

芪参益气滴丸对ApoE基因敲除小鼠动脉粥样硬化中调节性T细胞的影响

彭立, 沈佳成, 王亚东, 吕崇山, 赵云, 卢大为, 黄淑琼, 杨宗保, 钱林超, 文磊

(厦门大学医学院, 厦门 361102)

摘要: 目的: 研究芪参益气滴丸对动脉粥样硬化中调节性T细胞的影响。方法: 采用6周龄雄性C57BL/6J小鼠和ApoE基因敲除小鼠, 分为正常组、模型组、芪参低剂量组、芪参高剂量组, 每组6只。除正常组外, 其他3组小鼠均给予高脂饲料喂养, 药物组还给予高、低剂量的芪参益气滴丸, 8周后评价内脏指数、动脉粥样硬化病变、调节性T细胞情况。结果: 与模型组比较, 芪参高剂量组可显著降低肝指数 ($P<0.05$), 减少动脉粥样硬化斑块面积 ($P<0.05$, $P<0.01$), 并增加脾脏调节性T细胞数量 ($P<0.01$)。结论: 芪参益气滴丸可能通过增加脾脏调节性T细胞数量抑制动脉粥样硬化形成。

关键词: 动脉粥样硬化; 斑块; 芪参益气滴丸; 调节性T细胞

基金资助: 福建省自然科学基金项目 (No.2016J01413), 广东省自然科学基金项目 (No.2016A030313860), 教育部留学回国人员科研启动基金项目 (No.2015-311), 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目 (No.NCET-13-0505), 国家重点研发计划“重大慢性非传染性疾病防控研究”重点专项 (No.2016YFC1305903)

Effects of Qishen Yiqi Dripping Pills on regulatory T cells in ApoE gene knockout mice with atherosclerosis

PENG Li, SHEN Jia-cheng, WANG Ya-dong, LYU Chong-shan, ZHAO Yun, LU Da-wei, HUANG Shu-qiong, YANG Zong-bao, QIAN Lin-chao, WEN Lei

(Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: Objective: To study the effect of of Qishen Yiqi Dripping Pills (QSYQ) on regulatory T cells in atherosclerosis. Methods: Six-week male C57BL/6J mice and ApoE gene knockout mice were randomly divided into control group, model group, QSYQ low dosage group and QSYQ high dosage group, six mice in each group. Except for the control group, mice in the other three groups were fed with high fat diet, and those in the drug treatment groups were administered with high or low dosage QSYQ respectively at the same time. Internal organs index, aortic atherosclerosis lesion and regulatory T cells were determined. Results: Compared with model group, QSYQ could significant decreased liver index ($P<0.05$), attenuate aortic atherosclerotic plaque area ($P<0.05$, $P<0.01$), and increase the quantity of regulatory T cells in spleen ($P<0.01$). Conclusion: QSYQ might inhibit the formation of atherosclerosis by increasing the quantity of regulatory T cells in spleen.

Key words: Atherosclerosis; Plaque; Qishen Yiqi Dripping Pills; Regulatory T cell

Funding: Natural Science Foundation of Fujian Province (No.2016J01413), Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.2016A030313860), Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (No.2015-311), Program for New Century Excellent Talents in University of Ministry of Education (No.NCET-13-0505), National Key Research and Development Program of China (No.2016YFC1305903)

根据2015年中国心血管病报告, 心血管病死亡占城乡居民总死亡原因的首位, 已成为重大的公共卫生问题, 其主要病理基础动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 被认为是一种炎症性疾病^[1]。调

节性T细胞 (regulatory T cell, Treg) 是近年发现的辅助性T细胞亚群, 被证实通过分泌转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 和白介素10 (interleukin 10, IL-10) 具有抑制细胞免疫反应的作

用,而清除Treg亚群可以促进高胆固醇血症和AS^[2],提示Treg可能通过抑制免疫反应和胆固醇代谢影响AS进展。芪参益气滴丸是临床常用于治疗气虚血瘀型冠心病的中成药,由黄芪、丹参、三七、降香4味药物组成,具有益气通脉、活血止痛的功效。临床和实验研究显示,芪参益气滴丸及其有效成分具有抑制炎症反应、促进粥样斑块稳定的作用^[3]。本研究拟进一步探讨芪参益气滴丸是否通过影响Treg而发挥抗动脉粥样硬化的作用。

材料与方法

1. 仪器与试剂 电子天平(梅特勒托利多仪器上海有限公司,型号:ME104E/02),电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司,型号:DGG-9203A),冰冻切片(德国Leica Biosystems Nussloch GmbH,型号:CM 1950),倒置显微镜(日本OLYMPUS Corporation,型号:IX53),图像拍摄系统(日本OLYMPUS Corporation,型号:cellSens Standard 1.9)。芪参益气滴丸(组成:黄芪、丹参、三七、降香,规格:0.5g/袋,天士力制药股份有限公司,批号:140706),油红O(规格:5g/瓶,南京奥多福尼生物科技有限公司,货号:150126),抗叉头状蛋白P3抗体(forkhead box P3, Foxp3,规格:100 μ L/瓶,艾博抗上海贸易有限公司,货号:Ab54501)。

2. 动物 SPF级雄性C57BL/6J小鼠和ApoE基因敲除小鼠(品系C57BL/6J),6周龄,体质量21-23g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2014-0004。动物饲养于厦门大学海峡中医药研究中心,提供充足的饮用水和标准饲料,温度保持在22 $^{\circ}$ C,相对湿度控制在50%,12h光照-黑暗循环,适应性饲养1周后进行实验。动物实验过程获得厦门大学医学院实验动物伦理委员会批准,并按实验动物使用的3R原则给予人道关怀。

3. 实验设计 ApoE基因敲除小鼠随机分为模型组、芪参低剂量组、芪参高剂量组,每组各6只小鼠,3组小鼠均给予高脂饲料喂养(高脂配方:基础饲料79%,猪油21%,胆固醇0.15%),芪参低剂量组给予芪参益气滴丸0.3g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹(人等效剂量),芪参高剂量组给予芪参益气滴丸1.5g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹(人等效剂量的5倍),溶于0.3mL 0.9%氯化钠溶液中腹腔注射,模型组和正常组给予等量0.9%氯化钠溶液。正常组为同年龄C57BL/6J小鼠6只,正常饲料喂养。给药8周后取材,用10%水合氯醛进行腹腔麻醉,收集腹主动脉血液后,经心脏灌注20mL的1 \times PBS和20mL的4%多聚甲醛

(PFA),取出主动脉、心脏、肝脏、脾脏、胸腺等器官。

4. 内脏指数测定 肝脏、脾脏、胸腺取出后,剥去包膜及连接的脂肪组织,之后用预冷的0.9%氯化钠溶液洗净内脏并用滤纸吸干、擦净,置于电子天平进行称重,内脏指数=内脏重量(mg)/自身体质量(g)。

5. 病理形态学染色及测量 动脉粥样硬化损伤评价主要采用主动脉根部油红O染色法,用最佳切割温度复合物(OCT)包埋心脏后对主动脉根部行连续冰冻切片(10 μ m),每隔10张切片进行油红O染色,采用图像拍摄系统在100倍镜下进行摄片,用Image J软件定量测量动脉粥样硬化损伤面积,结果以损伤面积占主动脉管壁的面积比进行表示。

6. 免疫组化染色及测量 冰冻切片室温干燥30min,4%PFA固定10min,1 \times PBS清洗2 \times 5min。3% H_2O_2 /PBS孵育5min,1 \times PBS清洗5min。5%山羊血清/0.3%Triton-X100/PBS封闭20min。一抗加入封闭液中,于室温孵育1-2h或4 $^{\circ}$ C过夜,1 \times PBS清洗5min。生物素化二抗室温孵育30min,1 \times PBS清洗5min。Streptavidin Peroxidase室温孵育30min,1 \times PBS清洗5min。新鲜配置的DAB显色10min,1 \times PBS清洗5min。苏木素染色1min,自来水洗2 \times 5min。中性树脂封片。每隔10张切片进行免疫组化染色,采用图像拍摄系统在400倍镜下进行摄片,每张切片随机选3个视野,计数Foxp3阳性染色细胞数,结果以Foxp3阳性染色细胞数/切片进行表示。

7. 统计学方法 所有数据均符合正态分布,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD法,统计软件为SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 芪参益气滴丸对高脂喂养的ApoE基因敲除小鼠体质量及内脏指数的影响 结果显示,各组小鼠实验前后体质量差异无统计学意义,提示高脂和药

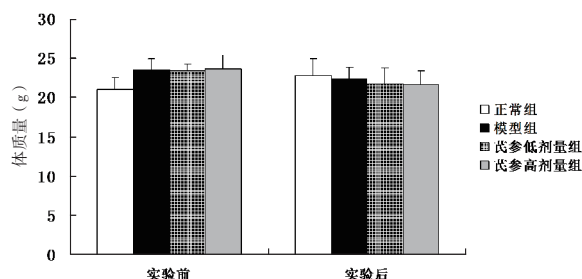


图1 芪参益气滴丸对高脂喂养的ApoE基因敲除小鼠体质量的影响(n=6)

物因素并未显著影响小鼠的正常生长, 见图1。与正常组比较, 模型组肝指数显著升高 ($P < 0.01$), 而脾指数和胸腺指数则明显低于正常组 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 芪参高剂量组肝指数明显降低 ($P < 0.05$), 但芪参高、低剂量组脾指数和胸腺指数无明显变化, 见图2。

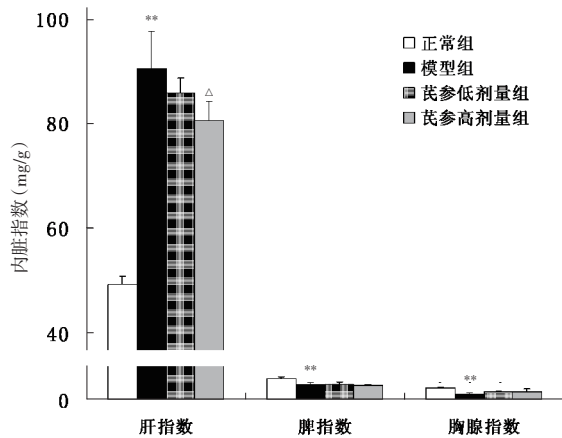


图2 芪参益气滴丸对高脂喂养的ApoE基因敲除小鼠内脏指数的影响 ($n=6$)

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$ 。

2. 芪参益气滴丸对高脂喂养的ApoE基因敲除小鼠动脉粥样硬化损伤的影响 见图3。结果显示, 模型组小鼠在主动脉起始部出现较大粥样硬化斑块,

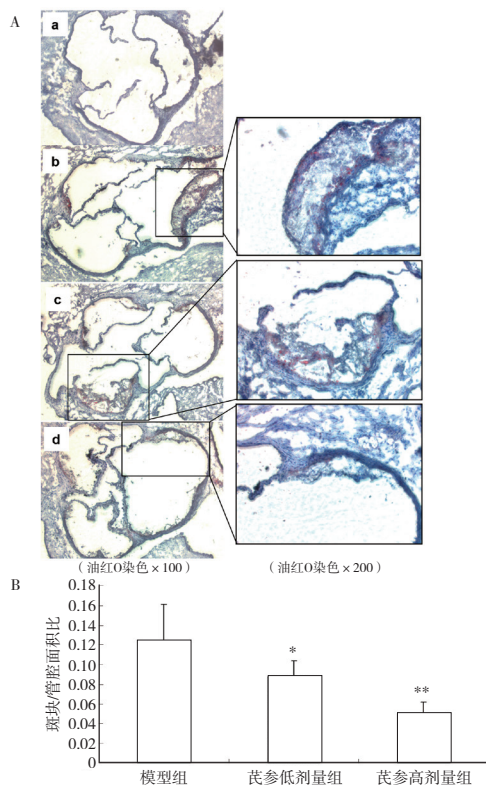


图3 芪参益气滴丸对各组小鼠动脉粥样硬化损伤的影响 ($n=6$)

注: a、b、c、d分别为正常组、模型组、芪参低剂量组、芪参高剂量组。与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。图4同。

内部有大量脂滴沉积, 结构较疏松, 斑块占管腔总面积约12%, 芪参高、低剂量组均能显著减小斑块与管腔的面积比 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而且芪参高剂量组的作用更强, 显示一定的剂量依赖特征。

3. 芪参益气滴丸对高脂喂养的ApoE基因敲除小鼠调节性T细胞的影响 见图4。结果显示, 与正常组比较, 模型组脾脏Treg的数量显著减少 ($P < 0.05$)。芪参高剂量组与模型组比较可显著增加脾脏Treg数量 ($P < 0.01$), 提示芪参益气滴丸可能通过增加脾脏Treg发挥抑制动脉粥样硬化的作用。

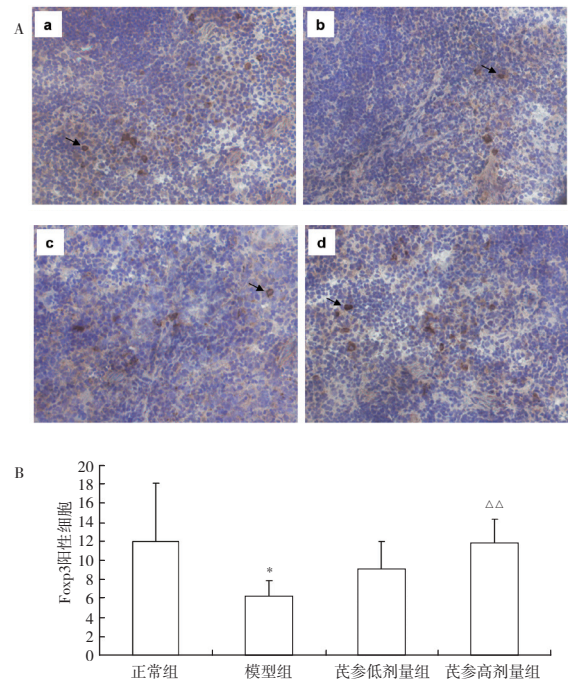


图4 芪参益气滴丸对高脂喂养的ApoE基因敲除小鼠脾脏Treg的影响 ($n=6$)

注: A为脾脏Treg免疫组化染色图 (Treg免疫组化染色 $\times 400$), a、b、c、d分别为正常组、模型组、芪参低剂量组、芪参高剂量组。图中箭头指示Foxp3阳性染色细胞 (Treg细胞)。B为各组Treg数量的比较。与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

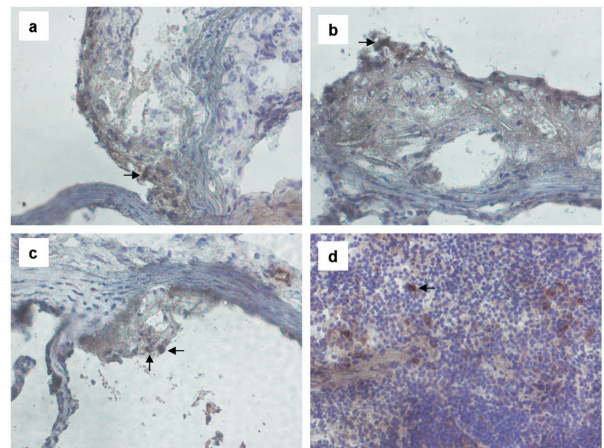


图5 芪参益气滴丸对高脂喂养的ApoE基因敲除小鼠粥样斑块区Treg的影响 (Treg免疫组化 $\times 400$)

注: a、b、c分别为模型组、芪参低剂量组、芪参高剂量组, d为正常脾脏阳性对照。图中箭头指示Foxp3阳性染色细胞 (Treg细胞)。

图5结果显示,各组斑块区Treg数量较少,约1-2个,无法进行定量统计比较,Treg多位于斑块表面纤维帽附近,提示斑块区Treg可能通过分泌细胞因子发挥抑制动脉粥样硬化的作用。

讨论

心血管疾病主要病理基础是以管腔狭窄、供血不足、血栓形成、组织坏死为特征的,AS是其主要病理改变,它是一种慢性透壁性炎性疾病,主要由巨噬细胞吞噬氧化修饰的低密度脂蛋白、引发一系列持续慢性的免疫反应,初期表现为脂纹、脂斑,中后期形成粥样斑块、纤维斑块,直至斑块破裂、血栓形成。其中,过度的免疫反应对斑块形成和斑块破裂的多个环节均起着重要的作用。Treg细胞主要由胸腺中T细胞发育而来,其表达Foxp3并分泌TGF- β 1和IL-10,对多种免疫细胞发挥免疫抑制作用。

临床研究显示,急性冠脉综合征患者与正常人和稳定性心绞痛患者比较,外周血Treg的亚群比例明显降低,同时Foxp3的表达和血浆TGF- β 1浓度也明显降低^[4]。在人体AS斑块中,Foxp3⁺Treg出现于粥样硬化损伤的所有阶段,但数量和功能都相对偏低,不足以抑制AS介导的炎性反应^[5]。采用抗-CD3抗体可扩增Foxp3⁺Treg的比例,减少动脉壁巨噬细胞的聚集,增加TGF- β 1的含量,减少粥样斑块的形成^[6]。而通过注射白喉毒素清除小鼠的Foxp3⁺Treg,则可造成血浆胆固醇水平的升高和炎性反应的加重,促进AS的进展^[2]。

芪参益气滴丸具有补虚、行滞、化痰的作用,针对气虚血瘀型冠心病患者血脂代谢紊乱的虚、瘀、滞具有良好的治疗作用。其抗AS机制包括:降低血脂,升高肝组织肝酯酶活性,降低高敏C反应蛋白水平,上调TGF- β 1表达等^[7]。本研究结果证实,芪参益气滴丸高剂量组可以显著降低肝指数,减小斑块与管腔的面积比,抑制斑块内脂滴沉积等,但其作用是否通过影响Treg功能而实现则不清楚。初步研究显示,单味黄芪和丹参即可促进体外培养的CD4⁺T细胞

向Treg分化,显著增加Foxp3的阳性表达率^[8]。而黄芪或丹参为主药的相关制剂均可上调Foxp3、TGF- β 1的mRNA水平,提高Treg细胞及相关细胞因子IL-10的水平,达到抑制效应性T细胞的作用^[9-10]。本研究证实,芪参益气滴丸高剂量组可显著增加粥样硬化小鼠脾脏的Foxp3⁺Treg数量,Foxp3⁺Treg主要位于粥样斑块的纤维帽附近,其抗粥样硬化作用可能通过分泌细胞因子如IL-10和TGF- β 1而实现。综上所述,本研究从免疫调节角度发现了芪参益气滴丸抗AS的新途径,为其临床应用提供了新的科学依据。

参 考 文 献

- [1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126
- [2] Klingenberg R, Gerdes N, Badeau R M, et al. Depletion of FOXP3+ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Clin Invest*, 2013, 123(3): 1323-1334
- [3] 谢伟, 康立源, 张德生, 等. 芪参益气滴丸防治动脉粥样硬化疾病研究进展. *中国中医药信息杂志*, 2012, 19(10): 108-110
- [4] Potekhina A V, Pylaeva E, Provatorov S, et al. Treg/Th17 balance in stable CAD patients with different stages of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2015, 238(1): 17-21
- [5] Patel S, Chung S H, White G, et al. The 'atheroprotective' mediators apolipoprotein A-I and Foxp3 are over-abundant in unstable carotid plaques. *Int J Cardiol*, 2010, 145(2): 183-187
- [6] Kita T, Yamashita T, Sasaki N, et al. Regression of atherosclerosis with anti-CD3 antibody via augmenting a regulatory T-cell response in mice. *Cardiovascular Research*, 2014, 102(1): 107-117
- [7] 燕芳芳, 刘艳, 刘运芳, 等. 芪参益气滴丸对实验性动脉粥样硬化超敏C反应蛋白的影响. *上海中医药杂志*, 2007, 41(2): 59-60
- [8] 董文毅, 胡刚正, 张博, 等. 黄芪等12味中药在体外培养中对人调节性T细胞分化的影响. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(24): 2770-2774
- [9] 魏强华, 聂紫雯. 黄芪注射液对NOD小鼠CD4+CD25+CD127(-/low)调节性T细胞的影响. *免疫学杂志*, 2010(4): 316-319
- [10] 彭立, 钱林超, 文磊, 等. 中医药对Th17/Treg平衡调节的影响及在炎性疾病中的作用. *中华中医药杂志*, 2015, 30(10): 3598-3601

(收稿日期: 2016年12月15日)