

天麻芎苈止眩片对血管内皮细胞自噬的影响及机制[△]

雍苏南^{1*}, 房 赤¹, 龙远雄¹, 李 萍², 谢小兵^{2#}(1. 湖南中医药大学第一附属医院学科建设与科研管理办公室, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第一附属医院医学检验中心, 长沙 410007)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)14-1737-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.14.08



摘要 目的 探究天麻芎苈止眩片对大鼠血管内皮细胞自噬的影响及潜在机制。方法 将大鼠主动脉内皮细胞(RAECs)分为正常组、模型组、空白血清组、中药含药血清组、自噬阻断剂组、自噬激动剂组、中药联合自噬激动剂组。除正常组外,其余各组分别加入10 μg/mL脂多糖干预24 h建立RAECs炎症损伤模型。空白血清组加入10%空白血清,中药含药血清组加入10%天麻芎苈止眩片含药血清,自噬阻断剂组加入20 μmol/L PD98059,自噬激动剂组加入50 μmol/L Honokiol,中药联合自噬激动剂组加入10%天麻芎苈止眩片含药血清和50 μmol/L Honokiol。观察各组RAECs形态学特征,检测各组细胞活力、上清液中内皮素1(ET-1)和一氧化氮(NO)水平、线粒体活性氧水平、线粒体膜电位,以及PTEN诱导激酶1(PINK1)、E3泛素连接酶Parkin、选择性自噬接头蛋白62(p62)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)的蛋白表达。结果 与模型组比较,自噬阻断剂组和中药含药血清组的ET-1水平、线粒体活性氧水平及PINK1、Parkin、LC3蛋白的相对表达量均显著降低或下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),细胞存活率(仅自噬阻断剂组)、NO水平、线粒体膜电位、p62蛋白的相对表达量均显著升高或上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),RAECs病理损伤改善明显,细胞数量显著增加,恢复典型的铺路石样特点;自噬激动剂组的ET-1水平、线粒体活性氧水平及Parkin和LC3蛋白的相对表达量均显著升高或上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),细胞存活率显著降低($P < 0.05$),病理损伤加重。与自噬激动剂组比较,中药联合自噬激动剂组细胞存活率、p62蛋白相对表达量均显著升高或上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),ET-1水平及PINK1、Parkin、LC3蛋白的相对表量均显著下调($P < 0.01$),RAECs形态结构受损被一定程度逆转。结论 天麻芎苈止眩片可通过调控线粒体自噬来保护血管内皮功能,其作用机制可能与调控PINK1/Parkin信号通路、抑制线粒体自噬有关。

关键词 天麻芎苈止眩片;血管内皮细胞损伤;线粒体自噬;PINK1/Parkin信号通路

Effects and mechanism of Tianma xiongling zhixuan tablet on autophagy of vascular endothelial cells

YONG Sunan¹, FANG Chi¹, LONG Yuanxiong¹, LI Ping², XIE Xiaobing²(1. Office of Discipline Construction and Scientific Research Management, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 2. Dept. of Medical Laboratory Center, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effects of Tianma xiongling zhixuan tablet on autophagy in vascular endothelial cells of rats and its potential mechanism. **METHODS** The rat aortic endothelial cells (RAECs) were divided into normal group, model group, blank serum group, traditional Chinese medicine (TCM) medicated serum group, autophagy blocker group, autophagy agonist group, and TCM combined with autophagy agonist group. Except for normal group, other groups were given 10 μg/mL lipopolysaccharide for 24 hours to induce RAECs inflammation injury model. Blank serum group was treated with 10% blank serum; TCM medicated serum group received 10% medicated serum derived from Tianma xiongling zhixuan tablet; autophagy blocker group was treated with 20 μmol/L of PD98059; autophagy agonist group was administered 50 μmol/L Honokiol. Lastly, the TCM combined with autophagy agonist group was given both 10% medicated serum derived from Tianma xiongling zhixuan tablet and 50 μmol/L Honokiol. The morphological characteristics of RAECs in each group were observed. The cell viability of each group, the contents of endothelin-1 (ET-1) and nitric oxide (NO), mitochondrial reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, and the expression levels of PTEN-induced kinase 1 (PINK1), Parkin, ubiquitin-binding protein (p62), and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) were detected. **RESULTS** Compared with model group, the levels of ET-1,

mitochondrial reactive oxygen species, and the relative expressions of PINK1, Parkin, and LC3 proteins in the autophagy blocker group and TCM medicated serum group were decreased or down-regulated significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the cell viability rate (only autophagy blocker group), NO level, mitochondrial membrane potential, and the relative expression level of p62 protein were increased or up-regulated significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the pathological damage of RAECs was significantly improved, the number of

△基金项目 湖南省自然科学基金项目(No.2024JJ9418);湖南省中医药科研课题(No.B2023027);湖南省教育厅科学研究优秀青年项目(No.23B0354);长沙市指导性科技计划项目(No.kzd2501108);中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金项目(No.24PTKF1009, No.24PTKF1022)

*第一作者 副研究员,博士。研究方向:中医药防治心血管疾病。
E-mail:46164660@qq.com

#通信作者 主任技师,博士。研究方向:心血管疾病的早期预警、检验技术。E-mail:Xxiaobing888@163.com

cells increased significantly, and the typical paving stone-like characteristics were restored. The levels of ET-1, mitochondrial reactive oxygen species, and the relative expression levels of Parkin and LC3 proteins in the autophagy agonist group were increased or up-regulated significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while cell viability rate was decreased significantly ($P < 0.05$), the damage of RAECs was aggravated. Compared with the autophagy agonist group, the cell viability rate and the relative expression level of p62 protein in TCM combined autophagy agonist group were increased or up-regulated significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the levels of ET-1, the relative expression levels of PINK1, Parkin, and LC3 proteins were down-regulated significantly ($P < 0.01$), the damage of RAECs was reversed to a certain extent. **CONCLUSIONS** Tianma xiongling zhixuan tablet protects vascular endothelial function by regulating mitochondrial autophagy, the mechanism of which may be associated with the regulation of PINK1/Parkin signaling pathway and the inhibition of mitochondrial autophagy.

KEYWORDS Tianma xiongling zhixuan tablet; vascular endothelial cell injury; mitochondrial autophagy; PINK1/Parkin signaling pathway

高血压是临床常见的心血管疾病,全世界范围内有13亿高血压患者,每年有1 000万人因收缩压过高导致死亡;我国30~79岁成年人高血压患病人数约2.567亿,患病率达27%^[1]。血管内皮功能障碍是高血压患者血管表型的标志,常表现为血管舒缩因子分泌失衡,加速血压升高进程,并加重靶器官的损害^[2]。自噬是维持血管内皮细胞内环境稳定和存活的重要机制,自噬失衡被认为是血管内皮功能改变的主要表现之一^[3]。

天麻芎苈止眩片主要由天麻、钩藤、川芎、茯苓、陈皮等中药组成,为湖南中医药大学第一附属医院(以下简称“我院”)的院内制剂,具有平肝熄风、化痰逐瘀的功效,临床主要用于治疗高血压,降压效果明显、安全^[4]。本研究前期动物实验证实,天麻芎苈止眩片能减轻血管内皮自噬,逆转血管内皮损伤^[5],但其分子机制尚未完全阐明。PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, PINK1)/Parkin(一种 E3 泛素连接酶)通路是研究线粒体自噬相关疾病的经典通路^[6]。有研究显示,调控 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬,可有效减轻血管内皮细胞损伤^[7]。本研究利用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导构建高血压状态下大鼠主动脉内皮细胞(rat aortic endothelial cells, RAECs)炎症损伤模型,观察 PINK1/Parkin 信号通路在线粒体自噬中的变化,探讨天麻芎苈止眩片对该通路表达的影响,以期揭示天麻芎苈止眩片对血管内皮细胞损伤的作用机制。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 SW-CJ-2FD 型洁净工作台(苏州苏净仪器自控设备有限公司),L530R 型台式低速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),Galaxy 170 R 型 CO₂ 培养箱(德国 Eppendorf 公司),MSX-2 型细胞成像分析系统(广州市明美光电技术有限公司),AX223ZH 型电子分析天平(美国 OHAUS 公司),PURELOAB Classic UVF 型超纯水仪(英国 ELGA 公司),Z32HK 型高速冷冻离心机(德国 HAIMER 公司),Enspire 型多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司),LSM880 型激光共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss AG 公司)。

1.2 主要药品与试剂

天麻芎苈止眩片(湘药制字 Z20150970,批号 20220312,规格 0.5 g/片)由我院制剂中心提供。RAECs 专用培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)(批号分别为 CMR075、WH0022K510)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胰蛋白酶消化液(批号 J202303)购自美国 Hyclone 公司;LPS(批号 L4391-1)购自美国 Sigma 公司;CCK-8 检测试剂盒(批号 BA08918147)购自北京博奥森生物技术有限公司;一氧化氮(NO)、内皮素 1(endothelin-1, ET-1)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号分别为 FY9044-B-2308R02、FY3435-B-2308R03)均购自江苏菲亚生物科技有限公司;线粒体超氧化物检测试剂盒(批号 M36008)购自美国 Invitrogen 公司;线粒体膜电位检测试剂盒、自噬阻断剂 PD98059、自噬激活剂 Honokiol(批号分别为 HY-15534、HY-12028-41867、HY-N0003-25245)均购自美国 MCE 公司;兔抗大鼠微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、Parkin、PINK1、选择性自噬接头蛋白 62(ubiquitin-binding protein 62, p62)抗体(货号分别为 27H8816、T127090、85H3726、43Z8688)均购自江苏亲科生物研究中心;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗(货号 T127090)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 实验大鼠与细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只,6~8 周龄,体重 220~250 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。大鼠饲养于我院实验动物中心 SPF 级动物房,饲养温度 20~26 °C,相对湿度 40%~70%,所有大鼠自由进食、饮用蒸馏水,隔日更换一次垫料。本研究经我院实验动物伦理委员会批准,批件号:ZYFY20200518-02。RAECs(批号 CP-R075)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 药液和含药血清的制备

取天麻芎苈止眩片,粉碎,精密称取粉末 9 g,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 30 mL 甲醇,称量后超声提取 30 min,放置室温,补足失重;取上清液,以 8 000 r/min 离

心5 min,经0.22 μm微孔滤膜过滤,得到大鼠等效剂量3倍量的天麻苧苧止眩片药液。

大鼠适应性喂养7 d后,按随机数字表法分为空白组和中药组,每组6只。根据天麻苧苧止眩片成人每日用量12 g,按体表面积折算法^[8]计算大鼠等效给药剂量,即中药组大鼠按0.8 g/(kg·d)灌胃相应药液,空白组大鼠给予等体积蒸馏水,每日2次,连续3 d。末次给药1 h后,大鼠行腹主动脉取血,以4 500 r/min离心10 min,收集血清,置于56 °C水浴锅灭活处理30 min后,再以1 200 r/min离心5 min;收集上清液,经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌后,分装后置于-80 °C冰箱,备用。

2.2 天麻苧苧止眩片含药血清最佳干预浓度筛选

取对数生长期的RAECs,以胰酶消化,细胞稀释至 1×10^5 个/mL,以每孔100 μL接种至96孔板中。细胞分为6组,分别为正常组、模型组和5%、10%、15%、20%含药血清组,每组设4个复孔。除正常组外,其余各组分别加入10 μg/mL的LPS干预24 h,建立RAECs炎症损伤模型。各组分别给予“2.1”项下空白组血清(正常组、模型组)和相应浓度含药血清进行干预,24 h后,按每孔5 000个细胞接种至96孔细胞培养板中培养24 h后,每孔加入含20 μL CCK-8工作液的新鲜完全培养基200 μL,继续孵育2~3 h,采用多功能酶标仪于450 nm波长处检测各孔吸光度(A)值,计算细胞存活率:细胞存活率(%)=($A_{\text{中药组}} - A_{\text{正常组}}$)/($A_{\text{模型组}} - A_{\text{正常组}}$)×100%。

2.3 分组、造模与给药

待RAECs生长至70%~80%融合程度时,加入0.25%胰蛋白酶,离心、重悬细胞后,以每孔5 000个细胞接种至96孔细胞培养板中,置于CO₂细胞培养液中培养24 h。次日吸去全部旧培养基,补充足量新鲜完全培养基,将细胞随机分为正常组、模型组、空白血清组、中药含药血清组、自噬阻断剂组、自噬激动剂组、中药联合自噬激动剂组,每组设4个复孔。除正常组外,其余各组分别加入10 μg/mL的LPS干预24 h,建立RAECs炎症损伤模型,并以细胞形态学、细胞活力、炎症因子水平提示造模成功与否。空白血清组加入10%空白血清,中药含药血清组加入10%天麻苧苧止眩片含药血清,自噬阻断剂组加入20 μmol/L PD98059^[9],自噬激动剂组加入50 μmol/L Honokiol^[10],中药联合自噬激动剂组加入10%天麻苧苧止眩片含药血清和50 μmol/L Honokiol。以上各组均继续干预24 h后,收集细胞样本,用于后续各项指标检测。

2.4 RAECs形态学观察

取对数生长期的RAECs,以每孔5 000个接种至96孔细胞培养板中,置于细胞培养箱中培养24 h后,按“2.3”项下方法分组、造模、给药,采用细胞成像分析系统观察各组RAECs的形态及结构变化。

2.5 RAECs活力测定

取“2.3”项下RAECs的96孔板,吸弃上清后,每孔加入10% CCK-8工作液20 μL,持续孵育2~3 h后,采用多功能酶标仪于450 nm波长处检测各孔A值,按“2.2”项下公式计算细胞存活率。

2.6 上清液中ET-1、NO水平检测

收集“2.3”项下分组、造模、给药后的RAECs上清液,按照ELISA试剂盒说明书检测ET-1、NO水平。

2.7 线粒体活性氧检测

取“2.3”项下RAECs的96孔板,加入5 μmol/L线粒体超氧化物红色荧光探针工作液,于室温避光孵育30 min,用PBS洗涤5次,加入1:800浓度的Hoechst33342工作液,再于室温避光孵育20 min后,用PBS洗涤3次;使用激光共聚焦显微镜于510 nm激发波长处标记线粒体活性氧(红色),于350 nm激发波长处标记细胞核(蓝色),拍摄荧光图像,通过Image J 1.53软件分析细胞质区域内的平均荧光强度,用以反映线粒体活性氧水平。

2.8 线粒体膜电位检测

取“2.3”项下RAECs的96孔板,加入10 μg/mL线粒体膜电位荧光探针工作液,于37 °C避光孵育45 min,用PBS洗3次;采用激光共聚焦显微镜分别于585 nm和514 nm激发波长处进行荧光检测并拍照,绿色荧光为受损的线粒体膜电位,红色荧光为正常的线粒体膜电位,并以红绿荧光强度的比值反映线粒体膜电位的变化情况。

2.9 PINK1/Parkin信号通路相关蛋白检测

采用Western blot法进行检测。取对数生长期的RAECs,按“2.3”项下方法分组、造模、给药,24 h后弃液,加入细胞蛋白裂解液,于冰上裂解4 h,以12 000 r/min离心15 min;取上清,提取总蛋白,将蛋白与上样缓冲液混匀、变性后,经电泳、转膜、封闭,加入PINK1、Parkin、p62、LC3蛋白一抗(稀释度均为1:800),4 °C孵育过夜,加入HRP标记的二抗(稀释度为1:5 000),室温振荡孵育1 h。采用ECL化学发光及蛋白成像分析系统扫描,采用Image J 1.53软件分析,以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)的灰度值比值表示目标蛋白的相对表达量。上述实验重复3次。

2.10 统计学方法

采用SPSS 27.0软件进行统计分析。计量资料满足正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性时多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验;方差不齐时多组间比较采用非参数Kruskal-Wallis *H*检验,进一步两两比较采用Mann-Whitney *U*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 不同浓度含药血清对RAECs活力的影响

与正常组[(100.00±6.82)%]比较,模型组细胞存活率[(67.05±4.58)%]显著降低($P<0.01$),提示LPS诱导

造模成功。与模型组比较,5%含药血清组细胞存活率[(72.99±2.85)%]未能显著提升($P>0.05$),10%、15%、20%含药血清组细胞存活率[(81.76±4.53)%、(84.06±2.63)%、(85.16±1.65)%]均显著升高($P<0.01$),且3组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),故选择10%含药血清进行后续研究。

3.2 含药血清对RAECs形态学的影响

细胞成像分析结果显示,正常组RAECs生长状态良好,呈典型的铺路石样结构。与正常组比较,模型组、空白血清组RAECs均显著受损,细胞数量减少,胞体裂解,铺路石样结构减少或消失。与模型组比较,自噬阻断剂组RAECs显著缓解,而自噬激动剂组RAECs损伤进一步加重;中药含药血清组RAECs数量显著增加,同时细胞恢复铺路石样结构。与自噬激动剂组比较,中药联合自噬激动剂组能一定程度逆转自噬激动剂所致的RAECs形态结构受损。结果见图1。

3.3 含药血清对RAECs存活率的影响

与正常组比较,模型组、空白血清组RAECs存活率显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,自噬阻断剂组RAECs存活率显著升高($P<0.01$),自噬激动剂组RAECs存活率显著降低($P<0.05$)。与自噬激动剂组比较,中药联合自噬激动剂组RAECs存活率显著升高($P<0.01$)。结果见表1。

表1 各组RAECs存活率和上清液中ET-1、NO水平比较($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	细胞存活率/%	ET-1/(pg/mL)	NO/(pg/mL)
正常组	100.00±9.57	23.79±1.73	77.98±6.28
模型组	64.34±2.82 ^a	57.53±2.84 ^a	50.66±5.43 ^a
空白血清组	66.49±5.31 ^a	59.79±0.97 ^a	50.08±7.50 ^a
中药含药血清组	72.23±5.38	51.20±2.22 ^b	62.00±4.13 ^c
自噬阻断剂组	78.26±4.11 ^c	37.87±3.04 ^c	70.48±3.31 ^c
自噬激动剂组	52.70±6.82 ^c	63.31±2.40 ^b	44.90±8.82
中药联合自噬激动剂组	65.94±2.18 ^d	56.27±8.40 ^a	53.43±8.57

a:与正常组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.01$;d:与自噬激动剂组比较, $P<0.01$;e:与自噬激动剂组比较, $P<0.05$ 。

3.4 含药血清对上清液中ET-1及NO水平的影响

与正常组比较,模型组、空白血清组上清液中ET-1水平显著升高、NO水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,自噬阻断剂组上清液中ET-1水平显著降低、NO水平显著升高($P<0.01$),自噬激动剂组上清液中ET-1水

平显著升高($P<0.05$),中药含药血清组上清液中ET-1水平显著降低、NO水平显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与自噬激动剂组比较,中药联合自噬激动剂组上清液中ET-1水平显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

3.5 含药血清对RAECs线粒体活性氧的影响

正常组、模型组、空白血清组、中药含药血清组、自噬阻断剂组、自噬激动剂组、中药联合自噬激动剂组RAECs线粒体活性氧水平分别为20.17±2.88、54.30±2.85、51.56±4.88、45.62±3.37、33.38±4.89、64.14±3.76、57.25±4.96。与正常组比较,模型组、空白血清组RAECs线粒体活性氧水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,自噬阻断剂组和中药含药血清组RAECs线粒体活性氧水平均显著降低($P<0.01$),自噬激动剂组RAECs线粒体活性氧水平显著升高($P<0.01$)。结果见图2。

3.6 含药血清对RAECs线粒体膜电位的影响

正常组、模型组、空白血清组、中药含药血清组、自噬阻断剂组、自噬激动剂组、中药联合自噬激动剂组RAECs线粒体红绿荧光强度比值分别为4.07±0.84、0.29±0.03、0.28±0.05、1.27±0.14、2.11±0.12、0.18±0.03、0.51±0.10。与正常组比较,模型组、空白血清组RAECs线粒体红绿荧光强度比值均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,自噬阻断剂组和中药含药血清组RAECs线粒体红绿荧光强度比值均显著升高($P<0.01$)。结果见图3。

3.7 含药血清对PINK1/Parkin信号通路相关蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组、空白血清组RAECs中PINK1、Parkin、LC3蛋白相对表达量均显著升高,p62蛋白相对表达量显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,自噬激动剂组RAECs中Parkin、LC3蛋白相对表达量均显著升高($P<0.01$),自噬阻断剂组RAECs中PINK1、Parkin、LC3蛋白相对表达量均显著降低,p62蛋白相对表达量显著升高($P<0.01$);中药含药血清组RAECs中PINK1、Parkin、LC3蛋白相对表达量均显著降低,p62蛋白相对表达量显著升高($P<0.01$)。与自噬激动剂组比较,中药联合自噬激动剂组RAECs中PINK1、Parkin、LC3蛋白相对表达量均显著降低,p62蛋白相对表达量显著升高($P<0.01$)。结果见图4、表2。

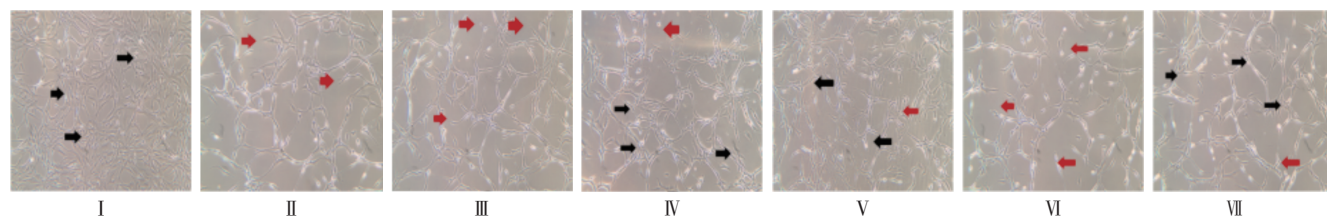
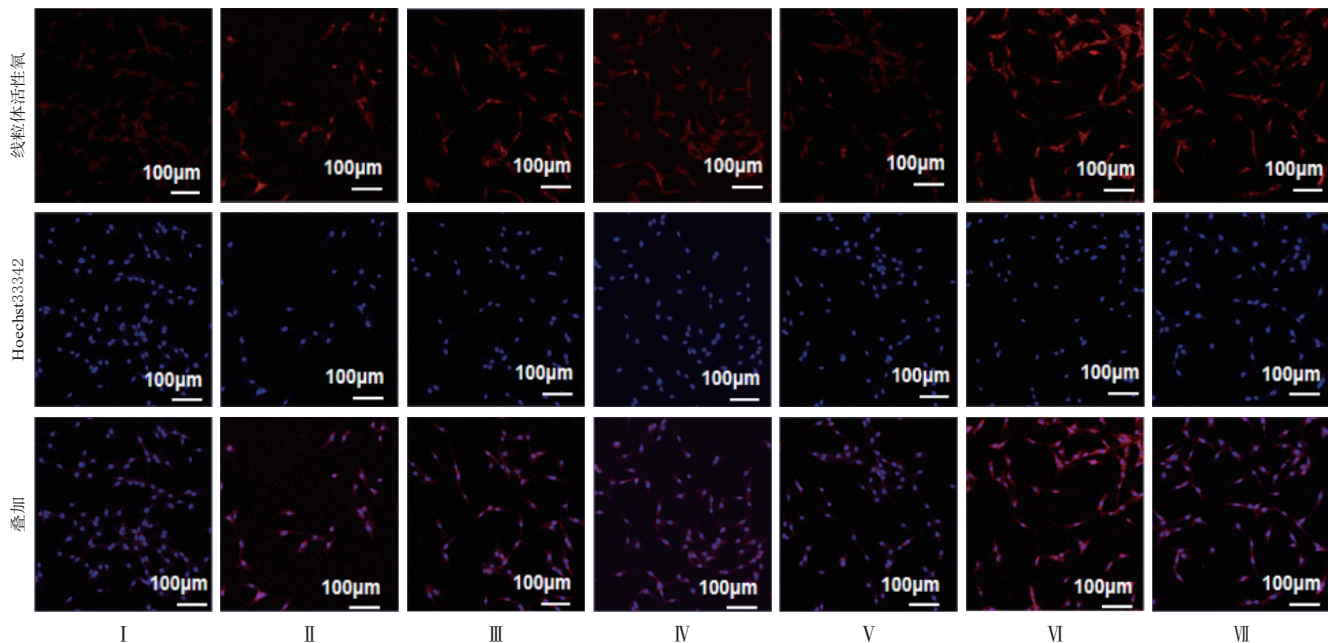


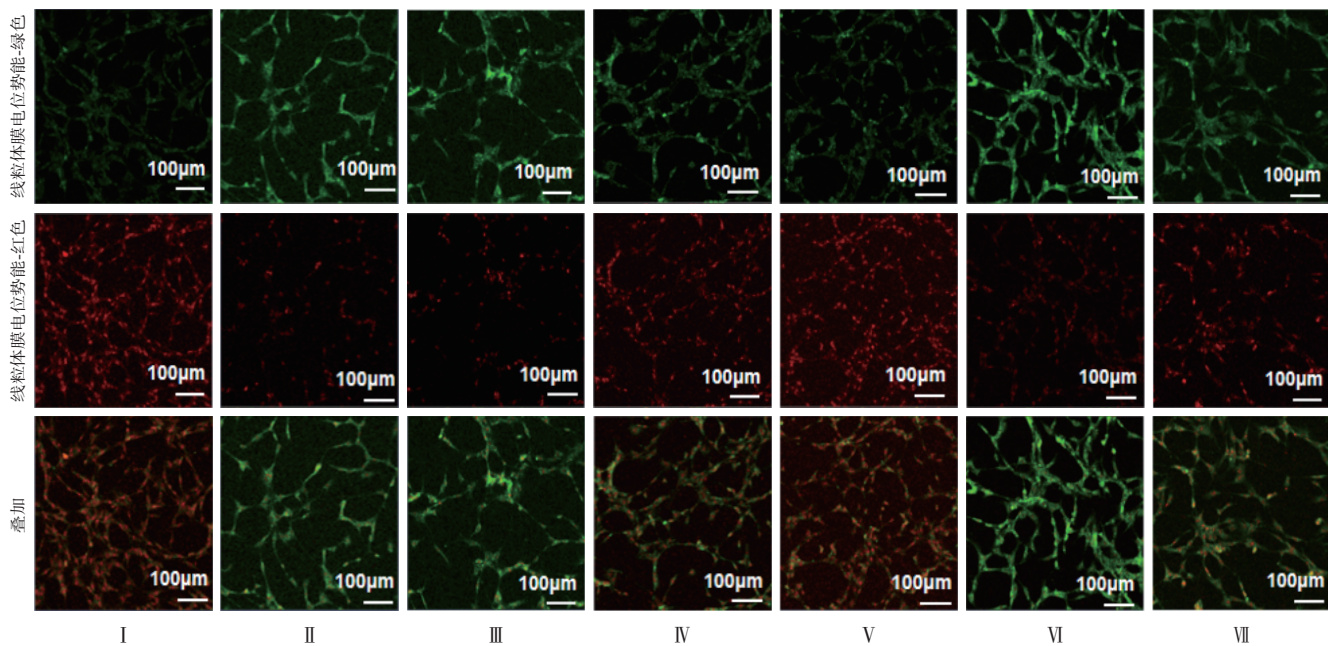
图1 各组RAECs形态学显微图(游标尺:100 μm)
I:正常组;II:模型组;III:空白血清组;IV:中药含药血清组;V:自噬阻断剂组;VI:自噬激动剂组;VII:中药联合自噬激动剂组;黑色箭头:正常RAECs;红色箭头:损伤的RAECs。

图1 各组RAECs形态学显微图(游标尺:100 μm)



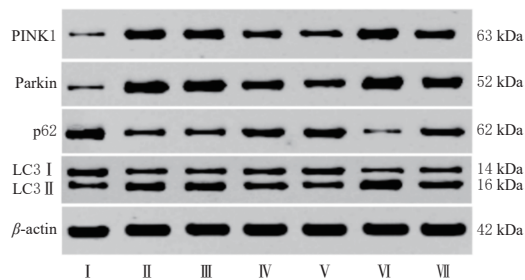
I: 正常组; II: 模型组; III: 空白血清组; IV: 中药含药血清组; V: 自噬阻断剂组; VI: 自噬激动剂组; VII: 中药联合自噬激动剂组。

图2 各组RAECs线粒体活性氧检测免疫荧光图



I: 正常组; II: 模型组; III: 空白血清组; IV: 中药含药血清组; V: 自噬阻断剂组; VI: 自噬激动剂组; VII: 中药联合自噬激动剂组。

图3 各组RAECs线粒体膜电位检测免疫荧光图



I: 正常组; II: 模型组; III: 空白血清组; IV: 中药含药血清组; V: 自噬阻断剂组; VI: 自噬激动剂组; VII: 中药联合自噬激动剂组。

图4 各组RAECs中通路相关蛋白表达电泳图

表2 各组RAECs中通路相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	PINK1/ β -actin	Parkin/ β -actin	p62/ β -actin	LC3/ β -actin
正常组	0.11 ± 0.05	0.09 ± 0.02	0.87 ± 0.09	0.62 ± 0.04
模型组	0.80 ± 0.05 ^a	0.78 ± 0.06 ^a	0.30 ± 0.06 ^a	1.86 ± 0.22 ^a
空白血清组	0.83 ± 0.07 ^a	0.79 ± 0.03 ^a	0.29 ± 0.05 ^a	1.78 ± 0.07 ^a
中药含药血清组	0.55 ± 0.04 ^b	0.56 ± 0.03 ^b	0.55 ± 0.09 ^b	1.25 ± 0.12 ^b
自噬阻断剂组	0.44 ± 0.08 ^b	0.42 ± 0.03 ^b	0.65 ± 0.12 ^b	0.87 ± 0.09 ^b
自噬激动剂组	0.89 ± 0.10	0.93 ± 0.07 ^b	0.10 ± 0.03	2.38 ± 0.26 ^b
中药联合自噬激动剂组	0.60 ± 0.09 ^a	0.68 ± 0.02 ^a	0.47 ± 0.05 ^a	1.56 ± 0.06 ^a

a: 与正常组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与自噬激动剂组比较, $P < 0.01$ 。

4 讨论

血管内皮位于血浆与血管平滑肌细胞之间,可以合成与分泌多种活性物质,保证血管正常收缩与舒张^[1]。研究表明,降低内皮细胞中的活性氧与炎症因子水平可以改善血管内皮细胞损伤^[2]。本研究通过LPS干预建立RAECs炎症损伤模型来探讨天麻芎苈止眩片对血管内皮细胞损伤的保护机制。结果显示,经LPS干预后,与正常组比较,模型组血清中ET-1水平显著升高、NO水平显著降低;经天麻芎苈止眩片含药血清干预后,与模型组比较,中药含药血清组以上指标均明显逆转,说明天麻芎苈止眩片可保护血管内皮细胞。

线粒体自噬在维持内皮细胞正常功能中发挥重要作用:自噬不足时,胞质内易堆积多余或变性蛋白质和衰老细胞器,引起细胞代谢紊乱,甚至损伤血管内皮组织;自噬被过度激活时会通过非选择性降解正常的线粒体和线粒体相关蛋白,进一步加重线粒体损伤和能量代谢障碍^[3],形成能量代谢紊乱等恶性循环,最终引起血管结构和功能恶化,引发高血压^[4]。PINK1/Parkin信号通路通过调节线粒体自噬,在线粒体质量控制中发挥重要作用^[5]。正常生理状态下,具有正常膜电位的健康线粒体通过TOM(线粒体外膜转位酶)/TIM23(线粒体内膜前导序列转位酶)复合体将PINK1导入线粒体内膜后降解,使PINK1维持在低水平;线粒体损伤降低线粒体内膜电位,从而直接抑制PINK1进入线粒体。因此,PINK1不断在线粒体外膜表面积累,并从细胞质中大量募集E3泛素连接酶Parkin^[6]。LC3和p62是线粒体自噬的关键下游蛋白,当发生线粒体损伤时,激活的PINK1/Parkin信号通路通过招募p62并与LC3结合,从而激活自噬溶酶体系统进行降解^[7]。本研究结果显示,经天麻芎苈止眩片含药血清干预后,RAECs中PINK1、Parkin、LC3蛋白表达下调,p62表达上调;免疫荧光染色结果显示,含药血清可降低线粒体活性氧水平,升高线粒体膜电位,调控过度自噬,保护线粒体功能。进一步与自噬激动剂组和自噬阻断剂组比较发现,PINK1/Parkin信号通路是线粒体自噬调控的关键通路,同时,通过对比中药联合自噬激动剂组与自噬激动剂组发现,含药血清能逆转自噬激动剂造成的自噬增强,与自噬阻断剂的作用趋势一致,进一步证明天麻芎苈止眩片含药血清具有抑制线粒体自噬的作用。

综上所述,天麻芎苈止眩片可通过调控线粒体自噬来保护血管内皮功能,其作用机制可能与调控PINK1/Parkin信号通路、抑制线粒体自噬有关。

参考文献

[1] 孙芹,田伟帆,罗婷婷,等. 2023年世界卫生组织《全球高血压报告》解读[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2024,31(2):203-208.

[2] DROŹDŹ D, DROŹDŹ M, WÓJCIK M. Endothelial dysfunction as a factor leading to arterial hypertension[J]. Pe-

diatr Nephrol, 2023,38(9):2973-2985.

[3] SIMULA L, CORRADO M, ACCORDI B, et al. JNK1 and ERK1/2 modulate lymphocyte homeostasis via BIM and DRP1 upon AICD induction[J]. Cell Death Differ, 2020,27(10):2749-2767.

[4] 姚福胜,田晶,张稳,等. 天麻芎苈止眩片治疗原发性高血压肝火亢盛、痰热内蕴证的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022,20(3):505-508.

[5] 雍苏南,房赤,李苏,等. 天麻芎苈止眩片通过调控ERK1/2-CREB通路及自噬标志物对自发性高血压大鼠血管内皮功能的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2023,39(9):1252-1256.

[6] 余婧萍,贺春香,李泽,等. 芍药苷对PINK1-Parkin介导的线粒体自噬在H₂O₂诱导SH-SY5Y细胞损伤中的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2020,27(11):45-51.

[7] 闫明静,沈涛. 线粒体功能障碍与血管内皮损伤的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021,29(10):829-837.

[8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2011:1698.

[9] DI PAOLA R, GALUPPO M, MAZZON E, et al. PD98059, a specific MAP kinase inhibitor, attenuates multiple organ dysfunction syndrome/failure (MODS) induced by zymosan in mice[J]. Pharmacol Res, 2010, 61(2):175-187.

[10] CHANG K H, YAN M D, YAO C J, et al. Honokiol-induced apoptosis and autophagy in glioblastoma multiforme cells[J]. Oncol Lett, 2013,6(5):1435-1438.

[11] LAFOZ E, RUART M, ANTON A, et al. The endothelium as a driver of liver fibrosis and regeneration[J]. Cells, 2020,9(4):929.

[12] PINHEIRO L C, OLIVEIRA-PAULA G H. Sources and effects of oxidative stress in hypertension[J]. Curr Hypertens Rev, 2020,16(3):166-180.

[13] DEN BRAVE F, SCHULTE U, FAKLER B, et al. Mitochondrial complexome and import network[J]. Trends Cell Biol, 2024,34(7):578-594.

[14] 姜文秀,王英超,常诚. 中医药调节细胞自噬刍议[J]. 中医杂志, 2017,58(18):1566-1568,1572.

[15] YI S L, ZHENG B, ZHU Y, et al. Melatonin ameliorates excessive PINK1/Parkin-mediated mitophagy by enhancing SIRT1 expression in granulosa cells of PCOS[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020,319(1):E91-E101.

[16] CHEN X C, SUN T, QI Y X, et al. Paeoniflorin ameliorates reperfusion injury in H9C2 cells through SIRT1-PINK1/Parkin-mediated mitochondrial autophagy[J]. Mol Immunol, 2025,177:32-43.

[17] ZHAO H, WANG W S, YANG Y, et al. Norepinephrine attenuates benzalkonium chloride-induced dry eye disease by regulating the PINK1/Parkin mitophagy pathway[J]. Ocul Immunol Inflamm, 2024:1-15.

(收稿日期:2025-02-17 修回日期:2025-06-29)

(编辑:舒安琴)