

丹红注射液对氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的影响

曾海燕, 曾高峰

(南华大学附属第二医院心内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 丹红注射液; 胆固醇流出; ATP结合盒转运体 A1; 肝 X 受体 α ; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 观察丹红注射液对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的影响,并探讨其机制。**方法** 160 nmol/L PMA 孵育 THP-1 巨噬细胞 24 h 后,细胞分为三组:对照组、ox-LDL 组(100 mg/L)和丹红组(100 mg/L ox-LDL + 30 mL/L 丹红注射液)。高效液相色谱分析法检测细胞内胆固醇水平,采用液体闪烁计数法观察细胞内胆固醇的流出,Western blot 检测细胞 ATP 结合盒转运体 A1(ABCA1)和肝 X 受体 α (LXR α)的蛋白表达,定量 PCR 检测细胞 ABCA1 和 LXR α 的 mRNA 表达。**结果** 丹红注射液抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积,显著降低细胞总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)和胆固醇酯(CE)的含量,增加载脂蛋白 A I(ApoA I)介导的胆固醇流出,促进 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 和 LXR α 的表达。**结论** 丹红注射液抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积,可能与其促进 LXR α -ABCA1 途径介导的胆固醇流出有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Danhong Injection on Lipid Accumulation in THP-1 Macrophages Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

ZENG Hai-Yan, and ZENG Gao-Feng

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Danhong Injection; Cholesterol Efflux; ATP-binding Cassette Transporter A1; Liver X Receptor α ; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects and mechanisms involved of Danhong injection on lipid accumulation in THP-1 macrophages induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** The human THP-1 macrophages were induced by phorbol-12-myristate acetate (PMA, 160 nmol/L) for 24 h, then cells were divided into three groups: control group, ox-LDL group (100 mg/L) and Danhong group (100 mg/L ox-LDL + 30 mL/L Danhong injection).

Cellular cholesterol was examined by HPLC. Cholesterol efflux was determined by liquid scintillation counting. The protein and mRNA expression of ATP-binding cassette transporter A-1 (ABCA1) and liver X receptor α (LXR α) were detected by Western blot and RT-PCR, respectively. **Results** Danhong injection inhibited the lipid accumulation in THP-1 macrophage induced by ox-LDL. Cellular total cholesterol, free cholesterol and cholesterol ester were decreased by application of Danhong injection. Danhong injection increased apolipoprotein A I (ApoA I) mediated cholesterol efflux. In addition, Danhong injection significantly decreased the expression of ABCA1 and LXR α in both protein and mRNA levels.

Conclusions Danhong injection inhibits lipid accumulation induced by ox-LDL, and the mechanisms may be related to the activation of LXR α -ABCA1 pathway and the increase of ApoA I mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是大部分心脑血管类疾病的共同病理学基础,其中泡沫细胞的形成是 As 发病的核心环节^[1]。泡沫细胞的主要来源是巨噬细胞,其主要原因是细胞内脂质过量蓄

积,因此,降低巨噬细胞内的脂质蓄积可以有效的减缓 As 的病理进程^[2]。中药制剂丹红注射液主要由丹参和红花两种药效成分组成,丹参与红花是广泛应用于临床治疗心血管疾病的中药。近年来研

[收稿日期] 2014-03-20

[作者简介] 曾海燕,硕士,主治医师,研究方向为心血管疾病防治研究,E-mail 为 18973468460@189.cn。通讯作者曾高峰,博士,主任医师,研究方向为心血管疾病防治研究,E-mail 为 qichingnudou@tom.com。

究发现,丹红注射液能有效地改善冠心病患者的临床症状,有防止 As 的作用^[3-6]。然而,丹红注射液抗 As 的确切作用机制仍不十分清楚。为了进一步研究丹红注射液的抗 As 作用及可能机制,本实验将观察丹红注射液对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的影响,并探讨其是否能够调节巨噬细胞内胆固醇流出及其可能机制,从而为丹红注射液应用于临床治疗 As 提供新的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

THP-1 细胞购自中科院上海生物化学与细胞生物研究所;RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司;小牛血清购自四季青公司;丹红注射液(10 mL/支)购自菏泽步长制药有限公司; [³H]胆固醇购自 Sigma 公司;载脂蛋白 A I (apolipoprotein A I, ApoA I) 购自 Fluka Biochemika 公司;ATP 结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 兔抗人一抗以及肝 X 受体 α (liver X receptor α , LXR α) 兔抗人一抗均购自 Novus 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自武汉博士德公司。

1.2 细胞培养及分组

THP-1 细胞采用 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清)于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。细胞在实验前用 160 nmol/L 的佛波酯孵育 12 h,使其诱导分化为巨噬细胞。巨噬细胞分为三组:对照组、ox-LDL 组和丹红组。对照组为正常培养 THP-1 细胞,不加干预措施;ox-LDL 组为 100 mg/L 的 ox-LDL 处理 24 h;丹红组为 100 mg/L 的 ox-LDL 和 30 mL/L 的丹红注射液共处理 24 h。每次实验均设立复孔。

1.3 油红 O 染色

在 6 孔培养板内接种 THP-1 细胞并用 PMA 诱导分化为巨噬细胞。细胞按前所述分为三组,首先用 PBS 洗涤细胞后,再用 60% 异丙醇固定 1~2 min,油红 O 染色液滴染 10~15 min, PBS 水洗,苏木素进行复染 3~5 min,然后用 1% HCl 分色 1~2 s,水洗返蓝,干燥后用甘油明胶封片,光学显微镜下观察红色脂滴。

1.4 高效液相色谱分析

参照文献[7]方法,按前述分组方法处理细胞后,PBS 清洗,随后加入细胞裂解液 200 μ L,使细胞裂解;采用 BCA 法进行蛋白定量,再加入 7.2% 三氯乙酸使蛋白沉淀,以 800 \times g 离心 10 min;取上清液 100

μ L,加入 15% 的醇溶性 KOH,涡旋使胆固醇酯(cholesterol ester, CE)水解,此时的样品为细胞内总胆固醇(total cholesterol, TC)待测样品。各样品分别与内标液混匀,再加入等体积正己烷:异丙醇(4:1),进行涡旋、抽提,并于真空冷冻干燥剂中进行真空干燥,加入 100 μ L 异丙醇:正庚烷:乙晴(35:12:53)将样品溶解后上样。采用 C-18 柱,柱温保持 4℃,流速为 1 mL/min,紫外光检测波长为 250 nm,以峰面积定量,内标校准,以 mg/g 细胞蛋白为单位。

1.5 巨噬细胞胆固醇流出检测

参照文献[8]方法进行。THP-1 细胞用 PMA 诱导成巨噬细胞。实验各组细胞在处理时同时加入 [³H]胆固醇(0.2 mCi/L)孵育 48 h。以 PBS 清洗细胞后加牛血清白蛋白(2 g/L),再加入 ApoA I (10 mg/L)处理 12 h,采用闪烁计数法检测培养液以及细胞内 [³H]胆固醇含量。巨噬细胞胆固醇流出率表示方式为:培养液中 cpm/总 cpm(培养液 cpm + 细胞 cpm) \times 100%。

1.6 Western blot 分析巨噬细胞 ABCA1 和 LXR α 蛋白的表达

参照文献[9]方法,收集细胞,提取蛋白质,加入 5 \times 凝胶上样缓冲液,100℃ 煮 10 min,从而使蛋白质变性,再用 10% SDS-PAGE 进行电泳分离,再转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 4 h,分别加入 ABCA1 (1:500)、LXR α (1:500) 和 β -actin (1:2000) 一抗室温孵育 4~8 h,用 TBST 洗膜 3 次,共 20~30 min。加入二抗(1:1000),室温孵育 2 h,再次洗膜 3 次。用蛋白质印迹荧光检测试剂盒显影、定影于 X 光胶片,结果用凝胶图像分析系统扫描、并分析目的蛋白与内参蛋白条带的灰度值,以二者的比值代表目的蛋白表达的变化。

1.7 实时荧光定量 PCR 分析巨噬细胞 ABCA1 和 LXR α mRNA 的表达

按试剂盒说明操作。人 ABCA1 引物序列为上游 5'-GGT TTG GAG ATG GT T ATA CAA TAG TTG T-3',下游 5'-CCC GGA AAC GCA AGT CC-3';人 LXR α 引物序列为上游 5'-AGC GTC CAC TCA GAG CAA GT-3',下游 5'-GGG GAC AGA ACA GTC ATT CG-3';人 β -actin 引物序列为上游 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3',下游 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3'。采用 Roche Light Cycler Run 5.32 型号荧光定量仪进行反应,检测结束后导出实验结果,在相应的统计学软件中分析相关数据。目的基因的表达量采用 $\Delta\Delta$ Ct 方法计算。

1.8 统计学分析

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理,两组间的比较采用 t 检验,三组之间的比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 判定差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹红注射液降低 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积

与对照组比较,ox-LDL 组细胞内脂质蓄积明显加重,HPLC 结果显示 TC、游离胆固醇(free chole-

sterol, FC) 和 CE 均明显增加,其中细胞内 CE 从 62 mg/g 蛋白增加至 392 mg/g 蛋白,表明大量胆固醇酯在细胞内聚集;而与 ox-LDL 组比较,丹红组细胞内 TC、FC 和 CE 均显著减少(图 1 和表 1)。

2.2 丹红注射液促进 THP-1 巨噬细胞胆固醇流出

ApoA I 接受膜上 ABCA1 蛋白转运出的胆固醇,是最主要的细胞外胆固醇接受体^[7]。因此,我们在细胞培养液中加入 ApoA I 以检测胆固醇的流出水平,结果发现丹红组 ApoA I 所介导的胆固醇流出提高近 2 倍,提示丹红注射液可能影响了 ABCA1 蛋白的功能(表 2)。

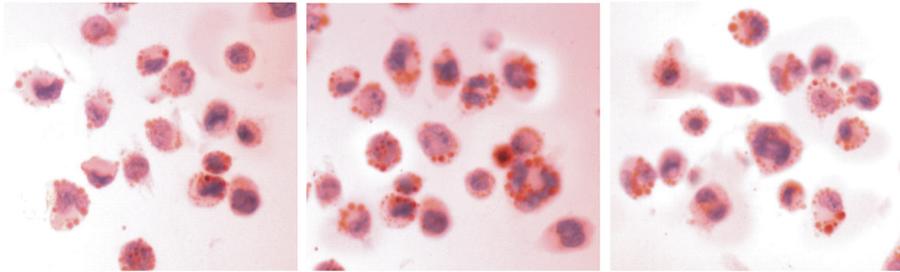


图 1. 油红 O 染色检测丹红注射液对 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的影响($\times 400$) 从左到右依次为对照组、ox-LDL 组和丹红组。

Figure 1. The effect of Danhong injection on lipid accumulation in THP-1 macrophages by oil red O($\times 400$)

表 1. 丹红注射液对 THP-1 巨噬细胞胆固醇含量的影响(mg/g, $n = 3$)

Table 1. The effect of Danhong injection on cholesterol contents in THP-1 macrophages(mg/g, $n = 3$)

指标	对照组	ox-LDL 组	丹红组
TC	236 \pm 13	712 \pm 29 ^a	381 \pm 21 ^{ab}
FC	173 \pm 19	319 \pm 14 ^a	195 \pm 15 ^{ab}
CE	62 \pm 6	392 \pm 21 ^a	186 \pm 22 ^{ab}
CE/TC	23.8% \pm 4.3%	52.8 \pm 8.2% ^a	46.5 \pm 6.7% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

表 2. 丹红注射液对 THP-1 巨噬细胞胆固醇流出的影响

Table 2. The effect of Danhong injection on cholesterol efflux in ox-LDL induced THP-1 macrophages

分组	胆固醇流出率
对照组	5.1% \pm 0.5%
ox-LDL 组	8.5% \pm 0.4% ^a
丹红组	18.2% \pm 1.3% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

2.3 丹红注射液上调 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 的表达

THP-1 巨噬细胞经 ox-LDL 和丹红注射液处理

后,提取细胞总蛋白和总 RNA,分别采用 Western blot 和 RT-PCR 法检测细胞 ABCA1 蛋白和 mRNA 含量,结果发现,与 ox-LDL 组比较,丹红注射液处理后 THP-1 巨噬细胞内 ABCA1 蛋白和 mRNA 含量明显升高(图 2)。

2.4 丹红注射液上调 THP-1 巨噬细胞 LXR α 的表达

THP-1 巨噬细胞经 ox-LDL 和丹红注射液处理后,Western blot 和 RT-PCR 检测发现,与 ox-LDL 组比较,丹红组 THP-1 巨噬细胞内 LXR α 蛋白和 mRNA 含量明显升高(图 3)。

3 讨论

巨噬细胞泡沫化过程可作为 As 防治过程中的重要靶点,泡沫细胞形成是 As 形成和发展中的早期变化。胆固醇流出障碍是导致泡沫细胞形成的重要原因之一^[10],因此,寻找影响胆固醇流出的体内因素并探索其相关机制,对 As 类疾病的防治具有十分重要的意义。我们的研究结果发现,THP-1 巨噬细胞经丹红注射液处理后,可明显减少巨噬细胞脂质蓄积;我们的结果进一步显示丹红注射液可

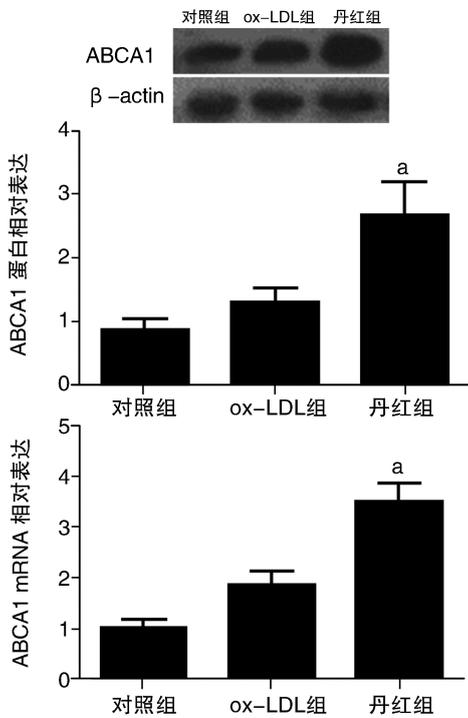


图 2. 丹红注射液对 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 蛋白(上图)和 mRNA(下图)表达的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 2. The effect of Danhong injection on protein and mRNA expression of ABCA1 in THP-1 macrophages

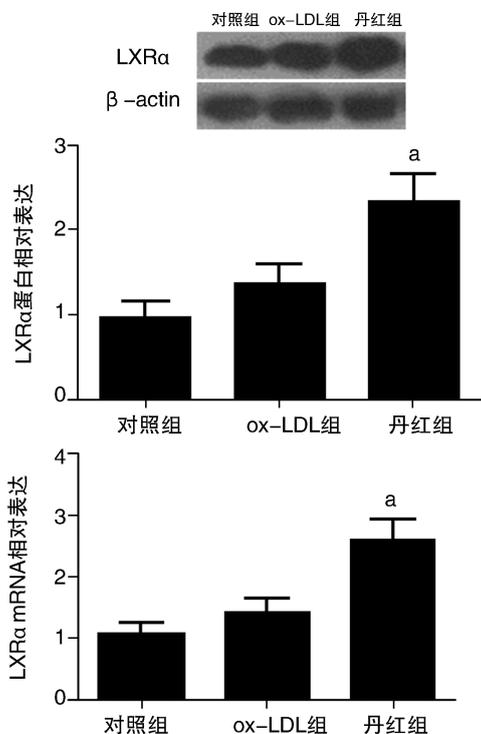


图 3. 丹红注射液对 THP-1 巨噬细胞 LXRα 蛋白(上图)和 mRNA(下图)表达的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 3. The effect of Danhong injection on protein and mRNA expression of LXRα in THP-1 macrophages

以促进 ApoA I 介导的巨噬细胞胆固醇流出。

大量文献证实,胆固醇逆向转运(RCT)可以促进外周胆固醇从细胞内流出,经血液循环转运到肝脏进行代谢,该过程对于抑制 As 的发生发展具有重要作用^[11,12]。巨噬细胞胆固醇流向 ApoA I 并形成盘状前 β-HDL 是 RCT 的重要步骤^[13]。本实验中,丹红注射液明显促进巨噬细胞胆固醇流出,提示丹红注射液可能影响体内 RCT,这也可以部分解释为什么实验性 As 家兔使用丹红注射液处理后,血清 TC 和低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)含量下降^[3]。

ABCA1 是 ABC 转运蛋白家族中的成员,可促进细胞内胆固醇流出至贫脂的载脂蛋白 A,在胆固醇逆向转运和 HDL 生成的起始步骤中起重要作用,是介导细胞内胆固醇流出的关键基因^[14]。细胞敲除 ABCA1 后,其胆固醇流出受到抑制;ABCA1 基因突变可引起丹吉尔病和家族性 HDL 缺乏症,患者的 HDL 含量极低,泡沫细胞在多种组织中堆积,往往伴随 As 的发生^[15]。本研究以 THP-1 巨噬细胞为研究对象,ox-LDL 干预促进巨噬细胞脂质蓄积,在体外模拟体内 As 发生时泡沫细胞的形成;再用丹红注射液处理细胞,结果发现,ABCA1 的 mRNA 和蛋白表达含量明显升高,说明丹红注射液促胆固醇流出的作用很可能与其促 ABCA1 的表达有关。这与以往智晓文等^[16]在 U937 细胞中的观察结果一致,再次证明丹红注射液可在调控巨噬细胞脂质蓄积中发挥积极作用。

可调节 ABCA1 的因素众多,这些因素主要包括核受体超家族、环磷酸腺苷(cAMP)、细胞因子和酶等四类^[17],近年研究发现 microRNA 也可调控 ABCA1 的表达^[18]。细胞核受体家族包括肝 X 受体(liver X receptor, LXRα 和 β)和维甲酸 X 受体(retinoic acid receptor, RXR)等。这些核受体中, LXR 是脂质体内平衡稳定的主要调节器,与 RXR 形成 LXR/RXR 异二聚体,在巨噬细胞, LXR 激活后通过诱导 ABCA1 表达而促进 ApoA I 介导的胆固醇流出^[19]。为进一步探讨丹红注射液促巨噬细胞 ABCA1 表达的机制,我们又观察了丹红注射液对 LXRα 表达的影响。结果显示,丹红注射液处理后, LXRα 的表达水平明显升高,说明丹红注射液的促胆固醇流出及 ABCA1 表达功能与 LXRα 的表达有关, LXRα-ABCA1 途径激活是丹红注射液抑制巨噬细胞脂质蓄积的重要原因。同时,近年的研究发现, LXR 具有明显的抗炎效应^[20],这也可以部分解释丹红注射液对择期经皮冠状动脉介入治疗(PCI)

术后患者体内炎症反应的抑制效应^[21],以及抑制巨噬细胞分泌炎症因子及基质金属蛋白酶^[22]。

总之,本实验研究发现,丹红注射液可抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积,其机制可能与激活 LXR α -ABCA1 途径,进而促进巨噬细胞胆固醇外流有关。中医药在临床调脂稳定斑块方面有独特优势,如降脂效用多靶点、副反应少等^[23]。综合本实验及其他课题组的研究结果,丹红注射液可以改善血脂代谢,对 RCT 过程中 LXR α -ABCA1 途径的干预能明显改善血脂代谢,显示出该中药在防治 As 中的潜在治疗作用。通过对丹红注射液及有效成分在巨噬细胞脂质蓄积以及对实验动物血脂、体内炎症和斑块的深入研究,有助于人们找到治疗 As 性疾病新的治疗策略。

[参考文献]

- [1] Yu XH, Fu YC, Zhang DW, et al. Foam cells in atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 424C: 245-252.
- [2] Yuan Y, Li P, Ye J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis [J]. *Protein Cell*, 2012, 3(3): 173-181.
- [3] 管高峰, 华先平, 王琳, 等. 丹红注射液对动脉粥样硬化家兔脂代谢及血管内皮功能的影响[J]. *临床心血管病杂志*, 2007, 23(4): 304-306.
- [4] Liu H, Wang S, Sun A, et al. Danhong inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced immune maturation of dendritic cells via a peroxisome proliferator activated receptor gamma-mediated pathway [J]. *J Pharmacol Sci*, 2012, 119(1): 1-9.
- [5] 郭桂萍, 王宝亮. 丹红注射液治疗高脂血症合并下肢动脉粥样硬化 30 例[J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(6): 1 146.
- [6] 付婷婷, 王昌俊, 闵存云, 等. 丹红注射液抗实验性兔动脉粥样硬化的作用及其机制 [J]. *中药材*, 2009, 32(11): 1 720-722.
- [7] 赵国军, 汤石林, 田国平, 等. 肝 X 受体激动剂 T0901317 对脂多糖诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症因子释放的影响及其机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(7): 594-598.
- [8] 莫中成, 陈欣, 谢远杰, 等. 高密度脂蛋白对 THP-1 巨噬细胞 B 类 I 型清道夫受体的表达及胆固醇流出的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(5): 726-728.
- [9] 曹冬黎, 尹凯, 莫中成, 等. 脂多糖通过核因子- κ B 途径下调泡沫细胞 ATP 结合盒转运体 A1 的表达 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(5): 540-548.
- [10] 路倩, 陈五军, 尹凯, 等. 动脉粥样硬化中胆固醇外流的研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(4): 319-326.
- [11] 肖继, 廖端方, 唐朝克. 胆固醇逆向转运与动脉粥样硬化的转基因动物研究进展 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2010, 16(1): 58-62.
- [12] 倪占玲, 黄改荣, 赵水平. 普罗布考干预后小鼠血清对巨噬细胞胆固醇流出的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(2): 144-148.
- [13] Ohashi R, Mu H, Wang X, et al. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis [J]. *QJM*, 2005, 98(12): 845-856.
- [14] 邹涛, 王婧, 谭琰, 等. 过表达 KLF4 对 RAW264.7 巨噬细胞 ABCA1 表达和胆固醇蓄积的影响 [J]. *中南医学科学杂志*, 2013, 41(2): 127-130.
- [15] Tang C, Oram JF. The cell cholesterol exporter ABCA1 as a protector from cardiovascular disease and diabetes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791(7): 563-572.
- [16] 智晓文, 苏显明. 丹红注射液对 U937 细胞 SR-A I 及 ABCA1 mRNA 表达的影响 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012, 33(5): 654-657.
- [17] 胡炎伟, 唐朝克. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 研究的最新进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(4): 373-379.
- [18] Chen WJ, Zhang M, Zhao GJ, et al. MicroRNA-33 in atherosclerosis etiology and pathophysiology [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 227(2): 201-208.
- [19] Zhu R, Ou Z, Ruan X, et al. Role of liver X receptors in cholesterol efflux and inflammatory signaling (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(4): 895-900.
- [20] Im SS, Osborne TF. Liver X receptors in atherosclerosis and inflammation [J]. *Circ Res*, 2011, 108(8): 996-1001.
- [21] 史卫国, 孙学玉, 渠莉, 等. 丹红注射液对经皮冠状动脉介入治疗后心肌炎症反应及冠状动脉血流的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17(5): 288-291.
- [22] 周清, 张倩, 严激. 丹红注射液对巨噬细胞 CXCL16、MMP-1、MMP-9 分泌的影响 [J]. *临床输血与检验*, 2011, (3): 222-225.
- [23] 吴昊, 蔡少杭. 血脂异常的中医药研究进展 [J]. *承德医学院学报*, 2013, (3): 221-224.

(此文编辑 许雪梅)