

山茱萸、银杏叶提取物对体外 oxLDL 诱导单核巨噬细胞炎性因子释放的抑制作用研究[△]

樊莉^{1*}, 杨鹏远², 枉前¹, 张恩娟^{1#} (1. 第三军医大学新桥医院药学部, 重庆市 400037; 2. 第二军医大学药学院, 上海市 200433)

中图分类号 R285.5; R284.2 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2009)12-0886-03

摘要 目的: 研究山茱萸提取物(EPH)、银杏叶提取物(EGB)对氧化低密度脂蛋白(oxLDL)诱导单核巨噬细胞 U937 细胞炎性因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)释放的抑制作用。方法: 以 80 mg·L⁻¹ 的 oxLDL 刺激 U937 细胞, 通过酶联免疫吸附法(ELISA)测定各时间点 IL-1 β 、TNF- α 释放量, 绘制释放曲线, 并考察 EPH、EGB 对其释放的影响。结果: oxLDL 刺激 U937 细胞释放 IL-1 β 、TNF- α ; 在 24 h 时, IL-1 β 与 TNF- α 释放量均极显著性增加 ($P < 0.01$), EPH、EGB 均在 100、10 mg·L⁻¹ 浓度下对 IL-1 β 有显著性抑制作用 ($P < 0.05$); EPH 在 100、10 mg·L⁻¹ 浓度和 EGB 在 100 mg·L⁻¹ 浓度下均对 TNF- α 释放有显著性抑制作用。结论: oxLDL(80 mg·L⁻¹) 在体外可显著诱导 U937 细胞释放炎性因子 IL-1 β 、TNF- α , EGB、EPH 对炎性因子释放有抑制作用, 且在 100 mg·L⁻¹ 浓度下 EPH 的体外抗炎作用更为显著。

关键词 山茱萸提取物; 银杏叶提取物; 动脉粥样硬化; 氧化低密度脂蛋白; U937 细胞; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α

Inhibitory Effects of *Piper hancei* (EPH) and *Ginkgo biloba* (EGB) Extracts on Mononuclear Macrophages' Releasing of Inflammatory Factors Induced by oxLDL in Vitro

FAN Li, WANG Qian, ZHANG En-juan (Dept. of Pharmacy, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

YANG Peng-yuan (Dept. of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effects of the extracts of *Piper hancei* (EPH) and *Ginkgo biloba* (EGB) extracts on mononuclear macrophages' releasing of inflammatory factors (IL-1 β and TNF- α) induced by oxLDL. METHODS: U937 cells were incubated with oxLDL (80 mg·L⁻¹), and the release of IL-1 β and TNF- α at different time point was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The releasing curve was drawn and the inhibitory effects of EGB and EPH on the release of IL-1 β and TNF- α were observed. RESULTS: Stimulated by oxLDL, U937 cells did release IL-1 β and TNF- α , with their release rates increased significantly at 24 h ($P < 0.01$), at the concentrations of 100 mg·L⁻¹ and 10 mg·L⁻¹, both EPH and EGB showed remarkable inhibitory effects on IL-1 β ($P < 0.05$). At a concentration of 100 mg·L⁻¹ and 10 mg·L⁻¹ of EPH and at a concentration of 100 mg·L⁻¹ of EGB both showed remarkable inhibitory effect on TNF- α release. CONCLUSION: oxLDL (80 mg·L⁻¹) showed remarkable efficacy in inducing U937 cells' releasing of IL-1 β and TNF- α in vitro; however, which could be inhibited by EGB and EPH, especially by EPH (100 mg·L⁻¹).

KEY WORDS EPH; EGB; Artherosclerosis; oxLDL; U937 cells; Interleukin-1 β ; TNF- α

度, 调节有关炎症细胞水平, 对实验性大鼠肠粘连有一定防治作用。

参考文献

- [1] Menzies D, Ellis H. Intestinal obstruction from adhesions - how big is the problem? [J]. *Ann R Coll Surg Engl*, 1990, 72(1): 60.
- [2] Liu Jendi JK Rw, de Lange DCD, Wauter CCAP, et al. Foreign material in postoperative adhesion [J]. *Ann Surg*, 1996 (223): 242.
- [3] Dizerage GS. Contemporary adhesion prevention [J]. *Fe*

[△] 第三军医大学中青年基金课题(2006D146)

* 药师。研究方向: 药理学。电话 023-68755400。E-mail: fanli1977411@126.com

通讯作者: 主任药师。研究方向: 医院药学。电话 023-68755401。E-mail: enjuan@sohu.com

rtil Steril, 1994(61): 219.

- [4] Mueller MD, Tschudi J, Herrmann, et al. An evaluation of laparoscopic adhesiolysis in patients with chronic abdominal pain [J]. *Surg Endosc*, 1995(9): 802.
- [5] 杨西晓, 曾煦欣, 侯连兵. 常通口服液对手术所致肠粘连大鼠肠壁转化生长因子表达的影响 [J]. *中国药房*, 2004, 15(4): 206.
- [6] 王梦炎, 李会晨, 陈振德, 等. 维通注射液对大鼠实验性肠粘连预防作用的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2000, 6(4): 40.
- [7] Nair SK, Bhal ZK, Aurora AI, et al. Role of proteolytic enzymes in the prevention of the post-operative intra-peritoneal adhesion [J]. *Arch Surg*, 1975(108): 849.

(收稿日期: 2008-10-06 修回日期: 2009-01-11)

炎症的发生在动脉粥样硬化(AS)病因中具有重要的地位,其中氧化低密度脂蛋白(oxLDL)发挥了关键性作用。oxLDL诱导单核细胞向巨噬细胞转化并将其吞噬,沉积于血管内皮,并通过释放炎症因子触发级联的炎症与机体免疫反应,构成重要的病理基础^[1],其中炎症因子白细胞介素-1(IL-1)和肿瘤坏死因子(TNF)发挥了重要的作用^[2,3]。银杏叶提取物(EGB)具有多种心脑血管活性,其对AS的作用已得到初步认可和重视。胡椒属植物山茱萸是目前中药海风藤的主要来源,具有祛风湿、通经络的功能,过去主要用于治疗风湿性疾病。近年来,药理研究表明,山茱萸具有改善血流动力学,以及显著的抗炎作用等药理活性^[4,5]。在动物实验中,山茱萸提取物(EPH)也显示出了对AS良好的防治作用^[6]。EPH和EGB在对AS的防治机制研究中,其抗炎机制的研究较为缺乏,本实验通过oxLDL诱导U937细胞建立炎症细胞模型,考察EPH和EGB的体外作用,通过抗炎途径初步阐述其抑制AS病理进程的机制。

1 材料

1.1 仪器

Leica LB305型倒置相差显微镜(德国Leica公司);Surise Remote酶标仪(奥地利Surise公司);BB5060UV型CO₂孵箱(德国Heraeus公司);SW-CJ-2FD型超净工作台(苏州净化设备有限公司)。

1.2 试剂

低密度脂蛋白(LDL,美国Sigma公司,批号:03/05/2005);IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒,包括IL-1 β 、TNF- α 标准品(武汉博士德公司);山茱萸,产自福建,购于福州中药材公司,由四川省中药研究所生药实验室鉴定为真品;EGB由第二军医大学药学院提供;RPMI1640培养基(美国Gibco公司,批号:1219520);其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞株及培养

人类单核细胞系U937,由第二军医大学药学院提供,倍增时间24~48h,在含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中悬浮生长,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,每隔1天换液1次,至细胞密度为10⁹个·L⁻¹左右用于实验。

2 方法

2.1 药物工作溶液的制备

山茱萸切碎,以95%乙醇浸渍24h后回流提取3次,每次1h,减压干燥得EPH,1g提取物相当于原药材21g。精密称取提取物1.0g,加入二甲亚砜(DMSO)5.0mL,振荡溶解,加入5mL不含血清的培养基,使其浓度为100g·L⁻¹,0.22 μ m微孔滤膜过滤,4℃冰箱保存,备用;EGB以同法配制成100g·L⁻¹的工作溶液。

2.2 oxLDL的制备^[7]

将LDL置于含10 μ mol·L⁻¹CuSO₄的磷酸盐缓冲液(PBS)中,37℃透析12h,在含0.1%乙二胺四乙酸(EDTA)的PBS中透析24h,用0.22 μ m的微孔滤膜过滤除菌,备用。用硫代巴比妥酸的含量测定oxLDL^[8]。氧化后每1mg胆固醇中丙二醛的含量为47.9nmol·L⁻¹。

2.3 细胞毒性实验

分别用25、50、100、200mg·L⁻¹浓度的EGB、EPH溶液与U937细胞于不含血清的培养基中孵育24h,置于显微镜下观察细胞形态。

2.4 IL-1 β 、TNF- α 标准曲线的绘制

分别按ELISA说明书方法,以6个浓度梯度IL-1 β 与TNF- α 标准品,按每孔0.1mL加入预先用抗人IL-1 β 、TNF- α 抗体包被的酶标板作ELISA检测,检测结果以吸光度值(Y)为横坐标,检测浓度(X)为纵坐标绘制标准曲线,并得出回归方程。

2.5 oxLDL诱导U937细胞释放IL-1 β 及TNF- α 的释放曲线绘制

细胞培养至密度为10⁹个·L⁻¹左右。将U937细胞分为对照、4h、8h、16h、24h、32h组。对照组只加不含血清的培养基,各时间组加oxLDL至终浓度为80mg·L⁻¹。在相应时间点,将细胞于1000r·min⁻¹离心10min后吸取培养上清液,置于-20℃冰箱保存,样品收集齐后进行ELISA检测,分别测定IL-1 β 、TNF- α 分泌量。

2.6 EGB、EPH对oxLDL诱导U937细胞释放IL-1 β 及TNF- α 的影响

细胞培养至密度为10⁹个·L⁻¹左右。将U937细胞分为对照、诱导组和药物组。药物组分EGB、EPH组,分别包括1、10、100mg·L⁻¹3个浓度梯度。对照组只加不含血清的培养基;诱导组加oxLDL至终浓度为80mg·L⁻¹,培养24h,药物组在不加血清的培养基处理24h后加入不同浓度的药物预孵育12h,再加入oxLDL至终浓度为80mg·L⁻¹,培养24h。将细胞于1000r·min⁻¹离心10min后吸取培养上清,分别用ELISA检测IL-1 β 、TNF- α 分泌量。

2.7 统计学方法

用SPSS 10.0软件进行分析,多组间计量值比较采用One Way ANOVA方法分析,组间两两比较采用方差分析。

3 结果

3.1 细胞毒性试验

在25、50、100mg·L⁻¹浓度的EGB、EPH溶液以及200mg·L⁻¹浓度的EGB溶液下,细胞状态无显著变化,表现为细胞结构完整,形态饱满,折光度强;而在200mg·L⁻¹浓度的EPH溶液中,细胞开始出现边缘模糊,变形,出现破裂,培养液中细胞碎片明显增多,显示出了一定的细胞毒性。

3.2 IL-1 β 、TNF- α 标准曲线的绘制

IL-1 β 、TNF- α 的回归方程分别为 $Y = 260.29X - 12.16$ ($r = 0.9937$)、 $Y = 344.17X - 19.03$ ($r = 0.9898$)。

3.3 oxLDL诱导U937细胞释放IL-1 β 、TNF- α 的释放曲线

将检测结果代入回归方程,得到oxLDL诱导后不同时间点U937细胞培养上清液中IL-1 β 、TNF- α 的浓度,并绘制释放曲线。oxLDL诱导U937细胞释放IL-1 β 、TNF- α 的释放曲线见图1。

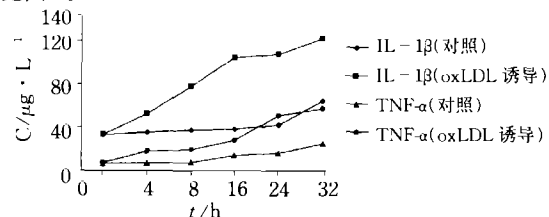


图1 oxLDL诱导U937细胞释放IL-1 β 、TNF- α 的释放曲线($n = 3$)

Fig 1 Releasing curves of IL-1 β and TNF- α from U937 cells induced by oxLDL

由图 1 可知,oxLDL($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)可诱导 U937 细胞释放炎性因子 IL-1 β 和 TNF- α ,并随时间推移,其培养上清液中的 IL-1 β 、TNF- α 浓度与对照组比较显著增加($P < 0.05$),其中 8、24、32 h 时间点的浓度均极显著性增加($P < 0.01$)。

3.4 EGB、EPH 对 oxLDL 诱导 U937 细胞释放 IL-1 β 及 TNF- α 的影响

将检测结果代入回归方程,得到 oxLDL 诱导后不同时间点 U937 细胞培养上清液中 IL-1 β 、TNF- α 的浓度,并绘制释放曲线。EGB、EPH 对 oxLDL 诱导 U937 细胞释放 IL-1 β 的影响见图 2; EGB、EPH 对 oxLDL 诱导 U937 细胞释放 TNF- α 的影响见图 3。

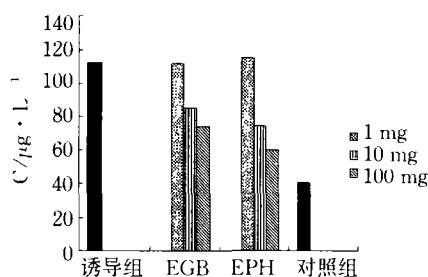


图 2 EGB、EPH 对 oxLDL 诱导 U937 细胞释放 IL-1 β 的影响 ($n = 3$)

Fig 2 Effects of EGB or EPH on oxLDL - induced U937 cells' releasing of IL-1 β ($n = 3$)

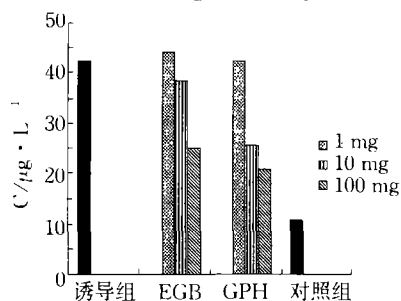


图 3 EGB、EPH 对 oxLDL 诱导 U937 细胞释放 TNF- α 的影响 ($n = 3$)

Fig 3 Effects of EGB or EPH on oxLDL - induced U937 cells' releasing of TNF- α

经统计学处理,与对照组比较,oxLDL 诱导 24 h 后诱导组的 IL-1 β 、TNF- α 释放有极显著性提高($P < 0.01$);与诱导组比较,10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EPH 和 10、100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EGB 溶液对 IL-1 β 释放具有显著的抑制作用($P < 0.05$),100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EPH 溶液有极显著性抑制作用($P < 0.01$);10、100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EPH 和 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EGB 溶液对 TNF- α 释放有显著性差异($P < 0.05$)。

4 讨论

LDL 经过氧化修饰成为 oxLDL 后被清道夫受体(SR)识别,即可促进血液中单核细胞黏附于血管壁并分化为巨噬细胞,巨噬细胞通过膜上的 SR 大量摄取 oxLDL 形成泡沫细胞^[8],因而泡沫细胞模型是研究 AS 的常用手段,目前建立模型的细胞有腹腔巨噬细胞、平滑肌细胞、U937 细胞、THP-1 细胞等,其中 U937 细胞与 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 oxLDL 孵育 48 h 可成功复制出泡沫细胞^[7],故实验中选择了 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 oxLDL 浓度作

为诱导浓度。结果表明,oxLDL 可显著诱导炎性因子 IL-1 β 和 TNF- α 的释放。

IL-1 与 TNF 通常出现在 AS 局部炎症早期并参与介导机体免疫反应,促进病理改变的发生^[1,9]。IL-1 主要参与局部炎症和细胞内事件的调节,是前炎症免疫反应的主要诱导剂,导致单核细胞和 T 淋巴细胞的募集和浸润^[2]。TNF 可影响内皮功能和血管重建,诱导自身及 IL-1、IL-6 的表达^[1,3]。IL-1、TNF 与 AS 的发生、发展密切相关,二者通过引发级联的炎症进展,启动和参与了 AS 形成的过程。

虽然有多个复杂的环节参与,炎症的发生和机体的局部免疫反应却贯穿 AS 形成的病理过程中,它与血流动力学改变等因素一起共同构成 AS 的病因。本实验结果显示,EPH 和 EGB 对 oxLDL 介导的单核巨噬细胞炎性因子释放具有显著的抑制作用,二者作用强度相当且 EPH 稍好,提示二者可能通过抗炎药活性抑制 AS 的病理进程。而以银杏、山茱萸为代表的多种中药,可能通过改善血流动力学^[10]、抑制炎性因子释放、调节机体免疫反应等多方面的作用发挥 AS 的防治作用,它们是潜在的具有 AS 防治作用新药的宝库。

参考文献

- [1] Hahn BH, Grossman J, Chen W, *et al*. The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: Roles of inflammation and dyslipidemia[J]. *J Autoi*, 2007, 28(2): 69.
- [2] Faten MS, Brenda RK, David M, *et al*. Interleukin - 1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E - knockout mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(6): 583.
- [3] Popa C, Barrea P, Netea MG, *et al*. Anti - TNF therapy and plasma HDL cholesterol concentration[J]. *Atherosclerosis*, 2005, 182(10): 375.
- [4] 蔡少青,王 璇主编.常用中药材品种整理与质量研究 - 北方编(第 6 册)[M].北京:北京医科大学出版社,2003: 455.
- [5] 枉 前,张恩娟.胡椒属植物药理作用的研究概况[J].*药学实践杂志*,2006,24(3):139.
- [6] 枉 前,曹 健,葛 勤,等.山茱萸提取物对兔动脉粥样硬化的影响[J].*中国药房*,2005,16(18):1382.
- [7] 李全忠,杨永宗,易光辉,等.U937 泡沫细胞模型的建立[J].*中国动脉硬化杂志*,1999,7(2):152.
- [8] Scott MC, Julie MM, Sara GC, *et al*. Oxidized LDL - induced injury and apoptosis in atherosclerosis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2001, 11(4): 131.
- [9] Nicola F, Carlo G, Euro P, *et al*. Atherosclerosis and inflammation. Patterns of cytokine regulation in patients with peripheral arterial disease[J]. *Atherosclerosis* 1999, 145(7): 51.
- [10] 卢 鑫,高 尔.银杏苦内酯药理作用的研究进展[J].*中国药房*,2006,17(3):221.

(收稿日期:2008-12-08 修回日期:2009-02-08)