

## · 基础研究 ·

# 益气活血方对内毒素诱导内皮细胞炎症反应的干预作用

吴 鸿<sup>1,2</sup> 王新洲<sup>1</sup> 高水波<sup>1</sup> 雷 震<sup>1</sup> 高海霞<sup>1</sup> 韩勇军<sup>1</sup> 王振涛<sup>2</sup> 韩丽华<sup>2</sup>

**摘要 目的** 研究益气活血方对内毒素(lipopolysaccharide, LPS)诱导内皮细胞炎症反应的干预作用。**方法** 体外培养内皮细胞 EA.hy926, 设为空白对照组、LPS 组、益气活血方低剂量组、益气活血方高剂量组、辛伐他汀组、SB203580(p38 MAPK 抑制剂)组、SB203580 + 益气活血方组, 药物预处理 3 h 后加 LPS 刺激 12 h, 收集上清及细胞, ELISA 检测上清炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平, Western blot 检测黏附因子 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平及 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平。**结果** 与空白对照组比较, LPS 组 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 分泌水平以及 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平升高( $P < 0.01$ ), p38 MAPK 蛋白磷酸化水平亦明显升高( $P < 0.01$ ); 与 LPS 组比较, 益气活血方低、高剂量组、辛伐他汀组 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、VCAM-1、ICAM-1 表达水平以及 p38 MAPK 磷酸化水平明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 益气活血方组、SB203580 组以及益气活血方 + SB203580 组 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、VCAM-1、ICAM-1 表达水平及 p38 MAPK 磷酸化水平较 LPS 组均有明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 益气活血方 + SB203580 组与益气活血方组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 益气活血方通过抑制 p38 MAPK 活性发挥抗 LPS 诱导内皮细胞炎症反应之作用。

**关键词** 益气活血方; 内毒素; 内皮细胞; 炎症因子; 黏附因子

Effect of Yiqi Huoxue Formula on Inflammation Induced by Lipopolysaccharide in Endothelial Cells  
WU Hong<sup>1,2</sup>, WANG Xin-zhou<sup>1</sup>, GAO Shui-bo<sup>1</sup>, LEI Zhen<sup>1</sup>, GAO Hai-xia<sup>1</sup>, HAN Yong-jun<sup>1</sup>, WANG Zhen-tao<sup>2</sup>, and HAN Li-hua<sup>2</sup> 1 Laboratory of Cell Imaging, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450002); 2 Institute of Cardiovascular Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450002)

**ABSTRACT Objective** To study the effects of Yiqi Huoxue Formula (YQHX) on inflammatory responses induced by lipopolysaccharide (LPS) in endothelial cells. **Methods** Endothelial cells were cultured *in vitro* and divided into seven groups, including control group, LPS group, low-dose group of YQHX, high-dose group of YQHX, simvastatin group, SB203580 (p38 MAPK inhibitor) group, and SB203580 plus YQHX group. After pretreated with above chemicals for 3 h, LPS was added into endothelial cells and incubated for another 12 h, and supernatant and cells were collected, respectively. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 in the supernatant were detected using ELISA, and the expression of VCAM-1 and ICAM-1 as well as the phosphorylation level of p38 MAPK were determined using Western blot. **Results** The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, VCAM-1 and ICAM-1 in LPS group were higher than those in control group ( $P < 0.01$ ), and the phosphorylation level of p38 MAPK was also increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with the LPS group, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, VCAM-1, ICAM-1 and p38 MAPK phosphorylation were decreased in low-dose and high-dose group of YQHX group and simvastatin group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, VCAM-1 and ICAM-1 and the expression of p38 MAPK in SB203580 group and SB203580 plus YQHX group were also dramatically reduced

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81473453, 81673800); 河南省高校科技创新人才支持计划(No. 14HASTIT028); 河南省科技攻关项目(No. 142102310040)

作者单位: 1. 河南中医药大学细胞成像实验室(郑州 450002); 2. 河南中医药大学心血管病研究所(郑州 450002)

通讯作者: 高水波, Tel: 0371-60906297; E-mail: gaoshuibow@hactcm.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20181210.234

( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). There was no significant difference among groups of YQHX, SB203580 and SB203580 plus YQHX ( $P > 0.05$ ). Conclusion YQHX suppresses the inflammatory responses in endothelial cells induced by LPS by inhibiting the activity of p38 MAPK.

**KEYWORDS** Yiqi Huoxue Formula; lipopolysaccharide; endothelial cells; inflammatory factors; adhesion factor

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病等心血管疾病的重要病理基础<sup>[1,2]</sup>。有学者提出 AS 是一种慢性炎症反应<sup>[3,4]</sup>,越来越多的研究提示 AS 与血管内皮细胞受损后炎症因子表达紊乱密切相关<sup>[5,6]</sup>。细菌内毒素(lipopolysaccharide, LPS)具有极强的炎症反应启动作用,能激活内皮细胞,一方面引起肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-8 等细胞因子分泌量增加,放大炎症反应;另一方面导致细胞间黏附因子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞间黏附因子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)等黏附因子表达增强,细胞黏附性增加,引起淋巴细胞黏附,加速 AS 发生发展<sup>[1,5]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是细胞内参与细胞增殖、分化和凋亡等过程的信号分子,p38 MAPK 是 MAPK 家族成员之一,对细胞炎症反应具有重要的调节作用<sup>[7]</sup>。临床上用于防治心血管疾病的益气活血类方药具有益气活血、化瘀通络功效<sup>[8]</sup>,亦有抗 AS 作用<sup>[9]</sup>。本研究旨在观察益气活血方(黄芪、人参、赤芍、西红花)对内皮细胞炎症反应的干预作用。

## 材料与方法

**1 细胞** 人脐静脉内皮细胞株(EA.hy926)购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心(批号:GNHu39)。

**2 药物** 益气活血方组成(成人每天用量):黄芪 30 g 人参 15 g 赤芍 15 g 西红花 10 g。本研究所用复方颗粒剂由四川新绿药科技发展有限公司配方颗粒剂按益气活血方各单味中药比例配置而成。各个单味中药批号如下:黄芪(No. 17010092),人参(No. 17010055),赤芍(No. 16060138),红花(No. 16080067)。使用时称取复方颗粒剂 4 g,加生理盐水 10 mL,混匀后置 80 °C 水浴 10 min 使其充分溶解(pH 值为 7.4)。10 000 r/min 离心 5 min,离心后 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,4 °C 保存备用。

**3 主要试剂及仪器** DMEM 高糖培养基(以色列 BI 公司,批号:06-1055-57-1ACS);胎牛血清(以色列 BI 公司,批号:04-001-1ACS);胰蛋白酶(以色

列 BI 公司,批号:03-050-1ACS);细菌内毒素(lipopolysaccharide, LPS, 美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:L2880,加生理盐水配置储存液);辛伐他汀(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:S6196,加生理盐水配置储存液);p38 MAPK 抑制剂 SB203580(美国 Selleck Chemicals 公司,批号:S1076,加 DMSO 配置储存液);TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号:DTA00D);IL-6 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号:D6050);IL-8 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号:D8000C);BCA 蛋白定量试剂盒(武汉博士德生物公司,批号:AR1110);RIPA 裂解液(武汉博士德生物公司,批号:AR0102);SDS-PAGE 凝胶试剂盒(西安晶彩生物公司,批号:JC-PE022);ECL 发光液(美国赛默飞公司,批号:34580);抗 p-p38 MAPK 抗体(美国 CST 公司,批号:4631);抗 p38 MAPK 抗体(美国 CST 公司,批号:9212);抗 VCAM-1 抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab134047);抗 ICAM-1 抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab2213);抗 GAPDH 抗体(武汉三鹰生物公司,批号:60004-1-Ig);酶标羊抗鼠二抗(武汉三鹰生物公司,批号:SA00001-1);酶标羊抗兔二抗(武汉三鹰生物公司,批号:SA00001-2)。主要仪器:生物安全柜(美国赛默飞公司,型号 1384-A2);二氧化碳培养箱(美国赛默飞公司,型号 3111);酶标仪(美国赛默飞公司,型号 MULTISKAN FC);SDS-PAGE 凝胶系统(美国伯乐公司,型号 Mini-PROTEAN);半干转膜仪(美国伯乐公司,型号 Trans-Blot SD);Western blot 成像系统(美国伯乐公司,型号 ChemiDoc XRS+)。

**4 细胞培养及分组** 复苏 EA.hy926 细胞,接种于 25  $\text{cm}^2$  培养瓶,用含 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素和 100 U/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基于二氧化碳培养箱中培养。将生长状态良好的细胞按  $2 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔细胞板,贴壁生长 24 h 后进行分组。由于 MTT 结果提示益气活血方药物浓度  $\leq 1.25$  mg/mL 时无细胞毒性,故将 1.25 mg/mL 设定为高剂量组,其五分之一剂量即 0.25 mg/mL 为低剂量组。分为 5 组:空白对照组、LPS 组(25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、益气活血方低剂量组(0.25 mg/mL)、益气活血方高剂量组

(1.25 mg/mL)、辛伐他汀组(3  $\mu$ mol/L),观察益气活血方对 LPS 诱导的炎性因子、黏附因子表达的干预作用。并基于此筛选出益气活血方干预作用的最佳剂量为 1.25 mg/mL,以此浓度设置 5 组:空白对照组、LPS 组、益气活血方组、SB203580(p38 MAPK 抑制剂)组、益气活血方组 + SB203580 组,观察益气活血方对 p38 MAPK 信号通路活性的影响。除空白对照组和 LPS 组外,其余各组分别加入益气活血方、SB203580、益气活血方 + SB203580 或辛伐他汀预处理 3 h,然后加入 LPS 刺激 12 h,收集上清及细胞。

## 5 检测指标与方法

5.1 ELISA 法测定细胞上清炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平 参照 ELISA 试剂盒检测方法,细胞上清经 3 000 r/min 离心 10 min 后去除细胞碎片,将梯度浓度的目的蛋白标准品溶液和稀释后的细胞上清分别加入酶标板微孔中,经过目的蛋白结合、酶标抗 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 抗体结合等步骤后加入底物显色,终止显色,在酶标仪上读取各孔在 450 nm 处吸光值。根据吸光值和标准品孔浓度制作标准曲线,计算细胞上清目的蛋白浓度。重复 4 次。

5.2 Western blot 法检测细胞 VCAM-1、ICAM-1、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白表达水平 参照文献[10]方法,胰蛋白酶消化收集处理后的细胞,加入 RIPA 裂解液后震荡 5 min,BCA 法测定蛋白浓度。混入 loading buffer 后于沸水浴中煮 5 min,SDS-PAGE 凝胶电泳。用半干转法将蛋白转至 PVDF 膜,5%脱脂奶室温封闭 2 h。PVDF 膜加入抗 VCAM-1、ICAM-1、p38 MAPK、p-p38 MAPK 抗体溶液,于 37  $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,PBST 洗膜 5 次,加酶标羊抗鼠或兔二抗于 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBST 洗 5 次,置于 ECL 发光液中反应 3 min,用凝胶成像系统成像,Image J 软件分析条带灰度值。重复 3 次。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组细胞上清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平比较(表 1) 与空白对照组比较,LPS 组细胞上清炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平升高( $P < 0.01$ )。与 LPS 组比较,益气活血方低、高剂量组及辛伐他汀组 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。益气活血方高剂量组和辛伐他汀组对 TNF- $\alpha$ 、IL-6 分泌水平的抑制作用优于益气活血方低剂量组( $P < 0.05$ ),IL-8 分泌水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

2 各组细胞 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平比较(图 1) 与空白对照组比较,LPS 组细胞黏附因子 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平升高( $P < 0.01$ )。与 LPS 组比较,益气活血方低、高剂量组及辛伐他汀组 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。益气活血方高剂量组对 ICAM-1 蛋白表达水平的抑制作用强于益气活血方低剂量组( $P < 0.05$ ),其他各组间指标比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

3 p38 MAPK 抑制剂对 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平的影响(表 2) 与空白对照组比较,LPS 组细胞上清炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 分泌水平升高( $P < 0.01$ )。与 LPS 组比较,益气活血方组、SB203580 组以及益气活血方 + SB203580 组炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 分泌水平明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。益气活血方 + SB203580 组 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 分泌水平较益气活血方组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

4 p38 MAPK 抑制剂对 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平的影响(图 2) 与空白对照组比较,LPS 组细胞黏附因子 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平明显升高( $P < 0.01$ )。与 LPS 组比较,益气活血方组、SB203580 组以及益气活血方 + SB203580 组黏附因子 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平较 LPS 组明显下降( $P < 0.01$ ),但益气活血方 + SB203580 组 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平较益气活血方组无叠加作用( $P > 0.05$ )。

表 1 各组细胞上清炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平比较 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

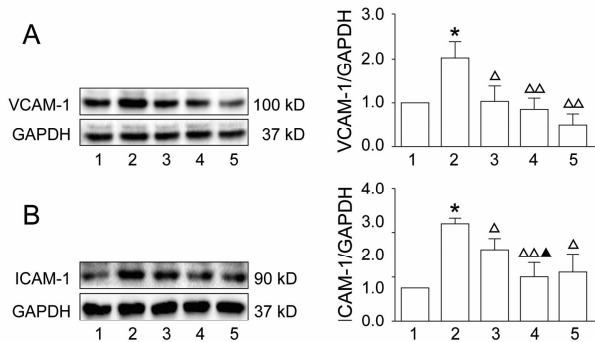
组别	n	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-8
空白对照	4	264.88 $\pm$ 25.91	171.10 $\pm$ 23.07	352.21 $\pm$ 44.76
LPS	4	964.24 $\pm$ 94.46 *	410.21 $\pm$ 28.06 *	861.01 $\pm$ 68.34 *
益气活血方低剂量	4	656.06 $\pm$ 116.83 $\Delta$	335.33 $\pm$ 35.02 $\Delta$	659.15 $\pm$ 84.00 $\Delta$
益气活血方高剂量	4	443.01 $\pm$ 81.08 $\Delta\Delta$	265.98 $\pm$ 28.18 $\Delta\Delta$	617.89 $\pm$ 60.54 $\Delta\Delta$
辛伐他汀	4	394.03 $\pm$ 36.45 $\Delta\Delta\Delta$	239.67 $\pm$ 18.92 $\Delta\Delta\Delta$	571.19 $\pm$ 52.99 $\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与益气活血方低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 p38 MAPK 抑制剂对 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平的影响 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

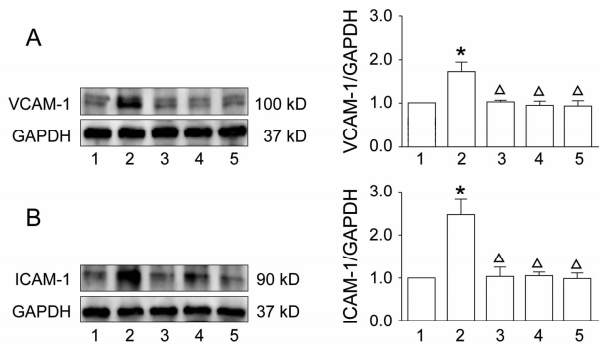
组别	n	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-8
空白对照	4	253.83 $\pm$ 55.01	189.00 $\pm$ 12.11	300.01 $\pm$ 32.32
LPS	4	1 021.14 $\pm$ 34.31 *	453.00 $\pm$ 35.02 *	751.01 $\pm$ 52.19 *
益气活血方	4	551.05 $\pm$ 95.00 $\Delta\Delta$	260.10 $\pm$ 43.33 $\Delta\Delta$	610.11 $\pm$ 63.00 $\Delta$
SB203580	4	481.02 $\pm$ 60.01 $\Delta\Delta$	231.00 $\pm$ 30.78 $\Delta\Delta$	501.83 $\pm$ 20.14 $\Delta\Delta$
益气活血方 + SB203580	4	410.03 $\pm$ 57.00 $\Delta\Delta$	212.01 $\pm$ 22.04 $\Delta\Delta$	511.12 $\pm$ 32.66 $\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$



注:A 为各组 VCAM-1 蛋白表达水平;B 为各组 ICAM-1 蛋白表达水平;1 为空白对照组;2 为 LPS 组;3 为益气活血方低剂量组;4 为益气活血方高剂量组;5 为辛伐他汀组;与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与益气活血方低剂量组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ ;  $n = 3$

图 1 各组细胞黏附因子 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平比较

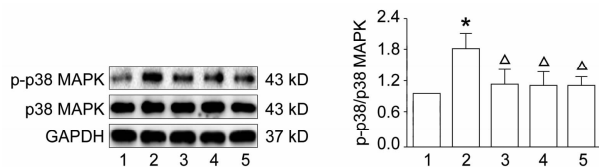


注:A 为 VCAM-1 蛋白表达水平; B 为 ICAM-1 蛋白表达水平; 1 为空白对照组; 2 为 LPS 组; 3 为益气活血方组; 4 为 SB203580 组; 5 为益气活血方 + SB203580 组; 与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较,  $\Delta P < 0.01$ ;  $n = 3$

图 2 p38 MAPK 抑制剂对 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平的影响

5 各组 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平比较(图 3)与空白组比较,LPS 组 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平明显升高( $P < 0.01$ ),各个药物干预组(益气活血方组、SB203580 组、益气活血方 + SB203580 组) p38MAPK 蛋白磷酸化水平明显低于 LPS 组( $P < 0.05$ )。益气活血方 + SB203580 组 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平较益气活血方组差异无统计学意义

( $P > 0.05$ ),益气活血方和 SB203580 对 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平的抑制作用无叠加效应。



注:1 为空白对照组;2 为 LPS 组;3 为益气活血方组;4 为 SB203580 组;5 为益气活血方 + SB203580 组;与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ;与 LPS 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ;  $n = 3$

图 3 各组细胞 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平比较

## 讨 论

AS 是心血管疾病的主要病因,其发病机理尚未完全阐明。血管损伤后白细胞集聚引起的慢性炎症反应是 AS 的主要病理特点,并伴随 AS 发生发展的各个阶段。研究表明,炎症反应在 AS 形成发展过程中起重要作用<sup>[6,11]</sup>。随着炎症反应进展,血管内皮细胞表达多种炎性因子<sup>[12]</sup>、黏附因子<sup>[13]</sup>,进一步加重炎症反应。本实验结果提示,LPS 诱导 EA.hy926 细胞炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 分泌水平及黏附因子 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平明显升高。

AS 炎症反应由多种信号通路介导<sup>[14]</sup>。p38 MAPK 信号通路是真核细胞内重要的通路信号,在未活化状态时主要存在于胞浆,当细胞周围环境改变或机体受到损伤时,其丝氨酸/苏氨酸残基发生磷酸化,并迅速转运至核内与靶基因结合,调控蛋白表达水平,从而参与体内多种生理反应的调控<sup>[15]</sup>。研究表明,p38 MAPK 信号通路在致炎因子诱导内皮细胞炎症反应过程中起到了连接上下游分子的作用<sup>[7]</sup>。同时,p38 MAPK 被认为是巨噬细胞活化调节器,是调控 AS 炎症的一个潜在靶点<sup>[7]</sup>。一些抗 AS 的药物如他汀类药物具有抗炎作用<sup>[16]</sup>,抗炎治疗成为防治 AS 的潜在治疗方向<sup>[17,18]</sup>。目前各个研究小组报道的益气活血类药物虽然组成药物不尽相同,但临床上治疗冠心病或 AS 作用显著<sup>[19,20]</sup>,可有效抑制高糖、致炎因子等病理因素引起的内皮细胞炎症,降低炎性因子、黏

附因子表达水平,起到保护内皮细胞作用<sup>[21,22]</sup>。然而,具有抗炎作用的益气活血类方药是否作用于 p38 MAPK 信号通路发挥抗炎作用鲜有文献报道。

实验结果表明,益气活血方显著抑制 LPS 诱导的 EA.hy926 细胞炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 分泌水平以及黏附因子 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平,发挥抗内皮细胞炎症作用。同时,益气活血方可抑制 LPS 诱导的 p38 MAPK 磷酸化水平升高,p38 MAPK 信号通路抑制剂 SB203580 亦抑制了 p38 MAPK 活性,但联合应用益气活血方和 SB203580 并未进一步降低 p38 MAPK 磷酸化水平,即联合应用益气活血方和 SB203580 较单用益气活血方对 p38 MAPK 磷酸化水平的抑制作用没有呈现叠加效应,提示 p38 MAPK 信号通路是益气活血方的潜在作用靶点。以上生物学作用是否与药物的细胞毒性有关呢?课题组用 MTT 法筛选了中药复方水溶液作用于 EA.hy926 细胞的安全剂量,以排除药物细胞毒性对实验结果的影响,结果提示益气活血方药物浓度  $\leq 1.25$  mg/mL 时,其无细胞毒性。由于中药复方水溶液 pH 值为 7.4,提示中药发挥作用的是其生物学作用而不是物理作用。与本研究所用中药复方同属益气活血类方药的“通心络”亦对致炎因子引起的内皮细胞炎症有抑制作用,减少炎性因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的分泌和降低黏附因子 ICAM-1 的表达<sup>[23,24]</sup>。一些益气活血类中药单体如黄芪甲苷、丹参酮 IIA 等也有类似保护内皮的作用<sup>[25,26]</sup>,这些研究结果进一步证实了该类中药治疗冠心病或 AS 的临床价值。与本研究不同的是近年对益气活血类方药或单体抗内皮炎症、抗 AS 作用靶点的研究主要集中在 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[23,25,27]</sup>,而对 p38 MAPK 信号通路的干预作用研究较少。

本研究所用益气活血方是笔者所在课题组韩丽华教授拟定的中药复方,由黄芪、人参、赤芍、西红花组成,临床用于治疗胸痹心痛气虚血瘀型患者,疗效确切<sup>[28]</sup>。韩丽华教授认为,胸痹心痛多从气虚血瘀论治,其成因不外乎两种:其一,久病气血亏损,元气耗伤,心脉不荣而痛,或气虚运血无力,血流不畅,心脉瘀滞,不通而痛。其二,中老年人本身生理性衰老。“年四十而阴气半,起居衰矣”,中老年人年过半百,肾气渐衰,引起心气不足,心气不足则不能助心行血而致心脉瘀滞。以上诸因素相合,在病理上形成正气虚于内、血瘀阻于里的正虚邪实病机。有文献表明,气虚血瘀证是 AS 人群普遍存在的证候基础<sup>[29,30]</sup>,为益气活血方治疗 AS 相关疾病提供了现代医学方面的理解依据。本实验结果从 p38 MAPK 信号通路途径揭示了

益气活血方的干预效应,为临床中西医结合治疗 AS 相关疾病提供理论支持。

临床医家治疗心血管疾病(气虚血瘀型)实践中,以益气活血治法为指导,遣方用药、药味、用量不尽相同。笔者所在课题组从事益气活血方的基础与临床研究工作十余年,最初从事基础研究时,益气活血方选取了黄芪、人参、黄精、赤芍、西红花等 5 味药物,而且有数篇论文发表<sup>[31-35]</sup>。对于基础研究应该保持药物组成及用量的一致性,但随着研究的深入开展,课题组发现去掉“黄精”这味中药并不影响益气活血方的总体作用效果,“黄芪、人参”能够体现“益气”治法,“赤芍、红花”能够体现“活血”治法,减少 1 味“黄精”后组方原则并未改变。而减少药物更有利于中药复方的基础研究,尤其是中药复方的物质基础研究。基于以上考虑,在近几年的基础研究中,课题组将益气活血方组成调整为黄芪、人参、赤芍、西红花 4 味药物<sup>[36-38]</sup>。

综上所述,益气活血方降低 LPS 诱导的炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 分泌水平及黏附因子 VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达水平,其作用与抑制 p38 MAPK 信号通路活性相关。当然,这仅仅是益气活血方保护内皮细胞、抗 AS 的作用机制之一,对于益气活血方中的药物活性物质是什么、其与 p38 MAPK 信号通路如何相互作用等问题有待进一步研究。

利益冲突:无。

## 参 考 文 献

- [1] Barton M. Mechanisms and therapy of atherosclerosis and its clinical complications [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(2): 149 - 153.
- [2] Prandoni P, Ciammaichella M, Mumoli N, et al. An association between residual vein thrombosis and subclinical atherosclerosis: Cross-sectional study [J]. *Thromb Res*, 2017, 157(9): 16 - 19.
- [3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis—an update [J]. *N Engl J Med*, 1986, 314(8): 488 - 500.
- [4] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115 - 126.
- [5] Biessen EAL, Wouters K. Macrophage complexity in human atherosclerosis: Opportunities for treatment? [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2017, 28(5): 419 - 426.
- [6] Cochain C, Zerneck A. Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(3-4): 485 - 499.
- [7] Rajamäki K, Mäyränpää MI, Risco A, et al. p38 $\delta$  mapk: A novel regulator of NLRP3 inflammasome activation with increased expression in coronary atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Bi-*

- ol, 2016, 36(9): 1937-1946.
- [8] 赵爱梅, 任钧国, 刘建勋. 益气活血方治疗冠心病气虚血瘀证作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 215-220.
- [9] 钟伟, 王永刚, 于远望, 等. 活血化瘀类中药防治颈动脉粥样硬化的临床研究进展[J]. 中医药学报, 2017, 45(2): 119-121.
- [10] 王振冉, 李扬, 唐博. 山姜素对肺微血管内皮细胞损伤保护机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(4): 476-479.
- [11] Lawal AO. Air particulate matter induced oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease and atherosclerosis: The role of Nrf2 and AhR-mediated pathways[J]. Toxicol Lett, 2017, 270(3): 88-95.
- [12] Krayem I, Bazzi S, Karam M. The combination of CRP isoforms with oxLDL decreases INF- $\alpha$  and IF-6 release by U937-derived macrophages[J]. Biomed Rep, 2017, 7(3): 272-276.
- [13] Khodabandehlou K, Masehi-Lano JJ, Poon C, et al. Targeting cell adhesion molecules with nanoparticles using *in vivo* and flow-based *in vitro* models of atherosclerosis[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2017, 242(8): 799-812.
- [14] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2015, 36(2): 141-152.
- [15] Corre I, Paris F, Huot J. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(33): 55684-55714.
- [16] Diamantis E, Kyriakos G, Quiles-Sanchez LV, et al. The anti-inflammatory effects of statins on coronary artery disease: An updated review of the literature[J]. Curr Cardiol Rev, 2017, 13(3): 209-216.
- [17] Fredman G, Tabas I. Boosting inflammation resolution in atherosclerosis: The next frontier for therapy[J]. Am J Pathol, 2017, 187(6): 1211-1221.
- [18] Li B, Li W, Li X, et al. Inflammation: A novel therapeutic target/direction in atherosclerosis[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(8): 1216-1227.
- [19] 杜文婷, 明冠, 刘萍, 等. 益气活血、通阳泄浊方对冠心病慢性心力衰竭伴颈动脉斑块患者的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(11): 1322-1325.
- [20] 王筠, 张晓云, 侯维维, 等. 益气活血散治疗颈动脉粥样硬化的临床疗效[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(12): 2558-2560.
- [21] 王芹, 申国明, 王浩, 等. 益气活血通络方对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞炎症因子表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(5): 65-69.
- [22] 王铭铭, 薛梅, 杨琳, 等. 益气活血中药配伍双联抗血小板药物对人脐静脉内皮细胞损伤和内皮血小板黏附的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(7): 842-848.
- [23] Wu XL, Zheng B, Jin LS, et al. Chinese medicine Tongxinluo reduces atherosclerotic lesion by attenuating oxidative stress and inflammation in microvascular endothelial cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6): 6323-6333.
- [24] 位庚, 申瑞霞, 李创, 等. 通心络对同型半胱氨酸诱导大鼠心肌微血管内皮细胞炎症损伤的保护作用[J]. 医学动物防制, 2018, 34(6): 562-565, 569.
- [25] 战云, 张英杰, 冷彬. 黄芪甲苷通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路改善脂多糖诱导的急性血管内皮损伤[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3): 77-80.
- [26] Zhu J, Xu Y, Ren G, et al. Tanshinone IIA Sodium sulfonate regulates antioxidant system, inflammation, and endothelial dysfunction in atherosclerosis by downregulation of CLIC1[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 815(11): 427-436.
- [27] Cheng L, Pan GF, Zhang XD, et al. Yindanxinnaotong, a Chinese compound medicine, synergistically attenuates atherosclerosis progress[J]. Sci Rep, 2015, 5(12333): 12333.
- [28] 陈爱莲, 韩丽华, 董晓瑞, 等. 益气活血方治疗不稳定型心绞痛 30 例[J]. 河南中医, 2006, 26(12): 34-35.
- [29] 梁煜, 林代华, 王清. 气虚血瘀是冠心病的病机关键释义[J]. 中华中医药学刊, 2003, 21(4): 588, 599.
- [30] 邵致格, 胡曼菁, 王长松, 等. 现代人群的体质病理学特征: 气虚血瘀[J]. 医学与哲学, 2005, 26(4): 74-75.
- [31] 韩丽华, 吴鸿, 王振涛, 等. 益气活血方对心梗后大鼠血小板聚集率和 APTT、PT、TT 的影响[J]. 江苏中医药, 2005, 26(1): 55-56.
- [32] 韩丽华, 王振涛, 吴鸿, 等. 益气活血方对心梗后左室重构大鼠血 PC III、TNF- $\alpha$ 、ET-1 的影响[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(9): 50-52.
- [33] 张会超, 韩丽华, 王振涛, 等. 益气活血方对心梗后左室重构大鼠心肌基质金属蛋白酶-2、转化生长因子- $\beta_1$  的影响[J]. 中成药, 2010, 32(11): 1871-1874.
- [34] 韩丽华, 王振涛, 索红亮, 等. 益气活血方对大鼠缺血心肌血管新生及缺血心肌局部胰岛素样生长因子-1 表达的影响[J]. 中医杂志, 2007, 48(3): 262-264.
- [35] 韩丽华, 王振涛, 索红亮, 等. 益气活血方促心梗后大鼠缺血心肌血管新生及对 VEGF-B 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(4): 263-265.
- [36] 吴鸿, 王新洲, 高水波, 等. 益气活血方对凝血酶诱导内皮细胞促血栓因子表达的影响[J]. 中医学报, 2017, 32(9): 1683-1685.
- [37] 吴鸿, 雷震, 高水波, 等. 益气活血方联合 PI3K 抑制剂 Wortmannin 对血小板聚集率的影响[J]. 中医学报, 2018, 33(11): 2151-2155.
- [38] Wu H, Gao HX, Gao SB, et al. A Chinese 4-herb formula, Yiqi-Huoxue granule, alleviates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis by upregulating uncoupling protein 2 in H9c2 cells[J]. Phytomedicine, 2019, 53(2): 171-181.