

山楂叶水提物对同型半胱氨酸和高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块进展的影响

郭文静¹, 邵婷婷², 张银芳², 柳彤彤², 宋 鹏^{2*}

1. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 730099

摘要: **目的** 观察山楂叶水提物对同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 和高脂诱导的载脂蛋白 E 敲除 (apolipoprotein E knockout, ApoE^{-/-}) 小鼠血管炎症损伤及机体脂代谢紊乱的影响。**方法** 取 8 只正常喂养的 C57BL/6J 小鼠作为对照组, 40 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为高脂组、高脂+甲硫氨酸组、辛伐他汀 (5.7 mg/kg) 组和山楂叶低、高剂量 (12、24 g/kg) 组, 每组 8 只。除对照组外, 其余小鼠均使用 21% 高脂饲料喂养 18 周。从第 11 周开始, 除对照组和高脂组外, 其余小鼠每日 ig 甲硫氨酸 (1 g/kg) 诱导高 Hcy 血症。同时各给药组 ig 相应药物, 对照组和高脂组 ig 等体积的生理盐水。检测小鼠外周血中白细胞、红细胞、血红蛋白和血小板含量; 检测小鼠血清中 Hcy、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)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、血肌酐 (serum creatinine, SCr) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平; 油红 O 染色观察小鼠主动脉内壁的脂质斑块及肝脏切片中脂质含量; Filipin 染色检测小鼠肝脏中胆固醇含量; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色检测小鼠主动脉组织病理形态变化; Masson 染色检测小鼠主动脉胶原纤维的沉积; 免疫荧光染色检测主动脉 p50、p65 及肝脏中固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element binding protein 1, SREBP1)、SREBP2 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 高脂组和高脂+甲硫氨酸组小鼠血清中 Hcy、TC、TG、LDL-C 和炎症因子水平显著升高 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$); 主动脉红染面积明显增加 ($P < 0.01$), 内膜增厚并出现明显病理改变, 脂质累积增加 ($P < 0.01$), p50 和 p65 表达增加 ($P < 0.01$); 肝脏 SREBP1 和 SREBP2 表达增加 ($P < 0.01$), 脂质含量增加 ($P < 0.01$)。与高脂+甲硫氨酸组比较, 各给药组小鼠血清中 Hcy、TC、TG、LDL-C 和炎症因子水平显著降低 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 主动脉红染面积明显减少 ($P < 0.01$), 病理改变减轻, 脂质累积减少 ($P < 0.01$), p50 和 p65 表达减少 ($P < 0.01$); 肝脏 SREBP1 和 SREBP2 表达减少 ($P < 0.01$), 脂质含量减少 ($P < 0.01$)。**结论** 山楂叶水提物能够改善小鼠血管的动脉粥样硬化, 其作用机制可能与抑制血管内皮的炎症损伤和肝脏脂质合成密切相关。

关键词: 山楂叶; 同型半胱氨酸; 高脂; ApoE^{-/-}小鼠; 动脉粥样硬化; 核因子- κ B; 固醇调节元件结合蛋白; 牡荆素鼠李糖苷; 金丝桃苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)11-4254-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.11.015

Effect of water extract of *Crataegus pinnatifida* leaves on progression of atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice induced by homocysteine and high fat

GUO Wenjing¹, SHAO Tingting², ZHANG Yinfang², LIU Tongtong², SONG Peng²

1. First School of Clinical Medical, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730099, China

Abstract: Objective To observe the effect of water extract of *Crataegus pinnatifida* leaves on vascular inflammatory injury and

收稿日期: 2025-12-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82280659); 甘肃省自然科学基金资助项目 (22JR11RA125); 甘肃省高校教师创新基金项目 (2026A-102); 西北营养与环境相关疾病中医药防控协同创新中心 2025 年度开放基金 (ZYXT-25-03)

作者简介: 郭文静, 博士研究生, 主治医师, 从事中医药防治慢性疾病研究。E-mail: guowj15@163.com

*通信作者: 宋 鹏, 博士, 副研究员, 从事中医药防治慢性疾病研究。E-mail: songp06@163.com

systemic lipid metabolism disorders in apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mice induced by homocysteine (Hcy) and high fat. **Methods** Eight C57BL/6J mice fed a normal diet were served as the control group, 40 ApoE^{-/-} mice were randomly divided into high-fat group, high-fat + methionine group, simvastatin (5.7 mg/kg) group, *C. pinnatifida* leaves low-and high-dose (12, 24 g/kg) groups, with eight mice in each group. Except for the control group, all other mice were fed a 21% high-fat diet for 18 weeks. Starting from the 11th week, except for the control and high-fat groups, the remaining mice were received daily intragastric administration of methionine (1 g/kg) to induce hyperhomocysteinemia. Corresponding drugs were administered to each treatment group, while the control and high-fat groups received an equivalent volume of saline. Counts of white blood cells, red blood cells, hemoglobin and platelets in peripheral blood were measured. Levels of Hcy, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β , alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) in serum were assessed. Oil red O staining was used to observe lipid plaques in aortic intima and lipid content in liver sections. Filipin staining was used to measure hepatic cholesterol level. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to examine pathological morphological changes in aortic tissue. Masson staining was used to detect collagen fiber deposition in aorta. Immunofluorescence staining was used to evaluate the expressions of p50, p65 in aorta and sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) and SREBP2 in liver. **Results** Compared with control group, levels of Hcy, TC, TG, LDL-C and inflammatory factors in serum of mice in high-fat group and high-fat + methionine group were significantly increased ($P < 0.01$), while the level of HDL-C was significantly decreased ($P < 0.01$). The red stained area of aorta was significantly increased ($P < 0.01$), the endometrium was thickened and showed obvious pathological changes, lipid accumulation was increased ($P < 0.01$), and expressions of p50, p65 were increased ($P < 0.01$). The expressions of SREBP1 and SREBP2 in liver were increased ($P < 0.01$), and the lipid content was increased ($P < 0.01$). Compared with high-fat + methionine group, levels of Hcy, TC, TG, LDL-C and inflammatory factors in serum of mice in each treatment group were significantly reduced ($P < 0.01$), while the level of HDL-C was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The red stained area of aorta was significantly reduced ($P < 0.01$), pathological changes were alleviated, lipid accumulation was reduced ($P < 0.01$), and the expressions of p50, p65 were reduced ($P < 0.01$). The expressions of SREBP1 and SREBP2 in liver were decreased ($P < 0.01$), and the lipid content was decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** The water extract of *C. pinnatifida* leaves could improve the atherosclerosis of blood vessels in mice, and its mechanism may be closely related to the inhibition of inflammatory damage of vascular endothelium and liver lipid synthesis.

Key words: *Crataegus pinnatifida* leaves; homocysteine; high fat; ApoE^{-/-} mice; atherosclerosis; nuclear factor- κ B; sterol regulatory element binding protein; vitexin-2-O-rhamnoside; hyperoside

目前冠状动脉疾病 (coronary artery disease, CAD) 是发达国家和一些发展中国家的主要死亡原因, 在我国 CAD 发病率呈现增长趋势, 而且发病年龄日趋年轻化。CAD 是一种多因素疾病, 其中动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是其重要的病理学基础和常见使动因素^[1]。AS 的本质是一种以内膜发生改变和脂质沉积为特点的慢性炎症性疾病。血管壁内脂质沉积、炎症细胞浸润和介质释放作为其主要病理特征贯穿疾病全过程^[2-3]。Peter Libby 在《自然》杂志指出, 胆固醇与炎症是 AS 必不可缺的 2 大致病因子, 两者共存才能启动并推动 AS 发展^[4]。相关研究报道, 高同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 可通过炎症反应和氧化应激等机制诱导 AS 发生^[5], 但高 Hcy 血症介导 AS 形成和发展的确切生物化学及分子机制尚未充分阐明。

东晋《肘后方》最早记载了山楂叶的药用价值, 称其“茎叶煮汁, 洗漆疮”。西方则在 19 世纪初开

始使用山楂叶, 并将其誉为治疗心血管疾病的“秘密”。至今山楂叶及其制剂仍在中国和欧洲广泛用于心血管疾病的治疗^[6]。此外, 研究发现山楂叶提取物能够调控载脂蛋白 E 敲除 (apolipoprotein E knockout, ApoE^{-/-}) 小鼠血脂并降低单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和超敏 C 反应蛋白 (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP) 水平^[7-8], 表明山楂叶提取物具有抗 AS、稳定斑块的作用, 其机制可能与抗炎和抑制脂质合成有关。宓伟等^[9]研究发现, 山楂叶中的原花青素可抑制固醇调节元件结合蛋白 1 (sterol regulatory element binding protein 1, SREBP1) 基因的转录和蛋白表达, 从而抑制下游脂肪酸和胆固醇合成酶的表达, 减少脂质合成。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 转录因子是 AS 发病机制中炎症和细胞死亡的关键调节因子。鄂璐莎等^[10]发现, 山楂叶中的

活性成分金丝桃苷能抑制 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/NF- κ B 信号通路,减轻 AS 的炎症。另有学者研究发现,山楂叶多酚提取物通过调节腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/沉默调节蛋白 1 (silent information regulator protein 1, SIRT1)/NF- κ B 和 miR-34a/SIRT1/p53 等信号通路,减少高血糖诱导的细胞炎症反应和凋亡^[1],进一步证实了山楂叶抗炎及抑制脂质合成的药理作用。因此,本研究采用高甲硫氨酸和高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠建立 AS 模型,并给予山楂叶水提物进行干预,观察山楂叶对 AS 模型小鼠血管炎症损伤及机体脂代谢紊乱的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 8 只、ApoE^{-/-}小鼠 40 只,购买自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2019-0010。动物适应性喂养 1 周后开始实验。实验期间,动物自由进食饮水,定期更换新鲜细木棍供咀嚼。实验室温度维持在 22 °C,相对湿度 48%,每周更换全新灭菌垫料。动物实验经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 SY2023-714)。

1.2 药材

山楂叶(批号 080420101,产地为安徽)购自甘肃康乐药业有限责任公司,经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任药师鉴定为蔷薇科植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥叶。

1.3 药品与试剂

辛伐他汀片(批号 H20084486)购自山德士(中国)制药有限公司;甲硫氨酸(批号 PS2375-1000)购自成都普思生物科技股份有限公司;异丙醇(批号 80109218)、无水乙醇(批号 100092683)购自国药集团化学试剂有限公司;p65 抗体(批号 GB11997)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;p50 抗体(批号 1194R)购自上海雅吉生物科技有限公司;IgG-CY3 抗体(批号 WK362)购自北京百奥莱博科技有限公司;IgG-FITC 抗体(批号 Abs20004)购自爱必信生物科技有限公司;SREBP1 抗体(批号 K106528P)、SREBP2 抗体(批号 K106821P)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(批号 SEKM-0007)、小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(批号 SEKM-0002)、小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA

试剂盒(批号 SEKM-0034)、油红 O 染色试剂盒(批号 G1015)、Masson 染色试剂盒(批号 G1340)购自北京索莱宝科技有限公司;Filipin 染色试剂盒(批号 MB1848)购自大连博格林生物科技有限公司;小鼠 Hcy ELISA 试剂盒(批号 SBJ-M0905)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) ELISA 试剂盒(批号 SBJ-M0602)、三酰甘油 (triglyceride, TG) ELISA 试剂盒(批号 SBJ-M0617)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) ELISA 试剂盒(批号 SBJ-M0742)购自南京森贝伽生物科技有限公司;小鼠高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) ELISA 试剂盒(批号 HB-P9S733X)购自上海化邦生物科技有限公司;小鼠低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) ELISA 试剂盒(批号 GN-M20333)、小鼠天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) ELISA 试剂盒(批号 GN-M20900)购自上海盖宁生物科技有限公司;小鼠丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) ELISA 试剂盒(批号 ZK-0049720)购自上海再康生物科技有限公司;小鼠肌酐 (serum creatinine, SCr) ELISA 试剂盒(批号 J25469)购自武汉吉立德生物科技有限公司。

1.4 仪器

CV300 型真空离心浓缩仪(北京吉艾姆科技有限公司);CM1950 型冷冻切片仪(徕卡显微系统贸易有限公司);BX53 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);BS-350S 型全自动生化分析仪(迈瑞医疗国际有限公司);ARM-2216 型病理组织切片机(湖北安立信医疗实业有限公司);BTH-I 型病理组织摊片机(济南博坤科学仪器有限公司);ELx800 酶标仪(美国 BioTek 公司);JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);Donatello 脱水机(意大利 DIAPATH 公司);ECLIPSE C1 型正置荧光显微镜、DS-U3 型成像系统(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 山楂叶水提物的制备

称取 1 kg 山楂叶,加 10 倍量水,浸泡 1 h 后开始煎煮,加热至沸腾后煎煮 2 h,滤过;加 8 倍量水,加热至沸腾后煎煮 1.5 h,滤过;合并 2 次滤液,浓缩至 500 mL,每毫升浓缩液含生药 2 g,分装储存于 4 °C 冰箱中备用。采用高效液相色谱法检测山楂叶浓缩液中含牡荆素鼠李糖苷 8.2 mg/mL、金丝桃苷 1.6 mg/mL。

2.2 小鼠 *ApoE* 基因型的 PCR 鉴定

2.2.1 溶液的配制 取 10 mL 1 mol/L Tris HCl (pH 8.0)、4 mL 0.5 mol/L EDTA、400 mL 1 mol/L NaCl、100 mL 10% SDS, 加水定容至 1 L, 配制成鼠尾裂解液; 称取 242 g Tris、37.2 g 二水合 EDTA 二钠, 量取 57.1 mL 冰醋酸, 定容至 1 L, 配制成 50×TAE 核酸电泳缓冲液; 取 20 mL 50×TAE 核酸电泳缓冲液于烧杯中, 稀释至 1 L, 配制成 1×TAE 核酸电泳缓冲液; 取 50 mL 1×TAE 核酸电泳缓冲液于烧杯中, 加入 1.5 g 琼脂糖, 加热溶化后加入 20 μL 0.1 mg/mL EB, 摇匀后倒在制胶模具中, 冷却凝固, 配制成 3%琼脂糖凝胶。

2.2.2 小鼠基因组的提取 剪取小鼠尾尖 3 mm 左右放入 EP 管中, 取不同小鼠尾尖时用 75%乙醇擦拭剪刀, 以防交叉污染; 加入 500 μL 鼠尾裂解液和 50 μL 蛋白酶 K, 于 55 °C 水浴 4 h, 间歇轻晃 EP 管, 在室温下 12 000 r/min 离心 5 min, 并将上清转移至新的 EP 管中; 加入 1 mL 无水乙醇, 颠倒混匀后于 -20 °C 放置 20 min 沉淀核酸, 室温下 12 000 r/min 离心 5 min; 弃去乙醇, 加入 1 mL 70%乙醇颠倒 EP 管数次, 室温下 12 000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 重复此步骤 1 次, 挥干乙醇后加入 100 μL 水和 1 μL 10 mg/mL RNase A, 37 °C 孵育 30 min 溶解核酸。

2.2.3 小鼠基因型的 PCR 鉴定 基于 *ApoE* 基因设计引物, 引物序列见表 1。引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。将提取的小鼠基因组稀释 10 倍后作为 PCR 模板, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 次循环; 72 °C 再延伸 10 min 后冷却至 4 °C。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	引物序列 (5'-3')
通用	GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG
野生型	TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC
突变	GCCGCCCGACTGCATCT

2.3 动物分组、造模与给药

采用 8 只正常喂养的 C57BL/6J 小鼠作为对照组, 40 只 *ApoE*^{-/-} 小鼠随机分为高脂组、高脂+甲硫氨酸组、辛伐他汀 (5.7 mg/kg) 组和山楂叶低、高剂量 (12、24 g/kg) 组, 每组 8 只。除对照组外, 其余小鼠均使用 21%高脂饲料喂养 18 周。从第 11

周开始, 除对照组和高脂组外, 其余小鼠每日 ig 甲硫氨酸混悬液 (1 g/kg) 诱导高 Hcy 血症。同时各给药组 ig 相应药物, 对照组和高脂组 ig 等体积的生理盐水。

2.4 动物取材

给药结束后, 在小鼠麻醉状态下, 通过眼眶采血获取全血, 立刻进行全血分析; 随后, 样本在 4 °C 下 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 用于生化指标和炎症因子检测。采血完成后, 将小鼠放置于仰卧位, 沿腹部中线切开皮肤, 分离下方组织以暴露心脉, 轻柔剥离心脏至髂动脉的整段主动脉, 并在体视显微镜下小心去除其周围结缔组织和外膜。取一段腹主动脉用于油红 O 染色; 将剩余主动脉均分为 2 部分, 一部分使用 OCT 包埋剂包埋并切片 (8 μm 厚) 进行油红 O 染色实验; 另一部分固定于 4% 甲醛中, 随后石蜡包埋并切片 (6 μm 厚) 进行 Masson 染色、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色和免疫荧光染色。肝脏均分为 2 部分, 一部分 OCT 包埋切片 (8 μm 厚) 用于油红 O 染色实验和 Filipin 染色; 另一部分进行 4%甲醛固定、石蜡包埋后切片 (6 μm 厚) 进行 HE 染色和免疫荧光染色。

2.5 外周血全血分析

采用全自动生化分析仪进行全血分析, 检测小鼠外周血白细胞、红细胞、血红蛋白和血小板含量。

2.6 血清中 Hcy、TC、TG、LDL-C、HDL-C、ALT、AST、SCr、BUN、IL-6、TNF-α 和 IL-1β 水平的检测

取血清, 按照试剂盒说明书检测 Hcy、TC、TG、LDL-C、HDL-C、ALT、AST、SCr、BUN、IL-6、TNF-α、IL-1β 水平。

2.7 油红 O 染色观察小鼠主动脉内壁的脂质斑块

将主动脉剥离干净, 纵向剖开, 在双蒸水中浸洗 15 min; 将主动脉浸于油红 O 染料中染色 15 min, 转移至 60%异丙醇中进行背景分化处理, 直至背景呈现无色。蒸馏水冲洗后拍照记录, 利用 Image J Pro Plus 软件进行斑块区域的量化分析。

2.8 油红 O 染色检测小鼠主动脉及肝脏中脂质含量

将小鼠主动脉和肝脏组织制备成冰冻切片, 于室温下复温干燥 3~5 min, 用固定液处理 15 min 并用自来水冲洗干净, 晾干。切片在油红 O 染液中加盖避光浸染 8~10 min。染色完成后, 使用 60%异丙醇快速分化 2 次, 每次 5 s, 蒸馏水中清洗 2 次, 每次 10 s。使用苏木素复染 3~5 min, 蒸馏水浸洗 3 次, 每次 10 s。用分化液处理 2~8 s, 蒸馏水浸

洗,此步骤共重复2次。使用返蓝液快速返蓝,自来水浸洗后,滴加适量甘油,封片。使用数字切片扫描仪采集图像,通过Image J软件计算主动脉中的脂质积聚区域比例。

红染脂质面积比=阳性染色面积/主动脉窦管腔总面积

2.9 Filipin 染色检测小鼠肝脏中胆固醇含量

在室温下将肝脏冰冻切片复温干燥,滴加适量GENMED清洁剂覆盖整个切片表面,去除清洁剂,重复此步骤1次。随后,涂覆适量的GENMED固定剂覆盖整个切片表面,在室温下孵育30 min。去除固定剂,使用适量的清洁剂进行清洗,去除清洁剂。涂覆适量的GENMED抗干扰剂覆盖切片表面,室温下孵育20 min后去除抗干扰剂。加入适量GENMED染料覆盖切片表面,室温下避光孵育30 min并去除染料。使用适量清洗剂清洗样品表面2次,盖上盖玻片封闭。设置光学显微镜的荧光激发波长为340 nm,发射波长为430 nm,采集图像,利用Image J软件对小鼠肝脏中的游离胆固醇进行统计分析。

阳性染色面积比=蓝色荧光面积/主动脉窦管腔总面积

2.10 HE 染色检测小鼠主动脉组织病理形态变化

将小鼠主动脉制成石蜡切片,随后将切片置于70℃烘箱中加热30 min,使用二甲苯脱蜡振荡15 min,重复此步骤1次。使用无水乙醇浸洗3 min,浸洗2次,蒸馏水冲洗2次,每次2 min。使用苏木素染色5 min,染色完成后置于自来水中冲洗10 min,并将其浸泡于40℃预热的蒸馏水中10 min,后在自来水中和蒸馏水中浸洗1 min。在伊红染液中染色2 min,随后放入蒸馏水中快速清洗,使用95%乙醇和无水乙醇漂洗1 min,在二甲苯中透明5 min,最终滴加适量中性树胶封片。通过光学显微镜和数字切片扫描仪捕获小鼠主动脉和肝脏组织的HE染色图像,借助Image J软件对主动脉内斑块面积比进行定量分析。

斑块面积比=斑块面积/主动脉窦管腔总面积

2.11 Masson 染色检测小鼠主动脉胶原纤维的沉积情况

将小鼠主动脉制成石蜡切片,随后将切片置于70℃烘箱处理30 min,使用二甲苯进行2次脱蜡处理,每次15 min。将切片依次经过无水乙醇、95%乙醇和75%乙醇中浸泡3 min,随后放入蒸馏水中冲洗。将切片在Masson A溶液中浸泡过夜,自来水冲洗后,再将其浸入Masson B液与Masson C液按

等比混合的溶液中60 s,自来水清洗。切片经1%盐酸乙醇处理后,自来水冲洗,在Masson D液中染色6 min并漂洗。切片在Masson E液中浸泡1 min后沥干,快速通过Masson F液,并在1%冰醋酸中漂洗,使用无水乙醇进行2次快速脱水,在二甲苯中处理5 min,最后滴加中性树胶封片。通过光学显微镜采集图像,并利用Image J软件计算小鼠主动脉胶原含量比。

胶原含量比=蓝色胶原含量/主动脉管腔总面积

2.12 免疫荧光染色检测主动脉 p50、p65 及肝脏中 SREBP1、SREBP2 蛋白表达

将小鼠主动脉及肝脏制成石蜡切片,后将切片于二甲苯中脱蜡,使用梯度乙醇复水。将石蜡切片置于枸橼酸钠修复液中,使用微波炉加热10 min进行抗原修复,自然冷却至室温。使用PBS清洗3次,每次3 min,去除切片表面的液体。滴加血清并在湿盒中37℃孵育30 min以封闭非特异性结合位点,用滤纸擦去多余封闭液。滴加一抗并在4℃湿盒中孵育过夜,PBS清洗5次,每次5 min。滴加FITC标记的山羊抗兔IgG二抗,室温避光孵育1 h,PBS清洗5次,每次5 min。滴加DAPI染色细胞核,避光孵育2 min,PBS清洗3次,每次3 min,滴加适量中性树胶进行封片处理。在荧光显微镜下进行观察和图像采集,利用Image J软件统计小鼠主动脉及肝脏抗体表达量。

2.13 统计学分析

利用SPSS 26.0软件进行统计学分析。利用Graphpad Prism 9.0绘制柱状图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较应用One-way ANOVA单因素方差分析,组间两两比较采用Student's test检验。

3 结果

3.1 小鼠 ApoE 基因型的鉴定结果

使用新霉素的基因序列将野生型小鼠ApoE的部分基因序列进行替换后得到ApoE突变小鼠^[12],引物“通用”根据野生型小鼠和突变小鼠共有的序列设计,引物“野生型”根据野生型小鼠特有序列设计,引物“突变”根据ApoE突变小鼠特有序列设计。在同时使用这3条引物进行PCR时,纯合野生型小鼠获得PCR产物为155 bp,而纯合的ApoE突变小鼠获得PCR产物为255 bp。如图1所示,8只C57BL/6J小鼠的PCR产物为155 bp,均为野生型小鼠;40只ApoE^{-/-}小鼠的PCR产物为255 bp,均为ApoE突变小鼠。

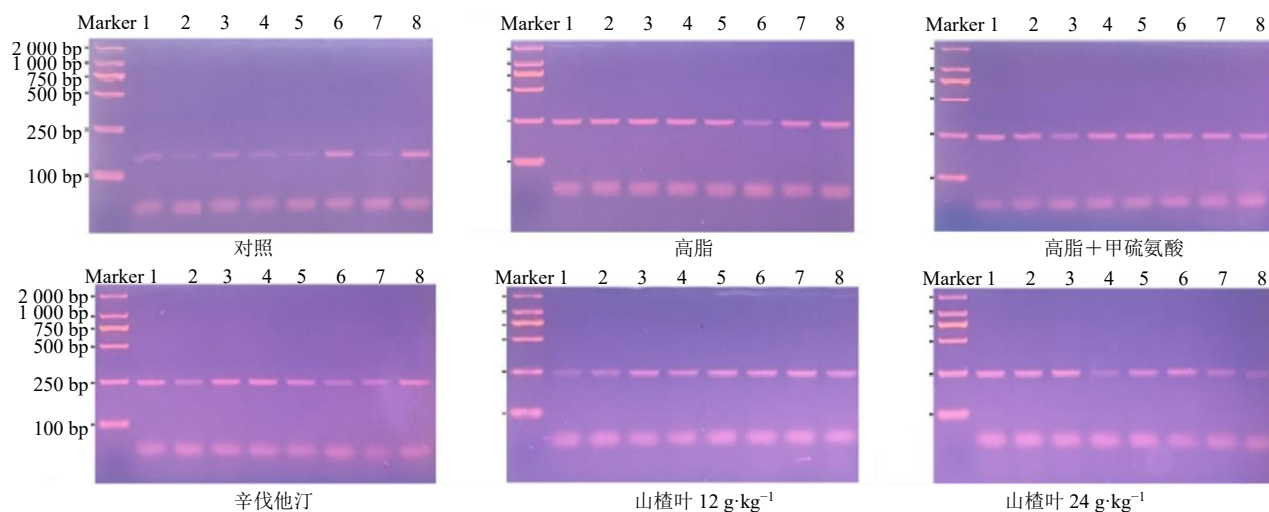


图 1 各组小鼠 *ApoE* 基因型的鉴定结果

Fig. 1 Identification results of *ApoE* genotype of mice in each group

3.2 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 *ApoE*^{-/-} 小鼠一般情况的影响

造模前各组小鼠反应灵敏，行动迅速，毛发浓密有光泽，双眼明亮，大小便正常。实验过程中，对照组小鼠形态、精神、情绪及活动度正常；高脂组小鼠体型肥胖，动作迟缓，毛色无光泽；高脂+甲硫氨酸组小鼠毛发疏松枯槁，且有皮毛脱落；辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组小鼠活动度、粪便性状、毛色等较高脂+甲硫氨酸组均有所改善。实验期间，各组小鼠摄食良好。

3.3 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 *ApoE*^{-/-} 小鼠体质量的影响

分别在第 0、3、6、9、12、15、18 周称定各组小鼠体质量，如表 2 所示，第 9 周开始，与对照组比较，高脂组和高脂+甲硫氨酸组小鼠体质量显著升高 ($P < 0.01$)；与高脂+甲硫氨酸组比较，第 15 周山楂叶高剂量组小鼠体质量显著降低 ($P < 0.01$)，第 18 周辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组小鼠体

质量均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.4 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 *ApoE*^{-/-} 小鼠血清中 Hcy、TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平的影响

如表 3 所示，与对照组比较，高脂组和高脂+甲硫氨酸组小鼠血清中 Hcy、TC、TG、LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$)，HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$)；与高脂+甲硫氨酸组比较，辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组小鼠血清中 Hcy、TG、LDL-C 水平明显降低 ($P < 0.01$)，HDL-C 水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，辛伐他汀组和山楂叶高剂量组 TC 水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.5 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 *ApoE*^{-/-} 小鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平的影响

如表 4 所示，与对照组比较，高脂组和高脂+甲硫氨酸组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$)；与高脂+甲硫氨酸组比较，辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组小鼠血清中 IL-6、

表 2 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Changes in body weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g						
		第0周	第3周	第6周	第9周	第12周	第15周	第18周
对照	—	17.95 ± 0.39	19.63 ± 0.13	21.34 ± 0.29	23.93 ± 0.12	25.02 ± 0.35	27.27 ± 0.23	27.81 ± 0.31
高脂	—	18.49 ± 0.31	19.67 ± 0.21	22.17 ± 0.25	26.25 ± 0.40 ^{##}	29.58 ± 0.57 ^{##}	31.05 ± 0.20 ^{##}	31.67 ± 0.46 ^{##}
高脂+甲硫氨酸	1	18.58 ± 0.41	19.41 ± 0.11	22.92 ± 0.21	25.88 ± 0.34 ^{##}	28.87 ± 0.50 ^{##}	31.90 ± 0.28 ^{##}	32.15 ± 0.35 ^{##}
辛伐他汀	5.7 × 10 ⁻³	19.02 ± 0.21	19.60 ± 0.22	22.86 ± 0.21	26.77 ± 0.42	28.17 ± 0.25	29.83 ± 0.24	30.28 ± 0.42 ^{**}
山楂叶	12	17.95 ± 0.61	19.56 ± 0.31	22.84 ± 0.14	26.89 ± 0.54	28.07 ± 0.30	29.30 ± 0.11	30.09 ± 0.21 ^{**}
	24	17.59 ± 0.50	19.18 ± 0.20	21.48 ± 0.27	26.33 ± 0.34	27.17 ± 0.29	28.26 ± 0.14 ^{**}	28.55 ± 0.69 ^{**}

与对照组比较：^{##} $P < 0.01$ ；与高脂+甲硫氨酸组比较：^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ，下表同。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs high fat + methionine group, same as below tables.

表3 各组小鼠血清中 Hcy、TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Levels of Hcy, TC, TG, LDL-C and HDL-C in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Hcy/ (mmol·L ⁻¹)	TC/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	LDL-C/ (mmol·L ⁻¹)	HDL-C/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	11.91 ± 1.44	0.68 ± 0.18	2.02 ± 0.32	0.04 ± 0.03	1.81 ± 0.29
高脂	—	20.95 ± 2.18 ^{##}	1.17 ± 0.14 ^{##}	18.88 ± 1.17 ^{##}	15.39 ± 0.95 ^{##}	0.98 ± 0.30 ^{##}
高脂+甲硫氨酸	1	40.20 ± 1.95 ^{##}	1.31 ± 0.22 ^{##}	19.96 ± 0.95 ^{##}	16.45 ± 0.89 ^{##}	0.84 ± 0.26 ^{##}
辛伐他汀	5.7 × 10 ⁻³	21.29 ± 1.88 ^{**}	0.84 ± 0.23 ^{**}	11.14 ± 1.28 ^{**}	9.71 ± 1.67 ^{**}	1.63 ± 0.14 ^{**}
山楂叶	12	29.01 ± 2.58 ^{**}	1.23 ± 0.37	15.19 ± 1.54 ^{**}	12.72 ± 1.11 ^{**}	1.42 ± 0.30 [*]
	24	21.80 ± 2.07 ^{**}	0.92 ± 0.24 [*]	11.28 ± 0.67 ^{**}	10.13 ± 0.91 ^{**}	1.57 ± 0.29 ^{**}

表4 各组小鼠血清中 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Levels of IL-6, TNF-α and IL-1β in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)	IL-1β/(ng·L ⁻¹)
对照	—	7.78 ± 1.28	22.10 ± 7.11	51.37 ± 8.32
高脂	—	46.10 ± 10.29 ^{##}	61.71 ± 15.96 ^{##}	101.60 ± 14.72 ^{##}
高脂+甲硫氨酸	1	71.35 ± 6.49 ^{##}	117.63 ± 10.33 ^{##}	173.45 ± 14.00 ^{##}
辛伐他汀	5.7 × 10 ⁻³	25.61 ± 4.97 ^{**}	48.88 ± 6.17 ^{**}	70.39 ± 6.45 ^{**}
山楂叶	12	38.95 ± 6.63 ^{**}	85.36 ± 6.92 ^{**}	88.98 ± 8.35 ^{**}
	24	26.04 ± 7.10 ^{**}	52.50 ± 6.96 ^{**}	73.55 ± 5.17 ^{**}

TNF-α 和 IL-1β 水平明显降低 ($P < 0.01$)。

3.6 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠外周血白细胞、红细胞、血红蛋白和血小板含量的影响

如表 5 所示, 各组小鼠外周血中白细胞、红细胞、血红蛋白和血小板均无显著变化。

3.7 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠血清中 ALT、AST、SCr 和 BUN 水平的影响

如表 6 所示, 各组小鼠血清中 ALT、AST、SCr

和 BUN 水平均无显著变化。

3.8 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉内壁脂质斑块的影响

油红 O 染色通过特异性结合脂质以显现肉眼可辨的红色, 故对小鼠全主动脉进行油红 O 染色有助于 AS 病变的整体评估。如图 2 所示, 与对照组比较, 高脂组和高脂+甲硫氨酸组小鼠主动脉红染面积显著增加 ($P < 0.01$), 表明高 Hcy 可加速 ApoE^{-/-}小鼠的主动脉脂质沉积过程; 与高脂+甲硫

表5 各组小鼠外周血白细胞、红细胞、血红蛋白和血小板含量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

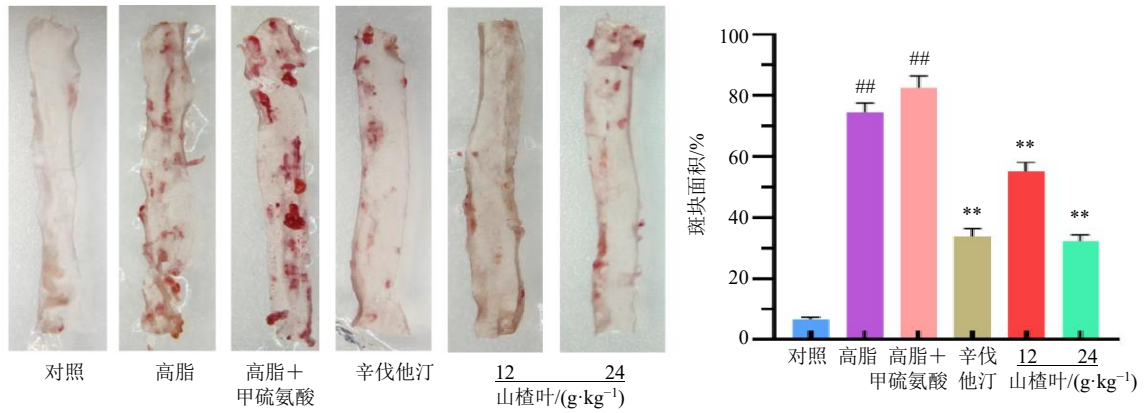
Table 5 Contents of white blood cells, red blood cells, hemoglobin and platelets in peripheral blood of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	白细胞/(×10 ⁹ 个·L ⁻¹)	红细胞/(×10 ¹² 个·L ⁻¹)	血红蛋白/(g·L ⁻¹)	血小板/(×10 ⁹ 个·L ⁻¹)
对照	—	2.54 ± 0.37	9.87 ± 0.69	144.00 ± 10.39	1 135.88 ± 208.96
高脂	—	2.09 ± 0.19	9.46 ± 0.90	142.63 ± 13.29	1 258.50 ± 275.45
高脂+甲硫氨酸	1	2.15 ± 0.28	9.56 ± 0.65	140.38 ± 9.69	1 301.00 ± 238.76
辛伐他汀	5.7 × 10 ⁻³	1.91 ± 0.31	9.93 ± 0.67	147.00 ± 8.57	1 235.50 ± 255.85
山楂叶	12	1.75 ± 0.61	9.46 ± 0.10	140.75 ± 15.17	1 324.25 ± 236.90
	24	2.56 ± 0.28	9.71 ± 0.39	142.25 ± 11.06	1 392.63 ± 150.36

表6 各组小鼠血清中 ALT、AST、SCr 和 BUN 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Levels of ALT, AST, SCr and BUN in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	SCr/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	30.25 ± 3.94	143.80 ± 32.84	22.12 ± 1.60	7.64 ± 0.45
高脂	—	34.79 ± 3.76	147.93 ± 16.95	20.00 ± 2.62	7.53 ± 0.62
高脂+甲硫氨酸	1	34.95 ± 3.36	163.29 ± 34.23	21.27 ± 1.21	7.73 ± 0.70
辛伐他汀	5.7 × 10 ⁻³	32.91 ± 4.14	153.99 ± 21.74	20.24 ± 1.80	7.75 ± 1.11
山楂叶	12	35.53 ± 3.58	148.94 ± 28.09	20.97 ± 2.49	7.73 ± 0.55
	24	33.46 ± 3.56	149.49 ± 18.76	21.49 ± 2.19	8.00 ± 0.82



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与高脂+甲硫氨酸组比较: ^{**} $P < 0.01$, 下同。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs high fat + methionine group, same as below figures.

图2 各组小鼠主动脉大体油红 O 染色及斑块面积定量分析 ($\times 20$; $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 2 Aortic gross oil red O staining and quantitative analysis of plaque area of mice in each group ($\times 20$; $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

氨酸组比较, 辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组小鼠主动脉斑块面积显著降低 ($P < 0.01$), 表明山楂叶可明显抑制小鼠主动脉脂质沉积。

3.9 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉病理变化的影响

如图 3 所示, 对照组小鼠主动脉壁结构整齐, 没有明显的 AS 标志; 与对照组比较, 高脂组和高脂+甲硫氨酸组小鼠主动脉壁出现了内膜增厚、纤维化和粥样斑块等 AS 特征, 其中高脂+甲硫氨酸组血管壁内泡沫细胞聚集和胆固醇结晶形成尤为明显 ($P < 0.01$); 与高脂+甲硫氨酸组比较, 辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组小鼠 AS 病变有所减

轻, AS 斑块缩小, 泡沫细胞减少 ($P < 0.01$), 其中辛伐他汀组和山楂叶高剂量组效果较为明显。

3.10 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织中脂质含量的影响

油红 O 染色能特异性地将细胞内脂质染为红色, 如图 4 所示, 对照组显微镜下可观察到血管壁层次分明, 结构清楚, 空泡和皱褶较少, 几乎没有红色沉积; 与对照组比较, 高脂组和高脂+甲硫氨酸组内膜显著增厚, 脂质沉积斑块增多, 结构模糊且出现众多褶皱和空泡, 大量红色沉积明显 ($P < 0.01$); 与高脂+甲硫氨酸组比较, 辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组内膜明显变薄, 脂质沉积显著降

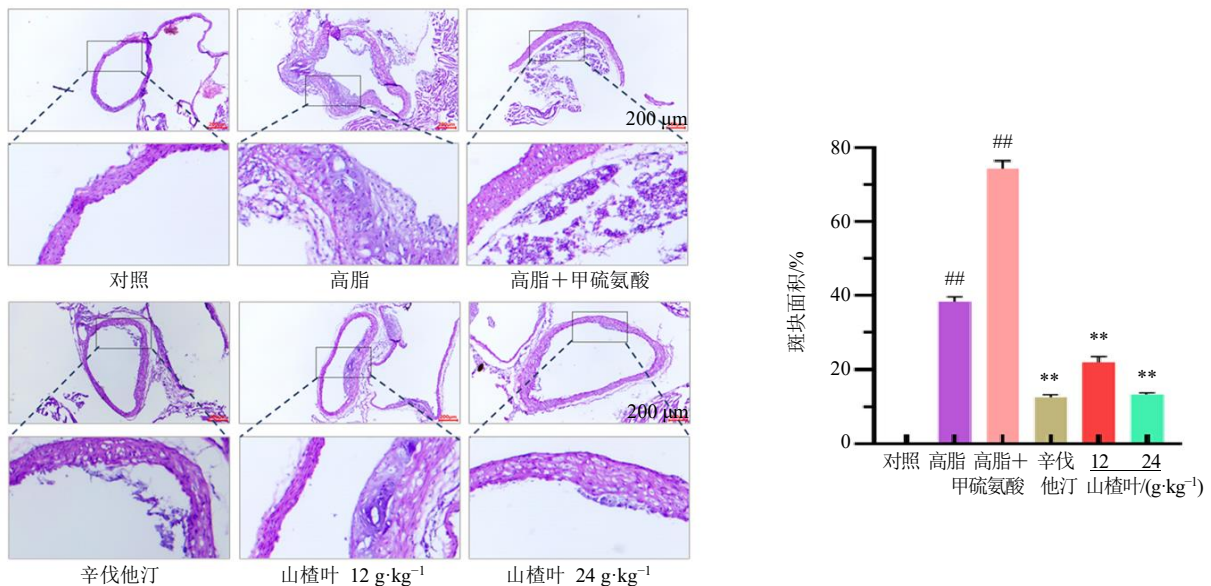


图3 各组小鼠主动脉 HE 染色及斑块面积定量分析 ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 3 Aortic HE staining and quantitative analysis of plaque area of mice in each group ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

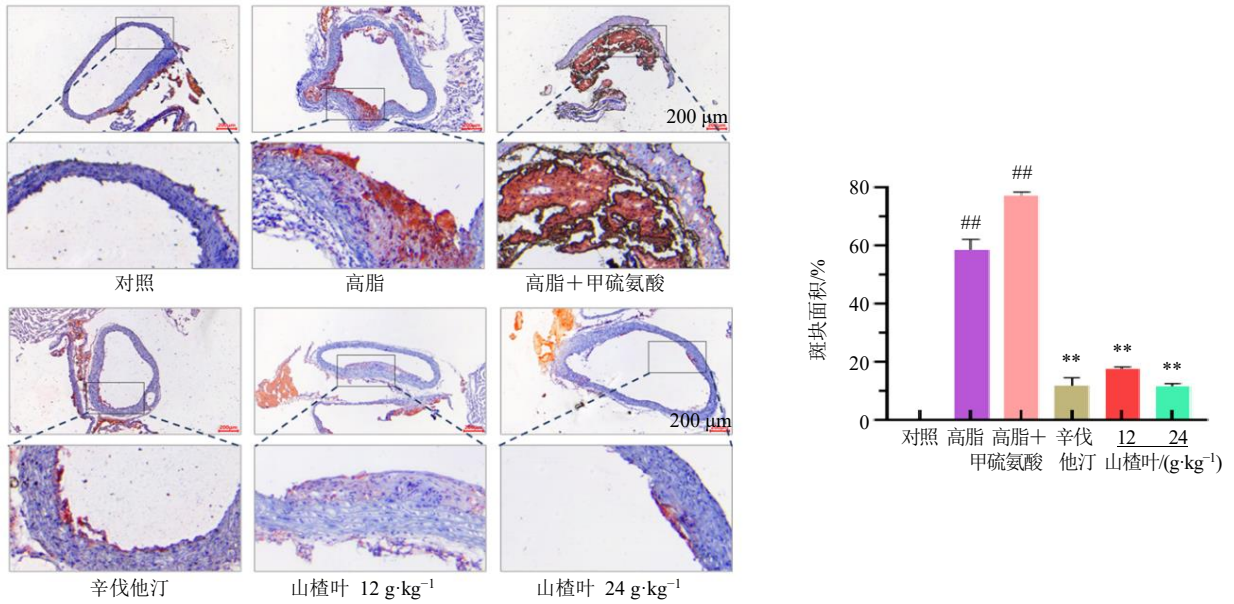


图4 各组小鼠主动脉油红O染色及斑块面积定量分析 (×200; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Aortic oil red O staining and quantitative analysis of plaque area of mice in each group (× 200; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

低 ($P < 0.01$), 空泡和皱褶减少, 血管结构更为整洁明晰, 其中辛伐他汀组和山楂叶高剂量组效果更加明显。

3.11 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织纤维化程度的影响

Masson 染色可将胶原纤维与黏液染为蓝色, 肌纤维、纤维素和红细胞染为红色。如图 5 所示, 对照组小鼠主动脉未形成明显的纤维化; 与对照组比较, 高脂组和高脂+甲硫氨酸组小鼠主动脉内膜增生, 斑块纤维化显著增多并且出现纤维帽 ($P <$

0.01); 与高脂+甲硫氨酸组比较, 辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组纤维化面积显著降低 ($P < 0.01$), 主动脉内膜无明显增生。

3.12 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织中 p50 和 p65 蛋白表达的影响

p50 为 NF-κB 家族的重要成员, 在血管发育及炎症反应中发挥核心作用。如图 6、7 所示, 与对照组比较, 高脂组和高脂+甲硫氨酸组小鼠主动脉 p50 和 p65 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与高脂+甲硫氨酸组比较, 辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组

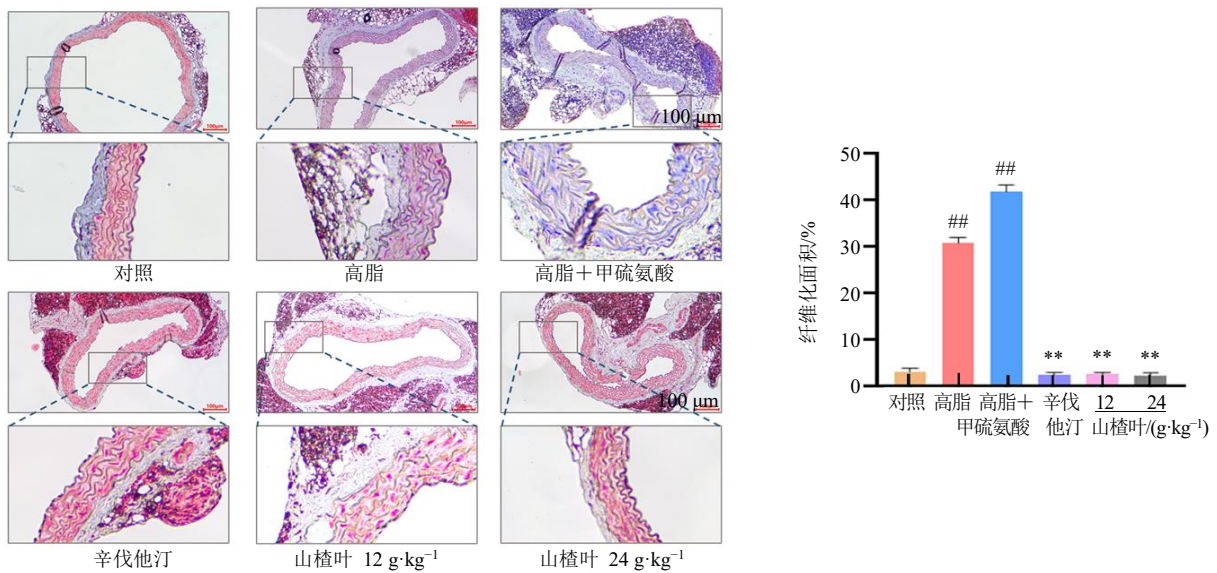


图5 各组小鼠主动脉 Masson 染色及纤维化面积定量分析 (×200; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Aortic Masson staining and quantitative analysis of fibrosis area of mice in each group (× 200; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

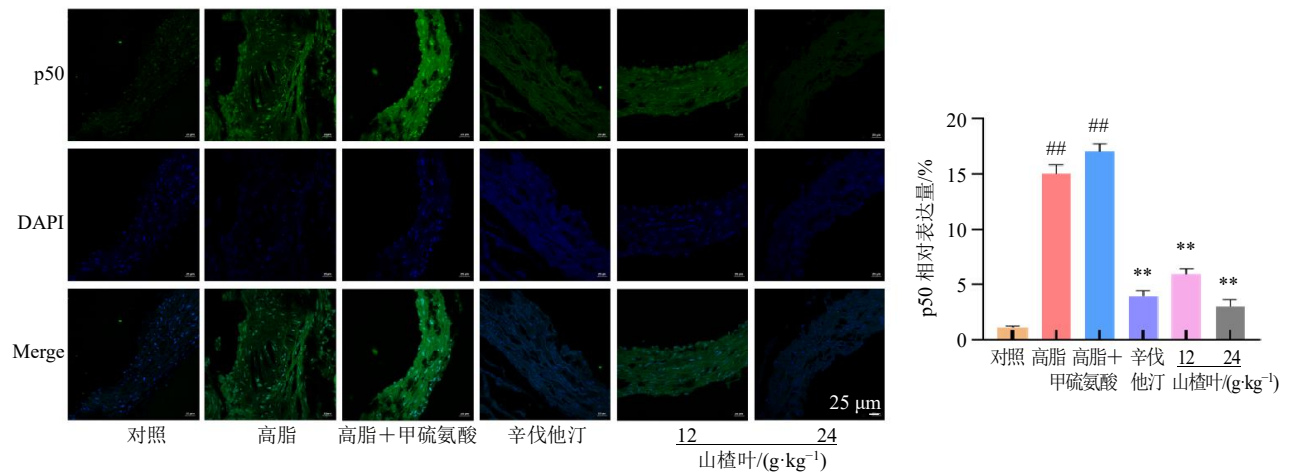


图 6 免疫荧光染色检测各组小鼠主动脉 p50 表达 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Expression of p50 in aorta of mice in each group detected by immunofluorescence staining (× 400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

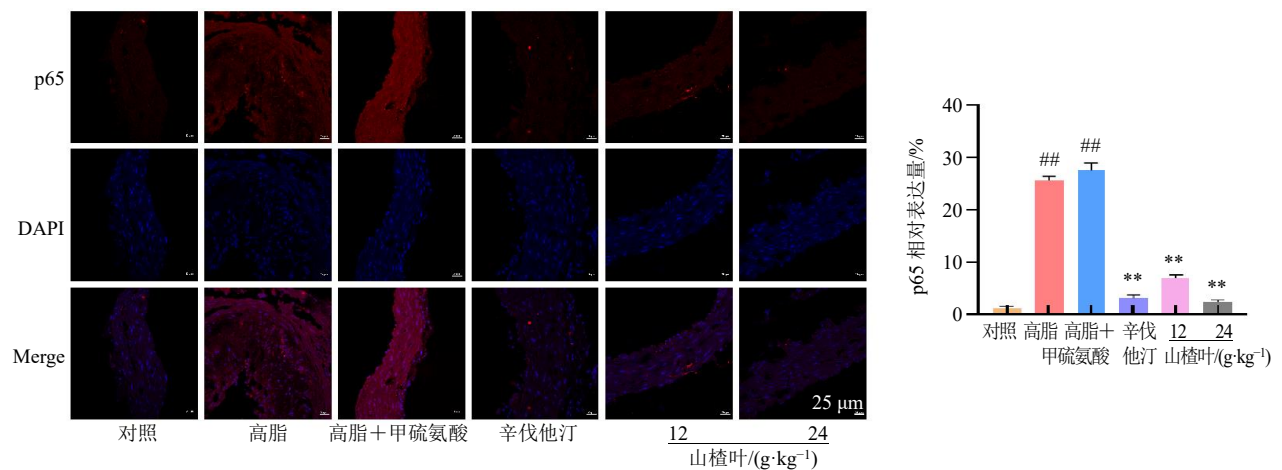


图 7 免疫荧光染色检测各组小鼠主动脉 p65 表达 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Expression of p65 in aorta of mice in each group detected by immunofluorescence staining (× 400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

小鼠主动脉 p50 和 p65 表达显著降低 ($P < 0.01$), 其中辛伐他汀组和山楂叶高剂量组作用更为明显。

3.13 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠肝脏组织中脂质含量的影响

如图 8 所示, 对照组显微镜下可见肝脏细胞排列整齐, 细胞核呈蓝色, 结构清晰, 红染较少; 与对照组比较, 高脂组和高脂+甲硫氨酸组红染面积显著增加 ($P < 0.01$), 脂质大量堆积; 与高脂+甲硫氨酸组比较, 辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组红染面积减少, 脂质含量明显降低 ($P < 0.01$), 其中辛伐他汀组和山楂叶高剂量组作用更为明显。

Filipin 与细胞中的胆固醇结合形成 Filipin-TC 复合物, 在特定波长下发出蓝色荧光信号。如图 9 所示, 对照组显微镜下可见肝脏冰冻切片蓝色较弱, 胆固醇含量较少; 与对照组比较, 高脂组和高

脂+甲硫氨酸组蓝色荧光显著增强 ($P < 0.01$), 胆固醇大量堆积; 与高脂+甲硫氨酸组比较, 辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组蓝色荧光显著减弱 ($P < 0.01$), 胆固醇含量显著降低。

3.14 山楂叶水提取物对 Hcy 和高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠肝脏组织中 SREBP1/2 蛋白表达的影响

SREBP1 是细胞内调控脂质代谢的关键转录因子, 主要调控脂肪合成中关键酶基因的表达。SREBP2 能够编码多种 TC 合成酶基因, 是调控 TC 生物合成的关键亚型。如图 10、11 所示, 与对照组比较, 高脂组和高脂+甲硫氨酸组小鼠肝脏中 SREBP1 和 SREBP2 表达明显升高 ($P < 0.01$); 与高脂+甲硫氨酸组比较, 辛伐他汀组和山楂叶低、高剂量组 SREBP1 和 SREBP2 表达均显著降低 ($P < 0.01$), 其中辛伐他汀组和山楂叶高剂量组作用更为明显。

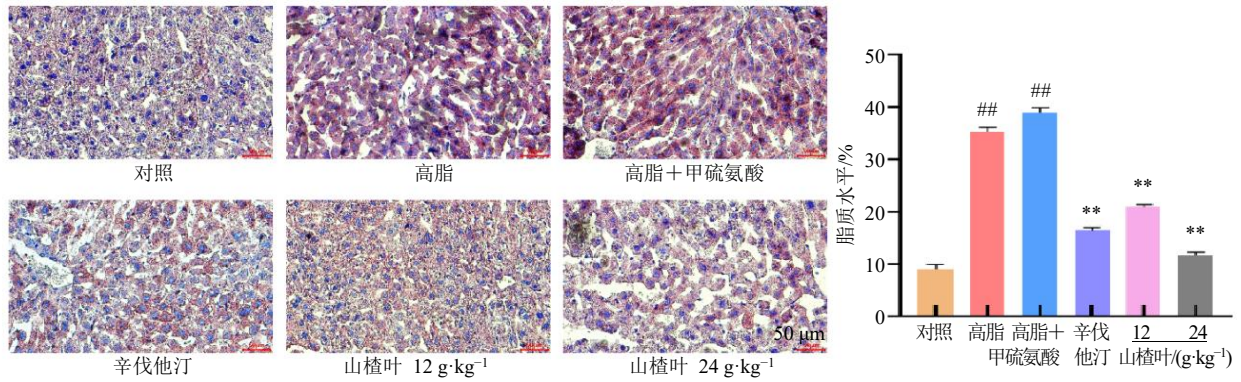


图 8 各组小鼠肝脏油红 O 染色及脂质水平 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 8 Oil red O staining of liver and lipid level of mice in each group (×400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

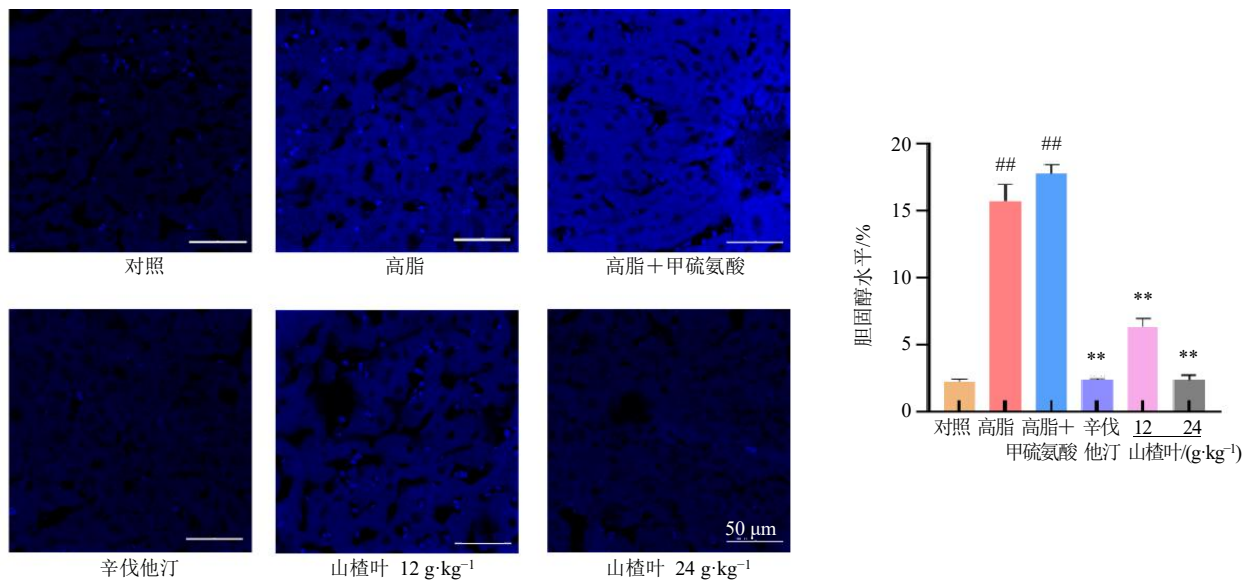


图 9 各组小鼠肝脏 Filipin 染色及胆固醇水平 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 9 Filipin staining of liver and cholesterol level of mice in each group (×400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

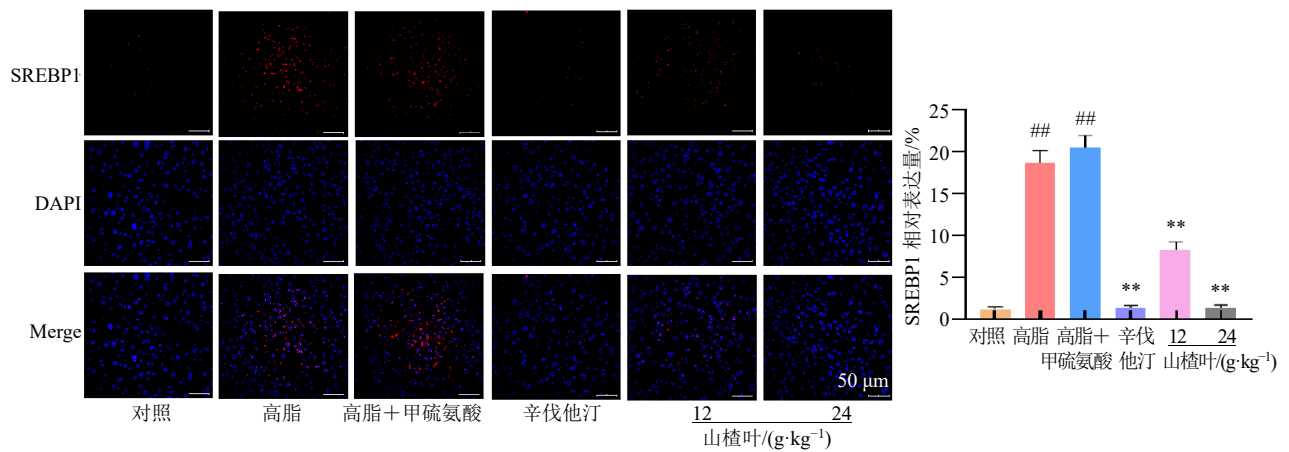


图 10 免疫荧光染色检测各组小鼠肝脏 SREBP1 表达 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 10 Expression of SREBP1 in liver of mice in each group detected by immunofluorescence staining (×400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

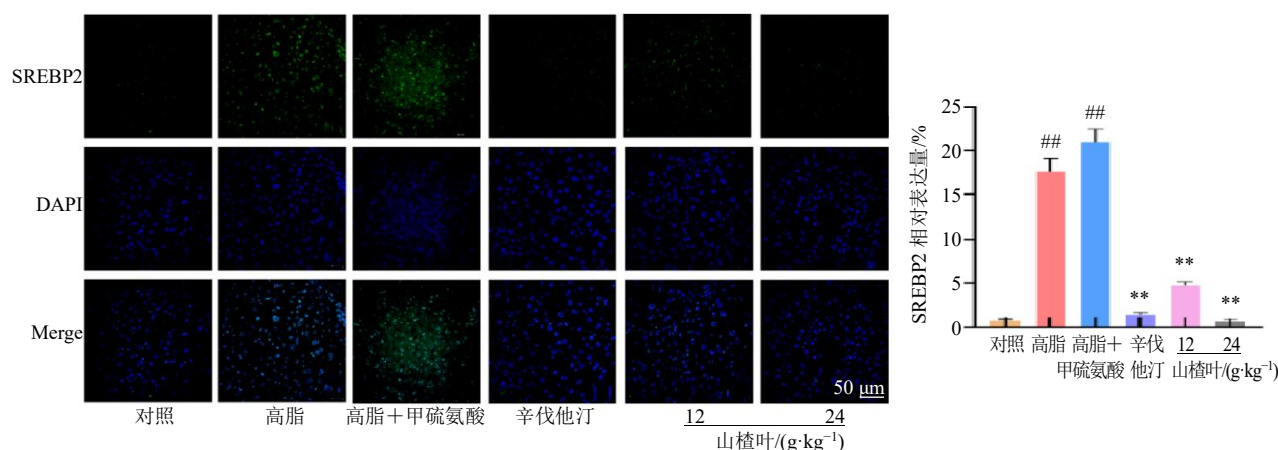


图 11 免疫荧光染色检测各组小鼠肝脏 SREBP2 表达 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 11 Expression of SREBP2 in liver of mice in each group detected by immunofluorescence staining (×400; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

AS 是心血管疾病的潜在病理基础, 现代医学研究表明, AS 的发病涉及多种致病因素, 包括脂代谢紊乱、氧化应激、内皮损伤和血管炎性反应等^[13-14], 但尚无单一学说能够全面解释 AS 的发生与发展。近年来, AS 的治疗取得了显著进展, 临床常用药物主要包括调血脂药、抗血小板药、血管扩张药以及溶栓和抗凝药。其中, 他汀类药物虽为治疗 AS 的特效药, 但其皮肤潮红、头痛、胃肠道反应及肝功能损害等不良反应在一定程度上限制了其广泛应用^[15]。因此, 开发安全性高、不良反应小的新型抗 AS 药物具有重要的临床意义。

ApoE 是重要的载脂蛋白, 在脂质正常代谢中发挥关键作用^[16]。ApoE 是极低密度脂蛋白胆固醇 (very low density lipoprotein cholesterol, VLDL-C) 和 HDL-C 的组成部分, 参与 TC 的运输。ApoE 基因敲除可导致小鼠血浆 TC 水平升高, 从而促进 AS 的发生发展^[17-18]。此外, 血浆中 Hcy 水平升高是 AS 的独立危险因素。Hcy 是甲硫氨酸的重要代谢产物, 参与 DNA 合成所需甲基基团的生成。高 Hcy 可通过氧化应激与炎症损伤机制诱导血管内皮细胞功能障碍^[19-20]。基于上述机制, 本研究采用甲硫氨酸联合高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠以制备 AS 模型。结果显示, 与对照组相比, 高脂联合甲硫氨酸组小鼠血清中 Hcy、TC、TG、LDL-C 水平显著升高, HDL-C 水平显著降低; 同时, 腹主动脉血管斑块面积及炎症损伤因子明显增加, 肝脏脂质堆积显著, 提示 AS 模型制备成功。

中医理论虽未直接记载 AS 病名, 但根据其临床表现, 可将其归属于“胸痹”“心痛”“中风”“痰

饮”等范畴^[21-22]。中医主张通过调节气血、津液以及脏腑功能进行综合治疗, 强调多途径、多环节、多靶点的整体干预, 通过调血脂、抗氧化、保护血管内皮功能、抗血小板黏附聚集、抗血栓形成以及抑制血管中膜平滑肌细胞增殖等途径, 全面干预 AS 的发生与发展, 具有独特的优势和疗效。山楂叶具有活血化瘀、化浊降脂、理气通脉的功效, 临床主治气滞血瘀所致的胸闷憋气、胸痹心痛、心悸健忘等症^[23]。本研究结果显示, 12、24 g/kg 的山楂叶水提物均能降低 AS 模型小鼠血清中 Hcy、TC、TG、LDL-C、IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平, 升高 HDL-C 水平, 且未见显著毒性作用, 为山楂叶治疗 AS 的临床用药剂量提供了实验依据。进一步机制研究显示, 山楂叶水提物可通过抑制 NF- κ B 信号通路中 p50 和 p65 的蛋白表达, 减少主动脉斑块形成, 减轻血管炎症损伤, 抑制血管壁纤维化和内膜增生; 同时, 山楂叶水提物还能抑制脂质合成关键转录因子 SREBP1 和 SREBP2 的蛋白表达, 从而降低小鼠肝脏脂质含量。

值得注意的是, NF- κ B 同 SREBP 之间也存在功能关联。在血管内皮细胞中, 促炎信号可激活 NF- κ B, 后者进入细胞核后促进 *STARD10* 基因表达, 最终增加其蛋白表达。*STARD10* 蛋白可调节细胞膜上“可利用胆固醇”的水平, 其表达升高会导致膜胆固醇含量下降。SREBP (尤其是负责胆固醇代谢的 SREBP2) 作为细胞内的固醇感受器, 当感知到细胞膜胆固醇水平降低时, 会启动经典激活程序: 从内质网转运至高尔基体并被切割, 释放出活性片段进入细胞核, 进而驱动胆固醇合成及摄取相关基因的表达。因此, NF- κ B 通路可能通过诱导

STARD10 表达, 间接改变细胞胆固醇分布, 进而触发 SREBP2 的激活^[24]。

综上, 山楂叶水提物可改善小鼠血管 AS, 其作用机制可能与抑制血管内皮炎症损伤及肝脏脂质合成密切相关。这一结果与山楂叶“化浊降脂、理气通脉”的中医功效相吻合: 其中“化浊降脂”可能指向抑制肝脏脂质合成, “理气通脉”可能指向通过抑制血管炎症损伤而保护血管通畅性。本研究尚存在一定的局限性: 山楂叶化学成分复杂, 且其抑制血管内皮炎症损伤与肝脏脂质合成的机制涉及多个信号通路, 难以从整体到细胞及分子水平进行全面系统的阐释。因此, 后续研究将结合网络药理学与分子对接技术, 探索山楂叶发挥上述作用的物质基础及分子机制, 并在分子网络调控的背景下加以验证; 同时, 将通过细胞实验对活性成分及作用机制进行验证, 为深入研究山楂叶在 AS 治疗中的应用奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘明波, 何新叶, 杨晓红, 等. 《中国心血管健康与疾病报告 2024》要点解读 [J]. 中国心血管杂志, 2025, 30(4): 384-399.
- [2] 梁玉琴, 陈平平, 卢芳, 等. 中药活性成分调控肠道菌群代谢物改善动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(6): 2197-2206.
- [3] Xu S W, Ilyas I, Little P J, *et al.* Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: From mechanism to pharmacotherapies [J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(3): 924-967.
- [4] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 524-533.
- [5] 杨佳琪, 张正皓, 马芳, 等. LncRNA EFRL 在同型半胱氨酸致动脉粥样硬化巨噬细胞胞葬中的作用及机制研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2025, 41(7): 577-584.
- [6] Rigelsky J M, Sweet B V. Hawthorn: Pharmacology and therapeutic uses [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2002, 59(5): 417-422.
- [7] Malekmohammad K, Bezsonov E E, Rafieian-Kopaei M. Role of lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis: Focus on molecular and cellular mechanisms [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 707529.
- [8] 海杰, 陈振东, 张宗博, 等. 山楂叶总黄酮干预非酒精性脂肪性肝病作用机制的研究进展 [J]. 中成药, 2025, 47(6): 1937-1942.
- [9] 宓伟, 于敏, 李宁, 等. 基于 AMPK/SREBP-1c 分子通路的山楂原花青素调控脂质代谢机制 [J]. 食品科学, 2023, 44(15): 129-136.
- [10] 鄂璐莎, 田志强, 王婷. 金丝桃苷通过 TLR4/NF- κ B 信号通路对动脉粥样硬化小鼠的干预作用 [J]. 广西医学, 2023, 45(3): 302-308.
- [11] Liu S W, Fang Y, Yu J C, *et al.* Hawthorn polyphenols reduce high glucose-induced inflammation and apoptosis in ARPE-19 cells by regulating miR-34a/SIRT1 to reduce acetylation [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(2): e13623.
- [12] 薛越强. 人突变 ApoE 转基因小鼠疾病模型及其基因表达特点的初步研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2002.
- [13] 王玲玲, 谢慧仪, 陈绮玲, 等. 动脉粥样硬化发病机制与治疗药物的研究进展 [J]. 广东医科大学学报, 2023, 41(5): 589-594.
- [14] 赵庭瑞, 王隐, 邹瑶, 等. 中性粒细胞在动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2025, 41(1): 241-245.
- [15] 杜艳梅, 田展松, 李红, 等. ApoE 基因多态性、Hcy 与 2 型糖尿病患者发生冠状动脉粥样硬化性心脏病的相关性研究 [J]. 空军军医大学学报, 2023, 44(8): 717-720.
- [16] 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.
- [17] 武成艳, 段旭磊, 王立波, 等. 内皮功能障碍在高同型半胱氨酸致动脉粥样硬化中作用及机制的研究进展 [J]. 生理学报, 2023, 75(5): 703-713.
- [18] 李超超, 黄会紫, 张璟怡, 等. PIAS3 缺失促进雌性 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化发展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(8): 665-672.
- [19] 石思, 杨梅, 赵琦, 等. 基于网络药理学探讨山楂叶治疗非酒精性脂肪性肝炎作用机制 [J]. 山西中医, 2023, 39(5): 61-64.
- [20] Cheng F X, Kovács I A, Barabási A L. Network-based prediction of drug combinations [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 1197.
- [21] Yao Y S, Li T D, Zeng Z H. Mechanisms underlying direct actions of hyperlipidemia on myocardium: An updated review [J]. *Lipids Health Dis*, 2020, 19(1): 23.
- [22] 谢彩霞, 裴宇鹏, 梁钰琦, 等. 中药治疗动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(18): 6852-6863.
- [23] Jalaja R, Leela S G, Mohan S, *et al.* Anti-hyperlipidemic potential of natural product based labdane-pyrroles via inhibition of cholesterol and triglycerides synthesis [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 108: 104664.
- [24] Fowler J W M, Zhang R, Tao B, *et al.* Inflammatory stress signaling via NF- κ B alters accessible cholesterol to upregulate SREBP2 transcriptional activity in endothelial cells [J]. *eLife*, 2022, 11: e79529.

[责任编辑 李亚楠]