

香青兰总黄酮对小鼠腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响及其机制

姜雯¹, 彭克军³, 陈强¹, 古丽斯坦·阿吾提², 邢建国^{2*}

1. 新疆医科大学第六附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830000

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004

3. 成都医学院检验医学院, 四川 成都 610083

摘要: **目的** 探讨香青兰 *Dracocephalum moldovica* 总黄酮对小鼠腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响及其可能机制。**方法** 以氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)诱导小鼠腹腔巨噬细胞建立泡沫细胞的模型, 并以不同质量浓度的香青兰总黄酮进行干预。分别采用油红O染色观察泡沫细胞, 荧光分光光度法检测细胞内胆固醇酯的量, 荧光定量PCR法检测细胞内酰基辅酶A-胆固醇酰基转移酶1(ACAT-1)mRNA的表达水平, 流式细胞术检测细胞表面清道夫受体A(SR-A)的表达水平。**结果** 香青兰总黄酮能显著抑制Ox-LDL诱导的泡沫细胞的形成、细胞内胆固醇酯的积聚、细胞中ACAT-1 mRNA及细胞表面SR-A分子的表达水平, 且呈一定的剂量依赖性。**结论** 香青兰总黄酮通过抑制巨噬细胞源性泡沫细胞的形成, 可能是其治疗动脉粥样硬化的药效机制之一。

关键词: 香青兰总黄酮; 泡沫细胞; 胆固醇酯; 清道夫受体A; 酰基辅酶A-胆固醇酰基转移酶1; 动脉粥样硬化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)23-3432-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.014

Effects of total flavonoids from *Dracocephalum moldovica* on formation of mouse peritoneal macrophage-derived foam cells and study on their mechanisms

JIANG Wen¹, PENG Ke-jun³, CHEN Qiang¹, Gulistan-Awuti², XING Jian-guo²

1. The Sixth Clinical Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China

3. Laboratory Medical School, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China

Abstract: **Objective** To study the effects of total flavonoids from *Dracocephalum moldovica* on the formation of mouse peritoneal macrophage-derived foam cells and their possible mechanisms. **Methods** The mouse peritoneal macrophages were induced with oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) to establish foam cell model, and were intervened with different concentration of total flavonoids from *D. moldovica*. The foam cells were observed by oil red O staining and the contents of cholesterol ester in cells were detected by fluorescence spectrophotometric method. The expression levels of acyl-coenzyme A, cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) mRNA in cells and scavenger receptor A (SR-A) on cells were determined using real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and flow cytometry, respectively. **Results** The Ox-LDL-induced formation of foam cells, accumulation of cholesterol ester in cells, and the expression levels of ACAT-1 mRNA in cells and SR-A on cells were significantly inhibited by total flavonoids from *D. moldovica*, which showed a tendency toward a dose-dependent manner. **Conclusion** These data suggest that total flavonoids from *D. moldovica* could inhibit the formation of macrophage-derived foam cells, which is probably one of the underlying mechanisms of the total flavonoids for clinical treatment of atherosclerosis.

Key words: total flavonoids from *Dracocephalum moldovica*; foam cell; cholesterol ester; scavenger receptor A; acyl-coenzyme A, cholesterol acyltransferase-1; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)被认为是一种慢性炎症性疾病, 其中巨噬细胞源性泡沫细胞的形成是As形成和发展的关键环节之一, 主要表

现为粥样斑块内巨噬细胞中含有大量的胆固醇酯积聚^[1]。维吾尔民族药物香青兰 *Dracocephalum moldovica* L. 为唇形科青兰属植物, 在临床上主要

收稿日期: 2014-05-26

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制项目(2012ZX09102201-009)

作者简介: 姜雯(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为新药研究与开发。Tel: 15026018390 E-mail: 523524359@qq.com

*通信作者 邢建国(1968—), 男, 硕士生导师, 研究员。Tel: (0991)2300682 E-mail: xjguodd@163.com

用于治疗冠心病及高血压、心绞痛、As、心肌缺血等疾病^[2]。黄酮类化合物是香青兰的主要化学成分^[3]，现代药理研究表明，香青兰总黄酮具有调血脂、抑制血小板聚集及抑制平滑肌细胞的增生、迁移及黏附分子的表达等抗As作用^[4-5]。本研究通过氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)诱导小鼠腹腔巨噬细胞形成泡沫细胞为实验模型，观察香青兰总黄酮对泡沫细胞形成及细胞内酰基辅酶A-胆固醇酰基转移酶1(ACAT-1)和细胞表面清道夫受体A(SR-A)等分子表达的影响，进一步探讨香青兰总黄酮在治疗As中的可能药效机制。

1 材料

倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)，CO₂培养箱(美国 Thermo 公司)，酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)，iQ5 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)，流式细胞仪(美国 BD 公司)，荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司)。

香青兰总黄酮(总黄酮质量分数为 57%，新疆西部加斯特药业有限公司提供，批号 20100708)。细胞细菌总 RNA 提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品；逆转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Kit 为 Toyobo 公司产品；荧光定量 PCR 试剂盒 Real Master Mix (EVAGreen™) 为 NewBio 公司产品；RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品；牛血清白蛋白、Ox-LDL、油红 O、胆固醇氧化酶、胆固醇酯酶、辣根过氧化物酶均为 Sigma 公司产品，兔抗鼠 SR-A 单克隆抗体为 Epitomics 公司产品，FITC 标记山羊抗兔 IgG 二抗为武汉博士德生物工程有限公司产品。

SPF 级 BALB/c 小鼠，体质量为 18~22 g，由成都达硕生物科技有限公司提供，许可证号 SCXK(川)2008-24。

2 方法

2.1 小鼠腹腔巨噬细胞的分离及分组

小鼠 ip 8% 硫乙醇酸盐液 1 mL，1 次/d，连续 3 d。第 4 天颈椎脱臼法处死小鼠，75% 乙醇浸泡 10 min，剪开腹部皮肤，暴露出腹膜。将 5 mL PBS 注入腹腔中，用手揉压腹膜两侧 15 min，抽吸出腹腔液体注入离心管中。重复以上操作 1 次，合并 2 次液体，4 ℃、1 000 r/min 离心 10 min。去上清，加入 10 mL 含 10% 胎牛血清的无酚红 RPMI 1640 培养液，混匀后计数细胞，调整为 2×10^6 /mL。接种到 6 孔培养板中，每孔 2 mL，置 5% CO₂、37 ℃ 孵箱

培养 2 h 后去上清液，用 PBS 洗去未贴壁细胞，继续培养 3 d 后随机分组：对照组(未加任何干预因素)、Ox-LDL 组(50 μg/mL)、Ox-LDL(50 μg/mL) + 香青兰总黄酮组(高、中、低剂量分别为 100、50、25 μg/mL)，各组的最终体积均为 2 mL，分组后细胞继续培养 48 h 后进行以下检测。

2.2 油红 O 染色

培养的巨噬细胞用 PBS 冲洗 3 次，每次 5 min，2.5% 戊二醛固定 3 h，2.5% 重铬酸钾处理 16 h，新鲜配制的 1% 油红 O 染色 20 min，苏木素染 2 min，1% HCl 分色及返蓝，各步骤间均用双蒸水冲洗干净。显微镜下观察，细胞内脂质呈红色、细胞核呈蓝色的为泡沫细胞。400 倍光镜下非重复计数 100 个细胞，计算泡沫细胞所占的百分比。

2.3 细胞内胆固醇酯的测定

收集各组细胞，PBS 洗涤 3 次，重悬于 0.5 mL 磷酸钠缓冲液(pH 7.4, 0.1 mol/L)中，超声波裂解细胞 1 min，取 0.1 mL 细胞样品加入到 0.9 mL 胆固醇检测反应液(0.1 U/mL 胆固醇氧化酶、1 U/mL 过氧化物酶、0.01 U/mL 胆固醇酯酶、0.05% Triton X-100、1 mmol/L 胆酸钠、0.6 mg/mL 对羟基苯乙酸，配制于 pH 7.4、0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液中)，37 ℃ 孵育 1 h 后，于荧光分光光度计检测其荧光强度，设定激发波长为 325 nm，发射波长为 415 nm^[9]。以标准胆固醇溶液制作标准曲线，计算出各组细胞中胆固醇浓度。以考马斯亮蓝 G-250 法测定各组细胞样品中蛋白质的量，细胞内总胆固醇的量用每毫克蛋白所含胆固醇的量表示(μg/mg)。反应液中省去胆固醇酯酶用以检测游离胆固醇，细胞内胆固醇酯的量用总胆固醇与游离胆固醇的差值获得。

2.4 RT-PCR 法检测 ACAT-1 mRNA 表达

收集各组细胞，按照试剂盒说明操作方法提取总 RNA，并进行逆转录反应。参照 GenBank 中小鼠 ACAT-1 mRNA 的序列设计引物，上游 5'-TGCACGACTGGCTCTACTAC-3'，下游 5'-CCG-GGTAGAAGTAAGTCAGG-3'。针对目的基因和内参 β-actin，选择一确定表达该基因的 cDNA 模板进行 PCR 反应，并将 PCR 产物梯度稀释作为标准品，与适当浓度的待测样品 cDNA 2 μL，加入上下游引物各 0.4 μL (10 μmol/L)，EVAGreen™ 10 μL，无菌双蒸水补齐至 20 μL，于 BIO-RAD IQ5 荧光实时定量 PCR 仪中进行反应。在每个循环结束前系统会自动检测荧光产物的量。为建立 PCR 产物的熔解曲

线, 扩增反应结束后继续从 72 ℃ 缓慢加热到 94 ℃, 溶解曲线峰值单一性判断扩增特异性。将不同浓度标准品的模板量的对数和相应的 C_t 值绘制标准曲线, 根据标准曲线计算待测样品的拷贝数。以目的基因拷贝数与 β -actin 基因拷贝数比值计算目的基因 mRNA 相对表达量。

2.5 细胞表面 SR-A 表达水平的检测

收集各组细胞, 分别加入兔抗鼠 SR-A 一抗, 再加入 FITC 标记的二抗, 采用流式细胞术检测细胞表面 SR-A 的表达水平。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件处理, 所有实验数

据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量均数间的比较采用 t 检验, 比值均数间的比较采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 对小鼠腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响

油红 O 染色显示, 对照组细胞几乎未被油红 O 染上红色, Ox-LDL 组大量细胞胞浆被染成红色, 形成典型的泡沫细胞。而香青兰总黄酮对 Ox-LDL 诱导的泡沫细胞形成具有明显的抑制作用, 见图 1。其中, 高、中剂量组的抑制作用较为显著 ($P < 0.05$ 、 0.01), 低剂量组的抑制作用无显著意义 ($P > 0.05$), 总体上呈一定的剂量依赖性, 见表 1。

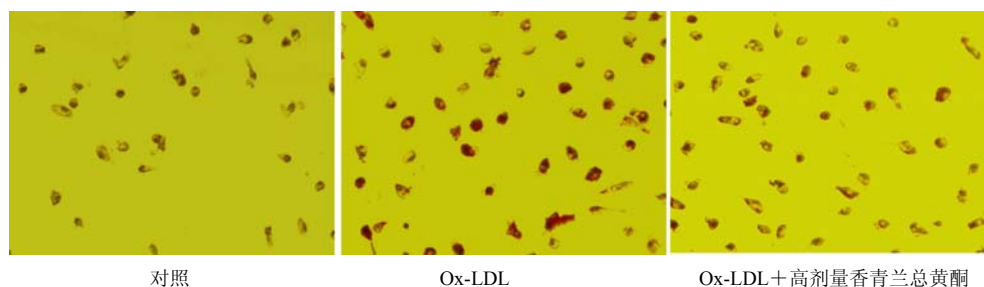


图 1 小鼠腹腔巨噬细胞油红 O 染色结果

Fig. 1 Oil red O staining pictures of peritoneal macrophages of mice

表 1 香青兰总黄酮对巨噬细胞形成泡沫细胞的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effects of total flavonoids from *D. moldovica* on macrophage foam cell formation ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	泡沫细胞 / %
对照	—	$3.52 \pm 0.85^{**}$
Ox-LDL	—	86.30 ± 11.30
Ox-LDL+香青兰总黄酮	100	$53.50 \pm 8.26^{**}$
	50	$71.50 \pm 7.87^*$
	25	83.90 ± 9.54

与 Ox-LDL 组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$, 下同

$^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs Ox-LDL group, same as below

3.2 对巨噬细胞内胆固醇酯的影响

如表 2 所示, 培养基中添加 Ox-LDL 后, 巨噬细胞能大量吞噬 Ox-LDL, 细胞内胆固醇酯显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而各质量浓度的香青兰总黄酮能不同程度地抑制巨噬细胞内胆固醇酯的量。其中, 高剂量组和中剂量组抑制作用较为显著 ($P < 0.05$ 、 0.01), 低剂量组的抑制作用无显著意义 ($P > 0.05$), 总体上呈一定的剂量依赖性。

3.3 对巨噬细胞 ACAT-1 mRNA 表达水平的影响

与对照组比较, 巨噬细胞在摄取 Ox-LDL 的过程中, 其 ACAT-1 mRNA 的表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 而不同剂量的香青兰总黄酮均能不同程度地

表 2 香青兰总黄酮对巨噬细胞内胆固醇酯、ACAT-1 mRNA、表面 SR-A 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effects of total flavonoids from *D. moldovica* on content of cholesterol ester and expression level of ACAT-1 mRNA in cells and expression level of SR-A on cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	胆固醇酯 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	ACAT-1 mRNA	SR-A (平均荧光强度)
对照	—	$4.37 \pm 0.64^{**}$	$0.25 \pm 0.03^{**}$	$5.39 \pm 1.34^{**}$
Ox-LDL	—	68.30 ± 11.50	0.76 ± 0.14	28.50 ± 7.07
Ox-LDL+香青兰总黄酮	100	$48.50 \pm 9.47^{**}$	$0.48 \pm 0.15^{**}$	$16.60 \pm 6.12^{**}$
	50	$55.60 \pm 8.26^*$	$0.61 \pm 0.12^*$	$18.90 \pm 6.08^*$
	25	64.80 ± 8.12	$0.64 \pm 0.09^*$	21.50 ± 7.12

抑制 ACAT-1 mRNA 的表达 ($P<0.05$ 、 0.01)，总体上呈一定的剂量依赖性，见表 2。

3.4 对巨噬细胞表面 SR-A 表达的影响

培养基中添加 Ox-LDL 后，巨噬细胞表面 SR-A 的表达水平显著高于对照组 ($P<0.01$)，而香青兰总黄酮能不同程度地抑制细胞表面 SR-A 的表达。其中高剂量组和中剂量组总黄酮的抑制作用较为显著 ($P<0.05$ 、 0.01)，低剂量组的抑制作用无显著意义 ($P>0.05$)，总体上呈一定的剂量依赖性，见表 2。

4 讨论

氧化损伤学说是 As 发病机制的一个重要学说，该学说认为机体产生的活性氧分子可引起脂质的氧化损伤。氧化修饰后的低密度脂蛋白 (Ox-LDL) 可被单核细胞来源的巨噬细胞通过其细胞表面的清道夫受体摄取，这种内吞作用引起胞内脂质过氧化产物的生成，并且促使细胞内胆固醇酯的积聚，最终导致了泡沫细胞的形成^[6]。泡沫细胞在动脉管壁内的聚积可引起脂质条纹病变的发生，是 As 早期阶段关键环节之一。

香青兰作为新疆地区传统治疗心血管疾病的天然药物，对其药理作用机制的认识仍然不足。本实验通过 Ox-LDL 诱导建立小鼠腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞模型，结果显示，香青兰总黄酮可有效抑制 Ox-LDL 诱导巨噬细胞内胆固醇酯的积聚，并且显著减弱了巨噬细胞源性泡沫细胞的形成，因此香青兰总黄酮可能通过抑制泡沫细胞的形成来发挥其抗 As 作用。

清道夫受体是一类主要位于巨噬细胞表面的糖蛋白^[7]，其中与 As 关系密切的有 SR-A，SR-A 是介导巨噬细胞摄取 Ox-LDL 的主要途径^[8]。与 LDL 受体不同，由 SR-A 介导的巨噬细胞对 Ox-LDL 的内吞，不受细胞内胆固醇水平的负反馈调节，使得胞内脂质无限制积聚，造成胞内胆固醇酯的堆积，最终形成泡沫细胞。本实验结果显示，Ox-LDL 在诱导小鼠腹腔巨噬细胞形成泡沫细胞过程中，细胞表面 SR-A 的表达水平显著提高，香青兰总黄酮可显著抑制 Ox-LDL 的这种作用。因此香青兰总黄酮可能通过抑制 SR-A 的表达从而减少巨噬细胞对 Ox-LDL 的摄取，进而抑制泡沫细胞的形成。

ACAT-1 是细胞内催化胆固醇与长链脂肪酸酯化形成胆固醇酯的酶，研究表明 ACAT-1 参与了巨

噬细胞内胆固醇酯的积聚和泡沫细胞的形成过程，与 As 斑块的生成密切相关^[9]。本实验显示，Ox-LDL 在诱导小鼠腹腔巨噬细胞形成泡沫细胞过程中，ACAT-1 的 mRNA 表达水平显著增高，香青兰总黄酮可显著抑制 ACAT-1 的转录水平。因此推测香青兰总黄酮可能通过抑制 ACAT-1 的表达而减少巨噬细胞内胆固醇酯的积聚。

本研究显示，维吾尔民族药物香青兰总黄酮能够显著抑制小鼠腹腔巨噬细胞对 Ox-LDL 的摄取，进而抑制泡沫细胞的形成。其机制可能通过抑制细胞表面 SR-A 分子以及细胞中 ACAT-1 mRNA 的表达水平有关。本研究为探讨香青兰总黄酮临床治疗 As 的药效机制提供了实验依据。

参考文献

- [1] Imanishi T, Akasaka T. Novel strategies to target inflammatory processes in atherosclerosis [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(9): 1616-1625.
- [2] 戴晓庆, 汪 豪, 叶文才, 等. 维药香青兰叶的化学成分研究 [J]. *药学与临床研究*, 2010, 18(3): 267-268.
- [3] 姜 雯, 何承辉, 邢建国. 香青兰总黄酮微丸制备工艺及释药机制研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(21): 3004-3010.
- [4] 张 丽, 贺金华, 王新堂. 香青兰中总黄酮的纯化与含量测定 [J]. *新疆中医药*, 2009, 27(2): 67-69.
- [5] Xing J, Peng K J, Cao W J, *et al.* Effects of total flavonoids from *Dracocephalum moldavica* on the proliferation, migration, and adhesion molecule expression of rat vascular smooth muscle cells induced by TNF- α [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(1): 74-83.
- [6] Peluso I, Morabito G, Urban L, *et al.* Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2012, 12(4): 351-360.
- [7] Ashraf M Z, Gupta N. Scavenger receptors: Implications in atherothrombotic disorders [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(5): 697-700.
- [8] Raizman J E, Chen Y X, Seibert T, *et al.* Heat shock protein-27 attenuates foam cell formation and atherogenesis by down-regulating scavenger receptor-A expression via NF-kappa B signaling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(12): 1721-1728.
- [9] Sekiya M, Osuga J I, Igarashi M, *et al.* The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophage foam cells [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2011, 18(5): 359-364.