

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.24.014

# 参芪瓜蒌薤白半夏汤对动脉粥样硬化模型小鼠 PPAR $\gamma$ 、胆汁酸及血脂的影响

敖玉涵, 隋国媛, 曹慧敏, 孔亮, 贾连群, 杨关林✉

辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110032

**[摘要]** **目的** 探究参芪瓜蒌薤白半夏汤(简称半夏方)治疗动脉粥样硬化的作用机制。**方法** 将 30 只载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠随机分为模型组、瑞舒伐他汀组及半夏方低、中、高剂量组,每组 6 只,给予高脂饲料喂养 12 周制备动脉粥样硬化模型。另设 6 只 C57BL/6J 野生型小鼠作为空白组。造模后半夏方低、中、高剂量组分别按照半夏方 6.46、12.92、25.84 g/(kg·d)灌胃,瑞舒伐他汀组予瑞舒伐他汀片 1.55 mg/(kg·d)灌胃,空白组和模型组给予生理盐水 0.5 ml 灌胃。4 周后检测各组小鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),肝脏 TC、TG 水平;酶循环比色法检测血清胆汁酸水平;Real time RT-PCR 法及 Western blot 法检测肝脏中过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )、固醇调节元件-结合蛋白 2(SREBP2)、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMGCR)、胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶(CYP7A1)的 mRNA 及蛋白表达。**结果** 与空白组比较,模型组小鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平均显著升高, HDL-C、胆汁酸水平显著下降,肝脏 TG、TC 水平显著升高,肝脏 SREBP2、HMGCR 蛋白及 mRNA 表达显著升高, PPAR $\gamma$ 、CYP7A1 蛋白及 mRNA 表达显著降低(均  $P < 0.01$ )。与模型组比较,瑞舒伐他汀组及半夏方高剂量组血清 TG、TC、LDL-C 水平及肝脏 TG、TC 水平降低,胆汁酸水平升高, PPAR $\gamma$ 、CYP7A1 蛋白及 mRNA 表达升高, SREBP2、HMGCR 蛋白及 mRNA 表达降低,半夏方低剂量组的血清 TC、LDL-C 水平和肝脏 TC 水平降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与瑞舒伐他汀组相比,半夏方低剂量组肝脏 TC 水平升高,半夏方高剂量组肝脏 TC 水平、CYP7A1 mRNA 表达、PPAR $\gamma$  蛋白表达降低、SREBP2 蛋白表达升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与半夏方低、中剂量组相比,半夏方高剂量组血清 TG、肝脏 TC 水平降低( $P < 0.05$ )。**结论** 半夏方可能通过调控 PPAR $\gamma$  蛋白水平,同时影响肝脏胆固醇的生成和胆固醇向胆汁酸的转化,从而改善血脂水平,发挥抗动脉粥样硬化作用。

**[关键词]** 动脉粥样硬化;参芪瓜蒌薤白半夏汤;过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ ;胆固醇代谢;从脾论治

由动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)引发的重要脏器缺血性功能障碍已成为全球人类死亡的首要原因,其所导致的心血管疾病亦是造成我国居民死亡和疾病负担的首要因素<sup>[1]</sup>。当前研究认为,细胞内胆固醇聚集可促进泡沫细胞的形成,造成内皮细胞损伤和平滑肌细胞增生,三者共为 AS 的主要发病机制<sup>[2]</sup>,其中胆固醇代谢紊乱是 AS 发病的重

要一环,全身胆固醇过多通常被认为是 AS 的主要标志<sup>[3]</sup>。通过调节胆固醇代谢防治 AS 已成为全球共同关注的重大课题,多项国际协会的指南与共识已将高胆固醇血症的管理作为动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)一级和二级预防策略的重要一环,能同时减少胆固醇合成并增加胆固醇排泄的方法可能为抗 AS 及 ASCVD 的重要手段<sup>[3-4]</sup>。

AS 主要与嗜食肥甘以致脾虚运津无力,津停凝化为痰痹阻脉道有关,因此脾气亏虚、痰阻脉络为其重要的发病基础。参芪瓜蒌薤白半夏汤(以下

**基金项目:**国家自然科学基金(81974548, 82074145);辽宁省教育厅科学技术研究项目(L202033);辽宁省科技厅科学技术计划(2021-MS-252)

✉ 通讯作者:jlq-8@163.com

简称半夏方)由《金匱要略》中瓜蒌薤白半夏汤加西洋参、黄芪化裁而来,具有益气健脾、化痰通络之功,可有效减少冠心病患者中医证候积分,改善血管内皮功能,并有良好的调脂作用<sup>[5-7]</sup>。课题组前期发现,胆固醇代谢紊乱可能为血脂异常导致 AS 等心脑血管疾病发生的微观病理基础及分子生物学依据<sup>[8]</sup>,其根本病机与脾失健运、津液聚而为痰相契合,从分子生物学角度证实以健脾化痰通络法治 AS 有据可依。本研究以高脂喂饲 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠构建 AS 动物模型,给予半夏方干预,以调节脂代谢的过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )作为切入点进行观察,旨在探究半夏方通过调控胆固醇代谢抗 AS 的干预作用及其潜在机制,亦为“从脾论治”防治 AS 提供分子生物学证据。本研究通过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理审查号:21000042021072)。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

8 周龄 SPF 级雄性载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠 30 只,同龄具有相同遗传背景雄性 C57BL/6J 野生型小鼠 6 只,体重(20 $\pm$ 2) g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0008。动物饲养于辽宁中医药大学 SPF 级实验动物中心,自然光照,自由摄取食物和水源,相对湿度 45%~55%,环境温度 20~24℃。

### 1.2 药物和饲料

瑞舒伐他汀钙片(规格:5 mg/片,批号:99201103,鲁南贝特制药有限公司)。参芪瓜蒌薤白半夏汤组成:西洋参 10 g,黄芪 30 g,法半夏 15 g,瓜蒌 15 g,薤白 15 g。所有饮片购自江阴天江药业有限公司,药材浸泡 1 h 后,武火煮沸,文火煎煮 20 min,过滤,重复煎 3 次,合并滤液,制成含生药 0.775 g/ml 煎剂。基础饲料:许可证号 SCXK(京)2018-0006,购自小泰有泰(北京)生物科技有限公司。高脂饲料:许可证号 SCXK(京)2018-0006,含脂肪 21%,胆固醇 0.15%,购自小泰有泰(北京)生物科技有限公司。

### 1.3 主要试剂与仪器

总胆固醇(TC,批号:20210806)、甘油三酯(TG,批号:20210809)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C,批号:20210806)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C,批号:20210809)测定试剂盒,南京建成生物科技有限公司;HE 染液(批号:C0105S)、

油红 O 染液(批号:C0158S),上海碧云天生物技术有限公司;总胆汁酸(TBA)试剂盒(批号:JL-T1373),上海江莱生物科技有限公司;RIPA Lysis Buffer (Strong)(批号:CW2333)、二辛可酸(BCA)蛋白定量试剂盒(批号:CW0014)、羊抗兔 IgG(批号:CW0103)、羊抗鼠 IgG(批号:CW0102)、HiFiScript 快速去基因组 cDNA 第一链合成试剂盒(批号:CW2582)、UltraSYBR 一步法荧光定量 PCR 试剂盒(批号:CW0659),江苏康为世纪生物科技有限公司;PPAR $\gamma$ (批号:16643-1-AP)、胆固醇调节元件结合蛋白 2(SREBP2,批号:28212-1-AP)、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMGCR,批号:13533-1-AP)、GADPH 蛋白一抗(批号:60004-1-Ig),Proteintech 公司(武汉);细胞色素 7A1(CYP7A1)蛋白一抗(批号:K007769P),索莱宝生物科技有限公司;Trizol(批号:180-501),江苏康为世纪生物科技股份有限公司康为试剂(批号:03877/20331);ECL 化学发光试剂(批号:180-501),上海天能科技有限公司。

多功能全波长酶标仪(美国 MD 公司, Spectra-Maxi3 型);高性能组织脱水机(ASP 6025 型)、手动石蜡切片机(RM2235 型)、包埋机(EG1150H 型)、烘片机(HI1220 型),德国 Leica 公司;正置白光显微镜(日本尼康公司, Nikon Eclipse C1 型);高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司, Micro 17 型);垂直板电泳装置(美国 Bio-Rad 公司, 1658033 型);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司, 5200 型);实时荧光定量 PCR 仪(7500 型)、梯度 PCR 仪(Veriti 型),美国 Life 公司。

### 1.4 动物分组、造模及给药

30 只 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠采用随机数字表法分为模型组、瑞舒伐他汀组及半夏方低、中、高剂量组,每组 6 只。6 只 C57BL/6J 小鼠作为空白组。参照文献[2],给予 30 只 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠高脂饲料喂养 12 周以制备 AS 模型。空白组小鼠给予基础饲料喂养。取主动脉根部行 HE 染色,显微镜下观察主动脉壁内膜有斑块形成,则提示造模成功<sup>[9-10]</sup>。结果显示,30 只小鼠均造模成功。参照人与动物体表面积折算系数换算给药浓度<sup>[11]</sup>。造模后,半夏方低、中、高剂量组分别按照 6.46、12.92、25.84 g/(kg·d)剂量进行灌胃,其中中剂量为等效剂量。瑞舒伐他汀组给予瑞舒伐他汀钙片 1.55 mg/(kg·d)进行灌胃,空白组和模型组给予等体积生理盐水 0.5 ml 灌

胃。各组均每日 1 次,灌胃 4 周。

### 1.5 观察指标及方法

各组小鼠末次灌胃结束后,禁食不禁水 12 h,予摘眼球取血,静置 1~2 h,4℃、3000 r/min(离心半径 10 cm)离心 20 min 后分离血清,-80℃保存。小鼠眼球摘除即死,暴露腹部区域,予 75%乙醇消毒,取出肝脏和主动脉。

**1.5.1 酶标仪比色法检测血清血脂水平及胆汁酸水平** 严格按照生化试剂盒说明书操作,采用酶标仪比色法分别检测各组小鼠血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平。准备采集好的各组小鼠血清,采用酶循环比色法检测血清胆汁酸水平。严格按照试剂盒说明书步骤检测,并根据所测吸光度计算血清胆汁酸水平。

**1.5.2 酶标仪比色法检测肝脏 TC、TG 水平** 精密称取各组小鼠肝脏组织 0.1 g 制作组织匀浆,测定 BCA 浓度后,按试剂盒说明书,采用酶标仪比色法分别测定各组小鼠肝脏 TC、TG 水平。

**1.5.3 HE 和油红 O 染色观察肝脏及主动脉病理形态** 4%多聚甲醛固定肝脏和主动脉组织,经梯度乙醇脱水,石蜡包埋切片,根据染色试剂盒步骤严格操作,用制备的各切片进行 HE 染色,并在光镜下拍照观察。4%多聚甲醛固定肝脏和主动脉冰冻切片,60%异丙醇浸洗,严格操作油红 O 染色常规步骤,封片后显微镜下观察各组小鼠肝脏和主动脉组织病理学形态改变。

**1.5.4 Real time RT-PCR 法检测肝脏 PPAR $\gamma$ 、SREBP2、HMGCR、CYP7A1 mRNA 表达** 基于半夏方低、中、高剂量组血清血脂、胆汁酸及肝脏血脂结果,选取其中能最有效降低血脂并升高胆汁酸水平的最佳中药剂量组进行 mRNA 和蛋白检测。采用 Real time RT-PCR 法检测各组小鼠肝脏中 PPAR $\gamma$ 、SREBP2、HMGCR、CYP7A1 mRNA 表达。称取各组小鼠肝脏 100 mg,Trizol 裂解肝组织提取总 RNA 并测定浓度,后去除基因组 DNA,逆转录合成 cDNA (42℃孵育 15 min,85℃孵育 5 min),加入 PCR 扩增反应体系进行检测,设定 PCR 反应程序,在 40 个循环结束后应用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法检测 mRNA 的相对表达水平。引物合成公司:北京赛百盛基因技术有限公司,引物序列见表 1。

**1.5.5 蛋白免疫印迹法检测肝脏 PPAR $\gamma$ 、SREBP2、HMGCR、CYP7A1 蛋白表达** 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏组织 PPAR $\gamma$ 、SREBP2、HMGCR、CYP7A1 蛋白表达。取出各组小鼠肝脏

表 1 肝脏 PPAR $\gamma$ 、SREBP2、HMGCR、CYP7A1 mRNA 引物序列

Table 1 Primer sequence of liver PPAR $\gamma$ , SREBP2, HMGCR, CYP7A1 mRNA

| 名称            | 序列 (5'→3')                  | 引物长度/bp |
|---------------|-----------------------------|---------|
| PPAR $\gamma$ | 上游: AAGCGGTGAACCACTGATATTC  | 22      |
|               | 下游: AGAAATGCTGGAGAAATCAACTG |         |
| SREBP2        | 上游: GCCCTGGAAGTGACCGAG      | 18      |
|               | 下游: GTGCCGCTGACGTTGAGA      |         |
| HMGCR         | 上游: GCTACAACGCCACGCAG       | 18      |
|               | 下游: CCACGGTTCCTATCTCTATCGA  |         |
| CYP7A1        | 上游: AACTGGATGATGTAACGACTGC  | 23      |
|               | 下游: ACACGAATCCCCAGGAACGT    |         |

注: PPAR $\gamma$ , 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ ; SREBP2, 胆固醇调节元件结合蛋白 2; HMGCR, 乙酰辅酶 A 还原酶; CYP7A1, 细胞色素 7A1。

组织 0.1 g, 加入 1 ml RIPA 裂解液, 用匀浆器充分匀浆并置于冰上裂解 30 min, 后 4℃、12 000 r/min 离心 15 min 取上清得到样品, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 各组以 50  $\mu$ g 蛋白/泳道上样经 SDS-PAGE 电泳后, 转膜至 PVDF 膜(半干转), 后经 5% 脱脂奶粉封闭, TBST 清洗, 一抗稀释液稀释(1:5 000), 进行一抗孵育, 于 4℃置摇床上孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 放入二抗(1:10 000)室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, 并用 ECL 化学发光试剂显色, 在凝胶成像系统检测分析蛋白条带, 以 GAPDH 为内参, 用 Image J 1.8.0.112 图像分析软件对条带进行分析以测定蛋白表达, 以目的蛋白/内参表示。

### 1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件、SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计学处理, 符合正态分布数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )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。不符合正态分布数据用中位数和四分位数即  $M(Q_1, Q_3)$  表示, 多组间比较采用 Kruskal Wallis  $H$  检验, 两两比较采用 Dunnett's  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠血清血脂水平及胆汁酸水平比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠血清 TG、TC 和 LDL-C 水平均明显升高, HDL-C、胆汁酸水平明显下降 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, 瑞舒伐他汀组、半夏方中、高剂量组血清 TG、TC、LDL-C 水平显著降低, 胆汁酸水平显著升高, 半夏方低剂量组血清 TC、LDL-C 水平显著降低 ( $P<0.01$ )。

表2 各组小鼠血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C、胆汁酸水平比较

Table 2 Comparison of serum TG, TC, HDL-C, LDL-C and bile acids levels in mice of each group

| 组别      | 鼠数 | TG/mm <sup>ol</sup> ·L <sup>-1</sup> ,<br>$\bar{x}\pm s$ | TC/mm <sup>ol</sup> ·L <sup>-1</sup> ,<br>$M(Q_1, Q_3)$ | HDL-C/mm <sup>ol</sup> ·L <sup>-1</sup> ,<br>$M(Q_1, Q_3)$ | LDL-C/mm <sup>ol</sup> ·L <sup>-1</sup> ,<br>$M(Q_1, Q_3)$ | 胆汁酸/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> ,<br>$M(Q_1, Q_3)$ |
|---------|----|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 空白组     | 6  | 1.32±0.14                                                | 3.63(3.13,4.13)                                         | 1.33(1.25,1.45)                                            | 1.03(0.81,1.14)                                            | 102.80(99.29,109.90)                              |
| 模型组     | 6  | 3.64±0.13 <sup>a)</sup>                                  | 16.33(15.03,17.25) <sup>a)</sup>                        | 0.76(0.66,0.90) <sup>a)</sup>                              | 3.18(2.90,3.58) <sup>a)</sup>                              | 39.01(35.46,46.10) <sup>a)</sup>                  |
| 瑞舒伐他汀组  | 6  | 2.31±0.04 <sup>b)</sup>                                  | 10.18(10.17,11.74) <sup>b)</sup>                        | 1.05(0.60,1.19)                                            | 1.17(1.09,1.46) <sup>b)</sup>                              | 106.40(85.11,113.50) <sup>b)</sup>                |
| 半夏方低剂量组 | 6  | 3.44±0.36 <sup>c)</sup>                                  | 14.20(12.74,14.29) <sup>b)c)</sup>                      | 0.81(0.80,0.84)                                            | 1.74(1.70,2.30) <sup>b)</sup>                              | 60.28(46.10,78.01) <sup>c)</sup>                  |
| 半夏方中剂量组 | 6  | 2.95±0.48 <sup>b)c)d)</sup>                              | 11.71(11.16,13.19) <sup>b)</sup>                        | 0.81(0.71,0.84)                                            | 1.98(1.35,2.06) <sup>b)</sup>                              | 63.83(60.28,95.74) <sup>b)c)</sup>                |
| 半夏方高剂量组 | 6  | 2.32±0.10 <sup>b)d)e)</sup>                              | 11.78(10.29,13.26) <sup>b)</sup>                        | 0.85(0.78,0.99)                                            | 1.00(0.91,1.30) <sup>b)d)</sup>                            | 67.38(63.83,78.01) <sup>b)c)</sup>                |

注：TG，甘油三酯；TC，总胆固醇；HDL-C，低密度脂蛋白胆固醇；LDL-C，高密度脂蛋白胆固醇。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与瑞舒伐他汀组比较， $P<0.01$ ；d) 与半夏方低剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与半夏方中剂量组比较， $P<0.01$ 。

与瑞舒伐他汀组比较，半夏方低剂量组血清TG、TC水平明显升高，半夏方中剂量组血清TG水平明显升高，半夏方各剂量组胆汁酸水平均显著降低( $P<0.01$ )。与半夏方低剂量组比较，半夏方中剂量组血清TG明显降低、半夏方高剂量组血清TG、LDL-C降低( $P<0.05$ )；与半夏方中剂量组比较，半夏方高剂量组血清TG显著降低( $P<0.01$ )。

2.2 各组小鼠肝脏脂质水平比较

表3示，与空白组相比，模型组肝脏TG、TC水平明显升高( $P<0.01$ )。与模型组比较，半夏方中、高剂量组和瑞舒伐他汀组肝脏TG、TC水平显著降低，半夏方低剂量组肝脏TC水平显著降低( $P<0.01$ )。与瑞舒伐他汀组相比，半夏方低剂量组肝脏TC水平明显升高、半夏方高剂量组肝脏TC水平明显较降低( $P<0.05$ )。与半夏方低、中剂量组相比，半夏方高剂量组肝脏TC水平显著

降低( $P<0.05$ )。

表3 各组小鼠肝脏 TG、TC 水平比较

Table 3 Comparison of liver TG and TC levels in mice of each group (mmol·L<sup>-1</sup>,  $\bar{x}\pm s$ )

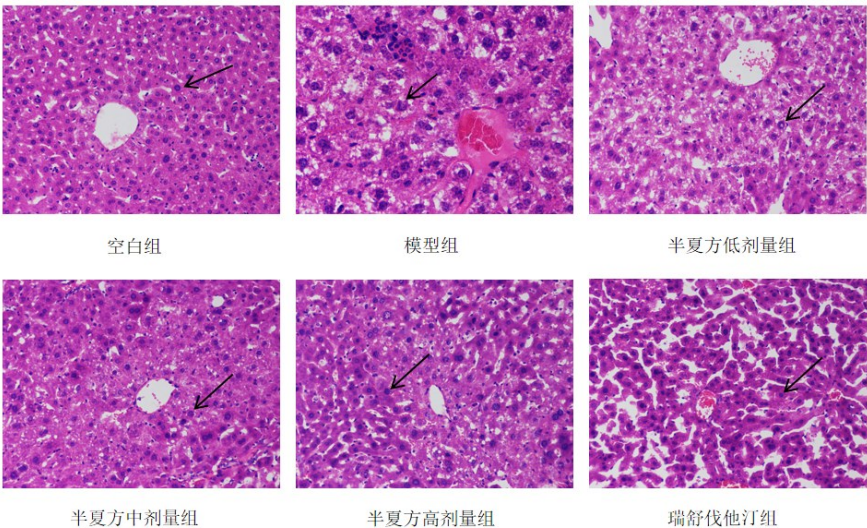
| 组别      | 鼠数 | TG                       | TC                            |
|---------|----|--------------------------|-------------------------------|
| 空白组     | 6  | 12.20±0.74               | 1.05±0.07                     |
| 模型组     | 6  | 18.72±0.93 <sup>a)</sup> | 2.55±0.08 <sup>a)</sup>       |
| 瑞舒伐他汀组  | 6  | 14.79±0.60 <sup>b)</sup> | 1.71±0.09 <sup>b)</sup>       |
| 半夏方低剂量组 | 6  | 18.61±1.22               | 1.95±0.07 <sup>b)c)</sup>     |
| 半夏方中剂量组 | 6  | 16.43±0.98 <sup>b)</sup> | 1.92±0.15 <sup>b)</sup>       |
| 半夏方高剂量组 | 6  | 14.96±0.60 <sup>b)</sup> | 1.62±0.08 <sup>b)c)d)e)</sup> |

注：TG，甘油三酯；TC，总胆固醇。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与瑞舒伐他汀组比较， $P<0.05$ ；d) 与半夏方低剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与半夏方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠肝脏病理组织学形态

HE染色结果见图1。空白组肝小叶结构清晰，肝细胞索排列清晰，肝窦正常，肝细胞核圆且居



注：图中箭头所指为肝细胞。

图1 各组小鼠肝脏组织 HE 染色结果 (×200)

Figure 1 HE staining results of liver tissue of mice in each group (×200)

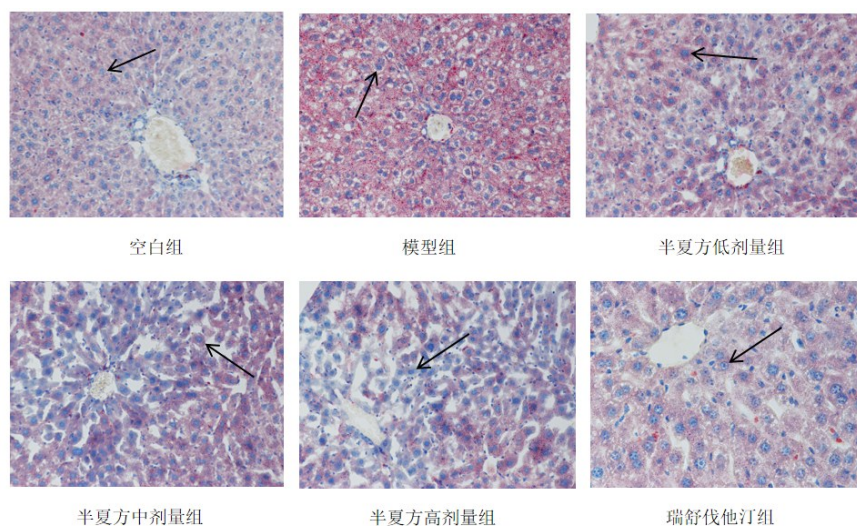
中, 细胞未见脂肪变性。模型组肝小叶结构破坏, 肝细胞肿胀明显且排列杂乱, 胞浆内出现大量空泡状细胞。与模型组相比, 半夏方低、中、高剂量组及瑞舒伐他汀组的肝小叶结构略有恢复, 肝细胞水肿明显减轻, 胞浆内脂肪空泡减少。半夏方中剂量组较低剂量组略有改善, 半夏方高剂量组和瑞舒伐他汀组差异不明显。

油红 O 染色结果见图 2。空白组肝脏组织细胞核呈蓝色, 未见橘红色脂滴, 细胞排列整齐。模型组小鼠肝细胞明显肿胀, 细胞核大小不均匀, 可见弥漫性橘红色脂滴, 表明肝脏脂质沉积明显。与模型组相比, 半夏方低、中、高剂量组及瑞舒伐他汀

组的细胞核大小略有恢复, 肝细胞水肿明显减轻, 橘红色脂滴分布明显减少, 表明脂质沉积情况明显缓解。其中半夏方中剂量组较低剂量组略有改善, 半夏方高剂量组和瑞舒伐他汀组差异不明显。

#### 2.4 各组小鼠主动脉病理组织学形态

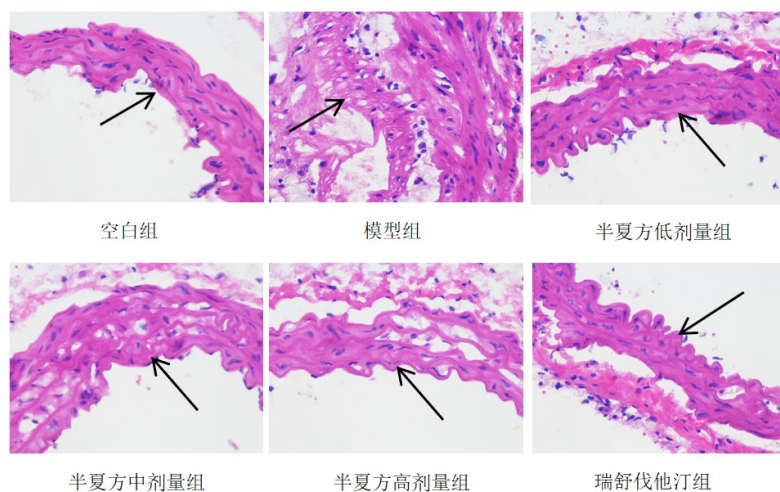
HE 染色结果见图 3。空白组动脉内膜完整、平滑, 表面内皮细胞呈褶皱状排列且分布均匀; 模型组可见大量泡沫细胞聚集形成脂纹, 内皮隆起发生变形。与模型组比较, 半夏方各剂量组和瑞舒伐他汀组泡沫细胞减少, 内皮较平整。其中半夏方低、中、高剂量组差异不明显, 瑞舒伐他汀组较半夏方各剂量组略有改善。



注: 图中箭头所指为肝细胞。

图2 各组小鼠肝脏组织油红 O 染色结果 (×200)

Figure 2 Oil red O staining results of liver tissue in mice of each group (×200)



注: 图中箭头所指为主动脉内膜。

图3 各组小鼠主动脉组织 HE 染色结果 (×400)

Figure 3 HE staining results of aorta tissue in mice of each group (×400)

油红 O 染色结果见图 4。空白组动脉血管未见明显脂质沉积,而模型组动脉血管中可发现大量的脂质积累。与模型组比较,半夏方各剂量组和瑞舒伐他汀组血管中脂质的累积均有改善。其中半夏方低、中、高剂量组差异不明显,瑞舒伐他汀组较半夏方各剂量组略有改善。

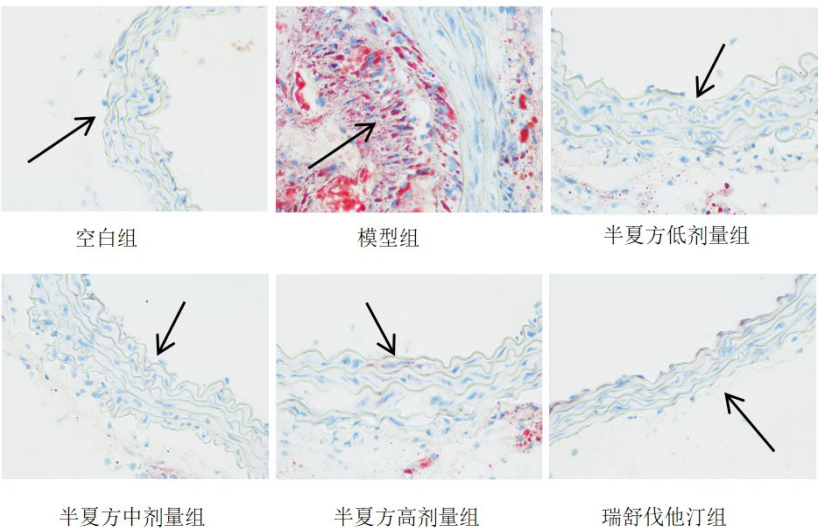
2.5 各组小鼠肝脏 PPAR $\gamma$ 、SREBP2、HMGCR、CYP7A1 mRNA 表达比较

综合上述各项指标测试结果,以高剂量组效果最佳,因此选择半夏方高剂量组进行 mRNA 和蛋白表达分析。表 4 示,与空白组比较,模型组小鼠肝脏 SREBP2 和 HMGCR 的 mRNA 表达显著升高,PPAR $\gamma$  和 CYP7A1 的 mRNA 表达显著降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,瑞舒伐他汀组和半夏方高剂量组可明显升高 PPAR $\gamma$  和 CYP7A1 的 mRNA 表达,并降低 SREBP2 和 HMGCR 的 mRNA 表达 ( $P<$

0.05)。瑞舒伐他汀组 CYP7A1 mRNA 水平显著高于半夏方高剂量组( $P<0.01$ );而在 PPAR $\gamma$ 、SREBP2、HMGCR 的 mRNA 表达方面,瑞舒伐他汀组与半夏方高剂量组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.6 各组小鼠肝脏 PPAR $\gamma$ 、SREBP2、HMGCR、CYP7A1 蛋白表达比较

表 5 示,与空白组比较,模型组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肝脏 SREBP2 和 HMGCR 的蛋白表达显著升高,PPAR $\gamma$  和 CYP7A1 的蛋白显著降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,瑞舒伐他汀组和半夏方高剂量组可明显升高 PPAR $\gamma$  和 CYP7A1 蛋白表达,并降低 SREBP2 和 HMGCR 蛋白表达( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与瑞舒伐他汀组相比,半夏方高剂量组 PPAR $\gamma$  蛋白表达水平显著降低, SREBP2 蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),而 CYP7A1、HMGCR 的蛋白表达方面比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。



注:图中箭头所指为主动脉内膜。

图 4 各组小鼠主动脉组织油红 O 染色结果 (×400)

Figure 4 Oil red O staining results of aorta tissue in mice of each group (×400)

表 4 各组小鼠肝脏 PPAR $\gamma$ 、SREBP2、HMGCR、CYP7A1 mRNA 相对量表达比较

| Table 4 Comparison of relative expression of PPAR $\gamma$ , SREBP2, HMGCR and CYP7A1 mRNA in liver of mice in each group |    |                         |                         |                         |                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| (2 <sup>-<math>\Delta\Delta C_t</math></sup> , $\bar{x}\pm s$ )                                                           |    |                         |                         |                         |                            |
| 组别                                                                                                                        | 鼠数 | PPAR $\gamma$           | SREBP2                  | HMGCR                   | CYP7A1                     |
| 空白组                                                                                                                       | 6  | 1.00±0.00               | 1.00±0.00               | 1.00±0.00               | 1.00±0.00                  |
| 模型组                                                                                                                       | 6  | 0.73±0.04 <sup>a)</sup> | 1.43±0.12 <sup>a)</sup> | 1.50±0.16 <sup>a)</sup> | 0.69±0.05 <sup>a)</sup>    |
| 瑞舒伐他汀组                                                                                                                    | 6  | 0.94±0.04 <sup>b)</sup> | 1.03±0.02 <sup>b)</sup> | 1.11±0.06 <sup>b)</sup> | 1.20±0.12 <sup>b)</sup>    |
| 半夏方高剂量组                                                                                                                   | 6  | 0.98±0.05 <sup>b)</sup> | 1.04±0.03 <sup>b)</sup> | 1.16±0.09 <sup>b)</sup> | 0.88±0.05 <sup>b) c)</sup> |

注: PPAR $\gamma$ , 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ ; SREBP2, 胆固醇调节元件结合蛋白2; HMGCR, 乙酰辅酶A还原酶; CYP7A1, 细胞色素7A1。  
a) 与空白组比较,  $P<0.01$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c) 与瑞舒伐他汀组比较,  $P<0.01$ 。

表5 各组小鼠肝脏PPAR $\gamma$ 、SREBP2、HMGCR、CYP7A1 蛋白表达比较Table 5 Comparison of protein expression of PPAR $\gamma$ , SREBP2, HMGCR and CYP7A1 in liver of mice in each group /GADPH

| 组别      | 鼠数 | PPAR $\gamma$ /<br>$\bar{x} \pm s$ | SREBP2/<br>$\bar{x} \pm s$       | HMGCR/<br>$M(Q_1, Q_3)$         | CYP7A1/<br>$M(Q_1, Q_3)$        |
|---------|----|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 空白组     | 6  | 0.85 $\pm$ 0.01                    | 0.84 $\pm$ 0.02                  | 0.77 (0.77, 0.78)               | 1.07 (1.06, 1.20)               |
| 模型组     | 6  | 0.51 $\pm$ 0.03 <sup>a)</sup>      | 1.05 $\pm$ 0.07 <sup>a)</sup>    | 1.17 (1.15, 1.19) <sup>a)</sup> | 0.72 (0.71, 0.74) <sup>a)</sup> |
| 瑞舒伐他汀组  | 6  | 1.05 $\pm$ 0.02 <sup>b)</sup>      | 0.69 $\pm$ 0.09 <sup>b)</sup>    | 1.04 (1.03, 1.06) <sup>c)</sup> | 1.28 (1.28, 1.30) <sup>b)</sup> |
| 半夏方高剂量组 | 6  | 0.82 $\pm$ 0.03 <sup>b) d)</sup>   | 0.89 $\pm$ 0.03 <sup>b) d)</sup> | 1.06 (1.03, 1.06) <sup>c)</sup> | 1.28 (1.26, 1.30) <sup>b)</sup> |

注：PPAR $\gamma$ ，过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ ；SREBP2，胆固醇调节元件结合蛋白2；HMGCR，乙酰辅酶A还原酶；CYP7A1，细胞色素7A1。

a) 与空白组比较， $P < 0.01$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.01$ ；c) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；d) 与瑞舒伐他汀组比较， $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

AS的中医病机与脾虚生痰而致脉道不利相关。长期饮食肥甘厚味易伤脾，以致脾失健运，水谷精微失于输布，导致膏脂转输障碍而成血脂异常<sup>[8]</sup>。膏脂不归正化，聚而为痰，痰性黏滞胶着于脉道，久滞不散结成固定不移的有形斑块，此即为AS斑块，可导致管腔狭窄，引发重要脏器缺血性功能障碍的发生。因此，通过减少蓄积膏脂阻止动脉粥样硬化斑块的形成应重视健脾益气、化痰通络，脾气健运才能布散水谷精微，推动痰浊运化。半夏方中西洋参补气养阴、健脾宁心，黄芪益气健脾、升阳举陷，二者共奏健脾益气之功，促进脾气健运；半夏燥湿化痰；瓜蒌涤痰浊又可润肠通便，导痰下行，促痰外排而使脉道滑利；薤白味苦有顺降之性，可与瓜蒌下顺痰滞，又可同半夏共奏化痰、燥湿、散结之功。全方有补有泻，药性平和，散化痰结，又兼凉补，正对应AS胆固醇风险与慢性低度炎症反应双机制<sup>[12]</sup>。临床研究表明，半夏方加减能有效改善痰浊闭阻型冠心病患者的症状，减少中医证候积分，并有良好的调脂作用<sup>[13]</sup>。亦有体内实验证实，半夏方加减能减少ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的AS斑块面积，抑制小鼠动脉AS的形成与发展，在调脂方面主要是降低TC、TG和LDL-C水平，升高HDL-C水平<sup>[14]</sup>。

胆固醇代谢失调导致胆固醇蓄积是AS重要的发病因素。胆固醇蓄积主要有两方面原因：胆固醇合成增加，胆固醇排泄减少。本研究结果表明，经高脂饲料喂饲后，小鼠TC、TG、LDL-C水平明显上升，HDL-C、胆汁酸水平显著下降，提示胆固醇合成增加同时排泄减少，且病理结果提示，小鼠肝脏细胞出现大量脂肪空泡、脂质沉积明显增加，主动脉病理结果与此相一致，可见大量的脂质积累，并可见大量泡沫细胞聚集形成脂纹，同时内皮隆起发生变形。经药物干预后，瑞舒伐他汀组、半夏方中、高剂量组血清TG、TC、LDL-C水平及肝脏TG、

TC水平显著降低，胆汁酸水平显著升高，半夏方低剂量组血清TC、LDL-C水平显著降低，其中在降低血清TG和肝脏TC水平方面，半夏方以高剂量效果最佳，且半夏方高剂量组降低肝脏TC作用优于瑞舒伐他汀组。病理结果显示，半夏方各剂量组肝脏和主动脉脂质积累减轻，提示其能有效减少胆固醇合成，并促进胆固醇转化为胆汁酸排出体外，从而减少胆固醇蓄积，改善ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的血脂水平。基于半夏方高剂量组对血脂及胆汁酸水平、组织病理状态的改善效果最佳，并与瑞舒伐他汀效果相当，因此，后续选择半夏方高剂量组进一步探究半夏方抗AS的具体作用机制。

氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)是一类脂质代谢的重要转录调节因子，与配体结合后，可启动下游一系列参与脂质代谢的基因表达<sup>[15]</sup>。研究发现，PPAR $\gamma$ 在许多代谢性疾病中发挥重要作用，并在脂肪组织和AS斑块中高度表达，不仅能促进脂质的分化和储存，还涉及炎症相关机制，通过升高PPAR $\gamma$ 水平可能促进胆固醇逆转运、调节脂质代谢，有效发挥抗AS的作用<sup>[15-18]</sup>。SREBP2及胆固醇合成限速酶HMGCR均是调节胆固醇合成的关键因子。SREBP2前体锚定于内质网(ER)，只有当ER膜感知胆固醇含量不足时才会转运至高尔基体活化，经剪切入核与HMGCR靶基因结合并上调其转录，从而生成胆固醇<sup>[19]</sup>。研究表明<sup>[20]</sup>，PPAR $\gamma$ 作为脂质代谢动态平衡的枢纽因子，在细胞中过表达可显著减少HMGCR和SREBP2的表达水平，降低胆固醇合成。本研究证实，经高脂饲料喂饲后，小鼠血清PPAR $\gamma$  mRNA表达和蛋白水平显著降低，SREBP2、HMGCR mRNA表达和蛋白水平显著增加；而经半夏方干预后，PPAR $\gamma$  mRNA表达和蛋白水平显著增加，SREBP2、HMGCR mRNA表达和蛋白水平显著降低，提示半夏方可能通过增加PPAR $\gamma$ 表达，降低SREBP2、HMGCR表达来发挥抗AS的作用。细胞色素7A1(CYP7A1)是胆汁酸

合成代谢经典途径中最主要的限速酶,用于催化人体内近 50% 的胆固醇转化为胆汁酸排出体外<sup>[21]</sup>。研究表明, CYP7A1 缺失会导致高胆固醇血症和动脉粥样硬化前表型<sup>[22]</sup>, PPAR 对于 CYP7A1 基因有正调控作用<sup>[23]</sup>。本研究结果表明,经高脂饲料喂饲后,小鼠 CYP7A1 mRNA 表达和蛋白水平显著降低;而经半夏方干预后, CYP7A1 mRNA 表达和蛋白水平显著增加,提示半夏方可能同时通过升高 CYP7A1 水平进而提高胆固醇转化水平来发挥抗 AS 的作用。因此上述结果提示半夏方可能通过调控 PPAR $\gamma$ , 既影响 SREBP2 启动的胆固醇合成,又干预 CYP7A1 调节的胆汁酸转化,改善胆固醇蓄积状态,进而影响体内胆固醇水平,从而发挥抗 AS 的疗效。

就 AS 的中医病机而言,脾虚无力散精、津液失布、聚而为痰的过程与 HMGCR-SREBP2 调控的胆固醇生成,以及 PPAR- $\gamma$ -CYP7A1 调控的胆固醇转化为胆汁酸的机制过程颇为契合,为“从脾论治”AS 提供了探索方向。脾气亏虚无力布散,精微物质不能流通,是病邪产生的根本机制,对应于胆固醇生成的现代医学机制,即 ER 膜上胆固醇分布异常,ER 膜感知不足,以致 SREBP2 不断增加活化并上调 HMGCR,则胆固醇不断产生。脾虚津停聚而为痰,痰浊留于脉内阻塞脉道,影响津液运行及浊液代谢,加重痰浊留滞,此可对应于胆汁酸排出减少,导致体内胆固醇蓄积,引起 AS 的发生。半夏方通过健脾散结化痰之效上调 PPAR $\gamma$  水平,减少 SREBP2 活化介导的胆固醇合成,同时又能促进胆汁酸的正常转化,以增加胆固醇的外排过程,协同减少体内胆固醇水平。

综上所述,本研究认为半夏方健脾益气、化痰通络,能有效干预 AS 模型的胆固醇生成与排泄途径,从而改善主动脉 AS 病理状态,这种抗 AS 的作用可能是通过影响 PPAR $\gamma$  水平、调控 SREBP2-HMGCR 通路,同时调节 CYP7A1 水平来实现的,即通过减少胆固醇合成的同时增加胆汁酸转化来改善体内胆固醇蓄积,从而对 AS 的发生发展发挥至关重要的阻断作用。此外,半夏方通过 PPAR $\gamma$  水平来调控 SREBP2 和 CYP7A1,恰符合中医学针对脾虚痰浊所致 AS 施以健脾益气以促津布散、化痰散结以通脉络的治疗思路,但在此过程中,PPAR $\gamma$  会否对具有固醇感受器的 SCAP 发挥调控作用,以及 PPAR $\gamma$  对 SREBP2 的负调控作用是否是通过阻止 SREBP2 前体前往高尔基体活化来实现的,抑或其中涉及某种更为复杂的分子机制,目前尚未有明确

定论,今后将对此进行更深入的研究。

## 参考文献

- [1] 中国心血管病风险评估和管理指南编写联合委员会. 中国心血管病风险评估和管理指南[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(1): 4-28.
- [2] ZHANG Y, FATIMA M, HOU S, et al. Research methods for animal models of atherosclerosis (Review)[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(6): 871. doi: 10. 3892/ mmr. 2021. 12511.
- [3] LIBBY P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. Nature, 2021, 592(7855): 524-533.
- [4] GRASSI G, DEL PINTO R, AGABITI ROSEI C, et al. Reduction of high cholesterol levels by a preferably fixed-combination strategy as the first step in the treatment of hypertensive patients with hypercholesterolemia and high/very high cardiovascular risk: a consensus document by the italian society of hypertension[J]. High Blood Press Cardiovasc Prev, 2022, 29(2): 105-113.
- [5] 姚仙, 刘聪. 参芪瓜蒌薤白半夏汤在药物球囊干预不稳定型心绞痛单支罪犯血管中的应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(2): 127-130.
- [6] 刘小霞, 李婷, 李怀宇, 等. 参芪瓜蒌薤白半夏汤治疗肝肾阴虚型冠状动脉粥样硬化性心脏病合并糖尿病 50 例[J]. 环球中医药, 2019, 12(12): 1871-1874.
- [7] 刘忠贵. 参芪瓜蒌薤白半夏汤联合柴胡疏肝散治疗冠心病合并心力衰竭[J]. 中医学报, 2019, 34(2): 388-390, 403.
- [8] 贾连群, 杨关林. 动脉粥样硬化中医痰浊血瘀证候的现代生物学基础研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(1): 95-96.
- [9] GETZ GS, REARDON CA. Animal models of atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(5): 1104-1115.
- [10] 梁璐, 洪瑞云, 周敏, 等. ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化模型构建[J]. 赣南医学院学报, 2017, 37(3): 337-342, 364.
- [11] 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.
- [12] 李建军, 杨进刚. “融合”学说: 胆固醇、炎症与动脉粥样硬化的新视野[J]. 临床心血管病杂志, 2022, 38(4): 265-266.
- [13] 寇培军. 瓜蒌薤白半夏汤治疗冠心病心绞痛(痰浊痹阻)随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(8): 32-34.
- [14] LUO M, FAN R, WANG X, et al. Gualou Xiebai Banxia decoction ameliorates Poloxamer 407-induced hyperlipidemia[J]. Biosci Rep, 2021, 41(6): BSR20204216. doi: 10. 1042/ BSR20204216.
- [15] 李伟楠, 关立克. PPAR- $\gamma$  在动脉粥样硬化中的意义

- [J]. 吉林医学, 2014, 35(1): 139-141.
- [16] 张晓璐, 南亚昀, 姜希娟, 等. 中药基于 PPAR $\gamma$  抗炎防治动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(5): 1218-1221.
- [17] 晏昆, 蒙凌, 陈玉芳. PPAR $\gamma$  基因多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的相关性研究[J]. 中国现代药物应用, 2020, 14(9): 31-33.
- [18] CHAWLA A. Control of macrophage activation and function by PPARs[J]. Circ Res, 2010, 106(10): 1559-1569.
- [19] SUN LP, SEEMANN J, GOLDSTEIN JL, et al. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(16): 6519-6526.
- [20] HAN T, LV Y, WANG S, et al. PPAR $\gamma$  overexpression regulates cholesterol metabolism in human L02 hepatocytes[J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(1): 1-8.
- [21] XIA B, LIN P, JI Y, et al. Ezetimibe promotes CYP7A1 and modulates PPARs as a compensatory mechanism in LDL receptor-deficient hamsters[J]. Lipids Health Dis, 2020, 19(1): 24.
- [22] PULLINGER CR, ENG C, SALEN G, et al. Human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype[J]. J Clin Invest, 2002, 110(1): 109-117.
- [23] KIM DH, LEE JW. Tumor suppressor p53 regulates bile acid homeostasis via small heterodimer partner[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(30): 12266-12270.

### Effects of *Shenqi Gualou Xiebai Banxia Decoction* (参芪瓜蒌薤白半夏汤) on PPAR $\gamma$ , Bile Acids, and Blood Lipids in Mouse Models of Atherosclerosis

AO Yuhan, SUI Guoyuan, CAO Huimin, KONG Liang, JIA Lianqun, YANG Guanlin

Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 110032

**ABSTRACT Objective** To explore the mechanism of *Shenqi Gualou Xiebai Banxia Decoction* (参芪瓜蒌薤白半夏汤, SGXBD) in the treatment of atherosclerosis. **Methods** Thirty Apolipoprotein E gene knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) mice were randomly divided into five groups: model group, rosuvastatin group, low-, moderate-, and high-dose SGXBD, with six mice in each group. They were fed a high-fat diet to prepare for atherosclerosis model. Another six C57BL/6J wild-type mice were set as the blank group. After modeling, the low-, moderate-, and high-dose SGXBD groups were gavaged with 6.46, 12.92, and 25.84 g/(kg·d) of SGXBD, respectively. The rosuvastatin group was given 1.55 mg/(kg·d) of rosuvastatin tablets by gavage. The blank group and model group were given 0.5 ml saline by gavage. After four weeks, the total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in the serum of each group were detected, as well as TC and TG in the liver. The serum bile acid level was detected by enzyme cycling colorimetry. The mRNA and protein expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) in the liver were detected by real-time RT-PCR and Western blot. **Results** Compared with the blank group, the model group showed significant increases in serum TG, TC, and LDL-C levels, and significant decreases in HDL-C and bile acid levels; the levels of TG and TC in the liver, as well as the expression of SREBP2 and HMGCR proteins and mRNA in the liver significantly increased, while the expression of PPAR $\gamma$  and CYP7A1 proteins and mRNA significantly decreased (all  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the rosuvastatin group and high-dose SGXBD group showed significant decreases in serum TG, TC, and LDL-C levels and liver TG and TC levels, and significant increases in bile acid levels; the expression of PPAR $\gamma$  and CYP7A1 proteins and mRNA increased, while the expression of SREBP2 and HMGCR proteins and mRNA decreased; the low-dose SGXBD group showed significant decreases in serum TC and LDL-C levels and liver TC level ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the rosuvastatin group, the low-dose SGXBD group had a significantly higher liver TC level, while the high-dose SGXBD group had a significantly lower liver TC level, CYP7A1 mRNA level, and PPAR $\gamma$  protein expression level, and a significantly higher SREBP2 protein expression level ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the low- and moderate-dose groups, the high-dose SGXBD group had significantly lower serum TG and liver TC levels ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** SGXBD may improve blood lipid levels and exhibit anti-atherosclerotic effects by regulating the protein level of PPAR $\gamma$  and simultaneously affecting the synthesis of liver cholesterol and the conversion of cholesterol to bile acids.

**Keywords** atherosclerosis; *Shenqi Gualou Xiebai Banxia Decoction* (参芪瓜蒌薤白半夏汤); PPAR $\gamma$ ; cholesterol metabolism; treatment from spleen

(收稿日期: 2023-06-21; 修回日期: 2023-10-14)

[编辑: 王利芬]