

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.18.016

化痰祛痰方对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠肝脏脂质过氧化及 p53、GPX4、xCT 表达的影响

吴瑶, 宋囡, 贾连群^{*}, 王杰, 陈丝, 王莹, 曹慧敏

辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110847

摘要 目的 探讨化痰祛痰方治疗动脉粥样硬化 (AS) 的可能作用机制。方法 24 只载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠随机分为模型组、化痰祛痰方组、辛伐他汀组, 8 只 C57BL/6J 小鼠作为空白组。除空白组外, 其他各组给予高脂饲料喂养制备 AS 模型。化痰祛痰方组给予化痰祛痰方 20 g/(kg·d) 灌胃; 辛伐他汀组给予辛伐他汀 2.275 mg/(kg·d) 灌胃, 空白组与模型组均给予 0.5 ml 生理盐水灌胃。各组均灌胃 4 周后, 检测血清甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 丙二醛 (MDA)、活性氧 (ROS) 水平, 肝脏铁死亡相关因子 p53、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、胱氨酸/谷氨酸反向转运体 (xCT) 蛋白及 mRNA 表达; 观察肝脏组织形态学改变。结果 与空白组比较, 模型组小鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 含量显著升高, 肝脏组织内 ROS、MDA 水平显著升高, SOD 活性显著下降, 肝脏组织 p53 蛋白及 mRNA 的表达增高, GPX4、xCT 蛋白和 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$), HE 染色显示肝细胞肿胀明显且胞浆内含有大量脂肪空泡蓄积。与模型组比较, 化痰祛痰组及辛伐他汀组小鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 水平显著降低, 肝脏组织内 ROS、MDA 水平显著降低, SOD 活性显著升高, p53 蛋白及 mRNA 的表达降低, GPX4、xCT 蛋白和 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 肝细胞形态恢复或者部分恢复, 胞浆内脂滴含量明显减少。结论 化痰祛痰方可能通过调控 p53/xCT 通路影响肝细胞铁死亡, 减轻肝脏脂质过氧化损伤, 从而防治 AS。

关键词 动脉粥样硬化; 化痰祛痰方; 脂质过氧化; 铁死亡

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 为心脑血管疾病共同的病理基础, 主要病机为脂质代谢障碍或转运异常^[1]。肝脏脂质过氧化物的发生导致肝脏脂质代谢紊乱, 是 AS 发生的一个重要病理环节^[2], 因此, 改善肝脏脂质过氧化对防治 AS 具有重要意义。化痰祛痰方是我们课题组研究多年的专利方 (专利号: ZL200710010845.9), 对防治 AS 效果显著^[3-4]。前期研究^[5-7]发现, 化痰祛痰方在改善血脂异常、减轻肝脏脂质沉积以及内皮细胞氧化应激方面效果显著。近年来, 铁死亡作为一种新型的细胞死亡方式引起了学术界广泛关注。细胞内活性氧增多是铁死亡的主要特征, 这种死亡方式还可被铁螯合剂或抗氧化剂等抑制^[8]。因此, 本实验选用载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠, 以肝脏细胞铁死亡为切入点, 探究化痰祛痰方是否能

够通过影响铁死亡相关通路而减轻肝脏脂质过氧化物的发生, 为化痰祛痰方防治 AS 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 2 月龄健康雄性 ApoE^{-/-} 小鼠 24 只, SPF 级 2 月龄健康雄性 C57BL/6J 野生型小鼠 8 只, 体重 (20 ± 2) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号为: SCXK (京) 2012-0001。饲养于辽宁中医药大学实验动物中心, 环境温度为 (22 ± 1) °C, 湿度 (50 ± 5) %, SPF 级, 自由饮食饮水。

1.2 实验药品

化痰祛痰方组成: 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, 以上药物均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 (批号 L036325), 杭州默沙东制药有限公司。

* 通讯作者: jllq_8@163.com

1.3 主要试剂与仪器

胆固醇 (TC, 批号 CH0103152)、甘油三酯 (TG, 批号 CH0105151)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C, 批号 CH0105162)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C, 批号 CH0105161) 测定试剂盒, 四川迈新生物技术有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 CW0014S)、蛋白裂解液 (批号 CW2333), 康为世纪生物科技有限公司; 总 RNA 提取试剂盒 (Promega 公司, 批号 287896); 丙二醛 (MDA, 批号 20171103)、超氧化物歧化酶 (SOD, 批号 20171107)、活性氧 (ROS, 批号 20171105) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所有限公司; 实时逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, 批号 RR014A); 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4, 批号 ab125066)、p53 蛋白 (批号 ab143148032)、胱氨酸/谷氨酸反向转运体 (xCT, 批号 ab37185), 英国 Abcam 公司; 苏木素染液 (批号 G1004)、油红 O 染液 (批号 G1016), 武汉谷歌生物科技有限公司; 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 公司, 批号 P1110)。

化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司, 型号 Tanon-5200); 全自动生化分析仪 (日本日立电子公司, 型号 7180); 垂直电泳槽 (型号 1658001)、转移电泳槽 (型号 170-3932)、电泳仪 (型号 Power Pac TM Basic), Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司, 型号 7500); 倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司, 型号 BX51TRF); 高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技有限公司, 型号 Thermo ST16R)。

1.4 模型制备、分组及干预

将 24 只 ApoE^{-/-} 小鼠适应性喂养 1 周后, 根据体重将小鼠进行编号, 01-24 号, 从随机数字表中的第 5 行、第 5 列开始取数, 从左到右, 舍弃不在 01-24 之间的数或者已被抽取的数, 取出前 8 个数组成模型组, 取出中间 8 个数组成辛伐他汀组, 取出最后 8 个数为化瘀祛痰方组。8 只 C57BL/6J 小鼠作为空白组。空白组每日给予基础饲料。24 只 ApoE^{-/-} 小鼠每日给予高脂饲料 (含 0.15% 胆固醇、21% 脂肪) 喂饲制备 AS 模型^[8], 共 8 周。ApoE^{-/-} 小鼠 ApoE 基因敲除导致 LDL-C 清除障碍沉积于动脉管壁, 形成倾向于 AS 的病灶, 是学术界公认研究 AS 发病机制较为理想的动物模型^[10]。8 周后取主动脉根部, HE 染色, 显微

镜下观察主动脉壁内膜有斑块形成, 则造模成功^[11]。24 只小鼠均造模成功。小鼠给药剂量按人与动物体表面积折算系数进行换算^[12], 化瘀祛痰方组给予化瘀祛痰方 20 g/(kg·d) 灌胃; 辛伐他汀组给予辛伐他汀 2.275 mg/(kg·d) 灌胃, 空白组与模型组均给予 0.5 ml 生理盐水灌胃。各组均灌胃 4 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 血脂检测 各组小鼠最后一次灌胃结束后, 禁食不禁水 12 h 后称重, 予以 4% 水合氯醛 (1.5 ml/25 g) 腹腔注射进行麻醉, 采用摘眼球取血, 4℃、3000 r/min、离心 25 min, 离心半径 10 cm, 取上清液, 全自动生化分析仪检测 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平。

1.5.2 肝脏组织病理形态 小鼠摘眼球采血结束后采用颈椎脱臼法处死小鼠, 各组用随机数表法选取 3 只小鼠, 无菌状态下打开腹腔, 分离小鼠肝脏组织。肝脏组织固定于 4% 多聚甲醛 48 h 以上, 梯度脱水后石蜡包埋、切片, 片厚约 5 μm, 常规 HE 染色后封片, 光学显微镜下观察。

1.5.3 肝脏脂质沉积情况 取小鼠肝脏组织依次放入 15% 和 30% 蔗糖中脱水, 石蜡包埋, 制备 8~10 μm 厚度的冰冻切片。油红 O 染色 15 min, 75% 乙醇分化 2 s, 水洗 1 min 后放入苏木素中复染 2 min, 流水冲洗, 1% 盐酸酒精分化并水洗, 氨水返蓝水洗后甘油明胶封片, 在倒置荧光显微镜下观察。

1.5.4 肝脏组织 SOD 活性及 MDA、ROS 水平 各组小鼠取 0.1 g 肝脏组织研磨成匀浆液, 用预冷 PBS 将其稀释为 10% 肝脏组织匀浆液待用。4℃、3000 r/min 离心 15 min, 离心半径为 10 cm, 取上清液。按照试剂盒说明测定 SOD 活性及 MDA、ROS 水平。

1.5.5 Western blot 法检测肝脏组织 p53、GPX4、xCT 蛋白表达 各组小鼠采用随机数表法选取 3 只小鼠, 摘取肝脏过程同上, 将组织蛋白裂解液加入各组小鼠的肝组织中, 充分研磨, 置于冰上 30 min 后, 4℃、离心半径 8.5 cm、12000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。采用 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, 计算出每个样本上样体积。120 V、30 min 浓缩胶电泳, 80 V、50 min 分离胶电泳。电泳结束后 100 V 恒压湿转 70 min, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗孵育过夜, 洗

膜,二抗孵育,二抗稀释比例为 1: 10000,再洗膜,最后滴加发光液进行曝光,分析灰度值,以目的蛋白与内参蛋白灰度值比为目的蛋白表达水平。

1.5.6 RT-PCR 法检测肝脏组织 p53、GPX4、xCT mRNA 水平 取 20 mg 肝脏组织,离心柱法提取总 RNA,按照试剂盒说明书进行操作,测得样本 RNA 浓度,将其稀释为 200 ng/ μ l 后反转录为 cDNA,加入扩增反应体系,采用实时荧光定量 PCR 法,设定 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。检测各基因相对表达水平,结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成,序列见表 1。

表 1 肝脏组织 p53、GPX4、xCT mRNA 引物序列

基因	引物	产物长度 (bp)
p53	上游 GTCAAGAAAGTGGG-GCCTGA	121
	下游 TGAGTGGGAATCTGGGATTGTG	
xCT	上游 GCATTCCCAGGG-GCTAACAT	96
	下游 AATTTCTCCCATGCG-GGTGT	
GPX4	上游 CCGCTTATTGAAGCCAGCAC	161
	下游 TATCGGGCATGCAG-ATCGAC	
GAPDH	上游 GGTGTCTCTGCG-ACTTCA	183
	下游 TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	

注: xCT, 胱氨酸/谷氨酸反向转运体; GPX4, 谷胱甘肽过氧化物酶 4

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量数据符合正态分布以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey's 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血脂水平比较

表 2 示,与空白组比较,模型组小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$),HDL-C 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与模型组比较,辛伐他汀组、化癥祛痰方组血清中 TG、TC、LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$),HDL-C 水平差

异无统计学意义 ($P > 0.05$);化癥祛痰方与辛伐他汀组血清中 TG、TC、LDL-C、HDL-C 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠肝脏组织病理形态学结果

图 1 示,空白组小鼠肝细胞为圆形,细胞核圆、大且居中,肝索条理清晰,排列整齐,肝窦未见狭窄;模型组肝细胞肿胀,体积明显增大,胞浆内有大量脂肪空泡,脂肪变性明显;与模型组相比,化癥祛痰方组肝细胞体积部分恢复正常,细胞肿胀明显减轻,脂肪空泡显著减少,肝细胞脂肪变性减轻;辛伐他汀组肝细胞排列整齐,脂肪空泡明显减少,肝细胞脂肪变性显著减轻。

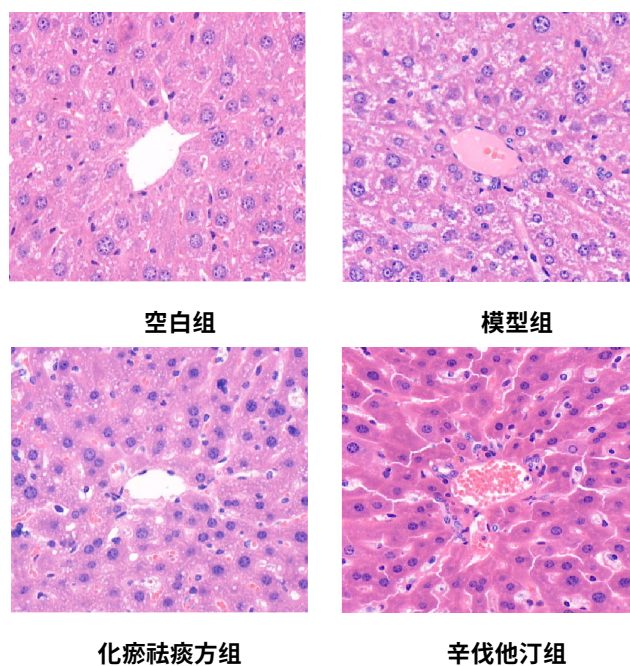


图 1 各组小鼠肝脏 HE 染色结果 ($\times 400$)

2.3 各组小鼠肝脏脂质沉积结果

空白组小鼠肝细胞内未见橘红色脂滴;模型组胞浆见大量橘红色脂滴沉积,脂肪变性显著;与模型组相比,化癥祛痰方组和辛伐他汀组肝细胞胞浆内橘红色脂滴均明显减少;化癥祛痰方组与辛伐他汀组间未见明显差异。

表 2 各组小鼠血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 含量比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TG	TC	LDL-C	HDL-C
空白组	8	0.37 $\pm$ 0.19	12.36 $\pm$ 1.29	3.14 $\pm$ 0.12	2.16 $\pm$ 0.43
模型组	8	0.92 $\pm$ 0.21*	36.12 $\pm$ 1.22*	15.25 $\pm$ 0.13*	2.83 $\pm$ 0.59
辛伐他汀组	8	0.46 $\pm$ 0.12 $^{\Delta}$	20.16 $\pm$ 0.27 $^{\Delta}$	6.89 $\pm$ 0.54 $^{\Delta}$	2.17 $\pm$ 0.29
化癥祛痰方组	8	0.51 $\pm$ 0.17 $^{\Delta}$	21.28 $\pm$ 0.99 $^{\Delta}$	7.19 $\pm$ 0.25 $^{\Delta}$	2.62 $\pm$ 0.34

注: TC, 胆固醇; TG, 甘油三酯; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

2.4 各组小鼠肝脏组织 SOD 活性及 ROS、MDA 水平比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组 ROS、MDA 水平升高, SOD 活性降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 辛伐他汀组和化癥祛瘀方组中 ROS、MDA 水平降低, SOD 活性明显升高 ($P < 0.01$); 化癥祛瘀方与辛伐他汀组 SOD 活性及 ROS、MDA 水平含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠肝脏组织 SOD 活性及 ROS、MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SOD (U/mg)	ROS (荧光强度)	MDA (nmol/mg)
空白组	8	316.93 ± 9.69	10.97 ± 3.14	191.38 ± 9.18
模型组	8	172.40 ± 8.62*	88.19 ± 9.54*	631.12 ± 17.96*
辛伐他汀组	8	305.10 ± 7.32 [△]	20.53 ± 5.82 [△]	256.43 ± 14.57 [△]
化癥祛瘀方组	8	284.42 ± 9.90 [△]	23.47 ± 5.33 [△]	287.21 ± 9.16 [△]

注: SOD, 超氧化物歧化酶; ROS, 活性氧; MDA, 丙二醛; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.5 各组小鼠肝脏组织 p53、GPX4、xCT 蛋白表达比较

图 2、表 4 示, 与空白组比较, 模型组肝脏组织 GPX4、xCT 蛋白表达均明显下降, p53 蛋白表达明显上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 辛伐他汀组及化癥祛瘀方组肝脏组织 GPX4、xCT 蛋白表达明显上升, p53 蛋白表达明显下降 ($P < 0.01$)。化癥祛瘀方与辛伐他汀组 GPX4、xCT、p53 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

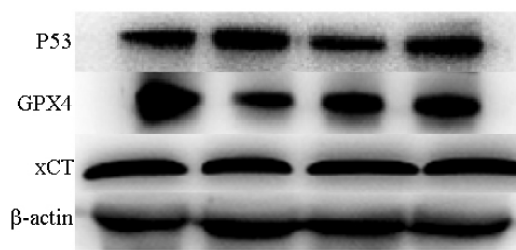
表 4 各组小鼠肝脏组织 GPX4、xCT、p53 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GPX4	xCT	p53
空白组	3	0.94 ± 0.04	0.97 ± 0.15	0.49 ± 0.06
模型组	3	0.57 ± 0.03*	0.60 ± 0.04*	0.77 ± 0.03*
辛伐他汀组	3	0.82 ± 0.05 [△]	0.89 ± 0.09 [△]	0.55 ± 0.03 [△]
化癥祛瘀方组	3	0.71 ± 0.04 [△]	0.82 ± 0.14 [△]	0.56 ± 0.04 [△]

注: GPX4, 谷胱甘肽过氧化物酶 4; xCT, 胱氨酸/谷氨酸反向转运体; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.6 各组小鼠肝脏组织 GPX4、xCT、p53 mRNA 表达比较

表 5 示, 与空白组比较, 模型组肝脏组织 GPX4、xCT mRNA 表达显著下降, p53 mRNA 表达显著上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 辛伐他汀组、化癥祛瘀方组肝脏组织 GPX4、xCT mRNA 表达上升, p53 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 化癥祛瘀方与辛伐他汀组 GPX4、xCT、p53 mRNA 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



空白组 模型组 辛伐他汀组 化瘀祛瘀方组

注: GPX4, 谷胱甘肽过氧化物酶 4; xCT, 胱氨酸/谷氨酸反向转运体

图 2 各组小鼠肝组织 GPX4、xCT、p53 蛋白电泳图

表 5 各组小鼠肝脏组织 GPX4、xCT、p53 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GPX4	xCT	p53
空白组	3	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
模型组	3	0.56 ± 0.10*	0.41 ± 0.15*	4.31 ± 0.21*
辛伐他汀组	3	0.82 ± 0.12 [△]	0.87 ± 0.13 [△]	1.41 ± 0.07 [△]
化癥祛瘀方组	3	0.77 ± 0.07 [△]	0.56 ± 0.08 [△]	1.82 ± 0.18 [△]

注: GPX4, 谷胱甘肽过氧化物酶 4; xCT, 胱氨酸/谷氨酸反向转运体; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

中医学将 AS 归属于“心悸”“胸痹”等范畴。中医学认为, 脾主运化, 乃气血生化之源, 饮食中水谷精微等物质皆依赖脾的转输功能布散周身^[3]。过食肥甘厚味, 饮食失常, 损伤脾脏, 脾运化失职, 清浊难辨, 水谷精微物质无以输布周身, 脂质浊毒瘀阻于血脉, 聚而为痰, 日久致使气机阻滞, 形成痰瘀互结证, 最终导致 AS 的发生^[4]。因此, 脾失健运、痰瘀互结、瘀阻脉络为 AS 的中医病机, 临床上采用益气健脾、化癥祛瘀法治疗。

本研究采用化癥祛瘀方从脾论治, 采用活血、化瘀、祛痰等方法治疗。方中党参、黄芪、绞股蓝同为君药, 具有益气健脾之效; 臣药茯苓渗湿利水, 法半夏健脾燥湿, 丹参活血祛瘀, 川芎行气凉血; 石菖蒲化痰泻浊, 郁金行气化痰为佐使药; 诸药合用可达益气健脾、化癥祛瘀之效。前期研究^[5]发现, 化癥祛瘀方可减轻肝脏脂质沉积。本研究结果显示, 与空白组相比, 模型组小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 水平含量显著升高, HDL-C 水平无显著变化, 虽然 HDL-C 无“量”的改变, 但高密度脂蛋白 (HDL) 结构和功能的改变对 AS 的形成与发展至关重要^[6-17], 因此, HDL “质”的改

变亦不容忽视。课题组前期研究^[14]发现, HDL 功能丧失导致机体脂质代谢紊乱, 进而促进了 AS 的发展。HE 染色显示, 模型组中肝脏细胞脂肪变性明显, 呈空泡样改变, 肝细胞内大量脂滴蓄积。与模型组相比, 辛伐他汀组、化瘀祛痰方组均可使 ApoE^{-/-} 模型小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 水平显著性降低, 说明化瘀祛痰方可降低 ApoE^{-/-} 模型小鼠血脂水平, 纠正血脂紊乱现象。病理切片结果显示, 肝脏组织细胞内脂滴明显减少, 空泡样改变减轻, 说明化瘀祛痰方可改善 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏脂质沉积情况。

铁死亡是一种区别于细胞凋亡、自噬等新型的细胞死亡方式, 并且能够被铁离子等螯合剂有效抑制, 证实铁离子在其中发挥了重要作用, 并将这种由铁依赖的细胞死亡方式命名为铁死亡^[15]。铁死亡在形态学及分子生物学等方面与其他细胞死亡方式区别显著, 其主要特点为由于铁离子在人体内的平衡被打破, 细胞内的铁离子大量堆积, 最终引起大量 ROS 的堆积以及脂质过氧化物的产生并诱导细胞死亡^[16]。研究^[17]表明, 细胞内铁储存量增多, 将导致超氧自由基生成增多, 可通过检测氧化应激过程中的代谢产物 MDA 以判断机体过氧化损伤程度; SOD 存在于机体抗氧化体系中, 具有清除超氧自由基的作用。本研究结果显示, 与空白组比较, 模型组肝脏中 ROS 及 MDA 含量均显著增高, SOD 表达量显著降低; 经过化瘀祛痰方治疗后, ROS 及 MDA 含量均显著降低, SOD 表达显著升高, 说明模型组较空白组小鼠肝细胞内氧化损伤程度明显升高, 抗氧化能力减弱; 而经化瘀祛痰方治疗后, 氧化损伤程度明显缓解, 抗氧化能力有所恢复, 化瘀祛痰方可降低肝脏脂质过氧化物的水平。

xCT、GPX4 通路、p53 介导相关通路等是铁死亡的关键调控靶点^[18]。其中 p53 在细胞增殖、凋亡及代谢的整个过程中都发挥了重要的作用^[19], 细胞内发生死亡时 p53 表达量显著升高, 同时 xCT 的表达显著降低, 进而导致胱氨酸的摄取减少, GPX4 的活性下降, 谷胱甘肽合成减少, 最终诱导细胞发生铁死亡^[20]。本实验结果显示, 与空白组比较, 模型组小鼠肝脏组织内 p53 升高, xCT、GPX4 下降, p53 的升高增加了细胞发生铁死亡的敏感性, 同时也会降低 xCT、GPX4 因子的表达, GPX4 作用减低将难以清除毒性脂质过氧化产物, 致使脂质过氧化产物大量积累, 从而诱导细胞铁死亡的发生。经化瘀祛痰方治疗后能明显改善小鼠肝脏组织 p53、xCT、GPX4 的水平, 表明化瘀祛痰方

可改善 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏脂质沉积, 通过降低 p53, 升高 xCT、GPX4 的蛋白及 mRNA 铁死亡相关因子的表达, 从而抑制肝细胞铁死亡的发生, 减轻脂质过氧化物的损伤。

综上所述, 化瘀祛痰方可调控 p53、xCT、GPX4 等铁死亡相关因子, 降低 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏细胞脂质过氧化物的发生进而改善肝脏脂质沉积情况。本研究也存在一定的局限性, 虽然 p53/xCT 通路是细胞发生铁死亡的经典途径, 但也可能存在其他途径对肝细胞铁死亡产生影响, 化瘀祛痰方是否通过影响其他细胞发生铁死亡进而影响肝脏脂质过氧化水平尚未可知, 仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 冯君, 刘建, 冉俊宁, 等. 从痰、瘀、虚探讨动脉粥样硬化的中医病机 [J]. 陕西中医, 2020, 41(2): 217-219.
- [2] CZUBKOWSKI P, WIERZBICKA A, PAWŁOWSKA J, et al. Obesity, lipid profiles and oxidative stress in children after liver transplantation [J]. Acta Biochim Pol, 2017, 64(4): 661-665.
- [3] 王健, 贾连群, 宋国, 等. 化瘀祛痰方通过调控 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.
- [4] 冷雪, 李阳, 宋国, 等. 化瘀祛痰方对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(4): 116-121.
- [5] 杜莹, 贾连群, 宋国, 等. 化瘀祛痰方对高脂血症大鼠 sd-LDL 的影响及机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8): 1935-1939.
- [6] 陈丝, 贾连群, 宋国, 等. 化瘀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.
- [7] 贾连群, 杨关林, 任路, 等. 化瘀祛痰方药及其拆方对 H₂O₂ 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.
- [8] CONRAD M, PRATT DA. The chemical basis of ferroptosis [J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(12): 1137-1147.
- [9] SHAH PK, NILSSON J, KAUL S, et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I (Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Circulation, 1998, 97(8): 780-785.
- [10] WANG SZ, WU M, CHEN KJ, et al. Hawthorn extract alleviates atherosclerosis through regulating inflammation and apoptosis related factors: an experimental study [J]. Chin J Integr Med, 2018, 25(2): 108-115.
- [11] 黄雪云, 李七一, 严士海, 等. 冠心平对动脉粥样硬化 ApoE^{-/-} 小鼠 ox-LDL、LoX-1 蛋白及 mRNA、ICAM-1、ELAM-1 水平的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39

- (15): 3725–3729.
- [2] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069–1072.
- [3] 贾连群, 宋囡, 张妮, 等. 基于“脾主运化”理论探讨肠道微生物稳态与膏脂转输的关系 [J]. 中医杂志, 2017, 58(18): 1554–1557.
- [4] 宋磊, 梁家祺, 官宝怡, 等. 动脉粥样硬化斑块与血管瘤 [J]. 中医杂志, 2019, 60(21): 1812–1814.
- [5] 陈宁, 贾连群, 宋囡, 等. 化痰祛瘀方对动脉粥样硬化家兔肝脏脂质沉积的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(20): 1755–1759.
- [6] 尔璐, 边云飞, 宋晓苏, 等. 失功能高密度脂蛋白与心血管疾病研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(3): 309–313.
- [7] 李博洁, 张彩平, 龙石银. 高密度脂蛋白亚类与心血管疾病的现状分析 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(12): 1080–1086.
- [8] 陈丝, 贾连群, 宋囡, 等. 香砂六君子汤对脾虚高脂血症大鼠 dyHDL 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 22–28.
- [9] DIXON SJ, LEMBERG KM, LAMPRECHT MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell, 2012, 149(5): 1060–1072.
- [20] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(3): 486–541.
- [21] COLAKOGLU HE, YAZLIK MO, KAYA U, et al. MDA and GSH-Px activity in transition dairy cows under seasonal variations and their relationship with reproductive performance [J]. J Vet Res, 2017, 61(4): 497–502.
- [22] GAO H, BAI Y, JIA Y, et al. Ferroptosis is a lysosomal cell death process [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(3): 1550–1556.
- [23] HUANG C, YANG M, DENG J, et al. Upregulation and activation of p53 by erastin-induced reactive oxygen species contribute to cytotoxic and cytostatic effects in A549 lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2018, 40(4): 2363–2370.

Effect of *Huayu Qutan Formula* (化痰祛瘀方) on Liver Lipid Peroxidation and Expression of p53, GPX4 and xCT in ApoE^{-/-} Mice

WU Yao, SONG Nan, JIA Lianqun, WANG Jie, CHEN Si, WANG Ying, CAO Huimin

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *Huayu Qutan Formula* (化痰祛瘀方) in treating atherosclerosis (AS). **Method** A total of 24 ApoE^{-/-} mice were randomly divided into a model group, a *Huayu Qutan Formula* group, and a simvastatin group. Eight C57BL/6J mice were used as the blank group. Except for the blank group, mice were given high-fat feed to make AS models. The mice in *Huayu Qutan Formula* group was given *Huayu Qutan Formula* 20 g/(kg·d) by gavage; the simvastatin group was given simvastatin 2.275 mg/(kg·d) by gavage, and the blank group and the model group were given 0.5 ml normal saline by gavage. After intragastric administration for 4 weeks, serum triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), superoxide dismutation (SOD) activity, malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS) levels, liver ferroptosis related factor p53, glutathione peroxidase 4 (GPX4), cystine/glutamate reverse transport Body (xCT) protein and mRNA expression were detected; and the morphological changes of liver tissue were observed. **Results** Compared with the blank group, the levels of serum TC, TG and LDL-C in the model group were significantly increased; the levels of ROS and MDA in the liver tissue were significantly increased; SOD activity was significantly decreased; the expression of p53 protein and mRNA in the liver tissue was increased; the levels of GPX4, xCT protein and mRNA were significantly reduced ($P < 0.01$). HE staining showed that hepatocytes were swollen and the cytoplasm contained a large amount of fatty vacuoles. Compared with the model group, the serum TC, TG and LDL-C levels of the mice in the *Huayu Qutan Formula* group and simvastatin group were significantly reduced; the levels of ROS and MDA in the liver tissue were significantly reduced; SOD activity was significantly increased; the levels of p53 protein and mRNA expression decreased; the levels of GPX4, xCT protein and mRNA increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the morphology of liver cells recovered or partially recovered, and the lipid droplet content in the cytoplasm was significantly reduced. **Conclusion** *Huayu Qutan Formula* affects ferroptosis in liver cells by p53/xCT pathways and alleviate the lipid peroxidation injury of ApoE^{-/-} mice and prevents atherosclerosis.

Keywords atherosclerosis; *Huayu Qutan Formula* (化痰祛瘀方); lipid peroxidation; ferroptosis

(收稿日期: 2019-11-25; 修回日期: 2020-04-02)

编辑: 王利芬