

- Cell Biochem Biophys*, 2011, 60(3): 297-310.
- [28] Wu H L, Li W B, Wang T T, et al. α -Tomatine, a novel early-stage autophagy inhibitor, inhibits autophagy to enhance apoptosis via Beclin-1 in Skov3 cells[J]. *Fitoterapia*, 2021, 152: 104911.

阿魏酸钠通过 miR-136-5p 对 ox-LDL 诱导内皮细胞增殖、迁移和侵袭的影响

黄泓轲¹, 罗健玮², 冉 华³

(1. 乐山职业技术学院药学系, 四川 乐山 614000; 2. 乐山职业技术学院医学系, 四川 乐山 614000; 3. 重庆市黔江中心医院心内科, 重庆 409000)

摘要:目的 探讨阿魏酸钠对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导内皮细胞增殖、迁移和侵袭的影响。方法 将人脐静脉内皮细胞株 EA. HY926 分为对照组、ox-LDL 组、不同浓度阿魏酸钠组、miR-NC+ox-LDL 组、miR-136-5p+ox-LDL 组、anti-miR-NC+ox-LDL 组、anti-miR-136-5p+ox-LDL 组、阿魏酸钠+miR-NC+ox-LDL 组、阿魏酸钠+miR-136-5p+ox-LDL 组。CCK-8 检测细胞活性, Transwell 检测细胞迁移和侵袭, Western blot 法检测细胞 Ki67、MMP2、MMP9、p-p65、p-IkB α 蛋白表达, RT-qPCR 法检测 miR-136-5p 表达。结果 ox-LDL 可诱导内皮细胞的增殖、迁移和侵袭。阿魏酸钠处理后, ox-LDL 诱导的内皮细胞中 Ki67 蛋白表达升高, 细胞活性升高, MMP2、MMP9 蛋白表达升高, 迁移和侵袭细胞数升高, miR-136-5p 表达降低 ($P<0.05$)。抑制 miR-136-5p 表达可促进 ox-LDL 诱导的内皮细胞增殖、迁移和侵袭。过表达 miR-136-5p 逆转了阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导的内皮细胞增殖、迁移和侵袭的作用。阿魏酸钠可降低内皮细胞 p-p65、p-IkB α 蛋白表达 ($P<0.05$), 而过表达 miR-136-5p 逆转了阿魏酸钠对 p-p65、p-IkB α 蛋白表达的抑制作用。结论 阿魏酸钠可能通过下调 miR-136-5p 表达抑制 NF- κ B 信号通路, 进而抑制内皮细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词: 阿魏酸钠; 内皮细胞; miR-136-5p; NF- κ B 信号通路; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-2010-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.052

动脉粥样硬化是一种病因复杂的慢性疾病, 内皮细胞损伤及功能障碍是动脉粥样硬化的始动环节, 参与动脉粥样硬化的进展过程^[1]。药物治疗是动脉粥样硬化及其相关心血管疾病的主要治疗手段之一, 因此有必要筛选有效的预防和治疗动脉粥样硬化的药物, 并探讨其作用机制, 寻找敏感的靶点^[2]。阿魏酸钠是传统活血化瘀类中药当归、川芎等的主要成分, 具有抗细胞凋亡、抑制血小板聚集、抗血栓形成等作用^[3]。阿魏酸钠通过抑制 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 通路能够有效降低氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的细胞凋亡, 发挥内皮保护作用^[4], 阿魏酸钠还能促进内皮细胞的增殖和迁移^[5]。核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路参与炎症反应、内皮细胞损伤、氧化应激等过程, 其可促进动脉粥样硬化的进展^[6], 抑制 NF- κ B p65 信号通路激活可减弱内皮细胞的增殖和迁移^[7]。阿魏酸钠可通过抑制 NF- κ B p65 核转位减轻缺血再灌注大鼠脑神经细胞炎症反应, 发挥脑保护作用^[8]。沉默 miR-136-5p 通过靶向 I κ B 激酶 β (IKK β) 调控 NF- κ B 信号通路改善大鼠脊髓损伤^[9]。因此, 用 ox-LDL 损伤人脐静脉内皮细胞

EA. HY926 建立体外细胞模型, 研究阿魏酸钠通过 miR-136-5p 调控 NF- κ B 信号通路对 ox-LDL 诱导内皮细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

1 材料

人脐静脉内皮细胞株 EA. HY926 购自中国科学院上海细胞库。阿魏酸钠 (纯度>98%) 购自北京索莱宝科技有限公司。DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 HyClone 公司; 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 购自上海泽叶生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒购自日本同仁研究所; 蛋白提取试剂盒、BCA 试剂盒购自北京凯瑞基生物科技有限公司; TRIzol 试剂、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。Transwell 小室、Matrigel 购自美国 BD 公司。

2 方法

2.1 细胞处理与分组 人脐静脉内皮细胞株 EA. HY926 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂, 待细胞融合至 90% 左右时进行传代。用 50 μ g/mL ox-LDL 诱导 EA. HY926 细胞模拟动脉粥样硬化模型, 为 ox-LDL 组; 正常培养的细胞作为对照组; 分别用

收稿日期: 2020-09-09

作者简介: 黄泓轲 (1986—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为药理学

25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠和 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理 EA. HY926, 为不同浓度阿魏酸钠组。将 miR-NC、miR-136-5p、anti-miR-NC、anti-miR-136-5p 转染至 EA. HY926 细胞中, 再用 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理, 分别记为 miR-NC+ox-LDL 组、miR-136-5p+ox-LDL 组、anti-miR-NC+ox-LDL 组、anti-miR-136-5p+ox-LDL 组; 将 miR-NC、miR-136-5p 转染至 EA. HY926 细胞中, 用 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠处理, 分别记为阿魏酸钠+miR-NC+ox-LDL 组、阿魏酸钠+miR-136-5p+ox-LDL 组。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力 各组细胞培养 48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 2 h, 酶标仪检测各组细胞在 450 nm 波长处的光密度值 (OD), 以 OD 值表示细胞活性。

2.3 Transwell 检测细胞迁移和侵袭 收集各组细胞, 取 200 μL 接种于 Transwell 小室上层, 培养 24 h, PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 显微镜下拍照并计数发生迁移的细胞数量。细胞侵袭实验除用 Matrigel 包被 Transwell 小室上室外, 其余操作同细胞迁移实验。

2.4 Western blot 法检测 Ki67、MMP2、MMP9、p-p65、p-IkB α 蛋白表达 提取细胞总蛋白, BCA 法进行定量, 将蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至聚偏二氟乙烯膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜, 加入二抗 (1:2 000) 室温孵育 90 min, 洗膜, 用 ECL 发光液显影, 成像, 用 Quantity One 软件测定蛋白条带的灰度值。

2.5 RT-qPCR 检测 miR-136-5p 表达 提取细胞总 RNA, 反转录成 cDNA, 进行 PCR 扩增, 每个样品重复 3 次, 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因的相对表达。以 U6 为内参, miR-136-5p 正向引物序列 5'-ACTCCATTGTTTATGATG-3', 反向引物序列 5'-GCTGTCAACGATACGC TACGTAAC-3'; U6 正向引物序列 5'-CTCGCTTCGGCAGC

ACA-3', 反向引物序列 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理, 结果以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞活力的影响 与对照组比较, ox-LDL 组内皮细胞 Ki67 蛋白表达降低, 细胞活性降低 ($P<0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 不同浓度阿魏酸钠处理组 Ki67 蛋白表达升高, 细胞活性升高 ($P<0.05$), 见图 1、表 1。

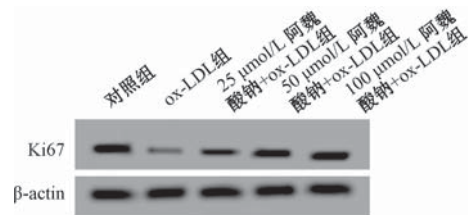


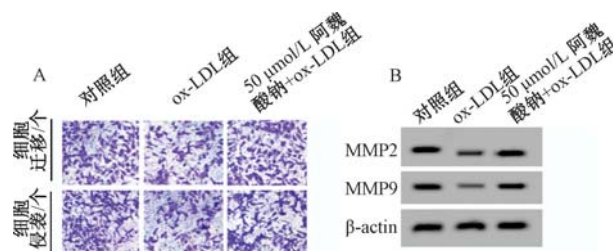
图 1 各组内皮细胞 Ki67 蛋白表达

表 1 不同浓度阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	Ki67	OD 值
对照组	0.80±0.09	0.81±0.07
ox-LDL 组	0.32±0.03 [*]	0.39±0.02 [*]
25 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	0.48±0.04 [#]	0.46±0.04 [#]
50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	0.66±0.05 [#]	0.67±0.06 [#]
100 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	0.78±0.07 [#]	0.76±0.05 [#]

注: 与对照组比较, $^*P<0.05$; 与 ox-LDL 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

3.2 阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞迁移和侵袭的影响 与对照组比较, ox-LDL 组内皮细胞 MMP2、MMP9 蛋白表达降低, 迁移和侵袭细胞数降低 ($P<0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组内皮细胞 MMP2、MMP9 蛋白表达升高, 迁移和侵袭细胞数升高 ($P<0.05$), 见图 2、表 2。



注: A 为 Transwell 检测细胞迁移和侵袭 ($\times 200$), B 为 MMP2、MMP9 蛋白表达。

图 2 阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞迁移和侵袭的影响

表 2 阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞迁移和侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	MMP2	MMP9	细胞迁移数量/个	细胞侵袭数量/个
对照组	0.89±0.07	0.76±0.06	161.13±10.06	133.69±9.25
ox-LDL 组	0.40±0.03 [*]	0.35±0.04 [*]	88.01±7.27 [*]	64.03±5.73 [*]
50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	0.75±0.07 [#]	0.67±0.06 [#]	143.28±11.17 [#]	115.14±8.02 [#]

注: 与对照组比较, $^*P<0.05$; 与 ox-LDL 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

3.3 阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞 *miR*-136-5p 表达的影响 与对照组比较, ox-LDL 组 ox-LDL 诱导内皮细胞 *miR*-136-5p 表达升高 ($P<0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组 ox-LDL 诱导内皮细胞 *miR*-136-5p 表达降低 ($P<0.05$), 见表 3。

表 3 阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞 *miR*-136-5p 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	<i>miR</i> -136-5p
对照组	1.00 $\pm$ 0.11
ox-LDL 组	3.67 $\pm$ 0.31 [*]
50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	1.56 $\pm$ 0.11 [#]

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 ox-LDL 组比较,[#] $P<0.05$ 。

3.4 *miR*-136-5p 对 ox-LDL 诱导内皮细胞活性、迁移和侵袭的影响 与 *miR*-NC+ox-LDL 组比较, *miR*-136-5p+ox-LDL 组内皮细胞 *miR*-136-5p 表达升高, Ki67、MMP2、MMP9 蛋白表达降低, 细胞活性降低, 迁移、侵袭细胞数降低 ($P<0.05$); 与 anti-*miR*-NC+ox-LDL 组比较, anti-*miR*-136-5p+ox-LDL 组内皮细胞 *miR*-136-5p 表达降低, Ki67、MMP2、MMP9 蛋白表达升高, 细胞活性升高, 迁移、侵袭细胞数升高 ($P<0.05$), 见图 3、表 4。

表 4 *miR*-136-5p 对 ox-LDL 诱导内皮细胞活性、迁移和侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	<i>miR</i> -136-5p	Ki67	MMP2	MMP9	OD 值	细胞迁移数量/个	细胞侵袭数量/个
ox-LDL 组	1.00 $\pm$ 0.11	0.34 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.02	89.24 $\pm$ 7.54	66.14 $\pm$ 4.39
<i>miR</i> -NC+ox-LDL 组	1.01 $\pm$ 0.09	0.38 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.03	90.14 $\pm$ 8.46	62.58 $\pm$ 5.53
<i>miR</i> -136-5p+ox-LDL 组	2.86 $\pm$ 0.13 [*]	0.12 $\pm$ 0.01 [*]	0.21 $\pm$ 0.02 [*]	0.10 $\pm$ 0.01 [*]	0.18 $\pm$ 0.02 [*]	54.22 $\pm$ 4.67 [*]	42.37 $\pm$ 3.24 [*]
anti- <i>miR</i> -NC+ox-LDL 组	1.02 $\pm$ 0.10	0.35 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.02	88.62 $\pm$ 7.58	63.11 $\pm$ 6.01
anti- <i>miR</i> -136-5p+ox-LDL 组	0.35 $\pm$ 0.03 [#]	0.72 $\pm$ 0.07 [#]	0.85 $\pm$ 0.08 [#]	0.78 $\pm$ 0.07 [#]	0.73 $\pm$ 0.06 [#]	148.25 $\pm$ 10.20 [#]	124.76 $\pm$ 12.06 [#]

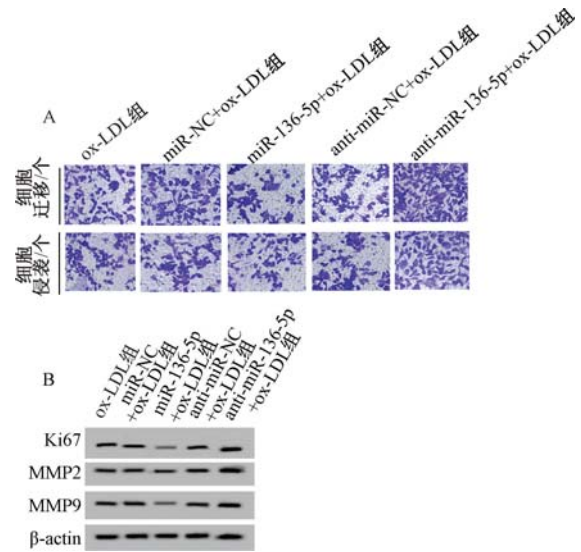
注:与 *miR*-NC+ox-LDL 组比较,^{*} $P<0.05$;与 anti-*miR*-NC+ox-LDL 组比较,[#] $P<0.05$ 。

3.5 *miR*-136-5p 逆转阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞活性、迁移和侵袭的作用 与 *miR*-NC+50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组比较, *miR*-136-5p+50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组内皮细胞 *miR*-136-5p 表达升高, Ki67、MMP2、MMP9 蛋白表达降低, 细胞活性降低, 迁移、侵袭细胞数降低 ($P<0.05$), 见图 4、表 5。

3.6 阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞 NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响 与对照组比较, ox-LDL 组内皮细胞 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组内皮细胞 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与 *miR*-NC+ox-LDL 组比较, *miR*-136-5p+ox-LDL 组内皮细胞 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与 *miR*-NC+50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组比较, *miR*-136-5p+50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组内皮细胞 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 见图 5、表 6。

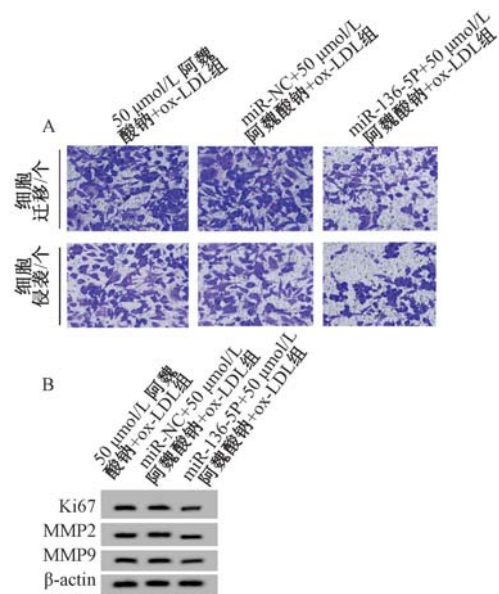
4 讨论

动脉粥样硬化是引起多种心脑血管疾病的主要原因, 内皮细胞的损伤和功能性障碍是动脉粥样硬化形成第一步, 减轻内皮细胞损伤是防治动脉粥样硬化的途径之一^[10]。阿魏酸钠能够缓解同型半胱氨酸导致的人脐静脉内皮细胞功能障碍^[11], 也可通过下调趋化因子配体 1 (CXCL1) 基因



注: A 为 Transwell 检测细胞迁移和侵袭 ($\times 200$), B 为 Ki67、MMP2、MMP9 蛋白表达。

图 3 *miR*-136-5p 对 ox-LDL 诱导内皮细胞迁移、侵袭和蛋白表达的影响



注: A 为 Transwell 检测细胞迁移和侵袭 ($\times 200$), B 为 Ki67、MMP2、MMP9 蛋白表达。

图 4 *miR*-136-5p 逆转阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞迁移、侵袭和蛋白表达的影响

表 5 miR-136-5p 逆转阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞活性、迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	miR-136-5p	Ki67	MMP2	MMP9	OD 值	细胞迁移数量/个	细胞侵袭数量/个
50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	1.00 $\pm$ 0.09	0.68 $\pm$ 0.05	0.74 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.06	0.67 $\pm$ 0.06	145.26 $\pm$ 10.27	117.17 $\pm$ 9.01
miR-NC+50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	1.02 $\pm$ 0.11	0.65 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.07	0.63 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.05	141.69 $\pm$ 10.22	114.03 $\pm$ 8.81
miR-136-5p+50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	2.76 $\pm$ 0.18 *	0.34 $\pm$ 0.03 *	0.38 $\pm$ 0.03 *	0.33 $\pm$ 0.04 *	0.40 $\pm$ 0.03 *	91.66 $\pm$ 8.16 *	71.62 $\pm$ 6.14 *

注:与 miR-NC+50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组比较, * $P<0.05$ 。

表 6 阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导内皮细胞 NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	p-p65	p-I κ B α
对照组	0.34 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.02
ox-LDL 组	0.75 $\pm$ 0.06 *	0.63 $\pm$ 0.06 *
50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	0.42 $\pm$ 0.04 #	0.33 $\pm$ 0.02 #
miR-NC+ox-LDL 组	0.73 $\pm$ 0.07	0.66 $\pm$ 0.06
miR-136-5p+ox-LDL 组	1.08 $\pm$ 0.09 Δ	0.98 $\pm$ 0.09 Δ
miR-NC+50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	0.40 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$ 0.03
miR-136-5p+50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组	0.70 $\pm$ 0.06 &	0.58 $\pm$ 0.05 &

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 ox-LDL 组比较, # $P<0.05$;与 miR-NC+ox-LDL 组比较, Δ $P<0.05$;与 miR-NC+50 $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠+ox-LDL 组比较, & $P<0.05$ 。

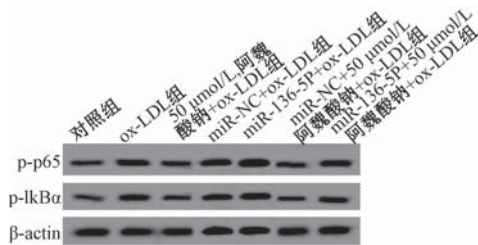


图 5 各组内皮细胞 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达

表达对 ox-LDL 损伤的人脐静脉内皮细胞起保护作用^[12]。阿魏酸钠治疗冠心病患者有较好的效果,可以有效保护血管内皮功能^[13]。本研究显示,阿魏酸钠处理后,内皮细胞 Ki67 蛋白表达升高,细胞活性升高, MMP2、MMP9 蛋白表达升高,迁移和侵袭细胞数增加,表明阿魏酸钠可促进内皮细胞增殖、迁移和侵袭,对 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤有保护作用。

miRNA 参与调控动脉粥样硬化形成、发展的病理生理过程,参与调节血管内皮细胞的生物学功能^[14]。利帕舒地尔可通过上调 miR-136-5p 减轻 RPE 细胞的炎症损伤^[15]。miR-136-5p 对内皮细胞生物学功能的影响尚未明确。本研究显示,抑制 miR-136-5p 表达后,ox-LDL 诱导的内皮细胞中 Ki67 蛋白表达升高,细胞活性升高, MMP2、MMP9 蛋白表达升高,迁移和侵袭细胞数升高,表明抑制 miR-136-5p 表达可促进 ox-LDL 诱导的内皮细胞增殖、迁移和侵袭。阿魏酸钠可下调 miR-136-5p 表达;而过表达 miR-136-5p 逆转了阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导的内皮细胞增殖、迁移和侵袭的作用。提示,阿魏酸钠可能通过下调 miR-136-5p 表达影响内皮细胞增殖、迁移和侵袭。

NF- κ B 信号通路在动脉粥样硬化的发生发展过程中发挥重要的作用^[16]。miR-98 可能通过负性调控 NF- κ B 信号通路抑制 ox-LDL 诱导的动脉粥样硬化早期血管内皮损伤^[17]。甲基莲心碱通过抑制 NF- κ B 信号通路,减轻脂多糖诱导的血管内皮细胞损伤,从而抗动脉粥样硬化^[18]。吐根碱通过

抑制 NF- κ B 信号通路能抑制人脐静脉内皮细胞的增殖、侵袭、迁移能力^[19]。本研究显示,阿魏酸钠处理后,内皮细胞 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达降低,表明阿魏酸钠可抑制 NF- κ B 信号通路。而过表达 miR-136-5p 后,内皮细胞 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达升高,表明过表达可激活 NF- κ B 信号通路;且过表达 miR-136-5p 逆转了阿魏酸钠对 p-p65、p-I κ B α 蛋白表达的抑制作用。

综上所述,阿魏酸钠可能通过下调 miR-136-5p 表达抑制 NF- κ B 信号通路,进而抑制内皮细胞的增殖、迁移和侵袭。

参考文献:

- [1] 高爽,王臻楠,顾耘. 血管内皮细胞功能障碍与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(20): 2966-2974.
- [2] 郑刚. 动脉粥样硬化及其相关心血管疾病药物治疗新靶点的研究进展[J]. 世界临床药物, 2018, 39(1): 54-58.
- [3] 王立霞,王枫,陈欣,等. 阿魏酸钠的心脑血管药理作用研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(3): 772-777.
- [4] 袁超睿,游路,汪少开. 阿魏酸钠对 Ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的保护作用与机制[J]. 世界最新医学信息文摘: 连续型电子期刊, 2014, 14(24): 162-163.
- [5] 朱晓斐,李江,王宝,等. 阿魏酸钠对人动脉平滑肌细胞和内皮细胞作用的机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(16): 3046-3050.
- [6] 郑学忠,万怡轩,王清岑,等. NF- κ B 信号通路在动脉粥样硬化中的作用及机制研究进展[J]. 西南国防医药, 2018, 28(3): 285-287.
- [7] 简冬冬. IFI35 通过抑制 NF- κ B 信号通路调节血管内皮细胞功能以及血管损伤后的再内皮化[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [8] 龚婉,陈晓玲,周莉,等. 阿魏酸钠对大鼠脑缺血再灌注炎症损伤的保护作用及机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 94-99.

- [9] Deng G, Gao Y, Cen Z, *et al.* miR-136-5p regulates the inflammatory response by targeting the IKK β /NF- κ B/A20 pathway after spinal cord injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(2): 512-524.
- [10] 张健美, 景永帅, 张丹参. 动脉粥样硬化的发病机制及治疗[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(6): 472.
- [11] 张东献, 张 伟, 满永宏. 阿魏酸钠对同型半胱氨酸致人脐静脉内皮细胞功能障碍的影响及机制[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(17): 1667-1670.
- [12] 张东献, 陶俊良, 满永宏, 等. 阿魏酸钠对 CXCL1 基因的调控在防治动脉粥样硬化中的应用: 中国, CN104306365A [P]. 2015-01-28.
- [13] 高 翔. 阿魏酸钠治疗冠心病效果及对机体血管内皮功能的保护作用观察[J]. 心理医生, 2018, 24(3): 95-96.
- [14] 韩 杨, 蒋知新. microRNA 在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(4): 441-444.
- [15] Gao Z, Li Q, Zhang Y, *et al.* Ripasudil alleviated the inflammation of RPE cells by targeting the miR-136-5p/ROCK/NLRP3 pathway[J]. *BMC Ophthalmol*, 2020, 20(1): 134.
- [16] 丁趁趁, 霍清萍. 核因子- κ B 抑制蛋白在动脉粥样硬化中的作用及其中医药研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(2): 222-224.
- [17] 刘继红, 冯 斌. miR-98 通过调控 ox-LDL 诱导血管内皮损伤抑制动脉粥样硬化形成的作用机制研究[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10(8): 970-974.
- [18] 戴 淳, 宋金春. 甲基莲心碱对 LPS 诱导人脐血管内皮细胞损伤中 NF- κ B 信号通路及相关因子表达的影响[J]. 中国药物警戒, 2017, 14(3): 129-132.
- [19] 李 溪, 朱 晔, 吴培洁, 等. 吐根碱对人脐静脉内皮细胞增殖、迁移、侵袭的影响及机制[J]. 山东医药, 2019, 59(11): 18-21.

桂枝抗肾病综合征作用机制的网络药理学研究

何 丹, 李 强, 孙继佳, 陈少丽, 宋哲平, 都广礼*
(上海中医药大学 基础医学院, 上海 201203)

摘要:目的 运用网络药理学构建桂枝活性成分-靶点网络、PPI 网络,并结合体外实验对靶点涉及的主要通路进行分析,探讨桂枝对肾病综合征影响的作用机制。方法 采用 TCMSPP 数据库检索桂枝的化合物,并筛选其中 OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18、Caco-2 $\geq$ -0.4 的主要活性成分;利用 Hitpick、SEA、SwissTargetPrediction 数据库预测桂枝活性成分的作用靶点;依托 DisGeNET、GeneCards、OMIM 数据库预测肾病综合征相关靶点,并与桂枝作用靶点取交集;通过 Cytoscape 软件构建活性成分-靶点网络;采用 String 数据库和 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络;通过 Autodock Vina 对靶点与活性成分进行分子对接验证;采用 DAVID 数据库对靶点进行 GO 及 KEGG 通路分析;对 MAPK 通路进行体外实验验证。结果 桂枝关键活性成分包括 β -谷甾醇、谷甾醇、桂皮醛等;关键蛋白涉及 VEGFA、MAPK3、SRC、PTGS2、MAPK8 等;KEGG 主要涉及 MAPK 等信号通路。体外实验中,桂枝主要成分桂皮醛降低了 p-p38 MAPK 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 桂枝主要通过调控 MAPK 等信号通路来发挥对肾脏的保护作用。

关键词: 桂枝;肾病综合征;网络药理学;分子对接;MAPK 信号通路;桂皮醛

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-2014-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.053

肾病综合征是一种由多种病因引起的常见肾小球疾病,是仅次于急性肾小球肾炎的第二大肾脏疾病,其临床表现主要为“三高一低”,即大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症以及水肿^[1-2]。流行病学调查发现,肾病综合征发病率为 2/100 000~10/100 000,且好发于男性儿童^[3],该病并发症多、疗效差、复发率高,给人们的生活和健康带来巨大压力^[4]。因此,探讨肾病综合征发病机制,寻找安全有效的治疗药物是一个亟待解决的问题^[5]。

桂枝味辛、甘,性温,归肺、心、膀胱经,功能发汗解肌、温通经脉、通阳化气。研究表明桂枝可提高肾病综合征的临床疗效^[6],且本课题组前期研究也发现,桂枝对阿霉素肾病大鼠具有肾功能保护作用^[7]。目前,关于桂枝的药理作用研究报道较多,但不够全面系统,尚不能明确阐述桂枝通阳化气利水方面的作用机制。

网络药理学作为中药研究的一种新思路,其多成分-多靶点-多通路的整体调控思维方法已被广泛应用于预测中药

收稿日期: 2021-09-22

基金项目: 上海中医药大学“杏林传承型人才培养计划”(上中医人字[2019]24号)

作者简介: 何 丹 (1990—),女,博士生,从事方剂配伍规律的理论 and 实验研究。Tel: 18217434056, E-mail: danhe2020@163.com

*通信作者: 都广礼 (1970—),男,教授,从事方剂配伍的理论及机制研究。Tel: 13916195505, E-mail: duguangli2002@126.com