

彭超杰,南淞华,吴林柯,等. 茯苓杏仁甘草汤调控巨噬细胞极化抑制动脉粥样硬化病变的进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 38-46.

Peng CJ, Nan SH, Wu LK, et al. Fuling Xingren Gancan granules regulate macrophage polarization and inhibit the progression of atherosclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 38-46.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.005

茯苓杏仁甘草汤调控巨噬细胞极化抑制动脉粥样硬化病变的进展

彭超杰¹,南淞华¹,吴林柯¹,孟雪¹,吴鸿^{1,2*}

(1.河南中医药大学第二附属医院,郑州 450002;2.河南中医药大学心血管病研究所,郑州 450002)

【摘要】 目的 探讨茯苓杏仁甘草汤 (Fuling Xingren Gancan granule, FXG) 对小鼠动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 巨噬细胞极化的调控作用。方法 ApoE^{-/-}小鼠构建 AS 模型, RAW264.7 巨噬细胞构建极化模型。油红 O 和苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 观察主动脉斑块总面积和主动脉管腔狭窄程度。荧光定量 PCR 和 Western blot 体内外检测 M1 型极化因子诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, CCL2) 和 M2 型极化因子精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1)、类几丁质酶样蛋白 (chitinase-like protein 3, YMI)、甘露糖受体 (CD206) 的表达水平及信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription, STAT3) 磷酸化水平。结果 FXG 明显减少 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块总面积、降低 M1 型巨噬细胞极化因子 iNOS、CCL2 表达水平, 升高 M2 型巨噬细胞极化因子 Arg-1、YMI 表达水平 ($P < 0.05$)。模型组小鼠和 M1 型巨噬细胞 STAT3 磷酸化水平降低, 在 FXG 干预后其磷酸化水平上调 ($P < 0.05$)。P-STAT3 抑制剂 Stattic 部分消除了 FXG 对 iNOS 和 Arg-1 的调控作用 ($P < 0.05$)。结论 FXG 具有抑制 AS 进展的作用, 其作用与靶向 STAT3 调控巨噬细胞极化有关。

【关键词】 茯苓杏仁甘草汤; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞极化; 信号转导和转录激活因子 3

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0038-09

Fuling Xingren Gancan granules regulate macrophage polarization and inhibit the progression of atherosclerosis

PENG Chaojie¹, NAN Songhua¹, WU Linke¹, MENG Xue¹, WU Hong^{1,2*}

(1. the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China.

2. Institute of Cardiovascular Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002)

【Abstract】 **Objective** To investigate the regulatory effect of Fuling Xingren Gancan granules (FXG) on macrophage polarization in atherosclerosis (AS) model mice. **Methods** ApoE^{-/-} mice were used to construct an AS model and RAW264.7 macrophages were used to construct a polarized cell model. The total area of aortic plaques and the degree of aortic stenosis were detected by Oil red O and hematoxylin and eosin staining, respectively. Expression levels of the M1 polarization factors inducible nitric oxide synthase (iNOS) and chemokine ligand 2 (CCL2), as well as the M2 macrophage

【基金项目】 河南省自然科学基金面上项目 (232300420054); 河南省科技研发计划联合基金 (222301420088); 河南省高校重点科研项目 (23A360013)。

【作者简介】 彭超杰 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。E-mail: pengcj6699@163.com

【通信作者】 吴鸿 (1974—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治心血管疾病。E-mail: kevin5me@126.com

factors Arg-1, YM1, and CD206, and the phosphorylation levels of signal transducer and activator of transcription (STAT3) *in vitro* and *in vivo* were detected by polymerase chain reaction and Western blot. **Results** FXG significantly reduced the total area of aortic plaques in ApoE^{-/-} mice, decreased the expression levels of the M1 macrophage polarization factors iNOS and CCL2, and increased the expression levels of the M2 macrophage polarization factors Arg-1 and YM1 ($P < 0.05$). STAT phosphorylation levels were decreased in the model mice and M1 macrophages, but were upregulated after FXG intervention ($P < 0.05$). The STAT3 inhibitor Stattic partially eliminated the regulatory effect of FXG on iNOS and Arg-1 ($P < 0.05$). **Conclusions** FXG has an inhibitory effect on the progression of AS, via targeting STAT3 to regulate macrophage polarization.

[Keywords] Fuling Xingren Gancao granule; atherosclerosis; macrophage polarization; STAT3

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是导致多种心血管疾病发生发展的病理基础^[1]。巨噬细胞在 AS 病变过程中极化为不同表型参与全部病理阶段^[2]。巨噬细胞可以极化为促炎性经典激活表型 (M1 型), 或者抗炎性交替激活表型 (M2 型)^[3], 其表型比例失衡是 AS 发生发展的重要因素^[4]。研究表明, 巨噬细胞极化受信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription, STAT3) 调控^[5]。茯苓杏仁甘草汤 (Fuling Xingren Gancao granule, FXG) 是临床用于治疗心血管疾病 (胸痹) 的经典方。有研究报道, FXG 具有抑制大鼠心肌细胞凋亡、改善心肌缺血等作用^[6-7]。前期研究表明, FXG 能抑制 AS 小鼠炎症反应和脂质沉积^[8-9], 但机制尚不明确。本研究基于前期研究基础, 观察 FXG 对 AS 病变中 M1 型巨噬细胞极化因子诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, CCL2) 和 M2 型巨噬细胞极化因子精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1)、类几丁质酶样蛋白 (chitinase-like protein 3, YM1) 以及 M2 型巨噬细胞标志蛋白甘露糖受体 (CD206) 表达水平和 STAT3 磷酸化水平的影响, 探讨其干预 AS 进展的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 购自中国科学院昆明细胞库 (KCB), 编号: KCB200603YJ。

1.1.2 实验动物

45 只 SPF 级 8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠, 15 只同品系 SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠, 体重 (20±

2)g, 由江苏省赛业模式生物研究中心 (太仓) 有限公司提供 [SCXK (苏) 2020-0006]。动物实验在河南省中医院中心实验室 SPF 级动物中心进行 [SYXK (豫) 2021-0018]。实验室环境 12 h/12 h 明/暗交替, 温度恒定为 22~24 °C, 以每笼 4 只, 自由进食进水饲养。动物实验获得河南中医药大学第二附属医院动物伦理委员会批准 (HNSZYY-20200529)。在实验中, 动物饲养和实验过程中按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

茯苓杏仁甘草汤: 茯苓 45 g、杏仁 15 g、甘草 15 g, 由四川新绿药科技发展有限公司生产的配方颗粒剂提供 (批号: 茯苓 21060127、杏仁 21060027、甘草 21060124)。Arg-1 抗体、iNOS 抗体 (Gene Tex, GTX109242、GTX13024); STAT3 抗体、磷酸信号转导和转录激活因子 3 (phosphorylation STAT3, P-STAT3) 抗体 (Cell Signaling Technology, #4904、#9145S); CD206 抗体、Cy3 标记山羊抗兔二抗、FITC 标记山羊抗兔二抗、 β -actin (武汉三鹰生物技术公司, 18704-1-AP、SA00009-2、SA00003-2、81115-1-RR); 总 RNA 抽提纯化试剂盒 (上海生工, B518621); 逆转录聚合酶链反应试剂盒、荧光定量试剂盒 (TaKaRa, RR047A、RR820A); BCA 蛋白定量试剂盒; 苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色试剂盒 (京素莱宝, G1120); 干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) (PeproTech, 315-05); 白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) 重组蛋白 (PeproTech, AF-214-14); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、油红 O 粉末 (Sigma, L2880、1002391130); STAT3 抑制剂 Stattic CAS (Santa Cruz, 19983-44-9); 高脂饲料 (南京麦瑞斯生物科技有限公司, D12108C)。

蛋白垂直电泳仪、转印仪、凝胶图像系统、荧光

定量 PCR 定量仪 (Bio-Rad, 164-5070、170-4070、170-8265、CFX Connect); 荧光显微镜 (Nikon, Ti-E); 荧光定量 PCR 扩增仪 (Thermo Fisher Scientific, 7500Fast); 超微量核酸蛋白测定仪 (南京五义科技有限公司, Onedrop 2000); 超速低温离心机 (Sigma-Aldrich, SIGMA 3-18K)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠分组及造模方法

45 只 ApoE^{-/-} 小鼠分为模型组、茯苓杏仁甘草汤 (茯苓甘, FXG) 组、瑞舒伐 (Rosuvastatin, RST) 组, 每组 15 只。空白组饲喂普通饲料, 其余各组给予高脂饲料 (成分: 蛋白质 23%、碳水化合物 45%、脂肪 20%、其他 12%) 喂养。灌胃给药与高脂饮食同步进行, 均采用临床等效量给药, 每天灌胃给药 1 次。空白组、模型组给予等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃。持续 16 周^[10-11]。

1.3.2 干预药物配备

茯苓杏仁甘草汤: 将 1 剂中药溶于 40 mL 去离子水中, 煮沸并超声溶解, 给药量按照小鼠与人体表面积换算等效剂量, 最终小鼠给药浓度为 0.006 mL/g。

瑞舒伐他汀钙: 同上, 将 1 片瑞舒伐他汀钙溶于 40 mL 去离子水, 超声充分溶解, 置于冰箱保存。

1.3.3 RAW264.7 巨噬细胞造模及干预方法

LPS (100 ng/mL) 和 IFN- γ (20 ng/mL) 刺激 RAW264.7 巨噬细胞 12 h 建立 M1 型巨噬细胞极化模型, IL-4 (20 ng/mL) 刺激 12 h 建立 M2 型巨噬细胞极化模型^[12], 造模前 24 h 加入 FXG 和 Stattic 干预。细胞分为空白组、M1 模型组 (LPS+IFN- γ)、FXG 组 (LPS+IFN- γ +FXG)、M2 阳性对照组 (LPS+IFN- γ +IL-4)、STAT3 抑制剂组 (LPS+IFN- γ +FXG+Stattic), 干预后收集各组细胞及细胞上清。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Fluorescence quantitative PCR primer sequence

| 基因名称 Gene name | 引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3') | 引物长度/bp Primer length |
|----------------------|---------------------------------------------|--------------------------|
| 一氧化氮合酶 iNOS | F: GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA | 23 |
| | R: GTGGACGGTCGATGTCAC | 19 |
| 单核细胞趋化蛋白 1 CCL2 | F: GAGATGCCTCAGCAGAGTGAAGA | 24 |
| | R: AGGCTTGCCAACCCAGGTAAC | 21 |
| 精氨酸酶-1 Arg-1 | F: CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG | 22 |
| | R: AGGAGCTGTCTATTAGGACATC | 22 |
| 类几丁质酶样蛋白 YM1 | F: AGAAGGAGTTTCAAACCTGGT | 22 |
| | R: GTCTTGCTCATGTGTAAAGTGA | 23 |
| 内参 β -actin | F: AGAAGCTGTGCTATGTTGCTCTA | 23 |
| | R: AAGGCTGAAAAGAGCCTCAG | 21 |

1.3.4 存取组织标本

小鼠取材前 12 h 禁食禁水, 4% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 留取血液标本, 冰生理盐水进行心脏灌注, 分离肝、脾等脏器, 迅速剥离小鼠完整胸腹主动脉, 并尽量保留主动脉弓、头臂干、左侧颈总动脉、左锁骨下动脉, 部分用 4% 多聚甲醛固定, 剩余保存于 -80 °C 冰箱中, 用于进行后续实验。

1.3.5 油红 O 染色

将分离后的主动脉在体式显微镜下剔除主动脉管腔外的脂肪组织及外膜, 室温固定漂洗后, 将主动脉沿管腔剪开, 60% 异丙醇中浸洗 3 s 后将主动脉浸没于 0.3% 油红 O 工作液中密闭孵育 10 min, 将主动脉平铺于显微镜下拍照。

1.3.6 HE 染色

组织切片脱蜡后滴加苏木素染色液染色 10 min, 流动水冲洗后, 滴加分化液分化 30 s, 自来水浸洗 3 次, 伊红染色液染色 30 s, 镜检观察染色情况。中性树胶封片。在显微镜下进来暴露完整主动脉根部组织, 观察各组小鼠主动脉根部斑块病理情况。

1.3.7 荧光定量 PCR 检测各组小鼠巨噬细胞极化因子 mRNA 的表达水平

剪取主动脉组织或收集各组细胞后, 提取并检测各组总 RNA 纯度及浓度, 逆转录为 cDNA。分别加入上下游引物、TB GREEN 等进行检测, 空白组做参照, β -actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。引物序列由上海生工提供, 见表 1。

1.3.8 Western blot 检测各组小鼠 iNOS、Arg-1、P-STAT3/STAT3 蛋白表达水平

剪取适量主动脉组织置于离心管, 或细胞培养板内每孔加入 80 μ L 裂解液 (RIPA 裂解液: PMSF = 100 : 1) 和磷酸酶抑制剂, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 以 120 V 恒压垂直电泳 20 min, 240

V 恒压电泳 30 min 电泳跑胶, 恒定电流 0.24 A 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 转膜 1 h。5% 脱脂奶粉溶液中室温摇床封闭 1 h 后孵育抗体并显影。一抗比例如下: iNOS (1 : 2000)、Arg-1 (1 : 2000)、P-STAT3 (1 : 1500)、STAT3 (1 : 2000)、 β -actin (1 : 4000)、二抗 (1 : 4000)。

1.4 统计学方法

GraphPad Prism 8.1 软件对所有实验数据进行统计分析和作图, 实验结果以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 方式呈现。数据分析多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FXG 对小鼠主动脉斑块面积的影响

油红 O 染色结果如图 1A 所示, 与模型组比较, FXG 干预后明显减少了主动脉中斑块总面积, 减轻病变程度 ($P < 0.05$)。图 1B 中 HE 染色显示, 与模型组比较, FXG 组管腔狭窄程度降低。

2.2 FXG 对小鼠主动脉组织极化因子 mRNA 表达量的影响

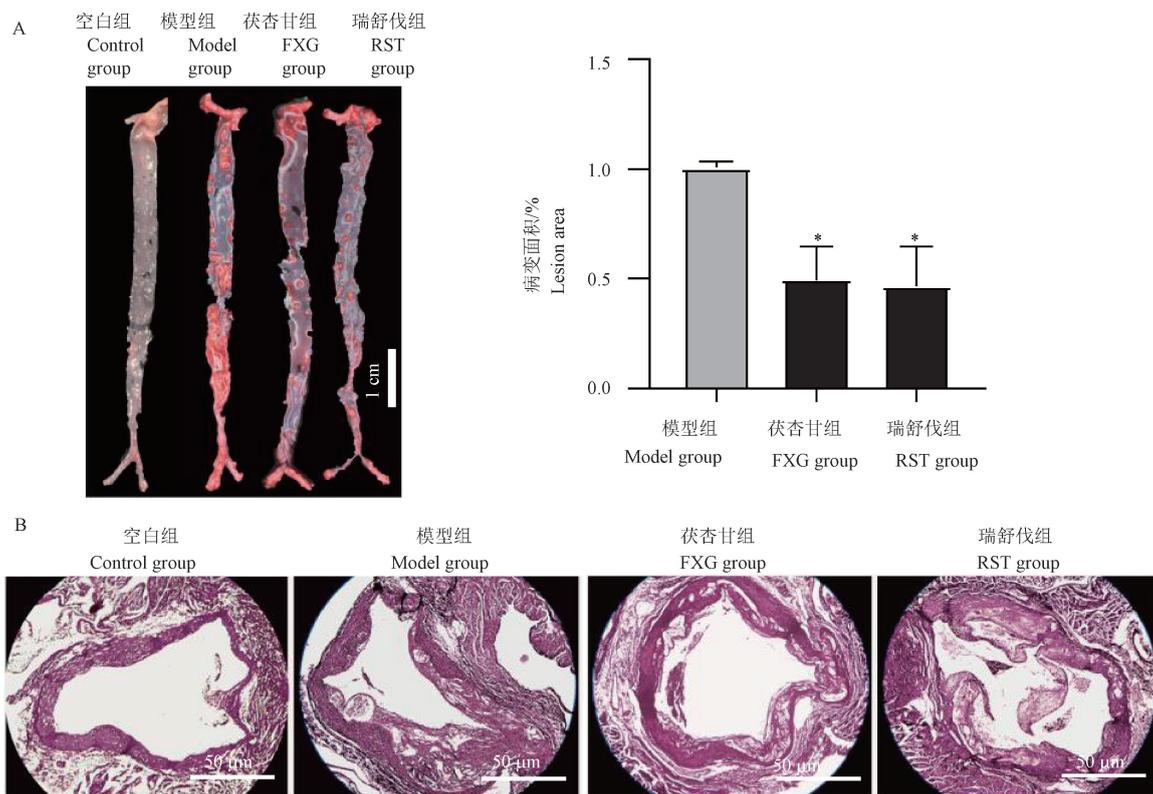
如图 2 所示, 极化因子表达水平可以反映 FXG 对巨噬细胞极化的调控作用, 与模型组比较, FXG 组 M1 型巨噬细胞极化因子 iNOS、CCL2 mRNA 表达水平降低, M2 型极化因子 Arg-1、YM1 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$)。

2.3 FXG 对小鼠主动脉组织极化因子蛋白表达量的影响

如图 3 所示, 与模型组比较, FXG 干预后小鼠主动脉斑块内 iNOS 蛋白表达水平明显降低, M2 型巨噬细胞标志蛋白 CD206 和极化因子 Arg-1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。

2.4 FXG 对 STAT3 磷酸化水平的影响

多项研究表明 STAT3 为驱动 M2 型巨噬细胞极化和抑制炎症反应的关键途径^[13-14]。因此, 为探索 FXG 调节巨噬细胞极化因子的作用是否与 STAT3 激活有关, 分别在体内外检测了 STAT3 及其磷酸化蛋白表达水平。如图 4A、4B 所示, 与空白组比较,



注: A: 小鼠主动脉油红 O 染色及斑块面积统计; B: 小鼠主动脉根部斑块 HE 染色。与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠主动脉组织病理变化 (HE, $n = 3$)

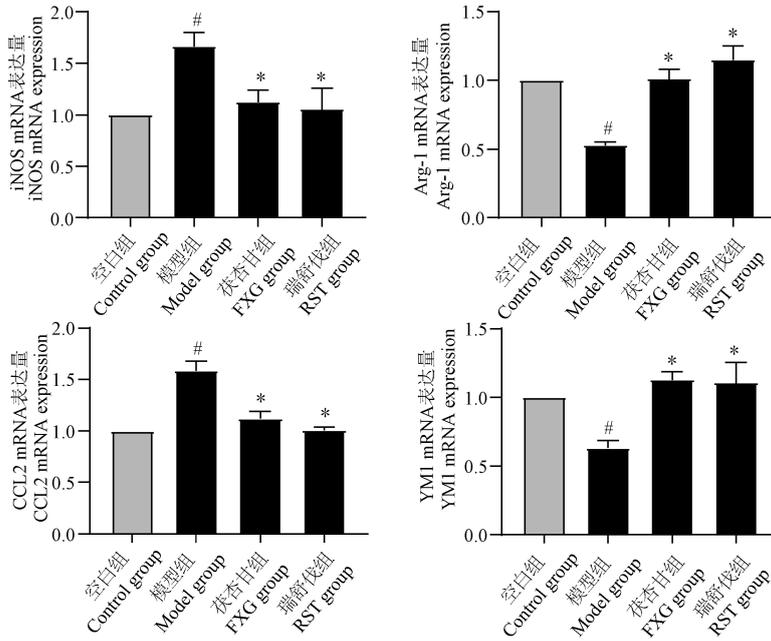
Note. A, Mouse aortic Oil red O staining and plaque area statistics. B, HE staining of mouse aortic root plaques. Compared with the Model group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Pathological changes in aortic tissue of mice in each group (HE, $n = 3$)

AS 小鼠和 M1 型巨噬细胞模型组的 STAT3 磷酸化水平均明显降低 ($P < 0.05$), 而经 FXG 干预后 STAT3 磷酸化水平在体内外均有所回升 ($P < 0.05$)。

2.5 FXG 对 STAT3 磷酸化水平和极化因子 iNOS、Arg-1 的表达量的影响

如图 5 所示, 进一步利用 STAT3 抑制剂 Stattic

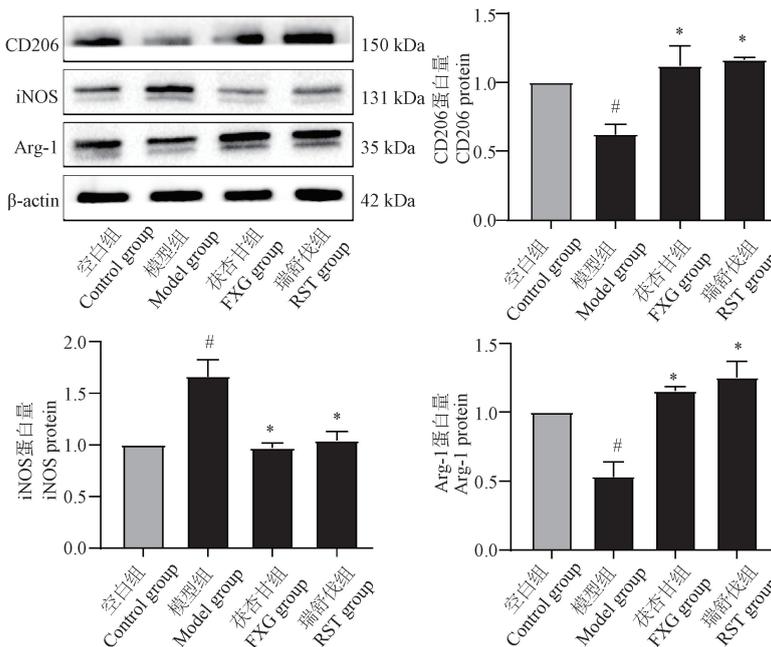


注: 与空白组比较, $\#P < 0.05$; 与模型组比较, $*P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠主动脉组织内巨噬细胞极化因子的 mRNA 表达水平 ($n = 3$)

Note. Compared with the Control group, $\#P < 0.05$. Compared with the Model group, $*P < 0.05$.

Figure 2 mRNA expression levels of macrophage polarization factor in the aortic tissues of mice in each group

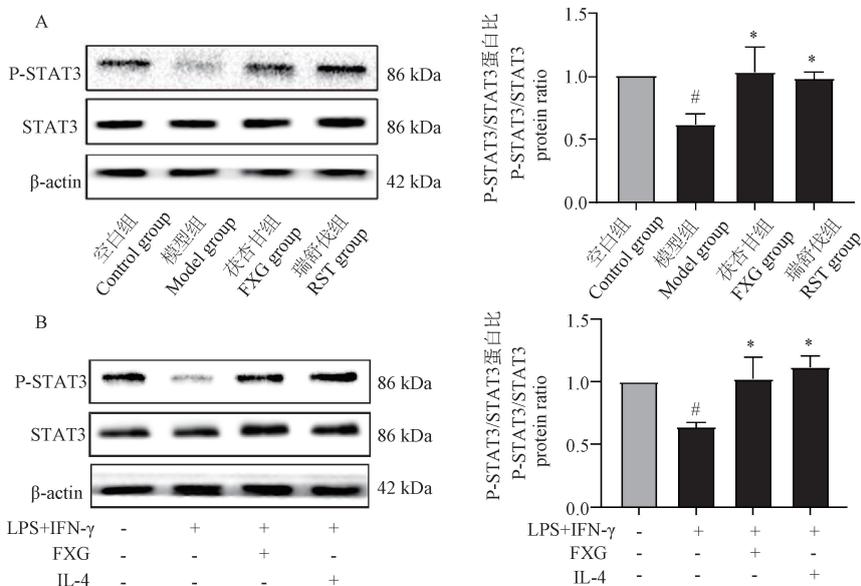


注: 与空白组比较, $\#P < 0.05$; 与模型组比较, $*P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠主动脉组织内巨噬细胞极化因子的蛋白表达水平 ($n = 3$)

Note. Compared with the Control group, $\#P < 0.05$; Compared with the Model group, $*P < 0.05$.

Figure 3 Protein expression levels of macrophage polarization factor in the aortic tissue of mice in each group

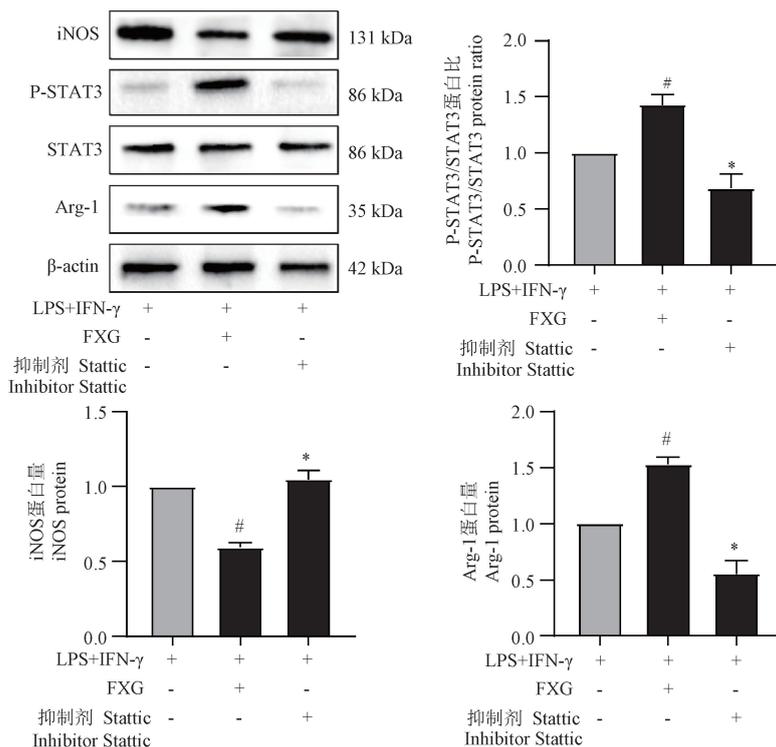


注:A;Western blot 检测小鼠主动脉组织内 P-STAT3/STAT3 蛋白表达水平;B;Western blot 检测 RAW264.7 巨噬细胞内 P-STAT3/STAT3 蛋白表达水平。与空白组比较, # $P<0.05$;与模型组比较, * $P<0.05$ 。

图 4 各组小鼠主动脉斑块和 RAW264.7 巨噬细胞内 iNOS、Arg-1 和 P-STAT3/STAT3 蛋白表达水平 ($n=3$)

Note. A, Western blot detection of P-STAT3/STAT3 protein expression levels in mouse aortic tissue. B, Western blot detection of P-STAT3/STAT3 protein expression levels in RAW264.7 macrophages. Compared with the Control group, # $P<0.05$. Compared with the Model group, * $P<0.05$.

Figure 4 Expression levels of iNOS, Arg-1, and P-STAT3/STAT3 proteins in aortic plaques and RAW264.7 macrophages of mice in each group



注:与 LPS+IFN-γ 组比较, # $P<0.05$;与 FXG 组比较, * $P<0.05$ 。

图 5 各组 RAW264.7 巨噬细胞内 iNOS、Arg-1 和 P-STAT3/STAT3 蛋白表达水平 ($n=3$)

Note. Compared with the LPS+IFN-γ group, # $P<0.05$. Compared with the FXG group, * $P<0.05$.

Figure 5 Expression levels of iNOS, Arg-1, and P-STAT3/STAT3 proteins in RAW264.7 macrophages of each group

对茯苓杏仁甘草汤治疗后的 RAW264.7 巨噬细胞进行处理,发现与 FXG 组比较,Stattic 组抑制 P-STAT3 表达($P<0.05$),同时升高 iNOS 表达水平,降低了 Arg-1 表达水平($P<0.05$),提示 FXG 抑制 iNOS 和促进 Arg-1 表达水平的作用随着 P-STAT3 表达被抑制而消除。

3 讨论

巨噬细胞在 AS 病变过程中主要极化为 M1 表型 M2 表型^[15],其中 M1 型巨噬细胞介导炎症反应,促进 iNOS、CCL2 等促炎因子产生,加剧 AS 慢性炎症状态^[16]。而 M2 型巨噬细胞释放 Arg-1、YM1 等因子,促进受损血管修复^[17],降低胆固醇积累,发挥抗 AS 和稳定斑块的作用^[18]。AS 斑块的进展和稳定性取决于浸润巨噬细胞的数量、极化状态以及不同表型巨噬细胞的比例^[19],通过靶向调控巨噬细胞极化状态成为防治 AS 的重要途径。

AS 归属于中医学“胸痹”范畴,M1 型和 M2 型巨噬细胞在 AS 中的作用与阴阳的对立制约、相互转化关系相似^[20],调节巨噬细胞极化,维持其表型比例平衡是 AS 防治的重要思路。许多应用于炎症性疾病的中药被证明具有调控巨噬细胞极化的作用^[21]。茯苓杏仁甘草汤由茯苓、杏仁、甘草三味药组成,现代研究表明,茯苓三萜提取物制造的透明质酸水凝胶能够调控 M2 型巨噬细胞极化,从而抑制炎症反应^[22]。羧甲基茯苓多糖可以增强巨噬细胞吞噬功能,降低其 CCL2 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 分泌水平,刺激巨噬细胞向 M2 型极化^[23]。苦杏仁苷抑制巨噬细胞白细胞介素(interleukin, IL)-6、TNF- α 的表达水平,增加 IL-10 表达水平,抑制 AS 病变进展^[24]。从甘草中提取的类黄酮异甘草素^[25]和 GLA^[26]被证明具有抗炎、抗氧化活性的作用,降低 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平,增加 M2 细胞因子 IL-10 和 TGF- β 表达水平,减少化疗药物引起的心脏毒性。总之,茯苓、杏仁、甘草的单体及其有效成分均被证明具有抑制 AS 和调控巨噬细胞极化的作用。团队前期研究也表明,FXG 能够减少 AS 小鼠主动脉斑块面积,降低其体重并改善血脂水平,抑制 AS 小鼠血清炎症因子水平^[8-9]。本研究结果提示,FXG 通过降低 iNOS、CCL2 表达水平,升高 Arg-1、YM1、CD296 表达水平,抑制 M1 型巨噬细胞极化,促进 M2 型巨噬细胞极化,从而减少斑块面积,抑制 AS 进展。

AS 的主要病理因素是血管壁内持续的慢性炎症反应。STAT3 在炎症反应和免疫控制中起着关键作用,过度激活或失活都会导致人类疾病^[27]。IL-10 和 IL-4 可以通过酪氨酸磷酸化 STAT3,提高其活性,抑制促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-12 和 IFN- γ 的水平,促进巨噬细胞向 M2 型极化,释放抗炎性和修复性细胞因子 IL-10、TGF- β 、Arg-1、血管内皮生长因子等,加速炎症消退、参与修复和重塑受损组织,发挥保护血管和抗 AS 作用^[28-29]。有研究报道,Wnt3a 通过激活 STAT3,响应 IL-4 诱导 M2 型巨噬细胞极化,从而促进小鼠 AS 斑块消退^[30]。白藜芦醇激活 STAT3 通路,抑制 NF- κ B 活性,从而抑制 M1 型巨噬细胞,增加 M2 型巨噬细胞,抑制 LPS 诱导的小鼠疾病发展^[31]。与这些研究一致,本研究结果表明 FXG 促进巨噬细胞向 M2 表型极化,并能升高 STAT3 磷酸化水平。随后探索了 FXG 调控巨噬细胞极化与调控 STAT3 磷酸化水平是否存在作用关系。结果表明,在使用 STAT3 抑制剂后,FXG 降低 iNOS、升高 Arg-1 的作用伴随 P-STAT3 水平降低而消除,提示 FXG 是通过调节 STAT3 活性来发挥调控巨噬细胞极化作用的。

综上所述,FXG 可减少 AS 斑块形成,其作用机制与促进 P-STAT3 表达水平从而调控巨噬细胞向 M2 表型转换有关。本研究结果揭示了中药复方在治疗 AS 这类复杂疾病时的优势,为临床应用 FXG 及研发 AS 等慢性炎症疾病的治疗性药物提供了实验依据,但其具体调控机制还有待进一步阐明。

参考文献:

- [1] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2022, 145(8): e153-e639.
- [2] TABAS I, BORNFELDT K E. Intracellular and intercellular aspects of macrophage immunometabolism in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2020, 126(9): 1209-1227.
- [3] MURRAY P J. Macrophage polarization [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 541-566.
- [4] LEE S G, OH J, BONG S K, et al. Macrophage polarization and acceleration of atherosclerotic plaques in a swine model [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193005.
- [5] WANG G, LIU X, LI X, et al. Suppression of PAPP-a mitigates atherosclerosis by mediating macrophage polarization via STAT3 signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 543: 29-37.
- [6] 陈新宇,文凯,蔡虎志,等. 茯苓杏仁甘草汤合橘枳姜汤对

- 急性心肌缺血大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(3): 165-168.
- CHEN X Y, WEN K, CAI H Z, et al. Effect of decoction of *Poria Cocos*, *Semen Armeniacae Amarum*, and *Radix Glycyrrhizae* combined with decoction of tangerine peel, immature bitter orange, and fresh ginger on cardiomyocyte apoptosis in rats with acute myocardial ischemia [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2016, 32(3): 165-168.
- [7] 陈新宇, 姜玲, 张世鹰, 等. 茯苓杏仁甘草汤合橘枳姜汤对异丙肾上腺素致急性心肌梗死大鼠的保护作用研究 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(5): 753-755, 851.
- CHEN X Y, JIANG L, ZHANG S Y, et al. The antioxidant protection research on combined Fuling Xingren Gancao Tang and juzhijiang Tang on rats with isoprenaline leading acute myocardial ischemia [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2016, 25(5): 753-755, 851.
- [8] 曹盼夏. 基于 PPAR γ 探讨茯苓杏仁甘草汤调控动脉粥样硬化脂质代谢的作用机制 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2022.
- CAO P X. Based on PPAR γ , the mechanism of Fuling almond licorice decoction in regulating lipid metabolism of atherosclerosis was discussed [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2022.
- [9] 葛鸾蝶. 茯苓杏仁甘草汤通过调控 SIRT1/NF- κ B 信号通路干预动脉粥样硬化炎症反应的作用 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2022.
- GE L D. Effect of Fuling almond licorice decoction on the inflammatory reaction of atherosclerosis by regulating SIRT1/NF- κ B signaling pathway [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2022.
- [10] LI Y, ZHANG C G, WANG X H, et al. Progression of atherosclerosis in ApoE-knockout mice fed on a high-fat diet [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(18): 3863-3867.
- [11] 陈慧, 郑乐民, 郭延松, 等. 常见大、小鼠实验性心血管病模型专家共识 [J]. 中华高血压杂志, 2022, 30(8): 710-719.
- CHEN H, ZHENG L M, GUO Y S, et al. Expert consensus on common large and mouse experimental cardiovascular disease models [J]. Chin J Hypertens, 2022, 30(8): 710-719.
- [12] LI X, ZHANG Y, PEI W, et al. LncRNA Dnmt3as regulates Dnmt3a expression leading to aberrant DNA methylation in macrophage polarization [J]. FASEB J, 2020, 34(4): 5077-5091.
- [13] EL KASMI K C, SMITH A M, WILLIAMS L, et al. Cutting edge: a transcriptional repressor and corepressor induced by the STAT3-regulated anti-inflammatory signaling pathway [J]. J Immunol, 2007, 179(11): 7215-7219.
- [14] 邓凌志. 冠心病患者外周血 M₂ 巨噬细胞水平变化及其极化的相关信号通路 [D]. 衡阳: 南华大学, 2016.
- DENG L Z. Changes of M₂ macrophages in peripheral blood of patients with coronary heart disease and related signal pathways of polarization [D]. Hengyang: University of South China, 2016.
- [15] BARRETT T J. Macrophages in atherosclerosis regression [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(1): 20-33.
- [16] COLIN S, CHINETTI-GBAGUIDI G, STAEELS B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis [J]. Immunol Rev, 2014, 262(1): 153-166.
- [17] BI Y, CHEN J, HU F, et al. M2 macrophages as a potential target for antiatherosclerosis treatment [J]. Neural Plast, 2019, 2019: 6724903.
- [18] RAHMAN K, VENGRENYUK Y, RAMSEY S A, et al. Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression [J]. J Clin Invest, 2017, 127(8): 2904-2915.
- [19] ESHGHJOO S, KIM D M, JAYARAMAN A, et al. Macrophage polarization in atherosclerosis [J]. Genes, 2022, 13(5): 756.
- [20] 刁雅静, 洗绍祥. 从中医阴阳学说论巨噬细胞极化在动脉粥样硬化中的作用 [J]. 世界中医药, 2023, 18(6): 823-827.
- DIAO Y J, XIAN S X. Role of macrophage polarization in atherosclerosis based on the Yin and Yang theory of traditional Chinese medicine [J]. World Chin Med, 2023, 18(6): 823-827.
- [21] 曹云祥, 刘健, 陶艳红, 等. 新风胶囊通过调控巨噬细胞极化改善活动期类风湿关节炎患者炎症反应及生活质量的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(9): 1466-1470, 1473.
- CAO Y X, LIU J, TAO Y H, et al. Study on Xinfeng Capsule improving inflammatory response and life quality in patients with active rheumatoid arthritis by regulating macrophage polarization [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2022, 28(9): 1466-1470, 1473.
- [22] DING X, LI S, TIAN M, et al. Facile preparation of a novel nanoemulsion based hyaluronic acid hydrogel loading with *Poria cocos* triterpenoids extract for wound dressing [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 226: 1490-1499.
- [23] 廖海锋, 邓向亮, 罗霞, 等. 羧甲基茯苓多糖对巨噬细胞极化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 122-126.
- LIAO H F, DENG X L, LUO X, et al. Effects of carboxymethylpachyman on polarization of macrophages [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(13): 122-126.
- [24] WANG Y, JIA Q, ZHANG Y, et al. Amygdalin attenuates atherosclerosis and plays an anti-inflammatory role in ApoE knock-out mice and bone marrow-derived macrophages [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 590929.
- [25] SUN J, ZHANG Q, YANG G, et al. The licorice flavonoid isoliquiritigenin attenuates *Mycobacterium tuberculosis*-induced inflammation through Notch1/NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 294: 115368.
- [26] HUANG K, LIU Y, TANG H, et al. Glabridin prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through gut microbiota modulation and colonic macrophage polarization in mice [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 107.
- [27] HILLMER E J, ZHANG H, LI H S, et al. STAT3 signaling in

- immunity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 31: 1-15.
- [28] AZEMI A K, MOKHTAR S S, SHARIF S E T, et al. *Clinacanthus nutans* attenuates atherosclerosis progression in rats with type 2 diabetes by reducing vascular oxidative stress and inflammation [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 1432-1440.
- [29] QIAN Z, YANG H, LI H, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway attenuates the development of atherosclerosis in *Apoe*^{-/-} mice through modulating macrophage functions [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(9): 1150.
- [30] WEINSTOCK A, RAHMAN K, YAACOV O, et al. Wnt signaling enhances macrophage responses to IL-4 and promotes resolution of atherosclerosis [J]. *eLife*, 2021, 10: e67932.
- [31] ZHANG J, HUANG F, CHEN L, et al. Sodium lactate accelerates M2 macrophage polarization and improves cardiac function after myocardial infarction in mice [J]. *Cardiovasc Ther*, 2021, 2021: 5530541.

[收稿日期]2024-06-20



一种动物联合模型测定生长猪在不同粗纤维水平下大肠挥发性脂肪酸的净吸收量

厌氧微生物在动物胃肠道中发酵一系列碳水化合物从而生成有机酸和气体等产物,而单胃动物主要在大肠(盲肠、结肠)中进行微生物厌氧发酵产生挥发性脂肪酸(VFAs)和乳酸等。有研究发现:猪大肠利用发酵产生的 VFAs 能满足自身约 5%~20% 的能量维持需求,除此之外,这部分 VFAs 还为动物肠道和动物健康提供营养。然而,大肠内微生物发酵生成 VFAs 的产量和模式会受到多种因素的影响,如何监控大肠内产生的内源性 VFAs 情况是一大难点问题,这也是难以对动物进行精准营养调控的原因。

基于上述背景,武汉轻工大学-湖北省动物营养与饲料科学重点实验室赵胜军团队研究构建“血管瘘-肠瘘”结合“同位素标记法”的动物联合模型,测定生长猪在不同粗纤维水平下大肠 VFAs 的净吸收量情况。其中为动态检测 VFAs 吸收情况采用手术造肠系膜、门静脉和股左动脉血管瘘,来测定单位时间门静脉对 VFAs 的吸收量。为消除前肠道以及外源性 VFAs 的干扰,手术构建回肠瘘管并在测定期间灌注碳 13 标记的 VFAs (¹³C-VFAs),通过检测门静脉血液和大肠组织中¹³C-VFAs 含量来计算大肠对 VFAs 的动态净吸收量。

总的来说,本研究构建了一种新方法探索动物大肠对 VFAs 的净吸收量,对精准监控大肠的营养吸收提供了新的思路并为进一步的研究奠定了基础。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(4):375-380. <http://doi:10.1002/ame2.12329>)。