

当归芍药散对动脉粥样硬化小鼠的干预作用及 DNA 甲基转移酶 1 和 PPAR- γ 表达的影响

任攀 康群甫 周明学 张蕾 李思耐 刘卫红

【摘要】 目的 研究当归芍药散对载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠主动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块的干预作用及 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 和 PPAR- γ 表达的影响。**方法** 将 30 只 8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠西方类型膳食喂养 9 周, 随机分为模型组、立普妥组 (阳性对照组) 和当归芍药散组 ($n=10$), 药物干预 9 周后, 检测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、血清 DNA 甲基化水平及 DNMTs 水平。行苏木素-伊红染色 (hematoxylin and eosin staining, HE), 采用 IPP 图像分析软件测量小鼠主动脉 As 斑块面积。免疫组化法检测各组小鼠主动脉 As 斑块内 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 和过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (PPAR γ) 的表达。**结果** 与模型组相比, 当归芍药散组和立普妥组小鼠血清 TC、

基金项目: 国家自然科学基金 (81573735); 北京市自然科学基金 (7142037)

作者单位: 100010 北京, 首都医科大学附属北京中医医院北京市中医研究所 [任攀 (硕士研究生)、康群甫 (硕士研究生)、周明学、张蕾、李思耐、刘卫红]

作者简介: 任攀 (1990-), 2015 级在读硕士研究生。研究方向: 中西医结合心血管病研究。E-mail: renpanzy@163.com

通信作者: 刘卫红 (1968-), 女, 博士, 硕士生导师, 主任医师。研究方向: 中医药防治心血管病的疗效评价及作用机制研究。E-mail: wh. l-007@163.com

TG 水平明显降低($P<0.05$),当归芍药散组小鼠血清 HDL-C 水平明显升高($P<0.05$)。与模型组相比,当归芍药散组小鼠主动脉 As 斑块面积显著降低($P<0.01$),当归芍药散组小鼠主动脉斑块内 DNMT1 表达显著降低($P<0.05$),PPAR γ 表达显著升高($P<0.05$)。结论 当归芍药散可改善 As 小鼠的血脂水平,减少 As 斑块面积,具有明确的抗 As 作用,其机制可能与抑制 As 小鼠血清甲基化水平和 DNMTs 水平,促进 As 小鼠主动脉斑块内 PPAR γ 表达和抑制斑块内 DNMT1 表达有关。

【关键词】 动脉粥样硬化; 当归芍药散; DNA 甲基化; DNA 甲基化转移酶; DNA 甲基转移酶 1; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

【中图分类号】 R285.5 【文献标识码】 A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.11.009

Effects of Danggui Shaoyao powder on the DNMT1 and the expression of PPAR γ in atherosclerotic mice REN Pan, KANG Qunfu, ZHOU Mingxue, et al. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China

Corresponding author: LIU Weihong, E-mail: wh.1-007@163.com

【Abstract】 **Objective** To study the effects of Danggui Shaoyao powder on the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and PPAR γ in apolipoprotein E knockout (ApoE $^{-/-}$) mice with atherosclerosis. **Methods** Thirty 8 week-old male ApoE $^{-/-}$ mice were fed with high fat diet for 9 weeks, and the mice were randomly divided into the control group, the Lipitor (positive control group), the Danggui Shaoyao powder group ($n=10$). The levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum were detected. The level of DNA Methylation and the DNMTs in serum were detected. HE staining was used to measure the area of atherosclerosis plaque of mice. Immuno-histochemical staining and image analysis were used to measure the expressions of DNMT1 and PPAR γ in the atherosclerosis plaques of mice. **Results** Compared with the model group, the TC and TG levels of Danggui Shaoyao powder group and Lipitor group were significantly decreased ($P<0.05$), the HDL-C levels of Danggui Shaoyao powder group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the aorta As plaque area was significantly decreased in Danggui Shaoyao powder group ($P<0.05$). The expressions of DNMT1 of the Danggui Shaoyao powder group were significantly reduced ($P<0.05$) while the expressions of PPAR γ were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Danggui Shaoyao powder can improve the blood lipid level and the plaque area of As mice. The mechanism may be related to the reduction of DNA methylation level and the DNMTs level in serum, and also related to the inhibition of DNMT1 expression, and the promotion of PPAR γ expression in mice with As.

【Key words】 Atherosclerosis; Danggui Shaoyao powder; DNA methylation; DNA methyltransferase; DNA methyltransferase 1; Peroxisome proliferator activated receptor gamma

炎症能够导致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的发生,是 AS 发生发展的病理基础^[1]。DNA 甲基化是表观遗传学的一种重要的调控方式。新近研究表明,DNA 甲基化的异常能够促进 AS 的发生发展^[2]。DNA 甲基化受炎症信号通路的影响,DNA 甲基化转移酶 1 (DNMT1) 能够促进 AS 有关的巨噬细胞的炎性激活,并通过抑制 PPAR γ 介导的抗炎作用来促进小鼠 AS 的发展^[3-4]。当归芍药散出自汉代张仲景的《金匮要略》,对 AS 和高脂血症等疾病有较好的治疗作用^[5-8]。既往研究表明,当归芍药散具有明确的抗炎、调脂作用^[8-9],而 DNA 甲基化与炎症和 AS 均关系密切,从 DNA 甲基化调控角

度研究当归芍药散抗 AS 的机制,具有较好的创新性和研究价值。因此,本实验拟采用高脂饮食喂养的 ApoE $^{-/-}$ 小鼠为 AS 模型,研究当归芍药散对 AS 小鼠主动脉粥样硬化的干预作用及对 DNA 甲基化水平、DNMT1 和 PPAR γ 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 检测试剂盒 (批号: 010503040-100301)、血清甘油三酯 (triglyceride, TG) 检测试剂盒 (批号: 010503041-100301)、血清低密度脂蛋白胆固醇 (low density

lipoprotein cholesterol, LDL-C) 检测试剂盒(批号: 010503291-091201)、血清高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 检测试剂盒(批号: 010503290-091201), 购自英科新创(厦门)科技有限公司。小鼠血清 DNA 甲基化转移酶检测试剂盒(批号: CKE433652M), 购自美国 R&D 公司。血生化指标检测采用日本奥林巴斯株式会社全自动生化仪(AU400)。美国 Image-ProPlus Version 6.0(IPP)图像分析软件。

1.2 实验药物

阿托伐他汀钙, 商品名立普妥, 上海辉瑞制药有限公司, 批号: H20051408。当归芍药散(当归 30 g、赤芍 160 g、茯苓 40 g、白术 40 g、泽泻 80 g、川芎 30 g), 中药饮片由首都医科大学附属北京中医医院中药房提供。

1.3 动物及分组

8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠(品系 C57BL/6J), 体重 18~20 g, 购自北京维通利华实验技术有限公司, 30 只, 高脂饲养 9 周后, 所有小鼠随机分为模型组、立普妥组(阳性对照组)和当归芍药散组, 每组 10 只。当归芍药散选取临床等效剂量, 并按成人与小鼠的给药剂量换算系数折算成小鼠用量(2.2 g/kg)灌胃给药^[8], 每日 1 次, 灌胃给药 9 周。模型组给予等量的生理盐水。高脂饲料配方为脂肪 21% (wt/wt)、胆固醇 0.15% 的西方类型膳食饲料^[10]。各组动物在喂养 18 周后, 颈椎脱臼法处死, 眶下静脉丛取血, 血清-80℃保存, 无菌条件下取心脏, 心脏用 4% 多聚甲醛固定。

1.4 血脂检测

采用氧化酶法和直接法检测当归芍药散对高脂喂养 18 周 ApoE^{-/-}小鼠血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平的影响。

1.5 血清 DNA 甲基化水平及 DNA 甲基化转移酶检测

采用高效液相色谱法(HPLC)检测血清 DNA 甲基化水平。在 100 μL(含 DNA 约 25 μg)的 DNA 溶液中加入 70% 的高氯酸 50 μL, 在 95℃下水解 50

分钟, 然后用浓度为 1 mol/L KOH 调节 pH 3~5, 12000 r/min 离心 5 分钟, 取上清滤过, 注入 HPLC 中进行检测。采用 ELISA 法检测血清 DNMTs 水平。

1.6 组织病理

小鼠心底部横断面连续切片, 每隔 50 μm 连续取 6 张切片, 切片厚 5 μm。采用 HE 病理染色和 IPP 图像软件分析测量小鼠主动脉 As 斑块面积; 测量管腔面积(LA, mm²)、内弹力膜围绕面积(IELa, mm²), 并计算斑块面积、校正后斑块面积。斑块面积(PA, mm²) = IELa - LA。校正后斑块面积 = PA/IELa。

1.7 免疫组化检测

免疫组化染色选取小鼠主动脉同一水平位置的斑块, 采用两步法测定斑块内 DNMT1 和 PPARγ 的表达。(DNMT1 抗体稀释度为 1:100, PPARγ 抗体稀释度为 1:50), 每组均以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 在 200 倍镜下每张切片选取 5 个不同的视野, 对阳性区域累积面积进行定量测定, 最后求取斑块内阳性区域面积占斑块面积的百分比。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 11.5 软件对数据进行统计分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示。首先进行正态性和方差齐性检验, 符合正态分布及方差齐性的数据采用方差分析, 符合正态分布但方差不齐的数据选用 Wilcoxon 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 当归芍药散对高脂喂养 18 周 ApoE^{-/-}小鼠血脂的影响

小鼠灌胃 9 周后, 与模型组相比, 当归芍药散组和立普妥组小鼠血清 TC、TG 水平明显降低($P < 0.05$)。与模型组相比, 当归芍药散组小鼠血清 HDL-C 水平明显升高($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 当归芍药散对高脂喂养 18 周 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块面积的影响

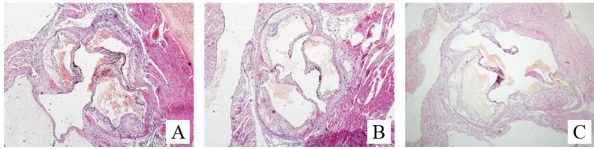
药物干预 9 周后, 经 HE 染色和 IPP 图像软件

表 1 当归芍药散对高脂喂养 18 周 ApoE^{-/-}小鼠血脂的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
模型组	39.44±0.36	2.20±0.08	11.18±0.63	5.18±0.13
立普妥组	35.84±1.20 ^a	1.48±0.07	8.45±0.77 ^a	5.91±0.38
当归芍药散组	35.80±1.27 ^a	1.50±0.14 ^a	8.83±1.04	5.99±0.25 ^a

注: 与模型组相比, ^a $P < 0.05$ 。

分析结果显示:与模型组相比,当归芍药散组小鼠校正后主动脉 As 斑块面积显著降低($P<0.05$),与阳性对照立普妥组之间无显著差异($P>0.05$)。见图 1、表 2。



注:A 模型组;B 立普妥组;C 当归芍药散组

图 1 当归芍药散对 As 小鼠主动脉斑块的影响 HE 染色图($\times 100$)

表 2 当归芍药散对 As 小鼠主动脉斑块的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	校正后斑块面积(%)
模型组	30.55±1.74
立普妥组	18.10±1.40 ^a
当归芍药散组	17.23±2.20 ^a

注:与模型组相比,^a $P<0.05$ 。

2.3 当归芍药散对高脂喂养 18 周 ApoE^{-/-} 小鼠血清 DNA 甲基化水平及 DNA 甲基转移酶的影响

药物干预 9 周后,结果显示:药物干预 9 周后,与模型组相比,当归芍药散组小鼠血清 DNA 甲基化水平及 DNMTs 水平显著降低($P<0.05$)。见表 3。

表 3 当归芍药散对 As 小鼠血清 DNA 甲基化水平及 DNA 甲基转移酶的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	DNA 甲基化水平(%)	DNMTs(U/L)
模型组	18.47±0.41	96.76±2.58
立普妥组	8.58±0.39 ^a	34.94±2.46 ^a
当归芍药散组	12.54±0.54 ^a	59.64±3.36 ^a

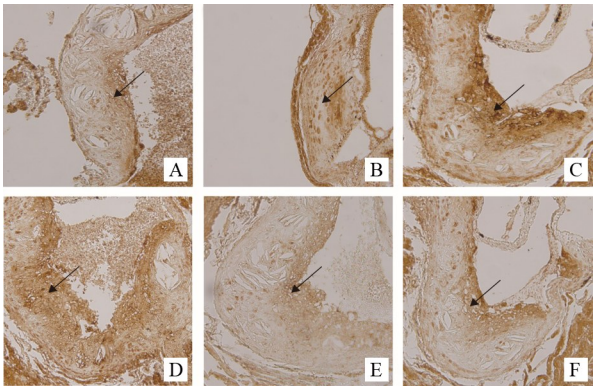
注:与模型组相比,^a $P<0.05$ 。

2.4 当归芍药散对高脂喂养 18 周 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块内 PPAR γ 和 DNMT1 表达的影响

药物干预 9 周后,免疫组化结果显示:与模型组相比,当归芍药散组小鼠主动脉斑块内 PPAR γ 表达面积百分比明显增多($P<0.05$),DNMT1 表达面积的百分比显著降低($P<0.05$)。见图 2、表 4。

3 讨论

当归芍药散出自汉代张仲景的《金匱要略》,方中当归、川芎、芍药活血化瘀,茯苓、白术、泽泻化痰利水、健脾益气。诸药合用,共奏活血化瘀、化痰祛浊和补虚渗湿之功。AS 的中医病机多属本虚标



注:A. 模型组 B. 立普妥组 C. 当归芍药散组,三组小鼠主动脉斑块内 PPAR γ 表达。D. 模型组 E. 立普妥组 F. 当归芍药散组,三组小鼠主动脉斑块内 DNMT1 表达。图片中箭头所指棕色颗粒为阳性表达。

图 2 当归芍药散对 As 小鼠主动脉斑块内 PPAR γ 和 DNMT1 表达的影响($\times 200$)

表 4 当归芍药散对 As 小鼠主动脉斑块内 PPAR γ 和 DNMT1 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

分组	PPAR γ 表达面积 百分比(%)	DNMT1 表达面积 百分比(%)
模型组	45.56 ± 5.99	66.48 ± 5.19
立普妥组	71.47 ± 6.24 ^a	30.74 ± 4.01 ^a
当归芍药组	75.34 ± 9.10 ^a	29.69 ± 3.06 ^a

注:与模型组相比,^a $P<0.05$ 。

实,本虚即气虚,标实即“痰证”“瘀证”等病症。由痰致瘀,痰瘀互结,是 AS 的主要病机。因此,本实验根据 AS 的主要病机,采用了祛湿化痰活血的当归芍药散来治疗 AS。有研究表明,当归芍药散通过提高 PPAR γ 的表达,调节血脂,抑制炎症反应,对早期 AS 具有较好的治疗作用^[8]。本实验结果亦提示当归芍药散可改善 AS 小鼠的血脂水平,其中对 TG 的作用尤为显著,同时还可以降低小鼠主动脉斑块面积,具有较好的调节血脂和抗 AS 作用,与董培良等人的研究相一致^[5,8-9]。

DNA 甲基化可通过调控与 AS 有关的炎症免疫细胞和炎症因子来影响 AS 的发生与发展^[11-13]。基因组甲基化水平与冠心病及冠心病风险呈正相关,例如,氧化低密度脂蛋白可通过上调 DNMTs 活性使 DNA 甲基化高表达,从而增加 AS 的风险^[4,14]。DNMTs 在 DNA 甲基化的过程中是必不可少的,主要包括 DNMT1、DNMT2、DNMT3 三种。其中, DNMT1 在细胞分裂过程中起最主要的、稳定的维持甲基化状态作用^[15-16]。在 DNMT1 特异性表达的小鼠巨噬细胞中, DNMT1 能够增加促炎因子的产生,

促进 AS 的进展^[4]。本实验中,模型组小鼠血清 DNA 甲基化和 DNMTs 处于较高的水平,而当归芍药散组小鼠血清 DNA 甲基化水平和 DNMTs 水平显著降低,提示当归芍药散抗 AS 的机制可能与降低血清 DNMTs 水平和 DNA 甲基化水平有关。

PPAR γ 可以调节细胞的分化、增殖和生存。活化的 PPAR γ 可通过多种信号通路抑制 AS 斑块中促炎因子的表达,减轻免疫和炎症反应,减少泡沫细胞形成,从而稳定斑块,延缓 AS 的发展^[17]。课题组前期的研究^[8]也表明,当归芍药散可能通过调控核转录因子 NF- κ B 和 PPAR γ 受体,抑制小鼠体内代谢性炎症反应,从而对早期 AS 起到干预作用。

新近研究提示 PPAR 信号通路的表达受到 DNMT1 的显著影响。赵静^[18]研究表明,PPAR γ 基因 DNA 甲基化水平与 DNMTs 活性呈正相关,DNA 甲基化可能通过调控相关炎症基因的表达,提高炎症因子的水平,促进炎症反应,导致 AS 的发生与发展^[19]。Yu 等^[4]的研究指出, DNMT1 能够调控 PPAR γ 的显性表达,促进 AS 有关的巨噬细胞的炎症激活,并通过抑制 PPAR γ 介导的抗炎作用来促进小鼠 AS 的发展。DNMT1 的下游因子 PPAR γ 能有效调节巨噬细胞炎症细胞因子的产生,抑制小鼠 AS 的发展。本实验结果显示,与模型组小鼠相比,当归芍药散组小鼠主动脉斑块内 DNMT1 的表达显著降低,而斑块内 PPAR γ 的表达显著上升,提示当归芍药散可能通过调节 DNMT1-PPAR γ 信号通路来发挥抗 AS 的作用,而 DNMT1 和 PPAR γ 可能是当归芍药散抗 AS 甲基化机制的两个重要靶点。

综上所述,当归芍药散在降低 AS 小鼠血脂,减少 AS 斑块面积方面疗效显著,具有明确的抗 AS 作用,其甲基化机制可能与降低 AS 小鼠血清 DNMTs 和 DNA 甲基化水平以及调节 AS 小鼠主动脉斑块内 PPAR γ 和 DNMT1 表达有关。

参 考 文 献

- [1] 刘俊田. As 发病的炎症机制的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版),2015,36(2):141-152.
- [2] 谭剑凯,谭小进,王佐. DNA 甲基化与 As[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2014,30(2):132-136.
- [3] Khyzha N, Alizada A, Wilson MD, et al. Epigenetics of Atherosclerosis; Emerging Mechanisms and Methods[J]. Trends Mol Med,2017,23(4):332-347.
- [4] Yu J, Qiu Y, Yang J, et al. DNMT1-PPAR γ pathway in macrophages regulates chronic inflammation and atherosclerosis development in mice[J]. Sci Rep,2016,(17):30053.
- [5] 宋晓宇,张天真,徐薇,等. 当归芍药散治疗血脂异常痰瘀互结证的临床观察[J]. 河北中医报,2009,24(1):12-13.
- [6] 陈静,叶平,阎艳丽,等. 当归芍药散防治高脂血症的实验研究[J]. 天津中医药,2005,22(6):493-494.
- [7] 阎艳丽,吉梅,宋晓宇,等. 当归芍药散对血脂异常大鼠抗氧化能力及动脉壁血管细胞黏附分子-1 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(2):25-28.
- [8] 贾丽超,周明学,张蕾,等. 当归芍药散对代谢性炎症反应小鼠血脂和血清炎症反应因子 IL-6、MCP-1 及 NF- κ B、PPAR γ 、mRNA 表达的影响[J]. 首都医科大学学报,2014,35(6):813-817.
- [9] 董培良,殷鑫,张天宇,等. 当归芍药散对实验性高脂血症模型大鼠的影响(1)[J]. 中医学报,2013,41(6):81-83.
- [10] XR Yang, E Wat, YP Wang, et al. Effect of Dietary Cocoa Tea (Camellia ptilophylla) Supplementation on High-fat Diet-Induced Obesity, Hepatic Steatosis and Hyperlipidemia in Mice [J]. Evidence-BASed Complementary and Alternative Medicine, 2013,(3):783-860.
- [11] Hiltunen MO, Turunen MP, Häkkinen TP, et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions[J]. Vasc Med,2002,7(1):5-11.
- [12] Revankar C M, Cimino D F, Sklar L A, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling[J]. Science,2005,307(5715):1625-1630.
- [13] Post W S, Goldschmidt-Clermont P J, Willhide C C, et al. Methylation of the estrogen receptor gene is Associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system[J]. Cardiovasc Res,1999,43(4):985-991.
- [14] Kim M, Long TI, Arakawa K, et al. DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk[J]. PLoS One,2010,5(3):e9692.
- [15] Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1 [J]. Cancer Res, 2007, 67(3):946-950.
- [16] 陈晓娟,闫少春,邵国. 人 DNA 甲基化转移酶的分类及其功能[J]. 包头医学院学报,2014,30(4):136-138.
- [17] 吴圣贤,聂波,潘美香,等. 解毒活血法对 ApoE $^{-/-}$ 小鼠 As 斑块 PPAR- γ 和炎症因子的影响[J]. 辽宁中医杂志,2014,41(5):1046-1048.
- [18] 赵静. 青钱柳多糖对大鼠脂代谢相关基因 DNA 甲基化及表达影响的研究[D]. 南昌:江西农业大学,2016.
- [19] 范锐心. 甜菜碱对 apoE 基因缺陷小鼠 AS 发生及 TNF- α 甲基化的影响[D]. 广州:中山大学,2007.

(收稿日期:2017-06-15)

(本文编辑:董历华)