

熊果酸对大鼠颈动脉粥样硬化易损斑块的影响及其机制

张敏燕^{1*}, 王亚博², 谢剑琳¹, 王海叶¹

1. 邯郸市中心医院, 河北 邯郸 056000

2. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017

摘要:目的 探讨熊果酸对大鼠颈动脉粥样硬化(CAS)易损斑块的影响及相关机制。方法 采用随机数字表法将144只雄性SD大鼠分为对照组、模型组、熊果酸(10、20、40 mg·kg⁻¹)组和阿托伐他汀(ATO, 2 mg·kg⁻¹)组, 每组24只。采用高脂饮食2周+ip维生素D₃+液氮冷冻损伤血管+免疫刺激的方法制备CAS易损斑块大鼠模型, 继续高脂饮食10周。造模第3周开始, 各组ig给药, 每天1次, 连续10周。通过苏丹IV染色观察颈动脉斑块分布, 计算斑块面积与管腔面积比值(PA/LA); 通过HE染色、Movat五色染色观察颈动脉组织病理学改变和斑块形态, 计算颈动脉斑块泡沫细胞容积分数(FVF)和胶原容积分数(CVF); 生化分析法检测血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平; 分光光度法检测血清丙二醛(MDA)、氧化修饰型低密度脂蛋白胆固醇(ox-LDL-C)水平; ELISA法检测血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、细胞间黏附分子1(ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)水平; Western blotting法检测颈动脉Toll样受体4(TLR4)、核因子-κB(NF-κB)蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组颈动脉斑块数量明显增多, PA/LA显著升高($P<0.01$); 颈动脉可见平滑肌细胞增多、排列紊乱、内膜增厚、大量泡沫细胞聚集等病理学改变; LDL-C、MDA、ox-LDL-C、TNF-α、IL-1β、ICAM-1、MCP-1水平显著升高而HDL-C水平显著降低($P<0.01$); TLR4、NF-κB蛋白表达量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较, 熊果酸20、40 mg·kg⁻¹组和ATO组颈动脉斑块数量明显减少, PA/LA显著降低($P<0.01$); 颈动脉病理学改变明显改善, FVF显著降低、CVF显著升高($P<0.01$); LDL-C、MDA、ox-LDL-C、TNF-α、IL-1β、ICAM-1、MCP-1水平显著降低且HDL-C水平显著升高($P<0.01$); TLR4、NF-κB蛋白表达量显著降低($P<0.01$)。结论 熊果酸具有减少和稳定大鼠CAS易损斑块的作用, 其机制可能与抑制TLR4/NF-κB通路, 进而抑制炎症反应和氧化应激有关。

关键词:熊果酸; 颈动脉; 易损斑块; TLR4/NF-κB通路; 炎症; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)06-1070-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.06.008

Effect of ursolic acid on vulnerable plaques of carotid atherosclerosis in rats and its mechanism

ZHANG Minyan¹, WANG Yabo², XIE Jianlin¹, WANG Haiye¹

1. Handan Central Hospital, Handan 056000, China

2. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To investigate the effect of ursolic acid (UA) on vulnerable plaques in rats with carotid atherosclerosis (CAS) and related mechanisms. **Methods** Totally 144 male SD rats were randomly divided into control group, model group, UA (10, 20, 40 mg·kg⁻¹) group and atorvastatin (ATO) 2 mg·kg⁻¹ group. The CAS vulnerable plaque rat models were prepared by high-fat diet for two weeks + ip injection of vitamin D₃ + liquid nitrogen to freeze blood vessels + immune stimulation, and after continuing high-fat diet for 10 weeks. Starting from the 3rd week of modeling, the drugs were given by intragastric administration, once a day. The plaque distribution was observed through Sudan IV staining, and the ratio of plaque area to lumen area (PA/LA). The histopathological changes and plaque morphology of the aorta were observed by HE staining and Movat five-color staining. The level of low density lipoprotein (LDL-C) and high density lipoprotein (HDL-C) in serum were detected by biochemical analysis

收稿日期: 2021-10-09

基金项目: 河北省邯郸市科学技术研究与发展计划项目(1823208043ZC)

*通信作者: 张敏燕(1985—), 女, 硕士, 主管药师, 主要从事药理学与临床药学研究。E-mail: zmy851201@163.com

method; the level of malondialdehyde (MDA), oxidatively modified low-density lipoprotein (ox-LDL-C) were detected by spectrophotometric. The level of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) were detected by ELISA method; the expression of aortic toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor- κ B (NF- κ B) were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, the number of aortic plaques in the model group increased, and the PA/LA significantly increased ($P < 0.01$). The physiological changes of aorta showed increased smooth muscle cells, disordered arrangement, intimal thickening, large number of foam cell accumulations. The level of LDL-C, MDA, ox-LDL-C, TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, MCP-1 significantly increased while the level of HDL-C significantly decreased ($P < 0.01$). The expression of TLR4, NF- κ B were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the number of aortic plaques in the UA 20, 40 mg·kg⁻¹ group and ATO 2 mg·kg⁻¹ group was significantly decreased, and the PA/LA was significantly reduced ($P < 0.01$). The pathological changes of the aorta were significantly improved, the FVF was significantly decreased and the CVF was significantly increased ($P < 0.01$). The level of LDL-C, MDA, ox-LDL-C, TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, MCP-1 significantly decreased and the level of HDL-C significantly increased ($P < 0.01$). The expression of TLR4, NF- κ B were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** UA has the effect of reducing and stabilizing vulnerable plaques of CAS in rats, which mechanism may be related to inhibiting the TLR4/NF- κ B pathway, and then inhibiting inflammation and oxidative stress.

Key words: ursolic acid; carotid artery; vulnerable plaques; TLR4/NF- κ B pathway; inflammation; oxidative stress

颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerotic, CAS)是一种较为常见的慢性疾病,以颈动脉内膜粥样斑块病变为主要病理特征,其中易损斑块破裂、脱落是导致缺血性脑血管病的主要原因。有研究发现,炎症和氧化应激是诱发易损斑块形成及进展的重要因素,给药抑制炎症和氧化应激具有稳定易损斑块的作用^[1-3]。因此,炎症和氧化应激可做为防治CAS新药探索研究的作用靶点。

熊果酸(ursolic acid)是天然存在的一种五环三萜类化合物,广泛分布于熊果、女贞、枇杷叶、夏枯草叶中,既往药理学研究表明熊果酸具有良好的抗炎、抗氧化活性^[4-5]。Toll样受体4/核因子- κ B(toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B, TLR4/NF- κ B)信号通路对机体炎症反应和氧化应激具有重要调控作用^[6-7]。既往有研究表明,熊果酸能够通过抑制TLR4/NF- κ B通路减轻酒精性肝损伤^[8]、慢性阻塞性肺疾病^[9]、脓毒症肺损伤^[10]大鼠炎症反应和氧化应激损伤。但熊果酸对大鼠CAS易损斑块的影响尚未见文献报道。本实验通过制备CAS易损斑块大鼠模型,并以临床治疗CAS一线用药阿托伐他汀(atorvastatin, ATO)作为阳性对照药物,探讨熊果酸对大鼠CAS易损斑块的影响及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级健康雄性SD大鼠144只,7周龄,220~250 g,购自河北伊维沃生物科技有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(冀)2020-002。饲养环境23~25℃、相对湿度55%~65%、光照/黑暗各12 h

循环,自由进食饮水,适应性饲养1周后开展实验研究。本研究经邯郸市中心医院伦理委员会审批,伦理批号HDZXLL(K)字2019-023,实验过程按照3R原则对所有大鼠施以人道主义关怀。

1.2 药物与试剂

熊果酸(质量分数 $\geq 98.5\%$,批号U6753)购自美国Sigma公司;ATO(规格每片10 mg,批号2011026)购自浙江乐普药业股份有限公司;维生素D₃注射液(规格1 mL:15 mg,批号20200914)购自浙江仙琚制药股份有限公司;卵清白蛋白(货号A8041)、苏丹IV试剂盒(货号S5770)、Movat五色染色试剂盒(货号G3701)购自北京索莱宝科技有限公司;低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C,货号A113-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C,货号A112-1-1)、丙二醛(MDA,货号A003-1-1)、氧化修饰型低密度脂蛋白胆固醇(ox-LDL-C,货号H248)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,货号SEKR-0009)、白细胞介素-1 β (IL-1 β ,货号SEKR-0002)、细胞间黏附分子1(ICAM-1,货号SEKR-0030)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1,货号SEKR-0024)ELISA试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;TLR4(货号bs-20594R)、NF- κ B(货号bs-3485R)、 β -actin(货号bs-12581R)抗体和IgG二抗(货号bs-0294P)购自北京博奥森生物科技有限公司;ECL试剂盒(货号CSB-E08453r)购自广东晶欣生物科技有限公司。

1.3 主要仪器

SM2000r型切片机、EG1150H型包埋机(德国Leica公司);EnVision型酶标仪(英国Perkin公司);

7170A型全自动生化仪(日本日立公司);D37520型高速冷冻离心机、Nanodrop2000型紫外-可见分光光度计(美国 Thermo 公司);VE-180型电泳槽、VE-186型转膜仪(上海天能科技有限公司);Flour Chem M型凝胶成像分析仪(美国 Protein simple 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

按照随机数字表法将144只大鼠随机分为对照组、模型组、ATO(阳性药, $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[3]组和熊果酸10、20、40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组^[11],每组24只。对照组给予常规饲料喂养;其余各组均参照文献报道^[12]的方法制备CAS易损斑块大鼠模型:1次性ip $7\times 10^5\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ 维生素D₃后给予高脂饲料喂养2周,麻醉后沿颈正中切口并游离右侧颈总动脉,阻断近心端和远心端血流后液氮冷冻损伤15 s,恢复血流、逐层缝合并消毒;然后继续高脂饲料喂养10周,并于第3~5周ip $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 牛血清白蛋白(每周3次)和 $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 卵清白蛋白(每3天1次),第5和7周ip $3\times 10^5\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ 维生素D₃。给药:在造模第3周开始ig给药,每天1次,对照组和模型组ig生理盐水,疗程10周。

2.2 苏丹IV染色观察颈动脉斑块分布

各组随机取8只大鼠,麻醉后颈椎脱臼处死,用眼科剪取右侧颈总动脉并纵向剪开,平铺于泡沫板上并固定,用生理盐水冲洗干净后置于4%多聚甲醛溶液中固定48 h,冲洗后置于苏丹IV染色液6 min,75%乙醇溶液清洗多余染液,蒸馏水浸洗2 min,斑块呈红色,通过Image J图像分析软件计算斑块面积与管腔面积比值(PA/LA)。

2.3 HE染色、Movat五色染色观察颈动脉组织病理学改变和斑块形态

各组随机取8只大鼠,麻醉后颈椎脱臼处死,用眼科剪取右侧颈总动脉,用生理盐水冲洗干净后置于4%多聚甲醛溶液中固定72 h,经石蜡包埋、切片(厚度4 μm)、展片、梯度乙醇溶液脱蜡水化处理, (1)取部分切片行常规HE染色^[13]:苏木精染液中染色5 min,蒸馏水冲洗5 min后1%盐酸乙醇分化3 s,蒸馏水冲洗5 min后伊红染液染色3 min,梯度乙醇溶液脱水、二甲苯中透明,通过中性树胶封片后在光学显微镜下观察颈动脉病理学改变;(2)另取部分切片行Movat五色染色,封片后在光学显微镜下观察颈动脉斑块,胶原纤维呈黄色、弹力纤维呈黑色、泡沫细胞呈淡紫色、心肌平滑肌呈红色、蛋白聚糖呈绿色,通过Image J图像分析软件计算颈

动脉斑块泡沫细胞容积分数(FVF)和胶原容积分数(CVF)。

2.4 血清生化指标检测

取各组剩余的8只大鼠,麻醉后经腹主动脉取血, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ($r=8\text{ cm}$)离心5 min分离血清,然后通过生化分析法检测LDL-C、HDL-C水平;通过分光光度法检测MDA、ox-LDL-C水平;通过ELISA法检测TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、MCP-1水平。操作均参照试剂盒说明书。

2.5 Western blotting法检测颈动脉TLR4、NF- κ B蛋白表达

取血完成后,用眼科剪取右侧颈总动脉100 mg,剪碎后加入1 mL RIPA裂解液置于冰上充分裂解30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ($r=8\text{ cm}$)离心20 min取上清液,2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠(BCA)法检测总蛋白浓度,以30 μg 蛋白量上样行SDS-PAGE凝胶电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭后,滴加TLR4(1:800)、NF- κ B(1:800)、 β -actin(1:1 000)抗体后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后滴加IgG二抗(1:3 000)室温孵育1 h,滴加ECL显色,通过凝胶成像分析仪测定蛋白条带灰度值,以目标蛋白与 β -actin条带灰度值的比值做为目标蛋白相对表达量。

2.6 统计学方法

运用SPSS 15.0软件分析实验数据,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验。

3 结果

3.1 熊果酸对CAS易损斑块大鼠颈动脉的影响

苏丹IV染色结果显示,对照组大鼠颈动脉内膜光滑平整,未见CAS斑块;模型组可见大量CAS斑块;与模型组比较,熊果酸10、20、40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组和ATO 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组CAS组斑块数量不同程度减少,其中熊果酸40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组最为明显。与对照组比较,模型组PA/LA值显著升高($P<0.01$);与模型组比较,熊果酸20、40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组和ATO 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组PA/LA值显著降低($P<0.01$);与ATO $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较,熊果酸40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组PA/LA比值显著降低($P<0.01$)。见图1、2。

3.2 熊果酸对CAS易损斑块大鼠颈动脉组织病理学改变的影响

HE染色结果显示,对照组大鼠颈动脉内、中、外膜分层清晰,内膜细胞排列整齐有序,未见CAS易损斑块形成;模型组颈动脉可见平滑肌细胞增

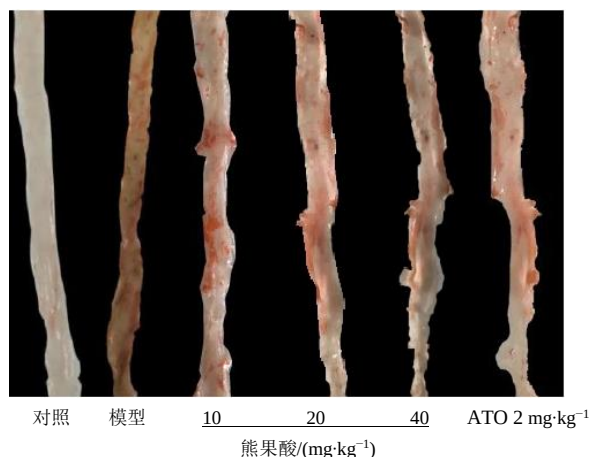
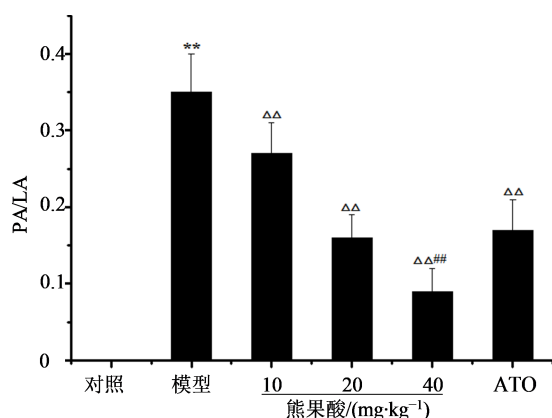


图1 熊果酸对CAS易损斑块大鼠颈动脉斑块的影响(苏丹IV染色)

Fig. 1 Effect of UA on carotid artery plaque in rats with CAS vulnerable plaque (Sudan IV staining)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: △△ $P < 0.01$; 与ATO组比较: ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; △△ $P < 0.01$ vs model group; ## $P < 0.01$ vs ATO group

图2 熊果酸对CAS易损斑块大鼠颈动脉PA/LA比值的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of UA on PA/LA ratio of carotid artery in rats with CAS vulnerable plaque ($\bar{x} \pm s, n=8$)

多、排列紊乱、内膜增厚、大量泡沫细胞聚集、隆起的CAS易损斑块等病理学改变;与模型组比较,熊果酸10、20、40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和ATO组CAS组颈动脉上述病理性改变不同程度减轻,其中熊果酸40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组效果最为明显。见图3。

3.3 熊果酸对CAS易损斑块大鼠颈动脉易损斑块的影响

如图4、5所示,Movat五色染色结果显示,对照组未见颈动脉斑块,模型组、ATO组和熊果酸10、20、40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组可见大量颈动脉斑块;与模型组比较,熊果酸20、40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和ATO组斑块泡沫细

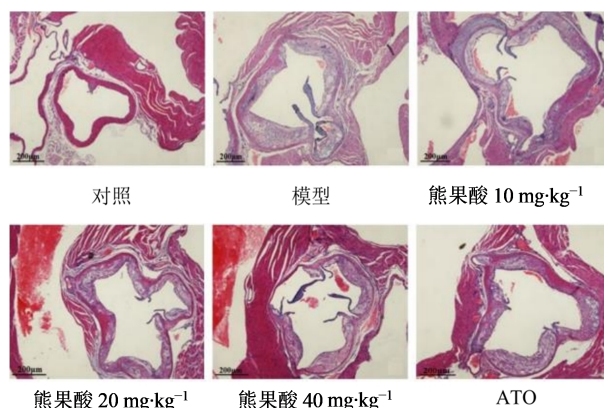


图3 熊果酸对CAS易损斑块大鼠颈动脉组织病理学改变的影响(HE染色)

Fig. 3 Effect of UA on histopathological changes of carotid artery in rats with CAS vulnerable plaque (HE staining)

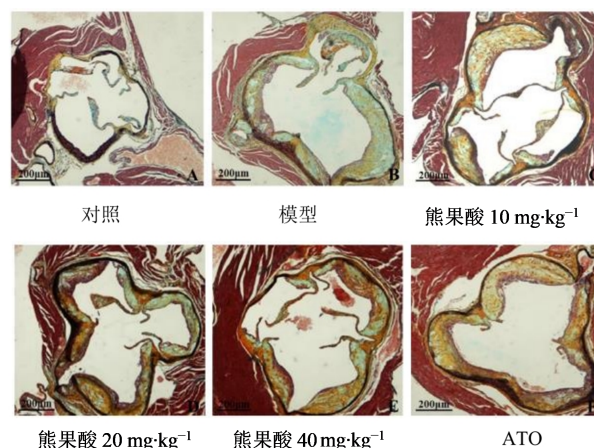
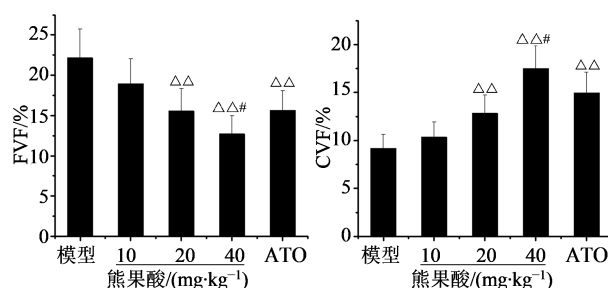


图4 熊果酸对CAS易损斑块大鼠颈动脉易损斑块的影响(Movat五色染色)

Fig. 4 Effect of UA on vulnerable plaque of carotid artery in rats with CAS vulnerable plaque (Movat five-color staining)



与模型组比较: △△ $P < 0.01$; 与ATO组比较: # $P < 0.05$

△△ $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs ATO group

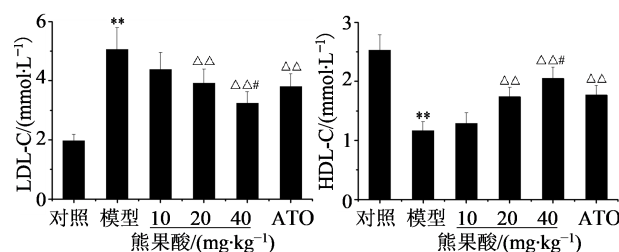
图5 熊果酸对CAS易损斑块大鼠斑块FVF、CVF的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 5 Effect of UA on FVF and CVF in rats with CAS vulnerable plaque ($\bar{x} \pm s, n=8$)

胞数量明显减少、胶原表达量明显增多, FVF 显著降低、CVF 显著升高 ($P < 0.01$); 与 ATO 组比较, 熊果酸 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 FVF 显著降低、CVF 显著升高 ($P < 0.05$)。

3.4 熊果酸对 CAS 易损斑块大鼠血清 LDL-C、HDL-C 水平的影响

与对照组比较, 模型组血清 LDL-C 水平显著升高、HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 熊果酸 20 、 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和 ATO 组 LDL-C 水平显著降低、HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 ATO 组比较, 熊果酸 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 LDL-C 水平显著降低、HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$)。见图 6。



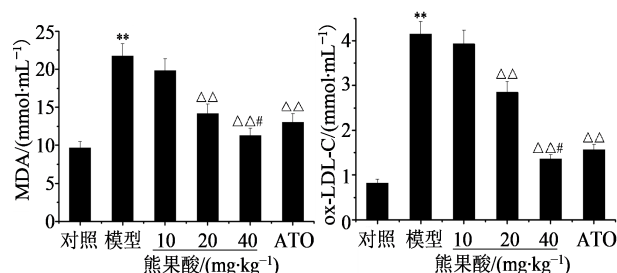
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 ATO 组比较: # $P < 0.05$
 ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs ATO group

图 6 熊果酸对 CAS 易损斑块大鼠血清 LDL-C、HDL-C 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 6 Effect of UA on level of LDL-C, HDL-C in serum of rats with CAS vulnerable plaque ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.5 熊果酸对 CAS 易损斑块大鼠血清 MDA、ox-LDL-C 水平的影响

与对照组比较, 模型组 MDA、ox-LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 熊果酸 20 、 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和 ATO 组 MDA、ox-LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 ATO 组比较, 熊果酸 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 MDA、ox-LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$)。见图 7。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 ATO 组比较: # $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs ATO group

图 7 熊果酸对 CAS 易损斑块大鼠血清 MDA、ox-LDL-C 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 7 Effect of UA on level of MDA, ox-LDL-C in serum of rats with CAS vulnerable plaque ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.6 熊果酸对 CAS 易损斑块大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、MCP-1 水平的影响

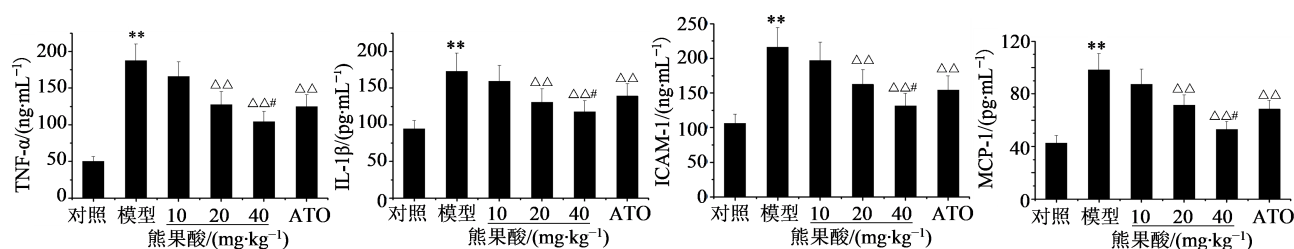
与对照组比较, 模型组 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、MCP-1 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 熊果酸 20 、 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和 ATO 组 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、MCP-1 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 ATO 组比较, 熊果酸 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、MCP-1 水平显著降低 ($P < 0.05$)。见图 8。

3.7 熊果酸对 CAS 易损斑块大鼠颈动脉 TLR4、NF- κ B 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组 TLR4、NF- κ B 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 熊果酸 20 、 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和 ATO 组 TLR4、NF- κ B 相对表达量显著降低 ($P < 0.01$); 与 ATO 组比较, 熊果酸 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 TLR4、NF- κ B 相对表达量显著降低 ($P < 0.01$)。见图 9。

4 讨论

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 将引发血管狭窄、血管壁弹性减弱, 导致靶器官继发性改变。AS 主要累及大中型动脉, 其中颈动脉是 AS 的常见



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 ATO 组比较: # $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs ATO group

图 8 熊果酸对 CAS 易损斑块大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、MCP-1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 8 Effect of UA on level of TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, MCP-1 in serum of rats with CAS vulnerable plaque ($\bar{x} \pm s, n=8$)

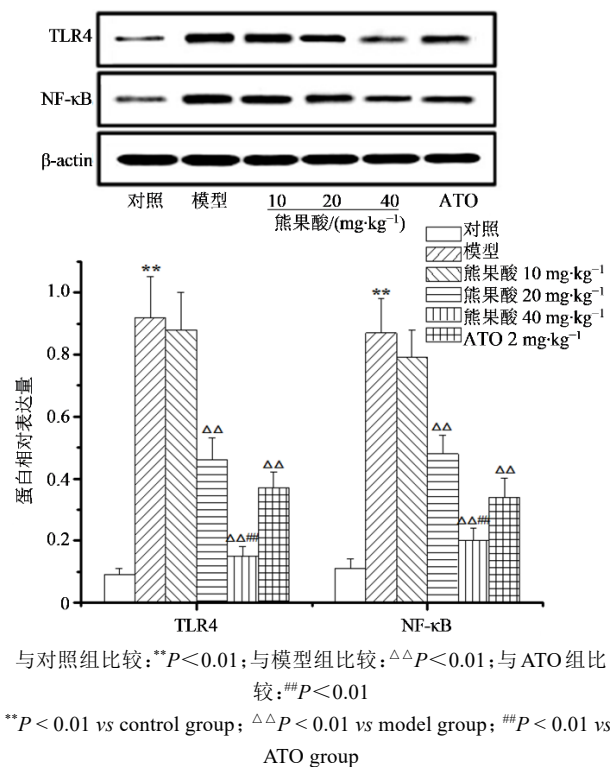


图9 熊果酸对CAS易损斑块大鼠颈动脉TLR4、NF-κB蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 9 Effect of UA on expression of TLR4 and NF-κB protein in carotid artery of rats with CAS vulnerable plaque ($\bar{x} \pm s, n=8$)

病发部位,是导致缺血性脑血管病的主要原因。CAS病变严重程度与斑块稳定性密切相关,所以稳定易损斑块对抑制CAS并发症具有重要意义,Mury等^[14]研究发现斑块内炎症反应与氧化应激状态是粥样斑块不稳定的关键性因素。

目前,他汀类药是临床防治CAS的一线用药,具有稳定易损斑块的作用,对CAS具有较好的防治效果,常作为CAS新药研究的阳性对照药物^[15]。本研究采用高脂饮食2周+ip维生素D₃+液氮冷冻损伤血管+免疫刺激的方法制备CAS易损斑块大鼠模型,模型大鼠可见颈动脉斑块数量明显增多,以及平滑肌细胞增多、排列紊乱、内膜增厚、大量泡沫细胞聚集等病理学改变,FVF显著升高、CVF显著降低,与魏刚等^[12]研究报道一致。进一步研究发现,经熊果酸或ATO干预能够明显减少CAS易损斑块大鼠颈动脉斑块数量、降低PA/LA比值,明显改善颈动脉组织病理学改变,降低FVF、提高CVF,降低血浆LDL-C水平水平、提高HDL-C水平,并且熊果酸40 mg·kg⁻¹组对CAS易损斑块大鼠的干预作用优于ATO组,提示熊果酸具有稳定大鼠CAS易损斑

块的作用。

血管内皮粥样硬化斑块病变是AS的主要病变表现,导致内皮功能障碍而使炎症因子TNF-α、IL-1β、MCP-1和活性氧(ROS)大量释放,进而引发炎症反应和氧化应激损伤。TNF-α和IL-1β能够刺激巨噬细胞、中性粒细胞等进一步释放白细胞介素、前列腺素(PG)、MCP-1等细胞因子而加重炎症反应,并且能够刺激ICAM-1释放而增加内皮通透性和炎症细胞浸润^[16]。Tam等^[17]研究发现降低TNF-α水平能够有效缓解AS进展。靳宏光等^[18]研究发现给予IL-1β单克隆抗体能够显著降低AS小鼠斑块数量。ROS能够氧化和修饰LDL-C形成ox-LDL-C,ox-LDL-C可诱导炎症因子表达与释放,并促进血管内皮细胞增殖,导致内膜增厚及CAS斑块形成^[19]。本研究结果显示,经熊果酸或ATO干预能够明显降低CAS易损斑块大鼠血浆TNF-α、IL-1β、MCP-1、ICAM-1、MDA、ox-LDL-C水平,并且熊果酸40 mg·kg⁻¹组对CAS易损斑块大鼠的干预作用优于ATO组,提示熊果酸对CAS易损斑块的稳定作用可能与其抑制炎症和氧化应激反应有关。

TLR是一类跨膜蛋白,由细胞外域、跨膜结构域和细胞内结构域3部分组成。其中,TLR4是非特异性免疫系统重要的模式识别受体,TLR4能够促进NF-κB核转位,进而与特定DNA位点结合而促进TNF-α、IL-1β、IL-6等细胞因子转录表达^[20]。孙攀兴等^[21]研究发现NF-κB能够激活一氧化氮合酶(NOS),导致NO等ROS大量释放而引发氧化应激反应。本研究结果显示,经熊果酸或ATO干预能够明显下调CAS易损斑块大鼠颈动脉TLR4、NF-κB蛋白表达,并且熊果酸40 mg·kg⁻¹组对TLR4、NF-κB表达的调控作用优于ATO组,提示熊果酸对TLR4/NF-κB通路具有抑制作用,这可能是熊果酸抑制CAS易损斑块大鼠炎症和氧化应激损伤的重要机制。

熊果酸具有稳定大鼠CAS易损斑块的作用,其机制可能与抑制TLR4/NF-κB通路,进而抑制炎症反应和氧化应激有关。本研究结果说明熊果酸可做为CAS治疗的潜在药物,具有良好的开发前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Varghese J F, Patel R, Yadav U C S. Novel insights in the metabolic syndrome-induced oxidative stress and

- inflammation-mediated atherosclerosis [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2018, 14(1): 4-14.
- [2] Chai S C, Davis K, Zhang Z G, et al. Effects of tart cherry juice on biomarkers of inflammation and oxidative stress in older adults [J]. *Nutrients*, 2019, 11(2): 228.
- [3] 魏 刚, 包小敏, 张 英, 等. 阿托伐他汀与一氧化碳供体分子3联用对动脉粥样硬化易损斑块模型大鼠炎症及氧化应激指标的影响 [J]. *中国药房*, 2019, 30(3): 338-343.
Wei G, Bao X M, Zhang Y, et al. Effects of atorvastatin combined with CORM-3 on inflammation and oxidative stress indexes in atherosclerotic vulnerable plaque model rats [J]. *China Pharm*, 2019, 30(3): 338-343.
- [4] 王 佳, 张 炯. 熊果酸对急性心肌梗死小鼠氧化应激和脂质代谢的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(1): 14-18.
Wang J, Zhang J. The effect of ursolic acid on oxidative stress and lipid metabolism in mice with acute myocardial infarction [J]. *Chin J Arterioscler*, 2018, 26(1): 14-18.
- [5] 王金艳, 孟祥茹, 肖亚利, 等. 熊果酸对动脉粥样硬化大鼠氧化应激和炎症反应的影响 [J]. *安徽医药*, 2018, 22(5): 815-818, 1007.
Wang J Y, Meng X R, Xiao Y L, et al. The effects and mechanism of ursolic acid on oxidative stress and inflammation in atherosclerosis rats [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2018, 22(5): 815-818, 1007.
- [6] Fu X, He H D, Li C J, et al. microRNA-155 deficiency attenuates inflammation and oxidative stress in experimental autoimmune prostatitis in a TLR4-dependent manner [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36(9): 712-720.
- [7] Wang L, Liu X H, Chen H, et al. Picoside II protects rat kidney against ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and inflammation by the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1253-1258.
- [8] 杨冬晗, 贾逸林, 张文龙, 等. 基于TLR4信号通路探讨熊果酸改善大鼠酒精性肝损伤的作用机制 [J]. *现代预防医学*, 2021, 48(6): 1099-1102, 1127.
Yang D H, Jia Y L, Zhang W L, et al. Exploring the mechanism of ursolic acid in ameliorating alcoholic liver injury in rats based on TLR4 signaling pathway [J]. *Mod Prev Med*, 2021, 48(6): 1099-1102, 1127.
- [9] 余晓丹, 李 铮. 熊果酸通过抑制TLR4/NF- κ B通路以及Caspase-3蛋白的表达对慢阻肺疾病大鼠的影响 [J]. *解剖学研究*, 2019, 41(6): 483-486.
Yu X D, Li Z. Effects of ursolic acid on Caspase-3 protein expression in rats with chronic obstructive disease via TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Anat Res*, 2019, 41(6): 483-486.
- [10] 袁 园, 吴晓东, 龙安予. 熊果酸对脓毒症模型大鼠肺损伤的保护作用及对HMGB1/TLR4/NF- κ B通路的影响 [J]. *中医学报*, 2019, 34(3): 555-558, 580.
Yuan Y, Wu X D, Long A Y. Protective effect of ursolic acid on lung injury and its influence on HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway in septic model rats [J]. *Acta Chin Med*, 2019, 34(3): 555-558, 580.
- [11] 杨晓龙. 熊果酸对动脉粥样硬化大鼠血脂和血液流变学的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(11): 1509-1512.
Yang X L. The effects of ursolic acid on blood lipid and hemorheology in rats with atherosclerosis [J]. *Chin J Integr Med Cardio/cerebrovascular Dis*, 2018, 16(11): 1509-1512.
- [12] 魏 刚, 高尚远, 张 英, 等. 免疫刺激协同液氮冷冻损伤血管构建动脉粥样硬化易损斑块大鼠模型 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(35): 5656-5661.
Wei G, Gao S Y, Zhang Y, et al. Immunostimulation combined with liquid nitrogen freezing to construct a rat model of atherosclerotic vulnerable plaque [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2020, 24(35): 5656-5661.
- [13] 庞 庚, 李 沙, 唐新月, 等. 推拿疗法对骨骼肌纤维化大鼠MMP-1和TIMP-1表达的影响 [J]. *天津中医药大学学报*, 2020, 39(2): 209-214.
Pang G, Li S, Tang X Y, et al. Effect of massage therapy on the expression of MMP-1 and TIMP-1 in rats with skeletal muscle fibrosis [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med*, 2020, 39(2): 209-214.
- [14] Mury P, Chirico E N, Mura M, et al. Oxidative stress and inflammation, key targets of atherosclerotic plaque progression and vulnerability: Potential impact of physical activity [J]. *Sports Med*, 2018, 48(12): 2725-2741.
- [15] Chen Z, Gao X, Jiao Y, et al. Tanshinone IIA exerts anti-inflammatory and immune-regulating effects on vulnerable atherosclerotic plaque partially via the TLR4/MyD88/NF- κ B signal pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 850.
- [16] 董福兴. 益赛普介导TNF- α 调控UUO小鼠肾组织C3在肾间质纤维化中的作用机制 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(3): 267-272.
Dong F X. Mechanisms of complement 3 expression via etanercept-mediated TNF- α in UUO mice renal tubular fibrosis [J]. *Chin J Clin Exp Pathol*, 2018, 34(3): 267-272.
- [17] Tam L S, Kitas G D, González-Gay M A. Can suppression of inflammation by anti-TNF prevent progression of subclinical atherosclerosis in inflammatory arthritis ? [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53(6): 1108-1119.

- [18] 靳宏光, 朱 星, 李 铁, 等. 参红通络方对大鼠动脉粥样硬化斑块的影响 [J]. 医药导报, 2021, 40(7): 863-869.
Jin H G, Zhu X, Li T, et al. Effect of Shenhong Tongluo prescription on atherosclerotic plaque [J]. Her Med, 2021, 40(7): 863-869.
- [19] Hartley A, Haskard D, Khamis R. Oxidized LDL and anti-oxidized LDL antibodies in atherosclerosis - Novel insights and future directions in diagnosis and therapy [J]. Trends Cardiovasc Med, 2019, 29(1): 22-26.
- [20] 杨怡侠, 刘天龙, 刘 晶, 等. 黄芪三萜皂苷通过抑制 TLR-4/NF- κ B p65 信号调节的炎症反应而发挥保护病毒性心肌炎的作用研究 [J]. 中南药学, 2018, 16(12): 1705-1709.
- Yang Y X, Liu T L, Liu J, et al. *Astragalus* triterpenoid saponins attenuated CVB₃-induced virus myocarditis via suppressing TLR-4/NF- κ B p65 signal pathway [J]. Central South Pharm, 2018, 16(12): 1705-1709.
- [21] 孙攀兴, 邱春光. 大黄素通过调控 TLR4/NF- κ B 通路对脂多糖诱导血管内皮细胞氧化损伤的保护作用研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(6): 1040-1045.
Sun P X, Qiu C G. Protective effect of emodin on lipopolysaccharide induced oxidative damage of vascular endothelial cells by regulating TLR4/NF- κ B pathway [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(6): 1040-1045.

[责任编辑 兰新新]