

李藤藤, 徐东升, 李琪, 等. 淫羊藿苷对 ox-LDL 诱导的 RAW264. 7 细胞凋亡及炎症的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (3): 9-15.

Li TT, Xu DS, Li Q, et al. Effect of icariin the apoptosis and inflammation of RAW264. 7 cells induced by ox-LDL [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 9-15.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 03. 002

淫羊藿苷对 ox-LDL 诱导的 RAW264. 7 细胞凋亡及炎症的影响

李藤藤¹, 徐东升², 李琪¹, 吴迪¹, 张洋¹, 任立群^{1*}, 李相军^{1*}

(1. 吉林大学药学院实验药理与毒理学教研室, 长春 130021; 2. 吉林大学第一医院肿瘤科, 长春 130000)

【摘要】 目的 研究淫羊藿苷(ICA)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264. 7)凋亡及炎症的影响,进一步阐明 ICA 抗动脉粥样硬化(AS)的作用。**方法** 体外培养 RAW264. 7 细胞,ox-LDL 诱导 RAW264. 7 细胞构建泡沫细胞模型,观察 ICA 低、中、高剂量对 RAW264. 7 细胞活力、细胞凋亡、泡沫化、炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 分泌的影响,同时采用 Western blot 检测 ICA 对 Bcl-2、Bax、Caspase-3、I κ B α 、NF- κ B p65 蛋白表达的影响。**结果** ICA 可以提高细胞活力,降低细胞的凋亡率;减少泡沫巨噬细胞的形成;降低炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌;下调 Bcl-2、Caspase-3、NF- κ B p65 蛋白表达,上调 Bax、I κ B α 的蛋白表达。**结论** ICA 能够减轻泡沫巨噬细胞的凋亡,抑制炎症因子的表达,从而可能延缓动脉粥样硬化的发展进程。

【关键词】 淫羊藿苷;动脉粥样硬化;巨噬细胞;凋亡;炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0009-07

Effect of icariin the apoptosis and inflammation of RAW264. 7 cells induced by ox-LDL

LI Tengting¹, XU Dongsheng², LI Qi¹, WU Di¹, ZHANG Yang¹, REN Liqun^{1*}, LI Xiangjun^{1*}

(1. Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China.

2. Department of Oncology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130000)

【Abstract】 Objective To study the effect of icariin (ICA) on apoptosis and inflammation of leukemic mouse macrophages (RAW264. 7) induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL), and to clarify the anti-arterial effect of ICA and the role of atherosclerosis (AS). **Methods** RAW264. 7 cells were treated with ox-LDL to induce foam cell models. The effects of low, medium, and high doses of ICA on RAW264. 7 cell viability, apoptosis, foaming and secretion of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α were investigated. Western blot was used to assess the effect of ICA on protein expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, I κ B α and NF- κ B p65. **Results** ICA improved cell viability and reduced apoptosis, the formation of foamy macrophages, secretion of inflammatory factors IL-1 β , IL-6, TNF- α , Bcl-2, Caspase-3 and NF- κ B p65 protein expression, and up-regulated protein expression of Bax and I κ B α . **Conclusions** ICA reduces apoptosis of foamy macrophages and inhibits the expression of inflammatory factors, thereby delaying the development of atherosclerosis.

【Keywords】 icariin; macrophages; atherosclerosis; apoptosis; inflammation

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81773934)。

【作者简介】 李藤藤(1995—),女,硕士研究生,研究方向:心血管药理学方向。E-mail: 17865650090@163.com

【通信作者】 任立群(1963—),女,教授,研究方向:心血管与肿瘤药理学。E-mail: renlq@jlu.edu.cn

李相军(1974—),男,副教授,研究方向:心血管药理学。E-mail: lxj@jlu.edu.cn

* 共同通信作者

随着生活条件的改善和饮食结构的变化,我国心血管疾病的发生率和死亡率迅速增长,据推算,我国现患心血管病人数 2.9 亿,其死亡高于肿瘤和其他疾病,占居民疾病死亡的 40% 以上,居于首位^[1]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种心血管疾病,是由内源性促炎和抗炎失衡所引起的炎症反应^[2-3],涉及脂质沉积、内皮损伤、泡沫细胞堆积和不稳定斑块的破裂等病理过程^[4],不稳定斑块容易发生破裂并促进血栓形成。巨噬细胞是斑块中最重要的免疫细胞,其数量和功能对斑块的大小和稳定性有直接的影响,并通过分泌多种炎症因子,进一步介导免疫细胞浸润不稳定斑块,引发斑块内细胞的凋亡和坏死,进而加速不稳定斑块的破裂^[5-7]。因此,抑制巨噬细胞凋亡及减少促炎因子的分泌对延缓 AS 进展有重要意义。

淫羊藿苷(icariin, ICA)是从传统补益中药淫羊藿中提取的一种黄酮类化合物,是淫羊藿最为代表性的成分^[8],具有抗骨质疏松、抗炎、抗肿瘤和免疫调节等药理作用^[9]。目前,本课题组已发现,ICA 通过阻断 p38 MAPK 和 ERK1/2 信号通路抑制 VSMC 增殖^[10]。本研究旨在通过体外构建泡沫巨噬细胞模型,探讨 ICA 对泡沫巨噬细胞凋亡以及炎症因子分泌的影响,为抗 AS 治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 细胞

RAW264.7 细胞株(吉林大学生命科学学院实验室赠送,由吉林大学药学院实验药理与毒理学教研室冻存)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养液(Hyclone 公司,美国);胎牛血清(四季青,浙江天杭生物科技股份有限公司);青霉素-链霉素双抗溶液(美国 Gibco 公司);淫羊藿苷(四川维克奇生物技术有限公司,纯度 98.0%);氧化低密度脂蛋白(ox-LDL,广州奕源生物技术有限公司);CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Hoechst33258 染色试剂盒(南京凯基科技有限公司);油红 O(北京索莱宝科技有限公司);总蛋白提取试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司);IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ELISA 试剂盒(上海酶联)。TGL-16M 台式高速冷冻离心机(长沙湘智离心机有限公司);Nikon ECLIPSE 80i 正置显微镜(尼康仪器(上海)有限公司);美国伯乐 Bio-Rad 垂直电泳转印系

统(上海巴玖实业有限公司);MD 全波长光吸收酶标仪 SpectraMax 190(美谷分子仪器(上海)有限公司);4200 全自动化学发光成像分析系统(上海天能);倒置荧光显微镜和生物显微镜(Nikon 仪器(上海)有限公司);CO₂ 恒温培养箱(美国 BD 公司);JJ260 型精密电子天平。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养和实验分组

RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,第 2 天换液继续培养。当细胞生长密度至 70%~80% 时进行传代培养,2~4 代细胞用于实验。将培养的 RAW264.7 细胞分为空白组(CON 组)、模型组(MOD 组,50 μ g/mL ox-LDL)、ICA 低、中、高剂量组(ICA 10、20、40 μ mol/L 组 + 50 μ g/mL ox-LDL)。低、中、高浓度的 ICA 预处理 RAW264.7 细胞 30 min 后,模型组和 ICA 低、中、高剂量组中加入 50 μ g/mL 的 ox-LDL 培养 24 h,空白组不作处理,加入等量的培养液代替。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞活力

使用无血清的 DMEM 培养液制备浓度分别为 10、20、40 μ mol/L 的 ICA 工作液。按照每孔每毫升 1.5×10^4 个细胞数将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种到 96 孔板中,每孔 100 μ L,按照 1.3.1 培养条件及实验分组处理,每组设置 6 个复孔。培养 24 h 后,向各孔中加入 10 μ L CCK-8,37℃ 孵育 4 h 后,吸去各孔中的培养液,37℃ 摇床 5 min,酶标仪 490 nm 波长处检测各孔的吸光度,细胞活力 = 实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$

1.3.3 Hoechst 33258 检测细胞凋亡率

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞按照每孔每毫升 2.0×10^5 个细胞数接种于放有盖玻片 6 孔板中,按照 1.3.1 培养条件及实验分组处理 24 h 后,弃培养液,用预冷的 PBS 洗 1 遍,加入 500 μ L 4% 的多聚甲醛固定液进行固定,时间 10~15 min,弃掉固定液并用预冷的 PBS 洗 2 遍,加入 500 μ L Hoechst33258 染色液,摇床摇动 5 min 后,弃掉染色液,PBS 洗 2 遍,调整显微镜的荧光波长,于镜下仔细观察并拍照,圆形是正常细胞核的着色形态,呈现淡蓝色;凋亡细胞则是致密浓染,呈现亮蓝色。

1.3.4 油红 O 染色

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞按照每孔每毫升 2.0×10^5 个细胞数接种于放有盖玻片的 6

孔板中,按照 1.3.1 培养条件及实验分组处理 24 h 后,弃掉培养液,PBS 洗 2 遍,加 4%多聚甲醛,固定 30 min,弃掉多聚甲醛,PBS 洗两遍,加入 2 mL 油红 O 染液,37℃ 孵育 30 min,镜下观察,弃掉油红 O 染液,苏木素复染 2~3 min,水洗,甘油明胶封片,镜下观察拍照。

1.3.5 酶联免疫吸附实验(ELISA)

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞按照每孔每毫升 2.0×10^5 个细胞数接种于 6 孔板中,按照 1.3.1 培养条件及实验分组处理 24 h 后,收集各孔中的培养液并于 -80℃ 保存,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作,测定 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 释放的影响。

1.3.6 免疫印迹实验(Western blot)

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞按照每孔每毫升 2.0×10^5 个细胞数接种于 6 孔板中,按照 1.3.1 培养条件及实验分组处理 24 h 后,弃掉培养皿中的培养液,PBS 洗 2 遍,然后收集细胞。提取各组细胞总蛋白时按照提取试剂盒的说明书,采用 BCA 定量法,然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,通过湿法转膜到 PVDF 膜上,用脱脂奶粉封闭 2 h,加入相应的一抗抗体,4℃ 冰箱中孵育过夜。第 2 天用 TBST 洗膜 4 次,每次 5 min 加入稀释后的二抗,室温摇床孵育 2 h,TBST 洗膜 4 次,每次 5 min,按照高灵敏度化学发光检测试剂盒说明书滴加发光工作液显色后,内参以 GAPDH 作为参照,采用 Image proplus 6.0 软件进行灰度分析。Western blot 实验过程中涉及的抗体及稀释浓度见表 1。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。

1.4 统计学方法

统计学采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析。计量资料经正态分布和方差齐性检验,实验结果以平

均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示,多组平均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响

给药处理 24 h 后,经 CCK-8 法检测,与 CON 组比较,MOD 组细胞活力明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与 MOD 组比较,ICA 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 可以显著提高细胞活力,具有统计学意义($P<0.05$),ICA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞活力增加,但差异无统计学意义(表 2)。

2.2 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞凋亡的影响

给药处理 24 h 后,经 Hoechst33258 染色观察,未经药物处理的 CON 组细胞生长状态良好,细胞核形态均一,整体细胞呈现均匀的蓝色荧光;与 CON 组比较,MOD 组细胞核变形皱缩且发出明显的蓝色荧光,即细胞染色质密集皱缩,出现高亮的凋亡小体,典型凋亡细胞核数目明显增多,具有统计学意义($P<0.05$);与 MOD 组比较,ICA 低、中、高剂量组亮蓝色荧光渐弱,高亮的凋亡小体数目逐渐减少,凋亡细胞核数逐渐减少,具有统计学意义($P<0.05$)(表 3,图 1)。

2.3 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞油红 O 染色观察

药物处理 24 h 后,经油红 O 染色观察,与 CON 组比较,MOD 组细胞体积增大且均有油红 O 染色阳性细胞遍布,细胞内脂滴形成,具有统计学意义($P<0.05$);与 MOD 组比较,ICA 中、高剂量组油红 O 染色阳性细胞逐渐减少,细胞内脂滴变小且减少,具有统计学意义($P<0.05$),ICA 低剂量组油红 O 染色阳性细胞减少,但差异无统计学意义(图 2)。

表 1 Western blot 法检测中使用的抗体和稀释浓度比例
Table 1 Antibodies used in Western blot method detection and dilutions

抗体 Antibody		稀释 Dilutions	种属 Source	公司 Company
一抗 Primary antibodies	Bcl-2	1:800	兔 Rabbit	ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
	Bax	1:800	兔 Rabbit	ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
	Caspase-3	1:800	兔 Rabbit	ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
	IκBα	1:1000	兔 Rabbit	ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
	NF-κB p65	1:800	兔 Rabbit	ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
	GAPDH	1:2000	兔 Rabbit	ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
二抗 Secondary antibody	HRPGoat Anti-Rabbit IgG	1:5000	山羊 Goat	ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)

表 2 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264. 7 细胞活力的影响
Table 2 Effect of ICA on the viability of RAW264. 7 cells induced by ox-LDL

组别 Groups	细胞相对活力 (%) Relative cell viability
正常组 CON	100. 00±0. 00
模型组 MOD	60. 00±0. 69 *
淫羊藿苷 10 μmol/L	62. 10±0. 39
淫羊藿苷 ICA 20 μmol/L	67. 88±1. 49 [#]
淫羊藿苷 ICA 40 μmol/L	80. 63±1. 00 [#]

注:与 CON 组相比, **P*<0. 05;与 MOD 组相比, [#]*P*<0. 05。
Note. Compared with the CON group, * *P* < 0. 05. Compared with the MOD group, [#] *P* < 0. 05.

表 3 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264. 7 细胞凋亡的影响
Table 3 Effect of ICA on RAW264. 7 cell apoptosis induced by ox-LDL

组别 Groups	细胞凋亡数 Apoptosis number
正常组 CON	6±0. 82
模型组 MOD	17±0. 82 *
淫羊藿苷 ICA 10 μmol/L	11±1. 62 [#]
淫羊藿苷 ICA 20 μmol/L	9±0. 82 [#]
淫羊藿苷 ICA 40 μmol/L	6±0. 82 [#]

注:与 CON 组相比, **P*<0. 05;与 MOD 组相比, [#]*P*<0. 05。
Note. Compared with the CON group, * *P* < 0. 05. Compared with the MOD group, [#] *P* < 0. 05.

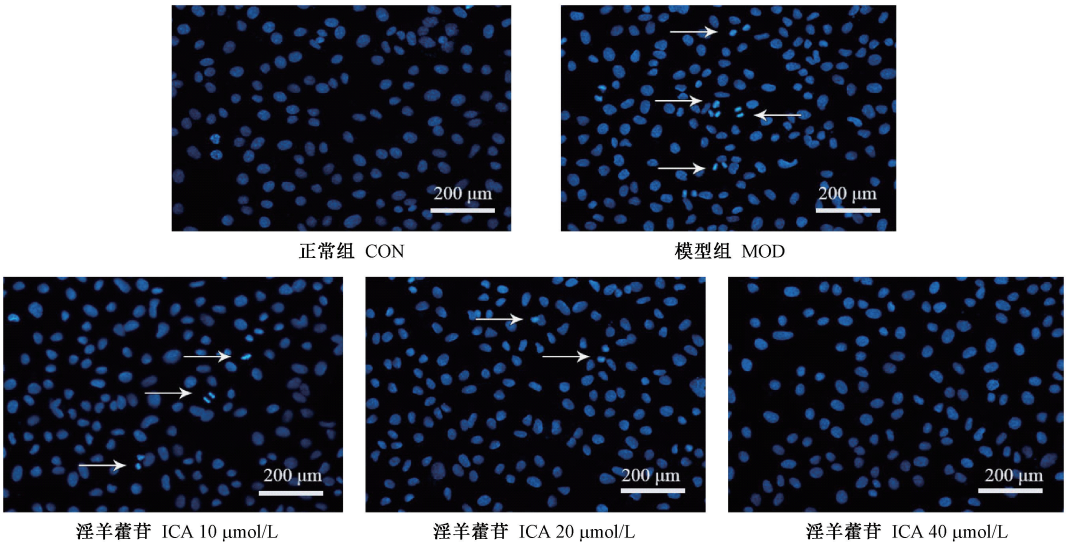
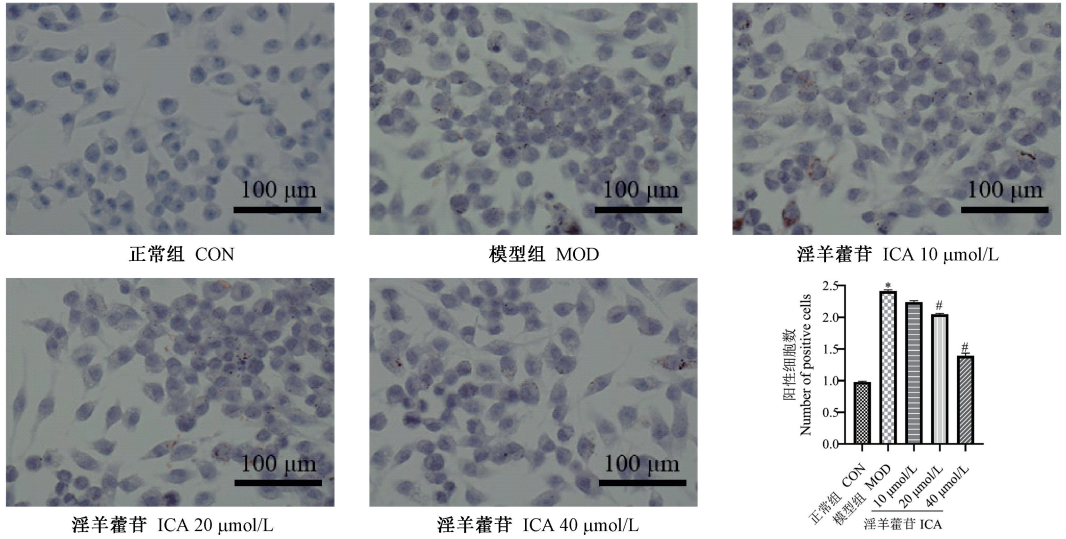


图 1 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264. 7 细胞凋亡的影响
Figure 1 Effect of ICA on RAW264. 7 cell apoptosis induced by ox-LDL



注:与 CON 组相比, **P*<0. 05;与 MOD 组相比, [#]*P*<0. 05。
图 2 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264. 7 细胞泡沫化影响
Note. Compared with the CON group, * *P* < 0. 05. Compared with the MOD group, [#] *P* < 0. 05.

Figure 2 Effect of ICA on the foaming of RAW264. 7 cells induced by ox-LDL

2.4 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子释放的影响

药物处理 24 h 后,收集细胞培养上清,经 ELISA 测定,与 CON 组比较,MOD 组细胞分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 因子均显著增加,具有统计学意义 ($P<0.05$);与 MOD 组比较,ICA 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 处理时可以降低 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 因子的分泌,具有统计学意义 ($P<0.05$),且呈剂量依赖性(表 4)。

2.5 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、I κ B α 和 NF- κ B p65 蛋白表达的影响

ICA 浓度为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 30 min,

ox-LDL 诱导 24 h 后,提取细胞蛋白,经 Western blot 检测,与 CON 组比较,MOD 组细胞 Bax、Caspase-3 和 NF- κ B p65 蛋白表达均显著增加,Bcl-2 和 I κ B α 蛋白表达显著下降,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);与 MOD 组比较,ICA 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 处理时可以降低 Bax、Caspase-3 和 NF- κ B p65 蛋白的表达,提高 Bcl-2 和 I κ B α 蛋白表达,具有统计学意义 ($P<0.05$),且呈剂量依赖性(图 3)。

3 讨论

AS 是一种累及动脉血管壁的慢性炎症疾病,随着生活水平和生活方式的改变,AS 呈现逐年上升趋势

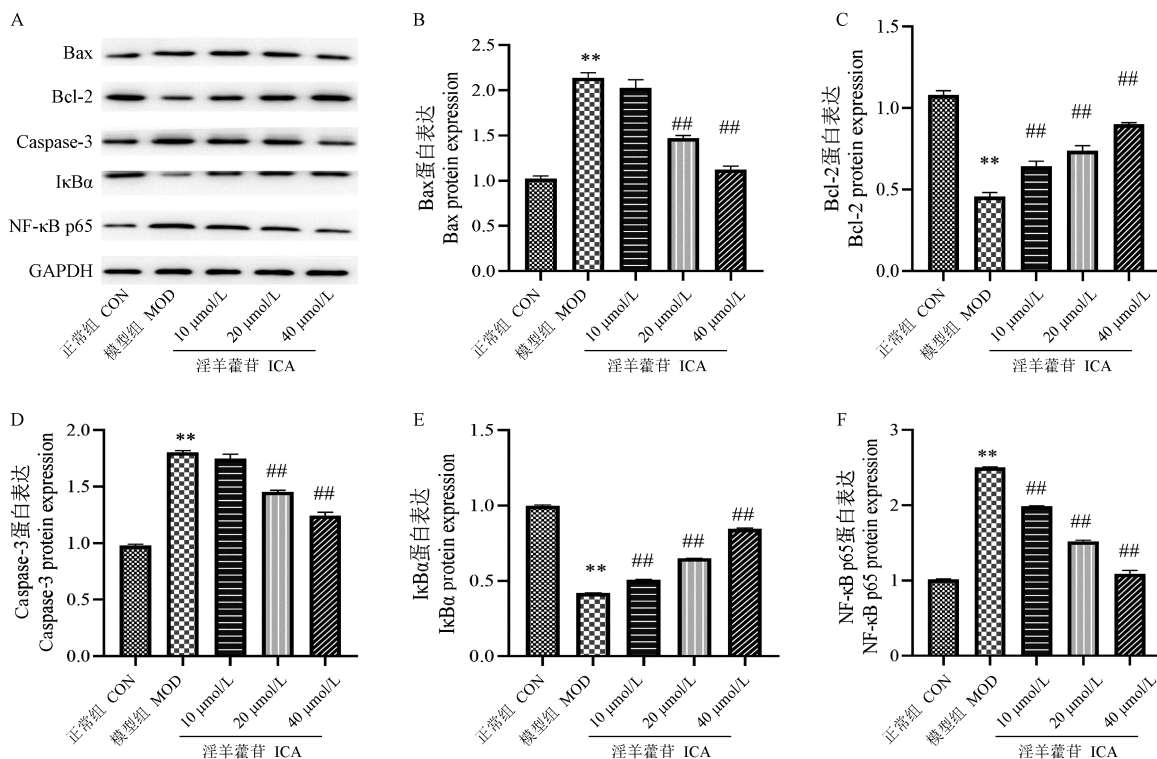
表 4 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子释放的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of ICA on the secretion of inflammatory factors in RAW264.7 cells induced by ox-LDL

组别 Groups	白介素 1 β (pg/mL) IL-1 β	白介素 6 (pg/mL) IL-6	肿瘤坏死因子 α (pg/mL) TNF- α
正常组 CON	127.30 $\pm$ 0.82	92.42 $\pm$ 1.14	430.04 $\pm$ 1.67
模型组 MOD	202.19 $\pm$ 1.20*	149.65 $\pm$ 1.17*	821.31 $\pm$ 2.33*
淫羊藿苷 ICA 10 $\mu\text{mol/L}$	188.94 $\pm$ 1.20 [#]	127.36 $\pm$ 1.60 [#]	680.07 $\pm$ 1.64 [#]
淫羊藿苷 ICA 20 $\mu\text{mol/L}$	164.20 $\pm$ 0.90 [#]	100.65 $\pm$ 0.88 [#]	627.75 $\pm$ 1.93 [#]
淫羊藿苷 ICA 40 $\mu\text{mol/L}$	133.27 $\pm$ 1.40 [#]	95.74 $\pm$ 0.74 [#]	508.18 $\pm$ 2.45 [#]

注:与 CON 组相比,* $P<0.05$;与 MOD 组相比,[#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the CON group,* $P<0.05$. Compared with the MOD group,[#] $P<0.05$.



注:与 CON 组相比,** $P<0.01$;与 MOD 组相比,## $P<0.01$ 。

图 3 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、I κ B α 和 NF- κ B p65 蛋白表达的影响

Note. Compared with the CON group,** $P<0.01$. Compared with the MOD group,## $P<0.01$.

Figure 3 Effect of ICA on the expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, I κ B α and NF- κ B p65 protein in RAW264.7 cells induced by ox-LDL

势,其发生发展与很多疾病紧密相关,比如肥胖病、高血压、糖尿病及高胆固醇血症等^[11]。目前他汀类药物是预防和治疗动脉粥样硬化的常用药物,但是他汀类药物可能会出现肌痛、肌炎和横纹肌溶解等肌肉病症,严重情况下还可能引起急性肾衰竭和肝功能受损^[12]。

淫羊藿来源于小檗科多年生草本植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿或朝鲜淫羊藿的干燥叶,其性温而味辛、甘,归肝、肾经,中医临床多用于肾阳虚衰,阳痿遗精,筋骨痿软,风湿痹痛,麻木拘挛等症。淫羊藿具有悠久的药用历史,开始记载在《神农本草经》中。现代的实验研究发现,淫羊藿中含有多种化学成分,其中以黄酮类为主要化学成分,还包括酚苷类、多糖类、生物碱类等其他多种化学成分,淫羊藿具有多种药理作用,比如抗炎、抗肿瘤、抗衰老和抗骨质疏松等^[13]。淫羊藿苷(ICA)是淫羊藿的主要活性成分之一,分子式为 $C_{33}H_{40}O_{15}$,分子量为 676.65^[14],是一种黄酮类的化合物。既往研究多集中于淫羊藿苷抗骨质疏松、抗炎、抗肿瘤和免疫调节等药理作用方面,最近几年来,越来越多的研究者们开始将研究目标转移到 ICA 对心血管系统的作用上,在 ICA 抗 AS、抗高血压、抗心肌缺血等很多方面均取得了一些崭新的科研成果。本课题组对 ICA 具有较为系统和深刻的药理学研究,目前成果主要集中在药物安全性评价;对 ApoE^{-/-}小鼠的抗 AS 作用及治疗价值研究^[15];对体外培养的平滑肌细胞药理作用及机制研究^[16]。基于此,本研究以巨噬细胞为切入点,明确 ICA 对巨噬细胞凋亡及炎症因子的影响,从而揭示 ICA 抗动脉粥样硬化的作用。

巨噬细胞在 AS 的形成、发生以及发展中发挥至关重要的作用,参与着全过程^[17]。巨噬细胞凋亡在 AS 病变早期可以抑制 AS 的发生进程,但是在病变晚期,巨噬细胞降解细胞内脂质的能力下降,巨噬细胞凋亡则导致不稳定斑块的破裂,从而加速 AS 的发生进程^[18]。单核细胞迁移至内皮下分化形成巨噬细胞,巨噬细胞吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞,泡沫细胞的形成是 AS 发展过程中的一个典型事件^[19]。用 ox-LDL 刺激巨噬细胞分化成泡沫细胞是研究 AS 的经典模型,本研究在此模型上研究 ICA 的体外抗动脉粥样硬化作用及其机制。结果表明,加入不同浓度的 ICA 处理 24 h 后,经 ox-LDL 诱导的巨噬细胞细胞活力增加,凋亡细胞数减少;细胞

泡沫化减少;IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 炎症因子分泌减少,表明 ICA 具有减少巨噬细胞凋亡并抑制 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 炎症因子分泌的作用,提示 ICA 具有抗 AS 的药理作用。

在病理状态下,细胞内源性凋亡通路会在巨噬细胞吞噬 ox-LDL 的过程中被激活^[20]。Bcl-2 是定位在线粒体膜上的一种蛋白,与 Bax 蛋白共同形成异源二聚体,从而来控制线粒体膜的通透性,防止细胞色素 C 的流出而激活下游 Caspase-3 凋亡蛋白引发内源性凋亡^[21-22]。当泡沫细胞出现生存障碍时,泡沫细胞会发生破裂,从而释放出大量的炎症因子和脂质吞噬物^[23-24],进一步导致不稳定斑块的形成和破裂。刘学谦等^[25]发现清心通脉饮可降低巨噬细胞的凋亡,其机制与降低促凋亡蛋白 Bax 的表达,增加 Bcl-2 蛋白表达有关;赵正等^[26]研究发现 TM 可引起 Caspase-3 活性增加,诱导泡沫细胞凋亡,与 ox-LDL 诱导的巨噬细胞泡沫化和凋亡结果相符;林徐泽等^[27]研究表明脂肪因子 Omentin-1 可显著抑制巨噬细胞的凋亡,其机制与 Omentin-1 促进巨噬细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 及 Caspase-3 的蛋白表达有关。本研究结果表明,与 CON 组相比,MOD 组 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达增加,Bcl-2 蛋白表达减少;与 MOD 组相比,ICA 将不同程度降低 Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达,并提高 Bcl-2 蛋白表达,并且呈剂量依赖性,与上述研究结果一致,表明 ICA 可激活细胞内源性凋亡途径引起细胞凋亡。

Park 等^[28]研究发现, NF- κ B 的激活能够抑制巨噬细胞的凋亡,这一现象的发现提示可能与级联放大炎症反应相关。NF- κ B 的抑制因子是 I κ B,I κ B 与 NF- κ B 结合后,能够阻止 NF- κ B 转移到细胞核内。当细胞处于静息状态时,NF- κ B 和 I κ B 结合形成没有活性的复合体,存在于胞浆中,当外界信号的刺激细胞后,I κ B 激酶复合体则将 I κ B 磷酸化,使 NF- κ B 暴露出核定位的相关位点。游离的 NF- κ B 迅速进入到细胞核中,与特异性 κ B 序列结合,诱导基因转录,进而抑制巨噬细胞凋亡。本研究中,MOD 组 NF- κ B p65 蛋白表达增加,I κ B α 蛋白表达减少。ICA 处理后发现:ICA 将不同程度地提高 I κ B α 蛋白表达,降低 NF- κ B p65 蛋白的表达,并且呈剂量依赖性,与以往人们研究结果一致,表明 ICA 能够激活 NF- κ B 活性抑制巨噬细胞凋亡。综上所述,本研究在细胞水平证实了 ICA 可以提高巨噬细

胞活性并减少细胞凋亡,抑制相关炎症因子的释放,激活细胞内源性凋亡途径和 NF- κ B 活性抑制凋亡蛋白的表达,为 ICA 抗 AS 的研究提供了实验证据。

参考文献:

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2016》概要[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(6): 521-530.
- [2] Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis-A matter of unresolved inflammation [J]. Semin Immunol, 2015, 27(3): 184-193.
- [3] Libby P, Bornfeldt KE, Tall AR. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges [J]. Circ Res, 2016, 118(4): 531-534.
- [4] Perrotta P, Emini VB, Bieke VDV, et al. Pharmacological strategies to inhibit intra-plaque angiogenesis in atherosclerosis [J]. Vascu Pharmacol, 2018, 112: 72-78.
- [5] Pant S, Deshmukh A, Gurumurthy GS, et al. Inflammation and atherosclerosis-revisited [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2014, 19(2): 170-178.
- [6] Williams JW, Giannarelli C, Rahma A, et al. Macrophage biology, classification, and phenotype in cardiovascular disease; JACC macrophage in CVD series (Part 1) [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(18): 2166-2180.
- [7] Rafeian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, et al. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes [J]. Int J Prev Med, 2014, 5(8): 927-946.
- [8] Li C, Li Q, Mei Q, et al. Pharmacology effects and pharmacokinetics properties of icariin, the major bioactive component in herba epimedii [J]. Life Sci, 2015, 126: 57-68.
- [9] 李聪聪,赵鹏,秦燕勤,等.淫羊藿苷的药理活性研究进展[J]. 中医学报, 2020, 35(4): 781-786.
- [10] 胡彦武,李海涛,刘凯,等.淫羊藿苷通过影响 MAPK 信号通路抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞增殖作用研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(19): 3655-3660.
- [11] Phrommintikul A, Krittayaphong R, Wongcharoen W, et al. Management of atherosclerosis risk factors for patients at high cardiovascular risk in real-world practice: a multicentre study [J]. Singapore Med J, 2017, 58(9): 535-542.
- [12] 刘梅林,冯雪茹.老年人应用他汀类药物的安全性[J]. 临床荟萃, 2008, 23(10): 691-694.
- [13] 袁航,曹树萍,陈抒云,等.淫羊藿的化学成分及质量控制研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(24): 3630-3640.
- [14] Chen YJ, Zheng HY, Huang XX, et al. Neuroprotective effects of icariin on brain metabolism, mitochondrial functions, and cognition in triple-transgenic Alzheimer's disease mice [J]. CNS Neurosci Ther, 2016, 22(1): 63-73.
- [15] 张洋,冷晓薇,李亚娟,等.罗布麻叶总黄酮对大鼠动脉粥样硬化干预作用[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(12): 1696-1699.
- [16] 徐瑞,黄鹏,张玮冰,等. miR-205-5p/PRKCA/p38 信号通路在淫羊藿苷抑制动脉粥样硬化中的介导作用[J]. 老年学杂志, 2020, 40(10): 2169-2176.
- [17] Koelwyn GJ, Corr EM, Erbay E, et al. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis [J]. Nat Immunol, 2018, 19(6): 526-537.
- [18] Gonzalez L, Trigatti BL. Macrophage apoptosis and necrotic core development in atherosclerosis: a rapidly advancing field with clinical relevance to imaging and therapy [J]. Can J Cardiol, 2017, 33(3): 303-312.
- [19] 尹建国,张社兵,彭道泉.载脂蛋白 AI 通过诱导自噬抑制泡沫细胞脂质沉积和凋亡[J]. 中国医科大学学报, 2018, 47(1): 17-21.
- [20] Dominic EA, Ramezani A, Anker SD, et al. Mitochondrial cytopathies and cardiovascular disease [J]. Heart, 2014, 100(8): 611-618.
- [21] 冯健愉,朱玉山,陈仨,等. Bcl-2 家族蛋白的生理功能及结构基础[J]. 中国细胞生物学报, 2019, 41(8): 1477-1489.
- [22] Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 65-80.
- [23] Yurdagul A Jr, Doran AC, Cai B, et al. Mechanisms and consequences of defective efferocytosis in atherosclerosis [J]. Front Cardiovasc Med, 2018, 4: 86.
- [24] Cai B, Thorp EB, Doran AC, et al. MerTK receptor cleavage promotes plaque necrosis and defective resolution in atherosclerosis [J]. J Clin Invest, 2017, 127(2): 564-568.
- [25] 刘学谦,王静,曹守沛,等.凉血散瘀法通过抑制巨噬细胞凋亡抗动脉粥样硬化的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 59-65.
- [26] 赵正,李琦,尹婕,等.参莲提取物对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞泡沫化和凋亡的药效学研究及提取部位活性比较[J]. 中国现代中药, 2019, 21(5): 590-597.
- [27] 林徐泽,王志坚,周玉杰.脂肪因子 Omentin-1 通过磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B 通路抑制泡沫巨噬细胞炎症因子释放及凋亡的研究[J]. 心脑血管病杂志, 2019, 38(9): 975-981.
- [28] Park JM, Greten FR, Wong A, et al. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis-CREB and NF- κ B as key regulators [J]. Immunity, 2005, 23(3): 319-329.

[收稿日期] 2021-01-22