

青心酮对载脂蛋白E缺陷小鼠主动脉粥样硬化形成及斑块中主要细胞的TLR4表达的影响

张代娟¹, 刘同美^{1*}, 刘江月¹, 崔晓栋¹, 郭军堂¹, 王建英¹, 叶笃筠² (1. 潍坊医学院病理生理教研室, 山东 潍坊 261053; 2. 华中科技大学同济医学院病理生理教研室, 武汉 430030)

摘要: 目的 观察青心酮对小鼠动脉粥样硬化(AS)斑块中平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞 Toll 样受体 4 表达(Toll-like receptor 4, TLR4)的影响, 及对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化病变的影响。方法 取小鼠胸主动脉, 进行平滑肌细胞、内皮细胞的原代培养, RAW 264.7(小鼠巨噬细胞)细胞株传代培养。实验分 4 组: 空白对照组, 脂多糖(LPS)组, 青心酮组, 辛伐他汀组。收集各组细胞总 mRNA 及蛋白, 应用 RT-PCR 及 Western-blot 方法检测 TLR4 mRNA 及蛋白。取 30 只 8 周龄雄性 ApoE(-/-)小鼠, 随机分成 3 组: 模型组($n=10$), 每天生理盐水灌胃; 青心酮治疗组($n=10$)经胃管灌注青心酮 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 辛伐他汀治疗组($n=10$)经胃管灌注辛伐他汀 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。所有实验小鼠均饲以“西方类型膳食”饲料 12 周。剪取主动脉根部切片及 HE 染色观察主动脉粥样硬化病变情况。结果 $1 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 青心酮组血管平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞 TLR4 mRNA 和蛋白含量明显低于未处理组($P<0.01$); 与辛伐他汀组比较无显著性差异; 青心酮组 AS 病灶形成减少。结论 青心酮可下调 LPS 活化的小鼠平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞 TLR4 mRNA 和蛋白的表达, 在一定程度上能减少 AS 病灶的形成, 可能通过 TLR4 途径发挥其作用。

关键词: 青心酮; Toll 样受体 4; 动脉粥样硬化

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)01-0001-05

Effect of 3,4-dihydroxyacetophenone on Atherogenesis in ApoE-Deficient Mice and the Expression of TLR4 in Three Main Cells of Atherosclerosis Plaque

ZHANG Daijuan¹, LIU Tongmei^{1*}, LIU Jiangyue¹, CUI Xiaodong¹, GUO Juntang¹, WANG Jianying¹, YE Dujun² (1. Department of Pathophysiology, Weifang Medical College, Weifang 261053, China; 2. Pathophysiology Department of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of 3,4-dihydroxyacetophenone(DHAP) on the expression of Toll-like receptor 4(TLR4) mRNA and protein in activated mouse vascular smooth muscle cells (VSMC), endothelial cells (EC) and macrophage (MC) to observe the change of aortic atherosclerosis at apolipoprotein E knockout (ApoE(-/-) mouse treated with DHAP. **METHODS** Normal thoracic aortas were obtained from 4 adult mice, and the VSMC, EC were cultured. The MC (RAW264.7 cell lines) was obtained from ATCC. The cells were divided into four groups: control group; LPS group; DHAP group; simvastatin group. Changes of TLR4 mRNA and protein were analyzed by RT-PCR and Western blot. In addition, 30 same age male mice of ApoE(-/-) were fed with a Western diet (21% fat, 0.15% cholesterol) for 12 weeks, and these mice were divided into three groups at random including: model group; DHAP treated group receiving DHAP administered via gastric tube at $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for consecutive 12 weeks; simvastatin treated group receiving simvastatin administered via gastric tube at $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for consecutive 12 weeks. The changes of aortic atherosclerosis were analyzed. **RESULTS** The VSMC, EC and MC pretreated by $1 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DHAP expressed TLR4 mRNA and protein lower than unpretreated ones ($P<0.01$) in activated. The lesions of aortic atherosclerosis were inhibited in two treated groups. **CONCLUSION** It suggested that DHAP could be effective for the prevention and treatment of AS, and TLR4 path might be the mechanism of DHAP to treat AS.

KEY WORDS: 3,4-dihydroxyacetophenone; Toll-like receptor 4; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种炎症性疾病, Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)在其中扮演了重要的角色。AS斑块中的主要细胞: 血管平滑肌、内皮细胞、巨噬细胞都表达TLR4^[1],

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30200373); 山东省中医药科技发展计划项目(2005-238)

作者简介: 张代娟, 硕士, 讲师 Tel: (0536)8462020 E-mail: zdj_zhangdaijuan@sohu.com *通信作者: 刘同美, 教授, 硕士
Tel: (0536)8462020 E-mail: jaeymacs@yahoo.com.cn

因此,应用抗炎药物抑制TLR4在AS斑块中的表达,便能影响AS的发生发展过程。活血化瘀中药成分青心酮(3, 4-dihydroxyacetophenone, DHAP)在临床上用于冠心病,妊娠高血压综合征^[2-3]等均获得较好的疗效,其药理作用机制尚未完全阐明。本课题组前期工作发现DHAP能显著抑制巨噬细胞TNF- α 的分泌,具有较好的抗炎作用^[4]。DHAP能否通过血管平滑肌、内皮细胞TLR4途径是否通过抑制TNF- α 的分泌来影响AS炎症反应的发展,目前尚无这方面的报道。本试验拟研究DHAP对AS斑块中平滑肌、内皮细胞、巨噬细胞的TLR4表达的影响,初步探讨DHAP对AS的防治机制。

1 材料与方法

1.1 动物

ApoE(-/-)小鼠,♂,8周龄,清洁级,体重(18.14±0.70)g,购于协和医大实验动物中心,合格证号:scxk(京)2005-0013。

1.2 药品与试剂

青心酮(北京制药三厂,批号:051202,规格:2 mL·支⁻¹);辛伐他汀(浙江京新药业公司,批号:100601-200502,规格:10 mg·片⁻¹);戊巴比妥钠(Westang,批号:P3671,规格:5 g);RT-PCR相关试剂(GibcoBrl公司)。免疫印迹法相关试剂(北京中山生物技术有限公司)。

1.3 细胞株及培养

RAW 264.7细胞株购自中国科学院上海细胞所,用DMEM完全培养基,在37℃,5% CO₂培养箱中培养。

1.4 主要仪器

2720型PCR仪(USA),Hoefer垂直型电泳槽和湿式电转膜槽(USA),DF-C型电泳仪(东方特力科贸中心),BIO-RAD型转膜仪(USA),AM188402酶标仪(DNA-ESPRP)。

1.5 细胞实验

1.5.1 细胞培养 在37℃,5% CO₂培养箱培养细胞,细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。小鼠巨噬细胞株(RAW 264.7)传代培养。血管平滑肌细胞、内皮细胞取自C57BLP6J小鼠胸主动脉,原代培养,方法:①血管平滑肌细胞。用植块法培养小鼠主动脉平滑肌细胞,7 d左右长出细胞,呈峰谷状交错生长,10~14 d长满培养瓶的70%~80%,用0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA以1:2比例进行消化传代培养,实验用4~8代。②血管内皮细胞。将小鼠主动脉

翻转,两端完全折入封闭,置于培养瓶中,加入含有20%胎牛血清的DMEM/F12培养液,细胞培养约12~14 d,迁出生长的细胞覆盖培养瓶面积的2/3以上,约80%的细胞汇合即可传代培养,用0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA以1:2比例进行消化传代培养,实验用4~8代。

1.5.2 实验内容 本试验采用脂多糖(LPS)刺激小鼠平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)、内皮细胞(endothelial cells, EC)、巨噬细胞(macrophage, MC)使其活化(在培养基中加入LPS,浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,用此培养基培养细胞,刺激细胞发生炎症反应),时间为8 h(预实验此时TLR4变化最明显)。实验分为4大组:空白对照组(正常细胞培养,加入等量的培养基,不加入任何药物);LPS组(加入等量的培养基3 h,再加入LPS $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 刺激8 h);DHAP组(先加入溶有DHAP $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基培养3 h,再加入LPS $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 刺激8 h);辛伐他汀组(阳性对照组,先加入溶有辛伐他汀 $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基培养3 h,再加入LPS $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 刺激8 h)。

1.5.3 指标测定

1.5.3.1 RT-PCR^[5] 目的基因TLR4:上游引物5' TGGATACGTTTCCTTATAAG 3',下游引物5' GAAATGGAGGCACCCCTTC 3'; β -actin:上游引物5' ATCATGTTTGAGACCTTCAACA 3',下游引物5' CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 3'。扩增片段分别为311 bp,300 bp。扩增:每个反应体系用2.5 μL $10 \times \text{PCR Buffer}$,2 μL $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$,1 μL $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上游引物,1 μL $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下游引物,1 U TaqDNA聚合酶,15 μL H₂O,混匀,分装到0.2 mL PCR薄壁管里,每管23 μL 。内参采用同样的方式进行。在每管中加入2 μL RT产物,混匀。加入30 μL 石蜡油。目的、内参基因PCR扩增条件:94℃预变性5 min,94℃变性1 min,56℃退火1 min,72℃延伸1 min,最后一次延伸10 min;目的基因扩增32个循环,内参扩增25个循环。扩增产物用含EB的 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察照相。并经图像分析系统软件(ID软件)处理,以TLR4与内参 β -actin的平均吸光度比值进行半定量分析。

1.5.3.2 免疫印迹法^[5] 弃去培养基,用冰PBS洗2遍,加入细胞裂解液,在冰上静置10~20 min,转移到EP管中,加入1/3体积的 $4 \times \text{sample buffer}$,

煮沸 10 min, 超声破碎, 3 000 r·min⁻¹ 室温离心, 取上清。SDS-PAGE 电泳分离蛋白。将蛋白从电泳凝胶中转移到 NC 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 30 min, 一抗 37 °C 2 h, TBS 冲洗 3 次, 每次 15 min, 碱性磷酸酶标记二抗 37 °C 1 h, TBS 冲洗 4 次, 每次 15 min, NBT 方法显色 10 min。扫描分析。

1.6 整体实验

1.6.1 小鼠饲养 取 30 只 8 周龄雄性 ApoE(-/-) 小鼠, 随机分成 3 组: 模型组 ($n=10$), 建立小鼠 AS 模型; DHAP 治疗组 ($n=10$) 经灌胃针灌注 DHAP 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹; 辛伐他汀治疗组 ($n=10$) 经灌胃针灌注辛伐他汀 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹。所有实验小鼠均为清洁级别, 到达动物室后在同样温度、湿度和光照等环境条件下适应 3 d, 进食进水正常, 体重稳定后开始进入试验程序。所有小鼠自由进食饮水, 实验用药溶于生理盐水配成混悬液, 根据当日动物体重用注射器抽取药液, 然后经灌胃针灌胃; 模型组均给予生理盐水灌胃。所有实验小鼠均饲以含脂肪 21%, 胆固醇 0.15% 的“西方类型膳食”饲料至 12 周。

1.6.2 实验取材 小鼠禁食过夜(不禁水), 称体重。5% 戊巴比妥钠 40 mg·kg⁻¹ 腹腔注射, 无菌条件

表 1 DHAP 对 LPS 活化血管内皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞 TLR4 mRNA 表达的影响 ($n=8$)

Tab 1 Effects of DHAP on TLR4 mRNA expression at activated VSMC, EC, MC by LPS ($n=8$)

组别	剂量	血管平滑肌细胞	内皮细胞	巨噬细胞
空白对照组	-	0.271±0.017	0.414±0.027	0.553±0.009
LPS 组	10 ng·mL ⁻¹	2.380±0.051 ¹⁾	1.079±0.039 ¹⁾	0.978±0.056 ¹⁾
DHAP 组	10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹	0.606±0.032 ²⁾	0.524±0.035 ²⁾	0.481±0.022 ²⁾
辛伐他汀组	5×10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹	0.603±0.023 ²⁾	0.482±0.017 ²⁾	0.479±0.016 ²⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 LPS 组比较, ²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with LPS group, ²⁾ $P<0.01$

2.2 DHAP 对 LPS 活化血管内皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞 TLR4 蛋白合成的影响。

DHAP 对 3 种细胞 TLR4 蛋白的影响是一致的。与空白对照组比较, LPS 组 TLR4 蛋白量明显增高 ($P<0.01$)。DHAP 组和辛伐他汀组与 LPS

表 2 DHAP 对 LPS 活化血管内皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞 TLR4 蛋白合成的影响 ($n=8$)

Tab 2 Effects of DHAP on TLR4 protein at activated VSMC, EC, MC by LPS ($n=8$)

组别	剂量	血管平滑肌细胞	内皮细胞	巨噬细胞
空白对照组	-	20.369±1.221	31.617±0.946	105.392±1.121
LPS 组	10 ng·mL ⁻¹	44.109±1.304 ¹⁾	57.112±1.325 ¹⁾	194.096±1.214 ¹⁾
DHAP 组	10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹	31.232±0.873 ²⁾	15.901±0.684 ²⁾	92.957±0.725 ²⁾
辛伐他汀组	5×10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹	30.689±0.784 ²⁾	15.320±1.032 ²⁾	96.293±0.966 ²⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 LPS 组比较, ²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with LPS group, ²⁾ $P<0.01$

下心脏取血, 取主动脉根部血管 10% 甲醛固定后行石蜡包埋, 自主动脉根部向下行连续切片, 每只小鼠切片 50 张, 每张切片 2 个组织面, 切片厚 5 μm, 每间隔 6 张取 1 张, 进行 HE 染色, 光镜观察血管壁 AS 病变的组织学形态; 数码相机 100 倍镜下采集图像, 用 Image Pro Plus 6.0 图像处理软件作形态学分析, 测量动脉壁横切面积、粥样斑块面积, 计算粥样斑块面积与动脉壁横切面积之比, 取其均值进行统计学分析。

1.7 统计分析

全部数据用 SPSS 13.0 统计软件进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间比较用 LSD 检验分析。

2 结果

2.1 DHAP 对 LPS 活化小鼠血管平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞 TLR4 mRNA 表达的影响。

DHAP 对 3 种细胞 TLR4 mRNA 表达的影响是一致的。与空白对照组比较, LPS 组 TLR4 mRNA 及蛋白的表达明显增高 ($P<0.01$)。DHAP 组和辛伐他汀组与 LPS 组比较均下降 ($P<0.01$), 但高于空白对照组 ($P<0.01$), 且 DHAP 组和辛伐他汀组的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 结果见表 1。

组比较均下降 ($P<0.01$), 在血管平滑肌细胞和巨噬细胞均高于空白对照组 ($P<0.01$), 但在内皮细胞却低于空白对照组 ($P<0.01$)。3 种细胞的 DHAP 组和辛伐他汀组的差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 结果见表 2。

2.3 DHAP对ApoE基因敲除小鼠斑块形成的影响

2.3.1 HE染色结果 模型组ApoE(-/-)小鼠主动脉均有斑块形成,以纤维斑块为主,可见由大量泡沫细胞形成的脂纹;DHAP治疗组和辛伐他汀治疗组纤维帽较厚,结构较为完整,内含脂质成分,泡沫细胞数量较少,见图1。

2.3.2 面积与主动脉壁横截面积的比较 DHAP组、辛伐他汀组与空白对照组比较,斑块总面积明显减少($P<0.01$);斑块面积/动脉壁横切面积也明显降低($P<0.01$);但2组之间无显著性差异;3组之间的血管壁面积无统计学差异($P>0.5$),见表3。

表3 DHAP对ApoE基因敲除小鼠斑块形成的影响($n=10$)

Tab 3 Influence of DHAP on the atherosclerosis of ApoE(-/-) mice ($n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	LA/ μm^2	PA/ μm^2	PA/LA/%
空白对照组	-	100 022.58±15 917.65	7 752.49±635.76	7.75
DHAP组	10	93 650.02±20 568.56	3 560.80±927.60	3.80 ¹⁾
辛伐他汀组	10	97 362.53±14 367.44	3 241.71±842.51	3.30 ¹⁾

注:与空白对照组比较,¹⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$

3 讨论

Toll蛋白最初是在果蝇胚胎中发现的,在介导果蝇的天然免疫反应过程中起着重要作用。哺乳动物Toll蛋白的同源受体称Toll样受体(toll like receptors, TLRs),其中TLR4因其主要介导LPS损伤细胞作用而备受关注。TLR4介导LPS等致病因子引发的致炎细胞因子释放过程主要是TLR4识别内、外源性配体后,启动炎性应答信号通路及诱导TNF- α 等致炎因子释放,进而激活抗病原通路,直接去除病原体,对机体组织产生保护作用,但同时也可引起组织损伤^[6-7]。

AS是一种多因素参与的严重危害人类健康的常见疾病,其形成过程和发病机制复杂,具体机制尚未完全阐明。1999年R.ROSS教授在其损伤反应学说的基础上,明确提出“动脉粥样硬化是一种炎症性疾病”^[8]。TLR4因具有介导致病因子启动炎性应答信号通路等功能^[7],被认为与AS的关系最为密切。此外,TLR4可能为细菌感染和动脉粥样硬化炎症形成之间建立一个桥梁,通过调节先天与获得性免疫而在宿主抗微生物感染及抗机体内源性配体中起重要作用,从而在AS这一炎症性疾病的发生发展中有着重要作用^[9-11]。

DHAP是从活血化瘀中药毛冬青根中提取的有效成分,研究治疗冠心病、妊高征等均获得较



图1 DHAP对ApoE基因敲除小鼠斑块形成的影响(HE染色, $\times 200$)

A-模型组; B-DHAP治疗组; C-辛伐他汀治疗组

Fig 1 The effect of DHAP on atherosclerosis plaque at ApoE(-/-) mice

A-model group; B-DHAP group; C-simvastatin group

好的疗效,还能较好的舒张血管,抑制血管平滑肌增殖等^[3-4]。在体外实验中从实验数据上可以看出DHAP对AS斑块中3种主要细胞:血管平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞TLR4的表达有明显抑制作用,部分抑制TNF- α 分泌,具有较好的抗炎作用;DHAP对血管平滑肌细胞及巨噬细胞TLR4在基因及蛋白水平的影响是一致的,而对血管内皮细胞TLR4在基因及蛋白水平的影响不一致:在基因水平,用药后TLR4仍高于空白对照组;在蛋白水平,用药后TLR4蛋白低于空白对照组,且与阳性对照组(辛伐他汀组)是一致的,这是否提示了TLR4蛋白在血管内皮细胞合成过程中某个环节又受到DHAP的抑制作用,仍有待于进一步研究。此外,在整体实验中明确了DHAP对AS斑块的数目、大小的影响,为DHAP用于防治AS提供了确切的实验依据。

REFERENCES

- [1] AKASHI S, SHIMAZU R, OGATA H, et al. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages [J]. J Immunol, 2000, 164(7): 3471-3475.
- [2] WU P, HUANG Y P, YE D Y, et al. Progress in studies on mechanism of promoting blood circulation and removing blood stasis of 3,4-dihydroxyacetophenone [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2001, 32(3): 277-279.
- [3] HUANG Y P, YE D Y, MA T Y, et al. The effects of DHAP on

- plasma endothelin, nitric oxide in patients with pregnancy induced hypertension [J]. *Chin J Obstet Gynecol*(中华妇产科杂志), 1996, 31(11): 667-669.
- [4] ZHANG D J, WU S J, LIU T M, et al. Effects of DHAP on the expression of sTLR4 mRNA & protein and inflammation factors in RAW264.7 cell line [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2006, 10(10): 120-122.
- [5] SAMBROOK J. *Molecular Cloning 3* [M]. Beijing: Science Press, 2002: 516-701; 1713-1726.
- [6] FAN H, COOK J A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance [J]. *J Endotoxin Res*, 2004, 10(2): 71-84.
- [7] ADEREM A, ULEVITCH R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response [J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 782-787.
- [8] ROSS R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (2): 115-126.
- [9] EDFELDT K, SWEDENBORG J, HANSSON G K, et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation [J]. *Circulation*, 2002, 105(10): 1158-1161.
- [10] SORRENTINO R, ARDITI M. Innate immunity, toll-like receptors, and atherosclerosis: mouse models and methods [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 517: 381-399.
- [11] NAIKI Y, SORRENTINO R, WONG MH, et al. TLR/MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally control *Chlamydia pneumoniae*-induced acceleration of atherosclerosis [J]. *Immunol*, 2008, 181(10):7176-7185.

收稿日期: 2009-06-08