

DOI:10.16781/j.cnki.2187/R.20210832

· 论 著 ·

基于 HAT/HDAC 平衡调控 PPAR γ /PI3K/Akt 通路活化探讨黄连化浊胶囊对糖尿病大血管病变的作用

王苑铭^{1*}, 朱 瑾¹, 杨维杰¹, 易希善², 肖国庆², 康学东¹

1. 甘肃中医药大学附属医院内分泌科, 兰州 730200

2. 甘肃中医药大学, 兰州 730000

[摘要] **目的** 探讨基于组蛋白乙酰转移酶 (HAT) / 组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 平衡调控过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) / PI3K/Akt 通路活化探讨黄连化浊胶囊对糖尿病大血管病变的影响。**方法** 40 只载脂蛋白 E (ApoE) 基因剔除小鼠均建立糖尿病大血管病变模型, 随机分为模型组、阿托伐他汀组、黄连化浊胶囊组、阿托伐他汀+黄连化浊胶囊组, 每组 10 只。10 只野生型 C57 小鼠为空白组。阿托伐他汀组小鼠灌胃阿托伐他汀 10 mg/kg, 黄连化浊胶囊组小鼠灌胃黄连化浊胶囊 0.675 g/kg, 阿托伐他汀+黄连化浊胶囊组小鼠灌胃给予阿托伐他汀 10 mg/kg+黄连化浊胶囊 0.675 g/kg, 空白组及模型组小鼠灌胃等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 8 周。培养小鼠胸主动脉平滑肌细胞, 分为空白组、人氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 组、ox-LDL+PPAR γ 沉默组、ox-LDL+PPAR γ 过表达组, 除空白组采用等体积空白血清培养外, 其他 3 组细胞均加入 100 μ g/mL ox-LDL 处理并采用含 200 μ g/mL 黄连化浊胶囊的血清共培养, ox-LDL+PPAR γ 沉默组进行 PPAR γ siRNA 转染, ox-LDL+PPAR γ 过表达组转染 PPAR γ 质粒。采用全自动生化分析仪检测小鼠血糖及血脂水平, H-E 染色观察小鼠胸主动脉病理形态, 流式细胞术检测平滑肌细胞凋亡率, 蛋白质印迹法和 qPCR 分别检测细胞中 HAT1、HDAC1、PPAR γ 、PI3K、Akt 蛋白和 mRNA 的表达。**结果** 与模型组比较, 阿托伐他汀组、黄连化浊胶囊组及阿托伐他汀+黄连化浊胶囊组小鼠餐后血糖、总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白胆固醇水平均降低, 高密度脂蛋白胆固醇水平均升高 (P 均 <0.05) ; 与模型组相比, 阿托伐他汀组、黄连化浊胶囊组小鼠主动脉血管内壁层次紊乱改善, 可见少量的泡沫细胞, 阿托伐他汀+黄连化浊胶囊组小鼠胸主动脉血管内壁层次紊乱改善优于阿托伐他汀组及黄连化浊胶囊组。ox-LDL+PPAR γ 沉默组平滑肌细胞凋亡率低于 ox-LDL 组和 ox-LDL+PPAR γ 过表达组 (P 均 <0.05) ; 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL+PPAR γ 沉默组平滑肌细胞中 HAT1 蛋白和 mRNA 表达均升高, 而 HDAC1、PPAR γ 、PI3K、Akt 蛋白和 mRNA 表达均降低 (P 均 <0.05) ; 与 ox-LDL+PPAR γ 沉默组相比, ox-LDL+PPAR γ 过表达组平滑肌细胞中 HAT1 蛋白和 mRNA 表达均降低, HDAC1、PPAR γ 、PI3K、Akt 蛋白和 mRNA 表达均升高 (P 均 <0.05) 。**结论** 黄连化浊胶囊可能通过抑制 HAT 表达促进 HDAC1 表达和 PPAR γ /PI3K/Akt 通路活化, 抑制糖尿病大血管病变小鼠代谢紊乱, 增加平滑肌细胞凋亡, 减少动脉斑块形成, 发挥保护作用。

[关键词] 糖尿病大血管病; 黄连化浊胶囊; 组蛋白乙酰转移酶; 组蛋白脱乙酰酶; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白激酶 B

[中图分类号] R 285.5; R 587.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 2097-1338(2023)01-0072-08

Effect of *Huanglian Huazhuo* capsule on diabetic macrovascular disease by regulating PPAR γ /PI3K/Akt pathway based on HAT/HDAC balance

WANG Yuan-ming^{1*}, ZHU Jin¹, YANG Wei-jie¹, YI Xi-shan², XIAO Guo-qing², KANG Xue-dong¹

1. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730200, Gansu, China

2. University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of *Huanglian Huazhuo* capsule on diabetic macrovascular disease by regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein

[收稿日期] 2021-08-25**[接受日期]** 2021-12-29**[基金项目]** 甘肃省中医药科研课题 (GZKP-2020-30). Supported by Scientific Research Project of Traditional Chinese Medicine of Gansu Province (GZKP-2020-30).**[作者简介]** 王苑铭, 硕士, 副主任医师.

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 0931-8635007, E-mail: yxzs10001@163.com

kinase B (Akte) pathway based on histone acetyltransferase (HAT)/histone deacetylase (HDAC) balance. **Methods** Forty apolipoprotein E (ApoE) gene deleted mice were randomly divided into model group, atorvastatin group, *Huanglian Huazhuo* capsule group, and atorvastatin+*Huanglian Huazhuo* capsule group, with 10 in each group. Ten wild-type C57 mice were included in the blank group. The mice in the atorvastatin group were gavaged with atorvastatin at a dose of 10 mg/kg, the mice in the *Huanglian Huazhuo* capsule group were gavaged with *Huanglian Huazhuo* capsule aqueous solution at a dose of 0.675 g/kg, the mice in the atorvastatin+*Huanglian Huazhuo* group were gavaged with atorvastatin at a dose of 10 mg/kg and *Huanglian Huazhuo* capsule aqueous solution at a dose of 0.675 g/kg, and the mice in the blank group and model group were gavaged with normal saline at the same dose, once daily for 8 weeks. Mouse thoracic aortic smooth muscle cells were collected and divided into blank group, human oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) group, ox-LDL+PPAR γ silent group, and ox-LDL+PPAR γ overexpression group. The blank group was cultured with blank serum, and the other 3 groups were treated with 100 μ g/mL ox-LDL, and co-cultured with serum containing 200 μ g/mL *Huanglian Huazhuo* capsule. The ox-LDL+PPAR γ silent group was transfected with PPAR γ small interfering RNA, and ox-LDL+PPAR γ overexpression group was transfected with PPAR γ plasmid. Automatic biochemical analyzer was used to detect the blood glucose and blood lipid levels of mice, hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological morphology of mice thoracic aorta, flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of smooth muscle cells, and Western blotting and quantitative ploymerase chain reaction were used to detect the protein and mRNA expression of HAT1, HDAC1, PPAR γ , PI3K and Akt. **Results** Compared with the model group, the contents of postprandial blood glucose (PBG), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) of mice in the atorvastatin group, *Huanglian Huazhuo* capsule group and atorvastatin+*Huanglian Huazhuo* capsule group were significantly decreased, while the contents of high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) were significantly increased (all $P<0.05$). Compared with the model group, the inner wall disorder was improved in the atorvastatin group and *Huanglian Huazhuo* capsule group, and a small number of foam cells were observed. The inner wall of thoracic aorta had the most significant improvement in the atorvastatin+*Huanglian Huazhuo* capsule group. The apoptosis rate of smooth muscle cells in the ox-LDL+PPAR γ silent group was significantly lower than those in the ox-LDL group and ox-LDL+PPAR γ overexpression group (both $P<0.05$). Compared with the ox-LDL group, the expression of HAT1 protein and mRNA in smooth muscle cells of the ox-LDL+PPAR γ silent group was significantly increased, while the expression of HDAC1, PPAR γ , PI3K and Akt protein and mRNA was significantly decreased (all $P<0.05$). Compared with the ox-LDL+PPAR γ silent group, the expression of HAT1 protein and mRNA in smooth muscle cells of ox-LDL+PPAR γ overexpression group was significantly decreased, while the expression of HDAC1, PPAR γ , PI3K, Akt protein and mRNA was significantly increased (all $P<0.05$). **Conclusion** *Huanglian Huazhuo* capsule can improve the expression of HDAC1 and the activation of PPAR γ /PI3K/Akt pathway by inhibiting the expression of HAT, inhibit the metabolic disorder of mice with diabetic macrovascular disease, increase the apoptosis of smooth muscle cells, and reduce the formation of arterial plaque, displaying a protective role.

[**Key words**] diabetic macrovascular disease; *Huanglian Huazhuo* capsule; histone acetyltransferase; histone deacetylase; peroxisome proliferator-activated receptor γ ; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(1): 72-79]

糖尿病是一种临床常见内分泌系统疾病,具有慢性进展的特点。流行病学资料显示,2型糖尿病患者的发病率和致残、致死率增加,严重威胁患者生命安全^[1]。对糖尿病大血管病变患者,高糖会促进动脉斑块形成、增加血管闭塞。相关研究证实,动脉硬化是糖尿病合并血管病变患者最常见的病理特征,患者体内高糖会加重机体氧化应激,增加炎症反应,损伤内皮功能,加快疾病的发展^[2]。

组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)/组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylase, HDAC)平衡是众多疾病调节的靶点之一。HAT/

HDAC通过参与基因结构修饰调控基因的表达^[3]。研究证实,HAT/HDAC与血管病变存在关联,高糖会加快平滑肌细胞活性增殖而诱导动脉斑块形成,在此期间HAT过度激活能够抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)的表达,而HDAC激动剂干预使PPAR γ 表达升高,提示PPAR γ 高表达可能是干预动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的中心环节^[3]。PI3K/Akt通路是机体的重要信号通路,在细胞存活、蛋白质合成、代谢、运动及血管生成等多种生理功能中发挥重要作用。PI3K/Akt通路

能够调控 AS 炎症反应、内皮细胞活性等多个生物过程,而 PPAR γ 激动剂可诱导 Akt 磷酸化并抑制上述生物过程,推测通过调节 HAT/HDAC 平衡调控 PPAR γ /PI3K/Akt 通路活化可能是干预 AS 发病的机制之一^[4-5]。黄连化浊胶囊是甘肃中医药大学附属医院院内制剂,主要活性成分为小檗碱,具有改善糖尿病患者胰岛素抵抗、调节血脂代谢的作用^[6]。本研究基于 HAT/HDAC 平衡调控 PPAR γ /PI3K/Akt 通路活化,探讨黄连化浊胶囊对糖尿病大血管病变的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 6~8 周龄载脂蛋白 (apolipoprotein E, ApoE) 基因剔除小鼠 40 只,品系名称为 C57BL/6J-KO (ApoE),雌雄各半,体重 (20 $\pm$ 3) g; 10 只野生型 C57 小鼠,体重 (22 $\pm$ 2) g。所有小鼠均购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 [动物生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010], 于封闭、无菌环境下隔离饲养。

1.2 药物、试剂与仪器 黄连化浊胶囊 (黄连 9 g, 鸡内金 12 g, 法半夏 9 g, 竹茹 15 g, 枳实 9 g, 陈皮 9 g, 茯苓 15 g, 炙甘草 9 g) 为甘肃中医药大学附属医院院内制剂 (批准文号: 甘药制字 Z120110)。阿托伐他汀购自美国辉瑞公司 (批号: 20130841); FBS 购自美国 Mediatech 公司; 人氧化低密度脂蛋白 (human oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 购自上海雅吉生物科技有限公司; HAT 抗体、HDAC1 抗体购自安诺伦 (北京) 生物科技有限公司; PPAR γ 抗体、PI3K 抗体及 Akt 抗体均购自英国 Abcam 公司; H-E 染色试剂盒购自海德创业 (北京) 生物科技有限公司; CytoFLEX 流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司; 台式高速离心机购自长沙东旺实验仪器有限公司; 转轮式石蜡切片机购自郑州博邦科贸有限公司; 蛋白电泳系统购自北京柏莱斯特科技发展有限公司; COBAS C501 全自动生化分析仪购自瑞士 Roche 公司。

1.3 糖尿病大血管病变小鼠模型的构建 所有 ApoE 基因剔除小鼠均适应性饲养 7 d 后以高脂、高糖饲料^[7]喂养 4 周,抽取尾静脉血检测血糖,空腹血糖 > 16.7 mmol/L 表示 2 型糖尿病小鼠建模成功。之后继续以高脂、高糖饲料喂养并于饮水

中加入 0.1 g/L 一氧化氮合酶抑制剂 *N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯盐酸盐 (*N*-nitro-*L*-arginine methyl ester hydrochloride, *L*-NAME), 连续 4 周,建立糖尿病大血管病变动物模型。10 只野生型 C57 小鼠以普通饲料喂养。

1.4 动物分组与药物干预 10 只野生型 C57 小鼠为空白组; ApoE 基因剔除小鼠随机分为模型组、阿托伐他汀组、黄连化浊胶囊组、阿托伐他汀+黄连化浊胶囊组,每组 10 只。阿托伐他汀组小鼠用阿托伐他汀 10 mg/kg (溶于 0.3% 羧甲基纤维素溶液) 灌胃,每天 1 次,连续 8 周。黄连化浊胶囊组小鼠灌胃 0.675 g/kg 黄连化浊胶囊水溶液 (将 1 个 2 g 的胶囊加水 50 mL 配制成 40 g/L 水溶液,采用常规方法利用天平及量筒检测溶液密度,密度为 1 g/mL), 每天 1 次,连续 8 周。阿托伐他汀+黄连化浊胶囊组小鼠同时按阿托伐他汀组和黄连化浊胶囊组小鼠的给药方案处理。空白组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水。黄连化浊胶囊组小鼠实验结束后取血清,即为黄连化浊胶囊含药血清。

1.5 血糖和血脂水平检测 末次灌胃后,每只小鼠眼眶取静脉血 1.5 mL,采用全自动生化分析仪检测餐后血糖 (postprandial blood glucose, PBG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) 及低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 含量。

1.6 H-E 染色 麻醉后颈部脱臼处死小鼠,分离胸主动脉,吸干水分后用 4% 甲醛溶液固定 24 h, 80% (体积分数) 乙醇脱水,5 μ m 厚度切片,脱蜡 10 min 后用 95% (体积分数) 乙醇水化。采用碱性苏木精染液染 15 min, PBS 冲洗 3 次,蒸馏水清洗。再用伊红染液染 3 min, PBS 透明处理后封片。在光学显微镜下观察小鼠胸主动脉病理形态。

1.7 细胞培养及分组 分离小鼠胸主动脉,去除血管内膜及外膜,制成 2 mm³ 大小组织块,研磨后加入裂解液裂解,0.25% 胰蛋白酶消化后过 80 目筛,收集平滑肌细胞,用高糖培养基 (含 100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素) 培养,常规条件下培养至 80%~90% 细胞融合时进行实验。将细胞分为空白组、ox-LDL 组、ox-LDL+PPAR γ 沉默组、ox-LDL+PPAR γ 过表达组,除空白组外,另 3 组细

胞均加入 100 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 共培养。PPAR γ 质粒转染方法参考文献[8], PPAR γ siRNA 转染方法参考文献[9]。

1.8 细胞干预方法 除空白组外,其余3组细胞均加入 200 $\mu\text{g/mL}$ 黄连化浊胶囊含药血清,空白组加入等体积的空白血清,培养 24 h 后进行后续实验。血清提取方法参考文献[10]。

1.9 流式细胞术检测平滑肌细胞凋亡率 将用 0.25% 胰蛋白酶消化的平滑肌细胞接种到含 FBS 的培养基过夜培养。各组随机选择 3 个细胞样本,取 100 μL 接种于 5 mL 流式试管中,加入 5 μL FITC 标记的膜联蛋白 V 与 5 μL PI 混合染色液,遮光条件下静置 15 min,再加入 200 μL 结合溶液,用流式细胞仪进行检测。

1.10 蛋白质印迹法检测平滑肌细胞中 HAT1、HDAC1、PPAR γ 、PI3K 及 Akt 蛋白的表达 平滑肌细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后离心,取上清液检测蛋白质含量后进行 SDS-PAGE。将蛋白条带转移到 PVDF 膜,分别加入一抗(HAT1、HDAC1 抗体稀释比例均为 1 : 2 000, PPAR γ 、PI3K、Akt 抗体稀释比例均为 1 : 1 000)进行孵育,后加入二抗山羊抗兔 IgG(稀释比例为 1 : 5 000)杂交,用 PBS 冲洗。将 PVDF 膜放入显影液,在化学显影仪中曝光,用 ImageJ 软件对曝光得到的蛋白条带进行灰度测量,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白的相对表达水平。

1.11 qPCR 检测平滑肌细胞中 HAT1、HDAC1、PPAR γ 、PI3K 及 Akt mRNA 的表达 平滑肌细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后采用 TRIzol 法抽提总 RNA。将提取的 RNA 反转录为 cDNA,以 β -肌动蛋白为内参进行 qPCR。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s、58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,共 40 个循环。检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行分析。引物序列如下: HAT1 正向引物为 5'-GATGATGAAAGATGGCACTAC-3',反向引物为 5'-CCTTGACCTTGAAATGGAGT-3'; HDAC 正向引物为 5'-GCCAAGTGTGTGGAATTTGT-3',反向引物为 5'-GGAAGGACTGATATGAAGTTT-3'; PPAR γ 正向引物为 5'-CCCTTTACCACGGTTGATTCTC-3',反向引物为 5'-CCAGGCTCTACTTTGATCGACT-3'; PI3K 正向引物为 5'-GACTCCAAGATGAAGAAGATGTG-3',反向引物为 5'-AAGTA-

GGGAGGCATCTCG-3'; Akt 正向引物为 5'-GGGTG-GACTGCTCAAGAAGG-3',反向引物为 5'-ATCC-TGCCAGTTGATGCTGA-3'; β -肌动蛋白正向引物为 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3',反向引物为 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'。

1.12 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析,实验数据符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用最小显著性差异法。检验水准(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 各组小鼠血糖及血脂水平 与空白组相比,模型组小鼠 PBG、TC、TG 及 LDL-C 含量升高, HDL-C 含量降低(P 均 <0.05)。与模型组比较,阿托伐他汀组、黄连化浊胶囊组、阿托伐他汀+黄连化浊胶囊组小鼠 HDL-C 含量均升高, PBG、TC、TG 及 LDL-C 含量均降低(P 均 <0.05)。阿托伐他汀组与黄连化浊胶囊组小鼠血糖及血脂水平的差异均无统计学意义(P 均 >0.05);与黄连化浊胶囊组、阿托伐他汀组比较,阿托伐他汀+黄连化浊胶囊组小鼠 PBG、TC、TG 及 LDL-C 含量均降低, HDL-C 含量均升高,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。见表 1。

2.2 各组小鼠胸主动脉病理形态改变 空白组小鼠胸主动脉血管内壁层次清晰,细胞无坏死,平滑肌细胞排列正常,无增殖;模型组小鼠胸主动脉血管内皮增厚,有明显的斑块形成,泡沫细胞增多,炎症浸润及平滑肌细胞增多;与模型组相比,阿托伐他汀组、黄连化浊胶囊组小鼠胸主动脉血管内壁层次紊乱改善,泡沫细胞较少;阿托伐他汀+黄连化浊胶囊组小鼠胸主动脉血管内壁层次紊乱的改善优于阿托伐他汀组、黄连化浊胶囊组。见图 1。

2.3 各组平滑肌细胞凋亡率 空白组平滑肌细胞凋亡率为(5.95 ± 0.63)%, ox-LDL 组平滑肌细胞凋亡率[(7.55 ± 1.15)%]与空白组相比升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 ox-LDL 组相比, ox-LDL+PPAR γ 沉默组平滑肌细胞凋亡率降低[(4.45 ± 0.57)% vs (7.55 ± 1.15)%, $P < 0.05$], ox-LDL+PPAR γ 过表达组平滑肌细胞凋亡率升高[(14.96 ± 2.08)% vs (7.55 ± 1.15)%, $P < 0.05$]。见图 2。

表1 各组小鼠血糖及血脂水平比较

Tab 1 Comparison of blood glucose and blood lipid levels of mice in each group

Group	(mmol · L ⁻¹), n=10, $\bar{x} \pm s$				
	PBG	TC	TG	HDL-C	LDL-C
Blank	4.30±0.23	2.35±0.25	1.50±0.26	1.34±0.28	0.69±0.10
Model	11.36±0.51*	14.50±1.62*	2.67±0.31*	0.61±0.20*	1.25±0.18*
Atorvastatin	6.03±0.71* [△]	6.41±1.05* [△]	1.90±0.54* [△]	0.89±0.17* [△]	0.75±0.14* [△]
Huanglian Huazhuo capsule	5.96±0.80* [△]	6.60±1.00* [△]	1.92±0.60* [△]	0.90±0.16* [△]	0.76±0.08* [△]
Atorvastatin+Huanglian Huazhuo capsule	5.35±0.41* ^{△▲▽}	5.12±1.05* ^{△▲▽}	1.64±0.30* ^{△▲▽}	1.15±0.30* ^{△▲▽}	0.63±0.05* ^{△▲▽}
F value	232.6	173.8	11.29	14.730	43.430
P value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*P<0.05 vs blank group; [△]P<0.05 vs model group; [▲]P<0.05 vs atorvastatin group; [▽]P<0.05 vs Huanglian Huazhuo capsule group. PBG: Postprandial blood glucose; TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride; HDL-C: High density lipoprotein-cholesterol; LDL-C: Low density lipoprotein-cholesterol.

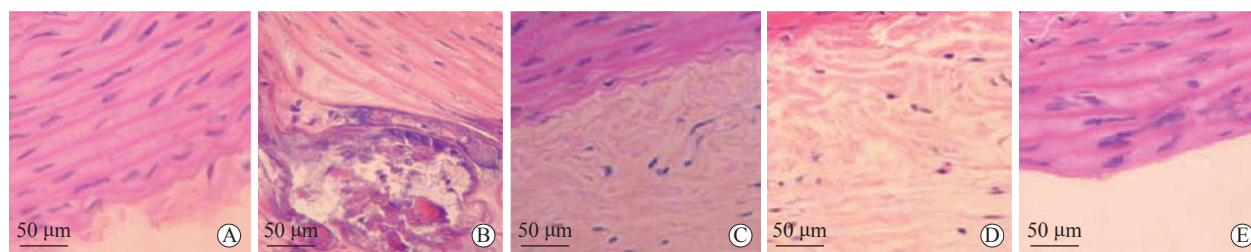


图1 苏木精-伊红染色观察各组小鼠胸主动脉病理形态

Fig 1 Observation of pathological morphology of thoracic aorta of mice in each group by hematoxylin-eosin staining

A: Blank group; B: Model group; C: Atorvastatin group; D: Huanglian Huazhuo capsule; E: Atorvastatin+Huanglian Huazhuo capsule group.

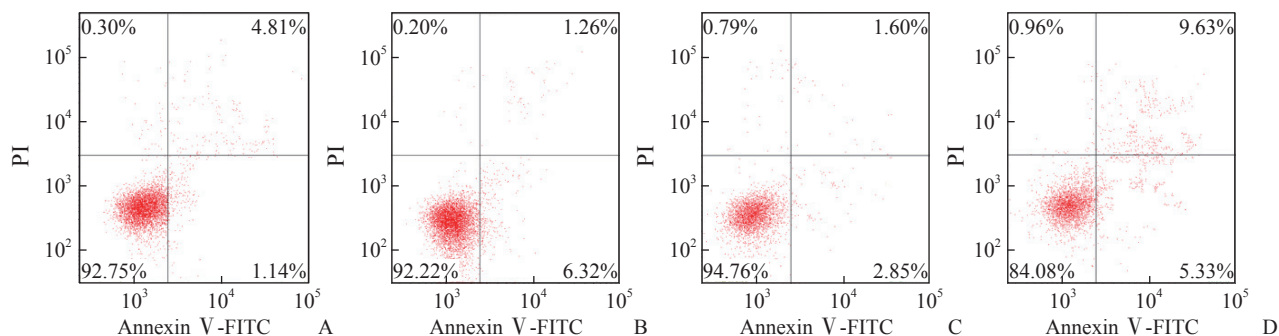


图2 流式细胞术检测各组平滑肌细胞凋亡率

Fig 2 Apoptosis rate of smooth muscle cells in each group detected by flow cytometry

A: Blank group; B: ox-LDL group; C: ox-LDL+PPAR γ silent group; D: ox-LDL+PPAR γ overexpression group; ox-LDL: Human oxidized low density lipoprotein; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PI: Propidium iodide; FITC: Fluorescein isothiocyanate.

2.4 各组平滑肌细胞中HAT1、HDAC1、PPAR γ 、PI3K及Akt蛋白的表达 与空白组相比, ox-LDL组平滑肌细胞中HAT1蛋白表达水平升高, HDAC1、PPAR γ 、PI3K及Akt蛋白表达水平降低 (P 均<0.05)。与ox-LDL组相比, ox-LDL+PPAR γ 沉默组平滑肌细胞中HAT1蛋白表达水平升

高, HDAC1、PPAR γ 、PI3K及Akt蛋白表达水平降低 (P 均<0.05); ox-LDL+PPAR γ 过表达组平滑肌细胞的HAT1蛋白表达水平降低, HDAC1、PPAR γ 、PI3K及Akt蛋白表达水平升高 (P 均<0.05)。见图3、表2。

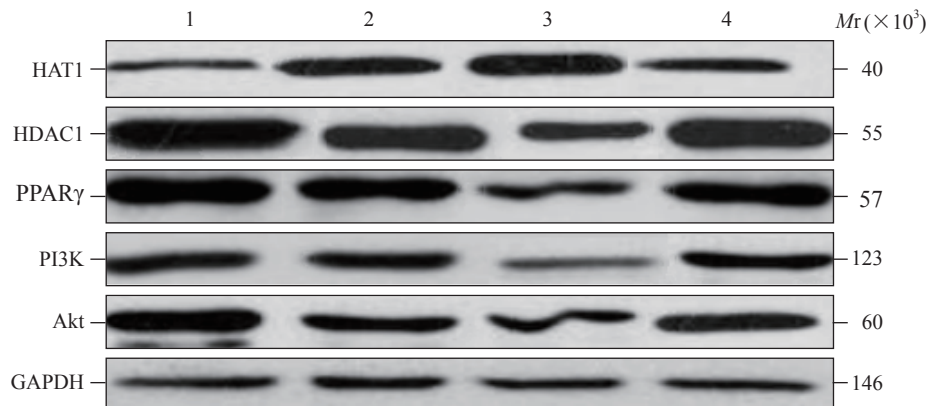


图 3 蛋白质印迹法检测各组平滑肌细胞中 HAT1、HDAC1、PPAR γ 、PI3K 及 Akt 蛋白的表达
Fig 3 Expression of HAT1, HDAC1, PPAR γ , PI3K and Akt in smooth muscle cells of each group detected by Western blotting
1: Blank group; 2: ox-LDL group; 3: ox-LDL+PPAR γ silent group; 4: ox-LDL+PPAR γ overexpression group. HAT1: Histone acetyltransferase 1; HDAC1: Histone deacetylase 1; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; Akt: Protein kinase B; ox-LDL: Human oxidized low density lipoprotein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

表 2 各组平滑肌细胞中 HAT1、HDAC1、PPAR γ 、PI3K 及 Akt 蛋白表达水平比较
Tab 2 Comparison of protein expression levels of HAT1, HDAC1, PPAR γ , PI3K and Akt in smooth muscle cells of each group

<i>n</i> =6, $\bar{x}\pm s$					
Group	HAT1	HDAC1	PPAR γ	PI3K	Akt
Blank	0.57 $\pm$ 0.13	1.08 $\pm$ 0.18	2.05 $\pm$ 0.19	1.18 $\pm$ 0.25	1.55 $\pm$ 0.33
ox-LDL	1.66 $\pm$ 0.20*	0.81 $\pm$ 0.30*	1.36 $\pm$ 0.17*	0.87 $\pm$ 0.19*	1.12 $\pm$ 0.22*
ox-LDL+PPAR γ silent	1.87 $\pm$ 0.31* Δ	0.48 $\pm$ 0.08* Δ	0.96 $\pm$ 0.10* Δ	0.50 $\pm$ 0.07* Δ	0.80 $\pm$ 0.15* Δ
ox-LDL+PPAR γ overexpression	0.90 $\pm$ 0.26* $\Delta\Delta$	0.93 $\pm$ 0.11* $\Delta\Delta$	1.80 $\pm$ 0.30* $\Delta\Delta$	1.02 $\pm$ 0.16* $\Delta\Delta$	1.28 $\pm$ 0.13* $\Delta\Delta$
<i>F</i> value	41.250	13.960	33.770	15.710	11.980
<i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05 vs blank group; Δ *P*<0.05 vs ox-LDL group; $\Delta\Delta$ *P*<0.05 vs ox-LDL+PPAR γ silent group. HAT1: Histone acetyltransferase 1; HDAC1: Histone deacetylase 1; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; Akt: Protein kinase B; ox-LDL: Human oxidized low density lipoprotein.

2.5 各组平滑肌细胞中 HAT1、HDAC1、PPAR γ 、PI3K 及 Akt mRNA 的表达 ox-LDL 组平滑肌细胞中 HAT1 mRNA 相对表达量高于空白组, HDAC1、PPAR γ 、PI3K 及 Akt mRNA 相对表达量低于空白组 (*P* 均<0.05)。与 ox-LDL 组相比, ox-LDL+PPAR γ 沉默组平滑肌细胞中 HAT1 mRNA

相对表达量增高, HDAC1、PPAR γ 、PI3K 及 Akt mRNA 相对表达量降低 (*P* 均<0.05); ox-LDL+PPAR γ 过表达组平滑肌细胞 HAT1 mRNA 相对表达量降低, HDAC1、PPAR γ 、PI3K 及 Akt mRNA 相对表达量增高 (*P* 均<0.05)。见表 3。

表 3 各组平滑肌细胞中 HAT1、HDAC1、PPAR γ 、PI3K、Akt mRNA 相对表达量比较
Tab 3 Comparison of relative mRNA expression levels of HAT1, HDAC1, PPAR γ , PI3K and Akt in smooth muscle cells of each group

<i>n</i> =6, $\bar{x}\pm s$					
Group	HAT1	HDAC1	PPAR γ	PI3K	Akt
Blank	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
ox-LDL	1.41 $\pm$ 0.18*	0.56 $\pm$ 0.20*	0.63 $\pm$ 0.07*	0.75 $\pm$ 0.09*	0.58 $\pm$ 0.12*
ox-LDL+PPAR γ silent	1.76 $\pm$ 0.24* Δ	0.30 $\pm$ 0.06* Δ	0.40 $\pm$ 0.04* Δ	0.51 $\pm$ 0.08* Δ	0.36 $\pm$ 0.09* Δ
ox-LDL+PPAR γ overexpression	1.16 $\pm$ 0.20* $\Delta\Delta$	0.82 $\pm$ 0.10* $\Delta\Delta$	0.79 $\pm$ 0.10* $\Delta\Delta$	0.86 $\pm$ 0.05* $\Delta\Delta$	0.81 $\pm$ 0.06* $\Delta\Delta$
<i>F</i> value	20.250	22.920	93.530	60.520	70.950
<i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05 vs blank group; Δ *P*<0.05 vs ox-LDL group; $\Delta\Delta$ *P*<0.05 vs ox-LDL+PPAR γ silent group. HAT1: Histone acetyltransferase 1; HDAC1: Histone deacetylase 1; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; Akt: Protein kinase B; ox-LDL: Human oxidized low density lipoprotein.

3 讨 论

糖尿病大血管病变由多种因素导致,糖脂代谢紊乱及氧化应激等增加了血管中血小板聚集黏附,氧化应激引起的炎症反应会增加血管通透性,胆固醇等沉积在动脉内膜下会导致血管病理损伤。高糖环境下血管内皮细胞损伤可诱导血管活性物质或因子表达异常,血管功能紊乱可导致平滑肌细胞结构及功能改变并演变成具有分泌及增殖功能的一类细胞^[11]。平滑肌细胞由收缩型表型转变为合成型表型,细胞外基质中基质金属蛋白酶和Ⅰ/Ⅲ型胶原表达增加,可促进动脉粥样斑块形成。本研究首先建立了糖尿病大血管病变小鼠模型观察黄连化浊胶囊对血糖、血脂的改善作用,随后提取平滑肌细胞用高糖培养制成损伤细胞,敲除或过表达PPAR γ 以含有黄连化浊胶囊血清培养,观察黄连化浊胶囊通过调控PPAR γ 对糖尿病大血管病变的保护机制。

本研究证实糖尿病大血管病变小鼠静脉血中代谢指标紊乱,H-E染色发现胸主动脉形态有明显斑块形成,经黄连化浊胶囊或阿托伐他汀干预后代谢指标改善、病理损伤减轻,两者联合干预效果更佳,说明黄连化浊胶囊能够改善模型小鼠代谢紊乱,降低主动脉血管损伤。阿托伐他汀能够通过抑制羟甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶活性减少胆固醇合成,降低外周血中LDL-C表达,发挥抗斑块形成作用^[12]。黄连化浊胶囊由甘肃中医药大学附属医院内分泌科结合糖尿病“浊毒”病理机制研制而成,方中黄连清热燥湿、泻火解毒、止消渴,鸡内金具有醒脾消食、化积滞、缩小便之功,两者共为君药,对于脾胃一泻一补,对于痰浊一解一化,标本兼治,起到化浊、解毒之功效,以治消渴。法半夏体滑而性燥,具有健脾燥湿、温胃降逆作用;竹茹开胃土之郁,清肺金之燥,胆和则烦呕自止;陈皮以辛散之,以苦燥之,调中而快膈,消痰而导滞;枳实破气,痰化而痞胀消,四者共为臣药。茯苓为佐药,味甘、淡,性平,归心、肺、脾、肾经,具有益脾除湿、利窍宁心之功,脾健而痰无以生。炙甘草味甘气温,补三焦元气而散表寒,调和诸药,为使药。全方寒温并用,补泻兼施,达到清热解毒、运脾化浊之效。黄连性寒,对脾、心及大肠经,在《名医别录》中记载对消渴具有治疗作用。现代药理学研究表明,黄连化浊胶囊中黄连的主要活性成分小檗碱能够发挥降糖、改善胰岛素抵抗及降低血脂作用^[13]。小檗碱能改善高糖诱导的足细

胞功能损伤^[14]。刘琴等^[15]的研究证实,小檗碱对糖尿病大血管病变小鼠具有抗斑块形成作用。本研究结果与上述文献一致。

高糖能够促进平滑肌细胞增殖,这是糖尿病大血管病变动脉血管中产生斑块的主要原因。糖尿病大血管病变引起动脉硬化产生的主要机制在于平滑肌细胞大量增殖,进入内膜上调细胞外基质活化,诱导纤维组织增生,加快斑块形成^[16]。平滑肌细胞生长及凋亡属于一个复杂的基因调控过程,乙酰化是蛋白质翻译后参与细胞活性调控的重要途径之一^[17]。HAT/HDAC是乙酰化重要蛋白,两者互相拮抗,均可以调节蛋白乙酰化水平。在糖尿病大血管病变中HAT能够加快组蛋白乙酰化,导致平滑肌细胞DNA与组蛋白连接稀疏,而与其他复合物结合启动基因转录。在上述过程中HDAC表达降低,无法发挥基因抑制作用。

本研究证实,高糖诱导动脉斑块形成时HAT1过度激活,降低了PPAR γ 表达,因而无法调节胰岛素抵抗的作用,糖脂代谢紊乱增加,促进了平滑肌细胞活性增加、斑块的形成。HDAC特异性激动剂能够上调糖尿病血管病变小鼠PPAR γ 表达,加快葡萄糖运转调节脂肪因子,抑制平滑肌细胞活性,减少斑块形成^[18-19]。PI3K参与细胞生长、分化及凋亡,Akt是相关信号通路之一,两者联合能够在胰岛素调控血糖方面发挥作用。本研究表明,PPAR γ 过表达能够通过上调PI3K/Akt表达促进平滑肌细胞凋亡,与刘文华等^[20]的研究结果一致。黄连是黄连化浊胶囊君药之一,从黄连中提取的异哇琳类生物碱类小檗碱主要发挥抗肿瘤、改善血糖和血脂等作用,能够通过改善糖尿病小鼠代谢指标紊乱对高糖下的斑块形成发挥抑制作用^[21]。ox-LDL能致平滑肌细胞中PPAR γ 表达降低,抑制巨噬细胞对ox-LDL的吸收,小檗碱通过上调PPAR γ 表达增加巨噬细胞对ox-LDL的摄取并促进细胞凋亡,抑制平滑肌细胞活性,减少斑块形成。魏胜男^[22]的研究也发现,黄葵固体分散体的主要成分小檗碱能够介导PI3K/Akt通路激活,促进糖代谢运转,减少血管内皮损伤。

综上所述,黄连化浊胶囊能够通过抑制HAT表达,抑制糖尿病大血管病变小鼠代谢紊乱,促进平滑肌细胞凋亡,减少动脉斑块形成,从而发挥保护作用,其机制可能与调节PPAR γ /PI3K/Akt信号通路有关。

[参考文献]

- [1] 孙学娇,刘乃丰.关注糖尿病与血管钙化的共同发病机制和临床意义[J].中国动脉硬化杂志,2020,28:169-174.
- [2] LI C L, LIU X H, QIAO Y, NING L N, LI W J, SUN Y S, et al. Allicin alleviates inflammation of diabetic macroangiopathy via the Nrf2 and NF- κ B pathway[J/OL]. Eur J Pharmacol, 2020, 876: 173052. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173052.
- [3] DEMYANENKO S V, DZREYAN V A, UZDENSKY A B. The expression and localization of histone acetyltransferases HAT1 and PCAF in neurons and astrocytes of the photothrombotic stroke-induced penumbra in the rat brain cortex[J]. Mol Neurobiol, 2020, 57: 3219-3227.
- [4] CICCOCIOPPO R, UBALDI M. Nuclear peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR γ) as a therapeutic target to treat neurodegeneration and dependence elicited by drugs of abuse[J]. Neural Regen Res, 2021, 16: 984-985.
- [5] RAMBUR A, LOURS-CALET C, BEAUDOIN C, BUÑAY J, VIALAT M, MIROUSE V, et al. Sequential Ras/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways recruitment drives basal extrusion in the prostate-like gland of *Drosophila*[J/OL]. Nat Commun, 2020, 11: 2300. DOI: 10.1038/s41467-020-16123-w.
- [6] 金轶平,朱皓皓,廖宇洁,于晓彦.黄连素对高糖培养的大鼠视网膜Müller细胞的抗凋亡和抗炎作用及其机制[J].中华实验眼科杂志,2020,38:1016-1024.
- [7] 富晓旭,高泓,刘桢,谢红艳,袁海泼,谢春光.基于表达谱芯片研究参芪复方对糖尿病大血管病变大鼠血管内皮生长的双向调节作用[J].辽宁中医杂志,2019,46:463-466.
- [8] 沈娜,方涛,苏卫东,刘勇,李焕明.ox-LDL诱导的Raw264.7细胞炎症因子表达变化及PPAR γ Ser273磷酸化调控作用观察[J].山东医药,2020,60:27-31.
- [9] 田宏山,苏晓彤,赵志东,韩向敏,咎林森,胡江,等. siRNA沉默*ACSL1*基因对秦川肉牛脂肪细胞中不饱和脂肪酸合成的影响[J].农业生物技术学报,2020, 28:1722-1732.
- [10] XU F, LIU Y X, ZHU X X, LI S S, SHI X L, LI Z J, et al. Protective effects and mechanisms of vaccarin on vascular endothelial dysfunction in diabetic angiopathy[J/OL]. Int J Mol Sci, 2019, 20: E4587. DOI: 10.3390/ijms20184587.
- [11] HU Z P, YANG M Y, XIE C G, GAO H, FU X X, XIE H Y, et al. Efficacy and safety of shenqi compound for the treatment of diabetic macroangiopathy: a protocol for systematic review and meta-analysis[J/OL]. Medicine (Baltimore), 2020, 99: e19682. DOI: 10.1097/MD.00000000000019682.
- [12] 魏京霞,李丽淑.阿托伐他汀钙治疗糖尿病合并动脉粥样硬化性疾病的疗效观察[J].实用临床医药杂志,2020,24:101-103,107.
- [13] 庄微,刘挺松,张成成,宫剑滨.小檗碱对波动性高糖诱导的人冠状动脉内皮细胞凋亡的影响[J].中草药,2019,50:1365-1371.
- [14] 王盈盈,刘青,唐丽琴,魏伟.小檗碱对高糖诱导足细胞功能及相关蛋白表达的影响[J].中国药理学通报,2018,34:1158-1163.
- [15] 刘琴,杨黎星,石婧,黄雨晴,高洪婷,鞠瑞,等.小檗碱激活巨噬细胞自噬并改善动脉粥样硬化斑块脆弱性[J].基础医学与临床,2020,40:668-677.
- [16] NIE X W, TAN J X, DAI Y A, LIU Y, ZOU J, SUN J, et al. CCL5 deficiency rescues pulmonary vascular dysfunction, and reverses pulmonary hypertension via caveolin-1-dependent BMPR2 activation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 116: 41-56.
- [17] ZHANG B Y, DONG Y, LIU M, YANG L, ZHAO Z. miR-149-5p inhibits vascular smooth muscle cells proliferation, invasion, and migration by targeting histone deacetylase 4 (HDAC4)[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 7581-7590.
- [18] GAO Q, WEI A, CHEN F, CHEN X R, DING W W, DING Z Q, et al. Enhancing PPAR γ by HDAC inhibition reduces foam cell formation and atherosclerosis in *ApoE* deficient mice[J/OL]. Pharmacol Res, 2020, 160: 105059. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105059.
- [19] 张昭亮. *C/EBP α* 基因启动子DNA超甲基化对与PPAR γ 相关的HDAC1抑制解除作用[J].中国矫形外科杂志,2013,21:1761-1766.
- [20] 刘文华,望永鼎,翟一飞,靳莉莉,肖丽,李永兵.人参皂苷Rg1介导PI3K/AKT/FOXO3通路缓解高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激反应[J].免疫学杂志,2020,36:285-291.
- [21] 胡亚耘,陆付耳,胡倩,易屏.小檗碱调控AMPK-TSC1/LC3- II 信号通路促进高糖高脂应激下NIT-1胰岛 β 细胞的自噬[J].中国医院药学杂志,2020,40:29-37.
- [22] 魏胜男.黄葵固体分散体通过调控肝脏HNF4 α /miR122通路纠正糖尿病糖脂代谢紊乱机制研究[D].长春:吉林大学,2016.

[本文编辑] 尹 茶