

芍药苷对脂多糖诱导的 THP-1 细胞炎症因子分泌和 ABCA1 表达的影响

袁娜¹, 朱明燕², 杨宏发², 曾高峰², 王波²

(南华大学附属第二医院 1.急诊科, 2.心血管内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 芍药苷; 脂多糖; 炎症因子; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1

[摘要] 目的 观察芍药苷(PF)对脂多糖(LPS)诱导的 THP-1 细胞炎症因子和三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1)表达的影响。方法 用含 PF (10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} mol/L) 培养基预处理细胞 0.5 h,再用含 LPS (1 mg/L) 培养基共同培养细胞 24 h。ELISA 检测细胞培养液上清中白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 8 (IL-8) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平,Western blot 检测细胞中 ABCA1 蛋白的表达。结果 与对照组比较,LPS 组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 的水平显著性升高 ($P < 0.05$),ABCA1 蛋白表达显著性下调 ($P < 0.05$)。与 LPS 组比较,LPS+PF (10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L) 组上清液中 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 的水平显著性降低 (均 $P < 0.05$),ABCA1 蛋白表达显著性上调 ($P < 0.05$),呈现浓度依赖性。结论 芍药苷抑制 LPS 诱导的 THP-1 细胞炎症因子分泌和 ABCA1 表达下调。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effect of paeoniflorin on secretion of inflammatory factors and expression of ATP-binding cassette transporter A1 in THP-1 cells

YUAN Na¹, ZHU Ming-Yan², YANG Hong-Fa², ZENG Gao-Feng², WANG Bo²

(1.Department of Emergency, 2.Department of Cardiovascular, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Paeoniflorin; Lipopolysaccharide; Inflammatory factors; ATP-binding cassette transporter A1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of paeoniflorin (PF) on secretion of inflammatory factors and expression of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in THP-1 cells. **Methods** After pretreatment with PF (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} mol/L) for 0.5 h, THP-1 cells was co-treated by LPS (1 mg/L) and PF for 24 h. Levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in supernatant of cell culture medium were tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Expression of ABCA1 in THP-1 cells were measured by Western blot. **Results** Compared with control group, the levels of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α in supernatant of cell culture medium were significantly increased (all $P < 0.05$) and expression of ABCA1 was significantly down-regulated in LPS group ($P < 0.05$). Compared with LPS group, the levels of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α in supernatant of cell culture medium were significantly decreased (all $P < 0.05$) and expression of ABCA1 was significantly up-regulated in LPS+PF (10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} mol/L) group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Paeoniflorin inhibits the secretion of inflammatory factors and down-regulation of ABCA1 expression induced by LPS in THP-1 cells.

冠心病的直接病因是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As), 这与血脂水平升高和血管炎症密切相关, 血管炎症的产生在 As 病变的形成中发挥了重要的作用^[1]。单核/巨噬细胞在血管局部浸润是形成动

脉粥样斑块的主要原因之一, 因此抑制炎症反应是抗 As 的重要途径。芍药苷 (paeoniflorin, PF) 是从中药芍药中提取出来的生物活性成分, 是中药芍药的有效单体成分, 也是一种单萜类糖苷化合物, 分子

[收稿日期] 2017-07-14

[修回日期] 2017-09-07

[基金项目] 衡阳市科技计划项目 (2015KJ58)

[作者简介] 袁娜, 硕士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化性疾病的防治。通讯作者王波, 硕士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化性疾病的防治, E-mail 为 wangbohy46@126.com。

式为 $C_{23}H_{28}O_{11}$ 。PF 具有广泛的药理作用,主要包括抗 As、抗炎、降血糖、抑制肿瘤、治疗痴呆性疾病及免疫调节等作用^[2-4],但其抗 As 的机制还没有阐明清楚。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 被称逆向胆固醇转运的“看门人”,发挥了抗 As 作用,近年来发现 ABCA1 具有抗炎作用^[5-6]。但 PF 对炎症细胞炎症因子的分泌及 ABCA1 表达的影响还不明确。因此本研究旨在观察 PF 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 THP-1 细胞炎症因子分泌和 ABCA1 表达的影响,从 ABCA1 抗炎症的角度探讨 PF 抗 As 的机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

PF 由中国药品生物制品检定所提供;LPS 购自美国 Sigma 公司;白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的酶联免疫吸附检测试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司;兔抗人 ABCA1 一抗以及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养及实验分组

THP-1 细胞由南华大学心血管疾病研究所提供。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养 THP-1 细胞于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中。THP-1 细胞呈悬浮型生长,每 2~3 天换液一次,当细胞生长至 $(5\sim 6)\times 10^9$ cells/L 时进行细胞传代。实验分组:①对照组;②LPS 组:用含 LPS (1 mg/L) 的培养基培养细胞 24 h;③PF 组:用含 PF (10^{-4} mol/L) 的培养基培养细胞 24 h;④LPS+PF 组:先用含 PF (10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L) 培养基预处理细胞 0.5 h,再加入 LPS (1 mg/L) 共同处理细胞 24 h。

1.3 ELISA 检测细胞培养液上清中 IL- 1β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平

用无血清培养基培养 THP-1 细胞 24 h 后,将细胞加入 6 孔板中,加入 LPS 和 PF 后继续培养 24 h,收集细胞,1000 r/min 离心 10 min,收集细胞上清液。采用 ELISA 检测试剂盒按说明要求进行操作。分别将细胞上清液或不同浓度的标准品加入反应

孔中,空白孔不加, 37°C 条件下孵育 90 min。PBS 洗板 4 次,加入生物素标记的抗体工作液, 37°C 孵育 60 min。清洗板后加入酶结合物工作液, 37°C 孵育 30 min。洗板后加入显色剂, 37°C 避光反应 15 min。加终止液终止反应,酶标仪测量 450 nm 波长的吸光度。根据标准品数据绘制标准曲线,根据标准曲线计算细胞上清液中 IL- 1β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平。

1.4 Western blot 检测

收集各实验组细胞,置于冰上,加入 1 mL RIPA 蛋白裂解液裂解 30 min,离心提取细胞总蛋白,BCA 法测量蛋白浓度。蛋白样本在 $2\times$ 十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 凝胶加样缓冲液中煮沸。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,用半干转膜仪将蛋白转移到 PVDF 膜。10% 脱脂牛奶室温下孵育 PVDF 膜 2 h 用于封闭非特异性抗原。加入兔抗人 ABCA1 (1:100) 和 β -actin (1:600) 的一抗, 4°C 过夜。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, 4°C 下孵育 4 h。蛋白质印迹荧光检测试剂盒曝光于 X 光片,经显影、定影后,ChemiDoc MP 多色荧光凝胶成像分析系统中观察并记录结果,并采用 Image J 软件进行灰度分析,采用目的蛋白与 β -actin 吸光度比值表示蛋白的相对表达量。

1.5 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PF 对 LPS 诱导的 THP-1 细胞 IL- 1β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 的影响

与对照组比较,LPS 组细胞上清液中 IL- 1β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 的水平显著性升高 ($P<0.05$)。与 LPS 组比较,LPS+PF (10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L) 组上清液中 IL- 1β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 的水平显著性降低 ($P<0.05$),LPS+PF (10^{-7} mol/L) 组上清液中 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的水平显著性降低 ($P<0.05$),呈现浓度依赖性 (表 1)。

2.2 PF 对 LPS 诱导的 THP-1 细胞 ABCA1 表达的影响

与对照组比较,LPS 组细胞中 ABCA1 蛋白表达显著性下调 ($P<0.05$)。与 LPS 组比较,LPS+PF (10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L) 组细胞中 ABCA1 蛋白表达显著性上调 ($P<0.05$),呈现浓度依赖性 (图 1)。

表 1. 芍药苷对 LPS 诱导的 THP-1 细胞 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 的影响($\bar{x}\pm s$, ng/L, $n=5$)Table 1. Effect of paeoniflorin on the secretion of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α induced by LPS in THP-1 cells($\bar{x}\pm s$, ng/L, $n=5$)

分 组	IL-1 β	IL-6	IL-8	TNF- α
对照组	64.23 \pm 5.71	397.74 \pm 31.27	85.16 \pm 6.75	28.73 \pm 3.75
LPS 组	137.65 \pm 8.65 ^a	743.29 \pm 542.78 ^a	254.79 \pm 31.22 ^a	245.13 \pm 15.47 ^a
PF 组	62.83 \pm 7.23	378.14 \pm 41.33	84.75 \pm 7.18	27.11 \pm 5.36
LPS+PF(10 ⁻⁸ mol/L) 组	135.82 \pm 11.36	725.48 \pm 87.66	248.61 \pm 18.74	231.97 \pm 18.94
LPS+PF(10 ⁻⁷ mol/L) 组	127.85 \pm 8.94	657.88 \pm 34.95 ^b	189.78 \pm 15.69 ^b	205.74 \pm 17.32 ^b
LPS+PF(10 ⁻⁶ mol/L) 组	104.16 \pm 10.26 ^b	597.54 \pm 64.37 ^b	154.32 \pm 8.44 ^b	159.63 \pm 8.07 ^b
LPS+PF(10 ⁻⁵ mol/L) 组	87.21 \pm 7.39 ^b	498.33 \pm 37.12 ^b	127.55 \pm 10.73 ^b	97.31 \pm 7.26 ^b
LPS+PF(10 ⁻⁴ mol/L) 组	69.69 \pm 5.43 ^b	427.21 \pm 42.87 ^b	94.39 \pm 5.97 ^b	45.82 \pm 4.33 ^b

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 LPS 组比较。

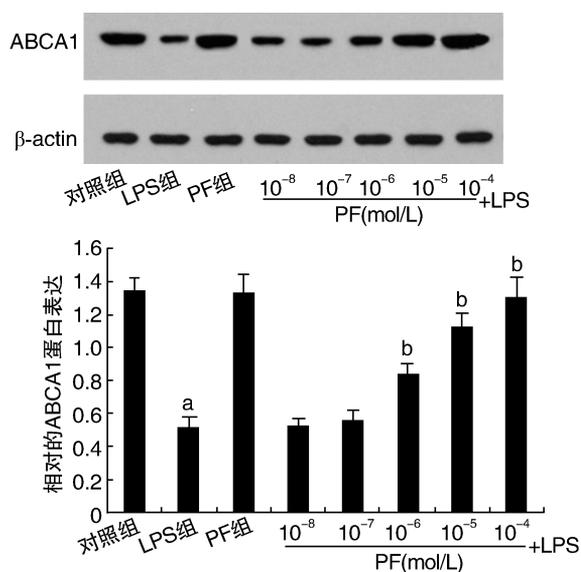


图 1. 芍药苷对 LPS 诱导的 THP-1 细胞 ABCA1 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 LPS 组比较。

Figure 1. Effect of paeoniflorin on the expression of ABCA1 induced by LPS in THP-1 cells($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

3 讨 论

研究表明,As 是一种慢性炎症性疾病,是血管壁对各种损伤的一种异常炎症反应,具有经典炎症的变性、渗出及增生的特点。单核/巨噬细胞等炎症细胞在血管壁局部浸润,分泌大量的炎症因子,对 As 的炎症反应发挥了关键作用^[7]。因此抑制炎症反应是抗 As 的重要举措。PF 是一种单萜类葡萄糖苷,为毛茛科植物芍药根的主要生物活性成分,研究显示 PF 具有抗 As 的作用,但机制不明^[8]。本研究结果表明 PF 能抑制 LPS 诱导的 THP-1 细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 的分泌。

THP-1 细胞是来源于人急性单核细胞白血病细

胞的单核细胞系,其细胞表型和分化能完整地代表人单核-巨噬细胞系统的功能趋势,是常用来研究单核-巨噬细胞功能的细胞模型。LPS 是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种对宿主是有毒性的活性成分, LPS 通过活化核因子 κ B 对 THP-1 细胞具有明显的诱导激活作用,并诱导其产生炎症因子,介导炎症反应^[9]。IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 是由单核细胞、内皮细胞、成纤维细胞等炎症细胞在应答感染时产生的致炎性因子。IL-1 β 和 IL-8 可趋化并激活中性粒细胞。TNF- α 在早期的炎症反应中发挥了重要作用, TNF- α 可引起激发状态的免疫细胞产生更多的炎症介质,形成“瀑布式反应”,从而导致组织损伤。IL-6 具有增强 TNF- α 损害的作用,诱导 T、B 淋巴细胞分化,放大炎症反应,从而导致组织细胞损伤^[10]。本研究结果表明 PF 能减少 LPS 诱导的 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 炎症因子的产生,从而抑制炎症反应,这可能是 PF 发挥抗 As 的作用机制之一。

本研究中,LPS 可降低 THP-1 细胞中 ABCA1 的表达,而 PF 干预可以抑制 LPS 诱导的 ABCA1 表达的降低。ABCA1 是调节胆固醇逆向转运的关键信号分子,也是调节慢性炎症的重要因素,ABCA1 功能失调可引起慢性炎症,参与 As 的发生^[11-12]。而炎症又可以抑制 ABCA1 的表达,降低其抗炎作用^[13],本研究结果与其一致。提示 PF 抗炎和抗 As 作用可能与降低 ABCA1 的表达有关。但是 PF 调节炎症反应及抗 As 的关系及详细机制还有待进一步的研究。

总之,本研究结果表明 PF 抑制 LPS 诱导的 THP-1 细胞炎症因子分泌和 ABCA1 表达下调,从而发挥抗炎和抗 As 的作用,为阐明 PF 抗 As 的机制提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. Are short chain fatty acids

- in gut microbiota defensive players for inflammation and atherosclerosis[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2017, 24(7): 660-672.
- [2] 张倩, 周静, 黄敏, 等. 芍药苷对细菌脂蛋白诱导的 THP-1 细胞炎症因子表达的影响[J]. *江苏医药*, 2011, 37(9): 1 002-004.
- [3] Liu H, Wang J, Wang J, et al. Paeoniflorin attenuates A β 1-42-induced inflammation and chemotaxis of microglia in vitro and inhibits NF- κ B- and VEGF/Flt-1 signaling pathways[J]. *Brain Res*, 2015, 1618(1): 149-158.
- [4] 吴东方, 靳善睿, 刘娟, 等. 芍药苷抗 ApoE 基因缺失小鼠动脉粥样硬化作用的初步研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(5): 385-388.
- [5] 韩耀霞, 张强, 梁斌, 等. ABCA1 在冠心病及其发病机制中的研究新进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(4): 417-421.
- [6] Yin K, Liao DF, Tang CK. ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport [J]. *Mol Med*, 2010, 16(9-10): 438-449.
- [7] Fredman G, Tabas I. Boosting inflammation resolution in atherosclerosis: the next frontier for therapy [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(6): 1 211-221.
- [8] 许文平, 王艳艳, 孟笑玮, 等. 芍药苷对 ApoE^{-/-}小鼠血脂及主动脉斑块的影响[J]. *天津中医药大学学报*, 2014, 33(4): 210-212.
- [9] Shen L, Zhou T, Wang J, et al. Daphnetin reduces endotoxin lethality in mice and decreases LPS-induced inflammation in Raw264.7 cells via suppressing JAK/STATs activation and ROS production [J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(7): 579-589.
- [10] Zhang M, Zhou J, Wang L, et al. Caffeic acid reduces cutaneous tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-6 and IL-1 β levels and ameliorates skin edema in acute and chronic model of cutaneous inflammation in mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(3): 347-354.
- [11] Bochem AE, van der Valk FM, Tolani S, et al. Increased systemic and plaque inflammation in ABCA1 mutation carriers with attenuation by statins [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(7): 1 663-669.
- [12] 施凤飞, 魏伟, 汪玉成, 等. 24-乙酰泽泻醇 A 对氧化型低密度脂蛋白诱导巨噬细胞脂代谢因子 ABCA1、CD36 及炎症因子 CD147、MMP-9 的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(1): 7-12.
- [13] Bi X, Vitali C, Cuchel M. ABCA1 and inflammation: from animal models to humans [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(7): 1 551-553.
- (此文编辑 文玉珊)