

连梅方含药血清抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞泡沫化及机制研究

王光明¹, 李明强², 王 琪², 邓长生², 朱 伟³ (1. 广东省食品药品职业学院, 广东 广州 510663; 2. 广东新南方青蒿科技有限公司, 广东 广州 510410; 3. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120)

摘要: **目的** 观察连梅方含药血清是否能够减缓泡沫细胞的形成, 并探讨其作用机制。 **方法** 采用氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导小鼠 RAW 264.7 巨噬细胞建立泡沫化模型, 制备不同浓度的连梅方含药血清, 将不同浓度的含药血清作用于 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞, 用油红 O 染色法观察细胞泡沫化程度, 通过 RT-PCR、Western Blot 检测 B 类 I 型清道夫受体(scavenger receptor class B type I, SR-B1)及 CD36 mRNA 和蛋白表达情况。 **结果** 细胞油红 O 染色显示, 镜下可观察到染色后的红色脂滴随连梅方含药血清浓度的升高而减少。连梅方含药血清组 SR-B1 的 mRNA 和蛋白表达明显升高, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); CD36 的 mRNA 和蛋白表达明显降低, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。 **结论** 连梅方含药血清可抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞泡沫化, 其机制与连梅方含药血清调节 SR-B1 及 CD36 的表达有关。

关键词: 连梅方; 泡沫细胞; 氧化型低密度脂蛋白; SR-B1; CD36

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)05-

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.05.0

Lianmeifang drug-containing serum attenuates ox-LDL induced mitochondrial injure in RAW264.7 cells and its mechanisms

Wang Guangmin¹, LI Mingqiang², Wang Qi², Deng Changsheng, Zhu Wei³,

1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong province, 510663;

2. Artepharm Company Limited, Guangzhou, Guangdong province, 510410;

3. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou university of Chinese medicine, Guangzhou, Guangdong province, 510120

[Abstract] Objective To investigate the effects of Lianmeifang drug-containing serum on foam cell formation and the expression of B type I scavenger receptor (SR-B1) and CD36. Methods The ox-LDL was used to induce the foam cell model in RAW264.7 cell. The morphological change of foam cells was observed by oil red O staining. The levels of SR-B1 and CD36 mRNA were measured by Real-Time PCR. The expression of SR-B1 and CD36 were detected by Western blot. Results Compared with the control group, Lianmeifang drug-containing serum reduced aggregation of lipid drops in foam cell. Lianmeifang drug-containing serum up-regulated the expression of SR-B1 mRNA and protein ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and down-regulate the expression of CD36 mRNA and protein significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Conclusion Lianmeifang drug-containing serum can effectively inhibit the formation of foam cells by ox-LDL. It may partially related to regulation of SR - B1 and CD36 expression.

[Key words] Lianmeifang; Foam cells; ox-LDL; SR-B1; CD36

收稿日期: 2017-04-20

作者简介: 王光明, 男, 副教授, 研究方向: 中药药理学。Email: wanggm@gdyzy.edu.cn。通信作者: 朱伟, 男, 研究员, 研究方向: 中药复方药理学, Email: zhuwei9201@163.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(2013B021800173); 广州中医药大学 2017 年高水平大学建设项目、扬帆计划引进创新创业团队专项资助(2014YT02S008)。

数据表明,动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)易损斑块破裂引发了 70 %~80 %心肌梗死、脑血栓等急性心脑血管事件,稳定易损斑块是临床上防治心脑血管急性事件发生的重要目标。由于 AS 易损斑块具有多血管、多病灶的特点,因此,全身药物治疗十分重要^[1-3]。连梅方是第三届国医大师伍炳彩教授的经验方,由黄连、乌梅、麦冬、生地、阿胶、黄芪、山药等组成。临床观察结果显示,连梅方治疗 AS 临床疗效确切,但其分子机制上不明确。本研究采用血清药理学方法,以连梅方为研究对象,观察其对巨噬细胞泡沫化的影响,探讨其作用机制,为连梅方的临床应用和新药研发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 健康 SD 大鼠 40 只, SPF 级, 雄性, 体重(200 ± 20) g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK(粤)2013-0034, 在广州中医药大学科技产业园动物房饲养供实验用, 使用许可证号: SYXK(粤)2013-0014。

1.2 试剂 氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), 奕源生物, 批号: 20160512; DMEM, 美国 Gibicol, 批号: 8116027; 胎牛血清(FBS), 美国 Gibicol, 批号: 1545515; 一抗: SR-B1, 美国 NOVUS Biologicals, 批号: GR149558-14; CD36, 美国 NOVUS Biologicals, 批号: I-4; 二抗: Anti-Rabbit IgG, 美国 Cell Signaling technology, 批号: 4413; 内参: β -Actin, 美国 Cell Signaling technology, 批号: 4970; 其他试剂均为分析纯。

1.3 药品的制备 连梅方由黄连、乌梅、麦冬、生地、黄芪、山药等中药组成, 所有药材均购于康美药业股份有限公司, 经广州中医药大学第二临床医学院陈燕芬主任中药师鉴定, 均符合《中国药典》2015 年版的要求, 按照传统方法进行水煎煮, 煎液喷雾干燥, 1 g 干燥粉末相当于 2.60 g 生药, -4 °C 冰箱保存待用。

1.4 仪器与设备 荧光定量基因扩增仪(美国 ABI Applied Biosystems); PCR 仪(美国 ABI Applied Biosystems); 倒置显微镜(日本 Olympus); 多功能酶标仪(瑞士 Tecan); 细胞培养箱(美国 Thermo Scientific); 多功能冷冻台式离心机(美国 Beckman coulter); 纯水机(美国 Millipore)。

1.5 连梅方含药血清的制备 选取雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 采用随机数字表法分为 4 组, 每组 10 只, 分别为连梅方高、中、低剂量组(6.09, 3.06, 1.02

$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、空白对照组(生理盐水)。于每天上午 9:00 开始灌胃, 共 7 d。每只大鼠按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃, 灌胃前大鼠称量体质量, 灌胃结束后 1 h 腹主动脉取血, 室温静置 1 h 左右后, 放置于 4 °C 过夜保存, 第 2 天用冷冻离心机 4 °C, $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 15 min 取上层血清, 56 °C 灭活, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤器过滤后 -80 °C 冻存备用, 各组血清均在制备后 1 个月内使用。

1.6 细胞培养及实验分组 小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7 株购自中山大学动物中心实验室。RAW264.7 细胞培养于 37 °C、5 % CO_2 细胞培养箱中, 细胞培养条件: 高糖培养基 DMEM、加入 10 % 胎牛血清 FBS、1 % 双抗(青霉素和链霉素)。巨噬细胞生长至培养皿 80 %~90 % 左右, 按照 1:4 的比例进行传代。取对数生长期的细胞进行实验, 以适宜的细胞密度进行种板, 待 12 h 细胞贴壁后, 弃去旧培养液, 加入各组血清及 ox-LDL ($80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 培养 24 h 后, 进行后续实验^[6]。分组为: 空白对照组、模型组(完全培养液 + $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ox-LDL)、空白血清组(20 % 空白血清 + $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ox-LDL)、连梅含药血清低、中、高剂量组(20 % 连梅含药血清低、中、高剂量 + $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ox-LDL)。

1.7 油红 O 染色 RAW 264.7 经 1.6 步骤后, 先用 4 % 多聚甲醛室温固定 30 min, 再用油红 O 试剂盒方法染色, 在显微镜下观察并拍照。

1.8 Real-time PCR 方法检测 CD36 及 SR-B1 mRNA 的表达 Trizol 法提取 RAW 264.7 细胞总 RNA, 并采用紫外分光光度计测定纯度及浓度, 按 Invitrogen 逆转录试剂盒说明书进行操作, 反应条件: 37 °C 孵育 2 h, 95 °C 5 min 终止反应。采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 由上海生物工程公司合成纯化, CD 36 上游引物: 5'-GAACCTATTGAAGGC-TTACATCC-3'; 下游引物: 5'-CCCAGTCACTTGTG-TTTTGAAC-3'。SR-B1 上游引物: 5'-CTCCCAGACATGCTTCCCATA-3'; 下游引物 5'-GTCAGCTTCATGGACCTGCA-3'。GAPDH 上游引物: 5'-TTTGTCAAGCTCATTTCTGCTATG-3'; 下游引物: 5'-TGGG-ATAGGGCCTCTCTTGC-3'。PCR 反应体系按 Universal SYBR Green Supermix 2 × Utag PCR MAster 说明书配制。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 57 °C 退火/延伸 30 s, 45 个循环; 60 °C ~ 95 °C 溶解曲线分析 60 s。以 10 倍梯度稀释 cDNA 获得 6 个质量浓度梯度的标准品, 分别对目的基因和

内参基因制作标准曲线。标准品和待测样品同时进行扩增。目的基因 Ct 值代入目的基因的扩增直线方程,计算出“起始模板浓度”,同理算出内参基因的“起始模板浓度”。同一样品的目的基因定量值除以内参基因定量值即该样品相对表达量。

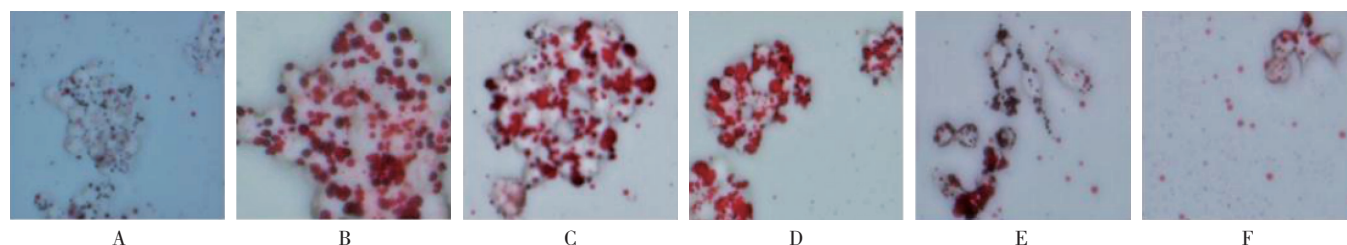
1.9 Western blot 方法检测 CD36 及 SR-B1 蛋白的表达 参考文献方法^[4],分别收取 6 组细胞,根据细胞量加入相应的蛋白裂解液,提取细胞总蛋白。将各组提取到蛋白的缓冲液分别转移到 1.5 mL 管中,在 14000 r·min⁻¹ 转速下离心 15 min,将上清液转移到新的 1.5 mL 管中。BCA 法检测蛋白含量,样品蛋白上样量为 40 μg,将提取好样品的蛋白溶液和上样缓冲液按 4 : 1 混合,100 ℃变性 5 min,4 ℃备用。制备 8 %分离胶和 5 %浓缩胶,上样电泳,400 mA 转膜 100 min,5 %脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,TBST 液洗膜 3 次,每次 5 min。一抗 4 ℃过夜,

TBST 液洗膜 3 次后将相应的二抗室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,将显影液与定影液等体积混合,均匀地涂在 PVDF 膜上,立即进行显影。显影后用凝胶成像分析系统扫描分析,以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参照,以相应蛋白灰度结果与 β-actin 的比值作为相对表达量进行统计分析。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析,结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,2 组间差异比较采用 *t* 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 油红 O 染色 油红 O 染色法可以直接观察巨噬细胞内脂质蓄积情况,结果显示,空白组只有少量红色脂滴,模型组细胞内中则有大量红色脂滴,与模型组相比,连梅方含药血清各剂量组的红色脂滴明显减少,且浓度越高,作用越明显,详见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 连梅方含药血清空白组 +ox-LDL 组; D. 连梅方含药血清低剂量组 +ox-LDL 组; E. 连梅方含药血清中剂量组 +ox-LDL 组; F. 连梅方含药血清高剂量组 +ox-LDL 组

图 1 油红 O 染色

Figure 1

2.2 连梅方含药血清对 SR-B1 及 CD36 mRNA 表达的影响 如表 1 所示,与空白对照组比较,模型组和空白血清组 SR-B1 的 mRNA 表达量均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,连梅方含药血清组 SR-B1mRNA 表达量均有明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),且存在一定的量效关系。与空白对照组比较,模型组和空白血清组 CD36 的 mRNA 表达量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,连梅方含药血清组 CD36 的 mRNA 表达量则有明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

2.3 连梅方含药血清对 SR-B1 及 CD36 蛋白表达的影响 与空白对照组比较,模型组和空白血清组 SR-B1 的蛋白表达量均明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,连梅方含药血清中、高剂量组 SR-B1 的蛋白表达量均明显增加,差异有

表 1 对巨噬细胞 SR-B1、CD36 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1

组别	剂量	SR-B1	CD36
空白对照组	-	1.03 ± 0.30	1.01 ± 0.12
模型组	-	20.20 ± 8.30**	2.65 ± 0.11**
空白血清组	-	21.48 ± 7.84**	2.32 ± 0.09**
连梅含药血清低剂量组	6.09	51.66 ± 9.18 ^{##}	1.21 ± 0.09 ^{##}
连梅含药血清中剂量组	3.06	86.80 ± 12.51 ^{##}	1.15 ± 0.12 ^{##}
连梅含药血清高剂量组	1.02	131.63 ± 25.50 ^{##}	1.04 ± 0.06 ^{##}

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

统计学意义($P < 0.01$),且随着药物浓度越高作用效果越明显。与空白对照组比较,模型组和空白血清组 CD36 的蛋白表达量明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,连梅方含药血清低、中、高剂量组 CD36 的蛋白表达量则显著降低,差异有统

计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 2 和表 2。

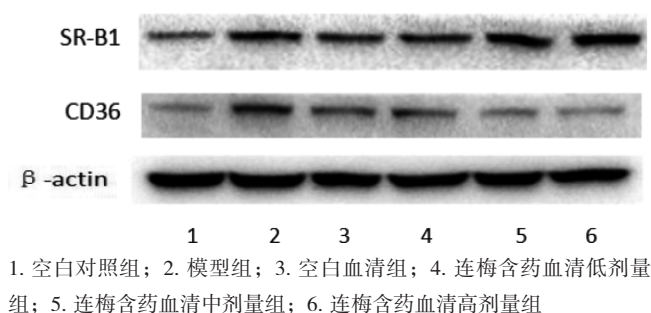


图 2 连梅方含药血清对 SR-B1 及 CD36 蛋白表达的影响

Figure 2

表 2 连梅颗粒含药血清对巨噬细胞 CD36 及 SR-B1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2

组别	剂量	SR-B1	CD36
空白对照组	-	0.35 ± 0.05	0.20 ± 0.03
模型组	-	$0.73 \pm 0.08^{**}$	$0.71 \pm 0.05^{**}$
空白血清组	-	$0.65 \pm 0.07^{**}$	$0.59 \pm 0.06^{**}$
连梅含药血清低剂量组	6.09	0.78 ± 0.12	$0.46 \pm 0.08^{\#}$
连梅含药血清中剂量组	3.06	$1.77 \pm 0.10^{\#\#}$	$0.31 \pm 0.05^{\#\#}$
连梅含药血清高剂量组	1.02	$2.83 \pm 0.07^{\#\#\#}$	$0.23 \pm 0.02^{\#\#\#}$

注: 与空白对照组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

3 讨论

随着我国人民生活水平的不断提高和饮食习惯的改变, AS 已经成为严重危害民众健康的重大疾病之一。研究表明, AS 易损斑块的稳定性是影响急性心脑血管事件的决定性因素, 一旦易损斑块破裂, 形成血栓阻塞血管, 就会诱发致命的急性心脑血管事件。大规模的流行病学结果显示, 我国心血管病死亡率居首位, 远高于肿瘤和其他疾病, 占居民疾病死亡构成的 40 % 以上^[5]。在 AS 的早期, 巨噬细胞黏附于血管内皮细胞, 并迁入内皮下摄取脂质转化为泡沫细胞, 药物治疗是稳定 AS 易损斑块的主要治疗措施, 目前发现他汀类药物、抗氧化剂、血管紧张素转换酶抑制剂等具有一定的斑块稳定作用, 其中他汀类药物的疗效最为确切, 但是其引发的肝毒性、横纹肌溶解等副作用使不少患者不得不停药。很多科学家就把研究的重点放在中药上。连梅方是伍炳彩教授由《温病条辨》的连梅汤化裁而来, 组方遣药精练老道, 于酸甘之中佐以辛甘, 大剂凉药之中辅以微温之品, 则有养阴而不碍阳, 清热兼能制寒。初步临床观察结果显示, 连梅方具有良好的抗 AS 作用, 但具体机制尚不清楚, 值得进一步深入研

究。

ox-LDL 是由亲水表面层及疏水核心组成的多分子复合物, ox-LDL 与巨噬细胞表面的清道夫受体结合而被摄取, 巨噬细胞超负荷启动吞噬功能最终形成泡沫细胞死亡, 大量死亡的泡沫细胞聚集形成脂池, 形成 AS 的早期病变, 这是 AS 形成的核心环节^[6-8]。本实验结果表明, 经 ox-LDL 刺激 12 h 后, 巨噬细胞发生明显变化, 脂质沉积严重, 形成典型的泡沫细胞。连梅方干预后, 抑制了巨噬细胞对 ox-LDL 的摄取, 泡沫细胞明显减少, 且呈剂量依赖性, 这说明连梅方对 ox-LDL 诱导的细胞泡沫化有显著地抑制作用进而延缓 AS 的进展。ox-LDL 的致 AS 程度不仅决定于其自身水平, 还取决于其受体及受体后效应的变化, 经典 ox-LDL 受体是清道夫受体, 其主要功能是摄取修饰后的 LDL, B 类清道夫受体是 ox-LDL 代谢中的重要受体蛋白, 其中 SR-B1 和 CD36 这两种蛋白最为重要。SR-B1 是位于细胞表面的一种呈马蹄形结构的糖蛋白, 其定位于细胞表面富含糖脂和胆固醇的小窝, SR-B1 上的配体结合位点具有多样性和重叠性, 不但能介导高密度脂蛋白胆固醇进入细胞, 而且能使细胞内游离胆固醇流出, 从而发挥良好的抗 AS 作用^[9]。而 CD36 则介导 50 % -60 % 的 ox-LDL 的内吞, 同时诱导 CD36 的正反馈表达, 使细胞内的胆固醇不断积累, 促进巨噬细胞泡沫化^[10-11]。本研究结果显示, ox-LDL 诱导的泡沫细胞表面 SR-B1 和 CD36 的 mRNA 和蛋白表达量明显增高, 连梅方含药血清干预后, SR-B1 的 SR-B1 mRNA 和蛋白表达量表达明显增加, 而 CD36 的 mRNA 和蛋白表达量明显降低, 这提示连梅方抗泡沫细胞形成的机制可能是通过上调 SR-B1 和下调 CD36 有关。本研究结果可为连梅方的临床应用提供实验数据, 并为其新药开发提供依据。但由于条件限制, 本研究没有专门设立阳性药物对照组, 因此还有很多科学问题有待解答, 如和现有的西药相比, 连梅方的药效是否具有优势? 连梅方和西药联用, 是否能够起到增效作用? 这些都有待本课题组的进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Chen YC, Huang AL, Kyaw TS, et al. Atherosclerotic Plaque Rupture: Identifying the Straw That Breaks the Camel's Back [J]. Arterioscler Thromb VASc Biol, 2016, 36(8): e63-72.
- [2] Takayama T, Komatsu S, Ueda Y, et al. Comparison of the Effect of Rosuvastatin 2.5 mg vs 20 mg on Coronary Plaque Determined by

- Angioscopy and Intravascular Ultrasound in Japanese With Stable Angina Pectoris (from the Aggressive Lipid-Lowering Treatment Approach Using Intensive Rosuvastatin for Vulnerable Coronary Artery Plaque [ALTAIR] Randomized Trial)[J]. *Am J Cardiol*, 2016, 117(8): 1206-1212.
- [3] Chistiakov DA, Myasoedova VA, Revin VV, et al. The phenomenon of atherosclerosis reversal and regression: Lessons from animal models [J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 102(1): 138-145
- [4] 龙香菊、孙亚楠、刘喆, 等. Ox-LDL 受体 CD36 与糖尿病大鼠肾小管损伤的关系[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2016, 32(7): 602-606.
- [5] 隋辉, 陈伟伟, 王文. 《中国心血管病报告 2015》要点解读[J]. *中国心血管杂志*, 2016, 21(4): 259-261.
- [6] Huang YQ1, Cai AP, Chen JY, et al. The relationship of plasma miR-29a and oxidized low density lipoprotein with atherosclerosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(6): 1521-1528
- [7] Su G, Sun G, Liu H, et al. Niacin suppresses progression of atherosclerosis by inhibiting vascular inflammation and apoptosis of vascular smooth muscle cells[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 4081-4089.
- [8] Yu XH, Fu YC, Zhang DW, et al. Foam cells in atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 424: 245-52
- [9] Trigatti BL. SR-B1 and PDZK1: partners in HDL regulation[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2017, 28(2): 201-208
- [10] Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, et al. How do macrophages sense modified low-density lipoproteins[J]. *Int J Cardiol*, 2017, 230: 232-240
- [11] 刘庆艳、白静、王禹. 清道夫受体 CD36 在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2017, 19(2): 206-207.
- (编辑: 宋威)