

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-06-0548-05

普罗布考对炎症单核细胞亚群分化的影响及可能机制

张敏丽, 侯禹晨, 张大庆

(中国医科大学附属盛京医院心内科, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 单核细胞; 异质性; 普罗布考; 氧化应激; NADPH 氧化酶

[摘要] 目的 探讨普罗布考对炎症单核细胞亚群分化的影响及其可能机制。方法 用 8 周龄 C57BL/6 小鼠制备脾脏单细胞悬液, 以 100 kU/L 重组干扰素 γ 诱导单核细胞亚群分化, 再以 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考干预, 观察其对各单核细胞亚群分化的影响。用抗-CD11b-PE 及抗-Ly-6C-FITC 抗体进行细胞染色, 通过流式细胞仪检测各单核细胞亚群的分化情况, 再以 Flowjo 软件进行数据分析。利用细胞内细胞因子染色法, 以 2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯探针, 通过流式细胞仪检测各单核细胞亚群中活性氧(ROS)水平。用 NADPH 氧化酶试剂盒检测人单核细胞系 THP-1 细胞内 NADPH 氧化酶活性。结果 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考呈浓度依赖性地抑制脾脏原代细胞中 Ly-6C^{hi} 炎症单核细胞亚群的分化。Ly-6C⁺ 炎症单核细胞亚群中 ROS 水平是 Ly-6C⁻ 炎症单核细胞亚群的 2 倍, 同时 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考呈浓度依赖性地抑制 Ly-6C⁺ 炎症单核细胞亚群中 ROS 的产生。100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考显著抑制 THP-1 细胞内 NADPH 氧化酶的活性。结论 普罗布考可能通过干预 NADPH 氧化酶活性, 从而抑制 Ly-6C^{hi} 炎症单核细胞亚群的分化及其 ROS 的产生。

[中图分类号] R541.1

[文献标识码] A

The effect of probucol on the differentiation of inflammatory monocytes and its potential mechanism

ZHANG Min-Li, HOU Yu-Chen, ZHANG Da-Qing

(Department of Cardiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China)

[KEY WORDS] Monocyte; Heterogeneity; Probucol; Oxidative stress; NADPH oxidase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of probucol on the differentiation of inflammatory monocyte subsets and its potential mechanism. **Methods** The primary single cell suspension of spleen was prepared from 8 week old C57BL/6 mice. The differentiation of monocyte subsets was induced by 100 kU/L recombinant interferon- γ , then intervened with 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ probucol, in order to observe their effects on the differentiation of monocytes. The cells were stained with anti-CD11b-PE and anti-Ly-6C-FITC antibody, and the differentiation of monocyte subsets was detected by flow cytometry, then the data were analyzed by Flowjo software. Using intracellular cytokine staining and 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate probe, the level of reactive oxygen species (ROS) in monocyte subsets was detected by flow cytometry. NADPH oxidase activity in human monocytic cell line THP-1 was detected by using NADPH oxidase test kit. **Results** In a concentration dependent manner, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ probucol inhibited the differentiation of Ly-6C^{hi} inflammatory monocyte subsets in the spleen primary cells. The level of ROS in Ly-6C⁺ inflammatory monocyte subset was 2 times of that in Ly-6C⁻ inflammatory monocyte subset. At the same time, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ probucol inhibited the production of ROS in Ly-6C⁺ inflammatory monocyte subset in a concentration dependent manner. 100 $\mu\text{mol/L}$ probucol significantly inhibited the activity of NADPH oxidase in THP-1 cells. **Conclusion** Probucol may interfere with the activity of NADPH oxidase, thereby inhibiting the differentiation of Ly-6C^{hi} inflammatory monocyte subset and the production of ROS.

[收稿日期] 2016-08-19

[修回日期] 2017-01-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81200199)

[作者简介] 张敏丽, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为炎症单核细胞与动脉粥样硬化, E-mail 为 zhangminli081208@163.com。张大庆, 博士研究生导师, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化性心血管疾病的临床与基础, E-mail 为 zhangdaqing@vip.163.com。

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性病理状态,在各种危险因素作用下,循环中单核细胞(monocyte, MC)黏附并聚集在内皮下,分化为巨噬细胞后吞噬氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL),从而启动了动脉粥样硬化病变的发生发展^[1]。近年研究显示,在人类和小鼠中,单核细胞存在异质性,并且对动脉粥样硬化病变的贡献不同。在鼠类,依据单核细胞表面抗原 Ly-6C 的表达情况将其分为 Ly-6C^{hi}、Ly-6C^{mid}和 Ly-6C^{low}单核细胞亚群, Ly-6C^{hi}和 Ly-6C^{mid}被认为是炎症单核细胞, Ly-6C^{low}被认为是抗炎性单核细胞^[2]。前期研究显示, Ly-6C^{hi}和 Ly-6C^{mid}单核细胞亚群可分泌炎症因子,并可聚集到动脉粥样硬化病变处分化为巨噬细胞,并且还还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶介导的氧化应激反应在炎症单核细胞亚群分化中可能具有重要作用^[3]。普罗布考是一种具有抗氧化和抗动脉粥样硬化作用的药物。长期普罗布考治疗高危纯合子家族性高胆固醇血症的患者,能够降低其心血管风险达 87%^[4]。有研究显示普罗布考能够抑制 ox-LDL 的形成^[5],提高高密度脂蛋白抗氧化成分屏氧酶的血清水平^[6],清除细胞内氧自由基^[7],抑制血管壁的 NADPH 氧化酶的活性^[8],降低基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase, MMP-2)和 MMP-9 的活性^[9];但有关普罗布考对各单核细胞亚群分化的影响尚不清楚。因此,本研究利用体外培养脾脏原代单核细胞,进一步观察普罗布考对各单核细胞亚群分化的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 脾脏原代细胞培养及普罗布考干预

利用 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠在腹腔深麻醉状态下去脾脏后制备脾脏单细胞悬液(已去除红细胞),以 1.5×10^9 个/L 的密度接种于含有 RPMI 1640 培养基、10% 胎牛血清(BI, Kibbutz Beit-Haemek, Israel)、2 mmol/L 谷氨酰胺、10 mmol/L HEPES、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、1 mmol/L 丙酮酸钠、50 $\mu\text{mol/L}$ 巯基乙醇(Invitrogen, Carlsbad, California)的 24 孔板中,以 100 kU/L 重组干扰素 γ (recombinant interferon- γ , rIFN- γ)诱导分化。培养 24 h 后以 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考进行干预,继续培养 48 h。

1.2 流式细胞仪检测单核细胞亚群分化

收集细胞后以抗-CD11b-PE 和抗-Ly-6C-FITC

(BD PharmingenTM, San Diego, California) 抗体 4 度染色 30 min, BD FACS Calibur 流式细胞仪检测单核细胞亚群的分化情况, Flowjo 软件分析数据。去除红细胞及细胞碎片的细胞设为门 i, 而与淋巴细胞及中性粒细胞比较, 单个核细胞(mononuclear cell, MNC) 颗粒较少, 反映为较低的侧向角散射(side scatter, SSC), 体积较大, 反映为较大的前向角散射(forward scatter, FSC), 因此根据体积和颗粒情况将 MNC 设为门 ii, 单核细胞被定义为 CD11b⁺MNC, 进一步根据单核细胞表面 Ly-6C 抗原的表达量, 将单核细胞进一步分为 Ly-6C^{hi}、Ly-6C^{mid}和 Ly-6C^{low}三个亚群。

1.3 单核细胞亚群内活性氧的检测

以 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯探针(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate, DCFH-DA; 碧云天, 北京)检测各单核细胞亚群内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。脾脏原代细胞以 100 kU/L rIFN- γ 诱导炎症单核细胞亚群分化, 在培养后 24 h 加入 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考, 继续培养 48 h。收集细胞后, 于 0.5 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。以 PBS 洗涤 2 次, 去除未进入细胞内的探针, 后以抗-CD11b-PE 和抗-Ly-6C-APC(BD PharmingenTM, CA) 荧光抗体 4 度染色, BD FACS Calibur 流式细胞仪检测单核细胞分化情况, Flowjo 软件分析数据。根据 FSC 及 SSC 设门 MNC 即门 ii, 再以 Ly-6C 表达将 CD11b⁺MNC 分为 Ly-6C⁺和 Ly-6C⁻细胞亚群。再进一步分析 Ly-6C⁺和 Ly-6C⁻单核细胞亚群中 DCFH-DA 的含量, 将含有 DCFH-DA 的细胞定义为 DCFH-DA⁺细胞, 代表细胞内 ROS 的产生。

1.4 NADPH 氧化酶活性检测

为了探讨普罗布考影响炎症单核细胞分化的机制, 利用人单核细胞系 THP-1 细胞检测普罗布考对 NADPH 氧化酶的影响。首先以 100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考干预 30 min, 再以 1 mg/L 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)干预 30 min 后进行裂解, 之后进行蛋白浓度测定, 在 96 孔板中分别加入阴性液、样品及专性液和样品, 采用 NADPH 氧化酶检测试剂盒(Gemand, 上海)分别检测背景对照、样品总活性及样品非特异活性, 通过公式计算样品特异活性。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 所有实验均独立重复 3 次。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 普罗布考显著抑制 Ly-6C^{hi} 单核细胞亚群的分化

25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考显著抑制 Ly-6C^{hi} 单核细胞亚群的分化,分别达 70%、63%、54%,但对 Ly-6C^{mid} 和 Ly-6C^{low} 单核细胞亚群分化无显著影响(图 1)。

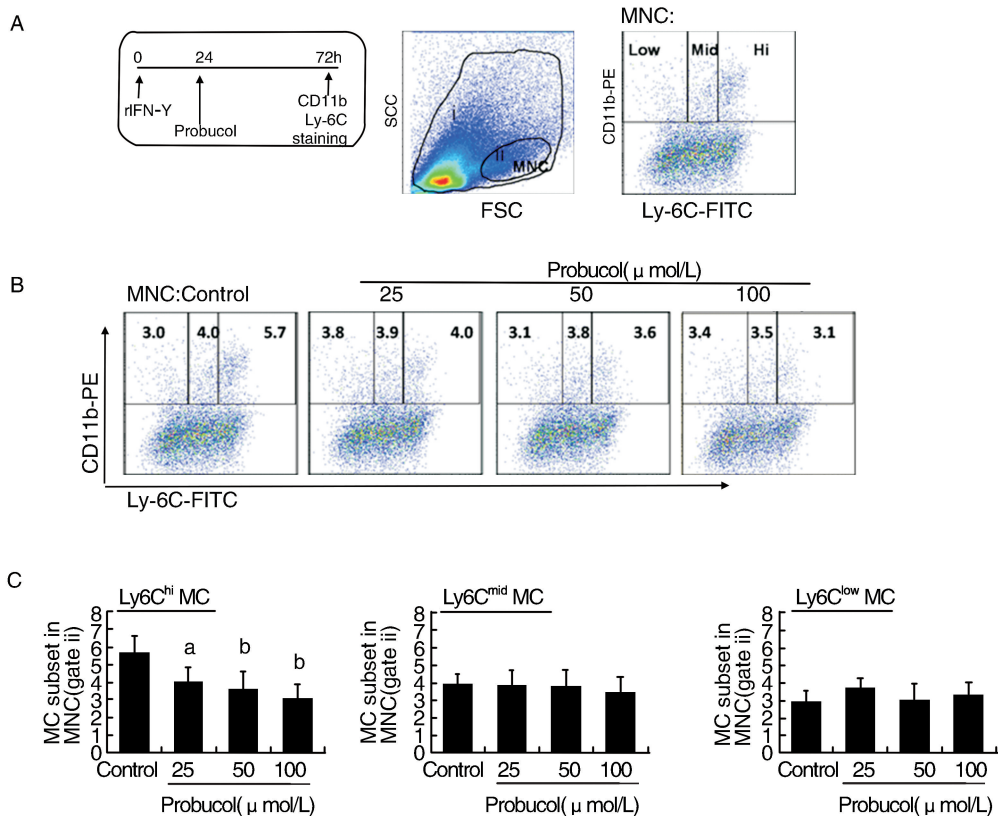


图 1. 普罗布考抑制 Ly-6C^{hi} 单核细胞亚群的分化 ($n=3$) A 为 CD11b⁺ MNC, 根据 Ly-6C 表达将其分为 Ly-6C^{hi}、Ly-6C^{mid} 和 Ly-6C^{low} 单核细胞亚群; B、C 为普罗布考干预后, Ly-6C^{hi}、Ly-6C^{mid} 和 Ly-6C^{low} 单核细胞亚群分化的散点图、柱形图。a 为 $P=0.031$, b 为 $P=0.004$, 与对照组比较。

Figure 1. Probenecol inhibits Ly-6C^{hi} monocyte subset differentiation ($n=3$)

2.2 普罗布考抑制脾脏原代 Ly-6C⁺ 单核细胞亚群中活性氧的产生

为了进一步探讨普罗布考抑制 Ly-6C^{hi} 单核细胞亚群分化的可能机制,我们检测了普罗布考干预后各单核细胞亚群中 ROS 的水平。我们观察到 Ly-6C⁺ 单核细胞亚群中 ROS 的水平是 Ly-6C⁻ 的约 2 倍。我们又观察到 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考可显著抑制 Ly-6C⁺ 单核细胞亚群中 ROS 的产生达 68%、62%、34% (图 2), 使 Ly-6C⁻ 单核细胞亚群中 ROS 降到 86%、51%、48%。

2.3 普罗布考抑制 THP-1 细胞中 NADPH 氧化酶活性

由于 NADPH 氧化酶是产生 ROS 最主要的酶,因此我们进一步观察了普罗布考对 NADPH 氧化酶活性的影响。我们观察到 100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考使 THP-1 细胞中 NADPH 氧化酶活性降到 75% (图 3)。

3 讨论

我们前期研究显示 Ly-6C^{hi} 炎性单核细胞亚群的分化在动脉粥样硬化病变的进展中具有重要作用,且氧化应激反应可能参与此过程^[2]。普罗布考作为一种抗氧化剂,能够显著抑制动脉粥样硬化病变的进程^[10],但其抗动脉粥样硬化的机制尚未完全阐明。本研究进一步证实普罗布考能够抑制 Ly-6C^{hi} 炎性单核细胞亚群的分化,可能与其抑制 NADPH 氧化酶活性、降低 ROS 的产生有关,这可能是普罗布考抗动脉粥样硬化的重要机制之一。

目前研究显示,单核细胞具有异质性,且该现象在鼠类和人类普遍存在。在小鼠中, Ly-6C^{hi} 和 Ly-6C^{mid} 单核细胞亚群与炎症反应有关^[3]。本团队既往研究显示,在各种危险因素的作用下,循环炎

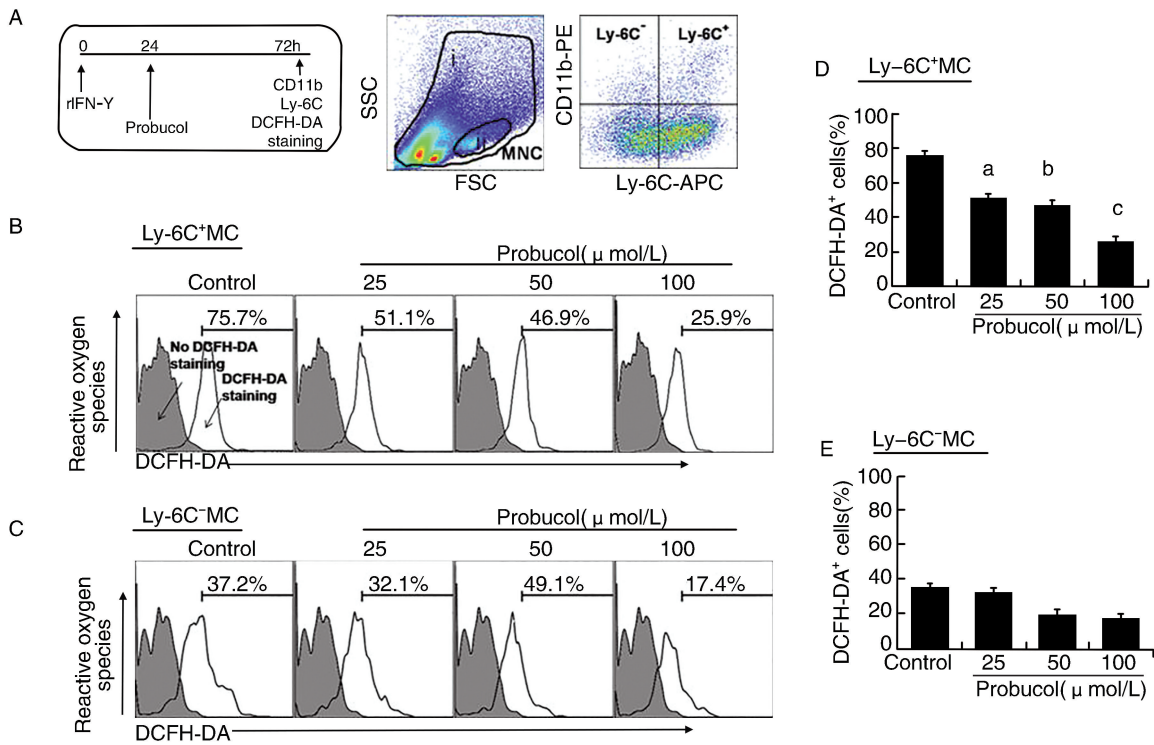


图 2. 普罗布考抑制 Ly-6C⁺ 单核细胞亚群 ROS 的产生 (n=3) A 为 CD11b⁺MNC, 根据 Ly-6C 表达将其分为 Ly-6C⁺ 和 Ly-6C⁻ 单核细胞亚群, 含有 DCFH-DA 的细胞被定义为 DCFH-DA⁺ 细胞; B、C 为普罗布考干预后 Ly-6C⁺ 和 Ly-6C⁻ 单核细胞亚群中 ROS 水平; D、E 为 Ly-6C⁺ 和 Ly-6C⁻ 单核细胞亚群中 ROS 水平的量化柱状图。a 为 P=0.012, b 为 P=0.005, c 为 P=0.001, 与对照组比较。

Figure 2. Probuco suppresses the ROS production in Ly-6C⁺ monocyte subset (n=3)

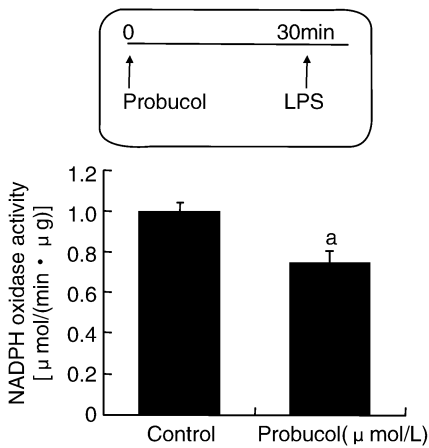


图 3. 普罗布考抑制 THP-1 细胞 NADPH 氧化酶的活性 (n=3) 100 μmol/L 普罗布考干预 30 min 后以 1 mg/L LPS 诱导 30 min, 然后用酶标仪测定吸光值变化。a 为 P=0.019, 与对照组比较。

Figure 3. Probuco inhibits the NADPH oxidase activity in THP-1 cells (n=3)

性单核细胞亚群增生并进入内皮下, 分化为巨噬细胞, 从而促进血管壁的炎症反应和动脉粥样硬化病变的进展^[2], 可见如何干预炎性单核细胞亚群的分化和增生是目前待解决的问题。在高胆固醇饮食

喂养的大鼠中, 普罗布考能够抑制单核细胞黏附、浸润到内皮下^[11], 提示普罗布考干预单核细胞进入内皮下是其重要的抗动脉粥样硬化机制, 但有关普罗布考对炎性单核细胞亚群分化的影响尚未明确。本研究证实了普罗布考能够呈浓度依赖性地显著抑制 Ly-6C^{hi} 单核细胞亚群的分化。本团队前期研究显示, Ly-6C^{hi}+mid 单核细胞是主要分泌白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 的炎性单核细胞亚群, 参与机体的炎症反应^[3]; 本研究观察到普罗布考能够抑制 Ly-6C^{hi} 炎性单核细胞亚群的分化, 这可能是普罗布考抑制机体炎症反应的重要机制之一。

本研究进一步观察了普罗布考抑制炎性单核细胞亚群分化的可能机制。本团队前期研究显示氧化应激反应可能参与炎性单核细胞亚群的分化。普罗布考分子结构中包含 2 个酚羟基, 能够捕捉氢离子, 具有强大的抗氧化作用, 因此普罗布考有可能通过抗氧化作用参与调控炎性单核细胞亚群的分化。另外, 有关各单核细胞亚群对机体氧化应激的贡献尚不清楚。因此, 本团队采用 DCFH-DA 探针检测了各单核细胞亚群内 ROS 的水平。首先验证了 Ly-6C⁺ 单核细胞亚群相对于 Ly-6C⁻ 单核细胞

亚群产生更多的 ROS,丰富了 Ly-6C⁺单核细胞的炎症功能及参与机体氧化应激反应。另外,有研究表明普罗布考是一种强有力的氧自由基清除剂,能够抑制 Cu²⁺诱导的巨噬细胞脂质氧化,发挥强大的抗动脉粥样硬化作用^[8]。最新研究显示普罗布考能够抑制 ROS 的产生,从而保护内皮细胞免受 ox-LDL 的损伤^[11];普罗布考能否抑制炎症单核细胞亚群中氧化应激反应还未报道。本研究结果显示 25、50、100 μmol/L 普罗布考呈浓度依赖性地抑制炎症单核细胞亚群中 ROS 的水平,表明普罗布考可能通过抑制炎症单核细胞亚群的分化、减少 ROS 的产生,来抑制机体的氧化应激反应。

本团队既往研究提示 NADPH 氧化酶参与炎症单核细胞亚群的分化^[2],且单核细胞或巨噬细胞中的 NADPH 氧化酶是产生 ROS 最主要的酶,在动脉粥样硬化病变形成中具有重要作用^[12]。因此,本研究进一步利用人单核细胞系检测了普罗布考对人单核细胞中 NADPH 氧化酶活性的影响,结果证实了普罗布考能显著抑制人单核细胞中 NADPH 氧化酶的活性,说明普罗布考可能通过抑制 NADPH 氧化酶活性的途径来干预炎症单核细胞亚群的分化及其 ROS 的产生。

综上所述,普罗布考可显著抑制炎症单核细胞亚群的分化及其 ROS 的产生,该过程可能与其抑制 NADPH 氧化酶活性有关;这可能是普罗布考抗动脉粥样硬化的重要机制之一,亦为临床应用普罗布考干预炎症单核细胞亚群的分化提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Kevin KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(2): 77-86.
- [2] Zhang D, Jiang X, Fang P, et al. Hyperhomocysteinemia promotes inflammatory monocyte generation and accelerates atherosclerosis in transgenic cystathionine β-synthase-deficient mice [J]. *Circulation*, 2009, 120(19): 1 893-902.
- [3] Zhang D, Fang P, Jiang X, et al. Severe hyperhomocysteinemia promotes bone marrow-derived and resident inflammatory monocyte differentiation and atherosclerosis in LDLr/CBS-deficient mice [J]. *Circ Res*, 2012, 111(1): 37-49.
- [4] Yamashita S, Hbujo H, Arai H, et al. Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events: a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2008, 15(6): 292-303.
- [5] Liu GX, Ou DM, Li LX, et al. Probucol inhibits oxidized-low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to endothelial cells in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(6): 516-522.
- [6] Yi GH, Mo ZC, Ye YP. Effects of probucol on paraoxonase 1 expression and oxidative stress in hyperlipidemic mice [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(3): S19-S20.
- [7] Liao DF, Chen JX, Huang HL, et al. Correlation between the protection of probucol on injury of endothelial cells by free radicals and the activity of nitric oxide [J]. *Chin J Arterioscler*, 1994, 2(2-3): 67-71.
- [8] Umeji K, Umemoto S, Itoh S. Comparative effects of pitavastatin and probucol on oxidative stress, Cu/Zn superoxide dismutase, PPAR-γ, and aortic stiffness in hypercholesterolemia [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(5): H2 522-532.
- [9] Jiang JL, Zhang XH, Li NS, et al. Probucol decreases asymmetrical dimethylarginine level by alternation of protein arginine methyltransferase I and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2006, 20(4): 281-294.
- [10] Zhu H, Jin X, Zhao J, et al. Probucol protects against atherosclerosis through lipid-lowering and suppressing immune maturation of CD11C⁺ dendritic cells in STZ-induced diabetic LDLR^{-/-} mice [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 65(6): 620-627.
- [11] Qing BZ, Li MC, Zhi HS, et al. Probucol protects endothelial progenitor cells against oxidized low-density lipoprotein via suppression of reactive oxygen species formation in vivo [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(1): 89-101.
- [12] Manea A, Manea SA, Gan AM, et al. Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5, a potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461(1): 172-179.

(此文编辑 曾学清)