

· 药理 ·

艳山姜挥发油通过调控巨噬细胞 CD36 和 ABCA1 表达 抑制泡沫细胞的形成

甘诗泉, 王声全, 张光琼, 安红润, 付凌云, 肖潮达, 陈妍, 陶玲, 沈祥春*
(贵州医科大学药学院天然资源有效利用重点实验室, 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 观察艳山姜挥发油对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导巨噬细胞转化为泡沫细胞的抑制作用,并探索其机制。方法: 使用佛波酯(PMA, $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导人白血病单核细胞(THP-1)24 h 后形成巨噬细胞,实验分为 4 组,分别为空白组(无血清 RPMI 1640),模型组($80 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ox-LDL),艳山姜挥发油低剂量组($80 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ox-LDL + $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 艳山姜挥发油),艳山姜挥发油高剂量组($80 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ox-LDL + $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 艳山姜挥发油)。噻唑蓝(MTT)比色法检测艳山姜挥发油对巨噬细胞的活性的影响,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测巨噬细胞中白细胞分化抗原 36(CD36)和三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)的表达,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测巨噬细胞内胆固醇酯含量,油红 O 染色法检测巨噬细胞中脂质小滴的含量。结果: 艳山姜挥发油对巨噬细胞无毒性。与空白组比较,模型组的巨噬细胞内脂滴和胆固醇酯的含量显著增加($P < 0.01$),CD36 蛋白表达显著上升($P < 0.01$),ABCA1 蛋白表达无显著变化;与模型组比较,艳山姜挥发油显著抑制巨噬细胞中脂滴和胆固醇酯的含量($P < 0.01$),下调 CD36 的蛋白表达($P < 0.01$),上调 ABCA1 蛋白的表达($P < 0.01$),艳山姜挥发油可抑制巨噬细胞向泡沫细胞的转化。结论: 艳山姜挥发油对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞向泡沫细胞的形成具有抑制作用,该药理作用与艳山姜挥发油下调巨噬细胞 CD36 和上调 ABCA1 蛋白的表达有关。

[关键词] 艳山姜挥发油; 巨噬细胞; 泡沫细胞; THP-1 细胞; 白细胞分化抗原 36 (CD36); 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1); 动脉粥样硬化

[中图分类号] R2-0;R289;R285.5;R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0064-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20200438

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191106.1355.001.html>

[网络出版时间] 2019-11-07 09:28

Essential Oil from *Alpinia zerumbet* Rhizome Inhibits Macrophage-derived Foam Cell Formation Via Modulating Expression of CD36 and ABCA1

GAN Shi-quan, WANG Sheng-quan, ZHANG Guang-qiong, AN Hong-run, FU Ling-yun,
XIAO Chao-da, CHEN Yan, TAO Ling, SHEN Xiang-chun*

(Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To clarify the inhibitory effect of essential oil from *Alpinia zerumbet* rhizome (EOFAZ) on oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) -induced transformation of macrophage into foam cell and explore its possible mechanism. **Method:** THP-1 monocyte was incubated with $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ phorbol myristate acetate (PMA) to grow into macrophage, experiment was divided into 4 groups as follows, control group, model

[收稿日期] 20190620(015)

[基金项目] 国家自然科学基金喀斯特中心项目(U1812403-4-4);国家自然科学基金项目(81760725);贵州省科学技术基金2019年度基础研究计划项目(黔科合基础[2019]1279号);贵州省教育厅基础药理教育部重点实验室开放课题项目(黔教合KY字[2017]379);贵州医科大学博士启动基金(院博合J字[2017]24号)

[第一作者] 甘诗泉,博士,讲师,从事民族药和心血管药物药理研究,E-mail:503888243@qq.com

[通信作者] * 沈祥春,博士,教授,从事心血管系统药物药理、功能天然产物化学生物学研究,E-mail:shenxiangchun@126.com

group (80 mg·L⁻¹ ox-LDL), EOFAZ at low dose (80 mg·L⁻¹ ox-LDL + 4 μg·L⁻¹ EOFAZ) and EOFAZ at high dose (80 g·L⁻¹ ox-LDL + 20 μg·L⁻¹ EOFAZ). Mathye thiazolye telrazliurn (MTT) method was employed to examine the influence of EOFAZ on macrophage viability. Western blot was used to analyze the expression level of cluster of differentiation 36 (CD36) and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) protein in macrophage. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect cholesteryl ester contents in macrophage. Oil red O staining was applied to determine the accumulation of lipids in macrophage. **Result:** EOFAZ showed non-toxic effect on macrophage. Compared to control group, macrophage in model group displayed higher level of cholesteryl ester and lipid droplet ($P < 0.01$), as well as significant increasing of CD36 expression ($P < 0.01$), but no effect on ABCA1 expression. EOFAZ notably reduced the contents of lipids and cholesteryl ester ($P < 0.01$), down-regulated expression of CD36 and up-regulated expression of ABCA1 in macrophage in comparison with the model group ($P < 0.01$), indicating that EOFAZ inhibited transformation of macrophage into foam cell. **Conclusion:** EOFAZ could inhibit ox-LDL-induced transformation of macrophage into foam cell, the underlying mechanism may involves its ability to increase CD36 expression and decrease ABCA1 expression in macrophage.

[**Key words**] essential oil from *Alpinia zerumbet* rhizome; macrophage; foam cell; THP-1 monocyte; cluster of differentiation 36 (CD36); ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1); atherosclerosis

动脉粥样硬化是由血脂异常沉积于大、中动脉管壁形成纤维斑块或粥样斑块,导致动脉管壁增厚、管腔狭窄、弹性降低的一种动脉硬化性疾病。动脉粥样硬化与多种低密度脂蛋白和氧化低密度脂蛋白密切相关,是多种心脑血管疾病发生的病理基础,严重威胁人类的健康,成为严重的公共卫生事件^[1]。现有的降脂药治疗动脉粥样硬化作用单一,易导致肝功能损伤等不良反应。目前中药、民族药在治疗动脉粥样硬化的应用日益增加,从中药、民族药中开发新型药物并研究其作用机制对防治动脉粥样硬化有重要意义。

既往研究发现,动脉粥样硬化的早期内皮细胞受损,释放的血管内皮细胞黏附分子-1 (VCAM-1)与细胞间黏附因子-1 (ICAM-1),生长因子和单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)等诱使血液中的单核细胞穿过内膜屏障成为巨噬细胞聚集到动脉壁^[2]。巨噬细胞吞噬大量脂质分子后形成泡沫细胞,泡沫细胞的堆积是动脉粥样硬化早期的主要病理基础^[3],抑制巨噬细胞泡沫细胞化,是防治动脉粥样硬化的关键环节之一。白细胞分化抗原 36 (CD36)是分布在巨噬细胞膜的一类 B 类清道夫受体^[4]。氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL)等胆固醇经 CD36 摄取,在巨噬细胞内转变成胆固醇酯,当胆固醇酯含量超过 50%,巨噬细胞成为泡沫细胞^[5]。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1)也是膜转运蛋白,参与胆固醇的逆转运,介导巨噬细胞内游离胆固醇流出^[6]。CD36 和 ABCA1 共同控制巨噬细胞内胆固醇酯的含量,二者的蛋白水平决定泡沫细胞的形成程度^[7],

为新药干预动脉粥样硬化提供明确的靶点。

艳山姜挥发油是从贵州少数民族习用药—艳山姜果实中提取的挥发油成分。艳山姜最早见于清代吴其濬所著的《植物名实图考》,时称玉桃,味辛性温,具有温中燥湿、行气止痛的功效。本课题组聚焦艳山姜挥发油的心血管药理作用,证明其具有抗炎、镇痛、降脂、保护内皮损伤、抑制血管重塑等药理作用^[8-9]。艳山姜挥发油在治疗心血管疾病展现独到的优势,可作为抗动脉粥样硬化的药物进一步研究和开发。然而目前针对艳山姜挥发油防治动脉粥样硬化的研究仅限于血管内皮细胞和血管平滑肌细胞^[10],尚未涉及免疫系统中的单核-巨噬细胞系统。结合前期实验结果证明,艳山姜挥发油保护 ox-LDL 诱导的损伤^[10]。故本实验从胆固醇酯含量的角度,考察艳山姜挥发油对巨噬细胞内 2 个关键蛋白 CD36 和 ABCA1 的表达的影响,探讨艳山姜挥发油抑制巨噬细胞形成泡沫细胞,以期明确艳山姜挥发油抗动脉粥样硬化的机制,为艳山姜挥发油对动脉粥样硬化的治疗指明新的方向。

1 材料

1.1 细胞、药物及试剂 人白血病单核细胞 THP-1 购自上海中乔新舟生物科技有限公司,批号 ZQ-0086;氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL,广州奕源生物科技有限公司,批号 20190428);佛波酯 (PMA,上海懋康生物科技有限公司,批号 16561-29-8);CD36 兔多克隆抗体, β -肌动蛋白 (β -actin)小鼠单克隆抗体 (美国 Proteintech 公司,批号分别为 18836-1-AP,66009-1-Ig);ABCA1 兔多克隆抗体 (美国 Abcam 公司,

批号 ab18180); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔二抗 (南京巴傲得生物科技有限公司, 批号 BS13278); 人胆固醇酯酶免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (中国上海酶联生物科技有限公司, 批号 MI038414); 油红 O 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 20190312); RPMI 1640 完全培养基 (中国上海中乔新舟生物科技有限公司, 批号 ZQ-206); 噻唑蓝 (MTT) 粉末 (中国北京索莱宝科技有限公司, 批号 M8180)。

1.2 仪器 HF90 型二氧化碳培养箱 (上海力申科学仪器有限公司); JB-CJ-1FXS 型洁净工作台 (苏州佳宝净化工程设备有限公司); 3020-426 型多功能全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司); CFX 型蛋白电泳仪及凝胶成像系统, XDS-2B 型倒置显微镜 (日本尼康公司); Microfuge 20R 型离心机 (美国 Beckman 公司); Mini-trans-blot Module 转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 THP-1 细胞体外传代培养, 复苏后加入 RPMI 1640 完全培养基于 37 °C 5% CO₂ 的湿热培养箱中培养, 取对数生长期细胞用于实验。

2.2 艳山姜挥发油的提取和配制 艳山姜挥发油系自提, 艳山姜成熟果实采集自贵州省黔西南州贞丰县, 由贵州医科大学龙庆德副教授鉴定为正品, 经干燥和破碎后, 清水中浸泡 2 h, 经水蒸气蒸馏法提取。取艳山姜挥发油 50 μL (约为 44.5 mg) 于 10 mL 的离心管中, 溶于 4.4 mL 二甲基亚砜 (DMSO), 配成质量浓度为 $1 \times 10^7 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的艳山姜挥发油母液, 棕色离心管分装于 4 °C 冰箱中保存。

2.3 PMA 诱导巨噬细胞形成 接种一定量的细胞, 以终质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PMA 诱导 24 h, 细胞由悬浮状态转为贴壁状态, 巨噬细胞形态上呈梭形、椭圆形或伸出伪足, 胞体增大, 表明 THP-1 细胞已转化为巨噬细胞。处理细胞前用无血清的 RPMI 1640 培养基培养 24 h 使细胞同步化。

2.4 分组 根据本实验室前期结果^[10], 艳山姜挥发油在 $1 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下对巨噬细胞无毒性, 且处理巨噬细胞时有效质量浓度范围在 $1 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[10]。将实验分为 4 组, 其中空白组 (无血清 RPMI 1640), 模型组 ($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL), 艳山姜挥发油低浓度组 ($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL + $4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EOF AZ), 艳山姜挥发油高浓度组 ($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ox-LDL + $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EOF AZ)。各组处理时间均为 24 h, 考察艳山姜挥发油对 ox-LDL 诱导泡沫细胞形

成的影响。

2.5 MTT 比色法检测细胞存活率 取对数生长期的 THP-1 细胞接种于 96 孔板中, 诱导并同步化, 使用不同浓度 EOF AZ 孵育 THP-1 细胞 24 h。采用 MTT 比色法用多功能全波长酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔吸光度 A, 根据以下公式计算细胞的存活率。细胞存活率 = A 实验组 / A 空白组 × 100%。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 CD36 和 ABCA1 蛋白表达 取对数生长期的 THP-1 细胞, 以 1.5×10^6 个/孔接种于 6 孔板, PMA 诱导并同步化。给药处理后, 以适当裂解液裂解细胞, 经 4 °C, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后收集上清液, 以 BCA 法测定蛋白浓度, 然后进行 SDS-PAGE 电泳, 每孔加总蛋白 20 μg, SDS-PAGE 胶浓度为 6% 或 8%, 电泳完成后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 5% BSA 室温封闭 90 min, 加入一抗孵育液 (CD36 1:1 500 稀释, ABCA1 1:500 稀释, β-actin 1:1 000 稀释), 室温孵育 30 min, 4 °C 过夜孵育, 次日室温继续孵育 30 min。用含 0.5% 聚山梨酶-20 的 TBST 洗膜 15 min, 重复洗 3 次后用二抗 (1:1 万) 孵育 90 min。洗膜 3 次后以 ECL 化学发光法进行显色, 凝胶成像系统成像, 以 Image-Lab 软件对蛋白条带灰度值进行统计和分析。

2.7 ELISA 检测胆固醇酯含量 操作按人胆固醇酯 ELISA 试剂盒说明书进行, 基本原理为双抗体夹心法, 形成的抗体-胆固醇酯-酶标抗体复合物经底物 TMB 显色, 在 450 nm 处测定吸光度 A, 根据制备的标准曲线计算胆固醇酯的实际含量。

2.8 油红 O 染色法检测细胞内脂肪颗粒 取对数生长期的 THP-1 细胞, 以 3×10^5 个/孔接种于 24 孔板, 以 PMA 诱导并同步化, 给药处理后, 按油红 O 试剂盒说明书操作进行油红 O 染色, 用倒置显微镜进行拍照, Image J 软件进行定量分析。

2.9 统计学方法 使用 Graph Pad Prism 软件内置的统计学分析工具, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对巨噬细胞存活率的影响 使用不同浓度的艳山姜挥发油处理经 THP-1 细胞诱导形成的巨噬细胞, 比较各浓度下艳山姜挥发油对巨噬细胞存活率的影响。与空白组比较, 艳山姜挥发油质量浓度在 $4, 20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, THP-1 源性巨噬细胞的存活率略有降低, 与空白组比较无明显差异, 说明艳山姜挥发

油在 $4 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对巨噬细胞无毒性。见表 1。故选择 $4, 20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别作为艳山姜挥发油的低、高剂量浓度用于后续实验。

表 1 不同浓度的艳山姜挥发油对巨噬细胞存活率的影响

Table 1 Effect of essential oil from *Alpinia zerumbet* rhizome (EOFAZ) at different concentration on macrophage survival rate

组别	质量浓度 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A	存活率 ($\bar{x} \pm s, n=3$) /%
空白	-	0.372	100
艳山姜挥发油	4	0.366	98.34 ± 3.01
	20	0.364	97.64 ± 2.14

3.2 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞胆固醇酯含量的影响 与空白组比较, $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ox-LDL 诱导后, 巨噬细胞内胆固醇酯的含量显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 艳山姜挥发油显著减少巨噬细胞内的胆固醇酯含量, 且随着艳山姜挥发油浓度的增加, 该抑制趋势更加明显 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 艳山姜挥发油对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞内胆固醇酯含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

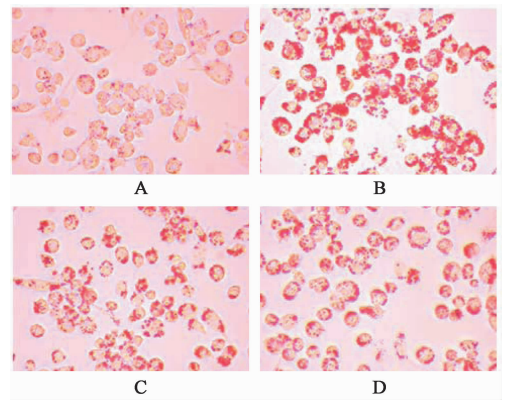
Table 2 Effect of EOFAZ on ox-LDL-induced cholesteryl ester content in macrophage ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	胆固醇酯 $/\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$
空白	-	1.028 ± 0.032
模型	-	$1.166 \pm 0.013^{1)}$
艳山姜挥发油	4	$0.903 \pm 0.023^{2)}$
	20	$0.759 \pm 0.030^{2)}$

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

3.3 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞脂滴的影响 巨噬细胞系自 THP-1 单核细胞经 PMA 孵育后而成, 巨噬细胞用 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ox-LDL 处理 24 h 后, 油红 O 染色后可见巨噬细胞内出现红色的圆形颗粒状脂滴。与空白组比较, 模型组的 ox-LDL 明显增加巨噬细胞内脂滴的数量和体积, 艳山姜挥发油干预后, 细胞内的脂滴数量和体积呈现下降的趋势。艳山姜挥发油显著抑制了 ox-LDL 诱导的巨噬细胞脂质蓄积 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 3。

3.4 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞 CD36 和 ABCA1 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组的 CD36 蛋白水平显著上升 ($P < 0.01$), ABCA1 蛋白的表达上调, 但无明显差异。与模型组比较, 艳山姜挥发油



A. 空白组; B. 模型组; C. 艳山姜挥发油低剂量组; D. 艳山姜挥发油高剂量组 (图 2 同)

图 1 艳山姜挥发油对巨噬细胞内脂滴蓄积的影响 (油红 O 染色, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of EOFAZ on lipid droplet accumulation in macrophage (oil red O staining, $\times 400$)

表 3 艳山姜挥发油对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞中脂滴面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of EOFAZ on ox-LDL-induced lipid droplet area in macrophage ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	脂滴相对面积/%
空白	-	0.326 ± 0.023
模型	-	$1.817 \pm 0.126^{1)}$
艳山姜挥发油	4	$0.770 \pm 0.090^{2)}$
	20	$0.542 \pm 0.128^{2)}$

低、高剂量组中 CD36 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 且随着艳山姜挥发油浓度的上升, CD36 蛋白的表达量相应减少。经艳山姜挥发油干预后, 与模型组比较, 巨噬细胞内 ABCA1 蛋白水平显著减少 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

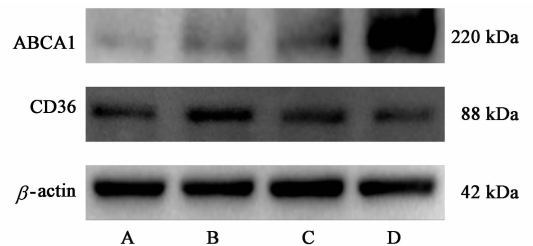


图 2 ox-LDL 诱导的巨噬细胞 CD36 和 ABCA1 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of ox-LDL-induced CD36 and ABCA1 protein expression in macrophage

4 讨论

动脉粥样硬化发病机制复杂, 包括脂质代谢异常、细胞外基质的过度沉积、血管钙化等多个过程。

表 4 艳山姜挥发油对巨噬细胞中 CD36 和 ABCA1 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of EOFAZ on CD36 and ABCA1 protein expression in macrophage($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	CD36 / β -actin	ABCA1 / β -actin
模型	-	1.317 \pm 0.047 ¹⁾	1.087 \pm 0.078
艳山姜挥发油	4	0.542 \pm 0.140 ²⁾	1.411 \pm 0.080 ²⁾
	20	0.428 \pm 0.064 ²⁾	2.555 \pm 0.115 ²⁾

注:设空白组各蛋白表达量均为 1。

多种细胞参与了动脉粥样硬化的病理过程,其中免疫细胞扮演关键角色。动脉粥样硬化的起始阶段,血管壁的内皮细胞受损后,分泌黏附分子,募集血液中的单核细胞,单核细胞渗出后即成为巨噬细胞,巨噬细胞吞噬大量的脂质,成为泡沫细胞。泡沫细胞促使动脉内膜的脂质条纹和纤维斑块的形成,是治疗动脉粥样硬化的关键靶标^[11]。

动脉粥样硬化早期的泡沫细胞的形成,关键在于巨噬细胞摄取和吸收以 ox-LDL 为代表的胆固醇。胆固醇在巨噬细胞内转化为胆固醇酯,当胆固醇酯的含量超过 50%,巨噬细胞将转化为泡沫细胞。ox-LDL 系 LDL 经巨噬细胞、内皮细胞和平滑肌细胞等氧化而来,不能为 LDL 受体识别,在巨噬细胞中有一套独特的摄取和转运步骤。巨噬细胞表面的 CD36 受体,是清道夫受体家族的成员,识别并摄取 ox-LDL。多项研究显示,泡沫细胞和动脉粥样硬化的斑块中 CD36 高表达^[12],因此 ox-LDL 诱导的 CD36 蛋白水平上调是巨噬细胞向泡沫细胞转化的关键信号。此外,胆固醇在巨噬细胞中可被逆转运出胞外,ABCA1 属于三磷酸腺苷结合盒转运体(ABC)家族,是执行此功能的重要蛋白,通过消耗细胞内的 ATP,促进细胞内胆固醇的流出,负责维持细胞内胆固醇和磷脂分子平衡^[13]。因此抑制巨噬细胞表面 CD36 蛋白的过度表达,减少巨噬细胞胆固醇的摄入;同时上调膜蛋白 ABCA1 的表达,增加胆固醇的流出,是控制巨噬细胞脂质摄入和早期干预动脉粥样硬化的有效手段,而巨噬细胞中胆固醇酯的含量,侧面反映了胆固醇的蓄积和泡沫细胞的形成情况,油红 O 染色实验,则可衡量巨噬细胞中脂质小滴的数量和体积。

目前治疗动脉粥样硬化缺乏特效药,临床上使用的他汀类主要用于降脂治疗,存在胃肠道反应、肝功能生化异常、骨骼肌溶解症等不良反应,接受他汀类药物治疗的患者还易出现冠状动脉疾病^[14]。迫

切需要副作用小、疗效确切、安全廉价的新型药物。艳山姜系贵州省少数民族地区特有的习用药物,是姜科山姜属植物艳山姜的干燥成熟果实。国外对艳山姜的研究止于使用艳山姜的根和叶,贵州民间传统以艳山姜的根茎和果实入药。本实验室创新性地对艳山姜的果实提取挥发油,系统地研究了其抗动脉粥样硬化作用。前期研究表明,艳山姜挥发油减少高糖和炎症诱导的血管内皮细胞的损伤,减少小鼠胸主动脉的炎性细胞浸润^[15-16],证明艳山姜挥发油作为抗动脉粥样硬化的药物的应用前景。然而,艳山姜挥发油的药理作用研究尚未涉及在动脉粥样硬化病理过程中起主要作用的单核/巨噬细胞向泡沫细胞的转化,本研究旨在观察其对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞向泡沫细胞转化的抑制作用,并进一步探讨具体的作用机制。研究结果表明,艳山姜挥发油的干预,明显减少泡沫细胞的形成,表现为巨噬细胞内的胆固醇酯含量和脂滴数量下降;同时减少巨噬细胞膜表面的 CD36 和上调 ABCA1 蛋白表达,调控细胞内胆固醇摄入和转运机制。

综上所述,本研究证明艳山姜挥发油通过抑制 CD36 蛋白表达和促进 ABCA1 蛋白表达,减少了 THP-1 源性巨噬细胞内的胆固醇酯的蓄积和脂滴的含量,从而抑制巨噬细胞向泡沫细胞的转化。泡沫细胞的来源不止于巨噬细胞,在动脉粥样硬化的中后期病变,血管的平滑肌细胞也可以转化为泡沫细胞,今后的研究将聚焦艳山姜挥发油对平滑肌源性的泡沫细胞形成的影响,以期取得更为深入的研究成果。总之,以上结果为今后深入研究艳山姜挥发油对动脉粥样硬化的防治作用,阐明其抗动脉粥样硬化的药理作用提供新的理论基础和实验证据。

[参考文献]

[1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.

[2] YANG W, LI Y, WANG J, et al. Circulating levels of adipose tissue-derived inflammatory factors in elderly diabetes patients with carotid atherosclerosis: a retrospective study [J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1): 75.

[3] Miteva K, Madonna R, De Caterina R, et al. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis [J]. Vasc Pharmacol, 2018, 107: 67-77.

[4] Naoto K. Mechanism of development of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes mellitus [J]. J

- Atheroscler Thromb, 2018, 25(1):27-39.
- [5] Kotla S, Singh N K, RAO G N. ROS via BTK-p300-STAT1-PPAR γ signaling activation mediates cholesterol crystals-induced CD36 expression and foam cell formation[J]. Redox Biol, 2017, 11: 350-364.
- [6] Dergunov A D, Savushkin E V, Dergunova L V, et al. Significance of cholesterol-binding motifs in ABCA1, ABCG1, and SR-B1 Structure[J]. J Membr Biol, 2018, 252(1):1-20.
- [7] Rubic T, Lorenz R L. Downregulated CD36 and ox-LDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10 [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(2):527.
- [8] HUANG N, XU Y, ZHOU H, et al. Essential oil from fructus alpiniae zerumbet protects human umbilical vein endothelial cells *in vitro* from injury induced by high glucose levels by suppressing nuclear transcription factor-kappa B signaling[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 4760-4767.
- [9] CHEN Y, LI D, XU Y, et al. Essential oils from fructus A. Zerumbet protect human aortic endothelial cells from apoptosis induced by Ox-LDL *in vitro* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014(8):956824.
- [10] 徐旖旎, 杨红, 李晨, 等. 基于 NOS 信号的艳山姜挥发油对 ox-LDL 诱导 HAECs 损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15):143-147.
- [11] 谢霆, 刘成珪, 陈新忠, 等. 脂肪因子 chemerin 促进巨噬泡沫细胞形成 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2012, 41(1):27-31.
- [12] Rahaman S O, Lennon D J, Febbraio M, et al. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation [J]. Cell Metab, 2006, 4(3):211-221.
- [13] TANG C, LIU Y, Kessler P S, et al. The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor[J]. J Bio Chem, 2009, 284(47):32336-32343.
- [14] Mach F, Ray K K, Wiklund O. Adverse effects of statin therapy: perception vs. the evidence-focus on glucose homeostasis, cognitive, renal and hepatic function, haemorrhagic stroke and cataract [J]. Eur Heart J, 2018, 39(27):2526-2539.
- [15] 张彦燕, 赵爽, 付凌云, 等. 艳山姜挥发油对 TGF- β 1 诱导内皮细胞氧化应激损伤的保护作用研究 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2018, 44(6):556-560.
- [16] 付凌云, 杨红, 林丹, 等. EOFAZ 抑制 TNF- α 诱导的血管新生和炎症损伤 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(11):1594-1599.

[责任编辑 孙丛丛]