

冠心平含药血清对氧化低密度脂蛋白诱导的 RAW264.7 巨噬细胞泡沫化的影响

周冠进¹, 严飞¹, 孙玉婷², 陈韦凯², 掌琳惠², 袁冬平², 刘福明³

(1. 涟水县中医院, 江苏 淮安 223400; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023;

3. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210023)

[摘要]目的 观察冠心平含药血清对氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)诱导的 RAW264.7 巨噬细胞泡沫化的调控作用。**方法** 将 RAW264.7 巨噬细胞分为对照组, 模型组, 冠心平含药血清低、中、高剂量组, 以 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL 刺激 24 h, 诱导巨噬细胞泡沫化模型, 采用不同浓度冠心平含药血清进行干预。油红 O 染色观察巨噬细胞内脂滴形成; ELISA 法检测巨噬细胞内游离胆固醇(free cholesterol, FC)与胆固醇酯(cholesterol esterase, CE)的表达水平; 实时荧光定量 PCR 法检测巨噬细胞清道夫受体 A(scavenger receptor-A, SR-A)和 CD36 mRNA 表达水平。**结果** 冠心平中、高剂量能够显著减少巨噬细胞泡沫化; 低剂量显著增加巨噬细胞 FC 水平($P < 0.05$), 高剂量显著降低巨噬细胞 CE 水平($P < 0.05$); 冠心平高剂量显著增加 SR-A mRNA 表达水平($P < 0.05$), 低、中、高剂量均显著增加 CD36 mRNA 表达水平($P < 0.05$)。**结论** 冠心平能够抑制巨噬细胞的泡沫化, 这或许是冠心平治疗动脉粥样硬化的潜在机制之一。

[关键词] 冠心平; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; 泡沫化

[中图分类号] R541.4 **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2021.04.019

冠心平由黄精、当归、三七、瓜蒌皮、甘松五味药组成, 适用于气阴两虚、痰瘀互阻型稳定心绞痛, 同时还可作为心肌梗死的辅助用药, 改善预后^[1]。前期临床和动物实验结果^[2]表明, 其具有调节血脂、抗血小板、抗血液黏稠度增高、抗氧化和保护血管内皮细胞功能等作用。

血液中的单核细胞在受到相关信号刺激后聚集到血管内壁, 发育成为巨噬细胞, 巨噬细胞吞噬并处理脂质; 但当脂质水平过高、超过巨噬细胞的处理能力时, 巨噬细胞产生泡沫化, 进一步发展为泡沫细胞, 使脂质在血管内壁不断堆积, 加剧动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)疾病进程^[3]。因此, 进一步研究冠心平对巨噬细胞泡沫化进程的调控将有助于 AS 的防治。

1 材料

1.1 药品和试剂 冠心平片(药物批准文号: 苏药制字 Z04000515; 批号: 1812008), 药片研磨成粉末

后溶于蒸馏水并进行梯度稀释。DMEM 培养基、胎牛血清: 美国 Gibco 公司; 青霉素双抗溶液: 美国 Thermo 公司; 磷酸盐缓冲液粉末: 博士德生物工程有限公司; 油红 O 粉末: 北京索莱宝科技有限公司; 游离胆固醇(free cholesterol, FC)检测试剂盒、胆固醇酯(cholesterol esterase, CE)检测试剂盒: 南京建成生物工程研究所; TRIzol 试剂: Invitrogen; DEPC 水(批号 71027223)、Tris-EDTA 缓冲液(批号 69097422): Biosharp; 三氯甲烷(批号 20130916): 上海凌峰化学试剂有限公司; 异丙醇(批号 20190227)、无水乙醇(批号 20190920): 国药集团化学试剂有限公司; 5X All-In-One 逆转录试剂盒(G490)、EvaGreen 2X qPCR MasterMix-Low ROX 试剂盒(Master Mix-LR): Abm; PCR 引物: 上海生物工程股份有限公司。

1.2 仪器 NanoDrop One 微量紫外-可见光分光光度计、Revco ULT 超低温冰箱、Heraeus Multifuge X1R 离心机: 美国 Thermo Fisher 公司; Infinite M200PRO 多功能酶标仪: 瑞士 TECAN 公司; 5417R 高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司; Veriti 96-Well Thermal Cycler 梯度 PCR 仪、7500 荧光实时定量 PCR 仪: 美国 Applied Biosystems 公司。

2 方法

2.1 冠心平含药血清获取 冠心平片按标示量研

基金项目: 江苏省重点研发计划项目(BE2020683); 江苏省中医药科技发展计划重点项目(ZD201906); 江苏省中医院创新发展基金项目(Y2019CX20)

作者简介: 周冠进(1984-), 男, 硕士研究生

通信作者: 刘福明(1966-), 男, 博士, 主任中医师, 博士生导师, doctor.liufuming@outlook.com

磨成粉末,蒸馏水溶解,4℃保存,使用前37℃水浴温热。12只SD大鼠[180~200g,雄性,SPF级,合格证号为1103241911006182,生产许可证号为SCXK(京)2016-0002],购自青龙山实验动物繁殖场,饲养于南京中医药大学实验室。适应性喂养3d后,将大鼠分为空白组、冠心平低剂量组(0.405g/kg)、冠心平中剂量组(0.810g/kg)、冠心平高剂量组(1.620g/kg),每组3只。冠心平各剂量组连续4d灌胃给药,空白组给予蒸馏水,末次给药1h后,戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉采血,血液于室温静置2h,3000r/min离心10min,分离血清,血清56℃热灭活30min,0.22μm滤膜过滤除菌后于-80℃分装保存备用。

2.2 RAW264.7巨噬细胞培养 细胞复苏:冻存的巨噬细胞于37℃水浴中迅速解冻,将细胞转移到装有2mL全血清培养液的15mL离心管。800r/min离心5min后弃上清,加入1mL全血清培养液重悬混匀后加入培养皿,摇匀。在37℃、5%CO₂细胞培养箱内培养,第2天更换培养基,细胞生长到对数生长期进行传代。

细胞传代:吸取一部分培养基,用剩余培养基将贴壁细胞吹落,置于显微镜下摇晃观察,将含有细胞的培养基吸入15mL至离心管,离心,贴好封口膜,离心条件为25℃、800r/min、5min;离心结束后,弃去上清,向细胞沉淀中加入1mL全血清培养液重悬,吹匀;将吹匀的1mL细胞分别加入培养皿中,并加入新鲜全血清培养液8mL,混匀。放入37℃、5%CO₂培养箱进行培养。

2.3 巨噬细胞泡沫化 取RAW264.7细胞悬液,调整密度为 1.0×10^5 /mL,接种于含培养基的24孔板中,每个孔接种1mL(含100μL冠心平各剂量组含药血清),细胞分为空白组,模型组,冠心平含药血清低、中、高剂量组,贴壁培养12h,吸除原培养基,除空白组外,其余各组加入氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)80μg/mL诱导巨噬细胞泡沫化,作用24h。

2.4 油红O染色 RAW264.7细胞 取RAW264.7细胞悬液,调整密度为 1.0×10^5 /mL,接种于含培养基的24孔板中,每个孔接种1mL,细胞分为空白组,模型组,冠心平含药血清低、中、高剂量组,贴壁培养12h,吸除原培养基,除空白组外,其余各组加入ox-LDL(80μg/mL)诱导巨噬细胞泡沫化,作用24h,空白组和模型组加入新鲜全血清培养液,药物干预组加入高、中、低剂量的冠心平含药血清作用于

细胞,24h后进行油红O染色。

2.5 巨噬细胞胆固醇水平检测 RAW264.7巨噬细胞接种于6孔板,每孔接种2mL,将细胞密度调整为每孔 1×10^5 ,贴壁12h,次日早上吸走原培养基,除了空白组加入新鲜全血清培养液,其余各组给予ox-LDL(80μg/mL),刺激细胞24h后,药物组加入10%不同浓度冠心平含药血清作用于细胞,作用24h后按试剂盒说明书测定胆固醇水平,包括FC与CE。

2.6 实时荧光定量PCR法检测巨噬细胞清道夫受体A(scavenger receptor-A, SR-A)与CD36 mRNA表达水平 TRIzol法提取细胞RNA。细胞培养于6孔板,药物处理结束后弃去培养上清,1mL TRIzol试剂加入细胞中,充分吹打,收集溶液于离心管内,12000r/min,4℃高速离心,收集上清,用三氯甲烷去除苯酚等有机相后,加入异丙醇将RNA与水相分离,获得RNA沉淀。75%乙醇清洗RNA后控干,DEPC水溶解。微量紫外分光光度计检测RNA浓度,用DEPC水将RNA定量为10ng/μL。按试剂说明书要求加入预混的逆转录试剂和RNA,用梯度PCR仪将RNA逆转录为互补DNA(cDNA)。选用特异性PCR扩增引物,根据实时荧光定量PCR试剂盒说明书要求,使用Thermo Fisher 7500实时荧光定量PCR仪进行扩增反应。mRNA相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算,内参基因为GAPDH。

2.7 统计学方法 使用SPSS 17.0统计学软件分析数据。连续型变量采用“均数±标准差($\bar{x} \pm s$)”进行统计学描述。两组均数比较使用两个独立样本t检验,多组均数比较使用单因素方差分析。采用双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

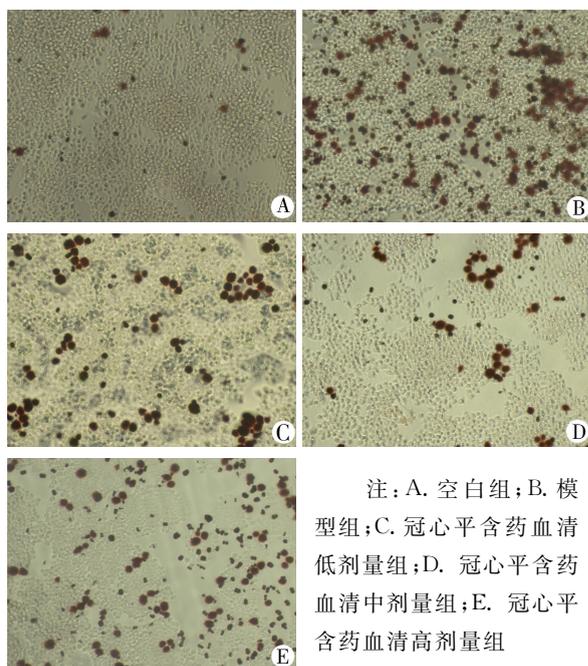
3 结果

3.1 冠心平含药血清减少巨噬细胞的泡沫化 与空白组相比,模型组巨噬细胞大量红染脂滴,代表泡沫化程度明显;与模型组比较,冠心平含药血清低、中、高剂量组均减轻了巨噬细胞泡沫化情况,其中尤以中、高剂量组效果最为明显。见图1。

3.2 冠心平含药血清调节巨噬细胞胆固醇水平 与模型组比较,冠心平含药血清低剂量组巨噬细胞FC水平显著增加($P < 0.05$);冠心平含药血清高剂量组巨噬细胞CE水平显著降低($P < 0.05$)。见表1。

3.3 冠心平含药血清增加泡沫细胞相关因子表达水平 与模型组比较,冠心平含药血清高剂量组SR-A mRNA表达水平显著增加($P < 0.05$);冠心

平含药血清低、中、高剂量组 CD-36 mRNA 表达水平平均显著增加($P<0.05$)。见表2。



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 冠心平含药血清低剂量组; D. 冠心平含药血清中剂量组; E. 冠心平含药血清高剂量组

图1 冠心平含药血清对巨噬细胞泡沫化的影响
(油红O染色, 10×20 倍)

表1 冠心平含药血清对巨噬细胞胆固醇水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	FC/ (mmol/L)	CE/ (mmol/L)
空白	3	74.51±33.30	7.595±1.696
模型	3	74.51±18.24	7.304±1.165
冠心平含药血清低剂量	3	125.90±13.88 [#]	6.743±0.087
冠心平含药血清中剂量	3	106.80±23.36	6.062±0.911
冠心平含药血清高剂量	3	117.60±19.78	3.899±0.801 [#]

注:与模型组比较,[#] $P<0.05$

表2 冠心平含药血清对巨噬细胞 SR-A 与 CD36 mRNA 表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SR-A	CD-36
空白	3	1.203±0.357	1.025±0.0287
模型	3	2.031±0.749	1.133±0.505
冠心平含药血清低剂量	3	3.246±2.149	3.371±0.867 [#]
冠心平含药血清中剂量	3	3.280±0.387	4.093±0.369 [#]
冠心平含药血清高剂量	3	4.203±0.586 [#]	3.538±0.628 [#]

注:与模型组比较,[#] $P<0.05$

4 讨论

巨噬细胞泡沫化是 AS 形成的一个重要因素,巨噬细胞内脂质过量积累是形成泡沫细胞的重要原因,巨噬细胞泡沫化会引发相关的炎症反应,进一步加重 AS 病理进程^[4],因此抑制巨噬细胞泡沫化并减轻由此引发的炎症反应对防治 AS 具有积极作用。

巨噬细胞向泡沫细胞的转化是以细胞内脂质大量沉积为特点的,ox-LDL 常被用于诱导巨噬细胞泡沫化^[5]。本研究选用 ox-LDL 处理巨噬细胞 24 h 以造成巨噬细胞泡沫化模型,观察不同浓度冠心平含药血清在这一过程中的影响。

油红 O 染色结果显示,ox-LDL 处理增加了泡沫细胞的形成,表明巨噬细胞泡沫化模型构建成功。进一步加以不同浓度的冠心平含药血清干预后,泡沫细胞的形成减少,以中、高浓度较为明显。实验结果表明,冠心平含药血清能够对巨噬细胞泡沫化产生一定的抑制作用,并且具有一定的剂量依赖性。

在巨噬细胞泡沫化进程中,巨噬细胞对脂质的处理能力减弱,脂质在细胞内不断堆积,进而加剧泡沫化的发生。FC 与 CE 属于脂质中的胆固醇,是胆固醇的两种存在形式,其水平的增加意味着巨噬细胞更易于泡沫化以及泡沫化进程的加快^[6]。本研究结果表明,冠心平低剂量含药血清增加细胞 FC 含量,但中、高剂量含药血清则不具有增加 FC 水平的作用。此外,高剂量含药血清降低了 CE 水平,减少了细胞的 CE 脂质含量。实验结果表明,冠心平含药血清对于不同类型的胆固醇可能存在不同的调节作用。冠心平对于 FC 的升高作用和对于结合形式的 CE 的降低作用,表明其对于 CE 的形成过程存在抑制作用,但这需要进一步的实验验证。

巨噬细胞在泡沫化过程中,SR-A 的表达水平增加与巨噬细胞摄取 ox-LDL 相关^[7]。研究结果表明,高剂量冠心平含药血清显著增加了 SR-A mRNA 的表达,这提示冠心平含药血清增加了巨噬细胞对 ox-LDL 的摄取。此外,对 CD36 的检测则表明冠心平含药血清低、中、高剂量均可增加 CD36 mRNA 的表达水平。SR-A 与 CD36 的表达增加提示巨噬细胞摄取了更多的 ox-LDL,意味着巨噬细胞更易于发展成为泡沫细胞^[8],但油红 O 染色的结果又与此推论相反。由此,笔者推测冠心平含药血清在巨噬细胞处理脂质的环节发挥了重要作用,冠心平含药血清很有可能增强了巨噬细胞对脂质的分解,使得巨噬细胞对外界脂质的摄取能力增强却又不加剧自身向泡沫化的转变,事先对环境中脂质的调节及对自身的调节^[9-10]。同时,这也使得冠心平含药血清增加 FC 却减少 CE 水平这一实验结果易于理解。

综合实验结果来看,冠心平含药血清能够抑制巨噬细胞的泡沫化,但这一功能的发挥可能并不是常规直接减少巨噬细胞对脂质的摄取,其中更可能

涉及巨噬细胞对脂质的处理。

参考文献:

- [1] 张洪兵,袁礼洪. 冠心平对冠心病心绞痛患者血管内皮功能障碍的调节作用[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(4):24-27.
- [2] 朱萱萱,李七一,吴旭彤,等. 冠心平颗粒对金黄色地鼠血脂与动脉粥样硬化斑块形成的影响[J]. 医药导报, 2012, 31(2):135-128.
- [3] CHISTIYAKOV D A, MELNICHENKO A A, MYASOEDOVA V A, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis[J]. J Mol Med, 2017, 95 (11): 1153-1165.
- [4] MAGUIRE E M, PEARCE S W A, XIAO Q. Foam cell formation; a new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease[J]. Vascul Pharmacol, 2019, 112: 54-71.
- [5] HE J, ZHANG G, PANG Q, et al. SIRT6 reduces macrophage foam cell formation by inducing autophagy and cholesterol efflux under ox-LDL condition[J]. FEBS J, 2017, 284(9):1324-1337.
- [6] CHISTIYAKOV D A, BOBRYSHV Y V, OREKHOV A N. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(1):17-28.
- [7] NIGORIKAWA K, MATSUMURA T, SAKAMOTO H, et al. Sac1 phosphoinositide phosphatase regulates foam cell formation by modulating SR-A expression in macrophages[J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(6):923-928.
- [8] ACKERS I, SZYMANSKI C, DUCKETT K J, et al. Blocking Wnt5a signaling decreases CD36 expression and foam cell formation in atherosclerosis[J]. Cardiovasc Pathol, 2018, 34:1-8.
- [9] MCLAREN J E, MICHAEL D R, ASHLIN T G, et al. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy[J]. Prog Lipid Res, 2011, 50(4):331-347.
- [10] WANG F, ZHANG Z, FANG A, et al. Macrophage foam cell-targeting immunization attenuates atherosclerosis[J]. Front Immunol, 2019, 9:3127.

(收稿日期:2021-02-20)

Effect of Serum Containing Guanxinping on the Foaming of RAW264. 7 Macrophages Induced by Oxidized Low-density Lipoprotein

ZHOU Guan-jin¹, YAN Fei¹, SUN Yu-ting², CHEN Wei-kai², ZHANG Lin-hui², YUAN Dong-ping², LIU Fu-ming³

(1. Lianshui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Huai'an 223400, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Nanjing 210023, China; 3. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Nanjing 210023, China)

[Abstract] Objective To investigate the regulatory effect of serum containing Guanxinping on the foaming of RAW264. 7 macrophages induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** RAW264. 7 macrophages were divided into control group, model group, and low-, middle-, and high-dose serum containing Guanxinping groups. RAW264. 7 macrophages were stimulated by 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL for 24 hours to establish a model of macrophage foaming, and different concentrations of serum containing Guanxinping were used for intervention. Oil red O staining was used to observe the formation of lipid droplets in macrophages; ELISA was used to measure the expression of free cholesterol (FC) and cholesterol esterase (CE) in macrophages; quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression of SR-A and CD36 in macrophages. **Results** Middle- and high-dose Guanxinping significantly reduced the foaming of macrophages. Low-dose Guanxinping significantly increased the level of FC in macrophages ($P < 0.05$), and high-dose Guanxinping significantly reduced the level of CE in macrophages ($P < 0.05$). High-dose Guanxinping significantly increased the mRNA expression level of SR-A ($P < 0.05$), and low-, middle-, and high-dose Guanxinping significantly increased the mRNA expression level of CD36 ($P < 0.05$). **Conclusion** Guanxinping can inhibit the foaming of macrophages, which may be one of the potential mechanisms of Guanxinping in the treatment of atherosclerosis.

[Key words] Guanxinping; Atherosclerosis; Macrophage; Foaming