

[文章编号] 1007 3949(2011) 19 10 0813 06

· 实验研究 ·

## 麝香保心丸对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞 凋亡及炎症因子表达的影响

许昌声, 宁若冰, 柴大军, 林金秀

(福建医科大学附属第一医院心血管内科 福建省高血压研究所, 福建省福州市 350005)

[关键词] 麝香保心丸; 内皮细胞; 炎症因子

[摘要] 目的 探讨麝香保心丸对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞增殖凋亡及炎症因子表达的影响。方法 体外胶原酶消化法培养人脐静脉内皮细胞, 5-溴脱氧尿嘧啶核苷渗入法测定细胞增殖活性, dUTP 缺口末端标记法测定内皮细胞的凋亡, 逆转录-聚合酶链反应法测定炎症因子单核细胞趋化蛋白 1、白细胞介素 6、核因子- $\kappa$ B-P65 mRNA 表达水平, Western blotting 测定内皮细胞核因子- $\kappa$ B-P65 的蛋白水平。结果 (1) 与对照组相比, 过氧化氢组内皮细胞活性明显降低( $P < 0.05$ ), 麝香保心丸药物血清呈浓度依赖性抑制过氧化氢诱导内皮细胞损伤( $P < 0.05$ ), 与对照血清组相比, 药物血清 1 g 组内皮细胞活性显著升高( $P < 0.05$ ); (2) 过氧化氢组内皮细胞大量凋亡, 1 g 麝香保心丸血清组只有少量细胞凋亡; (3) 与对照组相比, 过氧化氢组单核细胞趋化蛋白 1、白细胞介素 6、核因子- $\kappa$ B-P65 mRNA 表达水平明显增高( $P < 0.05$ ), 麝香保心丸药物血清组呈浓度依赖性抑制上述指标的表达, 1 g 麝香保心丸血清组有明显降低, 而对照血清组单核细胞趋化蛋白 1、白细胞介素 6、核因子- $\kappa$ B-P65 mRNA 表达无明显差别( $P > 0.05$ ); (4) 与对照组相比, 过氧化氢组核因子- $\kappa$ B-P65 蛋白表达水平明显增高, 麝香保心丸(血清)呈浓度依赖性抑制其的表达, 1 g 麝香保心丸血清组核因子- $\kappa$ B-P65 表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。结论 麝香保心丸保护血管内皮细胞可能与抑制过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞炎症因子有关。

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

### Effect of Shexiang Baoxin Wan on Cell Apoptosis and Expression of Inflammatory Factors in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced with Hydrogen Peroxide

XU Chang Sheng, NING Ruo Bing, CHAI Da Jun, and LIN Jin Xiu

(The Department of Cardiology of the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian Provincial Institute of Hypertension, Fuzhou, Fujian 350005, China)

[KEY WORDS] Shexiang Baoxin Wan; Endothelial Cells; Inflammatory Factors

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Shexiang Baoxin Wan on cell proliferation, apoptosis and expression of inflammatory factors in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).

**Methods** Collagenase I was used to digest and isolate HUVEC and then cultured. Bromodeoxyuridine (BrdU) enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to assay proliferation of HUVEC in vitro. Cell apoptosis was determined by terminal dUTP nick end labling (TUNEL). Expression of monocyte chemotactic protein 1 (MCP 1), interleukin 6 (IL 6) and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) P65 mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Western blotting was performed to detect the expression of NF- $\kappa$ B p65.

**Results** (1) Compared with control, cell growth and proliferation was significantly lower in  $H_2O_2$  group. The serum of Shexiang Baoxin Wan could inhibit the HUVEC proliferation declined by  $H_2O_2$  in concentration dependent manner. Apoptosis was higher in  $H_2O_2$  groups than that in control group and reserved to normal in 1 g Shexiang Baoxin Wan. (2) Compared with control, the level of MCP 1, IL 6 and NF- $\kappa$ B mRNA in  $H_2O_2$  group was greatly increased. Shexiang Baoxin Wan could inhibit the

[收稿日期] 2011 03 08

[作者简介] 许昌声, 本科毕业, 主管技师, 研究方向为高血压和动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 xcseng2005@yahoo.com.cn。宁若冰, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 nrb6860279@yahoo.com.cn。通讯作者林金秀, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为高血压和动脉粥样硬化的发病机制及其防治, E-mail 为 linjinxiu@med-mail.com.cn, 电话为 0591 87982517。

expression of these inflammatory factors induced by  $H_2O_2$  in concentration dependent manner. The serum of 1 g Shexiang Baoxin Wan remarkably decreased the level of MCP-1, IL-6 and NF- $\kappa$ B P65 mRNA. (3) Compared to control, the level of NF- $\kappa$ B P65 was largely increased in  $H_2O_2$  group, Shexiang Baoxin Wan could inhibit the expression of NF- $\kappa$ B P65 in concentration dependent manner. The serum of 1 g Shexiang Baoxin Wan greatly decreased the level of NF- $\kappa$ B P65.

**Conclusion** The role of Shexiang Baoxin Wan in protecting endothelial cell may be related to inhibiting the inflammatory factors induced by  $H_2O_2$ .

近年大量研究已证实动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)与血管内皮功能障碍及内皮氧化损伤所引起的炎症反应有关<sup>[1]</sup>。核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是调节炎症因子基因转录的关键环节,且已证实动脉硬化组织中NF- $\kappa$ B活性及含量明显增加<sup>[2]</sup>。Egashira K研究表明,阻断炎症因子单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)可减轻血管炎症反应,并认为动脉硬化始动因素主要由于内皮炎症反应及内皮损伤过程<sup>[3]</sup>。麝香保心丸是中药制成的复合制剂,经大量临床应用证实可改善血管内皮功能,减少动脉斑块形成,但其改善血管内皮功能与抑制炎症反应是否有关,目前仍不清楚。本研究通过观察麝香保心丸制备大鼠血清对过氧化氢(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )诱导人脐静脉内皮细胞凋亡及白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、MCP-1、NF- $\kappa$ B P65表达的影响,探讨麝香保心丸抗动脉硬化的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和试剂

胶原酶 I(Gibco 公司), M199 培养基(Gibco 公司), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco 公司), 胰蛋白酶(Gibco 公司), 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)(北京中杉公司); Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司), 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(Fermentas 公司); M-MLV 反转录酶、oligo(dT)15(美国 Promega 公司), Taq 酶(大连宝生物公司); Marker(Fermentas 公司); Western 印迹化学发光试剂(Santa Cruz 公司); 硝酸纤维素膜(Amersham 公司); 抗  $\beta$ -actin、免疫印迹化学发光试剂(Santa Cruz 公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(Santa Cruz 公司); 引物设计、合成由上海 Invitrogen 公司完成; 其他常用试剂均为分析纯。

### 1.2 脐静脉内皮细胞的分离与培养

实验中所用脐带全部来自于福建医科大学附属第一医院住院育龄健康产妇剖宫产后的新鲜脐带

(孕妇自愿提供)。无菌条件下取新生儿脐带约 15 cm, 置于预先准备的装有 M199 培养液的无菌瓶中, 按 Jaffe 等人<sup>[4]</sup>的方法加以改进, 于无菌条件下用一钝头的针头扎入脐静脉中, PBS 冲洗脐静脉 2~3 次; 用手术钳夹紧脐带远端, 向脐静脉内注入约 10 mL 0.1% I 型胶原酶, 于 37 °C 15~20 min, 将下端手术钳松开, 再用 M199 培养液反复冲洗 3 次, 移入 15 mL 离心管 1 000 r/min 离心 10 min; 弃上清, 加入含 20% FBS 的 M199 培养基重悬细胞, 移入培养瓶, 置于 37 °C 培养箱中培养 24 h 后更换新的培养基; 镜下观察, 待细胞长至 80%~90% 汇合时行 1:2 传代, 取 3~5 代细胞进行实验。

### 1.3 麝香保心丸动物血清制备

称取麝香保心丸原粉 0.5、1.0、2.0 g 充分溶解于 5 mL 水中, 采用灌胃法连续给药 3 天, 10 mL/kg 大鼠, 第 4 天灌胃给药后 4 h 断头取血, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.22  $\mu$ m 过滤器过滤, -70 °C 保存备用, 以对照组(未给药大鼠)血清为对照血清组, 上述制备血清浓度为体外细胞干预 10 × 血清, 血清浓度分别为 0.5、1.0、2.0 g/L, 称为 0.5 g 血清组、1.0 g 血清组、2.0 g 血清组。

### 1.4 5-溴脱氧尿嘧啶核苷法检测人脐静脉内皮细胞活性

取 3~5 代内皮细胞消化接种于 96 孔培养板中, 每孔  $1 \times 10^4$  个细胞, 待其生长至 70%~80% 汇合时更换 2% FBS 培养基, 每孔 90  $\mu$ L, 培养 24 h, 加入含不同浓度麝香保心丸血清, 每孔 10  $\mu$ L, 30~45 min 后加入  $H_2O_2$  10  $\mu$ L(终浓度 50 mg/L) 继续培养 24 h, 加入  $10 \times$  BrdU(5-溴脱氧尿嘧啶核苷, bromodeoxyuridine), 每孔 10  $\mu$ L, 37 °C 孵育 2~3 h, 弃上清, 加固定液 30 min, 弃上清, PBS 洗涤 1 次, 加 anti-BrdU POP 抗体室温 60~90 min, 弃上清, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加显色底物每孔 100  $\mu$ L 10~20 min, 每孔加 25  $\mu$ L 硫酸(终浓度 1 mol/L)。450 nm 波长酶标仪检测其光密度(optical density, OD)值, 用 OD 值大小表示细胞活性。

### 1.5 dUTP 缺口末端标记法测定细胞凋亡

取 3~5 代内皮细胞消化接种于预先放置有盖

玻片的 6 孔培养板中, 每孔  $10^5$  个细胞, 观察待细胞生长至 70% ~ 80% 汇合时更换 2% FBS 培养基 24 h, 加入含不同浓度麝香保心丸血清每孔 100  $\mu$ L 30 ~ 45 min 后加入  $H_2O_2$  10  $\mu$ L (终浓度 50 mg/L) 继续培养 24 h, 弃上清, PBS 洗涤 1 次, 95% 酒精固定液 30 min, 弃上清, PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min, 加 0.1% Triton 室温孵育 10 min, 加 dUTP 缺口末端标记 (terminal dUTP nick end labelling, TUNEL) 反应液 50  $\mu$ L 37  $^{\circ}$ C 60 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, converter-POD 混合液 37  $^{\circ}$ C 30 min, 加 DAB 显色液, 苏木素复染, 中性树脂封片, 镜下观察, 随机取 5 个高倍视野, 分别计数每个视野细胞凋亡占总数的百分数。

### 1.6 逆转录-聚合酶链反应法测定单核细胞趋化蛋白 1、白细胞介素 6 及核因子- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达

收集上述各组细胞, 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA; 取各组细胞 RNA 1  $\mu$ g 根据试剂盒说明书逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 1  $\mu$ L 进行 PCR 扩增。引物序列及扩增条件: IL 6: 上游: 5'-TGAGAGTAGTGAGGAACAAGCC 3', 下游: 5'-CCAT-TAACAACAACAATCTGAGGTG 3', 产物片段大小 272 bp, 变性 94  $^{\circ}$ C 30 s, 退火 58  $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; MCP 1: 上游: 5'-ATGAAAGTCTCTGCCGCC 3', 下游: 5'-TTGCTTGTCCAGGTGGTC 3', 产物片段大小 290 bp, 变性 94  $^{\circ}$ C 30 s, 退火 60  $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; NF- $\kappa$ B p65: 上游: 5'-AGCT-GATGTGCACCCACAAGTG 3', 下游: 5'-GCTGAAAG-GACTCTTCTTCATG 3', 产物片段大小 235 bp, 变性 94  $^{\circ}$ C 30 s, 退火 60  $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 60  $^{\circ}$ C 30 s, 进行 30 个循环; 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH): 上游: 5'-ACCA-CAGTCCATGCCATCAC 3', 下游: 5'-TCCACCAC-CCTGTTGCTGTA 3', 产物片段大小 454 bp, 变性 94  $^{\circ}$ C 30 s, 退火 57  $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环。上述反应结束后, 取 5  $\mu$ L 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, UVP 型凝胶图像分析系统摄图, 并分析各组目的基因及 GAPDH 基因的灰度值, 以两者的比值代表各基因的表达量。

### 1.7 Western blotting 法测定内皮细胞核因子- $\kappa$ B-p65 蛋白的表达

细胞接种于 6 孔板中, 带生长至 80% 汇合时进行干预。干预后每孔加入 200  $\mu$ L 1  $\times$  SDS (十二烷基硫酸钠, sodium dodecyl sulfate) 裂解液 (临用前加入 5  $\times$  DTT 液, 100 mL/L PMSF, 2 mL/L 抑肽酶), 置于冰上裂解 10 min, 将液体转至无菌的 1.5 mL EP 管中振荡 30 s, 放入水浴锅煮沸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 12 000

g 离心 10 min, 取上清, 放入 -70  $^{\circ}$ C 冰箱待用; 10% 不连续 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 3% 脱脂奶粉的 TBS 中封闭 30 min, 加 NF- $\kappa$ B 抗体 (1:500)、 $\beta$ -actin (1:1 000) 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 用 TBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加辣根过氧化物酶标记的二抗 (山羊抗兔 IgG 1:5 000) 37  $^{\circ}$ C 摇 1 h, 用 TBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加 Luminol 混合液在 X 线胶片显色; 洗片, 显影信号的强弱用光密度分析值反映。以总  $\beta$ -actin 为内参照, 进行半定量分析, 比值表示其相对含量。

### 1.8 统计学处理

所有数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 SPSS 13.0 软件包统计; 多组间的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验;  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 麝香保心丸药物血清对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞增殖的影响

与对照血清组相比,  $H_2O_2$  能明显抑制人脐静脉内皮细胞增殖 ( $0.25 \pm 0.036$  比  $1.76 \pm 0.090$ ,  $P < 0.01$ ); 与  $H_2O_2$  组相比, 麝香保心丸药物血清呈浓度依赖性促进  $H_2O_2$  诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 增殖 ( $P < 0.01$ ); 与对照血清组相比, 1.0 g 药物血清组的 HUVEC 细胞增殖明显升高 ( $P < 0.01$ ) (图 1)。

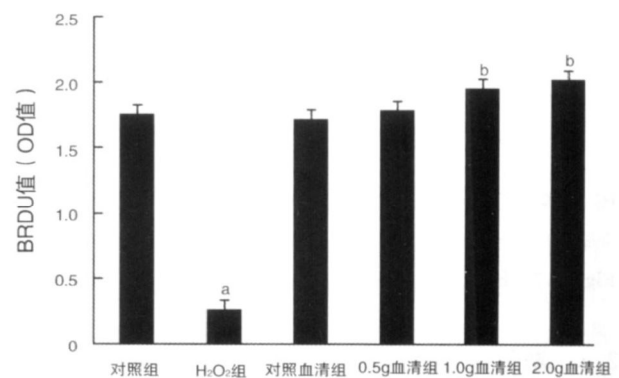


图 1. 麝香保心丸药物血清对  $H_2O_2$  诱导 HUVEC 细胞增殖的影响 a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与对照血清组比较。

Figure 1. Effect of Shexiang Baoxin Wan on cell proliferation in HUVEC induced with  $H_2O_2$

### 2.2 麝香保心丸药物血清对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

正常对照组内皮细胞形态卵圆形, 胞膜光滑, 核

膜完整,细胞核未见明显棕色沉淀, $H_2O_2$ 组可见大量细胞变形,细胞呈细丝状,胞核皱缩,核膜破坏,细胞核中可现棕黄色信号,1.0 g 药物血清组细胞生长均匀,细胞形态未见明显改变,只见少量核膜不完

整,并有少量细胞核出现棕色信号;细胞凋亡率分析:与对照组相比, $H_2O_2$ 组 HUVEC 细胞凋亡率显著增加( $P < 0.01$ );与 $H_2O_2$ 组相比,1.0 g 药物血清组明显降低( $P < 0.01$ ) (图 2A、B)。

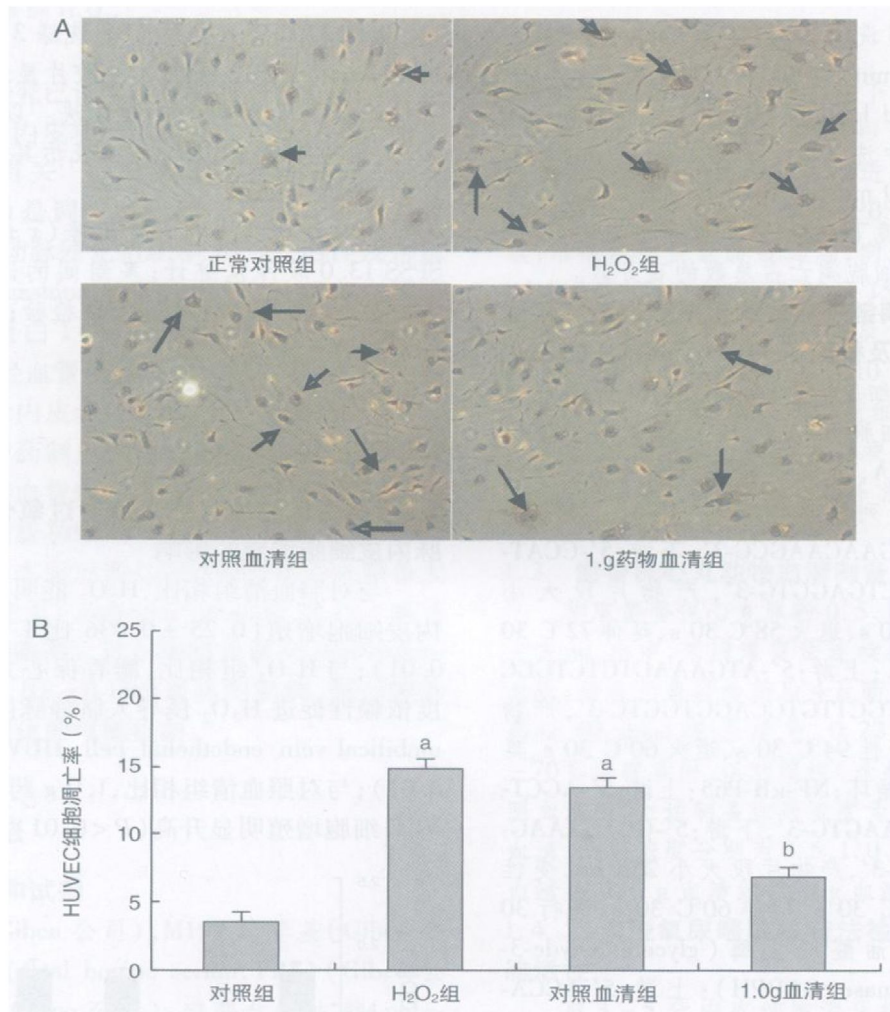


图 2. 麝香保心丸药物血清对 $H_2O_2$ 诱导 HUVEC 细胞凋亡的影响 A: 内皮细胞凋亡 TUNNEL 图, 箭头号表示细胞凋亡。B: 内皮细胞凋亡率分析, a 为 $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$ , 与 $H_2O_2$ 组比较。

Figure 2. Effect of Shexiang Baoxin Wan on cell apoptosis in HUVEC induced with  $H_2O_2$

### 2.3 麝香保心丸药物血清对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞白细胞介素 6、单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达水平的影响

与对照组相比, $H_2O_2$ 组 IL 6、MCP 1 mRNA 表达均明显升高,与 $H_2O_2$ 组相比,对照血清组中 IL 6 与 MCP 1 mRNA 表达水平无显著差别;麝香保心丸药物血清呈浓度依赖性抑制 $H_2O_2$ 诱导 HUVEC 细胞 IL 6 和 MCP 1 mRNA 的表达,1.0 g 药物血清组显著抑制上述两种炎症因子 mRNA 表达水平( $P < 0.05$ ; 图 3)。

### 2.4 麝香保心丸药物血清对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞核因子- $\kappa$ B p65 mRNA 及蛋白表达的影响

与对照组相比, $H_2O_2$ 组 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 及蛋白表达水平均明显升高。与 $H_2O_2$ 组相比,对照血清组 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 及蛋白表达水平无显著差别;麝香保心丸药物血清呈浓度依赖性抑制 $H_2O_2$ 诱导 HUVEC 中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 及蛋白的表达,1.0 g 药物血清组两者表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ; 图 4)。



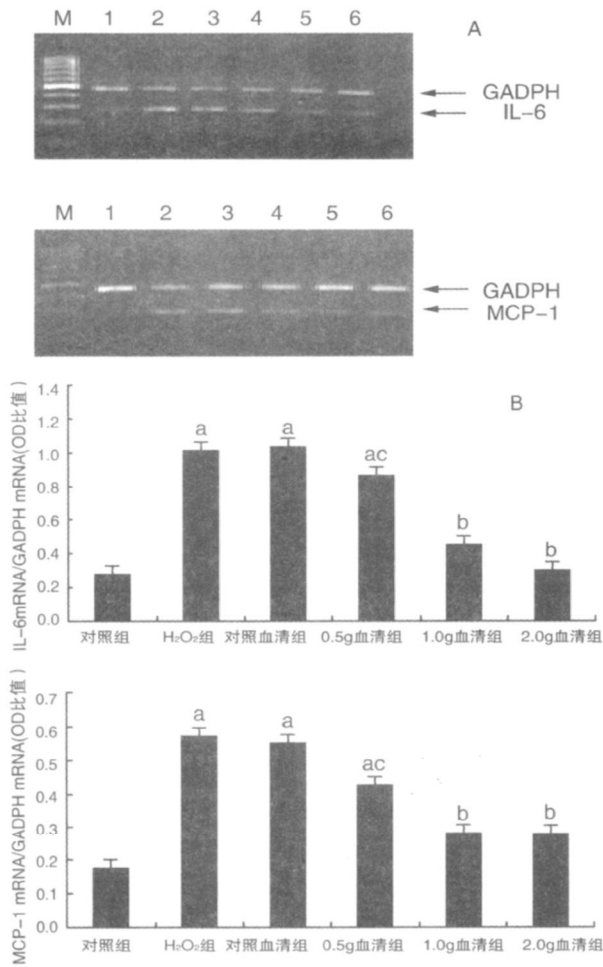


图3. 麝香保心丸药物血清对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVEC 细胞 IL-6、MCP-1 mRNA 表达水平的影响 A: 凝胶电泳图, M、1、2、3、4、5、6 分别为 Marker、对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、对照血清组、0.5 g 血清组、1.0 g 血清组、2.0 g 血清组。B: 凝胶电泳光密度分析统计图; a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与对照血清组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与对照血清组比较。

Figure 3. Effect of Shexiang Baoxin Wan on expression of IL-6, MCP-1 mRNA in HUVEC induced with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3 讨论

动脉粥样硬化是心脑血管疾病的重要病理基础, 研究认为动脉粥样硬化的形成是血管内皮损伤的一种慢性炎症反应过程<sup>[5]</sup>。内皮细胞损伤导致 MCP-1 表达的增多, 在动脉粥样硬化炎症反应过程中起着重要的作用<sup>[6, 7]</sup>。既往研究表明, 阻断早期的血管炎症反应能降低动脉硬化和稳定斑块<sup>[5]</sup>。本研究观察到麝香保心丸能抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人脐静脉内皮细胞炎症因子表达, 提高细胞活性, 抑制细胞凋亡。

麝香保心丸由麝香、人参提取物、苏合香、牛黄、蟾酥、肉桂、冰片等中药组成, 长期以来作为一种治

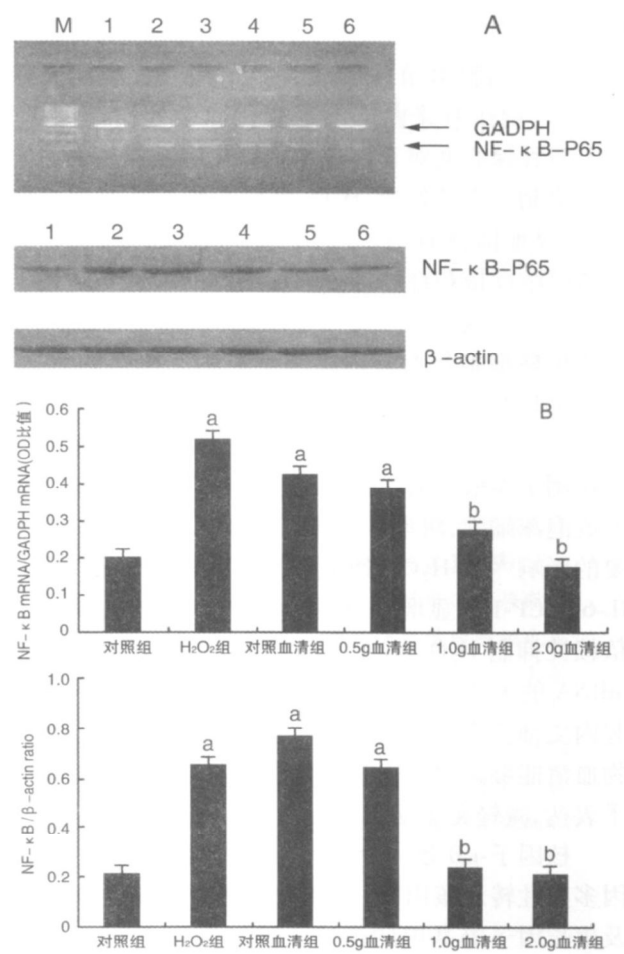


图4. 麝香保心丸药物血清对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVEC 细胞 NF-κB-p65 mRNA 及蛋白表达的影响 A: 分别为凝胶电泳图、免疫印迹图, M、1、2、3、4、5、6 分别为 Marker、对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、对照血清组、0.5 g 血清组、1.0 g 血清组、2.0 g 血清组。B: 凝胶电泳光密度分析; a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与对照血清组比较。

Figure 4. Effect of Shexiang Baoxin Wan on expression of NF-κB p65 mRNA and protein in HUVEC induced with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的有效药物, 临床上已得到广泛应用。麝香和牛黄具有强心、扩张血管的作用, 人参具有提高心肌收缩力、保护心肌、扩张血管和抗氧化等作用, 苏合香脂、冰片具有扩张血管、改善冠状动脉痉挛的作用, 蟾酥有强心的作用。长期以来麝香保心丸作为一种治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的有效药物, 临床上已得到广泛应用。它对缓解心绞痛症状、改善缺血性心电图的表现、治疗心肌缺血效果显著<sup>[8]</sup>。

已有研究证实, 麝香保心丸能通过增加血管内皮细胞中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子

(basic fibroblast growth factor, bFGF) 的表达, 促进血管内皮细胞增殖并形成管腔结构<sup>[9]</sup>。本研究采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 制作血管内皮细胞氧化应激损伤模型, 来研究麝香保心丸对于内皮细胞氧化应激损伤的影响及其机制。实验发现, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能引起细胞活性明显降低, 明显地抑制 HUVEC 的增殖, 而麝香保心丸药物血清呈浓度依赖性增加了内皮细胞的增殖与活性。

内皮细胞可被炎症因子激活, 从而生成黏附分子使单核细胞与血管内皮细胞黏附。IL 6 的致 A<sub>s</sub> 作用也日益受到重视<sup>[10, 11]</sup>。IL 6 被认为是 A<sub>s</sub> 的标志物<sup>[10, 12]</sup>。MCP 1 是一种趋化激活剂, 它可以特异地作用于血液中的单核细胞, 诱导其迁移至内皮下, 形成泡沫细胞, 对动脉粥样硬化的发生发展具有重要的影响<sup>[13]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能引起血管内皮细胞所产生的 IL 6、MCP 1 明显增多, 麝香保心丸药物血清呈浓度依赖性抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVEC 细胞中 IL 6、MCP 1 mRNA 的表达水平。这些结果说明氧化应激损伤引起内皮细胞内的炎症因子表达增加, 麝香保心丸药物血清能够减少氧化应激损伤的内皮细胞中炎症因子表达, 减轻炎症反应。

核因子- $\kappa$ B 是一种广泛存在于真核细胞内的基因多显性转录核因子, 控制着细胞因子、黏附分子及生长因子等基因的表达。转录因子 NF- $\kappa$ B 能调节多种炎症和免疫基因表达, 是 A<sub>s</sub> 的启动因子。多种致 A<sub>s</sub> 因子可通过激活血管壁细胞的 NF- $\kappa$ B 活性并调节 MCP 1 活性, 进而促进 A<sub>s</sub> 的发展进程<sup>[14, 15]</sup>。本研究中, 麝香保心丸药物血清呈浓度依赖性抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 HUVEC 细胞中 NF- $\kappa$ B 的表达, 提示麝香保心丸能够通过 NF- $\kappa$ B 及 MCP 1 途径抑制内皮细胞的氧化应激损伤。

抗氧化应激治疗对心血管疾病患者具有重要的作用, 寻找更多减轻氧化应激损伤的方法具有重大意义。中医药治疗心血管疾病有着悠久的历史, 并且疗效明确。本文的结果为在病理状态下临床应用麝香保心丸抑制血管内皮细胞的氧化应激损伤提供了实验依据, 为麝香保心丸早期防治冠心病提供新的理论依据。

#### [参考文献]

[1] 童海, 涂玉林. 高敏 C 反应蛋白与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(9): 746-750.  
[2] Tanimoto A, Murata Y, Wang KY, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 expression is enhanced by granulocyte macrophage colony stimulating factor via Jak2-Stat5 signaling and inhibited by atorvastatin in human monocytic

U937 cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(8): 4643-4651.  
[3] Inoue S, Egashira K, Ni W, et al. Anti monocyte chemoattractant protein 1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E knock-out mice[J]. Circulation, 2002, 106(21): 2700-2706.  
[4] Jaffe EA, Nochman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. J Clin Invest. 1973, 52(11): 2745-2758.  
[5] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.  
[6] Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease[J]. Circ Res, 2004, 95(9): 858-866.  
[7] Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, et al. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability[J]. Circulation, 2000, 101(12): 1372-1378.  
[8] 王静, 吴时达. 中药对血管内皮功能的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(1): 116-118.  
[9] 汪姗姗, 李勇, 范维琥, 等. 麝香保心丸对鸡胚绒毛尿囊膜及培养的血管内皮细胞的促血管生成作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(2): 42-45.  
[10] McGlinchey PG, Spence MS, Patterson CC, et al. Cytokine gene polymorphisms in ischaemic heart disease: investigation using family based tests of association[J]. J Mol Med, 2004, 82(11): 756.  
[11] Goldhammer E, Tanchilevitch A, Maor I, et al. Exercise training modulates cytokines activity in coronary heart disease patients[J]. Int J Cardiol, 2005, 100(1): 93-99.  
[12] Bemelmans WJ, Lefrandt JD, Feskens EJ, et al. Increased alpha-linolenic acid intake lowers C-reactive protein, but has no effect on markers of atherosclerosis[J]. Eur J Clin Nutr, 2004, 58(7): 1083-1089.  
[13] 李福生, 王宗立, 许漫, 等. 表达反义单核细胞趋化蛋白 1 的重组逆转录病毒对家兔动脉平滑肌细胞趋化蛋白 1 基因表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7(4): 283-287.  
[14] Wang G, Siow YL. Homocysteine induces MCP 1 expression by activating NF- $\kappa$ B in THP 1 macrophages[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(6): H2840-2847.  
[15] Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, et al. Toll like receptor 4 dependent and independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low density lipoprotein in macrophages[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 1213-1219.

(此文编辑 曾学清)