

姜黄素通过影响巨噬细胞的极性延缓动脉粥样硬化进展

黄科^{1,2}, 周瑶瑶^{1,2}

(浙江省金华市中心医院 1. 健康管理科, 2. 心内一科, 浙江省金华市 321004)

[关键词] 姜黄素; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞极化; ApoE 基因敲除小鼠

[摘要] **目的** 研究姜黄素对 ApoE 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠动脉粥样硬化进展及斑块中巨噬细胞极性的影响。**方法** 用高脂高胆固醇饮食饲养 ApoE^{-/-} 小鼠建立动脉粥样硬化模型, 设立姜黄素治疗组、阿托伐他汀治疗组和高脂组; 通过免疫组织化学 (HE 染色、油红 O 染色、Masson 染色、苏木精染色) 及免疫荧光染色检测主动脉斑块形态及不同亚型巨噬细胞的含量。通过实时荧光定量 PCR 检测主动脉组织中炎症因子的表达。**结果** 姜黄素干预能减轻 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化病变, 并降低动脉粥样硬化斑块的易损指数。姜黄素降低动脉粥样硬化斑块内 M1/M2 巨噬细胞的比值, 减少 M1 型巨噬细胞分泌的促炎因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达, 促进 M2 型细胞因子 IL-10、Ym1 和 Fizz1 的表达。**结论** 姜黄素可通过影响斑块中巨噬细胞的极性、抑制相关的炎症反应, 从而延缓 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的进展。

[中图分类号] R96; R5

[文献标识码] A

Curcumin alleviates the progression of atherosclerosis through its action on macrophage polarization

HUANG Ke, ZHOU Yaoyao

(Department of Cardiology, Jinhua Municipal Hospital, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

[KEY WORDS] curcumin; atherosclerosis; macrophage polarization; ApoE^{-/-} mice

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of curcumin on the progression of atherosclerosis and macrophage polarization in vivo. **Methods** The apolipoprotein E deficient (ApoE^{-/-}) mice were fed with high fat diet to establish atherosclerosis model. The aortas were isolated for haematoxylin and eosin, masson trichrome, picosirus red, oil red O and immunofluorescence staining. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and CD206 were utilized as biomarkers of M1 and M2 phenotypes, respectively. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was carried out to examine the gene expression of inflammatory factors. **Results** Curcumin significantly decreased atherosclerotic burden and plaque vulnerability in the experimental atherosclerosis model. Furthermore, curcumin decreased the ratio of M1/M2 macrophages together with the gene expressions of pro-inflammatory interleukin 1beta (IL-1 β), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), but promoted the levels of anti-inflammatory cytokines IL-10, Ym1, Fizz1 in the atherosclerotic plaque. **Conclusion** Curcumin could alleviate the progression of atherosclerosis by inhibiting macrophage polarizing towards M1 phenotype as well as inflammatory response.

动脉粥样硬化作为一种慢性炎症性疾病, 各种炎症介质参与其发生发展。其中, 巨噬细胞在动脉粥样硬化的发病过程中扮演了非常重要的角色^[1]。姜黄素是姜黄根中的多酚成分, 具有抗氧化、抗炎、抗微生物和抗凋亡等多种药理活性^[2-4]。有研究证实姜黄素具有抗动脉粥样硬化及调节巨噬细胞功

能的作用^[5-7]。然而, 大多数针对姜黄素对巨噬细胞功能的研究都是在体外进行^[8-9]。在本研究中, 我们通过 ApoE 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠建立动脉粥样硬化模型, 探讨姜黄素是否能延缓动脉粥样硬化的进展, 并进一步研究姜黄素对小鼠体内巨噬细胞的表型及功能的免疫调节作用。

[收稿日期] 2018-10-09

[修回日期] 2018-11-15

[基金项目] 浙江省科技计划项目 (2017C37129)

[作者简介] 黄科, 副主任医师, 研究方向为心血管疾病及动脉粥样硬化的综合防治, E-mail 为 5012607@qq.com。通信作者周瑶瑶, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病及动脉粥样硬化的综合防治, E-mail 为 joyoyo88@163.com。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠(品系 C57BL/6J, 购于常州卡文斯实验动物有限公司), 均为雄性, 分组为: (1) 普食对照组(Control): 给予普通饲料喂养; (2) 高脂(high-fat diet, HFD) 组: 给予高脂饲料(含 1.25% 胆固醇、1.25% 脂肪) 喂养; (3) 阿托伐他汀(Atorvastatin) 治疗组: 给予高脂饲料+阿托伐他汀[10 mg/(kg·d)] 喂养; (4) 姜黄素(curcumin) 治疗组: 给予高脂饲料+姜黄素[100 mg/(kg·d)] 喂养。所有小鼠自由饮水饮食, 并在相同的 SPF 级环境下饲养 16 周。

1.2 实验试剂及仪器

姜黄素、油红 O、苏木精、酸性品红购于 Sigma 公司; 诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 抗体购于 CST 公司; CD206、 α 平滑肌细胞抗体(α -SAMC) 购于 Abcam 公司; 抗单核巨噬细胞(MOMA-2) 抗体购于 SantaCruz 公司; 荧光(CY3) 标记羊抗兔 IgG、荧光(CY3) 标记羊抗小鼠 IgG 及 DAPI 购于碧云天公司; cDNA 合成试剂盒和荧光定量 PCR 试剂购于 TaKaRa 公司。低温高速离心机为德国 Sigma 公司产品; Real-Time PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司产品; 荧光正置显微镜为日本 Carl Zeiss 公司产品; 普通正置显微镜为日本 Olympus 公司产品; 图像分析软件为美国 Image Pro Plus 6.0。

1.3 免疫染色

麻醉小鼠后解剖取出胸主动脉, 主动脉根部连续切片, OCT 包埋切片后分别行 HE 染色、油红 O 染色、Masson 染色及苏木精染色, 用于观察血管病理形态变化, 测量内膜、中膜厚度, 计算校正斑块面积(斑块面积/血管横截面积) 及脂质中心面积占斑块面积百分比。免疫荧光染色方面, MOMA-2 抗体及 α -SAMC 抗体分别用于检测巨噬细胞和平滑肌细胞的含量; iNOS 抗体及 CD206 抗体分别用于检测动脉粥样硬化斑块中的 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞。染色完成后使用正置(荧光) 显微镜观察组织切片的染色情况并进行拍照, 采用 Image Pro Plus 6.0 对图像进行分析。计算时每个样本选取 4 个切面的平均值。通过分析斑块脂质、巨噬细胞、胶原纤维和平滑肌细胞含量, 计算易损指数: 易损指数 = (巨噬细胞+脂质) 阳性面积百分比/(平滑肌细胞+胶原) 阳性面积百分比^[10-11]。

1.4 实时荧光定量 PCR

Trizol 处理各组小鼠的主动脉组织, 提取总 RNA, 反转录成 cDNA。根据 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 试剂盒的使用说明, 检测 M1 型巨噬细胞相关的炎症因子[白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β), iNOS, 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)] 和 M2 型巨噬细胞相关的炎症因子(IL-10, Ym1, Fizz1) 的 mRNA 水平, 所有数据均重复检测 3 次。应用 Primer 5.0 设计检测基因引物, 内参基因为 β -actin。IL-1 β 引物为 F: 5'-CAGCTTTCGACAGTGAGGAGA-3', R: 5'-TTGTCCAGATGCTGCTGTGA-3'; iNOS 引物为 F: 5'-CAAGCACCTTGAAGAGGAG-3', R: 5'-AAGGCCAAACA-CAGCATACC-3'; TNF- α 引物为 F: 5'-CCTCTCTCTA-ATCAGCCCTCTG-3', R: 5'-GAGGACCTGGGAGTAGATGAG-3'; IL-10 引物为 F: 5'-ACTTTAAGGGTTAC-CTGGGTTGC-3', R: 5'-TCACATGCCCTTGATGTC TG-3'; Ym1 引物为 F: 5'-CAGGGTAATGAGTGGGTTGG-3', R: 5'-CACGGCACCTCCTAAATTGT-3'; Fizz1 引物为 F: 5'-GCTACTGGGTGTGCTTGTG-3', R: 5'-CTGGGTTCTCCACCTCTTC-3'。PCR 条件如下: 50 °C 2 min, 95 °C 3 min, 95 °C 12 s 延伸, 40 个循环, 62 °C 1 min。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示。

1.5 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。SPSS 19.0 用于数据分析。

2 结果

2.1 姜黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块的影响

HE 染色及油红 O 染色结果发现, 相较于普食对照组, 高脂组动脉切片可见内膜完整性部分破坏, 内膜内聚集大量的泡沫细胞及炎症细胞, 局部斑块形成; 阿托伐他汀治疗组和姜黄素治疗组都可见主动脉形成明显的动脉粥样硬化斑块, 但相较于高脂组, 病理变化均有一定的改善。Masson 染色结果可见, 阿伐他汀治疗组和姜黄素治疗组的胶原纤维含量明显高于高脂组, 在一定程度上说明姜黄素可以提高病理斑块的稳定性(图 1)。

应用图像分析软件(Image Pro Plus 6.0) 测量斑块面积、被染成红色的脂质面积及胶原纤维面积, 计算脂质面积占斑块面积的百分比。结果发现, 姜

黄素治疗组的校正斑块面积和脂质面积明显低于高脂组 ($P<0.01$, 表 1), 这表明姜黄素治疗能减轻 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉粥样硬化病变。

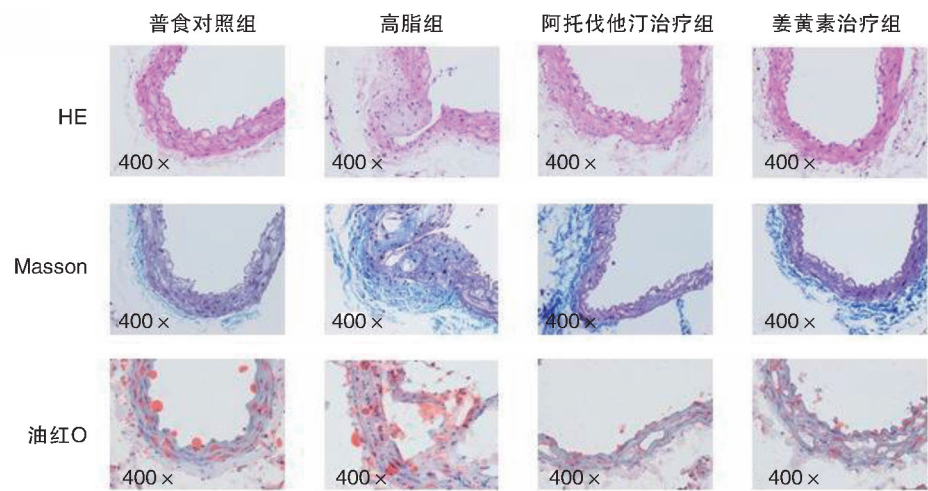


图 1. 不同分组 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块的免疫染色结果

Figure 1. Representative histological pictures of aortic atherosclerotic lesion in ApoE^{-/-} mice fed with different diets

表 1. 各组主动脉校正斑块面积、脂质面积及胶原纤维面积百分比的比较

Table 1. Comparison of corrected plaque area, lipid area and collagen fiber area of the aorta in ApoE^{-/-} mice fed with different diets

分 组	校正斑块 面积 (%)	脂质面积 (%)	胶原纤维 面积 (%)
普食对照组	2.16±2.46	-	3.56±2.04
高脂组	32.86±3.64 ^a	21.83±4.49	18.57±3.04 ^a
阿托伐他汀治疗组	12.12±2.86 ^{ab}	9.87±3.20 ^b	35.14±2.95 ^{ab}
姜黄素治疗组	18.02±3.24 ^{ab}	13.25±2.16 ^b	27.53±2.70 ^{ab}

a 为 $P<0.05$, 与普食对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与高脂组比较。

组织免疫荧光染色结果(图 2)发现, 相较于高脂组, 姜黄素能显著降低动脉粥样硬化斑块的易损指数(1.52 比 0.90, $P<0.01$), 提示姜黄素能稳定 ApoE^{-/-} 小鼠体内的动脉粥样硬化斑块。

2.2 姜黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块内巨噬细胞极性和功能的影响

使用免疫荧光双标法检测小鼠主动脉组织中 iNOS 和 CD206 的表达量(分别反映动脉粥样硬化斑块中 M1 型及 M2 型巨噬细胞的极化状态), 并计算 M1 型巨噬细胞与 M2 型巨噬细胞的比值。结果发现, 与高脂组相比, 姜黄素治疗组显著降低了 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块内 M1/M2 巨噬细胞的比值(iNOS/CD206) ($P<0.01$; 图 3)。

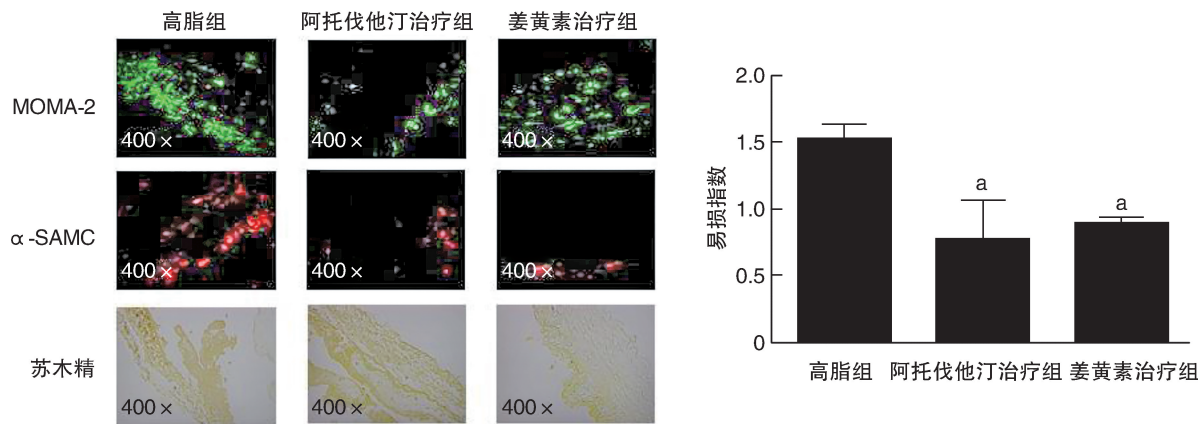


图 2. 不同分组 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块的易损性比较

Figure 2. Comparison of vulnerability of atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice fed with different diets

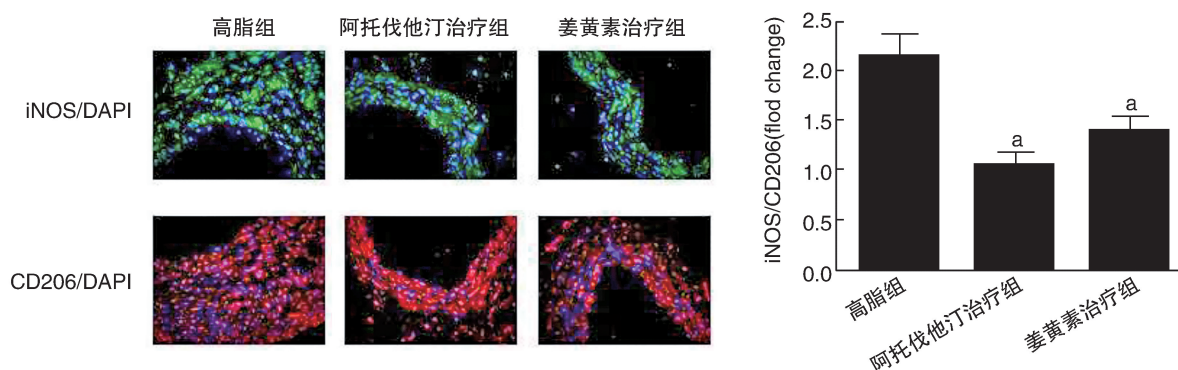


图 3. 不同分组 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块中 M1 型巨噬细胞/M2 型巨噬细胞的比值 a 为 $P < 0.01$, 与高脂组比较。

Figure 3. The percentage of M1/M2 macrophages in aortic root plaques of ApoE^{-/-} mice fed with different diets

为进一步验证姜黄素对巨噬细胞功能的影响, 我们检测了各组 ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织中各炎症因子的基因表达水平。结果发现, 与高脂组相比, 姜黄素治疗组和阿托伐他汀治疗组中 M1 型巨噬细

胞分泌的促炎因子 (IL-1 β , iNOS 和 TNF- α) 表达下调, 而 M2 型巨噬细胞分泌的抗炎因子 (IL-10、Ym1 和 Fizz1) 表达上调 (图 4)。提示姜黄素治疗能显著改善 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块内的炎症反应。

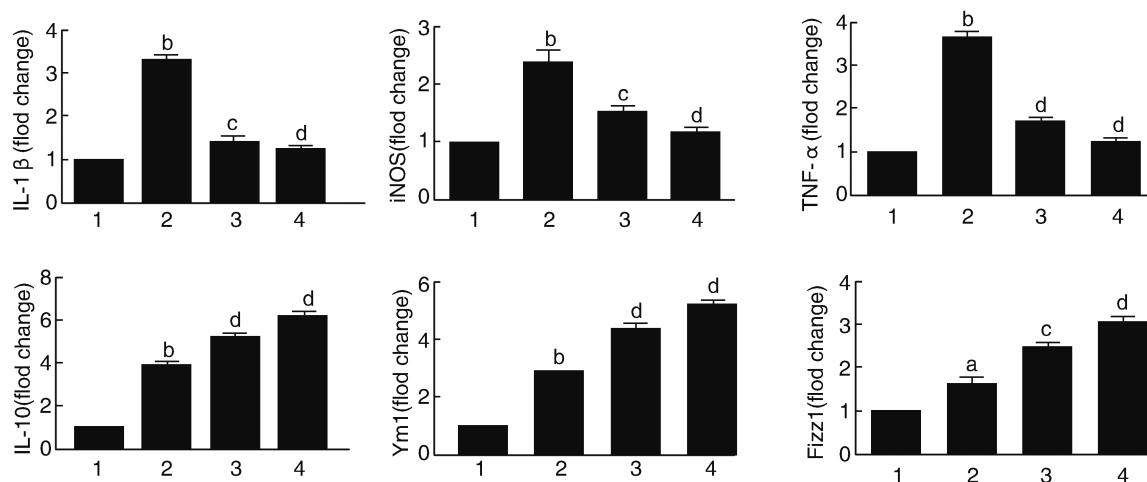


图 4. 不同分组 ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织中各炎症因子的表达水平 1 为普食对照组, 2 为高脂组, 3 为阿托伐他汀治疗组, 4 为姜黄素治疗组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与普食对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与高脂组比较。

Figure 4. The gene expression of inflammatory cytokines in aortic root plaques of ApoE^{-/-} mice fed with different diets

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症的病理状态, 最终会导致斑块破裂及相关的心血管事件 (心肌梗死、中风、心脏猝死等)。动脉粥样硬化斑块的稳定性是决定疾病预后的关键^[12]。一般来说, 不稳定斑块的病理表现为巨噬细胞聚集、病灶炎症反应显著、脂质含量增加、纤维帽变薄、平滑肌细胞和胶原蛋白含量减少等^[13]。姜黄素由于其相对安全、药理作用范围广泛, 在心血管防治领域具有广阔的应用前景^[5]。既往的研究发现, 姜黄素可通过降脂、抗氧化等方面发挥抗动脉粥样硬化的作用。本研究

中, 我们通过 ApoE^{-/-}小鼠建立动脉粥样硬化模型, 分别比较不同实验组小鼠动脉粥样硬化斑块的校正斑块面积、脂质面积和易损指数, 证实姜黄素可减轻活体内动脉粥样硬化负担并稳定动脉粥样硬化斑块。另外, 我们还使用阿托伐他汀治疗作为实验的阳性对照组。值得一提的是, 我们发现姜黄素的抗动脉粥样硬化作用并不亚于阿托伐他汀, 提示姜黄素对于治疗动脉粥样硬化性心血管疾病具有良好的疗效和应用前景。

巨噬细胞在动脉粥样硬化的发生发展中发挥关键作用。动脉壁中的巨噬细胞可转化为泡沫细胞, 引起过度的炎症反应, 从而加剧动脉粥样硬化

病变的进展^[14]。巨噬细胞具有异质性,可根据不同的微环境分化为 M1 和 M2 型巨噬细胞^[15-17]。其中, M1 型巨噬细胞可通过表达促炎因子(如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及 iNOS 等)加剧炎症反应,而 M2 型巨噬细胞则可通过抑制炎症反应、促进组织修复增强动脉粥样硬化斑块的稳定性^[18]。最近的研究表明, M1 型巨噬细胞多位于斑块的易损区域(如斑块的肩部),而 M2 型巨噬细胞多集中于动脉外膜,提示不同亚型巨噬细胞在动脉粥样硬化病程中可能执行不同的功能^[19]。因此,调控巨噬细胞极性以达到斑块内免疫平衡是一种防治动脉粥样硬化疾病的有效策略。最新的细胞实验发现,姜黄素能够抑制巨噬细胞 M1 型极化,从而达到抗炎的作用^[9,20-21]。本研究通过应用 ApoE^{-/-}小鼠建立动脉粥样硬化模型,证实姜黄素能在活体中影响巨噬细胞极性,即抑制巨噬细胞向 M1 型极化,从而抑制炎症反应及动脉粥样硬化的进展。然而,姜黄素抗动脉粥样硬化的临床应用及其影响巨噬细胞极化的具体机制仍需进一步的临床试验及基础研究。

综上所述,本研究结果表明,姜黄素能通过减少动脉粥样硬化斑块中 M1/M2 型巨噬细胞的比值,抑制病灶中的炎症反应,从而延缓动脉粥样硬化的进展。该结果将为姜黄素在动脉粥样硬化防治领域中的应用提供进一步的理论基础。

[参考文献]

- [1] Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis [J]. *Immunity*, 2017, 47(4): 621-634.
- [2] Sikora E, Scapagnini G, Barbagallo M. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases [J]. *Immun Ageing*, 2010, 7 (1): 1.
- [3] 付尧, 吴冬冬, 李晓东. 姜黄素对维生素 D3 和尼古丁诱导血管钙化大鼠血管中组织蛋白酶 D 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(5): 485-490.
- [4] Jurenka JS, Ascp MT. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of curcuma longa: a review of preclinical and clinical research [J]. *Altern Med Rev*, 2009, 14(2): 141-154.
- [5] Wongcharoen W, Phrommintikul A. The protective role of curcumin in cardiovascular diseases [J]. *Int J Cardiol*, 2009, 133(2): 145-151.
- [6] Cao J, Ye B, Lin L, et al. Curcumin alleviates oxLDL induced MMP-9 and EMT expression through the inhibition of NF- κ B and MAPK pathways in macrophages [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8(FEB): 1-9.
- [7] Zhou Y, Zhang T, Wang X, et al. Curcumin modulates macrophage polarization through the inhibition of the toll-like receptor 4 expression and its signaling pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(2): 631-641.
- [8] Chen FY, Zhou J, Guo N, et al. Curcumin retunes cholesterol transport homeostasis and inflammation response in M1 macrophage to prevent atherosclerosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(4): 872-878.
- [9] Chen F, Guo N, Cao G, et al. Molecular analysis of curcumin-induced polarization of murine RAW264.7 macrophages [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 63(6): 544-552.
- [10] Shiomi M, Ito T, Hirouchi Y, et al. Fibromuscular cap composition is important for the stability of established atherosclerotic plaques in mature WHHL rabbits treated with statins [J]. *Atherosclerosis*, 2001, 157(1): 75-84.
- [11] 安园园, 杨柳, 朱海波. 实验性小鼠动脉粥样硬化斑块易损指数计算方法的优化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(4): 400-406.
- [12] Smeets T. Stabilization of atherosclerotic plaques [J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1257-1262.
- [13] Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, et al. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression [J]. *Heart Lung Circ*, 2013, 22(6): 399-411.
- [14] Cochain C, Zernecke A. Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 2017, 469(3-4): 485-499.
- [15] Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(1): 10-17.
- [16] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [17] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 723-737.
- [18] Tabas I, Bornfeldt KE. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 653-667.
- [19] Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 225(2): 461-468.
- [20] Li B, Hu Y, Zhao Y, et al. Curcumin attenuates titanium particle-induced inflammation by regulating macrophage polarization in vitro and in vivo [J]. *Front Immunol*, 2017, 8(9): 55.
- [21] Liu Z, Ran Y, Huang S, et al. Curcumin protects against ischemic stroke by titrating microglia/macrophage polarization [J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9(JUL): 1-10.

(此文编辑 许雪梅)