

吴茱萸碱介导miR-223-3p对心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成的影响

刘文频 熊向晖* 毛湘屏

(湖南中医药大学第二附属医院心血管内科, 长沙 410005)

摘要 为探讨吴茱萸碱(Evodyamine)介导miR-223-3p对缺氧诱导的心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成的机制, 该研究体外分离培养大鼠心肌微血管内皮细胞, 将细胞分为对照组(Con), 缺氧组(Hypoxia), 吴茱萸碱低、中、高剂量组(Evodyamine-L、M、H), anti-miR-NC组, anti-miR-223-3p组, 吴茱萸碱+miR-NC组(Evodyamine+miR-NC), 吴茱萸碱+miR-223-3p组(Evodyamine+miR-223-3p), 除Con组除外, 其余各组均进行缺氧处理。采用MTT检测细胞增殖变化; Transwell实验检测细胞迁移能力; Western blot检测VEGF蛋白表达情况; 血管生成实验检测血管形成情况; RT-qPCR检测miR-223-3p表达水平。结果显示, Hypoxia组的细胞活性以及迁移细胞数明显低于Con组($P<0.05$), VEGF蛋白表达、血管生长长度和miR-223-3p表达水平明显高于Con组($P<0.05$)。Evodyamine-L、Evodyamine-M、Evodyamine-H组的细胞活性、迁移细胞数、VEGFA蛋白表达和血管生长长度明显高于Hypoxia组($P<0.05$), miR-223-3p表达水平明显低于Hypoxia组($P<0.05$)。anti-miR-223-3p组的miR-223-3p表达水平明显低于anti-miR-NC组($P<0.05$), 细胞活性、迁移细胞数、VEGF蛋白表达和血管生长长度明显高于anti-miR-NC组($P<0.05$)。Evodyamine+miR-223-3p组的miR-223-3p表达水平明显高于Evodyamine+miR-NC组($P<0.05$), 细胞活性、迁移细胞数、VEGF蛋白表达水平和血管生长长度明显低于Evodyamine+miR-NC组($P<0.05$)。这说明吴茱萸碱可能通过下调miR-223-3p促进缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成。

关键词 吴茱萸碱; miR-223-3p; 心肌微血管内皮细胞; 增殖; 迁移; 血管生成

Evodyamine-Mediated Effects of miR-223-3p on the Proliferation, Migration and Angiogenesis of Myocardial Microvascular Endothelial Cells

LIU Wenpin, XIONG Xianghui*, MAO Xiangping

(Department of Cardiology, the Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China)

Abstract To investigate the mechanism of Evodyamine-mediated miR-223-3p on the proliferation, migration and angiogenesis of myocardial microvascular endothelial cells induced by hypoxia, rat myocardial microvascular endothelial cells were isolated and cultured *in vitro* in this study. The cells were divided into control group (Con), hypoxia group (Hypoxia), low, medium, and high dose evodyamine groups (Evodyamine-L, M, H), anti-miR-NC group, anti-miR-223-3p group, Evodyamine+miR-NC group (Evodyamine+miR-NC), Evodyamine+miR-223-3p group (Evodyamine+miR-223-3p). The other groups were all treated with hypoxia except for the Con group. MTT was used to detect cell proliferation changes; Transwell test was used to detect cell migration ability; Western blot was used to detect VEGF protein expression; angiogenesis test was used to detect blood vessel formation; RT-

收稿日期: 2021-12-23

接受日期: 2022-02-27

*通讯作者: Tel: 13667397963, E-mail: xxhivy@163.com

Received: December 23, 2021

Accepted: February 27, 2022

*Corresponding author. Tel: +86-13667397963, E-mail: xxhivy@163.com

qPCR was used to detect miR-223-3p expression level. The results show that, the cell activity, the number of migration cells of Hypoxia group were significantly lower than those of Con group ($P<0.05$), and the VEGF protein expression, angiogenesis length, and miR-223-3p expression levels were significantly higher than those of Con group ($P<0.05$). The cell viability, number of migration cells, VEGF protein expression, and angiogenesis length of Evodiamine-L, Evodiamine-M, and Evodiamine-H groups were significantly higher than those of Hypoxia group ($P<0.05$), and the expression level of miR-223-3p was significantly lower than that of Hypoxia group ($P<0.05$). The expression level of miR-223-3p in the anti-miR-223-3p group was significantly lower than that in the anti-miR-NC group ($P<0.05$), and the cell activity, number of migration cells, VEGF protein expression, and angiogenesis length in the anti-miR-223-3p group were significantly higher than those in the anti-miR-NC group ($P<0.05$). The expression level of miR-223-3p in the Evodiamine+miR-223-3p group was significantly higher than that in the Evodiamine+miR-NC group ($P<0.05$), and the cell activity, number of migration cells, VEGF protein expression, and angiogenesis length were significantly lower than those in the Evodiamine+miR-NC group ($P<0.05$). These aforementioned findings indicates that evodiline may promote hypoxia-induced myocardial microvascular endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis by down-regulating miR-223-3p.

Keywords Evodiamine; miR-223-3p; myocardial microvascular endothelial cells; proliferation; migration; angiogenesis

心肌缺血再灌注损伤是在心肌组织阻塞后的一定时间内又重新恢复灌注, 重新恢复灌注组织受损明显, 这也是导致心血管疾病发生率上升的原因^[1]。心肌微血管内皮细胞是心脏组织的重要组成部分, 也是心肌缺血再灌注损伤最先涉及的部位, 心脏发生缺血再灌注可使心肌微血管内皮细胞凋亡增多, 细胞增殖、迁移能力、血管形成能力受损^[2-3]。吴茱萸是芸香科植物吴茱萸的干燥成熟果实, 广泛被应用于临床心血管疾病、中枢神经系统疾病、消化系统疾病等疾病的治疗中^[4]。吴茱萸碱是从吴茱萸内提取分离而来的, 对心肌细胞损伤具有保护作用^[5], 如吴茱萸碱能增加缺氧诱导的心肌细胞增殖, 减轻细胞凋亡和炎性损伤^[6], 但是其对缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞的作用机制鲜有报道。微小RNA(miRNA)是近年发现的一种转录后调控因子, 在血管形成和心血管疾病中具有重要的作用^[7], 如miR-223-3p在缺血性心脏微血管内皮细胞中表达上调, miR-223-3p通过靶向负调控RPS6KB1/hif-1a轴抑制缺血性心脏微血管内皮细胞增殖和迁移, 并抑制血管生成^[8]。关于吴茱萸碱与miR-223-3p之间的研究鲜有报道。鉴于此, 本研究通过缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞, 探究吴茱萸碱是否能通过调控miR-223-3p影响缺氧诱导的心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成, 旨在为心肌缺血再灌注损伤提供相应的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清、M199培养基购于上海研谨生物科技有限公司; 肝素、内皮细胞生长添加剂购于美国Sigma公司; 胰蛋白酶购于上海碧云天生物科技有限公司; 吴茱萸碱购于上海宝曼生物科技有限公司; anti-miR-NC、anti-miR-223-3p、miR-NC、miR-223-3p引物由上海吉玛公司设计合成; Lipofectamine™ 3000试剂盒购于美国Invitrogen公司; MTT试剂盒购于上海晶抗生物工程有限公司; VEGF抗体、GAPDH抗体购于美国Abcam公司; Transwell、Matrigel基质胶购于美国Corning公司; TRIzol试剂盒、TaqMan microRNA逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒购于日本TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌微血管内皮细胞分离、培养 SPF级SD大鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。将SD大鼠用3%的戊巴比妥钠麻醉处死, 取出心脏左心室, 用磷酸盐缓冲液冲洗后, 放入含有75%乙醇溶液内以灭活心外膜、心内膜内皮细胞, 用磷酸盐缓冲液冲洗3次, 将组织剪碎, 加入0.1%胰蛋白酶消化30 min后终止消化, 收集细胞, 将细胞接种在含有20%胎牛血清、肝素、内皮细胞生长添加剂的M199培养基内。观察细胞生长情况, 当细胞生长铺至瓶底时进行消化传代培养。取第3~5代细胞进行实验。

本研究取得湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号: ZYFY20200928)。

1.2.2 细胞分组 取大鼠心肌微血管内皮细胞, 将细胞分为对照组(Con), 缺氧组(Hypoxia), 吴茱萸碱低、中、高剂量组(Evodiamine-L、M、H), anti-miR-NC组, anti-miR-223-3p组, 吴茱萸碱+miR-NC组(Evodiamine+miR-NC), 吴茱萸碱+miR-223-3p组(Evodiamine+miR-223-3p)。除Con组除外, 其余各组均在94% N₂、1% O₂、5% CO₂条件下培养24 h, 即缺氧处理。Evodiamine-L、M、H组: 用浓度为1、5、10 μmol/L的吴茱萸碱处理细胞, 然后进行缺氧处理24 h; anti-miR-NC组、anti-miR-223-3p组: 将anti-miR-NC、anti-miR-223-3p转染细胞6 h后, 进行缺氧处理; Evodiamine+miR-NC、Evodiamine+miR-223-3p: 将miR-NC、miR-223-3p转染细胞6 h, 用10 μmol/L吴茱萸碱处理细胞, 进行缺氧处理24 h。细胞进行转染时按照Lipofectamine™ 3000试剂盒说明书进行。

1.2.3 MTT检测细胞增殖变化 收集各组大鼠心肌微血管内皮细胞调整为 5×10^3 个/mL接种至96孔板中, 放入37 °C培养箱中培养48 h、72 h, 取出细胞板每孔内加入10 μL的MTT溶液, 37 °C继续培养4 h, 加入150 μL二甲基亚砷溶液, 用酶标仪检测每孔吸光度(D)值, 并计算细胞活性。细胞活性(%)=(实验组D值-空白组D值)/(对照组D值-空白组D值)×100%。

1.2.4 Transwell实验检测细胞迁移能力 收集各组大鼠心肌微血管内皮细胞使用不含血清的培养基调整细胞密度为 2×10^5 个/孔, 在Transwell上室加入100 μL细胞悬液, 下室内加入500 μL含血清的培养基, 继续培养24 h, 取出小室擦掉没有迁移的细胞, 用甲醛固定30 min, 结晶紫染色20 min, 使用蒸馏水冲洗待晾干后, 在显微镜下随机选择明亮视野拍照, 并记录数据, 计算细胞迁移细胞数。

1.2.5 Western blot检测VEGF蛋白表达 收集各组大鼠心肌微血管内皮细胞, 用裂解液提取细胞总蛋白, 使用BCA试剂盒检测定量蛋白浓度, 取30 μg总蛋白加入上样孔内进行凝胶电泳处理蛋白样品, 转移PVDF膜上, 室温下使用脱脂奶粉封闭60 min, 加入一抗VEGF抗体(稀释比例为1:800)、GAPDH抗体(稀释比例为1:3 000), 4 °C过夜孵育, 加入山羊抗兔IgG-HRP二抗(稀释比例为1:5 000)室温孵育60 min, 暗室加入ECL显影, 定影, 采用Quantity One软件分析蛋白条带密度值。

1.2.6 血管生成实验检测血管形成情况 将实验用的枪头、Matrigel基质胶、细胞板预冷过夜, 将Matrigel基质胶以300 μL加入24孔板内进行固化。将各组细胞接种至24孔板中(1×10^5 个/mL), 细胞过夜培养后, 使用无菌枪头加Matrigel基质胶, 置于4 °C下进行凝固1 h, 加入胰酶进行消化, 然后将Matrigel基质胶加入孔内培养10 h, 置于显微镜下观察生长情况, 采用Image Pro Plus软件分析总血管长度和总血管数目。

1.2.7 RT-qPCR检测miR-223-3p表达水平 收集各组大鼠心肌微血管内皮细胞与TRIzol试剂混合并提取细胞内总RNA, 检测RNA浓度和丰度, 按照Taq-Man microRNA逆转录试剂盒合成cDNA, 取cDNA模板按照荧光定量试剂盒说明书配置反应体系进行PCR扩增反应: 4 μL cDNA, 0.5 μL正、反向引物, 10 μL SYBR Green Master Mix, 0.4 μL Reference Dye 2, 使用ddH₂O补充体积至20 μL。用2^{-ΔΔCt}法计算miR-223-3p表达水平。miR-223-3p正向引物: 5'-GAA GCT GTA CCT AAC ATA CCG TG-3', 反向引物: 5'-GAT TGG TCG TGG ACG TGT CG-3'。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0软件统计分析实验数据, 实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)显示, 五组间比较用单因素方差分析, 组内间比较用LSD-*t*检验, 两组间独立样本比较用*t*检验。*P*<0.05代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞增殖和迁移的影响

与Con组相比, Hypoxia组的细胞活性、迁移细胞数均显著降低, 差异具有统计学意义(*P*<0.05, 图1和表1); 与Hypoxia组相比, Evodiamine-L组、Evodiamine-M组、Evodiamine-H组的细胞活性、迁移细胞数均显著上升, 差异具有统计学意义(*P*<0.05, 图1和表1)。

2.2 吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞血管生成的影响

与Con组相比, Hypoxia组的VEGF蛋白表达均显著上升, 血管生成长度均显著上升, 差异具有统计学意义(*P*<0.05, 图2和表2); 与Hypoxia组相比, Evodiamine-L组、Evodiamine-M组、Evodiamine-H组的VEGF蛋白表达均显著上升, 血管生成长度均显著上升, 差异具有统计学意义(*P*<0.05, 图2和表2)。

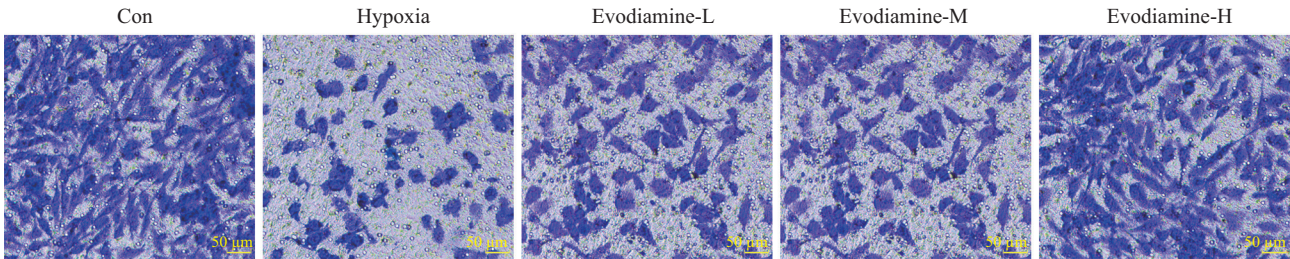


图1 吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞迁移的影响

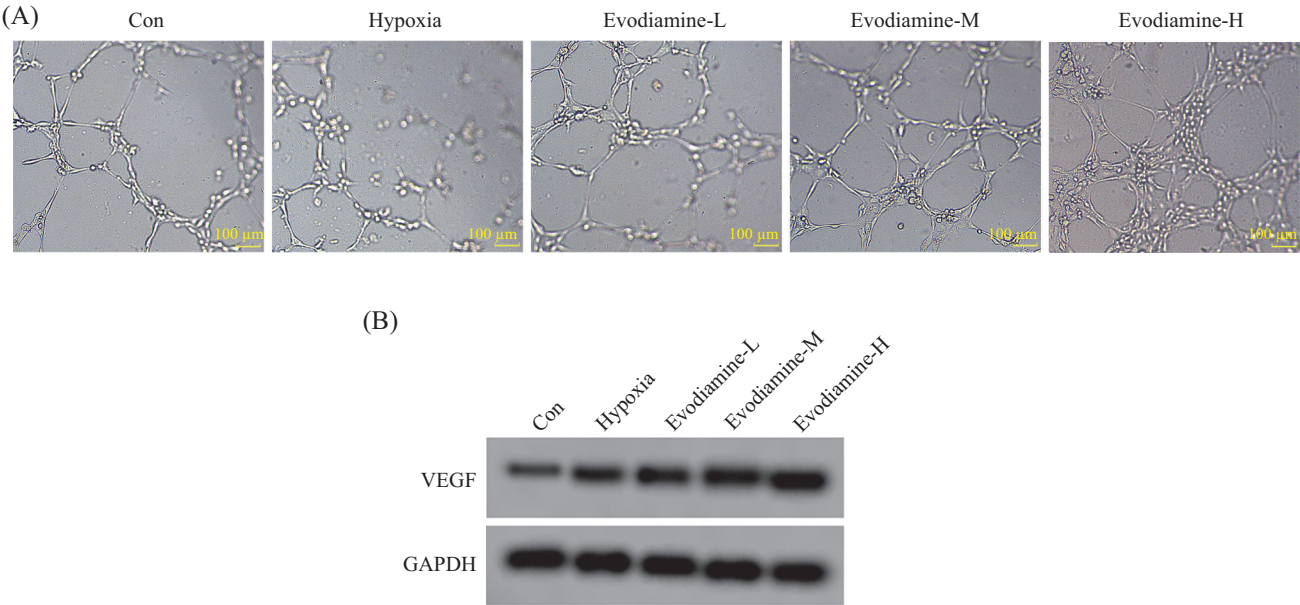
Fig.1 The effect of evodiamine on the migration of rat myocardial microvascular endothelial cells induced by hypoxia

表1 吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞增殖和迁移的影响

Table 1 Effect of Evodiline on the proliferation and migration of rat myocardial microvascular endothelial cells induced by hypoxia

分组 Group	细胞活性/% Cell viability/%		迁移细胞数 Number of migrating cells
	48 h	72 h	
Con	101.2±8.4	98.6±7.8	125.6±7.4
Hypoxia	42.3±3.8*	36.3±5.4*	47.1±3.2*
Evodiamine-L	56.4±4.3 [#]	49.3±4.2 [#]	61.3±5.5 [#]
Evodiamine-M	69.3±5.5 [#]	62.5±5.5 [#]	82.4±6.8 [#]
Evodiamine-H	82.9±7.1 [#]	75.3±6.1 [#]	107.4±6.1 [#]
<i>F</i>	127.786	148.823	261.557
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

**P*<0.05, 与Con组比较; [#]*P*<0.05, 与Hypoxia组比较。
**P*<0.05 compared with Con group; [#]*P*<0.05 compared with Hypoxia group.



A: 血管形成实验; B: VEGF蛋白表达。
A: angiogenesis experiment; B: VEGF protein expression.

图2 吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞血管生成的影响

Fig.2 The effect of evodiamine on the angiogenesis of rat myocardial microvascular endothelial cells induced by hypoxia

2.3 吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞内miR-223-3p表达的影响

与Con组相比, Hypoxia组的miR-223-3p表达水平显著上升, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 与Hypoxia组相比, Evodiamine-L组、Evodiamine-M组、Evodiamine-H组的miR-223-3p表达水平显著降低, 差异具

有统计学意义($P<0.05$, 表3)。

2.4 下调miR-223-3p对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞增殖和迁移的影响

与anti-miR-NC组相比, anti-miR-223-3p组的miR-223-3p表达水平显著降低, 细胞活性、迁移细胞数均显著上升, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 图3和表4)。

表2 吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞血管生成的影响

Table 2 Effect of Evodiline on the angiogenesis of rat myocardial microvascular endothelial cells induced by hypoxia

分组 Group	VEGF	血管生成长度/ μm Angiogenesis length / μm
Con	0.23 $\pm$ 0.02	532.1 $\pm$ 10.7
Hypoxia	0.42 $\pm$ 0.04*	733.5 $\pm$ 15.5*
Evodiamine-L	0.55 $\pm$ 0.04 [#]	921.6 $\pm$ 20.2 [#]
Evodiamine-M	0.63 $\pm$ 0.06 [#]	1 358.9 $\pm$ 26.4 [#]
Evodiamine-H	0.77 $\pm$ 0.08 [#]	1 563.2 $\pm$ 31.0 [#]
<i>F</i>	140.294	3 437.699
<i>P</i>	0.000	0.000

* $P<0.05$, 与Con组比较; [#] $P<0.05$, 与Hypoxia组比较。

* $P<0.05$ compared with Con group; [#] $P<0.05$ compared with Hypoxia group.

表3 吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞内miR-223-3p表达的影响

Table 3 Effect of Evodiline on the expression of miR-223-3p in rat myocardial microvascular endothelial cells induced by hypoxia

分组 Group	miR-223-3p
Con	0.99 $\pm$ 0.05
Hypoxia	2.25 $\pm$ 0.21*
Evodiamine-L	2.08 $\pm$ 0.28 [#]
Evodiamine-M	1.73 $\pm$ 0.06 [#]
Evodiamine-H	1.32 $\pm$ 0.12 [#]
<i>F</i>	85.891
<i>P</i>	0.000

* $P<0.05$, 与Con组比较; [#] $P<0.05$, 与Hypoxia组比较。

* $P<0.05$ compared with Con group; [#] $P<0.05$ compared with Hypoxia group.

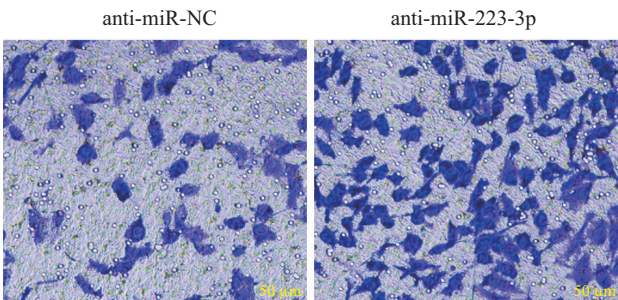


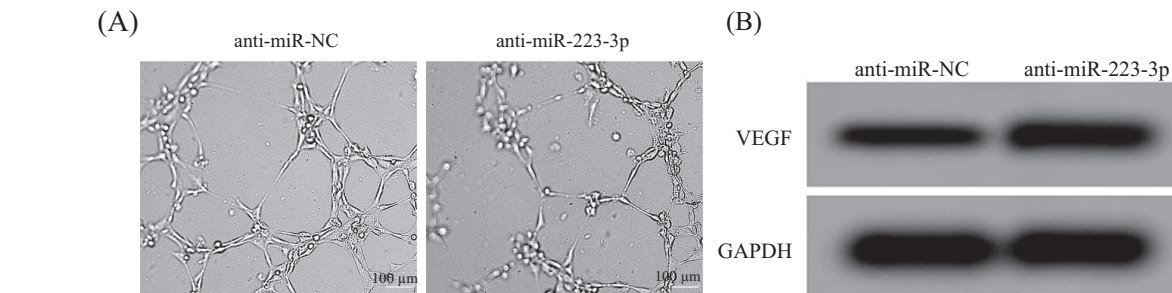
图3 下调miR-223-3p对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞迁移的影响

Fig.3 The effect of down-regulation of miR-223-3p on the migration of rat myocardial microvascular endothelial cells induced by hypoxia

表4 下调miR-223-3p对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞增殖和迁移的影响
Table 4 The effect of down-regulation of miR-223-3p on the proliferation and migration of rat myocardial microvascular endothelial cells induced by hypoxia

分组 Group	miR-223-3p	细胞活性/% Cell viability /%		迁移细胞数 Number of migrating cells
		48 h	72 h	
anti-miR-NC	1.01±0.08	45.3±4.1	38.5±3.2	48.3±4.0
anti-miR-223-3p	0.41±0.03*	78.5±7.4*	70.5±6.4*	85.2±6.5*
<i>t</i>	21.067	11.773	13.416	14.504
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

**P*<0.05, 与anti-miR-NC组比较。
**P*<0.05 compared with anti-miR-NC group.



A: 血管形成实验; B: VEGF蛋白表达。
A: angiogenesis experiment; B: VEGF protein expression.

图4 下调miR-223-3p对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞血管生成的影响
Fig.4 The effect of down-regulation of miR-223-3p on hypoxia-induced angiogenesis in rat myocardial microvascular endothelial cells

表5 下调miR-223-3p对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞血管生成的影响
Table 5 The effect of down-regulation of miR-223-3p on hypoxia-induced angiogenesis in rat myocardial microvascular endothelial cells

分组 Group	VEGF	血管生成长度/ μ m Angiogenesis length / μ m
anti-miR-NC	0.44±0.04	726.8±31.4
anti-miR-223-3p	0.62±0.05*	957.6±22.2*
<i>t</i>	8.433	18.005
<i>P</i>	0.000	0.000

**P*<0.05, 与anti-miR-NC组比较。
**P*<0.05 compared with anti-miR-NC group.

2.5 下调miR-223-3p对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞血管生成的影响

与 anti-miR-NC 组相比, anti-miR-223-3p 组的 VEGF 蛋白表达水平均显著上升, 血管生成长度均显著增加, 差异具有统计学意义(*P*<0.05, 图4和表5)。

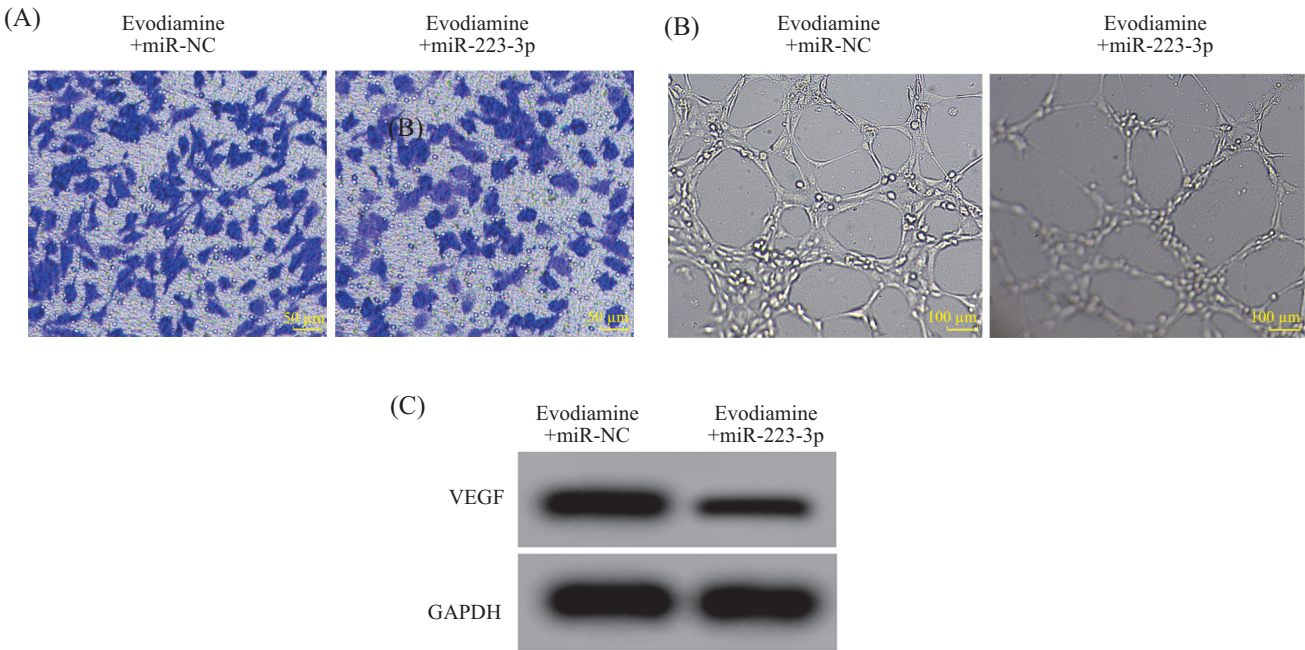
2.6 过表达miR-223-3p逆转了吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成的影响

与 Evodiamine+miR-NC 组相比, Evodiamine+miR-223-3p 组的 miR-223-3p 表达水平显著上升, 细胞活性、

迁移细胞数均显著降低, VEGF 蛋白表达水平均显著降低, 血管生成长度均显著减少, 差异具有统计学意义(*P*<0.05, 图5和表6)。

3 讨论

心肌微血管内皮细胞在心肌缺血再灌注损伤、心肌梗大等中具有重要的作用, 是心血管疾病的靶器官, 机体内缺氧、缺血可导致内皮细胞增殖、迁移、黏附能力减弱^[9-10]。血管生成受多种生长因子的调节, 生理过程较为复杂, 血管生成在肿瘤和疾病的生



A: 迁移实验; B: 血管形成实验; C: VEGF蛋白表达。
A: migration experiment; B: blood vessel formation experiment; C: VEGF protein expression.

图5 过表达miR-223-3p逆转了吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞迁移、血管生成的影响

Fig.5 Overexpression of miR-223-3p reversed the effects of evodiamine on the migration and angiogenesis of rat cardiac microvascular endothelial cells induced by hypoxia

表6 过表达miR-223-3p逆转了吴茱萸碱对缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成的影响

Table 6 Overexpression of miR-223-3p reversed the effects of evodiamine on the proliferation, migration and angiogenesis of rat cardiac microvascular endothelial cells induced by hypoxia

分组 Group	miR-223-3p	细胞活性/% Cell viability /%		迁移细胞数 Number of mi- grating cells	VEGF	血管生长长度/ μm Angiogenesis length / μm
		48 h	72 h			
Evodiamine+miR-NC	1.00 $\pm$ 0.06	81.4 $\pm$ 7.5	76.5 $\pm$ 6.1	103.5 $\pm$ 9.0	0.77 $\pm$ 0.06	1 558.9 $\pm$ 26.8
Evodiamine+miR-223-3p	2.77 $\pm$ 0.24*	63.4 $\pm$ 5.2*	55.4 $\pm$ 4.6*	85.2 $\pm$ 7.3*	0.49 $\pm$ 0.05*	1 057.7 $\pm$ 20.7*
<i>t</i>	21.464	5.917	8.285	4.738	10.755	44.402
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

* $P<0.05$, 与Evodiamine+miR-NC组比较。
* $P<0.05$ compared with Evodiamine+miR-NC group.

长和转移过程起到重要作用^[11]。研究发现, VEGF是诱导肿瘤血管生成能力最强且特异性较高的一种促进血管生成的因子, 能促进血管内皮细胞血管生成, 参与内皮细胞的发展^[12]。因此, 本研究将大鼠心肌微血管内皮细胞通过缺氧处理, 观察缺氧对心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管形成的影响, 发现缺氧能降低细胞活性, 减少迁移细胞数, 增加血管生长长度, 增加VEGF蛋白表达水平, 说明缺氧能降低大鼠心肌微血管内皮细胞增殖、迁移能力, 这与上述^[9-10]的研究结果相似, 提示其具有促进血管生成能力。

吴茱萸化学成分丰富, 其中包括生物碱、萜类、

柠檬苦素、挥发油等, 吴茱萸碱是从吴茱萸生物碱内提取分离而来的, 生物活性较强、毒副作用低是其特点, 现代药理学证明其具有抗肿瘤、调节血压、舒张血管、保护内皮细胞等作用^[6,13]。吴茱萸碱被广泛用于心血管疾病的治疗中, 且效果作用明显, 如吴茱萸生物碱类(吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸总碱)能减缓血管紧张素II(angiotensinogen, AngII)诱导的心肌细胞肥大^[14]。吴茱萸碱还能抑制AngII诱导的血管平滑肌细胞增殖, 增加MKP-1蛋白表达水平^[15]。本研究通过不同浓度吴茱萸碱处理缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞, 验证吴茱萸碱对缺氧

诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管形成的影响, 结果显示, 吴茱萸碱能增加缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞增殖活性、迁移细胞数, 增加血管生成长度, 上调VEGF蛋白表达, 且呈剂量依赖性, 说明吴茱萸碱能促进缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成, 对心血管疾病具有一定作用效果。

miR-223基因(主要包括miR-223-3p和miR-223-5p)在内皮细胞、血小板内含量丰富, 能调控多种mRNA参与心血管疾病发生和发展的过程, 如增殖、转移、心肌代谢、血管生成等^[16-17]。有研究结果显示, miR-223在血小板衍生生长因子-BB(platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)诱导的人主动脉平滑肌细胞中表达下调, 过表达miR-223抑制了PDGF-BB诱导的人主动脉平滑肌细胞增殖和迁移^[18]。DAI等^[19]研究结果显示, miR-223-3p在缺血心肌微血管内皮细胞中表达上调, 芪参益气滴丸通过下调miR-223-3p的表达促进大鼠缺血心肌微血管内皮细胞血管生成。本研究结果显示, 缺氧能增加大鼠心肌微血管内皮细胞miR-223-3p的表达水平, 这与上述研究结果相似^[19], 说明miR-223-3与心血管疾病发展有关。用anti-miR-223-3p转染缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞, 观察下调miR-223-3对缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管形成的作用, 结果发现下调miR-223-3p能促进缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成能力。本研究采用不同浓度吴茱萸碱处理缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞观察miR-223-3p表达情况, 并验证吴茱萸碱是否能调控miR-223-3p, 结果显示, 吴茱萸碱能下调缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞的miR-223-3p表达, 说明吴茱萸碱能下调miR-223-3p表达。为了验证吴茱萸碱可能通过调控miR-223-3p表达影响缺氧诱导大鼠心肌微血管内皮细胞的生物学功能, 进一步实验结果显示, 过表达miR-223-3p可以逆转吴茱萸碱对缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成的影响。

综上所述, 吴茱萸碱能促进缺氧诱导的大鼠心肌微血管内皮细胞的增殖、迁移和血管生成, 其作用机制可能与下调miR-223-3p表达有关。当然本实验也存在不足之处, 关于miR-223-3p通过下游靶基因或信号通路对内皮细胞的作用机制, 需要我们进行后一步的实验探究。

参考文献 (References)

- [1] FRANK A, BONNEY M, BONNEY S, et al. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside [J]. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 2012, 16(3): 123-32.
- [2] DIAO L W, BAI L, JIANG X P, et al. Long-chain noncoding RNA GAS5 mediates oxidative stress in cardiac microvascular endothelial cells injury [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17649-62.
- [3] 曾超, 姚远, 范智文, 等. 藏红花素对心肌微血管内皮细胞缺氧复氧损伤的保护作用研究[J]. *今日药学*(ZENG C, YAO Y, FAN Z W, et al. Protective effect of crocin against hypoxia-reoxygenation injury of cardiac microvascular endothelial cells [J]. *Pharmacy Today*), 2019, 29(10): 669-72,83.
- [4] 王嫣, 彭芳, 陈天琪. 吴茱萸对心血管系统的作用研究进展[J]. *中药药理与临床*(WANG Y, PENG F, CHEN T Q, et al. Research progress of Evodiae pharmacological effect in cardiovascular system [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*), 2018, 34(6): 189-92.
- [5] 吴梅青, 王姣, 唐海飞. 吴茱萸生物碱类在心脑血管系统疾病中的研究进展[J]. *亚太传统医药*(WU H Q, WANG J, TANG H F. Recent advances of alkaloids from Evodia fructus on cardiovascular and cerebrovascular diseases effects [J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*), 2020, 16(11): 194-7.
- [6] 吴青青, 唐其柱. 吴茱萸碱对心肌细胞缺血损伤的研究[J]. *中国药师*(WU Q Q, TANG Q Z. Effect of evodiamine on hypoxia induced cardiomyocytes injury [J]. *China Pharmacist*), 2018, 21(2): 193-7.
- [7] YAN P, SUN C, MA J L, et al. MicroRNA-128 confers protection against cardiac microvascular endothelial cell injury in coronary heart disease via negative regulation of IRS1 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 13452-63.
- [8] DAI G H, MA P Z, SONG X B, et al. MicroRNA-223-3p inhibits the angiogenesis of ischemic cardiac microvascular endothelial cells via affecting RPS6KB1/hif-1a signal pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e108468.
- [9] 辛毅, 许秀芳, 黄益民, 等. 小鼠心肌微血管内皮细胞的原代培养及生物学特性[J]. *中国病理生理杂志*(XIN Y, XU X F, HUANG Y M, et al. Biological characteristics of primary cultured microvascular endothelial cells in mouse myocardium [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*), 2013, 29(3): 565-70.
- [10] 蔡梅峰, 崔永生, 何文凯, 等. 高糖、低氧对大鼠心肌微血管内皮细胞新生功能影响的体外研究[J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*(CAI M F, CUI Y S, HE W K, et al. Effect of high glucose and hypoxia on the neogenesis function of rat myocardial microvascular endothelial cells *in vitro* [J]. *Journal of Jinan University, Natural Science & Medicine Edition*), 2019, 40(2): 109-16.
- [11] MA Q, REITER R J, CHEN Y D. Role of melatonin in controlling angiogenesis under physiological and pathological conditions [J]. *Angiogenesis*, 2020, 23(2): 91-104.
- [12] CLAESSON-WELSH L, WELSH M. VEGFA and tumour angiogenesis [J]. *J Intern Med*, 2013, 273(2): 114-27.
- [13] 张志仙, 蒋美玲, 王欣慧, 等. 吴茱萸碱的药理学研究进展[J]. *现代生物医学进展*(ZHANG Z X, JIANG M L, WANG X H, et al. Progress on pharmacological effect of evodiamine [J]. *Progress in Modern Biomedicine*), 2014, 14(21): 4189-91,95.
- [14] 林淑娟, 李利生, 张婧怡, 等. 吴茱萸生物碱类抑制大鼠心

- 肌细胞肥大作用的比较[J]. 华西药理学杂志(LIN S X, LI L S, ZHANG J Y, et al. Comparison of the anti-cardiomyocyte hypertrophy effect of alkaloids isolated from *Evodia rutaecarpa* in rat cultured cardiomyocytes [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences), 2017, 32(1): 31-3.
- [15] 侯化化, 徐洋, 李强, 等. 吴茱萸碱抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖及对细胞外信号调节激酶-1表达的影响[J]. 中国现代医学杂志(HOU H H, XU Y, LI Q, et al. Inhibition of evodiamine on rat vascular smooth muscle cells the proliferation and impact on ERK-1 expression [J]. China Journal of Modern Medicine), 2014, 24(35): 5-9.
- [16] 孙垭娉, 张俊峰. miR-223在心血管疾病中的研究进展[J]. 心脏杂志(SUN Y P, ZHANG J F. Research progress of miR-223 in cardiovascular diseases [J]. Chinese Heart Journal), 2019, 31(1): 89-93.
- [17] WANG X H, HUANG W, YANG Y, et al. Loss of duplexmiR-223 (5p and 3p) aggravates myocardial depression and mortality in polymicrobial sepsis [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(5): 701-11.
- [18] SU F F, SHI M Q, ZHANG J, et al. MiR-223/NFAT5 signaling suppresses arterial smooth muscle cell proliferation and motility *in vitro* [J]. Aging, 2020, 12(24): 26188-98.
- [19] DAI G H, LIU N, ZHU J W, et al. Qi-shen-yi-qi dripping pills promote angiogenesis of ischemic cardiac microvascular endothelial cells by regulating microRNA-223-3p expression [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 5057328.