本文引用:邵 乐, 夏相宜,王宇红, 蔡光先, 佘 颜. 补阳还五汤精简方对氧化应激损伤血管内皮细胞保护作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(2): 163-167.

补阳还五汤精简方对氧化应激损伤血管内皮细胞的保护作用研究

邵 乐[1],夏相宜[2],王宇红[1],蔡光先[1],佘 颜[3]*
(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;2.湖南中医药研究院附属医院,湖南 长沙 410013;
3.湖南中医药大学医学院,湖南 长沙 410208)

〔**摘要**〕**目的** 观察补阳还五汤精简方对氧化应激损伤后血管内皮细胞的保护作用,并从核转录因子 E2 相关因子/抗氧化反应元件(NF-E2-related factor 2/ antioxidant response element,Nrf2/ARE)途径探讨其作用机制。**方法** 采用 H_2O_2 作用大鼠血管内皮细胞 4 h 建立体外血管内皮细胞氧化应激模型,根据不同处理分成正常组,模型组,补阳还五汤含药血清组(补阳组),补阳还五汤精简方含药血清组(5%精简组、10%精简组、20%精简组)6 组。采用倒置显微镜观察细胞形态;流式细胞术检测血管内皮细胞调亡;测定细胞 SOD 活力、MDA 含量;采用 Western blot 法检测细胞 Nrf2、血红素加氧酶-1(HO-1)蛋白的表达。**结果** 与模型组比较,含药血清组均能不同程度改善细胞形态,升高细胞存活率,其中 10%精简组较 5%精简组、20%精简组细胞损伤程度低;与模型组比较,补阳组和 10%精简组可有效抑制细胞凋亡 (P<0.05);与模型组比较,补阳组及 10%精简组可显著提升 SOD 活力(P<0.01);补阳组、10%精简组及 20%精简组可降低 MDA 含量(P<0.05);补阳组及 10%精简组可明显上调 Nrf2、HO-1 蛋白表达 (P<0.05)。**结论** 10%补阳还五汤精简方可以显著减轻氧化应激造成血管内皮细胞的损伤,抑制细胞调亡,这一作用可能与上调 Nrf2/ARE 抗氧化信号通路途径表达有关。

〔**关键词**〕补阳还五汤精简方;氧化应激;血管内皮细胞;核转录因子 E2 相关因子 2;血红素加氧酶-1
〔**中图分类号**〕R285.5;R393 〔**文献标志码**〕A 〔**文章编号**〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.02.004

Protective Effect of Thin Recipe of Buyang Huanwu Decoction Against Oxidative Stress Injury in Vascular Endothelial Cells

*SHAO Le[1], XIA Xiangyi[2], WANG Yuhong[1], CAI Guangxian[1], SHE Yan[3]**
(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 3. Medical College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔**Abstract**〕 **Objective** To investigate the protective effect of thin recipe of Buyang Huanwu Decoction on vascular endothelial cells after oxidative stress injury and its mechanism of action based on the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) pathway. **Methods** Rat vascular endothelial cells were treated with H_2O_2 for 4 hours to establish an in vitro model of oxidative stress in vascular endothelial cells, and according to the treatment method, the cells were divided into normal group, model group, serum containing Buyang Huanwu Decoction group (Buyang group), and serum containing thin recipe of Buyang Huanwu Decoction groups (5%, 10%, and 20% thin recipe groups). Inverted microscopy was performed to observe cell morphology; flow cytometry was used to measure the apoptosis of vascular endothelial cells; the activity of

〔**收稿日期**〕2018-07-13
〔**基金项目**〕国家自然科学基金(81603415);湖南省自然科学基金(2017JJ3231);湖南省中医药管理局重点项目(201820);湖南省教育厅一般项目(15C1034、17C1648)。
〔**作者简介**〕邵 乐,女,硕士,助理研究员,研究方向:心脑血管疾病的防治。
〔**通讯作者**〕* 佘 颜,女,博士,副教授,E-mail:892645304@qq.com。

superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) were measured; Western blot was used to measure the protein expression of Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1) in cells. **Results** Compared with the model group, the drug-containing serum groups had varying degrees of improvement in cell morphology and an increase in cell survival rate, and the 10% thin recipe group had a lower degree of cell injury than the 5% and 20% thin recipe groups. Compared with the model group, the Buyang group and the 10% thin recipe group had significant inhibition of cell apoptosis ($P<0.05$) and a significant increase in the activity of SOD ($P<0.01$). The Buyang group, the 10% thin recipe group, and the 20% thin recipe group had a significant reduction in the content of MDA ($P<0.05$). The Buyang group and the 10% thin recipe group had significant increases in the protein expression of Nrf2 and HO-1 ($P<0.05$). **Conclusion** The 10% thin recipe of Buyang Huanwu Decoction can significantly reduce oxidative stress injury in vascular endothelial cells and inhibit cell apoptosis, possibly by upregulating the expression of the Nrf2/ARE antioxidant signaling pathway.

〔**Keywords**〕 thin recipe of Buyang Huanwu Decoction; oxidative stress; vascular endothelial cell; nuclear factor-erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase-1

有研究表明，氧化应激造成的内皮细胞损伤在缺血性脑损害中起关键作用，是造成脑缺血/再灌注不可逆损伤的主要因素[1-2]。转录因子 E2 相关因子/抗氧化反应元件(NF-E2-related factor 2/antioxidant response element，Nrf2/ARE)抗氧化信号通路是机体重要的内源性抗氧化应激通路，在内皮细胞氧化应激损伤中发挥重要调控作用[3]。因此，研究氧化应激对血管内皮细胞的损伤机制，并以此为靶点寻找保护血管内皮细胞的有效药物，对缺血性脑血管疾病的防治具有重要意义。

补阳还五汤精简方是课题组在多年临床经验的基础上，遵循补阳还五汤之方义，基于益气祛瘀生新法精简方药，并且配合醇提、超临界 CO_2 提取工艺制备而成。前期动物实验研究表明补阳还五汤精简方通过调控 Nrf2/ARE 信号通路发挥抗脑缺血的作用[4]。本实验在前期研究的基础上，进一步观察该方对氧化应激损伤后血管内皮细胞保护作用及可能机制。

1 材料

1.1 细胞和动物

大鼠血管内皮细胞株(bEnd.3 细胞株)由长沙唯尔生物技术有限公司提供。SPF 级 SD 大鼠，体质量 250~280 g，雄性，北京维通利华实验动物技术有限公司，动物许可证号:SCXK(京)2012-0001。

1.2 药材

补阳还五汤处方(生黄芪 120 g，当归尾 6 g，川芎 3 g，红花 3 g，赤芍 4.5 g，桃仁 3 g，地龙 3 g)和补阳还五汤精简方处方(黄芪 30 g，川芎 9 g，地龙 6 g)，补阳还五汤按传统水煎后浓缩干燥制备成干浸膏(每 1 g 干浸膏相当于原生药 4.5 g)，补阳还五汤精简方采用醇提、超临界 CO_2 提取工艺制备干浸膏(每 1 g 干浸膏相当于原生药 4.7 g)，以上干浸膏均由湖南中医药研究院中药所提供。

1.3 主要试剂和仪器

DMEM 培养基(Hyclone 公司)；胎牛血清(Gibco 公司)；MTT (Sigma 公司)；Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物有限公司)；SOD 试剂盒、MDA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)；兔抗大鼠 Nrf2 多克隆抗体、兔抗大鼠血红素加氧酶-1 (HO-1) 多克隆抗体 (Abcam 公司)；兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体 (上海拜力生物科技有限公司)。YT-CJ-2NB 型超净工作台 (北京亚泰科隆公司)；DSZ2000X 型倒置生物显微镜 (北京中显恒业仪器仪表有限公司)；MB-530 型酶联免疫检测仪(深圳汇松有限公司)；FACSAriaII 型流式细胞仪(美国 BD 公司)；Bx51 光学显微镜及 IPP6.0 图像分析系统(日本 Olympus 公司)；MK3 酶标仪(芬兰雷勃公司)；mini protean 3 cell 电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备

大鼠适应性喂养 3 d 后随机分为补阳组、精简方组和对照组，每组 5 只。根据相关文献研究[5]，药物组予以相当于人临床用量的 6 倍剂量给药，补阳组大鼠剂量换算后约为 18 g/(kg·d)，精简组大鼠剂量换算后约 12 g/(kg·d)，正常组用等容量生理盐水。均为每天 2 次，连续灌胃 7 d。于末次灌胃 2 h 后，无菌条件下，腹主动脉取血，3 500 r/min，离心 20 min，取上清，56 ℃灭活 30 min，0.22 μm 微膜滤过除菌后，置-20 ℃保存备用。

2.2　细胞培养

大鼠血管内皮细胞培养于 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中，37 ℃、5%CO_2 饱和湿度培养箱中培养，单层融合达 80%左右，胰酶消化细胞，一分为二进行细胞传代。待状态稳定后移至 96 孔培养板上，分组实验。

2.3　细胞分组和处理

取生长良好的细胞制成细胞悬液，细胞生长至密度 90%左右，接种于 96 孔培养板中，37 ℃、5% $C0_2$ 培养。将补阳还五汤含药血清配制成 10%浓度，而补阳还五汤精简方含药血清配制成 5%、10%、20% 3 个浓度。采用 300 μmol/L 的 H_2O_2 作用血管内皮细胞 4 h 建立细胞氧化应激模型。细胞设 6 组：(1)正常组；(2)H_2O_2 模型组；(3)补阳组(H_2O_2 模型+10%补阳含药血清)；(4)5%精简组(H_2O_2 模型+5%补阳还五汤精简方含药血清)；(5)10%精简组(H_2O_2 模型+10%补阳还五汤精简方含药血清)；(6)20%精简组(H_2O_2 模型+20%补阳还五汤精简方含药血清)。将细胞与药物共同作用 2 h 后，3 000 r/min 离心后，收集各组细胞上清液进行检测。

2.4　形态学观察

将各组细胞置于倒置显微镜下观察各组细胞形态变化，并拍片记录。

2.5　细胞凋亡检测

将收集的各组细胞置于 PBS 中洗涤 2 次，2 000 r/min下离心 5 min，收集 1×10^5~5×10^5 细胞；加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞；加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后，加入 5 μL Propidium Iodide，混匀；室温、避光、反应 5~15 min；在 1 h 内，采用流式细胞仪进行观察和检测。

2.6　细胞 SOD 活力和 MDA 含量的检测

按“2.3”中的分组进行相应处理后，收集细胞，离心收集上清液。采用专用试剂盒检测 SOD 活力和 MDA 含量，按试剂盒检测说明书严格操作。

2.7　细胞 Nrf2、HO-1 的蛋白表达的检测

将裂解液融化、分装，离心得到蛋白抽提物，并用 BCA 法定量。备胶、凝胶电泳、转膜、封闭。加入一抗 4 ℃ 孵育过夜，一抗包括兔抗大鼠 Nrf2(1:600)，兔抗大鼠 HO-1(1:600)，洗膜后加入 HRP 标记的二抗(1:4 000)孵育，用 ECL 系统进行发光和观察。采用美国 BioRad 公司生产 Quantity one 4.5.0.软件系统分析各条带的灰度值，记录每条蛋白电泳带的灰度值与相应的内对照 GAPDH 灰度值的比值，进行定量分析。

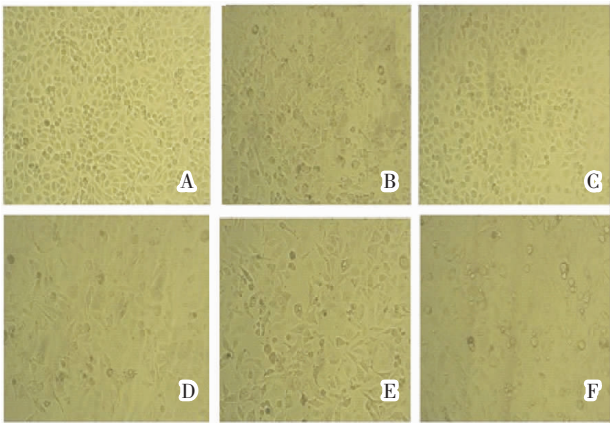
2.8　统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。所有实验数据均经过方差齐性检验和正态性检验，计量资料用“$\bar{x}\pm s$”表示，相同时间点的比较采用独立样本 t 检验或方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　形态学观察

正常组血管内皮细胞饱满，大小均匀，胞核比较清晰，细胞呈铺路石样紧密排列。H_2O_2 模型组细胞呈多角形，轮廓不清晰，核周围可见深色颗粒，同时可见一些细胞碎片，细胞存活率较正常组明显降低，含药血清处理组细胞存活率不同程度升高，其中 10%精简组含药血清处理组较 5%、20%精简组细胞损伤程度低。见图 1。



注：A.正常组；B.模型组；C.补阳组；D.5%精简组；E.10%精简组；F.20%精简组

图 1　不同含药血清对细胞组织形态光镜图(×100)

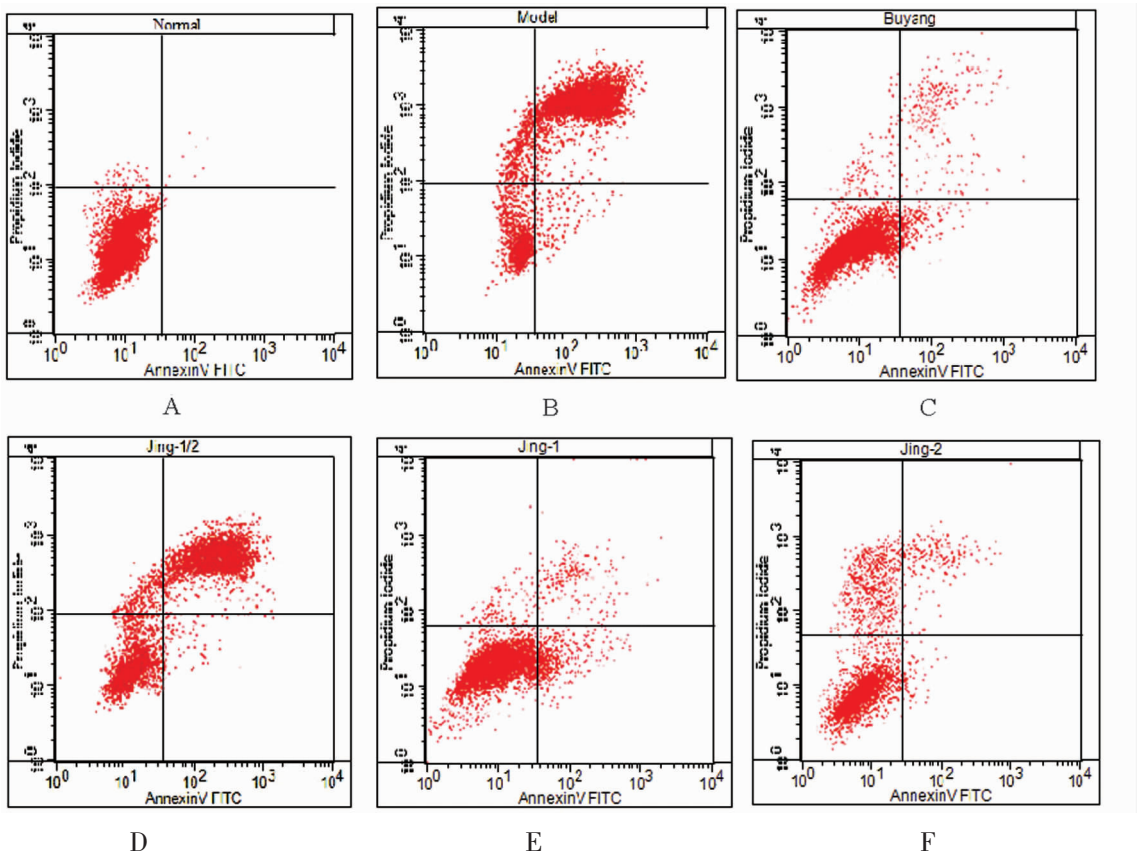
3.2　不同含药血清对 H_2O_2 处理血管内皮细胞后细胞凋亡的影响

相较于正常组，模型组细胞发生明显的凋亡现象(P<0.01)。补阳组和 10%精简组抑制凋亡的效果明显，凋亡率与模型组比较差异有统计学意义(P<0.05)。见表 1 和图 2。

表 1　不同含药血清对细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s$，n=5，%)

组别	凋亡率
正常组	0.49±0.08
模型组	84.2±0.49**
补阳组	8.56±0.26#
5%精简组	62.28±0.73
10%精简组	11.16±0.17#
20%精简组	38.68±0.67

注：与正常组比较，**P<0.01；与模型组比较，#P<0.05



注：A.正常组；B.模型组；C.补阳组；D.5%精简组；E.10%精简组；F.20%精简组

图 2 流式细胞术检测细胞凋亡

3.3 不同含药血清对 H_2O_2 处理血管内皮细胞后细胞内 SOD 活力、MDA 含量的影响

与正常组比较，模型组 SOD 活力明显降低（$P<0.01$），MDA 含量显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，补阳组及 10%精简组能升高 SOD 活力（$P<0.01$），降低 MDA 含量（$P<0.05$）。见表 2。

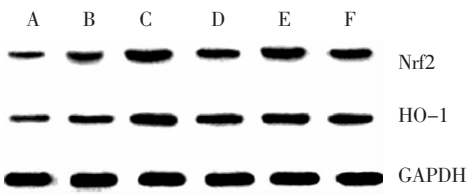
表 2 不同含药血清对血管内皮细胞内 SOD、MDA 的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	SOD/(U·L^{-1})	MDA/(nmol·L^{-1})
正常组	25.71±1.45	1.93±0.04
模型组	7.82±0.36**	7.65±0.21**
补阳还组	15.31±0.98##	4.87±0.18#
5%精简组	9.34±0.49	6.73±0.25
10%精简组	12.67±0.83##	3.89±0.09#
20%精简组	8.77±0.21	4.21±0.11#

注：与正常组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$

3.4 不同含药血清对 H_2O_2 处理血管内皮细胞后细胞内 Nrf2、HO-1 蛋白的影响

正常组中 Nrf2、HO-1 蛋白呈少量表达，模型组 Nrf2 蛋白表达与正常组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。补阳组及10%精简组明显上调 Nrf2、HO-1 蛋白表达，与模型组比较差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见图 3 和表 3。



注：A.正常组；B.模型组；C.补阳组；D.5%精简组；E.10%精简组；F.20%精简组

图 3 不同含药血清对细胞 Nrf2、HO-1 蛋白表达电泳图

表 3 不同含药血清对血管内皮细胞 Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	Nrf2/GAPDH	HO-1/GAPDH
正常组	0.374±0.018	0.381±0.035
模型组	0.741±0.034*	0.396±0.029
补阳组	1.078±0.062#	0.764±0.053#
5%精简组	0.660±0.049	0.519±0.026
10%精简组	0.992±0.058#	0.772±0.049#
20%精简组	0.721±0.052	0.421±0.028

注：与正常组比较，*$P<0.05$；与模型组比较，#$P<0.05$

4 讨论

正常血管内皮细胞形态上紧密相连，在维持血管壁通透性完整、保持血管舒张收缩平衡、抗血栓形成及减轻血管炎症反应等方面发挥着重要的调节作用。血管内皮细胞损伤是缺血性脑血管疾病病理学基础，在众多损伤因素中，氧化应激反应是导致内皮细胞损伤的始动因素和关键环节，干预血管内皮细胞氧化应激损伤已成为治疗心脑血管疾病的主要途经[6-8]。

Nrf2/ARE 抗氧化信号通路是机体重要的内源性抗氧化应激通路，Nrf2 属于 CNC (cap-n-collar)转录因子家族成员，该因子在生理状态下与 Keap1 结合处于失活状态，氧化应激刺激 Nrf2 与 Keap1 解偶联并在多种蛋白激酶的磷酸化作用下，Nrf2 进入细胞核与抗氧化反应元件(ARE) 结合，启动 HO-1 基因转录，发挥强大的抗氧化作用。有研究表明 Nrf2/ARE 抗氧化信号通路中的关键分子 Nrf2、HO-1 参与不同来源氧自由基诱导血管内皮细胞损伤的保护作用[9-11]。

体外氧化应激细胞模型成功建立是从细胞分子基因水平研究缺血缺氧性损伤的前提，其能准确模拟体内脑缺血时自由基增多这一环境，有助于研究脑缺血后氧化应激机制以及抗氧化应激药物的作用靶点。本文采用 H_2O_2 作用血管内皮细胞模拟氧化应激条件下血管内皮细胞的损伤[12-13]，实验表明：在 H_2O_2 刺激下，细胞明显损伤，这种损伤变化可能与 SOD 活力降低、MDA 含量升高有关，提示氧化应激加剧内皮细胞的脂质过氧化反应，导致内皮细胞的损伤。同时，氧化应激刺激 Nrf2/ARE 抗氧化信号通路中关键分子 Nrf2 及 HO-1 表达增多，从而发挥抗氧化效应。

补阳还五汤为已证实可有效抑制早期神经功能恶化[14]，且 P13K-Akt 信号通路的调控可能是关键机制之一[15]。补阳还五汤精简方由黄芪、川芎等组成，遵循补阳还五汤之方义，秉承“瘀血不去，新血不生”和“不破不立，瘀祛新生”的观念而组方，并且配合醇提、超临界 CO_2 提取工艺制备，以组建一种物质基础明确、药效相当甚至更优于原方的新型复方。本实验将不同浓度(5%、10%、20%)的补阳还五汤精简方含药血清与 H_2O_2 损伤的血管内皮细胞共培养，结果 10%补阳还五汤精简方含药血清能明显促进血管内皮细胞增殖，抑制血管内皮细胞凋亡，且显著提高 SOD 活性，降低 MDA 含量，提示补阳还五汤精简方通过增强脂质抗氧化酶活性而拮抗氧化应激诱导的血管内皮细胞损伤，从而发挥对血管内皮细胞保护作用。10%补阳还五汤精简方含药血清能上调 Nrf2-ARE 信号通路中 Nrf2、HO-1 蛋白的表达，推测补阳还五汤精简方可激活内源性抗氧化应激通路，进而增强血管内皮细胞抗氧化应激损伤能力，进一步丰富了补阳还五汤抗氧化应激的作用机制。

参考文献

[1] ALLEN C L, BAYRAKTUTAN U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischemia stroke[J]. International Journal of Stroke, 2009, 4(6):461-470.

[2] ZHANG J, FU B, ZHANG X, et al. Bicyclol Upregulates Transcription Factor Nrf2, Ho-1 Expression and Protects Rat Brains against Focal Ischemia[J]. Brain Research Bulletin, 2014, 100:38-43.

[3] CHEN B, LU Y, CHEN Y, CHENG J. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries[J]. Journal of Endocrinology, 2015, 225(3): 83-99.

[4] 佘　颜，王宇红，邵　乐，等.补阳还五汤精简方对大鼠脑缺血后血管新生及 Nrf2/HO-1 信号途径的影响[J].中国药理学通报，2016，3(1)：123-128.

[5] 李振光，王净净.关于中药血清药理学方法的思考[J].中国中医药信息杂志，2002，9(2)：5-6.

[6] CAHILL S S, LI J M. Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2[J]. British Journal of Clinical Pharmacology, 2014, 78(3): 441-453.

[7] 毛文星，李　冰，王志梅，等.氧化应激、血管内皮功能障碍与高血压[J].现代生物医学进展，2014，19(5)：1673-6273.

[8] VANHOUTTE P M. Endothelial dysfunction: the first steptoward coronary arteriosclerosis[J]. Circulation Journal, 2009, 73(4): 595-601.

[9] CHEN J S, HUANG P H, WANG C H, et al. Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression,an antioxidant-independent mechanism,contributes to anti-atherogenesis and vascular protective effects of Ginkgo biloba extract[J]. Atherosclerosis, 2011, 214(2): 301-309.

[10] DING Y, ZHANG B, ZHOU K, et al. Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis:role of Nrf2 activation[J]. International Journal of Cardiology, 2014,175(3):508-514.

[11] YU J, ZHU X, QI X, et al. Paeoniflorin protects human EA hy926 endothelial cells against gamma-radiation induced oxidative injury by activating the NF-E2-related factor 2/heme oxygenase-1pathway[J]. Toxicology Letters, 2013,218(3):224-234.

[12] 高蒙蒙，孙桂波，斯建勇，等.红车轴草总黄酮对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J].中国药理学通报，2013，29(2)：201-207.

[13] 王诗才，陈太军，黄美松，等.脑源性神经营养因子保护 H_2O_2 诱导的氧化损伤血管内皮细胞[J].中国病理生理杂志，2015，31(8)：1384-1394.

[14] 廖亮英，蔡光先，周赛男.补阳还五汤超微饮片对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞移植后 Bcl-2、Bax 表达的影响[J].湖南中医药大学学报，2018，38(3)：257-260.

[15] 刘　楠，姜云耀，黄婷婷，等.基于网络药理学方法研究补阳还五汤治疗脑梗死的作用机制[J].中国中药杂志，2018，43(11)：2190-2198.

(本文编辑　杨　瑛)