

◆本文引用:陈生民,吴艳芳,武俊芳.枸杞多糖对过氧化氢诱导人主动脉平滑肌细胞损伤的保护作用[J].新乡医学院学报,2014,31(9):705-709.

## 【基础研究】

# 枸杞多糖对过氧化氢诱导人主动脉平滑肌细胞损伤的保护作用

陈生民<sup>1</sup>, 吴艳芳<sup>2</sup>, 武俊芳<sup>2</sup>

(1. 公安边防部队士官学校军需卫生系疾病预防研究室, 云南 昆明 650214; 2. 新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003)

**摘要:** 目的 研究枸杞多糖(LBP)对过氧化氢( $H_2O_2$ )诱导的人主动脉平滑肌细胞(HASMC)损伤模型的保护作用。方法 对HASMC进行传代培养, 将生长良好的HASMC分为8组, 正常对照组加入磷酸盐缓冲液(PBS), 药媒对照组给予 $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LBP, 模型组给予 $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $H_2O_2$ , 洛伐他汀组给予 $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $H_2O_2 + 1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 洛伐他汀, 脂必妥组给予 $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $H_2O_2 + 50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脂必妥, 低剂量LBP组给予 $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $H_2O_2 + 25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LBP, 中剂量LBP组给予 $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $H_2O_2 + 50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LBP, 高剂量LBP组给予 $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $H_2O_2 + 100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LBP。采用3,3'-[1-(苯胺酸基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氧基-6-硝基)苯横酸钠法检测细胞增殖, 生物化学法检测细胞培养液中丙二醛(MDA)水平及超氧化物歧化酶(SOD)活性, 酶联免疫吸附试验检测HASMC上清液中细胞因子水平。结果 正常对照组, 药媒对照组, 模型组, 洛伐他汀组, 脂必妥组, 低、中、高剂量LBP组HASMC活细胞比例分别为84.2%、82.6%、21.3%、52.7%、57.2%、27.4%、42.1%、57.6%, 中、高剂量LBP组与模型组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组, 洛伐他汀组, 脂必妥组, 低、中、高剂量LBP组光密度(OD)值、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、组织金属蛋白酶-2(TIMP-2)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、MDA、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)水平和SOD活性与正常对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );药媒对照组, 洛伐他汀组, 脂必妥组, 低、中、高剂量LBP组OD值、IL-1、IL-6、TIMP-2、MMP-2、NF- $\kappa$ B、MDA、ICAM-1、VCAM-1水平和SOD活性与模型组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。低、中、高剂量LBP组OD值、IL-1、IL-6、TIMP-2、MMP-2、NF- $\kappa$ B、MDA、ICAM-1、VCAM-1水平和SOD活性与洛伐他汀组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );低、中剂量LBP组以上各指标与脂必妥组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );不同剂量LBP组之间以上各指标两两比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 LBP能有效发挥抗炎、抗氧化作用, 显著抑制HASMC增殖、迁移, 在动脉粥样硬化的治疗方面具有重要价值。

**关键词:** 枸杞多糖; 人主动脉平滑肌细胞; 过氧化氢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2014)09-0705-05

## Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on injury in human aortic smooth muscles cells induced by hydrogen peroxide

CHEN Sheng-min<sup>1</sup>, WU Yan-fang<sup>2</sup>, WU Jun-fang<sup>2</sup>

(1. Military Health School, Research Center for Disease Prevention, Public Security and Border Defense Force Sergeant School, Kunming 650214, Yunnan Province, China; 2. School of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To study the protective effect of Lycium barbarum polysaccharide (LBP) on injury in human aortic smooth muscles cells (HASMC) induced by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). **Methods** The HASMC was subcultured and then was divided into eight groups. The normal control group was given phosphate buffered saline, the drug media control group was given  $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LBP, the model group was given  $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $H_2O_2$ , the lovastatin group was given  $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $H_2O_2 + 1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  lovastatin, the Zhibituo group was given  $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $H_2O_2 + 50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Zhibituo pian, the low dose LBP group was given  $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $H_2O_2 + 25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LBP, the medium dose LBP group was given  $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $H_2O_2 + 50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LBP, the high dose LBP group was given  $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $H_2O_2 + 100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  LBP. The 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[ (phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) method was used to detect the cell proliferation; the biochemistry method was used to detect the malondialdehyde (MDA) levels and superoxide dismutase (SOD) activity; the enzyme linked immunosorbent assay was used to detect the cytokine levels in supernate of HASMC. **Results** The ratio of living cell of HASMC in normal control group, drug media control group, model group, lovastatin group, Zhibituo group,

DOI: 10.7683/xxxyxb.2014.09.009

收稿日期: 2014-03-17

作者简介: 陈生民(1977-), 男, 山东泰安人, 学士, 主治医师, 主要从事临床医学诊疗及基础理论研究。

通信作者: 武俊芳(1972-), 女, 河南延津人, 硕士, 副教授, 主要从事心血管疾病基础研究。

low dose LBP group, medium dose LBP group, high dose LBP group was 84.2%, 82.6%, 21.3%, 52.7%, 27.2%, 27.4%, 42.1%, 57.6%, respectively; there was statistic difference of the ratio of living cell of HASMC between the medium dose LBP group, high dose LBP group and model group ( $P < 0.05$ ). There were statistic differences of optical density (OD) value, the levels of interleukin (IL)-1, IL-6, tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), MDA, intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the activity of SOD between the model group, lovastatin group, Zhibituo group, low dose LBP group, medium dose LBP group, high dose LBP group and normal control group ( $P < 0.05$ ). There were statistic differences of OD value, the levels of IL-1, IL-6, TIMP-2, MMP-2, NF- $\kappa$ B, MDA, ICAM-1, VCAM-1 and the activity of SOD between drug media control group, lovastatin group, Zhibituo group, low dose LBP group, medium dose LBP group, high dose LBP group and model group ( $P < 0.05$ ). There were statistic differences of OD value, the levels of IL-1, IL-6, TIMP-2, MMP-2, NF- $\kappa$ B, MDA, ICAM-1, VCAM-1 and the activity of SOD between the low, middle, high dose LBP group and lovastatin group ( $P < 0.05$ ). There were statistic differences of all the above indexes between low, middle dose LBP group and Zhibituo group ( $P < 0.05$ ). There were statistic differences of all the above indexes and the different dose LBP group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** LBP has obvious anti-inflammatory and antioxidant ability effect, which could significantly inhibit the proliferation and migration of HASMC, it has important value in treatment of atherosclerosis.

**Key words:** Lycium barbarum polysaccharides; human aortic smooth muscle cell; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一慢性炎症过程,氧化应激产生的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)以配体形式与血管内皮细胞及平滑肌细胞胞核受体结合,或直接充当细胞内信号分子参与并调节多种基因表达产物,增强单核细胞对血管内膜的黏附、迁移,在AS发病早期起着关键作用<sup>[1-2]</sup>。AS由多种细胞及炎症递质参与<sup>[3]</sup>,其在刺激因子作用下,血管中膜的平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)增殖、表型转变、向内膜迁移及形成肌源性泡沫细胞,在AS形成的早、中、晚期均起着关键性的作用,是AS病变的重要病理学特征之一<sup>[4]</sup>。枸杞多糖(Lycium barbarum polysaccharides, LBP)是枸杞的主要活性成分,经红外光谱推测其可能含-OH、-COOH、-NH<sub>2</sub>-或-NH-基团。本研究用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤人主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cells, HASMC)模拟AS中血管平滑肌受损模型,从LBP对受损HASMC的影响方面探讨其起保护性作用的可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器** HASMC 细胞株(美国 ACTT 公司), LBP 原料药(北京同仁堂有限责任公司), 脂必妥片(成都地奥九泓制药厂, 批准文号 Z200025688), 1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司), 瑞-吉染液(长沙丽欣生物有限公司), 洛伐他汀、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、碳酸二乙酯、3,3'-[1-(苯胺酰基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氨基-6-硝基)苯磺酸钠{2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[phenylamino]carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide, XTT}、甲基呫咤甲基硫酸盐(N-Methyl-phenazinium methylsulfate, PMS)、二乙基焦磷酸酰胺(diethylpyrocarbonate, DEPC)(美国 Sigma 公司), 胰蛋白酶、乙二胺四乙酸、乙醇等为国产分析纯, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superox-

ide dismutase, SOD) 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所), 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒(美国 R&D 公司)。0.01~0.05 μm 陶瓷膜、0.02 μm 微孔滤膜(南京米格过滤材料有限公司), 肽核酸中空纤维超滤膜(外径:0.5~2.0 mm, 内径:0.3~1.4 mm, 截留分子量:10 万)、针头式滤器(北京九鼎高科过滤设备有限公司), CO<sub>2</sub> 培养箱、WX 系列离心机、ELX-800 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 HASMC 培养** HASMC 置于37℃体积分数5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 用含体积分数10% 胎牛血清的1640 培养基(含终浓度青霉素1×10<sup>5</sup> U·L<sup>-1</sup>, 链霉素1×10<sup>5</sup> U·L<sup>-1</sup>, pH 7.4)培养, 当细胞达到80%~90%融合时用1.25 g·L<sup>-1</sup>胰蛋白酶和体积分数0.01%乙二胺四乙酸按照1:1的体积比配制的消化液进行消化, 2~3 d 传代1次, 实验用第5~10代的细胞。

**1.2.2 实验分组及处理** 取生长良好的 HASMC, 按4×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>的密度接种, 培养24 h 后加对应终浓度的药物, 再培养24 h 后做后续实验。实验分8组, 各组加入1 mL 相关药物。正常对照组加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH 7.4); 药媒对照组给予50 mg·L<sup>-1</sup> 的 LBP; 模型组给予200 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 洛伐他汀组给予200 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+1 μmol·L<sup>-1</sup> 洛伐他汀; 脂必妥组给予200 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+50 mg·L<sup>-1</sup> 脂必妥; 低剂量 LBP 组给予200 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+25 mg·L<sup>-1</sup> 的 LBP; 中剂量 LBP 组给予200 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+50 mg·L<sup>-1</sup> 的 LBP; 高剂量 LBP 组给予200 μmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+100 mg·L<sup>-1</sup> 的 LBP。

**1.2.3 XTT 法检测 HASMC 增殖** 细胞接种于

96 孔板上,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,再加入 100  $\mu\text{L}$  培养基及 XTT 和 PMS 混合液 25  $\mu\text{L}$ ,培养 4 h,酶标仪上用 450、630 nm 双波长检测吸光度值。每组设 6 孔,取 6 孔平均值。

**1.2.4 HASMC 形态学观察** 细胞接种于 24 孔板上,每孔 1 mL,用 PBS 缓冲液洗 2 遍,干燥,滴加瑞-吉染液适量,1 min 后,滴加等量 PBS 缓冲液,使缓冲液与染液充分混合,8~10 min 后用水冲去染液,干燥,倒置显微镜下观察 HASMC 形态并拍照。

**1.2.5 HASMC 活性检测** 各实验组细胞贴壁生长,当细胞密度达  $10^6 \text{ cm}^{-2}$  时,用 PBS 清洗 2 次,加入  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰蛋白酶消化,摇动培养瓶使细胞脱离瓶壁,同时用尖细管吹打。各孔中加入  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $37^\circ\text{C}$ ,体积分数 5%) 嘧唑蓝溶液,吸取 10  $\mu\text{L}$  加入到 Countstar 自动细胞计数板,然后在 Countstar 自动细胞计数仪下对各组活细胞计数。

#### 1.2.6 HASMC 细胞上清液生物化学指标检测

细胞接种于 6 孔板上,每孔 2 mL,收集上清液做下列实验。MDA 检测:按照生物化学试剂盒说明进行操作,在 450 nm 波长处测定各孔的光密度(optical density,OD)值。细胞培养液中 MDA 水平 = [(测定管 OD - 测定空白管 OD)/(标准管 OD - 标准空白管 OD)] × 标准品浓度/样本测试前稀释倍数。SOD 检测:按照 WST 试剂盒说明进行操作,在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。细胞培养液中 SOD 活力 = [(对照管 OD - 测定管 OD)/对照管 OD] × 标准品浓度/样本测试前稀释倍数,计算出细胞培养液中 SOD 的活力。

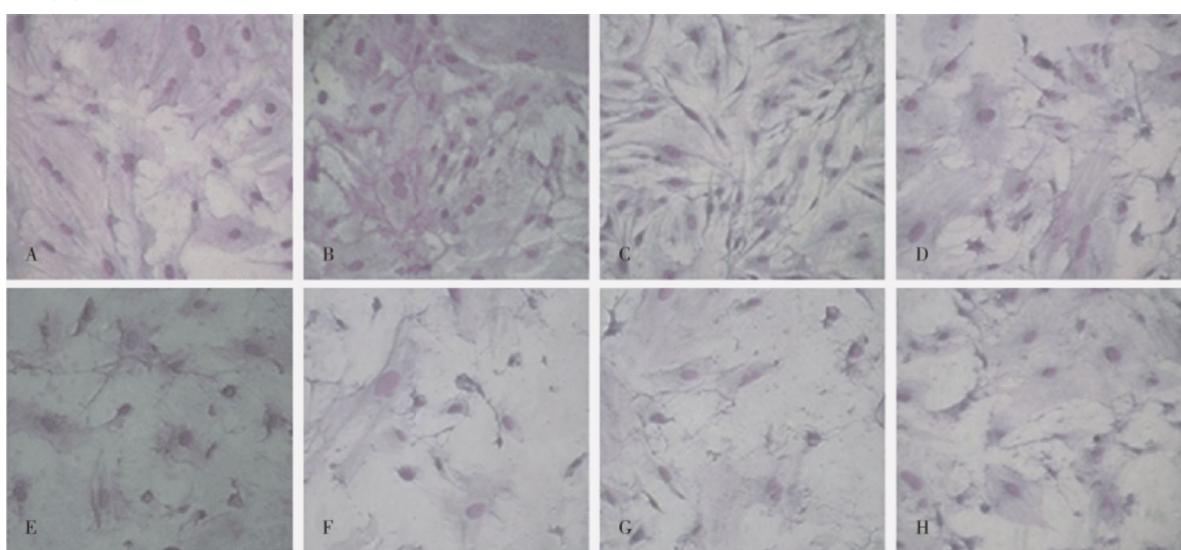
**1.2.7 HASMC 上清液中细胞因子水平检测** 细胞接种于 6 孔板上,每孔 2 mL,收集各孔中细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明进行操作,在 450 nm

波长处测定各孔的 OD 值。以 OD 值为纵坐标,相应的试剂盒标准品浓度为横坐标,得出相应的曲线,计算出标准曲线方程。将样品的 OD 值代入到标准曲线方程中,分别计算出自细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、组织金属蛋白酶抑制剂-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)、核转录因子- $\kappa$ B (nuclear transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 水平。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。组间比较采用单因素方差分析及 SNK-q 多重比较分析; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

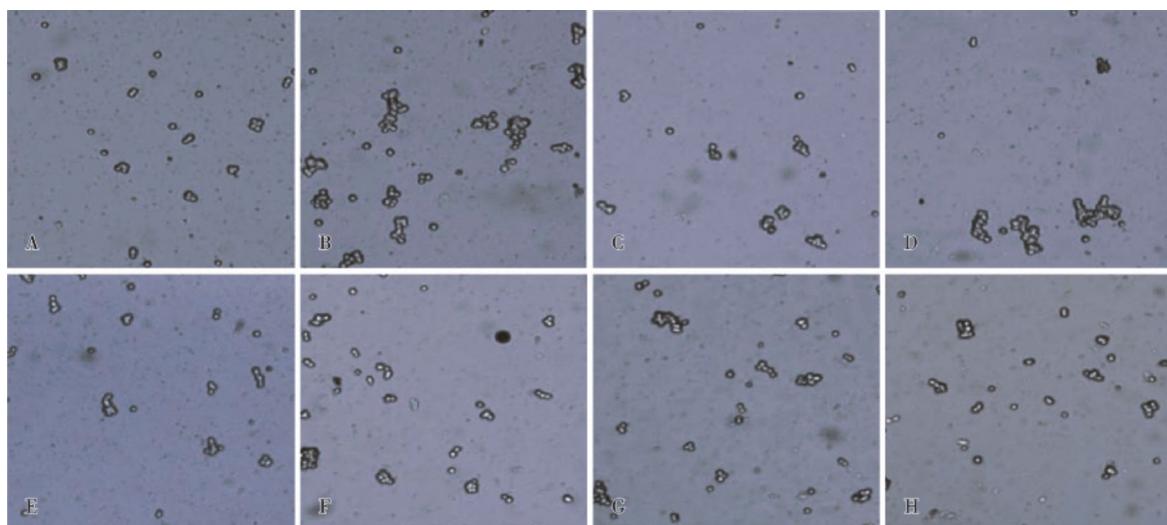
**2.1 各组 HASMC 形态变化** 正常 HASMC 胞膜完整,胞质丰富,细胞间连接致密,呈典型的“峰-谷”样生长。模型组细胞数量增多,细胞间连接疏松,细胞质皱缩,细胞失去典型生长而呈长梭形;各给药组不同程度抑制细胞增殖,细胞质逐渐丰满,受损细胞逐渐修复,高剂量 LBP 组效果尤其明显,有些细胞甚至恢复至接近正常状态,而脂必妥组和洛伐他汀组效果均不明显,特别是洛伐他汀组细胞皱缩尤为严重(图 1、图 2)。正常对照组,药媒对照组,模型组,洛伐他汀组,脂必妥组,低、中、高剂量 LBP 组 HASMC 活细胞比例分别为 84.2%、82.6%、21.3%、52.7%、57.2%、27.4%、42.1%、57.6%,中、高剂量 LBP 组活细胞比例与模型组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



A:正常对照组;B:药媒对照组;C:模型组;D:洛伐他汀组;E:脂必妥组;F:低剂量 LBP 组;G:中剂量 LBP 组;H:高剂量 LBP 组。

图 1 各组 HASMC 的形态变化(瑞-吉染色,  $\times 200$ )

Fig. 1 Morphological changes of HASMC in each group (R-G staining,  $\times 200$ )



A:正常对照组;B:药媒对照组;C:模型组;D:洛伐他汀组;E:脂必妥组;F:低剂量LBP组;G:中剂量LBP组;H:高剂量LBP组。

图2 LBP对 $H_2O_2$ 诱导的HASMC损伤过程中细胞活性的影响

Fig.2 Effect of LBP on cell activity in injury of HASMC induced by  $H_2O_2$

**2.2 不同浓度的LBP对 $H_2O_2$ 诱导的HASMC增殖影响** 结果见表1。模型组,洛伐他汀组,脂必妥组,低、中、高剂量LBP组OD值与正常对照组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )；药媒对照组,洛伐他汀组,脂必妥组,低、中、高剂量LBP组OD值与模型组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。低、中、高剂量LBP组与洛伐他汀组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )；低、中剂量LBP组与脂必妥组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )；高剂量LBP组与脂必妥组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )；低、中、高剂量LBP组各指标两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3 LBP对细胞因子的作用** 结果见表2。模型组,洛伐他汀组,脂必妥组,低、中、高剂量LBP组IL-1、IL-6、TIMP-2、MMP-2、NF-κB水平与正常对照组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )；药媒对照组,洛伐他汀组,脂必妥组,低、中、高剂量LBP组IL-1、IL-6、TIMP-2、MMP-2、NF-κB水平与模型组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。低、中、高剂量LBP组IL-1、IL-6、TIMP-2、MMP-2、NF-κB水平与洛伐他汀组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )；低、中剂量LBP组与高剂量LBP组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表2 LBP对 $H_2O_2$ 诱导HASMC损伤修复中炎性因子的影响

Tab.2 Effect of LBP on the inflammatory factors in injury repair of HASMC induced by  $H_2O_2$

伐他汀组比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )；低、中剂量LBP组IL-1、IL-6、TIMP-2、MMP-2、NF-κB水平与脂必妥组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )；高剂量LBP组与脂必妥组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )；低、中、高剂量LBP组各指标两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

表1 LBP对 $H_2O_2$ 诱导的HASMC损伤细胞增殖作用影响

Tab.1 Effect of LBP on cell proliferation of injured HASMC induced by  $H_2O_2$  ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	OD
正常对照组	0.57 ± 0.07
药媒对照组	0.52 ± 0.05 <sup>a</sup>
模型组	1.23 ± 0.17 <sup>b</sup>
洛伐他汀组	0.79 ± 0.09 <sup>ab</sup>
脂必妥组	0.85 ± 0.08 <sup>ab</sup>
低剂量LBP组	0.91 ± 0.08 <sup>abcd</sup>
中剂量LBP组	0.72 ± 0.06 <sup>abcde</sup>
高剂量LBP组	0.83 ± 0.07 <sup>abcef</sup>

注:与模型组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与正常对照组比较<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与洛伐他汀组比较<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与脂必妥组比较<sup>d</sup> $P<0.305$ ;与低剂量LBP组比较<sup>e</sup> $P<0.05$ ;与中剂量LBP组比较<sup>f</sup> $P<0.05$ 。

表2 LBP对 $H_2O_2$ 诱导HASMC损伤修复中炎性因子的影响

Tab.2 Effect of LBP on the inflammatory factors in injury repair of HASMC induced by  $H_2O_2$

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-1/(ng·L <sup>-1</sup> )	IL-6/(ng·L <sup>-1</sup> )	TIMP-2/(pg·L <sup>-1</sup> )	MMP-2/(μg·L <sup>-1</sup> )	NF-κB/(ng·L <sup>-1</sup> )
正常对照组	12.52 ± 0.14	4.13 ± 0.09	1 977.36 ± 132.39	0.68 ± 0.08	44.77 ± 7.87
药媒对照组	12.73 ± 0.13 <sup>a</sup>	4.92 ± 0.11 <sup>a</sup>	1 876.41 ± 122.47 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.08 <sup>a</sup>	46.65 ± 8.45 <sup>a</sup>
模型组	22.42 ± 0.28 <sup>b</sup>	7.54 ± 0.28 <sup>b</sup>	1 126.39 ± 155.14 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.07 <sup>b</sup>	165.78 ± 12.67 <sup>b</sup>
洛伐他汀组	15.91 ± 0.13 <sup>ab</sup>	5.08 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1 353.39 ± 124.45 <sup>ab</sup>	0.59 ± 0.06 <sup>ab</sup>	109.36 ± 11.67 <sup>ab</sup>
脂必妥组	16.48 ± 0.17 <sup>ab</sup>	5.01 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1 368.54 ± 144.77 <sup>ab</sup>	0.59 ± 0.08 <sup>ab</sup>	78.65 ± 8.76 <sup>ab</sup>
低剂量LBP组	17.67 ± 0.18 <sup>abcd</sup>	6.12 ± 0.12 <sup>abcd</sup>	1 452.65 ± 139.87 <sup>abcd</sup>	0.63 ± 0.07 <sup>abcd</sup>	79.55 ± 6.57 <sup>abcd</sup>
中剂量LBP组	14.90 ± 0.13 <sup>abcde</sup>	5.03 ± 0.13 <sup>abcde</sup>	1 684.55 ± 147.38 <sup>abcde</sup>	0.64 ± 0.08 <sup>abcde</sup>	63.26 ± 4.67 <sup>abcde</sup>
高剂量LBP组	13.70 ± 0.12 <sup>abcef</sup>	5.02 ± 0.12 <sup>abcef</sup>	1 647.66 ± 126.96 <sup>abcef</sup>	0.63 ± 0.07 <sup>abcef</sup>	62.57 ± 6.46 <sup>abcef</sup>

注:与模型组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与正常对照组比较<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与洛伐他汀组比较<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与脂必妥组比较<sup>d</sup> $P<0.305$ ;与低剂量LBP组比较<sup>e</sup> $P<0.05$ ;与中剂量LBP组比较<sup>f</sup> $P<0.05$ 。

## 2.4 LBP 对 SOD 活性, MDA、ICAM 和 VCAM-1 水平的影响

结果见表 3。模型组, 洛伐他汀组, 脂必妥组, 低、中、高剂量 LBP 组 MDA、ICAM 和 VCAM-1 水平和 SOD 活性与正常对照组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) ; 药媒对照组, 洛伐他汀组, 脂必妥组, 低、中、高剂量 LBP 组 MDA、ICAM 和 VCAM-1 水平和 SOD 活性与模型组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 。低、中、高剂量 LBP 组 MDA、ICAM-1 和 VCAM-1 水平及 SOD 活性与洛伐他汀组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) ; 低、中剂量 LBP 组 MDA、ICAM-1 和 VCAM-1 水平及 SOD 活性与脂必妥组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) ; 高剂量 LBP 组与脂必妥组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) ; 低、中、高剂量 LBP 组各指标两两比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 。

**表 3 LBP 对  $H_2O_2$  诱导的 HASMC 损伤过程中 SOD 活性及 MDA、ICAM-1、VCAM-1 水平影响**

**Tab.3 Effect of LBP on the levels of MDA and activity of SOD in injury of HASMC induced by  $H_2O_2$  ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	MDA/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	SOD/ ( $\times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	ICAM-1/ ( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )	VCAM-1/ ( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )
正常对照组	56.32 $\pm$ 4.37	21.59 $\pm$ 2.33	22.35 $\pm$ 3.65	39.41 $\pm$ 3.21
药媒对照组	54.22 $\pm$ 4.19 <sup>a</sup>	20.47 $\pm$ 2.14 <sup>a</sup>	21.47 $\pm$ 2.68 <sup>a</sup>	41.27 $\pm$ 3.36 <sup>a</sup>
模型组	19.36 $\pm$ 2.37 <sup>b</sup>	58.42 $\pm$ 4.21 <sup>b</sup>	78.54 $\pm$ 6.24 <sup>b</sup>	64.57 $\pm$ 5.87 <sup>b</sup>
洛伐他汀组	34.75 $\pm$ 3.69 <sup>ab</sup>	31.24 $\pm$ 3.14 <sup>ab</sup>	59.42 $\pm$ 5.33 <sup>ab</sup>	57.22 $\pm$ 5.36 <sup>ab</sup>
脂必妥组	38.14 $\pm$ 3.24 <sup>ab</sup>	27.45 $\pm$ 2.31 <sup>ab</sup>	62.37 $\pm$ 5.41 <sup>ab</sup>	27.45 $\pm$ 2.31 <sup>ab</sup>
低剂量 LBP 组	28.54 $\pm$ 2.68 <sup>abcd</sup>	44.27 $\pm$ 4.36 <sup>abcd</sup>	67.21 $\pm$ 5.33 <sup>abcd</sup>	45.32 $\pm$ 4.33 <sup>abcd</sup>
中剂量 LBP 组	45.78 $\pm$ 5.64 <sup>abcde</sup>	46.97 $\pm$ 5.84 <sup>abcde</sup>	45.78 $\pm$ 5.64 <sup>abcde</sup>	42.37 $\pm$ 5.44 <sup>abcde</sup>
高剂量 LBP 组	44.21 $\pm$ 3.97 <sup>abcef</sup>	44.64 $\pm$ 4.21 <sup>abcef</sup>	42.21 $\pm$ 3.97 <sup>abcef</sup>	40.61 $\pm$ 4.23 <sup>abcef</sup>

注:与模型组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与正常对照组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与洛伐他汀组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与脂必妥组比较<sup>d</sup> $P < 0.305$ ;与低剂量 LBP 组比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ ;与中剂量 LBP 组比较<sup>f</sup> $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

正常动脉壁中膜平滑肌细胞处于静止的收缩型, 胞质内充满肌丝而细胞器很少, 主要功能是调节血管张力。当受到炎症、外伤等影响时, 平滑肌细胞就会降低其特异性伸缩蛋白的表达而处于增殖型, 增加其迁移性及增生性, 促进损伤的修复过程<sup>[5]</sup>。这种对损伤血管的修复过程出现过表达, 就会导致血管性疾病如 AS、血管狭窄及高血压等的发生, 在 AS 病变的发生及发展过程中, 血管平滑肌细胞由收缩型转为增殖型, 促进了血管内膜损伤后的内膜修复, 导致再狭窄、粥样硬化斑块的形成及生长<sup>[6]</sup>。从这一点来说, 阻止血管平滑肌细胞的增生及聚集, 可能有助于防止血管再狭窄及粥样硬化斑块的形成。本实验结果显示, 高剂量 LBP 组 HASMC 细胞质逐渐丰满, 受损细胞逐渐修复, 有些细胞甚至恢复至接近正常状态。细胞计数结果显示, 高剂量 LBP 组活细胞比例为 57.6%, 与模型组比较差异有统计学意义, 进一步说明 LBP 对 HASMC 具有明显的保

护作用。HASMC 增殖在 AS 的形成过程中扮演重要角色, 导致血管壁弹性下降, 血管内皮依赖性舒张反应降低<sup>[6]</sup>。本研究表明, LBP 可明显降低受损 HASMC 的 OD 值, 对  $H_2O_2$  刺激 HASMC 增殖具有明显的抑制作用。

AS 发病过程中, 细胞因子 IL-1 和 IL-6 的表达明显增加, 表明 AS 与炎症相关<sup>[6]</sup>。本研究显示, LBP 明显降低受损 HASMC 的 IL-1 和 IL-6 表达, 说明 LBP 通过抑制促增殖的细胞因子 IL-1 和 IL-6 的表达而抑制 HASMC 的增殖, 平滑肌细胞数量减少能有效降低血管紧张性, 防止血管狭窄。同时, LBP 明显升高受损 HASMC 的 TIMP-2 和 MMP-2 值, 说明 LBP 具有消除斑块, 减轻 AS 血管硬化的作用。此外, LBP 明显降低受损 HASMC 的 NF- $\kappa$ B 值, 进一步说明了 LBP 通过活化 NF- $\kappa$ B 通路、促进 TIMP-2 和 MMP-2 的表达来降低  $H_2O_2$  损伤 HASMC 引起的炎症反应, 通过减轻炎症反应抑制细胞的进一步损伤, 从而延缓疾病的发展最终达到治愈的目的。

SOD 具有重要的抗氧化作用, SOD 合成增加有助于减轻 AS 过程中的氧化应激反应。本研究结果表明, LBP 可使 MDA 下降、SOD 升高, 具有明显的抗氧化作用, 明显降低受损 HASMC 的细胞氧化。此外, 平滑肌细胞从中膜向内膜迁移过程中 VCAM-1 和 ICAM-1 起着重要作用, LBP 通过抑制它们的合成而降低了 HASMC 的黏附性, 有效抑制其迁移。

总之, LBP 可能通过抑制 HASMC 增殖、抑制炎症反应、抑制黏附作用和发挥抗氧化作用等减轻 AS 过程中粥样斑块的形成, 促进细胞的修复, 在 AS 中起到保护性作用。当然, 抑制细胞间黏附是否会导致斑块脱落, 引起心脑血管意外性疾病还不清楚, 有待进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] 郭志刚,尹雅玲,李鹏,等.动脉粥样硬化的发生机制及西药治疗现状[J].新乡医学院学报,2013,30(9):765-768.
- [2] Parthasarethy S,Santanam N,Ramachandran S,et al.Oxidants and antioxidants in atherogenesis[J].An appraisal J Lipid Res,1999,40(12):2143-2157.
- [3] Bernal-Mizrachi C,Gates A C,Weng S,et al.Vascular respiratory uncoupling increases blood pressure and atherosclerosis[J].Nature,2005,435(7041):502-506.
- [4] Marsboom G,Archer S L.Pathways of proliferation: new targets to inhibit the growth of vascular smoothmuscle cells[J].Circ Res,2008,103(10):1047-1049.
- [5] Rudijanto A.The role vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis[J].Acta Med Indones,2007,39(2):86-93.
- [6] Qin C,Liu Z.In atherogenesis, the apoptosis of endothelial cell itself could directly induce over-proliferation of smooth muscle cells[J].Med Hypotheses,2007,68(2):275-277.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)