

黄精多糖对小鼠腹腔源性巨噬泡沫细胞形成的抑制作用[△]

郑星宇^{1*}, 魏世超¹, 王热华^{1,2}, 黄昉萌¹, 孟晓嵘¹, 郭苗苗³, 骆杰伟¹(1.福建省立医院中医科,福州 350001;2.福建省立医院心内科,福州 350001;3.福建省立医院高干门诊,福州 350001)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2178-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.06

摘要 目的:研究黄精多糖对小鼠腹腔源性巨噬泡沫细胞(MFC)形成的抑制作用。方法:体外传代培养细胞,以20 mg/L氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)培养细胞以复制MFC模型。试验分为空白对照(常规培养基)组、模型(常规培养基)组与黄精多糖高、中、低浓度(质量浓度分别为80、40、20 mg/L)组,复制模型的同时给药培养,连续72 h。以油红O染色,显微镜下观察细胞形态,计数10个视野内的细胞总数与MFC数并计算MFC形成率;测定细胞中总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)含量并计算胆固醇酯(EC)量;Western blot法测定CD36、三磷酸腺苷结合转运子(ABCA)1、胆固醇酰基转移酶(ACAT)1蛋白的表达。结果:空白对照组细胞体积未见明显增大,油红O染色阳性细胞数量少。与空白对照组比较,模型组细胞体积增大,镜下可见细胞红油O染色阳性细胞数量增多,MFC形成率升高,TC、FC、EC含量增加,CD36、ACAT1蛋白表达增强,ABCA1蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,黄精多糖高、中、低浓度组细胞接近梭形,油红O染色阳性细胞数量减少,MFC形成率降低,TC、FC、EC含量减少,CD36、ACAT1蛋白表达减弱,ABCA1蛋白表达增强,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:黄精多糖可抑制因ox-LDL诱导的MFC的形成。其机制可能与减少巨噬细胞内胆固醇的含量,下调CD36、ACAT1蛋白,并上调ABCA1蛋白表达有关。

关键词 黄精多糖;巨噬泡沫细胞;总胆固醇;游离胆固醇;总胆固醇酯

Inhibitory Effects of Polygonati Rhizoma Polysaccharide on the Formation of Enterocoelia-derived Macrophage Foam Cell in Mice

ZHENG Xing-yu¹, WEI Shi-chao¹, WANG Re-hua^{1,2}, HUANG Fang-meng¹, MENG Xiao-rong¹, GUO Miao-miao³, LUO Jie-wei¹(1.Dept. of TCM, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China; 2.Dept. of Cardiology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China; 3.Outpatient Deptment for Senior Cadres, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of Polygonati Rhizoma polysaccharide on the formation of enterocoelia-derived macrophage foam cell (MFC) in mice. METHODS: Cells were subcultured *in vitro*. The cells were cultured with 20 mg/L oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to establish the models of MFC. There were blank control group (routine medium), model group (routine medium), and Polygonati Rhizoma polysaccharide high, medium and low concentration groups (mass concentrations were respectively 80 mg/L, 40 mg/L and 20 mg/L). During the establishment of the models, the drugs were given for consecutive 72 h. Oil red O was used to stain and the cell morphology was observed, the total number of cells and MFC within 10 horizons and the formation rate of MFC was calculated; the contents of total cholesterol (TC) and free cholesterol (FC) in the cells were determined and the amount of cholesteryl ester (EC) was calculated; western blot was adopted to determine the expressions of CD36, ABCA1 and ACAT1 proteins. RESULTS: There was no obvious enlargement of cell volume in the blank control group, and the cells positive in the oil red O stain was little. Compared with blank control group, the cells volume in model group was larger; the cells positive in the oil red O stain was increased under the microscope; the formation rate of MFC was higher; the contents of TC, FC and EC were increased; the expressions of CD36 and ACAT1 proteins was increased and the expression of ABCA1 protein was decreased, with significant difference ($P<0.01$). Compared with model group, the cells in Polygonati Rhizoma polysaccharide high, medium and low dose groups were close to fusiform, among which the cells positive in the oil red O stain were decreased; formation rate of MFC was decreased; the contents of TC, FC and EC were decreased; the expressions of CD36 and ACAT1 proteins were decreased and the expression of ABCA1 protein was increased, with significant difference ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: Polygonati Rhizoma polysaccharide can inhibit the formation of MFC cells induced by ox-LDL through a mechanism which may be related to the decrease in the content of cholesterol in macrophages and the expressions of CD36 and ACAT1 proteins, and the increase in the expression of ABCA1 protein.

KEYWORDS Polygonati Rhizoma polysaccharide; Macrophage foam cell; Total cholesterol; Free cholesterol; Cholesteryl ester

[△] 基金项目:福建省中医药科研项目(No.wztn201308)

* 主任医师。研究方向:中西医结合心血管病的治疗。E-mail: zxy000999@sina.com

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病,是增加冠心病、脑中风等心脑血管疾病发病风险的危险因素^[1]。在AS的发生发展过程中,巨噬泡沫细胞(Macrophage

foam cell, MFC)的形成起到了关键作用^[2]。MFC的形成是早期AS的病理特征,因此抑制MFC的形成,将延缓AS的发展。在氧化型低密度脂蛋白(Oxidized LDL, ox-LDL)诱导单核巨噬细胞向MFC的转变过程中,细胞表面受体CD36、三磷酸腺苷(ATP)结合转运子A(ATP binding transporter A, ABCA1)以及胆固醇酰基转移酶(Cholesterol acyltransferase, ACAT)1均起着重要的调节作用^[3]。黄精多糖是黄精中主要药效成分。研究表明,黄精可通过抗炎、调节免疫等多种途径防治AS,但对于黄精作用的物质基础,即黄精多糖的作用和机制尚无深入研究^[4]。本研究以此为依据,通过观察黄精多糖对ox-LDL诱导的MFC形成的影响,探讨黄精多糖对MFC形成的抑制作用,并探讨其相关的机制。

1 材料

1.1 仪器

CO₂细胞培养箱(美国 Thermo 公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);HC-3018R 型台式高速冰冻离心机(安徽中凯科学仪器有限公司);ELx800 型全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);TS-1 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 药品与试剂

黄精多糖(本课题组提取,纯度:30%~35%);RPMI 1640 培养液(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(FBS,杭州四季青生物工程材料有限公司);GADPH 兔多克隆一抗、CD36 兔多克隆一抗、ABCA1 兔多克隆一抗、ACAT1 兔多克隆一抗、山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(上海生工生物工程股份有限公司);油红O粉末(美国 Sigma 公司);ox-LDL(广州奕源生物科技有限公司);总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)测试盒(北京普利莱生物科技有限公司)。

1.3 动物

KM 小鼠6只,普通级,♂,体质量(20±2)g,购于福建医科大学实验动物中心[实验动物使用许可证号:SCXK(闽)2012-0003]。小鼠饲养于清洁环境,自由饮食饮水,每天12h光照、12h黑暗,适应性饲养48h后用于试验。

2 方法

2.1 小鼠腹腔巨噬细胞原代培养

KM 小鼠,颈椎脱臼处死,以75%乙醇浸泡15min后移入无菌操作台,以眼科剪进行腹部皮肤开口,75%乙醇消毒,注入4ml RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清),轻揉小鼠腹部1min。灭菌注射器吸出腹腔灌洗液3ml,以离心半径15cm、1500r/min离心10min,去上清,加入1ml RPMI 1640培养基,细胞计数,调整细胞密度为1×10⁶ ml⁻¹,加入细胞培养皿中,于37℃下、5%CO₂细胞孵箱培养过夜。次日,去除未贴壁细胞死细胞,换液继续培养。取3~5代的巨噬细胞用于试验。

2.2 复制模型与分组、给药

巨噬细胞消化后,以1×10⁶ ml⁻¹的细胞密度接种于60mm培养皿中,细胞培养过夜,次日去除死细胞,用于试验。参考文献[5],以20mg/L ox-LDL 培养巨噬细胞72h以复制MFC模型。试验分为空白对照(常规培养基)组、模型(常规培养基)组与黄精多糖高、中、低浓度(质量浓度分别为80、40、20mg/L)组,复制模型的同时加药培养,连续72h。

2.3 各组MFC形成率的测定

培养细胞结束后,以磷酸盐缓冲液(PBS)溶液冲洗细胞3次,以4%甲醛溶液(I/V)在4℃下固定15min, PBS洗3次,室

温下以油红O染色15min,苏木精复染30s, PBS洗3次,自然风干。于显微镜下观察细胞,当细胞中可见较大脂肪颗粒或脂肪颗粒数大于5个时,即判定为油红O染色阳性细胞(即MFC)。镜下随机观察10个视野,计数细胞总数与MFC数,计算MFC形成率。MFC形成率=MFC数/细胞总数×100%^[6]。

2.4 各组细胞胆固醇含量的测定

培养细胞结束后,收集细胞,将细胞用预冷PBS冲洗3次,加入细胞裂解液,裂解5min,混匀1次,共计裂解15min。以离心半径15cm、10000r/min离心15min,取上清液,参照测试盒说明书测定TC、FC。TC与FC之间的差值为胆固醇酯(EC)的含量^[7],试验重复3次。

2.5 各组细胞CD36、ABCA1与ACAT1蛋白表达的测定

培养细胞结束后,收集细胞,提取各组细胞总蛋白,以二辛可宁酸(BCA)进行蛋白定量,蛋白97℃水浴变性5min。各组蛋白上样50μg,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),蛋白湿转至PVDF膜上, TBST洗膜3次,每次5min, 5%脱脂奶粉室温封闭2h, TBST洗膜3次,每次5min。CD36、ABCA1、ACAT1、GAPDH(稀释比例1:500, V/V)一抗4℃孵育过夜,次日TBST洗膜3次,每次5min,二抗(1:5000, V/V)室温培养2h, TBST洗膜3次,每次5min。增强化学发光法(ECL)显影,拍摄条带, Image-J 软件分析蛋白条带。以GAPDH条带灰度值为内参,计算CD36、ABCA1、ACAT1与内参的比值,并分析结果。

2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0软件处理试验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组MFC形成率的测定结果

油红O染色结果发现,空白对照组细胞体积未见明显增大, MFC数少;模型组细胞体积增大,镜下可见MFC数增多,与空白对照组比较, MFC数明显增加;与模型组比较,黄精多糖高、中、低浓度组细胞接近梭形, MFC数减少,且呈浓度依赖关系。

与空白对照组比较,模型组MFC形成率升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,黄精多糖高、中、低浓度组MFC形成率降低,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果表明,黄精多糖能够减少MFC数,抑制MFC的形成。各组MFC形成率的测定结果见表1。

表1 各组MFC形成率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 Determination results of formation rate of MFC in all groups($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	MFC形成率
空白对照组	0
模型组	65.124 ± 12.656*
黄精多糖高浓度组	20.365 ± 6.112 ^{##}
黄精多糖中浓度组	34.182 ± 8.681*
黄精多糖低浓度组	45.412 ± 8.821*

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, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.2 各组细胞胆固醇含量的测定结果

与空白对照组比较,模型组细胞内TC、FC、EC含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,黄精多糖高、中、低浓度组细胞内TC、FC、EC含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组细胞胆固醇含量的测定结果见表2。

表2 各组细胞胆固醇含量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/ml}$)
Tab 2 Determination results of contents of FC, TC and EC in the cells in all groups($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/ml}$)

组别	TC	FC	EC
空白对照组	20.022 ± 4.042	11.603 ± 2.037	7.555 ± 1.426
模型组	81.443 ± 17.423*	50.847 ± 13.359*	32.776 ± 8.513*
黄精多糖高浓度组	29.221 ± 8.612 ^{##}	19.253 ± 5.543 ^{##}	10.236 ± 3.516 ^{##}
黄精多糖中浓度组	41.632 ± 11.531 [#]	26.786 ± 9.513 [#]	17.141 ± 6.428 [#]
黄精多糖低浓度组	59.292 ± 10.145 [#]	40.177 ± 0.444 [#]	25.854 ± 8.246 [#]

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, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.3 各组细胞CD36、ABCA1、ACAT1蛋白表达的测定结果

与空白对照组比较,模型组细胞CD36、ACAT1蛋白表达增强,ABCA1蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,黄精多糖高、中、低浓度组细胞CD36蛋白表达减弱,ABCA1蛋白表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);黄精多糖高、中浓度组细胞ACAT1蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组细胞CD36、ABCA1、ACAT1蛋白表达的测定结果见表3。

表3 各组细胞CD36、ABCA1、ACAT1蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Determination results of expressions of CD36, ABCA1 and ACAT1 proteins in the cells in all groups($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CD36	ABCA1	ACAT1
空白对照组	1.021 ± 0.012	1.003 ± 0.033	1.015 ± 0.027
模型组	2.121 ± 0.423*	0.841 ± 0.119*	1.736 ± 0.312*
黄精多糖高浓度组	1.221 ± 0.311 ^{##}	1.433 ± 0.372 ^{##}	1.222 ± 0.516 ^{##}
黄精多糖中浓度组	1.462 ± 0.518 [#]	1.286 ± 0.513 [#]	1.415 ± 0.432 [#]
黄精多糖低浓度组	1.730 ± 0.392 [#]	1.177 ± 0.444 [#]	1.656 ± 0.510

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, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

4 讨论

MFC的形成,是导致AS的重要致病因素^[8]。血管中的巨噬细胞通过清道夫受体(CD36)吞噬大量ox-LDL,导致胆固醇和EC在巨噬细胞内聚积,脂质代谢调控机制失衡,最终形成MFC^[9]。

黄精多糖具有抗氧化、抗肿瘤、调节免疫等多种生理活性,而脂类代谢紊乱是导致AS的主要原因之一^[10]。本研究通过观察黄精多糖对ox-LDL诱导小鼠腹腔MFC的影响,探讨黄精多糖对AS的治疗作用。研究发现,黄精多糖在20~80 mg/L质量浓度范围内,能有效降低巨噬细胞内MFC数,结果提示黄精多糖能够抑制MFC的形成。同时,进一步试验发现,黄精多糖能有效降低MFC中TC、FC、EC含量,结果提示黄精多糖能够减少胆固醇在细胞内的堆积。综上两点试验结果,提示黄精多糖抗MFC形成的作用与降低细胞内胆固醇含量相关。

为进一步探讨黄精多糖抗MFC形成作用机制,本研究对CD36、ABCA1、ACAT1蛋白表达进行了测定。CD36属于受体,是一种细胞表面单链糖蛋白,参与巨噬细胞对ox-LDL的吞噬过程,是导致巨噬细胞内胆固醇含量增高的重要蛋白,直接参与泡沫细胞形成过程。本研究发现,高、中、低质量浓度的黄精多糖均能够降低MFC中CD36蛋白的表达量,且呈现剂量依赖关系。

ACAT-1可以催化胆固醇合成胆固醇酯并储存在细胞质中形成脂滴,从而使巨噬细胞转化成为MFC。本研究结果表明,黄精多糖能够降低MFC中EC的含量,同时,高、中、低质量浓度的黄精多糖可减弱ACAT1蛋白的表达,提示黄精多糖降低细胞中EC堆积的作用与调节ACAT1蛋白表达相关,从而抑制MFC的形成。

ABCA1是一种重要的脂质转运蛋白,以ATP为能源对多种底物进行转运,在胆固醇逆转运的过程中起到重要的调节作用^[11]。ABCA1通过多种调节机制,参与细胞内多余的胆固醇向外转运过程。本研究中,经黄精多糖处理后,与模型组比较,MFC中ABCA1蛋白的表达量明显增强,同时呈现剂量依赖性。结果提示,黄精多糖通过干预ABCA1、ACAT1蛋白表达加快细胞内胆固醇的转运,从而抑制MFC的形成。

综上所述,黄精多糖能够通过抑制MFC中CD36受体蛋白的表达,减少细胞对ox-LDL的摄入,减弱ACAT1蛋白的表达,减少胆固醇在细胞内的堆积,并增强ABCA1蛋白表达,加速胆固醇向细胞外转运,从而实现抑制MFC的形成的目的。

参考文献

- [1] 何雪峰,李晓辉,李淑惠,等.三七总皂苷对家兔实验性动脉粥样硬化的预防作用[J].中国药房,2007,18(6):408.
- [2] Huang H, Koellea P, Fendlera M, et al. Induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by oxLDL inhibits macrophage derived foam cell migration[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 25(1):213.
- [3] 周云,沃兴德.巨噬源性泡沫细胞形成过程中的机制研究及其进展[J].生命科学,2010,22(6):579.
- [4] 王倩,汪海.具有抗动脉粥样硬化作用的天然药物及其单体化合物[J].世界科学技术:中药现代化,2012,4(5):52.
- [5] 邓远雄,钱之玉,何丽华,等.西红花酸对巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响[J].中国中药杂志,2011,36(10):1374.
- [6] 王飞,戴亚蕾,徐婷,等. LPS和IL-10对低密度脂蛋白诱导泡沫细胞形成的影响[J].同济大学学报,2007,28(1):1.
- [7] 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):2288.
- [8] 祝甜甜,段菊,张刘强,等.巨噬细胞极化在动脉粥样硬化中的作用和药物靶标[J].中国药理学通报,2014,70(6):748.
- [9] 李天平,轩贵平,殷勤慧.胆固醇代谢调控的研究进展[J].临床与病理杂志,2014,34(1):71.
- [10] 陈文瑛,唐富天,陈少锐,等.丹参酮II A对动脉粥样硬化的防御作用研究[J].中国药房,2008,19(12):884.
- [11] 张晓菲,谭晓华,杨磊. ABCA1在胆固醇逆转运中作用的研究进展[J].健康研究,2010,30(3):214.

(收稿日期:2014-12-04 修回日期:2015-01-27)

(编辑:张静)