·实验研究·

本文引用: 周梦红, 曾勇, 王月爱, 陈露阳, 雍苏南. 天苓止眩片调控SIRT3改善高血压大鼠心脏微血管内皮细胞损伤的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(10): 1963-1972.

天苓止眩片调控SIRT3改善高血压大鼠心脏微血管内皮细胞损伤的机制研究

周梦红,曾勇,王月爱,陈露阳,雍苏南*
湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007

〔摘要〕**目的** 探讨天苓止眩片调控沉默信息调节因子3(SIRT3)改善高血压环境下的大鼠心脏微血管内皮细胞(RCMECs)损伤的分子机制。**方法** 采用1 μg·mL^{-1}脂多糖(LPS)联合0.2 μmol·L^{-1}血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)干预24 h,模拟高血压环境下RCMECs损伤模型,设置正常组、模型组、SIRT3阻断剂组、天苓止眩片含药血清组和SIRT3阻断剂+天苓止眩片含药血清组。采用CCK-8法筛选天苓止眩片含药血清给药浓度。采用细胞成像分析系统观察各组RCMECs形态结构变化;采用CCK-8法检测RCMECs存活率。采用荧光探针法检测RCMECs线粒体活性氧(mtROS)水平;采用ELISA检测细胞上清液中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-1β(IL-1β)含量;采用免疫荧光和Western blot分别检测RCMECs中SIRT3、缺氧诱导因子1α(HIF-1α)、核因子κB亚基p65(p65)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)和胱天蛋白酶-1(Caspase-1)蛋白表达水平。**结果** 天苓止眩片含药血清以10%浓度进行给药。与正常组比较,模型组形态明显受损,RCMECs存活率降低(P<0.01),mtROS水平、TNF-α、IL-1β含量均升高(P<0.01),SIRT3蛋白表达水平降低(P<0.01),HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平均升高(P<0.01)。与模型组比较,SIRT3阻断剂组、SIRT3阻断剂+天苓止眩片含药血清组RCMECs形态结构损伤未明显改善,而天苓止眩片含药血清组RCMECs形态结构损伤明显改善;SIRT3阻断剂组RCMECs存活率、SIRT3蛋白表达水平均降低(P<0.05,P<0.01),mtROS水平、TNF-α、IL-1β含量、HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平均升高(P<0.01);SIRT3阻断剂+天苓止眩片含药血清组、天苓止眩片含药血清组RCMECs存活率、SIRT3蛋白表达水平均升高(P<0.01),mtROS水平、TNF-α、IL-1β含量、HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平均降低(P<0.05,P<0.01)。与SIRT3阻断剂组比较,SIRT3阻断剂+天苓止眩片含药血清组、天苓止眩片含药血清组RCMECs存活率、SIRT3蛋白表达水平均升高(P<0.01),mtROS水平、TNF-α、IL-1β含量、HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平均降低(P<0.05,P<0.01)。与天苓止眩片含药血清组比较,SIRT3阻断剂+天苓止眩片含药血清组RCMECs存活率、SIRT3蛋白表达水平降低(P<0.05),mtROS水平、TNF-α和IL-1β含量、HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平均升高(P<0.05)。**结论** 天苓止眩片含药血清可能通过上调SIRT3,进而抑制HIF-1α/p65与NLRP3/Caspase-1两条通路蛋白表达异常升高,减少mtROS、TNF-α、IL-1β释放,最终改善高血压环境下的RCMECs损伤。

〔关键词〕高血压;天苓止眩片;心脏微血管内皮细胞;沉默信息调节因子3;氧化应激;炎症小体
〔中图分类号〕R285.5 〔文献标志码〕A 〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.10.001

Mechanism of Tianling Zhixuan Tablets in ameliorating cardiac microvascular endothelial cell injury by regulating SIRT3 in hypertensive rats

*ZHOU Menghong, ZENG Yong, WANG Yueai, CHEN Luyang, YONG Sunan**
The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔**Abstract**〕**Objective** To investigate the molecular mechanism by which Tianling Zhixuan Tablets (TLZXT) regulate sirtuin 3

〔收稿日期〕2026-07-06
〔基金项目〕湖南省自然科学基金医卫联合项目(2024JJ9418,2026JJ82085);湖南省教育厅科学研究项目(25A0303);长沙市2025年度指导性科技计划项目(kzd2501108);湖南中医药大学院校联合基金项目(2024XYLH012)。
〔通信作者〕* 雍苏南,女,博士,研究员,硕士研究生导师,E-mail:sunan0526@163.com。

(SIRT3) to ameliorate injury of rat cardiac microvascular endothelial cells (RCMECs) under hypertensive conditions. **Methods** An RCMEC injury model under simulated hypertensive conditions was established by intervention with 1 μg·mL^{-1} lipopolysaccharide (LPS) combined with 0.2 μmol·L^{-1} angiotensin Ⅱ (AngⅡ) for 24 h. The cells were randomized into normal group, model group, SIRT3 inhibitor group, TLZXT medicated serum group, and SIRT3 inhibitor+TLZXT medicated serum group. The CCK-8 assay was used to screen the administration concentration of TLZXT medicated serum. A cell imaging analysis system was used to observe morphological and structural changes of RCMECs in each group; the CCK-8 assay was used to determine RCMEC viability; a fluorescent probe method was used to examine mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) levels in RCMECs; ELISA was used to determine the content of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-1β (IL-1β) in the cell supernatant; immunofluorescence and Western blot were used to determine the protein expression levels of SIRT3, hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α), nuclear factor κB p65 (p65), NOD-like receptor family pyrin domain containing protein 3 (NLRP3), and Caspase-1 in RCMECs. **Results** A 10% TLZXT medicated serum was used in subsequent experiments. Compared with the normal group, the model group showed obvious morphological damage, decreased RCMEC viability (P<0.01), increased mtROS levels as well as TNF-α and IL-1β content (P<0.01), decreased SIRT3 protein expression (P<0.01), and increased protein expression levels of HIF-1α, p65, NLRP3, and Caspase-1 (P<0.01). Compared with the model group, the SIRT3 inhibitor group and the SIRT3 inhibitor+TLZXT medicated serum group showed no obvious amelioration in morphological and structural damage of RCMECs, whereas the TLZXT medicated serum group showed obvious amelioration in morphological and structural damage of RCMECs; in the SIRT3 inhibitor group, RCMEC viability and SIRT3 protein expression were decreased (P<0.05, P<0.01), while mtROS levels, TNF-α and IL-1β content, and protein expression levels of HIF-1α, p65, NLRP3, and Caspase-1 were increased (P<0.01); in the SIRT3 inhibitor+TLZXT medicated serum group and the TLZXT medicated serum group, RCMEC viability and SIRT3 protein expression were increased (P<0.01), while mtROS levels, TNF-α and IL-1β content, and protein expression levels of HIF-1α, p65, NLRP3, and Caspase-1 were decreased (P<0.05, P<0.01). Compared with the SIRT3 inhibitor group, the SIRT3 inhibitor+TLZXT medicated serum group and the TLZXT medicated serum group showed increased RCMEC viability and SIRT3 protein expression (P<0.01), and decreased mtROS levels, TNF-α and IL-1β content, and protein expression levels of HIF-1α, p65, NLRP3, and Caspase-1 (P<0.05, P<0.01). Compared with the TLZXT medicated serum group, the SIRT3 inhibitor+TLZXT medicated serum group showed decreased RCMEC viability and SIRT3 protein expression (P<0.05), and increased mtROS levels, TNF-α and IL-1β content, and protein expression levels of HIF-1α, p65, NLRP3, and Caspase-1 (P<0.05). **Conclusion** TLZXT medicated serum may up-regulate SIRT3, thereby inhibiting the abnormally elevated protein expression of the HIF-1α/p65 and NLRP3/Caspase-1 pathways, reducing the release of mtROS, TNF-α and IL-1β, and ultimately ameliorating RCMECs injury under hypertensive conditions.

〔**Keywords**〕 hypertension; Tianling Zhixuan Tablets; cardiac microvascular endothelial cells; sirtuin 3; oxidative stress; inflammasome

目前,全球高血压患者已达 14 亿,高血压已成为全球性公共健康问题,我国高血压患病率约为 27.5%,且患者呈现年轻化趋势[1-3]。高血压病属中医学“眩晕”“头痛”等范畴,其“虚、瘀、风”的病机特点与现代医学中血管内皮氧化应激损伤、炎症反应病理过程存在密切关联[4-5]。天苓止眩片(原名复方钩藤降压片)具有养阴柔肝、化瘀通络的功效。本课题组前期研究表明,该药适用于阴虚阳亢、瘀血阻络证的原发性高血压病,可改善患者的高血压性左心室肥厚,降压作用显著,同时能有效改善患者眩晕、头痛、心悸等症状,临床疗效确切,安全性良好[6-7]。研究表明,血管内皮功能障碍是高血压的病理基础之一,在疾病发展过程中沉默信息调节因子 3(silent information regulator 3, SIRT3)介导的线粒体氧化应激、炎症激活与高血压性左心室肥厚、血管内皮功能损伤密切相关[8-11]。课题组前期初步揭示了天苓止眩片减轻高血压性血管内皮氧化损伤的药效物质基础[12]。动物实验结果表明,天苓止眩片能有效调节自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)血管活性物质的平衡,抑制炎症因子释放,从而改善模型大鼠高血压性左心室肥厚,但其作用机制仍有待阐明[13-14]。本项目拟通过体外细胞实验,以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)联合血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ, AngⅡ)干预模拟高血压环境下大鼠心脏微血管内皮细胞(rat cardiac microvascular endothelial cells, RCMECs)损伤模型,进一步揭示天苓止眩片调控 SIRT3,改善大鼠RCMECs 损伤的分子机制。

1 实验材料

1.1 细胞及实验动物

RCMECs(批号:CP-R135)购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

SPF 级雄性 SD 大鼠 10 只，体质量 180~220 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，实验动物许可证号：SCXK(湘)2021-0002。大鼠饲养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级动物实验中心，温度 24~26 ℃，相对湿度 50%~60%，12 h 昼夜交替循环，动物自由饮水、摄食。本研究已经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会审批通过，其批准号为 ZYFY202409183。

1.2　试药

天苓止眩片，由钩藤、天麻、川芎、当归、萝芙木、白芍、野菊花 7 味中药组成(湖南中医药大学第一附属医院制剂中心提供，批准文号：湘药制字 Z20210516，批号：20240601，规格：0.5 g/片，100 片/瓶)。大鼠 RCMECs 专用培养基(武汉普诺赛生物科技有限公司，批号：CM-R135)；LPS(美国 Sigma 公司，批号：2024031L4)；Ang Ⅱ、SIRT3 阻断剂 3-TYP(美国 MCE 公司，批号：HY-121782、HY-108331)；CCK8检测试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司，批号：BA07018328)；红色线粒体超氧化物荧光探针试剂盒(red mitochondrial superoxide indicator, MitoSOX)(美国 Invitrogen 公司，批号：202509342)；大鼠肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、白细胞介素-1β(interleukin 1β, IL-1β)ELISA 检测试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司，批号：202501R3、202501R6)；SIRT3、缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)、核因子 κB 亚基 p65(p65)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing prot-ein 3, NLRP3)、胱天蛋白酶-1(cysteinyl aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)抗体(美国 Affinity 公司，批号：5614216、8325641、5963214、4599536、7509541)。

1.3　仪器

CO_2 细胞培养箱(德国 Eppendorf 公司，型号：Galaxy170RCO2)；高速冷冻离心机(德国贺默仪器科技有限公司，型号：Z32HK)；细胞成像分析系统(广州明美科技有限公司，型号：MSX-2)；多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司，型号：EnSpire)；凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司，型号：MPTC)；超高分辨率激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司，型号：LSM800)。

2　方法

2.1　含药血清的制备

10 只 SPF 级雄性 SD 大鼠，适应性饲养 5 d后，按体质量随机分为空白组和天苓止眩片组，每组 5只。将天苓止眩片加入 8 倍量水浸泡 30 min，武火煮沸后，转为文火煮 2 h，药液倒出后，药渣加入适量水继续煎煮，方法同前，合并两次药液，浓缩成生药含量为 2.285 g/mL 的天苓止眩片悬液，于 4 ℃冷藏备用。天苓止眩片组大鼠灌胃给予 22.85 $g\cdot kg^{-1}$ 的天苓止眩片悬液(参考课题组前期给药剂量[15])，空白组大鼠灌胃等体积蒸馏水，每日灌胃给药 2 次，给药体积为 10 $mL\cdot kg^{-1}$，连续 3 d，末次给药 1 h 后，大鼠经戊巴比妥钠麻醉后，行腹主动脉取血，室温 3 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 15 min(离心半径为 18 cm)，取上清液，置于 56 ℃水浴锅灭活处理 30 min，于室温 1 200 $r\cdot min^{-1}$ 离心 5 min(离心半径为 18 cm)，收集上清液，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，保存至-80 ℃冰箱，备用。

2.2　细胞造模

将对数生长期的 RCMECs 用 0.25%胰蛋白酶消化，离心、重悬细胞后，按每孔 2×10^4 个细胞接种至 24 孔细胞培养板中，置于 CO_2 细胞培养箱中继续培养 24 h。参照文献[16-17]中的方法，用 1 $\mu g\cdot mL^{-1}$ LPS 联合 0.2 $\mu mol\cdot L^{-1}$ Ang Ⅱ 干预 RCMECs24 h，以模拟高血压环境下的体外细胞模型。

2.3　天苓止眩片含药血清给药浓度的筛选

将接种至 96 孔细胞培养板中的 RCMECs 培养 24 h，随机分为正常组、模型组、不同空白血清(5%、10%、15%、20%)组、不同天苓止眩片含药血清(5%、10%、15%、20%)组。

空白组添加无血清培养基处理 48 h；造模组经 LPS 联合 Ang Ⅱ 干预造模 24 h 后，添加无血清培养基处理 24 h；空白血清组(5%、10%、15%、20%)和天苓止眩片含药血清液组(5%、10%、15%、20%)经 LPS 联合 Ang Ⅱ 干预造模 24 h 后，添加相应药物处理 24 h。每孔加入含 20 μL CCK-8 溶液，孵育 2 h。采用多功能酶标仪测定 450 nm 处吸光度(optical density, OD)值，计算各组细胞存活率。

2.4　分组及给药

将对数生长期 RCMECs 随机分为正常组、模型组、SIRT3 阻断剂组、天苓止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天苓止眩片含药血清组。正常组加入正常培养基培养；模型组及其他给药组加入终浓度1 $\mu g\cdot mL^{-1}$ 的LPS 和 0.2 $\mu mol\cdot L^{-1}$ 的 Ang Ⅱ 建立 RCMECs 损伤模型；SIRT3 阻断剂组加入终浓度 38 $\mu mol\cdot L^{-1}$ 的 3-TYP 进行干预；天苓止眩片含药血清组加入 10%天

苓止眩片含药血清进行干预;SIRT3 阻断剂组+天苓止眩片含药血清组同时加入终浓度 38 μmol·L^{-1} 的 3-TYP 和 10%天苓止眩片含药血清进行干预。

2.5 细胞形态学观察

将细胞培养板置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养,造模及给药干预后,采用细胞成像分析系统观察 RCMECs 胞体、溶酶体等形态结构变化情况。

2.6 细胞存活率检测

将细胞培养板置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养,造模及给药干预后,弃掉原培养基,每孔加入含 20 μL CCK-8 溶液孵育 2 h,在多功能酶标仪上于 450 nm 处检测各孔 OD 值,计算各组 RCMECs 存活率。

2.7 线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)检测

加入终浓度 5 μmol·L^{-1} 的 MitoSOX 荧光探针工作液,37 ℃避光孵育 30 min;加入 4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(4′,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)工作液(1:800),室温避光孵育 20 min,最后于激光共聚焦显微镜上以激发波长 510 nm/发射波长 580 nm 进行荧光检测。

2.8 ELISA 检测 TNF-α、IL-1β 含量

收集细胞上清液,于室温 3 000 r·min^{-1} 离心 10 min(离心半径为 18 cm),取上清液,根据 ELISA 试剂盒说明书,经抗体孵育、酶结合、显色、终止等操作,于 450 nm 波长下测定 OD 值,并根据标准曲线计算蛋白浓度,检测各组 RCMECs 上清液中 TNF-α、IL-1β 含量。

2.9 免疫荧光检测各组细胞中 SIRT3、HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白的表达水平

将处于对数生长期的 RCMECs 用 4%多聚甲醛室温固定 30 min,使用 0.5% Triton X-100 室温透化 10 min,山羊血清封闭 30 min,加入兔抗大鼠SIRT3、HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 一抗稀释液(稀释比均为 1:100),4 ℃湿盒避光孵育过夜;随后加入山羊抗兔异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)荧光二抗(1:400),37 ℃避光孵育 30 min;最后加入 DAPI 工作液(1:800)室温避光孵育 20 min,封片,于激光共聚焦显微镜下观察。

2.10 Western blot 检测各组细胞中 SIRT3、HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平

将处于对数生长期的 RCMECs 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液,提取总蛋白并定量,经变性、电泳、转膜和封闭等处理后,分别加入兔抗大鼠 SIRT3(1∶1 000)、HIF-1α(1∶800)、p65(1∶1 000)、NLRP3(1∶1 000)、Caspase-1(1∶800)一抗稀释液,4 ℃孵育过夜,再与辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶10 000)于摇床中室温孵育 1 h,最后用 ECL 显影液显色,并采用超灵敏多色荧光成像分析系统进行曝光,通过 ImageJ 软件计算各组蛋白的相对表达情况。

2.11 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析,计量资料以“$\bar{x}\pm s$”表示,先通过 *Shapiro-Wilk* 检验评估数据正态性分布特征,正态分布且方差齐性数据,采用单因素方差分析(*ANOVA*)比较组间差异,其中方差齐性采用 *LSD* 检验,方差非齐性采用 *Dunnett's T3* 检验。若数据呈非正态分布,则选用非参数 *Mann-Whitney U* 检验进行分析,采用双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 天苓止眩片含药血清浓度筛选

与正常组比较,模型组和各血清干预组RCMECs 存活率均明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,5%空白血清组、10%空白血清组、15%空白血清组及 20%空白血清组细胞存活率均升高,但差异无统计学意义($P>0.05$),故后续研究中不再设置空白血清对照组;与模型组比较,5%、10%、15%、20%天苓止眩片含药血清组均能升高 RCMECs 存活率($P<0.05$,$P<0.01$),其中以 10%天苓止眩片含药血清的作用效果最佳,故采用该浓度进行后续的实验研究。详见图 1。

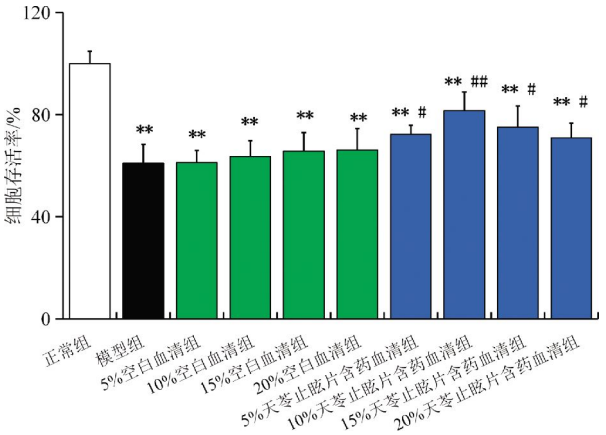


图 1 不同浓度的天苓止眩片含药血清处理后 RCMECs 的存活率($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Fig.1 Viability of RCMECs treated with different concentrations of TLZXT medicated serum ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

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

3.2　天芩止眩片含药血清对 RCMECs 形态学观察

与正常组比较，模型组 RCMECs 折光性明显降低，可观察到胞体变小、皱缩或破裂。与模型组比较，SIRT3 阻断剂组 RCMECs 损伤进一步加重，细胞体破坏，细胞死亡数量明显增多；天芩止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组细胞折光性增高、细胞体清晰度增加、细胞内溶酶体减少。与天芩止眩片含药血清组比较，SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组细胞折光性降低、细胞体破坏，细胞内溶酶体增多。详见图 2。

3.3　天芩止眩片含药血清对 RCMECs 存活率的影响

与正常组比较，模型组、SIRT3 阻断剂组、天芩止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组 RCMECs 存活率均明显降低(P<0.01)。与模型组比较，SIRT3 阻断剂组 RCMECs 存活率明显降低(P<0.01)，而天芩止眩片含药血清组、SIRT3阻断剂+天芩止眩片含药血清组 RCMECs 存活率均升高(P<0.05，P<0.01)。与SIRT3 阻断剂组比较，天芩止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组RCMECs 存活率均明显升高(P<0.01)。与天芩止眩片含药血清组比较，SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组 RCMECs 存活率降低(P<0.05)。详见图 3。

3.4　天芩止眩片含药血清对 RCMECs 中 mtROS 水平的影响

与正常组比较，模型组、SIRT3 阻断剂组、天芩止眩片含药血清组和 SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组 RCMECs 中 mtROS 水平均明显升高(P<0.01)。与模型组比较，SIRT3 阻断剂组细胞中 mtROS 水平升高(P<0.05)，天芩止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组 RCMECs 中 mtROS 水平降低(P<0.05，P<0.01)。与 SIRT3 阻断剂组比较，天芩止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组 RCMECs 中 mtROS 水平明显降低(P<0.01)。与天芩止眩片含药血清组比较，SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组RCMECs 中 mtROS 水平升高(P<0.05)。详见图 4。

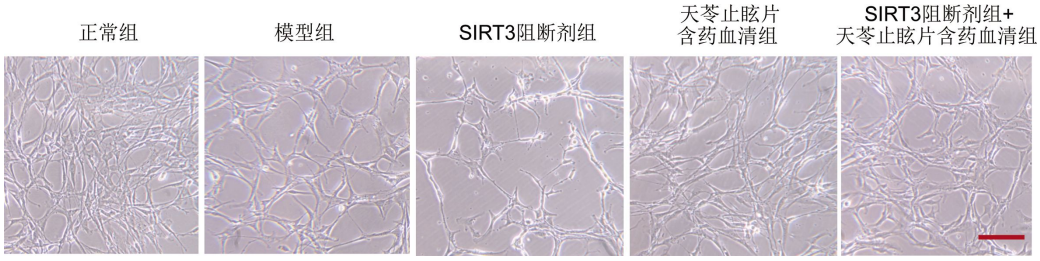


图 2　天芩止眩片含药血清处理后 RCMECs 的形态观察(×100，比例尺=100 μm)

Fig.2　Morphological observation of RCMECs after treatment with TLZXT medicated serum (×100, scale bar=100 μm)

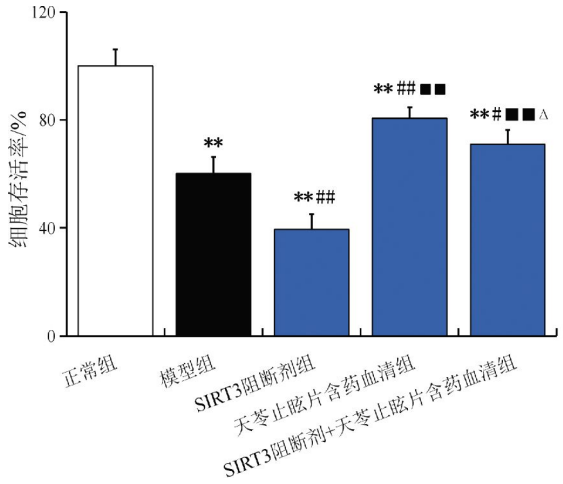


图 3　天芩止眩片含药血清对 RCMECs 存活率的影响

($\bar{x}\pm s$，n=4)

Fig.3　Effects of TLZXT medicated serum on the viability of RCMECs ($\bar{x}\pm s$，n=4)

注：与正常组比较，**P<0.01；与模型组比较，#P<0.05，##P<0.01；与 SIRT3 阻断剂组比较，■■P<0.01；与天芩止眩片含药血清组比较，△P<0.05。

3.5 天芩止眩片含药血清对 RCMECs 上清液中TNF-α、IL-1β 含量的影响

与正常组比较，模型组、SIRT3 阻断剂组、SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组 RCMECs 上清液中 TNF-α、IL-1β 含量均明显升高(P<0.01)。与模型组比较，SIRT3 阻断剂组细胞上清液中炎症因子TNF-α、IL-1β 含量升高(P<0.05，P<0.01)，天芩止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组细胞上清液中 TNF-α、IL-1β 含量降低(P<0.05，P<0.01)。与 SIRT3 阻断剂组比较，天芩止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组细胞上清液中 TNF-α、IL-1β 含量均明显降低(P<0.01)。与天芩止眩片含药血清组比较，SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组细胞上清液中 TNF-α、IL-1β 含量升高(P<0.05，P<0.01)。详见图 5。

3.6 天芩止眩片含药血清对 RCMECs 中 SIRT3、HIF-1α、p65、NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达水平的影响

与正常组比较，模型组、SIRT3 阻断剂组、天芩止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组 RCMECs 中 SIRT3 蛋白表达水平均明显降低(P<0.01)，HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平均明显升高(P<0.01)。与模型组比较，SIRT3 阻断剂组中 SIRT3、Caspase-1 蛋白表达水平明显降低(P<0.01)，HIF-1α、p65、NLRP3 蛋白表达水平升高(P<0.05)；天芩止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天芩止眩片含药血清组则 RCMECs 中 SIRT3 蛋白表达

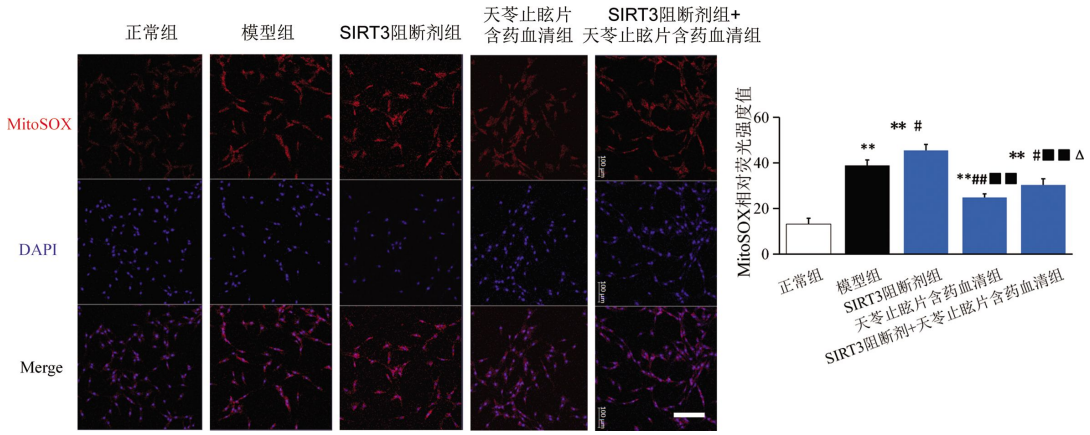


图 4 天芩止眩片含药血清对 mtROS 水平的影响($\bar{x}\pm s$，n=3，×100，比例尺=100 μm)

Fig.4 Effects of TLZXT medicated serum on mtROS levels ($\bar{x}\pm s$, n=3, ×100, scale bar=100 μm)

注：与正常组比较，**P<0.01；与模型组比较，#P<0.05，##P<0.01；与 SIRT3 阻断剂组比较，■■P<0.01；与天芩止眩片含药血清组比较，△P<0.05。

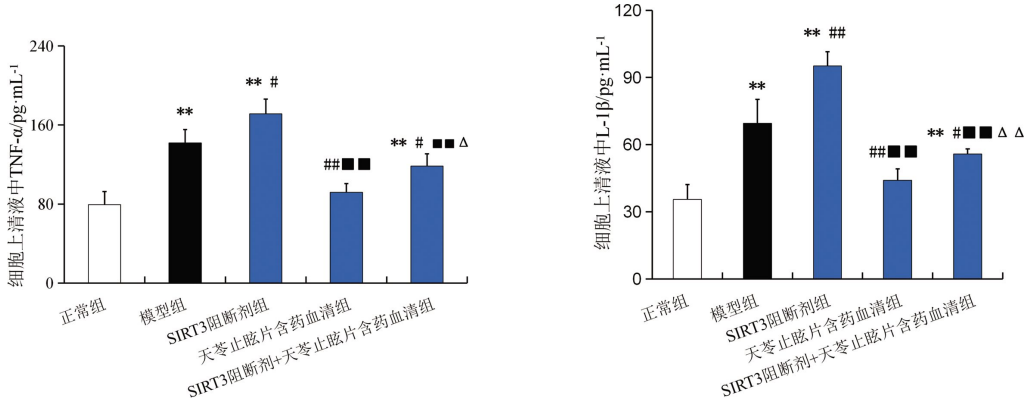


图 5 天芩止眩片含药血清对细胞上清液中 TNF-α、IL-1β 含量的影响($\bar{x}\pm s$，n=4)

Fig.5 Effects of TLZXT medicated serum on the content of TNF-α and IL-1β in the cell supernatant ($\bar{x}\pm s$, n=4)

注：与正常组比较，**P<0.01；与模型组比较，#P<0.05，##P<0.01；与 SIRT3 阻断剂组比较，■■P<0.01；与天芩止眩片含药血清组比较，△P<0.05，△△P<0.01。

水平均升高(P<0.05,P<0.01),HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平降低(P<0.05,P<0.01)。与SIRT3阻断剂组比较,天苓止眩片含药血清组、SIRT3阻断剂+天苓止眩片含药血清组SIRT3蛋白表达水平均升高(P<0.01),HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平均明显降低(P<0.01)。与天苓止眩片含药血清组比较,SIRT3阻断剂+天苓止眩片含药血清组SIRT3蛋白表达水平均明显降低(P<0.05),HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1蛋白表达水平升高(P<0.05)。详见图6。

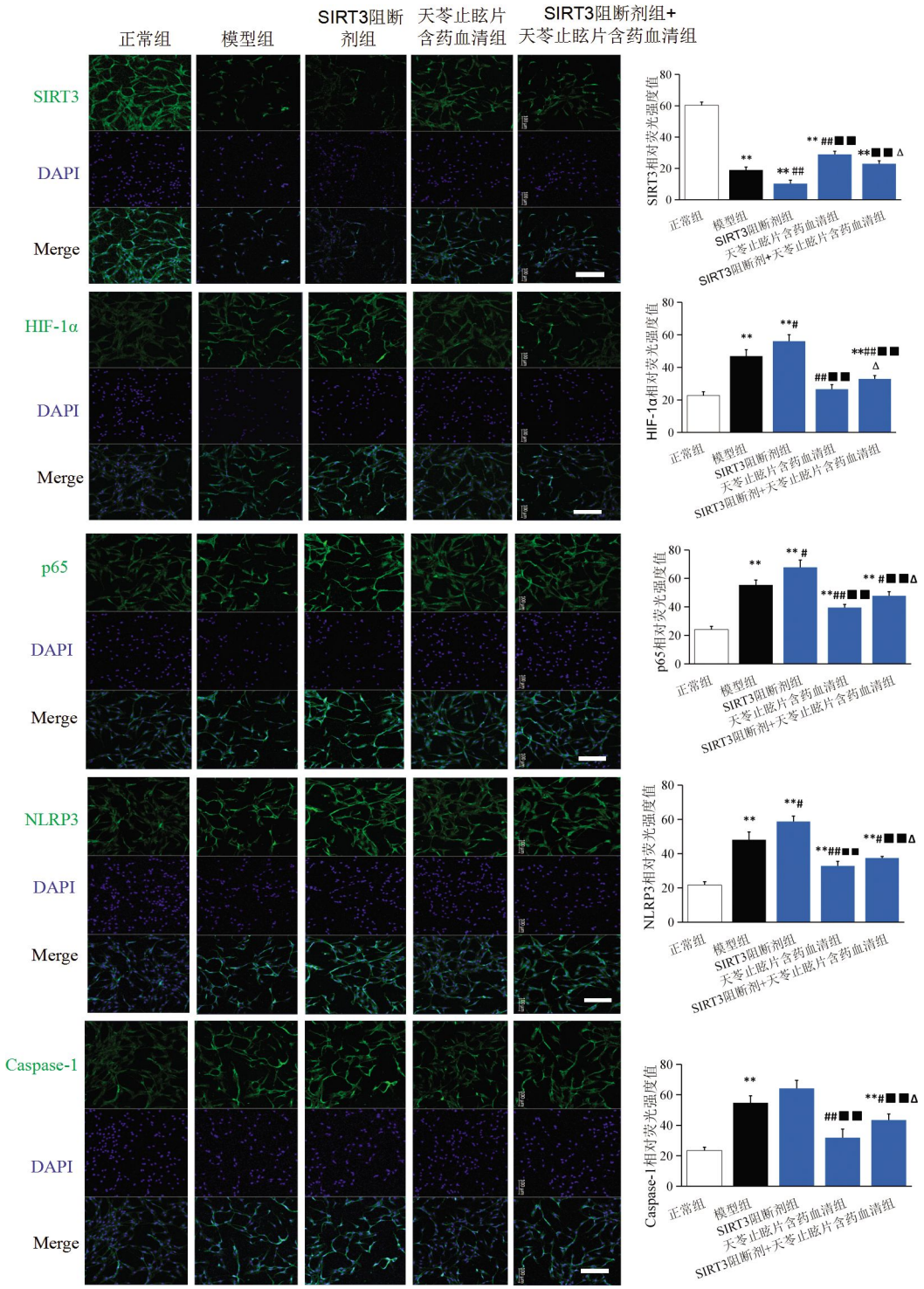


图6　天苓止眩片含药血清对SIRT3、HIF-1α、p65、NLRP3和Caspase-1蛋白表达水平的影响

($\bar{x}\pm s$,n=3,×100,比例尺=100 μm)

Fig.6　Effects of TLZXT medicated serum on the protein expression levels of SIRT3, HIF-1α, p65, NLRP3, and Caspase-1 ($\bar{x}\pm s$, n=3, ×100, scale bar=100 μm)

注:与正常组比较,**P<0.01;与模型组比较,$^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01;与SIRT3阻断剂组比较,■■P<0.01;与天苓止眩片含药血清组比较,$^{\Delta}P$<0.05。

3.7 天苓止眩片含药血清对RCMECs 中 SIRT3、HIF-1α、p65、NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达水平的影响

与正常组比较，模型组、SIRT3 阻断剂组、天苓止眩片含药血清组和 SIRT3 阻断剂+天苓止眩片含药血清组 RCMECs 中 SIRT3 蛋白表达水平均明显降低(P<0.01)，HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平均明显升高(P<0.01)。与模型组比较，SIRT3阻断剂组中 SIRT3 蛋白表达明显降低(P<0.01)，HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达升高(P<0.05)；天苓止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天苓止眩片含药血清组 RCMECs 中 SIRT3 蛋白表达升高(P<0.05，P<0.01)，HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平降低(P<0.05，P<0.01)。与 SIRT3 阻断剂组比较，天苓止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天苓止眩片含药血清组 SIRT3 蛋白表达均明显升高(P<0.01)，HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平均明显降低(P<0.01)。与天苓止眩片含药血清组比较，SIRT3 阻断剂+天苓止眩片含药血清组 SIRT3 蛋白表达明显降低(P<0.01)，HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平升高(P<0.05，P<0.01)。详见图 7。

4 讨论

高血压属中医学“眩晕”“头痛”等病证范畴，病位在肝、肾、心、脾等脏腑，病理性质属“本虚标实”，以气血亏虚、脑海不充、清窍失养为虚，风、火、痰、瘀为实。《素问·评热病论篇》载：“邪之所凑，其气必虚。”若心气、肾气亏虚，失于对脉道的调控和温养，邪气袭扰，则易引起血管功能与结构异常，发展为血管内皮功能障碍[18]。目前，高血压发病机制复杂，涉及交感神经系统、血管内皮功能障碍等多个方面[19-20]。诸多证据表明，血管内皮功能障碍和高血压病之间存在双向关联，血管内皮功能障碍参与高血压发病过程，而

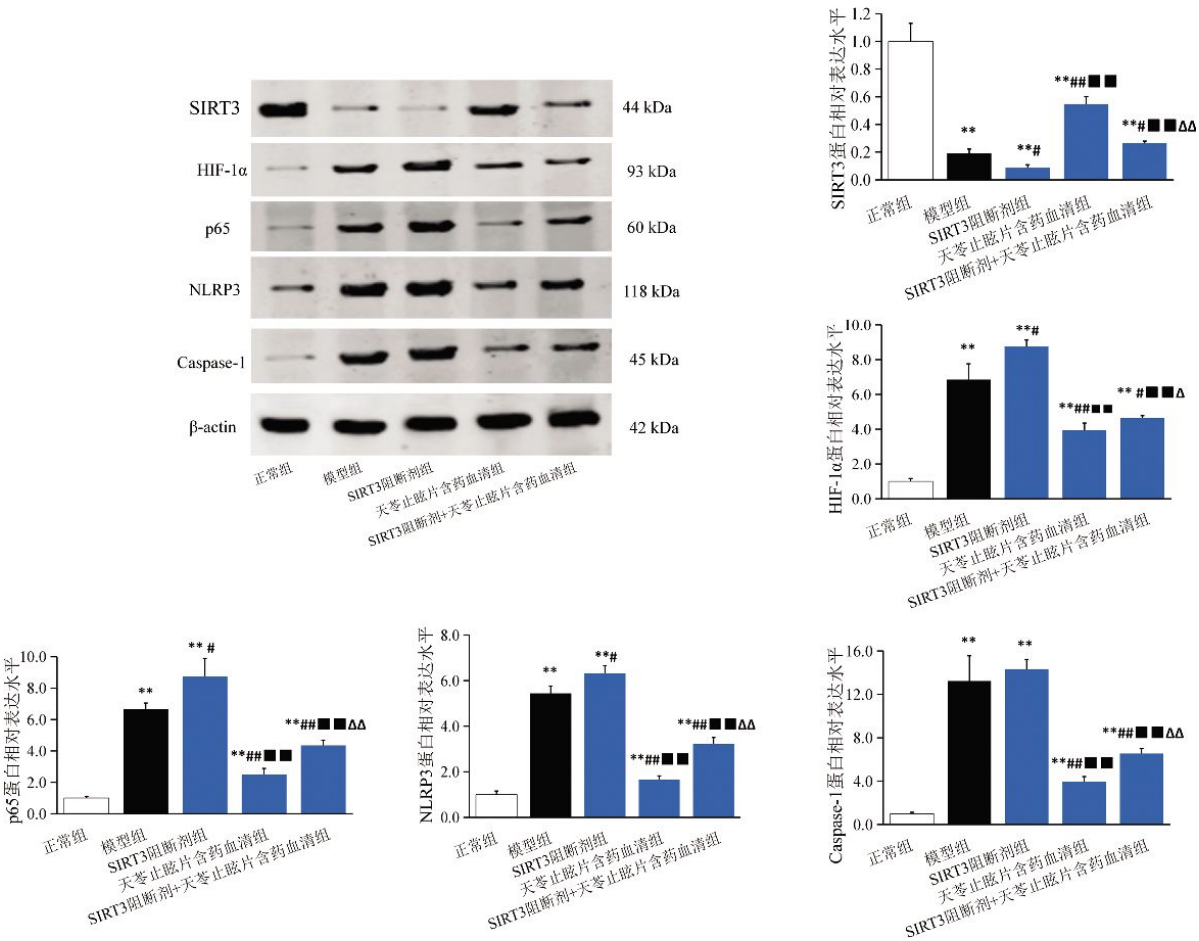


图 7 天苓止眩片含药血清对 SIRT3、HIF-1α、p65、NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s$，n=3)

Fig.7 Effects of TLZXT medicated serum on the protein expression levels of SIRT3, HIF-1α, p65, NLRP3, and Caspase-1 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

注：与正常组比较，**P<0.01；与模型组比较，#P<0.05，##P<0.01；与 SIRT3 阻断剂组比较，■■P<0.01；与天苓止眩片含药血清组比较，△△P<0.01。

高血压又加重血管内皮功能障碍[21]。然而,目前中医药干预血管内皮功能的作用尚未阐明,其分子机制尚待深入研究。SIRT3 是Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶 Sirtuin 蛋白家族的成员,其在调节氧化应激、炎症反应等功能活动中发挥重要作用,高度参与高血压病程[9-10]。最新研究认为,SIRT3 低表达可介导高血压血管内皮功能障碍[22-24]。在高钠饮食、遗传等高血压风险因素作用下,SIRT3 致超氧化物歧化酶 2(superoxide dismutase 2, SOD2)失活和线粒体氧化应激水平增高,促进具有细胞毒性的脂质氧化产物形成,细胞内 ROS 增加、HIF-1α 增加、血管内皮钙黏蛋白(vascular endothelial cadherin, VE-cadherin)减少,导致内皮细胞通透性增加,并激活核因子 κB,使炎症因子、血管细胞黏附分子和细胞间黏附分子分泌增加,诱导内皮细胞病理生理改变和血管表型改变,最终导致高血压血管内皮功能障碍[25]。此外,在高血压状态下,SIRT3 功能异常造成血管内皮细胞线粒体超氧化物和 ROS 大量累积,升高NLRP3和Caspase-1表达水平,血管内皮炎症细胞浸润,炎症因子分泌增多,加重高血压血管内皮功能障碍[26]。SIRT3 介导的 mtROS 和炎症异常激活,是高血压早期微血管内皮损伤的核心启动环节。

为了验证上述调控网络,机制研究中,采用免疫荧光和 Western blot 检测 ROS 和炎症反应密切相关的信号通路 HIF-1α/p65 与 NLRP3/Caspase-1 关键蛋白的表达。结果表明,与正常组比较,模型组RCMECs 中 HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平均明显升高(P<0.01)。与模型组比较,天苓止眩片含药血清组、SIRT3 阻断剂+天苓止眩片含药血清组则能显著降低 HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平(P<0.01)。与天苓止眩片含药血清组比较,SIRT3 阻断剂+天苓止眩片含药血清组HIF-1α、p65、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平明显升高(P<0.01)。

本文结果提示,天苓止眩片通过上调 SIRT3,抑制 mtROS 的过量生成,一方面通过减少 ROS 蓄积,抑制 HIF-1α 核转位,阻断 p65 活化,切断氧化应激向炎症信号的传导;另一方面通过降低 mtROS 水平,阻断其介导的 NLRP3 炎症小体组装与 Caspase-1 的剪切活化,减少 TNF-α、IL-1β 等促炎性细胞因子的成熟释放,实现对 RCMECs 的保护效应。同时 HIF-1α 入核后可进一步协同增强 p65 的转录活性,而 NLRP3/Caspase-1 通路激活后生成的 IL-1β 等炎症因子,又可反向促进 HIF-1α 的蓄积与 p65 的持续活化,形成“氧化应激-炎症放大”的正反馈恶性循环。而天苓止眩片可能通过 SIRT3 介导 mtROS 清除,同时切断两条通路的共同上游驱动信号,打破二者的交互串扰环路, 最终实现对高血压环境下RCMECs 损伤的协同保护作用。以上结果提示,天苓止眩片可能通过 SIRT3 调控氧化应激和炎症反应,进而减轻 RCMECs 损伤。然而,由于本研究中的体外模型难以完全复现体内真实病理状态,后续我们将通过自发性高血压大鼠体内实验,结合血流动力学检测、血管内皮功能评价与靶点通路验证,进一步验证天苓止眩片具体的分子机制与临床转化潜力。

参考文献

[1] Zhang X L, Huang D, Zhao J X, et al. Hypertension and burden of myocardial infarction in China: risk factors, gender differences and temporal trends from a National Chronic Disease Surveillance study (2021-2023)[J]. Blood Pressure, 2025, 34(1): 2487584.

[2] Huang Y Q, Zhou Y, Xu Y D, et al. Inflammatory markers link triglyceride-glucose index and obesity indicators with adverse cardiovascular events in patients with hypertension: insights from three cohorts[J]. Cardiovascular Diabetology, 2025, 24(1): 11.

[3] Khoury M, Urbina E M. Hypertension in adolescents: diagnosis, treatment, and implications[J]. The Lancet Child & Adolescent Health, 2021, 5(5): 357-366.

[4] 黄露, 谭元生, 雍苏南. 从虚、瘀、风论治高血压病[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(4): 451-452.

[5] 蔺晓源, 杨晓丹, 姚福胜, 等. 原发性高血压病“本虚标实”的中医病机与治疗[J]. 中医药学报, 2018, 46(6): 10-12.

[6] 杨黎明, 谭元生. 复方钩藤降压片治疗阴虚阳亢、瘀血阻络证高血压病的效果[J]. 中国医药导报, 2017, 14(1): 78-81.

[7] 黄娟娟, 谭元生. 复方钩藤降压片治疗原发性高血压阴虚阳亢挟瘀证疗效及对 CysC、hs-CRP 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(7): 72-75.

[8] Santisteban M M, Ahn S J, Lane D, et al. Endothelium-macrophage crosstalk mediates blood-brain barrier dysfunction in

hypertension[J]. Hypertension, 2020, 76(3): 795–807.

[9] Brandes R P. Endothelial dysfunction and hypertension[J]. Hypertension, 2014, 64(5): 924–928.

[10] Dikalov S, Dikalova A. Mitochondrial deacetylase SIRT3 in vascular dysfunction and hypertension[J]. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2022, 31(2): 151–156.

[11] Dikalova A E, Pandey A, Xiao L, et al. Mitochondrial deacetylase SIRT3 reduces vascular dysfunction and hypertension while SIRT3 depletion in essential hypertension is linked to vascular inflammation and oxidative stress[J]. Circulation Research, 2020, 126(4): 439–452.

[12] 龙红萍, 易健, 蔺晓源, 等. 基于 UPLC–ESI–Q–TOF–MS/MS 技术的复方钩藤降压片化学成分分析[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(3): 396–403.

[13] 蔺晓源, 易健, 雍苏南, 等. 复方钩藤降压片对高血压模型大鼠血压及血管内皮功能的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(10): 75–80.

[14] 黄秋锦, 席建元, 刘秀梅, 等. 基于 P2Y11/cAMP/PKA 信号通路探讨复方钩藤降压片通过干预 SHR 炎症改善左心室肥厚的作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(5): 779–786.

[15] 蔺晓源. 基于 NLRP3 炎症小体研究复方钩藤降压片抗高血压血管内皮损伤机制[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.

[16] 杨凯, 张莉娟. 白藜芦醇激活 Akt/eNOS 信号缓解 LPS 诱导血管内皮细胞功能损伤的作用探讨[J]. 药物生物技术, 2022, 29(6): 564–568.

[17] 热依兰·艾沙. 甘松干预 AngⅡ损伤心脏微血管内皮细胞、2K1C 高血压心脏损害机制研究及基于 NMR 代谢组学分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2017.

[18] 孙夕童, 陈博, 范吉林, 等. 中医药与 miRNA 调控血管内皮功能障碍干预高血压病研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(4): 126–130.

[19] Te Riet L, van Esch J H M, Roks A J M, et al. Hypertension: renin–angiotensin–aldosterone system alterations[J]. Circulation Research, 2015, 116(6): 960–975.

[20] Backston K, Morgan J, Patel S, et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction: the pathogenesis of pediatric hypertension[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(11): 5355.

[21] Grylls A, Seidler K, Neil J. Link between microbiota and hypertension: focus on LPS/TLR4 pathway in endothelial dysfunction and vascular inflammation, and therapeutic implication of probiotics[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 137: 111334.

[22] Dikalova A, Fehrenbach D, Mayorov V, et al. Mitochondrial CypD acetylation promotes endothelial dysfunction and hypertension[J]. Circulation Research, 2024, 134(11): 1451–1464.

[23] Dikalova A E, Itani H A, Nazarewicz R R, et al. SIRT3 impairment and SOD2 hyperacetylation in vascular oxidative stress and hypertension[J]. Circulation Research, 2017, 121 (5): 564–574.

[24] Wang D M, Wu Y R, Sun S H, et al. NLRP3 inflammasome–mediated pyroptosis involvement in cadmium exposure–induced cognitive deficits via the SIRT3–mtROS axis[J]. Science of the Total Environment, 2023, 903: 166478.

[25] He J, Liu X, Su C, et al. Inhibition of mitochondrial oxidative damage improves reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells via SIRT3 (sirtuin 3)–enhanced SOD2 (superoxide dismutase 2) deacetylation in hypertension[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2019, 39(8): 1682–1698.

[26] Su Q, Li S J, Zhou J Y, et al. Chronic anatabine administration attenuates cardiovascular activity by targeting NF–κB/NLRP3/caspase–1–dependent pyroptosis and oxidative stress in paraventricular nucleus of hypertensive rat[J]. Cardiovascular Toxicology, 2025, 25(9): 1352–1368.

（本文编辑　徐易琳）