

化痰祛瘀方通过调控 HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 通路影响动脉粥样硬化家兔主动脉脂质斑块

王健^{1,2}, 贾连群³, 宋 囡³, 谢思梦², 陈 宁², 陈 丝², 吕晓明², 张会永⁴

(辽宁中医药大学 1. 实验动物中心, 2. 研究生学院, 3. 中医脏象理论及应用教育部重点实验室

辽宁省中医转化医学研究中心, 辽宁省沈阳市 110847; 4. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁省沈阳市 110032)

[关键词] 动脉粥样硬化; 脂质斑块; 血管新生; 化痰祛瘀方

[摘要] 目的 研究化痰祛瘀方调控 HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 通路对动脉粥样硬化家兔主动脉脂质斑块的影响, 探讨化痰祛瘀方对动脉粥样硬化脂质斑块的作用机制。方法 将 60 只新西兰家兔随机分为对照组 15 只, 实验组 45 只。实验组 45 只家兔通过免疫性内皮损伤合并高脂饲料喂养的方法制备动脉粥样硬化模型, 对照组喂饲普通饲料。8 周后, 将实验组家兔随机分为模型组、化痰祛瘀方组及辛伐他汀组。各组给予相应药物干预, 对照组、模型组给予同体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 4 周后取材。全自动生化分析仪检测各组血清甘油三酯(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)含量; HE 和油红 O 染色观察家兔主动脉病理形态学改变, 测量内膜、中膜厚度; 免疫组化法测定 CD31 平均光密度值; ELISA 检测血清缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)和血管内皮生长因子(VEGF)含量; Western blot 法检测主动脉 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达。结果 模型组血清 TG、TC、LDL-C 水平较对照显著升高($P < 0.01$), HDL-C 水平显著降低($P < 0.01$), 而化痰祛瘀方组和辛伐他汀组血清 TG、TC、LDL-C 含量较模型组降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), HDL-C 含量均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。病理染色可见模型组主动脉内膜细胞增生, 有大量泡沫细胞和脂质沉积, 经化痰祛瘀方和辛伐他汀治疗后均可见明显改善。模型组内膜、中膜厚度较对照组显著增厚($P < 0.01$), 而化痰祛瘀方组和辛伐他汀组较模型组显著减小($P < 0.01$)。模型组主动脉 CD31 平均光密度值较对照组显著升高($P < 0.01$), 而化痰祛瘀方组和辛伐他汀组较模型组显著降低($P < 0.01$)。模型组血清 HIF-1 α 和 VEGF 含量较对照组显著升高($P < 0.01$), 而化痰祛瘀方组和辛伐他汀组较模型组均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组主动脉 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达较对照组显著升高($P < 0.01$), 经化痰祛瘀方和辛伐他汀治疗后, 两组主动脉 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达水平较模型组均有显著降低($P < 0.01$)。结论 化痰祛瘀方稳定动脉粥样硬化脂质斑块, 其机制可能与调控 HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 通路抑制血管新生有关。

[中图分类号] R2

[文献标识码] A

Effect of Huayu Qutan recipe on aortic lipid plaque in atherosclerotic rabbits by regulating HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 pathway

WANG Jian^{1,2}, JIA Lian-Qun³, SONG Nan³, XIE Si-Meng², CHEN Ning², CHEN Si², LV Xiao-Ming², ZHANG Hui-Yong⁴

(1. Laboratory Animal Center, 2. Graduate School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110847; 3. Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine & Translational Medicine Research Center of Traditional Chinese Medicine in Liaoning Province, Shenyang, Liaoning 110847; 4. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032)

[收稿日期] 2017-11-02

[修回日期] 2018-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金(81774022, 81603513); 百千万人才(2017-58)辽宁省高等学校优秀人才支持计划(LR2015041)

[作者简介] 王健, 硕士, 助理实验师, 研究方向为中医药防治动脉粥样硬化分子生物学机制, E-mail 为 13889342896@163.com。通讯作者贾连群, 博士后, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为中西医结合防治心血管疾病, E-mail 为 jliq-8@163.com。

[**KEY WORDS**] Atherosclerosis; Lipid plaques; Angiogenesis; The Huayu Qutan recipe

[**ABSTRACT**] **Aim** To observe the effect of Huayu Qutan recipe on regulating the expression of HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 pathway on the aortic lipid plaque in As rabbits and to explore the mechanism of the Huayu Qutan recipe on the atherosclerotic plaque. **Methods** Sixty New Zealand rabbits were randomly divided into the control group ($n=15$) and the experimental group ($n=45$). Rabbits in the experimental group were prepared as atherosclerotic rabbit model by immune-induced endothelial injury and by feeding with high-fat diet. The control group was given normal feed. After 8 weeks, the rabbits in the experimental group were randomly divided into the model group, the Huayu Qutan recipe group and the Simvastatin group. Each group was given the corresponding drug intervention; the control group and the model group were given the same volume of saline, one time a day for 4 weeks before taking materials. The levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDLC) and high-density lipoprotein cholesterol (HDLC) in serum were detected by the automatic biochemical analyzer. HE staining and the oil red O staining were used to observe the pathological changes of the aorta in rabbits. The thickness of the intima and tunica media was measured in aortic wall. Immunohistochemical method was adopted to determine CD31 mean optical density value. The contents of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum were detected by ELISA. Western blot was used to detect the expression of HIF-1 α , VEGF and VEGFR-2 in the aorta. **Results** Compared with the control group, the levels of TG, TC and LDLC in the model group were significantly increased ($P<0.01$) and HDLC levels were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the levels of TG, TC and LDLC in the Huayu Qutan recipe group and the Simvastatin group were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and HDLC content was significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the control group, the thickness of intima and tunica media were significantly increased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, the thickness of intima and tunica media were significantly decreased in the Huayu Qutan recipe group and the Simvastatin group ($P<0.01$). Compared with the control group, the CD31 mean optical density value were significantly increased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, the CD31 mean optical density value were significantly decreased in the Huayu Qutan recipe group and the Simvastatin group ($P<0.01$). Pathological staining showed the aortic intimal hyperplasia, a large number of foam cells and lipid deposition in the model group. After the treatment of the Huayu Qutan recipe and the simvastatin, they were significantly improved. Compared with the control group, the contents of HIF-1 α and VEGF were significantly increased in the model group ($P<0.01$). Compared with the model group, the levels of HIF-1 α and VEGF were significantly decreased in the Huayu Qutan recipe group and the Simvastatin group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The expressions of HIF-1 α , VEGF and VEGFR-2 in the aorta of the model group were significantly higher than those in the normal group ($P<0.01$). After treated by the Huatan Qutan recipe and the Simvastatin, the expression of HIF-1 α , VEGF and VEGFR-2 in the two groups were significantly lower than those in model group ($P<0.01$). **Conclusion** The Huayu Qutan recipe stabilizes the As lipid plaque and the mechanism may be related to the regulation of HIF-1 α / VEGF / VEGFR-2 pathway to inhibit angiogenesis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是以进行性脂质沉积、纤维组织增生和炎性细胞浸润为特征的累及全身大、中型弹性和肌性动脉的慢性疾病^[1]。由As引起的动脉粥样硬化性心血管疾病患病率呈逐年增加趋势,而且发病年龄趋于年轻化。计算机模拟预测显示,到2030年,我国由As导致疾病的死亡率可高达73%^[2],因此,对As的机制研究具有重要的意义。化痰祛瘀方是杨关林教授根据多年临床经验得出的经验方,主治痰浊血瘀型As,临床疗效确切^[3-4]。近年来,贾连群等^[5-7]在关于化痰祛瘀方的基础研究中,分别从整体和细胞水平进一步证实了该方防治As的疗效和分子机制。但其机制研究尚不完善,本实验重点观察化痰祛瘀方对As家兔脂质斑块的影响,以As家兔为模型,以缺氧诱

导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)/血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)/血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)通路为切入点,探讨化痰祛瘀方对As脂质斑块的影响和可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性新西兰家兔60只,体重 2.2 ± 0.2 kg,由济南金丰实验动物有限公司提供(生产许可证号:SCXK(鲁)2014-0006),动物饲养于辽宁中医药大学实验动物中心(使用许可证号:SYXK(辽)

2013-0009)。室内温度 18~22℃,相对湿度 40%~70%。实验通过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审查合格,编号为 20160704。

1.2 主要药品、试剂及仪器

化痰祛痰方药由辽宁中医药大学附属医院中心实验室提供;辛伐他汀购于杭州默沙东制药有限公司;牛血清白蛋白为美国 Sigma 公司产品;HIF-1 α 、VEGF 和 VEGFR-2 测定试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司,蛋白裂解液、一抗稀释液、ECL 化学发光试剂购于美国 Santa Cruz 公司,BCA 蛋白定量测定试剂盒、 β -actin 抗体购于中国 Abmart 公司;其它试剂均为分析纯。日本东芝 TAB-120FR 型全自动生化分析仪;其林贝尔仪器制造有限公司的 SHZ-88 型水浴恒温振荡器;德国 Thermo 的 MULTI-SKAN FC 型酶标仪、ST 16R 冷冻高速离心机;美国 Bio-Rad 的 Mini-PROTEAN Tetra 小型垂直电泳槽和小型湿转印槽;英国 Syngene 的 F3 型全自动荧光与可见光凝胶成像分析系统。

1.3 实验分组、模型制备及给药方式

家兔普通饲料适应性喂养 2 周后,随机分为对照组 15 只,实验组 45 只。对照组耳缘静脉注射生理盐水(250 mg/kg),喂饲普通饲料;实验组耳缘静脉注射牛血清白蛋白生理盐水溶液(250 mg/kg),喂饲高脂饲料制备 As 模型^[8-9](高脂饲料配方:1.5%胆固醇、1%胆盐、3%猪油、3%花生油、5%蛋黄粉,加 86.5%普通饲料)。两组均自由摄食,饮水不限。8 周后,将实验组 45 只家兔随机分为模型组、化痰祛痰方组和辛伐他汀组,每组 15 只,分别给予相应药物干预,给药剂量按人和动物体表面积折算系数换算,化痰祛痰方组给予化痰祛痰方药 16 g/(kg·d),辛伐他汀组给予辛伐他汀 1.4 mg/(kg·d),对照组和模型组给予同体积的生理盐水,给药容积 8 mL/(kg·d),灌胃给药,每天 1 次,连续 4 周。

1.4 血脂检测

各组家兔给药 4 周后,禁食不禁水 12 h,耳缘静脉注射 10%水合氯醛彻底麻醉后,腹主动脉取血,装入抗凝管中,4℃ 3000 r/min 离心 10 min,用全自动生化分析仪检测血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDLC)含量。

1.5 血清 HIF-1 α 和 VEGF 检测

按照 ELISA 试剂盒操作说明书,稀释标准品,每孔加样 50 μ L,37℃ 温育 30 min,洗涤,加酶温育

30 min,再洗涤,显色 10 min,终止液 10 μ L/孔,酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度值。

1.6 主动脉病理形态学观察

1.6.1 HE 染色及病理形态学定量分析 各组随机选取 6 只家兔,剪取主动脉根部 1 cm 放于多聚甲醛中固定,石蜡包埋后切片,烤片,脱蜡,苏木精染色,水洗,1%盐酸乙醇脱水,水洗,尹红染色,梯度乙醇脱水,中性树脂封片。每张切片于 200 倍光镜下观察内膜病理变化,应用 JEOR 801D 形态学图像分析系统软件测量家兔主动脉内膜、中膜厚度。测量最厚处、中间 3 点和最薄处 5 组数值,取平均值。

1.6.2 油红 O 染色 将剩余部分主动脉纵行剖开,用生理盐水洗净,60%异丙醇冲洗,然后用 0.5%油红 O 溶液反复染 15 min,再重复异丙醇和双蒸水冲洗。

1.6.3 血小板-内皮细胞黏附分子平均光密度值测定 采用免疫组化 SABC 法,对血小板-内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31)的表达进行标记。每张切片于 400 倍镜下取三个不重叠视野,应用 JEOR 801D 形态学图像分析系统软件测定 3 个图像的平均光密度值,取平均值。

1.7 Western blot 法检测主动脉 HIF-1 α 、VEGF 和 VEGFR-2 蛋白表达

各组取 6 只家兔主动脉,剪取肉眼可见斑块明显处动脉组织 100 mg,蛋白裂解液提取组织蛋白,制备 SDS-PAGE 凝胶,样品变性后以 60 μ g 蛋白/泳道上样,经电泳、转膜、一抗封闭、洗膜、二抗封闭、再洗膜,曝光过程。同法检测 β -actin 内参蛋白。通过各条带的光密度比值作为 HIF-1 α 、VEGF 和 VEGFR-2 蛋白的相对含量。

1.8 统计学处理方法

数据统计采用 SPSS17.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。统计资料采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 方法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 TG、TC、LDLC 及 HDLC 含量

与对照组比较,模型组血清 TG、TC、LDLC 含量显著升高($P<0.01$),血清 HDLC 含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,化痰祛痰方组和辛伐他汀组血清 TG、TC、LDLC 含量均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清 HDLC 含量均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$;表 1)。

表 1. 各组家兔血清 TG、TC、LDLC 及 HDLC 含量比较($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

Table 1. Comparison of serum TG, TC, LDLC and HDLC levels in each group of rabbits($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

分组	n	TG	TC	LDLC	HDLC
对照组	6	1.35±0.23	8.57±2.18	6.61±2.66	2.03±0.40
模型组	6	9.55±1.31 ^a	55.18±9.98 ^a	33.90±7.96 ^a	1.21±0.40 ^a
化痰祛痰方组	6	3.00±0.68 ^c	27.78±6.44 ^c	23.89±5.83 ^c	1.95±0.45 ^b
辛伐他汀组	6	2.72±0.68 ^c	24.83±5.04 ^c	24.46±5.55 ^b	2.09±0.64 ^c

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。

2.2 血清 HIF-1 α 和 VEGF 水平

与对照组比较, 模型组血清 HIF-1 α 和 VEGF 含量显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 化痰祛痰方组、辛伐他汀组血清 HIF-1 α 和 VEGF 含量均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$; 表 2)。

表 2. 各组家兔血清 HIF-1 α 、VEGF 水平比较($\bar{x}\pm s$, ng/L)

Table 2. Comparison of serum HIF-1 α and VEGF levels in each group of rabbits($\bar{x}\pm s$, ng/L)

分组	n	HIF-1 α	VEGF
对照组	6	1.92±0.09	27.07±2.91
模型组	6	2.46±0.07 ^a	36.39±2.65 ^a
化痰祛痰方组	6	2.25±0.09 ^c	32.63±1.35 ^b
辛伐他汀组	6	2.24±0.09 ^c	33.23±2.34 ^b

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。

2.3 主动脉病理形态学改变

2.3.1 HE 染色 对照组动脉管壁内皮完整, 厚度均匀, 细胞排列层次分明、整齐, 无脂质沉积。模型组动脉管壁内膜细胞增殖、内皮明显增厚, 管壁增厚, 有大量泡沫细胞和脂质沉积。药物干预后, 化痰祛痰方组和辛伐他汀组管壁增厚程度明显减轻, 泡沫细胞和脂质沉积量明显减少(图 1)。

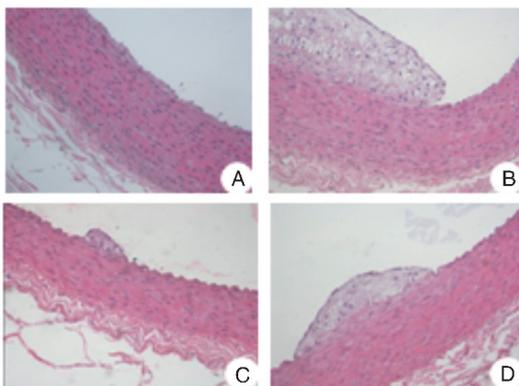


图 1. 各组家兔主动脉 HE 染色结果(200 \times) A 为对照组, B 为模型组, C 为化痰祛痰方组, D 为辛伐他汀组。

Figure 1. The HE staining result in aortic wall(200 \times)

2.3.2 主动脉病理形态学定量分析 与对照组比较, 模型组内膜、中膜厚度显著增大 ($P<0.01$); 与模型组比较, 化痰祛痰方组和辛伐他汀组内膜、中膜厚度显著减小 ($P<0.01$; 表 3)。

表 3. 各组家兔主动脉内膜、中膜病理形态学定量分析比较($\bar{x}\pm s$, μm)

Table 3. Comparison of intima and tunica media thickness in aortic wall($\bar{x}\pm s$, μm)

分组	n	内膜厚度	中膜厚度
对照组	6	4.50±0.61	143.04±13.97
模型组	6	341.37±37.14 ^a	245.05±20.86 ^a
化痰祛痰方组	6	108.96±21.01 ^b	160.69±22.18 ^b
辛伐他汀组	6	97.76±16.86 ^b	144.52±17.60 ^b

a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与模型组比较。

2.3.3 油红 O 染色 对照组动脉管壁内膜光滑, 薄且柔软, 有光泽; 模型组动脉管壁内膜粗糙, 增厚, 有大量红染的、大小不一的突起斑块联合成片存在; 化痰祛痰方组和辛伐他汀组脂质条纹和斑块明显减少, 且均可见光滑管壁内膜(图 2)。

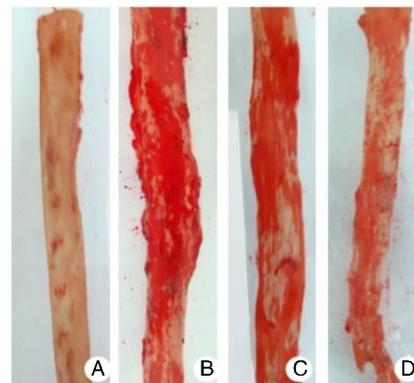


图 2. 各组家兔主动脉油红 O 染色结果 A 为对照组, B 为模型组, C 为化痰祛痰方组, D 为辛伐他汀组。

Figure 2. The oil red staining result in aortic wall

2.3.4 免疫组化染色 对照组血管壁内膜有少量 CD31 阳性表达, 表达产物为棕黄色颗粒; 模型组

靠近内弹力板处内呈强阳性表达,可见棕黄色连续或不连续的小管腔,为新生的小血管;化瘀祛痰方组和辛伐他汀组内膜阳性表达量明显减少(图3)。

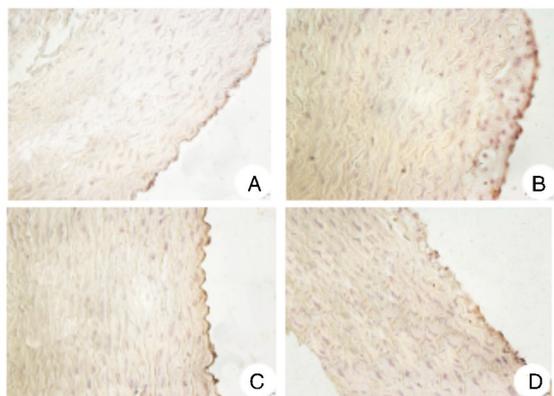


图3. 各组家兔主动脉 CD31 免疫组化染色结果(400×)

A 为对照组,B 为模型组,C 为化瘀祛痰方组,D 为辛伐他汀组。

Figure 3. The CD31 immunohistochemical staining in aortic wall(400×)

2.3.5 主动脉 CD31 平均光密度值 与对照组比较,模型组主动脉 CD31 平均光密度值显著升高(0.60 ± 0.03 比 0.26 ± 0.04 , $P < 0.01$);与模型组比较,化瘀祛痰方组(0.44 ± 0.04)和辛伐他汀组(0.41 ± 0.01)主动脉 CD31 平均光密度值显著降低($P < 0.01$)。

2.4 主动脉 HIF-1 α 、VEGF 和 VEGFR-2 蛋白表达水平

Western blot 检测结果表明,模型组 HIF-1 α 、VEGF 和 VEGFR-2 蛋白表达较对照组显著升高($P <$

0.01);经化瘀祛痰方和辛伐他汀治疗后,两组 HIF-1 α 、VEGF 和 VEGFR-2 蛋白表达水平较模型组均有显著下降($P < 0.01$;图4)。

3 讨论

As 是动脉粥样硬化性心血管疾病的主要病理基础,As 斑块堵塞动脉管腔,导致管腔狭窄,受累动脉出现破裂或缺血;另外,易损斑块脱落,容易引起急性冠状动脉综合征、脑卒中、心肌梗死、外周动脉疾病等心血管疾病^[10]。近年来研究发现,导致急性心血管病事件的主要原因是 As 斑块破裂和血栓形成,后者取决于斑块的易损性^[11]。临床研究证实,即使大剂量服用他汀类药物,动脉粥样硬化性心血管事件发生率仍高达 22%^[12]。因此,需要研制新型药物,以更好的防治 As 疾病的发生、发展,防止斑块形成、破裂,稳定已经形成的斑块组织,进而减少心血管事件的发生。中医认为 As 是由多种病因所致脏腑功能失调,气、血、津液运行、代谢障碍,产生痰、瘀等内生之邪,痹阻血脉,胶结凝聚,形成粥样斑块^[13]。中医学不存在“动脉粥样硬化”这个名词,但可根据其临床表现和受累部位将其概括为“头痛”、“眩晕”、“中风”、“真心痛”、“脉痹”等。其中医病机概括为脾失健运,痰瘀互结,属本虚标实,治以健脾益气、化瘀祛痰,据此课题组研制化瘀祛痰方。

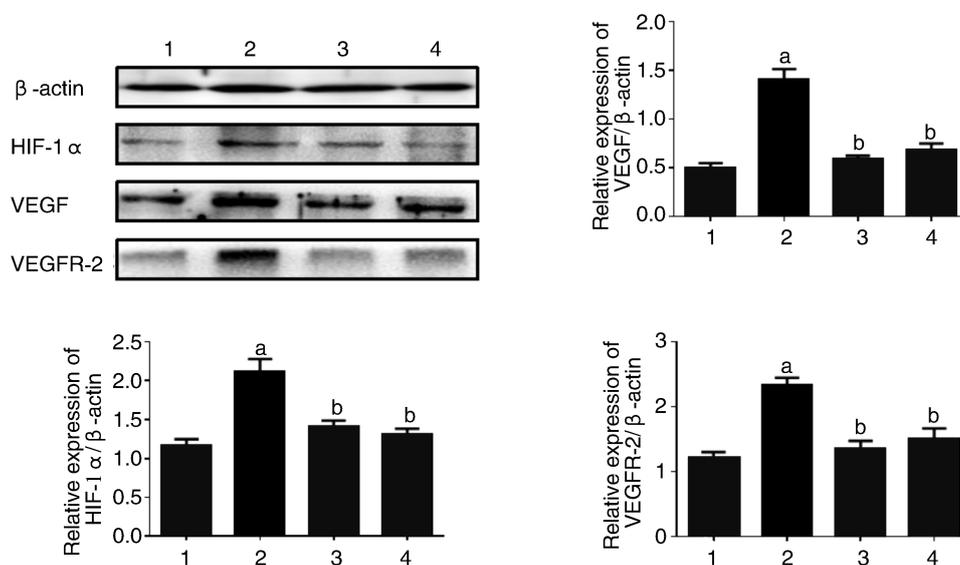


图4. 各组家兔主动脉 HIF-1 α 、VEGF 和 VEGFR-2 蛋白表达水平比较

1 为对照组,2 为模型组,3 为化瘀祛痰方组,4 为辛伐他汀组。a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

Figure 4. The protein levels of HIF-1 α , VEGF and VEGFR-2 in aortic wall

1 为对照组,2 为模型组,3 为化痰祛痰方组,4 为辛伐他汀组。

本实验中发现,模型组家兔血脂含量较对照组均出现显著变化,病理见动脉管壁内膜细胞增殖、内皮明显增厚,管壁增厚,管腔狭窄,有大量泡沫细胞和脂质沉积,由此证明成功复制 As 疾病模型。经化痰祛痰方和辛伐他汀治疗 4 周后,两组血脂含量较模型组均得到显著改善,主动脉管壁增厚程度明显减轻,泡沫细胞、脂质沉积量、脂质条纹及斑块面积明显减少。上述结果进一步证实,化痰祛痰方可改善 As 进程,起到很好的预防和治疗作用。该方配伍主要通过补气、化痰、祛痰,主治痰浊血瘀型动脉粥样硬化患者,临床亦取得可喜疗效^[3-4]。

As 血管壁微血管含量与脂质斑块稳定性密切相关^[14]。新生血管的密度与脂质斑块的厚度和动脉血管的狭窄程度呈正相关。血管新生是一个动态的过程,受到血管生成因子微妙的平衡调节,最终决定血管网络的增加^[15]。有学者研究发现,As 病变发展到脂纹时微血管发生率为 30%,发展为脂瘤的 III 型病变时,微血管发生率可达到 100%^[16]。在哺乳动物组织中,组织缺氧是刺激血管新生的最强因素之一,缺氧可上调参与血管新生的各种基因的表达,以增加氧的输送和促进代谢低氧适应^[17]。HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 信号通路是参与血管新生代谢调节的典型因素。HIF 是各种低氧诱导基因调节的关键转录因子^[18]。HIF 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 组成的异源二聚体,HIF-1 β 在体内可正常表达,而 HIF-1 α 在氧含量正常的细胞中并不表达,只在低氧情况下才被诱导表达^[19]。组织缺氧情况下,HIF-1 α 表达增强,促进 VEGF 表达上调,刺激血管内皮细胞活化、增殖,形成新的血管。而在 VEGF 的多种受体中,VEGFR-2 是 VEGF 主要功能受体^[20],在血管内皮细胞膜上表达,调控血管生成。本研究结果显示,与模型组比较,化痰祛痰方组可显著降低 HIF-1 α 和 VEGF 在 As 家兔血清和脂质斑块中的表达,显著降低 HIF-1 α 、VEGF 和 VEGFR-2 在主动脉脂质斑块中的表达。CD31 是内皮细胞黏附分子,在血管内皮细胞中表达,为血管新生的评价指标^[21]。本实验免疫组化结果显示,化痰祛痰方组主动脉 CD31 平均光密度值较模型组显著降低,证明药物干预后新生血管数量减少,进一步明确该方抑制斑块内血管新生的作用。综上所述,化痰祛痰方可选择性下调脂质斑块中促血管新生相关因子的表达,减少斑块中新生血管的数量,延缓斑块发生、发展,稳定易损斑块,防止破裂,从而减少心血管事件发生。

鉴于动物实验的局限性,仍需大样本的临床实验进一步证明该方通过抑制脂质斑块内血管新生

稳定斑块,进而起到防治 As 的作用。目前,中医药防治 As 取得长足的进展,成为研究热点。中药复方化痰祛痰方是否可以同时促进梗死组织血管新生,起到双向调节、多靶点作用于患病机体,体现中药扶正祛邪的作用机制,仍有待深入研究。

[参考文献]

- [1] 张运. 动脉粥样硬化研究的当前问题[J]. 中国医药科学, 2012, 2(1): 9-11.
- [2] Moran A, Gu D, Zhao D, et al. Future cardiovascular disease in China: Markov model and risk factor scenario projections from the coronary heart disease policy model-chain[J]. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2010, 3(3): 243-252.
- [3] 王健, 杨关林. 化痰祛痰颗粒剂对冠心病患者血管内皮功能的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2005(5): 430.
- [4] 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(4): 674.
- [5] 贾连群, 杨关林, 陈文娜, 等. 化痰祛痰方通过调节 ApoE(-/-)小鼠胆固醇代谢相关基因表达抗动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(1): 1-6.
- [6] 贾连群, 陈文娜, 赵秋宇, 等. 化痰祛痰方对动脉粥样硬化模型小鼠肝脏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.
- [7] 贾连群, 杨关林, 赵钢, 等. 化痰祛痰方对巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1、CD36 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(2): 234-237.
- [8] 刘剑刚, 马鲁波, 史大卓, 等. 气血并治方组分配伍防治兔动脉粥样硬化的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(3): 328-334.
- [9] 黄雪君, 孙冬梅, 姚楠, 等. 穿心莲内酯对新西兰兔动脉粥样硬化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 150-155.
- [10] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead[J]. Cell, 2001, 104(4): 503-516.
- [11] 张运. 攻克易损斑块根除心脏事件[J]. 中华医学杂志, 2004(13): 5-7.
- [12] Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. Pravastatin or atorvastatin evaluation and infection therapy-thrombolysis in myocardial infarction 22 investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes[J]. N Engl J Med, 2004, 350(15): 1495-504.
- [13] 贾连群, 杨关林. 动脉粥样硬化中医痰浊血瘀证候的现代生物学基础研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(1): 95-96.
- [14] Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta implications for plaque vulnerability[J]. Circulation, 2004, 110(14): 2032-038.
- [15] Caroline Camare, Melanie Pucelle. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque[J]. Redox Biology, 2017, 12: 18-34.
- [16] Jeziorska M, Woolley DE. Neovascularization in early atherosclerotic lesions of human carotid arteries: its potential contribution to plaque development[J]. Hum Pathol, 1995, 26(4): 450-456.
- [17] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia. role of the HIF system[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 677-684.
- [18] 刘莉, 叶鹏, Aarup A, 等. 巨噬细胞中缺氧诱导因子 1 α 表达促进动脉粥样硬化的发展[J]. 中华高血压杂志, 2016, 24(9): 808.
- [19] Wenger R H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression[J]. FASEB J, 2002, 16(10): 1151-162.
- [20] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. Nat Med 2003, 9: 669-676.
- [21] 孙佳音, 翟琳, 李巧玲, 等. 氨氯地平对急性心肌梗死大鼠血管新生和心功能的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(7): 589-593.

(此文编辑 许雪梅)