

[文章编号] 1007-3949(2009)17-04-0269-04

• 实验研究 •

槟榔碱抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的小鼠巨噬细胞炎症因子表达及其机制

张伟, 周寿红, 凌红艳, 姚起鑫, 亓竹青, 王光, 胡弼

(南华大学生理学研究室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 槟榔碱; 巨噬细胞; 炎症因子; 过氧化体增殖物激活型受体

[摘要] 目的 观察槟榔碱对氧化型低密度脂蛋白诱导的小鼠巨噬细胞炎症因子表达的影响,并探讨其作用机制。方法 不同浓度槟榔碱(10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 和 10^{-3} mol/L)处理细胞 24 h,台盼兰拒染法观察细胞活力;氧化型低密度脂蛋白诱导小鼠巨噬细胞,同时给予槟榔碱处理,采用逆转录聚合酶链反应检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 和细胞间黏附分子 1 mRNA 的表达以及过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达。结果 槟榔碱处理细胞 24 h 后, 10^{-3} mol/L 组细胞活力下降($P < 0.01$),而 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 组对细胞活力无明显影响; 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 槟榔碱分别处理细胞 24 h 后,对肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 和细胞间黏附分子 1 mRNA 的表达无明显影响; 10^{-6} mol/L 槟榔碱与氧化型低密度脂蛋白共同处理细胞 24 h 后,细胞肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 和细胞间黏附分子 1 mRNA 的表达无显著改变,而 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 槟榔碱明显抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的小鼠巨噬细胞肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 和细胞间黏附分子 1 mRNA 的表达,且 10^{-5} mol/L 槟榔碱使氧化型低密度脂蛋白诱导的细胞内过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达增加($P < 0.01$)。结论 槟榔碱抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞炎症因子表达,其作用机理可能是通过过氧化体增殖物激活型受体 γ 起作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Arecoline Repressed Inflammation Factor Expression of Macrophages Stimulated by Oxidized Low Density Lipoprotein and Its Mechanism

ZHANG Wei, ZHOU Shou-Hong, LING Hong-Yan, YAO Qi-Xin, QI Zhu-Qing, WANG Guang, and HU Bi

(Department of Physiology, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Arecoline, Macrophages, Inflammation Factor, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of arecoline on inflammation factors expression of RAW 264.7 murine macrophages and the relation with PPAR γ . RAW 264.7 murine macrophages were co-incubated with 75 mg/L oxidized low density lipoprotein and arecoline respectively for 24 h. **Methods** Reverse transcription-PCR was performed to determine the level of the inflammation factor and PPAR γ mRNA expression. **Results** The cell viability was decreased when culture with the arecoline 10^{-3} mol/L, but not in the group of arecoline 10^{-6} mol/L, 10^{-5} mol/L and 10^{-4} mol/L.

The inflammation factor expression in macrophages has no significant difference among control group, 10^{-6} mol/L, 10^{-5} mol/L and 10^{-4} mol/L arecoline groups. The mRNA levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and intercellular adhesion molecules-1 (ICAM-1) was no significant changes when the macrophages was co-incubated with 75 mg/L ox-LDL and 10^{-6} mol/L arecoline, but they were all decreased in ox-LDL 75 mg/L + 10^{-4} mol/L arecoline group and ox-LDL 75 mg/L + 10^{-5} mol/L arecoline group while the expression of PPAR γ mRNA was increased in ox-LDL 75 mg/L + 10^{-5} mol/L arecoline group. **Conclusion** These results suggest that arecoline could inhibit inflammation factor expression of macrophages, which may be related to up-regulation of PPAR γ .

槟榔碱是从天然植物中提取的生物碱。研究发现,槟榔碱能抑制成人牙龈纤维细胞生长、黏附、基质蛋白合成^[1,2];槟榔碱能抑制牙周症患者成骨细胞内碱性磷酸酶基因的表达,提高核因子 κ B基

因的表达^[3]。近年来,有文献报道槟榔碱能抑制氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)或高糖致血管内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)的基因表达^[4-6];槟榔碱能抑制口腔角质细胞内白细胞介素(IL)和肿瘤坏死因子(TNF)的表达^[7];槟榔碱能抑制人多形核白细胞内活性氧的产生以及髓过氧化物酶的释放^[8];槟榔碱能抑制高脂诱导的大鼠血管组织中黏附分子和趋化因子的表达,促进一氧化氮的合成与释放,可能具有一定的抗动脉粥样硬化作用^[6]。然而,槟榔碱对巨噬细胞炎

[收稿日期] 2009-02-08 [修回日期] 2009-04-04

[基金项目] 湖南省科技厅项目(2006TP3016)

[作者简介] 张伟,硕士研究生,研究方向为 2 型糖尿病的发病机制与药物治疗,Email为 zw_lenc@gmail.com。周寿红,讲师,博士研究生,研究方向为心血管生理。通讯作者胡弼,教授,研究方向为 2 型糖尿病的发病机制与药物治疗,Email为 hubishengli@yahoo.com.cn。

症因子表达的作用目前还未见有报道。本研究观察棕榈碱对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞 TNF- α 、IL-6 和 ICAM-1 表达的影响,同时观察棕榈碱是否通过过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ) 途径起作用。

1 材料和方法

1.1 主要药品、试剂及仪器

胰蛋白酶和棕榈碱 (Sigma 公司); RPMI 1640 干粉培养基 (Gibco 公司)、胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); Trizol (加拿大 BBI 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (上海捷瑞生物工程有限公司); MDA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); MMLV 逆转录酶试剂盒 (立陶宛 Fementas 公司); 其它试剂均为分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的制备及氧化

正常人血浆 400 mL, 采用序列超高速冷冻离心法制备低密度脂蛋白 (LDL)。按文献 [9] 方法, 将 LDL 置于 PBS 溶液中, 4℃ 透析 36 h 充分去除 EDTA 后, 置于含 10 μ mol CuSO₄ 的 PBS 溶液 (pH = 7.2) 中, 37℃ 透析 20 h 进行氧化修饰。氧化修饰后的 LDL 置于含 100 μ mol EDTA 的 PBS 溶液中, 4℃ 透析 24 h 终止氧化。最后, 将氧化修饰后的 LDL 置于 PBS 溶液中, 4℃ 透析 24 h 充分去除 EDTA。超滤除菌, BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白含量, 调蛋白浓度为 1 g/L 用于实验。LDL 的氧化程度通过 MDA 试剂盒检测。

1.3 小鼠巨噬细胞的培养及细胞活力检测

鼠单核细胞源性巨噬细胞 RAW 264.7 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调密度至 1×10^8 个/L。24 h 后换含 0.1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 细胞静置 24 h 后再做相应的处理。不同浓度棕榈碱 (10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 及 10^{-3} mol/L) 处理细胞 24 h 后, 台盼兰拒染法观察细胞活力。

1.4 实验分组

依据实验, 进行以下分组: 对照组、ox-LDL (75 mg/L) 组、棕榈碱 (10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L) 组、棕榈碱 (10^{-6} 、 10^{-4} 、 10^{-5} mol/L) + ox-LDL (75 mg/L) 组。处理 24 h 后进行相关指标检测。

1.5 聚合酶链反应

收集处理后的 RAW 264.7 细胞, Trizol 一步法提取细胞总 RNA。紫外分光光度计测定总 RNA 纯度。根据逆转录试剂盒说明, 取 2 μ g 总 RNA 逆转录后取 2 μ L 行聚合酶链反应。TNF- α 上游引物

5'-CCA CCA TCA AGG ACT CAA-3', 下游引物 5'-GGT CAC CAA ATC AGC GTT A-3', 扩增片段 457 bp; IL-6 上游引物 5'-TTC TTG GGA CTG ATG CTG-3', 下游引物 5'-CTG GCT TTG TCT TTC TTG TT-3', 扩增片段 380 bp; ICAM-1 上游引物 5'-ATG GCA GCC TCT TAT GTT T-3', 下游引物 5'-TGA AGT CAG CGT TTC TTG G-3', 扩增片段 357 bp。PPAR γ 上游引物 5'-GAC CAC TCG CAT TCC TTT-3', 下游引物 5'-CCA CAG ACT CGG CAC TCA-3'。扩增片段 266 bp。 β -actin 上游引物 5'-GCT GTC CCT GTA TGC CTC T-3', 下游引物 5'-GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3', 扩增片段 220 bp。TNF- α 循环参数为 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 40 s, 53℃ 退火 35 s, 72℃ 延伸 60 s, 循环 30 次; IL-6 循环参数为 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 40 s, 51℃ 退火 35 s, 72℃ 延伸 60 s, 循环 30 次; ICAM-1 循环参数为 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 40 s, 51℃ 退火 35 s, 72℃ 延伸 60 s, 循环 30 次。PCR 产物经 EB 染色后于 1.5% 琼脂糖电泳并用凝胶图像分析系统摄片。Image J 软件进行灰度分析。

1.6 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异进行方差分析后再用 t 检验。采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 棕榈碱对巨噬细胞活力的影响

10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 棕榈碱对巨噬细胞活力没有明显的影响, 10^{-3} mol/L 棕榈碱引起细胞活力下降 ($P < 0.01$; 表 1)。

表 1 不同浓度棕榈碱对巨噬细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	细胞活力
对照组	94.11% \pm 1.21%
10^{-6} mol/L 棕榈碱	92.66% \pm 2.21%
10^{-5} mol/L 棕榈碱	92.67% \pm 1.83%
10^{-4} mol/L 棕榈碱	91.75% \pm 2.10%
10^{-3} mol/L 棕榈碱	85.37% \pm 1.31% ^a

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较。

2.2 棕榈碱对巨噬细胞肿瘤坏死因子 α mRNA 表达的影响

正常情况下, 巨噬细胞低水平表达 TNF- α 。75 mg/L ox-LDL 刺激 24 h 后巨噬细胞 TNF- α mRNA

的表达明显上调。与对照组比较, 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 槟榔碱对巨噬细胞 TNF- α mRNA 的表达无显著影响。 10^{-6} mol/L 槟榔碱对 ox-LDL 诱导的 TNF- α mRNA 表达没有显著影响, 10^{-5} mol/L 和 10^{-4} mol/L 槟榔碱抑制 ox-LDL 诱导的 TNF- α mRNA 表达(表 2和图 1)。

2 3 槟榔碱对巨噬细胞白细胞介素 6和细胞间黏附分子 1 mRNA 表达的影响

与对照组比较, 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 槟榔碱对巨噬细胞 IL-6和 ICAM-1 mRNA 的表达无显著影响; 10^{-6} mol/L 槟榔碱对 ox-LDL 诱导的 IL-6和 ICAM-1 mRNA 的表达无显著影响, 10^{-5} mol/L 和 10^{-4} mol/L 槟榔碱抑制 ox-LDL 诱导的 IL-6和 ICAM-1 mRNA 的表达(表 2和图 1)。

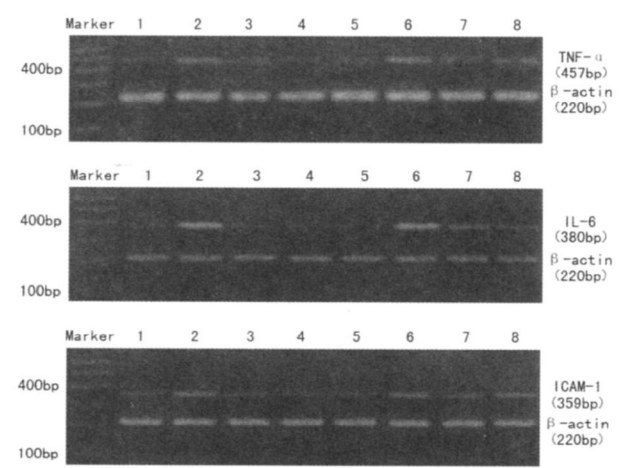


图 1 槟榔碱对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子 mRNA 表达的影响 1为对照组, 2为 ox-LDL 组, 3为 10^{-6} mol/L 槟榔碱组, 4为 10^{-5} mol/L 槟榔碱组, 5为 10^{-4} mol/L 槟榔碱组, 6为 10^{-6} mol/L 槟榔碱 + ox-LDL 组, 7为 10^{-5} mol/L 槟榔碱 + ox-LDL 组, 8为 10^{-4} mol/L 槟榔碱 + ox-LDL 组。

表 2 槟榔碱对巨噬细胞 IL-6和 ICAM-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	TNF- α mRNA	IL-6 mRNA	ICAM-1 mRNA
对照组	0.118 \pm 0.024	0.229 \pm 0.037	0.169 \pm 0.022
ox-LDL 组	0.264 \pm 0.037 ^a	1.275 \pm 0.170 ^a	0.611 \pm 0.083 ^a
10^{-6} mol/L 槟榔碱	0.121 \pm 0.024	0.206 \pm 0.050	0.172 \pm 0.029
10^{-5} mol/L 槟榔碱	0.128 \pm 0.026	0.238 \pm 0.068	0.164 \pm 0.023
10^{-4} mol/L 槟榔碱	0.124 \pm 0.025	0.249 \pm 0.021	0.147 \pm 0.031
10^{-6} mol/L 槟榔碱 + ox-LDL	0.255 \pm 0.036	1.209 \pm 0.108	0.592 \pm 0.052
10^{-5} mol/L 槟榔碱 + ox-LDL	0.163 \pm 0.037 ^c	0.655 \pm 0.256 ^c	0.491 \pm 0.054 ^c
10^{-4} mol/L 槟榔碱 + ox-LDL	0.203 \pm 0.025 ^b	0.986 \pm 0.201 ^b	0.520 \pm 0.034 ^b

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.05$, c为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

2 4 槟榔碱对氧化型低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 表达的影响

10^{-5} mol/L 槟榔碱与 ox-LDL 共同处理巨噬细胞 24 h 后 PPAR γ mRNA 表达上调(图 2)。

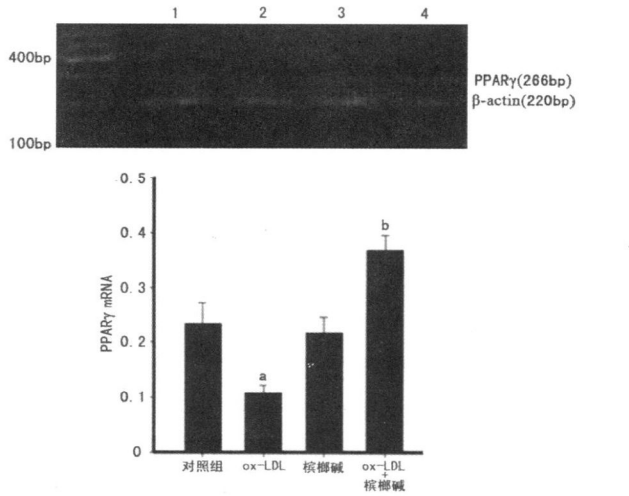


图 2 槟榔碱对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞 PPAR γ mRNA 表达的影响 a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。1为对照组, 2为 ox-LDL 组, 3为槟榔碱组, 4为 ox-LDL + 槟榔碱组。

3 讨论

动脉粥样硬化是严重危害人类健康的疾病之一^[10]。其主要的病理学改变是粥样斑块的形成,而在斑块的形成过程中,巨噬细胞吞噬脂质形成泡沫化是关键环节^[11]。巨噬细胞一方面造成脂质在血管壁中的堆积,导致斑块形成;另一方面巨噬细胞释放大量的炎症介质,加剧斑块形成及其后的斑块破裂^[12]。

已有报道槟榔碱能抑制破骨细胞炎症因子的表达,槟榔碱能抑制高脂诱导的大鼠血管组织中黏附分子和趋化因子的表达,促进一氧化氮的合成与释放,可能具有一定的抗动脉粥样硬化的作用^[6],那么槟榔碱是否也能抑制巨噬细胞内炎症因子的表达。为此,我们首先通过台盼兰拒染法观察不同浓度槟榔碱对巨噬细胞活力的影响,发现 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 槟榔碱对巨噬细胞活力没有明显的影响, 10^{-3} mol/L 槟榔碱引起细胞活力下降。随后,观察了 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 槟榔碱对巨噬细胞炎症因子表达的影响,结果发现槟榔碱对巨噬细胞 TNF- α 、IL-6和 ICAM-1 mRNA 表达的无显著影响; 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 槟榔碱分别与 ox-LDL 共同处理细胞 24 h 后, 10^{-6} mol/L 槟榔碱对 ox-LDL 诱导的细胞炎症因子表达没有显著影响, 10^{-5} mol/L

和 10^{-4} mol/L 槟榔碱抑制 ox-LDL 诱导的 TNF- α 、IL-6 和 ICAM-1 mRNA 表达, 且 10^{-5} mol/L 槟榔碱 + ox-LDL 组炎症因子下降更明显。提示槟榔碱能抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子的表达。

为了探明上述过程的机制, 又检测了 PPAR γ 。PPAR γ 是一种属于核激素受体超家族的配体激活转录因子, 在巨噬细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞中均有表达。它调节与脂质代谢、血管炎症和促进动脉粥样硬化及血管成形术后再狭窄的形成有关的主要蛋白的基因表达^[13-14]。PPAR γ 在巨噬细胞活化的过程中起着至关重要的作用。研究表明 PPAR γ 参与调节 IL-4 诱导的巨噬细胞活化和炎症因子的表达^[15-17]。本研究中, 10^{-5} mol/L 槟榔碱与 ox-LDL 共同处理巨噬细胞 24 h 后 PPAR γ mRNA 表达上调。由此推测 PPAR γ 可能参与了槟榔碱抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子表达这一过程。综上所述, 槟榔碱能抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子表达, 其机理可能与提高 PPAR γ 的表达有关。

[参考文献]

- [1] Jeng JH, Lan WH, Hahn LJ, et al. Inhibition of the migration, attachment, spreading, growth and collagen synthesis of human gingival fibroblasts by arecoline, a major areca alkaloid, in vitro [J]. *J Oral Pathol Med*, 1996; **25**: 371-375.
- [2] Chang MC, Kuo MY, Hahn LJ, et al. Areca nut extract inhibits the growth, attachment, and matrix protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts [J]. *J Periodontol*, 1998; **69**: 1 092-097.
- [3] Ling LJ, Ho FC, Chen YT, et al. Areca nut extracts modulated expression of alkaline phosphates and receptor activator of nuclear factor κ B ligand in osteoblasts [J]. *J Clin Periodontol*, 2005; **32**: 353-359.
- [4] 段智变, 汪海. 高糖致内皮细胞黏附分子基因的过度表达以及槟榔碱的调节作用 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2006; **11** (1): 27-32.
- [5] 石翠格, 胡刚, 汪海. 天然药物槟榔碱对氧化低密度脂蛋白致血管内皮细胞损伤的保护作用研究 [J]. *科学技术与工程*, 2007; **7** (12): 2 780-783.
- [6] 山丽梅, 张锦超, 赵艳玲, 等. 槟榔碱抗动脉粥样硬化分子机制的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2004; **20** (2): 146-151.
- [7] Jeng JH, Wang Y, Chiang BL, et al. Roles of keratinocyte inflammation in oral cancer: regulating the prostaglandin E₂, interleukin-6 and TNF- α production of oral epithelial cells by areca nut extract and arecoline [J]. *Carcinogenesis*, 2003; **24** (8): 1 301-315.
- [8] Lai YL, Lin J, Yang SF, et al. Areca nut extracts reduce the intracellular reactive oxygen species and release of myeloperoxidase by human polymorphonuclear leukocytes [J]. *J Periodontol Res*, 2007; **42** (1): 69-76.
- [9] Ranyer HC, Horsburgh T, Brown SL, et al. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells [J]. *Nephron*, 1990; **55** (3): 229-299.
- [10] Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005; **3** (1): 63-68.
- [11] Webb NR, Moore K. Macrophage-derived foam cells in atherosclerosis: lessons from murine models and implications for therapy [J]. *Curr Drug Targets*, 2007; **8** (12): 1 249-263.
- [12] Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization [J]. *Stroke*, 2006; **37** (7): 1 923-932.
- [13] Puddu P, Puddu GM, Muscarelli A. Peroxisome proliferator-activated receptors: are they involved in atherosclerosis progression [J]? *Int J Cardiol*, 2003; **90** (2-3): 133-140.
- [14] Riganonti E, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Regulation of macrophage functions by PPAR- α , PPAR- γ and LXRs in mice and men [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008; **28** (6): 1 050-059.
- [15] Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance [J]. *Nature*, 2007; **447** (7148): 1 116-120.
- [16] Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, et al. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation [J]. *Cell Metab*, 2006; **4** (1): 13-24.
- [17] Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2003; **10** (2): 63-71.

(此文编辑 文玉珊)