

基于巨噬细胞极化探究清热化痰活血方抗动脉粥样硬化的作用机制^Δ

钟华平^{1*}, 朱启城², 邹征伟¹, 何正义¹, 谢和平¹, 陈旭¹, 段志胜¹, 肖天^{2#} (1. 赣南医科大学第一附属医院心脏中心, 江西赣州 341000; 2. 赣南医科大学第一附属医院南康院区心血管内科, 江西赣州 341000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)04-0438-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.04.05



摘要 **目的** 基于巨噬细胞极化探究清热化痰活血方抗动脉粥样硬化(AS)的作用机制。**方法** 制备清热化痰活血方含药血清,以阿托伐他汀为阳性对照,用以处理RAW264.7巨噬细胞;检测巨噬细胞活性、凋亡率和CD86、CD206的荧光强度以及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)水平。将喂食高脂饲料的载脂蛋白e基因缺乏(ApoE^{-/-})小鼠(AS模型小鼠)随机分为模型组、阿托伐他汀组(2.6 mg/kg)及清热化痰活血方低、中、高剂量组(90、180、360 mg/kg),另将喂食普通饲料的C57BL/6J小鼠作为正常对照组,每组10只;给药组小鼠灌胃相应药物,每日1次,连续8周。检测各组小鼠血清中TNF- α 、IL- 1β 水平,观察主动脉脂质沉积情况(以主动脉整体及根部斑块占比计)和主动脉根部的形态学变化,检测主动脉组织中CD86、CD206表达水平及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、精氨酸酶1(Arg-1)、AMP激活蛋白激酶(AMPK)、磷酸化AMPK(p-AMPK)、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR- γ)蛋白表达水平。**结果** 细胞实验结果显示,5~100 μ g/mL清热化痰活血方含药血清能显著提高RAW264.7细胞活性($P<0.05$),10、50、100 μ g/mL清热化痰活血方含药血清和阿托伐他汀能显著降低RAW264.7细胞凋亡率、CD86荧光强度和TNF- α 、IL- 1β 水平,并显著升高CD206荧光强度($P<0.05$)。动物实验结果显示,与模型组比较,清热化痰活血方各剂量组和阿托伐他汀组小鼠血清中TNF- α 、IL- 1β 水平,主动脉整体及根部斑块占比,CD86表达和iNOS蛋白表达均显著降低/下调,而CD206表达和Arg-1、PPAR- γ 蛋白表达以及AMPK磷酸化表达均显著上调($P<0.05$);主动脉病理形态均有不同程度改善。**结论** 清热化痰活血方可通过调控巨噬细胞极化,增加M2型巨噬细胞比例,进而有效抑制AS斑块形成、减轻炎症反应,发挥抗AS的作用。

关键词 清热化痰活血方;巨噬细胞极化;动脉粥样硬化;AMPK/PPAR- γ 信号通路

Mechanism of action of Qingre huatan huoxue decoction against atherosclerosis based on macrophage polarization

ZHONG Huaping¹, ZHU Qicheng², ZOU Zhengwei¹, HE Zhengyi¹, XIE Heping¹, CHEN Xu¹, DUAN Zhisheng¹, XIAO Tian² (1. Heart Center, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Jiangxi Ganzhou 341000, China; 2. Dept. of Cardiovascular Medicine, Nankang Campus of the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Jiangxi Ganzhou 341000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the mechanism of action of Qingre huatan huoxue decoction against atherosclerosis (AS) based on macrophage polarization. **METHODS** Using atorvastatin served as the positive control, the drug-containing serum of the Qingre huatan huoxue decoction was prepared to treat RAW264.7 macrophages. Macrophage viability, apoptosis rate, and the fluorescence intensities of CD86 and CD206 were measured, along with the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin- 1β (IL- 1β). Apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice (AS model mice) fed with a high-fat diet were randomly assigned to model group, atorvastatin group (2.6 mg/kg), and low-, medium- and high-dose groups of Qingre huatan huoxue decoction (90, 180, 360 mg/kg), respectively. C57BL/6J mice fed with a standard diet served as the normal control group, with 10 mice per group. The treatment group mice were administered the corresponding drugs intragastrically, once daily, for 8 consecutive weeks. Serum levels of TNF- α and IL- 1β were measured in all groups. Lipid deposition in the aorta (assessed by the percentage of plaque in the entire aorta and aortic root) and morphological changes in the aortic root were observed. Expression levels of CD86 and CD206 in aortic tissue, as well as the protein expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), arginase-1 (Arg-1), AMP-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK (p-AMPK), and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) in aortic tissues were all detected. **RESULTS** Cell experiment results showed that, at concentrations of 5-100 μ g/mL, the drug-containing serum of the Qingre huatan huoxue decoction significantly increased RAW264.7 cell viability ($P<0.05$). The drug-containing

^Δ基金项目 江西省教育厅科学技术研究项目(No.GJJ2201440)

*第一作者 主治医师,硕士。研究方向:心血管疾病基础与临床。

E-mail:zhonghuaphp@163.com

#通信作者 副主任医师。研究方向:心血管内科疾病诊治。

E-mail:xlz123xlz123@163.com

serum of the Qingre huatan huoxue decoction at concentrations of 10, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$, along with atorvastatin, significantly reduced apoptosis rates, CD86 fluorescence intensity, and TNF- α and IL-1 β levels in RAW264.7 cells, while markedly enhancing CD206 fluorescence intensity ($P<0.05$). Animal experiment results showed that, compared with the model group, all dosage groups of Qingre huatan huoxue decoction and the atorvastatin group showed significantly reduced/down-regulated levels of TNF- α and IL-1 β in serum, along with decreased aortic total and root plaque percentages, CD86 expression, and iNOS protein expression. CD206 expression and Arg-1, p-AMPK/AMPK, PPAR- γ protein expression were significantly up-regulated ($P<0.05$). Pathological morphology of the aorta showed varying degrees of improvement. **CONCLUSIONS** The formula of Qingre huatan huoxue decoction exerts its anti-AS effects by regulating macrophage polarization, increasing the proportion of M2 macrophages, thereby effectively inhibiting AS plaque formation and reducing inflammatory responses.

KEYWORDS Qingre huatan huoxue decoction; macrophage polarization; atherosclerosis; AMPK/PPAR- γ signaling pathway

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种由多因素参与、发病机制复杂的慢性炎症性动脉疾病,其病理特征主要为脂质沉积在血管内壁形成 AS 斑块,是多种心血管疾病的主要病理基础^[1]。目前临床针对 AS 的治疗手段虽可在一定程度上改善患者症状,但总体疗效仍不理想。AS 属于中医学“胸痹心痛”“痰瘀”等范畴,病机常因气滞、血瘀、痰凝等实邪阻滞,导致热毒内蕴、灼伤脉络,以致络脉拘挛不通、五脏虚损,故发此病^[2]。基于此,临床常采用清热解毒、活血化癥法治疗 AS。清热化痰活血方是参考相关文献^[3]报道的方剂改良而来,由金银花、蒲公英、连翘、瓜蒌、川芎、丹参、红花、赤芍 8 味中药组成,且该文献报道,该方具有解毒清热、活血化癥的功效,能够显著改善冠心病支架术后患者的临床症状并减轻其炎症反应,提升临床治疗效果,但具体作用机制尚未明确。

巨噬细胞作为 AS 进程中主要参与的免疫细胞,与其发生发展关系密切^[4]。巨噬细胞的 M1/M2 极化具有动态可塑性,二者在 AS 不同阶段可相互转化,是调控 AS 进展的关键机制之一^[5]。诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)是 M1 型巨噬细胞极化的重要标志性因子,精氨酸酶 1(arginase-1, Arg-1)是 M2 型巨噬细胞的标志性因子^[6]。巨噬细胞极化受 AMP 激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ)等多种信号通路的调控,并参与缓解炎症性疾病^[7]。本文在此基础上,基于巨噬细胞极化探究清热化痰活血方抗 AS 的作用机制,旨在为 AS 的治疗提供参考依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 BD115 型 CO₂ 培养箱(德国 Binder 公司)、MC-101 型倒置显微镜和 SYNERGYH1 型酶标仪(美国 BioTek 公司)、FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)、Megafuge8R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、VORTEX2S025 型涡旋振荡器(德国 IKA 公司)、Mini-PROTEAN Tetra 型蛋白电泳系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 主要药品与试剂

金银花、蒲公英、连翘、瓜蒌、川芎、丹参、红花、赤芍饮片均购自江西九州堂中药饮片有限公司,批号分别为 230115、220427、230225、230701、220111、220801、230402、220211,均由赣南医科大学第一附属医院药学部副主任中药师李德平博士鉴定为真品;10% 胎牛血清、0.25% 胰酶、DMEM 培养基(货号分别为 26010074、2472358、C11995500BT)均购自美国 Gibco 公司;磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为 C0221a、PT512、PI301)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;CCK-8 试剂盒(批号 TR688)购自日本 Dojindo 公司;Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒(批号 1271578)和 CD86、CD206 荧光抗体(批号分别为 2389535、2365408)均购自美国 BD 公司;CD86 抗体、CD206 抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗(批号分别为 DF6332、DF4149、DF6171)均购自美国 eBiosciences 公司;iNOS、Arg-1、AMPK、磷酸化 AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)、PPAR- γ 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(货号分别为 ab178945、ab60176、ab32382、ab133448、ab68206、ab9485)及辣根过氧化物酶标记的二抗(货号 ab6721)均购自英国 Abcam 公司。

1.3 细胞与动物

巨噬细胞系 RAW264.7 购自北京 ATCC 细胞库。20 只 SPF 级体重 180~220 g 的雄性 Wistar 大鼠,50 只 6~8 周龄、体重 20~23 g 的雄性载脂蛋白 e 基因缺乏(apolipoprotein E-deficient, ApoE^{-/-})小鼠,以及 10 只同标准雄性 C57BL/6J 小鼠,均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号为 SCXK(湘)2024-0009。

2 方法

2.1 清热化痰活血方药液制备

按清热化痰活血方的处方量称取金银花 10 g、蒲公英 12 g、连翘 10 g、瓜蒌 12 g、川芎 12 g、丹参 10 g、红花 10 g、赤芍 10 g,由赣南医科大学第一附属医院中药房代煎浓缩成 2 g/mL(以生药量计,下同)的药液。

2.2 细胞实验

2.2.1 清热化痰活血方含药血清制备

选取SPF级Wistar大鼠20只,随机分组为空白血清组、清热化痰活血方组。空白血清组大鼠灌胃生理盐水,清热化痰活血方组大鼠灌胃清热化痰活血方20 g/kg(按临床常用剂量换算),每次给药体积为10 mL/kg,每日2次,连续5 d。于末次灌胃1 h后,腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉大鼠,腹主动脉取血,室温静置30 min,以3 000 r/min离心15 min分离血清,于56 °C水浴灭活补体30 min,经0.22 μm滤膜除菌,分装后于-80 °C保存。

2.2.2 巨噬细胞培养

RAW264.7细胞静置培养,待长至85%时进行扩增传代。传代时,吸弃旧培养基,使用0.25%胰酶消化30~60 s,再加入含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基,以300×g离心10 min,收集细胞沉淀,重悬后接种至25 cm²培养瓶中继续培养。培养期间每2~3 d更换一次新鲜培养基,待细胞状态稳定后用于后续实验。

2.2.3 巨噬细胞活性检测

将RAW264.7细胞接种至96孔板中,每孔 5×10^3 个,待贴壁后,吸弃旧培养基,加入预先配制好的含药培养基[由清热化痰活血方含药血清与培养基混合而成,质量浓度分别为0(对照组)、2.5、5、10、25、50、100 μg/mL],另设不含细胞、不含药物的调零组,将实验孔设为相应的处理组,每组设3个复孔,于37 °C、5%CO₂培养箱中继续培养24 h后,加入CCK-8工作液110 μL,作用2 h。使用酶标仪检测450 nm波长处各孔的光密度(optical density, OD),计算细胞活性:细胞活性(%)=(加药组OD值-调零组OD值)/(对照组OD值-调零组OD值)×100%,并根据结果筛选3个对细胞活性具有显著促进效应且无细胞毒性的低、中、高浓度用于后续研究。

2.2.4 巨噬细胞凋亡检测

按“2.2.3”项下方法接种细胞并加药培养,含药培养基包括0 μg/mL(对照组)和低、中、高浓度清热化痰活血方含药血清以及含阿托伐他汀(阳性对照,20 μg/mL)的培养基,每组设置3个复孔,分别作用24、48、72 h后,按Annexin V/PI凋亡检测试剂盒说明书操作,使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.2.5 巨噬细胞极化检测

收集“2.2.4”项下作用24 h的细胞,使用CD86、CD206荧光抗体进行表面染色,然后用流式细胞仪检测CD86(M1型巨噬细胞)、CD206(M2型巨噬细胞)的荧光强度,以评价M1型和M2型巨噬细胞的极化情况。

2.2.6 免疫相关炎症因子水平检测

收集“2.2.4”项下作用24 h的细胞上清液,按ELISA试剂盒说明书操作,使用酶标仪检测TNF-α、IL-1β水平。

2.3 动物实验

2.3.1 AS模型构建与分组给药

将ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、阿托伐他汀组(2.6 mg/kg)和清热化痰活血方低、中、高剂量组(90、180、360 mg/kg,分别为临床常用剂量的0.5、1、2倍),每组10只,予以高脂饲料喂养8周构建AS模型。将10只C57BL/6J小鼠作为正常对照组,予以普通饲料喂养8周。然后,正常对照组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水,给药组小鼠灌胃相应药物,每日1次,连续8周。

2.3.2 血清中炎症因子水平检测

末次给药24 h后,腹腔注射1%戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉小鼠,腹主动脉采血,分离血清,按ELISA试剂盒说明书操作,检测TNF-α、IL-1β水平。

2.3.3 主动脉病理学观察

小鼠采血后处死,分离主动脉,用PBS冲洗后,置于4%多聚甲醛中固定48~72 h,先进行大体油红O染色,使用显微镜观察主动脉脂质沉积情况(以主动脉整体及根部斑块占比计);再切片后进行苏木精-伊红(HE)染色,使用显微镜观察主动脉根部的形态学变化。

2.3.4 主动脉组织中CD86、CD206表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.3.3”项下各组小鼠主动脉切片,脱蜡、抗原修复(高压煮沸2 min)并封闭后,加入CD86、CD206荧光抗体(稀释比例均为1:500)于4 °C孵育过夜,次日加入二抗(稀释比例为1:2 000)室温孵育1 h,用3,3'-二氨基联苯胺显色,苏木精复染,最后脱水透明、封片,使用显微镜观察并拍照,以棕黄色显色区域为阳性信号,采用Image J软件分析其OD值。

2.3.5 主动脉组织中蛋白表达检测

取“2.3.3”项下各组小鼠主动脉组织,液氮速冻研磨后提取蛋白,BCA法定量后加热变性。取变性后的蛋白样品,经电泳分离并转至PVDF膜上,封闭后,分别与iNOS、Arg-1、AMPK、p-AMPK、PPAR-γ、GAPDH抗体(稀释比例分别为1:1 000、1:4 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:5 000)于4 °C孵育过夜;次日加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),室温孵育2 h后,用ECL显影。采用Image J软件进行分析,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值评价目的蛋白的表达水平,再以p-AMPK与AMPK的比值表示AMPK的磷酸化表达水平。

2.4 统计学方法

采用SPSS 23.0软件进行统计分析,计量资料符合正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞实验

3.1.1 清热化痰活血方含药血清对细胞活性的影响
0(对照组)、2.5、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 清热化痰活血方含药血清组 RAW264.7 细胞活性分别为 $(99.97 \pm 2.26)\%$ 、 $(104.22 \pm 3.19)\%$ 、 $(112.85 \pm 2.07)\%$ 、 $(120.16 \pm 3.82)\%$ 、 $(131.49 \pm 1.63)\%$ 、 $(135.98 \pm 2.14)\%$ 、 $(140.72 \pm 3.57)\%$ ($n=3$)；与对照组比较，5~100 $\mu\text{g/mL}$ 清热化痰活血方含药血清组 RAW264.7 细胞活性均显著增加 ($P<0.05$)。选择 10、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 作为清热化痰活血方含药血清的低、中、高浓度进行后续实验。

3.1.2 清热化痰活血方含药血清对巨噬细胞凋亡的影响

与对照组比较，低、中、高浓度清热化痰活血方含药血清组和阿托伐他汀组作用 24、48、72 h 的 RAW264.7 细胞凋亡率均显著降低 ($P<0.05$)，结果见表 1。

表 1 各组巨噬细胞在不同时间的凋亡率比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	12.41 $\pm$ 1.15	32.07 $\pm$ 4.43	62.51 $\pm$ 3.74
低浓度清热化痰活血方含药血清组	10.29 $\pm$ 1.07 ^a	25.41 $\pm$ 3.18 ^a	56.29 $\pm$ 2.08 ^a
中浓度清热化痰活血方含药血清组	7.51 $\pm$ 1.28 ^a	17.39 $\pm$ 2.47 ^a	43.15 $\pm$ 5.32 ^a
高浓度清热化痰活血方含药血清组	3.08 $\pm$ 0.53 ^a	6.04 $\pm$ 1.12 ^a	24.84 $\pm$ 1.63 ^a
阿托伐他汀组	5.14 $\pm$ 0.96 ^a	11.35 $\pm$ 1.04 ^a	31.79 $\pm$ 2.81 ^a

a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

3.1.3 清热化痰活血方含药血清对巨噬细胞 CD86、CD206 表达的影响

与对照组比较，低、中、高浓度清热化痰活血方含药血清组和阿托伐他汀组 RAW264.7 细胞 CD86 的荧光强度均显著降低，CD206 的荧光强度均显著升高 ($P<0.05$)，结果见表 2。

表 2 各组巨噬细胞 CD86、CD206 的荧光强度比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	CD86	CD206
对照组	4 312.46 $\pm$ 70.24	2 029.52 $\pm$ 69.45
低浓度清热化痰活血方含药血清组	4 016.10 $\pm$ 92.85 ^a	2 402.71 $\pm$ 43.16 ^a
中浓度清热化痰活血方含药血清组	3 629.32 $\pm$ 205.84 ^a	4 227.48 $\pm$ 51.26 ^a
高浓度清热化痰活血方含药血清组	2 958.21 $\pm$ 113.43 ^a	5 428.18 $\pm$ 63.38 ^a
阿托伐他汀组	3 282.23 $\pm$ 94.88 ^a	4 812.07 $\pm$ 55.70 ^a

a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

3.1.4 清热化痰活血方含药血清对巨噬细胞中 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响

与对照组比较，低、中、高浓度清热化痰活血方含药血清组和阿托伐他汀组 RAW264.7 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 水平均显著降低 ($P<0.05$)，结果见表 3。

3.2 动物实验

3.2.1 清热化痰活血方对小鼠血清炎症因子水平的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平均显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，清热化痰活血方各剂量组以及阿托伐他汀组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平均显著降低 ($P<0.05$)。结果见表 4。

表 3 各组巨噬细胞中 TNF- α 、IL-1 β 水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$, pg/mL)

组别	TNF- α	IL-1 β
对照组	93.41 $\pm$ 3.19	84.12 $\pm$ 2.52
低浓度清热化痰活血方含药血清组	88.10 $\pm$ 2.62 ^a	73.61 $\pm$ 2.18 ^a
中浓度清热化痰活血方含药血清组	82.53 $\pm$ 2.41 ^a	69.05 $\pm$ 1.94 ^a
高浓度清热化痰活血方含药血清组	72.14 $\pm$ 1.75 ^a	52.37 $\pm$ 1.59 ^a
阿托伐他汀组	78.22 $\pm$ 2.03 ^a	61.48 $\pm$ 1.62 ^a

a: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

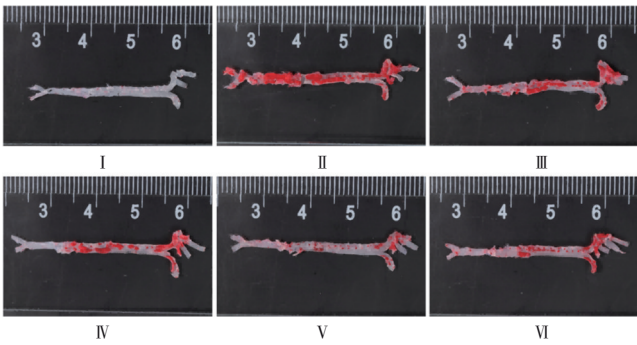
表 4 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$, pg/mL)

组别	TNF- α	IL-1 β
正常对照组	80.49 $\pm$ 9.16	95.27 $\pm$ 7.63
模型组	194.27 $\pm$ 4.82 ^a	208.53 $\pm$ 5.14 ^a
清热化痰活血方低剂量组	181.31 $\pm$ 8.94 ^a	184.17 $\pm$ 9.36 ^a
清热化痰活血方中剂量组	157.04 $\pm$ 9.13 ^b	160.91 $\pm$ 9.73 ^b
清热化痰活血方高剂量组	102.41 $\pm$ 9.18 ^b	109.18 $\pm$ 8.52 ^b
阿托伐他汀组	115.08 $\pm$ 7.05 ^b	119.63 $\pm$ 8.30 ^b

a: 与正常对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.2.2 清热化痰活血方对小鼠主动脉病理学的影响

大体油红 O 染色结果(图 1)显示，正常对照组小鼠主动脉未见明显斑块；模型组小鼠主动脉可见明显红色斑块，主动脉整体及根部斑块占比均显著高于正常对照组 ($P<0.05$)；与模型组比较，清热化痰活血方各剂量组和阿托伐他汀组小鼠主动脉的红色斑块区域均有不同程度的减少，主动脉整体及根部斑块占比均显著降低 ($P<0.05$)，结果见表 5。HE 染色结果(图 2)显示，正常对照组小鼠主动脉内壁边缘整齐，结构清晰，且无斑块；模型组小鼠主动脉内壁可见明显斑块凸起并伴有坏死核心形成；与模型组比较，清热化痰活血方各剂量组和阿托伐他汀组小鼠主动脉病理形态均有不同程度改善。



I: 正常对照组; II: 模型组; III: 清热化痰活血方低剂量组; IV: 清热化痰活血方中剂量组; V: 清热化痰活血方高剂量组; VI: 阿托伐他汀组。

图 1 各组小鼠主动脉的大体油红 O 染色图

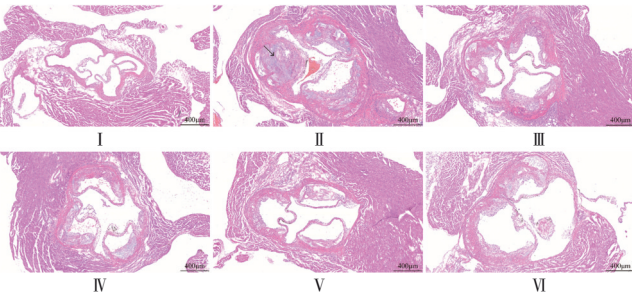
3.2.3 清热化痰活血方对小鼠主动脉组织中 CD86、CD206 表达的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠主动脉组织中 CD86 表达显著上调，CD206 表达显著下调 ($P<0.05$)。与模型组比较，清热化痰活血方各剂量组和阿托伐他汀

表5 各组小鼠主动脉整体及根部斑块占比较($\bar{x} \pm s$, $n=10, \%$)

组别	主动脉整体斑块占比	主动脉根部斑块占比
正常对照组	0	0
模型组	45.18 ± 5.06 ^a	57.42 ± 6.74 ^a
清热化痰活血方低剂量组	32.41 ± 3.52 ^b	44.23 ± 2.38 ^b
清热化痰活血方中剂量组	24.37 ± 4.08 ^b	37.24 ± 2.12 ^b
清热化痰活血方高剂量组	21.25 ± 1.63 ^b	30.51 ± 3.92 ^b
阿托伐他汀组	22.63 ± 1.17 ^b	34.18 ± 1.75 ^b

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。



I: 正常对照组; II: 模型组; III: 清热化痰活血方低剂量组; IV: 清热化痰活血方中剂量组; V: 清热化痰活血方高剂量组; VI: 阿托伐他汀组; 黑色箭头指示病变部位。

图2 各组小鼠主动脉根部HE染色图

组小鼠主动脉组织中CD86表达均显著下调,CD206表达均显著上调($P < 0.05$)。结果见表6和图3。

表6 各组小鼠主动脉组织中CD86、CD206表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	CD86	CD206
正常对照组	31.74 ± 5.02	115.17 ± 10.92
模型组	127.42 ± 4.61 ^a	27.59 ± 4.08 ^a
清热化痰活血方低剂量组	94.91 ± 4.13 ^b	74.08 ± 4.32 ^b
清热化痰活血方中剂量组	87.25 ± 4.83 ^b	86.24 ± 5.16 ^b
清热化痰活血方高剂量组	75.48 ± 3.07 ^b	94.85 ± 4.29 ^b
阿托伐他汀组	82.87 ± 3.24 ^b	91.04 ± 3.83 ^b

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3.2.4 清热化痰活血方对小鼠主动脉组织中蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠主动脉组织中Arg-1、PPAR- γ 蛋白表达以及AMPK磷酸化表达均显著下调,iNOS蛋白表达显著上调($P < 0.05$)。与模型组比较,清热化痰活血方各剂量组和阿托伐他汀组小鼠主动脉组织中Arg-1、PPAR- γ 蛋白表达以及AMPK磷酸化表达

均显著上调,iNOS蛋白表达均显著下调($P < 0.05$)。结果见表7。

表7 各组小鼠主动脉组织中蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	iNOS	Arg-1	p-AMPK/AMPK	PPAR- γ
正常对照组	0.34 ± 0.01	0.43 ± 0.03	1.01 ± 0.04	1.02 ± 0.01
模型组	0.63 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.02 ^a	0.41 ± 0.02 ^a	0.33 ± 0.04 ^a
清热化痰活血方低剂量组	0.53 ± 0.02 ^b	0.17 ± 0.02 ^b	0.57 ± 0.03 ^b	0.61 ± 0.03 ^b
清热化痰活血方中剂量组	0.49 ± 0.02 ^b	0.22 ± 0.02 ^b	0.62 ± 0.06 ^b	0.82 ± 0.03 ^b
清热化痰活血方高剂量组	0.44 ± 0.02 ^b	0.26 ± 0.01 ^b	0.81 ± 0.05 ^b	0.90 ± 0.02 ^b
阿托伐他汀组	0.37 ± 0.01 ^b	0.35 ± 0.02 ^b	0.73 ± 0.04 ^b	0.85 ± 0.03 ^b

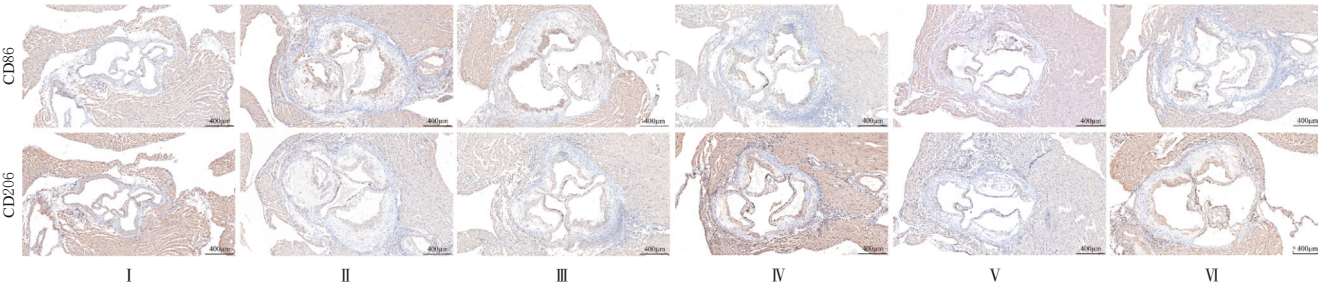
a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

本研究所用清热化痰活血方中,金银花、蒲公英、连翘具有消痈散结、清热解毒等功效^[8];瓜蒌则能涤痰通痹,发挥瘀血闭阻的作用;川芎行散,其性辛温,活血行气,通利经脉;赤芍苦寒,清热凉血,行血破滞;丹参通脉,清心止痛,引药于心;红花为活血化瘀之要药,又具辛散温通之功。本研究细胞实验结果显示,与对照组比较,低、中、高浓度清热化痰活血方含药血清组和阿托伐他汀组RAW264.7细胞凋亡率、CD86荧光强度和TNF- α 、IL-1 β 水平均显著降低,CD206荧光强度均显著升高,表明清热化痰活血方含药血清能够抑制巨噬细胞凋亡,并促进M1型巨噬细胞向M2型巨噬细胞转化,发挥抗炎作用。

为进一步探讨清热化痰活血方抗AS的作用机制,本研究选用ApoE^{-/-}小鼠进行动物实验,结果显示,正常对照组小鼠主动脉内壁边缘整齐,结构清晰,且无斑块;模型组小鼠主动脉内壁可见明显斑块凸起。与模型组比较,清热化痰活血方各剂量组和阿托伐他汀组小鼠主动脉整体及根部斑块占比均显著降低,病理形态均有不同程度改善,表明清热化痰活血方可有效减少斑块形成。

巨噬细胞表型不同对AS斑块的发生发展有着不同的调控作用。M1型巨噬细胞发挥促炎作用,可引发及维持炎症;M2型巨噬细胞发挥抗炎作用,可促进炎症消退^[9]。研究发现,在不稳定斑块中,M1巨噬细胞占比高于M2巨噬细胞;而在稳定斑块中,M2巨噬细胞占比高于M1巨噬细胞^[10]。在AS炎症进展期,巨噬细胞主要极化为M1型,高表达CD86,释放IL-1 β 、iNOS等促炎因



I: 正常对照组; II: 模型组; III: 清热化痰活血方低剂量组; IV: 清热化痰活血方中剂量组; V: 清热化痰活血方高剂量组; VI: 阿托伐他汀组。

图3 各组小鼠主动脉组织中CD86、CD206表达的免疫组化图

子,促进AS发展^[11];而在AS炎症消退期,巨噬细胞主要极化为M2型,高表达CD206和CD163,释放Arg-1等细胞因子,减缓炎症反应,维持血管内稳态,发挥抗AS的作用^[12]。本研究动物实验结果显示,与模型组比较,清热化痰活血方各剂量组和阿托伐他汀组小鼠主动脉组织中CD86、iNOS表达均显著下调,CD206、Arg-1表达均显著上调,表明清热化痰活血方可有效调控巨噬细胞极化,增加M2型巨噬细胞比例。

在AS的病理过程中,TNF- α 和IL-1 β 是驱动慢性炎症和斑块进展的核心因子^[13]。本研究动物实验结果显示,与模型组比较,清热化痰活血方各剂量组和阿托伐他汀组小鼠主动脉组织中TNF- α 、IL-1 β 水平均显著降低,表明清热化痰活血方可有效减轻炎症反应。

AMPK是哺乳动物的代谢传感器,是细胞和全身能量平衡的关键调节因子,并在脂质代谢中发挥重要调控作用^[14]。PPAR- γ 是AMPK下游调控糖脂代谢和炎症的重要转录因子,可调控脂质代谢,发挥抗炎及保护血管内皮细胞等作用^[15]。本研究动物实验结果显示,与模型组比较,清热化痰活血方各剂量组和阿托伐他汀组小鼠主动脉组织中AMPK磷酸化表达、PPAR- γ 蛋白表达均显著上调,表明清热化痰活血方的抗AS作用可能与调控AMPK/PPAR- γ 信号通路有关。既往研究表明,激活AMPK/PPAR- γ 信号通路可促进M2巨噬细胞极化,从而发挥抗AS的作用^[16],这与本研究结果相似。

综上所述,清热化痰活血方可通过调控巨噬细胞极化,增加M2型巨噬细胞比例,进而有效抑制AS斑块形成、减轻炎症反应,发挥抗AS的作用。

参考文献

[1] 刘梦华,程序,赵梦竹,等. 血府逐瘀胶囊对动脉粥样硬化小鼠巨噬细胞极化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024,30(12):54-61.

[2] 何小莲,王嵩. 黄连解毒汤在心血管疾病防治中的应用[J]. 解放军预防医学杂志,2019,37(6):190-191,194.

[3] 姚建斌,陈光瑞,付立彪,等. 自拟清热化痰活血方预防冠心病支架术后再狭窄临床研究[J]. 四川中医,2022,40(5):106-109.

[4] 袁一顺,徐驹,刘言薇,等. 基于“脾失散精、浊邪内生”理论探讨线粒体自噬和巨噬细胞极化与动脉粥样硬化的相关性[J/OL]. 中国免疫学杂志:1-21[2025-07-27].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.r.20240516.1859.003.html>.

[5] ESHGHJOO S,KIM D M,JAYARAMAN A,et al. Macrophage polarization in atherosclerosis[J]. Genes, 2022, 13

(5):756.

[6] 王敕,李梦兰,赵旭,等. 黑骨藤醇提取物调控巨噬细胞极化对小鼠痛风性关节炎的影响及机制研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),2025,47(3):179-190.

[7] YANG S,DUAN H W,ZENG J L,et al. Luteolin modulates macrophage phenotypic switching via the AMPK-PPAR γ pathway to alleviate ulcerative colitis in mice[J]. J Ethnopharmacol,2025,339:119157.

[8] 吴紫红,宋恩峰,项琼. 清热凉血泄浊方联合西药治疗痛风性关节炎临床研究[J]. 湖北中医药大学学报,2019,21(3):85-88.

[9] JINNOUCHI H,GUO L,SAKAMOTO A,et al. Diversity of macrophage phenotypes and responses in atherosclerosis[J]. Cell Mol Life Sci,2020,77(10):1919-1932.

[10] FUNES S C,RIOS M,ESCOBAR-VERA J,et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity[J]. Immunology,2018,154(2):186-195.

[11] BÄCK M,YURDAGUL A Jr,TABAS I,et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(7):389-406.

[12] ORECCHIONI M,GHOSHEH Y,PRAMOD A B,et al. Corrigendum: macrophage polarization: different gene signatures in M1 (LPS+) vs. classically and M2 (LPS-) vs. alternatively activated macrophages[J]. Front Immunol, 2020,11:234.

[13] 谢宜芸,刘暴. 动脉粥样硬化炎症微环境中血管平滑肌细胞的表型转化机制与抗炎治疗进展[J/OL]. 协和医学杂志, 2026: 1-8[2026-02-04]. <https://link.cnki.net/urlid/11.5882.R.20260129.1123.002>.

[14] WANG Q,LIU S D,ZHAI A H,et al. AMPK-mediated regulation of lipid metabolism by phosphorylation[J]. Biol Pharm Bull,2018,41(7):985-993.

[15] SUN B,RUI R P,PAN H Y,et al. Effect of combined use of astragaloside IV (AsIV) and atorvastatin (AV) on expression of PPAR- γ and inflammation-associated cytokines in atherosclerosis rats[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 6229-6236.

[16] CHIANG C F,CHAO T T,SU Y F,et al. Metformin-treated cancer cells modulate macrophage polarization through AMPK-NF- κ B signaling[J]. Oncotarget, 2017, 8(13):20706-20718.

(收稿日期:2025-08-22 修回日期:2026-02-05)

(编辑:邹丽娟)