

黄连解毒汤通过调节性 T 细胞产生 抗动脉粥样硬化作用

周凤华,程赛博,张宇,张蕾,贾钰华,赵丹丹,苏志杰

(南方医科大学中医药学院,广州 510515)

【摘要】 目的 观察黄连解毒汤(HLJDD)对 ApoE^{-/-}小鼠斑块、炎症因子及调节性 T 细胞(Tregs)的影响。**方法** 高脂饲料喂养雄性 ApoE^{-/-}小鼠建立动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)模型,40 只雄性 ApoE^{-/-}小鼠随机分为:模型组,辛伐他汀组,HLJDD 高、中、低剂量组($n = 8$)。HLJDD 灌胃剂量依次为:每日 3.5、7.0、14.0 g/(kg · bw),辛伐他汀灌胃剂量为每日 5 g/(kg · bw),另设 8 只同龄雄性 C57BL/6J 小鼠为对照组,喂以普通饲料,连续给药 16 周后处死小鼠。检测血脂水平,观察主动脉斑块形成情况;ELISA 法检测血清炎症因子水平;流式细胞术检测 Tregs 数量;RT-PCR 法检测 Foxp3 mRNA 水平。**结果** 与对照组相比,模型组中主动脉斑块明显,TC、TG 与 LDL-C 浓度显著升高,促炎因子超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平显著升高,而 HDL-C、白介素-10(IL-10)、生长转化因子- β (TGF- β)、Foxp3 mRNA 水平显著降低,Tregs 数量减少,二者差异有显著性($P < 0.01$);HLJDD 能显著缩小主动脉斑块面积,降低血清 TC、TG 与 LDL-C,并降低 IL-6、hs-CRP 与 TNF- α 水平,增加血清 HDL-C、IL-10、TGF- β 及 Foxp3 mRNA 水平,并增加 Tregs 数量,与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$)。**结论** HLJDD 可显著减轻 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块损伤,可能与增加 Tregs 数量,从而降低血清炎症因子水平有关。

【关键词】 动脉粥样硬化;调节性 T 细胞;黄连解毒汤;白介素-10;生长转化因子- β ; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0233-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.003

Anti-atherosclerotic effect of a Chinese medicine, Huanglian Jiedu Decoction, mediated by regulatory T cells

ZHOU Feng-hua, CHENG Sai-bo, ZHANG Yu, ZHANG Lei,
JIA Yu-hua, ZHAO Dan-dan, SU Zhi-jie

(School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of a Chinese medicine, Huanglian Jiedu Decoction (HLJDD), on atherosclerotic plaque, inflammatory factors and regulatory T cells in ApoE^{-/-} mice. **Methods** High fat diet was given to ApoE^{-/-} mice to establish an atherosclerosis model. 40 male ApoE^{-/-} mice were randomly divided into five groups: model group, simvastatin group, low, moderate and high dose HLJDD groups ($n = 8$). HLJDD was intragastrically administered in a dose of 3.5, 7.0, or 14.0 g/(kg · bw) once daily for 16 weeks. The dose of simvastatin was 5.0 g/(kg · bw). Another 8 male C57BL/6J mice were taken as control group. At the end of the 29-week experiment, all of the mice were sacrificed. The aortic plaques, level of blood lipids, inflammatory factors, Tregs number and the level of Foxp3 mRNA were detected and analyzed by ELISA, flow cytometry and RT-PCR, respectively. **Results** Compared with the control group, the

【基金项目】国家自然科学基金(No. 81403339);广东省自然科学基金博士启动项目(No. 2014A030310150);广东省中医药管理局科研项目(No. 20141186)

【通讯作者】周凤华(1986-),女,讲师,博士学位,从事缺血性心血管疾病的中医药防治研究。Email: wendyzhou515@126.com

aortic plaques were much larger in the model group, and the levels of TC, TG, LDL-C, IL-6, hs-CRP, and TNF- α were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$ for all). Meanwhile, the levels of HDL-C, IL-10, TGF- β and Foxp3 mRNA were much lower than those in the control group ($P < 0.01$ for all), and the Tregs numbers were less than that in the control group ($P < 0.01$). HLJDD regulated the blood lipids in ApoE^{-/-} mice and decreased the levels of IL-6, hs-CRP, and TNF- α , however increased the levels of IL-10, TGF- β and Foxp3 mRNA. At the same time, it increased Tregs number in the ApoE^{-/-} mice. Compared with the model group, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusions** HLJDD can significantly alleviate the aortic plaque damages in ApoE^{-/-} mice. It may be related to the up-regulation of Tregs, which can lead to decrease the expression of serum pro-inflammatory factors such like IL-10, hs-CRP and TNF- α .

【Key words】 Atherosclerosis; Regulatory T cells; Huanglian Jiedu Decoction, Chinese medicine; IL-10; TGF- β ; Mice

Corresponding author: ZHOU Feng-hua, Email: wendyzhou515@126.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是多数心脑血管疾病的共同病理基础,其发病机制复杂。目前普遍认为,AS是发生在全身大中弹性动脉的慢性炎症性病变,免疫反应贯穿了AS发生发展的全过程。调节性T细胞(CD4⁺CD25⁺T regulatory cells, Tregs)是一类特殊亚群的T细胞,主要通过分泌白介素-10与转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)抑制炎症反应。已有研究证实,Tregs能显著延缓AS进展,但其机制尚未阐明^[1]。

黄连解毒汤(Huanglian Jiedu Decoction, HLJDD)出自《外台秘要》,主要由黄连、黄柏、栀子、黄芩四味中药组成,具有清热解毒之功效。研究表明,HLJDD能显著调节机体免疫功能,对热毒炽盛型感染性疾病疗效较好^[2]。中医认为热毒是AS的主要病理矛盾,因而清热解毒法是治疗AS性疾病的主要中医治法。本研究采用高脂喂养ApoE基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠建立AS模型,主要观察HLJDD对AS小鼠血脂、斑块及Tregs的影响,初步探讨HLJDD防治AS的药理机制。

1 材料与方法

1.1 动物及饲料

6周龄SPF级雄性ApoE基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠40只,同周龄C57BL/6J雄性小鼠8只,均由北京维通利华实验动物公司提供【SCXK(京)2012-0001】。高脂饲料配方:78.85%基础饲料+0.15%胆固醇+21%脂肪,由广东省医学实验中心提供【SCXK(粤)2013-0002】。动物实验在南方医科大学实验动物中心完成【SYXK(粤)2011-0074】。

1.2 药物与试剂

黄连解毒汤水煎剂由黄连、栀子、黄芩、黄柏组

成(3:3:2:2),南方医院药剂科代煎;辛伐他汀片购自杭州默沙东公司;血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒均购自南京建成生物公司;超敏C反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-10与TGF- β 试剂盒均购自武汉华美生物公司;TRIzol、TaqMan Universal PCR Master Mix、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit、TaqMan MicroRNA Assays(Takara,日本)购自大连宝生物公司。

1.3 仪器

酶标定量测定仪(德国Thermo公司)、低温高速离心机(美国Thermo公司)、Leica超低温冰箱(美国Revco公司)、L420台式低速自动平衡离心机(湘仪仪器有限公司)、PL303电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)、SDS电泳系统(北京君意东方有限公司)、Image Station 2000 MM成像系统(美国Kodak公司)、实时荧光定量PCR仪(德国Roche公司)。

1.4 方法

1.4.1 小鼠分组及AS模型建立

40只ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组,辛伐他汀组,HLJDD低、中、高剂量组,每组8只,高脂饲料喂养12周后开始药物干预。HLJDD组灌胃剂量依次为每日3.5、7.0、14.0 g/(kg·bw),辛伐他汀灌胃剂量为5 mg/(kg·d),模型组每日给予等体积生理盐水灌胃,药物连续干预16周。另取8只同周龄C57BL/6J雄性小鼠作为对照组,普通饲料喂养。

1.4.2 标本采集及处理

实验第29周处死小鼠,心脏穿刺采集血液标本,离心分离血清,检测小鼠血脂水平;取主动脉弓制作病理切片,HE染色观察血管内斑块;另每组取三条主动脉进行油红O染色,观察整条主动脉的斑

块形成情况;采用流式细胞术检测各组小鼠 Tregs 数量。

1.4.3 ELISA 法测血浆炎症因子水平

分离小鼠血浆,按照试剂盒说明书进行操作,分别计算各组小鼠 IL-6、hs-CRP、TNF-α、IL-10 及 TGF-β 浓度。

1.4.4 RT-PCR 检测

Foxp3 及内参引物由上海 Invitrogen 公司合成纯化。Foxp3 上游引物序列为 5'-ATGAAGAGCCT-GCCTT GGT A-3',下游引物序列为 5'-CCAGATGT-TGTGGGTGAGTG-3';β-actin 上游引物 5'-CTGTC-CCTGTATGCCTCTG-3',下游 5'-ATGTCACG-CACGATTTCC-3'。提取血管总 RNA,并采用琼脂糖凝胶电泳检测其质量。合成 cDNA:反应体系由 14 μL 模板 RNA,2 μL enzyme mix 以及 5 × RT 缓冲液 4 μL 组成,42℃ 反应 1 h,95℃ 反应 5 min,即可得 cDNA。RT-PCR:反应体系分别为:cDNA 1 μL、2 × PCR 反应混合物 10 μL、引物 0.5 μL、H₂O 7.5 μL 及 20 × SYBR 1 μL。95℃ 反应 10 min,再转向 (95℃ 10 s、60℃ 1 min)共 40 个循环。目的基因与内参基因的相对表达量用 2^{-ΔΔCT}表示,重复 3 次。

1.5 统计分析

采用 SPSS20.0 软件对数据进行分析。计量资料数据以均数 ± 标准差表示。对符合正态分布和方差齐性的数据,采用 one-way ANOVA 方法分析;若不符合正态分布和方差齐性,则采用秩和检验。检验显著性水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 小鼠体重及血脂

实验中发现对照组小鼠精神最佳,进食与活动量均正常,毛色有光泽。而模型组小鼠精神状态较差,进食量大,活动量小,体重增长最显著,毛发稀疏,缺少光泽。药物干预组小鼠精神较好,体重增加比模型组小,毛发有光泽。比较各组血脂水平发现,模型组 TG、TC 与 LDL-C 增高,HDL-C 明显降低,与对照组相比差异有显著性(P < 0.01,表 1)。辛伐他汀与 HLJDD 各组 TG、TC 与 LDL-C 有所降低,相反 HDL-C 浓度增加,其中,辛伐他汀与 HLJDD 高剂量组效果最明显,与模型组相比差异有显著性(P < 0.01,表 1)。提示,HLJDD 汤具有 ApoE^{-/-}小鼠调节血脂的功效。

表 1 各组小鼠体重及血脂水平($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{mmol/L}$)
Tab.1 Body weight and level of blood lipoproteins in the mice

组别 Groups	体重/g Body weight	总胆固醇 TC	低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C	高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C	血清甘油三酯 TG
对照组 Control	31.32 ± 2.87 [#]	4.98 ± 0.57 [#]	0.92 ± 0.06 [#]	1.88 ± 0.37 [#]	2.18 ± 0.25 [#]
模型组 Model	43.85 ± 6.24 [*]	28.65 ± 3.74 [*]	4.33 ± 0.25 [*]	0.31 ± 0.09 [*]	24.01 ± 2.20 [*]
HLJDD Low dose	40.49 ± 3.77 [*]	22.65 ± 2.68 [*]	3.21 ± 0.37 [*]	0.56 ± 0.12 [*]	18.79 ± 1.97 [*]
HLJDD moderate dose	38.52 ± 5.38 [*]	17.53 ± 3.52 ^{#*}	1.98 ± 0.34 ^{#*}	0.83 ± 0.21 ^{#*}	14.72 ± 1.26 ^{#*}
HLJDD High dose	35.13 ± 4.26 [#]	13.65 ± 3.21 ^{#*}	1.51 ± 0.26 ^{#*}	1.29 ± 0.17 ^{#*}	10.85 ± 1.03 ^{#*}
辛伐他汀组 Simvastatin	41.48 ± 4.07 [*]	15.88 ± 1.99 ^{#*}	1.49 ± 0.31 ^{#*}	1.25 ± 0.23 ^{#*}	13.14 ± 0.85 ^{#*}

注:与模型组比较,[#]P < 0.01,与对照组比较,^{*}P < 0.01。
Note. Compared with the model group, [#]P < 0.01; Compared with the control group, ^{*}P < 0.01.

2.2 病理形态学

对 ApoE^{-/-}小鼠整条主动脉进行油红 O 染色发现,对照组小鼠主动脉内膜光滑,无明显斑块形成,而模型组小鼠主动脉内膜出现多处肉眼可见的斑块,尤其是主动脉弓及分叉处。辛伐他汀及 HLJDD 组斑块有所减轻,斑块占主动脉的

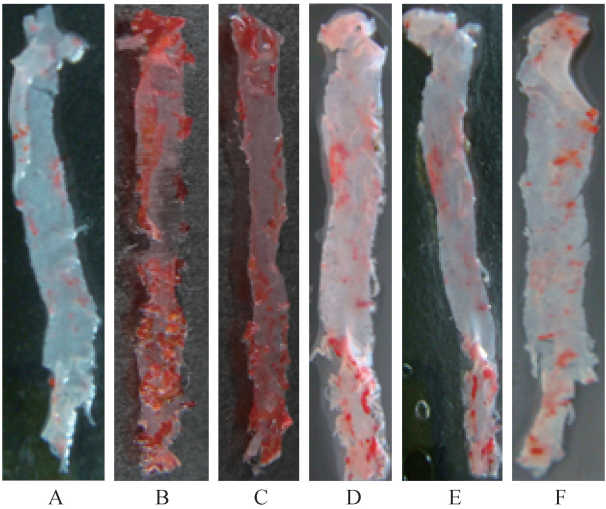
比例也显著低于模型组(P < 0.01,表 2 与图 1)。主动脉弓处的石蜡切片显示,辛伐他汀与 HLJDD 高剂量组斑块面积显著小于模型组,差异有显著性(P < 0.01,表 2 与图 2)。说明 HLJDD 与辛伐他汀都能显著抑制 AS 斑块发展,从而延缓 AS 进程。

2.3 炎症因子水平

模型组 hs-CRP、IL-6 与 TNF-α 水平较对照组显著升高,辛伐他汀与 HLJDD 中、高剂量能显著降低 hs-CRP、IL-6 与 TNF-α 水平,与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$,表 3),HLJDD 高剂量组与辛伐他汀组差异无显著性($P > 0.05$)。提示 HLJDD 具有较好的抗炎作用。

2.4 Tregs 数量及 IL-10 与 TGF-β 水平

与对照相比,模型组 Tregs 数量显著降低,HLJDD 中、高剂量组显著增加了 Tregs 数量,差异有显著性($P < 0.01$,表 4)。分析各组小鼠 IL-10 与 TGF-β 水平发现,模型组小鼠 IL-10 与 TGF-β 浓度较对照组显著降低,HLJDD 高剂量组显著提高两者水平,与其他组相比差异均有显著性($P < 0.01$)。而模型组 Tregs 表面特异性标记物 Foxp3 mRNA 水平显著低于对照组,HLJDD 能显著增加 Foxp3 mRNA 水平,增加 Tregs 数量。提示 HLJDD 能增加 Tregs 数量,并促进其分泌 IL-10 与 TGF-β,发挥其抗炎作用。



注:A:对照组;B:模型组;C:辛伐他汀组;
D:HLJDD 低剂量组;E:HLJDD 中剂量组;F:HLJDD 高剂量组。

图1 各组主动脉斑块油红 O 染色

Note. Groups as follows; A: control; B: model; C: simvastatin; D:HLJDD low dose, E: HLJDD moderate dosw; F: HLJDD high dose.

Fig.1 Atherosclerotic plaques in the mouse aortas Oil red O staining

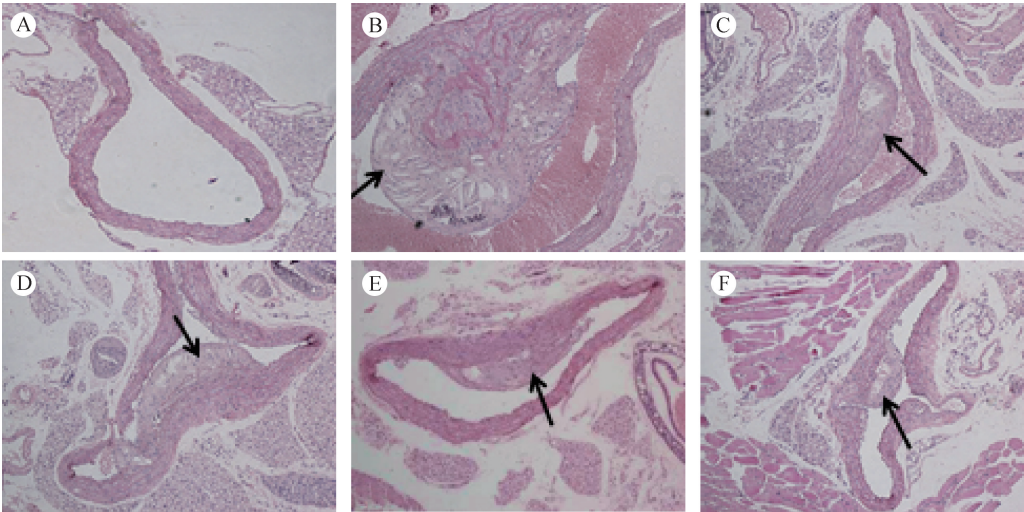


图2 各组主动脉斑块石蜡切片染色(分组同上,×200)

Fig.2 The atherosclerotic plaques in the mice aortas (groups as the above, HE staining ×200)

表2 各组小鼠主动脉斑块面积比例($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.2 Ratios of plaque area in the mouse aortas

组别 Groups	主动脉 Aorta/%	主动脉弓 Aortic arch/%
对照组 Control	0	0
模型组 Model	33.19 ± 5.35 *	42.73 ± 8.62 *
HLJDD 低组 HLJDD low dose	18.43 ± 6.72 *	28.65 ± 2.68 # *
HLJDD 中组 HLJDD moderate dose	14.26 ± 4.22 **	20.36 ± 4.82 # *
HLJDD 高组 HLJDD high dose	10.37 ± 3.43 **	15.94 ± 3.57 # *
辛伐他汀组 Simvastatin	17.50 ± 4.03 **	33.18 ± 5.44 *

注:与模型组比较, # $P < 0.01$, 与对照组比较, * $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the model group, # $P < 0.01$; Compared with the control group, * $P < 0.01$.

表 3 各组小鼠血清炎症因子水平($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{ng/mL}$)

Tab. 3 The levels of serum inflammation factors in the mice

组别 Groups	hs-CRP	IL-6	TNF- α
对照组 Control	132. 73 $\pm$ 6. 22 [#]	159. 62 $\pm$ 8. 93 [#]	55. 08 $\pm$ 4. 36 [#]
模型组 Model	296. 52 $\pm$ 10. 43 *	427. 58 $\pm$ 15. 33 *	163. 24 $\pm$ 7. 56 *
HLJDD 低组 Low dose HLJDD	233. 71 $\pm$ 7. 58 *	379. 32 $\pm$ 18. 44 *	134. 39 $\pm$ 7. 27 *
HLJDD 中组 Moderate dose HLJDD	198. 52 $\pm$ 9. 34 *	291. 49 $\pm$ 13. 26 ^{**}	118. 71 $\pm$ 5. 74 ^{**}
HLJDD 高组 High dose HLJDD	166. 13 $\pm$ 6. 73 [#]	213. 70 $\pm$ 15. 63 [#]	73. 51 $\pm$ 8. 23 [#]
辛伐他汀组 Simvastatin	158. 32 $\pm$ 9. 07 [#]	186. 53 $\pm$ 10. 19 [#]	82. 45 $\pm$ 6. 35 [#]

注:与模型组比较,[#] $P < 0. 01$,与对照组比较,^{*} $P < 0. 01$ 。
Note. Compared with the model group, [#] $P < 0. 01$; Compared with the control group, ^{*} $P < 0. 01$.

表 4 各组小鼠 Tregs 数量及 IL-10 与 TGF- β 水平($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{ng/mL}$)

Tab. 4 The serum levels of IL-10, TGF β and Tregs in the mice

组别 Groups	Tregs /%	IL-10	TGF- β	Foxp3/ β -actin
对照组 Control	9. 64 $\pm$ 0. 59 [#]	295. 34 $\pm$ 12. 66 [#]	421. 26 $\pm$ 18. 65 [#]	0. 38 $\pm$ 0. 09 [#]
模型组 Model	4. 85 $\pm$ 0. 27 *	98. 16 $\pm$ 15. 48 *	148. 37 $\pm$ 10. 59 *	0. 16 $\pm$ 0. 05 *
HLJDD 低组 Low dose HLJDD	5. 57 $\pm$ 0. 42 *	132. 53 $\pm$ 8. 62 *	230. 19 $\pm$ 17. 72 *	0. 20 $\pm$ 0. 05 *
HLJDD 中组 Moderate dose HLJDD	6. 99 $\pm$ 0. 36 ^{**}	198. 49 $\pm$ 13. 82 ^{**}	331. 82 $\pm$ 11. 46 ^{**}	0. 25 $\pm$ 0. 06 ^{**}
HLJDD 高组 High dose HLJDD	8. 76 $\pm$ 0. 48 [#]	261. 73 $\pm$ 15. 25 [#]	378. 15 $\pm$ 15. 67 [#]	0. 34 $\pm$ 0. 04 [#]
辛伐他汀组 Simvastatin	8. 19 $\pm$ 0. 37 ^{**}	234. 58 $\pm$ 10. 93 ^{**}	362. 91 $\pm$ 18. 18 [#]	0. 28 $\pm$ 0. 07 ^{**}

注:与模型组比较,[#] $P < 0. 01$,与对照组比较,^{*} $P < 0. 01$ 。
Note. Compared with the model group, [#] $P < 0. 01$; Compared with the control group, ^{*} $P < 0. 01$.

3 讨论

本研究以高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠复制 AS 模型,以 HLJDD 高中低剂量连续干预小鼠 16 周,检测小鼠血脂、主动脉斑块、炎症因子水平及 Tregs 数量与功能。通过分析实验结果我们得出以下结论:(1) HLJDD 能显著降低 ApoE^{-/-}小鼠 TC、TG 与 LDL-C 水平,增高 HDL-C 水平,具有显著调节血脂水平的作用;(2) HLJDD 能显著缩小主动脉处的斑块面积,降低小鼠血清炎症因子 hs-CRP、IL-6 与 TNF- α 水平,通过抗炎机制来延缓 AS 斑块进展;(3) ApoE^{-/-}小鼠 Tregs 数量显著降低,IL-10 与 TGF- β 分泌减少,HLJDD 显著增加 Tregs 数量,促进 Tregs 分泌 IL-10 与 TGF- β ,从而起到抗炎作用。

免疫反应贯穿于 AS 全过程,并在其中起到重要作用,通过调节免疫功能可起到防治 AS 的功效^[3]。Tregs 是一类特殊类型的 T 细胞,在调节机体免疫系统平衡及控制自身免疫性疾病的进展中具有重要作用。ApoE^{-/-}小鼠体内 Tregs 的数量和功能均明显低于正常 C57BL/6J 小鼠,而且随着 AS 的进展,Tregs 的数量及其特异性标志物 Foxp3 的表达、分泌的 TGF- β 水平都显著下降^[1,4]。ACS 患者人群外周血中 Tregs 的数量也明显低于健康人群,而且 Tregs 数量的降低伴随人类 AS 发生和发展的各个阶

段^[5,6]。因此,内源性 Tregs 的数量和功能降低与 AS 的发生关系密切。在 ApoE^{-/-}小鼠中给予 Tregs 治疗可有效阻止小鼠斑块内 T 细胞和巨噬细胞浸润,显著降低斑块面积,从而阻止早期 AS 形成^[7]。本实验中,模型组 Tregs 数量显著低于对照组,而由其分泌的 IL-10 及 TGF- β 水平也显著降低,这与文献结果一致,说明 AS 小鼠体内呈现低水平的 Tregs。而 HLJDD 高剂量可显著增加 Tregs 数量,促进其分泌抗炎因子 IL-10 及 TGF- β ,从而减轻 AS 斑块的炎症反应,延缓 AS 斑块进展。这些结果都提示,对维持体内免疫稳态起重要作用的 Tregs 同样可以在抗 AS 方面发挥重要作用,通过提高体内 Tregs 的数量和功能,可有效抑制 T 细胞和巨噬细胞介导的免疫反应,最终逆转 AS 斑块进程^[8]。

虽然 AS 的病理机制十分复杂,但学者们普遍认为 AS 是一种慢性炎症性疾病,炎症反应是 AS 斑块形成、发展和最终破裂的关键环节^[9]。炎症的作用主要依赖于炎症细胞的浸润和促炎因子如 TNF- α 、IL-6、hs-CRP 等的产生和释放。效应性 T 细胞和巨噬细胞直接参与 AS 的炎症过程,产生大量促炎因子,而 Tregs 抑制 T 细胞的活化及其从外周组织向 AS 斑块的迁移^[10]。TNF- α 、IL-6 与 hs-CRP 等促炎因子无论在 AS 病人或 ApoE^{-/-}小鼠血清中均呈现较高的水平,它们也是炎症的血清标记物,通过检

测其浓度可快速了解机体炎症反应的程度。而主要由 Tregs 分泌的 IL-10 与 TGF- β 具有显著的抗炎作用,能有效抑制由促炎因子所激发的炎症反应,维持体内免疫功能的正常与稳定。IL-10 可抑制 IL-1、IL-6、TNF- α 、ICAM-1 等炎症因子的合成和释放,并促进其他抗炎因子的产生。IL-10 在 AS 的形成和稳定性方面起到重要的保护作用,IL-10 的缺失可加速 AS 的发展,促进血栓形成和斑块不稳定^[11]。LDLR^{-/-}小鼠体内过表达 IL-10 后,小鼠体内 AS 病变则受到明显抑制^[12]。TGF- β 信号通路的抑制则会诱导 T 细胞的活化及向 Th1、Th2 细胞分化,相应降低 Tregs 的细胞数量,减少其表面 Foxp3 的表达,同时减弱 Tregs 的抑制功能^[13]。因此,TGF- β 在维持 Tregs 的数量和功能方面也发挥了关键作用。研究表明,TGF- β 抑制斑块内炎症细胞的浸润,促进胶原的合成和平滑肌细胞分泌基质金属蛋白酶抑制剂;反之,TGF- β 信号通路的缺失则加重斑块内炎症反应,促进胶原降解,从而诱导斑块不稳定^[14]。

我们的结果也显示,ApoE^{-/-}小鼠血清 TNF- α 、IL-6 与 hs-CRP 水平显著高于正常的 C57BL/6J 小鼠,提示 ApoE^{-/-}小鼠体内存在较高水平的炎症反应。HLJDD 与辛伐他汀均能显著降低小鼠炎症因子水平,辛伐他汀的抗炎效果明显优于中药 HLJDD,但 HLJDD 调节 Tregs 数量及功能的作用显著优于辛伐他汀,说明 HLJDD 抗 AS 功效部分是通过调节 Tregs 实现的,但 HLJDD 如何调控 Tregs 数量及功能尚需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Mor A, Planer D, Luboshits G, et al. Role of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in experimental atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2007, 27: 893–900.
- [2] 魏玉芬. 黄连解毒汤对 CLP 诱导的脓毒症大鼠的保护作用及其代谢组学研究 [D]. 第二军医大学博士学位论文, 2014.
- [3] Usman A, Ribatti D, Sadat U, et al. From lipid retention to immune-mediate inflammation and associated angiogenesis in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2015, 22(8): 739–749.
- [4] de Boer OJ, van der Wal AC. FOXP3⁺ regulatory T cells in vulnerable atherosclerotic plaques [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 145: 183–187.
- [5] de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling R, et al. Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions [J]. *PLoS One*, 2007, 2(8): e779.
- [6] Zhu ZF, Meng K, Zhong YC, et al. Impaired Circulating CD4(+) LAP(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndrome and its mechanistic study [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88775.
- [7] Feng J, Zhang Z, Kong W, et al. Regulatory T cells ameliorate hyperhomocysteinaemia accelerated atherosclerosis in apoE^{-/-} mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 84: 155–163.
- [8] Goronzy JJ, Weyand CM. Immunosuppression in atherosclerosis: mobilizing the opposition within [J]. *Circulation*, 2006, 114: 1901–1904.
- [9] Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340: 115–126.
- [10] Kvakani H, Kleinewietfeld M, Qadri F, et al. Regulatory T cells ameliorate angiotensin II induced cardiac damage [J]. *Circulation*, 2009, 119: 2904–2912.
- [11] Ait-Oufella H, Wang Y, Herbin O, et al. Natural regulatory T cells limit angiotensin II-induced aneurysm formation and rupture in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(10): 2374–2379.
- [12] Dietel B, Cicha I, Voskens CJ, et al. Decreased numbers of regulatory T cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells [J]. *Atherosclerosis*. 2013, 230(1): 92–99.
- [13] Ogawa C, Tone Y, Tsuda M, et al. TGF- β -mediated Foxp3 gene expression is cooperatively regulated by Stat5, Creb, and AP-1 through CNS2 [J]. *J Immunol*, 2014, 192(1): 475–483.
- [14] Li D, Liu Y, Chen J, et al. Suppression of atherogenesis by delivery of TGF β 1 using adeno-associated virus type 2 in LDLR knockout mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344: 701–707.

[收稿日期] 2015-12-08