

• 论 著 •

菲牛蛭素对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化体内脂质代谢和血管斑块的影响*黄贵庆¹, 李吉星¹, 黄桢莹², 韦文兴¹, 林 思¹, 赖宗强¹, 黎渊弘^{1△}

(1. 广西医科大学第二附属医院, 广西 南宁 530007; 2. 南宁市动物疫病预防控制中心, 广西 南宁 530007)

[摘要] **目的** 探讨菲牛蛭素对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化体内脂质代谢和血管斑块的影响。**方法** 将 24 只高脂饮食饲养的雄性 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组, 菲牛蛭素高、低剂量给药组和辛伐他汀阳性给药组, 每组 6 只。另取 6 只 C57BL/6J 小鼠作为空白对照组, 正常饲料喂养。之后连续给药干预 8 周, 末次给药后, 检测血脂水平, HE 染色及 Masson 染色观察主动脉血管病理学改变; 免疫组化染色分别观察菲牛蛭素对小鼠主动脉粥样斑块中增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞凋亡蛋白-3(caspase-3)蛋白的影响。**结果** 与空白对照组比较, 模型组小鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平显著升高, 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 菲牛蛭素高、低剂量组小鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 水平显著降低, HDL-C 水平显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。Masson 染色显示, 与模型组比较, 菲牛蛭素高、低剂量组小鼠血管斑块中的胶原含量显著增加, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。免疫组化染色结果显示, 与空白对照组比较, 模型组小鼠主动脉粥样斑块 PCNA 蛋白表达显著下调, caspase-3 蛋白表达显著上调, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 菲牛蛭素组小鼠主动脉粥样斑块 PCNA 蛋白表达显著上调, 菲牛蛭素高剂量组的 caspase-3 蛋白表达显著下调, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 菲牛蛭素可以通过降低 ApoE^{-/-}小鼠血清血脂水平, 延缓平滑肌细胞凋亡, 稳定血管斑块等方面来抑制动脉粥样硬化的发展。

[关键词] 动脉粥样硬化; 菲牛蛭素; 血脂水平; 血管斑块; 血管平滑肌细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.19.001 中图法分类号: R96

文章编号: 1009-5519(2024)19-3241-07 文献标识码: A

Effects of bufrudin on lipid metabolism and vascular plaque in ApoE^{-/-} mice atherosclerosis*HUANG Guiqing¹, LI Jixing¹, HUANG Liying², WEI Wenxing¹,LIN Si¹, LAI Zongqiang¹, LI Yuanhong^{1△}

(1. The Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530007, China;

2. Nanning Animal Disease Prevention and Control Center, Nanning, Guangxi 530007, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of bufrudin on lipid metabolism and vascular plaques in ApoE^{-/-} mice with atherosclerosis. **Methods** A total of 24 male ApoE^{-/-} mice fed with high-fat diet were randomly divided into the model group, the high-dose and the low-dose groups of bufrudin, and the simvastatin positive group, with six mice in each group. Another six C57BL/6J mice were taken as the blank control group and fed with normal diet. After continuous administration for eight weeks, the blood lipid level was detected after the last administration, and the pathological changes of aortic vessels were observed by HE staining and Masson staining. Immunohistochemical staining was used to observe the effects of bufrudin on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and caspase-3 protein in aortic atherosclerotic plaques of mice. **Results** Compared with the blank control group, the levels of serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in the model group were significantly increased, and the level of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was significantly decreased, and differences were statistically significant ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of serum TC, TG and LDL-C in the high-dose and low-dose groups of bufrudin were significantly decreased, and the level of HDL-C was significantly increased, the differences were statistically significant ($P < 0.01$). Masson staining showed that compared with the model group, the collagen content in the vascular plaque of mice in the high and low dose groups of bufrudin was sig-

* 基金项目: 广西自然科学基金面上项目(2020GXNSFAA238042)。

作者简介: 黄贵庆(1987—), 硕士研究生, 主管药师, 主要从事动脉粥样硬化方面的研究。△ 通信作者, E-mail: zyli2007@163.com。

nificantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The results of immunohistochemical staining showed that compared with the blank control group, the expression of PCNA protein in the aortic atherosclerotic plaque of the model group was significantly down-regulated, and the expression of caspase-3 protein was significantly up-regulated, the differences were statistically significant ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of PCNA protein in the aortic atherosclerotic plaque of the mice in the bufrudin group was significantly up-regulated, and the expression of caspase-3 protein in the bufrudin high-dose group was significantly down-regulated, the differences were statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion Bufrudin can inhibit the development of atherosclerosis by reducing serum lipid levels in ApoE^{-/-} mice, delaying smooth muscle cell apoptosis, and stabilizing vascular plaques.

[Key words] Atherosclerosis; Bufrudin; Serum lipids levels; Vascular plaque; Vascular smooth muscle cells

根据世界卫生组织的报告,1 年中约有 1 790 万人死于心血管疾病,该比例约占全球死亡总人数的 32%^[1]。心血管疾病的范围很广,包括心肌梗死、心力衰竭、缺血性心脏病、脑卒中和跛行等^[2],动脉粥样硬化是引起以上疾病的主要原因。目前,针对动脉粥样硬化的治疗主要包括心血管介入治疗、服用他汀类药物和服用水杨酸类药物治疗^[3]。然而,以上治疗方法所产生的不良反应却不容小觑。如心血管介入治疗虽然在缓解严重的冠状动脉狭窄方面具有一定疗效,但它无法阻止动脉粥样硬化的病变进程,更不能从根本上稳定动脉粥样硬化中易损斑块的形成;至于他汀类药物虽然有一定的预防作用,但是长期服用所产生的肝损害及容易出现的横纹肌溶解症目前也已经受到外界的广泛关注^[4-7];而水杨酸类药物在治疗过程中容易产生消化道症状及出血反应。因此,研发治疗动脉粥样硬化的新型药物刻不容缓。

在中国,水蛭有着悠久的药用历史,《本草纲目》记载,水蛭有疏通瘀血,闭经化瘀的功效。水蛭素作为水蛭的一个重要有效成分,因具有抗凝、抗血栓和降血脂等作用,目前已获得美国 FDA 批准被应用于药物研发和临床医疗中^[8]。菲牛蛭(*poecilobdella manillensis*)是医蛭科牛蛭属,又名马尼拉医蛭,在中国俗称金边蚂蟥,于 2011 年被编入广西特色壮药目录。菲牛蛭性属平和,味道略带一点咸,还有一点苦;也具有有一点轻微的毒性,归属于肝经;其还有破血通经、逐瘀消症的功效,目前已经应用到了很多治疗领域,如在血液凝滞、癥结肿块、中风导致的偏瘫,以及跌打扭伤等病症中得到应用^[9]。已有研究通过分离纯化菲牛蛭唾液得到一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,可以有效调节血小板功能^[10-12]。目前国内外主要的药用水蛭品种为宽体金线蛭,而菲牛蛭与其相比,具有抗凝溶栓活性更好、抗血栓效果更显著等优点^[13];并且菲牛蛭可人工大量养殖,易于获取,价格低廉。由此可见,菲牛蛭是一种具有药用开发价值的水蛭品种。本课题组前期研究发现,菲牛蛭素对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型具有一定改善作用,表明其在动脉粥样硬化防治中具有一定的应用潜力^[14]。

因此,本课题组利用 ApoE^{-/-} 小鼠所建立的动脉粥样硬化模型,进一步去研究菲牛蛭素在抗动脉粥样硬化方面的作用,旨在为菲牛蛭素的临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 ApoE^{-/-} 小鼠、雄性 C57BL/6J 小鼠,均为 8 周龄左右,体重(23±2)g,均购自南京青紫兰科技有限公司,动物质量合格证: NO. 2021062601。实验动物饲养于广西医科大学 SPF 级实验动物中心(证书编号 SYXK 桂 2020-0004),环境温度 20~24℃,湿度控制在 40%~60%,明暗循环 12 h,模拟自然生活规律。本实验经广西医科大学实验动物福利与伦理委员会审查通过。

1.1.2 药物与试剂 菲牛蛭素(广西优未康有限公司);辛伐他汀片(杭州默沙东制药有限公司);血脂试剂盒(南京建成生物工程研究所);增殖细胞核抗原(PCNA)抗体(Abcam);细胞凋亡蛋白-3(caspase-3)抗体(Cell Signaling);免疫组化超敏试剂盒、抗原修复液(福州迈新生物技术有限公司);中性树脂(Bio-sharp);Mayer 苏木素(北京中衫金桥生物技术有限公司)。

1.1.3 主要仪器 SZ2-STB1 体式显微镜(日本 Olympus 公司);TDL-33 台式低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂);4590 包埋机(日本 SAK 精密技术公司);CKX-41 光学显微镜(日本 Olympus 公司);RM2235 型轮转切片机(德国 LEICA 公司);连续光谱扫描式酶标仪(香港分子仪器公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组、造模与给药 C57BL/6J 小鼠予普通饲料喂养,为空白对照组, ApoE^{-/-} 小鼠予高脂饲料[1.25%胆固醇(TC)+15%甘油三酯(TG)]喂养,喂养 10 周,建立小鼠动脉粥样硬化模型。

建模成功后采用随机区组方法将高脂饲料喂养的 ApoE^{-/-} 小鼠分为 4 组,即模型组(Model 组)、辛伐他汀组(Sim 组)、菲牛蛭素低剂量组(BDL 组)和菲牛蛭素高剂量组(BDH 组),C57BL/6J 小鼠作为空白

对照组(Control 组),每组 6 只。通过腹腔注射菲牛蛭素(活性单位 40 U/mL),剂量设置为高剂量组[400 U/(kg·d)]、低剂量组[200 U/(kg·d)],阳性药组接受辛伐他汀混悬液(浓度 0.45 mg/mL)灌胃[3 mg/(kg·d)]。空白对照组、模型组腹腔注射等体积生理盐水,每天 1 次,连续给药 8 周。实验期间全程观察小鼠的一般情况,如进食、活动和精神情况等,给药期间,所有小鼠接受普通饲料喂养。

1.2.2 标本采集 经过 8 周的给药后,禁食且禁饮 12 h,然后眼球取血。血液收集后静置于常温下 2 h,1 500 r/min 离心 10 min,随后将上清液分装并储存在-20℃,用于血清脂质水平检测。通过生理盐水对小鼠左心室进行灌洗,直至肝脏变白后停止灌洗,用眼科镊快速分离出心脏、胸主动脉和腹主动脉(到髂动脉分支处)。将其置于 4%多聚甲醛溶液固定 1 d 后制成蜡块以便后面做成切片用于 HE、Masson 和免疫组化染色。

1.2.3 血清血脂水平检测 采用试剂盒测定各组小鼠血清中的相关脂质水平。

1.2.4 HE 染色 取小鼠主动脉根部石蜡切片,烘片机 55℃烘干 2 h 左右,100%的二甲苯溶液浸泡 10 min;再用梯度乙醇浸泡 5 min;最后用蒸馏水冲洗 5 min。之后按照 HE 染色法上色,树脂封片,光学显微镜观察、采集图像后长期保存。

1.2.5 Masson 染色 脱蜡步骤同 1.2.4。按照 Masson 染色步骤进行染色后再通过树脂封片后利用光学显微镜观察、采集图像,使用 Image J 软件测绘出斑块中的胶原含量,以此计算小鼠主动脉斑块中胶原含量占比。

1.2.6 免疫组化染色检测小鼠主动脉 PCNA、caspase-3 蛋白的表达 取主动脉根部石蜡切片,脱蜡后经免疫组化染色,于光学显微镜下观察并拍照,观察主动脉斑块中 PCNA 和 caspase-3 蛋白的表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS26.0 进行统计分析,计数资料以构成比表示,进行 χ^2 检验,正态分布和非正态分布的计量资料分别以 $\bar{x}\pm s$ 和 $M(Q_1,Q_3)$ 表示,采用 t 检验和 Kruskal-Wallis 秩和检验。对符合正态分布和方差齐性的计量资料进行单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验,其中多时间点的比较需进行重复测量方差分析,若不符合则需进行变量转换或做广义估计方程后再分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

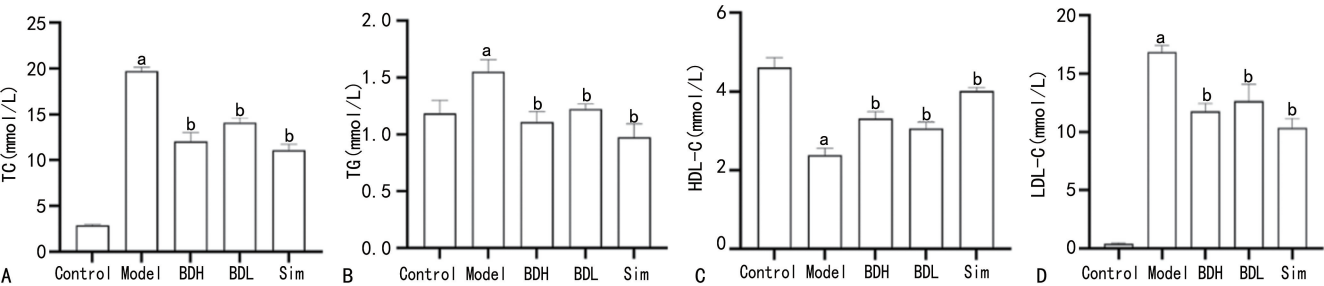
2.1 小鼠一般情况和体重变化 在整个实验过程中,各组小鼠饮食和运动均正常。给药第 0 周各组小鼠体重比较,差异无统计学意义($P>0.05$);给药 8 周后各组小鼠体重均增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。在第 8 周时小鼠各组间的体重比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.2 菲牛蛭素对 ApoE^{-/-}小鼠血清血脂水平的影响 与空白对照组比较,模型组小鼠血清 TC、TG、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平显著升高,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,菲牛蛭素高、低剂量组及辛伐他汀组小鼠血清 TC、TG、HDL-C 水平显著降低,LDL-C 水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见图 1。

表 1 各组小鼠不同时间点的体重变化情况($\bar{x}\pm s$,g,n=6)

组别	第 0 周	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
Control 组	24.49±0.37	25.97±0.29	27.81±0.49	29.85±0.43	30.62±0.74
Model 组	25.61±0.72	27.14±0.64	28.99±0.63	28.79±0.86	29.33±0.55
BDH 组	25.43±0.61	26.63±0.45	27.74±0.71	29.39±0.36	29.26±1.11
BDL 组	25.40±0.25	26.91±0.80	28.65±0.47	29.17±0.72	28.87±0.97
Sim 组	25.50±0.66	26.71±0.62	28.22±0.49	29.51±0.49	30.34±0.64

注:Control 组为空白对照组;Model 组为模型组;BDH 组为菲牛蛭素高剂量组;BDL 组为菲牛蛭素低剂量组;Sim 组为辛伐他汀组。

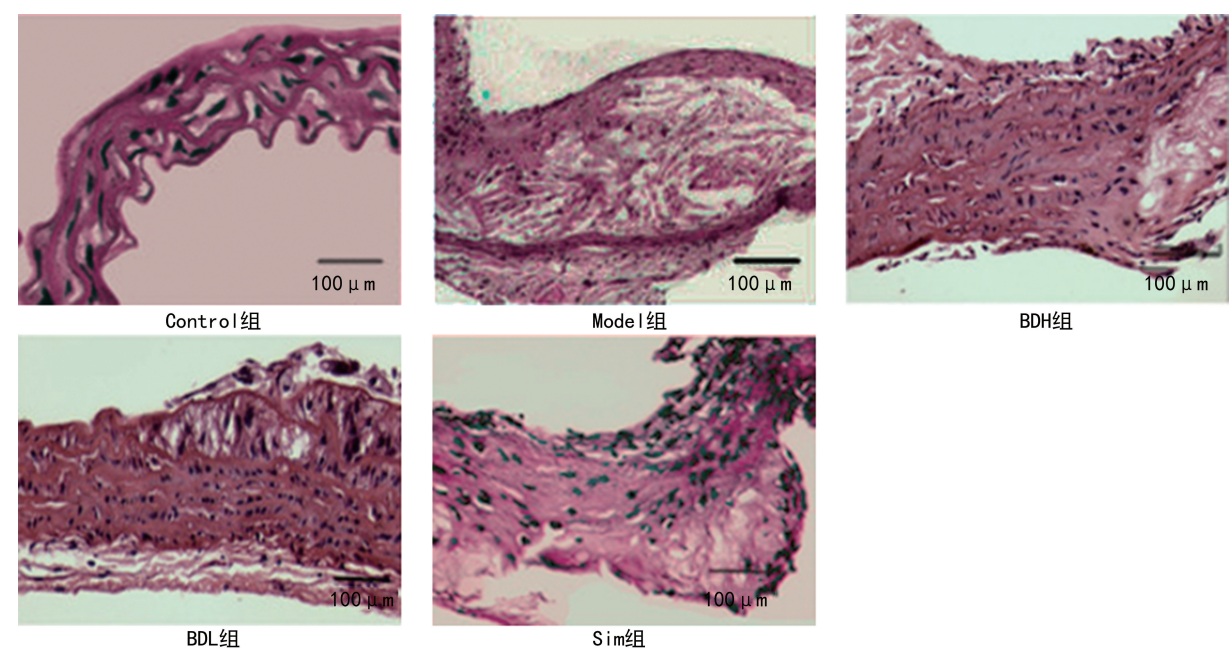


注:A. TC 水平;B. TG 水平;C. HDL-C 水平;D. LDL-C 水平。Control 为空白对照组;Model 为模型组;BDH 为菲牛蛭素高剂量组;BDL 为菲牛蛭素低剂量组;Sim 为辛伐他汀组。与 Control 组比较,^a $P<0.01$;与 Model 组比较,^b $P<0.01$ 。

图 1 各组小鼠血清血脂水平表达情况($\bar{x}\pm s$,mmol/L,n=6)

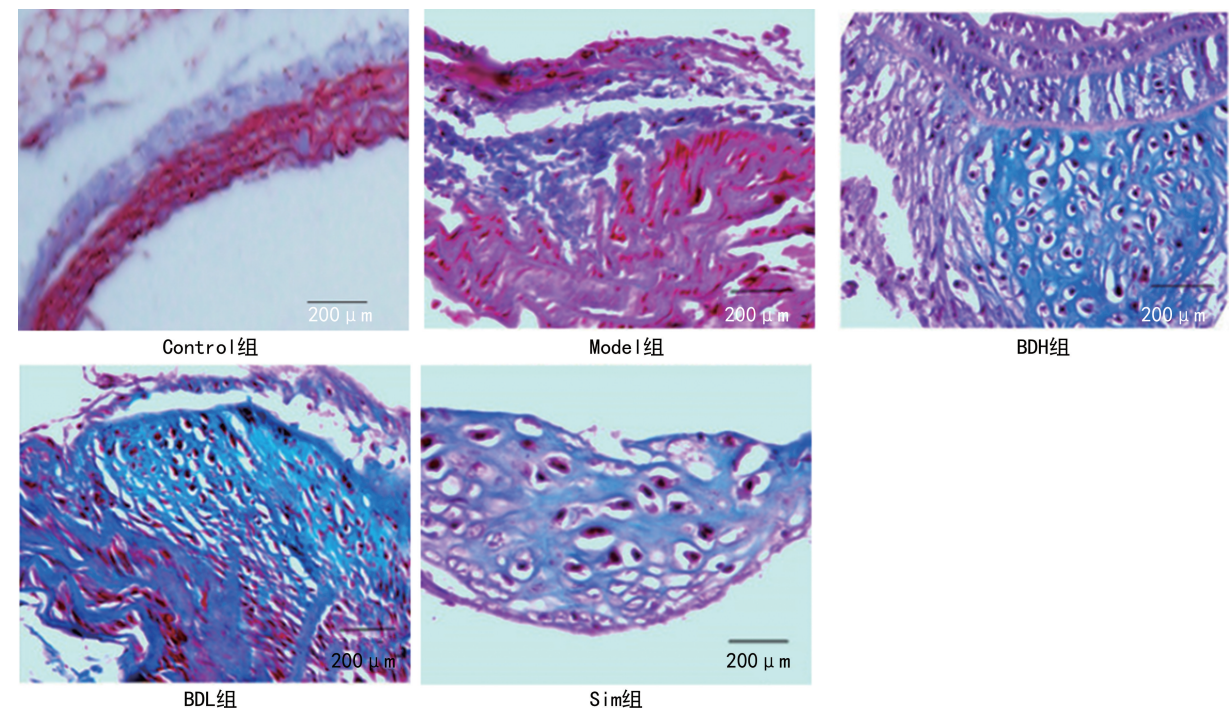
2.3 菲牛蛭素对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉血管结构形态的影响 HE 染色显示,空白对照组动脉管壁无明显异常变化,管壁无脂质沉积、炎性细胞、粥样斑块生成。与空白对照组比较,模型组小鼠主动脉壁上有显著的粥样硬化斑块,血管内皮结构不全,内膜表面凹凸不平,管腔变窄,斑块内有“空泡”、脂质沉积、胆固醇晶体等。与模型组比较,菲牛蛭素高、低剂量及辛伐他汀组小鼠主动脉壁都有相应的变化,虽然其主动脉壁也增厚且有斑块形成,但斑块的损伤程度还是有

所降低,“空泡”的范围缩小了许多。见图 2。
2.4 菲牛蛭素对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉粥样斑块中胶原含量的影响 经 Masson 染色后的胶原呈蓝绿色,而血管中的肌纤维、细胞浆显红色,胞核表现为蓝黑色,见图 3。模型组小鼠主动脉粥样斑块中的胶原含量较少,与模型组相比,菲牛蛭素高、低剂量及辛伐他汀组小鼠动脉粥样斑块中的胶原含量有不同程度增加,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图 4。



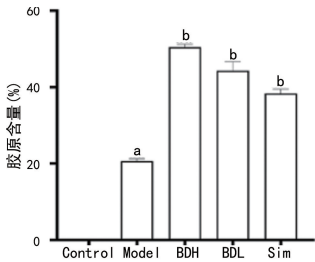
注:Control 组为空白对照组;Model 组为模型组;BDH 组为菲牛蛭素高剂量组;BDL 组为菲牛蛭素低剂量组;Sim 组为辛伐他汀组。

图 2 菲牛蛭素对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉结构形态的影响(HE 染色,100×)



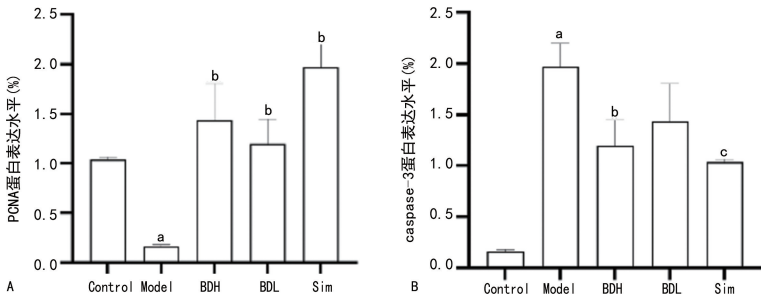
注:Control 组为空白对照组;Model 组为模型组;BDH 组为菲牛蛭素高剂量组;BDL 组为菲牛蛭素低剂量组;Sim 组为辛伐他汀组。

图 3 菲牛蛭素对 ApoE^{-/-} 小鼠血管斑块中的胶原含量的影响(Masson 染色,200×)



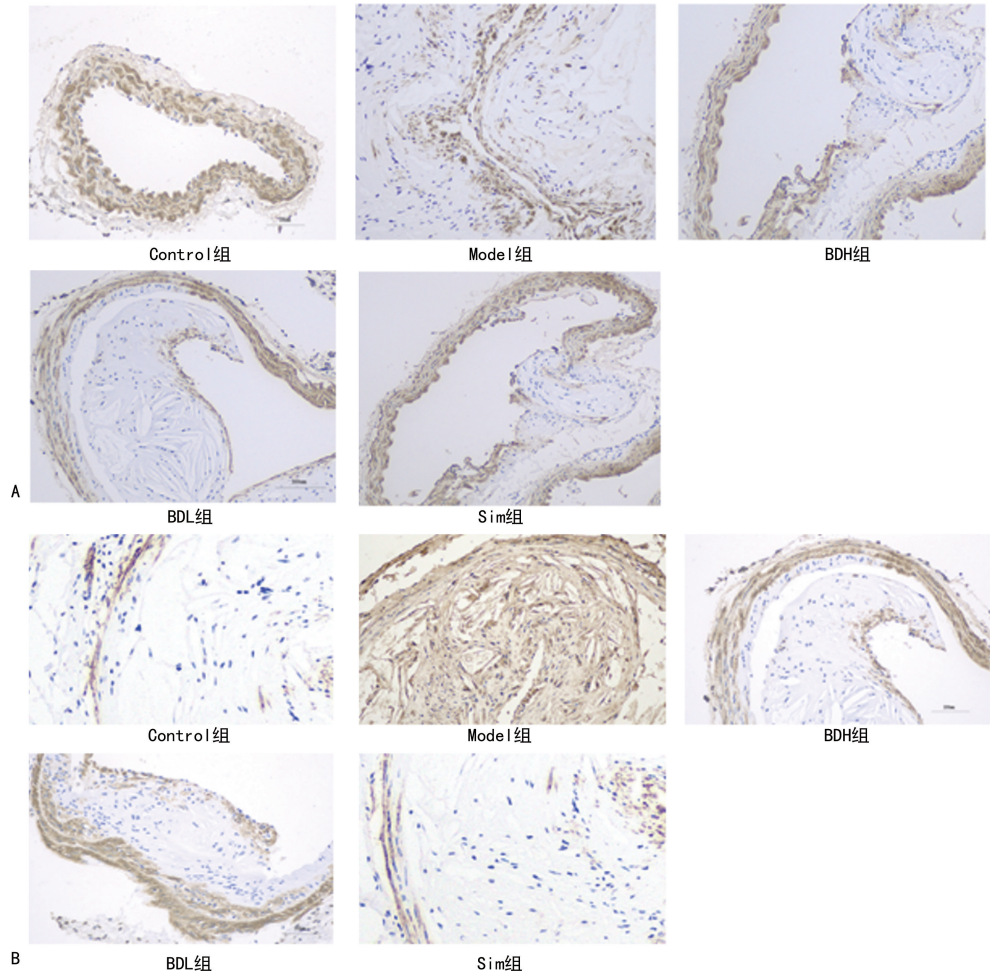
注:Control 为空白对照组;Model 为模型组;BDH 为菲牛蛭素高剂量组;BDL 为菲牛蛭素低剂量组;Sim 为辛伐他汀组。与 Control 组比较,^a $P<0.01$;与 Model 组比较,^b $P<0.01$ 。

图 4 各组小鼠血管斑块中胶原含量



注:A. PCNA 蛋白表达水平;B. caspase-3 蛋白表达水平。Control 为空白对照组;Model 为模型组;BDH 为菲牛蛭素高剂量组;BDL 为菲牛蛭素低剂量组;Sim 为辛伐他汀组。与 Control 组比较,^a $P<0.01$;与 Model 组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

图 5 菲牛蛭素对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块稳定性及 PCNA、caspase-3 蛋白表达水平的影响



注:A. PCNA 染色情况;B. caspase-3 染色情况。Control 为空白对照组;Model 为模型组;BDH 为菲牛蛭素高剂量组;BDL 为菲牛蛭素低剂量组;Sim 为辛伐他汀组。

图 6 菲牛蛭素对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉粥样硬化斑块的影响(免疫组化染色,100×)

3 讨 论

动脉粥样硬化是主要发生在大、中型动脉血管的慢性进行性脂质沉积、炎症反应和纤维组织病灶性增厚的疾病^[15]。以动脉粥样硬化为重要病理基础的心脑血管疾病,已成为我国乃至全世界导致死亡的主要原因,严重危害人类生命和健康^[16]。因此,寻找能够有效治疗或预防动脉粥样硬化的药物具有极其重要的现实意义。

血脂是影响动脉粥样硬化发展的一个重要因素,TC、TG 和脂蛋白水平与动脉粥样硬化发展密切相关。而且动脉粥样硬化一般认为是一种由脂质积累而引发的慢性炎症^[17]。血脂的长期升高容易使 TC 侵入大血管壁并沉积,促进动脉平滑肌细胞和成纤维细胞的增殖^[18-19]。而且随着血脂的不断升高,大量的 LDL-C、ApoB 等蛋白沉积在动脉壁上,LDL 被氧化修饰成氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL),从而引起一系列的病理改变。还有一种学说认为,血脂长期升高容易导致 TC 逆转运相关功能障碍,因为当 TC 逆转运出现障碍后,血液中的 HDL-C 无法将外周脂质转运到肝脏,从而就无法使其在肝脏中正常分解转化为 TC,进而无法在小肠内将其排泄出体外,至此,慢性炎症和泡沫细胞便开始形成,导致动脉粥样硬化的产生^[20]。在本研究中,菲牛蛭素显著降低动脉粥样硬化模型小鼠血清中 LDL-C、TG 和 TC 水平。这提示菲牛蛭素能够通过改善动脉粥样硬化模型小鼠的血脂水平发挥抗动脉粥样硬化作用。尽管目前治疗动脉粥样硬化的水平在发展,但是在预防动脉粥样硬化方面仍然存在许多不足。在动脉粥样硬化最早期,只有内皮细胞、巨噬细胞和少许 T 细胞参与泡沫细胞的形成,随着病变的进展,当动脉血管损伤后,血管平滑肌细胞(VSMC)会迁移至受损的血管内膜并增殖,同时分泌大量的细胞外基质(ECM)修复损伤的血管,而 ECM 过度沉积促进了动脉粥样硬化斑块的形成^[21]。已有大量研究证实,斑块的形成和破裂是动脉粥样硬化疾病的一个标志。易损斑块破裂并发血栓形成是动脉粥样硬化致命的并发症^[22]。本研究 HE 染色和 Masson 染色结果显示,与模型组相比较,菲牛蛭素和辛伐他汀组的动脉血管斑块都有所减轻且斑块内的胶原含量有所增加。表明菲牛蛭素能够通过减轻斑块的形成及提高斑块的稳定性来改善小鼠的动脉粥样硬化症状。

血管壁的组成细胞主要为内皮细胞和 VSMC,成熟的内皮细胞不具有增殖活性,因此动脉粥样硬化发生中后期主要为 VSMC 增殖所致。VSMC 细胞的活化、迁移和增殖在动脉粥样硬化发病中起重要作用^[17],其生物学行为(如衰老、凋亡、自噬和增殖)是动脉粥样硬化斑块进展和易损性的主要因素^[23]。在动脉粥样硬化斑块的形成过程中,血管内侧的 VSMC 从收缩表型向合成、迁移和增殖表型去分化^[24],当其

异常增殖时会导致内膜增厚,使动脉容易被脂质和炎症细胞浸润,从而加剧动脉粥样硬化斑块的形成^[25]。已有研究证实,通过抑制 VSMC 的增殖和迁移可以干预动脉粥样硬化的形成及防止支架术后再狭窄^[26]。PCNA 是细胞增殖的一种可靠标志物,一般用其评估细胞增殖^[27],其功能主要表现在通过招募其他因子参与 DNA 修复、染色质重塑和细胞周期控制^[28],所以在几个细胞事件(如细胞增殖、DNA 修复和细胞凋亡)中起着关键的作用。在动脉粥样硬化发生早期 PCNA 含量的变化和 VSMC 的增殖保持一致^[29]。本研究结果显示,菲牛蛭素组的动脉粥样硬化斑块内 PCNA 蛋白表达水平较模型组均有所上升,提示菲牛蛭素很可能参与了抑制 VSMC 的早期增殖和迁移的过程。正常的 VSMC 分布于血管中膜,处于不增殖的状态,维持着血管的张力和结构的完整性。动脉粥样硬化发生早期同样伴随 VSMC 的凋亡,VSMC 的增殖与凋亡失衡加速了动脉粥样硬化斑块的形成。在动脉粥样硬化的晚期,VSMC 大量凋亡也是斑块破裂出血形成血栓的主要原因之一。Caspase-3 是细胞凋亡的重要介质和效应因子^[30-31],其存在是细胞程序性凋亡的标志^[32],该因子的裂解对于高效凋亡的发生至关重要。激活的 caspase-3 在细胞质中具有裂解与其相对应的胞质及胞核底物的作用,最终引发细胞凋亡^[33],从而加速动脉粥样硬化斑块的形成。本实验发现菲牛蛭素组较模型组相比,caspase-3 蛋白表达水平有所下降,提示菲牛蛭素可能通过抑制 VSMC 的异常凋亡来起到抗动脉粥样硬化的作用。

综上所述,菲牛蛭素通过改善血脂水平,抑制斑块形成,稳定动脉粥样硬化小鼠主动脉斑块,以及通过促进 PCNA 和抑制 caspase-3 蛋白的相关表达来抑制 VSMC 的异常增殖、迁移和凋亡来达到治疗动脉粥样硬化的效果。本研究结果为菲牛蛭素如何改善动脉粥样硬化提供了新的见解,表明菲牛蛭素可能是一种治疗心血管疾病的潜在辅助治疗药物。

参考文献

[1] FAN J L, WATANABE T. Atherosclerosis: Known and unknown[J]. Pathol Int, 2022, 72 (3):151-160.

[2] GREAVES D R, GORDON S. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease[J]. Trends Immunol, 2001, 22(4):180-181.

[3] 中国医师协会中西医结合分会心血管专业委员会, 中华中医药学会心血管病分会. 动脉粥样硬化中西医防治专家共识(2021 年)[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(3):287-293.

[4] 陈清杰. 他汀类药物不良反应的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2013, 34(2):279-283.

- [5] ARMITAGE J. The safety of statins in clinical practice[J]. *Lancet*, 2007, 370(9601):1781-1790.
- [6] BEŁTOWSKI J, WÓJCICKA G, JAMROZWIŚNIEWSKA A. Adverse effects of statins-mechanisms and consequences[J]. *Curr Drug Saf*, 2009, 4(3):209-228.
- [7] BROWN W V. Safety of statins[J]. *Current opinion in lipidology*, 2008, 19(6):558-562.
- [8] DONG H, REN J X, WANG J J, et al. Chinese medicinal leech: Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological activities[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016: 7895935.
- [9] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准: 2011 年版. 第 2 卷[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011.
- [10] BROWER M S, LEVIN R I, GARRY K. Human neutrophil elastase modulates platelet function by limited proteolysis of membrane glycoproteins[J]. *J Clin Invest*, 1985, 75(2):657-666.
- [11] LEGRAND Y, PIGNAUD G. Human blood platelet elastase and proelastase[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 1975, 23(7):546-549.
- [12] SELAK M A. Neutrophil elastase potentiates cathepsin G-induced platelet activation [J]. *Thromb Haemost*, 1992, 68(5):570-576.
- [13] 吴志军, 于立华. 菲牛蛭及其制品的抗血栓、溶血栓作用[J]. *中成药*, 2007, 29(4):591-593.
- [14] 赖吴芳, 周维官, 黄栎莹, 等. 菲牛蛭素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块的干预作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(24): 2595-2598.
- [15] PETERS S A E, RUIJTER H M D, BOTS M L, et al. Improvements in risk stratification for the occurrence of cardiovascular disease by imaging subclinical atherosclerosis: A systematic review[J]. *Heart*, 2012, 98(3):177-184.
- [16] LIM S S, VOS T, FLAXMAN A D, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990 — 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859):2224-2260.
- [17] JOJIMA T, UCHIDA K, AKIMOTO K, et al. Liraglutide, a GLP-1 receptor agonist, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by enhancing AMP-activated protein kinase and cell cycle regulation, and delays atherosclerosis in ApoE deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 261:44-51.
- [18] ZHAO S, ZHONG J, SUN C, et al. Effects of aerobic exercise on TC, HDL-C, LDL-C and TG in patients with hyperlipidemia: A protocol of systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(10):e25103.
- [19] FIRDOUS S M, HAZRA S, GOPINATH S C B, et al. Antihyperlipidemic potential of diosmin in Swiss Albino mice with high-fat diet induced hyperlipidemia [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 28(1):109-115.
- [20] KOROLENKO T A, BGATOVA N P, OVSYUKOVA M V, et al. Hypolipidemic effects of β -Glucans, mannans, and fucoidans: Mechanism of action and their prospects for clinical application[J]. *Molecules*, 2020, 25(8):1819.
- [21] 舒刘芳, 姜希娟, 杨琳, 等. 血管平滑肌细胞表型转换对动脉粥样硬化的作用研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(1):99-102.
- [22] LUO Z, XU W, MA S, et al. Moderate autophagy inhibits vascular smooth muscle cell senescence to stabilize progressed atherosclerotic plaque via the mTORC1/ULK1/ATG13 signal pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 3018190.
- [23] HIGASHI Y, SUKHANOV S, SHAI S Y, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor deficiency in macrophages accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Circulation*, 2016, 133(23):2263-2278.
- [24] FALK E. Pathogenesis of atherosclerosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(8 Suppl):C7-12.
- [25] SCHWARTZ S M, DEBLOIS D, O'BRIEN E R. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis[J]. *Circ Res*, 1995, 77(3):445-465.
- [26] FINN A V, JOHN M, NAKAZAWA G, et al. Differential healing after sirolimus, paclitaxel, and bare metal stent placement in combination with peroxisome proliferator-activator receptor gamma agonists: Requirement for mTOR/Akt2 in PPARgamma activation[J]. *Circ Res*, 2009, 105(10):1003-1012.
- [27] GONZÁLEZ-MAGAÑA A, BLANCO F J. Human PCNA structure, function and interactions[J]. *Bio-molecules*, 2020, 10(4):570. (下转第 3252 页)