

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.12.016

脑络通颗粒对动脉粥样硬化小鼠血管组织 NF- κ B、PPAR- γ 的影响

严士海¹, 李七一¹, 卢征涛², 赵宁伟¹, 刘福明¹, 戴海云², 刘园园², 严冬^{3*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市汉中路 150 号, 210029; 2. 南京中医药大学研究生院; 3. 南京中医药大学第一临床医学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302902); 江苏省中医院科研基金资助项目 (Y12022)

摘要 目的 探讨脑络通颗粒抗动脉粥样硬化 (AS) 的可能作用机制。方法 30 只 8 周龄 ApoE-/- 小鼠高脂饲料饲养 10 个月建立 AS 模型, 随机分为模型组、脑络通组、辛伐他汀组, 每组 10 只; 同时以同周龄 C57BL/6J 小鼠 10 只作为空白组。脑络通组小鼠给予脑络通颗粒溶液 6.67 g/kg 灌胃, 辛伐他汀组给予辛伐他汀片溶液 6.67 mg/kg 灌胃, 空白组和模型组给予等量生理盐水, 各组均每天灌胃 1 次, 共 2 个月。比较各组小鼠血脂水平及血管组织斑块面积指数、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、核因子 κ B (NF- κ B)、过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR- γ) 蛋白及 mRNA 水平。结果 与空白组比较, 模型组小鼠血脂水平及血管组织 TNF- α 蛋白、NF- κ B 蛋白及 mRNA 升高, PPAR- γ 蛋白及 mRNA 降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 脑络通组和辛伐他汀组小鼠血脂水平、血管组织斑块面积指数及血管组织 TNF- α 蛋白、NF- κ B 蛋白及 mRNA 降低, PPAR- γ 蛋白及 mRNA 升高 ($P < 0.01$)。结论 脑络通颗粒能调控 ApoE-/- 小鼠 AS 模型 NF- κ B 与 PPAR- γ 的平衡, 可能是其抗 AS 的机制之一。

关键词 动脉粥样硬化; 脑络通颗粒; 炎症因子; 血脂

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种慢性的以动脉结构和功能改变为特征性疾病, 是心脑血管病的主要病理基础。脑络通颗粒是南京中医药大学附属医院院内制剂, 具有滋肾养肝、化痰消瘀作用, 临床研究显示其可降低 AS 患者血脂水平、改善血液流变学参数、对颈部 AS 斑块具有较好消退作用^[1]。“损伤反应”学说认为, 血管内皮细胞炎症损伤是 AS 形成的关键环节^[2]。本研究通过建立载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE-/-) 小鼠 AS 模型, 研究脑络通颗粒对 AS 血管炎症反应因子的影响, 从而探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

ApoE-/- 小鼠 30 只, ApoE-/- 小鼠来源种鼠 C57BL/6J 小鼠 10 只, 均为 SPF 级, 8 周龄, 体重 (20 $\pm$ 2) g, 雄性, 由北京大学医学部实验动物科学部提供, 实验动物合格证号: SCXK(京) 2011 -

0012。小鼠均分笼饲养, 自由饮水, 室温 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 湿度 55% - 65%。

1.2 药物及试剂

脑络通颗粒由制何首乌 30 g、黄精 15 g、海藻 10 g、水蛭 6 g、川芎 10 g 组成, 其中制何首乌、黄精、海藻、川芎 4 味药水煮醇沉, 水蛭水提, 分别浓缩, 加入糊精, 流化床制粒, 每克颗粒剂相当于生药 3.5 g, 南京中医药大学附属医院制剂部制备, 批号 20120220; 辛伐他汀片, 杭州默沙东制药有限公司生产, 批号 120710。总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 试剂盒 (批号: 20130402), 日本第一化学药品株式会社; 全蛋白抽提试剂盒 (批号: 20130527)、Bradford 蛋白含量检测试剂盒 (批号: 201300118)、5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (批号: 20130309), 南京凯基生物科技发展有限公司; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、核因子 κ B (NF- κ B)、过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR- γ) 抗体, Abcam 公司, 批号分别是

* 通讯作者: y12d12@163.com, (025) 86617141

20130302、20130503、20130404。

1.3 主要仪器

FA1004 型电子分析天平, 上海精科天平厂; 日本东芝 120 全自动生化分析仪, 日本东芝公司; TP1020 自动脱水机, RM2135 型石蜡切片机, 德国 Leica 公司; CS-VI 型摊片烤片机, 湖北孝感宏业医用仪器有限公司; DMLS-1000 光学显微镜, 德国 Leica 公司; Western 电泳仪, 164-5051, Bio-Rad 公司; PCR 循环仪, MultiGene Gradient, 美国 Labnet 公司; 高速冷冻离心机, D-37520, Sorvall 公司; 紫外分光光度计, UV-2450, 日本 Shimadzu 公司; 核酸电泳仪, DYY-6B, 北京六一仪器厂; 凝胶成像仪, Gel Doc XR, Bio-Rad 公司。

1.4 模型建立

参考文献 [6], 8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠给予高脂饲料喂养, 饲养 10 个月。

1.5 动物分组及给药

30 只造模成功的 ApoE^{-/-}小鼠分为模型组、脑络通组和辛伐他汀组, 每组 10 只; 另将 10 只 C57BL/6J 小鼠设为空白组。脑络通组小鼠给予脑络通颗粒溶液 (浓度 0.67 g/ml) 6.67 g/kg 灌胃; 辛伐他汀组给予辛伐他汀片溶液 (浓度 0.67 mg/ml) 6.67 mg/kg 灌胃; 空白组和模型组给予等量生理盐水。各组小鼠均每天灌胃 1 次, 共 2 个月, 给药期间全部换为普通饲料。

1.6 观察指标及方法

末次给药 2h 后, 眼眶静脉取血, 采集主动脉与颈总动脉备检, 脱颈椎法处死小鼠。①动脉粥样斑块病理检测与分析: 取血管用 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋用于常规病理检查, 斑块面积采用 Image-Pro Plus 5.1 测定 [7]。②血脂检测: 全自动生化仪检测血清 TC、TG、LDL-C 水平。③TNF- α 、NF- κ B、PPAR- γ 蛋白表达检测: 提取血管组织蛋白, 蛋白样品处理后进行 SDS-PAGE, 转膜, 染色, 封闭, 一抗、二抗孵育, 加发光液, 曝光。保存显示有目的条带的胶片, 以 β -actin 为内参照, 应用图像分析仪对条带做扫描半定量。④NF- κ B mRNA、PPAR- γ mRNA 检测: 提取血管组织中的总 RNA, 取 5 μ g 用于逆转录, 再取 1 μ l cDNA 用于 PCR。 β -actin 在反应体系中作为内部参照, 引物序列及 PCR 产物大小 (bp): β -actin primer (460 bp), 上游: 5-GCCAACCGTGAAAAGATG-3, 下游: 5-AGAAGGAAGGCTGGAAAA-3; NF- κ B primer (485bp), 上游: 5-AGCCTATCACCAACTCTT-3, 下

游: 5-GGCACTTCGGACAACA-3; PPAR- γ primer (172bp), 上游: 5-TTTTCAAGGGTGCCAGT-3, 下游: 5-CCATCTTTATTCATCAGG-3。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件进行数据处理, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠血脂水平比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 的水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 脑络通组和辛伐他汀组血清 TC、TG、LDL-C 的水平明显下降 ($P < 0.01$); 辛伐他汀组与脑络通组血清 TC、TG、LDL-C 的水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组 AS 小鼠血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TC	TG	LDL-C
空白组	10	3.32 $\pm$ 0.32	1.15 $\pm$ 0.17	0.15 $\pm$ 0.03
模型组	10	28.93 $\pm$ 2.62*	1.92 $\pm$ 0.28*	9.73 $\pm$ 1.69*
脑络通组	10	17.28 $\pm$ 1.47 Δ	1.55 $\pm$ 0.30 Δ	2.97 $\pm$ 0.75 Δ
辛伐他汀组	10	15.20 $\pm$ 1.95 Δ	1.48 $\pm$ 0.20 Δ	2.41 $\pm$ 0.45 Δ

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

2.2 各组小鼠血管组织斑块面积指数比较

表 2 示, 与模型组比较, 脑络通组与辛伐他汀组小鼠血管组织斑块面积指数显著降低 ($P < 0.01$)。

表 2 各组 AS 小鼠血管组织斑块面积指数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	斑块面积指数
空白组	10	0
模型组	10	2363928.8 $\pm$ 136807.5
脑络通组	10	265455.1 $\pm$ 46786.2*
辛伐他汀组	10	225497.3 $\pm$ 25758.5*

注: 与模型组比较, * $P < 0.01$

2.3 各组小鼠血管组织 TNF- α 、NF- κ B、PPAR- γ 蛋白表达比较

表 3 示, 模型组血管组织中 TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达水平上升, PPAR- γ 蛋白表达下降, 与空白组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 脑络通组和辛伐他汀组 TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达降低, PPAR- γ 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。脑络通组与辛伐他汀组 TNF- α 、NF- κ B、PPAR- γ 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组小鼠 NF- κ B mRNA、PPAR- γ mRNA 表达比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组 NF- κ B mRNA

的表达显著增加, PPAR- γ mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 脑络通组和辛伐他汀组 NF- κ B mRNA 表达降低, PPAR- γ mRNA 表达升高 ($P < 0.01$); 脑络通组与辛伐他汀组 NF- κ B mRNA、PPAR- γ mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组 AS 小鼠血管组织 TNF- α 、NF- κ B、PPAR- γ 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	NF- κ B	PPAR- γ
空白组	3	0.21 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.02	0.69 $\pm$ 0.04
模型组	3	0.70 $\pm$ 0.05*	0.70 $\pm$ 0.04*	0.23 $\pm$ 0.01*
脑络通组	3	0.36 $\pm$ 0.06 Δ	0.31 $\pm$ 0.03 Δ	0.40 $\pm$ 0.05 Δ
辛伐他汀组	3	0.39 $\pm$ 0.09 Δ	0.35 $\pm$ 0.05 Δ	0.44 $\pm$ 0.04 Δ

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

表 4 各组 AS 小鼠 NF- κ B mRNA、PPAR- γ mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NF- κ B mRNA	PPAR- γ mRNA
空白组	3	0.15 $\pm$ 0.03	1.05 $\pm$ 0.08
模型组	3	1.11 $\pm$ 0.17*	0.18 $\pm$ 0.02*
脑络通组	3	0.27 $\pm$ 0.04 Δ	0.43 $\pm$ 0.07 Δ
辛伐他汀组	3	0.37 $\pm$ 0.01 Δ	0.77 $\pm$ 0.06 Δ

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

3 讨论

ApoE-/-小鼠的 AS 病变与人类 AS 的病变相似, 近年来已成为研究 AS 发病机制的最重要的动物模型, C57BL/6J 小鼠作为其来源种鼠, 一般作为其对照鼠^[5-6]。AS 是一个多因素疾病, 它受脂质代谢紊乱、高血压病、糖尿病、吸烟、饮食等多种因素影响, AS 的病理改变是以动脉内膜下脂质沉积、纤维基质成分增加以及炎症反应为特征。脑络通颗粒中制何首乌为君, 其味甘涩, 性温, 补益精血, 具滋肾养肝之功效。因 AS 患者阴伤兼有气耗, 筋骨无力, 故以黄精辅佐制何首乌为臣, 黄精味甘, 性平, 具养阴益气、滋肾填精之功, 加强制何首乌养阴之力。此外, 痰瘀久痹, 化、消必有较长时日, 峻猛破伐之品自非所宜, 选药应既具消、化之功, 能除脉中之痰瘀, 又可久用而不伤正, 故以海藻、水蛭、川芎为佐。其中海藻咸寒, 有软坚化痰之功, 能祛经隧胶着之痰; 水蛭咸苦平, 具逐血破结软坚之效, 小量常服活血化瘀而不伤正。全方标本兼顾、消补兼施, 补虚不忘泻实, 祛邪不忘扶正, 共奏滋肾养肝、化痰消瘀之效, 且药性平和, 药证合拍, 宜于久服。

炎症因子水平上调一直被认为是促进 AS 性损

伤的原因, 许多炎症因子如 TNF- α 与 AS 及其他心血管病有关。NF- κ B 是炎症反应中的关键因子, 在 AS 早期 LDL 修饰和炎性介质形成中有几种重要的酶都受 NF- κ B 调控。PPAR 是一种转录调节因子, 其参与脂质代谢、炎症和 AS 过程^[7]。PPAR 包括 PPAR α 、 β/δ 、 γ 3 种受体亚型, PPAR γ 对 AS 的抑制作用主要表现为抑制炎症反应和调节细胞增生和迁移, PPAR γ 配体或激动剂可抑制单核细胞/巨噬细胞转录因子 AP-1 和 NF- κ B 的活性, 减少炎症因子 TNF- α , 可调节 AS 中的炎性反应, 防止 AS 的形成^[8]。

本研究发现, 脑络通组和辛伐他汀组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 的水平及血管组织斑块面积指数比模型组明显下降 ($P < 0.01$), 说明脑络通颗粒可明显降低 AS 小鼠血脂水平, 减小斑块面积, 并且与辛伐他汀片疗效相当。与空白组比较, 模型组小鼠血管组织细胞的 TNF- α 蛋白、NF- κ B 蛋白及 mRNA 的表达水平上升, PPAR- γ 蛋白及 mRNA 的表达下降; 与模型组相比, 脑络通组和辛伐他汀组小鼠的 TNF- α 蛋白、NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达降低, PPAR- γ 蛋白及 mRNA 表达上升 ($P < 0.01$), 提示脑络通颗粒能抑制 AS 小鼠血管组织 TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达, 促进 PPAR- γ 蛋白的表达。综上所述, 脑络通颗粒调控 ApoE-/-小鼠 AS 模型 NF- κ B 与 PPAR- γ 的平衡, 可能是其抗 AS 的机制之一。

参考文献

- [1] 周仲瑛, 金妙文, 顾勤, 等. 滋肾养肝、化痰消瘀法治疗动脉粥样硬化的理论探讨 [J]. 南京中医药大学学报 (自然科学版), 2002, 18(3): 137-139.
- [2] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis [J]. Circulation, 2002, 105(9): 1135-1143.
- [3] 路永刚, 黄秀清, 满永. 不同年龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠头臂干动脉粥样硬化斑块的进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 7(7): 591.
- [4] Song G, Liu J, Zhao Z, et al. Simvastatin reduces atherogenesis and promotes the expression of hepatic genes associated with reverse cholesterol transport in apoE-knockout mice fed high-fat diet [J]. Lipids Health Dis, 2011, 10: 8. doi: 10.1186/1476-511X-10-8.
- [5] Takai S, Jin D, Kawashima H, et al. Anti-atherosclerotic effects of dihomo-gamma-linolenic acid in ApoE-deficient mice [J]. J Atheroscler Thromb, 2009, 16(4): 480-489.
- [6] Bond AR, Jackson CL. The fat-fed apolipoprotein E knock-out mouse brachiocephalic artery in the study of atherosclerotic plaque rupture [J]. J Biomed Biotechnol, 2011:

379069. doi: 10. 1155/2011/379069.

[7] 马晶晶, 章涛. PPAR γ 功能与疾病关系研究进展 [J].

中国药理学通报, 2012, 28(5): 601-604.

[8] Ozasa H, Ayaori M, Lizuka M, et al. Pioglitazone enhances

cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1 /

ABCG1 expressions via PPAR γ /LXR α pathway: findings

from in vitro and ex vivo studies [J]. Atherosclerosis,

2011, 219(1): 141-150.

Effects of Naoluo Tong Granules on NF- κ B and PPAR- γ in Vascular Tissue of Atherosclerotic Mice

YAN Shihai¹, LI Qiyi¹, LU Zhengtao², ZHAO Ningwei¹, LIU Fuming¹, DAI Haiyun², LIU Yuanyuan², YAN Dong³

(1. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province 210029; 2. Graduate School, Nanjing University of Chinese Medicine; 3. The First Clinical Medical School, Nanjing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of Naoluo Tong Granules for atherosclerosis (AS).

Methods The AS models were established by high-fat diet feeding 30 8-week-old ApoE-/- mice for 10 months. The model mice were randomized into the model group, Naoluo Tong group and Simvastatin group, with 10 in each. Ten 8-week-old C57BL/6J mice were selected as the blank group. The mice in the Naoluo Tong group were gavaged with 6. 67g/kg Naoluo Tong Granules solution. The mice in the Simvastatin group were gavaged with 6. 67mg/kg Simvastatin Tablets solution. The mice in the blank group and model group were gavaged with the same amount of normal saline. The mice in each group were given intragastric administration once daily for 2 months. The levels of blood lipids, vascular tissue plaque area index, tumor necrosis factor- α (TNF- α), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) were compared. **Results** Comparing with the blank group, the levels of blood lipids, TNF- α and NF- κ B were significantly increased but the PPAR- γ level was significantly decreased in the model group ($P < 0. 01$). Comparing with the model group, the levels of blood lipids, vascular tissue plaque area index, TNF- α and NF- κ B were significantly decreased but the PPAR- γ level was significantly increased in the Naoluo Tong group and Simvastatin group ($P < 0. 01$). **Conclusion** Naoluo Tong Granules is effective for AS, which may be relevant to regulating the balance of NF- κ B and PPAR- γ in ApoE-/- mouse models.

Keywords atherosclerosis; Naoluo Tong Granules; inflammatory factors; blood lipid

(收稿日期: 2013 - 10 - 22; 修回日期: 2014 - 01 - 21)

编辑: 邓 媛

欢迎邮购《一选方治验实录》

在浩瀚的中医典籍中,有方名的古方数以十万计。为了汰芜存菁,借鉴古今医家的经验,为现代临床服务,作者在长期从事中医方药文献研究和临床诊疗工作的基础上,在完成“中医古方筛选方案和利用研究”课题研究的基础上,经过深入发掘,编纂完成《一选方治验实录》(上下册)。本书以有验案资证作为筛选古方的重要条件,结合古方其他价值特征,从近 10 万首方剂中,筛选出 583 首古方及其相关验案 5 500 余则。这些优选出的古方,既不乏传世名方,也有相当一部分以往未被方剂学教材或方剂选本收录过的“新面孔”。从 10 万首方中最终优选出 500 余首方,其比例约为 200 选 1;又鉴于治验记录是本书的主要内容,故名为《一选方治验实录》。

全书分上、下两册,上册收录汉唐方(张仲景方、晋唐方),下册收录宋元明清方(宋元方、明清方),编次以方为纲,医案为目,每一方剂又分方源记载和治验实录(分为中医病证医案、西医病症医案)两部分。书末附有方名索引、中医病证索引、西医病症索引和引用书目,方便读者检索。本书汇集古今文献,资料丰富,拥有本书,就如同跟随古今名医侍诊,通过品读古方所附的具体病例,领悟出该方的适应证和用法秘诀,可大大提高中医治疗的疗效。本书是中医各科临床医生提高临床疗效必备的案头书,又可为各中药生产厂家研发新药提供借鉴。

《一选方治验实录》(上下册),为 16 开精装本,1584 页,已由人民卫生出版社于 2011 年 1 月出版。上册定价 99 元,下册定价 108 元,全套 207 元。邮购汇款地址:北京市东直门南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店;邮政编码:100700;联系电话:(010) 64013162, (010) 64014411 转 3053。请在汇款附言中注明所购书名、上下册或全套及数量,邮购单册需加邮费 10 元,全套及 2 册以上免邮费。欢迎邮购。