

益气通脉方对 $ApoE^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化的影响及机制^Δ

任权娜^{1*}, 陈雨晗¹, 汪坤², 马鸣², 杨艳华², 张雨², 赵旭^{2#} (1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2. 河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院药学部, 郑州 450002)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)18-2232-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.18.08



摘要 目的 探究益气通脉方对载脂蛋白E基因敲除($ApoE^{-/-}$)小鼠动脉粥样硬化(AS)的影响及机制。方法 将40只 $ApoE^{-/-}$ 小鼠随机分为模型组、阳性对照组[阿托伐他汀钙, 2.6 mg/(kg·d)]和益气通脉方低、中、高剂量组[0.46、0.91、1.82 g/(kg·d), 以生药量计], 每组8只; 另取C57BL/6J小鼠8只作为正常组。除正常组外, 其余各组小鼠给予高脂饲料并灌胃相应药液或生理盐水, 每天1次, 连续12周。末次给药后, 检测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)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)含量; 检测并计算各组小鼠主动脉斑块面积占比, 观察主动脉窦病理形态学变化; 检测小鼠主动脉中磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、蛋白激酶B(又称Akt)及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的磷酸化水平。**结果** 与模型组比较, 益气通脉方中、高剂量组小鼠血清TC、TG、LDL-C水平和TNF- α 、IL- 1β 、MCP-1(含低剂量组)含量均显著降低, 高剂量组的HDL-C含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 益气通脉方各剂量组小鼠主动脉斑块均有不同程度减少, 脂质沉积、炎症细胞浸润等病理改变均有不同程度减轻; 益气通脉方中、高剂量组小鼠主动脉斑块面积占比和主动脉中PI3K、Akt、mTOR蛋白的磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 益气通脉方可改善AS小鼠的脂质代谢, 减轻炎症反应, 延缓斑块发展, 其作用可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路激活有关。

关键词 益气通脉方; 动脉粥样硬化; 炎症反应; PI3K/Akt/mTOR信号通路

Effects of Yiqi tongmai formula on atherosclerosis in $ApoE^{-/-}$ mice and its mechanism

REN Quanna¹, CHEN Yuhan¹, WANG Kun², MA Ming², YANG Yanhua², ZHANG Yu², ZHAO Xu² (1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Dept. of Pharmacy, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine/the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of Yiqi tongmai formula on atherosclerosis (AS) in $ApoE^{-/-}$ mice and its mechanism. **METHODS** Forty $ApoE^{-/-}$ mice were randomly divided into model group, positive control group [atorvastatin calcium, 2.6 mg/(kg·d)], and low-dose, medium-dose and high-dose groups of Yiqi tongmai formula [0.46, 0.91, 1.82 g/(kg·d), by raw material], with 8 mice in each group. Eight C57BL/6J mice were selected as the normal group. Except for the normal group, the other groups were given a high-lipid diet and relevant drug or normal saline intragastrically, once a day, for 12 consecutive weeks. After the last medication, the serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) as well as the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were measured in mice. The proportion of aortic plaque area in each group of mice was detected and calculated, and the pathological morphological changes of the aortic sinus were observed; the protein phosphorylation levels of aortic phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protein kinase B (aka Akt) and mammalian target of rapamycin (mTOR) were examined. **RESULTS** Compared with the model group, the serum levels of

^Δ 基金项目 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(No. 212102311114); 河南省中医药拔尖人才培养项目(No. 豫卫中医函[2021]15号); 河南省中医药科学研究专项课题(No. 20-21ZYD08, No. 2023ZY1015, No. 2023ZY2081)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向: 中药炮制机制及饮片标准化。E-mail: 17739746376@163.com

通信作者 主任药师, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 中药质量标准及临床应用。E-mail: zhaoxu0163@163.com

TC, TG and LDL-C and the contents of TNF- α , IL- 1β and MCP-1 (including low-dose group) were decreased significantly in medium-dose and high-dose groups of Yiqi tongmai formula, while the content of HDL-C in high-dose group was increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); aortic plaques of the mice were reduced in Yiqi tongmai formula groups to different extents, and pathological changes such as lipid

deposition and inflammatory cell infiltration were relieved to different extents; the proportion of aortic plaque area, the protein phosphorylation levels of PI3K, Akt and mTOR in aortic tissue were significantly reduced in medium-dose and high-dose groups of Yiqi tongmai formula ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSIONS** Yiqi tongmai formula can improve lipid metabolism, reduce inflammatory response, and delay plaque development in AS mice. Its effect may be related to the inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway activation.

KEYWORDS Yiqi tongmai formula; atherosclerosis; inflammation response; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性、代谢性疾病,以脂质沉积、平滑肌细胞增殖、血管内膜增厚和斑块形成为主要特征^[1]。其中,斑块是聚集于血管壁内膜的脂质沉积物,主要由胆固醇晶体、平滑肌细胞、纤维素等组成^[2]。随着纤维组织和周围平滑肌的增生,斑块不断生长并在管腔内堆积、增厚,从而使血流量明显减少^[3]。由此可见,减少脂质沉积、抑制炎症反应在改善AS中起关键作用。

益气通脉方由红参、三七、酒丹参、土鳖虫、水蛭、酒大黄6味中药组成,具有健脑益气、化瘀通脉、改善循环、消除斑块及血栓之功。方中,君药红参可补益元气、祛瘀通络;臣药三七、酒丹参意在活血祛瘀、行气止痛;臣药水蛭、土鳖虫通经活络,专于行药力;佐药酒大黄泻下祛浊、引药下行,具去瘀血、生新血之功^[4]。全方以补气、通络化瘀为主,补气而不壅滞,活血而不伤正之功。益气通脉方在临床治疗AS等心脑血管疾病方面的疗效确切^[5],但具体作用机制尚不明确。

磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, 又称“Akt”)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路是经典的细胞内信号转导通路,可参与细胞增殖、血管生成和炎症反应等多个生物学过程^[6]。研究发现,芳香新塔花总黄酮可通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路来改善载脂蛋白E基因敲除(*ApoE*^{-/-})小鼠的血脂异常,降低其炎症因子水平,减少其主动脉组织中泡沫细胞和斑块的生成^[7]。由此可见,该信号通路与AS密切相关。基于此,本研究以*ApoE*^{-/-}小鼠为对象,建立AS模型,并基于PI3K/Akt/mTOR信号通路初步探究益气通脉方对小鼠AS的影响及潜在作用机制,旨在为该方的进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括170-4070型凝胶电泳仪、Mini TransBlot型转膜仪、Chemi Doc XRS+型凝胶扫描成像系统(美国Bio-Rad公司), SMZ745T型电视显微镜(日本Nikon公司), Multiskan FC型酶标仪[赛默飞世尔

(上海)仪器有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

红参、三七、酒丹参、酒大黄饮片(批号分别为2108171、2111079、21121303、2107122)均购自安徽普仁中药饮片有限公司;水蛭、土鳖虫饮片(批号分别为22010301、21110201)均购自亳州市先锋中药饮片有限公司。所有饮片经河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院药学部黄晓敏副主任药师鉴定均为真品。

阿托伐他汀钙片(批号8148435,规格20 mg)购自晖致制药(大连)有限公司;饱和油红O染液、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号分别为CR2305087、2309004)均购自北京索莱宝科技有限公司;低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、总胆固醇(total cholesterol, TC)检测试剂盒(批号均为20230916)和甘油三酯(triglyceride, TG)检测试剂盒(批号20230918)均购自南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为ZD0226041375、DP07P0F89596、FU02F6487219)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;兔源PI3K抗体和鼠源Akt、mTOR、磷酸化mTOR(phosphorylated mTOR, p-mTOR)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号分别为20584-1-AP、60203-2-Ig、66888-1-Ig、67778-1-Ig、66009-1-Ig)及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗鼠IgG二抗(货号分别为SA00001-1、SA00001-2)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔源磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)、磷酸化Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)抗体(货号分别为YP0765、YP0006)均购自苏州睿瀛生物技术有限公司。

1.3 实验动物与饲料

SPF级雄性*ApoE*^{-/-}小鼠40只和雄性C57BL/6J小鼠8只,体重18~22 g,均购自斯贝福(北京)生物技术有

限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0010。所有小鼠均分笼饲养于河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院中心实验室SPF级动物房(温度23~25℃,相对湿度50%~70%,每12h昼夜循环),自由摄食、饮水。本实验方案经该院伦理委员会批准(伦理批准文号PZ-HNSZYY-2022-044)。普通饲料与高脂饲料(含83.75%基础饲料+15%猪油+1.25%胆固醇)均购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。

2 方法

2.1 药液的制备

益气通脉方由红参、三七、酒丹参、酒大黄、水蛭、土鳖虫饮片按质量比1:1:3:2:1:0.6配伍。酒丹参、酒大黄用80%乙醇水浴回流提取3次,每次1h,过滤浓缩得干浸膏;红参、三七、土鳖虫和水蛭打成细粉,混合均匀。灌胃前,将上述干浸膏及细粉混于一定量生理盐水中,制得混悬液,备用。阿托伐他汀钙片用生理盐水配制成0.26 mg/mL的混悬液,备用。

2.2 动物分组、造模与给药

参考文献方法^[8]建立ApoE^{-/-}小鼠AS模型:取40只雄性ApoE^{-/-}小鼠,适应性喂养4周后,按随机数字表法分为模型组、阳性对照组[阿托伐他汀钙,2.6 mg/(kg·d),根据临床有效剂量换算^[9]]和益气通脉方低、中、高剂量组[0.46、0.91、1.82 g/(kg·d),以生药量计,中剂量根据临床有效剂量换算^[9]],每组8只。取C57BL/6J小鼠8只作为正常组,用普通饲料喂养并灌胃等体积生理盐水。益气通脉方低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠用高脂饲料喂养并灌胃相应药液,每天1次,连续12周。12周后,随机抽取模型组、益气通脉方中剂量组及阳性对照组各2只小鼠,取主动脉进行油红O染色,如果出现不同程度斑块和脂质沉积,则表明AS模型构建成功。

2.3 样本采集

末次给药后,每组取6只小鼠禁食、不禁水12h,腹腔注射1%戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉,摘眼球取血。血样于室温下静置2h后离心,取上层血清,于-80℃下保存,备用。取血后,迅速解剖小鼠,随机取各组3只小鼠的心脏及主动脉,浸泡于4%多聚甲醛中固定24h;取各组剩余3只小鼠的主动脉,迅速放入液氮中,于-80℃下保存,备用。

2.4 小鼠血脂水平检测

取“2.3”项下各组小鼠冻存的血清样品,室温下解冻后,按照相应试剂盒说明书方法操作,以酶标仪检测其血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C水平。

2.5 小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 和MCP-1含量检测

取“2.3”项下各组小鼠冻存的血清样品,室温下解冻后,按照相应ELISA试剂盒说明书方法操作,以酶标仪检测其血清中TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1含量。

2.6 小鼠主动脉斑块面积检测

取“2.3”项下各组小鼠经固定的主动脉,用磷酸盐缓冲液清洗3次,剥离多余的结缔组织后沿纵轴剖开,放入45℃预热的油红O染液(饱和油红O染液与水的体积比为3:2)中孵育1h,再用75%乙醇分化5min×3次,用水润洗后置于黑色橡胶垫上,以体视显微镜观察、拍照。利用Image J软件分析斑块,并按下式计算斑块面积占比:斑块面积占比=斑块面积/主动脉总面积×100%。

2.7 小鼠主动脉窦病理形态学观察

取“2.3”项下各组小鼠经固定的心脏,经常规石蜡包埋后制作主动脉窦切片(厚约3 μ m),经HE染色后脱水、封片,使用显微镜观察其主动脉窦病理形态学变化情况。

2.8 小鼠主动脉中PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达检测

取“2.3”项下各组小鼠冻存的主动脉,提取蛋白后以BCA法测定蛋白浓度,并作变性处理。取变性蛋白适量,进行电泳分离并转膜,用5%脱脂奶粉封闭2h;加入PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、 β -actin一抗(稀释比例分别为1.5:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、0.4:1 000、2:1 000、0.2:1 000),于4℃下孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例均为1:5 000),于37℃下孵育1h;采用ECL Plus超敏发光液曝光后,于凝胶扫描成像系统下成像。使用Image Lab 5.2软件分析蛋白的条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值表示目的蛋白的表达量,再以p-PI3K与PI3K、p-Akt与Akt、p-mTOR与mTOR的表达量比值表示PI3K、Akt、mTOR蛋白的磷酸化水平。

2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 8软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Tukey's多重比较检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 益气通脉方对小鼠血脂水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清中TC、TG、LDL-C水平均显著升高($P<0.01$),HDL-C水平显著降低($P<$

0.01);与模型组比较,益气通脉方中、高剂量组及阳性对照组小鼠血清中TC、TG、LDL-C水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),益气通脉方高剂量组小鼠血清中HDL-C水平显著升高($P < 0.05$)。结果见表1。

表1 各组小鼠血清中TC、TG、LDL-C和HDL-C水平比较($\bar{x} \pm s, n=6, \text{mmol/L}$)

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常组	4.84±1.64	1.32±0.43	8.46±1.31	4.84±0.49
模型组	34.85±2.61 ^a	2.65±0.29 ^a	28.89±2.27 ^a	2.03±0.45 ^a
益气通脉方低剂量组	32.68±1.65	2.18±0.39	25.42±2.04	2.54±0.47
益气通脉方中剂量组	27.47±3.67 ^b	1.78±0.42 ^c	20.92±4.66 ^c	2.87±0.51
益气通脉方高剂量组	26.84±4.97 ^b	1.80±0.35 ^c	22.12±4.44 ^c	2.92±0.49 ^b
阳性对照组	25.86±4.63 ^c	1.66±0.37 ^c	22.39±1.77 ^b	2.76±0.47

a:与正常组比较, $P < 0.01$;b:与模型组比较, $P < 0.05$;c:与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3.2 益气通脉方对小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1含量的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1含量均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,益气通脉方中、高剂量组及阳性对照组小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1含量以及益气通脉方低剂量组小鼠血清中MCP-1含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表2。

表2 各组小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 和MCP-1含量比较($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

组别	TNF- α	IL-1 β	MCP-1
正常组	74.60±12.12	92.10±11.28	149.20±57.43
模型组	274.10±44.05 ^a	193.20±21.06 ^a	405.00±56.52 ^a
益气通脉方低剂量组	232.00±27.47	172.70±9.87	331.40±28.97 ^b
益气通脉方中剂量组	205.10±23.90 ^b	160.30±13.45 ^b	313.50±24.52 ^c
益气通脉方高剂量组	193.00±37.99 ^b	148.40±23.00 ^c	297.30±23.50 ^c
阳性对照组	207.30±28.69 ^b	144.30±26.17 ^c	294.50±45.08 ^c

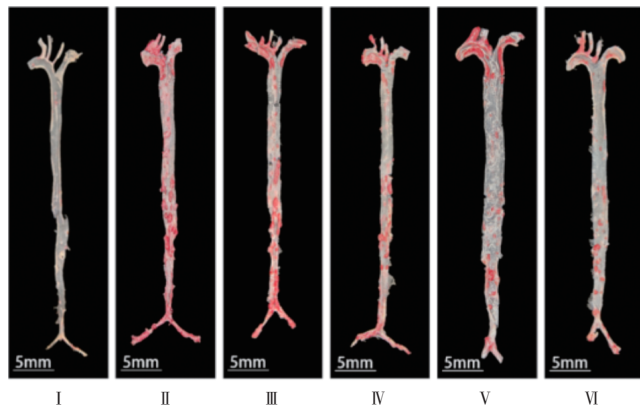
a:与正常组比较, $P < 0.01$;b:与模型组比较, $P < 0.05$;c:与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3.3 益气通脉方对小鼠主动脉斑块的影响

与正常组比较,模型组小鼠主动脉斑块明显,其斑块面积占比显著增大($P < 0.01$);与模型组比较,各药物组小鼠主动脉斑块均有不同程度减少,其中益气通脉方中、高剂量组及阳性对照组小鼠主动脉斑块面积占比均显著减小($P < 0.01$)。结果见图1、图2。

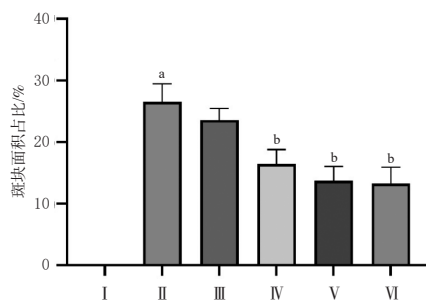
3.4 益气通脉方对小鼠主动脉窦病理形态学的影响

正常组小鼠主动脉外膜、中膜、内膜层次清晰,血管内膜平滑完整,未见斑块沉积;模型组小鼠主动脉内膜明显增厚,斑块明显且斑块内可见大量胆固醇脂质沉积、炎症细胞浸润及由泡沫细胞组成的脂质条纹;与模型组比较,益气通脉方低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠主动脉内斑块呈不同程度减少,脂质沉积、炎症细胞及泡沫细胞亦有所减少。结果见图3。



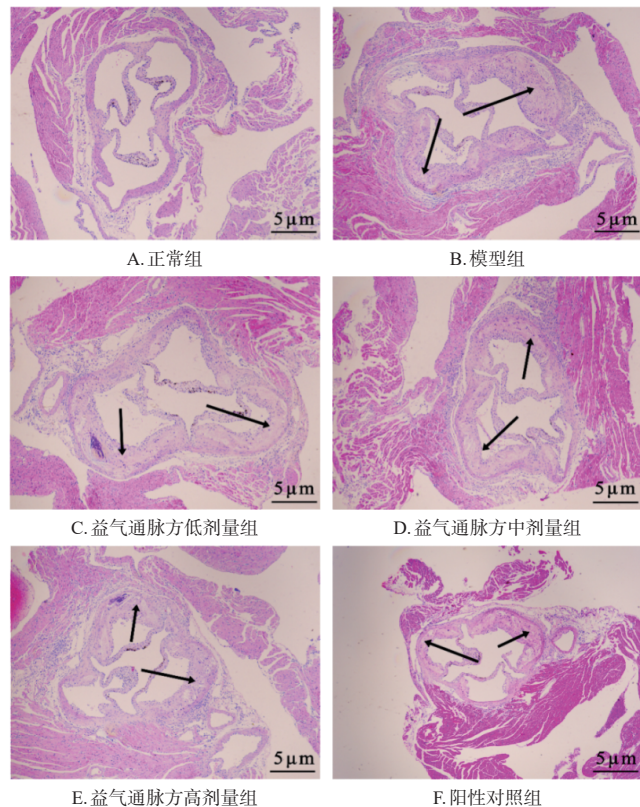
I:正常组;II:模型组;III:益气通脉方低剂量组;IV:益气通脉方中剂量组;V:益气通脉方高剂量组;VI:阳性对照组。

图1 各组小鼠主动脉斑块染色图



I:正常组;II:模型组;III:益气通脉方低剂量组;IV:益气通脉方中剂量组;V:益气通脉方高剂量组;VI:阳性对照组;a:与正常组比较, $P < 0.01$;b:与模型组比较, $P < 0.01$ 。

图2 各组小鼠主动脉斑块面积占比比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

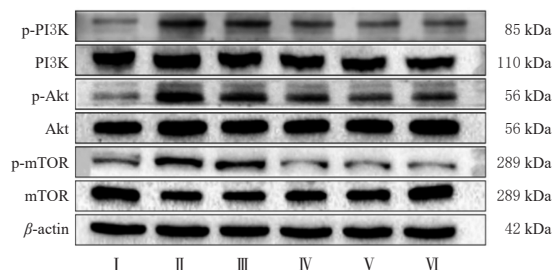


A.正常组 B.模型组 C.益气通脉方低剂量组 D.益气通脉方中剂量组 E.益气通脉方高剂量组 F.阳性对照组 箭头:斑块。

图3 各组小鼠主动脉窦病理形态学改变的显微图(HE染色)

3.5 益气通脉方对小鼠主动脉中PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠主动脉中PI3K、Akt、mTOR蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,益气通脉方中、高剂量组及阳性对照组小鼠主动脉中PI3K、Akt、mTOR蛋白的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图4、表3。



I:正常组;II:模型组;III:益气通脉方低剂量组;IV:益气通脉方中剂量组;V:益气通脉方高剂量组;VI:阳性对照组。

图4 各组小鼠主动脉中PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达的电泳图

表3 各组小鼠主动脉中PI3K、Akt、mTOR蛋白的磷酸化水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
正常组	0.49±0.04	0.43±0.10	0.46±0.09
模型组	1.09±0.22 ^a	1.00±0.04 ^a	1.01±0.15 ^a
益气通脉方低剂量组	0.83±0.07	0.89±0.06	0.80±0.18
益气通脉方中剂量组	0.70±0.05 ^b	0.67±0.07 ^b	0.63±0.14 ^b
益气通脉方高剂量组	0.59±0.10 ^b	0.62±0.12 ^b	0.59±0.13 ^b
阳性对照组	0.59±0.02 ^b	0.65±0.14 ^b	0.50±0.10 ^b

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$;c:与模型组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

AS是一种常见的血管内膜疾病,可累及主动脉、冠状动脉等所有血管,以内膜斑块增厚为主要特征,发病机制复杂^[9]。中医理论认为,AS发病机制为“湿、浊、痰、瘀”,而益气通脉方具有活血化瘀、通络泄浊的功效,可用于治疗AS及其引发的心脑血管疾病^[10]。炎症引发的血管病变是AS发生、发展的主要因素。基于此,本实验以ApoE^{-/-}小鼠为对象,通过高脂饲料喂养建立AS模型,结果显示,与正常组比较,模型组小鼠血管壁内斑块明显,脂质堆积增多,表明造模成功。此外,HE染色结果显示,正常组小鼠主动脉外膜、中膜及内膜层次清晰,血管内膜平滑完整,未见斑块沉积;模型组小鼠主动脉内膜明显增厚,斑块明显且斑块内可见大量胆固醇脂质沉积、炎症细胞浸润及由泡沫细胞组成的脂质条纹;与模型组比较,益气通脉方低、中、高剂量组及阳性对照组小鼠主动脉斑块呈不同程度减少,脂质沉积、炎症细胞及泡沫细胞亦有所减少,表明益气通脉方可减轻AS大鼠主动脉的炎症,减少脂质沉积。

脂质代谢失衡和炎症反应是AS发展的关键因素,改善脂质沉积和炎症反应对AS的治疗具有重要意义^[11]。TNF- α 和IL-1 β 是典型的促炎因子,其产生/释放与AS的形成和发展密切相关^[12]。MCP-1是AS炎症级联反应的起始细胞因子,可激活单核细胞在血管损伤部位的过度聚集,从而诱导AS的形成和发展^[11]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组小鼠血清中TC、TG、LDL-C水平以及TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1含量均显著升高,HDL-C含量显著降低;与模型组比较,益气通脉方中、高剂量组及阳性对照组小鼠血清中TC、TG、LDL-C水平以及炎症因子TNF- α 、IL-6、MCP-1(含益气通脉方低剂量组)含量均显著降低,益气通脉方高剂量组小鼠血清中HDL-C含量显著升高,表明益气通脉方可有效改善AS小鼠的血脂水平,减轻其炎症反应,延缓斑块的发展。

PI3K/Akt/mTOR是一条细胞内信号转导通路,PI3K的激活可促使下游Akt发生磷酸化,后者可调控一系列因子的表达,进而触发mTOR的磷酸化^[13]。该信号通路被激活后,可上调多个炎症相关基因的表达。Ji等^[14]研究发现,白藜芦醇抗AS的作用可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路有关。本研究结果显示,与正常组比较,模型组小鼠主动脉中PI3K、Akt、mTOR蛋白的磷酸化水平均显著升高,表明PI3K/Akt/mTOR信号通路被激活;经益气通脉方干预后,小鼠主动脉中PI3K、Akt、mTOR蛋白的磷酸化水平均显著降低,表明该方可抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活。

综上所述,益气通脉方可改善AS小鼠的脂质代谢,减轻炎症反应,延缓斑块发展,上述作用可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路激活有关。但本研究尚未采用PI3K/Akt/mTOR信号通路激活剂进行验证,后续本课题组将进一步完善实验设计,深入探讨益气通脉方干预AS的作用机制,为该方的临床应用提供参考依据。

参考文献

- [1] SONG T, CHEN W D. Berberine inhibited carotid atherosclerosis through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Bioengineered, 2021, 12(1):8135-8146.
- [2] LIU R Y, SUN Y, DI D, et al. PI3K/Akt/SERBP-1 pathway regulates *Alisma orientalis* beverage treatment of atherosclerosis in ApoE^{-/-} high-fat diet mice[J]. Pharm Biol, 2023, 61(1):473-487.
- [3] 林泉. 西洋参丹参配伍调控PI3K/Akt/NF- κ B通路稳定动脉粥样硬化易损斑块的作用机制研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2021.

LIN Q. Study on the mechanism of regulating PI3K/Akt/

- NF- κ B pathway by compatibility of Radix Panacis Quinquefolii and Radix Salviae Miltiorrhizae in stabilizing vulnerable atherosclerotic plaques[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2021.
- [4] 庞伯通, 南淞华, 陈芳芳, 等. 益气通脉方联合阿托伐他汀治疗缺血性中风恢复期气虚血瘀型合并颈动脉粥样硬化斑块[J]. 医药导报, 2023, 42(10): 1511-1516.
- PANG B T, NAN S H, CHEN F F, et al. Effect of Yiqi tongmai formula combined with atorvastatin in the treatment of carotid atherosclerotic plaque complicated by qi deficiency and blood stasis in the recovery period of ischemic stroke[J]. Her Med, 2023, 42(10): 1511-1516.
- [5] 宋鹏鹏. 益气通脉方对缺血性中风恢复期(气虚血瘀痰阻型)的临床疗效分析及评价[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2020.
- SONG P P. Analysis and evaluation of the clinical efficacy of Yiqi tongmai recipe in the recovery period of ischemic stroke (qi deficiency, blood stasis and phlegm resistance type)[D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2020.
- [6] WANG N D, ZHANG X F, MA Z, et al. Combination of tanshinone II_A and astragaloside IV attenuate atherosclerotic plaque vulnerability in ApoE^{-/-} mice by activating PI3K/Akt signaling and suppressing TLR4/NF- κ B signaling[J]. Biomedicine Pharmacother, 2020, 123: 109729.
- [7] 马晓宇, 钊浩然, 乔会林, 等. 芳香新塔花总黄酮调控 PI3K/Akt/mTOR 通路改善动脉粥样硬化的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(2): 465-471.
- MA X Y, ZHAO H R, QIAO H L, et al. Mechanism of total flavonoids of *Ziziphora clinopodioides* in improving atherosclerosis by regulating PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(2): 465-471.
- [8] 王姝瑞, 张翌蕾, 焦伟杰, 等. 益气通脉方对动脉粥样硬化模型小鼠血清代谢组学的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(17): 1788-1793.
- WANG S R, ZHANG Y L, JIAO W J, et al. Effects of Yiqi tongmai recipe on serum metabolomics of atherosclerotic mice[J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(17): 1788-1793.
- [9] WANG J C, HU K L, CAI X Y, et al. Targeting PI3K/Akt signaling for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(1): 18-32.
- [10] 刘姚钰菁, 沈月红, 瞿旻晔, 等. 从“脉生痰核”理论及脂质炎症学说辨治动脉粥样硬化[J/OL]. 中药药理与临床, 2024; 1-18[2024-07-30]. <http://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20240612.003>.
- LIU Y Y Q, SHEN Y H, QU Y Y, et al. Treatment of atherosclerosis from the theory of “pulse-generated phlegm nuclei” and the theory of lipid inflammation[J/OL]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2024; 1-18[2024-07-30]. <http://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20240612.003>.
- [11] 尹丽梅, 袁建, 陈楷, 等. 解毒活血方调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化小鼠斑块稳定性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(12): 112-120.
- YIN L M, YUAN J, CHEN K, et al. Jiedu huoxue prescription affects plaque stability in ApoE^{-/-} atherosclerosis mice by modulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(12): 112-120.
- [12] 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.
- [13] WANG Y, LI Y J, LIU D X. Erythropoietin promoted intraplaque angiogenesis by PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in atherosclerosis[J]. Tissue Cell, 2023, 82: 102084.
- [14] JI W G, SUN J, HU Z H, et al. Resveratrol protects against atherosclerosis by downregulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in atherosclerosis model mice [J]. Exp Ther Med, 2022, 23(6): 414.

(收稿日期: 2024-03-19 修回日期: 2024-08-18)

(编辑: 邹丽娟)