

川芎嗪对巨噬源性泡沫细胞形成的抑制作用研究

于妍*(甘肃省中医院心血管病防治中心,兰州 730050)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3096-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.22

摘要 目的:研究川芎嗪对巨噬源性泡沫细胞形成的抑制作用及其可能的作用机制。方法:将人急性单核细胞白血病细胞株1(THP-1)与160 nmol/L佛波酯(PMA)孵育24 h,使之分化为巨噬细胞;再将巨噬细胞与80 mg/L氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)培养液孵育24 h,使之向泡沫细胞转化;再将上述细胞随机分为空白对照(ox-LDL)组、模型(Ang II)组、阳性对照(缬沙坦)组和川芎嗪低、中、高浓度(质量浓度分别为0.025、0.05、0.1 g/L)组,各组细胞分别与80 mg/L ox-LDL培养液孵育48 h后,采用油红O染色观察巨噬源性泡沫细胞转化率,酶化学法测定细胞内胆固醇含量,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法和Western blot法分别检测酰基辅酶A-胆固醇酰基转移酶1(ACAT-1)mRNA、蛋白的表达。结果:与空白对照组比较,模型组巨噬源性泡沫细胞转化率升高,细胞内胆固醇含量增加,ACAT-1 mRNA、蛋白的表达均增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组与川芎嗪低、中、高浓度组泡沫细胞转化率降低,细胞内胆固醇含量减少,ACAT-1 mRNA、蛋白的表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:川芎嗪可抑制巨噬细胞分化为泡沫细胞。其可能的作用机制为通过抑制ACAT-1的表达、降低细胞内胆固醇含量,从而减少巨噬源性泡沫细胞形成。

关键词 川芎嗪;巨噬源性泡沫细胞;血管紧张素II;酰基辅酶A-胆固醇酰基转移酶1

Study on the Inhibitory Effect of Ligustrazine on the Formation of Macrophage-derived Foam Cells

YU Yan(Cardiovascular Disease Prevention Center, Gansu Provincial Hospital of TCM, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effect of ligustrazine on the formation of macrophage-derived foam cells and its possible mechanism. METHODS: Human acute mononuclear cells (THP-1) were incubated with 160 nmol/L phorbol ester (PMA) for 24 h to differentiate into macrophages; and the macrophages were incubated with oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) culture solution containing 80 mg/L for 24 h to differentiate into macrophage-derived foam cells. And then the cells were randomly divided into blank control group (ox-LDL), model (Ang II) group, positive control (valsartan) group, and ligustrazine low, medium and high concentration groups (the mass concentration were 0.025, 0.05 and 0.1 g/L). After all cells were respectively incubated with 80 mg/L ox-LDL culture solution for 48 h, oil red O staining was adopted to observe the transformation rate of foam cells, enzyme chemical method was used to determine the content of cholesterol, and real-time quantitative polymerase chain (RT-PCR) and Western blot were conducted to detect expression levels of Acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) mRNA and its protein. RESULTS: Compared with blank control group, the transformation rate of foam cells and content of cholesterol in model group were increased, and the expression levels of ACAT-1 mRNA and its protein were obviously strengthened, with significant differences ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with model group, the transformation rate of foam cells and content of cholesterol in positive control group (valsartan) and ligustrazine low, medium and high concentration groups were decreased, and the expression levels of ACAT-1 mRNA and its protein were obviously weakened, with significant differences ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: Ligustrazine can inhibit the macrophages differentiating into foam cells, by a mechanism that may be related to inhibiting expression of ACAT-1, and reducing content of cholesterol to reduce formation of foam cells.

KEYWORDS Ligustrazine; Macrophage-derived foam cells; Angiotensin II; Acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase-1

目前,心脑血管疾病的发病率、复发率、致残率及病死率均很高,而动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是这类疾病的共同病理基础。在AS斑块中,巨噬细胞由于摄取了过多的胆固醇而形成泡沫细胞,这类巨噬源性泡沫细胞是AS斑块形成和发展过程中的主要细胞类型,也是AS早期特征^[1]。中医理论认为AS的发生与痰浊、血瘀密切相关^[2]。川芎嗪是活血化瘀中药川芎中提取的生物碱,是川芎主要有效成分之一,在抗AS方面具有显著作用^[3]。本试验以人急性单核细胞白血病细胞株1(THP-1)为研究对象,观察巨噬源性泡沫细胞形成中细胞内胆固醇含量及酰基辅酶A-胆固醇酰基转移酶1(ACAT-1)表达的变化情况,并在此基础上给予川芎嗪干预,初步探讨川芎嗪在巨噬源性泡沫细胞形成过程中的调节作用及其可能的

机制。

1 材料

1.1 仪器

SVE-4A1型超净工作台(新加坡Esco公司);HERAcell 150i型CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司);Biofuge 28RS型低温高速离心机(德国Heraeus公司);4000B型倒置相差显微镜及成像系统(德国Leica公司);Clinicbio128C型酶标仪(澳大利亚Asys Hitech公司);GeneAmp 2400型聚合酶链反应(PCR)系统(美国Perkin Elme公司);Mx3000P/3005P型实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)仪(美国Agilent公司);DY-CZ-25E型电泳仪、转膜仪、电泳槽(北京六一仪器厂)。

1.2 药品与试剂

血管紧张素II(Ang II,美国Sigma公司,批号:A9525);佛波酯(PMA,美国Sigma公司,批号:P1585);氧化低密度脂蛋

* 主治医师,博士。研究方向:中西医结合治疗心血管疾病。电话:0931-4937749。E-mail:17468057@qq.com

白(ox-LDL,北京协生生物科技有限责任公司,批号:TB002,纯度:97%);缬沙坦(中国食品药品检定研究院,批号:100651-201203,纯度:99.8%);盐酸川芎嗪注射液(哈尔滨三联药业股份有限公司,批号:121003A2,规格:0.2 mg/10 ml);油红O(武汉博士德生物工程有限公司,批号:00625-5);总胆固醇试剂盒、游离胆固醇试剂盒(北京普利莱公司,批号分别为:E1015、E1016);总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒(美国Promega公司,批号分别为:Z3100、A3500);Power SYBR Green PCR Master Mix反应体系(美国ABI公司);ACAT-1多克隆抗体(美国Abcam公司,批号:ab71407); β -actin单克隆抗体(美国Cell Signaling公司,批号:8h10d10);引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.3 细胞株

THP-1细胞株由中国医学科学院细胞中心提供。

2 方法

2.1 细胞培养与分组

取生长活跃的THP-1,加入质量浓度为160 nmol/L佛波酯(PMA)无血清培养液孵育24 h,使其转化为巨噬细胞,再加入80 mg/L ox-LDL培养液孵育24 h,使之向泡沫细胞转化。将以上细胞随机分为4组,继续以80 mg/L ox-LDL孵育48 h:①空白对照组:培养液不加干预因素;②模型组:加入含 1×10^{-6} mol/L Ang II培养液;③阳性对照组:在模型组基础上加入含 1×10^{-6} mol/L缬沙坦培养液;④川芎嗪低、中、高浓度组:在模型组基础上分别加入含0.025、0.05、0.1 g/L川芎嗪培养液(质量浓度参考文献[4]及预试验中MTT结果确定)。

2.2 油红O染色鉴定巨噬源性泡沫细胞

将各组细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3遍,加入85%丙二醇,5 min后吸出,PBS冲洗3遍,加入油红O染液,于60℃烤箱放置30 min后吸出,再加85%丙二醇,5 min后弃去,PBS冲洗3遍。倒置相差显微镜下观察并拍照,每组细胞取10个视野,计算巨噬源性泡沫细胞转化率,每组试验重复3次,每次取2个复孔。

2.3 酶化学法测定细胞内胆固醇含量

将待测细胞用PBS冲洗3遍,加入裂解液反复吹打后,将细胞裂解液转移到EP管中,室温下以离心半径为10 cm、12 000 r/min离心5 min,取上清液,酶化学法测定各组细胞内总胆固醇及游离胆固醇含量(具体步骤按试剂盒说明操作)。总胆固醇含量减去游离胆固醇含量等于胆固醇酯(CE)含量。每组试验重复3次,每次取2个复孔。

2.4 RT-PCR法测定ACAT-1 mRNA表达

按总RNA提取试剂盒说明书提取总RNA,测定总RNA纯度和浓度,按反转录试剂盒说明书加样进行反转录反应,用RT-PCR仪扩增。ACAT-1基因上游引物序列:5'-CAAGGC-GCTCTCTCTTAGATGAAC-3',24 bp;下游引物序列:5'-GAT-AAAGAGAATGAGGAGGGCAATAA-3',26 bp。内参 β -actin上游引物序列:5'-CCTGGGCATGGAGTCTCTGTG-3',20 bp;下游引物序列:5'-TCTTCATTGTGCTGGGTGCC-3',20 bp。反转录cDNA试验条件:42℃,60 min;95℃,5 min,冷却至4℃。RT-PCR扩增条件:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,57℃退火30 s,72℃延伸30 s,共40个循环;72℃延伸5 min结束。参考文献[5],ACAT-1 mRNA表达量以各处理组与内参 β -actin基因的比值表示。每组试验重复3次,每次取2个复孔。

2.5 Western blot法检测ACAT-1蛋白表达

提取细胞总蛋白,二喹啉甲酸(BCA)法蛋白定量,十二烷基磺酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,5%脱脂奶粉封

闭过夜,加入1:1 000倍稀释的抗兔ACAT-1一抗,杂交2 h, β -actin作为内参。TBST洗膜后加入二抗,温育1 h,TBST洗膜后,制备超敏发光液,暗室内发光压片,扫描后,各组ACAT-1蛋白表达以各组与 β -actin灰度比值进行分析,每组试验重复3次,每次取2个复孔。

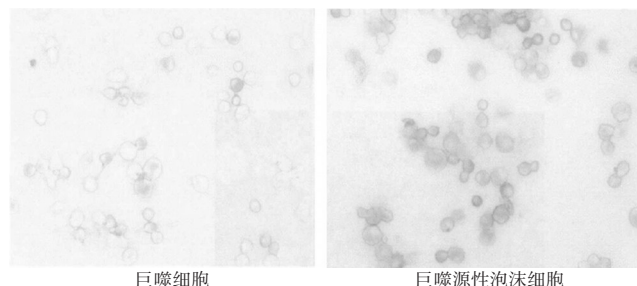
2.6 统计学方法

用SPSS 11.5统计软件进行统计学处理。各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用One-Way ANOVA;若方差齐用LSD法,方差不齐用Dunnett's T3法进行多重比较;样本率的比较用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 油红O染色鉴定结果

ox-LDL与巨噬细胞共同孵育24 h后,经油红O染色,倒置显微镜下观察,胞质内可见大量红色颗粒,符合巨噬源性泡沫细胞形态特点,见图1。



巨噬细胞 巨噬源性泡沫细胞

图1 油红O染色图($\times 20$)

Fig 1 Graph of oil red O staining($\times 20$)

3.2 川芎嗪对巨噬源性泡沫细胞转化率的影响

与空白对照组比较,模型组细胞的巨噬源性泡沫细胞转化率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组与川芎嗪低、中、高浓度组细胞的巨噬源性泡沫细胞转化率下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。川芎嗪作用呈浓度依赖性,但各浓度组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见表1。

表1 各组细胞巨噬源性泡沫细胞转化率结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 Results of transformation rates of macrophage-derived foam cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	转化率
空白对照组	0.406 \pm 0.087
模型组	0.851 \pm 0.110*
阳性对照组	0.430 \pm 0.096*
川芎嗪低浓度组	0.541 \pm 0.073*
川芎嗪中浓度组	0.519 \pm 0.061*
川芎嗪高浓度组	0.458 \pm 0.085*

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group,* $P < 0.01$; vs. model group,* $P < 0.01$

3.3 川芎嗪对细胞内胆固醇含量的影响

与空白对照组比较,模型组细胞内总胆固醇、游离胆固醇与CE含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组与川芎嗪低、中、高浓度组细胞内总胆固醇、游离胆固醇及CE含量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。川芎嗪作用呈浓度依赖性,但各浓度组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见表2。

3.4 川芎嗪对细胞中ACAT-1 mRNA表达的影响

与空白对照组比较,模型组细胞ACAT-1 mRNA表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组

表2 各组细胞内胆固醇含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{g}/\text{mg}$)
Tab 2 Determination results of cholesterol contents in each group($\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{g}/\text{mg}$)

组别	总胆固醇	游离胆固醇	胆固醇酯
空白对照组	25.346 ± 4.020	15.212 ± 3.069	10.171 ± 2.207
模型组	72.451 ± 9.361*	31.931 ± 5.292*	43.135 ± 7.153*
阳性对照组	36.802 ± 7.165 ^{##}	21.589 ± 5.976 ^{##}	17.388 ± 4.942 ^{##}
川芎嗪低浓度组	52.674 ± 9.053 ^{###}	28.101 ± 6.483 ^{##}	26.532 ± 7.031 ^{##}
川芎嗪中浓度组	49.534 ± 7.932 ^{###}	26.375 ± 6.254 ^{##}	24.783 ± 5.892 ^{##}
川芎嗪高浓度组	47.423 ± 8.417 ^{###}	25.961 ± 7.349 ^{##}	23.827 ± 5.474 ^{##}

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

Note: vs. blank control group, * $P < 0.01$; vs. model group, ^{##} $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$

与川芎嗪低、中、高浓度组细胞ACAT-1 mRNA表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$)。川芎嗪作用呈浓度依赖性,但各浓度组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见表3。

表3 各组细胞ACAT-1 mRNA表达结果($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab 3 Results of expressions of ACAT-1 mRNA in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ACAT-1 mRNA表达
空白对照组	1.000 ± 0.000
模型组	2.741 ± 0.692*
阳性对照组	1.409 ± 0.455 ^{##}
川芎嗪低浓度组	1.835 ± 0.526 ^{##}
川芎嗪中浓度组	1.674 ± 0.483 ^{##}
川芎嗪高浓度组	1.482 ± 0.378 ^{##}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^{##} $P < 0.05$
 Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, ^{##} $P < 0.05$

3.5 川芎嗪对细胞中ACAT-1蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组细胞ACAT-1蛋白表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组与川芎嗪低、中、高浓度组细胞ACAT-1蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$)。川芎嗪作用呈浓度依赖性,但各浓度组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见表4,蛋白表达电泳图见图2。

表4 各组细胞ACAT-1蛋白表达结果($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab 4 Results of expressions of ACAT-1 protein in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ACAT-1蛋白表达
空白对照组	0.192 ± 0.047
模型组	0.562 ± 0.129*
阳性对照组	0.328 ± 0.073 ^{##}
川芎嗪低浓度组	0.487 ± 0.081 ^{##}
川芎嗪中浓度组	0.420 ± 0.076 ^{##}
川芎嗪高浓度组	0.395 ± 0.064 ^{##}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^{##} $P < 0.05$
 Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, ^{##} $P < 0.05$

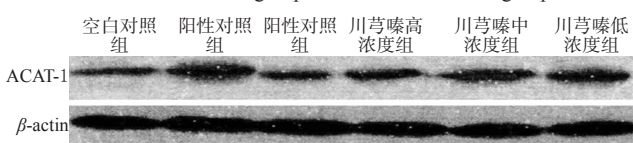


图2 各组细胞ACAT-1蛋白表达电泳图
Fig 2 Electrophoresis of expressions of ACAT-1 protein in each group

4 讨论

在AS的病理过程中,从早期的脂纹期到斑块形成期,巨噬源性泡沫细胞均起到了重要的作用^[6]。正常情况下,细胞内CE水平较低,但在AS中,CE在巨噬细胞内逐渐积聚,巨噬源性细胞泡沫化是AS早期特征性表现。ACAT-1是一种膜连接蛋白,广泛分布于人体的各种组织中,具有维持细胞内胆固醇代谢平衡的作用^[7]。试验证明,THP-1在分化成巨噬细胞的过程中ACAT-1活性增强,AS斑块中ACAT-1蛋白的表达也明显增强^[8]。当巨噬细胞内聚积大量游离胆固醇时,游离胆固醇会被转运到内质网,由ACAT-1酯化为CE并储存在细胞质中形成脂滴,从而使巨噬细胞转化成为巨噬源性泡沫细胞^[9]。

以往研究显示,Ang II可逆转巨噬细胞内胆固醇外流,从而促进巨噬细胞的浸润和巨噬源性泡沫细胞的形成,最终导致AS的发生、发展^[10]。本试验结果表明,Ang II作用于巨噬细胞后ACAT-1 mRNA、蛋白的表达均明显增强,细胞内胆固醇含量增加,对巨噬源性泡沫细胞的形成有明显促进作用。缬沙坦作为Ang II 1型受体(Ang II type 1, AT1)拮抗药,通过抑制Ang II对巨噬源性泡沫细胞的促进作用,从而发挥其抗AS作用。活血化瘀中药川芎嗪同样能使细胞内总胆固醇、游离胆固醇和CE含量明显减少,一定程度上下调巨噬源性泡沫细胞ACAT-1 mRNA、蛋白的表达,减少巨噬源性泡沫细胞的形成,起到抑制AS的作用。

目前,现代医学已对多种药物对巨噬细胞泡沫化的影响进行了广泛而深入的研究,而中医药在这一领域的研究仍不够充分。随着对巨噬细胞泡沫化机制研究的不断深化,中医药将在这一研究领域做出自己的贡献。

参考文献

- [1] 蒙颖,徐芳,王志禄,等.罗格列酮对泡沫细胞中胆固醇贮存与运输相关蛋白ACAT-1、ABCA-1表达的影响[J].第三军医大学学报,2012,34(22):2 288.
- [2] 戴婷,罗超,张曼,等.川芎嗪对大鼠动脉粥样硬化形成中Toll样受体4表达的影响[J].山西医药杂志,2013,42(1):6.
- [3] 李晋生,陈霞,靳冉,等.活血化瘀中药干预兔动脉粥样硬化形成作用研究[J].中国中医药信息杂志,2012,19(4):35.
- [4] 熊娟,潘勇军,郭桂香,等.川芎嗪对肥大心肌细胞中钙调神经磷酸酶信号转导通路的干预作用[J].医药导报,2009,28(10):1 265.
- [5] Newson RS, Hek K, Luijendijk HJ, et al. Atherosclerosis and incident depression in late life[J]. Arch Gen Psychiatry, 2010, 67(11): 1 144.
- [6] Badimon L, Storey RF, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis[J]. Thromb Haemost, 2011, 105(1): 34.
- [7] Shindou H, Shimizu T. Acyl-CoA: lysophospholipid acyltransferases[J]. J Biol Chem, 2009, 284(1): 1.
- [8] 徐艳杰,程晓曙.巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇代谢与动脉粥样硬化[J].基础医学与临床,2013,33(2),235.
- [9] Chang TY, Li BL, Chang CC, et al. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 297(1): 1.
- [10] 李慧,杨志明,肖传实,等.血管紧张素原(1-7)与血管紧张素II对THP-1巨噬细胞NPC1表达及胆固醇流出的影响[J].中国病理生理杂志,2011,27(3):455.

(收稿日期:2014-09-20 修回日期:2015-01-13)

(编辑:林 静)