

## 木豆叶、鲜地黄提取物对 ox-LDL 损伤的 HUVEC 的保护作用

刘长河, 李开言, 张雪侠, 王艳艳, 李华妮, 葛文静, 刘方洲, 王晓丽(河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004)

**摘要:** **目的** 研究木豆叶、鲜地黄提取物(DMT)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的影响,初步探讨 DMT 防治动脉粥样硬化的机制。**方法** 应用血清药理学方法制备正常对照、辛伐他汀、DMT 血清,以供细胞实验使用。采用 ox-LDL 损伤 HUVEC,与各组药物共培养,即空白组、模型组、辛伐他汀组(15%辛伐他汀血清)及 DMT 低(5% DMT 血清)、中(10% DMT 血清)、高剂量组(15% DMT 血清),24 h 后 MTT 法检测细胞活力;收集细胞,流式细胞术检测细胞内活性氧(ROS)含量;硝酸还原酶法检测上清液 NO 含量;ELISA 法检测上清液内皮素(ET-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)含量;Western Blot 法检测细胞凝集素样氧化低密度脂蛋白受体(Lox-1)、Caspase-3、Cytc 蛋白的表达。**结果** 与模型组比较,辛伐他汀组及 DMT 低、中、高剂量组细胞活力明显提高( $P < 0.01$ );DMT 低剂量组 ROS 水平明显降低( $P < 0.05$ );辛伐他汀组细胞上清液 ET-1、VCAM-1 含量及 Lox-1、Caspase-3、Cytc 蛋白含量明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );DMT 低剂量组细胞 Caspase-3、Cytc 蛋白含量明显降低( $P < 0.01$ );DMT 中剂量组细胞上清液 ET-1、VCAM-1 含量及 Lox-1、Caspase-3、Cytc 蛋白含量明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),细胞上清液中 NO 含量明显升高( $P < 0.01$ );DMT 高剂量组细胞上清液 ET-1、VCAM-1 含量及 Lox-1、Cytc 蛋白含量明显降低( $P < 0.01$ ),NO 含量明显升高( $P < 0.01$ )。**结论** DMT 能够抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤,恢复其收缩舒张分泌功能,其机制可能与影响 Lox-1 介导的内皮细胞氧化应激有关。

**关键词:** 木豆叶;鲜地黄;氧化低密度脂蛋白(ox-LDL);人脐静脉内皮细胞(HUVEC);细胞凝集素样氧化低密度脂蛋白受体(Lox-1);氧化应激

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)08-1073-06

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.08.002

### The Protective Effect of *Cajanus cajan* Leaf Extract and *Rehmannia* Root Extract on ox-LDL-induced HUVEC Injury

LIU Changhe, LI Kaiyan, ZHANG Xuexia, WANG Yanyan, LI Huani, GE Wenjing, LIU Fangzhou, WANG Xiaoli (Henan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Zhengzhou 450004 Henan, China)

**Abstract: Objective** To study the influence of extracts of *Cajanus cajan* leaf and *Rehmannia* root (DMT) on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), which were damaged by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) and to preliminarily discuss the mechanism of prevention and treatment of atherosclerosis by DMT. **Methods** The serum containing the contrast, simvastatin and DMT was prepared and used in cell experiment. Ox-LDL was used to induce HUVEC injury and corresponding drugs were given for co-culture. Cultured HUVEC contained blank control group, model group, simvastatin group (15% simvastatin serum), DMT low dosage group (5% DMT serum), DMT medium dosage group (10% DMT serum), DMT high dosage group (15% DMT serum). The MTT method was used to detect the cell viability after 24 h culture. Flow cytometry was used to detect the reactive oxygen (ROS). The nitrate reductase activity method was used to detect the content of nitric oxide. The enzyme-linked immunosorbent

收稿日期: 2021-03-24

作者简介: 刘长河,男,副研究员,研究方向:中药、天然药物的提取分离,中药新药研发。Email: liuchhn371@163.com。

基金项目: 河南省中医药科学研究专项(2015ZY02010、2016ZY2021、2017ZY2037、2018ZY2025); 中国中医科学院中药研究所新药联合创制项目(2011xycz-04); 郑州市金水区科技攻关项目(金科 2014-33)。

assay(ELISA) was used to detect the content of endothelins(ET-1), intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) in the supernatants. Western blot method was used to detect the protein expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1(Lox-1), Caspase-3 and Cytc. **Results** Compared with model group, the viability of HUVEC in 4 groups (simvastatin group, DMT low dosage group, DMT medium dosage group and DMT high dosage group) was obviously improved( $P < 0.01$ ). The level of ROS in DMT low dosage group was significantly decreased( $P < 0.05$ ). The contents of ET-1, VCAM-1 and the expressions of Lox-1, Caspase-3 and Cytc protein in simvastatin group were significantly reduced( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The contents of Caspase-3, Cytc protein in DMT low dosage group were significantly reduced( $P < 0.01$ ). The contents of ET-1, VCAM-1 and the expressions of Lox-1, Caspase-3 and Cytc protein in DMT medium dosage group were significantly reduced( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and the content of nitric oxide in the cultured supernatant was significantly increased( $P < 0.01$ ). The contents of ET-1, VCAM-1 and the expressions of Lox-1, Cytc protein in DMT high dosage group were significantly reduced( $P < 0.01$ ) and the release of nitric oxide was significantly increased( $P < 0.01$ ). **Conclusion** DMT could inhibit ox-LDL-induced HUVEC injury and restore its systolic and diastolic secretory function. The mechanism might be related to the oxidative stress injury of endothelial cells mediated by Lox-1.

**Keywords:** *Cajanus cajan* leaf; *Rehmannia* root; oxidized low-density lipoprotein(ox-LDL); human umbilical vein endothelial cells(HUVEC); lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1(Lox-1); oxidative stress

动脉粥样硬化(AS)是引起严重心脑血管疾病的主要原因之一,是一种血管慢性炎症性疾病<sup>[1]</sup>。氧化型低密度脂蛋白损伤内皮细胞是导致动脉粥样硬化的直接致病因素,会引起炎症介质的升高<sup>[2]</sup>。炎症因子在中医学传统理论中可归属为“湿热、浊毒、瘀血”<sup>[3]</sup>,治疗应予以凉血活血<sup>[4]</sup>。

木豆叶系豆科木豆属植物木豆 *Cajanus cajan*(L.) Millsp. 的干燥成熟叶片,具有解毒消肿的功效<sup>[5]</sup>。本实验组前期研究<sup>[6]</sup>发现,含有黄酮类(如球松素)和芪类(如木豆素 C)的木豆叶提取物对过氧化氢损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)具有保护作用。地黄(*Rehmannia* Root)为玄参科植物,以干燥块根入药,是“凉血活血”的代表药物<sup>[7]</sup>。以生地黄为主药的地黄饮子对心血管疾病、动脉硬化中风等疾病具有一定疗效<sup>[8]</sup>。

本实验将地黄与木豆叶配伍,提取其中有效成分(环烯醚萜苷类和芪类),以氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导损伤 HUVEC,采用血清药理学方法研究木豆叶、鲜地黄提取物(DMT)血清对 HUVEC 的活力、活性氧(ROS)浓度、细胞上清液中 NO、ET-1、ICAM-1、VCAM-1 及细胞 Lox-1、Caspase-3、Cytc 蛋白表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 动物及细胞株** SD 大鼠,雄性,SPF 级,10 周

龄,体质量( $200 \pm 20$ ) g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可证号:SCXK(鲁)2019-0003,动物质量合格证号:0001854;饲养于河南省中医药研究院实验动物中心,标准饲料喂养,自由饮食饮水。本研究经河南省中医药研究院实验动物伦理委员会批准(批准号:HNZYJYJ2019-0007),符合实验动物伦理学要求。HUVEC 细胞株,购自江苏恩莫阿赛生物技术有限公司。

**1.2 药物及试剂** 木豆叶来自云南红河县泰富木豆种植专业合作社,经河南省中医药研究院张留记研究员鉴定为豆科植物木豆 *Cajanus cajan*(L.) Millsp 的干燥叶;地黄来自河南省武陟县怀药种植专业合作社,经河南省中医药研究院张留记研究员鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的根。

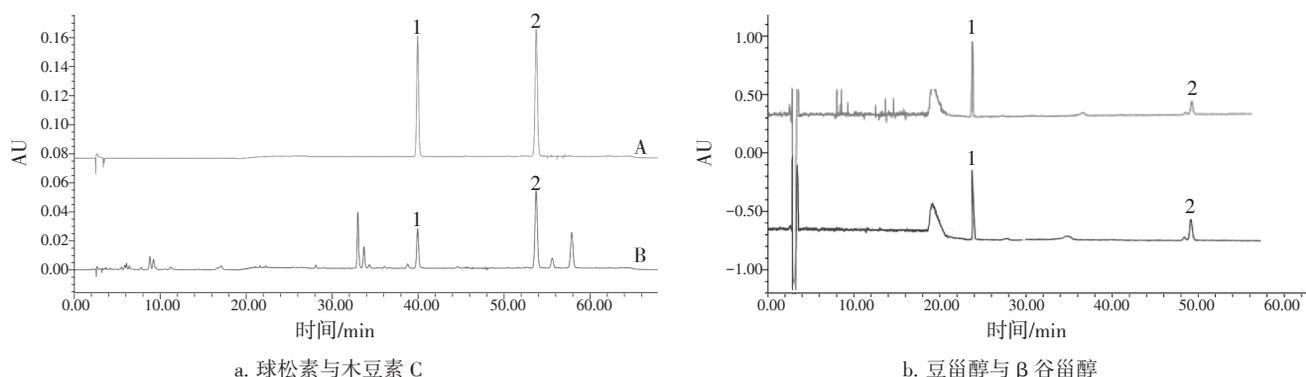
95%乙醇为国产分析纯;ox-LDL,广州奕源生物技术有限公司,批号:20190418;澳洲新生胎牛血清(FBS),江苏恩莫阿赛生物技术有限公司,批号:S171204F;PBS 缓冲液( $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.2~7.4 批号:13D17B21)、胰蛋白酶消化液(批号:T5016)、ROS 检测试剂盒(批号:20190321)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:20171228),北京索莱宝科技有限公司;噻唑蓝(MTT),美国 Amresco 公司,批号:6041053;一氧化氮(NO)试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:20180530;内皮素

(ET-1)试剂盒(批号: 5911540510)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1, 批号: 921553510)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1, 批号: 2511493510)、Caspase-3 兔多克隆抗体(批号: 19677-1-AP)、DMEM/F12 培养基(批号: 08H17B04), 武汉博士德生物工程有限公司; OLR1 兔多克隆抗体(批号: 11837-1-AP)、Cytc 兔多克隆抗体(批号: 10993-1-AP)、beta Actin 鼠单克隆抗体(批号: 60008-1-1g), 武汉三鹰生物技术有限公司; 超敏 ECL 化学发光检测试剂

盒, 美国 Proteintech 公司, 批号: B2201806; 彩色预染中分子蛋白质分子量标准, 博士德生物工程有限公司, 批号: 13E15B13。

**1.3 提取物的制备** 按照本课题组前期研究方法<sup>[6]</sup>提取纯化。

**1.3.1 木豆叶提取物的制备** 见图 1。木豆叶粉末乙醇提取, 回收乙醇, 过大孔树脂 D152 制备芪类(脂溶性)部位。结果显示, 木豆叶芪类部位木豆素 C、球松素、 $\beta$  谷甾醇、豆甾醇含量占总质量的 50%以上。



注: A 为混合对照品; B 为木豆叶提取物。图 a 中 1 为球松素; 2 为木豆素 C。图 b 中 1 为豆甾醇; 2 为  $\beta$  谷甾醇

图 1 木豆叶提取物高效液相色谱(HPLC)图

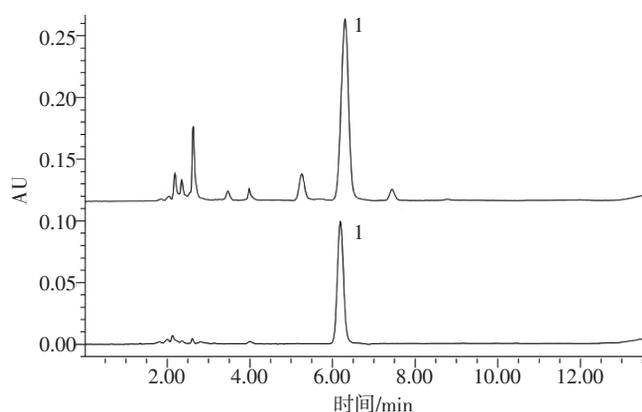
Figure 1 HPLC chromatograms of extracts of *Cajanus cajan* leaf

**1.3.2 地黄提取物的制备** 见图 2。地黄用乙醇高速匀浆机提取、活性炭脱色、回收乙醇, 过 AB8 大孔树脂柱, 制备环烯醚萜苷类。结果显示, 梓醇等环烯醚萜苷占总质量的 50%以上。

司; HF160W 型 CO<sub>2</sub> 培养箱, 上海力申科学仪器有限公司; CKX53 型倒置显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; 2K15 型冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; TDZ5WS 型离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; HH-S6 型电热恒温水浴锅, 北京科伟永兴仪器有限公司; NAVIOS 型流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特有限公司; DDY-7C 型电泳仪电源, 北京六一仪器厂; FluorChem R 型凝胶成像系统, 美国 ProteinSimple 公司。

**1.5 动物分组、给药及含药血清制备** SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只, 随机分为 3 组: 正常对照组(0.5% CMC-Na)、辛伐他汀组(1.8 mg·kg<sup>-1</sup>)及木豆叶、鲜地黄提取物(DMT)组(DMT 浸膏 0.4 g·kg<sup>-1</sup>, 生药量约为 101 g·kg<sup>-1</sup>), 灌胃给药, 给药体积为 10 mL·kg<sup>-1</sup>, 每天 1 次, 连续 7 d。第 7 天给药后 1 h, 腹腔注射 10%水合氯醛, 3 mL·kg<sup>-1</sup> 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 静置 2 h, 以 3 580×g 离心 10 min 分离血清, 56 °C 水浴灭活 30 min, 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌, 分装, -80 °C 冰箱中保存备用。

**1.6 HUVEC 培养和分组** HUVEC 用含有 10%胎牛血清和 1%青链霉素的 DMEM/F12 培养基, 在



注: 1 为梓醇

图 2 地黄提取物高效液相色谱(HPLC)图

Figure 2 HPLC chromatograms of extracts of *Rehmannia root*

**1.3.3 木豆叶、鲜地黄提取物的制备** 上述木豆叶、地黄提取物按 1:1 混合, 加 0.5%羧甲基纤维素钠溶液制成即得。

**1.4 仪器** ELX800 型多功能酶标仪, 美国 BioTek 公

37 ℃、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下培养，待细胞生长至融合度 80%左右时进行实验。实验分组：空白组(体积分数为 15%空白血清)、模型组(15%空白血清 + ox-LDL 160 μmol·L<sup>-1</sup>)、辛伐他汀组(15%辛伐他汀血清 + ox-LDL 160 μmol·L<sup>-1</sup>)及 DMT 低、中、高剂量组(5%、10%、15% DMT 血清分别加 ox-LDL 160 μmol·L<sup>-1</sup>)。

**1.7 HUVEC 活力检测** 按“1.6”项下培养、分组和给药处理，每组均设 4 个复孔。MTT 法检测细胞活力(A)值。细胞活力(%)=(OD<sub>实验组</sub>-OD<sub>调零孔</sub>)/(OD<sub>空白组</sub>-OD<sub>调零孔</sub>)×100%。实验重复 3 次。

**1.8 HUVEC 的 ROS 测定** 取处于对数生长期的 HUVEC，调整细胞密度为每毫升 1×10<sup>5</sup> 个，每孔 2 mL，接种于 6 孔板。37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。吸弃上清液，分别加入“1.5”项下现配的各鼠血清，继续培养 24 h，使用流式细胞仪按 ROS 检测试剂盒进行细胞内活性氧浓度测定(激发波长为 488 nm，发射波长为 525 nm)。实验重复 3 次。

**1.9 HUVEC 上清液 NO、ET-1、ICAM-1、VCAM-1 含量测定** HUVEC 以密度每毫升 1×10<sup>5</sup> 个，每孔 150 μL 接种于 96 孔板。培养 24 h 后，按“1.6”项下分组及药物处理 24 h；每组 4 个复孔，收集上清液，保存于-80 ℃。采用硝酸还原酶法检测 NO 含量。Elisa 法检测 ET-1、ICAM-1、VCAM-1 含量，实验操作按照试剂盒说明书进行。实验重复 3 次。

**1.10 HUVEC 中 Lox-1、Caspase-3、Cytc 蛋白表达水平** 取处于对数生长期的 HUVEC，调整细胞密度为每毫升 1×10<sup>5</sup> 个，每孔 2 mL，接种于 6 孔板，37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。吸弃上清液，分别加入“1.5”项下现配的各鼠血清，继续培养 24 h，RIPA:PMSF(100:1)非变性裂解液处理细胞，BCA 法测定蛋白浓度。以每泳道 20 μg 蛋白上样，经 SDS-PAGE 电泳后，电转膜至 0.45 μm PVDF 膜，分别加入兔抗体 Lox-1 (1:500)、Caspase-3 (1:750)、Cytc (1:750)、β-actin(1:5000)，4 ℃封闭过夜后 TBST 洗膜 6 次，每次 5 min，加入封闭液稀释的羊抗兔二抗 (1:5000)，37 ℃孵育 45 min 后，TBST 洗膜 6 次，每次 5 min。膜蛋白面朝上均匀滴加 ECL 发光液，暗室成像。实验重复 3 次。

**1.11 统计学处理方法** 采用 SPSS 21.0 统计软件，计量资料用均值±标准误( $\bar{x} \pm s_x$ )表示，多组间比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA)，两两比较用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HUVEC 活力检测** 结果见表 1。与空白组比较，模型组 HUVEC 存活率明显降低(P < 0.01)。与模型组比较，辛伐他汀组和 DMT 低、中、高剂量组均能明显提高 ox-LDL 诱导损伤 HUVEC 的存活率(P < 0.01)。

表 1 木豆叶、鲜地黄提取物(DMT)对 ox-LDL 损伤的 HUVEC 存活率的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

Table 1 Effects of DMT on viability in HUVEC damaged by ox-LDL( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	OD <sub>570nm</sub>	细胞存活率/%
空白组	2.253 ± 0.134	100.0
模型组	1.118 ± 0.026*	55.1 ± 3.10**
辛伐他汀组	1.311 ± 0.079 <sup>#</sup>	61.8 ± 2.20 <sup>#</sup>
DMT 低剂量组	1.573 ± 0.104 <sup>#</sup>	69.9 ± 2.14 <sup>#</sup>
DMT 中剂量组	1.530 ± 0.229 <sup>#</sup>	79.9 ± 3.26 <sup>#</sup>
DMT 高剂量组	1.340 ± 0.172 <sup>#</sup>	77.4 ± 1.60 <sup>#</sup>

注：与空白组比较，\*P < 0.05，\*\*P < 0.01；与模型组比较，<sup>#</sup>P < 0.01

**2.2 HUVEC 的 ROS 测定** 结果见图 3、表 2。与空白组比较，模型组细胞内 ROS 水平明显升高(P < 0.01)；与模型组比较，DMT 低剂量组细胞内 ROS 水平明显降低(P < 0.05)。

**2.3 细胞上清液中 NO、ET-1、ICAM-1、VCAM-1 测定** 结果见表 3。与空白组比较，模型组细胞上清液 ET-1、VCAM-1 含量明显升高，NO 含量明显降低(P < 0.01)；与模型组比较，辛伐他汀组 ET-1、VCAM-1 含量明显降低(P < 0.05, P < 0.01)；DMT 中、高剂量组 ET-1、VCAM-1 含量明显降低(P < 0.05, P < 0.01)，NO 含量明显升高(P < 0.01)。

**2.4 DMT 对 ox-LDL 损伤 HUVEC 内 Lox-1、Caspase-3、Cytc 蛋白表达的影响** 结果见图 4、表 4。与空白组比较，模型组 HUVEC 中 Caspase-3、Lox-1 蛋白表达明显升高(P < 0.01)。与模型组比较，辛伐他汀组 HUVEC 中 Lox-1、Caspase-3、Cytc 蛋白表达明显降低(P < 0.05, P < 0.01)；DMT 低剂量组细胞 Caspase-3、Cytc 蛋白含量明显降低(P < 0.01)；DMT 中剂量组细胞 Lox-1、Caspase-3、Cytc 蛋白含量均明显降低(P < 0.01)；DMT 高剂量组细胞 Lox-1、Cytc 蛋白含量明显降低(P < 0.01)。

## 3 讨论

动脉粥样硬化(AS)的发生是一种复杂的病理生理过程，与氧化应激和细胞凋亡密切相关<sup>[9-10]</sup>。内皮

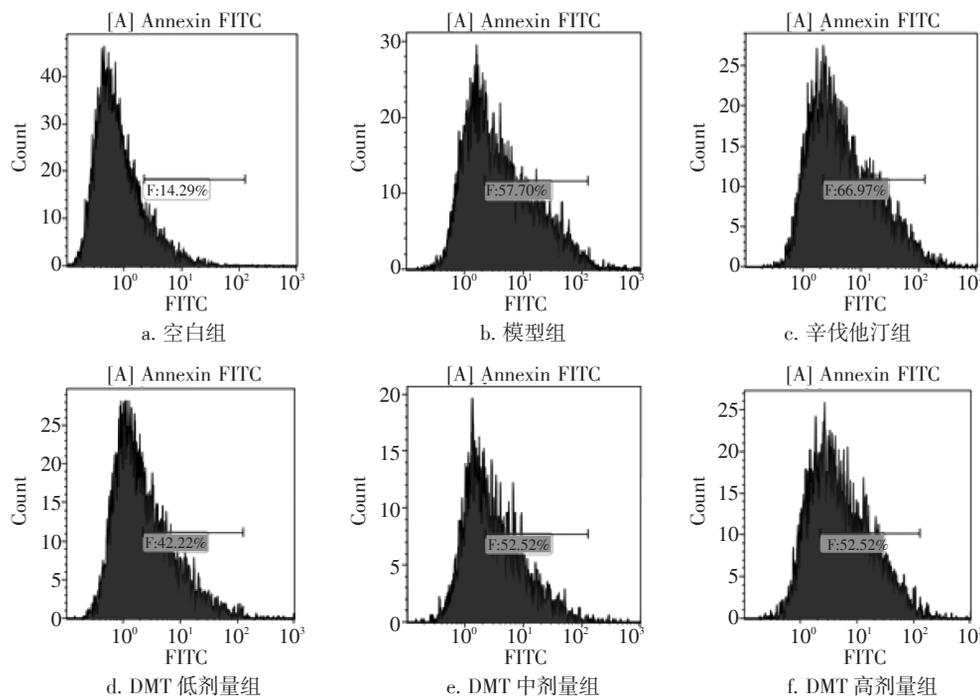


图 3 流式细胞仪对 HUVEC 中 ROS 的测定

Figure 3 Determination of ROS in HUVEC by flow cytometry

表 2 木豆叶、鲜地黄提取物 (DMT) 对 ox-LDL 损伤的 HUVEC 中 ROS 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effects of DMT on ROS in HUVEC damaged by ox-LDL ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	ROS /%
空白组	14.50 ± 3.03
模型组	57.88 ± 4.74**
辛伐他汀组	66.61 ± 3.95
DMT 低剂量组	42.56 ± 4.91#
DMT 中剂量组	52.45 ± 2.52
DMT 高剂量组	70.27 ± 2.92

注：与空白组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

功能障碍是动脉粥样硬化发生的始动环节，动脉粥样硬化发生常伴随氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoproteins, ox-LDL) 引起的内皮细胞损

伤<sup>[11]</sup>，降低 NO 介导的血管舒张功能<sup>[12]</sup>。因此，保护血管内皮细胞不受 ox-LDL 损伤是防治动脉粥样硬化的关键。

内皮素 1 (ET-1) 是迄今为止作用最强的血管收缩物<sup>[13]</sup>，对不同部位的动脉、静脉及微血管均表现出强烈而持久的收缩作用<sup>[14]</sup>。细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 和血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 是两种重要的黏附分子，同属于黏附分子的免疫球蛋白超家族。其存在于内皮细胞中，受致炎因子刺激时表达增加，与炎症反应密切相关<sup>[15]</sup>。由实验可知，木豆叶、鲜地黄提取物 (DMT) 中、高剂量组可使 ox-LDL 导致的 HUVEC 上清液中 ET-1、VCAM-1 含量明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )，NO 含量明显升高 ( $P < 0.01$ )，从而恢复细胞的正常功能。

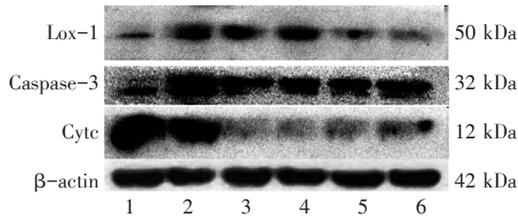
氧化型低密度脂蛋白受体 1 (Lox-1) 是存在于

表 3 木豆叶、鲜地黄提取物 (DMT) 对 ox-LDL 损伤的 HUVEC 上清液中 NO、ET-1、ICAM-1、VCAM-1 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effects of DMT on NO, ET-1, ICAM-1 and VCAM-1 in the supernatant of HUVEC injured by ox-LDL ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	ET-1/(pg·mL <sup>-1</sup> )	NO / (μmol·L <sup>-1</sup> )	ICAM-1/(pg·mL <sup>-1</sup> )	VCAM-1/(pg·mL <sup>-1</sup> )
空白组	5.97 ± 0.92	367.51 ± 10.67	102.82 ± 3.50	370.07 ± 32.53
模型组	13.77 ± 2.04**	278.48 ± 11.72**	106.68 ± 7.97	662.54 ± 20.14**
辛伐他汀组	9.78 ± 1.52#	306.44 ± 21.39	112.62 ± 1.50	542.94 ± 52.12##
DMT 低剂量组	12.42 ± 3.09	271.65 ± 12.59	103.11 ± 4.98	642.15 ± 54.74
DMT 中剂量组	8.41 ± 2.62#	341.81 ± 13.60##	108.76 ± 2.57	563.18 ± 38.87#
DMT 高剂量组	7.33 ± 1.76##	351.91 ± 13.06##	105.19 ± 4.75	547.04 ± 82.46##

注：与空白组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$



注：1-6 分别代表空白组、模型组、辛伐他汀组、DMT 低剂量组、DMT 中剂量组、DMT 高剂量组

图4 ox-LDL 损伤的 HUVEC 内 Lox-1、Caspase-3、CytC 蛋白表达条带

Figure 4 The expression of Lox-1, Caspase-3 and CytC protein in HUVEC injured by ox-LDL

表4 木豆叶、鲜地黄提取物 (DMT) 对 ox-LDL 损伤的 HUVEC 中 Lox-1、Caspase-3、CytC 蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 4 Effects of DMT on the expression of Lox-1, Caspase-3, CytC in HUVEC injured by ox-LDL ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	Lox-1/ $\beta$ -actin	Caspase-3/ $\beta$ -actin	CytC/ $\beta$ -actin
空白组	0.302 $\pm$ 0.121	0.465 $\pm$ 0.112	1.525 $\pm$ 0.270
模型组	0.930 $\pm$ 0.108**	1.547 $\pm$ 0.185**	1.620 $\pm$ 0.138
辛伐他汀组	0.659 $\pm$ 0.124 <sup>#</sup>	1.106 $\pm$ 0.126 <sup>#</sup>	0.395 $\pm$ 0.145 <sup>###</sup>
DMT 低剂量组	0.885 $\pm$ 0.129	0.942 $\pm$ 0.097 <sup>###</sup>	0.425 $\pm$ 0.123 <sup>###</sup>
DMT 中剂量组	0.309 $\pm$ 0.073 <sup>###</sup>	0.963 $\pm$ 0.090 <sup>###</sup>	0.785 $\pm$ 0.116 <sup>###</sup>
DMT 高剂量组	0.284 $\pm$ 0.083 <sup>###</sup>	1.239 $\pm$ 0.101	0.681 $\pm$ 0.143 <sup>###</sup>

注：与空白组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>###</sup> $P < 0.01$

HUVEC 表面的 ox-LDL 特异性受体，是血管内皮细胞摄取和代谢 ox-LDL 的主要受体<sup>[16]</sup>。ox-LDL 能够通过 Lox-1 相互作用参与调控内皮细胞凋亡。细胞内 ROS 的主要来源是线粒体<sup>[17]</sup>，ROS 过度生成可促进线粒体通透性转换孔开放导致 CytC 释放至胞质，触发 Caspases 级联反应，导致细胞凋亡<sup>[18-19]</sup>。Caspase-3 是促进凋亡的关键蛋白酶<sup>[20]</sup>。Caspase-3 一旦被激活，凋亡的发生不可避免。DMT 低、中剂量组可以使 ox-LDL 损伤的 HUVEC 的 Caspase-3 明显降低 ( $P < 0.05$ )，从而起到保护细胞的作用。由实验可知，DMT 使 ox-LDL 导致的 HUVEC 凋亡明显减少 ( $P < 0.01$ )，可能与其降低 ROS 含量及 Lox-1、Caspase-3 蛋白水平有关。预示木豆叶、鲜地黄提取物 (DMT) 具有抗动脉粥样硬化的前景。

参考文献：

[1] 国家卫生计生委合理用药专家委员会，中国药师协会. 冠心病合理用药指南 (第2版)[J]. 中国医学前沿杂志 (电子版), 2018, 10(6): 1-130.  
 [2] 林岳武，杜心清. 冠心病患者血管内皮功能与冠脉狭窄程度的相关

性分析[J]. 吉林医学, 2017, 38(9): 1679-1682.  
 [3] 谢永祥，龙春莉，陶志虎，等. 益肾补脾法对慢性肾脏病3期患者微炎症、氧化应激及营养状态的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 1(17): 54-56.  
 [4] 魏明刚. 肾病微炎症状态的中医理论探讨[J]. 中医杂志, 2011, 52(10): 813-815.  
 [5] 钟小荣. 木豆的利用价值[J]. 中药研究与信息, 2001, 3(8): 47-47.  
 [6] 刘长河，郝然，刘婷，等. 高效液相色谱法同时测定木豆叶中球松素、木豆素C的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(6): 440-443.  
 [7] 李卫民. 影响方剂中地黄功效发挥方向的诸因素研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.  
 [8] 张喜武，刘美欣，谢宁，等. 地黄饮子现代研究进展[J]. 中医药信息, 2017, 5(34): 124-128.  
 [9] JACINTO T A, MEIRELES G S, DIAS A T, et al. Increased ROS production and DNA damage in monocytes are biomarkers of aging and atherosclerosis[J]. Biological research, 2018, 51(1): 33.  
 [10] WANG Y Q, LI L L, ZHAO W B, et al. Targeted Therapy of atherosclerosis by a broad-spectrum reactive oxygen species scavenging nanoparticle with intrinsic anti-inflammatory activity[J]. ACS Nano, 2018, 12(9): 8943-8960.  
 [11] 匡泽民，奉淑君，唐欣颖，等. 血脂康对氧化型低密度脂蛋白致人脐静脉内皮细胞凋亡的拮抗作用[J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2019, 27(7): 573-578.  
 [12] SCHMEISSER A, MARQUETANT R, ILLMER T, et al. The expression of macrophage migration inhibitory factor 1 alpha (MIF 1 alpha) in human atherosclerotic plaques is induced by different proatherogenic stimuli and associated with plaque instability[J]. Atherosclerosis, 2005, 178(1): 83-94.  
 [13] 崔敏，贡沁燕. 内皮素与缺血性心脑血管疾病[J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(1): 64-68.  
 [14] 马林伟，屈百鸣. 内皮素与心脑血管疾病[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(9): 1075-1076.  
 [15] KOTTESS E A, BOULAS P, GKIOZOS I, et al. The intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) in lung cancer: implications for disease progression and prognosis[J]. Anticancer research, 2014, 34(9): 4665-4672.  
 [16] 尹凯，涂玉林，桂庆军. 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体1与动脉粥样硬化易损斑块[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(7): 572-574.  
 [17] TANG Z H, LI T H, PENG J, et al. PCSK9: a novel inflammation modulator in atherosclerosis?[J]. J Cel. I Physiol, 2019, 234(3): 2345-2355.  
 [18] ELEFThERiADiS T, PiSSAS G, LiAKOPOULOS V, et al. Cytochrome C as a potentially clinical useful marker of mitochondrial and cellular damage[J]. Frontiers in immunology, 2016, 20(7): 279.  
 [19] AMOS A F, VALINA L D, TED M D. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities[J]. British Journal of Pharmacology, 2014, 171(8): 2000-2016.  
 [20] WILSON M R. Apoptotic signal transduction: emerging pathways[J]. Biochemistry and cell biology, 1998, 76(4): 573-582.

(编辑：修春)