

## 二陈汤合桃红四物汤含药血清对 ox-LDL 诱导内皮细胞损伤的保护作用及机制

王俊岩<sup>1</sup>, 曲宁宁<sup>2</sup>, 贾连群<sup>2</sup>, 陈文娜<sup>2</sup>, 张林<sup>2</sup>, 宋 囡<sup>2</sup>, 杨关林<sup>2</sup>, 冼绍祥<sup>1,3</sup>

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东省广州市 510405; 2. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁省沈阳市 110847; 3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405)

[关键词] 二陈汤; 桃红四物汤; 氧化型低密度脂蛋白; 内皮细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 观察二陈汤合桃红四物汤含药血清对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导内皮细胞损伤的保护作用并探讨其可能的机制。方法 培养 EA.hy926 细胞, 随机分为对照组、ox-LDL 组、干预组、抑制剂组。流式细胞仪检测各组细胞凋亡水平, 比色法检测细胞内丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)水平及超氧化物歧化酶(SOD)活性, ELISA 检测细胞上清液中肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(IL-6)水平, Western blot 检测磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、磷酸化 AKT(p-AKT)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)蛋白表达水平。结果 与对照组比较, ox-LDL 组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著升高( $P < 0.01$ ), 细胞内 MDA 含量显著升高( $P < 0.01$ ), SOD 活性明显降低( $P < 0.05$ ), 上清液中 NO 水平显著降低( $P < 0.01$ ), 活性氧(ROS)含量和细胞凋亡率明显升高, PI3K、eNOS 蛋白表达水平和 AKT 蛋白磷酸化水平显著降低( $P < 0.01$ )。与 ox-LDL 组比较, 干预组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著降低( $P < 0.01$ ), 细胞内 MDA 含量显著降低( $P < 0.01$ ), SOD 活性明显升高( $P < 0.05$ ), 上清液中 NO 水平显著升高( $P < 0.01$ ), ROS 含量和细胞凋亡率明显降低, PI3K、eNOS 蛋白表达水平和 AKT 蛋白磷酸化水平显著升高( $P < 0.01$ )。与干预组比较, 抑制剂组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著升高( $P < 0.01$ ), 细胞内 MDA 含量显著升高( $P < 0.01$ ), SOD 活性明显降低( $P < 0.05$ ), 上清液中 NO 水平明显降低( $P < 0.05$ ), 细胞内 ROS 含量升高, PI3K、eNOS 蛋白表达水平和 AKT 蛋白磷酸化水平显著降低( $P < 0.01$ )。结论 二陈汤合桃红四物汤含药血清能有效保护 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤, 其机制可能与激活 PI3K/AKT/eNOS 信号通路有关。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

### Effect and mechanism of serum containing of Erchen decoction and Taohong Siwu decoction on ox-LDL induced endothelial cell damage

WANG Junyan<sup>1</sup>, QU Ningning<sup>2</sup>, JIA Lianqun<sup>2</sup>, CHEN Wenna<sup>2</sup>, ZHANG Lin<sup>2</sup>, SONG Nan<sup>2</sup>, YANG Guanlin<sup>2</sup>, XIAN Shaoxiang<sup>1,3</sup>

(1. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, Ministry of Education of China, Shenyang, Liaoning 110847, China; 3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

[KEY WORDS] Erchen decoction; Taohong Siwu decoction; oxidized low density lipoprotein; endothelial cells; atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of Erchen decoction and Taohong Siwu decoction containing serum on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced endothelial cell damage. **Methods** EA.hy926 cells were cultured in vitro, then randomly divided into control group, ox-LDL group, intervention group, inhibitor group. Cell apoptosis was detected by flow cytometry, malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and superoxide dismutase

[收稿日期] 2018-04-19

[修回日期] 2018-05-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774022, 81300229); 国家重点基础研究发展计划项目(973 计划)(2013CB531704)

[作者简介] 王俊岩, 博士, 研究方向为中医药防治心血管疾病, E-mail 为 junyan\_wang@163.com。通信作者杨关林, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中西医结合防治心脑血管疾病, E-mail 为 yang\_guanlin@163.com。通信作者冼绍祥, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中医药防治心脑血管疾病, E-mail 为 zhongfy@126.com。

(SOD) activity were detected by colorimetry, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) levels in cell supernatant were detected by ELISA, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated AKT (p-AKT) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein expressions were detected by Western blot. **Results** Compared with control group, the level of TNF- $\alpha$  and IL-6 increased significantly ( $P<0.01$ ), MDA content in cells increased significantly ( $P<0.01$ ), SOD activity decreased ( $P<0.05$ ), NO level in supernatant decreased significantly ( $P<0.01$ ), content of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis rate increased significantly, the protein expression level of PI3K, eNOS and the protein phosphorylation of AKT were significantly decreased ( $P<0.01$ ) in ox-LDL group. Compared with ox-LDL group, the level of TNF- $\alpha$  and IL-6 in cell supernatant decreased significantly ( $P<0.01$ ), MDA content in cells decreased significantly ( $P<0.01$ ), SOD activity increased significantly ( $P<0.05$ ), NO level in the supernatant increased significantly ( $P<0.01$ ), ROS content and apoptosis rate decreased significantly, the protein expression level of PI3K, eNOS and the protein phosphorylation of AKT were significantly increased ( $P<0.01$ ) in intervention group. Compared with intervention group, the level of TNF- $\alpha$  and IL-6 increased significantly ( $P<0.01$ ), MDA content in cells increased significantly ( $P<0.01$ ), SOD activity decreased ( $P<0.05$ ), NO level in supernatant decreased significantly ( $P<0.05$ ), content of ROS and apoptosis rate increased significantly, the protein expression level of PI3K, eNOS and the protein phosphorylation of AKT were significantly decreased ( $P<0.01$ ) in inhibitor group. **Conclusion** The serum containing of Erchen decoction and Taohong Siwu decoction can effectively protect ox-LDL induced endothelial cell injury, which may be related to activation of PI3K/AKT/eNOS signaling pathway.

我国每年因心脑血管疾病死亡的患者在不断提高,心脑血管疾病已成为人类健康的又一大杀手,因此心脑血管疾病的防治十分重要。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心脑血管疾病发生的主要病理基础,目前研究认为,动脉粥样硬化的发生是由于长期不良的生活习惯,如吸烟、饮酒、熬夜等导致高血脂、高血压、高血糖、高尿酸、肥胖等病理因素致使血管内皮损伤,血管壁增厚,血管弹性改变<sup>[1]</sup>。因此,防治血管内皮损伤在治疗动脉粥样硬化中发挥重要的作用。中医学认为,心主血脉功能失司,血脉失于濡养,气血运行不畅,加之肥甘厚味,脾虚痰浊内生,瘀血阻滞,痰瘀互结,是本病发生的主要病机,痰瘀是本病发生的关键<sup>[2]</sup>。本研究根据“痰瘀”这一致病关键,选取具有“化痰除湿”和“活血化瘀”的经典方剂二陈汤与桃红四物汤,通过观察含药血清对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的内皮细胞损伤的影响,并通过观察磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)信号通路抑制剂 LY294002 的干预作用,探讨二陈汤合桃红四物汤对内皮细胞损伤的保护作用及抗动脉粥样硬化作用相关机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要药物、试剂与仪器

EA.hy926 细胞株购自中国科学院上海细胞库;20 只 SD 大鼠购自辽宁长生生物科技有限公司,许可证号:SCXK(辽)2012-0001;ox-LDL 购自北京索莱宝生物

科技有限公司;LY294002 购自 Selleckchem Company;DMEM/高糖培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、双抗购自 Hyclone 公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒购自南京建成生物科技有限公司;凋亡检测试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒购自碧云天生物科技有限公司;肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)试剂盒购自北京达科为生物科技有限公司;PI3K、AKT、p-AKT、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、 $\beta$ -actin、二抗购自美国 CST 公司。二陈汤由半夏 15 g、陈皮 15 g、茯苓 12 g、甘草 6 g 组成,桃红四物汤由桃仁 12 g、红花 9 g、当归 12 g、川芎 9 g、赤芍 9 g、生地 12 g 组成,全部药物购买于辽宁中医药大学附属医院。煎煮浓缩为含有生药量为 2.0 g/mL 的煎剂。细胞培养箱(Thermo Scientific);酶标仪(Berthold Company);流式细胞仪(BeckMan);电泳仪、化学发光成像系统(上海天能);荧光显微镜(Leica)。

### 1.2 含药血清的制备

10 只大鼠给予二陈汤合桃红四物汤煎液灌胃,每日早晚各一次,每次 2 mL,另外 10 只大鼠给予等量生理盐水灌胃,连续灌胃 7 天,于末次灌胃 2 h 后用 10%水合氯醛麻醉,腹主动脉采血,4 °C 静置 2 h,3000 r/min 离心 10 min,分离上清液,60 °C 水浴灭活 30 min, -20 °C 保存备用。

### 1.3 细胞培养、分组及干预

新购置的 EA.hy926 细胞株用含 10%胎牛血清

的 DMEM 高糖培养基于 37 °C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱内培养。待细胞汇合到 80% 时用胰酶消化后传代。待细胞传至足够时,进行分组处理:①对照组:由含有 10% 生理盐水大鼠血清的 DMEM 高糖培养基培养;②ox-LDL 组:对照组+50 mg/L ox-LDL;③干预组:由含有 10% 含药血清的 DMEM 高糖培养基培养+50 mg/L ox-LDL;④抑制剂组:在干预组处理前加入 10 μmol/L LY294002 抑制剂预处理 2 h。各组细胞连续处理 12 h 后进行相应指标检测。

#### 1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡水平

采用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒检测各组细胞凋亡水平。使用 0.25% 不含 EDTA 的胰酶消化细胞,显微镜下观察,待细胞分离后使用培养液终止消化,收集最初培养液中细胞和消化后的细胞,制备单细胞悬液,PBS 洗两遍,1500 r/min 离心 3 min,Buffer 重悬细胞,按照说明书加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀,加入 10 μL 碘化丙啶染色液,混匀,室温避光孵育 15 min,上机检测。Q1-UL 区域代表坏死细胞,Q1-UR 区域代表晚期凋亡细胞,Q1-LR 区域代表早期凋亡细胞,Q1-LL 区域代表活细胞。

#### 1.5 比色法检测细胞内 MDA、NO 水平及 SOD 活性

收集细胞,分别采用 TBA 法和羟胺法检测细胞内 MDA 水平和 SOD 活性。收集细胞上清液,采用硝酸还原酶法检测细胞上清液中 NO 水平。严格按照说明书进行操作。

#### 1.6 ELISA 检测细胞上清液 TNF-α、IL-6 水平

收集细胞上清液,采用 ELISA 检测各组上清液中 TNF-α 和 IL-6 水平,严格按照说明书进行操作。

#### 1.7 细胞内 ROS 水平检测

采用原位装载探针的方法检测细胞内 ROS 水平,使用 DMEM 培养基稀释 DCFH-DA 至 5 μmol/L,去除培养液,加入配好的含 DCFH-DA DMEM 培养基,37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min,使用荧光显微镜观察,采集图像。使用 Image J 分析平均光密度。

#### 1.8 Western blot 检测 PI3K、p-AKT、eNOS 蛋白水平

使用 PBS 冲洗细胞,加入蛋白裂解液提取总蛋白,Bradford 蛋白质测定试剂盒进行蛋白定量。每泳道上样蛋白 20 μg,SDS-PAGE 电泳后电转膜至 PVDF 膜,加入 1:1000 兔抗人 PI3K、AKT、p-AKT、eNOS、β-actin,4 °C 封闭过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,1 h 后,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,按试剂盒说明书混合发光液 A 和 B,与膜作用 5 min 后,使用天能化学发光成像系统进行曝光。实验重复 3 次。

#### 1.9 统计学分析

实验数据均为计量资料,用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较首先进行单因素方差齐性分析,若方差齐,组间比较采用 LSD 法检验;若方差不齐,组间比较采用 Tamhane 法检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞凋亡水平

与对照组比较,ox-LDL 能明显诱导 EA.hy926 细胞凋亡,二陈汤合桃红四物汤含药血清预处理能明显改善 ox-LDL 对细胞的损伤,加入抑制剂后细胞凋亡率增加(图 1 和表 1)。

### 2.2 细胞内 MDA 含量、SOD 活性及上清液中 NO 水平

与对照组比较,ox-LDL 组细胞内 MDA 含量显著升高( $P < 0.01$ )、SOD 活性明显降低( $P < 0.05$ ),上清液中 NO 水平显著降低( $P < 0.01$ );与 ox-LDL 组比较,干预组细胞内 MDA 含量显著降低( $P < 0.01$ ),SOD 活性明显升高( $P < 0.05$ ),上清液中 NO 水平显著升高( $P < 0.01$ );与干预组比较,抑制剂组细胞内 MDA 含量显著升高( $P < 0.01$ ),SOD 活性明显降低( $P < 0.05$ ),上清液中 NO 水平明显降低( $P < 0.05$ ;表 2)。

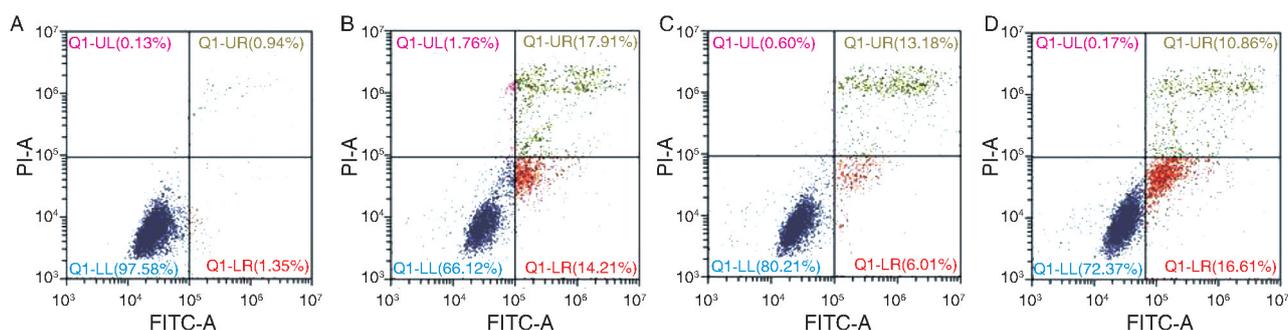


图 1. 各组细胞凋亡水平 A 为对照组,B 为 ox-LDL 组,C 为干预组,D 为抑制剂组。

Figure 1. The level of cell apoptosis in each group

表 1. 各组细胞凋亡率( $\bar{x}\pm s, \%, n=3$ )

Table 1. Cell apoptosis rate in each group( $\bar{x}\pm s, \%, n=3$ )

分组	凋亡率
对照组	2.42±0.52
ox-LDL 组	32.55±3.82 <sup>a</sup>
干预组	19.33±2.63 <sup>b</sup>
抑制剂组	27.64±2.50 <sup>c</sup>

a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与 ox-LDL 组比较; c 为  $P<0.01$ , 与干预组比较。

表 2. 各组细胞内 MDA 含量、SOD 活性及细胞上清液中 NO 水平( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2. The MDA content and SOD activity in cells and the level of NO in cell supernatant( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

分组	MDA(g/L)	SOD(kU/L)	NO( $\mu\text{mmol/L}$ )
对照组	1.91±0.15	26.91±7.16	0.23±0.06
ox-LDL 组	6.10±0.70 <sup>b</sup>	17.16±2.42 <sup>a</sup>	0.08±0.02 <sup>b</sup>
干预组	3.01±0.59 <sup>d</sup>	24.52±2.56 <sup>c</sup>	0.18±0.03 <sup>d</sup>
抑制剂组	5.03±0.71 <sup>ef</sup>	18.19±2.82 <sup>e</sup>	0.10±0.03 <sup>e</sup>

a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; c 为  $P<0.05$ , d 为  $P<0.01$ , 与 ox-LDL 组比较; e 为  $P<0.05$ , f 为  $P<0.01$ , 与干预组比较。

2.3 细胞上清液 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平

与对照组比较, ox-LDL 组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著升高( $P<0.01$ ); 与 ox-LDL 组比较,

干预组和抑制剂组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著降低( $P<0.01$ ); 与干预组比较, 抑制剂组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著升高( $P<0.01$ ; 表 3)。

表 3. 各组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平( $\bar{x}\pm s, \mu\text{g/L}, n=5$ )

Table 3. The level of TNF- $\alpha$  and IL-6 in cell supernatant( $\bar{x}\pm s, \mu\text{g/L}, n=5$ )

分组	TNF- $\alpha$	IL-6
对照组	173.16±10.78	96.96±13.79
ox-LDL 组	488.01±25.01 <sup>a</sup>	393.98±33.13 <sup>a</sup>
干预组	283.92±20.56 <sup>b</sup>	209.03±9.43 <sup>b</sup>
抑制剂组	392.44±21.24 <sup>bc</sup>	317.35±18.02 <sup>bc</sup>

a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与 ox-LDL 组比较; c 为  $P<0.01$ , 与干预组比较。

2.4 细胞内 ROS 含量

荧光显微镜观察结果显示, 与对照组比较, ox-LDL 组细胞内有大量绿色荧光, 表明细胞内 ROS 含量显著升高; 与 ox-LDL 组比较, 干预组荧光亮度明显减弱, 表明细胞内 ROS 含量明显降低; 与干预组比较, 抑制剂组细胞内荧光轻度增加, 表明细胞内 ROS 含量升高(图 2 和表 4)。

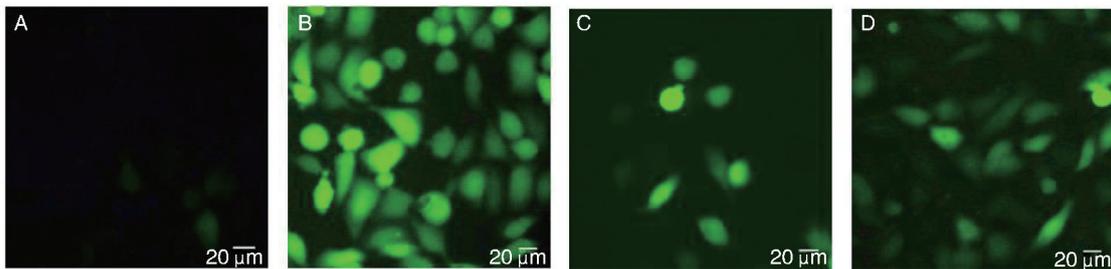


图 2. 各组细胞内 ROS 水平 A 为对照组, B 为 ox-LDL 组, C 为干预组, D 为抑制剂组。

Figure 2. The level of reactive oxygen species in each group

表 4. 各组细胞内 ROS 平均光密度

Table 4. Mean light density of reactive oxygen species in cells

分组	平均光密度(IOD/area)
对照组	0.12±0.04
ox-LDL 组	0.79±0.11 <sup>a</sup>
干预组	0.28±0.08 <sup>b</sup>
抑制剂组	0.52±0.12 <sup>bc</sup>

a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与 ox-LDL 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与干预组比较。

2.5 细胞 PI3K、AKT、eNOS 蛋白表达水平

Western blot 检测结果显示, 与对照组比较, ox-LDL 组细胞 PI3K、eNOS 蛋白表达水平和 AKT 蛋白磷酸化水平显著降低( $P<0.01$ ); 与 ox-LDL 组比较, 干预组细胞 PI3K、eNOS 蛋白表达水平和 AKT 蛋白磷酸化水平显著升高( $P<0.01$ ); 与干预组比较, 抑制剂组细胞 PI3K、eNOS 蛋白表达水平和 AKT 蛋白磷酸化水平显著降低( $P<0.01$ ; 图 3)。

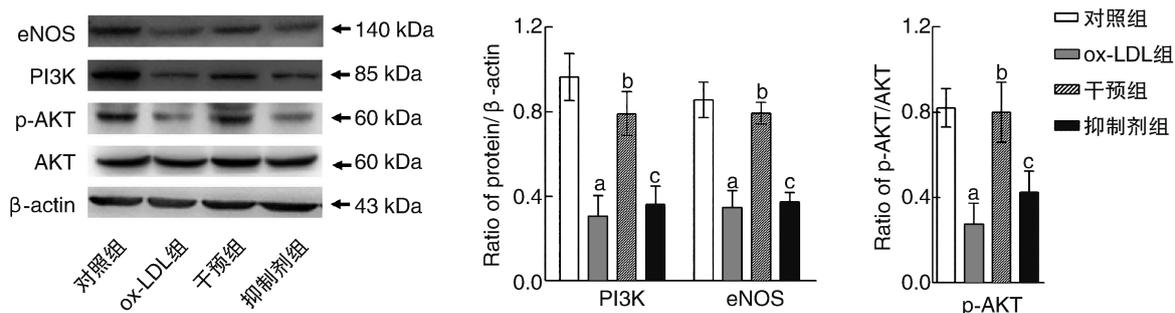


图 3. 各组细胞 PI3K、AKT、eNOS 蛋白表达水平 a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 ox-LDL 组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与干预组比较。

Figure 3. The level of proteins expression in each group

### 3 讨论

动脉粥样硬化是现代医学名词, 中医学中没有对动脉粥样硬化这一病名的记载, 现代医家根据临床表现、特点等将其归属于“胸痹”“眩晕”“头痛”“中风”“痰浊”“血瘀”等研究范畴<sup>[3]</sup>, 认为动脉粥样硬化为本虚标实之证, 心、肝、脾等脏器虚损为本, 痰浊、血瘀为标。随着研究不断的深入, 中医学中的痰浊血瘀、膏脂异常导致胸痹、中风等与现代医学中的血脂代谢异常导致的冠心病、脑血管疾病等不谋而合, 再次说明了“痰浊、血瘀”导致动脉粥样硬化的重要因素, 而临床上, 痰浊与血瘀密不可分, 二者总是伴随发生, 早在元代, 朱丹溪在《丹溪心法》中就提出: “痰淤同病”, 《症因脉治》中又明确提出“痰瘀互结”可导致胸痹心痛的发生<sup>[4-5]</sup>。因此, 中医学在临床治疗动脉粥样硬化、冠心病等疾病时, 根据其病因病机除了补虚外, 多采用燥湿祛痰、活血化瘀等治疗原则进行选方用药, 众多研究表明, 化痰祛痰法能有效治疗动脉粥样硬化<sup>[6-7]</sup>。

内皮细胞是血管内膜的主要细胞, 血管内膜是血管壁和血液之间的重要器官, 具有交换血液与组织间的营养物质、氧气等重要作用, 在炎症反应、抗血小板聚集等方面具有重要的作用<sup>[8-9]</sup>。研究证实, 血管内皮功能障碍和动脉粥样硬化之间有着密切关系, 正常的内皮细胞能够调节血管紧张度, 维持血管结构, 抑制单核细胞、炎性细胞、黏附分子聚集, 释放 NO, NO 具有内皮依赖的血管舒张功能、抑制内皮素释放, 抑制血小板聚集等作用, 是一种能够使血管有效舒张的内源性抗动脉粥样硬化因子<sup>[10-11]</sup>, 主要由 PI3K/AKT 信号通路重要的下游基因 eNOS 催化作用下由内皮细胞产生。当由于长期吸烟、高血脂、氧化自由基等病理刺激后<sup>[12]</sup>, 则会引

起血管内皮功能障碍, ROS 则能通过损伤细胞通透性, ROS 氧化 LDL 生成 ox-LDL, ox-LDL 和内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞的外源凝集素样 ox-LDL 受体 1 结合, 加速脂质对内皮细胞的损伤, 诱发内皮细胞凋亡, 导致 eNOS 合成减少, 进一步导致 NO 合成减少, 加速动脉粥样硬化进程<sup>[13-14]</sup>。研究表明, PI3K/AKT/eNOS 信号通路在动脉粥样硬化中起到重要作用<sup>[15-16]</sup>, AKT 被 PI3K 活化后通过激活 eNOS 促进内源性 NO 合成释放, 对血管内皮起到保护作用<sup>[17]</sup>。目前研究认为, 自由基损伤亦是组织损伤的主要机制之一, MDA 是细胞膜脂质损伤产生的重要脂质自由基, 能够反应机体脂质过氧化的程度, SOD 是机体清除氧化自由基的主要抗氧化酶, 二者是反应自由基氧化损伤的重要指标<sup>[18]</sup>。TNF- $\alpha$  和 IL-6 则是反应内皮细胞炎性损伤的重要炎症因子, 能够反应内皮细胞损伤程度。

本研究选用 ox-LDL 诱导 EA.hy926 细胞损伤, 复制氧化应激损伤模型, 同时, 基于动脉粥样硬化痰瘀论治理论选取经典的治痰方剂二陈汤和活血化瘀的经典方剂桃红四物汤含药血清进行干预, 以及观察 PI3K 抑制剂 LY294002 是否能够干预二陈汤合桃红四物汤含药血清的干预作用, 探讨 PI3K 信号通路是否参与了二陈汤合桃红四物汤含药血清对 ox-LDL 诱导的 EA.hy926 细胞损伤的干预作用。研究结果发现, 与对照组比较, ox-LDL 组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著升高, 细胞内 MDA 含量显著升高, SOD 活性明显降低, 上清液中 NO 水平显著降低, ROS 含量明显增高, ox-LDL 能明显诱导细胞凋亡; 与 ox-LDL 组比较, 干预组细胞上清液中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著降低, 细胞内 MDA 含量显著降低, SOD 活性明显升高, 上清液中 NO 水平显著升高, ROS 含量和细胞凋亡率明显降低, 而

PI3K 抑制剂 LY294002 逆转了这一结果; Western blot 结果显示,与对照组比较,ox-LDL 组细胞 PI3K、eNOS 蛋白表达水平和 AKT 蛋白磷酸化水平显著降低;与 ox-LDL 组比较,干预组细胞 PI3K、eNOS 蛋白表达水平和 AKT 蛋白磷酸化水平显著升高;与干预组比较,抑制剂组细胞 PI3K、eNOS 蛋白表达水平和 AKT 蛋白磷酸化水平显著降低。结果表明 ox-LDL 能够明显诱导细胞损伤,二陈汤合桃红四物汤含药血清能够有效保护细胞损伤,通过抑制 PI3K 信号通路能够逆转二陈汤合桃红四物汤含药血清对 ox-LDL 诱导细胞损伤的保护作用。

综上,二陈汤合桃红四物汤含药血清能有效保护 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤,其机制可能与激活 PI3K/AKT 信号通路有关。

#### [参考文献]

- [1] Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(3): 204-212.
- [2] 王椿野, 赵振武, 李新龙, 等. 基于现代文献的动脉粥样硬化中医病机研究[J]. *环球中医药*, 2013, 6(2): 92-95.
- [3] 赵步长, 伍海勤, 王一民, 等. 动脉粥样硬化中医浅析[J]. *光明中医*, 2012, 27(12): 2518-2522.
- [4] 张艳, 杨关林, 于睿, 等. 动脉粥样硬化中医虚瘀痰毒病因病机实质研究探讨[J]. *时珍国医国药*, 2007, 18(6): 1513-1514.
- [5] 杨宝元, 张洁, 史俊玲, 等. 冠状动脉粥样硬化形成与中医气虚血瘀病机相关性研究[J]. *中西医结合心血管病杂志*, 2009, 7(4): 385-387.
- [6] 盛松, 徐凤芹. 活血化痰中药抗动脉粥样硬化的作用机制研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2013, 11(5): 591-592.
- [7] 曲文彦, 吕晓檬, 赵娜, 等. 中医药治疗冠心病作用机制概述[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(3): 66-68.
- [8] 林艾雯, 陈竹君. 动脉粥样硬化与内皮细胞损伤机制的研究进展[J]. *岭南心血管病杂志*, 2015, 31(4): 580-582.
- [9] Gates PE, Strain WD, Shore AC. Human endothelial function and microvascular ageing[J]. *Exp Physiol*, 2009, 94(3): 311-316.
- [10] Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, et al. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. *Circ J*, 2009, 73(3): 411-418.
- [11] Katakam PV, Wappler EA, Katz PS, et al. Depolarization of mitochondria in endothelial cells promotes cerebral artery vasodilation by activation of nitric oxide synthase[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(4): 752-759.
- [12] 冯高科, 汪小丁, 陈晶晶, 等. 冠心病危险因素与冠脉病变程度的相关分析[J]. *中国医师杂志*, 2018, 20(1): 72-75.
- [13] 徐倩, 曹凯, 周晓慧, 等. 丹皮酚对同型半胱氨酸损伤内皮细胞 eNOS 表达及 NO 水平的影响[J]. *中成药*, 2012, 34(12): 2286-2289, 2301.
- [14] 李晓东, 谷丽维, 冉庆森, 等. 3 种桂枝汤苯丙烯酸类化合物对 ox-LDL 诱导人脑微血管内皮细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(12): 2315-2320.
- [15] 储佳佳, 李积东, 雷霆, 等. 柚皮苷对高糖诱导的血管内皮细胞损伤及 PI3K/AKT/eNOS 信号通路的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(4): 625-629.
- [16] 邓华菲, 李坚, 周琴, 等. PI3K/AKT/eNOS 信号通路在葛根素抑制 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞组织因子表达中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(7): 1214-1218.
- [17] 高妮妮, 王芳, 廉哲勋. PI3K-Akt-eNOS 信号通路在三磷酸腺苷后处理减轻兔心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. *中国循环杂志*, 2014, 29(1): 59-63.
- [18] 王佑权, 刘国文, 黄果, 等. 纳米细菌对人脐静脉内皮细胞的损伤及超氧化物歧化酶分泌的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(9): 899-903.

(此文编辑 文玉珊)