

·实验研究·

本文引用:徐顺洲,陈凌波,阎卉芳,邓常清.黄芪-当归6种活性成分配伍对大鼠血管外膜成纤维细胞合成细胞外基质的影响[J].湖南中医药大学学报,2023,43(4):579-584.

黄芪-当归6种活性成分配伍对大鼠血管外膜成纤维细胞合成细胞外基质的影响

徐顺洲^{1,2},陈凌波¹,阎卉芳¹,邓常清^{1*}

1.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南长沙410208;2.湖南中医药高等专科学校附属第一医院心内科,湖南株洲412000

〔摘要〕目的 观察黄芪-当归活性成分阿魏酸(ferulic acid, FA)、毛蕊异黄酮苷(calycosin, CG)、芒柄花素(formononetin, FMN)、黄芪皂苷Ⅰ(astragaloside I, AS I)、黄芪甲苷(astragaloside IV, AS IV)、毛蕊异黄酮(calycosin, CAL)配伍对血管紧张素Ⅱ(angiotensin II, Ang II)诱导的大鼠血管外膜成纤维细胞(vascular adventitia fibroblasts, VAF)合成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的影响。**方法**以Ang II诱导VAF增殖模型,采用目标成分“敲除/敲入”的方法,将细胞分为空白组、模型组、IC10配伍组、某一活性成分敲除组、某一活性成分敲入组,分别检测细胞及培养液中纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、层粘连蛋白(laminin, LN)、Ⅰ型胶原(collagen type I, COL I)、Ⅲ型胶原(collagen type III, COL III)含量,并检测细胞基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)、基质金属蛋白酶组织抑制剂2(tissue inhibitor of metalloproteinase 2, TIMP2)、转化生长因子β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)蛋白表达,研究黄芪-当归6种活性成分配伍对VAF合成ECM的影响。**结果**黄芪-当归6种活性成分配伍抑制VAF合成FN、LN、COL I、COL III($P<0.01$)。FA、CG、FMN、AS I敲入后抑制FN、LN合成的作用增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$),FA、CAL、FMN、AS I、AS IV敲入后抑制COL I、COL III合成的作用增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。黄芪-当归6种活性成分配伍促进MMP2、TIMP2的表达($P<0.01$),FA、CG、FMN、AS IV、CAL敲入后促进MMP2表达的作用增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$),FMN、AS IV、CAL敲入后促进TIMP2表达的作用增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$);黄芪-当归6种活性成分配伍抑制TGF-β1表达($P<0.05$),FA、CG、FMN敲入后抑制TGF-β1表达的作用增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论**黄芪-当归6种活性成分配伍可抑制VAF合成ECM,其作用可能是通过调节TGF-β1、MMP2、TIMP2发挥的。

〔关键词〕 黄芪;当归;活性成分;血管外膜成纤维细胞;细胞外基质

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.04.001

Effects of compatibility of 6 active ingredients of Huangqi (Radix Astragali)-Danggui (Radix Angelicae Sinensis) on extracellular matrix synthesis by vascular adventitia fibroblasts in rats

XU Shunzhou^{1,2}, CHEN Lingbo¹, YAN Huifang¹, DENG Changqing^{1*}

1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Department of Cardiology, The First Hospital of Hunan College of Chinese Medicine, Zhuzhou, Hunan 412000, China

〔Abstract〕 **Objective** To observe the effects of 6 active components of Huangqi (Radix Astragali)-Danggui (Radix Angelicae Sinensis), namely ferulic acid (FA), calycosin (CG), formononetin (FMN), astragaloside I (AS I), astragaloside IV (AS IV) and calycosin (CAL), on the synthesis of extracellular matrix (ECM) by vascular adventitia fibroblasts (VAF) induced by angiotensin II (Ang II) in rats. **Methods** By employing VAF proliferation model induced by Ang II, and the target component "knock-out/knock-in"

〔收稿日期〕 2022-06-13

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81874406);湖南省教育厅科学研究项目(18B245)。

〔第一作者〕 徐顺洲,男,硕士研究生,主治医师,研究方向:中医药防治心血管疾病。

〔通信作者〕 * 邓常清,男,博士,教授,博士研究生导师, E-mail: dchangq@sohu.com。

method, the cells were divided into blank group, model group, 10% inhibitory concentration compatibility group, active component knock-out group, and active component knock-in group. Then, the content of fibronectin (FN), laminin (LN), collagen type I (COL I), and collagen type III (COL III) in cells and culture medium were measured respectively. The expression levels of matrix metalloproteinase2 (MMP2), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase2 (TIMP2), and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) were detected. Based on the above, we studied the effects of compatibility of six active components of Huangqi (Radix Astragali)-Danggui (Radix Angelicae Sinensis) on extracellular matrix synthesis by vascular adventitia fibroblasts in rats. **Results** The compatibility of 6 active ingredients of Huangqi (Radix Astragali)-Danggui (Radix Angelicae Sinensis) can inhibit the synthesis of FN, LN, COL I and COL III by VAF ($P < 0.01$); after the knock-in of FA, CG, FMN and AS I, the synthesis of FN and LN was more inhibited ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); and after the knock-in of FA, CAL, FMN, AS I, and AS IV, the synthesis of COL I and COL III was more inhibited ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The compatibility of 6 active ingredients of Huangqi (Radix Astragali)-Danggui (Radix Angelicae Sinensis) can promote the expression of MMP2 and TIMP2 ($P < 0.01$); after the knock-in of FA, CG, FMN, AS IV and CAL, the expression of MMP2 was enhanced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and after the knock-in of FMN, AS IV and CAL, the expression of TIMP2 was enhanced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the compatibility of six active ingredients of Huangqi (Radix Astragali)-Danggui (Radix Angelicae Sinensis) can inhibit the expression of TGF- β 1 ($P < 0.05$); after the knock-in of FA, CG and FMN, the expression of TGF- β 1 was more inhibited ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The compatibility of six active ingredients of Huangqi (Radix Astragali)-Danggui (Radix Angelicae Sinensis) can inhibit the synthesis of ECM by VAF in rats, possibly by regulating TGF- β 1, MMP2 and TIMP2.

[**Keywords**] Huangqi (Radix Astragali); Danggui (Radix Angelicae Sinensis); active ingredients; vascular adventitia fibroblasts; extracellular matrix

病理性血管重构是诸多心血管疾病发生发展的共同病理基础^[1],是一个动态变化的过程,主要包括细胞增殖、迁移、凋亡以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成、降解和重新排列等。目前研究发现,血管外膜对损伤的反应最为灵敏,先于内膜及中膜,可能是介导内膜及中膜病变的始动因素和“主导者”^[2]。ECM是血管壁的重要组成部分,研究发现,ECM对生理和病理刺激的反应是高度动态的^[3]。外膜的胶原成分主要由血管外膜成纤维细胞(vascular adventitia fibroblasts, VAF)合成与分泌,因此,VAF决定了血管ECM的组成。当血管损伤时,血管壁细胞合成大量ECM,同时合成基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)增加,导致原有基质发生降解,被激活的细胞侵入病变区,胶原蛋白、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)等沉积增加,最后形成胶原纤维交互连接,血管在ECM降解和新的基质成分沉积增加过程中发生重构^[4-5]。因此,调节ECM成为改善血管重构治疗的潜在靶点^[6]。课题组前期研究表明,黄芪和当归配伍可抑制血管内膜增生,改善局部血管炎症反应,减轻ECM在血管壁的沉积,抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型转化和增殖^[7-11]。药物吸收实验表明,黄芪-当归配伍活性成分阿魏酸(ferulic acid, FA)、毛蕊异黄酮(calycosin glycoside, CG)、芒柄花素(formononetin,

FMN)、黄芪皂苷 I (astragaloside I, AS I)、黄芪甲苷(astragaloside IV, AS IV)、毛蕊异黄酮(calycosin, CAL)可吸收入血^[12-13]。血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)氧化损伤模型相关研究发现,上述6种成分及配伍可减轻氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的VEC氧化损伤,促进VEC增殖,对VEC氧化损伤具有保护作用^[14]。VSMC异常增殖模型研究发现,上述6种活性成分配伍可以抑制VSMC异常增殖^[15]。因此,推测这些有效成分可以抑制VAF合成ECM。本研究用血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)诱导VAF增殖模型,采用目标成分“敲除/敲入”的方法^[16],研究黄芪-当归6种活性成分配伍对ECM合成的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞

大鼠VAF购自武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:CP-R077。经鉴定,VAF标志物Vimentin表达阳性率>90%,符合VAF生物学特征。

1.2 试剂与药物

AS I (纯度 $\geq 98\%$,批号:C10070259,上海麦克林生化科技有限公司);FA(纯度>99%,批号:SF8030)、FMN(纯度>98%,批号:SF8070)、AS IV(纯度>98%,批号:SA8640)、CAL(纯度>98%,批号:SC8040)、CG(纯度>98%,批号:SC8050)、Ang II (批号:A9290)、二甲

基亚砒(dimethyl sulfoxide, DMSO)(批号:1129E033)均购自北京索莱宝科技有限公司;DMEM 高糖培养基(批号:AE29163339,美国 HyClone 公司);兔抗大鼠基质金属蛋白酶抑制因子 2(tissue inhibitor of metallo proteinase 2, TIMP2)多克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号:A1558);兔抗大鼠基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)单克隆抗体(批号:ab92536)、兔抗大鼠转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)单克隆抗体(批号:ab179695)均购自英国 abcam 公司;兔抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号:20536-1-AP)、HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(批号:SA00001-2)均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

Heracell 型 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司);SW-CJ-1FD 型超净工作台(中国苏州安泰公司);CYTATION5 型 ChemiDo C-XRS+化学发光成像分析仪、Synergy HT 型多功能酶标成像系统仪(美国博腾仪器有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 VAF 培养 将 VAF 用含 10%胎牛血清的 DMEM 制成细胞悬液,置于 37 °C 无菌 CO₂ 培养箱中培养,每 3 天换液 1 次,每周传代 2 次,第 4 代开始用于实验。

1.4.2 各活性成分的制备 各活性成分以 DMSO-DMEM 溶解,制备成储存液,使用时以基础培养液稀释,含药培养基中 DMSO 终体积分数 $\leq 0.1\%$ 。

1.4.3 细胞毒性实验 选择各个成分,在对细胞有着相同抑制效应的 5%、10%、20%抑制浓度(inhibiting concentration, IC)即 IC05、IC10、IC20 中进行配伍。取对数生长期 VAF,以 2500 个/孔接种于 96 孔培养板。待细胞贴壁后,无血清培养基培养使细胞同步化于 G0 期。然后将细胞随机分为空白组;加入基础培养基;IC05 配伍组;加入 6 种活性成分浓度均为 IC05 配伍的培养基;IC10 配伍组;加入 6 种活性成分浓度均为 IC10 配伍的培养基;IC20 配伍组;加入 6 种活性成分浓度均为 IC20 配伍的培养基。每组设 6 个复孔。药物干预 48 h 后,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L,37 °C 温育 1 h,应用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔吸光度(A)。按下式计算细胞存活率和细胞增殖抑制率:细胞存活率=(实验孔 A-空白孔 A)/(对照孔 A-空白孔 A) $\times 100\%$;细胞增殖

抑制率=(1-实验孔 A/对照孔 A) $\times 100\%$ 。

1.4.4 “敲除/敲入”法研究活性成分配伍对 VAF 合成 ECM 的影响 取对数生长期 VAF,接种于 6 孔培养板。待细胞贴壁后,同步化于 G0 期。参考相关资料^[6],将细胞随机分为空白组、模型组(Ang II 10⁻⁶ mol/L^[17])、IC10 配伍组、某一成分敲除组、某一成分敲入组。IC10 配伍组 6 种活性成分浓度均为 IC10 配伍,“敲除”是在各成分 IC10 配伍基础上敲除某目标成分,“敲入”是在各成分 IC10 配伍基础上将目标成分的剂量增加至 IC20(FA:IC10 14 μ g/mL,IC20 29 μ g/mL;CG:IC10 8 μ g/mL,IC20 20 μ g/mL;FMN:IC10 18 μ g/mL,IC20 35 μ g/mL;AS I :IC10 3 μ g/mL,IC20 11 μ g/mL;AS IV :IC10 42 μ g/mL,IC20 68 μ g/mL;CAL:IC10 11 μ g/mL,IC20 24 μ g/mL)。详见表 1。

表 1 黄芪-当归 6 种活性成分配伍实验方案(μ g/mL)

组别	FMN	AS I	AS IV	CAL	FA	CG
空白组	0	0	0	0	0	0
模型组	0	0	0	0	0	0
IC10 配伍组	18	3	42	11	14	8
FA 敲除组	18	3	42	11	0	8
FA 敲入组	18	3	42	11	29	8
CG 敲除组	18	3	42	11	14	0
CG 敲入组	18	3	42	11	14	20
FMN 敲除组	0	3	42	11	14	8
FMN 敲入组	35	3	42	11	14	8
AS I 敲除组	18	0	42	11	14	8
AS I 敲入组	18	11	42	11	14	8
ASIV 敲除组	18	3	0	11	14	8
ASIV 敲入组	18	3	68	11	14	8
CAL 敲除组	18	3	42	0	14	8
CAL 敲入组	18	3	42	24	14	8

1.4.5 ELISA 法检测细胞总 FN、LN、COL I、COL III 含量 各组细胞干预 48 h 后,同时收集培养液及细胞,采用超声破碎仪破碎细胞,离心后取提取液,采用 ELISA 法检测 FN、LN、COL I、COL III 含量,操作按说明书进行。

1.4.6 Western blot 法检测细胞 MMP2、TIMP2、TGF- β 1 表达 各组细胞干预 48 h 后,收集细胞提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,每孔上样蛋白量 20 μ g,蛋白样品经电泳及转膜后,5%脱脂牛奶封闭 1~2 h,分别加入抗 TIMP2 抗体(1:2000)、抗 TGF- β 1 抗体(1:2000)、抗 MMP2 抗体(1:3000)、抗 β -

actin 抗体(1:8000),4 ℃过夜,TBST 清洗 10 min×3 次,加入 HRP 标记羊抗兔二抗(1:8000),37 ℃孵育 1 h, TBST 清洗 10 min×3 次,显影。采用 Image Lab 图像分析软件分析结果,以目的蛋白与 β -actin 光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.5 统计学处理

实验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,用 SPSS 26.0 统计软件进行分析。多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较时,方差齐者采用 *LSD* 检验,方差不齐者采用 *Dunnett's T3* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪-当归 6 种活性成分配伍对 VAF 增殖的影响

与空白组比较,IC05 配伍组细胞存活率显著增加、增殖抑制率降低(为负值)($P < 0.01$),表明 IC05 配伍可促进 VAF 增殖;IC10 配伍组细胞存活率和增殖抑制率差异均无统计学意义($P > 0.05$),说明 IC10 配伍对细胞增殖无明显抑制作用;IC20 配伍组细胞存活率显著降低、增殖抑制率显著增加($P < 0.01$),说明 IC20 配伍明显抑制 VAF 增殖。以增殖抑制率 $< 20\%$ 作为细胞的无毒性浓度,IC10 配伍剂量无细胞毒性,IC20 配伍剂量有细胞毒性,故选用 IC10 配伍剂量作为中点剂量,在此基础上进行活性成分敲除/敲入实验。详见表 2。

表 2 不同浓度配伍对 VAF 的细胞毒性($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	OD ₄₅₀	细胞存活率/%	增殖抑制率/%
空白组	0.63±0.08	100	0
IC05 配伍组	0.82±0.02	160±33 ^{###}	-31±16 ^{###}
IC10 配伍组	0.65±0.03	107±19	-3±11
IC20 配伍组	0.39±0.03	30±8 ^{###}	38±6 ^{###}

注:与空白组比较,^{###} $P < 0.01$ 。

2.2 黄芪-当归 6 种活性成分配伍对 FN、LN、COL I、COL III 的影响

与空白组比较,模型组 FN、LN、COL I、COL III 含量显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,IC10 配伍组 FN、LN、COL I、COL III 显著降低($P < 0.01$)。FA、CG、FMN、AS I 敲除组 FN、LN 含量显著高于对应敲入组及 IC10 配伍组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),AS IV、CAL 敲入组 FN、LN 含量显著高于对应敲除组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。FMN、FA、AS I、AS IV、CAL 敲入组 COL I、COL III 显著低于对应敲除组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),CG 敲入组 COL I、COL III 显著高于对应敲除组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 3。

2.3 黄芪-当归 6 种活性成分配伍对 MMP2、TIMP2、TGF- β 的影响

与空白组比较,模型组 MMP2 表达显著降低($P < 0.01$),TGF- β 1 表达显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,IC10 配伍组 MMP2、TIMP2 表达显著升高($P < 0.01$),TGF- β 1 表达降低($P < 0.05$)。FA、CG、FMN、

表 3 各组 FN、LN、COL I、COL III 比较($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

组别	FN(n=3)	LN(n=3)	COL I (n=4)	COL III (n=4)
空白组	4.31±0.54	1.24±0.08	82.12±1.10	3.90±0.08
模型组	7.38±0.67 ^{###}	2.03±0.07 ^{###}	200.18±5.00 ^{###}	22.44±0.49 ^{###}
IC10 配伍组	2.76±0.19 ^{**}	1.43±0.05 ^{**}	129.92±2.56 ^{**}	7.53±0.31 ^{**}
FA 敲除组	4.97±0.64 ^{**■}	1.75±0.08 ^{**■}	143.6±4.17 ^{**}	8.26±0.18 ^{**}
FA 敲入组	2.73±0.40 ^{**▲}	1.35±0.04 ^{**▲}	100.17±3.08 ^{**■▲}	3.75±0.04 ^{**■▲}
CG 敲除组	5.67±0.56 ^{**■}	1.85±0.06 [■]	118.27±3.75 ^{**}	4.01±0.09 ^{**■}
CG 敲入组	2.52±0.21 ^{**▲}	1.35±0.04 ^{**▲}	141.39±1.97 ^{**■▲}	7.98±0.68 ^{**▲}
FMN 敲除组	3.81±0.26 ^{**■}	1.78±0.15 ^{**■}	136.08±3.07 ^{**}	9.35±0.29 ^{**■}
FMN 敲入组	2.86±0.30 ^{**▲}	1.30±0.11 ^{**▲}	115.89±3.99 ^{**▲}	6.82±0.11 ^{**▲}
AS I 敲除组	4.50±0.49 ^{**■}	1.83±0.11 ^{**■}	138.07±2.27 ^{**}	11.19±0.34 ^{**■}
AS I 敲入组	2.40±0.14 ^{**▲}	1.43±0.04 ^{**▲}	104.76±4.78 ^{**■▲}	5.31±0.11 ^{**■▲}
AS IV 敲除组	2.32±0.29 ^{**}	1.06±0.07 ^{**■}	158.21±12.71	20.08±0.83 [■]
AS IV 敲入组	3.75±0.30 ^{**■▲}	1.41±0.11 ^{**▲}	97.97±3.96 ^{**■▲}	4.27±0.14 ^{**■▲}
CAL 敲除组	2.83±0.49 ^{**}	1.38±0.08 ^{**}	137.42±3.92 ^{**}	11.91±0.32 ^{**■}
CAL 敲入组	5.02±0.55 ^{**■▲}	1.90±0.10 ^{■▲}	87.74±3.90 ^{**■▲}	2.89±0.03 ^{**■▲}

注:与空白组比较,^{###} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 IC10 配伍组比较,[■] $P < 0.05$,[■] $P < 0.01$;与同一活性成分敲除组比较,[▲] $P < 0.05$,[▲] $P < 0.01$ 。

AS IV、CAL 敲入组 MMP2 表达显著高于对应敲除组及 IC10 配伍组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), AS I 敲入组 MMP2 表达显著低于对应敲除组 ($P<0.01$), FA、FMN、AS IV、CAL 敲入组 TIMP2 表达高于对应敲除组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), FA、CG、FMN 敲入组 TGF- β 1 表达低于对应敲除组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), CAL 敲入组 TGF- β 1 表达高于对应敲除组 ($P<0.05$)。详见图 1、表 4。

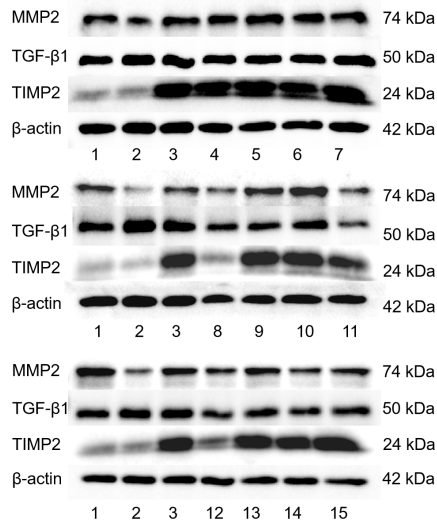


图 1 各组 MMP2、TIMP2、TGF- β 1 蛋白表达图

注:1.空白组;2.模型组;3. IC10 配伍组;4. FA 敲除组;5. FA 敲入组;6. CG 敲除组;7. CG 敲入组;8. FMN 敲除组;9. FMN 敲入组;10. AS I 敲除组;11. AS I 敲入组;12. AS IV 敲除组;13. AS IV 敲入组;14. CAL 敲除组;15. CAL 敲入组。

表 4 各组 MMP2、TIMP2、TGF- β 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	MMP2/ β -actin ($n=3$)	TIMP2/ β -actin ($n=4$)	TGF- β 1/ β -actin ($n=3$)
空白组	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.13
模型组	0.39 $\pm$ 0.05 ^{###}	0.73 $\pm$ 0.09	1.39 $\pm$ 0.14 ^{##}
IC10 配伍组	1.17 $\pm$ 0.17 ^{**}	3.10 $\pm$ 0.57 ^{**}	1.09 $\pm$ 0.13 [*]
FMN 敲除组	0.92 $\pm$ 0.08 ^{**}	2.05 $\pm$ 0.50 ^{**■}	1.39 $\pm$ 0.14
FMN 敲入组	1.63 $\pm$ 0.08 ^{**■▲▲}	4.08 $\pm$ 0.67 ^{**▲▲}	1.18 $\pm$ 0.04 ^{**▲}
AS I 敲除组	1.52 $\pm$ 0.16 ^{**}	3.07 $\pm$ 0.49 ^{**}	1.21 $\pm$ 0.09 ^{**}
AS I 敲入组	1.01 $\pm$ 0.17 ^{**▲▲}	3.67 $\pm$ 0.73 ^{**}	1.22 $\pm$ 0.11 ^{**}
ASIV 敲除组	0.90 $\pm$ 0.05 ^{**}	1.27 $\pm$ 0.08 ^{**■}	0.95 $\pm$ 0.10 [*]
ASIV 敲入组	1.44 $\pm$ 0.15 ^{**■▲▲}	3.28 $\pm$ 0.27 ^{**▲▲}	1.27 $\pm$ 0.24 [■]
CAL 敲除组	0.97 $\pm$ 0.15 ^{**}	2.82 $\pm$ 0.18 ^{**}	0.99 $\pm$ 0.18 [*]
CAL 敲入组	1.32 $\pm$ 0.06 ^{**▲▲}	4.00 $\pm$ 0.34 ^{**▲}	1.38 $\pm$ 0.24 ^{■▲}
FA 敲除组	1.04 $\pm$ 0.14 ^{**}	2.67 $\pm$ 0.33 ^{**}	1.15 $\pm$ 0.05 ^{**}
FA 敲入组	1.47 $\pm$ 0.08 ^{**■▲▲}	3.27 $\pm$ 0.37 ^{**■}	0.99 $\pm$ 0.04 ^{**▲}
CG 敲除组	1.08 $\pm$ 0.05 ^{**}	3.05 $\pm$ 0.47 ^{**}	1.22 $\pm$ 0.04 [■]
CG 敲入组	1.35 $\pm$ 0.14 ^{**▲}	3.06 $\pm$ 0.21 ^{**}	0.98 $\pm$ 0.03 ^{**▲▲}

注:与空白组比较, ^{###} $P<0.01$;与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与 IC10 配伍组比较, [■] $P<0.05$, [■] $P<0.01$;与同一活性成分敲除组比较, [▲] $P<0.05$, [▲] $P<0.01$ 。

3 讨论

近年研究表明,血管损伤时,VAF 最先被激活,激活后转化为肌成纤维细胞,并分泌大量细胞生长因子,导致大量胶原在血管壁沉积及 ECM 重构^[2,18-19]。TGF- β 1 是一种多功能的蛋白肽,为生长因子家族的重要成员,可促进 ECM 合成,抑制 MMP 的生成并减少胶原蛋白降解^[20]。MMP 可以降解 ECM,MMP2 在血管重构中发挥重要作用。TIMP 是 MMP 的特异性内源抑制因子,其中 TIMP2 主要抑制 MMP2,在正常血管中 MMP/TIMP 处于动态平衡,两者的比例失衡是导致 ECM 降解减少的重要原因^[5]。

气虚血瘀是血管重构的基本病机,益气活血是基本治则。黄芪和当归是临床常用的气血双补药对,黄芪和当归的配伍应用最有名的是黄芪与当归比为 5:1 的当归补血汤,具有益气活血之功效^[21]。课题组前期研究表明,黄芪-当归在一定比例范围配伍时具有抑制血管内膜增生的作用,其中以黄芪-当归 1:1 配伍抗血管内膜增生的作用为佳^[7]。其作用机制可能是两药配伍可抑制血管内皮受损后 PI3K/Akt 信号通路激活,进而抑制 VSMC 表型转化和细胞增殖,从而发挥抗 VSMC 增殖的作用^[9]。黄芪-当归配伍可抑制血管内膜增生时血管壁 ECM 沉积^[8]。黄芪-当归 6 种主要活性成分及其配伍可以通过抑制氧化损伤及细胞凋亡,抑制 VEC 损伤^[11]。

为了验证黄芪-当归活性成分配伍能否通过调节 ECM 合成改善病理性血管重构,本研究以 Ang II 诱导 VAF 增殖模型,探讨了黄芪-当归活性成分配伍对 VAF 合成 ECM 的影响。结果显示,Ang II 诱导 VAF 后,细胞合成 FN、LN、COL I、COL III 的能力增强,TGF- β 1 表达升高,MMP2、TIMP2 表达降低。表明 Ang II 可使 VAF 合成 ECM 的能力增强。6 种活性成分配伍可降低细胞 FN、LN、COL I、COL III 合成。在本研究使用的剂量范围内,FA、CG、FMN、AS I 可抑制 FN、LN 合成,FA、FMN、AS I、AS IV、CAL 可抑制 COL I、COL III 合成。

6 种活性成分配伍可促进 MMP2 的表达,其中 FA、CG、FMN、AS IV、CAL 有促进 MMP2 表达的作用,AS I 有抑制 MMP2 表达的作用。6 种活性成分配伍可促进 TIMP2 的表达,其中 FA、FMN、AS IV、CAL 可促进 TIMP2 表达,CG、AS I 对 TIMP2 表达的

作用无明显影响。6 种活性成分配伍可以抑制 TGF- β 1 表达,其中 FA、CG、FMN 可抑制 TGF- β 1 表达,AS IV、CAL 可促进 TGF- β 1 表达,而 AS I 对 TGF- β 1 的表达无明显影响。提示黄芪和当归的活性成分及其配伍可能通过抑制 TGF- β 1 促 ECM 合成,发挥抑制 VAF 合成 ECM 的作用。黄芪和当归的活性成分及其配伍可以促进 MMP2、TIMP2 表达,其机制可能是使 MMP2、TIMP2 在一个新的水平上达到平衡,从而有利于调节 ECM 合成与重构。

综上所述,黄芪-当归 6 种活性成分配伍可以抑制 Ang II 诱导的 VAF 合成 ECM 成分 FN、LN、COL I、COL III。其机制可能与抑制 TGF- β 1 信号通路,调节 MMP2、TIMP2 的表达有关。6 种活性成分配伍对 ECM 合成的调节作用十分复杂,并不只是单个成分药效之间的叠加,而是存在相互作用关系。调整其中某一成分剂量都可能对药物效应产生影响,可能与多种成分对多途径、多靶点发挥作用有关。

参考文献

- [1] 张伟,邓常清.从气血理论探讨病理性血管重构的研究思路[J]. 中华中医药杂志,2019,34(10):4713-4717.
- [2] TINAJERO M G, GOTLIEB A I. Recent developments in vascular adventitial pathobiology: The dynamic adventitia as a complex regulator of vascular disease[J]. The American Journal of Pathology, 2020, 190(3): 520-534.
- [3] MA Z H, MAO C F, JIA Y T, et al. Extracellular matrix dynamics in vascular remodeling[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2020, 319(3): C481-C499.
- [4] OLEJARZ W, ACHETA D, KUBIAK-TOMASZEWSKA G. Matrix metalloproteinases as biomarkers of atherosclerotic plaque instability[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(11): 3946.
- [5] SIMES G, PEREIRA T, CASEIRO A. Matrix metalloproteinases in vascular pathology[J]. Microvascular Research, 2022, 143: 104398.
- [6] KARAMANOS N K, THEOCHARIS A D, PIPERIGKOU Z, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix[J]. The FEBS Journal, 2021, 288(24): 6850-6912.
- [7] 彭熙炜,阎卉芳,黄娟,等.黄芪-当归不同配伍比例对大鼠血管内膜增生的影响[J].中国中医药信息杂志,2017,24(6):56-59.
- [8] 彭熙炜,阎卉芳,黄娟,等.黄芪-当归配伍对大鼠血管内膜增生模型细胞外基质的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(6):629-634.
- [9] 阎卉芳,徐昊,彭熙炜,等.黄芪和当归配伍对大鼠血管内膜增生血管平滑肌细胞增殖的影响[J].中国临床药理学与治疗学, 2018,23(4):361-369.
- [10] 彭熙炜,阎卉芳,黄娟,等.黄芪-当归配伍对大鼠血管内膜增生模型炎症反应的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(2):580-584.
- [11] 谭妮子,刘彩霞,朱秋燕,等.黄芪当归主要活性成分配伍对人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(24):4141-4148.
- [12] WEN X D, QI L W, LI P, et al. Simultaneous determination of calycosin-7-O-beta-D-glucoside, ononin, astragaloside IV, astragaloside I and ferulic acid in rat plasma after oral administration of Danggui Buxue Tang extract for their pharmacokinetic studies by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2008, 865(1/2): 99-105.
- [13] 唐蓉,张依人,陈叶童,等.不同剂量配伍对黄芪-当归中 5 种化学成分的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(23):1-5.
- [14] LIU C X, TAN Y Z, DENG C Q. Main active components and cell cycle regulation mechanism of astragali Radix and angelicae Sinensis radix in the treatment of ox-LDL-induced HUVECs injury and inhibition of their cell cycle[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021: 8087183.
- [15] 陈凌波,任芮彬,阎卉芳,等.基于均匀试验设计的黄芪-当归主要化学成分剂量配伍对血管平滑肌细胞增殖的影响[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(3):143-151.
- [16] 崔文博,李爱平,崔婷,等.基于目标成分敲除/敲入技术辨识中药药效物质基础研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(6):1279-1286.
- [17] GUO Y T, LU Y Y, LU X, et al. Krüppel-like factor 15/interleukin 11 axis-mediated adventitial remodeling depends on extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation in angiotensin II-induced hypertension[J]. Journal of the American Heart Association, 2021, 10(16): e020554.
- [18] LI X D, HONG M N, CHEN J, et al. Adventitial fibroblast-derived vascular endothelial growth factor promotes vasa vasorum-associated neointima formation and macrophage recruitment[J]. Cardiovascular Research, 2020, 116(3): 708-720.
- [19] MACKAY C D A, JADLI A S, FEDAK P W M, et al. Adventitial fibroblasts in aortic aneurysm: Unraveling pathogenic contributions to vascular disease[J]. Diagnostics, 2022, 12(4): 871.
- [20] TZAVLAKI K, MOUSTAKAS A. TGF- β signaling[J]. Biomolecules, 2020, 10(3): 487.
- [21] 刘彩霞,邓常清.中药及复方改善血管内皮细胞氧化应激损伤的研究进展[J].湖南中医药大学学报,2021,41(1):151-158.

(本文编辑 周旦)