

· 药理 ·

## 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

王金霞<sup>1,2</sup>, 贾可欣<sup>2</sup>, 明瑞蕊<sup>2</sup>, 徐腾腾<sup>2</sup>, 刘春芳<sup>2\*</sup>, 林娜<sup>1,2\*</sup>

(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:观察通络生骨胶囊(TLSGC)对糖皮质激素致血管内皮细胞功能损伤的影响,并从丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)/细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路初步探索其作用机制。方法:取正常SD大鼠胸主动脉环,用甲泼尼龙琥珀酸钠(MPS, 0.04 g·L<sup>-1</sup>)和(或)血管内皮细胞生长因子(VEGF, 20 μg·L<sup>-1</sup>)体外干预,加入TLSGC(12.5, 25, 50 μg·L<sup>-1</sup>)连续作用5 d,观察血管环芽出的微血管数目、长度和面积;此外,以甲泼尼龙琥珀酸钠(MPS, 0.04 μg·L<sup>-1</sup>)加入由VEGF(20 μg·L<sup>-1</sup>)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC),再加入TLSGC(12.5, 25, 50 μg·L<sup>-1</sup>),然后分别采用transwell迁移,transwell侵袭及管腔形成实验检测HUVEC的迁移、侵袭及管腔形成能力,并以硝酸还原酶法检测细胞上清中一氧化氮(NO)含量,干粉法检测细胞上清中内皮素-1(ET-1)含量,蛋白免疫印迹法检测细胞中血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2), ERK, 磷酸化(p)-ERK, MEK和p-MEK蛋白表达量。结果:与正常组比较, MPS能明显抑制由VEGF诱导的大鼠胸主动脉环微血管数目、长度和面积以及HUVEC细胞迁移、侵袭和管腔形成能力,降低NO并升高ET-1含量, MPS还能明显减少由VEGF诱导的VEGFR2, p-MEK和p-ERK在HUVEC中的蛋白含量( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与模型组比较, TLSGC能剂量依赖地改善由MPS降低的大鼠胸主动脉环微血管数目、长度和面积以及HUVEC细胞迁移、侵袭和管腔形成能力,提高HUVEC中的NO, VEGFR2, p-MEK和p-ERK蛋白含量并降低ET-1含量( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论: TLSGC对糖皮质激素所致血管内皮细胞血管生成和分泌功能的损伤具有保护作用,其机制可能与活化MEK/ERK信号通路有关。

**[关键词]** 通络生骨胶囊; 甲泼尼龙琥珀酸钠(MPS); 血管内皮细胞; 细胞功能; 血管生成

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)09-0048-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210604

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210308.1515.004.html>

**[网络出版日期]** 2021-3-9 16:02

### Protective Effect of Tongluo Shenggu Capsule on Function Damage of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Glucocorticoid

WANG Jin-xia<sup>1,2</sup>, JIA Ke-xin<sup>2</sup>, MING Rui-rui<sup>2</sup>, XU Teng-teng<sup>2</sup>, LIU Chun-fang<sup>2\*</sup>, LIN Na<sup>1,2\*</sup>

(1. Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Tongluo Shenggu capsule (TLSGC) on glucocorticoid-induced vascular endothelial cell functional damage, and to preliminarily explore the mechanism of action through MEK-ERK signaling pathway. **Method:** The blood vessel of aorta rings of normal SD rats were induced *in vitro* intervention with methylprednisolone sodium succinate (MPS, 0.04 g·L<sup>-1</sup>) and/or vascular endothelial growth factor (VEGF, 20 μg·L<sup>-1</sup>), and were treated with TLSGC(12.5, 25, 50 μg·L<sup>-1</sup>) continuously for 5 days

**[收稿日期]** 20210107(017)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09731002);中国中医科学院中药研究所技术研发项目(20181218)

**[第一作者]** 王金霞,在读硕士,从事中药药理研究, Tel:010-64014411-2869, E-mail:1612779387@qq.com

**[通信作者]** \*刘春芳,副研究员,从事抗炎中药药理研究, Tel:010-64014411-2869, E-mail:chunfang666@126.com;

\*林娜,博士,研究员,博士生导师,从事抗炎中药药理研究, Tel:010-64014411-2869, E-mail:linna888@163.com

to observe the number, length and area of microvascular ring buds. In addition, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by VEGF ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were added into MPS ( $0.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and TLSGC ( $12.5, 25, 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were added. Then, Transwell migration, Transwell invasion and lumen formation experiments were used to detect the migration, invasion and lumen formation ability of HUVEC, respectively. The content of nitric oxide(NO) in the cell supernatant was detected by nitrate reductase method, the content of endothelin 1(ET-1) in the cell supernatant was detected by dry powder method. Moreover, the protein contents of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), extracellular signal-regulated kinase (ERK), phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), mitogen extracellular kinase1 (MEK) and phosphorylated mitogen extracellular kinase1 (p-MEK) in the cells were determined by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, MPS could significantly inhibit the number, length and area of VEGF-induced rat thoracic aortic ring microvessels, HUVEC cell migration, invasion and lumen formation ability. It could reduce NO content and increase ET-1 content. MPS could also significantly reduce the protein content of VEGF-induced VEGFR2, p-MEK and p-ERK in HUVEC ( $P<0.05, P<0.01$ ). Compared with the model group, TLSGC could dose-dependently increase the number, length and area of MPS-induced abnormally reduced rat thoracic aortic ring microvessels, promote MPS-induced abnormally decreased HUVEC cell migration, invasion and lumen formation ability. It could increase the protein contents of NO, VEGFR2, p-MEK and p-ERK in HUVEC, and reduce abnormally increased ET-1 content ( $P<0.05, P<0.01$ ). **Conclusion:** TLSGC has a protective effect on the damage of angiogenesis and secretion of vascular endothelial cells induced by glucocorticoid, and the mechanism may be related to the activation of MEK/ERK signaling pathway.

[**Key words**] Tongluo Shenggu capsule; methylprednisolone sodium succinate (MPS); human umbilical vein endothelial cells; cell function; angiogenesis

激素性股骨头坏死是一种由短期大剂量或长期使用糖皮质激素所引起的临床常见的难治性骨关节疾病,其发病机制尚不明确。已知糖皮质激素所致的血管内皮细胞损伤、骨内微循环障碍是造成骨坏死的重要原因,而采取有效的手段保护血管内皮细胞、恢复微循环是治疗激素性股骨头坏死的最新研究策略<sup>[1-2]</sup>。木豆叶为豆科木豆属植物木豆的茎叶,以木豆叶水提取物制成的中成药通络生骨胶囊(TLSGC)来源于全国知名骨伤科专家挖掘的民间经验方,具有补肾健骨、活血化瘀、消肿止痛的功效,临床治疗股骨头坏死疗效显著<sup>[3]</sup>。既往的现代药理研究显示,TLSGC体外能促进骨髓间充质干细胞成骨分化并抑制成脂分化,体内能改善激素性股骨头坏死动物血运循环,升高坏死骨中血管数量和血管内皮细胞生长因子(VEGF)含量,提高骨钙素、降钙素合成,改善骨密度,促进成骨细胞增殖和坏死骨的修复再生<sup>[4-9]</sup>,但对糖皮质激素所致血管内皮细胞功能损伤的作用如何,则尚未见报道。本研究拟采用临床常用的中效类糖皮质激素甲泼尼龙琥珀酸钠(MPS)为诱导剂,首先观察其对大鼠主动脉环血管生成和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)迁移、侵袭、管腔形成和分泌能力影响的基础上,进一步研

究 TLSGC 对 MPS 所致血管内皮细胞功能损伤的干预作用,并从丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)/细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路探索初步作用机制,为临床的合理应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 细胞** HUVEC 购自上海子实生物公司,取 4~8 代用于实验。

**1.2 试剂和耗材** TLSGC 粉末(浙江海正药业杭州有限公司,批号 20181130);重组人粒细胞 VEGF(美国 Pepro Tech 公司,批号 100-20);MPS(比利时辉瑞制药,批号 W59975);RPMI-1640 培养基,青霉素/链霉素溶液(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH40007.01, SV30010);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 94LT8987);0.25% 胰蛋白酶,胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 25200-072, 16000-044);二甲基亚砜(DMSO,美国 Amresco 公司,批号 20190315);基质胶 Matrigel(美国 Corning 公司,批号 354234);转移小室 transwell(美国 Costar 公司,批号 3422);结晶紫(北京科海金忠科技有限公司,批号 2014071603);一氧化氮(NO),内皮素-1(ET-1)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为 A012-1, H093); VEGF

受体2(VEGFR2)单克隆抗体,MEK单克隆抗体,磷酸化(p)-MEK单克隆抗体,ERK单克隆抗体,p-ERK单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为9698,4694,9154,4695,4370);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号ab181602);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,HRP标记羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(北京普利莱基因技术有限公司,批号分别为C1309,C1308)。

**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);XDS-1B型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);BX50型正置显微镜(日本Olympus公司);MK3型全自动酶标仪,3111型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo公司);BS224S型电子天平(赛多利斯公司);CJ-20型净化工作台(天津市泰斯特仪器有限公司);YX-280型手提式压力蒸汽灭菌器(合肥华泰医疗设备有限公司);Powerpac TM Basic型电泳仪、转膜仪,Mini Trans-Blot Cell型转移电泳槽(美国Bio-Rad公司);Fusion FX5型凝胶成像仪(法国Vilber公司)。

## 2 方法

**2.1 药物的制备** 称取TLSGC粉末500 mg,加入磷酸盐缓冲液(PBS)10 mL,配成母液,经0.22 μm微孔滤膜过滤,-20℃保存备用;VEGF用灭菌三蒸水配成0.1 g·L<sup>-1</sup>,用含0.1% BSA的三蒸水稀释至10 mg·L<sup>-1</sup>母液,-80℃保存,临用时以培养液配成需要的浓度,-80℃封口保存。

**2.2 细胞培养** HUVEC置于10%胎牛血清,青霉素、链霉素各100 U·mL<sup>-1</sup>的RPMI-1640培养基37℃5% CO<sub>2</sub> 100%湿度培养,隔天换液,细胞贴壁达90%左右胰酶消化传代。

**2.3 大鼠胸主动脉环实验** 实验设空白,VEGF(20 μg·L<sup>-1</sup>),MPS(VEGF 20 μg·L<sup>-1</sup>+MPS 0.04 g·L<sup>-1</sup>),TLSGC不同剂量(VEGF 20 μg·L<sup>-1</sup>+MPS 0.04 g·L<sup>-1</sup>+TLSGC 12.5, 25, 50 μg·L<sup>-1</sup>)组,TLSGC的给药质量浓度在参考文献[10]的基础上通过前期预实验的摸索而确定,该浓度范围既对细胞活性无影响、又对血管生成有疗效。**2.4~2.8**项实验相同。提前将基质胶4℃过夜融化,用基质胶与RPMI-1640培养基等量混合,包被48孔板,于37℃恒温培养箱中孵育30 min,使基质胶凝固;剥离SD大鼠胸主动脉,切成1~1.5 mm胸主动脉环,垂直放置于基质胶包被的48孔板中,并加入基质胶与RPMI-1640 1:1等量混合后的液体,于37℃恒温培

养箱中孵育30 min;加入0.04 g·L<sup>-1</sup>MPS,0.5 h后加入20 μg·L<sup>-1</sup>VEGF,再0.5 h后给药组分别加入12.5, 25, 50 μg·L<sup>-1</sup>TLSGC,并设置空白组;24 h后开始观察,于大鼠胸主动脉环开始长出微血管时开始拍照,每3 d换液1次;选取第5天的拍照结果,并采用Image-Pro Plus分析。

**2.4 transwell迁移实验** 上室加入用无血清RPMI-1640培养基重悬的HUVEC 180 μL,密度为5×10<sup>4</sup>个,0.04 g·L<sup>-1</sup>MPS和(或)12.5, 25, 50 μg·L<sup>-1</sup>TLSGC;下室加入含20% FBS的RPMI-1640培养基和/或20 μg·L<sup>-1</sup>VEGF,并设置空白组;培养12 h后,润湿的棉签拭去膜上未迁移的细胞;4%多聚甲醛固定20 min,用0.1%结晶紫染色15 min,PBS洗3次;将插槽翻转倒置,正置光学显微镜观察迁移到膜下的细胞,每孔随机选取5~8个视野拍照并计数。

**2.5 transwell侵袭实验** 提前将基质胶于4℃冰箱过夜融化,用RPMI-1640基础培养基1:8稀释基质胶,包被transwell小室底部膜的上室面,40 μL/孔,置于37℃培养箱中60 min使Matrigel聚合成凝胶,备用。Matrigel包被的transwell上室加入无血清RPMI 1640培养基重悬的HUVEC 1×10<sup>4</sup>个,0.04 μg·L<sup>-1</sup>MPS,和(或)12.5, 25, 50 μg·L<sup>-1</sup>TLSGC;下室加入含20% FBS的RPMI-1640培养基和/或20 μg·L<sup>-1</sup>VEGF,并设置空白组;培养24 h后,润湿棉签拭去膜上未侵袭的细胞;4%多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色15 min,PBS洗3次;将插槽翻转倒置,用正置光学显微镜观察侵袭到膜下的细胞,随机选取5~8个视野拍照并计数。

**2.6 管腔形成实验** 提前将基质胶于4℃冰箱过夜融化,用基质胶100 μL/孔包被48孔板,包被好后37℃放置30~60 min使其凝固;含10% FBS的RPMI-1640培养基重悬HUVEC,按6×10<sup>4</sup>个/孔接种至提前用基质胶包被的48孔板,加入0.04 g·L<sup>-1</sup>MPS,0.5 h后加入20 μg·L<sup>-1</sup>VEGF,再0.5 h后给药组分别加入12.5, 25, 50 μg·L<sup>-1</sup>TLSGC,空白组和阴性组加入等体积培养基。置37℃5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育3 h,每孔随机选取5~8个视野拍照并用Image Pro Plus 6.0计算微血管数目、分支长度和面积。

**2.7 细胞上清中NO和ET-1含量检测** HUVEC按15×10<sup>4</sup>个/孔接种至6孔板,培养12 h左右后移去培养液,用基础培养基饥饿12 h后加入0.04 g·L<sup>-1</sup>MPS,0.5 h后加入20 μg·L<sup>-1</sup>VEGF,再0.5 h后给药组分别加入12.5, 25, 50 μg·L<sup>-1</sup>TLSGC,空白组和阴性组加入等体积培养基。37℃5% CO<sub>2</sub>

培养箱中孵育24 h后,收集细胞上清液。按说明书要求采用硝酸还原酶法测定细胞上清中NO含量,干粉法检测细胞上清中ET-1的含量。

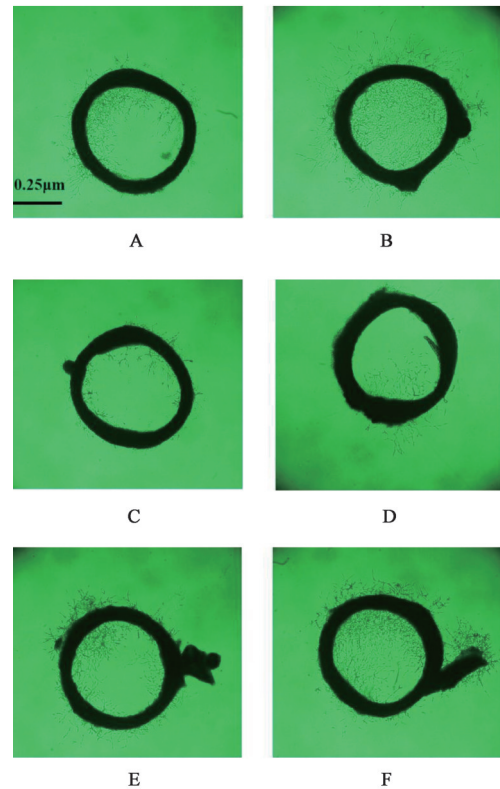
**2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ERK, p-ERK, MEK, p-MEK 蛋白表达** HUVEC 接种于6孔板中,加入 $0.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  MPS, 0.5 h后给药组分别加入 $12.5, 25, 50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TLSGC, 作用24 h后,再加入 $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 VEGF, 正常组均加入等体积培养基, 作用5 min后收集细胞, 用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白。VEGFR2 检测样本制备, HUVEC 接种于6孔板中, 加入 $0.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  MPS, 0.5 h后加入 $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  VEGF, 再0.5 h后给药组分别加入 $12.5, 25, 50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TLSGC, 正常组和对照组加入等体积培养基, 作用24 h后收集细胞, 用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白。Bradford 法进行蛋白定量, 蛋白 $40 \text{ }\mu\text{g}$ 上样, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, PVDF 转膜, 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭1 h, 按抗体说明书稀释一抗(VGFR2, p-ERK, ERK, p-MEK, GAPDH 均为兔来源抗体, p-ERK 1:2 000 稀释, GAPDH 1:1 万稀释, 其余均为1:1 000 稀释; MEK 为鼠来源抗体, 1:1 000 稀释),  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜, 洗膜, 加辣根酶标记的山羊抗兔/小鼠 IgG 二抗(1:5 000 稀释), 室温摇床孵育2 h, 洗膜后加入 ECL 超敏发光液, 凝胶成像仪成像, 运用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析, 以蛋白条带灰度值代表蛋白表达量, 最终以目的蛋白与 GAPDH 比值来评估蛋白表达水平。

**2.9 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间比较采用方差分析,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 MPS 对大鼠胸主动脉环微血管生成能力的影响及 TLSGC 的干预作用** 与空白组比较, VEGF 组

动脉环周围微血管数目、长度及面积明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ); 与模型组比较, 加入 MPS 后, 能显著降低 VEGF 诱导的大鼠主动脉环周围微血管数目、分支长度及面积( $P<0.01$ ), 提示 MPS 可抑制 VEGF 诱导的主动脉环微血管形成能力; 与 MPS 组比较, TLSGC  $12.5, 25, 50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  3 个剂量组能显著升高由 MPS 降低的微血管数目、分支长度和面积( $P<0.01$ ), 且 TLSGC 随给药浓度增大作用越明显。见图 1 和表 1。



A. 空白组; B. VEGF 组; C. MPS 组; D. 通络生骨胶囊  $12.5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组; E. 通络生骨胶囊  $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组; F. 通络生骨胶囊  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组(2~5同)

图 1 TLSGC 对 MPS 抑制的大鼠主动脉环微血管生成能力的影响( $\times 40$ )

Fig. 1 Effect of TLSGC on microangiogenesis of rat aortic rings inhibited by MPS( $\times 40$ )

表 1 TLSGC 对 MPS 抑制的大鼠主动脉环微血管生成能力的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of TLSGC on microangiogenesis of rat aortic rings inhibited by MPS( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	管腔分支点数/个	管腔分支面积( $\times 10^4$ )	管腔分支长度( $\times 10^4$ )
空白		$129.33\pm 1.25$	$8.61\pm 0.28$	$1.43\pm 0.05$
VEGF	20	$171.33\pm 11.79^{2)}$	$9.13\pm 0.08^{1)}$	$1.52\pm 0.01^{1)}$
MPS	$4\times 10^4$	$82.33\pm 1.89^{3)}$	$8.14\pm 0.05^{3)}$	$1.36\pm 0.01^{3)}$
TLSGC	12.5	$130.33\pm 0.94^{4)}$	$8.47\pm 0.24$	$1.41\pm 0.04$
	25	$143.33\pm 0.94^{4)}$	$8.85\pm 0.01^{4)}$	$1.47\pm 0.01^{4)}$
	50	$165.00\pm 1.41^{4)}$	$8.94\pm 0.01^{4)}$	$1.49\pm 0.01^{4)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与 VEGF 组比较<sup>3)</sup> $P<0.01$ ;与 MPS 组比较<sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

**3.2 MPS对HUVEC细胞迁移能力的影响及TLSGC的干预作用** 与空白组比较,EGF组HUVEC迁移的数目显著增多( $P<0.01$ );与VEGF组比较,MPS组HUVEC迁移的数目显著减少( $P<0.01$ ),提示MPS抑制VEGF诱导的HUVEC迁移能力;与MPS组比较,TLSGC 12.5, 25, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组HUVEC迁移的数目均明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),且TLSGC随给药浓度增大作用越明显。见图2,表2。

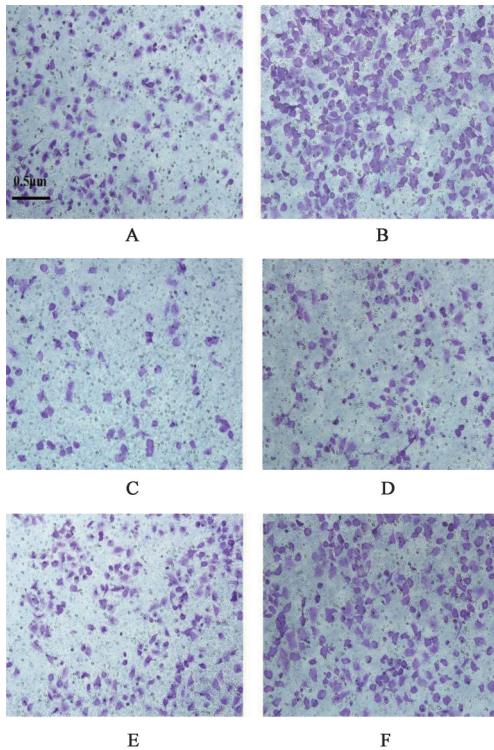


图2 TLSGC对MPS抑制的HUVEC细胞迁移能力的影响(结晶紫,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of TLSGC on MPS-inhibited migration of HUVEC cells (crystal violet,  $\times 200$ )

表2 TLSGC对MPS抑制的HUVEC细胞迁移能力的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of TLSGC on MPS-inhibited migration of HUVEC cells ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	迁移细胞数/个
空白		96.43 $\pm$ 10.54
VEGF	20	267.71 $\pm$ 13.43 <sup>1)</sup>
MPS	$4\times 10^4$	136.71 $\pm$ 11.49 <sup>2)</sup>
TLSGC	12.5	157.43 $\pm$ 13.52 <sup>3)</sup>
	25	164.43 $\pm$ 20.71 <sup>3)</sup>
	50	232.00 $\pm$ 11.38 <sup>4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与VEGF组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与MPS组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表6同)。

**3.3 TLSGC对MPS抑制的HUVEC细胞侵袭能力的影响** 与空白组比较,VEGF组HUVEC侵袭的数目显著增多( $P<0.01$ );与VEGF组比较,MPS组HUVEC侵袭的细胞数目显著减少( $P<0.01$ );与MPS组比较,TLSGC 12.5, 25, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组HUVEC侵袭的数目均显著增加( $P<0.01$ ),且TLSGC随给药浓度增大作用越明显。见图3,表3。

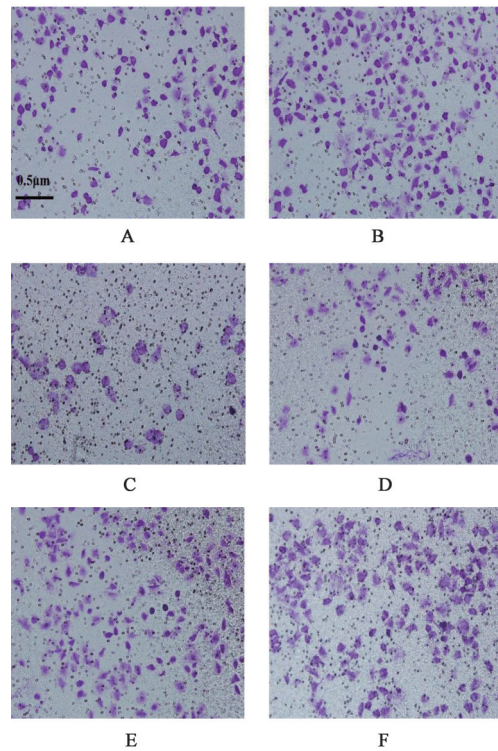


图3 TLSGC对MPS抑制的HUVEC细胞侵袭能力的影响(结晶紫,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of TLSGC on MPS-inhibited invasion ability of HUVEC cells (crystal violet,  $\times 200$ )

表3 TLSGC对MPS抑制的HUVEC细胞侵袭能力的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of TLSGC on MPS-inhibited invasion ability of HUVEC cells ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭细胞数/个
空白		94.20 $\pm$ 10.16
VEGF	20	209.80 $\pm$ 11.29 <sup>1)</sup>
MPS	$4\times 10^4$	79.20 $\pm$ 11.43 <sup>2)</sup>
TLSGC	12.5	112.80 $\pm$ 26.73 <sup>3)</sup>
	25	156.10 $\pm$ 11.43 <sup>3)</sup>
	50	169.10 $\pm$ 12.59 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与VEGF组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与MPS组比较<sup>3)</sup> $P<0.01$ (表5同)。

**3.4 MPS对HUVEC细胞管腔形成能力的影响及TLSGC的干预作用** 与空白组比较,VEGF组

HUVEC管腔分支点数目、面积及分支长度均明显增多( $P<0.05, P<0.01$ );与VEGF组比较,MPS组HUVEC管腔分支点数目、面积及分支长度均明显减少( $P<0.05, P<0.01$ );与MPS组比较,TLSGC

12.5, 25, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组管腔分支点数目、管腔分支长度及管腔分支面积明显增加( $P<0.05, P<0.01$ ),且TLSGC随给药浓度增大作用越明显。见表4,图4。

表4 TLSGC对MPS抑制的HUVEC管腔形成能力的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of TLSGC on MPS-inhibited tube formation of HUVEC cells ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	管腔分支点数	管腔分支面积( $\times 10^4$ )	管腔分支长度( $\times 10^4$ )
空白		101.80 $\pm$ 18.70	3.01 $\pm$ 0.83	0.51 $\pm$ 0.14
VEGF	20	249.20 $\pm$ 36.53 <sup>2)</sup>	12.74 $\pm$ 4.04 <sup>1)</sup>	2.12 $\pm$ 0.67 <sup>1)</sup>
MPS	4 $\times 10^4$	35.60 $\pm$ 27.12 <sup>4)</sup>	0.56 $\pm$ 0.17 <sup>3)</sup>	0.12 $\pm$ 0.08 <sup>3)</sup>
TLSGC	12.5	101.40 $\pm$ 5.54 <sup>5)</sup>	2.23 $\pm$ 0.58	0.37 $\pm$ 0.09
	25	124.60 $\pm$ 25.19 <sup>6)</sup>	2.90 $\pm$ 1.21	0.48 $\pm$ 0.20
	50	179.60 $\pm$ 23.16 <sup>6)</sup>	9.72 $\pm$ 3.71 <sup>5)</sup>	1.62 $\pm$ 0.62 <sup>5)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05, ^2)P<0.01$ ;与VEGF组比较<sup>3)</sup> $P<0.05, ^4)P<0.01$ ;与MPS组比较<sup>5)</sup> $P<0.05, ^6)P<0.01$ 。

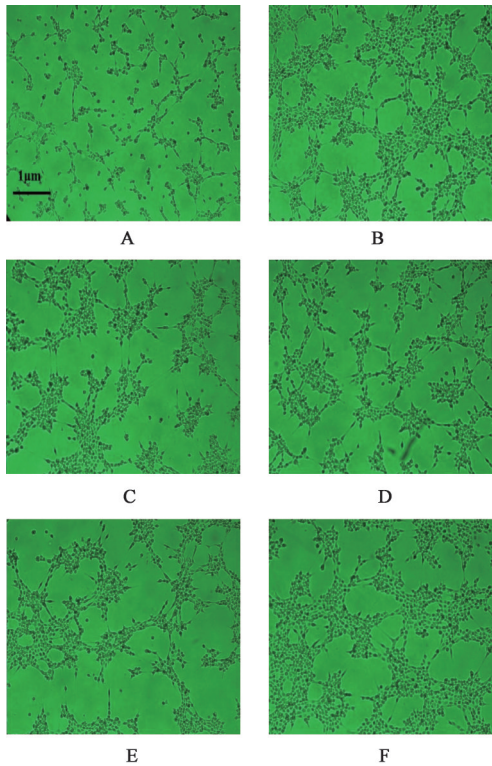


图4 TLSGC对MPS抑制的HUVEC管腔形成能力的影响(正置显微镜,  $\times 100$ )

Fig. 4 Effect of TLSGC on MPS-inhibited tube formation of HUVEC cells (upright metallurgical microscope,  $\times 100$ )

3.5 MPS对HUVEC中NO, ET-1含量的影响及TLSGC的干预作用 与空白组比较, VEGF组HUVEC分泌NO含量显著升高( $P<0.01$ ), ET-1含量显著降低( $P<0.01$ );与VEGF组比较, MPS组HUVEC分泌NO的含量则显著减少( $P<0.01$ ), ET-1含量显著升高( $P<0.01$ );与MPS组比较, TLSGC 12.5, 25, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组HUVEC分泌NO的含量显著

增加( $P<0.01$ ), 而ET-1的含量显著减少( $P<0.01$ ), 且随给药浓度增大作用越明显。见表5。

表5 TLSGC对MPS干预的HUVEC细胞中NO, ET-1含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 5 Effect of TLSGC on NO and ET-1 of MPS-inhibited HUVEC cells ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ET-1/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
空白		1.73 $\pm$ 0.32	87.29 $\pm$ 27.47
VEGF	20	7.07 $\pm$ 0.49 <sup>1)</sup>	13.62 $\pm$ 7.28 <sup>1)</sup>
MPS	4 $\times 10^4$	1.52 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	102.26 $\pm$ 1.33 <sup>2)</sup>
TLSGC	12.5	7.80 $\pm$ 2.26 <sup>3)</sup>	85.46 $\pm$ 18.61
	25	8.26 $\pm$ 0.47 <sup>3)</sup>	63.43 $\pm$ 5.12 <sup>3)</sup>
	50	8.61 $\pm$ 0.66 <sup>3)</sup>	45.31 $\pm$ 2.20 <sup>3)</sup>

3.6 MPS对HUVEC中VEGFR2, p-ERK, ERK, p-MEK, MEK蛋白表达的影响及TLSGC的干预作用 与空白组比较, VEGF组HUVEC中VEGFR2, p-MEK, p-ERK蛋白表达显著升高( $P<0.01$ ), 而加上MPS后这些蛋白则明显降低;与MPS组比较, TLSGC 12.5, 25, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 干预后能显著升高由MPS抑制了的VEGFR2, p-MEK和p-ERK蛋白含量( $P<0.05, P<0.01$ ), 而各组MEK和ERK蛋白含量则差异无统计学意义。见表6和图5。

#### 4 讨论

血管内皮细胞作为血管腔内的一层防护细胞, 是血液和组织之间的关键调控界面, 具有血管生成等生物学功能, 已成为多种血管损伤因素的潜在靶点<sup>[11]</sup>。研究显示, 过量糖皮质激素应用可导致血管内皮细胞损伤, 触发血管内凝血, 这既涉及到股骨

表 6 TLSGC 对 MPS 干预的 HUVEC 中 VEGFR2, p-ERK, ERK, p-MEK, MEK 蛋白含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of TLSGC on decreased VEGFR2, p-ERK, ERK, p-MEK, MEK in MPS-induced of HUVEC ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	VEGFR2/GAPDH	p-MEK/MEK	p-ERK/ERK
空白		0.63±0.01	1.03±0.02	0.71±0.02
VEGF	20	0.76±0.12 <sup>1)</sup>	1.16±0.02 <sup>1)</sup>	1.07±0.01 <sup>1)</sup>
MPS	4×10 <sup>4</sup>	0.64±0.04 <sup>2)</sup>	0.82±0.01 <sup>2)</sup>	0.60±0.01 <sup>2)</sup>
TLSGC	12.5	0.77±0.02 <sup>3)</sup>	0.90±0.08 <sup>4)</sup>	0.89±0.02 <sup>4)</sup>
	25	0.86±0.01 <sup>4)</sup>	0.93±0.01 <sup>4)</sup>	0.95±0.01 <sup>4)</sup>
	50	0.99±0.08 <sup>4)</sup>	1.15±0.02 <sup>4)</sup>	0.97±0.02 <sup>4)</sup>

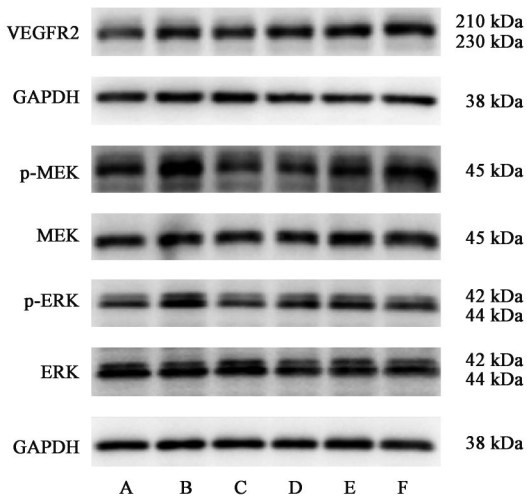


图 5 各组 HUVEC 中 VEGFR2 和 MEK/ERK 信号通路蛋白表达电泳

Fig.5 Electrophoresis of VEGFR2 and MEK/ERK signals of each groups HUVEC

头坏死的发生和发展,也与中医骨痹的血瘀证候科学内涵密切相关,故研究学者们常常通过测定内皮细胞分泌的活性物质或观察行为学来探索骨痹血瘀证发生机制和活血化瘀药的作用<sup>[12]</sup>。已知 TLSGC 具有活血化瘀功效,对激素性股骨头坏死动物股骨头中的血管损伤具有修复作用,但 TLSGC 是否对糖皮质激素所致的血管内皮细胞功能的损伤影响作用,则一直不清楚。考虑到主动脉环实验是研究血管内皮细胞血管生成的一种常用离体组织模型,通过动脉环体外培养可以观察到由内皮细胞“出芽”和“分支”组成的微血管网,并定量计数新生成的微血管结构<sup>[13-14]</sup>,而血管内皮细胞迁移、侵袭和管腔形成实验则能模拟血管生成的动态过程,是研究血管生成应用很广泛的体外模型。因此,本研究拟采用激素诱导所致的主动脉环微血管生成和 HUVEC 迁移、侵袭和管腔形成等损害模型,探索 TLSGC 对糖皮质激素致血管内皮细胞血管生成功能损伤的影响。研究结果显示, MPS 可抑制 VEGF 诱导的大鼠主动脉环微血管生成,抑制 VEGF 诱导

的 HUVEC 的迁移、侵袭和管腔形成能力,提示 MPS 体外可诱导血管内皮细胞血管生成功能的损伤。进一步的研究可知, TLSGC 作用后能剂量依赖地缓解由 MPS 所致的主动脉环微血管生成数量减少以及 HUVEC 迁移、侵袭和管腔形成能力下降,而相同浓度给药对 HUVEC 细胞的生存活性则没有明显影响,提示了 TLSGC 对 HUVEC 迁移、侵袭和管腔形成能力的促进作用是特异有效的,与药物的细胞毒性无关,也说明了在本实验体系下 TLSGC 对 MPS 致血管内皮细胞血管生成功能的损伤具有保护作用。

研究得知,血管内皮细胞除了形成血管的功能外,还具有分泌血管活性物质的作用。ET 是主要源于血管内皮细胞的一种血管收缩活性物质,分 3 种类型,其中以 ET-1 的活性为最强。ET-1 也是所有收缩血管物质中唯一强有力的缩微血管物质,对微循环的调节起着重要作用<sup>[15]</sup>; NO 是由血管内皮细胞分泌的重要血管舒张活性物质,具有抑制平滑肌增生的作用从而避免血管病理重构和管腔狭窄;正常情况下 ET-1/NO 处于一种动态的平衡状态<sup>[16]</sup>。在病理过程中,激素可诱导血浆和血管组织中 ET-1 含量增多, NO 含量减少,血管舒张功能减弱,收缩功能增强,而血管的强烈收缩则导致血液流动受阻,股骨头缺血进而发生骨坏死<sup>[17]</sup>。为了进一步观察 TLSGC 对血管内皮细胞分泌功能的影响,检测了 HUVEC 中 ET-1 和 NO 的含量变化。结果显示, MPS 能显著升高 VEGF 干预下的 HUVEC 中 ET-1 含量的同时降低 NO 的含量,而经不同剂量的 TLSGC 作用后,能剂量依赖地拮抗 MPS 所致的 NO 和 ET-1 含量在 HUVEC 中的异常分泌,提示 TLSGC 可改善 MPS 所致的血管内皮细胞分泌 NO 和 ET-1 功能失调,从而调节异常的血管收缩和舒张功能,促进血管功能修复。

VEGF 是一种强效的促血管生成因子,他与其

特异性的受体结合后具有促进血管内皮细胞迁移、分化和形成管腔以及分泌功能<sup>[18]</sup>。已知VEGF受体有VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3等多种,其中VEGFR2是内皮细胞中VEGF信号通路的主要受体,当VEGF与VEGFR2结合后,通过MEK/ERK通路在VEGF介导有丝分裂信号传导以及血管生成等生物效应中发挥关键作用<sup>[19-20]</sup>。前期实验研究已显示TSLGC能提高激素性股骨头坏死动物股骨头和血管内皮细胞中VEGF的含量<sup>[4,9]</sup>。为了探索TSLGC对激素致血管内皮细胞功能损伤影响的作用是否与调控VEGF的这些重要因子有关,采用了Western blot进行相关检测。结果显示,MPS可抑制VEGF诱导的HUVEC中VEGFR2的蛋白含量,而TSLGC则能剂量依赖地促进VEGFR2在内皮细胞中的生成;此外,MPS能显著降低VEGF诱导的p-MEK和p-ERK在HUVEC中的蛋白含量,而TSLGC作用后则能剂量依赖地调整这个异常情况,但对ERK和MEK无明显影响,提示了TSLGC能够通过激活细胞内MEK和ERK信号分子,从而促进VEGFR2合成,发挥其对MPS致血管内皮细胞功能损伤的保护作用。

综上所述,本研究通过主动脉环和HUVEC体外MPS干预培养模型,证明了TSLGC对MPS所致的血管内皮细胞血管生成和分泌功能损伤的保护作用,且发现其机制可能与活化MEK/ERK信号通路有关。相关研究结果将有助于TSLGC活血化瘀功效的阐明及药效作用机制的深入探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 陈森,彭昊. 成人糖皮质激素性骨坏死的病理机制研究进展[J]. 骨科,2017,8(2):157-160.

[2] 高彦淳,冯勇,张长青. 激素性股骨头坏死发生机制的研究进展[J]. 国际骨科学杂志,2018,39(4):231-234.

[3] 李永吉. 通络生骨胶囊治疗股骨头缺血性坏死(筋脉瘀滞型)的临床观察[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2016.

[4] 樊粤光,赵长青. 生脉成骨胶囊对血管内皮细胞增殖及分泌VEGF功能的影响[J]. 第一军医大学学报,2005,25(10):1228-1231.

[5] 刘少军,邓彦,王海彬. 通络生骨胶囊对骨髓基质干细胞成骨和成脂肪双向分化的影响[J]. 四川中医,2008,26(3):22-24.

[6] 刘和波,魏玲丽,李勃,等. 通络生骨胶囊对兔骨性关

节炎血液生化指标的影响[J]. 甘肃中医,2008,21(6):62-63.

[7] 杨俊兴,方斌,徐传毅,等. 通络生骨胶囊对激素性股骨头坏死大鼠骨钙素、降钙素与骨密度的影响[J]. 广州中医药大学学报,2007,24(1):41-43.

[8] 袁捷,林吉,徐传毅,等. 通络生骨胶囊预防激素性股骨头缺血性坏死的药理学实验[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(3):185-188.

[9] 樊粤光,徐传毅,何伟,等. 生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死血管内皮细胞功能的调节及意义[J]. 中国中医基础医学杂志,2002,8(9):35-37.

[10] 王海彬,王军舰,黄辉,等. 通络生骨胶囊对雌激素受体的激活作用[J]. 四川中医,2006,24(7):23-25.

[11] 李苗,王丽丽,常冰梅. 血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2019,27(8):730-736.

[12] 路玉峰,俞庆声,郭万首,等. 糖皮质激素对人股骨头骨微血管内皮细胞功能的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2015,23(15):1400-1405.

[13] 魏仙,姚于勤,杨金亮. 新生血管生成模型及应用[J]. 生物技术通讯,2015,26(3):421-425.

[14] KIM H K, SONG K S, CHUNG J H, et al. Platelet microparticles induce angiogenesis *in vitro* [J]. Br J Haematol,2015,124(3):376-384.

[15] HOMMA S, KIMURA T, SAKAI S, et al. Calcitonin gene-related peptide protects the myocardium from ischemia induced by endothelin-1: intravital microscopic observation and <sup>31</sup>P-MR spectroscopic studies-ScienceDirect [J]. Life Sci, 2014, 118 (2) : 248-254.

[16] 杜智超,姜睿. 血管外周脂肪组织与血管内皮细胞功能障碍的研究进展[J]. 西南医科大学学报,2018,41(3):284-286.

[17] 赵万军,周辉,潘浩,等. 复方丹参对兔激素性股骨头坏死内皮细胞分泌一氧化氮、内皮素、血管紧张素的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2003,11(3):17-20.

[18] 赵耀东,徐文东. 强骨胶囊联合柳氮磺吡啶治疗类风湿性关节炎并发骨质疏松的临床效果[J]. 世界中医药,2019,14(2):438-441.

[19] FABIO C, MARTINA C, MELANIA P, et al. Formyl peptide receptor 1 modulates endothelial cell functions by NADPH oxidase-dependent VEGFR2 transactivation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018:1-12.

[20] BALLMER-HOFER K. Vascular endothelial growth factor, from basic research to clinical applications [J]. Int J Mol Sci,2018,19(12):3750.

[责任编辑 周冰冰]