

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.07.016

实验研究

稳斑汤对 ApoE 基因敲除动脉粥样硬化小鼠
不稳定斑块 TLR4 的影响姜明贺¹, 宫丽鸿^{2*}

(1. 辽宁中医药大学第一临床学院, 辽宁省沈阳市崇山东路 79 号, 110032; 2. 辽宁中医药大学附属医院)

摘要 目的 研究稳斑汤防治动脉粥样硬化 (AS) 不稳定斑块形成和破裂的可能作用机制。方法 采用高脂饲料喂养 ApoE 基因敲除小鼠建立 AS 模型, 将造模成功的 60 只小鼠随机分为模型对照组、西药组和稳斑汤低、中、高剂量组, 每组 12 只; 另将 C57BL/6J 小鼠 12 只设为空白对照组。空白对照组不予处理, 模型对照组给予每天 0.3 ml 的生理盐水; 稳斑汤低、中、高剂量组分别给予稳斑汤 6.175、12.35、24.7 g/(kg·d), 西药组给予阿托伐他汀钙片 27.3 mg/(kg·d), 均每日灌胃 1 次, 给药 13 周。取腹主动脉, 进行 HE 染色病理观察, 检测各组 Toll 样受体 4 (TLR4) mRNA 的表达水平。结果 模型对照组血管腔内可见明显的粥样硬化斑块出现, 斑块内可见大量泡沫细胞, 偶见炎性细胞浸润; 稳斑汤中、高剂量组及西药组动脉内膜大部分较为光滑, 偶见内膜不全。模型对照组腹主动脉组织中 TLR4 mRNA 的表达水平明显高于空白对照组 ($P < 0.01$); 稳斑汤低、中、高剂量组及西药组 TLR4 mRNA 的表达水平明显低于模型对照组 ($P < 0.01$)。稳斑汤低、中剂量组 TLR4 mRNA 水平明显高于西药组 ($P < 0.01$), 而稳斑汤高剂量组与西药组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 稳斑汤降低 AS 小鼠腹主动脉组织中 TLR4 mRNA 的表达可能是其防治 AS 斑块的形成和破裂机制之一。

关键词 稳斑汤; 动脉粥样硬化; 不稳定斑块; Toll 样受体 4

动脉粥样硬化 (AS) 是动脉硬化性血管病中最常见、最重要的一种, 在 AS 斑块破裂或糜烂的基础上血小板聚集、并发血栓形成、冠状动脉痉挛收缩、微血管栓塞导致急性或亚急性心肌梗死的减少和缺血加重是导致急性冠脉综合征的主要原因^[1]。目前常规西药防治过程中出现对肝肾功能的损害仍无法避免, 因此, 中药防治 AS 斑块的形成和破裂是研究的新热点。研究表明搜风祛痰中药复方稳斑汤具有改善血管内皮功能, 延缓 AS 进程的作用^[2]。本文旨在研究稳斑汤对 AS 不稳定斑块 Toll 样受体 4 (TLR4) mRNA 的影响, 从而探讨其防治 AS 斑块的形成和破裂可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 ApoE 基因敲除小鼠 70 只, 6~8 周龄,

雌雄各半, 体重 18~20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2013-0001。清洁级 C57BL/6J 小鼠 12 只, 6~8 周龄, 雌雄各半, 体重 18~20 g, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2013-0002。

1.2 实验药品及制备

稳斑汤: 全蝎 5 g, 蜈蚣 2 g, 地龙 20 g, 水蛭 15 g, 陈皮 15 g, 法半夏 15 g, 白术 15 g, 由辽宁中医药大学附属医院中药局提供, 加工制成含生药 2 g/ml 中药浓缩液备用。阿托伐他汀钙片: 辉瑞制药有限公司, 10 mg/片, 国药准字号: J20030047。

1.3 主要试剂和仪器

高脂饲料 (批号: 201305), 沈阳市于洪区盛旺牧业饲料厂。两步法 RT-PCR 试剂盒 (批号: AT401-D1), 北京全式金生物技术有限公司。DNA marker (批号: BM121-01), 北京全式金生物技术有限公司。Trizol (批号: 15596-026), Invitrogen 公司。引物由北京三博远志生物技术有限公司合成, 引物

基金项目: 中国博士后科学基金 (20110491540); 2011 年辽宁省“百千万人才工程” (2011921022)

* 通讯作者: linda1795@sina.com, 18102457688

序列: 上游: 5'-ACTGGGTGAGAAATGAGCTGGTA-3', 下游: 5'-TGGCTACACCAGGAATAAAGTCTCT-3', 扩增片段长度: 96bp。脱水机, 300 型, 德国 Leica 公司。石蜡包埋机, EG1150 型, 德国 Leica 公司。切片机, RM2235 型, 德国 Leica 公司。数码显微镜, BX41 型; 荧光显微镜, BX51 型; 光学显微镜, CHA 型, 均为日本 Olympus 公司产品。

1.4 造模方法

参考文献 [3], ApoE 基因敲除小鼠 70 只, 饲以含花生油 8%、砂糖 6%、蛋黄粉 5%、胆固醇 1.5%、胆盐 0.2%、甲基硫氧嘧啶 20g、谷氨酸钠 (味素) 1%, 其余为基础饲料 78% 的高脂饲料 ($^{60}\text{Co}\gamma$ 灭菌照射处理), 饲养条件为 2 级, 室温保持在 22~24℃, 相对湿度 50%, 光照时间 7:00~19:00。13 周后, 采用随机数字表法取出 4 只处死, 取腹主动脉根部, HE 染色确定造模成功。

1.5 动物分组与处理

采用随机数字表法将造模成功的 60 只小鼠分为模型对照组、西药组和稳斑汤低、中、高剂量组, 每组 12 只, 继续给予高脂饲料喂养; 另设 C57BL/6J 小鼠 12 只为空白对照组, 给予正常饲料喂养。空白对照组小鼠不予处理, 模型对照组每天给予 0.3 ml 的生理盐水灌胃; 稳斑汤低、中、高剂量组分别给予稳斑汤 6.175、12.35、24.7 g/(kg·d), 西药组给予阿托伐他汀钙片 27.3 mg/(kg·d), 均灌胃给药每日 1 次, 共 13 周。

1.6 观察指标及方法

给药 13 周后取材, 取材前夜禁食, 处死全部小鼠, 无菌条件下取出腹主动脉, 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) 切片进行 HE 染色, 光镜下观察并记录结果。2) 实时定量 RT-PCR 法检测小鼠腹主动脉中 TLR4 mRNA 表达, 参照试剂盒说明进行操作。电泳完毕, 取出凝胶, 在波长为 254 nm 的紫外灯下观察, 于 MSD-2000 凝胶成像系统 (北京麦恩琪高科技有限公司) 中拍照并保存。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 15.0 数据处理软件包进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 t 检验, 多组均数比较用方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠腹主动脉组织 HE 染色结果

空白对照组: 动脉内膜附有一层内皮细胞, 内皮细胞层呈现皱褶状排列, 排列均匀, 表面光滑, 未见泡沫细胞及炎性细胞; 模型对照组: 血管腔内可见明显的粥样硬化斑块出现, 斑块表面附有纤维帽, 纤维帽主要由平滑肌细胞、弹力纤维和胶原组织构成, 斑块中央可见大量的脂质聚集, 斑块内可见大量泡沫细胞, 偶见炎性细胞浸润, 未出现斑块的动脉内膜区域严重破损; 稳斑汤低剂量组: 血管腔内可见粥样硬化斑块, 斑块面积明显小于模型对

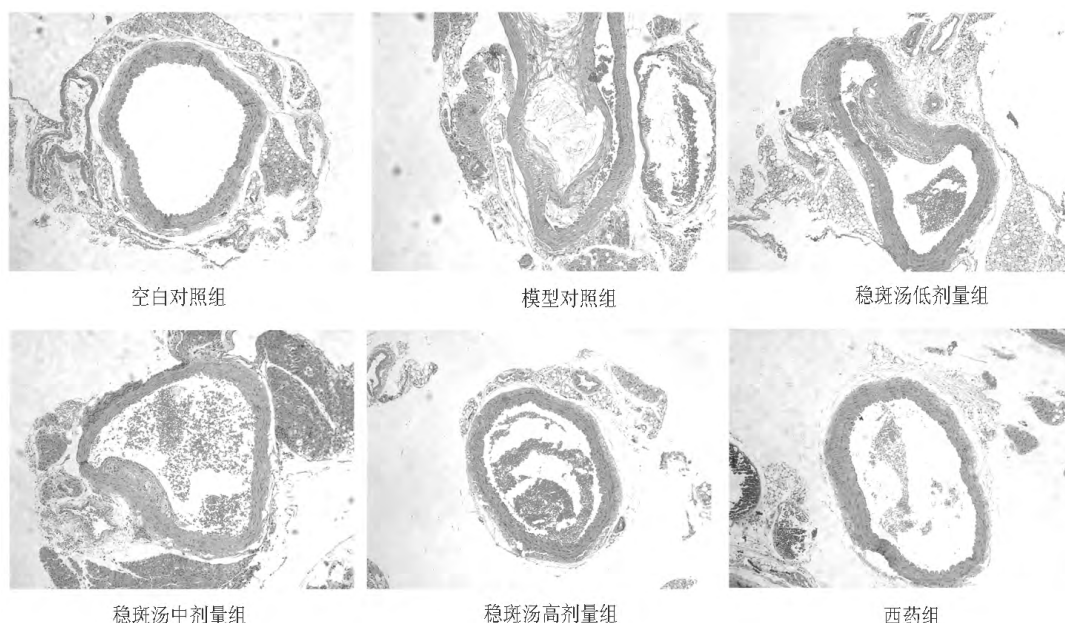


图 1 各组小鼠腹主动脉组织病理图 (HE 染色, ×100 倍)

照组, 斑块内脂质含量较模型组少, 斑块内可见少量泡沫细胞及炎性细胞, 未出现斑块的动脉内膜区域形态较为完整, 偶见内膜残缺; 稳斑汤中剂量组、稳斑汤高剂量组及西药组: 动脉内膜大部分较为光滑, 偶见内膜不全, 内膜不全区域可见明显的脂质条纹块形成, 偶见泡沫细胞聚集, 有少量纤维成分交联。见图 1。

2.2 各组小鼠腹主动脉 TLR4 mRNA 表达比较

表 1 示, 模型对照组小鼠腹主动脉组织中 TLR4 mRNA 表达水平明显高于空白对照组 ($P < 0.01$); 稳斑汤低、中、高剂量组及西药组小鼠腹主动脉组织中 TLR4 mRNA 表达水平明显低于模型对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 稳斑汤低、中剂量组小鼠腹主动脉组织中 TLR4 mRNA 水平明显高于西药组 ($P < 0.01$), 而稳斑汤高剂量组与西药组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组小鼠腹主动脉 TLR4 mRNA 表达电泳图见图 2。

表 1 各组小鼠腹主动脉组织中 TLR4 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TLR4 mRNA
空白对照组	5	0.280 ± 0.026
模型对照组	5	0.323 ± 0.020 **
稳斑汤低剂量组	5	0.270 ± 0.026 Δ ▲
稳斑汤中剂量组	5	0.243 ± 0.013 * Δ ▲
稳斑汤高剂量组	5	0.209 ± 0.021 ** Δ ▲
西药组	5	0.213 ± 0.020 ** Δ ▲

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与西药组比较, $\Delta P < 0.01$

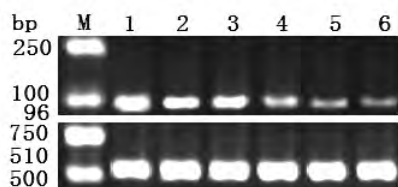


图 2 各组小鼠腹主动脉组织中 TLR4 mRNA 表达电泳图

注: M: marker; 1: 空白对照组; 2: 模型对照组; 3: 稳斑汤低剂量组; 4: 稳斑汤中剂量组; 5: 稳斑汤高剂量组; 6: 西药组

3 讨论

痰浊是导致 AS 发生的重要原因, 痰性胶着黏滞, 滞留脉络, 日久形成固定不移、有形可征的络脉癥瘕, 致使管壁增厚、管腔狭窄, 与颈动脉粥样硬化的形成过程相近。郭双庚等^[4]认为痰浊瘀血热毒与形成动脉粥样硬化的炎性机制高度相关。痰浊是颈动脉粥样硬化发病的主要病理因素之一^[5],

但常与湿、虚、瘀等病理因素合而为病, 而痰在其中起主要作用^[6]。痰浊为脾胃运化输布无权而形成人体升高的血脂, 痰浊胶着阻滞脉络成为粥样斑块的重要组成部分^[7]。风为百病之长, 善行数变, 痰为百病之祟, 与 AS 斑块的不稳定性有相似之处。稳斑汤方中全蝎、蜈蚣熄风止痉, 攻毒散结, 通络止痛; 地龙清热息风, 通络, 利尿, 共为君药; 陈皮、半夏、白术合用, 既能燥湿健脾, 又能化痰散结, 为臣药; 水蛭为虫类化痰药, 破血逐瘀而不伤新血, 为佐药。诸药合用, 共奏搜风祛痰、祛瘀通络之功。

炎症和免疫反应在 AS 的发生发展过程中具有重要作用, Ross R 等^[8]指出 AS 是一种炎症性疾病。TLR4 是天然免疫系统的一种模式识别受体, 其在天然免疫系统的许多效应细胞 (包括单核/巨噬细胞和树突状细胞) 均有表达, 发挥对外来致病微生物的识别作用, 构成机体天然的第一道防线。TLR4 与其相应配体结合通过信号转导最终导致核因子- κ B (NF- κ B) 和免疫反应基因的激活, 引起前炎症因子和趋化因子的分泌, 参与 AS 的发生、发展过程^[9-10], 干预 TLR4 mRNA 的表达将成为防治 AS 新的靶点。本研究根据 HE 染色结果可以看出, 稳斑汤低、中、高剂量组及西药组与模型对照组相比 AS 斑块的面积都有所缩小, 证实稳斑汤具有缩小 AS 斑块的作用。且稳斑汤高剂量与西药降低 AS 小鼠腹主动脉组织中 TLR4 mRNA 的效果无明显差异, 提示稳斑汤降低 AS 小鼠腹主动脉组织 TLR4 mRNA 表达的作用, 从而推测其可能是防治 AS 斑块的形成和破裂机制之一。

参考文献

- [1] 葛均波, 徐永健. 内科学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 220.
- [2] 高峰, 刘丹, 张宇, 等. 搜风祛痰中药对 Ang II 诱导人脐静脉内皮细胞 Lox-1 mRNA 及 iNOS mRNA 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 37(2): 195-197.
- [3] 申瑞玲, 马婧. 四种肥胖动物造模方法的比较 [J]. 动物医学进展, 2007, 28(3): 105-108.
- [4] 郭双庚, 李娜, 张林. 痰瘀热毒与动脉粥样硬化炎性机制的关系探讨 [J]. 中医杂志, 2010, 51(6): 485-487.
- [5] 黄小波, 李宗信, 陈文强, 等. 颈动脉粥样硬化痰浊内阻证与血脂证主成分的相关分析 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(3): 135-137.
- [6] 张春燕, 李宗信, 黄小波, 等. 老年颈动脉粥样硬化患者血清炎症因子与中医证型的关系 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(7): 16-21.
- [7] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. N

Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.

[8] Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, et al. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS [J]. Cardiovasc Res, 2002, 56(1): 126-134.

[9] Xu XH, Shah PK, Faure E, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich

atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL [J]. Circulation, 2001, 104(25): 3103-3108.

[10] Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, et al. Expression of toll like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation [J]. Circulation, 2002, 105(10): 1158-1161.

Effect of Wenban Decoction on the Unstable Plaque TLR4 in ApoE Knock-out Mice with Atherosclerosis

JIANG Minghe¹, GONG Lihong²

(1. First Clinical College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Province, 110032; 2. First Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Wenban Decoction* (WBD) on the formation and rupture of unstable plaque of atherosclerosis (AS). **Methods** AS model was induced by high lipid diet in ApoE knockout mice. Sixty successfully modeled mice were equally randomized into 5 groups including control group (CG), western medicine group (WMG), and WBD groups (WBDGs) consisting of low, middle and high dose groups. Twelve C57BL/6J mice were also prepared as blank group (BG). During experiment, the BG received no intervention; CG took normal saline 0.3 ml daily; low, middle and high dose WBDGs were treated by WBD 6.175, 12.35 and 24.7 g/kg · d, respectively; WMG was administered atorvastatin 27.3 mg/kg · d. The treatment lasted for 13 weeks by gastric lavage. Then the mice were killed to reap abdominal aorta for HE stain. The mRNA levels of Toll-like receptors (TLR4) of each group were assayed. **Results** Atherosclerotic plaque were observed in the aorta of CG mice with an overwhelming formation of foam cells and occasional infiltration of inflammatory cells. The endarterium of mice from high and low dose WBDGs were smooth with occasional injury. The TLR4 mRNA expressions of CG were higher than BG ($P < 0.01$); The expressions of low, middle and high dose WBDGs and WMG were lower than CG ($P < 0.01$). Low and middle dose WBDG showed the expressions of TLR4 significantly higher than WMG ($P < 0.01$). No statistical significant difference was observed between the expressions of high dose WBDG and WMG ($P > 0.05$). **Conclusion** Inhibiting the expression of TLR4 in abdominal aorta tissue might be one of the possible mechanisms for WBD to prevent from the formation and rupture of AS plaque.

Keywords *Wenban Decoction*; atherosclerosis; unstable plaque; toll-like receptor 4

(收稿日期: 2014-05-16; 修回日期: 2014-10-13)

编辑: 邓 媛

颈复康颗粒、腰痛宁胶囊、蚁参蠲痹胶囊临床研究与应征文通知

山庄牌“颈复康颗粒”“腰痛宁胶囊”“蚁参蠲痹胶囊”系颈复康药业集团有限公司生产的治疗颈椎病、腰腿痛、类风湿性关节炎的常用药品,因其疗效好、价格低,深受患者与医生的信赖。为了总结“颈复康颗粒”“腰痛宁胶囊”“蚁参蠲痹胶囊”多年来的临床应用经验,更好地指导临床用药,中医杂志社与颈复康药业集团有限公司联合举办此次征文活动,现将有关事项通知如下。

1. 征文内容: 1) “颈复康颗粒”治疗各种类型颈椎病(神经根型、椎动脉型、交感神经型、颈型、混合型等)的临床应用经验、体会与分析; “腰痛宁胶囊”治疗腰椎间盘突出症、坐骨神经痛、腰肌劳损、腰肌纤维炎、风湿性关节痛,症见腰腿痛、关节痛及肢体活动受限等病症的临床经验、体会与分析; “蚁参蠲痹胶囊”治疗风湿性关节炎、类风湿关节炎、强直性脊柱炎、骨关节炎、坐骨神经痛、肩周炎、痛风、系统性红斑狼疮等病症的临床经验、体会与分析。2) “颈复康颗粒”“腰痛宁胶囊”“蚁参蠲痹胶囊”临床用量、用法的研究与经验总结; 3) “颈复康颗粒”“腰痛宁胶囊”“蚁参蠲痹胶囊”组方研究、药理研究与探讨; 4) “颈复康颗粒”“腰痛宁胶囊”“蚁参蠲痹胶囊”临床扩大应用范围的研究与探讨。2. 征文要求: 1) 来稿应未公开发表,字数在4000字以内,请加盖单位公章,不退稿; 2) 请采用法定计量单位; 3) 文题下署作者姓名、单位、通讯地址、邮编和联系电话等。请用电子邮件形式投稿(Word文件格式)。3. 奖励办法: 由全国中医界知名专家组成评审委员会,将评选出: 一等奖2篇(每篇奖励5000元); 二等奖8篇(每篇奖励3000元); 三等奖15篇(每篇奖励1500元); 优秀奖25篇(每篇奖励价值500元礼品)。获奖者将由主办单位颁发获奖论文证书、奖金或礼品,获奖论文达到刊用标准者将在《中医杂志》等期刊发表,其他获奖论文将在《中医杂志》2015年增刊发表,并赠送样刊1册。此次征文活动不收任何费用。评选结果将在《中医杂志》、《健康报》上予以公布。主办单位将邀请部分获奖论文作者免费参加在河北省承德市召开的颁奖大会并考察承德颈复康药业集团有限公司。论文请于2015年3月30日前发至邮箱: jtcn@163.com。联系地址: 北京东直门内南小街16号中医杂志社,联系人: 22号编辑,邮编: 100700。电话: (010) 64035632。