

## 基于胆固醇逆转运探讨泽泻白术配伍改善 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化的作用

吕昕儒<sup>1</sup>, 魏伟<sup>2,3</sup>, 王夏蕾<sup>1</sup>, 杨景达<sup>1</sup>, 林志诚<sup>2,3</sup>, 王君<sup>2,3</sup>, 王宏<sup>2,3</sup>, 薛偕华<sup>2,3</sup>

(1. 福建中医药大学康复医学院, 福建省福州市 350122; 2. 福建中医药大学附属康复医院神经康复科, 福建省福州市 350003; 3. 福建省康复技术重点实验室, 福建省福州市 350003)

[关键词] 泽泻白术配伍; 胆固醇逆转运; 动脉粥样硬化; 沉默信息调节因子 1; 肝 X 受体  $\alpha$ ; ATP 结合盒转运体 A1; B 族 I 型清道夫受体

[摘要] 目的 探讨泽泻白术配伍改善 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化(As)及其与胆固醇逆转运的相关性。方法 高脂饮食喂养 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠构建 As 动物模型, 随后以泽泻白术配伍干预。超声测量颈总动脉管壁厚度和管腔直径, HE 染色检测动脉形态学改变, 油红 O 染色观察肝脏内脂质沉积情况, ELISA 检测血清肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 含量, 全自动生化分析仪检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)水平, Western blot 检测肝脏内的胆固醇逆转运蛋白如沉默信息调节因子 1 (SIRT1)、肝 X 受体  $\alpha$  (LXR $\alpha$ )、ATP 结合盒转运体 A1 (ABCA1) 和 B 族 I 型清道夫受体(SR-B I) 的表达。结果 泽泻白术配伍显著改善模型鼠的颈总动脉管壁厚度和管腔直径, 抑制模型鼠血清炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-2 和 MMP-9 的表达, 降低 TC、TG 和 LDL 水平, 增加 HDL 表达, 促进肝脏内的胆固醇逆转运相关蛋白 SIRT1、LXR $\alpha$ 、ABCA1 和 SR-B I 表达, 减轻脂质在肝脏的沉积。结论 泽泻白术配伍可能通过 SIRT1-LXR $\alpha$ -ABCA1/SR-B I 通路促进胆固醇逆转运, 减轻肝脏内脂质沉积, 改善炎症反应, 抑制血管壁增厚和血管狭窄, 从而发挥抗 As 作用。

[中图分类号] R5; R28

[文献标识码] A

### To explore effect of Alisma combined with Atractylodes macrocephala on atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice with reverse cholesterol transport

LYU Xinru<sup>1</sup>, WEI Wei<sup>2,3</sup>, WANG Xialei<sup>1</sup>, YANG Jingda<sup>1</sup>, LIN Zhicheng<sup>2,3</sup>, WANG Jun<sup>2,3</sup>, WANG Hong<sup>2,3</sup>, XUE Xiehua<sup>2,3</sup>

(1. Rehabilitation Medical College, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China; 2. Department of Neurorehabilitation, the Affiliated Rehabilitation Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China; 3. Fujian Key Lab of Rehabilitation Technology, Fuzhou, Fujian 350003, China)

[KEY WORDS] alisma decoction; reverse cholesterol transport; atherosclerosis; silent information regulator protein 1; liver X receptor  $\alpha$ ; ATP-binding cassette transporter A1; scavenger receptor class B type I

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of the compatibility of Alisma and Atractylodes on relieving atherosclerosis (As) in ApoE<sup>-/-</sup> mice and the correlation with reverse cholesterol transport. **Methods** ApoE<sup>-/-</sup> mice were fed with a high-fat diet to construct an animal model of As and treated with Alisma and Atractylodes. The wall thickness, lumen diameter of common carotid artery were measured by ultrasound. HE staining was used to observe the morphology of the artery, and lipid deposition in the liver was observed by oil red O staining. Inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were test by ELISA, and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and blood lipid components serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein

[收稿日期] 2020-06-29

[修回日期] 2020-10-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81774380, 81473744); 中央引导地方科技发展专项项目(2018L3009)

[作者简介] 吕昕儒, 硕士研究生, 主要从事脑血管病和神经康复研究, E-mail 为 1056381510@qq.com。通信作者薛偕华, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脑血管病临床和基础研究, E-mail 为 465356738@qq.com。

(LDL) and high density lipoprotein(HDL) were analyzed by automatic biochemical analyser. Western blot was used to quantify the expression of silent information regulator protein 1(SIRT1), liver X receptor  $\alpha$ (LXR $\alpha$ ), ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1) and scavenger receptor class B type I(SR-B I) in the ApoE<sup>-/-</sup> mice liver. **Results** The compatibility of Alisma and Atractylodes not only significantly repressed the wall thickness, lumen diameter of the common carotid in ApoE<sup>-/-</sup> mice, but also reduced the deposition of lipids in the ApoE<sup>-/-</sup> mice liver. Treatment with Alisma decoction caused a drop in serum MMP-2, MMP-9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TC, TG, LDL and increase in serum HDL. The expression of SIRT1, LXR $\alpha$ , ABCA1 and SR-B I were markedly up-regulated in the ApoE<sup>-/-</sup> mice liver treated with Alisma and Atractylodes. **Conclusion** It was suggested that the compatibility of Alisma and Atractylodes promoted reverse cholesterol transport to reduce liver lipid deposition, suppressed inflammation and improved the morphology of artery via SIRT1-LXR $\alpha$ -ABCA1/SR-B I pathway. It exerted the protective effect in the occurrence and development of As.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是导致心脑血管疾病的主要病因,大量异常代谢的脂质不断地进入血管内膜引发血管壁炎症反应,促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)迁移和增殖,造成血管壁增厚及管腔狭窄,最终形成 As<sup>[1]</sup>。脂质入侵血管及诱发的炎症是 As 发生发展的主要因素,促进脂质、胆固醇有效排出及抑制炎症可以起到防治 As 的目的。越来越多的证据显示,胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)是将体内异常代谢的脂质转运到肝脏代谢转化成胆汁,并通过肠道排出体外的过程<sup>[2-3]</sup>,同时抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )等炎症因子的释放<sup>[4-5]</sup>,在防治 As 进程中发挥关键的作用。ATP 结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)作为一种转运蛋白,被证实是介导体内 RCT 的主要分子<sup>[6]</sup>。B 族 I 型清道夫受体(scavenger receptor class B type I, SR-B I)是高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)代谢的调控受体,通过与 HDL 配对介导细胞选择性摄取 HDL-胆固醇酯,促进胆固醇从细胞内流出,还是防止游离胆固醇在动脉壁中的沉积,是 RCT 强弱的主要标志之一<sup>[7]</sup>。但 ABCA1 和 SR-B I 的表达受多种生物活性分子的调控,其中肝 X 受体 $\alpha$ (liver X receptor  $\alpha$ , LXR $\alpha$ )调控能力最强。LXR $\alpha$  是 RCT 过程中起关键调节作用的转录因子<sup>[8]</sup>,是胆固醇代谢的传感器,当细胞中胆固醇含量增高时,它们被激活并促进胆固醇外排基因 ABCA1 的转录及表达<sup>[9]</sup>,还能够激活 SR-B I 增强游离胆固醇的外排能力<sup>[10]</sup>。沉默信息调节因子 1(silent information regulator protein 1, SIRT1)作为乙酰化酶,乙酰化激活肝脏中的 LXR $\alpha$ ,提高其在肝脏中的表达,进而激活 ABCA1 介导 RCT 过程,增强胆固醇在肝脏中的逆转运;同时 SIRT1 还能通过抑制

MMP-2、MMP-9、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子的分泌<sup>[11]</sup>,从而起到抗 As 的作用。故通过调节 SIRT1 的表达,激活 LXR $\alpha$ -ABCA1/SR-B I 介导的 RCT,可以减少脂质在血管壁及肝脏内的沉积及炎症反应,发挥抗 As 的作用。

泽泻和白术配伍,出自《金匮要略》,具有降血脂、抗 As 等多种药理作用,临床上长期用于高脂血症、心脑血管等疾病的治疗<sup>[12]</sup>。前期课题组研究发现泽泻白术配伍可以促进巨噬细胞源性泡沫细胞内 LXR $\alpha$ 、ABCA1 的表达,减轻泡沫细胞内的脂质沉积<sup>[13]</sup>,提示泽泻白术配伍具有启动 RCT 改善 As 的可能性。故本研究利用高脂饮食的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠构建 As 动物模型,在活体动物水平探讨泽泻白术配伍对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 As 的影响及其与 RCT 的相关性,明确泽泻白术配伍抗 As 的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂与仪器

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠(南京大学动物研究所);高脂饲料(21%脂肪,0.15%胆固醇,江苏美迪森生物医药有限公司,MD12015);BS-2000M 全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);SIRT1、LXR $\alpha$  和 ABCA1 抗体(Cell Signaling Technology 公司);SR-B I 抗体(Abcam 公司);GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/抗鼠二抗(武汉博士德有限公司);抗体稀释液(北京碧云天有限公司);PVDF 膜(Millipore 公司);TC、TG、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、HDL、MMP-2、MMP-9、TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  的 ELISA 检测试剂盒(武汉博士德有限公司);苏木精-伊红染色试剂盒(北京碧云天有限公司);油红 O 染色试剂盒(南京建成生物技术有限公司);动物超声(Vevo 2100, Canada)。

### 1.2 泽泻白术配伍药剂的制备

泽泻白术配伍组成(泽泻:白术为 5:2),购自

福建中医药大学附属康复医院药剂科, 泽泻、白术剂量按《金匱要略》原方剂量比例制剂并提供; 以上药物均经过鉴定, 符合《中华人民共和国药典》2005年版有关规定。参考中药药理实验方法学(李仪奎著, 上海科学技术出版社)制备不同浓度的生药: 头煎加水量为药量的6倍, 浸泡1 h, 煎20 min; 二煎加水量为药物的4倍, 煎0.5 min, 两次药液混合, 浓缩成药剂(相当于生药材2.4 g/mL), 4℃冰箱储存备用。

### 1.3 动物分组及给药

将 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠喂以普通颗粒饲料, 经适应性饲养1周后, 18只 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠随机分为普通饮食组( $n=6$ )、高脂饮食组( $n=6$ )、泽泻白术配伍组( $n=6$ )。实验动物在温度20~25℃、湿度40%~70%、昼夜明暗交替12 h的环境下饲养, 普通饮食组喂普通饮食, 高脂饮食组和泽泻白术配伍组喂高脂饮食, 7周后泽泻白术配伍组予以泽泻白术配伍干预, 普通饮食组及高脂饮食组喂等体积的生理盐水, 干预7周后取材进行试验。

### 1.4 超声检测小鼠颈总动脉的血管壁厚度及管腔直径

用4%异氟烷气体麻醉 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠后, 用脱毛膏脱净小鼠颈部和腹部毛发, 将小鼠固定于恒温检查台上, 1%~2%异氟烷维持小鼠心率在300~400次/分, 使用 Vevo 2100 小动物超声成像系统进行检测, 在小鼠颈部和腹部皮肤均匀涂抹超声耦合剂, 将 MS400 探头分别置于左右颈总动脉处, 采集 B 模式图像和 M 模式图像, 结果使用 Vevo 2100 分析系统进行分析, 计算管壁厚度和管腔直径。

### 1.5 全自动生化分析仪检测小鼠的血脂水平

将 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠用10%水合氯醛麻醉后, 摘眼球取血, 放置2 h后, 血液出现分层且有无色透明液体析出时, 将血样置于超低温高速离心机, 4℃、3 000 r/min 离心15 min, 提取上层血清。BS-2000M 全自动生化分析仪检测 TC、TG、LDL 和 HDL 水平。

### 1.6 ELISA 检测小鼠血清炎症因子水平

将 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠用10%水合氯醛麻醉后, 摘眼球取血, 放置2 h后, 血液出现分层且有无色透明液体析出时, 将血样置于超低温高速离心机, 4℃、3 000 r/min 离心15 min, 提取上层血清。ELISA 试剂盒检测炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-2 和 MMP-9 水平, 使用 TECAN M200 多功能酶标仪进行检测。

### 1.7 小鼠动脉血管 HE 染色

将 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠处死后快速分离出动脉血管,

PBS 清洗干净, 预冷的4%多聚甲醛固定24~48 h, 15%、20%、30%的蔗糖梯度脱水, OCT 包埋剂包埋后于-80℃保存。冰冻切片厚度15  $\mu$ m, 苏木精-伊红染色, 封片, 用光学显微镜拍片。

### 1.8 小鼠肝脏油红 O 染色

将 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠处死后快速分离出肝脏组织, PBS 清洗干净, 预冷的4%多聚甲醛固定24~48 h, 15%、20%、30%的蔗糖梯度脱水, OCT 包埋剂包埋后于-80℃保存。冰冻切片厚度15  $\mu$ m, 油红 O 及苏木精-伊红染色, 封片, 用光学显微镜拍片。

### 1.9 Western blot 检测小鼠肝脏 SIRT1、LXR $\alpha$ 、ABCA1 和 SR-B I 的表达

采用组织裂解液裂解肝脏, 获取肝脏蛋白提取物。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂测定各组总蛋白浓度。各组取30  $\mu$ g 蛋白样品于10% SDS-PAGE 凝胶中电泳分离, 电转蛋白质至0.45  $\mu$ m 孔径的 PVDF 膜, 用 BSA 封闭液室温封闭2 h, 然后与特异性抗体 SIRT1、LXR $\alpha$ 、ABCA1 和 SR-B I 在原发性抗体稀释液(1:1 000)中, 4℃孵育过夜, TBST 洗膜3次, 每次10 min; 相应 HRP 标记二抗(1:3 000)室温孵育1 h, TBST 清洗3次。过氧化物酶活性采用 hemiDoc XRS+ 系统(Bio-Rad 公司)化学发光试剂盒检测, 并采用 Image-Lab version 3.0 软件定量分析。

### 1.10 统计学分析

所有实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组均数间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 泽泻白术配伍对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠颈总动脉管壁厚度和管腔直径的影响

与普通饮食组比, 高脂饮食组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠颈总动脉管壁明显增厚( $P<0.05$ ); 颈总动脉管腔直径显著减小( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。而泽泻白术配伍组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠颈总动脉管壁厚度明显变薄( $P<0.05$ ), 颈总动脉管腔直径明显增加( $P<0.05$ ; 图1)。

### 2.2 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的血脂水平

与普通饮食相比, 高脂饮食组 TC、TG、LDL 水平明显升高, HDL 则显著降低( $P<0.05$ ); 泽泻白术配伍组 TC、TG、LDL 水平较高脂饮食组显著下降, HDL 水平升高( $P<0.05$ ; 图2)。

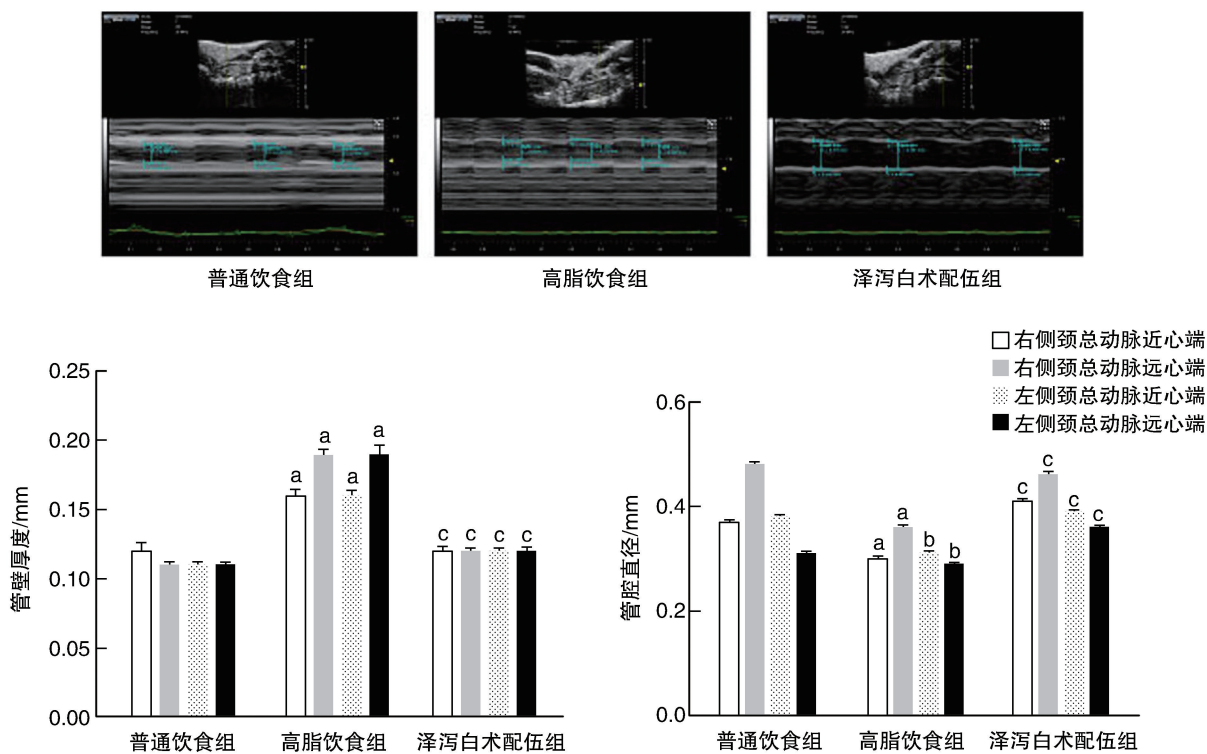


图 1. 超声检测 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠双侧颈总动脉管壁厚度和管腔直径 (n=6)

a 为 P<0.01, b 为 P<0.05, 与普通饮食组比较; c 为 P<0.05, 与高脂饮食组比较。

Figure 1. The wall thickness, lumen diameter of bilateral common carotid artery in ApoE<sup>-/-</sup> mice was detected by ultrasound (n=6)

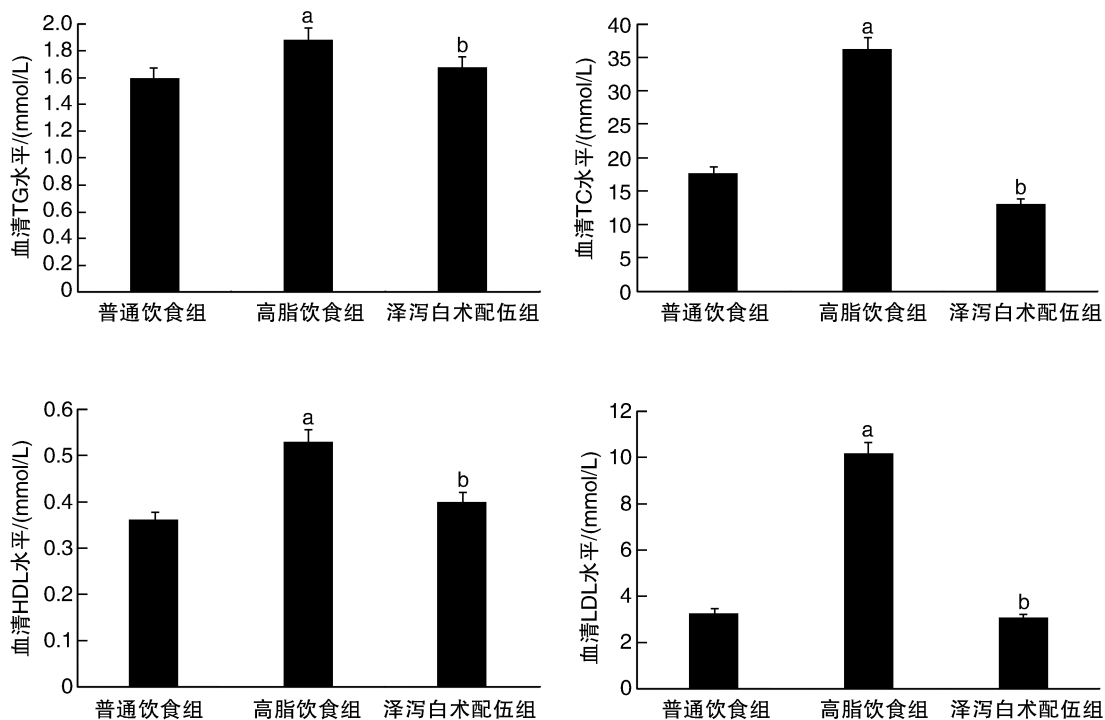


图 2. 血清 TG、TC、LDL、HDL 水平 (n=6)

a 为 P<0.05, 与普通饮食组比较; b 为 P<0.05, 与高脂饮食组比较。

Figure 2. Serum levels of TC, TG, LDL and HDL (n=6)

### 2.3 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-2 和 MMP-9 水平

与普通饮食组相比,高脂饮食促进 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-2 和 MMP-9 在血清中的分泌 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ );但泽泻白术配伍干预后可抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-2 和 MMP-9 的分泌 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  ;图 3)。

### 2.4 泽泻白术配伍对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠颈总动脉的病理学改变的影响

与普通饮食组相比,高脂饮食组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血管壁增厚,内膜不平滑,但泽泻白术配伍干预后能够抑制动脉血管壁增厚,改善内膜平整度(图 4)。

### 2.5 泽泻白术配伍对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏脂质沉积的影响

与普通饮食组相比,高脂饮食组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏小叶不清晰,结构紊乱,内有大量脂滴沉积;泽泻白术配伍干预后其肝脏组织排列紊乱情况好转,脂质沉积情况明显改善(图 5)。

### 2.6 泽泻白术配伍对肝脏 SIRT1、LXR $\alpha$ 、ABCA1 和 SR-B I 表达的影响

高脂饮食组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏 SIRT1、LXR $\alpha$ 、ABCA1 和 SR-B I 水平较普通饮食组明显降低,泽泻白术配伍干预后肝脏 SIRT1、LXR $\alpha$ 、ABCA1 和 SR-B I 水平较高脂饮食组显著升高 ( $P < 0.05$  ;图 6)。

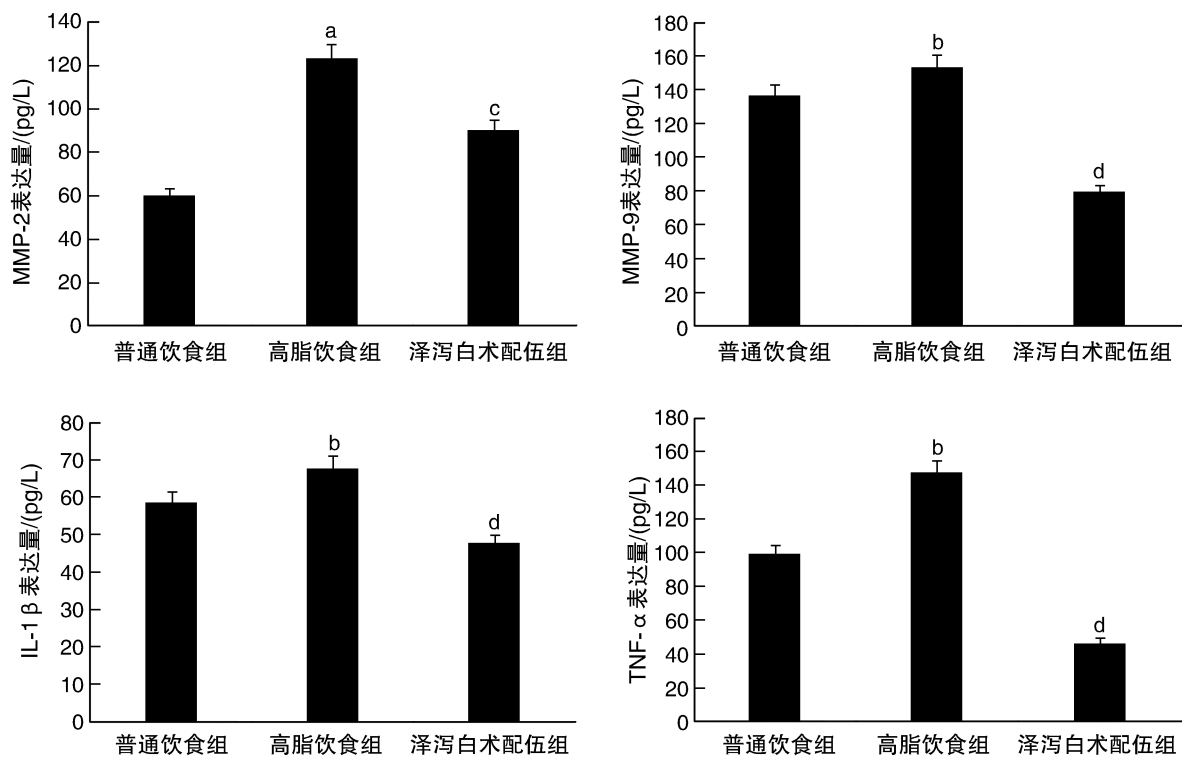


图 3. 血清 MMP-2、MMP-9、IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平 ( $n=6$ )

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与普通饮食组比较; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与高脂饮食组比较。

Figure 3. Serum expression of MMP-2, MMP-9, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  ( $n=6$ )

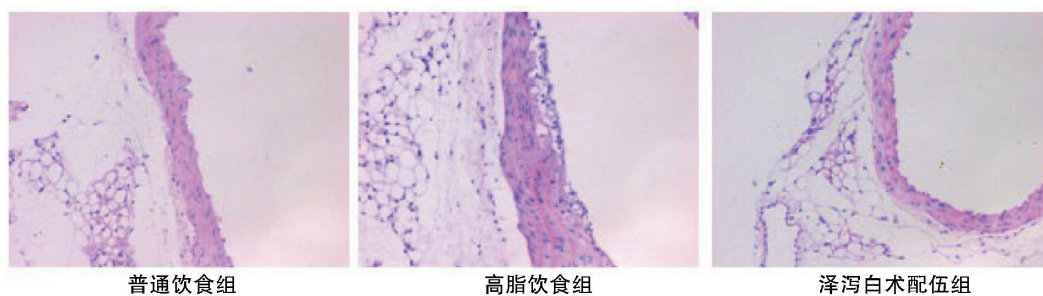
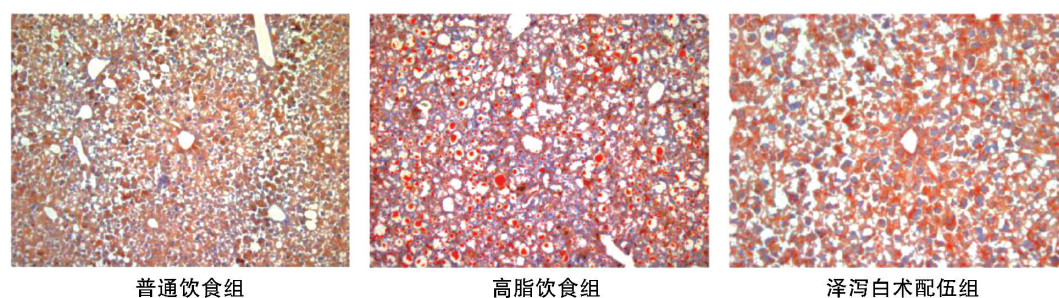
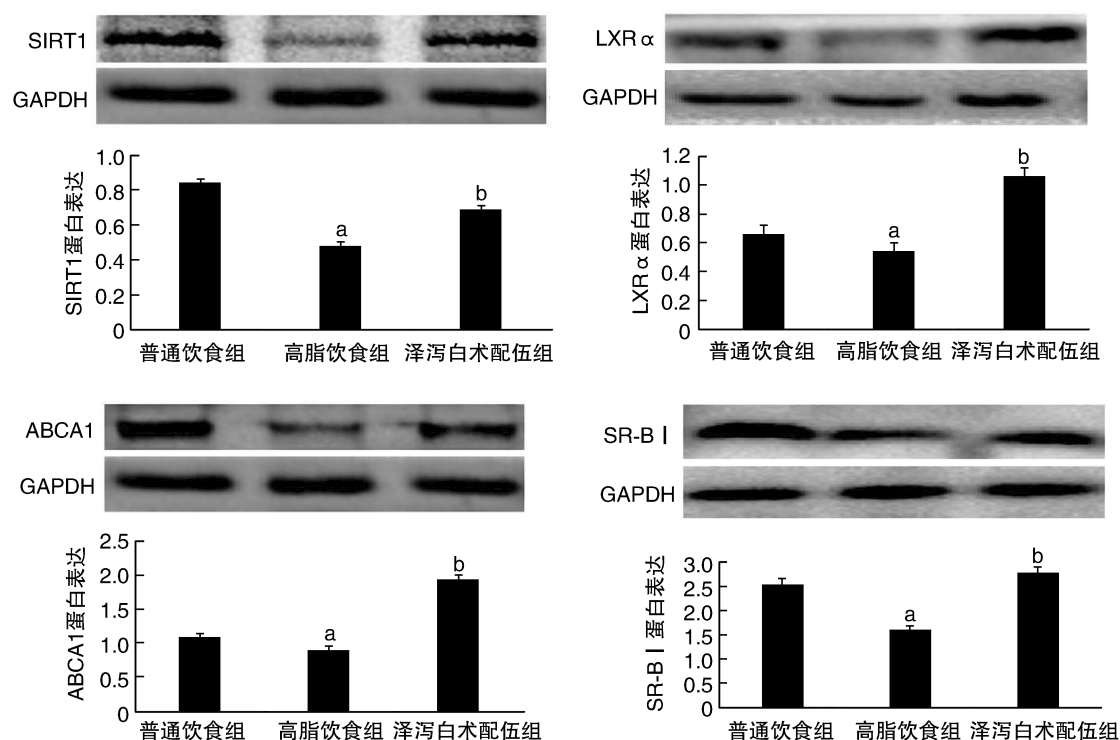


图 4. ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉血管 HE 染色 (100 $\times$ )

Figure 4. Representative HE-stained arteries obtained from ApoE<sup>-/-</sup> mice (100 $\times$ )

图 5. ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏油红 O 染色(100×)Figure 5. Representative oil red O staining liver obtained from ApoE<sup>-/-</sup> mice (100×)图 6. 肝脏 SIRT1、LXR $\alpha$ 、ABCA1 和 SR-B I 蛋白的表达( $n=6$ )a 为  $P<0.05$ , 与普通饮食组比较; b 为  $P<0.05$ , 与高脂饮食组比较。Figure 6. The expression of SIRT1, LXR $\alpha$ , ABCA1 and SR-B I in liver ( $n=6$ )

### 3 讨论

泽泻白术配伍是一个经典的中药方剂,具有降血压、调节脂质代谢和抗 As 等临床功效<sup>[14]</sup>。研究表明,当泽泻、白术依照 5:2 的配比混合使用时能够有效地降低血脂及抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子的表达<sup>[15]</sup>。但其抗 As 分子机制尚未阐明,是否通过调节脂质代谢及抗炎需进一步明确。

本研究采用高脂饮食喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠构建 As 动物模型,并采用泽泻白术配伍干预,检测 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的大动脉形态,结果发现泽泻白术配伍可以抑制 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的血管壁增厚,改善体内主要大动脉

的管腔直径,明确了泽泻白术配伍在活体动物水平有抗 As 的功效。结合课题组前期体外研究发现泽泻白术配伍可以促进 RCT 的主要分子 ABCA1 和 LXR $\alpha$  的表达,减轻脂质在泡沫细胞内沉积<sup>[16]</sup>,提示在活体水平泽泻白术配伍有通过 RCT 发挥抗 As 作用的潜在可能。

长期的高脂饮食导致脂质在体内过度积累,促进 As 的发生和发展<sup>[17]</sup>。体内胆固醇过载时,被肝脏捕获并吞噬转变为游离胆固醇,最终转化为胆汁经胆管排到肠道,混入肠道内容物排泄体外,即 RCT 过程<sup>[18-20]</sup>。RCT 既可以减少脂质在体内的堆积、维持胆固醇的体内平衡,还能够抑制动脉管壁

的脂质沉积,改善血管壁重构<sup>[5,21]</sup>。ABCA1 主要是通过增加 HDL 的表达,强化与 TG 的脂肪交换,促进游离胆固醇转运外排,改善脂质代谢过程中的分子结构。此外,SR-B I 是 RCT 的重要调控因子,其广泛分布于人体的各种组织细胞表面,肝脏表达量最高,肝脏细胞表面的 SR-B I 选择性摄取脂质,介导胆固醇从肝脏转运至胆汁,最后通过粪便排出体外,同时 SR-B I 的高表达对动脉血管有明显的保护作用<sup>[22-23]</sup>。故 SR-B I 是介导 RCT 及判断 RCT 强弱的主要分子生物指标。因此 ABCA1 和 SR-B I 是 RCT 转运效率的关键调控因子<sup>[24-25]</sup>。本研究通过高脂饮食喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,其血清 TC、TG 和 LDL 明显升高,HDL 水平及肝脏中 ABCA1、SR-B I 较普通饮食组明显降低,RCT 效率下降,脂质在肝脏内沉积明显;泽泻白术配伍干预后模型鼠体内血脂 TC、TG 和 LDL 水平降低,HDL 水平显著提高,肝脏中 ABCA1 和 SR-B I 表达增加,肝脏内脂质沉积显著改善;以上结果表明泽泻白术配伍可以通过 ABCA1 和 SR-B I 介导的 RCT 促进胆固醇外排降低体内血脂水平而发挥抗 As 作用。此外,研究发现 LXR $\alpha$  能够促进 ABCA1/SR-B I 的表达,增强 RCT 功效<sup>[9-10]</sup>,本研究也证实了泽泻白术配伍干预后模型鼠肝脏 LXR $\alpha$  表达量升高,进一步明确了泽泻白术配伍通过 LXR $\alpha$ -ABCA1/SR-B I 介导 RCT 而发挥抗 As 的作用。

SIRT1 主要依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸/NADH 的信号转导来发挥作用,通过多种转录因子调节蛋白表达,参与各种细胞生理功能的调控<sup>[26-29]</sup>。近来研究发现 SIRT1 与 As 密切相关,SIRT1 的缺乏会导致血脂代谢异常,从而促进 As<sup>[30]</sup>;而当 SIRT1 功能活性正常时,与 LXR $\alpha$  相互作用使其脱乙酰化并激活,激活的 LXR $\alpha$  增强体内 RCT 功效而抗 As<sup>[31-32]</sup>。本研究结果发现高脂饮食喂养模型鼠,其肝脏 SIRT1、LXR $\alpha$ 、ABCA1 及 SR-B I 表达较普通饮食组明显下降,但泽泻白术配伍干预后模型鼠肝脏 SIRT1、LXR $\alpha$ 、ABCA1 及 SR-B I 的表达明显升高,明确泽泻白术配伍通过增强 SIRT1 乙酰化 LXR $\alpha$  能力,激活 ABCA1/SR-B I 介导的 RCT,促进胆固醇外排,减少脂质在体内堆积,最终达到抗 As 的作用。

RCT 促进胆固醇外排的同时还会抑制 MMP、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子的分泌<sup>[33-34]</sup>。正常血管中细胞外基质(ECM)是其主要成分,具有支撑细胞和维持组织的生理结构和功能的作用,能够限制正常 VSMC 移入内膜,但脂质侵入血管内膜,激活和分泌

大量 MMP、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  炎症因子,破坏 ECM,促进 VSMC 表型转化并从中膜向内膜浸润迁移和增殖,导致血管狭窄而加速 As 发展<sup>[35-36]</sup>,而 RCT 过程可以抑制炎症因子的分泌而阻止血管狭窄。MMP 家族中 MMP-2 和 MMP-9 与 As 关系密切,通过降解 ECM 及增强 VSMC 的迁移增殖能力,导致血管壁增厚和管腔狭窄<sup>[37]</sup>,近来研究表明 SIRT1 通过抑制 MMP 的表达,减少 ECM 的降解及 VSMC 的增殖和迁移,缓解血管狭窄<sup>[38]</sup>。SIRT1 还可以乙酰化 Rel A/p65,阻断其与 NF- $\kappa$ B 启动子的结合,抑制 NF- $\kappa$ B 的活化,干扰 NF- $\kappa$ B 信号通路转导,抑制下游 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子的分泌,阻断 As 炎症进程<sup>[11,39-40]</sup>。由此可见,SIRT1 是衔接 RCT 及抑炎作用的核心蛋白,其可以防止血管壁增厚和血管狭窄而抗 As。此外,高脂饲料喂养大鼠后干预加味泽泻汤(由泽泻、白术及熟大黄组成)可以降低肝脏 TLR4 蛋白的表达,从而进一步抑制下游的 MyD88、p38 MAPK 及 NF- $\kappa$ B 蛋白的合成及活化,改善肝脏炎症<sup>[41]</sup>。有外国学者发现,泽泻的块茎还能通过抑制 NF- $\kappa$ B 和激活 Nrf2 减轻急性肺部炎症<sup>[42]</sup>。本研究高脂饮食喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,发现模型鼠血管壁增厚、管腔狭窄且 MMP-2、MMP-9、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  分泌程度均严重于普通饮食组,证实了长期脂质侵袭血管会促进炎症因子的分泌,加速血管壁增厚及血管腔狭窄;泽泻白术配伍干预后上调模型鼠 SIRT1 的表达,抑制 MMP-2、MMP-9、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  分泌,改善 As 严重程度,明确了泽泻白术配伍能够通过 SIRT1 改善血管壁炎症,抑制 VSMC 增殖及迁移而导致血管壁厚度的增加,防止 As 斑块的形成。

综上,本研究证实了泽泻白术配伍通过促进 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏 SIRT1、LXR $\alpha$ 、ABCA1 和 SR-B I 的表达,增强体内 RCT 的能力,改善脂质代谢水平;同时通过 SIRT1 抑制炎症因子分泌,阻止血管壁增厚和血管狭窄,最终发挥抗 As 的作用。该研究为泽泻白术配伍治疗 As 提供了理论基础及实验依据。

(致谢:感谢福建中医药大学动物研究中心提供实验小鼠饲养场地及中西医结合研究院提供实验平台)

#### [参考文献]

- [1] Summerhill VI, Grechko AV, Yet SF, et al. The atherogenic role of circulating modified lipids in atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3561.
- [2] Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells

- has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis[J]. *Nat Med*, 2015, 21(6): 628-637.
- [3] Van Eck M. ATP-binding cassette transporter A1: key player in cardiovascular and metabolic disease at local and systemic level[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(4): 297-303.
- [4] Sonett J, Goldklang M, Sklepkiewicz P, et al. A critical role for ABC transporters in persistent lung inflammation in the development of emphysema after smoke exposure[J]. *FASEB J*, 2018, 32(12): fj201701381.
- [5] Ou X, Gao JH, He LH, et al. Angiopoietin-1 aggravates atherosclerosis by inhibiting cholesterol efflux and promoting inflammatory response[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(2): 158535.
- [6] Westerterp M, Gautier EL, Ganda A, et al. Cholesterol accumulation in dendritic cells links the inflammasome to acquired immunity [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(6): 1294-1304.
- [7] Valacchi G, Sticozzi C, Lim Y, et al. Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1229: E1-E7.
- [8] Costet P, Luo Y, Wang N, et al. Sterol-dependent trans-activation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(36): 28240-28245.
- [9] Feng T, Liu P, Wang X, et al. SIRT1 activator E1231 protects from experimental atherosclerosis and lowers plasma cholesterol and triglycerides by enhancing ABCA1 expression[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 274: 172-181.
- [10] Greffhorst A, Oosterveer MH, Brufau G, et al. Pharmacological LXR activation reduces presence of SR-B I in liver membranes contributing to LXR-mediated induction of HDL-cholesterol[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 222(2): 382-389.
- [11] Zhou Y, Cao ZQ, Wang HY, et al. The anti-inflammatory effects of Morin hydrate in atherosclerosis is associated with autophagy induction through cAMP signaling[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017. DOI: 10.1002/mnfr.201600966.
- [12] 李莎莎, 钟利群, 夏梦幻. 泽泻汤的相关研究概况[J]. *现代中医临床*, 2017, 24(04): 56-60.
- [13] Xue X, Chen T, Wei W, et al. Effects of alisma decoction on lipid metabolism and inflammatory response are mediated through the activation of the LXR $\alpha$  pathway in macrophage-derived foam cells[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(4): 971-977.
- [14] 陈兴娟, 尹萌萌, 魏建梁, 等. 泽泻在心血管疾病治疗中的应用[J]. *长春中医药大学学报*, 2014, 30(4): 620-622.
- [15] 林高城, 陈云欢, 杨莉惠, 等. 不同比例配伍泽泻汤对高脂血症大鼠血脂代谢及炎症因子影响[J]. *中国卫生标准管理*, 2018, 9(19): 112-114.
- [16] 薛偕华, 魏伟, 陈彤, 等. 泽泻汤对巨噬细胞泡沫化脂质沉积及其 LXR $\alpha$  和 ABCA1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(11): 971-976.
- [17] Hsieh V, Kim MJ, Gelissen IC, et al. Cellular cholesterol regulates ubiquitination and degradation of the cholesterol export proteins ABCA1 and ABCG1 [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(11): 7524-7536.
- [18] Lee-Rueckert M, Blanco-Vaca F, Kovanen PT, et al. The role of the gut in reverse cholesterol transport--focus on the enterocyte [J]. *Prog Lipid Res*, 2013, 52(3): 317-328.
- [19] Bashore AC, Liu M, Key CC, et al. Targeted deletion of hepatocyte Abca1 increases plasma HDL (High-Density lipoprotein) reverse cholesterol transport via the LDL (Low-Density lipoprotein) receptor [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(9): 1747-1761.
- [20] Meng XD, Yao HH, Wang LM, et al. Knockdown of GAS5 inhibits atherosclerosis progression via reducing EZH2-Mediated ABCA1 transcription in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 84-96.
- [21] Thacker SG, Rousset X, Esmail S, et al. Increased plasma cholesterol esterification by LCAT reduces diet-induced atherosclerosis in SR-BI knockout mice [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(7): 1282-1295.
- [22] Huang L, Chambliss KL, Gao X, et al. SR-B I drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis [J]. *Nature*, 2019, 569(7757): 565-569.
- [23] Korporaal SJ, Meurs I, Hauer AD, et al. Deletion of the High-Density lipoprotein receptor scavenger receptor BI in mice modulates thrombosis susceptibility and indirectly affects platelet function by elevation of plasma free cholesterol[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(1): 34.
- [24] Lake NJ, Taylor RL, Trahair H, et al. TRAK2, a novel regulator of ABCA1 expression, cholesterol efflux and HDL biogenesis[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(48): 3579-3587.
- [25] Le Lay S, Robichon C, Le Liepvre X, et al. Regulation of ABCA1 expression and cholesterol efflux during adipose differentiation of 3T3-L1 cells[J]. *J Lipid Res*, 2003, 44(8): 1499-1507.
- [26] Peng L, Yuan Z, Li Y, et al. Ubiquitinated sirtuin 1 (SIRT1) function is modulated during DNA damage-induced cell death and survival[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(14): 8904-8912.
- [27] Chattopadhyay T, Maniyadath B, Bagul HP, et al. Spatiotemporal gating of SIRT1 functions by O-GlcNAcylation

- is essential for liver metabolic switching and prevents hyperglycemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(12): 6890-6900.
- [28] Xi L, Ruan L, Yao X, et al. SIRT1 promotes pulmonary artery endothelial cell proliferation by targeting the Akt signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 179.
- [29] Lu CL, Liao MT, Yc H, et al. Sirtuin-1 and its relevance in vascular calcification [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1593.
- [30] Kitada M, Ogura Y, Koya D. The protective role of Sirt1 in vascular tissue: its relationship to vascular aging and atherosclerosis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(10): 2290-2307.
- [31] Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(37): 14855-14860.
- [32] Calkin AC, Tontonoz P. Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(8): 1513-1518.
- [33] Salminen A, Åström P, Metso J, et al. Matrix metalloproteinase 8 degrades apolipoprotein A-I and reduces its cholesterol efflux capacity[J]. *FASEB J*, 2015, 29(4): 1435-1445.
- [34] Ohashi R, Mu H, Wang X, et al. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis [J]. *QJM*, 2005, 98(12): 845-856.
- [35] Huang WC, Sala-Newby GB, Susana A, et al. Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor- $\kappa$ B[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42507.
- [36] Chen Q, Jin M, Yang F, et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling[J]. *Mediators Inflamm*, 2013; 928315.
- [37] Bäck M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52(5): 410-428.
- [38] Kim YH, Ju BE, Lee SJ, et al. SIRT1 attenuates PAF-induced MMP-2 production via down-regulation of PAF receptor expression in vascular smooth muscle cells [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 72: 35-42.
- [39] Zeng HT, Yc F, Yu W, et al. SIRT1 prevents atherosclerosis via liver X receptor and NF- $\kappa$ B signaling in a U937 cell model[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(1): 23-28.
- [40] Liu P, Wilson MJ. miR-520c and miR-373 upregulate MMP9 expression by targeting mTOR and SIRT1, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF- $\kappa$ B factor in human fibrosarcoma cells [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(2): 867-876.
- [41] 郭雨雅, 孙晓琦, 方晶, 等. 加味泽泻汤对NAFLD大鼠肝脏炎症信号通路相关蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(5): 90-94.
- [42] Han CW, Kwun MJ, Kim KH, et al. Ethanol extract of *Alismatis Rhizoma* reduces acute lung inflammation by suppressing NF- $\kappa$ B and activating Nrf2[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(1): 402-410.
- (此文编辑 秦旭平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 作者更正

发表在《中国动脉硬化杂志》2021年第29卷第3期《内脏脂肪指数、脂质蓄积指数与脑卒中高危人群颈动脉粥样硬化的相关性研究》一文,因作者笔误,将通信作者张允岭所在的科室写错,现更正为中国中医研究院西苑医院脑病科,并在此致歉!