

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.19.004

白藜芦醇苷在增强 ox-LDL 诱导 THP-1 巨噬细胞增殖能力及抑制炎症因子表达中的作用*

石春林¹, 沙前坤², 陈瑾³, 刘俊^{4△}

(1. 重庆市永川区人民医院, 重庆 402100; 2. 重庆央都生物研究院药学部, 重庆 408000; 3. 重庆医科大学附属第一医院皮肤科, 重庆 400016; 4. 重庆市沙坪坝陈家桥医院, 重庆 401331)

摘要:目的 探讨虎黄烧伤搽剂中白藜芦醇苷在增强氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导 THP-1 巨噬细胞增殖能力及抑制炎症因子表达中的作用。方法 选取 THP-1 巨噬细胞进行培养,并分为对照组、ox-LDL 组和白藜芦醇苷组。采用 CCK-8 法检测 3 组 THP-1 巨噬细胞的增殖活性和单核细胞趋化因子 1(MCP-1)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。结果 THP-1 巨噬细胞增殖活性与 ox-LDL 处理浓度和时间呈相关性,浓度越高,时间越长,增殖活性越强;与 ox-LDL 处理组相比,白藜芦醇苷组处理 4 h 后,THP-1 巨噬细胞增殖能力均有不同程度的升高,其中 50 μ mol/L 白藜芦醇苷组细胞增殖活性变化最明显;ox-LDL 组 MCP-1, IL-6, TNF- α 炎症因子水平均高于对照组($P < 0.05$);白藜芦醇苷组 MCP-1, IL-6, TNF- α 炎症因子水平高于对照组,但低于 ox-LDL 组($P < 0.05$)。结论 虎黄烧伤搽剂中的白藜芦醇苷能增强 THP-1 巨噬细胞的增殖活性,抑制炎症因子的表达,可能与减少 ox-LDL 诱导有关。

关键词:虎黄烧伤搽剂;白藜芦醇苷;氧化低密度脂蛋白;THP-1 巨噬细胞;增殖能力;炎症因子

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)19-0016-04

The Role of Resveratrol in Enhancing the Proliferation Ability of ox-LDL-Induced THP-1 Macrophages and Inhibiting the Expression of Inflammatory Factors

SHI Chunlin¹, SHA Qiankun², CHEN Jin³, LIU Jun⁴

(1. Yongchuan District People's Hospital, Chongqing, China 402100; 2. Department of Pharmacy, Chongqing Yangdu Institute of Biology, Chongqing, China 408000; 3. Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China 400016; 4. Shapingba District Chenjiaqiao Hospital, Chongqing, China 401331)

Abstract: Objective To investigate the role of resveratrol in Huhuang Burn Liniment in enhancing the proliferation ability of oxidized low-density lipoprotein(ox-LDL) induced THP-1 macrophages and inhibiting the expression of inflammatory factors. **Methods** THP-1 macrophages were cultured and divided into the normal control group, ox-LDL group, and resveratrol group. The proliferation of THP-1 macrophages, monocyte chemokine 1(MCP-1), interleukin 6(IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in each group were detected by CCK-8 method. **Results** The proliferation activity of THP-1 macrophages was correlated with the concentration and time of ox-LDL treatment. The higher the concentration, the longer the time, and the stronger the proliferation activity. Compared with the ox-LDL group, the proliferation capacity of THP-1 macrophages increased to different degrees after 4 h of resveratrol treatment, and the proliferation capacity of cells in the 50 μ mol/L resveratrol group was the most obvious. Levels of inflammatory factors such as MCP-1, IL-6 and TNF- α were higher in ox-LDL group than those in the control group($P < 0.05$). The levels of inflammatory factors such as MCP-1, IL-6 and TNF- α in the resveratrol group were higher than those in the control group, but lower than those in the ox-LDL group($P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol in Huhuang Burn Liniment can enhance the proliferation of THP-1 macrophages and inhibit the expression of inflammatory factors, which may be related to the reduction of ox-LDL induction.

Key words: Huhuang Burn Liniment; resveratrol; oxidized low density lipoprotein; THP-1 macrophages; proliferative capacity; inflammatory factors

在动脉粥样硬化斑块的形成过程中,其诱发因素较多,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的炎症损伤是其中最重要的因素,其作用机制表现为:ox-LDL 作用→巨噬细胞进入血管内皮→形成泡沫细胞→粥样硬化斑块形成^[1]。ox-LDL 与血管炎性反应密切相关,单核细

胞趋化因子 1(MCP-1)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等均为常见炎症因子,其表达会直接影响细胞膜脂质过氧化而损伤血管内膜,进而参与到动脉粥样硬化斑块的形成中^[2-3]。虎黄烧伤搽剂为中医常见制剂,具有泻火解毒、凉血活血、消肿止痛、燥湿敛

*基金项目:国家自然科学基金[81372917]。

第一作者:石春林,男,大学本科,主管药剂师,研究方向为药剂学,(电子信箱)315748434@qq.com。

△通信作者:刘俊,男,大学本科,副主任医师,主要从事新生儿、儿童感染及儿童消化疾病的诊治工作,(电子信箱)6542022@qq.com。

疮等功效,含有多酚类植物抗毒素白藜芦醇苷。白藜芦醇苷是组蛋白去乙酰化酶沉默信息调控因子(SIRT1)家族的主要激动剂,有保护心肌、延缓衰老及抗炎抗氧化作用^[4-5]。刘雅倩等^[6]的研究指出,白藜芦醇苷能增强 THP-1 巨噬细胞的增殖能力,抑制炎症因子的表达,但其作用机制尚不明确。动物实验表明,白藜芦醇苷能通过调控 SIRT1 蛋白对 ox-LDL 诱导 THP-1 巨噬细胞的增殖能力起到有效作用^[7],也能抑制炎症因子的产生,但由于国内相关文献报道不多见,其可靠性和真实性有待进一步证实。本研究中探讨了白藜芦醇苷对巨噬细胞增殖、炎症细胞因子的干预作用及作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:TP-1200C 型电子天平(湘仪天平仪器设备有限公司,精度为 0.01 g);1658001 型电泳仪(美国 Bio-Rad 有限公司);PY-16 型恒温培养箱(南京畅翔仪器设备有限公司);WD-9405F 型脱色摇床(北京六一生物科技有限公司);1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);SAT-680T 型酶标仪(上海巴玖实业有限公司)。

试剂:THP-1 人单核细胞株(中科院上海细胞生物所细胞中心);虎黄烧伤搽剂(重庆喜旋生物科技有限公司,国药准字 Z20010151,规格为每瓶 50 mL);白藜芦醇苷(中国药品生物制品检定所,纯度大于 98%,规格为每瓶 20 mg);RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);TNF- α 及 IL-6 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(深圳晶美生物有限公司);CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒,生物素标记的山羊抗兔二抗或生物素标记的山羊抗小鼠二抗,HRP 标记的链霉亲和素(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 THP 巨噬细胞制备

细胞复苏后均匀平铺于培养基中,加入含 100 mL/L 胎牛血清的培养液,置含 50 mL/L CO₂ 的 37 °C 电热恒温箱孵育,细胞汇合至 0 左右,以 2×10^4 个/mL 细胞数接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,包含 160 nmol/L PMA 培养液,置含 50 mL/L CO₂ 培养箱中诱导贴壁 36 h,弃培养液,每孔再加入培养液 100 μ L。在白藜芦醇苷处理前添加 0, 30, 90 μ mol/L ox-LDL 对巨噬细胞预处理 4 h,用 5, 25, 50 μ mol/L 白藜芦醇苷分别处理巨噬细胞 4, 8, 16 h。将所有 THP-1 巨噬细胞分为 3 组。对照组仅加入普通培养基,ox-LDL 组加入 ox-LDL,白藜芦醇苷组加入白藜芦醇苷。以白藜芦醇苷作为标准品,采用高效液相色谱(HPLC)法对虎黄烧伤搽剂中的白藜芦醇苷进行含量测定^[8-9]。

1.2.2 细胞增殖活性检测

将各处理组终点细胞,在 96 孔板加入 100 μ L CCK-8 工作液,置 37 °C 恒温箱孵育过夜。次日,避光采用酶标仪于 450 nm 波长处检测各细胞标本的吸光度(A)值。

1.2.3 炎症因子水平测定

收集处理后的细胞,用蛋白提取试剂盒分别提取细胞总蛋白及核蛋白,用 BCA 法进行蛋白质定量。取蛋白 40 μ g, 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,蛋白质电转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 2 h,加入一抗,分别加入小鼠抗 MCP-1 抗体(1:500)、小鼠抗 IL-6 抗体(1:1 000)、小鼠抗 TNF- α 抗体(1:800),室温孵育 12 h, TBST 缓冲液洗膜 30 min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h;TBST 洗膜 30 min,采用蛋白质印迹(WB)荧光检测试剂激发荧光,显示于 X 光片,显影,定影,进行图像分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验;计数资料以百分比(%)表示,行 χ^2 检验。呈非正态分布数据,多组间比较采用 One-way ANOVA 检验,组间两两比较行 SNK 法。相关性分析采用 Pearson 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在 ox-LDL 诱导 THP-1 巨噬细胞增殖能力中的作用

采用 0, 30, 90 μ mol/L ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞预处理 4 h 后,采用 5, 25, 50 μ mol/L 白藜芦醇苷分别处理巨噬细胞,于 4, 8, 16 h 时分别检测细胞增殖活性。结果显示,THP-1 巨噬细胞增殖活性与 ox-LDL 处理浓度和时间有一定相关性,除去 90 μ mol/L ox-LDL 处理 16 h THP-1 巨噬细胞的增殖活性低于 8 h 外,其余均表现为浓度越高,时间越长,增殖活性越强。详见表 1。

表 1 ox-LDL 诱导 THP-1 巨噬细胞增殖活性的时间和浓度依赖性($\bar{x} \pm s$)

浓度 (μ mol/L)	THP-1 巨噬细胞增殖活性(A)		
	4 h	8 h	16 h
0	1.21 $\pm$ 0.32	1.35 $\pm$ 0.41	1.39 $\pm$ 0.43
30	1.30 $\pm$ 0.38	1.37 $\pm$ 0.42	1.50 $\pm$ 0.51
90	1.38 $\pm$ 0.42	1.45 $\pm$ 0.47	1.41 $\pm$ 0.43

选择 90 μ mol/L ox-LDL,进一步分析白藜芦醇苷在增强 ox-LDL 诱导 THP-1 巨噬细胞增殖能力中的作用。在 ox-LDL 处理后,添加 5, 25, 50 μ mol/L 3 种浓度的白藜芦醇苷处理 4 h 后,THP-1 巨噬细胞增殖活性分别为 (1.25 $\pm$ 0.34) A, (1.36 $\pm$ 0.41) A, (1.49 $\pm$ 0.51) A。结果显示,与 ox-LDL 处理组相比,白藜芦醇

昔的浓度达到50 $\mu\text{mol/L}$ 时,其对 THP-1 巨噬细胞增殖活性的影响最显著。

2.2 白藜芦醇昔在增强 ox-LDL 抑制炎症因子表达中的作用

ox-LDL 组的 MCP-1, IL-6, TNF- α 炎症因子水平均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。白藜芦醇昔组 MCP-1, IL-6, TNF- α 炎症因子水平高于对照组,但低于 ox-LDL 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),提示白藜芦醇昔能抑制炎症因子的表达,其中可能与增强 ox-LDL 诱导有关。详见表 2 和图 1。

表 2 3 组相关炎症因子水平比较 ($\bar{X} \pm s$, ng/L)

组别	MCP-1	IL-6	TNF- α
对照组	12.54 $\pm$ 3.67	65.45 $\pm$ 13.47	1.65 $\pm$ 0.54
ox-LDL 组	27.41 $\pm$ 8.12*	102.62 $\pm$ 23.08*	2.89 $\pm$ 0.76*
白藜芦醇昔组	16.58 $\pm$ 4.91 $^{\Delta}$	84.15 $\pm$ 20.64 $^{\Delta}$	2.03 $\pm$ 0.61 $^{\Delta}$

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 ox-LDL 组, $^{\Delta} P < 0.05$ 。

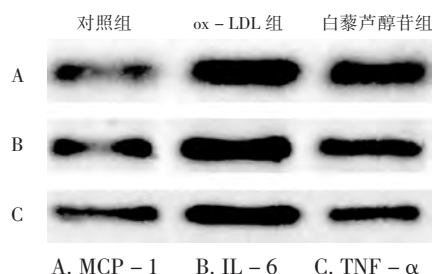


图 1 巨噬细胞 MCP-1, IL-6, TNF- α 蛋白水平

3 讨论

巨噬细胞介导冠状动脉粥样硬化的进展是冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)的主要病理机制。脂质蛋白被氧化修饰作用后,会入侵受损的内皮细胞,在趋化因子的作用下导致单核细胞发生迁移至内膜下,单核细胞膜体与 ox-LDL 相结合,分化成巨噬细胞,并分泌多种促炎因子,较常见的有 IL-6, IL-8, TNF- α 等,使平滑肌层细胞迁移、内皮细胞增生,增加粥样斑块的不稳定性^[10-11]。可见,单核巨噬细胞的功能状态直接影响斑块的稳定性。因此,干预冠状动脉粥样硬化必须对巨噬细胞进行干预,以此提升治疗效果,达到治疗目的。

在巨噬细胞的分化过程中,ox-LDL 具有至关重要的作用^[12]。借助巨噬细胞与内皮整合素家族受体结合,ox-LDL 能诱导局部促进炎症反应损伤血管内膜,产生一系列细胞分化增殖异常反应^[13]。MA 等^[14]研究认为,ox-LDL 是促使巨噬细胞参与形成不稳定斑块的重要因素,诱导斑块周边细胞增殖与过度凋亡,增加了脂质池内部的容积,减少了纤维帽钙化的硬度。本研究结果显示,THP-1 巨噬细胞增殖效应与 ox-LDL 呈一定的时间和浓度依赖性。其中,30 $\mu\text{mol/L}$ 干预 16 h 时增殖效果最显著。进一步分析炎症因子水平的变化情况发

现,IL-6, TNF- α 等水平在 ox-LDL 作用后均有不同程度的升高,证实了 ox-LDL 诱导巨噬细胞增殖与炎症因子的介导有关。MCP-1 是核因子 κB (NF- κB) 的调控关键糖蛋白,是炎症介导通路中的关键靶点,能直接诱导单核巨噬细胞趋化迁移,对 IL-6, TNF- α 炎症细胞因子的表达具有激活作用^[15]。SHAYGANNI 等^[16]研究发现,动脉粥样硬化斑块的形成过程中,会被过度修饰的脂质蛋白直接激活炎症通路,使 MCP-1 的表达得到增加,发生平滑细胞的过度增殖。本研究结果显示,在 ox-LDL 作用下,除 IL-6 和 TNF- α 上升外, MCP-1 也明显增加,表明 ox-LDL 诱导巨噬细胞的增殖,与 MCP-1 的表达密切相关。白藜芦醇昔是一种多酚类中药提取物,是 SIRT1 的有效激活剂,可改善细胞代谢,对自噬水平的调控也有一定作用。研究表明,白藜芦醇昔能有效抑制 NF- κB 的活性水平,促进谷胱甘肽过氧化物酶的表达^[17]。本研究结果显示,白藜芦醇昔作用后,巨噬细胞明显增殖,同时 MCP-1, IL-6, TNF- α 炎症细胞因子水平明显下降,进一步证实了白藜芦醇昔在 ox-LDL 诱导巨噬细胞增殖中的作用,抗炎性细胞因子表达的效应被抑制。

综上所述,虎黄烧伤搽剂中白藜芦醇昔能增强 THP-1 巨噬细胞的增殖能力,抑制炎症因子的表达,可能与减少 ox-LDL 诱导有关。

参考文献:

- [1] 马 懿,阮云军,王玉筵,等. 白藜芦醇昔通过上调 SIRT1 抑制氧化低密度脂蛋白诱导的 THP-1 巨噬细胞增殖和炎症因子表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2018,34(3):193-198.
- [2] 郭家彬,崔 岚,袁海涛,等. 白藜芦醇通过调节 PGC-1 α 活性与线粒体功能抑制多柔比星心肌细胞损伤[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,15(10):1004.
- [3] 高 颖,陈 蕊,顾 宁,等. 藻本内酯对重组人热休克蛋白 60 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症反应的作用及机制[J]. 中华心血管病杂志,2016,44(9):793-798.
- [4] TAJFARD M, LATIFF LA, RAHIMI HR, et al. Serum concentrations of MCP-1 and IL-6 in combination predict the presence of coronary artery disease and mortality in subjects undergoing coronary angiography[J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2017, 435(1/2):37-45.
- [5] KITADA M, OGURA Y, KOYA D. The protective role of Sirt1 in vascular tissue: its relationship to vascular aging and atherosclerosis[J]. Aging, 2016, 8(10):2290-2307.
- [6] 刘雅倩,周 通,张 瑜,等. 砷诱发 THP-1 巨噬细胞氧化应激及抑制 ABCA1 表达诱导细胞凋亡[J]. 毒理学杂志, 2019, 10(2):213-215.
- [7] 王师英,林 江. 白藜芦醇调控 TGF β 1/Smad 信号通路抑制胃癌 MGC803 细胞增殖机制探讨[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(23):3713-3717.