

龚姗,李弘,刘叶倩,等. 复方七芎降压片对 TNF- α 诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 733-741.

Gong S, Li H, Liu YQ, et al. Effects of compound Qishao Jiangya tablet on inflammatory factors, AP-1 and MCP-1 in vascular endothelial cells stimulated with TNF- α and co-cultured with smooth muscle cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 733-741.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.001

复方七芎降压片对 TNF- α 诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响

龚姗¹, 李弘¹, 刘叶倩¹, 陈春茗¹, 马丹凤², 刘林¹, 任卫琼^{1*}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南省儿童医院, 长沙 410006)

【摘要】 目的 观察复方七芎降压片对 TNF- α 诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达情况,探讨复方七芎降压片抑制血管重塑的作用机制。**方法** 利用炎症因子 TNF- α 联合血管内皮细胞和血管平滑肌细胞共培养体系构建高血压炎症环境。将共培养好的细胞随机分为 7 组,即正常对照组(A)、模型组(B)、空白血清对照组(C)、MRS2578 组(D)、厄贝沙坦片含药血清组(E)、复方七芎降压片含药血清组(F)、MRS2578 + 复方七芎降压片含药血清组(G)。除正常对照组外,其余各组加入炎症因子 TNF- α ,浓度 10 ng/mL;厄贝沙坦片含药血清组、复方七芎降压片含药血清组和 MRS2578 + 复方七芎降压片含药血清组加入 10% 的含药血清;MRS2578 组与 MRS2578 + 复方七芎降压片含药血清组加入 10 μ m 的 P2Y6 受体阻断剂 MRS2578;造模与给药干预 24 h 后,采用 CCK8 法检测内皮细胞及平滑肌细胞的存活率;采用 ELISA 法检测培养基上清液中炎症因子 IL-8 的水平;采用免疫荧光、Western Blot、实时荧光定量法 (qPCR) 技术检测内皮细胞中 AP-1、MCP-1 的表达。**结果** 与正常对照组比较,模型组和空白血清对照组内皮细胞及平滑肌细胞存活率明显降低 ($P < 0.01$),IL-8 水平明显升高 ($P < 0.01$),内皮细胞中 AP-1、MCP-1 的荧光强度值、灰度值比值、mRNA 水平均明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,复方七芎降压片含药血清组内皮细胞及平滑肌细胞存活率明显升高 ($P < 0.01$),IL-8 水平明显降低 ($P < 0.05$),内皮细胞中 AP-1、MCP-1 荧光强度值、灰度值比值、mRNA 水平均明显降低 ($P < 0.01$)。**结论** 复方七芎降压片能够改善因炎症因子 TNF- α 诱导的内皮细胞及平滑肌细胞的存活率,降低 AP-1 和 MCP-1 的活性,抑制内皮细胞炎症反应,改善内皮损伤,保护平滑肌细胞正常功能。

【关键词】 炎症;AP-1;MCP-1;内皮细胞;平滑肌细胞;复方七芎降压片

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0733-09

Effects of compound Qishao Jiangya tablet on inflammatory factors, AP-1 and MCP-1 in vascular endothelial cells stimulated with TNF- α and co-cultured with smooth muscle cells

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81473616),国家自然科学基金青年基金项目(81804077),湖南省中医药管理局重点项目(201910),湖南省科技厅项目(2018SK51203),中医内科重大疾病防治及转化教育部重点实验室开放基金(ZYNK201703),国家科技部重大专项(2019ZX09301-103),湖南省自然科学基金(青年基金)项目(2019JJ50468)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81473616), National Natural Science Foundation for the Youth(81804077), Hunan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Key Project(201910), Hunan Science and Technology Department Project(2018SK51203), the Open Fund of the Key Laboratory of the Ministry of Education of the People's Republic of China(ZYNK201703), Major Project of the Ministry of Science and Technology(2019ZX09301-103), Hunan Natural Science Foundation for the Youth(2019JJ50468).

【作者简介】 龚姗(1988—),女,药师,硕士研究生,研究方向:心血管疾病的中医药防治。Email:564291733@qq.com

【通信作者】 任卫琼(1975—),女,博士,副主任药师,研究方向:心血管疾病的中医药防治。Email:renweiqiong1@126.com

GONG Shan¹, LI Hong¹, LIU Ye-qian¹, CHEN Chunming¹, MA Danfeng², LIU Lin¹, REN Weiqiong^{1*}

(1. the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China.

2. Hunan Children's Hospital, Changsha 410006)

Corresponding author: REN Weiqiong. E-mail: renweiqiong1@126.com

[Abstract] Objective To observe the expression levels of inflammatory factors, AP-1, and MCP-1 in TNF- α -stimulated vascular endothelial cells and co-cultured with smooth muscle cells following treatment with the compound Qishao Jiangya tablet, and explore the mechanism by which the compound Qishao Jiangya tablet inhibits vascular remodeling. **Methods** A co-culture system was established using vascular endothelial cells and smooth muscle cells. Stimulation with TNF- α was used to mimic the hypertensive inflammatory environment. The cultured cells were randomly divided into seven groups: normal control, model, blank serum control, MRS2578, irbesartan tablet drug-containing serum, compound Qishao Jiangya tablet-containing serum, and MRS2578 + compound Qishao Jiangya tablet-containing serum. Except the normal control group, all groups were stimulated with 10 ng/mL TNF- α ; the irbesartan tablet drug-containing serum, compound Qishao Jiangya tablet-containing serum, and MRS2578 + compound Qishao Jiangya tablet-containing serum were treated with 10% drug-containing serum; the MRS2578 and MRS2578 + compound Qishao Jiangya tablet drug-containing serum groups were treated with 10 μ m P2Y6 receptor blocker MRS2578. After 24 hours of modeling and drug intervention, CCK8 assays were used to detect the survival rates of endothelial cells and smooth muscle cells. ELISA was used to detect the level of IL-8 in the culture supernatant. Immunofluorescence, Western Blot, and quantitative PCR were used to detect endothelial expression levels of AP-1 and MCP-1. **Results** Compared with the normal control group, the survival rates of smooth muscle and endothelial cells decreased significantly in the model and blank serum control groups, while the levels of IL-8 were significantly higher ($P < 0.01$). Compared with the normal control group, AP-1 and MCP-1 in endothelial cells in the model and blank serum control groups were detected by fluorescence intensity value of immunofluorescence, gray value ratio by Western Blot, and mRNA levels by quantitative PCR were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the survival rates of smooth muscle and endothelial cells were significantly increased in the compound Qishao Jiangya tablet-containing serum groups, while the levels of IL-8 were significantly lower ($P < 0.05$). AP-1 and MCP-1 in endothelial cells were detected by fluorescence intensity value of immunofluorescence, gray value ratio by Western blotting, and mRNA levels by quantitative PCR in the compound Qishao Jiangya tablet-containing serum groups were significantly reduced compared with the model group ($P < 0.01$). **Conclusions** Following stimulation with TNF- α , the compound Qishao Jiangya tablet can improve the survival rates of endothelial cells and smooth muscle cells, reduce the levels of AP-1 and MCP-1, prevent endothelial cell inflammation, improve endothelial damage, and protect normal function of smooth muscle cells.

[Keywords] inflammation; AP-1; MCP-1; endothelial cell; smooth muscle cell; compound Qishao Jiangya tablet

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

高血压是心血管疾病的独立危险因素之一,每年全球因高血压死亡人数约有 900 多万^[1],严重危害人类身体健康。血管重塑是许多血管疾病共同的关键病理环节^[2],也是高血压靶器官损害的病理基础和导致其他心血管疾病发生引起死亡的重要原因^[3]。

高血压是一种慢性炎症性疾病,随着病程的发展,血管的切应力增加,更多的炎症因子会损伤内皮细胞,导致血管舒张功能降低,进一步促进血管内皮细胞的炎性损伤,引起平滑肌细胞的增殖、迁移,导致组织纤维化而出现血管结构的改变^[4-5]。激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)是细胞内一类

转录激活因子,能够诱导调控多种炎症因子的释放,加速内皮损伤,促进平滑肌细胞增殖和分泌,参与血管重塑^[6-7]。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)是炎性反应重要的趋化因子,机体发生炎症时,导致血管内皮细胞受损, MCP-1 大量分泌,促进血管内皮修复及血管新生^[8]。因此,以内皮细胞炎症反应为切入点研究高血压病血管重塑的发生机制具有重要意义。针对高血压“虚、瘀、风”的病机,我们采用养阴柔肝、化痰息风立法的复方七芍降压片治疗“肝肾阴虚、阴虚阳亢”型高血压。前期研究发现复方七芍降压片能降低患者血压^[9],有效降低原发性高血压大鼠

(spontaneous hypertension rat, SHR) 肠系膜动脉上血管重塑标志物活性和炎症因子表达, 改善血管重塑^[10-11], 但是否与调控内皮细胞 AP-1、MCP-1 蛋白表达, 影响内皮细胞炎症反应, 调节平滑肌细胞增殖有关, 尚不清楚。因此, 本实验利用炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导内皮细胞与平滑肌细胞共培养体系模拟高血压炎症环境, 观察复方七芎降压片对内皮细胞炎症因子和 AP-1、MCP-1 的影响及其与血管平滑肌细胞损伤相关性, 并在此基础上探讨复方七芎降压片的干预机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

15 只 3 ~ 4 月龄的 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 230 ~ 250 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2016-0002】, 室温 22℃、湿度 50%, 12 h 光照/黑暗循环。实验动物伦理审批号(ZYFY2018112503), 由湖南省科技厅实验动物管理办公室审批实验动物环境设施合格证号【SYXK(湘)2015-0003】。

1.1.2 细胞

原代大鼠血管平滑肌细胞株和内皮细胞株均购于 Procell 公司。

1.2.3 主要试剂与仪器

复方七芎降压片(批号: 20181026, 规格: 每片 0.46 g), 人临床日用量为 12 片, 相当于生药量 97 g, 购自湖南中医药大学第一附属医院制剂室。厄贝沙坦片(批号: 17122111, 规格: 每片 75 mg), 人临床日用量为 300 mg, 购自扬子江药业集团北京海燕药业有限公司。

TNF- α 购自美国 eprotech 公司, 批号: 101373A2918, P2Y6 受体阻断剂 MRS2578 购自美国 selleck 公司, 批号: S285501, IL-8 ELISA 检测试剂盒购自上海晶天生物科技有限公司, 批号: 20190305, AP-1 一抗、MCP-1 一抗、 β -actin 内参抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司, 批号分别为: AI03113818、AB05105689、AH11286487。

MK3 型酶标仪(雷勃, 芬兰), 电泳仪(BIO-RAD, mini protean 3 cell, 美国), 离心机(Eppendorf, Centrifuge 5424 R 型, 德国), 冰箱(Haier, BCD-196TMZL 型, 中国), 全自动化学发光分析(上海天

能科技有限公司, Tanon-5200 型), 实验室超纯水(MilliPORE, ULUPURE 型, 法国)。

1.2 方法

1.2.1 含药血清及对照血清的制备

SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只, 根据体重随机分为 3 组, 即空白对照组(5 只)、厄贝沙坦片组(5 只)、复方七芎降压片组(5 只)。分别按临床等效剂量临床成人常用剂量 3 倍给予等体积蒸馏水、厄贝沙坦片(0.081 g/kg)和复方七芎降压片(1.50 g/kg), 灌胃。每天 2 次, 连续给药 7 次。末次给药后 2 h, 腹主动脉取血于血清管中, 离心 10 min(4500 r/min), 取上清液, 水浴灭活(56℃, 30 min), 置于-80℃冰箱保存备用。

1.2.2 细胞培养

将原代内皮细胞和平滑肌细胞分别于专用培养液(条件: 5% CO₂, 37℃)中传代培养, 取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2.3 共培养体系的建立

按细胞常规方法培养, 将内皮细胞消化后接种至康宁 24 孔细胞培养板中, 处于对数生长期的平滑肌细胞消化后接种至康宁 Transwell 小室内侧, 置于细胞培养箱内(条件: 5% CO₂, 37℃), 培养 1~2 d 后, 即可成功构建内皮细胞和平滑肌细胞共培养体系^[12]。

1.2.4 分组及给药

将共培养好的细胞随机分为 7 组, 即正常对照组(A): 内皮细胞 + 平滑肌细胞; 模型组(B): 炎症因子 + 内皮细胞 + 平滑肌细胞; 空白血清对照组(C): 炎症因子 + 内皮细胞 + 平滑肌细胞 + 空白血清; MRS2578 组(D): 炎症因子 + 沉默内皮细胞 + 平滑肌细胞; 厄贝沙坦片含药血清组(E): 炎症因子 + 内皮细胞 + 平滑肌细胞 + 厄贝沙坦片血清; 复方七芎降压片含药血清组(F): 炎症因子 + 内皮细胞 + 平滑肌细胞 + 复方七芎降压片血清; MRS2578 + 复方七芎降压片含药血清组(G): 炎症因子 + 沉默内皮细胞 + 平滑肌细胞 + 复方七芎降压片血清。除 A 组外的共培养体系中加入 10 ng/mL 的 TNF- α , 构建模拟高血压炎症微环境, 给药组加入 10% 的含药血清, 其余各组加入等量空白血清, 沉默内皮细胞为加入 10 μ m 的 MRS2578 的内皮细胞, 造模及给药干预 24 h 后进行相关指标检测。

1.2.5 细胞活力检测

采用 CCK-8 法检测各组平滑肌细胞及内皮细

胞活性。弃孔内液体, 然后加入完全培养基 200 μ L, 同时每孔加入 10 μ L CCK8 溶液, 于细胞培养箱中继续培养 3 h, 最后用酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔 OD 值, 扣除板底值, 并计算各组细胞的相对存活率。其中细胞存活率率= 给药组细胞存活率/正常组细胞存活率。

1.2.6 酶联免疫吸附剂测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测平滑肌细胞与内皮细胞共培养液中炎症因子 IL-8 的水平

收集平滑肌细胞与内皮细胞共培养上清液, 离心 15 min (3000 r/min), 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书, 检测共培养体系中培养液中 IL-8 水平。

1.2.7 免疫荧光法检测内皮细胞中 MCP-1、AP-1 的蛋白表达

将共培养后的各组细胞, 移去 Transwell 小室及孔内液体, 冷 PBS 润洗, 多聚甲醛固定 30 min。用 0.25% Triton-100 通透 15 min, 滴加 5% BSA 封闭 10 min, 根据 1:100 的体积比分别加入 AP-1、MCP-1 一抗稀释液, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育, PBS 润洗。根据 1:400 的体积比加入二抗稀释液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 冷 PBS 润洗 4 次。滴加 DAPI 避光孵育 15 min, PBS 润洗 4 次。荧光检测并采集图像, 并记录细胞平均荧光强度值。

1.2.8 蛋白免疫印迹法 (Western Blot) 检测内皮细胞中 MCP-1、AP-1 的蛋白表达

严格按照 BCA 蛋白检测试剂盒说明书操作, 根据标准曲线求出每个样本的蛋白浓度。提取各组细胞蛋白, 100 $^{\circ}$ C 变性后, SDS-PAGE 电泳后采用湿转转膜, 用含 5% 脱脂奶粉在室温封闭 2 h。一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBST 洗涤 5 min, 3 次。二抗孵育, PBST 洗涤 5 min, 3 次。取 ECL 发光液与膜的正面充分接触进行化学发光, 置于全自动化学发光分析仪中曝光, 通过 TANON GIS 软件读取相关蛋白的条带灰度值。

1.2.9 实时荧光定量法 (qPCR) 检测内皮细胞中 AP-1、MCP-1 mRNA 的表达

加入适量 TRIzol 试剂, 离心 12 000 rpm, 5 min, 取上清液加入 200 μ L 氯仿溶液, 剧烈振荡 15 s 后离心, 取上清液, 加入等体积的异丙醇溶液以沉淀其中的 RNA, 待 RNA 沉淀干燥后加入 RNase-free 溶液反复吹打使其完全溶解。按试剂盒说明书操作, 逆转录合成 cDNA, 进行 PCR 反应。通过 Primer 5.0

软件设计引物, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 各基因引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR genes	
基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
AP-1	Forward: CAGCCGCCGACCACTTG
	Reverse: TCCGCTCTGAGACTCCATGTC
MCP-1	Forward: GCAGGTCTCTGTACGCTTCTG
	Reverse: GTTCTCCAGCCGACTCATTGGG
β -actin	Forward: CCCAGGCATTGCTGACAGGATG
	Reverse: TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

1.3 统计学分析

运用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。各组实验数据均用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两组间比较用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异具显著性。

2 结果

2.1 对内皮细胞及平滑肌细胞活力的影响

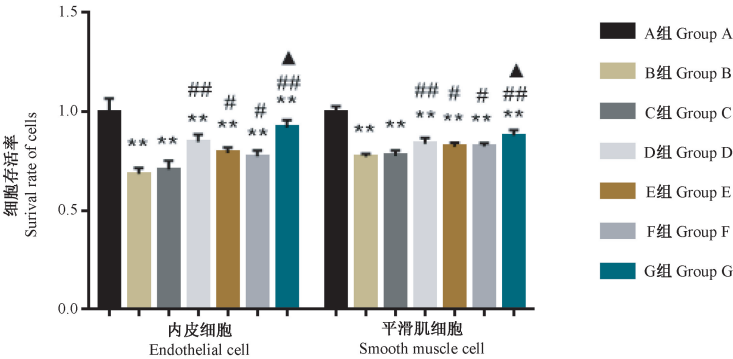
与 A 比, B 组和 C 组内皮细胞及平滑肌细胞存活率明显降低 ($P < 0.01$), 表明 TNF- α 介导的炎症微环境对细胞具有一定的损伤作用; 与 B 组比, D 组、E 组、F 组以及 G 组中的内皮细胞及平滑肌细胞存活率不同程度增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与 D 组比, G 组内皮细胞及平滑肌细胞存活率增加 ($P < 0.05$)。MRS2578 和复方七芎降压片含药血清均能明显恢复炎症微环境损伤后的内皮细胞及平滑肌细胞活性 (见图 1)。

2.2 对平滑肌细胞与内皮细胞共培养液中炎症因子 IL-8 水平的影响

与 A 组比, B 组和 C 组平滑肌细胞与内皮细胞共培养液中 IL-8 水平明显升高 ($P < 0.01$), 表明 TNF- α 干预构建炎症微环境后会造成炎症因子 IL-8 分泌增加; 与 B 组比, D、E、F、G 组平滑肌细胞与内皮细胞共培养液中 IL-8 水平不同程度降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 D 组比, G 组 IL-8 水平降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。MRS2578 和复方七芎降压片含药血清均能抑制炎症微环境损伤后炎症因子 IL-8 分泌增加 (见图 2)。

2.3 对内皮细胞中 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响

免疫荧光结果显示: 与 A 组比, B、C 组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 荧光强度值明显升高 ($P < 0.01$); 与 B 组比, D、E、F、G 组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 荧光强度值明显降低 ($P < 0.01$)。与 D 组比, G 组 AP-1、MCP-1 蛋白荧光强度值降低, 但



注:A组:正常对照组;B组:模型组;C组:空白血清对照组;D组:MRS2578组;E组:厄贝沙坦含药血清组;F组:复方七苧降压片含药血清组;G组:MRS2578+复方七苧降压片含药血清组。与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与MRS2578组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。(下同)

图 1 各组内皮细胞及平滑肌细胞活力比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note. Group A. Normal control group. Group B. Model group. Group C. Blank serum control group. Group D. MRS2578 group. Group E. Irbesartan tablet drug-containing serum group. Group F. Compound Qishao Jiangya tablet containing serum group. Group G. MRS2578 + compound Qishao Jiangya tablet containing serum group. Compared with the normal control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with MRS2578 group, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Comparison of the viability of endothelial cells and smooth muscle cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

差异无统计学意义($P>0.05$)。复方七苧降压片能够抑制炎症因子诱导的内皮细胞中AP-1、MCP-1蛋白的表达水平,且与MRS2578合用时,这种抑制程度更加明显(见图3、4)。

Western Blot结果显示:与A组相比,B、C组内皮细胞中AP-1、MCP-1光密度比值明显升高($P<0.01$)。与B组比较,D、E、F、G组内皮细胞中AP-1、MCP-1光密度比值均明显降低($P<0.01$)。与D组比较,G组AP-1、MCP-1光密度比值明显降低($P<0.01$)。复方七苧降压片能够抑制炎症因子诱导的内皮细胞中AP-1、MCP-1蛋白的高表达,且与MRS2578合用时,作用更加明显(见图5、6)。

2.4 对内皮细胞中AP-1、MCP-1mRNA的影响

qPCR结果显示:与A组比,B、C组内皮细胞中AP-1、MCP-1 mRNA表达水平均明显升高($P<0.01$)。与B组比较,D、E、F、G组内皮细胞中

AP-1、MCP-1mRNA表达水平均明显降低($P<0.01$)。与D组比较,G组AP-1、MCP-1 mRNA表达水平降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。复方七苧降压片能够抑制炎症因子诱导的内皮细胞中AP-1、MCP-1mRNA的表达水平(见图7)。

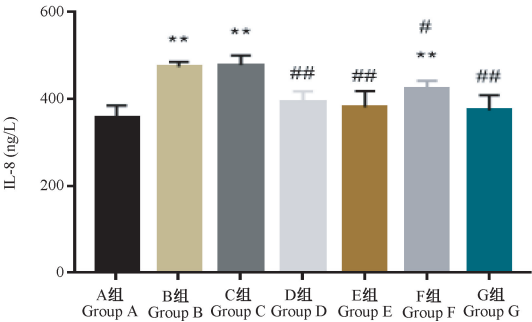


图 2 各组平滑肌细胞与内皮细胞共培养液中IL-8水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 2 Comparison of IL-8 levels in co-culture medium of smooth muscle cells and endothelial cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

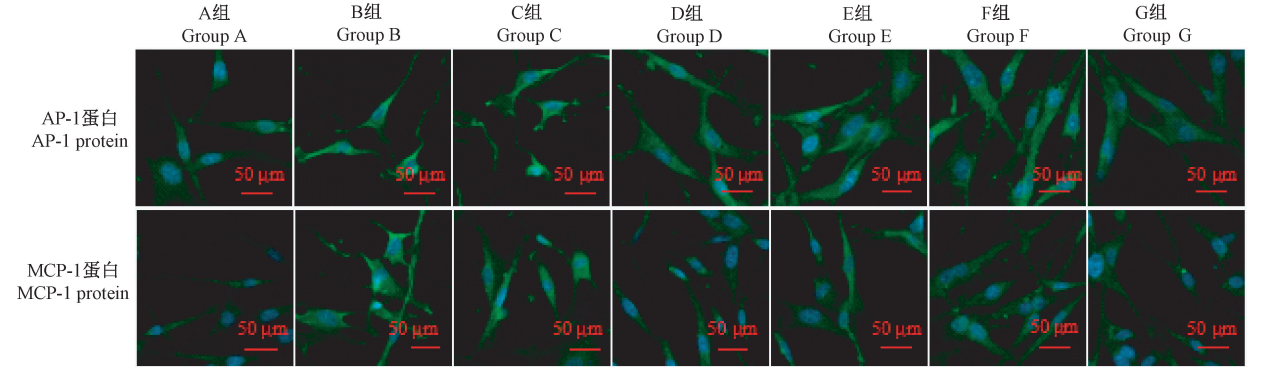


图 3 各组内皮细胞中AP-1、MCP-1蛋白表达比较

Figure 3 Comparison of AP-1、MCP-1 protein expression in each group of endothelial cells

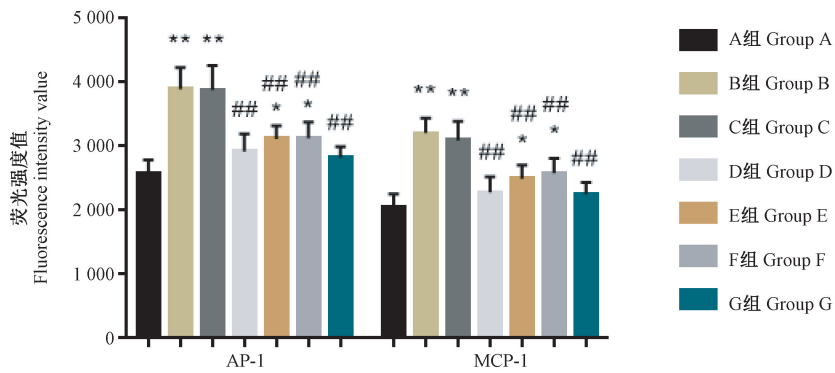


图 4 各组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 荧光强度值比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 4 Comparison of the fluorescence intensity value of AP-1 and MCP-1 in each group of endothelial cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

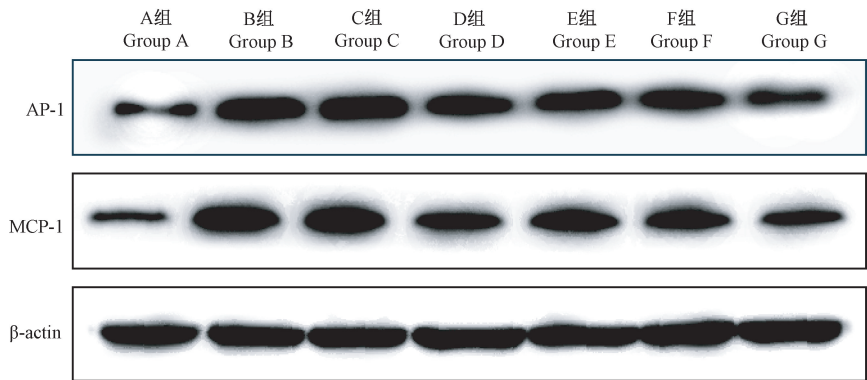


图 5 各组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 蛋白表达比较

Figure 5 Comparison of AP-1、MCP-1 protein expression in each group of endothelial cells

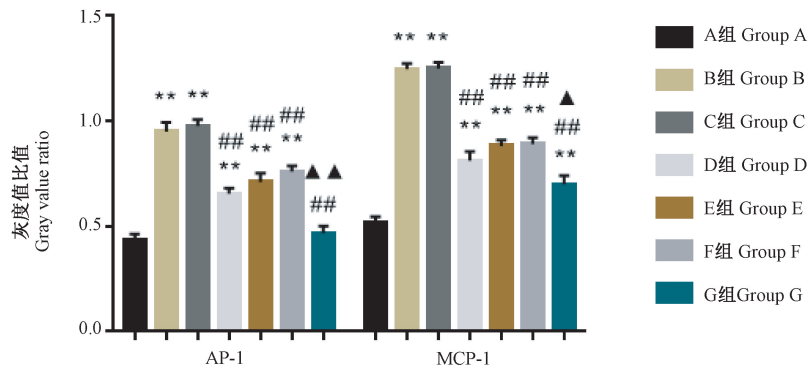


图 6 各组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 灰度值比值比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 6 Comparison of the gray value ratio of AP-1 and MCP-1 in each group of endothelial cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

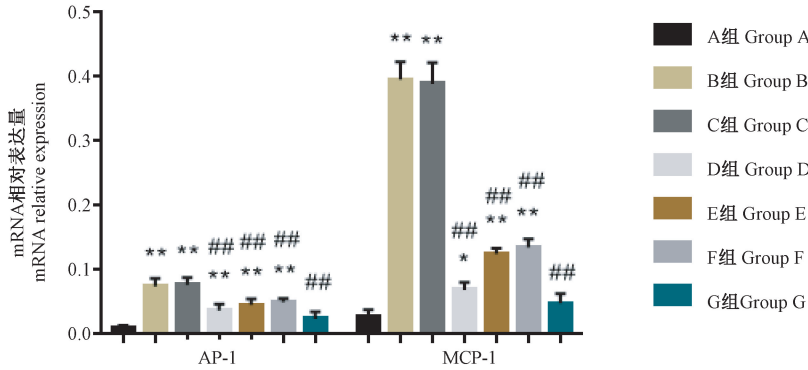


图 7 各组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 mRNA 水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 7 Comparison of the mRNA levels of AP-1 and MCP-1 in each group of endothelial cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

复方七芍降压片是根据高血压病“肝肾阴虚、瘀血阻络”的发病特点,采用“养阴柔肝、化瘀息风”的立法组方而成。该方由三七、白芍、天麻、杜仲、丹参等 11 味中药组成。方中三七活血化瘀通络、白芍养阴柔肝息风,共为君药;天麻平肝息风、桑寄生、杜仲补益肝肾、丹参活血祛瘀,共为臣药;芫花木平肝清热、葛根生津活血、地龙息风通络、炒香附理气疏肝,共为佐药;甘草为使,调和诸药;以上诸药合用使阴虚得补,阳亢得平,脉络得畅,髓海得濡、清窍得养、眩晕自止。现代药理研究发现:三七、天麻、丹参都具有扩张血管、减少外周血管阻力、增加血流量起到降低血压的作用^[13-15],白芍、杜仲能降低内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 和增加一氧化氮 (nitric oxide, NO) 浓度,改善内皮功能,调节血管重构,降低血压^[16-17]。

血管平滑肌细胞和内皮细胞是血管中的两个重要组成成分,两种细胞之间存在肌内皮缝隙连接,允许电和小分子物质传递,在调节血管收缩和舒张功能中起重要作用^[18]。内皮功能的损伤是发生血管重塑的始动环节^[19],在炎症因子 TNF- α 诱导的血管内皮细胞中,细胞存活率降低,凋亡细胞增多,内皮细胞大量分泌白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白介素 8 (interleukin-8, IL-8)、TNF- α 、MCP-1 等前炎性因子,导致血管内皮细胞损伤,平滑肌细胞的增殖、迁移,组织纤维化而出现血管结构的改变^[20-21]。刘雅蓉等^[12]发现丹皮酚能减少血管内皮细胞炎性分泌的作用,影响血管平滑肌细胞中 p38MAPK 信号通路,最终抑制其凋亡。黄荷等^[22]在内皮细胞-平滑肌细胞共培养体系中发现,内皮细胞的损伤可引起 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 炎症蛋白的表达增加,导致内皮细胞炎症反应加剧,平滑肌细胞增殖、迁移,进而诱发血管重塑。以上说明内皮细胞的损伤,可以导致其分泌炎症因子增加,作用于平滑肌细胞,影响血管舒张功能以及促进血管重塑。因此,研究内皮细胞对平滑肌细胞的影响,对保护血管正常功能和改善血管重塑有重要意义。建立内皮细胞-平滑肌细胞共培养体系,模拟体内细胞微环境,是目前研究内皮细胞和平滑肌细胞相互作用的理想模型^[23]。本实验以 TNF- α 联合血管内皮细胞和血管平滑肌细胞共培养体系构建高血压炎症环境,观察内皮细胞炎症对平

滑肌细胞增殖、迁移的影响。

AP-1 是机体内一类重要的核转录因子,由 c-Jun 和 c-Fos 两个亚单位组成的 AP-1 异源二聚体最为典型。MCP-1 属于趋化类细胞因子,是重要的促炎细胞因子,在单核细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等不同细胞中均有表达。内皮细胞中 AP-1 的两个亚单位 c-Jun 和 c-Fos 的激活可上调 MCP-1 的表达,促进多种炎症因子的分泌,引起血管平滑肌增殖、迁移,引发病理性血管重塑^[24-27]。任卫琼等^[28]通过抑制 SHR 大鼠肠系膜动脉中 AP-1 的活化,抑制 MCP-1 蛋白表达,能够降低炎症因子水平,抑制炎症反应,保护血管,改善血管重构。氧化低密度脂蛋白的内皮受体-1 (lectin-like ox-LDL receptor 1, LOX-1) 通过 KLF2/AP-1 途径介导内皮功能障碍和损伤,内皮功能的损伤进一步加剧内皮炎症反应,导致平滑肌细胞增殖、迁移,引发血管重塑^[29-30]。李恒华等^[31]发现葛根素联合丹参酮 II A 通过有效抑制糖尿病大鼠主动脉中 MCP-1、TNF- α 的表达,减轻血管内皮炎症反应,增强对血管内皮的保护作用,促使平滑肌细胞功能修复,改善血管重塑。TNF- α 通过诱导内皮细胞中 AP-1 蛋白的活化,可调控多种炎症因子的释放,导致内皮功能紊乱,加剧炎症因子的表达,促使血管平滑肌细胞异常增殖^[32-33];P2Y6 受体阻断剂 MRS2578 是炎性蛋白的抑制剂,能够阻断 TNF- α 的炎性信号传递,抑制平滑肌细胞增殖,改善血管重构^[34]。本实验研究结果显示,TNF- α 诱导的血管内皮细胞和平滑肌细胞存活率明显降低,血管平滑肌细胞与内皮细胞共培养产生的炎症因子 IL-8 的含量增加,内皮细胞中 AP-1、MCP-1 蛋白表达和 mRNA 表达升高。给予药物干预后,复方七芍降压片含药血清组、厄贝沙坦含药血清组、MRS2578 组、MRS2578+复方七芍降压片含药血清组内皮细胞及平滑肌细胞存活率增加,IL-8 水平降低,内皮细胞中 AP-1、MCP-1 蛋白及其 mRNA 的表达水平降低。提示,复方七芍降压片能恢复内皮细胞和平滑肌细胞活性,抑制炎症微环境损伤后细胞炎症因子分泌,降低内皮细胞中 AP-1、MCP-1 的活性,改善内皮损伤,保护平滑肌细胞正常功能,抑制血管重塑。

本实验研究发现,复方七芍降压片能够改善因炎症因子 TNF- α 诱导的内皮细胞及平滑肌细胞的存活率,抑制血管重塑,其机制可能与抑制 IL-8 的分泌,降低 AP-1 和 MCP-1 的活性,抑制内皮细胞炎

症反应,改善内皮损伤,保护平滑肌细胞正常功能有关。

参 考 文 献(References)

- [1] Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: A systematic analysis for the global burden of disease study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2224–2260.
- [2] Zhang J, Sun J, Chang Z, et al. Characterization of hand, foot, and mouth disease in China between 2008 and 2009 [J]. *Biomed Environ Sci*, 2011, 24(3): 214–221.
- [3] Zhou Q, Gensch C, Liao JK. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32(3): 167–173.
- [4] 卿颖平, 陈贞艳. 原发性高血压患者相关炎症因子表达的检测及临床分析 [J]. *医药论坛杂志*, 2019, 40(12): 69–72.
Qing YP, Chen ZY. Clinical value of serum cytokines detection in patients with primary hypertension [J]. *J Med Forum*, 2019, 40(12): 69–72.
- [5] 冯伟伟, 韩伟, 唐华平. 血管内皮细胞对平滑肌细胞增殖和分泌的影响 [J]. *当代医学*, 2012, 18(11): 1–3.
Feng WW, Han W, Tang HP. Effects of vascular endothelial cells on the proliferation and secretion of smooth muscle cells [J]. *Contemp Med*, 2012, 18(11): 1–3.
- [6] 姚华丽, 戴秋艳. 转录因子激活蛋白-1 在血管重构发生中的作用 [J]. *国际心血管病杂志*, 2010, 37(4): 203–206.
Yao HL, Dai QY. The effect of transcription factor activating protein-1 in the occurrence of vascular remodeling [J]. *Int J Cardiovasc Dis*, 2010, 37(4): 203–206.
- [7] Shaulian E. AP-1 – The Jun proteins: oncogenes or tumor suppressors in disguise? [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(6): 894–899.
- [8] 毛志敏, 周如丹, 赵学凌, 等. MCP-1 在炎症反应中的研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(6): 10–12.
Mao ZM, Zhou RD, Zhao XL, et al. Research developments of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory reaction [J]. *Med Recapitulate*, 2013, 19(6): 10–12.
- [9] 谭元生, 谭胜真, 宋雪云, 等. 复方七芎降压片对自发性高血压大鼠血压及左室肥厚的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2005, 3(3): 232–234.
Tan YS, Tan SZ, Song XY, et al. The influence of compound qishao jiangya tablet on blood pressure and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats [J]. *Chin J Integr Med Cardio –/Cerebrovascular Dis*, 2005, 3(3): 232–234.
- [10] 雍苏南, 王顺民, 张稳. 养阴柔肝、化痰息风法对自发性高血压大鼠血管重塑的影响 [J]. *中国中医急症*, 2015, 24(10): 1696–1572.
Yong SN, Wang SM, Zhang W. Effects of the treatment of enriching yin to emolliate liver and resolving stasis to extinguish wind on vascular remodeling in rats with spontaneously hypertension [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2015, 24(10): 1696–1572.
- [11] 李弘, 刘叶倩, 龚姍, 等. 复方七芎降压片对自发性高血压大鼠肠系膜动脉中 I、Ⅲ型胶原蛋白表达及血压的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24(12): 1364–1370.
Li H, Liu YQ, Gong S, et al. Compound Qishao Jiangya tablet reduces blood pressure in mesenteric artery of SHR rats by decreasing the deposition of type I and type III collagen [J]. *Chin J Clin Pharmacol Therapeut*, 2019, 24(12): 1364–1370.
- [12] 刘雅蓉, 吴鸿飞, 戴敏. 丹皮酚抑制脂多糖诱导的血管内皮细胞 TNF- α 释放对共培养体系中血管平滑肌细胞凋亡及 p38MAPK 信号通路的影响 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2018, 37(4): 65–71.
Liu YR, Wu HF, Dai M. Effects of paeonol on the release of tumor necrosis factor- α from vascular endothelial cells with lipopolysaccharide-induced injury and the apoptosis of vascular smooth muscle cells in a Co-culture system and its influence on the p38MAPK signaling pathway [J]. *J Anhui Univ Chin Med*, 2018, 37(4): 65–71.
- [13] 张继, 赵朝伟, 赵睿. 三七的药理作用研究进展 [J]. *中国药业*, 2003, 12(11): 76–77.
Zhang J, Zhao CW, Zhao R. Advances in research on pharmacological effects of Panax notoginseng [J]. *Chin Pharm*, 2003, 12(11): 76–77.
- [14] 韩大荣. 天麻研究新进展 [J]. *中国处方药*, 2018, 16(4): 19–21.
Han DR. New progress of Gastrodia research [J]. *J Chin Prescription Drug*, 2018, 16(4): 19–21.
- [15] 王涵, 杨娜, 谭静, 等. 丹参化学成分、药理作用及临床应用的研究进展 [J]. *特产研究*, 2018, 40(1): 48–53.
Wang H, Yang N, Tan J, et al. Research progress on salvia miltiorrhiza bge of the chemical constituents and their pharmacological effects [J]. *Spec Wild Econ Anim Plant Res*, 2018, 40(1): 48–53.
- [16] Su HC, Qi C, Bo L, et al. Antihypertensive effect of radix paeoniae alba in spontaneously hypertensive rats and excessive alcohol intake and high fat diet induced hypertensive rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 731237.
- [17] 潘龙, 支娟娟, 许春国, 等. 杜仲糖苷对肾性高血压大鼠血压及血浆 ET、NO 的影响 [J]. *现代中医药*, 2010, 30(2): 54–56.
Pan L, Zhi JJ, Xu CG, et al. Effects of eucommia glucoside on blood pressure, plasma ET and NO in renal hypertensive rats [J]. *Modern Tradit Chin Med*, 2010, 30(2): 54–56.
- [18] Doran AC, Meller N, McNamara CA. The role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(5): 812–819.
- [19] 谭元生, 田梦影. 血管平滑肌增殖在血管重塑过程中的作用 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 11(11): 1233–1235.
Tan YS, Tian MY. The role of vascular smooth muscle proliferation in the process of vascular remodeling [J]. *Chin J*

- Integr Med Cardio -/Cerebrovascular Dis, 2016, 11(11): 1233-1235.
- [20] Chen Q, Jin M, Yang F, et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 928315.
- [21] 吴亚军, 苏洁, 黄浦俊, 等. 蒙花苷对 TNF- α 诱导的血管内皮细胞炎症损伤及 TLR4/I κ B α /NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 637-642.
- Wu YJ, Su J, Huang PJ, et al. Buddleoside prevents TNF- α induced human aortic endothelial cells inflammatory injury through inhibiting TLR4/I κ B α /NF- κ B signaling pathway [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2017, 34(5): 637-642.
- [22] 黄荷, 张勇, 杨舒婷, 等. DFMG 调节 TLR-4 抑制损伤内皮细胞对平滑肌细胞增殖和迁移促进作用[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2016, 13(1): 1-5.
- Huang H, Zhang Y, Yang ST, et al. DFMG inhibited proliferation and migration of smooth muscle cells stimulated by lpc-induced injured endothelial cells through depressing TLR4 [J]. J Hunan Normal Univ (Med Sci), 2016, 13(1): 1-5.
- [23] 李玉洁, 杨庆, 翁小刚, 等. 血管内皮细胞-平滑肌细胞共培养体系研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 265-268.
- Li YJ, Yang Q, Weng XG, et al. Advance in study of vascular endothelial cell and smoothmuscle cell co-culture system [J]. Chin J Chin Mat Med, 2012, 37(3): 265-268.
- [24] Jung MK, Ha S, Son JA, et al. Polyphenon-60 displays a therapeutic effect on acne by suppression of TLR2 and IL-8 expression via down-regulating the ERK1/2 pathway [J]. Arch Dermatol Res, 2012, 304(8): 655-663.
- [25] 韩畅畅, 万福生. AP-1 的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(10): 1357-1362.
- Han CC, Wan FS. Research progress on AP-1 [J]. Chin J Cell Biol, 2017, 39(10): 1357-1362.
- [26] 沈洵, 陈北冬, 关丹丹. 硫氧还蛋白 1 通过抑制核转录因子 AP-1 和氧化还原因子 Ref-1 的核转位下调血管内皮细胞对单核细胞趋化蛋白 MCP-1 的分泌和表达 [J]. 生物物理学报, 2009, 25(S1): 105.
- Shen X, Chen BD, Guan DD. Thioredoxin 1 down-regulates the secretion and expression of monocyte chemotactic protein MCP-1 by vascular endothelial cells by inhibiting nuclear translocation of nuclear transcription factor AP-1 and redox factor Ref-1 [J]. Acta Biophys Sin, 2009, 25(S1): 105.
- [27] 李志, 张梦莹, 徐亮, 等. 糖皮质激素联合环磷酰胺对人脐静脉内皮细胞增殖及其细胞间黏附分子-1 和单核细胞趋化因子-1 表达水平的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(4): 366-370.
- Li Z, Zhang MY, Xu L, et al. Effects of glucocorticoid and cyclophosphamide on the human umbilical vein endothelial cell proliferation and ICAM-I and MCP-1 expression level [J]. Chin J Clin Pharmacol Therapeut, 2014, 19(4): 366-370.
- [28] 任卫琼, 李弘, 刘叶倩, 等. 复方七芍降压片对 SHR 大鼠 IL-8、IL-10 水平及 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(4): 1031-1034.
- Ren WQ, Li H, Liu YQ, et al. Effects of compound qishao jiangya tablet on IL-8 and IL-10 levels and AP-1 and MCP-1 protein expressions in SHR rats [J]. Chin Tradit Patent Med, 2020, 42(4): 1031-1034.
- [29] Lee JY, Chung J, Kim KH, et al. Fluid shear stress regulates the expression of Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor - 1 via KLF2-AP-1 pathway depending on its intensity and pattern in endothelial cells [J]. Atherosclerosis, 2018, 270: 76-88.
- [30] Cook JP. The endothelium: a new target for therapy [J]. Vasc Med, 2000, 5(1): 49-53.
- [31] 李恒华, 周飞, 杨炆, 等. 葛根素联合丹参酮 II A 对糖尿病血管病变大鼠炎症相关因子的影响 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(5): 77-83.
- Li HH, Zhou F, Yang Y, et al. Effect of puerarin combined with tanshinoneIIA on inflammatory factors in DM rats with vascular lesions [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2019, 35(5): 77-83.
- [32] 陈铁龙, 祝光礼, 张旭栋, 等. TNF- α 诱导人脐静脉血管内皮细胞凋亡和炎症机制研究 [J]. 中华全科医学, 2018, 16(2): 184-187.
- Chen TL, Zhu GL, Zhang XD, et al. The effect of TNF- α on apoptosis and inflammation of human umbilical vein endothelial cells [J]. Chin J Gen Pract, 2018, 16(2): 184-187.
- [33] 郭庶, 谭海萍, 张宗尧, 等. 血管内皮细胞对血管平滑肌细胞影响的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(24): 4801-4806.
- Guo S, Tan HP, Zhang ZY, et al. Research progress in the effect of vascular endothelial cells on vascular smooth muscle cells [J]. Med Recapitulate, 2017, 23(24): 4801-4806.
- [34] 王顺民, 陆朵梅, 黄露, 等. 复方七芍降压片含药血清对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. 中医药导报, 2020, 26(1): 34-38.
- Wang SM, Lu DM, Huang L, et al. Effect of serum with fufang qishao jiangya tablet on proliferation of vascular smooth muscle cells in rat [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 26(1): 34-38.

[收稿日期] 2020-06-01