

# 基于Cav-1/NF- $\kappa$ B通路探讨调脾护心方抗动脉粥样硬化的作用机制<sup>Δ</sup>

林 潼<sup>1\*</sup>, 石础硕<sup>1</sup>, 孙治中<sup>1</sup>, 纪树亮<sup>1</sup>, 温俊茂<sup>1</sup>, 陈乾英<sup>1</sup>, 孙伟鹏<sup>1</sup>, 张 填<sup>1</sup>, 周小琦<sup>1</sup>, 李俊哲<sup>2#</sup> (1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 2. 广东省中医院大学城住院部心血管二科, 广州 510006)

中图分类号 R285.5; R-332 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)02-0165-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.02.05

**摘要** 目的: 研究调脾护心方对载脂蛋白基因敲除(*ApoE*<sup>-/-</sup>)小鼠动脉粥样硬化(AS)的影响, 并探讨其作用机制。方法: 将40只雄性*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠分为空白组、模型组、辛伐他汀组(阳性对照, 5 mg/kg)以及调脾护心方低、高剂量组(50、150 mg/kg), 每组8只。除空白组小鼠给予普通饲料外, 其余各组小鼠均给予高脂饲料以复制AS模型。造模后, 各给药组小鼠均灌胃相应药物, 空白组和模型组小鼠均灌胃等容生理盐水, 每天1次, 连续12周。末次给药后, 采用分光光度法检测各组小鼠血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(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, 采用硝酸酶还原法检测血清一氧化氮(NO)水平; 采用酶联免疫吸附测定法检测血清白细胞介素6(IL-6)、血管细胞黏附分子1(VCAM-1)水平; 分离胸主动脉, 以苏木精-伊红染色, 观察各组小鼠胸主动脉斑块形成情况, 并计算校正斑块面积; 采用蛋白质印迹法检测各组小鼠胸主动脉组织中核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)p65、小窝蛋白1(Cav-1)、一氧化氮合酶(eNOS)蛋白的表达情况。结果: 与空白组比较, 模型组小鼠血清TC、TG、LDL-C、IL-6、VCAM-1水平均显著升高, HDL-C、NO水平均显著下降( $P < 0.01$ ); 胸主动脉斑块明显, 校正斑块面积显著增大( $P < 0.01$ ), 该组织中NF- $\kappa$ B p65、Cav-1蛋白的相对表达量均显著升高, eNOS蛋白的相对表达量显著下降( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 各给药组小鼠血清TC、TG、LDL-C水平以及辛伐他汀组和调脾护心方高剂量组小鼠血清IL-6、VCAM-1水平均显著下降, 各给药组小鼠血清HDL-C、NO水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 各给药组小鼠胸主动脉斑块减少, 校正斑块面积均显著缩小( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 该组织中NF- $\kappa$ B p65、Cav-1蛋白的相对表达量均显著下降, eNOS蛋白的相对表达量均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论: 调脾护心方可调节血脂水平、降低炎症因子水平、抑制AS斑块的形成, 其机制可能与其抑制Cav-1/NF- $\kappa$ B通路有关。**关键词** 调脾护心方; 动脉粥样硬化; 血脂水平; 炎症因子; 小窝蛋白1; 核因子 $\kappa$ B; 小鼠

## Investigation on Anti-atherosclerosis Mechanism of Tiaopi Huxin Prescription Based on Cav-1/NF- $\kappa$ B Pathway

LIN Tong<sup>1</sup>, SHI Chushuo<sup>1</sup>, SUN Zhizhong<sup>1</sup>, JI Shuliang<sup>1</sup>, WEN Junmao<sup>1</sup>, CHEN Qianying<sup>1</sup>, SUN Weipeng<sup>1</sup>, ZHANG Tian<sup>1</sup>, ZHOU Xiaoqi<sup>1</sup>, LI Junzhe<sup>2</sup> (1. The First Clinical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 2. Second Dept. of Cardiovascular Disease, Inpatient Department of University Town, Guangdong Provincial Hospital of TCM, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the effects of Tiaopi huxin prescription (TPHXP) on the atherosclerosis (AS) of *ApoE*<sup>-/-</sup> mice, and to investigate its mechanism. **METHODS:** Forty male *ApoE*<sup>-/-</sup> mice were divided into blank group, model group, simvastatin group (positive control, 5 mg/kg) and TPHXP low-dose and high-dose groups (50, 150 mg/kg), with 8 mice in each group. Except that blank group was given common diet, other groups were given high-lipid diet to induce AS model. After modeling, administration groups were given relevant medicine intragastrically, and blank group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 12 weeks. After last medication, the serum levels of TC, TG, LDL-C and HDL-C were determined by spectrophotometry. The serum level of NO was detected by nitrate reduction method. The serum levels of IL-6 and VCAM-1 were determined by ELISA. After separating thoracic aorta, HE staining was used to observe the formation of plaque in the thoracic aorta of mice in each group, and the corrected plaque area was calculated.

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81403225、81673923); 广东省中医药局科研项目(No.20181088); 广州中医药大学本科生拔尖创新人才培养项目(No.BKBJCX2018003)

\* 本科生。研究方向: 中医基础与临床。E-mail: 929023709@qq.com

# 通信作者: 主治医师, 博士。研究方向: 中西医结合治疗冠心病的基础与临床。电话: 020-36588581。E-mail: 2015404734@qq.com

Western blotting was conducted to determine the expression of NF- $\kappa$ B p65, Cav-1 and eNOS. **RESULTS:** Compared with blank group, the serum levels of TC, TG, LDL-C, IL-6 and VCAM-1 were increased significantly in model group, while the levels of HDL-C and NO were decreased significantly ( $P < 0.01$ ). The plaque of thoracic aorta was obvious and the corrected plaque area were increased significantly ( $P < 0.01$ ).

The relative expression of NF- $\kappa$ B p65 and Cav-1 were increased significantly, while the relative expression of eNOS was decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the serum levels of TC, TG and LDL-C in administration groups, the serum levels of IL-6 and VCAM-1 in simvastatin group and TPHXP high-dose group were decreased significantly, while the serum levels of HDL-C and NO were increased significantly in administration groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). In administration groups, the plaques of thoracic aorta were reduced and the corrected plaque area was decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); the relative expression of NF- $\kappa$ B p65 and Cav-1 were decreased significantly, while the relative expression of eNOS was increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: TPHXP can regulate the level of blood lipid, decrease the level of inflammatory factors and inhibit the formation of AS plaque, the mechanism of which may be associated with inhibiting Cav-1/NF- $\kappa$ B pathway.

**KEYWORDS** Tiaopi huxin prescription; Atherosclerosis; Blood lipid; Inflammatory factor; Cav-1; NF- $\kappa$ B; Mice

动脉粥样硬化(AS)是众多心脑血管疾病共同的病理基础,严重危害人类身体健康<sup>[1-2]</sup>。近年来,炎症学说的提出和建立为AS的研究指明了方向。Ross R<sup>[3]</sup>在其损伤反应学说的基础上指出,AS实为一种炎症性疾病,炎症始终贯穿于该症的发生、发展和演变过程中。目前,临床AS常规治疗药物以他汀类为主,其能显著降低患者心血管事件的发生率,是临床防治这类疾病的重要药物。然而现有研究发现,长期使用他汀类药物可能会增加肝酶升高和肌病发生的风险,导致AS患者的治疗效果欠佳<sup>[4]</sup>。临床实践证明,中医药在防治AS等疾病方面具有毒副作用小、疗效显著等优势,同时还可显著降低血脂水平、减少动脉斑块、抑制AS的进展<sup>[5]</sup>。因此,寻求防治AS的中医药疗法、探究中医药抗AS机制具有重要意义。

小窝蛋白1(Cav-1)是位于小窝上的标志蛋白,在细胞信号转导过程中具有枢纽作用<sup>[6]</sup>。Cav-1可通过影响内皮一氧化氮合酶(eNOS)的活性来调控机体一氧化氮(NO)的合成,从而发挥对炎症信号转导的调节作用<sup>[7]</sup>。NO是血管保护的信号分子,其可通过抑制核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)这一炎症相关因子的活性来抑制AS的形成<sup>[8]</sup>。由此可见,AS的形成可能与Cav-1/NF- $\kappa$ B这一条炎症通路的激活有关。调脾护心方是根据邓铁涛教授以“心脾相关”核心理论为基础所创制的冠心病治疗经验方,含人参、半夏、橘红、丹参、三七、藿香等6味药材,具调脾护心、益气除痰之功效<sup>[9]</sup>。该方治疗AS的临床疗效较好,可有效抑制AS合并糖代谢异常患者的炎症反应<sup>[10]</sup>;此外,本课题组前期动物实验表明,调脾护心方可调节载脂蛋白基因敲除(*ApoE*<sup>-/-</sup>)小鼠血管内皮依赖性舒张功能,降低其血管内皮脂肪的堆积,提高NO水平<sup>[11]</sup>。然而调脾护心方抗AS的作用机制及相关通路尚未明确。为此,本研究拟以Cav-1/NF- $\kappa$ B通路为突破口,初步探讨调脾护心方发挥抗AS炎症反应的可能机制,以期为该方的临床应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Filter Max F3型全自动酶标仪(美国Molecular Devices公司);AU5800型全自动生化分析仪(美国Beckman Coulter公司);402T型电泳仪(美国CBS公司);

UV-6100S型分光光度计(上海元析仪器有限公司);AL-204型电子天平(德国Sartorius公司);GT-10型高速离心机(北京时代北利离心机有限公司);IX71型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);WD-9413A型凝胶成像仪(广州深华生物技术有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

调脾护心方颗粒[广东省中医院自制,批号:20160512,规格:1g(含人参0.19g、半夏0.09g、橘红0.15g、丹参0.19g、三七0.19g、藿香0.19g)];辛伐他汀片[Merck Sharp & Dohme (Australia) Pty. Ltd.,批号:20160623,规格:20mg];白细胞介素6(IL-6)、血管细胞黏附分子1(VCAM-1)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(英国Abcam公司,批号分别为20161101、20160613);人抗鼠NF- $\kappa$ B p65、Cav-1、eNOS抗体和兔抗鼠二抗(美国R&D Systems公司,批号分别为20170113、20161203、20160314、20160413);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(内参)、5%牛血清蛋白(BSA)封闭液、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TBST)溶液(上海钰博生物科技有限公司,批号分别为20170106、20161123、20161025);免疫印迹化学发光(ECL)试剂盒(上海炎熙生物科技有限公司,批号:20161012);血脂生化检测试剂盒、NO(硝酸酶还原法)试剂盒(上海信裕生物科技有限公司,批号分别为20160825、20160524);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 动物与饲料

SPF级雄性*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠40只,2月龄,体质量20~25g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001]。高脂饲料(含3%胆固醇、1%胆盐、10%猪油、5%蛋黄粉、81%基础饲料)由广东省医学实验动物中心提供。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模与给药

将所有*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠适应性喂养7d后,随机分为5组,即空白组、模型组、辛伐他汀组(阳性对照,5mg/kg,根据小鼠体表面积按人用临床剂量的10倍换算而得)以及调脾护心方低、高剂量组(50、150mg/kg,参照前期预实验结果,并根据小鼠体表面积按人用临床剂量的5、15倍换算而得),每组8只。空白组小鼠给予普通饲料,其余各组小鼠均给予高脂饲料以复制AS模型。造模后,

各给药组小鼠均灌胃相应药物(以生理盐水为溶剂),空白组和模型组小鼠均灌胃等容生理盐水,每天1次,连续12周。

## 2.2 血脂以及血清 NO、IL-6、VCAM-1 水平检测

末次给药后,所有小鼠均禁食不禁水12 h,腹腔注射3%戊巴比妥进行麻醉,随后颈椎脱臼处死小鼠,摘取眼球取血3 mL,静置1 h后,以3 000 r/min离心10 min,取上层血清于-80 ℃保存,备用。采用分光光度法以全自动生化分析检测各组小鼠血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平;采用硝酸酶还原法以分光光度计检测血清NO水平;采用ELISA法以全自动酶标仪检测血清IL-6、VCAM-1的水平。上述实验均严格按照相关试剂盒说明书操作。

## 2.3 胸主动脉斑块面积检测

采用苏木精-伊红(HE)染色法检测各组小鼠胸主动脉斑块面积。分离各组小鼠胸主动脉组织0.2 g,置于液氮中速冻保存,备用。将胸主动脉置于4%多聚甲醛/0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.2,下同)中固定,用石蜡包埋,常规切片(厚度约4 μm),经HE染色后,置于荧光倒置显微镜下观察其胸主动脉斑块形成情况,并采用Image J 1.41软件测量斑块面积(粥样硬化斑块阳性判定标准为:细胞内膜显著增厚、内皮细胞排列紊乱、脂质浸润明显;经HE染色后,斑块呈红色,且较其他部位明显增厚),计算校正斑块面积=(内弹力膜围绕面积-管腔面积)/内弹力膜围绕面积×100%。

## 2.4 胸主动脉组织中 NF-κB p65、Cav-1、eNOS 蛋白表达水平检测

采用蛋白质印迹法(Western blotting)检测各组小鼠胸主动脉组织中NF-κB p65、Cav-1、eNOS等蛋白的表达水平。取各组小鼠胸主动脉组织适量,研磨,以3 000 r/min离心5 min后,弃去沉淀。取上清液至聚丙烯酰胺凝胶中,恒压电泳(电压:90 V)3 h,转膜,用PBS清洗4次,每次5 min,加入5% BSA封闭液适量,于37 ℃下封闭1 h,分别加入NF-κB p65、Cav-1、eNOS一抗(均为1:1 000),于37 ℃下反应1 h,用TBST溶液清洗3次,每次5 min;加入二抗(1:2 000),于37 ℃下反应1 h,用TBST溶液清洗3次,每次5 min;以ECL显色后,置于凝胶成像仪上成像,采用Bio-1D Express 1.0图像分析软件检测蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值来表示其相对表达量。

## 2.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析或t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 调脾护心方对小鼠血脂水平的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清TC、TG、LDL-C水平均显著升高,HDL-C水平显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,辛伐他汀组和调脾护心方低、高剂量组小鼠血清TC、TG、LDL-C水平均显著降低,HDL-C水平均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),详见表1。

表1 调脾护心方对小鼠血脂水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8, \text{mmol/L}$ )

Tab 1 Effects of TPHXP on blood lipid levels of mice ( $\bar{x} \pm s, n=8, \text{mmol/L}$ )

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
空白组	4.38±0.58	1.43±0.34	3.21±0.22	2.15±0.32
模型组	7.49±0.45*	4.27±0.34*	6.81±0.99*	1.47±0.42*
辛伐他汀组	4.31±0.52**	2.03±0.30**	3.42±0.61**	1.95±0.43**
调脾护心方低剂量组	6.41±0.73*	3.46±0.25*	5.64±0.62*	1.96±0.29*
调脾护心方高剂量组	4.48±0.29**	2.14±0.22**	3.94±0.58**	2.04±0.27**

注:与空白组比较:\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,\*\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank group, \* $P < 0.01$ ; vs. model group, \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$

0.01

### 3.2 调脾护心方对小鼠血清 NO、IL-6、VCAM-1 水平的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清NO水平显著降低,IL-6、VCAM-1水平均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,辛伐他汀组和调脾护心方低、高剂量组小鼠血清NO水平均显著升高,辛伐他汀组和调脾护心方高剂量组小鼠血清IL-6、VCAM-1水平均显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),而调脾护心方低剂量组小鼠血清IL-6、VCAM-1水平与模型组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见表2。

表2 调脾护心方对小鼠血清 NO、IL-6、VCAM-1 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 2 Effects of TPHXP on the serum levels of NO, IL-6 and VCAM-1 in mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	NO, μmol/L	IL-6, pg/mL	VCAM-1, mg/mL
空白组	144.32±28.43	290.12±73.35	310.32±63.29
模型组	105.67±18.41*	341.18±67.09*	372.16±54.28*
辛伐他汀组	132.15±17.26**	305.14±58.05**	322.15±51.26**
调脾护心方低剂量组	113.63±15.24*	329.16±53.07	357.63±68.24
调脾护心方高剂量组	135.27±21.14**	302.13±49.03**	313.27±59.14**

注:与空白组比较:\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,\*\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank group, \* $P < 0.01$ ; vs. model group, \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$

0.01

### 3.3 调脾护心方对小鼠胸主动脉斑块面积的影响

与空白组比较,模型组小鼠胸主动脉斑块面积明显增大,内膜明显增厚,且可见明显脂质沉积,校正斑块面积显著增大,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,辛伐他汀组和调脾护心方低、高剂量组小鼠胸主动脉脂质沉积明显减少,校正斑块面积显著缩小,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),详见图1、表3。

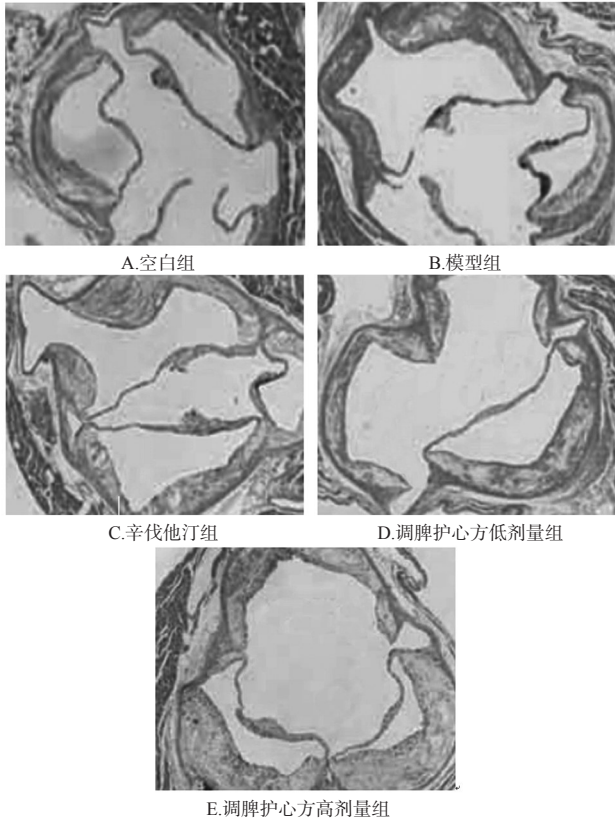


图1 各组小鼠胸主动脉斑块的显微图(HE染色, ×200)  
Fig 1 Micrographs of thoracic aorta plaque in mice of each group(HE Staining, ×200)

表3 调脾护心方对小鼠胸主动脉校正斑块面积及其NF-κB p65、Cav-1、eNOS蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

Tab 3 Effects of TPHXP on corrected plaque area of thoracic aorta and the protein expression of NF-κB p65, Cav-1 and eNOS in mice ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

组别	校正斑块面积, %	NF-κB p65, ng/mL	Cav-1, ng/mL	eNOS, ng/mL
空白组	25.44 ± 5.58	1.00 ± 0.12	0.12 ± 0.05	0.64 ± 0.13
模型组	43.38 ± 8.32*	3.27 ± 0.29*	0.18 ± 0.09*	0.31 ± 0.17*
辛伐他汀组	28.91 ± 5.61**	1.42 ± 0.37**	0.14 ± 0.05**	0.57 ± 0.12**
调脾护心方低剂量组	36.84 ± 6.83*	2.65 ± 0.36*	0.16 ± 0.07**	0.38 ± 0.09*
调脾护心方高剂量组	27.76 ± 4.63**	1.48 ± 0.31**	0.12 ± 0.03**	0.51 ± 0.15**

注:与空白组比较, \*P<0.01;与模型组比较, #P<0.05, ##P<0.01

Note: vs. blank group, \*P<0.01; vs. model group, #P<0.05, ##P<0.01

### 3.4 调脾护心方对小鼠胸主动脉组织中NF-κB p65、Cav-1、eNOS蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组小鼠胸主动脉组织中NF-κB p65、Cav-1蛋白的相对表达量均显著升高,eNOS蛋白的相对表达量显著降低,差异均有统计学意义(P<0.01)。与模型组比较,辛伐他汀组和调脾护心方低、高剂量组小鼠胸主动脉组织中NF-κB p65、Cav-1蛋白的相对表达量均显著下降,eNOS蛋白的相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义(P<0.05或P<0.01),详见

图2、表3。

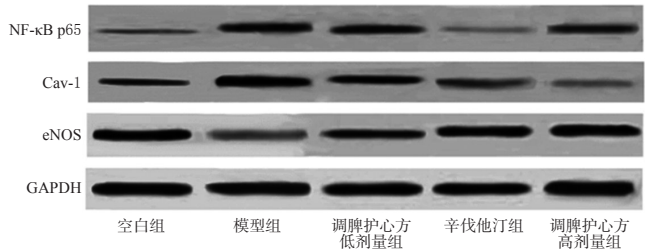


图2 各组小鼠胸主动脉组织中NF-κB p65、Cav-1、eNOS蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretic maps of protein expression of NF-κB p65, Cav-1 and eNOS in thoracic aorta of mice in each group

## 4 讨论

AS是指脂质在动脉血管壁上堆积,形成粥样硬化斑块,从而使血管壁增厚、管腔变窄的一种慢性炎症改变,容易导致心脑血管疾病的发生<sup>[12]</sup>。1999年,Ross R<sup>[3]</sup>明确提出AS是一种炎症性疾病,炎症反应贯穿AS的全过程。Cav-1是位于小窝上的标志蛋白,在细胞的信号转导过程中起枢纽作用<sup>[6]</sup>。Cav-1通过影响eNOS的活性,来调控NO的合成,从而调节炎症信号的转导<sup>[7]</sup>。NO是血管保护分子,可抑制NF-κB的活性,后者参与炎症过程中黏附因子、炎症因子等的信号转导途径,可调控VCAM-1、IL-6等的表达<sup>[9,13]</sup>。黏附因子VCAM-1在AS的形成中发挥关键作用,eNOS可直接下调内皮细胞中VCAM-1的表达,从而减少AS斑块的形成<sup>[14]</sup>。由此可见,若NF-κB的活性被抑制,炎症反应也会随之减少,AS的进程将得以延缓。

他汀类药物是防治AS性心脑血管疾病的主要药物,可调节血脂水平,延缓AS进程,但长期使用可能会导致肝损害及横纹肌溶解等不良反应的发生<sup>[4,15]</sup>。其中,辛伐他汀能调节血脂代谢紊乱,防治AS,是目前冠心病二级预防的推荐药物之一<sup>[16]</sup>,故本研究将其作为阳性对照药物。随着中医学对AS病因病机、证候分布特征、治疗等认识的不断深入,中西医结合防治AS逐渐成为临床关注的热点问题。临床研究表明,中医药在调节血脂水平、缓解AS患者临床症状、改善其生活质量等方面发挥着积极的作用<sup>[17]</sup>。AS属于中医学“痰浊”“血瘀”范畴,由内外合邪而成,心、脾、肾功能虚损于内,外加饮食不节、情志不舒,则气滞血瘀,脾虚津液不能输布,聚而生痰<sup>[18]</sup>。国医大师邓铁涛教授基于“心脾相关”理论,把握冠心病“脾虚生痰,因痰致瘀”的基本病机,创制了调脾护心方,该方治疗心系疾病时重视脾胃,强调调脾护心之法<sup>[9]</sup>。方中人参补气健脾,养心通脉;丹参清热除烦,宁心安神,二者共为君药。半夏燥湿化痰,祛痰开窍;橘红行气调脾,燥湿化痰,二者共同增强人参益气除痰之效,均为臣药。藿香理气醒脾和胃,与补脾养心之药合用,使得补而不滞;三七行气活血,祛瘀通脉,二者

共为佐药。诸药合用,共奏健脾补气、养心安神之功<sup>[9]</sup>。同时现代药理研究证实,该方可调节脂质代谢、改善血液流变、纠正自由基代谢紊乱,有助于提高AS患者的生活质量<sup>[10]</sup>。曾有实验研究证实,调脾护心方可促进细胞内胆固醇逆向转运,减少血管内AS斑块的形成,发挥抗AS的作用<sup>[9]</sup>。为此,本研究以ApoE-/-小鼠为研究对象,对该方抗AS的可能机制进行了初步探讨(综合考虑前期实验结果<sup>[11]</sup>和现有成本,本研究暂未设立调脾护心方中剂量组)。

本研究结果显示,与空白组比较,模型组小鼠血脂(TC、TG、LDL-C)及炎症因子(IL-6、VCAM-1)水平均显著升高,HDL-C、NO水平均显著降低,胸主动脉脂质沉积明显,校正斑块面积显著增大,其组织中NF-κB p65、Cav-1蛋白表达水平均显著升高,eNOS表达水平显著下降,差异均有统计学意义,提示小鼠具有明显的AS症状及炎症反应,造模成功。而低、高剂量调脾护心方可显著降低AS模型小鼠血清TC、TG、LDL-C水平,显著升高HDL-C水平,差异均有统计学意义,提示其具有血脂调节作用。此外,低、高剂量调脾护心方可缩小胸主动脉斑块面积,上调NO、eNOS蛋白的表达,抑制NF-κB p65、Cav-1蛋白的表达,降低其下游炎症因子IL-6、VCAM-1的水平,差异均有统计学意义,提示其可通过下调Cav-1的表达、提高eNOS水平、增加NO的释放来发挥对血管内皮功能的保护作用;同时,该方可阻断NF-κB信号通路,减少其下游炎症因子(如IL-6、VCAM-1)的表达,抑制AS的炎症反应,减少斑块的形成,进而抑制AS的发生和进展。

综上所述,调脾护心方可调节血脂水平、降低炎症因子水平、抑制AS斑块形成,这种作用可能与其抑制Cav-1/NF-κB通路有关。但其具体的信号转导通路及作用靶点仍有待后续研究深入探讨。

## 参考文献

[1] TABAS I, GARCÍA-CARDEÑA G, OWENS GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis[J]. *J Cell Biol*, 2015, 209(1): 13-22.

[2] PATERAS I, GIAGINIS C, TSIGRIS C, et al. NF-κB signaling at the crossroads of inflammation and atherogenesis: searching for new therapeutic links[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(9): 1089-1101.

[3] ROSS R. Atherosclerosis: an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.

[4] 中国成人血脂异常防治指南修订联合委员会. 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.

[5] HAO CZ, WU F, LU L, et al. Chinese herbal medicine for

diabetic peripheral neuropathy: an updated meta-analysis of 10 high-quality randomized controlled studies[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76113.

[6] DRAB M, VERKADE P, ELGER M, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice[J]. *Science*, 2001, 293(5539): 2449-2452.

[7] BUCCI M, GRATTON JP, RUDIC RD, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation[J]. *Nat Med*, 2000, 6(12): 1362-1367.

[8] MINAMINO T, KITAKAZE M, SANADA S, et al. Increased expression of P-selectin on platelets is a risk factor for silent cerebral infarction in patients with atrial fibrillation: role of nitric oxide[J]. *Circulation*, 1998, 98(17): 1721-1727.

[9] PAVLIDES S, GUTIERREZ-PAJARES JL, ITURRIETA J, et al. Endothelial caveolin-1 plays a major role in the development of atherosclerosis[J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 356(1): 147-157.

[10] 郑家鼎. 从CAV-1探讨护心方对冠心病合并糖代谢异常患者内皮功能研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.

[11] 郭改玲. 基于“健脾护心”理论探讨健脾方干预动脉粥样硬化的机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.

[12] 汪志忠, 黎红华. 动脉粥样硬化与炎症因子[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2011, 18(4): 296-298.

[13] GARREAN S, GAO XP, BROVKOVYCH V, et al. Caveolin-1 regulates NF-kappa B activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide[J]. *J Immunol*, 2006, 177(7): 4853-4860.

[14] FRANK PG, LEE H, PARK DS, et al. Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(1): 98-105.

[15] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南2010[J]. *中华高血压杂志*, 2011, 19(8): 701-743.

[16] 彭道泉. 2016年欧洲心脏病学会/欧洲动脉粥样硬化化学会血脂异常管理指南解读[J/D]. *中国医学前沿杂志: 电子版*, 2017, 9(6): 8-11.

[17] 马悦颖, 刘建勋, 李澎, 等. 痰瘀同治方含药血清对ox-LDL损伤的人脐静脉内皮细胞产生NO, caveolin-1和eNOS的影响研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(7): 974-978.

[18] 钟伟, 王永刚, 于远望, 等. 中医防治颈动脉粥样硬化的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(8): 2043-2045.

[19] JIANG W, LI S, MAO W, et al. Effect of Huxin formula on reverse cholesterol transport in ApoE-gene knockout mice[J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(6): 451-456.

(收稿日期: 2018-05-08 修回日期: 2018-10-29)

(编辑: 张元媛)