

大蒜素调节 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路改善 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化作用

徐天舒¹, 张芸阳¹, 柴王静², 尹纪元¹, 王丽丽², 刘斌², 郭淑贞^{1*}, 张东伟^{1*}

1. 北京中医药大学中医学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 基于 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路探讨大蒜素对动脉粥样硬化小鼠的作用及其机制。方法 24 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、阿托伐他汀 (2.6 mg/kg) 组和大蒜素 (20 mg/kg) 组, 每组 8 只, 给予高脂饲料喂养 8 周。另取 8 只 C57BL/6N 野生型小鼠作为对照组, 给予普通饲料喂养。给予药物干预 9 周后, 利用油红 O 染色观察小鼠主动脉斑块面积, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察小鼠肝脏病理变化; 利用生化法检测小鼠血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglycerides, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平及天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性, 检测肝脏 TC、TG、游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 水平; 利用 ELISA 法检测小鼠血清 25-羟基胆固醇 (25-hydroxycholesterol, 25-HC)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平; 利用 Western blotting 检测肝脏中胆固醇 25 羟化酶 (cholesterol 25 hydroxylase, CH25H)、TLR4、NF- κ B、磷酸化 NF- κ B (phosphorylated NF- κ B, p-NF- κ B)、MyD88、IL-1 β 蛋白表达。结果 大蒜素能显著抑制高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块形成和肝脏的脂肪变性 ($P < 0.01$), 降低血清 TC、TG、LDL-C、non-HDL-C、25-HC、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平以及动脉粥样硬化指数 ($P < 0.05$ 、 0.01)。此外, 大蒜素能降低肝脏 TC、TG 和 FC 水平 ($P < 0.01$), 抑制肝脏中 CH25H、TLR4、MyD88、p-NF- κ B 和 IL-1 β 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 大蒜素通过改善脂质代谢和抑制炎症反应, 进而抑制动脉粥样硬化小鼠主动脉的脂质斑块沉积, 其作用机制可能与降低肝脏 CH25H 水平以及抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路有关。

关键词: 大蒜素; 动脉粥样硬化; 炎症反应; 胆固醇 25 羟化酶; TLR4/MyD88/NF- κ B 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)19-6636-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.017

Allicin ameliorates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice via TLR4/MyD88/NF- κ B pathway

XU Tianshu¹, ZHANG Yunyang¹, CHAI Wangjing², YIN Jiyuan¹, WANG Lili², LIU Bin², GUO Shuzhen¹, ZHANG Dongwei¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of allicin on atherosclerosis in mice based on Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway. **Methods** A total of 24 ApoE^{-/-} mice were randomly divided into model group, atorvastatin (2.6 mg/kg) group and allicin (20 mg/kg) group, with eight mice in each group, and fed with high-fat diet for eight weeks. Another eight C57BL/6N wild-type mice were selected as the control group and fed with regular feed. After nine weeks of drug intervention, the area of aortic plaques in mice was observed using oil red O staining, and the pathological changes in liver of mice was observed using hematoxylin-eosin (HE) staining. Biochemical method was used to detect the levels of

收稿日期: 2024-06-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82261138556)

作者简介: 徐天舒, 男, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合药理。E-mail: xuts1999@163.com

*通信作者: 郭淑贞, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中医药防治心血管疾病。E-mail: guoshz@bucm.edu.cn

张东伟, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药防治内分泌代谢性疾病。E-mail: zhangdw@bucm.edu.cn

total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), as well as the activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) in serum of mice, and to measure the levels of TC, TG and free cholesterol (FC) in liver. ELISA method was used to detect the levels of 25 hydroxycholesterol (25-HC), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum of mice. Western blotting was used to detect cholesterol 25 hydroxylase (CH25H), TLR4, NF- κ B, phosphorylated NF- κ B (p-NF- κ B), MyD88 and IL-1 β protein expressions in liver. **Results** Allixin could significantly inhibit the formation of aortic plaque and liver steatosis in ApoE^{-/-} mice induced by high-fat diet ($P < 0.01$), reduce the levels of TC, TG, LDL-C, non-HDL-C, 25-HC, IL-6, IL-1 β , TNF- α in serum and atherosclerosis index ($P < 0.05, 0.01$). In addition, allixin could reduce TC, TG and FC levels in liver ($P < 0.01$), and inhibit the expressions of CH25H, TLR4, MyD88, p-NF- κ B and IL-1 β proteins in liver ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Allixin can inhibit the deposition of lipid plaque in the aorta of atherosclerotic mice by improving lipid metabolism and inhibiting inflammatory response. Its mechanism may be related to the reduction of CH25H level in liver and the inhibition of TLR4/MyD88/NF- κ B pathway.

Key words: allixin; atherosclerosis; inflammation; cholesterol 25 hydroxylase; TLR4/MyD88/NF- κ B pathway

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种常见的慢性血管疾病, 为多种心脑血管疾病的发病基础。根据世界卫生组织数据显示, 心血管疾病已经成为全球死亡的首要原因之一, 每年约造成 1 700 多万人死亡^[1-2]。研究表明, AS 是一种慢性、进行性动脉疾病, 炎症反应和脂质代谢障碍是其发病的主要原因^[3]。肝脏是胆固醇合成和代谢的主要器官, 能通过调节胆固醇水平而维持血脂稳态^[4]。而肝脏内过多脂肪的积累也将诱发肝脏的炎症反应^[5]。肝脏产生的炎症因子也是诱发和加重 AS 的主要因素^[6]。因此, 改善肝脏的脂代谢、抑制肝脏的炎症反应能抑制 AS 的发生和发展。

25-羟基胆固醇 (25-hydroxycholesterol, 25-HC) 是胆固醇在胆固醇 25 羟化酶 (cholesterol 25 hydroxylase, CH25H) 作用下的氧化衍生产物^[7], 由巨噬细胞 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 激活而产生和分泌^[8]。研究发现, AS 斑块中活化的巨噬细胞可产生 25-HC 并抑制斑块内平滑肌细胞迁移, 进一步增加斑块的不稳定性^[9]。而 25-HC 也能促进巨噬细胞泡沫化, 导致脂质条纹增粗或动脉斑块进一步扩大^[10]。此外, 25-HC 不仅能增强荷脂巨噬细胞的炎症反应, 刺激 TLR4 信号通路并增强细胞凋亡敏感性^[9], 还能通过抑制内皮型一氧化氮合酶解偶联以及诱导内皮细胞凋亡进而损害内皮功能, 加速 AS 的发展^[11]。因此, 25-HC 和 TLR4 通路在 AS 诱发的脂代谢紊乱和炎症反应中发挥着重要的作用^[12]。

AS 在中医中虽无明确病名, 但据其症状体征, 可属于“脉痹”“心悸”“中风”等病症范畴^[13]。其病机在于人体气血阴阳不足, 出现痰、瘀、毒等

病理产物, 充斥脉络, 聚而难消。痰浊、瘀血、毒邪胶着难解, 损及脉管, 进而发病^[14]。大蒜别名胡蒜、葫、独蒜, 始载于陶弘景《名医别录》, 为天然药食同源药物, 其味辛性温, 《本草纲目》记载: “其气熏烈, 能通五脏, 达诸窍……血逆心痛, 生蒜捣汁, 服二升即愈”^[15]。《本草经疏》中亦记载其“辛温能辟恶散邪……辛温走窜, 无处不到, 故主归五脏”^[16]。提示大蒜辛温走窜之力较强, 能达全身诸窍。此外, 《本草拾遗》中亦有云: “大蒜宣通温补, 无以加之”^[17], 提示大蒜能补阳扶阳, 使阳气运行宣畅。由此可见, 大蒜能温中散寒通络、活血化瘀、消除瘀滞, 具有治疗 AS 的作用。

大蒜素是大蒜的主要活性成分之一, 具有抗炎、杀菌、预防心脑血管疾病、抗肿瘤等生物活性, 且其不良反应少, 临床使用安全^[18-20]。研究表明, 大蒜素能有效降低糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠血脂、血糖、同型半胱氨酸水平, 抑制 AS 不稳定斑块的破裂^[21]。此外, 大蒜素能通过肠道微生物群减少三甲胺-N-氧化物的产生进而抑制 AS 的发展^[22]。大蒜素还能促进核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 活化并抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 对血管内皮细胞的损伤^[23], 抑制氧化低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞凋亡, 进而改善内皮细胞功能^[24], 但是, 大蒜素抑制 AS 的发生和发展是否与调节肝脏脂代谢紊乱及炎症反应相关尚未见相关报道。因此, 本研究以高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠为研究对象, 探讨大蒜素对 AS 模型小鼠肝脏脂代谢紊乱和炎症反应的影响以及其可能的作用机制, 以期为大蒜素防治 AS 提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 ApoE^{-/-}小鼠 24 只, 雄性 C57BL/6N 小鼠 8 只, 7 周龄, 体质量 22~27 g, 购自江苏赛业生物公司, 生产许可证号 SCXK(苏)2022-0016。小鼠饲养于北京中医药大学动物实验中心 SPF 级实验动物屏障环境, 室温(22±2)℃, 相对湿度 40%~60%, 12 h/12 h 光照循环, 自由进食饮水。动物实验经北京中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号 BUCM-2023-052202-2094)。

1.2 药品与试剂

大蒜素(批号 RDD-D06511804026, 质量分数为 97.36%) 购自成都瑞芬思德丹生物科技有限公司; 阿托伐他汀钙片(国药准字 H20051407, 批号 8249355) 购自辉瑞制药有限公司; 小鼠高脂饲料(批号 D12108C) 购自美国 Research Diet 公司, 主要由 40 千卡脂肪(主要成分为可可脂)和 1.25% 胆固醇构成; 羧甲基纤维素钠(批号 C835846) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 油红 O 染色液(批号 G1261)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE) 染色液(批号 G1100)、游离胆固醇(free cholesterol, FC) 试剂盒(批号 BC1895) 购自北京索莱宝科技有限公司; 总胆固醇(total cholesterol, TC) 试剂盒(批号 A111-1-1)、三酰甘油(triglycerides, TG) 试剂盒(批号 A110-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒(批号 A112-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 试剂盒(批号 A113-1-1)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒(批号 C010-2-1)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒(批号 C009-2-1)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 试剂盒(批号 A059-2-2) 购自南京建成生物工程研究所; 25-HC ELSIA 试剂盒(批号 MB-66421A)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELSIA 试剂盒(批号 MB-2899A)、IL-1 β ELSIA 试剂盒(批号 MB-2776A)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELSIA 试剂盒(批号 MB-2868A) 购自江苏酶标生物科技有限公司; CH25H 抗体(批号 A24299) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; TLR4 抗体(批号 19811-1-AP)、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 抗体(批号 10745-1-AP)、髓样分化因子 88

(myeloid differentiation factor 88, MyD88) 抗体(批号 66660-1-Ig)、IL-1 β 抗体(批号 16806-1-AP)、IL-6 抗体(批号 21865-1-AP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体(批号 60004-1-Ig)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 RGAR001)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(批号 RGAM001) 购自美国 Proteintech 公司; 磷酸化 NF- κ B(phosphorylated NF- κ B, p-NF- κ B) 抗体(批号 3033S) 购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

22331 Hamburg 型离心机(德国 Eppendorf 公司); RM2255 型轮转式切片机(德国 Leica 公司); BX53 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 电泳、电转系统(美国 Bio-Rad 公司); Tanon 5200 系列凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

所有小鼠适应性喂养 1 周后, 将 24 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、阿托伐他汀(2.6 mg/kg) 组和大蒜素(20 mg/kg)^[25-26]组, 每组 8 只, 给予高脂饲料喂养。另取 8 只 C57BL/6N 野生型小鼠作为对照组, 给予普通饲料喂养。喂养 8 周后, 各给药组 ig 以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制的相应药物(10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液, 1 次/d, 连续给药 9 周。给药过程中每日监测小鼠进食量变化, 每周称量 1 次小鼠体质量。

2.2 血清指标检测

给药结束后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 腹腔麻醉后, 取腹主动脉血, 室温静置 2 h, 4℃、3 000 r/min 离心 10 min, 取上清。按照试剂盒说明书检测血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C、25-HC、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平和 AST、ALT、ALP 活性, 并计算 non-HDL-C 水平和 AS 指数。

$$\text{non-HDL-C 水平} = \text{TC 水平} - \text{HDL-C 水平}$$

$$\text{AS 指数} = (\text{TC 水平} - \text{HDL-C 水平}) / \text{HDL-C 水平}$$

2.3 油红 O 染色观察 AS 斑块形成

取各组小鼠主动脉, 剥离其外周脂肪组织, 并在预冷的生理盐水中清洗干净以去除血液及其他污物, 用解剖剪沿血管壁小心将血管纵向剖开, 放入 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 用 PBS 浸洗 2 次。将血管浸入油红 O 染液, 于 37℃ 染色 60 min, 75% 乙

醇分化,蒸馏水洗涤 2 次。将染好的主动脉平铺于板上,拍照。采用 Image Pro Plus 图像分析系统测量主动脉油红 O 着色斑块面积及管腔内膜总面积,计算斑块面积相对百分比。

斑块面积相对百分比=斑块总面积/内膜总面积

2.4 HE 染色观察肝脏病理变化

小鼠取血后立即摘取肝脏,称定质量,计算肝脏指数。切下肝小叶后脱水、浸蜡、包埋、修蜡块、切片,将切片依次置入二甲苯 I、II 各 15 min,梯度乙醇复水,按照 HE 染色试剂盒说明书进行染色、脱水、透明,中性树脂封片后拍照观察,并按照文献方法^[27],由 2 名实验人员(盲法)进行病理学评分。评分标准:肝细胞形态及肝细胞索排列整齐,无炎症细胞浸润等病理改变,为 0 分;肝细胞索排列紊乱,偶见脂滴空泡,有轻微的炎性细胞浸润,为 1 分;肝细胞有轻度肿胀,较多脂滴空泡或炎性细胞浸润,为 2 分;肝窦消失,肝细胞重度肿胀,有大量脂滴空泡或炎性浸润,为 3 分;肝细胞大面积空泡样病变并有炎性坏死,为 4 分。

肝脏指数=肝脏质量/体质量

2.5 肝组织 TC、TG 和 FC 水平的检测

称取 100 mg 肝组织,按照试剂盒说明书测定 TC、TG 和 FC 水平。

2.6 Western blotting 检测肝组织中 CH25H 和 TLR4 信号通路相关蛋白表达

称取 100 mg 肝组织,加入裂解液提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。分别取 50 μ g 样品与上样缓冲液混合均匀,100 $^{\circ}$ C 加热 7 min 使蛋白变性。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 3%牛血清白蛋白,室温封

闭 1 h,分别加入 CH25H (1:1 000)、TLR4 (1:3 000)、NF- κ B (1:3 000)、p-NF- κ B (1:1 000)、MyD88 (1:3 000)、IL-1 β (1:3 000) 和 GAPDH (1:5 000) 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;次日,TBST 洗膜后,分别加入二抗 (1:12 000),室温孵育 1 h,使用 ECL 发光液显色,采用凝胶成像仪拍照,利用 Image J 软件对条带进行半定量分析。

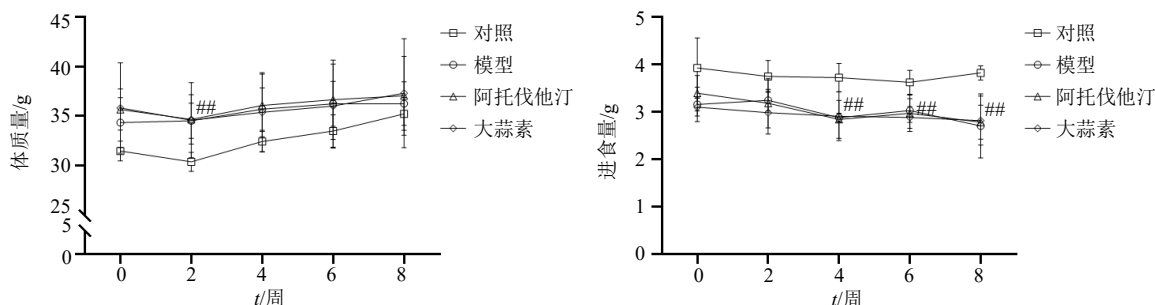
2.7 统计学分析

利用 GraphPad prism 10 软件对数据进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐则采用单因素方差分析,方差不齐时采用 Welch's t 检验。

3 结果

3.1 大蒜素对 AS 小鼠体质量、进食量、主动脉斑块面积及肝脏脂质沉积的影响

如图 1 所示,各组小鼠体质量无明显差异。与对照组比较,模型组小鼠进食量显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠进食量无显著性差异。ApoE^{-/-}小鼠经高脂饲料喂养后,可产生严重 AS 病变。油红 O 染色能特异性识别 AS 斑块中的 TG 等脂质成分。如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠主动脉脂质斑块面积显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠主动脉脂质斑块面积均显著减少 ($P < 0.01$),表明大蒜素能抑制 AS 小鼠主动脉脂质斑块的形成。小鼠肝脏 HE 染色结果见图 3,对照组小鼠肝细胞绵密清晰,形状规则;与对照组比较,模型组小鼠肝细胞肿大,出现气球样病变,同时可见大量大小不一空泡(脂滴);与模型组比较,各给药组小鼠肝细胞形态均有明显改善作用,其脂滴明显减少,表明大蒜素能抑制 AS 小鼠的肝脏脂肪变性。

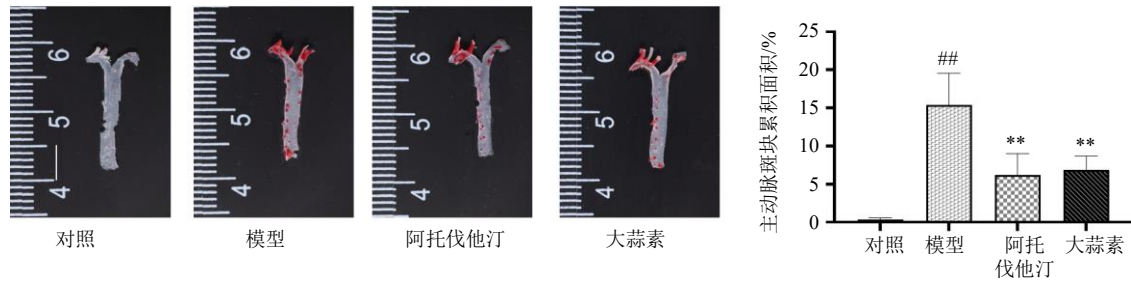
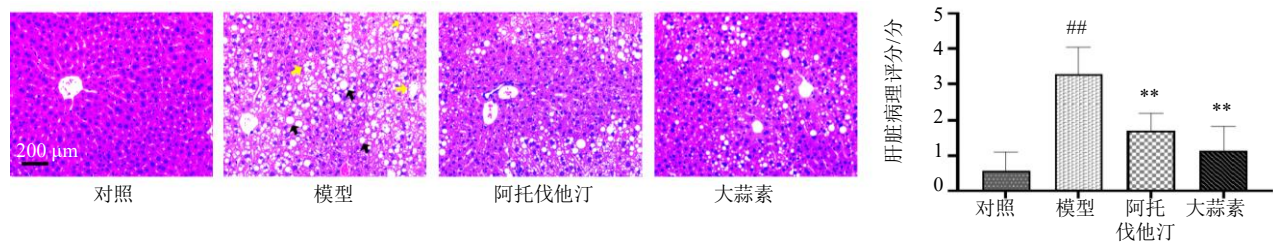


与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 大蒜素对 AS 小鼠体质量及进食量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of allicin on body weight and food intake in AS mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

图 2 大蒜素对 AS 小鼠主动脉斑块面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Fig. 2 Effect of allicin on aortic plaque area in AS mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

黑色箭头表示脂滴, 黄色箭头表示气球样病变。

Black arrow indicates lipid droplets, yellow arrow indicates balloon-like lesions.

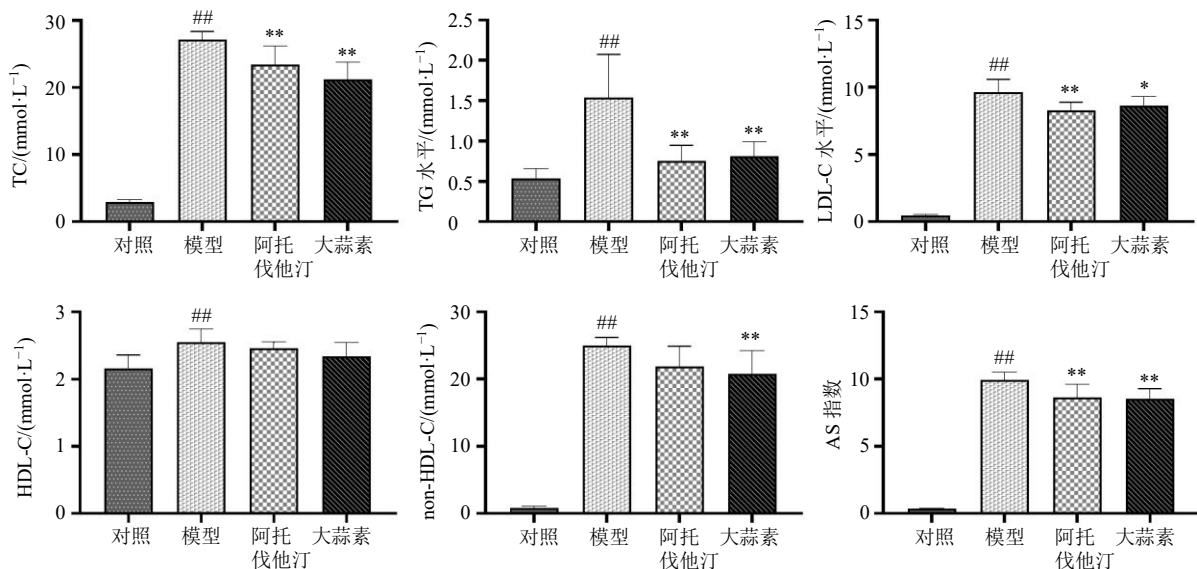
图 3 大蒜素对 AS 小鼠肝脏病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effect of allicin on pathological change in liver of AS mice (HE, ×200)

3.2 大蒜素对 AS 小鼠血脂代谢以及 AS 指数的影响

AS 发生的主要危险因素包括血脂代谢的异常, 除临床常见的 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 评价指标外, 近年来, non-HDL-C 逐渐作为独立危险因素, 被认为是心血管事件的预测指标^[28]。如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 TC、TG、

LDL-C、HDL-C、non-HDL-C 水平和 AS 指数均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平和 AS 指数均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 大蒜素组小鼠血清中 non-HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$), 表明大蒜素能改善 AS 小鼠的血脂代谢。

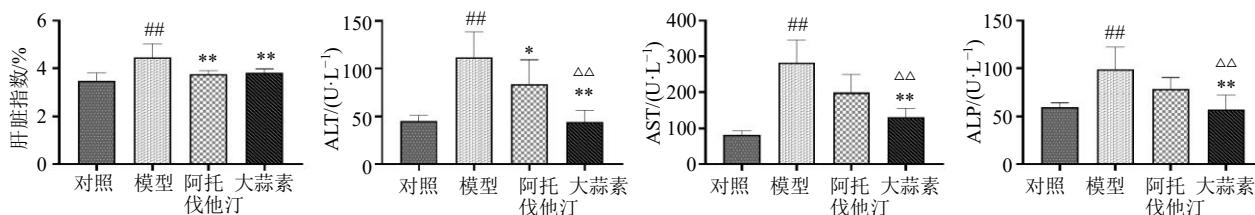
图 4 大蒜素对 AS 小鼠血脂代谢及 AS 指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Fig. 4 Effect of allicin on blood lipid metabolism and AS index in AS mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 大蒜素对 AS 小鼠肝脏指数、肝功能以及肝脏 TC、TG 和 FC 水平的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠的肝脏指数以及血清肝功能指标(ALT、AST、ALP)均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠的肝脏指数和血清中 ALT 活性明显降低($P<0.05$ 、 0.01),大蒜素组小鼠血清中 AST 和 ALP 活性显著降低($P<0.01$);与阿托伐他汀组比较,大

蒜素组小鼠血清肝功能指标均显著降低($P<0.01$)。

如图 6 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏中 TC、FC 和 TG 水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肝脏中 TC、TG 水平均显著降低($P<0.01$),大蒜素组小鼠肝脏中 FC 水平显著降低($P<0.01$);与阿托伐他汀组比较,大蒜素组小鼠肝脏中 FC 水平显著降低($P<0.01$)。



与对照组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与阿托伐他汀组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$, 下同。
$P<0.05$ ## $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs atorvastatin group, same as below figures.

图 5 大蒜素对 AS 小鼠肝脏指数和肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 5 Effect of allicin on liver index and liver function in AS mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

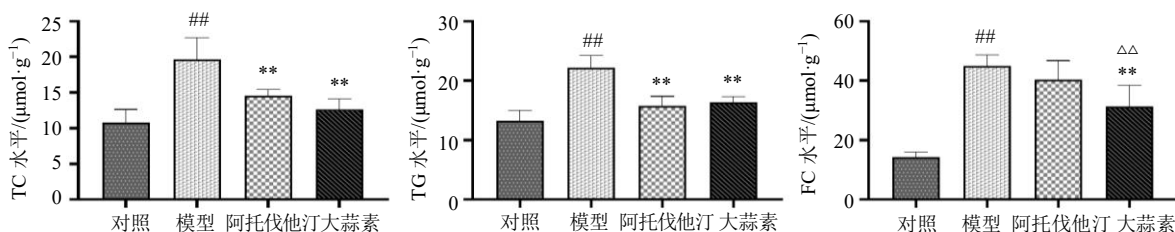


图 6 大蒜素对 AS 小鼠肝脏 TC、TG 和 FC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 6 Effect of allicin on levels of TC, TG and FC in live of AS mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.4 大蒜素对 AS 小鼠血清中炎症因子和 25-HC 水平的影响

如图 7 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中炎症因子(IL-6、TNF- α 、IL-1 β)和 25-HC 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠血清中炎症因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)水平均显著降低($P<0.05$ 、 0.01),大蒜素组血清中 25-HC 水平显著降低($P<0.01$);与阿托伐他汀组比较,

大蒜素组小鼠血清中 25-HC 水平显著降低($P<0.01$)。表明大蒜素能抑制 AS 小鼠的血清炎症反应。

3.5 大蒜素对 AS 小鼠肝组织 CH25H 和 TLR4 信号通路相关蛋白表达的影响

为进一步研究大蒜素对高脂喂养的 ApoE^{-/-}小鼠肝脏脂质积累和炎症的干预作用及机制,通过 Western blotting 检测了肝脏 CH25H 和 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达。如图 8 所示,与对照组比较,

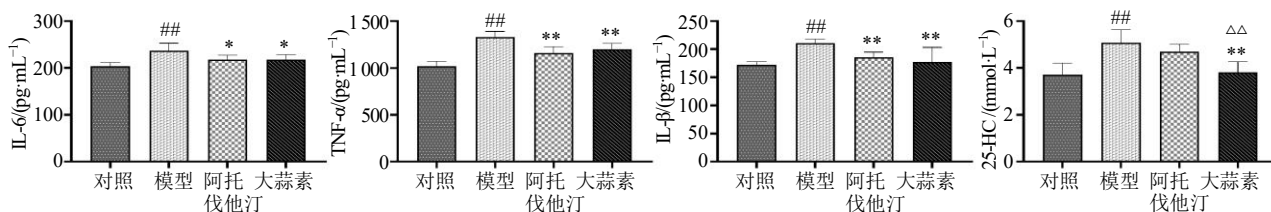


图 7 大蒜素对 AS 小鼠血清中炎症因子和 25-HC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 7 Effect of allicin on levels of inflammation factors and 25-HC in serum of AS mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

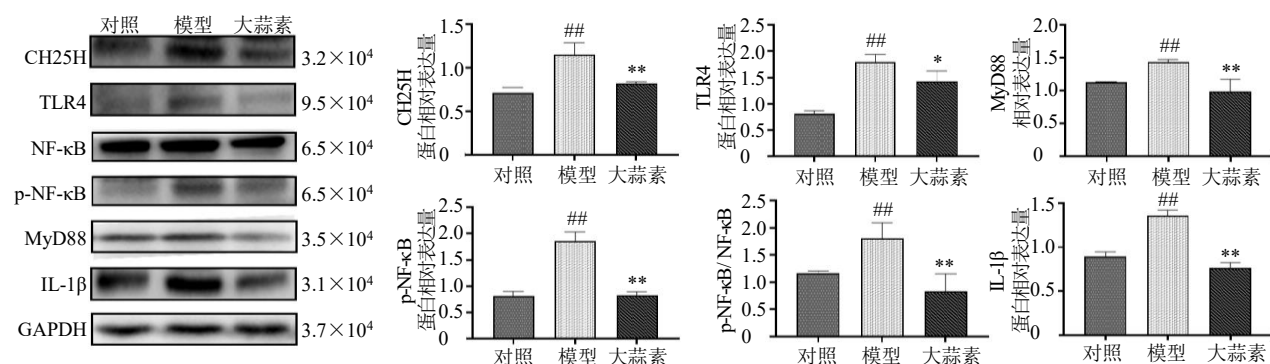


图 8 大蒜素对 AS 小鼠肝组织 CH25H 和 TLR4 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of allicin on CH25H and TLR4 signaling pathway related protein expressions in liver tissue of AS mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

模型组小鼠肝脏中 CH25H、TLR4、MyD88、p-NF-κB、p-NF-κB/NF-κB 和 IL-1β 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，大蒜素组小鼠肝脏中 CH25H、TLR4、MyD88、p-NF-κB、p-NF-κB/NF-κB 和 IL-1β 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。表明大蒜素可以通过抑制 AS 小鼠肝脏中 CH25H 活性以及 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路，从而抑制肝脏炎症反应的发生和发展。

4 讨论

AS 的发生和发展与肝脏炎症反应和脂质代谢异常密切相关。ApoE 载脂蛋白是一种多态性蛋白，主要在肝脏中合成，可通过与 LDL 受体和肝脏 ApoE 受体结合，促进血液中乳糜微粒 (chylomicron, CM)、LDL 和极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 的降解^[29]。敲除 ApoE 基因的小鼠由于体循环中 TG 无法被肝脏吸收而滞留血液中形成高脂血症，进而诱发 AS^[30]。ApoE^{-/-}小鼠是目前研究 AS 应用最为广泛的小鼠，在正常饮食下，16 周龄的 ApoE^{-/-}小鼠 TC 和 LDL-C 水平为野生型小鼠的数倍，同时伴有主动脉脂质的沉积^[31]。而在高脂饲料喂养下，16 周龄的 ApoE^{-/-}小鼠可见 AS 中晚期病理表现^[31]。因此，本研究采用高脂饲料喂养雄性 ApoE^{-/-}小鼠，建立小鼠 AS 模型。结果显示，大蒜素干预 AS 小鼠 9 周后，能显著抑制 AS 小鼠主动脉脂质斑块的沉积和肝脏脂肪变性，降低 AS 小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平和肝脏 TC、TG、FC 含量。文献报道也显示，大蒜素干预能显著降低糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠血脂 (TC、TG 和 LDL-C) 水平^[21]，能呈剂量相关性地减少主动脉脂质斑块的形成^[25]，减轻高脂胆固醇饮食诱导的肝脏脂肪变性^[32]。临床实验也

证明，大蒜素能降低高脂血症患者血脂水平^[33-35]。以上结果表明，大蒜素能抑制 AS 小鼠主动脉的脂质斑块沉积，改善血脂代谢和抑制肝脏的脂肪变性。

non-HDL-C 是指除 HDL-C 以外的其他脂蛋白中含有胆固醇的总和，包括 LDL-C、VLDL-C 等。研究发现，除 LDL-C 外，其他 non-HDL-C 中的脂蛋白均可促进 AS 的发生和发展^[36]，因此，与 HDL-C 相比，non-HDL-C 被认为能更好地预测 AS 发生和发展，是 AS 的独立危险因素或预测因素，并逐渐受到临床关注^[28]。AS 指数能从 AS 的危险因素 non-HDL-C 和安全因素 HDL-C 两方面衡量 AS 的发生和发展^[37]。本研究发现，大蒜素能显著降低小鼠 non-HDL-C 水平和 AS 指数，具有抑制 AS 发生和发展的作用。

AS 是一种慢性炎症性血管系统疾病，IL-6、IL-1β 和 TNF-α 是促进其发生和发展的重要炎症标志物^[38]。IL-6 是一种多效性细胞因子，能直接或间接通过加重炎症反应而促进 AS 的发生和发展^[39]。IL-1β 是炎症瀑布链上游因子，由炎性小体产生^[40]，既可促进 IL-6 和 TNF-α 的生成以增强炎症反应，又可特异性促进 AS 斑块形成^[41]。在 AS 发展过程中，单核细胞和中性粒细胞产生的 TNF-α 能诱发细胞凋亡和坏死，导致血管内皮细胞功能障碍，促进斑块的破裂^[42]。循环炎症因子水平的升高和血脂异常进一步导致肝功能损伤加重^[43]。本研究结果显示，大蒜素能降低 AS 小鼠血清 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的水平，能显著降低 AS 小鼠肝功能 (ALT、AST 和 ALP) 活性，同时抑制肝脏中炎症因子 (IL-1β) 的表达。文献报道也表明，大蒜素能抑制 ApoE^{-/-}糖尿病小鼠 IL-6 的分泌^[21]，能降低 LPS 刺激的

RAW264.7 细胞中 IL-1 β 和 IL-6 的表达^[44]。以上结果表明,大蒜素能抑制 AS 小鼠的肝脏乃至全身的炎症反应,改善其肝功能。

CH25H 是一种参与胆固醇代谢的酶,可催化产生 25-HC 进而调节炎症反应和脂质代谢^[45]。研究表明,CH25H/25-HC 不仅参与阿尔茨海默病、糖尿病肾病、癌症等发病过程^[46-48]。而且也参与 AS 的发生和发展。巨噬细胞产生的 25-HC 在斑块中积累,能促进内皮细胞凋亡,抑制内皮细胞依赖性血管舒张,进而促进血管炎症反应和重塑^[11]。25-HC 还能通过活化转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4)/C/EBP 同源蛋白 (C/EBP-homologous protein, CHOP) 信号通路以激活内质网应激和促进血管钙化,而血管钙化也是心血管疾病的一个常见重要危险因素^[49]。研究表明,LPS 激动 TLR4 后,能促进 CH25H 的表达^[50]。而在 AS 斑块中,25-HC 也能促进 TLR4 信号通路的激活^[9]。LPS/TLR4 信号可以激活 MyD88,导致 NF- κ B 的高表达,进而加剧炎症反应^[51]。本研究发现,AS 模型小鼠血清中 25-HC 水平明显升高,肝脏中 CH25H 蛋白表达量也显著增加,而大蒜素干预该模型小鼠 9 周后能显著降低血清 25-HC 和肝脏 CH25H 的水平。本研究也发现,大蒜素能显著降低小鼠肝脏中 TLR4、MyD88、p-NF- κ B、p-NF- κ B/NF- κ B 的表达。提示大蒜素可能通过调节肝脏 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路进而抑制 AS 小鼠肝脏的炎症反应,从而发挥抗 AS 的作用。

综上,本研究发现大蒜的活性成分大蒜素能改善 AS 小鼠脂代谢紊乱和炎症反应,抑制 AS 小鼠的主动脉脂质斑块的形成,其作用机制可能与抑制肝脏 25-HC 的生成以及抑制 TLR4 炎症信号通路有关。本研究为大蒜素治疗 AS 的临床应用提供一定的科学依据,同时也为防治 AS 药物的研发提供了新的策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mensah G A, Fuster V, Murray C J L, *et al.* Global burden of cardiovascular diseases and risks, 1990—2022 [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2023, 82(25): 2350-2473.
- [2] Blanco-Colio L M, Martín-Ventura J L. Atherosclerosis and other related-arterial diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10453.
- [3] Groenen A G, Halmos B, Tall A R, *et al.* Cholesterol efflux pathways, inflammation, and atherosclerosis [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2021, 56(4): 426-439.
- [4] Li H, Yu X H, Ou X, *et al.* Hepatic cholesterol transport and its role in non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis [J]. *Prog Lipid Res*, 2021, 83: 101109.
- [5] Wang H H, Garruti G, Liu M, *et al.* Cholesterol and lipoprotein metabolism and atherosclerosis: Recent advances in reverse cholesterol transport [J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(Suppl 1): s27-s42.
- [6] Kleemann R, Verschuren L, van Erk M J, *et al.* Atherosclerosis and liver inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: A combined transcriptomics and metabolomics analysis [J]. *Genome Biol*, 2007, 8(9): R200.
- [7] Nguyen C, Saint-Pol J, Dib S, *et al.* 25-Hydroxycholesterol in health and diseases [J]. *J Lipid Res*, 2024, 65(1): 100486.
- [8] McDonald J G, Russell D W. Editorial: 25-Hydroxycholesterol: A new life in immunology [J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 88(6): 1071-1072.
- [9] Canfrán-Duque A, Rotllán N, Zhang X B, *et al.* Macrophage-derived 25-hydroxycholesterol promotes vascular inflammation, atherogenesis, and lesion remodeling [J]. *Circulation*, 2023, 147(5): 388-408.
- [10] Gold E S, Ramsey S A, Sartain M J, *et al.* ATF3 protects against atherosclerosis by suppressing 25-hydroxycholesterol-induced lipid body formation [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(4): 807-817.
- [11] Ou Z J, Chen J, Dai W P, *et al.* 25-Hydroxycholesterol impairs endothelial function and vasodilation by uncoupling and inhibiting endothelial nitric oxide synthase [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 311(4): E781-E790.
- [12] Gold E S, Diercks A H, Podolsky I, *et al.* 25-Hydroxycholesterol acts as an amplifier of inflammatory signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(29): 10666-10671.
- [13] 刘莉, 王凤荣. 动脉粥样硬化临床前期中医证候特点及用药规律文献挖掘 [J]. 中医药导报, 2024, 30(2): 94-99.
- [14] 杨彤, 姚秋菊, 陈勇, 等. 基于“虚、痰、瘀、毒”理论探讨颈动脉粥样硬化 [J]. 亚太传统医药, 2024, 20(5): 215-218.
- [15] 明·李时珍. 本草纲目 [M]. 长春: 吉林大学出版社, 2009: 76.
- [16] 明·缪希雍著, 李玉清, 成建军主校. 神农本草经疏 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 292.
- [17] 唐·陈藏器. 本草拾遗 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 56.
- [18] Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke M C H, *et al.* Allicin: Chemistry and biological properties [J]. *Molecules*, 2014, 19(8): 12591-12618.
- [19] Catanzaro E, Canistro D, Pellicioni V, *et al.* Anticancer potential of allicin: A review [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 177: 106118.
- [20] 杨璐, 王宇航, 滕霏, 等. 大蒜素注射液联合亚胺培南西司他丁钠治疗重症社区获得性细菌性肺炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(6): 1511-1515.
- [21] 李文静. 大蒜素对糖尿病动脉粥样硬化的干预作用及其机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
- [22] Panyod S, Wu W K, Chen P C, *et al.* Atherosclerosis

- amelioration by allicin in raw garlic through gut microbiota and trimethylamine-*N*-oxide modulation [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2022, 8(1): 4.
- [23] Zhang M, Pan H C, Xu Y J, *et al.* Allicin decreases lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammation in human umbilical vein endothelial cells through suppression of mitochondrial dysfunction and activation of Nrf2 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(6): 2255-2267.
- [24] Chen X S, Pang S N, Lin J F, *et al.* Allicin prevents oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial cell injury by inhibiting apoptosis and oxidative stress pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 133.
- [25] 王喜欢, 张金华, 胡亚南, 等. 大蒜素对高脂饮食 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化形成的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(2): 140-144.
- [26] Lu Y, He Z J, Shen X Y, *et al.* Cholesterol-lowering effect of allicin on hypercholesterolemic ICR mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 489690.
- [27] 付兆媛, 马承旭. 当归多糖对顺铂化疗 H₂₂ 腹水瘤小鼠所致肝脏损伤的影响 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3): 68-72.
- [28] Raja V, Aguiar C, Alsayed N, *et al.* Non-HDL-cholesterol in dyslipidemia: Review of the state-of-the-art literature and outlook [J]. *Atherosclerosis*, 2023, 383: 117312.
- [29] Yang L G, March Z M, Stephenson R A, *et al.* Apolipoprotein E in lipid metabolism and neurodegenerative disease [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2023, 34(8): 430-445.
- [30] Knouff C, Hinsdale M E, Mezdoor H, *et al.* Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(11): 1579-1586.
- [31] Wang H H, Zhang L S, Zhang X R, *et al.* Prediction model for different progressions of Atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice based on lipidomics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 214: 114734.
- [32] 傅强. 大蒜素初提物对脂代谢三基因突变小鼠血脂代谢及肝脏生理病变的影响 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [33] 王瑞, 樊颖, 肖林平, 等. 大蒜素对老年高脂血症患者血脂及体质量指数的影响 [J]. 心脏杂志, 2016, 28(5): 565-567.
- [34] Adler A J, Holub B J. Effect of garlic and fish-oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentrations in hypercholesterolemic men [J]. *Am J Clin Nutr*, 1997, 65(2): 445-450.
- [35] 李睿坤, 李继锋, 周晓莹, 等. 大蒜素对动脉粥样硬化小鼠血脂代谢的影响 [J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2007, 1(1): 29-33.
- [36] Borén J, Packard C J. Keeping remnants in perspective [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(42): 4333-4335.
- [37] Taskinen M R, Barter P J, Ehnholm C, *et al.* Ability of traditional lipid ratios and apolipoprotein ratios to predict cardiovascular risk in people with type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2010, 53(9): 1846-1855.
- [38] 马洁, 刘毅, 欧金鹏, 等. 免疫调控及靶向治疗在动脉粥样硬化斑块炎症反应中的研究进展 [J]. 临床神经病学杂志, 2024, 37(2): 157-160.
- [39] 崔艳, 李艳. 白细胞介素 6 及其受体对动脉粥样硬化作用 [J]. 微循环学杂志, 2016, 26(4): 66-70.
- [40] Hettwer J, Hinterdobler J, Miritsch B, *et al.* Interleukin-1 β suppression dampens inflammatory leucocyte production and uptake in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(13): 2778-2791.
- [41] 徐琛, 吴晨霞, 程洪强, 等. 白细胞介素-1 在动脉粥样硬化中的作用和靶向治疗价值 [J]. 中国细胞生物学报, 2020, 42(8): 1437-1442.
- [42] Lamb F S, Choi H, Miller M R, *et al.* TNF α and reactive oxygen signaling in vascular smooth muscle cells in hypertension and atherosclerosis [J]. *Am J Hypertens*, 2020, 33(10): 902-913.
- [43] Li Q, Tan Y, Chen S N, *et al.* Irisin alleviates LPS-induced liver injury and inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome and NF- κ B signaling [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(3): 294-303.
- [44] Hitchcock J K, Mkwana N, Barnett C, *et al.* The garlic compound Z-ajoene, S-thiolates COX2 and STAT3 and dampens the inflammatory response in RAW264.7 macrophages [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2021, 65(3): e2000854.
- [45] de Freitas F A, Levy D, Reichert C O, *et al.* Effects of oxysterols on immune cells and related diseases [J]. *Cells*, 2022, 11(8): 1251.
- [46] Toral-Rios D, Long J M, Ulrich J D, *et al.* Cholesterol 25-hydroxylase mediates neuroinflammation and neurodegeneration in a mouse model of tauopathy [J]. *J Exp Med*, 2024, 221(4): e20232000.
- [47] Zhang L, Fang Z Y, Zhu Q Q, *et al.* Cholesterol 25-hydroxylase protects against diabetic kidney disease by regulating ADP ribosylation factor 4 [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(29): e2309642.
- [48] Xiao J, Wang S, Chen L L, *et al.* 25-Hydroxycholesterol regulates lysosome AMP kinase activation and metabolic reprogramming to educate immunosuppressive macrophages [J]. *Immunity*, 2024, 57(5): 1087-1104.
- [49] Dong Q Q, Chen Y T, Liu W T, *et al.* 25-Hydroxycholesterol promotes vascular calcification via activation of endoplasmic reticulum stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 880: 173165.
- [50] Diczfalussy U, Olofsson K E, Carlsson A M, *et al.* Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(11): 2258-2264.
- [51] Kim H J, Kim H, Lee J H, *et al.* Toll-like receptor 4 (TLR4): New insight immune and aging [J]. *Immun Ageing*, 2023, 20(1): 67.

[责任编辑 李亚楠]