

[文章编号] 1007-3949(2007)15-07-0481-03

•实验研究•

## 脂欣康胶囊对血管平滑肌细胞源性泡沫细胞 CD36 表达的影响

朱莹, 张文高, 郑广娟, 姜浩

(山东中医药大学, 山东省济南市 250014)

[关键词] 内科学; 脂欣康胶囊; 血管平滑肌细胞源性泡沫细胞; CD36; 流式细胞仪; 原位杂交

[摘要] 目的 探讨脂欣康胶囊对动脉粥样硬化泡沫化细胞形成的可能调控机制, 观察脂欣康胶囊及洛伐他汀干预大鼠血管平滑肌细胞源性泡沫细胞 CD36 mRNA 表达的变化。方法 用组织贴块培养法培养血管平滑肌细胞, 以氧化型低密度脂蛋白使其泡沫化, 并以脂欣康胶囊和洛伐他汀分别干预。采用流式细胞仪和原位杂交技术观察 CD36 mRNA 表达的变化。结果 与生理盐水组和空白对照组相比, 脂欣康胶囊与洛伐他汀均能降低 CD36 mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ), 且脂欣康组较洛伐他汀组下降更显著 ( $P < 0.05$ )。结论 脂欣康与洛伐他汀均能抑制 CD36 的表达, 并且其作用优于洛伐他汀。其作用机制可能为脂欣康的益气活血、解毒化浊之功使平滑肌细胞内蕴藏的痰浊瘀毒得以疏布排泄于外。这可能是其抑制血管平滑肌细胞增殖和泡沫化细胞形成的机制之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The Effect of Zhixinkang Capsule on the Expression of CD36 in Foam Cell Originated From Vascular Smooth Muscle Cell in Rats

ZHU Ying, ZHANG Wen-Gao, ZHENG Guang-Juan, and JIANG Hao

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

[KEY WORDS] Zhixinkang Capsule; Foam Cell Originated From Vascular Smooth Muscle Cell; CD36; Flow Cytometer; In Situ Hybridization

[ABSTRACT] **Aim** To approach Zhixinkang possible regulation mechanism for atherosclerosis (As) foam cell, and to investigate the effect of Zhixinkang and Lovastatin on CD36 mRNA in foam cell originated from vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods** The cultured VSMC were loaded with oxidize low density lipoprotein (ox-LDL) and interfered in Zhixinkang and Lovastatin. The expression of CD36 mRNA were detected with flow cytometer and In Situ hybridization and analyzed with statistics. **Results** Zhixinkang and Lovastatin could decrease CD36 mRNA expression than that in the isotonic Na chloride group and the blank group. Moreover, CD36 mRNA expression in Zhixinkang group was different from that in Lovastatin group. **Conclusion** Zhixinkang could decrease CD36 mRNA expression, which was superior to Lovastatin. Zhixinkang had the effect of tonifying qi and promoting blood, neutralizing poison and resolving turbid in VSMC, which was one of mechanism to inhibit the multiplication of VSMC and restrain the formation of foam cell.

CD36 作为一种清道夫受体, 既参与脂质代谢, 也在带负电荷的生物大分子粘附中发挥作用。它在单核巨噬细胞、平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 以及脂肪细胞中高度表达, 对氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 具有高亲和力, ox-LDL 通过过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ )-CD36 途径被单核巨噬细胞和 SMC 摄取并转化为泡沫细胞, 后者促进动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的形成。对 CD36 的调控可能是巨噬细胞和 SMC 泡沫化和 As 形成的关键因素。研究证实脂欣康具有益气活血降浊之功效, 对 As 临床及实验

干预效果肯定, 本研究在此基础上, 结合最新 As 研究进展, 应用流式细胞仪和原位杂交技术观察脂欣康及洛伐他汀干预大鼠血管 SMC 泡沫化过程中 CD36 mRNA 的表达, 从分子细胞水平探讨脂欣康干预大鼠血管 SMC 源性泡沫化细胞形成的可能调控机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

2 只体重 150 g 左右雌性 SD 大鼠和 12 只体重 200 g 左右雄性 SD 大鼠由本校动物中心提供。

### 1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基 (美国 GIBCO), 胎牛血清 (杭州四季青), PBS (北京鼎国), 0.25% 胰酶 (北京索莱宝),  $\alpha$ -SM-action (鼠抗  $\alpha$  肌动蛋白) (武汉博士德),

[收稿日期] 2007-06-02 [修回日期] 2007-07-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30472275)

[作者简介] 朱莹, 博士, E-mail 为 debora407@163.com。通讯作者 张文高, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 zhangwengao@263.net。

FITC 标记羊抗兔 IgG (北京中杉), ox-LDL (北京协和), 脂欣康胶囊 (济南孟氏生物科技研究所有限公司) 含药血清, 洛伐他汀 (北京万生) 含药血清, FITC-anti-CD36 单抗 (美国 eBioscience), CD36 原位杂交检测试剂盒 (武汉博士德)。

### 1.3 主要仪器

气体培养箱 (贺利氏 BB5060), 无菌操作台 (苏州佳宝净化工程设备有限公司), 恒温杂交箱 (美国 PE), 倒置相差显微镜 (日本 OLYMOUS), 流式细胞分析仪 (美国贝克曼库尔特有限公司, EPICS XL-ADC)。

### 1.4 含药血清的制备

参照杨奎等<sup>[1,2]</sup>方法, 将体重 200 g 左右 SD 大鼠 12 只, 分为三组, 每只大鼠按照成人用药量 7.5 倍给药灌胃。脂欣康组给予脂欣康 0.06 g/d, 洛伐他汀组给予洛伐他汀 0.5 mg/d, 生理盐水组给予生理盐水 3 mL/d, 灌胃 5 天后, 末次灌胃 1 h 后取血制备含药血清。

### 1.5 平滑肌细胞的培养及鉴定

参照文献[3, 4]的方法, 取体重 150 g 左右 SD 大鼠胸主动脉, 剥离外膜, 置于 PBS 中洗净血迹。取中膜 (平滑肌层), 剪成 1 mm × 1 mm 左右小块, 移植于培养瓶中, 4 h 后加培养基。4 天左右换液, 7 天左右细胞爬出, 约两周, 瓶底覆盖约 80% 细胞时传代, 以后根据生长情况, 4~10 天传代一次, 取 3~5 代性状稳定细胞, 应用免疫荧光进行  $\alpha$ -SM-action 鉴定, 纯度 > 98%, 细胞可用于试验。

### 1.6 平滑肌细胞泡沫化及药物干预

取 3~5 代性状稳定的血管 SMC, 消化后植于 24 孔培养板中培养 48 h, 每孔中加入 20  $\mu$ L ox-LDL, 同时分别加入脂欣康、洛伐他汀和生理盐水含药血清, 并设不加含药血清的空白对照组, 每组做 3 个复孔。

### 1.7 流式细胞术检测 CD36 抗原的表达

各组细胞经上述处理, 分别培养 24、48、72 h 后, 消化细胞, 收集  $1 \times 10^6$  个细胞用 PBS 清洗, 加入 FITC-anti-CD36 单抗 20  $\mu$ L, 避光 4  $^{\circ}$ C 放置 30 min。加 1 mL PBS 1 000 r/min 离心 5 min 去上清, 加 1 mL PBS 溶解的 10% 多聚甲醛固定, 滤网过滤后, 用流式细胞仪检测荧光值, 每管计数 10 000 个细胞, 每管重复 3 次。

### 1.8 原位杂交检测 CD36 mRNA 表达

各组分别按上述药物干预 24、48、72 h 后, 按照试剂盒说明书要求进行检测。以倒置相差显微镜观察后, 用 AO 万能研究显微镜拍照; 用 OPTIMAS (MEDIA CYBER NETICS) 图像分析仪 (美国) 和 OLYMPUS

显微镜采集图像, 计数阳性细胞数。

## 1.9 统计学方法

采用软件系统 SPSS13.0 进行统计, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 流式细胞仪检测 CD36 抗原表达

氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 作用 24 h 后, SMC 泡沫化, CD36 浓度开始升高, 药物干预 48、72 h 时, 脂欣康组和洛伐他汀组 CD36 浓度比空白对照组和生理盐水组均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且脂欣康组比洛伐他汀组下降更显著 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

表 1. 流式细胞术检测各组 CD36 抗原表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

时间	空白对照组	生理盐水组	脂欣康组	洛伐他汀组
0 h	35.34 $\pm$ 3.65	37.68 $\pm$ 0.24	34.39 $\pm$ 2.37	32.13 $\pm$ 3.21
24 h	53.75 $\pm$ 0.68	59.25 $\pm$ 1.35	49.24 $\pm$ 1.58	51.31 $\pm$ 2.34
48 h	62.35 $\pm$ 3.25	65.73 $\pm$ 0.74	42.53 $\pm$ 2.73 <sup>ab</sup>	45.82 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>
72 h	75.24 $\pm$ 0.76	78.63 $\pm$ 3.14	35.25 $\pm$ 2.42 <sup>ab</sup>	38.36 $\pm$ 1.47 <sup>a</sup>

为  $P < 0.01$ , 与空白对照组和生理盐水组比; b 为  $P < 0.05$ , 与洛伐他汀组比。

### 2.2 原位杂交检测 CD36 mRNA 表达

培养的 SMC 泡沫化 24 h 后, SMC 中 CD36 浓度开始升高, 进行药物干预 48 h、72 h 时, 脂欣康组和洛伐他汀组 CD36 mRNA 比空白对照组和生理盐水组均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且脂欣康组比洛伐他汀组降低更显著 ( $P < 0.01$ , 表 2)。

表 2. 原位杂交检测 CD36 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\times 10^{-2}$  个/像素)

分 组	样本数	视野数	48 h	72 h
空白对照组	4	30	2.78 $\pm$ 0.36	3.92 $\pm$ 0.41
生理盐水组	4	30	2.59 $\pm$ 0.40	3.87 $\pm$ 0.63
脂欣康组	4	30	1.32 $\pm$ 0.34 <sup>ab</sup>	1.16 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>
洛伐他汀组	4	30	1.53 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	1.37 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组和生理盐水组比; b 为  $P < 0.05$ , 与洛伐他汀组比。

## 3 讨论

近年来, CD36 在 ox-LDL 的摄取和 As 发生发展中的作用日益引起重视。Endemann 等<sup>[5]</sup>发现小鼠巨噬细胞中的 CD36 可与 ox-LDL 结合而不与乙酰 LDL 结合, 提出 CD36 可能是潜在的 ox-LDL 受体。随后发现, CD36 与 iv 型 B 类清道夫受体 (scavenger receptor class B type iv, SR-B iv) 有 30% 的同源性, 属

于 B 族清道夫受体。SR-B iv 已被证明是体内有功能的高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 受体, 虽然 CD36 对 HDL 也有配基结合活性, 但 SR-B iv 对 HDL 和胆固醇酯摄入的能力要比 CD36 强得多<sup>[6]</sup>。对 CD36 基因缺失小鼠进行研究发现, 其腹膜巨噬细胞对 ox-LDL 的结合和摄取能力与对照组比显著降低<sup>[7]</sup>。此外, 他们用高脂肪的食物建立鼠动脉粥样硬化模型, 证明 CD36 和载脂蛋白 E 基因双敲除小鼠动脉损伤比正常小鼠约减少 70%<sup>[7]</sup>。进一步证实 CD36 是 ox-LDL 的受体, 并且与细胞内胆固醇堆积直接相关。培养的单核细胞在向巨噬细胞分化的早期即出现 CD36 mRNA 明显升高, 在培养的第 3~4 天达到高峰, 至第 7~8 天逐渐下降到原来的水平。用巨噬细胞集落刺激因子处理分化的巨噬细胞可引起 CD36 抗原表达持续升高, 并能显著促进泡沫细胞形成。以上作用能被抗 CD36 抗体所阻断, 说明 CD36 抗原与单核细胞向巨噬细胞分化及单核细胞泡沫化有关<sup>[8]</sup>。本研究证明 CD36 与 SMC 的泡沫化亦密切相关, 从而进一步为 CD36 作为 As 治疗的潜在靶点提供依据。

CD36 抗原广泛存在于单核细胞、血小板、内皮细胞、SMC 和脂肪细胞。CD36 和三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (adenosine triphosphate binding cassette transporter A1, ABCA1) 都是核受体 PPAR $\gamma$  转录调控的下游靶基因。PPAR $\gamma$  活化后可从转录水平调节下游靶基因 CD36、ABCA1 及炎症因子肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  的表达, 阻断 ox-LDL-PPAR $\gamma$ -CD36 信号通路, 放大 ox-LDL-PPAR $\gamma$ -ABCA1 信号通路, 拮抗 ox-LDL 摄入, 增加胞内胆固醇的排出, 减少脂质积聚, 抑制泡沫化细胞的形成, 从而起到抗 As 的作用。

他汀类药物是 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 能够抑制清道夫受体的表达, 影响 As 斑块的形成。该类药物最重要的作用是抑制肝脏胆固醇的合成, 同时还能发挥其他多种效应而降低胆固醇水平。他汀类药物可抑制 PPAR $\gamma$  激动剂和 ox-LDL 诱导的 CD36 mRNA 和蛋白质表达的上调, 影响 ox-LDL 的结合和摄取, 但并不影响 CD36 mRNA 的半衰期, 表明其作用是通过抑制 CD36 的转录来下调其表达的<sup>[9,10]</sup>。此外, 他汀类药物可以增加 P44/42 丝裂原活化蛋白激酶的活性, 使得 PPAR $\gamma$  磷酸化增加。磷酸化的 PPAR $\gamma$  可抑制 PPAR $\gamma$  依赖的 CD36 的转录激活<sup>[11]</sup>。

脂欣康胶囊以人参、银杏叶、三七、绿茶提取物和牛磺酸为组方, 临床研究表明<sup>[12]</sup>, 脂欣康胶囊具有降脂、降低 As 指数、抗心肌缺血、保护血管内皮、抑制血小板活化和抗脂质过氧化等作用。前期实验研究表明, 脂欣康胶囊有对抗载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 As 斑块形成和稳定斑块的作用, 对该小鼠主动脉内膜超微结构有良好的修复和保护作用<sup>[13]</sup>。并且, 可降低血管 SMC 内的 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 浓度, 降低血管 SMC 内的钙负荷, 减轻 ox-LDL 对 SMC 的泡沫化程度<sup>[14]</sup>。本研究结果表明脂欣康与洛伐他汀一样能抑制 CD36 的表达, 并且其作用优于洛伐他汀, 这可能是其影响泡沫细胞形成的又一重要机制。

#### [参考文献]

- [1] 杨奎, 王宁生, 雷燕, 刘平. 关于血清药理学的若干思考[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 5 (19): 263-266.
- [2] 徐海波, 李彩君. 中药学清药理学方法探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5 (8): 13-16.
- [3] 徐正云, 任国珍, 马爱群. 大鼠胸主动脉平滑肌细胞的培养与鉴定[J]. 岭南心血管病杂志, 2005, 11 (3): 202-204.
- [4] 周晓莉, 雷寒, 柳青. 血管平滑肌细胞的培养及鉴定[J]. 重庆医学, 2005, 34 (6): 877-878.
- [5] Endem ann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (16): 11 811-816.
- [6] Connellym A, Klein SM, Azhar S, Abumrad NA, Williams DL. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptorBI (SR-B iv), shows that both receptors mediate high density lipoprotein cholesterol ester selective uptake but SR-B iv exhibits a unique enhancement of cholesterol ester uptake [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (1): 41-47.
- [7] Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108 (6): 785-791.
- [8] Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, Silverstein RL. Regulated expression of CD36 during monocyte to macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation [J]. *Blood*, 1996, 87: 2 020-028.
- [9] Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 717-726.
- [10] Grip O, Janciauskiene S, Lindgren S. Atorvastatin activates PPAR $\gamma$  and attenuates the inflammatory response in human monocytes [J]. *Inflamm Res*, 2002, 51: 58-62.
- [11] Fuhman B, Koren L, Volkova N, Keidar S, Hayek T, Aviram M. Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients suppresses cellular uptake of oxidized LDL by differentiating monocytes [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 164: 179-185.
- [12] Zhang WC, Yan TX, Gao FJ. Study on effect of zhixinkang capsule in treating unstable effort angina and hyperlipidemia and its function in vascular endothelium protection [J]. *Chin J Integ Med*, 2003, 9 (1): 25-30.
- [13] 张文高, 郑广娟. 脂欣康胶囊抗载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化形成作用[J]. 生物医学工程研究, 2003, 22 (3): 54-56.
- [14] 朱莹, 张文高, 郑广娟, 姜浩. 脂欣康胶囊对血管平滑肌细胞源性泡沫细胞钙离子浓度的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5 (2): 123-124.

(此文编辑 许雪梅)