

# 基于TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路探究心脉康改善兔动脉粥样硬化的机制<sup>Δ</sup>

周智慧<sup>1\*</sup>, 陈贺<sup>2</sup>, 吴锦波<sup>1</sup>, 叶小汉<sup>1#</sup>(1. 广州中医药大学东莞医院心内科, 广东东莞 523015; 2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405)

中图分类号 R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)22-2736-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.22.09



**摘要** 目的:探究心脉康改善兔动脉粥样硬化(AS)的机制。方法:将50只雄性新西兰兔随机分为假手术组、模型组、辛伐他汀组[阳性对照, 2.60 mg/(kg·d)]和心脉康低、高剂量组[0.21、0.84 g/(kg·d)], 每组10只。假手术组兔给予普通饲料喂养, 只分离结扎股动脉但不损伤腹主动脉内皮; 其余各组兔均给予高脂饲料喂养并行腹主动脉内膜球囊损伤术以复制AS模型。术后10周, 假手术组和模型组兔均灌胃生理盐水, 各药物组兔灌胃相应药液(溶剂均为生理盐水), 给药体积为100 mL, 每天给药1次, 连续12周。末次给药后, 观察各组兔腹主动脉及内壁的病理变化, 检测血清中三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)以及白细胞介素6(IL-6)、IL-1 $\beta$ 含量, 检测腹主动脉组织中Toll样受体4(TLR4)、核因子 $\kappa$ B p65(NF- $\kappa$ B p65)含量及其蛋白表达水平。结果:与假手术组比较, 模型组兔腹主动脉管腔内膜富含脂质, 管壁厚度和斑块面积明显增加, 可见明显的血管内皮损伤; 血清中TG、TC、LDL-C、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量和腹主动脉组织中TLR4、NF- $\kappa$ B p65含量及其蛋白表达水平均显著升高, HDL-C含量显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与模型组比较, 心脉康高剂量组和辛伐他汀组兔腹主动脉病变减轻, 且内壁未见明显损伤, 其TG、TC、LDL-C、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量以及心脉康低剂量组NF- $\kappa$ B p65含量和TLR4、NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平均显著改善( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论:心脉康可改善兔AS, 其机制可能与下调TLR4、NF- $\kappa$ B p65表达, 抑制炎症反应有关。

**关键词** 心脉康; 动脉粥样硬化; Toll样受体家族4/核因子 $\kappa$ B信号通路; 血脂代谢; 炎症反应; 兔

## Study on Mechanism of the Improvement Effects of Xinmaikang on Atherosclerosis in Rabbits Based on TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway

ZHOU Zhihui<sup>1</sup>, CHEN He<sup>2</sup>, WU Jinbo<sup>1</sup>, YE Xiaohan<sup>1</sup>(1. Dept. of Cardiology, Dongguan Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangdong Dongguan 523015, China; 2. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To explore the mechanism of Xinmaikang improving atherosclerosis (AS) in rabbits. METHODS: A total of 50 male Zealand rabbits were randomly divided into sham operation group, model group, simvastatin group [positive control, 2.60 mg/(kg·d)] and Xinmaikang low-dose and high-dose groups [0.21, 0.84 g/(kg·d)], with 10 rabbits in each group. Rabbits in sham operation group were fed with ordinary diet, and only femoral artery was separated and ligated, and abdominal aortic endothelium was not strained; the other groups were given high-fat diet and received abdominal aortic intimal balloon injury to induce AS model. Ten weeks after operation, sham operation group and model group were given intragastric administration of normal saline, and administration groups were given corresponding drug solution intragastrically (normal saline as solvent) with the volume of 100 mL, once a day, for consecutive 12 weeks. After last administration, the pathological changes of abdominal aorta and inner wall in rabbits were observed in each group. The serum contents of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 $\beta$  were detected, and the contents and protein expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) in abdominal aortic tissue were determined. RESULTS: Compared with sham operation group, the intima of abdominal aorta in model group was rich in lipids, the thickness of vessel wall and plaque area were increased obviously, and there was obvious vascular endothelial injury. The contents of TG, TC, LDL-C, IL-6 and IL-1 $\beta$  in serum, the contents and protein expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B p65 in abdominal aorta tissue were significantly increased, while the content of HDL-C was decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with model group, the lesion of rabbit abdominal aorta were alleviated, and no obvious damage was found on the inner wall. The contents of TG, TC, LDL-C, IL-6, IL-1 $\beta$  of Xinmaikang high-dose group and simvastatin group as well as the content of NF- $\kappa$ B p65 and protein expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B p65 were improved significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Xinmaikang can improve AS in rabbits,

<sup>Δ</sup> 基金项目:广东省中医药局科研项目(No.20184019)

\* 硕士研究生。研究方向:中西医结合治疗心血管疾病。E-mail: 1401398147@qq.com

# 通信作者:主任中医师。研究方向:心血管内科。E-mail: cnd-gyxx@163.com

and its mechanism may be associated with inhibiting the expression of TLR4, NF- $\kappa$ B p65 and inhibiting inflammatory response.

**KEYWORDS** Xinmaikang; Atherosclerosis; TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway; Lipid metabolism; Inflammatory response; Rabbit

动脉粥样硬化(AS)是动脉硬化性血管疾病中重要且常见的一种,是多种心脑血管疾病(如冠心病、血栓栓塞性疾病和脑血管病等)的病理基础<sup>[1]</sup>。进入21世纪以来,全球AS的发病率呈逐年上升趋势,对人类健康造成了严重威胁<sup>[2]</sup>。AS的发病机制尚未明确。近年来,多项研究提示,慢性炎症在AS的发生发展中发挥着重要作用<sup>[3-4]</sup>。Toll样受体4(TLR4)作为Toll样受体家族(TLRs)中的一员,与配体结合后能够促进核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)发生核转移,从而激活下游炎症因子参与到AS的各个阶段,故抑制TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路可能是改善AS的潜在机制之一<sup>[5-6]</sup>。

现代医学对AS的治疗方法包括手术治疗与药物治疗,但二者均存在一定的局限性,如患者经皮冠状动脉腔内成形术后易发生再狭窄,长期服用他汀类药物会对其肝脏、肌肉、肾脏以及糖代谢等造成负面影响,二者联合则可能引发横纹肌溶解<sup>[7-8]</sup>。中医认为,AS属本虚标实之证,阴虚、阳虚、气虚为本,血瘀、痰浊、气滞、热毒、寒凝为标,可归“脉痹”“积聚”的范畴<sup>[9]</sup>。心脉康由广州中医药大学东莞医院叶小汉教授创方,以鳖甲、三棱、莪术、枳实、制胆星和石斛等药材组成,具有软坚散结、益气通脉的功效<sup>[10]</sup>。临床研究证实,心脉康对AS患者具有显著的治疗作用<sup>[11-12]</sup>,但其分子机制尚未明确。本研究通过观察心脉康对兔AS的影响,基于TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路探究其改善兔AS的作用机制,旨在为心脉康的机制研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括BX41TF型光学显微镜(日本Olympus公司)、LEO-1430VP型扫描电子显微镜(德国Zeiss公司)、Modular P800型全自动生化分析仪(瑞士Roche公司)、BondmaX型全自动免疫组化染色机(德国Leica公司)、Power Wave XS2型酶标仪(美国BioTek公司)、JS-680A型自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

心脉康片(批号Z20110041,规格0.75 g)由东莞市中医院提供;辛伐他汀片(批号R018651,规格20 mg)购自荷兰Merck Sharp V Dohme B.V.公司;0.5%油红O染液(货号SLBG0158V)购自美国Sigma公司;三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(批号分别为23743986、23451355、23377464、23460238)均购自美国

Thermo Fisher Scientific公司;白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒和TLR4、NF- $\kappa$ B p65免疫组化试剂盒(批号分别为A13267、A12347、A12567、A17267)均购自美国ABclonal Technology公司;苏木精染液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒、ECL化学发光试剂盒(批号分别为C0107、P0012A、P0012S、P0018FS)均购自上海碧云天生物技术有限公司;山羊抗小鼠TLR4单克隆抗体、山羊抗小鼠NF- $\kappa$ B p65多克隆抗体、山羊抗小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号分别为1358、8242、5174、7074)均购自美国Cell Signaling Technology公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

### 1.3 实验动物

本研究所用实验动物为普通级5月龄雄性新西兰兔,共50只,体质量1.8~2.3 kg,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物使用许可证号为SYXK(粤)2018-0001。所有动物均饲养于普通级动物实验室内,温度为20~26℃,相对湿度为40%~70%,昼夜明暗交替(12 h/12 h)。高脂饲料(含1%胆固醇、5%猪油、94%普通饲料)、普通饲料均由广州中医药大学实验动物中心提供。本研究方案已通过广州中医药大学实验动物管理和伦理委员会批准,批件号为ZSSL-2015-45。

## 2 方法

### 2.1 造模

参考文献[13],采用高脂饲料喂养与腹主动脉内膜球囊损伤结合的方法复制兔AS模型,具体操作如下:用高脂饲料(100 g/d)喂养新西兰兔2周后,再行腹主动脉内膜球囊损伤术——经耳缘静脉注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,穿刺右股动脉,将内径3.5 mm、长15 mm的球囊导管送入腹主动脉(插入深度约2.0 cm),充盈球囊并缓慢回拉球囊至动脉切口处,反复回拉3次,以造成腹主动脉内膜损伤和剥脱,术后继续以高脂饲料喂养。术后10周根据油红O的染色情况判断是否建模成功。

### 2.2 分组与给药

将50只新西兰兔以普通饲料喂养2周后,随机分为假手术组、模型组、辛伐他汀组[阴性对照,2.60 mg/(kg·d)]和心脉康低、高剂量组[0.21、0.84 g/(kg·d)],每组10只。假手术组兔给予普通饲料喂养,只分离结扎股动脉但不损伤腹主动脉内皮,其余各组兔均按“2.1”项下方法

复制 AS 模型。术后 10 周,假手术组和模型组兔灌胃生理盐水,各药物组灌胃相应药液(溶剂均为生理盐水),给药体积均为 100 mL,每天给药 1 次,连续 12 周,给药剂量均依据本课题组预实验结果设置。

### 2.3 采样方法

末次给药后,用 4% 水合氯醛溶液麻醉各组兔,收集其腹主动脉血 40 mL 后,处死,分离腹主动脉。血样于室温下放置 30 min 后,以 5 000 r/min 离心 15 min,取上层血清,备用。

### 2.4 兔腹主动脉的病理观察

取各组兔腹主动脉,以石蜡包埋后切片(厚度约 5  $\mu\text{m}$ ),脱蜡至水并经水洗后,在异丙醇中放置 5 min,用滤纸吸去异丙醇,加入 0.5% 油红 O 染色 30 min;用水清洗 3 次,加入苏木精染色 5 min;用盐酸-乙醇溶液(1:100, *V/V*)分色、氨水返蓝后,用中性树胶封片,使用光学显微镜观察其腹主动脉的病理变化(红褐色为血脂沉积)。

### 2.5 兔腹主动脉内壁的病理观察

取各组兔腹主动脉,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)清洗表面后,快速放入 2.5% 戊二醛固定液中固定 4 h;用 PBS 清洗 5 min $\times$ 4 次,再放入 1% 锇酸固定液中固定 1 h;用 PBS 清洗 5 min $\times$ 4 次,依次放入 70%、80%、90%、100% 乙醇中脱水 10 min,彻底干燥后,使用扫描电子显微镜观察其腹主动脉内壁的病理变化。

### 2.6 兔血脂指标含量的检测

取各组兔腹主动脉血清样品适量,按照相应试剂盒说明书方法操作,使用全自动生化分析仪检测其血清中 TG、TC、LDL-C、HDL-C 的含量。

### 2.7 兔血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量的检测

采用 ELISA 法进行检测。取各组兔腹主动脉血清样品适量,按照相应试剂盒说明书方法操作,使用酶标仪检测其血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的含量。

### 2.8 兔腹主动脉组织中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 含量的检测

采用免疫组化法进行检测。取各组兔腹主动脉,以石蜡包埋后切片(厚度约 5  $\mu\text{m}$ ),按照相应试剂盒说明书方法操作,使用全自动免疫组化染色机分别进行 TLR4 和 NF- $\kappa$ B p65 免疫组化染色,使用光学显微镜观察并采集放大时的显微图像,同时运用 Image J v1.8.0 图像分析软件计算兔腹主动脉组织中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 在 465 nm 波长下的积分光密度(IOD),并以此表示两者含量。

### 2.9 兔腹主动脉组织中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平的检测

采用 Western blot 法进行检测。取各组兔腹主动脉,经裂解、匀浆、静置后,以 12 000 r/min 离心 10 min,获取蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度后,煮沸 5 min 使蛋白变性。取变性后的蛋白样品经 SDS-PAGE 分离,转

移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,以 5% 脱脂奶粉于室温下封闭 2 h 后,加入 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、GAPDH 一抗(稀释比例分别为 1:1 000、1:200、1:1 000),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;用 TBST 缓冲液洗涤 10 min $\times$ 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(稀释比例为 1:15 000),室温孵育 1 h;用 TBST 缓冲液洗涤 10 min $\times$ 3 次,加入 ECL 化学发光显色液显影,于自动凝胶成像分析仪中成像。使用 Sensi Ansys 13.0 软件进行分析,以目标蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

### 2.10 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析。数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验(方差齐)或 Dunnett's 检验(方差不齐)。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 兔腹主动脉的病理变化

假手术组兔的腹主动脉管腔内可见少许脂质,未见明显斑块和血管内皮损伤。与假手术组比较,模型组兔的腹主动脉管腔内膜富含脂质,管壁厚度和斑块面积均明显增加,可见明显的血管内皮损伤。与模型组比较,心脉康低剂量组兔的腹主动脉结构相对完整,管腔内膜脂质沉积较少;心脉康高剂量组和辛伐他汀组兔的腹主动脉结构正常,局部有小灶性钙化颗粒物沉积,病变轻微,斑块小,弹力板基本完整。结果见图 1。

### 3.2 兔腹主动脉内壁的病理变化

假手术组兔的腹主动脉内壁光滑,未见明显肿胀、损伤、粥样硬化斑块和泡沫细胞。与假手术组比较,模型组兔的腹主动脉内壁可见许多粥样硬化斑块,在斑块表面可见纤维帽和泡沫细胞,在硬化斑块上可见黏附的巨噬细胞,血管内皮损伤明显。与模型组比较,心脉康低剂量组兔的腹主动脉内壁斑块面积缩小,血管内皮损伤较轻;心脉康高剂量组和辛伐他汀组兔的腹主动脉内壁斑块明显较少,血管内皮相对完整,未见明显损伤。结果见图 2。

### 3.3 兔血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 的含量变化

与假手术组比较,模型组兔血清中 TC、TG、LDL-C 含量均显著升高( $P<0.01$ ),HDL-C 含量显著降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,心脉康高剂量组和辛伐他汀组兔血清中 TC、TG、LDL-C 含量均显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),各药物组 HDL-C 含量和心脉康低剂量组 TC、TG、LDL-C 含量差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结果见表 1。

### 3.4 兔血清中 IL-6、IL-1 $\beta$ 的含量变化

与假手术组比较,模型组兔血清中 IL-6、IL-1 $\beta$  含量均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,心脉康高剂量

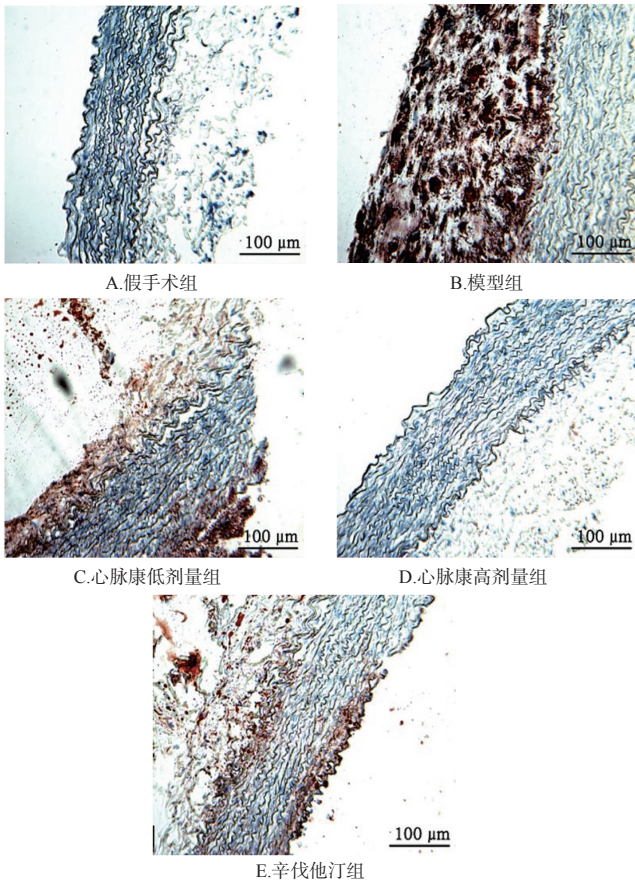


图1 各组兔腹主动脉病理变化的显微图(油红O染色)

Fig 1 Micrographs of pathological changes of abdominal aorta of rabbits in each group (oil red O staining)

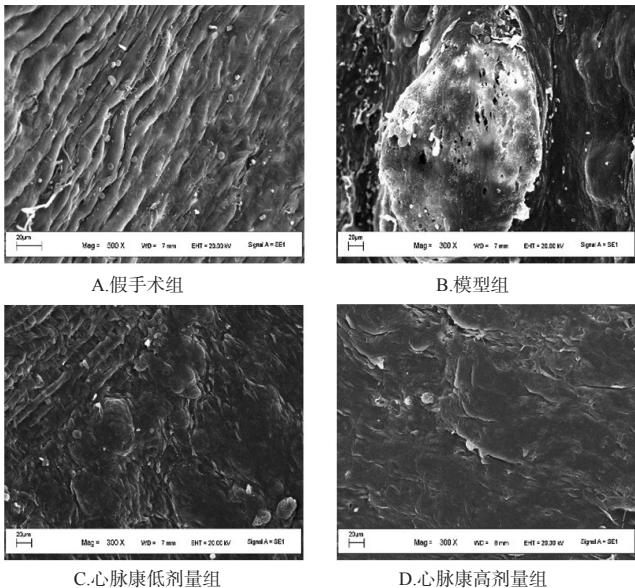
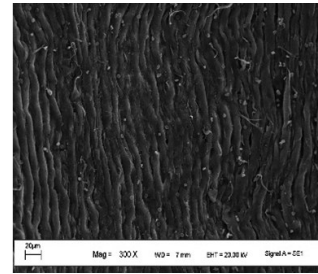


图2 各组兔腹主动脉内壁病理变化的扫描电子显微镜图

Fig 2 Scanning electron microscope graphs of pathological changes in the inner wall of abdominal aorta of rabbits in each group



E.辛伐他汀组  
续图2

Continued fig 2

表1 心脉康对AS模型兔血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$ )

Tab 1 Effects of Xinmaikang on serum contents of TC, TG, LDL-C and HDL-C in AS model rabbits( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$ )

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
假手术组	0.74 ± 0.12	0.85 ± 0.11	0.38 ± 0.11	3.63 ± 0.08
模型组	3.52 ± 1.11**	4.16 ± 0.55**	5.89 ± 1.23**	2.75 ± 0.38*
心脉康低剂量组	3.22 ± 1.19	4.12 ± 0.41	5.03 ± 1.11	2.33 ± 0.42
心脉康高剂量组	2.69 ± 1.23*	2.85 ± 0.24**	2.46 ± 0.67**	2.24 ± 0.31
辛伐他汀组	2.95 ± 1.60*	2.76 ± 0.22**	2.80 ± 0.89**	2.14 ± 0.32

注:与假手术组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

组和辛伐他汀组兔血清中IL-6、IL-1 $\beta$ 含量均显著降低( $P < 0.01$ ),心脉康低剂量组上述指标含量差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结果见表2。

表2 心脉康对AS模型兔血清中IL-6、IL-1 $\beta$ 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$ )

Tab 2 Effects of Xinmaikang on serum contents of IL-6 and IL-1 $\beta$  in AS model rabbits( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{pg/mL}$ )

组别	IL-6	IL-1 $\beta$
假手术组	46.53 ± 12.61	20.94 ± 3.22
模型组	64.34 ± 6.16**	30.41 ± 6.46**
心脉康低剂量组	60.58 ± 9.65	29.67 ± 7.11
心脉康高剂量组	41.15 ± 10.53**	21.36 ± 7.59**
辛伐他汀组	43.51 ± 11.97**	22.21 ± 3.72**

注:与假手术组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, ## $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, ## $P < 0.01$

### 3.5 兔腹主动脉组织中TLR4、NF- $\kappa$ B p65的含量变化

与假手术组比较,模型组兔腹主动脉组织中TLR4、NF- $\kappa$ B p65含量均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各药物组兔腹主动脉组织中TLR4(除心脉康低剂量组外)、NF- $\kappa$ B p65含量均显著降低( $P < 0.01$ )。结果见图3、图4、表3。

### 3.6 兔腹主动脉组织中TLR4、NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达水平变化

与假手术组比较,模型组兔腹主动脉组织中TLR4、

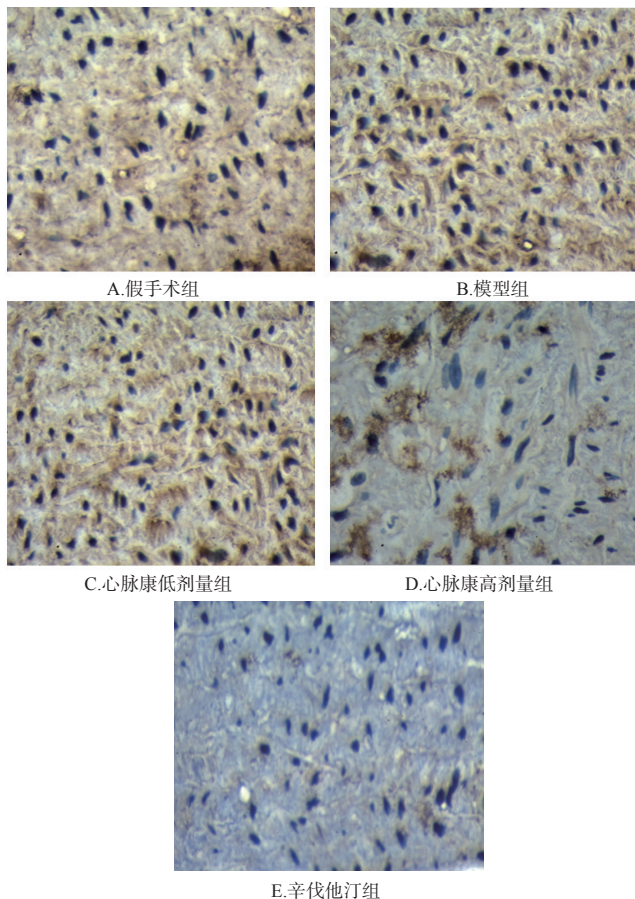


图3 心脉康对AS模型兔腹主动脉组织中TLR4含量影响的免疫组化图( $\times 50$ )

Fig 3 Immunohistochemical maps of the effects of Xinmaikang on the content of TLR4 in abdominal aorta tissue of AS model rabbits( $\times 50$ )

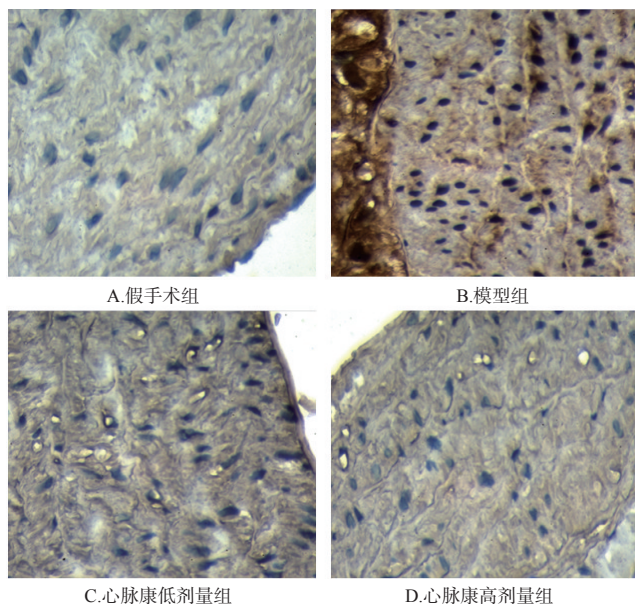
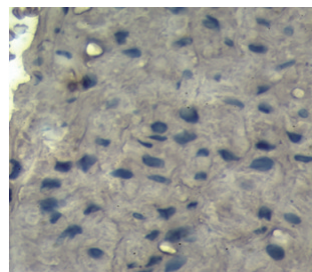


图4 心脉康对AS模型兔腹主动脉组织中NF-κB p65含量影响的免疫组化图( $\times 50$ )

Fig 4 Immunohistochemical maps of the effects of Xinmaikang on the content of NF-κB p65 in abdominal aorta tissue of AS model rabbit( $\times 50$ )



E.辛伐他汀组

续图4

Continued fig 4

表3 心脉康对AS模型兔腹主动脉组织中TLR4、NF-κB p65含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 3 Effects of Xinmaikang on the contents of TLR4 and NF-κB p65 in abdominal aorta tissue of AS model rabbits( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	TLR4	NF-κB p65
假手术组	0.330 ± 0.020	0.160 ± 0.008
模型组	0.820 ± 0.021**	0.343 ± 0.009**
心脉康低剂量组	0.730 ± 0.016	0.245 ± 0.024 <sup>#</sup>
心脉康高剂量组	0.290 ± 0.019 <sup>#</sup>	0.204 ± 0.020 <sup>#</sup>
辛伐他汀组	0.280 ± 0.020 <sup>#</sup>	0.268 ± 0.014 <sup>#</sup>

注:与假手术组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group,

<sup>#</sup> $P < 0.01$

NF-κB p65蛋白的表达水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与模型组比较,各药物组兔腹主动脉组织中TLR4、NF-κB p65蛋白的表达水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果见图5、表4。

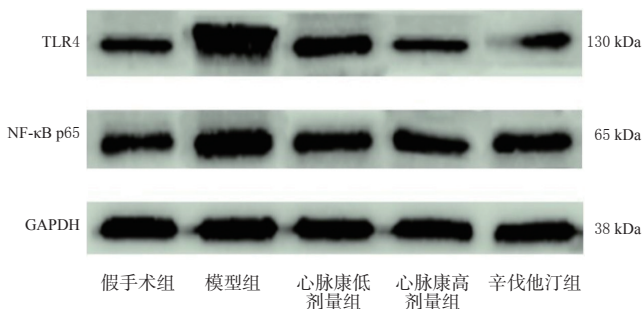


图5 心脉康对AS模型兔腹主动脉组织中TLR4、NF-κB p65蛋白表达影响的电泳图

Fig 5 Electrophoretogram of the effects of Xinmaikang on the protein expression of TLR4 and NF-κB p65 in abdominal aorta tissue of AS model rabbits

#### 4 讨论

AS是一种慢性炎症性疾病,是由脂质过度积累诱发内皮细胞、白细胞和内膜平滑肌细胞共同参与的动脉病变<sup>[4]</sup>。心脉康是由鳖甲、三棱、莪术、枳实、制胆星和石斛等药材组成,其中鳖甲可滋阴潜阳、软坚散结;三棱

表4 心脉康对AS模型兔腹主动脉组织中TLR4、NF-κB p65蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 4 Effects of Xinmaikang on the protein expression of TLR4 and NF-κB p65 in abdominal aorta tissue of AS model rabbits( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	TLR4/GAPDH	NF-κB p65/GAPDH
假手术组	0.52±0.12	0.73±0.14
模型组	1.00±0.22*	0.96±0.21**
心脉康低剂量组	0.74±0.16 <sup>#</sup>	0.84±0.18 <sup>#</sup>
心脉康高剂量组	0.46±0.13 <sup>##</sup>	0.75±0.13 <sup>##</sup>
辛伐他汀组	0.42±0.09 <sup>##</sup>	0.79±0.08 <sup>##</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

和莪术可破血消积、行气止痛,现代药理学研究提示两者均能够抑制炎症、降低全血黏度和阻止血栓形成;枳实可破气散痞、消积化痰;制胆星可清热化痰,配合诸药可增坎散结之功;石斛擅益胃生津、滋阴清热,其提取物亦可降低全血黏度、抑制血栓形成;诸药合用,共奏软坚散结、益气通脉之功<sup>[15-17]</sup>。

在AS病变过程中,血浆中的细胞因子和脂蛋白颗粒通过受损的血管内皮渗入至内皮下空间,通过氧化修饰等反应成为具有细胞毒性的化学物质,从而促进炎症反应和AS进程<sup>[18]</sup>。本研究油红O染色和扫描电子显微镜观察结果提示,高剂量心脉康能够保护AS模型兔的血管内皮,抑制其粥样硬化斑块形成。脂质代谢异常是AS最重要的危险因素之一<sup>[19]</sup>,本研究对各组兔的血脂指标进行分析,结果提示,高剂量心脉康能够改善AS模型兔的血脂异常,下调血清中TC、TG和LDL-C含量,干预AS的进程。

炎症在AS的所有阶段都起着重要作用,是其起始和发展过程中生理和病理变化的共同基础<sup>[20]</sup>。已有研究表明,炎症因子IL-6和IL-1β的过度表达能够提升炎症细胞的黏附能力,IL-1β还可降低血栓调节素的表达,破坏凝血与抗凝血功能的平衡,导致血管内部凝血,从而促进AS的进程<sup>[21]</sup>。本研究结果提示,高剂量心脉康能够下调AS模型兔血清中IL-6和IL-1β的含量,抑制炎症反应,干预AS的进程。

有学者指出,心脉康可能通过降低血脂、减轻过氧化损伤等途径来抑制兔AS的形成<sup>[22-23]</sup>。心脉康联合化学药治疗具有较好的抗炎效果<sup>[24]</sup>。TLR4是介导天然免疫TLRs家族中的一员,是一种位于细胞膜表面的跨膜蛋白,参与多种免疫及炎症反应,其在AS内皮细胞和斑块上的表达水平明显升高<sup>[25]</sup>。NF-κB是炎症最重要的调节因子之一,其主要形式为p50和p65组成的二聚体,参

与AS的病理进程<sup>[26-27]</sup>。有研究发现,*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠经NF-κB抑制剂干预后,其体内泡沫细胞的形成受到明显抑制<sup>[28]</sup>。TLR4/NF-κB信号通路是机体重要的炎症信号转导途径之一,血管内皮细胞内TLR4蛋白表达水平的上调能够激活NF-κB,诱导肿瘤坏死因子α、IL-6和IL-1β等促炎性细胞因子的产生和释放,从而促进AS斑块的形成<sup>[29]</sup>。相关研究指出,抑制TLR4/NF-κB信号通路能够下调炎症因子的表达,从而减轻血管内皮细胞的受损程度,延缓AS的进程<sup>[30-31]</sup>。本研究通过构建AS模型兔,探究心脉康对TLR4/NF-κB信号通路及炎症因子表达的影响,结果显示,与模型组比较,心脉康低、高剂量组兔腹主动脉组织中TLR4(除低剂量组外)、NF-κB p65含量及其蛋白的表达水平均显著降低,提示TLR4/NF-κB信号通路可能是心脉康改善兔AS的靶点之一。

综上所述,心脉康可能通过下调TLR4、NF-κB p65的表达,抑制炎症反应,从而延缓AS的发展。

### 参考文献

- [1] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, et al. Atherosclerosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 1-18.
- [2] HERRINGTON W, LACEY B, SHERLIKER P, et al. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease[J]. Circ Res, 2016, 118(4): 535-546.
- [3] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis[J]. Circ Res, 2019, 124(2): 315-327.
- [4] BÄCK M, YURDAGUL A J, TABAS I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(7): 389-406.
- [5] ZHANG X, XUE C, XU Q, et al. Caprylic acid suppresses inflammation via TLR4/NF-κB signaling and improves atherosclerosis in ApoE-deficient mice[J]. Nutr Metab (Lond), 2019, 16: 40.
- [6] 李嘉慧,王欣佩,冷静. TLR4/NF-κB参与动脉粥样硬化发生发展机制的研究进展[J].中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 137-142.
- [7] BLAHA M J, DAUBERT M A. Assessing the impact of coronary plaque on the relative and absolute risk reduction with statin therapy[J/OL]. JACC Cardiovasc Imaging, 2021[2021-05-15]. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2021.07.005>.
- [8] PEPE M, NAPOLI G, CARULLI E, et al. Autoimmune diseases in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a risk factor for in-stent restenosis[J]. Atherosclerosis, 2021, 333: 24-31.

- [9] 江爽,韩燕星,蒋建东,等.葛根素抗动脉粥样硬化作用及其机制的研究进展[J].药科学报,2021,56(4):966-971.
- [10] 邓志刚,陈静,叶小汉,等.软坚散结方对颈动脉粥样硬化治疗的临床观察[J].中医临床研究,2012,4(10):19-20.
- [11] 王婷,叶小汉,苏志远.心脉康方治疗下肢动脉硬化闭塞症31例临床观察[J].中国现代药物应用,2018,12(12):6-8.
- [12] 侯焯均,陈建兴,赖惠东,等.心脉康联合阿托伐他汀对急性冠脉综合征患者疗效及血脂的影响[J].深圳中西医结合杂志,2021,31(6):54-56.
- [13] 刘鹏,王广新,苏国海.兔动脉粥样硬化模型建立方法的研究进展[J].中国比较医学杂志,2021,31(4):150-154.
- [14] LI B, LI W, LI X, et al. Inflammation: a novel therapeutic target/direction in atherosclerosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(8):1216-1227.
- [15] 王小萍,徐冠玲,闫昕,等.“莪术-三棱”药对及其单味药水煎液的酚类和有机酸类化学成分分析[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(23):171-179.
- [16] 唐照琦,李彪,王秋红,等.胆南星的化学成分、药理作用及相关复方临床应用的研究进展[J].中国药房,2020,31(12):1523-1527.
- [17] 宋广青,刘新民,王琼,等.石斛药理作用研究进展[J].中草药,2014,45(17):2576-2580.
- [18] CHEN Z W, TSAI C H, PAN C T, et al. Endothelial dysfunction in primary aldosteronism[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20):5214.
- [19] ZHANG Y, GU Y, CHEN Y, et al. Dingxin Recipe IV attenuates atherosclerosis by regulating lipid metabolism through LXR- $\alpha$ /SREBP1 pathway and modulating the gut microbiota in ApoE<sup>-/-</sup> mice fed with HFD[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266:113436.
- [20] ZHU Y, XIAN X, WANG Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation[J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3):80.
- [21] WU M, YANG S, WANG S, et al. Effect of berberine on atherosclerosis and gut microbiota modulation and their correlation in high-fat diet-fed ApoE<sup>-/-</sup> mice[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:223.
- [22] 叶小汉,董明国,钟云良,等.心脉康对动脉粥样硬化家兔血脂代谢和MDA、SOD的影响[J].新中医,2010,42(10):117-119.
- [23] 王婷,叶小汉,吴锦波,等.心脉康方对兔动脉粥样硬化及NF- $\kappa$ B p65表达的影响[J].广州中医药大学学报,2020,37(10):1963-1968.
- [24] 胡传普.心脉康片对冠心病介入治疗术后炎症因子水平的影响[D].广州:广州中医药大学,2017.
- [25] LI Y, WANG Y, CHEN Y, et al. Corilagin ameliorates atherosclerosis in peripheral artery disease via the toll-like receptor-4 signaling pathway in vitro and in vivo[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:1611.
- [26] BOWMAN J D, SURANI S, HORSEMAN M A. Endotoxin, toll-like receptor-4, and atherosclerotic heart disease[J]. *Curr Cardiol Rev*, 2017, 13(2):86-93.
- [27] KARUNAKARAN D, NGUYEN M A, GEOFFRION M, et al. RIPK1 expression associates with inflammation in early atherosclerosis in humans and can be therapeutically silenced to reduce NF- $\kappa$ B activation and atherogenesis in mice[J]. *Circulation*, 2021, 143(2):163-177.
- [28] PLOTKIN J D, ELIAS M G, DELLINGER A L, et al. NF- $\kappa$ B inhibitors that prevent foam cell formation and atherosclerotic plaque accumulation[J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(6):2037-2048.
- [29] ZHU L, GONG X, GONG J, et al. Notoginsenoside R<sub>1</sub> up-regulates miR-221-3p expression to alleviate ox-LDL-induced apoptosis, inflammation, and oxidative stress by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway in HUVECs[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 53(6):e9346.
- [30] WANG N, ZHANG X, MA Z, et al. Combination of tanshinone II<sub>A</sub> and astragaloside IV attenuate atherosclerotic plaque vulnerability in ApoE<sup>-/-</sup> mice by activating PI3K/Akt signaling and suppressing TLR4/NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123:109729.
- [31] DING Z, POTHINENI N, GOEL A, et al. PCSK9 and inflammation: role of shear stress, pro-inflammatory cytokines, and LOX-1[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(5):908-915.

(收稿日期:2021-06-17 修回日期:2021-10-07)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ)收录期刊,欢迎投稿、订阅