

活血胶囊激活 PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 通路对血管内皮细胞 发挥抗氧化损伤作用 *

赵 静¹, 袁瑞华¹, 王海芳¹, 邓国荣², 张琳萍³, 曹情雯⁴, 霍雪萍⁵, 赵向绒⁵, 刘勤社^{1△}

(1. 陕西中医药大学中西医结合心血管病专业, 陕西省中西医结合心血管病防治重点实验室, 陕西 西安 712046;

2. 陕西中医药大学第二附属医院心内科, 陕西 西安 712000;

3. 西安交通大学医学部中西医结合心血管专业, 陕西 西安 710061;

4. 陕西省中医医院医疗管理处, 陕西 西安 710003;

5. 陕西省人民医院中心实验室, 陕西 西安 710068)

摘要: **目的** 研究活血胶囊(HXJN)对血管内皮细胞的抗氧化损伤作用分子机制。**方法** 采用 WST-1 法检测细胞活力;qRT-PCR 和 Western blot 技术检测血红素加氧酶-1(HO-1)的表达;检测 HXJN 对 Akt 和转录因子 Nrf2 的激活作用,并分析其对 HO-1 表达的影响。**结果** HXJN 可显著减轻 H₂O₂ 对细胞活力的抑制作用。HXJN 可上调 HO-1 表达水平。HXJN 可诱导 Akt 和 Nrf2 磷酸化,并促进 Nrf2 核转位;LY294002、perifosine 和 ML385 均抑制 HXJN 对 HO-1 的上调,LY294002 可抑制 Nrf2 核转位。**结论** HXJN 促进 HO-1 表达而发挥抗氧化损伤作用,Akt 和 Nrf2 参与调控 HO-1 表达。

关键词: 活血胶囊;血管内皮细胞;Nrf-2;HO-1;氧化损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2019)03-0010-07

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.03.002

HXJN Mitigate Oxidative Stress in Brain Microvascular Endothelial Cells via Regulation of PI3K/Akt/Nrf2/ HO-1 Pathways

ZHAO Jing¹, YUAN Ruihua¹, WANG Haifang¹, DENG Guorong², ZHANG Linping³, CAO Qingwen⁴,
HUO Xueping⁵, ZHAO Xiangrong⁵, LIU Qinshe¹

(1. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Cardiovascular Diseases, Shaanxi Key Laboratory of Integrated Traditional and Western Medicine for Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China;

2. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712000, China; 3. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 4. Medical Management Office, Shaanxi Province Hospital of Chinese Medicine, Xi'an 710003, China; 5. Central Laboratory of Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the anti-oxidant effects of HXJN in brain microvascular endothelial cells (bEND.3) and the underlying mechanism. **Methods** HXJN-containing serum and HXJN extract solution were prepared and their effects on bEND.3 cell viability were measured by WST-1 assay. The protective effect of HXJN on H₂O₂-induced

收稿日期: 2019-03-10

* 基金项目: 国家自然科学基金(81573823);陕西省中医管理局平台项目(JCPT028);陕西省中医管理局项目(2019-ZZ-JC025)

第一作者简介: 赵静(1990-),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合心血管病防治。

△通信作者: 刘勤社, E-mail: lqsspph@126.com

oxidative cell damage was also measured. Heme oxygenase (HO-1) mRNA level was detected by quantitative RT-PCR. The expression levels of HO-1, ph-Akt, ph-Nrf2 (nuclear factor erythroid 2, Nrf2) and Nrf2 nuclear translocation were detected by using Western Blot analysis. The involvement of Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway in the effect of HXJN were analyzed using specific pharmacological inhibitors. **Results** Treatment of the bEND.3 cells with HXJN-containing serum less than 10% for 24 h did not reduce the cell viability. Treatment of the cells with HXJN extract for 24 h increased the cell viability significantly. The cell viability was greatly decreased by a 3 h's treatment of 200 μ M or 300 μ M H_2O_2 , and HXJN showed a significant protective effect on the cell injury induced by 200 μ M H_2O_2 ($P<0.01$). Furthermore, HXJN induced the expression of HO-1 and increased the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. HXJN-induced HO-1 up-regulation was suppressed by LY294002, perifosine and ML385. The nuclear translocation of Nrf2 was inhibited by LY294002. **Conclusion** HXJN protects bEND.3 against oxidative stress through up-regulating the expression of HO-1. PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway may be involved in this effect.

KEY WORDS: Huoxue Capsule (HXJN); brain microvascular endothelial cells; nuclear factor E2 related factor 2; heme oxygenase-1; oxidative injury

血管内皮层不仅是血液和组织的屏障,还能够合成多种血管活性物质,从而调节血管张力和血管通透性。血管内皮细胞(vascular endothelial cell,VEC)在创伤修复、血管生成、止血等一系列生理和病理过程中发挥着重要作用。VEC 损伤是多种疾病发生、发展的基础,保持 VEC 结构和功能的完整性对于维持心血管系统稳态调节极为重要。VEC 损伤和功能失常与多种心血管疾病(如冠心病、高血压、糖尿病等)均有密切的关系。动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是老年性慢性心血管疾病的共同病理基础,而引起 AS 的主要原因之一是 VEC 氧化损伤。从整体、细胞、分子水平研究对 VEC 具有抗氧化损伤作用的药物对于心血管疾病的防治研究具有重要意义^[1]。

活血胶囊(以下简称 HXJN)由黄芪、红花、赤芍、川芎、桃仁、牛膝、当归、生地、枳壳、桔梗、酸枣仁、甘草 12 味中药组成,具有补气养血、活血化瘀、理气安神等功效,临床用于治疗冠心病气虚血瘀证具有良好疗效,但其药理学作用机理和分子机制尚未完全阐明。既往动物实验表明,HXJN 可缩小动脉粥样硬化斑块面积,减少斑块内巨噬细胞浸润,降低斑块内炎症因子表达,具有抗炎和增强斑块稳定性的作用^[2-3]。笔者前期对于黄芪、红花和赤芍等药材中主要活性成分的药理学研究显示,黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)^[4]、黄芪皂苷 III^[5]、羟基红花黄色素 A(hydroxy-Safflower Yellow A, HSYA)^[6] 和芍药苷(paeoniflorin, PF)^[7] 等活性单体成分可抑制血管内皮细胞的炎症反应,同时还具有不同程度的抗氧化作用^[8-10]。然而单个药物成分的研究既不能如实反映复方中的活性成分含量与比例关系,也难以体现不同成分的综合

作用,不能够全面阐释复方的药理学作用和作用机制。因此,本研究通过制备 HXJN 含药血清和提取物水溶液,离体培养小鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, bEND.3),采用 H_2O_2 诱导细胞氧化损伤模型,研究 HXJN 的抗氧化损伤作用及其相关分子机制,为其药理学作用提供直接的实验室证据。

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠 bEND.3 细胞购自上海拜力生物技术公司。RPMI-1640 细胞培养基和胎牛血清购自 Clontech 公司。PI3K 抑制剂 LY294002、Akt 抑制剂 perifosine、Nrf2 抑制剂 ML385,以及 WST-1 细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒、细胞浆蛋白和核蛋白抽提试剂盒均购自碧云天生物技术公司。RNA 提取试剂盒、反转录及 qRT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。抗 β -actin 抗体、抗 ph-Akt/Akt 一抗和抗 ph-Nrf2/Nrf2 一抗购自美国 Cell signaling 公司,抗 HO-1 一抗购自美国 Abcam 公司。所用二抗购自北京康为世纪生物科技有限公司。主要仪器有 CO₂ 细胞培养箱(美国 Napco 公司),倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司),台式冷冻离心机 Allegra 64R (德国 Beckman 公司),Model 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),Eco Real-Time PCR 扩增仪(美国 Illumina 公司)和化学发光仪(美国 Alpha Innotech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 含药血清制备 健康雄性 SD 大鼠,体质量 200~220 g,由西安交通大学医学院实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(陕)2012-003。按照人用剂量换算大鼠给药剂量,将 HXJN(西安大唐制药集团

有限公司生产,批号:B20020336)配制成 0.09 g/mL 生理盐水溶液,每只大鼠每次灌胃 2 mL,对照组灌服等量生理盐水,1 日 2 次,连续 5 d,末次给药前禁食 12 h,给药后 1 h 麻醉动物后经腹主动脉取血,离心分离血清,56 ℃灭活 30 min,过滤除菌,分装,-80℃保存备用。

1.2.2 HXJN 提取物溶液制备 将 3 粒活血胶囊(0.9 g)溶于 6 mL 无血清 RPMI-1640 细胞培养基,充分溶解,3 000 rpm 离心 5 min,过滤除菌,分装,-80℃保存备用。

1.2.3 细胞培养 在 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中,bEND.3 细胞贴壁生长于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI-1640 培养液中,0.025% 胰酶消化传代。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.4 细胞活力检测 将细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中,加入 200 μ L 完全培养液培养,每组设 5 个复孔。次晨换为 100 μ L 含不同浓度含药血清或 HXJN 提取物的新鲜培养液处理。24 h 后每孔加入 10 μ L WST-1 溶液,在细胞培养箱内继续孵育 1~1.5 h,充分混匀,450 nm 处测定吸光度。采用公式“细胞活力值(实验组)=[OD(实验组)/OD(对照组)] $\times$ 100%”计算各组细胞活力值。

1.2.5 实时定量 RT-PCR 检测 HO-1 基因表达 bEND.3 细胞在 6 孔培养板中生长至 90% 铺满,以高浓度(750 μ g/mL)HXJN 提取物处理细胞 4、8、16 h,利用 TRIzol 试剂裂解细胞收集裂解液,提取总 RNA。按照反转录试剂盒说明书以 1 μ g 总 RNA 为模板反转录出 cDNA 链。按照试剂盒说明书以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。引物: β -actin: 正向引物 5'-TAG-GCGACTGTTACTGAGC-3'; 反向引物 TGCTC-CAACCAACTGCTGTC;HO-1: 正向引物 5'-GCT-CACGGTCTCCAGTC-GCC-3'; 5'-GGCGACTGGA-GACCGTGAGC-3'。反应条件:95 ℃变性 1 min,58 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 45 s,设 35 个循环。以 β -actin 作为内参基因,计算同一样本中目的基因的含量比值,评价目的基因表达水平。

1.2.6 Western Blot 检测目标蛋白表达 生长于 6 孔细胞培养板中的细胞经过适当药物处理后,每孔加入 100 μ L 2 $\times$ SDS 样品缓冲液,直接收集细胞裂解

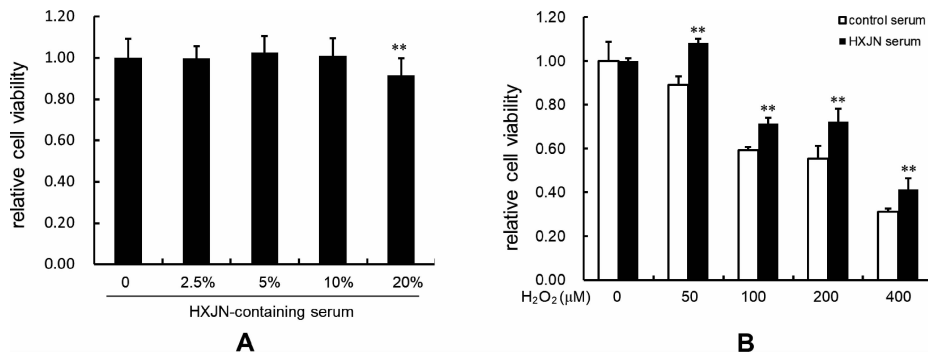
物;或采用试剂盒分离胞浆蛋白和核蛋白。采用氨基黑法进行蛋白定量。95 ℃变性 10 min 后按照目标蛋白分子量进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白(蛋白上样量为 20~30 μ g),转硝酸纤维素膜,用 50 g/L 脱脂牛奶室温封闭 60 min,一抗(1:500)4 ℃孵育过夜,二抗(1:1 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜,ECL 法发光,在化学发光影像分析系统检测抗体信号,利用 Image J 软件进行灰度分析,以 β -actin 作为内参计算蛋白相对表达水平的变化。蛋白表达检测实验进行至少 3 次,给出具有代表性的结果图。

1.2.7 统计学处理 应用 SPSS 14.0 软件进行统计分析,结果采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。首先用方差分析检验各组是否有显著差异,存在显著差异时采用学生 *t* 检验分析均数间是否有显著性差异。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

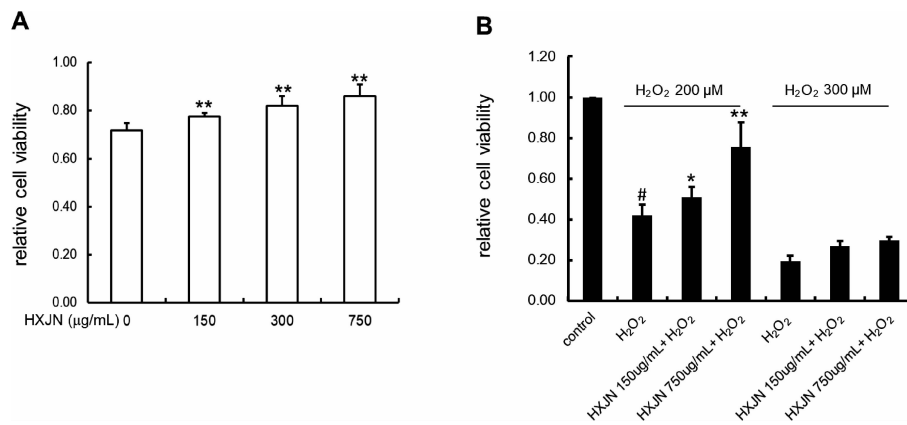
2.1 HXJN 含药血清对细胞活力和 H₂O₂ 诱导细胞损伤的影响 首先检测不同浓度 HXJN 含药血清处理 24 h 对 bEND.3 细胞活力的影响。结果如图 1A 显示,2.5%、5% 和 10% 浓度含药血清对细胞活力无显著影响,但在 20% 浓度时可引起细胞活力显著降低($P < 0.01$),因此后续实验选用最高 10% 浓度进行研究。图 1B 显示,H₂O₂ 作用 3 h 可呈浓度依赖性诱导细胞活力降低,表明发生氧化损伤,显微镜下观察在 100 μ M 以上剂量组可见细胞出现明显的变圆、皱缩、破裂及脱落现象。10% 含药血清预处理 24 h 可显著减轻 H₂O₂ 对细胞活力的影响($P < 0.01$),但不能恢复到对照组水平。

2.2 HXJN 提取物对 H₂O₂ 诱导细胞氧化应激损伤的保护作用 检测 HXJN 提取物处理 24 h 对 bEND.3 细胞活力的影响,结果如图 2A 所示,HXJN 在 150、300 和 750 μ g/mL 浓度均可引起细胞活力升高($P < 0.01$)。图 2B 显示,200 μ M H₂O₂ 作用 3 h 可使细胞活力明显减低,约为对照组的 40% ($P < 0.01$),表明发生氧化损伤。采用 750 μ g/mL HXJN 提取物预处理 24 h 可显著减轻 H₂O₂ 对细胞活力的影响($P < 0.01$)。300 μ M H₂O₂ 可使细胞活力减低至约为对照组的 20% ($P < 0.01$),此时 HXJN 不能减轻 H₂O₂ 的损伤作用。



A. 不同浓度含药血清对 bEND.3 细胞活力的影响; B. 10%含药血清对不同浓度 H₂O₂ 诱导细胞活力变化的影响。与对照血清+H₂O₂ 组相比, ** $P<0.01$

图 1 HXJN 含药血清对 bEND.3 细胞活力的影响

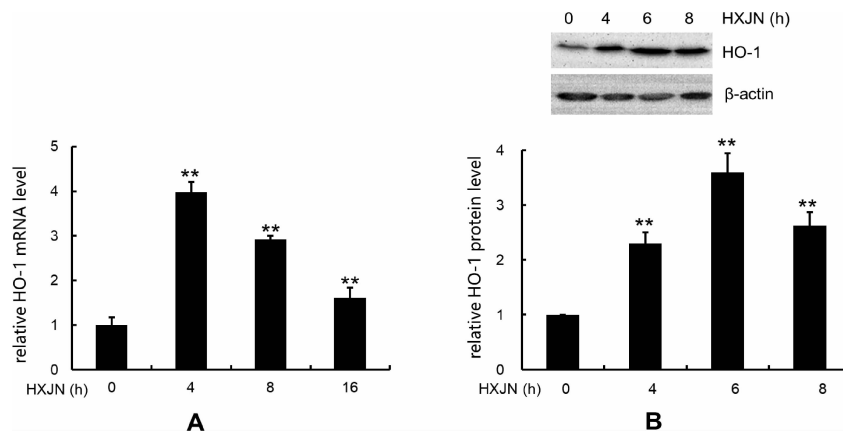


A. 不同浓度 HXJN 提取物对细胞活力的影响。与对照组相比, ** $P<0.01$; B. HXJN 提取物抑制 H₂O₂ 诱导的细胞氧化损伤。与对照组相比, * $P<0.01$; 与 H₂O₂ 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 2 HXJN 提取物对 bEND.3 细胞活力的影响

2.3 HXJN 诱导细胞中 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平上调 血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是一种广泛存在于各种细胞中的具有抗氧化、抗凋亡、抗炎症等保护作用的重要分子,对于维持细胞氧化还原稳态具有重要意义。图 3A 显示, 750 μg/mL

HXJN 提取物作用 4、8、16 h 均可检测到细胞中 HO-1 mRNA 表达水平显著上调 ($P<0.01$)。图 3B 显示, HXJN 提取物作用 4、6 和 8 h 可显著上调 HO-1 蛋白的表达 ($P<0.01$), 提示其可能与 HXJN 对细胞的抗氧化损伤作用有关。



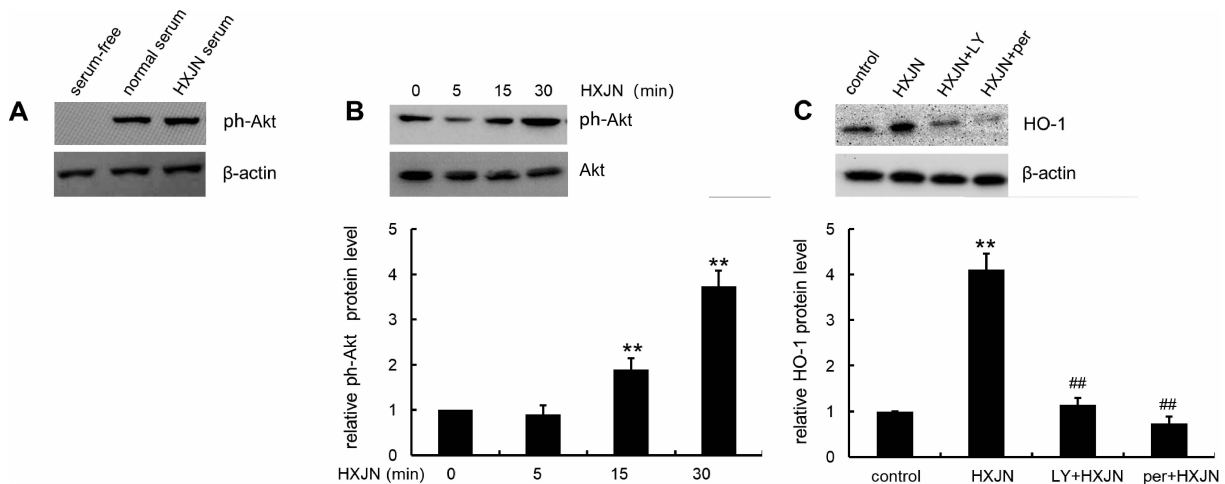
A. HXJN 提取物上调 HO-1 mRNA 的表达; B. HXJN 提取物上调 HO-1 蛋白的表达。与对照组相比, ** $P<0.01$

图 3 HXJN 提取物诱导 bEND.3 细胞中 HO-1 的表达

2.4 PI3K/Akt 信号通路参与 HXJN 对 HO-1 表达的调控 图 4A 显示, 正常血清和含药血清均可上调 ph-Akt 蛋白的表达水平, 提示 Akt 被激活。由于血清对 Akt 蛋白磷酸化具有激活作用, 为了去除血清对实验结果的影响, 我们采用 HXJN 提取物在无血清条件下进一步研究 HXJN 对 Akt 磷酸化的影响。结果如图 4B 显示, 750 $\mu\text{g/mL}$ HXJN 作用于细胞在 15 min 和 30 min 时即可检测到 ph-Akt 蛋白水平显著升高。同时, 如图 4C 显示, 与 HXJN 组相比, 应用 PI3K 抑制剂 LY294002 (LY, 20 μM) 和 Akt 抑制剂 perifosine

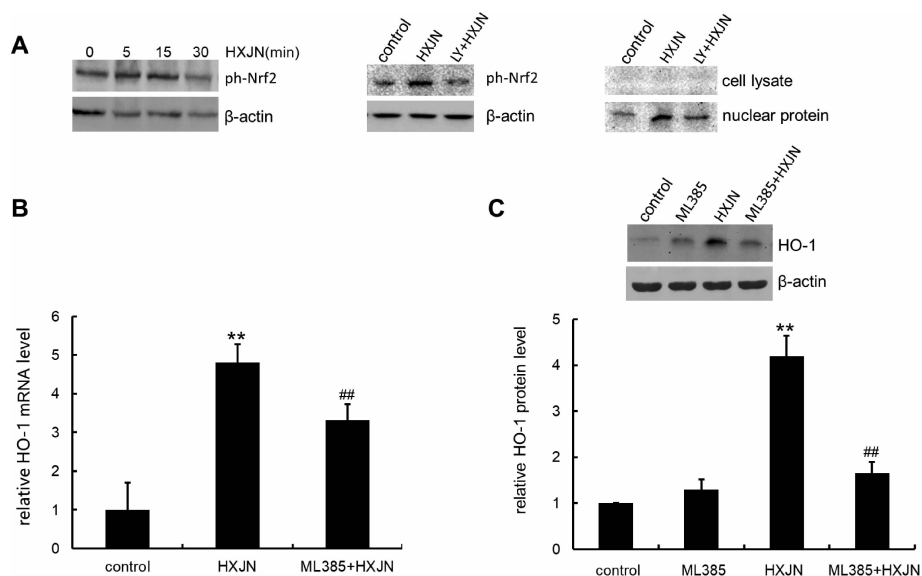
(10 μM) 预处理可显著抑制 HXJN 对 HO-1 蛋白表达的上调作用 ($P < 0.01$), 表明 PI3K/Akt 信号通路参与 HXJN 对 HO-1 表达的调控。

2.5 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路参与介导 HXJN 对 HO-1 表达的调控作用 图 5A 显示, HXJN 提取物作用于细胞后在 5 min 和 15 min 即可检测到转录因子 Nrf2 (NF-E2-related factor 2) 发生磷酸化, 随后 30 min 时 ph-Nrf2 水平基本恢复正常。HXJN 作用 60 min 时可检测到细胞核中 Nrf2 蛋白水平升高, 表明其发生了核转位, 提示转录活性增强。应用 PI3K



A. 正常血清和 HXJN 含药血清对 ph-Akt 蛋白表达的影响; B. HXJN 提取物对 ph-Akt 蛋白表达的影响; 与对照组相比, ** $P < 0.01$; C. PI3K 抑制剂 LY294002 (LY) 和 ph-Akt 抑制剂 perifosine (per) 对 HXJN 诱导 HO-1 蛋白表达的影响。与对照组相比, ** $P < 0.01$; 与 HXJN 相比, ## $P < 0.01$

图 4 PI3K/Akt 信号通路参与 HXJN 对 HO-1 表达的调控



A. HXJN 促进 Nrf2 磷酸化和细胞核转位及 LY294002 (LY) 的抑制作用; B. ML385 抑制 HXJN 对 HO-1 mRNA 表达的上调; C. ML385 抑制 HXJN 对 HO-1 蛋白表达的上调。与对照组相比, ** $P < 0.01$; 与 HXJN 组相比, ## $P < 0.01$

图 5 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路参与 HXJN 对 HO-1 表达的调控

抑制剂 LY294002 (LY, 50 μ M) 预处理细胞可抑制 HXJN 对 Nrf2 核转位的诱导作用。图 5B 显示, HXJN 可诱导 HO-1 mRNA 表达上调, 而应用 Nrf2 抑制剂 ML385 (10 μ M) 可显著抑制 HXJN 的诱导作用 ($P < 0.01$)。图 5C 显示, HXJN 可显著促进 HO-1 蛋白表达 ($P < 0.01$), 而应用 ML385 可显著阻断 HXJN 对 HO-1 蛋白表达的促进作用 ($P < 0.01$), 提示 HXJN 可通过转录因子 Nrf2 介导 HO-1 的表达, 而 PI3K/Akt/信号调控 Nrf2 磷酸化和核转位增强其转录活性。

3 讨论

活血胶囊(HXJN)具有补气养血、活血化瘀、理气安神的功效, 近年来临床常用于气虚血瘀型心血管病的辅助治疗。动物实验已证明, HXJN 对动物 AS 模型具有抗炎和增强斑块稳定性的作用, 但其药理学作用和分子机制都尚未完全阐明。尽管以往对黄芪、红花、赤芍等药材中主要活性成分的药理学研究显示, 许多活性单体成分都具有不同程度的抗氧化作用, 本研究则通过制备 HXJN 含药血清和提取物溶液, 直接研究其对 H_2O_2 诱导 bEND.3 细胞氧化损伤模型的保护作用, 并对其机制进行研究。

本研究结果显示, HXJN 含药血清和提取物均对 H_2O_2 诱导的细胞氧化损伤具有抑制作用。进一步研究显示, HXJN 可诱导 bEND.3 细胞中重要的抗氧化酶 HO-1 基因和蛋白表达升高, 可能是其发挥抗氧化作用的基础。HO-1 是体内最广泛存在的一种重要的抗氧化防御酶, 主要催化血红素分解代谢成亚铁、一氧化碳和胆绿素, 近年来其功能及调控备受关注, 已成为药物开发的重要靶点^[11]。研究表明 HO-1 不仅在维持细胞内氧化还原的平衡中起着重要的作用, 同时还具有抗炎和抗凋亡^[12]作用, 并在肿瘤预防中发挥重要作用^[13]。不过, HO-1 的过度表达则可能促进肿瘤的发生发展^[14]。正常情况下 HO-1 在大多数组织内呈低水平表达, 可为多种伤害性刺激包括缺氧、细胞因子、 H_2O_2 、脂质、NO 等诱导表达升高, 许多药物可通过诱导 HO-1 表达而发挥保护作用。HO-1 的重要作用之一是参与血管保护。HO-1 的表达升高可以对诸如 AS 和心肌缺血-再灌注损伤等心血管疾病起防御保护作用^[15-16]。因此, 本研究为 HXJN 通过抗氧化作用而发挥心血管系统保护作用提供了依据。

研究显示在 HO-1 启动子序列中存在类似抗氧

化反应元件(antioxidant response element, ARE)的结合位点, 因此其表达受转录因子 Nrf2 调控。Nrf2 是细胞氧化应激反应中的关键因子, 通过诱导调控一系列抗氧化蛋白的组成型和诱导型表达, 减轻 ROS 和亲电体引起的细胞损伤, 发挥保护作用。Nrf2 蛋白在机体的多种组织(如肝、肾、脾、心等)的细胞内广泛表达, 提示这些器官的慢性疾病发病机制可能与 Nrf2 活性缺乏有关^[17]。正常生理状态下, Nrf2 与其抑制蛋白 Keap-1(Kelch-like ECH-associated protein-1)相结合存在于细胞质中, 并通过 Keap1-Cul3-Rbx 依赖的泛素化过程保持平衡而处于非活性状态。在氧化应激或药物诱导条件下, Nrf2 和/或 Keap-1 发生磷酸化, Nrf2 与 Keap-1 解离并转位进入细胞核, 在细胞核内积聚并进一步识别、结合抗氧化反应元件 ARE, 从而启动受 Nrf2 调控的抗氧化酶基因转录表达^[18]。本研究结果可见, 应用 Nrf2 抑制剂可抑制 HXJN 对 HO-1 表达的上调, 提示 Nrf2 参与介导 HXJN 对 HO-1 表达的调控。Nrf2/HO-1 是保护心血管系统对抗氧化损伤的重要途径^[19-20]。我们的研究结果显示, HXJN 可诱导 Nrf2 磷酸化, 亦可促进其向细胞核内转位, 应用 Nrf2 抑制剂可抑制 HO-1 的表达, 提示 HXJN 可通过调控 Nrf2 转录活性而诱导 HO-1 表达, 因此这可以部分解释 HXJN 对心血管疾病的治疗作用。值得注意的是, 研究显示 Nrf2 可激活人类基因组中 500 多种基因的转录, 这些基因大多数具有细胞保护功能。基于以往对疾病动物模型研究, 提高 Nrf2 活性对于许多其他疾病(神经退行性病变、慢性肾病、代谢性疾病、自身免疫性疾病等)具有改善作用^[21], 这提示 HXJN 可能对其他老年性慢性疾病也具有改善作用。

本研究对 HXJN 激活 Nrf2 的机制进行进一步研究的结果表明, HXJN 可通过诱导 Akt 磷酸化使之激活。应用 PI3K/Akt 信号通路抑制剂可抑制 HXJN 引起的 Nrf2 核转位的水平, 并且抑制 HXJN 引起的 HO-1 表达上调, 表明 PI3K/Akt 信号通路参与了 HXJN 对 Nrf2 转录活性的调控。但目前的结果尚不能完全排除其它信号途径如 ERK1/2 或 p38 等的作用。

综上所述, HXJN 可激活 bEND.3 中 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路, 从而激活下游分子 HO-1 的表达, 发挥抗氧化作用, 抑制内皮功能失调和动脉粥样硬化进

程。除抗氧化作用之外,PI3K/Akt/Nrf2 信号通路及 HO-1 蛋白还与抗炎作用、抗细胞衰老作用密切相关,同时也是细胞自噬的重要信号途径。尽管多种药物单体成分对 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路的激活作用已有报告,但采用复方直接研究,活性成分组成与比例更能够反应其整体作用,为 HXJN 对 AS 和冠心病发挥预防和治疗作用提供了细胞水平的直接证据。

参考文献:

- [1] INCALZA M A,D'ORIA R,NATALICCHIO A,et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases[J]. *Vascul Pharmacol*,2018,100(1):1-19.
- [2] 任得志,刘勤社,李静,等. 活血胶囊对兔动脉粥样硬化斑块血管内皮细胞生长因子和血管细胞黏附分子-1 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*,2014,20(21):167-170.
- [3] 周洁,刘勤社,张晓艳,等. 活血胶囊对家兔动脉粥样硬化斑块稳定性的影响 [J]. *中药新药与临床药理*,2011,22(5):528-531.
- [4] LIU Q S,WANG H F,SUN A K,et al. A comparative study on inhibition of total astragalus saponins and astragaloside IV on TNFR1-mediated signaling pathways in arterial endothelial cells[J]. *PLoS One*,2014,9(7):e101504.
- [5] 王海芳,张琳萍,霍雪萍,等. 黄芪皂苷 III 抑制小鼠动脉平滑肌细胞 TNFR1 介导信号转导 [J]. *云南中医学院学报*,2017,40(3):1-6.
- [6] WANG H,LIU J L,YANG Y,et al. Hydroxy-safflower yellow A inhibits TNFR1-mediated classical NF- κ B pathway through inducing shedding of TNFR1 [J]. *Phytother Res*,2016,30(5):790-796.
- [7] WANG H,MA S,LI J,et al. ADAM17 participates in the protective effect of paeoniflorin on mouse brain microvascular endothelial cells[J]. *J Cell Physiol*,2018,233(12):9320-9329.
- [8] QIAO Y,FAN C L,TANG M K. Astragaloside IV protects rat retinal capillary endothelial cells against high glucose-induced oxidative injury [J]. *Drug Des Devel Ther*,2017,11:3567-3577.
- [9] PEI J P,FAN L H,NAN K,et al. HSYA alleviates secondary neuronal death through attenuating oxidative stress,inflammatory response,and neural apoptosis in SD rat spinal cord compression injury[J]. *J Neuroinflammation*,2017,14(1):97.
- [10] LI P,LI Z. Neuroprotective effect of paeoniflorin on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells by modulation of reactive oxygen species and the inflammatory response [J]. *Exp Ther Med*,2015,9(5):1768-1772.
- [11] MOTTERLINI R,FORESTI R. Heme oxygenase-1 as a target for drug discovery [J]. *Antioxid Redox Signal*,2014,20(11):1810-1826.
- [12] SUN J,WEI X,LU Y,et al. Glutaredoxin 1 (GRX1) inhibits oxidative stress and apoptosis of chondrocytes by regulating CREB/HO-1 in osteoarthritis[J]. *Mol Immunol*,2017,90:211-218.
- [13] GIUDICE A,MONTELLA M. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway:a promising strategy in cancer prevention[J]. *Bioessays*,2006,28(2):169-181.
- [14] SALERNO L,ROMEO G,MODICA M N,et al. Heme oxygenase-1:A new druggable target in the management of chronic and acute myeloid leukemia [J]. *Eur J Med Chem*,2017,142:163-178.
- [15] CHENG Y,RONG J. Therapeutic potential of heme oxygenase-1/carbon monoxide system against ischemia-reperfusion injury [J]. *Curr Pharm Des*,2017,23(26):3884-3898.
- [16] WU N,LI R Q,LI L. SOAT1 deficiency attenuates atherosclerosis by regulating inflammation and cholesterol transportation via HO-1 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2018,501(2):343-350.
- [17] SCHMOLL D,ENGEL C K,GLOMBIK H. The Keap1-Nrf2 protein-protein interaction:A suitable target for small molecules [J]. *Drug Discov Today Technol*,2017,24:11-17.
- [18] GIUDICE A,ARRA C,TURCO M C. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents [J]. *Methods Mol Biol*,2010,647:37-74.
- [19] ZHU H,JIA Z,MISRA B R,et al. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent myocardial cytoprotection against oxidative and electrophilic stress[J]. *Cardiovascular Toxicology*,2008,8(2):71-85.
- [20] OOI B K,GOH B H,YAP W H. Oxidative stress in cardiovascular diseases:Involvement of Nrf2 antioxidant redox signaling in macrophage foam cells formation[J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(11):E2336.
- [21] PALL M L,LEVINE S. Nrf2,a master regulator of detoxification and also antioxidant,antiinflammatory and other cytoprotective mechanisms,is raised by health promoting factors[J]. *Acta Physiologica Sinica*,2015,67(1):1-18.