

罗布麻提取物对动脉粥样硬化早期 TNF- α 表达的影响*巨名飞¹, 贾立立², 黄贤胜¹, 王文丰¹, 冷艳明¹, 郑杨^{3△}

(1. 承德医学院附属医院心脏科, 河北承德 067000; 2. 吉林大学公共卫生学院/卫生部放射生物学重点实验室, 吉林长春 130021; 3. 吉林大学第一医院心血管内科, 吉林长春 130021)

摘要:目的 通过观察罗布麻提取物对动脉粥样硬化早期炎症因子肿瘤坏死因子(TNF)- α 表达的影响, 研究罗布麻抗动脉粥样硬化的作用。方法 人 U937 单核细胞经佛波脂诱导分化为巨噬细胞, 与 100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL) 作用形成泡沫细胞, 建立动脉粥样硬化早期模型(ox-LDL 组), 加入不同浓度(0.2、0.4、0.8 mg/L) 的罗布麻共同孵育 48 h(AV1、AV2、AV3 组), ELISA 和 RT-PCR 方法分别检测细胞上清液中 TNF- α 表达水平。结果 ox-LDL 组较对照组 TNF- α 的表达明显增加, AV1、AV2、AV3 组较 ox-LDL 组 TNF- α 明显减少($P < 0.05$)。罗布麻浓度的增加与 TNF- α 表达水平呈负相关($P < 0.05$)。结论 TNF- α 是动脉粥样硬化早期重要的炎症因子, 罗布麻通过抑制炎症因子发挥抗动脉粥样硬化作用。

关键词: 罗布麻; 泡沫细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 氧化型低密度脂蛋白

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)25-3314-03

Effect of apocynum venetum extract on expression of TNF- α in early atherosclerosis*Ju Mingfei¹, Jia Lili², Huang Xiansheng¹, Wang Wenfeng¹, Leng Yanming¹, Zheng Yang^{3△}

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital, Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China; 2. Key Laboratory of Radiobiology of Ministry of Health/School of

Public Health, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China;

3. Department of Medicine, First Affiliated Hospital, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-atherosclerosis effect of apocynum venetum(AV) by observing the influence of AV extract on early inflammatory factor TNF- α expression. Methods Human U937 monocytes were differentiated to macrophages by the phorbol myristate acetate(PMA) induction and acted with 100 mg/L ox-LDL to form the foam cells for establishing the early atherosclerosis model(ox-LDL group). The different concentrations(0.2, 0.4, 0.8 mg/L) of AV were added to co-culture for 48 h (AV1, AV2, AV3 groups). The expression level of TNF- α in the supernate was detected by ELISA and RT-PCR respectively. Results Compared with control group, the expression level of TNF- α in the ox-LDL group was significantly increased, the expression level of TNF- α in various AV medication groups(AV1, AV2, AV3 groups) was significantly decreased compared with the ox-LDL group($P < 0.05$). The AV concentration increase was negatively correlated with the TNF- α expression level($P < 0.05$). Conclusion TNF- α is an important inflammatory factor in early atherosclerosis, AV could play the anti-atherosclerosis role by inhibiting the inflammatory factors.

Key words: apocynum venetum; foam cells; tumor necrosis factor-alpha; ox-LDL

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病, 炎症反应始终伴随其发展^[1]。炎症因子和炎症细胞间相互作用是 AS 发病机制的核心。氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL) 是致 AS 的独立危险因素, 可诱导 AS 中的炎症细胞表达分泌炎症因子, 级联放大炎症反应, 为动脉硬化病变的始动因素之一^[2]。肿瘤坏死因子(TNF)- α 不仅是最强大的肿瘤因子, 还是重要的炎症因子, 促进 AS 的发生、发展^[3-4]。罗布麻(apocynum venetum) 又称红麻, 是祖国传统中药之一, 具有降压、降脂、抗氧化等功效。近年研究表明罗布麻对 AS 有一定的防治作用。本实验通过建立 AS 模型, 观察罗布麻对此过程中 TNF- α 表达的影响, 旨在说明罗布麻通过抑制炎症因子发挥抗 AS 作用。

1 材料与方

1.1 药品与试剂 TNF- α 定量 ELISA 试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司, 罗布麻提取物购自西安奥晶科技发展有限公司。佛波酯购自 Sigma 公司。引物由上海生工合成。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白(LDL)的纯化、氧化修饰及鉴定 采集健康成人空腹 12 h 后新鲜混合静脉血, 加入 100 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA) 抗凝。采用超速离心法分离, 离心速度 42 000 r/min 获得 LDL 提取液, 经琼脂糖电泳显示为单一蛋白带。将 LDL 置于含 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS 溶液(pH 7.4) 中, 37 $^{\circ}$ C 温育 24 h。氧化后的 LDL 置于含 200 μ mol EDTA 的 PBS 中透析 24 h, PBS 再透析 24 h, 过滤除菌后 4 $^{\circ}$ C 保存。LDL 中

* 基金项目: 承德市科技局项目(20122131)。 作者简介: 巨名飞(1979-), 硕士研究生, 主治医师, 主要从事冠心病的临床研究。

△ 通讯作者, Tel: 13039202930; E-mail: feijv@126.com。

的脂过氧化物在氧化过程中增加,颜色也由深逐渐变浅。琼脂糖电泳显示,ox-LDL 的电泳迁移速率快于未氧化的 LDL。

1.3 U937 细胞培养及诱导分化 人 U937 单核细胞悬浮样生长于含 10% 高温灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。每 2~3 天换液 1 次。每次实验前用 100 nmol/L 佛波酯孵育 U937 单核细胞 72 h,诱导分化为巨噬细胞,换无血清 24 孔培养板培养 24 h 后加处理因素。

1.4 实验分组 将细胞随机分为 5 组,对照组(C 组):U937 巨噬细胞置于无血清 24 孔培养板培养;模型组(ox-LDL 组):在 U937 巨噬细胞的培养液中加入 ox-LDL 100 mg/L;罗布麻低浓度组(AV1 组):在模型组基础上加入罗布麻提取物(0.2 mg/L);罗布麻中浓度组(AV2 组):加入罗布麻提取物的浓度为 0.4 mg/L;罗布麻高浓度组(AV3 组):加入罗布麻提取物的浓度为 0.8 mg/L。各组设 3 个复孔,于 5% CO₂、37 ℃、饱和湿度培养箱中培养 48 h。

1.5 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 TNF-α 的表达 操作按实验试剂盒说明进行。

1.6 RT-PCR 检测 TNF-α mRNA 的表达 收集各组细胞,TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,溶于无 Rnase 水中,紫外分光光度计测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值在 1.8~2.0。分别取 1 μg RNA 在 20 μL 反应体系中逆转录合成 cDNA;取 5 μL cDNA 于 50 μL 反应体系中进行 PCR 扩增 TNF-α 引物,上游:5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC-3',下游:5'-TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT-3'(298 bp)。内参 GAPDH 引物,上游:5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'(450 bp)。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)3 V/cm 电泳分离,对电泳条带进行扫描定量分析并摄像,应用作为 GAPDH 内参照。TNF-α mRNA 表达分析:采用 Image Master VDS 进行光密度扫描(IOD),以 TNF-α 各组条带和相应 GAPDH 的条带的 IOD 比值表示 TNF-α 表达的强弱。

1.7 统计学处理 各组实验至少独立重复 3 次,结果采用 SPSS17.0 统计软件统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 U937 单核细胞分化为巨噬细胞、泡沫细胞形态学改变 光学显微镜下 U937 细胞呈圆形、悬浮状态(图 1),佛波酯诱导分化后,细胞形态变为梭形、椭圆形或不规则形,由悬浮变为贴壁状态,且伸展伪足,细胞体积增大,表明已经分化为巨噬细胞(图 2)。经氧化低密度脂蛋白孵育后经油红 O 染色可见细胞内含许多红色脂类颗粒物质,提示 AS 泡沫细胞模型制备成功(图 3)。

2.2 ELISA 方法检测 TNF-α 蛋白的表达结果 按照 TNF-α 定量 ELISA 试剂盒提供的标准品做 ELISA 检测,C 组、ox-LDL 组、AV1 组、AV2 组、AV3 组 5 组上清液中 TNF-α 浓度分别是(42.70 ± 2.80)、(108.62 ± 8.41)、(86.11 ± 7.28)、(78.52 ± 6.23)、(62.51 ± 8.45)pg/mL。结果表明:ox-LDL 组较 C 组 TNF-α 分泌量明显增加,AV1 组、AV2 组、AV3 组与 ox-LDL 组比较 TNF-α 浓度减少($P < 0.05$),随罗布麻浓度的

增加 TNF-α 表达呈逐渐下降趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 RT-PCT 检测 TNF-α 基因 C 组、ox-LDL 组、AV1 组、AV2 组、AV3 组 5 组细胞上清液中 TNF-α 与内参积分光密度比值分别是 0.84 ± 0.56、2.34 ± 0.12、2.03 ± 0.02、1.86 ± 0.11、1.02 ± 0.21。C 组 TNF-α 表达最少,ox-LDL 组与 C 组比较 TNF-α 表达明显增加($P < 0.05$),AV1 组、AV2 组、AV3 组 TNF-α 表达较 ox-LDL 组分泌减少($P < 0.05$),呈浓度依赖,这与 ELISA 结果基本一致。

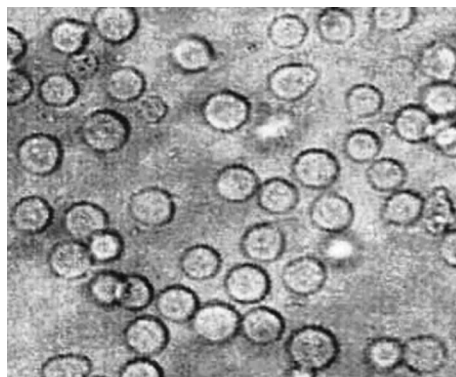


图 1 U937 单核细胞(×400)



图 2 U937 巨噬细胞(×400)

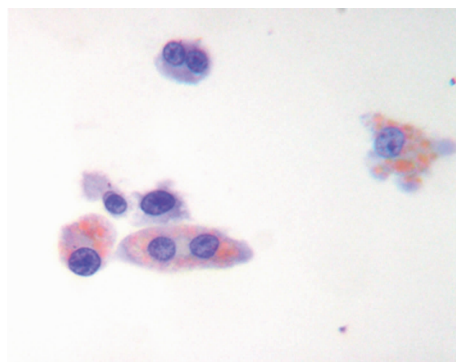


图 3 油红 O 染色泡沫细胞(×400)

3 讨 论

研究发现,ox-LDL 是致 AS 的独立危险因素之一。本实验结果进一步证实了 ox-LDL 是 AS 重要始动因素,ox-LDL 具有细胞毒性,导致内皮细胞损伤、产生 AS 发生的环境,直接刺

激巨噬细胞促进其泡沫化, 激活巨噬细胞分泌炎症细胞因子, 能直接或间接地影响免疫炎症反应, 启动 AS 炎症反应, 对 AS 发生有重要促进作用^[5-7]。罗布麻提取物的主要成分为黄酮类和萜类化合物^[8], 有研究显示: 罗布麻可抑制 ox-LDL 参与 AS 过程^[9]。本研究结果表明: 罗布麻浓度依赖性抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞表达 TNF- α 的表达和释放, 说明罗布麻有一定的抗 AS 作用。

TNF- α 是一种主要由巨噬细胞分泌的炎症因子, 具有调节免疫诱发炎症反应等多种生物学功能。研究表明它是 AS 中重要的炎症因子, 可直接作用于血管内皮致内皮细胞损伤, 启动 AS 过程; 可诱导内皮细胞产生 IL-6 和 IL-8, 促进血管内皮细胞表达黏附分子和其他炎症介质, 增强局部的炎症反应; 趋化、活化单核细胞向内膜下迁移; 促进新血管和血栓形成, 加速 AS 的发生、发展^[10-11]。

本实验结果显示: TNF- α 在 ox-LDL 诱导 U937 单核细胞形成泡沫细胞中表达增加, 这一结果印证了 ox-LDL 在 AS 过程中发挥重要作用的观点; 经过不同剂量的罗布麻提取物作用后, TNF- α 表达呈减少趋势。本研究结果表明: 罗布麻可通过抑制炎症因子的表达发挥抗 AS 作用。

综上所述, 本实验初步探讨了罗布麻提取物抗 AS 的作用及可能作用途径, 推测罗布麻除现有降压、抗氧化作用外, 还可作为防治动脉硬化的药物, 但罗布麻在 AS 中的具体作用途径尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 165-197.
- [2] Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20(5): 363-369.
- [3] Li D, Patel AR, Klibanov AL, et al. Molecular imaging of atherosclerotic plaques targeted to oxidized LDL receptor LOX-1 by SPECT/CT and magnetic resonance[J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2010, 3(4): 464-472.
- [4] Zhang YC, Wei JJ, Wang F, et al. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein correlate positively with C-reactive protein in patients with acute coronary syndrome[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62(2): 365-372.
- [5] Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2311-2316.
- [6] 何玉萍, 匡忠生, 何玉珊, 等. 氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞及促血管平滑肌细胞增殖的机制[J]. *中国老年学杂志*, 2013(4): 837-839.
- [7] 李厚轩, 雷浪, 闫福华. 氧化低密度脂蛋白诱导泡沫细胞形成过程中细胞因子水平的变化[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(8): 742-745.
- [8] 薛华茂, 钱学射, 张卫明, 等. 罗布麻的化学成分研究进展[J]. *中国野生植物资源*, 2005, 24(4): 6-8, 12.
- [9] 张素琼, 燕虹, 李青山. 罗布麻叶有效部位降血脂及抗动脉粥样硬化的研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2007(9): 831-832.
- [10] 吴俊, 陈琛, 汪道文. 高表达 CYP2C8 基因对动脉粥样硬化小鼠肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. *中国医药导报*, 2013, 10(3): 31-34.
- [11] Lee J, Cho JY, Kim WK. Anti-inflammation effect of Exercise and Korean red ginseng in aging model rats with diet-induced atherosclerosis[J]. *Nutr Res Pract*, 2014, 8(3): 284-291.
- [12] Lu SH, Sacks MS, Chung SY, et al. Biaxial mechanical properties of muscle-derived cell seeded small intestinal submucosa for bladder wall reconstitution[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(4): 443-449.
- [13] Cen L, Liu W, Cui L, et al. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications[J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(5): 492-496.
- [14] Montzka K, Laufer T, Becker C, et al. Microstructure and cytocompatibility of collagen matrices for urological tissue engineering[J]. *BJU Int*, 2011, 107(12): 1974-1981.
- [15] 李秋波, 康纪平, 冯晓科, 等. Beagle 犬正常血液学指标及血清生化指标测定[J]. *四川动物*, 2011, 30(2): 265-267.
- [16] 王冬平, 洪宝庆, 李慕, 等. 比格犬生化指标及不同性别的比较[J]. *实验动物科学*, 2008, 25(5): 62-64.
- [17] Laroute V, Chetboul V, Roche L, et al. Quantitative evaluation of renal function in healthy Beagle puppies and mature dogs[J]. *Res Vet Sci*, 2005, 79(2): 161-167.

(收稿日期: 2014-03-16 修回日期: 2014-06-21)

(上接第 3313 页)

- [7] Falke G, Caffaratti J, Atala A. Tissue engineering of the bladder[J]. *World J Urol*, 2000, 18(1): 36-43.
- [8] 廖云峰, 刘春晓, 邹晓峰. 种子细胞在膀胱重建中的研究进展[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(50): 9937-9940.
- [9] Yamzon JL, Kokorowski P, Koh CJ. Stem cells and tissue engineering applications of the genitourinary tract[J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(5): 472-477.
- [10] Gerharz EW, McDougal WS. Metabolic and functional Consequences of urinary diversion through intestinal segments[J]. *World J Urol*, 2004, 22(3): 155-156.
- [11] Brown AL, Farhat W, Merguerian PA, et al. 22 week assessment of bladder acellular matrix as a bladder augmentation material in a porcine model[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(10): 2179-2190.
- [12] Lu SH, Sacks MS, Chung SY, et al. Biaxial mechanical properties of muscle-derived cell seeded small intestinal

(收稿日期: 2014-03-25 修回日期: 2014-05-22)