

丹红注射液对共培养体系中平滑肌细胞舒张的影响及其作用机制研究

王冰瑶^{1,2}, 吴晓燕^{1,2}, 樊官伟^{1,2*}

1. 天津中医药大学 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学 药剂学教育部重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 研究丹红注射液在共培养体系中通过人脐静脉内皮细胞(Ea.Hy926)对大鼠胸主动脉平滑肌细胞(A7r5)舒张的影响及其作用机制。**方法** 以A7r5、Ea.Hy926为细胞模型,用Western blotting法检测丹红注射液对单独培养的A7r5细胞中肌球蛋白轻链(MLC)和磷酸化MLC(P-MLC)蛋白表达的影响;检测其对A7r5细胞内钙离子浓度的影响;用RT-PCR法检测A7r5细胞钙调蛋白(CaM)mRNA表达的变化,MTT法观察其对重组人血小板源性生长因子-BB(PDGF-BB)诱导的A7r5细胞增殖的影响;最后用Transwell小室建立共培养体系,分别用Western blotting法和ELISA法检测丹红注射液对共培养体系中A7r5细胞MLC、P-MLC的蛋白表达以及环磷酸腺苷(cAMP)分泌的影响。**结果** 丹红注射液(10 μ L/mL)能降低单独培养的A7r5细胞中P-MLC/MLC的值($P < 0.05$)和CaM mRNA表达($P < 0.01$),对细胞内钙离子浓度和MLC蛋白表达无显著影响,也可降低共培养体系中A7r5细胞P-MLC/MLC值($P < 0.05$),并增加cAMP的分泌($P < 0.01$),此外还能抑制PDGF-BB诱导的A7r5细胞增殖($P < 0.01$)。**结论** 丹红注射液能通过降低P-MLC/MLC值和CaM的mRNA表达直接使平滑肌舒张,也能通过促进内皮细胞释放舒血管因子间接增加共培养体系中平滑肌细胞cAMP的分泌,使平滑肌细胞舒张。

关键词: 丹红注射液;肌球蛋白轻链;共培养体系;人脐静脉内皮细胞;Transwell小室

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)07-1169-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.018

Relaxation of Danhong Injection in vascular smooth muscle cells in co-culture system and study on its mechanism

WANG Bing-yao^{1,2}, WU Xiao-yan^{1,2}, FAN Guan-wei^{1,2}

1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective In this study, we examined whether Danhong Injection (DHI) exerted a relaxation effect in vascular smooth muscle cells (A7r5) in co-culture system by human umbilical vein endothelial cells (Ea.Hy926) and studied its mechanisms. **Methods** First of all, Western blotting assay was carried out to quantify the protein expression of MLC and P-MLC in A7r5 cells. Secondly, calcium assay kit was used to detect the changes in intracellular calcium while the changes of CaM mRNA expression were subsequently detected by RT-PCR. MTT assay was used to detect the effect of DHI in proliferation of A7r5 cell, which is induced by PDGF-BB. Finally, the co-culture system of EA.Hy926 and A7r5 cells was constructed by a Transwell. After the treatment of Hy926 cells with DHI for co-culture system, the protein expression of MLC and P-MLC in A7r5 cells in co-culture system was also quantified by Western blotting. Cell-based ELISA was used to observe the cAMP generation in A7r5 cells. **Results** DHI (10 μ L/mL) contributed to the decrease of the ratio of P-MLC/MLC ($P < 0.05$) and CaM mRNA expression ($P < 0.01$) in A7r5 cells, which are cultured individually, but had no significant effect in intracellular calcium concentration and the expression of MLC proteins. In co-culture system, DHI (10 μ L/mL) could still decrease the ratio of P-MLC/MLC ($P < 0.05$) and increase the secretion of cAMP ($P < 0.01$) in A7r5 cells. In addition, DHI contributed to suppress the proliferation of A7r5 cells which were induced by the PDGF-BB ($P < 0.01$). **Conclusion** DHI can directly relax vascular smooth muscle cells by reducing the ratio of P-MLC/MLC and the expression of CaM

收稿日期: 2015-09-06

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB518404); 国家自然科学基金资助项目(81273891)

作者简介: 王冰瑶(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药心血管药理。Tel: 15222817737 E-mail: wby71214@163.com

*通信作者 樊官伟(1977—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药心血管药理。E-mail: fgw1005@hotmail.com

mRNA, meanwhile indirectly relaxing the vascular smooth muscle cells in co-culture system by promoting the secretion of cAMP which is increased by vasodilatory factors in endothelial cells.

Key words: Danhong Injection; MLC; co-culture system; human umbilical vein endothelial cells; Transwell

世界卫生组织发表的《全球疾病负担》评估报告显示心血管疾病已成为全球人类死亡的主要原因。高血压是最常见的慢性心血管疾病,与冠心病密切相关^[1],我国高血压患病率处于亚洲中上水平,并继续上升^[2]。血管内皮功能的失调不仅与动脉粥样硬化、心绞痛密切相关,且是引起高血压病的重要机制之一^[3]。血管内皮细胞通过释放内皮源舒张因子一氧化氮(NO)、前列腺素类(PGI₂和PGE₂)以及内皮衍生性超级化因子(EDHF)起到舒张平滑肌、降低血管紧张度、维持血管内皮功能的作用^[4]。

丹红注射液由丹参和红花的水溶性成分组成,具有活血化瘀、通脉舒络作用,临床上多用于胸痹、脑卒中、冠心病、心绞痛和心肌梗死等疾病的治疗^[5-7]。目前已有研究表明丹红注射液能够改善血管内皮功能^[8],舒张大鼠腹主动脉^[9],通过调节内皮细胞上的PGI₂/COX途径而不是NO/eNOS途径来调节内皮依赖性血管舒张^[10]。但关于丹红注射液直接对血管平滑肌细胞舒张的影响以及如何通过内皮细胞影响血管平滑肌细胞的研究较少,本实验主要通过大鼠胸主动脉平滑肌细胞(A7r5)单独培养以及A7r5和人脐静脉内皮细胞(Ea.Hy926)共同培养来研究丹红注射液对其影响及作用机制,为其血管保护作用提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞

A7r5 细胞, ATCC[®] Number: CRL-1444[™]; Ea.Hy926 细胞 (Hy926), ATCC[®] Number: CRL-2922[™];均来自天津中医药大学研究中心实验室细胞库。

1.2 药品与试剂

丹红注射液(规格 10 mL/支)由菏泽步长制药有限公司提供,批号 Z20026866; 吡啶美辛购自 Sigma 公司; DMEM、胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; 热灭活处理胎牛血清(HI-FBS)、双抗、胰酶购自 Biological Industries 公司; 钙流试剂盒购自 Molecular Devices 公司; 提取细胞中蛋白试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; 蛋白浓度检测试剂盒购自 Thermo 公司; Western blotting 试剂购自天津智恩生物科技有限公司、北京索莱宝科技有限公

司; Elisa 法检测环磷酸腺苷(cAMP)试剂盒购自上海蓝基生物科技有限公司; 提取细胞总 RNA 试剂盒、cDNA 合成试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 Roche 公司; Transwell 小室、培养瓶、细胞培养板等产品购自 Corning 公司。重组人血小板源性生长因子-BB(PDGF-BB)购自美国 Sigma 公司。

1.3 仪器

Nikon TE300 倒置相差显微镜, 日本 Nikon 公司; FORMA3111 CO₂ 恒温培养箱, 美国 Thermo Fisher 公司; 电泳仪、转膜仪, GE Healthcare Life Sciences 公司; Gene genius 凝胶成像分析仪, 英国 Syngene 公司; Flex Station 3 多功能酶标仪, 美国 Molecular Device 公司; 7500 定量 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

2.1.1 细胞单独培养 细胞复苏后培养于 Corning T25 培养瓶, A7r5 细胞培养基为 DMEM+10% FBS+1% 双抗, Hy926 细胞培养基为 DMEM+10% HI-FBS+1% 双抗, 接种于培养瓶 48 h 后更换新的培养基, 72 h 后用胰酶消化传代。传 2~3 代后进行后续实验。培养条件: 5% CO₂、95% 空气, 37 ℃。

2.1.2 共培养体系的建立 调整 A7r5 细胞密度为 5×10^5 个/mL, 将 Transwell 小室(12 孔体系)倒置于培养皿中, 吸取 100 μ L A7r5 细胞悬液均匀涂抹在小室的 PET 膜上, 培养皿放于孵箱中培养 5 h 后将小室翻转并置于 12 孔板中, 分别于上室、下室加入全培养基 0.5、1.5 mL, 置于孵箱中培养 24 h。24 h 后用全培养基更换小室、下室的培养上清, 并调整 Hy926 细胞为 2×10^5 个/mL, 吸弃小室上室中的上清, 向上室加入 Hy926 细胞悬液 0.5 mL, 继续培养 24 h。

2.2 Western blotting 法检测 A7r5 细胞 MLC 和 P-MLC 蛋白表达

以 1.5×10^5 个/孔的密度将 A7r5 细胞接种到 6 孔培养板中, 继续培养 48 h 后加入 2.5、5.0、10.0 μ L/mL 的丹红注射液, 分别继续培养 5、10、20、30、40 min。正常培养细胞为对照, 培养结束后, 弃去培养液, 依照提取蛋白试剂盒提取蛋白后, 进

行 Western blotting 实验。每 4 μL 蛋白样品加入 1 μL SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合,沸水煮 5 min,使蛋白充分变性。取 40 μg 样品上样至 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳,随后电转膜至 PVDF (聚偏氟乙烯)膜,于 Western 封闭液内封闭 2 h 后,分别用 MLC、p-MLC、 β -actin 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h,二抗室温缓慢振荡孵育 1.5 h,显色后用 Gene Genins 凝胶成像分析仪进行拍照,并用 Image J 2X 软件进行半定量灰度分析。

2.3 钙流试剂盒检测 A7r5 细胞内钙离子浓度

调整 A7r5 细胞密度至 2×10^4 个/孔,接种于 96 孔黑色培养板中,继续培养 24 h。分别加入 50 μL 含有 5% FBS 的 DMEM 培养液,药物分组为对照组(正常培养)及丹红注射液 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{L/mL}$ 组。按照钙流试剂盒的方法检测细胞内钙离子浓度。

2.4 RT-PCR 法检测 A7r5 细胞中钙调蛋白(CaM)的 mRNA 表达

将 A7r5 细胞的浓度调整至 1.5×10^5 个/mL,接种于 6 孔板中,每孔 1.5 mL,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,吸弃培养液,分别加入 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{L/mL}$ 的丹红注射液,孵育 24 h 后依照 Roche 试剂盒的操作方法提取总 RNA,并用 Roche 反转录试剂盒迅速将 RNA 反转成 cDNA。依照 PCR 试剂对 CaM、GAPDH 进行扩增。引物序列 CaM: 上游 5'-CTAAGCCCTTCTGCACATCTACAC-3', 下游 5'-AACTCCACACTTCAACAGCAACAT-3', GAPDH: 上游 5'-ATGATTCTACCCACGGCAAG-3', 下游 5'-CTGGAAGATGGTGATGGGTT-3'。

2.5 MTT 法检测丹红注射液对 PDGF-BB 诱导的 A7r5 细胞增殖的影响

将 A7r5 细胞重悬于 DMEM 培养液(10% FBS)中,调整细胞密度为 2×10^4 个/mL,吸取 100 μL 细胞悬液种于 96 孔板中。培养 24 h 后弃去培养液,随机分为 8 组:对照组(正常培养)、PDGF-BB (20 ng/mL)组、丹红注射液(10.0、5.0、2.5 $\mu\text{L/mL}$)组、丹红注射液(10.0、5.0、2.5 $\mu\text{L/mL}$) + PDGF-BB (20 ng/mL)组,按照分组进行加药(100 μL /孔)。加药 24 h 以后,吸去上清,每孔加入 100 μL 5% MTT,继续孵育 4 h。4 h 后小心吸弃上清,可见板底有大量蓝紫色结晶,每孔加入 150 μL DMSO 振荡 5 min,于 490 nm 处测定吸光度(A)值,计算细胞增殖率(增殖率=加药组 A 值/对照组 A 值)。

2.6 Western blotting 法检测丹红注射液对共培养体系中 A7r5 细胞 MLC 和 P-MLC 蛋白表达的影响

建立 6 孔板 Transwell 共培养体系后,吸弃上室培养液,加入环氧酶(COX)抑制剂吲哚美辛预处理共培养上层细胞 30 min,向共培养上室分别加入 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{L/mL}$ 的丹红注射液。继续培养 24 h 后用预冷的 PBS 轻轻冲洗下室后小心吸净 PBS,将小室倒置,依照提取蛋白试剂盒提取小室下层细胞蛋白后,进行 Western blotting 实验。

2.7 ELISA 法检测共培养体系中 A7r5 细胞 cAMP 的分泌量

建立 12 孔板共培养体系后,吸弃上室培养液,加入吲哚美辛预处理共培养上层细胞 30 min 后向上室加入 10.0 $\mu\text{L/mL}$ 的丹红注射液,孵育 24 h 后取共培养下室上清,依照 ELISA 试剂盒的操作方法检测上清中 cAMP 的质量浓度,于酶标仪 450 nm 波长处读取 A 值,依照公式计算 cAMP 的质量浓度(pg/mL)。

$$\text{cAMP 的质量浓度} = (A - 0.0963) / 0.0032$$

2.8 数据分析

所有实验每次单独进行统计分析,独立重复 3 次。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 软件进行数据处理,组间比较采用单因素方差分析。

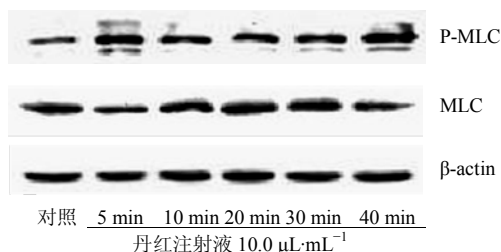
3 结果

3.1 对 A7r5 细胞中 MLC 和 P-MLC 蛋白表达的影响

3.1.1 丹红注射液作用不同时间对 A7r5 细胞中 MLC 和 P-MLC 蛋白表达的影响 平滑肌的收缩状态是由 P-MLC 驱动的^[11],当 MLC 磷酸化时平滑肌收缩,去磷酸化时平滑肌舒张。因此 P-MLC/MLC 值一定程度上反映了平滑肌收缩的情况,当比值升高时平滑肌收缩,反之平滑肌舒张。通过不同时间点的实验发现,丹红注射液(10.0 $\mu\text{L/mL}$)作用 20 min 时的 P-MLC 蛋白表达以及 P-MLC/MLC 的值最低,与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$);而在其他时间点时,丹红注射液使 P-MLC/MLC 值增加,使平滑肌收缩,与对照组相比差异显著($P < 0.05$ 、0.01),结果见图 1。

3.1.2 不同体积分数的丹红注射液对 A7r5 细胞中 MLC 和 P-MLC 蛋白表达的影响 根据“3.1.1”项结果,考察不同体积分数丹红注射液对 A7r5 细胞的作用时选取 20 min 作为时间点。实验发现丹红注射液 10.0 $\mu\text{L/mL}$ 组能降低 P-MLC/MLC 值($P <$

0.05), 而丹红注射液 5.0、2.5 $\mu\text{L/mL}$ 组却能增加 P-MLC 的蛋白表达和 P-MLC/MLC 值, 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.01$)。结果见图 2。表明丹红注射液低体积分数时具有收缩平滑肌的作用; 而较高体积分数的丹红注射液具有舒张平滑肌作用, 具有双向调节的作用。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 1 丹红注射液作用不同时间对 A7r5 细胞中 MLC 和 P-MLC 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of Danhong Injection treated for different time on protein expression of MLC and P-MLC in A7r5 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

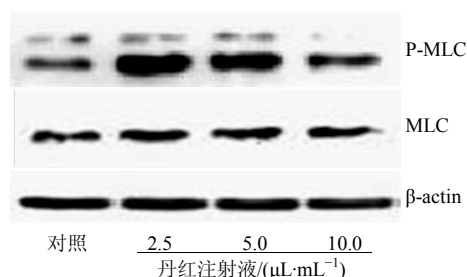


图 2 不同体积分数的丹红注射液对 A7r5 细胞中 MLC 和 P-MLC 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Danhong Injection at different concentration on protein expression of MLC and P-MLC in A7r5 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

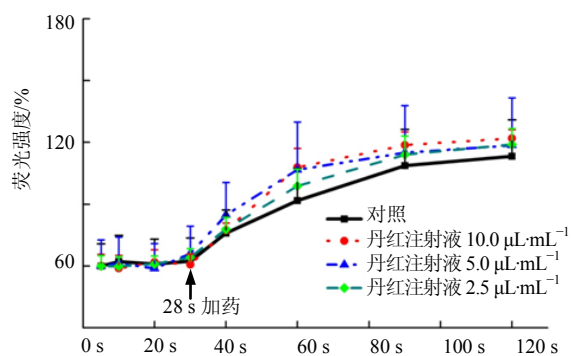
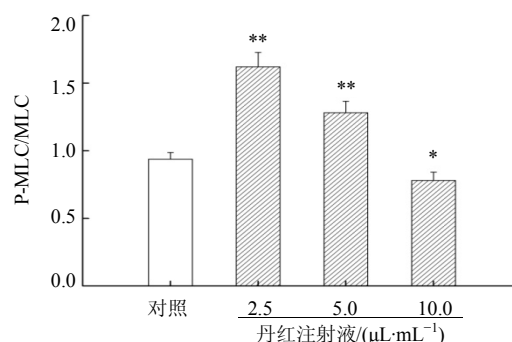
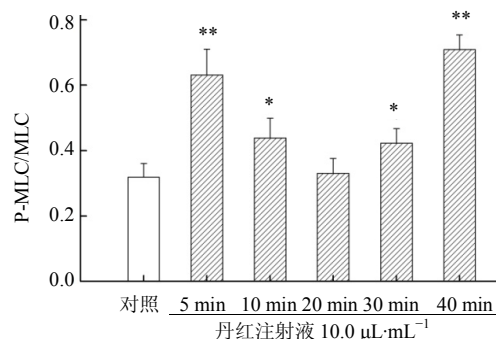


图 3 丹红注射液对 A7r5 细胞中钙离子浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of Danhong Injection on Ca^{2+} concentration in A7r5 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 对 A7r5 细胞中钙离子浓度的影响

钙离子在调节平滑肌收缩中起着重要的作用^[12], 降低细胞内钙离子浓度能够使平滑肌舒张, 而钙流实验结果表明不同体积分数的丹红注射液对 A7r5 细胞中钙离子的浓度没有显著影响, 与对照组相比均无统计学差异 ($P > 0.05$)。结果见图 3。



3.3 对 A7r5 细胞中 CaM mRNA 表达的影响

钙离子与 CaM 结合后改变 CaM 的构象, 从而使其与 MLCK 结合^[13-15], 激活 MLCK 并促进 MLC 磷酸化, 使平滑肌收缩, 故在钙离子浓度不变的情况下, CaM 的表达降低能促进平滑肌舒张, 反之则促进平滑肌收缩。RT-PCR 实验表明丹红注射液 2.5、10.0 $\mu\text{L/mL}$ 能够显著降低 A7r5 细胞中 CaM mRNA 的表达, 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.01$), 见图 4。

3.4 对 PDGF-BB 诱导的 A7r5 细胞增殖的影响

PDGF-BB (20 ng/mL) 能够诱导 A7r5 细胞的增殖, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$)。丹红注射液对正常 A7r5 细胞的增殖没有显著影响, 与对照组相比, 差异不显著 ($P > 0.05$), 但是丹红注射液 10.0

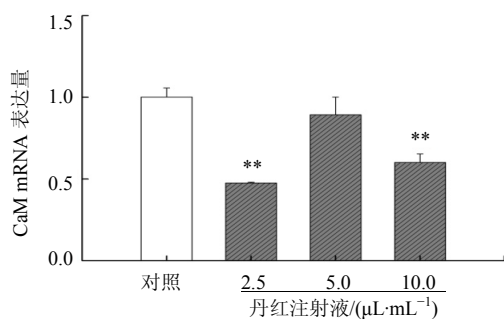


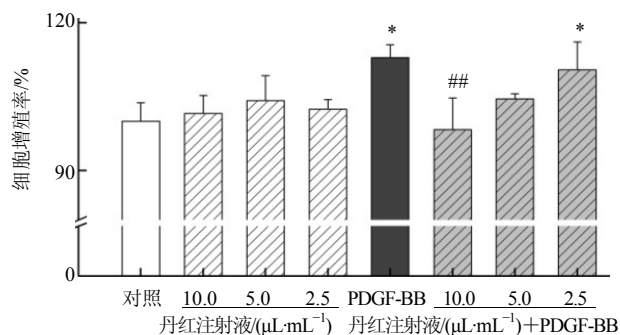
图 4 丹红注射液对 A7r5 细胞 CaM mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Danhong Injection on expression of CaM mRNA in A7r5 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

μL/mL 却能抑制 PDGF-BB 诱导的 A7r5 细胞增殖, 与 PDGF-BB 组相比, 差异显著 ($P < 0.01$), 见图 5。

3.5 丹红注射液通过 Hy926 细胞对 A7r5 细胞中 MLC 和 P-MLC 蛋白表达的影响

与丹红注射液单独作用于 A7r5 细胞相似, 丹红注射液 10.0 μL/mL 作用于 Hy926 后仍能降低共培养体系中 A7r5 细胞的 P-MLC/MLC 值, 舒张平滑肌, 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。吡啶美



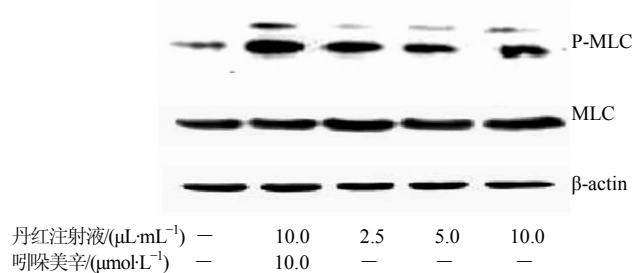
与 PDGF-BB 组比较: ## $P < 0.01$

* $P < 0.01$ vs PDGF-BB group

图 5 丹红注射液对 PDGF-BB 诱导的 A7r5 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of Danhong Injection on proliferation of A7r5 cells induced by PDGF-BB ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

辛 (COX 酶抑制剂) 与丹红注射液共同作用时却能升高 P-MLC 蛋白表达和 P-MLC/MLC 值, 抑制丹红注射液的舒张作用, 与丹红注射液 10.0 μL/mL 相比, 差异显著 ($P < 0.01$), 推测丹红注射液舒张平滑肌的作用依赖于 COX 途径, 见图 6。



与丹红注射液 10.0 μL·mL⁻¹ 组比较: ^{ΔΔ} $P < 0.01$, 下同

^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs Danhong Injection 10.0 μL·mL⁻¹ group, same as below

图 6 丹红注射液对共培养体系中 A7r5 细胞 MLC 和 P-MLC 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Danhong Injection on protein expression of MLC and P-MLC in A7r5 cells of co-culture system ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 丹红注射液通过 Hy926 细胞对 A7r5 细胞中 cAMP 分泌的影响

平滑肌细胞中 cAMP 的增加能促进其舒张, 实验表明丹红注射液 10.0 μL/mL 能显著促进 cAMP 的产生, 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.01$)。吡啶美辛 (10.0 μmol/L) 能抑制丹红注射液诱导的 cAMP 的产生, 与丹红注射液相比, 差异显著 ($P < 0.01$), 见图 7。说明丹红注射液是通过刺激 Hy926 细胞的 PGI₂/COX 途径从而促进 A7r5 细胞中 cAMP 的增加, 进一步起到舒张平滑肌的作用。

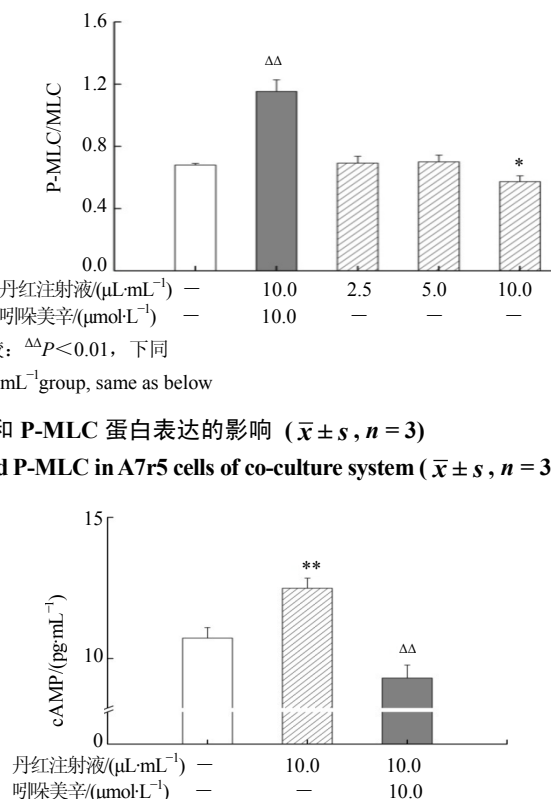


图 7 丹红注射液对共培养体系中 A7r5 细胞 cAMP 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Danhong Injection on secretion of cAMP in A7r5 cells of co-culture system ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

血管平滑肌细胞对维持成年人正常的血流和血压起到重要的作用,其细胞骨架中的肌球蛋白包含肌球蛋白轻链MLC20,磷酸化的MLC驱动着平滑肌的收缩^[16],因此本研究首先观察了丹红注射液对胸主动脉平滑肌A7r5细胞中MLC和P-MLC蛋白表达的影响,发现10 $\mu\text{L/mL}$ 的丹红注射液能降低P-MLC/MLC值,使平滑肌舒张。此外,在血管平滑肌细胞中钙离子在调节平滑肌收缩中起着重要的作用,MLCK的激活和MLCP的抑制都依赖于钙离子^[11,17],并协同作用于MLC的磷酸化^[18];当钙离子与CaM形成复合物后与MLCK结合,激活MLCK并进一步促进MLC磷酸化^[12,19],导致平滑肌收缩,可见降低细胞内钙离子浓度、CaM的表达均能舒张平滑肌。故本研究继续考察丹红注射液对A7r5细胞中钙离子浓度变化以及CaM mRNA表达的影响,发现其对细胞内钙离子浓度没有显著影响,但是能够显著降低CaM mRNA的表达,即导致钙离子敏感性降低,抑制MLC的磷酸化,说明丹红注射液能够通过降低平滑肌细胞中的CaM基因表达发挥舒张平滑肌的作用。

内皮源性血管舒张因子 PGI_2 与血管平滑肌细胞表面的G蛋白偶联受体(IP)结合后形成 PGI_2/IP 复合物^[13-14],激活VSMC的腺苷酸环化酶(AC),增加第二信使cAMP的产生^[15]。cAMP通过多种机制抑制MLCK的活化并进一步抑制MLC的磷酸化,舒张平滑肌^[12,15]。此外,cAMP能够使MLCP去抑制并恢复MLCP的活性^[20-21],减少MLC的磷酸化和平滑肌收缩。有研究表明,丹红注射液能够增加内皮细胞中前列环素 PGI_2 的释放^[10],为了验证丹红注射液是否能够通过影响内皮细胞释放舒血管因子进而间接舒张平滑肌细胞,本研究利用Transwell小室构建了共培养体系,在体外模拟血管的结构。Transwell小室PET膜的上层为Hy926,下层为A7r5,由于PET膜的孔径为0.04 μm ,化合物等大分子物质无法透过PET膜,而细胞因子类小分子物质可以穿过PET膜,因此排除了丹红注射液对平滑肌细胞的直接影响。通过本研究发现丹红注射液作用于共培养体系上层中的内皮细胞后仍然能够抑制共培养体系下层中平滑肌细胞MLC的磷酸化,并且能促进cAMP的产生。证明丹红注射液的确能够通过刺激内皮细胞产生细胞因子 PGI_2 从而间接刺激平滑肌细胞cAMP的产生,抑制MLC

的磷酸化,舒张平滑肌。

血管平滑肌细胞的异常增殖可能导致动脉粥样硬化,在血管损伤局部及血小板黏附部位,邻近受损的内皮细胞和侵入内皮细胞下层的巨噬细胞释放大量的细胞因子和生长因子,诱导平滑肌细胞的增殖,促进动脉粥样硬化的发生和发展^[22]。本研究发现丹红注射液能够抑制血小板源性生长因子PDGF-BB诱导的细胞增殖,从而发挥一定的动脉粥样硬化防治作用。

本研究首次通过Transwell小室共培养体系证实丹红注射液通过内皮细胞影响平滑肌舒张的部分作用机制,但是有关平滑肌中的舒张作用机制仍需进一步研究,如对平滑肌细胞中IP受体、Rho激酶、MYPT1的影响等。此外,丹红注射液还显示出抗动脉粥样硬化的作用,但其机制尚不清楚。随着研究的深入,将为丹红注射液在高血压、动脉粥样硬化、冠心病等疾病的防治作用提供理论基础。

参考文献

- [1] 闫奎坡,王 滢. 高血压与冠心病的关系研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(6): 140-141.
- [2] 白 洁,唐智柳,李 岚,等. 2000-2010年我国高血压患病率系统综述[J]. 上海预防医学, 2012, 24(11): 604-608.
- [3] 翟丽华,董少红. 血管内皮功能失调与心血管疾病[J]. 心血管病学进展, 2001, 22(2): 112-114.
- [4] Giles T D, Sander G E, Nossaman B D, *et al.* Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins [J]. *J Clin Hypert*, 2012, 14(4): 198-205.
- [5] 周 鹏,周惠芬,何 昱,等. 丹红注射液对大鼠脑微血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用[J]. 中草药, 2013, 44(19): 2727-2731.
- [6] 廉秋芳,吴 朝,李晶晶,等. 丹红注射液联合盐酸替罗非班治疗急性冠状动脉综合征的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(12): 1455-1459.
- [7] 韩素环. 丹红注射液治疗脑卒中恢复期瘀血闭阻证的疗效观察[J]. 药物评价研究, 2012, 35(6): 461-462.
- [8] 张 茹,宋巧凤,王希柱. 丹红注射液对冠心病患者血管内皮功能影响的临床研究[J]. 中国药房, 2008, 19(21): 1664-1665.
- [9] 崔 婷,智晓文,苏显明,等. 丹红注射液对大鼠腹主动脉的舒张作用及机制[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(12): 911-916.
- [10] Wang D, Fan G, Wang Y, *et al.* Vascular reactivity screen of Chinese medicine Danhong Injection identifies

- danshensu as a NO-independent but PGI₂-mediated relaxation factor [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 62(5): 457-465.
- [11] Mita M, Yanagihara H, Hishinuma S, *et al.* Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase [J]. *Biochem J*, 2002, 364(2): 431-440.
- [12] Hartshorne D J, Ito M, Erdödi F. Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(36): 37211-37214.
- [13] Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes [J]. *Prostagl Other Lipid Mediat*, 2002(68/69): 535-556.
- [14] Norel X. Prostanoid receptors in the human vascular wall [J]. *Sci World J*, 2007, 7(1): 1359-1374.
- [15] Lim H, Dey S K. Minireview: a novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(9): 3207-3210.
- [16] Yamin R, Morgan K G. Deciphering actin cytoskeletal function in the contractile vascular smooth muscle cell [J]. *J Physiol*, 2012, 590(17): 4145-4154.
- [17] Sakurada S, Takuwa N, Sugimoto N, *et al.* Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction [J]. *Circul Res*, 2003, 93(6): 548-556.
- [18] Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle [J]. *J Appl Physiol*, 2001, 91(1): 497-503.
- [19] Somlyo A P, Somlyo A V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1325-1358.
- [20] Etter E F, Eto M, Wardle R L, *et al.* Activation of myosin light chain phosphatase in intact arterial smooth muscle during nitric oxide-induced relaxation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 34681-34685.
- [21] Bonnevier J, Fässler R, Somlyo A P, *et al.* Modulation of Ca²⁺ sensitivity by cyclic nucleotides in smooth muscle from protein kinase G-deficient mice [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(7): 5146-5151.
- [22] Kataoka S, Alam R, Dash P K, *et al.* Inhibition of PDGF-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells by calcium antagonists [J]. *Stroke*, 1997, 28(2): 364-369.