

· 基础研究 ·

宁心痛颗粒及其有效组分抑制 HSP60 诱导的 THP-1 细胞炎症反应的实验研究

高颖¹ 陈蕊² 顾宁² 何小丽²

摘要 **目的** 观察 NF- κ B、MAPKs 信号通路在介导重组人热休克蛋白 60 (HSP60) 诱导巨噬细胞 (M ϕ) 炎症反应中的作用,探讨益气活血方宁心痛颗粒的抗炎机制。**方法** 采用人急性单核白血病细胞株 (human acute monocytic leukemia cell line, THP-1) 体外培养模型,结合血清药理学与中药组分配伍方法进行论证。将 THP-1 细胞诱导分化为 M ϕ ,分为对照组 (M ϕ + 培养液)、HSP60 (10 μ g/mL) 组、黄芪多糖 (APS, 200 μ g/mL) 组、藁本内酯 (LIG, 20 μ g/mL) 组、APS (200 μ g/mL) + LIG (20 μ g/mL) 组、含药血清 (3%) 组、辛伐他汀 (15 μ g/mL) 组,各药物干预组以相应治疗药物预处理 24 h 后,除对照组外,其余各组均加入终浓度为 10 μ g/mL 的 HSP60。检测磷酸化的 NF- κ B (p-NF- κ B)、MAPKs [包括 p-p38、胞外信号调节激酶 1/2 (p-ERK1/2) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK)] 蛋白表达及 TNF- α 、IL-6 含量。**结果** 与对照组比较, HSP60 组的 p-NF- κ B 及 p-p38、p-JNK、p-ERK1/2 蛋白表达和 TNF- α 、IL-6 含量升高 ($P < 0.01$); 与 HSP60 组比较, 各药物干预组检测蛋白表达和 TNF- α 、IL-6 含量均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 APS 组比较, APS + LIG 组、含药血清组和辛伐他汀组检测蛋白表达和 TNF- α 、IL-6 含量均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 LIG 组比较, APS + LIG 组检测蛋白表达均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), TNF- α 、IL-6 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 含药血清组和辛伐他汀组检测蛋白表达及 TNF- α 、IL-6 含量均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 含药血清组和辛伐他汀组均较 APS + LIG 组蛋白表达和 TNF- α 、IL-6 含量降低更明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且辛伐他汀组降低蛋白表达的效果优于含药血清组 ($P < 0.01$)。**结论** NF- κ B 及 MAPKs 信号通路是 HSP60 诱导 THP-1 源性 M ϕ 发生炎症反应的关键信号通路, 宁心痛颗粒含药血清、APS、LIG、APS 配伍 LIG 可不同程度通过调控以上通路发挥抗炎效果, 其中宁心痛颗粒含药血清的效果最强。

关键词 宁心痛颗粒; 核因子- κ B; 丝裂原活化蛋白激酶; 热休克蛋白 60

Inhibitory Effects of Ningxintong Granule and its Effective Components on the THP-1 Cells Inflammation Induced by Extracellular Human Heat Shock Protein 60 GAO Ying¹, CHEN Rui², GU Ning², and HE Xiao-li² 1 Postdoctoral Mobile Research Station of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210046); 2 Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210001)

ABSTRACT **Objective** To explore the inhibitory effects of Ningxintong Granule (NXT), which can invigorate qi and activate blood, and its effective components on the inflammatory reaction induced by extracellular recombinated heat shock protein 60 (HSP60) in the human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) and the underlying anti-inflammatory mechanisms. **Methods** The THP-1 were cultured *in vitro* and the serum drug of NXT was used in coordination with component combination of *Astragalus membranaceus*—*Ligusticum wallichii* herb. The THP-1 cells were differentiated into macrophages (M ϕ) and then divided into the control group, the HSP60 group, the astragalus polysaccharide (APS) group, the ligustilide (LIG) group, the APS + LIG group, the NXT group and the simvastatin group. HSP60 with ultimate

基金资助: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81173399); 中国博士后科学基金项目 (No. 2015M571791); 江苏省博士后科学基金项目 (No. 1401137C); 江苏省自然科学基金面上项目 (No. BK20161115); 十三五南京市医学科技创新平台重大项目 (No. ZDX16013)

作者单位: 1. 南京中医药大学博士后流动站 (南京 210046); 2. 南京中医药大学第三附属医院心血管科 (南京 210001)

通讯作者: 顾宁, Tel: 025-52276242, E-mail: jsguning@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180206.046

concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ was added into all but the control group after incubation of APS (200 $\mu\text{g/mL}$), LIG (20 $\mu\text{g/mL}$), APS(200 $\mu\text{g/mL}$) plus LIG(20 $\mu\text{g/mL}$), NXT(3%) or simvastatin (15 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, respectively. The protein expressions of phosphate-nuclear factor kappa B (NF- κ B) and mitogen activated protein kinases [including p38, c-Jun NH2-terminal kinases (JNK), extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2)] and the contents of TNF- α and IL-6 were detected. Results Compared with the control group, the expressions of the four proteins and the contents of TNF- α and IL-6 in the HSP60 group were all elevated remarkably ($P < 0.01$), which were decreased significantly in the APS group, the LIG group, the APS + LIG group, the NXT group and the simvastatin group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the APS group, those in the APS + LIG group, the NXT group and the simvastatin group were decreased dramatically ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In contrast to the LIG group, the four protein expressions were decreased outstandingly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the APS + LIG group, while there was not statistically significant in the contents of TNF- α and IL-6 between the two groups ($P > 0.05$). Compared with the LIG group, the protein expressions and the contents were decreased notably ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the NXT group and the simvastatin group. The protein expressions and the contents were decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the NXT group and the simvastatin group, in contrast to those in the APS + LIG group. The protein expressions were further decreased in the simvastatin group than in the NXT group ($P < 0.01$). Conclusions The HSP60 induces inflammatory reaction in THP-1 cells mainly through the NF- κ B and MAPKs signaling pathway. The four components, namely NXT, APS, LIG and APS + LIG, all exert some anti-inflammatory activities which is partly due to their abilities to inhibiting the above signaling pathways. Therefore, NXT has the best effect.

KEYWORDS Ningxintong Granule; nuclear factor- κ B; mitogen activated protein kinases; heat shock protein 60

目前认为,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种血管慢性增殖性炎症病理过程,长期炎症负荷在其发生发展中所发挥的作用远远超过胆固醇、氧化修饰低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL)等脂类^[1,2],热休克蛋白 60 (heat shock protein 60, HSP60)是近些年本研究领域的热点^[3,4]。HSP 60 生理状态下存在于细胞内,具有协助多肽或蛋白质正确转运、折叠和装配等功能;病理情况下被释放到细胞外,即作为警戒素诱发炎症/免疫反应。研究证实,其可通过激活三大炎症信号转导通路中的两条——核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)而诱导炎症反应^[5],不仅作为 AS 病变始动因子^[6],尚可促使斑块趋于不稳定^[7]。宁心痛颗粒为自主研发与创制、具有知识产权的中药复方制剂,由君药黄芪、臣药川芎、葛根、佐药毛冬青、细辛等组成,可有效缓解冠心病(胸痹—气虚血瘀证)患者心肌缺血、减轻心绞痛的临床症状^[8],并具有一定的抗炎^[9]、抑制巨噬细胞泡沫化^[10]、稳定易损斑块等作用。其中,黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)是君药黄芪的有效组分,藜本内酯(ligustilide, LIG)是臣药川芎的主要活性成分及质量控制标准。本实验利用人急性单核

白血病细胞株(human acute monocytic leukemia cell line, THP-1)源性巨噬细胞(macrophage, M ϕ)体外培养模型,结合中药“组分配伍”等研究方法,从以上两条信号转导通路入手,对宁心痛颗粒抑制 HSP60 诱导 M ϕ 炎症反应进行初步探讨。

材料与方法

1 细胞及动物 THP-1 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库(20170505-01)。清洁级健康 SD 大鼠 24 只,雌雄各半,体重(200 $\pm$ 20 g),由南京中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号:SCXK(浙)20130033。所有动物均饲养于南京中医药大学 SPF 级动物房,实验动物的处置严格按照实验中心的相关伦理规定进行。

2 药物 宁心痛颗粒为自主研发与创制的医院自制制剂(苏药制字 Z04000781,批号:120919),主要由黄芪 1 000 g 川芎 1 000 g 葛根 700 g 毛冬青 700 g 细辛 100 g 五味药组方,以上制成 1 000 g 颗粒剂,每克相当于生药 3.5 g。成人日服量为 30 g (10 g, 每日 3 次),折合生药 35 g,按标准成人(70 kg)折算剂量为 0.5 g/(kg $\cdot$ d)生药。转换成大鼠日服剂量:大鼠剂量约为人的 6 倍^[11],即 3 g/(kg $\cdot$ d)生

药,标准大鼠体重 0.2 kg,故日剂量约为 0.6 g 生药。APS(生产批号:ALB-20150312)、LIG(生产批号:ALB-20141203)购自香港 ALB 技术有限公司;辛伐他汀(生产批号:03)购自 Selleck Chemicals 公司。

3 主要试剂及仪器 主要试剂:佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate,PMA,批号:1001761219)购自美国 Sigma 公司;重组(HSP 60,批号:11021228)购自瑞士 Enzo 生命科学公司;兔抗人 NF- κ B p65 单克隆抗体(批号:0014)、兔抗人磷酸化 NF- κ B p65 单克隆抗体(批号:0012)、兔抗人 p38 单克隆抗体(批号:0007)、兔抗人磷酸化 p38 单克隆抗体(批号:0003)、兔抗人 ERK1/2(137F5)单克隆抗体(批号:0015)、兔抗人磷酸化 ERK1/2 单克隆抗体(批号:0011)、兔抗人 JNK 单克隆抗体(批号:0013)、兔抗人磷酸化 JNK 单克隆抗体(批号:0004)、羊抗兔 IgG(批号:0025)均购自美国 CST 公司;兔抗人 β -actin 多克隆抗体(批号:254182)、羊抗兔 IgG(批号:264474)购自艾比玛特生物医药(上海)有限公司;GAPDH(批号:AB-R-001)购自杭州贤至生物有限公司。TNF- α (批号:101931024)及 IL-6(批号:103143060)酶联免疫检测试剂盒购自 eBioscience 公司。主要仪器:微型垂直电泳槽(美国伯乐公司)、半干转膜仪(美国伯乐公司)、化学发光成像仪(Image Quant LAS 4000 mini)、多模式微孔板检测仪(美国伯金埃尔默公司)、HERA cell 150i CO₂ 培养箱(Thermo 公司)。

4 方法

4.1 细胞培养与诱导分化 THP-1 细胞于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,使用 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清),每 2~3 天更换 1 次培养液,待细胞长至融合度达 90% 左右时传代,传代至第 2~3 代时取对数生长期的细胞,经 PMA(终浓度为 200 μ g/L)诱导 24 h 分化为 M ϕ 后进行实验。

4.2 宁心痛颗粒含药血清的制备 24 只 SD 大鼠普通饲料喂养,自由饮水。随机分为空白对照组和宁心痛颗粒组,每组 12 只。将日服用量分两次灌胃给药,连续给药 3 天,第 4 天一次灌服全天剂量,空白对照组大鼠仅灌服等量生理盐水。第 4 天给药前禁食 12 h,自由饮水,给药后 2 h 在麻醉状态下颈动脉采血。以 3% 水合氯醛(0.1 mL/100 g)腹腔缓慢注射麻醉后,将大鼠仰位固定,切开颈部皮肤,分离皮下结缔组织,使颈动脉充分暴露,结扎远心端后用静脉留置针穿刺后拔出内硬针头,接注射器收集动脉血,移入标记好的 15 mL 离心管中。将收集到的血液 4 ℃,静置

4 h;4 ℃ 3 000r/min 离心 15 min,取上清液;3 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min;取上清,同组混匀,56 ℃ 水浴 30 min 灭活,0.22 μ m 滤器抽滤除菌,分装,于 -70 ℃ 保存备用^[12]。

4.3 实验分组及处理方法 参照参考文献[12],含药血清浓度选择依据前期研究结果。实验设 7 组:对照组(M ϕ + 培养液)、HSP60(10 μ g/mL)组、APS(200 μ g/mL)组、LIG(20 μ g/mL)组、APS(200 μ g/mL) + LIG(20 μ g/mL)组、含药血清(3%)组和辛伐他汀(15 μ g/mL)组。APS 组、LIG 组、APS + LIG 组、含药血清组和辛伐他汀组分别加入空白血清、APS、LIG、APS + LIG、3% 含药血清和辛伐他汀预处理 24 h 后,除对照组外,其余各组均加入 HSP60(10 μ g/mL)作用 1 h(测定 MAPKs 蛋白表达)、12 h(测定磷酸化 NF- κ B 蛋白表达)、24 h(测定 TNF- α 、IL-6 含量)。

4.4 Western blot 法检测磷酸化 NF- κ B、MAPKs 蛋白表达 MAPKs 包括 p38、ERK1/2 和 JNK 蛋白。按 1×10^6 个/mL 的密度将 THP-1 细胞接种于 6 孔培养板,经诱导分化、分组处理后收集细胞,以 PBS 清洗 2 次,裂解细胞提取总蛋白、定量、变性后于 -20 ℃ 保存。蛋白经电泳后转膜、封闭;与磷酸化核因子-kappa B(phospho-nuclear factor-kappa B,p-NF- κ B,1:1 000)、磷酸化胞外信号调节激酶 1/2(phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2,p-ERK1/2,1:1 000)、ERK1/2(1:1 000)、磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(phospho-c-Jun NH2-terminal kinases,p-JNK,1:1 000)、JNK(1:1 000)、磷酸化-p38(phospho-p38,p-p38,1:1 000)、p38(1:1 000)、 β -actin(1:2 000)、GAPDH(1:2 000)一抗于 4 ℃ 孵育过夜;移除一抗工作液,洗膜,将 PVDF 膜与 p-NF- κ B(1:1 000)、p-ERK(1:2 000)、ERK(1:2 000)、p-JNK(1:2 000)、JNK(1:2 000)、p38(1:2 000)、p-p38(1:2 000)、 β -actin(1:2 000)、GAPDH(1:2 000)二抗在室温下孵育 2 h;洗膜,加入显色剂,化学发光成像仪进行曝光、保存图像。用 Image J 软件测定蛋白条带灰度值,将目的蛋白与内参照 β -actin 或总蛋白灰度值的比值进行蛋白表达半定量分析。

4.5 ELISA 法测定 TNF- α 和 IL-6 含量 将 THP-1 细胞按 1×10^6 个/mL 密度接种于 24 孔细胞培养板,每孔 500 μ L,经诱导分化、分组处理后,4 ℃ 1 200 $\times$ g,5 min 离心提取细胞培养上清液,测定 TNF- α 、IL-6 的含量。具体操作步骤按 ELISA 试剂盒说明书进行。以上实验在相同条件下重复 3 次。

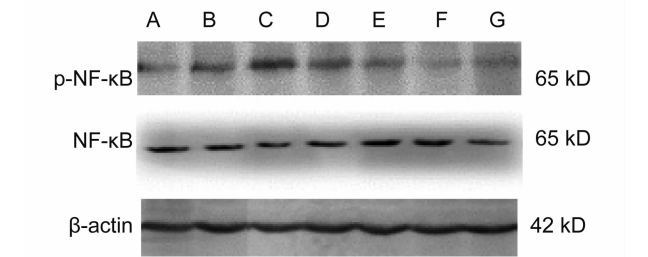
4.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件对 3 次重复实验的数据进行统计分析, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较使用单因素方差分析, 两组间比较采用 Bonferroni 法进行检验。 $P < 0.05$ 差异为有统计学意义。

结 果

1 各组 p-NF-κB 蛋白表达比较 (表 1, 图 1) 与对照组比较, HSP60 组 p-NF-κB 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与 HSP60 组比较, 各药物干预组蛋白表达均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 APS 组和 LIG 组比较, APS + LIG 组、含药血清组和辛伐他汀组蛋白表达均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 含药血清组和辛伐他汀组均较 APS + LIG 组降低更明显 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且辛伐他汀组优于含药血清组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组 p-NF-κB 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	n	p-NF-κB/β-actin
对照	3	0.340 ± 0.015 **
HSP60	3	0.868 ± 0.086
APS	3	0.649 ± 0.030 *△▲▲○
LIG	3	0.648 ± 0.022 *△▲▲▲○
APS + LIG	3	0.560 ± 0.020 **
含药血清	3	0.498 ± 0.027 *△
辛伐他汀	3	0.415 ± 0.019 **△▲▲

注: 与 HSP60 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 APS + LIG 组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与含药血清组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与辛伐他汀组比较, ○ $P < 0.01$

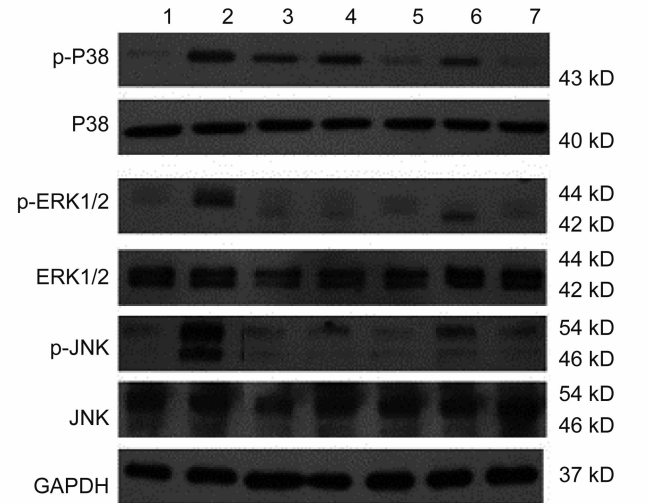


注: A 为对照组; B 为 HSP60 组; C 为 APS 组; D 为 LIG 组; E 为 APS + LIG 组; F 为含药血清组; G 为辛伐他汀组

图 1 各组 NF-κB 蛋白表达比较

2 各组 MAPKs 蛋白表达比较 (表 2, 图 2) 与对照组比较, HSP60 组 p-p38、p-JNK 及 p-ERK1/2 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$); 与 HSP60 组比较, 各药物干预组检测蛋白表达均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 APS 组和 LIG 组比较, APS + LIG 组、含药血清组和辛伐他汀组 p-p38、p-JNK 及 p-ERK1/2 蛋白表达均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 含药血清组和辛伐他汀组均较 APS + LIG 组蛋白表达降低明显 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且辛伐他汀组优于含药血清组 ($P < 0.01$)。

3 各组 TNF-α、IL-6 含量比较 (表 3) 与对照组比较, HSP60 组 TNF-α、IL-6 含量升高 ($P < 0.01$); 与 HSP60 组比较, 各药物干预组 TNF-α、IL-6 含量均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 APS 组比较, APS + LIG 组、含药血清组和辛伐他汀组 TNF-α、IL-6 含量均降低 ($P < 0.01$); 与 LIG 组比较, APS + LIG 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 含药血清组和辛伐他汀组含量均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 含药血清组和辛伐他汀组均较 APS + LIG 组降低明显 ($P < 0.05$); 含药血清组与辛伐他汀组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: 1 为对照组; 2 为 HSP60 组; 3 为 APS 组; 4 为 LIG 组; 5 为 APS + LIG 组; 6 为含药血清组; 7 为辛伐他汀组

图 2 各组 MAPKs 蛋白表达比较

表 2 各组 MAPKs 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	MAPKs 蛋白表达		
		p-p38/GAPDH	p-JNK/GAPDH	p-ERK1/2/GAPDH
对照	3	0.242 ± 0.014 **	0.334 ± 0.017 **	0.329 ± 0.007 **
HSP60	3	0.695 ± 0.011	0.828 ± 0.015	0.605 ± 0.016
APS	3	0.626 ± 0.012 **△▲▲○	0.737 ± 0.022 *△▲▲○	0.550 ± 0.012 *△▲▲○
LIG	3	0.620 ± 0.007 **△▲▲○	0.729 ± 0.027 *△▲▲○	0.548 ± 0.008 **△▲▲○
APS + LIG	3	0.582 ± 0.009 **	0.688 ± 0.010 **	0.517 ± 0.009 **
含药血清	3	0.529 ± 0.018 **△	0.587 ± 0.017 **△△	0.475 ± 0.014 **△△
辛伐他汀	3	0.450 ± 0.016 **△▲▲	0.494 ± 0.011 **△▲▲	0.412 ± 0.012 **△▲▲

注: 与 HSP60 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 APS + LIG 组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与含药血清组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与辛伐他汀组比较, ○ $P < 0.01$

表 3 各组 TNF- α 、IL-6 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α	IL-6
对照	8	6.026 $\pm$ 0.698 **	2.291 $\pm$ 0.414 **
HSP60	8	321.355 $\pm$ 22.442	236.568 $\pm$ 21.249
APS	8	293.837 $\pm$ 21.661 *	211.060 $\pm$ 21.282 *
LIG	8	271.202 $\pm$ 18.323 **	181.630 $\pm$ 13.567 **
APS + LIG	8	259.850 $\pm$ 0.028 ** Δ	170.806 $\pm$ 16.164 ** Δ
含药血清	8	248.411 $\pm$ 22.292 ** Δ Δ Δ Δ	163.633 $\pm$ 17.359 ** Δ Δ Δ Δ
辛伐他汀	8	238.341 $\pm$ 18.421 ** Δ Δ Δ Δ	152.115 $\pm$ 16.103 ** Δ Δ Δ Δ

注:与 HSP60 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 APS 组比较, $\Delta P < 0.01$;与 LIG 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 APS + LIG 组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

AS 斑块局部 HSP60 的致炎作用强烈而广泛,其可在多种细胞^[3,13]中上调 TNF- α 、IL-6 等炎症因子表达。本课题组前期工作发现,HSP60 对 THP-1 源性 M ϕ 具有致炎作用^[14,15],且呈时间和剂量依赖性,本实验进一步证实了其致炎作用,发现 10 μ g/mL HSP60 可使所检测的 TNF- α 、IL-6 含量明显升高。本研究还显示,HSP60 可促使 NF- κ B、p38、ERK1/2 和 JNK 发生磷酸化激活,这说明 HSP60 升高炎症因子含量与激活上述信号通路有关。结合本课题组前期研究,利用特异性 siRNA 沉默 MyD88 基因表达或 MyD88 抑制剂 ST2825,可抑制 HSP60 诱导的 MyD88、磷酸化蛋白 p38、JNK、ERK1/2 及 NF- κ B 表达,抑制下游炎症因子上调,进一步证实 MyD88-MAPKs/NF- κ B 是 HSP60 诱导 M ϕ 炎症反应的重要信号途径^[14]。有学者发现,HSP60 对 p38、ERK1/2 和 JNK 的激活作用具有细胞特异性,如在小鼠 M ϕ 系 RAW264.7 中,其通过激活 JNK 上调炎症因子表达,而在大鼠心肌细胞系 H9C2 中,则由 p38 通路介导炎症反应^[16]。因此,本研究未能最终确认 HSP60 通过激活 p38、ERK1/2 和 JNK 中的哪些通路发挥致炎作用,今后可使用 PD98059 等抑制 MAPKs 进一步进行探讨。

现阶段抗炎及免疫调节药物是 AS 干预的三大靶标(抗炎、抑制胆固醇合成和调节中间代谢、抗 AS 疫苗)之一,但其临床疗效仍有待进一步提高。与 AS、易损斑块密切相关的冠心病归属于中医学“胸痹”、“心痛”等范畴,多从气虚血瘀立论进行治疗^[17]。宁心痛颗粒即依据该理论组方,重用黄芪为君,其味甘、性温,入脾肺二经,为补气之要药;臣药川芎味辛、性温,善走散,兼有活血与行气双重功效,乃“血中之气药”;葛根味甘辛、性凉,升举清阳,使脾之清气上达,填充胸中宗气,与川芎相配共为臣药,川芎行气、葛根提升中气,使补而不滞;佐以毛冬青、细辛等活血通脉止痛之品。全方共奏气血并治、补通共行、标本兼顾之

功。本课题组的既往研究结果显示,其君药黄芪与臣药川芎的有效组分 APS^[18]、LIG^[12,15]单独使用均具有一定的抗炎效果。而与结构相对明确、成分较为单一的中药有效组分相比,复方中药药效成分复杂,多种成分相互协同、拮抗,其作用往往强于单一有效组分或几个有效组分的简单相加^[19]。这在本研究中也获得证实,宁心痛颗粒含药血清抑制 NF- κ B、MAPKs 蛋白磷酸化和降低炎症因子 TNF- α 、IL-6 含量的作用显著优于 APS + LIG。另一方面,复方中药制剂成分的复杂性也增加了中医药机制研究的困难。王永炎院士认为,中药及其复方研究应“明确概念、逻辑推理,建立体现自身特色的研究方法体系,在系统论指导下还原分析”^[20]。以此理论思想为指导,有学者提出中药“组分配伍”进而“分子配伍”等理念。本研究课题即借鉴以上指导思想和研究方法,对中药复方药理机制研究进行了初步的探索和尝试。

有研究显示,他汀类药物具有抗炎活性。本研究也显示,辛伐他汀预处理可明显抑制 HSP60 诱导的 M ϕ MyD88-MAPKs/NF- κ B 通路激活及其下游炎症因子升高。鉴于益气活血药物良好的抗炎效果(含药血清组与辛伐他汀组比较,TNF- α 、IL-6 含量差异无统计学意义),有必要今后对益气活血药物与辛伐他汀联合使用的抗炎效果进行观察。

综上,HSP60 通过激活 NF- κ B、MAPKs 信号通路发挥致炎作用,具有益气活血功效的宁心痛颗粒可能通过调控以上通路而发挥其抗炎效果,值得未来进一步深入研究。

利益冲突:除前文所列政府基金外,本研究成果未受其他公司赞助;本文所有作者及其配偶、子女或工作伙伴不存在影响研究结果的财务关系。

参 考 文 献

- [1] Wick G, Jakic B, Buszko M, et al. The role of heat shock proteins in atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2014, 11(9): 516 - 529.
- [2] Chen R, Gu N, Gao Y, et al. TLR4 Asp299Gly (rs4986790) polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis [J]. Peer J, 2015, 3: e1412.
- [3] Kreutmayer S, Csordas A, Kern J, et al. Chlamydia pneumoniae infection acts as an endothelial stressor with the potential to initiate the earliest heat shock protein 60-dependent inflammatory stage of atherosclerosis [J]. Cell Stress Chaperones, 2013, 18(3): 259 - 268.
- [4] Xu Q, Metzler B, Jahangiri M, et al. Molecular chaperones and heat shock proteins in atherosclerosis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,

- 2012, 302(3): H506 - H514.
- [5] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update[J]. *Physiol Rev*, 2012, 92(2): 689 - 737.
 - [6] Grundtman C, Wick G. The autoimmune concept of atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2011, 22(5): 327 - 334.
 - [7] Grundtman C, Kreutmayer SB, Almanzar G, et al. Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5): 960 - 968.
 - [8] 都基莎, 何小丽, 顾宁. 顾宁教授创宁心痛颗粒方治疗冠心病不稳定型心绞痛经验[J]. *中国中医急症*, 2013, 22(5): 745 - 746.
 - [9] 潘仁智, 吴同启, 顾宁. 宁心痛颗粒干预模型兔动脉粥样硬化易损斑块的生化指标观察[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(6): 649 - 651.
 - [10] 都基莎, 顾宁. 宁心痛颗粒对人类单核细胞株源性巨噬细胞泡沫化的影响[J]. *中医杂志*, 2015, 56(15): 1322 - 1325.
 - [11] 施新猷编著. *医用实验动物学*[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989: 482.
 - [12] 何小丽. 益气活血方通过“oxLDL - SRs - 巨噬细胞”途径影响动脉粥样硬化斑块易损性的机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
 - [13] Hao HN, Zheng B, Nasser S, et al. The roles of monocytic heat shock protein 60 and Toll-like receptors in the regional inflammation response to wear debris particles[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 92(4): 1373 - 1381.
 - [14] 高颖, 陈蕊, 顾宁, 等. 藁本内酯对重组人热休克蛋白 60 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症反应的作用及机制[J]. *中华心血管病杂志*, 2016, 44(9): 793 - 798.
 - [15] 高颖, 陈蕊, 顾宁, 等. 藁本内酯抑制 rhHSP60 诱导 THP-1 细胞炎症反应及其机理探讨[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(9): 1926 - 1930.
 - [16] 郭昕. 胞外 HSP60 上调心肌 TLR2 和 TLR4 受体表达的研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2013.
 - [17] 都基莎, 何小丽, 顾宁. 益气活血方调节 SRA、CD36 干预 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化机制[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(12): 4498 - 4502.
 - [18] 李冬方. 基于“HSP60-TLR4/MyD88 - 巨噬细胞”途径黄芪多糖干预动脉粥样硬化易损斑块机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
 - [19] 向丽. 麝香保心丸及组分配伍代谢组学研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
 - [20] 王永炎, 张启明. 中医研究应进行系统论指导下的还原分析[J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(7): 437 - 439.
- (收稿: 2016 - 11 - 23 在线: 2018 - 06 - 27)
责任编辑: 白 霞

《中国中西医结合杂志》第八届编委会名单

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 王文健 史大卓 吕爱平 肖培根 吴伟康 沈自尹 雷 燕

顾 问 王永炎 邓铁涛 吴咸中 辛育龄 张伯礼 陈香美 陈凯先 陈维养 唐由之
曹洪欣 韩济生

编辑委员

于德泉	王一涛	王卫霞	王宁生	王 伟	王 阶	王拥军(上海)	王拥军(北京)	王昌恩
王学美	王硕仁	王 舒	卞兆祥	方邦江	方敬爱	邓跃毅	叶文才	田金洲
史载祥	白彦萍	吕志平	吕维柏	朱 兵	朱明军	危北海	庄曾渊	刘干中
刘瓦利	刘 平	刘龙涛	刘 良	刘建平	刘建勋	刘保廷	刘鲁明	齐清会
阮新民	阳 晓	孙汉董	孙 燕	苏 励	杨任民	杨宇飞	杨秀伟	李乃卿
李大金	李廷谦	李军祥	李连达	李国栋	李国勤	李 恩	李 涛	李焕荣
连 方	吴大嵘	吴万垠	吴泰相	吴根诚	吴 烈	时毓民	邱 峰	张大钊
张卫东	张永贤	张永祥	张荣华	张亭栋	张俊华	张家庆	张敏州	张敏建
陆付耳	陈士奎	陈小野	花宝金	范吉平	范维琥	林志彬	林 谦	林瑞超
郁仁存	果德安	季 光	周 俊	周霭祥	郑国庆	赵一鸣	赵伟康	赵芳芳
赵健雄	胡义扬	胡晓梅	胡镜清	侯凡凡	饶向荣	洪传岳	顾振纶	栗原 博(日本)
徐凤芹	徐 浩	殷惠军	郭 军	郭 艳	郭赛珊	唐旭东	夏城东	凌昌全
黄光英	黄 熙	黄璐琦	梅之南	曹小定	高瑞兰	崔 红	麻 柔	梁挺雄
梁 春	梁晓春	梁繁荣	董竞成	董福慧	谢竹藩	谢明村	谢 恬	蔡定芳
裴正学	廖福龙	衡先培	戴瑞鸿	Yung-chi CHENG(美国)	Sheng-xing MA(美国)	Qun-hao ZHANG(美国)		

(以上名单按姓氏笔画为序)