

基于 NOS 信号的艳山姜挥发油对 ox-LDL 诱导 HAECs 损伤的保护作用

徐旖旎, 杨红, 李晨, 令狐克刚, 文波, 沈祥春*, 张彦燕*

(贵州医科大学, 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价重点实验室, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:研究艳山姜挥发油(EOFAZ)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人主动脉内皮细胞(HAECs)损伤的保护作用。方法:体外传代培养 HAECs,EOFAZ 保护作用研究分为 7 组,分别为空白组(无血清 ECM),模型组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL),EOFAZ 高质量浓度组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μg·L⁻¹ EOFAZ),EOFAZ 低质量浓度组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 10 μg·L⁻¹ EOFAZ),阿司匹林组(Asp,200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 2.5 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ Asp),卡维地洛组(Car,200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ Car),阿托伐他汀钙组(Atorv,200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ Atorv);一氧化氮合酶(NOS)信号研究分为 5 组,分别为空白组(无血清 ECM),模型组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL),EOFAZ 组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μg·L⁻¹ EOFAZ),NOS 抑制剂组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μmol·L⁻¹ L-NAME 或 300 μmol·L⁻¹ L-NMMA),EOFAZ 加 NOS 抑制剂组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μg·L⁻¹ EOFAZ + 100 μmol·L⁻¹ L-NAME 或 300 μmol·L⁻¹ L-NMMA)。噻唑蓝(MTT)法分析细胞存活率,酶标仪法及 Griess 试剂法分别检测培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活性和一氧化氮(NO)含量。化学法检测内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 iNOS 及 eNOS mRNA 表达水平。结果:与模型组比较,EOFAZ 明显提高 ox-LDL 诱导损伤的 HAECs 的细胞存活率,抑制 LDH 外漏及 iNOS 活力($P < 0.05$, $P < 0.01$),促进 NO 及 eNOS 的产生($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Real-time PCR 分析表明,EOFAZ 以及相关抑制剂显著下调 iNOS mRNA 表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),上调 eNOS mRNA 表达水平($P < 0.05$)。结论:EOFAZ 对 ox-LDL 诱导损伤的 HAECs 具有保护作用,其作用机制与调控 eNOS 和 iNOS 的表达水平有关。

[关键词] 艳山姜挥发油; 氧化低密度脂蛋白; 人主动脉内皮细胞; 一氧化氮合酶; 一氧化氮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0143-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017150143

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170511.0931.040.html>

[网络出版时间] 2017-05-11 9:31

Protection Effect of Essential Oil from *Alpinia zerumbet* Rhizome on ox-LDL-induced HAECs Injury via NOS Signal

XU Yi-ni, YANG Hong, LI Chen, LINGHU Ke-gang, WEN Bo, SHEN Xiang-chun*, ZHANG Yan-yan*

(The High Educational Key Laboratory of Guizhou Province for Natural Medicinal Pharmacology and Drugability,
Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of essential oil from *Alpinia zerumbet* rhizome (EOFAZ) on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) -induced human aortic endothelial cells (HAECs) injury. **Method:** HAECs were subcultured *in vitro*, and the experiment on EOFAZ protective effect was randomly

[收稿日期] 20170305(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360650,81560811);贵州省高等教育科技创新团队项目(黔教合人才团队字[2014]31);贵州省科技创新团队项目(黔科合人才团队[2015]4025号);贵州省高层次创新型人才百层次人才项目(贵州省科技厅黔科合人才[2015]4029号;贵阳市科技基金项目(筑科合同[20151001]药07号)

[第一作者] 徐旖旎,在读博士,从事心血管药理学研究,Tel:18798734687,E-mail:605446623@qq.com

[通讯作者] *沈祥春,教授,博士生导师,从事心血管系统药物药理与功能天然产物化学生物学研究,Tel: 0851- 88416149,E-mail: shenxiangchun@126.com;

*张彦燕,副教授,从事心血管药理学研究,Tel:18685152923,E-mail:chinazyzy201@163.com

divided into 7 groups as following: blank control group (serum free ECM), model group (ox-LDL, 200 mg·L⁻¹ ox-LDL), EOFAZ high dose group (200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μg·L⁻¹ EOFAZ), EOFAZ low dose group (200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 10 μg·L⁻¹ EOFAZ), Aspirin group (200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 2.5 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ Aspirin), Carvedilol group (200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ Carvedilol), and Atorvastatin Calcium group (200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ Atorvastatin Calcium). Experiment on NOS signals was divided into 5 groups as following: blank control group (serum free ECM), model group (ox-LDL, 200 mg·L⁻¹ ox-LDL), EOFAZ group (200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μg·L⁻¹ EOFAZ), NOS inhibitor group (200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μmol·L⁻¹ L-NAME or 300 μmol·L⁻¹ L-NMMA), and EOFAZ + NOS inhibitor group (200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μg·L⁻¹ EOFAZ + 100 μmol·L⁻¹ L-NAME or 300 μmol·L⁻¹ L-NMMA). 3- (4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl) -2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) method was used to analyze the cell survival ratio; lactate dehydrogenase (LDH) activity and nitric oxide (NO) content in culture supernatant were determined by enzyme labelling method and Griess kit method. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) activities were determined by chemical methods. Quantitative Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of iNOS and eNOS. **Result:** MTT results showed that EOFAZ could significantly improve the survival rate of ox-LDL-induced injury HAECs, inhibit the increase of LDH and iNOS activity as compared with the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and simultaneously increase the release of NO and eNOS in medium ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Real-time PCR analysis indicated that EOFAZ and related inhibitors could down-regulate iNOS mRNA expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and up-regulate eNOS mRNA expression ($P < 0.05$). **Conclusion:** EOFAZ could protect against HAECs injury induced by ox-LDL, and this mechanism was associated with regulating eNOS and iNOS expression.

[**Key words**] essential oil from *Alpinia zerumbet* rhizome; oxidized low density lipoprotein; human aortic endothelial cells; nitric oxide synthase; nitric oxide

心血管系统疾病 (cardiovascular disease, CVD) 的致死率已居于各种死亡原因之首, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是其发生发展的重要病理基础^[1]。很多细胞如巨噬细胞、淋巴细胞、血管平滑肌细胞和血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VECs) 参与了 AS 的形成^[2], 尤其是 VECs 的损伤贯穿于 AS 的始终^[3]。氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 是主要的危险因素, 参与了内皮细胞损伤以及 AS 病变的发生发展过程^[4]。当血管内皮功能受损后, 内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 表达减少或活性下降, 内源性一氧化氮 (NO) 产生减少, 血管内皮细胞中诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达增多, 继而打破原本正常血管内皮细胞的平衡, 由此产生大量 NO 自由基并与过氧阴离子反应形成过氧化亚硝酸盐, 引起内皮细胞凋亡和组织损伤, 促进血栓的形成和发展^[5]。

贵州民族区域特色药艳山姜, 为姜科山姜属植物, 有温中燥湿、行气止痛、截疟之功效, 已被收录于 2003 年版《贵州省中药民族药标准》^[6]。本课题组前期从艳山姜干燥成熟果实中提取并制备了艳山姜挥发油 (essential oil from *Alpinia zerumbet* rhizome,

EOFAZ), 其具有抗动脉粥样硬化、抗炎、抗氧化、抗溃疡、镇痛、抗心肌缺氧、降压、降血脂等作用^[7-8]。前期研究结果表明, EOFAZ 对脂多糖 (LPS) 或 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤具有保护作用^[9-10], 但其作用机制尚不明确, 本实验将基于 NOS-NO 信号探讨 EOFAZ 对 ox-LDL 诱导的 HAECs 损伤的保护作用, 为民族药艳山姜的后续研究奠定实验及理论基础。

1 材料

1.1 细胞 人主动脉内皮细胞株, 购于美国 Science Cell 公司, 批号 11035。

1.2 药物及试剂 ox-LDL (北京协生生物科技公司, 批号 20120212); 人乳酸脱氢酶 (LDH), 一氧化氮合酶 (NOS) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20141225, 201411); 人 NO 试剂盒 (齐一生物科技上海有限公司, 批号 201502); iNOS 抑制剂 L-单甲基精氨酸 (L-NMMA, 英国 Abcam 公司, 批号 APN08104-4-4); iNOS 抑制剂 L-NAME (美国 Bioworld 公司, 批号 CJ36131); 总 RNA 提取试剂盒, 逆转录 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, 批号分别为 AK703, AK5301); 实时荧光定量聚合酶链式反应

(Real-time PCR)试剂盒,荧光染料(美国Bio-Rad公司,批号分别为177-5001,172-5124)。

1.3 仪器 JB-CJ-1FXS型洁净工作台(中国苏州佳宝净化工程设备有限公司);HF90型二氧化碳培养箱(中国上海力申科学仪器有限公司);DMi1型倒置相差显微镜(德国Leica Microsystems公司);ELX800型酶联免疫检测仪(美国GE公司);XL cellc型垂直电泳仪及转膜系统,Universal Hood II型Real-time PCR系统仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 体外培养人主动脉内皮细胞(HAECs)。常规方法复苏HAECs,加入内皮细胞培养基后于37℃ 5% CO₂的湿热培养箱中培养。视具体情况换液及传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

2.2 ox-LDL诱导的HAECs损伤模型 对数生长期的细胞消化后以1×10⁵个/mL接种于培养板培养,待细胞基本长至融合后进行实验。200 mg·L⁻¹ ox-LDL孵育24 h建立ox-LDL诱导HAECs损伤模型^[11-12]。

2.3 分组 EOFAZ保护作用研究分为7组,分别为空白组(无血清ECM),模型组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL),EOFAZ高质量浓度组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μg·L⁻¹ EOFAZ),EOFAZ低质量浓度组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 10 μg·L⁻¹ EOFAZ),阿司匹林组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 2.5×10⁻⁴ mol·L⁻¹阿司匹林),卡维地洛组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 1×10⁻⁶ mol·L⁻¹卡维地洛),阿托伐他汀钙组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 1×10⁻⁶ mol·L⁻¹阿托伐他汀钙)。NOS信号研究分为5组,分别为空白组(无血清ECM),模型组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL),EOFAZ组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μg·L⁻¹ EOFAZ),NOS抑制剂组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μmol·L⁻¹ L-NAME或300 μmol·L⁻¹ L-NMMA),EOFAZ加NOS抑制剂组(200 mg·L⁻¹ ox-LDL + 100 μg·L⁻¹ EOFAZ + 100 μmol·L⁻¹ L-NAME或300 μmol·L⁻¹ L-NMMA)。

2.4 噻唑蓝(MTT)法检测HAECs细胞存活率 取对数生长期细胞接种于96孔细胞培养板,待其长满底部后进行实验。先用不同质量浓度的EOFAZ或阳性药预处理1 h,然后加入200 mg·L⁻¹ ox-LDL共同孵育24 h,应用MTT法,酶联免疫检测仪490 nm波长处测定吸光度A,每组重复6个复孔,实验重复3次。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.5 LDH活性分析 细胞接种于24孔板,各组按前述处理方法处理后,按照试剂盒说明书测定各组培养上清液LDH水平;超声法碎裂细胞,测定细胞内LDH水平,计算LDH活性。

2.6 NO及NOS水平的检测 细胞悬液接种于24孔板,给药处理后按照NO或者NOS检测试剂盒说明书检测培养上清液中NO含量及NOS活性。

2.7 Real-time PCR法检测eNOS,iNOS mRNA表达 HAECs接种于6孔板,待其生长至90%,各组用EOFAZ预处理1 h,继续用ox-LDL处理24 h后弃除孔内液体,冷磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次后,根据RNA提取试剂盒说明书提取总RNA,逆转录合成cDNA,加入上游及下游引物进行PCR反应。eNOS(116 bp):上游5'-GGCATCACCAGGAAGAAGAC-3',下游5'-TCGGAGCCATACAGGATTGT-3';iNOS(121 bp):上游5'-AAGCGGAGACCCAAGAGAAG-3',下游5'-TCGCCAAGAGGATGCTGACT-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,131 bp):上游5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3',下游5'-GAAGGCTGGGGCTCATT-3'。iNOS PCR反应条件为95℃预变性30 s,95℃变性5 s,64℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环40次。eNOS PCR反应条件为95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环40次。以GAPDH为内参物,凝胶成像系统成像并保存。

2.8 统计学分析 采用SPSS 11.0软件包进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对ox-LDL诱导损伤的HAECs存活率的影响 200 mg·L⁻¹ ox-LDL显著降低细胞A,提示其能明显降低细胞存活率,与空白组比较,差异有显著统计学意义(P<0.01)。阿司匹林、阿托伐他汀钙、卡维地洛以及EOFAZ预保护1 h后,均能提高细胞A,与模型组比较,差异均有统计学意义(P<0.05, P<0.01)。提示,EOFAZ能提高ox-LDL诱导的细胞存活率。见表1。

3.2 对ox-LDL诱导损伤的HAECs中LDH,NO,eNOS和iNOS水平的影响 用酶标仪法试剂盒进行测定,与空白组比较,模型组LDH和iNOS水平明显升高(P<0.05, P<0.01),模型组NO和eNOS水平显著降低(P<0.01);与模型组比较,各阳性药物以及EOFAZ高、低质量浓度组明显降低LDH和iNOS水平,明显升高NO和eNOS水平(P<0.05,

表 1 MTT 法分析各药物对 200 mg·L⁻¹ ox-LDL 诱导 HAECs 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of different drugs on HAECs induced by 200 mg·L⁻¹ ox-LDL in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	A	存活率/%
空白	-	0.43 ± 0.068	100.0
模型	-	0.313 ± 0.039 ¹⁾	72.8
阿司匹林 ⁴⁾	2.5 × 10 ⁻⁴	0.402 ± 0.054 ³⁾	93.4
阿托伐他汀钙 ⁴⁾	1 × 10 ⁻⁶	0.372 ± 0.050 ²⁾	86.5
卡维地洛 ⁴⁾	1 × 10 ⁻⁶	0.391 ± 0.042 ³⁾	91.1
EOFAZ	100	0.391 ± 0.025 ³⁾	90.9
	10	0.375 ± 0.038 ²⁾	87.2

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$; ⁴⁾表示单位为 mol·L⁻¹。

表 2 EOFZA 对 HAECs 损伤 LDH, NO, eNOS 和 iNOS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of EOFZA on LDH, NO, eNOS and iNOS levels of HAECs injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LDH/U·L ⁻¹	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	eNOS/U·mL ⁻¹	iNOS/U·mL ⁻¹
空白	-	33.18 ± 9.67	185.92 ± 21.13	6.97 ± 0.65	3.67 ± 0.55
模型	-	67.51 ± 9.68 ²⁾	133.83 ± 7.33 ²⁾	4.06 ± 0.96 ²⁾	5.41 ± 1.31 ¹⁾
阿司匹林 ⁵⁾	2.5 × 10 ⁻⁴	47.32 ± 9.28 ³⁾	167.58 ± 14.36 ⁴⁾	5.95 ± 0.60 ⁴⁾	3.74 ± 0.43 ³⁾
阿托伐他汀钙 ⁵⁾	1 × 10 ⁻⁶	41.54 ± 11.03 ⁴⁾	159.25 ± 13.08 ³⁾	5.84 ± 0.92 ³⁾	4.08 ± 0.25
卡维地洛 ⁵⁾	1 × 10 ⁻⁶	49.91 ± 10.38 ³⁾	142.58 ± 21.92	5.61 ± 0.47 ³⁾	3.54 ± 0.37 ³⁾
EOFAZ	100	43.85 ± 7.89 ⁴⁾	175.92 ± 20.38 ⁴⁾	5.94 ± 1.12 ³⁾	3.47 ± 0.42 ³⁾
	10	49.05 ± 9.00 ³⁾	170.08 ± 17.02 ⁴⁾	5.44 ± 0.63 ³⁾	3.77 ± 0.92

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$; ⁵⁾表示单位为 mol·L⁻¹。

表 3 EOFZA 对 ox-LDL 诱导损伤的 HAECs 中 eNOS mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of EOFZA on eNOS mRNA expression of HAECs injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	eNOS/GAPDH
空白	-	1
模型	-	0.452 ± 0.050 ¹⁾
EOFAZ	100	0.706 ± 0.087 ²⁾
L-NAME ⁴⁾	100	0.526 ± 0.072 ^{1,3)}
EOFAZ + L-NAME ⁴⁾	100 + 100	0.520 ± 0.060 ^{1,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与 EOFZA 组比较³⁾ $P < 0.05$; ⁴⁾表示单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 4 EOFZA 对 ox-LDL 诱导损伤的 HAECs 中 iNOS mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of EOFZA on iNOS mRNA expression of HAECs injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	iNOS/GAPDH
空白	-	1
模型	-	1.589 ± 0.095 ¹⁾
EOFAZ	100	1.133 ± 0.169 ²⁾
L-NMMA ⁴⁾	300	1.482 ± 0.127 ³⁾
EOFAZ + L-NMMA ⁴⁾	100 + 300	1.469 ± 0.141 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$; ⁴⁾表示单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

$P < 0.01$)。结果提示, EOFZA 能明显降低 ox-LDL 诱导 HAECs 损伤的 LDH 的外漏量, 减少细胞损伤。见表 2。

3.3 对 ox-LDL 诱导损伤的 HAECs 中 iNOS 以及 eNOS mRNA 表达水平的影响 细胞经 ox-LDL 损伤后, eNOS mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), iNOS mRNA 表达水平显著增高 ($P < 0.01$)。而 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EOFZA 分别上调 ox-LDL 诱导内皮细胞中 eNOS mRNA 表达水平并下调 iNOS mRNA 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-NAME 与 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-NMMA 分别抑制 eNOS 和 iNOS, 导致 eNOS 和 iNOS mRNA 表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3, 4。

4 讨论

心血管疾病被称为影响人类健康的“第一大杀手”, 动脉粥样硬化是其最重要的病理基础。血管内皮细胞(VEC)损伤贯穿于 AS 的始终^[3]。在 VEC 损伤的诸多因素中, ox-LDL 是主要的危险因子, 参与了 VEC 损伤以及 AS 病变的发生发展过程^[4]。因此, 开展 ox-LDL 诱导的 VEC 研究具有十分重要的意义。本实验采用 HAEC 为研究对象, ox-LDL (200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 建立内皮细胞脂质损伤模型。MTT 实验结果表明 EOFZA 高、低质量浓度及各阳性药单独作用于 HAECs 对细胞无影响, 预保护后显著提高 ox-LDL 作用的 HAECs 存活率。LDH 是细胞损伤的标志物之一, 本实验采用 LDH 外漏试剂盒检测了培养上清液中 LDH 的外漏量, 结果表明, 除 ox-LDL 组 LDH 外漏显著增加外, 其余各组相对于模型组都有不同程度降低。以上结果证明了 EOFZA 对 ox-LDL 诱导的 HAEC 损伤具有保护作用。

NOS-NO 通路在调节内皮细胞生存功能方面起着重要作用。NO 是内皮细胞产生的血管源性舒张因子, 有舒张血管、降低血压、抑制 VSMC 增殖和

血小板黏附等许多重要的生理作用^[13]。正常生理情况下,血管舒张因子和收缩因子之间保持着功能平衡,从而能维持血管的正常张力;而在病理状态下,这种平衡被打破,血管舒张因子分泌减少,而收缩因子增多,导致细胞受损,血管功能破坏,引发心血管疾病^[5]。NOS 是影响 NO 生成的关键酶,是主要的限速因子,在人体内可将 L-Arg 催化生成 NO^[14]。NOS 包括 nNOS, eNOS 和 iNOS。nNOS 主要存在于神经元细胞中, eNOS 为维持细胞内皮功能必须的物质, iNOS 为细胞损伤的标志物质之一。通过 iNOS 衍生的 NO 促进细胞促炎信号的产生,使促炎因子释放;而通过 eNOS 衍生的 NO 能够干扰超氧化物的形成,抑制黏附分子表达,不断减少白细胞与内皮细胞的黏附、血小板的聚集和平滑肌细胞的增殖^[15]。实验结果表明, EOFAZ, 各种阳性药物以及 NOS 抑制剂进行干预后,能明显逆转 eNOS-iNOS 之间的不平衡,维持血管内皮 NO 的释放量,减少细胞损伤。Real-time PCR 分析结果显示,与空白组相比较, ox-LDL 处理后 eNOS mRNA 显著减少, iNOS mRNA 显著增多。提示 ox-LDL 导致了内皮细胞 eNOS 与 iNOS 两者合成的失衡。EOFAZ 能显著抑制 ox-LDL 诱导的 eNOS mRNA 的减少, iNOS mRNA 的增加,进而维持了血管内皮 NOS 系统的平衡,保护了血管内皮细胞的损伤。

[参考文献]

[1] 马桂鑫,赵文文,陈修平. 血管内皮细胞损伤模型及中药保护作用研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(2): 276-283.

[2] 杨桂棠,韩雅玲,闫承慧. E1A 激活基因阻遏子在动脉粥样硬化血管中的表达及其与炎症因子的关系[J]. 心脏杂志, 2016, 28(1): 7-10.

[3] 孙晓辉. 姜黄煎剂对血管内皮细胞损伤大鼠 TNF- α 及 CRP 的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(2): 37-39.

[4] Kiyani Y, Tkachuk S, Hilfiker-Kleiner D, et al. ox-LDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4 [J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 66

(1): 72-82.

[5] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳:贵州科技出版社, 2003:187.

[6] 李丹,李玉洁,杨庆,等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8):272-276.

[7] 张彦燕,文波,陶玲,等. EOFAZ 对脂多糖诱导损伤的血管内皮细胞保护作用研究[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(4):66-68.

[8] ZHANG Y Y, WEN B, JI Y P, et al. Protective effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* against human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injury induced by LPS [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 7(34):79-83.

[9] TAO L, HU H S, SHEN X C. Endothelium-dependent vasodilatation effects of the essential oil from *Fructus alpiniae zerumbet* (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings *in vitro* [J]. Phytomedicine, 2013, 20(5): 387-393.

[10] CHEN Y, LI D, XU Y N, et al. Essential oils from fructus *A. zerumbet* protect human aortic endothelial cells from apoptosis induced by ox-LDL *in vitro* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, doi: 10.1155/2014/956824.

[11] 文波,令狐克刚,徐旖旎,等. 艳山姜挥发油抑制 JNK1/2/3 磷酸化对 ox-LDL 诱导的 HAECs 损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22):112-115.

[12] 文波,张彦燕,徐旖旎,等. 卡维地洛对 ox-LDL 诱导的人主动脉内皮细胞损伤的保护作用[J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(8):789-792.

[13] 张彦燕,李桂川,张小金,等. 鱼腥草素钠对人脐静脉内皮细胞 NO 合成及 NOS 活力的影响[J]. 西南民族大学学报, 2014, 40(5): 711-714.

[14] 邓亚萍,赵婷,倪敏,等. eNOS: 糖尿病内皮细胞功能失调的一个关键因素[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(7):901-903.

[15] Grassi D, Desider G, Ferri C. Cardiovascular risk and endothelial dysfunction: the preferential route for atherosclerosis [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011, 12(9):1343-1353.

[责任编辑 周冰冰]