

基于EETs介导的细胞焦亡探讨化痰祛痰方对ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的影响^Δ

赵娜*, 隋国媛, 孟嘉伟, 吕美君, 贾连群[#](辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 沈阳110847)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)12-1437-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.12.05



摘要 目的 探讨化痰祛痰方对ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化(AS)的影响及机制。方法 将30只ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、化痰祛痰方组[20 g/(kg·d)]和瑞舒伐他汀组[1.55 mg/(kg·d)],每组10只,另取10只C57BL/6J小鼠作为正常对照组。ApoE^{-/-}小鼠喂饲高脂饲料12周复制AS模型。造模成功后,各组小鼠灌胃相应药物或生理盐水,每日1次,连续4周。末次给药后,检测各组小鼠血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、5,6-环氧二十碳三烯酸(5,6-EET)、8,9-EET、11,12-EET、14,15-EET、白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-18水平,主动脉组织中核因子 κ B抑制蛋白(I κ B)、核因子 κ B(NF- κ B)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、胱天蛋白酶1(Caspase-1)、IL-1 β 、IL-18 mRNA表达水平和I κ B、NF- κ B、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白质(ASC)、Caspase-1、消皮素D(GSDMD)、IL-1 β 、IL-18蛋白表达水平,并观察主动脉组织形态学变化。结果 与模型组比较,化痰祛痰方组及瑞舒伐他汀组小鼠血清中TC、TG、LDL-C、IL-1 β 、IL-18水平,主动脉组织中I κ B、NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA表达水平以及I κ B、NF- κ B、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$),血清中5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET、14,15-EET水平均显著升高($P < 0.05$);主动脉粥样斑块明显减少。结论 化痰祛痰方可能通过EETs介导细胞焦亡发挥抗AS作用。

关键词 化痰祛痰方;动脉粥样硬化;细胞焦亡;环氧二十碳三烯酸

Exploration of the effects of Huayu qutan formula on atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice based on EETs-mediated pyroptosis

ZHAO Na, SUI Guoyuan, MENG Jiawei, LYU Meijun, JIA Lianqun (Ministry of Education Key Laboratory of Visceral Phenomenon Theory and Application of Traditional Chinese Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effects and mechanism of Huayu qutan formula on atherosclerosis (AS) in ApoE^{-/-} mice. **METHODS** Thirty ApoE^{-/-} mice were randomly divided into model group, Huayu qutan formula group [20 g/(kg·d)], rosuvastatin group [1.55 mg/(kg·d)], with 10 mice in each group. Another 10 C57BL/6J mice were selected as normal control group. ApoE^{-/-} mice were given high-lipid diet for 12 weeks to induce AS model. After modeling, each group was given relevant medicine or normal saline intragastrically, once a day, for 4 consecutive weeks. After the last administration, the levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), 5,6-epoxyeicosatrienoic acid (5, 6-EET), 8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET, interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 in serum were detected; mRNA expressions of inhibitor of nuclear factor κ B (I κ B), nuclear factor κ B (NF- κ B), NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), Caspase-1, IL-1 β and IL-18 in the aortic tissue of mice were detected; protein expression levels of I κ B, NF- κ B, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), Caspase-1, gasdermin D (GSDMD), IL-1 β and IL-18 in the aortic tissue of mice were detected. The morphological changes of the aortic tissue were observed. **RESULTS** Compared with model group, the serum levels of TC, TG, LDL-C, IL-1 β and IL-18, the mRNA expressions of I κ B, NF- κ B, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β and IL-18 in aortic tissue, and the protein expressions of I κ B, NF- κ B, NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18 were all decreased significantly in Huayu qutan formula group and rosuvastatin group ($P < 0.05$), while the serum levels of 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET and 14,15-EET were increased

significantly ($P < 0.05$). The aortic atherosclerotic plaques were alleviated significantly. **CONCLUSIONS** Huayu qutan formula can play role of anti-AS through EETs-mediated pyroptosis.

KEYWORDS Huayu qutan formula; atherosclerosis; pyroptosis; epoxyeicosatrienoic acid

^Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No. 81974548, No. 82074145);辽宁省自然科学基金面上项目(No.2021-MS-252);辽宁中医药大学自然科学类重点项目(No.2021LZY038)

* 第一作者 实验师,博士研究生。研究方向:中西医结合防治心血管疾病。E-mail:810zn@163.com

[#] 通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中西医结合防治心血管疾病。E-mail:jq-8@163.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性且不断进展的炎症性疾病,是引发心血管事件的主要原因之一,因此防治AS的发生发展具有十分重要的意义。核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)可通过激活NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)诱导细胞焦亡^[1]。细胞焦亡是细胞的一种程序性死亡方式,其以质膜破坏为特征,并可释放细胞内物质和促炎因子^[2]。在AS的发展中,细胞焦亡的发生会引起大量炎症因子的累积,进而破坏血管壁的结构,最终引起斑块的破裂出血,导致严重的心血管事件^[3]。

中医学认为,痰浊、血瘀是AS发生的主要病因,脾失健运、痰瘀互结是其关键病机,临床应用具有健脾、祛痰、化痰功效的药物治疗AS的疗效颇为显著^[4]。杨关林教授基于以脾论治的学术思想,研制了化痰祛痰方(专利号ZL200710010845.9),该方可明显改善冠心病患者的临床症状^[5-6]。环氧二十碳三烯酸(epoxyicosatrienoic acids, EETs)是花生四烯酸的代谢产物,包括5, 6-EET、8, 9-EET、11, 12-EET、14, 15-EET 4种活性形式,可通过抑制NF- κ B活性、减轻炎症反应来发挥抗AS作用^[7]。本课题组前期研究发现,冠心病患者体内的EETs水平有所降低,而化痰祛痰方可提高EETs水平^[8-9]。基于此,本研究以EETs介导细胞焦亡为切入点,探讨化痰祛痰方对小鼠AS的影响及作用机制,旨在为深入筛选有效的抗AS方剂提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括7180型全自动生化分析仪(日本HITACHI公司),7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Applied Biosystems公司),EM UC7型超薄切片机(德国Leica公司),C1型正置白光显微镜(日本Nikon公司),1658001型垂直电泳槽、PowerPac Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司),5200型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司),51119180型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)等。

1.2 主要药品与试剂

绞股蓝、黄芪、党参、川芎、石菖蒲、茯苓、丹参、法半夏、郁金饮片(批号分别为2203212、2110272、212220303、2203201、2103252、2111071、2202071、2203107、2201233)均购自辽宁中医药大学附属医院,由该院中药师鉴定均符合2020年版《中国药典》的相关要求;瑞舒伐他汀钙片(阳性对照药,批号99201103,规格5 mg)购自鲁南贝特制药有限公司;BCA蛋白定量试剂盒和5, 6-EET、8, 9-EET、11, 12-EET、14, 15-EET、白细胞介素1 β (interleu-

kin-1 β , IL-1 β)、IL-18酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(批号分别为ml095490、YJ961775、YJ256639、YJ149752、YJ112055、YJ301814、YJ002294)均购自东莞市酶联生物科技有限公司;实时荧光定量PCR试剂盒、反转录试剂盒和 β -肌动蛋白(β -actin)一抗(批号分别为CW3008、CW2019、CW0096)均购自北京康为世纪生物科技有限公司;兔抗小鼠NLRP3、消皮素D(gasdermin D, GSDMD)、NF- κ B、胱天蛋白酶1(Caspase-1)、NF- κ B抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)、IL-1 β 、IL-18一抗(批号分别为19771-1-Ap、20770-1-Ap、80979-1-RR、22915-1-Ap、10268-1-Ap、26048-1-Ap、10663-1-Ap)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔抗小鼠凋亡相关斑点样蛋白质(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)一抗(批号HY-P80548)购自美国MedChemExpress公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(批号CW0103)购自江苏康为世纪科技股份有限公司;总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)检测试剂盒(批号分别为CH0103152、CH0105151、CH0105161、CH0105162)均购自四川迈克生物科技股份有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号MB9898-Jun-11G)购自大连美仑生物科技有限公司;油红O染色试剂盒(批号052521210730)购自北京碧云天生物科技有限公司。

1.3 实验动物及饲料

6~8周龄SPF级ApoE^{-/-}小鼠30只,具有相同遗传背景的C57BL/6J同龄野生型小鼠10只,体质量为(20 \pm 2)g,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物生产许可证号SCXK(京)2019-0008。小鼠在辽宁中医药大学SPF级实验动物中心饲养(相对湿度40%~50%,室温21~23 $^{\circ}$ C),自由饮食。本研究方案经辽宁中医药大学动物实验伦理委员会审批通过,批件号为21000042021072。高脂饲料(胆固醇0.15%,脂肪21%)购自小泰有泰(北京)生物科技有限公司,批号为2018-0006。

2 方法

2.1 化痰祛痰方水煎剂的制备

取绞股蓝30 g、黄芪30 g、党参30 g、川芎20 g、石菖蒲20 g、茯苓15 g、丹参15 g、法半夏15 g、郁金15 g,混合后加入10倍量水浸泡1 h后,武火煮沸,文火煮20 min,过滤,重复3次,合并滤液,浓缩成质量浓度为1.2 g/mL的溶液(以生药量计),冷却后于4 $^{\circ}$ C保存备用。

2.2 动物分组干预及取材

30只 ApoE^{-/-}小鼠采用随机数字表法分为模型组、化痰祛痰方组、瑞舒伐他汀组,每组10只;10只 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组。参照文献方法^[10-11]给予30只 ApoE^{-/-}小鼠高脂饲料喂养12周以复制AS模型,ApoE^{-/-}小鼠主动脉经HE染色后在显微镜下可观察到根部内膜有斑块形成,即AS造模成功;正常对照组的小鼠用普通饲料喂养。根据人与动物体表面积折算系数和临床常用剂量换算,化痰祛痰方组及瑞舒伐他汀组小鼠给药剂量分别为20 g/(kg·d)及1.55 mg/(kg·d),模型组及正常对照组小鼠给予等体积生理盐水。造模成功后,各组小鼠每日灌胃1次,每次0.5 mL,连续4周。在给药期间,各组小鼠喂养饲料不变。各组小鼠在末次灌胃结束后,禁食不禁水12 h后,腹腔注射0.3%戊巴比妥钠0.2 mL进行麻醉,随后眼眶取血200~300 μL,离心(4 000 r/min,15 min),取血清置于干净的离心管,冻存于-80 °C冰箱中,备用。取血后处死小鼠,固定于解剖板上,剖离小鼠主动脉组织,每组取3只小鼠的主动脉组织用4%多聚甲醛固定,其余小鼠的主动脉组织冻存于-80 °C冰箱中,备用(部分小鼠用于其他实验)。

2.3 小鼠血脂水平检测

取各组小鼠血清,参照试剂盒说明书进行操作,采用全自动生化分析仪检测TC、TG、LDL-C、HDL-C水平。

2.4 小鼠主动脉组织形态学变化观察

取各组小鼠固定于4%多聚甲醛中的主动脉组织,梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋,制备石蜡切片(4 μm),脱蜡后进行HE染色,脱水封片,在光学显微镜下观察各组小鼠主动脉组织形态学变化,并拍照。

2.5 小鼠血清中EETs、IL-1β、IL-18水平检测

取各组小鼠血清,参照ELISA检测试剂盒说明书进行操作,用酶标仪检测其中5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET、14,15-EET、IL-1β、IL-18水平。

2.6 小鼠主动脉组织中IκB、NF-κB、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA表达水平检测

采用实时荧光定量PCR法检测。取各组3只小鼠冻存的主动脉组织200 mg,提取总RNA,检测总RNA浓度,反转录为cDNA。PCR条件为95 °C预变性30 s;95 °C变性10 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,共40个循环;最后72 °C再延伸5 min。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,应用2^{-ΔΔCt}法计算主动脉组织中IκB、NF-κB、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA表达水平,并以正常对照组为参照进行归一化处理。引物序列和产物大小见表1。

表1 引物序列和产物大小

基因名称	序列(5'-3')	产物大小/bp
IκB	正向引物 TACGCCCCAGCATCTCCACTCCG	123
	反向引物 CTCCACGATGCCAGGTAGCCAT	
NF-κB	正向引物 GCGCATCCAGACCAACAATAAC	108
	反向引物 GCCGAAGCTGCATGGACACT	
NLRP3	正向引物 CATCAATGCTGCTTCGACAT	126
	反向引物 TCAGTCCCACACAGCAAT	
Caspase-1	正向引物 CACAGCTCTGGAGATGGTGA	136
	反向引物 GGTCCCACATATCCCTCCT	
IL-1β	正向引物 GCTGCTCCAAACCTTTGAC	152
	反向引物 AGCTTCTCCACGCCACAAT	
IL-18	正向引物 GACTCTTGGCTCAACTCAAGG	163
	反向引物 CAGGCTGCTTTTGTCAACGA	
GAPDH	正向引物 GTCAAGAAAGTGGGGCCTGA	132
	反向引物 TGAGTGAATCTGGGATTGTG	

2.7 小鼠主动脉组织中IκB、NF-κB、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18蛋白表达水平检测

采用Western blot法检测。取各组3只小鼠冻存的主动脉组织100 mg,加入RIPA裂解液1 mL,在冰上裂解28 min,离心(4 °C,12 000 r/min,10 min)。取上清液,应用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,变性后电泳、转膜,加入5%脱脂奶粉室温下封闭1 h,再加入IκB、NF-κB、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18、β-actin一抗(稀释比例分别为1:5 000、1:5 000、1:1 000、1:1 000、1:2 000、1:2 000、1:1 000、1:2 000、1:1 000),4 °C封闭过夜;用TBST缓冲液洗涤3~4次,加入二抗(稀释比例为1:10 000),室温孵育1 h;用TBST缓冲液洗涤3次,ECL发光液显色曝光,于化学发光成像系统下成像。利用Alpha View软件对条带进行分析,以目的蛋白和内参蛋白(β-actin)的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 各组小鼠血脂水平比较

与正常对照组比较,模型组小鼠血清中TC、TG、LDL-C水平均显著升高($P<0.05$),HDL-C水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,化痰祛痰方组及瑞舒伐他汀组小鼠血清中TC、TG、LDL-C水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

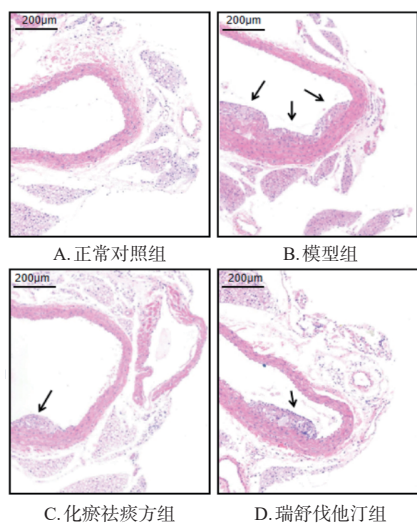
表2 各组小鼠的血脂水平比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常对照组	3.14±0.80	1.46±0.15	0.56±0.08	1.14±0.12
模型组	16.13±1.51 ^a	3.69±0.20 ^a	3.10±0.39 ^a	0.77±0.08 ^a
化痰祛痰方组	11.32±1.05 ^b	2.67±0.19 ^b	1.42±0.11 ^b	0.82±0.05
瑞舒伐他汀	9.52±1.22 ^b	2.19±0.32 ^b	1.23±0.09 ^b	0.83±0.04

a:与正常对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.2 各组小鼠主动脉组织形态学比较

正常对照组小鼠主动脉血管壁结构正常,血管内壁光滑平整,未出现粥样斑块;模型组小鼠主动脉结构异常,血管内壁增厚、不平整,可见较大面积粥样斑块;化痰祛痰方组及瑞舒伐他汀组小鼠主动脉血管内壁略不光滑,可见少量粥样斑块,血管壁厚度较模型组减轻。结果见图1。



箭头:粥样斑块。

图1 各组小鼠主动脉组织形态学显微图(HE染色)

3.3 各组小鼠血清中EETs、IL-18、IL-1β水平比较

与正常对照组比较,模型组小鼠血清中5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET、14,15-EET水平均显著降低($P < 0.05$),IL-1β、IL-18水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,化痰祛痰方组及瑞舒伐他汀组小鼠血清中5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET、14,15-EET水平均显著升高($P < 0.05$),IL-1β、IL-18水平均显著降低($P < 0.05$)。结果见表3。

表3 各组小鼠血清中EETs、IL-1β、IL-18水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

组别	5,6-EET	8,9-EET	11,12-EET	14,15-EET	IL-1β	IL-18
正常对照组	6.11 ± 0.90	14.00 ± 1.06	4.19 ± 0.70	39.16 ± 3.55	25.96 ± 2.35	36.07 ± 2.78
模型组	3.66 ± 0.39 ^a	9.10 ± 1.13 ^a	2.30 ± 0.58 ^a	26.87 ± 2.65 ^a	37.27 ± 4.11 ^a	55.47 ± 5.55 ^a
化痰祛痰方组	4.90 ± 0.57 ^b	12.49 ± 0.70 ^b	3.22 ± 0.48 ^b	32.82 ± 1.89 ^b	30.88 ± 3.54 ^b	43.04 ± 3.10 ^b
瑞舒伐他汀组	5.15 ± 0.42 ^b	13.26 ± 1.17 ^b	3.56 ± 0.68 ^b	34.54 ± 1.78 ^b	28.67 ± 1.88 ^b	41.04 ± 3.20 ^b

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$;b:与模型组比较, $P < 0.05$ 。

表5 各组小鼠主动脉组织中IκB、NF-κB、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IκB/β-actin	NF-κB/β-actin	NLRP3/β-actin	ASC/β-actin	Caspase-1/β-actin	GSDMD/β-actin	IL-1β/β-actin	IL-18/β-actin
正常对照组	0.72 ± 0.07	0.72 ± 0.08	0.85 ± 0.05	1.48 ± 0.08	0.55 ± 0.06	1.26 ± 0.12	0.92 ± 0.09	1.22 ± 0.06
模型组	1.05 ± 0.09 ^a	1.11 ± 0.08 ^a	1.35 ± 0.05 ^a	1.81 ± 0.09 ^a	1.07 ± 0.08 ^a	1.67 ± 0.09 ^a	1.25 ± 0.06 ^a	1.48 ± 0.06 ^a
化痰祛痰方组	0.81 ± 0.02 ^b	0.82 ± 0.05 ^b	1.12 ± 0.05 ^b	1.47 ± 0.05 ^b	0.76 ± 0.07 ^b	1.37 ± 0.08 ^b	1.00 ± 0.04 ^b	1.29 ± 0.01 ^b
瑞舒伐他汀组	0.81 ± 0.07 ^b	0.84 ± 0.04 ^b	1.12 ± 0.67 ^b	1.57 ± 0.10 ^b	0.76 ± 0.05 ^b	1.42 ± 0.05 ^b	0.99 ± 0.08 ^b	1.32 ± 0.03 ^b

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$;b:与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3.4 各组小鼠主动脉组织中IκB、NF-κB、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA表达水平的比较

与正常对照组比较,模型组小鼠主动脉组织中IκB、NF-κB、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,化痰祛痰方组及瑞舒伐他汀组小鼠主动脉组织中上述指标均显著降低($P < 0.05$)。结果见表4。

表4 各组小鼠主动脉组织中IκB、NF-κB、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IκB	NF-κB	NLRP3	Caspase-1	IL-1β	IL-18
正常对照组	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
模型组	1.41 ± 0.16 ^a	3.55 ± 0.32 ^a	1.43 ± 0.21 ^a	1.62 ± 0.16 ^a	2.26 ± 0.33 ^a	1.67 ± 0.08 ^a
化痰祛痰方组	1.04 ± 0.08 ^b	1.75 ± 0.39 ^b	1.12 ± 0.09 ^b	1.19 ± 0.12 ^b	1.50 ± 0.08 ^b	1.12 ± 0.15 ^b
瑞舒伐他汀组	1.01 ± 0.04 ^b	1.71 ± 0.26 ^b	1.11 ± 0.07 ^b	1.14 ± 0.12 ^b	1.40 ± 0.23 ^b	1.18 ± 0.17 ^b

a:与正常对照组比较, $P < 0.05$;b:与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3.5 各组小鼠主动脉组织中IκB、NF-κB、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18蛋白表达水平比较

与正常对照组比较,模型组小鼠主动脉组织中IκB、NF-κB、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,化痰祛痰方组及瑞舒伐他汀组小鼠主动脉组织中上述指标均显著降低($P < 0.05$)。结果见图2、表5。

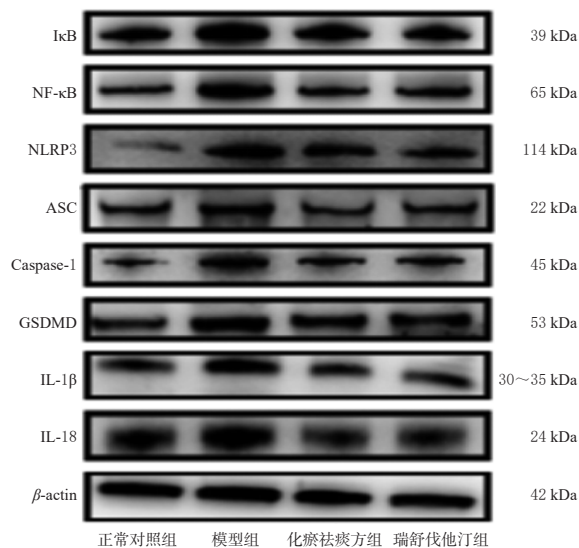


图2 各组小鼠主动脉组织中IκB、NF-κB、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18蛋白表达的电泳图

4 讨论

AS是现代医学名词,在中医学并无记载,但根据其引起的症状可归入胸痹、头晕、头痛、中风等,属本虚标实之证。在中医理论中,AS的发展与痰浊和血瘀等重要病理因素密切相关,其关键病机主要是脾失健运、痰瘀互结。诸多研究发现,健脾益气、祛痰化瘀的药物治AS的临床疗效显著^[12-13]。化瘀祛痰方是杨关林教授的专利方,该方由绞股蓝、黄芪、党参、川芎、石菖蒲、茯苓、丹参、法半夏、郁金组成,具有益气健脾、祛痰降浊、活血化瘀之功效。脂质代谢紊乱是AS发生发展的主要危险因素,改善血脂异常可有效缓解AS斑块形成及防治心血管疾病发生^[14]。本研究结果显示,与正常对照组比较,模型组小鼠血清中TC、TG、LDL-C水平均显著升高,HDL-C水平显著降低,主动脉可见较大面积粥样斑块;经化瘀祛痰方干预后,小鼠血清中TC、TG、LDL-C水平均显著降低,主动脉粥样斑块明显减少,说明化瘀祛痰方可有效改善血脂水平,减少主动脉粥样斑块数量,进而延缓AS的发生发展。

AS是脂质代谢紊乱和炎症相互作用的结果,其发展过程伴随免疫炎症反应、氧化应激等过程。花生四烯酸是生物体内分布最广的一种必需多不饱和脂肪酸,可在表氧化酶作用下生成化合物EETs,此类化合物具有多种心血管保护作用,如抗炎、保护内皮细胞、调节血管张力等^[15]。研究发现,EETs可通过降低I κ B激酶的活性,抑制NF- κ B向细胞核移位,进而抑制NF- κ B的激活,降低促炎因子的表达,从而抑制病理性炎症的发生与发展^[16]。本研究结果显示,与正常对照组比较,模型组小鼠血清中5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET、14,15-EET水平均显著降低,主动脉组织中I κ B和NF- κ B mRNA及蛋白表达水平均显著升高;经化瘀祛痰方干预后,血清中5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET、14,15-EET水平均显著升高,主动脉组织中I κ B和NF- κ B mRNA及蛋白表达水平均显著降低,提示化瘀祛痰方可能通过提高EETs水平,进而抑制I κ B的表达,降低NF- κ B的水平,从而抑制炎症反应,发挥抗AS作用。

细胞焦亡是伴随着炎症反应的细胞死亡方式,炎症小体与细胞焦亡的发生密切相关^[17]。炎症小体亦称为焦亡小体,属于多种蛋白质组成的复合体,能对内源性应激诱导的危险相关分子模式以及入侵病原体的病原体相关分子模式进行识别,在诱导巨噬细胞焦亡、释放炎症因子和推进AS病变进展等方面扮演重要角色^[18]。NLRP3是目前研究最为广泛的炎症小体,是细胞焦亡的重要调控分子,主要由富含亮氨酸的重复蛋白、含 Cas-

pase 酶募集域的ASC、前体 Caspase-1 三个部分构成。研究发现,当机体受到外来刺激时,活化的NF- κ B会引起NLRP3寡聚化,进而激活Caspase-1^[19]。活化的Caspase-1一方面对GSDMD进行剪切,使其成孔活性的N端结构域被释放,导致细胞膜形成孔隙,改变细胞渗透压,引起细胞肿胀至溶解,发生细胞焦亡^[20];另一方面,Caspase-1可裂解IL-1 β 前体和IL-18前体,产生炎症因子IL-1 β 、IL-18,并通过GSDMD所形成的孔隙释放到细胞外,加重炎症反应,进而诱发炎症级联反应^[21]。本研究结果显示,与正常对照组比较,模型组小鼠血清中IL-1 β 、IL-18水平,主动脉组织中NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA表达水平,以及NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18蛋白表达水平均显著升高,经化瘀祛痰方干预后,上述指标均显著降低,提示化瘀祛痰方能够抑制细胞焦亡,降低炎症因子的表达,从而发挥抗AS作用。

综上所述,化瘀祛痰方可能通过提高EETs水平介导细胞焦亡发挥抗AS作用。但是由于本研究未进行体外实验的验证,因此后续仍需进一步在细胞水平继续探讨化瘀祛痰方防治AS的分子机制。

参考文献

- [1] LI H, ZHAO Q W, LIU D N, et al. Cathepsin B aggravates atherosclerosis in ApoE-deficient mice by modulating vascular smooth muscle cell pyroptosis through NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. PLoS One, 2024, 19(1):e0294514.
- [2] DING J J, WANG K, LIU W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family[J]. Nature, 2016, 535(7610):111-116.
- [3] 张宇擎,杨慧. 炎性小体诱导的细胞焦亡在动脉粥样硬化斑块发生发展中的作用[J]. 心脑血管病杂志, 2020, 39(9):1134-1135,1140.
ZHANG Y Q, YANG H. The role of cell apoptosis induced by inflammatory corpuscles in the occurrence and development of atherosclerotic plaques[J]. J Cardiovasc Pulm Dis, 2020, 39(9):1134-1135, 1140.
- [4] 许晓敏. 从脾虚痰瘀论治动脉粥样硬化[J]. 四川中医, 2015, 33(3):32-33.
XU X M. Treating atherosclerosis from spleen-deficiency generates phlegm and blood stasis[J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2015, 33(3):32-33.
- [5] 李勇,杨关林,刘宁. 祛痰化瘀汤对心绞痛患者血管内皮生长因子及脑利钠肽的影响[J]. 中国实用医药, 2009, 4(5):7-9.

- LI Y, YANG G L, LIU N. Effects of eliminating phlegm and resolving stasis soup on serum VEGF and BNP in patients of angina pectoris[J]. *China Pract Med*, 2009, 4 (5):7-9.
- [6] 王昕,杨关林.化痰祛痰颗粒剂治疗冠心病心绞痛63例[J]. *中医药学刊*,2005,23(4):674.
WANG X, YANG G L. 63 case of coronary heart disease and angina pectoris treated by resolving stasis eliminating phlegm granule[J]. *Study J Tradit Chin Med*, 2005, 23 (4):674.
- [7] LARSEN B T, GUTTERMAN D D, HATOUM O A. Emerging role of epoxyeicosatrienoic acids in coronary vascular function[J]. *Eur J Clin Invest*, 2006, 36 (5) : 293-300.
- [8] 贾连群,甄毕贤,徐莹,等.应用液质联用技术研究脾虚大鼠血清代谢物谱群特征[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016,36(3):359-365.
JIA L Q, ZHEN B X, XU Y, et al. Study on serum metabolite profiling in pi-deficiency rats based on LC-MS technique[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2016, 36 (3) : 359-365.
- [9] 张妮.基于代谢组学探讨化痰祛痰方防治冠心病心绞痛痰瘀互结证疗效机制[D].沈阳:辽宁中医药大学,2018.
ZHANG N. Based on metabonomics, this paper discusses the therapeutic mechanism of Huayu qutan recipe in preventing and treating angina pectoris of coronary heart disease with phlegm and blood stasis syndrome[D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [10] 贾连群,陈文娜,赵秋宇,等.化痰祛痰方药对动脉粥样硬化模型小鼠肝胆固醇代谢相关基因表达调控的影响[J]. *中华中医药杂志*,2014,29(1):214-218.
JIA L Q, CHEN W N, ZHAO Q Y, et al. Effect of Huayu qutan recipe on the metabolism of cholesterol in ApoE^{-/-} atherosclerotic mice[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2014,29(1):214-218.
- [11] 麻莉.基于核受体Nur77探讨景虎通脉方对ApoE^{-/-}小鼠炎症因子作用的研究[D].昆明:云南中医学院,2018.
MA L. Study on the effect of Jinghu tongmai recipe on inflammatory factors in ApoE^{-/-} mice based on nuclear receptor Nur77[D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [12] 武亚涛,王玲玲,陈学军,等.益气化痰活血法治疗颈动脉粥样硬化斑块临床疗效及其安全性[J]. *临床合理用药杂志*,2018,11(6):73-74.
WU Y T, WANG L L, CHEN X J, et al. Clinical efficacy and safety of Yiqi huatan huoxue method in the treatment of carotid atherosclerotic plaque[J]. *Chin J Clin Ration Drug Use*, 2018, 11(6):73-74.
- [13] 谢婷婷,郭家娟.散结通脉方对老年颈动脉粥样硬化患者的影响[J]. *中国老年学杂志*,2018,38(22):5395-5397.
XIE T T, GUO J J. Effect of Sanjie tongmai recipe on elderly patients with carotid atherosclerosis[J]. *Chin J Gerontol*, 2018, 38(22):5395-5397.
- [14] 于宁,宋囡,王莹,等.四妙勇安汤抑制焦亡通路TLR4/NLRP3/Caspase-1防治动脉粥样硬化机制研究[J]. *中华中医药学刊*,2021,39(8):199-203,279.
YU N, SONG N, WANG Y, et al. Study on mechanism of Simiao yong' an decoction inhibiting pyroptosis pathway TLR4/NLRP3/Caspase-1 to prevent and treat atherosclerosis[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2021, 39 (8) : 199-203,279.
- [15] FLEMING I. The pharmacology of the cytochrome P₄₅₀ epoxygenase/soluble epoxide hydrolase axis in the vasculature and cardiovascular disease[J]. *Pharmacol Rev*, 2014,66(4):1106-1140.
- [16] DENG Y M, THEKEN K N, LEE C R. Cytochrome P₄₅₀ epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010,48(2):331-341.
- [17] JIN H F, XIE W Q, HE M, et al. Pyroptosis and sarcopenia: frontier perspective of disease mechanism[J]. *Cells*, 2022,11(7):1078.
- [18] YANG Z, SHI J H, CHEN L, et al. Role of pyroptosis and ferroptosis in the progression of atherosclerotic plaques [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10:811196.
- [19] HORNUNG V, LATZ E. Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation[J]. *Eur J Immunol*, 2010,40(3):620-623.
- [20] WANG K, SUN Q, ZHONG X, et al. Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis[J]. *Cell*, 2020,180(5):941-955.

(收稿日期:2023-12-14 修回日期:2024-05-24)

(编辑:邹丽娟)