

黄连解毒汤对高脂饮食 apoE^{-/-} 小鼠全身和主动脉血管局部免疫反应影响的研究

马雅奎¹ 王蓓蓓² 韩俊燕² 李蕊² 张卫梅² 李彤² 陈冰¹ 苏静¹ 王宪波² 曾辉²

摘要 **目的** 观察黄连解毒汤对高脂饮食喂养的 apoE 基因敲除 (apoE^{-/-}) 小鼠全身和主动脉血管局部免疫反应的影响。**方法** 以 8 只野生型 C57BL/6 小鼠为野生普食组, 24 只 apoE^{-/-} 小鼠随机分为 apoE^{-/-} 普食组、apoE^{-/-} 高脂组、apoE^{-/-} 高脂加中药组, 每组 8 只。普食组与高脂组分别给予普食和高脂饮食 4 周。apoE^{-/-} 高脂加中药组同时给予黄连解毒汤 5 g/(kg·d) 灌胃, 其他小鼠采用等量纯净水灌胃。4 周后, 检测血脂水平、外周血单核细胞比例及其表面 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 和清道夫受体 CD36 的表达; 检测主动脉病理变化和主动脉血管局部细胞因子表达水平; 进一步采用脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 刺激检测血浆细胞因子的水平。**结果** (1) 与野生普食组比较, apoE^{-/-} 普食组 TC、TG 和 LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 apoE^{-/-} 普食组比较, apoE^{-/-} 高脂组 TC 和 LDL-C 水平显著增高 ($P < 0.05$); apoE^{-/-} 高脂组与 apoE^{-/-} 高脂加中药组血脂各项指标比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 (2) 与野生普食组比较, apoE^{-/-} 普食组外周血单核细胞比例无明显变化, TLR4 表达水平显著增多 ($P < 0.05$); 与 apoE^{-/-} 普食组比较, apoE^{-/-} 高脂组小鼠外周血单核细胞比例及 TLR4 表达水平显著增多 ($P < 0.05$); 与 apoE^{-/-} 高脂组比较, apoE^{-/-} 高脂加中药组外周血单核细胞比例及其表面 TLR4 表达显著降低, 清道夫受体 CD36 表达水平亦显著降低 ($P < 0.05$)。 (3) LPS 刺激 3 h 后, 与野生普食组比较, apoE^{-/-} 普食组血浆 TNF- α 和 IL-10 表达显著增加 ($P < 0.05$); 与 apoE^{-/-} 普食组比较, apoE^{-/-} 高脂组小鼠血浆 IL-12、TNF- α 、MCP-1 和 IL-10 表达增加, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 黄连解毒汤干预 4 周后, 与 apoE^{-/-} 高脂组比较, apoE^{-/-} 高脂加中药组 MCP-1 表达显著下调, 而 IL-10 水平进一步显著上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 (4) 与野生普食组比较, apoE^{-/-} 普食组主动脉血管壁炎症因子 IFN- γ 、MCP-1、TNF- α 和 IL-1 β mRNA 水平显著升高, 抑炎因子 IL-10 亦显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 apoE^{-/-} 普食组比较, apoE^{-/-} 高脂组主动脉血管壁不仅 IFN- γ 、MCP-1、TNF- α 和 IL-1 β 水平进一步显著升高, 且抑炎因子 IL-12、IL-10 和 TGF- β 亦显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 黄连解毒汤干预 4 周后, 与 apoE^{-/-} 高脂组比较, apoE^{-/-} 高脂加中药组主动脉血管壁炎症因子 MCP-1、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-12 显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 高脂饮食引发 apoE^{-/-} 小鼠全身性炎症反应和血管局部炎症反应, 血管局部炎症反应程度超过全身性炎症反应。黄连解毒汤干预后能够减轻炎症反应, 并且对血管局部的作用更为显著, 同时增强全身抗炎反应。

关键词 黄连解毒汤; apo E 基因敲除小鼠; 高脂血症; 单核细胞; 细胞因子

Protection of Huanglian Jiedu Decoction on Systemic and Vascular Immune Responses of High Fat Induced apoE^{-/-} Mice MA Ya-luan¹, WANG Bei-bei², HAN Jun-yan², LI Rui², ZHANG Wei-mei², LI Tong², CHEN Bing¹, SU Jing¹, WANG Xian-bo², and ZENG Hui² 1 Lab for Molecular Biology, Institute of Basic Theory on Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700), China; 2 Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81072938); 北京市自然科学基金资助项目 (No. 7102119); 中华人民共和国人力资源和社会保障部留学人员科技活动择优资助优秀类项目 (No. 2010)

作者单位: 1. 中国中医科学院中医基础理论研究所分子生物学实验室 (北京 100700); 2. 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所 (北京 100011)

通讯作者: 曾辉, Tel: 010-84322620, E-mail: zenghui@ccmu.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2013.11.1520

ty, Beijing (100011), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Huanglian Jiedu Decoction (HJD) on systemic and vascular immune responses of high fat diet fed apoE deficient (apoE^{-/-}) mice. **Methods** Eight wild type C57BL6 mice were recruited as the wild type common food group. Totally 24 apoE^{-/-} mice were randomly divided into the ApoE^{-/-} common food group, the ApoE^{-/-} hyperlipidemia group, and the ApoE^{-/-} hyperlipidemia plus HJD group, 8 in each group. In the present study, the common food mice and high fat fed mice were fed with a chow diet or a high cholesterol diet for 4 weeks. HJD was given to mice in the ApoE^{-/-} hyperlipidemia plus HJD group at the daily dose of 5 g/kg by gastrogavage, while equal volume of pure water was given to mice in the rest groups by gastrogavage. Four weeks later, the plasma levels of blood lipids, the ratio of peripheral blood mononuclear cells, and expressions of Toll-like receptor 4 (TLR-4) and CD36 on the monocytes were detected. The pathological changes and expressions of cytokines in local aorta were detected. The plasma cytokine levels in response to lipopolysaccharide (LPS) were analyzed. **Results** (1) Compared with the wild type common food group, TC, TG, and LDL-C significantly increased in the ApoE^{-/-} common food group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the ApoE^{-/-} common food group, TC and LDL-C significantly increased in the hyperlipidemia group ($P < 0.05$). There was no statistical difference in each index between the ApoE^{-/-} hyperlipidemia group and the ApoE^{-/-} hyperlipidemia plus HJD group ($P > 0.05$). (2) Compared with the wild type common food group, no obvious change of the ratio of peripheral blood mononuclear cells happened, the TLR4 expression level significantly increased in the ApoE^{-/-} common food group ($P < 0.05$). Compared with the ApoE^{-/-} common food group, the ratio of peripheral blood mononuclear cells and the TLR4 expression level significantly increased in the ApoE^{-/-} hyperlipidemia group ($P < 0.05$). Compared with the ApoE^{-/-} hyperlipidemia group, the ratio of peripheral blood mononuclear cells and the TLR4 expression level significantly decreased. Besides, the CD36 expression level also significantly decreased ($P < 0.05$). (3) After stimulated by LPS for 3 h, compared with the wild type common food group, plasma TNF- α and IL-10 expressions significantly increased in the ApoE^{-/-} common food group ($P < 0.05$). Compared with the ApoE^{-/-} common food group, plasma expressions of IL-12, TNF- α , MCP-1, and IL-10 increased, but with no statistical difference in the ApoE^{-/-} hyperlipidemia group ($P > 0.05$). After 4-week intervention of HJD, compared with the ApoE^{-/-} hyperlipidemia group, the MCP-1 expression was significantly down-regulated, while the IL-10 expression significantly increased, showing statistical difference ($P < 0.05$). Compared with the wild type common food group, mRNA expression levels of IFN- γ , MCP-1, TNF- α , IL-10, and IL-1 β significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the ApoE^{-/-} common food group, not only mRNA expression levels of IFN- γ , MCP-1, TNF- α , and IL-1 β , further significantly increased, but also IL-12, IL-10, and TGF- β significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After 4-week intervention of HJD, compared with the ApoE^{-/-} hyperlipidemia group, mRNA expression levels of MCP-1, TNF- α , IL-1 β , and IL-12 significantly decreased in the ApoE^{-/-} hyperlipidemia plus HJD group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** High fat diet induced systemic reaction and inflammatory reactions of local vessels. The local inflammatory response of vessels exceeded systemic inflammatory response. Intervention of HJD could attenuate inflammatory response, especially in local arteries. Meanwhile, it enhanced systemic anti-inflammatory reactions.

KEYWORDS Huanglian Jiedu Decoction; apo E gene knocked-out mouse; hyperlipidemia; monocyte; cytokine

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病^[1]。高脂血症一方面通过引发一系列血管免疫炎症反应,导致 AS 的发生,加速 AS 进展;另一方面,高脂血症导致的免疫异常并不仅仅局限于

血管局部,而是全身系统性免疫反应增高。有文献表明 apoE 基因敲除(apoE^{-/-})小鼠高脂血症/AS 模型对细菌内毒素主要成分脂多糖(LPS)可诱导的免疫炎症反应增强^[2]。这种细菌或病毒感染导致的全身系

统炎症,可进一步影响血管局部炎症反应,与 AS 的发生、发展密切相关^[3]。同时,细菌内毒素主要成分 LPS 可诱导 apoE^{-/-} 小鼠高脂血症/AS 模型分泌细胞因子增高,提示高脂血症导致的免疫损伤并不仅仅是血管局部炎症反应,而是系统性免疫反应增高。

黄连解毒汤为清热解毒法的经典代表方,具有清热、泻火、解毒之功效,既往广泛用于治疗各类实热火毒、三焦热盛之证,相当于现代医学范畴的微生物感染引起的多种急性感染性疾病^[4]。近期研究表明,此方还具有降压、降糖、降脂等作用,临床应用于治疗 AS、2 型糖尿病、高血压等疾病^[5-8]。黄连解毒汤治疗多种疾病有一定疗效,这不仅符合中医“异病同治”的理论,而且提示该方可能对于全身免疫应答和局部免疫应答均具有调节作用。因此,本文应用 apoE^{-/-} 小鼠探讨黄连解毒汤对高脂血症/AS 的全身和主动脉搏管局部免疫调节机制。

材料与方法

1 动物 所有实验用鼠均购于北京大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(京)2011-0012,并饲养于 SPF 条件下。实验采用雌性 C57BL6 小鼠 8 只和 apoE^{-/-} 小鼠 24 只,体重(20±2)g。

2 药物与试剂 黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏、栀子按 3:2:2:3 比例组成,其药材均购于北京同仁堂药店,按常规方法煎煮取汁,浓缩成相当于黄连解毒汤生药 0.5 g/mL。抗小鼠 CD11b-PerCPy5.5、Gr1-APC、Ly6C-FITC 和 TLR4-PE 抗体为美国 BD Pharmingen 公司产品;抗小鼠 CD36-PE 抗体为美国 eBioscience 公司产品;流式微球阵列(cytometric bead array, CBA)小鼠炎症试剂盒购于美国 BD 公司;RNA 提取试剂盒购于 Quagen 公司;实时荧光定量 PCR 探针甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ),单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1),肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α),白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β),白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12),白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)和转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)试剂盒购于 Life Technology 公司;逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购于 ABI 公司。

3 动物分组及处理 C57BL6 小鼠 8 只为野生普食组;apoE^{-/-} 小鼠 24 只,采用配对比较法随机分

组,分为 apoE^{-/-} 普食组、apoE^{-/-} 高脂组 and apoE^{-/-} 高脂加中药组,每组 8 只,普食组和高脂组分别给予普食和高脂饮食饲养 4 周。高脂食料含 78.85% 基础饲料,0.15% 胆固醇,21% 脂肪。ApoE^{-/-} 高脂加中药组同时给予黄连解毒汤 5 g/(kg·d)(相当于临床等效剂量的 10 倍)灌胃,其他小组采用等量纯净水灌胃。所有实验独立重复 3 次。4 周后,每组取 4 只小鼠,异戊烷吸入麻醉下,摘眼球采 EDTA 抗凝血,离心(2 000 r/min, 10 min)后获取血浆, -80℃ 保存备用。血细胞用于流式细胞仪检测;剥离胸腹主动脉,1 条主动脉血管用于病理检测,另外 3 条血管用于实时定量 PCR 检测。其余小鼠注射 LPS(10 mg/kg),刺激 3 h,取血,获取血浆,用于 CBA 检测细胞因子。由于高脂血症及 AS 是一种免疫反应强度较弱的慢性炎症,故采用 LPS 刺激造成免疫异常。

4 观察指标及检测方法

4.1 血脂水平测定 BECKMAN CX4 全自动生化分析仪,日本和光公司试剂,常规测定各组血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)和低密度脂蛋白胆固醇(low density cholesterol protein, LDL-C)。

4.2 外周血单核细胞及表面受体 TLR4 和 CD36 的表达检测 血细胞加入获取血浆等量的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS),裂解红细胞后应用抗小鼠 CD11b-PerCPy5.5、Gr-1-APC、Ly6C-FITC、TLR4-PE 和 CD36-PE 抗体直接法标记。采用 FACS Callibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测。

4.3 血浆细胞因子测定 血浆细胞因子 IL-12、TNF-α、IFN-γ、IL-10、MCP-1 和 IL-6 用 CBA 小鼠炎症试剂盒(美国 BD 公司)测定,严格按试剂盒说明书进行。

4.4 病理染色 剥离胸腹主动脉,用 4% 多聚甲醛固定,经脱水、透明浸蜡、包埋、切片、摊片、苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin, HE)染色后观察。

4.5 主动脉细胞因子实时定量 PCR 检测 剥离胸腹主动脉,剪取其主动脉弓少量的胸主动脉约 1 cm, TRIzol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA,荧光实时定量 PCR 检测炎症因子(IFN-γ, MCP-1, TNF-α, IL-1β 和 IL-12)和抑炎因子(IL-10 和 TGF-β)表达水平。使用 ABI SDS 7500 软件分析结果。

5 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行单因素方差分析,组间比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠血脂水平比较(表 1) 与野生普食组比较,apoE^{-/-}普食组血脂 TC、TG 和 LDL-C 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 apoE^{-/-}普食组比较,apoE^{-/-}高脂组 TC 和 LDL-C 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);apoE^{-/-}高脂组与 apoE^{-/-}高脂加中药组各项指标比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)				
组别	n	TC	TG	LDL-C
野生普食	4	1.72 ± 0.33	0.82 ± 0.12	0.32 ± 0.06
apoE ^{-/-} 普食	4	13.51 ± 1.76 ^{**△}	2.56 ± 1.02 [*]	2.63 ± 0.33 ^{**△}
apoE ^{-/-} 高脂	4	33.14 ± 9.05	1.78 ± 0.48	6.56 ± 1.89
apoE ^{-/-} 高脂加中药	4	27.50 ± 4.77	1.43 ± 0.74	5.13 ± 0.76

注:与野生普食组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 apoE^{-/-}高脂组比较,[△] $P < 0.05$

2 各组小鼠外周血单核细胞比例及其表面受体 TLR4 和 CD36 表达水平比较(表 2) 饲养 4 周后,与野生普食组比较,apoE^{-/-}普食组外周血单核细胞比例无明显变化,TLR4 表达水平显著升高($P < 0.05$);与 apoE^{-/-}普食组比较,apoE^{-/-}高脂组小鼠外周血单核细胞比例及 TLR4 表达水平显著升高($P < 0.05$);黄连解毒汤干预 4 周后,与 apoE^{-/-}高脂组比较,apoE^{-/-}高脂加中药组外周血单核细胞比例及其表面 TLR4 表达显著降低,且清道夫受体 CD36 表达水平亦显著降低($P < 0.05$)。

3 各组小鼠血浆炎症和抑炎细胞因子表达水平比较(表 3) LPS 刺激 3 h 后,与野生普食组比较,apoE^{-/-}普食组血浆 TNF-α 和 IL-10 表达显著升高

表 2 各组小鼠外周血单核细胞比例及 TLR4 和 CD36 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	外周血单核细胞比例(%)	TLR4 (FMI)	CD36 (FMI)
野生普食	4	6.95 ± 1.18	43.24 ± 2.30	117.71 ± 16.08
apoE ^{-/-} 普食	4	5.95 ± 1.36 [△]	50.82 ± 4.54 [*]	92.10 ± 22.64
apoE ^{-/-} 高脂	4	10.98 ± 1.88	62.21 ± 7.29	126.77 ± 29.28
apoE ^{-/-} 高脂加中药	4	6.12 ± 1.38 [△]	46.53 ± 9.87 [△]	65.69 ± 30.23 [△]

注:与野生普食组比较,^{*} $P < 0.05$;与 apoE^{-/-}高脂组比较,[△] $P < 0.05$

($P < 0.05$);与 apoE^{-/-}普食组比较,apoE^{-/-}高脂组小鼠血浆 IL-12、TNF-α、MCP-1 和 IL-10 表达增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。黄连解毒汤干预 4 周后,与 apoE^{-/-}高脂组比较,apoE^{-/-}高脂加中药组 MCP-1 表达显著降低,而 IL-10 水平显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4 各组小鼠主动脉炎症和抑炎细胞因子 mRNA 表达水平比较(图 1,表 4) 12 周龄 apoE^{-/-}小鼠饲养 4 周后,病理检测可见主动脉粥样硬化斑块(图 1)。因主动脉血管早期粥样硬化斑块不规则且分布不均匀,难以镜下定量比较。笔者取主动脉根部 1 cm,实时定量 PCR 检测主动脉血管局部炎症和抑炎因子表达,结果发现:与野生普食组比较,apoE^{-/-}普食组主动脉血管壁炎症因子 IFN-γ、MCP-1、TNF-α 和 IL-1β mRNA 水平显著升高,抑炎因子 IL-10 亦显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 apoE^{-/-}普食组比较,apoE^{-/-}高脂组主动脉血管壁不仅 IFN-γ、MCP-1、TNF-α 和 IL-1β 水平进一步显著升高,且抑炎因子 IL-12、IL-10 和 TGF-β 亦显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示高脂血症导致血管炎症反应。黄连解毒汤干预 4 周后,与 apoE^{-/-}高脂组比较,apoE^{-/-}高脂加中药组主动脉血管壁炎症因子 MCP-1、TNF-α、IL-1β 和 IL-12 显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠血浆炎症和抑炎细胞因子表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-12 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	MCP-1 (FMI)	IL-6 (FMI)
野生普食	4	101.03 ± 51.23	712.78 ± 208.22	140.98 ± 87.22	1 432.71 ± 577.15	7 840.12 ± 299.16	8 889.28 ± 1 124.32
apoE ^{-/-} 普食	4	165.44 ± 88.20	4 459.29 ± 2 628.39 [*]	194.55 ± 147.61	2 664.92 ± 701.97 [*]	8 302.72 ± 834.80	9 842.46 ± 68.56
apoE ^{-/-} 高脂	4	178.49 ± 76.04	4 775.26 ± 2 150.32	96.47 ± 18.75	3 270.67 ± 867.19	8 583.42 ± 97.92	9 839.48 ± 45.10
apoE ^{-/-} 高脂加中药	4	139.95 ± 71.36	5 037.13 ± 3 863.99	93.35 ± 127.42	5 866.05 ± 780.31 [△]	7 717.94 ± 570.18 [△]	8 526.38 ± 604.24

注:与野生普食组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 apoE^{-/-}高脂组比较,[△] $P < 0.05$

表 4 各组动物主动脉细胞因子 mRNA 相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IFN-γ	MCP-1	TNF-α	IL-1β	IL-1β	IL-10	TGF-β
野生普食	3	1.00 ± 0.37	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.46	1.00 ± 0.26	1.00 ± 1.17	1.00 ± 0.86	1.00 ± 0.28
apoE ^{-/-} 普食	3	1.65 ± 0.59 ^{*△△}	2.03 ± 0.15 ^{**△△}	1.55 ± 0.21 ^{*△△}	1.88 ± 0.26 ^{**△△}	1.78 ± 0.57 [△]	1.86 ± 0.17 ^{*△△}	0.93 ± 0.05 ^{△△}
apoE ^{-/-} 高脂	3	4.19 ± 1.25	6.76 ± 1.05	4.95 ± 0.44	4.61 ± 0.68	3.19 ± 1.04	4.87 ± 0.97	2.73 ± 0.24
apoE ^{-/-} 高脂加中药	3	3.57 ± 1.92	3.18 ± 1.67 ^{△△}	2.97 ± 0.85 ^{△△}	2.84 ± 1.01 ^{△△}	1.94 ± 0.56 [△]	4.87 ± 3.12	2.28 ± 0.62

注:与野生普食组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 apoE^{-/-}高脂组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

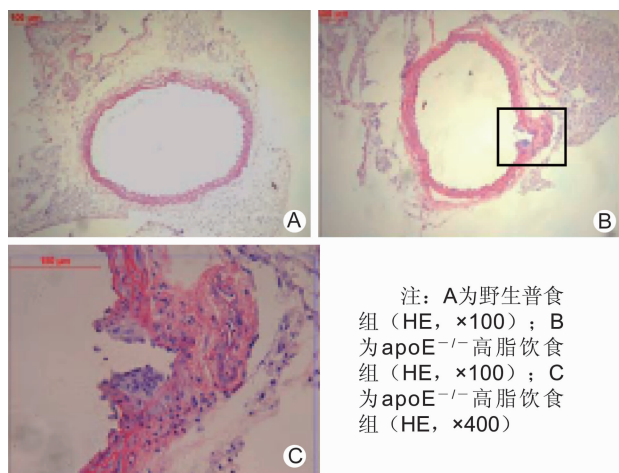


图1 主动脉病理组织变化

讨 论

现代医学研究认为,高血脂导致多种免疫细胞异常,而AS是高血脂全身免疫紊乱的血管局部炎性病变^[9]。中医学认为:高脂血症患者多长期过食肥甘厚味,形成脾胃及肝胆湿热蕴积,热蒸津液,不仅湿热胶结难化,而且聚湿生痰,痰热互结,日久由痰致瘀,“痰瘀阻滞,蕴积生毒,毒损脉络”。黄连解毒汤源于唐朝王焘所著之《外台秘要》,由黄连、黄柏、黄芩、栀子四味中药组成,为清热解毒法的经典代表方。方中黄连为君,清泻心火、兼泻中焦之火;黄芩为臣,清肺热,泻上焦之火;佐以黄柏,泻下焦之火;使以栀子,通泻三焦之火。四药合用,苦寒直折,火邪去而热毒解。近年来实验与临床研究发现黄连解毒汤对于高血脂导致的AS有治疗作用^[8,10,11]。

长期高血脂引发了单核细胞的数量和功能的异常,导致脂质清除障碍,异常炎症介质的产生,进一步发展形成AS和系统性炎症反应。单核细胞增多是AS及冠心病的一个独立的危险因素^[12,13]。高脂血症的氧化脂蛋白及氧化脂质,与单核巨噬细胞表面的TLR4结合,引发无菌性的炎症,形成泡沫细胞,产生多种细胞因子和趋化因子,参与并加速AS的发生^[14]。在感染等炎症状态下,单核细胞比例升高^[12,13],可能加重炎症反应。但是在本实验观察的4周范围内,apoE^{-/-}高脂加中药组对于高脂饮食apoE^{-/-}小鼠TC、TG和LDL的影响无统计学意义,因此,黄连解毒汤对于高脂血症/AS防治作用并不依赖于降脂,而是通过调节免疫发挥作用。

虽然高脂血症及AS是一种慢性炎症,血浆细胞因子水平低于常规检测方法低限。但笔者采用LPS刺激

后,发现高脂饮食apoE^{-/-}小鼠炎症因子TNF-α和MCP-1的表达增多,证实高血脂导致机体全身天然免疫应答增强。然而在接受高脂饮食后,apoE^{-/-}小鼠主动脉血管壁炎症因子改变更加广泛,IFN-γ、MCP-1、TNF-α、IL-1β和IL-12等多种炎症因子水平显著升高,提示血管局部免疫反应程度超过全身免疫反应。笔者还发现,在炎症因子增高的同时,apoE^{-/-}小鼠血浆抑炎因子IL-10显著增加,主动脉血管壁IL-10和TGF-β表达增高,提示高血脂同时激发机体代偿性抗炎反应。而黄连解毒汤对于机体全身和主动脉血管局部免疫反应表现出不同的效应,对于全身免疫反应,仅抑制炎症因子MCP-1的表达,而IL-10升高非常显著,提示黄连解毒汤主要提高机体全身抗炎反应。相反,对于高血脂引发的血管病变,黄连解毒汤抑制血管局部多种炎症因子,但对于抑炎因子表达并无显著作用。

对于上述差异,推测可能与诱发炎症反应的因素相关。内毒素通过激活TLR4,诱导炎症细胞因子和趋化因子等表达、分泌,促进AS发生和进展。临床报道高脂血症患者单核细胞TLR4的表达增高,阿托伐他汀干预4周可降低TLR4的表达^[15]。笔者发现apoE^{-/-}小鼠高脂饮食引发单核细胞TLR4的表达有差异,但TLR4的表达的强度不大,可能与高脂饮食导致apoE^{-/-}小鼠全身性炎症反应较弱有关。在炎症条件下,炎症刺激ROS产物氧化LDL,oxLDL通过激活PPARγ信号传导通路促进单核巨噬细胞表面CD36的表达,进一步促进oxLDL内化和巨噬细胞泡沫化^[15]。高脂饮食apoE^{-/-}小鼠单核细胞CD36的表达的幅度较大,CD36的水平与吞噬脂质形成血管局部AS直接相关,黄连解毒汤干预不仅降低系统性炎症反应,更主要是通过降低CD36的水平抑制血管局部炎症反应。

综上所述,黄连解毒汤干预主要增强高脂饮食apoE^{-/-}小鼠全身抑炎因子,抑制血管局部炎症因子的表达,从而发挥免疫调节作用。

参 考 文 献

- [1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease [J]. N Engl J Med, 2005, 352: 1685 - 1695.
- [2] 马雅奎,秦明照,曾辉. 感染与动脉粥样硬化[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2009, 3(1): 86 - 91.
- [3] Yin K, Tang SL, Yu XH, et al. Apolipoprotein A-I inhibits LPS-induced atherosclerosis in apoE^{-/-} mice possibly via activated STAT3-mediated up-regulation of tristetraprolin [J]. Acta Pharmacol

- Sin, 2013, 34(6): 837–846.
- [4] Lu J, Wang JS, Kong LY. Anti-inflammatory effects of Huanglian Jiedu Decoction, its two fractions and four typical compounds[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 911–918.
- [5] 李运伦. 黄连解毒汤加减治疗高血压病 30 例临床研究[J]. 国医论坛, 2000, 15(2): 38–39.
- [6] Yu YL, Lu SS, Yu S, et al. Huanglian Jiedu Decoction modulates glucagon-like peptide-1 secretion in diabetic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 124(3): 444–449.
- [7] 夏丽娅. 黄连解毒胶囊治疗不稳定型心绞痛 32 例[J]. 中国药业, 2006, 15(15): 62–63.
- [8] Cho KH, Kang HS, Jung WS, et al. Efficacy and safety of chunghyul-dan (qingwie-dan) in patients with hypercholesterolemia[J]. Am J Chin Med, 2005, 33(2): 241–248.
- [9] Shimada K. Immune system and atherosclerotic disease: heterogeneity of leukocyte subsets participating in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Circ J, 2009, 73(6): 994–1001.
- [10] Sekiya N, Kainuma M, Hikiami H, et al. Oren-gedoku-to and Keishi-bukuryo-gan-ryo inhibit the progression of atherosclerosis in diet-induced hypercholesterolemic rabbits [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(2): 294–298.
- [11] Sekiya N, Kogure T, Kita T, et al. Reduction of plasma triglyceride level and enhancement of plasma albumin concentration by Oren-gedoku-to administration[J]. Phytomedicine, 2002, 9(5): 455–460.
- [12] Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, et al. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice[J]. J Clin Invest, 2011, 121(10): 4138–4149.
- [13] Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice[J]. Circ J, 2010, 74(2): 213–220.
- [14] Falck-Hansen M, Kassiteridi C, Monaco C. Toll-like receptors in atherosclerosis [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(7): 14008–14023.
- [15] Methe H, Kim JO, Kofler S, et al. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14⁺ monocytes [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(7): 1439–1445.

(收稿:2013-02-04 修回:2013-07-22)

更正

本刊 2013 年第 6 期第 797 页的图 1 C 图片作者提供有误,特更正如下。作者及本刊编辑部在此向读者表示真诚的歉意!

