

· 药理 ·

## 基于 Akt/JNK/p38 MAPK 信号通路探讨健脾活骨方对酒精致血管内皮细胞功能损伤的保护作用

王潇潇<sup>1</sup>, 何莲花<sup>2</sup>, 方罗昌婷<sup>2</sup>, 李群<sup>2</sup>, 杨超<sup>2</sup>, 胡智星<sup>2</sup>, 陈卫衡<sup>3</sup>, 刘春芳<sup>2</sup>, 韩岚<sup>1\*</sup>, 林娜<sup>2\*</sup>

- (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012;
2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:观察健脾活骨方(JPHGP)对酒精致血管内皮细胞功能损伤的保护作用,并基于蛋白激酶B/c-Jun氨基末端激酶/p38 MAPK(Akt/JNK/p38 MAPK)信号通路探索相关作用机制。方法:通过鸡胚尿囊膜实验、胸主动脉环实验和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的迁移、侵袭、黏附和管腔形成实验,在有或无酒精诱导条件下,观察 JPHGP 不同质量浓度 8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  对血管新生的影响;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HUVEC 中 Akt、JNK、p38 MAPK 等磷酸化表达水平。结果:与正常组比较,模型组动脉环周围微血管数目及长度均减少, HUVEC 的迁移、侵袭、和管腔形成能力降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); JPHGP 16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组作用后能明显升高鸡胚尿囊膜新生血管长度( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),与模型组比较, JPHGP 8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组能浓度依赖地增加胸主动脉环周围微血管数量( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), JPHGP 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组能升高胸主动脉环周围微血管长度( $P<0.05$ ); JPHGP 16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组均能增强 HUVEC 的迁移、侵袭、和管腔形成能力。Western blot 检测结果表明,与正常组比较,模型组中的 p-JNK/JNK、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-Akt/Akt 蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较, JPHGP 8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组的 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-Akt/Akt 蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ ), JPHGP 16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组的 p-JNK/JNK 的蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ )。结论: JPHGP 对酒精致血管内皮细胞功能损伤具有保护作用,其机制可能与激活 Akt/JNK/p38 MAPK 信号通路有关,相关研究结果将为 JPHGP“健脾活骨”功效阐明提供一定的科学依据。

**[关键词]** 健脾活骨方; 人脐静脉内皮细胞; 蛋白激酶B/c-Jun氨基末端激酶/p38 MAPK(Akt/JNK/p38 MAPK)信号通路; 血管生成

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R742 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)11-0064-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230442

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20230320.1624.006.html>

[网络出版日期] 2023-03-22 08:53:50

### Protective Effect of Jianpi Huogu Prescription on Functional Injury of Vascular Endothelial Cells Caused by Alcohol Based on Akt/JNK/p38 MAPK Signaling Pathway

WANG Xiaoxiao<sup>1</sup>, HE Lianhua<sup>2</sup>, FANG-LUO Changting<sup>2</sup>, LI Qun<sup>2</sup>, YANG Chao<sup>2</sup>, HU Zhixing<sup>2</sup>,  
CHEN Weiheng<sup>3</sup>, LIU Chunfang<sup>2</sup>, HAN Lan<sup>1\*</sup>, LIN Na<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences,

Beijing 100700, China;

3. The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[收稿日期] 2023-02-17

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(82030122);国家自然科学基金面上项目(81973888);北京市自然科学基金面上项目(7232304);中国中医科学院科技创新工程项目(C12021A03808)

[第一作者] 王潇潇,在读硕士,从事中药药理研究,Email:x1471531523@163.com

[通信作者] \* 韩岚,博士,教授,从事中药药理研究,E-mail:hanlan56@ahtcm.edu.cn;

\* 林娜,研究员,博士生导师,从事中药药理研究,E-mail:linna888@163.com

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of Jianpi Huogu prescription (JPHGP) on the functional injury of vascular endothelial cells caused by alcohol and explore its mechanism based on protein kinase B/c-Jun amino-terminal kinase/p38 MAPK (Akt/JNK/p38 MAPK) signaling pathway. **Method:** Through chick embryo allantoic membrane, thoracic aortic ring, and migration, invasion, adhesion, and lumen formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), the effect of JPHGP with different concentrations (8, 16 and 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on angiogenesis was observed in the presence or absence of alcohol. The expression levels of phosphorylation of Akt, JNK, and p38 MAPK were determined by Western blot. **Result:** As compared with the normal group, the number and length of capillaries around the arterial ring in the model group were decreased, and the migration, invasion, and lumen formation capacity of HUVEC were decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). After treatment with 16 and 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  JPHGP, the length of neovascularization in chick embryo allantoic membrane was significantly increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the model group, the 8, 16, and 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  JPHGP groups increased the number of capillaries around the thoracic aortic ring in a concentration-dependent manner ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  JPHGP group increased the length of capillaries around the thoracic aortic ring ( $P<0.05$ ). The 16 and 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  JPHGP groups enhanced the migration, invasion, and lumen formation capacity of HUVEC. The results of Western blot showed that, as compared with the normal group, the protein expression levels of p-JNK/JNK, p-p38 MAPK/p38 MAPK, and p-Akt/Akt were significantly decreased in the model group ( $P<0.01$ ), and as compared with the model group, the protein expression levels of p-p38 MAPK/p38 MAPK and p-Akt/Akt were significantly increased in the 8, 16, and 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  JPHGP groups ( $P<0.01$ ) and the protein expression level of p-JNK/JNK was increased significantly in the 16 and 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  JPHGP groups ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** JPHGP has a protective effect on the functional injury of vascular endothelial cells caused by alcohol, and its mechanism may be related to the activation of Akt/JNK/p38 MAPK signaling pathway. Relevant research results will provide certain scientific basis for clarifying the effect of JPHGP on 'invigorating spleen and promoting blood circulation'.

**[Keywords]** Jianpi Huogu prescription; human umbilical vein endothelial cells; protein kinase B/c-Jun amino-terminal kinase/p38 MAPK (Akt/JNK/p38 MAPK) signaling pathways; angiogenesis

长期过度饮酒是导致酒精性股骨头坏死(AONFH)的重要原因<sup>[1]</sup>。AONFH发病趋于年轻化,具有极高发病率和致残率,病情严重者往往需要进行人工关节置换,给社会和患者造成较大的经济负担<sup>[2]</sup>。研究表明,酒精能够促进脂肪形成,进而增加骨内压,股骨头内血供受阻,同时酒精也能抑制骨生成和血管生成<sup>[3]</sup>。目前关于AONFH确切的发病机制尚未明确,其中长期饮酒引起的血管损伤、血供中断被认为是酒精导致AONFH的终末病理环节。因此,开展相关研究找寻采取有效的手段促进坏死区域血管新生、恢复血供和促进新的骨组织生成,是治疗AONFH的关键<sup>[4]</sup>。

健脾活骨方(JPHGP)是本课题组北京中医药大学陈卫衡教授在长期的临床实践中形成的用治早中期非创伤性股骨头坏死的效验方,由茯苓、赤芍、党参、白术、桂枝、熟地黄、鹿角胶等中药组成,以茯苓和赤芍为君药,二者同用共奏“痰瘀同治”之效,全方具有健脾化痰,活血通络,补肾生骨的功效。

本课题组前期实验研究结果表明,JPHGP可明显改善血脂代谢紊乱,抑制骨吸收、促进骨形成,并且具有体外抑制激素致血管内皮细胞功能损伤的作用<sup>[5-9]</sup>。然而,JPHGP对酒精所致血管内皮细胞功能损伤的作用和机制尚不清楚。本实验拟通过鸡胚尿囊膜实验,酒精诱导的大鼠主动脉环血管损伤模型和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)模型,观察JPHGP对酒精所致血管内皮细胞功能损伤的影响,并从蛋白激酶B/c-Jun氨基末端激酶/p38 MAPK (Akt/JNK/p38 MAPK)信号通路探索其作用机制,为进一步指导临床合理用药提供实验数据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠4只,6周龄,由北京市维通利华实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0011。实验动物饲养于中国中医科学院基础理论研究所实验动物中心,温度22~24℃,每日日光灯照明12h,湿度40%~60%,自由饮水饮食。本实验通过中国中医科学院基础理论

研究所实验动物福利伦理委员会审查,编号为2021B121。种蛋,批号SCXK(京)2014-0002,由北京梅里亚维通实验动物技术有限公司提供。

**1.2 药物与试剂** 无水乙醇(北京化工厂,货号20150918);0.25%胰蛋白酶、胎牛血清(美国Gibco公司,货号分别为25200-072、16000-044);结晶紫(美国Sigma公司,货号C6158);H-DMEM培养基、青霉素-链霉素溶液(美国Hyclone公司,货号分别为SH30023.01B、SV30010);重组人粒细胞血管内皮细胞生长因子(recombinant human VEGF<sub>165</sub>)(美国PeproTech公司,货号100-20);兔抗Akt、磷酸化(p)-Akt、JNK、p-JNK、p38 MAPK、p-p38 MAPK、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为9272s、4060s、9258s、4668s、8690s、4511s、2118s);RIPA裂解液(北京普利莱基因技术有限公司,货号分别为C1053);Bradford试剂盒(北京天根生化科技有限公司,货号PA012);蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(北京普利莱基因技术有限公司,货号分别为P1265、P1260);Transwell小室(北京Costar公司,货号3422)。

**1.3 仪器** TD5A-WS型低速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);Mini-PROTEAN® Tetra Cell型电泳槽、PowerPac™ Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司);CX31型显微镜(日本Olympus公司);Fusion FX5 Spectra型凝胶成像仪(法国Vilber公司);MK3型全自动酶标仪(美国Thermo公司);70型6屏全自动孵化机(顺泰畜牧科技公司);SFG-02.400型电热恒温鼓风干燥箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** JPHGP其组成为茯苓5g(批号1609001G143V),赤芍5g(批号1608001C063K),党参5g(批号1608001G102P),白术5g(批号1609001),桂枝5g(批号1604001J169X),熟地黄5g(批号1608001P383E),鹿角胶5g(烊化,批号20150601)等,购自安国市昌达中药材饮片有限公司,经安国市昌达中药材饮片有限公司许琪等鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》检验标准,JPHGP制备:取除鹿角胶外其他各药,加10倍量水提取3次,每次1h,提取液过滤并旋蒸浓缩,浓缩液中加入鹿角胶烊化,真空干燥,得膏率约为23%。使用无菌水配制含生药终质量浓度1g·mL<sup>-1</sup>的母液,0.22 μm的滤器过滤灭菌并进行分装,-20℃保

存备用,使用前稀释成相应浓度。

**2.2 鸡胚尿囊膜实验观察体内血管形成能力** 将种蛋于37℃、60%~80%的湿度下预孵育6d后,在种蛋的大头空气端开一约2mm×2mm窗口,将直径为12mm×10mm×1mm的无菌硅胶圈应用于6d龄的鸡胚尿囊膜上,放在鸡胚附近血管少的地方,给药组在圈内加入50 μL不同质量浓度(8、16、32 μg·L<sup>-1</sup>)的JPHGP。在37℃下孵育48h后,用数码相机拍摄环中的血管生成,使用Image Pro Plus 6.0测量鸡胚尿囊膜新生血管长度,并进行统计分析。

**2.3 大鼠主动脉环血管新生实验检测新生血管形成能力** 将大鼠断颈处死,75%乙醇浸泡10min,注意口鼻勿入乙醇,剪下大鼠胸主动脉,切成1~1.5mm长的切片,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,放置于孔中基质胶上,再加入基质胶50 μL覆盖30min胶化后,培养在含10%胎牛血清的H-DMEM培养基中,造模组加入终质量浓度为4.6 mg·L<sup>-1</sup>的乙醇,给药组加入终质量浓度分别为8、16、32 μg·L<sup>-1</sup>的JPHGP,与1mL培养基中培养。每3d更换一次培养基。孵育9d后,用4%多聚甲醛固定。用显微镜观察微血管的生长情况,使用Image Pro Plus 6.0测量主动脉环内血管分支的数目和长度,并进行统计分析。

## 2.4 HUVEC的迁移、侵袭、黏附和管腔形成实验

**2.4.1 Transwell小室检测细胞迁移能力** 将基质胶与RPMI-1640基础培养基按1:8包被Transwell上室,Matrigel聚合成凝胶后加入5×10<sup>4</sup>个/孔无血清RPMI-1640培养基重悬的HUVEC,除正常组外各组加入4.6 mg·L<sup>-1</sup>乙醇50 μL;下室正常组加入10%FBS的培养基600 μL,其余各组除加入10%FBS的培养基外分别做相应处理;7h后,拭去膜上未迁移的细胞,4%多聚甲醛固定10min,0.1%结晶紫染色10min,蒸馏水冲洗,镜下每组随机采集5~8张图片并采用Image Pro Plus 6.0进行统计分析。

**2.4.2 Transwell小室实验检测细胞侵袭能力** 将基质胶与RPMI-1640基础培养基按1:8包被Transwell上室,Matrigel聚合成凝胶后加入5×10<sup>4</sup>个/孔无血清RPMI-1640培养基重悬的HUVEC,各组做相应干预,侵袭12h后进行染色,后续步骤与迁移实验基本一致。

**2.4.3 内皮细胞黏附实验检测细胞黏附能力** 待细胞生长密度至80%~90%时,消化重悬的细胞,按5×10<sup>4</sup>个/孔密度接种至24孔板,待细胞贴壁后,除正常组外各组加入终质量浓度为4.6 mg·L<sup>-1</sup>的乙醇

诱导1 h, 给药组分别加入8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  JPHGP, 消化干预24孔板内的细胞, 调整各组细胞浓度, 均按 $5\times 10^4$ 个/孔接种至FN及1% BSA包被的96孔板, 每组4个复孔; 孵育1.5 h后, PBS清洗, 加入无血清H-DMEM 100  $\mu\text{L}$ /孔与MTS 20  $\mu\text{L}$ , 孵育约4 h, 酶标仪于波长492 nm处测吸光度A。

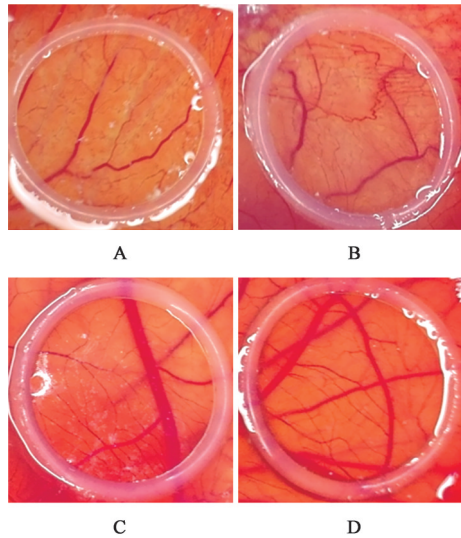
**2.4.4 管腔形成实验检测血管生成能力** 弃去上清后, 用含5% FBS的H-DMEM培养基重悬HUVEC, 按 $5\times 10^4$ 个/孔接种至48孔板, 除正常组外, 其余各组加入VEGF 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 模型组和健脾活骨方各给药组均加入4.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙醇诱导0.5 h, 给药组再加入终质量浓度分别为8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的JPHGP, 对照组加入等体积培养基, 培养箱培养6 h后, 镜下每组随机采集5~8张图片并采用Image Pro Plus 6.0进行统计分析。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测HUVEC中 p-Akt、Akt、p-JNK、JNK、p-p38 MAPK、p38 MAPK蛋白表达水平** 用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液细胞, 提取蛋白, 进行Bradford法定量后变性, 配置浓度为10%的SDS-PAGE上样凝胶, 上样、电泳、转膜、封闭、一抗4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜(Akt、JNK、p-JNK、p38 MAPK、p-p38 MAPK以1:1 000比例稀释, p-Akt以1:2 000比例稀释, GAPDH以1:10 000比例稀释)、洗涤、室温孵育二抗(1:3 000)2 h, 显影, 凝胶成像仪成像, 采用Image J软件对结果进行统计分析。

**2.6 统计学分析** 采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析, 采用单因素方差分析进行组间比较, 实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对鸡胚尿囊膜血管新生的影响** 与正常组比较, JPHGP 8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组鸡胚尿囊膜新生血管长度虽呈升高趋势, 但差异无统计学意义, JPHGP 16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组鸡胚尿囊膜新生血管长度均升高, 差异



注: A. 正常组; B~D. JPHGP 8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图1 JPHGP对鸡胚尿囊膜血管新生的影响

Fig. 1 Effect of JPHGP on angiogenesis of chicken embryo

表1 健脾活骨方对鸡胚尿囊膜血管新生的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

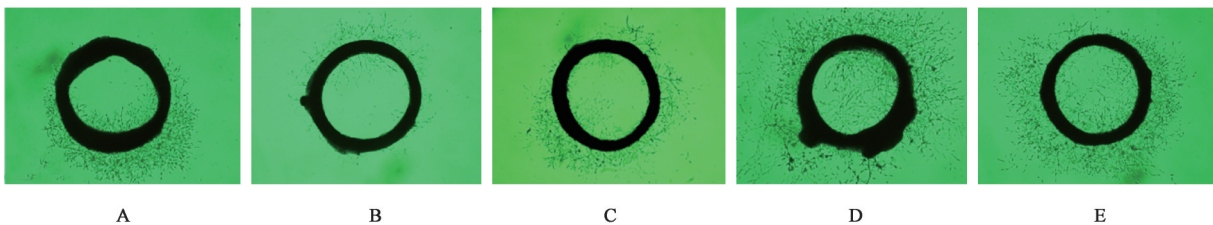
Table 1 Effect of JPHGP on angiogenesis of chicken embryo ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	新生血管长度/cm
正常组		29.71 $\pm$ 0.76
JPHGP组	8	53.32 $\pm$ 7.43
	16	55.82 $\pm$ 8.51 <sup>1)</sup>
	32	83.82 $\pm$ 17.38 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$

具有统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ )。见图1、表1。

**3.2 对酒精抑制的大鼠胸主动脉环血管新生的影响** 与正常组比较, 模型组动脉环周围微血管数目及长度均明显减少( $P<0.05, P<0.01$ ); 与模型组比较, JPHGP 8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组大鼠动脉环周围微血管数目均明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ), 而JPHGP 8、16  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组动脉环周围微血管长度虽呈升高趋势, 但差异无统计学意义, JPHGP 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组动脉环周围微血管长度明显增加, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见图2、表2。



注: A. 正常组; B. 模型组; C~E. JPHGP 8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组(图3和图4同)

图2 JPHGP对酒精抑制的大鼠胸主动脉环血管新生的影响(正置显微镜,  $\times 40$ )

Fig. 2 Effect of JPHGP on angiogenesis of thoracic aortic ring in rats (orthomicroscope,  $\times 40$ )

表2 JPHGP对酒精抑制的大鼠胸主动脉环血管新生的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of JPHGP on angiogenesis of thoracic aortic ring in rats ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	微血管数目/个	微血管长度/cm
正常组		39.25±14.87	89.10±21.69
模型组		15.10±2.91 <sup>1)</sup>	49.56±4.70 <sup>2)</sup>
JPHGP组	8	36.42±10.51 <sup>3)</sup>	56.46±17.50
	16	41.77±7.67 <sup>4)</sup>	67.10±18.38
	32	44.45±7.13 <sup>4)</sup>	79.24±23.03 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表3、表4、表6同)

**3.3 对酒精抑制的HUVEC迁移、侵袭、黏附和管腔形成能力的影响** 在迁移和侵袭实验中,与正常组比较,模型组迁移和侵袭的细胞数目显著减少( $P<0.01$ );与模型组比较,JPHGP  $8\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组迁移和侵袭的细胞数目均呈升高趋势,但差异无统计学意义,JPHGP  $16、32\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组迁移和侵袭的细胞数目均显著增加( $P<0.01$ )。见图3、图4和表3。

在黏附实验中,与正常组比较,1% BSA组  $A$  显著降低( $P<0.01$ ),模型组  $A$  显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,JPHGP  $8、16、32\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组  $A$  呈浓度依赖性升高( $P<0.05, P<0.01$ )。见表4。

在管腔形成实验中,与正常组比较,VEGF组管腔分支点数目显著增加( $P<0.01$ );与VEGF组比较,模型组管腔分支点数目显著减少( $P<0.01$ );与模型组比较,JPHGP  $8\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 管腔分支点数目呈升高趋

表3 健脾活骨方对酒精抑制的HUVEC的迁移和侵袭能力的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of JPHGP on migration and invasion of HUVEC inhibited by alcohol ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞迁移数目	细胞侵袭数目
正常组		115.00±16.61	130.40±11.50
模型组		13.60±2.07 <sup>2)</sup>	17.00±6.16 <sup>2)</sup>
JPHGP组	8	19.00±5.15	30.40±8.20
	16	53.20±8.61 <sup>4)</sup>	54.60±10.36 <sup>4)</sup>
	32	105.60±13.52 <sup>4)</sup>	99.80±15.35 <sup>4)</sup>

表4 JPHGP对酒精抑制的HUVEC的黏附能力的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of JPHGP on adhesion of HUVEC inhibited by alcohol ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$A$
正常组		1.02±0.02
1% BSA组		0.76±0.02 <sup>2)</sup>
模型组		0.91±0.01 <sup>2)</sup>
JPHGP组	8	0.99±0.05 <sup>3)</sup>
	16	1.01±0.03 <sup>4)</sup>
	32	1.04±0.02 <sup>4)</sup>

势,但差异无统计学意义,JPHGP  $16、32\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组管腔分支点数目均显著升高( $P<0.01$ )。见图5、表5。

**3.4 对酒精抑制的HUVEC中p-Akt/Akt、p-JNK/JNK、p-p38 MAPK/p38 MAPK蛋白表达水平的影响** Western blot检测结果表明,与正常组比较,模型组中的p-JNK/JNK、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-Akt/Akt蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ );与模型

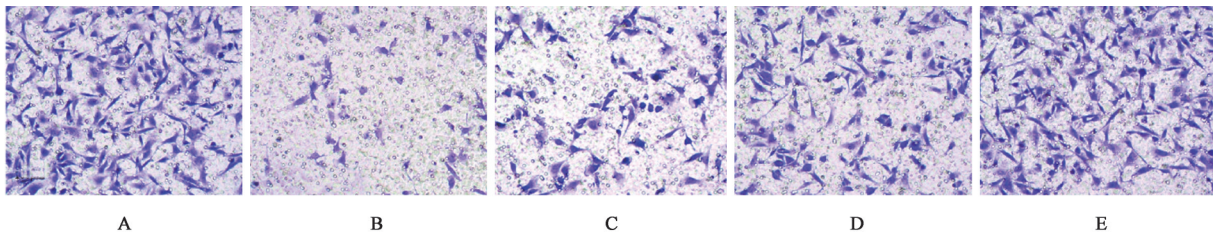


图3 JPHGP对酒精抑制的HUVEC的迁移能力的影响(结晶紫,×200)

Fig. 3 Effect of JPHGP on migration of HUVEC inhibited by alcohol (crystal violet, ×200)

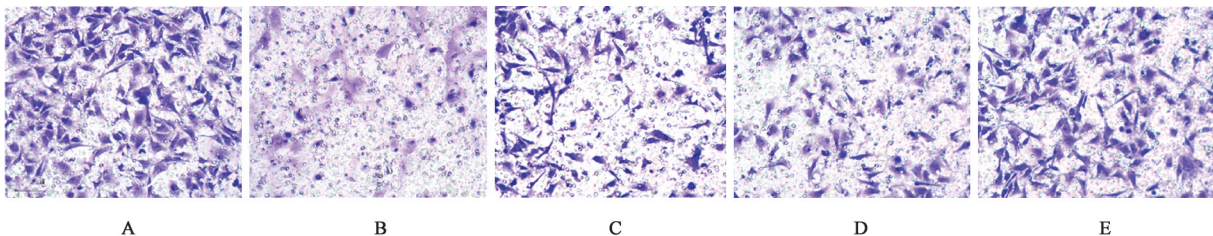
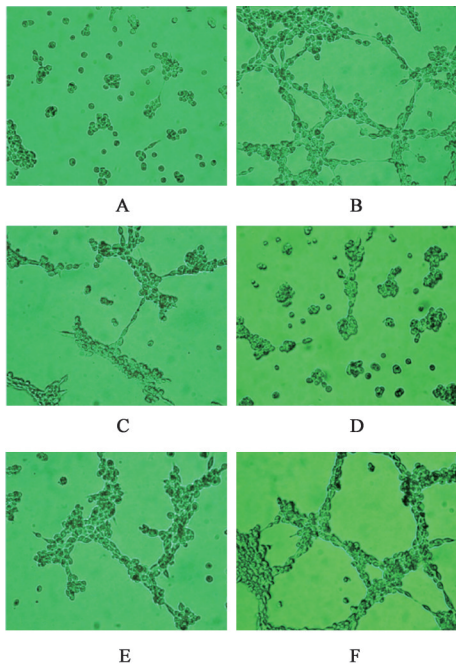


图4 JPHGP对酒精抑制的HUVEC的侵袭能力的影响(结晶紫,×200)

Fig. 4 Effect of JPHGP on invasion of HUVEC inhibited by alcohol (crystal violet, ×200)



注: A. 正常组; B. VEGF组; C. 模型组; D~E. JPHGP 8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图5 JPHGP对酒精抑制的HUVEC的管腔形成和黏附能力的影响(正置显微镜,  $\times 200$ )

Fig. 5 Effect of JPHGP on adhesion and lumen formation of HUVEC inhibited by alcohol (orthomicroscope,  $\times 200$ )

表5 JPHGP对酒精抑制的HUVEC的管腔形成能力的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Table 5 Effect of JPHGP on lumen formation of HUVEC inhibited by alcohol ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	管腔分支数目/个
正常组		5.00 $\pm$ 1.58
VEGF组		16.60 $\pm$ 2.30 <sup>3)</sup>
模型组		5.60 $\pm$ 1.14 <sup>1)</sup>
JPHGP组	8	7.80 $\pm$ 1.48
	16	12.40 $\pm$ 1.52 <sup>5)</sup>
	32	14.20 $\pm$ 1.92 <sup>5)</sup>

注: 与VEGF组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与正常组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ , <sup>3)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较<sup>4)</sup> $P<0.05$ , <sup>5)</sup> $P<0.01$

组比较, JPHGP 8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 p-p38 MAPK/

表6 JPHGP对酒精抑制的HUVEC中p-Akt、p-JNK、p-p38 MAPK蛋白表达水平的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Table 6 Effect of JPHGP on expression levels of p-Akt, p-JNK and p-p38 MAPK in HUVEC inhibited by alcohol ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	p-Akt/Akt	p-JNK/JNK	p-p38 MAPK/p38 MAPK
正常组		0.99 $\pm$ 0.00	1.07 $\pm$ 0.03	0.96 $\pm$ 0.01
模型组		0.43 $\pm$ 0.00 <sup>2)</sup>	0.68 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	0.32 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>
JPHGP组	8	0.55 $\pm$ 0.00 <sup>4)</sup>	0.63 $\pm$ 0.04	0.89 $\pm$ 0.03 <sup>4)</sup>
	16	0.91 $\pm$ 0.01 <sup>4)</sup>	1.07 $\pm$ 0.04 <sup>4)</sup>	1.67 $\pm$ 0.03 <sup>4)</sup>
	32	1.90 $\pm$ 0.04 <sup>4)</sup>	0.94 $\pm$ 0.02 <sup>4)</sup>	1.41 $\pm$ 0.07 <sup>4)</sup>

p38 MAPK、p-Akt/Akt蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ ), JPHGP 16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 p-JNK/JNK的蛋白表达水平均显著升高, 差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。见图6、表6。

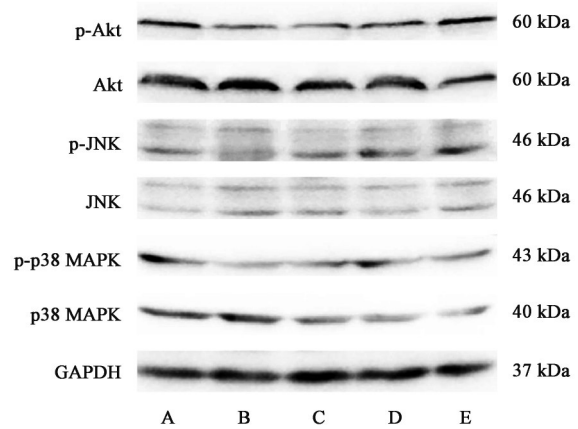


图6 酒精抑制的HUVEC中p-Akt、p-JNK、p-p38 MAPK蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of protein expression levels of p-Akt, p-JNK and p-p38 MAPK in HUVEC inhibited by alcohol

#### 4 讨论

酒精性股骨头坏死是由过度饮酒引发的一种非创伤性股骨头坏死。研究显示酒精可通过损伤血管的内皮细胞, 刺激脂质的合成堆积, 血管发生硬化, 从而造成股骨头局部的血液供应障碍, 最终导致股骨头坏死<sup>[10]</sup>。JPHGP由健脾化痰经典方苓桂术甘汤和补血养血经典方四物汤加减而成, 以“健脾活血”为治法, 是临床治疗股骨头坏死的效验方。本课题组前期实验结果表明JPHGP对AONFH大鼠股骨头内的血管损伤具有修复作用<sup>[11]</sup>, 但对酒精直接所致的血管新生损伤的作用尚不清楚。因此, 本实验采用鸡胚尿囊膜、大鼠主动脉环等离体能够直接反映血管生成的模型, 观察JPHGP对酒精诱导抑制的血管生成的影响。结果显示, 不同质量浓度8~32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的JPHGP作用后能改善酒精诱导降低的鸡胚尿囊膜新生血管长度及胸主动脉环周围微血管数量和长度, 且质量浓度越高疗效越好,

提示 JPHGP 促进酒精直接诱导抑制的血管生成,这与其对 AONFH 大鼠血管损伤的作用相符<sup>[11]</sup>。

在血管生成的过程中,内皮细胞起着至关重要的作用<sup>[12]</sup>。HUVEC 是基础实验研究中常用的内皮细胞模型,能较好地模拟血管内皮细胞的特性。为了观察 JPHGP 体外对血管内皮细胞生成过程的影响,本文采用 HUVEC 的迁移、侵袭、黏附和管腔形成等实验进行研究。结果显示,酒精能明显降低 HUVEC 的迁移、侵袭、黏附和管腔形成能力,提示了在本实验体系下 JPHGP 对酒精致血管内皮细胞血管生成功能的损伤具有保护作用。这一结果与课题组前期研究证明的 JPHGP 对激素所致的血管内皮细胞血管生成功能的保护作用相似<sup>[9]</sup>。

VEGF 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,作为血管新生的关键介质,具有促进血管通透性增加、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用。VEGF 主要与 VEGFR2 受体结合,通过 VEGFR2 的磷酸化作用激活下游信号分子,引起内皮细胞增殖和迁移,增加血管通透性,调节机体的血管新生等生物过程,PI3K 在 VEGFR2 激活后可随之激活,其活化促使 Akt 发生磷酸化<sup>[13-14]</sup>,活化后的 Akt 是血管再生及修复中的关键因素,如血管生成素、血管内皮生长因子、一氧化氮、缺氧诱导因子等进行调控,参与机体血管新生的调节<sup>[15-20]</sup>,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路是细胞反应发生的重要通路,也对组织细胞的增殖、分化和凋亡有着重要的调控作用<sup>[21-23]</sup>。本课题组前期实验研究显示 JPHGP 能升高激素性股骨头坏死鸡模型中 VEGF 的含量<sup>[24]</sup>,且通过临床样本的转录组和网络药理分析发现 PI3K/Akt 和 MAPKs 信号轴均与 JPHGP 治疗非创伤性股骨头坏死痰瘀阻络证的核心靶标富集的通路有关<sup>[25]</sup>。为探索 JPHGP 对酒精致血管内皮细胞功能损伤的修复作用是否与激活 Akt/JNK/p38 MAPK 信号通路有关,本实验检测了 HUVEC 细胞中 Akt、JNK、p38 MAPK 及其相应的磷酸化蛋白表达水平。结果表明,JPHGP 8、16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组均能上调酒精诱导降低的 HUVEC 细胞的 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-Akt/Akt 蛋白表达水平,JPHGP 16、32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组均能上调酒精诱导降低的 p-JNK/JNK 的蛋白表达水平。提示健脾活骨方可能通过调控 Akt/JNK/p38 MAPK 信号通路,对酒精致血管内皮细胞

功能损伤起修复作用,从而治疗 AONFH,这与课题组前期激素诱导血管内皮细胞损伤结果相符<sup>[9]</sup>,也再次验证了前期的网络预测结果<sup>[25]</sup>。

临床研究发现,激素性股骨头坏死病人坏死股骨头骨吸收区内血管化能力强,而酒精性股骨头坏死病人的则比较较弱<sup>[26-27]</sup>,提示激素与酒精所致的股骨头坏死病变存在差异。结合前期的实验结果<sup>[9,28]</sup>,研究发现甲泼尼龙琥珀酸钠和酒精均能明显诱导血管或血管内皮细胞功能的损伤,为股骨头坏死血瘀证与病因无关<sup>[29]</sup>这一发现提供科学依据,但二者所致的病变难以反应临床类似的差异结果,这可能与离体和体外实验中激素或酒精直接作用于靶器官或靶细胞,而临床病人是经过激素或酒精代谢后的综合作用不同有关。后续可以通过激素性股骨头坏死和酒精性股骨头坏死动物模型进行比较,将会比较好地体现临床病变差异特点。同时,研究发现无论是激素还是酒精诱导的血管内皮细胞功能损伤,健脾活骨方均具有显著的改善作用,体现该方“活血”治法的科学性。

综上所述,本研究通过模拟血管生成的过程,建立酒精致血管内皮细胞功能损伤的模型,证明了 8~32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  质量浓度的 JPHGP 对酒精致血管内皮细胞功能损伤具有不同程度的修复作用,其中 JPHGP 32  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组疗效最佳,其调控机制可能与激活 Akt/JNK/p38 MAPK 信号通路有关,相关结果将有助于阐明于其“健脾活血”治法的生物学内涵,为其临床应用提供科学参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 周占国,郭浩山,关涛,等. 股骨头坏死病因的相关因素分析[J]. 中医正骨,2020,32(1):7-10.
- [2] ZHAO D, ZHANG F, WANG B, et al. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version) [J]. J Orthop Translat,2020,21:100-110.
- [3] CHEN X, LI M, YAN J K, et al. Alcohol induces cellular senescence and impairs osteogenic potential in bone Marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Alcohol Alcohol,2017,52(3):289-297.
- [4] 刘铁钢,陈卫衡. 非创伤性股骨头坏死的流行病学研究进展[J]. 医学综述,2009,15(17):2637-2639.
- [5] KONG X, LI X, ZHANG C, et al. Ethyl acetate fraction of Huogu formula inhibits adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells via the

- BMP and Wnt signaling pathways[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(4):480-491.
- [6] KONG X, LI X, ZHANG C, et al. Aqueous fraction of Huogu formula promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through the BMP and Wnt signaling pathways[J]. *Rejuvenation Res*, 2016, 19(6):509-520.
- [7] JIANG Y, LIU D, KONG X, et al. Huogu I formula prevents steroid-induced osteonecrosis in rats by down-regulating PPAR $\gamma$  expression and activating Wnt/LRP5/beta-catenin signaling[J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(3):342-350.
- [8] CHEN W H, KONG X Y, WAN R, et al. Effects of huogu I formula ( I ) on correlated factors of bone regeneration in chickens with steroid-induced necrosis of femoral head[J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(5):378-384.
- [9] 徐腾腾,王金霞,明瑞蕊,等. 健脾活骨方对糖皮质激素致血管内皮细胞功能损伤的干预作用[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(6):1625-1631.
- [10] 惠银银,刘又斌,王晶,等. 非创伤性股骨头坏死病因的研究进展[J]. *中医正骨*, 2018, 30(2):33-36, 40.
- [11] 方罗昌婷,汪倩倩,孙丛丛,等. 基于 VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt 信号通路研究健脾活骨方对 AONFH 血管损伤的修复作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(8):186-194.
- [12] LI Q, WANG Z. Influence of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in co-culture on osteogenesis and angiogenesis: An *in vitro* study[J]. *Arch Med Res*, 2013, 44(7):504-513.
- [13] PEACH CJ, MIGNONE VW, ARRUDA MA, et al. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: Binding and signalling at VEGFR2[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19:1264.
- [14] MELINCOVICI C S, BOŞCA A B, ŞUŞMAN S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2018, 59(2):455-467.
- [15] 谭婕,李芑,王洪星,等. 加味阳和汤对阳虚寒凝型酒精性股骨头坏死大鼠 PI3K、Akt 基因及蛋白表达水平的影响[J]. *临床合理用药杂志*, 2022, 15(36):118-121.
- [16] 马文元,吴智恒,吴洁,等. 股骨头坏死信号通路研究概述[J]. *中国医药科学*, 2022, 12(18):26-29, 90.
- [17] SONG F, HU B, CHENG J W, et al. Anlotinib suppresses tumor progression via blocking the VEGFR2/PI3K/Akt cascade in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7):573.
- [18] 史桂荣,任博文,张仲博,等. 红茴香提取物干预骨质疏松性大鼠骨折后的血管生成[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(31):5028-5034.
- [19] AGAS D, HANNA R, BENEDICENTI S, et al. Photobiomodulation by near-infrared 980-nm wavelengths regulates pre-osteoblast proliferation and viability through the PI3K/Akt/Bcl-2 pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14):7586.
- [20] 耿军辉,张丽军,王亚丽,等. PI3K/Akt 信号通路与肿瘤血管新生的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(9):1462-1466.
- [21] 周毅,杨世鹏,赵智慧,等. 川骨片对家兔激素性股骨头缺血性坏死 ERK1/2、JNK、p38 磷酸化蛋白的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2019, 36(11):1808-1813.
- [22] SUZUKI A, GUICHEUX J, PALMER G, et al. Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation[J]. *Bone*, 2002, 30(1):91-98.
- [23] 李登举,张瑶珍. JNK 和 p38 通路正常及异常造血[J]. *国外医学:生理、病理科学与临床分册*, 2001, 21(4):264-265.
- [24] 田能,孔祥英,万蓉,等. 健脾活血方对激素性股骨头坏死血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(2):48-51.
- [25] 李泰贤,张彦琼,黄泽青,等. 从分子网络解析非创伤性股骨头坏死不同中医证候的生物学基础及其对证方药的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(16):192-204.
- [26] 沈莹姗,乌日莎娜,庄至坤,等. 基于病理表型辨析激素性与酒精性股骨头坏死的血瘀证特点[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(8):4868-4872.
- [27] 魏秋实,杨帆,陈晓俊,等. 激素性与酒精性股骨头坏死患者骨标本坏死区域病理与显微结构特点分析[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2018, 32(7):866-872.
- [28] 王金霞,贾可欣,明瑞蕊,等. 通络生骨胶囊对糖皮质激素致血管内皮细胞功能损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(9):48-55.
- [29] 徐传毅. 袁浩教授从血瘀证论治激素性股骨头坏死经验[J]. *中医药学刊*, 2003, 21(2):194-195.

[责任编辑 孙丛丛]