

三棱含药血清对脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用研究

时海燕¹, 孙 蓉², 徐 男^{3*}

1. 山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)临床药学, 山东省儿童药物临床评价与研发工程技术研究中心, 山东省医药卫生临床药学重点实验室, 山东 济南 250014
2. 山东大学 高等医学研究院, 山东 济南 250014
3. 山东省中医药研究院 中药制剂研究所, 山东 济南 250014

摘要:目的 研究三棱含药血清对脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)损伤的影响。方法 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为空白组和三棱组, 制备空白血清及含药血清。建立 LPS 诱导的 HUVEC 损伤模型, 设置对照组、模型组、5%空白血清组和三棱含药血清(1%、3%、5%)组, 采用 MTT 法检测三棱含药血清对细胞活力的影响; 采用荧光显微镜分析各组细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 采用 ELISA 法检测各组细胞上清液乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)活性和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-17、组织因子(tissue factor, TF)、血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)、凝血酶调节蛋白(thrombomodulin, TM)水平; 采用 Western blotting 检测各组细胞微管相关蛋白 1 轻链 3 II(microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, LC3 II)、Beclin-1、Parkin 和 PINK 蛋白表达情况; 采用 qRT-PCR 法测定各组细胞 IL-1 β 、IL-18 和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) mRNA 表达情况。结果 与对照组比较, 模型组细胞活力、MPP 显著降低($P<0.01$), 细胞内 ROS 水平显著升高($P<0.01$), 上清液 LDH、Caspase-1 活性和 TNF- α 、IL-6、IL-17、TF、vWF、TM 水平均显著升高($P<0.01$), LC3 II、Beclin-1、Parkin 和 PINK 蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$), IL-1 β 、IL-18 和 NLRP3 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较, 三棱含药血清组细胞活力、MPP 显著升高($P<0.01$), 细胞内 ROS 水平显著降低($P<0.05$ 、0.01), 上清液 LDH、Caspase-1 活性和 TNF- α 、IL-6、IL-17、TF、vWF、TM 水平均显著降低($P<0.01$), LC3 II、Beclin-1、Parkin 和 PINK 蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$), IL-1 β 、IL-18 和 NLRP3 mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$)。结论 三棱含药血清具有内皮细胞保护作用, 可以降低 LPS 诱导的细胞氧化损伤和炎症, 降低凝血级联反应。

关键词: 三棱; 含药血清; 人脐静脉内皮细胞; 脂多糖; 氧化损伤; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)07-2064-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.015

Protective effect of *Sparganii Rhizoma*-containing serum on lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cells injury

SHI Hai-yan¹, SUN Rong², XU Nan³

1. Shandong Medicine and Health Key Laboratory of Clinical Pharmacy, Shandong Engineering and Technology Research Center for Pediatric Drug Development, Department of Clinical Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University & Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Jinan 250014, China
2. Institute of Advanced Medical Sciences, Shandong University, Jinan 250014, China
3. Institute of Traditional Chinese Medicine Preparation, Shandong Research Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China

收稿日期: 2021-11-22

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(ZR2015HL117); 山东省中医药科技发展计划项目(2017-165); 山东省重点研发计划项目(2017CXGC1308); 山东省自然科学基金重点项目(ZR2020KH017); 山东省高校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心项目(CYLXTCX2020-03, CYLXTCX2021-02)

作者简介: 时海燕, 博士, 主任药师, 从事中药药效物质与药动学研究。E-mail: shihaiyan123@163.com

*通信作者: 徐 男, 博士, 副研究员, 从事中药新药开发与药效物质研究。E-mail: 93679706@qq.com

Abstract: Objective To study the effect of Sanleng (*Sparganii Rhizoma*, SR) medicated serum on lipopolysaccharides (LPS)-induced injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** SPF male SD rats were randomly divided into blank group and SR group, blank serum and drug-containing serum were prepared. LPS-induced HUVEC injury model was established, and were divided into control group, model group, 5% blank serum group and SR medicated serum (1%, 3%, 5%) group, MTT method was used to detect the effect of SR medicated serum on cell viability. Fluorescence microscopy was used to analyze the mitochondrial membrane potential (MMP) and reactive oxygen species (ROS) levels of cells in each group; ELISA was used to detect lactate dehydrogenase (LDH), cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1) activities and tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-17, tissue factor (TF), von Willebrand factor (vWF), thrombomodulin (TM) in supernatant of cells in each group. Western blotting was used to detect the protein expressions of microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3 II), Beclin-1, Parkin and PINK of cells in each group; qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of *IL-1 β* , *IL-18* and NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (*NLRP3*) of cells in each group. **Results** Compared with control group, cell viability and MMP in model group were significantly decreased ($P < 0.01$), level of intracellular ROS was significantly increased ($P < 0.01$), activities of LDH and Caspase-1 in the supernatant and TNF- α , IL-6, IL-17, TF, vWF, TM levels were significantly increased ($P < 0.01$), LC3 II, Beclin-1, Parkin and PINK protein expression levels were significantly increased ($P < 0.01$), *IL-1 β* , *IL-18* and *NLRP3* mRNA expression levels were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, cell viability and MMP in SR drug-containing serum group were significantly increased ($P < 0.01$), level of intracellular ROS was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), activities of LDH and Caspase-1 in the supernatant and TNF- α , IL-6, IL-17, TF, vWF, TM levels were significantly decreased ($P < 0.01$), protein expressions of LC3 II, Beclin-1, Parkin and PINK were significantly decreased ($P < 0.01$), *IL-1 β* , *IL-18* and *NLRP3* mRNA expression levels were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** SR medicated serum has the protective effect of endothelial cells, which can reduce LPS-induced oxidative damage and inflammation, and reduce the coagulation cascade.

Key words: *Sparganii Rhizoma*; medicated serum; human umbilical vein endothelial cells; lipopolysaccharide; oxidative damage; inflammation

血栓性疾病已超过恶性肿瘤成为威胁人类健康和生命的重大疾病。现代抗血栓药物具有起效迅速的优点，但作用机制单一，长期使用易产生药物抵抗和增加出血风险等不良反应。三棱为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum* Buch.-Ham. 的干燥块茎，具有破血行气、消积止痛等功效，主要含有苯丙素类、黄酮类、蒽醌类、有机酸类、生物碱类、甾体类、挥发油类、二肽类等成分^[1-3]，被誉为“破血逐瘀之要药”“破血之王”。现代药理学研究发现，三棱水煎剂及其不同炮制品具有显著的抗血小板聚集、抗凝及抗血栓活性^[1]。本课题组前期亦发现三棱总提取物和醋酸乙酯部位能显著增加斑马鱼血栓模型的心脏染色强度，确证了三棱的抗血栓疗效^[4]，但其抗血栓的作用机制尚未有研究。本研究从细胞活性、细胞自噬、炎症损伤、氧化应激、凝血功能 5 个层面，研究三棱含药血清对脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 损伤的影响，为抗血栓药物的开发提供依据。

1 材料

1.1 动物及细胞株

SPF 级 SD 雄性大鼠 20 只，体质量 (300±20) g，

4 周龄，购自济南朋悦实验动物繁育有限公司，许可证号 SCXK (鲁) 20190003。动物实验经山东第一医科大学第一附属医院 (山东省千佛山医院) 伦理委员会批准，批准号为 [2021] 动伦审字 (S845) 号。HUVEC 细胞株购自无锡菩禾生物医药技术有限公司。

1.2 药材

三棱购自山东百味堂中药饮片有限公司，经山东省中医药研究院中药资源研究室靳光乾研究员鉴定为黑三棱科植物黑三棱 *S. stoloniferum* Buch.-Ham. 削去外皮的干燥块茎。取三棱药材 1 kg，粉碎至粗粉，用 80% 乙醇浸提 2 次，合并提取液，减压浓缩，聚酰胺柱色谱纯化，浓缩定容至 100 mL 得三棱提取物，主要成分为酚类物质，其中阿魏酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酸质量浓度分别为 0.91、0.80、1.22 mg/mL。

1.3 药品与试剂

LPS (批号 L8880)、线粒体膜电位检测试剂盒 (批号 M8650)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 CA1410)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) 活性检测试剂盒 (批号 BC3810) 购自北京索莱宝科技有限公司；SYBR Green PCR 试剂盒 (批号 F-

415XL)、逆转录试剂盒(批号 K1622)购自美国赛默飞公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒(批号 A020-2)购自南京建成生物工程有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 BL521A)购自 Biosharp 公司;人组织因子(tissue factor, TF)ELISA 试剂盒(批号 YB-TF-Hu)、人血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)ELISA 试剂盒(批号 YB-vWF-Hu)、人凝血酶调节蛋白(thrombomodulin, TM)ELISA 试剂盒(批号 YB-TM-Hu)购自上海钰博生物科技有限公司;人肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒(批号 JYM0110Hu)、人白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(批号 JYM0140Hu)、人 IL-17 ELISA 试剂盒(批号 JYM0082Hu)购自武汉基因美科技有限公司;胎牛血清、青-链霉素购自上海双洙生物科技有限公司;RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司;MTT 购自美国 Sigma 公司;氯仿、异丙醇、无水乙醇购自上海国药;微管相关蛋白 1 轻链 3 II(microtubule-associated protein I light chain 3 II), LC3 II)兔抗(批号 NB100-2220)购自美国 Novus 公司;Beclin 1 兔抗(批号 ab210498)、Parkin 鼠抗(批号 ab77924)、PINK1 兔抗(批号 ab23707)购自英国 Abcam 公司;GAPDH 鼠抗(批号 60004-1-Ig)购自美国 Proteintech 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 ZB2301)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(批号 ZB2305)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 仪器

MK3 型酶标仪、8000 型细胞培养箱、移液器(美国赛默飞公司);7500 型 qRT-PCR 仪(美国 ABI 公司);Qilinbeier TS-1000 型摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);IX71 型倒置拍照显微镜(日本奥林巴斯公司);TDZ4-WS 型低速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);3K15 型低温冷冻离心机(美国 Sigma 公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);PS-9 型电转仪(大连竞迈科技有限公司);HI1210 型水浴锅(德国 Leica 公司);ChemiScope 5300 Pro 一体式化学发光成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、给药及含药血清的制备

20 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,随机分为空白组(去离子水)和三棱组,每组 10 只。三棱组 ig 三棱提取物(5 mL/kg),2 次/d,连续 2 d。第 4 次给药

后 2 h,麻醉大鼠,心尖取血,静置 1 h,3000 $\times$ g 离心 10 min,分离血清,-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用,用于细胞给药前经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过除菌。

2.2 细胞培养

HUVEC 用含 10%胎牛血清和 1%青-链霉素的 RPMI 1640 完全培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

2.3 三棱含药血清对细胞活力的影响

取处于对数生长期的 HUVEC,以 1 $\times$ 10⁵/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h。设置对照组、模型组、5%空白血清组、1%含药血清组、3%含药血清组和 5%含药血清组。用完全培养基稀释 LPS,使其终质量浓度为 1 μ g/mL,除对照组外,其余各组加入 LPS;各给药组加入以含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基稀释的血清,培养 48 h。每孔加入 10 μ L MTT,避光孵育 3~4 h,弃去上清液,加入 150 μ L 二甲基亚砷,室温振荡孵育 10 min;采用酶标仪测定 492 nm 处的吸光度(A)值。

2.4 三棱含药血清对细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的影响

按“2.3”项下方法进行分组和给药,培养 48 h。弃去培养液,PBS 溶液冲洗 1 遍,分别加入 2 μ mol/L JC-10(线粒体膜电位荧光探针),37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,PBS 溶液洗涤细胞 3 次,DAPI 染核,于荧光显微镜下观察并拍照。

2.5 三棱含药血清对细胞 ROS 的影响

按“2.3”项下方法进行分组和给药,培养 48 h。按 1:1000 用无血清培养基稀释 DCFH-DA 探针,使终浓度为 10 μ mol/L,去除细胞培养液,加入 DCFH-DA,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,用 10%胎牛血清洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA,于荧光倒置显微镜下观察并拍照。

2.6 三棱含药血清对细胞上清液 LDH、Caspase-1 活性和 TNF- α 、IL-6、IL-17、TF、vWF、TM 水平的影响

取处于对数生长期的 HUVEC,以 1 $\times$ 10⁵/mL 接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h。设置对照组、模型组、5%空白血清组和 5%含药血清组。用完全培养基稀释 LPS,使其终质量浓度为 1 μ g/mL,除对照组外,其余各组加入 LPS;各给药组加入以含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基稀释的血清,培养 48 h。收集上清液,按照试剂盒说明书测定 LDH、Caspase-1 活性和 TNF- α 、IL-6、IL-17、

TF、vWF、TM 水平。

2.7 三棱含药血清对细胞LC3II、Beclin-1、Parkin和PINK蛋白表达的影响

收集“2.6”项下各组细胞,提取蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度,加入 5×SDS 上样缓冲液,混合均匀后,沸水浴 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%脱脂牛奶,37 ℃封闭 2 h;分别加入 LC3II、Beclin-1、Parkin、PINK 和 GAPDH 抗体,4 ℃孵育过夜;TBST 冲洗 3 次,1 min/次,加入相应二抗(1:5000),37 ℃孵育 1h;TBST 冲洗 3 次,5 min/次,加入 ECL 发光液显影,采用一体式化学发光仪拍摄。

2.8 三棱含药血清对细胞IL-1β、IL-18和NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)mRNA表达的影响

按“2.6”项下方法进行分组和给药,收集细胞,按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
IL-1β	F: GAATCTGTACCTGTCCTGCGTGTG R: GTCAGTTATATCCTGGCCGCCTTTG
NLRP3	F: AGCACTAATCAGAATCTCACGCACC R: ACTTCACAGAACATCATGACCCCA
IL-18	F: GTATAAAGATAGCCAGCCTAGAGGT R: TTTCAAAAATGAGTTAAAAAAGGTCT
GAPDH	F: AGAAGGCTGGGGCTCATTTG R: AGGGGCCATCCACAGTCTTC

2.9 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据采用单因素方差分析,其中两两比较采用 SNK 检验

3 结果

3.1 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞活力的影响

如表 2 所示,与对照组相比,模型组细胞活力显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,含药血清组细胞活力均显著升高 ($P<0.01$),且呈剂量相关性。

3.2 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞 MMP 的影响

MMP 较高时,JC-10 聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,可以产生红色荧光;MMP 较低时,JC-10 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-10 为单体,呈现绿色荧光。MMP 下降是细胞凋亡早期的一个

表 2 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of *Sparganii Rhizoma*-containing serum on cell viability induced by LPS ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	A 值
对照	0.849±0.015
模型	0.493±0.010**
5%空白血清	0.499±0.015
1%含药血清	0.535±0.014##
3%含药血清	0.641±0.013##
5%含药血清	0.740±0.012##

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ## $P<0.01$, 下表同

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs model group, same as below tables

标志性事件。如图 1 所示,与对照组比较,模型组细胞 MMP 显著下降 ($P<0.01$),主要呈现绿色荧光。与模型组比较,含药血清组细胞 MMP 呈现不同程度地升高 ($P<0.01$),红色荧光逐渐增强,绿色荧光逐渐减弱,且呈剂量相关性。

3.3 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞 ROS 的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组细胞内 ROS 荧光强度显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,含药血清组细胞内 ROS 荧光强度呈现不同程度地降低 ($P<0.05$ 、 0.01),且呈剂量相关性。

3.4 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞上清液 LDH、Caspase-1 活性和 TNF-α、IL-6、IL-17、TF、vWF、TM 水平的影响

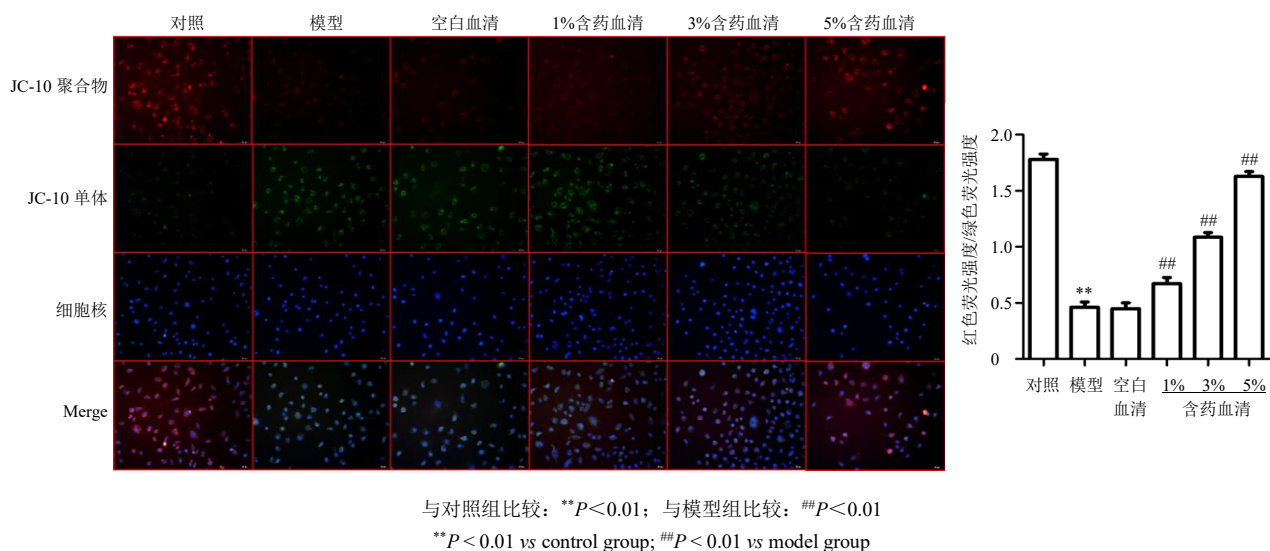
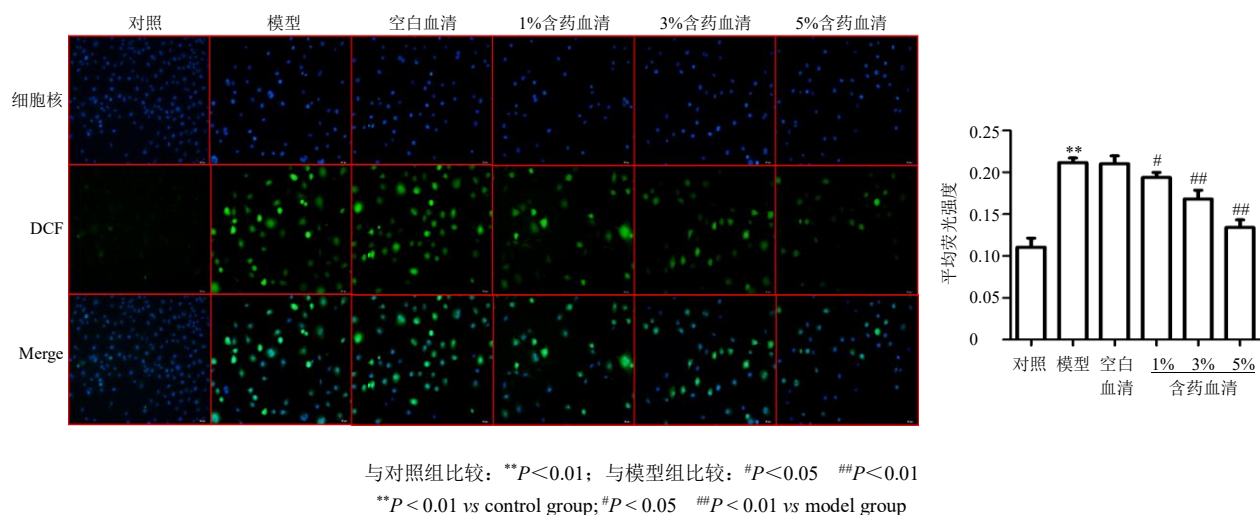
如表 3 所示,与对照组比较,模型组细胞上清液 LDH、Caspase-1 活性和 TNF-α、IL-6、IL-17、TF、vWF、TM 水平均显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,含药血清组细胞上清液中 LDH、Caspase-1 活性和 TNF-α、IL-6、IL-17、TF、vWF、TM 水平均显著降低 ($P<0.01$)。

3.5 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞 LC3 II、Beclin-1、Parkin 和 PINK 蛋白表达的影响

如图 3 和表 4 所示,与对照组比较,模型组细胞 LC3 II、Beclin-1、Parkin 和 PINK 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,含药血清组细胞 LC3 II、Beclin-1、Parkin 和 PINK 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.01$)。

3.6 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞 IL-1β、IL-18 和 NLRP3 mRNA 表达的影响

如表 5 所示,与对照组比较,模型组细胞 IL-1β、IL-18 和 NLRP3 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$);

图 1 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞 MMP 的影响 ($\times 200$)Fig. 1 Effect of *Sparganii Rhizoma*-containing serum on MMP of cells induced by LPS ($\times 200$)图 2 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞 ROS 的影响 ($\times 200$)Fig. 2 Effect of *Sparganii Rhizoma*-containing serum on ROS of cells induced by LPS ($\times 200$)表 3 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞上清液 LDH、Caspase-1 活性和 TNF- α 、IL-6、IL-17、TF、vWF、TM 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Effect of *Sparganii Rhizoma*-containing serum on LDH, Caspase-1 activities and TNF- α , IL-6, IL-17, TF, vWF, TM levels in supernatant of cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	LDH/(U·L ⁻¹)	Caspase-1/%	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)
对照	217.95 $\pm$ 11.13	100.00	174.24 $\pm$ 5.24	81.09 $\pm$ 3.13
模型	376.41 $\pm$ 12.44**	176.12 $\pm$ 11.53**	286.04 $\pm$ 9.55**	150.46 $\pm$ 2.38**
5%空白血清	380.51 $\pm$ 7.59	173.59 $\pm$ 7.05	288.13 $\pm$ 7.51	153.54 $\pm$ 3.73
5%含药血清	257.95 $\pm$ 7.27##	119.55 $\pm$ 4.01##	229.10 $\pm$ 9.39##	117.66 $\pm$ 2.84##
组别	IL-17/(pg·mL ⁻¹)	TF/(ng·L ⁻¹)	vWF/(U·L ⁻¹)	TM/(μ g·L ⁻¹)
对照	187.08 $\pm$ 10.36	82.46 $\pm$ 3.00	254.61 $\pm$ 4.19	23.57 $\pm$ 1.91
模型	409.06 $\pm$ 11.97**	124.52 $\pm$ 3.72**	332.39 $\pm$ 10.05**	32.90 $\pm$ 0.75**
5%空白血清	405.19 $\pm$ 13.15	125.71 $\pm$ 3.15	335.17 $\pm$ 7.26	33.11 $\pm$ 0.56
5%含药血清	282.49 $\pm$ 8.74##	108.45 $\pm$ 3.90##	289.06 $\pm$ 3.47##	28.84 $\pm$ 0.71##

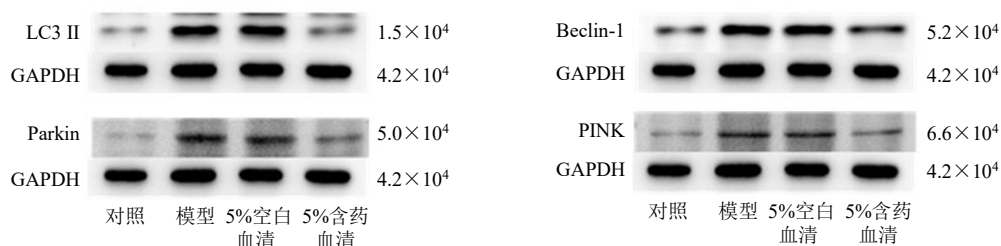


图 3 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞 LC3 II、Beclin-1、Parkin 和 PINK 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of *Sparganii Rhizoma*-containing serum on LC3 II, Beclin-1, Parkin and PINK protein expressions of cells induced by LPS

表 4 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞 LC3 II、Beclin-1、Parkin 和 PINK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of *Sparganii Rhizoma*-containing serum on LC3 II, Beclin-1, Parkin and PINK protein expressions of cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	蛋白相对表达量			
	LC3 II	Beclin-1	Parkin	PINK
对照	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05
模型	3.08 ± 0.08**	2.03 ± 0.06**	2.78 ± 0.06**	1.95 ± 0.06**
5%空白血清	3.11 ± 0.08	1.98 ± 0.06	2.82 ± 0.06	1.85 ± 0.05
5%含药血清	1.73 ± 0.09##	1.54 ± 0.07##	1.74 ± 0.07##	1.54 ± 0.06##

表 5 三棱含药血清对 LPS 诱导的细胞 *IL-1β*、*IL-18* 和 *NLRP3* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of *Sparganii Rhizoma*-containing serum on *IL-1β*, *IL-18* and *NLRP3* mRNA expressions of cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	mRNA 相对表达量		
	<i>IL-1β</i>	<i>NLRP3</i>	<i>IL-18</i>
对照	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.03
模型	3.75 ± 0.19**	4.94 ± 0.16**	3.67 ± 0.12**
5%空白血清	3.87 ± 0.22	4.92 ± 0.36	3.78 ± 0.09
5%含药血清	1.70 ± 0.18##	2.28 ± 0.17##	1.97 ± 0.22##

与模型组比较, 含药血清组细胞 *IL-1β*、*IL-18* 和 *NLRP3* mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

血管内皮细胞结构或功能异常, 均可使凝血和抗凝血平衡发生紊乱, 启动血栓形成, 血小板继而在损伤的血管内膜外黏附、聚集, 导致血小板活化及释放反应。血栓形成和炎症传统上被视为是不同的互补过程, 认为血栓是过度的止血反应导致形成闭塞的血凝块, 炎症是对有害刺激的复杂保护性免疫反应, 然而, 随着炎症刺激血栓形成, 进而血栓形成促进炎症形成的不断认识, 血栓与炎症的功能依赖已经变得逐渐明确^[5]。

本课题组前期采用网络药理学分析了三棱抗血栓形成的分子靶标, 主要包括蛋白激酶 Cδ (protein kinase Cδ, PRKCD)、磷酸腺苷激活的蛋白激酶 α2

催化亚基 (adenosine monophosphate-activated protein kinase catalytic subunit α2, PRKAA2)、Na⁺, K⁺三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 酶 1α1 亚基 (Na⁺, K⁺ ATPase α1, ATP1A1)、细胞色素 C 氧化酶亚基 7C (cytochrome C oxidase subunit 7C, COX7C) 等^[6]。PRKAA2 与 PRKCD 可激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 信号通路, AMPK 进一步负性调控哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)^[7], UNC-51 样激酶 1 (uncoordinated 51 like kinase 1, ULK1) 被激活, 磷酸化 Beclin-1 的 Ser14 位点, 由此提高空泡分选蛋白 34 (vacuolar protein-sorting 34, VPS34) 复合体活性, 诱导细胞自噬。ATP1A1 可以激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路, 同时 Akt 又是 FOXO3a 的上游调控关键因子, 激活 FOXO3a 可负性调控 mTOR, 进一步诱导自噬^[8]。适度的自噬有利于维持机体细胞内环境的稳态, 以适应外环境的变化, 而超负荷的刺激将诱发机体过度自噬, 导致细胞功能紊乱, 严重者甚至引发炎症的瀑布性放大作用^[9-11]。COX 是参与机体氧化应激的重要蛋白。本研究结果显示, 三棱含药血清可以显著降低 LPS 诱导的细胞内 ROS 荧光强度, 并呈剂量相关性, 5%含药血清抑制作用最为明显; 三棱含药血清可以显著下调线粒体自噬相关蛋

白 LC3 II、Beclin-1、Parkin 和 PINK 的表达,表明三棱含药血清可以调控氧化应激及线粒体自噬。

线粒体自噬主要由线粒体氧化应激产生的 ROS 激活,同时,ROS 亦是调控 NLRP3 炎症小体活化的关键信号^[12],线粒体自噬调控线粒体质量,减少受损线粒体数目,从而防止 ROS 诱导的 NLRP3 炎症小体活化^[13-14]。NLRP3 炎症小体亦可调控细胞自噬,Caspase-1 可通过切割自噬底物来负调控自噬水平^[15]。同时,炎症小体激活是导致血液凝结的触发器,并诱导炎症细胞因子产生,上调凝血相关蛋白酶表达,产生凝血和炎症反应。本研究结果表明,三棱含药血清可显著抑制细胞上清液中 Caspase-1 活性,下调 *IL-1 β* 、*NLRP3* mRNA 表达水平,显著降低炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-18 和促栓因子 TF、vWF、TM 水平,提示三棱含药血清经胃肠道吸收进入体内后的代谢产物可能通过调控细胞线粒体自噬-炎症小体 NLRP3 通路,修复血管内皮细胞损伤,降低促栓因子表达,从而逆转 LPS 诱导的血管内皮细胞损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jia J, Li X, Ren X Y, *et al.* *Sparganii Rhizoma*: A review of traditional clinical application, processing, phytochemistry, pharmacology, and toxicity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113571.
- [2] 匡宇. 三棱的总黄酮提取、纯化工艺及化学成分研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [3] 徐男, 孙蓉, 李元媛, 等. 基于 HPLC 指纹图谱、多成分定量结合化学计量学方法评价不同产地三棱药材的质量 [J]. *中草药*, 2019, 50(7): 1682-1689.
- [4] 徐男, 李明臣, 李元媛, 等. 基于斑马鱼模型三棱抗血栓活性部位筛选及其化学成分研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(14): 1439-1443.
- [5] Jackson S P, Darbousset R, Schoenwaelder S M. Thromboinflammation: Challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms [J]. *Blood*, 2019, 133(9): 906-918.
- [6] 徐男, 王亮, 孙蓉, 等. 基于整合药理学平台探究三棱抗血栓形成及抗血小板聚集的分子机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(5): 192-200.
- [7] Jia J Y, Bissa B, Brecht L, *et al.* AMPK, a regulator of metabolism and autophagy, is activated by lysosomal damage via a novel galectin-directed ubiquitin signal transduction system [J]. *Mol Cell*, 2020, 77(5): 951-969.
- [8] Tamargo-Gómez I, Mariño G. AMPK: Regulation of metabolic dynamics in the context of autophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3812.
- [9] Onishi M, Yamano K, Sato M, *et al.* Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy [J]. *EMBO J*, 2021, 40(3): e104705.
- [10] Wanderoy S, Hees J T, Klesse R, *et al.* Kill one or kill the many: Interplay between mitophagy and apoptosis [J]. *Biol Chem*, 2020, 402(1): 73-88.
- [11] Li P, Chen X R, Xu F, *et al.* Alamandine attenuates sepsis-associated cardiac dysfunction via inhibiting MAPKs signaling pathways [J]. *Life Sci*, 2018, 206: 106-116.
- [12] Ma K L, Chen G, Li W H, *et al.* Mitophagy, mitochondrial homeostasis, and cell fate [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 467.
- [13] Yuan X X, Bhat O M, Meng N, *et al.* Protective role of autophagy in Nlrp3 inflammasome activation and medial thickening of mouse coronary arteries [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(12): 2948-2959.
- [14] Xu Y, Shen J, Ran Z H. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases [J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 3-17.
- [15] Biasizzo M, Kopitar-Jerala N. Interplay between NLRP3 inflammasome and autophagy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 591803.

[责任编辑 李亚楠]