

血管软化丸调控 miR-17-5p 与 PCSK9/VLDLR 信号通路抗动脉粥样硬化研究

孔艳芳¹, 秦合伟^{1,2}, 王 媛², 胡长春²

(1. 河南省中医院 河南中医药大学第二附属医院, 河南 郑州 450002;

2. 河南中医药大学, 河南 郑州 450002)

[摘要]目的 观察血管软化丸对 miR-17-5p 及其下游前蛋白转化酶枯草溶菌素(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)/极低密度脂蛋白受体(very low density lipoprotein receptor, VLDLR)信号通路的调控作用, 揭示血管软化丸抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的作用机制。**方法** 细胞实验: 通过加入氧化型低密度脂蛋白构建血管平滑肌细胞损伤模型。根据不同干预方法将细胞分为4组: 模型组、miR-17-5p 抑制剂组、血管软化丸高剂量含药血清组和低剂量含药血清组; 干预后检测各组细胞活性以及细胞 miR-17-5p、VLDLR 和 PCSK9 mRNA 和蛋白表达水平。动物实验: 根据不同干预方法将小鼠分为模型组、miR-17-5p 抑制剂组、血管软化丸高剂量组和低剂量组; 干预8周后检测小鼠外周血清中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平和小鼠主动脉 miR-17-5p、VLDLR 和 PCSK9 表达水平, 并观察各组小鼠病理学改变情况。**结果** 细胞实验: 与模型组比较, miR-17-5p 抑制剂组, 血管软化丸高、低剂量含药血清组血管平滑肌细胞活性均明显升高($P < 0.05$), 血管平滑肌细胞的 miR-17-5p 和 VLDLR mRNA 和蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$), 血管平滑肌细胞的 PCSK9 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$)。动物实验: 与模型组比较, miR-17-5p 抑制剂组和血管软化丸高、低剂量组外周血清中 IL-6、TNF- α 水平均明显降低($P < 0.05$), 血清中 IL-10 水平均明显升高($P < 0.05$), 主动脉 miR-17-5p 和 VLDLR mRNA 水平均明显降低($P < 0.05$), PCSK9 mRNA 表达水平均明显升高($P < 0.05$); 病理学观察发现模型组小鼠主动脉搏管径厚薄不均匀, 内膜不光滑, 管腔内可见明显 AS 斑块形成, 斑块内可见浅染无定形物和钙化颗粒物, 部分 AS 斑块截面积大于主动脉截面积。miR-17-5p 抑制剂组和血管软化丸高、低剂量组 AS 病变程度明显较模型组减轻。**结论** 血管软化丸防治 AS 的作用机制可能与靶向调控 miR-17-5p 影响 PCSK9/VLDLR 信号通路, 抑制血管炎症反应, 减轻血管平滑肌细胞损伤有关。

[关键词] 动脉粥样硬化; 血管软化丸; 血管平滑肌细胞; 微小核糖核酸 17-5p

[中图分类号] R543.1⁺2 **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2021.06.016

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是导致缺血性心脑血管疾病的主要病理基础, 目前西医防治 AS 的临床效果不理想, 而中医药防治 AS 取得了一定的成果, 但具体作用机制不明确^[1]; 新近研究发现微小 RNA(microRNA, miR)参与了 AS 的发生、发展, 其中 miR-17-5p 能够通过抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)极低密度

脂蛋白受体(very low density lipoprotein receptor, VLDLR)的表达, 影响前蛋白转化酶枯草溶菌素(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)的表达, 进而负调控 VLDLR 表达, 缓解血管内膜的增生, 抑制血管管腔狭窄和平滑肌细胞的增殖迁移, 抑制 AS 的形成^[2]。鉴于最新研究进展和本课题组前期研究基础^[3], 笔者推测中医药防治 AS 的作用机制可能与调控 miR-17-5p, 靶向调控 VLDLR 或靶向调控 PCSK9 有关。因此, 本研究旨在观察血管软化丸抗 AS 的作用机制是否与靶向调控 miR-17-5p, 靶向调控 VLDLR 或靶向调控 PCSK9 间接调控 VLDLR, 抑制血管炎症反应, 减轻 VSMC 有关。

基金项目: 河南省中医药科学研究专项重点课题(2019ZY1015); 河南省科技攻关计划项目(212102310359); 河南省中医药拔尖人才培养项目

作者简介: 孔艳芳(1986-), 女, 主管治疗师

通讯作者: 秦合伟(1982-), 男, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, qinhewei@126.com

1 材料

1.1 实验动物 健康雄性 ApoE^{-/-}小鼠 60 只, SPF 级, 体质量(20±2)g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK(京)2016-0006。健康雄性 C57BL/6 小鼠 15 只, 体质量(20±2)g, 购自南京大学模式动物研究所, 生产许可证号: SCXK(苏)2015-0001; SD 大鼠 60 只, 体质量(300±20)g, 雄性, 购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场, 动物生产许可证号: SCXK(豫)2019-0002。所有动物饲养于河南中医药大学第二附属医院动物实验中心, 实验动物使用许可证号: SYXK(豫)2016-0009, (22±1)℃ 恒温、60%~75% 恒湿、12 h 循环照明, 自由摄食、饮水。人 VSMC 购自上海沪震生物科技有限公司。

1.2 伦理审查 经河南中医药大学第二附属医院动物实验伦理委员会审核通过, 本实验设计方案符合安全性和公平性原则, 实验动物符合国家对医学实验动物的有关要求。伦理审核批准标号: 20190622。

1.3 实验药物 本研究所用血管软化丸(药物组成: 山楂、神曲、珍珠、代赭石各 30 g, 莱菔子、茯苓、枸杞子各 15 g, 陈皮、连翘、郁金、三七各 12 g、清半夏 9 g)方中所有中药均来源于河南中医药大学第二附属医院药剂科; 按照“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”换算低、高 2 个剂量分别为 21.6、86.4 g/kg, 分别相当于 60 kg 成人临床用量等效量的 5.8、23.3 倍, 医院煎药房按照要求煎煮成生药含量为 0.864、3.456 g/mL^[4]。

1.4 含药血清制备 SD 大鼠高剂量组(20 只)灌胃给予血管软化丸高剂量制备高剂量含药血清; SD 大鼠低剂量组(20 只)灌胃给予血管软化丸低剂量制备低剂量含药血清; 每日早晚 2 次灌胃, 连续灌胃 5 d。空白血清对照组(20 只)给予等量的生理盐水灌胃, 每日 2 次; 各组大鼠末次灌胃后 1 h, 给予腹腔注射水合氯醛(350 mg/kg)麻醉, 腹主动脉取血, 37℃ 静置 1 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 放入离心管中, 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装, -20℃ 保存备用。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 VSMC 培养和分组 VSMC 在含有 15% (V/V) 热灭活胎牛血清的 DMEM 培养基(含有 100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素)中培养, 以每孔 1×10⁵/mL 的细胞数将细胞铺板于 24 孔板,

37℃、5% CO₂ 的环境下培养, 通过加入氧化低密度脂蛋白(oxidation low lipoprotein, Ox-LDL) 20 μg/mL 构建平滑肌细胞损伤模型^[4]。模型复制成功后分为 4 组: (1) 模型组: VSMC+Ox-LDL+不含药正常血清; (2) miRNA-17-5p 抑制剂组: VSMC+Ox-LDL+HiperFect 转染试剂, 将 RNA-17-5p 抑制剂转染 VSMC; (3) 含药血清高剂量组: VSMC+Ox-LDL+中药高剂量含药血清; (4) 含药血清低剂量组: VSMC+Ox-LDL+中药低剂量含药血清。干预 48 h 后观察收集细胞总 RNA 和总蛋白进行相应指标检测。

2.1.2 血清干预和细胞转染的具体方法

(1) 血清干预: 将第 3~5 代 VSMC 弃去培养基, 用 PBS 温和洗 3 遍, 在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 16 h, 观察到每孔内细胞铺板率达 50%, 弃掉孔内旧培养基, 分别加入血管软化丸不同浓度(6.25、12.5 和 25 μg/mL) 含药血清的 RPMI1640 培养基, 最终选取 25 μg/mL 含药血清, 进行含药血清干预。

(2) 细胞转染: 在无菌条件下, 用含有 10% FBS 的细胞培养基 DMEM, 将 VSMC(1×10⁵/mL) 接种于 6 孔板, 每孔含有 2 mL 培养基; 37℃ 温度下在 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育备用; 取 miR-17-5p 抑制剂, 以 0.6 μL(20 mol/L) 和 HiPerFect 转染试剂 12 μL 滴加入 300 μL 的不含 FBS 和抗生素的 DMEM 细胞培养基, 混合为浓度 5 μmol/L 在室温条件下放置 5~10 min 形成转染复合物, 将转染复合物均匀滴入上述接种 VSMC 培养基中, 孵育直至血管内皮细胞融合度约 80% 时终止培养, 刮取细胞, 以提取血管内皮细胞的 RNA^[4]。经 qRT-PCR 检测, 细胞转染成功率为 70%。

2.1.3 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyltetrazolium, MTT)法检测细胞活性 收集各组细胞并调整密度为每孔 2×10⁴ 个细胞, 接种于 96 孔板中, 每组设 5 个复孔, 培养 24 h 后加入 MTT 20 μL(浓度为 5 mg/mL), 培养箱孵育 4 h 后取出, 弃上清, 加入二甲基亚砷 150 mL, 摇床震荡 10 min 后, 于 490 nm 波长测定吸光度(A)值^[4]。

2.1.4 检测细胞 miR-17-5p、VLDLR 和 PCSK9 mRNA 表达水平 采用 RT-PCR 法: 收集血清处理 48 h 后的细胞, 提取总 RNA, 逆转录, 采用 SYBR Green 进行 qRT-PCR 反应; 反应参数: 95℃ 30 s, 1 个循环; 95℃ 5 s, 55℃ 10 s, 40 个循环, 样本中目的基因的计算方法为 2^{-ΔΔC_T}。GAPDH 为内参^[4]。

引物序列: miR-17-5p 正向引物 5'-CCAGC-CAAAGTGCTTACAGTGC-3',反向引物 5'-GTG-CAGGGTCCGAGGTATTC-3';VLDLR 正向引物 5'-CCCGTTCTACTCAGTGTATCCC-3',反向引物 5'-CTGCCATCGTCACAGTCATCC-3';PCSK9 正向引物 5'-GCGTCGTGGTGATTGGATTG-3',反向引物 5'-CAGGGGTGTTGTGGATGCT-3';GAPDH 正向引物 5'-AGTGTGACGATTA-ATCGCAAG-3',反向引物 5'-ATCCACATCTCTCGTTGTGGC-3'。

2.1.5 Western blot 法检测细胞 VLDLR 和 PCSK9 蛋白表达水平 收集处理 48 h 后的细胞,提取蛋白,采用 BCA 蛋白定量法,蛋白电泳,分离,转膜,室温下 5%脱脂奶粉封闭 2 h,用相应的一抗(VLDLR 和 PCSK9),分别按照 1:200 和 1:500 孵育,4 ℃ 过夜,洗涤后标记二抗(滴度 1:200)杂交。采用化学发光试剂盒检测,使用 Image Lab 4.1 图像分析软件检测 VLDLR 和 PCSK9 印迹条带净吸光度值,以 β -actin 为内参照,结果以样本灰度值/内参照灰度值表示^[4]。

2.2 体内实验

2.2.1 模型复制与给药 C57BL/6 小鼠给予全程普通饲料喂养,作为正常对照组;ApoE^{-/-}小鼠给予全程高脂饲料(含脂肪 21%、胆固醇 0.15%)喂养,分为 4 组,每组 15 只;饲养 8 周模型复制成功(每组随机抽取 1 只小鼠主动脉壁可见明显的斑块形成)后开始干预。每日灌胃 1 次,连续干预 8 周后取材进行检测。①对照组:C57BL/6 小鼠给予等量生理盐水灌胃;②模型组:ApoE^{-/-}小鼠给予等量生理盐水灌胃;③miR-17-5p 抑制剂组:ApoE^{-/-}小鼠尾静脉注射 miR-17-5p 抑制剂处理;④血管软化丸高剂量组:ApoE^{-/-}小鼠采用血管软化丸灌胃量为 86.4 g/(kg·d);⑤血管软化丸低剂量组:ApoE^{-/-}小鼠采用血管软化丸灌胃量为 21.6 g/(kg·d)。

2.2.2 样品采集和病理形态学观察 经药物干预 8 周后取材,禁食 12 h 后摘眼球取血,用于血清指标检测;取胸腹全长主动脉,一部分主动脉固定于 4%甲醛溶液中,用于 HE 染色;一部分置于-80 ℃冻存用于主动脉相关指标检测。

2.2.3 ELISA 法测定外周血清中白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)等炎症因子水平 采用 ELISA 法检测血清中 IL-6、IL-10、TNF- α 水平,按 ELISA 试剂盒说

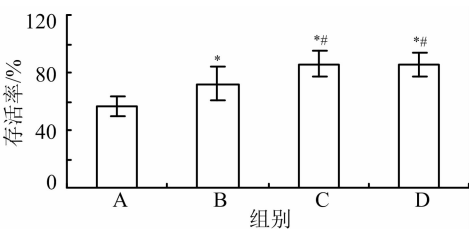
明书进行。
2.2.4 RT-PCR 检测各组主动脉 miR-17-5p、VLDLR 和 PCSK9 mRNA 表达水平 将主动脉称量后,加入适量的 Trizol,提取总 RNA。具体方法见“2.1.4”项。

2.3 统计学方法 所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理。连续型变量采用“均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)”表示。多组均数比较用单因素方差分析,方差齐时均数多重比较采用 LSD 法检验,方差不齐时均数多重比较采用 Tamhane's 法检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 动物模型鉴定时每组各处死 1 只,除去撕咬致死 5 只,灌胃致死 6 只,剔除各组离群值,各组进入统计数量均为 10 只。

3.2 各组 VSMC 存活率比较 与模型组比较,miR-17-5p 抑制剂组,血管软化丸高、低剂量含药血清组 VSMC 存活率均明显升高($P<0.05$)。见图 1。



注: A. 模型组; B. miR-17-5p 抑制剂组; C. 血管软化丸高剂量组; D. 血管软化丸低剂量组; 与模型组比较, * $P<0.05$; 与 miR-17-5p 抑制剂组比较, # $P<0.05$

图 1 各组 VSMC 细胞存活率($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

3.3 VSMC 中 miR-17-5p、VLDLR、PCSK9 mRNA 表达水平比较 与模型组比较,miR-17-5p 抑制剂组,血管软化丸高、低剂量含药血清组 VSMC 中 miR-17-5p 和 VLDLR mRNA 表达水平均明显升高($P<0.05$),PCSK9 mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$);血管软化丸高、低剂量含药血清组 miR-17-5p、VLDLR、PCSK9 mRNA 表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组 VSMC 中 miR-17-5p、VLDLR、PCSK9 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	miR-17-5p mRNA	VLDLR mRNA	PCSK9 mRNA
模 型	6	2.02 $\pm$ 0.13	2.13 $\pm$ 0.24	1.06 $\pm$ 0.19
miR-17-5p 抑制剂	6	0.83 $\pm$ 0.05*	0.91 $\pm$ 0.37*	2.32 $\pm$ 0.43*
血管软化丸高剂量	6	1.49 $\pm$ 0.57*#	1.53 $\pm$ 0.29*#	1.83 $\pm$ 0.26*#
血管软化丸低剂量	6	1.51 $\pm$ 0.68*#	1.60 $\pm$ 0.29*#	1.80 $\pm$ 0.33*#

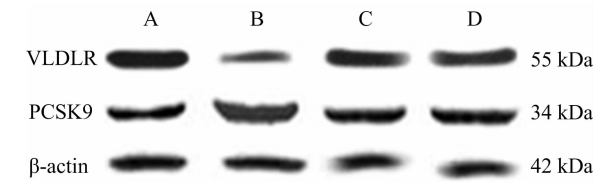
注:与模型组比较, * $P<0.05$; 与 miR-17-5p 抑制剂组比较, # $P<0.05$

3.4 各组 VSMC 内 VLDLR、PCSK9 蛋白表达水平比较 与模型组比较,miR-17-5p 抑制剂组,血管软化丸高、低剂量组 VSMC 中 VLDLR 蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$),VSMC 中 PCSK9 蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$);血管软化丸高、低剂量组各项指标比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2 和图 2。

表 2 各组 VSMC 中 VLDLR、PCSK9 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	VLDLR	PCSK9
模 型	6	1.82±0.21	1.07±0.18
miR-17-5p 抑制剂	6	0.93±0.31*	1.91±0.32*
血管软化丸高剂量	6	1.56±0.25* [#]	1.82±0.25*
血管软化丸低剂量	6	1.62±0.27* [#]	1.79±0.32*

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与 miR-17-5p 抑制剂组比较,[#] $P<0.05$



注:A.模型组;B. miR-17-5p 抑制剂组;C. 血管软化丸高剂量组;D. 血管软化丸低剂量组

图 2 Western blot 法检测各组 VSMC 中 VLDLR 和 PCSK9 蛋白表达水平

3.5 主动脉病理形态观察 光学显微镜下观察发现,模型组小鼠主动脉管径厚薄不均匀,内膜不光滑,管腔内可见明显 AS 斑块形成,斑块内可见染染无定形物和钙化颗粒物,部分 AS 斑块截面积大于主动脉截面积。miR-17-5p 抑制剂组和血管软化丸高、低剂量组 AS 病变程度明显较模型组减轻。见图 3。

3.6 各组小鼠血清 IL-6、IL-10、TNF- α 水平比较 与对照组比较,模型组小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平明显升高($P<0.05$),IL-10 水平明显降低($P<0.05$);与模型组比较,miR-17-5p 抑制剂组和血管软化丸高、低剂量组血清 IL-6 和 TNF- α 水平明显降低($P<0.05$),IL-10 水平明显升高($P<0.05$)。血管软化丸高、低剂量组各项指标比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

3.7 各组主动脉 miR-17-5p、VLDLR、PCSK9 mRNA 表达水平比较 与模型组比较,miR-17-5p 抑制剂组,血管软化丸高、低剂量组主动脉 miR-17-5p、VLDLR mRNA 表达水平均明显降低($P<0.05$),主动脉 PCSK9 mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$);血管软化丸高、低剂量组 miR-17-5p、VLD-

LR、PCSK9 mRNA 表达水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 3 各组小鼠外周血 IL-6、IL-10、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	IL-6/ (pg/mL)	IL-10/ (pg/mL)	TNF- α / (pg/mL)
对 照	10	20.14±4.53	265.50±28.24	10.14±1.84
模 型	10	65.47±9.36 [△]	92.14±21.21 [△]	33.47±4.61 [△]
miR-17-5p 抑制剂	10	48.47±6.32*	191.25±26.15*	18.19±7.15*
血管软化丸高剂量	10	51.26±12.27*	231.98±34.67* [#]	19.26±2.59*
血管软化丸低剂量	10	52.89±7.15*	235.01±36.83* [#]	19.89±1.78*

注:与对照组比较,[△] $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与 miR-17-5p 抑制剂组比较,[#] $P<0.05$

表 4 各组主动脉 miR-17-5p、VLDLR、PCSK9 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	miR-17-5p mRNA	VLDLR mRNA	PCSK9 mRNA
对 照	10	1.05±0.11	1.12±0.19	1.57±0.21
模 型	10	2.05±0.16 [△]	2.14±0.28 [△]	0.27±0.06 [△]
miR-17-5p 抑制剂	10	0.86±0.19*	0.94±0.33*	1.36±0.32*
血管软化丸高剂量	10	1.48±0.54* [#]	1.54±0.24* [#]	0.84±0.19* [#]
血管软化丸低剂量	10	1.50±0.61* [#]	1.61±0.28* [#]	0.83±0.15* [#]

注:与对照组比较,[△] $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与 miR-17-5p 抑制剂组比较,[#] $P<0.05$

4 讨论

miRNA 在 AS 的发生发展过程中发挥了重要的作用,人为调控 miRNA 的表达也是疾病防治的一个重要方法,其中 miRNA-17-5p 的表达水平与 AS 严重程度密切相关^[5]。有研究发现,低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein, recptor, LDLR)能够通过结合并内吞低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)调节胆固醇代谢,在 LDLR 数量降低时将导致血浆中 LDL 和胆固醇水平升高;VLDLR 主要分布在心肌、骨骼肌以及脂肪组织中,能够通过与含有载脂蛋白 E 的脂蛋白结合,调节脂质代谢;巨噬细胞膜上 VLDLR 通过摄取富含三酰甘油的脂蛋白,促进三酰甘油在细胞中的沉积,导致和加重 AS^[6]。此外,在粥样斑块存在情况下,研究者通过高表达 VLDLR,结合低脂饮食,能够降低血浆中 VLDL 及 LDL 水平,促进 AS 斑块消退^[7]。

研究发现,PCSK9 能够影响 VLDLR 的表达^[8],增强肝脏中 VLDLR 的溶酶体和内涵体降解,导致血清低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)水平升高^[9];研究者通过转染 PCSK9 进入 VSMC,发现提高 PCSK9 表达能够降低 VLDLR 蛋白水平^[10]。新近研究^[2]发现,

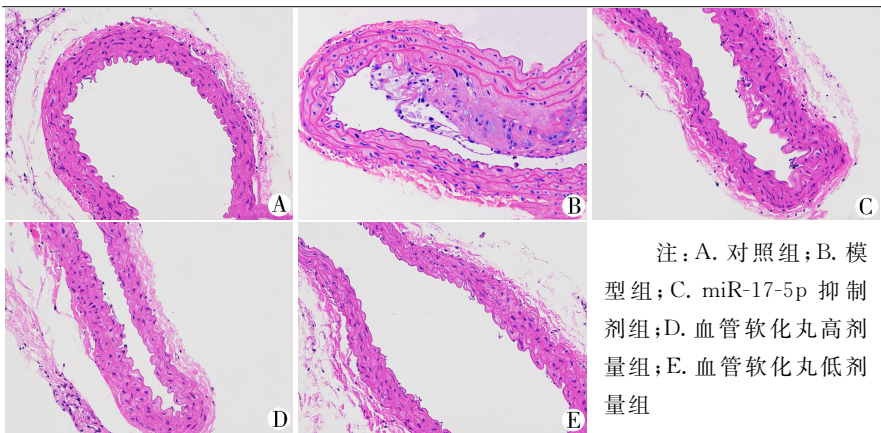


图 3 各组小鼠主动脉病理形态(HE 染色,10×20 倍)

AS 发病与 miR-17-5p 表达成正相关,与 VLDLR 表达成负相关;miR-17-5p 能够靶向 VLDLR,直接抑制 VSMC 中 VLDLR 的表达,miR-17-5p 通过影响 PCSK9 参与负调控 VLDLR 表达,抑制 AS 的发生发展。

高脂血症和 AS 可归属于中医“血浊”和“脉痹”范畴,痰、瘀等病理产物壅塞脉道,沉积脉壁,痰瘀蓄留不去而成“脉痹”,即 AS 和血栓形成。本课题组针对 AS“痰阻血瘀”的基本病机,采用由保和丸加减化裁而成的血管软化丸治疗 AS。该方山楂消饮食积滞、活血化瘀为君药;神曲消食健胃,莱菔子理气消食,半夏、茯苓燥湿健脾、化痰散结,郁金、三七行气解郁、活血化瘀,枸杞子滋补肝肾、益精明目,珍珠和代赭石平肝潜阳、降逆祛痰,共为臣药;陈皮理气和胃为佐药;甘草调和诸药。诸药合用,共奏消积化痰、活血化瘀之功^[4]。本课题组既往研究^[11-15]发现,血管软化丸防治 AS 与调控 PI3K/Akt/mTOR 通路、TLR3/TLR9、miR-155、CD40-CD40L 系统、miR-467b 等 miR 及其下游信号有关。

鉴于 miR-17-5p 能够靶向调控 VLDLR 或靶向调控 PCSK9 间接调控 VLDLR,抑制血管炎症反应,减轻 VSMC 损伤,防治 AS^[2],本研究旨在验证血管软化丸抗 AS 的作用机制是否与靶向调控 miR-17-5p,靶向调控 VLDLR 或靶向调控 PCSK9 间接调控 VLDLR,抑制血管炎症反应,减轻 VSMC 损伤有关,进而揭示血管软化丸防治 AS 的分子机制,这是本研究的思路创新。

本研究结果显示,经过血清干预后,与模型组比较,miR-17-5p 抑制剂组和两个中药含药血清组 VSMC 活性均明显升高,VSMC 中 miR-17-5p、VLDLR mRNA 表达水平均明显降低,VSMC 中 PCSK9 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高;与模型组比较,miR-17-5p 抑制剂组和两个中药含药血清组细胞 VLDLR 蛋白表达水平均明显降低。这表明 VSMC 活性与 miR-17-5p 和 VLDLR mRNA 表达水平呈负相关,与 PCSK9 mRNA 表达水平呈正相关,血管软化丸对 Ox-LDL 构建平滑肌细胞损伤模型的 VLDLR 和 PCSK9 表达有明显调控作用,这可能与调控 miR-17-5p 表达有关。

体内实验结果也显示,经过干预后,与模型组比较,miR-17-5p 抑制剂组和血管软化丸高、低剂量组外周血清中 IL-6 和 TNF-α 水平明显降低,IL-10 水平明显升高,miR-17-5p 抑制剂组和血管软化丸高、低剂量组主动脉 miR-17-5p 和 VLDLR mRNA 表达水平均明显降低,PCSK9 mRNA 表达水平明显升高;血管软化丸不同剂量组之间各项指标比较差异无统计学意义,不存在量效关系。病理学检测也证实,血管软化丸和 miR-17-5p 抑制剂均能防治 AS。

综上所述,血管软化丸防治 AS 的作用机制可能与靶向调控 miR-17-5p,靶向调控 VLDLR 或靶向调控 PCSK9 间接调控 VLDLR,抑制血管炎症反应,减轻 VSMC 损伤有关。

参考文献:

[1] MORIYA J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis[J]. J Cardiol, 2019, 73(1): 22-27.

[2] TAN L, MENG L, SHI X, et al. Knockdown of microRNA-17-5p ameliorates atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice and restores the expression of very low density lipoprotein receptor[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(7): 967-976.

[3] 秦合伟,李彦杰,李斯锦,等.化痰祛瘀中药抗动脉粥样硬化的作用机制研究[J].北京中医药大学学报,2019, 42(7): 566-576.

[4] 秦合伟,李彦杰,张志鑫,等.化痰祛瘀法通过调控 miR-181 影响输入蛋白 α3/NF-κB 通路的抗动脉粥样硬化的研究[J].北京中医药大学学报,2020, 43(8): 653-660.

[5] JING C, LIN X, QI H, et al. MiR-17-5p as circulating biomar-

- kers for the severity of coronary atherosclerosis in coronary artery disease[J]. *Int J Cardiol*, 2015, 197: 123-124.
- [6] QU S, WU F, TIAN J, et al. Role of VLDL receptor in the process of foam cell formation[J]. *J Huazhong Univ Sci Technology Med Sci*, 2004, 24(1): 1-4, 8.
- [7] MACDOUGALL E D, KRAMER F, POLINSKY P, et al. Aggressive very low-density lipoprotein (VLDL) and LDL lowering by gene transfer of the VLDL receptor combined with a low-fat diet regimen induces regression and reduces macrophage content in advanced atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice[J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(6): 2064-2073.
- [8] THORP E, CUI D, SCHRIJVERS D M, et al. MerTK receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-} mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(8): 1421-1428.
- [9] THORP E, VALSAR T, SUBRAMANIAN M, et al. Shedding of the Mer tyrosine kinase receptor is mediated by ADAM 17 protein through a pathway involving reactive oxygen species, protein kinase C delta, and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(38): 33335-33344.
- [10] SEIDAH N G, ABIFADEL M, PROST S, et al. The proprotein convertases in hypercholesterolemia and cardiovascular diseases; emphasis on proprotein convertase subtilisin/kexin 9 [J]. *Pharmacol Rev*, 2017, 69(1): 33-52.
- [11] 赵晶, 秦合伟, 李彦杰, 等. 血管软化丸调控 PI3K/Akt/mTOR 通路影响细胞自噬及抗动脉粥样硬化的作用机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(1): 65-69.
- [12] 秦合伟, 李彦杰, 任锟, 等. 基于 TLR3/TLR9 介导巨噬细胞自噬/极化效应探讨血管软化丸抗 AS 的作用机制[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(1): 156-160, 225.
- [13] 聂勇, 秦合伟, 吕哲, 等. 血管软化丸调控 miRNA-155 防治动脉粥样硬化的机制[J]. *安徽中医药大学学报*, 2021, 40(2): 72-76.
- [14] 秦合伟, 李彦杰, 李斯锦. 血管软化丸调控 CD40-CD40L 系统及抗动脉粥样硬化的作用机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(6): 1306-1309, 1543-1544.
- [15] QIN H W, LI Y J, GUO N, et al. Mechanism of vasomalacia pill regulating mirna-467b in inhibiting atherosclerosis[J]. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 2020, 127(8): 262-270.

(收稿日期: 2021-05-16)

Anti-atherosclerotic Effect of Xueguan Ruanhua Pill by Regulating miR-17-5p and the PCSK9/VLDLR Signaling Pathway

KONG Yan-fang¹, QIN He-wei^{1,2}, WANG Yuan², HU Chang-chun²

(1. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine & The Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Henan Zhengzhou 450002, China; 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Henan Zhengzhou 450002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory effect of Xueguan Ruanhua Pill on miR-17-5p and its downstream proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)/very low density lipoprotein receptor (VLDLR) signaling pathway and the anti-atherosclerotic mechanism of Xueguan Ruanhua Pill. **Methods** In a cell experiment, a model of vascular endothelial cell injury was established by adding oxidized low-density lipoprotein, and according to the intervention method, the cells were divided into model group, miR-17-5p inhibitor group, and high- and low-dose serum containing Xueguan Ruanhua Pill groups; after intervention, cell viability as well as the mRNA and protein expression levels of miR-17-5p, VLDLR, and PCSK9 in cells were measured. In an animal experiment, according to the intervention method, the mice were divided into model group, miR-17-5p inhibitor group, and high- and low-dose Xueguan Ruanhua Pill groups; after 8 weeks of intervention, the mice were observed in terms of the peripheral serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and tumor necrosis factor- α (TNF- α), the expression levels of miR-17-5p, VLDLR, and PCSK9 in the aorta, and pathological changes. **Results** In the cell experiment, compared with the model group, the miR-17-5p inhibitor group and the high- and low-dose serum containing Xueguan Ruanhua Pill groups had a significant increase in the viability of VSMCs ($P < 0.05$) and the mRNA and protein expression levels of miR-17-5p and VLDLR ($P < 0.05$) and significant reductions in the mRNA and protein expression levels of PCSK9 in VSMCs ($P < 0.05$). In the animal experiment, compared with the model group, the miR-17-5p inhibitor group and the high- and low-dose Xueguan Ruanhua Pill groups had significant reductions in the peripheral serum levels of IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$), a significant increase in the serum level of IL-10 ($P < 0.05$), significant reductions in the mRNA expression levels of miR-17-5p

肝豆汤改良方调控 PKR/eIF2 α 通路改善 Wilson 病模型 TX 小鼠突触功能障碍的机制研究

刘松杨¹,程楠²,徐陈陈²,董健健²,高曼莉¹

(1. 安徽中医药大学研究生院,安徽 合肥 230012;

2. 安徽中医药大学神经病学研究所附属医院,安徽 合肥 230061)

[摘要]目的 探究肝豆汤改良方调控双链 RNA 依赖蛋白激酶(double-stranded RNA-dependent protein kinase,PKR)/真核细胞起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α ,eIF2 α)通路改善 Wilson 病模型毒牛奶(toxic milk, TX)小鼠突触功能障碍的机制。方法 实验分为正常组、正常加肝豆汤改良方组、模型组、模型加肝豆汤改良方组,每组 20 只小鼠;正常组和模型组每日分 2 次予生理盐水灌胃,每次 20 mL/kg,正常加肝豆汤改良方组与模型加肝豆汤改良方组每日分 2 次予中药肝豆汤改良方各 20 mL/kg 灌胃给药,连续 4 周,末次给药结束后取各组小鼠海马组织进行检测;采用旷场实验、Barnes 迷宫实验检测 Wilson 病模型小鼠认知功能;采用 TUNEL 染色法检测小鼠海马组织中神经细胞凋亡情况;采用免疫荧光染色检测各组小鼠海马 8-羟化脱氧鸟苷(8-hydroxylated deoxyguanosine, 8-OHdG)的表达水平;采用 Western blot 法检测海马组织 PKR/eIF2 α 通路以及突触相关蛋白表达水平。结果 模型组小鼠的认知功能显著低于正常组($P<0.05$),模型加肝豆汤改良方组小鼠的认知功能显著高于模型组($P<0.05$);与正常组比较,模型组小鼠海马神经细胞凋亡数目显著增加($P<0.05$);与模型组比较,模型加肝豆汤改良方组小鼠海马神经细胞凋亡数量显著降低($P<0.05$),8-OHdG 表达水平显著降低($P<0.05$);小鼠海马内突触相关蛋白突触蛋白 1、突触素、突触后致密物-93、突触后致密物-95 表达水平显著增加($P<0.05$),小鼠海马 PKR/eIF2 α 通路相关蛋白 PKR、磷酸化 eIF2 α 、转录激活因子 4、促凋亡分子 C/EBP 同源蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。结论 肝豆汤改良方可通过调控 PKR/eIF2 α 通路,促进突触相关蛋白表达,减轻高铜诱导的突触功能障碍,改善 TX 小鼠认知功能损伤症状。

[关键词]突触功能障碍;PKR/eIF2 α 通路;肝豆汤改良方;Wilson 病;认知功能障碍

[中图分类号]R742.4 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2021.06.017

Wilson 病(Wilson's disease, WD)是由 ATP7B 基因突变引起以铜代谢障碍为表现的神经性遗传病^[1]。部分 WD 患者,特别是脑型患者伴有较明显的认知功能障碍,临床主要表现为记忆力减退、学习能力下降

等^[2]。安徽中医药大学神经病学研究所自 1970 年代开始使用具有清热解毒、通腑利湿作用的肝豆汤治疗 WD 患者获得显著临床疗效。肝豆汤改良方是在原肝豆汤组方基础上加芍药、山茱萸、三七等活血养髓药物组成,该改良方可改善脑损伤与肝损伤 WD 患者的认知功能^[3]。实验研究^[4]发现,肝豆汤改良方可通过调控细胞色素 C(cytochrome-C, Cyt-C)/

基金项目:国家自然科学基金项目(81904086)
作者简介:刘松杨(1993-),男,硕士研究生
通信作者:程楠(1972-),男,博士,教授,syschengnan@163.com

and VLDLR in the aorta ($P<0.05$), and a significant increase in the mRNA expression level of PCSK9 ($P<0.05$); pathological examination showed uneven thickness and rough intima of the aorta, with the formation of atherosclerotic plaques, in which light-stained amorphous matter and calcified particles were observed, and the cross-sectional area of some atherosclerotic plaques was larger than that of the aorta. Compared with the model group, the miR-17-5p inhibitor group and the high- and low-dose Xueguan Ruanhua Pill groups had alleviation of atherosclerotic lesions. **Conclusion** Xueguan Ruanhua Pill exerts a preventive and therapeutic effect on atherosclerosis through targeted regulation of miR-17-5p to affect the PCSK9/VLDLR signaling pathway, inhibit vascular inflammatory response, and alleviate endothelial cell injury.

[Key words] atherosclerosis; Xueguan Ruanhua Pill; vascular endothelial cell; miR-17-5p