

引用:程序,魏琼,赵梦竹,刘梦华,张冬梅.血府逐瘀胶囊及其拆方抑制棕榈酸钠诱导的平滑肌细胞泡沫化、线粒体损伤及凋亡[J].中医指导报,2025,31(3):45-50.

血府逐瘀胶囊及其拆方抑制棕榈酸钠诱导的平滑肌细胞泡沫化、线粒体损伤及凋亡*

程 序¹, 魏 琼¹, 赵梦竹^{1,2}, 刘梦华^{1,3}, 张冬梅¹

(1.北京中医药大学东直门医院,北京 100007;

2.海军军医大学,上海 200433;3.开封市中医院,河南 开封 475000)

[摘要] 目的:通过体外实验探讨血府逐瘀胶囊及其拆方对平滑肌源性泡沫细胞的形成及凋亡的影响。方法:将血府逐瘀胶囊拆分为活血方(红花、炒桃仁、牛膝、桔梗、生地黄、甘草)和理气方(枳壳、川芎、柴胡、当归、赤芍、炒桃仁);制备活血方、理气方及二者混合方的冻干粉;棕榈酸钠诱导小鼠平滑肌细胞(Movas)泡沫化及凋亡并给予药物干预;CCK-8法检测药物对平滑肌细胞活力的影响;油红O染色检测细胞内脂质吞噬及泡沫化;Annexin V-PI检测细胞凋亡情况;ROS检测细胞活性氧释放情况;JC-1检测细胞线粒体膜电位。结果:随着棕榈酸钠诱导浓度的升高,Movas的脂质吞噬情况、相对泡沫化程度和凋亡率逐步升高;500 $\mu\text{mol/L}$ 及1 mmol/L棕榈酸钠诱导Movas凋亡率高于60%($P<0.01$)。1.6 mg/mL混合方及800 $\mu\text{g/mL}$ 理气方能明显抑制Movas泡沫化。800 $\mu\text{g/mL}$ 活血方及理气方能显著增加Movas存活率($P<0.01$)、抑制Movas早期凋亡率($P<0.01$)、抑制Movas活性氧释放($P<0.05$),并显著提高线粒体膜电位($P<0.05$)。结论:血府逐瘀胶囊及其拆方可抑制棕榈酸钠诱导的平滑肌细胞泡沫化及凋亡,这可能与抑制线粒体的激活从而抑制活性物质ROS的释放有关。

[关键词] 平滑肌细胞;泡沫细胞;凋亡;线粒体损伤;血府逐瘀胶囊;活血;理气

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)03-0045-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.03.008

Xuefu Zhuyu Capsule (血府逐瘀胶囊) and Demolitions Inhibited the Foam Formation, Mitochondrial Damage and Apoptosis of Smooth Muscle Cells Induced by Sodium Palmitate

CHENG Xu¹, WEI Qiong¹, ZHAO Mengzhu^{1,2}, LIU Menghua¹, ZHANG Dongmei¹

(1.Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100007, China;

2.Naval Medical University, Shanghai 200433, China;

3.Kaifeng Traditional Chinese Medicine Hospital,Kaifeng He'nan 475000, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Xuefu Zhuyu capsule and its disassembly prescription on the formation and apoptosis of smooth muscle derived foam cells by in vitro experiment. Methods: Xuefu Zhuyu capsule was divided into Huoxue (活血) formula [Honghua (safflower), Chaotaoren (fried peach kernel), Niuxi (achyranthus), Jiegeng (platycodon platycodon), Shengdihuang (rehmannia), and Gancao (licorice)] and Liqi (理气) formula [Zhiqiao (fructus aurantii), Chuanxiong (chuanxiong), Chiahua (bupleurum), Dangui (angelica sinensis), Chishao (red peony) and Chaotaoren (fried peach kernel)]. The freeze-dried powder of Huoxue formula, Liqi formula and their mixture was prepared. Sodium palmitate was used to induce the foaming and apoptosis of mouse smooth muscle cells (Movas), treating with drug intervention. CCK-8 was used to detect the effect of drugs on Movas activity. Lipid phagocytosis and foaming were detected by oil red O staining. Annexin V-PI was used to detect apoptosis. ROS was used to detect the release of reactive oxygen species. Cell mitochondrial membrane potential was detected by JC-1. Results: With the increase of sodium palmitate induction concentration, the lipid phagocytosis, relative foaming degree and apoptosis rate of Movas increased

*基金项目:北京中医药大学“揭榜挂帅”项目(2022-JYB-JBZR-013);国家自然科学基金项目(82474445)

通信作者:张冬梅,女,主任医师,研究员,研究方向为中西医结合防治心血管疾病

gradually. The apoptosis rate of Movas induced by 500 $\mu\text{mol/L}$ and 1 mmol/L sodium palmitate reached over 60% ($P<0.01$). Mixed formula (1.6 mg/mL) and Liqi formula (800 $\mu\text{g/mL}$) inhibited Movas foaming significantly. Huoxue formula and Liqi formula increased the survival rate of Movas at 800 $\mu\text{g/mL}$ ($P<0.01$), inhibited the early apoptosis rate of Movas ($P<0.01$), inhibited the release of Movas ROS ($P<0.05$), and increased the mitochondrial membrane potential ($P<0.05$) significantly. Conclusion: Xuefu Zhuyu capsule and its disassembly can inhibit the foam and apoptosis of smooth muscle cells induced by sodium palmitate, which may be related to the inhibition of the activation of mitochondria and the release of ROS.

[Keywords] smooth muscle cells; foam cells; apoptosis; mitochondrial damage; Xuefu Zhuyu capsule; Huoxue; Liqi

缺血性心脏病是全球疾病负担的主要原因,是由易感动脉内皮下间隙积聚胆固醇导致的动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)引起的^[1]。由AS导致的心脑血管病,包括心肌梗死、心力衰竭、中风等一直是全球主要死亡原因^[2]。目前他汀类药物的使用因轻微的肝脏毒性、肌肉毒性等副作用及部分患者的不耐受而受限。中医药治疗具有多靶点、毒副作用小等特点,在AS的防治中有较好的发展前景。AS在中医上属于“脉痹”“脉痛”范畴,其病位在血脉,属本虚标实,可诱发“胸痹”“中风”等病证。血府逐瘀汤来自于清代医家王清任所著《医林改错》,有行气止痛、活血祛瘀之功,可治疗胸中血瘀诸证。血府逐瘀胶囊为血府逐瘀汤的胶囊制剂,临床应用广泛^[3]。研究^[4]发现其有较好的降血脂、抗炎、促进内皮修复等作用。在AS的病理过程中,泡沫细胞的形成、聚集、凋亡和坏死是一个持续的过程,与脂质中心的形成、坏死核心的扩大息息相关^[5]。课题组前期研究^[6-7]表明,血府逐瘀胶囊可促进巨噬细胞向M2型转变,吞噬凋亡的泡沫细胞,从而抑制斑块形成。然而其对泡沫细胞的形成及凋亡的作用尚未可知。本研究通过体外实验探讨血府逐瘀胶囊及其拆方对平滑肌源性泡沫细胞的形成及凋亡的影响,以期为血府逐瘀胶囊的临床应用提供实验依据,为AS的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、药物与仪器 胎牛血清(FBS)(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:C2910);DMEM高糖培养基(批号:12100)、CCK-8试剂(批号:CA1210)均购自北京索莱宝科技有限公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(BD Biosciences公司,批号:556547);线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(批号:C2006)、活性氧(ROS)检测试剂盒(批号:S0033S)、油红O染色试剂盒(批号:C0158S)均购自上海碧云天生物科技股份有限公司;血府逐瘀胶囊相关药粉(包含以下所说的活血方、理气方及混合方)由天津宏仁堂药业有限公司提供(批号:BB03182)。

EQR超净工作台(ESCO公司,型号:GL-41A);CO₂细胞培养箱(SANYO公司,型号:MCO-20AIC);电热恒温水浴锅(金坛市新锐仪器厂,型号:HH-1A);倒置显微镜(德国Leica公司,型号:DMIL);真空冷冻干燥机(北京博医康仪器有限公司,型号:Lab-1);多功能酶标仪(Thermo Scientific公司,型号:Varioskan Flash);流式细胞仪(BD Bioscience,型号:FAC-SymphonyTMA3)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠主动脉血管平滑肌细胞(Movas)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司,批号:iCell-m088。Movas细胞采用含10% FBS的DMEM高糖培养基培养,于含5% CO₂的37℃细胞培养箱中孵育。

1.2.2 泡沫细胞模型的制备 取对数生长期的Movas细胞均匀接种于6孔板中,在含5%CO₂的37℃孵育箱中培养24 h;用含10% FBS的完全培养基配备终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、250 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的棕榈酸钠溶液,分别加入Movas中干预24 h。

油红O染色评价泡沫细胞模型:将处理好的Movas细胞从培养箱取出,使用PBS清洗3次后用4%多聚甲醛固定20 min;使用60%异丙醇浸洗细胞后,加入油红O染色液浸染30 min;于正置显微镜下观察并拍照。

1.2.3 药物制备 血府逐瘀胶囊填充物在制备过程中主要包含两个部分:以桃红为主的活血方(红花、炒桃仁、牛膝、桔梗、生地黄及甘草)以及以四逆散为主的理气方(麸炒枳壳、川芎、柴胡、当归、赤芍及炒桃仁),将活血方和理气方混合制粒、干燥粉碎制成混合方。本研究在细胞给药前,制备活血方、理气方及混合方冻干粉,冻存于-20℃待用。

(1)混合方(HHF):血府逐瘀胶囊填充物总混前制剂。称取10 g混合方置于50 mL离心管中,加入50 mL去离子水,混匀后置于超声机中处理30 min,5 000 r/min离心5 min(离心半径15 cm),取上清均匀平铺于10 cm²培养皿中,冻存于-80℃过夜。

(2)活血方(HXF):由红花、炒桃仁、牛膝、桔梗、生地黄及甘草经过提取、浓缩制成的膏状物,取适量均匀平铺于10 cm²培养皿中,冷冻于-80℃过夜。

(3)理气方(LQF):由麸炒枳壳、川芎、柴胡、当归、赤芍、及炒桃仁经过粉碎混合制成的生药粉。采用水提法提取理气方有效成分:称取10 g理气方置于蒸馏瓶中,加入100 mL去离子水,旋蒸30 min,滤纸过滤后置于干净烧杯中,重复3次。将蒸得的液体均匀平铺于10 cm²培养皿中,冻存于-80℃过夜。

次日,预冷真空冷冻干燥机,真空泵抽真空后将上述培养皿放入冻干机中进行真空干燥,用刮刀将冻干粉从皿中取下,收集于干净的研磨钵中,充分研磨混匀,分装冻存于-20℃。

药物工作液配制:称取冻干粉,用基础培养基或完全培养基溶解,配成50 mg/mL的母液,用0.22 $\mu\text{mol/L}$ 的无菌针式滤膜过滤除菌,分装冻存于-20℃。使用时将母液融化后充分混匀,用基础培养基或完全培养基稀释成所需浓度的工作液。

1.2.4 CCK-8法检测细胞活力 选取细胞形态适宜、生长状态良好的Movas细胞接种于6孔板中,37℃、5%CO₂孵育箱孵育24 h。用DMEM高糖基础培养基或完全培养基(含10% FBS)溶解、稀释、过滤,配备0、0.1、0.4、0.8、1.6 mg/mL的HHF、HXF、LQF,每孔100 μL,孵育24 h。每孔避光加入CCK-8稀释液,CCK-8原液、DMEM基础培养基[V(CCK-8原液):V(DMEM基础培养基)]=1:10],孵育1 h,于酶标仪上450 nm波长测定吸光度(OD值),计算细胞活力,确定给药浓度。

1.2.5 Annexin V-PI检测细胞凋亡情况 分组给药刺激24 h后,收集细胞,加入Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞;分别加入Annexin V-FITC和碘化丙啶(PI)染色液,轻轻混匀;室温避光孵育10 min,冰浴终止反应。随后流式细胞仪进行检测。其中,Annexin V-/PI-代表存活细胞,Annexin V+/PI-代表早期凋亡细胞,Annexin V+/PI+代表晚期凋亡细胞,Annexin V-/PI+代表坏死细胞。

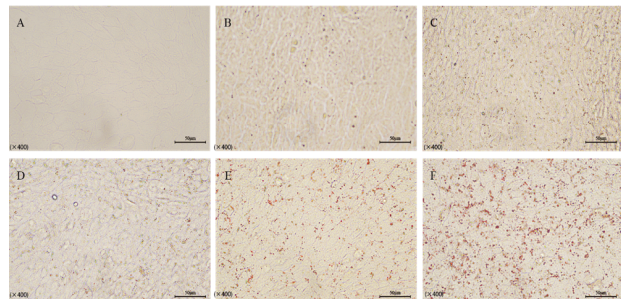
1.2.6 活性氧(ROS)检测 选取细胞形态适宜、生长状态良好的Movas细胞接种于6孔板中,用无血清培养液制备DCFH液,重悬细胞,37℃培养20 min;无血清培养液洗涤细胞3次;加入选定浓度的HHF、HXF、LQF刺激细胞30 min;冰上终止反应,流式细胞仪检测平均荧光强度值(mean fluorescence intensity, MFI)。

1.2.7 线粒体膜电位(JC-1)检测 配置JC-1染色工作液;选取细胞形态适宜、生长状态良好的Movas细胞接种于6孔板中,加入选定浓度的HHF、HXF、LQF刺激3 h后,收集细胞;加入染色工作液,37℃培养20 min;收集细胞,缓冲液洗涤2次并重悬细胞,流式细胞仪检测MFI。

1.3 统计学方法 计量资料以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)进行描述,应用SPSS 29.0进行统计分析,所有数据先进行正态性检验。符合正态分布、方差齐的数据,应用单因素方差分析(One-way ANOVA),应用LSD进行两两比较,若方差不齐,应用Dunnett's T3进行检验。若数据不符合正态性分布,应用非参数秩和检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

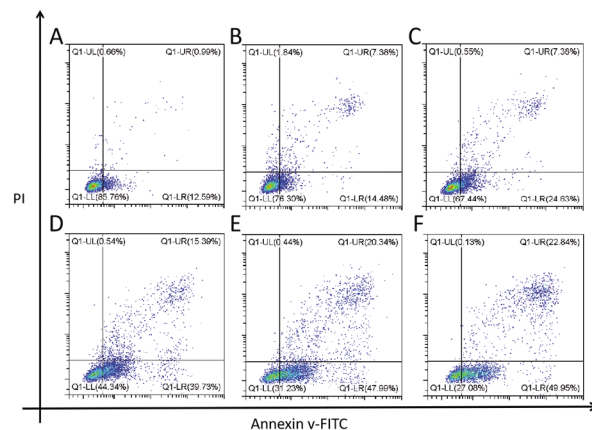
2.1 棕榈酸钠诱导Movas泡沫化 与对照组比较,经棕榈酸钠诱导巨噬细胞Movas 24 h后,细胞质内红色脂滴明显,呈现出典型的泡沫细胞形态;随着棕榈酸钠诱导浓度的升高,Movas呈现递增的脂质吞噬情况和相对泡沫化程度。(见图1)



注:A.对照组;B.10 μmol/L棕榈酸钠组;C.100 μmol/L棕榈酸钠组;D.250 μmol/L棕榈酸钠组;E.500 μmol/L棕榈酸钠组;F.1 000 μmol/L棕榈酸钠组。

图1 不同浓度棕榈酸钠诱导 Movas 脂质吞噬情况 (×400)

2.2 棕榈酸钠诱导Movas凋亡 与对照组比较,棕榈酸钠诱导Movas凋亡率明显升高;随着棕榈酸钠浓度的升高,Movas存活率逐渐降低,早期凋亡率和晚期凋亡率均逐渐升高,500 μmol/L及1 000 μmol/L棕榈酸钠诱导Movas凋亡率高于60%,且Movas坏死率降低。(见图2~3、表1)综合上述结果,后续的研究选用500 μmol/L棕榈酸钠建立Movas泡沫化细胞模型。



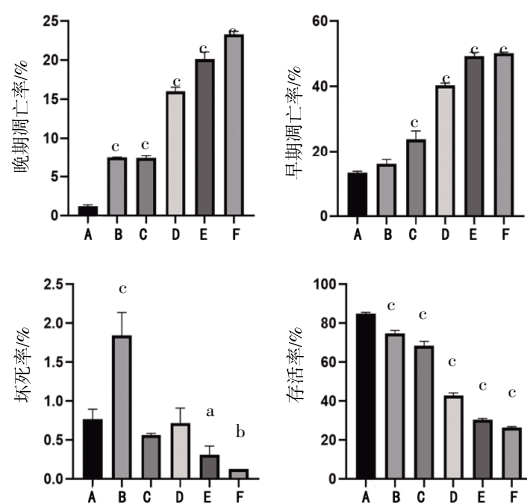
注:A.对照组;B.10 μmol/L棕榈酸钠组;C.100 μmol/L棕榈酸钠组;D.250 μmol/L棕榈酸钠组;E.500 μmol/L棕榈酸钠组;F.1 000 μmol/L棕榈酸钠组。

图2 不同浓度棕榈酸钠诱导的 Movas 凋亡率流式图

表1 不同浓度棕榈酸钠诱导的 Movas 凋亡率 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	存活率	早期凋亡率	晚期凋亡率	坏死率
对照组	3	84.78 ± 0.84	13.25 ± 0.57	1.19 ± 0.17	0.77 ± 0.12
10 μmol/L棕榈酸钠组	3	74.69 ± 1.57 ^a	16.01 ± 1.40	7.44 ± 0.05 ^c	1.84 ± 0.29 ^a
100 μmol/L棕榈酸钠组	3	68.35 ± 2.34 ^a	23.71 ± 2.66 ^a	7.37 ± 0.32 ^c	0.57 ± 0.02
250 μmol/L棕榈酸钠组	3	42.98 ± 1.19 ^a	40.31 ± 0.69 ^a	15.98 ± 0.54 ^c	0.72 ± 0.19
500 μmol/L棕榈酸钠组	3	30.36 ± 0.76 ^a	49.17 ± 1.25 ^a	20.14 ± 0.88 ^c	0.31 ± 0.11 ^a
1 000 μmol/L棕榈酸钠组	3	26.36 ± 0.62 ^a	50.22 ± 0.24 ^a	23.28 ± 0.39 ^c	0.13 ± 0.01 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$ 。



注:A.对照组;B.10 μmol/L棕榈酸钠组;C.100 μmol/L棕榈酸钠组;D.250 μmol/L棕榈酸钠组;E.500 μmol/L棕榈酸钠组;F.1 000 μmol/L棕榈酸钠组。与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$ 。

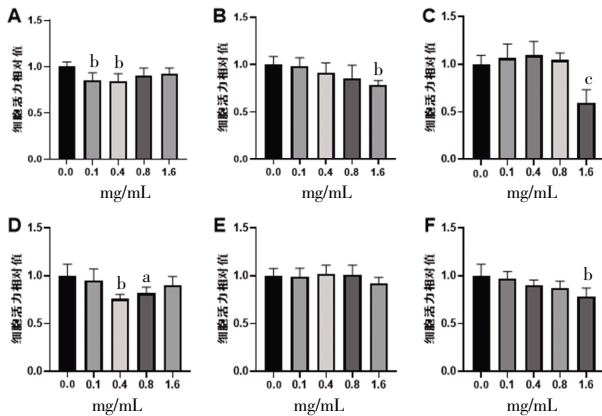
图3 不同浓度棕榈酸钠诱导的 Movas 凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

2.3 活血方、理气方及混合方作用下 Movas 活力值 CCK-8 结果表明,1.6 mg/mL 混合方对 Movas 活力无显著抑制作用,而 1.6 mg/mL 活血方和理气方可显著降低 Movas 相对活力值。因此,后续的研究选用 1.6 mg/mL 混合方,800 μ g/mL 相对活血方和理气方探索血府逐瘀胶囊对 Movas 泡沫化及凋亡的影响。(见图 4、表 2)

表 2 Movas 相对活力值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	基础培养基组			完全培养基组		
		HHF	HXF	LQF	HHF	HXF	LQF
对照组	6	0.98 \pm 0.04	1.00 \pm 0.08	0.97 \pm 0.07	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.07	0.98 \pm 0.12
0.1 mg/mL	6	0.83 \pm 0.06 ^b	0.98 \pm 0.08	1.04 \pm 0.15	0.95 \pm 0.11	0.98 \pm 0.08	0.94 \pm 0.05
0.4 mg/mL	6	0.81 \pm 0.04 ^b	0.91 \pm 0.10	1.06 \pm 0.13	0.75 \pm 0.04 ^b	1.02 \pm 0.09	0.89 \pm 0.04
0.8 mg/mL	6	0.87 \pm 0.03	0.85 \pm 0.14	1.02 \pm 0.05	0.81 \pm 0.06 ^a	1.01 \pm 0.09	0.88 \pm 0.07
1.6 mg/mL	6	0.91 \pm 0.07	0.78 \pm 0.05 ^b	0.61 \pm 0.15 ^c	0.89 \pm 0.09	0.91 \pm 0.06	0.75 \pm 0.05 ^b

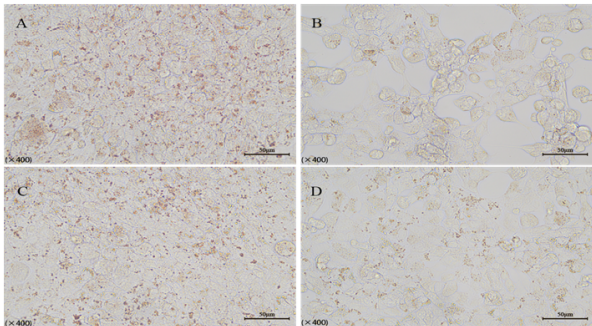
注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$ 。



注:A.HHF基础培养基组;B.HXF基础培养基组;C.LQF基础培养基组;D.HHF完全培养基组;E.HXF完全培养基组;F.LQF完全培养基组。与0.0 mg/mL组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$ 。

图 4 Movas 相对活力值比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

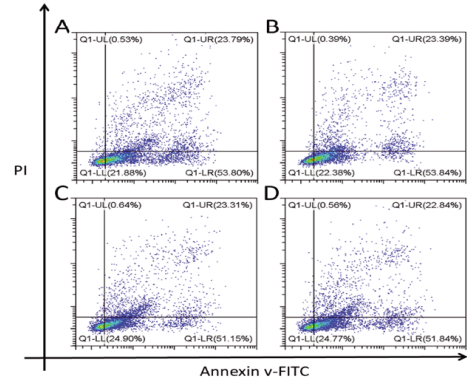
2.4 血府逐瘀胶囊抑制棕榈酸钠诱导的 Movas 泡沫化 采用 500 μ g/mL 棕榈酸钠分别与 1.6 mg/mL 混合方、800 μ g/mL 活血方、800 μ g/mL 理气方同时作用 Movas 24 h。结果表明,活血方、理气方及混合方可减少 Movas 细胞质内红色脂滴。其中,1.6 mg/mL 混合方及 800 μ g/mL 理气方抑制 Movas 脂质吞噬更为明显。(见图 5)



注:A.500 μ mol/L 棕榈酸钠组;B.1.6 mg/mL 混合方组;C.800 μ g/mL 活血方组;D.800 μ g/mL 理气方组。

图 5 活血方、理气方及混合方作用下 Movas 脂质吞噬情况 ($\times 400$)

2.5 血府逐瘀胶囊抑制棕榈酸钠诱导的 Movas 凋亡 采用 500 μ g/mL 棕榈酸钠分别与 HHF (1.6 mg/mL)、HXF (800 μ g/mL) LLQF (800 μ g/mL) 同时作用 Movas 24 h。结果表明,活血方、理气方及混合方可抑制棕榈酸钠诱导的 Movas 凋亡。其中,800 μ g/mL HXF 及 LQF 可显著增加 Movas 存活率、抑制 Movas 早期凋亡率。(见图 6~7、表 3)



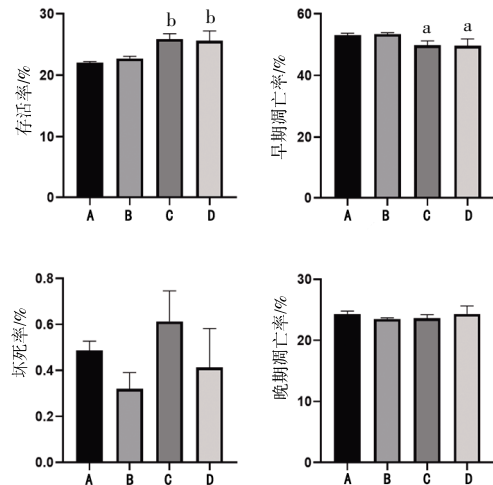
注:A.500 μ mol/L 棕榈酸钠组;B.1.6 mg/mL 混合方组;C.800 μ g/mL 活血方组;D.800 μ g/mL 理气方组。

图 6 活血方、理气方及混合方作用下 Movas 凋亡流式图

表 3 活血方、理气方及混合方作用下 Movas 凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	存活率	早期凋亡率	晚期凋亡率	坏死率
500 μ mol/L 棕榈酸钠组	3	22.06 \pm 0.17	53.13 \pm 0.61	24.32 \pm 0.47	0.49 \pm 0.04
1.6 mg/mL 混合方组	3	22.73 \pm 0.36	53.44 \pm 0.46	23.51 \pm 0.16	0.32 \pm 0.07
800 μ g/mL 活血方组	3	25.88 \pm 0.86 ^b	49.84 \pm 1.38 ^a	23.62 \pm 0.58	0.61 \pm 0.13
800 μ g/mL 理气方组	3	25.60 \pm 1.61 ^b	49.68 \pm 2.19 ^a	24.30 \pm 1.33	0.41 \pm 0.16

注:与 500 μ mol/L 棕榈酸钠组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。



注:A.500 μ mol/L 棕榈酸钠组;B.1.6 mg/mL 混合方组;C.800 μ g/mL 活血方组;D.800 μ g/mL 理气方组;与 500 μ mol/L 棕榈酸钠组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。

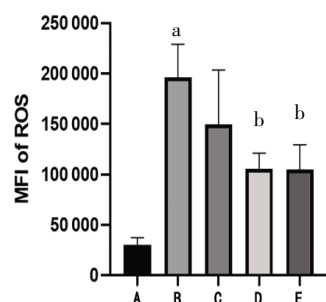
图 7 活血方、理气方及混合方作用下 Movas 凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.6 血府逐瘀胶囊抑制棕榈酸钠诱导的 Movas 活性氧释放 与对照组比较,500 μ mol/L 棕榈酸钠能显著升高 Movas 活性氧释放,而与活血方、理气方及混合方共同作用下 Movas 活性氧释放受到抑制,其中 800 μ g/mL HXF 及 LQF 作用显著。(见图 8、表 4)

表4 Movas 活性氧检测平均荧光强度值 ($\bar{x} \pm s, \times 10^4$)

组别	n	平均荧光强度值
对照组	3	3.01±0.72
500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸钠组	3	19.63±3.27 ^a
1.6 mg/mL混合方组	3	14.95±5.39
800 $\mu\text{g/mL}$ 活血方组	3	10.55±1.57 ^b
800 $\mu\text{g/mL}$ 理气方组	3	10.48±2.45 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.001$;与500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸钠组比较,^b $P<0.05$ 。



注:A.对照组;B.500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸钠组;C.1.6 mg/mL混合方组;D.800 $\mu\text{g/mL}$ 活血方组;E.800 $\mu\text{g/mL}$ 理气方组。与对照组比较,^a $P<0.001$;与500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸钠比较,^b $P<0.05$ 。

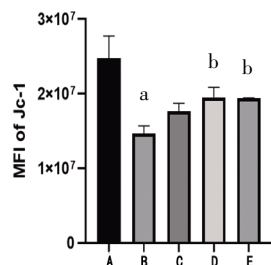
图8 Movas 活性氧比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.7 血府逐瘀胶囊抑制棕榈酸钠诱导的Movas线粒体膜电位下降 与对照组比较,500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸钠能显著抑制Movas线粒体膜电位,而活血方、理气方及混合方共同作用下Movas线粒体膜电位升高,其中800 $\mu\text{g/mL}$ HXF及LQF作用显著。(见图9、表5)

表5 Movas 线粒体膜电位平均荧光强度值比较 ($\bar{x} \pm s, \times 10^7$)

组别	n	平均荧光强度值
对照组	3	2.48±0.29
500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸钠组	3	1.46±0.11 ^a
1.6 mg/mL混合方组	3	1.76±0.11
800 $\mu\text{g/mL}$ 活血方组	3	1.95±0.13 ^b
800 $\mu\text{g/mL}$ 理气方组	3	1.94±0.35 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.001$;与500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸钠组比较,^b $P<0.05$ 。



注:A.对照组;B.500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸钠组;C.1.6 mg/mL混合方组;D.800 $\mu\text{g/mL}$ 活血方组;E.800 $\mu\text{g/mL}$ 理气方组;与对照组比较,^a $P<0.001$;与500 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸钠组比较,^b $P<0.05$ 。

图9 Movas 线粒体膜电位比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨 论

在AS斑块中,脂蛋白的初始滞留是与内膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)分泌的蛋白聚糖离子相互作用的

结果^[8-9]。脂质核心边缘的临界区几乎完全由泡沫细胞填充。泡沫细胞死亡将抗原和氧化产物类脂蛋白泄漏到发育中的核心,这是脂质核心的开始。泡沫细胞的聚集、死亡和坏死核心的扩大是一个持续的过程,在AS的最初病变到晚期斑块都扮演着重要的角色^[10-11]。尽管AS病变中的泡沫细胞群被认为是主要是白细胞起源,与AS发展的早期步骤一致,但先前的报道^[12]表明,SMCs对人类AS中的泡沫细胞群有重要贡献。在中度冠状动脉粥样硬化中,超过50%的泡沫细胞是SMCs衍生的^[12]。

本研究提示棕榈酸钠能较好地诱导平滑肌细胞泡沫化及细胞凋亡。同时,500 $\mu\text{mol/L}$ 及1 000 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸钠能显著降低平滑肌细胞坏死率,使其成为较好的吞噬底物。在体外实验中,最常用的诱导刺激和建立AS相关细胞模型的试剂是氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)和脂多糖(LPS)。然而氧化型低密度脂蛋白诱导细胞脂质吞噬的模型并不稳定。棕榈酸作为饮食中常见的饱和游离脂肪酸,已被广泛用于建立肝脏脂肪变性、高脂饮食和高糖饮食的模型^[13-14]。作为AS的表型生物标志物,棕榈酸在AS相关脂质沉积、炎症环境等模型制备中具有较好的应用前景。

细胞死亡和死亡细胞未被有效清除被认为是斑块和坏死核心形成的主要原因之一^[15]。细胞的程序性死亡涉及多种机制,例如内质网应激、氧化应激、线粒体功能障碍和溶酶体破裂等^[16]。本研究显示混合方及理气方可明显抑制平滑肌细胞的脂质吞噬,而理气方及活血方可显著抑制棕榈酸钠诱导的平滑肌细胞凋亡,这可能与抑制线粒体的激活从而抑制活性物质ROS的释放有关。

血府逐瘀胶囊混合方由牛膝、桔梗、甘草、红花、生地黄、当归、赤芍、枳壳、川芎、柴胡、炒桃仁组成。全方共奏活血祛瘀,行气止痛之效。其中活血方由红花、炒桃仁、牛膝、桔梗、生地黄及甘草制成。方中红花、桃仁内外兼顾、活血祛瘀;牛膝引胸中瘀血下行;桔梗调畅胸中之气;生地黄清热凉血养阴,使祛瘀而不伤正。理气方由枳壳、川芎、柴胡、当归、赤芍、炒桃仁制成。方中柴胡枳壳升降并用,疏肝理气,行气散结,通阳达郁;川芎走窜全身,上行头部、下走血海;当归补血活血;赤芍凉血清热活血,避免郁而化热;桃仁活血祛瘀。相较于活血方,理气方在活血药中配伍理气之品,活血兼理气,使气通则血活。本研究显示理气方在脂质沉积、细胞凋亡、线粒体损伤等方面均有较为显著的抑制作用,而活血方对平滑肌细胞泡沫化的抑制作用相对较差。这可能也提示了理气之法对于活血之法的重要性。

气为血之帅,气行则血行,气滞则血瘀。叶天士云“初病在气,久病在血”。《素问·举痛论篇》曰“百病生于气也”。理气法突破了以往注重活血化瘀治疗心血管疾病的思维。越来越多的研究表明,相较于单纯的理气药、活血药,气血并治方在改善脂质代谢异常、抑制炎症反应等方面具有优势^[17-18]。活血方与理气方对于脂质代谢作用的差异值得进一步探讨。

值得注意的是,本研究中混合方对平滑肌细胞的泡沫化具有较明显的抑制作用,而对棕榈酸钠诱导的平滑肌细胞凋亡作用不显著,这可能与药物制备方法有关。考虑到某些中药活性成分不宜高温煮取,本研究采用超声辅助溶解混合方。经过超声、离心后的离心管底部仍有较多沉淀,这可能导致

有效物质未能完全溶解。后续实验仍需改进混合方的药物制备方法,采用水提或醇提的方法进行有效成分提取。此外,血府逐瘀胶囊及其拆方对平滑肌细胞泡沫化的作用机制及有效活性成分值得更深入的探索。

参考文献

- [1] DUAN Y J, GONG K, XU S W, et al. Regulation of cholesterol homeostasis in health and diseases: From mechanisms to targeted therapeutics[J]. *Signal Transduct Target Ther*,2022,7:265.
- [2] RANA J S, KHAN S S, LLOYD-JONES D M, et al. Changes in mortality in top 10 causes of death from 2011 to 2018[J]. *J Gen Intern Med*,2021,36(8):2517-2518.
- [3] 傅春燕,刘永辉,曾立,等.血府逐瘀汤化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].*亚太传统医药*,2024,20(5):232-237.
- [4] 张秀瑛.血府逐瘀胶囊的药理作用及临床研究进展[J].*中国处方药*,2023,21(10):179-181.
- [5] GUI Y, ZHENG H, CAO R Y. Foam cells in atherosclerosis: Novel insights into its origins, consequences, and molecular mechanisms[J]. *Front Cardiovasc Med*,2022,9:845942.
- [6] 刘梦华,程序,赵梦竹,等.血府逐瘀胶囊对动脉粥样硬化小鼠巨噬细胞极化的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2024,30(12):54-61.
- [7] 王曼曼,贾冬冬,张馨月,等.血府逐瘀胶囊对动脉粥样硬化模型小鼠主动脉病变及CD47、PPAR- γ 、NR1H3表达的影响[J].*中医杂志*,2022,63(17):1673-1678,1684.
- [8] ALLAHVERDIAN S, ORTEGA C, FRANCIS G A. Smooth muscle cell-proteoglycan-lipoprotein interactions as drivers of atherosclerosis[J]. *Handb Exp Pharmacol*,2022,270:335-358.
- [9] PRYMA C S, ORTEGA C, DUBLAND J A, et al. Pathways of smooth muscle foam cell formation in atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*,2019,30(2):117-124.
- [10] CHISTIYAKOV D A, MELNICHENKO A A, MYASOE-DOVA V A, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis[J]. *J Mol Med*,2017,95(11):1153-1165.
- [11] BASATEMUR G L, JØRGENSEN H F, CLARKE M C H, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. *Nat Rev Cardiol*,2019,16:727-744.
- [12] LIU Y X, YUAN P Z, WU J H, et al. Lipid accumulation and novel insight into vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. *J Mol Med*,2021,99(11):1511-1526.
- [13] FATIMA S, HU X J, GONG R H, et al. Palmitic acid is an intracellular signaling molecule involved in disease development[J]. *Cell Mol Life Sci*,2019,76(13):2547-2557.
- [14] BERMÚDEZ M A, PEREIRA L, FRAILE C, et al. Roles of palmitoleic acid and its positional isomers, hypogeic and sapienic acids, in inflammation, metabolic diseases and cancer[J]. *Cells*,2022,11(14):2146.
- [15] DHAWAN U K, SINGHAL A, SUBRAMANIAN M. Dead cell and debris clearance in the atherosclerotic plaque: Mechanisms and therapeutic opportunities to promote inflammation resolution[J]. *Pharmacol Res*,2021,170:105699.
- [16] D'ARCY M S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biol Int*,2019,43(6):582-592.
- [17] 薛鹏,陈晓虎.理气法在冠心病心绞痛治疗中的运用[J].*中医杂志*,2015,56(11):919-921.
- [18] 张红霞,刘剑刚,马鲁波,等.气血并治方及方中理气药、活血药对高脂血症血瘀大鼠炎症因子的干预作用[J].*北京中医药大学学报*,2004,27(4):27-30.

(收稿日期:2024-08-29 编辑:罗英姣)

- (上接第36页)
- [25] O H, MONSALVE M, et al. Targeting lipid peroxidation for cancer treatment[J]. *Molecules*,2020,25(21):5144.
 - [26] LAI J Q, ZHAO L L, HONG C, et al. Baicalein triggers ferroptosis in colorectal cancer cells via blocking the JAK2/STAT3/GPX4 axis[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2024,45(8):1715-1726.
 - [27] WU Y C, PI D J, ZHOU S Y, et al. Ginsenoside Rh3 induces pyroptosis and ferroptosis through the Stat3/p53/NRF2 axis in colorectal cancer cells [J]. *ActaBiochimBiophys Sin (Shanghai)*,2023,55(4):587-600.
 - [28] ZHANG W F, GONG M Y, ZHANG W N, et al.

- Thiostrepton induces ferroptosis in pancreatic cancer cells through STAT3/GPX4 signalling[J]. *Cell Death Dis*,2022,13(7):630.
- [29] OUYANG S M, LI H X, LOU L L, et al. Inhibition of STAT3-ferroptosis negative regulatory axis suppresses tumor growth and alleviates chemoresistance in gastric cancer[J]. *Redox Biol*,2022,52:102317.
- [30] LI M Y, JIN S F, ZHANG Z Y, et al. Interleukin-6 facilitates tumor progression by inducing ferroptosis resistance in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*,2022,527:28-40.

(收稿日期:2025-01-22 编辑:蒋凯彪)