

## 温阳活血解毒方稳定 $ApoE^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化斑块机制研究

张涛涛<sup>1</sup>, 黄娜<sup>1</sup>, 余锋<sup>2</sup>, 刘南<sup>2</sup>, 洪永敦<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东广州 510405)

**摘要:**【目的】探讨温阳活血解毒方防治动脉粥样硬化(AS)不稳定斑块发生发展的可能作用机制。【方法】以高脂饲料喂养50只8周龄雄性载脂蛋白E基因敲除( $ApoE^{-/-}$ )小鼠13周, 复制动脉粥样硬化模型。将模型小鼠随机分为模型组、辛伐他汀组( $2.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )和中药低、中、高剂量组( $14.08$ 、 $28.16$ 、 $56.32\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), 每组9只。分组后次日各给药组开始灌胃给药, 每日1次, 连续灌胃给药13周; 模型组灌胃等体积生理盐水。采用苏木素-伊红(HE)染色观察主动脉组织病理学变化; 用干化学法在全自动生化仪上检测血清中总胆固醇(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; 分别采用蛋白免疫印迹(Western Blot)法和实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测主动脉组织中小凹蛋白1(Caveolin-1)和磷酸化细胞外信号调节蛋白激酶1/2(p-ERK1/2)的蛋白及mRNA表达水平。【结果】与模型组比较, 中药高剂量组及辛伐他汀组小鼠主动脉胆固醇结晶明显减少, 斑块明显趋于稳定, 血清中TC、TG、LDL-C水平明显降低, HDL-C水平明显升高(均 $P < 0.01$ ), 主动脉组织中Caveolin-1蛋白的表达量明显增加, p-ERK1/2蛋白的表达量明显降低(均 $P < 0.05$ )。与模型组比较, 各给药组主动脉组织Caveolin-1 mRNA、p-ERK1/2 mRNA表达水平均无明显变化, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。且与辛伐他汀组比较, 中药高剂量组在稳定斑块、调节血脂水平、Caveolin-1蛋白表达水平方面无明显差异( $P > 0.05$ )。【结论】温阳活血解毒方可调节血脂水平, 增加动脉粥样硬化斑块稳定性, 其机制可能与上调Caveolin-1蛋白表达抑制ERK1/2信号通路的激活有关。

**关键词:** 温阳活血解毒方; 动脉粥样硬化; 易损斑块; 小凹蛋白1(Caveolin-1); 细胞外信号调节蛋白激酶1/2(ERK1/2); 小鼠  
**中图分类号:** 285.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1007-3213(2021)08-1679-07

**DOI:** 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.08.026

## Mechanism Study on Yang-Warming, Blood-Activating, Toxins-Removing Recipe for Stabilizing Atherosclerotic Plaque in $ApoE^{-/-}$ mice

ZHANG Tao-Tao<sup>1</sup>, HUANG Na<sup>1</sup>, YU Feng<sup>2</sup>, LIU Nan<sup>2</sup>, HONG Yong-Dun<sup>2</sup>

(1. The First Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the possible therapeutic mechanism of Yang-Warming, Blood-Activating, Toxins-Removing Recipe (YBTR) for the formation and progress of unstable plaque of atherosclerosis (AS). **Methods** Fifty 8-week-old male  $ApoE^{-/-}$  mice were induced into atherosclerosis model by feeding with high-fat diet for 13 weeks. And then the model mice were randomly divided into model group, simvastatin group ( $2.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), low-, middle- and high-dose YBTR groups ( $14.08$ ,  $28.16$ ,  $56.32\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), 9 mice in each group. From the following day the medication groups were given intragastric administration of corresponding medicine for 13 continuous weeks, once a day, and the model group was given intragastric administration of the same volume of normal saline. After medication, the histopathological features of mouse aorta tissue were observed by hematoxylin eosin (HE) staining. The levels of serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were detected by automatic biochemical analyzer by dry chemistry method. The protein and mRNA expression levels of Caveolin-1 and phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase (p-ERK1/2) in aortic tissue were detected by Western blotting assay

收稿日期: 2021-02-25

作者简介: 张涛涛(1995-), 女, 在读研究生; E-mail: 1099920061@qq.com

通讯作者: 余锋(1982-), 男, 博士, 副主任医师; E-mail: doctoryufeng@126.com

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金资助项目(编号: A2020498); 广州中医药大学第一附属医院青年科研基金资助项目(编号: 2019QN19)

and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), respectively. **Results** Compared with the model group, the cholesterol crystals were significantly reduced in the high-dose YBTR group and simvastatin group, and plaque tended to be stable obviously, the serum TC, TG and LDL-C levels were decreased, HDL-C level was increased (all  $P < 0.01$ ), the protein expression level of Caveolin-1 in aortic tissue was increased, the expression protein level of p-ERK1/2 was decreased (all  $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the mRNA expression levels of Caveolin-1 in aortic tissue had no obvious changes ( $P > 0.05$ ). There were no statistically significant differences in lipid metabolism, plaque stability, and Caveolin-1 protein expression between the high-dose YBTR group and simvastatin group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** YBTR is effective for regulating blood lipid level and increasing atherosclerotic plaque stability, the mechanism possible is associated with the up-regulation of Caveolin-1 expression and suppression of activation of ERK1/2 signaling pathway.

**Keywords:** Yang-Warming, Blood-Activating, Toxins-Removing Recipe; atherosclerosis; vulnerable atherosclerotic plaque; Caveolin-1; extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2); mice

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病,是急性心脑血管疾病发展的病理基础。AS斑块破裂和血栓形成是急性心血管事件的主要发病原因。《中国心血管健康与疾病报告2019概要》<sup>[1]</sup>报道,心脑血管疾病是我国居民死亡的首要因素,占总死亡率的70%以上,且随着人口老龄化的增长,其患病率和死亡率仍处于上升阶段。目前,西医治疗AS以他汀类药物为主,他汀类药物能显著降低患者心血管事件的发生率,但长期使用会增加肝损害和肌病等不良反应的发生,导致AS患者的疗效欠佳<sup>[2]</sup>。临床实践证明,中医药在防治AS等疾病方面具有整体调节、毒副作用小、疗效显著等优点,因此,加强中医药对AS易损斑块的研究具有重要意义。本课题组前期临床及实验研究证实,温阳活血解毒方可抑制血管新生、改善血管内皮功能及稳定易损斑块,对冠心病急性冠脉综合征有较好的治疗作用<sup>[3-9]</sup>。小凹蛋白1(Caveolin-1)是位于小凹上的标志蛋白,在细胞信号转导中起枢纽作用<sup>[10]</sup>。细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)是控制AS炎症反应的重要细胞信号转导通路,Caveolin-1蛋白表达上调能够激活ERK1/2通路,以磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)形式存在,进而抑制炎症反应和促进血管平滑肌细胞凋亡,减轻AS<sup>[11-12]</sup>。推测干预Caveolin-1/ERK1/2信号通路的蛋白表达可能影响AS的病理过程。为进一步探讨温阳活血解毒方稳定AS斑块的作用机制,本研究观察了温阳活血解毒方对AS易损斑块Caveolin-1、

p-ERK1/2蛋白和mRNA表达的影响,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 动物及饲料** SPF级雄性载脂蛋白E基因敲除(*ApoE<sup>-/-</sup>*)小鼠50只,8周龄,体质量12~16g,由广州中医药大学实验动物中心提供,使用许可证号:SYXK(粤)2018-0092,动物质量合格证号:44005800010047。动物饲养于广州中医药大学第一附属医院SPF级动物实验室,温度21~25℃,湿度40%~70%,光照时间为12h日夜交替照明。高脂饲料(含脂肪质量分数为21%、胆固醇质量分数为0.15%),已经钴-60灭菌处理,购自广东省医学实验中心。

**1.2 药物** 温阳活血解毒方由党参10g、薤白15g、桂枝10g、法半夏10g、川芎10g、丹参15g、柴胡10g、黄芩10g、连翘10g、炙甘草5g组成。药材饮片均购自广州中医药大学第一附属医院,由广州中医药大学实验中心药理研究所方坚松副研究员鉴定,并以高压灭菌蒸馏水稀释成质量浓度为3g·mL<sup>-1</sup>的中药汤剂。辛伐他汀片,每片20mg,由杭州默沙东制药有限公司生产,批号:H20191110。

**1.3 试剂与仪器** 两步法RT-PCR试剂盒(大连宝生物功能有限公司);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);引物由上海博尚生物技术有限公司合成。人抗鼠Caveolin-1、p-ERK1/2抗体和兔抗鼠IgM抗

体LS-C60748(美国R&D Systems公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(上海钰博生物科技有限公司,批号为20191125)。全自动生化分析仪(日本日立公司);Eppendorrf-5332型PCR自动扩增仪(德国Eppendorf公司);LightCycler2.0实时定量PCR仪(瑞士罗氏公司);LightCycler 2.0冰冻切片LEICA CM1900型(德国Leica公司);BX41型光学显微镜、BX-51型偏振光显微镜(日本Olympus公司);Biofuge Stratos型低温高速台式离心机(德国Heracus公司)。

**1.4 造模、分组与给药** 给予50只SPF级ApoE<sup>-/-</sup>小鼠高脂饮食13周,构建AS模型。参考文献[9],随机选取小鼠5只,用100 g/L水合氯醛腹腔注射麻醉处死,按照局部解剖方法打开胸腔,取主动脉根部作病理切片行苏木素-伊红(HE)染色,观察小鼠主动脉斑块形成的情况,判断动脉斑块形成及模型复制成功与否。AS模型成功建立后,按照随机数字表将其分为模型组,中药低、中、高剂量组及辛伐他汀组,每组9只。中药低、中、高剂量组分别给予温阳活血解毒方(对应剂量为14.08、28.16、56.32 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,均按成人60 kg体质量临床剂量的1、2、4倍折算成小鼠等效剂量<sup>[13]</sup>)灌胃,辛伐他汀组给予辛伐他汀(2.6 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,按成人60 kg体质量常用量20 mg·d<sup>-1</sup>折算成小鼠等效剂量)灌胃,给药体积为20 mL·kg<sup>-1</sup>;模型组给予等体积生理盐水灌胃,给药体积为20 mL·kg<sup>-1</sup>。每天1次,共13周。

**1.5 全自动生化分析仪检测血脂水平** 摘除小鼠眼球静脉采血,静置30 min,待血凝,以4 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(离心半径13.5 cm),吸取上层血清0.5 mL左右,用于化学法在全自动生化仪上检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平。

**1.6 苏木素-伊红(HE)染色观察主动脉组织病理学变化** 小鼠处死后迅速打开胸腔,左心室逆行灌注液体至主动脉,迅速剥离自主动脉起始部、主动脉弓分叉处至降主动脉移行为胸主动脉段2~3 cm处,连通主动脉根部部分心肌组织一同剪下;冰水洗涤,将主动脉根部连同主动脉弓分叉血管立即置于体积分数4%中性甲醛溶液中固定24 h;以浓度体积分数75%乙醇脱水,置于二甲苯

中透明后,浸蜡包埋。将包埋好的蜡块固定于切片机上,连续切片,厚度5 μm,切片展平贴于载玻片上烘干,进行HE染色。光学显微镜下观察各组小鼠主动脉组织的病理学变化。

**1.7 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测主动脉组织中Caveolin-1、p-ERK1/2蛋白的表达情况** 分离小鼠主动脉并置入玻璃匀浆器中,加入放射免疫沉淀分析(RIPA)蛋白裂解液+蛋白酶抑制剂+磷酸酶抑制剂配制的组织裂解液,在冰上研磨后离心取上清。将上清蛋白质用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离并转膜后,50 g/L脱脂奶粉封闭液封闭1 h,加入相应抗体4 ℃过夜。磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗3次,每次5 min,加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗孵育1 h,显影后成像并拍照,最后用ImageJ软件分析各蛋白条带灰度值,结果以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值表示。

**1.8 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测主动脉组织中Caveolin-1、p-ERK1/2 mRNA的表达情况** 采用TRIzol试剂一步法抽取小鼠主动脉组织总RNA,微量分光光度计检测RNA样品纯度。然后进行逆转录,RT-PCR反应体系及条件按试剂盒说明书进行。Caveolin-1上游引物序列为5'-TCTACAAGCCCAACAACAAGGCC-3',下游引物序列为5'-TGC ACTGAATCTCAATCAGGAAGC-3',扩增片段长度360 bp; p-ERK1/2上游引物序列为5'-AACAGGTTGTTCCCAAATGC-3',下游引物序列为5'-GCCAGAGCCTGTTCAACTTC-3',扩增片段长度136 bp。以GAPDH作为内参照物基因,GAPDH上游引物序列为5'-CGGCTCAAGGCATTCTAGGC-3',下游引物序列为5'-TGAGTCCACCACCCTGTTCCCTG-3'。PCR扩增程序:95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,循环40次。然后进行20 min的产物熔解程序,作熔解曲线分析,将不同浓度的定量的模板的对数和相应Ct值作图,结果判定:ΔCt=Ct-Ct<sub>GAPDH</sub>,再采用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法<sup>[14]</sup>计算mRNA的相对表达量。

**1.9 统计方法** 采用SPSS 22.0及GraphPad Prism 8.0软件进行数据分析及图像处理。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析或独立样本T检验,多组间两两比较采用Bonferroni法。以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 温阳活血解毒方对 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉组织病理学变化的影响 图1结果显示:模型组血管壁破损,管腔内可见明显的粥样硬化斑块出现,向管腔突起,内膜连续性结构破坏。中药低、中剂量组主动脉斑块纤维帽变薄,脂核增大,斑块内

可见明显胆固醇结晶沉积,平滑肌及胶原纤维减少,斑块处于不稳定状态。中药高剂量组及辛伐他汀组主动脉斑块未见明显破裂和出血,平滑肌细胞及胶原纤维成分较多,斑块内胆固醇结晶较少,呈不对称分布,斑块趋于稳定。

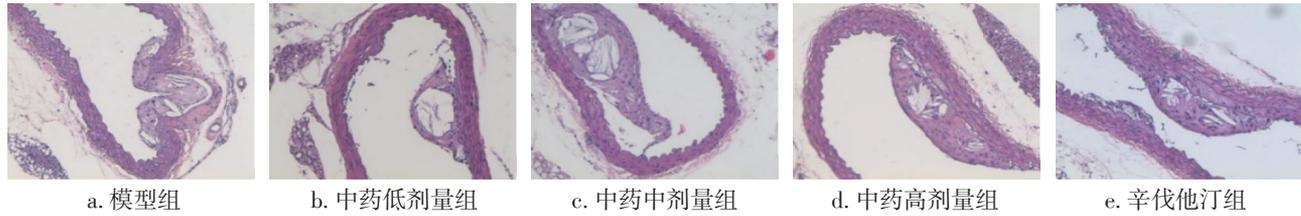


图1 温阳活血解毒方对 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉组织病理学变化的影响(HE染色, ×200)

Figure 1 Effect of YBTR on pathological changes of aortic tissue in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice (by HE staining, ×200)

2.2 温阳活血解毒方对 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C水平的影响 图2结果显示:与模型组比较,中药高剂量组及辛伐他汀组TC、TG及LDL-C水平明显降低, HDL-C水平明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,中药中剂量组TC、LDL-C水平明显减低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),而TG、HDL-C水平无明显变化,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与模型组比较,中药低剂量组TC、TG、LDL-C及HDL-C水平均无明显变化,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与辛伐他汀组比较,中药高剂量组TC、TG、LDL-C、HDL-C水平无明显变化,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

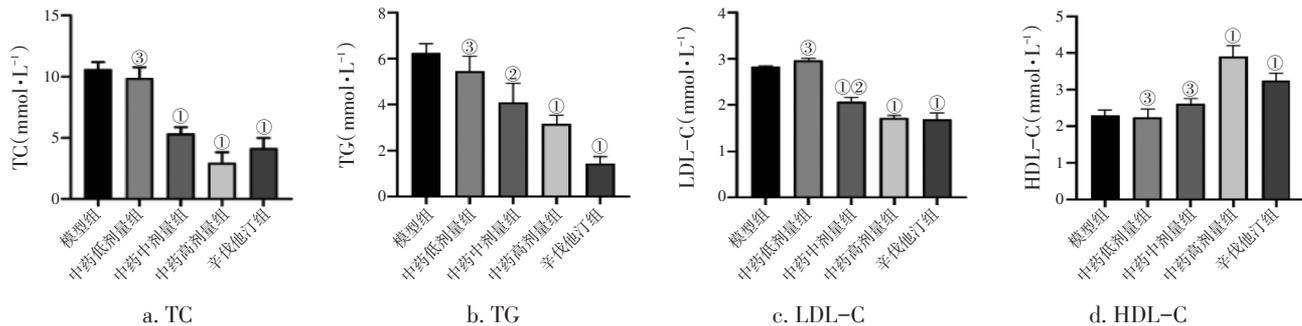
组主动脉组织中Caveolin-1蛋白表达水平明显升高, p-ERK1/2蛋白表达水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而中药低、中剂量组主动脉组织中Caveolin-1表达水平有所升高, p-ERK1/2蛋白表达水平有所减少,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

2.3 温阳活血解毒方对 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉组织Caveolin-1、p-ERK1/2蛋白表达的影响 图3结果显示:与模型组比较,中药高剂量组及辛伐他汀

2.4 温阳活血解毒方对 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉组织Caveolin-1、p-ERK1/2 mRNA表达的影响 图4结果显示:与模型组比较,中药低、中、高剂量组及辛伐他汀组主动脉组织Caveolin-1 mRNA、p-ERK1/2 mRNA表达水平无明显变化,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

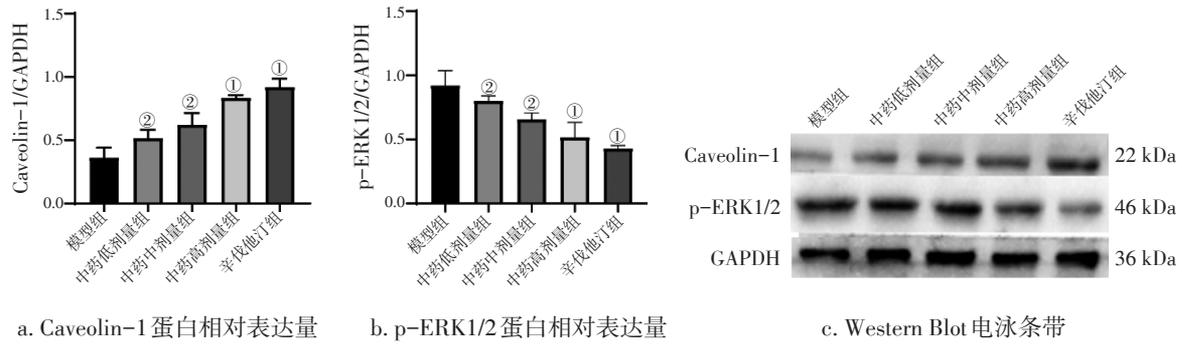
动脉粥样硬化(AS)是指脂质在动脉内膜上大量沉积,形成粥样硬化斑块,导致内膜增厚、管



① $P < 0.01$ , 与模型组比较; ② $P < 0.05$ , ③ $P < 0.01$ , 与辛伐他汀组比较

图2 温阳活血解毒方对 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C水平的影响

Figure 2 Effect of YBTR on serum TC, TG, LDL-C and HDL-C levels in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice



①  $P < 0.05$ , 与模型组比较; ②  $P < 0.05$ , 与辛伐他汀组比较

图 3 温阳活血解毒方对 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉 Caveolin-1、p-ERK1/2 蛋白表达的影响  
Figure 3 Effect of YBTR on the expression of Caveolin-1 and p-ERK1/2 in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice

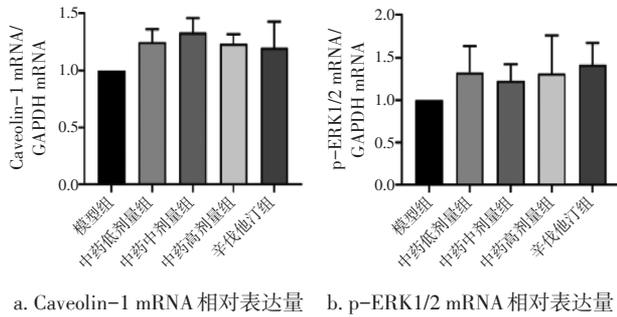


图 4 温阳活血解毒方对 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉 Caveolin-1、p-ERK1/2 mRNA 表达的影响  
Figure 4 Effect of YBTR on the expression of Caveolin-1 mRNA and p-ERK1/2 mRNA in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice

腔狭窄的一种慢性炎症性疾病<sup>[15]</sup>。1999年, Ross 明确提出 AS 是一种炎症性疾病, 炎症反应贯穿 AS 的整个阶段<sup>[16]</sup>。越来越多证据表明, 内质网应激与动脉粥样硬化斑块也密切相关<sup>[17-19]</sup>。Caveolin-1 是位于小凹上的标志蛋白, 在细胞信号转导中起枢纽作用<sup>[10]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是中药抗 AS 炎性机制研究的热点通路。ERK1/2 是 MAPK 家族控制炎症反应的重要成员, 亦是参与脂质代谢的重要细胞信号转导通路。研究<sup>[11]</sup>证实, 抑制 ERK1/2 通路的激活可减轻 AS。当血管内皮细胞受到炎症因子及脂多糖(LPS)刺激时 Caveolin-1 可激活 ERK1/2, 以其磷酸化形式(p-ERK1/2)存在。而 ERK1/2 的活化是将信号从细胞膜表面受体转导至胞核的关键<sup>[12]</sup>, 在内皮细胞诱导核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) 活化, 促进炎症细胞增殖、迁移, 加剧炎症反应<sup>[11]</sup>, 同时, 亦激活内质网应激下游的蛋白激酶 R 样内质网激酶-真核起始因子 2 $\alpha$ -活化转录因子 4

(PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4)信号通路, 促进血管平滑肌细胞凋亡, 导致斑块形成, 并影响粥样斑块的稳定性, 在 AS 的发生发展中发挥重要作用<sup>[20]</sup>。研究亦发现, Caveolin-1 的下调可致 ERK1/2 的过度激活<sup>[21]</sup>。而 Caveolin-1 的过度表达又可抑制 ERK1/2 信号级联<sup>[22]</sup>。Jia 等<sup>[23]</sup>报道 Caveolin-1/ERK1/2 通路可调控血管平滑肌细胞的增殖和迁移。故干预 Caveolin-1/ERK1/2 信号通路的蛋白表达可能成为防治 AS 的新靶点。

他汀类药物是目前临床上治疗 AS 首选的最基本的调脂药物, 不仅可调节血脂, 还可通过抗炎及保护血管内皮等作用防治 AS, 但长期服用有不同程度的肝损害和肌肉毒性等不良反应。其中, 辛伐他汀可调节血脂紊乱, 能延缓或逆转 AS 发病的进程, 是公认推荐的降脂药物之一<sup>[24]</sup>, 故本研究选用辛伐他汀为阳性对照药物。

随着中医药对 AS 研究的不断深入, 中药以其疗效显著及不良反应少, 在 AS 的临床治疗中发挥了独特的优势。中医学认为 AS 病变性质总属本虚标实。其中, 气血阴阳的虚衰为本虚, 气滞、血瘀、痰浊为标实, 治当标本同治。温阳活血解毒方是我们研究团队基于中医辨证思想和组方原则, 结合多年临床实践经验及 AS 的病理机制总结出的防治 AS 的临床验方。方中: 桂枝、薤白、法半夏奏温阳通脉、通阳散结、行气导滞之效, 柴胡、黄芩、连翘清热解毒, 川芎、丹参活血化瘀, 党参、炙甘草补中益气。全方寒温并用, 标本兼顾, 共奏温阳活血解毒之功。本课题组系列临床研究结果表明, 温阳活血解毒方干预急性冠脉综合征、稳定动脉斑块有较好的临床疗效<sup>[3-7]</sup>,

可有效改善患者临床症状,减轻炎症因子水平,有助于提高患者的生活质量。初步动物实验研究证实温阳活血解毒方能减少AS斑块内泡沫细胞、增加斑块内平滑肌和胶原成分,降低斑块内新生血管的表达,稳定AS斑块<sup>[9]</sup>,而其确切的作用机制及相关通路尚不明确。

*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠由于遗传因素损伤,导致脂蛋白代谢异常,高脂饮食即可形成弥漫纤维增殖性AS损伤病灶及明显的高胆固醇血症,与人类AS病变类似,具有自然发生、渐进发展、病理形态典型等特点,是目前研究AS斑块较理想的动物模型<sup>[25]</sup>。为此,本研究以*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠为研究对象,对温阳活血解毒方抗AS的可能作用机制进行进一步探究。

本研究血脂检测结果显示,与模型组比较,中药高剂量组*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠血清中LDL-C、TC和TG水平显著降低,HDL-C水平显著升高,提示温阳活血解毒方可通过调节血脂,降低AS斑块脂质核心大小。病理学结果显示,中药高剂量组小鼠主动脉粥样斑块明显趋于稳定,表明温阳活血解毒方具有稳定斑块的作用。关键分子检测结果显示,与模型组比较,中药高剂量组*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠主动脉中Caveolin-1蛋白的表达量明显增加,p-ERK1/2蛋白的表达量明显减少,提示温阳活血解毒方可上调主动脉Caveolin-1蛋白表达,下调ERK1/2的磷酸化水平,抑制ERK1/2信号通路的激活,故推测其可能是温阳活血解毒方防治AS不稳定斑块、抑制主动脉内炎症及血管平滑肌细胞凋亡的机制之一。此外,本研究结果表明,温阳活血解毒方对Caveolin-1/ERK通路mRNA表达无影响,考虑其原因可能是信号分子的产生不仅需要mRNA模板,亦受其他相关酶及蛋白因子的影响,而其中的具体机理还需进一步研究。

综上所述,温阳活血解毒方可调节血脂水平、稳定AS易损斑块,这种作用机制可能与其上调主动脉Caveolin-1蛋白表达,抑制ERK1/2信号通路的激活有关。此为防治AS提供了新思路、新靶点、新方向,但其具体的分子机制有待进一步深入研究完善。

#### 参考文献:

[1] 中国心血管疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告2019概要[J]. 中国循环杂志, 2020, 35(9): 833-854.

- [2] MACH F, BAIGENT C, CATAPANO A L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk[J]. Eur Heart J, 2020, 41(1): 111-188.
- [3] 吴兴波, 涂海涛, 苏志强, 等. 温阳活血解毒法治急性心肌梗死的临床观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(35): 20-21.
- [4] 刘静, 余锋, 信梦雪, 等. 温阳活血解毒方对急性心肌梗死患者Th/Tregs水平影响及疗效评价[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(12): 180-183.
- [5] 洪永敦, 赵春晓. 传统中医的心痛病诊疗与温阳活血解毒法[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(4): 640-644.
- [6] 洪永敦, 詹鸿越, 吴兴波. 温阳活血解毒法治冠心病的探讨[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(1): 112-114.
- [7] 洪永敦, 吴兴波. 温阳解毒活血法对急性心肌梗死患者的临床干预作用[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(5): 519-522.
- [8] 陈爽, 洪永敦, 黎智文, 等. 温阳活血解毒复方对大鼠静脉内皮细胞VEGFs/VEGFRs通路的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(1): 1-6.
- [9] 陈广进, 洪永敦, 赵静, 等. 温阳活血解毒方对*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化斑块及斑块内血管新生的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(2): 139-144.
- [10] 廖端芳, 覃丽. 小凹及小凹蛋白1: 胆固醇逆向转运与炎症应答的共同分子平台[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(5): 385-392.
- [11] CHEN Y, DUAN Y, YANG X, et al. Inhibition of ERK1/2 and activation of LXR synergistically reduce atherosclerotic lesions in *ApoE*-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(4): 948-959.
- [12] OBCHOEI S, SAWANYAWISUTH K, WONGKHAM C, et al. Secreted cyclophilin A mediates G1/S phase transition of cholangiocarcinoma cells via CD147/ERK1/2 pathway[J]. Tumour Biol, 2015, 36(2): 849-859.
- [13] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-204.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> Method[J]. Methods, 2001; 25(4): 402-408.
- [15] SUMMERHILL V I, GRECHKO A V, YET S F, et al. The atherogenic role of circulating modified lipids in atherosclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3561.
- [16] ROSS R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
- [17] ZULLI A, LAU E, WIJAYA B P, et al. High dietary taurine reduces apoptosis and atherosclerosis in the left main coronary artery: association with reduced CCAAT/enhancer binding protein homologous protein and total plasma homocysteine but not lipidemia[J]. Hypertension, 2009, 53(6): 1017-1022.
- [18] MYOISHI M, HAO H, MINAMINO T, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome[J]. Circulation, 2007,

- 116(11): 1226-1233.
- [19] TABAS I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2010, 107(7): 839-850.
- [20] CHEN M T, HUANG R L, OU L J, et al. Pollen Typhae total flavone inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in human aortic-vascular smooth muscle cells through down-regulating PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4-CHOP pathway [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(8): 604-612.
- [21] GALBIATI F, VOLONTE D, ENGELMAN J A, et al. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade [J]. *EMBO J*, 1998, 17(22): 6633-6648.
- [22] PARK W Y, PARK J S, CHO K A, et al. Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(27): 20847-20852.
- [23] JIA L, WANG L, WEI F, et al. Effects of Caveolin-1-ERK1/2 pathway on endothelial cells and smooth muscle cells under shear stress [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2020, 245(1): 21-33.
- [24] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版) [J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(10): 937-953.
- [25] EMINI V B, PERROTTA P, DE MEYER G R A, et al. Animal models of atherosclerosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 5(816): 3-13.

【责任编辑：侯丽颖】

## 丹参酮 II A 减轻棕榈酸诱导的心肌细胞凋亡及内质网应激

王亚丹, 艾景雪, 高瑞, 李运丽, 张海波  
(河南大学第一附属医院心内三科, 河南开封 475000)

**摘要:**【目的】探讨丹参酮 II A 对棕榈酸诱导心肌细胞脂毒性损伤模型内质网应激凋亡的影响。【方法】将对数期 H9c2 细胞分 6 组, 即对照组, 棕榈酸(400  $\mu\text{mol/L}$ )组, 丹参酮 II A 20  $\mu\text{mol/L}$  组和棕榈酸+丹参酮 II A(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )组, 另外引入棕榈酸+CCT020312 组与棕榈酸+CCT020312+丹参酮 II A 20  $\mu\text{mol/L}$  组考察通路激活状态。细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法测定 H9c2 细胞活力; 流式细胞术测定细胞凋亡情况; 实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法检测细胞内质网应激相关分子葡萄糖调控蛋白 78(GRP78)、转录激活因子 4(ATF4)和 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)的 mRNA 表达水平; 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测细胞 GRP78、ATF4、CHOP、Caspase-3、Caspase-9、Caspase-12、蛋白激酶 RNA 样内质网激酶(PERK)、磷酸化 PERK(p-PERK)、真核生物翻译起始因子 2 $\alpha$ (eIF2 $\alpha$ )、磷酸化 eIF2 $\alpha$ (p-eIF2 $\alpha$ )的蛋白表达水平。【结果】与对照组比较, 棕榈酸组细胞存活率显著降低( $P < 0.01$ ), GRP78、ATF4、CHOP mRNA 和蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.01$ ), H9c2 细胞的凋亡率升高, p-PERK/PERK 和 p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  比例也显著增大( $P < 0.01$ ), 凋亡相关分子 Caspase-3、Caspase-9 和 Caspase-12 蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.01$ )。不同浓度丹参酮 II A 作用后, 与棕榈酸组比较, 棕榈酸+丹参酮 II A(5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )组细胞存活率显著升高( $P < 0.01$ ), GRP78、ATF4、CHOP mRNA 和蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.01$ ), H9c2 细胞的凋亡率降低, p-PERK/PERK 和 p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  比例也显著减小( $P < 0.01$ ), Caspase-3、Caspase-9 和 Caspase-12 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ ), 均具有剂量依赖性, 且棕榈酸+丹参酮 II A 10  $\mu\text{mol/L}$  组( $P < 0.05$ )和棕榈

收稿日期: 2020-06-12

作者简介: 王亚丹(1982-), 女, 硕士, 主治医师; E-mail: wyd13592133542@163.com

通讯作者: 艾景雪(1989-), 女, 硕士, 住院医师; E-mail: 362456141@qq.com

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(编号: 2018020313)