

本文引用: 潘 杨, 张 蕾, 李梦杰, 等. 黄芪多糖和水蛭素联合干预对巨噬细胞脂质积聚的影响及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(12): 1029-1036. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.12.003.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-12-1029-08

• 实验研究 •

黄芪多糖和水蛭素联合干预对巨噬细胞脂质积聚的影响及其机制

潘 杨¹, 张 蕾^{2,3}, 李梦杰^{2,3}, 郭帅杰^{2,3}, 郭家娟¹, 刘红旭², 刘卫红^{2,3}, 周明学^{2,3}

(1. 长春中医药大学, 吉林省长春市 130117; 2. 首都医科大学附属北京中医医院, 3. 北京市中医药研究所, 北京市 100010)

[摘要] **[目的]** 明确黄芪多糖和水蛭素联合干预对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的巨噬细胞内脂质积聚、线粒体膜电位和细胞凋亡相关蛋白的影响。**[方法]** 采用 100 mg/L ox-LDL 孵育 RAW264.7 细胞 24 h 建立泡沫细胞模型, 采用优化浓度的黄芪多糖和水蛭素联合干预, 设立对照组、模型组、黄芪多糖组、水蛭素组和二者联合干预组。采用油红 O 染色和氧化酶法检测 ox-LDL 诱导的巨噬细胞内胆固醇含量, 流式细胞仪检测巨噬细胞早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率, 激光共聚焦显微镜检测细胞线粒体膜电位的变化, Western blot 检测抗凋亡蛋白 Bcl-2 及促凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bax 的表达水平。**[结果]** 与水蛭素组、黄芪多糖组相比, 黄芪多糖和水蛭素联合干预组细胞内胆固醇含量降低更明显($P<0.05$)。与模型组相比, 黄芪多糖+水蛭素联合干预组可显著降低 ox-LDL 诱导的巨噬细胞早期凋亡率和总凋亡率($P<0.01$)、上调巨噬细胞线粒体膜电位($P<0.01$), 并显著降低 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达量, 升高 Bcl-2 蛋白表达量($P<0.05$)。**[结论]** 黄芪多糖和水蛭素联合干预可降低巨噬细胞内脂质积聚, 且优于单独用药干预, 两者联合干预可降低 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡率, 其作用机制可能与调控线粒体膜电位和改善促凋亡蛋白 Caspase-3、Bax 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达有关。

[关键词] 动脉粥样硬化; 黄芪多糖; 水蛭素; 脂质积聚; 巨噬细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

Effects of astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention on lipid accumulation in macrophages and its mechanism

PAN Yang¹, ZHANG Lei^{2,3}, LI Mengjie^{2,3}, GUO Shuaijie^{2,3}, GUO Jiajuan¹, LIU Hongxu², LIU Weihong^{2,3}, ZHOU Mingxue^{2,3}

(1. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130117, China; 2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, 3. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention on lipid accumulation, mitochondrial membrane potential and apoptosis-related proteins in macrophages induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** RAW264.7 cells were incubated with 100 mg/L ox-LDL for 24 h to establish a foam-cell model, which were treated by astragalus polysaccharide and hirudin after dose optimization. The control group, model group, astragalus polysaccharide group, hirudin group and the combined intervention of the two drugs group were established. Oil red O staining and oxidase method were used to detect the cholesterol contents in macrophages induced by ox-LDL, flow cytometry was used to detect the early apoptosis rate, late apoptosis rate and total apoptosis rate of macrophages, the changes of mitochondrial membrane potential were detected by laser confocal microscopy, Western blot was used to detect the expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-2, proapoptotic protein Caspase-3 and Bax. **Results** The contents of cholesterol in macrophages of the astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention group were decreased than those in the hirudin group or astragalus polysaccharide group significantly ($P<0.05$). Compared with the model group, the astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention could reduce the early apoptosis rate

[收稿日期] 2023-04-12

[修回日期] 2023-07-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274287);北京市自然科学基金项目(7232266)

[作者简介] 潘杨, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化及其相关机制的中医临床与研究, E-mail: 469908556@qq.com。通信作者 周明学, 医学博士, 研究员, 研究方向为心血管疾病中西医结合研究, E-mail: mingxue78@163.com。

and total apoptosis rate of macrophages induced by ox-LDL ($P<0.01$), increase the mitochondrial membrane potential of macrophages ($P<0.01$), reduce the expressions of Caspase-3 and Bax, and increase the expression of Bcl-2 protein ($P<0.05$) significantly.

Conclusions The astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention in reducing lipid accumulation in macrophages is superior to drug treatment alone. The combined treatment of the two drugs can reduce the apoptosis rate of macrophages induced by ox-LDL. Its mechanism may be related to regulate mitochondrial membrane potential and regulate the expressions of proapoptotic protein Caspase-3, Bax and anti-apoptotic protein Bcl-2.

[**KEY WORDS**] atherosclerosis; astragalus polysaccharide; hirudin; lipid accumulation; macrophage; apoptosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是全世界血管疾病的主要病因^[1],是冠状动脉粥样硬化性心脏病的主要病理基础,严重危害人类健康。As的发生发展过程涉及多种细胞机制和途径,如脂质积聚、自噬和凋亡、炎症、氧化应激和血管平滑肌增殖等^[2]。随着研究的不断深入,越来越多的证据表明血脂代谢异常导致动脉内膜下泡沫细胞的形成和聚集是As斑块发生的中心环节^[3],而细胞凋亡贯穿整个As的发展过程中,大量的细胞凋亡会影响斑块的稳定性,造成急性心血管事件的发生^[4]。

中医多将As归为“脉痹”“血痹”“胸痹”和“心痛”等范畴,病理机制早期以痰浊、血瘀为主,后期出现虚实夹杂,气虚血瘀证^[5]。清代医家王清任《医林改错》中提到“元气既虚,必不达于血管,血管无气,必停留而为瘀,此乃气虚血瘀也,气行则血行,气虚则血瘀”^[6]。益气逐瘀法是在益气活血法的基础上结合中医络病理论演变而来,络病学说认为As属“久病入络”“久瘀入络”,其病理基础多由心气虚乏,络脉瘀阻,细急而痛所致,气虚血瘀导致津液输布障碍,停留于脉络积聚成毒,致使脉络受损,治疗上常采用通络法,利用虫类药搜剔血络,透毒外出的作用,同时配伍大剂量补气药扶正透毒,防虫类药耗伤正气^[7]。

因此,基于细胞凋亡和细胞脂质积聚在As中的作用以及中医络病理论,推测益气代表药黄芪和逐瘀通络代表药水蛭的有效成分黄芪多糖和水蛭素联合干预可能通过抑制巨噬细胞凋亡,减少巨噬细胞内脂质积聚,从而延缓As进程。为此,本研究采用氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导巨噬细胞泡沫化,并选取黄芪多糖和水蛭素联合干预,从细胞凋亡角度研究其作用机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

RAW264.7小鼠巨噬细胞购自北京协和细胞资

源中心。

1.2 药物

水蛭素冻干粉购自西安普瑞斯生物工程有限公司;黄芪多糖冻干粉(IA0570)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 试剂

DMEM培养基(2120395)、胎牛血清(2132094P)购自Gibco公司;ox-LDL购自北京源博汇科生物技术有限公司;组织总胆固醇(total cholesterol, TC)酶法测定试剂盒(E1015)、组织游离胆固醇(free cholesterol, FC)酶法测定试剂盒(E1016)、蛋白质定量试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司;油红O染色液(G1262)、高效RIPA裂解液(R0010)购自Solarbio公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(C1062L)、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1, C2006)购自上海碧云天生物技术有限公司;Caspase-3兔单克隆抗体(14220S)、Bcl-2兔单克隆抗体(3498S)和Bax兔单克隆抗体(14796S)购自Cell Signaling Technology公司; β -actin(G1003S)购自北京冠星宇科技有限公司。

1.4 仪器

电子天平(德国Sartorius公司, BP1215);低温离心机(美国Sigma公司, 3-18k);蒸汽高压消毒箱(美国Tuttnaner公司, 2540MK);全波长酶标仪(美国Thermo公司, 1500);微型离心机(珠海罗马医学仪器有限公司, Mini-6k);流式细胞仪(美国Becton公司, Dickinson and Company);激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司, LSM780);电泳仪(北京六一仪器厂, DYY-6C);凝胶成像仪(上海山富科学仪器有限公司, BioSens SC 810B);超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司);CO₂培养箱(日本Sanyo公司, MCO-18AC);电子天平(德国Sartorius公司, BP1215);水浴锅(德国Wiggins公司, WA20)。

1.5 分组及干预方法

实验分组:对照组、模型组、黄芪多糖组、水蛭素组和两药联合干预组。干预方法:对照组给予DMEM培养;模型组给予DMEM+100 mg/L ox-LDL

溶液;黄芪多糖组给予 DMEM+100 mg/L ox-LDL 溶液+100 mg/L 黄芪多糖;水蛭素组给予 DMEM+100 mg/L ox-LDL 溶液+40 mg/L 水蛭素溶液;联合干预组给予 DMEM+100 mg/L ox-LDL 溶液+40 mg/L 水蛭素溶液+100 mg/L 黄芪多糖溶液,共培养 24 h。

1.6 氧化酶法检测巨噬细胞内胆固醇含量

将细胞按照 4×10^5 /孔接种于 6 孔板中培养 24 h,饥饿过夜后进行不同组间干预,继续培养 24 h 后收集细胞。裂解,取上清液进行酶学测定,选择 550 nm 波长进行 OD 值测定,根据标准品绘制标准曲线,计算样品胆固醇的浓度,用 BCA 法进行蛋白定量,确定每毫克胆固醇含量。

1.7 油红 O 染色检测巨噬细胞泡沫化

将细胞按照 1×10^8 /孔接种于 24 孔板中培养 24 h,饥饿过夜后进行不同组间干预,孵箱内培养 24 h。固定 20~30 min,浸染 10~20 min,加入蒸馏水覆盖细胞并在显微镜下观察拍照。

1.8 流式细胞仪检测黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡的影响

将细胞按照 6×10^5 /孔接种于 6 孔板中,按照实验需要处理后 PBS 洗涤 2 次,收集细胞,加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,加入 5 μ L Annexin V-FITC,再加入 10 μ L PI 染色液混匀,避光,室温孵育 10~20 min 后置于冰上,离心收集细胞后加入 500 μ L PBS 重悬,转移至流式管中,立即上流式细胞仪检测。

1.9 流式细胞仪检测黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞线粒体膜电位的影响

将细胞按照 6×10^5 /孔接种于 6 孔板中培养 24 h,饥饿过夜后进行不同组间干预,继续培养 24 h,弃上清,收集细胞后进行重悬,再加入 0.5 mL JC-1 染色工作液混匀,避光,孵箱中孵育 20 min,收集细胞,用 JC-1 染色缓冲液洗涤细胞 2 次,再用 500 μ L JC-1 染色缓冲液重悬后,转移至流式管内,上流式细胞仪检测分析。

1.10 激光共聚焦检测黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞线粒体膜电位的影响

将细胞按照 4×10^5 /孔接种于共聚焦小皿中培养 24 h,饥饿过夜后进行不同组间干预,用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 1 mL 细胞培养液,再加入 1 mL JC-1 染色工作液混匀,避光,孵箱中孵育 20 min,JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,加入细胞培养液 2 mL,在激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.11 Western blot 检测黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞相关凋亡蛋白表达的影响

提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒检测总蛋白浓度,加入 5 \times Loading buffer,配置好所需样本后,95 $^{\circ}$ C 5 min,蛋白变性后置于冰上;配制 12.5% 和 15% 快速凝胶,取蛋白上样 20 μ L/孔,蛋白电泳,无水乙醇激活 PVDF 膜进行电转,在摇床上室温封闭 1 h,孵育一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。加入二抗,室温摇床孵育 1 h。ECL 滴加到膜的蛋白面,反应 3 min,胶片曝光,显影定影,图片扫描后用凝胶成像仪进行拍照并进行灰度分析。

1.12 统计学分析

用 SPSS 20.0 软件分析组间数据,各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,目的蛋白的相对表达量=目标蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪多糖和水蛭素联合干预可减少 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 内脂质积聚

与对照组相比,模型组泡沫细胞内 TC 含量增加 3.38 倍,FC 增加 1.02 倍,胆固醇酯(cholesteryl ester,CE)增加 13.8 倍,CE/TC 增加 2.41 倍,差异均具有统计学意义($P < 0.01$),且 CE/TC 大于 0.5,说明本研究中泡沫细胞模型成功建立^[8]。与模型组相比,黄芪多糖+水蛭素联合干预组 TC 含量降低 50.4%,FC 降低 14.3%,CE 降低 72.1%,CE/TC 降低 44.2%,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。与水蛭素组相比较,黄芪多糖+水蛭素联合干预组 TC、CE 含量及 CE/TC 分别降低 22.5%、40.4% 和 24.2%,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);与黄芪多糖组相比,黄芪多糖+水蛭素联合干预组 TC、CE 含量及 CE/TC 分别降低 27.0%、49.6% 和 31.4%,差异均具有统计学意义($P < 0.01$;表 1)。

2.2 黄芪多糖和水蛭素联合干预减弱 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 泡沫化

与对照组相比较,100 mg/L ox-LDL 能诱导巨噬细胞泡沫化,使细胞体积增大,胞质内可见大量的红色脂滴;水蛭素组、黄芪多糖组和联合干预组胞质中红色脂滴减少,其中,联合干预组油红 O 染色效果相对更弱(图 1)。

2.3 黄芪多糖和水蛭素联合干预可抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示,与对照组相比,模

型组细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率显著增加($P<0.01$);与模型组相比,黄芪多糖+水蛭素联合干预组细胞早期凋亡率和总凋亡率显著降低

($P<0.01$),说明水蛭素和黄芪多糖联合干预可降低 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡(图 2)。

表 1. 黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 内脂质积聚的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1. Effect of astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention on lipid accumulation in RAW264.7 induced by ox-LDL($\bar{x}\pm s$)

分组	TC/(mmol/g)	FC/(mmol/g)	CE/(mmol/g)	CE/TC
对照组	0.081±0.009	0.066±0.004	0.015±0.005	0.183±0.045
模型组	0.355±0.024 ^a	0.133±0.008 ^a	0.222±0.018 ^a	0.624±0.013 ^a
水蛭素组	0.227±0.013 ^b	0.123±0.005	0.104±0.011 ^b	0.459±0.023 ^b
黄芪多糖组	0.241±0.023 ^b	0.118±0.0007 ^b	0.123±0.023 ^b	0.507±0.047 ^b
黄芪多糖+水蛭素联合干预组	0.176±0.012 ^{bcd}	0.114±0.003 ^b	0.062±0.013 ^{bcd}	0.348±0.049 ^{bcd}

注:a 为 $P<0.01$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与模型组比较;c 为 $P<0.05$,与水蛭素组比较;d 为 $P<0.01$,与黄芪多糖组比较。

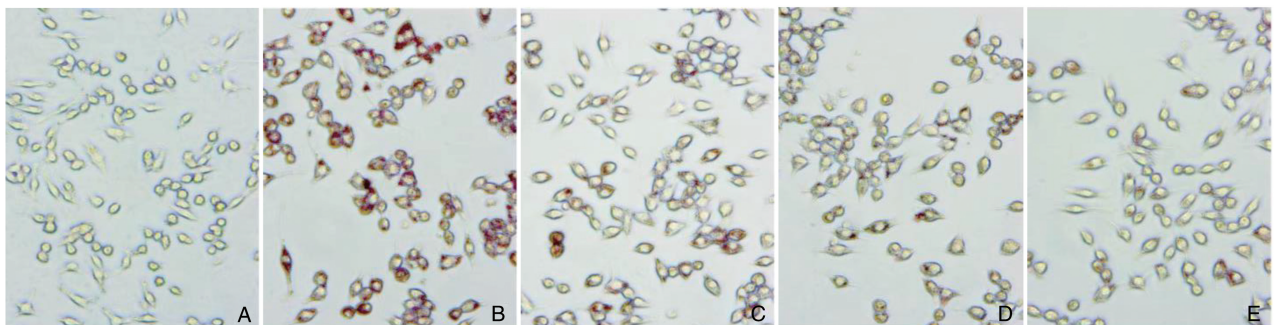


图 1. 黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 泡沫化的影响(油红 O 染色,40×)

A 为对照组,B 为模型组,C 为水蛭素组,D 为黄芪多糖组,E 为黄芪多糖+水蛭素联合干预组。

Figure 1. Effect of astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention on ox-LDL induced RAW264.7 foam

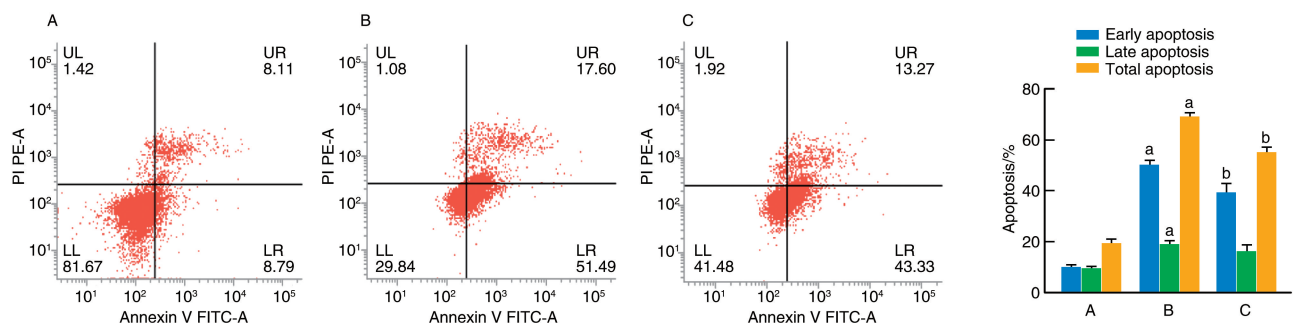


图 2. 黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡的影响

A 为对照组,B 为模型组,C 为黄芪多糖+水蛭素联合干预组。a 为 $P<0.01$,与对照组比较;b 为 $P<0.01$,与模型组比较。

Figure 2. Effect of astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention on ox-LDL induced macrophage apoptosis

2.4 黄芪多糖和水蛭素联合干预上调 ox-LDL 诱导的巨噬细胞线粒体膜电位

与对照组相比,模型组巨噬细胞线粒体膜电位下降,以单体形式存在的 JC-1 (绿色荧光) 比例增加($P<0.01$);同时,线粒体基质中的 JC-1 聚合物产生红色荧光的比例下降($P<0.01$)。与模型组相比较,

黄芪多糖+水蛭素联合干预组巨噬细胞线粒体膜电位上调,JC-1 单体比例降低,线粒体基质中的 JC-1 聚合物比例上升($P<0.01$)。说明黄芪多糖和水蛭素联合干预可以上调 ox-LDL 诱导的巨噬细胞膜电位,减轻泡沫化巨噬细胞早期凋亡的发生(图 3 和图 4)。

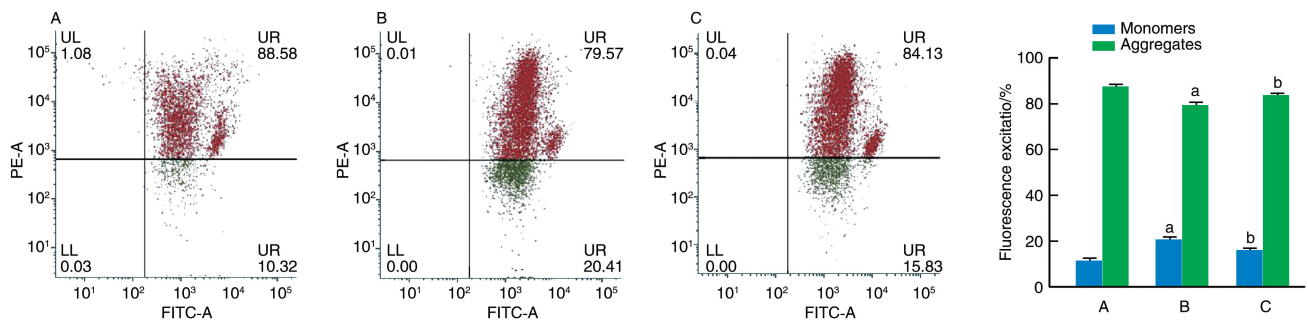


图 3. 流式细胞仪检测黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞线粒体膜电位的影响
A 为对照组, B 为模型组, C 为黄芪多糖+水蛭素联合干预组。a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与模型组比较。
Figure 3. Flow cytometry was used to detect the effect of astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention on ox-LDL-induced mitochondrial membrane potential in macrophages

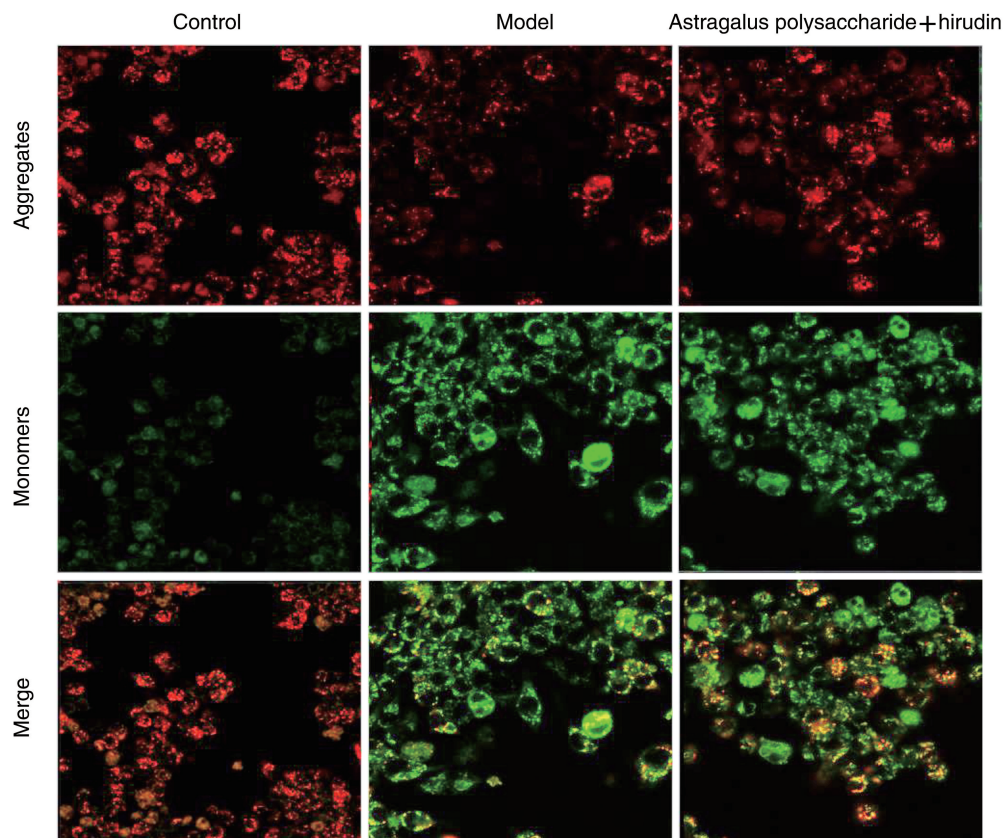


图 4. 激光共聚焦显微镜观察黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞线粒体膜电位的影响(400×)
Figure 4. Laser confocal microscopy was used to observe the effect of astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention on ox-LDL-induced mitochondrial membrane potential in macrophages(400×)

2.5 黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡蛋白 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 表达的影响

与对照组相比,模型组巨噬细胞内 Caspase-3 和 Bax 的蛋白表达量增加,Bcl-2 的蛋白表达量减少,差异均具有统计学意义($P<0.01$);与模型组相比,

黄芪多糖+水蛭素联合干预组巨噬细胞内 Caspase-3 和 Bax 的蛋白表达量降低,Bcl-2 的蛋白表达量升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。说明黄芪多糖和水蛭素联合干预可显著上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,下调促凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bax 的表达(图 5)。

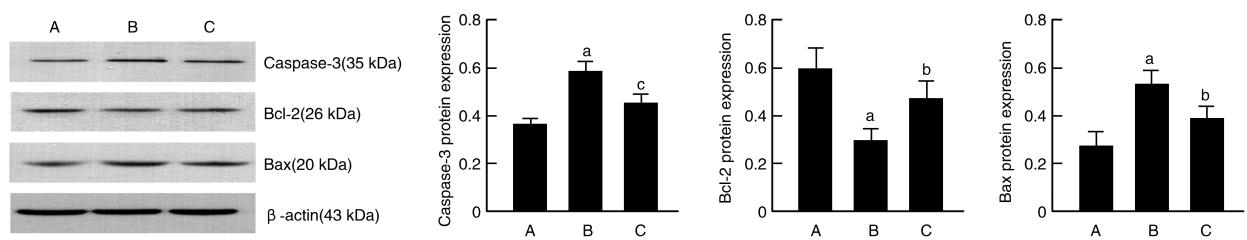


图5. 黄芪多糖和水蛭素联合干预对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞相关凋亡蛋白表达的影响

A 为对照组, B 为模型组, C 为黄芪多糖+水蛭素联合干预组。

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。

Figure 5. Effect of astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention on the expression of macrophage related apoptotic proteins induced by ox-LDL

3 讨论

目前,中医多认为 As 为本虚标实之证,气虚血瘀、痰浊壅滞是 As 形成的病理因素,膏脂运化失常为其病理基础,血脉闭阻为其临床终点^[9],这与西医所说“血栓”和“脂质斑块”概念相类似,是导致冠状动脉狭窄的重要病理基础^[10]。临床上针对治疗 As 的中药复方中多包含黄芪和水蛭两味药,其中黄芪味甘、性微温、归脾肺两经,具有固表止汗、益气升阳、托毒生肌和利水消肿之功效^[11],是益气的典型代表药。水蛭是破血逐瘀药中治疗胸痹心痛的良药,味咸,性平,色黑,气腐,因其味咸故善入血分,为嗜血之物故善于破血;气腐,其气味与瘀血相感召,而不与新血相感召,故破瘀而不伤新血,可消瘀血于无形^[12]。现代药理研究发现,黄芪多糖是黄芪最重要的天然有效成分,也是主要活性成分之一,具有保护血管内皮、保护心肌细胞等功能;水蛭的主要成分水蛭素有抑制血小板聚集、抗凝、抗栓、促纤溶、降血脂等作用^[13]。故选取具有益气逐瘀代表性药物的主要成分黄芪多糖和水蛭素进行联合干预,探讨其对巨噬细胞内脂质积聚的影响。

研究发现,益气、活血中药的联合干预对 As 有不同程度的治疗作用。张红珍等^[14]研究发现益气药黄芪和活血药三七的联合干预具有抗 As 作用,并在一定范围内随着益气药物量的增加其效果增强,降低 C 反应蛋白和血脂可能是其作用机制之一。张永波等^[15]发现黄芪槲皮素、三七总皂甙联合干预可增加血清 TIMP-1 表达,发挥抗 As 作用,且联合用药比单独应用效果好。杨志红等^[16]研究表明黄芪多糖可能通过上调 ABCA1 的蛋白表达而降低泡沫细胞内胆固醇含量,促进 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出。刘东泽等^[17]研究发现水蛭酶解物能够很好地降低泡沫细胞内脂质含量,使泡沫

细胞形成受到抑制,与调控细胞自噬有关。基于以上研究,推测益气逐瘀代表性药物的主要成分黄芪多糖和水蛭素联合干预可能对巨噬细胞内脂质积聚和泡沫细胞形成具有一定的抑制作用。

本课题组早期通过 CCK-8、胆固醇测定和油红 O 染色预实验发现,100 mg/L ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞 24 h 可建立巨噬细胞泡沫化模型,水蛭素高剂量(40 mg/L)组、黄芪多糖高剂量(100 mg/L)组可降低细胞内胆固醇含量,较其他剂量组而言,水蛭素 40 mg/L 和黄芪多糖 100 mg/L 在降低 ox-LDL 诱导的巨噬细胞内脂质积聚方面具有更为明显的效果。故在预实验的基础上,本研究采用优化剂量水蛭素 40 mg/L 和黄芪多糖 100 mg/L 进行联合干预,结果发现,与水蛭素组、黄芪多糖组相比,二者联合干预在降低 TC、CE 含量以及两者比例方面效果更好,提示黄芪多糖和水蛭素联合干预抑制巨噬细胞脂质积聚方面具有较好的协同增效作用。

巨噬细胞向泡沫细胞的转变过程实质上是细胞凋亡的过程^[18],并且线粒体凋亡途径是细胞凋亡的主要途径之一^[19]。研究表明,在几乎所有的细胞凋亡中均伴有细胞线粒体膜电位的下降,这主要受线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 调控的线粒体膜通透性 (permeability transition, PT) 的改变所致^[20]。MPTP 主要由线粒体内膜的腺苷转位因子 (adenine nucleotide translocator, ANT)、线粒体外膜的电压依赖性阴离子通道 (voltage dependent anion channel, VDAC) 和亲环蛋白 D 等蛋白组成, MPTP 的孔道组分与其他多肽协同,将细胞色素 c (cytochrome C, Cyt c) 输送到胞质中。最近研究表明,促凋亡家族成员 (Bax 和 Bak) 和抗凋亡家族成员可与孔道的某些成分 (ANT、VDAC) 相互作用,被氧化修饰的低密度脂蛋白可使抗凋亡和促凋亡相关基因的表达失衡^[21]。

Bcl-2 抗凋亡蛋白的抑制使线粒体膜的通透性增大并促进 Cyt c 释放, Cyt c 进入胞质中即与细胞凋亡蛋白酶活化因子 1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 结合, 在 dATP/ATP 存在的条件下活化 Caspase-9, 启动 Caspase 级联反应, 进而激活凋亡过程中最主要的终末剪切酶 Caspase-3 的表达, 促进凋亡发生^[22]。巨噬细胞源性泡沫细胞凋亡后形成的凋亡产物难以清除, 胞质内容物释放堆积形成脂质池, 促进粥样坏死中心形成和增大^[18]。此外, 大量研究表明, 晚期 As 中含脂质的巨噬细胞凋亡促进病变坏死, 并导致斑块易损、破裂和急性血管事件的发生。因此, 抑制巨噬细胞源性泡沫细胞的形成和凋亡可能是预防和治疗 As 发生发展的有效策略^[23]。

因此, 在明确药物疗效的基础上, 本研究进一步通过流式细胞仪、激光共聚焦显微镜和蛋白质印迹检测发现, 黄芪多糖和水蛭素联合干预通过上调线粒体膜电位、促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达并抑制促凋亡蛋白 Bax 以及凋亡中重要的激活蛋白 Caspase-3 的表达, 减轻 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡, 抑制泡沫细胞形成, 延缓 As 斑块的进展。

综上所述, 黄芪多糖和水蛭素联合干预可降低巨噬细胞内脂质积聚, 其治疗 As 作用机制可能与降低 ox-LDL 诱导巨噬细胞凋亡、调控线粒体膜电位和相关促凋亡蛋白 Caspase-3、Bax 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达有关, 但其具体机制仍需要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] HERRINGTON W, LACEY B, SHERLIKER P. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 535-546.
- [2] 杨双, 王忠良. 中医药治疗动脉粥样硬化作用机制的研究进展[J]. *中医药学报*, 2023, 51(3): 107-111.
YANG S, WANG Z L. Research progress on action mechanism of TCM in treatment of atherosclerosis[J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2023, 51(3): 107-111.
- [3] 李天梅, 温远平, 罗培, 等. 黄芪及其活性成分通过调节脂质代谢防治动脉粥样硬化的作用机制研究进展[J]. *山东医药*, 2023, 63(5): 85-87.
LI T M, WEN Y P, LUO P, et al. Research progress in the mechanism of astragalus membranaceus and its active components preventing atherosclerosis by regulating lipid metabolism[J]. *Shandong Med J*, 2023, 63(5): 85-87.
- [4] 张皓南, 任博文, 纪元浩, 等. 巨噬细胞程序性死亡在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(8): 43-49.
- [5] ZHANG H N, REN B W, JI Y H, et al. Research progress of programmed death of macrophages in atherosclerosis[J]. *Chin J Mod Med*, 2023, 33(8): 43-49.
- [6] 崔圆圆. 冠状动脉粥样硬化性心脏病中医证型与血脂、颈动脉粥样硬化相关性研究[J]. *河南中医*, 2020, 40(10): 1569-1572.
CUI Y Y. Study on correlation between TCM syndrome types of coronary atherosclerotic heart disease and blood lipid and carotid atherosclerosis[J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2020, 40(10): 1569-1572.
- [7] 魏佳明, 朱俊平, 刘瑞连, 等. 动脉粥样硬化的中医药研究进展[J]. *湖南中医杂志*, 2020, 36(9): 177-180.
WEI J M, ZHU J P, LIU R L, et al. Research progress of atherosclerosis in traditional Chinese medicine[J]. *Hunan J Tradit Chin Med*, 2020, 36(9): 177-180.
- [8] 吴以岭. 络病学说构建及其指导血管病防治药物的研究[J]. *实用心电学杂志*, 2018, 27(4): 229-233.
WU Y L. Construction of collateral theory and its guidance on preventive and therapeutic medication for vascular diseases[J]. *J Pract Electrocardiol*, 2018, 27(4): 229-233.
- [9] 崔永春, 刘晓鹏, 张宏, 等. 不同阶段泡沫细胞模型的建立与鉴定[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2014, 14(3): 953-957.
CUI Y C, LIU X P, ZHANG H, et al. Establishment and identification for different stages of foam cells[J]. *Mol Cardiol Chin*, 2014, 14(3): 953-957.
- [10] 杨关林, 张哲, 张会永, 等. 血脉病探要[J]. *辽宁中医杂志*, 2007, 34(11): 1528-1529.
YANG G L, ZHANG Z, ZHANG H Y, et al. Exploration of blood vessel disease[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2007, 34(11): 1528-1529.
- [11] 支晨曦, 谢忠成, 李靛, 等. 中国动脉粥样硬化近三年基础研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(9): 744-752.
ZHI C X, XIE Z C, LI L, et al. The progress of the national preclinical research of atherosclerosis in the recent three years[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(9): 744-752.
- [12] 张国用. 中药黄芪的药理作用及其临床应用研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2012, 20(6): 1059-1060.
ZHANG G Y. Chinese medicine Huangqi pharmacological functions and clinical application research[J]. *PJCCPVD*, 2012, 20(6): 1059-1060.
- [13] 刘师, 赵华明. 虫类药治疗胸痹心痛有感[J]. *北方药学*, 2016, 13(2): 193.
LIU S, ZHAO H M. Insect drugs for treating chest pain and heartache[J]. *J North Pharm*, 2016, 13(2): 193.

- [13] 李克明, 张国, 武继彪. 水蛭的药理研究概况[J]. 中医研究, 2007, 20(2): 62-64.
LI K M, ZHANG G, WU J B. Overview of pharmacological research on leeches[J]. TCM Res, 2007, 20(2): 62-64.
- [14] 张红珍, 李丽. 黄芪、三七对动脉粥样硬化模型 C 反应蛋白的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2004, 2(10): 589-590.
ZHANG H Z, LI L. Effects of astragalus and panax notoginseng on C-reactive protein in atherosclerotic model[J]. Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis, 2004, 2(10): 589-590.
- [15] 张永波, 李丽. 黄芪与三七有效成分配伍对动脉粥样硬化大鼠模型 TIMP-1 表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(4): 326-328.
ZHANG Y B, LI L. Effects of astragalus march panax notoginseng on the expression of TIMP-1[J]. Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis, 2007, 5(4): 326-328.
- [16] 杨志红, 龚伟, 陈凤玲, 等. 黄芪多糖对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(10): 2029-2032.
YANG Z H, GONG W, CHEN F L, et al. Effect of astragalus polysaccharides on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells[J]. Chin J Pathophysiol, 2008, 24(10): 2029-2032.
- [17] 刘东泽. 水蛭酶解物对动脉粥样硬化中泡沫细胞的作用及机制研究[D]. 威海市: 山东大学, 2014: 43-63.
LIU D Z. The research of effect and mechanism of leech enzymatic extraction on the foam cell of atherosclerosis [D]. Weihai; Shandong University, 2014: 43-63.
- [18] 赵张艳, 林玉璧, 孙雷. 巨噬细胞凋亡与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(5): 406-408.
ZHAO Z Y, LIN Y B, SUN L. Macrophage apoptosis and atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2008, 16(5): 406-408.
- [19] 易念, 王莉, 王松, 等. 贝母素乙通过调控 PI3K/Akt 信号通路诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(12): 2180-2185.
YI N, WANG L, WANG S, et al. Peiminine induces apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by regulating PI3K/Akt signaling pathway[J]. Mod Oncol, 2023, 31(12): 2180-2185.
- [20] 陈津, 张如松. 细胞凋亡机制概述[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(4): 886-889.
CHEN J, ZHANG R S. Mechanism of cell apoptosis[J]. Chin Arch TCM, 2011, 29(4): 886-889.
- [21] 李宏, 冯有胜. 线粒体 CytC 的释放机制及其在细胞凋亡中的作用[J]. 生物信息学, 2010, 8(3): 210-213.
LI H, FENG Y S. Mechanism of mitochondria CytC release and its action in apoptosis[J]. Chin J Bioinform, 2010, 8(3): 210-213.
- [22] 李天富, 罗玉敏, 吕传真. 细胞凋亡与 caspase 机制的调控[J]. 中国临床神经科学, 2003, 11(3): 313-315.
LI T F, LUO Y M, LV C Z. Regulation of apoptosis and caspase mechanism[J]. Chin J Clin Neurosci, 2003, 11(3): 313-315.
- [23] ZHANG H, LIU Q, LIN J L, et al. Recombinant human thioredoxin-1 protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced foam cell formation and cell apoptosis[J]. Biomol Ther(Seoul), 2018, 26(2): 121-129.
- (此文编辑 文玉珊)