

# 巨噬细胞对内皮细胞凋亡的影响及通心络的干预作用

李红蓉<sup>1,2\*</sup>, 常丽萍<sup>1,2</sup>, 秘红英<sup>1,2</sup>, 刘玉金<sup>1,2</sup>, 魏聪<sup>2,3</sup>, 梁俊清<sup>3,4</sup>

(1. 河北医科大学 研究生学院, 石家庄 050017;

2. 国家中医药管理局 重点研究室 (心脑血管络病), 石家庄 050035;

3. 河北医科大学 附属以岭医院, 石家庄 050091;

4. 河北省络病重点实验室, 石家庄 050035)

**[摘要]** **目的:**研究不同亚型巨噬细胞对内皮细胞凋亡的影响及通心络的干预作用,并探讨其可能的作用机制。**方法:**以 THP-1 细胞为研究对象,实验分为 5 组,分别为空白组,佛波酯(PMA)组,M2 组,M1 组及通心络组。采用 PMA( $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )分别联合白细胞介素(IL)-4( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),脂多糖(LPS, $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )诱导 THP-1 细胞分别向 M2 和 M1 型巨噬细胞极化并给以通心络( $300 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )进行干预,采用酶联免疫吸附方法(ELISA)检测其标志分子 IL-10,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),IL-6 的表达。取巨噬细胞培养上清作为条件培养基培养内皮细胞,采用流式细胞仪检测内皮细胞凋亡率、蛋白免疫印迹方法检测凋亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白的表达。**结果:**与空白组比较,M2 组细胞培养上清中 IL-10 水平显著升高( $P < 0.01$ );M1 组细胞培养上清中 IL-10 水平显著降低,IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平显著升高( $P < 0.01$ );与 M1 组比较,通心络组细胞培养上清中 IL-10 水平升高,IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平下降( $P < 0.01$ )。与 M2 组内皮细胞比较,M1 型巨噬细胞细胞培养的内皮细胞凋亡率显著升高( $P < 0.01$ ),促凋亡蛋白 Caspase-3,Bax 蛋白的表达明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达显著降低( $P < 0.01$ );与 M1 组比较,通心络组内皮细胞的凋亡率显著降低( $P < 0.01$ ),促凋亡蛋白 Caspase-3,Bax 蛋白的表达明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达显著升高( $P < 0.01$ )。**结论:**通心络可以抑制巨噬细胞向 M1 型极化。M2 型巨噬细胞培养上清对内皮细胞的凋亡无明显影响,M1 型巨噬细胞培养上清可以促进内皮细胞凋亡;通心络预培养的 M1 型巨噬细胞培养上清培养的内皮细胞凋亡率显著下降。

**[关键词]** 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; 极化; 内皮细胞; 通心络

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)13-0121-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017130121

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.1113.050.html>

**[网络出版时间]** 2017-04-20 11:13

## Effect of Macrophages on Apoptosis of Endothelial Cells and Interventing Effect of Tongxinluo

LI Hong-rong<sup>1,2\*</sup>, CHANG Li-ping<sup>1,2</sup>, MI Hong-ying<sup>1,2</sup>, LIU Yu-jin<sup>1,2</sup>, WEI Cong<sup>2,3</sup>, LIANG Jun-qing<sup>3,4</sup>

(1. Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine (Cardio-Cerebral Vessel Collateral Disease), Shijiazhuang 050035, China; 3. Affiliated Yiling Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China;

4. Key Laboratory of Hebei Province for Collateral Diseases, Shijiazhuang 050035, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of different subtypes of macrophages on the apoptosis of endothelial cells and the intervening effect of Tongxinluo (TXL). **Method:** THP-1 cells were taken as the study object. Cells were divided into five groups: control group, phorbol myristate acetate (PMA) group, M2 group, M1

**[收稿日期]** 20170209(004)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB518606)

**[通讯作者]** \*李红蓉,博士,从事中西医结合心脑血管病防治研究,Tel: 0311-66703020, E-mail: hongrongli@126.com

group and TXL group. THP-1 cells were respectively induced by PMA ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) combined with interleukin (IL)-4 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) or lipopolysaccharide (LPS) ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) to M2 and M1 type polarized macrophages, and treated by TXL with  $300 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The expressions of marker molecules IL-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The culture supernatant was taken as conditioned medium to culture endothelial cells, and the apoptosis rate and the expression of apoptosis related proteins were detected by flow cytometry and Western blot, respectively. **Result:** Compared with control group, the level of IL-10 increased in M2 group ( $P < 0.01$ ), and the level of IL-10 decreased, and IL-6, TNF- $\alpha$  increased in M1 group ( $P < 0.01$ ). Compared with M1 group, the level of IL-10 increased, and IL-6, TNF- $\alpha$  decreased in TXL group ( $P < 0.01$ ). Compared with M2 group, the apoptosis rate and the expression of Caspase-3, Bax increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the expression of Bcl-2 decreased in M1 group ( $P < 0.01$ ). And compared with M1 group, the apoptosis rate and the expression of Caspase-3, Bax decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the expression of Bcl-2 increased in TXL group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The polarization of macrophages to M1 type can be inhibited by TXL. The supernatant of M2 macrophages has not a significant effect on the apoptosis of endothelial cells. The apoptosis of endothelial cells increases in the cultured supernatant of M1 macrophages, and TXL can reduce the apoptosis of endothelial cells.

[ **Key words** ] atherosclerosis; macrophage; polarization; endothelial cell; Tongxinluo

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是当前发病率较高的心脑血管疾病,尽管关于 AS 的基础和临床研究已经取得了很大进展,但仍然是世界主要死亡原因之一<sup>[1]</sup>。多种致病因素都可以导致 AS 的发生,其机制目前尚不明确。AS 病变涉及到内皮细胞<sup>[2]</sup>、巨噬细胞<sup>[3]</sup>、中性粒细胞<sup>[4]</sup>、成纤维细胞<sup>[5]</sup>、血管平滑肌细胞<sup>[6]</sup>等多种细胞的参与。其中巨噬细胞发挥了重要作用,能够吞噬脂质而形成的泡沫细胞和脂质条纹、斑块是 AS 斑块的主要构成成分<sup>[3]</sup>。研究表明 AS 病变部位同时存在 M1 和 M2 型巨噬细胞,是斑块形成、纤维帽破裂和血栓形成的关键因素<sup>[3]</sup>。在不稳定斑块中以 M1 型为主,而在稳定斑块组织中以 M2 型为主<sup>[7]</sup>。M1 型由于其促炎及组织损伤作用在早期 AS 形成过程中占主导作用;M2 型巨噬细胞,释放抑炎因子,促进斑块纤维帽形成,增强斑块稳定性<sup>[8]</sup>。在特定条件下,二者可相互转化,M1 型和 M2 型巨噬细胞的比例能显著影响斑块的稳定性。炎症因子是血管内皮的重要损伤因素,M1 型巨噬细胞分泌的炎症因子必然对血管内皮造成损伤。而内皮细胞凋亡是 AS 的关键病理环节<sup>[9]</sup>,所以本研究建立 M2 和 M1 型巨噬细胞模型,采用共培养的方式观察不同表型的巨噬细胞对内皮细胞凋亡情况的影响。

通心络是以中医络病理论为指导研制的针对心脑血管疾病的中成药,在心脑血管疾病的治疗方面取得了显著疗效,并且能够在多方面发挥抗 AS 作用,而关于通心络能否通过影响巨噬细胞极化而发

挥抗 AS 作用尚未见报道<sup>[10]</sup>。所以本实验将就通心络能否抑制巨噬细胞向 M1 型极化,减少炎症因子的产生,改善巨噬细胞极化对血管内皮细胞的影响,而发挥抗 AS 的作用进行研究。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人白血病单核细胞(THP-1),人脐静脉内皮细胞(HUVEC)(中国科学院上海细胞库)。

**1.2 药物及试剂** 通心络超微粉(石家庄以岭药业,批号 20150621);RPMI 1640 培养基及胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 11875093, 16000044);胰蛋白酶(美国 Amersco 公司,批号 0458),佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)及脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(美国 Sigma 公司,批号分别为 P8139, L4516);人重组白细胞介素(IL)-4(美国 Peprotech 公司,批号 200-04);Hoechst33342 细胞核染料(美国 AAT Bioquest 公司,批号 17530),V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号 KGA7027);IL-10, IL-6, 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒及兔抗人半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab46034, ab46042, ab46087, ab32351, ab32503, ab692);BCA 蛋白定量分析试剂盒及细胞核/细胞质蛋白抽提试剂盒(美国 Pierce 公司,批号分别为 23225, 78833)。

**1.3 仪器** 756 型紫外分光光度计, SYNERGY4 多

功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);Odyssey 9120 型双色红外线扫描膜仪(美国 Li-Cor 公司);PrimoVert 型倒置显微镜(ZEISS 公司);221BR 型半干转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);DeltaVision 活细胞成像系统(美国 GE 公司)。

## 2 方法

**2.1 通心络组成成分和超微粉溶液的制备** 通心络含有 12 种中药成分,按照 2005 年版《中国药典》标准进行标准化鉴定。为了减少不同批次药物之间的差异,各中药成分的物种、起源、收获时间、药用部位和炮制方法都有严格规范。并应用高效液相色谱、高效毛细管电泳法和气相色谱法对通心络各成分含量进行严格定量。通心络具体成分请参见文献[11-12]。参照文献[13]制备通心络超微粉溶液,取适量通心络超微粉溶于无血清 RPMI 1640 培养基,超声促溶 1 h,6 500 × g 离心 10 min,收集上清液并用 0.22 μm 微孔过滤器过滤除菌,离心所得沉淀于 60 °C 加热烘干并称量,以计算和校正所得溶液中药物浓度,于 -20 °C 保存备用,用时稀释至目标浓度。

**2.2 细胞培养** 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 THP-1 细胞,于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。实验分为 5 组,取对数生长期的细胞接种于 96 孔板或 6 cm 皿中培养,带细胞生长稳定后,分别对各组细胞进行处理。空白组:无血清培养基培养 24 h;PMA 组:含 PMA(5 μg·L<sup>-1</sup>)的无血清培养基培养 24 h;M2 组:含 PMA(5 μg·L<sup>-1</sup>),IL-4(100 μg·L<sup>-1</sup>)的无血清培养基培养 24 h;M1 组:含 PMA(5 μg·L<sup>-1</sup>),LPS(200 μg·L<sup>-1</sup>)的无血清培养基培养 24 h;通心络组:含通心络(300 mg·L<sup>-1</sup>)的无血清培养基培养 4 h,采用含 PMA(5 μg·L<sup>-1</sup>),LPS(200 μg·L<sup>-1</sup>),通心络(300 mg·L<sup>-1</sup>)的无血清培养基培养 24 h。收取各组细胞培养上清用于指标检测并更换新的培养基培养 24 h,收集更换后的培养上清作为条件培养基培养 HUVEC 细胞,收集内皮细胞进行指标检测。

**2.3 ELISA 法检测细胞培养上清中 M2 型巨噬细胞标志分子 IL-10, M1 型巨噬细胞标志分子 IL-6, TNF-α 的水平** 将各组细胞进行相应处理后,收集细胞培养上清,按照各指标试剂盒所附操作方法检测细胞培养上清中 IL-6, IL-10, TNF-α 的水平。

**2.4 活细胞成像系统动态观察内皮细胞凋亡过程中细胞核变化** 将 HUVEC 细胞采用 Hoechst 33342 细胞核染料进行标记,随机分为 5 组,加入相应各组的细胞条件培养基,采用活细胞成像系统在 400 镜

下动态观察细胞核的变化, Hoechst 33342 的蓝色荧光通过 DAPI 通道检测。

**2.5 流式细胞仪检测内皮细胞凋亡率** 将各组细胞进行相应处理后,0.5% 胰蛋白酶消化后收集细胞悬液,1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,弃上清,结合缓冲液 500 μL 重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 5 μL 及碘化丙啶(PI)5 μL 混匀,避光孵育 15 min,上机检测。流式细胞仪光源发射波长 488 nm,发射波长 Em = 530 nm。Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道检测,PI 红色荧光通过 PE 通道检测。

**2.6 蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测细胞 Caspase-3, Bcl-2, Bax 蛋白表达** 将各组 HUVEC 细胞进行相应处理后,弃去培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,吸干 PBS,各皿加入等量细胞裂解液充分裂解后将细胞裂解物移至离心管中,以上操作均在冰上进行。4 °C,12 000 × g 离心 20 min,收集上清至新的离心管中。采用 BCA 试剂盒测定上清中蛋白浓度,余加入 5 × 上样缓冲液,100 °C 金属浴加热 5 min 使蛋白变性,冷却备用。配制 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,各组取等量蛋白样品进行凝胶电泳,90 V 稳压电泳约 30 min,待溴酚蓝进入分离胶后,换用 120 V 稳压电泳,至溴酚蓝前缘移动到凝胶底部,取出凝胶。采用半干式转膜,将凝胶内蛋白转入硝酸纤维素膜(NC 膜)。转膜完毕后取出 NC 膜,应用封闭液室温封闭 3 h,将封闭后的 NC 膜置入使用按说明书稀释后的相应一抗溶液中,4 °C 缓慢摇动孵育过夜,洗涤缓冲液(TBST)水平摇床振荡洗膜 3 次后,将 NC 膜置入适量稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗溶液中,室温孵育 2 h。TBST 室温洗膜 3 次。用 Odyssey 9120 型双色红外激光成像系统扫描检测,以相对灰度值作为蛋白表达量。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,首先进行正态性检验和方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐同,采用 LSD 方法;方差不齐,用 Dunnett T3 方法进行方差分析;不符合正态分布,采用非参数检验进行分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对巨噬细胞标志分子 IL-10, IL-6, TNF-α 表达的影响** 与空白组比较,PMA 组 IL-10, IL-6, TNF-α 的水平无统计学差异,说明实验浓度的 PMA 对巨噬细胞极化表型没有影响。与空白组比较,M1 组 IL-6, TNF-α 水平显著升高( $P < 0.01$ );M2 组 IL-10

水平升高 ( $P < 0.01$ ), IL-6, TNF- $\alpha$  的水平无统计学差异;说明 M2 和 M1 型巨噬细胞模型建立成功。与 M1 组比较,在 M1 型诱导因素存在的情况下,通心

络组 IL-6, TNF- $\alpha$  的水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),说明通心络可以抑制 LPS 诱导的巨噬细胞向 M1 型极化。见表 1。

表 1 通心络对巨噬细胞标志分子 IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	IL-10	IL-6	TNF- $\alpha$
空白	-	47.29 ± 1.36	7.40 ± 0.22	16.82 ± 2.25
PMA	-	37.89 ± 1.88	7.74 ± 0.47	20.44 ± 1.33
M2	-	105.14 ± 1.44 <sup>1)</sup>	4.98 ± 0.44	27.06 ± 2.06
M1	-	9.86 ± 0.83 <sup>1,3)</sup>	98.51 ± 0.66 <sup>1,3)</sup>	265.64 ± 2.42 <sup>1,3)</sup>
通心络	300	44.03 ± 2.05 <sup>2)</sup>	37.31 ± 0.87 <sup>2)</sup>	122.02 ± 2.79 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 M1 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 M2 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

**3.2 对内皮细胞凋亡过程中细胞核形态变化的影响** 空白组 HUVEC 细胞核形态规整,边缘清晰,荧光强度弥散均一,可见细胞分裂增殖;PMA 组和 M2 组 HUVEC 细胞核与空白组无明显差别,观察后期可见细胞核固缩碎裂;M1 组 HUVEC 细胞核较早出现浓染、固缩、边缘化,细胞核体积缩小,核碎裂,产生凋亡小体,这些均是细胞凋亡时细胞核的特征性变化。通心络组 HUVEC 细胞核形态较 M1 组规整,边缘较清晰,核浓染、固缩、边缘化等现象发生较晚,程度较轻,并可见细胞分裂增殖。见图 1。

**3.3 对内皮细胞凋亡率的影响** 空白组与 PMA 组, M2 组比较,内皮细胞凋亡率无统计学差异;与空白组和 M2 组比较, M1 组内皮细胞凋亡率显著提高 ( $P < 0.01$ );与 M1 组比较,通心络组内皮细胞凋亡率显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.4 对内皮细胞凋亡相关蛋白表达的影响** 与空白组比较, PMA 组, M2 组凋亡相关蛋白 Caspase-3,

表 2 通心络对内皮细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Tongxinluo on apoptotic percentage of HUVECs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	凋亡率
空白	-	1.00 ± 0.00
PMA	-	0.90 ± 0.30
M2	-	1.00 ± 0.20
M1	-	2.17 ± 0.40 <sup>1,3)</sup>
通心络	300	1.17 ± 0.47 <sup>2)</sup>

Bax, Bcl-2 的表达无统计学差异;与空白组和 M2 组比较, M1 组 Caspase-3, Bax 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), Bcl-2 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ );与 M1 组比较,通心络组 Caspase-3, Bax 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), Bcl-2 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。说明通心络抑制巨噬细胞向 M1 型极化可以减少内皮细胞凋亡。见表 3, 图 2。

表 3 通心络对内皮细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	Caspase-3	Bax	Bcl-2
空白	-	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.22 ± 0.05
PMA	-	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.22 ± 0.07
M2	-	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.21 ± 0.06
M1	-	0.58 ± 0.06 <sup>1,4)</sup>	0.62 ± 0.03 <sup>2,5)</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>2,5)</sup>
通心络	300	0.13 ± 0.07 <sup>3)</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>3)</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 M1 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与 M2 组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

近年来络学说指导 AS 防治取得了显著进展。络学说的核心理论为营卫理论,“营卫不通,血凝不流”(《伤寒论》),营血亏虚或血液运行不畅

进一步发展为痰瘀毒等病理产物壅滞于脉,导致络脉狭窄或络脉瘀塞。络学说认为动脉粥样硬化属于络脉狭窄或络脉瘀塞的范畴。通心络胶囊以络学说为指导,针对心脑血管病络脉瘀阻与络脉缠急

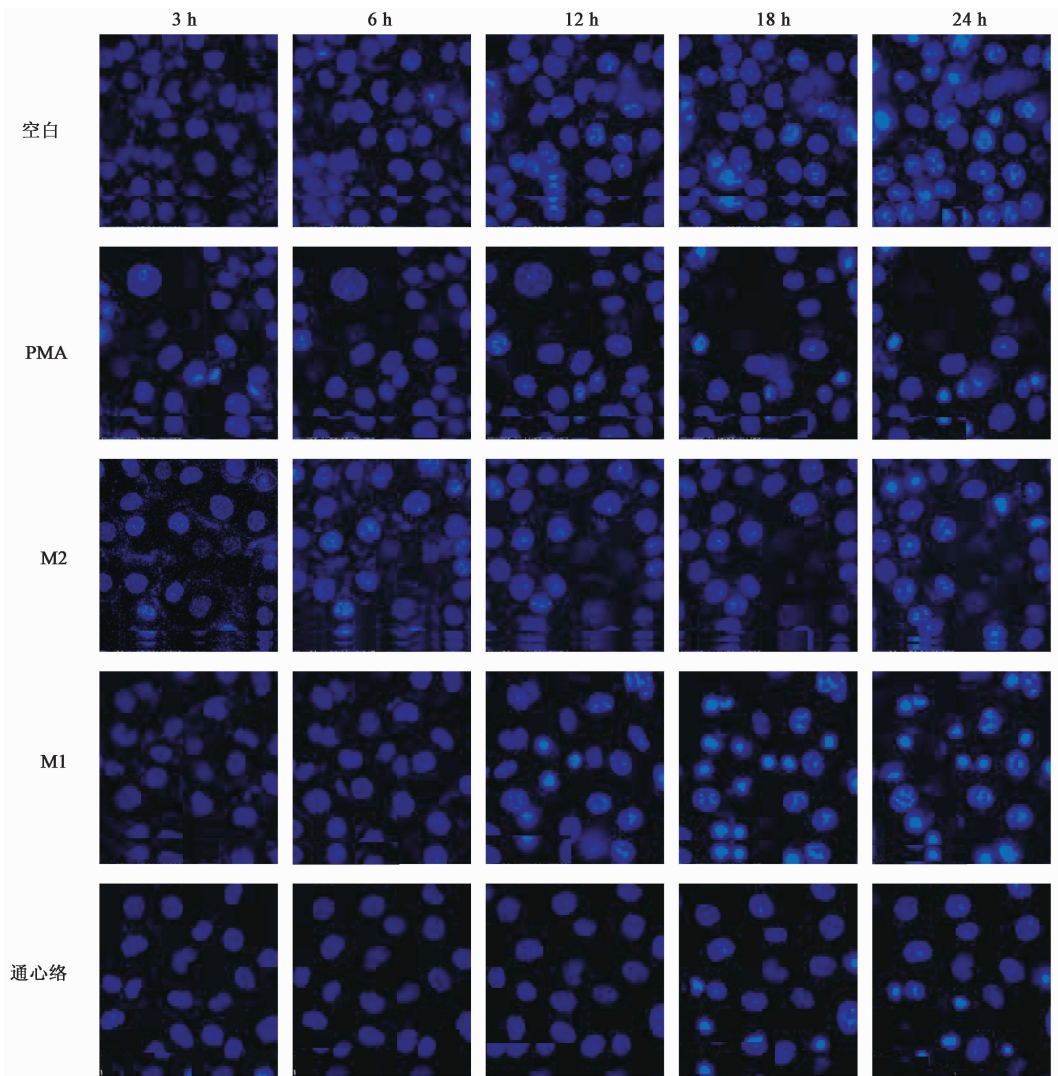
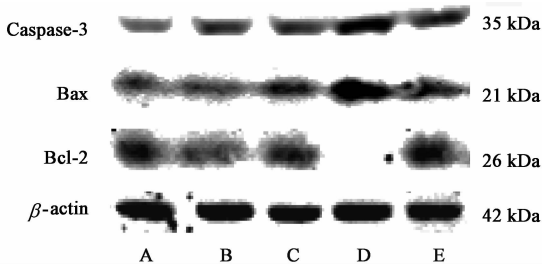


图 1 通心络对内皮细胞凋亡过程中细胞核形态变化的影响 (Hoechst 33342, × 400)

Fig. 1 Effect of Tongxinluo on nucleus during apoptosis in various groups (Hoechst 33342, × 400)



A 空白组; B. PMA 组; C. M2 组; D. M1 组; E. 通心络组

图 2 各组内皮细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白的表达  
Fig. 2 Expression of Caspase-3, Bax, Bcl-2 protein of HUVECs

的病机变化,以益气活血、搜风通络为原则创立。由人参、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、乳香(制)、酸枣仁(炒)、冰片等通络药物组成,以通畅络脉为作用特点。是近年来应用广泛的治疗心脑血管类疾病的中成药<sup>[14]</sup>。方中以人参为君,补益络气,气旺而运血有力,络脉自易畅通;水蛭化痰

通络,全蝎搜风通络共为臣药;土鳖虫活血通络,佐水蛭搜剔络中之瘀;蝉蜕息风止痉,佐蜈蚣、全蝎搜风解痉以止络脉之绌急;赤芍凉血散血,并制之人参之温;酸枣仁养血安神以防逐瘀伤正,共为佐药;檀香、降香、乳香、冰片芳香,引诸药入络通窍为使药。诸药配伍,益气扶正以固本虚,活血通络搜风解痉以祛邪,气旺血行,心脑血管通畅,临床诸证自能解除<sup>[15]</sup>。基于“病在脉,调之血;病在血,调之络”(《素问》)的理论,和“络以通为用”的络脉病变治疗总则,通心络胶囊可以从多方面发挥抗动脉粥样硬化作用<sup>[10]</sup>。近期研究表明通心络可以通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路调节巨噬细胞 Kruppel 样因子 (Kruppel like factor, KLF5) 的表达和翻译后修饰抑制动脉内膜增生而抑制动脉粥样硬化的发展<sup>[16]</sup>,通心络还可以抑制微血管内皮细胞的炎症和氧化应激损伤而减轻动脉粥

样硬化斑块病变<sup>[17]</sup>。而关于通心络对巨噬细胞极化的影响目前尚未见深入研究。

单核细胞作为血液中的有形成分,随血液进行循环并与血管内皮细胞直接接触。单核细胞在多种因素影响下迁移到血管壁内成为巨噬细胞,并产生多种细胞因子影响内皮细胞的结构和功能。巨噬细胞与 AS 病变部位的炎症和斑块稳定性密切相关,AS 病变部位同时存在 M1 型和 M2 型巨噬细胞。M1 型巨噬细胞因其分泌较多的炎症因子而起到促进 AS 的作用;M2 型高表达抑炎因子,有促进组织修复和稳定斑块的作用<sup>[18]</sup>。动脉粥样硬化病变部位血管内皮细胞凋亡增加,而炎症是血管内皮细胞的重要损伤因素,动脉粥样硬化病变部位浸润的巨噬细胞是否会促进内皮细胞凋亡,从而促进动脉粥样硬化的发展。已有研究表明通心络能够显著增强斑块的稳定性<sup>[11]</sup>,其作用可能涉及到对巨噬细胞极化的调控。

参考文献[19]采用 PMA 分别联合 IL-4, LPS 建立 M2 型和 M1 型巨噬细胞模型。观察到 PMA 可以诱导悬浮的 THP-1 细胞贴壁, LPS 诱导的巨噬细胞形态狭长,伪足较少; IL-4 诱导的巨噬细胞形态不规则有较多的伪足,可能与 M2 型巨噬细胞具有较强的吞噬功能有关。LPS 诱导的巨噬细胞高表达 M1 型标志分子 IL-6 和 TNF- $\alpha$ , 低表达 M2 型标志分子 IL-10; 而 IL-4 诱导的巨噬细胞高表达 IL-10, 低表达 IL-6 和 TNF- $\alpha$ 。表明 M1 和 M2 型巨噬细胞极化模型的成功建立。在 M1 型巨噬细胞诱导因素存在的条件下,通心络可以抑制巨噬细胞表达 IL-6 和 TNF- $\alpha$ , 而上调 IL-10 的表达。表明通心络可以抑制巨噬细胞向 M1 型极化。

炎症是血管内皮细胞的重要损伤因素之一。动脉粥样硬化病变部位浸润 M1 型巨噬细胞释放的炎症因子必然对血管内皮造成损伤,进一步加重 AS 血管内皮的病变。在动脉粥样硬化发展过程中, TNF- $\alpha$  诱导的内皮细胞凋亡是斑块形成的早期事件。TNF- $\alpha$  具有直接细胞毒作用,可以通过促进特异性半胱氨酸蛋白酶的激活、减少应力纤维形成、过度生成一氧化氮(NO)等方式时间-剂量依赖性的促进血管内皮细胞凋亡,并损伤血管内皮细胞功能<sup>[20]</sup>。研究表明 TNF- $\alpha$  还可以增加内皮细胞细胞外基质蛋白 CCN 家族成员 1(CNN1)的 mRNA 和蛋白表达并促进内皮细胞凋亡,而 CNN1 可以通过 p53 和核转录因子 kappa B(NF- $\kappa$ B)的活化而直接上调 TNF- $\alpha$  靶基因的表达<sup>[20]</sup>。用含有 IL-6, IL-1 $\beta$ ,

TNF- $\alpha$  等炎症因子的细胞培养上清培养内皮细胞可促进内皮细胞凋亡,而分别加入相关细胞因子单克隆抗体或受体拮抗剂可不同程度逆转内皮细胞的凋亡。IL-10 是辅助性 T 细胞和单核/巨噬细胞产生的重要细胞因子,可抑制多种免疫活性细胞的细胞因子 mRNA 的转录,在细胞培养上清中加入 IL-10 后可以抑制 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  等炎症细胞因子的产生,并减少内皮细胞的凋亡<sup>[21]</sup>。本实验采用巨噬细胞条件培养基干预血管内皮细胞的方式研究不同极化类型巨噬细胞对血管内皮细胞凋亡的影响。实验结果显示,空白组和 M2 组 HUVEC 细胞凋亡率及 Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达无统计学差异,而 M1 型巨噬细胞条件培养基可以促进 HUVEC 细胞的凋亡,上调促凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bax 的蛋白表达,下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 的蛋白表达。前期研究表明,血管内皮细胞损伤可以促进单核细胞的趋化黏附,从而增加病变部位的巨噬细胞,而动脉粥样硬化病变部位浸润的 M1 型巨噬细胞又可以对血管内皮细胞造成损伤,促进内皮细胞的凋亡。经通心络干预后, HUVEC 细胞凋亡率较 M1 组下降,且 Caspase-3, Bax 的表达减少, Bcl-2 的表达增加。结合上述研究结果说明通心络可以通过抑制巨噬细胞向 M1 型极化,减少炎症因子的表达,从而抑制 M1 型巨噬细胞对 HUVEC 细胞的促凋亡作用。

血管内皮细胞凋亡在动脉粥样硬化发生发展中发挥重要作用。在动脉粥样硬化斑块中发现覆盖于病变处的血管内皮细胞凋亡增加, Bax 等促凋亡蛋白表达增加而 Bcl-2 等抑凋亡蛋白表达减少。血管内皮细胞凋亡可以从促进脂质沉积、导致血液高凝状态和增加斑块不稳定性等方面影响 AS 的发生发展。研究显示,血管内皮细胞凋亡可以增加血管壁对脂质及炎症细胞的通透性,促进单核细胞及血小板向病变血管内皮的趋化黏附,并刺激血管平滑肌细胞增殖,引起血栓和粥样斑块形成。正常血管内皮细胞分泌的组织因子途径抑制剂、血栓调节蛋白、膜联蛋白 V 等抗凝物质在细胞凋亡时分泌减少,而磷脂酰丝氨酸等促凝物质分泌增多,导致抗凝和促凝物质失衡及血小板的聚集能力增强,加之内皮细胞凋亡部位暴露的细胞外基质共同导致了血液的高凝状态;血管内皮细胞凋亡会使病变部位血管张力调节机能受损,导致血管壁容易发生重塑,并可以使纤维帽表面持续受到侵蚀和破坏,增加粥样斑块的不稳定性,使斑块易于糜烂,继发血栓形成<sup>[10]</sup>。

综上所述,通心络抑制单核细胞向 M1 型巨噬

细胞极化,减少炎症因子产生,并抑制M1型巨噬细胞培养基所致的内皮细胞凋亡,起到抗动脉粥样硬化的作用。

[参考文献]

- [1] Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: A report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2016, 26,133(4): e38-e360.
- [2] Gimbrone M A, Garcia-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-636.
- [3] Tabas I, Bornfeldt K E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 653-667.
- [4] Hartwig H, Silvestre Roig C, Daemen M, et al. Neutrophils in atherosclerosis. A brief overview[J]. *Hamostaseologie*, 2015, 35(2): 121-127.
- [5] Brokopp C E, Schoenauer R, Richards P, et al. Fibroblast activation protein is induced by inflammation and degrades type I collagen in thin-cap fibroatheromata [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(21), 2713-2722.
- [6] Bennett M R, Sinha S, Owens G K. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 692-702.
- [7] Quillard T, Charreau B. Impact of notch signaling on inflammatory response in cardiovascular disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(4): 6863-6888.
- [8] CHEN F Y, ZHOU J, GUO N, et al. Curcumin retunes cholesterol transport homeostasis and inflammation response in M1 macrophage to prevent atherostasis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 15(10): 1-7.
- [9] ZHANG T, TIAN F, WANG J, et al. Atherosclerosis-associated endothelial cell apoptosis by MiR-429-mediated down regulation of Bcl-2 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(4): 1421-1430.
- [10] 李红蓉,张肖,常丽萍,等. 通心络胶囊抗动脉粥样硬化研究进展[J]. *中成药*, 2016, 38(2): 386-391.
- [11] CHEN W Q, ZHONG L, ZHANG L, et al. Chinese medicine Tongxinluo significantly lowers serum lipid levels and stabilizes vulnerable plaques in a rabbit model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124(1): 103-110.
- [12] SU W, SUN A, XU D, et al. Tongxinluo inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced maturation of human dendritic cells via activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56(2): 177-183.
- [13] CUI H H, LI X D, LI N, et al. Induction of autophagy by Tongxinluo through the MEK/ERK pathway protects human cardiac microvascular endothelial cells from hypoxia/reoxygenation injury[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 64(2): 180-190.
- [14] 吴以岭. 脉络论[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010: 670.
- [15] 吴以岭. 络病学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006: 179-180.
- [16] JIANG W, ZHENG B, ZHANG X H, et al. Tongxinluo inhibits neointimal formation by regulating the expression and post-translational modification of KLF5 in macrophages[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11): 4778-4790.
- [17] WU X L, ZHENG B, JIN L S, et al. Chinese medicine Tongxinluo reduces atherosclerotic lesion by attenuating oxidative stress and inflammation in microvascular endothelial cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6323-6333.
- [18] CHEN F Y, ZHOU J, GUO N, et al. Curcumin retunes cholesterol transport homeostasis and inflammation response in M1 macrophage to prevent atherostasis[J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2015, 15(10): 1-7.
- [19] ZHANG F, LIU H, JIANG G, et al. Changes in the proteomic profile during the differential polarization status of the human monocyte-derived macrophage THP-1 cell line[J]. *Proteomics*, 2015, 15(4): 773-786.
- [20] ZHANG J, WU G, DAI H. The matricellular protein CCN1 regulates TNF- $\alpha$  induced vascular endothelial cell apoptosis[J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(1): 1-6.
- [21] HAN X, Boisvert W A. Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function[J]. *Thromb Haemost*, 2015, 113(3): 505-512.

[责任编辑 周冰冰]