doi：10.3969/j.issn.1672-397X.2019.06.029

景虎通脉方含药血清对巨噬细胞炎症反应及泡沫化形成的作用研究

周　敏[1]　麻　莉[2]　杨迎飞[3]　黄　丰[2]　张　俐[4]　童晓云[4]

（1.宁乡市中医医院，湖南宁乡410600；2.云南中医学院中药学院，云南昆明650500；3.昭通市中医院，云南昭通657000；4.云南中医学院第一附属医院，云南昆明650021）

摘　要　目的：通过研究景虎通脉方含药血清对巨噬细胞炎症反应及泡沫化形成的影响，探讨景虎通脉方抗动脉粥样硬化的可能机制。方法：大鼠灌胃后制备不同浓度的景虎通脉方含药血清，观察其对小鼠单核巨噬细胞白血病细胞株（RAW264.7）增殖的影响；观察1%景虎通脉方含药血清对氧化型低密度脂蛋白（Ox-LDL）诱导RAW264.7细胞脂质沉积和泡沫细胞形成的影响，酶联免疫吸附测定法（ELISA）检测白介素-1β（IL-1β）及白介素-6（IL-6）水平，油红O染色观察细胞脂质沉积，流式细胞术检测巨噬细胞CD36与CD204表达。结果：与正常对照组比较，10%、5%、2.5%景虎通脉方含药血清均对RAW264.7细胞增殖有不同程度的抑制作用，1%、0.5%含药血清对RAW264.7细胞增殖无明显影响。与模型组比较，1%景虎通脉方含药血清组RAW264.7细胞胞内脂质沉积减少，细胞中IL-1β、IL-6表达明显降低（$P<0.01$），CD36和CD204表达明显降低（$P<0.01$）。结论：景虎通脉方含药血清可能通过减少CD36和CD204的表达，抑制脂质的沉积和泡沫细胞的形成，减少炎症反应，达到抗动脉粥样硬化的目的。

关键词　巨噬细胞；景虎通脉方；泡沫细胞；培养的细胞株；SD大鼠；含药血清；实验研究

中图分类号　R289.51　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1672-397X（2019）06-0082-04

基金项目　国家自然科学基金地区项目（81560768）；云南省科技厅-云南中医学院中医联合项目（2017FF116-033）

心血管疾病（Cardiovascular Diseases，CVD），包括冠心病、急性心肌梗死、脑梗死等，是世界范围内死亡的主要原因之一，而动脉粥样硬化（Atherosclerosis，ATH）则是CVDs的主要原因。关于ATH的发病机制目前尚无统一的认识，有学者认为ATH是以动脉内皮功能障碍开始的慢性炎症状态，低密度脂蛋白（Low Density Lipoprotein，LDL）尤其是其氧化形式在其中起着关键作用[1-3]。在动脉粥样硬化发展过程中，氧化型低密度脂蛋白（Oxidized Low Density Lipoprotein，Ox-LDL）被巨噬细胞大量吞噬，胆固醇持续积累变成泡沫细胞，泡沫细胞刺激内皮细胞产生细胞因子和趋化因子，从而导致炎症反应，促进斑块的形成并产生ATH。

景虎通脉方是第三、四、五批全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师赵淳教授用于治疗ATH的经验方，取得了良好的临床效果[4-6]。前期实验结果证实，景虎通脉方可有效改善实验性颈动脉粥样硬化及高脂血症模型兔血脂，降低其外周血炎症因子白介素-6（Interleukin 6，IL-6）、细胞间黏附分子-1（Intercellular Cell Adhesion Molecule-1，ICAM-1）的表达，并可能通过抑制Toll样受体4（Toll-like Receptor 4，TLR4）信号通路以改善颈动脉斑块形成[7-9]。结合我们的临床实践及前期动物实验研究结果，景虎通脉方的抗ATH作用机制可能与巨噬细胞及泡沫细胞的转化、炎症反应具有极为密切的关系。本实验观察了景虎通脉方含药血清对巨噬细胞炎症反应及泡沫化形成的影响，进一步探讨景虎通脉方抗动脉粥样硬化的可能机制。

1　实验材料

1.1　实验细胞、实验动物　RAW264.7巨噬细胞：小鼠单核巨噬细胞白血病细胞株，购自中国科学院昆明动物研究所细胞库，编号KCB200602YJ。实验用SD大鼠10只，雄性，6~8周，体重（300±50）g，购自简阳比尔实验动物有限公司，编号SCXK2015-0001，恒温（20℃左右）饲养。已通过云南中医学院第一附属医院动物伦理委员会审核。

1.2　药物与试剂　景虎通脉方：红景天10g（购自云南福林堂药业有限公司）、虎杖20g、三七10g、茯苓15g、隔山消15g（购自云南省中医医院中药房）。菲牛蛭冻干粉1g（云南海瑞迪生物公司，批号

20130199，温水兑入），胎牛血清（以色列BI公司，批号1601001），胰蛋白酶（美国Gibco公司，批号25200-056），甲醇（美国TEDIA公司，色谱纯），1640培养基（美国HyClone公司，批号AAJ206662），二甲基亚砜（DMSO，美国Sigma公司），Ox-LDL（北京协生生物科技有限责任公司），油红O染液（美国Sigma公司，批号1002230755），IL-6试剂盒（欣博盛生物科技有限公司，批号M160602-004a），IL-1β试剂盒（杭州联科生物技术有限公司，批号：2201B70231），杜氏磷酸缓冲液（DPBS，美国Gbico公司，批号1802675），多聚赖氨酸（美国Sigma公司，批号SJ1030B4013J），鼠CD36抗体（Anti-Mouse CD36，美国Cat.BD Phamingen公司，批号562744），鼠CD204抗体（Anti-Mouse CD204，美国eBioscience公司，批号12-2046-82）。

1.3 主要仪器 流式细胞仪（FACSCantoⅡ，美国BD公司），台式离心机（HERAEUS MEGAFUGE 1.0R，美国Thermo公司），移液器（美国Thermo公司），CO_2细胞培养箱（美国Thermo公司），酶标仪（SpectraMax i3x，美国Molecular Devices公司），倒置显微镜（LD3000，美国Leica公司），LC-1260高效液相色谱仪（日本岛津），AQ-C18色谱柱（月旭科技股份有限公司），水浴锅（美国Thermo公司），6孔板/96孔板（美国Coring公司）。

2 实验方法

2.1 景虎通脉方含药血清制备 雄性SD大鼠10只，给药前禁食不禁水4h，给予临床等效剂量8倍的景虎通脉方灌胃（成人临床常用剂量：景虎通脉方每日71g/70kg体重），每日早晚灌胃2次，2次灌胃时间间隔8h，共给药3d。末次灌胃后1h，麻醉，腹主动脉采血，1881×*g*离心10min，吸取上层血清，56℃灭活30min，-20℃保存备用。使用高效液相法对含药血清中的中药活性成分进行检测。

2.2 景虎通脉方含药血清浓度选择 常规培养RAW264.7巨噬细胞，设定细胞密度为5×10^4/mL，将配置好的细胞悬液加入96孔板中，100μL/孔，放入培养箱过夜待细胞贴壁后，分别给予浓度为10%、5%、2.5%、1%、0.5%的景虎通脉方含药血清，作用48h，同时给予等量的1640完全培养基作为正常对照组。48h后加入20μL/孔的MTT工作液（5mg/mL）继续培养2~4h后离心去上清，加入150μL/孔二甲基亚砜（分析纯），振荡3~5min后于570nm处测定吸光度值，观察景虎通脉方含药血清对RAW264.7巨噬细胞增殖的影响。结果提示：与正常对照组相比，10%、5%、2.5%景虎通脉方含药血清对RAW264.7细胞增殖均呈现不同程度的抑制作用，差异有统计学意义（$P<0.05$）；而1%、0.5%含药血清对RAW264.7细胞增殖无明显影响（$P>0.05$）。因此，本实验选择景虎通脉方含药血清实验浓度为1%。

2.3 Ox-LDL浓度选择 实验方法同2.2部分，选择Ox-LDL浓度分别为6.25、12.5、25、50、100μg/mL。结果提示：与正常对照组相比，6.25μg/mL浓度的Ox-LDL诱导48h对RAW264.7细胞增殖无明显抑制作用，其结果不具有统计学意义；12.5、25、50、100μg/mL浓度的Ox-LDL诱导48h对细胞的抑制率分别为11%、14%、36%和62%，差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。因此，本实验选择Ox-LDL刺激浓度为5μg/mL。

2.4 药物血清对Ox-LDL诱导后RAW264.7细胞泡沫细胞形成的影响 取状态良好的处于对数生长期的细胞，将设定并配置好的细胞密度为5×10^4/mL的细胞悬液加入6孔板中，1000μL/孔，置于培养箱中过夜待其贴壁后，分为景虎通脉方含药血清组、模型组与正常对照组。景虎通脉方含药血清组和模型组均给予1640培养基1000μL/孔，2h后去上清液加入5μg/mL Ox-LDL与1μg/mL LPS，1000μL/孔。景虎通脉方含药血清组给予1%景虎通脉方含药血清工作液1000μL/孔。正常对照组给予等量的1640完全培养基。48h后用提前配制好的油红工作液进行油红O染色，显微镜下观察并拍照，观察细胞内脂质沉积和泡沫细胞的形成情况。

2.5 药物血清对Ox-LDL诱导后RAW264.7细胞IL-6、IL-1β表达的影响 常规培养细胞，设定细胞密度为5×10^5/mL，将配置好的细胞悬液加入96孔板中，100μL/孔，放入培养箱过夜待细胞贴壁后，分为景虎通脉方含药血清组、模型组及正常对照组。模型组及景虎通脉方含药血清组予1640培养基200μL/孔，2h后去上清液予5μg/mL Ox-LDL与1μg/mL LPS，200μL/孔，景虎通脉方含药血清组给予浓度为1%的景虎通脉方含药血清工作液200μL/孔，正常对照组给予等量1640完全培养基。24h和48h后分别收集细胞上清，通过ELISA试剂盒（按照试剂盒说明操作）检测各组细胞因子IL-1β和IL-6的表达。

2.6 药物血清对Ox-LDL诱导后RAW264.7细胞CD36、CD204表达的影响 细胞培养、分组及药物干预同2.4部分，将各组100μL细胞悬液（5×10^5/mL）分别转移至流式管中，分别加入CD36-APC或CD204-PE 1μL，震荡混匀。同时制备对照管。4℃冰箱中孵育20min，加入1~2mL PBS稍洗1次，离心后再加入300μL/管DPBS使细胞重悬，流式细胞仪检测。

2.7 统计学方法 使用SPSS 19.0对数据进行统计分析，计量资料采用（$\bar{x}\pm s$）表示，2组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为存在统计学差异，$P<0.01$ 为存在显著统计学差异。

3 实验结果

3.1 各组细胞脂质沉积情况 结果见图1。Ox-LDL作用48h后，与正常对照组比较，模型组油红O染色后显示细胞胞质内脂质沉积明显，且着色强，提示泡沫细胞形成；经1%景虎通脉方含药血清干预后，细胞内红色脂质减少。推测景虎通脉方含药血清可能通过抑制RAW264.7细胞对Ox-LDL的摄取，减少胞内脂质的沉积，从而抑制泡沫细胞形成。

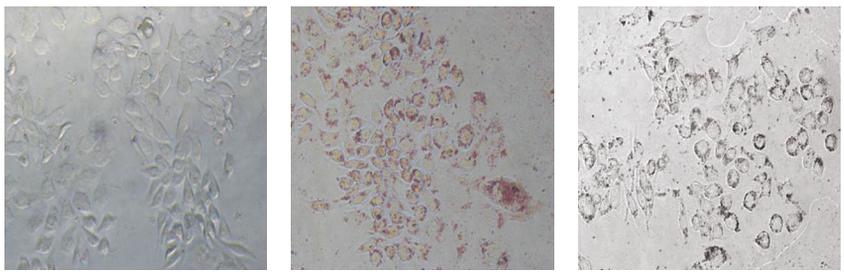
3.2 各组RAW264.7细胞IL-6、IL-1β表达比较 结果见表1。

3.3 各组RAW264.7细胞CD36、CD204水平比较 结果见表2、图2。

4 讨论

ATH是多种致病因素共同作用的结果，病因及发病机制十分复杂。根据ATH的症状表现，可归属于中医学“眩晕”“头痛”“胸痹心痛”“真心痛”“血痹”“腹痛”“中风”及“厥证”等范畴。赵淳教授认为本病多因先天禀赋不足或年老体衰，加之过食肥甘厚味，日久损伤脾胃，运化输布失司，水湿无以运化，聚而成痰，留滞血脉，凝聚成块而为瘀，痰瘀互结，日久化毒生热，凝于血脉，气血运行不畅，无以荣养脏腑经络，久则成虚，故“痰、瘀、毒、虚”贯穿ATH发病整个过程，为本虚标实之证。景虎通脉方活血化瘀、祛痰解毒、健脾益气、补益肝肾，通补兼施，标本兼顾。

动脉粥样硬化的病理学特征是血管炎症和血管壁内脂质积聚，它由内皮细胞损伤和Ox-LDL附着在动脉内壁引起，内皮细胞的炎症促使单核细胞黏附和迁移，分化成为巨噬细胞，通过摄取Ox-LDL进而分化成泡沫细胞，泡沫细胞刺激内皮细胞产生细胞因子和趋化因子，以吸引单核细胞进一步迁移[10]。其他免疫细胞，包括树突细胞和T细胞，均能被各种刺激激活，促进斑块的形成和ATH的进展[11]。有研究表明，识别Ox-LDL存在的氧化磷酸胆碱抗体可减少巨噬细胞对Ox-LDL的摄取，并大大减少ATH斑块的形



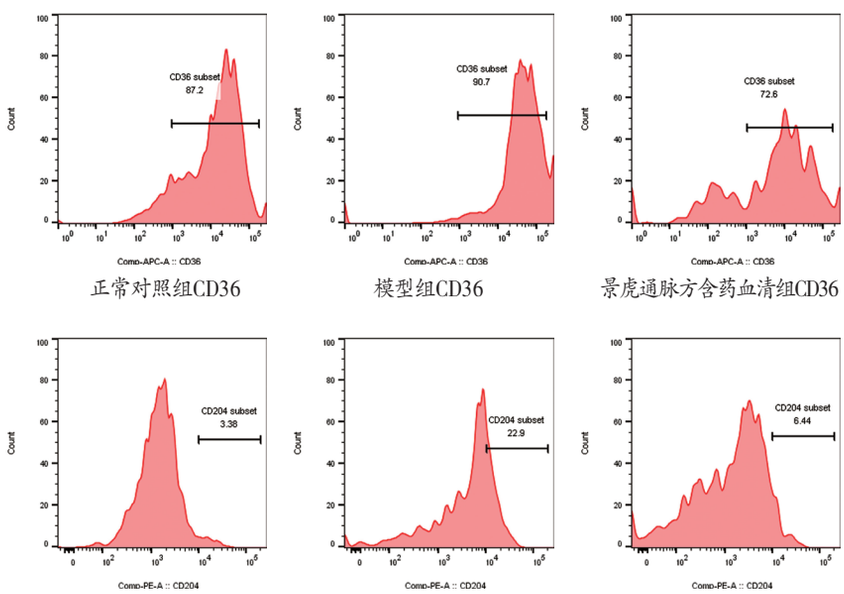
正常对照组　　模型组　　景虎通脉方含药血清组

图1 各组RAW264.7细胞内脂质沉积和泡沫细胞形成（×400）

表1 各组RAW264.7细胞IL-1β、IL-6表达比较（$\bar{x}\pm s$） pg/mL

组别	样本数	IL-1β	IL-6
正常对照组	3	11.68±5.54	35.30±2.70
模型组	3	25.37±2.47#	538.93±3.57##
景虎通脉方含药血清组	3	0.78±0.65##**	460.45±11.12##**

注：与正常对照组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$；与模型组比较，**$P<0.01$。



正常对照组CD36　　模型组CD36　　景虎通脉方含药血清组CD36

正常对照组CD204　　模型组CD204　　景虎通脉方含药血清组CD204

图2 各组RAW264.7细胞CD36、CD204水平比较

表2 各组RAW264.7细胞CD36、CD204水平比较（$\bar{x}\pm s$） %

组别	样本数	CD36	CD204
正常对照组	3	87.2±2.2	3.38±0.43
模型组	3	90.7±1.3#	22.9±2.6##
景虎通脉方含药血清	3	72.6±3.1#**	6.44±0.55##**

注：与正常对照组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$；与模型组比较，**$P<0.01$。

成和炎症的产生[12]。通过油红染色试验，我们发现景虎通脉方可以减少巨噬细胞对Ox-LDL的摄取，减少胞内脂质的沉积与泡沫细胞的形成，从而稳定并减少粥样斑块，以延缓ATH的进展。

动脉粥样硬化为血管慢性炎性病变[1-3]，单核细胞通过受损的内皮细胞分化成为巨噬细胞，巨噬细胞释放的多种炎症因子如IL-1β、IL-6、人单核细胞趋化蛋白-1（MCP-1）和肿瘤坏死因子-α（TNF-α），在ATH的发病中起关键作用[1]。前期实验研究表明，景虎通脉方可降低高脂血症兔模型外周血中炎症因子IL-6、ICAM-1的表达，起到保护血管的作用。本研究发现，模型组细胞上清较正常对照组IL-1β、IL-6水平明显升高，而经景虎通脉方含药血清干预后，细胞上清IL-1β、IL-6水平均明显低于模型组，提示景虎通脉方含药血清可抑制RAW264.7细胞IL-1β、IL-6的表达。因此，我们认为，景虎通脉方可能通过抑制促炎因子，减轻血管炎症，达到保护血管、抗ATH的作用。

巨噬细胞通过清道夫受体吞噬Ox-LDL转变为泡沫细胞，从而形成ATH早期的脂质条纹。脂多糖（LPS）是革兰氏阴性细菌细胞的主要成分，与ATH发展息息相关，脂多糖主要通过增加负责摄取Ox-LDL的主要清除剂受体CD36和CD204的表达，加强对Ox-LDL的摄取。CD204又名A类清道夫受体（SR-A）、巨噬细胞清道夫受体1（MSR1），可介导巨噬细胞源性泡沫细胞形成，并调节巨噬细胞炎症反应与细胞凋亡，在ATH发生发展过程中发挥重要作用。CD36属于B类清道夫受体（SR-B），是单核巨噬细胞吞噬Ox-LDL的主要受体。LPS激活丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）/细胞外信号调节激酶（ERK）途径，增加CD204和CD36的表达，从而增强小鼠骨髓巨噬细胞对乙酰化LDL（Ac-LDL）的摄取[13]。本研究中，LPS联合Ox-LDL作用后，RAW264.7细胞中CD36、CD204水平较正常对照组升高，而景虎通脉方含药血清组的CD36、CD204表达较模型组明显降低。因此，景虎通脉方可能通过抑制巨噬细胞CD36、CD204的表达，减少巨噬细胞对Ox-LDL的吞噬，从而抑制泡沫细胞的形成，减轻炎症反应，从而起到抗ATH的作用。

综上，中医药治疗心血管疾病疗效确切，但因其在治疗过程中具有多成分、多靶点、多环节的特性，这一途径可能只是景虎通脉方抗ATH作用机制的一部分，是否还存在其他的作用环节和保护机制值得我们进一步深入研究。

参考文献

[1] ZHOU P, XIE W J, LUO Y, et al.Inhibitory effects of ginsenoside Rb1 on early atherosclerosis in ApoE-/-mice via inhibition of apoptosis and enhancing autophagy[J]. Molecules, 2018, 23（11）: E2912.

[2] IKETANI M, SEKIMOTO K, IGARASHI T, et al.Administration of hydrogen-rich water prevents vascular aging of the aorta in LDL receptor-deficient mice[J].Sci Rep, 2018, 8（1）: 16822.

[3] WANG H, YANG Y, SUN X, et al.Sonodynamic therapy-induced foam cells apoptosis activates the phagocytic PPARγ-LXRα-ABCA1/ABCG1 pathway and promotes cholesterol efflux in advanced plaque[J].Theranostics, 2018, 8（18）: 4969.

[4] 谢健.赵淳诊治血瘀证经验浅谈[J].中医杂志，2002，43（3）：174.

[5] 詹文涛，吴生元，谢健，等.赵淳教授学术思想与临床经验总结[M]//詹文涛，吴生元，主编.云南师承名老中医学术经验荟萃.昆明：云南民族出版社，2004：358.

[6] 张磊，唐彬.赵淳教授防治动脉粥样硬化的学术经验[J].云南中医中药杂志，2011，32（4）：8.

[7] 谢健，童晓云，沈超，等.活血通脉颗粒对颈动脉粥样硬化家兔ICAM-1、IL-6表达的影响[J].中国中医急症，2015，24（3）：396.

[8] 谢健，沈超，童晓云，等.活血通脉颗粒对颈动脉粥样硬化兔TLR4信号通路及相关炎症因子mRNA表达的影响[J].中国中医药信息杂志，2016，23（3）：47.

[9] 谢健，魏丹，沈超，等.活血通脉颗粒对兔颈动脉粥样硬化干预作用的实验研究[J].中国中医急症，2016，25（12）：2249.

[10] TSUI P F, LIN C S, HO L J, et al.Spices and atherosclerosis[J].Nutrients, 2018, 10（11）: 1724.

[11] GISTERÅ A, HANSSON G K.The immunology of atherosclerosis[J].Nat Rev Nephrol, 2017, 13（6）: 368.

[12] QUE X C, HUNG M Y, YEANG C, et al.Oxidized phospholipids are proinflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice[J]. Nature, 2018, 558（7709）: 301.

[13] HASHIMOTO R, KAKIGI R, NAKAMURA K, et al. LPS enhances expression of CD204 through the MAPK/ERK pathway in murine bone marrow macrophages[J]. Atherosclerosis, 2017, 266 : 167.

第一作者：周敏（1990—），女，医学硕士，住院医师，研究方向为中医老年病的防治。

通讯作者：童晓云，博士，教授。1724840697@qq.com

收稿日期：2019-01-25

编辑：吴　宁