

当归补血汤对内皮祖细胞氧化应激损伤的保护作用

郭静, 莫友胜, 王奇, 黄水清*

(广州中医药大学科技创新中心, 广州 510405)

[摘要] 目的:研究当归补血汤(DBT)对过氧化氢(H_2O_2)诱导的小鼠骨髓来源内皮祖细胞(EPCs)氧化应激损伤的保护作用。方法:采用密度梯度离心法获取小鼠骨髓来源的单核细胞,通过特定培养基培养并鉴定获得EPCs,实验分为空白组,模型组,DBT组(100,200,400 $mg \cdot L^{-1}$)。采用噻唑蓝(MTT)比色法测定EPCs细胞存活率,构建 H_2O_2 诱导的细胞损伤模型;通过MTT,迁移小室(transwell),Matrigel基质胶,超氧化物荧光阴离子探针(DHE),分别检测EPCs增殖、迁移与体外血管形成能力,以及活性氧(ROS)水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞自噬相关蛋白泛素结合蛋白SQSTM1(p62),微管相关蛋白1轻链3 II型蛋白(LC3-II)的蛋白表达。结果:与空白组比较,模型组EPCs细胞增殖能力、迁移能力、成管腔数及小管分支长度均显著降低($P<0.01$),胞内ROS水平显著升高($P<0.01$),自噬标志性蛋白p62显著升高($P<0.01$),LC3-II蛋白表达降低($P<0.01$);与模型组比较,DBT组能呈浓度依赖性地升高EPCs增殖能力与迁移能力($P<0.01$),增加细胞成管腔数和小管分支长度($P<0.01$),降低胞内ROS水平($P<0.01$);此外,DBT呈浓度依赖性上调了LC3-II蛋白的表达($P<0.01$),降低p62蛋白的表达($P<0.01$)。结论:当归补血汤能提高氧化应激状态下的EPCs自噬水平,促进损伤的EPCs迁移、增殖能力与血管形成能力,保护氧化应激条件下内皮祖细胞的生物学功能。

[关键词] 当归补血汤; 内皮祖细胞; 氧化应激; 生物学功能; 自噬

[中图分类号] R2-0;R289;R54;R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0039-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202038

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200813.1704.007.html>

[网络出版日期] 2020-8-13 17:13

Protective Effect of Danggui Buxuetang on Endothelial Progenitor Cells Against Oxidative Stress Injury Induced by H_2O_2

GUO Jing, MO You-sheng, WANG Qi, HUANG Shui-qing*

(Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine,
Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To observe protective effect of Danggui Buxuetang (DBT) on oxidative stress injury of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) against induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). **Method:** Monocytes from bone marrow of mice were obtained by density gradient centrifugation, and EPCs were obtained by specific culture medium. The experiment was divided into blank group, model group, DBT group (100, 200, 400 $mg \cdot L^{-1}$). Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to determine the survival rate of EPCs and establish the cell injury model induced by H_2O_2 . MTT, transwell chamber, matrigel and superoxide fluorescent anion probe (DHE) were used to detect the proliferation, migration, *in vitro* angiogenesis and ROS level, detection of autophagy by Western blot. **Result:** Compared with blank group, the proliferation ability, migration ability, the number of lumens and the length of tubule branches of EPCs in the model group were significantly reduced ($P<0.01$), the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was significantly

[收稿日期] 20200408(020)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81774199);广州市科技计划项目(201803010047)

[第一作者] 郭静,在读硕士,从事中医药防治心脑血管疾病研究,E-mail:271164288@qq.com

[通信作者] *黄水清,博士,教授,博士生导师,从事中医药防治心脑血管疾病研究,E-mail:hsq@gzucm.edu.cn

increased ($P<0.01$), the expression of p62, the light chain microtubule associated protein 1 protein light chain 3 II type (LC3-II) protein of microtubule associated protein 1, was significantly increased ($P<0.01$). Compared with model group, DBT group increased the ability of cell proliferation and migration ($P<0.01$). In addition, DBT increased the expression of LC3-II protein in a concentration dependent manner ($P<0.01$), and decreased the expression of p62 protein ($P<0.01$). **Conclusion:** DBT can improve the autophagy level of EPCs under oxidative stress, promote the proliferation, migration and angiogenesis of injured EPCs, and protect the biological function of EPCs under oxidative stress.

[Key words] Danggui Buxuetang; endothelial progenitor cells; oxidative stress; biological function; autophagy

内皮功能障碍和损伤是导致心脑血管疾病发生的重要因素,此类内皮损伤可被骨髓衍生的内皮祖细胞(EPCs)修复^[1]。EPCs能在血管损伤或组织缺血缺氧信号的刺激下,迅速增殖,从骨髓快速动员、迁移、归巢至内皮损伤处参与动脉内膜损伤修复,一定程度上阻止心脑血管疾病的恶化^[2-3]。EPCs在心脑血管疾病、糖尿病周围血管疾病和其他血管损伤疾病的研究和治疗中具有广阔的前景,由于这类血管损伤性疾病常伴随较强的氧化应激过程,会影响EPCs的正常生理功能^[4-7],引起细胞自噬功能障碍^[8-10],因此,研究能促进EPCs在损伤条件下保持其生物学功能的药物,对修复血管损伤对抗心脑血管疾病具有重要意义。

当归补血汤出自李东垣《内外伤辨惑论》,由黄芪与当归5:1配伍组成,具有补气生血的功用。现代医学研究发现,当归补血汤在促进骨髓造血系统重建、调节免疫力,具有较突出的作用^[11]。药理学实验研究发现,当归补血汤可以通过多种途径影响与血管新生相关的基因表达,可能通过调控小鼠骨髓造血细胞线粒体自噬,改善再障小鼠骨髓造血功能衰竭^[13]。研究组前期研究发现,当归补血汤具有抗氧化损伤的作用,可以增加动脉粥样硬化动物模型的外周EPCs数量,促进其集落形成、黏附和迁移能力,其可以通过影响磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路调控EPCs活性^[14-15]。然而,当归补血汤能否改善氧化应激状态下EPCs的功能完整性值得继续探究。目前,对于从自噬水平探讨损伤条件下的体外EPCs生物学功能的研究资料甚少。本次实验主要利用H₂O₂诱导小鼠骨髓来源的EPCs体外构建氧化应激细胞模型,来研究当归补血汤对损伤状态下的EPCs的生物学功能的作用与相关机制,以期能为当归补血汤在心脑血管疾病的治疗中提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级C57BL/6J小鼠180只,3~4周龄,体质量10~12 g,购于广州中医药大学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2013-0034。动物中心标准动物房饲养(温度20~25℃,湿度40%~60%),自由进食进水,本实验符合并通过《广州中医药大学动物实验伦理审查条例》。

1.2 药物与试剂 当归补血汤由黄芪30 g,当归6 g组成,产自甘肃,批号分别为H5116412, 14115719,购于广东省药材公司中药饮片厂,经广州中医药大学中药学院药剂学部魏刚教授鉴定均为正品。淋巴细胞分离液(美国Sigma公司,批号10831);EGM-2MV完全培养基(瑞士Lonza公司,批号CC-3202);干细胞标志单克隆CD133抗体,单克隆CD34抗体,血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)抗体(美国eBioscience公司,批号分别为12-1331-8011, 13-0341-81, 13-5821-80);活性氧(ROS)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号S0063);噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司,批号M2128);Matrigel基质胶(英国BD Biocoat公司,批号356234);泛素结合蛋白SQSTM1/p62抗体,自噬微管相关蛋白轻链LC3A/B抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗和兔抗二抗(美国CST公司,批号分别为5114, 12741, 7076P2, 7074); β -肌动蛋白(β -actin,英国Abcam公司,批号ab69512)。

1.3 仪器 3470型24孔板transwell小室(美国Corning公司);81501型 μ -Slide血管生成载玻片(美国Ibidi公司);BPN-150CH型二氧化碳培养箱(美国Thermo Scientific公司);5424R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);DFC9000 GT型倒置荧光显微镜DMi8(德国Leica公司);En Vision型多功能全波长酶标仪(美国PerkinElmer公司);VCX500型超声细胞破碎仪(美国Sonics公司);170-8170型

垂直板电泳转印系统、凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 EPCs的分离培养鉴定与细胞造模 密度梯度离心法分离出小鼠单核细胞层,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬2次后加入EGM-2MV完全培养基,接种于经纤维连接蛋白包被的培养瓶中,接种至第4天首次换液,随后每2~3 d换液。培养至第7天,待细胞呈集落状,细胞融合度90%以上时,利用CD34, CD133, VEGFR2免疫荧光鉴定获得的细胞^[16-17]。取分离培养第7天的EPCs细胞,96孔板调整细胞个数,根据文献,分别加入含不同浓度(50, 100, 200, 400, 800, 1 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[18]的 H_2O_2 培养液,分别处理30 min,继续培养24 h后,MTT比色法检测细胞活力,选择最适浓度进行细胞损伤造模与后续实验。

2.2 DBT培养液的制备与分组 称取黄芪与当归质量比5:1的生药比例混合置于提取浓缩机,依次加入8倍,6倍体积的水,冷凝回流煎煮2 h,煎煮2次后将2次煎煮液混合,随后旋蒸浓缩,温度75 $^{\circ}\text{C}$,待浓缩液体积剩余1/5时,停止浓缩,将所得的浓缩液放入真空干燥器箱中,恒温干燥制备成每克含生药3.74 g的浸膏。 -80°C 冰箱长期保存。于实验前按比例溶于EBM-2MV培养基,配置为37.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的当归补血汤培养液,反复离心去渣,微孔滤膜除菌后,分装保存至 -20°C 冰箱备用。预实验摸索细胞用量浓度再进行稀释。将第7天后EPCs分别设置空白组(常规培养);模型组(400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2);当归补血汤低、中、高浓度组(100, 200, 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),分别培养24 h后进行相关实验。

2.3 MTT比色法检测细胞增殖能力 选方法2.2项下干预24 h后的96孔板细胞,每组6个复孔,每孔加入5%MTT溶液10 μL ,孵育4 h后弃上层液体,每孔加入DMSO 150 μL ,避光振荡10 min后,用酶标仪于490 nm测各孔吸光度A。

2.4 DHE法检测胞内ROS水平 选方法2.2项下干预24 h后的96孔板细胞,每组设置6个复孔,根据试剂盒说明书加入5 μmol 超氧化阴离子荧光探针,37 $^{\circ}\text{C}$ 装载30 min后,利用倒置荧光显微镜的绿光激发观察并拍照。

2.5 transwell迁移实验检测细胞迁移能力 将不同分组EPCs细胞刮刮下后,将 2.5×10^4 个EPCs悬浮于基础培养基中,加入到transwell小室上室中,下室加入含细胞生长因子的完全培养基500 μL ,并按方法2.2项下各药物浓度给药诱导迁移,培养24 h后,

用多聚甲醛固定20 min,PBS清洗2次,加入4,6-联脒-2-苯基吡啶DAPI染色液避光孵育5 min,用棉签小心擦去细胞小室上层的细胞,倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 小管形成实验tube formation法检测细胞血管形成能力 取第7天的EPCs细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/每孔的体积接种于前期铺好基质胶的 $\mu\text{-Slide}$ 血管生成载玻片内孔中,以每孔50 μL 的体积将2.2项下方法中浓度药物加入 $\mu\text{-Slide}$ 的外孔中,倒置显微镜下动态观察2~12 h小管结构的形成,每孔采集3~5个视野并拍照,用Image J分析软件分析。

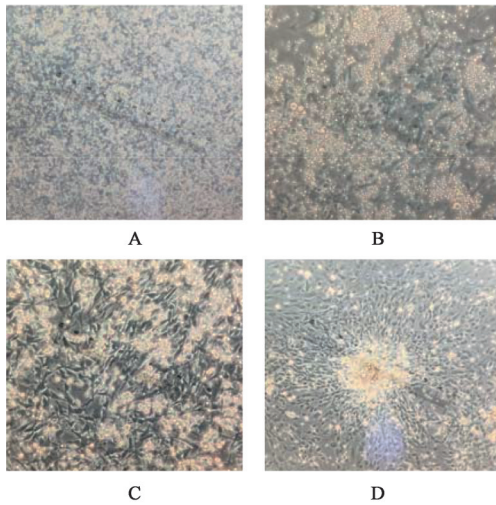
2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关蛋白表达 取2.2项下方法中的6孔板细胞,各加入裂解液150 μL 冰上裂解20 min;收集细胞离心(12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$,10 min),取上清液,BCA法检测总蛋白浓度;计算蛋白上样量,每孔上样20 μg ,p62,LC3一抗(1:1 000), $\beta\text{-actin}$ (1:5 000),加入二抗(1:3 000)孵育,ECL化学发光法显色,Image Lab软件分析各蛋白相对表达量,目标蛋白的相对含量以目标蛋白与内参蛋白的比值表示。

2.8 统计学分析 采用SPSS 22.0统计分析软件进行统计学处理,服从正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。满足方差齐性的多组间计量资料比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 EPCs的培养与鉴定 倒置显微镜下可见,第1天新分离的单个核细胞为小圆形,细胞数量多。培养2 d后可见部分细胞贴壁变形,呈梭形或不规则,细胞增殖不明显。培养第5天后迅速增殖,并可见细胞集落及线状结构形成。细胞集落中心为圆形细胞,周围为梭形,呈放射状。培养至第7天,呈集落状细胞数量显著增多,中央为一群密集细胞,向四周伸出长,细胞呈长梭形且首尾相连,网状排列,细胞融合度可以达90%以上,见图1。免疫荧光鉴定的细胞表面抗原CD34, CD133, VEGFR2呈阳性,说明小鼠骨髓来源的单核细胞通过特定培养基培养至7 d能得到早期EPCs,见图2。

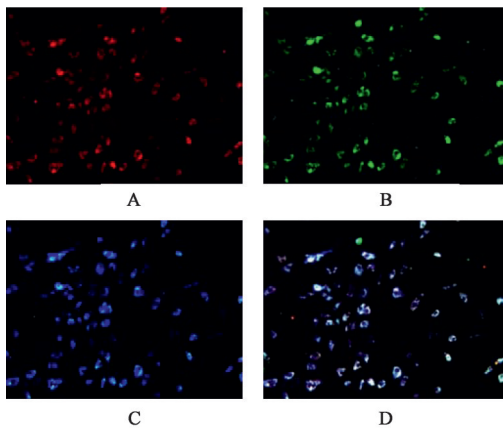
3.2 细胞损伤模型的构建 分别给予50, 100, 200, 400, 800, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 , MTT结果显示,与空白组比较,浓度为200, 400, 800, 1 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EPCs细胞存活率显著降低($P<0.01$),最终选择400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 构建细胞损伤模型。见表1。



A. 分离培养第1天; B. 分离培养第3天; C. 分离培养第5天; D. 分离培养第7天

图1 体外培养的小鼠骨髓源EPCs的形态与生长(倒置显微镜, ×100)

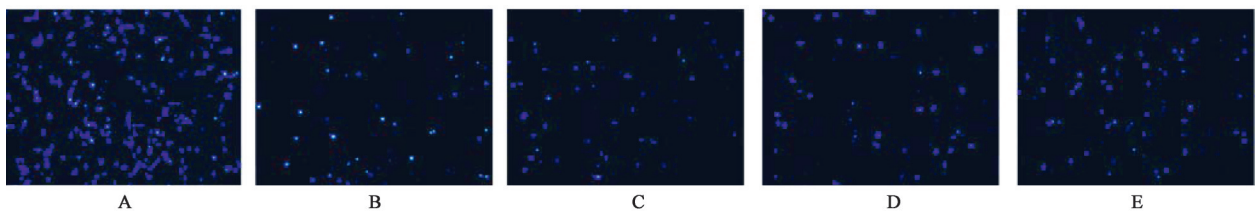
Fig. 1 Morphology and growth of mice bone marrow-derived EPCs cultured (inverted microscope, ×100)



A. CD34标记的细胞; B. CD133标记的细胞; C. VEGFR2标记的细胞; D. Merged

图2 免疫荧光标记细胞表面抗原CD34, CD133和VEGFR2(免疫荧光, ×200)

Fig. 2 Immunofluorescent labeling of cell surface antigens CD34, CD133 and VEGFR2 (IF, ×200)



A. 空白组; B. 模型组; C. 当归补血汤低质量浓度组; D. 当归补血汤中质量浓度组; E. 当归补血汤高质量浓度组(图4~6同)

图3 当归补血汤对H₂O₂损伤的EPCs迁移能力影响(DAPI, ×100)

Fig. 3 Effect of Danggui Buxuetang on migration of H₂O₂-induced EPCs (DAPI, ×100)

3.5 对H₂O₂诱导的EPCs血管形成功能的影响 倒置显微镜下观察12 h后基质胶上的小管结构的形

表1 不同浓度H₂O₂对EPCs细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of H₂O₂ with different concentration on proliferation of EPCs ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力/%
空白	-	99.33±2.33
H ₂ O ₂	50	98.43±6.95
	100	89.44±5.54
	200	79.33±10.94 ²⁾
	400	54.16±7.88 ²⁾
	800	39.55±3.68 ²⁾
	1 600	22.70±4.23 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

3.3 对H₂O₂诱导的EPCs增殖能力的影响 MTT结果显示,与空白组比较,模型组EPCs的细胞存活率明显下降(P<0.01);与模型组比较,当归补血汤各质量浓度组EPCs的细胞存活率呈浓度依赖性升高(P<0.05)。见表2。

表2 当归补血汤对H₂O₂诱导的EPCs增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Danggui Buxuetang on proliferation of H₂O₂-induced EPCs ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力/%
空白	-	100.00±9.76
模型	-	51.68±4.54 ²⁾
当归补血汤	100	58.76±6.02
	200	60.91±6.33 ³⁾
	400	67.91±6.35 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01(表3,4同)。

3.4 对H₂O₂诱导的EPCs迁移能力的影响 与空白组比较,模型组EPCs迁移到下室的细胞个数显著减少(P<0.01);与模型组比较,当归补血汤中、高质量浓度组EPCs迁移到下室的细胞个数显著增加(P<0.01)。见图3,表3。

成,与空白组比较,模型组所形成的管腔数、小管分支长度均显著减少(P<0.01);与模型组比较,当归补

表3 当归补血汤对H₂O₂损伤的EPCs迁移能力、体外血管形成能力与胞内ROS水平的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Danggui Buxuetang on migration, angiogenesis and intracellular ROS level of H₂O₂-induced EPCs($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	迁移能力/%	微血管长度/mm	ROS水平/%
正常	-	75.71±1.05	74.71±0.88	55.71±2.52
模型	-	50.64±1.02 ²⁾	52.31±3.83 ²⁾	182.63±3.54 ²⁾
当归补血汤	100	53.49±1.47	57.15±1.01	167.15±2.89 ³⁾
	200	67.57±1.10 ⁴⁾	67.57±2.01 ⁴⁾	134.94±7.46 ⁴⁾
	400	70.64±1.07 ⁴⁾	76.31±2.02 ⁴⁾	86.97±2.49 ⁴⁾

血汤中、高质量浓度组基质胶上EPCs形成的管腔数 与小管分支长度显著增加($P<0.01$)。见图4,表3。

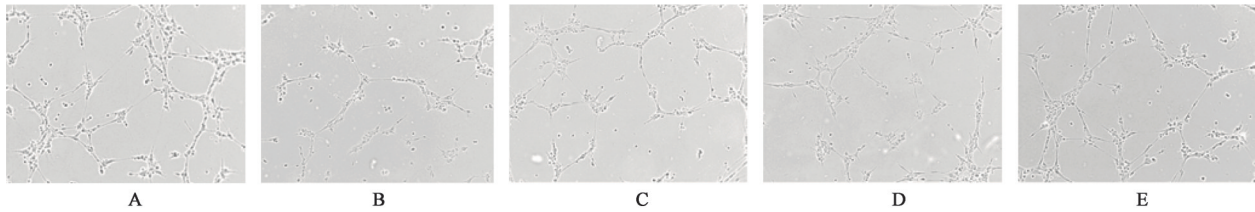


图4 当归补血汤对H₂O₂损伤的体外血管形成能力的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 4 Effect of Danggui Buxuetang on angiogenesis of H₂O₂-induced EPCs(inverted microscope,×100)

3.6 对H₂O₂损伤的EPCs细胞胞内ROS水平的影响 倒置荧光显微下观察,与空白组比较,模型组EPCs细胞的荧光表达显著增强,差异有统计学意义

($P<0.01$);与模型组比较,当归补血汤3个浓度组的细胞荧光表达数显著减弱,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图5,表3。

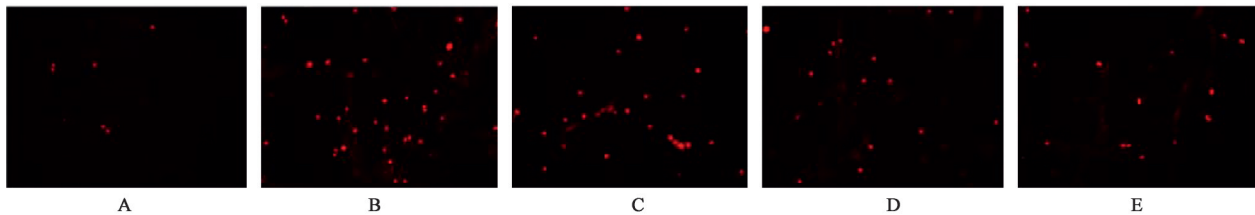


图5 当归补血汤对H₂O₂损伤的EPCs胞内ROS水平的影响(倒置荧光显微镜,×100)

Fig. 5 Effect of Danggui Buxuetang on intracellular ROS level of H₂O₂-induced EPCs(inverted fluorescence microscope,×100)

3.7 对H₂O₂损伤的EPCs自噬相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组EPCs的p62蛋白明显增加($P<0.05$),LC3-II型蛋白明显减少($P<0.05$);与模型组比较,当归补血汤各质量浓度组p62蛋白显著减少,LC3-II型蛋白显著增多,差异有统计学意义($P<0.01$),且呈现一定的浓度依耐性。见图6,表4。

4 讨论

目前我国的心脑血管疾病事件发生率处于持续上升阶段,心血管病死亡占居民死亡原因的首位,严重影响着人们的生活质量与经济负担^[19]。吸烟、高血压、糖尿病为主要心血管危险因素,会破坏内皮细胞以及EPCs的生物活性与功能,因此EPCs与心血管健康密切相关^[20]。大量临床报道也证实了心血管患者体内EPCs的含量会出现下降,功能被破坏^[8-10,20]。另外,从目前部分实验研究来看,由

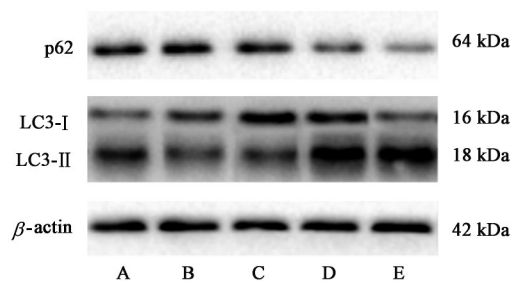


图6 各组EPCs细胞自噬相关蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of autophagy related protein expression of EPCs

EPCs介导的血管修复与血管生成的动物实验成功的关键因素也在于EPCs的数量与生物学功能状态^[21]。因此,研究能增加EPCs数量及保护其生物活性功能的药物具有重要意义。

当归补血汤是临床与研究常用的补气生血经典名方,主要由补气见长的黄芪与补血为主的当归

表4 当归补血汤对H₂O₂损伤的EPCs自噬相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Danggui Buxuetang on expression of autophagy related protein in H₂O₂-induced EPCs($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p62/β-actin	LC3-II/LC3-I
正常	-	100.00	100.00
模型	-	107.05±1.72 ²⁾	90.77±1.38 ²⁾
当归补血汤	100	98.01±2.15	116.98±3.15 ³⁾
	200	63.95±1.24 ⁴⁾	142.26±4.77 ⁴⁾
	400	39.66±0.63 ⁴⁾	149.39±0.75 ⁴⁾

组成,其中黄芪为君药,芪归用量为五比一,大量运用黄芪能大补脾肺之气,以资生血之源,当归益血和营,使气生血旺,其配伍用意在于通过大补无形之气促进有形之血的生成^[22]。既往研究发现当归补血汤能促进循环EPCs的增殖、迁移黏附功能以及血管形成功能^[14-15],从补气功用而言,补气有推动、促进的作用,可以将细胞的迁移、黏附能力看作是被“气”推动运行,促成气能生血体现当归补血汤“生血”,形成血管的功用^[23]。

氧化应激损伤是大多数心脑血管疾病中内皮损伤的重要机制,氧化应激造成的血管损伤能导致大量ROS产生,过量的ROS具有细胞毒性,会直接降低循环EPCs含量,并破坏其正常生物活性及功能^[6-7],在本实验中,利用H₂O₂体外诱导EPCs造成氧化应激损伤模型,发现胞内ROS增加,增殖、迁移与血管能力均有所下降,说明氧化应激状态下的EPCs功能完整性遭到破坏,在给与当归补血汤干预后,胞内ROS水平下降,同时提高了EPCs的细胞增殖、迁移与血管形成能力,且呈剂量依耐性,说明当归补血汤在一定程度上逆转了损伤状态下的EPCs功能。由此可以说明,当归补血汤能在氧化应激损伤状态下保持EPCs的生物功能完整性,充分发挥其修复血管内皮的作用。

根据最新研究报道,ROS除了通过引起氧化应激反应直接破坏内皮细胞功能外,又可诱导自噬的启动^[24]。自噬过程主要是细胞将损伤状态下细胞器及错误折叠蛋白包裹形成自噬体,再与溶酶体结合降解,从而维持细胞内环境稳态的过程^[25]。自噬接头蛋白p62与自噬受体LC3通常被用来检测应激状态下的自噬活性,LC3又分为LC3-I型与LC3-II型,当自噬发生时,LC3-I型经泛素样加工修饰与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺结合,形成与自噬体膜结合的LC3-II^[26],并稳定结合于膜上直至与溶酶体

融合,LC3-II蛋白水平的表达升高说明自噬体含量升高,自噬水平增强^[27];p62是含有人微管相关蛋白1轻链3识别序列(LC3-interacting region LIR)结合域的接头蛋白^[28],在自噬中晚期被激活,能与定位于自噬小体膜上的LC3-II蛋白结合形成复合物,并在自噬溶酶体中降解,所以p62蛋白表达水平与自噬活性呈负相关^[28]。本次实验通过Western blot检测二者的蛋白表达量发现,模型组的p62蛋白表达降低,LC3-II型蛋白表达升高,而经过当归补血汤干预后,p62蛋白表达降低,LC3-II型蛋白表达水平显著上调,且呈浓度依赖性,说明当归补血汤增强了EPCs的自噬水平。有研究发现当归补血汤还可以通过提高miR-21调控自噬,当归补血汤通过上调Atg7和调节mTOR/P70s6k信号通路诱导大肠癌细胞自噬死亡^[29],说明当归补血汤有多种通路途径调控细胞自噬。

综上所述,当归补血汤能一定程度上提高氧化应激状态下的细胞自噬水平,促进损伤后的EPCs的细胞生物学功能,增强其增殖、迁移能力与血管形成能力促进其本身的修复血管能力,为当归补血汤治疗血管损伤性疾病提供了有力的证据。

[参考文献]

[1] JATIN P, PRUDENCE D, KIARASH K. Concise review: functional definition of endothelial progenitor cells: a molecular perspective [J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5(10): 1302-1306.

[2] KIM H Y, YUN J, KWON S M. Therapeutic strategies for oxidative stress-related cardiovascular diseases: removal of excess reactive oxygen species in adult stem cells [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, doi: 10.1155/2016/2483163.

[3] THOMAS V S, RONALD M A, JACQUELINEM D, et al. Endothelial dysfunction plays a key role in increasing cardiovascular risk in type 2 diabetes: the Hoorn study [J]. Hyper, 2014, 64(6): 1299-1305.

[4] ZHOU B, MA F X, LIU P X, et al. Impaired therapeutic vasculogenesis by transplantation of ox-LDL-treated endothelial progenitor cells [J]. J Lipid Res, 2007, 48(3): 518-527.

[5] VELIMIR A, KARMELA A, LORA K. Endothelial progenitor cells (EPCs) in ageing and age-related diseases: how currently available treatment modalities affect EPC biology, atherosclerosis, and cardiovascular outcomes [J]. Mech Age Dev, 2016, 159: 49-62.

[6] MOON J H, KHAE M, KIM K J, et al. Decreased endothelial progenitor cells and increased serum

- glycated albumin are independently correlated with plaque-forming carotid artery atherosclerosis in type 2 diabetes patients without documented ischemic disease [J]. *Circ J*, 2012, 76(9):2273-2279.
- [7] DEWI S, RICA T. Introduction to next generation of endothelial progenitor cell therapy: a promise in vascular medicine[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(3): 411-421.
- [8] PELLICCIA F, PASCERI V, MORETTI A, et al. Endothelial progenitor cells predict long-term outcome in patients with coronary artery disease: ten-year follow-up of the PROCREATION extended study[J]. *Int J Cardiol*, 2020, doi: 10.1016/j.ijcard. 2020. 06. 002.
- [9] ZHOU D M, SUN L, ZHU J, et al. MiR-9 promotes angiogenesis of endothelial progenitor cell to facilitate thrombi recanalization via targeting TRPM7 through PI3K/Akt/autophagy pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(8):4624-4632.
- [10] MEHDI H, RAYSA R, MASOUD P, et al. Distinct role of autophagy on angiogenesis: highlights on the effect of autophagy in endothelial lineage and progenitor cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 305-317.
- [11] ZHENG K Y, CHOI R C, XIE H Q, et al. The expression of erythropoietin triggered by Danggui Buxue Tang, a Chinese herbal decoction prepared from Radix Astragali and Radix Angelicae Sinensis, is mediated by the hypoxia-inducible factor in cultured HEK293T cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(1): 259-267.
- [12] 董海燕,杨建刚,肖志强,等. 4种中药和3个方剂促血管新生作用及有效组分的研究[J]. *中药材*, 2013, 36(8):1297-1300.
- [13] 陈维达,徐龙晋,张静,等. 当归补血汤对再障小鼠骨髓造血及线粒体自噬的实验研究[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(1):14-18.
- [14] 秦臻,黄水清. 当归补血汤含药血清对内皮祖细胞功能及PI3K/Akt通路影响的研究[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(9):1320-1323.
- [15] 秦臻,黄水清. 当归补血汤对动脉粥样硬化兔内皮祖细胞及血清VEGF、SDF-1的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2012(2):211-215.
- [16] FRANK T, JEAN P, MERBIN C Y, et al. Endothelial progenitor cells: identity defined? [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(1):87-102.
- [17] JAMIE C, LAURA M, WAYLAN K B, et al. Human CD34⁺AC133⁺VEGFR-2⁺ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors [J]. *Exp Hematol*, 2007, 35 (7) : 1109-1118.
- [18] WU Q Q, QI B L, LIU Y, et al. Mechanisms underlying protective effects of trimetazidine on endothelial progenitor cells biological functions against H₂O₂-induced injury: involvement of antioxidation and Akt/eNOS signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 707(1/3):87-94.
- [19] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2018》概要[J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(3):209-220.
- [20] XUE L, CHEN H, ZHANG T, et al. Changes in serum vascular endothelial growth factor and endostatin concentrations associated with circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke [J]. *Met Brain Dis*, 2017, 32(2):641-648.
- [21] DEWI S, RICA T. Introduction to next generation of endothelial progenitor cell therapy: a promise in vascular medicine[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(3): 411-421.
- [22] 谢东杰,王爱迪,刘宝山. 当归补血汤在血液疾病中作用机制的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(6):2488-2490.
- [23] 殷沈华,唐德才. 益气活血类中药对血管生成影响的研究[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(1):43-44.
- [24] DING Z F, WANG X W, SCHNACKENBERG L, et al. Regulation of autophagy and apoptosis in response to ox-LDL in vascular smooth muscle cells, and the modulatory effects of the microRNA hsa-let-7g[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(2):1378-1385.
- [25] BEATRIZ C, AKIHIKO H, NOBORU T, et al. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(4):575-581.
- [26] FRANCESCO G, ANNA L, TIZIANA A, et al. Autophagy markers LC3 and p62 accumulate in immune-mediated necrotizing myopathy [J]. *Muscle Nerve*, 2019, 60(3):315-327.
- [27] MARTÍN P S, SAITO T, KOMATSU M. p62/SQSTM1: Jack of all trades' in health and cancer [J]. *FEBS J*, 2019, 286(1):8-23.
- [28] LIM J, LACHEN M L, WU S, et al. Proteotoxic stress induces phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to regulate selective autophagic clearance of protein aggregates [J]. *PLoS Genet*, 2015, doi: 10.1371/journal.pgen. 1004987.
- [29] CHEN S T, LEE T Y, TSAI T H, et al. Traditional Chinese medicine Danggui Buxue Tang inhibits colorectal cancer growth through induction of autophagic cell death [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(51): 88563-88574.

[责任编辑 孙丛丛]