

# 丹皮酚改善氧化低密度脂蛋白诱导的人血管内皮细胞损伤的作用及其机制\*

贾成文<sup>1△</sup>, 李应东<sup>2</sup>, 蒋虎刚<sup>3</sup>, 韩国炜<sup>1</sup>, 赵信科<sup>1</sup>

(1. 甘肃中医药大学附属医院心血管中心, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学中西医结合学院, 兰州 730000)

**【摘要】 目的:** 探讨丹皮酚对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人血管内皮细胞损伤的影响及分子机制。**方法:** 人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)分为9组, 正常对照(NC)组、ox-LDL组(100 ng/L ox-LDL)、丹皮酚低、中、高剂量组(60 μmol/L、120 μmol/L、240 μmol/L的丹皮酚+100 ng/L ox-LDL)、ox-LDL+小分子干扰RNA阴性对照(si-NC)组、ox-LDL+circ\_0003204小分子干扰RNA(si-circ\_0003204)组、中剂量+ox-LDL+circ\_0003204过表达阴性对照(pcDNA-NC)组、中剂量+ox-LDL+circ\_0003204过表达(pcDNA-circ\_0003204)组, 每组3个复孔。MTT法、流式细胞术法、Western blot法分别对细胞增殖、凋亡、蛋白(CDK2、Bcl2、p27、Bax)表达进行检测; 丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒分别检测MDA含量和SOD活性; 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测circ\_0003204表达水平。**结果:** 与NC组比较, ox-LDL组HUVECs增殖活性、蛋白(CDK2、Bcl2)表达、SOD活性明显降低( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率、蛋白(p27、Bax)表达、MDA含量、circ\_0003204表达明显升高( $P < 0.05$ )。与ox-LDL组比较, 低、中、高剂量丹皮酚组HUVECs增殖活性、蛋白(CDK2、Bcl2)表达、SOD活性明显升高( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率、蛋白(p27、Bax)表达、MDA含量、circ\_0003204表达明显降低( $P < 0.05$ )。与ox-LDL+si-NC组比较, ox-LDL+si-circ\_0003204组HUVECs增殖活性、蛋白(CDK2、Bcl2)表达、SOD活性明显升高( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率、蛋白(p27、Bax)表达、MDA含量明显降低( $P < 0.05$ )。与中剂量+ox-LDL+pcDNA-NC组比较, 中剂量+ox-LDL+pcDNA-circ\_0003204组HUVECs增殖活性、蛋白(CDK2、Bcl2)表达、SOD活性明显降低( $P < 0.05$ ), circ\_0003204水平、细胞凋亡率、蛋白(p27、Bax)表达、MDA含量明显升高( $P < 0.05$ )。**结论:** 丹皮酚可抑制ox-LDL诱导的人脐静脉血管内皮细胞凋亡和氧化应激反应, 改善人脐静脉血管内皮细胞损伤, 其作用机制可能与下调circ\_0003204表达有关。

**【关键词】** 丹皮酚; 环状RNA 0003204; 动脉粥样硬化; 人脐静脉血管内皮细胞; 增殖; 凋亡; 氧化应激

**【中图分类号】** R285

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1000-6834(2024)01-153-06

**【DOI】** 10.12047/j.cjap.6325.2022.100

## Study on the mechanism of paeonol in improving low-density lipoprotein-induced human vascular endothelial cell injury

JIA Cheng-wen<sup>1△</sup>, LI Ying-dong<sup>2</sup>, JIANG Hu-gang<sup>3</sup>, HAN Guo-wei<sup>1</sup>, ZHAO Xin-ke<sup>1</sup>

(1. Cardiovascular Center, Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000; 2. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000; 3. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

**【ABSTRACT】 Objective:** To investigate the effects of paeonol on low-density lipoprotein-induced human vascular endothelial cell injury and its molecular mechanisms. **Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into 9 groups, normal control (NC) group, ox-LDL group (100 ng/L ox-LDL), low, medium, and high-dose paeonol groups (60 μmol/L, 120 μmol/L, 240 μmol/L paeonol+100 ng/L ox-LDL), ox-LDL+small interfering RNA negative control (si-NC) group, ox-LDL+circ\_0003204 small interfering RNA (si-circ\_0003204) group, middle dose group+ox-LDL+circ\_0003204 overexpression negative control (pcDNA-NC) group, middle dose group+ox-LDL+circ\_0003204 overexpression (pcDNA-circ\_0003204) group, three replicate wells in each group. MTT flow cytometry, and Western blot were used to detect cell proliferation, apoptosis and protein (CDK2, Bcl2, p27, Bax) expressions, respectively. Malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) kit were used to detect MDA content and SOD activity; real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of circ\_0003204. **Results:** Compared with the NC group, the proliferation activity, protein expressions of CDK2 and Bcl2, and SOD activity of HUVECs in the ox-LDL group were decreased significantly ( $P < 0.05$ ), and the apoptosis rate, protein expressions of p27 and Bax, MDA content, and circ\_0003204 expression were increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the ox-LDL group, the proliferation activity, protein (CDK2, Bcl2) expressions and SOD activity of HUVECs in the low, medium and high dose paeonol groups were increased significantly ( $P < 0.05$ ), and the apoptosis rate, protein (p27, Bax) expressions, MDA content and circ\_0003204 expression were decreased significantly ( $P <$

0.05)。Compared with ox-LDL+si-NC group, the proliferation activity, protein (CDK2, Bcl2) expressions, SOD activity of HUVECs in ox-LDL+si-circ\_0003204 group were increased significantly ( $P<0.05$ ), the apoptosis rate, protein (p27, Bax) expressions, and the content of MDA were decreased significantly ( $P<0.05$ ). Compared with the middle-dose+ox-LDL+pcDNA-NC group, the HUVECs proliferation activity, protein (CDK2, Bcl2) expressions, and SOD activity in the middle-dose+ox-LDL+pcDNA-circ\_0003204 group were decreased significantly ( $P<0.05$ ), and the levels of circ\_0003204, apoptosis rate, protein (p27, Bax) expressions and MDA content were increased significantly ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Paeonol can inhibit ox-LDL-induced apoptosis and oxidative stress of human umbilical vein endothelial cells, and alleviate human umbilical vein endothelial cell injury. The mechanism of action may be related to the down-regulation of circ\_0003204 expression.

**[KEY WORDS]** paeonol; circular RNA 0003204; atherosclerosis; human umbilical vein endothelial cells; proliferation; apoptosis; oxidative stress

动脉粥样硬化是心脑血管疾病的主要危险因素,而血管内皮细胞损伤是动脉粥样硬化发生发展的重要病理机制,保护血管内皮细胞功能是研究热点。研究表明中医药在保护血管内皮细胞方面,治疗动脉粥样硬化方面具有明显的优势与潜力<sup>[1,2]</sup>。丹皮酚是中药牡丹皮的主要活性成分,具有抗菌、消炎、抗氧化、降血糖、抗心律失常、保护心血管等多种药理作用<sup>[3,4]</sup>。研究结果显示,丹皮酚可改善大鼠血液流变学异常,降低粘附分子的表达,从而干预大鼠动脉粥样硬化的形成<sup>[5]</sup>。此外,丹皮酚还可抑制血管内皮细胞炎症反应,降低 ROS 含量,调节血管平滑肌细胞功能<sup>[6,7]</sup>。而丹皮酚对血管内皮细胞增殖、凋亡的影响及机制尚不清楚。环状 RNA (circRNA) 与动脉粥样硬化密切相关,研究报道称, circ\_0003204 在氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 表达增加,敲减 circ\_0003204 对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 活性和管形成能力起促进作用,而对细胞炎症和凋亡起抑制作用<sup>[8]</sup>。另有报道称,敲除 circ\_0003204 可促进 ox-LDL 诱导的 HUVECs 增殖,减少其凋亡<sup>[9]</sup>。这提示,敲除 circ\_0003204 有利于动脉粥样硬化的治疗。因此,本实验用 ox-LDL 诱导 HUVECs 建立动脉粥样硬化内皮细胞损伤模型,旨在研究丹皮酚是否通过调控 circ\_0003204 影响 ox-LDL 诱导 HUVECs 增殖、凋亡、氧化应激。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HUVECs (货号: HTX1922C, 深圳市豪地华拓生物科技有限公司); ox-LDL (货号: H7950, 北京索莱

宝科技有限公司); 丹皮酚 (货号: D0303, 上海宝曼生物科技有限公司); DMEM 培养基 (货号: 1272, 上海信帆生物科技有限公司); MTT 试剂盒 (货号: YS-RIBIO-C1268, 上海研生实业有限公司); 凋亡检测试剂盒 (货号: 4817-60-K, 美国 R&D 公司); RIPA 蛋白裂解液 (货号: AR0105, 上海振誉生物科技有限公司); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (货号: CEA597Ge03); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (货号: SES134Hu03) (南京赛泓瑞生物科技有限公司); 荧光定量 PCR 试剂盒 (货号: 218073, 上海联硕宝为生物科技有限公司); 二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒 (货号: 23227, 北京诺博莱德科技有限公司)。

### 1.2 细胞分组

HUVECs 用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养, 分为 9 组, 每组设置 3 个复孔: 正常对照 (NC) 组、ox-LDL 组、ox-LDL+丹皮酚低、中、高剂量组、ox-LDL+小分子干扰 RNA 阴性对照 (si-NC) 组、ox-LDL+circ\_0003204 小分子干扰 RNA (si-circ\_0003204) 组、中剂量+ox-LDL+circ\_0003204 过表达阴性对照 (pcDNA-NC) 组、中剂量+ox-LDL+circ\_0003204 过表达 (pcDNA-circ\_0003204) 组。ox-LDL 组用 100 ng/L 的 ox-LDL 处理 HUVECs 24 h 建立动脉粥样硬化内皮细胞损伤模型, NC 组细胞常规培养; ox-LDL+丹皮酚低、中、高剂量组分别用 60  $\mu\text{mol/L}$ 、120  $\mu\text{mol/L}$ 、240  $\mu\text{mol/L}$  的丹皮酚作用 12 h<sup>[10]</sup>, 再用 100 ng/L 的 ox-LDL 处理 24 h; ox-LDL+si-NC 组、ox-LDL+si-circ\_0003204 组分别将 si-NC、si-circ\_0003204 转染至 HUVECs 后用 100 ng/L 的 ox-LDL 处理; 中剂量+ox-LDL+pcDNA-NC 组、中剂量+ox-LDL+pcDNA-circ\_0003204 组分别将 pcDNA-NC、pcDNA-circ\_0003204 转染至 HUVECs 后 6 h, 用 120  $\mu\text{mol/L}$  丹皮酚和 100 ng/L 的 ox-LDL 处理。处理完成后, 收集各组细胞, 检测其增殖、凋亡能力及相关蛋白 (CDK2、Bcl2、p27、Bax) 表达, 并检测 MDA 含

\*【基金项目】国家自然科学基金地区项目 (81860786)

【收稿日期】2022-06-14 【修回日期】2022-09-28

△【通讯作者】Tel: 18919098178; E-mail: jujc07@163.com

量、SOD 活性和 circ\_0003204 表达。实验重复 3 次。

### 1.3 MTT 检测细胞增殖

HUVECs 接种 96 孔板中,每孔接种 5 000 个,按照 1.2 法细胞处理后,加 MTT (20  $\mu$ l/well),孵育 4 h,每孔内继续加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砷试剂,用酶标仪于波长 490 nm 处检测吸光度 (OD) 值。

### 1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

各组细胞处理后,收集细胞,经 PBS 清洗 2 次后,制备细胞悬液,按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒操作步骤,依次加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液各 5  $\mu$ l,避光反应 15 min,上流式细胞仪测各组凋亡情况。

### 1.5 蛋白质印迹 (Western blot) 法检测蛋白表达

各组细胞处理后,加 RIPA 试剂对细胞中总蛋白进行提取,并测蛋白含量 (BCA 法)。取 45  $\mu$ g 上样蛋白经过电泳分离总蛋白,迅速转膜,加 5% 脱脂奶粉封闭处理 1 h 后,于一抗细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase 2, CDK2) (稀释 1 : 800)、p27 (稀释 1 : 500)、BCL2 相关 X 蛋白 (BCL2-associated X protein, Bax) (稀释 1 : 800)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl2) (稀释 1 : 800)、 $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) (稀释 1 : 1 500) 中 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h,洗膜 3 次。于室温下在二抗 (稀释 1 : 5 000) 中孵育 1 h,加化学发光试剂显影,曝光,Quantity One 分析条带灰度值。以  $\beta$ -actin 内参计算蛋白相对表达量。

### 1.6 MDA 和 SOD 试剂盒分别检测 MDA 含量和 SOD 活性

各组细胞处理后,收集细胞沉淀破碎,4 000 r/min 离心 10 min 取上清液,利用 MDA、SOD 试剂盒对细胞中 MDA 含量、SOD 活性进行检测。

### 1.7 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 检测 circ\_0003204 表达

提取各组处理后按照 Trizol 法提取细胞中总 RNA,逆转录合成 cDNA 后,按照荧光定量 PCR 反

应进行扩增, $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 circ\_0003204 相对 GAPDH 表达量采用。引物序列:circ\_0003204 上游:5'-GATCCAGAGGCCATGGAAGAGT-3',下游:5'-AG-CAGGTGACACAGCCCCATGC-3'; GAPDH 上游:5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3',下游:5'-TT-GATTTTGGAGGGATCTCG-3'。

### 1.8 统计学处理

各指标均为计量资料,且符合正态分布,用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。统计学分析采用 SPSS 20.0 软件。NC 组、ox-LDL 组、ox-LDL+低、中、高剂量丹皮酚组各指标先用采用单因素方差分析,再采用 LSD-*t* 检验进行组间比较。ox-LDL+si-circ\_0003204 组与 ox-LDL+si-NC 组、中剂量+ox-LDL+pcDNA-NC 组与中剂量+ox-LDL+pcDNA-circ\_0003204 组各指标均为两组间比较,行独立样本 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 丹皮酚对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞增殖和凋亡的影响

ox-LDL 组细胞增殖活性、蛋白 (CDK2、Bcl2) 水平较 NC 组降低,细胞凋亡率、蛋白 (p27、Bax) 水平较 NC 组升高 ( $P<0.05$ ); ox-LDL+低、中、高剂量丹皮酚组的细胞增殖活性、蛋白 (CDK2、Bcl2) 水平较 ox-LDL 组升高,细胞凋亡率、蛋白 (p27、Bax) 水平较 ox-LDL 组降低 ( $P<0.05$ , 表 1, 图 1)。提示丹皮酚能促进 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞增殖和抑制凋亡。

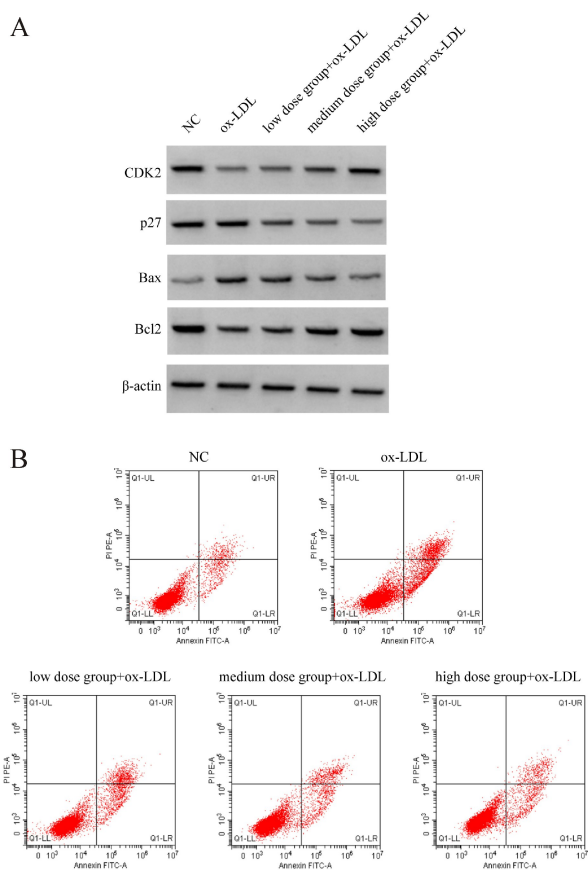
### 2.2 丹皮酚对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞氧化应激的影响

ox-LDL 组 MDA 含量较 NC 组升高,SOD 活性较 NC 组降低 ( $P<0.05$ ); ox-LDL+低、中、高剂量丹皮酚组 MDA 含量较 ox-LDL 组降低,SOD 活性较 ox-LDL 组升高 ( $P<0.05$ , 表 2)。提示丹皮酚能抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞氧化应激。

Tab. 1 Effects of paeonol on the proliferation and apoptosis of HUVECs induced by ox-LDL ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=9$ )

Group	Proliferative activity (OD <sub>450nm</sub> )	CDK2 (34 kDa)	p27 (28 kDa)	Apoptosis rate (%)	Bax (21 kDa)	Bcl2 (26 kDa)
NC	1.73 $\pm$ 0.02	0.83 $\pm$ 0.03	0.78 $\pm$ 0.02	9.22 $\pm$ 0.49	0.16 $\pm$ 0.02	0.79 $\pm$ 0.02
ox-LDL	1.12 $\pm$ 0.02*	0.22 $\pm$ 0.01*	1.47 $\pm$ 0.02*	27.00 $\pm$ 0.73*	0.62 $\pm$ 0.03*	0.27 $\pm$ 0.02*
ox-LDL+low dose group	1.29 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	1.40 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	17.44 $\pm$ 0.55 <sup>#</sup>	0.46 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>
ox-LDL+medium dose group	1.38 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	0.44 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>	1.27 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	14.78 $\pm$ 0.49 <sup>#</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	0.46 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>
ox-LDL+high dose group	1.48 $\pm$ 0.03 <sup>#</sup>	0.66 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>	1.04 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>	13.22 $\pm$ 0.32 <sup>#</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>	0.51 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>

\* $P<0.05$  vs NC group; <sup>#</sup> $P<0.05$  vs ox-LDL group



**Fig. 1** The effects of paeonol on HUVECs cell proliferation and apoptosis proteins induced by ox-LDL

A: CDK2, p27, Bax, Bcl2 protein expression; B: Apoptosis map

**Tab. 2** Effects of paeonol on the oxidative stress of HUVECs induced by ox-LDL( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

Group	MDA (nmol/L)	SOD(U/ml)
NC	16.00±0.47	88.44±1.68
ox-LDL	52.00±2.55*	44.00±1.83*
Low dose group+ox-LDL	41.00±0.65#	57.00±0.74#
Medium dose group+ox-LDL	32.00±0.71#	68.11±0.75#
High dose group+ox-LDL	28.67±1.00#	74.00±1.63#

\* $P<0.05$  vs NC group; # $P<0.05$  vs ox-LDL group

### 2.3 丹皮酚对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞中 circ\_0003204 表达的影响

NC 组、ox-LDL 组、ox-LDL+低、中、高剂量丹皮酚组的 circ\_0003204 表达量分别为 1.01±0.02、1.57±0.02、1.37±0.01、1.25±0.02、1.19±0.01,五

**Tab. 3** The effects of silencing circ\_0003204 on the proliferation and apoptosis of HUVECs induced by ox-LDL( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

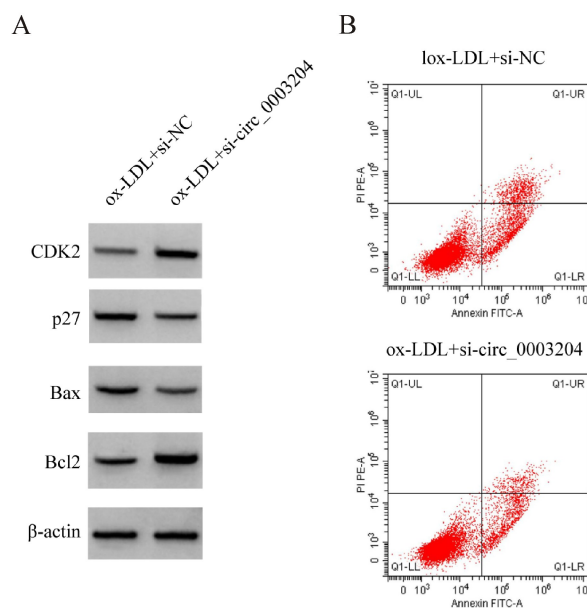
Group	circ_0003204	Proliferative activity (OD <sub>450nm</sub> )	CDK2	p27	Apoptosis rate (%)	Bax	Bcl2
ox-LDL+si-NC	1.02±0.02	1.73±0.02	0.80±0.02	0.79±0.02	25.67±0.82	0.64±0.02	0.33±0.02
ox-LDL+si-circ_0003204	0.35±0.01*	2.02±0.04*	1.40±0.03*	0.36±0.02*	17.22±0.57*	0.32±0.02*	0.81±0.02*

\* $P<0.05$  vs ox-LDL+si-NC group

组间比较差异有统计学意义 ( $F = 121.000, P < 0.05$ )。与 NC 组相比,ox-LDL 组 circ\_0003204 水平升高 ( $P < 0.05$ );与 ox-LDL 组相比,ox-LDL+低、中、高剂量丹皮酚组 circ\_0003204 水平降低 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 沉默 circ\_0003204 对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞增殖和凋亡的影响

ox-LDL+si-circ\_0003204 组 circ\_0003204 水平、细胞凋亡率、蛋白 (p27、Bax) 水平较 ox-LDL+si-NC 组均降低,细胞增殖活性、蛋白 (CDK2、Bcl2) 水平较 ox-LDL+si-NC 组均升高 ( $P < 0.05$ ,表 3,图 2)。提示沉默 circ\_0003204 促进 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞增殖,并抑制凋亡。



**Fig. 2** The effects of circ\_0003204 silencing on the proliferation and apoptosis rate of HUVECs induced by ox-LDL

A: CDK2, p27, Bax, Bcl2 protein expression; B: Apoptosis map

### 2.5 沉默 circ\_0003204 对 HUVECs 细胞氧化应激的影响

与 ox-LDL + si-NC 组相比, ox-LDL + si-circ\_0003204 组 MDA 含量降低, SOD 活性升高 ( $P < 0.05$ ,表 4)。提示沉默 circ\_0003204 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞氧化应激。



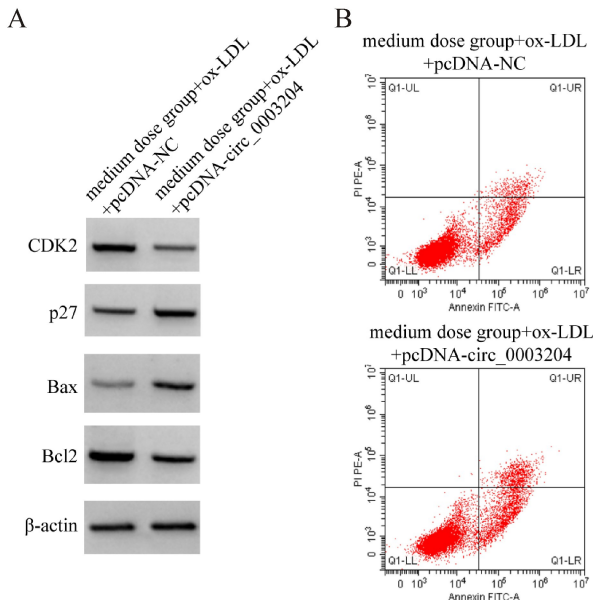
**Tab. 4** The effects of silencing circ\_0003204 on the oxidative stress of HUVECs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ )

Group	MDA (nmol/L)	SOD (U/ml)
ox-LDL+si-NC	41.78±1.06	63.56±2.32
ox-LDL+si-circ_0003204	24.67±1.19*	89.78±2.13*

\* $P < 0.05$  vs ox-LDL+si-NC group

**2.6 过表达 circ\_0003204 逆转中剂量丹皮酚对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞增殖凋亡和氧化应激的影响**

中剂量+ox-LDL+pcDNA-circ\_0003204 组 circ\_0003204 水平、凋亡率、蛋白 (p27、Bax) 较中剂量+ox-LDL+pcDNA-NC 组均升高, 细胞增殖活性、蛋白 (CDK2、Bcl2) 水平较 medium dose group+ox-LDL+pcDNA-NC 组均降低 ( $P < 0.05$ , 表 5, 图 3)。提示过表达 circ\_0003204 逆转中剂量丹皮酚对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞增殖凋亡和氧化应激的影响。



**Fig. 3** Overexpression of circ\_0003204 reverses the effect of paeonol on the proliferation and apoptosis protein and apoptosis rate of HUVECs induced by ox-LDL  
A: CDK2, p27, Bax, Bcl2 protein expression; B: Apoptosis map

**Tab. 5** Overexpression of circ\_0003204 reverses the effect of middle-dose paeonol on the proliferation, apoptosis and oxidative stress of HUVECs induced by ox-LDL ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ )

Group	circ_0003204	Proliferative activity (OD <sub>450nm</sub> )	CDK2	p27	Apoptosis rate (%)	Bax	Bcl2	MDA (nmol/L)	SOD (U/ml)
Medium dose group+ox-LDL+pcDNA-NC	1.02±0.02	1.84±0.02	1.04±0.03	0.70±0.03	17.00±0.67	0.36±0.02	0.66±0.03	34.44±1.44	72.33±1.64
Medium dose group+ox-LDL+pcDNA-circ_0003204	1.54±0.02*	1.41±0.02*	0.46±0.04*	1.38±0.02*	26.11±0.75*	0.90±0.02*	0.29±0.02*	90.44±2.11*	36.78±1.43*

\* $P < 0.05$  vs the middle dose group+ox-LDL+pcDNA-NC group

**3 讨论**

血管内皮细胞损伤, 内皮功能障碍是动脉粥样硬化的起始环节, 其参与动脉粥样硬化的启动和进展过程<sup>[11]</sup>。ox-LDL 可诱导血管内皮细胞损伤, 包括细胞凋亡、氧化应激及炎症反应, 因此, 常用 ox-LDL 处理 HUVEC 模拟动脉粥样硬化内皮细胞损伤<sup>[12]</sup>。SOD 和 MDA 是氧化应激的标志物。MDA 是脂质过氧化的最终产物, 其含量是反映机体和细胞过氧化损伤程度的重要指标。SOD 是主要的抗氧化酶, 可将超氧自由基转化为无害的过氧化氢分子和氧分子, 减轻氧自由基对细胞的损伤; SOD 含量与 MDA 含量呈负相关<sup>[13]</sup>。CDK2 是一种关键的 G1 激酶, 可以直接影响细胞周期, 决定细胞凋亡; p27 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 通过抑制 CDK2 的激活而调节细胞从 G1 期到 S 期的进展<sup>[14]</sup>。抗凋亡蛋白 Bcl2 和促凋亡蛋白 Bax 是细胞凋亡的关键调节因子。本实验结果显示, ox-LDL 处理 HUVECs 后, 细胞增殖活性、CDK2、Bcl2 蛋白表达降低, 而细胞凋亡率、p27、Bax 蛋白表达升高, 同时氧化应激指标 MDA 含量升高, 而 SOD 活性降低, 表明 ox-LDL 诱导 HUVECs 出现氧化应激, 增加了细胞凋亡, 这与既往的研究结果<sup>[12]</sup>一致; 提示成功建立内皮细胞损伤模型。

中医药具有全方位和多靶点的作用特征, 在动脉粥样硬化防治中具有较好的效果<sup>[15]</sup>。研究报道称, 丹皮酚可通过抑制血管内皮细胞 NF-κB/IκB 通路减少炎症反应<sup>[16]</sup>, 可抑制 miR-21 介导的 p38 MAPK 信号通路减少 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞炎症<sup>[10]</sup>, 还可减轻 LPS 诱导的内皮细胞损伤<sup>[17]</sup>。本研究显示, 经过低、中、高剂量丹皮酚处理后, ox-LDL 处理的 HUVECs 细胞增殖活性、CDK2、Bcl2 蛋白表达、SOD 活性升高, 细胞凋亡率、p27、Bax 蛋白表达、MDA 含量降低, 且呈剂量依赖性, 表明丹皮酚可抑制氧化应激和细胞凋亡, 减轻 ox-LDL 诱导的

HUVECs 损伤,这与既往研究结果相似,提示丹皮酚具有治疗动脉粥样硬化的潜在价值。

研究表明 circRNA 参与调控血管内皮细胞损伤过程,例如,沉默 circ\_0003645 可减轻 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症和细胞凋亡<sup>[18]</sup>,敲除 circBPTF 可通过调控 miR-384/LIN28B 轴减轻高糖诱导的 HUVECs 炎性损伤和氧化应激<sup>[19]</sup>。本实验结果显示,ox-LDL 诱导的 HUVECs 中 circ\_0003204 的表达升高,而沉默 circ\_0003204 增强 ox-LDL 诱导的 HUVECs 活性,并减少细胞凋亡,这与 Liu 等<sup>[9]</sup>报道结果一致,同时沉默 circ\_0003204 还降低 ox-LDL 诱导的 HUVECs 氧化损伤,提示 circ\_0003204 可作为治疗动脉粥样硬化的分子靶点。在本研究中,丹皮酚可下调 ox-LDL 诱导的 HUVECs 中 circ\_0003204 表达,而过表达 circ\_0003204 明显减弱丹皮酚对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞增殖、凋亡和氧化应激的影响,提示丹皮酚可能通过下调 circ\_0003204 来发挥抗动脉粥样硬化作用。

综上,丹皮酚可能通过下调 circ\_0003204 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 凋亡和氧化应激反应,促进细胞增殖,具有抗动脉粥样硬化的潜在价值,但尚需进一步在体内验证。同时,circ\_0003204 调控下游 miRNA 和靶基因的表达发挥作用,丹皮酚具体作用的 circ\_0003204 下游 miRNA 和靶基因也需进一步探究。

## 【参考文献】

- [1] 高鹏琳,桂丽卿,袁奕珂,等. 中医药治疗动脉粥样硬化研究进展[J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2018, 14(4): 55-60.
- [2] 吴洁,宋耀鸿. 中医药保护动脉粥样硬化血管内皮细胞研究进展[J]. 中医学, 2020, 9(2): 115-121.
- [3] 胡云飞,徐国兵. 牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展[J]. 安徽医药, 2014, 18(4): 589-592.
- [4] 蒋丽丽,张彦龙,王春杰,等. 牡丹皮中有效成分丹皮酚的药理活性研究进展[J]. 现代诊断与治疗, 2016, 27(22): 4223-4224.
- [5] 龚明玉,许倩,李素婷. 丹皮酚对动脉粥样硬化大鼠的防治作用及其机制[J]. 中成药, 2018, 40(2): 437-440.
- [6] 孙颖,刘雅蓉,吴鸿飞,等. 丹皮酚对动脉粥样硬化相关细胞的作用及机制[J]. 安徽中医学报, 2020, 39(3): 92-96.
- [7] 孙艺丹,侯晓峰. 丹皮酚对 H2O2 诱导血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国处方药, 2019, 17(4): 37-38.
- [8] Zhang DY, Zhang G, Yu K, et al. Circ\_0003204 knock-down protects endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced injuries by targeting the miR-491-5p-ICAM1 pathway[J]. *J Thromb Thrombolys*, 2022, 53(2): 302-312.
- [9] Liu H, Ma X, Mao Z, et al. Circular RNA has\_circ\_0003204 inhibits ox-LDL-induced vascular endothelial cell proliferation and angiogenesis [J]. *Cell Signal*, 2020, 70(1): 109595-109602.
- [10] 刘雅蓉,陈君君,戴敏,等. 丹皮酚通过 miR-21 介导的 p38MAPK 信号通路下调氧化低密度脂蛋白诱导的大鼠血管内皮细胞肿瘤坏死因子- $\alpha$  释放[J]. 安徽中医学报, 2014, 33(1): 51-56.
- [11] 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): 50-54.
- [12] 陈刚,陈九霖,吴俊. miR-133b 靶向抑制 SGTB 对 oxLDL 诱导的血管内皮细胞损伤的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(6): 594-600.
- [13] 欧阳昕,李清,肖爱娇,等. 艾灸对缺氧缺血性脑损伤新生小鼠的治疗作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(5): 543-547.
- [14] Bassi C, Fortin J, Snow BE, et al. The PTEN and ATM axis controls the G1/S cell cycle checkpoint and tumorigenesis in HER2-positive breast cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(11): 3036-3051.
- [15] 李杰. 中医药治疗动脉粥样硬化研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2019, 38(12): 167-168.
- [16] 周晓慧,牛成伟,曹凯,等. 丹皮酚通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路下调高脂血清诱导的人脐静脉内皮细胞黏附分子的表达[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(2): 249-253.
- [17] 胡文君,张振,戴敏. 丹皮酚通过抑制 PI3K/AKT-NF- $\kappa$ B 通路对 LPS 诱导的与平滑肌细胞共培养的大鼠血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(12): 2298-2302.
- [18] Qin M, Wang W, Zhou H, et al. Circular RNA circ\_0003645 silencing alleviates inflammation and apoptosis via the NF- $\kappa$ B pathway in endothelial cells induced by ox-LDL[J]. *Gene*, 2020, 755(1): 144900-144907.
- [19] Zhang W, Sui Y. CircBPTF knockdown ameliorates high glucose-induced inflammatory injuries and oxidative stress by targeting the miR-384/LIN28B axis in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 471(1-2): 101-111.