

# 新活络效灵丹对 ApoE 基因敲除早期动脉粥样硬化小鼠 TGF- $\beta$ 的影响

房玉涛 刘桂芳 张 云

(中国中医科学院广安门医院,北京,100053)

**摘要** 目的:观察新活络效灵丹对 ApoE 基因敲除小鼠 AS 早期斑块的病理形态学改变及转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )表达的影响,探讨新活络效灵丹抗 AS 早期斑块的可能机制。方法:采用高脂饲料喂养 ApoE 基因敲除小鼠建立 AS 模型,将 45 只小鼠随机分为模型组、西药组、中药组,另将 C57BL/6J 小鼠 10 只设为空白对照组。在造模的同时即给予药物干预,空白对照组不予处理,模型组予以生理盐水 0.3 mL/d,中药组给予新活络效灵丹 9.67 g/(kg·d),西药组给予阿托伐他汀钙片 3.33 mg/(kg·d),均每日灌胃 1 次,连续给药 13 周。取主动脉根部,HE 染色进行病理观察,采用 RT-PCR 技术检测各组 TGF- $\beta$ mRNA 的表达水平。结果:模型组主动脉内形成明显的 AS 斑块,并出现脂质核心,泡沫细胞增多,大量的巨噬细胞的浸润;西药组管壁可见 AS 斑块,斑块面积明显小于模型组;中药组斑块面积显著减少,部分内膜较为光滑。模型组小鼠主动脉组织中 TGF- $\beta$ mRNA 表达水平明显低于空白对照组( $P < 0.01$ );西药组、中药组小鼠主动脉组织中 TGF- $\beta$ mRNA 表达水平明显高于模型对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而中药组小鼠主动脉组织中 TGF- $\beta$ mRNA 表达水平高于西药组,但 2 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:新活络效灵丹在一定程度上可通过上调保护性因子 TGF- $\beta$  以抑制免疫炎症反应,发挥抗动脉粥样硬化的作用,可能是其防治 AS 早期斑块的形成机制之一。

**关键词** 新活络效灵丹;ApoE 基因敲除小鼠;动脉粥样硬化;转化生长因子- $\beta$

## Effect of New Huoluo Xiaoling Dan on the TGF- $\beta$ in ApoE Knock-out Mice with Early Atherosclerosis

Fang Yutao, Liu Guifang, Zhang Yun

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical sciences, Beijing 100053, China)

**Abstract Objective:** To observe the effect of New Huoluo Xiaoling Dan (NHLXLD) on aorta pathological changes in ApoE Knock-out mice and the expressions of Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ), and to explore possible mechanism of anti-AS.

**Methods:** AS model was induced by high lipid diet in ApoE knock-out mice. Forty five ApoE knock-out mice were equally randomized into 3 groups, including control group (CG), western medicine group (WGM) and traditional Chinese medicine group (TCMG). Ten C57BL/6J mice were also prepared as blank group (BG). During modeling, BG received no intervention; CG took normal saline 0.3 mL daily; TCMG was treated by NHLXLD 9.67 g/kg. d, and WGM was administered atorvastatin 3.33 mg/kg. d. The treatment lasted for 13 weeks with gastric lavage once everyday. Then the aortic roots were taken for HE stain and the mRNA levels of TGF- $\beta$  of each group were assayed. **Results:** Atherosclerotic plaques were observed obviously in the aorta of CG mice with overwhelming formation of foam cells, lipid core and a large number of macrophages infiltration. There were visible AS plaques on WGM aortic wall; plaque area was significantly lower than the CG; plaque area in TCMG was significantly reduced with the more smooth aortic endometrium. The TGF- $\beta$  mRNA expressions of CG were lower than BG ( $P < 0.01$ ); The TGF- $\beta$  mRNA expressions of WGM and TCMG were higher than CG ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). While the TGF- $\beta$  mRNA expressions of TCMG were higher than WGM, but the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** NHLXLD suppressed immune inflammatory response in a certain extent by increasing protective factor TGF- $\beta$  on anti-AS. It might be one of the possible mechanisms preventing the formation of AS plaque.

**Key Words** New Huoluo Xiaoling Dan; ApoE Knock-out Mice; Atherosclerosis; TGF- $\beta$

中图分类号:R972.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.10.044

动脉粥样硬化 (Artherosclerosis, AS) 是心脑血管疾病的主要致病因素,具有进展性和全身性的特点。防治 AS 的关键在于早期干预,防止、延缓斑块形成

和稳定斑块。在 AS 发生和发展过程中,炎症反应始终起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。研究表明,转化生长因子- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta, TGF- $\beta$ ) 具有抗炎

基金项目:中国博士后科学基金(编号:20080440498);国家自然科学基金青年项目(编号:81302964/H2708)

作者简介:房玉涛(1972.11—),男,博士,副主任医师,研究方向:中医药治疗心血管病,E-mail:fangyutao@sohu.com

通信作者:张云(1973.11—)女,博士,助理研究员,研究方向:中医药治疗心血管病,E-mail:bingqian0711@sina.com

和对抗脂质损害的作用,可延缓 AS 的发展,是保护心血管系统重要的细胞因子之一<sup>[3,4]</sup>。本研究通过高脂饮食构建 ApoE 基因敲除小鼠 AS 模型,观察新活络效灵丹对 ApoE 基因敲除小鼠 AS 的早期斑块面积的影响,并采用 PCR 技术,检测主动脉内 TGF- $\beta$  表达水平,从而探讨其防治 AS 斑块形成的可能作用机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8 周龄 ApoE 基因敲除小鼠 (C57BL/6J)45 只,均为雄性,体重 17~21 g,饲以高脂饲料;清洁级 C57BL/6J 小鼠 10 只,6~8 周龄,均为雄性,体重 17~21 g,普通饲料喂养。饲养条件为 2 级,室温 20~24 °C,相对湿度 40%~60%,光照时间:7:00—19:00。以上动物购自北京大学医学部实验动物中心,许可证号:SCXK(京)2011-0012。

1.2 实验药物及制备 新活络效灵丹(颗粒剂型):丹参 30 g、三七 4 g、乳香 12 g、没药 12 g,由中国中医科学院广安门医院药剂科制备,颗粒剂为四川新绿色药业科技发展股份有限公司生产。阿托伐他汀钙片由大连辉瑞制药有限公司提供,20 mg/片(批号:031711k)。

1.3 主要试剂和仪器 Trizol 试剂,购自 Invitrogen 公司,批号:14105;Fermentas K1622 RT 逆转录试剂盒购自 MBI 公司,批号:00044977;SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒购自美国应用生物公司,批号:1108401;7900HT 型荧光定量 PCR 仪,购自美国应用生物公司;光学显微镜, BX-41 型,日本 OLYMPUS 公司;引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成,引物序列:上游 5'-CCAGATCCTGTCCAACTAAGG-3',下游:5'-TTTCTCATAGATGGCGTTGTTG-3',扩增物长度:217 bp。苏木素伊红(HE)染液由广安门医院病理实验室提供。

## 1.4 方法

1.4.1 动物分组及造模 适应性喂养 4 d 后,采用随机数字表法将 45 只 ApoE 基因敲除小鼠分为模型组 15 只、中药组 15 只、西药组 15 只。3 组均喂以高脂饲料饲料(78.85% 基础饲料 + 0.15% 胆固醇 + 21% 脂肪混合而成)13 周。另设 C57BL/6J 小鼠 10 只为空白对照组,给予正常饲料喂养。

1.4.2 各组小鼠给药方法 造模同时即进行药物干预,根据成人临床推荐的常用剂量,按成人与小鼠的体重折算系数 10 折算成小鼠用量,中药组给予新活络效灵丹颗粒剂 9.67 g/(kg·d)灌胃,西药组给予阿托伐他汀钙片 3.33 mg/(kg·d)灌胃。西药组

和中药组药剂均以蒸馏水溶解后,按照体重比灌胃;模型组每天给予 0.3 mL 的生理盐水灌胃。连续给药 13 周。空白对照组小鼠不予处理。

1.5 观察指标与方法 给药 13 周后取材,取材前夜禁食水。处死全部小鼠,无菌条件下取出主动脉根部,部分组织常规石蜡包埋切片,部分组织放在冻存管内液氮骤冷保存。1)自主动脉根部连心肌部分横断面做连续切片,切片厚度 5  $\mu\text{m}$ <sup>[5]</sup>。对切片分别行 HE 染色,在镜下观察主动脉病理组织形态。2) RT-PCR 法检测小鼠主动脉中 TGF- $\beta$  mRNA 表达,参照试剂盒说明进行操作。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件,组之间选用 *t* 检验,数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义, $P < 0.01$  为差异有显著统计学意义, $P > 0.05$  为无统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组小鼠主动脉组织 HE 染色结果 空白对照组(A):主动脉内膜光滑连续,内皮细胞排列均匀,表面光滑,未见泡沫细胞及炎性细胞;模型组(B):主动脉内形成明显的 AS 斑块,并可出现脂质核心,胆固醇和胆固醇酯沉积,泡沫细胞增多,大量的巨噬细胞的浸润;西药组(C):管壁可见 AS 斑块,斑块面积明显小于模型组;中药组(D):斑块面积显著减少,部分内膜较为光滑。见图 1。

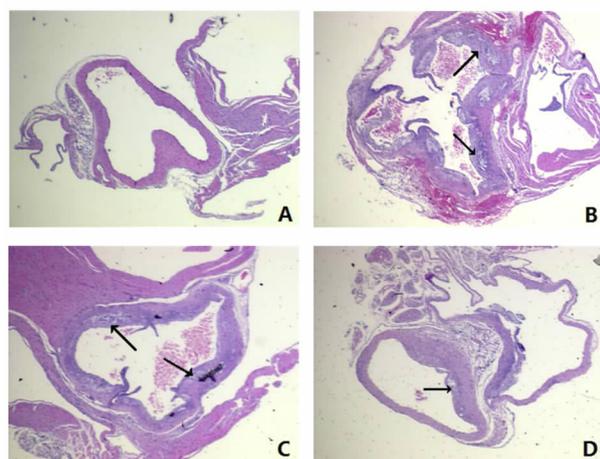


图 1 各组小鼠主动脉根部组织病理图(HE 染色,  $\times 15$  倍)

2.2 各组小鼠主动脉 TGF- $\beta$ mRNA 表达比较 表 1 显示,模型组小鼠主动脉组织中 TGF- $\beta$ mRNA 表达水平明显低于空白对照组( $P < 0.01$ );西药组、中药组小鼠主动脉组织中 TGF- $\beta$ mRNA 表达水平明显高于模型对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而中药组小鼠腹主动脉组织中 TGF- $\beta$ mRNA 表达水平高于西药组,但 2 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表1 各组小鼠主动脉组织中 TGF- $\beta$  mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	TGF- $\beta$ mRNA
空白对照组	10	1.770 $\pm$ 0.180
模型组	15	1.252 $\pm$ 0.308 * *
西药组	15	1.471 $\pm$ 0.056 * * $\Delta$
中药组	15	1.570 $\pm$ 0.260 * * $\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

### 3 讨论

目前已有很多研究证据表明,AS 是一种血管的慢性炎症反应病变。炎症反应可以启动斑块内炎症细胞分泌多种细胞因子,通过多种途径影响斑块稳定。抑制血管的炎症反应已成为除他汀之外的另一重要的抗 AS 手段。

TGF- $\beta$  是一类功能广泛、作用复杂的生长因子,参与炎症反应、创伤修复和免疫调节、细胞生长和分化、细胞外基质合成等许多生物学过程<sup>[6]</sup>。研究表明,TGF- $\beta$  具有抗炎和对抗脂质损害的作用,可延缓 AS 的发展,是保护心血管系统重要的细胞因子之一<sup>[7-8]</sup>。近来发现不稳定性心绞痛的患者呈现 TGF- $\beta$  水平下降的趋势,低水平的 TGF- $\beta$  表达很可能与 AS 的进展密切相关<sup>[9-10]</sup>。

血瘀证贯穿 AS 整个病变过程的观点已经得到众多医者认同,临床采用活血化瘀为主治疗 AS,疗效得到确定。挖掘组方简洁、疗效确切、机制明确、价格低廉、易于久服的抗 AS 活血化瘀方剂有着非常重要的现实意义。

活络效灵丹为近代名医张锡纯所创,首见于《医学衷中参西录》,近年,运用该方加减在心血管疾病领域的作用日益受到重视和关注<sup>[11]</sup>。我们根据多年临床经验,将活络效灵丹加减,化裁创制出新活络效灵丹(乳香、没药、三七、丹参),治疗 AS 取得较好疗效。乳香、没药为树脂类活血化瘀中药,两者均具有活血化瘀、消肿止痛生肌之效,现代药理研究表明:乳香具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等药理活性,抗炎作用可能与其对炎症反应细胞因子的调控和对蛋白激酶通路的影响有关<sup>[12]</sup>。没药具有强效抑制急性慢性炎症反应的作用,其活性成分能降低炎症反应递质过氧化物酶的活性<sup>[13]</sup>。方中以三七易当归,活血止血、生血补气,以纠乳香、没药久服耗气之弊,使祛瘀而不伤正,易于长久服用。现代药理研究表明<sup>[14]</sup>,三七能通过抑制血小板聚集、促进纤溶而达到抗血栓的效应。其有效成分三七总皂苷提高心肌对缺氧环境的耐受力,同时扩张血管、改善血供。丹

参具有祛瘀止痛、活血通经之功。现代药理研究表明<sup>[15]</sup>,丹参可扩张冠状动脉、降低心肌耗氧量、防止心肌缺血和心肌梗死,所含丹参酮可抑制炎症反应细胞活化、降低炎症反应细胞因子、趋化因子表达。四药相伍,共奏补气活血、化瘀通经之效,临床治疗 AS 疗效显著,但是其作用机制尚不明确。

本研究显示,与模型组比较,中医组和西药组 AS 斑块面积明显缩小,证实新活络效灵丹具有防止 AS 早期斑块形成的作用,中药组 AS 小鼠主动脉组织 TGF- $\beta$  mRNA 表达明显升高,与西药组比较无明显差异,提示新活络效灵丹具有提高 AS 小鼠主动脉组织 TGF- $\beta$  mRNA 的表达的作用,可能是防治 AS 早期斑块形成的机制之一。

### 参考文献

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. New England journal of medicine,1999,340(2):115-126.
- [2] 张运. 关于动脉粥样硬化(AS)的新治疗靶点[J]. 医学研究杂志,2011,40(6):1-3.
- [3] McCaffrey T A. TGF- $\beta$ s and TGF- $\beta$  receptors in atherosclerosis[J]. Cytokine and growth factor reviews,2000,11(1):103-114.
- [4] McCaffrey T A, Du B, Fu C, et al. The expression of TGF- $\beta$  receptors in human atherosclerosis; evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance[J]. Journal of molecular and cellular cardiology,1999,31(9):1627-1642.
- [5] Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection[J]. Nature,1997,386:292-296.
- [6] Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta(TGF-beta)[J]. Int J Biochem Cell Biol,1998,30(3):293-298.
- [7] 王婉秋,孙侃,靳瑾,等. 糖尿病性动脉粥样硬化大鼠血浆 VEGF 及 TGF- $\beta$ 1 表达水平的改变和辛伐他汀的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2014,22(9):929-933.
- [8] 郝春艳,段虎斌,刘学军,等. 口服 HSP60 对动脉粥样硬化大鼠血清 TGF- $\beta$  和调节性 T 细胞含量的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2013,11(11):1355-1356.
- [9] 李玉,张言镇,周艳菊,等. 血清 TGF- $\beta$ 1 和 CTGF 水平与急性冠脉综合征的关系[J]. 现代医药卫生,2011,27(7):968-970.
- [10] 裴芳,黄骥,黄婕,等. 重庆地区汉族人群冠心病 TGF- $\beta$ 1 基因启动子区-509C/T 多态性检测及其意义[J]. 第三军医大学学报,2015,15(1):1-3.
- [11] 邓茹月,房玉涛. 活络效灵丹治疗心血管疾病的进展[J]. 贵阳中医学院学报,2014,36(3):142-144.
- [12] 常允平,韩英梅,张俊艳. 乳香的化学成分和药理活性研究进展[J]. 现代药物与临床,2012,27(1):52-59.
- [13] Hanus L, Rezanka T, Dembitskv VM, et al. Myrrh-Com-miphora chemistry[J]. 2005,149(1):23.
- [14] 朴春花. 三七的药理作用研究进展概述[J]. 中国医药指南,2011,13(9):209-210.
- [15] 杨志霞,林谦,马利. 丹参对心血管疾病药理作用的文献研究[J]. 世界中西医结合杂志,2012,7(2):93-97.