

· 基础研究 ·

马来酸依那普利叶酸片联合通心络对蛋氨酸诱导大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的影响

黄剑锋¹ 肖善花¹ 黄绍烈¹ 段勇² 胡永辉³ 左汉恒⁴ 巢胜吾⁵ 陈可冀⁶ 吴以岭⁷
贾振华⁸ 聂志华⁹ 袁丽霞¹⁰ 赵宇¹¹ 江小杰¹²

摘要 目的 探讨马来酸依那普利叶酸片联合通心络对蛋氨酸诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的影响。方法 通过蛋氨酸诱导大鼠主动脉平滑肌细胞增殖,采用马来酸依那普利叶酸片和通心络单独或者联合孵育细胞。实验随机分为对照组、蛋氨酸颗粒组、蛋氨酸颗粒加马来酸依那普利叶酸片组(简称 EFA 组)、蛋氨酸颗粒加通心络组(简称 TXL 组)及蛋氨酸颗粒加马来酸依那普利叶酸片加通心络组(简称 EFA+TXL 组);通过 MTT 实验探索蛋氨酸颗粒、马来酸依那普利叶酸片和通心络的最佳浓度。采用 Western Blot 和 RT-qPCR 检测葡萄糖调节蛋白 94 (GRP94)、半胱氨酸门冬氨酸特异性蛋白激酶 12 (Caspase-12) 和葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 蛋白和 mRNA 表达,免疫荧光检测 GRP94 和 Caspase-12 表达。结果 MTT 结果显示:蛋氨酸颗粒最佳浓度为 3.2 mmol/L,马来酸依那普利叶酸片和通心络最佳浓度分别选择 10 μg/mL 和 10 μg/mL。与对照组比较,蛋氨酸颗粒组 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 蛋白和 mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$);与蛋氨酸颗粒组比较,EFA 组、TXL 组、EFA+TXL 组 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 蛋白和 mRNA 表达明显下降 ($P<0.05$);与 EFA 组和 TXL 组比较,EFA+TXL 组中 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 蛋白表达明显下降 ($P<0.05$),GRP78 mRNA 水平明显下降 ($P<0.05$)。结论 蛋氨酸可能通过内质网应激 (ERS) 途径参与并加重高血压引起的血管平滑肌重构的过程;马来酸依那普利叶酸片和通心络处理后能够通过抑制 ERS 保护血管平滑肌细胞,且联合作用效果更明显。

关键词 马来酸依那普利叶酸片;通心络;同型半胱氨酸;主动脉平滑肌细胞

Effect of Enalapril Maleate and Folic Acid Tablets Combined with Tongxinluo on the Proliferation of Aortic Smooth Muscle Cells in Rats Induced by Methionine HUANG Jian-feng¹, XIAO Shan-hua¹, HUANG Shao-lie¹, DUAN Yong², HU Yong-hui³, ZUO Han-heng⁴, CHAO Sheng-wu⁵, CHEN Ke-ji⁶, WU Yi-ling⁷, JIA Zhen-hua⁸, NIE Zhi-hua⁹, YUAN Li-xia¹⁰, ZHAO Yu¹¹, and JIANG Xiao-jie¹² 1 Department of Ultrasonic Diagnosis, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang (330006); 2 Department of Cardiovascular Medicine, The Third Hospital of Changsha, Changsha (410000); 3 Department of Cardiovascular Medicine, Tai'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong (271000); 4 Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Shandong (272000); 5 Department of Cardiovascular Medicine, Shanghai People's Liberation Army 455 Hospital, Shanghai (200052); 6 National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical

基金项目:江西省科技厅重点项目(No. S2017YBYFE0196)

作者单位:1. 南昌大学第一附属医院超声诊断科(南昌 330006); 2. 湖南长沙市第三医院心血管内科(长沙 410000); 3. 泰安市中心医院心血管内科(山东 271000); 4. 山东济宁医学院附属医院心血管内科(山东 272000); 5. 上海市解放军 455 医院心血管内科(上海 200052); 6. 国家中医心血管病临床医学研究中心,中国中医科学院西苑医院(北京 100091); 7. 河北省中西医结合医药研究院心血管内科(石家庄 050000); 8. 河北以岭医院心血管内科(石家庄 050000); 9. 厦门市海沧医院心血管内科(福建 361000); 10. 郑州市心血管病医院心血管内科(郑州 450000); 11. 南昌大学第四附属医院心血管内科(南昌 330006); 12. 南昌市第三医院心血管内科(南昌 330006)

通讯作者:肖善花, Tel: 0791-88692918, E-mail: 417915025@qq.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20211219.228

Sciences, Beijing (100091); 7 Department of Cardiovascular Medicine, Hebei Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shijiazhuang (050000); 8 Department of Cardiovascular Medicine, Hebei Yiling Hospital Shijiazhuang (050000); 9 Department of Cardiovascular Medicine, Xiamen Haicang Hospital Department, Fujian (361000); 10 Department of Cardiovascular Medicine, Zhengzhou Cardiovascular Hospital, Zhengzhou (450000); 11 Department of Cardiovascular Medicine, The Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang (330006); 12 Department of Cardiovascular Medicine, Nanchang Third Hospital, Nanchang (330006)

ABSTRACT Objective To explore the effect of enalaprilat maleate and folic acid tablets Combined with Tongxinluo on methionine-induced proliferation of aortic smooth muscle cells in rats. **Methods** The proliferation of rat aortic smooth muscle cells was induced by the methionine and the cells were incubated with enalapril maleate and folate tablets and Tongxinluo alone or in combination. The cells were assigned to control group, methionine Granule group, methionine Granule + enalapril maleate and folic acid tablet group (EFA group), methionine Granule + Tongxinluo group (TXL group) and methionine Granule plus enalapril maleate and folic acid tablet + Tongxinluo group (EFA+TXL group). The optimum concentrations of methionine granules, enalapril maleate and folic acid tablets and Tongxinluo were determined by MTT assay. The protein and mRNA levels of glucose regulatory protein 94 (GRP94), Caspase-12 and GRP78 (GRP78) were measured by Western Blot and RT-qPCR. The expressions of GRP94 and Caspase-12 were detected by immunofluorescence assay. **Results** MTT results showed that the optimal concentration of methionine granules, enalapril maleate and folic acid tablets and Tongxinluo were 3.2 mmol/L, 0 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Compared with the control group, the protein and mRNA expressions levels of GRP94, Caspase-12 and GRP78 were significantly increased in the methionine granule group ($P < 0.05$). Compared with methionine granule group, the protein and mRNA expressions levels of GRP94, Caspase-12 and GRP78 were significantly decreased in the EFA group, TXL group and EFA+TXL group ($P < 0.05$). Compared with the EFA group and the TXL group, the expression of GRP94, Caspase-12 and GRP78 protein in the EFA+TXL group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Methionine may participate in and aggravate the process of vascular smooth muscle remodeling through endoplasmic reticulum stress (ERS) pathway; the treatment of enalapril maleate and folate Tablets or Tongxinluo could protect vascular smooth muscle cells by inhibiting ERS, and the combination of both is more promising.

KEYWORDS enalapril maleate and folate tablets; Tongxinluo; homocysteine; aortic smooth muscle cells

高血压病具有病发率、致残率、病死率均较高的特点^[1]。研究证实内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 可能是同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 所致的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 过度增殖的重要机制^[2-5]。在 ERS 初期, 细胞通过增加帮助蛋白质折叠的分子伴侣如葡萄糖调节蛋白 94 (glucose regulatory protein 94, GRP94)、GRP78 等方式, 减少蛋白质合成, 促进蛋白质降解, 缓解内质网压力^[6], 从而起到保护细胞、稳定细胞的作用^[7]。马来酸依那普利叶酸片能有效地控制伴 H 型高血压急性脑梗死患者的血浆 Hcy 及血压水平, 改善脑梗死的预后^[8]。通心络是基于中医络病学说制定的通络干预代表方剂^[9], 而且近二十年以来, 通心络临床广泛运用于心脑血管疾病, 包括心绞痛、动脉粥样硬化、高血压病和脑梗死等^[10]。通心络和马来

酸依那普利叶酸片都能通过降低血压保护血管内皮系统, 改善肾素-血管紧张素系统异常^[11, 12]。临床常用马来酸依那普利叶酸片联合通心络治疗 H 型高血压, 效果好但缺少总结或机制不明, 所以为了探讨马来酸依那普利叶酸片和通心络的联合作用, 故本研究通过蛋氨酸作用于细胞后给予马来酸依那普利叶酸片和通心络单独干预或联合干预, 了解马来酸依那普利叶酸片和通心络对大鼠主动脉平滑肌细胞单独或联合干预效果及机制。

材料与方法

1 细胞 大鼠主动脉平滑肌细胞购于上海酶联 (批号: C623-5)。

2 药物 DL-蛋氨酸 (批号: CP29181013, 张家港市曙光生物制品厂); 马来酸依那普利叶酸片 (10.8 mg, 其中马来酸依那普利 10 mg/ 叶酸

0.8 mg/片, 批号: 20180701, 中国深圳奥萨制药有限公司); 通心络 (0.26 g/粒, 石家庄以岭药业股份有限公司, 批号: S-160901)。

3 主要试剂与仪器 RPMI-1640 培养基 (批号: 20, 191116, 凯基生物); 辣根酶标记山羊抗鼠 IgG (H+L) (批号: 137699)、Mouse Monoclonal Anti-GAPDH (批号: 19F00000412)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (批号: 139931) 均购自中国北京中杉金桥; Rabbit Polyclonal Anti-caspase-12 (批号: GR-1948245-21)、Rabbit Polyclonal Anti-GRP78 BIP (批号: GR183548-35)、Mouse Monoclonal Anti-GRP94 (批号: GR-192321-45) 均购自美国 Abcam; 大鼠 Hcy 试剂盒 (MM-0293R1, 中国江苏酶免); 蛋白垂直电泳仪 (DYY-6C, 北京市六一仪器厂); 多功能酶标仪 (S/N502000011, TECAN 美国); 荧光显微镜 (CKX53, OLYMPUS 日本) 超高灵敏度化学发光成像系统 [Chemi Doc™ XRS+, 伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司美国]。

4 MTT 实验筛选蛋氨酸颗粒、马来酸依那普利叶酸片和通心络浓度 细胞传代至 2~3 代, 将细胞重悬、消化, 计数, 铺至 96 孔板中, 细胞数量约为 6×10^3 个/孔, 密度为 70%; 待细胞贴壁后, 配制液通过母液进行稀释, 加入配制好的蛋氨酸 (配置液浓度为 268 mmol/L 浓度梯度为 0、0.4、0.8、1.2、1.6、3.2 mmol/L)、马来酸依那普利叶酸片 (配置液浓度为 4 mg/mL, 浓度梯度为 0、10、20、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、通心络 (配置液浓度为 10 mg/mL, 浓度梯度为 0、10、30、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 24 h, 将待测的 96 孔板细胞换成相同的培养基, 每孔 100 μL ; 每孔加入 10 μL MTT 试剂, 置于培养箱中孵育 2 h; 酶标仪在 450 nm 波长处检测每孔的吸光值。细胞培养板的规格: MTT 为 96 孔板, 免疫荧光为 24 孔板。给药体积根据不同培养板进行稀释。

5 实验分组 实验分为对照组: 正常培养细胞; 蛋氨酸颗粒组: 加入蛋氨酸颗粒浓度为 3.2 mmol/L; 蛋氨酸颗粒加马来酸依那普利叶酸片组 (简称 EFA 组): 加入蛋氨酸颗粒浓度为 3.2 mmol/L 作用 12 h 后再加入浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 马来酸依那普利叶酸片; 蛋氨酸颗粒加通心络组 (简称 TXL): 加入蛋氨酸颗粒浓度为 3.2 mmol/L 作用 12 h 后再加入浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 通心络; 蛋氨酸颗粒加马来酸依那普利叶酸片加通心络组 (简称 EFA+TXL 组): 加入蛋氨酸颗粒浓度为 3.2 mmol/L 作用 12 h 后再加入浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 通心络 (通心络的配制方法: PBS 缓冲液溶解通心

络, 放在漩涡仪混匀, 经 0.22 μm 滤头过滤, 配制好的通心络浓液放冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 根据实验所需最佳作用浓度, 加入细胞培养基) 和浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 马来酸依那普利叶酸片 (马来酸依那普利叶酸片的配置方法: PBS 缓冲液溶解马来酸依那普利叶酸片, 放在漩涡仪混匀, 经 0.22 μm 滤头过滤, 配制好的通心络浓液放冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 根据实验所需最佳作用浓度, 加入细胞培养基); 加入蛋氨酸颗粒浓度为 3.2 mmol/L 作用 12 h 后再加入浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 通心络和浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 马来酸依那普利叶酸片, 再作用 12 h 后进行相关检测。细胞培养皿的规格为: 7 cm 培养皿, 加液量为 6 mL。蛋氨酸、马来酸依那普利叶酸片和通心络的加入体积依次为 71.60、15、6 μL 。

6 Western Blot 检测 GPR94、Caspase-12 和 GPR78 蛋白表达 取各组样本加入相应的裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 30 min, 在 10 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清液, 即得总蛋白。利用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定。蛋白变性、上样、电泳 1~2 h, 湿法转膜 30~50 min。用 3% 的脱脂牛奶封闭液, 室温封闭 1 h。配置 1 抗稀释液 (GPR94: 1 : 5 000 稀释、Caspase-12: 1 : 1 000 稀释和 GPR78: 1 : 1 000 稀释), 将 PVDF 膜孵育一抗过夜。洗膜, 用 1 \times TBST 浸泡 10 min 后弃掉 1 \times TBST, 重复 3 次。配置 2 抗稀释液 (1 : 2 000 稀释), 将 PVDF 膜孵育二抗 2 h。洗膜, 用 1 \times TBST 浸泡 10 min 后弃掉 1 \times TBST, 重复 3 次。用发光液浸湿 PVDF 膜后放置于超高灵敏度化学发光成像系统样品放置区运行程序显影成像。用 "Quantity one" 软件分析各抗体条带灰度值。

7 RT-PCR 法检测 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 mRNA 表达 用 Trizol 提取细胞总 RNA 及进行纯度测定, 然后逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 在荧光定量 PCR 仪上进行检测, 以 GAPDH 为内参, 计算 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 表达情况。引物序列如下: GRP94: 上游 5' -CTGGAAATGAGGAGTTGACG -3', 下游 5' -CTGGAAATGAGGAGTTGACG-3'; GRP78: 上游 5' -GGTGACCTGGTTCTGCTTG-3', 下游 5' -TGTTACGGTGGGCTGATTAT-3'; Caspase-12: 上游 5' -TGAGCAAAGCTGAGAACCCTG-3', 下游 5' -CACTCCAACATTTACCTCCATT-3'; GAPDH: 上游 5' -GCAAGTTC AACGGCACAG-3', 下游 5' -CGCCAGTAGACTCCACGAC-3'。各基因产物大小分别是 285、153 和 218 bp。Ct 值通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

进行计算。

8 免疫荧光检测 GRP94 和 Caspase-12 表达首先在培养板中将已爬好细胞的培养皿用 PBS 浸洗 3 次, 每次 3 min; 再用 4% 的多聚甲醛固定 15 min, PBS 浸洗培养皿 3 次, 每次 3 min; 打孔: 0.5% Triton X-100 (PBS 配制) 室温通透 20 min。PBS 浸洗培养皿 3 次, 每次 5 min, 移液枪吸干 PBS, 培养皿内滴加 5% BSA, 37 °C 封闭 30 min。用移液枪吸掉封闭液, 不洗, 培养皿内滴加足够剂量稀释好的一抗 GRP94 (1 : 100), Caspase-12 (1 : 200), 4 °C 孵育过夜。PBS 浸洗培养皿 3 次, 每次 3 min, 移液枪吸干培养皿内多余液体后滴加稀释好的荧光二抗 FITC (1 : 100), 37 °C 孵育 30 min, PBS 浸洗培养皿 3 次, 每次 3 min; 注意: 从加荧光二抗起, 之后的所有操作步骤都尽量在暗处进行。复染核: 滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 对本标本进行染核, 用 PBS 冲洗多余的 DAPI; 封片: 用 50% 甘油封闭培养皿, 然后在荧光显微镜下观察采集的图像。

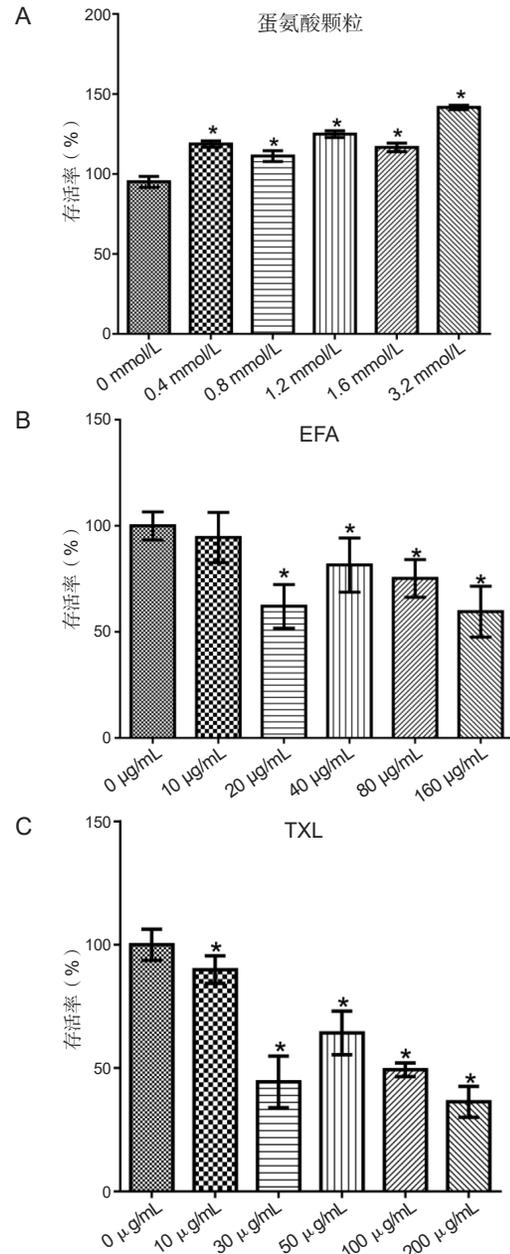
9 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 19.0 进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间定量数值比较采用独立样本 *T* 检验, 多组之间定量数值比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *LSD* 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 蛋氨酸颗粒、马来酸依那普利叶酸片和通心络浓度的筛选 (图 1) 蛋氨酸颗粒选择促进细胞增殖的浓度, 因此选择浓度为 3.2 mmol/L; 马来酸依那普利叶酸片和通心络浓度选择对细胞影响很小的浓度, 因此马来酸依那普利叶酸片和通心络浓度分别选择 10 μg/mL 和 10 μg/mL。

2 各组细胞 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 蛋白表达比较 (表 1) 与对照组比较, 蛋氨酸颗粒组 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与蛋氨酸颗粒组比较, EFA 组和 TXL 组和 EFA+TXL 组的细胞 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$); 分别与 EFA 组、TXL 组比较, EFA+TXL 组 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。

3 各组细胞 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 mRNA 表达比较 (表 2, 图 2) 与对照组比较, 蛋氨酸颗粒组 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$); 与蛋氨酸颗粒组比较, EFA 组、TXL 组和 EFA+TXL 组的细胞 GRP94、Caspase-12



注: A 为蛋氨酸; B 为马来酸依那普利叶酸片; C 为通心络; 与对照组比较, * $P < 0.05$; $n = 5$

图 1 蛋氨酸颗粒、马来酸依那普利叶酸片和通心络浓度的筛选

表 1 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	GRP94	Caspase-12	GRP78
对照	3	0.40 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.37 ± 0.01
蛋氨酸颗粒	3	1.26 ± 0.07*	1.26 ± 0.04*	1.17 ± 0.02*
EFA	3	0.86 ± 0.03 [△]	0.97 ± 0.04 [△]	0.82 ± 0.06 [△]
TXL	3	0.75 ± 0.01 [△]	0.86 ± 0.03 [△]	0.78 ± 0.03 [△]
EFA+TXL	3	0.57 ± 0.01 ^{△▲○}	0.55 ± 0.02 ^{△▲○}	0.54 ± 0.01 ^{△▲○}

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与蛋氨酸颗粒组比较, [△] $P < 0.05$; 与 EFA 组比较, [▲] $P < 0.05$; 与 TXL 组比较, [○] $P < 0.05$

和 GRP78 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 EFA 组比较, EFA+TXL 组 Caspase-12、GRP78

表 2 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GRP94	Caspase-12	GRP78
对照	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
蛋氨酸颗粒	3	2.94 ± 0.30*	6.13 ± 1.39*	4.23 ± 0.70*
EFA	3	1.70 ± 0.07 [△]	4.12 ± 0.94 [△]	2.58 ± 0.17 [△]
TXL	3	1.60 ± 0.17 [△]	3.43 ± 0.37 [△]	2.37 ± 0.36 [△]
EFA+TXL	3	1.24 ± 0.07 [△]	3.20 ± 0.22 ^{△▲}	1.70 ± 0.06 ^{△▲○}

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与蛋氨酸颗粒组比较，[△] $P < 0.05$ ；与 EFA 组比较，[▲] $P < 0.05$ ；与 TXL 组比较，[○] $P < 0.05$

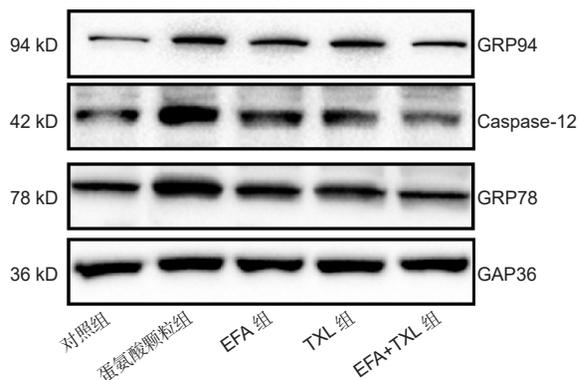


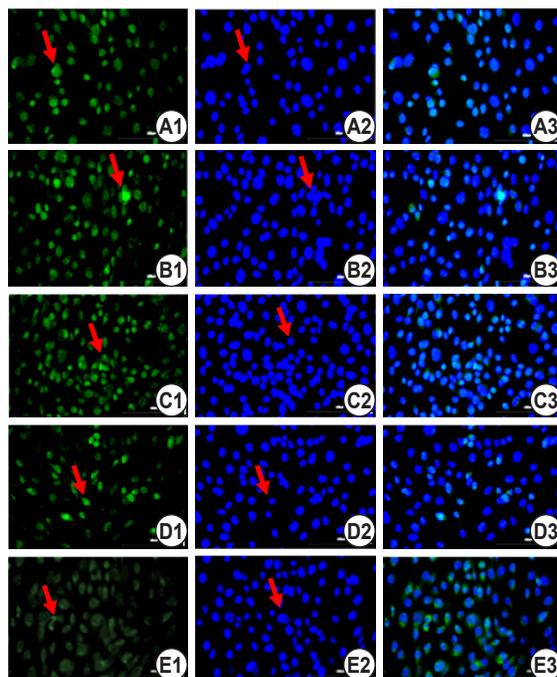
图 2 各组细胞 GRP94、Caspase-12 和 GRP78 蛋白表达

mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$)；与 TXL 组比较，EFA+TXL 组 GRP78 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$)。

4 免疫荧光检测各组 GRP94 和 Caspase-12 表达结果 (图 3、4) 绿色荧光代表目的蛋白 GRP94 或 Caspase-12，蓝色荧光代表细胞核，与对照组比较，蛋氨酸颗粒组 GRP94 和 Caspase-12 表达明显升高；与蛋氨酸颗粒组比较，EFA 组、TXL 组细胞 GRP94 和 Caspase-12 表达明显下降；与 EFA 和 TXL 组比较，EFA+TXL 组 GRP94 和 Caspase-12 表达明显下降。

讨 论

Hcy 是人体内含硫氨基酸，是蛋氨酸和半胱氨酸的中间代谢产物，人体获取 Hcy 的唯一途径是摄入含有蛋氨酸的食物，而动物体内含有较高的蛋氨酸，人体内 Hcy 是蛋氨酸脱甲基后的产物，蛋氨酸是重要的“一碳单位”供体，蛋氨酸在 S-腺苷蛋氨酸合成酶催化下与三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 结合生成 S-腺苷蛋氨酸 (S-Adenosyl methionine, SAM)，SAM 在供出甲基后，水解生成 Hcy 和腺苷，高 Hcy 水平被证实是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的独立危险因素，AS 的发病机制极其复杂，近年来随着研究的深入，发现 VSMC 的增殖和迁移涉及 AS 进展的所有阶



注：A 为对照组；B 为蛋氨酸颗粒；C 为 EFA 组；D 为 TXL 组；E 为 EFA+TXL 组；1 代表目的蛋白；2 代表 DAPI；3 代表 Merge；箭头所指为目的的颜色；图 4 同

图 3 免疫荧光检测各组 Caspase-12 表达结果

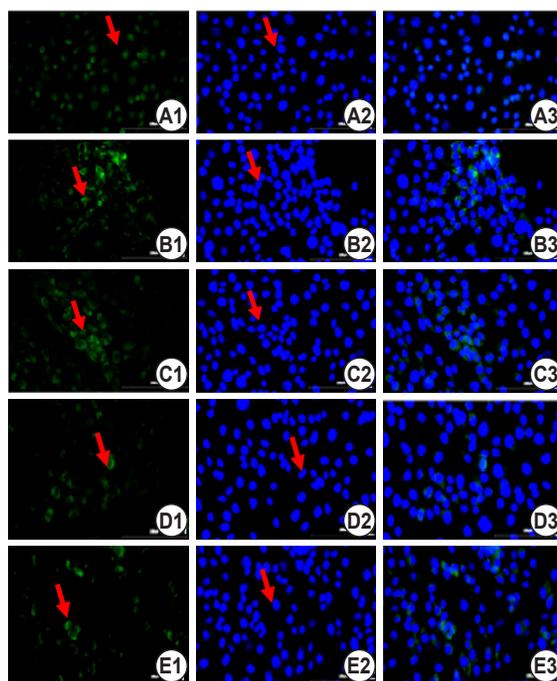


图 4 免疫荧光检测各组 GRP94 表达结果

段^[2, 13, 14]。所以本研究通过蛋氨酸处理 VSMC 细胞诱导其 ERS 过程，探究马来酸依那普利叶酸片和通心络联合作用对 ERS 过程的抑制效果。

内质网是加工蛋白质的主要细胞器，各种应激原可通过诱发内质网腔中未折叠或错误折叠蛋白质堆积而激活未折叠蛋白反应及细胞凋亡信号通路^[3]。在高

血压初期, 可以引起血管平滑肌细胞 ERS, 使内质网应急相关因子 GRP94 和 Caspase-12 等的表达增加, 致使内质网的内稳态失去平衡, 血管平滑肌细胞肥大凋亡, 血管壁增厚, 引起动脉血管重构。ERS 途径是新近发现的一条凋亡信号通路, 研究发现其参与了多种病理和生理过程, 可使血管动脉平滑肌细胞中 ER 分子伴侣 GRP94、GRP78 等上调, 促进未折叠或错误折叠的蛋白降解, 从而达到缓解内质网压力。长时间的以及过度 ERS, 促凋亡因子 Caspase-12 过度表达, 致细胞代谢紊乱, 细胞凋亡^[15-17]。马来酸依那普利是血管紧张素转化酶抑制剂, 有良好降压作用; 叶酸能促进 Hcy 甲基化, 降低 Hcy^[5]。本实验的蛋氨酸颗粒加马来酸依那普利叶酸片组与蛋氨酸颗粒组比较, GRP94、GRP78 和 Caspase-12 表达降低, 表明马来酸依那普利叶酸片通过抑制 VSMC 细胞的 ERS 途径来逆转血管重构, 保护 VSMC。

近年来有研究证明通心络具有降 Hcy、降脂、抗炎、抗凝、抗血小板形成、抗氧化、抑制斑块炎症因子、组织因子、起到稳定斑块的作用^[17, 18]。通心络主要由人参、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕所组成, 其功能为益气活血、通络止痛^[19]。有研究表明, 在猪冠脉结扎前给予通心络能有效保护心脏微血管内皮屏障, 血清内皮素 1 (endothelin1, ET-1) 存在各种组织和细胞中, 调节心血管功能, 内皮细胞释放 ET-1 通过旁分泌作用在血管 VSMC 内皮素受体 A 上引起强烈而持久的血管收缩, 通心络能有效降低 ET-1 水平, 从而有效保护血管内皮屏障^[20-24]。李必强等^[25]实验研究结果显示, 自发性高血压大鼠 (SHR) 经通心络治疗后, 主动脉血管平滑肌诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) mRNA 表达增强, 同时检测血浆一氧化氮 (nitric oxide, NO) 浓度升高, 提示通心络复方制剂中某些有效成分可以影响 SHR 血管平滑肌 NO/NOS 系统诱导 iNOS 基因转录, 增加 NO 的合成, 对主动脉血管平滑肌细胞的肥大增殖有抑制作用。马来酸依那普利叶酸片为马来酸依那普利和叶酸的复方制剂, 既可以降压, 又可以降低 Hcy, 通心络和马来酸依那普利叶酸片合用对降低血压, 对保护血管内皮系统, 改善肾素-血管紧张素系统异常, 抑制血管平滑肌细胞的肥大增殖起有合力作用。本研究通过细胞实验结果显示: GRP94、GRP78 和 Caspase-12 记录到蛋氨酸颗粒组与对照组比较表达明显升高 ($P < 0.05$)。免疫荧光检测各组 GRP94 和 Caspase-12 表达结果表明: GRP94 和 Caspase-12 记录到蛋氨酸颗粒组与对照组比较表达

升高。

本文研究结果表明: 马来酸依那普利叶酸片和通心络可以缓解 ERS, 保护血管、降低血压; 马来酸依那普利叶酸片和通心络联合应用, 对于缓解平滑肌重构起到了降低 Hcy 和高血压的双重作用。对于治疗 H 型高血压、AS 有着重要意义。但是在本研究中马来酸依那普利叶酸片和通心络对血管平滑肌的功能影响无进一步的探究, 且仅在细胞当中验证了马来酸依那普利叶酸片和通心络对血管保护的作用, 结果不够充分, 下一步会利用动物模型深入探究马来酸依那普利叶酸片和通心络的作用机制。

利益冲突: 本研究无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等.《中国心血管病报告 2017》概要 [J]. 中国循环杂志, 2018, 33 (1): 1-8.
- [2] 李玉霞, 商瑀家, 宋佳新, 等. 血管平滑肌细胞表型转换与动脉粥样硬化关系的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2021, 50 (2): 17-19, 27.
- [3] 李炜, 赵连友, 槐勇, 等. 拉西地平对高血压大鼠血管平滑肌细胞 CRT 和 caspase-12 表达变化的影响 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4 (3): 250-253, 257.
- [4] 付强, 张妍, 沈晓君, 等. 丹参酮 II A 对血管平滑肌细胞内质网应激相关基因表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (14): 280-283.
- [5] 卢凡, 赵连友, 张志敏, 等. 马来酸依那普利对 H 型高血压大鼠血管平滑肌细胞 GRP94 和 caspase-12 的表达影响 [J]. 解放军医药杂志, 2014, 26 (3): 85-88, 98.
- [6] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8 (7): 519-529.
- [7] Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications [J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26 (8): 504-510.
- [8] 王清, 吴松笛, 职瑾, 等. 马来酸依那普利叶酸片治疗伴 H 型高血压急性脑梗死患者临床疗效 [J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14 (3): 143-144.
- [9] Zhou B, Yong L, Li Q, et al. GW24-e0762 effects of Tongxinluo and homocysteine on proliferation of human umbilical vein endothelial cells [J]. Heart, 2013, 99 (Suppl 3): A82-A82.
- [10] Zhou B, Lin LY, Yong L, et al. GW25-e4467 Effects

- of Tongxinluo on vascular stenosis and TGF- β 1 after balloon injury of rabbit iliac artery[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64 (16): C90-C90.
- [11] 袁婧玮, 赵广阳, 郭丽. 依那普利叶酸片对 H 型高血压伴左心室肥厚患者心脏重构的影响 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2020, 29 (3): 3.
- [12] 葛华, 赵英莉, 王璇, 等. 通心络对高血压大鼠血管内皮功能的保护作用 [J]. *心脏杂志*, 2006, 18 (5): 550-552.
- [13] 张志岗, 孙宇飞, 范国权. miR-149-5p 对 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移的研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37 (8): 981-984.
- [14] 王桂娟. miR-20a 过表达促进 VEGF 表达及血管平滑肌细胞活性和迁移 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13 (2): 320-324.
- [15] Dai YJ, Qiu YB, Jiang R, et al. Concomitant high expression of ER α 36, GRP78 and GRP94 is associated with aggressive papillary thyroid cancer behavior[J]. *Cell Oncol*, 2018, 41 (3): 269-282.
- [16] Song J, Zhang Q, Wang S, et al. Cleavage of caspase-12 at Asp94, mediated by endoplasmic reticulum stress (ERS), contributes to stretch-induced apoptosis of myoblasts[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233 (12): 9473-9487.
- [17] Lin F, Liao C, Sun Y, et al. Hydrogen sulfide inhibits cigarette smoke-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in bronchial epithelial cells[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 675-679.
- [18] 常丽萍, 张秋燕, 韩建科, 等. 通心络超微粉对缺血性脑卒中大鼠微血管新生影响的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28 (7): 1015-1018.
- [19] Wang Y, Ma TT, Gao NN, et al. Effect of Tongxinluo on pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats exposed to a low pressure hypoxic environment[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194: 668-673.
- [20] 赵京林, 杨跃进, 尤士杰, 等. 通心络对猪急性心肌梗死再灌注后内皮素 -1 的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2005, 25 (10): 902-906.
- [21] 张海涛, 杨跃进, 程宇彤, 等. 通心络预给药 2 h 对猪急性心肌梗死再灌注后心肌无复流和细胞因子变化的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29 (9): 821-824.
- [22] 张海涛, 康晟, 王春玥, 等. 通心络对猪急性心肌缺血再灌注晚期微血管内皮屏障损伤的治疗作用 [J]. *山东医药*, 2020, 60 (28): 33-36.
- [23] 位庚, 常丽萍, 尹玉洁, 等. 通心络干预心肌微血管内皮细胞条件培养液对心肌细胞的保护作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37 (11): 1334-1338.
- [24] 尹玉洁, 张倩, 贾振华, 等. 通心络对高脂血症兔血管内皮功能的保护作用及机制研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38 (3): 325-330.
- [25] 李必强, 姚恩辉. 通心络对自发性高血压大鼠血浆 NO、ET 及血管平滑肌 iNOS 表达的影响 [J]. *福建中医学院学报*, 2009, 9 (4): 53-55, 65.

(收稿: 2021-09-30 在线: 2021-12-24)

责任编辑: 白 霞

Chinese Journal of Integrative Medicine (《中国结合医学杂志》)

2020 年 SCI 影响因子为 1.978

2021 年 6 月 29 日, 科睿唯安公布 2020 年 *Journal Citation Reports*, *Chinese Journal of Integrative Medicine* (CJIM, 《中国结合医学杂志》英文版) 影响因子为 1.978。

Chinese Journal of Integrative Medicine 创办于 1995 年, 2007 年被 SCI 收录。杂志由中国中医科学院和中国中西医结合学会主办, 国家中医药管理局主管, 主编为陈可冀院士。本刊 2012—2020 年连续被中国知网评选为最具国际影响力学术期刊之一。2019 年入选中国科技期刊卓越行动计划。

期刊以创办国际化期刊为目标, 不断促进结合医学发展为己任, 欢迎大家积极向我刊投稿、赐稿。在今后的工作中, 我们将力争为广大读者、作者提供更好服务!