

丹参酮 II A 通过抑制 HDAC3 影响巨噬细胞极化的作用研究

姚宇迪², 吴志婷¹, 王 炜¹, 罗达亚³, 王云霞¹, 张淑华¹

(1. 江西省人民医院 南昌大学附属人民医院 江西省心血管病研究所, 江西省南昌市 330006; 2. 南昌大学第一附属医院 高新医院中心实验室, 江西省南昌市 330096; 3. 南昌大学基础医学院, 江西省南昌市 330006)

[关键词] 动脉粥样硬化; 丹参酮 II A; 巨噬细胞; 组蛋白去乙酰化酶 3

[摘要] **目的** 探讨丹参酮 II A (Tan II A) 通过抑制组蛋白去乙酰化酶 3 (HDAC3) 影响巨噬细胞极化的作用。**方法** 应用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 筛选 Tan II A 药效靶点和动脉粥样硬化作用靶点, 并将二者的交集基因进行 KEGG 通路分析, 采用 Cytoscape 3.7.1 软件对主要交集基因-信号通路进行可视化分析。选用 THP-1 单核细胞株经佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯 (PMA) 诱导为贴壁的巨噬细胞后, 分为 M0 组、氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 组、Tan II A+ox-LDL 组及 ox-LDL+HDAC3 siRNA 组。采用流式细胞术、免疫荧光实验及 qRT-PCR 技术检测 Tan II A 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞极化方向的改变及 HDAC3 mRNA 表达水平的变化。**结果** 生物信息学分析得到 Tan II A 药效靶点和动脉粥样硬化作用靶点有 23 个交集基因, 选取排序靠前的 20 条信号通路进行可视化分析, 发现主要富集于动脉粥样硬化、流体剪切力和 TNF 信号通路等。其中, JUN、FOS、RELA、NFKBIA 四个交集基因参与巨噬细胞极化的信号通路调控。流式细胞术、免疫荧光实验及 qRT-PCR 结果显示 ox-LDL 可诱导 M0 巨噬细胞 CCR7 和 CCL2 表达显著升高; 与 ox-LDL 组相比, Tan II A 预处理的 M0 巨噬细胞经 ox-LDL 诱导后 HDAC3、CCR7 及 CCL2 mRNA 表达均下降, 和 ox-LDL+HDAC3 siRNA 组结果一致。**结论** Tan II A 能有效地阻止 ox-LDL 诱导巨噬细胞往 M1 方向极化, 其机制可能是通过调控巨噬细胞 HDAC3 表达介导的。

[中图分类号] R96;R5

[文献标识码] A

Effect of Tanshinone II A on macrophage polarization by inhibiting HDAC3

YAO Yudi², WU Zhiting¹, WANG Wei¹, LUO Daya³, WANG Yunxia¹, ZHANG Shuhua¹

(1. Jiangxi Provincial People's Hospital & People's Hospital Affiliated to Nanchang University & Jiangxi Provincial Cardiovascular Research Institute, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Central Laboratory, Gaoxin Hospital of the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330096, China; 3. Basic Medical College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[KEY WORDS] atherosclerosis; Tanshinone II A; macrophage; histone deacetylase 3

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of Tanshinone II A (Tan II A) on macrophage polarization by inhibiting histone deacetylase 3 (HDAC3). **Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) was applied to screen drug targets of Tan II A and therapeutic targets of atherosclerosis (As). The intersection genes were enriched and visualized by KEGG pathway analysis and Cytoscape 3.7.1 software, respectively. THP-1 monocytes were induced as adherent macrophages by phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA), and divided into four groups: M0 group, oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) group, Tan II A+ox-LDL group and ox-LDL+HDAC3 siRNA group. Flow cytometry, immunofluorescence and qRT-PCR were used to detect the change of polarization and expression of HDAC3 mRNA in macrophage. **Results** Twenty-three intersection genes were obtained of Tan II A drug targets and As therapeutic targets by Bioinformatics analysis. The top twenty signal pathways were selected for visual analysis and displayed that these genes concentrated in signaling pathways such as atherosclerosis, fluid shear force and TNF signaling pathway, among which JUN, FOS, RELA and NFKBIA, were involved in the regulation of macrophage polarization. Results of Flow cytometry, immunofluorescence and qRT-PCR showed that ox-LDL could

[收稿日期] 2020-11-04

[修回日期] 2020-12-07

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(20192BAB205007); 江西省卫生健康委中医药科研计划课题(2018B158)

[作者简介] 姚宇迪, 硕士, 实习研究员, 主要从事非编码 RNA 研究, E-mail 为 yyd121288@163.com。通信作者张淑华, 硕士, 副研究员, 主要从事心血管疾病的基础及临床研究, E-mail 为 zsh1228@126.com。

significantly increased the expression of CCR7 and CCL2 in M0 macrophages. Compared with ox-LDL group, HDAC3, CCR7 and CCL2 expression decreased in Tan II A+ox-LDL group, consistent with ox-LDL+HDAC3 siRNA group.

Conclusion Tan II A could effectively prevent ox-LDL-induced macrophage polarization toward M1 direction, the mechanism may be mediated by regulating HDAC3 expression.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是冠心病、脑卒中及外周血管病共同的病理学基础,是一种复杂的代谢性心血管疾病,也是导致患者死亡的重要原因,被认为是一种慢性炎症性疾病^[1]。巨噬细胞作为最重要的免疫细胞贯穿于炎症反应始末,巨噬细胞 M1/M2 亚型的平衡一直处于动态变化^[2],向任何一方倾斜都决定了炎症的最终转归,决定 As 的结局。细胞的炎症状态受多种代谢、遗传和药理学因素的动态影响,巨噬细胞呈现不同表型,取决于斑块形成微环境和细胞内信号通路的激活。因此,调控巨噬细胞介导的炎症反应是 As 治疗的新希望和手段。

丹参作为活血化瘀之要药,是临床上广泛用于心脑血管疾病治疗的常见中药材,其主要药用成分丹参酮 II A(Tanshinone II A, Tan II A)是一类脂溶性二萜类物质,可以通过抑制血管平滑肌细胞增殖、减轻低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)引起的内皮细胞损伤、抑制炎症反应及抗血小板凝集、抗血栓形成等多重作用发挥其抗 As 功效^[3]。近年来有研究表明 Tan II A 参与了巨噬细胞极化的调控从而发挥抗 As 作用,然而具体作用机制尚不十分明确。对 Tan II A 抗 As 作用机制的深入阐释,有利于更充分地发挥祖国中医药的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

人髓系白血病单核细胞(human myeloid leukemia mononuclear cells, THP-1)购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库;佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(phorbol 12-myristate-13-acetate, PMA)购自美国 Sigma 公司;TanIIA(CAS 号 568-72-9)购自上海源叶生物公司;CCR7 流式标记抗体、CCL2 流式标记抗体、山羊抗鼠 IgG-Fc(PE)购自英国 Abcam 公司;FITC-CD68 流式标记抗体购自美国 eBioscience 公司;山羊抗鼠 IgG 二抗购自武汉博士德生物工程有限公司;RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自美国 Thermo 公司;SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 购自日本 TaKaRa 公司;TRIzol[®] Reagent 购自美国 Ambion 公司;DAPI 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 Tan II A 药效靶点和 As 作用靶点匹配及筛选

应用中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TC MSP)获取丹参的全部有效活性成分,并结合文献报道分析 Tan II A 的已知药效靶点;通过 Genecards 数据库以“Atherosclerosis”为关键词检索 As 作用靶点,筛选 TanIIA 药效靶点和 As 作用靶点的交集基因。且将交集基因进行 KEGG 通路分析,采用 Cytoscape 3.7.1 软件对主要交集基因-信号通路进行可视化分析。

1.3 细胞分组及处理

THP-1 细胞经 PMA 诱导为贴壁的巨噬细胞后,根据实验需求分组:①M0 组:经 PMA 诱导的巨噬细胞;②ox-LDL 组:终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 处理 M0 巨噬细胞;③Tan II A+ox-LDL 组:终浓度为 40 mg/L 的 Tan II A 预处理 M0 巨噬细胞 6 h 后加入 ox-LDL(终浓度为 50 mg/L);④ox-LDL+HDAC3 siRNA 组:设计合成的 HDAC3 siRNA 转染 ox-LDL(终浓度为 50 mg/L)处理的 M0 巨噬细胞。各组细胞均设立 3 个复孔,每项实验重复 3 次。

1.4 免疫荧光实验检测细胞 CD68 蛋白表达

细胞爬片,长至 70% 时弃上清,用 PBS 漂洗 2 次;用 4% 多聚甲醛冰上孵育 20 min;预冷的 PBST 漂洗 3 次;加 1 mL 封闭液孵育 30 min,一抗 4℃ 孵育过夜, PBST 漂洗 3 次;二抗室温孵育 1 h,漂洗 3 次;加入 DAPI 染色液,覆盖住细胞孵育 5 min, PBST 漂洗 3 次;封片、晾干后,置于显微镜上观察。

1.5 流式细胞术检测巨噬细胞特征分子的表达

收集生长状态良好的细胞,保证每个样品组细胞不少于 10^6 个, PBS 清洗 2 遍;加入胰酶消化,制备成单细胞悬液; PBS 清洗 2 遍,用含有 1% BSA 的 PBS 稀释抗体,根据抗体说明书稀释相应倍数(CCL2 稀释倍数为 1:250, CCR7 稀释倍数为 1:500),重悬细胞,室温避光孵育 45 min,期间可震荡几次;离心弃一抗上清,再用 PBS 清洗细胞 2 遍;用 500 μ L PBS 重悬细胞,1 h 内流式细胞仪上机检测。

1.6 qRT-PCR 检测 HDAC3 的表达

收集生长状态良好的细胞, TRIzol[®] Reagent 提取细胞总 RNA,采用 RevertAid First Strand cDNA

Synthesis Kit 试剂盒进行反转录及 T SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行实时定量 PCR 分析。反转录条件为 42 ℃、60 min; 72 ℃、5 min, 得到的 cDNA 行两步法 PCR 扩增, 扩增条件: 预变性 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s; 40 个循环。引物序列: β -actin 正向为 5'-CCT TCC TGG GCA TGG AGT C-3', 反向为 5'-TGA TCT TCA TTG TGC TGG GTG-3'; HDAC3 正向为 5'-AGT CAG CCC CAC CAA TAT GC-3', 反向为 5'-TGT GTA ACG CGA GCA GAA CT-3'。

1.7 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据比较采用 *t* 检验, 多组数据比较采用单因素方差分析, 计数资料以百分率表示, 组间比较采用卡方检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tan II A 药效靶点和 As 作用靶点交集基因富集于巨噬细胞极化信号通路

应用 TCMSP 获取丹参的全部有效活性成分, 共

得到符合 OB \geq 30%, DL \geq 0.18 条件的主要有效化学成分 65 种。基于丹参的相关研究文献, 聚焦于 Tan II A, 并结合 TCMSP 数据库及文献报道分析 Tan II A 的已知靶点, 得到 Tan II A 药物靶点蛋白 41 个。通过 Genecards 数据库“Atherosclerosis”为关键词检索出 As 作用靶点, 将数据导出至 EXCEL 表格中, 根据中位数分法进行标准化处理, 得到 1 119 个 As 相关靶点。将 TanIIA 药效靶点和 As 作用靶点匹配, 得到 23 个交集基因(图 1A)。将交集基因进行 KEGG 通路分析, 筛选前 20 条主要信号通路进行可视化分析, 结果显示 TanIIA 药效靶点和 As 作用靶点的交集主要富集于 As、流体剪切力及 TNF 等信号通路。其中 JUN、FOS、RELA、NFKBIA 四个交集基因参与巨噬细胞极化的信号通路调控(图 1B)。

2.2 THP-1 单核-巨噬细胞培养体系的建立

THP-1 细胞使用 PMA 刺激后, 细胞形态发生明显的变化, 从悬浮状态的球型单核细胞转变成了簇状贴壁细胞, 且随着作用时间的延长, 贴壁细胞越来越多(图 2)。流式细胞术和免疫荧光实验检测显示, 贴壁的细胞表面巨噬细胞标志物 CD68 的表达明显升高(图 3)。结果表明 PMA 处理 THP-1 细胞 24 h 后, 细胞被诱导为 M0 巨噬细胞。

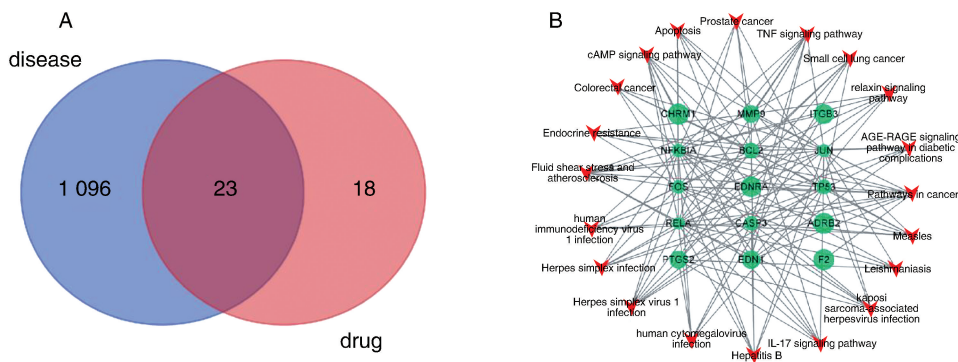


图 1. TanIIA 药效靶点和 As 作用靶点交集基因参与巨噬细胞极化的信号通路调控

A 为 TanIIA 药效靶点和 As 作用靶点交集基因韦恩图, B 为交集基因-主要信号通路网络图。

Figure 1. The intersection genes of TanIIA drug targets and As targets are involved in the regulation of macrophage polarization

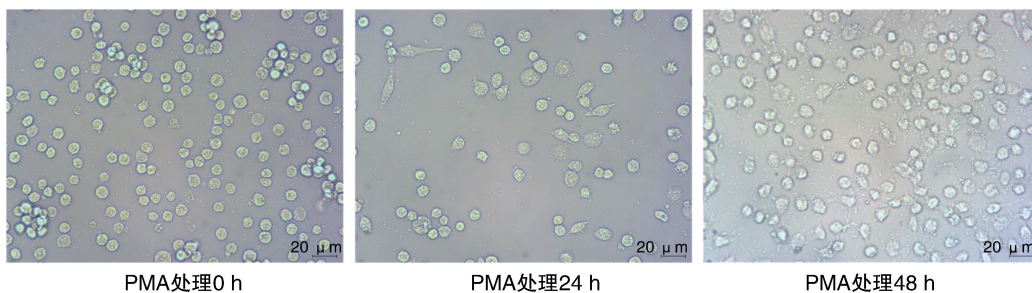


图 2. THP-1 细胞株经 PMA 处理不同时间的细胞形态

Figure 2. Morphology of THP-1 cell line treated with PMA

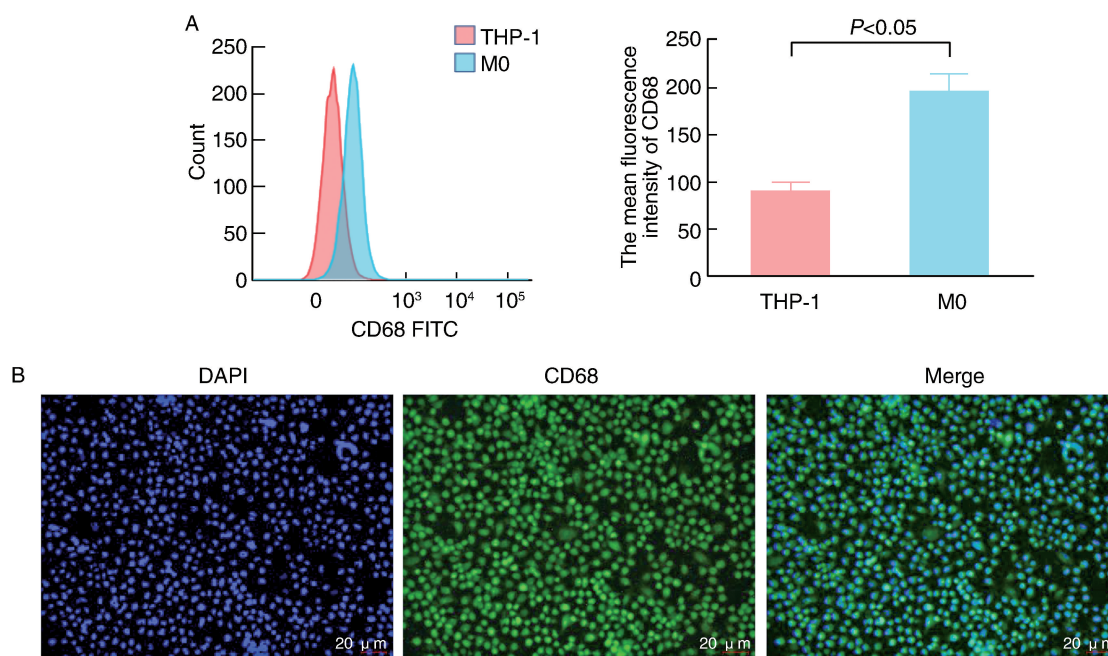


图 3. THP-1 细胞株经 PMA 处理后高表达 CD68

A 为流式细胞术检测结果, B 为免疫荧光实验结果。

Figure 3. The expression of CD68 was high in THP-1 cell line after PMA treatment

2.3 ox-LDL 诱导巨噬细胞极化方向的变化

流式细胞术检测结果显示, 与 M0 巨噬细胞相

比, ox-LDL 诱导的巨噬细胞 M1 型特征分子 CCR7 和 CCL2 的表达显著升高(图 4)。

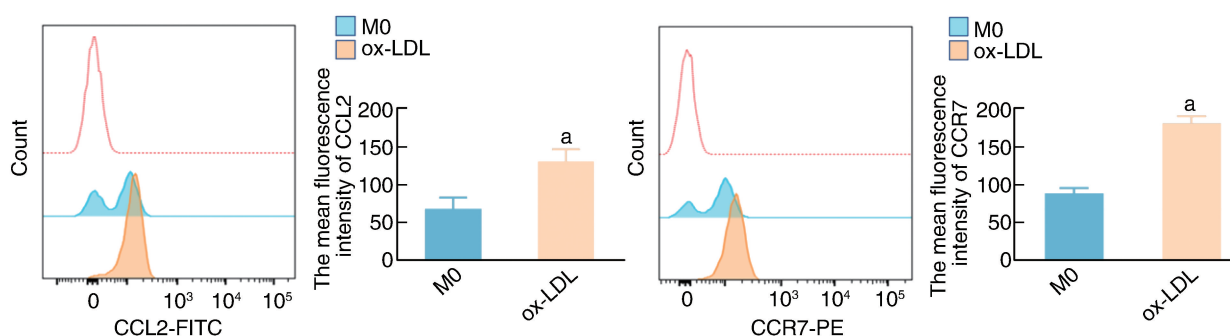


图 4. ox-LDL 诱导巨噬细胞发生 M1 极化

a 为 $P < 0.05$, 与 M0 组比较。

Figure 4. Ox-LDL induced M1 polarization in macrophages

2.4 Tan II A 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞极化方向的影响

流式细胞术检测结果显示, Tan II A 可有效阻止 ox-LDL 诱导的巨噬细胞发生 M1 极化, 抑制 CCR7 和 CCL2 的表达(图 5)。

2.5 Tan II A 抑制 HDAC3 调控巨噬细胞极化

流式细胞术和 qRT-PCR 检测结果显示, ox-LDL 诱导的巨噬细胞 HDAC3 mRNA 表达水平显著高于 M0 组, CCR7 和 CCL2 表达升高; 与 ox-LDL 组相比, Tan II A 预处理的 M0 巨噬细胞经 ox-LDL 诱导后

HDAC3 及 CCR7、CCL2 mRNA 的表达均下降; HDAC3 siRNA 转染 ox-LDL 诱导的巨噬细胞 CCR7 和 CCL2 的表达同样下降(图 6)。

3 讨论

丹参是广泛应用于 As、高血压、冠心病、高血脂等心脑血管疾病治疗的中药材, 其药效作用得到了大量临床及基础研究的证实^[4]。然而, 丹参及其有效成分抗炎及免疫调节作用并不清楚。本研究利用

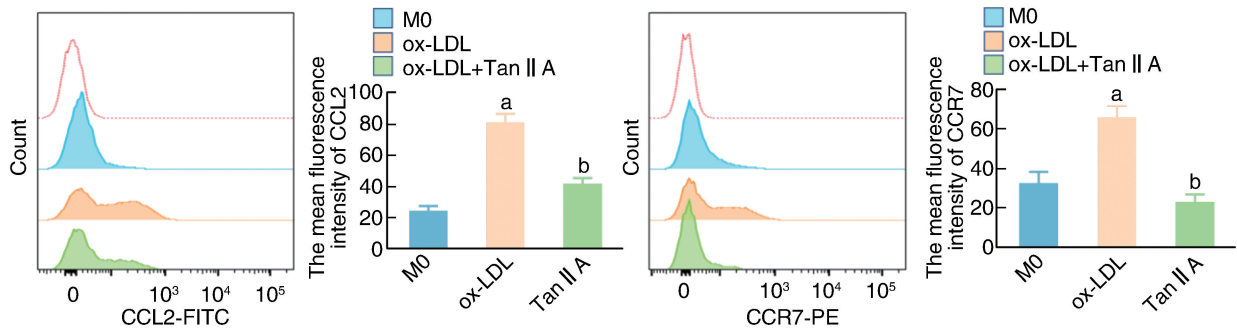


图 5. Tan II A 抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞发生 M1 极化
a 为 $P < 0.05$, 与 M0 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 5. Tan II A inhibited M1 polarization in ox-LDL induced macrophages

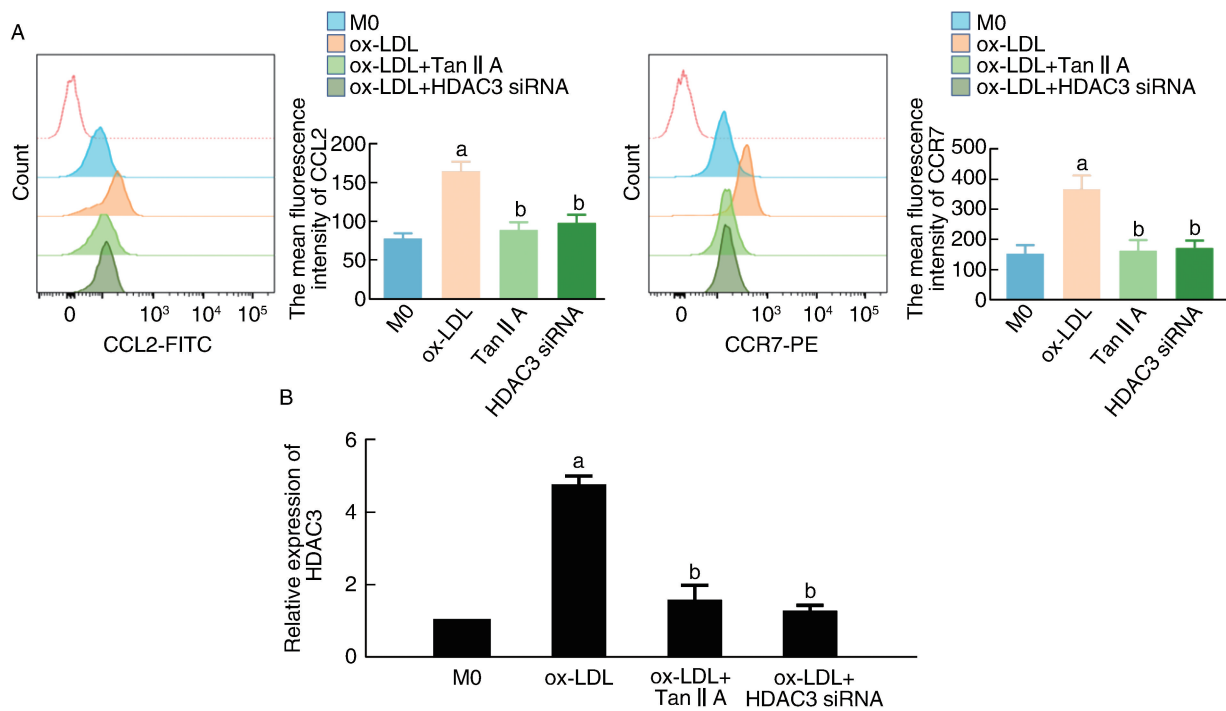


图 6. Tan II A 抑制 HDAC3 表达调控巨噬细胞极化

A 为流式细胞检测结果, B 为 qRT-PCR 检测结果。a 为 $P < 0.05$, 与 M0 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 6. Tan II A regulated macrophage polarization by inhibiting HDAC3 expression

TCMSP 数据库信息并经过筛选,共得到丹参主要有效化学成分 65 种。基于本课题组以往的研究基础,本文通过 TCMSP 数据库及文献收集到 TanIIA 对应的药物靶点蛋白 41 个,运用 Uniprot 数据库进行靶点基因注释,并从 Genecards 数据库中获得 As 靶点,经过标准化处理得到 1 119 个 As 相关靶点。继而分析得到 Tan II A 药效靶点和 As 作用靶点有 23 个交集基因,它们主要富集于 As、流体剪切力和 TNF 信号通路等。其中原癌基因 JUN 和 FOS 是转录因子复合物 AP-1 形成的重要要素,RELA 是 NF- κ B 的亚基,它和 NFKBIA 基因均参与 NF- κ B/REL 复合物的形成^[5]。大量研究显示转录因子复合物

AP-1 及 NF- κ B 均调控了巨噬细胞极化^[6]。为此,本课题组参照文献^[7]利用 ox-LDL 诱导巨噬细胞,在体外细胞水平模拟 As 中泡沫细胞的病理变化,验证 TanIIA 对巨噬细胞极化的影响,并试图探索其药理作用机制。预实验中设计了 TanIIA 四个不同浓度 (10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L) 预处理 M0 巨噬细胞,结果表明终浓度为 40 mg/L TanIIA 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞极化方向的影响最为显著。

巨噬细胞是 As 形成过程中最具代表性的炎症细胞,在 As 发生发展的各个阶段都发挥着重要作用。巨噬细胞的迁移、活化、浸润和增殖使斑块甚至使整个机体处于低度炎症反应状态,并且通过分

泌大量的蛋白酶和组织因子促进炎症、脂质沉积和斑块破裂^[8]。巨噬细胞是一类具有异质性、可塑性的免疫细胞,为了有效地适应微环境,机体通过多个信号通路选择性表达靶基因,使巨噬细胞呈现相应特征性的分子标志物,最终实现不同极性及功能^[9]。其中 M1 型巨噬细胞能促进病灶内的炎症反应,导致坏死核心和不稳定性斑块形成,从而加快 As 进程;M2 型巨噬细胞分泌抗炎因子下调免疫应答促进血管生成、组织修复、斑块稳定、延缓甚至逆转 As 进程^[10]。各型巨噬细胞及其分泌的细胞因子在 As 各个阶段发挥不同作用,M1/M2 型的极化维持机体内炎症的程度与平衡,二者的比例在很大程度上决定了炎症的发展方向、斑块内脂质含量以及斑块的稳定性,影响着 As 结局。巨噬细胞呈现不同表型,取决于斑块形成微环境和细胞内信号通路的激活^[11]。研究表明特定的转录因子可以通过多个信号通路选择性调控与巨噬细胞异质性有关的基因,比如 STAT、AP-1、NF- κ B、PPAR γ 、NR4A1 以及 IFN 调节因子等信号通路均可调控巨噬细胞极化^[12]。

在 As 发生发展过程中,组蛋白修饰相关酶的表达水平显著降低^[13];HDAC 在维持血管内皮细胞的完整性、调控平滑肌细胞增殖以及调节巨噬细胞和平滑肌细胞源性泡沫细胞的形成中扮演重要角色。HDAC3 和 HDAC7 则可能通过促进白细胞活化、招募、附着,继而迁移至血管内膜,引发早期 As 病变^[14];HDAC3 能够降低 IL-4 诱导 M2 型相关基因增强子的乙酰化程度,作为 IL-4 诱导 M2 型极化的“闸”^[15]。尽管目前有不少丹参及其有效成分调控巨噬细胞极化抵抗 As 的研究,但表观遗传修饰调控,包括组蛋白修饰介导巨噬细胞极化影响 As 转归的研究鲜有报道。本研究在体外实验证实了 TanIIA 通过抑制 HDAC3 表达阻止 ox-LDL 诱导的巨噬细胞往 M1 方向极化。由于本研究仅进行了细胞体外实验,初步探索了 Tan II A 表观调控巨噬细胞极化抗 As 的机制,后续需要设计动物实验甚至临床试验进一步深入探索 Tan II A 抗 As 的药理作用机制。

[参考文献]

[1] 瞿媛,顾宁. 微小 RNA 在动脉粥样硬化易损斑块中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28 (6): 548-552.
 [2] LI C, XU M M, WANG K, et al. Macrophage polarization and meta-inflammation[J]. *Transl Res*, 2018, 191: 29-44.
 [3] LI Y, CHEN F, GUO R, et al. Tanshinone II A inhibits homocysteine-induced proliferation of vascular smooth muscle

cells via miR-145/CD40 signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 522(1): 157-163.

- [4] 杨凯麟,曾柳庭,葛金文. 基于网络药理学的丹参干预动脉粥样硬化分子机制的分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(4): 407-413.
 [5] YANG W S, KIM J H, JEONG D, et al. 3-deazaadenosine, an S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses via inhibition of AP-1 and NF- κ B signaling[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 182: 114264.
 [6] 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.
 [7] SHEN Z J, LI H G. Long non-coding RNA GAS5 knock-down facilitates proliferation and impedes apoptosis by regulating miR-128-3p/FBLN2 axis in ox-LDL-induced THP-1 cells [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2021, 77 (2): 153-164.
 [8] LI J, LEI H T, CAO L, et al. Crocin alleviates coronary atherosclerosis via inhibiting lipid synthesis and inducing M2 macrophage polarization [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 120-127.
 [9] LI C, XU M M, WANG K, et al. Macrophage polarization and meta-inflammation[J]. *Transl Res*, 2018, 191: 29-44.
 [10] LEENTJENS J, BEKKERING S, JOOSTEN L A B, et al. Trained innate immunity as a novel mechanism linking infection and the development of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 122(5): 664-669.
 [11] YANG S, YUAN H Q, HAO Y M, et al. Macrophage polarization in atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 501: 142-146.
 [12] DANIEL B, CZIMMERER Z, HALASZ L, et al. The transcription factor EGR2 is the molecular linchpin connecting STAT6 activation to the late, stable epigenomic program of alternative macrophage polarization [J]. *Genes Dev*, 2020, 34(21-22): 1474-1492.
 [13] PANG X, WANG S S, ZHANG M, et al. OSCC cell-secreted exosomal CMTM6 induced M2-like macrophages polarization via ERK1/2 signaling pathway [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(4): 1015-1029.
 [14] GHIBOUB M, ZHAO J, LI YIM A Y F, et al. HDAC3 mediates the inflammatory response and LPS tolerance in human monocytes and macrophages [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 550769.
 [15] EDDERKAoui M, XU S, CHHEDA C, et al. HDAC3 mediates smoking-induced pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7): 7747-7760.

(此文编辑 文玉珊)