

益气活血中药配伍双联抗血小板药物对人脐静脉内皮细胞损伤和内皮血小板黏附的影响

王铭铭¹ 薛梅¹ 杨琳¹ 缪宇¹ 许勇钢¹ 寇娜² 曲华² 史大卓¹

摘要 **目的** 基于 PI3K/Akt 通路研究益气活血中药联合双联抗血小板药物对氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)损伤及损伤内皮诱导的血小板黏附的作用及机制。**方法** 将 HUVEC 随机分为空白组、模型组(80 mg/L ox-LDL)组、双抗(15 μg/mL 阿司匹林 + 10 μg/mL 氯吡格雷 + 80 mg/L ox-LDL)组、西洋参茎叶总皂苷(*Panax Quinquefolium* saponins, PQS, 160 μg/mL) + 三七总皂苷(*Panax Notoginseng* saponins, PNS, 160 μg/mL) + 双抗组和 LY294002 (30 μg/mL) + PQS + PNS + 双抗组, 共 5 组。利用流式细胞术检测 HUVEC 凋亡率和内皮-血小板黏附情况;生化法检测 HUVEC 上清液乳酸脱氢酶浓度(lactate dehydrogenase, LDH);放射免疫法检测 HUVEC 上清液细胞间黏附分子浓度(intercellular adhesion molecule, ICAM);Western blot 检测 HUVEC 中 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达。**结果** 与空白组比较,模型组 HUVEC 凋亡率、平均荧光强度(mean fluorescence indicator, MFI)、LDH、ICAM 浓度均升高($P < 0.05$), HUVEC p-Akt 蛋白表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较,双抗组 HUVEC 凋亡率和 LDH 浓度均升高($P < 0.05$), MFI 和 ICAM 浓度均降低($P < 0.05$);PQS + PNS + 双抗组凋亡率、MFI、LDH、ICAM 均降低($P < 0.05$), PQS + PNS + 双抗组 HUVEC 中 p-Akt 表达增加($P < 0.05$)。与双抗组比较, PQS + PNS + 双抗组 HUVEC 凋亡率、MFI、LDH 及 ICAM 均明显降低($P < 0.05$), HUVEC 中 p-Akt 表达升高($P < 0.05$);加入 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 后, HUVEC 中 p-Akt 表达被抑制,益气活血中药配伍双抗发挥的上述保护作用均消失。**结论** 益气活血中药配伍双抗通过上调内皮细胞 PI3K/Akt 通路,减轻 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡以及损伤内皮诱导的血小板黏附。

关键词 益气活血;内皮细胞;血小板黏附;双联抗血小板药物;PI3K

Chinese Herbal Compounds for Supplementing Qi and Activating Blood Circulation Combined with Dual Antiplatelet Drugs Alleviated Human Umbilical Vein Endothelial Cell Injury and Platelet Adhesion via Up-regulation of PI3K/Akt Pathway WANG Ming-ming¹, XUE Mei¹, YANG Lin¹, MIAO Yu¹, XU Yong-gang¹, KOU Na², QU Hua², and SHI Da-zhuo¹ 1 Department of Cardiovascular Disease, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091); 2 Graduates School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect and underlying mechanism of Chinese herbal compound (CHC) for supplementing qi and activating blood circulation (SQABC) combined with dual antiplatelet drugs (DA) on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) injury and platelet adhesion evoked by injured endothelial cells (ECs) based on PI3K/Akt signaling pathway. **Methods** HUVECs were randomly divided into 5 groups, i.e., the blank control group, the model group (80 mg/L ox-LDL), the DA group (15 μg/mL aspirin + 10 μg/mL clopidogrel + 80 mg/L ox-LDL), the *Panax Quinquefolium* saponins (PQS, 160 μg/mL) + *Panax Notoginseng* saponins (PNS, 160 μg/mL) + DA group, the LY294002 (30 μg/mL) + PQS + PNS + DA group. HUVEC apoptosis rate and

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No. 81102722);国家自然科学基金面上项目(No. 81273933);北京市自然科学基金青年基金资助项目(No. 7144240)

作者单位:1. 中国中医科学院西苑医院心血管科(北京 100091);2. 北京中医药大学研究生院(北京 100029)

通讯作者:史大卓, Tel:010-62835005, E-mail: shidazhuo@126.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 07. 0842

platelet adhesion to HUVECs were detected by flow cytometry. Concentration of lactate dehydrogenase (LDH) in HUVEC supernatant was detected by biochemical assay. Concentration of intercellular adhesion molecular (ICAM) was detected by radioimmunoassay. Protein expressions of p-PI3K and p-Akt in HUVECs were detected by Western blot. Results Compared with the blank control group, the apoptosis rate of HUVECs, mean fluorescence indicator (MFI), concentrations of both LDH and ICAM increased ($P < 0.05$), and p-Akt protein expression decreased ($P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, the apoptosis rate of HUVECs and LDH concentration increased ($P < 0.05$), concentrations of MFI and ICAM obviously decreased ($P < 0.05$) in the DA group. The apoptosis rate, MFI, concentrations of both LDH and ICAM all decreased in the PQS + PNS + DA group ($P < 0.05$). p-Akt protein expression in HUVECs obviously increased in the PQS + PNS + DA group ($P < 0.05$). Compared with the DA group, HUVEC apoptosis rate, MFI, concentrations of both LDH and ICAM in supernatant obviously decreased, p-Akt expression in HUVECs increased in the PQS + PNS + DA group (all $P < 0.05$). p-Akt protein expression in HUVECs was inhibited after adding specific PI3K inhibitor LY294002. Protection mentioned above all disappeared in the PQS + PNS + DA group ($P < 0.05$). Conclusion CHC for SQABC combined with DA could alleviate ox-LDL induced apoptosis of endothelial cells and reduce injured ECs evoked platelet adhesion via up-regulation of PI3K/Akt pathway in ECs.

KEYWORDS supplementing qi and activating blood circulation; endothelial cell; platelet adhesion; dual antiplatelet; PI3K

阿司匹林和氯吡格雷组成的双联抗血小板(双抗)方案是急性冠脉综合征,尤其是经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术后患者的常规治疗方案^[1, 2]。但是,即使应用双抗抗血小板治疗,仍有 7.4% ~ 16.5% 的患者在 12 个月内发生血栓事件^[3, 4]。如何更有效地减少血栓事件发生,仍是心血管领域面临的挑战。内皮损伤后黏附性增加,通过细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)等黏附分子诱导血小板对内皮的黏附以及血小板活化^[5],活化的血小板则进一步加重内皮的损伤^[6, 7],加速血栓形成^[8, 9]。损伤内皮诱导的血小板黏附和活化逐渐成为心血管领域的研究热点。然而双抗对内皮细胞有无保护作用,尚缺乏相关报道。

西洋参茎叶总皂苷(*Panax quinquefolium* saponins, PQS)和三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)联合应用是益气活血法的一种典型配伍,既往临床研究证实益气活血中药联合双抗比单用双抗更能降低 PCI 术后患者的血栓事件发生率,同时还可以减轻双抗药物引起的出血^[10]。基础研究证实西洋参的主要活性成分 PQS 可以通过上调内皮细胞 PI3K/Akt 通路减轻波动性高血糖造成的内皮损伤^[11]。益气活血中药配伍双抗能否减轻内皮细胞损伤及损伤内皮诱导的血小板黏附,其机制是否涉及 PI3K/Akt 通路的调节值得研究。本研究通过氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导建立人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell,

HUVEC)损伤模型,观察益气活血中药配伍双抗对 ox-LDL 损伤后内皮细胞的凋亡和内皮黏附性的影响,并从 PI3K/Akt 通路探讨其作用机制。

材料与方法

1 材料收集 血小板取自健康志愿者,30 名志愿者均为中国中医科学院研究生院 2013 级研究生,年龄 20 ~ 30 岁,平均 25 岁。志愿者于抽血前 1 个月内未服用任何抗血小板、抗凝药物。未扎止血带抽取肘静脉血 10 mL,注入含 3.8% 枸橼酸钠的抗凝管中,上下颠倒充分摇匀,立即室温下 1 500 r/min 离心 15 min,获得富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP),PRP 室温下 3 000 r/min 离心 10 min,沉淀血小板重悬于 ECM 培养基中,调整血小板计数为 1×10^8 /mL。健康产妇脐带取自北京海淀区妇幼保健院。

2 药物 阿司匹林标准品(200 mg/瓶,批号:201405)、硫酸氢氯吡格雷标准品(100 mg/瓶,批号:201403)、PNS(100 mg/瓶,批号:201002)均购自中国药品生物制品检定所,PQS(批号:140311)购自吉林吉安益盛药厂。

3 试剂和仪器 ox-LDL 购自广州奕源生物科技有限公司(批号:201507)。CD144-PE 抗体(批号:E19430-102),CD61-FITC 抗体(批号:J4012-NM03C),PO-PRO-17-AAD 试剂盒(批号:V35123)均购自美国 Life 公司。Western blot 一抗 p-Akt(批号:0019),Akt(批号:0017)均购自美国

CST 公司。内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM)购自 Science Cell 公司(批号:16854)。6-keto-PGF 1α 放免药盒(批号:20160115)、TXB $_2$ 放免药盒(批号:20160115)均购自北京华英生物技术研究所。CD61-FITC 单克隆抗体(批号:348093), CD62-PE 单克隆抗体(批号:348107), 均购自美国 BD 公司。CO $_2$ 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司; I 级 2 型生物安全柜购自新加坡 ESCO 公司; 流式细胞仪(NAVIOS)购自美国 Beckman Coulter 公司; T25 细胞培养瓶、6 孔细胞培养板、15 mL 离心管、50 mL 离心管均购自美国 Corning 公司。

4 方法

4.1 HUVEC 细胞分离与培养 参照文献[12]报道的方法进行 HUVEC 的分离。无菌条件下取健康产妇脐带, 用 0.1% 胶原酶 I 灌注脐静脉收集 HUVEC。采用 ECM 培养基, 将 HUVEC 接种于 60 mm 细胞培养皿(Corning, 美国), 置于 37 °C, 5% CO $_2$ 培养箱(Thermo, 美国)中培养。原代细胞自分离后 24 h 换液, 之后细胞每 2 天换液 1 次。待细胞融合, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。实验采用第 5 代细胞。

4.2 细胞分组及给药 PNS 的治疗浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [13], 参考既往实验和预实验结果 [11, 14], 确定本研究所用 PQS 和 PNS 的浓度均为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。HUVEC 随机分为空白组、模型组、双抗组、PQS + PNS + 双抗组和 LY294002 + PQS + PNS + 双抗组, 共 5 组。空白组细胞置于 37 °C, 5% CO $_2$ 培养箱中常规培养 16 h; 模型组细胞培养基中加入 ox-LDL (80 mg/L), 37 °C 培养箱孵育 16 h; 双抗组细胞培养基中加入阿司匹林 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和氯吡格雷 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 °C 培养箱孵育 30 min, 之后加入 ox-LDL (80 mg/L), 继续孵育 16 h; PQS + PNS + 双抗组细胞培养基中加入 PQS (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、PNS (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阿司匹林 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和氯吡格雷 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 °C 培养箱孵育 30 min, 之后加入 ox-LDL (80 mg/L), 继续孵育 16 h; LY294002 + PQS + PNS + 双抗组细胞中加入 LY294002 (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预先孵育 1 h, 之后同 PQS + PNS + 双抗组。

4.3 HUVEC 凋亡率 采用 PO-PRO-1/7-AAD 凋亡试剂盒检测 HUVEC 凋亡率。0.25% 胰蛋白酶收集 HUVEC, PBS 清洗 2 次, 重悬于 1 mL 4 °C PBS 中, 调整细胞计数为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 取出 100 μL 细胞悬液, 加入 2.5 μL PO-PRO-1 和 1 μL 7-AAD, 避光孵育 30 min, 进行流式细胞仪分析。

4.4 HUVEC 上清液酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 和 ICAM 含量 收集 HUVEC 上清液, 生化法检测 LDH 浓度, 放免法检测 ICAM 浓度。严格按照各试剂盒进行操作。

4.5 内皮-血小板黏附情况 将 100 μL 血小板悬液加入 HUVEC 培养皿中, 37 °C 细胞培养箱孵育 5 min。孵育完毕, 弃掉上清液, PBS 轻轻冲洗培养皿 3 遍。0.25 % 胰蛋白酶收集 HUVEC 及黏附在 HUVEC 上的血小板, PBS 清洗 2 遍, 重悬于 1 mL 4 °C PBS 中, 调整 HUVEC 细胞计数为 $1 \times 10^8/\text{mL}$ 。取出 100 μL 细胞悬液, 加入 2 μL FITC 标记的抗 CD61 抗体和 2 μL PE 标记的抗 CD144 抗体, 进行流式细胞仪分析。CD61 和 CD144 分别为血小板和 HUVEC 的特异性标记物 [13]。流式分析时 CD144 阳性的细胞 (即 HUVEC) 中 CD61 的平均荧光强度 (mean fluorescence indicator, MFI) 即可反映内皮细胞上血小板的黏附程度。

4.6 HUVEC 中 p-Akt、p-PI3K 蛋白表达 采用 Western blot 检测法。弃掉细胞培养上清液, 用预冷的 PBS 冲洗 HUVEC 培养皿 3 次, 每个培养皿中加入 200 μL 细胞裂解液, 之后用细胞刮刀刮取细胞, 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 取上清, BCA 法进行蛋白定量。将剩余蛋白加热变性, 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4 °C 转移到 PVDF 膜上, 5 % 脱脂奶粉封闭 1 h, 加抗 p-Ak 抗体和抗 Akt 抗体 4 °C 孵育过夜。HRP 标记的二抗 (1:2 000) 常温孵育 1 h。AlphaEaseFC 6.0 分析条带光密度值。

4.7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数比较采用单因素方差分析, 并进行方差齐性检验, 方差齐用 LSD 检验, 方差不齐用 Tamhane's t^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 HUVEC 凋亡率比较 (表 1、图 1) 与空白组比较, 模型组 HUVEC 凋亡率升高 (P < 0.05)。

表 1 各组 HUVEC 凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率
空白	6	4.911 $\pm$ 2.115
模型	6	18.513 $\pm$ 3.099 *
双抗	6	20.011 $\pm$ 6.401 Δ
PQS + PNS + 双抗	6	5.520 $\pm$ 2.444 $\Delta\Delta$
LY294002 + PQS + PNS + 双抗	6	16.438 $\pm$ 4.346 $\circ$

注: 与空白组比较, *P < 0.05; 与模型组比较, Δ P < 0.05; 与双抗组比较, $\Delta\Delta$ P < 0.05; 与 PQS + PNS + 双抗组比较, $\circ$ P < 0.05

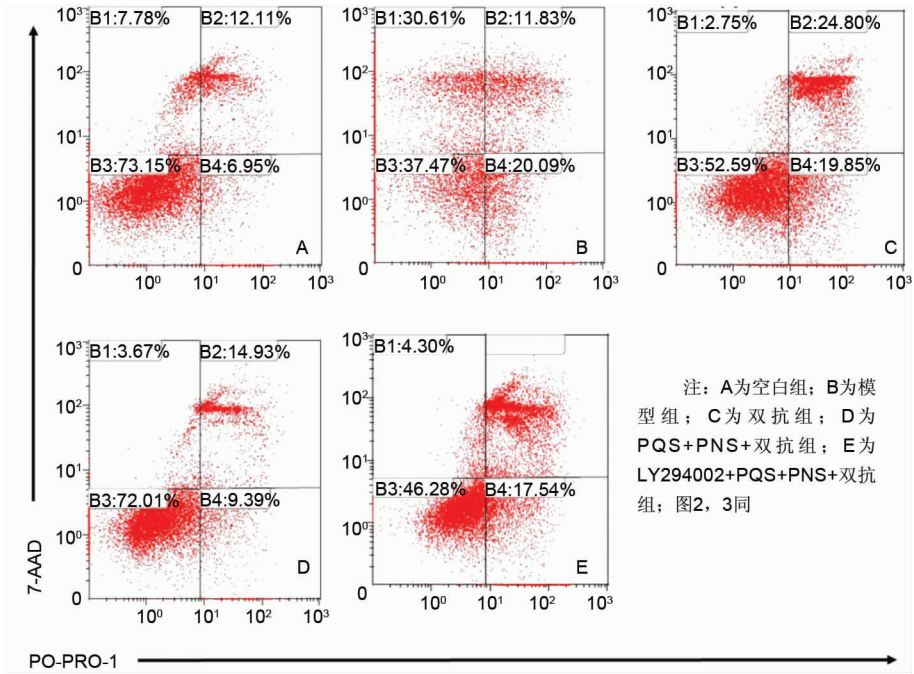


图 1 各组 HUVEC 凋亡率比较

与模型组比较,双抗组 HUVEC 凋亡率升高 8.1%, PQS + PNS + 双抗组 HUVEC 凋亡率降低 70.18%, 差异均有统计学意义($P < 0.05$),且 PQS + PNS + 双抗组 HUVEC 凋亡率较双抗组明显降低($P < 0.05$)。与 PQS + PNS + 双抗组比较,LY294002 + PQS + PNS + 双抗组 HUVEC 凋亡率升高 66.42%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2 各组 HUVEC 上清液 LDH 和 ICAM 浓度比较 (表 2) 与空白组比较,模型组 LDH 和 ICAM 浓度升高($P < 0.05$)。与模型组比较,双抗组 LDH 浓度升高 5.41%, PQS + PNS + 双抗组 LDH 浓度降低 35.70%,差异均有统计学意义($P < 0.05$),双抗组与 PQS + PNS + 双抗组 ICAM 浓度均降低($P < 0.05$)。与双抗组比较,PQS + PNS + 双抗组 LDH 和 ICAM 浓度降低更明显($P < 0.05$)。与 PQS + PNS + 双抗组比较,LY294002 + PQS + PNS + 双抗组 LDH、ICAM 浓度均升高($P < 0.05$)。

表 2 各组 HUVEC 上清液 LDH、ICAM 浓度比较 (U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	LDH	ICAM
空白	6	230.616 ± 79.127	32.338 ± 3.728
模型	6	441.366 ± 33.489 *	43.977 ± 2.664 *
双抗	6	444.440 ± 75.519 Δ	40.050 ± 2.740 Δ
PQS + PN + 双抗	6	270.315 ± 39.617 ▲	33.793 ± 3.055 ▲▲
LY294002 + PQS + PNS + 双抗	6	444.426 ± 33.678 ○	39.950 ± 3.077 ○

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,Δ $P < 0.05$;与双抗组比较,▲ $P < 0.05$;与 PQS + PNS + 双抗组比较,○ $P < 0.05$

3 各组 MFI 比较(表 3,图 2) 与空白组比较,模型组 MFI 升高($P < 0.05$)。与模型组比较,双抗组与 PQS + PNS + 双抗组 MFI 均降低,其中 PQS + PNS + 双抗组 MFI 降低更明显($P < 0.05$)。与 PQS + PNS + 双抗组比较,LY294002 + PQS + PNS + 双抗组 MFI 升高($P < 0.05$)。

表 3 各组 MFI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MFI
空白	6	2.938 ± 0.330
模型	6	5.027 ± 0.413 *
双抗	6	4.487 ± 0.402 Δ
PQS + PNS + 双抗	6	2.615 ± 0.252 ▲▲
LY294002 + PQS + PNS + 双抗	6	4.378 ± 0.588 ○

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,Δ $P < 0.05$;与双抗组比较,▲ $P < 0.05$;与 PQS + PNS + 双抗组比较,○ $P < 0.05$

4 各组 HUVEC 中 p-Akt、p-PI3K 蛋白表达比较(表 4,图 3) 与空白组比较,模型组 HUVEC 中 p-Akt 表达降低($P < 0.05$),p-PI3K 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,PQS + PNS + 双抗组 HUVEC 中 p-Akt 表达增加($P < 0.05$),其他表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与双抗组比较,PQS + PNS + 双抗组 p-Akt 表达升高($P < 0.05$),p-PI3K 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 PQS + PNS + 双抗组比较,LY294002 + PQS + PNS + 双抗组 p-Akt 表达降低($P < 0.05$)。

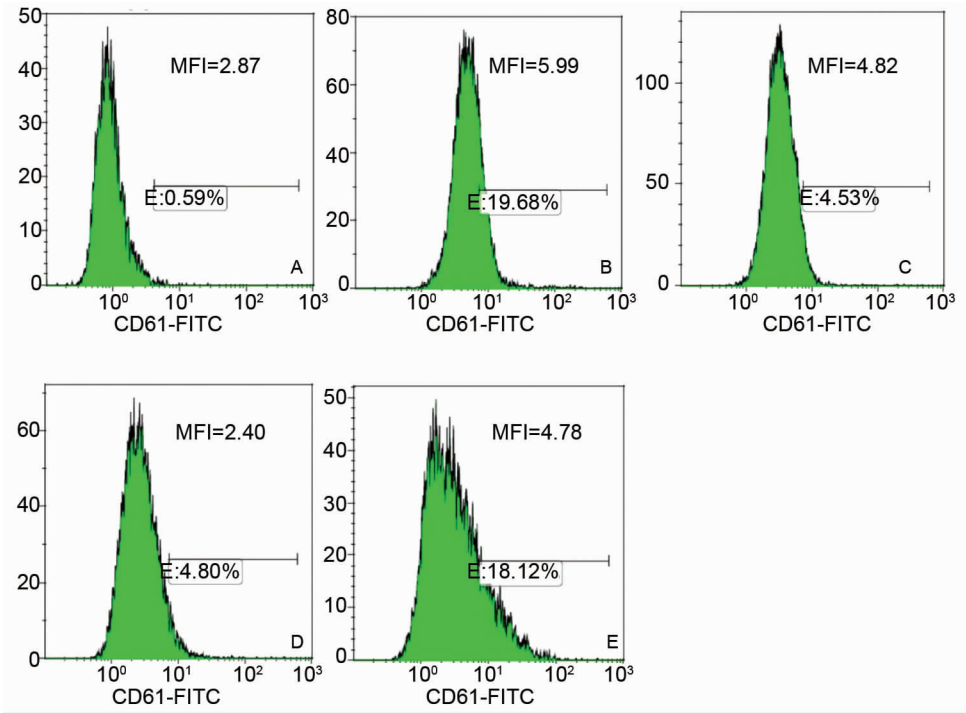


图2 各组血小板黏附程度比较

表4 各组 HUVEC p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-Akt/Akt	p-PI3K/PI3K
空白	3	1.312 ± 0.230	2.186 ± 0.190
模型	3	0.934 ± 0.210 *	1.894 ± 0.112
双抗	3	0.867 ± 0.101	1.673 ± 0.201
PQS + PNS + 双抗	3	1.308 ± 0.221 $\triangle$ $\blacktriangle$	1.876 ± 0.121
LY294002 + PQS + PNS + 双抗	3	0.543 ± 0.282 $\circ$	1.634 ± 0.230

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\triangle P < 0.05$;与双抗组比较, $\blacktriangle P < 0.05$;与 PQS + PNS + 双抗组比较, $\circ P < 0.05$

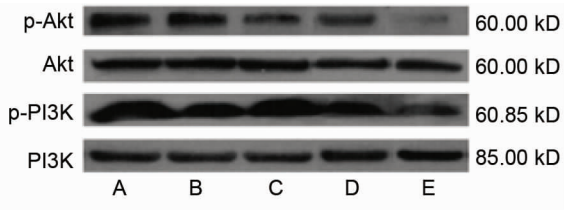


图3 各组 HUVEC p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白表达印迹图

讨 论

内皮细胞损伤是血栓形成的重要始动因素,凋亡的内皮可诱发血小板的活化和内皮-血小板黏附,从而加速血栓的形成^[5]。本研究表明,益气活血中药与双抗联用可以更有效地降低 ox-LDL 诱导的内皮细胞

凋亡和内皮-血小板黏附,其机制与内皮细胞 PI3K/Akt 通路有关。

双抗药物对内皮细胞的影响尚存在争议:有研究显示氯吡格雷可改善内皮依赖的血管舒张,改善血管重塑^[16],提高内皮型一氧化氮合酶的表达^[17];但也有研究显示,常规剂量氯吡格雷并不能改善内皮功能^[18],也不能减轻内皮细胞氧化应激损伤^[19]。同样,有研究报道阿司匹林可减轻 ox-LDL 诱导的内皮氧化应激损伤及炎症反应^[20],但也有研究提出阿司匹林对内皮细胞凋亡并无改善作用^[21],浓度大于 1×10^7 mol/L 的阿司匹林反而可诱导内皮细胞的凋亡^[22]。本实验结果表明,对于 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡,双抗药物不能发挥保护作用。

ICAM 是介导损伤内皮-血小板黏附的重要分子。阿司匹林可以乙酰化内皮 COX-2 蛋白,从而降低内皮细胞 ICAM 的表达^[23];氯吡格雷可以降低内皮炎症介质的表达^[24]。本实验中双抗有效降低上清液 ICAM 浓度,与既往研究是一致的^[23,24]。此外,研究报道抗血小板药物可降低内皮-血小板黏附率^[25]。推测本实验中双抗降低血小板对内皮细胞的黏附一方面与双抗对内皮 ICAM 的抑制作用有关,一方面与双抗抗血小板的作用有关。

益气活血中药与双抗联用后,可以降低内皮细胞凋亡率,此外,益气活血中药联用双抗降低 ICAM 表达

和抑制血小板黏附的作用均强于单用双抗,而 LY294002 消除了益气活血中药的上述作用。这提示益气活血中药保护内皮、抑制 ICAM 表达和降低血小板黏附的作用均与内皮细胞 PI3K/Akt 通路有关。

PI3K/Akt 是重要的维持细胞活性、抑制细胞凋亡通路。Wang J 等^[11]证实 PQS 可以通过调节内皮细胞 PI3K/Akt 通路有效减轻波动性高糖诱导的内皮细胞损伤和凋亡。本研究结果表明,ox-LDL 可以降低内皮细胞中 p-Akt 蛋白的表达,这提示 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤和凋亡和其抑制内皮细胞 PI3K/Akt 通路有关。益气活血中药上调内皮细胞中 p-Akt 蛋白表达,同时有效降低 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡和 LDH 水平。LY294002 阻断内皮细胞 PI3K 活性后,益气活血中药对内皮细胞凋亡率的抑制作用消失,这证实益气活血中药是通过上调内皮细胞 PI3K/Akt 通路发挥内皮细胞保护作用的。

PI3K/Akt 通路可以通过多种途径发挥不同的 ICAM 调节作用。Kim HG 等^[26]证实 TNF 通过活化 PI3K/Akt 通路促进 ICAM 的表达;Radisavljevic Z 等^[27]证实血管内皮生长因子通过上调 PI3K/Akt 通路促进 ICAM 的表达。此外,Yamagata K 等^[28]证实茶多酚通过上调内皮细胞中 PI3K/Akt 通路抑制 ICAM 的表达,从而发挥内皮保护作用。Lu CY 等^[29]证实穿心莲内酯通过上调内皮细胞 PI3K/Akt 通路抑制 ICAM 表达,从而减轻 TNF 诱导的炎症损伤。本实验提示益气活血中药很可能通过上调内皮细胞 PI3K/Akt 通路发挥抑制 ICAM 表达的作用。

冠心病常表现为气虚血瘀证,益气活血中药具有补气扶本、祛瘀通痹的功效,因此被广泛应用于冠心病等血栓性疾病的临床治疗^[30,31]。本实验结果表明,益气活血中药联合双抗,可以通过调节内皮细胞 PI3K/Akt 通路减轻 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤和凋亡,从而进一步抑制损伤内皮诱导血小板黏附。一方面保留了双抗较强的抗血小板作用,一方面增加了益气活血中药带来的保护内皮和降低内皮黏附性的作用,两者相得益彰,抑制血栓形成,这无疑会带来显著的临床获益。

参 考 文 献

[1] Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of

Cardiology (ESC) [J]. Eur Heart J, 2011, 32 (23): 2999-3054.

- [2] Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, et al. 2011 ACCF/AHA/SCAI Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions [J]. Circulation, 2011, 124(23): 2574-2609.
- [3] Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation [J]. New Engl J Med, 2001, 345(7): 494-502.
- [4] Mehran R, Baber U, Steg PG, et al. Cessation of dual antiplatelet treatment and cardiac events after percutaneous coronary intervention (PARIS): 2-year results from a prospective observational study [J]. Lancet, 2013, 382(9906): 1714-1722.
- [5] Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets [J]. Blood, 1999, 93 (11): 3831-3838.
- [6] Tomita Y, Tanahashi N, Tomita M, et al. Role of platelet glycoprotein II b/III a in ADP-activated platelet adhesion to aortic endothelial cells *in vitro*: observation with video-enhanced contrast microscopy [J]. Clin Hemorheol Micro, 2001, 24(1): 1-9.
- [7] Nomura S, Shouzu A, Omoto S, et al. Activated platelet and oxidized LDL induce endothelial membrane vesiculation: clinical significance of endothelial cell-derived microparticles in patients with type 2 diabetes [J]. Clin Appl Thromb-Hem, 2004, 10(3): 205-215.
- [8] Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, et al. Platelets roll on stimulated endothelium *in vivo*: an interaction mediated by endothelial P-selectin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92 (16): 7450-7454.
- [9] Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis [J]. J Clin Invest, 2005, 115(12): 3378-3384.
- [10] Wang SL, Wang CL, Wang PL, et al. Combination of Chinese herbal medicines and conventional treatment *versus* conventional treatment alone in patients with acute coronary syndrome after percutaneous coronary intervention (5C Trial): an open-label randomized controlled, multicenter study [J]. Evid-Based Complement Alternat Med, 2013: 741518.
- [11] Wang J, Yin H, Huang Y, et al. *Panax quinquefolius* saponin of stem and leaf attenuates intermittent high glucose-induced oxidative stress injury in cultured human umbilical vein endothelial cells

- via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway [J]. Evid-Based Complement Altanat Med, 2013: 196283.
- [12] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. J Clin Invest, 1973, 52 (11): 2745–2756.
 - [13] Ling SH, Lina N, Aozhi D, et al. Effects of four medicinal herbs on human vascular endothelial cells in culture [J]. Int J Cardiol, 2007, 128 (3): 350–358.
 - [14] Qin JH, Zhu LQ, Cui W, et al. Effects of *Panax Notoginseng* saponins on expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells injury induced by oxidized low density lipoprotein [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2009, 13 (15): 2896–2898.
 - [15] Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, et al. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia [J]. Haematologica, 2009, 94 (7): 911–918.
 - [16] Giachini FR, Leite R, Osmond DA, et al. Antiplatelet therapy with clopidogrel prevents endothelial dysfunction and vascular remodeling in aortas from hypertensive rats [J]. PLoS One, 2014, 9 (3): e91890.
 - [17] Schafer A, Fraccarollo D, Pfortsch S, et al. Clopidogrel improves endothelial function and NO bioavailability by sensitizing adenylyl cyclase in rats with congestive heart failure [J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106 (3): 485–494.
 - [18] Smadja DM, Bura A, Szymezak J, et al. Effect of clopidogrel on circulating biomarkers of angiogenesis and endothelial activation [J]. J Cardiol, 2012, 59 (1): 30–35.
 - [19] Willoughby SR, Lu LJ, Cameron JD, et al. Clopidogrel improves microvascular endothelial function in subjects with stable coronary artery disease [J]. Heart Lung Circ, 2014, 23 (6): 534–541.
 - [20] Chen B, Zhao J, Zhang S, et al. Aspirin inhibits the production of reactive oxygen species by down-regulating Nox4 and inducible nitric oxide synthase in human endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein [J]. J Cardiovasc Pharm, 2012, 59 (5): 405–412.
 - [21] Fiorucci S, Mencarelli A, Mannucci R, et al. NCX-4016, a nitric oxide-releasing aspirin, protects endothelial cells against apoptosis by modulating mitochondrial function [J]. FASEB J, 2002, 16 (12): 1645–1647.
 - [22] Chen QQ, Liu WL, Guo X, et al. Biphasic effect of aspirin on apoptosis of bovine vascular endothelial cells and its molecular mechanism [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28 (3): 353–358.
 - [23] Fiorucci S, Distrutti E, Mencarelli A, et al. Evidence that 5-lipoxygenase and acetylated cyclooxygenase 2-derived eicosanoids regulate leukocyte-endothelial adherence in response to aspirin [J]. Br J Pharmacol, 2003, 139 (7): 1351–1359.
 - [24] Hadi NR, Mohammad BI, Ajeena IM, et al. Anti-atherosclerotic potential of clopidogrel: antioxidant and anti-inflammatory approaches [J]. Biomed Res Int, 2013: 790263.
 - [25] Catella-Lawson F. Vascular biology of thrombosis: platelet-vessel wall interactions and aspirin effects [J]. Neurology, 2001, 57 (5 Suppl 2): S5–S7.
 - [26] Kim HG, Kim JY, Hwang YP, et al. The coffee diterpene kahweol inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in human endothelial cells [J]. Toxicol Appl Pharm, 2006, 217 (3): 332–341.
 - [27] Radisavljevic Z, Avraham H, Avraham S. Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (27): 20770–20774.
 - [28] Yamagata K, Tanaka N, Suzuki K. Epigallocatechin 3-gallate inhibits 7-ketocholesterol-induced monocyte-endothelial cell adhesion [J]. Microvasc Res, 2013, 88 (7): 25–31.
 - [29] Lu CY, Yang YC, Li CC, et al. Andrographolide inhibits TNF α -induced ICAM-1 expression via suppression of NADPH oxidase activation and induction of HO-1 and GCLM expression through the PI3K/Akt/Nrf2 and PI3K/Akt/AP-1 pathways in human endothelial cells [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 91 (1): 40–50.
 - [30] 刘莉, 何苗苗, 金娟, 等. 从益气活血法探析冠心病心绞痛 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37 (4): 613–615.
 - [31] 陈可冀, 史大卓主编. 冠心病及急性心肌梗死中医临床辨证标准及防治指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 39–42.

(收稿: 2015-12-25 修回: 2016-03-16)