

# 田蓊昔对动脉粥样硬化模型小鼠的改善作用及机制研究<sup>△</sup>

曹文疆\*, 信盼, 赵云丽, 袁勇, 郭新红, 马晓莉, 黄川生, 文志萍, 王新春<sup>#</sup>(石河子大学医学院第一附属医院药剂科, 新疆石河子 832008)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)01-0019-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.01.04



**摘要** 目的 研究田蓊昔对动脉粥样硬化(AS)模型小鼠的改善作用及可能机制。方法 以8只C57BL/6J小鼠作为正常组;将40只载脂蛋白E基因敲除(*ApoE*<sup>-/-</sup>)小鼠随机分为模型组,田蓊昔低、中、高剂量组[2.1、3.5、7.0 mg/(kg·d)]和辛伐他汀组[阳性对照药物,3.5 mg/(kg·d)],每组8只。正常组小鼠饲以普通饲料,其余各组小鼠饲以高脂饲料建立AS模型。同时,正常组和模型组小鼠灌胃生理盐水,各给药组小鼠灌胃相应药液,每天1次,连续12周。测定小鼠血浆中总胆固醇(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)、氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)、白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平;观察小鼠主动脉病理形态学变化;测定小鼠主动脉中细胞间黏附分子1(ICAM-1)、血管细胞间黏附分子1(VCAM-1)和增殖细胞核抗原(PCNA)的阳性率;测定小鼠主动脉中基质金属蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9、转化生长因子(TGF- $\beta$ <sub>1</sub>)、Smad2、Smad3 mRNA的表达水平以及TGF- $\beta$ <sub>1</sub>、Smad2/3、磷酸化Smad2/3(p-Smad2/3)蛋白的表达水平。结果 与正常组比较,模型组小鼠血浆中TC、TG、LDL-C、Ox-LDL、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$ 水平均显著升高( $P < 0.01$ ),HDL-C水平显著降低( $P < 0.01$ );主动脉有脂质斑块生成,且斑块面积较大并致使管腔严重狭窄;主动脉中MMP-2、MMP-9、TGF- $\beta$ <sub>1</sub>、Smad2和Smad3 mRNA的表达水平,ICAM-1、VCAM-1、PCNA蛋白表达阳性率以及TGF- $\beta$ <sub>1</sub>、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白的表达水平均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各给药组上述指标水平大部分均显著回调( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论 田蓊昔可能是通过抑制TGF- $\beta$ <sub>1</sub>/Smads信号通路的激活,进而抑制血管平滑肌细胞增殖、减轻炎症反应、调节脂质代谢来抑制AS的形成。

**关键词** 田蓊昔;动脉粥样硬化;转化生长因子 $\beta$ <sub>1</sub>/Smads信号通路;炎症反应;脂质代谢

## Improvement effects of tilianin on atherosclerosis model mice and its mechanism study

CAO Wenjiang, XIN Pan, ZHAO Yunli, YUAN Yong, GUO Xinhong, MA Xiaoli, HUANG Chuansheng, WEN Zhiping, WANG Xinchun (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of School of Medicine, Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832008, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the improvement effects of tilianin on the atherosclerosis (AS) model mice and its potential mechanism. **METHODS** Eight C57BL/6J mice were taken as the normal group. Forty *ApoE*<sup>-/-</sup> mice were randomly divided into model group, tilianin low-dose, medium-dose and high-dose groups [2.1, 3.5, 7.0 mg/(kg·d)] and simvastatin group [positive control drug, 3.5 mg/(kg·d)], with 8 mice in each group. Normal group was given normal diet, and other groups were given high-lipid diet to induce AS model. At the same time, normal group and model group were given normal saline intragastrically, administration groups were given relevant drug intragastrically, once a day, for 12 consecutive weeks. The levels of TC, TG, LDL-C, HDL-C, Ox-LDL, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 and TNF- $\alpha$  in plasma were determined. The pathomorphological changes of the aorta in mice were observed. The positive rate of ICAM-1, VCAM-1 and PCNA in the aorta were determined. mRNA expressions of MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, Smad2 and Smad3 as well as protein expressions of TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, Smad2/3 and p-Smad2/3 were also determined in aorta of mice. **RESULTS** Compared with normal group, the plasma levels of TC, TG, LDL-C, Ox-LDL, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 and TNF- $\alpha$  in model group were increased significantly ( $P < 0.01$ ), while HDL-C level was significantly reduced ( $P < 0.01$ ). Lipid plaques were formed in the aorta, and the plaque area was large and caused severe stenosis of the lumen. mRNA expressions of MMP-2, MMP-9, TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, Smad2 and Smad3 as well as positive rate of ICAM-1, VCAM-1, PCNA and protein expression TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, Smad2/3, and p-Smad2/3 in the aorta were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, most of above indexes of medication groups were improved significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **CONCLUSIONS** Tilianin can inhibit the activation of TGF- $\beta$ <sub>1</sub>/Smads signaling pathway and then inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells, reduce

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81860747, No.81960766)

\* 副主任技师,硕士。研究方向:临床检验。E-mail:cwjwxc@163.com

<sup>#</sup> 通信作者:主任药师,博士。研究方向:中药民族药新药研究与开发。E-mail:841175436@qq.com

inflammation and regulate lipid metabolism to inhibit the formation of AS.

**KEYWORDS** tilianin; atherosclerosis; TGF- $\beta$ <sub>1</sub>/Smads signaling pathway; inflammation; lipid metabolism

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种动脉血管壁的慢性进行性疾病,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的增殖、迁移与AS斑块纤维帽及新生血管的生成具有重要联系<sup>[1]</sup>。转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )是一类具有多种生物学功能的生长因子,可参与调节细胞的生长、增殖、分化和迁移等过程;其不仅可刺激多种细胞因子和炎症介质的合成与分泌,还可参与细胞外基质的合成与降解<sup>[2]</sup>。而在TGF- $\beta$ 家族中,又以TGF- $\beta_1$ 的功能最多、活性最强、分布最广。Smads蛋白家族是TGF- $\beta_1$ 信号转导的主要分子,介导信号从细胞膜向细胞核的传递<sup>[3]</sup>。近年来的研究发现,TGF- $\beta_1$ /Smads信号通路可刺激炎症介质生成、参与血管新生、调控VSMC的增殖与迁移,而这些过程在AS的发生发展过程中发挥着重要作用<sup>[4-6]</sup>。

香青兰 *Dracocephalum moldavica* L. 为唇形科青兰属一年生草本植物,以地上全草入药,具有清热燥湿、凉肝止血的功效<sup>[7]</sup>。香青兰中主要含黄酮类、多糖、萜类等成分,其中黄酮类成分具有抗炎、抗氧化、保护心肌及抗AS等作用<sup>[8-9]</sup>。田蓟苷是香青兰总黄酮中的主要活性成分,具有降血脂、抗炎、抗氧化应激等作用,对AS具有一定的防治作用<sup>[10-13]</sup>。本课题组前期研究发现,田蓟苷可以抑制血管紧张素II诱导的大鼠VSMC过度增殖和迁移,并且此过程涉及TGF- $\beta_1$ /Smads信号通路的激活和调控<sup>[14]</sup>。因此,本研究以载脂蛋白E基因敲除(*ApoE*<sup>-/-</sup>)小鼠为动物模型,研究田蓟苷是否能通过调控TGF- $\beta_1$ /Smads信号通路来抑制*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠AS的形成,为进一步阐明田蓟苷抑制AS的作用机制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有5430R小型台式高速低温冷冻离心机(德国Eppendorf公司),XL-200型低速离心仪器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司),EM-UC6型超薄型切片仪、RM2245型半自动石蜡切片机(美国Leica公司),VE-180型垂直电泳及电转仪(上海天能科技有限公司),EC3600型凝胶成像系统(美国UVP公司),Rotor-Gene Q型实时荧光定量-聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪(德国Qiagen公司),Modular DPP-H7600型全自动生化分析仪(德国罗氏诊断有限公司),TES99型石蜡包埋机(湖北徕克医疗仪器有限公司),CKX53型常规倒置显微镜(日本Olympus公司),M200 Pro型多功能酶标仪(瑞士Tacan公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂包括:田蓟苷(新疆维吾尔自治区药物研究所,批号20100626,纯度 $\geq$

98%),辛伐他汀片(杭州默沙东制药有限公司,批号M042689,规格为20 mg/片),4%多聚甲醛(武汉博士德生物工程有限公司,批号11K17B68),苏木精(美国Sigma公司,批号SLBP6815V),伊红(上海蓝季科技发展有限公司,批号100715),二甲苯(天津市富宇精细化工有限公司,批号20150519),二氨基联苯胺(DAB,丹麦丹科股份有限公司,批号20039541),兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号10494-1-AP),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为131879、131224),小鼠氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL)、白细胞介素1 $\beta$ (interleukin-1beta, IL-1 $\beta$ )、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)酶联免疫吸附检测(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为AK0017OCT19007、AK0017OCT19004、AK0017OCT19006、AK0017OCT19003、AK0017OCT-19005),动物组织总RNA提取试剂盒、QuantiNova<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit(北京天根生化科技有限公司,批号分别为Q5920、154045739),cDNA合成试剂盒、ECL超敏发光试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为00422714、RJ238588),RIPA组织细胞裂解液、磷酸酶抑制剂混合物(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20150319、P1260),小鼠源TGF- $\beta_1$ 单克隆抗体、兔源Smad2/3单克隆抗体、兔源磷酸化Smad2/3(p-Smad2/3)多克隆抗体、小鼠源细胞间黏附分子1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)单克隆抗体、兔源血管细胞间黏附分子1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)单克隆抗体、兔源增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体(英国Abcam Cambridge公司,批号分别为ab64715、ab202445、ab272332、ab171123、ab134047、ab92552);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。PCR实验中的引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成。

### 1.3 动物

本研究所用动物为健康雄性SPF级*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠(40只)和健康雄性SPF级C57BL/6J小鼠(8只)。两种小鼠均为8周龄,体质量20~24 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产合格证号均为SCXK(京)2016-0011。所有小鼠均单笼单只饲养,饲养期间自由进食和饮水。动物房环境温度为22~25℃、

相对湿度为50%~60%、每天的光照时间为12 h。本实验过程满足动物实验“3R”原则。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模与给药

小鼠经过2周的适应性喂养后进行正式实验。以8只C57BL/6J小鼠作为正常组;将40只ApoE<sup>-/-</sup>小鼠随机分为模型组,田蓟昔低、中、高剂量组[2.1、3.5、7.0 mg/(kg·d)]<sup>[11]</sup>和辛伐他汀组[阳性对照药物,3.5 mg/(kg·d)]<sup>[12]</sup>,每组8只。正常组小鼠饲以普通饲料,其余各组小鼠均通过饲以高脂饲料(0.75%胆固醇、15%猪油和84.25%基础饲料)的方式建立AS模型,连续饲养12周<sup>[13]</sup>。同时,各给药组小鼠灌胃相应药物(均以生理盐水为溶剂溶解),正常组和模型组小鼠灌胃生理盐水,灌胃体积均为10 mL/kg,每天1次,连续12周。

### 2.2 样本取材及处理

末次灌胃24 h后,小鼠先禁食不禁水12 h,然后摘眼球取血。将血样置于含肝素钠的抗凝管中,以3 000 r/min离心10 min,分离血浆并分装。将部分血浆用于血脂指标检测;部分血浆于-80℃保存,备用。取血后将小鼠处死,开胸剪取主动脉,剥离外膜脂肪组织,然后用预冷的灭菌生理盐水冲洗主动脉。取洗净后的主动脉根部(长约1.0 cm),置于4%多聚甲醛溶液中固定;其余的主动脉用锡箔纸包裹并标记好后迅速置于液氮中冷冻,再于-80℃保存,备用。

### 2.3 血浆中血脂指标水平检测

取“2.2”项下血浆,采用全自动生化分析仪检测血浆中总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平。

### 2.4 血浆中Ox-LDL、IL-1β、IL-6、MCP-1、TNF-α水平检测

采用ELISA法进行检测。取“2.2”项下血浆,按照相应试剂盒说明书方法操作,采用酶标仪在450 nm波长处测定血浆中Ox-LDL、IL-1β、IL-6、MCP-1、TNF-α的水平。

### 2.5 主动脉病理形态学变化观察

采用苏木精-伊红(HE)染色法进行观察。取4%多聚甲醛溶液固定的主动脉,常规制备石蜡切片(厚度约5 μm),行常规HE染色后,置于光学显微镜下观察。

### 2.6 主动脉中ICAM-1、VCAM-1、PCNA蛋白表达检测

采用免疫组化法进行测定。取4%多聚甲醛溶液固定的主动脉,常规制备石蜡切片(厚度约5 μm),60℃脱蜡后,在100℃下用pH 6.0的柠檬酸盐抗原修复液修复5 min,然后在25℃下用3%过氧化氢溶液阻断内源过氧

化物酶活性10 min;加入ICAM-1一抗(稀释比例1:100)、VCAM-1一抗(稀释比例1:125)、PCNA一抗(稀释比例1:200),4℃孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例1:500),37℃孵育30 min;进行磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤、DAB显色、苏木精染色、封片后,在光学显微镜下检测。ICAM-1和VCAM-1主要在胞浆中表达,胞浆阳性染色呈棕黄色。通过Image-Pro Plus 6.0软件计算棕黄色部位的平均光密度(IOD)值和阳性表达蛋白的分布面积,计算2种蛋白的阳性率[阳性率(%)=IOD值/阳性表达蛋白的分布面积×100%]。PCNA主要在细胞核中表达,细胞核阳性染色呈棕色,阴性染色呈蓝色。通过Image-Pro Plus 6.0软件计数阳性细胞个数和视野中所有细胞个数,并计算PCNA阳性率[阳性率(%)=(阳性细胞个数/视野中所有细胞个数)×100%]。

### 2.7 主动脉中MMP-2、MMP-9、TGF-β<sub>1</sub>、Smad2、Smad3 mRNA表达的检测

采用qRT-PCR法进行检测。取“2.2”项下冻存的主动脉,常规解冻后,按动物组织总RNA抽提试剂盒方法提取组织中的总RNA;验证其纯度后,按cDNA逆转录试剂盒方法合成cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系(共20 μL):2×QuantiNova SYBR Green PCR Master mix 10 μL,上、下游引物各1 μL,cDNA模板2 μL,ddH<sub>2</sub>O 6 μL。PCR反应条件:95℃预变性1 min;95℃变性10 s,60℃退火/延伸15 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算各目的基因的mRNA表达水平。引物序列及产物扩增长度见表1。

表1 引物序列及产物扩增长度

基因名称	引物序列	产物扩增长度/bp
MMP-2	上游:5'-ACACTGGGACCTGTCACTCC-3'	122
	下游:5'-TGTCAGTGTCCGCCAATAA-3'	
MMP-9	上游:5'-AGACGACATAGACGGCATCC-3'	116
	下游:5'-TGGGACACATAGTGGGAGGT-3'	
TGF-β <sub>1</sub>	上游:5'-CAATTCCTGGCGTTACCTTG-3'	122
	下游:5'-AGCCCTGTATTCCGCTCTCT-3'	
Smad2	上游:5'-GGAACCTGCATTCTGGTGT-3'	118
	下游:5'-CGAGTTTGATGGGTCTGTGA-3'	
Smad3	上游:5'-CACAGCCACCATGAATTACG-3'	120
	下游:5'-TGGAGGTAGAAGTGGCGTCT-3'	
GAPDH	上游:5'-TGGCCTCCGTGTTCTAC-3'	178
	下游:5'-GAGTTGCTGTGAAGTCGCA-3'	

### 2.8 主动脉中TGF-β<sub>1</sub>、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白表达的检测

采用Western blot法进行测定。取“2.2”项下冻存的主动脉,常规解冻后,采用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取组织中的总蛋白;测定蛋白的浓度和纯度后,将蛋白进行高温变性。取变性后蛋白进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(分离胶电压100 V、浓缩胶电压80 V,电泳时间2 h),湿法转



移至聚偏二氟乙烯膜上(电流200 mA,转膜时间2 h),用5%脱脂奶粉或5%牛血清白蛋白封闭1 h;加入TGF- $\beta_1$ 一抗(稀释比例1:1 000)、Smad2/3一抗(稀释比例1:1 000),p-Smad2/3一抗(稀释比例1:1 000)、GAPDH一抗(稀释比例1:5 000),4℃孵育过夜;TBST洗膜10 min $\times$ 3次,加入相应二抗(稀释比例1:20 000),室温孵育1 h;加入ECL显色,凝胶成像系统成像、显影。用Image J 1.8.0软件分析,以目的蛋白与内参(GAPDH)蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

## 2.9 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 田蓟苷对AS模型小鼠血浆中血脂水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠血浆中TG、TC、LDL-C水平均显著升高( $P<0.01$ ),HDL-C水平显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组小鼠血浆中TG水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );田蓟苷高剂量组和辛伐他汀组小鼠血浆中TC水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );田蓟苷中、高剂量组和辛伐他汀组小鼠血浆中LDL-C水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠血浆中血脂指标水平测定结果见表2。

表2 各组小鼠血浆中血脂水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=8, \text{mmol/L}$ )

组别	TG	TC	LDL-C	HDL-C
正常组	0.56 $\pm$ 0.07	2.71 $\pm$ 0.25	0.20 $\pm$ 0.05	1.44 $\pm$ 0.15
模型组	1.43 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	31.92 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>	14.35 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
田蓟苷低剂量组	1.21 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	31.17 $\pm$ 0.66	13.87 $\pm$ 0.93	0.19 $\pm$ 0.02
田蓟苷中剂量组	0.98 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	31.07 $\pm$ 0.58	12.65 $\pm$ 1.06 <sup>b</sup>	0.21 $\pm$ 0.05
田蓟苷高剂量组	0.84 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	30.77 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>	10.09 $\pm$ 1.07 <sup>c</sup>	0.24 $\pm$ 0.10
辛伐他汀组	0.78 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	30.37 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>	8.62 $\pm$ 1.69 <sup>c</sup>	0.23 $\pm$ 0.06

a:与正常组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ ;c:与模型组比较, $P<0.01$

### 3.2 田蓟苷对AS模型小鼠血浆中Ox-LDL水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠血浆中Ox-LDL水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组小鼠血浆中Ox-LDL水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠血浆中Ox-LDL水平测定结果见表3。

表3 各组小鼠血浆中Ox-LDL水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=8, \text{ng/mL}$ )

组别	Ox-LDL	组别	Ox-LDL
正常组	5 734.09 $\pm$ 1 350.12	田蓟苷中剂量组	10 615.51 $\pm$ 1 925.50 <sup>a</sup>
模型组	14 640.69 $\pm$ 2 803.79 <sup>a</sup>	田蓟苷高剂量组	8 660.31 $\pm$ 1 904.50 <sup>b</sup>
田蓟苷低剂量组	11 609.18 $\pm$ 1 485.47 <sup>b</sup>	辛伐他汀组	8 397.32 $\pm$ 1 161.14 <sup>c</sup>

a:与正常组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ ;c:与模型组比较, $P<0.01$

### 3.3 田蓟苷对AS模型小鼠血浆中IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1和TNF- $\alpha$ 水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠血浆中IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1和TNF- $\alpha$ 水平均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,除田蓟苷低剂量组小鼠血浆中TNF- $\alpha$ 水平降低不显著外( $P>0.05$ ),其余各组小鼠血浆中上述指标水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠血浆中IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$ 水平测定结果见表4。

表4 各组小鼠血浆中IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$ 水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=8, \text{pg/mL}$ )

组别	IL-1 $\beta$	IL-6	MCP-1	TNF- $\alpha$
正常组	5.74 $\pm$ 0.99	59.11 $\pm$ 11.73	1 127.37 $\pm$ 49.86	396.10 $\pm$ 49.51
模型组	79.00 $\pm$ 9.96 <sup>a</sup>	375.2 $\pm$ 65.41 <sup>a</sup>	3 423.32 $\pm$ 260.02 <sup>a</sup>	1 040.85 $\pm$ 125.06 <sup>a</sup>
田蓟苷低剂量组	50.13 $\pm$ 7.45 <sup>b</sup>	278.32 $\pm$ 24.12 <sup>b</sup>	2 868.90 $\pm$ 326.72 <sup>b</sup>	914.52 $\pm$ 109.51
田蓟苷中剂量组	42.11 $\pm$ 4.82 <sup>b</sup>	244.55 $\pm$ 36.07 <sup>b</sup>	2 277.83 $\pm$ 395.71 <sup>b</sup>	689.98 $\pm$ 95.85 <sup>b</sup>
田蓟苷高剂量组	30.83 $\pm$ 3.61 <sup>b</sup>	209.64 $\pm$ 40.98 <sup>b</sup>	2 084.84 $\pm$ 243.86 <sup>b</sup>	617.62 $\pm$ 114.38 <sup>b</sup>
辛伐他汀组	21.30 $\pm$ 3.67 <sup>b</sup>	220.18 $\pm$ 37.87 <sup>b</sup>	1 862.56 $\pm$ 290.32 <sup>b</sup>	580.19 $\pm$ 126.98 <sup>b</sup>

a:与正常组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.05$ ;c:与模型组比较, $P<0.01$

### 3.4 田蓟苷对AS模型小鼠主动脉病理形态学的影响

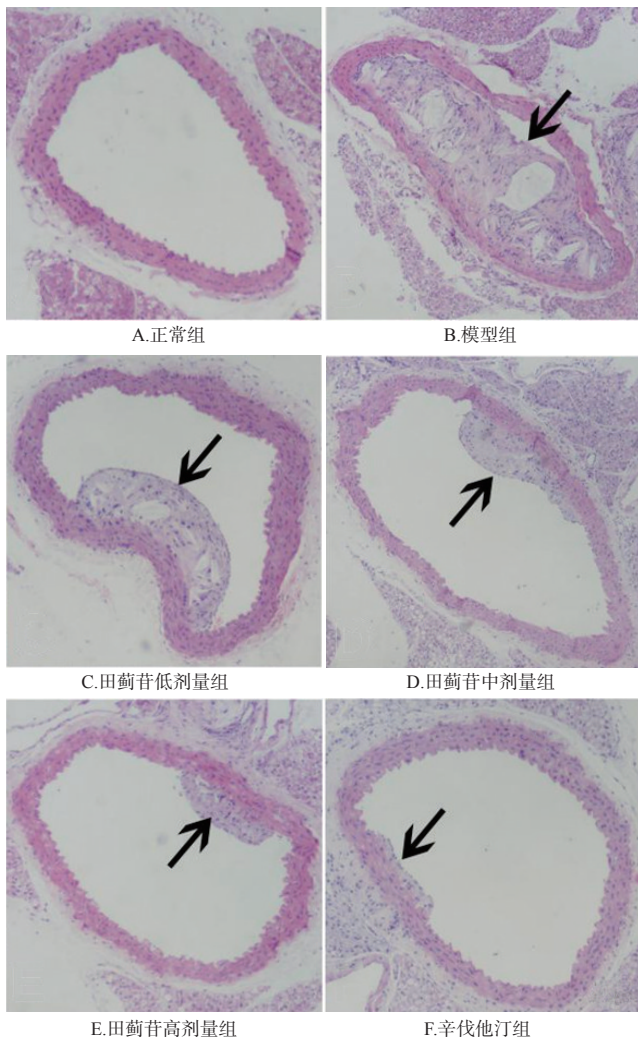
正常组小鼠主动脉层次清晰,内膜完整,无泡沫细胞与胆固醇结晶形成;管腔未发生明显狭窄,且无脂质斑块生成。模型组小鼠主动脉层次紊乱,有脂质斑块生成,且斑块面积较大并呈现向管腔发展的占位性病变;管腔严重狭窄,斑块脂质核心大,存在大量泡沫细胞和胆固醇结晶。田蓟苷各剂量组和辛伐他汀组小鼠主动脉层次有所改善,斑块面积减小;管腔狭窄程度明显减轻,斑块脂质核心小,斑块内泡沫细胞和胆固醇结晶减少。各组小鼠主动脉病理形态学观察结果见图1。

### 3.5 田蓟苷对AS模型小鼠主动脉中ICAM-1、VCAM-1和PCNA蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠主动脉中ICAM-1、VCAM-1和PCNA蛋白表达的阳性率均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组小鼠主动脉中上述蛋白表达的阳性率均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠主动脉中ICAM-1、VCAM-1和PCNA蛋白表达的免疫组化图见图2,蛋白表达的阳性率测定结果见表5。

### 3.6 田蓟苷对AS模型小鼠主动脉中MMP-2、MMP-9、TGF- $\beta_1$ 、Smad2和Smad3 mRNA表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠主动脉中MMP-2、MMP-9、TGF- $\beta_1$ 、Smad2、Smad3 mRNA的表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组小鼠主动脉中上述因子mRNA的表达水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠主动脉中MMP-2、MMP-9、TGF- $\beta_1$ 、Smad2和Smad3 mRNA的表达水平测定结果见表6。



箭头所指处:脂质斑块

图1 各组小鼠主动脉病理形态学观察结果(HE染色,  $\times 40$ )

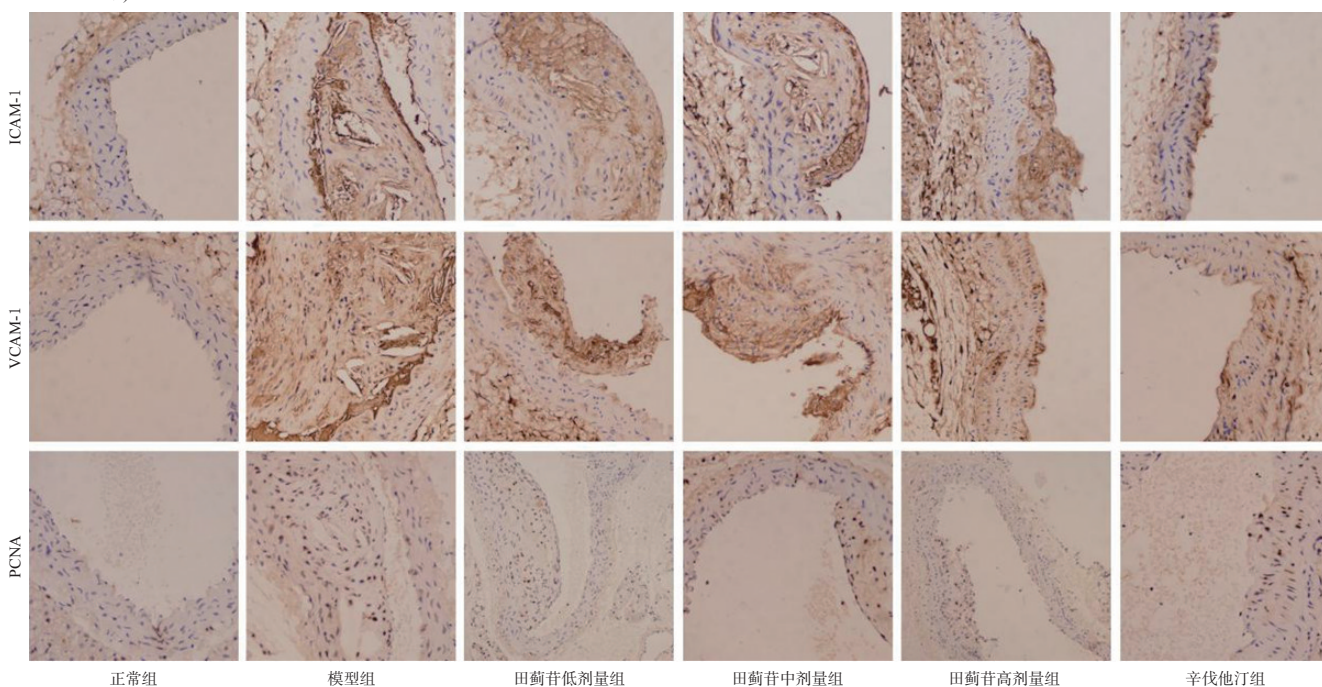


图2 各组小鼠主动脉中ICAM-1、VCAM-1和PCNA蛋白表达的免疫组化图( $\times 400$ )

表5 各组小鼠主动脉中ICAM-1、VCAM-1和PCNA蛋白表达的阳性率测定结果( $\bar{x} \pm s, n=8, \%$ )

组别	ICAM-1	VCAM-1	PCNA
正常组	1.70 ± 0.80	0.30 ± 0.10	14.60 ± 2.1
模型组	15.90 ± 1.50 <sup>a</sup>	10.20 ± 0.50 <sup>a</sup>	73.50 ± 8.1 <sup>a</sup>
田蓊苷低剂量组	12.20 ± 1.70 <sup>b</sup>	7.70 ± 0.80 <sup>c</sup>	60.10 ± 10.3 <sup>b</sup>
田蓊苷中剂量组	10.50 ± 1.10 <sup>c</sup>	5.80 ± 1.00 <sup>c</sup>	42.80 ± 7.1 <sup>c</sup>
田蓊苷高剂量组	7.30 ± 1.30 <sup>c</sup>	4.00 ± 0.30 <sup>c</sup>	28.20 ± 8.3 <sup>c</sup>
辛伐他汀组	6.00 ± 1.20 <sup>c</sup>	3.30 ± 0.40 <sup>c</sup>	20.60 ± 6.0 <sup>c</sup>

a: 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与模型组比较,  $P < 0.01$

表6 各组小鼠主动脉中MMP-2、MMP-9、TGF- $\beta_1$ 、Smad2和Smad3 mRNA表达水平的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	MMP-2 mRNA	MMP-9 mRNA	TGF- $\beta_1$ mRNA	Smad2 mRNA	Smad3 mRNA
正常组	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10
模型组	1.69 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.09 <sup>a</sup>
田蓊苷低剂量组	1.34 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.56 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.23 ± 0.05 <sup>b</sup>
田蓊苷中剂量组	0.98 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.91 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.14 ± 0.13 <sup>c</sup>	0.92 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.86 ± 0.09 <sup>c</sup>
田蓊苷高剂量组	0.85 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.88 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.85 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.84 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.78 ± 0.10 <sup>c</sup>
辛伐他汀组	0.80 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.87 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.81 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.71 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.64 ± 0.11 <sup>c</sup>

a: 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与模型组比较,  $P < 0.01$

### 3.7 田蓊苷对AS模型小鼠主动脉中TGF- $\beta_1$ 、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠主动脉中TGF- $\beta_1$ 、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白的表达水平均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各给药组小鼠主动脉中上述蛋白的表达水平均显著降低( $P < 0.01$ )。各组小鼠主动脉中TGF- $\beta_1$ 、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白表达的电泳图见图3,蛋白表达水平测定结果见表7。



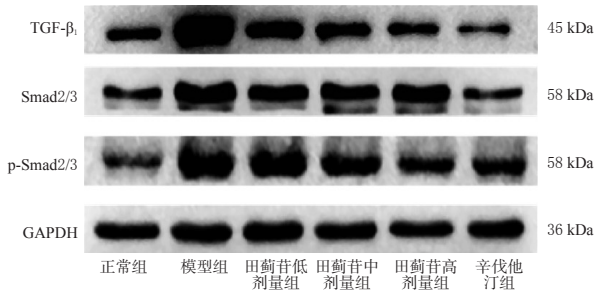


图3 各组小鼠主动脉中TGF-β<sub>1</sub>、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白表达的电泳图

表7 各组小鼠主动脉中TGF-β<sub>1</sub>、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白表达水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	TGF-β <sub>1</sub> /GAPDH	Smad2/3/GAPDH	p-Smad2/3/GAPDH
正常组	0.42 ± 1.27	0.44 ± 0.05	0.62 ± 0.04
模型组	1.27 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.13 <sup>a</sup>
田藜苷低剂量组	0.70 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.81 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.35 ± 0.14 <sup>b</sup>
田藜苷中剂量组	0.64 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.26 ± 0.06 <sup>b</sup>
田藜苷高剂量组	0.43 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.71 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.91 ± 0.07 <sup>b</sup>
辛伐他汀组	0.34 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.86 ± 0.09 <sup>b</sup>

a: 与正常组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.01$

#### 4 讨论

载脂蛋白E可特定地与外周细胞受体结合,对脂蛋白成分的正常分解、代谢至关重要;敲除ApoE基因后,会影响胆固醇与细胞表面的脂蛋白结合,造成胆固醇无法降解,胆固醇蓄积会导致AS的发生<sup>[16]</sup>。本研究选用ApoE<sup>-/-</sup>小鼠为动物模型进行研究。以高脂饲料喂养ApoE<sup>-/-</sup>小鼠后,容易形成AS,而AS的主要临床表现为血脂水平升高和斑块形成<sup>[17]</sup>,因此,控制血脂水平、抑制斑块形成对防治AS具有重要意义。临床上常用辛伐他汀治疗高脂血症,其可降低血脂水平(如TC、TG、LDL-C等),因此本研究选择辛伐他汀作为阳性对照药物。结果显示,模型组小鼠血浆中TG、TC、LDL-C水平均显著升高,主动脉内可见明显的AS斑块,说明以高脂饲料喂养ApoE<sup>-/-</sup>小鼠可成功建立AS模型;而给予不同剂量田藜苷后,AS模型小鼠血浆中TG、TC、LDL-C水平均不同程度地降低,AS斑块均不同程度地减小,说明田藜苷具有降低血脂水平和抑制斑块形成的作用。

AS发病机制复杂,脂质代谢紊乱和炎症被认为是AS发病的主要危险因素<sup>[18-19]</sup>。Ox-LDL可以促进脂质堆积,导致AS斑块形成<sup>[20]</sup>。本研究通过检测小鼠血浆中脂质代谢相关指标Ox-LDL水平和炎症标志物IL-6、IL-1β、TNF-α、MCP-1的水平发现,模型组小鼠血浆中Ox-LDL、IL-6、IL-1β、TNF-α、MCP-1水平均显著升高,而不同剂量田藜苷均可不同程度地降低AS模型小鼠血浆中上述指标的水平,说明田藜苷可以调节脂质代谢和抑制炎症反应。

ICAM-1和VCAM-1均属于黏附分子免疫球蛋白家

族,主要参与细胞的识别和黏附,两者均可介导细胞的黏附、迁移和分化,使单核细胞、白细胞、T淋巴细胞等在血管内壁大量堆积,致使血管发生炎症和形成斑块<sup>[21]</sup>。PCNA表达水平的高低可反映VSMC增殖能力的大小,其表达水平越高表示VSMC的增殖能力越强<sup>[22]</sup>,而VSMC大量增殖会促进斑块坏死核心的形成<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,模型组小鼠主动脉中ICAM-1、VCAM-1和PCNA蛋白表达的阳性率均明显升高,而不同剂量田藜苷均可降低AS模型小鼠主动脉中上述蛋白表达的阳性率,说明田藜苷可通过抑制细胞的黏附和VSMC的增殖、迁移来抑制AS斑块的形成。

在AS的发展过程中,巨噬细胞、平滑肌细胞、淋巴细胞和泡沫细胞均可以合成和分泌基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinases, MMPs),其中MMP-2与MMP-9可降解细胞外基质,导致AS斑块不稳定和破裂<sup>[24]</sup>,而不稳定斑块是血栓形成的主要原因<sup>[25]</sup>。本研究结果显示,模型组小鼠主动脉中MMP-2、MMP-9 mRNA的表达水平均显著升高,而不同剂量田藜苷均可降低AS模型小鼠主动脉中MMP-2、MMP-9 mRNA的表达水平,说明田藜苷可起到稳定斑块的作用。

TGF-β<sub>1</sub>/Smads信号通路的激活是许多血管疾病的标志<sup>[1]</sup>。TGF-β<sub>1</sub>具有促进炎症细胞浸润、VSMC增殖和迁移以及细胞外基质沉积等作用<sup>[2]</sup>,Smad2和Smad3是TGF-β<sub>1</sub>/Smads信号通路的重要下游信号转导分子和靶点<sup>[3]</sup>,激活TGF-β<sub>1</sub>/Smads信号通路会促进VSMCs增殖和基质合成<sup>[26-27]</sup>,从而导致AS斑块形成。因此,抑制TGF-β<sub>1</sub>/Smads通路的激活可减少炎症介质生成、抑制VSMC增殖和AS斑块形成。本研究结果显示,模型组小鼠主动脉中TGF-β<sub>1</sub>、Smad2、Smad3 mRNA的表达和TGF-β<sub>1</sub>、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白的表达均显著上调,而不同剂量田藜苷均可下调AS模型小鼠主动脉中上述因子mRNA和蛋白的表达。以上结果说明,田藜苷可通过抑制TGF-β<sub>1</sub>及其下游信号分子Smad2/3、p-Smad2/3的表达,从而发挥抑制VSMC增殖和迁移的作用。

综上所述,田藜苷可能是通过抑制TGF-β<sub>1</sub>/Smads信号通路的信号传导,进而抑制VSMC增殖、减轻炎症反应、调节脂质代谢来抑制AS的形成,但其具体的作用机制还有待进一步确定。

#### 参考文献

- [1] LOWE L, BAKER A H, BRADSHAW A C. TGFβ, smooth muscle cells and coronary artery disease: a review[J]. Cell Signal, 2019, 53: 90-101.
- [2] LI M O, WAN Y Y, SANJABI S, et al. Transforming growth factor-β regulation of immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24: 99-146.

- [ 3 ] SUWANABOL P A, KENT K C, LIU B. TGF- $\beta$  and restenosis revisited: a smad link[J]. *J Surg Res*, 2011, 167(2): 287-297.
- [ 4 ] LICHTMAN M K, OTERO-VINAS M, FALANGA V. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isoforms in wound healing and fibrosis[J]. *Wound Rep And Reg*, 2016, 24(2):215-222.
- [ 5 ] CHEN P Y, SIMONS M. Fibroblast growth factor-transforming growth factor beta dialogues, endothelial cell to mesenchymal transition, and atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2018, 29(5):397-403.
- [ 6 ] GOUMANS MJ, TEN DIJKE P. TGF-beta signaling in control of cardiovascular function[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(2):a022210.
- [ 7 ] 查亚锦. 香料、色素、观赏类中药材植物种植技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001:85-86.
- [ 8 ] 张华然. 香青兰的化学成分及生物活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [ 9 ] 刘云, 靳敏, 王占黎. 香青兰总黄酮化学成分和药理作用研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2019, 28(1):68-71.
- [10] WANG Y Y, YUAN Y, WANG X C, et al. Tilianin post-conditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via mitochondrial protection and inhibition of apoptosis[J]. *Med Sci Monit* 2017, 23:4490-4499.
- [11] 曹文疆, 彭克军, 袁勇, 等. 田蓟苷对大鼠血脂水平和炎症因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(11): 164-167.
- [12] 李海宁, 郑瑞芳, 都研文, 等. 田蓟苷抗脑缺血再灌注程序性坏死的作用及机制研究[J]. *中草药*, 2021, 52(7): 1974-1980.
- [13] 姜雯, 杨浩, 席梅, 等. 田蓟苷对高脂饮食 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠抗动脉粥样硬化活性及作用机制[J]. *中成药*, 2021, 43(8): 2024-2029.
- [14] CAO W J, HU N, YUAN Y, et al. Effects of tilianin on proliferation, migration and TGF-beta/smad signaling in rat vascular smooth muscle cells induced with angiotensin II[J]. *Phytothe Res*, 2017, 31(8):1240-1248.
- [15] 信盼, 王新春, 黄川生, 等. 香青兰总黄酮对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化及 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路的影响[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2018, 36(4):492-497.
- [16] JAWIEŃ J, NASTAŁEK P, KORBUT R. Mouse models of experimental atherosclerosis[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2004, 55(3):503-517.
- [17] 郑刚. 冠状动脉粥样硬化斑块特征与临床预后相关性研究的进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2020, 22(3): 317-320.
- [18] GISTERÅ A, HANSSON G K. The immunology of atherosclerosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13(6):368-380.
- [19] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2019, 124(2):315-327.
- [20] 陈彩玲, 吴铁, 杨亚军, 等. 骨质疏松与动脉粥样硬化: 基于 Ox-LDL 的转导作用[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(6):747-750.
- [21] VARONA J F, ORTIZ-REGALÓN R, SÁNCHEZ-VERA I, et al. Soluble ICAM 1 and VCAM 1 blood levels alert on subclinical atherosclerosis in non smokers with asymptomatic metabolic syndrome[J]. *Arch Med Res*, 2019, 50(2):20-28.
- [22] ZHANG L, CHENG H L, YUE Y X, et al. H19 knock-down suppresses proliferation and induces apoptosis by regulating miR-148b/WNT/ $\beta$ -catenin in Ox-LDL-stimulated vascular smooth muscle cells[J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1):11.
- [23] GROOTAERT M O J, MOULIS M, ROTH L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4):622-634.
- [24] GRESELE P, FALCINELLI E, SEBASTIANO M, et al. Matrix metalloproteinases and platelet function[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147:133-165.
- [25] 严士海, 张建平, 王海丹, 等. 脑络通颗粒对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化血管重构的影响[J]. *中成药*, 2016, 38(3): 480-484.
- [26] 徐丹, 陶永梅, 宋丹, 等. 蓬子菜总黄酮经调控 TGF- $\beta$ /Smad3 信号通路对内皮细胞增殖、凋亡的影响研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(18):1944-1948, 1953.
- [27] 许昌声, 张美金, 练桂丽, 等. RXR $\alpha$  激动剂贝萨罗汀通过调控 TGF- $\beta_1$ /Smad2 通路抑制 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化的形成[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(9): 1565-1571.

(收稿日期:2021-07-25 修回日期:2021-11-22)

(编辑:林 静)