

三七皂苷对泡沫细胞形成的影响及其信号机制

樊继山, 李晓辉*, 李淑慧

(第三军医大学基础部 新药研究室, 重庆 400038)

通常认为冠脉疾病的发生与脂肪沉积造成动脉狭窄有关,近年来的临床流行病学调查提示炎症因素在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 发病中可能具有更重要作用^[1]。基于这一新的认识,本室率先建立了炎症免疫性 AS 动物模型,并利用先进的抗体芯片技术发现炎症免疫反应引发的 AS 形成过程中存在大量细胞因子的整体变化^[2]。c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino-terminal kinase, JNK) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38) 作为信号转导分子可被多种应激刺激活化,进而通过对各自底物的磷酸化调节炎症细胞因子的基因表达,参与免疫炎症反应。因此磷酸化激活的 JNK、p38 在 AS 的免疫炎症机制中可能具有重要作用。含大量脂质的泡沫细胞的形成是 AS 初期的特征性病理变化,也是 AS 发病的核心环节,因此本研究在氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导泡沫细胞形成的过程中叠加炎症刺激剂酵母多糖 (zymosan A, Zym) 探讨炎症刺激对泡沫细胞形成的影响及其信号机制。三七总皂苷 (*Panax notoginseng* total saponin, PNS) 对 AS 具有良好的防治作用,但通常认为其机制与降血脂、抗血栓形成有关^[3]。既往研究发现 PNS 对急、慢性炎症均具有显著治疗作用^[4,5]。提示 PNS 除具有调节血脂等作用外,还具有很强的炎症调节作用。因此,本研究在既往的研究基础上进一步探讨 PNS 对泡沫细胞形成的影响及其作用机制是否涉及 JNK 和 p38 信号通路,为临床上探寻既具有降血脂效应又具有抗炎活性的抗 AS 的良好候选药物奠定理论基础。

1 材料

1.1 动物:雄性昆明小鼠,18~20 g,购于第三军医大学实验动物中心。

1.2 试剂:Zym 粉剂购于 Sigma 公司,ox-LDL (1.8 mg/mL) 购于北京协和医科大学,PNS (质量

分数 99%) 购于中国科学院昆明植物研究所。无酚红 RPMI-1640 培养基购于 Gibco 公司,胆固醇酶比色法 (CHOD-PAP 法) 测定试剂盒购自上海荣盛生物制品公司,磷酸化 JNK (Phospho-JNK, P-JNK)、磷酸化 p38 (Phospho-p38, P-p38) 兔抗小鼠双磷酸化位点抗体购自 Cell signaling 公司。

2 方法

2.1 巨噬细胞的分离:每只小鼠 ip 无血清无酚红 RPMI-1640 培养液 2 mL,20 min 后颈椎脱臼处死,75% 乙醇浸泡 10 min,剖腹收集腹腔内液,750 r/min 离心 5 min 后收集细胞,用含 10% 胎牛血清的无酚红 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 5×10^6 /mL。培养板中各孔加入细胞悬液 (24 孔板稀释 10 倍),置 5% CO₂、37 °C 孵箱培养 2 h 后去上清液,用 PBS 洗去未贴壁细胞。

2.2 分组:6 孔板分为单纯 ox-LDL 对照组、Zym+ox-LDL 组、PNS 干预 (低、高剂量) 组。每孔加入细胞 5×10^5 /mL、含 10% 胎牛血清无酚红 RPMI-1640 培养液 2.5 mL 及 ox-LDL 80 µg/mL。Zym+ox-LDL 组加入 Zym 50 µg/mL,PNS 组加入 Zym 50 µg/mL 后分别加入 PNS 50、100 µg/mL。24 孔板细胞爬片分为阴性对照组、ox-LDL 对照组、Zym+ox-LDL 组、PNS 干预组。每孔加入细胞 5×10^5 /mL、含 10% 胎牛血清无酚红 RPMI-1640 培养液 1 mL 及 ox-LDL 80 µg/mL。Zym+ox-LDL 组加入 Zym 50 µg/mL,PNS 组加入 Zym 50 µg/mL 后再加入 PNS 100 µg/mL。各组培养板置 5% CO₂、37 °C 孵箱培养 48 h。

2.3 油红 O 染色:24 孔板细胞爬片染色观察泡沫细胞,弃去培养液,漂洗固定后,依次用 0.3% 油红 O 和苏木精染色,光学显微镜下观察。

2.4 细胞内胆固醇的测定:6 孔板细胞吸去培养液,用 Folch 法^[6]抽提泡沫细胞中脂质,按试剂盒说明进行。

收稿日期:2006-12-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30470465,30371768)

作者简介:樊继山 (1972—),男,河北省邯郸市人,博士,研究方向为心血管药理学。

Tel: (023) 68753397-81 E-mail: river080@163.com

* 通讯作者 李晓辉

2.5 P-JNK、P-p38 蛋白表达水平的测定:培养的细胞用 4℃ 预冷的 PBS 轻洗 2 次,加入预冷的细胞裂解液(50 mmol/L β-甘油磷酸 pH 7.3, 1.5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L NaF, 1% Triton-X100, 2 mmol/L PMSF, 10 mg/L 抑肽酶, 10 mg/L 亮抑酶肽, 10 mg/L 胃蛋白酶抑制剂 A) 100 μL,冰浴 5 min,将细胞从培养板上刮下,14 000×g 离心 10 min,吸上清液 -80℃ 保存。以上操作步骤均在 4℃ 下进行,蛋白质定量后加等量 2×样品缓冲液,100℃ 水浴 5 min,5 000 r/min 离心 10 s,取上清液上样。取样品每孔 60 μg,用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离;分离的蛋白转膜至硝酸纤维素膜后,室温封闭液封闭 1 h;与一抗(浓度 1:1 000) 4℃ 过夜;洗膜 3 次后,与二抗(1:1 000) 室温下摇育 2 h;洗膜 3 次后,用化学发光显色系统显示蛋白条带。用 quantity one 4.4 软件进行图像分析,测定各条带面积×吸光度值,目的蛋白的表达水平即相对表达量用目的条带/β-actin 的值计算。

2.6 统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

3 结果

3.1 泡沫细胞形态观察:光镜下,经显示中性脂肪的油红 O 法染色后,脂质呈红色,细胞核呈蓝色。阴性对照组细胞未吞噬脂质,胞浆呈淡蓝色。加入 ox-LDL 培养 48 h 后,与阴性对照组相比,ox-LDL 组及 Zym+ox-LDL 组可见胞浆内含有大量红染的脂质颗粒,细胞体积明显增大,表明泡沫细胞已经形成。与 ox-LDL 组相比,Zym+ox-LDL 组细胞胞浆内红染脂质颗粒明显增多,大量红染颗粒重叠使胞浆着色明显加深。PNS 组细胞胞浆内脂质明显减少,体积较炎症刺激明显减小。

3.2 PNS 对泡沫细胞内胆固醇量的影响:与 ox-LDL 组比较,Zym+ox-LDL 组细胞内胆固醇水平明显升高,与 Zym+ox-LDL 组相比,PNS 组细胞内胆固醇水平明显降低 ($P<0.01$),且呈现剂量依赖性 ($P<0.05$),见表 1。

3.3 Western blotting 测定 P-p38、P-JNK 的表达:结果显示,β-actin 在各泳道表达量基本一致,说明各组上样量基本一致,实验系统稳定。在相对分子质量 43 000 和 55 000 处,各泳道分别出现 P-p38 和 P-JNK 目的条带,比较蛋白的相对表达量发现,ox-LDL 对照组少量表达 P-p38、P-JNK,Zym+ox-

LDL 组的表达明显高于 ox-LDL 组 ($P<0.01$),PNS 低、高剂量组表达量较 Zym+ox-LDL 组减少 ($P<0.01$),且呈现剂量依赖性 ($P<0.05$),见表 1。

表 1 PNS 对泡沫细胞内胆固醇水平及 P-p38、P-JNK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of PNS on cholesterol level and protein expression of P-p38 and P-JNK in foam cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (μg·mL ⁻¹)	胆固醇/μg (5×10 ⁶ cells)	P-p38/ β-actin	P-JNK/ β-actin
ox-LDL	80	32.90±4.40	0.17±0.046	0.16±0.045
Zym+ox-LDL	80+50	54.73±7.19**	0.54±0.053**	0.36±0.042**
PNS	50	40.18±5.98##	0.32±0.043##	0.24±0.033##
	100	31.85±4.62##△△	0.25±0.039##△△	0.19±0.037##△△

与 ox-LDL 组比较: ** $P<0.01$; 与 Zym+ox-LDL 组比较: ** $P<0.01$; 与 PNS 50 μg/mL 组比较: △△ $P<0.01$

** $P<0.01$ vs ox-LDL group; ## $P<0.01$ vs Zym+ox-LDL group; △△ $P<0.01$ vs PNS 50 μg/mL group

4 讨论

含大量脂质的泡沫细胞的形成是 AS 初期的特征性病理变化,也是 AS 发病的核心环节,巨噬细胞源性泡沫细胞更是 AS 病变初期主要的泡沫细胞类型,ox-LDL 在泡沫细胞形成中起到至关重要的作用,是体外诱发巨噬细胞泡沫化的经典方法,因此,本研究应用炎症刺激剂 Zym 叠加传统的 ox-LDL 刺激小鼠腹腔巨噬细胞性泡沫细胞的形成,结果表明 Zym 在体外可以明显促进 ox-LDL 诱发的巨噬细胞源性泡沫细胞的形成,泡沫细胞内脂质沉积量也显著升高,并且 PNS 对其有明显的抑制作用。提示 PNS 能够抑制炎症刺激促进的泡沫细胞的形成。

本实验结果显示 ox-LDL 组少量表达 P-JNK、P-p38,表明 ox-LDL 在体外可以刺激巨噬细胞源性泡沫细胞中 JNK、p38 的磷酸化。Zym+ox-LDL 组中 P-p38、P-JNK 的表达明显高于 ox-LDL 对照组,表明 Zym 对 ox-LDL 刺激巨噬细胞源性泡沫细胞中 JNK、p39 的磷酸化具有显著的增强作用。有研究证实 p38 和 JNK 的激活是巨噬细胞产生肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 所必需的,JNK 的激活是诱导 TNF-α 和白细胞介素-6 (IL-6) 所必需的^[7]。p38 通路和 JNK 通路激活后能上调 IL-1β 诱导的环氧合酶 (COX) 表达,使在促进炎症的过程中起重要作用的前列腺素 E₂ (PGE₂) 合成增加。激活的 p38 能促进白细胞的聚集和活化。抑制 p38 活性可减少或阻断多种细胞因子,如 TNF-α、IL-1、IL-6 等的产生。提示磷酸化激活的 JNK、p38 在细胞因子和炎性介质产生中起着重要的调节作用。结合前期研究结果:免疫

炎症反应引发的 AS 形成过程中存在大量细胞因子的整体变化,提示在巨噬细胞泡沫化过程中,JNK、p38 的磷酸化激活后,通过相应转录因子的磷酸化对多种炎性相关因子及炎症介质的调节,可能是免疫炎症反应促进泡沫细胞形成的原因之一。

本实验在检测 JNK 磷酸化的结果中发现,仅检测出相对分子质量为 54 000 的 JNK2,却没有发现相对分子质量为 46 000 的 JNK1。Ricci 等^[8]在 ApoE^{-/-}小鼠 AS 模型中也得出类似的结果,提示在泡沫细胞形成中 JNK2 比 JNK1 的作用更为重要。虽然目前更多的学者关注 JNK1 的特异性抑制剂,但是至少在 AS 等免疫炎症相关性疾病的治疗中,JNK2 的特异性抑制剂更有前途和价值。

本研究观察到,PNS 可以剂量依赖性地抑制巨噬细胞受到炎症刺激后 JNK、p38 的磷酸化水平,并能减少泡沫细胞内脂质沉积的增加。该结果提示,抑制 JNK、p38 的磷酸化可能是 PNS 抗泡沫细胞形成的又一重要机制。本室前期研究发现升高细胞内 cAMP 和降低 $[Ca^{2+}]_i$ 水平,是 PNS 发挥炎症调节效应的重要机制^[4,5]。Xia 等^[9]观察到 cAMP 在 PC12 细胞中可抑制 p38 和 JNK 活性。Schwarzschild 等^[10]发现提高细胞外 Ca^{2+} 水平,可抑制 JNK 通路激活。应用钙离子螯合剂降低细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平能够抑制地鼠 V79 细胞中由 H_2O_2 诱导的 JNK 激酶的激活,提示 PNS 可能通过影响 cAMP 水平、细胞内外 Ca^{2+} 平衡等机制作用于 JNK、p38 的转导通路中上游分子的某一环节从而阻断或部分阻断了其磷酸化的作用。但其具体机制尚需进一步的深入研究。

综上所述,炎症反应是促进 AS 的一个重要原

因,JNK、p38 的磷酸化是其中一个重要环节,PNS 对 JNK、p38 异常激活的抑制作用进而从整体上调控多种细胞因子的表达,可能是其有效防治 AS 的分子机制之一。

References:

- [1] Taubes G. Cardiovascular disease. Does inflammation cut to the heart of the matter? [J]. *Science*, 2002, 296(5566): 242-245.
- [2] Fan J S, Li X H, Li S H, et al. Antibody array analysis of atherosclerosis cytokine levels in rats [J]. *Acta Acad Med Mil Tert* (第三军医大学学报), 2007, 29(3): 210-212.
- [3] Zhou X H, Zhou X X, Yang H M. Advances in study on *Panax notoginseng* total saponin in preventing and treating atherosclerosis [J]. *J Chengde Med Coll* (承德医学院学报), 2003, 20(4): 350-352.
- [4] Li S H, Li X H, Chu Y. Anti-inflammation mechanisms of *Panax notoginseng* total saponins [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(9): 676-678.
- [5] Li S H, Li X H. Experimental study on the effects of *Panax notoginseng* saponin on neutrophil functions in rats with air-vesicle synovitis and its mechanisms [J]. *China Pharm* (中国药房), 2001, 12(11): 648-650.
- [6] Folch J, Less M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. *J Biol Chem*, 1957, 226(1): 497-509.
- [7] Li Y, Schwabe R F, DeVries-Seimon T, et al. Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor- α and interleukin-6: model of NF- κ B and mapkinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(23): 21763-21772.
- [8] Ricci R, Sumara G, Sumara I, et al. Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis [J]. *Science*, 2004, 306(5701): 1558-1561.
- [9] Xia Z G, Dickens M, Raingeaud J, et al. Opposing effects of ERK and JNK-P38MAP kinase on apoptosis [J]. *Science*, 1995, 270(5240): 1326-1331.
- [10] Schwarzschild M A, Cole R L, Meyers M A, et al. Contrasting calcium dependencies of SAPK and ERK activations by glutamate in cultured striatal neurons [J]. *J Neurochem*, 1999, 72(6): 2248-2551.

狼疮 2 号对系统性红斑狼疮模型鼠不同组织细胞雌激素受体 mRNA 表达的影响

张京玲¹, 陈 宏², 朱元元³, 倪春生¹, 戴胜刚¹, 樊 仪²

(1. 南开大学医学院, 天津 300071; 2. 天津市长征医院, 天津 300021; 3. 南开大学化学学院, 天津 300071)

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是人类较常见的一种典型的自身免疫

性疾病。SLE 具有一定的遗传基础, 属于多基因疾病。现在认为 SLE 是由自身免疫系统紊乱、病毒感染、遗

收稿日期: 2006-08-19

基金项目: 天津市自然科学基金项目 (023613211)

作者简介: 张京玲, 女, 副教授, 硕士, 毕业于天津医科大学临床药理专业, 主要从事中药新药的药理研究。

Tel: (022) 23504374 E-mail: zhangjl100@eyou.com

三七皂苷对泡沫细胞形成的影响及其信号机制

作者：[樊继山](#)，[李晓辉](#)，[李淑慧](#)
作者单位：[第三军医大学基础部, 新药研究室, 重庆, 400038](#)
刊名：[中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2007, 38 (6)
被引用次数：2次

参考文献(10条)

1. [Taubes G Cardiovascular disease. Does inflammation cut to the heart of the matter](#) [外文期刊] 2002 (5566)

2. [Fan J S; Li X H; Li S H Antibody array analysis of atherosclerosis cytokine levels in rats](#) [期刊论文] - [第三军医大学学报](#) 2007 (03)

3. [Zhou X H; Zhou X X; Yang H M Advances in study on Panax notoginseng total saponin in preventing and treating atherosclerosis](#) [期刊论文] - [承德医学院学报](#) 2003 (04)

4. [Li S H; Li X H; Chu Y Anti-inflammation mechanisms of Panax notoginseng total saponins](#) [期刊论文] - [中草药](#) 2000 (09)

5. [Li S H; Li X H Experimental study on the effects of Panax notoginseng saponin on neutrophil functions in rats with air vesicle synovitis and its mechanisms](#) [期刊论文] - [中国药房](#) 2001 (11)

6. [Folch J; Less M; Stanley G H S A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues](#) 1957 (01)

7. [Li Y; Schwabe R F; DeVries-Seimon T Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor- \$\alpha\$ and interleukin-6: model of NF \$\kappa\$ B- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis](#) [外文期刊] 2005 (23)

8. [Ricci R; Sumara G; Sumara I Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis](#) [外文期刊] 2004 (5701)

9. [Xia Z G; Dickens M; Raingeaud J Opposing effects of ERK and JNK-P38MAP kinase on apoptosis](#) [外文期刊] 1995 (5240)

10. [Schwarzschild M A; Cole R L; Meyers M A Contrasting calcium dependencies of SAPK and ERK activations by glutamate in cultured striatal neurons](#) [外文期刊] 1999 (06)

引证文献(2条)

1. [黄勇, 郑君渭 中药抗动脉粥样硬化作用机理研究进展](#) [期刊论文] - [浙江中医杂志](#) 2007 (12)

2. [何琼, 谭初兵, 赵晴 血塞通注射液联合常规疗法治疗脑梗死的临床观察](#) [期刊论文] - [现代药物与临床](#) 2011 (3)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200706040.aspx