

茱萸丸调控 TMA/FMO3/TMAO 通路促进 胆固醇逆向转运抗动脉粥样硬化

宋玮, 梁清芝, 张钟艺, 沈涛
(成都中医药大学, 四川 成都 610075)

摘要:目的 旨在研究茱萸丸对动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)形成的影响及其相关机制。方法 采用高脂饲料喂养雄性载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠诱导动脉粥样硬化模型,造模周期为12周。造模成功的47只 ApoE^{-/-}小鼠随机分成5组,即模型组10只,茱萸丸低、中、高剂量组各9只,阿托伐他汀钙组10只,以同周龄雄性 C57BL/6J 小鼠10只作为空白组。空白组与模型组予等体积无菌蒸馏水灌胃,茱萸丸低、中、高剂量组分别给予130.54、261.08、522.16 mg·kg⁻¹灌胃,阿托伐他汀钙组10.40 mg·kg⁻¹灌胃,每日1次,各组小鼠共灌胃12周。给药结束后,采用苏木精-伊红(HE)染色观测主动脉及肝脏病理变化;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)水平;生化法检测肝脏总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平;超高效液相色谱-质谱联用技术(UHPLC-MS/MS)检测血浆三甲胺(TMA)、氧化三甲胺(TMAO)含量;免疫荧光法检测小鼠肝脏中二甲基苯胺单加氧酶3(FMO3)蛋白的表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time PCR)检测肝脏 FMO3、腺苷三磷酸结合盒转运蛋白 A1(ABCA1)、B 族 I 型清道夫受体(SR-B1)、ATP 结合盒转运子 G5 抗体(ABCG5)、三磷酸腺苷结合盒转运体 G8(ABCG8)和细胞色素 P4507A1(CYP7A1)mRNA 表达水平。结果 与空白组比较,模型组小鼠 HE 染色可见主动脉内膜大面积增厚,肝脏脂肪变性及炎症浸润严重;血清中 ox-LDL、MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 升高;肝脏 TC、TG、LDL-C 升高;血浆中 TMA、TMAO 水平升高;以及肝脏中 FMO3 mRNA 与蛋白表达水平升高,ABCA1、SR-B1、ABCG5、ABCG8、CYP7A1 mRNA 表达水平升高(P<0.01)。与模型组比较,茱萸丸低、中、高剂量组及阿托伐他汀钙组 HE 染色随着茱萸丸浓度的增加,斑块富集区域逐渐缩小,肝脏脂肪变性及炎症浸润降低;血清中 ox-LDL、MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 降低;肝脏 TC、TG、LDL-C 降低;血浆中 TMA、TMAO 水平降低;以及肝脏中 FMO3 mRNA 与蛋白表达水平降低,ABCA1、SR-B1、ABCG5、ABCG8、CYP7A1 mRNA 表达水平降低(P<0.01 或 P<0.05)。结论 茱萸丸对小鼠动脉粥样硬化斑块具有较好的治疗作用,其机制可能与调节 TMA/FMO3/TMAO 脂代谢通路,促进胆固醇的逆向转运和分解有关。

关键词: 茱萸丸;动脉粥样硬化;胆固醇逆向转运;TMA/FMO3/TMAO 脂代谢通路

中图分类号:R289.5

文献标志码:A

文章编号:1673-7717(2024)09-0124-09

Zhuyu Pills(茱萸丸) Regulate TMA/FMO3/TMAO Pathway and Promote Cholesterol Reverse Transport and Anti-Atherosclerosis

SONG Wei, LIANG Qingzhi, ZHANG Zhongyi, SHEN Tao

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan, China)

Abstract: *Objective* This article aims to investigate the effect of Zhuyu Pills(茱萸丸) on atherosclerosis and the underlying mechanism. The mouse model of atherosclerosis was induced by a high-fat diet, and the total modeling period was 12 weeks. *Methods* A total of 47 ApoE^{-/-} mice successfully modeled were randomized into 5 groups, including 10 in the model group, 9 in each of low, medium and high dose(130.54, 261.08 and 522.16 mg·kg⁻¹, respectively) Zhuyu Pills groups, and 10 in the atorvastatin calcium(10.40 mg·kg⁻¹) group. In addition, 10 C57BL/6J mice were included as the normal group. The mice in the normal group and model group were administrated with an equal volume of sterile distilled water, and those in the other groups

基金项目:国家自然科学基金项目(81973743);四川省科技厅科技创新创业人才和苗子工程项目(20MZGC0241);四川省科技厅重点研发项目(2022YFS0381)

作者简介:宋玮(1993-),男,山西吕梁人,博士在读,研究方向:中药及复方防治动脉粥样硬化。

通讯作者:沈涛(1963-),男,四川成都人,主任医师、教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中药及复方治疗代谢性疾病。E-mail:shentaotcm@ailun.com。

were administrated with the corresponding agents by gavage once a day for 12 weeks. The pathological changes of aorta and liver were observed by hematoxylin - eosin (HE) staining after administration. The levels of oxidized low - density lipoprotein (ox - LDL), monocyte chemotactic egg - 1 (MCP - 1), vascular cell adhesion - 1 (VCAM - 1) and intercellular adhesion molecule - 1 (ICAM - 1) in serum were detected by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein cholesterol (LDL - C) in liver were detected by biochemical method. Ultra high performance liquid chromatography - mass spectrometry (UHPLC - MS/MS) was used to detect the plasma trimethylamine (TMA) and trimethylamine oxide (TMAO). The expression level of flavin containing monooxygenase 3 (FMO3) protein in mouse liver was detected by immunofluorescence. Real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (real - time PCR) was employed to measure the mRNA levels of FMO3, adenosine triphosphate binding cassette transporter A1 (ABCA1), scavenger receptor B1 (SR - B1), ATP binding cassette transporter G5 (ABCG5), adenosine triphosphate - binding cassette transporter G8 (ABCG8) and cytochrome P450 7A1 (CYP7A1) in the liver tissues. **Results** Compared with the control group, the model group showed large area thickening of the aortic intima and severe hepatic steatosis and inflammatory infiltration. The levels of ox - LDL, MCP - 1, VCAM - 1 and ICAM - 1 in serum were increased. The levels of TC, TG and LDL - C in liver increased. The levels of plasma TMA and TMAO increased. The mRNA and protein expression levels of FMO3 in liver were increased, and the mRNA expression levels of ABCA1, SR - B1, ABCG5, ABCG8 and CYP7A1 were increased ($P < 0.01$). Compared with that of the model group, HE staining of low, medium and high dose Zhuyu Pills groups and atorvastatin calcium group showed that with the concentration increase of Zhuyu Pills, the plaque enrichment area was gradually narrowed, liver steatosis and inflammatory infiltration decreased. The levels of ox - LDL, MCP - 1, VCAM - 1 and ICAM - 1 in serum were decreased. The levels of TC, TG and LDL - C in liver decreased. The levels of TMA and TMAO in plasma decreased. The mRNA and protein expression levels of FMO3 in liver were decreased, and the mRNA expression levels of ABCA1, SR - B1, ABCG5, ABCG8 and CYP7A1 were decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** Zhuyu Pills have a good therapeutic effect on atherosclerotic plaque in mice, and its mechanism may be related to regulating the lipid metabolism pathway of TMA/FMO3/TMAO and promoting the reverse transport and decomposition of cholesterol.

Keywords: Zhuyu Pills (茱萸丸); atherosclerosis; cholesterol reverse transport; TMA/FMO3/TMAO lipid metabolism pathway

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是动脉内膜的脂质、血液成分沉积,平滑肌细胞及胶原纤维增生,伴有坏死及钙化等不同程度病变的慢性进行性病理过程^[1]。流行病学研究显示,在我国有超过 3.3 亿的心血管病患者,且导致的死亡人数占全球死亡人数的 1/3,而 AS 就是导致心血管疾病的最主要原因^[2]。目前治疗 AS 的药物主要针对脂质代谢和血小板活化途径,如他汀类和阿司匹林等^[3],治疗效果有限,并能引发细胞损伤、肝肾损伤及肌病等不良反应^[4]。肠道菌群与 AS 之间有密切联系,调节肠道菌群稳态已成为防治 AS 新靶点^[5]。肠道菌群能将卵磷脂、胆碱、肉碱等物质代谢生成三甲胺 (TMA),后者经肝脏黄素单加氧酶 3 (FMO3) 作用活化产生氧化三甲胺 (TMAO),TMAO 可使胆固醇代谢紊乱,并激活炎症反应,从而诱发 AS^[6]。如今抑制胆固醇合成不再是治疗 AS 的唯一方法,促进胆固醇逆向转运已成为治疗的新思路^[7]。研究表明^[8],TMAO 可能抑制胆固醇转运及胆固醇 - 胆汁酸这一代谢通路,导致血液中胆固醇升高,并促进泡沫细胞在血管内沉积。中医学认为,中焦气机升降失司,脾不散津,津液代谢紊乱,聚湿生痰,日久生瘀,痰瘀互结阻于脉道,导致 AS 形成^[9]。肠道菌群稳态是脾主运化功能正常的重要体现,中药通过斡旋中焦气机,影响肠道菌群结构,治疗 AS 具有一定的优势^[10]。茱萸丸出自《太平圣惠方》,方中黄连、吴茱萸等比配伍,黄连味苦而性寒,吴茱萸味辛苦而性热,二者苦辛相合,具有苦辛化浊的功效^[11]。团队前期研究证实,黄连、吴茱萸配伍可显著降低高脂模型动物血脂水平,且 1:1 降脂效果最佳^[12],同时可通过巨噬细胞极化、影响脂代谢相关基因发挥抗炎效应^[13-14]。为进一步探讨茱萸丸防治 AS 的作用机制,本研究以 TMA/FMO3/TMAO 脂代谢通路为切入点,探讨其逆向转运及分解胆固醇的机制,为临床治疗 AS 提供新思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性健康 C57BL/6J 品系小鼠 13 只,同品系的 ApoE^{-/-}小鼠 50 只,体质量(22 ± 2)g,6 周龄,购自成都达硕实验动物有限公司,实验动物合格证号 SCXK(川)2020 - 030。动物饲养于成都中医药大学动物中心清洁级动物房,温度 22 ~ 25 ℃,湿度 50% ~ 70%,12 h 明暗循环,自由饮水进食。喂养小鼠的基础饲料及高脂饲料均购自于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。本实验通过成都中医药大学动物实验伦理委员会审查,编号 2021DL - 001。

1.2 药物

茱萸丸组成:黄连 5 g(批号 190901)、吴茱萸 5 g(批号 191001),2 味药材饮片按 1:1 进行配制,药材由成都中医药大学附属医院制剂室提供。称取黄连 50 g,吴茱萸 50 g 后加入 10 倍容积水浸泡 1 h,然后煎煮 40 min 过滤,滤渣加入 9 倍体

积水继续煎煮 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 茺菀丸获得 17.21 g 冻干粉,即每 1 g 冻干粉中含 5.81 g 药材,保存于 4 °C 环境备用。阿托伐他汀钙片(批号 H20051408)购自沈阳辉瑞制药有限公司。

1.3 试剂

苏木素-伊红(HE)染色、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒,4%多聚甲醛(批号分别为 G1004、G2002、BL521A、G1101-500ML,武汉赛维尔生物科技有限公司);氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、血管细胞黏附分-1(VCAM-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(批号分别为 MM-0908M1、MM-0082M1、MM-0129M1、MM-0183M1,美国 Abcam 公司);总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒(批号分别为 A111-1-1、A110-1-1、A113-1-1、A112-1-1,南京建成生物科技有限公司);二甲苯胺单加氧酶 3(FMO3)抗体、4',6-二脒基-2-苯基喹啉(DAPI)、羊抗兔 IgG 二抗(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab65596、ab66217、ab182981);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、Sso Advanced™ Universal SYBR® Green Supermix(批号分别为 221010-A4、221010-A5,成都蓉为基因生物科技有限公司);甲酸(批号 20191010,美国 ROE 公司);乙腈(批号 WXD0233V,德国默克公司);甲酸胺(批号 20190815,美国 Sigma 公司);戊巴比妥钠(批号 11715,美国 Merck 公司)。

1.4 仪器

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);1290 Infinity series UHPLC 型液相色谱仪、6470 Triple Quadruple MS/MS 型质谱(美国 Agilent Technologies 公司);EG1150C 型包埋机、SM2000R 型石蜡滑动式切片机(德国 Leica 公司);VO-53 型真空干燥机(上海泰坦科技股份有限公司);Revos 型脱水机(美国 Thermo Fisher Scientific 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);Miseq 型测序仪(美国 Illumina 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

经过适应性喂养后,13 只 C57BL/6J 小鼠作为空白组,继续以基础饲料喂养。50 只同品系的 ApoE^{-/-}小鼠给予高脂饲料喂养造模,每天 2 次投喂(8:00、16:00 各 1 次),自由饮水及活动 12 周,构建 AS 模型^[15]。造模周期 12 周,然后在空白组及造模组中各随机选取 3 只小鼠进行主动脉根部油红染色判断造模是否成功,主动脉斑块形成可判定为 AS 造模成功^[16]。造模成功后,将 47 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为 5 组:模型组(10 只)、茺菀丸低剂量组(9 只)、茺菀丸中剂量组(9 只)、茺菀丸高剂量组(9 只)、阿托伐他汀钙组(10 只)。将冻干粉加无菌蒸馏水配制成茺菀丸低、中、高浓度的混悬液,以 60 kg 成人每日治疗剂量 10 g·d⁻¹为基准,参照文献方法设计

分组梯度^[17]:按体表面积折算得出对应小鼠灌胃剂量为中剂量,高、低剂量分别为中剂量的 2、0.5 倍,按含药量计算浓度,给药剂量分别为 130.54、261.08、522.16 mg·kg⁻¹·d⁻¹。模型组予等体积无菌蒸馏水灌胃,西药组予阿托伐他汀钙片混悬液 10.40 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,以上给药干预时间为 12 周。

2.2 观察指标

2.2.1 ELISA 检测血清中 ox-LDL、MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 的含量 灌胃至第 12 周末,末次给药后 12 h 禁食不禁水,之后摘眼球取血。室温静置 2 h,高速低温离心机 4 °C、12 000 r·min⁻¹离心 15 min,收集上层血清。严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。在 450 nm 下检测各孔吸光度并绘制曲线,计算并分析上清液中 ox-LDL、MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 水平。

2.2.2 主动脉、肝脏 HE 染色 将采集完血清标本的小鼠脱椎处死,剪取完整肝脏,用生理盐水冲洗,滤纸吸干表面水分后置于冰块上。然后剪开胸骨,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,在冰上剪段,用 4%多聚甲醛固定、最佳切削温度(OCT)包埋剂处理,进行常规 HE 染色,光学显微镜下观察主动脉病理变化并拍照保存。光学显微镜观察主动脉组织的病理形态,计算斑块相对面积,公式为斑块相对面积=斑块面积/管腔面积×100%。

2.2.3 肝脏脂质谱水平测定 取肝组织约 100 mg,加入 9 倍冰生理盐水,在冰冻条件下充分匀浆,4 °C、3000 r/min 离心 20 min,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测组织匀浆中的蛋白含量并按照试剂说明书检测 TC、TG、LDL-C 含量。

2.2.4 血浆 TMA、TMAO 含量 用含有乙二胺四乙酸(EDTA)的采集管采集血液后,立即轻轻颠倒混匀,在 4 °C 条件下 3000 r/min 离心 10 min,吸取上清液(即血浆)200 μL 置于已编号的 2 mL 离心管中,用于 UHPLC-MS/MS 分析。流动相条件:通过 X Bridge BEH Amide Column(2.5 μm,2.1 mm×100 mm)色谱柱对目标化合物进行色谱分离,10 mmol/L 甲酸铵,Ph 3.5(A)-乙腈,Ph 3.5(B)。质谱条件:气体温度 350 °C;气体流量 9 L/min;雾化器压力 275 800 Pa;鞘气加热器 300 °C;鞘气流量 11 L/min;毛细管 3500 V。

2.2.5 免疫荧光法检测肝脏 FMO3 蛋白阳性表达 将肝脏组织放入多聚甲醛 20 min,室温下通透组织切片 20 min,3%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 1 h,按 1:100 滴加 FMO3 抗体,4 °C 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,采用 Image pro plus 软件进行分析。

2.2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测肝脏组织 FMO3、ABCA1、SR-B1、ABCG5、ABCG8、CYP7A1 mRNA 的表达水平 将肝脏组织于液氮中研磨成粉末,取 20 mg 粉末加入到 1 mL TRIPure Reagent 总 RNA 抽提试剂(TRIZOL)提取总 RNA,采用超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度,OD_{260 nm}/OD_{280 nm}、OD_{260 nm}/OD_{230 nm}。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。反应条件设置为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,40 个循

环,对肝脏的基因 FMO3、ABCA1、SR - B1、ABCG5、ABCG8、CYP7A1 进行荧光定量 PCR 分析,以 β - actin 为内参照物,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 mRNA 的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物	序列(5'-3')	长度/(bp)
FMO3	上游:AACAAGCCATGTTCCCTCAG	109
	下游:ATAATGGCCACCAACTCACC	
ABCA1	上游:AACAAGCCACCAACTCACC	122
	下游:GACGCAAACACAAAAGTGG A	
SR - B1	上游:TTCTCGCCCTTCAGGATCT	147
	下游:GCTCATCAAGCAGCAGGTC	
ABCG5	上游:CGCGAGAGGTTGCGATACA	128
	下游:CTGCCAATCATTTGGTCCGC	
ABCG8	上游:TGGGCATCCGAAATCTAAG	222
	下游:TGGGCATCCGAAATCTAAG	
CYP7A1	上游:AACAACCTGCCAGTACTAGATAGC	99
	下游:GTGTAGACTGAAGTCCTCCTTAGC	
β - actin	上游:TGTTACCAACTGGACGAC	165
	下游:GGGGTGTGAAGGTCTCAAA	

2.3 统计分析

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,先进行正态分析和方差齐性检验,若二者均符合,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA);若不符合正态分布或方差齐性检验,采用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 主动脉 HE 染色

空白组小鼠主动脉血管壁结构完整,未见动脉粥样斑块。与空白组比较,模型组可见明显粥样斑块,斑块内可见炎性细胞浸润,斑块附着处血管内膜明显增厚且结构紊乱,中膜增生。与模型组比较,茛菪丸低、中、高剂量组及阿托伐他汀钙组血管内壁欠光滑,可见少量粥样斑块,炎性细胞浸润程度及血管壁厚度均呈现不同程度的改善,见插页 XX 图 1、表 2。

表 2 各组小鼠主动脉组织病理形态变化定量分析($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹)	HE 染色/(%)
空白组	10	-	-
模型组	10	-	33.26 \pm 1.21 **
茛菪丸低剂量组	9	130.54	21.33 \pm 0.32 $\Delta\Delta$
茛菪丸中剂量组	9	261.08	18.52 \pm 0.61 $\Delta\Delta$
茛菪丸高剂量组	9	552.16	10.46 \pm 0.54 $\Delta\Delta$
阿托伐他汀钙组	10	10.40	15.72 \pm 0.46 $\Delta\Delta$

注: ** 与空白组比较, $P < 0.01$; $\Delta\Delta$ 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3.2 茛菪丸对血清中 ox - LDL、MCP - 1、VCAM - 1、ICAM - 1 水平的影响

与空白组比较,模型组 ox - LDL、MCP - 1、VCAM - 1、ICAM - 1 水平均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,茛菪丸低、中、高剂量组及阿托伐他汀钙组 ox - LDL、MCP - 1、VCAM - 1、ICAM - 1 水平均明显降低($P < 0.01$),见表 3。

3.3 茛菪丸对各组小鼠肝脏 TG、TC、LDL - C 的影响

与空白组比较,模型组小鼠肝脏 TG、TC、LDL - C 水平明

显升高($P < 0.01$);与模型组比较,茛菪丸低、中、高剂量组及阿托伐他汀钙组小鼠肝脏 TG、TC、LDL - C 水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 4。

表 3 茛菪丸对各组小鼠血清中 ox - LDL、MCP - 1、VCAM - 1、ICAM - 1 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ox - LDL/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MCP - 1/ (pg/mL)	VCAM - 1/ (ng/mL)	ICAM - 1/ (ng/mL)
空白组	10	3.39 \pm 0.72	10.96 \pm 0.44	116.13 \pm 4.80	233.62 \pm 5.74
模型组	10	5.81 \pm 0.63 **	23.03 \pm 0.43 **	212.34 \pm 5.88 **	370.04 \pm 5.32 **
茛菪丸低剂量组	9	4.98 \pm 0.44 $\Delta\Delta$	18.52 \pm 0.42 $\Delta\Delta$	168.67 \pm 4.17 $\Delta\Delta$	330.12 \pm 5.60 $\Delta\Delta$
茛菪丸中剂量组	9	4.42 \pm 0.28 $\Delta\Delta$	15.55 \pm 0.32 $\Delta\Delta$	142.53 \pm 2.61 $\Delta\Delta$	305.25 \pm 4.41 $\Delta\Delta$
茛菪丸高剂量组	9	4.09 \pm 0.45 $\Delta\Delta$	14.39 \pm 0.56 $\Delta\Delta$	129.35 \pm 2.06 $\Delta\Delta$	274.93 \pm 5.22 $\Delta\Delta$
阿托伐他汀钙组	10	4.56 \pm 0.36 $\Delta\Delta$	17.62 \pm 0.27 $\Delta\Delta$	150.06 \pm 3.42 $\Delta\Delta$	316.15 \pm 3.01 $\Delta\Delta$

注: ** 与空白组比较, $P < 0.01$; $\Delta\Delta$ 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

表 4 茛菪丸对小鼠肝脏 TG、TC、LDL - C 的影响($\bar{x} \pm s$)

单位: mmol/gprot

组别	n	TG	TC	LDL - C
空白组	10	1.23 \pm 0.15	3.29 \pm 0.16	2.21 \pm 0.63
模型组	10	5.54 \pm 0.22 **	9.31 \pm 0.25 **	8.91 \pm 0.33 **
茛菪丸低剂量组	9	5.17 \pm 0.78 Δ	8.83 \pm 0.16 $\Delta\Delta$	8.48 \pm 0.07 Δ
茛菪丸中剂量组	9	4.20 \pm 0.04 $\Delta\Delta$	6.56 \pm 0.43 $\Delta\Delta$	6.35 \pm 0.25 $\Delta\Delta$
茛菪丸高剂量组	9	3.39 \pm 0.32 $\Delta\Delta$	5.72 \pm 0.23 $\Delta\Delta$	5.30 \pm 0.34 $\Delta\Delta$
阿托伐他汀钙组	10	4.83 \pm 0.14 $\Delta\Delta$	7.35 \pm 0.15 $\Delta\Delta$	7.49 \pm 0.55 $\Delta\Delta$

注: ** 与空白组比较, $P < 0.01$; Δ 与模型组比较, $P < 0.05$; $\Delta\Delta$ 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3.4 茛菪丸对小鼠肝脏组织病理形态的影响

空白组小鼠肝细胞索和肝小叶结构完整,无明显脂肪变性和坏死。与空白组比较,模型组小鼠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。与模型组比较,茛菪丸低、中、高剂量组及阿托伐他汀钙组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,见插页 XXI 图 2。

3.5 茛菪丸对小鼠血浆 TMA、TMAO 含量比较

与空白组比较,模型组血浆 TMA、TMAO 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,茛菪丸低、中、高剂量组及阿托伐他汀钙组血浆 TMA、TMAO 水平降低($P < 0.01$),见表 5。

表 5 茛菪丸对各组小鼠血浆 TMA、TMAO 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

单位: ng/mL

组别	n	TMA	TMAO
空白组	10	415.67 \pm 20.01	234.00 \pm 3.46
模型组	10	578.83 \pm 18.55 **	529.34 \pm 17.12 **
茛菪丸低剂量组	9	486.67 \pm 6.15 $\Delta\Delta$	322.83 \pm 16.47 $\Delta\Delta$
茛菪丸中剂量组	9	460.17 \pm 11.67 $\Delta\Delta$	287.17 \pm 6.46 $\Delta\Delta$
茛菪丸高剂量组	9	437.17 \pm 10.38 $\Delta\Delta$	262.00 \pm 10.39 $\Delta\Delta$
阿托伐他汀钙组	10	472.50 \pm 7.79 $\Delta\Delta$	314.50 \pm 20.25 $\Delta\Delta$

注: ** 与空白组比较, $P < 0.01$; $\Delta\Delta$ 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3.6 茛菪丸对小鼠肝脏 FMO3 mRNA 和蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组肝脏 FMO3 mRNA 和蛋白水平升高($P < 0.01$);与模型组比较,茛菪丸低、中、高剂量组及阿托伐他汀钙组肝脏 FMO3 mRNA 和蛋白水平降低($P < 0.01$),见插页 XXII 图 3、表 6。

表6 茺萸丸对各组小鼠肝脏 FMO3 mRNA 和蛋白表达的影响

组别	n	FMO3 荧光蛋白	FMO3 mRNA
空白组	10	0.99 ± 0.25	1.01 ± 0.04
模型组	10	3.08 ± 0.20 **	3.43 ± 0.05 **
茺萸丸低剂量组	9	2.02 ± 0.02 △△	1.92 ± 0.04 △△
茺萸丸中剂量组	9	1.52 ± 0.65 △△	1.66 ± 0.03 △△
茺萸丸高剂量组	9	1.16 ± 0.58 △△	1.30 ± 0.06 △△
阿托伐他汀钙组	10	1.86 ± 0.30 △△	1.87 ± 0.04 △△

注: ** 与空白组比较, $P < 0.01$; △△ 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3.7 各组小鼠肝脏 ABCA1、SR-B1、ABCG5、ABCG8、CYP7A1 mRNA 表达比较

与正常组比较,模型组小鼠肝脏 ABCA1、SR-B1、ABCG5、ABCG8、CYP7A1 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,茺萸丸低、中、高剂量组及阿托伐他汀钙组 ABCA1、SR-B1、ABCG5、ABCG8、CYP7A1 mRNA 表达均有不同程度升高 ($P < 0.01$),见表7。

4 结果

AS 属于中医“脉痹”的范畴。《素问·痹论篇》中记载:“风寒湿三气杂至,合而为痹也……以夏遇此者为脉痹”,并指出“痹在于脉则血凝而不流”。通过梳理脉痹源流,认为其基本病机为虚、痰、瘀^[18]。内有气血不足,外受风寒湿热之邪,邪入血脉,阻滞脉道,痰瘀互生,脉痹乃成^[19]。本团队认为,AS 病在血脉,根在脏腑,脾失健运,水津不布,精化为浊,导致膏脂运化输布障碍,湿浊内生,输于血脉,成为“浊脂”,壅积脉道,浸淫脉络,着而不去,脉络与痰瘀相搏,结聚成块,日久渐成脉痹,正如《证治汇补》所言:“脾虚不运清浊,停滞津液而为痰生”^[20]。痰浊黏滞于血脉之内,留而不去,凝聚成块的过程多反映了现代医学的高血脂症和高凝状态,此为 AS 最主要的危险因素^[21]。针对“脾气壅滞,痰瘀交阻,积留于脉”的核心病机,提出升清降浊,调畅中焦气机,恢复脾胃升降是防治 AS 的关键。茺萸丸由黄连、吴茺萸等比配伍组成,二者升降同施,寒热并调,紧扣 AS 脾胃壅滞、痰湿阻滞之病机,以辛味药之宣发与苦味药之降逆相结合,调畅中焦气机,健中助运,达到消膏降浊之效。

ApoE 是血液中最重要载脂蛋白,介导了血浆脂蛋白的运输与清除,当小鼠缺失 ApoE 时,其血液中 TC、TG、LDL-C 含量都会增加,增加了小鼠 AS 的发生风险。有文献表明^[22],给予 ApoE^{-/-}小鼠高脂饲料饮食,12 周左右即可于小鼠主动脉弓部发现广泛的 AS 斑块。ApoE^{-/-}小鼠动脉受损严重程度方面有类人的特征,且雄性高于雌性,故实验多选用雄性 ApoE^{-/-}小鼠^[23]。阿托伐他汀钙是一种强效的降胆固醇药

物,具有抑制炎症细胞和炎症介质释放、抑制血栓形成、保持斑块稳定等作用,因此选用阿托伐他汀作为阳性对照药物^[24]。AS 是体内脂质代谢紊乱导致血管壁上脂质堆积引起动脉壁狭窄的疾病,主动脉斑块形成是判断 AS 的金标准^[25]。HE 染色结果显示,茺萸丸治疗后可有效减轻模型小鼠主动脉的粥样斑块沉积,并能够显著降低泡沫细胞数量,呈现抗 AS 作用。ox-LDL 是脂质代谢异常的直接因素,以拥有较强的趋化性和细胞毒性为其致病特征,能够诱导并加剧其被巨噬细胞识别吞噬,是导致泡沫细胞形成的直接原因^[26]。MCP-1 是重要的单核细胞趋化因子,刺激单核或者巨噬细胞合成细胞因子,从而促进 AS 的发生^[27]。ICAM-1、VCAM-1 是 AS 早期的病理变化及斑块进展的潜在机制,在一定程度上反映了血管内皮的损伤程度^[28]。ox-LDL、MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 指标分别从脂质浸润、炎症反应、内皮损伤等方面反映 AS 的发生发展,作为评估 AS 严重程度的重要指标。本研究发现,茺萸丸干预可明显降低 AS 模型小鼠血清 ox-LDL、MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 表达水平,且疗效与药物剂量呈正相关关系,以高剂量茺萸丸的总体效果最好。

研究表明^[29],TMAO 与 AS 的发生发展密切相关,被认为是 AS 的潜在促进剂。Meta 分析^[30]结果亦显示,循环 TMAO 水平越高,心血管事件的发生率越高。肠道中的膳食胆碱和左旋肉碱在多种酶的作用下产生 TMA,后者在肠道上皮细胞被吸收并输送到肝脏,在肝脏中被 FMO3 进一步氧化,形成 TMAO。FMO3 是催化 TMA 生成 TMAO 关键酶,也是胆固醇代谢的关键调节剂,抑制肝脏 FMO3 的表达和活性,进而减少 TMA 向 TMAO 的转化,可能是防治 AS 的有效途径^[31]。本研究发现,茺萸丸干预能够显著降低 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化模型小鼠血浆 TMA 和 TMAO 水平,并降低肝脏 FMO3 mRNA 和蛋白水平,提示茺萸丸可能通过抑制 TMA/FMO3/TMAO 信号通路来发挥抗 AS 的作用。

胆固醇逆向转运作为人体调节脂质代谢平衡的重要途径,能够将体内外周组织细胞中多余的胆固醇通过高密度脂蛋白介导,经血液循环转运至肝脏最终排出体外,改善动脉血管壁脂质沉积^[32]。外周组织细胞内胆固醇通过 ABCA1 释放到细胞外,经卵磷脂胆固醇酰基转移酶酯化为胆固醇酯后,与肝脏 SR-B1 受体结合,进入肝脏^[33]。胆固醇酯通过 ABCG5/ABCG8 异二聚体向胆汁中转移,再经过 CYP7A1 代谢为胆汁酸排出体外^[34]。本研究中发现,茺萸丸能够较好地降低肝脏中 TC、TG、LDL-C 水平,改善肝脏脂质沉积,发挥调节脂肪代谢的作用。进一步分子机制研究显示,茺萸丸能够提高 ABCA1、

表7 各组小鼠肝脏 ABCA1、SR-B1、ABCG5、ABCG8、CYP7A1 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ABCA1	SR-B1	ABCG5	ABCG8	CYP7A1
空白组	6	0.32 ± 0.03	1.03 ± 0.08	1.01 ± 0.08	0.97 ± 0.07	1.08 ± 0.05
模型组	6	0.12 ± 0.02 **	0.39 ± 0.02 **	0.39 ± 0.03 **	0.28 ± 0.05 **	0.38 ± 0.05 **
茺萸丸低剂量组	6	0.19 ± 0.01 △△	0.74 ± 0.05 △△	0.57 ± 0.05 △△	0.52 ± 0.04 △△	0.67 ± 0.02 △△
茺萸丸中剂量组	6	0.28 ± 0.01 △△	0.87 ± 0.02 △△	0.79 ± 0.03 △△	0.64 ± 0.06 △△	0.79 ± 0.04 △△
茺萸丸高剂量组	6	0.30 ± 0.02 △△	1.12 ± 0.07 △△	0.87 ± 0.05 △△	0.83 ± 0.06 △△	0.85 ± 0.07 △△
阿托伐他汀钙组	6	0.22 ± 0.02 △△	0.83 ± 0.06 △△	0.59 ± 0.04 △△	0.54 ± 0.04 △△	0.68 ± 0.04 △△

注: ** 与空白组比较, $P < 0.01$; △△ 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

SR-B1、ABCG5、ABCG8、CYP7A1 mRNA 表达,提示胆固醇逆向转运途径相关基因表达上调。研究表明^[35],TMAO 能够下调胆汁酸转运蛋白的表达,导致血液中胆固醇升高,促进泡沫细胞在血管内沉积。然而,降低小鼠血浆 TMAO 水平,能够逆转 TMAO 对胆固醇逆向转运的抑制作用。因此,茱萸丸通过降低血浆 TMAO 的水平,促进胆固醇逆向转运与分解,使动脉的斑块向肝脏转移并被代谢出体外,进而发挥抗 AS 的作用。

综上所述,茱萸丸可能通过调节 TMA/FMO3/TMAO 信号通路,即减少 TMA 生成,降低肝 FMO3 表达,抑制 TMAO 合成,调节胆固醇的逆向转运相关因子的表达,从而抑制 ApoE^{-/-}小鼠体内 AS 斑块的发生与发展。

参考文献

[1] 李苑榆,龙清吟,傅馨莹,等.补阳还五汤和黄芪当归归伍对动脉粥样硬化小鼠炎症反应的影响[J].中国中药杂志,2023,48(15):4164-4172.

[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] 朱迪,曹焯民.动脉粥样硬化抗炎治疗的研究进展[J].中国现代医学杂志,2023,33(5):50-55.

[4] LIU A, WU Q, GUO J, et al. Stains; adverse reactions, oxidative stress and metabolic interactions [J]. Pharmacol Ther, 2009, 19(5): 2144-2148.

[5] 张蓉,王猛,江洪.肠道微生物与动脉粥样硬化的研究进展[J].中华老年心脑血管病杂志,2021,23(7):775-777.

[6] 贾连群,隋国媛,宋囡,等.肠道菌群驱动巨噬细胞糖代谢重编程与动脉粥样硬化“脾虚痰瘀”[J].中华中医药学刊,2021,39(2):1-3.

[7] 郑柳怡,甘海宁,黄丹娥,等.银蓝调脂胶囊抗 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的作用[J].中成药,2022,44(2):555-559.

[8] 张一凡,丁洁,杜敏,等.基于 SENP1 分子探讨冠心康通过胆固醇逆向转运改善动脉粥样硬化的机制[J].中华中医药杂志,2022,37(5):2903-2907.

[9] 崔运浩,裘雪莹,贾连群,等.基于“肠道菌群-脂质-线粒体”稳态失衡探讨“从脾论治”动脉粥样硬化[J].中华中医药学刊,2022,40(6):134-136.

[10] 罗宏扬,周昕,沈涛,等.基于肠道菌群探讨“饮食自倍,肠胃乃伤”在代谢性疾病发生中的作用[J].时珍国医国药,2022,33(2):425-428.

[11] 宋玮,张钟艺,邱海荣,等.基于茱萸丸谈“理论框架”方剂研究思路[J].中华中医药杂志,2023,38(5):2144-2149.

[12] 王静.从血脂调控 Leptin/JAK2/STAT3 信号通路探索黄连吴茱萸配伍的降脂效应[D].成都:成都中医药大学,2016.

[13] 周昕,魏宏,沈涛,等.小檗碱与吴茱萸碱配伍对高胆固醇血症大鼠小肠 ACAT2、ApoB48 和 NPC1L1 表达的影响[J].中成药,2017,39(10):1993-1999.

[14] 周昕,林晶晶,王静,等.黄连-吴茱萸组分配伍对高脂模型大鼠脂代谢相关基因的影响研究[J].中华中医药学刊,2018,36(3):605-608.

[15] LI J, LIN S, VANHOUTTE P M, et al. Akkermansia muciniphila protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemia-induced inflammation in ApoE^{-/-} mice [J]. Circu-

lation, 2016, 133(24):2434-2446.

[16] 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.

[17] 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,2010,12(5):52-53.

[18] 胡力丹,钱袁媛,揭晓,等.基于中医时空医学探讨瘀、毒、郁所致动脉粥样硬化性心血管疾病[J].中医杂志,2022,63(7):624-627.

[19] 梁清芝,陈正涛,冷玉琳,等.基于“虚气留滞”理论探讨血管内皮细胞自噬对糖尿病大血管病变的影响[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(3):178-185.

[20] 李用粹.证治汇补[M].顾宏平,校注.北京:人民卫生出版社,2006:242.

[21] 李英,龚宝莹,朱建华,等.国医大师朱良春从痰瘀论治颈动脉不稳定斑块的学术经验[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(23):195-200.

[22] 倪坤,姚坚涛,胡晨,等.小鼠动脉粥样硬化模型研究进展[J].血管与腔内血管外科杂志,2023,9(1):74-79.

[23] 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.

[24] 黄志红,郭伟强,张国平,等.大剂量阿托伐他汀治疗脑血栓对延缓动脉粥样硬化、降低血脂的作用[J].中国老年学杂志,2019,39(8):1818-1821.

[25] 动脉粥样硬化中西医结合防治专家共识(2021年)[J].中国中西医结合杂志,2022,42(3):287-293.

[26] 陈娟,王志文,魏宇森.特异性抗体 P210 减轻 Ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤[J].华中科技大学学报(医学版),2021,50(1):1-6.

[27] 管新竹,王怡茹,张一凡,等.ERK5 对 M1 型巨噬细胞标志炎症因子 iNOS、MCP-1 表达的影响[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2020,41(1):10-15.

[28] 柯珂,纪文岩,姜婷,等.新血府逐瘀汤对动脉粥样硬化型大鼠 ICAM-1、VCAM-1 表达的影响[J].中华中医药学刊,2017,35(11):2953-2955.

[29] 隋国媛,赵娜,宋囡,等.化痰祛瘀方对 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化模型小鼠肠道菌群驱动 TMA/FMO3/TMAO 通路的影响[J].中医杂志,2021,62(8):700-706.

[30] 张亚男,于雪.血浆氧化三甲胺水平对冠心病患者预后的预测作用:剂量-反应 Meta 分析[J].中国循环杂志,2021,36(2):149-155.

[31] 李易易,牛璇,张兆辉.氧化三甲胺及其与动脉粥样硬化关系的研究进展[J].卒中与神经疾病,2020,27(1):118-122.

[32] 刘冬,马志强,杨阳,等.肝 X 受体抗动脉粥样硬化作用机制的研究进展[J].中华实验外科杂志,2017,34(11):2007-2009.

[33] 张岩,周雯,肖韩艳.姜黄素对 THP-1 源性巨噬泡沫细胞 B 类 1 型清道夫受体表达的影响[J].中国现代医生,2019,57(7):26-29.

[34] 黄菊阳,王琴,毕亚男,等.异补骨脂素不同时间给药对大鼠肝脏功能和转运体的影响[J].中国药理学通报,2019,35(2):260-264.

[35] 王焕辉,王蓓,覃咏梅,等.氧化三甲胺致动脉粥样硬化作用及其防治的研究进展[J].中国动脉硬化杂志,2019,27(2):175-179.