

# 银杏蜜环口服溶液作用 p38 MAPK 调节 eNOS/NO 信号途径 保护人脐静脉内皮细胞缺氧复氧损伤

韩笑<sup>1</sup>, 徐立<sup>1</sup>, 刘建勋<sup>1\*</sup>, 王益民<sup>2</sup>, 王勇<sup>2</sup>

(1. 中国中医科学院 西苑医院 基础医学研究所, 北京市中药药理重点实验室, 北京 100091;  
2. 西安步长中医心脑血管病医院, 西安 710082)

**[摘要]** **目的:** 评估银杏蜜环口服溶液对缺氧复氧损伤人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的保护作用;从 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)及内皮型一氧化氮合酶(eNOS)/一氧化氮(NO)信号途径探讨银杏蜜环口服溶液保护受损 HUVECs 的药效机制。**方法:** 缺氧缺糖/复氧复糖法建立体外 HUVECs 缺血再灌注损伤模型。分为正常组、模型组、银杏蜜环口服溶液高质量浓度组(75 mg·L<sup>-1</sup>, 简称银蜜高), 低质量浓度组(36 mg·L<sup>-1</sup>, 简称银蜜低), p38 MAPK 抑制剂 SB203580 组, 银蜜高 + SB203580 组, eNOS 抑制剂亚硝基左旋精氨酸甲酯(L-NAME)组, 银蜜高 + L-NAME 组。细胞增殖-毒性检测试剂盒(CCK-8)及微量酶标法检测细胞活力及细胞损伤;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)/p38 MAPK 和磷酸化 eNOS(p-eNOS)/eNOS 蛋白表达;酶联免疫吸附法(ELISA)检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)含量;硝酸盐还原酶法检测 NO 含量。**结果:** 银蜜高、银蜜低组可显著提高缺氧复氧损伤 HUVECs 活力、降低细胞乳酸脱氢酶(LDH)漏出量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );抑制受损细胞 p38 的磷酸化( $P < 0.05$ ), 降低细胞培养上清中 TNF- $\alpha$ , sICAM-1 含量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。在给予银蜜高或(和)SB203580 后, 受抑制的 eNOS 磷酸化表达水平显著升高( $P < 0.05$ );银蜜高可显著提高受损细胞 NO 含量, 在加入 eNOS 抑制剂 L-NAME 后, 银蜜高可拮抗 L-NAME 降低细胞 NO 生成和升高 Caspase-3 的作用( $P < 0.05$ )。**结论:** 银杏蜜环口服溶液可提高氧复氧损伤 HUVECs 活力, 具有抗炎、调节内皮系统、抑制细胞凋亡的作用, 机制与其作用于 p38 MAPK 进而调节 eNOS-NO 信号途径相关。

**[关键词]** 银杏蜜环口服溶液; 缺氧复氧; p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK); 内皮型一氧化氮合酶(eNOS); 一氧化氮(NO)

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0079-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2017230079

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1410.030.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-12 14:10

## Yinxing Mihuan Oral Solution Protect HUVECs Against Hypoxia Reoxygenation Injury Through p38 MAPK Regulating eNOS/NO Signaling Pathway

HAN Xiao<sup>1</sup>, XU Li<sup>1</sup>, LIU Jian-xun<sup>1\*</sup>, WANG Yi-min<sup>2</sup>, WANG Yong<sup>2</sup>

(1. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China;  
2. Xi'an Buchang Traditional Chinese Cardio-Cerebrovascular Disease Hospital, Xi'an 710082, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect and mechanism of Yinxing Mihuan oral solution on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injured by hypoxia/reoxygenation (H/R) through p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) regulating endothelial nitric oxide synthase (eNOS)/nitric oxide (NO)

**[收稿日期]** 20170627(005)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2015CB554405);中国中医科学院科技创新团队项目(Y13103)

**[第一作者]** 韩笑, 博士, 副研究员, 从事中药药理研究, Tel: 010-62835644, E-mail: hxfresh@sina.com

**[通讯作者]** \* 刘建勋, 博士, 首席研究员, 博士生导师, 从事心脑血管研究、中药新药研发, Tel: 010-62835601, E-mail: liujx0324@sina.com

signaling pathway. **Method:** Hypoxia ischemia/reperfusion injury model was established by hypoxia/hypoglycemia/reoxygenation on HUVECs. Cultured HUVECs were divided into control group, H/R group, Yinxing Mihuan oral solution high ( $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), low dose group ( $36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), p38 MAPK inhibitor SB203580, Yinxing Mihuan oral solution high dose + SB203580, eNOS inhibitor *L*-nitro-arginine methylester (*L*-NAME), Yinxing Mihuan oral solution high dose + *L*-NAME. Cell viability and cell injury were measured by cell counting kit-8 (CCK-8) and enzyme labeling method. Protein expression of phosphorylating-p38 MAPK (p-p38 MAPK) / p38 MAPK and phosphorylating-eNOS (p-eNOS) / eNOS were detected by Western blot. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). NO content was measured by nitrate reductase method. **Result:** Yinxing Mihuan oral solution high and low dose group could significantly improve cell viability and reduce lactate dehydrogenase (LDH) content ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), inhibit p-p38 MAPK expression on injured HUVECs, decrease TNF- $\alpha$ , sICAM-1 levels in cell culture supernatant ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The inhibited p-eNOS expression was significantly increased after administration of Yinxing Mihuan oral solution high dose and (or) SB203580 ( $P < 0.05$ ). Yinxing Mihuan oral solution high dose significantly increased the NO content of damaged HUVECs. After the addition of the eNOS inhibitor *L*-NAME, Yinxing Mihuan oral solution high dose could antagonize the effects of *L*-NAME on decreasing NO production and Caspase-3 elevation in injured HUVECs. **Conclusion:** Yinxing Mihuan oral solution can prevent HUVECs against H/R injury by resisting inflammatory, regulating the endothelial system and inhibiting apoptotic through p38 MAPK regulating eNOS/NO pathway.

[**Key words**] Yinxing Mihuan oral solution; hypoxia reoxygenation; p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK); eNOS; nitric oxide (NO)

血管内皮细胞是血流与血管壁之间的屏障结构,具有调节动脉血管舒缩、平衡凝血系统、血小板聚集、单核细胞黏附和促进新生血管生长等功能,是维持血管正常功能的关键因素。研究表明血管内皮炎症在动脉粥样硬化过程各个阶段均起到重要作用<sup>[1]</sup>。减轻炎症和改善内皮功能对治疗及预防心血管事件具有重要意义<sup>[2]</sup>。炎症反应调控系统中,p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)是一重要的信号通路,在缺血性心肌病中起关键作用<sup>[3]</sup>。它的激活可使转录因子和胞质蛋白质磷酸化,黏附分子等高表达,中性粒细胞活化增加,最后引起心肌坏死和凋亡<sup>[4-5]</sup>。因此,降低 p38 MAPK 信号途径活性可减轻心肌损伤<sup>[6]</sup>。

银杏蜜环口服溶液由银杏叶提取物、蜜环菌粉组成。银杏叶提取物具有活血化瘀通络之功,蜜环菌可镇静安神,该药上市后,广泛用于冠心病、心绞痛、缺血性脑血管疾病,可改善心、脑缺血性症状<sup>[7-8]</sup>。临床研究表明银杏蜜环口服液可升高肱动脉内皮依赖性舒张功能和一氧化氮(NO)水平,降低内皮素水平,具有改善血管内皮功能的作用<sup>[9]</sup>。但是,该药保护血管内皮的机制不明,且目前尚无该药对血管内皮炎症反应的研究报道。为明确银杏蜜

环口服溶液发挥临床疗效的药理机制,实验首先建立人脐静脉内皮细胞(HUVECs)缺氧复氧模型,观察药物对内皮细胞的保护作用;进而研究该药对 p38 MAPK,对内皮系统内皮型一氧化氮合酶(eNOS)/NO 的影响,探讨银杏蜜环口服溶液保护血管内皮细胞的机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人脐静脉内皮细胞(武汉赛普诺生命科技有限公司,批号 CL-0122)。

**1.2 药物** 银杏蜜环口服溶液(含银杏叶提取物  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,蜜环粉  $0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,邛崃天银制药有限公司,批号 160312)。

**1.3 试剂** 人脐静脉内皮细胞专用培养基(武汉赛普诺生命科技有限公司,含 Ham's F-12 培养基,  $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  肝素,  $0.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  内皮细胞生成因子,1% 青-链霉素,批号 PM17FEB006);DMEM 高糖培养基(天津 BioRoc 公司,批号 150923H);无糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 1710161);胰蛋白酶(北京 Solarbio 公司,批号 20150605);p38 MAPK 抑制剂 SB203580,eNOS 抑制剂亚硝基左旋精氨酸甲酯(*L*-NAME)及 NO 试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所,批号分别为 072616161229,030816161111,

121916170124); 细胞增殖-毒性检测 (CCK-8) 试剂盒 (日本 Dojindo 公司, 批号 GA611); BCA 蛋白浓度测定和乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20161019, 20170110); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒 (美国 Cloud-Clone Corp 公司, 批号分别为 L170125222, L170125216); 溶性细胞间黏附分子-1 (sICAM-1) ELISA 试剂盒 (南京 KeyGEN BioTECH 公司, 批号 20170209); 免疫印迹高灵敏度化学发光检测试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司, 批号 QF218488A); 小鼠抗 p38, p-p38 抗体, 兔抗磷酸化-eNOS (p-eNOS), eNOS, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号分别为 31828, 178867, GR159274-35, GR79258-2, 301708-1); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体和山羊抗小鼠 IgG 抗体 (北京 YUABIO 公司, 批号分别为 127760, 127655) 等。

**1.4 仪器** 371 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo 公司); IX51 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); HVE-50 型高压蒸气消毒器 (日本 Hirayama 公司); BHC-1300 II A/B3 生物安全柜 (苏净集团安泰公司); BSA224S-CW 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); SYNERGY4 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); IEC CL31R 型冷冻高速离心机 (美国 Thermo 公司); Power Pac Universal 型电泳仪, 1703930 型转移槽, ChemiDoc™ XRS + 型凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 HUVECs 的培养** 取冻存于液氮中的 HUVECs 细胞, 37 °C 水浴中迅速解冻, 将细胞转移至离心管, 加入人脐静脉内皮细胞专用培养基, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 沉淀用专用培养基 5 mL 重悬, 培养箱中静置培养。待细胞达到 80% 融合时, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 专用培养基重悬, 调节细胞密度至 0.5 × 10<sup>5</sup> ~ 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种于细胞培养瓶或 96 孔板内。复苏细胞稳定 2 ~ 3 代后, 用于实验。

### 2.2 HUVECs 细胞缺氧复氧损伤模型的建立<sup>[10]</sup>

接种于细胞板或细胞瓶中的细胞, 弃旧培养基, PBS 洗板/孔 2 次之后, 换成低氧处理过的无糖 DMEM 或含药无糖 DMEM, 将细胞放进充入氮气的缺氧盒中密闭培养 4 h (缺氧缺糖缺血清); 缺氧结束后, 每孔加入葡萄糖, 使葡萄糖终质量浓度为

4.5 g·L<sup>-1</sup>, 放回培养箱中进行 2 h 的复氧复糖操作。

**2.3 分组及给药** 细胞随机分为正常组, 模型组 (缺氧复氧损伤), 银杏蜜环口服溶液高质量浓度组 (75 mg·L<sup>-1</sup>, 简称银蜜高), 低质量浓度组 (36 mg·L<sup>-1</sup>, 简称银蜜低), p38 MAPK 抑制剂 SB203580 组 (10 μmol·L<sup>-1</sup>), 银蜜高 + SB203580 组, eNOS 抑制剂 L-NAME 组 (1 mmol·L<sup>-1</sup>), 银蜜高 + L-NAME 组<sup>[9]</sup>。正常组用高糖 DMEM 培养基培养; 模型组用无糖无氧 DMEM 培养基培养, 缺氧同时不加任何药物; 给药组缺氧同时加入各受试药物 (受试药物用无氧无糖 DMEM 培养基配制), 其余过程同模型组。缺氧复氧结束后, 取细胞进行下述操作。

**2.4 HUVECs 细胞活力 CCK-8 检测** 细胞活力检测采用 CCK-8 法, 复氧结束后, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL, 继续培养 4 h 后, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 *A*。

**2.5 HUVECs 细胞上清 LDH 含量的检测** 实验结束后, 收集细胞上清液, 进行 LDH 检测, 评估药物对细胞的保护作用。按试剂盒说明书设定空白孔、标准孔、测定孔和对照孔, 将试剂混匀按要求孵育相应时间, 酶标仪测定吸光度 *A*<sub>450 nm</sub>。

**2.6 HUVECs 细胞 p38 MAPK, eNOS 蛋白表达的检测** 实验结束后, 细胞用预冷 PBS 洗涤 3 次, RIPA 细胞裂解液冰上裂解 30 min, 离心取上清, BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取等量总蛋白上样, SDS-PAGE 分离后, 将蛋白转印至 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 2 h, 小鼠单克隆抗体 p-p38 MAPK (1:500), 小鼠单克隆抗体 p38 MAPK (1:500), 兔多克隆抗体 p-eNOS (1:1 000), 兔多克隆抗体 eNOS (1:1 000), 4 °C 冰箱孵育过夜。TBST 洗膜 5 次, 辣根过氧化物酶标记二抗 (1:10 万) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 5 次, 增强型化学发光试剂 (ECL) 显色, 系统成像软件灰度分析, 以各组细胞 p-p38 MAPK/p38 MAPK 或 p-eNOS/eNOS 蛋白表达与内参 GAPDH 表达的比值表示蛋白表达水平。

**2.7 ELISA 对 HUVECs 细胞 sICAM-1, TNF- $\alpha$ , Caspase-3, NO 的检测** 实验结束后, 取细胞上清检测。按说明书精确配制对照品, 严格按照说明书要求依次加入对照品、样品和检测试剂, 混匀孵育相应时间后, 酶标仪测定 sICAM-1, TNF- $\alpha$  及 Caspase-3 *A*<sub>450 nm</sub>, 测定 NO *A*<sub>540 nm</sub>。绘制相应的标准曲线, 计算所测指标含量。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS17.0 软件统计分析, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 One-Way ANOVA (单因素方差分析) 方法, 方差齐性应用 Tukey 检验, 方差不齐采用 Tamhane's  $T_2$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 银杏蜜环菌口服溶液对缺氧复氧损伤 HUVECs 细胞活力及 LDH 含量的影响** 细胞活力 CCK-8 及 LDH 检测结果显示, 缺氧复氧损伤后 HUVECs 细胞活力(A)显著降低, LDH 漏出增多, 与正常组比较具有统计学差异 ( $P < 0.01$ ), 提示细胞损伤严重。各给药组处理后细胞活力(A)升高、细胞上清中 LDH 含量降低, 其中银蜜高、低浓度组与模型组比较, 具有统计学差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 且银蜜高组提高细胞活力的作用显著优于银蜜低组 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 银杏蜜环口服溶液对缺氧复氧损伤 HUVECs 细胞活力及 LDH 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

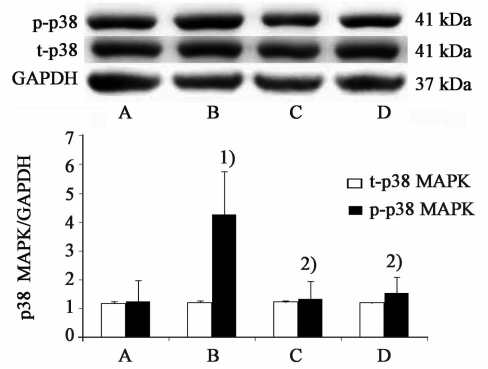
Table 1 Effect of Yinxing Mihuan oral solution on cell viability and LDH level ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	2.20 ± 0.04	58.84 ± 21.54
模型	-	0.98 ± 0.12 <sup>1)</sup>	201.52 ± 59.72 <sup>1)</sup>
银蜜	75	1.43 ± 0.07 <sup>3,4)</sup>	106.57 ± 43.73 <sup>3)</sup>
	36	1.19 ± 0.06 <sup>3)</sup>	123.74 ± 35.49 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; 与银蜜低剂量组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 ~ 3 同)。

**3.2 银杏蜜环口服溶液对缺氧复氧损伤 HUVECs 细胞 p38 蛋白表达的影响** p-p38 MAPK 及 t-p38 MAPK 蛋白量表达水平采用灰度值校正值显示 (各条带灰度值/内参 GAPDH 灰度值)。结果显示, 正常组及缺氧复氧损伤后, 模型组及各给药组 t-p38 表达量无明显差异。与正常组比较, 模型组 p-p38 蛋白表达量增高显著 ( $P < 0.05$ ), 提示缺氧复氧损伤可激活 p38 蛋白的磷酸化。与模型比较, 银蜜高、低剂量组均可抑制缺氧复氧损伤时 p38 的磷酸化 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

**3.3 银杏蜜环口服溶液对缺氧复氧损伤 HUVECs 细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ , sICAM-1 含量的影响** 与正常组比较, 模型组 HUVECs 细胞培养上清中 TNF- $\alpha$ , sICAM-1 含量增高显著 ( $P < 0.05$ )。银蜜高, p38 抑制剂 SB203580 均可降低缺氧复氧损伤后细胞培养上清中 TNF- $\alpha$ , sICAM-1 的含量 ( $P < 0.05, P <$



A. 正常组; B. 模型组; C. 银蜜高组; D. 银蜜低组; 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$

图 1 银杏蜜环口服溶液对缺氧复氧损伤 HUVECs 细胞 p38 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effect of Yinxing Mihuan oral solution on p38 expression ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

0.01)。银蜜高 + SB203580 组处理后, TNF- $\alpha$ , sICAM-1 含量进一步降低, 与模型组比较 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

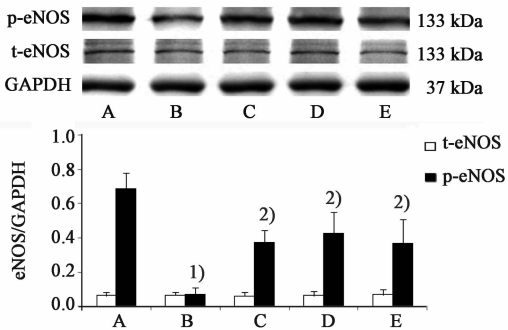
表 2 银杏蜜环口服溶液对缺氧复氧 HUVECs 细胞 TNF- $\alpha$ , sICAM-1 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Yinxing Mihuan oral solution on TNF- $\alpha$ , sICAM-1 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度	TNF- $\alpha$	sICAM-1
正常	-	5.26 ± 1.57	0.20 ± 0.07
模型	-	29.32 ± 9.33 <sup>1)</sup>	0.94 ± 0.08 <sup>1)</sup>
银蜜	75 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	19.18 ± 5.65 <sup>2)</sup>	0.67 ± 0.12 <sup>2)</sup>
	36 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	25.69 ± 5.44	0.81 ± 0.10
SB203580	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	15.66 ± 5.35 <sup>3)</sup>	0.6 ± 0.09 <sup>3)</sup>
银蜜高 + SB203580	75 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	13.83 ± 3.61 <sup>3)</sup>	0.52 ± 0.12 <sup>3)</sup>

**3.4 银杏蜜环口服溶液对缺氧复氧损伤 HUVECs 细胞 eNOS 蛋白表达的影响** 各组细胞 t-eNOS 表达基本无差异。与正常组比较, 模型组 p-eNOS 表达量显著降低 ( $P < 0.01$ )。经 SB203580, 银蜜高处理后, p-eNOS 表达量显著升高, 与模型组比较  $P < 0.05$ , 提示银杏蜜环口服溶液有与 S203580 具有类似的作用, 且两者合用可进一步促进 eNOS 的磷酸化 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

**3.5 银杏蜜环口服溶液对缺氧复氧损伤 HUVECs 细胞 NO 含量的影响** 与正常组比较, 模型组 NO 浓度降低。与模型组比较, eNOS 抑制剂 L-NAME 进一步降低受损细胞 NO 浓度, 与正常组比较有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。银蜜高剂量组处理后, 细胞上清中 NO 浓度升高, 与模型组比较  $P < 0.05$ , 与 L-NAME 组比



A. 正常组; B. 模型组; C. SB203580 组; D. 银蜜高 + SB203580 组; E. 银蜜高组; 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$

图 2 银杏蜜环口服溶液对缺氧复氧损伤 HUVECs 细胞 eNOS 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig. 2 Effect of YinXing MiHuan oral solution on eNOS expression ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

较  $P < 0.01$ , 提示对细胞有保护作用。银蜜高 + L-NAME 合用结果显示, 银蜜高有抗 eNOS 抑制剂 L-NAME 减少细胞 NO 生成的作用趋势。见表 3。

表 3 银杏蜜环口服溶液对缺氧复氧损伤 HUVECs 细胞培养上清 NO, Caspase-3 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 3 Effect of YinXing MiHuan oral solution on NO and Caspase-3 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	浓度	NO / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Caspase-3 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	2.75 ± 0.33	0.49 ± 0.22
模型	-	0.97 ± 0.19 <sup>1)</sup>	1.45 ± 0.44 <sup>1)</sup>
银蜜	75 mg·L <sup>-1</sup>	1.65 ± 0.40 <sup>2,5)</sup>	0.90 ± 0.13 <sup>2,4)</sup>
	36 mg·L <sup>-1</sup>	1.19 ± 0.25	1.21 ± 0.21 <sup>4)</sup>
L-NAME	1 mmol·L <sup>-1</sup>	0.87 ± 0.27 <sup>1)</sup>	1.98 ± 0.27 <sup>1,2)</sup>
银蜜高 + L-NAME	75 mg·L <sup>-1</sup> + 1 mmol·L <sup>-1</sup>	1.22 ± 0.36	1.26 ± 0.36 <sup>2,5)</sup>

注: 与 L-NAME 组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.6 银杏蜜环菌口服溶液对缺氧复氧损伤 HUVECs 培养上清 Caspase-3 含量的影响** 与正常组比较, 模型组细胞培养上清中 Caspase-3 含量升高, 提示细胞凋亡的发生。银蜜高剂量处理后, 细胞上清中 Caspase-3 水平显著降低, 与模型组比较具有统计学差异, 提示对细胞有保护作用。eNOS 抑制剂 L-NAME 可进一步促进受损细胞培养上清中 Caspase-3 含量的升高, 与模型组和正常组比较均有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。银蜜高剂量与 L-NAME 合用, 培养上清 Caspase-3 含量降低, 提示银蜜高可对抗 L-NAME 促细胞凋亡的作用, 与模型组比较具有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

#### 4 讨论

MAPK 属于丝蛋白/(苏氨酸)激酶。p38 是 MAPK 家族控制炎症反应最重要的成员, p38 MAPK 信号通路参与巨噬细胞、嗜中性粒细胞的功能性反应, 包括黏附和凋亡等, 在多种心血管疾病的发生发展过程中起重要作用<sup>[11]</sup>。内皮细胞内的 p38 可因生理性应激、脂多糖、渗透性应激和缺血再灌注等刺激而激活, 并可影响内皮细胞功能异常<sup>[12-13]</sup>。过阻断和调控 p38 MAPK 的表达和活性, 探索防治心血管疾病的新的治疗手段具有重大临床意义<sup>[14]</sup>。该课题建立缺氧复氧诱导的 HUVECs 损伤为研究模型, 明确银杏蜜环口服溶液保护受损内皮细胞的作用之后, 初步探讨银杏蜜环口服溶液保护受损内皮细胞与 p38 MAPK 之间关系, 以及 p38 MAPK 对内皮系统 eNOS 的调节作用, 研究银杏蜜环口服溶液保护受损 HUVECs 细胞的机制。

实验证实了银杏蜜环口服溶液可提高缺氧复氧损伤 HUVECs 细胞活力、降低 LDH 漏出量, 减轻细胞损伤。HUVECs 受缺氧复氧诱导后, 细胞 p-p38 表达升高, 银杏蜜环口服溶液可下调 p-p38 表达, 与模型组比较具有显著差异。提示 p38 MAPK 信号蛋白可能参与了银杏蜜环口服溶液保护血管内皮细胞的行为。为明确 p38 MAPK 磷酸化受到抑制后, 对炎症因子是否有影响, 笔者加入了 p38 MAPK 抑制剂 SB203580, 发现经银蜜或(和)SB203580 处理后的 HUVECs 细胞培养上清中 TNF- $\alpha$ , sICAM-1 的含量显著降低, 提示银杏蜜环口服溶液降低细胞炎症因子的作用与 P38 抑制剂 SB203580 相似; 银杏蜜环口服溶液可能通过下调 p38 MAPK 信号蛋白的磷酸化表达, 抑制缺氧复氧诱导的炎症因子 TNF- $\alpha$ , sICAM-1 病理性增加。

eNOS 一种重要的调节血管内皮细胞的蛋白酶, 是合成 NO 的关键酶。NO 是内皮细胞生成的重要保护因子, 具有松弛血管平滑肌、调节血管张力、抗血栓、抗动脉粥样硬化和抑制细胞凋亡的作用<sup>[15]</sup>。NO 产生减少或生物活性下降是导致内皮功能障碍的主要原因。

为了明确 p38 MAPK 信号蛋白参与银杏蜜环菌口服溶液保护血管内皮细胞的作用是否涉及到 eNOS 活性的调节, 检测了各实验组 eNOS 的蛋白表达。发现缺氧复氧损伤后 HUVECs eNOS 的磷酸化表达下降, 而银杏蜜环菌口服液, SB203580 及二者合用可上调 eNOS 的磷酸化表达, 与模型组比较, 具有统计学差异。提示银杏蜜环口服溶液有可能通过

p38 MAPK 信号通路调节 eNOS 的表达。NO 检测结果表明, 缺氧复氧损伤及 eNOS 抑制剂 L-NAME 均可导致细胞 NO 生成减少, Caspase-3 含量增加, 银杏蜜环口服溶液可提高受损细胞 NO 含量, 降低 Caspase-3 含量, 拮抗 eNOS 抑制剂 L-NAME 对 eNOS/NO 系统的抑制作用, 提示银杏蜜环口服溶液通过 eNOS/NO 途径促进细胞 NO 的生成, 进而抑制由缺氧复氧诱导的内皮细胞凋亡。

综上所述, 银杏蜜环口服溶液对缺氧复损伤 HUVECs 细胞的保护机制与其作用于 p38 MAPK, 进而调节 eNOS/NO 信号途径相关。银杏蜜环口服溶液首先抑制了 p38 MAPK 信号蛋白的磷酸化, 降低炎症因子水平; 并通过 p38 MAPK 信号通路调节内皮细胞 eNOS 的磷酸化表达, 进而促进 NO 的生成, 最终减少 Caspase-3 病理性升高, 从而达到保护内皮细胞的作用。

[参考文献]

[1] Gardner A W, Parker D E, Montgomery P S, et al. Impaired vascular endothelial growth factor A and inflammation in patients with peripheral artery disease [J]. *Angiology*, 2014, 65(8): 683-690.

[2] Tousoulis D, Charakida M, Stefanadis C. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease [J]. *Heart*, 2006, 92(4): 441-444.

[3] 陈冰心, 任澎. 心肌缺血再灌注损伤信号分子 p38 MAPK 的研究进展 [J]. *心肺血管病杂志*, 2010, 29(1): 68-70.

[4] 任澎, 刘永国, 郭敏, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶介导大鼠心肌缺血再灌注损伤信号传导的研究 [J]. *中国循环杂志*, 2012, 27(5): 387-390.

[5] 刘流, 周海洋, 冉珂, 等. p38 MAPK 信号通路在甘草酸二铵减轻兔心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(2): 298-300.

[6] 丁洪涛, 刘霖, 王智超. p38 MAPK 抑制剂对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及凋亡信号通路的影响 [J]. *临床和实验医学杂志* 2014, 13(6): 425-428.

[7] 闫洁, 袁森. 银杏蜜环口服溶液联合阿司匹林肠溶片和氯吡格雷治疗冠心病心绞痛的疗效观察 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(10): 1575-1578.

[8] 李广宣. 银杏蜜环口服溶液治疗风痰瘀血证脑梗死临床研究 [J]. *中医学报*, 2013, 28(5): 737-738.

[9] 范国颖, 谢岩, 刘文忠. 银杏蜜环口服液对不稳定型心绞痛病人 CRP、E-SOD、P-LPO、E-LPO 的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(18): 2137-2041.

[10] 鲁谦, 白鹏, 周荣, 等. 二甲双胍对人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧损伤的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(3): 247-251.

[11] YANG Y, KIM S C, YU T, et al. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, doi:10.1155/2014/352371.

[12] Palmieri D, Aliakbarian B, Casazza A A, et al. Effects of polyphenol extract from olive pomace on anoxia-induced endothelial dysfunction [J]. *Microvasc Res*, 2012, 83(3): 281-289.

[13] 刘倩, 石颖, 殷惠军. p38MAPK 信号通路与内皮细胞激活 [J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2011, 11(5): 308-311.

[14] 王蒙, 陈绍良. P38MAPK 信号通路与心血管疾病关系的研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(30): 2968-2970.

[15] Park S, Sorenson C M, Sheibani N. PECAM-1 isoforms, eNOS and endoglin axis in regulation of angiogenesis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129(3): 217-234.

[责任编辑 邹晓翠]