

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.06.012

茺蔚丸及其拆方对动脉粥样硬化模型小鼠主动脉斑块及主动脉组织 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路的影响

宋玮, 张钟艺, 王楷, 沈涛✉

成都中医药大学, 四川省成都市金牛区十二桥路37号, 610075



[摘要] **目的** 探讨茺蔚丸治疗动脉粥样硬化的可能作用机制及配伍意义。**方法** 13只正常C57BL/6J小鼠作为空白组, 40只同品系的ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、黄连组、吴茺蔚组、茺蔚丸组各10只。除空白组外, 其余各组均采用高脂饲料连续12周喂养制备动脉粥样硬化模型。造模后黄连组给予黄连药液143.34 mg/(kg·d)灌胃, 吴茺蔚组给予吴茺蔚药液301.78 mg/(kg·d)灌胃, 茺蔚丸组给予茺蔚丸药液261.07 mg/(kg·d)灌胃, 空白组及模型组每日给予0.3 ml生理盐水灌胃, 各组小鼠均灌胃12周。各组小鼠采用生化法检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、空腹血糖水平; 采用ELISA检测血清中空腹胰岛素, 并计算胰岛素抵抗指数; 采用HE染色观察小鼠主动脉组织、肝脏、附睾脂肪的病理学形态变化, 油红O染色观察小鼠主动脉组织脂质沉积情况, 并计算主动脉斑块面积占比、主动脉红染脂质面积占比、非酒精性脂肪肝活动性积分(NAS)评分、附睾脂肪横截面面积; 采用ELISA检测血清中白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素18(IL-18)水平; 采用Western blot检测主动脉组织核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族吡啶结构域蛋白3(NLRP3)蛋白表达; 采用免疫荧光法检测含CARD结构域的凋亡相关颗粒样蛋白(ASC)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)蛋白表达; 采用实时荧光PCR法检测小鼠主动脉组织NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 mRNA表达量。**结果** 与空白组比较, 模型组血清TC、TG、LDL-C升高, 空腹胰岛素降低, 空腹血糖、胰岛素抵抗指数升高($P<0.01$); 主动脉斑块增大, 肝脏脂质沉积增多, 附睾脂肪细胞体积变大, 主动脉斑块面积占比及红染脂质面积占比增加, 肝脏NAS评分升高, 附睾脂肪横截面面积变大, 血清IL-1 β 、IL-18升高, 主动脉组织NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白及mRNA表达水平升高($P<0.01$)。与模型组比较, 黄连组、吴茺蔚组、茺蔚丸组血清TC、TG、LDL-C降低, 空腹胰岛素升高, 空腹血糖、胰岛素抵抗指数降低($P<0.01$); 主动脉斑块明显缩小, 肝脏脂质沉积减轻, 附睾脂肪细胞体积缩小, 主动脉斑块面积占比及红染脂质面积占比减小, 肝脏NAS评分降低, 附睾脂肪横截面面积减小, 血清IL-1 β 、IL-18降低, 主动脉组织NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白及mRNA表达水平降低($P<0.01$), 且茺蔚丸组各指标改善优于黄连组、吴茺蔚组($P<0.01$)。**结论** 茺蔚丸对动脉粥样硬化斑块有较好的治疗作用, 且黄连与吴茺蔚配伍具有协同作用, 其作用机制可能与调节主动脉NLRP3/ASC/Caspase-1信号通路, 从而减轻血管炎症反应有关。

[关键词] 动脉粥样硬化; 主动脉斑块; 茺蔚丸; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族吡啶结构域蛋白3; 含CARD结构域的凋亡相关颗粒样蛋白; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶1

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是由于胆固醇、脂肪及其他物质在动脉内、外壁积聚形成斑

块的病理过程, 是冠心病、外周血管疾病、脑血管疾病的病变基础, 其常见的并发症为心肌梗死和中风^[1]。据2022年统计数据显示, 我国心血管病患病人数高达3.3亿, 其中冠心病患者约有1139万^[2]。AS发病机制复杂, 其中炎症反应是目前AS发病机

基金项目: 国家自然科学基金(81973743); 四川省科技计划项目(2022YFS0381, 2020JDR0103)

✉ 通讯作者: st1963@263.net

制以及防治机制研究的重点领域^[3]。细胞焦亡作为一种新型的促炎细胞程序性死亡方式，其关键步骤是核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族吡啶结构域蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体的活化^[4]，而 AS 各阶段均存在血管壁细胞焦亡。NLRP3 通过识别病原相关分子模式与含 CARD 结构域的凋亡相关颗粒样蛋白 (ASC) 结合，并招募含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 前体形成蛋白质复合体，Caspase-1 在这一蛋白复合体中活化，促使机体中白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 18 (IL-18) 等促炎细胞因子的产生，促进血管炎症反应，进而加重 AS^[5]。因此，NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路在 AS 的发病中具有重要作用。

茺莢丸出自《太平圣惠方》，方中黄连、吴茺莢等比配伍，黄连味苦而性寒，吴茺莢味辛苦而性热，二药以辛味药之宣发与苦味药之降逆相结合，具有辛开苦降、消膏降脂之效^[6]。临床研究^[7]表明，黄连、吴茺莢配伍能够减轻炎症水平，并具有调节糖脂代谢的作用。本课题组前期研究^[8-9]证实，茺莢丸全方能够通过调控巨噬细胞极化，抑制促炎因子，进而缩小 AS 斑块面积。本研究在前期研究的基础上，从 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路角度探讨茺莢丸及其拆方对 ApoE^{-/-}小鼠 AS 动脉斑块的影响，进一步探讨茺莢丸“辛开”与“苦降”方证相应组方结构与配伍意义，为中医临床 AS 辨证立法和选方用药提供实验依据。本实验通过成都中医药大学动物实验伦理委员会审查 (批件号：2022KL-079)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性健康 C57BL/6J 品系小鼠 13 只，同品系的 ApoE^{-/-}雄性小鼠 40 只，6 周龄，体质量 (23 $\pm$ 2) g，购自成都达硕实验动物有限公司，实验动物合格证号：SCXY (川) 2020-034。动物饲养于成都中医药大学动物中心 SPF 级动物房，使用许可证编号：SYXK (川) 2019-049，温度 22~25℃，湿度 50%~70%，12 h 明暗循环，自由饮水进食。基础饲料及高脂饲料均购自江苏协同医药生物工程有限公司，合格证号：SCXK (苏) 2020-0018。高脂饲料由 78.85% 基础饲料、21% 脂肪、0.15% 胆固醇构成，所有饲料均经钴-60 γ 射线辐照灭菌处理。

1.2 药物

茺莢丸组成：黄连 5 g，吴茺莢 5 g；拆方分为黄连组 (黄连 5 g)、吴茺莢组 (吴茺莢 5 g)。以上药材购自四川新绿色药业科技发展有限公司，黄连批号 190901，吴茺莢批号 191001。煎煮方法：称取中药后加入 1000 ml 水浸泡 1 h，然后煎煮 40 min 过滤，获得第一遍药液；随后滤渣加入 900 ml 水继续煎煮 30 min，合并两次滤液后放入真空冻干机中制作冻干粉。最终 100 g 茺莢丸获得 17.21 g 冻干粉；100 g 黄连获得 9.45 g 冻干粉；100 g 吴茺莢获得 19.89 g 冻干粉。冻干粉密封置于 -20℃ 冰箱备用。

1.3 主要试剂及仪器

总胆固醇 (TC) 试剂盒 (批号：A111-1-1)、甘油三酯 (TG) 试剂盒 (批号：A110-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 试剂盒 (批号：A113-1-1)、血糖 (GLU) 测定试剂盒 (批号：F006-1-1)，南京建成生物科技有限公司；戊巴比妥钠 (批号：20180716)，天津市大茂化学试剂厂；苏木素-伊红染液 (HE，批号：G1004)、RIPA 裂解液 (批号：G2002)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号：BL521A)、4% 多聚甲醛 (批号：G1101-500ML)、油红染液 (批号：G1016)，武汉塞维爾生物科技有限公司；IL-1 β 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒 (批号：ab283822)、IL-18 ELISA 试剂盒 (批号：ab245626)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI，批号：ab182981)、羊抗兔 IgG 二抗 (批号：ab150077)、GAPDH 抗体 (批号：ab37168)，美国 Abcam 公司；血清胰岛素 ELISA 试剂盒 (批号：MM-0587R1)，江苏酶免实业有限公司；NLRP3 抗体 (批号：00081002)、ASC 抗体 (批号：00043354)、Caspase-1 抗体 (批号：00080438)，美国 Proteintech 公司；总 RNA 提取试剂盒 (批号：R220901)，成都福际生物技术有限公司；iScript[™] cDNA 合成试剂盒 (批号：221010-A4)、Sso Advanced[™] Universal SYBR[®] Green Supermix (批号：221010-A5)，成都蓉为基因生物科技有限公司。

Cool Safe110-4 型真空冻干机 (丹麦 Scanlaf 公司)；BS-220 型全自动生化分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子有限公司)；EG1150C 型包埋机、SM2000R 型石蜡滑动式切片机 (德国 Leica 公司)；Filter Max F3 型酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)；Allegra X-15R 型医用离心机 (美国 Beckman Coulter 公司)；PIDRed 96 型聚合酶链式反应 (PCR) 扩增仪 (德国 Biometra 公司)；ECLIPSE C1 型正置荧光

显微镜(日本尼康公司);KZ-IH-F型高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司);HT-300型垂直电泳槽及组件(合肥雨泽生物科技有限公司);VO-53型真空干燥机(上海泰坦科技股份有限公司);Nano Drop2000C型超微量紫外分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司);Chemi-Scope 6100型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);101-3B型烤箱(绍兴市上虞区沪越仪器设备厂)。

1.4 分组、模型制备及给药

适应性喂养1周后,13只C57BL/6J小鼠作为空白组,以基础饲料喂养。采用随机数字表法将同品系的40只ApoE^{-/-}小鼠分为模型组、黄连组、吴茱萸组、茱萸丸组,每组10只。除空白组外,其余各组均采用高脂饲料喂养诱导AS动物模型^[10],每天2次投喂(上午8:00,下午16:00),自由饮水及活动,连续12周。于12周末采用随机数字表法选取空白组、黄连组、吴茱萸组、茱萸丸组ApoE^{-/-}小鼠各1只进行模型验证。若ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块形成,可以判定为AS模型成功^[11]。黄连组、吴茱萸组、茱萸丸组ApoE^{-/-}小鼠予以油红O染色观察到主动脉内膜较空白组明显增厚,内壁附着大量斑块,泡沫细胞浸润、堆积、部分破裂情况可见,血管内皮细胞脱落明显,在内膜和中膜可见较多的炎性细胞浸润,故判定AS造模成功。造模后模型组剩余10只小鼠,黄连组、吴茱萸组、茱萸丸组各剩余9只小鼠。第13周开始将冻干粉加无菌蒸馏水配制混悬液,以60 kg成人每日治疗剂量10 g/d为基准,并按照人与小鼠体表面积折算的等效剂量表^[12]换算,黄连组、吴茱萸组、茱萸丸组灌胃给药剂量分别为143.34、301.78、261.07 mg/(kg·d)。同时空白组、模型组小鼠予0.3 ml生理盐水灌胃,每日1次,各组小鼠均灌胃12周。

1.5 取材

各组小鼠最后一次灌胃结束后,禁食不禁水12 h,予以1%戊巴比妥钠(0.3 ml/100 g)腹腔注射进行麻醉,采用摘眼球取血,血液室温静置2 h后,予以4℃、3000 r/min、离心25 min,离心半径10 cm。用移液器抽取上层血清,置于超低温冰箱-80℃冻存。将采集完血液标本的小鼠脱椎处死,剪取完整肝脏及附睾脂肪,用生理盐水冲洗,滤纸吸干表面水分后置于冰块上。剪开胸骨,暴露心脏,1 ml注射器穿刺左心室注入磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗主动脉后完整分离,在冰上剪为4小段,

其中1段主动脉组织用4%多聚甲醛固定,用于制作石蜡切片,3段主动脉组织于液氮速冻,用于冰冻切片、ELISA及实时荧光PCR检测。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 血清TC、TG、LDL-C含量测定 取上述制备好的血清样本各100 μl,严格按照试剂盒说明书操作,采用全自动生化分析仪检测各组小鼠血清中TC、TG、LDL-C含量。

1.6.2 空腹血糖、空腹胰岛素及胰岛素抵抗测定 采用全自动生化分析仪检测小鼠空腹血糖水平。严格按照ELISA试剂盒说明书操作,在450 nm波长下检测各孔吸光度并绘制曲线,分析上清液中空腹胰岛素水平,并计算胰岛素抵抗指数。胰岛素抵抗指数=空腹血糖×空腹胰岛素÷22.5^[13]。

1.6.3 主动脉、肝脏及附睾脂肪组织病理形态观察 将小鼠主动脉、肝脏及附睾脂肪组织放入4%多聚甲醛固定24 h,用梯度乙醇及二甲苯进行脱水并透明,石蜡包埋。冷却后切取5 μm左右切片,40℃水温摊片,载玻片捞出并于60℃烘烤,之后二甲苯浸泡。梯度乙醇脱蜡至水,苏木素染色后,盐酸乙醇分化,冲洗后返蓝,再进行伊红染色,脱水封片,镜下观察。计算主动脉斑块面积占比,主动脉斑块面积占比(%)=斑块面积/管腔面积×100%^[14]。根据非酒精性脂肪肝活动性积分(NAS)^[15]对肝脏HE染色进行半定量分析。对附睾脂肪细胞进行形态计量:每只小鼠40倍物镜随机数字表法选取5张显微镜照片,使用Image-Pro Plus 6.0分析系统测量附睾脂肪横截面面积。将冰冻主动脉切片晾干,置于异丙醇浸泡5 min,油红O染液孵育10 min,分化后用苏木素复染2 min,冲洗,少许甘油封片,于显微镜下观察和摄片,用Image-Pro Plus 6.0计算主动脉红染脂质面积占比。主动脉红染脂质面积占比(%)=阳性染色面积/横截面总面积×100%^[16]。

1.6.4 ELISA检测血清中IL-1β、IL-18含量 严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作。在450 nm波长下检测各孔吸光度并绘制曲线,分析上清液中IL-1β、IL-18水平。

1.6.5 Western blot检测小鼠主动脉中NLRP3蛋白表达 采用随机数字表法每组选取3只小鼠主动脉组织25 mg进行蛋白提取,使用BCA测定各组总蛋白浓度,使用双蒸水将3只小鼠主动脉组织总蛋白提取液配制同一浓度,进行变性处理,根据目的蛋白分子量制胶,蛋白上样电泳,PVDF膜转膜,使用NLRP3(1:1000)孵育过夜(4℃摇床),

二抗（1：10 000）孵育 2 h（4℃摇床），封闭后直接进行曝光，使用 Image J 1.44 软件对条带进行测量和分析。

1.6.6 免疫荧光检测 ASC、Caspase-1 蛋白表达

采用随机数字表法每组选取 6 个石蜡标本。采用切片机将组织切成 5 μm 厚的薄片，在温水中将组织展平后捞在防脱载玻片上，60℃烘烤切片至少 2 h，脱蜡至水，抗原修复，血清封闭后按 1：100 滴加 ASC 和 Caspase-1 抗体，4℃过夜，按 1：2000 滴加二抗，室温 1 h，按 1：7000 滴加 DAPI，染色 15 min。封片，荧光显微镜下观察并拍照记录，用 Image pro plus 6.0 软件进行分析。

1.6.7 实时荧光 PCR 检测主动脉 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA 表达 采用随机数字表法每组选取 6 只小鼠主动脉组织 20 mg，采用总 RNA 提取试剂盒提取组织中总 RNA，采用超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度，测定 OD260 nm/OD280 nm、OD260 nm/OD230 nm 的值。采用 iScript™ cDNA 合成试剂盒将 RNA 逆转录为模板 cDNA。采用 Sso Advanced™ Universal SYBR® Green Supermix 试剂盒进行 qPCR 反应。反应条件如下：预变性 95℃ 5 min，变性 95℃ 15 s，退火及延伸 60℃ 1 min，循环 40 次后，收集荧光信号。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成，NLRP3：上游 CTCGTCACCATGGGTCTGCT，下游 AACG-GACACTCGTCATCTTCA，产物长度 123 bp；ASC：上游 GTCTTAGGGGCGGAAACCAA，下游 CCGCG-GTCACCTTTTACTCT，产物长度 178 bp；Caspase-1：上游 GGACCCTCAAGTTTGGCCCT，下游 AACTT-GAGCTCCAACCCTCG，产物长度 144 bp；IL-1β：上游 GCAGTGTTTTCAGCTGGG，下游 CACACCA-CAGGGGAGAAGTG，产物长度 196 bp；IL-18：上游 TGCCACCTTTTGACAGTGAGT，下游 AAGGTC-CACGGGAAAGACAC，产物长度 220 bp；β-actin：上游 TGTTACCAACTGGGACGAC，下游 GGGGT-GTTGAAGGTCTCAAA，产物长度 165 bp。计算结果以 β-actin 为内参照物，采用 2^{-ΔΔCT} 法计算相关分子 mRNA 相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据，计量资料均符合正态分布，以均值±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示。方差齐时多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 法。方差不齐时多组间比较采用 Welch 检验，组间两两比较采用 Kruskal-Wallis 秩和

检验。*P*＜0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 TG、TC、LDL-C 含量比较

表 1 示，与空白组比较，模型组小鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平升高（*P*＜0.01）；与模型组比较，黄连组、吴茱萸组及茱萸丸组 TG、TC、LDL-C 水平降低（*P*＜0.01）；与茱萸丸组比较，黄连组、吴茱萸组 TG、TC、LDL-C 水平升高（*P*＜0.01）。

表 1 各组小鼠血清 TG、TC、LDL-C 含量比较

Table 1 Effects of serum TG, TC and LDL-C in each group of mice (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	TG	TC	LDL-C
空白组	10	1.35±0.14	3.33±0.16	2.24±0.60
模型组	10	5.56±0.23 ^{a)}	9.44±0.17 ^{a)}	8.92±0.37 ^{a)}
黄连组	9	4.36±0.26 ^{b) c)}	6.67±0.57 ^{b) c)}	6.52±0.56 ^{b) c)}
吴茱萸组	9	4.68±0.12 ^{b) c)}	7.53±0.32 ^{b) c)}	7.32±0.44 ^{b) c)}
茱萸丸组	9	3.43±0.20 ^{b)}	5.84±0.13 ^{b)}	5.05±0.12 ^{b)}

注：TG，甘油三酯；TC，总胆固醇；LDL-C；低密度脂蛋白胆固醇。

a) 与空白组比较，*P*＜0.01；b) 与模型组比较，*P*＜0.01；c) 与茱萸丸组比较，*P*＜0.01。

2.2 各组小鼠空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数比较

表 2 示，与空白组比较，模型组小鼠空腹血糖含量、胰岛素抵抗指数升高，空腹胰岛素含量降低（*P*＜0.01）；与模型组比较，黄连组、吴茱萸组及茱萸丸组空腹血糖含量、胰岛素抵抗指数均明显下降，空腹胰岛素含量升高（*P*＜0.01）；与茱萸丸组比较，黄连组、吴茱萸组空腹血糖含量、胰岛素抵抗指数升高，空腹胰岛素含量降低（*P*＜0.01）。

表 2 各组小鼠空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数比较

Table 2 Comparison of fasting blood glucose, fasting blood insulin and insulin resistance index of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	空腹血糖 /mmol·L ⁻¹	空腹胰岛素 /mU·L ⁻¹	胰岛素抵抗指数
空白组	10	4.92±0.35	16.91±0.10	3.69±0.28
模型组	10	8.35±0.17 ^{a)}	15.34±0.12 ^{a)}	5.82±0.33 ^{a)}
黄连组	9	6.84±0.15 ^{b) c)}	16.05±0.26 ^{b) c)}	4.87±0.25 ^{b) c)}
吴茱萸组	9	7.27±0.20 ^{b) c)}	15.97±0.22 ^{b) c)}	5.06±0.31 ^{b) c)}
茱萸丸组	9	5.42±0.12 ^{b)}	16.75±0.29 ^{b)}	4.03±0.22 ^{b)}

注：a) 与空白组比较，*P*＜0.01；b) 与模型组比较，*P*＜0.01；c) 与茱萸丸组比较，*P*＜0.01。

2.3 各组小鼠主动脉、肝脏、附睾脂肪组织病理学结果比较

图 1 示，空白组小鼠主动脉血管壁结构完整，未见 AS 斑块，无红染，肝细胞索和肝小叶结构完

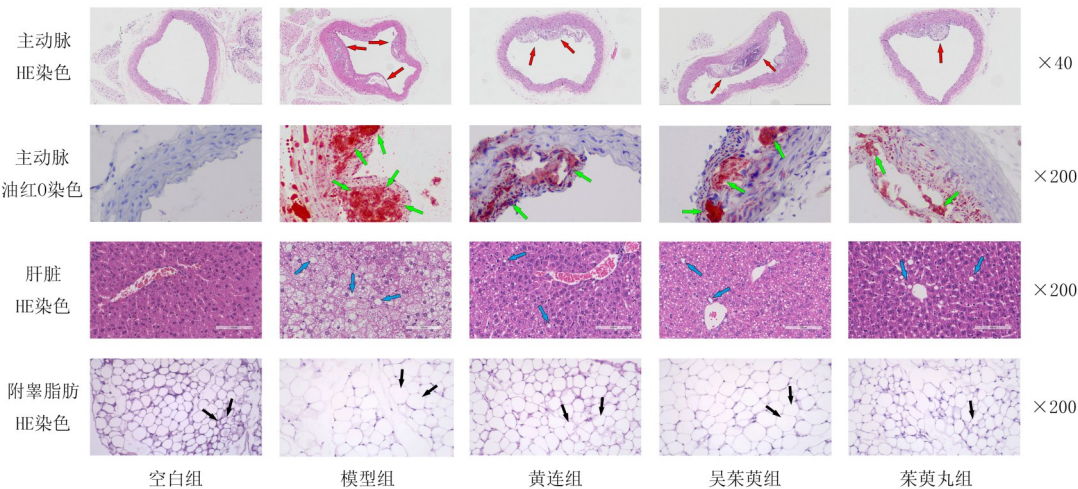
整，肝细胞无明显脂肪变性和坏死，附睾脂肪细胞结构完整，界限清晰。模型组小鼠血管内壁不平整，可见明显粥样斑块，斑块内可见炎性细胞浸润，斑块附着处血管内膜明显增厚，大片红染，肝组织出现大泡性和小泡性脂肪变性，伴有炎症细胞浸润、气球样变性和细胞坏死，附睾脂肪细胞形态膨大，形态不甚规则，细胞相交处发生融合，有融合成大细胞的趋势。与模型组比较，黄连组、吴茱萸组及茱萸丸组血管内壁欠光滑，可见少量粥样斑块，炎性细胞浸润程度均呈现不同程度的改善，斑块面积和脂滴均明显减少，肝细胞均有不同程度的脂肪细胞浸润，且脂肪变性程度和脂肪空泡数量均呈不同程度减少，附睾脂肪细胞不同程度减小。与茱萸丸组比较，黄连组、吴茱萸组 AS 斑块厚度有所增加，斑块内柳叶状胆固醇结晶和脂肪空泡增多，斑块面积均增大，肝细胞脂肪样变及细胞肿胀加重，附睾脂肪细胞及细胞间隙增大，间隙中炎性

浸润增多。

表 3 示，与空白组比较，模型组小鼠主动脉斑块面积占比、主动脉红染脂质面积占比、肝脏 NAS 评分、附睾脂肪横截面面积显著增大 ($P<0.01$)；与模型组比较，黄连组、吴茱萸组及茱萸丸组主动脉斑块面积占比、主动脉红染脂质面积占比、肝脏 NAS 评分、附睾脂肪横截面面积均减小 ($P<0.01$)；与茱萸丸组比较，黄连组、吴茱萸组的主动脉斑块面积占比、主动脉红染脂质面积占比、肝脏 NAS 评分、附睾脂肪横截面面积均显著增大 ($P<0.01$)。

2.4 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量比较

表 4 示，与空白组比较，模型组血清中 IL-1 β 、IL-18 含量升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，黄连组、吴茱萸组及茱萸丸组血清中 IL-1 β 、IL-18 含量均不同程度降低 ($P<0.01$)，且茱萸丸组血清炎性因子 IL-1 β 、IL-18 含量明显低于黄连组、吴



注：红色箭头指示主动脉粥样斑块；绿色箭头指示主动脉脂质沉积；蓝色箭头指示大泡性和小泡性脂肪变性；黑色箭头指示脂肪细胞。

图 1 各组小鼠主动脉、肝脏、附睾脂肪组织病理变化

Figure 1 Pathological changes of aorta, liver and epididymis tissue of mice in each group

表 3 各组小鼠主动脉斑块病变程度、肝脏 NAS 评分、附睾脂肪横截面面积比较

Table 3 Comparison of aortic plaque area, liver NAS score, and epididymal fat area among groups of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	主动脉斑块病变程度/%		肝脏 NAS 评分/分	附睾脂肪横截面面积/ μm^2
		主动脉斑块面积占比	主动脉红染脂质面积占比		
空白组	10	—	—	1.17 $\pm$ 0.76	1772.33 $\pm$ 34.51
模型组	10	30.09 $\pm$ 1.21 ^{a)}	33.43 $\pm$ 1.36 ^{a)}	4.68 $\pm$ 0.82 ^{a)}	5371.46 $\pm$ 56.33 ^{a)}
黄连组	9	16.02 $\pm$ 0.32 ^{b) c)}	18.92 $\pm$ 2.25 ^{b) c)}	3.11 $\pm$ 0.67 ^{b) c)}	2529.93 $\pm$ 66.24 ^{b) c)}
吴茱萸组	9	19.52 $\pm$ 0.66 ^{b) c)}	20.66 $\pm$ 0.74 ^{b) c)}	3.50 $\pm$ 0.56 ^{b) c)}	3104.60 $\pm$ 58.62 ^{b) c)}
茱萸丸组	9	10.17 $\pm$ 0.58 ^{b)}	12.84 $\pm$ 1.06 ^{b)}	2.83 $\pm$ 0.65 ^{b)}	2005.18 $\pm$ 35.04 ^{b)}

注：“—”，表示未见到；NAS，非酒精性脂肪肝活动性积分。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与茱萸丸组比较， $P<0.01$ 。

茺蔚组 ($P<0.01$)。

表4 各组小鼠血清IL-1β、IL-18含量比较

Table 4 Comparison of serum IL-1β and IL-18 contents of mice in each group (ng/L, $\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	IL-1β	IL-18
空白组	10	13.57±2.58	5.35±0.66
模型组	10	58.28±3.27 ^{a)}	30.83±3.46 ^{a)}
黄连组	9	32.76±4.34 ^{b) c)}	18.59±2.66 ^{b) c)}
吴茺蔚组	9	39.55±3.24 ^{b) c)}	21.66±2.78 ^{b) c)}
茺蔚丸组	9	26.01±1.08 ^{b)}	13.59±3.47 ^{b)}

注：IL-1β，白细胞介素1β；IL-18，白细胞介素18。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
c) 与茺蔚丸组比较， $P<0.01$ 。

2.5 各组小鼠主动脉组织中NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达比较

表5示，与空白组比较，模型组主动脉组织中NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，黄连组、吴茺蔚组及茺蔚丸组主动脉组织中NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平低于黄连组、吴茺蔚组 ($P<0.01$)。各组NLRP3蛋白电泳图见图2。各组主动脉组织中ASC、Caspase-1蛋白表达免疫荧光图见附图1、附图2 (请扫描本文二维码获取)。

2.6 各组小鼠主动脉组织NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA表达比较

表6示，与空白组比较，模型组小鼠主动脉组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA表达显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，黄连组、吴茺蔚组及茺蔚丸组主动脉组织中NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA表达均有不同程度降低，且茺蔚丸组各mRNA表达明显低于黄连组、吴茺蔚组 ($P<0.01$)。

表6 各组小鼠主动脉组织NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA表达比较

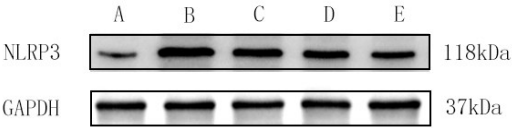
Table 6 Comparison of mRNA expression of NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1β and IL-18 in aorta of mice in each group ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	NLRP3	ASC	Caspase-1	IL-1β	IL-18
空白组	6	0.29±0.05	0.19±0.05	0.36±0.02	0.31±0.07	0.28±0.04
模型组	6	1.12±0.10 ^{a)}	0.91±0.01 ^{a)}	1.01±0.02 ^{a)}	1.12±0.10 ^{a)}	1.09±0.08 ^{a)}
黄连组	6	0.76±0.09 ^{b) c)}	0.42±0.06 ^{b) c)}	0.71±0.10 ^{b) c)}	0.83±0.06 ^{b) c)}	0.64±0.03 ^{b) c)}
吴茺蔚组	6	0.88±0.15 ^{b) c)}	0.49±0.04 ^{b) c)}	0.80±0.14 ^{b) c)}	0.92±0.08 ^{b) c)}	0.88±0.04 ^{b) c)}
茺蔚丸组	6	0.54±0.04 ^{b)}	0.37±0.04 ^{b)}	0.59±0.09 ^{b)}	0.55±0.02 ^{b)}	0.50±0.07 ^{b)}

注：NLRP3，核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族吡啶结构域蛋白3；ASC，含CARD结构域的凋亡相关颗粒样蛋白；Caspase-1，含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶1；IL-1β，白细胞介素1β；IL-18，白细胞介素18。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与茺蔚丸组比较， $P<0.01$ 。

表5 各组小鼠主动脉组织中NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达比较

Table 5 Comparison of NLRP3, ASC, Caspase-1 protein expression in aorta tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)			
组别	NLRP3/GAPDH	ASC	Caspase-1
空白组	0.37±0.07 (3)	0.18±0.09 (6)	0.23±0.24 (6)
模型组	1.78±0.16 ^{a)} (3)	1.85±0.21 ^{a)} (6)	1.96±0.55 ^{a)} (6)
黄连组	1.16±0.04 ^{b) c)} (3)	1.02±0.14 ^{b) c)} (6)	0.81±0.70 ^{b) c)} (6)
吴茺蔚组	1.05±0.14 ^{b) c)} (3)	1.26±0.33 ^{b) c)} (6)	1.13±0.24 ^{b) c)} (6)
茺蔚丸组	0.53±0.08 ^{b)} (3)	0.63±0.05 ^{b)} (6)	0.45±0.11 ^{b)} (6)

注：NLRP3，核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族吡啶结构域蛋白3；ASC，含CARD结构域的凋亡相关颗粒样蛋白；Caspase-1，含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶1；() 中为鼠数。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
c) 与茺蔚丸组比较， $P<0.01$ 。



注：NLRP3，核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族吡啶结构域蛋白3；A，空白组；B，模型组；C，黄连组；D，吴茺蔚组；E，茺蔚丸组。
图2 各组小鼠主动脉组织中NLRP3蛋白电泳图
Figure 2 Electrophoresis of NLRP3 protein in aorta of mice in each group

3 讨论

中医学认为，AS病在血脉，根在脏腑^[17]。脾失健运，水津不布，精化为浊，导致膏脂运化输布障碍，脂浊停聚，输于血脉，成为“浊脂”，壅积脉道，浸淫脉络，脉络与痰瘀相搏，结聚为有形且固定不移之斑块。国医大师阮士怡将AS斑块与中医有形实邪“积证”相结合，创新性提出“脉中积”概念，不仅体现出沉积于血脉的发病位置，还概括了“脾胃壅遏，浊伏于脉”的病理机制^[18]。

因此,升清降浊,调畅中焦气机,恢复脾胃升降是防治 AS 的关键。茺莢丸由黄连、吴茺莢组成,二者一苦一辛、一降一升,是辛开苦降的代表组合。《临证指南医案》中就有“辛以开之,苦以降之”的论点,认为辛苦合用则“苦能驱热除湿,辛能开气宣浊”。通过辛开苦降治法健中助运,调畅气机,导浊下行,充分发挥“气行-津行-脂行”^[19]之效,以此防治 AS。基于此,本研究从苦辛相合的茺莢丸以及黄连、吴茺莢单味药物角度,探讨茺莢丸治疗 AS 的可能作用机制。

ApoE^{-/-}小鼠是 AS 研究的经典动物模型,可在自然膳食的情况下形成严重的高脂血症,并自发形成纤维斑块和复合斑块,动脉受损严重程度方面有类人的特征,且雄性高于雌性^[20],故本实验选用雄性 ApoE^{-/-}小鼠作为研究 AS 的动物模型。血脂水平与 AS 病变程度密切相关,因脂质异常会造成血液黏度上升,其可附着于血小板与红细胞表面,增加细胞间黏附性,而红细胞聚集性增加,则导致血流缓慢,引起主动脉根部脂质积聚,炎性细胞汇聚,从而诱发炎症,加速 AS 的形成^[21]。研究^[22]表明,血清 TG 增高会促进血游离脂肪酸的分泌,加速细胞自身的氧化代谢,使机体葡萄糖代谢能量供应不足,减少胰岛素分泌。本研究结果显示,与模型组比较,茺莢丸及其拆方组能够有效降低小鼠血清 TC、TG、LDL-C、空腹血糖及胰岛素抵抗指数,升高空腹胰岛素含量,提示茺莢丸及其拆方组均能够有效降低血清血脂、血糖水平,达到化浊降脂的目的,且茺莢丸组血脂、血糖水平低于拆方组,说明黄连与吴茺莢配伍后降血糖、降血脂效果更好,全方优于拆方给药。本研究组织病理学结果也佐证了此结论,茺莢丸能够有效减轻模型小鼠主动脉的粥样斑块沉积,显著降低泡沫细胞及炎性细胞聚集数量,肝脏脂质沉积减轻,脂滴减少,附睾脂肪细胞体积减小,主动脉斑块面积占比、主动脉红染脂质面积占比、肝脏 NAS 评分、附睾脂肪横截面面积减小,其作用优于拆方组。由此可见,单用黄连或单用吴茺莢均达不到茺莢丸的效果,二者协同增效、相辅相成,属于相须配伍。

NLRP3 炎症小体是一种与慢性低度炎症反应相关的大分子复合物,主要由 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 组成^[23]。其中 NLRP3 为一个蛋白复合体的支架,ASC 是 NLRP3 和 Caspase-1 之间的连接体,并参与 Caspase-1 的活化^[24]。NLRP3 炎症小体作为炎症和氧化应激通路的上游调控因子,是炎症-免疫的桥

梁,参与了机体众多炎症性疾病的发生、发展过程。正常情况下,NLRP3 处于活性抑制状态,当机体受到微生物产物、内源性分子等刺激后,通过 ACS 衔接 Caspase-1 前体被激活,并介导 NLRP3 激活 Caspase-1^[25]。Caspase-1 作为炎症的主要介导者,其被激活后募集、激活其他免疫细胞,切割 IL-18、IL-1 β 等前体,使前体转化为活性形式的促炎因子 IL-18、IL-1 β 等,激活下游炎性通路,产生炎症级联反应^[26]。因此,抑制 NLRP3 炎症小体相关通路,能够抑制下游炎性通路的级联放大,从而改善相关炎症性疾病的进展及预后。IL-18、IL-1 β 均是 NLRP3 炎症小体活化后产生的主要促炎分子,在 NLRP3 炎症小体通路被激活后表达均增加^[27]。本实验结果显示,模型组较空白组 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白及 mRNA 的表达显著上升,促炎因子 IL-18、IL-1 β 水平显著增加,经茺莢丸全方干预后 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白及 mRNA 表达显著下降,促炎因子 IL-18、IL-1 β 水平明显下降,提示茺莢丸降低小鼠血脂、血糖水平,改善炎症反应,缩小主动脉斑块的作用机制可能与抑制 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路及其下游炎性因子 IL-18、IL-1 β 有关。茺莢丸拆方干预后相关蛋白及炎性因子表达水平虽有所下降,但均低于全方组,提示黄连、吴茺莢这两味药协同配伍运用疗效更佳。

综上所述,黄连、吴茺莢两药成方配伍后,不仅能保留单味药物本身促进小鼠 AS 斑块面积缩小的作用,而且能相辅相成,增强疗效,改善主动脉组织的炎性浸润,其机制可能与抑制主动脉 NLRP3/ASC/Caspase-1 炎症信号通路的活性有关。本研究不足之处在于 NLRP3 作为炎性传感器还受到上游信号的调控,茺莢丸对其上游信号的调控仍有待进一步研究;且本研究未能明确茺莢丸治疗 AS 的最佳有效剂量,后期实验还需进一步探讨不同剂量的茺莢丸调控炎症小体 NLRP3 信号通路的量效关系。

参考文献

- [1]安冬青,吴宗贵.动脉粥样硬化中西医结合诊疗专家共识[J].中国全科医学,2017,20(5):507-511.
- [2]马丽媛,王增武,樊静,等.《中国心血管健康与疾病报告 2022》要点解读[J].中国全科医学,2023,26(32):3975-3994.
- [3]雷紫琴,栾飞,高铭,等.细胞焦亡与心血管疾病的关系及中医药防治研究进展[J].中国中药杂志,2023,48(7):1779-1791.
- [4]胡颖超,杨硕.细胞焦亡的研究进展[J].南京医科大学

- 学报(自然科学版), 2021, 41(8): 1245-1251.
- [5] 雷紫琴, 栾飞, 高铭, 等. 细胞焦亡与心血管疾病的关系及中医药防治研究进展[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(7): 1779-1791.
- [6] 宋玮, 张钟艺, 邱海荣, 等. 基于茺萸丸谈“理论框架”方剂研究思路[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(5): 2144-2149.
- [7] YANG LL, ZHU WY, ZHANG XB, et al. Efficacy and safety of berberine for several cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Phytomedicine*, 2023, 112(8): 154716.
- [8] PAN YY, FENG XR, SONG W, et al. Effects and potential mechanism of Zhuyu pill against atherosclerosis: network pharmacology and experimental validation [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17(21): 597-612.
- [9] 宋玮, 张钟艺, 王楷, 等. 茺萸丸通过 PPAR γ /NF- κ B 信号通路促进巨噬细胞 M2 型极化防治动脉粥样硬化[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(1): 243-250.
- [10] 戴贻权, 颜晓晓, 刘晓如, 等. 小鼠动脉粥样硬化模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 36(1): 172-175.
- [11] 黄爱良, 黄荣志, 黄小倩, 等. 动脉粥样硬化动物模型构建的方法与现状[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(27): 4423-4428.
- [12] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010, 25(5): 52-53.
- [13] MEOLA G. Acute disseminated encephalomyelitis and multiple sclerosis [J]. *Pediatr Med Chir*, 2004, 26(3), 210-211.
- [14] HUANG B, YANG WQ, LIU XT, et al. Basilar artery atherosclerotic plaques distribution in symptomatic patients: a 3.0T high-resolution MRI study [J]. *Eur J Radiol*, 2013, 82(4): 199-203.
- [15] KLEINER DE, BRUNT EM, VAN NM, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2005, 41(6): 1313-1321.
- [16] VEILLARD NR, STEFFENS S, BURGER F, et al. Differential expression patterns of proinflammatory and anti-inflammatory mediators during atherogenesis in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(12): 2339-2344.
- [17] 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, 43(3): 137-139.
- [18] 方子寒, 张琴, 谢盈彧, 等. 阮士怡从“脉中积”理论治疗冠心病冠状动脉粥样硬化经验[J]. 中医杂志, 2018, 59(21): 1812-1814, 1823.
- [19] 宋玮, 张钟艺, 沈涛. 从“气津敷布”视角构建动脉粥样硬化中医辨治体系[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(2): 178-183.
- [20] 沈伟, 刘湘绪, 施海明, 等. 一种新型 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化和心肌梗死双模型的建立[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(17): 2473-2478.
- [21] 尹丽梅, 袁建, 陈楷, 等. 解毒活血方调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠斑块稳定性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(12): 112-120.
- [22] 苏文全, 杜雅薇, 吴圣贤. 四妙勇安汤对颈动脉粥样硬化瘀热内郁证患者血清高敏 C 反应蛋白水平的影响[J]. 中医杂志, 2021, 62(6): 505-509.
- [23] PANICKER N, KANTHASAMY A, KANTHASAMY AG. Fyn amplifies NLRP3 inflammasome signaling in Parkinson's disease [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(16): 5871-5873.
- [24] COLL RC, SCHRODER K, PELEGRI $\acute{N}$ P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 3(8): 653-668.
- [25] PAIK S, KIM JK, SILWAL P, et al. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1141-1160.
- [26] CODOLO G, PLOTEGHER N, POZZOBON T, et al. Triggering of inflammasome by aggregated alpha-synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55375.
- [27] ZENG C, DUAN F, HU J, et al. NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis contributes to the pathogenesis of non-ischemic dilated cardiomyopathy [J]. *Redox Biol*, 2020, 7(34): 101523. doi:10.1016/j.redox.2020.101523.

Effects of Zhuyu Pill (茺萸丸) and its Ingredient on Aortic Plaque and the NLRP3/Asc/Caspase-1 Signaling Pathway in Aortic Tissue of Mice in Atherosclerosis Model

SONG Wei, ZHANG Zhongyi, WANG Kai, SHEN Tao

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610075

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of action and combination of medicinals of *Zhuyu Pill* (茺萸丸) in the treatment of atherosclerosis. **Methods** Thirteen normal C57BL/6J mice were used as blank group, and 40 ApoE^{-/-} mice of the same strain were randomly divided into model group, Huanglian (*Coptis chinensis*

Franch.) group, Wuzhuyu (*Tetradium ruticarpum*) group, and *Zhuyu Pill* group, with 10 mice in each group. Except the blank group, the other groups were fed with high-fat diet for modeling, and the total modeling cycle was 12 weeks. After modelling, Huanglian group was given Huanglian solution 143.34 mg/(kg·d), Wuzhuyu group with Wuzhuyu solution 301.78 mg/(kg·d), *Zhuyu Pill* group with 261.07 mg/(kg·d) of *Zhuyu Pill* solution, blank group and model group were given 0.3ml of normal saline. Mice in all groups were gavaged for 12 weeks. The levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and fasting blood glucose were measured by biochemical method; fasting insulin in serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and insulin resistance index was calculated; HE staining was used to observe the pathological and morphological changes of aortic tissue, liver and epididymal fat in mice, and oil red O staining was used to observe the lipid deposition of aortic tissue in mice, and the percentage of positive area of aortic HE staining, the percentage of positive area of aortic oil red O staining, the non-alcoholic fatty liver activity score (NAS) score, and the cross-sectional area of epididymal fat were calculated; serum levels of interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 18 (IL-18) were detected by ELISA; protein expression of nucleotide-binding oligomerisation structural domain-like receptor family pyridoxal structural domain protein 3 (NLRP3) in aortic tissues was detected by Western blot; and immunofluorescence was used to detect the levels of apoptosis-associated granulocyte-like protein (ASC), which contains the CARD structural domain (ASC) and cysteine-containing aspartic protease 1 (Caspase-1) protein expression; and real-time fluorescence PCR was used to detect NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 mRNA expression in mouse aortic tissues. **Results** Compared with blank group, serum TC, TG and LDL-C were increased, insulin was decreased, fasting blood glucose and insulin resistance index were increased in model group ($P<0.01$). Aortic plaque area increased, liver lipid deposition increased, epididymal fat cells volume increased, liver NAS score increased, and epididymal fat cross-sectional area increased. Serum IL-1 β and IL-18 increased, and the expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1 protein and mRNA in aortic tissue increased ($P<0.01$). Compared with model group, serum TC, TG and LDL-C in Huanglian group, Wuzhuyu group and *Zhuyu Pill* group decreased, fasting insulin increased, fasting blood glucose and insulin resistance index decreased ($P<0.01$); aortic plaque area decreased significantly, liver lipid deposition decreased, liver NAS score decreased, epididymal fat cell volume decreased, epididymal fat cross section area decreased, serum IL-1 β and IL-18 were decreased, the expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1 protein and mRNA in aortic tissue were decreased ($P<0.01$), and the improvement of all indexes in the *Zhuyu Pill* group was better than that in Huanglian and Wuzhuyu groups ($P<0.01$). **Conclusion** *Zhuyu Pill* has a good therapeutic effect on atherosclerosis in mice, and the combination of Huanglian and Wuzhuyu has a synergistic effect, the mechanism of which may be related to regulation of the NLRP3/ASC/Caspase-1 aortic signaling pathway, and thus reducing the vascular inflammatory response.

Keywords atherosclerosis; aortic plaque; *Zhuyu Pill* (茺萸丸); nucleotide-binding oligomerized domain-like receptor family of pyrinoid domain protein 3; apoptosis-associated granule-like proteins containing CARD structural domains; cysteine aspartic proteinase-1

(收稿日期: 2023-09-10; 修回日期: 2024-01-02)

[编辑: 王利芬]