

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.20.012

实验研究

化瘀祛痰方对动脉粥样硬化家兔肝脏脂质沉积的影响

陈宁¹, 贾连群^{2*}, 宋囡², 陈丝¹, 隋昕欣¹, 于宁¹, 冷雪²

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847; 2. 辽宁省中医转化医学研究中心)

摘要 目的 探讨化瘀祛痰方治疗动脉粥样硬化的可能作用机制。方法 将 60 只雄性新西兰白兔随机分为空白组、模型组、化瘀祛痰方组、辛伐他汀组, 每组 15 只。空白组普通饲料喂养, 其他组高脂饲料喂养同时结合免疫损伤法建立动脉粥样硬化模型。造模 8 周后, 化瘀祛痰方组给药剂量 16 g/(kg·d), 辛伐他汀组给药剂量 1.4 mg/(kg·d), 空白组和模型组给予 8 ml/(kg·d) 生理盐水。4 周后苏木素-伊红 (HE) 和油红 O 染色观察肝组织形态学改变; Elisa 法检测家兔肝脏及血清中白细胞介素 18 (IL-18) 和白细胞介素 1β (IL-1β) 含量; Western blot 法检测家兔肝脏含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (Caspase-1)、含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLRP3)、黑素瘤缺乏因子 2 (AIM2)、gasdermin D 蛋白 (GSDMD) 蛋白表达。结果 与空白组相比, 模型组家兔肝组织肿胀明显、脂肪空泡清晰可见, 胞浆内有大量脂滴蓄积; 血清及肝脏组织内 IL-18、IL-1β 含量升高, 细胞焦亡相关 Caspase-1、GSDMD、NLRP3、AIM2 蛋白表达水平上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比, 化瘀祛痰方组及辛伐他汀组脂肪空泡明显减少或消失, 肝组织形态恢复或部分恢复正常; 血清及肝脏组织内 IL-18、IL-1β 含量下降, 细胞焦亡相关蛋白 Caspase-1、GSDMD、NLRP3 表达水平下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), AIM2 蛋白表达水平无明显改变 ($P > 0.05$)。结论 化瘀祛痰方可能通过调控 NLRP3/Caspase-1 通路影响细胞焦亡, 从而改善动脉粥样硬化家兔肝脏脂质沉积。

关键词 动脉粥样硬化; 化瘀祛痰方; 肝脏脂质沉积; 细胞焦亡

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心脑血管疾病的重要病理基础, 而肝脏脂质沉积是导致 AS 发生的一个重要病理环节^[1], 因此改善肝脏脂质沉积对防治 AS 具有重要意义。化瘀祛痰方为课题组研制多年的专利方 (专利号: ZL200710010845.9), 对防治 AS 具有很好的疗效^[2]。前期研究发现, 化瘀祛痰方在改善血脂异常、肝脏脂质沉积方面效果显著^[3-5]。细胞焦亡是近年来新发现的细胞死亡方式, 是由炎症小体等介导, 通过含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (Caspase-1) 途径将炎症因子白细胞介素 18 (IL-18) 和白细胞介素 1β (IL-1β) 释放到细胞外的过程。研究发现, 细胞焦亡与肝脏脂肪变性、肝细胞炎症

损伤发生关系密切^[6]。本实验选用 AS 家兔模型, 以细胞焦亡为切入点, 探究化瘀祛痰方是否能够通过影响细胞焦亡改善肝脏脂质沉积, 丰富化瘀祛痰方防治 AS 的分子机制。

1 材料及方法

1.1 动物

健康 SPF 级雄性新西兰白兔 60 只, 体质量 (2.2 ± 0.2) kg, 购于济南金丰实验动物有限公司, 实验动物合格证号 SCXK (鲁) 2014-0006。动物饲养于辽宁中医药大学实验动物中心, SPF 级, 温度 (22 ± 2) °C, 湿度 (50 ± 6) %。

1.2 药物与试剂

化瘀祛痰方由党参 30 g、绞股蓝 30 g、黄芪 30 g、茯苓 15 g、郁金 15 g、法半夏 15 g、丹参 15 g、川芎 20 g、石菖蒲 20 g 组成, 统一由辽宁中医药大学附属医院实验中心提供并煎煮。辛伐他汀 (杭州默沙东制药有限公司, 批号 L036325); 过硫酸铵 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 A8090);

基金项目: 国家自然科学基金 (81774022), 高层次创新人才计划 (RC170248), 辽宁省高等学校创新团队支持计划 (LT2016012), 沈阳市科技计划 (17-439-8-00), 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室

* 通讯作者: jllq-8@163.com

兔 IL-18 Elisa 试剂盒 (批号 ml027833)、兔 IL-1 β Elisa 试剂盒 (批号 ml027836), 上海酶联生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 CW0014S)、蛋白裂解液 (批号 CW2333)、一抗稀释液 (批号 CW2340S)、ECL 化学发光试剂 (批号 CW0049、CW2340), 均为康为世纪生物科技有限公司; 黑素瘤缺乏因子 2 (AIM2) 抗体 (批号 ARP50505)、Caspase-1 抗体 (批号 ARP58983)、gasdermin D 蛋白 (GSDMD) 抗体 (批号 OACA03071), Aviva Systems Biology 公司; 含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLRP3) 抗体 (Bioss, 批号 bs-23723R); β -actin 抗体 (Abbkint, 批号 A01010); 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma, 批号 5329846); OCT 包埋剂 (Sakura, 批号 4583); 油红 O 染液 (批号 G1016)、甘油明胶封片剂 (批号 G1402)、苏木素染液 (批号 G1004), 武汉谷歌生物科技有限公司; 伊红染色液 (碧云天生物科技有限公司, 批号 C0109); 水合氯醛 (上海源液生物科技有限公司, 批号 S24149)、4% 多聚甲醛 (Solarbio, 批号 P1110)。高脂饲料配方: 1.5% 胆固醇、1% 胆盐、3% 猪油、3% 花生油、5% 蛋黄粉, 加 86.5% 普通饲料, 原材料采购于北京索莱宝科技有限公司, 由沈阳于洪前民动物饲料加工中心制成颗粒。

1.3 仪器

垂直电泳槽 (型号 1658001)、转移电泳槽 (型号 170-3932)、电泳仪 (型号 PowerPac™ Basic), 均为 Bio-Rad 公司产品; 多功能全波长酶标仪 (Molecular Devices, 型号 Molecular Devices spectra-Max i3); 水浴恒温振荡器 (其林贝尔仪器制造有限公司, 型号 SHZ-88); 高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 型号 Thermo ST16R); 化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司, 型号 Tanon-5200); 荧光显微镜 (型号 DM6B)、组织包埋机 (型号 EG 1150H)、石蜡切片机 (型号 RM2235)、烘片机 (型号 HI1220)、摊片机 (型号 HI1210), 均为 Leica 公司产品; 干式恒温器 (杭州奥盛仪器有限公司, 型号 MK-20); 冷冻切片机 (Thermo, 型号 Cryotome E)。

1.4 动物分组及干预方法

本实验选取对胆固醇饮食敏感 (进食高胆固醇饲料后, 短时间形成高胆固醇血症) 的家兔为研究对象, 易于形成 AS 模型, 运用高脂饲料喂养结合免疫损伤方法建立动脉粥样硬化模型^[9]。60 只新西兰白兔采用随机数字表法分为空白组、模型

组、化瘀祛痰方组及辛伐他汀组, 每组 15 只。各组先给予普通饲料喂养 2 周, 随后空白组继续喂养普通饲料, 其他各组改喂高脂饲料同时耳缘静脉一次性注射牛血清白蛋白 250 mg/kg, 以病理形态学检测发现脂质斑块及血脂异常 [以总胆固醇 (TC) 值高于正常组均值的 6 倍视为血脂异常] 为造模成功的标准^[9]。8 周后采用随机数字表法抽取 2 只家兔, 取主动脉检测斑块形成情况评估造模是否成功。模型组家兔主动脉内观测到动脉内皮增厚, 管腔变窄, 动脉壁内附着大量泡沫细胞及脂质沉积, 脂质条纹明显, 说明复制 AS 模型成功, 并经耳缘静脉采集所有家兔血液检测血脂变化情况。造模成功后化瘀祛痰方组给药剂量 16 g/(kg·d), 辛伐他汀组给药剂量 1.4 mg/(kg·d), 空白组与模型组给予 8 ml/(kg·d) 的生理盐水, 各组连续灌胃 4 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 肝脏组织病理学观察 各组用随机数字表法选取 5 只家兔, 于第 12 周末禁食不禁水 12 h, 家兔耳缘静脉缓慢注射 10% 水合氯醛彻底麻醉后, 无菌状态下打开腹腔, 分离家兔肝脏组织。HE 染色: 首先将肝脏固定于 4% 多聚甲醛, 然后进行梯度脱水, 将蜡块制成约 5 μ m 厚的切片。苏木素染色液染 3 ~ 5 min, 自来水冲洗, 分色液进行分化, 再次利用自来水冲洗并用反蓝液反蓝切片。放入酒精中进行梯度脱水后放入伊红染液中染色 5 min, 最后脱水中性树胶封片。

油红 O 染色: 首先将置于 4% 多聚甲醛的肝组织取出依次放入 15% 和 30% 蔗糖脱水, OCT 包埋剂进行包埋, 制备 8 ~ 10 μ m 厚度的冰冻切片。油红 O 染色 10 min, 利用 75% 乙醇分化 2 s, 水洗 1 min, 然后放入苏木素中复染 2 min, 自来水冲洗, 1% 盐酸酒精分化并水洗, 氨水返蓝水洗后甘油明胶封片观察。

1.5.2 Elisa 法检测家兔血清及肝脏组织 IL-1 β 、IL-18 含量 各组用随机数字表法选取 8 只家兔, 于第 12 周末禁食不禁水 12 h, 家兔耳缘静脉缓慢注射 10% 水合氯醛彻底麻醉后, 腹主动脉取血, 装入抗凝管中, 4℃ 3000 r/min, 离心 10 min, 离心半径 10 cm, 吸取上层血清于 EP 管中, 冻存。无菌状态下打开腹腔, 分离家兔肝脏组织。准备采集好的各组家兔血清及肝脏组织匀浆上清液, 严格按照试剂盒说明书操作, 酶标仪测定血清及肝脏组织中 IL-1 β 、IL-18 吸光值, 建立标准曲线并计算血清及肝脏组织中 IL-1 β 、IL-18 含量。

1.5.3 Western blot 法检测肝脏组织 AIM2、Caspase-1、GSDMD 及 NLRP3 蛋白表达 各组用随机数字表法选出 5 只家兔，摘取肝脏过程同上。提取肝脏组织蛋白，利用 BCA 蛋白含量测定试剂盒测定样品浓度。加入上样缓冲液 100℃ 变性 5 min，每组按照 60 μg 进行电泳，计算每孔的上样体积。120 V 浓缩胶电泳，80 V 分离胶电泳。电泳结束后 100 V 恒压湿转，转膜结束牛奶封闭 1 h，然后一抗孵育过夜，其中一抗稀释比例分别为 AIM2 (1 : 500)、Caspase-1 (1 : 500)、GSDMD (1 : 500)、NLRP3 (1 : 500) 及内参 (1 : 3000)。洗膜，二抗孵育，二抗稀释比例为 1 : 8000，洗膜，最后曝光，分析灰度值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20 软件，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组家兔肝脏 HE 染色和油红 O 染色结果

图 1 (彩图见后插二页) 示，空白组家兔肝细胞索条理清晰排列整齐，肝窦正常，核圆、大、居中；模型组肝细胞体积增大，肿胀变圆，胞浆内出现大量脂肪空泡，脂肪变性明显，肝细胞排列杂乱；与模型组相比，化瘀祛痰方组肝细胞的体积大小有所恢复，细胞肿胀明显减轻，空泡变少，肝细胞脂肪变性程度减轻；辛伐他汀组肝细胞排列整齐，未见显著细胞肿胀，空泡样变明显减轻。图 2 (彩图见后插二页) 示，空白组家兔肝细胞内无橘红色脂滴；模型组胞浆内有大量橘红色脂滴蓄积，

脂肪变性明显；与模型组相比，化瘀祛痰方组和辛伐他汀组肝细胞内橘红色脂滴均明显减少；化瘀祛痰方组与辛伐他汀组间未见显著差异。

2.2 各组家兔肝脏组织及血清 IL-18、IL-1β 含量比较

表 1 示，与空白组比较，模型组肝脏组织及血清中 IL-18 和 IL-1β 含量均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；与模型组比较，化瘀祛痰方组及辛伐他汀组肝脏组织及血清 IL-18 和 IL-1β 含量均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。化瘀祛痰方组与辛伐他汀组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组家兔肝脏 AIM2、Caspase-1、GSDMD 及 NLRP3 蛋白表达比较

表 2、图 3 (彩图见后插二页) 示，与空白组比较，模型组肝脏组织 AIM2、Caspase-1、GSDMD 及 NLRP3 蛋白均显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，化瘀祛痰方组及辛伐他汀组肝脏组织 Caspase-1、GSDMD 及 NLRP3 蛋白均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，AIM2 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。化瘀祛痰方组与辛伐他汀组 AIM2、Caspase-1、GSDMD 及 NLRP3 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

AS 是一种慢性进展性动脉血管损伤疾病，是诱发心脑血管疾病的重要病理基础。AS 属中医学“心悸”“胸痹”等范畴，脾失健运、痰瘀互结是 AS 发生发展的核心病机^[9-10]，治以益气健脾、化瘀祛痰之法。脾主运化，脾虚津液不得运化转而为

表 1 各组家兔肝脏组织及血清 IL-18、IL-1β 含量比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	肝脏组织		血清	
		IL-18	IL-1β	IL-18	IL-1β
空白组	8	14.88 ± 0.67	8.88 ± 0.57	15.89 ± 0.93	8.16 ± 1.07
模型组	8	23.56 ± 4.46**	12.47 ± 3.69*	29.96 ± 4.43**	12.44 ± 3.55**
化瘀祛痰方组	8	15.06 ± 1.17 ^{△△}	8.77 ± 0.92 ^{△△}	16.88 ± 1.17 ^{△△}	8.63 ± 0.97 ^{△△}
辛伐他汀组	8	14.16 ± 1.23 ^{△△}	9.56 ± 0.86 [△]	19.26 ± 3.98 ^{△△}	9.28 ± 0.89 [△]

注：IL-18，白细胞介素 18；IL-1β，白细胞介素 1β；与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta \Delta P < 0.01$

表 2 各组家兔肝脏 AIM2、Caspase-1、GSDMD、NLRP3 蛋白相对表达量比较 (/actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	AIM2	Caspase-1	GSDMD	NLRP3
空白组	5	0.58 ± 0.03	0.90 ± 0.02	0.97 ± 0.10	0.97 ± 0.07
模型组	5	1.24 ± 0.14*	1.58 ± 0.01*	1.58 ± 0.08*	1.26 ± 0.09*
化瘀祛痰方组	5	1.24 ± 0.19	0.94 ± 0.10 ^{△△}	0.99 ± 0.16 [△]	0.97 ± 0.04 ^{△△}
辛伐他汀组	5	1.25 ± 0.07	1.05 ± 0.08 ^{△△}	1.11 ± 0.20 [△]	0.92 ± 0.02 ^{△△}

注：AIM2，黑素瘤缺乏因子 2；Caspase-1，含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1；GSDMD，gasdermin D 蛋白；NLRP3，含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3；与空白组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta \Delta P < 0.01$

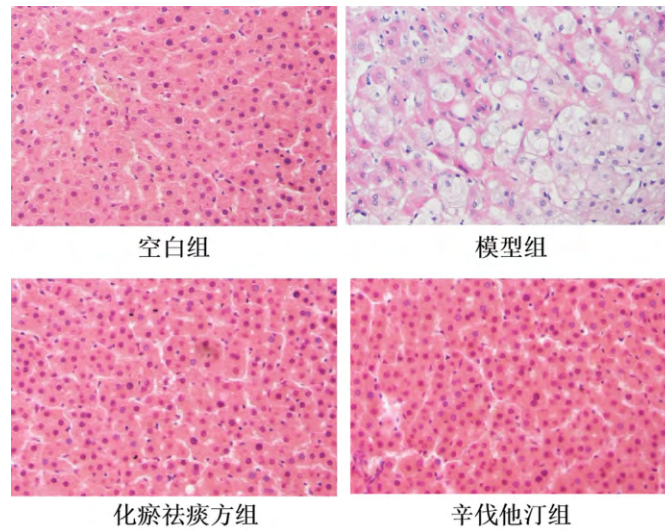


图1 各组家兔肝脏组织 HE 染色图 ($\times 400$, $50\mu\text{m}$)

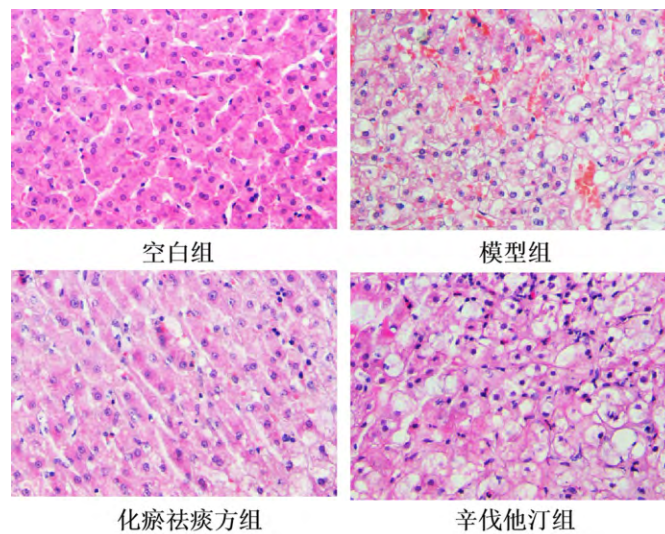


图2 各组家兔肝脏组织油红 O 染色图 ($\times 400$, $50\mu\text{m}$)

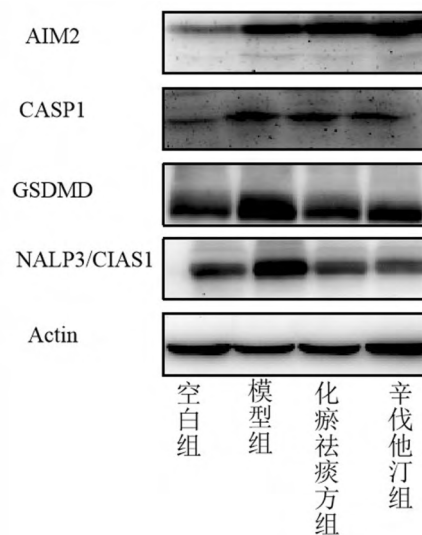


图3 家兔肝脏 AIM2、Caspase-1、GSDMD、NLRP3 蛋白的表达

痰,阻碍气机,血因气阻日久成瘀,瘀血阻络,津行受阻聚而为痰,形成痰瘀互结,阻于脉内最终导致 AS 的发生^[1]。临床上应用健脾祛痰化痰方药治疗 AS 疾病也取得良好疗效^[2]。

化痰祛痰方中党参、黄芪、绞股蓝共为君药,健脾益气,配以臣药茯苓健脾渗湿,使痰湿不聚,丹参活血祛瘀;佐以石菖蒲、郁金化痰和胃、活血行气,使气机畅通,诸药合用共奏益气健脾,化痰祛痰之功效。研究发现,化痰祛痰方能够影响肝脏自噬相关蛋白 Atg3 及 Beclin1 蛋白表达改善肝脏细胞脂质损伤进而防治 AS^[3]。同时,可调节 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白如 B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl2)、胰岛素样生长因子 1 (Igf1)、重组人自噬效应蛋白 (BFCN1) 等改善肝脏脂质损伤,提高胆固醇调节元件结合蛋白 2 (SREBP-2)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGCR)、胆固醇 7 α 羟化酶 (CYP7A1)、低密度脂蛋白胆固醇受体 (LDL-R) mRNA,增加胆固醇逆向转运,影响脂质代谢^[4-17]。HE、油红 O 染色结果显示,模型组家兔肝脏呈现明显的空泡样变化、脂滴蓄积,经化痰祛痰方治疗后可明显改善 AS 家兔肝脏脂质沉积情况。

细胞焦亡是一种新型细胞死亡形式,已有研究表明,AS 患者主动脉内存在细胞焦亡现象^[8]。肝脏是全身脂质代谢的最大枢纽器官,与脂质沉积、胆固醇逆向转运、血脂异常等密切相关,肝脏脂代谢功能异常与 AS 的发生发展不可分离^[9]。细胞焦亡是依赖于 Caspase-1 介导的程序性细胞死亡,促使细胞质膜破裂,大量促炎因子释放到外周微环境^[20]。NLRP3 与 AIM2 是细胞焦亡经典通路中的模式识别受体 (PRR),能够与凋亡相关斑点样蛋白 ASC 相互连接结合,然后募集连接前 Caspase-1。当前 Caspase-1 相互聚集靠近时就会被激活为成熟的 Caspase-1^[20-22]。活化后的 Caspase-1 一方面能够识别并激活 IL-1 β 和 IL-18 前体,另一方面 Caspase-1 剪切 GSDMD 形成 GSDMD 的 N 端结构域 (GSDMD-N)。GSDMD-N 介导质膜形成直径 1~2 nm 的小孔,驱动细胞发生渗透性肿胀,同时释放成熟的 IL-1 β 、IL-18 到细胞外诱发细胞焦亡^[24]。本实验结果显示,AS 家兔模型组肝脏组织及血清中 IL-18、IL-1 β 升高,细胞焦亡通路相关蛋白 NLRP3、AIM2 及 GSDMD 表达显著升高,化痰祛痰方能够降低肝脏组织 Caspase-1、GSDMD 及 NLRP3 蛋白表达,同时降低肝脏组织内及血清中 IL-1 β 、IL-18 含量,提示 AS 家兔肝脏内出现细胞焦亡现象。

炎症小体的激活在肥胖及药物等诱导的肝功能损害起着核心作用^[23]。研究发现,小鼠肝脏内 NLRP3 炎症小体活化后出现明显的肝功能损害,出现伴有中性粒细胞浸润的肝脏炎症导致肝脏细胞凋亡^[24]。化痰祛痰方能够有效改善 AS 家兔肝脏脂质沉积情况,此机制可能与焦亡通路 NLRP3/Caspase-1 相关,可能是通过 NLRP3 炎症小体途径发挥作用。

参考文献

- [1] WANG W, ZHANG ZZ, WU Y. Corrigendum: (-)-epigallocatechin-3-gallate ameliorates atherosclerosis and modulates hepatic lipid metabolic gene expression in apolipoprotein E knockout mice involvement of TTC39B [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 459. doi: 10.3389/fphar.2018.00459.
- [2] 王健,贾连群,宋国,等.化痰祛痰方通过调控 HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 通路影响动脉粥样硬化家兔主动脉脂质斑块 [J]. 中国动脉硬化杂志,2018,26(5):445-450.
- [3] 陈宁,宋国,贾连群,等.化痰祛痰方对 AS 家兔肝脏线粒体呼吸链酶复合物的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(7):171-176.
- [4] 贾连群,杨关林,陈文娜,等.化痰祛痰方通过调节 ApoE^{-/-}小鼠胆固醇代谢相关基因表达抗动脉粥样硬化 [J]. 中国动脉硬化杂志,2014,22(1):1-6.
- [5] 陈丝,贾连群,宋国,等.化痰祛痰方调控线粒体自噬相关蛋白减少动脉粥样硬化家兔肝脏脂质沉积的研究 [J]. 北京中医药大学学报,2018,41(4):310-315.
- [6] BEIER JI, BANALES JM. Pyroptosis: An inflammatory link between NAFLD and NASH with potential therapeutic implications [J]. J Hepatol, 2018, 68(4):643-645.
- [7] 李琳,窦健霖,楚天舒,等.高脂饲料喂养加静脉注射小牛血清白蛋白建立兔动脉粥样硬化模型 [J]. 中国组织工程研究,2012,16(20):3690-3693.
- [8] 周建红,常琥宇,李会恩,等.脂质异常家兔抗氧化能力与血管细胞黏附因子-1 的变化以及血脂康对其影响 [J]. 天津药学,2010,22(1):1-3.
- [9] 许晓敏.从脾虚痰瘀论治动脉粥样硬化 [J]. 四川中医, 2015,33(3):32-33.
- [10] 郭丛丛,黄力,董建军,等.冠状动脉粥样硬化性心脏病血瘀证与冠脉病变程度及血管内皮功能的相关性研究 [J]. 上海中医药杂志,2018,52(9):15-18.
- [11] 黄宝坤,李生鹏,王兴榆.基于痰瘀互结对动脉粥样硬化的认识 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2018,6(18):182,184.
- [12] 武亚涛,王玲玲,陈学军,等.益气化痰活血法治疗颈动脉粥样硬化斑块的临床疗效及其安全性 [J]. 临床合理用药杂志,2018,11(6):73-74.
- [13] 刘晶晶,贾连群,杨关林,等.化痰祛痰方对油酸和棕

- 桐酸诱导 HepG2 细胞脂质损伤及自噬的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(10): 4381-4385.
- [4] 贾连群, 杨关林, 罗莹, 等. 化痰祛痰方及其拆方对 HepG2 细胞胆固醇代谢的影响及机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 158-162.
- [5] 贾连群, 杨关林, 任路, 等. 化痰祛痰方药及其拆方对 H_2O_2 诱导 EA. hy926 细胞凋亡的影响及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(1): 5-10.
- [6] 孙艳梅, 贾连群, 张妮, 等. 化痰祛痰方对高脂血症大鼠肝脏 mTOR 介导自噬相关基因的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(12): 3143-3146.
- [7] 冷雪, 贾连群, 杨关林, 等. 化痰祛痰方对脾虚型高脂血症大鼠肝脏 SREBP-2 信号通路的干预作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(3): 320-326.
- [8] KOLODZIE FD, NARULA J, BURKE AP, et al. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death [J]. Am J Pathol, 2000, 157(4): 1259-1268.
- [9] TARGHER G, ARCARO G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease [J]. Atherosclerosis, 2007, 191(2): 235-240.
- [10] LIU X, LIEBERMAN J. A mechanistic understanding of pyroptosis: the fiery death triggered by invasive infection. [J]. Adv Immunol, 2017, 135: 81-117. doi: 10.1016/bs.ai.2017.02.002.

- [1] YANG D, HE Y, MU OZPLANILLO R, et al. Caspase-1 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock [J]. Immunity, 2015, 43(5): 923-932.
- [2] WU X, ZHANG H, QI W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 171. doi: 10.1038/s41419-017-0257-3.
- [3] MAN SM, KARKI R, KANNEGANTI T. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases [J]. Immunol Rev, 2017, 277(1): 61-75.
- [4] ZHENG F, XING S, GONG Z, et al. NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis [J]. Heart Lung Circ, 2013, 22(9): 746-750.
- [5] GENG Y, MA Q, LIU YN, et al. Heatstroke induces liver injury via IL-1 β and HMGB1-induced pyroptosis [J]. J Hepatol, 2015, 63: 622-633. doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.010.
- [6] LU YQ, ZHONG S, MENG N, et al. NLRP3 inflammasome activation results in liver inflammation and fibrosis in mice infected with Schistosoma japonicum in a Syk-dependent manner [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8120. doi: 10.1038/s41598-017-08689-1.

Effect of *Huayu Qutan Recipe* (化痰祛痰方) on Lipids Deposition in Liver of Atherosclerosis Rabbits

CHEN Ning¹, JIA Lianqun², SONG Nan², CHEN Si¹, SUI Xinxin¹, YU Ning¹, LENG Xue²

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847; 2. Translational Medicine Research Center of Traditional Chinese Medicine of Liaoning Province)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Huayu Qutan Recipe* (化痰祛痰方) in the treatment of atherosclerosis. **Methods** Sixty male New Zealand white rabbits were randomly divided into a normal group, a model group, a *Huayu Qutan Recipe* group, and a simvastatin group, with 15 rabbits in each group. The normal group was fed with normal feed, and the other groups were fed with high-fat diet and combined with immuno-injury to establish an atherosclerosis model. After 8 weeks of modeling, the *Huayu Qutan Recipe* group was given the dose of 16 g/(kg · d), and the simvastatin group was the dose of 1.4 mg/(kg · d). The normal group and the model group were given normal saline with the dose of 8 ml/(kg · d). Morphological changes of liver tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) and oil red O staining after 4 weeks. The content of interleukin-18 (IL-18) and interleukin-1 β (IL-1 β) in liver and serum of rabbits was detected by ELISA. Western blotting was used to detect the expression of cysteinyl aspartate specific proteinase 1 (Caspase-1), PYD domains-containing protein 3 (NLRP3), absent in melanoma 2 (AIM2) and gasdermin D (GSDMD) protein in rabbit liver. **Results** Compared with the normal group, the rabbits in the model group had obvious swelling of the liver tissue, the fat vacuoles were clearly visible, and a large amount of lipid droplets accumulated in the cytoplasm; The levels of IL-18 and IL-1 β in serum and liver tissues were increased, and the expression levels of pyroptosis related Caspase-1, GSDMD, NLRP3 and AIM2 were increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with the model group, the fat vacuoles in the *Huayu Qutan Recipe* group and the simvastatin group were significantly reduced or disappeared, and the morphology of the liver tissue recovered or partially returned to normal; the levels of IL-18 and IL-1 β in serum and liver tissues decreased; the expression levels of pyroptosis related Caspase-1, GSDMD and NLRP3 decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and the expression level of AIM2 protein did not change significantly ($P > 0.05$). **Conclusion** The mechanism of the *Huayu Qutan Recipe* might improve liver lipid deposition in rabbits with atherosclerosis by regulating NLRP3/Caspase-1 pathway to affect pyroptosis.

Keywords atherosclerosis; *Huayu Qutan Recipe* (化痰祛痰方); liver lipid deposition; pyroptosis

(收稿日期: 2018-12-20; 修回日期: 2019-07-15)

编辑: 王利芬