

● 实验研究 ●

引用:徐安莉,赵敏,陈会敏,周艳艳.NF- κ B活化对THP-1源性泡沫细胞胆固醇流出与炎症因子表达的影响及右归丸的干预机制研究[J].湖南中医杂志,2020,36(9):152-154,176.

NF- κ B活化对THP-1源性泡沫细胞胆固醇流出与炎症因子表达的影响及右归丸的干预机制研究

徐安莉,赵敏,陈会敏,周艳艳
(湖北中医药大学,湖北 武汉,430065)

[摘要] 目的:通过脂多糖(LPS)干预单核细胞(THP-1)源性泡沫细胞制备高胆固醇模型,探讨右归丸含药血清对THP-1源性泡沫细胞胆固醇流出与炎症因子表达的影响。方法:利用LPS培养THP-1源性泡沫细胞诱导24h制备高胆固醇细胞模型,给予右归丸含药血清小、中、大剂量干预。通过比色法检测干预后的THP-1源性泡沫细胞内总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)和胆固醇酯(CE)的含量;酶联免疫吸附法测定细胞内的细胞介素 1β (IL- 1β)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的含量;逆转录-聚合酶链反应法检测细胞NF- κ B p65、SREBP1c、ABCA1mRNA的含量和蛋白表达。结果:10 ng/ml LPS培养THP-1源性泡沫细胞成功复制了高胆固醇细胞模型。右归丸大、中、小剂量组THP-1源性泡沫细胞内TC、FC、CE、IL- 1β 、IL-6、TNF- α 、NF- κ B p65、SREBP1c、ABCA1mRNA含量以及NF- κ B p65、SREBP1c、ABCA1mRNA蛋白表达水平与正常组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:右归丸可能是通过抑制NF- κ B p65和SREBP1c基因表达而调节血脂,同时通过抑制炎症因子的释放来预防动脉粥样硬化,为临床预防和治疗动脉粥样硬化提供了新的靶点。

[关键词] THP-1源性泡沫细胞;右归丸;NF- κ B;SREBP-1c;ABCA1;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.09.063

Effect of nuclear factor - κ B activation on cholesterol efflux and expression of inflammatory factors in THP - 1 - derived foam cells and the intervention mechanism of Yougui pills

XU Anli, ZHAO Min, CHEN Huimin, ZHOU Yanyan

(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei, China)

[Abstract] Objective: To establish a model of high cholesterol by lipopolysaccharide (LPS) intervention of THP-1-derived foam cells, and to investigate the effect of serum containing Yougui pills on cholesterol efflux and expression of inflammatory factors in THP-1-derived foam cells. Methods: THP-1-derived foam cells were cultured with LPS for 24 hours to establish a model of high cholesterol, and then the cells were given the intervention of low-, middle-, and high-dose serum containing Yougui pills. Colorimetry was used to measure the content of total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), and cholesteryl ester (CE) in THP-1-derived foam cells after intervention; ELISA was used to measure the levels of interleukin- 1β (IL- 1β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cells; RT-PCR was used to measure the mRNA expression of NF- κ B p65, SREBP1c, and ABCA1 in cells. Results: The model of high cholesterol was successfully established by the intervention of THP-1-derived foam cells with 10 ng/ml LPS. There were significant differences in TC, FC, CE, IL- 1β , IL-6, TNF- α , and mRNA and protein expression of NF- κ B p65, SREBP1c, and ABCA1 between the normal group and the low-, middle-, and high-dose serum containing Yougui pills groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion: Yougui pills regulate blood lipids by inhibiting the mRNA expression of NF- κ B p65 and SREBP1c and prevent

基金项目:湖北省自然科学基金项目(2019CFC882)

第一作者:徐安莉,女,副教授,研究方向:中西医结合基础研究及生物化学教学

通讯作者:周艳艳,女,教授,研究方向:中西医结合基础研究及生物化学教学, E-mail: 847892443@qq.com

atherosclerosis by inhibiting the release of inflammatory factors, which provides new targets for the prevention and treatment of atherosclerosis in clinical practice.

[Keywords] THP-1-derived foam cells; Yougui pills; NF- κ B; SREBP-1c; ABCA1; experimental study

NF- κ B/SREBPs 信号通路是由细胞因子介导的信号转导通路,不仅参与炎症反应,也调控脂类物质的代谢及内皮细胞损伤、氧化应激、血管细胞凋亡等过程^[1]。本研究围绕 NF- κ B 信号通路在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)发生、发展中的作用及其机制进行探究,拟为 AS 中的有效干预靶点提供思路。

1 实验材料

1.1 细胞株 单核细胞(THP-1),购于普若赛公司,货号:CL-0103。

1.2 动物 SPF 级 8 周龄 SD 大鼠[辽宁长生生物技术股份有限公司,合格证号:SCXK(辽)2015-0001],30 只,雄性,体质量(180 $\pm$ 20)g。

1.3 药物 右归丸(河南宛西制药股份有限公司,批准文号:国药准字 Z41022170,批号:180203,规格:小蜜丸每 10 丸重 1.8 g)。

1.4 主要试剂及仪器 胆固醇试剂盒,购自武汉三鹰生物技术有限公司;SREBP1-c 单克隆抗体,武汉三鹰生物技术有限公司,批号:10785-1-AP;ABCA1 单克隆抗体,abcam,批号:Ab18180;Trizol,西格玛奥的(上海)贸易有限公司,批号:v900483;HRP 标记羊抗兔二抗,武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA1054;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,碧云天,批号:P0010;RPMI-1640(GIBCO,货号:11875-093);胎牛血清(GIBCO,货号:10091-148);青链霉素混合液(GIBCO,货号:15070-063)。酶标仪(Thermo, μ PLUSKANMK3);PCR 仪(东胜创新生物科技有限公司,EDC-810);水平电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司,JY300);紫外分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司,JY02S)。

2 实验方法

2.1 人单核细胞株培养 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液、160nmol/L 佛波酯(PMA)孵育 THP-1 细胞 12h,50 μ g/ml 的氧化型低密度脂蛋白(ox LDL)无血清培养基培养 48 h,即形成巨噬细胞源性泡沫细胞(THP-1 源性泡沫细胞)。

2.2 含药血清制备 将大鼠随机分为右归丸大、中、小剂量组,适应性喂养 1 周后进行实验。各组动物均给予 2 ml/200 g 的剂量(大、中、小剂量组药物浓度分别为 1.6 g/ml,0.8 g/ml,0.4 g/ml)连续灌胃 5 d,末次灌胃 2 h 后,1% 戊巴比妥钠麻醉,经腹主动脉取血 5 ml,离心取上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜,56 $^{\circ}$ C 水浴灭菌 30 min, -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。中药复方血清药理实验中体外培养液中的含药血清浓度,应以临床等效剂量为基准^[2],制备 10% 右归丸大、中、小剂量含药血清。

2.3 细胞分组、模型制备及药物干预 将 THP-1 源性泡沫细胞分为 5 组,即正常组、模型组、右归丸小剂量组、右归

丸中剂量组、右归丸大剂量组。正常组不做任何处理;模型组给予 10 ng/ml LPS 诱导 24 h 制备高胆固醇模型,不作任何处理;右归丸大、中、小剂量血清组在 10 ng/ml LPS 诱导 24h 的基础上分别给予右归丸含药血清小、中、大剂量含药血清干预 24 h。

2.4 观察指标

2.4.1 血脂 检测各组 THP-1 源性泡沫细胞内总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)和胆固醇酯(CE)的含量,通过批色法检测,按照胆固醇试剂盒说明进行操作。

2.4.2 炎症因子 检测各组 THP-1 源性泡沫细胞内白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量,采用酶联免疫吸附法测定,按照试剂盒说明书进行操作。

2.4.3 核转录因子 p65、胆固醇调节元件结合蛋白 1-C、ATP 结合盒转运蛋白 A1 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组 THP-1 源性泡沫细胞的核转录因子(NF- κ B) p65、胆固醇调节元件结合蛋白 1-C(SREBP1-c)、ATP 结合盒转运蛋白 A1(ABCA1)的表达。根据 Genbank 已发表的大鼠 NF- κ B p65、SREBP1-c、ABCA1 以及 β -actin c-DNA 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件和 Oligo 6 软件进行同源相关性比较,选择同源性较高的区域设计 NF- κ B p65、SREBP1-c、ABCA1 扩增引物。引物由武汉巴菲尔生物技术有限公司合成,序列如下: β -actin 上游引物:5'-GCCAACCCTGAAAAAGATG-3',下游引物:5'-CCAG-GATAGAGCCACCAAT-3'产物长度 210bp;NF- κ B p65 上游引物:5'-ATAGAAGAGCAGCGTGGGGACT-3',下游引物:5'-GGATGACCTAAAGGGATAGGGC-3',产物长度 185bp;SREBP-1c 上游引物:5'-GCTGAGTGCCTGAACC-3',下游引物:5'-CCATCCACGAAGAAACG-3',产物长度 237bp;ABCA1 上游引物:5'-CACTAGCCCAGAGAGAGGTGCC-3',下游引物:5'-GTGATCTGGCCCTCGTAAAA-3',产物长度 193 bp;PCR 反应体系:2 $\times$ SYBR—Green10 μ l,模板 1 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,重复 3 次。反应完成后,我们利用比较阈值法来分析实时定量 RT-PCR 结果。

2.4.4 NF- κ B p65、SREBP1-c、ABCA1 蛋白表达 采用蛋白免疫印迹检测各组 THP-1 源性泡沫细胞内 NF- κ B p65、SREBP1-c、ABCA1 蛋白表达,取每组样本 50 μ g 总蛋白上样电泳,用 X 光胶片压片后进行显影、定影,BandScan 分析胶片灰度值。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较进行 t 检验,多组均数间两两比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组 THP-1 源性泡沫细胞内 TC、FC、CE 含量的比较

与正常组比较,模型组细胞内 TC、FC 和 CE 的含量增加;含药血清干预后,右归丸小、中、大剂量组细胞内 TC、FC 和 CE 的含量均较模型组明显下降,差异均有统计学意义。(见表 1)

表 1 各组 THP-1 源性泡沫细胞内 TC、FC、CE 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	例数	TC	FC	CE
正常组	6	12.412 ± 0.029	5.043 ± 0.117	7.370 ± 0.201
模型组	6	17.973 ± 0.312 ^a	6.956 ± 0.286 ^a	11.016 ± 0.157 ^a
右归丸小剂量组	6	16.111 ± 0.148 ^b	6.155 ± 0.189 ^b	9.956 ± 0.233 ^b
右归丸中剂量组	6	15.404 ± 0.207 ^b	5.974 ± 0.235 ^b	9.430 ± 0.167 ^b
右归丸大剂量组	6	14.732 ± 0.305 ^b	5.534 ± 0.294 ^b	9.198 ± 0.206 ^b

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

3.2 各组 THP-1 源性泡沫细胞内 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量比较

与正常组比较,模型组血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量升高;含药血清干预后,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量均较模型组降低,差异均有统计学意义。(见表 2)

表 2 各组 THP-1 源性泡沫细胞内 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	例数	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常组	6	1.512 ± 0.243	1.328 ± 0.192	9.213 ± 0.187
模型组	6	3.725 ± 0.542 ^a	5.544 ± 0.276 ^a	23.947 ± 0.577 ^a
右归丸小剂量组	6	2.361 ± 0.393 ^b	2.412 ± 0.914 ^b	16.296 ± 0.794 ^b
右归丸中剂量组	6	2.053 ± 0.189 ^b	2.182 ± 0.158 ^b	15.187 ± 0.598 ^b
右归丸大剂量组	6	1.864 ± 0.245 ^b	1.954 ± 0.523 ^b	10.873 ± 0.671 ^b

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$ 。

3.3 各组 THP-1 源性泡沫细胞 NF- κ B p65、SREBP1-c、ABCA1 mRNA 水平比较

与正常组比较,模型组细胞中 NF- κ B p65、SREBP1c mRNA 水平增高,ABCA1 mRNA 的表达水平降低;含药血清干预后,与模型组比较,右归丸小、中、大剂量组 NF- κ B p65、SREBP1 cmRNA 的表达降低,ABCA1 mRNA 的表达升高,差异均有统计学意义。(见表 3)

表 3 各组 THP-1 源性泡沫细胞 NF- κ B p65、SREBP1-c、ABCA1 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NF- κ B p65 mRNA	SREBP1c mRNA	ABCA1 mRNA
正常组	6	1.000 ± 0.016	1.000 ± 0.011	1.000 ± 0.009
模型组	6	2.954 ± 0.076 ^a	2.423 ± 0.076 ^a	0.558 ± 0.117 ^a
右归丸小剂量组	6	2.407 ± 0.132 ^b	2.117 ± 0.102 ^b	0.682 ± 0.106 ^b
右归丸中剂量组	6	2.112 ± 0.084 ^b	1.824 ± 0.077 ^b	0.702 ± 0.054 ^b
右归丸大剂量组	6	1.954 ± 0.201 ^b	1.698 ± 0.153 ^b	0.896 ± 0.073 ^b

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

3.4 各组 THP-1 源性泡沫细胞 NF- κ B p65、SREBP1c、ABCA1 蛋白表达比较

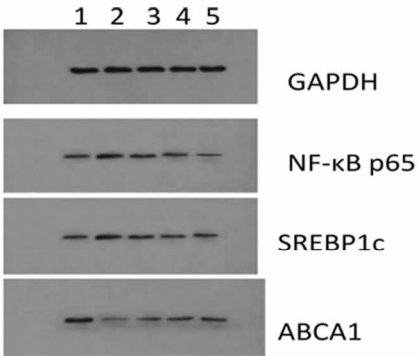
与正常组比较,模型组细胞中 NF- κ B p65、SREBP1c 蛋白表达水平增加,蛋白条带明显较粗,平均灰度值增高;ABCA1 蛋白表达水平降低,蛋白条带变细,

平均灰度值降低,差异均有统计学意义。含药血清干预后,与模型组相比,右归丸小、中、大剂量组 NF- κ B p65、SREBP1c 蛋白表达明显降低,蛋白条带变细,平均灰度值降低;ABCA1 蛋白表达水平明显升高,蛋白条带变粗,平均灰度值升高,差异均有统计学意义。(见表 4、图 1)

表 4 各组 THP-1 源性泡沫细胞 NF- κ B p65、SREBP1c、ABCA1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NF- κ B p65/GAPDH	SREBP1c/GAPDH	ABCA1/GAPDH
正常组	6	0.649 ± 0.017	0.476 ± 0.108	0.338 ± 0.113
模型组	6	0.826 ± 0.126 ^a	0.658 ± 0.154 ^a	0.196 ± 0.136 ^a
右归丸小剂量组	6	0.461 ± 0.053 ^b	0.602 ± 0.094 ^b	0.210 ± 0.106 ^b
右归丸中剂量组	6	0.393 ± 0.105 ^b	0.583 ± 0.119 ^b	0.234 ± 0.054 ^b
右归丸大剂量组	6	0.309 ± 0.118 ^b	0.503 ± 0.142 ^b	0.278 ± 0.084 ^b

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。



注:1—正常组;2—模型组;3—右归丸小剂量组;4—右归丸中剂量组;5—右归丸大剂量组。

图 1 各组 THP-1 源性泡沫细胞 NF- κ B p65、SREBP1-c、ABCA1 蛋白电泳图

4 讨论

研究发现,SREBPs 途径与高胆固醇血症发病联系中,ABCA1 作为 SREBP-1c 下游的靶基因,直接参与胆固醇的转运,促进 ABCA1 基因表达也很可能成为治疗高胆固醇血症的重要手段^[3]。NF- κ B/SREBPs 信号通路在介导机体的免疫炎症反应和胆固醇从组织细胞中流出起着关键性作用,AS 的发生与发展与 NF- κ B/SREBPs 关系十分密切^[4]。NF- κ B 可引起多种与免疫相关的细胞因子及趋化因子的分泌,如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18 和 TNF- α 等^[5];SREBPs 直接参与脂代谢,其下游的靶基因包括脂肪酸合成酶(FAS)、ABCA1 和胆固醇酯转运蛋白(CETP)等^[6]。ABCA1 是一种利用 ATP 为动力,促进细胞内游离 TC 和磷脂流出的整合膜蛋白^[7],ABCA1 的作用是促进细胞内的 TC 和磷脂(主要是卵磷脂)转运至 HDL 前体 apoA I 上,使得血浆中 TC 的含量增多^[8]。

本研究结果显示,LPS 可明显增加 THP-1 源性泡沫细胞内 TC、FC 和 CE、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量,而采用右归丸干预后,细胞内 TC、FC、CE、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量明显下降。同时经 LPS 处理能明显(下转第 176 页)

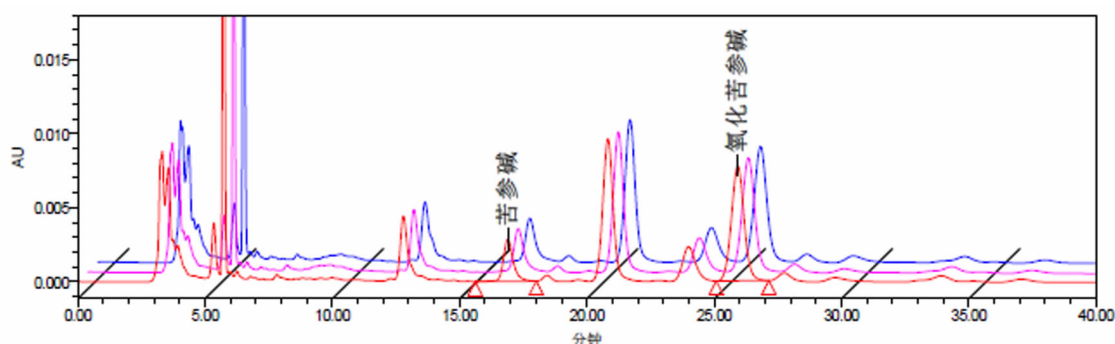


图2 不同批次的苦参配方颗粒的HPLC图谱

3 讨论

本文通过对HPLC样品前处理的6个参数(提取溶剂用量、提取方式、回流温度、浓氨试液浸泡时间、过中性氧化铝柱滴速与不过中性氧化铝柱因素)进行考察探索,确定了HPLC对苦参配方颗粒中苦参碱和氧化苦参碱含量测定最优的样品前处理操作方法,结果表明该方法样品中苦参碱、氧化苦参碱提取完全。

通过实验数据分析可知,对苦参配方颗粒中苦参碱及氧化苦参碱总量进行测定时,在样品前处理过程中,须控制浓氨浸泡的时间、采用加热回流提取、可以不采用过中性氧化铝柱步骤,如采用过中性氧化铝柱步骤须控制滴速。通过细化操作,可有效减少系统误差,保证提取效果的稳定

性,保证检测方法的准确性。本实验研究建立的方法,操作简便,准确性高,可作为苦参配方颗粒质量控制方法。

参考文献

- [1] 穆甲骏,王卫国,侯启昌. 苦参生理活性物质研究现状与展望[J]. 河南师范大学学报,2014,42(6):131-135.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:202-203.
- [3] 王丽聪,李松. HPLC测定苦参配方颗粒中苦参碱与氧化苦参碱含量[J]. 盐城学院学报,2013,26(1):48-51.
- [4] 王丽聪,李松. 苦参配方颗粒质量控制研究[J]. 现代药物与临床,2012,27(5):471-473.

(收稿日期:2019-12-17)

(上接第154页)增加细胞中NF- κ B p65、SREBP1c mRNA和蛋白的表达水平,降低ABCA1 mRNA和蛋白的表达水平,右归丸含药血清干预后,NF- κ B p65、SREBP1c mRNA和蛋白的表达明显降低($P < 0.05$),ABCA1 mRNA和蛋白的表达水平升高。研究表明,促进NF- κ B活性,可增加SREBP1c mRNA表达,减少ABCA1 mRNA表达,增加胆固醇在细胞内的聚集,导致泡沫细胞的堆积;同时刺激炎症因子的释放可加剧AS的发生发展。有效抑制NF- κ B和SREBP1c基因表达后,细胞内中胆固醇含量较对照组显著降低,可能是一条潜在的降低胆固醇水平的有效途径。

中医学认为,肾的气化功能失常最终导致津液的产生及输布功能失常而出现痰瘀互结^[9],右归丸通过温补肾阳,可激发肾主气化的功能,通过激发精血津液化生为气或能量,来达到促进“有形化无形”的气化过程^[10],促进瘀血与痰湿的有效分解来改善血中脂代谢的状态,从而起到降脂的作用。我们推测右归丸可能是通过抑制NF- κ B和SREBP1c基因表达,进而起到调节血脂的功能,同时通过抑制炎症因子的释放来防治AS,这为临床预防和治疗AS提供了新的靶点。

参考文献

- [1] 李显东,陈平英,谢华强,等. 泡沫细胞DNA甲基化及其对脂代谢基因SREBP1表达的影响[J]. 山东医药,2018,58(24):22-25.

- [2] 于红红,俞琦,蔡琨,等. 泻心汤含药血清对RAW264.7源性泡沫细胞TLR9/MyD88/NF- κ Bp65信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(18):24-29.
- [3] 谭玉林,唐艳艳,张敏,等. ABCA1介导胆固醇外流及抗炎的信号通路研究进展[J]. 生理科学进展,2015,46(1):52-56.
- [4] CHEN J, YUE J, LIU J, et al. Salvianolic acids improve liver lipid Metabolism in ovariectomized rats via blocking STAT-3/SREBP1 signaling[J]. Chin J Nat Med, 2018, 16(11):838-845.
- [5] HOVLAND A, JONASSON L, GARRED P, et al. The complement system and toll-like receptors as integrated players in the pathophysiology of atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2015, 241(2):480-494.
- [6] 赵敏,徐安莉,陈会敏,等. LXR α 靶基因对肾虚实验大鼠血脂中胆固醇的调控机制研究[J]. 时珍国医国药,2015,26(5):1264-1267.
- [7] WESTERTEP M, BOCHEM AE, YVAN-CHARVET L, et al. ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation[J]. Circ Res, 2014, 114(1):157-170.
- [8] HU J, XI D, ZHAO J, et al. Crosstalk between high-density lipoprotein and inflammation and its significance to atherosclerosis[J]. Am J Med Sci, 2016, 352(4):408-415.
- [9] 吴元洁,王正,王玉凤,等. “痰浊”与高脂血症相关性初探[J]. 中医临床杂志,2004,16(3):201-203.
- [10] 皮持衡,王茂泓,贺支支. 肾主气化的概念及其临床应用[J]. 中医药学刊,2002,20(5):502-503.

(收稿日期:2020-01-12)