

脂质过氧化炎症损伤模型中参莲提取物对巨噬细胞功能的药效与机制探讨

尹婕¹, 李琦², 赵正², 杨庆², 刘思思¹, 李玉洁², 陈颖²,
王娅杰², 翁小刚², 蔡维艳², 朱晓新^{2*}

(1. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:研究参莲(SL)提取物在脂质过氧化炎症损伤模型中,对巨噬细胞功能的作用和促进炎症消散的药效和药理机制。方法:利用氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)体外诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞和人单核细胞 THP-1 造成脂质过氧化损伤模型,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测不同质量浓度的 SL 提取物(2.5, 5.0, 10.0, 20.0 mg·L⁻¹)对巨噬细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的含量;流式细胞术检测巨噬细胞泡沫化形成;transwell 实验检测 SL 提取物对 THP-1 趋化功能的影响;以及用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS),炎症消散因子 5 脂氧合酶(ALOX5)以及对核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路中的磷酸化 p65(p-p65)和磷酸化 I κ K(p-I κ K)蛋白表达情况。结果:与正常组比较,ox-LDL 提高 M1 型巨噬细胞标志物 TNF- α , IL-1 β , iNOS 的表达($P < 0.01$),抑制 M2 型标志物 IL-10 的表达,促进泡沫细胞形成($P < 0.01$),诱导 THP-1 向 ox-LDL 趋化,提高 MCP-1 分泌量($P < 0.01$),抑制 ALOX5 的表达。与模型组比较,SL 提取物可以降低 TNF- α , IL-1 β , iNOS 的表达($P < 0.01$),提高 IL-10 的表达($P < 0.05$);能显著降低巨噬细胞吞噬脂质后泡沫化的形成($P < 0.01$);能降低 THP-1 细胞 MCP-1 的分泌($P < 0.01$),减少趋化的细胞数目($P < 0.01$);促进炎症消散因子 ALOX5 的升高($P < 0.05$),同时抑制 p65 和 I κ K 磷酸化表达($P < 0.01$)。结论:在脂质过氧化炎症损伤模型中,SL 提取物具有诱导巨噬细胞 M2 极化,抑制巨噬细胞对 ox-LDL 的趋化和泡沫化的形成,提高 ALOX5 表达,促进炎症消散,从而改善脂质过氧化炎症损伤状态,上述功能与抑制 NF- κ B 信号通路中 p65 和 I κ K 磷酸化水平有关。

[关键词] 脂质过氧化炎症损伤模型;参莲提取物;巨噬细胞;炎症消散;泡沫化;趋化能力

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)10-0026-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191001

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190206.1427.001.html>

[网络出版时间] 2019-02-11 14:28

Effect of Shenlian Extract on Macrophage Function and Inflammatory Resolution in Lipid Peroxidation Inflammatory Injury Models

YIN Jie¹, LI Qi², ZHAO Zheng², YANG Qing², LIU Si-si¹, LI Yu-jie², CHEN Ying²,
WANG Ya-jie², WENG Xiao-gang², CAI Wei-yan², ZHU Xiao-xin^{2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Shenlian extract (SL extract) on macrophage function and inflammatory resolution in lipid peroxidation inflammatory injury models. **Method:** The effects of different concentrations of SL extract (2.5, 5.0, 10.0, 20.0 mg·L⁻¹) on the polarization type, foam formation and

[收稿日期] 20190111(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573649);国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09101002-002-002,2017ZX09101002-002-008);中国中医科学院国际合作项目(GH2017-01,ZXKT17010)

[第一作者] 尹婕,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:yinjane@foxmail.com

[通信作者] *朱晓新,研究员,博士生导师,从事中药药理学研究,E-mail:zhuxx@icmm.ac.cn

chemotactic function of macrophages were detected with RAW264.7 cells induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). Western blot was used to detect pro-inflammatory resolution factor arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5) and inducible inducible nitric oxide synthase (iNOS), and phosphorylated p65 (p-p65) and phosphorylated I κ K (p-I κ K) in nuclear factor (NF)- κ B related signaling pathways. **Result:** Compared with the control group, ox-LDL enhanced the expressions of M1 macrophage markers TNF- α , IL-1 β , iNOS ($P < 0.01$), inhibited the expressions of IL-10 of M2 markers, promoted foam cell formation ($P < 0.01$), induced THP-1 chemotaxis ability, increased the content of MCP-1 ($P < 0.01$), and inhibited the expression of ALOX5. Compared with the model group, SL extract reduced the expressions of TNF- α , IL-1 β , and iNOS ($P < 0.01$), increased the expression of IL-10 ($P < 0.05$), and down-regulated the formation of foam of macrophages ($P < 0.01$). In transwell assay, SL extract obviously decreased the MCP-1 secretion and the number of chemotaxis cells ($P < 0.01$), and promoted the increase of the inflammatory resolution factor ALOX5. The phosphorylation of p65 and I κ K was inhibited significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** In the inflammatory damage model of lipid peroxidation, SL extract can regulate the polarization of macrophage, inhibit the chemotaxis and foaming of ox-LDL, increase the inflammatory resolution molecular expression, and improve the state of lipid peroxidation, which may be related to the inhibition of NF- κ B signaling pathway.

[**Key words**] lipid peroxidation inflammatory damage model; Shenlian extract; macrophage; inflammation resolution; foam; chemotaxis

在高发病率和死亡率的心血管疾病中,动脉粥样硬化是主要的病理过程特征之一^[1]。流行病学调查发现,多数患动脉粥样硬化症的患者血脂水平明显高于正常人,脂质斑块形成发生较早且病情严重^[2]。基础研究发现,用大量胆固醇喂食动物,形成斑块中的胆固醇几乎全部来自血浆,其病变与人相似^[3]。脂质代谢异常导致局部血管脂质堆积,高脂质水平已经成为动脉粥样硬化形成重要的致病因素和病理特征。而在动脉粥样硬化患者和实验性动物中,均发现脂质异常代谢过程中伴随着炎症水平的变化,即表现为炎症介质的持续释放和炎症消散的缺失,称之为脂质过氧化炎症损伤^[4-5]。主要表现为高血脂状态的血管局部环境中,肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)等促炎细胞因子持续升高,而白细胞介素-10 (IL-10),5 脂氧合酶 (ALOX5)等炎症消散因子相对较少,从而使动脉粥样硬化进入一个持续性的慢性炎症过程^[6-7]。其中巨噬细胞作为重要参与者和执行者,其极化状态、吞噬能力、募集能力等都影响着脂质过氧化炎症损伤的过程发展^[8-10]。因此从调节巨噬细胞功能的角度,进行抗动脉粥样硬化脂质过氧化炎症损伤的药物研究,已成为一个重要的功能突破点和机制新靶点。

参莲 (SL) 提取物是由中药丹参与穿心莲以丹参脂溶性部位、水溶性部位和穿心莲脂溶性部位配伍而成,具有活血、解毒的功效。在前期研究中发现,SL 提取物能够减少动脉粥样硬化斑块面积,增

加近心端血流量,调节血脂,具有明确的抑制斑块形成的作用^[11-13];此外,SL 提取物还具有抑制炎症的生物活性^[14-16]。但 SL 提取物对炎症环境下对巨噬细胞募集能力,吞噬脂质等其他功能的作用尚未有系统性研究,以及对炎症消散水平的影响和具体作用机制也尚未清晰。因此本实验着重从上述研究的短板与不足出发,通过体外诱导巨噬细胞成脂质过氧化炎症损伤模型,进一步观察 SL 提取物对巨噬细胞功能的影响,以及对炎症消散状态和相关通路的作用,从而丰富药物药效靶点,明确药物作用机制,为进一步抗动脉粥样硬化药物的研发提供思路。

1 材料

1.1 细胞株 RAW264.7 细胞,THP-1 细胞,购自国家实验细胞资源共享平台,由美国 ATCC 公司生产。

1.2 药物及试剂 SL 提取物由丹参与穿心莲提取有效部位以药材比例 15:9 配伍组成,由中国中医科学院中药研究所化学室刘淑芝研究员鉴定并提供 (201609),含丹参酮 II_A (2.04%),丹酚酸 B (29.29%) 以及穿心莲内酯 (12.61%) 成分。DMEM 培养基, RPMI Medium 1640 培养基 (美国 Gibco 公司,批号分别为 C11995500BT, C11875500BT); 谷氨酰胺,结晶紫染料 (索莱宝生物科技有限公司,批号分别为 G0200, C8470); 胎牛血清 (兰州百灵生物科技有限公司,批号 20141002); 脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司,批号 L2880); TNF- α ,

IL-1 β , IL-10, 单核趋化蛋白-1 (MCP-1) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒 (达科为生物技术有限公司, 批号分别为 DKW12-2720, DKW12-2060, DKW12-2100, DKW12-2739); 诱导性一氧化氮合酶 (iNOS) 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号 ab3523); ALOX5 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 PB0008); 鼠抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体, 小鼠二抗 (天津三箭生物科技有限公司, 批号分别为 AC415, LK9001); 磷酸化 (p)-p65 单克隆抗体, p-I κ K 单克隆抗体, 兔二抗 (美国 CST 公司, 批号分别为 93H1, 16A6, 7074); Dio 荧光探针标记的氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) (Dio-ox-LDL) (上海昂羽生物技术有限公司, 批号 2017-12-22); transwell 小室 (美国 Costar 公司, 批号 3422)。

1.3 仪器 ELX800 Spectramax190 型连续波长酶标仪 (美国 MDC 公司), IX81 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), DYY-6D 型电泳仪 (北京市六一仪器厂), AccuriC6 型流式细胞仪 (美国 BD 公司), Heracell 150i 型细胞培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司), SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司), Centrifuge5424R 型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

2.1.1 RAW264.7 细胞的培养 RAW264.7 细胞使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养, 3 d 传代 1 次, 传代比例为 1:5, 传代次数不超过 30 代。使用时, 将细胞刮下, 加入培养基重悬, 计数后, 加入培养板各孔中。

2.1.2 THP-1 细胞的培养 THP-1 细胞使用含 10% FBS 的 1640 培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养, 3 d 传代 1 次, 传代比例为 1:5, 传代次数不超过 30 代。使用时, 加入培养基重悬, 计数后, 加入培养板各孔中。

2.2 脂质过氧化炎症损伤模型的构建 常规培养细胞, 取对数培养期 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板内, 分为空白组和模型组。结合文献报道^[17], 设计 0.5, 2.0, 10.0, 50.0 mg \cdot L⁻¹ 作为 ox-LDL 刺激浓度, 可造成不同程度的炎症损伤。LPS 是公认度较高的巨噬细胞炎症模型的诱导剂, 因此选取 0.01 mg \cdot L⁻¹ LPS 作为模型诱导成功的阳性对照。于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下培养 24 h 后, 均换为无血清培养基, 加入 ox-LDL 和 LPS, 使其质量浓度为 ox-LDL 0.5, 2.0, 10.0,

50.0 mg \cdot L⁻¹ 和 LPS 0.01 mg \cdot L⁻¹。24 h 收集细胞上清, 采用 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 含量, 并对细胞状态进行观察。实验重复 3 遍, 确定 ox-LDL 的最佳刺激剂量。

2.3 巨噬细胞极化因子检测

2.3.1 ELISA 检测 TNF- α , IL-1 β , IL-10 含量 取对数生长期 RAW264.7 细胞, 以 5×10^4 个/孔细胞密度接种于 6 孔板, 在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下培养箱中培养 24 h 后, 撤去含血清培养基, 分为空白组、模型组 (ox-LDL) 及 SL 给药组, 根据前期噻唑蓝 (MTT) 比色法实验结果^[15], 设定 SL 提取物质量浓度为 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 mg \cdot L⁻¹。ox-LDL 与 SL 提取物同时加入培养板内, 24 h 后收集培养上清, 按照 TNF- α , IL-1 β , IL-10 试剂盒说明进行操作, 在 450 nm 波长检测吸光度 A。实验重复 3 次。

2.3.2 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 iNOS 表达情况 同 2.3.1 项细胞分组和处理, 用预冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞 3 遍, 加入 RIPA 冰上裂解细胞 30 min, 使细胞裂解完全, 转移至离心管内, 13 000 \times g 离心 5 min, 吸取上清, BCA 试剂盒定量并且统一稀释到同一浓度。每孔上样 13 μ L, SDS-PAGE 分离蛋白, 湿转法转移至 PVDF 膜上, 5% BSA 室温封闭 1 h, iNOS 抗体 (1:2 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入鼠二抗 (1:2 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 发光。Image J 软件统计灰度值。实验重复 3 次。

2.4 THP-1 细胞的趋化能力 transwell 实验 取对数生长期 THP-1 细胞, 以 2×10^4 个/孔细胞密度接种于 24 孔板。选用 8 μ m 孔径的迁移小室, 下室加入含 SL 提取物 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 mg \cdot L⁻¹ 的条件培养基 600 μ L, 上室加对数生长期细胞 2×10^5 /孔重悬的细胞 300 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。将小室取出, 用湿棉签擦净小室上表面细胞, 无水乙醇固定 10 min, 1 g \cdot L⁻¹ 结晶紫染色 30 min, PBS 清洗。用显微镜对聚碳酸酯膜下表面的细胞进行计数。随机选取 10 个视野, 计数每个视野细胞数目, 取平均值。

2.5 流式细胞检测巨噬细胞泡沫细胞形成 常规培养细胞, 取对数培养期 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板内, 分为空白组和模型组 (Dio-ox-LDL 10.0 mg \cdot L⁻¹) 及给药组 (SL 提取物 5.0, 10.0, 20.0 mg \cdot L⁻¹)。在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下培养箱中培养 12 h 后, 撤去含血清培养基, 按照分组使用不含血清培养基配制相对应的细胞培

培养基混合液。在正常组内加入不含血清培养基,其余组内加入配制好的相对应的混合液,24 h 弃去上清,加入预冷 PBS 轻柔洗去未被吞噬的 Dio-ox-LDL,重复 2 遍后,加入 PBS 1 mL,使用细胞刮子将细胞轻柔全部刮下,使用吸量管将细胞吹打均匀,转移至干净 15 mL 离心管内,1 000 r·min⁻¹离心 10 min,弃去上清,加入预冷 PBS 300 μL,将细胞重悬,避光,进行流式检测。实验重复 3 次。

2.6 Western blot 检测促炎症消散分子 ALOX5 的蛋白表达水平 RAW264.7 细胞以 2 × 10⁵ 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板内,分为空白组、模型组(ox-LDL)及给药组(SL 提取物 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 mg·L⁻¹)。24 h 后细胞蛋白收集和 Western blot 方法如 2.3.2 项,检测 ALOX5 表达。实验重复 3 次。

2.7 Western blot 检测 NF-κB 信号通路相关蛋白表达 RAW264.7 细胞以 2 × 10⁵ 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板内,分为空白组、模型组(ox-LDL)及给药组(SL 提取物 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 mg·L⁻¹),24 h 后,细胞蛋白收集和 Western blot 方法如 2.3.2 项,检测 p-p65 和 p-IκK 蛋白水平变化。实验重复 3 次。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较用 *t* 检验,多组之间比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ox-LDL 的最佳刺激剂量的确定 在 ox-LDL 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 后,与空白组比较,TNF-α 均明显升高,其中以 10.0 mg·L⁻¹ 为显著,与 LPS 诱导效果最为接近,因此,选定 10.0 mg·L⁻¹ 为 ox-LDL 的最佳刺激剂量。见表 1。

表 1 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞上清 TNF-α 蛋白分泌水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of ox-LDL on content of TNF-α in RAW 264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹
空白	-	106.87 ± 4.60
ox-LDL	0.5	173.44 ± 5.17
	2.0	285.63 ± 9.63
	10.0	399.38 ± 8.84 ¹⁾
	50.0	224.69 ± 4.99
LPS	0.01	484.69 ± 5.74 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与模型组比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01(表 2~7 同)。

3.2 SL 提取物对 RAW264.7 细胞极化的影响 与

空白组比较,经 ox-LDL 诱导 24 h 后,巨噬细胞 M1 型标志物 TNF-α, IL-1β 明显升高(*P* < 0.05), iNOS 蛋白表达明显升高(*P* < 0.05), M2 型标志物 IL-10 含量明显降低(*P* < 0.05);与模型组比较,20.0 mg·L⁻¹ SL 提取物明显降低 TNF-α, IL-1β 的分泌和 iNOS 蛋白表达(*P* < 0.05, *P* < 0.01), 升高 M2 型 IL-10 的含量(*P* < 0.05)。其中,5.0, 10.0, 20.0 mg·L⁻¹ 的 SL 提取物下降 IL-1β 作用较为显著(*P* < 0.01)。见表 2, 图 1 和表 3。

表 2 SL 提取物对 RAW264.7 巨噬细胞极化标志物 TNF-α, IL-1β 和 IL-10 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of SL extract on content of TNF-α, IL-1β and IL-10 in RAW264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TNF-α	IL-1β	IL-10
空白	-	152.15 ± 27.50	396.50 ± 12.68	671.66 ± 58.40
ox-LDL	10.0	318.46 ± 53.27 ¹⁾	491.33 ± 8.01 ¹⁾	458.67 ± 163.28
SL	2.5	234.00 ± 14.75	414.16 ± 28.75	536.17 ± 208.58
	5.0	261.63 ± 35.73	339.33 ± 36.31 ⁴⁾	703.67 ± 155.75
	10.0	218.92 ± 49.06	358.16 ± 38.21 ⁴⁾	689.50 ± 235.04
	20.0	191.00 ± 24.85 ³⁾	350.91 ± 52.32 ⁴⁾	752.67 ± 64.08 ³⁾

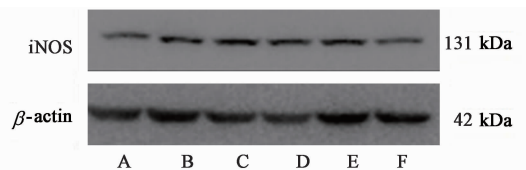


图 1 RAW264.7 巨噬细胞 iNOS 蛋白水平表达电泳
A. 空白组; B. ox-LDL 10 mg·L⁻¹ 组; C. SL 提取物 2.5 mg·L⁻¹ 组; D. SL 提取物 5.0 mg·L⁻¹ 组; E. SL 提取物 10.0 mg·L⁻¹ 组; F. SL 提取物 20.0 mg·L⁻¹ 组(图 2~4 同)

Fig. 1 Electrophoresis of iNOS protein expression in RAW264.7

表 3 SL 提取物对 RAW264.7 巨噬细胞 M1 极化标志物 iNOS 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of SL extract on content of iNOS in RAW264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	iNOS/β-actin
空白	-	152.15 ± 27.50
ox-LDL	10.0	318.46 ± 53.27 ¹⁾
SL	2.5	234.00 ± 14.75
	5.0	261.63 ± 35.73
	10.0	218.92 ± 49.06
	20.0	191.00 ± 24.85 ³⁾

3.3 SL 提取物对 THP-1 细胞趋化作用的影响 通过 transwell 趋化实验可知,与空白组比较,ox-LDL

能显著促进 THP-1 细胞发生趋化 ($P < 0.01$), 并提高 MCP-1 的蛋白分泌量 ($P < 0.05$); 与模型组比较, SL 提取物能显著减少趋化细胞数 ($P < 0.05, P < 0.01$), 降低 ox-LDL 引起的趋化蛋白 MCP-1 的升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

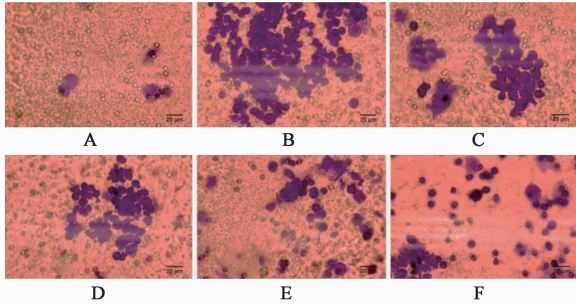


图 2 SL 提取物对 THP-1 细胞趋化能力的影响

Fig 2 Effect of SL extract on chemotaxis in THP-1

表 4 SL 提取物对 THP-1 细胞趋化能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of SL extract on chemotaxis in THP-1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	MCP-1	细胞计数
空白	-	299.50 \pm 39.96	6.40 \pm 3.36
ox-LDL	10.0	378.50 \pm 21.80 ¹⁾	193.84 \pm 32.58 ²⁾
SL	2.5	305.50 \pm 19.45	183.41 \pm 28.31
	5.0	227.00 \pm 12.73 ³⁾	127.70 \pm 14.13 ⁴⁾
	10.0	227.17 \pm 7.90 ³⁾	85.82 \pm 12.39 ⁴⁾
	20.0	163.33 \pm 10.61 ⁴⁾	57.11 \pm 17.54 ⁴⁾

3.4 SL 提取物对 RAW264.7 细胞泡沫细胞形成的影响 与空白组比较, 模型组中脂质在细胞内累积细胞数显著升高 ($P < 0.01$), 占整体活细胞数目 19.66%。与模型组比较, 而在加入 SL 提取物刺激后, 脂质累积细胞数量显著减少 ($P < 0.01$)。在平均荧光强度的检测中, 与空白组比较, 模型组平均荧光强度显著升高 ($P < 0.01$), 而在给予药物刺激后, 与模型组比较, 各给药组平均荧光强度显著降低 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 SL 提取物对 RAW264.7 细胞泡沫细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of SL extract on foam cell formation in RAW264.7 cells by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	泡沫细胞数/%	平均荧光强度
正常	-	0.32 \pm 0.17	2 440.81 \pm 107.01
ox-LDL	10.0	78.57 \pm 1.66 ²⁾	11 954.00 \pm 198.50 ²⁾
SL	5.0	67.40 \pm 1.15 ⁴⁾	10 935.83 \pm 156.91 ⁴⁾
	10.0	63.18 \pm 2.51 ⁴⁾	10 721.37 \pm 323.68 ⁴⁾
	20.0	55.08 \pm 2.09 ⁴⁾	10 430.61 \pm 280.50 ⁴⁾

3.5 SL 提取物对炎症消散相关因子 ALOX5 的影响 与空白组比较, ox-LDL 可以降低炎症消散相关因子 ALOX5 的蛋白表达; 与模型组比较, SL 提取物能升高 ALOX5 的蛋白水平, 其中 10.0, 20.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SL 提取物具有明显提高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 并且具有一定的剂量依赖性。见图 3, 表 6。

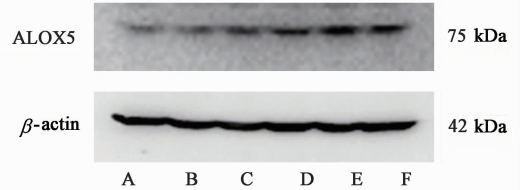


图 3 RAW264.7 细胞炎症消散相关因子 ALOX5 的蛋白电泳

Fig 3 Electrophoresis of ALOX5 protein expression in RAW264.7

表 6 SL 提取物对 RAW264.7 炎症消散相关因子 ALOX5 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of SL extract on content of ALOX5 in RAW264.7

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	ALOX5/ β -actin
空白	-	0.40 \pm 0.03
ox-LDL	10.0	0.33 \pm 0.07
SL	2.5	0.57 \pm 0.06
	5.0	0.67 \pm 0.09
	10.0	0.87 \pm 0.11 ³⁾
	20.0	0.58 \pm 0.06 ⁴⁾

3.6 SL 提取物对 RAW264.7 巨噬细胞极化 NF- κ B 相关蛋白的影响 与空白组比较, 模型组在给予 ox-LDL 刺激后, 能够使巨噬细胞 p65 和 I κ K 磷酸化表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 不同剂量 SL 提取物均能够显著降低 p65 和 I κ K 磷酸化水平, 其中 SL 提取物 5.0, 10.0, 20.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 具有显著差异 ($P < 0.01$)。见图 4, 表 7。

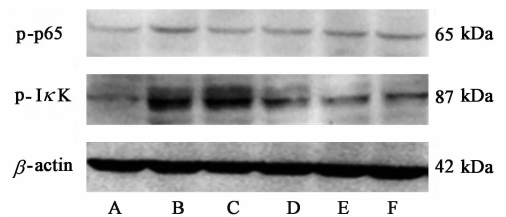


图 4 RAW264.7 细胞 p-p65 and p-I κ K 蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p-p65 and p-I κ K protein expression in RAW264.7

4 讨论

在 ox-LDL 构建的脂质过氧化炎症损伤模型中,

表 7 SL 提取物对 RAW264.7 p-p65 和 p-IκK 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of SL extract on expression of p-p65 and p-IκK in RAW264.7 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p-p65/β-actin	p-IκK/β-actin
空白	-	0.48 ± 0.02	0.210 ± 0.040
ox-LDL	10.0	0.89 ± 0.02 ²⁾	1.030 ± 0.164 ²⁾
SL	2.5	0.45 ± 0.01	1.852 ± 0.361
	5.0	0.49 ± 0.00 ⁴⁾	0.332 ± 0.031 ⁴⁾
	10.0	0.50 ± 0.00 ⁴⁾	0.251 ± 0.010 ⁴⁾
	20.0	0.56 ± 0.01 ⁴⁾	0.227 ± 0.012 ⁴⁾

SL 提取物能降低 M1 型表达,并使巨噬细胞逆转为 M2 型。SL 提取物能抑制巨噬细胞对 ox-LDL 的趋化能力和吞噬脂质后的泡沫化形成,并提高炎症消散 ALOX5 分子的表达,从而改善脂质过氧化炎症损伤状态,此与抑制 NF-κB 信号通路中 p65 和 IκK 磷酸化有关。本研究有效地证明了 SL 提取物对动脉粥样硬化过程中巨噬细胞功能的调节作用,为进一步作为抗动脉粥样硬化候选药物提供了实验支持。

本实验采用 ox-LDL 为脂质过氧化炎症损伤的诱导剂,更贴合动脉粥样硬化的真实病理环境。在体内过程中,脂蛋白颗粒通过受损内皮进入内皮被过氧化物酶,脂氧化酶和一氧化氮合酶所介导的氧化反应所修饰^[18-19],这些多是由巨噬细胞产生;氧化后的低密度脂蛋白具有化学趋化性,致动脉粥样硬化性和被清道夫受体识别的特性^[20],进一步诱导巨噬细胞发生极化和功能改变^[21-22]。可见巨噬细胞在脂质过氧化过程中充当重要角色。此外,整体的炎症水平也受到脂质代谢的花生四烯酸途径和炎症相关信号通路的调控^[23-24],这些基本通过巨噬细胞来执行完成。因此以 ox-LDL 诱导脂质过氧化模型,不仅贴合体内脂质代谢,更能高度还原巨噬细胞在体内的炎症环境,为靶向巨噬细胞的药物研究提供良好基础。

在以往对巨噬细胞单一化的研究基础上,本实验将关注点拓展到 SL 提取物对巨噬细胞全链条的功能调节上。从极化水平,到趋化能力,到吞噬能力,泡沫化能力,按照病程的发展,探讨并证明了 SL 提取物对动脉粥样硬化脂质过氧化炎症损伤的全程参与和药效发挥。并且从炎症消散的角度,丰富了 SL 提取物对炎症调节的内涵,更加符合中医药理论“协调平衡”的观念,为进一步完善 SL 提取物的炎症相关机制研究提供了充足的实验支持。

动脉粥样硬化本质上是促炎信号的持续释放与促炎症消散信号的缺失的过程,除巨噬细胞与疾病炎症进程发展密切相关^[25]外,还有许多其他细胞,如平滑肌细胞,血管内皮细胞,T 淋巴细胞,树突细胞等,共同存在于动脉粥样硬化血管病变微环境中,他们之间相互影响,共同作用,也都参与到动脉粥样硬化炎症损伤进程中来^[26-28]。目前,以单种细胞变化的药物研究已经开展地如火如荼^[29-30],但针对细胞间相互作用的药理学则研究较少,尚属薄弱环节。细胞之间的相互作用对于斑块的进展,以及脂质的代谢都具有极为重要的影响。例如,巨噬细胞与平滑肌细胞的相互作用,可改变平滑肌表型,并产生炎症水平的变化,从而影响动脉粥样硬化疾病进程^[31-32]。如果进一步研究 SL 提取物细胞间的相互作用的药效影响,则能改变以往药物研究单一化、孤立化的状况,使药效评价指标更加完善,研究格局更加多面,从而形成 SL 提取物对动脉粥样硬化更系统全面的药效药理评价。

SL 提取物是一个有效的抗动脉粥样硬化的候选药物,完善 SL 提取物在治疗动脉粥样硬化以及动脉粥样硬化炎症消散进程中的药理认识,丰富 SL 提取物对于动脉粥样硬化治疗的药效靶点,将有助于为未来抗动脉粥样硬化药物的优化与开发提供实验依据,同时,以 SL 提取物为代表,体现抗动脉粥样硬化传统中药以炎症免疫调节为思路的新活力,对其他中药系统化开发与创新化研究起到积极的指导意义。

[参考文献]

[1] Moss J W, Davies T S, Garaiova I, et al. A unique combination of nutritionally active ingredients can prevent several key processes associated with atherosclerosis *in vitro* [J]. PLoS One, 2016, 11 (3):e0151057.

[2] Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis-a matter of unresolved inflammation [J]. Semin Immunol, 2015, 27 (3):184-193.

[3] Fredman G, Tabas I. Boosting inflammation resolution in atherosclerosis: the next frontier for therapy [J]. Am J Pathol, 2017, 187(6):1211-1221.

[4] Motwani M P, Gilroy D W. Macrophage development and polarization in chronic inflammation [J]. Semin Immunol, 2015, 27(4):257-266.

[5] LIU Y C, ZOU X B, CHAI Y F, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases [J]. Int J Biol Sci,

- 2014,10(5):520-529.
- [6] Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010,10(1):36-46.
- [7] Gimbrone M A, Garcia-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2013, 22 (1) : 9-15.
- [8] Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis [J]. *Immunol Rev*, 2014, 262(1):153-166.
- [9] Shaikh S, Brittenden J, Lahiri R, et al. Macrophage subtypes in symptomatic carotid artery and femoral artery plaques [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2012, 44(5): 491-497.
- [10] Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, et al. Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(3):248-255.
- [11] 陈丽娜,李玉洁,杨庆,等. SL方对大鼠动脉粥样硬化病变形成过程影响的动态观察[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(1):66-71.
- [12] 郭琰. 基于炎症消散的 SL 提取物抗动脉粥样硬化作用的机理研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2015.
- [13] 李玉洁,朱晓新,杨庆,等. SL 提取物对动脉粥样硬化家兔血管病理形态和脂质代谢的影响[J]. *中草药*, 2011, 42(4):760-764.
- [14] 李玉洁,杨庆,翁小刚,等. SL 提取物抗炎药理活性评价[J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(1):65-69.
- [15] 刘思思,李琦,孙立东,等. SL 提取物对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10):85-91.
- [16] 周冰冰,李玉洁,李琦,等. SL 提取物对 M1 巨噬细胞的影响[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(11):2086-2090.
- [17] Jongstra-Bilen J, ZHANG C X, Wisnicki T, et al. Oxidized low-density lipoprotein loading of macrophages downregulates TLR-induced proinflammatory responses in a gene-specific and temporal manner through transcriptional control [J]. *J Immunol*, 2017, 199(6): 2149-2157.
- [18] Clement C, Alma Z. Macrophages and immune cells in atherosclerosis: recent advances and novel concepts[J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(4):34.
- [19] Martin R B, Sanjay S, Gary K O. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4):692-702.
- [20] Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010,10(1):36-46.
- [21] 王波,余珊,何江波,等. 熊果酸对 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇逆转运及对 PPAR- γ 的基因及蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10):127-132.
- [22] Ravandi A, Leibundgut G, Hung M Y, et al. Release and capture of bioactive oxidized phospholipids and oxidized cholesteryl esters during percutaneous coronary and peripheral arterial interventions in humans [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(19):1961-1971.
- [23] Caligiuri G, Rudling M, Ollivier V, et al. Lesions and Th17 in interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Mol Med*, 2003, 9(1/2):10-17.
- [24] Getz G S, Reardon C A. Atherogenic lipids and macrophage subsets [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2015, 26(5):357-361.
- [25] WANG H H, Garruti G, LIU M, et al. Cholesterol and lipoprotein metabolism and atherosclerosis: recent advances in reverse cholesterol transport [J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(Suppl. 1):s3-105):s27-s42.
- [26] Sergin I, Evans T D, Razani B. Degradation and beyond: the macrophage lysosome as a nexus for nutrient sensing and processing in atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2015, 26(5):394-404.
- [27] Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 84:1-7.
- [28] Sugimoto M A, Ribeiro A L C, Costa B R C, et al. Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1 [J]. *Blood*, 2017, 129(21): 2896-2907.
- [29] 刘玉晖,侯贝贝,游宇,等. 补阳还五汤稳定 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化易损斑块的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(15):112-119.
- [30] 万强,刘中勇. 定心方通过上调 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞表达对 PM2.5 所致动脉粥样硬化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(17):139-144.
- [31] YUAN T, YANG T, CHEN H, et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis [J]. *Redox Biol*, 2018, 20:247-260.
- [32] Gordon S, Pluddemann A, Martinez E F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions [J]. *Immunol Rev*, 2014, 262(1):36-55.

[责任编辑 周冰冰]