

• 药理与临床 •

茱萸丸抑制氧化三甲胺介导的 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路诱导血管内皮细胞焦亡

宋 玮, 张钟艺, 王 楷, 沈 涛*

成都中医药大学, 四川 成都 610075

摘要: 目的 研究茱萸丸对动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的影响及其相关机制。方法 采用高脂饲料喂养雄性低密度脂蛋白受体敲除 (low density lipoprotein receptor knockout, LDLR^{-/-}) 小鼠诱导 AS 模型, 造模周期为 12 周。造模成功的 50 只 LDLR^{-/-} 小鼠随机分成模型组及茱萸丸低、中、高剂量 (130.54、261.08、552.16 mg/kg) 组和阿托伐他汀 (10.40 mg/kg) 组, 每组 10 只, C57BL/6J 小鼠 10 只作为对照组。给药 12 周后, 采用生化法检测小鼠血清三酰甘油 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE)、Masson、油红 O 染色观察小鼠主动脉的病理学改变; ELISA 检测血清中白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)、IL-1 β 、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 超高液相色谱串联质谱法 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS) 检测小鼠血浆中三甲胺 (trimethylamine, TMA)、氧化三甲胺 (trimethylamine oxide, TMAO) 含量; 16S rRNA 技术检测小鼠粪便中肠道菌群物种组成差异; 荧光探针法检测主动脉 ROS 的荧光强度; 免疫荧光及 Western blotting 检测小鼠主动脉硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP) 和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 (NOD like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 蛋白表达; qRT-PCR 检测主动脉硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX)、TXNIP、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC)、NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) mRNA 表达。结果 与对照组比较, 模型组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平升高 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著下降 ($P < 0.01$), 主动脉内膜大面积增厚, 形成明显的泡沫细胞, 脉壁胶原蛋白沉积增多, 血清中 IL-18、IL-1 β 、ROS、TMA、TMAO 水平显著升高 ($P < 0.01$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$), Chao1、Ace 以及 observed species 指数降低 ($P < 0.01$), 拟杆菌门、粪杆菌属、布劳特氏属、乳杆菌属菌群丰度显著下降 ($P < 0.01$), 主动脉中 ROS 含量增加 ($P < 0.01$), TXNIP、NLRP3 蛋白与 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$), TRX、ASC、Caspase-1 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 茱萸丸组血清 TG、TC、LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$), 主动脉斑块、血管壁泡沫细胞及胶原蛋白沉积均呈现不同程度的改善, 血清中 IL-18、IL-1 β 、ROS、TMA、TMAO 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), SOD 活性显著升高 ($P < 0.01$), Chao1、Ace 以及 observed species 指数均明显升高 ($P < 0.01$), 拟杆菌门、粪杆菌属、布劳特氏属、乳杆菌属菌群丰度升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 厚壁菌门菌群丰度降低 ($P < 0.05$), 主动脉中 ROS 含量减少 ($P < 0.05$ 、0.01), TXNIP、NLRP3 蛋白与 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), TRX、ASC、Caspase-1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。结论 茱萸丸能够显著抑制 LDLR^{-/-} AS 小鼠主动脉病理改变、调节肠道菌群中有益菌和有害菌的相对丰度, 减少 TMAO 生成, 抑制 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路, 改善炎症反应, 减轻内皮细胞损伤, 从而发挥抗 AS 的作用。

关键词: 茱萸丸; 动脉粥样硬化; 肠道菌群; 氧化三甲胺; 活性氧/硫氧还蛋白相互作用蛋白/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白信号通路; 小檗碱; 黄连碱; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)04-1215-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.015

收稿日期: 2023-10-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (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, 博士研究生, 从事中医药防治代谢性疾病的临床与实验研究。E-mail: 361871575@qq.com

*通信作者: 沈 涛, 教授, 博士生导师, 主要从事中药及复方治疗代谢性疾病研究。E-mail: shentaotcm@ailiyun.com

Zhuyu Pills inhibits pyroptosis of vascular endothelial cells induced by ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway mediated by trimethylamine oxide

SONG Wei, ZHANG Zhongyi, WANG Kai, SHEN Tao

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of Zhuyu Pills (茺菟丸) on atherosclerosis (AS). **Methods** Male low-density lipoprotein receptor knockout (LDLR^{-/-}) mice were fed high-fat diet to induce AS model. The modeling period was 12 weeks. The 50 LDLR^{-/-} mice successfully modeled were randomly divided into model group, Zhuyu Pills low-, medium- and high-dose (130.54, 261.08, 552.16 mg/kg) group and atorvastatin (10.40 mg/kg) group, with 10 mice in each group. Another 10 C57BL/6J mice were set as control group. After 12 weeks of administration, triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels in serum of mice were detected by biochemical method; The pathological changes of aorta were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson staining and oil red O staining; The contents of interleukin-18 (IL-18), IL-1 β , reactive oxygen species (ROS) and superoxide dismutase (SOD) were detected by ELISA; The contents of trimethylamine (TMA) and trimethylamine oxide (TMAO) in serum of mice were detected by ultra-high liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); The species composition of intestinal flora in stool of mice was detected by 16S rRNA technique; The fluorescence intensity of ROS in aorta was detected by fluorescence probe; The expressions of thioredoxin interacting protein (TXNIP) and NOD like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) in aorta was detected by immunofluorescence and Western blotting; The mRNA expressions of thioredoxin (*TRX*), *TXNIP*, apoptosis-associated speck-like protein (*ASC*), *NLRP3* and cysteine-aspartate protease-3 (*Caspase-1*) were detected by qRT-PCR. **Results** Compared with control group, TC, TG and LDL-C levels in serum of mice in model group were significantly increased ($P < 0.01$), HDL-C level was decreased ($P < 0.01$), the aortic intima was thickened in a large area and formed obvious foam cells, the collagen deposition in the pulse wall was increased, IL-18, IL-1 β , ROS, TMA and TMAO levels in serum were increased ($P < 0.01$), SOD activity was decreased ($P < 0.01$). The index of Chao1, Ace and observed species were decreased ($P < 0.01$), the abundance of Bacteroidota, *Faecalibaculum*, *Blautia* and *Lactobacillus* were significantly decreased ($P < 0.01$), ROS levels in aorta was increased ($P < 0.01$), and the expression levels of TXNIP and NLRP3 protein and mRNA expressions were increased, the mRNA expression levels of *TRX*, *ASC* and *Caspase-1* were increased ($P < 0.01$). Compared with model group, TG, TC and LDL-C levels in serum were decreased ($P < 0.05, 0.01$), HDL-C level was increased in Zhuyu Pills group, aortic plaque, vascular wall foam cells and collagen deposition were improved to varying degrees, IL-18, IL-1 β , ROS, TMA and TMAO levels in serum were decreased ($P < 0.05, 0.01$), and SOD activity was increased ($P < 0.01$). Chao1, Ace and observed species indexes were significantly increased ($P < 0.01$), the abundance of Bacteroidota, *Faecalibaculum*, *Blautia* and *Lactobacillus* were increased ($P < 0.05, 0.01$), while the abundance of Firmicutes was decreased ($P < 0.05$), ROS level in aorta was decreased ($P < 0.05, 0.01$), protein and mRNA expression levels of TXNIP and NLRP3 were decreased ($P < 0.01$), mRNA expression levels of *TRX*, *ASC* and *Caspase-1* were decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Zhuyu Pills can significantly inhibit the pathological changes of aorta in LDLR^{-/-} AS mice, regulate the relative abundance of beneficial and harmful bacteria in intestinal flora, reduce TMAO production, inhibit ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway, improve inflammatory response, and alleviate endothelial cell damage, thus playing an anti-AS role.

Key words: Zhuyu Pills; atherosclerosis; intestinal flora; trimethylamine oxide; reactive oxygen species/thioredoxin interacting protein/NOD like receptor family pyrin domain containing 3 signaling pathway; berberine; coptisine; evodiamine; rutecarpine

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。研究表明, 氧化三甲胺 (trimethylamine oxide, TMAO) 作为肠道菌群衍生的代谢产物, 是炎症调控的关键因子, 可增加炎症因子释放或激活相关炎症通路, 促进泡沫细胞在血管内沉积^[5]。TMAO 升高会导致大量活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的生成, 过

量的 ROS 诱导硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP) 从硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 中解离。TXNIP 降低 TRX 的 ROS 清除能力并与核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 (NOD like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 结合, 介导 NLRP3 炎症小体与凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 前体 (pro-cystein-aspartate protease-3, pro-Caspase-3) 的组装。随后 Caspase-1 的自切割和激活反过来导致白细胞介素-1 β 前体 (pro-interleukin-1 β , pro-IL-1 β) 和 pro-IL-18 加工成其成熟形式, 然后诱导其他促炎基因的表达, 引发氧化应激和炎症反应, 促进 AS 形成^[6]。

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 发生^[7]。因此, 升清降浊、恢复中焦升降功能, 是调控血脂、防治 AS 的关键。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, 二者苦辛相合, 具有苦辛化浊的功效^[8]。课题组前期研究证实, 黄连、吴茺莢配伍可显著调控高脂模型动物血脂, 且 1:1 调血脂效果最佳^[9], 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^[10-11]。为进一步探讨茺莢丸防治 AS 的作用机制, 本研究以 TMAO 介导的 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路为切入点, 探讨其减轻内皮细胞损伤的机制, 为临床治疗 AS 提供新思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 13 只, 同品系的低密度脂蛋白受体敲除 (low density lipoprotein receptor knockout, LDLR^{-/-}) 小鼠 53 只, 体质量 (22 \pm 2) g, 6 周龄, 购自成都达硕实验动物有限公司, 动物合格证号 SCXK (川) 2020-034。动物饲养于成都中医药大学动物中心清洁级动物房, 使用许可证编号 SYXK (川) 2019-049, 温度 22~25 $^{\circ}$ C, 相对湿度 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江苏协同医药生物工程有限责任公司, 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 ⁶⁰Co γ 射线辐照灭菌处理。动物实验通过成都中医药大学动物

实验伦理委员会审查 (伦理编号 2021DL-001)。

1.2 药材

茺莢丸由黄连 5 g、吴茺莢 5 g 组成。黄连 (批号 190901)、吴茺莢 (批号 191001) 由成都中医药大学附属医院制剂室提供, 经成都中医药大学鉴定教研室严铸云教授分别鉴定为毛茺科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、芸香科植物吴茺莢 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥成熟果实, 符合《中国药典》2020 年版要求。

1.3 药品与试剂

阿托伐他汀钙片 (批号 H20051408) 购自沈阳辉瑞制药有限公司; 总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 测定试剂盒 (批号分别为 A111-1-1、A110-1-1、A113-1-1、A112-1-1) 购自南京建成生物科技有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色、油红染液、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、G1016、G2002、BL521A、G1101-500ML) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司; Masson 染色液 (批号 20200831) 购自北京索莱宝科技有限公司; IL-18、IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号分别为 MM-0182M1、MM-01563M1) 购自江苏酶免实业有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、ROS 试剂盒 (批号分别为 1013M、2086R) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 甲酸 (批号 20191010) 购自美国 ROE 公司; 乙腈 (批号 WXD0233V) 购自德国默克公司; 甲酸胺 (批号 20190815) 购自美国 Sigma 公司; 戊巴比妥钠 (批号 11715) 购自美国 Merck 公司; ROS 检测试剂盒 (批号 C1300) 购自北京普利莱基因公司; TXNIP 抗体、NLRP3 抗体、DAPI、羊抗兔 IgG 二抗 (批号分别为 ab188865、ab65596、ab66217、ab182981) 购自英国 Abcam 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (批号 R220901) 购自成都福际生物技术有限公司; iScriptTM cDNA 合成试剂盒、Sso AdvancedTM Universal SYBR[®] Green Supermix (批号分别为 221010-A4、221010-A5) 购自成都蓉为基因生物技术有限公司。

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); 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪、6470 Triple Quadruple MS/MS 型质谱仪(美国 Agilent 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); NovoCyte 2060R 型 NovoCyte™ 流式细胞仪(杭州艾森生物有限公司); 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); 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); ChemiScope 6100 型化学发光成像系统、ChemiScope Analysis 型图像采集软件(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 茺萸丸的制备

称取 50 g 黄连、50 g 吴茺萸后,加入 10 倍量水浸泡 1 h,然后煎煮 40 min 滤过,滤渣加入 9 倍量水继续煎煮 30 min,合并 2 次滤液后放入真空冻干机中制作冻干粉。最终 100 g 茺萸丸获得 17.21 g 冻干粉,即每克冻干粉中含 5.81 g 药材,保存于 4 °C 备用。采用高效液相色谱仪对茺萸丸中小檗碱、黄连碱、吴茺萸碱和吴茺萸次碱 4 种主要生物碱进行检测^[12],结果显示,茺萸丸中含有 36.8 mg/g 小檗碱、14.9 mg/g 黄连碱、0.78 mg/g 吴茺萸碱和 0.33 mg/g 吴茺萸次碱。

2.2 造模、分组与给药

经过适应性喂养后,13 只 C57BL/6J 小鼠作为对照组,继续以基础饲料喂养。53 只同品系的 LDLR^{-/-}小鼠给予高脂饲料喂养造模,每天 2 次投喂(8:00、16:00 时各 1 次),自由饮水及活动 12 周,构建 AS 模型^[13]。造模周期 12 周,然后在对照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型是否成功,主动脉斑块形成可判定为 AS 造模成功^[14]。造模成功后,将 50 只 LDLR^{-/-}小鼠按体质量随机分为模型组及茺萸丸低、中、高剂量(130.54、261.08、522.16 mg/kg,分别相当于临床剂量的 0.5、1、2 倍^[15])组和阿托伐他汀(10.40 mg/kg)组,每组 10 只。各给药组 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积无菌蒸馏水,1 次/d,连续

给药 12 周。

2.3 血脂水平测定

末次给药后 12 h 禁食不禁水,摘眼球取血。室温静置 2 h,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,收集上层血清。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、HDL-C 水平。

2.4 主动脉 HE、Masson 染色

将采集完血清标本的小鼠脱颈椎处死,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(optimum cutting temperature, OCT)包埋剂处理,制成厚度为 5 μm 的石蜡切片,进行常规 HE、Masson 染色,光学显微镜下观察主动脉病理变化并拍照保存。

HE 染色阳性面积比=斑块面积/管腔面积

Masson 染色阳性面积=蓝色区域面积/横截面总面积

2.5 主动脉油红 O 染色

将冰冻切片晾干,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,显微镜下观察和摄片,采用 Image pro plus 6.0 软件分析。

油红染色阳性区域面积比=红色区域面积/横截面总面积

2.6 ELISA 检测血清中 IL-18、IL-1β、ROS 水平和 SOD 活性

按照试剂盒说明书检测血清中 IL-18、IL-1β、ROS 水平和 SOD 活性。

2.7 UHPLC-MS/MS 检测血浆三甲胺(trimethylamine, TMA)、TMAO 的含量

用含有乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)的采集管采集血液后,立即轻轻颠倒混匀,4 °C、3 000 r/min 离心 10 min,取上清液即血浆。精确吸取 50 μL 血浆,加到 150 μL 甲醇中,涡旋 1 min,13 000 r/min 离心 10 min(离心半径 3 cm),取上清液进样,用于 UHPLC-MS/MS 分析。通过 X Bridge BEH Amide 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.5 μm)色谱柱对目标化合物进行色谱分离,流动相 A 为 10 mmol/L 甲酸铵(pH 3.5),流动相 B 为乙腈(pH 3.5)。气体温度 350 °C;气体体积流量 9 L/min;雾化器压力 2.758×10⁵ kPa;鞘气加热器 300 °C;鞘气体积流量 11 L/min;毛细管 3 500 V。

2.8 肠道菌群高通量测序

末次给药后,收集小鼠新鲜粪便。戴一次性无

菌手套，左手抓住小鼠，右手轻轻柔按揉小鼠腹部，刺激排便。当有粪便排出时，用一次性镊子夹取粪便 2~3 粒，置于灭菌冻存管，液氮保存。每取 1 只小鼠粪便换 1 次镊子，以防交叉感染，影响肠道菌群结果，且夹取粪便放入冻存管中务必迅速，以防空气中暴露太久，导致感染。小鼠粪便样本送至武汉迈维生物科技有限公司进行 16S rRNA 测序，按试剂盒说明进行操作。

2.8.1 DNA 提取和质检 使用 MoBio PowerSoil DNA Isolation 试剂盒提取基因组 DNA，使用纳米滴检验 DNA 质量和浓度。

2.8.2 目标片段 PCR 扩增 使用引物序列为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增。

2.8.3 PCR 产物电泳检测和纯化 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增目的条带大小，使用磁珠法进行自动化纯化。

2.8.4 Illumina Miseq 测序 将 PCR 产物回收纯化，利用 NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq 试剂盒进行建库，使用 Illumina Miseq PE300 平台进行测序。

2.8.5 操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 分析 使用 UPARSE 软件根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体，利用 RDP classifie 对每条序列进行物种分类注释。使用 Mothur 对 α 多样性进行分析，结果以 Chao1 指数、Ace 指数、observed species 指数表示。

2.9 荧光探针法检测主动脉组织 ROS 水平

取各组主动脉组织，按照 ROS 试剂盒说明书操作，激发和发射波长分别为 490、525 nm，测定 ROS 吸光度 (A) 值，根据样品和对照相对荧光单位 (relative fluorescence unit, RFU) 的差值计算 ROS 含量。

2.10 免疫荧光双标检测主动脉组织 TXNIP 和 NLRP3 蛋白表达

石蜡组织切片经脱蜡、水化、抗原修复、标记及封闭，滴加 TXNIP 抗体 (1:50)，4 °C 孵育过夜；磷酸缓冲液浸洗 3 次，滴加荧光二抗 (1:100，滴加 CY3-TSA)，湿盒中 37 °C 孵育 1 h，PBST 浸洗 3 次，血清室温封闭 30 min，吸掉封闭液，滴加稀释的 NLRP3 抗体 (1:50)，4 °C 孵育避光过夜，PBST 浸洗 3 次，滴加荧光二抗 (1:100，FITC-TSA)，湿盒中 37 °C 孵育 1 h，PBST 浸洗 3 次，滴

加 DAPI 避光孵育 5 min 复染细胞核，PBST 浸洗 4 次去处多余的 DAPI，用含抗荧光淬灭剂的封片液封片，荧光显微镜下观察并拍照记录，采用 Image pro plus 6.0 软件进行分析。

2.11 Western blotting 检测主动脉组织 TXNIP 和 NLRP3 蛋白表达

每组取 3 只小鼠主动脉组织进行蛋白提取，使用 BCA 测定各组总蛋白浓度，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，分别加入 TXNIP (1:1 000)、NLRP3 (1:1 000)、GAPDH (1:5 000) 一抗，4 °C 摇床孵育过夜；加入二抗 (1:10 000)，4 °C 摇床孵育 2 h，显影曝光，使用 ImageJ 1.44 软件对条带进行分析。

2.12 qRT-PCR 检测主动脉组织 TRX、TXNIP、ASC、NLRP3 和 Caspase-1 mRNA 表达

采用总 RNA 提取试剂盒提取主动脉组织中总 RNA，采用超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度。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，收集荧光信号，结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 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 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
TRX	F: CTGATCGAGAGCAAGGAAGC	158
	R: TCAAGGAACACCACATTGGA	
TXNIP	F: CGAGTCAAAGCCGTCAGGAT	400
	R: TTCATAG-CGCAAGTAGTCCAAGGT	
ASC	F: GTCTTAGGGGCGGAAACCAA	178
	R: CCGCGGTCACCTTTTACTCT	
NLRP3	F: CTCGTCACCATGGGTTCTGGT	123
	R: AACGGACACTCGTCATCTTCA	
Caspase-1R	F: GGACCCTCAAGTTTTGCCCT	144
	R: AACTTGAGCTCCAACCCTCG	
GAPDH	F: CAGTGGCAAAGTGGAGATTGTTG	169
	R: TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT	

2.13 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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 (One-way ANOVA) 分析；若不符合正态分布或方差齐性检验，采用非参数秩和检验，相关性采用 Pearson 相关性分析。

3 结果

3.1 茺萸丸对 AS 小鼠血清 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 水平的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$), HDL-

C 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$)。

3.2 茺萸丸对 AS 小鼠主动脉病理变化的影响

如图 1 所示, 对照组小鼠主动脉可见血管壁各

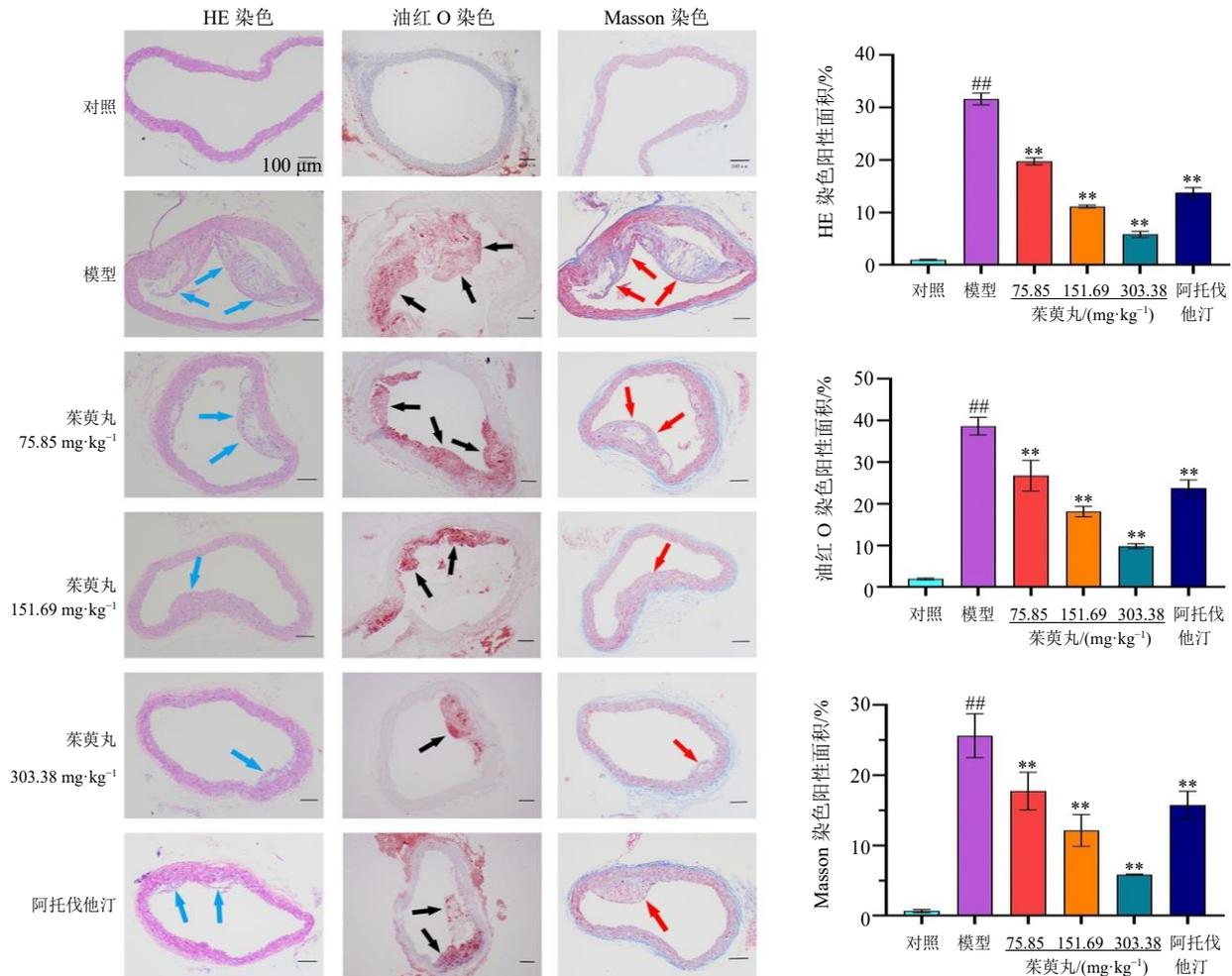
表 2 茺萸丸对 AS 小鼠血清 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Zhuyu Pills on TG, TC, LDL-C and HDL-C levels in serum of AS mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.32 ± 0.11	3.20 ± 0.35	2.21 ± 0.08	1.77 ± 0.06
模型	—	5.52 ± 0.15 ^{###}	9.31 ± 0.24 ^{###}	8.86 ± 0.30 ^{###}	0.14 ± 0.03 ^{###}
茺萸丸	75.85	5.28 ± 0.18 [*]	8.65 ± 0.15 ^{**}	8.53 ± 0.27 [*]	0.25 ± 0.09 ^{**}
	151.69	4.46 ± 0.25 ^{**}	6.46 ± 0.19 ^{**}	6.42 ± 0.34 ^{**}	0.45 ± 0.05 ^{**}
	303.38	3.54 ± 0.19 ^{**}	5.55 ± 0.22 ^{**}	5.44 ± 0.15 ^{**}	0.72 ± 0.06 ^{**}
阿托伐他汀	10.40	4.77 ± 0.11 ^{**}	7.19 ± 0.26 ^{**}	7.06 ± 0.23 ^{**}	0.38 ± 0.07 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下表同。

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below tables.



主动脉组织 HE 染色 ($\times 100$), 蓝色箭头指示粥样斑块; 主动脉油红 O 染色 ($\times 100$), 黑色箭头指示粥样斑块; 主动脉 Masson 染色 ($\times 100$), 红色箭头指示胶原纤维沉积; 与对照组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ 。

HE staining of aortic tissue ($\times 100$), blue arrow indicates atheromatous plaque; Aortic oil red O staining ($\times 100$), black arrow indicates atheromatous plaque; Masson staining of aortic tissue ($\times 100$), red arrow indicates collagen fiber deposition; ^{###} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 1 茺萸丸对 AS 小鼠主动脉病理变化的影响

Fig. 1 Effect of Zhuyu Pills on pathological changes of aorta in AS mice

个层次排列整齐，结构清晰，少见皱褶及空泡，几乎无红染及胶原着色。与对照组比较，模型组主动脉内膜大面积增厚，脂质斑块增多沉积，结构模糊化并形成明显的泡沫细胞，大量皱褶及空泡，大片红染形成，部分区域形成特征性 AS 斑块，斑块有较大范围的胶原蛋白沉积。与模型组比较，各给药组主动脉斑块及血管壁泡沫细胞均呈现不同程度的改善，胶原纤维增加减少，随着茺萸丸剂量的增加，

上述病变程度随之减轻。

3.3 茺萸丸对 AS 小鼠血清中 IL-1 β 、IL-18、ROS、水平和 SOD 活性的影响

如表 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-18、ROS 水平均显著升高 ($P < 0.01$)，SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组 IL-1 β 、IL-18、ROS 水平降低 ($P < 0.01$)，SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

表 3 茺萸丸对 AS 小鼠血清中 IL-1 β 、IL-18、ROS 水平和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of Zhuyu Pills on IL-1 β , IL-18, ROS levels and SOD activity in serum of AS mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(ng·L ⁻¹)	IL-18/(ng·L ⁻¹)	ROS/(U·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)
对照	—	13.88 \pm 1.45	5.26 \pm 1.55	49.69 \pm 6.05	66.83 \pm 7.21
模型	—	56.34 \pm 4.27 ^{##}	34.83 \pm 2.12 ^{##}	99.06 \pm 9.64 ^{##}	40.19 \pm 5.06 ^{##}
茺萸丸	75.85	38.28 \pm 2.79 ^{**}	23.04 \pm 3.11 ^{**}	72.38 \pm 6.23 ^{**}	44.21 \pm 5.52 [*]
	151.69	31.53 \pm 3.39 ^{**}	18.35 \pm 2.48 ^{**}	65.68 \pm 6.54 ^{**}	52.43 \pm 4.10 ^{**}
	303.38	25.03 \pm 3.02 ^{**}	12.43 \pm 2.27 ^{**}	60.42 \pm 5.47 ^{**}	60.55 \pm 3.28 ^{**}
阿托伐他汀	10.40	35.26 \pm 1.93 ^{**}	20.06 \pm 1.32 ^{**}	67.17 \pm 4.48 ^{**}	45.36 \pm 2.59 ^{**}

3.4 茺萸丸对 AS 小鼠血浆 TMA、TMAO 水平的影响

如表 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠血浆 TMA、TMAO 水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组血浆 TMA、TMAO 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 各组小鼠肠道菌群比较

3.5.1 Alpha 多样性分析 如表 5 所示，与对照组比较，模型组 Chao1、Ace 以及 observed species 指数均显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药

组 Chao1、Ace 以及 observed species 指数均显著升高 ($P < 0.01$)。

3.5.2 门水平菌群丰度及差异 门水平上各组小鼠菌群优势种类差异不大，主要由厚壁菌门、拟杆菌门等构成。如表 6 所示，与对照组比较，模型组拟杆菌门菌群丰度明显降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组拟杆菌门菌群丰度显著上升 ($P < 0.05$ 、0.01)，茺萸丸中、高剂量组厚壁菌门菌群丰度显著下降 ($P < 0.05$)。

3.5.3 属水平菌群丰度及差异 如表 7 所示，与对照组比较，模型组粪杆菌属、布劳特氏属、乳杆菌属菌群丰度显著下降 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组布劳特氏属、乳杆菌属菌群丰度显著升高 ($P < 0.01$)，茺萸丸中、高剂量组粪杆菌属丰度显著升高 ($P < 0.01$)。

3.6 各组小鼠肠道菌群与 TMA、TMAO 的关联分析结果

如表 8 所示，布劳特氏属、乳杆菌属、粪杆菌属与 TMA、TMAO 呈负相关 ($P < 0.05$)。

表 4 茺萸丸对 AS 小鼠血浆 TMA、TMAO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 4 Effect of Zhuyu Pills on plasma TMA and TMAO levels in AS mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TMA/(ng·mL ⁻¹)	TMAO/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	421.63 \pm 16.03	225.35 \pm 5.51
模型	—	583.04 \pm 21.56 ^{##}	532.18 \pm 12.29 ^{##}
茺萸丸	75.85	492.17 \pm 10.23 ^{**}	343.28 \pm 14.35 ^{**}
	151.69	455.02 \pm 11.28 ^{**}	315.16 \pm 12.45 ^{**}
	303.38	433.26 \pm 13.11 ^{**}	255.46 \pm 11.37 ^{**}
阿托伐他汀	10.40	469.23 \pm 18.08 ^{**}	326.43 \pm 23.08 ^{**}

表 5 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 5 Comparison of intestinal flora Alpha diversity index of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Chao1 指数	Ace 指数	observed species 指数
对照	—	774.55 \pm 12.98	501.83 \pm 21.28	800.10 \pm 22.84
模型	—	339.67 \pm 14.19 ^{##}	333.17 \pm 22.69 ^{##}	372.17 \pm 11.61 ^{##}
茺萸丸	75.85	432.50 \pm 16.21 ^{**}	428.83 \pm 10.57 ^{**}	490.00 \pm 17.81 ^{**}
	151.69	559.50 \pm 12.05 ^{**}	457.83 \pm 12.30 ^{**}	627.33 \pm 18.06 ^{**}
	303.38	673.17 \pm 11.44 ^{**}	470.00 \pm 13.92 ^{**}	742.83 \pm 12.49 ^{**}
阿托伐他汀	10.40	525.00 \pm 16.20 ^{**}	432.50 \pm 18.89 ^{**}	568.83 \pm 15.94 ^{**}

表 6 各组小鼠肠道菌群门水平前 5 位的物种平均相对丰度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Comparison of average relative abundance of top 5 species at level of intestinal microflora in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	相对丰度/%				
		厚壁菌门	拟杆菌门	变形菌门	放线菌门	疣微菌门
对照	—	73.99±4.46	9.59±0.44	2.39±0.25	1.43±0.11	2.63±0.06
模型	—	83.10±6.78	6.70±0.19 ^{##}	2.46±0.83	1.46±0.04	2.52±0.07
茺萸丸	75.85	79.08±6.06	7.30±0.44*	2.55±0.73	1.59±0.07	2.60±0.11
	151.69	70.81±9.66*	8.31±0.08**	2.57±0.21	1.45±0.12	2.64±0.05
	303.38	68.51±2.55*	8.95±0.28**	2.57±0.96	1.56±0.21	2.55±0.04
阿托伐他汀	10.40	73.76±7.87	7.53±0.17*	2.50±0.51	1.53±0.09	2.60±0.08

表 7 各组小鼠肠道菌群属水平前 5 位的物种平均相对丰度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Comparison of average relative abundance of top 5 species in level of intestinal flora of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	相对丰度/%				
		杜氏牙形石属	圣埃里立支杆菌属	粪杆菌属	布劳特氏属	乳杆菌属
对照	—	11.45±0.13	14.39±1.27	8.49±0.44	6.68±0.31	6.32±0.36
模型	—	11.51±0.18	14.54±0.96	4.65±0.91 ^{##}	2.81±0.54 ^{##}	4.31±0.27 ^{##}
茺萸丸	75.85	11.22±0.21	14.37±0.47	5.64±1.03	5.55±0.34**	5.72±0.66**
	151.69	12.07±0.71	13.62±2.37	6.65±0.23**	5.99±0.65**	6.12±0.62**
	303.38	10.93±0.82	15.60±0.27	7.72±0.66**	6.36±0.50**	6.40±0.55**
阿托伐他汀	10.40	11.24±0.20	14.45±0.13	5.74±0.17	5.54±0.23**	6.10±0.30**

表 8 小鼠肠道菌群与 TMA、TMAO 的关联分析结果

Table 8 Analysis results of association between intestinal flora and TMA and TMAO in mice

肠道菌群	相关系数	
	TMAO	TMA
罗斯氏菌属	0.07	0.03
布劳特氏属	-0.67 [#]	-0.61 [#]
杜氏牙形石属	0.11	0.18
乳杆菌属	-0.52 [#]	-0.54 [#]
圣埃里立支杆菌属	0.31	0.27
双歧杆菌属	-0.45	-0.48
粪杆菌属	-0.73 [#]	-0.67 [#]
艾克曼菌属	-0.39	-0.45
乳球菌属	0.32	0.34

[#]*P*<0.05。

[#]*P*<0.05。

3.7 茺萸丸对 AS 小鼠主动脉 ROS 水平的影响

如表 9 所示,与对照组比较,模型组小鼠主动脉 ROS 水平明显增加 (*P*<0.01);与模型组比较,给给药组 ROS 水平均显著降低 (*P*<0.05、0.01)。

3.8 茺萸丸对 AS 小鼠主动脉组织 TXNIP 和 NLRP3 蛋白表达的影响

如图 2、表 10 和图 3、表 11 所示,与对照组比较,模型组小鼠主动脉组织 TXNIP、NLRP3 蛋白表达水平显著升高 (*P*<0.01);与模型组比较,各给药组 TXNIP、NLRP3 蛋白表达水平明显降低 (*P*<0.01)。

表 9 茺萸丸对 AS 小鼠主动脉 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 9 Effect of Zhuyu Pills on ROS level in aorta of AS mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ROS/(RFU·mg ⁻¹)
对照	—	1 683.03±192.03
模型	—	4 579.42±266.73 ^{##}
茺萸丸	75.85	4 322.37±189.45*
	151.69	3 145.01±191.68**
	303.38	2 846.36±173.31**
阿托伐他汀	10.40	3 962.49±208.23**

3.9 茺萸丸对 AS 小鼠主动脉组织 TRX、TXNIP、ASC、NLRP3 和 Caspase-1 mRNA 的影响

如表 12 所示,与对照组比较,模型组小鼠主动脉组织 TRX、TXNIP、ASC、NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达水平显著升高 (*P*<0.01);与模型组比较,各给药组 TRX、TXNIP、ASC、NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达水平明显降低 (*P*<0.01)。

4 讨论

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,正如《证治汇补》所言“脾虚不运清浊,停滞津液而为痰生”^[16]。国医大师阮士怡^[17]将 AS 斑块与积病概念结合,创新性提出“脉中积”概念,该病名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,兼具中医特色。脾胃为水谷精微转

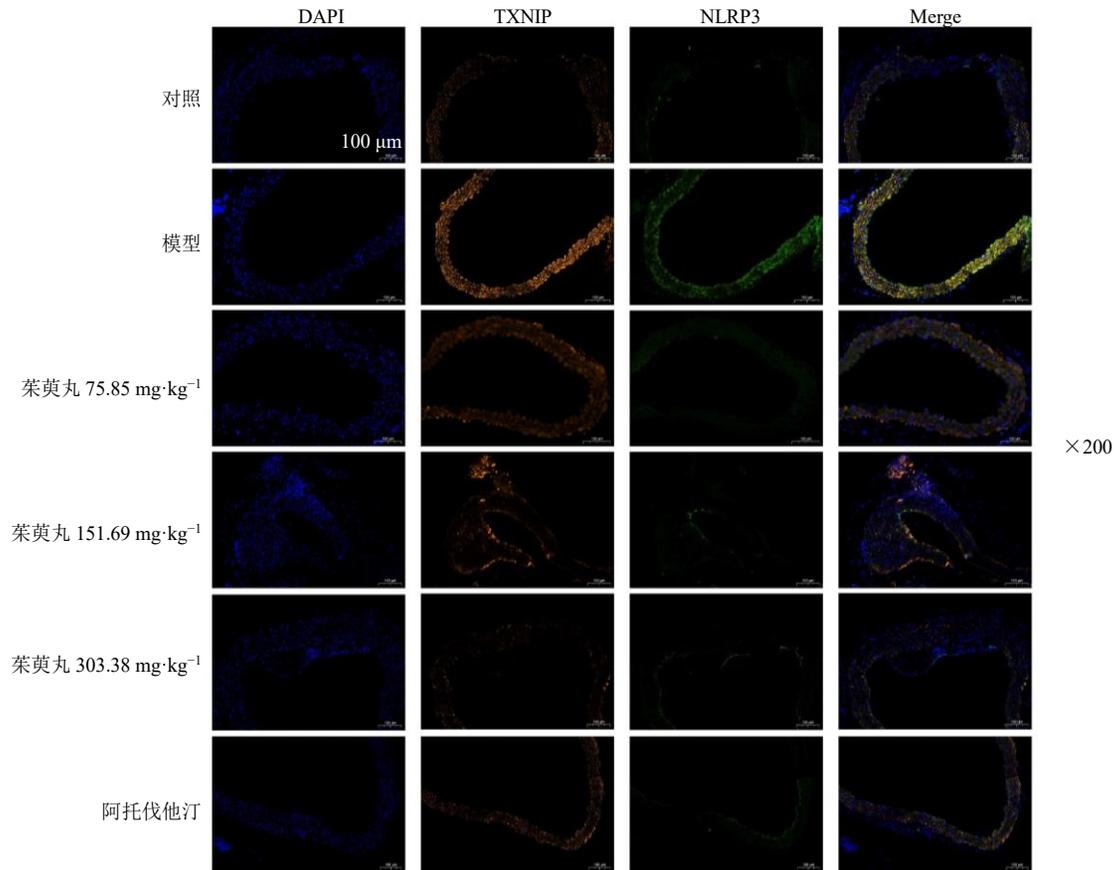


图 2 茺萸丸对 AS 小鼠主动脉组织 TXNIP、NLRP3 表达的影响

Fig. 2 Effect of Zhuyu Pills on TXNIP and NLRP3 of aorta tissue in AS mice

表 10 茺萸丸对 AS 小鼠主动脉组织中 TXNIP、NLRP3 表达荧光面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 10 Effect of Zhuyu Pills on TXNIP and NLRP3 fluorescence area on aortic tissue in AS mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TXNIP	NLRP3
对照	—	0.55 ± 0.12	0.30 ± 0.07
模型	—	1.82 ± 0.38 ^{##}	1.64 ± 0.12 ^{##}
茺萸丸	75.85	1.24 ± 0.40 ^{**}	1.08 ± 0.20 ^{**}
	151.69	0.87 ± 0.25 ^{**}	0.62 ± 0.06 ^{**}
	303.38	0.72 ± 0.16 ^{**}	0.53 ± 0.12 ^{**}
	阿托伐他汀	10.40	0.93 ± 0.09 ^{**}

表 11 茺萸丸对 AS 小鼠主动脉组织 TXNIP、NLRP3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Effect of Zhuyu Pills on protein expressions of TXNIP and NLRP3 in aortic tissue of AS mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TXNIP /GAPDH	NLRP3/GAPDH
对照	—	0.48 ± 0.10	0.44 ± 0.06
模型	—	1.52 ± 0.24 ^{##}	1.31 ± 0.16 ^{##}
茺萸丸	75.85	1.26 ± 0.13 ^{**}	1.12 ± 0.08 ^{**}
	151.69	0.94 ± 0.18 ^{**}	0.88 ± 0.11 ^{**}
	303.38	0.76 ± 0.09 ^{**}	0.75 ± 0.13 ^{**}
阿托伐他汀	10.40	1.09 ± 0.08 ^{**}	1.04 ± 0.05 ^{**}

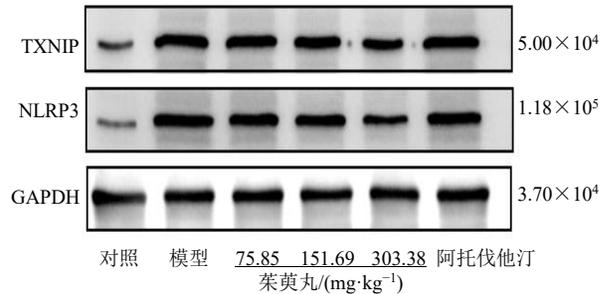


图 3 各组小鼠主动脉组织中 TXNIP、NLRP3 的蛋白表达
Fig. 3 TXNIP and NLRP3 protein expressions in aortic tissue of mice in each group

运之枢纽，气虚于内，周流不畅，则陈气、血浊蓄积，浊邪沉积于脉壁，形成有形、固定不移之斑块，发为 AS。治脾之剂以升运为要，调胃之力以降泄为先，脾胃并理，自当两法并取，故选择辛味药能开能通，苦味药可降可泄，辛苦相合，升降同施，藉以助脾散精，导浊下行，清除脉壁浊邪，从而脉道通畅，无斑块闭阻之碍。茺萸丸由黄连、吴茺萸组成，二者一辛一苦、一升一降，是辛开苦降的代表组合。该治法将辛热与苦寒 2 种药性相反的药物置于一方之中，彼此相互为用又互相佐制，是一种具有双向调节功能的典型中医特色的用药方法^[18]。《素问·至真要大论》

表 12 茺萸丸对各组小鼠主动脉组织中 *TRX*、*TXNIP*、*ASC*、*NLRP3*、*Caspase-1* mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 12 Effects of Zhuyu Pills on mRNA levels of *TRX*, *TXNIP*, *ASC*, *NLRP3* and *Caspase-1* on aortic tissue in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量				
		<i>TRX</i>	<i>TXNIP</i>	<i>ASC</i>	<i>NLRP3</i>	<i>Caspase-1</i>
对照	—	0.42±0.10	0.31±0.06	0.28±0.08	0.26±0.05	0.35±0.02
模型	—	1.63±0.05 ^{##}	1.12±0.15 ^{##}	0.92±0.02 ^{##}	1.16±0.13 ^{##}	1.03±0.07 ^{##}
茺萸丸	75.85	1.24±0.14 ^{**}	0.90±0.20 ^{**}	0.66±0.07 ^{**}	0.98±0.07 ^{**}	0.89±0.04 ^{**}
	151.69	0.96±0.07 ^{**}	0.63±0.10 ^{**}	0.47±0.06 ^{**}	0.71±0.05 ^{**}	0.67±0.05 ^{**}
	303.38	0.74±0.06 ^{**}	0.55±0.11 ^{**}	0.45±0.06 ^{**}	0.59±0.10 ^{**}	0.56±0.05 ^{**}
阿托伐他汀	10.40	1.16±0.12 ^{**}	0.85±0.28 ^{**}	0.59±0.03 ^{**}	0.87±0.06 ^{**}	0.81±0.10 ^{**}

中记载：“阳明之复，治以辛温，佐以苦甘，以苦泄之，以苦下之”，揭示了辛与苦 2 类不同性质的药物具有协同作用，可以合理配伍。清代叶天士将辛开苦降法作为一个治则提出，其在《临证指南医案》中提出“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”^[19]。总之，茺萸丸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”之效，以此防治 AS。

LDLR^{-/-}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，故本实验选用雄性 LDLR^{-/-}小鼠^[20]。研究表明，LDLR^{-/-}小鼠以高脂饲料饮食饲养，12 周左右即可于小鼠主动脉弓部发现广泛的 AS 斑块^[21]。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^[22]。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，炎症细胞汇聚，从而诱发炎症的发生，加速 AS 的形成。本研究结果显示，不同剂量的茺萸丸均能不同程度地降低 AS 模型小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 含量，升高 HDL-C 含量，并有效减少脂质堆积。本研究组织病理学结果也佐证了此结论，茺萸丸干预后，可有效减轻模型小鼠主动脉的粥样斑块沉积，并增加斑块的结构韧性，降低易损性，增加胶原防止弹性纤维进一步被破坏，保护中膜结构，且与药物剂量成正相关关系，以高剂量茺萸丸的总体效果最好。脂质代谢功能的下降可诱导机体氧化和抗氧化能力失衡，SOD 活性下降，ROS 含量增高，导致血管内皮下间隙的脂质和脂蛋白被氧化形成低密度脂蛋白，并影响血管壁正常结构及功能而加快 AS 发展^[23]。本研究结果显示，茺萸丸干预后小鼠血清 ROS 水平显

著降低，SOD 活性显著升高，提示茺萸丸可减轻氧化应激损伤而抑制 LDLR^{-/-}小鼠 AS 进展。

目前 TMA/TMAO 的代谢途径受到广泛关注，被认为是 AS 的潜在促进剂。TMAO 是胆碱、卵磷脂和肉碱的代谢产物，可由 TMA 转变而来^[24]。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，在肝脏中被黄素单加氧酶 3 进一步氧化，形成 TMAO，TMAO 通过诱发炎症^[25]、促进泡沫细胞形成^[26]及调控胆固醇的转运和代谢^[27]进而促进 AS 的发生发展。Meta 分析结果亦显示，循环 TMAO 水平越高，心血管事件的发生率越高^[28]。因此，抑制肠道菌群代谢产物 TMA，进而减少 TMA 向 TMAO 的转化，可能是防治 AS 的有效途径。本研究发现，茺萸丸干预能够显著降低 LDLR^{-/-}小鼠血浆 TMA 和 TMAO 水平，从而发挥抗 AS 的作用。经 16S rRNA 技术分析肠道菌群的结构、多样性变化发现，Alpha 多样性指数变化提示肠道菌群多样性可因 AS 发病而降低，因茺萸丸干预而提高。AS 常伴随厚壁菌门丰度降低以及拟杆菌门丰度上升，并且两者比值 F/B 的高低，多用于肠道菌群失调程度的评估^[29]。本研究发现，门水平上厚壁菌门、拟杆菌门为优势菌群。模型组厚壁菌门相对丰度增加，拟杆菌门相对丰度减少，F/B 值呈现升高趋势，这表明 AS 小鼠肠道菌群门水平物种比例失衡，菌群紊乱态势明显，与文献所载相似^[30]。而茺萸丸干预后小鼠肠道厚壁菌门相对丰度减少，拟杆菌门相对丰度增加，F/B 值出现回调趋势，肠道紊乱被纠正。属水平上布劳特氏属、粪杆菌属、乳杆菌属菌群丰度上升。其中布劳特氏菌属的发酵产物，如乙酸、丙酸和丁酸等具有优良的抗炎、调血脂活性，对 AS 具有良好的预防和治疗作用。研究表明，粪杆菌属在 AS 患者粪便中富集，提示粪杆菌属可能为 AS 的致病菌之一^[31]。乳杆菌属为肠道内有益菌群，其可激活调节性 T 细胞，抑制辅助性 T 细胞，影响巨噬细胞亚群比例，进而调节免疫，抑制

AS 相关炎症^[32]。本研究发现, 布劳特氏菌属、粪杆菌属、乳杆菌属与 TMA、TMAO 呈显著负相关。因此, 茺莢丸可能通过提高布劳特氏菌属、粪杆菌属以及乳杆菌属相对丰度, 抑制 TMA 生成, 进而减少 TMAO 生成发挥抗 AS 的作用。

细胞焦亡是近年来发现的一种新型的促炎细胞程序性死亡方式, AS 各阶段均存在血管壁细胞焦亡, 其关键步骤是炎症小体的活化^[33]。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^[34]。其中 NLRP3 作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^[35]。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^[36]。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。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 pro-IL-18、pro-IL-1 β 等前体, 使前体转化为活性形式的促炎因子 IL-1 β 、IL-18 等, 激活下游炎症通路, 产生炎症级联反应。因此, 抑制 NLRP3 炎症小体相关通路, 能够抑制下游炎症通路的级联放大, 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。本实验中模型组较对照组 NLRP3、ASC、Caspase-1 的蛋白及 mRNA 的表达量显著上升, 通路中促炎因子 IL-18、IL-1 β 水平显著增加, 说明 NLRP3 炎症小体处于激活状态。茺莢丸使 NLRP3、ASC、Caspase-1 的蛋白及 mRNA 表达显著下降, 促炎因子 IL-18、IL-1 β 水平明显下降, 说明 NLRP3 炎症小体受到抑制。TXNIP 是氧化应激与 NLRP3 炎症小体之间的桥梁, 作为激活 NLRP3 炎症小体的物质不可或缺^[35]。在 ROS 的作用下, TXNIP 从细胞核中释放出来, 并与胞质中的 TRX1 和线粒体中的 TRX2 结合, 导致 ROS 水平升高。增加 ROS 可以氧化 TRX1, 而氧化形式的 TRX 不能与 TXNIP 结合, 使 TXNIP 成游离状态^[36]。游离的 TXNIP 能直接与 NLRP3 结合, 从而激活 NLRP3 炎症小体。因此, TXNIP 可以直接结合 NLRP3 或通过产生 ROS 间接激活 NLRP3 炎症小体。本研究结果显示, 茺莢丸能有效降低 ROS 水平以及 TRX、TXNIP、NLRP3、ASC、Caspase-1 的蛋白和 mRNA 表达, 提示茺莢丸在改善 TMAO 激活的 ROS/TXNIP/NLRP3 通路及下游的炎症方面均有一定的效果。

综上, 茺莢丸可能通过调节肠道菌群中有益菌和有害菌的相对丰度, 纠正菌群紊乱情况, 减少 TMAO 合成, 抑制 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路, 减轻下游炎症反应, 发挥抗 AS 作用 (图 4)。鉴于

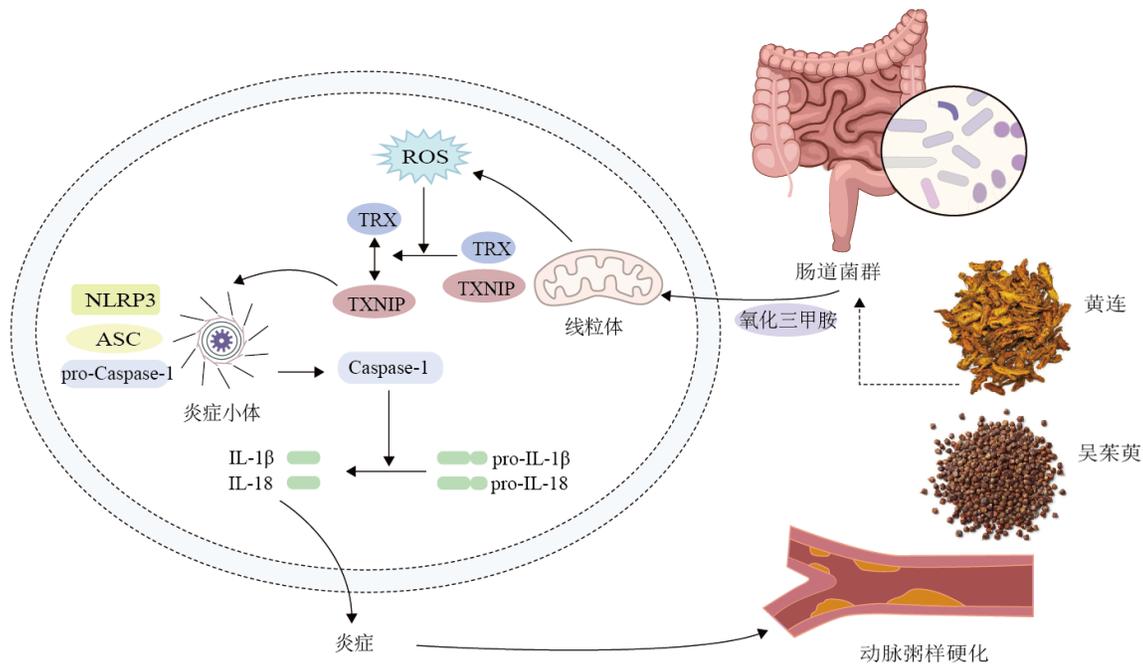


图 4 TMAO 调控 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路机制

Fig. 4 Mechanism of TMAO on regulating ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway

保护血管内皮在延缓 AS 发展中的重要作用, 有必要进一步开展干扰因素较少的体外研究, 以进一步说明茺菀丸对 TMAO 刺激下血管内皮的保护作用及其机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 万宛若, 黄丹, 徐婉茹, 等. 中药成分改善动脉粥样硬化及其机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5748-5758.
- [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 M, Wu Q H, Guo J C, et al. Statins: Adverse reactions, oxidative stress and metabolic interactions [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 195: 54-84.
- [5] Zhang Y X, Wang Y, Ke B B, et al. TMAO: How gut microbiota contributes to heart failure [J]. *Transl Res*, 2021, 228: 109-125.
- [6] 黄浪浪. 基于 TMAO 介导的 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路探讨健脾化浊调脂颗粒治疗动脉粥样硬化的作用机制 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2022.
- [7] 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.
- [8] 宋玮, 张钟艺, 邱海荣, 等. 基于茺菀丸谈“理论框架”方剂研究思路 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(5): 2144-2149.
- [9] 王静. 从血脂调控 Leptin/JAK2/STAT3 信号通路探索黄连吴茺菀配伍的降脂效应 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [10] 周昕, 魏宏, 沈涛, 等. 小檗碱与吴茺菀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.
- [11] 周昕, 林晶晶, 王静, 等. 黄连-吴茺菀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.
- [12] Yu H, Liu C, Wang J F, et al. miRNA and miRNA target genes in intervention effect of Zhuyu Pill on cholestatic rat model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114709.
- [13] Ma Y L, Wang W Y, Zhang J, et al. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in Ldlr-deficient mice on a long-term high-fat diet [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35835.
- [14] 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.
- [15] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用药量换算 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5): 52-53.
- [16] 清·李用粹编撰, 竹剑平整理. 证治汇补 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 242.
- [17] 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.
- [18] 魏本君, 陈恒文, 郭丽丽, 等. 辛开苦降法探析 [J]. 中医杂志, 2016, 57(1): 81-83.
- [19] 清·叶天士著, 宋白杨校注. 临证指南医案 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 144.
- [20] 李浩, 张琪. 动脉粥样硬化小鼠模型应用进展 [J/OL]. 中国实验动物学报, 2023: 1-8. (2023-05-28). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2986.Q.20230526.1136.014.html>.
- [21] 马贵萍, 陈冉, 章怡祎. 冠心病及其拆方对 LDLR^{-/-}动脉粥样硬化小鼠 PERK-eIF2 α -ATF4 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(9): 4357-4362.
- [22] 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.
- [23] Zhao T, Wu K, Hogstrand C, et al. Lipophagy mediated carbohydrate-induced changes of lipid metabolism via oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and ChREBP/PPAR γ pathways [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(10): 1987-2003.
- [24] 吕美君, 贾连群, 冷雪, 等. 动脉粥样硬化模型小鼠肠道菌群及其代谢产物 TMAO 与心功能的相关性 [J]. 中医杂志, 2021, 62(13): 1169-1174.
- [25] 杜李宇, 李倩滢, 陈伟哲, 等. 肠道菌群促炎与动脉粥样硬化关系研究进展 [J]. 食品科学, 2022, 43(3): 325-332.
- [26] 刘奇林, 薛毅, 赖晓辉, 等. TMAO 通过 CD147/MMPs 通路诱导巨噬细胞活化 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(1): 91-96.
- [27] 王琪格, 曹媛, 宋囡, 等. 茯苓多糖对 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏脂质沉积及胆固醇逆向转运相关蛋白表达的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(7): 2637-2643.
- [28] 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.
- [29] 白荣钰, 易欢, 陈丰连, 等. 毛冬青三萜皂苷对动脉粥样硬化大鼠肠道菌群的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6245-6253.

- [30] 郑昊龙, 翟亚荣, 吴瑶, 等. 化痰祛痰方对 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠肠道菌群及肠黏膜屏障损伤的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 81-85.
- [31] 李子芃, 陈巍, 田海. 肠道菌群及其代谢产物在冠心病中作用的研究进展 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2023, 30(5): 761-765.
- [32] 刘紫薇, 成泽东, 董宝强, 等. 电针对 ApoE^{-/-}小鼠肠道菌群及胆汁酸代谢的影响 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(10): 2535-2538.
- [33] 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.
- [34] 吴嘉思, 兰悦嘉, 王俊, 等. 表小檗碱调控 CD39-NLRP3-GSDMD 焦亡路径改善脓毒症肺损伤的机制研究 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 112-121.
- [35] 苏悦, 宋虹霏, 王鑫, 等. 黄芪甲苷经 CXCL12/CXCR4 信号轴及 TXNIP/NLRP3 炎性体途径抗肝纤维化的机制研究 [J]. 中草药, 2023, 54(8): 2453-2461.
- [36] 程媛, 张礼, 唐熠, 等. 苏萸痛风方通过 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路抗痛风性关节炎的作用机制 [J]. 中国药房, 2022, 33(19): 2343-2347.

[责任编辑 李亚楠]