

[文章编号] 1007-3949(2016)24-04-0361-07

· 实验研究 ·

丹参酮ⅡA 对 ox-LDL 诱导的小鼠巨噬细胞源性泡沫细胞蛋白质组的影响

闫昭芫, 耿伸, 刘佳, 卢德赵, 柴惠

(浙江中医药大学生命科学学院, 浙江省杭州市 310053)

[关键词] 蛋白质组; 丹参酮ⅡA; 氧化型低密度脂蛋白; 巨噬细胞源性泡沫细胞

[摘要] 目的 应用双向电泳和质谱技术研究丹参酮ⅡA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞源性泡沫细胞蛋白质组的影响, 探讨丹参酮ⅡA 调脂和抗动脉粥样硬化作用的分子机制。方法 分离纯化获得人血清低密度脂蛋白(LDL), 用 CuSO₄ 进行氧化得到 ox-LDL, 与 RAW264.7 细胞共孵育, 形成的泡沫细胞用含 20 mg/L 丹参酮ⅡA 继续培养 24 h 作为丹参酮组, 不含丹参酮ⅡA 的溶液培养 24 h 作为对照组, 经超声破碎细胞, 离心, 取上清进行蛋白质定量, 丹参酮ⅡA 组和对照组蛋白质等量上样, 进行双向电泳, 电泳完毕后用硝酸银染色得到不同样品的蛋白质组图谱。经 Labscan 软件进行差异蛋白质组分析, 选取蛋白质表达量差异超过 2 倍的蛋白质作为差异蛋白。经胶内酶解及质谱分析, 得到肽质量指纹图谱, 通过 Mascot 数据库搜索, 结合 2-D 图谱上蛋白质的分子量、等电点信息鉴定蛋白质。结果 丹参酮组钙网蛋白、波形蛋白、过氧化物酶 2、CuZn-超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)、亮氨酸拉链蛋白、stabilin-1、造血细胞系特异性蛋白表达量增加, 而 GTP 蛋白、ATP 合酶、mimitin、IL-5、热休克蛋白 70(HSP70)、翻译控制肿瘤蛋白、氯离子通道蛋白 1 表达量降低。结论 丹参酮ⅡA 通过降低 GTP 蛋白和 HSP70 表达以及提高钙网蛋白表达改善泡沫细胞对脂代谢的调控功能; 通过提高 stabilin-1 表达和降低 ATP 合酶表达调节细胞的吞噬能力; 通过提高亮氨酸拉链蛋白和波形蛋白表达促进脂与脂蛋白的代谢; 通过提高过氧化物酶 2 和 CuZn-SOD 表达起到清除氧自由基和抗脂质过氧化作用; 通过降低 mimitin 和 IL-5 表达以及提高造血细胞系特异性蛋白表达而具有抗炎和抗细胞凋亡作用; 通过降低氯离子通道蛋白 1 和翻译控制肿瘤蛋白表达具有抗肿瘤作用。因此可以认为丹参酮ⅡA 可能具有调节血脂和抗动脉粥样硬化作用, 在临幊上可以用于心脑血管疾病的治疗。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Effect of Tanshinon II A on Mouse Macrophages Derived Foam Cells Proteome Induced by Ox-LDL

YAN Zhao-Yuan, GENG Shen, LIU Jia, LU De-Zhao, and CHAI Hui

(College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang 310053, China)

[KEY WORDS] Proteome; Tanshinone II A; Oxidized Low Density Lipoprotein; Macrophages Derived Foam Cell

[ABSTRACT] Aim With the application of two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to study the effect of tanshinone II A on ox-LDL-induced RAW264.7 mouse macrophage-derived foam cells proteome and explore the molecular mechanism of lipid and anti-atherosclerotic effect of tanshinone II A. Methods The isolated purified human serum LDL, oxidized with CuSO₄ to give ox-LDL, co-incubated with RAW264.7 cells, the formation of foam cells containing tanshinone II A 20 mg/L to continue for 24 hours was used as the tanshinone II A group; and the control group excluding tanshinone II A solution was incubated for 24 hours; cells were disrupted by ultrasonic and 4°C 12000 g centrifugal 30 min, to get supernatant for protein quantitation; protein of the control group and the tanshinone II A group was loaded with the same amount and two-dimensional electrophoresis (IEF and SDS-PAGE); after the completion of electrophoresis, they were stained with silver nitrate to get proteome map with different samples. Through Labscan difference proteomic analysis

[收稿日期] 2015-10-29

[修回日期] 2016-03-03

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(LQ13H310003); 浙江省教育厅科研项目(Y200906333); 浙江省中医药重点项目(2009CB005)

[作者简介] 闫昭芫, 本科在读, 主要从事生物科学研究。耿伸, 硕士研究生, 主要从事中医药心血管疾病治疗研究。刘佳, 硕士研究生, 主要从事中医药心血管疾病治疗研究。通讯作者柴惠, 副教授, 主要从事中药药理学研究。

software, select the protein with expression difference of more than 2-fold. After gel digestion and mass spectrometry analysis, peptide mass fingerprinting was obtained, by Mascot database searching, combined with the 2-D map of protein molecular weight and isoelectric point information protein identification was realized. **Results** In Tanshinon II A treated group calreticulin, vimentin, peroxidase-2, CuZn-SOD, zipper protein, stabilin-1, hematopoietic cell specific protein were up-regulated, while GTP protein, ATP synthesis, mimitin, IL-5, HSP70, translationally controlled tumor protein, chloride ion channel protein were down-regulated. **Conclusions** Tanshinon II A improved the lipid regulation of foam cells by decreasing the expression of GTP protein and HSP70 and increasing the expression of CRT. Tanshinon II A regulated the ability of endocytosis by increasing the expression of stabilin-1 and decreasing the expression of ATP synthesis. It also stimulated the metabolism of lipid and lipoprotein by improving the expression of leucine zipper protein and vimentin. Meanwhile, tanshinon II A eliminated ROS and lipid peroxidation by increasing the expressions of peroxidase-2 and CuZn-SOD. It also had the effects of anti-inflammation and anti-apoptosis by reducing the expressions of mimitin and IL-5. Tanshinon II A played a role of anti-tumor by subsiding the expressions of CLIC1 and TCTP. In conclusion, tanshinon II A may have function of lipid regulation and anti-atherosclerosis, and can be used to treat cardiovascular diseases in clinic.

丹参酮 II A (tanshinone II A, Tan II A) 是从中药丹参中分离出来的一种脂溶性的二萜类化合物。虽然研究表明丹参酮具有抗氧化、抗血小板聚集、改善微循环、降血脂等药理作用,临幊上丹参酮制剂也被用于冠心病治疗,但其作用的分子机制仍不清楚。本研究以氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导 RAW264.7 细胞所形成的泡沫细胞为研究对象,分析丹参酮 II A 作用前后泡沫细胞蛋白质组的变化,从泡沫细胞蛋白质表达角度深入探讨丹参酮 II A 抗动脉粥样硬化治疗冠心病的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由奥地利格拉茨大学生物化学研究所惠赠;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、硫脲、甘氨酸、TRIS、CHAPS、SDS、碘乙酰氨、IPG 胶条为 Bio-Rad 公司产品,2-D clean up 试剂盒为 GE healthcare 公司产品,所有溶液用 MilliQ 水配制。

1.2 主要仪器

EttanTM IPGphorTM 等电聚焦电泳仪、EttanTM DALTSix 垂直板电泳仪、UMAX Image Scanner 凝胶扫描仪及 Labscan 软件均为美国 GE healthcare 公司产品,P80MX 超速冷冻离心机和 UV8200 分光光度计为日本日立公司产品。

1.3 ox-LDL 的制备

取健康人血清,用序列超速离心法及 Sepharose 6B 凝胶过滤法分离获取纯化的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。定量后用 0.01 mol/L PBS 将其稀释至 50 g/L,向稀释后的 LDL 中加入 1 mol/L CuSO₄,使之终浓度为 5 mmol/L,37℃ 水浴 24 h。氧

化结束后取少量样品,根据硫代巴比妥酸反应物含量来鉴定 LDL 氧化程度,按照丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒说明书测定 LDL 氧化程度,其余 ox-LDL 转入透析袋中,置于含 0.1% EDTA-Na₂ 的 PBS 缓冲液中,4℃ 透析 24 h,每 2 h 换液一次,第 4 次透析过夜。透析完毕,用 PEG20000 浓缩,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,测定浓度后于 4℃ 保存。

1.4 细胞培养及蛋白质提取

将细胞接种于 6 个 75 cm² 培养瓶中,每瓶细胞培养液 10 mL,细胞密度为 5.0×10⁸ cells/L,培养过夜后,分为两组:①丹参酮 II A 组:以含 20 mg/L ox-LDL 细胞培养液培养细胞 24 h 后换成 20 mg/L 丹参酮 II A 细胞培养液继续培养 24 h。②对照组:以含 20 mg/L ox-LDL 细胞培养液培养细胞 24 h 后换成细胞培养液继续培养 24 h。两组均在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。培养完毕后,弃上清液,用无菌生理盐水洗涤 3 次。刮下细胞,收集在 EP 管中,加入 1 mL 细胞裂解液(30 mmol/L Tris, 8 mol/L 尿素,4% CHAPS, pH8.5),在冰浴下超声破碎细胞,功率 200 W,超声 10 s,间歇 10 s,工作 15 次;4℃、12 000 g 离心 30 min,收集上清。并用 2D-Quant Kit 定量试剂盒测定蛋白浓度,分装,-80℃ 保存。

1.5 双向电泳

提取的细胞内蛋白质用水化液(8 mol/L 尿素,2% CHAPS,13 mmol/L DTT,0.5% IPG buffer, 0.002% 溴酚蓝)定容到 300 μg 蛋白质/450 μL,采用胶内泡涨的方法上样,两组样品被加到 6 条 pH4~7 的胶条中,进行第一向等电聚焦电泳,等电聚焦参数:30 V 12 h、500 V 1 h、1000 V 1 h、8000 V 8 h。等电聚集后,胶条于平衡液 1 (1% DTT, 50 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素,30% 甘油,2% SDS,0.002% 溴酚蓝)、平衡液 2(4% 碘乙酰氨,50 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L

尿素,30%甘油,2%SDS,0.002%溴酚蓝)中各平衡15 min,然后转移到已制好的12.5%聚丙烯酰胺凝胶上,用0.5%琼脂糖封顶,进行第二向SDS-PAGE电泳,电泳参数:30 W 45 min、90 W 6 h。直到溴酚蓝染料迁移至胶的底部边缘,结束电泳。

1.6 图像扫描分析

电泳结束后,轻轻敲开夹层玻璃,取出凝胶转移到染色盒里,进行硝酸银染色。经染色后的凝胶用UMAX Image Scanner凝胶扫描仪及Labscan软件进行扫描,蛋白质组图谱用Image Master 2D Plantinum 6.0软件进行差异蛋白质分析。

1.7 胶内酶解及质谱分析

制作一块制备胶,银染后切取经分析后有表达差异的蛋白质点,置于离心管中,用双蒸水冲洗后加入50 μL脱色液[50 mmol/L Na₂S₂O₃,15 mmol/L K₃Fe(CN)₆]脱色10 min,双蒸水冲洗,去除溶液,再用200 μL 200 mmol/L NH₄HCO₃冲洗,剧烈振荡10 min,去除液体后用100 μL乙腈脱水8 min,迅速干燥,估计干胶体积,加入3倍体积的12.5 mg/L胰蛋白酶(用25 mmol/L NH₄HCO₃配制),37℃酶解过夜,酶解后用15 μL萃取液(H₂O:TFA:乙腈=45:5:50)萃取2次,合并萃取液,冷冻干燥后加入1.2 μL含0.1%TFA的洗脱液重新溶解多肽片段,取0.3 μL样品点于靶上,加入等量的饱和基质溶液,进行MALDI-TOF-TOF-MS检测,得到肽质量指纹图谱,通过Mascot数据库搜索,结合2-D图谱上蛋白质的分子量、等电点信息鉴定蛋白质。

1.8 统计学方法

采用SPSS 13.0统计学软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用t检验,相关性分析采用Pearson直线相关分析法,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ox-LDL 氧化程度的鉴定

LDL经CuSO₄氧化修饰后,用MDA法测定,在λ=532处测得标准品、空白对照品和样品的吸收值分别为0.1347、0.0027、0.0212,蛋白浓度为50 mg/L,MDA含量=(样品OD值-空白对照品OD值)/(标准品OD值-空白对照品OD值)×10/蛋白质浓度,计算得出ox-LDL中丙二醛含量为28.03 μmol/g。

2.2 不同浓度的丹参酮ⅡA对细胞活性的影响

不同浓度的丹参酮ⅡA与RAW264.7细胞共培养24 h后,MTT法测定细胞活性,结果发现,丹参酮ⅡA在0~20 mg/L浓度范围内对RAW264.7细胞

无毒性,从30 mg/L起对细胞活性有显著抑制作用(图1)。因此选择20 mg/L以下的浓度来研究丹参酮ⅡA对RAW264.7细胞蛋白质组的影响。

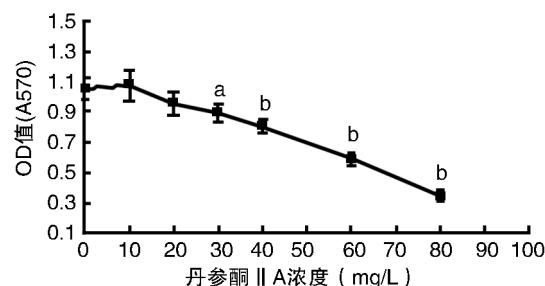


图1. 丹参酮ⅡA对RAW264.7细胞活性的影响(n=6) a为P<0.05,b为P<0.01,与0 mg/L组比较。

Figure 1. Effects of Tanshinone II A on the viability of RAW264.7 cell (n=6)

2.3 ox-LDL 浓度的选择

不同浓度的ox-LDL与RAW264.7细胞共培养24 h后,MTT法测定细胞活性,结果发现,ox-LDL浓度从20 mg/L起对细胞生长有显著抑制作用(图2)。经泡沫细胞形态学观察和胆固醇酯测定,20 mg/L ox-LDL诱导的泡沫细胞形态完整(图3);倒置显微镜下,相比于ox-LDL干预之前,巨噬细胞呈贴壁生长,大多呈类圆形或不规则形,体积较小,生长很快;干预之后成为泡沫细胞,细胞体积明显增大,细胞突触形成明显,胞浆增加,疏松化,胞内可见大量大小不等的脂滴;油红O染色显示,细胞浆内出现大量红染物质(约占60%)。胆固醇酯比重>60%,符合泡沫细胞特征。

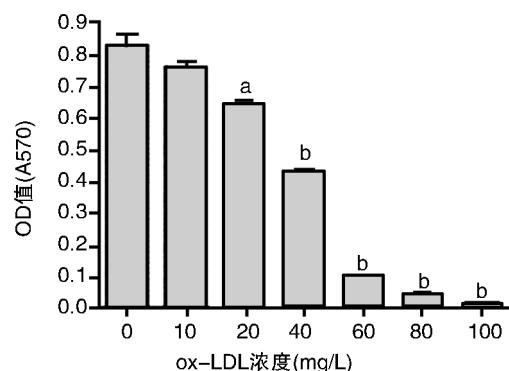


图2. ox-LDL对RAW264.7巨噬细胞活性的影响(n=6) a为P<0.05,b为P<0.01,与0 mg/L组比较。

Figure 2. Effects of ox-LDL on the viability of RAW264.7 cell (n=6)

2.4 差异蛋白质分析

6块胶扫描所得的蛋白质组图谱用Image

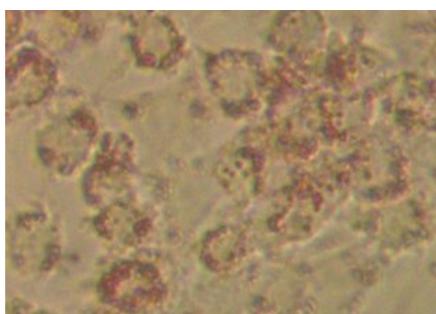


图 3. 20 mg/L ox-LDL 诱导的泡沫细胞 (40×10)

Figure 3. Foam cells induced by 20 mg/L ox-LDL (40×10)

Master 2D Plantinum 6.0 软件分析,胶中平均检测到 568 个点,其中所有图谱共有的点有 382 个。对这些蛋白质点进行差异比较,从中选择蛋白质表达量差异超过 2 倍的蛋白质作为差异蛋白。在本实验中,共鉴定出 14 个差异蛋白,其中有 7 个蛋白质在丹参酮 II A 作用过程中表达量增高,7 个蛋白质表达量降低(图 4)。

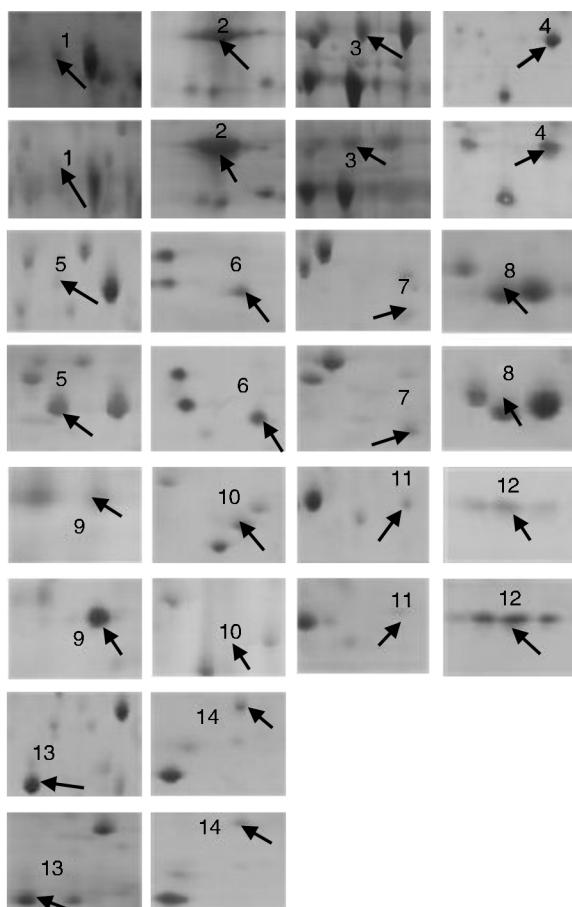


图 4. 差异蛋白在双向电泳凝胶图谱中的比较分析 第 1、3、5、7 排为对照组,第 2、4、6、8 排为丹参酮 II A 组。1-14 如表 1 中编号。

Figure 4. Analysis of differentially expressed proteins in two dimensional gel electrophoresis

2.5 质谱分析

上述 14 个差异蛋白质凝胶斑点经酶解和质谱测定获得肽质量指纹图谱,通过 Mascot 数据库搜索,结合 2-D 图谱上蛋白质的分子量、等电点等信息,最终确定 14 个蛋白质,其中钙网蛋白、波形蛋白、过氧化物酶 2、CuZn-超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)、亮氨酸拉链蛋白、stabilin-1、造血细胞系特异性蛋白在用药后表达量增加,而 GTP 蛋白、ATP 合酶、mimitin、白细胞介素 5(interleukin-5, IL-5)、热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)、控制翻译肿瘤蛋白、氯离子通道蛋白 1 在用药后表达量降低(表 1)。

表 1. 差异蛋白质的质谱鉴定

Table 1. Identification of differentially expressed proteins by mass spectrometry

| 蛋白分类 | 编号 | 蛋白名称 | 分子量 | PI | Av.Ratio |
|---------|----|--------------|----------|------|----------|
| 影响细胞调控 | 1 | GTP 蛋白 | 40578.3 | 5.50 | -2.50 |
| | 2 | 钙网蛋白 | 47964.9 | 4.33 | +2.82 |
| | 3 | 热休克蛋白 70 | 73482.7 | 5.91 | -3.53 |
| 影响吞噬功能 | 4 | ATP 合酶 | 18737.6 | 5.52 | -2.01 |
| | 5 | stabilin-1 | 276073.8 | 6.20 | +3.82 |
| 调节脂质代谢 | 6 | 波形蛋白 | 51533.1 | 4.96 | +2.02 |
| | 7 | 亮氨酸拉链蛋白 | 117104.9 | 8.61 | +2.64 |
| 抗氧化作用 | 8 | 过氧化物酶 2 | 21765.1 | 5.20 | +2.58 |
| | 9 | CuZn-超氧化物歧化酶 | 15932.8 | 6.02 | +2.18 |
| 抗炎抗凋亡作用 | 10 | mimitin | 19615.8 | 7.88 | -2.43 |
| | 11 | 白细胞介素 5 | 46883.5 | 6.19 | -2.53 |
| | 12 | 造血细胞系特异性蛋白 | 54179.1 | 4.73 | +3.42 |
| 抗肿瘤作用 | 13 | 控制翻译肿瘤蛋白 | 194449.6 | 4.76 | -2.81 |
| | 14 | 氯离子通道蛋白 1 | 26963.8 | 5.09 | -3.75 |

3 讨 论

丹参酮 II A 是从中药丹参中分离出的一种脂溶性的二萜类成分,大量前期研究证明丹参酮 II A 具有降血脂、抗动脉粥样硬化和抗氧化等作用,但是其确切的作用机制仍不十分清楚。我们选择 RAW264.7 巨噬细胞,用 ox-LDL 诱导形成巨噬细胞源性泡沫细胞为模型,将丹参酮 II A 与泡沫细胞共孵育,应用蛋白质组技术与方法分析药物作用后细胞内蛋白质组的变化,找出药物作用后的差异蛋白,从而阐述丹参酮 II A 可能的调血脂、抗动脉粥样硬化的作用途径和分子机制。

实验中筛选并鉴定出 14 个差异蛋白质,其中钙网蛋白、波形蛋白、过氧化物酶 2、CuZn-SOD、亮氨酸拉链蛋白、stabilin-1、造血细胞系特异性蛋白在用药后表达增加,而 GTP 蛋白、ATP 合酶、mimitin、白细胞介素 5、HSP70、控制翻译肿瘤蛋白、氯离子通道蛋

白 1 在用药后表达降低。通过对上述 14 个差异蛋白质的分析,我们认为丹参酮ⅡA 可能具有以下几个方面的作用。

3.1 丹参酮ⅡA 影响细胞的调控功能

G 蛋白为 α 、 β 、 γ 亚基组成的杂三聚体,有报道称,G 蛋白偶联受体参与平滑肌细胞增殖,在动脉内膜增生过程中发挥着重要作用^[1]。故而在细胞泡沫化损伤后,G 蛋白的表达呈时间依赖性递增,一旦 G 蛋白的表达被药物抑制,G 蛋白信号传导的中断将产生长期中断内膜增生的作用。在本研究中,丹参酮ⅡA 使 G 蛋白表达量显著下降,因此丹参酮ⅡA 可能通过抑制 G 蛋白的表达而具有抗内膜增生的作用。

同时,另外一个信号通道,生物体内的钙网蛋白具有调节细胞凋亡、应激、心血管炎症反应等多种生理和病理生理过程。以往研究发现,钙网蛋白表达的升高可以增强内质网 Ca^{2+} 缓冲能力,抵制高浓度 Ca^{2+} 的毒性作用,并可以增强细胞对氧自由基诱导的氧化应激损伤的抵抗力^[2];钙网蛋白能够提高脑毛细血管内皮细胞对缺氧/复氧的适应性反应,减少细胞凋亡,是心肌缺血早期重要的保护因子^[3];钙网蛋白还能抑制内皮细胞增殖和血管生成^[4]。在本研究中,丹参酮ⅡA 使钙网蛋白表达量显著升高,提示丹参酮ⅡA 可能通过升高钙网蛋白的表达来调控巨噬细胞 Ca^{2+} 稳态。可见,丹参酮ⅡA 可以增强巨噬细胞氧化应激损伤的抵抗能力,减轻炎症反应,减少细胞凋亡,并且有防止动脉粥样硬化血管再生的作用。

HSP70 是一个与损伤相关的炎症诱导因子^[5],可升高促炎症因子单核细胞趋化蛋白 1 和纤维转化生长因子的表达,增加心肌肥厚和纤维化的危险^[6]。不仅如此,研究发现 HSP70 与 MSR 的 N 端包浆区相结合,有助于 MSR 的功能发挥和信号传导^[7]。在本研究中,丹参酮ⅡA 使 HSP70 表达量显著降低,推测丹参酮ⅡA 能够通过降低 HSP70 的表达来影响 MSR 的功能和表达,减少 MSR 对修饰的低密度脂蛋白的吞噬。如若能控制 HSP70 的表达,则延缓甚至阻止动脉粥样硬化的进程^[8]。丹参酮在此方面显示了很好的前景。

3.2 丹参酮ⅡA 影响细胞的吞噬功能

以往普遍认为 ATP 合酶只在线粒体上表达,最近研究发现该酶也存在于多种细胞膜表面,作为多种配体的受体参与脂质代谢的调控、控制细胞的增殖与分化等^[9]。在前脂肪细胞向脂肪细胞转化过程中,ATP 合酶的表达显著增加^[10]。在脂类代谢中,通过使用小分子 ATP 合酶抑制剂,能够抑制细

胞溶质的脂滴形成^[11]。ATP 合酶的 β 亚基与 ApoA I 有高亲和力^[12],在 ApoA I 结合 ATP 合酶后,通过产生 ADP,促使高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 内吞受体 P2Y13 完成内吞^[13]。在本研究中,丹参酮ⅡA 使 ATP 合酶表达量显著下降,推测丹参酮ⅡA 可能通过减少 ATP 合酶的表达,从而降低巨噬细胞的吞噬功能,抑制巨噬细胞内脂滴形成,减轻泡沫化作用。

stabilin-1 又称 FEEL-1 或 CLEVER-1,是一个具有多功能的 I 型跨膜受体^[14],最初发现于肝窦内皮细胞,被称为具有清道夫受体功能的高分子蛋白。stabilin-1 也表达于选择性激活的巨噬细胞表面,调节巨噬细胞吞噬功能,在正常鼠源性巨噬细胞表面却少见其表达^[15]。据报道 stabilin-1 还能调节细胞内 ac-LDL 的转运和代谢^[16],具有抗炎、抗动脉粥样硬化作用。在本研究中,丹参酮ⅡA 使 stabilin-1 表达量显著增高,丹参酮ⅡA 的使用可能通过升高 stabilin-1 的表达来调节巨噬细胞的吞噬功能起到抗动脉粥样硬化的作用。

3.3 丹参酮ⅡA 具有调节脂代谢的作用

波形蛋白是一类中间丝蛋白,与细胞延伸、黏附及核信号传导密切相关。细胞中氧化固醇结合蛋白 (oxysterol-binding protein, OSBP) 具有调节脂质和胆固醇代谢的作用,它与氧化固醇结合蛋白相关蛋白 4 (OSBP-related protein 4, ORP4) 高度同源,而 ORP4 的固醇结合位点可结合波形蛋白、胆固醇、氧化固醇,并与丝状波形蛋白网络作用,转运胆固醇^[17]。波形蛋白还能与细胞中激素敏感脂肪酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 相互作用,促进脂类分解和胆固醇运输^[18]。波形蛋白还是细胞骨架结构中一种主要成分,在细胞的完整性和细胞骨架的稳定性中发挥作用,所以增强波形蛋白的表达有助于细胞骨架结构的稳定,具有抗细胞凋亡的作用^[19]。本研究发现丹参酮ⅡA 使波形蛋白含量显著增加,丹参酮ⅡA 可能通过升高波形蛋白表达来调节巨噬细胞内胆固醇的代谢平衡,增强细胞结构的稳定性,发挥抗动脉粥样硬化的作用。

固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element binding protein, SREBP) 是一类能与胆固醇调节元件 SRE-1 发生特异性结合的碱性螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链蛋白,它可激活一系列涉及胆固醇、不饱和脂肪酸、甘油三酯等生物合成以及脂质摄取所需要的酶,参与胆固醇代谢和酶的转录^[20-21]。此外,亮氨酸拉链蛋白还具有显著的抗炎功效。研究发现糖皮质激素诱导

的亮氨酸拉链蛋白能够抑制 TNF- α 和 IL-1 的表达^[22]。在本研究中,丹参酮ⅡA 使亮氨酸拉链蛋白的表达量显著增加,丹参酮ⅡA 可能通过升高亮氨酸拉链蛋白的表达来增加 SREBP 的表达及活性,从而调节胆固醇代谢。亮氨酸拉链蛋白表达增加也能起到抑制细胞炎症因子的表达,调节细胞凋亡信号通路,抑制巨噬细胞凋亡。

3.4 丹参酮ⅡA 具有抗氧化的作用

过氧化物酶 2 属于过氧化物酶家族,在抗氧化防御系统中发挥重要作用。研究表明过氧化物酶 2 能够直接清除过氧化氢,保护细胞免受毒害作用^[23]。CuZn-SOD 属于超氧化物酶体中的一类金属酶,占 SOD 总量的 90%,在保护脑、肺及其它组织的氧化应激中起着重要作用。SOD 是机体内天然存在的超氧自由基清除因子,能专一地清除体内有害的自由基,以解除自由基所造成的机体损害^[24],且 CuZn-SOD 能清除体内多余的 O²⁻,保护 NO 的生物活性。本研究发现丹参酮ⅡA 使过氧化物酶 2 和 CuZn-SOD 含量明显升高,说明丹参酮ⅡA 可能通过升高细胞内过氧化物酶 2 和 SOD 的含量而发挥抗氧化作用,同时通过 SOD 的作用来保护和发挥 NO 的调节血压和组织血流量以及抑制血小板的黏附聚集作用。

3.5 丹参酮ⅡA 具有抗炎和抗凋亡作用

mimitin 是线粒体上一种新型的细胞因子调节蛋白,IL-1、IL-6 是激活 mimitin 基因的炎性因子,mimitin 基因转录和蛋白表达亦随这些炎性因子的上调而上调^[25-26],并且 mimitin 基因的改变能够调节细胞凋亡因子 Caspase-3 和 Caspase-7 的表达,暗示着 mimitin 可能间接参与细胞凋亡过程。mimitin 还可能通过介导微管相关蛋白的表达来参与控制细胞凋亡^[27]。本研究证明丹参酮ⅡA 使 mimitin 的表达显著降低,说明丹参酮ⅡA 可以通过减轻炎症反应保护线粒体,减少 mimitin 的表达,间接抑制细胞凋亡。

IL-5 被认为是变应性致敏和促炎性反应的关键性细胞因子,它能诱导嗜酸性粒细胞前体细胞增殖和分化、延长嗜酸性粒细胞存活时间,以及选择性趋化和激活嗜酸性粒细胞等^[28]。本研究发现丹参酮ⅡA 使 IL-5 显著下降,推测丹参酮ⅡA 可能通过降低 IL-5 的表达来减轻炎症反应。

研究发现,CK2 蛋白激酶抑制剂 TBB 与细胞共孵育时,随着孵育时间的延长,细胞凋亡现象明显增加,而造血细胞系特异性蛋白的表达却显著降低^[29]。蛋白激酶 CK2 参与调节细胞生长和增殖,在增殖的组织中其活动显著增强^[30],多项实验暗示了 CK2 是

一种抗凋亡剂^[31],参与细胞凋亡事件过程。CK2 能够使造血细胞系特异性蛋白产生磷酸化位点,使半胱天冬酶难以水解造血细胞系特异性蛋白,从而对抗细胞凋亡^[32-33]。本研究发现丹参酮ⅡA 使泡沫细胞中造血细胞系特异性蛋白表达显著升高,推测丹参酮ⅡA 抗泡沫细胞凋亡的机制之一可能与升高造血细胞系特异性蛋白的表达有关,但通过何种途径升高造血细胞系特异性蛋白的表达或抑制造血细胞系特异性蛋白的降解还有待进一步研究。

3.6 丹参酮ⅡA 具有抗肿瘤作用

翻译控制肿瘤蛋白 (translationally-controlled tumor protein, TCTP) 是一种高度保守的蛋白质,广泛存在于肿瘤细胞中。目前研究发现翻译控制肿瘤蛋白基因的敲除能够抑制肿瘤细胞增殖、迁移和浸润,暗示翻译控制肿瘤蛋白在肿瘤发生发展过程中发挥着部分作用^[34]。氯离子通道蛋白具有重要的生理功能,氯离子通道蛋白的异常表达可以引发各种疾病,尤其是肿瘤的发生,在肿瘤细胞的增殖、浸润及转移等恶性生物学行为中起着重要作用。本研究发现丹参酮ⅡA 能使氯离子通道蛋白和翻译控制肿瘤蛋白表达量显著降低,说明丹参酮ⅡA 有较好的抗肿瘤作用。

综上所述,丹参酮ⅡA 具有广泛的药理作用,表现为改善细胞的调控功能、调节细胞的吞噬能力、促进脂和脂蛋白代谢、清除氧自由基和抗过氧化作用,丹参酮ⅡA 还有抗炎、抗细胞凋亡和抗肿瘤作用。对于这些差异蛋白质之间的相互关系、这些蛋白质的表达差异与脂代谢与动脉粥样硬化之间的相互关系和作用途径还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Davies MG, Mason DP, Tran PK, et al. G-protein expression and intimal hyperplasia after arterial injury: a role for Galpha (i) proteins [J]. J Vasc Surg, 2001, 33 (2): 408-418.
- [2] Hung CC, Ichimura T, Stevens JL, et al. Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (31): 29 317-326.
- [3] Haseloff RF, Krause E, Bigl M, et al. Differential protein expression in brain capillary endothelial cells induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation [J]. Proteomics, 2006, 6 (6): 1 803-809.
- [4] Pike SE, Yao L, Setsuda J, et al. Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth [J]. Blood, 1999, 94 (7): 2 461-468.
- [5] Anand PK, Anand E, Bledk CK, et al. Exosomal Hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria [J]. PLoS One, 2010, 5 (4): e10136.
- [6] Cai WF, Zhang XW, Yan HM, et al. Intracellular or extracellular heat shock protein 70 differentially regulates cardiac remodelling in

- pressure overload mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88 (1): 140-149.
- [7] Nakamura T, Hinagata J, Tanaka T, et al. HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290 (2): 858-864.
- [8] Griffin CS, Simpson PJ, Wilson CR, et al. Mammalian recombination repair genes XRCC 2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2 (10): 757-761.
- [9] Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, et al. Endothelial cell surface F1-FO ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiotatin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (12): 6 656-661.
- [10] Kim BW, Choo HJ, Lee JW, et al. Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts [J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36 (5): 476-485.
- [11] Arakaki N, Kita T, Shibata H, et al. Cell-surface H⁺-ATP synthase as a potential molecular target for anti-boesity drug [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581 (18): 3 405-409.
- [12] Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis [J]. *Nature*, 2003, 421 (6918): 75-79.
- [13] Jacquet S, Malaval C, Martinez LO, et al. The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62 (21): 2 508-515.
- [14] Kzhyshkowska J, Gratchev A, Goerdts S. Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions [J]. *J Cell Med*, 2006, 10 (3): 635-649.
- [15] Schledzewski K, Falkowski M, Moldenhauer G, et al. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1, F4/80, CD11b macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis [J]. *J Pathol*, 2006, 209 (1): 67-77.
- [16] Kzhyshkowska J, Gratchev A, Brundiers H, et al. Phosphatidylinositide 3-kinase activity is required for stabilin-1-mediated endosomal transport of acLDL [J]. *Immunobiology*, 2005, 210 (2-4): 161-173.
- [17] Wyles JP, Perry RJ, Ridgway ND. Characterization of the sterol-binding domain of oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 reveals a novel role in vimentin organization [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313 (7): 1 426-437.
- [18] Shen WJ, Patel S, Eriksson JE, et al. Vimentin is a functional partner of hormone sensitive lipase and facilitates lipolysis [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9 (4): 1 786-794.
- [19] Byun Y, Chen F, Chang R, et al. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8 (5): 443-450.
- [20] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor [J]. *Cell*, 1997, 89 (3): 331-340.
- [21] Hotron JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver [J]. *J Clin Invest* 2002, 109 (9): 1 125-131.
- [22] Yang N, Zhang W, Shi XM, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mediates glucocorticoid action and inhibits inflammatory cytokine-induced COX-2 expression [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103 (6): 1 760-771.
- [23] Peskin AV, Low FM, Paton LN, et al. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents [J]. *J Biol Chem*, 282 (16): 11 885-892.
- [24] Den Hartog GJ, Haenen GR, Vegter E, et al. Superoxide dismutase: the balance between prevention and induction of oxidative damage [J]. *Chem Biol Interact*, 2003, 145 (1): 33-39.
- [25] Wegrzyn P, Jura J, Kupiec T, et al. A search for genes modulated by interleukin-6 alone or with interleukin-1 beta in HepG2 cells using differential display analysis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1762 (3): 319-328.
- [26] Wegrzyn P, Yarwood SJ, Fiegler N, et al. Mimitin—a novel cytokine-regulated mitochondrial protein [J]. *BMC Cell Biol*, 2009, 10: 23.
- [27] Liu L, Vo A, Liu G, McKeehan WL. Distinct structural domains within C19ORF5 support association with stabilized micro-tubules and mitochondrial aggregation and genome destruction [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (10): 4 191-201.
- [28] 张罗, 韩德民. 细胞因子与鼻息肉中嗜酸性粒细胞浸润增多的关系 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2001, 5 (2): 93-95.
- [29] Holford NH, Hinkle G, Cao X, et al. Population pharmacokinetics of humanized monoclonal antibody HuCC49deltaCH₂ and murine antibody cc49 in colorectal cancer patients [J]. *J Clinic Pharmacol*, 2007, 47 (2): 227-237.
- [30] Guerra B, Issinger OG. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20 (2): 391-408.
- [31] Guo C, Yu S, Wang H, et al. A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (8): 5 992-999.
- [32] Krippner-Heidenreich A, Talanian RV, Sekul R, et al. Targeting of the transcription factor Max during apoptosis: phosphorylation-regulated cleavage by caspase-5 at an unusual glutamic acid residue in position P1 [J]. *Biochem J*, 2001, 358 (3): 705-715.
- [33] Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, et al. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8 [J]. *Mol Cell*, 2001, 8 (3): 601-611.
- [34] Ma Q, Geng Y, Xu W, et al. The role of translationally controlled tumor protein in tumor growth and metastasis of colon adenocarcinoma cells [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9 (1): 40-49.

(此文编辑 文玉珊)