

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.16.013

温心方含药血清对人脐静脉内皮细胞外泌体及人主动脉血管平滑肌细胞表型转化的影响

李金霞¹, 付依敏¹, 许英姿¹, 宗文静², 曹洪欣³, 刘旺华¹, 郑彩杏¹✉

1. 湖南中医药大学, 湖南省长沙市岳麓区学士路300号, 410208; 2. 中国中医科学院; 3. 中华中医药学会

[摘要] 目的 从人脐静脉内皮细胞(HUVECs)外泌体及人主动脉血管平滑肌细胞(HAVSMCs)表型转化角度探讨温心方治疗冠心病的可能作用机制。方法 30只SD大鼠给予温心方水煎剂33.75 g/(kg·d)灌胃,连续7天,末次灌胃2 h后腹主动脉取血制备含药血清。取对数生长期的HUVECs,分别设立对照组、模型组及温心方高、中、低剂量组,对照组使用完全培养基培养,温心方高、中、低剂量组分别用5%、15%、25%温心方含药血清培养24 h后加入50 mg/L氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)培养24 h,模型组仅加入50 mg/L ox-LDL培养24 h造模。各组高速离心分离获取HUVECs外泌体,透射电镜观察外泌体形态,BCA法测定外泌体蛋白浓度,检测外泌体粒径,Western Blot法检测外泌体标志蛋白溶酶体相关膜蛋白3(CD63)、肿瘤易感基因101(TSG101)表达,qRT-PCR法检测外泌体miR-145表达。各组HUVECs外泌体50 ng与HAVSMCs共培养24 h,观察外泌体摄取,于6、12、24、48 h应用MTT法检测HAVSMCs细胞增殖率,Transwell法检测细胞迁移能力,流式细胞仪检测细胞凋亡率,Western Blot法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、平滑肌22 α 蛋白(SM22 α)、骨桥蛋白(OPN)水平。结果 成功提取HUVECs外泌体,在镜下可见HAVSMCs细胞摄取HUVECs外泌体。模型组HUVECs外泌体中CD63、TSG101及miR-145表达较对照组显著减少($P<0.01$),温心方组各剂量组CD63、TSG101及miR-145表达较模型组显著升高,且温心方高剂量组在升高CD63、miR-145方面优于温心方低、中剂量组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组外泌体与HAVSMCs共培养后,与对照组比较,模型组HAVSMCs细胞增殖率、细胞凋亡率增加,细胞迁移个数增多, α -SMA、SM22 α 蛋白表达降低、OPN升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,温心方各剂量组在24、48 h时细胞增殖率及细胞凋亡率均降低,12、24、48 h时细胞迁移个数减少, α -SMA、SM22 α 表达升高,OPN表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与温心方中、低剂量组比较,温心方高剂量组在24、48 h细胞增殖率降低,在12、24、48 h细胞迁移个数降低, α -SMA、SM22 α 表达升高,OPN表达降低($P<0.05$)。结论 温心方含药血清可通过促进HUVECs外泌体释放,抑制HAVSMCs表型转化,减轻细胞增殖迁移,从而发挥治疗冠心病作用。

[关键词] 冠心病; 血管内皮细胞; 血管平滑肌细胞; 外泌体; 温心方

心血管病是我国城乡居民死亡原因之首,截至2021年冠心病患者达1139万人,患病率及死亡率逐年上升^[1]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病的病理基础,冠状动脉粥样斑块破裂和血栓形成是急性心血管事件发生的关键环节,然而目

前治疗AS以稳定斑块、防止疾病进展的他汀类药物为主,该类药无特效逆转斑块作用,且具有一定的肝肾损伤性^[2]。冠心病属中医学“胸痹”范畴,临床证候研究发现冠心病病性属本虚标实,阳虚痰瘀是其主要病机^[3-4],治疗当以温通心阳为重,以补助通,同时活血化瘀,攻补兼施。据此本团队提出温阳益心法,并创制代表方温心方。前期临床研究显示,以温阳益心为法的温心方可显著减小冠状动脉狭窄患者的冠状动脉斑块,降低冠状动脉平

基金项目:国家自然科学基金(82104775);湖南省自然科学基金(2021JJ40399);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金(2021ZYX12);中国科学技术学会青年人才托举工程(2022QN-RC001)

✉ 通讯作者:947726363@qq.com

均狭窄度^[5],减轻冠心病患者临床症状,有效率为90.90%^[6],长期应用可有效预防心血管事件^[7]。基础研究显示,该方可改善AS大鼠动脉内膜增生程度,降低动脉粥样硬化指数^[8],抑制炎症反应,保护血管内皮细胞^[9],抑制血管平滑肌细胞增殖活性,减轻冠状动脉血管内膜增生^[10-11]。最新研究表明,血管内皮细胞可通过分泌外泌体调控血管平滑肌细胞表型转化^[12]。本研究观察温心方含药血清对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)外泌体及人动脉血管平滑肌细胞(HAVSMCs)表型转化及增殖迁移的作用,探究温心方改善动脉内膜增生的效应机制,为其临床研究提供依据。本研究方案经湖南中医药大学动物实验伦理审查委员会批准,伦理编号:LLBH-202208190001。

1 材料

1.1 动物及细胞

SPF级雄性SD大鼠30只,体质量150~200 g,5~6周龄,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物合格证号:SCXK(湘)2019-0004,饲养于湖南中医药大学实验动物中心,每笼3只,自由饮食,室温(21.0±2.0)℃,湿度(50.0±10.0)%,每隔12 h开灯照明。

HUVECs,购自上海钰博生物科技有限公司,批号:YBC1263;HAVSMCs,购自北纳创联生物科技有限公司,批号:337616。

1.2 药物

温心方组成:人参10 g,桂枝10 g,瓜蒌15 g,薤白15 g,法半夏10 g,赤芍15 g,川芎15 g,麦冬15 g,黄连10 g,甘草10 g,购自湖南中医药大学第一附属医院。煎制方法:所有药物以双蒸水浸泡2 h,人参纳入煎药机先煎20 min,再纳入剩余药物继续煎煮1 h,头煎药液滤出,二煎1 h,2次药液混合,浓煎成1.35 g/ml的药液,4℃储存备用。

1.3 主要试剂及仪器

DMEM-F-12(EallBio公司,批号03.2001C);胎牛血清(Gibco公司,批号10100147);MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、RIPA裂解缓冲液、ECL试剂盒(南京建成科技有限公司,批号G020-1-1、W062-1-1、W028-2-1);BCA蛋白浓度测定试剂盒、4%多聚甲醛、结晶紫染液、DMSO、10%甲醇(MDL公司,批号分别为MD913053、MD6553、MD911626、MD1458、MDL6944);外泌体染色试剂盒(贝博生物公司,批号BB-3986);中等蛋白

分子量Marker(Thermo公司,批号26617);抗溶酶体相关膜蛋白3(CD63)、抗肿瘤易感基因101(TSG101)、抗 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、抗平滑肌22 α 蛋白(SM22 α)、抗骨桥蛋白(OPN)(Abcam公司,批号分别为ab271286、ab125011、ab124964、ab14106、ab166709);Annexin V-FITC/PI试剂盒(Solarbio公司,批号FXP018);SuperScript III RT逆转录试剂盒、琼脂糖、荧光定量PCR试剂盒(ABI公司,批号分别为11752050、16500100、4472920);戊巴比妥钠、青链霉素、氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)、PKH67、碘化丙啶(Sigma公司,批号分别为328510、TMS-AB2、L8292、PKH67GL、P4864);戊二醛、醋酸铀-枸橼酸铅染液、Trizol(南京建成科技有限公司,批号分别为C0670550223、C04633-1、N65);DAPI(Beyotime公司,C1005);Transwell(COStar公司,批号3422)。

LEGEND MICRO 21R型台式高速冷冻离心机,美国Thermo公司;550型酶标仪、SDS-PAGE电泳系统、170-8280型ChemiDoc MP化学发光成像系统,美国Bio-Rad公司;JEM1230型透射电子显微镜,日本JEOL公司;GelDoc-It310型凝胶成像系统,美国UVP公司;ZetaVIEW纳米颗粒跟踪分析仪,德国Particle Metrix公司;FV1200型激光共聚焦显微镜,日本Olympus公司;BeamCyte-1026型细胞流式仪,常州必达科生物有限公司;StepOne荧光定量PCR仪,美国Applied biosystems公司。

2 方法

2.1 温心方含药血清制备

30只大鼠适应性喂养3天后,给予温心方水煎剂33.75 g/(kg·d)(3倍临床等效剂量)灌胃^[13],每天1次,连续7天。末次灌胃2 h后2%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔注射麻醉,腹主动脉取血。血液常温静置1 h后4℃、285×g离心15 min,吸取上层血清,56℃水浴灭活30 min,滤膜过滤除菌,-20℃保存。

2.2 细胞培养及分组

取对数生长期的HUVECs,用含有10%胎牛血清和1%青链霉素的DMEM/F12培养基培养,在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养,细胞生长至融合度80%时进行传代。分别设立对照组、模型组和温心方高、中、低剂量组。对照组使用完全培养基培养,模型组加入50 mg/L ox-LDL培养24 h,依据前期实验结果,温心方低、中、高剂量组分别

用 5%、15%、25% 温心方含药血清培养 24 h 后加入 50 mg/L ox-LDL 培养 24 h。

2.3 外泌体分离获取及鉴定

收集细胞上清液，4℃、800×g 离心 5 min，继则 4℃、2000×g 离心 10 min，滤膜过滤以获得纯正细胞。再次收集上清液移入高速离心管，4℃、100 000×g 离心 2 h，收集沉淀部分 PBS 重悬，再次同上条件高速离心 2 h，得到外泌体沉淀，0.22 μm 膜滤过滤，-80℃保存，待测外泌体相关指标。

2.3.1 透射电镜观察外泌体形态 将提取得到的外泌体样品置于 2.5% 戊二醛中固定过夜，环氧丙烷包埋，9.3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色，置于透射电镜下观察，拍片。

2.3.2 外泌体粒径及蛋白浓度检测 对收集所得外泌体及同批细胞样本同时进行 BCA 法蛋白浓度测定，首先检测各浓度的标准品蛋白在 562 nm 的吸光度。以蛋白浓度为 y 轴，A562 为 x 轴，绘出标准曲线，将各样品的检测值代入标准曲线的计算公式，计算出样品的蛋白浓度。同时应用纳米颗粒跟踪分析仪对外泌体粒径及浓度进行纳米颗粒追踪分析。

2.3.3 Western Blot 法检测外泌体标志蛋白 CD63、TSG101 表达 取外泌体样品 100 μl，加入 5 倍体积的 RIPA 裂解缓冲液，混匀，4℃、13 400×g 离心 15 min，收集上清抽提总蛋白；BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，蛋白上样缓冲液将蛋白定量为 5 mg/ml；配制 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶，每孔加蛋白样品 20 μg，80 V 电泳；凝胶电泳结束后，将凝胶上分离到的蛋白条带通过转移电泳方式 65 v 2 h 转印至 PVDF 膜；5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h；加入一抗稀释液（CD63，1：1000；TSG101，1：1000；β-actin，1：1000）4℃孵育过夜，TBST 洗膜；加入二抗（1：300），室温避光孵育 1 h，TBST 洗膜；按 1：1 混合 ECL 试剂盒中两种液体，将上述混合液均匀铺在 PVDF 膜表面，室温作用 4 min；抖掉膜上液体，将其放入化学发光成像系统成像；Image J (v1.8.0) 软件测定条带灰度值，以目的条带与内参条带比值计算相对表达量。

2.3.4 qRT-PCR 法检测外泌体 miR-145 表达 从 GenBank 获得目的基因 mRNA 的全长序列，由武汉金开瑞生物工程有限公司利用 Primer 5.0 设计并合成引物序列。外泌体样本按 Trizol 法提取 RNA，测定 RNA 浓度，以总 RNA 为模板，使用反转录试剂盒进行 cDNA 合成；进行 Real-time PCR 扩增

（95℃预变性 5 min，1 个循环；95℃变性 10 s；63℃退火 20 s；72℃延伸 20 s，40 个循环）；在 Real-time PCR 仪上获取溶解曲线程序，以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因相对表达量。引物序列：miR-145-F：CAGTCTTGTCAGTTTTCCCAG，22 bp；miR-145-R：TATGCTTGTTCTCGTCTCTGTGTGTC，26 bp；β-actin-F：TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCC，20 bp；β-actin-R：CATACTCCTGCTTGCTGATCCAC，21 bp。

2.4 HUVECs 外泌体与 HAVSMCs 共培养

待 HAVSMCs 生长至对数期时，使用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并调整细胞浓度为 1×10^5 /ml 的单细胞悬液，以每孔 100 μl 加入 96 孔板中，调整各组外泌体终浓度为 100 μg/ml，待 HAVSMCs 生长至贴壁后加入各组对应的外泌体 50 ng 共培养，每组设置 3 个复孔。

2.4.1 激光共聚焦显微镜观察外泌体摄取 应用 PKH67 染色液对外泌体进行染色，37℃避光孵育 20 min，将外泌体 4℃、2 000×g 离心 10 min 重新提取，PBS 洗涤，将染色后的外泌体加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中，充分混匀，加入对数生长的 HAVSMCs 中共培养 24 h，培养后冲洗固定，5% 山羊血清 37℃孵育 1 h，DAPI 避光染色 2 min，甘油封片，通过激光共聚焦显微镜观察 HAVSMCs 摄取外泌体情况。

2.4.2 MTT 法检测 HAVSMCs 细胞增殖 HUVECs 外泌体与 HAVSMCs 分别共培养 6、12、24、48 h 后每孔加入 20 μl MTT（5 mg/ml）培养 4 h 后弃培养基，加入 150 μl DMSO，酶标仪在 490 nm 处检测每个孔的光密度（OD），计算细胞增殖率。细胞增殖率(%)= (实验组 OD-空白组 OD)/(对照组 OD-空白组 OD)。

2.4.3 流式细胞仪检测 HAVSMCs 细胞凋亡 分别于 6 h、12 h、24 h、48 h 时收集细胞，1×结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ /ml，取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中，加入 5 μl Annexin V/FITC 混匀后于室温避光孵育 5 min，加入 10 μl 20 μg/ml 的碘化丙啶溶液，并加 400 μl PBS，立刻进行流式细胞仪检测。

2.4.4 Transwell 法检测 HAVSMCs 细胞迁移能力 取对数生长期的 HAVSMCs 消化，用不含血清的 DMEM 培养液重悬细胞，以 5×10^4 个细胞/孔的密度种于小室的上层，150 μl/孔，置于孵箱中培养 24 h；另准备一个 24 孔板，每孔加入 500 μl 的 4% 多聚甲醛固定液，将 Transwell 小室置于含固定液的 24 孔

板中, 室温固定 30 min, 5 % CO₂、37 °C 培养 6 h、12 h、24 h、48 h 后; 吸去上室培养基, 棉签擦去上室内细胞; 将小室底面浸入 10% 甲醇溶液中固定细胞 30 s, 冲洗后浸入结晶紫染液中染色 2 min, 纯净水清洗; 100 倍镜下随机选取 3 个视野, 计数穿过膜细胞数。

2.4.5 Western Blot 法检测 HAVSMCs 细胞 α -SMA、SM22 α 、OPN 蛋白水平 Western Blot 检测方法同 2.3.3, 抗体稀释浓度为 α -SMA, 1 : 1000; SM22 α , 1 : 1000; OPN, 1 : 1000; β -actin, 1 : 1000; 二抗, 1 : 300。

2.5 统计学方法

运用 SPSS 24.0 软件进行分析, 符合正态分布数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐时多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐则采用 Tamhane's T^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

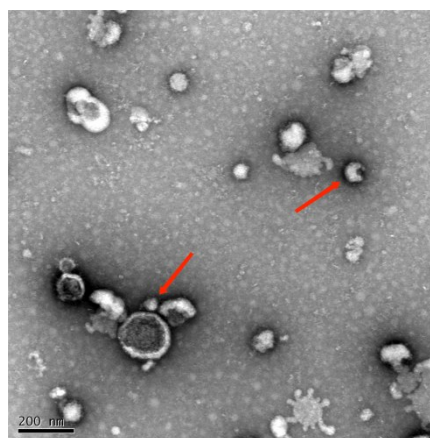
3 结果

3.1 HUVECs 外泌体形态、粒径及蛋白浓度检测结果

图 1 示, 钝化的外泌体形态呈现一侧凹陷的半球形。对外泌体粒径及蛋白浓度进行 BCA 法及 NTA 检测, 可知外泌体总蛋白量为 30 μ g, HUVECs 细胞总蛋白量为 1254 μ g, 外泌体总蛋白量/细胞总蛋白量=0.024, 外泌体平均粒径为 136.2 nm, 浓度为 1.6×10^8 个/ml。

3.2 各组 HUVECs 外泌体标志蛋白 CD63、TSG101 及外泌体中 miR-145 表达比较

表 1 示, 与对照组比较, 各组外泌体标志蛋白 CD63、TSG101 表达及外泌体中 miR-145 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 温心方各剂量组 CD63、TSG101 及外泌体中 miR-145 表达均显著



注: 图中红色箭头指示为外泌体。

图 1 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)外泌体形态($\times 60\ 000$)

Figure 1 Exosome morphology of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与温心方低剂量组比较, 温心方中、高剂量组 CD63、TSG101 表达升高, 温心方高剂量组 miR-145 表达亦升高 ($P < 0.01$)。与温心方中剂量组比较, 温心方高剂量组 CD63、miR-145 表达升高 ($P < 0.01$)。各组 HUVECs 外泌体中 CD63、TSG101 蛋白电泳图见图 2。

3.3 各组 HUVECs 外泌体摄取情况

图 3 示, 将 HUVECs 外泌体与 HAVSMCs 共培养后, 应用 DAPI 对 HAVSMCs 细胞进行染色 (蓝色), PKH67 对 HUVECs 外泌体进行染色 (绿色), 合并后可见各组 HAVSMCs 细胞成功摄取 HUVECs 外泌体。

3.4 各组 HAVSMCs 不同时间细胞增殖及细胞凋亡情况比较

表 2、表 3 示, 与对照组同时间比较, 除温心方高剂量组 12 h 的细胞增殖率外, 其余各组各时间点细胞增殖率和细胞凋亡率差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组同时间比较, 温

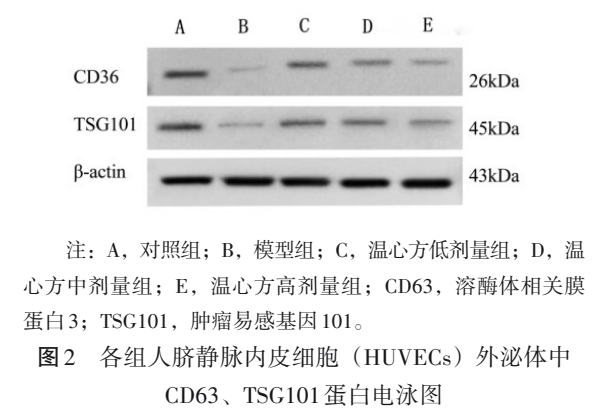
表 1 各组 HUVECs 外泌体标志蛋白 CD63、TSG101 及外泌体中 miR-145 表达比较

Table 1 Comparison of expression of exosome marker proteins CD63, TSG101 and miR-145 in exosomes of HUVECs in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	CD63/ β -actin	TSG101/ β -actin	miR-145
对照组	3	0.50 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.07
模型组	3	0.10 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.16 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.31 $\pm$ 0.05 ^{a)}
温心方低剂量组	3	0.15 $\pm$ 0.03 ^{a) b)}	0.24 $\pm$ 0.02 ^{a) c)}	0.47 $\pm$ 0.10 ^{a) c)}
温心方中剂量组	3	0.27 $\pm$ 0.03 ^{a) c) d)}	0.34 $\pm$ 0.02 ^{a) c) d)}	0.57 $\pm$ 0.04 ^{a) c)}
温心方高剂量组	3	0.34 $\pm$ 0.01 ^{a) c) d) e)}	0.38 $\pm$ 0.03 ^{a) c) d)}	0.81 $\pm$ 0.02 ^{a) c) d) e)}

注: HUVECs, 人脐静脉内皮细胞; CD63, 溶酶体相关膜蛋白 3; TSG101, 肿瘤易感基因 101。

a) 与对照组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$; d) 与温心方低剂量组比较, $P < 0.01$; e) 与温心方中剂量组比较, $P < 0.01$ 。



注：A，对照组；B，模型组；C，温心方低剂量组；D，温心方中剂量组；E，温心方高剂量组；CD63，溶酶体相关膜蛋白3；TSG101，肿瘤易感基因101。
 图2 各组人脐静脉内皮细胞（HUVECs）外泌体中CD63、TSG101蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoresis of CD63 and TSG101 proteins in exosomes of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in each group
 心方高剂量组在6 h时细胞增殖率显著降低，温心方中、高剂量组在12 h时细胞增殖率降低，温心方各剂量组在24、48 h时细胞增殖率亦降低，温心方各剂量组在各时间点细胞凋亡率均降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。与温心方低剂量组同时间比较，温心方高剂量组在6、12 h时细胞增殖率降低，温心方中、高剂量组在24、48 h时细胞增殖率均降低，温心方中剂量组在6 h时细胞凋亡率降低，温心方中、高剂量组在12、24、48 h时细胞凋亡率亦降低（ $P<0.05$ ）。温心方高剂量组在12、24、48 h时细胞增殖率低于温心方中剂量组（ $P<0.05$ ），而温

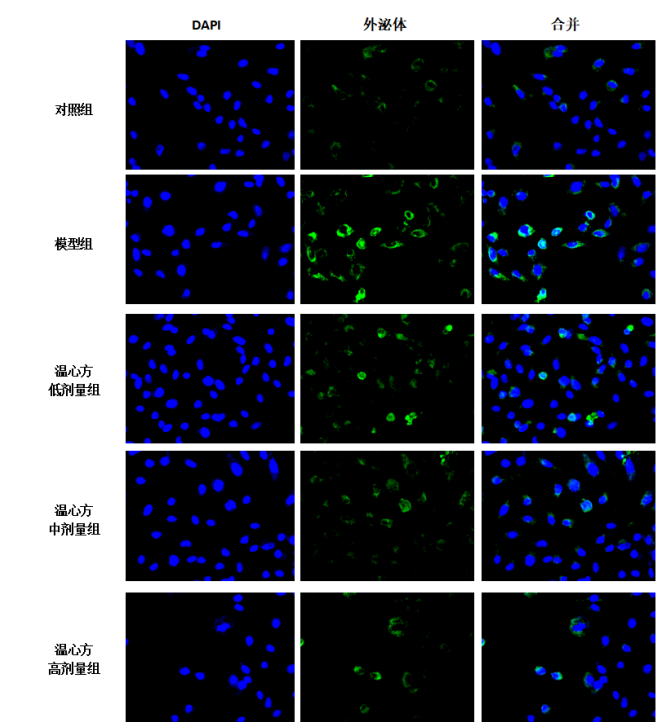


图3 各组人脐静脉内皮细胞（HUVECs）外泌体摄取情况
 Figure 3 The uptake of exosomes by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in each group

心方高剂量组和温心方中剂量组在各时间点细胞凋亡率差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

3.5 各组HAVSMCs不同时间细胞迁移情况比较
 表4示，与对照组同时间比较，各组6 h时细

表2 各组人主动脉血管平滑肌细胞（HAVSMCs）不同时间细胞增殖率比较					
Table 2 Comparison of cell proliferation rate of human aortic vascular smooth muscle cells (HAVSMCs) at different times in each group					
组别	样本量	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	3	100	100	100	100
模型组	3	121.73±14.76 ^{a)}	131.84±17.81 ^{a)}	134.00±19.04 ^{a)}	129.33±9.84 ^{a)}
温心方低剂量组	3	117.73±8.77 ^{a)}	129.10±11.36 ^{a)}	113.54±15.55 ^{a) b)}	114.26±10.74 ^{a) b)}
温心方中剂量组	3	114.51±13.14 ^{a)}	118.35±8.36 ^{a) b)}	102.96±13.94 ^{a) b) c)}	106.37±11.22 ^{a) b) c)}
温心方高剂量组	3	107.08±7.63 ^{a) b) c)}	99.76±8.00 ^{b) c) d)}	92.73±14.84 ^{a) b) c) d)}	94.44±16.13 ^{a) b) c) d)}

注：a) 与对照组同时间比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时间比较， $P<0.01$ ；c) 与温心方低剂量组同时间比较， $P<0.05$ ；d) 与温心方中剂量组同时间比较， $P<0.05$ 。

表3 各组人主动脉血管平滑肌细胞（HAVSMCs）不同时间细胞凋亡率比较					
Table 3 Comparison of the apoptosis rate of human aortic vascular smooth muscle cells (HAVSMCs) at different times in each group					
组别	样本量	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	3	5.41±0.57	5.16±1.13	5.32±0.79	4.54±0.64
模型组	3	20.38±4.37 ^{a)}	27.45±6.85 ^{a)}	29.79±5.73 ^{a)}	30.21±5.19 ^{a)}
温心方低剂量组	3	14.22±3.70 ^{a) b)}	19.27±4.46 ^{a) b)}	21.78±6.11 ^{a) b)}	21.32±5.82 ^{a) b)}
温心方中剂量组	3	11.10±2.60 ^{a) b) c)}	15.13±3.95 ^{a) b) c)}	15.45±4.74 ^{a) b) c)}	16.57±5.61 ^{a) b) c)}
温心方高剂量组	3	13.52±7.36 ^{a) b)}	14.51±5.24 ^{a) b) c)}	15.03±3.06 ^{a) b) c)}	15.32±4.55 ^{a) b) c)}

注：a) 与对照组同时间比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；c) 与温心方低剂量组同时间比较， $P<0.05$ 。

表 4 各组 HAVSMCs 不同时间细胞迁移个数比较

Table 4 Comparison of the number of cell migration of HAVSMCs at different times in each group (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	3	14.33±3.06	30.33±5.51	35.22±3.06	40.33±2.31
模型组	3	32.00±3.61 ^{a)}	86.33±3.51 ^{a)}	93.67±4.51 ^{a)}	112.33±9.29 ^{a)}
温心方低剂量组	3	24.33±4.04 ^{a) b)}	67.00±3.00 ^{a) c)}	71.00±3.00 ^{a) c)}	84.67±5.03 ^{a) c)}
温心方中剂量组	3	29.00±3.61 ^{a)}	58.00±4.00 ^{a) c) d)}	65.00±4.58 ^{a) c)}	68.00±4.36 ^{a) c) d)}
温心方高剂量组	3	27.33±2.52 ^{a)}	33.00±3.61 ^{c) d) e)}	39.33±4.04 ^{c) d) e)}	45.33±7.02 ^{c) d) e)}

注: HAVSMCs, 人主动脉血管平滑肌细胞。

a) 与对照组同时间比较, $P < 0.01$; b) 与模型组同时间比较, $P < 0.05$; c) 与模型组同时间比较, $P < 0.01$; d) 与温心方低剂量组同时间比较, $P < 0.05$; e) 与温心方中剂量组同时间比较, $P < 0.05$ 。

胞迁移个数明显增多;除温心方高剂量组外,其余各组 12、24、48 h 细胞迁移个数亦明显增多 ($P < 0.01$)。与模型组同时间比较,6 h 时温心方低剂量组细胞迁移个数减少,12、24、48 h 时温心方各剂量组细胞迁移个数亦减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与温心方低剂量组同时间比较,温心方中、高剂量组在 12、48 h 时细胞迁移个数减少,温心方高剂量组在 24 h 时细胞迁移个数减少 ($P < 0.05$)。与温心方中剂量组同时间比较,温心方高剂量组在 12、24、48 h 时细胞迁移个数均减少 ($P < 0.05$)。各组 HAVSMCs 不同时间细胞迁移结晶紫染色结果见图 4。

3.6 各组 HAVSMCs 中 α -SMA、SM22 α 、OPN 蛋白水平比较

表 5 示,与对照组比较,除温心方高剂量组 SM22 α 外,其余各组 α -SMA、SM22 α 蛋白表达均降低,OPN 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,温心方中、高剂量组 α -SMA、SM22 α 蛋白表达升高,OPN 蛋白表达降低,温心方低剂量组 OPN 蛋白降低 ($P < 0.01$)。与温心方低剂量组比较,温心方中、高剂量组 α -SMA、SM22 α 蛋白表达升高,OPN 蛋白表达降低,且温心方高剂量组各指标改善亦优于温心方中剂量组 ($P < 0.05$)。各组 HAVSMCs 中 α -SMA、SM22 α 、OPN 蛋白表达电泳图见图 5。

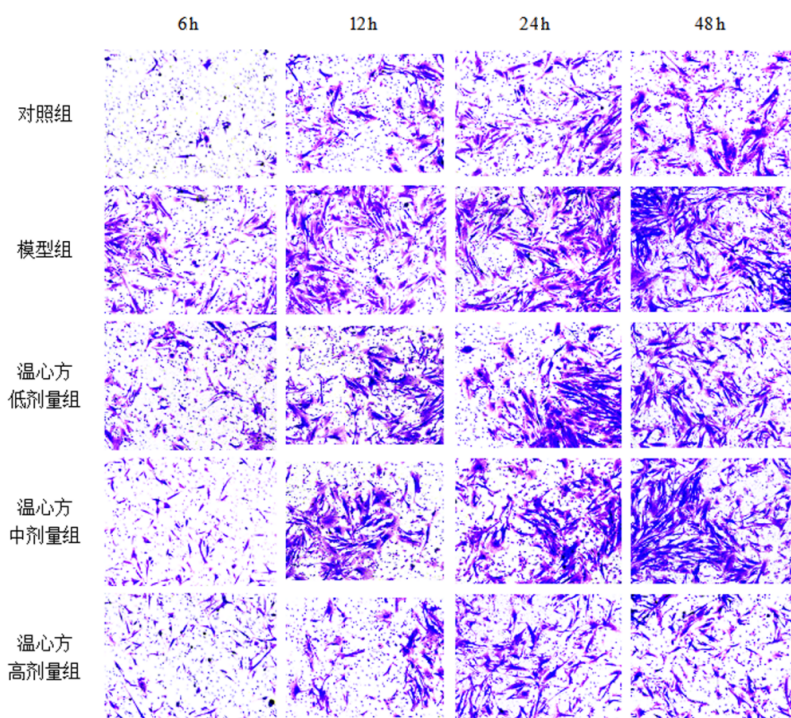


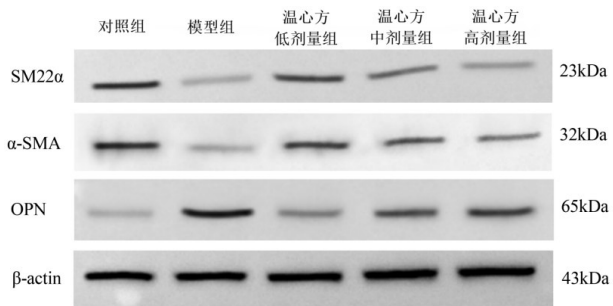
图 4 各组人主动脉血管平滑肌细胞(HAVSMCs)不同时间细胞迁移结晶紫染色结果

Figure 4 Crystal violet staining results of cell migration of human aortic vascular smooth muscle cells (HAVSMCs) at different times in each group

表 5 各组 HAVSMCs 中 α-SMA、SM22α、OPN 蛋白表达比较
Table 5 Comparison of α-SMA, SM22α and OPN protein expression in HAVSMCs in each group (/β-actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	α-SMA	SM22α	OPN
对照组	3	0.79±0.01	0.60±0.03	0.21±0.01
模型组	3	0.31±0.04 ^{a)}	0.22±0.03 ^{a)}	0.78±0.03 ^{a)}
温心方低剂量组	3	0.36±0.04 ^{a)}	0.24±0.05 ^{a)}	0.64±0.05 ^{a) b)}
温心方中剂量组	3	0.49±0.04 ^{a) b) c)}	0.32±0.05 ^{a) b) c)}	0.55±0.06 ^{a) b) c)}
温心方高剂量组	3	0.68±0.04 ^{a) b) c) d)}	0.53±0.04 ^{b) c) d)}	0.36±0.04 ^{a) b) c) d)}

注：HAVSMCs，人主动脉血管平滑肌细胞；α-SMA，α平滑肌肌动蛋白；SM22α，平滑肌 22α 蛋白；OPN，骨桥蛋白。
a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与温心方低剂量组比较， $P<0.05$ ；d) 与温心方中剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：α-SMA，α平滑肌肌动蛋白；SM22α，平滑肌 22α 蛋白；OPN，骨桥蛋白。

图 5 各组人主动脉血管平滑肌细胞（HAVSMCs）中 α-SMA、SM22α、OPN 蛋白表达电泳图
Figure 5 Electropherogram of α-SMA, SM22α, OPN protein expression in human aortic vascular smooth muscle cells (HAVSMCs) in each group

4 讨论

冠心病的基本病理变化为血管内膜增生导致的冠状动脉血管狭窄，而血管内皮细胞损伤及血管平滑肌细胞表型转化是血管内膜增生的关键环节^[14]。在血管内皮细胞损伤和炎症因子刺激下，血管平滑肌细胞由收缩型（分化型）转化为分泌型（去分化型），此时收缩型标志蛋白 SM22α 及 α-SMA 表达减少，分泌型标志蛋白 OPN 表达增多，血管平滑肌细胞获得迁移能力，从血管壁中膜迁移到血管内膜，并不断增殖同时分泌大量细胞外间质，血管内膜不断增厚，管腔内径趋于狭窄^[15]。最新研究表明，血管内皮细胞与血管平滑肌细胞之间的细胞通讯由外泌体介导，外泌体通过直接接触、与细胞质融合或内吞作用进入目标细胞进行细胞通讯^[16]。血管内皮细胞外泌体可携带多种 microRNA，参与受体细胞间的细胞通讯，其中 miR-145 在血管内皮细胞外泌体内高表达^[17]。在血管平滑肌细胞内过表达 miR-145，可抑制血管平滑肌细胞表型转化及增殖迁移的发生，延缓 AS 进程^[18]。因此，探索保护血管内皮细胞、抑制血管平滑肌细胞表型转化的

有效药物，是减轻血管内膜增生、改善冠脉狭窄的有效途径。

温阳益心法是本团队依据冠心病“阳虚痰瘀”病机提出的有效治法，并创制了代表方温心方。该方特点为温阳益心，贵在温通；痰瘀同治，宜先理气；滋阴清热，既病防变。方中以人参、桂枝、薤白为君，温补心阳，通阳化气，使气血津液得以运行，杜绝生邪之源，以补助通；以瓜蒌、法半夏、川芎、赤芍为臣，理气宽胸，痰瘀同治，使实邪尽去；胸痹病势缠绵，痰瘀易郁久化热，应用麦冬、黄连为佐，甘草为使，一方面滋阴清热，另一方面防其化热之虞，既病防变。前期研究显示，温心方可有效保护 AS 大鼠血管内皮细胞^[9]，同时抑制血管平滑肌细胞增殖，减轻 AS 大鼠冠状动脉血管内膜增生^[11]。

本研究应用不同浓度温心方含药血清干预 ox-LDL 损伤的 HUVECs，并成功分离得到 HUVECs 外泌体，将其与 HAVSMCs 共培养，镜下可见 HAVSMCs 细胞成功摄取 HUVECs 外泌体。对 HUVECs 外泌体进行检测发现，模型组细胞外泌体中标志蛋白 CD63、TSG101 及 miR-145mRNA 表达较对照组显著减少，而温心方各剂量组 CD63、TSG101 及 miR-145 表达较模型组显著升高，温心方中、高剂量组 CD63、TSG101 表达高于温心方低剂量组，温心方高剂量组 CD63、miR-145 表达高于温心方中剂量组，提示温心方可促进 HUVECs 外泌体分泌，并激活 miR-145 表达，其作用呈现剂量依赖性，以温心方高剂量组疗效最佳。对摄取外泌体后的 HAVSMCs 进行检测发现，与对照组比较，模型组 HAVSMCs 增殖、迁移显著增多，同时伴有细胞凋亡增加，收缩型标志蛋白 α-SMA、SM22α 显著降低，分泌型标志蛋白 OPN 显著升高，HAVSMCs 发生表型转化；而与模型组比较，温心方中、高剂量组 α-SMA、SM22α 表达显著升高，OPN 表达显著降低；同时

温心方各剂量组在 24、48 h 时细胞增殖率降低, 温心方各剂量组在 6、12、24、48 h 时细胞凋亡率均降低, 且以温心方高剂量组 24 h 时细胞增殖率降低最明显为 $(92.73 \pm 14.84)\%$, 提示温心方干预后的 HUVECs 外泌体可抑制 HAVSMCs 表型转化, 减轻细胞增殖迁移, 从而发挥治疗冠状动脉狭窄作用, 且以高剂量效果最好, 其机制可能与调控 HUVECs 外泌体中 miR-145 表达有关。

综上所述, 温心方含药血清可能发挥促进 HUVECs 外泌体释放, 抑制 HAVSMCs 表型转化及增殖迁移的作用, 并推测其作用可能是通过激活外泌体中 miR-145 实现的, 为温心方防治冠心病提供了依据。本实验仅观察了温心方含药血清对 HUVECs 外泌体及 HAVSMCs 表型转化的作用, 并未深入探究其具体机制, 下一步拟针对外泌体中 miR-145 释放的关键环节, 应用细胞转染技术, 进一步揭示温心方防治冠心病的可能作用机制。

参考文献

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2021 概要[J]. 心脑血管病防治, 2022, 22(4):20-36, 40.
- [2] 廖玉华, 程翔, 黄恺, 等. ASCVD 患者逆转斑块他汀治疗专家共识[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(1):1-5.
- [3] 于涛, 曹洪欣. 胸痹(冠心病)证候演变规律的临床研究[J]. 中医药信息, 2004, 21(3):44-46.
- [4] 曹洪欣, 张华敏. 痰瘀互结与冠心病发病机理辨识[J]. 中医药学刊, 2001, 19(6):544-545.
- [5] 李金霞, 张华敏, 曹洪欣. 温阳益心法治疗冠心病冠状动脉狭窄 32 例临床疗效的回顾性研究[J]. 中医杂志, 2019, 60(9):754-759.
- [6] 曹洪欣, 顾江萍, 龚其森. 温阳益心法治疗胸痹的临床研究[J]. 中医药学报, 2000, 28(5):10-11.
- [7] 李春杰, 谷素洁, 曹洪欣, 等. 温阳益心法治疗急性冠脉综合症的临床研究[J]. 中医药学报, 2011, 39(4):55-57.
- [8] 曹洪欣, 殷惠军. 温心胶囊抗动脉粥样硬化的形态学研究[J]. 中国中医药科技, 2001, 8(1):39.
- [9] 李同达. 温阳益心法对粥样硬化大鼠血管内皮保护作用研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2014.
- [10] 李金霞. 温阳益心法治疗冠脉狭窄疗效评价及作用机制研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2019.
- [11] 李金霞, 宗文静, 曹洪欣. 温心方对动脉粥样硬化大鼠 G1/S 细胞周期转换的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20):38-45.
- [12] BOYER MJ, KIMURA Y, AKIYAMA T, et al. Endothelial cell-derived extracellular vesicles alter vascular smooth muscle cell phenotype through high-mobility group box proteins [J]. J Extracell Vesicles, 2020, 9(1):1781427. doi: 10.1080/20013078.2020.1781427.
- [13] 张宏, 王旭昀, 刘美奇, 等. 中药含药血清实验动物灌胃给药剂量探讨[J]. 吉林中医药, 2015, 35(6):623-625.
- [14] FAN J, WATANABE T. Atherosclerosis: known and unknown[J]. Pathol Int, 2022, 72(3):151-160.
- [15] 丁祎霖, 陈欣怡, 王惠颖, 等. 血管平滑肌细胞迁移功能影响因素研究进展[J]. 现代医药卫生, 2021, 37(23):4016-4019.
- [16] HEO J, KANG H. Exosome-based treatment for atherosclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2):1002.
- [17] WANG Y, XIE Y, ZHANG A, et al. Exosomes: an emerging factor in atherosclerosis [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115: 108951. doi: 10.1016/j.biopha. 2019.108951.
- [18] ZHANG M, LI F, WANG X, et al. MiR-145 alleviates Hey-induced VSMC proliferation, migration, and phenotypic switch through repression of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Histochem Cell Biol, 2020, 153(5):357-366.

Effect of *Wenxin Formula* (温心方) Drug-containing Serum on Exosomes of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Phenotypic Transformation of Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells

LI Jinxia¹, FU Yimin¹, XU Yingzi¹, ZONG Wenjing², CAO Hongxin³, LIU Wanghua¹, ZHENG Caixing¹

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. China Academy of Chinese Medical Sciences; 3. China Association of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To discuss the possible mechanism of *Wenxin Formula* (温心方) in the treatment of coronary heart disease (CHD) from human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) exosomes and phenotypic transformation of human aortic vascular smooth muscle cells (HAVSMCs). **Methods** Thirty SD rats were given 33.75 g/(kg·d) of *Wenxin Formula* decoction by gavage for 7 consecutive days, and the blood was collected from the abdominal aorta 2 hours after the last administration to prepare drug-containing serum. HUVECs at logarithmic growth stage were divided into control group, model group, *Wenxin Formula* high-, medium- and low-dose groups. The control group was cultured with complete medium. The *Wenxin Formula* high-, medium-, and low-dose groups were cultured with 5%, 15%, and 25% of *Wenxin Formula*-containing serum for 24 hours, and then cultured with additional 50 mg/L

oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) for 24 hours. The model group was cultured with only 50 mg/L ox-LDL for 24 hours to establish a model. Exosomes of HUVECs were obtained by high-speed centrifugation in each group, and the morphology of exosomes was observed by transmission electron microscopy. Exosome protein concentration was determined by BCA, and exosome particle size was detected. Expressions of exosome marker protein lysosome-associated membrane protein 3 (CD63) and tumor susceptibility gene 101 (TSG101) were detected by Western Blot, and miR-145 expression was detected by qRT-PCR. 50 ng exosomes of HUVECs were co-cultured with HAVSMCs in each group for 24 hours, and exosomes uptake was observed. Proliferation of HAVSMCs cells was detected by MTT assay, while cell migration ability was detected by Transwell assay, and cell apoptosis was detected by flow cytometry at 6 h, 12 h, 24 h and 48 h respectively. The protein levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), smooth muscle 22 α protein (SM22 α) and osteopontin (OPN) were determined by Western Blot. **Results** In this experiment, HUVECs exosomes were extracted and taken up by HAVSMCs cells successfully. Compared to those in the control group, the expressions of CD63, TSG101 and miR-145 in exosomes of HUVECs in the model group significantly decreased ($P < 0.01$), while those in all *Wenxin Formula* groups increased than the model group, and high-dose group was superior in increasing CD36 and miR-145 than the medium- and low-dose *Wenxin Formula* group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After exosomes were co-cultured with HAVSMCs, the proliferation, migration and apoptosis rates of HAVSMCs cells in the model group significantly increased than the control group, while the expressions of α -SMA and SM22 α significantly decreased, and OPN increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The cell proliferation and apoptosis rates at 24 and 48 h and the migration number at 12, 24 and 48 h of all *Wenxin Formula* groups were significantly reduced than the model group, while the expressions of α -SMA and SM22 α significantly increased, and the expression of OPN significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the medium- and low-dose *Wenxin Formula* groups, the cell proliferation rate at 24 and 48 h and the migration number at 12, 24 and 48 h in the high-dose group decreased, while the expression of α -SMA and SM22 α increased, and the expression of OPN was reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** *Wenxin Formula* can inhibit phenotypic transformation of HAVSMCs by promoting exosomes release in HUVECs, and reduce HAVSMCs proliferation and migration, thereby playing a role in the treatment of CHD.

Keywords coronary heart disease; vascular endothelial cells; vascular smooth muscle cells; exosomes; *Wenxin Formula* (温心方)

(收稿日期: 2023-04-13; 修回日期: 2023-06-14)

[编辑: 邓 媛]

广告

《中医杂志(英文版)》欢迎投稿

Journal of Traditional Chinese Medicine [《中医杂志(英文版)》] (ISSN 0255-2922, CN 11-2167/R, 双月刊) 由中华中医药学会与中国中医科学院联合主办, 是我国中医药界具有权威的中医药英文科技期刊, 现发行和交换 90 多个国家和地区。

《中医杂志(英文版)》自 1981 年创刊以来一直坚持正确的办刊宗旨, 国际影响力不断提升。2010 年入选 SCI-E (《科学引文索引》扩刊版), 2011 年获得中国中医科学院自主选题项目资助, 2013 年获得“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助, 自 2012 年起连续被评为“中国最具国际影响力学术期刊”。本刊先后被国际知名文献数据库 MEDLINE、《化学文摘》(CA)、《医学文摘》(EM) 等收录, 是 MEDLINE 收录的第一份中国出版的中医药期刊, 是 SCI 收录的 30 余种全科医学和替代医学期刊中的中国传统医学综合性学术期刊。

《中医杂志(英文版)》主要栏目包括循证研究、理论研究、基础研究、临床观察、中药研究、文献研究, 思路与方法、综述等。内容以报道中医药基础、临床研究成果和科研前沿进展为主, 覆盖中医药学科各个领域。欢迎广大专家学者积极投稿。作者可直接登录本刊网站 <http://www.journaltcm.com> 投稿。

联系邮箱: jtcmen@126.com。电话: 010-64089190。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。