

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.15.017

宁心痛颗粒对人类单核细胞株源性巨噬细胞泡沫化的影响

都基莎¹, 顾 宁^{2*}

(1. 中国人民解放军第四五五医院, 上海市长宁区淮海西路 338 号, 200052; 2. 南京中医药大学第三附属医院)

摘要 目的 探讨宁心痛颗粒干预动脉粥样硬化易损斑块的可能作用机制。方法 SD 大鼠分别灌胃宁心痛颗粒 3、15、30、60 g/(kg·d) 浓煎剂 4 天, 制备宁心痛颗粒等剂量、5 倍、10 倍、20 倍含药血清。实验分为巨噬细胞组、模型组及宁心痛颗粒含药血清等剂量 5 倍、10 倍、20 倍剂量组。除巨噬细胞组外其余各组采用氧化低密度脂蛋白体外诱导正常生长的人类单核细胞株 (THP-1) 细胞建立巨噬细胞泡沫化模型。宁心痛颗粒含药血清各剂量组分别加入相应剂量的含药血清, 使含药血清终浓度为 3%, 每组实验重复 4 次。运用 Western blot 法检测各组细胞脂蛋白受体清道夫受体 A (SRA)、CD36 蛋白表达水平。结果 模型组细胞 SRA、CD36 蛋白表达含量较巨噬细胞组明显增高 ($P < 0.05$); 宁心痛颗粒含药血清各剂量组细胞 SRA、CD36 蛋白水平均较模型组明显降低 ($P < 0.01$); 宁心痛颗粒含药血清 10 倍剂量组细胞 SRA、CD36 的蛋白表达水平低于宁心痛颗粒其他剂量组 ($P < 0.01$)。结论 宁心痛颗粒能够下调巨噬细胞 SRA、CD36 蛋白表达, 从而抑制泡沫细胞的形成, 可能是其干预动脉粥样硬化易损斑块的分子机制之一。

关键词 宁心痛颗粒; 巨噬细胞; 泡沫细胞; 动脉粥样硬化; 易损斑块; 清道夫受体

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是引起心脑血管疾病最重要的病因, 其特征是散在的斑块在动脉内膜下形成。虽然每个斑块组成的成分不一, 但脂质是 AS 斑块的最基本成分, 单核巨噬细胞进入内膜下, 以及血管平滑肌细胞的增殖, 都会逐渐发展成 AS 斑块^[1]。斑块“易损性”从根本上取决于构成斑块相关细胞的功能状态, 这些细胞即为“易损斑块靶细胞”, 包括血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和巨噬细胞。其中巨噬细胞来源于循环中的单核细胞, 主要通过内质网应激、吞噬和转运脂蛋白失调 (泡沫化)、介导免疫炎症反应三个环节参与 AS 的发生发展^[2]。宁心痛颗粒是南京中医药大学第三附属医院院内制剂, 前期已有研究证实了宁心痛颗粒治疗冠心病不稳定性心绞痛临床疗效及干预 AS 易损斑块的部分机理^[3-7]。本研究旨在观察宁心痛颗粒对人类单核细胞株 (THP-1) 源性巨噬细胞泡沫化的影响, 进一步探讨其干预 AS 易

损斑块作用的可能机制。

1 材料

1.1 细胞和动物

THP-1 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。清洁级健康 SD 雄性大鼠 35 只, 3 月龄, 体重 (200 ± 20) g, 由南京中医药大学动物实验中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (浙) 20080033。层流柜饲养, 温度 (24 ± 2) °C, 湿度 60%, 24 h 通风, 自然照明, 普通饲料喂养, 自由饮水。

1.2 药品与试剂

宁心痛颗粒, 南京中医药大学第三附属医院院内制剂 (苏药制字: Z04000781, 批号: 120919), 药物组成: 黄芪 1000 g, 毛冬青 700 g, 川芎 1000 g, 葛根 700 g, 细辛 100 g, 制成颗粒剂, 1 g 颗粒剂相当于生药 3.5 g, 再将颗粒剂制备成浓度为 1 g/ml 的浓煎剂; 佛波醇酯 (PMA, Sigma 公司, 批号 040M1977V); 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL, 1.8 mg/ml, 广州奕源生物科技有限公司, 批

基金项目: 国家自然科学基金 (81173399)

* 通讯作者: jsguning@163.com, (025) 52276242

号 YB-002); BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo Scientific Pierce 公司, 批号 23227); 清道夫受体 A (SRA) 抗体 (50kD, Abcam 公司, 批号 ab93290); CD36 抗体 (Abcam 公司, 批号 ab17044); RPMI1640 (Gibco 公司, 批号 8110205); 胎牛血清 (FBS, Gibco 公司, 批号 737443); 油红 O 染色试剂盒 (Scien Cell 公司, 批号 0843)。

1.3 主要仪器

MCO-20AIC CO₂ 培养箱 (日本 Sanyo 公司); DMIL 倒置显微镜 (德国 Leica 公司); DMILS2 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 5810R 超速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Synergy 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); ELX800 酶标仪 (美国 BioTek 公司); Power Pac Basic 电泳仪、水平电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); TE77 半干式转膜仪 (美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备

将 35 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常对照组和宁心痛颗粒含药血清等剂量组、5 倍剂量组、10 倍剂量组、20 倍剂量组共 5 组, 每组 7 只。宁心痛颗粒含药血清等剂量组、5 倍剂量组、10 倍剂量组、20 倍剂量组分别给予宁心痛颗粒浓煎剂 3、15、30、60 g/(kg·d) 灌胃, 每日 2 次, 连续给药 3 天, 第 4 天一次性灌服全剂量, 正常对照组大鼠灌服等量生理盐水。12 h 后予 3% 水合氯醛 (1 ml/kg) 腹腔缓慢注射麻醉, 颈动脉采血, 放入标记好的 EP 管中。再将各组血液置于 4℃ 的冰箱内放置 4 h, 分离血清 (1000 r/min, 10 min), 取上清液, 同组混匀, 并将每组血清以 0.22 μm 滤器抽滤除菌, 经 56℃ 水浴, 30 min 灭活后分装, -20℃ 保存备用。

2.2 细胞培养及细胞模型建立

参考文献 [8] 方法: 正常生长的 THP-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。经传代培养后选择生长状态良好并处于对数生长期的细胞进行实验。培养瓶体外培养 THP-1 细胞, 经 PMA (终浓度为 100 nmol/ml, 用含 3% FBS 的 RPMI1640 配制) 干预 72 h 后, 在 400 倍光镜下 THP-1 细胞呈悬浮状态, 为圆形或卵圆形。PMA 刺激后细胞由悬浮状态转为贴壁状态, 形态学上呈梭形、椭圆

形或伸出伪足, 细胞体积增大, 表明 THP-1 细胞已转变为巨噬细胞; 再用 ox-LDL (终浓度为 50 mg/L, 用含 3% FBS 的 RPMI1640 配制) 诱导巨噬细胞泡沫化, 油红 O 染色证实细胞中形成大量的脂质小滴, 表明已经转变为泡沫细胞。

2.3 实验分组与干预方法

实验分为巨噬细胞组、模型组及宁心痛颗粒含药血清等剂量组、5 倍剂量组、10 倍剂量组、20 倍剂量组。用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液配成细胞密度 1×10^6 /ml 左右细胞悬液, 用 96 孔培养板, 每孔加入细胞悬液 220 μl。巨噬细胞组为转变的巨噬细胞, 其余各组细胞为泡沫细胞。宁心痛颗粒含药血清各剂量组加入相应剂量的含药血清, 使含药血清终浓度为 3%, 每组实验重复 4 次。

2.4 细胞 SRA、CD36 蛋白样品制备

干预结束后将细胞移入 10 ml 离心管, 4℃、1200 r/min, 离心 5 min, 弃上清; 用 4℃ PBS 洗涤沉淀细胞 3 遍 (将沉淀的细胞吹打均匀后 4℃、1200 r/min, 离心 5 min, 弃上清), 加入 1 ml PBS, 吹打后移入 1.5 ml EP 管中, 4℃, 6000 r/min, 离心 5 min, 弃上清; 4℃, 6000 r/min, 离心 3 min, 用 200 μl 枪头吸去残留上清; 每管细胞加 200 μl 预冷的细胞裂解液, 置冰上裂解 20 min, 再用 1 ml 注射器将裂解液反复抽吸 20 次, 继续冰上裂解 10 min; 4℃、12000 r/min, 离心 15 min, 取上清分装到 0.5 ml EP 管中, 每组预留一管 10 μl (-20℃ 保存, 供测蛋白浓度用), 其余每管 200 μl, 加入 50 μl 5 × 加样缓冲液, 100℃ 煮 5 min, 而后置冰上冷却 5 min, 再 4℃、12000 r/min, 离心 5 min, 取上清分装到 0.5 ml EP 管中, 50 μl/管, 放入冻存盒, -70℃ 保存。

2.5 Western blot 法检测细胞 SRA、CD36 蛋白的表达

用 BCA 试剂盒测定蛋白含量。根据蛋白标准曲线、等体积原则, 算出各组样品的上样量, 所有上样孔均加样, 没有样本用上样缓冲液代替。10% SDS-PAGE7 电泳, 转 NC 膜, 封闭, 一抗处理 4℃ 过夜, 洗膜后加入二抗室温孵育 2 h, 洗膜, 然后放入自动曝光程序系统内, 按时间自动曝光。凝胶图像采集系统分析结果。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 经正态性检验后用单因素方差分析和 Dunnett 检验进行差异性分析, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

表 1 各组细胞 SRA、CD36 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	SRA	CD36
巨噬细胞组	4	0.4929 $\pm$ 0.05254	0.4645 $\pm$ 0.04716
模型组	4	0.5620 $\pm$ 0.08255*	0.5443 $\pm$ 0.04029*
宁心痛颗粒含药血清等剂量组	4	0.5277 $\pm$ 0.03840 Δ Δ	0.2043 $\pm$ 0.01242 Δ Δ
宁心痛颗粒含药血清 5 倍剂量组	4	0.5277 $\pm$ 0.03840 Δ Δ	0.2489 $\pm$ 0.02912 Δ Δ
宁心痛颗粒含药血清 10 倍剂量组	4	0.3913 $\pm$ 0.09659 Δ	0.1370 $\pm$ 0.01717 Δ
宁心痛颗粒含药血清 20 倍剂量组	4	0.4219 $\pm$ 0.02401 Δ Δ	0.2655 $\pm$ 0.02140 Δ Δ

注: SRA, 清道夫受体 A; 与巨噬细胞组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与宁心痛颗粒含药血清 10 倍剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 结果

表 1 示, 模型组细胞 SRA、CD36 蛋白表达量较巨噬细胞组比较明显增高 ($P < 0.05$); 宁心痛颗粒含药血清各剂量组细胞 SRA、CD36 蛋白水平均较模型组明显降低 ($P < 0.01$); 宁心痛颗粒含药血清 10 倍剂量组细胞 SRA、CD36 的蛋白表达水平低于宁心痛颗粒含药血清等剂量组、5 倍剂量组、20 倍剂量组 ($P < 0.01$)。

4 讨论

宁心痛颗粒是遵循益气活血、通脉止痛的治则, 筛选有效方药而研制。方中黄芪为君药, 味甘性微温, 具有升发温运、补益心气之功。川芎为臣药, 温香窜, 走而不守, 为血中之气药, 有活血行气等作用; 葛根与川芎共为臣药, 辅助黄芪补益心气之功效, 其辛甘平, 解肌退热, 生津舒筋。毛冬青为佐药, 苦涩性寒, 具有活血通脉、清热解毒的作用; 细辛为佐药, 味辛甘、微苦、性温, 具有止痛消积之功效。临床应用宁心痛颗粒治疗冠心病不稳定性心绞痛具有一定的中医理论基础与现代相关中药药理学的研究依据^[9-12], 宁心痛颗粒不仅能改善患者临床症状、稳定病情、提高生活质量, 而且有明确的抑制炎症因子、抑制血小板聚集、调节脂质代谢、一定程度干预 AS 易损斑块等作用^[13-15]。

通过清道夫受体吞噬变性蛋白即低密度脂蛋白, 形成泡沫细胞并聚积形成动脉血管壁上的脂质条纹, 是早期 AS 形成的病理特征。能与变性 ox-LDL 结合的清道夫受体多样, 其中 SRA、CD36 是吞噬 ox-LDL、形成泡沫化细胞的主要受体^[14]。SRA 是巨噬细胞上识别 ox-LDL 的特异性结合位点, 研究发现 SRA 在 AS 斑块中呈现高表达, 并且 ox-LDL 与 SRA 结合后, 导致脂质堆积于巨噬细胞内, SRA 对修饰的低密度脂蛋白无限制的摄取, 最终导致泡沫化细胞形成、斑块破裂^[17]。CD36 同样是

ox-LDL 的主要介导受体之一, Park 等^[18]通过实验研究证实了 CD36 参与介导的人与小鼠的巨噬细胞向动脉壁下游走聚集, 因此, 降低 SRA、CD36 的活性可以影响 AS 易损斑块的进程。

本实验研究应用 Western Blot 技术检测巨噬细胞泡沫化后 SRA、CD36 的蛋白表达水平, 结果发现, 模型组细胞 SRA、CD36 的蛋白表达水平明显增高, 提示 SRA 和 CD36 在介导摄取 ox-LDL 促进 AS 斑块易损性过程中起重要作用。宁心痛颗粒含药血清等剂量组、5 倍剂量组、10 倍剂量组、20 倍剂量组细胞 SRA、CD36 蛋白表达水平均有不同程度的降低, 其中宁心痛颗粒含药血清 10 倍剂量组抑制 SRA、CD36 的蛋白表达强于其他剂量组, 说明宁心痛颗粒能够抑制及下调巨噬细胞 SRA、CD36 的蛋白表达, 阻抑泡沫细胞的形成, 这可能是该药干预 AS 易损斑块的分子机制之一。

参考文献

- [1] 朱明, 陆曙. 动脉粥样硬化中医病机探析 [J]. 陕西中医, 2007, 28(12): 1655-1657.
- [2] 何小丽, 顾宁. DAMP-PRR-巨噬细胞途径与动脉粥样硬化斑块的易损性 [J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2014, 22(7): 741-746.
- [3] 吴同后, 顾宁. 宁心痛颗粒对冠心病气虚血瘀证患者左室舒张功能不全的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(4): 357-360.
- [4] 潘仁智, 顾宁, 王芳芳. 宁心痛颗粒治疗对不稳定性心绞痛合并易损斑块患者血清学指标的影响 [J]. 江苏医药, 2012, 36(21): 2612-2613.
- [5] 黄霞, 顾宁. 宁心痛颗粒治疗冠心病不稳定型心绞痛 64 例临床疗效观察 [J]. 按摩与康复医学, 2012, 3(10): 179-180.
- [6] 吴同后, 顾宁, 陈志亮, 等. 宁心痛颗粒干预模型兔动脉粥样硬化易损斑块机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1042-1046.
- [7] 潘仁智, 吴同后, 顾宁. 宁心痛颗粒干预模型兔动脉粥样硬化易损斑块的生化指标观察 [J]. 检验医学与临

- 床, 2013, 10(6) : 479-480.
- 〔1〕王术玲, 潘华新, 王培训. THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及鉴定 〔J〕. 中药新药与临床药理, 2009, 20(3) : 281-284.
- 〔2〕李冬方, 何小丽, 都基莎, 等. 中药有效成分干预动脉粥样硬化易损斑块的研究概况 〔J〕. 时珍国医国药, 2013, 24(9) : 2242-2244.
- 〔3〕都基莎, 何小丽, 李冬方, 等. 益气活血法干预冠状动脉粥样硬化易损斑块研究进展 〔J〕. 辽宁中医杂志, 2012, 30(10) : 2094-2096.
- 〔4〕葛婷, 顾宁. 冠心病与中医气虚血瘀相关性初探 〔J〕. 中国中医急症, 2013, 22(12) : 2074-2075.
- 〔5〕吴同后, 顾宁. 冠心病、胸痹与“阳微阴弦” 〔J〕. 光明中医, 2009, 24(10) : 1860-1861.
- 〔6〕都基莎, 何小丽, 顾宁. 益气活血方宁心痛颗粒治疗冠心病心绞痛的研究思路初探 〔J〕. 时珍国医国药, 2013, 24(1) : 180-181.
- 〔7〕吴同后, 顾宁. 顾宁教授从气虚血瘀论治冠心病经验撷菁 〔J〕. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(1) : 74-75.
- 〔8〕都基莎, 何小丽, 顾宁. 顾宁教授创宁心痛颗粒方治疗冠心病不稳定型心绞痛经验 〔J〕. 中国中医急症, 2013, 22(5) : 745-746.
- 〔9〕陈莉娜, 戴亚蕾. 清道夫受体与动脉粥样硬化 〔J〕. 同济大学学报, 2007, 28(1) : 96-108.
- 〔10〕Tsukamoto K, Kinoshita M, Kojima K, et al. Synergically increased expression of CD36, CLA-1 and CD68, but not of SR-A and Lox-1, with the progression to foam cells from macrophages 〔J〕. J Artheroscler Thromb, 2002, 9(1) : 57-64.
- 〔11〕Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and also contribute to macrophage trapping in the arterial intima 〔J〕. J Clin Invest, 2009, 119(1) : 136-145.

Effect of *Ningxintong Granule* (宁心痛颗粒) on Human Monocyte Derived Macrophage Foam

DU Jisha¹, GU Ning²

(1. No. 455 Hospital of People's Liberation Army, Shanghai, 200052; 2. Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore possible mechanism of *Ningxintong Granule* acting on vulnerable atherosclerotic plaques. **Methods** Sprague-Dawley (SD) rats were given concentrated decoction of *Ningxintong Granule* 3, 15, 30, 60 g/(kg · d) by gavage for 4 days. Prepare serum medicated *Ningxintong Granule* isodose, 5 times, 10 times and 20 times. There were macrophages group, model group, serum medicated *Ningxintong Granule* isodose, 5 times, 10 times and 20 times groups. Besides macrophages group, foam cells models in other groups were established by normally grown human monocytic cell line (THP-1) cells in vitro induction by oxidized low density lipoprotein. Serum medicated *Ningxintong Granule* groups were added medicated serum of corresponding dose and final concentrations were 3%. Test 4 times in each group. Detect the expression of scavenging receptor A (SRA) and CD36 in each group. **Results** The expression of SRA and CD36 in model group was more than that in macrophages group ($P < 0.05$). The expression of SRA and CD36 in serum medicated *Ningxintong Granule* groups was less than that in model group ($P < 0.01$). The expression of SRA and CD36 in serum medicated *Ningxintong Granule* 10 times group was less than that in other dose groups ($P < 0.01$). **Conclusion** *Ningxintong Granule* could decrease the expression of SRA and CD36 and inhibit foam cells formation, which may be one of the molecular mechanisms of *Ningxintong Granule* acting on vulnerable atherosclerotic plaques.

Keywords *Ningxintong Granule*; macrophage; foam cell; atherosclerosis; vulnerable plaque; scavenging receptor

(收稿日期: 2014-09-22; 修回日期: 2015-01-13)

编辑: 邓 媛