# 补肾活血方调控沉默信息调节因子 6 介导的自噬延缓动脉粥样硬化小鼠血管老化的机制研究

宋晓莹，孟　静，楼丹飞*
（上海中医药大学附属市中医医院急诊与重症医学科，上海 200071）

**摘要：目的** 探讨补肾活血方通过调控 SIRT6 介导的自噬延缓动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）小鼠血管老化的机制。**方法** 共选取 96 只 9 周龄雄性 ApoE$^{-/-}$ 小鼠，随机分成模型组、补肾活血方组、他汀组及补肾活血方＋ 3-MA 组，每组 24 只，同品系 9 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 24 只设为正常组。观察主动脉窦细胞形态、胶原纤维含量、主动脉窦及主动脉总体脂质沉积，以及内皮细胞中自噬小体和脂滴形成情况。比较血清脂质水平，以及主动脉 *p53*、*p21*、*p62*、*SIRT6* 及 MAPLC3 表达。**结果** 与模型组相比，补肾活血方组主动脉窦有明显 AS 减轻、主动脉衰老延缓，血清 TG、LDL 及 TC 水平降低（$P < 0.05$），HDL 水平升高（$P < 0.05$）；补肾活血方＋ 3-MA 组血清 LDL、TC 水平升高（$P < 0.05$），HDL 水平降低（$P < 0.05$）；补肾活血方组和他汀组主动脉窦脂质沉积明显减少（$P < 0.01$），主动脉窦胶原纤维含量显著降低（$P < 0.01$），*p53*、*p21* 及 *p62* 表达量降低（$P < 0.01$），*SIRT6*、LC3 Ⅱ / Ⅰ表达量升高（$P < 0.05$）。与补肾活血方组相比，补肾活血方＋ 3-MA 组主动脉窦脂质沉积明显增加（$P < 0.01$），主动脉窦胶原纤维含量显著增加（$P < 0.01$），*p53*、*p21* 及 *p62* 表达量升高（$P < 0.01$），*SIRT6*、LC3 Ⅱ / Ⅰ表达量降低（$P < 0.01$）。**结论** 补肾活血方可能通过调控 SIRT6 介导的自噬延缓 AS 小鼠血管老化。

**关键词：** 补肾活血方；沉默信息调节因子 6；动脉粥样硬化；自噬；血管老化
**中图分类号：** R543.5　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1672-9188(2025)06-0555-010
**引用：** 宋晓莹, 孟静, 楼丹飞. 补肾活血方调控沉默信息调节因子6介导的自噬延缓动脉粥样硬化小鼠血管老化的机制研究[J]. 世界临床药物, 2025, 46(6): 555-564. DOI：10.13683/j.wph.2025.06.005



# Study on the mechanism of the Bushen Huoxue formula in regulating silent information regulator 6-mediated autophagy to delay vascular aging in atherosclerotic mice

SONG Xiaoying, MENG Jing, LOU Danfei*
(*Department of Emergency and Critical Care Medicine, Shanghai Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China*)

**Abstract:** ***Objective*** To explore whether Bushen Huoxue formua delays vascular aging in atherosclerotic (AS) mice by regulating autophagy mediated by the SIRT6. ***Methods*** A total of 96 9-week-old male ApoE$^{-/-}$ mice were selected and randomly divided into the model group, the Bushen Huoxue formula group, the statin group, and the Bushen Huoxue formula＋3-MA group, with 24 mice in each group. Twenty-four 9-week-old male C57BL/6 mice of the same strain were taken as the normal group. The morphological changes of aortic sinus cells, the changes in collagen fiber content, the overall lipid deposition in the aortic sinus and aorta, and the formation of autophagosomes and lipid droplets in endothelial cells in mice were observed. The serum lipid levels, as well as the expressions of *p53*, *p21*, *p62*, *SIRT6* genes and MAPLC3 protein in the aorta were compared. ***Results*** Compared with the model group, AS in the aortic sinus was

**收稿日期：** 2025-02-21
**作者简介：** 宋晓莹，住院医师，研究方向：中医药防治老年病、心血管疾病临床与基础研究。
**通信作者：** 楼丹飞，副主任医师，硕士生导师，研究方向：中医药防治老年病、心血管疾病临床与基础研究。
**基金项目：** 上海中医药大学高峰高原学科(临床人才专项，171319)

obviously alleviated and aortic aging delayed in the Bushen Huoxue formula group, and the levels of serum TG, LDL and TC decreased ($P<0.05$), and the level of HDL increased ($P<0.05$). In the Bushen Huoxue formula+3-MA group, the levels of serum LDL and TC increased ($P<0.05$), and the level of HDL decreased ($P<0.05$). In the Bushen Huoxue formula group and the statin group, lipid deposition in the aortic sinus was significantly reduced ($P<0.01$), and the content of collagen fibers in the aortic sinus was significantly decreased ($P<0.01$), the expression levels of *p53*, *p21* and *p62* were decreased ($P<0.01$), and the expression level of *SIRT6* and LC3Ⅱ/Ⅰ was increased ($P<0.05$). Compared with the Bushen Huoxue formula group, the lipid deposition in the aortic sinus and the content of collagen fibers in the aortic sinusin the Bushen Huoxue formula+3-MA group increased significantly ($P<0.01$), the expression levels of *p53*, *p21* and *p62* increased ($P<0.01$), and the expression level of *SIRT6* and LC3Ⅱ/Ⅰ decreased ($P<0.01$). ***Conclusion*** Bushen Huoxue formula may delay vascular aging in atherosclerotic mice by regulating SIRT6-mediated autophagy.

**Key words**: Bushen Huoxue formula; silent information regulator 6; atherosclerosis; autophagy; vascular aging





动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）是一种严重威胁老年人群健康的复杂性血管疾病，细胞自噬如内皮细胞自噬、巨噬细胞中线粒体自噬等均可延缓AS的发生[1]。沉默信息调节因子（silent information regulator，SIRT）6广泛表达于哺乳动物组织中，在DNA损伤修复、抑制细胞凋亡、调节自噬、抗氧化应激以及延长细胞寿命等方面发挥重要的调控作用[2]。研究[3]显示，在心血管细胞中，SIRT6调控的自噬可维持细胞平衡和延缓衰老。补肾活血法是临床治疗AS的常用治则，基于补肾活血方有效调控高脂饮食诱导的载体蛋白E基因敲除（apolipoprotein E homozygous knockout，$ApoE^{-/-}$）小鼠脂质代谢紊乱、自噬相关蛋白表达的前期试验基础，本研究从SRIRT6介导的自噬角度探讨补肾活血方干预治疗AS的可能相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

100只9周龄的清洁级$ApoE^{-/-}$雄性小鼠，同品系、同周龄的C57BL/6小鼠24只，购买于江苏集萃药康生物科技股份有限公司，实验动物生产许可证：SCXK（苏）2018-0008。小鼠饲养于上海中医药大学附属市中医医院实验动物中心，实验动物使用许可证：SYXK（沪）2020-0014，饲养动物温度为21～24 ℃、湿度55%～68%、光照时间明暗循环12/12 h。

基于前期试验基础，采用成人等效剂量，补肾活血方组成：熟地黄9 g（210326），黄精9 g（210315），枸杞子9 g（21031501），三七3 g（20113505），川芎6 g（20210317-1），丹参9 g（21052611），瓜蒌皮18 g（210427），生山楂9 g（210528），为中药颗粒剂，由江苏天阴天江药业有限公司生产。阿托伐他汀钙片（20 mg/片，8185447）购自辉瑞制药有限公司；3-甲基腺嘌呤（3-methyladenine，3-MA）（A8353）购自上海伟寰生物科技有限公司；苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）（GP1031）、油红O（G1015）以及Masson（GP1032）染色试剂盒均购自Service；甘油三酯（triglyceride，TG）（CM1114）、总胆固醇（total cholesterol，TC）（CM1113）、低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）（CM1115）以及高密度脂蛋白（high density lipoprotein，HDL）（CM1116）试剂盒均购自雷杜；细胞衰老染色试剂盒（C0602）及二喹啉甲酸（bicinchoninic acid assay，BCA）蛋白浓度测定试剂盒（P0012）均购自碧云天；一抗：兔抗Tubulin（Abs113692）、兔抗p21（Abs2947T）购自Absin，兔抗核孔蛋白（sequestosome 1，p62，E7M1A）、兔抗p53（2524T）以及兔抗SIRT6（D8D12）均购自CST；二抗：辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HPR）标记山

羊抗兔 Ig(H ＋ L)(A0208) 购自碧云天。

**1.2** 分组与造模

随机选取 ApoE$^{-/-}$ 小鼠 4 只，进行适应性喂养 1 周后，高脂饮食（蛋白质 22%、脂肪 4.5%、纤维 5.0%、猪油 21%、胆固醇 0.5% 及其他 47%）喂养 12 周，禁食 12 h 后麻醉处死，取其冠状动脉于电子显微镜下观察，4 只小鼠均可见内皮结构不完整，平滑肌细胞排列紊乱，泡沫细胞和单核细胞聚集，且伴有胆固醇结晶的形成，提示造模成功。

96 只 ApoE$^{-/-}$ 小鼠随机分为模型组、补肾活血方组、他汀组以及补肾活血方＋ 3-MA 组，每组 24 只，24 只 C57BL/6 小鼠作为正常组。所有小鼠先普通饲料适应性喂养 1 周，正常组小鼠继续予普通饲料喂养，其余组小鼠均予以高脂饮食喂养，喂养同时，正常组、模型组均予以 0.2 mL 双蒸水灌胃，一日 1 次；补肾活血方组、他汀组均予以 0.2 mL 成人等效剂量的补肾活血方、阿托伐他汀钙混悬液灌胃，一日 1 次；补肾活血方＋ 3-MA 组予以 0.2 mL 成人等效剂量的补肾活血方灌胃的同时，隔天腹腔注射 15 mg/kg 3-MA 水溶液。所有小鼠喂养 12 周。

**1.3** 方法

**1.3.1** HE 染色观察主动脉窦细胞形态变化

每组随机取 5 只小鼠处死后，采集各小鼠心脏连同主动脉，在 4% 多聚甲醛缓冲液中固定 24 h，石蜡包埋，切成 5 μm 厚切片，行 HE 染色，用苏木素处理 10 min，伊红处理 3 ～ 5 min，自来水冲洗后，中性树脂封片。显微镜（OLYMPUS BX41，日本）拍照，观察小鼠主动脉窦内膜情况及相关病理变化。若在 12 周后，模型组中小鼠主动脉窦中内皮结构不完整，平滑肌细胞排列紊乱，泡沫细胞和单核细胞聚集，并且伴有胆固醇结晶的形成，呈现出典型的 AS 病理改变，则表示造模成功。

**1.3.2** 小鼠血清中血脂水平

每组随机取 5 只小鼠眼球取血，离心后取上清，使用 TG、TC、LDL 以及 HDL 试剂盒，在全自动生化仪（深圳雷杜生命科技，Cheray 240）上检测相关血脂水平。

**1.3.3** Masson 染色观察主动脉窦胶原纤维含量的变化

石蜡切片同 HE 染色，脱蜡至水，行 Masson 染色，苏木素 10 min，丽春红酸性复红液 5 ～ 10 min，分化，透明，中性树脂封片，显微镜拍照，Imag J 统计胶原纤维蓝染面积占小鼠主动脉窦总面积百分比。

**1.3.4** 油红 O 染色观察主动脉窦脂质水平

每组随机取 5 只小鼠处死后，采集各小鼠主动脉窦，在 4% 多聚甲醛缓冲液中固定 24 h，冰冻切成 5 μm 厚切片，行油红 O 染色，用油红 O 处理 8 ～ 10 min，苏木素 30 s，自来水冲洗 10 min，晾干，显微镜拍照，Imag J 分析小鼠主动脉窦油红 O 染色面积占小鼠主动脉窦总面积百分比。

**1.3.5** 透射电镜观察主动脉内皮细胞自噬小体和脂滴

每组随机取 4 只小鼠处死后，采集各小鼠主动脉弓处组织，用 2.5% 戊二醛预固定 24 h，1% 锇酸固定 1 h，梯度酒精脱水，包埋切片，透射电镜（FEI 公司，Tecnai G2 Spirit BioTWIN）观察主动脉内皮细胞自噬小体、脂滴。

**1.3.6** 实时聚合酶链反应（real time-polymerase chain reaction，RT-PCR）检测小鼠主动脉 *SIRT6*、*p53*、*p21*、*p62* mRNA 变化

对 −80 ℃冻存主动脉组织进行研磨，离心机进行蛋白裂解，提取 RNA，分光光度计法测定 RNA 浓度和和纯度，逆转录，cDNA 合成，染料法 RT-PCR，相对定量算法 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算。其中 *p53* 引物上游：ACCGCCGACCTATCCTTACCATC，下游：GGCACAAACACGAACCTCAAAGC；*p21* 引物上游：CCCCACCCCATACTTCCCCTTC，下游：GTTGCCACTGGAGCTGCCTAAG；*SIRT6* 引物上游：GGACCCTGCGTGCTAGACAAAG，下游：GGGCTGTTGGGCTTGGACTTATAC；*p62* 引物上游：AGGAGGAGACGATGACTGGACAC，下游：TTGGTCT

GTAGGAGCCTGGTGAG。

**1.3.7** 免疫印迹法（western blotting，WB）检测小鼠主动脉 SIRT6、p53、p21、p62 以及微管相关蛋白 1 轻链（microtubule-associated 1 protein light chain，MAP1LC）3 蛋白表达：

提取每组 5 只小鼠主动脉蛋白，使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度，制胶，上样，电泳，转膜，封闭，孵育一抗，4 ℃过夜，孵育二抗，常温 1 h，曝光，Image J 读取灰度值，以 Tubulin 蛋白作为内参对照，计算蛋白的相对表达量。

**1.4** 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件分析，计量资料符合正态分布，采用（$\bar{x}\pm s$）进行统计学描述，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 HSD-$t$ 检验，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1** 小鼠主动脉窦细胞形态变化

正常组见主动脉窦中内膜、中膜、外膜结构完整，边界分明，血管内皮连续性较好，未见脂质斑块以及胆固醇结晶形成。中膜可见小鼠的血管平滑肌成梭形排列，外膜为疏松的结缔组织。模型组见内膜增厚，内皮细胞脱落，内皮结构不完整，平滑肌细胞发生肿胀、移行，排列紊乱，泡沫细胞和单核细胞聚集，且伴有胆固醇结晶的形成，呈现出典型的 AS 病理改变，说明造模成功。与模型组比较，补肾活血方组和他汀组的病理状态减轻，血管内膜中沉积的巨噬细胞和泡沫细胞减少，同时内膜、中膜及外膜结构完整性较好，血管内皮连续性比较好且只有轻微的内皮脱落，中膜平滑肌排列欠规则，伴有紊乱和增生，外膜为疏松的结缔组织。相较补肾活血方组，补肾活血方＋ 3-MA 组主动脉窦内膜中泡沫细胞的沉积增加。见图 1。

**2.2** 小鼠血清中血脂水平

与正常组比较，模型组血清 TG、LDL 以及 TC 水平升高（$P<0.01$），HDL 水平降低（$P<0.01$）。与模型组比较，补肾活血方组血清 TG、LDL 以及 TC 水平降低（$P<0.05$），HDL 水平升高（$P<0.05$）；补肾活血方＋ 3-MA 组血清中的 LDL、TC 水平升高（$P<0.05$），HDL 水平降低（$P<0.05$）。见表 1。

**2.3** 小鼠主动脉脂质沉积情况

与正常组比较，模型组主动脉窦中脂质沉积明显增加（$P<0.01$）。与模型组相比，补肾活血方组和他汀组主动脉窦脂质沉积明显减少（$P<0.01$）。与补肾活血方组相比，补肾活血方＋ 3-MA 组主动脉窦内膜中脂质的沉积明增加（$P<0.01$）。见图 2、表 2。

**2.4** 小鼠主动脉窦胶原纤维含量变化

模型组主动脉窦胶原纤维含量较正常组增加（$P<0.01$）。补肾活血方组以及他汀组主动脉窦胶原纤维含量较之模型组含量显著降低（$P<0.01$）。

**表 1 各组小鼠血清脂质水平比较**（$\bar{x}\pm s$，单位：mmol/L）

**Table 1 Comparison of serum lipid levels in each group of mice**（$\bar{x}\pm s$, unit: mmol/L）

| 组别 | TG | HDL | LDL | TC |
|---|---|---|---|---|
| 正常组（$n$=5） | 1.45±0.10 | 1.84±0.23 | 0.45±0.05 | 3.06±0.16 |
| 模型组（$n$=5） | 3.31±0.32** | 1.11±0.10** | 14.53±0.92** | 20.64±0.14** |
| 补肾活血方组（$n$=5） | 2.41±0.23$^{\#}$ | 1.55±0.09$^{\#}$ | 10.35±0.99$^{\#}$ | 17.99±0.33$^{\#\#}$ |
| 他汀组（$n$=5） | 2.37±0.83$^{\#}$ | 2.38±0.33$^{\#\#}$ | 11.60±3.65 | 18.56±0.98$^{\#\#}$ |
| 补肾活血方＋3-MA组（$n$=5） | 2.41±0.26 | 1.08±0.20$^{\&}$ | 14.95±2.37$^{\&}$ | 19.55±0.33$^{\&\&}$ |
| $F$值 | 11.770 | 33.010 | 41.470 | 1 082.000 |
| $P$值 | ＜0.001 | ＜0.001 | ＜0.001 | ＜0.001 |

注：与正常组相比，**$P$＜0.01；与模型组相比，$^{\#}P$＜0.05，$^{\#\#}P$＜0.01；与补肾活血方组相比，$^{\&}P$＜0.05，$^{\&\&}P$＜0.01。

Note: vs. normal group, **$P$＜0.01; vs. model group, $^{\#}P$＜0.05, $^{\#\#}P$＜0.01; vs. Bushen Huoxue formula group, $^{\&}P$＜0.05, $^{\&\&}P$＜0.01.

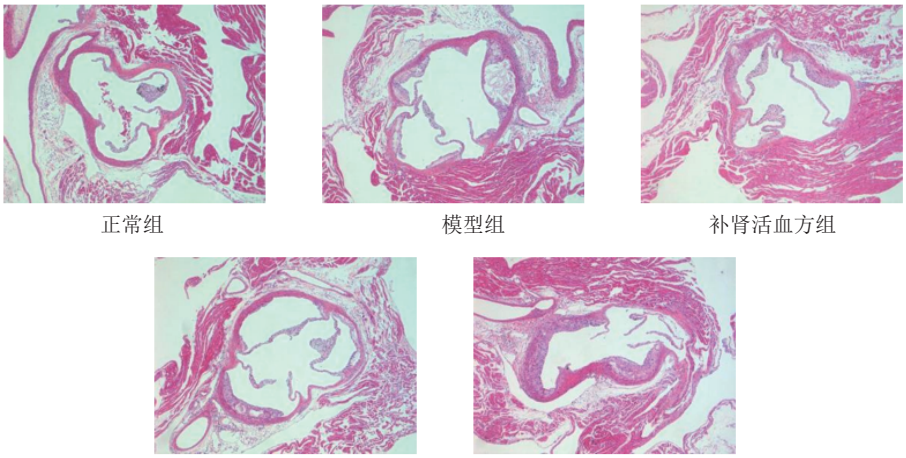



**图 1　HE 染色各组小鼠主动脉窦比较**（×40）

**Figure 1　Comparison of aortic sinuses in each group of mice stained with HE**（×40）

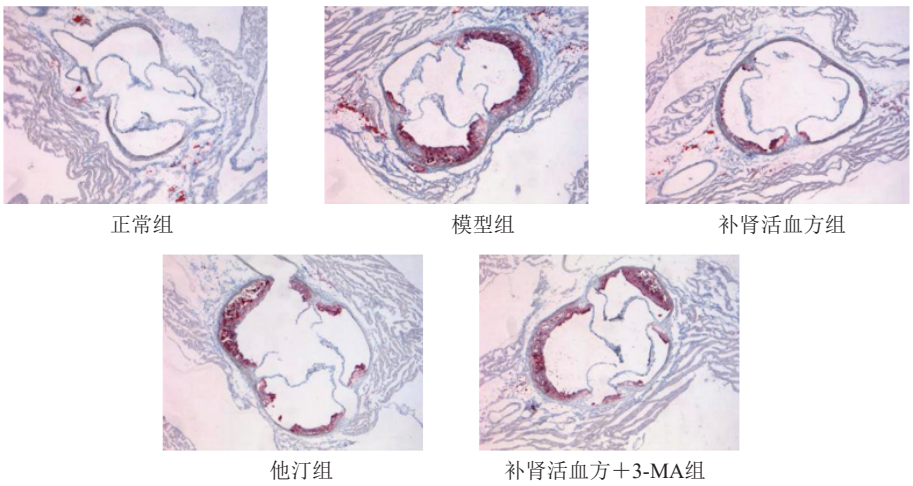



**图 2　油红 O 染色各组小鼠主动脉脂质比较**（×40）

**Figure 2　Comparison of aortic lipids in each group of mice stained with oil red O**（×40）

与补肾活血方组相比，补肾活血方＋ 3-MA 组主动脉窦胶原纤维含量显著增加（$P < 0.01$）。见图 3、表 3。

**2.5**　主动脉窦中自噬小体与脂滴情况

正常组中观察到自噬小体的生成；模型组主动脉内皮细胞中无自噬小体的生成，但可见脂滴生成；补肾活血方组和他汀组主动脉内皮细胞中均可见少量自噬小体的生成；补肾活血方＋ 3-MA 组主动脉内皮细胞中，未见自噬小体生成，有少量脂滴的生成。见图 4。

**2.6**　主动脉相关基因和蛋白表达情况

与正常组相比，模型组 *p53*、*p21* 及 *p62* 表达量升高（$P < 0.01$），*SIRT6* 表达量降低（$P < 0.01$），LC3 Ⅱ / Ⅰ表达量降低（$P < 0.05$）；与模型组相比，补肾活血方组和他汀组 *p53*、*p21* 及 *p62* 表达量降低（$P < 0.01$），*SIRT6*、LC3 Ⅱ / Ⅰ表达量升高（$P < 0.01$）；与补肾活血方组相比，补肾活血方＋ 3-MA 组 p53、*p21* 及 *p62* 表达量升高（$P < 0.01$），

表 2 油红 O 染色各组小鼠主动脉脂质比较
（$\bar{x}\pm s$，单位：%）

**Table 2 Comparison of aortic lipids in each group of mice stained with oil red O** ($\bar{x}\pm s$, unit: %)

| 组别 | 染色比 |
|---|---|
| 正常组（$n$=5） | 0.43±0.03 |
| 模型组（$n$=5） | 23.48±3.57** |
| 补肾活血方组（$n$=5） | 13.99±1.58$^{\#\#}$ |
| 他汀组（$n$=5） | 14.99±1.51$^{\#\#}$ |
| 补肾活血方+3-MA组（$n$=5） | 24.76±2.29$^{\&\&}$ |
| $F$值 | 104.100 |
| $P$值 | <0.001 |

注：与正常组相比，**$P$<0.01；与模型组相比，$^{\#\#}P$<0.01；与补肾活血方组相比，$^{\&\&}P$<0.01。

vs. normal group, **$P$<0.01; vs. model group, $^{\#\#}P$<0.01; vs. Bushen Huoxue formula group, $^{\&\&}P$<0.01.

表 3 各组小鼠主动脉窦 Masson 染色比比较
（$\bar{x}\pm s$，单位：%）

**Figure 3 Comparison of Masson staining ratios of the aortic sinus in each group of mice** ($\bar{x}\pm s$, unit: %)

| 组别 | 染色比 |
|---|---|
| 正常组（$n$=5） | 6.02±1.40 |
| 模型组（$n$=5） | 20.90±1.71** |
| 补肾活血方组（$n$=5） | 6.55±1.30$^{\#\#}$ |
| 他汀组（$n$=5） | 6.52±0.67$^{\#\#}$ |
| 补肾活血方+3-MA组（$n$=5） | 11.75±1.03$^{\&\&}$ |
| $F$值 | 125.000 |
| $P$值 | <0.001 |

注：与正常组相比，**$P$<0.01；与模型组相比，$^{\#\#}P$<0.01；与补肾活血方组相比，$^{\&\&}P$<0.01。

vs. normal group, **$P$<0.01; vs. model group, $^{\#\#}P$<0.01; vs. Bushen Huoxue formula group, $^{\&\&}P$<0.01.

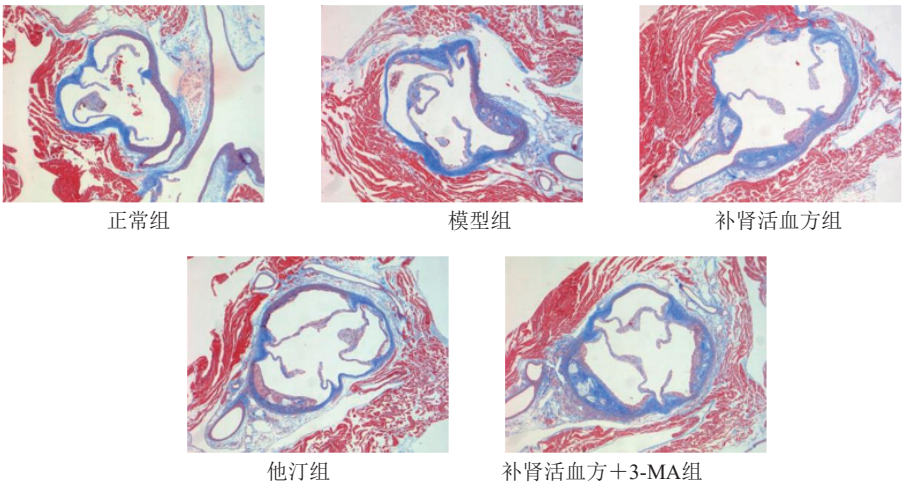



图 3 各组小鼠主动脉窦 Masson 染色比比较（×40）

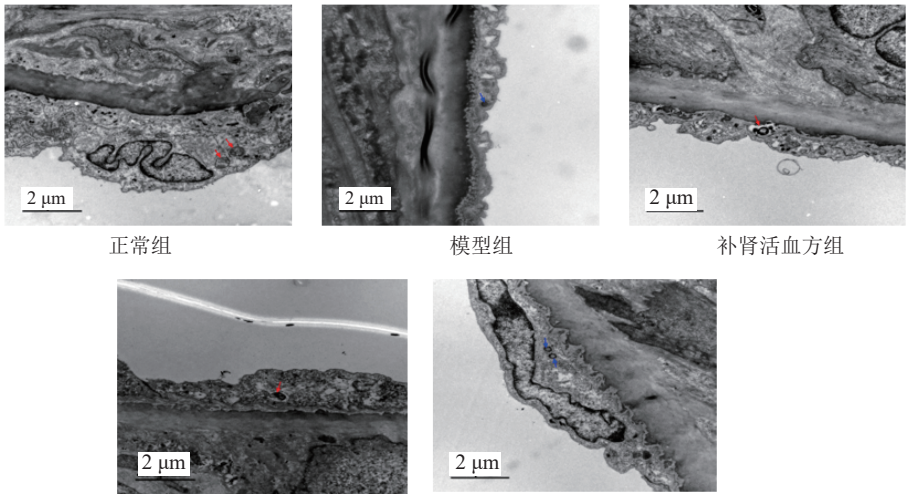
**Figure 3 Comparison of Masson staining ratios of the aortic sinus in each group of mice**（×40）

*SIRT6*、LC3 Ⅱ / Ⅰ表达量降低（$P$ < 0.01）。见图 5 和表 4、5。

## 3 讨论

血管老化是衰老典型表现，存在于 AS 的发展过程，亦可促进其的发生、发展[4—6]。AS 好发于中老年人群，随着年龄增加，老化动脉血管结构和功能发生改变，如组成血管壁的胶原增加和弹性纤维减少等[7]，其主要病理改变为大中动脉血管内膜下脂质、胆固醇晶体沉积，纤维斑块和粥样斑块形成，最终导致动脉管腔狭窄[8]。

研究[9—10]显示，LDL、TC 水平降低和 HDL 水平升高可延缓 AS 发生。本研究中，补肾活血方组可降低 TC、TG 水平，升高 HDL 水平，同时减少小鼠主动脉中脂质、胆固醇晶体、胶原纤维含量，降低主动脉斑块沉积。*p53* 能影响生长、发育、生殖、新陈代谢和衰老；*p21* 则通过调控细胞生长周期影




注：红为自噬小体；蓝为脂滴。

Note: red is autophagosome; blue is lipid droplet.

**图 4　各组小鼠主动脉内皮细胞中的自噬小体及脂滴比较（×6 000）**

**Figure 4　Comparison of autophagosomes and lipid droplets in aortic endothelial cells in each group of mice（×6 000）**

**表 4　各组小鼠主动脉相关基因表达比较（$\bar{x}\pm s$）**

**Table 4　Comparison of aortic-related gene expressions in each group of mice（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | 阳性表达率 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *p53*/GAPDH | *p62*/GAPDH | *SIRT6*/GAPDH | *p21*/GAPDH |
| 正常组（*n*=5） | 1.00±0.10 | 1.01±0.11 | 1.00±0.04 | 1.00±0.08 |
| 模型组（*n*=5） | 3.06±0.46** | 3.26±0.45** | 0.33±0.08** | 5.92±035** |
| 补肾活血方组（*n*=5） | 1.62±0.19$^{\#\#}$ | 0.87±0.10$^{\#\#}$ | 0.79±0.07$^{\#\#}$ | 1.43±0.27$^{\#\#}$ |
| 他汀组（*n*=5） | 1.70±0.16$^{\#\#}$ | 0.54±0.09$^{\#\#}$ | 0.89±0.20$^{\#\#}$ | 1.57±0.24$^{\#\#}$ |
| 补肾活血方＋3-MA组（*n*=5） | 3.35±0.21$^{\&\&}$ | 2.43±0.81$^{\&\&}$ | 0.11±0.07$^{\&\&}$ | 4.60±1.26$^{\&\&}$ |
| *F*值 | 77.610 | 37.880 | 63.100 | 66.110 |
| *P*值 | ＜0.001 | ＜0.001 | ＜0.001 | ＜0.001 |

注：与正常组相比，**$P$＜0.01；与模型组相比，$^{\#\#}P$＜0.01；与补肾活血方组相比，$^{\&\&}P$＜0.01。

vs. normal group, **$P$＜0.01; vs. model group, $^{\#\#}P$＜0.01; vs. Bushen Huoxue formula group, $^{\&\&}P$＜0.01.

响衰老[11]。*p53* 通过激活 *p21* 延缓衰老是公认的延缓衰老经典途径之一[12]。本研究中，模型组主动脉 *p53*、*p21* 表达量均增加；补肾活血方组和他汀组主动脉 *p53*、*p21* 表达量均减少。提示补肾活血方和阿托伐他汀钙可能会延缓主动脉衰老，进而延缓 AS 发生。*SIRT6* 能调节 AS 等衰老相关多种生物过程[13]，一定程度改善血管内皮功能障碍，延缓 AS 斑块形成，并抑制心脏肥大和心力衰竭，保护心血管[14]。研究[15]显示，*SIRT6* 缺失可导致小鼠内皮细胞松弛，抑制单核细胞黏附至内皮细胞，增加内皮黏附分子表达，加剧 AS 斑块形成。同时，*SIRT6* 还通过自噬依赖途径减少巨噬泡沫细胞形成[16]。本研究中，高脂饲料喂养组小鼠主动脉 *SIRT6* 表达量较正常组低；补肾活血方组和他汀组 *SIRT6* 表达量均较模型组高。推测补肾活血方可能通过调控 *SIRT6* 以延缓 AS 发生。

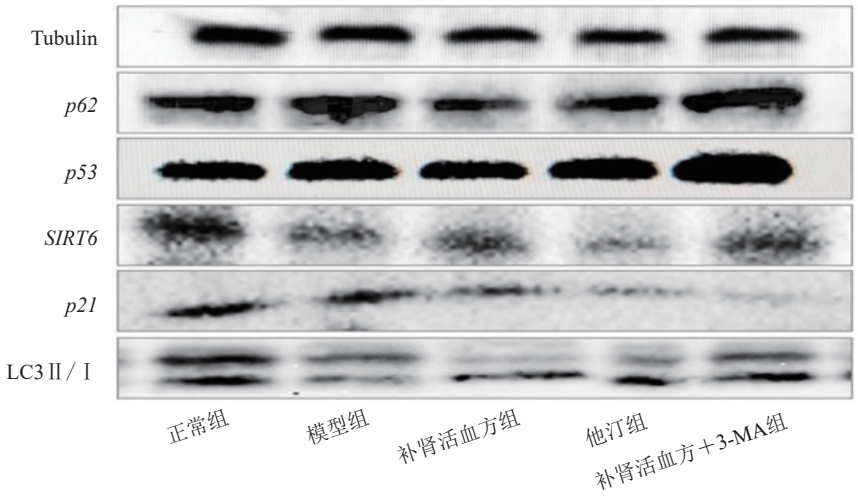



**图 5 各组小鼠主动脉相关蛋白表达**

**Table 5 Expression of aorta-associated proteins in each group of mice**

**表 5 各组小鼠主动脉相关蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$）**

**Table 5 Comparison of aortic-related protein expressions in each group of mice ($\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | 阳性表达率 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | *SIRT6* | *p53* | *p62* | LC3Ⅱ/Ⅰ | *p21* |
| 正常组（$n$=5） | 1.35±0.13 | 0.71±0.06 | 0.61±0.05 | 0.88±0.06 | 1.14±0.07 |
| 模型组（$n$=5） | 0.86±0.07** | 1.65±0.08** | 1.46±0.08** | 0.66±0.07* | 1.77±0.06** |
| 补肾活血方组（$n$=5） | 1.31±0.03$^{\#\#}$ | 1.14±0.06$^{\#\#}$ | 0.78±0.04$^{\#\#}$ | 1.28±0.17$^{\#\#}$ | 1.29±0.10$^{\#\#}$ |
| 他汀组（$n$=5） | 1.21±0.02$^{\#\#}$ | 1.11±0.07$^{\#\#}$ | 0.90±0.10$^{\#\#}$ | 1.18±0.04$^{\#\#}$ | 1.22±0.11$^{\#\#}$ |
| 补肾活血方+3MA组（$n$=5） | 0.82±0.06$^{\&\&}$ | 1.43±0.08$^{\&\&}$ | 1.52±0.02$^{\&\&}$ | 0.91±0.08$^{\&\&}$ | 1.85±0.07$^{\&\&}$ |
| $F$值 | 59.800 | 132.600 | 217.200 | 32.400 | 77.390 |
| $P$值 | ＜0.001 | ＜0.001 | ＜0.001 | ＜0.001 | ＜0.001 |

注：与正常组相比，*$P$＜0.05，**$P$＜0.01；与模型组相比，$^{\#\#}P$＜0.01；与补肾活血方组相比，$^{\&\&}P$＜0.01。

vs. normal group, *$P$＜0.05, **$P$＜0.01; vs. model group, $^{\#\#}P$＜0.01; vs. Bushen Huoxue formula group, $^{\&\&}P$＜0.01.

作为一种自噬受体，*p62* 在蛋白聚集体从细胞质基质穿梭至自噬体过程中起重要作用[17]。由于 *p62* 将细胞内自噬货物（包括脂质）运输至自噬体进行降解，故自噬破坏导致 p62 积累[18]，其水平升高提示各种疾病的自噬缺陷[19—22]。溶酶体自噬标志物 MAP1LC3 Ⅱ / Ⅰ的更新反映饥饿诱导的自噬活性[23]。文献[24]表明，3-MA 作为一种自噬抑制剂可抑制高脂饮食饲养 ApoE$^{-/-}$ 小鼠 LC3 Ⅱ / Ⅰ形成，促进 *p62* 表达，抑制小鼠主动脉自噬发生。本研究中，与正常组相比，模型组主动脉 *p62* 表达增加，补肾活血方组主动脉 *p62* 表达降低，LC3 Ⅱ / Ⅰ表达升高，补肾活血方＋ 3-MA 组 LC3 Ⅱ / Ⅰ表达量降低，*p62* 表达升高。进一步提示补肾活血方可促进小鼠主动脉自噬发生。

在我国传统医学中，AS 无对应病名，但相关症状和病因病机却有证可寻，如“胸痹”“心痛”“眩晕”“中风”等。笔者结合 AS 与增龄、衰老的密切关系，认为 AS 形成的病机是以肾精虚衰为本，痰瘀内阻为标。AS 患者多为中老年，故治疗应在补肾基础上加用活血化痰之品。补肾活血方中以熟地

黄为君药，重在滋补肝肾阴血，益精填髓，调益营卫；以枸杞子、制黄精、川芎、丹参、三七、瓜蒌皮六药合用为臣药，枸杞子滋补肝肾，益精明目；制黄精滋肾润肺，补脾益气，三者合用加强滋养肾精之效。川芎活血行气，祛风止痛；丹参活血祛瘀，凉血消痈；三七散瘀止血，活血定痛，三者合用兼活血通络，散脉中之瘀阻，又使补而不滞。瓜蒌皮清热化痰，利气宽胸。佐以生山楂加强活血化瘀之功，同时固护脾胃，防止养阴而滋腻伤胃。全方共奏滋补肾精，化瘀祛痰之效。前期研究[25—26]显示，补肾活血中药方可调节脂质代谢，干预内皮细胞衰老，从而起到抗 AS 作用。然而，补肾活血方与 SIRT6、自噬的关系尚待研究。

## 4 结论

综上所述，补肾活血方可减缓主动脉中斑块、脂质的沉积、胆固醇晶体的沉积、胶原纤维的生成，改善血清中 TC、TG 以及 LDL 的水平，增加主动脉窦中自噬小体和血清中 HDL 的水平，上调 *SIRT6* 表达，减少 *p53*、*p21*、*p62* 表达。补肾活血方可能通过调控 SIRT6 介导的自噬延缓 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 AS 血管老化。

## 参考文献：


[1] KLIONSKY DJ, PETRONI G, AMARAVADI RK, *et al*. Autophagy in major human diseases[J]. EMBO J, 2021, 40(19): e108863.

[2] LI X, LIU L, LI T, *et al*. SIRT6 in senescence and aging-related cardiovascular diseases[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 641315.

[3] NG F, TANG BL, Sirtuins' modulation of autophagy[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(12): 2262-2270.

[4] 杨蕤郡, 李瑞萍, 王小青, 等. 视网膜血管老化与动脉粥样硬化形成的相关性[J]. 解剖学杂志, 2019, 42(4): 335-341.

[5] 张存泰, 陶军, 田小利, 等. 血管衰老临床评估与干预中国专家共识(2018)[J]. 中华老年医学杂志, 2018, 37(11): 1177-1184.

[6] 张昭华, 庞敏. 动脉粥样硬化的发病机制综述[J]. 基层医学论坛, 2018, 22(34): 4918-4919.

[7] XU X, WANG B, REN C, *et al*. Recent progress in vascular aging: mechanisms and its role in age-related diseases[J]. Aging Dis, 2017, 8(4): 486-505.

[8] IURCIUC S, CIMPEAN AM, MITU F, *et al*. Vascular aging and subclinical atherosclerosis: why such a "never ending" and challenging story in cardiology?[J]. Clin Interv Aging, 2017, 12, 1339-1345.

[9] MARCEL V, DICHTEL-DANJOY ML, SAGNE C, *et al*. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(12): 1815-1824.

[10] BENSON EK, ZHAO B, SASSOON DA, *et al*. Effects of p21 deletion in mouse models of premature aging[J]. Cell Cycle, 2009, 8(13): 2002-2004.

[11] GASECKA A, ROGULA S, SZARPAK L, *et al*. LDL-cholesterol and platelets: insights into their interactions in atherosclerosis[J]. Life(Basel), 2021, 11(1): 39.

[12] ROSENSON RS, BREWER HB JR, ANSELL BJ, *et al*. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2016, 13(1): 48-60.

[13] YAO QP, ZHANG P, QI YX, *et al*. The role of SIRT6 in the differentiation of vascular smooth muscle cells in response to cyclic strain[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 49: 98-104.

[14] HE J, ZHANG G, PANG Q, *et al*. SIRT6 reduces macrophage foam cell formation by inducing autophagy and cholesterol efflux under ox-LDL condition[J]. FEBS J, 2017, 284(9): 1324-1337.

[15] WANG T, SUN C, HU L, *et al*. SIRT6 stabilizes atherosclerosis plaques by promoting macrophage autophagy and reducing contact with endothelial cells[J]. Biochem Cell Biol, 2020, 98(2): 120-129.

[16] WETZEL L, BLANCHARD S, RAMA S, *et al*. TECPR1 promotes aggrephagy by direct recruitment of LC3C autophagosomes to lysosomes[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2993.

[17] SERGIN I, RAZANI B. Self-eating in the plaque: what macrophage autophagy reveals about atherosclerosis[J]. Trends Endocrinol Metab, 2014, 25(5): 225-234.

[18] LIAO X, SLUIMER JC, WANG Y, *et al*. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis[J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 545-553.

[19] LACLAIR KD, DONDE A, LING JP, *et al*. Depletion of TDP-43 decreases fibril and plaque beta-amyloid and exacerbates neurodegeneration in an Alzheimer's mouse model[J]. Acta Neuropathol, 2016, 132(6): 859-873.
[20] WU LS, CHENG WC, CHEN CY, *et al*. Transcriptomopathies of pre- and post-symptomatic frontotemporal dementia-like mice with TDP-43 depletion in forebrain neurons[J]. Acta Neuropathol Commun, 2019, 7(1): 50.
[21] OGAWA M, YOSHIKAWA Y, KOBAYASHI T, *et al*. A tecpr1-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens[J]. Cell Host Microbe, 2011, 9(5): 376-389.
[22] 郭迎雪, 李俊峰, 高艺航, 等. 小而密低密度脂蛋白胆固醇对冠状动脉粥样硬化患者自噬诱导作用研究[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(11): 1614-1617.
[23] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 and autophagy[J]. Methods Mol Biol, 2008, 445: 77-88.
[24] 闫黎, 申定珠. 补肾降脂方调控自噬与胆固醇流出干预ApoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化的机制研究[J]. 中国医药导报, 2021, 18(33): 7-11.
[25] 楼丹飞, 李越华, 闫国良. 补肾活血方对动脉粥样硬化新西兰兔miRNA217的影响[J]. 四川中医, 2016, 34(10): 31-33.
[26] 楼丹飞, 闫国良, 汪海慧, 等. 补肾活血方对动脉粥样硬化新西兰兔miRNA-217/SIRT1/FoxO1信号通路的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(24): 3608-3610.

（编辑：沈佳婕）



（上接第554页）

[23] WANG P, GAO J, KE W, *et al*. Resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed mice via modulating the composition and metabolic function of the gut microbiota[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 156: 83-98.
[24] BARBER TM, KABISCH S, RANDEVA HS, *et al*. Implications of resveratrol in obesity and insulin resistance: a state-of-the-art review[J]. Nutrients, 2022, 14(14): 2870.
[25] MONGIOÌ LM, LA VIGNERA S, CANNARELLA R, *et al*. The role of resveratrol administration in human obesity[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4362.
[26] WAN Y, XIA J, XU JF, *et al*. Nuciferine, an active ingredient derived from lotus leaf, lights up the way for the potential treatment of obesity and obesity-related diseases[J]. Pharmacol Res, 2022, 175: 106002.
[27] WANG Z, XUE C, WANG X, *et al*. Quercetin 3-O-glucuronide-rich lotus leaf extract promotes a brown-fat-phenotype in $C_3H_{10}T_{1/2}$ mesenchymal stem cells[J]. Food Res Int, 2023, 163: 112198.
[28] YAN C, ZHAN Y, YUAN S, *et al*. Nuciferine prevents obesity by activating brown adipose tissue[J]. Food Funct, 2024, 15(2): 967-976.

（编辑：沈佳婕）