

加味二陈汤对 ApoE^{-/-} 小鼠炎症标志物 IL-6 和 TNF- α 的调节作用

谢雪皎¹, 李亚梅, 徐 佳, 廖端芳*, 吴若霞, 尹栋梁, 陈聪伶

(湖南中医药大学仲景学说教研室, 湖南 长沙 410208)

摘要: **目的** 研究加味二陈汤对 ApoE^{-/-} 小鼠血清、主动脉壁及瓣膜的 IL-6、TNF- α 表达的影响。 **方法** 40 只 ApoE^{-/-} 小鼠中 10 只为空白对照组, 30 只以高脂饲养 4 周构建动脉粥样硬化 (As) 小鼠模型, 均分成模型组、辛伐他汀组、加味二陈汤组, 分别用生理盐水、辛伐他汀及加味二陈汤对小鼠灌胃给药, 8 周后处死小鼠, Elisa 法检测血清中 IL-6、TNF- α 的含量; 免疫组化法检测 IL-6、TNF- α 在主动脉壁及瓣膜的表达。 **结果** 辛伐他汀组血清 IL-6 和 TNF- α 分别为 392.06 ± 37.70 pg/mL、 189.1 ± 50.4 pg/mL, 与模型组相比表达下降 ($P < 0.05$); 加味二陈汤组血清 IL-6、TNF- α 分别为 442.41 ± 172.26 pg/mL、 47.2 ± 13.3 pg/mL, 与模型组相比表达下降 ($P < 0.05$), 与辛伐他汀组相比, 表达下降 ($P < 0.05$); 免疫组化结果显示加味二陈汤可降低 IL-6、TNF- α 在主动脉壁内的表达。 **结论** 加味二陈汤可降低血清和主动脉壁及瓣膜的 IL-6、TNF- α 的表达。

关键词: 加味二陈汤; 动脉粥样硬化; TNF- α ; IL-6

中图分类号: R541.4 **文献标识码:** A

The Effects of Modified “Erchen Decoction” on the Expression of Inflammatory Marker IL-6, TNF- α on ApoE^{-/-} Mice

XIE Xuejiao, LI Yamei, XU Jia, et al

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

Abstract: **Objective** This study was to investigate the effects of Modified Erchen Decoction on the expression of IL-6, TNF- α in the aortic wall and serum of ApoE^{-/-} mice, in order to confirm the effect on the regulation of inflammatory factors in atherosclerosis. **Methods** ApoE^{-/-} mice of the control group ($n = 10$) were fed with normal diet, the others ($n = 30$) were fed with a high-cholesterol diet in 4 weeks to induce atherosclerosis mode, and then were divided into the model group ($n = 10$), the Modified Erchen Decoction group ($n = 10$) and the simvastatin group ($n = 10$). The two treatment groups were given Modified Erchen Decoction and simvastatin by gavage respectively. The expression of IL-6 and TNF- α was measured by ELISA kit after treated with the drugs for 8 weeks continuously. **Results** IL-6 and TNF- α in serum were 392.06 ± 37.70 pg/mL and 189.1 ± 50.4 pg/mL in the simvastatin group and were 47.2 ± 13.3 pg/mL and 442.41 ± 172.26 pg/mL in the Modified Erchen Decoction group respectively. They were decreased by the two drugs, and significant difference was found between each treatment group and the control group. The expression of IL-6 and TNF- α were decreased by the two drugs, which were confirmed by the histopathology. **Conclusion** Modified Erchen Decoction can inhibit the expression of IL-6 and TNF- α effectively in the ApoE^{-/-} mice, which indicates that Chinese formula may reduce atherosclerosis progress.

Key words: Modified Erchen Decoction; atherosclerosis; TNF- α ; IL-6

收稿日期: 2015-08-25; 修回日期: 2015-10-30

基金项目: 全国第五批老中医药专家学术经验继承项目, 湖南省教育厅科研青年项目 (编号 11B092); 湖南省中医药科研计划项目 (编号 201236); 湖南省自然科学基金项目 (编号: 2015JJ6076); 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地资助

* 通讯作者, E-mail: dfliao66@aliyun.com.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是严重危害人类健康的常见疾病之一, 是冠心病、脑血管病和血栓栓塞性疾病等缺血性心脑血管病的主要病理基础^[1], 2010 年全球死于缺血性心脏病和中风的人数约为 1.29 亿人, 且每 4 个死者中就有 1 个死于心血

管疾病^[2]。而我国每年在心血管疾病方面所花费的医疗费用及劳动力损失总约 2000 亿元^[3]。他汀类药物的问世及心脏搭桥手术给冠心病患者带来了福音,但却有着不可避免的弊端,中医药在改善冠心病患者症状及提高生存率方面发挥着重要的作用。已有研究表明二陈汤可显著降低血中胆固醇、甘油三脂以及低密度脂蛋白的含量^[4],而本文研究亦表明加味二陈汤可显著降低小鼠血清中血清总胆固醇(TCHOL)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平($P < 0.01$),但加味二陈汤对冠状动脉粥样硬化性心脏病“前炎症细胞因子”IL-6 及 TNF- α 表达的影响尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 实验动物 7~8 周龄雄性 ApoE 基因敲除小鼠 44 只,品系为 C57BL/6J,体重 19~21 g,来自北京大学医学部实验动物中心由美国 Jackson 实验室引进、繁育[SCXK(京):2011-0012]^[5]。实验操作在湖南中医药大学 SPF 级动物中心进行【SYXK(湘):2013-0005】。实验过程中按照实验动物 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 受试药物 加味二陈汤由茯苓 15 g、陈皮 10 g、法半夏 10 g、甘草 6 g、荷叶 10 g、山楂 15 g、刺五加 10 g 由湖南中医药大学中药鉴定教研室主任刘塔斯教授鉴定,加水煎煮 30 min 后趁热过滤,浓缩至生药 0.5 g 生药/mL,制得煎液。高脂饲料由湖南中医药大学实验动物中心加工制作,配方为猪油 5%、胆固醇 1%、普通饲料 94%。小鼠用垫料由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。

1.1.3 主要试剂 Mouse IL-6 ELISA 试剂盒(RD 公司,产品编号 EIA05846),Mouse TNF- α ELISA 试剂盒(RD 公司,产品编号 EIA05897),O·C·T compound Tissue-Tek (SaKura Finetek USA, order number 4583),羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗(PV-6001,北京中杉金桥),兔源 TNF- α 抗体(ab9739,abcam 公司),兔源 IL-6 抗体(ab6672,abcam 公司),DAB 试剂盒(753223A,北京中杉金桥),其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器 LEICA DM LB2 型双目显微镜(德国 LEICA 公司),Motic B5 型显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司),ELISA 检测仪器(基因有限公司,型号 biotek-ELX800)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立及给药 44 只 ApoE^{-/-}小鼠先给与适应性喂养 1 周,后随机抽取小鼠 10 只,作为空白对照组($n = 10$),给与普通饲料喂养;30 只给与高脂饲料(含 5% 的猪油、1% 的胆固醇)喂养,自由饮水,进行造模;余下 4 只为造模检验小鼠,分别与两组予相同喂养(各 2 只)。喂养 4 周后,将造模检验小鼠(类空白对照组 2 只,类模型组 2 只),检测小鼠血脂水平、对小鼠心脏主动脉及主动脉瓣行油红 O 染色,综合分析用于检验 AS 模型是否已制备成功。再将造模组小鼠按小鼠体重采用随机分组方法将动物分为 3 组,模型组、加味二陈汤组、辛伐他汀组各 10 只。

模型组小鼠与空白对照组均给予生理盐水灌胃,灌胃量与后面用药组相同,灌胃体积均为每天 20 mL/kg。辛伐他汀组小鼠给予辛伐他汀每天 3 mg/kg^[5]灌胃,加味二陈汤组小鼠给予其浸膏按生药量每天 2.2 g/kg 灌胃,配制药液的溶剂均为生理盐水。

1.2.2 取材及实验室检测 各组动物连续灌胃 8 周,再与 12 h 不禁水禁食处理,首先经眼眶静脉丛取血,将血液静置 2 h 后,离心 5 min(4 000 rpm),取上清液即血清,在 -20 ℃ 冰箱中保存,用于 IL-6、TNF- α 的检测。用 4% 多聚甲醛从小鼠左心室灌流 30 min,剥离主动脉,将其在常温条件下保存在 4% 多聚甲醛中。心脏在 4% 多聚甲醛中常温保存 24 h,取出以 OCT compound 包埋,保存在 -20 ℃ 冰箱中,将用于冰冻切片。

1.2.3 小鼠血清 IL-6、TNF- α 含量的检测 检测血清中 IL-6、TNF- α 的含量,方法按 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.2.4 小鼠主动脉内 IL-6、TNF- α 表达 冰箱中取出主动脉切片,予以脱蜡,在室温下采用 3% H₂O₂ 孵育 10 min;先以蒸馏水冲洗,再用 PBS 洗 2 次(各 5 min);洗后浸入 PBS 缓冲液中,微波炉加热 10 min,使液体温度保持在 95℃ 左右,拿出在室温中冷却 15 min;予以 5% 正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,在室温中孵育 10 min;除去血清,直接加稀释后的一抗(IL-6 稀释比例为 1:40;TNF- α 稀释比例为 1:400),孵育 2 h(37℃);使用 PBS 洗 5 min × 3 次;滴加 PV-6001 二抗,孵育 30 min(37℃);再 PBS 洗 5 min × 3 次;采用 DAB 显色 2 min;拿出后用自来水充分冲洗,以苏木精复染,用水洗晾干,给予中性树

胶封片后采集图像,供后期分析。

1.2.5 免疫组化法检测 IL-6 在小鼠主动脉瓣的表达 取小鼠心脏主动脉瓣冰冻切片,放置在 60℃烘箱中烤 30 min,取出来,进行免疫组织化学实验。按试剂盒说明书操作,检测 IL-6 在小鼠主动脉瓣的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计分析软件进行统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计采用单因素方差分析多重比较中的 LSD 方法进行检验。

2 结 果

2.1 加味二陈汤对 ApoE^{-/-} 小鼠血清 IL-6、TNF-α 表达的影响 由表 1 可见,模型组血清 IL-6 和 TNF-α 的表达与空白对照组相比显著上升 ($P < 0.01$)。与模型组相比,辛伐他汀组血清 IL-6 和 TNF-α 表达明显下降 ($P < 0.01$);加味二陈汤组血清 IL-6、TNF-α 表达下降;其中 TNF-α 的表达下降显著 ($P < 0.01$)。

表 1 加味二陈汤对 ApoE^{-/-} 小鼠血清 IL-6、TNF-α 表达的影响

组别	n	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
空白对照组	10	54.6 ± 22.3 ^b	313.38 ± 121.15 ^b
模型组	10	503.1 ± 95.3 ^a	711.18 ± 97.17 ^a
辛伐他汀组	10	189.1 ± 50.4 ^{ab}	392.06 ± 37.70 ^b
加味二陈汤组	10	47.2 ± 13.3 ^{bc}	442.41 ± 172.26 ^{bd}

与空白对照组相比,a; $P < 0.05$;与模型组相比,b; $P < 0.05$;与辛伐他汀组相比,c; $P < 0.01$,d; $P < 0.05$

2.2 加味二陈汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉内 IL-6、TNF-α 表达的影响 主动脉免疫组化结果表明(见图 1、图 2),空白对照组小鼠主动脉大致无 IL-6、TNF-α 的阳性表达(黄褐色颗粒物);模型组小鼠主动脉内 IL-6、TNF-α 的阳性表达(黄褐色颗粒物)显著高于空白对照组,而辛伐他汀组、加味二陈汤组主动脉斑块内 IL-6、TNF-α 的阳性表达明显低于模型组。

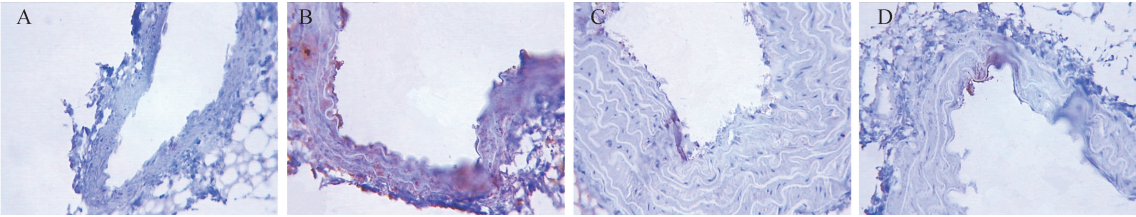


图 1 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 TNF-α 免疫组化结果(40 ×) A:空白对照组;B:模型组 ;C:辛伐他汀组; D:加味二陈汤组

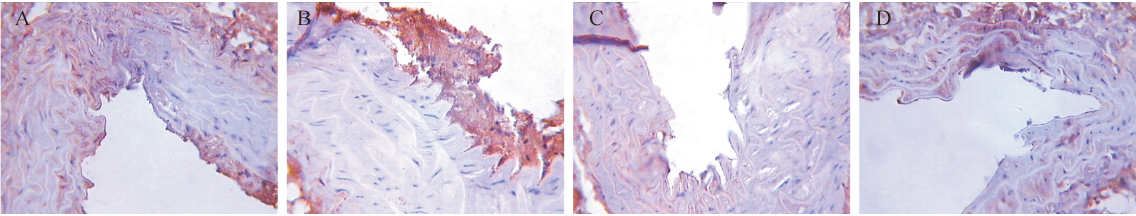


图 2 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 IL-6 免疫组化结果(40 ×) A:空白对照组;B:模型组 ;C:辛伐他汀组; D:加味二陈汤组

2.3 加味二陈汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉瓣 IL-6 表达的影响 免疫组化检测研究显示,模型组与空白对照组相比,其主动脉瓣斑块上棕黄颗粒明显增多。辛伐他汀组和加味二陈汤组较模型组相比,其小鼠主动脉瓣棕黄色颗粒均显著减少。图中棕黄色颗粒是 IL-6 的阳性表达。见图 3。

3 讨 论

迄今为止,As 的发病机制存在多种学说,尚未完全清楚,涉及多种危险因素,大量的临床和基础研究表明,其危险因素包括高血压、高脂血症、高血糖、高半胱氨酸血症、高纤维蛋白原血症、高尿酸血症、肾素—血管紧张素—醛固酮系统(RAAS)活化、肥

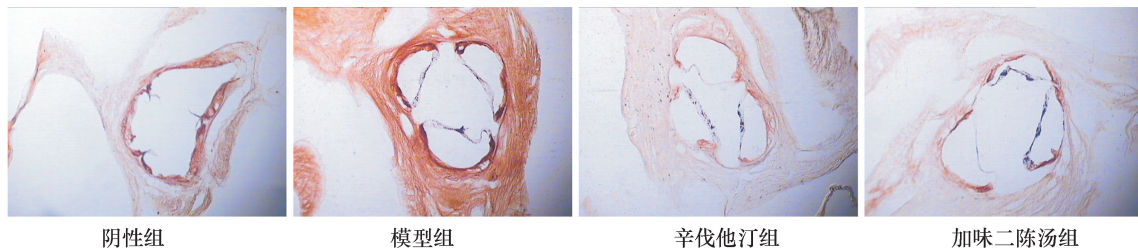


图3 各组小鼠主动脉瓣 IL-6 免疫组化染色病理切片 (40 ×)

胖、吸烟、慢性应激等,而 As 发病机制的学说也众多,公认的有脂质浸润学说(脂源性学说)、损伤反应学说、滞留反应学说(滞留一应答学说)、炎症学说、血小板功能亢进学说、血管平滑肌细胞克隆学说、氧化应激学说、血栓形成学说、免疫功能异常学说、Ca 超负荷学说等^[7-8]。在这众多学说中,炎症机制学说是相对新的一种学说。众多的研究提示炎症反应与 As 的发生发展具有直接关系,可见动脉粥样硬化是一种慢性持续性炎症反应性疾病的观点由美国华盛顿大学医学院 ROSS 教授提出后获得广泛认同^[9-14]。

研究表明^[15],上述 As 的多种危险因素如吸烟、高血脂等均可促氧化应激反应,从而导致血管内皮细胞(Endothelial cell, EC)损伤,内皮受损,激活的巨噬细胞分泌 IL-6,通过细胞信号转导 IL-6 可促使炎症介质、细胞因子的基因转录增加,使中膜平滑肌细胞增殖并发生表型转化。在此同时释放更多炎症介质,使更多单核细胞聚集、浸润,从而导致动脉粥样斑块形成。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是一种多功能的炎性细胞因子,主要由激活的单核细胞、淋巴细胞分泌,参与炎症反应,促进 As 的发展^[16]。TNF- α 还通过直接的细胞毒性作用,致使中性粒细胞脱颗粒、氧化代谢,破坏内皮细胞结构和功能的完整性^[17];并且可促进 IL-6 的分泌,参与血管平滑肌细胞增殖、分化和调控,从而促使血管壁增厚,官腔狭窄;此外还刺激内皮细胞激活血小板激活因子,导致损伤部位的血栓形成,加速动脉粥样硬化进程。队列研究证实^[18]血清中的 IL-6、TNF- α 及 CRP 含量指标高的人群发生冠心病等老年性疾病的概率明显增加,其中 IL-6、TNF- α 预测急性事件的价值要高于 CRP。因此,IL-6 和 TNF- α 作为炎症标志物,检测血清 IL-6、TNF- α 表达水平成为预测心脑血管事件的重要指标,若能降低其活性和表达水平将有利于控制 As 进程。

二陈汤是中医药常用的基础方,出自宋代《太平惠民和剂局方》,因方中半夏、橘红以陈久者良而命名为“二陈”,为祛痰的通用方剂。加味二陈汤乃二陈汤去乌梅、生姜,加荷叶、山楂、刺五加组成,方中以法夏为君,取其辛温性燥,善能燥湿化痰,且又降逆和胃。以陈皮为臣,理气燥湿祛痰,燥湿以助半夏化痰之力,理气可使气顺则痰消。痰由湿生,湿自脾来,故佐以茯苓健脾渗湿,俾湿去脾旺,痰无由生;去掉降逆之生姜、酸收之乌梅,加自古奉为瘦身的良药荷叶利尿通便、凉血消脂,山楂消食健胃、行气散瘀,刺五加补肝肾肾;活血通脉,使痰湿解而不伤脾阳;以甘草为使药,调和药性而兼润肺和中。诸药合用,标本兼顾,燥湿化痰,行气消脂,活血通脉。笔者临床将其辨证论治用之于单纯性肥胖、高脂血症、冠状动脉粥样硬化性心脏病等疾病证属痰湿郁结者,屡收奇效^[19]。

本课题组前期研究显示^[20],加味二陈汤与模型组相比,其血清 TCHOL、LDL-C 均明显降低($P < 0.05$);对小鼠主动脉行油红 O 大体染色,可见加味二陈汤组小鼠主动脉弓和主动脉干管腔内脂质沉积斑块均明显少于模型组,减少 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏脂质沉积,说明加味二陈汤具有明显的降脂消斑功效。也有研究表明冠心病血瘀证和痰热证患者其白细胞计数、C-反应蛋白含量、TNF- α 和 IL-6 含量均升高,表明中医学之“痰”、“瘀”与炎症因子密切相关^[21],并得到诸多验证^[22-24]。而本实验表明,模型组血清 IL-6、TNF- α 水平明显高于空白对照组($P < 0.01$),这结果也证实了血清 IL-6 和 TNF- α 升高成为冠心病重要病理因素之一。而加味二陈汤可明显下调血清中 IL-6、TNF- α 的表达($P < 0.05$);降低 IL-6、TNF- α 在主动脉内的表达,这为加味二陈汤辨证论治冠状动脉粥样硬化性心脏病和进一步深入研究提供了依据和基础。

参考文献:

[1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary

- artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352 (16): 1685-1695.
- [2] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet*, 2012, 380 (9859): 2095-2128.
- [3] Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, et al. International Prevalence, recognition, and Treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis [J]. *JAMA*, 2006, 295(2): 180-189.
- [4] 孟庆坤, 王培华等. 二陈汤治疗高脂血症 50 例临床观察[J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(6): 75-76.
- [5] 李亚梅, 吴萍, 谢雪姣等. 铁皮石斛对 ApoE^{-/-} 小鼠血脂及 TNF- α , IL-6 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志* 2013, 19(18): 270-274.
- [6] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2015, 36(2): 141-152.
- [7] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362 (6423): 801-809.
- [8] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis an update [J]. *N Engl J Med*, 1986, 314(8): 488-500.
- [9] 赵依帆, 潘思京. 动脉粥样硬化的炎症信号通路研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2014, 16(12): 1332-1334.
- [10] 毛美娇, 胡俊萍, 王从, 等. 冠心病对 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化小鼠 PPAR γ -LXR α -ABCA1 信号通路的影响[J]. *中西医结合学报*, 2012, 10(7): 814-820.
- [11] Wang XX1, Yang JX2, Pan YY1, Zhang YF3. Protective effects of tanshinone II A on endothelial progenitor cells injured by tumor necrosis factor α [J]. *Mol Med Rep*, 2015 Sep; 12(3): 4055-62.
- [12] Hüseyin Oren, MD, Role of Novel Biomarkers of Inflammation in Patients With Stable Coronary Heart Disease [J]. *Angiology*, 2007, 58(2): 148-155.
- [13] 樊继山, 刘丹宁, 何翠瑶, 等. 炎症诱导的新型大鼠动脉粥样硬化模型的建立及 Rb1 的防治作用[J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6): 60-65.
- [14] Charakida M, O Neil F, Stefano Masi S, et al. Inflammatory disorders and atherosclerosis: new therapeutic approaches [J]. *Curr Pharmaceuti Design*, 2012, 17(37): 4111-4120.
- [15] Harrison D, Kathy K, Griending, et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis [J]. *Am J cardiol*, 2003 (91): 7-11.
- [16] 张敏, 宁亚媛, 陈丽娟, 等. 阿托伐他汀对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型中血清一氧化氮、肿瘤坏死因子- α 表达的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(5): 715-717.
- [17] Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, et al. Hydroxyl radical generation, levels of tumor necrosis factor- α , and progression to heart failure after acute myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(11): 2000-2008.
- [18] Michaud M, Balardy L, Moulis G, et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases [J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2013, 14(12): 877-82.
- [19] 谢雪姣, 徐佳, 彭晓芳, 等. 二陈汤临床研究探究[J]. *医学信息*, 2014, 27(11): 487-488.
- [20] 谢雪姣, 徐佳, 李亚梅, 等. 加味二陈汤对 ApoE^{-/-} 小鼠脂质代谢及肝细胞形态的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(4): 44-47.
- [21] 洪永敦, 黄衍寿, 吴辉, 等. 冠心病中医证候与炎症因子关系的临床研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2005, 22(2): 81-86.
- [22] 郑爱东, 万镇, 范修才, 等. 炎症因子与冠状动脉支架植入术后再狭窄的相关性研究[J]. *医学理论与实践*, 2014, 22(2): 2947-2948.
- [23] 肖宪杰, 纪焕春. 冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血清 MMP-2、-9 及 IL-6 水平及意义[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(11): 6314-6315.
- [24] 冯丹, 鲁启洪. 银杏达莫注射液对冠心病心绞痛患者 TNF- α 和 hs-CRP 的影响[J]. *中国中医急症*, 2014, 23(11): 2081-2082.

(此文编辑: 蒋湘莲)