*
模型	8	2.67±0.65	2.35±0.62
他汀	8	1.35±0.24*	1.02±0.31**
丹葵	8	1.18±0.25**	0.67±0.30**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

讨 论

AS 发病机制复杂,在其形成过程中,VSMC 异常增殖是其关键环节之一^[14]。因此,抑制 VSMC 异常增殖是治疗 AS 的主要策略之一^[15]。研究表明,抵抗素作为一种新的炎症脂肪因子,可促使 VSMC 异常增殖,在 AS 的发生发展中起重要作用^[3]。表达于 AS 病灶中巨噬细胞上的抵抗素以旁分泌方式作用于 VSMC,通过激活 ERK 信号通路刺激病灶中 VSMC 异常增殖^[4]。Ras/Raf/MEK/ERK 是 ERK 信号通路的主要途径^[16],ERK 有 ERK1 和 ERK2 两个亚型,是 Ras 丝裂原信号转导下游的核心元件。ERK 信号通路被激活后,ERK1/2 被活化成 pERK1/2,并从胞浆转位入胞核,在核内激活多种转录因子^[17],如 c-jun、c-myc 和 c-fos 等,促进调控细胞增殖相关的基因高表达,产生细胞增殖效应。在此过程中,反映细胞增殖

状态的标志性蛋白质—PCNA 的阳性表达大幅度上调,且 VSMC 超微结构发生明显改变,由收缩型向合成型转变。因此,减少抵抗素的分泌,抑制 ERK 信号通路的激活,降低细胞增殖相关基因的转录活性,就可以减缓 VSMC 的增殖效应,延缓 AS 的发生发展。

在 AS 的防治中,中医中药发挥着重要的作用,由于本病“因痰致瘀,痰瘀互结”的病理特点,临床常遵循“痰瘀同治”进行遣方用药。丹葵片是痰瘀同治代表方,在应用中取得了较好的临床效果^[18],其主要由栝蒌皮、薤白、葛根、川芎、丹参、赤芍、泽泻、黄芪、骨碎补、郁金等成分组成,具有宽胸通阳、化痰散结、活血化瘀之功效。临床研究发现丹葵片可改善痰瘀互阻型冠心病心绞痛患者临床症状,抑制炎症反应,具有稳定斑块及抗氧化作用^[19]。实验研究证实丹葵片可降低血清中 TC、TG、LDL-C 水平,升高 HDL-C,抑制 ET/NOS 的分泌,降低 AngII 含量,从而起到降脂及保护血管内皮的作用^[20,21]。但对丹葵片是否具有抑制抵抗素激活 ERK 信号通路从而起到抗 VSMC 异常增殖的作用,尚无相关文献报道。

在本研究中,采用丹葵片灌胃干预 AS 模型 ApoE^{-/-}小鼠,从抵抗素水平、VSMC 超微结构改变及 ERK 通路关键元件 mRNA 及蛋白表达等方面观察丹葵片对 AS 病灶 VSMC 增殖的影响并探讨其可能机制。研究结果显示,血清抵抗素水平增加的同时,PCNA 阳性表达增加,VSMC 超微结构发生明显改变,肌丝含量减少,内质网和线粒体增加,细胞由收缩型转为合成型,血管内 ERK1、ERK2 mRNA 和 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达增加。提示抵抗素可通过 ERK 信号通路激活静止期的 VSMC,促进 VSMC 异常增殖,促使血管内粥样病灶或纤维脂质斑块形成,推动 AS 的发生发展,与文献报道一致^[3,4]。经丹葵片干预后,血清抵抗素水平下降,PCNA 阳性表达下调,电镜下可见 VSMC 胞浆中肌丝及致密体等收缩型标志物增多,血管内 ERK1、ERK2 mRNA 和 ERK1/2、pERK1/2 蛋白表达降低。提示丹葵片可通过降低血清抵抗素水平,抑制其对 ERK 信号通路的激活,从而减弱 VSMC 的增殖活性,进而发挥抗 VSMC 增殖作用。

在 AS 的中医药防治中,中医药对抵抗素的作用及对抵抗素促进 VSMC 异常增殖影响的相关研究尚未见报道,本研究首次证明丹葵片可降低血清抵抗素水平,改善 VSMC 超微结构改变,下调 ERK 信号通路关键元件的 mRNA 和蛋白表达,提示降低血清抵抗素水平,抑制 ERK 信号通路活化,减轻 VSMC 增殖效应可能是丹葵片发挥抗 VSMC 异常增殖的作用机制之一,为临床应用丹葵片治疗 AS 相关疾病提供更充分

的理论依据,但本研究仅对抵抗素激活 ERK 信号通路的上游关键元件进行了探索,丹莪片对 ERK1/2 激活入核后多种相关转录因子的影响还不明晰,尚需后续进一步深入研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Liu H, Jiang D, Zhang S, et al. Aspirin inhibits fractalkine expression in atherosclerotic plaques and reduces atherosclerosis in ApoE gene knock-out mice [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2010, 24 (1): 17-24.
- [2] Yerly P, Marqués-Vidal P, Owlya R, et al. The atherosclerosis burden score (abs): a convenient ultrasound-based score of peripheral atherosclerosis for coronary artery disease prediction [J]. *Cardiovasc Transl Res*, 2015, 8(2): 138-147.
- [3] Jung HS, Park KH, Cho YM, et al. Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(1): 76-85.
- [4] Calabro P, Samudio I, Willerson JT, et al. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways [J]. *Circulation*, 2004, 110(21): 3335-3340.
- [5] Pirro M, Simental-Mendía LE, Bianconi V, et al. effect of statin therapy on arterial wall inflammation based on 18F-FDG PET/CT: A systematic review and meta-analysis of interventional studies [J]. *Clin Med*, 2019, 8(1): 118.
- [6] Chen S, Dong S, Li Z, et al. Atorvastatin calcium inhibits PDGF-β-induced proliferation and migration of VSMCs through the G0/G1 cell cycle arrest and suppression of activated PDGFRβ-PI3K-Akt signaling cascade [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44 (1): 215-228.
- [7] Guo X, Wang L, Xia X, et al. Effects of atorvastatin and/or probucol on recovery of atherosclerosis in high-fat-diet-fed apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1445-1453.
- [8] 吉金荣, 高彩霞. 丹莪片治疗肥胖型冠心病心绞痛的临床观察 [J]. *光明中医*, 2012, 27(12): 2456-2457.
- [9] 周敏军. 丹莪片治疗痰瘀互阻型冠心病心绞痛患者 70 例临床疗效观察 [J]. *中国民族民间医药*, 2013, 22 (18): 98.
- [10] 许祥坤. 丹莪片治疗痰瘀互阻型老年冠心病心绞痛的临床疗效 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 10(33): 5126-5127.
- [11] 杨琳, 董莉, 陶红, 等. 鼠类动脉粥样硬化模型的制备 [J]. *心肺血管病杂志*, 2013, 32(6): 806-808.
- [12] Voisin EM, Ruthsatz M, Collins JM, et al. Extrapolation of animal toxicity to humans: interspecies comparisons in drug development [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1990, 12(2): 107-116.
- [13] 缪静, 周鑫斌, 毛威, 等. 丹莪片及血府逐瘀颗粒抗大鼠动脉粥样硬化作用及机制研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(1): 80-84.
- [14] Juan CC, Au LC, Fang VS, et al. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(5): 1328-1333.
- [15] Prochnau D, Straube E, Figulla HR, et al. Supra-additive expression of interleukin-6, interleukin-8 and basic fibroblast growth factor in vascular smooth muscle cells following coinfection with chlamydia pneumoniae and cytomegalovirus as a novel link between infection and atherosclerosis [J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2012, 23(2): e26-30.
- [16] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant, transformation and drug resistance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1263-1284.
- [17] Li X, Tsai p, Wieder ED, et al. Vascular smooth muscle cells grown on matrigel. A model of the contractile phenotype with decreased activation of mitogen-activated protein kinase [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(30): 19653-19658.
- [18] 陈新标. 丹莪片联合低分子肝素治疗不稳定心绞痛疗效观察 [J]. *中外医学研究*, 2011, 9(24): 49-50.
- [19] 王师菡, 王阶, 李霁, 等. 丹莪片治疗痰瘀互阻型冠心病心绞痛的疗效评价 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(8): 1051-1055.
- [20] 杨振, 洪铁. 丹莪片对高脂血症及血管内皮损伤大鼠的保护作用 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2010, 5(6): 491-494.
- [21] 陈洁, 蔡宏文, 缪静, 等. 丹莪片抗痰瘀互结型动脉粥样硬化大鼠炎症反应及机制 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(6): 703-708.

(收稿: 2018-12-24 在线: 2020-06-09)

责任编辑: 白霞