

活血及活血解毒配伍中药含药血清对肿瘤坏死因子- α 诱导人内皮细胞与中性粒细胞黏附及相关通路蛋白表达的影响

郭春雨¹ 马晓娟² 刘倩² 殷惠军³ 史大卓²

摘要 **目的** 探讨活血及活血解毒配伍中药含药血清对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 与外周血中性粒细胞 (PMN) 黏附、炎症反应及相关通路蛋白的影响。**方法** 采用随机数字表法将 32 只大鼠分为空白对照组、芎芎胶囊组、黄连胶囊组及芎芎胶囊加黄连胶囊组, 每组 8 只, 各给药组按临床等效剂量灌胃, 采血制备含药血清。空白对照组予等体积蒸馏水作对照。常规方法培养 HUVECs, 以 TNF- α (100 ng/mL) 为刺激物, 制备 HUVECs 细胞损伤模型。细胞分为 5 组: 空白对照组、模型组、活血组、解毒组及活血解毒组。空白对照组及模型组给予正常大鼠血清, 其他 3 组以 10% 含药血清干预 24 h 后收集细胞, 应用孟加拉玫瑰红染色法观察 HUVECs 与 PMN 发生病理性黏附情况; 酶联免疫法检测细胞上清液相关炎症因子 E 选择素 (E-selectin)、细胞黏附分子-1 (ICAM-1) 及白细胞介素-1 β (IL-1 β) 含量; Western blot 法检测丝裂素活化蛋白激酶 p38 (p38MAPK) 及细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK 1/2) 蛋白磷酸化水平。**结果** 与空白对照组比较, 模型组细胞出现明显的氧化损伤, PMN 黏附数量明显增加, IL-1 β 、E-selectin 及 ICAM-1 水平升高, 且 HUVEC 上清 p-p38MAPK、p-ERK 1/2 蛋白表达增加 (均 $P < 0.01$)。与模型组比较, 活血组、解毒组及活血解毒组 HUVECs 与 PMN 黏附数量减少 ($P < 0.05$), 细胞培养上清液 IL-1 β 、E-selectin 及 ICAM-1 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且内皮细胞 p-p38MAPK、p-ERK 1/2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。**结论** 活血及活血解毒含药血清能减轻 TNF- α 诱导的 HUVECs 损伤, 抑制 HUVECs-PMN 黏附和黏附因子释放。其机制可能与调节内皮细胞 MAPK 通路 p38MAPK、ERK 1/2 蛋白磷酸化水平有关。

关键词 活血解毒; 内皮细胞; 细胞黏附; 丝裂素活化蛋白激酶 p38; 细胞外信号调节激酶 1/2

Effect of Chinese Herbal Drug-Containing Serum for Activating Blood, Activating Blood and Dispersing Toxin on TNF- α -Induced Adherence between Endothelial Cells and Neutrophils and the Expression of MAPK Pathway GUO Chun-yu¹, MA Xiao-juan², LIU Qian², YIN Hui-jun³, and SHI Da-zhuo² 1 Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Hospital of Obstetrics and Gynecology, Capital Medical University, Beijing (100026), China; 2 Center for Cardiovascular Disease, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China; 3 Department of Cardiovascular Disease, Affiliated Hospital to Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou (730000), China

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of drug-containing serum of Chinese herbal compounds [Xiongshao Capsule (XS, for activating blood) and Huanglian Capsule (HL, for dispelling toxin)] on tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced adherence between human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and polymorphonuclear neutrophils (PMN), inflammatory reaction and expression of related proteins in mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. **Methods** Thirty-two rats were randomly di-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81030063, No. 81102845)

作者单位: 1. 首都医科大学附属北京妇产医院中医科 (北京 100026); 2. 中国中医科学院西苑医院心血管中心 (北京 100091); 3. 甘肃中医药大学附属医院心血管科 (兰州 730000)

通讯作者: 史大卓, Tel: 010-62860499, E-mail: heartmail@263.net

DOI: 10.7661/CJIM.2015.02.0204

vided into four groups (8 in each group) using random digit table: the blank control group treated with distilled water, the test group I treated with Chinese herbal compound of XS (0.135 g/kg), the test group II treated with Chinese herbal compound of HL (0.135 g/kg), and the test group III treated with Chinese herbal compound of XS (0.135 g/kg) and HL (0.135 g/kg). All medication was given by gastrogavage once a day for a week. Rats' blood serum was harvested 1 h after the last administration to prepare drug-containing serum. HUVECs were exposed to TNF- α (100 ng/mL) to induce cell injury model and incubated with corresponding drug-containing serum (10%) for 24 h. Normal rats' serum was given to cells in the blank control group and the model group, while XC + HL containing serum was given to cells in the rest 3 groups. The adherence of HUVECs and PMN cells was detected by using rose bengal strain. Levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and interleukin-1 β (IL-1 β) in the supernatant of cultured HUVECs were determined by ELISA. Protein expressions of mitogen-activated protein kinases p38 (p38MAPK) and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) were determined by Western blot. Results Compared with the blank control group, HUVECs were seriously injured; PMN adherence amount significantly increased; levels of E-selectin, ICAM-1, and IL-1 β increased; expression levels of p-p38MAPK and p-ERK 1/2 in the supernatant of HUVECs significantly increased in the model group (all $P < 0.01$). Compared with the model group, HUVECs-PMN adherence amount decreased ($P < 0.05$); levels of E-selectin, ICAM-1, and IL-1 β in the supernatant of HUVECs decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$); expression levels of p-p38MAPK and p-ERK 1/2 of endothelial cells decreased in the test group I, II, and III ($P < 0.01$). Conclusions Drug-containing serums of activating blood, activating blood and dispelling toxin could attenuate TNF- α induced injury of HUVECs, inhibit HUVECs-PMN adherence and the release of adhesion factors. Its mechanism might be involved with protein phosphorylation of p38MAPK and ERK 1/2 in the MAPK pathway.

KEYWORDS activating blood and dispelling toxin; human umbilical vein endothelial cell; cell adhesion; mitogen-activated protein kinase p38; extracellular signal-regulated kinase 1/2

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心脑血管疾病发生、发展的主要病理基础,其病理机制尚未明确。Ross R^[1]的“损伤反应”理论提出,AS 是一系列复杂的慢性炎症反应过程,巨噬细胞、内皮细胞、血小板以及这些细胞释放的各种细胞因子(如细胞因子、细胞素、氧自由基等)介导并参与了 AS 炎症反应的发生、发展过程。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 作为最常见的细胞因子,在慢性炎症反应过程中发挥关键作用。TNF- α 可直接损伤内皮细胞,使其发生氧化损伤,致使单核细胞与活化的血管内皮细胞发生黏附并迁移聚集于内膜下,进而诱导大量黏附分子表达,促进 AS 的发生及发展^[2-4]。

现代医学认为,易损斑块破裂、血栓形成、炎性反应贯穿了 AS 发生、发展的全过程,血小板的黏附、聚集,纤溶系统的抑制导致血栓形成,与中医“瘀毒”病机有相通之处。从中医学的角度,无论冠心病的发作期还是缓解期,瘀毒互结贯穿始终,因此,热毒瘀结,脉络瘀阻是冠心病发病的关键所在,而活血解毒法是治疗冠心病 AS 的基本原则之一。诸多研究证实,活血解毒配伍方药在防治由 AS 导致的不稳定性心绞痛、脑卒中方面具有较为可靠的临床疗效,其作用机制与

改善内皮功能,减少氧化应激反应及炎症反应等关系密切^[5-7]。

为深入探讨活血及活血解毒配伍中药治疗冠心病 AS 的具体作用机制,本研究观察了中药活血及活血解毒含药血清对 TNF- α 诱导的血管内皮细胞氧化应激、内皮细胞-中性粒细胞黏附及相关通路蛋白表达的影响,探讨活血解毒配伍中药对内皮细胞保护的效应及相关机制。

材料与方法

1 动物 健康清洁级 SD 大鼠 32 只,购自北京联通利华实验动物中心,动物许可证号:[SCXX(京)2006-0009],体重(200 $\pm$ 20) g,雌雄各半,适应性喂养 1 周后开始实验。

2 药物及试剂 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培养基 (glucose: 25 mmol/L) (Gibco 公司,美国);胎牛血清 (Hyclone 公司,美国);胶原酶 I (Sigma-Aldrich 公司,美国);玫瑰红比色法试剂盒、人白细胞介素-1 β (IL-1 β) 酶联免疫 (ELISA) 试剂盒、人 E-选择素 (E-selectin) ELISA 试剂盒、人细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) ELISA 试剂盒

(华美生物工程公司);丝裂素活化蛋白激酶 p38 (mitogen-activated protein kinase P38, p38MAPK)、磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK)、细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK 1/2) 及磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 (p-ERK 1/2) 抗体 (Abcam 公司, 美国);辣根过氧化物酶标记的二抗 (北京中杉金桥公司);芎芍胶囊由川芎、赤芍有效部位川芎总酚和赤芍总苷组成, 每粒 0.25 g, 每克提取物分别含芍药苷 ≥ 112 mg, 阿魏酸 ≥ 14 mg, 总酚酸 ≥ 136 mg, 由大连化学物理研究所提供 (批号: 101029); 黄连胶囊, 每粒 0.25 g, 由湖北香连药业有限责任公司生产 (批号 110506)。

3 细胞制备

3.1 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 培养与鉴定 参照文献[8]改良方法培养原代 HUVECs。用胶原酶 I 灌注消化分离新鲜人脐静脉内皮细胞, 接种于含 20% 胎牛血清、10 ng/mL 内皮细胞生长因子、40 U/mL 肝素、20 mmol/L 谷氨酰胺、50 U/mL 青链霉素、0.11 mg/mL 丙酮酸钠的高糖型 DMEM 培养基中培养。根据细胞形态和结构一致性选用第 2~4 代细胞用于本次研究。应用 VIII 因子相关抗原进行免疫荧光鉴定, 倒置显微镜下观察 HUVECs 生长情况。

3.2 人外周血中性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophil, PMN) 分离及鉴定 参照文献[9]非连续密度梯度离心法, 无菌取健康人新鲜肝素抗凝外周血 5 mL, 使用淋巴细胞分离液将细胞分为单核细胞层和 PMN 层, PBS 清洗后, 制备中性粒细胞悬液。瑞姬染色形态学观察细胞形态, 台盼蓝拒染试验鉴定细胞活性: 细胞活性 $>96\%$ 时使用。

4 含药血清制备 取健康清洁级 SD 大鼠 32 只, 采用随机数字表法分为 4 组: 空白对照组、芎芍胶囊组 (简称活血组)、黄连胶囊组 (简称解毒组) 及芎芍胶囊加黄连胶囊组 (简称活血解毒组), 每组 8 只。根据临床成人剂量, 按体表面积比等效剂量法折算大鼠用药量, 活血组、解毒组和活血解毒组大鼠分别按芎芍胶囊 0.135 g/kg、黄连胶囊 0.135 g/kg、芎芍胶囊和黄连胶囊各 0.135 g/kg 的剂量给药, 药物均用蒸馏水稀释后, 按 10 mL/kg 体重灌胃, 每天 1 次, 连续 7 天。末次给药后 1 h, 无菌条件下, 经腹主动脉取血, 分离含药血清。同组混匀, 56 °C 水浴 30 min 灭活, 微孔滤膜过滤除菌, -80 °C 保存备用。

5 细胞分组及给药 参考文献[10]改良后方法

制备 TNF- α 诱导 HUVECs 损伤模型。HUVECs 细胞分为 5 组: (1) 空白对照组: 加入 10% 正常大鼠血清; (2) 模型组: 加入 TNF- α (100 ng/mL) 及 10% 正常大鼠血清培养 24 h; (3) 活血组: 加入 TNF- α (100 ng/mL) 及 10% 芎芍胶囊含药血清共培养 24 h; (4) 解毒组: 加入 TNF- α (100 ng/mL) 及 10% 黄连胶囊含药血清共培养 24 h; (5) 活血解毒组: 加入 TNF- α (100 ng/mL)、10% 芎芍胶囊及 10% 黄连胶囊含药血清共培养 24 h。

6 孟加拉玫瑰红活细胞染色法测定 PMN-HUVECs 黏附率 参照文献[11], 各组 HUVECs 分别与相应的受试药物或溶剂于 37 °C, 5% CO₂ 温孵 60 min 后, 每孔加入 TNF- α (终浓度 10 μ g/mL) 刺激 24 h, PBS 洗孔一遍, 加入 PMN 悬液 (200 μ L/孔), 37 °C 孵育 30 min。吸除未黏附 PMN, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 100 μ L 0.25% 的 RoseBengal (PBS 配制), 室温作用 5 min。吸除染料, PBS 洗孔 2 遍, 每孔加入 PBS-乙醇 (1:1) 200 μ L, 室温作用 30 min 后, 酶标仪 492 nm 波长下测定各孔 OD 值。PMN 所摄取的 RoseBengal 染料在 PBS-乙醇作用约 30 min 释放, 采用 OD 值衡量 PMN 黏附数量。

7 ELISA 法检测细胞上清液中相关细胞因子 (IL-1 β 、E-selectin、ICAM-1) 水平 细胞接种于 60 mm 培养皿中, 按前述方法干预 24 h 后, 收集细胞培养上清液, -20 °C 保存。采用 ELISA 法检测 ET-1、IL-1 β 、E-selectin、ICAM-1 浓度, 具体步骤按照试剂盒说明书操作。

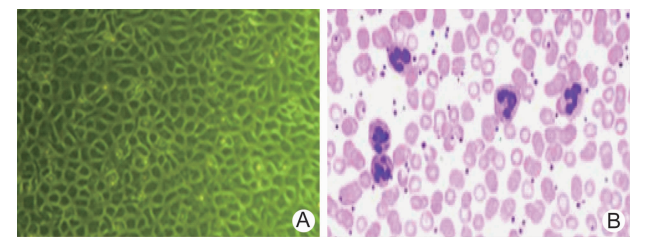
8 Western blot 法检测 p38MAPK、p-p38MAPK、ERK 1/2 及 p-ERK 1/2 蛋白表达 按前述方法干预 24 h 后, 收集细胞, 经裂解液作用后, 刮至 EP 管中, 4 °C 1 2000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 用于细胞总蛋白中 p38MAPK、p-p38MAPK、ERK 1/2 及 p-ERK 1/2 蛋白含量分析。测定蛋白浓度后, 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液 100 °C 5 min 使蛋白变性, 制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (10% 分离胶和 5% 的浓缩胶), 每孔加蛋白样品 40 μ g, 电泳 (积层胶: 电泳 80 V; 30 min 分离胶: 电压 100 V, 75 min), 半干电转移仪转膜 (恒流 30 mA, 电转 90 min), 5% TBS-T 脱脂奶粉封闭, 室温振荡 60 min。一抗: p38MAPK, p-p38MAPK, ERK 1/2 及 p-ERK 1/2 (1:1 000), β -actin (1:1 000) 稀释, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 二抗: 漂洗液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2 000), 37 °C 振荡 1 h, TBST 洗涤 3 次, 将聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜置 ECL

超敏发光液中于室温下振荡温育5 min, 每平方厘米膜片至少使用 0. 125 mL ECL 混合液以覆盖全膜片, 用 IPP(image-pro plus analysis software) 软件对扫描图象的目的条带进行灰度分析, 检测密度扫描值, 结果以各目的蛋白与 β -actin 的灰度比值表示。

9 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 q 检验, $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 HUVECs 及 PMN 鉴定(图 1) 培养第 3 ~5 天, 倒置显微镜下观察空白对照组 HUVECs 形态见细胞融合成片, 铺满培养瓶, 呈鹅卵石样排列, VIII 因子相关抗原免疫荧光鉴定显示, HUVECs 胞质呈较强的黄绿色荧光, 核周尤为明显, 镜下可见 HUVECs 融合连成片, 呈鹅卵石样铺满培养瓶, 形态单一, 呈棱形或多角形, 细胞边界清楚, 胞核椭圆形、靠近中央, 核仁明显(图 1A)。使用人淋巴细胞分离液分离后, 贴壁培养得到 PMN, 经瑞姬染色后, 倒置相差显微镜观察, 可见胞核呈蓝紫色, 染色质呈块状, 着色深, 呈分叶状, 一般可分 2 ~5 叶(图 1B)。



注: A 为 HUVECs; B 为 PMN

图 1 HUVECs 与 PMN 形态学观察 (×200)

2 各组 PMN-HUVECs 细胞黏附情况比较(表 1) 以 OD 值代表所黏附的 PMN 数量。与空白对照组比较, 模型组 PMN 黏附数量明显增加($P < 0. 01$); 与模型组比较, 活血及活血解毒组含药血清 PMN 黏附数量下降($P < 0. 05$)。各用药组间比较, 差异无统计学意义($P > 0. 05$)。

3 各组细胞上清 IL-1 β 、E-selectin 及 ICAM-1 表达水平比较(表 1) 与空白对照组比较, 模型组 IL-1 β 、E-selectin 及 ICAM-1 含量升高($P < 0. 01$)。与模型组比较, 活血组、解毒组及活血解毒组细胞上清中 IL-1 β 、E-selectin 和 ICAM-1 含量明显下降($P < 0. 05$, $P < 0. 01$)。各用药组间比较, 差异无统计学意义($P > 0. 05$)。

表 1 各组 PMN-HUVECs 细胞黏附数量及细胞上清 IL-1 β 、E-selectin 及 ICAM-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	OD ₅₇₀	IL-1 β (ng/mL)	E-selectin (pg/mL)	ICAM-1 (ng/mL)
空白对照	6	0. 22 $\pm$ 0. 03	46. 44 $\pm$ 7. 26	24. 18 $\pm$ 8. 85	1. 33 $\pm$ 0. 08
模型	6	0. 48 $\pm$ 0. 08 *	97. 89 $\pm$ 12. 33 *	182. 47 $\pm$ 23. 61	19. 26 $\pm$ 0. 25 *
活血	6	0. 28 $\pm$ 0. 04 Δ	61. 23 $\pm$ 8. 03 $\Delta\Delta$	40. 54 $\pm$ 14. 32 $\Delta\Delta$	10. 84 $\pm$ 0. 31 $\Delta\Delta$
解毒	6	0. 33 $\pm$ 0. 02	68. 34 $\pm$ 10. 75 $\Delta\Delta$	33. 52 $\pm$ 15. 74 $\Delta\Delta$	9. 56 $\pm$ 0. 26 Δ
活血解毒	6	0. 26 $\pm$ 0. 08 Δ	55. 48 $\pm$ 9. 52 $\Delta\Delta$	27. 65 $\pm$ 14. 66 $\Delta\Delta$	8. 23 $\pm$ 0. 19 $\Delta\Delta$

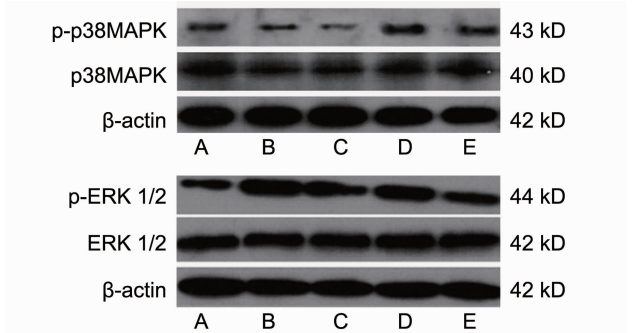
注: 与空白对照组比较, * $P < 0. 01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0. 05$, $\Delta\Delta P < 0. 01$

4 各组细胞上清 p38MAPK、p-p38MAPK、ERK 1/2 及 p-ERK 1/2 表达水平比较(表 2, 图 2) 与正常对照组比较, 模型组 HUVEC 上清 p-p38MAPK、p-ERK 1/2 蛋白表达增加($P < 0. 01$); 与模型组比较, 活血组、解毒组及活血解毒组 p-p38MAPK、p-ERK 1/2 蛋白达减少($P < 0. 01$)。各用药组间比较, 差异无统计学意义($P > 0. 05$)。

表 2 各组 p-p38MAPK 及 p-ERK 1/2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	p-p38MAPK	p-ERK 1/2
空白对照	6	0. 17 $\pm$ 0. 03	0. 09 $\pm$ 0. 02
模型	6	0. 85 $\pm$ 0. 11 *	0. 88 $\pm$ 0. 13 *
活血	6	0. 39 $\pm$ 0. 08 Δ	0. 38 $\pm$ 0. 06 Δ
解毒	6	0. 42 $\pm$ 0. 09 Δ	0. 45 $\pm$ 0. 07 Δ
活血解毒	6	0. 39 $\pm$ 0. 08 Δ	0. 32 $\pm$ 0. 05 Δ

注: 与空白对照组比较, * $P < 0. 01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0. 01$



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为活血组; D 为解毒组; E 为活血解毒组

图 2 各组 p-p38MAPK 及 p-ERK 1/2 蛋白表达比较

讨 论

AS 的形成是以贯穿斑块成熟、破裂, 以早期白细胞募集为特征的慢性炎症过程^[12], 其发生、发展过程以及形态学变化主要包括内皮损伤、单核/中性粒细胞内皮下浸润、泡沫细胞形成、血管平滑肌细胞迁移增殖, 最终粥样斑块形成^[13]。其中, 血管壁粥样斑块处

内皮细胞活化和循环血液中白细胞向血管壁募集是炎症-增殖反应过程中的两个关键环节^[14]。而炎症反应最重要的功能是将炎症细胞输送到炎症病灶,白细胞的渗出是炎症反应最重要的指征。白细胞渗出是复杂的连续过程^[15],它包括白细胞边集→黏附→游出→趋化作用。此步骤使白细胞和内皮细胞表面的黏附分子的表达增加,亲和性增强。通过细胞表面的黏附分子,白细胞黏附于内皮细胞表面,随后中性白细胞释放活性氧、蛋白酶等,诱导内皮细胞的炎症反应^[16]。由此可见,内皮细胞与白细胞间的黏附过程是炎症反应的关键步骤。

内皮细胞与中性白细胞的黏附是组织损伤的重要原因,而内皮细胞表达和释放的黏附分子在此过程中起着关键作用。在这些黏附分子中, ICAM-1 和 E-selectin 对于内皮细胞与中性白细胞的黏附和内皮细胞与细胞外基质的黏附起着最为重要的作用。白细胞在内皮细胞连接处伸出伪足,整个细胞以阿米巴运动方式,从内皮细胞之间的连接处中逸出。最后,白细胞在趋化因子的作用下向炎症局部进行单一定向的运动。活化的白细胞通过表面的 P-选择素配体 1 (PS-GL-1) 和黏附受体 Mac-1 (CD11b/CD18) 分别与血小板表面 P-选择素和 GP II b/III a 结合^[17,18]。本实验中,笔者使用 TNF- α 持续干预 HUVECs 24 h, PMN-HUVECs 黏附检测结果表明,与正常对照组比较,模型组细胞 PMN-HUVECs 黏附数量急剧上升,同时伴随着大量黏附因子 (ICAM-1、E-selectin)、趋化因子 (IL-1 β) 的释放,提示 TNF- α 刺激可增加血管内皮通透性^[19],诱导 PMN-HUVECs 间黏附,从而导致 AS 的最终形成。

丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 介导的信号转导通路是生物信号引起核反应的重要通路,在细胞生长、增殖、分化及凋亡的调节中起着至关重要的作用。p38MAPK 和 ERK 1/2 是该通路上重要的蛋白激酶。在多种物理和化学因素、炎症因子或应激刺激下,通过非磷酸化转化为磷酸化状态,促进下游底物的磷酸化来快速实现信号传递,促进炎症介质分泌,介导炎症反应,参与 AS 形成^[20,21]。本研究结果显示,造模后 HUVECs 中 p38MAPK 和 ERK 1/2 蛋白表达变化不明显,但 p-p38MAPK 和 p-ERK 1/2 蛋白表达明显增加,提示 TNF- α 诱导 HUVECs 发生的氧化损伤与 p38MAPK 和 ERK 1/2 蛋白磷酸化水平密切相关,进一步验证了刺激物可能通过 MAPK 通路诱导血管内皮发生损伤的观点。

近年来有医家认为 AS 斑块破裂、血栓闭塞引发

的组织损伤坏死、炎症瀑布反应、氧化脂质沉积、钙超载、细胞凋亡等病理损害,与中医“毒”邪起病急骤、传变迅速、直中脏腑、腐肌伤肉的特点多有相似之处^[21-23]。将“瘀”、“毒”两种病因结合以来,有望更全面地诠释心脑血管血栓性疾病的中医临床发病特点及病因、病机。一些小样本临床观察表明,应用中医活血清毒法治疗冠心病取得了满意效果。耿立梅等^[24]应用解毒活血丸治疗急性冠脉综合征,发现活血解毒丸不仅可以明显改善急性冠脉综合征的症状,并对 C 反应蛋白、IL-6 有明显降低作用,其可能机制是中药在扩张血管、改善微循环、增加冠脉血流量、降低全血黏度、抑制血小板聚集、血栓形成及炎症反应,促进炎症吸收等方面发挥了较好作用。赵伟峰等^[25]研究认为,活血解毒配伍中药制剂能有效降低 ApoE 基因敲除小鼠血清甘油三酯等血脂水平,具有稳定 AS 斑块的作用,其机制可能与提高血清中血清整体 DNA 甲基化水平和甲基化转移酶水平有关。可见,清热解毒配伍方药在防治心血管疾病方面具有较为可靠的临床疗效和药理基础。

芎芍胶囊是在传统活血化瘀名方血府逐瘀汤基础上,反复精简、提取有效部位,优化配比而成的有效组分配伍制剂,由川芎总酚和赤芍总苷配伍而成,是治疗冠心病的有效经验方。本研究使用芎芍胶囊、芎芍胶囊合用黄连胶囊的含药血清作为干预药物,观察活血及活血解毒法对 HUVECs 损伤的影响及其可能机制。结果显示,单纯活血药物血清和解毒药物血清均可降低 TNF- α 诱导的 PMN-HUVECs 大规模黏附,减少黏附因子释放,明显降低 MAPK 蛋白通路关键蛋白 p38MAPK 和 ERK 1/2 磷酸化水平。其中,单纯活血和活血解毒中药含药血清可显著逆转 TNF- α 诱导的 PMN-HUVECs 聚集率升高,说明在抗内皮细胞与白细胞黏附方面,活血和活血解毒中药配伍优势明显。

此外,本次研究还比较了活血法与活血解毒法在各组数据上的差异。结果显示,虽然两组在 PMN-HUVECs 黏附率、趋化黏附因子释放等方面比较,差异无统计学意义,但与单纯活血组比较,活血解毒组的数值有明显偏低的趋势。提示活血中药可能主要针对内皮损伤后出现的血小板凝集优势明显^[26],而配伍使用活血解毒中药,能有效提升中药抗击炎症细胞浸润、阻止内皮细胞与白细胞之间黏附的作用。单纯的活血法还是不能完全解决由“瘀毒”病因导致的血小板、内皮细胞、白细胞间的黏附、聚集、表达的问题。只有活血、解毒合用,才能从更好地抑制由 TNF- α 诱导的内皮损伤,改善血管内环境。

综上所述,活血和活血解毒中药配伍能有效抑制内皮细胞与中性白细胞间的黏附作用,且活血解毒法的疗效优于单纯活血法。活血解毒的中医治法有效阻断白细胞黏附后向血管外迁移,切断白细胞贴着细胞外基质,继而阻止浸润和损伤反应的第一步,其药理机制与阻断活化的 MAPK 信号通路密切相关。这一结论将为进一步探讨活血解毒配伍的内皮细胞保护作用提供的实验基础。

参 考 文 献

- [1] Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115 - 126.
- [2] Wu K, Tian S, Zhou H, et al. Statins protect human endothelial cells from TNF-induced inflammation via ERK5 activation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(12): 1753 - 1760.
- [3] Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(3): 1317 - 1542.
- [4] Chen C, Khisमतullin DB. Synergistic effect of histamine and TNF- α on monocyte adhesion to vascular endothelial cells [J]. *Inflammation*, 2013, 36(2): 309 - 319.
- [5] 俞邴, 魏江磊. 清热解毒法在缺血性中风急性期的应用 [J]. *中国中医急症*, 2013, 22(5): 766 - 769.
- [6] 郑峰, 周明学, 徐浩, 等. 活血解毒中药对稳定期冠心病患者血清炎症标记物及血脂的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2009, 24(9): 1153 - 1157.
- [7] 刘洗宜, 王振宇, 闻颖. 益气补血、活血解毒法治疗大动脉炎血管内皮损伤的免疫研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2011, 18(2): 11 - 13.
- [8] 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.
- [9] 吕金星, 汪健, 张锡庆, 等. Percoll 非连续密度梯度沉降法分离人外周血中性粒细胞 [J]. *上海免疫学杂志*, 2000, 20(2): 122.
- [10] 陈明亮, 易龙, 金鑫, 等. 白藜芦醇对 TNF- α 诱导的血管内皮细胞炎症反应的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(13): 1255 - 1258.
- [11] Gamble JR, Vadas MA. A new assay for the measurement of the attachment of neutrophils and other cell types to endothelial cells [J]. *J Immunol Methods*, 1988, 109(2): 175 - 184.
- [12] Tani S, Nagao K, Anazawa T, et al. Association of leukocyte subtype counts with coronary atherosclerotic regression following pravastatin treatment [J]. *Am J Cardiol*, 2009, 104(4): 464 - 469.
- [13] Cullen P, Rauterberg J, Lorkowski S. The pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2005, 170: 3 - 70.
- [14] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 801 - 809.
- [15] May AE, Langer H, Serizer P, et al. Platelet-leukocyte interactions in inflammation and atherothrombosis [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2007, 33(2): 123 - 127.
- [16] Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules [J]. *Blood*, 1994, 84(7): 2068 - 2101.
- [17] Shantsila E, Lip GY. The role of monocytes in thrombotic disorders insights from tissue factor, monocyte-platelet aggregates and novel mechanisms [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 102(5): 916 - 924.
- [18] Simon DI, Chen Z, Xu H, et al. Platelet glycoprotein Ib α is a counter-receptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(2): 193 - 204.
- [19] Van Nieuw Amerongen GP, Beckers CM, Achekar ID, et al. Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(11): 2332 - 2339.
- [20] Obata T, Brown GE, Yaffe MB. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28(4 suppl): N67-N77.
- [21] Indra MR, Karyono S, Ratnawati R, et al. Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK 1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in leptin-induced human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [J]. *BMC Res Notes*, 2013, 6(1): 275.
- [22] 张京春, 陈可冀. 瘀毒病机与动脉粥样硬化易损斑块相关的理论思考 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(4): 366 - 368.
- [23] Shi DZ, Xu H, Yin HJ, et al. Combination and transformation of toxin and blood stasis in etio-pathogenesis of thrombotic cerebro-cardiovascular diseases [J]. *J Chin Integr Med*, 2008, 6(1): 1105 - 1107.
- [24] 耿立梅, 陈分乔. 解毒活血丸对急性冠脉综合征 IL-6、C-反应蛋白的影响 [J]. *陕西中医*, 2006, 11(27): 1320 - 1322.
- [25] 赵伟峰, 周明学, 王绿娅, 等. 活血解毒中药对动脉粥样硬化小鼠斑块稳定性、血脂及 DNA 甲基化水平的影响 [J]. *北京中医药*, 2014, 33(3): 215 - 219.
- [26] Liu L, Duan JA, Tang Y, et al. Taoren-Honghua herb pair and its main components promoting blood circulation through influencing on hemorheology, plasma coagulation and platelet aggregation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2): 381 - 387.

(收稿: 2013 - 11 - 5 修回: 2014 - 10 - 16)