

冠心止痛胶囊阻断 MAPK 信号通路改善棕榈酸诱导血管内皮细胞损伤的研究

王晓丽¹, 邵静^{2*}, 吴冠信², 张薇¹, 周红艳¹, 李开言¹, 孙为¹

(1. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000)

[摘要] 为了研究冠心止痛胶囊(GXZT)对血管内皮细胞脂毒性损伤的影响,探索 GXZT 防治动脉粥样硬化可能的作用机制,该实验用棕榈酸(palmitic acid, PA)刺激人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)复制脂毒性损伤模型,将细胞分为正常对照组(NC, 15%正常血清)、模型组(PA, 0.6 mmol·L⁻¹ PA+15%正常血清)、GXZT 高剂量组(GXZT-H, 0.6 mmol·L⁻¹ PA+15% GXZT 血清)、中剂量组(GXZT-M, 0.6 mmol·L⁻¹ PA+10% GXZT 血清+5%正常血清)和低剂量组(GXZT-L, 0.6 mmol·L⁻¹ PA+5% GXZT 血清+10%正常血清)。用 CCK-8 法检测不同组 HUVEC 的细胞活力,流式细胞术检测细胞凋亡,JC-1 荧光探针标记后用激光共聚焦显微镜检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP),Western blot 检测丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路关键蛋白 p38、ERK1/2、JNK1/2 总蛋白和磷酸化蛋白表达,并计算蛋白的磷酸化水平。实验结果显示,与 NC 组相比,PA 组的细胞活力和 MMP 显著降低($P<0.01$, $P<0.01$),细胞凋亡率显著增加($P<0.01$),MAPK 信号通路 p38、ERK1/2、JNK1/2 的磷酸化水平显著增加($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$)。与 PA 组相比,GXZT-H、GXZT-M、GXZT-L 的细胞活力和 MMP 均显著升高($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$),细胞凋亡率显著降低($P<0.01$),p38、ERK1/2、JNK1/2 MAPK 信号通路的磷酸化蛋白表达减少,磷酸化水平显著降低($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$)。综上所述,GXZT 3 个剂量组均可改善 PA 诱导的 HUVEC 脂毒性损伤,其机制可能是通过阻断 MAPK 信号通路减少内皮细胞凋亡而发挥作用。

[关键词] 冠心止痛胶囊; 人脐静脉内皮细胞; 棕榈酸; MAPK 信号通路; 动脉粥样硬化

Guanxin Zhitong Capsules attenuate human endothelial cell damage induced by palmitic acid via MAPK signaling pathway

WANG Xiao-li¹, SHAO Jing^{2*}, WU Guan-xin², ZHANG Wei¹, ZHOU Hong-yan¹, LI Kai-yan¹, SUN Wei¹

(1. Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China; 2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] The present study observed the effect of Guanxin Zhitong Capsules (GXZT) on the lipotoxicity of vascular endothelial cells and investigated the mechanism of GXZT in atherosclerosis treatment. The lipotoxicity model in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was induced by palmitic acid (PA) stimulation. These cells were divided into a normal control group (NC, 15% normal serum), a model group (PA, 0.6 mmol·L⁻¹ PA+15% normal serum), a high-dose GXZT group (GXZT-H, 0.6 mmol·L⁻¹ PA+15% GXZT-medicated serum), a medium-dose GXZT group (GXZT-M, 0.6 mmol·L⁻¹ PA+10% GXZT-medicated serum+5% normal serum) and a low-dose GXZT group (GXZT-L, 0.6 mmol·L⁻¹ PA+5% GXZT-medicated serum+10% normal serum). HUVECs were detected for cell viability by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, apoptosis by flow cytometry, mitochondrial membrane potential (MMP) by JC-1 labeled laser scanning confocal microscopy, and total and phosphorylated proteins of p38, ERK1/2, and

[收稿日期] 2021-05-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81641147); 河南省中医药科学研究专项课题(2017ZY2004, 2018ZY2124)

[通信作者] * 邵静, 主任医师, 主要从事老年心血管疾病的中医药防治和研究, E-mail: shaojing1390@163.com

[作者简介] 王晓丽, 助理研究员, E-mail: zz_2008@163.com

JNK1/2 in the mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathway by Western blot. The phosphorylated level was calculated. Compared with the NC group, the PA group showed decreased cell viability and MMP ($P<0.01$, $P<0.01$), elevated apoptosis ($P<0.01$), and up-regulated phosphorylated levels of p38, ERK1/2, and JNK1/2 ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$). Compared with the PA group, the GXZT-H, GXZT-M, and GXZT-L groups showed increased cell viability and MMP ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$), reduced apoptosis ($P<0.01$), and down-regulated protein expression and phosphorylated levels of p38, ERK1/2 and JNK1/2 in the MAPK signaling pathway ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$). In conclusion, the results suggest that GXZT functions via blocking MAPK signaling pathway to relieve the damage of HUVECs induced by PA.

[Key words] Guanxin Zhitong Capsules; human umbilical vein endothelial cells; palmitic acid; MAPK signaling pathway; atherosclerosis

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20210726.701

全世界每年超过 1 700 万人死于心血管病 (cardiovascular disease, CVD), 占总死亡人数近 1/3, 在中、低收入国家情形尤为严重^[1]。中国防治 CVD 工作取得很大成绩, 但由于居民关于 CVD 的危险因素增多, 近年来 CVD 发病率和死亡率仍持续增长^[2]。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是 CVD 共同的病理基础, 是致死的首要原因, AS 与高血脂、氧化应激、低水平非反应性炎症密切相关, 高血脂是 AS 的独立高危因素。饱和脂肪酸属于前促炎类型, 与短链、中链脂肪酸相比, 长链脂肪酸是 CVD 发生因素中更大的风险^[3-5]。随着饮食习惯的改变, 血浆游离脂肪酸水平增加的趋势愈加严重, 严重危害血管内皮细胞功能, 血管内皮细胞功能失调是 AS 的始动环节, 加剧 AS 发展进程。尽管科学家们对 AS 的认识逐渐增加, 但 AS 具有的多重风险因素及复杂发病机制使得该病的防治仍然面临严峻的挑战。

AS 属于中医学“胸痹”“中风”等范畴, 病理因素主要为“痰、浊、瘀、毒”, 中医疗法丰富, 内科治法包括补肾活血、活血化瘀、清热解毒、健脾化痰、祛瘀化痰等。中药防治 AS 具有多靶点、多通道等优点, 通过改善内皮细胞功能、干预炎症反应、重构血管和微循环、抑制氧化应激, 达到稳定易损斑块、延缓 AS 进程的效果^[6-8]。

冠心痛胶囊 (简称 GXZT) 系河南省中医药研究院医院制剂, 由瓜蒌、半夏、蒲黄、五灵脂、红花、赤芍、川芎、桂枝、紫苏梗、山楂、薤白、甘草组成, 用于治疗冠心病心绞痛及慢性冠状动脉供血不足, 临床疗效良好。本实验室前期研究发现 GXZT 可改善动脉粥样硬化大鼠的脂质代谢、减轻炎症反应^[9], 减轻过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 损伤^[10], 然而还不清楚 GXZT 对棕榈酸所致内皮细胞脂质损伤的

影响及可能的作用机制。本实验用棕榈酸 (palmitic acid, PA) 刺激 HUVEC 复制内皮细胞脂毒性损伤模型, 通过检测 GXZT 对 PA 损伤的 HUVEC 细胞活力、凋亡、线粒体膜电位及 MAPK 信号通路的影响, 为临床应用提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 动物和细胞 选用健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 体质量 (250±10) g, 购自辽宁长生生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (辽) 2015-0003。于河南省中医药研究院实验动物中心适应性饲养 5 d 后用于实验, 实验内容符合动物实验伦理标准, 得到了河南省中医药研究院动物实验伦理委员会的批准, 伦理审核编号 HNTCMDW-20200408。

人脐静脉内皮细胞, 由河南省中医药研究院中药所保存。

1.2 受试药和试剂 冠心痛胶囊, 批准文号豫药制字 Z20121056, 批号 20190501。

DMEM 改良型培养基 (广州赛库生物技术有限公司, 批号 L430826); 胎牛血清 (美国 ThermoFisher 公司, 批号 42F0266K); 胰酶 (德国 Biofroxx 公司, 批号 EZ6688C183); 棕榈酸 (美国 Sigma 公司, 批号 SLCF9094); CCK8、BSA、PVDF 膜、超敏 ECL 发光试剂盒 (博士德生物工程有限公司, 批号 15G20B60、15K25C06、15125C36、15H03A72); Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, 批号 A00621); JC-1 (美国 ThermoFisher 公司, 批号 1724796); 蛋白磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、30% 制胶液、SDS-PAGE 分离胶、浓缩胶缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 20201226、20201130、20210104、20201217、20201128); Western 及 IP 细胞裂解液、蛋白相对分子质量标准 (北京碧云天生物技术有限公司, 批号 092120201201、

110520210108);BCA 蛋白定量试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司,批号 CW0014S);p-p38、p38、p-ERK、ERK、p-JNK、JNK 兔多克隆抗体(美国 CST 公司,批号 13、9、24、28、15、18);HRP 标记羊抗兔二抗(爱必信生物科技有限公司,批号 AS008);GAPDH 小鼠单克隆抗体、HRP 标记羊抗小鼠二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 10017731、20000242)。

1.3 仪器 HF160W 型 CO₂ 培养箱(上海力申科学仪器有限公司);Synergy Neo 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);NAVIOS 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 有限公司);Ti2-E 型激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 有限公司);DYY-7C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);FluorChem R 型凝胶成像系统(美国 Proteinsimple 公司);2K15 型冷冻离心机(德国 Sigma 公司);CKX53 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 配制含 10%胎牛血清的 DMEM 改良型培养基,并加入链霉素和青霉素,复苏低温下保存的 HUVEC,于 37 °C、5%CO₂、饱和湿度条件下培养,细胞呈集落样生长,细胞用 0.25%胰酶+0.53 mmol·L⁻¹ EDTA 消化后传代,传代 3 次后开始实验。

2.2 制备含药血清 将 SD 大鼠随机分为正常组、GXZT 组(3.0 g·kg⁻¹·d⁻¹,5 倍临床等效剂量),每组 10 只。取冠心止痛胶囊内容物用蒸馏水配成混悬液,大鼠灌胃给药,给药体积 10 mL·kg⁻¹,正常组给予等体积蒸馏水,连续给药 5 d,每天给药 1 次。末次给药后 2 h,用戊巴比妥钠麻醉大鼠,经腹主动脉取血。血样于 4 °C 放置 4 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血清,同一组大鼠的血清混在一起,0.22 μm 过滤除菌,分装冻存备用。

2.3 CCK-8 法检测 GXZT 对 HUVEC 细胞活力的影响 选取对数生长期的 HUVEC 细胞,收集细胞用培养液重悬,接种到 96 孔板中,细胞密度 5×10⁴ 个/mL,每孔 100 μL,实验结束前,弃上清,每孔加入 100 μL 新鲜的无血清培养基和 10 μL CCK-8 溶液,在细胞培养箱中继续孵育 2 h。用多功能酶标仪在测定波长 450 nm、参考波长 650 nm 下进行双波长测定,计算细胞活力=各组吸光度/正常对照组吸光度×100%。

将 HUVEC 细胞接种到 96 孔板中,过夜后细胞

贴壁,将细胞分为正常对照组(NC 组,15%正常血清)、GXZT 高剂量组(GXZT-H 组,15% GXZT 血清)、GXZT 中剂量组(GXZT-M 组,10% GXZT 血清+5%正常血清)、GXZT 低剂量组(GXZT-L 组,5% GXZT 血清+10%正常血清),每组设 6 个复孔,培养箱中孵育 24 h 后加入 CCK-8 检测液,用酶标仪测定吸光度,计算细胞活力。

2.4 CCK-8 法检测棕榈酸对 HUVEC 活力的影响

精密称取棕榈酸(PA),加入 0.1 mol·L⁻¹ NaOH,56 °C 水浴中溶解得到 0.1 mol·L⁻¹ PA 母液。用 PBS 配成 10% BSA 溶液,0.3 mL 0.1 mol·L⁻¹ 的 PA 加入到 5.7 mL 10% BSA 中,溶解后 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,得到 5 mmol·L⁻¹ 的 PA 储备液,造模前用培养基稀释成相应的浓度。将细胞接种到 96 孔板中,待细胞贴壁后,将细胞分为 NC 组和不同浓度的 PA 组(0.2、0.4、0.6、0.8 mmol·L⁻¹)。各组细胞均用含 15%正常血清的培养基培养,24 h 后加入 CCK-8 检测液,37 °C 孵育 2 h 后用酶标仪测定各孔细胞的吸光度,计算细胞活力,选择合适的造模浓度。

2.5 CCK-8 法检测 GXZT 对 PA 所致 HUVEC 损伤的影响 细胞接种到 96 孔板中,将贴壁后的细胞分为 NC 组、PA 组、GXZT-H 组、GXZT-M 组、GXZT-L 组,除 NC 组外,其余各组培养基中含 0.6 mol·L⁻¹ PA。药物、造模液与细胞作用 24 h 后,用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力,计算 GXZT 提高 PA 损伤 HUVEC 活力,活力=(A_{GXZT组}-A_{PA组})/A_{PA组}×100%。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞均匀接种到 6 孔板中,细胞接种密度 1.5×10⁵ 个/mL,2 mL/孔,细胞分组和处理方法同 2.5 项,24 h 后收集细胞,用预冷 PBS 离心洗涤 2 次,弃上清,加入预冷 binding buffer 重悬,每份样本加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,轻轻涡旋混匀后室温避光孵育 5 min。选用流式细胞仪的 FITC 和 PI 相应通道检测荧光强度,用 Kaluza 软件分析各组细胞的凋亡情况。

2.7 激光共聚焦显微镜检测线粒体膜电位(MMP)

将细胞接种到激光共聚焦专用 24 孔板中,细胞接种密度为 6×10⁴ 个/mL,0.5 mL/孔,细胞分组和处理方法同 2.5 项。JC-1 荧光探针用 DMSO 充分溶解后用培养基稀释至 10 μg·mL⁻¹,细胞造模给药 24 h 后弃去培养基,加入 JC-1 于 37 °C 孵育 20 min。用 PBS 轻柔洗 2 次去掉残余染料,加入 0.5 mL PBS,

在激光共聚焦显微镜明场下观察细胞状态,用红色荧光检测 JC-1 聚合物,绿色荧光检测 JC-1 单体,分析每张图的平均荧光强度,计算 MMP, $MMP = \text{红色平均荧光强度} / \text{绿色平均荧光强度}$,比较各组细胞的线粒体膜电位去极化程度。

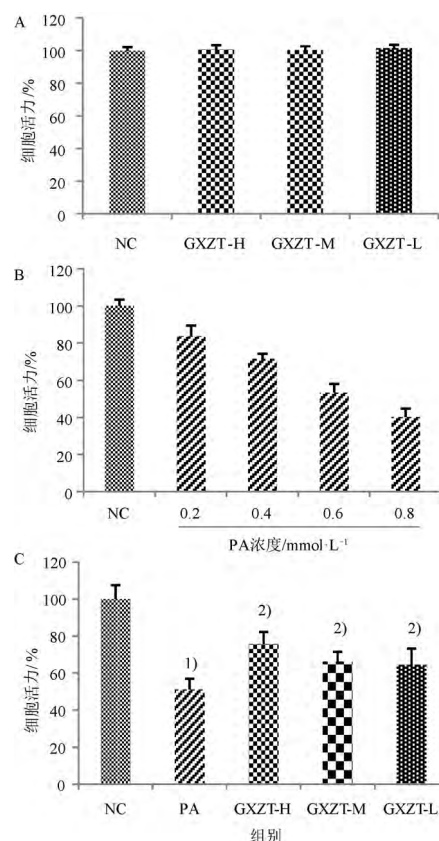
2.8 Western blot 检测 MAPK 信号通路 p38、ERK1/2、JNK1/2 蛋白的磷酸化水平 将细胞接种到 6 孔板中,细胞接种密度 1.5×10^5 个/mL,每孔 2 mL,细胞分组和处理方法同 2.6 项。细胞裂解液中加入 PMSF、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂配成蛋白提取液,培养板去除培养基后,将细胞用 PBS 洗 1 次,吸净残留液,加入蛋白提取液 120 μL /孔,充分裂解后用细胞刮刀收集细胞,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ $13\ 500 \times g$ 离心 5 min,取上清液用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白加入 loading buffer 经 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 min,用 SDS-PAGE 胶进行电泳分离,再将蛋白电转移到 PVDF 膜上,用 5% BSA 常温封闭蛋白 1 h,PVDF 膜分别用的 p-p38(1:1 000)、p38(1:1 000)、p-ERK(1:2 000)、ERK(1:1 000)、p-JNK(1:1 000)、JNK(1:1 000)兔多克隆抗体(用 5%BSA 配制抗体) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,再用 TBST 洗 3 次,每次 8 min。室温下用 HRP 标记的羊抗兔二抗孵育 1 h,TBST 洗 3 次 $\times 8\text{ min}$,加入超敏 ECL 化学发光底物,在凝胶成像系统中显影。PVDF 膜用 TBST 清洗 3 次 $\times 8\text{ min}$ 后,再加入 GAPDH 小鼠单克隆抗体(1:16 000)室温孵育 1 h,TBST 清洗后再加入 HRP 标记羊抗小鼠二抗室温孵育 1 h,TBST 清洗后加入 ECL 发光液显影。用 AlphaView SA 软件分析各条带的灰度值,计算蛋白的磷酸化水平,蛋白磷酸化水平 = (磷酸化蛋白灰度值/GAPDH 灰度值)/(总蛋白灰度值/GAPDH 灰度值) $\times 100\%$ 。

2.9 统计分析 用 SPSS 19.0 分析所有实验结果,用 $\bar{x} \pm s$ 描述结果,数据经检验符合正态性分布和方差齐性,用单因素方差分析(ANOVA)比较多组之间均数,各组之间的两两比较用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 GXZT 对 HUVEC 细胞活力的影响 GXZT 对 HUVEC 的增殖没有明显影响(图 1A)。与 NC 组相比,随着 PA 刺激 HUVEC 细胞的剂量增大,细胞活力逐渐下降,0.2、0.4、0.6、0.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PA 组细胞活力分别为 83.7%、71.6%、53.4%、40.2%,本次

实验选择 $0.6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PA 为合适的浓度(图 1B)。与 NC 组相比,HUVEC 经 PA 刺激后,细胞活性显著降低($P < 0.01$)。与 PA 组($0.6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比,GXZT-H、GXZT-M、GXZT-L 组细胞活力均显著提高($P < 0.01$),分别提高细胞活力 48%、20%、26%(图 1C)。



A. GXZT 对 HUVEC 细胞活力的影响;B. PA 对 HUVEC 细胞活力的影响;C. GXZT 对 PA 损伤 HUVEC 细胞活力的影响;NC: 正常对照组(15%正常血清);GXZT-H. 冠心痛胶囊高剂量组(15%冠心痛胶囊血清);GXZT-M. 冠心痛胶囊中剂量组(10%冠心痛胶囊血清+5%正常血清);GXZT-L. 冠心痛胶囊低剂量组(5%冠心痛胶囊血清+10%正常血清);与 NC 组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 PA 组比较²⁾ $P < 0.01$ (图 2~4 同)。

图 1 GXZT 对 HUVEC 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of Guanxin Zhitong Capsules on cell survival rate in human umbilical vein endothelial cells($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 GXZT 对 HUVEC 凋亡的影响 与 NC 组相比,PA 组细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$);与 PA 组相比,GXZT-H、GXZT-M 和 GXZT-L 组的细胞凋亡率均显著降低($P < 0.01$),随着 GXZT 浓度增大凋亡率减小(图 2)。

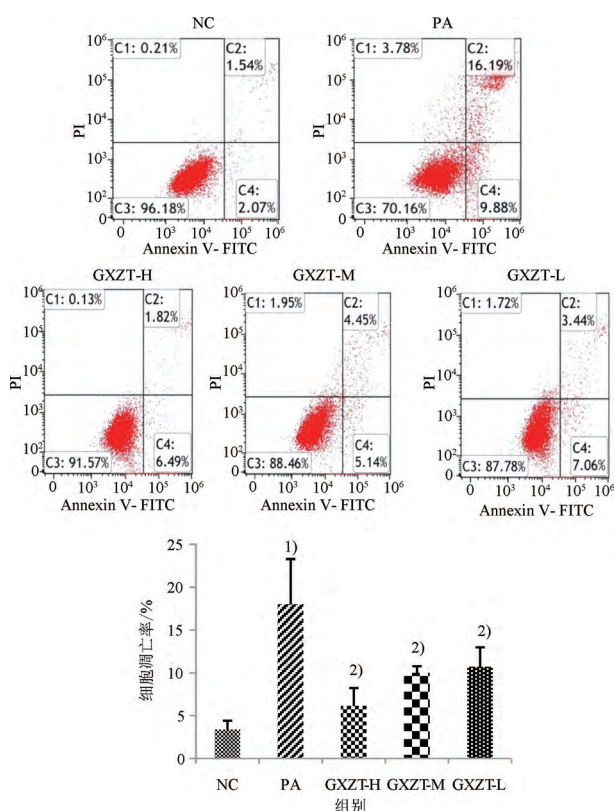
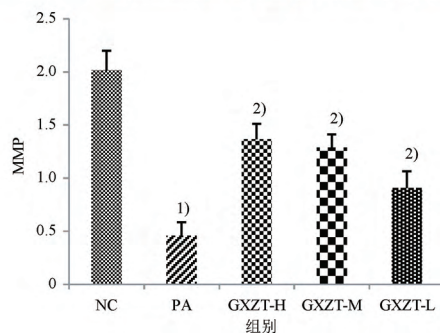
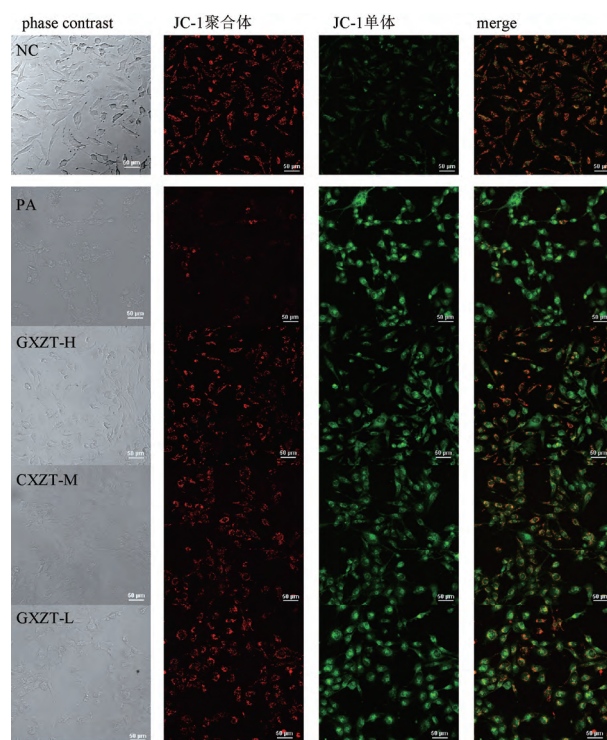


图2 GXZT对HUVEC凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Fig. 2 Effect of Guanxin Zhitong Capsules on apoptosis in human umbilical vein endothelial cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.3 GXZT对HUVEC线粒体膜电位的影响 正常细胞中MMP较高,JC-1聚集在线粒体中形成聚合物发出红色荧光,胞浆中JC-1单体发出绿色荧光,当细胞凋亡时MMP降低,线粒体发生去极化,JC-1从线粒体被释放到胞浆内,红色荧光减弱,绿色荧光增强。与NC组相比,PA组红色荧光减少,绿色荧光增强,MMP显著降低($P < 0.01$);与PA组相比,GXZT-H、GXZT-M、GXZT-L组的红色荧光增加,绿色荧光减弱,MMP显著提高($P < 0.01$) (图3)。

3.4 GXZT对HUVEC的MAPK信号通路的影响 与NC组相比,PA组的p-p38、p-ERK1/2、p-JNK1/2蛋白表达显著增加,p-p38/p38、p-ERK1/2/ERK1/2、p-JNK1/2/JNK1/2的比值显著增高($P < 0.01$),表明MAPK信号通路关键蛋白p38、ERK1/2、JNK1/2的磷酸化水平提高。与PA组相比,GXZT-H、GXZT-M、GXZT-L组的p-p38、p-ERK1/2、p-JNK1/2表达减少,p38、ERK1/2、JNK1/2的磷酸化水平显著降低($P < 0.01$) (图4)。



MMP. 线粒体膜电位。
图3 GXZT对HUVEC线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Fig. 3 Effect of Guanxin Zhitong Capsules on MMP in human umbilical vein endothelial cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

4 讨论

长链饱和脂肪酸PA在血液循环中含量最高,众多体内外研究证实大量摄入棕榈酸可诱导AS的发生发展^[11-13]。LDLR^{-/-}小鼠给予PA和脂多糖后出现明显的动脉粥样硬化病变,人动脉内皮细胞经PA和脂多糖处理后黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)、促炎细胞因子IL-6表达显著增高^[11]。LDLR^{-/-}小鼠喂养PA或富含PA的互酯化油脂,小鼠血脂升高、LDL微粒和巨噬细胞的胆固醇堆积、胶原含量升高、炎症因子释放增多,表明PA及其互酯化产品均可诱导AS病变,启动炎症进程^[9]。凋亡是脂质代谢

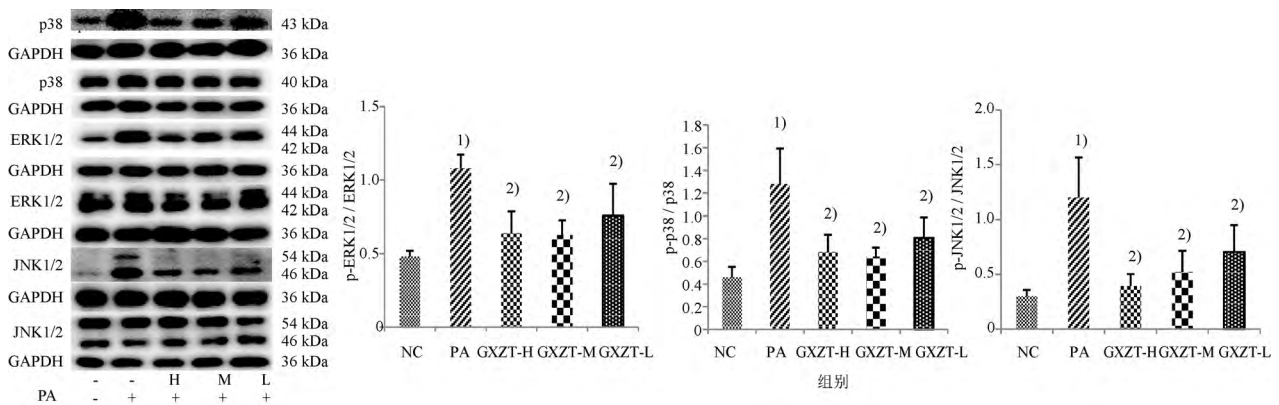


图4 GXZT对HUVEC细胞MAPK信号通路蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 Effect of Guanxin Zhitong Capsules on the expression of MAPK signaling proteins in human umbilical vein endothelial cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

紊乱造成内皮细胞损伤的关键因素,PA介导内皮细胞、内皮祖细胞等多种细胞的凋亡进程^[13-15]。PA可显著增加HUVEC细胞内脂肪含量和凋亡率,PCR Array基因分析参与AS反应的关键基因,发现PA可显著提高促凋亡分子(Bax、Bid)和炎症因子(TNF- α 、IL-1R1、IL-4、IL-2等)的基因表达,显著降低抗凋亡分子(Be1-2、CCL2、CFLAR)的基因表达,诱导载脂蛋白A1(ApoA1)、载脂蛋白E(ApoE)和脂蛋白脂酶(LPL)转录,在脂质代谢、运输和清除过程中发挥关键作用^[13]。HUVEC经PA刺激后氧化应激水平升高,凋亡基因表达增强,细胞发生明显凋亡,用凋亡抑制剂环孢霉素A(CsA)可明显缓解PA诱导HUVEC的脂毒性凋亡,表明PA通过激活氧化应激-线粒体凋亡信号通路启动凋亡^[16]。本实验通过采用PA刺激HUVEC建立内皮细胞脂毒性损伤模型,研究结果显示,PA显著降低HUVEC细胞活性,增加细胞凋亡率,降低线粒体膜电位,结果与文献报道相符。GXZT高、中、低剂量组的细胞活性显著增加,细胞凋亡率显著降低,线粒体膜电位下降发生逆转,实验结果提示GXZT可改善PA诱导的HUVEC细胞损伤。

MAPK信号通路参与调控动脉粥样硬化发生发展的病理过程,血管内皮细胞受到不良刺激后MAPK信号通路被异常激活,通过多条MAPKs信号通路的并行及交互作用共同精细调节细胞的增殖和凋亡、AS斑块内表型转换和炎症反应,介导AS形成、进展的各阶段。近年来越来越多关于AS和MAPK的研究结果提示,MAPK信号通路中的关键

分子可能成为AS预防和治疗的药理靶点^[17-18]。激活p38信号通路促进内皮细胞凋亡、诱导炎症因子分泌和黏附分子聚集,许多报道发现阻断p38信号通路的激活可保护细胞,抑制、延缓AS疾病进程。p38抑制剂losmapimod(GW856553)的II期临床结果发现losmapimod可降低AS病变的炎症作用^[19],但还没有研究AS早期患者能否从p38抑制剂治疗中获益^[20]。维生素D3联合高脂饮食复制的AS大鼠脂质代谢水平、氧化应激活性和炎症因子表达都显著增高,胸主动脉中JNK、ERK1/2、p38蛋白的磷酸化水平明显提高,MAPK信号通路被激活,淫羊藿苷可通过抑制MAPK信号通路激活逆转部分动脉粥样硬化病变^[21]。PA通过增加细胞活氧簇(ROS)生成,降低抗氧化酶含量,诱导HUVEC氧化应激和凋亡发生,提高NF- κ B和JNK磷酸化水平,利拉鲁肽可抑制JNK的磷酸化水平,拮抗PA诱导HUVEC的氧化应激和凋亡^[22]。本实验结果发现,PA可显著提高HUVEC细胞的p38、ERK1/2、JNK1/2磷酸化水平,激活p38、ERK1/2、JNK1/2MAPK信号通路,而GXZT-H、GXZT-M、GXZT-L均可显著降低p38、ERK1/2、JNK1/2的磷酸化水平,实验结果表明,GXZT可一定程度阻断MAPK信号通路。

综上所述,GXZT通过阻断MAPK信号通路减少细胞凋亡,保护PA诱导的HUVEC脂毒性损伤,这可能是GXZT防治动脉粥样硬化的机制。

[参考文献]

[1] WONG N D. Epidemiological studies of CHD and the evolution of

- preventive cardiology[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2014,11(5):276.
- [2] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J]. *中国循环杂志*, 2018, 33(1):1.
- [3] BRIGGS M A, PETERSEN K S, KRIS-ETHERTON P M. Saturated fatty acids and cardiovascular disease: replacements for saturated fat to reduce cardiovascular risk[J]. *Healthcare (Basel)*, 2017,5(2):29.
- [4] MIELENZ M. Invited review: nutrient-sensing receptors for free fatty acids and hydroxycarboxylic acids in farm animals[J]. *Animal*, 2017,11(6):1008.
- [5] 杜海霞,周惠芬,何昱,等.基于脂质代谢紊乱探讨丹红注射液对高脂血症大鼠的降脂作用及机制[J]. *中国中药杂志*, 2020,45(13):3203.
- [6] 李帅帅,于红红,田维毅.中医药防治动脉粥样硬化炎症反应相关信号通路研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(23):180.
- [7] 王群,贾连群,郑思成,等.基于文献计量学的动脉粥样硬化中西医研究进展可视化分析[J]. *世界中医药*, 2019,14(8):2166.
- [8] 高佳明,吕明,解微微,等.中医药心脑血管疾病同治的方剂用药规律分析[J]. *中国中药杂志*, 2019,44(1):193.
- [9] 黄霞,王守富,刘惠霞,等.冠心止痛胶囊对动脉粥样硬化模型大鼠的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(1):153.
- [10] 梁瑞峰,宋献美,王守富,等.冠心止痛胶囊含药血清内皮保护作用域体内给药时效关系研究[J]. *中医药信息*, 2017, 34(1):49.
- [11] LU Z, LI Y, BRINSON C W, et al. Cooperative stimulation of atherogenesis by lipopolysaccharide and palmitic acid-rich high fat diet in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2017,265:231.
- [12] AFONSO M S, LAVRADOR M S, KOIKE M K, et al. Dietary interesterified fat enriched with palmitic acid induces atherosclerosis by impairing macrophage cholesterol efflux and eliciting inflammation[J]. *J Nutr Biochem*, 2016,32:91.
- [13] GAN Y R, WEI L, WANG Y Z, et al. Dickkopf-1/cysteine-rich angiogenic inducer 61 axis mediates palmitic acid-induced inflammation and apoptosis of vascular endothelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2021,23(2):122.
- [14] JIANG H, LIANG C, LIU X, et al. Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 210(1):71.
- [15] NOVINBAHADOR T, NOURAZARIAN A, ASGHARZADEH M, et al. Docosahexaenoic acid attenuates the detrimental effect of palmitic acid on human endothelial cells by modulating genes from the atherosclerosis signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018,119(12):9752.
- [16] 许文虎,金春子,王晓龙,等.线粒体凋亡通路在棕榈酸诱导的血管内皮细胞凋亡中的作用[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(2):224.
- [17] KYRIAKIS J M, AVRUCH J. Mammalian mapk signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update [J]. *Physiol Rev*, 2012, 92: 689.
- [18] CHEN C C, LI H Y, LEU Y L, et al. Corylin inhibits vascular cell inflammation, proliferation and migration and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020,9(4):275.
- [19] NEWBY L K, MARBER M S, MELLONI C, et al. Losmapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in non-ST-segment elevation myocardial infarction: a randomised phase 2 trial[J]. *Lancet*, 2014, 384(9949):1187.
- [20] REUSTLE A, TORZEWSKI M. Role of p38 MAPK in atherosclerosis and aortic valve sclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2018,19(12):3761.
- [21] 胡彦武.基于MAPK信号通路的淫羊藿苷抗动脉粥样硬化作用及机制研究[D].长春:吉林大学,2016.
- [22] 高海娜,孙丽娜,陈树春,等.利拉鲁肽改善棕榈酸对人脐静脉内皮细胞损伤的作用及机制研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2019,27(10):777.

[责任编辑 陈玲]