

· 基础研究 ·

四妙勇安汤对动脉粥样硬化巨噬细胞泡沫化的影响

陈馨浓 葛其卉 赵一璇 郭晓辰 张军平

摘要 **目的** 探讨四妙勇安汤对于载脂蛋白 E 敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠动脉粥样硬化 (AS) 病变及 J774A.1 小鼠单核巨噬细胞泡沫化的影响。**方法** 将 30 只 ApoE^{-/-} 小鼠按随机数字表法分为模型组、阿托伐他汀组、低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组 6 只, 给予西方饮食饲料喂养 8 周后, 连续给药 8 周。阿托伐他汀组给予 3.64×10^{-5} g/d 阿托伐他汀 (蒸馏水溶解) 灌胃, 低、中、高剂量组分别给予四妙勇安汤 0.164、0.328、0.655 g/d 灌胃; 另将 6 只 C57BL/6J 小鼠作为对照组, 给予普通饮食喂养 16 周, 对照组和模型组每日予相同体积的蒸馏水灌胃。采用 Movat 法观察小鼠主动脉窦形态改变及泡沫细胞含量; 免疫荧光染色观察主动脉窦 F4/80 表达情况。制备四妙勇安汤含药血清, CCK-8 法筛选给药浓度; 建立氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的单核巨噬细胞株 J774A.1 泡沫化模型, 分为模型组、四妙勇安汤组, 另设对照组; 采用油红 O 染色检测细胞脂质吸收; Western Blot 法检测各组细胞清道夫受体分子蛋白表达水平。**结果** 动物实验证明: 与对照组比较, 模型组主动脉窦病理形态改变明显, 斑块内泡沫细胞含量和 F4/80 阳性表达的细胞数量均明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 低、中、高剂量组主动脉窦病理形态变化改善, 泡沫细胞生成减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 主动脉窦 F4/80 蛋白表达明显减少 ($P < 0.01$), 且与阿托伐他汀组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。细胞实验证明: 与对照组比较, 模型组脂滴面积明显增加 ($P < 0.01$), 血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (LOX-1)、CD36、清道夫受体 A1 (SRA1) 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 四妙勇安汤组细胞脂质吸收明显减少 ($P < 0.01$); LOX-1、CD36、SRA1 蛋白表达减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 四妙勇安汤通过抑制巨噬细胞中 LOX-1、CD36、SRA1 分子表达, 降低胆固醇吸收, 减少巨噬细胞泡沫化, 从而改善 AS。

关键词 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; 泡沫细胞; 四妙勇安汤; 中药复方

Effect of Simiao Yongan Decoction on Macrophage Foam Cell Formation in Atherosclerosis
CHEN Xin-nong, GE Qi-hui, ZHAO Yi-xuan, GUO Xiao-chen, and ZHANG Jun-ping *Department of Cardiology, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300381)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of Simiao Yongan Decoction (SMYAD) on atherosclerosis (AS) in apolipoprotein E^{-/-} knockout (ApoE^{-/-}) mice and macrophage foam cell formation in J774A.1 cell. **Methods** A total of 30 ApoE^{-/-} mice were randomly divided into the model group, atorvastatin group, low-dose, medium-dose, and high-dose groups, 6 in each group. All subjects were fed a Western diet for 8 consecutive weeks, and then continuously administered for 8 weeks. The atorvastatin group was given 3.64×10^{-5} g · d⁻¹ atorvastatin (dissolved in distilled water) by gavage, the low-dose, medium-dose and high-dose groups were given SMYAD (0.164, 0.328, 0.655 g · d⁻¹) by gavage, respectively. Meanwhile, 6 C57BL/6J mice were recruited in a control group and fed with a normal diet for 16 weeks. The control group and model group were administered with equal volume of distilled water by gavage. The morphological changes of the aortic sinus and the content of foam cells in mice were observed by the Movat method, while the expression of F4/80 in the aortic

基金项目: 中医药传承与创新“百千万”人才工程 (岐黄工程) 岐黄学者专项资助 (国中医药人教函[2021]203 号); 天津市卫生健康委名中医项目 (No. 津卫中[2020]732 号); 国家自然科学基金资助项目 (No. 81774232)

作者单位: 天津中医药大学第一附属医院心血管科 (天津 300381)

通讯作者: 张军平, Tel: 022-27432016, E-mail: tjzhtcm@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230224.036

sinus was detected by immunofluorescence staining. SMYAD-medicated serum had been prepared, and the drug concentration was screened by the CCK-8 method. A model of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced foaming of monocyte-macrophage cell line J774A.1 was established and divided into the model group, SMYAD group, and another control group was set. Lipid absorption was detected using the Oil-red O staining, while the molecular expression levels of scavenger receptors were detected by the Western Blot. **Results** *In vivo*, compared with the control group, the pathological changes of the aortic sinus in the model group were obvious, while the content of foam cells and the number of F4/80 positive cells in the plaque were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the pathological changes of the aortic sinus in the low, medium, and high-dose group were improved, and the formation of foam cells was decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the expression of F4/80 protein in aortic sinus was significantly decreased ($P<0.01$). There was no statistical difference in foam cell content and F4/80 protein expression between the intervention groups ($P>0.05$). *In vitro* results displayed that compared with the control group, the area of lipid droplets in the model group was significantly increased ($P<0.01$), and the expressions of lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), CD36, and scavenger receptor A1 (SRA1) proteins were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the SMYAD group's lipid absorption decreased ($P<0.01$); while the protein expression of LOX-1, CD36, and SRA1 decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** SMYAD can inhibit the expression of LOX-1, CD36, and SRA1 in macrophages, reducing cholesterol absorption and macrophage foam formation, thus ameliorating AS.

KEYWORDS atherosclerosis; macrophage; foam cell; Simiao Yongan Decoction; Chinese medicinal compound

心血管疾病是世界范围内的主要死亡原因,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是潜在的病理基础,其特征是大、中动脉血管壁内斑块逐渐积聚。脂质颗粒沉积于血管壁是 AS 斑块形成的始动环节,脂质和免疫细胞之间的相互作用是动脉壁慢性炎症的驱动因素,共同促进 AS 疾病进展^[1]。巨噬细胞吞噬脂质形成泡沫细胞,是构成 AS 斑块的主要成分,对于疾病发展具有重要影响^[2]。干预泡沫细胞形成是防治 AS 的有效策略。

四妙勇安汤最早记载于清代陈世铎所著的《石室秘录》^[3]中,后被《古今图书集成》^[4]和《验方新编》^[5]等引用,全方由金银花、玄参、当归、甘草组成,具有清热解毒、活血止痛的功效,早期用于治疗血栓闭塞性脉管炎等疾病^[6]。现代研究发现四妙勇安汤对心血管疾病有一定的作用,其中对于治疗 AS 疗效明确,作用机制可能涉及改善血管新生、抑制炎症反应等^[7-10]。在前期研究初步证实四妙勇安汤可以减少 AS 斑块生成,并且抑制载脂蛋白 E 敲除 (apolipoprotein E^{-/-} knockout, ApoE^{-/-}) 小鼠主动脉组织中清道夫受体 (scavenger receptor, SR) 分子血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)、脂肪酸转位酶 (fatty acid translocase, FAT/CD36)、清道夫受体 A1 (scavenger receptor A1, SRA1) 蛋白表达,但四妙勇安汤是否能够调节巨噬细胞泡沫化尚不清楚^[11]。

本研究采用西方饮食饲料喂养 ApoE^{-/-} 小鼠建立 AS 模型,观察四妙勇安汤对于泡沫细胞形成的影响,并在此基础上利用氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 刺激 J774A.1 小鼠单核巨噬细胞细胞株建立泡沫化模型,进一步明确药物作用机制,为阐释活血解毒法干预 AS 疾病提供新依据。

材料与方法

1 实验动物与细胞 6 只雄性 C57BL/6J 野生型小鼠,6 周龄,体重 18~20 g; 30 只雄性 ApoE^{-/-} 小鼠 (C57BL/6J), 6 周龄,体重 18~20 g; 雄性 SD 大鼠,体重 180~200 g,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号 SCXK (京) 2019-0008。自由进食、水,适应性饲养后进入实验。饲养于天津市南开医院动物中心,SPF 级环境,室温 21.9~22.9℃,相对湿度 32%~34%。本研究由天津中医药大学伦理委员会审批 (No.TCM-LAEC2018032),符合动物福利及伦理准则。J774A.1 小鼠单核巨噬细胞株购自国家实验细胞资源共享平台 (No.1101MOU-PUMC000222)。

2 药物 四妙勇安汤组方药材金银花、玄参、当归、甘草饮片购自天津市南开医院药房,由天津市南开医院药理实验室制备为浓缩剂型。采用高效液相色谱法测定浓缩液中主要指标成分含量,均符合中国药典 (2020 版) 标准。阿托伐他汀钙片 10 mg/片,

辉瑞制药有限公司进口分装,批号: X97034。

3 主要试剂及仪器 主要试剂: 高氧化程度 ox-LDL (批号: YB-002-1), 广州奕元生物技术有限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (批号: 04-001-IACS), 以色列 BI 公司; DMEM 高糖培养基 (批号: C11995500BT), 美国 GIBCO 公司; 增强型 CCK-8 试剂盒 (批号: C0042), 上海碧云天生物技术有限公司; 细胞油红 O 染色液 (批号: G1262), 北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: AR1110)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (批号: AR0138), 武汉博士德生物工程有限公司; F4/80 大鼠单克隆抗体 (批号: ab6640)、GAPDH 大鼠单克隆抗体 (批号: ab5174)、山羊抗大鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 594) 抗体 (批号: ab150160)、山羊抗兔 IgG H&L (HRP) (批号: ab205718), 英国 Abcam 公司; CD36 兔多克隆抗体 (批号: 18836-1-AP)、SRA1 兔多克隆抗体 (批号: 24655-1-AP)、LOX-1 兔多克隆抗体 (批号: 11837-1-AP)、山羊抗大鼠 IgG H&L (HRP) (批号: SA00001-15), 武汉三鹰生物技术有限公司; DAPI 染液 (批号: C0065), 北京索莱宝科技有限公司。

主要仪器: RM2235 型石蜡切片机、UC-7 型冰冻切片机 (德国 Leica 公司); KL-TP 型摊片烤片机 (湖北康龙电子科技有限责任公司); U-CMAD3 型光学显微镜、BX43F 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); Hera cell 150i 型二氧化碳恒温孵育箱 (德国 Thermo 公司); DL-CJ-2NDI 型超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司); ThermoVarioskan™ LUX 型多功能酶标仪 (德国 Thermo 公司); mini-PRoteam Tetra 型电泳、湿转仪 (美国 Bio-Rad 公司); Lgend Micro 21R 型高速冷冻离心机 (德国 Thermo 公司); 2314-1CECN 型多功能脱色摇床 (德国 Thermo 公司); UVP chemstudio 型凝胶成像系统 (德国耶拿公司)。

4 方法

4.1 动物实验

4.1.1 四妙勇安汤浓缩剂型制备 四妙勇安汤中,金银花、玄参、当归、甘草的配伍比例为 3:3:2:1,由天津市南开医院药理实验室制备为浓缩剂型。称取金银花 180 g 玄参 180 g 当归 120 g 甘草 60 g,加入 8 倍量水,回流提取 2 次,每次 1 h,合并滤液减压浓缩至 1:1 (药材:体积),每 1 mL 含生药量 1.5 g,置于 4℃ 冰箱保存备用。

4.1.2 造模、分组及给药 实验动物首先经历 1 周

的普通饮食适应期后,排除饮食异常者,维持正常生长状态。将 6 只 C57BL/6J 野生型小鼠作为对照组,30 只 ApoE^{-/-} 小鼠采用随机数字表法分为模型组、阿托伐他汀组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 6 只。对照组小鼠给予普通饲料,其余各组小鼠均给予西方饮食饲料 (胆固醇含量为 0.15%、脂肪含量 21%、蛋白质含量 20%、碳水化合物 50%,购自北京华阜康生物科技股份有限公司),连续喂养 8 周后给药。给药剂量遵循人和动物间体表面积折算的等效剂量比值计算^[12],其中,阿托伐他汀组给予 3.64×10^{-5} g/d 阿托伐他汀 (蒸馏水溶解) 灌胃,相当于 70 kg 成人所服剂量的 9.1 倍;低剂量组、中剂量组和高剂量组分别给予 0.164、0.328、0.655 g/d 四妙勇安汤浓缩剂灌胃,分别相当于 70 kg 成人所服剂量的 4.55、9.1、18.2 倍。对照组和模型组每日予相同体积的蒸馏水灌胃,每天定时给药 1 次,持续 8 周。各组开始给药前称体重,以后每周称取 1 次体重,调整给药剂量。

4.1.3 主动脉窦 Movat 染色 将固定的连接有主动脉根的心脏组织自左心耳下缘切下,浸泡在 4% 多聚甲醛中固定 24 h,进行梯度酒精脱水后石蜡包埋,切片 (厚度 5 μm)、展片、贴片,常规 Movat 染色,二甲苯透明,中性树脂胶封片,光学显微镜下观察采集图像。结果应用 Image J 图像分析软件进行分析。

4.1.4 主动脉窦免疫荧光染色 将固定的连接有主动脉根的心脏组织自左心耳下缘切下,将改刀后的心脏组织用 OCT 包埋,冰冻切片机作冠状切片 (厚度 8 μm),贴片,浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定,取出后自然晾干, PBS 浸洗, 0.5% Triton X-100 室温通透, 10% 正常山羊血清封闭孵育, PBS 浸洗后滴加一抗稀释液 (按 1:1 000 稀释) 置于湿盒中 4℃ 孵育 24 h; PBS 浸洗后滴加荧光标记二抗 (1:1 000) 室温孵育, PBS 浸洗后加入 DAPI 室温孵育, PBS 浸洗后滴加防荧光淬灭剂进行封片,荧光显微镜下观察采集图像。结果用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析。

4.2 细胞实验

4.2.1 四妙勇安汤含药血清制备 将 12 只 SD 大鼠适应性喂养 3 天后,随机分为四妙勇安汤组和对照组,每组 6 只。按照人和动物间体表面积折算的等效剂量比值计算大鼠给药剂量,四妙勇安汤组给予四妙勇安汤浓缩剂灌胃,对照组按照相同体积的蒸馏水灌胃,连续给药 7 天。末次给药 1 h 后,异氟烷麻醉,无菌条件下用不含抗凝剂的采血管由腹主动脉取血,将采血管室温静置 2 h, 3 000 r/min 离心 15 min,取

上清, 同组混合。将对照组大鼠血清作为空白血清, 四妙勇安汤组大鼠血清作为含药血清。56 ℃ 30 min 灭活, 再用 0.22 μm 双层微孔滤膜过滤器过滤除菌, 置于 -20 ℃ 保存备用。

4.2.2 CCK-8 法筛选含药血清干预浓度 取对数生长期的 J774A.1 细胞, 用含 10% FBS 培养基调整细胞浓度为 1×10^4 个/孔, 将细胞悬液接种到 96 孔板中, 分别使用空白血清, 含药血清和 FBS 配制空白血清组、含药血清组和阴性对照 (negative control, NC) 组培养基。空白血清组和含药血清组分别设 5%、10%、20% 不同血清浓度, 每个浓度设 5 个复孔, NC 组继续使用含 10% FBS 培养基干预, 设 5 个复孔。将 96 孔板继续放在培养箱中孵育 24 h。每孔加入 CCK-8 溶液, 继续孵育 2 h, 利用酶标仪测量每孔吸光度值, 计算细胞活力。

4.2.3 细胞培养、分组及给药 J774A.1 细胞用含有 10% FBS 和 0.1% 双抗的 DMEM 高糖培养基培养。置于 37 ℃, 5% 饱和湿度 CO₂ 培养箱中, 根据细胞生长速度和状态, 每 2 天换液 1 次, 待细胞长至 70%~80% 时传代。将 J774A.1 巨噬细胞分为 3 组: 对照组、模型组、四妙勇安汤含药血清干预组 (简称四妙勇安汤组)。其中对照组用含 10% 空白血清的培养基培养 24 h; 模型组用含 10% 空白血清的培养基培养, 同时加入 100 μg/mL ox-LDL 干预 24 h; 四妙勇安汤组用含 10% 含药血清的培养基培养, 同时加入 100 μg/mL ox-LDL 干预 24 h。

4.2.4 油红 O 染色检测细胞脂质吸收 于 6 孔板里每孔接种 2×10^5 个细胞, 干预 24 h 后, 移除培养基, PBS 洗 2 次, 加 ORO Fixative 固定液固定 30 min; 弃去固定液, 蒸馏水洗 2 次; 加入 60% 异丙醇浸洗 5 min; 弃去固定液后加入 ORO Stain 染液浸染 20 min; 弃去染色液, 水洗 5 次; 加入 Mayer 苏木素染液, 复染细胞核 2 min, 弃去染液后水洗 5 次; 入 ORO Buffer 1 min, 弃去; 加入蒸馏水覆盖细胞并在显微镜下观察。结果用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析。

4.2.5 Western Blot 法检测蛋白水平 利用四妙勇安汤含药血清联合 ox-LDL, 或空白血清分别处理细胞 24 h 后, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液提取蛋白, 采用 BCA 法测定总蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳, 将电泳后的蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF), 利用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液于室温封闭 1 h 后, 分别加入一抗 (抗体稀释比例为 1:1 000) 4 ℃ 冰箱孵育过夜。次日在常温条件下加入 HRP 标记的山羊抗兔 (大鼠) IgG (体

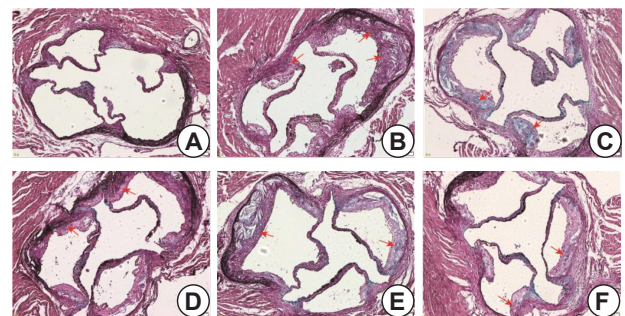
积稀释比例为 1:1 000) 孵育 1 h, 化学发光蛋白检测试剂盒显影成像。使用 Image J 软件对蛋白表达进行图像灰度分析。所有目的蛋白灰度值与内参灰度值之比为所需结果。

4.3 统计学方法 运用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行数据处理, 计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 各组间两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

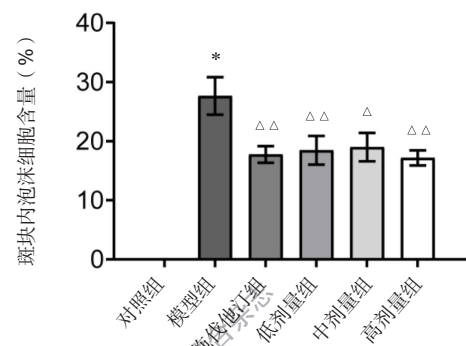
1 动物实验结果

1.1 四妙勇安汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉粥样硬化形态及泡沫细胞生成的影响 (图 1、2) Movat 染色光镜下观察显示: 对照组未见明显斑块形成, 血管壁弹力纤维完整; 模型组可见明显斑块形成, 胶原纤维、蛋白聚糖和平滑肌细胞形成的纤维帽下可见大量泡沫细胞, 血管壁弹力纤维断裂; 与模型组比较, 给药组斑块面积均减少, 纤维帽厚度增加, 泡沫细胞数量减少, 血管壁形态相对完整。定量分析显示, 与对照组比较, 模型组斑块内泡沫细胞含量明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 低、中、高剂量组和阿



注: A 为对照组; B 为模型组; C 为阿托伐他汀组; D 为低剂量组; E 为中剂量组; F 为高剂量组; 红色箭头标注泡沫细胞

图 1 各组小鼠主动脉粥样硬化形态情况 (Movat 染色, $\times 100$)

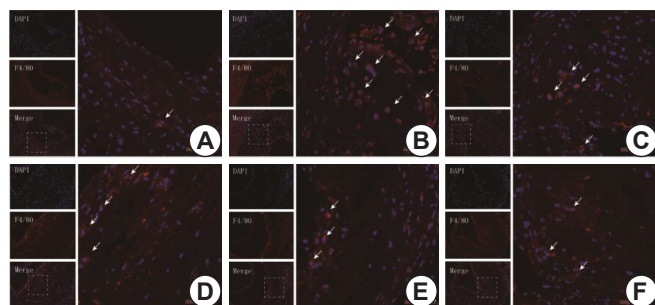


注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$

图 2 各组小鼠主动脉斑块内泡沫细胞含量比较

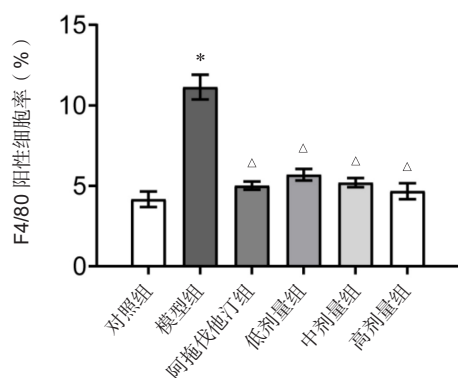
托伐他汀组泡沫细胞均减少 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且各干预组之间比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

1.2 四妙勇安汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉窦 F4/80 蛋白表达的影响 (图 3、4) 免疫荧光结果显示: 与对照组比较, 模型组 F4/80 阳性表达的细胞明显增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 低、中、高剂量组和阿托伐他汀组阳性细胞率均减少 ($P<0.01$), 且四妙勇安汤各剂量组与阿托伐他汀组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: A 为对照组; B 为模型组; C 为阿托伐他汀组; D 为低剂量组; E 为中剂量组; F 为高剂量组; 白色箭头标注 F4/80 阳性细胞

图 3 免疫荧光染色观察小鼠主动脉窦 F4/80 阳性细胞 (图左侧 $\times 200$, 图右侧 $\times 400$)



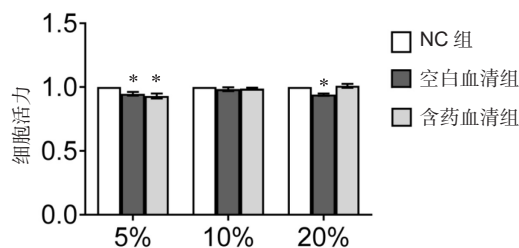
注: 与对照组比较, $*P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.01$

图 4 各组小鼠主动脉窦 F4/80 阳性细胞率比较

2 细胞实验结果

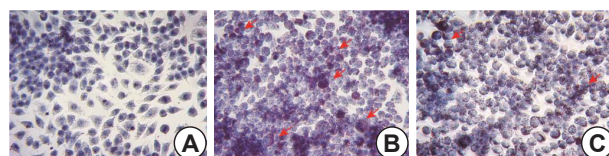
2.1 四妙勇安汤含药血清对 J774A.1 细胞活力的影响 (图 5) CCK-8 结果显示: 与 NC 组比较, 5% 血清浓度的含药血清组及空白血清组细胞存活率明显下降 ($P<0.01$), 且 20% 血清浓度的空白血清组细胞存活率明显下降 ($P<0.01$)。10% 的含药血清和空白血清干预细胞, 对于细胞存活率无显著影响 ($P>0.05$)。故选用 10% 血清浓度进行后续实验。

2.2 四妙勇安汤含药血清对于 J774A.1 细胞脂质蓄积的影响 (图 6、7) 细胞油红 O 结果显示: 与对照组比较, 模型组脂滴面积增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 四妙勇安汤组脂滴面积减少 ($P<0.01$)。



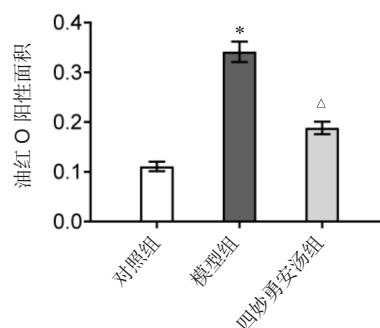
注: 与 NC 组比较, $*P<0.01$

图 5 不同浓度血清对 J774A.1 细胞活力的影响



注: A 为对照组; B 为模型组; C 为四妙勇安汤组; 红色箭头标注脂滴

图 6 各组 J774A.1 细胞油红 O 染色情况 ($\times 200$)



注: 与对照组比较, $*P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.01$

图 7 各组细胞油红 O 面积比较

2.3 四妙勇安汤对于 J774A.1 细胞 LOX-1、CD36、SRA1 蛋白表达的影响 (图 8、9) 与对照组比较, 模型组 LOX-1、CD36、SRA1 蛋白表达增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 四妙勇安汤组 LOX-1、CD36、SRA1 蛋白表达减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

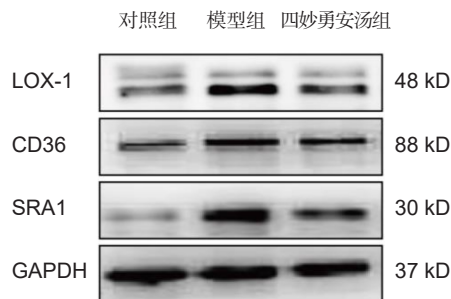
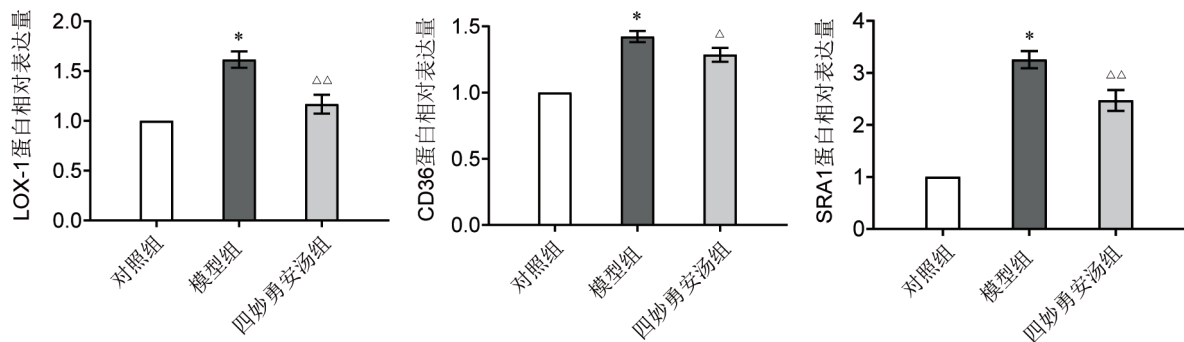


图 8 各组细胞分子蛋白电泳图

讨论

巨噬细胞通过受体介导的吞噬和胞饮作用来摄取细胞外修饰的脂蛋白, CD36、SRA、LOX-1 等 SR 分子参与这一过程, 是调节巨噬细胞吸收脂质的主要分子^[13]。在正常情况下, 这些分子可以有效控制外



注：与对照组比较，* $P<0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P<0.05$ ， $\Delta\Delta P<0.01$

图9 各组细胞分子蛋白表达水平比较

周血中的 LDL 和胆固醇含量。在 AS 过程中，SR 分子表达改变，可导致泡沫细胞形成。

CD36 属于清道夫受体 B 家族，与 ox-LDL 具有高亲和力，通过内化 CD36-oxLDL 组装体介导其致 AS 作用^[14]。ox-LDL 在 AS 中致病作用很大程度上依赖于 CD36^[15]。在 AS 倾向的小鼠模型中，CD36 清除受体被敲除，对于降低 AS 负担有效^[16]。SRA1 属于清道夫受体 A 家族，在巨噬细胞高表达，调节巨噬细胞 ox-LDL 吸收，抑制巨噬细胞 SR-A 可以减缓 ApoE^{-/-} 小鼠泡沫细胞形成和 AS 发生^[17]。虽然在 ApoE^{-/-} 小鼠中，SR-A 和 CD36 二者靶向缺失并不能消除巨噬细胞泡沫细胞的形成或显著减少 AS 病变区域，但抑制这些分子确实会减少更严重坏死病变的进展^[18]。因此，靶向抑制 SR-A 和 CD36 可减少斑块的炎症反应，促进斑块的稳定性^[19]。此外，机体内 ox-LDL 生成增加，可以刺激巨噬细胞 LOX-1 表达，LOX-1 表达升高也可以导致巨噬细胞对脂质的吸收增加，并影响 AS 斑块稳定性^[13, 20]。巨噬细胞表面的 SR-A、CD36 和 LOX-1 共同负责约 90% 的 ox-LDL 的摄取和利用^[21]。因此，提示通过干预巨噬细胞 SR 分子表达，抑制 ox-LDL 吸收，可以减少泡沫细胞形成，进而延缓 AS 发展。

本研究动物实验 Movat 染色结果显示模型组小鼠主动脉窦纤维帽形成，泡沫细胞增加，且可见脂质核心胆固醇晶体，四妙勇安汤干预可以减少 F4/80 表达及泡沫细胞含量，说明药物对于巨噬细胞源性泡沫细胞生成有抑制作用。巨噬细胞吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞，细胞实验结果显示 ox-LDL 刺激巨噬细胞后，促进 SR 分子蛋白 LOX-1、CD36、SRA1 表达，明显增加细胞内脂质蓄积，四妙勇安汤干预可以抑制 LOX-1、CD36、SRA1 表达，减少巨噬细胞泡沫化。总之，本实验在前期研究基础上^[11]，进一步证明了四妙勇安汤可以通过干预巨噬细胞 SR 分子表达，抑

制巨噬细胞泡沫化，从而改善 AS。

目前临床对于 AS 主要应用他汀等降脂药物进行治疗，但多数患者仍存在心血管残留风险^[22]。中医药在治疗心血管疾病方面具有独特优势，冠心病属中医学“胸痹”范畴，痰、瘀、热毒结聚于脉道管壁为病机关键。疾病初始，气机不畅、代谢失衡，导致津液不归正化，凝聚成痰；随着疾病进展，痰浊阻滞发为血瘀，痰瘀互结，聚而不散，化热生毒，煎熬阴血，导致阴虚毒瘀，脉道失柔，脉络细急^[23]。此时应用四妙勇安汤进行干预，取其化瘀行血、清热解毒之效，用以消散脉中瘀毒，稳定粥样斑块。

四妙勇安汤中金银花、玄参为君药，金银花清热解毒，玄参滋阴清热，共奏滋阴解毒功效；当归养血活血、化瘀散结；甘草既助金银花泻火解毒，又可调和诸药，该方为活血解毒法的代表方剂。现代药理研究显示四妙勇安汤水提物的入血成分绿原酸可以抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞脂质堆积和泡沫细胞的活力，减少 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉根部的 AS 病变面积^[24-26]。异绿原酸 C 可以下调 CD36 的表达，阻止巨噬细胞泡沫化^[27]。在后续研究中，进一步考察这些入血成分的生物活性，将有助于更好地阐明四妙勇安汤治疗 AS 的体内药效物质。总之，本研究证明四妙勇安汤对于抑制巨噬细胞泡沫化具有一定影响，为临床应用该方治疗 AS 疾病提供了新的理论依据。

利益冲突：无。

参 考 文 献

[1] Lacy M, Atzler D, Liu R, et al. Interactions between dyslipidemia and the immune system and their relevance as putative therapeutic targets in atherosclerosis[J]. Pharmacol Ther, 2019, 193: 50-62.

- [2] 景昱, 王宣春. 巨噬细胞内脂质代谢及泡沫细胞形成机制的研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2020, 47(3): 143-147.
- [3] 清·陈士铎著. 石室秘录[M]. 北京: 人民军医出版社, 2009: 208.
- [4] 王千怀, 张波主编. 古今图书集成医部全录(点校本)第四册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 811.
- [5] 清·鲍相璈著. 验方新编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 78.
- [6] 赵红霞, 于智敏, 耿颖, 等. 四妙勇安汤方源探析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(5): 1209-1212.
- [7] 许颖智, 张军平, 李明, 等. 四妙勇安汤对动脉粥样硬化斑块易损指数的影响及机制探讨[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2298-2301.
- [8] 张军平, 李明, 李良军, 等. 四妙勇安汤调控核因子- κ B 活性及抑制相关炎症因子的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(3): 372-376.
- [9] 许颖智, 张军平, 李明, 等. 四妙勇安汤对动脉粥样硬化易损斑块内细胞外基质的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(4): 822-824.
- [10] 漆仲文, 李萌, 朱科, 等. 四妙勇安汤促进滋养血管成熟化稳定动脉粥样硬化易损斑块机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 1998-2001.
- [11] Chen XN, Ge QH, Zhao YX, et al. Effect of Si-Miao-Yong-An decoction on the differentiation of monocytes, macrophages, and regulatory T cells in ApoE (-/-) mice[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 276: 114178.
- [12] 徐叔云, 卞如镰, 陈修主编. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 200-223.
- [13] Chistiakov D, Melnichenko A, Myasoedova V, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis[J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(11): 1153-1165.
- [14] Tarhda Z, Semlali O, Kettani A, et al. Three dimensional structure prediction of fatty acid binding site on human transmembrane receptor CD36[J]. Bioinform Biol Insights, 2013, 7: 369-373.
- [15] Yu X, Fu Y, Zhang D, et al. Foam cells in atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta, 2013, 424: 245-252.
- [16] Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice[J]. J Clin Invest, 2000, 105(8): 1049-1056.
- [17] Dai XY, Cai Y, Mao DD, et al. Increased stability of phosphatase and tensin homolog by intermedin leading to scavenger receptor A inhibition of macrophages reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 53(4): 509-520.
- [18] Mäkinen PI, Lappalainen JP, Heinonen SE, et al. Silencing of either SR-A or CD36 reduces atherosclerosis in hyperlipidaemic mice and reveals reciprocal upregulation of these receptors[J]. Cardiovasc Res, 2010, 88(3): 530-538.
- [19] Manning-Tobin JJ, Moore KJ, Seimon TA, et al. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(1): 19-26.
- [20] Ishino S, Mukai T, Kume N, et al. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression is associated with atherosclerotic plaque instability-analysis in hypercholesterolemic rabbits[J]. Atherosclerosis, 2007, 195(1): 48-56.
- [21] 刘静, 高森, 赵鹃. A 类清道夫受体参与动脉粥样硬化形成的机制[J]. 心血管病学进展, 2018, 39(3): 456-459.
- [22] Arbab-Zadeh A, Fuster V. From detecting the vulnerable plaque to managing the vulnerable patient: JACC state-of-the-art review[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 74(12): 1582-1593.
- [23] 方子寒, 张琴, 谢盈彧, 等. 阮士怡从“脉中积”理论治疗冠心病冠状动脉粥样硬化经验[J]. 中医杂志, 2018, 59(21): 1812-1814, 1823.
- [24] 迟森森, 王卫华, 刘斌. 四妙勇安汤水提物大鼠吸入血成分研究[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(11): 933-940.
- [25] Wu C, Luan H, Zhang X, et al. Chlorogenic acid protects against atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice and promotes cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e95452.
- [26] 林庆新. 绿原酸抑制 TLR4/NF- κ B 通路诱导巨噬细胞源性泡沫细胞凋亡[J]. 北方药学, 2019, 16(8): 123-126.
- [27] Zheng L, Lin G, Li R, et al. Isochlorogenic Acid C alleviates high-fat diet-induced hyperlipemia by promoting cholesterol reverse transport[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 881078.

(收稿: 2021-09-08 在线: 2023-06-08)

责任编辑: 白霞