

养阴活血方对高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-} 小鼠 Treg/Th17 失衡及动脉粥样硬化的影响

周李煜, 马元婧, 孙玉婷, 陈韦凯, 邱润泽, 袁冬平*, 龙 军**

(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

摘要 探讨养阴活血方(YHF)对高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-} 小鼠 Treg/Th17 失衡及动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的影响。小鼠给予高脂饮食诱导 AS, YHF 低剂量(18 g/kg, 以生药计)、YHF 高剂量(36 g/kg, 以生药计)灌胃给药 20 周进行干预。油红 O 脂肪染色法观测主动脉斑块面积变化;生化分析血脂水平;流式细胞术检测外周血 Treg、Th17 比例;荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)、免疫组化(IHC)及 Western blot 检测主动脉 Foxp3、ROR γ t mRNA 及蛋白表达。分离小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞并用 anti-CD3/CD28 活化,再经 LPS 刺激和 YHF 干预后,qRT-PCR 与免疫荧光(IF)检测 CD4⁺ T 细胞 Foxp3、ROR γ t 表达。结果显示,YHF 显著减小主动脉斑块面积,降低血脂水平,增加 Treg/Th17 比值;上调主动脉 Foxp3 表达而下调 ROR γ t 表达;且在体外上调 CD4⁺ T 细胞 Foxp3 表达而下调 ROR γ t 表达。本研究表明,YHF 可以调节高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-} 小鼠 Treg/Th17 比例失衡,减弱 LPS 对 CD4⁺ T 细胞的炎性刺激影响,从而改善 AS。

关键词 养阴活血方;动脉粥样硬化;ApoE^{-/-} 小鼠;调节性 T 细胞;辅助性 T 细胞 17

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)01-0060-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200110

引用本文 周李煜,马元婧,孙玉婷,等. 养阴活血方对高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-} 小鼠 Treg/Th17 失衡及动脉粥样硬化的影响[J]. 中国药科大学学报,2020,51(1):60-67.

Cite this article as: ZHOU Liyu, MA Yuanjing, SUN Yuting, et al. Effects of Yangyin Huoxue Prescription on the imbalance of Treg/Th17 and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice induced by high-fat diet [J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(1): 60–67.

Effects of Yangyin Huoxue Prescription on the imbalance of Treg/Th17 and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice induced by high-fat diet

ZHOU Liyu, MA Yuanjing, SUN Yuting, CHEN Weikai, QIU Runze, YUAN Dongping*, LONG Jun**

School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract Atherosclerosis (AS), characterized with the accumulation of lipids on the vessel wall, is an immune-related inflammatory disease which promotes the progression of cardiovascular diseases (CVD). The imbalance of Treg/Th17 accelerates the progression of AS. Yangyin Huoxue Prescription (YHF) is an efficient traditional Chinese medicine used in the treatment of AS, but the effects of YHF on the balance of immunity have still not been clarified. This project was designed to investigate the effects of YHF on the imbalance of Treg/Th17 and AS in ApoE^{-/-} mice induced by high-fat diet (HFD). ApoE^{-/-} mice were given HFD to induce AS and administered low-dose YHF (18 g/kg) or high-dose YHF (36 g/kg) for 20 weeks. Atherosclerotic plaque area was analyzed by oil red O staining. Serum lipids were measured by biochemical kits. Treg or Th17 cells in peripheral blood were detected by flow cytometry. mRNA and protein expression of Foxp3 and ROR γ t of aortas were determined by qRT-PCR, Western blot and immunohistochemistry. Splenic CD4⁺ T cells of mice were isolated and activated by anti-CD3/CD28, and then treated with lipopolysaccharide (LPS) and YHF. The expres-

收稿日期 2019-11-15 通信作者 * Tel:13851440628 E-mail: annieyuan99@163.com

** Tel:13851850016 E-mail: long_ydp@aliyun.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81973823, No. 81573929)

sion of mRNA and protein of Foxp3 and ROR γ t were detected by qRT-PCR and immunofluorescence. It was found that YHF reduced the plaque area, decreased lipid level and increased the ratio of Treg cells in peripheral blood. Moreover, YHF increased mRNA or protein expression of Foxp3 in aortas *in vivo* or CD4⁺T cells *in vitro* while decreasing mRNA or protein expression of ROR γ t. These results suggested that YHF can regulate the imbalance of Treg/Th17 in ApoE^{-/-} mice induced by HFD, and reduce the inflammatory stimulation of LPS on CD4⁺T cells, thereby improving AS.

Key words Yangyin Huoxue Prescription; atherosclerosis; ApoE^{-/-} mice; Treg; Th17

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81973823, No. 81573929)

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)以血管内脂质沉积为特点,是多种心脑血管疾病的发病基础^[1]。自 Ross^[2]提出 AS 的炎症免疫学说以来,炎症和免疫在 AS 发展中的作用受到越来越多的重视^[3]。脂质与炎症共同参与 AS 疾病进程,同时免疫平衡的破坏也加剧了 AS 的发展,其中 CD4⁺T 细胞亚群调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)和辅助性 T 细胞 17(helper T cell 17, Th17)之间的平衡已被证实是影响 AS 发生发展的重要因素^[4]。脂质、炎症以及免疫平衡三者 AS 中相互影响,是促进 AS 发病的关键环节。

养阴活血方(YHF)源自江苏省名老中医唐蜀华教授,已于临床治疗 AS 多年,疗效显著。YHF 由何首乌、黄精、红花、姜黄、漏芦以及虎杖六味中药组成,对 AS 阴虚淤热的特点综合发挥补益肝肾、活血化瘀、清热解毒的功效^[5]。YHF 对 AS 的积极作用已在家兔、大鼠 AS 模型中得到充分证实,并已发现调节脂质、保护血管内皮功能以及抑制炎症是其发挥功效的重要途径^[6]。

本课题组前期在高脂饮食诱发的 ApoE^{-/-}小鼠 AS 模型中发现,YHF 可以改善 AS 症状,减轻炎症水平,并上调外周血 Treg 比例^[7],由此推测 YHF 在调节 AS 小鼠 Treg/Th17 平衡中具有一定影响。本研究在此模型上进一步观察 YHF 对 AS 小鼠 Treg/Th17 平衡的影响。此外,观察 YHF 对 LPS 刺激的 CD4⁺T 细胞中 Treg 和 Th17 细胞特征性转录因子 Foxp3 和 ROR γ t 表达的影响。由此分析脂质、炎症以及 Treg/Th17 免疫失衡对 ApoE^{-/-}小鼠 AS 发病的影响以及 YHF 的干预作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

养阴活血方配方组成:片姜黄、红花、漏芦、虎

杖、制何首乌、酒黄精。养阴活血方的制备及有效成分检测见前期报道^[8];辛伐他汀(河南天方药业有限公司);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)与高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)生化试剂盒(南京建成生物技术研究);油红 O 粉末(北京索莱宝科技有限公司);抗小鼠 CD4 FITC 抗体、抗小鼠 CD25 PE 抗体、抗小鼠 Foxp3 eFluor 660 流式抗体(美国 eBioscience 公司);TRIzol 试剂、反转录试剂盒、Master Mix-LR qRT-PCR 染料法试剂盒(美国 Ambion 公司);Foxp3 兔抗鼠多克隆抗体、ROR γ t 兔抗鼠多克隆抗体(英国 Abcam 公司);小鼠 CD4⁺T 细胞阴选试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司),其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

Infinite M200PRO 酶标仪(瑞士 Tecan 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);Nano-Drop One 微量紫外-可见分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司);Veriti 96-Well Thermal Cycler 梯度反转录 PCR 仪、7500 荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司);Western 电泳仪、GelDoc XR + 全自动凝胶成像仪(美国 Bio-rad 公司);石蜡包埋机(日本 Tissue-TEK 公司);蔡司倒置荧光显微镜(德国 Zeiss 公司);5417R 冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 动物

ApoE^{-/-}小鼠,雄性,6~8周,18~22g,购自北京维通利华实验动物有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。饲养于南京中医药大学实验动物中心,实验动物使用许可证:SYXK(苏)2014-0001。C57BL/6 小鼠,雄性,18~20g,购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场,许可证号:SCXK(苏)2017-

0001。动物实验符合动物伦理委员会标准。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

ApoE^{-/-}小鼠分为正常组、模型组、辛伐他汀组、YHF低剂量组、YHF高剂量组,每组16只。正常组普通饲料喂养,其余各组给以高脂饲料(含1.25%胆固醇,20%猪油)。辛伐他汀组给予辛伐他汀(3.3 mg/kg),YHF低剂量组给予YHF(18 g/kg,以生药计),高剂量组给予YHF(36 g/kg,以生药计),灌胃给药20周。

2.2 细胞获取与处理

无菌分离小鼠脾脏,研磨成单细胞悬液,红细胞裂解液裂解红细胞,离心并清洗后,参照CD4⁺T细胞分离试剂盒说明获取CD4⁺T细胞,加入4 μg/mL抗小鼠CD28抗体、6 μg/mL抗小鼠CD3抗体,37℃,5% CO₂条件下培养。

除对照组以外的其余各组细胞中加入0.1 μg/mL脂多糖(LPS)以在体外模拟炎性微环境,同时给药组加入1,2,4 mg/L的YHF水提液,培养24 h后进行后续检测。

2.3 主动脉斑块面积测定与血脂检测

分离主动脉,油红O脂肪染色。MapInfo 7.0(美国,www.mapinfo.com)软件测量主动脉斑块面积,计算斑块占血管总面积比。血脂检测按照试剂盒说明书步骤操作,非高密度脂蛋白胆固醇(non-high density lipoprotein cholesterol, non-HDL-C) = TC - HDL-C。

2.4 流式细胞术检测外周血Treg、Th17比例

淋巴细胞分离液获取总淋巴细胞,固定缓冲液固定并用破膜缓冲液处理样本。用于检测CD4⁺IL-17A⁺Th17细胞的样本加用佛波酯处理以刺激IL-17A分泌。相应抗体孵育后检测。

2.5 qRT-PCR检测主动脉组织/小鼠脾脏CD4⁺T细胞Foxp3和RORγt mRNA表达

TRIzol法提取总RNA。qRT-PCR操作及反应条件按试剂盒说明书,引物委托上海生工合成,引物信息见表1。数据按2^{-ΔΔCt}法(内参GAPDH)分析。

2.6 免疫组化检测主动脉Foxp3、RORγt蛋白表达

石蜡包埋小鼠主动脉,切片,Foxp3、RORγt抗体孵育后,加二抗溶液孵育;按IHC实验步骤处

理,最后于光学显微镜下进行观察和图像采集。

Table 1 Primers used in qRT-PCR and the sequences

Gene		Sequence(5'→3')
GAPDH	Forward	CAGTATGACTCCACTCACGGCAA
	Reverse	CTCGCTCCTGGAAGATGGTGAT
Foxp3	Forward	CACCTATGCCACCCTTATCCG
	Reverse	CATGCGAGTAAACCAATGGTAGA
RORγt	Forward	TGCAAGACTCATCGACAAGG
	Reverse	AGGGGATTCAACATCAGTGC

2.7 Western blot检测主动脉Foxp3和RORγt蛋白表达

RIPA裂解液提取蛋白,BCA法蛋白定量后,加入Loading buffer,沸水浴5 min完成蛋白变性。样品以30 μg的上样量进行电泳。转膜,封闭,分别用一抗、二抗孵育,全自动凝胶成像仪获取条带图像,Image Lab 4.0.1软件分析。

2.8 免疫荧光法观察小鼠脾脏CD4⁺T细胞Foxp3、RORγt蛋白表达

收集培养的细胞,滴在预冷的多聚赖氨酸包被玻片后置于细胞孵箱2~3 h,按免疫荧光实验步骤处理加一抗、二抗。荧光显微镜观察拍照。

2.9 统计学处理

数据采用SPSS 17.0软件进行双侧t检验或One-Way ANOVA分析,GraphPad Prism 5.02软件制图,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 YHF对ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块及血脂水平的影响

与正常组相比,模型组小鼠主动脉斑块显著增多,且主动脉弓处尤为明显($P < 0.01$,图1-A和图1-B)。与模型组相比,YHF低、高剂量组小鼠主动脉斑块面积明显减小($P < 0.05$)。YHF对AS小鼠血脂水平具有调节作用。与正常组相比,模型组小鼠TC、TG、LDL-C与non-HDL-C水平升高,HDL-C水平下降($P < 0.05$,图1-C)。与模型组相比,YHF低剂量降低TG水平,升高HDL-C水平;YHF高剂量则降低TC、TG与non-HDL-C水平并升高HDL-C水平($P < 0.05$)。结果表明,YHF能够降低血脂水平,减少高脂饮食所致ApoE^{-/-}小鼠的AS斑块形成。

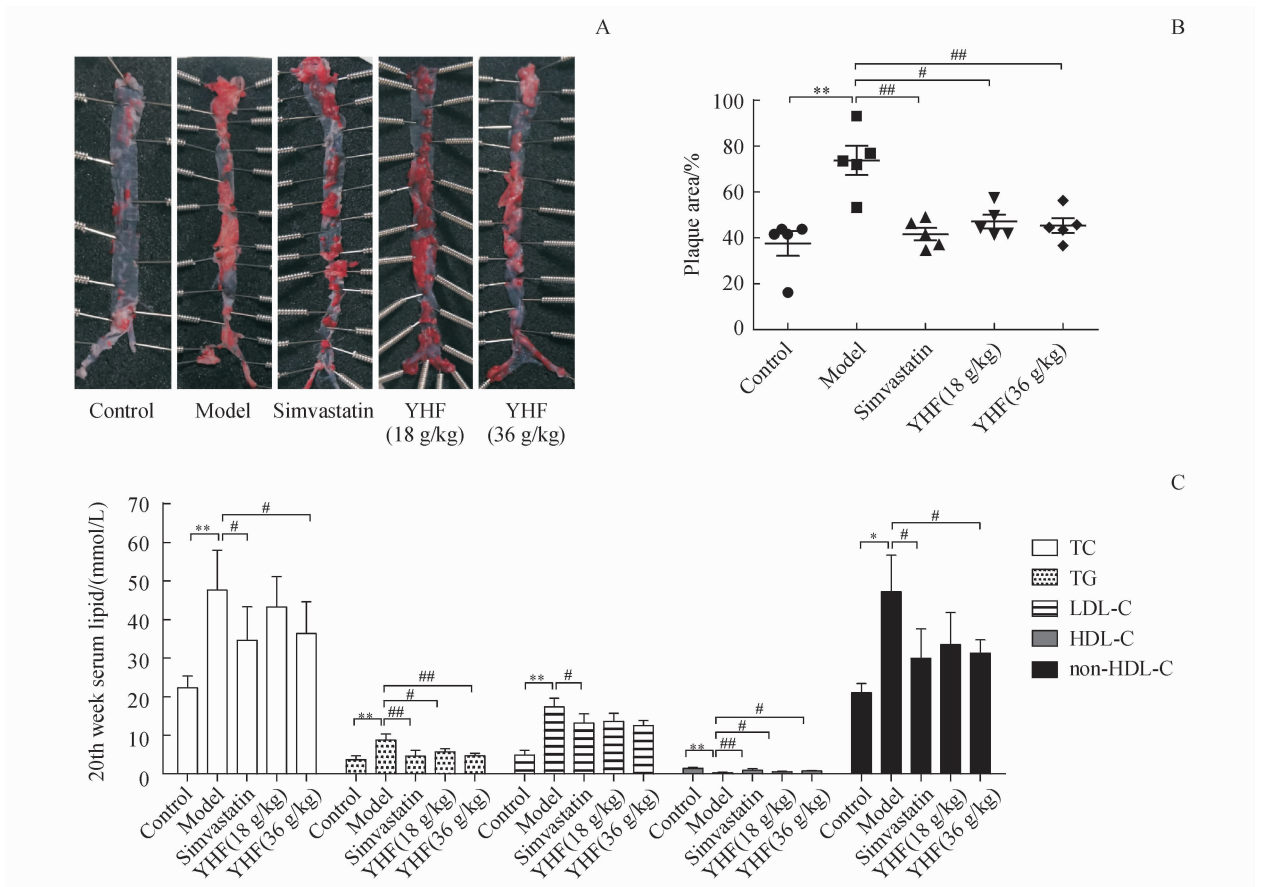


Figure 1 Effects of Yangyin Huoxue Prescription (YHF) on atherosclerotic plaque area and serum lipids level of ApoE^{-/-} mice

A: Aortas were separated from aortic arch to left and right common iliac artery and stained by oil Red O; B: Area of atherosclerotic plaque were measured by MapInfo 7.0 ($\bar{x} \pm s, n=5$); C: Content of serum lipids including total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) of ApoE^{-/-} mice were detected by biochemical kits, and the content of non-high density lipoprotein cholesterol (non-HDL-C) was calculated by HDL-C subtracted from TC content ($\bar{x} \pm s, n=6$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

3.2 YHF 对 ApoE^{-/-} 小鼠外周血 Treg/Th17 比例的影响

与正常组相比,模型组 Treg 比例下降 ($P < 0.01$,图 2-A 和图 2-B),Th17 比例上升 ($P < 0.05$,图 2-A 和图 2-B),Treg/Th17 降低 ($P < 0.01$,图 2-C)。与模型组相比,YHF 低、高剂量组 Treg 比例升高 ($P < 0.01$),Treg/Th17 增加 ($P < 0.01$)。结果表明,YHF 一定程度上提高了高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-} 小鼠外周血中 Treg 细胞比例,降低了 Th17 细胞比例。

3.3 YHF 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 Foxp3、ROR γ t mRNA 表达的影响

与正常组相比,模型组小鼠主动脉 Foxp3 mRNA 表达下降 ($P < 0.001$),ROR γ t mRNA 表达上升 ($P < 0.001$)。与模型组相比,YHF 高剂量上调小鼠主动脉 Foxp3 mRNA 表达 ($P < 0.01$),下调

ROR γ t mRNA 表达 ($P < 0.05$)。结果表明,YHF 增加主动脉 Foxp3 mRNA 表达而降低 ROR γ t mRNA 表达(图 3)。

3.4 YHF 对主动脉 Foxp3、ROR γ t 蛋白表达的影响

与正常组相比,模型组小鼠主动脉 Foxp3 蛋白表达下降 ($P < 0.01$,图 4-A 和图 4-B),ROR γ t 蛋白表达增加 ($P < 0.001$,图 4-A 和图 4-B)。与模型组相比,YHF 上调 Foxp3 蛋白表达 ($P < 0.001$),下调 ROR γ t 蛋白表达 ($P < 0.01$)。结果表明,YHF 可以增加主动脉 Foxp3 蛋白表达,降低 ROR γ t 蛋白表达。

3.5 IHC 检测 YHF 对主动脉 Foxp3、ROR γ t 蛋白表达的影响

与正常组相比,模型组小鼠主动脉 Foxp3 蛋白表达下降 ($P < 0.05$,图 5-A 和图 5-B),ROR γ t 蛋白

表达增加($P < 0.05$,图 5-A 和图 5-B)。与模型组相比,YHF 各组 Foxp3 蛋白表达均呈现上升趋势,ROR γ t 蛋白表达呈现下降趋势,但高剂量组 Foxp3 蛋白表达上升更加明显($P < 0.05$)、低剂量组

ROR γ t 蛋白表达下降更加明显($P < 0.05$)。结果表明,YHF 具有增加主动脉组织中 Foxp3 蛋白表达而降低 ROR γ t 蛋白表达的作用。

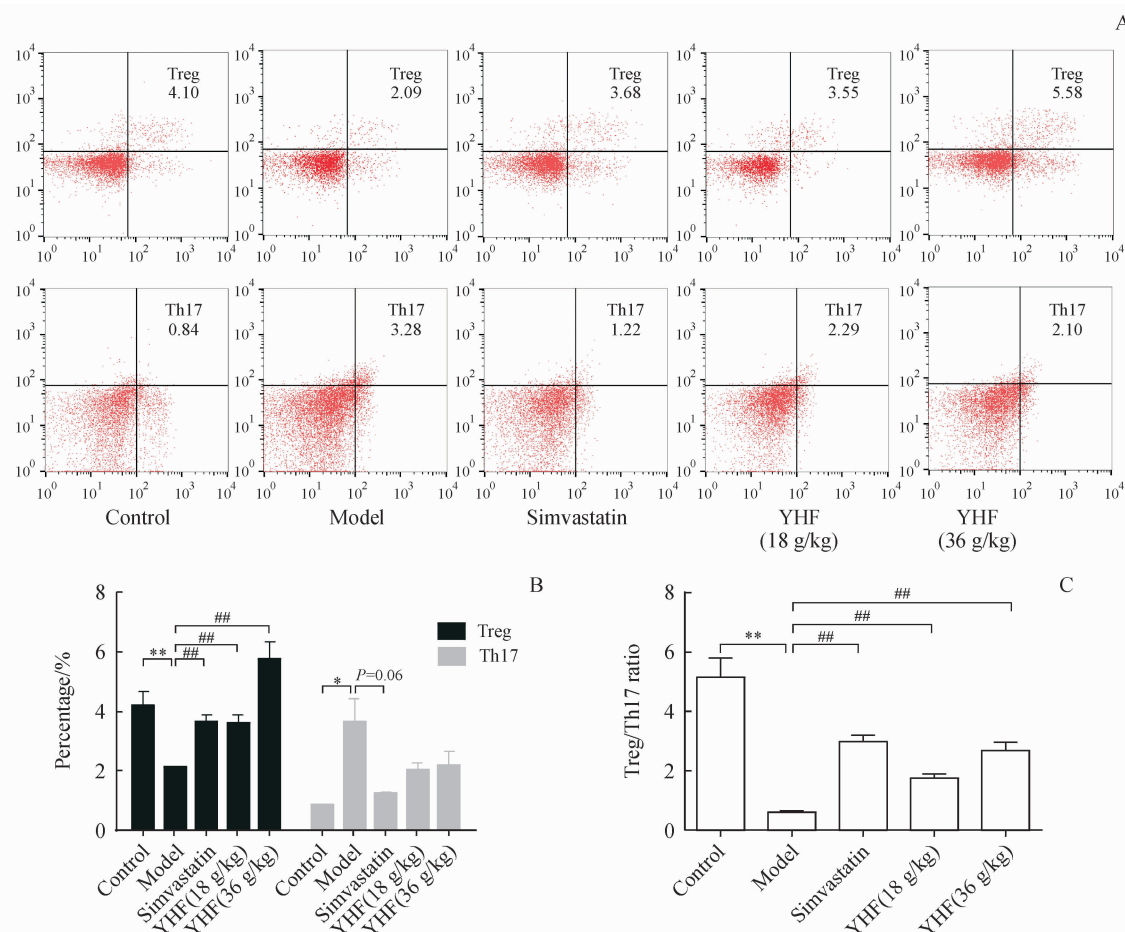


Figure 2 Effects of YHF on Treg or Th17 in peripheral blood of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Peripheral blood of mice were collected at the end of 20th week and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained to detect the percentage of Treg or Th17; B: Frequency of Treg or Th17 in PBMC; C: Ratio of Treg/Th17

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

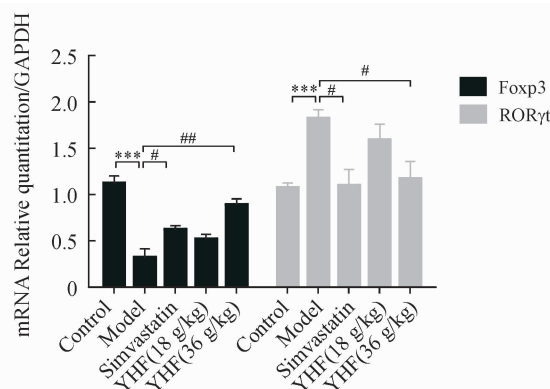


Figure 3 Effects of YHF on mRNA expression of Foxp3 or ROR γ t of aortas ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

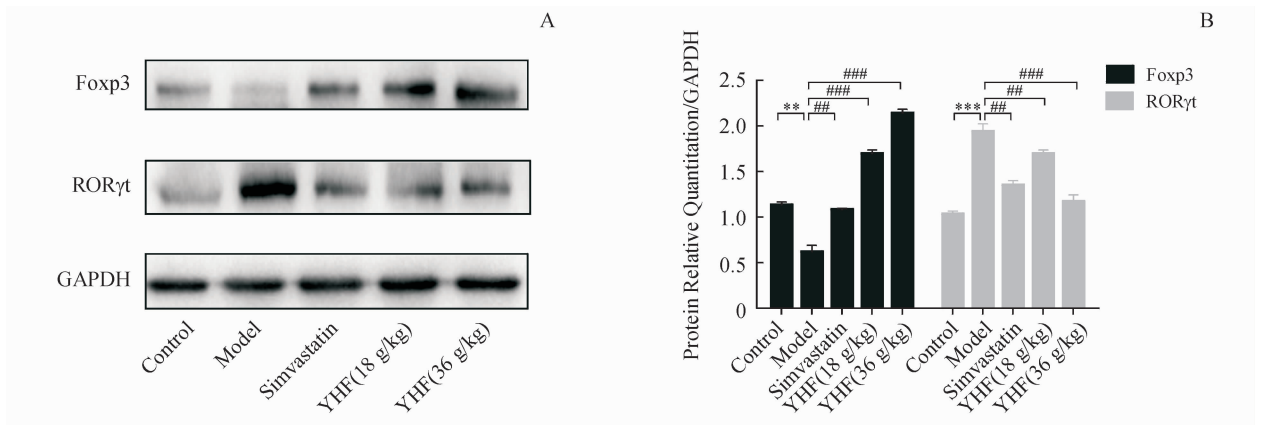


Figure 4 Effects of YHF on protein expression of Foxp3 or RORγt of aortas ($\bar{x} \pm s, n=3$)
A: Protein level of Foxp3 and RORγt of aortas were detected by Western blot; B: Protein relative quantitation of Foxp3 and RORγt
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group

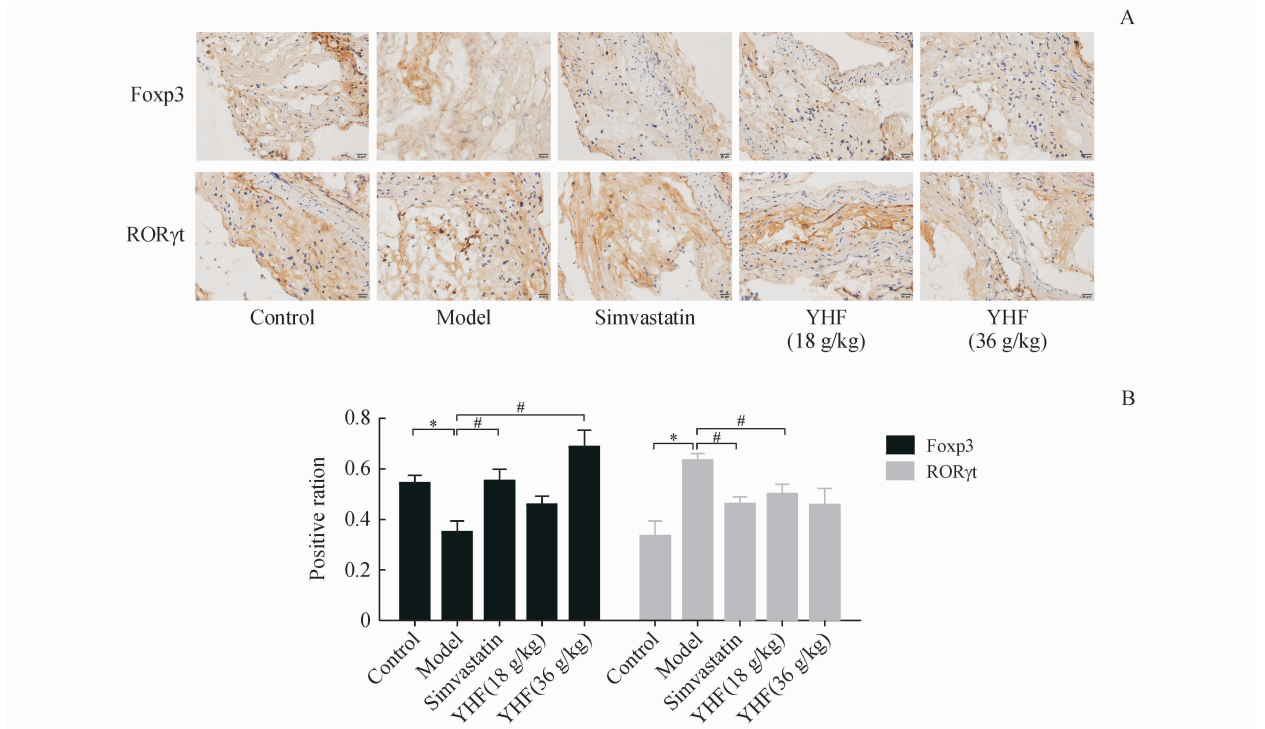


Figure 5 Effects of YHF on the protein expression of Foxp3 or RORγt of aortas (IHC; $200 \times, \bar{x} \pm s, n=3$)
A: Protein level of Foxp3 and RORγt of aortas were detected by immunohistochemical (IHC); B: Positive ratio of Foxp3 or RORγt protein in aortas
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

3.6 YHF 对体外培养 CD4⁺T 细胞 Foxp3、RORγt mRNA 表达的影响

相较于正常组, LPS 组 CD4⁺T 细胞 Foxp3 mRNA 表达下降($P < 0.05$), RORγt mRNA 表达上升($P < 0.05$), 表明 LPS 有利于 RORγt 的表达, 而不利 Foxp3 的表达。相较于 LPS 组, 2、4 mg/L YHF 水提液上调 Foxp3 mRNA 表达($P < 0.05$), 1、2、4 mg/L YHF 水提液下调 RORγt mRNA 表达($P < 0.05$), 且 YHF 对 Foxp3 mRNA 表达的影响呈剂量依赖性。结果表明, YHF 可以增加体外培养

CD4⁺T 细胞 Foxp3 mRNA 表达而降低 RORγt mRNA 表达(图 6)。

3.7 YHF 对体外培养 CD4⁺T 细胞 Foxp3、RORγt 蛋白表达的影响

相较于正常组, LPS 组 CD4⁺T 细胞 Foxp3 蛋白表达下调, RORγt 蛋白表达上调。相较于 LPS 组, YHF 上调 Foxp3 蛋白表达, 同时下调 RORγt 蛋白表达。结果表明, YHF 上调体外 CD4⁺T 细胞中 Foxp3 蛋白表达而下调 RORγt 蛋白表达。

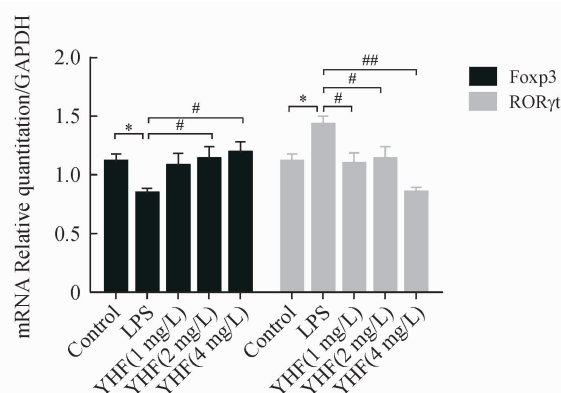


Figure 6 Effects of YHF on mRNA expression of Foxp3 or RORγt of CD4⁺ T cells treated by lipopoly saccharide (LPS) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

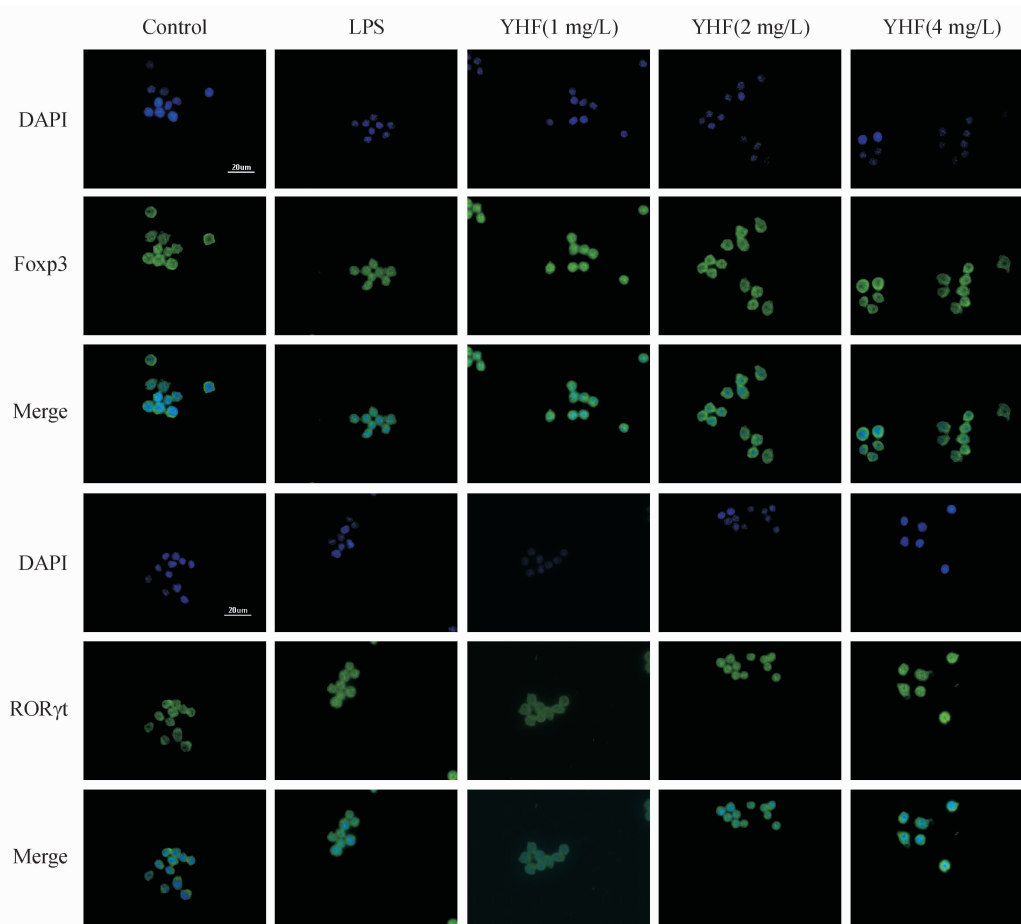


Figure 7 Effects of YHF on expression of Foxp3 or RORγt protein of CD4⁺ T cells

4 讨论

AS 发病机制复杂,脂质代谢障碍是其发病基础^[9],本研究采用长期高脂饮食造成 ApoE^{-/-} 小鼠脂质代谢紊乱,诱发 AS。高水平的脂质可造成 LPS 易位增加,引发低强度全身性炎症反应^[10] 及免疫活化,造成免疫细胞失衡,进一步加快 AS 进

程^[11]。脂质紊乱、低度炎症以及免疫平衡破坏都参与 AS 发生发展。

YHF 已在临床上运用多年,对 AS 疗效确切,长期用药对肝的毒性较辛伐他汀更低^[8]。在 ApoE^{-/-} 小鼠的研究中发现 YHF 可显著减少 AS 斑块形成,有效调节脂质水平,减轻炎症反应,但 YHF 对免疫的影响尚不明确。大量研究已经证

实,AS 发展过程中存在明显的 Treg/Th17 失衡^[4],因而本项研究着重探讨了 YHF 对 Treg/Th17 失衡的影响。

体内研究结果显示高脂饮食可破坏 ApoE^{-/-}小鼠 Treg/Th17 平衡,表明长期高脂饮食会引发免疫失衡。Foxp3 和 ROR γ t 分别是 Treg 和 Th17 的特征性转录因子,分别在维持两者的稳定表达和功能中具有至关重要的作用^[12-13],其表达变化在一定程度上反映了 Treg/Th17 的变化。对主动脉 Foxp3 和 ROR γ t 表达的检测结果表明,高脂饮食引起了主动脉 Foxp3 表达的下降和 ROR γ t 表达的增加。而在 YHF 的干预之下,Foxp3 表达增加,ROR γ t 表达下降,Treg/Th17 的比例增加,表明 YHF 确能改善高脂饮食引发的 Treg/Th17 失衡状态。

在 AS 的发展过程中,感染也是一个重要的诱发因素。在体内,肠道细菌失衡会增加肠道通透性,导致循环 LPS 增加;外界的结核分枝杆菌等细菌感染机体的过程中也会释放 LPS。LPS 主要通过 TLR4 信号传导引起单核-巨噬细胞及树突状细胞的炎症反应,引发机体固有免疫应答^[12,14]。同时,LPS 也能以独立于 TLR4 信号的机制发挥作用^[15],影响适应性免疫应答。研究表明 LPS 暴露会引起 Th1、Th2、Th17 以及 Treg 的数量及功能的变化,影响机体免疫平衡^[15-16]。因而,本研究在体外用 LPS 刺激活化的 CD4⁺T 细胞(anti-CD3/anti-CD28 刺激),模拟体内 CD4⁺T 细胞所处的炎性环境,观察 YHF 的干预作用。结果表明,LPS 刺激的 CD4⁺T 细胞 Foxp3 表达减少而 ROR γ t 表达增加,表明 CD4⁺T 细胞在 LPS 炎性刺激下 Treg/Th17 平衡发生了改变。YHF 干预后,CD4⁺T 细胞 Foxp3 表达增加而 ROR γ t 表达减少,表明 YHF 对 CD4⁺T 细胞遭受 LPS 炎性刺激后的反应产生一定的抑制作用。

本研究从炎症免疫的角度探讨了 YHF 对 AS 发病过程的影响,实验结果表明,YHF 可以在一定程度上对高脂诱导的 ApoE^{-/-}小鼠 Treg/Th17 失衡进行纠正,抑制 LPS 炎性刺激下 CD4⁺T 细胞向 Th17 的极化。AS 发病是一个复杂的过程,脂质、炎症以及免疫都积极参与了 AS 疾病的发生发展。中药复方 YHF 对 AS 的治疗作用在于其可以发挥调脂和抗炎性免疫反应的作用,但其具体分子机制还未阐明。

参考文献

- [1] Fan WX. Research progress on the mechanism of ischemic stroke [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(6): 751-759.
- [2] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340**(2): 115-126.
- [3] Foks AC, Kuiper J. Immune checkpoint proteins: exploring their therapeutic potential to regulate atherosclerosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, **174**(22): 3940-3955.
- [4] Ding JW, Zheng XX, Zhou T, et al. HMGB1 modulates the Treg/Th17 ratio in atherosclerotic patients [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, **23**(6): 737-745.
- [5] Zhu Y, Huang H, Gu WJ, et al. Clinical effect of luhuang granule in treatment of atherosclerosis: an analysis of 60 cases [J]. *J Anhui Univ Chin Med* (安徽中医药大学学报), 2019, **38**(2): 20-25.
- [6] He JJ, Ma YJ, Qiu RZ, et al. The effects of Qingre Huoxue Yangyin formula on blood lipid, arterial plaque and Th1/Th2 imbalance [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 2017, **33**: 623-626.
- [7] Ma YJ, Qiu RZ, Yuan DP, et al. Effects of YHF on expression of treg in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2018, **29**(3): 313-318.
- [8] Qiu RZ, Long J, Zhou LY, et al. Yangyin Qingre Huoxue method in traditional Chinese medicine ameliorates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice suffering from high-fat diet and HSP65 aggression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, **2019**: 2531979.
- [9] Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, **35**(3): 485-491.
- [10] Netto Candido TL, Bressan J, Alfenas RCG. Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet [J]. *Nutr Hosp*, 2018, **35**(6): 1432-1440.
- [11] Nasonov EL, Popkova TV. Atherosclerosis: perspectives of anti-inflammatory therapy [J]. *Ter Arkh*, 2018, **90**(5): 4-12.
- [12] Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene [J]. *Science*, 1998, **282**(5396): 2085-2088.
- [13] Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4 [J]. *Science*, 2013, **341**(6151): 1246-1249.
- [14] Rosadini CV, Kagan JC. Early innate immune responses to bacterial LPS [J]. *Curr Opin Immunol*, 2017, **44**: 14-19.
- [15] Brinkhoff A, Sieberichs A, Engler H, et al. Pro-inflammatory Th1 and Th17 cells are suppressed during human experimental endotoxemia whereas anti-inflammatory IL-10 producing T-cells are unaffected [J]. *Front Immunol*, 2018, **9**: 1133.
- [16] Ding FX, Fu Z, Liu B. Lipopolysaccharide exposure alleviates asthma in mice by regulating Th1/Th2 and treg/Th17 balance [J]. *Med Sci Monit*, 2018, **24**: 3220-3229.