

# 补阳还五汤加减通过 Nrf2/ARE 信号通路 防治动脉粥样硬化的机制研究

范增光,袁 野,欧阳效强,赵永法\*

江西中医药大学附属医院,南昌 330006

**摘要:**基于益心祛瘀化痰法,探讨补阳还五汤加减调控核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 信号通路防治动脉粥样硬化的机制。本研究选取 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠进行模型复制,模型复制成功后分为模型组、补阳还五汤加减低、中、高剂量组、阿托伐他汀组、C57BL/6J 背景的 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠空白组。第 9 周开始灌胃,连续灌胃 4 周。HE 及油红 O 染色观察小鼠主动脉粥样病理学变化;免疫组化法检测高级氧化蛋白产物 (advanced oxidative protein product, AOPP)、细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 表达水平;生化分析仪测定血脂表达水平;ELISA 法检测丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 表达水平;Western blot 法检测沉默信息调节因子 1 (sirtuin1, SIRT1)、Nrf2、血红素氧化酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 及醌氧化还原酶 1 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase, NQO-1) 蛋白表达;RT-PCR 法检测 HO-1、NQO1 基因的 mRNA 表达。结果显示,与模型组比较,补阳还五汤加减能够改善 AS 模型小鼠主动脉粥样病理学改变 ( $P < 0.01$ );降低主动脉斑块中 AOPP、ROS 表达水平 ( $P < 0.01$ );升高小鼠血浆中高密度脂蛋白胆固醇表达水平 ( $P < 0.01$ ),降低总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇表达水平 ( $P < 0.01$ );升高 SOD、GSH-Px 表达水平 ( $P < 0.01$ ),降低 MDA 表达水平 ( $P < 0.01$ );上调小鼠主动脉中 SIRT1、Nrf2、HO-1 及 NQO1 蛋白表达水平 ( $P < 0.01$ );并可以上调小鼠主动脉中 HO-1、NQO1 基因的 mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )。提示补阳还五汤加减通过调控氧化应激损伤发挥抗 AS 的作用,可能与 Nrf2/ARE 信号通路活化有关。

**关键词:**动脉粥样硬化;益心祛瘀化痰法;补阳还五汤;Nrf2/ARE 信号通路;氧化应激损伤

中图分类号:R285.5;R96

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)4-0644-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.4.011

## Study on the mechanism of modified Buyang Huanwu Decoction in preventing and treating atherosclerosis through Nrf2/ARE pathway

FAN Zeng-guang, YUAN Ye, OUYANG Xiao-qiang, ZHAO Yong-fa\*

Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

**Abstract:** Based on the therapy of benefiting the heart and removing blood stasis and phlegm, this paper discusses the mechanism of modified Buyang Huanwu Decoction (BHD) in preventing atherosclerosis by regulating nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway. This study selected ApoE<sup>-/-</sup> mice for model replication. After successful model replication, 50 ApoE<sup>-/-</sup> mice were randomly divided into model group, modified BHD (low, medium and high doses) group, and atorvastatin group, with ten mice in each group; Ten wild-type ApoE<sup>-/-</sup> mice with C57BL/6J background as a control group. Starting from the 9th week, gavage was administered continuously for four weeks. HE and Oil Red O staining methods were used to observe the pathological and morphological changes of mouse aortic sinuses. Immunohistochemical method was used to detect the expression levels of advanced oxidative protein product (AOPP) and reactive oxygen species (ROS). Biochemical analyzer determination was used to detect the expression levels of blood fat in mouse serum. ELISA method was used to detect the expression levels of oxidative stress related factors such as malondialdehyde (MDA), superoxide

收稿日期:2023-09-04 接受日期:2024-01-04

基金项目:江西省中医药管理局科技计划(2022A089);江西省自然科学基金(20224BAB216097);江西省卫生健康委科技计划(202210760)

\*通信作者 Tel:86-013767105195;E-mail:18845125679@163.com

dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in mouse serum. Western blot method was used to detect the expressions of sirtuin1 (SIRT1), Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) proteins in mouse aorta. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of HO-1 and NQO1 genes. These results showed that modified BHD could improve the pathological changes of aortic sinus in AS model mice ( $P < 0.01$ ), reduce the lipid content in the aortic sinus of AS model mice ( $P < 0.05$ ), reduce the expression levels of AOPP and ROS proteins in aortic plaques ( $P < 0.01$ ), increase the expression level of low-density lipoprotein cholesterol in mouse serum ( $P < 0.01$ ), and reduce the expression levels of total cholesterol, triglyceride and low-density lipoprotein cholesterol ( $P < 0.01$ ), increase the expression levels of SOD and GSH-Px ( $P < 0.01$ ), and reduce the expression level of MDA ( $P < 0.01$ ), upregulate the expression levels of SIRT1, Nrf2, HO-1 and NQO1 proteins in mouse aorta ( $P < 0.01$ ), and it could also upregulate the mRNA expression levels of HO-1 and NQO1 genes in the mouse aorta ( $P < 0.01$ ). These findings indicated that modified BHD exerts an anti AS effect by regulating oxidative stress damage, and some mechanisms may be related to the activation of Nrf2/ARE signaling pathway.

**Key words:** atherosclerosis; therapy of benefiting the heart and removing blood stasis and phlegm; Buyang Huanwu Decoction; Nrf2/ARE signaling pathway; oxidative stress damage

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种慢性炎症性疾病<sup>[1,2]</sup>。AS 患者早期起病隐匿,并无明显临床表现,但随着疾病不断发展后期可出现心、脑等靶器官受累<sup>[3]</sup>。根据世界卫生组织 (WHO) 调查显示:中老年人仍然是心血管不良事件发生的主要群体,大约有 81% 的心血管病患者死亡年龄在 65 岁以上,但是,近年来 AS 发病人群也趋向年轻化<sup>[4]</sup>。在我国,现有近 3 亿人患有心脑血管疾病<sup>[5]</sup>。现代医学治疗 AS 虽有一定疗效,但仍然无法降低 AS 的高发病率,且长期应用不良反应较多<sup>[6]</sup>。因此,降低 AS 患病率为当务之急和研究主流方向。氧化应激是导致 AS 发生发展的重要因素之一,高级氧化蛋白产物 (advanced oxidative protein product, AOPP) 可作为 AS 早期标志物和独立强预测因子,而细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可以促使白蛋白氧化成 AOPP,进而导致氧化应激的爆发;二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 是氧化应激反应重要的标志物,基本可以反映机体的氧化应激状态,且三者常常相互影响,导致血管内皮、组织细胞发生过氧化损伤,导致 AS 的发生<sup>[7,8]</sup>。研究发现,核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 信号通路是调控氧化应激的关键核转录因子,能够启动多种抗氧化蛋白,参与细胞衰老、凋亡和细胞增殖等多种生物学过程<sup>[9,10]</sup>。

中医学普遍认为,AS 的主要病机在于正气亏虚,为发病之本;而痰、瘀等实邪为重要的致病因素,

为发病之标。故针对 AS 的病机,本研究采用“益心祛瘀化痰法”为基本大法,选用补阳还五汤加减防治 AS。补阳还五汤是出自清代王清任《医林改错》中的经典活血益气方剂,联合瓜蒌薤白半夏汤,恰和 AS 发病病机,且二者在临床治疗 AS 相关疾病疗效显著,且无明显不良反应,故本研究选择根据补阳还五汤加减。前期预实验结果显示补阳还五汤加减对于防治 AS 具有一定的作用,通过调控免疫炎症反应、内质网应激及影响 HMGB1、Wnt1 等信号通路,缩小斑块面积,减轻 AS 病变,但是具体作用机制尚未阐释清楚。故本研究以氧化应激作为切入点,探讨补阳还五汤加减对 AS 斑块形成的影响,阐明补阳还五汤加减通过 Nrf2/ARE 信号通路调控 AS 的具体机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 50 只和雄性 C57BL/6J 背景的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 10 只。选取 6~8 周龄,体重约在 18~20g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2021-0006。将其饲养于江西中医药大学动物实验室,控制温度在 20~25℃,湿度维持在 (55±15)% 左右。本次动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准后执行,动物伦理批准号:20220521003。

### 1.2 实验药物

药物组成:黄芪 120 g,当归尾 6g,赤芍 4.5 g,地龙 3 g,川芎 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g,瓜蒌 12 g,薤白 9 g,半夏 12 g,党参 9 g,麦冬 9 g,五味子 6 g,以上中药饮片购于江西中医药大学附属医院中药房,所有

饮片以 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min 后煎煮 1 h, 倒出初煎液, 残渣再加入 8 倍量蒸馏水煎煮 1 h, 最后合并两次药液, 用旋转蒸发仪浓缩成 1 g/mL 的浓缩液, 冷却后放置于 4 °C 冰箱中保存备用。阿托伐他汀钙片购于江西中医药大学附属医院中心药房(立普妥, 辉瑞制药有限公司, 国药准字: H20051408, 规格 20 mg/片)。

### 1.3 实验试剂

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: 230126, 碧云天生物技术有限公司); Nrf2 抗体(批号: 230202)、HO-1 抗体(批号: 230224)、NQO1 抗体(批号: 230301)(武汉三鹰生物技术有限公司); 小鼠 MDA 酶联免疫检测试剂盒(批号: 230322)、SOD 酶联免疫检测试剂盒(批号: 230421)、GSH-Px 酶联免疫检测试剂盒(批号: 230412)(武汉默沙克生物技术有限公司)。

### 1.4 动物分组、模型制备及给药

采用高脂饮食喂养复制 AS 模型: 高脂饲料(含 15% 可可脂、2.5% 胆固醇)喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠, 8 周建立 AS 模型; C57BL/6J 小鼠整个实验过程中只给予普通饲料喂养。第 9 周开始对各组小鼠进行灌胃 4 周, 期间各组小鼠继续按相应饲料饲养。干预方法为: (1) 空白组(control, Con): 灌服相同体积蒸馏水, 1 次/日; (2) 模型组(model, Mod): 灌服相同体积蒸馏水, 1 次/日; (3) 补阳还五汤加减低剂量组(modified Buyang Huanwu Decoction-low doses, BHD-L): 5 g/(kg·d) 药液灌胃; (4) 补阳还五汤加减中剂量组(modified Buyang Huanwu Decoction-medium doses, BHD-M): 10 g/(kg·d) 药液灌胃, 1 次/日; (5) 补阳还五汤加减高剂量组(modified Buyang Huanwu Decoction-high doses, BHD-H): 20 g/(kg·d) 药液灌胃, 1 次/日; (6) 阿托伐他汀组(atrovastatin, Ato): 2.6 mg/(kg·d) 药液灌胃, 1 次/日。

### 1.5 标本取材与指标检测

第 12 周末, 各组小鼠均开始禁食, 时间为 12 h, 期间不禁水。1% 戊巴比妥溶液腹腔注射, 小鼠充分麻醉后, 采用无菌止血钳摘取眼球取血, 将采集盛有小鼠血液的 EP 管放置于离心机中离心(3 000 r/min, 10 min), 上层即为血浆, -80 °C 冰箱中保存备用; 找到小鼠的主动脉, 充分剥离干净血管周围的组织后, 一部分主动脉用 4% 多聚甲醛溶液固定; 另一

部分主动脉快速放于液氮罐中, 放置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

### 1.6 HE 染色观察主动脉粥样病理形态

取 4% 多聚甲醛固定后的主动脉根部制备石蜡切片, 用苏木素溶液中进行染色、1% 盐酸乙醇溶液中进行分化, 再用 0.5% 伊红进行染色, 依次放入不同浓度的乙醇溶液脱水, 再放入二甲苯中透明, 最后用中性树胶封片, 观察并拍照。

### 1.7 油红 O 染色观察主动脉粥样脂质含量

取固定好的主动脉根部, 使用 PBS 缓冲液冲洗组织, 在体式显微镜下将主动脉根部血管内壁切开并固定, 再放入异丙醇(60%) 浸泡后, 置于油红 O 工作溶液中, 避光染色 30 min(室温下), 弃去染液, 再用异丙醇(60%) 漂洗主动脉, 直至斑块呈现红色, 背景近乎透明。将主动脉固定于黑色蜡皿上, 采用立式显微镜观察染色情况并拍照。

### 1.8 免疫组化法检测 AOPP、ROS 阳性表达

取主动脉根部制备石蜡切片, 按照免疫组化试剂盒说明书进行操作, 再按照 DAB 显色试剂盒说明书逐步进行操作, 检测小鼠主动脉根部中 AOPP、ROS 的表达, 观察并拍照。

### 1.9 小鼠血脂水平检测

按全自动生化分析仪检测小鼠血浆中总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(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) 含量。

### 1.10 ELISA 检测 MDA、SOD、GSH-Px 水平

设置标准品孔和样本孔, 其中标准品孔内加 50 μL 不同浓度的标准品, 在待测样品孔中事先加入 40 μL 样品稀释液, 然后加 10 μL 待测样品, 将板用密封膜密封, 放置于 37 °C 恒温箱中孵育 30 min, 用蒸馏水稀释 30 倍后备用。弃液后甩干, 随后每孔加满洗涤液静置 30 s, 弃液拍干, 重复 5 次, 除空白孔外, 其余各孔加入 50 μL 酶标试剂。每孔各加入 50 μL A、B 显色液, 轻轻混匀, 37 °C 恒温箱避光孵育 15 min, 每孔加 50 μL 终止液, 450 nm 波长处, 测量各孔的吸光度值, 得出结果。

### 1.11 Western blot 法检测 Nrf2/ARE 通路相关蛋白表达水平

取出冻存于冰箱中的小鼠主动脉组织, 采用常

规的方法提取 Nrf2、ARE、HO-1、NQO1,根据 BCA 试剂盒测定其蛋白浓度,取 40 μg 蛋白,进行 SDS/PAGE 凝胶电泳,结束后,再经转膜、封闭后,4 °C 过夜,回收一抗,再经二抗孵育,ECL 显色液显影、定影。用 Image J 软件分析处理结果,以 β-actin 内参作为其相对表达量。

### 1.12 RT-PCR 法检测 HO-1、NQO1 基因 mRNA 表达水平

按总 RNA 试剂盒说明提取各组组织中总 RNA。计算 RNA 浓度和纯度,按照试剂盒进行反转录,用引物扩增并检测。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<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 mRNA 的相对表达量。计算结果用基因 β-actin 表达量作为内参进行对照,由此得出目的基因相对表达量。引物序列设计见表 1。

### 1.13 统计学分析

应用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者行 LSD 法,方差不齐者行 Dunnett's T3 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 Product length(bp)
HO-1	F: CACTCTGGAGATGACACCTGAG R: GTGTTCTCTGTGCAGCATCACC	115
NQO1	F: GCCGAACACAAGAAGCTGGAAG R: GCGAAATCCTGCTACGAGCACT	120

## 2 结果

### 2.1 对小鼠主动脉窦病理形态学的影响

空白组小鼠主动脉窦部未见脂质斑块形成;模型组小鼠主动脉窦部出现大量的脂质沉积,呈典型 AS 改变;补阳还五汤加减(低、中、高剂量组)及阿托伐他汀组小鼠主动脉窦部斑块不同程度减少( $P < 0.01$ )(见图 1)。

### 2.2 对小鼠主动脉窦脂质含量的影响

主动脉窦部行油红 O 染色观察脂质沉积情况。空白组小鼠主动脉窦未见脂质斑块的形成;与空白组比较,模型组小鼠主动脉窦有大量的脂质斑块形成;与模型组比较,补阳还五汤加减(低、中、高剂量组)及阿托伐他汀组小鼠主动脉窦脂质斑块均有不同程度的减小( $P < 0.05, P < 0.01$ )(见图 2)。

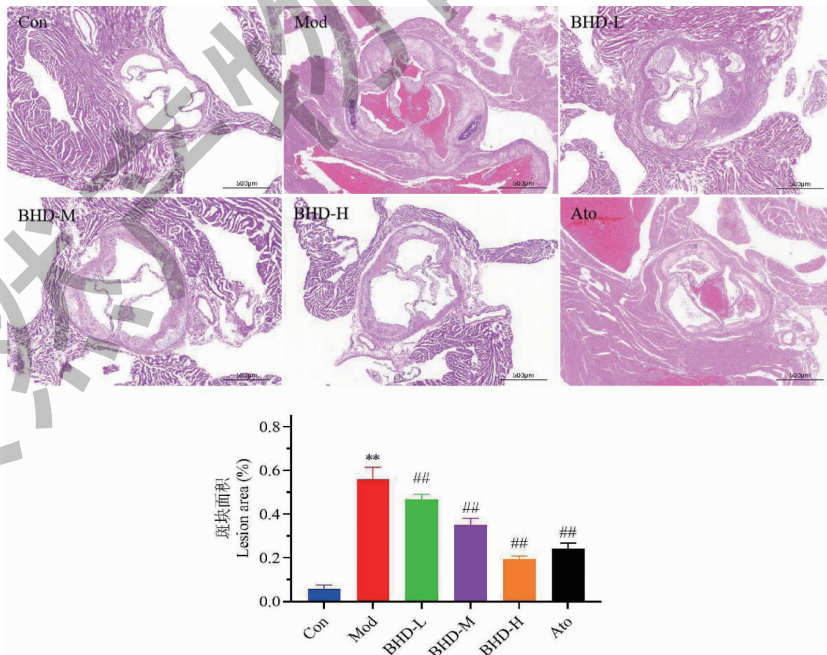


图 1 各组小鼠主动脉窦 HE 染色结果 (×20)

Fig. 1 HE staining results of aortic sinuses in each group of mice (×20)

注:与空白组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , 下同。Note: Compared with Con, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with Mod, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , the same below.

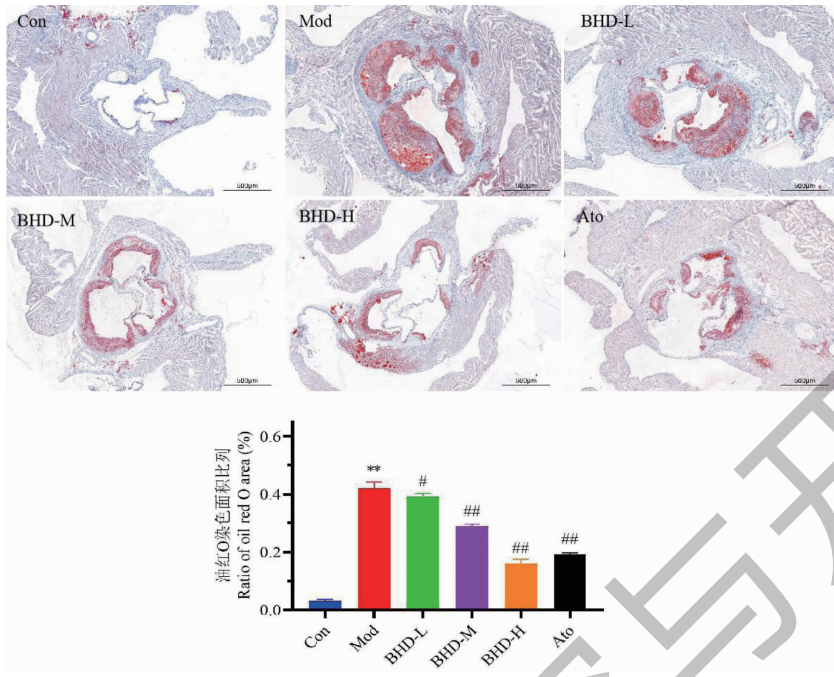


图2 各组小鼠主动脉窦油红O染色结果( $\times 20$ )

Fig. 2 Oil Red O staining results of aortic sinuses in each group of mice ( $\times 20$ )

### 2.3 对小鼠主动脉窦部 AOPP、ROS 表达的影响

通过免疫组化观察 AOPP、ROS 在主动脉窦部的表达水平。与空白组比较,模型组小鼠主动脉窦部 AOPP、ROS 阳性表达明显增高;与模型组比较,

补阳还五汤加减(低、中、高剂量组)及阿托伐他汀组小鼠主动脉窦内 AOPP、ROS 阳性表达均有不同程度的降低( $P < 0.01$ )(见图 3、图 4)。

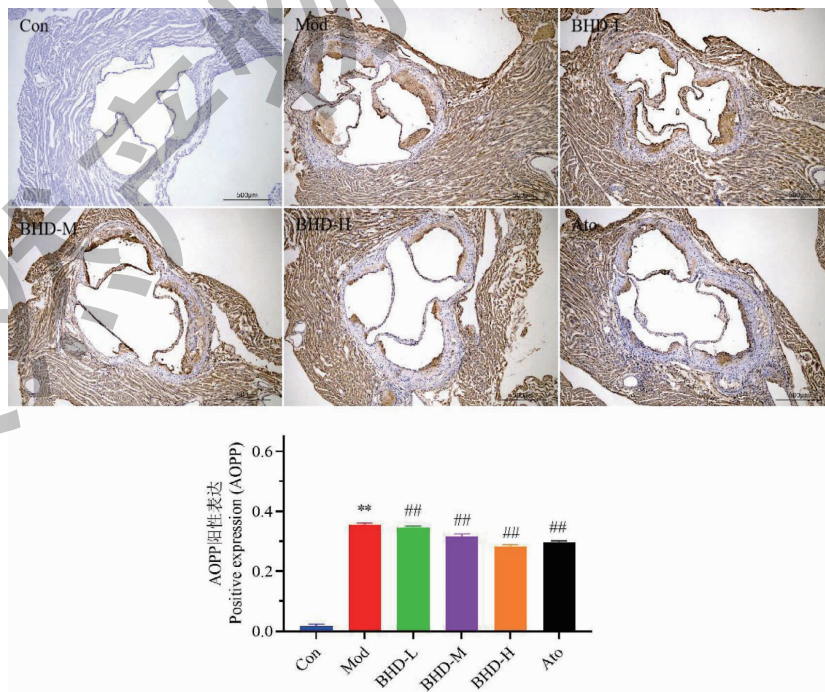


图3 各组小鼠主动脉窦 AOPP 表达( $\times 20$ )

Fig. 3 Expression of AOPP in the aortic sinus of mice in each group ( $\times 20$ )

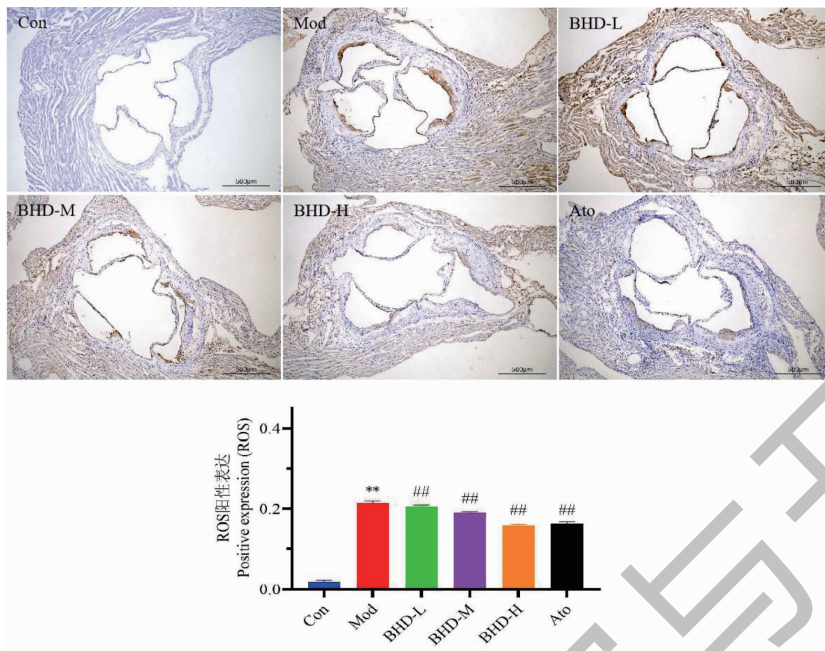


图4 各组小鼠主动脉窦 ROS 表达(×20)

Fig. 4 Expression of ROS in the aortic sinus of mice in each group (×20)

### 2.4 对小鼠血脂的影响

如表 2 所示,与空白组比较,模型组小鼠血浆 TC、TG、LDL-C 升高, HDL-C 降低 ( $P < 0.01$ ); 与模

型组比较,补阳还五汤加减(低、中、高剂量组)及阿托伐他汀组小鼠血浆 TC、TG、LDL-C 降低, HDL-C 升高 ( $P < 0.01$ )。

表 2 各组小鼠血浆 TC、TG、LDL-C 水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Comparison of TC, TG and LDL-C levels among different groups of mice plasma ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
Con	1.61 ± 0.13	0.74 ± 0.07	1.54 ± 0.10	1.03 ± 0.09
Mod	2.47 ± 0.13**	1.18 ± 0.08**	2.46 ± 0.13**	0.52 ± 0.09**
BHD-L	2.33 ± 0.12###	1.06 ± 0.08###	2.16 ± 0.15###	0.72 ± 0.05###
BHD-M	2.07 ± 0.09###	0.98 ± 0.10###	1.97 ± 0.09###	0.80 ± 0.07###
BHD-H	1.87 ± 0.07###	0.88 ± 0.06###	1.87 ± 0.08###	0.88 ± 0.07###
Ato	1.74 ± 0.09###	0.83 ± 0.08###	1.72 ± 0.05###	0.92 ± 0.05###

注:与空白组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, ###  $P < 0.01$ 。下同。

Note: Compared with Con, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with Mod, ###  $P < 0.01$ . The same below.

### 2.5 对小鼠氧化应激水平的影响

如表 3 所示,与空白组比较,模型组小鼠血浆中 SOD、GSH-Px 表达降低, MDA 表达升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,补阳还五汤加减(低、中、高剂量组)及阿托伐他汀组小鼠血浆中 SOD、GSH-Px 表达升高, MDA 表达降低 ( $P < 0.01$ )。

### 2.6 对小鼠主动脉 Nrf2/ARE 信号通路相关蛋白表达的影响

如表 4 所示,与空白组比较,模型组小鼠主动脉

SIRT1、Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型比较,补阳还五汤加减(低、中、高剂量组)及阿托伐他汀组小鼠主动脉 SIRT1、Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.01$ ) (见图 5)。

### 2.7 对小鼠主动脉 HO-1、NQO1 mRNA 表达的影响

如表 5 所示,与空白组比较,模型组小鼠主动脉 HO-1、NQO1 mRNA 表达降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型比较,补阳还五汤加减(低、中、高剂量组)及阿托伐他汀组小鼠主动脉 HO-1、NQO1 mRNA 表达升高 ( $P < 0.01$ )。

表3 各组小鼠血浆MDA、SOD、GSH-Px表达比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 3 Comparison of expression of MDA, SOD and GSH-Px in different groups of mice plasma( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	MDA (mmol/L)	SOD (U/mL)	GSH-Px (ng/L)
Con	22.83 ± 1.33	92.20 ± 3.26	80.62 ± 2.48
Mod	62.96 ± 2.90 <sup>**</sup>	35.97 ± 2.66 <sup>**</sup>	43.94 ± 2.32 <sup>**</sup>
BHD-L	52.02 ± 1.80 <sup>##</sup>	46.13 ± 2.32 <sup>##</sup>	49.24 ± 2.39 <sup>##</sup>
BHD-M	43.61 ± 2.76 <sup>##</sup>	61.87 ± 2.36 <sup>##</sup>	57.22 ± 2.01 <sup>##</sup>
BHD-H	32.71 ± 2.26 <sup>##</sup>	74.50 ± 2.91 <sup>##</sup>	70.74 ± 2.07 <sup>##</sup>
Ato	37.44 ± 2.90 <sup>##</sup>	69.13 ± 2.28 <sup>##</sup>	67.84 ± 2.64 <sup>##</sup>

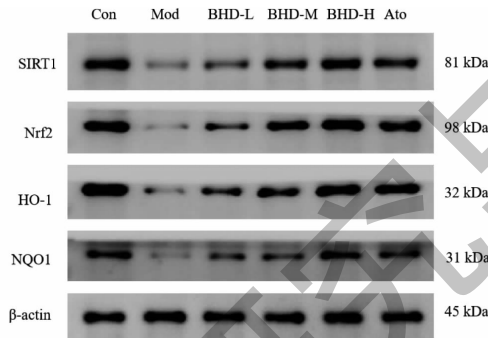


图5 各组小鼠主动脉Nrf2/ARE信号通路相关蛋白表达比较

Fig. 5 Comparison of expression of Nrf2/ARE signaling pathway related proteins in the aorta of mice in each group

表4 各组小鼠主动脉Nrf2/ARE信号通路相关蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 4 Comparison of expression of Nrf2/ARE signaling pathway related proteins in the aorta of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	SIRT1/ $\beta$ -actin	Nrf2/ $\beta$ -actin	HO-1/ $\beta$ -actin	NQO1/ $\beta$ -actin
Con	0.99 ± 0.06	1.00 ± 0.03	1.13 ± 0.04	0.75 ± 0.03
Mod	0.11 ± 0.02 <sup>**</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>**</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>**</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>**</sup>
BHD-L	0.24 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>##</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>##</sup>
BHD-M	0.53 ± 0.04 <sup>##</sup>	0.60 ± 0.04 <sup>##</sup>	0.55 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>##</sup>
BHD-H	0.91 ± 0.04 <sup>##</sup>	0.94 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.94 ± 0.04 <sup>##</sup>	0.53 ± 0.03 <sup>##</sup>
Ato	0.89 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.91 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.90 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>##</sup>

表5 小鼠主动脉中HO-1、NQO1 mRNA表达比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 5 Comparison of the expression of HO-1 and NQO1 mRNA in mice aorta( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	HO-1 mRNA	NQO1 mRNA
Con	1.01 ± 0.07	1.01 ± 0.08
Mod	0.19 ± 0.04 <sup>**</sup>	0.19 ± 0.03 <sup>**</sup>
BHD-L	0.34 ± 0.04 <sup>##</sup>	0.41 ± 0.03 <sup>##</sup>
BHD-M	0.56 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.63 ± 0.04 <sup>##</sup>
BHD-H	0.72 ± 0.04 <sup>##</sup>	0.74 ± 0.03 <sup>##</sup>
Ato	0.68 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>##</sup>

### 3 讨论与结论

AS 作为现代医学的病名,中医学古籍中并无“动脉粥样硬化”记载,主要表现为管腔狭窄、血管壁弹性减退等血液运行受阻,故将其归属为“胸痹心痛、眩晕、脉痹”等范畴。中医学认为其病机在于人体正气的亏虚,气血运行不畅。如《医林改错》中云:“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”;《医学纲目》中记载“中风皆因脉道不利,血气闭塞也”为瘀血诱发 AS 提供了理论依据。正气亏虚中尤以心虚为本;而瘀血、痰浊等病理因素为发病之标<sup>[10]</sup>。本研究针对 AS 病机以“益心祛瘀化痰法”为基本大法化裁而来,方药组成:黄芪,当归尾,赤芍,川芎,桃仁,红花,地龙,瓜蒌,薤白,半夏,党参,麦冬,五味子等药物。黄芪为君药,配合党参,麦冬,五味子补益元气,意在气旺则会助血行,血行则瘀去,瘀去则脉络通;当归补气养血,为臣药,佐以地龙,赤芍,桃仁,红花,川芎活血通络;瓜蒌、薤白、半夏宽胸散结、涤痰通络。诸药合用,共奏益气养心、泄浊通络之功效。现代研究表明,补阳还五汤可以通过抗氧化应激、抗炎、抗内皮细胞损伤、凋亡等方面发挥抗 AS 的作用<sup>[11,12]</sup>。瓜蒌、薤白、半夏取自瓜蒌薤白半夏汤之意,现代研究表明,瓜蒌薤白半夏汤通过抑制氧化应激、调节脂质代谢、减轻炎症反应等防治 AS<sup>[13]</sup>。

载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠,1992 年由美国北卡罗莱那大学病理遗传实验室和洛克菲勒大学生物遗传与代谢实验室培育成功。ApoE 是乳糜微粒、极低密度脂蛋白及高密度脂蛋白等重要组成成分,在调节氧化应激、脂质代谢、信号传导等方面具有重要作用<sup>[14]</sup>。ApoE<sup>-/-</sup>小鼠病理学改变与人类极为相似,可在自然膳食的情况下自发形成纤维斑块和复合斑块,并可形成严重的高脂血症,且雄性更容易形成 AS 病变,且与 SD 大鼠造模相比,ApoE<sup>-/-</sup>小鼠成模迅速,高脂饲料喂养(0.15%胆固醇、18%氢化可可脂)8 周时随机解剖小鼠就可以发现小鼠主动脉出现脂质斑块及炎症浸润,证实造模成功<sup>[15]</sup>。故实验一般选用雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠为研究对象。血脂水平与 AS 发生呈正相关,在病理状态下,动脉管壁脂质沉积,单核-巨噬细胞被氧化吞噬转化为泡沫细胞,从而降低纤维斑块稳定性,加快 AS 的进程。本研究结果显示,补阳还五汤组 AS 斑块内 TC、TG 及 LDL-C 较模型组降低,主动脉根部未见明显的脂质沉积及斑块形成,进一步证实了补阳还五汤具有抗 AS 及稳定斑块的作用。

氧化应激损伤是指体内 ROS 的生成与抗氧化酶系统清除 ROS 平衡紊乱,导致体内 ROS 蓄积增多,引起机体氧化损伤的过程。当动脉血管内 ROS 蓄积过多,会引起血管壁氧化性损伤,促进泡沫细胞产生,最终诱发或加重 AS,甚至会促进 AS 斑块破裂,严重影响人们的生活质量。AOPP 可以通过多种机制参与 AS 的形成与发展,一方面其氧化代谢可能引起超氧化物(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、O<sup>2-</sup>、OH<sup>-</sup>)的产生,导致内皮功能受损;另一方面 AOPP 可以促进炎症因子的合成、释放诱发、加重 AS 进程。因此,抗氧化反应在防治 AS 过程中显得尤为重要。Nrf2 信号通路与抗氧化应激密切相关。机体内 ROS 超载可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,使得 Nrf2 与 Keap1 形成的复合物中脱离下来,并游离状态蓄积在细胞质中,同时被磷酸化,转入细胞核,促进 HO-1 基因表达,进而提高细胞抗氧化应激能力,发挥细胞保护作用。Nrf2 基因是一种碱性亮氨酸拉链转录因子,广泛存在于氧耗器官中,能够介导抗氧化反应途径,有利于维持细胞还原-氧化稳态,可调节多种抗氧化蛋白基因,在细胞氧化应激中起关键作用。目前已知 Nrf2/ARE 信号通路是最重要的内源性抗氧化损伤通路,参与调节细胞稳态、脂质形成、炎症因子释放。研究表明,Nrf2 能够通过其介导的抗氧化损伤通路,降低氧化应激损伤,减轻炎症反应,对细胞具有保护作用,还能调控多种抗氧化酶活性<sup>[16,17]</sup>。NQO-1 能够还原 NADPH 氧化酶,减少 ROS 含量,降低氧化应激损伤的发生。HO-1 是目前已发现十分重要的抗氧化酶,可以促进血红素分解成 CO、胆红素、胆绿素等物质,具有较好预防 AS 发生的作用。本研究发现补阳还五汤可提高 AS 模型小鼠主动脉中 Nrf2、ARE、NQO-1 及 HO-1 表达,推测补阳还五汤可激活 Nrf2/ARE 信号通路,达到保护 AS 模型小鼠主动脉免遭氧化应激损伤的作用。为此本课题组进行了进一步研究,结果发现补阳还五汤能够提高小鼠主动脉中 Nrf2、ARE 蛋白表达及 NQO-1、HO-1 蛋白及其 mRNA 表达。提示补阳还五汤可激活 Nrf2/ARE 信号通路,发挥抗 AS 作用。SOD 是一种抗氧化酶,可以通过清除氧自由基发挥抗氧化作用,对氧化应激水平有直接影响。MDA 是膜脂过氧化过程中最重要的产物之一,与氧化应激水平呈正相关,能够反映出机体的氧化应激状态。GSH-Px 是体内重要的抗氧化剂,与氧化应激程度呈负相关,可清除 ROS 发挥抗氧化作用<sup>[18,19]</sup>。本研究结果显示,补阳还五汤组能够升高小鼠血浆中 GSH-Px、SOD 表达水平,降



低 MDA 表达水平;降低 AOPP、ROS 表达水平。以上进一步证实补阳还五汤具有抗氧化应激作用。

综上所述,以“益心祛瘀化痰法”为基本大法化裁而来的补阳还五汤具有抗氧化应激作用,能够明显改善主动脉病理形态学改变,减少主动脉中脂质沉积,其发挥抗动脉粥样硬化的机制可能与 Nrf2/ARE 信号通路激活有关。

#### 参考文献

- Song W, Zhang ZY, Wang K, et al. Zhuyu Pills promote polarization of macrophages toward M2 phenotype to prevent atherosclerosis via PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2024, 49: 243-250.
- Sun MY, Qin HW, Niu YQ, et al. The relationship between intestinal microecology imbalance and atherosclerosis based on the "heart small intestine spleen" axis [J/OL]. *J Basic Chin Med* (中国中医基础医学杂志): 1-8 [2023-08-29]. <https://doi.org/10.19945/j.cnki.issn.1006-3250.20230823.001>.
- Wei L, Wang X, Chen X, et al. Wogonin alleviates atherosclerosis and NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory response in ApoE<sup>-/-</sup> mice fed with high fat diet [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33: 750-757.
- Sun Y, Shu LF, Sun YX, et al. Based on the plaque stability to explore the characteristics of atherosclerosis between young and old ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2023, 43: 3960-3966.
- Hu N, Shi Y, Cao B, et al. Effect of Qingzhi Tongmai Granules on NF- $\kappa$ B signaling pathway in atherosclerotic lesions [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2023, 41: 67-70.
- Lin XL, Zhang LY. Rosmarinic acid attenuates atherosclerosis [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 652-658.
- Abuduzhayier M, Mawulang W, Aytula. Effect and mechanism of astaxanthin on lipid metabolism, oxidative stress and inflammatory response in carotid atherosclerosis rats [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis* (中华老年心脑血管病杂志), 2023, 25: 866-869.
- Sun YY, Zhu HJ, Zhao RY, et al. Remote ischemic conditioning attenuates oxidative stress and inflammation via the Nrf2/HO-1 pathway in MCAO mice [J]. *Redox Biol*, 2023, 66: 102852.
- Zhu MY, Shen N, Xin HW. Protective effect of ethyl acetate extract from *Arenaria kansuensis* on lung tissue of pulmonary fibrosis mice [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2023, 45: 2713-2718.
- Tang L, Song TL, Wu GY, et al. Anti-oxidative protection of *Panax japonicus* polysaccharide on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in rats based on Nrf2-ARE signaling pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2023, 54: 4866-4873.
- You XY, Wang WX, Xu X, et al. Research progress on the material foundation and mechanism of Buyang Huanwu decoction in the treatment of atherosclerosis [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharm* (中药新药与临床药理), 2021, 32: 1575-1581.
- Feng YN, Niu WY, Zhang YK, et al. Research on the regulatory mechanism of Buyang Huanwu Decoction on Qi deficiency and blood stasis syndrome based on platelet activation and inflammation related indicators [J]. *Lishizhen Med Mate Med Res* (时珍国医国药), 2023, 34: 581-584.
- Feng L, Zhuang AQ, Li ZW, et al. Study on mechanism of Gualou Xiebai Banxia decoction in treating dynamic atherosclerosis based on network pharmacology and *in vitro* study [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2022, 38: 904-912.
- Song K, Hou YH, Yang H, et al. Advances in research on disease model of ApoE knockout mice [J]. *Chin Med Herald* (中国医药导报), 2019, 16: 42-44.
- Jiang YC. Application and progress of ApoE<sup>-/-</sup> mice in anti atherosclerosis research of traditional Chinese medicine [J]. *J Huaihai Med* (淮海医药), 2023, 41: 209-211.
- Guo JZ, Chen HN, Ma JX, et al. Review the progress on Nrf2 signaling pathway for prevention and treatment of atherosclerosis caused by oxidative stress [J]. *J Guizhou Univ Tradit Chin Med* (贵州中医药大学学报), 2022, 44: 71-75.
- Lin WY, Wu LH, Chen XQ, et al. The mechanism of Nrf2/ARE signaling pathway in periodontitis with atherosclerosis [J]. *Clin Med Res*, 2022, 11: 1-5.
- Fan ZG, Yuan Y. The Effect of sappanwood ethyl acetate extract on oxidative stress in ApoE<sup>-/-</sup> mice model of atherosclerosis and on p38/JNK/ERK [J]. *J Jiangxi Univ Chin Med* (江西中医药大学学报), 2022, 34: 89-94.
- Lin XR, Jia L, Li LF, et al. Study on the inhibition of esophageal carcinoma development in mice by Chinese sage herb through induced ferroptosis [J/OL]. *Chin Gener Pract* (中国全科医学): 1-6 [2023-08-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/13.1222.R.20230811.1050.002.html>.