

本文引用: 范增光, 袁野. 补阳还五汤加减抑制 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化病变形及降低血清炎症因子水平的机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(4): 285-292. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.04.002.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-04-0285-08

· 实验研究 ·

## 补阳还五汤加减抑制 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化病变形及降低血清炎症因子水平的机制

范增光, 袁野

江西中医药大学附属医院, 江西省南昌市 330006

[摘要] [目的] 基于 Wnt/ $\beta$  连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路探讨补阳还五汤加减通过调控血管平滑肌细胞的表型转化及血清炎症因子水平, 发挥抗动脉粥样硬化(As)的作用。[方法] 将 50 只 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠随机分为模型组、补阳还五汤加减(低、中、高剂量)组及阿托伐他汀组, 每组 10 只; 10 只 C57BL/6J 小鼠设为对照组, 给予普通饲料喂养, 其余 5 组小鼠给予高脂饲料喂养 8 周进行 As 模型复制, 第 9 周开始灌胃, 连续灌胃 4 周, 12 周后分离小鼠主动脉根部, 制备石蜡切片, 油红 O 染色观察主动脉窦脂质含量; 免疫组织化学法检测骨桥蛋白(OPN)表达水平; ELISA 法检测小鼠血清中白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)的水平; Western blot 检测小鼠主动脉中 Wnt1、 $\beta$ -catenin 及 c-myc 蛋白的表达; RT-PCR 法检测小鼠主动脉中 Wnt1、 $\beta$ -catenin 基因的表达。[结果] 补阳还五汤加减(低、中、高剂量)能够降低 As 模型小鼠主动脉窦脂质含量及 OPN 表达; 降低小鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1 水平; 并可下调小鼠主动脉中 Wnt1、 $\beta$ -catenin 蛋白及基因的表达。[结论] 补阳还五汤加减通过调控炎症反应发挥抗 As 的作用, 部分机制可能与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活化有关。

[关键词] 动脉粥样硬化; 补阳还五汤加减; 平滑肌细胞表型转化; 炎症反应; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

### Study on the mechanism of Buyang Huanwu decoction in inhibiting atherosclerotic lesion formation and reducing serum inflammatory factors in ApoE<sup>-/-</sup> mice

FAN Zengguang, YUAN Ye

Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330006, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of Buyang Huanwu decoction on anti-atherosclerosis by regulating the phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells and serum inflammatory response based on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Methods** 50 ApoE<sup>-/-</sup> mice were randomly divided into model group, Buyang Huanwu decoction modified (low, medium and high dose) groups, and atorvastatin group, with 10 mice in each group; 10 C57BL/6J mice with the same genetic background were set as the control group. The mice of control group were fed with regular forages, while the mice of other five groups were fed with high-fat forages for 8 weeks for model replication. From the 9th week, they were continuously gavaged for 4 weeks. After 12 weeks, the mouse aortic roots were isolated and paraffin sections were prepared. Oil red O staining was used to observe the lipid content of aortic sinus. Immunohistochemical method was used to detect the expression level of bone bridge protein (OPN). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in serum. Western blot was used to detect the protein expressions of Wnt1,  $\beta$ -catenin and c-myc in mice aorta. RT-PCR was used to detect the expressions of Wnt1 and  $\beta$ -catenin gene. **Results** Buyang Huanwu decoction modified (low, medium and high dose) could reduce the lipid content and OPN expression in the aortic

[收稿日期] 2023-07-30

[修回日期] 2024-01-03

[基金项目] 江西省卫生健康委科技计划项目(202210760); 江西省自然科学基金项目(20224BAB216097); 江西省中医药管理局科技计划项目(2022A089)

[作者简介] 范增光, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail: 251084871@qq.com。通信作者袁野, 博士后, 副教授, 研究方向为糖尿病性动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail: 470578294@qq.com。

sinus of As model mice, reduce serum levels of IL-6 and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MCP-1 in mice, and downregulate the expression of Wnt1 and  $\beta$ -catenin protein and gene. **Conclusion** Buyang Huanwu decoction modified exerts an anti-atherosclerosis effect by regulating inflammatory response, and some of the mechanisms may be related to inhibiting the activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

[**KEY WORDS**] atherosclerosis; Buyang Huanwu decoction modified; phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells; inflammatory response; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

《中国心血管健康与疾病报告 2022》要点解读中指出,心血管疾病仍然是威胁中国人们身心健康的重要疾病<sup>[1]</sup>。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心血管疾病最常见的病理改变,是一类由于脂质和复合糖类异常积聚于动脉内壁,导致动脉硬化和继发病变的慢性代谢性炎症性病变,有着发病缓慢、病程长的特点,是心脑血管疾病的重要病理基础<sup>[2-3]</sup>。As 的发病机制复杂,研究表明,脂代谢紊乱、炎症和免疫功能障碍、平滑肌细胞表型转化及血管内皮细胞损伤在 As 的发生和发展中起着关键性作用,其中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型转化可促进 As 斑块的形成,加剧 As 病变进程,为 As 发生发展的重要条件<sup>[4-6]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 作为调控炎症的经典通路在炎症性疾病、自身免疫性疾病等研究中得到广泛探索<sup>[7-8]</sup>。亦有研究表明,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可以诱导 VSMC 的增殖、迁移,参与 As 的形成<sup>[9]</sup>。中医学认为,As 的主要病机在于正气亏虚,为发病之本;而痰、瘀等实邪为重要的致病因素,为发病之标,故针对 As 的病机,本研究以“益心祛瘀化痰法”为基本大法,选用不同剂量补阳还五汤对 As 的形成与发展进行干预,并探讨其剂量效应。本课题组前期预实验结果可知补阳还五汤具有抗炎、降脂、抑制 As 斑块形成等作用,但是具体作用机制尚未明确,故本课题以 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路为切入点,探索补阳还五汤加减调控 As 的具体机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

8 周龄雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 50 只和 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 10 只[许可证号 SCXK(京)2021-0006],体质量 18~21 g,均购于北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养于江西中医药大学动物实验室,调节温度为 20~25 °C,湿度(55%±15%),12 h 循环照明。本次动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准后执行(伦理批准号:20220521003)。

### 1.2 实验药物

补阳还五汤加减(黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 4.5 g,川芎 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g,地龙 3 g,瓜蒌 12 g,薤白 9 g,半夏 12 g,党参 9 g,麦冬 9 g,五味子 6 g),以上中药饮片皆购于江西中医药大学附属医院中药房,并严格按照中药饮片煎煮方法进行,最后合并浓缩成 1 kg/L 的浓缩液,经冷却后放置于 -4 °C 冰箱中保存备用。阿托伐他汀钙片购于江西中医药大学附属医院西药房(立普妥,辉瑞制药有限公司,国药准字:H20051408,规格 20 mg/片)。

### 1.3 实验试剂与仪器

油红 O 试剂(碧云天生物),4% 多聚甲醛(武汉塞维尔公司),Wnt1、 $\beta$ -catenin、c-myc 及骨桥蛋白(bone bridge protein, OPN)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司),小鼠白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)酶联免疫检测试剂盒(中国上海联硕生物科技有限公司)。全自动生物化学分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)、显微镜(广州明美科技有限公司)、离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)、石蜡切片机和石蜡包埋机(德国 Leica 公司)、酶标仪(芬兰雷勃公司)、移液枪(德国 Eppendorf 公司)、电子天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司)、电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)等。

### 1.4 分组、模型制备及给药

所有小鼠适应性饲养 2 周后,采用高脂饮食喂养复制 As 模型。ApoE<sup>-/-</sup>小鼠给予高脂饲料(含 15% 可可脂、2.5% 胆固醇)喂养 8 周建立 As 模型。模型制备成功后,随机分为:模型组,补阳还五汤加减低、中、高剂量组,阿托伐他汀组,每组 10 只;10 只 C57BL/6J 小鼠给予普通饲料喂养设为对照组。根据人、小鼠体表面积换算进行灌胃。对照组:灌服等体积的蒸馏水;模型组:灌服等体积的蒸馏水;补阳还五汤加减低、中、高剂量组分别灌服补阳还五汤加减 5 g/kg、10 g/kg、20 g/kg;阿托伐他汀组:灌服含阿托伐他汀钙片 2.6 mg/kg。

### 1.5 标本取材与指标检测

于实验的第 12 周末,小鼠禁食 12 h,不禁水,1%戊巴比妥溶液腹腔注射麻醉,摘取眼球取血,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清;剥离主动脉,并将周围的组织剔除干净,取主动脉及主动脉根部,一部分用 4%多聚甲醛溶液固定 24~48 h,以备后续处理;一部分放置于液氮罐中,最后放置于-80℃冰箱中保存备用。

### 1.6 油红 O 染色观察主动脉窦脂质含量

取固定好的主动脉根部,使用 PBS 缓冲液冲洗组织,在体视显微镜下将主动脉根部血管内壁切开并固定,再放入异丙醇(60%)浸泡后,置于油红 O 工作溶液中,避光染色 30 min(室温下),弃去染液,再用异丙醇(60%)漂洗主动脉,直至斑块呈现红色,背景近乎透明。将主动脉固定于黑色蜡皿上,采用立式显微镜观察染色情况并拍照。

### 1.7 免疫组织化学法检测 OPN 表达

取固定好的主动脉根部组织石蜡切片后,进行脱水、PBS 缓冲液冲洗,用 3%过氧化氢溶液洗去内源性过氧化物,再加入非免疫性动物血清,20 min 后滴加一抗,PBS 洗涤再滴加二抗,PBS 洗涤后加 ABC 复合物,再进行 DAB 显色,光镜下观察,MIAS 软件分析,通过图像分析计数阳性细胞。

### 1.8 ELISA 检测小鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1 水平

设置标准品孔和样本孔,其中标准品孔内加 50  $\mu$ L 不同浓度的标准品,在待测样品孔中事先加入 40  $\mu$ L 样品稀释液,然后加 10  $\mu$ L 待测样品,将板用密封膜密封,放置于 37℃恒温箱中孵育 30 min,用蒸馏水稀释 30 倍后备用。弃液后甩干,随后每孔加满洗涤液静置 30 s,弃液拍干,重复 5 次,除空白孔外,其余各孔加入 50  $\mu$ L 酶标试剂。每孔各加入 50  $\mu$ L A、B 显色液,轻轻混匀,37℃恒温箱避光孵育 15 min,每孔加 50  $\mu$ L 终止液,450 nm 波长处,测量各孔的吸光度值,得出结果。

### 1.9 Western blot 检测 Wnt1、 $\beta$ -catenin 及 c-myc 蛋白表达

取出冻存于冰箱中的小鼠主动脉组织,采用常规的方法提取 Wnt1、 $\beta$ -catenin 及 c-myc,根据 BCA 试剂盒测定其蛋白浓度,取 40  $\mu$ g 蛋白,进行 SDS/PAGE 凝胶电泳,结束后,再经转膜、封闭后,4℃过夜,回收一抗,再经二抗孵育,ECL 显色液显影、定影。用 Image J 软件分析处理结果,以  $\beta$ -actin 为

内参。

### 1.10 RT-PCR 检测 Wnt1、 $\beta$ -catenin 基因表达

取冻存主动脉组织,加入 1 mL TRIzol,低温下进行匀浆,裂解 5 min,提取总 RNA,检测 RNA 浓度及纯度。将过高浓度的 RNA 进行稀释,使其至 200 mg/L。将 RNA 样本进行反转录得到 cDNA 后进行 PCR 扩增,反应条件为 95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火 30 s,40 个循环,溶解曲线,60~95℃,每 15 s 升温 0.3℃。结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 的相对表达量。计算结果用  $\beta$ -actin 表达量作为内参进行对照,由此得出 Wnt1、 $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量。引物序列为:Wnt1 上游 5'-CGAGAGTGCAAATGGCAATTCCG-3',下游 5'-GATGAACGCTGTTTCTCGGCAG-3',产物长度 111 bp; $\beta$ -catenin 上游 5'-CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG-3',下游 5'-TGCTGGAAGGTGGACACTGAGG-3',产物长度 138 bp。

### 1.11 统计学方法

本研究数据均采用 Graphpad prism 8.0.2 软件统计分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- $q$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠主动脉窦脂质含量的变化

主动脉窦部行油红 O 染色观察脂质沉积情况,结果显示对照组小鼠主动脉窦未见脂质斑块的形成;与对照组比较,模型组小鼠主动脉窦有大量的脂质斑块形成,增加近 8.8 倍( $P<0.01$ );与模型组比较,补阳还五汤加减低、中、高剂量组及阿托伐他汀组小鼠主动脉窦脂质斑块均有不同程度的减少,约减少 15.34%、31.17%、64.89%、58.43% ( $P<0.01$ ,图 1),其中高剂量组效应最强。

### 2.2 小鼠主动脉窦部 OPN 表达的变化

对主动脉窦部行 OPN 免疫组织化学染色,观察 OPN 在主动脉窦斑块处的表达水平,结果表明与对照组比较,模型组小鼠主动脉窦部 OPN 表达明显增多,增加近 10.7 倍( $P<0.01$ );与模型组比较,补阳还五汤加减低、中、高剂量组及阿托伐他汀组小鼠主动脉窦内 OPN 表达均有不同程度的降低,分别约降低 2.64%、11.68%、30.16%、31.17% ( $P<0.05$ ,图 2)。

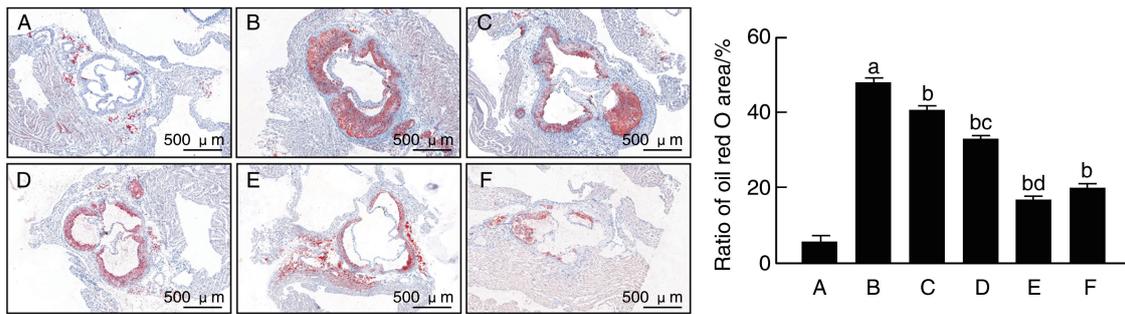


图 1. 各组小鼠主动脉窦油红 O 染色结果 (n=10)

A 为对照组, B 为模型组, C 为补阳还五汤加减低剂量组, D 为补阳还五汤加减中剂量组, E 为补阳还五汤加减高剂量组, F 为阿托伐他汀组。  
 a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与补阳还五汤加减低剂量组比较;  
 d 为  $P < 0.01$ , 与补阳还五汤加减中剂量组比较。

Figure 1. Results of oil red O staining on aortic sinuses of mice in each group (n=10)

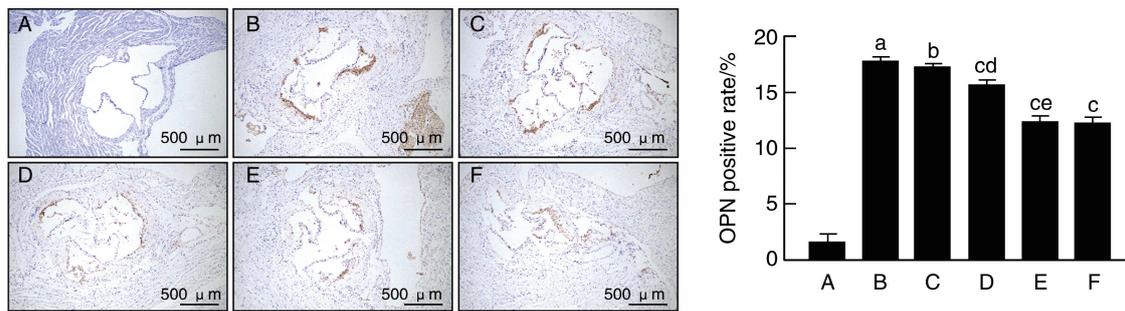


图 2. 各组小鼠主动脉窦 OPN 表达 (n=10)

A 为对照组, B 为模型组, C 为补阳还五汤加减低剂量组, D 为补阳还五汤加减中剂量组, E 为补阳还五汤加减高剂量组,  
 F 为阿托伐他汀组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较;  
 d 为  $P < 0.05$ , 与补阳还五汤加减低剂量组比较; e 为  $P < 0.01$ , 与补阳还五汤加减中剂量组比较。

Figure 2. Expression of OPN in the aortic sinuses of mice in each group (n=10)

2.3 血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 水平的变化

与对照组比较, 模型组小鼠血清中 IL-6 水平增加近 2 倍, TNF- $\alpha$  水平增加近 3.5 倍, IL-1 $\beta$  水平增加近 3.3 倍, MCP-1 水平增加近 2.8 倍 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 补阳还五汤加减低、中、高剂量组及阿托伐他汀组小鼠血清中 IL-6 水平约降低

26.61%、43.83%、58.2%、56.27%, TNF- $\alpha$  水平约降低 10.77%、28.83%、40.26%、39.31%, IL-1 $\beta$  水平约降低 7.97%、21.89%、37.55%、26.36%, MCP-1 水平约降低 3%、17.22%、23.79%、16.66% ( $P < 0.01$ , 表 1), 其中补阳还五汤加减高剂量组效应最强。

表 1. 各组血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1 水平比较 (n=10)

Table 1. Comparison of serum IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MCP-1 levels in each group (n=10) 单位: ng/L

分组	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	MCP-1
对照组	128.09 $\pm$ 5.68	110.42 $\pm$ 8.09	27.72 $\pm$ 2.07	65.12 $\pm$ 3.80
模型组	524.06 $\pm$ 8.32 <sup>a</sup>	392.00 $\pm$ 9.43 <sup>a</sup>	90.25 $\pm$ 2.74 <sup>a</sup>	183.29 $\pm$ 4.61 <sup>a</sup>
补阳还五汤加减低剂量组	384.62 $\pm$ 9.80 <sup>c</sup>	349.79 $\pm$ 12.35 <sup>c</sup>	83.06 $\pm$ 2.40 <sup>c</sup>	177.06 $\pm$ 4.56 <sup>b</sup>
补阳还五汤加减中剂量组	294.27 $\pm$ 8.04 <sup>cd</sup>	290.76 $\pm$ 11.10 <sup>cd</sup>	70.50 $\pm$ 3.41 <sup>cd</sup>	151.74 $\pm$ 4.24 <sup>cd</sup>
补阳还五汤加减高剂量组	219.04 $\pm$ 8.04 <sup>ce</sup>	234.18 $\pm$ 10.29 <sup>ce</sup>	56.37 $\pm$ 2.59 <sup>ce</sup>	139.68 $\pm$ 4.24 <sup>ce</sup>
阿托伐他汀组	229.16 $\pm$ 7.69 <sup>c</sup>	237.91 $\pm$ 17.60 <sup>c</sup>	66.46 $\pm$ 3.20 <sup>c</sup>	152.75 $\pm$ 4.74 <sup>c</sup>

注: a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; d 为  $P < 0.01$ , 与补阳还五汤加减低剂量组比较; e 为  $P < 0.01$ , 与补阳还五汤加减中剂量组比较。

## 2.4 主动脉 Wnt1、 $\beta$ -catenin 及 c-myc 蛋白表达的变化

与对照组比较,模型组小鼠主动脉 Wnt1 表达增加近 5.1 倍, $\beta$ -catenin 表达增加近 6.6 倍,c-myc 表达增加近 3.8 倍( $P < 0.01$ );与模型组比较,补阳还五汤加减低、中、高剂量组及阿托伐他汀组小鼠

主动脉 Wnt1 表达约减少 16.01%、45.83%、64.28%、60.98%, $\beta$ -catenin 表达约减少 8.02%、40.76%、78.33%、73.56%,c-myc 蛋白表达约减少 21.50%、30.39%、51.73%、45.07% ( $P < 0.01$ ,图 3),其中补阳还五汤加减高剂量组效应最强。

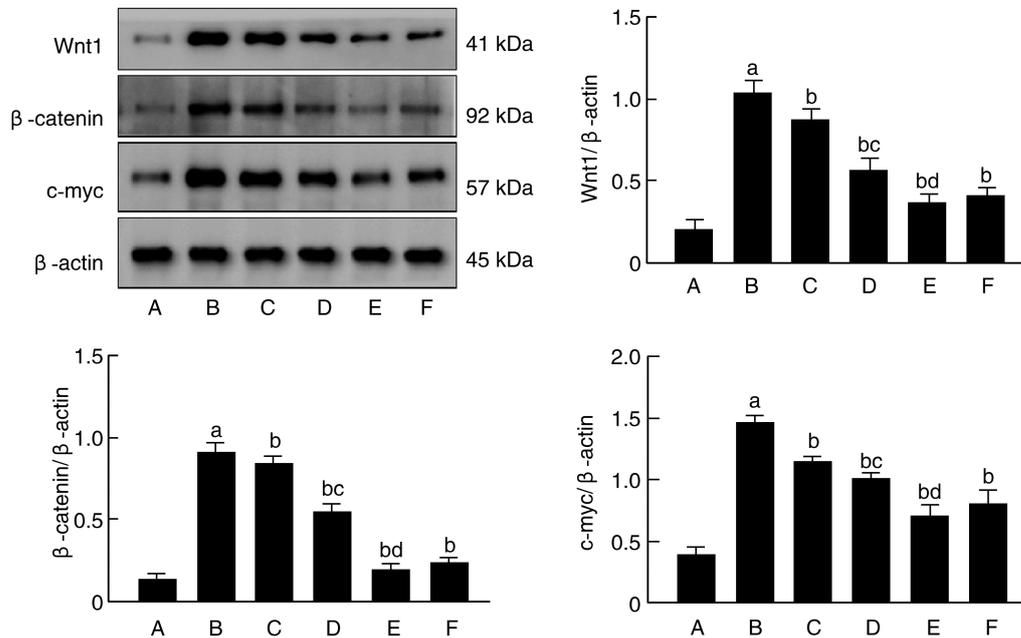


图 3. 各组小鼠主动脉中 Wnt1、 $\beta$ -catenin 及 c-myc 蛋白表达比较( $n=10$ )

A 为对照组,B 为模型组,C 为补阳还五汤加减低剂量组,D 为补阳还五汤加减中剂量组,E 为补阳还五汤加减高剂量组,F 为阿托伐他汀组。a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与模型组比较;c 为  $P < 0.01$ ,与补阳还五汤加减低剂量组比较;d 为  $P < 0.01$ ,与补阳还五汤加减中剂量组比较。

Figure 3. Comparison of Wnt1,  $\beta$ -catenin and c-myc protein expression in the aorta of mice in each group( $n=10$ )

## 2.5 小鼠主动脉 Wnt1、 $\beta$ -catenin mRNA 表达的变化

与对照组比较,模型组小鼠主动脉 Wnt1 mRNA 表达增加近 4.9 倍, $\beta$ -catenin mRNA 表达增加近 5.8 倍( $P < 0.01$ );与模型组比较,补阳还五汤加减低、中、高剂量组及阿托伐他汀组小鼠主动脉 Wnt1 mRNA 表达

约减少 17.88%、22.09%、34.3%、33.69%, $\beta$ -catenin mRNA 表达约减少 20.52%、42.77%、55.48%、53.75% ( $P < 0.05$ ,图 4),其中补阳还五汤加减高剂量组效应最强。

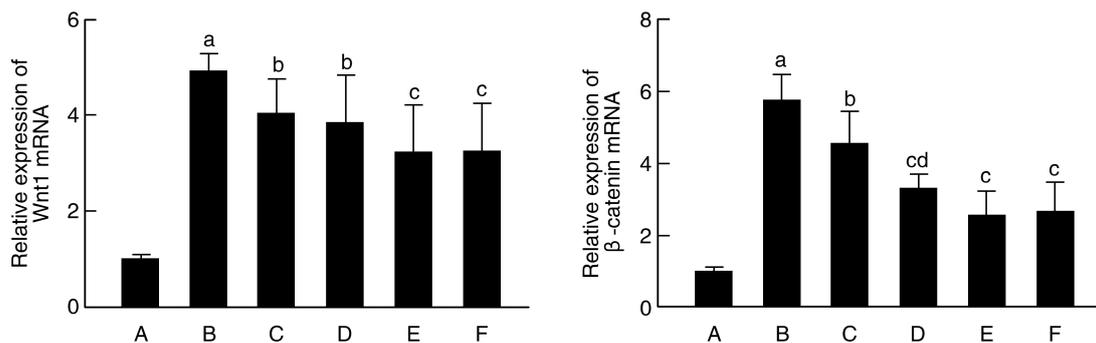


图 4. 各组小鼠主动脉中 Wnt1、 $\beta$ -catenin mRNA 表达比较( $n=10$ )

A 为对照组,B 为模型组,C 为补阳还五汤加减低剂量组,D 为补阳还五汤加减中剂量组,E 为补阳还五汤加减高剂量组,F 为阿托伐他汀组。a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,c 为  $P < 0.01$ ,与模型组比较;d 为  $P < 0.05$ ,与补阳还五汤加减低剂量组比较。

Figure 4. Comparison of Wnt1 and  $\beta$ -catenin mRNA expression in the aorta of mice in each group( $n=10$ )

### 3 讨论

中医学古籍中并无“动脉粥样硬化”病名的记载,现代医家根据其临床表现将其归属为“胸痹心痛、脉痹”等范畴,并认为其病机首要责之于正气的亏虚。如《医林改错》中云:“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”;《明医杂著》中有记载“脉者,血之隧道也,血随气行,周流无停”,即脉是血行之道路,血液的正常运行依赖气的通达;再如《医学纲目》中记载“中风皆因脉道不利,血气闭塞也”为瘀血诱发 As 提供了理论依据。而正气亏虚又可分为心气亏虚、脾肾亏虚等脏腑亏虚之别,而尤以心虚为本;而瘀血、痰浊等病理因素为发病之标,故而以益气活血法为主方化裁是治疗 As 的根本大法<sup>[10]</sup>。现代研究表明,补阳还五汤可以通过抗炎、抗内皮细胞损伤和凋亡、抗氧化应激及调节平滑肌细胞表型的转化等发挥抗 As 的作用<sup>[11-12]</sup>。瓜蒌、薤白、半夏取自瓜蒌薤白半夏汤之意,功用祛痰散结、开胸除痹。现代研究表明,瓜蒌薤白半夏汤通过调节脂质代谢、抑制氧化应激、减轻炎症反应等途径延缓 As<sup>[13]</sup>。

目前公认的 As 发病机制有免疫炎症、脂质代谢障碍、血管内皮损伤、氧化应激等,其中,免疫炎症反应是 As 发生发展的关键。As 是一类慢性炎症性疾病,最早由 Ross 提出<sup>[14]</sup>。在 As 的早期,脂质代谢紊乱,血管内皮细胞的结构及功能发生损伤,而受损的内皮细胞表达的黏附分子与循环中单核细胞结合,趋化单核细胞和淋巴细胞进入血管内膜,经过复杂的反应后会释放出大量炎症因子,这些炎症介质又会加重血管损伤处的炎症反应,导致 As 的进展。例如, MCP-1 是单核巨噬细胞的特异趋化性因子,作为 As 炎症级联反应的起始炎症因子,可激活和趋化单核细胞迁移转化成巨噬细胞,参与炎症反应<sup>[15]</sup>。IL-1 $\beta$  是一种重要的炎症因子并能诱导 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  等分泌,促进基质金属蛋白酶分泌,降解斑块的纤维帽使斑块不稳定甚至破裂。IL-6 是一种多功能炎症因子,作为上游炎症因子之一,不仅可以促进 MCP-1 释放、促进金属蛋白酶对胞外基质降解,影响调节性 T 细胞的数量及功能等促进 As 发生发展<sup>[16-17]</sup>。Wnt 蛋白家族是一类分泌型脂质修饰糖蛋白,目前共发现 19 种不同的 Wnt 配体(蛋白),其中 Wnt 经典信号通路主要指的是  $\beta$ -catenin 介导的,参与了多种炎症反应。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在心血管疾病发挥重要作用,尤其

在 As 中所起到的作用成为研究热点<sup>[18-20]</sup>。Gelfand 等<sup>[21]</sup>研究发现,在 ApoE 基因敲除 As 小鼠主动脉中  $\beta$ -catenin 表达水平升高,而其晚期斑块中亦呈现高表达状态,并且随着 As 不断发展又可以进一步促进  $\beta$ -catenin 通路表达。胥玉行<sup>[22]</sup>研究显示, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可以通过调控平滑肌细胞增殖、迁移,还能够影响巨噬细胞、内皮细胞的炎症反应过程,促进内皮下细胞外基质成分生成,导致内膜增厚,加速 As 斑块的形成。姜雪娇等<sup>[23]</sup>研究显示,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活可以有效降低 As 小鼠血清中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子的水平,减少斑块面积,发挥抗 As 作用。本研究结果显示,与模型组比较,补阳还五汤加减低、中、高剂量组小鼠主动脉中脂质沉积显著减少,补阳还五汤不同剂量组以剂量依赖性方式降低 ApoE<sup>-/-</sup> As 小鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1 水平和 Wnt/ $\beta$ -catenin 表达,说明补阳还五汤能够减轻炎症反应,抑制 As 病变的形成与发展,其机制可能与拮抗 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活化有关,以补阳还五汤加减高剂量组效应最强。

在 As 发病过程中,平滑肌细胞发生表型转化,随后由中膜迁移到内膜,成为泡沫细胞的另外一个重要来源,与 As 斑块纤维帽形成密切相关<sup>[24]</sup>。在生理情况下,VSMC 具有收缩力强的特性,保持着低增殖、低迁移功能,并表达一系列特定的收缩蛋白和细胞骨架蛋白,如  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、平滑肌 22 $\alpha$  蛋白(smooth muscle-22a, SM22a)等<sup>[25-26]</sup>。在炎症因子、细胞外基质或生长因子等刺激下,VSMC 从分化状态(收缩表型)向去分化状态(分泌表型)转换,收缩性标志物表达减少,OPN、金属蛋白酶等表达增加。去分化状态下的 VSMC 收缩能力低,而其增殖、迁移和分泌细胞外基质的能力强,这个过程被称为 VSMC 表型的转化<sup>[27-28]</sup>。研究表明,IL-1 $\beta$  可以促使 VSMC 发生表型转化,上调核因子  $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)表达,进而促进炎症因子的表达,影响斑块的稳定性,导致 As 进展<sup>[29-30]</sup>。本实验结果显示,补阳还五汤不同剂量组能够降低 ApoE<sup>-/-</sup> As 小鼠平滑肌细胞分化标志蛋白 OPN 的表达,减少 As 斑块生成及炎性细胞浸润,其中以补阳还五汤加减高剂量组效应最强。研究表明补阳还五汤发挥抗 As 及稳定易损斑块的作用,部分机制可能与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活化,进而抑制 VSMC 表型转化有关。

#### [参考文献]

[1] 《中国心血管健康与疾病报告 2022》编写组. 《中国心

- 血管健康与疾病报告 2022》要点解读[J]. 中国心血管杂志, 2023, 28(4): 297-312.
- Writing Team of Report on Cardiovascular Health and Diseases in China 2022. Interpretation of report on cardiovascular health and diseases in China 2022[J]. Chin J Cardiovasc Med, 2023, 28(4): 297-312.
- [2] LIBBY P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. Nature, 2021, 592(7855): 524-533.
- [3] SAIGUSA R, WINKELS H, LEY K. T cell subsets and functions in atherosclerosis[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(7): 387-401.
- [4] 苑明川, 王莉, 王贺, 等. HIF-1 $\alpha$  在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(9): 815-820.
- YUAN M C, WANG L, WANG H, et al. Research progress on the role of HIF-1 $\alpha$  in atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2023, 31(9): 815-820.
- [5] BÄCK M, YURDAGUL A J R, TABAS I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(7): 389-406.
- [6] 何敏慧, 陈正涛, 高泓, 等. 基于内皮祖细胞维持血管稳态的功能探讨动脉粥样硬化“从肾论治”的科学内涵[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(10): 110-115.
- HE H M, CHEN Z T, GAO H, et al. Scientific connotation of Congshenlunzhi of atherosclerosis based on the function of endothelial progenitor cells in maintaining vascular homeostasis [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2023, 39(10): 110-115.
- [7] 傅晓霞, 艾香英, 黄继德, 等. 苦豆碱在艾滋病患者外周血 PBMC 中调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路影响 T 细胞表达机制分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(3): 438-441.
- FU X X, AI X Y, HUANG J D, et al. Analysis of mechanism of Aloperine regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway on influencing T cell expression in peripheral blood PBMC of AIDS patients[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2023, 29(3): 438-441.
- [8] 宋俊华, 张沂, 陈海滨. 基于 Wnt/ $\beta$ -catenin 探讨山药多糖对高糖诱导心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中成药, 2023, 45(2): 626-629.
- SONG J H, ZHANG L, CHEN H B. The protective effect of yam polysaccharides on high glucose-induced cardiomyocyte injury based on Wnt/ $\beta$ -catenin[J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(2): 626-629.
- [9] 詹萍, 熊尚全, 柴大军, 等. 和厚朴酚通过 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路抗动脉粥样硬化[J]. 中华高血压杂志, 2022, 30(2): 153-160.
- ZHAN P, XIONG S Q, CHAI D J, et al. The effect of honokiol on the forming process of atherosclerosis by regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Chin J Hypertens, 2022, 30(2): 153-160.
- [10] 李苑榆, 龙清吟, 傅馨莹, 等. 补阳还五汤和黄芪当归配伍对动脉粥样硬化小鼠炎症反应的影响[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(15): 4164-4172.
- LI W Y, LONG Q Y, FU X Y, et al. Effects of Buyang Huanwu decoction and astragali Radix-Angelicae sinensis radix combination on inflammatory responses in atherosclerotic mice[J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(15): 4164-4172.
- [11] 尤心怡, 王文凤, 徐霞, 等. 补阳还五汤治疗动脉粥样硬化的物质基础及作用机制研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(10): 1575-1581.
- YOU X Y, WANG W F, XU X, et al. Research progress on the material foundation and mechanism of Buyang Huanwu decoction in the treatment of atherosclerosis [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2021, 32(10): 1575-1581.
- [12] 冯月男, 牛雯颖, 张玉昆, 等. 基于血小板活化和炎症相关指标探讨补阳还五汤对气虚血瘀证调控机制的研究[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(3): 581-584.
- FENG Y N, NIU W Y, ZHANG Y K, et al. Study of the regulatory mechanism of Buyang Huanwu decoction on qi deficiency and blood stasis based on platelet activation and inflammation-related indicators[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(3): 581-584.
- [13] 冯利, 庄安琪, 李轶维, 等. 基于网络药理学和体外研究探究瓜蒌薤白半夏汤治疗动脉粥样硬化的机制[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(6): 904-912.
- FENG L, ZHUANG A Q, LI Y W, et al. Study on mechanism of Gualou Xiebai Banxia decoction in treating dynamic atherosclerosis based on network pharmacology and in vitro study[J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(6): 904-912.
- [14] ROSS R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
- [15] 尹丽梅, 袁建, 陈楷, 等. 解毒活血方调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 ApoE<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup> atherosclerotic mice by modulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(12): 112-120.
- [16] 陆毅鹏. 阿利沙坦酯对动脉粥样硬化兔 IL-6、Lp-PLA2 的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2020.
- LU Y P. The effect of alisartan on IL-6 and Lp-PLA2 in

- atherosclerotic rabbits[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2020.
- [17] 肖素军, 赵明. 动脉粥样硬化与免疫[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(4): 277-286.
- XIAO S J, ZHAO M. Atherosclerosis and immunity[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(4): 277-286.
- [18] 李敏, 朱奕, 方丽娟, 等. Wnt 信号通路在动脉粥样硬化及血管钙化中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(11): 995-999.
- LI M, ZHU Y, FANG L J, et al. Research progress of Wnt signaling pathway in atherosclerosis and vascular calcification[J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(11): 995-999.
- [19] WANG J, ZHANG R G, LIN Z Y, et al. CDK7 inhibitor THZ1 enhances antiPD-1 therapy efficacy via the p38 $\alpha$ /MYC/PD-L1 signaling in non-small cell lung cancer[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 99.
- [20] BOUCHER P, MATZ R L, TERRAND J. Atherosclerosis: gone with the Wnt? [J]. Atherosclerosis, 2020, 301: 15-22.
- [21] GELFAND B D, MELLER J, PRYOR A W, et al. Hemodynamic activation of beta-catenin and T-cell-specific transcription factor signaling in vascular endothelium regulates fibronectin expression[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(7): 1625-1633.
- [22] 胥玉行. Urantide 对 ApoE<sup>-/-</sup> 动脉粥样硬化小鼠胸主动脉中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的调控作用及机制[D]. 承德: 承德医学院, 2023.
- XU Y H. Regulation and mechanism of Urantide on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in thoracic aorta in ApoE<sup>-/-</sup> atherosclerotic mice[D]. Chengde: Chengde Medical University, 2023.
- [23] 姜雪娇, 李金霞, 张秋云, 等. 基于 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路探讨通心络胶囊对 ApoE<sup>-/-</sup> 动脉粥样硬化小鼠炎症水平的影响[J]. 中国中医急症, 2023, 32(1): 43-46.
- JIANG X J, LI J X, ZHANG Q Y, et al. Effect of tongxinluo capsules on inflammation in ApoE<sup>-/-</sup> atherosclerotic mice based on Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2023, 32(1): 43-46.
- [24] 张晓璐, 耿妙颖, 王云, 等. N<sup>6</sup>-甲基腺苷修饰在动脉粥样硬化中的作用及药物干预的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(4): 277-284.
- ZHANG X L, GENG M Y, WANG Y, et al. Research progress on the role of N<sup>6</sup>-methyladenosine modification in atherosclerosis and the intervention of traditional Chinese medicine[J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(4): 277-284.
- [25] 舒刘芳. 血管平滑肌细胞表型转换对动脉粥样硬化的作用研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(1): 99-102.
- SHU L F. Phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2018, 26(1): 99-102.
- [26] 帕力旦·赛买提, 姚伟娟. 血管平滑肌细胞收缩的分子机制研究进展[J]. 生理科学进展, 2021, 52(3): 217-221.
- SAMAT P, YAO W J. Advances in molecular mechanisms of vascular smooth muscle cell contraction[J]. Prog Physiol Sci, 2021, 52(3): 217-221.
- [27] 金浩楠. Corilagin 调控血管平滑肌细胞表型转化治疗 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化作用及机制研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2022.
- JIN H N. Effect and mechanism of corilagin regulating phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells on ApoE<sup>-/-</sup> mice atherosclerosis[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2022.
- [28] 曾菲. DFMG 对动脉粥样硬化小鼠血管平滑肌表型转化的影响[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2018.
- ZENG F. Effect of DFMG on the phenotypic transformation of vascular smooth muscle in atherosclerotic mice [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2018.
- [29] MANTIONE M E, LOMBARDI M, BACCELLIERI D, et al. IL-1 $\beta$ /MMP9 activation in primary human vascular smooth muscle-like cells: exploring the role of TNF $\alpha$  and P2X7[J]. Int J Cardiol, 2019, 278: 202-209.
- [30] 张杰, 黄兴晓, 池菊芳. A $\beta$ 1-40 通过激活 MAPKs 通路诱导血管平滑肌细胞发生炎症及表型转化[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(11): 1966-1971.
- ZHANG J, HUANG X X, CHI J F. A $\beta$ 1-40 induces inflammation and phenotypic switching via activation of MAPKs signaling pathway in vascular smooth muscle cells [J]. Chin J Pathophysiol, 2020, 36(11): 1966-1971.
- (此文编辑 许雪梅)