

心肌尔康对血管紧张素 II 诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的作用

蔡毓威, 程攀, 黄光耀, 连凤珍, 王小云, 胡娟, 张永学, 高杉*
(安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032)

[摘要] **目的:**研究心肌尔康(XJEK)对血管紧张素 II(Ang II)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的作用,并探讨相关的作用机制。**方法:**体外培养 HUVECs 细胞,随机分为 7 组,分别为空白组,Ang II ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组,Ang II ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 心肌尔康不同质量浓度组(0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),噻唑蓝(MTT)比色法检测 HUVECs 的活性;Griess 法测定一氧化氮(NO)含量;流式细胞仪检测细胞内活性氧(ROS)的水平;钙成像仪测定细胞胞浆内游离钙离子(Ca^{2+})浓度;比色法及 TBA 法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测内皮型一氧化氮合酶(eNOS)蛋白表达水平。**结果:**与空白组比较,Ang II 组内皮细胞活力,NO 释放,eNOS 蛋白表达及 SOD 活力明显降低,MDA,ROS 含量和内皮细胞胞浆内 Ca^{2+} 浓度明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 Ang II 组比较,心肌尔康可剂量依赖性提高内皮细胞活力,促进 NO 释放、增加 eNOS 蛋白的表达;升高 SOD 活力,抑制 MDA,ROS 含量和内皮细胞胞浆内 Ca^{2+} 浓度的升高,各指标差异均具有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**心肌尔康对 Ang II 诱导的内皮损伤具有明显的保护作用,其可能机制为抑制细胞内 Ca^{2+} 超载和降低氧化应激水平。

[关键词] 心肌尔康; 黄芪; 人参; 玉竹; 人脐静脉内皮细胞; 血管紧张素 II; 钙离子

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0103-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20180929

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180222.1654.009.html>

[网络出版时间] 2018-02-22 22:26

Effect of Xinji Erkang on Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Jury Induced by Angiotensin II

CAI Guo-wei, CHENG Pan, HUANG Guang-yao, LIAN Feng-zhen,

WANG Xiao-yun, HU Juan, ZHANG Yong-xue, GAO Shan*

(Basic Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Xinji Erkang (XJEK) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injury induced by angiotensin II (Ang II). **Method:** HUVECs were cultured *in vitro* and randomly divided into 7 groups as follows: control group, Ang II ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group, and Ang II ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + XJEK groups (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Thiazole blue (MTT) assay was used to examine HUVEC viability. The level of reactive oxygen species (ROS) and the intracellular free calcium concentration were measured by flow cytometry and Calcium Imager respectively. The content of nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were detected by colorimetric and TBA analysis. Western blot was applied to determine the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein. **Result:** Compared with the control group, the Ang II group showed significant reduction in endothelial cell vitality, NO release and eNOS protein expression, and significant increase in MDA and ROS content and Ca^{2+}

[收稿日期] 20171208(007)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301012);国家自然科学基金面上项目(81373774)

[第一作者] 蔡毓威,在读硕士,从事心血管药理学研究工作,E-mail:caiguowei@stu.ahmu.edu.cn

[通信作者] *高杉,博士,教授,从事心血管药理学研究工作,Tel:0551-6516133,E-mail:gaoshan@ahmu.edu.cn

concentration in endothelial cell cytoplasm ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the Ang II group, XJEK could obviously improve endothelial dysfunction (ED) by promoting eNOS activities and enhancing NO in a dose-dependent manner. Moreover, XJEK could up-regulate SOD activity and down-regulate MDA content significantly. In addition, after treatment with XJEK, ROS level and intracellular Ca^{2+} concentration in endothelial cells were decreased compared with the Ang II group ($P < 0.05$). **Conclusion:** These results suggest that XJEK has a protective effect on AngII-induced HUVECs injury, and the mechanism underlying may contribute to inhibiting intracellular Ca^{2+} overload and improving ED and ameliorating ROS.

[**Key words**] Xinji Erkang; Astragali Radix; Ginseng Radix et Rhizoma; Polygonati Odorati Rhizoma; human umbilical vein endothelial cells (HUVECs); angiotensin II; calcium ion

内皮细胞不仅仅是血管的一道屏障,还是分泌血管活性物质的重要器官。内皮细胞损伤或功能障碍,会引起一系列的心血管疾病,如动脉粥样硬化、高血压和冠心病^[1-2]。既往的研究发现,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAS)的过度激活是导致内皮细胞损伤和功能障碍的主要原因之一^[3]。血管紧张素 II (Ang II)作为 RAS 系统激活的重要组成部分和最终效应者,高浓度的 Ang II 可导致内皮细胞损伤^[4]。近些年来围绕中药对内皮细胞作用的研究发现,参元丹胶囊、钩藤碱、黄芪甲苷等中药复方或单体可对高浓度 Ang II 所导致的内皮细胞损伤有明显的保护作用^[5-7],提示中药经由内皮细胞损伤保护发挥心血管疾病治疗作用具有很大的潜力。

心肌尔康是临床使用多年中药验方,主要由黄芪、人参、玉竹、麦冬等多味中药组成。临床研究显示心肌尔康对“胸痹”具有明显的治疗效果^[8-9],本课题组前期的研究发现,心肌尔康对两肾一夹诱导高血压大鼠和小鼠心肌梗死(MI)模型等都具有明显的实验治疗作用,其作用机制至少部分与抑制 RAS 系统过度激活和恢复内皮细胞功能有关^[10-12],但心肌尔康对内皮细胞是否有直接的作用尚不明确。本实验拟以 Ang II 建立人脐静脉内皮细胞(HUVECs)体外损伤模型,观察心肌尔康对 Ang II 诱导 HUVECs 损伤的作用,并对其作用机制进行初步的探讨,希冀能为临床用药提供进一步的理论支持和实验依据。

1 材料

1.1 HUVECs 细胞培养 HUVECs 生长于含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中,在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养细胞生长汇合成单层后,胰酶消化并收集细胞备用,使用时均匀接种于 25 cm² 细胞培养瓶或培养板中。

1.2 药物及试剂 心肌尔康水提浸膏干粉由合肥七星医药科技有限公司所制备(黄芪、人参、玉竹、

麦冬等原药按比例,经过水提、浓缩、喷雾干燥制成干粉,生药量 0.406 g·g⁻¹);AngII(美国 Aladdin 公司,批号 F1517013);噻唑蓝(MTT)粉剂(美国 Sigma 公司,批号 MKBN7264V);Fluo-8 AM 钙离子荧光探针,内皮型一氧化氮合酶(eNOS)一抗(美国 Abcam 公司,批号分别为 GR302495-4, GR291477-4);血管性血友病因子(vWF)一抗、山羊抗兔二抗和山羊抗鼠二抗(北京中杉金桥公司,批号分别为 ZP126BP26, 125946, 127655);超氧化物歧化醇(SOD)检测试剂盒和丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170724, 20170608);0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液,活性氧(ROS)检测试剂盒,一抗稀释液,苯甲基磺酰氟(PMSF),十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液和放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解液(碧云天公司,批号分别为 101617170301, 040116161206, 101617170602, 101116161206, 101917170627, 101217170421);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗,增强型化学发光试剂(ECL)试剂盒(美国 Affinity 公司,批号分别为 775153, 8290b25);其余化学试剂均为分析纯。

1.3 仪器 BBS-SDC 型超净工作台, QP-160 型二氧化碳培养箱(山东 Biobase 公司);FACSAria III 流式细胞仪(美国 BD 公司);Multiskan GO 型全自动酶标仪(美国 Thermo 公司);DG4P-312 型钙成像仪(美国 Lambda 公司);CX-31 型荧光学倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Mini-P3 型垂直电泳仪及转模仪, Gel Doc 1000 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 实验分组 以本实验室之前动物实验的研究为基础结合文献报道^[7-9],设置细胞实验用药质量浓度梯度,0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 g·L⁻¹ 心肌尔康,将药品加入无血清培养基中,再用超声波助溶 5 min 后使用 0.22 μm 的过滤器过滤^[13],并在 24 h 内使用,

心肌尔康主要组成成分见表 1。将细胞随机分为 7 组,空白组,AngII 组 ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), AngII 组 + 不同质量浓度心肌尔康 (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

表 1 心肌尔康主要药材组成

Table 1 Recipe of Xinji Erkang (XJEK) formulation

药材	标本号码	使用部位	组成比/%
人参	PCAHMU-20121005	根	11.71
玉竹	PCAHMU-20121006	根茎	7.18
三七	PCAHMU-20121007	根	3.09
小根蒜	PCAHMU-20121008	枝	7.80
当归	PCAHMU-20121009	根	7.80
麦冬	PCAHMU-20121010	根	7.80
五味子	PCAHMU-20121011	果实	3.93
丹参	PCAHMU-20121012	根	7.80
苦参	PCAHMU-20121013	根	7.80
甘草	PCAHMU-20121014	根茎	7.80
黄芪	PCAHMU-20121015	根	11.69
淫羊藿	PCAHMU-20121016	叶	7.80
瓜蒌	PCAHMU-20121017	种子	7.80

2.2 内皮细胞株鉴定 首先将细胞以 5×10^4 个/孔均匀的种在放有盖玻片的 6 孔板内,培养 24 h 后弃去细胞上清,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次,使用 4% 的多聚甲醛溶液固定细胞,30 min 后用 PBS 清洗 3 次,加入 1% TrintonX-100 透化处理 10 min 后用 PBS 清洗 3 次,透化处理后加配置好的封闭液封闭 30 min,然后加入稀释后的 vWF 一抗 (1:50),4 $^{\circ}\text{C}$ 避光过夜,第 2 天吸去一抗,并用 PBS 洗涤 3 次,滴加二抗 (1:100),避光孵育 1 h 后在荧光显微镜下观察,在 400 倍镜下拍照。

2.3 MTT 法检测细胞活力 用胰酶消化后收集细胞,用含血清的培养基重悬细胞,并吹打均匀后按 3 000 个/孔接种于 96 孔板内,每孔 100 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养,培养 24 h 后随机分为 7 组,按 2.1 项所述处理方法处理细胞,每组设置 6 个复孔,待到达指定时前 4 h,拿出 96 孔板,吸取上清,每孔使用 PBS 清洗 3 次,加入无血清培养基 100 μL ,然后每孔加入 MTT 溶液 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h,接着将 96 孔板从培养箱拿出,小心吸去孔内上清,每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μL 后,在摇床上振荡 10 min,选择 490 nm 波长,使用酶标仪测定各孔吸光度 A,减去调零孔的数值作为细胞活力值(用只加培养基没加细胞的孔作为调零孔)。

2.4 Griess 化学法测定细胞上清 NO 含量 将 HUVECs 以密度 2×10^4 个/孔均匀的种于 12 孔板种,待培养 24 h 后随机分为 7 组,按 2.1 项所述处理方法处理细胞,每组设置 6 个复孔,继续培养 24 h 后,每组每孔取上清 40 μL ,加入 Griess 试剂 160 μL (0.1% 萘乙二胺溶液与 1% 磺胺,5% 磷酸溶液,现配现用)后,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min,酶标仪 550 nm 波长处检测 A,根据 NO 标准曲线计算 NO 含量 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.5 Fluo-8 AM 探针检测细胞内游离钙离子浓度 将 HUVECs 细胞均匀的种于 6 孔板,待培养 24 h 后,随机分为 7 组,按 2.1 项所述处理方法处理细胞,继续培养 24 h 后,加入 Fluo-8 AM 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育细胞 30 min 后,用不含钙离子的缓冲溶液中冲洗 3 遍后将放于倒置荧光显微镜上,用 488 nm 波长的激发光激发钙离子荧光探针 Fluo-8 AM 发射荧光,荧光强度值大小反映胞浆内钙离子浓度高低,在 400 倍镜下拍摄并分析,以上每组取 6 个细胞计算平均荧光强度,以平均荧光强度来表示细胞内相对钙离子的浓度。

2.6 流式细胞仪检测细胞内 ROS 含量 将 HUVECs 种于 6 孔板,培养 24 h 后,随机分为 7 组,按 2.1 项所述处理方法处理细胞,继续培养 24 h 后,胰酶消化细胞,收集 6 孔板中内皮细胞,加入含 DCFH-DA 探针的无血清培养基 (探针稀释 1:1 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,期间每隔 5 min 摇晃 1 次,使细胞充分与 DCFH-DA 探针接触。30 min 后细胞悬液用 PBS 清洗 3 次,最后在 PBS 中被重新悬浮,然后通过流式细胞仪测量荧光强度,实验重复 3 次。

2.7 荧光显微镜观察细胞内 ROS 含量 将 HUVECs 种于 6 孔板,培养 24 h 后,随机分为 7 组,按 2.1 项所述处理方法处理细胞,继续培养 24 h 后,吸去含药上清,用 PBS 清洗 3 次,加入含 DCFH-DA 探针的无血清培养基 (探针稀释 1:1 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,期间每隔 5 min 摇晃 1 次,使细胞充分与 DCFH-DA 探针接触。30 min 后用 PBS 清洗 3 次,然后通过荧光显微镜观察,在 400 倍镜下拍照,实验重复 3 次。

2.8 邻苯三酚比色法检测细胞上清 SOD 含量 细胞接种于 6 孔板,分组及处理方法同 2.1 项,继续培养 24 h 后,取各组细胞上清液 100 μL ,按试剂盒所述方法测定,实验重复 3 次。

2.9 TBA 法检测细胞内 MDA 含量 首先将细胞接种于 6 孔板,每孔约 1×10^6 个细胞,培养 24 h 后,用上述 2.1 项方式处理细胞,过 24 h 后,收集细胞,

裂解细胞后按试剂盒所述方法测定各组 MDA 含量,实验重复 3 次。

2.10 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞内 eNOS 蛋白表达 细胞在培养瓶中用含血清培养基在 37 °C 5% CO₂ 下培养,待细胞达到 90% 后,用上述 2.1 项的分组方法处理细胞,继续培养 24 h,收集处理后的细胞,用冷 PBS 洗涤,用含有 1% 的 PMSF 的冰裂解缓冲液裂解 30 min。4 °C 高速离心取上清 (12 000 r·min⁻¹, 10 min),取上清 20 μL 用 BCA 蛋白浓度测定盒测定蛋白浓度,以保证每孔上样量所含的蛋白质含量一样。通过 SDS-PAGE 分离蛋白质,并通过湿转移转移到 PVDF 膜上。用含 5% 无脂牛奶的 TBS-T 的封闭 1 h 后,将膜与用一抗稀释液稀释的一抗 (1:1 000) 在 4 °C 过夜。使用 TBS-T 洗涤后,将膜与相应的二抗 (1:5 000) 在室温下孵育 1 h,暗室显影,分析条带。GAPDH 蛋白方法同上。实验重复 3 次。

2.11 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行上述数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据分析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 内皮细胞鉴定 荧光显微镜下观察发现 HUVECs 产生绿色荧光,提示本次实验所用 HUVECs 确为内皮细胞且纯度高未被污染。见图 1。

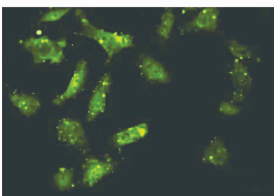


图 1 vWF 荧光标记的人脐静脉内皮细胞 (荧光显微镜, ×400)
Fig.1 vWF fluorescently labeled human umbilical vein endothelial cells (fluorescence fiber microscope, ×400)

表 3 Ang II 对细胞活力,NO 含量和细胞内钙离子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Ang II on cell viability, NO content in cultured medium and calcium concentration, calcium ion fluorescence diagram

($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	时间/h	A	NO/mmol·L ⁻¹	平均荧光强度
空白	0	0.55 ± 0.13	6.78 ± 0.42	233.37 ± 13.69
	6	0.57 ± 0.06	7.31 ± 1.22	211.20 ± 13.43
	12	0.70 ± 0.12	11.47 ± 0.57	213.72 ± 10.08
	24	0.95 ± 0.12	19.79 ± 1.60	214.78 ± 7.016
Ang II	0	0.57 ± 0.04 ¹⁾	7.02 ± 0.45 ¹⁾	266.23 ± 23.01
	6	0.45 ± 0.12 ²⁾	4.61 ± 1.05 ²⁾	404.64 ± 11.32 ²⁾
	12	0.44 ± 0.52 ²⁾	4.69 ± 1.02 ²⁾	454.67 ± 24.65 ²⁾
	24	0.62 ± 0.86 ²⁾	6.50 ± 1.36 ²⁾	456.49 ± 16.24 ²⁾

注:与对应时间空白组比较 $P < 0.05, P < 0.01$ 。

3.2 Ang II 对 HUVECs 细胞活力的影响 高浓度 Ang II 对 HUVECs 细胞的活力有明显的抑制,与空白组比较,Ang II $1 \times 10^{-3}, 1 \times 10^{-4}, 1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-6}, 1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对内皮细胞的抑制率分别约为 72%, 64%, 23%, 17%, 5% ($1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的实验结果与本实验要求不符,不予讨论),结果具有统计学差异 ($P < 0.05$)。根据实验需要选择 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 作为损伤诱导浓度。见表 2。

表 2 Ang II 对细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of different concentrations of Ang II on cells viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/mol·L ⁻¹	A
空白	-	0.78 ± 0.03
Ang II	1×10^{-3}	0.24 ± 0.15 ²⁾
Ang II	1×10^{-4}	0.34 ± 0.04 ²⁾
Ang II	1×10^{-5}	0.60 ± 0.14 ²⁾
Ang II	1×10^{-6}	0.67 ± 0.21 ¹⁾
Ang II	1×10^{-7}	0.72 ± 0.02 ¹⁾
Ang II	1×10^{-8}	0.76 ± 0.07

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$ 。

3.3 Ang II 对细胞活力,NO 含量和钙离子浓度的影响 细胞加入 Ang II 后处理,细胞的活力随着时间的推移下降,上清中 NO 的含量也随着时间的推移下降,通过比较同一时间点 Ang II 组和空白组比值,可见 NO 的生成率呈时间依赖性降低;钙离子荧光强度结果显示,随着处理时间的增加细胞内的钙离子浓度也随之上升。以上结果具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。通过 3.2 的结果分析可见,Ang II 对内皮细胞的损伤有时间和浓度依赖性,综合以上实验结果,后续开展的心肌尔康药效学测试实验 Ang II 浓度和处理时间分别为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 24 h。

3.4 对 Ang II 处理的 HUVECs 细胞活力的影响 与空白组比较,Ang II 组内细胞活力显著降低

($P < 0.01$), 而经心肌尔康实验处理后, 细胞活力呈剂量依赖性上升($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

表 4 心肌尔康对 Ang II 诱导细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 4 Effect of XJEK on viability of injury cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A
空白	-	1.49 ± 0.21
Ang II	-	$1.14 \pm 0.08^{1)}$
心肌尔康	0.1	1.22 ± 0.08
	0.2	$1.37 \pm 0.10^{2)}$
	0.4	$1.48 \pm 0.12^{3)}$
	0.8	$1.60 \pm 0.11^{3)}$
	1.6	$1.70 \pm 0.20^{3)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 Ang II 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 5~9 及图 4 同)。

3.5 对 Ang II 处理的 HUVECs 细胞分泌 NO 的影响 Ang II 作用于 HUVECs 细胞 24 h 后, 通过对比 Ang II 组与空白组, 发现 Ang II 组上清内的 NO 含量显著减少($P < 0.01$), 通过分析心肌尔康组细胞上清内的 NO 含量, 发现不同浓度处理的心肌尔康均可增加 NO 生成, 且有浓度依赖性($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5。

3.6 对 Ang II 处理的 HUVECs 细胞内钙离子的影响 给予 Ang II 刺激后, 与空白组比较, 发现 Ang II 组细胞内的钙离子荧光强度显著上升($P <$

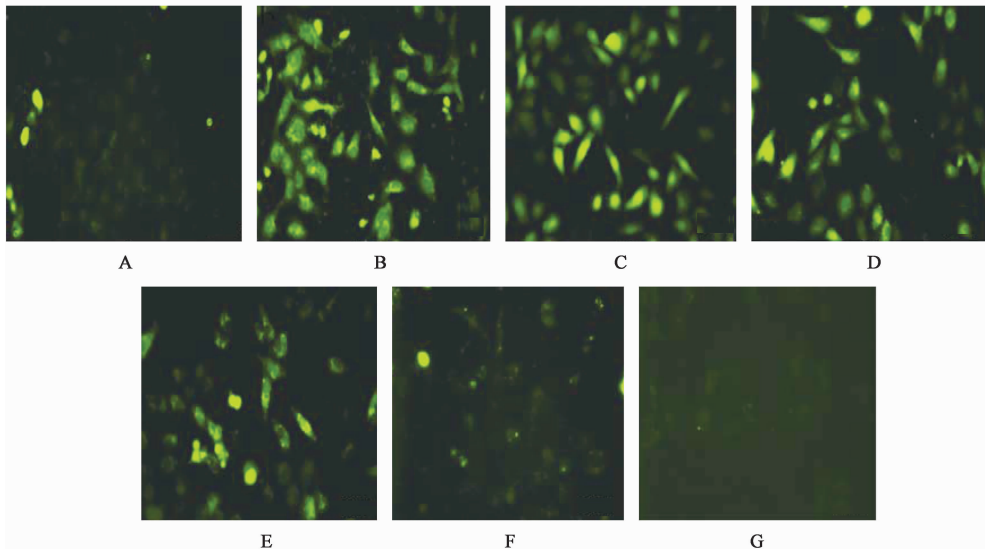
表 5 心肌尔康处理后受损细胞上清中 NO 的含量($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 5 Effect of XJEK on NO content in injury cells cultured medium($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	24.22 ± 3.13
Ang II	-	$7.56 \pm 0.92^{1)}$
心肌尔康	0.1	$10.42 \pm 1.57^{2)}$
	0.2	$14.31 \pm 1.98^{3)}$
	0.4	$16.41 \pm 1.60^{3)}$
	0.8	$26.94 \pm 2.01^{3)}$
	1.6	$29.32 \pm 3.03^{3)}$

0.01), 与 Ang II 组比较, 心肌尔康用药组 HUVECs 细胞内的钙离子浓度的下降, 并呈浓度依赖性($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6, 图 2。

表 6 心肌尔康对受损细胞内的钙离子浓度的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 6 Effect of XJEK on calcium concentration in injury cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	平均荧光强度
空白	-	214.78 ± 7.01
Ang II	-	$371.99 \pm 23.34^{1)}$
心肌尔康	0.1	$296.31 \pm 42.91^{2)}$
	0.2	$287.64 \pm 13.27^{3)}$
	0.4	$256.03 \pm 14.27^{3)}$
	0.8	$206.89 \pm 5.19^{3)}$
	1.6	$203.10 \pm 3.71^{3)}$



A. 空白组; B. Ang II 组; C. 心肌尔康 0.1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 心肌尔康 0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. 心肌尔康 0.4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; F. 心肌尔康 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; G. 心肌尔康 1.6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 3, 4 同)

图 2 心肌尔康对受损细胞内的钙离子浓度的影响(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of XJEK on calcium concentration in injury cells (immunofluorescence, $\times 400$)

3.7 对 Ang II 处理的 HUVECs 细胞内 ROS 的影响 Ang II 组与空白组比较 ROS 显著增高 ($P < 0.01$), 与 Ang II 比较, 发现心肌尔康能降低受损细胞内 ROS 的含量, 并且呈浓度依赖性 ($P <$

0.05)。通过对比荧光显微镜观察到的结果与流式细胞仪检测结果可以看出, 随着心肌尔康浓度的逐渐增加细胞内的荧光强度逐渐减少。见图 3, 表 7。

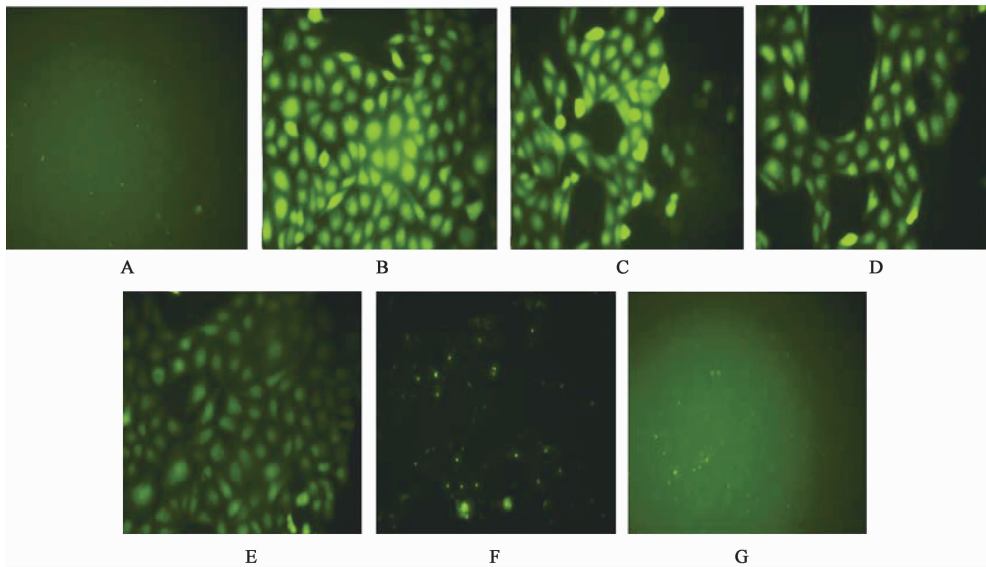


图 3 心肌尔康对内皮细胞 ROS 的影响 (免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of XJEK on ROS in injury cells (immunofluorescence, $\times 400$)

表 7 心肌尔康对内皮细胞 ROS 质量分数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of XJEK on ROS in injury cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	ROS/%
空白	-	3.03 ± 0.20
Ang II	-	$20.35 \pm 1.27^{1)}$
心肌尔康	0.1	19.33 ± 1.67
	0.2	18.65 ± 0.85
	0.4	$13.67 \pm 1.18^{2)}$
	0.8	$10.94 \pm 0.41^{2)}$
	1.6	$3.46 \pm 0.78^{2)}$

3.8 对 Ang II 处理的 HUVECs 细胞内 SOD 水平的影响 对比 Ang II 组与空白组上清内的 SOD 水平, 可以发现 Ang II 组 SOD 的生成量显著减少 ($P < 0.01$); 与 Ang II 组比较心肌尔康组随着质量浓度的上升, 细胞上清中的 SOD 也明显呈上升趋势 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 8。

3.9 对 Ang II 处理的 HUVECs 细胞内 MDA 含量的影响 与空白组比较, 发现 Ang II 组 MDA 的含量显著上升 ($P < 0.01$), 心肌尔康组比较于 Ang II 组, 细胞内的 MDA 含量的逐渐下降, 具有浓度依赖性 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 8。

3.10 对 Ang II 处理的 HUVECs 细胞内 eNOS 表达

表 8 心肌尔康对受损细胞内总 SOD 和细胞内 MDA 水平的影响

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of XJEK on SOD and MDA levels in injury cells

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
空白	-	13.24 ± 0.40	1.60 ± 0.34
Ang II	-	$8.79 \pm 0.82^{1)}$	$4.22 \pm 0.63^{1)}$
心肌尔康	0.1	$9.21 \pm 0.68^{2)}$	$3.52 \pm 0.41^{2)}$
	0.2	$9.71 \pm 0.68^{3)}$	$2.84 \pm 0.72^{3)}$
	0.4	$13.33 \pm 0.30^{3)}$	$2.14 \pm 0.36^{3)}$
	0.8	$13.98 \pm 0.86^{3)}$	$1.82 \pm 0.40^{3)}$
	1.6	$14.31 \pm 0.65^{3)}$	$1.38 \pm 0.17^{3)}$

量的影响 与空白组比较, Ang II 组 eNOS 表达量显著下降 ($P < 0.01$), 经过心肌尔康处理组中的受损细胞, 其 eNOS 表达均有上升, 提示心肌尔康可以提升细胞内 eNOS 表达量, 从而增加 NO 的释放从而发挥修复内皮细胞受损达到保护血管的作用, 结果具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4, 表 9。

4 讨论

血管内皮细胞是血管壁组织和血液间的通透性屏障, 多种因素都可损伤内皮细胞并进而引起内皮

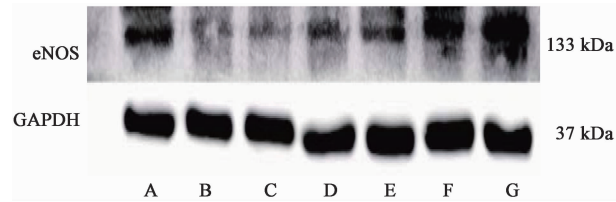


图 4 心肌尔康对受损细胞内 eNOS 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of XJEK on eNOS expression in injury cells

表 9 心肌尔康对受损细胞内 eNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of XJEK on eNOS expression in injury cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	eNOS/GAPDH
空白	-	0.63 ± 0.05
Ang II	-	0.39 ± 0.08 ¹⁾
心肌尔康	0.1	0.40 ± 0.07
	0.2	0.49 ± 0.16 ²⁾
	0.4	0.51 ± 0.06 ³⁾
	0.8	0.60 ± 0.14 ³⁾
	1.6	0.70 ± 0.04 ³⁾

细胞功能障碍,进而导致血栓形成、动脉粥样硬化、高血压等心脑血管疾病的发生发展。内皮细胞损伤是血管损伤的起始阶段,所以保护内皮细胞及其功能是预防心脑血管疾病发生的关键环节之一。近些年来的研究表明,多种中药单体和中药复方制剂均表现出明显的内皮细胞保护作用^[14-15]。

心肌尔康作为临床使用多年临床验方,由黄芪、人参、玉竹、麦冬等多味中药组成。大量的研究表明,本方中的人参可以调节血压的作用^[16-18];黄芪有抗应激、降压等作用^[19];麦冬具有清除自由基提高细胞免疫力的作用;丹参具有清除氧自由基的功效^[20];当归可以促进细胞增殖^[21],且以上研究均表明其作用机制至少部分与内皮细胞保护有关。本课题组前期的研究发现,心肌尔康可以抑制异丙肾上腺素诱导小鼠心肌肥大,改善两肾一夹诱导的大鼠高血压和小鼠 MI 模型心血管重构,其作用机制至少部分与恢复内皮细胞功能有关,但是否对内皮细胞有直接保护作用尚不明确。

Ang II 作为 RAS 系统中主要生物效应物质,是强有力的血管收缩剂,高浓度的 Ang II 可刺激 ROS 的产生,引起氧化应激反应,导致血管内皮细胞发生损伤^[22]。近期的研究发现,Ang II 所引起的脑微血管内皮细胞凋亡能被 SOD 所抑制,却不能因为血管紧张素 II 受体 1 (AT1) 受体拮抗剂抑制,其机制可

能在于高浓度的 Ang II 能直接激活细胞膜上的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸/尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADH/NADPH) 氧化酶从而产生氧自由基, $O_2^- \cdot$ 可以和 NO 结合形成氧化性更强的 ONOO⁻, 导致其生物利用度下降,是内皮依赖性血管舒张功能下降的原因之一^[23]。进一步的研究发现,高浓度 Ang II 导致细胞内 NO 生成减少,部分原因是通过激活蛋白激酶 C (PKC) 从而使 eNOS 的 mRNA 表达量减少所致^[24]。此外,过量的 ROS 刺激线粒体上线粒体膜通两性转运孔 (MPTP) 持续开放并释放细胞色素 C 导致线粒体损伤^[25], MPTP 的持续开放使线粒体内部钙离子游离到细胞浆内导致线粒体膜电位下降,加速三磷酸腺苷 (ATP) 消耗,加重氧化应激损伤。本研究结果显示,与 Ang II 组比较,心肌尔康用药组细胞释放 NO 功能和活力明显恢复;同时 ROS 分析结果和 MDA, SOD 结果也显示,心肌尔康可明显抑制 Ang II 诱导的内皮细胞氧化应激水平的增高,胞浆内钙离子浓度呈剂量依赖性降低, eNOS 表达亦随心肌尔康浓度增加逐渐恢复到正常水平。

综上所述,心肌尔康对内皮细胞的作用,一方面可能通过抑制 Ang II 激活细胞 NADH/NADPH 氧化酶,清除 ROS,提高 SOD 的活性来发挥;另一方面可能通过其减少 ROS 所诱导的钙超载,上调 eNOS 的基因表达,从而保留了部分血管内皮细胞的功能。本实验研究结果初步探讨了心肌尔康对 Ang II 诱导的内皮细胞的作用和部分机制,为该方剂的临床应用提供了进一步的理论支持和依据,其深入的分子机制本课题组正在进一步的研究。

[参考文献]

[1] 王海涛, 嵇克刚, 王霞. 改善血管内皮功能在心血管疾病中的研究进展 [J]. 光明中医, 2009, 24 (6): 1193-1195.

[2] Bell D M, Johns T E, Lopez L M. Endothelial dysfunction: implications for therapy of cardiovascular diseases [J]. Ann Pharmacother, 1998, 32 (4): 459-470.

[3] Miller A G, Tan G, Binger K J, et al. Candesartan attenuates diabetic retinal vascular pathology by restoring glyoxalase-I function [J]. Diabetes, 2010, 59 (12): 3208-3215.

[4] Agarwal D, Elks Carrie M, Reed Scott D, et al. Chronic exercise preserves renal structure and hemodynamics in spontaneously hypertensive rats [J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 16 (2): 139-152.

- [5] 刘红旭,尚菊菊,赵子厚,等. 参元丹胶囊对动脉内皮损伤大鼠血浆内皮素、血管紧张素Ⅱ、血清一氧化氮合酶影响的研究[J]. 中华中医药杂志,2006,21(12):743-746.
- [6] 李玉梅,杨辛欣,韩旭,等. 川芎嗪与黄芪甲苷配伍对人脐静脉内皮细胞血管生成的作用及机制探讨[J]. 中草药,2017,48(4):722-727.
- [7] 田丽娜,高华武,龙子江,等. 钩藤碱对自发性高血压大鼠的降压作用及其对血管的调节机制探讨[J]. 中草药,2014,45(15):2210-2213.
- [8] 王键,曹恩泽,李立志. 心肌尔康治疗胸痹的临床观察[J]. 南京中医药大学学报,1998,14(4):210-212.
- [9] 汪远金,江安宏,王钦茂,等. 心肌尔康冲剂对阿霉素致中毒性心肌炎小鼠心肌酶和MDA含量、SOD活性影响[J]. 安徽中医学院学报,2001,20(3):43-45.
- [10] 高杉,黄玲玲,汪星辉,等. 心肌尔康对两肾一夹诱导高血压大鼠靶器官损伤的影响[J]. 中药材,2012,35(4):591-595.
- [11] 高杉,汪星辉,黄玲玲,等. 心肌尔康对异丙肾上腺素致小鼠心室重构的保护作用及其机制[J]. 中西医结合学报,2012,10(3):330-336.
- [12] HU J, ZHANG Y X, WANG L, et al. Protective effects of Xinji'er kang on myocardial infarction induced cardiac injury in mice [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1):338.
- [13] 王强,雷燕,杨静,等. 人参三七川芎提取物对复制性衰老内皮细胞的影响和钙黏蛋白的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(10):123-127.
- [14] 郭重仪. 黄芩苷对脂质过氧化及内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中药材,2012,35(2):288-291.
- [15] 林耀波,谭少华,李少梅,等. 桂枝茯苓胶囊治疗颈动脉粥样硬化的临床研究[J]. 海南医学,2013,24(16):2346-2349.
- [16] XU Z W, LAN T H, WU W K, et al. The effects of ginsenoside Rb1 on endothelial damage and ghrelin expression induced by hyperhomocysteine [J]. J Vasc Med, 2011, 53(1):156-164.
- [17] LIU D H, CHEN Y M, LIU Y, et al. Rb₁ protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced cell senescence by modulating redox status [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(7):1072-1077.
- [18] ZHANG Y, SUN K, LIU Y Y, et al. Ginsenoside Rb₁ ameliorates lipopolysaccharide-induced albumin leakage from rat mesenteric venules by intervening in both trans- and paracellular pathway [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014, 306(4):G289-G300.
- [19] 李新才,曾碧映,邓凤君,等. 黄芪水提取物对载脂蛋白E基因敲除大鼠动脉硬化斑块部位基质金属蛋白酶-9表达及斑块形成的影响[J]. 中国老年学杂志,2013,33(20):5074-5075.
- [20] 赵宏宇,郑璐玉,张旭,等. 丹参麦冬水溶性部位对过氧化氢致血管内皮细胞凋亡的影响[J]. 现代中医药,2010,30(3):73-76.
- [21] 雷燕,高倩,李悦山,等. 黄芪、当归及其组方促血管内皮细胞增殖作用的研究[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(10):753-756.
- [22] Dimmeler S, Zeiher A M. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors [J]. Regul Pept, 2000, 90(1/3):19-25.
- [23] 刘慧青,张岫美,魏欣冰. 血管紧张素Ⅱ诱导培养的牛脑微血管内皮细胞凋亡及其机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2003,17(2):121-125.
- [24] Ramzy D, Rao V, umiati L C, et al. Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway [J]. Circulation, 2006, 114(S1):19-26.
- [25] ZHOU X, LIANG L, ZHAO Y. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates angiotensin II-induced oxidative stress and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells through the activation of Nrf2/Caspase-3 signaling [J]. J Vasc Res, 2017, 54(5):299-308.

[责任编辑 周冰冰]