

· 基础研究 ·

益气活血方对内毒素诱导小鼠炎症及内皮损伤的影响

王新洲¹ 高水波¹ 代丽萍² 王振涛³ 韩丽华³ 吴 鸿^{1,3}

摘要 目的 研究益气活血方对内毒素(LPS)诱导小鼠炎症及内皮损伤的干预作用。方法 50只8~12周龄雄性C57BL/6小鼠随机分为空白对照组、LPS组、益气活血方组[1.29 g/(kg·d)]、吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC,NF-κB抑制剂)组(50 mg/kg)、益气活血方[1.29 g/(kg·d)]+PDTC(50 mg/kg)组,每组10只。益气活血方组及益气活血方+PDTC组中药灌胃2周,其余组等体积生理盐水灌胃,结束后次日PDTC组及益气活血方+PDTC组腹腔注射PDTC,1h后除空白对照组外其余各组腹腔注射LPS(20 mg/kg)刺激6h。采集小鼠血清及主动脉,ELISA检测血清炎症因子TNF-α、IL-6浓度,qRT-PCR、Western Blot分别检测黏附因子VCAM-1、ICAM-1及促凝血因子PAI-1、TF的mRNA、蛋白表达水平,并用Western Blot检测NF-κB通路磷酸化水平。结果 与空白对照组比较,LPS组血清TNF-α、IL-6浓度,主动脉VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF mRNA及蛋白表达水平均升高($P<0.01$),NF-κB通路基团P65、IκB磷酸化水平亦明显升高($P<0.01$);与LPS组比较,益气活血方组、PDTC组及益气活血方+PDTC组血清TNF-α、IL-6浓度,VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF mRNA及蛋白水平,P65、IκB磷酸化水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);益气活血方+PDTC组与益气活血方组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 益气活血方通过抑制NF-κB通路活性发挥抗LPS诱导小鼠炎症及内皮损伤的作用。

关键词 益气活血方;内毒素;炎症反应;内皮损伤;核因子-κB

Effect of Yiqi Huoxue Formula on Inflammation and Endothelial Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice WANG Xin-zhou¹, GAO Shui-bo¹, DAI Li-ping², WANG Zhen-tao³, HAN Li-hua³, and WU Hong^{1,3} 1 Laboratory of Cell Imaging, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450002); 2 School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450046); 3 Institute of Cardiovascular Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450002)

ABSTRACT Objective To study the effects of Yiqi Huoxue Formula (YQHX) on inflammatory responses and endothelial injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Methods** Fifty male C57BL/6 mice (8–12 weeks old) were randomly assigned to the control group, LPS group, YQHX group (1.29 g·kg⁻¹·d⁻¹), pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC,NF-κB inhibitor) group (50 mg/kg), and YQHX (1.29 g·kg⁻¹·d⁻¹) plus PDTC (50 mg/kg) group, 10 in each group. The YQHX group and YQHX plus PDTC group were administered with YQHX for 2 weeks by gastrogavage, while the other groups were administered with equal volume of normal saline by gastrogavage. The next day after administration, PDTC group and YQHX plus PDTC group were intraperitoneally injected with PDTC for 1 h. Then, all groups except the control group were intraperitoneally injected with LPS (20 mg/kg) for another 6 h, and serums and aortas were collected, respectively. The levels of TNF-α and IL-6 in the serum were detected using ELISA. The mRNA expression levels of VCAM-1, ICAM-1, PAI-1 and TF were determined using qRT-PCR

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81473453, No. 81673800);河南省高校科技创新人才支持计划(No. 14HASTIT028);河南省科技攻关项目(No. 142102310040)

作者单位:1. 河南中医药大学细胞成像实验室(郑州 450002); 2. 河南中医药大学药学院(郑州 450046); 3. 河南中医药大学心血管病研究所(郑州 450002)

通讯作者:吴 鸿, Tel: 0371-60906297, E-mail: wuhong@hactcm.edu.cn

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200410. 226

and the protein levels of these factors as well as the phosphorylation levels of NF- κ B pathway were detected using Western Blot. **Results** The levels of TNF- α , IL-6, VCAM-1, ICAM-1, PAI-1 and TF in LPS group were higher than those in control group ($P < 0.01$), and the phosphorylation levels of P65 and I κ B were also increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the LPS group, the levels of TNF- α , IL-6, VCAM-1, ICAM-1, PAI-1, TF and NF- κ B pathway phosphorylation were decreased in YQHX group, PDTC group and YQHX plus PDTC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no significant difference among groups of PDTC and YQHX plus PDTC ($P > 0.05$). **Conclusion** YQHX suppresses the inflammatory responses and endothelial injuries induced by LPS in mice by inhibiting the activities of NF- κ B pathway.

KEYWORDS Yiqi Huoxue Formula; lipopolysaccharide; inflammatory response; endothelial injury; NF- κ B

机体局部病原菌感染可引起体内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 浓度升高, 从而活化单核、巨噬细胞, 迅速释放大量肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 等炎性因子至血液中, 形成“因子风暴”, 并进一步诱发全身系统性炎症反应^[1,2]。在高浓度 LPS、炎性因子共同作用下, 位于血管最内侧的内皮细胞被活化, 功能紊乱, 过量表达黏附因子如血管细胞间黏附因子 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、细胞间黏附因子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 及促凝血因子如纤溶酶原激活物抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、组织因子 (tissue factor, TF), 引起白细胞、血小板大量黏附和激活凝血级联反应, 形成促炎促凝的正反馈, 放大炎症反应^[3], 造成微血管凝血、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 形成加速、心肌受损等严重后果^[4,5]。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是调控机体炎症的主要通路, 其磷酸化激活在致炎因子引起的血管内皮功能紊乱中至关重要^[6]。益气活血法常用于临床防治 AS、冠心病等以内皮损伤为病理基础的心血管疾病。本课题组在前期研究中证实, 益气活血方 (黄芪、人参、赤芍、西红花) 在体外具有抗内皮细胞炎症、减少促血栓因子表达的作用, 分子机制与抑制 NF- κ B 信号通路活性有关^[7-9], 但其在体内的作用尚不清楚。该研究旨在观察益气活血方体内干预炎症反应及内皮损伤的作用。

材料与方法

1 动物 50 只 8~12 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 (25 $\pm$ 2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于河南省中医院实验动物中心 [许可证编号: SYXK (豫) 2016-0009], 动物质量合格证号: No. 11400700319066。本实验遵守国家有关实

验动物保护和使用准则, 经河南省中医院实验动物伦理委员会批准 (No. 20180315WZ)。

2 药物 益气活血方经四川新绿药科技发展有限公司配方颗粒剂配置而成, 每 2 剂 (成人一天用量) 含原药黄芪 30 g 人参 15 g 赤芍 15 g 西红花 10 g。各个单味中药批号如下: 黄芪 (No. 17010092)、人参 (No. 17010055)、赤芍 (No. 16060138)、西红花 (No. 16080067)。使用时取益气活血方颗粒剂 2 剂 (10 g), 加生理盐水 25 mL, 置 85 $^{\circ}$ C 水浴中使其充分溶解, 浓度为 0.4 g/mL, 4 $^{\circ}$ C 保存备用, 使用时于 37 $^{\circ}$ C 水浴加热, 按人与小鼠体表面积折算系数换算出灌胃剂量为 1.29 g/(kg $\cdot$ d)^[10]。

3 主要试剂及仪器 LPS (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: L2880, 加生理盐水溶解); 吡咯烷二硫代氨基甲酸酯 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: P8765, 加生理盐水溶解); 小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (杭州联科生物技术公司, 批号: 70-EK282/3-96); 小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (杭州联科生物技术公司, 批号: 70-EK206/3-96); 动物组织总 RNA 提取试剂盒 (上海生工生物公司, 批号: B518621); qRT-PCR 引物 (上海生工生物公司合成); 反转录试剂 (北京宝日医生物技术公司, 批号: RR047A); qRT-PCR 试剂 (北京宝日医生物技术公司, 批号: RR420A); BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术公司, 批号: P0010); RIPA 裂解液 (武汉博士德生物公司, 批号: AR0102); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司, 批号: IPVH00010); SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (西安晶彩生物公司, 批号: JCPE022); ECL 发光液 (美国赛默飞公司, 批号: 34580); 抗 VCAM-1 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号: ab134047); 抗 ICAM-1 抗体 (武汉三鹰生物公司, 批号: 10020-1-AP); 抗 PAI-1 抗体 (武汉三鹰生物公司, 批号: 13801-1-AP); 抗 TF 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号: sc-374441); 抗 p-P65

抗体(美国 CST 公司,批号:3033);抗 P65 抗体(美国 CST 公司,批号:3034);抗 p-I κ B 抗体(美国 CST 公司,批号:2859);抗 I κ B 抗体(美国 CST 公司,批号:4812);抗 GAPDH 抗体(武汉三鹰生物公司,批号:60004-1-Ig);酶标羊抗鼠二抗(武汉三鹰生物公司,批号:SA00001-1);酶标羊抗兔二抗(武汉三鹰生物公司,批号:SA00001-2)。主要仪器:酶标仪(美国赛默飞公司,型号 MULTISKAN FC);qRT-PCR 仪(美国赛默飞公司,型号 7500Fast);SDS-PAGE 凝胶电泳系统(美国伯乐公司,型号 Mini-PROTEAN);蛋白湿转仪(美国伯乐公司,型号 Mini Trans-Blot);Western Blot 成像系统(美国伯乐公司,型号 ChemiDoc XRS+)。

4 动物分组及干预方法 参照文献[11]中动物样本量设置,小鼠按随机数字表法分为 5 组:空白对照组、LPS 组、益气活血方组、PDTC 组、益气活血方+PDTC 组,每组 10 只。益气活血方组[1.29 g/(kg·d)]及益气活血方[1.29 g/(kg·d)]+PDTC(50 mg/kg)组中药灌胃 2 周,其余组等体积生理盐水灌胃,结束后次日 PDTC 组(50 mg/kg)及益气活血方+PDTC 组腹腔注射 PDTC,1 h 后除空白对照组外其余各组腹腔注射 LPS(20 mg/kg)刺激 6 h。LPS、PDTC 使用剂量参照文献[12]。小鼠造模后均有明显炎症反应,成功率 100%。麻醉后摘眼球取血,4℃静置 6 h,3 000 r/min 离心 10 min 抽取血清,同时用冰的生理盐水心脏灌流,剥离小鼠主动脉,迅速置于液氮中备用。

5 检测指标与方法

5.1 ELISA 检测血清 TNF- α 、IL-6 浓度 参照 ELISA 试剂盒检测方法,将梯度浓度的待检蛋白标准品溶液和按合适比例稀释的小鼠血清分别加入酶标板微孔中,同时加入稀释的一抗溶液,37℃孵育 1.5 h,洗板,加入稀释的酶标二抗溶液,37℃孵育 0.5 h,洗板后加入显色液反应 5~10 min,加入终止液,用酶标仪读取各孔在 450 nm 处吸光值。根据已知标准品孔的浓度和吸光值制作标准曲线,计算血清待检蛋白浓度。由于取材过程中小鼠部分血液样本出现溶血,可能对该部分实验结果产生影响,故去除这些样本后该部分实验重复次数 $n=6$ 。

5.2 qRT-PCR 检测主动脉 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF mRNA 表达水平 在 NCBI 中查找目的基因 mRNA 的 CCDS 区域序列,由 Primer 5.0 软件设计并合成 qPCR 引物,引物序列及扩增产物长度如下:VCAM-1F: TTGACATCTCCCCGGATCT, R: AACACAAGCGTGGATTTGGC, 166 bp;ICAM-1 F: CCACTGCCTTGCTAGAGGTG, R: GTCAGGACCGGAGCTGAAAA,

135 bp; PAI-1 F: CCGATGGGCTCGAGTATGAC, R: AGACTTGTGAAGTCGGCCAG, 283 bp; TF F: GTA-CATTCCTCACCTGCGG, R: ATTGCTCGGTGCA-CACTGTA, 225 bp; β -Actin F: AGAAGCTGTGCTATGTTGCTCTA, R: AAGGCTGGAAAAGAGCCTCAG, 153 bp。利用动物组织总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,逆转录为 cDNA,按 SYBR Green qPCR 试剂盒反应体系进行 qPCR 扩增,反应条件:94℃预变性 3 min,94℃变性 10 s,60℃退火 30 s,扩增 40 个循环,反应结束后由软件自动得出各组 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算分析。

5.3 Western Blot 检测主动脉 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF 蛋白表达水平及 NF- κ B 信号通路激活水平 各实验组称取等量的主动脉样品,加入 RIPA 裂解液后用组织匀浆仪震荡 5 min,1 2000 r/min 离心 2 min 取上清,BCA 法测定蛋白浓度。混入 loading buffer 后于沸水浴中煮 5 min,SDS-PAGE 凝胶电泳。采用湿转法将蛋白转至 PVDF 膜,5%脱脂奶室温封闭 2 h。一抗于 37℃孵育 1.5 h, PBST 洗膜后加入二抗于 37℃孵育 1 h, PBST 洗膜,置 ECL 发光液中反应 3 min,免疫印迹成像系统成像,Image J 软件分析条带灰度值。由于小鼠主动脉组织量较小,且在提取组织 RNA、蛋白时存在个别提取量较低无法用于检测的问题,故设置 qRT-PCR 实验重复次数 $n=6$,Western Blot 实验重复次数 $n=3$ 。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 对实验数据进行统计分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平比较(表 1) 与空白对照组比较,LPS 组 TNF- α 、IL-6 水平升高($P<0.01$)。与 LPS 组比较,益气活血方组、PDTC 组、益气活血方+PDTC 组 TNF- α 、IL-6 水平明显下降($P<0.01$)。

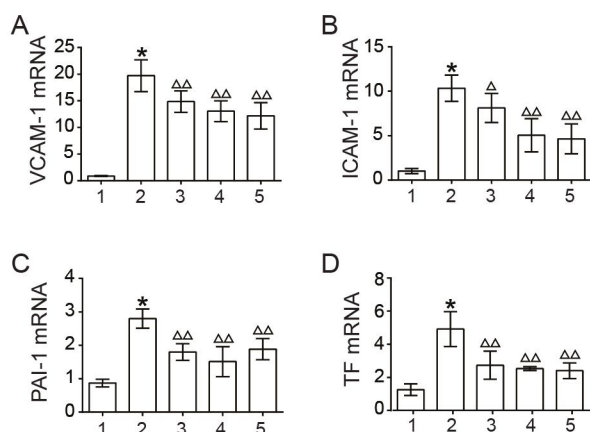
表 1 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	TNF- α	IL-6
空白对照	6	77.29 $\pm$ 5.67	7.96 $\pm$ 2.67
LPS	6	472.43 $\pm$ 70.56*	1 228.12 $\pm$ 37.48*
益气活血方	6	261.54 $\pm$ 78.21 Δ	773.50 $\pm$ 72.74 Δ
PDTC	6	225.62 $\pm$ 98.66 Δ	669.92 $\pm$ 128.92 Δ
益气活血方+PDTC	6	243.58 $\pm$ 36.33 Δ	678.54 $\pm$ 104.87 Δ

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与 LPS 组比较, $\Delta P<0.01$

益气活血方+PDTC 组与益气活血方组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2 各组小鼠主动脉 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF mRNA 表达水平比较(图 1) 与空白对照组比较, LPS 组主动脉 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF mRNA 表达水平明显升高($P<0.01$)。与 LPS 组比较,益气活血方组、PDTC 组、益气活血方+PDTC 组 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF mRNA 表达水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。益气活血方+PDTC 组 mRNA 水平较益气活血方组无叠加作用($P>0.05$)。

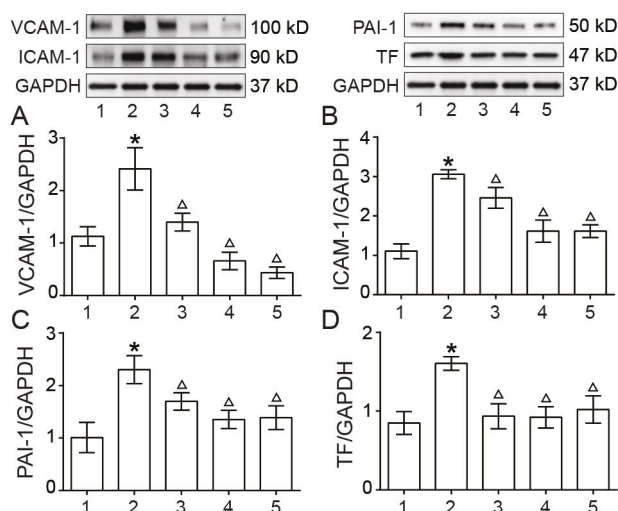


注:A 为 VCAM-1 mRNA 表达水平;B 为 ICAM-1 mRNA 表达水平;C 为 PAI-1 mRNA 表达水平;D 为 TF mRNA 表达水平;1 为空白对照组;2 为 LPS 组;3 为益气活血方组;4 为 PDTC 组;5 为益气活血方+PDTC 组;与空白对照组比较, * $P<0.01$;与 LPS 组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$; $n=6$

图 1 各组小鼠主动脉 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF mRNA 表达水平比较

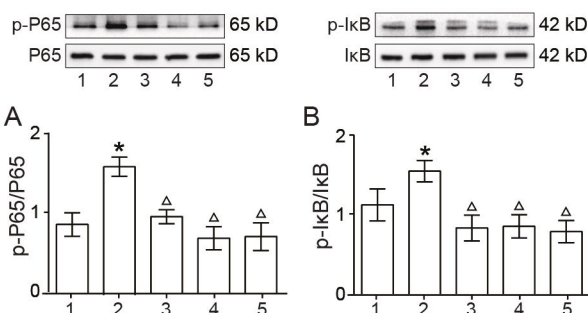
3 各组小鼠主动脉 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF 蛋白表达水平比较(图 2) 与空白对照组比较, LPS 组小鼠主动脉 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。与 LPS 组比较,益气活血方组、PDTC 组、益气活血方+PDTC 组主动脉 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。益气活血方+PDTC 组与益气活血方组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 各组小鼠血管内皮 NF- κ B 通路激活情况比较(图 3) 与空白对照组比较, LPS 组小鼠主动脉 P65、I κ B 基因磷酸化水平明显升高($P<0.01$)。与 LPS 组比较,益气活血方组、PDTC 组、益气活血方+PDTC 组 P65、I κ B 磷酸化水平明显降低($P<0.01$)。益气活血方+PDTC 组与益气活血方组 P65、I κ B 磷酸化水平比较,两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。



注:A 为 VCAM-1 蛋白表达水平;B 为 ICAM-1 蛋白表达水平;C 为 PAI-1 蛋白表达水平;D 为 TF 蛋白表达水平;1 为空白对照组;2 为 LPS 组;3 为益气活血方组;4 为 PDTC 组;5 为益气活血方+PDTC 组;与空白对照组比较, * $P<0.01$;与 LPS 组比较, Δ $P<0.01$; $n=3$

图 2 各组小鼠主动脉 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF 蛋白表达水平比较



注:A 为 P65 蛋白磷酸化水平;B 为 I κ B 蛋白磷酸化水平;1 为空白对照组;2 为 LPS 组;3 为益气活血方组;4 为 PDTC 组;5 为益气活血方+PDTC 组;与空白对照组比较, * $P<0.01$;与 LPS 组比较, Δ $P<0.01$; $n=3$

图 3 各组小鼠血管内皮 NF- κ B 通路激活情况比较

讨 论

机体炎症反应贯穿 AS、冠心病等心血管疾病的整个发生发展过程,炎症反应-内皮损伤是心血管疾病临床领域的重大关切,也是临床需要解决的重大问题之一。通过研究炎症反应及内皮损伤有利于探究该类疾病发病机制及研发治疗药物。血管内皮功能紊乱是多种心血管疾病发生发展的重要基础和起始因素,包括 AS、冠心病等疾病的最初病理特点都是血管内皮功能紊乱^[13,14]。研究表明,过度的炎症反应导致的内皮损伤不仅是靶细胞受损,更是反应的积极参与者,使炎症

进一步扩大^[15]。随着炎症反应进展,内皮细胞分泌 TNF- α 、IL-6 等多种炎性因子,同时黏附因子 VCAM-1、ICAM-1 表达量增加,进一步加重炎症反应。此外,一些促凝血因子 PAI-1、TF 表达量上升,打破血液原有的凝血动态平衡^[16]。本研究结果显示,LPS 诱导的小鼠炎症模型血清 TNF- α 、IL-6 水平明显升高,且血管内皮 VCAM-1、ICAM-1、PAI-1、TF 等基因在 mRNA、蛋白水平均明显升高。

抗炎治疗为防治 AS、冠心病提供了新的思路^[17,18],临床上广泛使用的他汀类药物亦有抗炎作用^[19]。益气活血类方药具有益气活血,化瘀通络的功效,有防治 AS 作用,在多种心血管疾病中对炎症有抑制作用^[20-22]。本课题组所用益气活血方由黄芪、人参、赤芍、西红花等四味中药组成,方中各味中药均具有抗炎或改善内皮功能之用。黄芪有效成分可抗炎、抗内皮氧化^[23],人参在治疗心血管疾病中的潜在价值包括消炎和抑制凝血^[24]。赤芍和红花具有抗凝、抗内皮细胞损伤的功效^[25,26]。体外研究显示,益气活血方可抑制 LPS、凝血酶诱导的内皮细胞炎症因子、促血栓因子表达,具有潜在的抗炎、抗凝作用^[7-9]。体内情况较体外更加复杂,益气活血方的干预作用如何呢?以往对益气活血类方药在体抗炎的研究多数集中在心肌细胞方面^[27,28],而对内皮损伤的研究较少。本研究通过腹腔注射 LPS 的方法制备小鼠炎症损伤模型,同时应用益气活血方进行干预,结果提示,益气活血方可明显抑制 LPS 诱导小鼠炎症因子 TNF- α 、IL-6 释放,减弱炎症反应程度,同时降低血管内皮黏附因子 VCAM-1、ICAM-1,促凝血因子 PAI-1、TF 表达水平,维持内皮正常生理功能。

NF- κ B 是真核细胞内重要的信号分子,具有维持机体正常生理功能的作用,与细胞炎症、细胞凋亡等密切相关^[29],参与调控 AS 的形成^[30]。作为一种转录调控因子,激活状态下的 NF- κ B 通过结合基因的启动子区域,调节多种参与炎症反应的细胞因子、黏附分子的转录过程。具体的激活机制为,静息状态下,NF- κ B 蛋白二聚体 P50/P65 与抑制蛋白 I κ B 结合成三聚体存在于胞浆中。在胞外刺激下(如病毒、炎性因子等),I κ B 发生磷酸化降解,从而 P50/P65 暴露核定位序列,同时 P65 发生磷酸化,随后二聚体进入胞核发挥其转录调节功能^[31]。内皮中重要的转录因子 krüppel 样因子 2(krüppel like factor 2, KLF2)亦受 NF- κ B 通路的调控^[32]。课题组前期研究显示,在内皮细胞中,益气活血方通过抑制 NF- κ B 通路活性和提高 KLF2 表达从而减少 LPS 诱导的促血栓因子表

达^[9]。在本研究中,通过使用 NF- κ B 通路抑制剂 PDTC 抑制 NF- κ B 活性,在体内验证了益气活血方对炎性因子 TNF- α 、IL-6,黏附因子 VCAM-1、ICAM-1,促凝血因子 PAI-1、TF 的干预作用与抑制 NF- κ B 信号通路活性相关,即 NF- κ B 信号通路是益气活血方抗 LPS 诱导小鼠炎症反应的作用靶点。

综上所述,本研究证实益气活血方在体内通过抑制 NF- κ B 信号通路活性减少由 LPS 诱导的小鼠炎症及内皮损伤。益气活血类方药在临床上用于治疗冠心病等心血管疾病取得了公认的临床效果,其作用与抗炎、保护血管内皮有关。本研究从炎症反应-内皮损伤的角度出发,利用动物实验,观察益气活血方对炎症及内皮损伤的干预作用并对其机制作初步探讨。基于临床效果,本研究在动物实验水平对益气活血方的作用进行验证,实验结果虽然不能直接进行临床转化,但是为益气活血方的临床应用提供了实验数据,有助于提升对益气活血方抗炎、保护血管内皮等临床疗效的理解。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 邢静,李玉玲,张斌,等.内毒素介导的炎症反应机制和多酚类化合物抗炎治疗的研究进展[J].中华危重症医学杂志(电子版),2016,9(4):283-288.
- [2] 张晓音,张珊珊,吴旻,等. β -胡萝卜素对脂多糖刺激巨噬细胞 RAW264.7 炎症因子的影响及其机制[J].中国免疫学杂志,2017,33(6):838-843.
- [3] 师灵灵,韩艳秋.脓毒症相关凝血-炎症生物标志物研究进展[J].医学综述,2016,22(5):873-877.
- [4] 邓思俊,张晗,郭春宝,等.脂多糖对新生小鼠肺血管内皮细胞的影响及机制探讨[J].中国细胞生物学学报,2019,41(3):431-438.
- [5] 王瑾,杨东伟,李海洲.银杏内脂 B 抑制 NF- κ B P65 磷酸化对内毒素诱导的小鼠心肌炎损伤的保护作用[J].解剖学杂志,2018,41(5):514-518.
- [6] 阎伟,侯玉芬.NF- κ B 在血管内皮细胞炎症反应中调控作用研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2009,15(1):102-104.
- [7] 吴鸿,王新洲,高水波,等.益气活血方对凝血酶诱导内皮细胞促血栓因子表达的影响[J].中医学报,2017,32(9):1683-1685.
- [8] 吴鸿,王新洲,高水波,等.益气活血方对内毒素诱导内皮细胞炎症反应的干预作用[J].中国中西医结合杂志,2019,39(2):200-205.
- [9] Wu H, Wang X, Gao S, et al. Yiqi-Huoxue Granule (YQHX) downregulates prothrombotic factors by

- modulating KLF2 and NF-kappaB in HUVECs following LPS stimulation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1–10.
- [10] 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理学实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 178–179.
- [11] 池明, 高玲, 吴巍巍, 等. 黄连素对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤和炎症的改善作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2018, 44(6): 1194–1199.
- [12] Shie PH, Huang SS, Deng JS, et al. *Spiranthes sinensis* suppresses production of pro-inflammatory mediators by down-regulating the NF-kappaB signaling pathway and up-regulating HO-1/Nrf2 anti-oxidant protein[J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(5): 969–989.
- [13] 高爽, 王臻楠, 顾耘. 血管内皮细胞功能障碍与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(20): 2966–2970.
- [14] 董霄, 邵明鑫. 冠心病与血管内皮功能的损伤[J]. *青岛医药卫生*, 2017, 49(4): 305–308.
- [15] 陈荣琳, 曹枫, 童华生, 等. 生脉注射液对脂多糖诱导大鼠炎症反应及血管内皮损伤的影响[J]. *临床急诊杂志*, 2016, 17(8): 621–624.
- [16] Li Y, Zhang X, Yang W, et al. Mechanism of the protective effects of the combined treatment with rhynchophylla total alkaloids and sinapine thiocyanate against a prothrombotic state caused by vascular endothelial cell inflammatory damage[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6): 3081–3088.
- [17] Fredman G, Tabas I. Boosting inflammation resolution in atherosclerosis: the next frontier for therapy[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(6): 1211–1221.
- [18] Li B, Li W, Li X, et al. Inflammation: A novel therapeutic target/direction in atherosclerosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(8): 1216–1227.
- [19] 宋鑫. 他汀类药物在心血管疾病中抗炎作用的研究进展[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(30): 5929.
- [20] 郑海波. 益气活血通脉汤治疗冠心病不稳定型心绞痛疗效观察及对血清炎症因子水平的影响[J]. *新中医*, 2018, 50(9): 49–51.
- [21] 李亚南, 刘小勇, 宋兆华. 益气活血通脉汤对糖尿病动脉硬化闭塞症患者炎症细胞因子及内皮功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(10): 193–199.
- [22] Wu XL, Zheng B, Jin L S, et al. Chinese medicine Tongxinluo reduces atherosclerotic lesion by attenuating oxidative stress and inflammation in microvascular endothelial cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6323–6333.
- [23] Xu C, Tang F, Lu M, et al. Pretreatment with Astragaloside IV protects human umbilical vein endothelial cells from hydrogen peroxide induced oxidative stress and cell dysfunction via inhibiting eNOS uncoupling and NADPH oxidase-ROS-NF-kappaB pathway[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(11): 1132–1140.
- [24] Kim JH. Pharmacological and medical applications of Panax ginseng and ginsenosides: a review for use in cardiovascular diseases[J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(3): 264–269.
- [25] Wang MM, Xue M, Xu YG, et al. Panax notoginseng saponin is superior to aspirin in inhibiting platelet adhesion to injured endothelial cells through COX pathway *in vitro*[J]. *Thromb Res*, 2016, 141: 146–152.
- [26] Ye F, Wang J, Meng W, et al. Proteomic investigation of effects of hydroxysafflor yellow A in oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial injury[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17981.
- [27] 唐胜, 沈建峰, 谢玉华, 等. 自拟益气活血方治疗冠心病慢性心力衰竭临床效果及对炎症因子水平的影响[J]. *河北中医药学报*, 2018, 33(1): 11–14.
- [28] 蔡常青, 方雪花. 益气活血汤辅助治疗冠心病心绞痛的疗效及对血脂、炎症因子水平的影响[J]. *慢性病学杂志*, 2017, 18(5): 562–564.
- [29] Panday A, Inda ME, Bagam P, et al. Transcription factor NF-κB: An update on intervention strategies[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2016, 64(6): 463–483.
- [30] 郑学忠, 万怡轩, 王清岑, 等. NF-κB 信号通路在动脉粥样硬化中的作用及机制研究进展[J]. *西南国防医药*, 2018, 28(3): 285–287.
- [31] Brown JD, Lin CY, Duan Q, et al. NF-κB directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis[J]. *Molecular Cell*, 2014, 56(2): 219–231.
- [32] Kumar A, Lin Z, Senbanerjee S, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated reduction of KLF2 is due to inhibition of MEF2 by NF-kappaB and histone deacetylases[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(14): 5893–5903.

(收稿: 2019-06-19 在线: 2020-06-28)

责任编辑: 白霞