DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.08.015

苓桂术甘汤影响VEGFC/VEGFR3通路促进淋巴管生成防治动脉粥样硬化分子机制研究

陈丝,宋囡,王群,朱敬轩,曹媛
(辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室,辽宁 沈阳 110847)

摘要:目的 探讨血管内皮生长因子C(Vascular endothelial growth factor-C,VEGFC)/血管内皮生长因子受体3(Vascular endothelial growth factor receptor-3,VEGFR3)通路影响淋巴管生成对动脉粥样硬化(Atherosclerotic,AS)发生进程的调控,并揭示苓桂术甘汤的干预机制。方法 高脂饮食喂养ApoE$^{-/-}$小鼠构建AS模型,C57BL/6J小鼠作为空白组,分为空白对照组、模型组以及苓桂术甘汤低、中、高剂量组,全自动生物分析仪检测各组小鼠血脂水平,HE染色观察小鼠主动脉病理学改变,qRT-PCR和Western Blot法检测小鼠主动脉淋巴管内皮受体-1(Lymphatic Vessel Endothelial Receptor-1,LYVE-1)、VEGFR3、血管内皮生长因子D(Vascular endothelial growth factor-D,VEGFD)、血管内皮生长因子受体2(Vascular endothelial growth factor receptor-2,VEGFR2)、平足蛋白(Podoplanin,PDPN)、蛋白激酶B(Protein kinase B,AKT)、细胞外信号调节激酶(Extracellular signal-regulated kinase 1/2,ERK1/2)、VEGFC基因mRNA及蛋白水平。结果 与空白对照组相比,模型组小鼠血清甘油三酯(Triacylglycerol,TG)、总胆固醇(Total cholesterol,TC)、低密度脂蛋白胆固醇(Low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)水平显著升高($P<0.01$),主动脉结构异常,可见较大粥样斑块,主动脉LYVE-1、VEGFD、VEGFR2、Podoplanin、VEGFR3、VEGFC基因及蛋白表达显著降低($P<0.05$或$P<0.01$),AKT、ERK1/2蛋白表达显著降低($P<0.01$);经苓桂术甘汤干预后,血脂异常情况得以改善,主动脉壁结构异常减轻,粥样斑块减少,主动脉LYVE-1、VEGFD、VEGFR2、VEGFC基因及蛋白表达显著升高($P<0.05$或$P<0.01$),主动脉AKT、ERK1/2蛋白表达显著升高($P<0.05$或$P<0.01$),苓桂术甘汤中剂量组和高剂量组小鼠主动脉Podoplanin、VEGFR3基因及蛋白表达显著升高($P<0.05$或$P<0.01$),其中,苓桂术甘汤高剂量组改善更为明显。结论 苓桂术甘汤可能通过影响VEGFC/VEGF3通路促进淋巴管生成参与AS发生发展进程的调控。

关键词:苓桂术甘汤;AS;淋巴管生成;VEGFC/VEGFR3
中图分类号:R259.435 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)08-0067-07

Study on Molecular Mechanism of Linggui Zhugan Decoction(苓桂术甘汤) Affecting VEGFC/VEGFR3 Pathway to Promote Lymphangiogenesis and Prevent Atherosclerosis

CHEN Si,SONG Nan,WANG Qun,ZHU Jingxuan,CAO Yuan
(Key Laboratory of Education Ministry on Chinese Medicine Viscera Image Theory and Application,
Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* To investigate the effect of vascular endothelial growth factor-C(VEGFC)/vascular endothelial growth factor receptor-3(VEGFR3) pathway on the regulation of lymphangiogenesis on the occurrence of atherosclerosis(AS),and to reveal the intervention mechanism of Linggui Zhugan Decoction(苓桂术甘汤). *Methods* ApoE$^{-/-}$ mice fed with high-fat diet were fed to construct an AS model,and C57BL/6J mice were used as the blank groups,which were blank control group,model group,Linggui Zhugan Decoction low,medium and high dose groups. The blood lipid levels of mice in each group were checked by automatic bioanalyzer,and the pathological changes of the mouse aorta were observed by HE staining,and the mRNA and protein levels of lymphatic vessel endothelial receptor-1(LYVE-1),VEGFR3,vascular endothelial growth factor-D(VEGFD),vascular endothelial growth factor receptor-2(VEGFR2),podoplanin(PDPN),protein kinase B(AKT),extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK1/2) and VEGFC were detected by qRT-PCR and Western blot. *Results* Compared with those of the control group,the serum levels of triglyceride(TG),total cholesterol(TC) and low-density lipoprotein cholesterol(LDL-C) in the model group were significantly increased($P<0.01$),the structure of the aorta was abnormal,the large atheroma plaques were seen. The expressions of genes and proteins of LYVE-1,VEGFD,VEGFR2,PDPN,VEGFR3 and VEGFC in the aorta were significantly decreased($P<0.05$ or $P<0.01$),and the protein expressions of AKT and ERK1/2 were significantly decreased($P<$

基金项目:国家自然科学基金项目(82374423,82474221);辽宁省教育厅高校基本科研项目(LJ232410162027);辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室开放基金项目(zyzx2509)
作者简介:陈丝(1994-),女,辽宁阜新人,讲师,硕士,研究方向:中西医结合防治心脑血管疾病。
通讯作者:曹媛(1988-),女,辽宁沈阳人,高级实验师,硕士研究生导师,硕士,研究方向:中西医结合防治心脑血管疾病。E-mail:1328550805@qq.com。

0.01). After the intervention of Linggui Zhugan Decoction, dyslipidemia was improved, the structure of the aortic wall was reduced, the atheroma plaque was reduced, the expressions of genes and proteins of LYVE-1, VEGFD, VEGFR2 and VEGFC in arteries were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), the protein expressions of AKT and ERK1/2 in the aorta were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$) and the protein expressions of PDPN and VEGFR3 genes in the aortic of Linggui Zhugan Decoction medium and high dose groups were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Among them, the improvement of Linggui Zhugan Decoction high dose group was more obvious. *Conclusion* Linggui Zhugan Decoction may promote lymphangiogenesis by affecting the VEGFC/VEGF3 pathway and participate in the regulation of the occurrence and development of AS.

Keywords: Linggui Zhugan Decoction (苓桂术甘汤); AS; lymphangiogenesis; VEGFC/VEGFR3

动脉粥样硬化(Atherosclerotic, AS)是一种由动脉脂质积累驱动的慢性炎症性疾病,它是心血管疾病的主要发病基础,是全球主要死亡原因之一[1]。据《中国心血管健康与疾病报告2023》推算,目前我国心血管疾病(Cardiovascular diseases, CVD)现患人数约达3.3亿,且患病率处于持续上升阶段,防治AS等心血管疾病进程刻不容缓[2-3]。

随着我国传统医学的不断发展,中医对AS认识不断深入。中医学将AS归于"脉痹""胸痹""真心痛"等范畴,《医学正传》:"津液稠黏,为痰为饮,积久渗入脉中,血为之浊",认为痰浊壅塞脉道是AS发生发展的关键环节[4]。《证治汇补》:"脾为生痰之源"。脾失健运则日久阳虚,水谷不化,膏脂蓄积,成痰成饮,阻于脉络而发病[4-5]。提出"脾失健运-脾阳不振-膏脂转输障碍"为AS发生发展的重要病机。基于上述病机,课题组选取古代经典名方《金匮要略》中苓桂术甘汤加以治疗,全方由茯苓、桂枝、白术、炙甘草组合而成,共奏温阳化饮、健脾利湿之功效,对痰饮阻滞中焦相关的病证有较好的治疗功效[6]。现代研究已发现苓桂术甘汤可通过调节水液代谢、血脂代谢、血压、血流、抗炎、抗氧化等多途径参与调控心血管疾病的进程[7]。说明苓桂术甘汤调控AS等心血管疾病具有显著可行性。

新兴研究表明,淋巴管生成对冠状AS疾病发生发展具有重要的影响[8],淋巴管是低压、盲端的管状结构,它在维持组织液稳态、调节免疫功能以及参与膳食脂质摄取和运输中起着至关重要的作用[8-9]。淋巴管生成是指从现有淋巴管系统形成新的淋巴管的过程,已有开创性研究提出,淋巴管生成可能有利于缓解和解决心血管疾病[10]。同时,有研究发现人淋巴内皮细胞白细胞分化抗原36(Cluster of differentiation 36, CD36)的治疗性阻断可能会促进动脉淋巴管生成,导致胆固醇从动脉壁的清除增加并减少AS[11]。本研究基于健脾祛痰化瘀法防治AS的有效性,以及中医治病多通路、多靶点的特点,创新性地提出血管内皮生长因子C(Vascular endothelial growth factor-C, VEGFC)/血管内皮生长因子受体3(Vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR3)通路介导淋巴管生成途径可能与AS发生发展密切相关,并探究苓桂术甘汤在其过程中的干预作用。

1 材料和方法

1.1 动物饲养及造模 实验小鼠:6~8周,雄性,体质量(20±5)g,C57BL/6J小鼠8只,ApoE$^{-/-}$小鼠32只,购于辽宁沈阳格润斯特(长生生物科技股份有限公司子公司),经辽宁中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(编号:21000042019090),动物饲养于辽宁中医药大学实验动物中心[实验动物许可证号:SCXK(辽)2020-0001]。动物造模:高脂饲料饲喂ApoE$^{-/-}$小鼠12周构建AS小鼠模型。造模成功后,AS小鼠随机分为模型组、苓桂术甘汤低、中、高剂量组,C57BL/6J小鼠为空白对照组。其中,苓桂术甘汤中剂量为人与小鼠体表面积比转换的等效给药剂量,低剂量组为等效剂量的1/2,高剂量组为等效剂量的两倍。苓桂术甘汤各剂量组小鼠每日灌胃相应剂量苓桂术甘汤1次,持续灌胃4周;正常组和模型组小鼠灌胃等量生理盐水。

1.2 药物制备 苓桂术甘汤:茯苓40 g,桂枝30 g,白术20 g,甘草20 g,饮片购买于辽宁中医药大学附属医院。药物制备时,将以上4味中药700 mL水浸泡30 min,武火煮沸后,文火煮20 min,倒出药液。次煎加400 mL水不浸泡,武火煮沸后,文火煮20 min,混合药液,经纱布过滤、旋转蒸发器浓缩。

1.3 实验主要试剂及仪器 淋巴管内皮受体-1(Lymphatic Vessel Endothelial Receptor-1, LYVE-1)、VEGFR3、平足蛋白(Podoplanin, PDPN)、细胞外信号调节激酶(Extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)、P-ERK1/2、血管内皮生长因子D(Vascular endothelial growth factor-D, VEGFD)、血管内皮生长因子受体2(Vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR2)抗体(ImmunoWay, YN2185、YT5878、YT7965、YT1625、YP0101、YT4872、YT1723), VEGFC、GAPDH(proteintech, 22601-1-AP、10494-1-AP),蛋白激酶B(Protein kinase B, AKT)、pAKT(CST, 9272S、9271S), HiFi-Script gDNA Removal cDNA Synthesis Kit、UltraSYBR Mixture(康为世纪生物科技有限公司, CW2582 M、CW0957 M);12~230 kDa Wes Separation Module 8x25 capillary cartridges(ProteinSimple, SM-W004);全自动生化分析仪(东芝, TAB-120FR);冷冻高速离心机、紫外分光光度计(Thermo, ST 16R、Nanodrop 2000);全波长酶标仪(Molecular Devices, SpectraMax i3),普通光学显微镜(Leica);梯度PCR仪、实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad, T100、CFX OPUS96)。

1.4 全自动生化分析仪检测小鼠血脂水平 将实验小鼠麻醉后,腹主动脉取血,静置后,4 ℃离心处理后,取上清并分装,-80 ℃保存备用。按照仪器操作说明以及血脂检测试剂盒说明书进行操作,全自动生化分析仪检测小鼠血清甘油三酯(Triacylglycerol, TG)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)含量。

1.5 HE和油红O染色观察小鼠主动脉脂质沉积情况 将实验小鼠麻醉后,快速处理并剪取小鼠主动脉组织,除-80 ℃保存外,将需进行病理形态学检测的小鼠主动脉进行4%多聚甲醛固定24 h以上,进行固定组织洗涤后,梯度酒精脱水,二甲苯透明,先将其放入二甲苯和石蜡各半的混合液中,再依次放入石蜡Ⅰ、石蜡Ⅱ进行透蜡,石蜡包埋结束后。进行切片、贴片,脱蜡复水后应用苏木精染色,再经水洗、分化、漂洗、脱水后0.5%伊红乙醇液复染,脱水、透明后中性树胶封存,显微镜观察。

1.6 qRT-PCR法检测小鼠主动脉LYVE-1、VEGFD、VEGFR2、PDPN、AKT、VEGFR3、ERK1/2、VEGFC mRNA表达 应用RNA提取试剂盒提取小鼠主动脉总RNA,超微量紫外分光

光度计检测 RNA 浓度后，将浓度统一，根据样本及待测基因数进行 PCR 预排版，根据排版情况计算 cDNA 所需量，按照 HiFi – Script gDNA Removal cDNA Synthesis Kit 说明书进行去基因组 DNA，并反转录为 cDNA，引物稀释后，参照 PCR 扩增试剂盒说明书进行体系配置及上样，应用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增，实验结束后保存结果并分析。引物序列表见表 1。

表 1 引物序列

基因名	引物	序列
LYVE – 1	Forward primer	ACATGCAGAATCATGGGCGT
	Reverse primer	CAACCCATCCATAGCTGCAA
VEGFR3	Forward primer	CGGGCTACCTGTCCATCATC
	Reverse primer	CCTAGGACTCTCCCGAGGTG
PDPN	Forward primer	AACTGTCCACCTCAGCAACC
	Reverse primer	ACTGGCAAGCCATCTCTATTG
AKT	Forward primer	CCGCCTGATCAAGTTCTCCT
	Reverse primer	GATGATCCATGCGGGGCTT
ERK1/2	Forward primer	CCTACGGCATGGTTTGCTCT
	Reverse primer	TTTGCTCAATGGTTGGTGCC
VEGF – D	Forward primer	CCTGGGACAGAAGACCACTC
	Reverse primer	TGAGATCTCCCGGACATGGT
VEGF – C	Forward primer	GCTTCTTGTCTCTGGCGTGT
	Reverse primer	TTTGCCTTCAAAAGCCTTGACC
VEGFR2	Forward primer	GCCTCTGTGGGTTTGCCT
	Reverse primer	CCTCAGAATCACGCTGAGCA
GAPDH	Forward primer	CAGGAGAGTGTTTCCTCGTCC
	Reverse primer	TGCCGTGAGTGGAGTCATAC

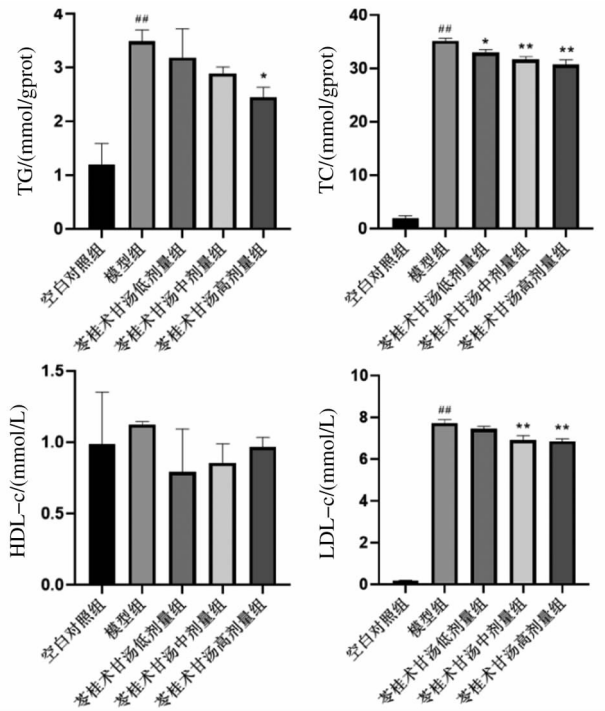
1.7 Wes 全自动蛋白质印迹定量分析系统检测小鼠主动脉 LYVE – 1、VEGFD、VEGFR2、PDPN、AKT、VEGFR3、ERK1/2、VEGFC 蛋白表达 提取小鼠主动脉组织蛋白，BCA 法检测主动脉蛋白浓度，将其浓度统一稀释至 3 μg/μL，应用 Antibody Diluent Ⅱ，按照抗体说明书稀释倍数的 10 ~ 20 倍进行稀释一抗，选择 ProteinSimple 提供的合适二抗备用，准备 Wes 仪器及软件等设备进行自检，根据试剂盒说明书配制 DTT、5 × Master Mix、Ladder 及发光液，根据样品浓度，计算每孔所需要的体积以配制样品，在试剂盒板内进行加样，盖上盖子，室温，2500 r/min离心 5 min，上机运行，结束保存结果并分析。

1.8 统计学处理 采用 Prism 6 软件进行统计分析，数值以均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用 One – way ANOVA 方差分析，组间两两比较采用 Tukey's 检验，当 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 TG、TC、HDL – C、LDL – C 水平情况 血清血脂结果显示：与空白对照组相比，模型组小鼠血清 TG、TC、LDL – C 水平显著升高（$P < 0.01$），HDL – C 水平呈上升趋势，但无统计学意义；与模型组相比，苓桂术甘汤低剂量组小鼠血清 TC 水平显著降低（$P < 0.05$），苓桂术甘汤中剂量组小鼠血清 TC、LDL – C 水平显著降低（$P < 0.01$），苓桂术甘汤高剂量组小鼠血清 TG、TC、LDL – C 水平显著降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），HDL – C 水平呈下降趋势，但无统计学意义。见图 1。

2.2 各组小鼠主动脉病理学形态改变 HE 染色结果显示：空白对照组小鼠主动脉管壁结构完整，内皮细胞和平滑肌细胞排列平整，无粥样斑块沉积形成；模型组小鼠主动脉血管壁结构异常，可见较大粥样斑块，且血管内壁增厚、不平整；苓桂术甘汤干预后，小鼠主动脉血管壁结构异常减轻，粥样斑块减少，其中苓桂术甘汤高剂量组小鼠主动脉粥样斑块减少更为明显。见插页Ⅻ图 2。



注：##与空白对照组比较，$P < 0.01$；＊与模型组比较，$P < 0.05$；＊＊与模型组比较，$P < 0.01$。

图 1 各组小鼠血清 TG、TC、HDL – C、LDL – C 水平情况

2.3 各组小鼠主动脉 LYVE – 1、VEGFD、VEGFR2、PDPN、AKT、ERK1/2、VEGFR3、VEGFC 基因 mRNA 表达 qRT – PCR 结果显示：与空白对照组相比，模型组小鼠主动脉 LYVE – 1、VEGFD、VEGFR2、PDPN、VEGFR3、VEGFC 基因 mRNA 表达显著降低（$P < 0.01$），AKT、ERK1/2 表达呈上升趋势，但无统计学意义。苓桂术甘汤干预后，ApoE$^{-/-}$ AS 小鼠 LYVE – 1、VEGFD、VEGFR2、VEGFC 表达显著升高（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），其中，苓桂术甘汤高剂量组改善更为明显。同时，与模型组相比，苓桂术甘汤中剂量组和高剂量组小鼠主动脉 PDPN、VEGFR3 基因 mRNA 表达显著升高（$P < 0.01$），AKT、ERK1/2 表达呈下降趋势，但无统计学意义。见图 3。

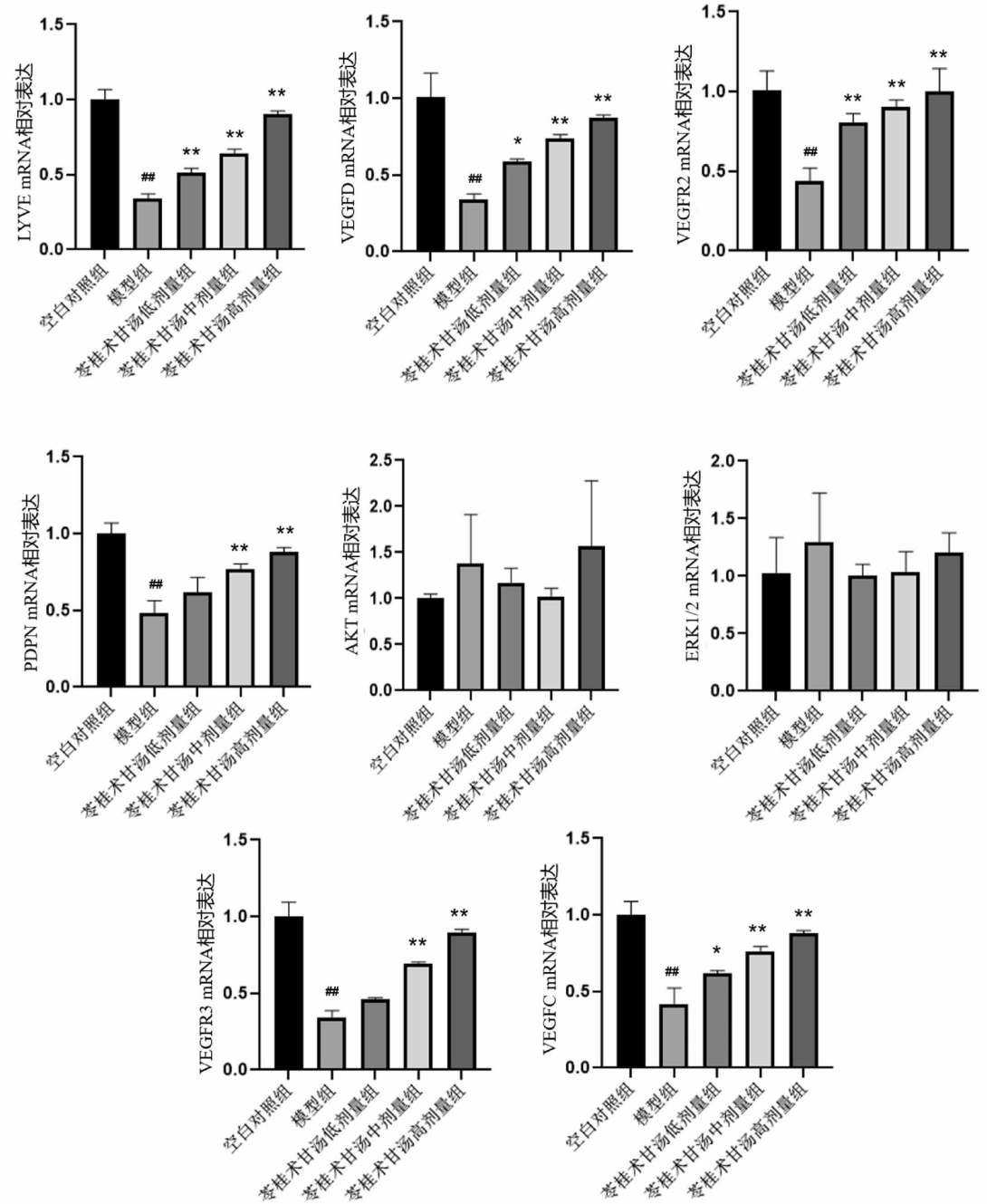
2.4 各组小鼠主动脉 LYVE – 1、VEGFR3、VEGFD、VEGFR2、PDPN、VEGFC、ERK1/2、AKT 蛋白表达 Wes 结果显示：与空白对照组相比，模型组小鼠主动脉 PDPN、AKT、LYVE – 1、VEGFD、VEGFR2、VEGFR3、VEGFC、ERK1/2 蛋白表达显著降低（$P < 0.01$），经苓桂术甘汤干预后，ApoE$^{-/-}$ AS 小鼠主动脉 PDPN、AKT、LYVE – 1、VEGFD、VEGFR2、VEGFC、ERK1/2 蛋白表达显著升高（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），且苓桂术甘汤高剂量组调控趋势更为明显。与模型组相比，苓桂术甘汤中剂量和高剂量组小鼠主动脉 VEGFR3 蛋白表达显著升高（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），苓桂术甘汤低剂量组小鼠主动脉 VEGFR3 呈上升趋势，但无统计学意义。见图 4。

3 讨论

AS 的发生源于促 AS、富含脂质的炎症环境，炎症环境存续存在将导致局灶性炎症、内膜增厚以及内皮损伤，最终形成粥样硬化斑块[12-13]。中医将 AS 归属于胸痹等范畴，认为其病机多由脾虚膏脂转输障碍，痰浊血瘀互结以及痹阻脉道由引发而成，其中膏脂淫精归心于脉中是 AS 的关键致病因素。《素问·经脉别论篇》："浊气归心，淫精于脉"。病理状态下，

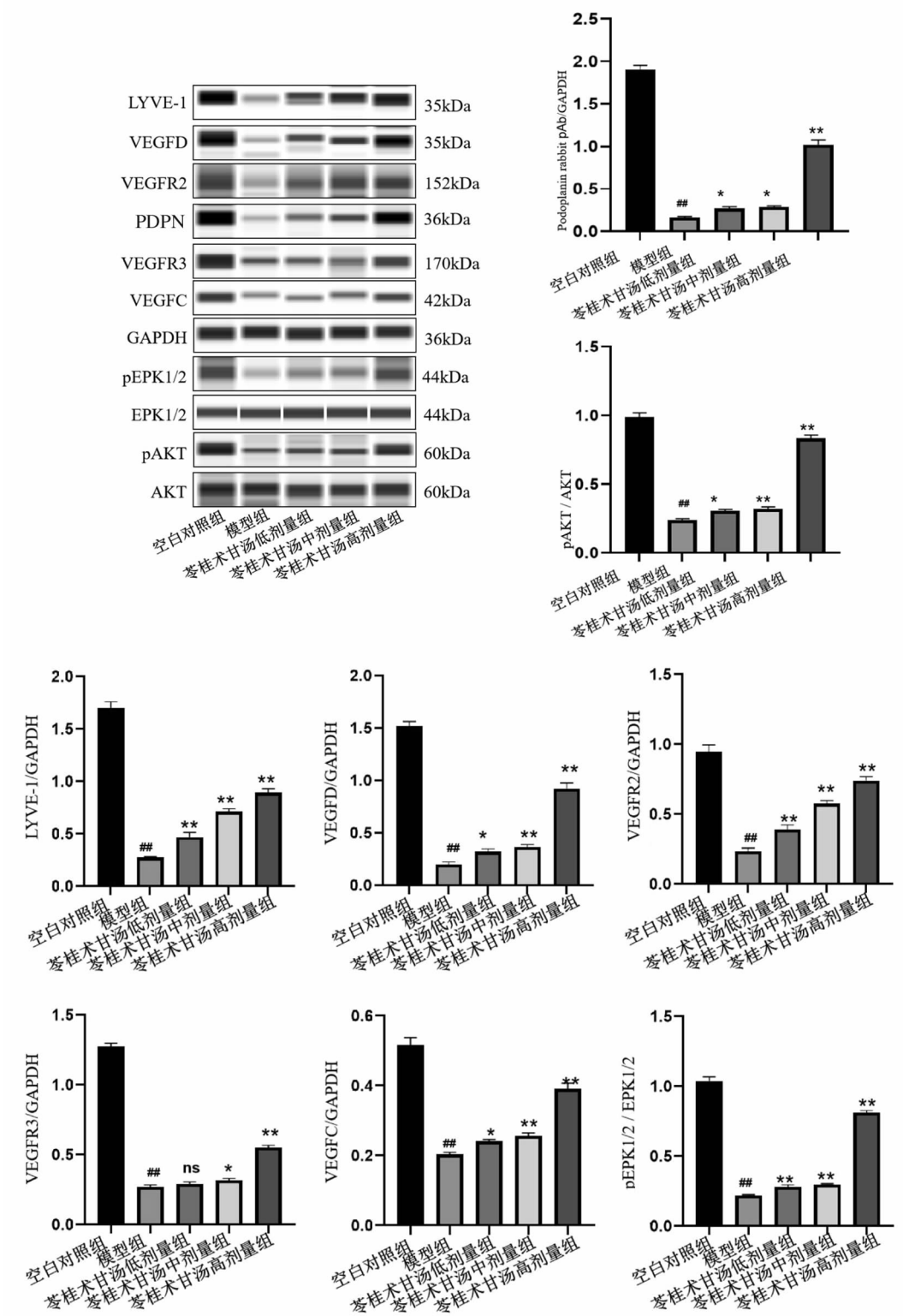
浊气不能运化的膏脂，淫精为膏脂浸入脉道，蓄积脉道日久，则脉道瘀阻，气血运行不畅，而生百病[14]。由此可见，治疗血脉疾病当以祛机体膏浊之邪、化痰浊之源。而痰浊内生，多由脾阳虚衰引起。故治疗 AS 等血脉疾病当以温阳健脾化饮，根据上述病因病机，本研究选用温阳化饮、健脾利湿的经典名方苓桂术甘汤加以治疗，课题组前期研究已发现，苓桂术甘汤可显著降低非酒精性脂肪肝相关肝细胞癌模型小鼠血清 TC、TG 和 LDL－C 水平，升高 HDL－C 水平[15]。说明其在调控血脂方面的优势，提示其可能是防治 AS 等心脑血管疾病的有效药物。

淋巴管生成是在旧的淋巴系统中淋巴内皮细胞发芽、迁移、增殖和形成管状结构，促使新淋巴管生成的过程[16－17]。其参与许多病理过程，包括组织炎症、肿瘤扩散、器官移植排斥反应以及淋巴水肿等[18－19]。淋巴管生成是淋巴系统发育和扩张新血管的一种机制，可促进液体引流和免疫细胞运输[20]。已有研究发现，巨噬细胞介导的炎症浸润和 AS 斑块周围的病理性淋巴管生成可能是 AS 新的治疗靶点[21]。近年来，淋巴管与 AS 之间的调控关系已逐渐成为治疗 AS 疾病的一个重要切入点。淋巴管是胆固醇逆向转运、炎症因子及坏死物质排出和组织液引流的重要通道，在小鼠主动脉斑块内胆固醇流出中发挥着重要作用[22]。已有研究发现淋巴管介导的动脉胆固醇清除已被证明可以减少 AS 病变的形成[11]。而淋巴功能障碍被证实是早期 AS 斑块发展的关键病理机制[23]。肯定了淋巴管与 AS 之间的密切联系，而淋巴管生成被认为是疾病中淋巴管扩张的主要机制，说明其可能是联系淋巴管与AS之间密切联系



注：##与空白对照组比较，$P<0.01$；＊与模型组比较，$P<0.05$；＊＊与模型组比较，$P<0.01$。

图 3 各组小鼠主动脉 LYVE－1、VEGFD、VEGFR2、PDPN、AKT、VEGFR3、ERK1/2、VEGFC mRNA 表达



注：##与空白对照组比较，$P<0.01$；＊与模型组比较，$P<0.05$；＊＊与模型组比较，$P<0.01$；ns 与模型组比较，$P>0.05$。

图4 各组小鼠主动脉 LYVE－1、VEGFR3、VEGFD、VEGFR2、PDPN、VEGFC、ERK1/2、AKT 蛋白表达

的重要机制之一。已有学者提出从现有淋巴管系统形成新的淋巴管（淋巴管生成）可有助于缓解和治疗心血管疾病[10]。再次说明淋巴管生成可能是防治 AS 等心血管疾病的重要手段。

长期以来，VEGFC/VEGFR3 信号传导被认为是淋巴管生成的主要分子驱动因素，VEGFC 通过 VEGFR3 诱导淋巴管生成。相关研究证实，促进 VEGFC/VEGFR3 通路介导的淋巴管生成能刺激胆固醇逆向转运和 T 细胞引流以限制 AS 的进展[24]。在配体 VEGFC 的刺激下，VEGFR3 可与 VEGFR2 形成同源二聚体和异源二聚体，并激活多个下游信号通路，包括 AKT/ERK1/2[25-26]。本研究结果显示，ApoE$^{-/-}$ AS 小鼠主动脉 VEGFD、VEGFR2、VEGFR3、VEGFC 基因及蛋白表达显著降

低，AKT、ERK1/2 蛋白表达显著降低，说明 AS 发生时 VEGFC/VEGFR3 通路调控淋巴管生成水平下降。苓桂术甘汤干预后，小鼠主动脉 VEGFD、VEGFR2、VEGFC、VEGFR3 基因及蛋白表达均显著上升，主动脉 AKT、ERK1/2 蛋白表达也显著升高，说明苓桂术甘汤可通过影响 VEGFC/VEGFR3 通路促进淋巴管生成，防治 AS 发生发展。

此外，本研究还分别检测淋巴管内皮细胞标志物 LYVE－1 和 PDPN 的表达[27]。其中，LYVE－1 是细胞外基质糖胺聚糖透明质酸的主要受体，局限表达于淋巴管壁上，可转运透明质酸至淋巴管内皮进行分解代谢或反向转运到淋巴管腔中发挥作用[28]。PDPN 是Ⅰ型唾液酸跨膜糖蛋白，主要表达于淋巴内皮上，作为淋巴内皮细胞的另一重要标志物，可维持淋巴管、静脉的完整性，充分发挥屏障功能，并在淋巴管生成中发挥重要作用[29－30]。本研究结果显示，$ApoE^{-/-}$ AS 小鼠主动脉 LYVE－1 和 PDPN 基因及蛋白表达显著降低，说明 AS 发生时伴随淋巴管减少。苓桂术甘汤干预后，小鼠主动脉 LYVE－1 和 PDPN 基因及蛋白表达显著升高，说明苓桂术甘汤可通过增加淋巴管影响 AS 的发生发展。

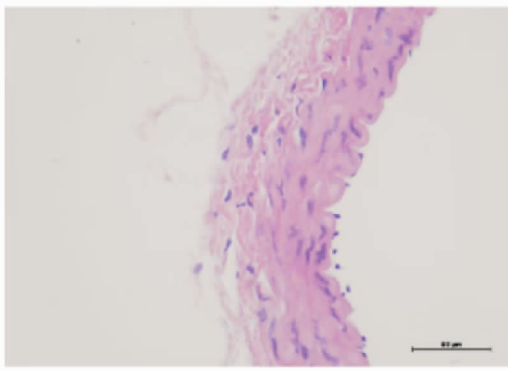
综上所述，VEGFC/VEGFR3 通路介导的淋巴管生成与 AS 发生发展密切相关。“脾失健运－脾阳不振－膏脂转输障碍”为 AS 发生发展的重要病机，温阳化饮、健脾利湿之苓桂术甘汤可通过影响 VEGFC/VEGFR3 通路促进淋巴管生成防治 AS，为从脾论治 AS 等心血管疾病提供研究策略和实验依据。

参考文献

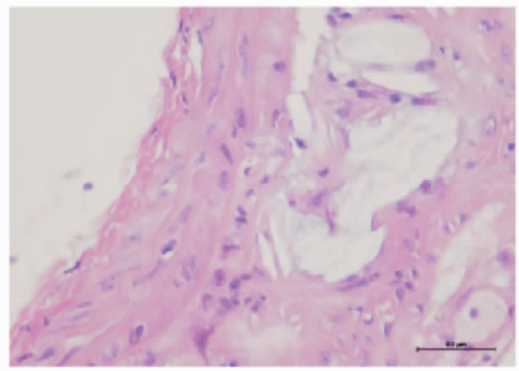
[1] XIAO Z C, LI Y, XIONG L Y, et al. Recent advances in anti－atherosclerosis and potential therapeutic targets for nanomaterial－derived drug formulations[J]. Adv Sci, 2023, 10(29): 2302918.
[2] 刘明波，何新叶，杨晓红，等.《中国心血管健康与疾病报告2023》要点解读[J]. 中国心血管杂志，2024，29(4)：305－324.
[3] 肖俊莹. 纳米硒对载脂蛋白 E 缺陷小鼠动脉粥样硬化病变的影响及生物安全性研究[D]. 武汉：华中科技大学，2022.
[4] 谭咪，刘悦，徐宁阳，等. 基于“脾－内质网相关”学说探讨巨噬细胞焦亡与动脉粥样硬化相关性[J]. 中国中药杂志，2024，49(16)：4532－4536.
[5] 崔馨月，王群，宋囡，等. 基于“脾失健运－膏脂转输障碍”探讨 HDL 蛋白修饰影响动脉粥样硬化发生发展的理论研究[J]. 中国中医基础医学杂志，2023，29(9)：1492－1495.
[6] 张晟安，刘志栋，戴亮，等. 苓桂术甘汤的临床应用：1 项系统性评价与 Meta 分析[J]. 中草药，2023，54(14)：4599－4614.
[7] 王荣，黄金玲. 苓桂术甘汤治疗心血管疾病的作用机制研究进展[J]. 中草药，2024，55(9)：3146－3156.
[8] FENG X T, DU M, ZHANG Y F, et al. The role of lymphangiogenesis in coronary atherosclerosis[J]. Lymphatic Res Biol, 2022, 20(3): 290－301.
[9] JI R C. The emerging importance of lymphangiogenesis in aging and aging－associated diseases[J]. Mech Ageing Dev, 2024, 221: 111975.
[10] LIU X L, CUI K, WU H, et al. Promoting lymphangiogenesis and lymphatic growth and remodeling to treat cardiovascular and metabolic diseases[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2023, 43(1): e1－e10.
[11] SINGLA B, LIN H P, AHN W, et al. Oxidatively modified LDL suppresses lymphangiogenesis *via* CD36 signaling[J]. Antioxidants, 2021, 10(2): 331.
[12] NAYOR M, BROWN K J, VASAN R S. The molecular basis of predicting atherosclerotic cardiovascular disease risk[J]. Circ Res, 2021, 128(2): 287－303.
[13] 宋玮，张钟艺，王楷，等. 动脉粥样硬化中医证候动物模型研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志，2024，30(7)：1254－1257.
[14] 周易，王凤荣，王帅，等. 基于“浊气归心，淫精于脉”理论探析脂质稳态与泛血管疾病关系[J]. 时珍国医国药，2024，35(3)：680－682.
[15] 曹慧敏，孔亮，隋国媛，等. 苓桂术甘汤对非酒精性脂肪肝相关肝细胞癌模型小鼠肝脂肪酸代谢重编程的影响[J]. 中医杂志，2023，64(13)：1366－1374.
[16] 冼业洋. 急性脊髓损伤后小胶质细胞通过 VEGF－C/VEGFR3 依赖性自噬和极化促进脊髓周围淋巴管生成[D]. 广州：南方医科大学，2024.
[17] 赵红博，熊桂宏，李明秋. 抑制肿瘤血管淋巴管生成的 VEGFR 分子机制及调控的研究进展[J]. 中国医学创新，2023，20(15)：184－188.
[18] TAMMELA T, ALITALO K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise[J]. Cell, 2010, 140(4): 460－476.
[19] YAMAKAWA M, DOH S J, SANTOSA S M, et al. Potential lymphangiogenesis therapies: Learning from current antiangiogenesis therapies—a review[J]. Med Res Rev, 2018, 38(6): 1769－1798.
[20] 董艺丹，马梦娇，彭珑萍，等. 阿霉素诱导扩张型心肌病模型小鼠心脏淋巴管生成障碍及扩心方干预作用的研究[J]. 世界科学技术－中医药现代化，2023，25(10)：3293－3303.
[21] FENG X T, DU M, LI S J, et al. Hydroxysafflor yellow A regulates lymphangiogenesis and inflammation *via* the inhibition of PI3K on regulating AKT/mTOR and NF－κB pathway in macrophages to reduce atherosclerosis in ApoE －/ － mice[J]. Phytomedicine, 2023, 112: 154684.
[22] 蔡恒烜，刘金鑫，王善杰，等. 淋巴管在动脉粥样硬化疾病中的研究进展[J]. 中华心血管病杂志，2021，49(9)：925－929.
[23] CAI H X, MA G P, ZHANG Z M, et al. A potential early－atheroprotective target: Irgm1 mediates lymphangiogenesis through LEC autophagy by Tfeb translocation[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2024, 1870(6): 167238.
[24] SLUIMER J C, BIESSEN E A L. Arterial lymphangiogenesis RESPONDINg 2 a new cue: the R－spondin2/LRG4 axis limits VEGFR3－mediated lymphangiogenesis and reverse cholesterol transport[J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(6): 1417－1419.
[25] DENG Y, ZHANG X, SIMONS M. Molecular controls of lymphatic VEGFR3 signaling[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(2): 421－429.
[26] LIN Q Y, ZHANG Y L, BAI J, et al. VEGF－C/VEGFR－3 axis protects against pressure－overload induced cardiac dysfunction through regulation of lymphangiogenesis[J]. Clinical & Translational Med, 2021, 11(3): e374.
[27] SUAREZ A C, HAMMEL J H, MUNSON J M. Modeling lymphangiogenesis: Pairing *in vitro* and *in vivo* metrics[J]. Microcirculation, 2023, 30(2－3): e12802.
[28] 李斯锦，冯骁腾，王怡茹，等. 探讨桃红饮体外通过 VEGFC 通路对巨噬细胞介导的淋巴管生成的抑制作用[J]. 北京中医药大学学报，2023，46(12)：1670－1683.
[29] 董熠，李营歌，姚颐，等. 平足蛋白在肿瘤发生发展中的研究现状[J]. 肿瘤学杂志，2019，25(4)：345－348.
[30] 赵塞，董圆，石林，等. 结直肠癌患者血浆可溶性平足蛋白的检测及临床意义[J]. 中国普外基础与临床杂志，2024，31(5)：579－584.

苓桂术甘汤影响 VEGFC/VEGFR3 通路促进淋巴管生成防治动脉粥样硬化分子机制研究

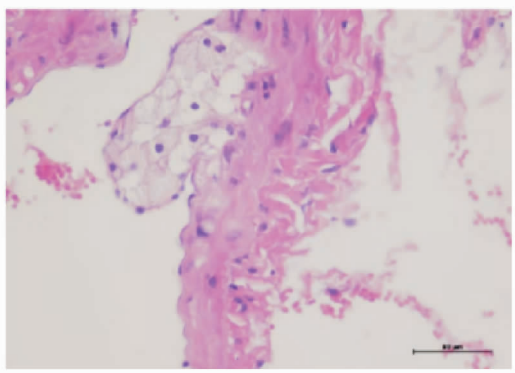
（正文见 67－72 页）



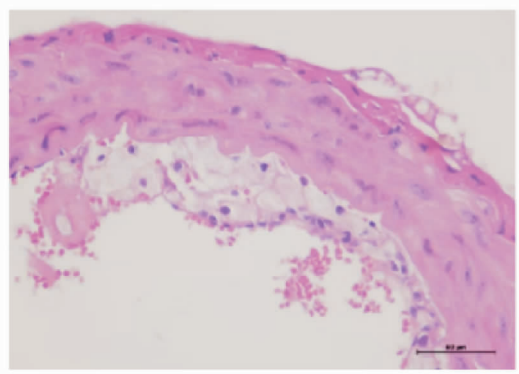
空白对照组



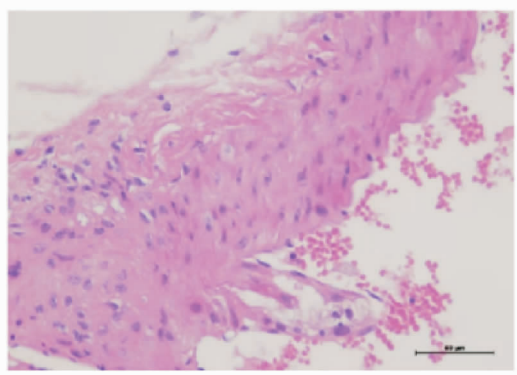
、模型组



苓桂术甘汤低剂量组



苓桂术甘汤中剂量组



苓桂术甘汤高剂量组

图 2　苓桂术甘汤对 ApoE$^{-/-}$ AS 小鼠主动脉病理的影响（HE 染色）