

黄芪甲苷对苯并芘诱导 RAW264.7 细胞 MMPs 表达的保护作用

邢 程 吴少泽 王娇妮 黄凯宇 季亢挺 薛杨静

摘要 目的 观察黄芪甲苷 (astragaloside IV, ASIV) 对苯并芘 (benzopyrene, Bap) 诱导 RAW264.7 巨噬细胞 MMPs 表达的保护作用, 探讨腹主动脉瘤防治的可能新策略。**方法** 应用 Western blot 法观察 Bap 对 RAW264.7 巨噬细胞基质金属蛋白酶 -9/12 (MMP -9、MMP -12)、NF -κB、TNF -α 等表达的变化及黄芪甲苷的作用, 利用流式细胞仪观察黄芪甲苷对巨噬细胞 ROS 表达的影响。**结果** Bap 能够诱导 RAW264.7 巨噬细胞 MMP -9、MMP -12 等金属蛋白酶的表达升高和 NF -κB、TNF -α 等炎性指标的活化。黄芪甲苷具有降低 RAW264.7 巨噬细胞因 Bap 诱导而表达升高的 MMP -9、MMP -12、NF -κB、TNF -α, 同时具有清除 ROS 的作用。**结论** 黄芪甲苷能够降低 Bap 刺激 RAW264.7 巨噬细胞引起的 MMP -9、MMP -12、NF -κB、TNF -α 的表达升高, 并具有清除 ROS 的作用。

关键词 黄芪甲苷 RAW264.7 巨噬细胞 苯并芘 基质金属蛋白酶

中图分类号 R543.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.10.009

Benzopyrene Induced the Expression of MMPs and the Effects of Astragaloside in RAW264.7 Cells. Xing Cheng, Wu Shaoze, Wang Jiaoni, et al. Department of Cardiology, The Central Hospital of Zhoukou, Henan 466000, China

Abstract Objective To explore the effect of astragaloside IV (ASIV) in Bap induced the expression of MMPs on RAW264.7 cells, to provide a new control strategy of abdominal aortic aneurysm caused by smoking. **Methods** We observed the influence of ASIV on matrix metalloproteinase -9/12 (MMP -9, MMP -12) and NF -κB, TNF -α of RAW264.7 cells in vitro by western blotting. We used flow cytometry instrument to analysis whether ASIV has the role of reducing ROS. **Results** Bap caused expression of MMP -9, MMP -12, NF -κB, TNF -α increased in cultured RAW264.7 cells. ASIV has the effect of decreasing the expression of MMP -9, MMP -12, NF -κB, TNF -α, otherwise it can eliminate the ROS which was caused by Bap incultured RAW264.7 cells. **Conclusion** ASIV can decrease the expression of MMP -9, MMP -12, NF -κB, TNF -α and eliminate the ROS in RAW264.7 cells cultured with Bap.

Key words Astragaloside; RAW264.7 cells; Benzopyrene; Matrix metalloproteinases

腹主动脉瘤 (abdominal aortic aneurysm, AAA) 的发生、发展是多种因素相互作用的结果, 其中吸烟是腹主动脉瘤的高危因素, 而 BaP 是香烟烟雾的主要成分之一^[1]。Yong 等^[2]的研究中, 在 C57/B6J 小鼠体内利用 Bap 和血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 能够成功诱导 AAA 模型, Bap 能够促使动脉血管壁巨噬细胞浸润、弹性纤维紊乱, 促进 AAA 的发生。

本课题组前期在体研究表明, 香烟成分 Bap 可能通过诱导血管壁巨噬细胞浸润、MMPs 表达升高同时伴随 NF -κB 活力的增强, 进一步导致血管壁的弹性纤维和胶原纤维降解, 血管壁结构丧失, 从而引起 AAA 的发生。目前由于对 AAA 发生、发展的病理和分子机制了解太少, 临床对于 AAA 的治疗药物和预防措施相对缺乏。

黄芪为临床常用中药, 黄芪中的主要活性成分为黄芪多糖、黄芪皂苷及黄芪异黄酮, 而黄芪皂苷中的黄芪甲苷有保护血管内皮、抗衰老、抗氧化等作用^[3, 4]。临幊上黄芪皂苷常用于治疗冠心病、心肌炎等疾病, 具有一定疗效。因此, 笔者设计本研究旨在探究黄芪甲苷对 BAP 诱导的氧化应激、NF -κB 的活化、MMPs 活力及炎性反应, 是否有同样的抑制作用并进而抑制腹主动脉瘤的发生、发展。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573185); 浙江省省科技厅基金资助项目(2014C33163); 温州市科技局基金资助项目(Y20140678)

作者单位: 466000 周口市中心医院心血管内科(邢程); 325000 温州医科大学附属第二医院育英儿童医院心血管内科(邢程、吴少泽、王娇妮、黄凯宇、季亢挺、薛杨静)

通讯作者: 薛杨静, 电子信箱: 497486104@qq.com

材料与方法

1. 实验细胞: RAW264.7 巨噬细胞(上海中国科学院细胞库), 细胞培养于 10% DMEM 培养液中, 每隔 2 天换液, 置于含 5% CO₂ 的恒温恒湿培养箱中培养。

2. 实验药物与试剂: DMEM 培养液、胎牛血清(fetal calf serum, FBS)(美国 Gibco 公司)。DMSO、黄芪甲苷(北京索莱宝生物有限公司)。Bap(美国 Sigma 公司)。所有抗体(英国 Abcam 公司)。

3. 实验分组: RAW264.7 将处于对数生长期的细胞铺于 6 孔板, 每孔细胞数为 1×10^6 , 随机分为对照组、DMSO 组、Bap 组、黄芪甲苷组。对照组: 即为正常组, 不做任何处理; 溶剂对照组(DMSO 组): DMSO 终浓度为 0.1 ml/L; Bap 组: BaP 终浓度为 20 μmol/L, 作用 24 h; 黄芪甲苷组: 黄芪甲苷终浓度为 50 μg/ml, 黄芪甲苷预处理 2 h, Bap 处理 24 h。

4. 目的蛋白的提取和测定: 将各组 RAW264.7 巨噬细胞培养 24 h 后提取总蛋白, 利用 BCA 法测定各组蛋白质浓度, 用 Western blot 法检测各组 NF-κB、TNF-α、MMP9、MMP12 蛋白的表达情况, 各组实验重复 3 次。

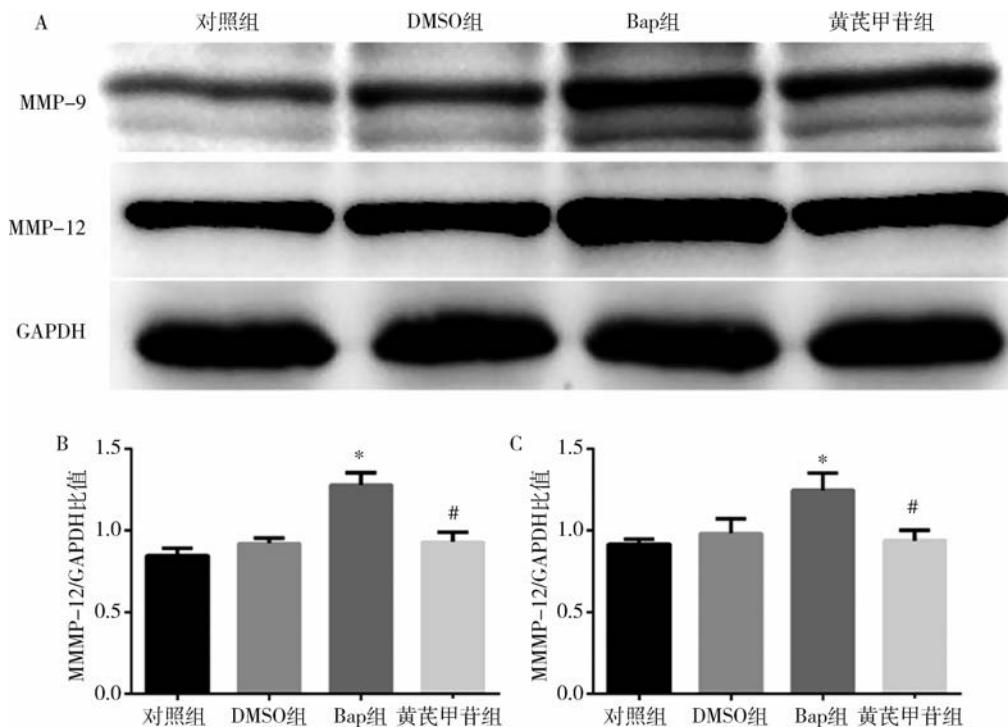


图 1 各组细胞 MMPs 表达水平

A. 不同药物干预细胞培养 24 h, Western blot 法检测显示 MMP-9、MMP-12 条带; B. 各组 MMP-9/GAPDH 比值的柱状图; C. 各组 MMP-12/GAPDH 比值柱状图; 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 Bap 组比较, # $P < 0.05$

5. 流式细胞仪检测各组 ROS 的高低: 将不同药物处理后的各组细胞与 10 μmol/L 的 ROS 敏感染料(DCFH-DA)在 37°C 下孵育 20 min, 通过流式细胞仪分选检测 ROS, 并通过 BD FACS 软件定量, 各组实验重复 3 次。

6. 统计学方法: 统计分析采用 SPSS 22.0 统计学软件完成。做图利用 GraphPad Prism6 完成。实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述。采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 黄芪甲苷对 Bap 诱导 RAW264.7 巨噬细胞 MMPs 表达的影响: MMP-9、MMP-12 的表达, 在黄芪甲苷组明显低于 Bap 组($P < 0.05$); 与对照组比较, Bap 组明显高于正常组($P < 0.05$), 对照组与 DMSO 组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 1、图 1)。

表 1 各组 MMPs 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MMP-9	MMP-12
对照组	0.85 ± 0.05	0.92 ± 0.03
DMSO 组	0.92 ± 0.04	0.98 ± 0.09
Bap 组	1.28 ± 0.08	1.25 ± 0.11
黄芪甲苷组	0.93 ± 0.06	0.94 ± 0.06

2. 黄芪甲苷对 Bap 诱导 RAW264.7 巨噬细胞相关炎性因子表达的影响: NF- κ B、TNF- α 相关炎性因子在黄芪甲苷组明显低于 Bap 组 ($P < 0.05$) ;与对照组比较, Bap 组明显高于正常组 ($P < 0.05$), 对照组与 DMSO 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1、图 2)。

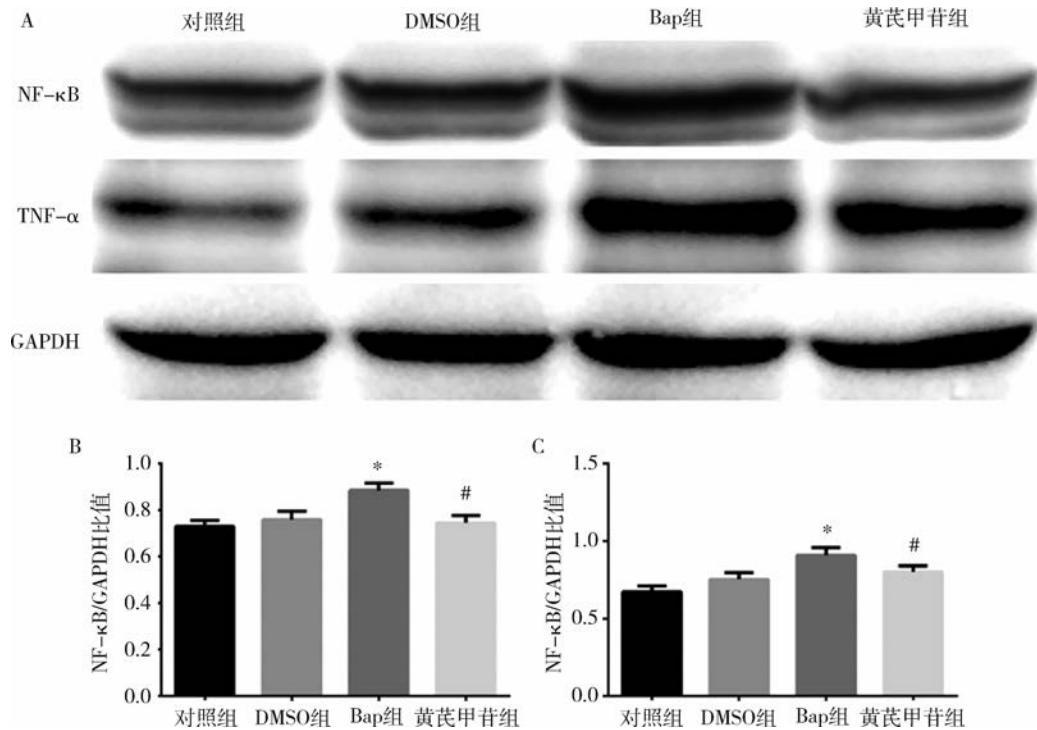


图 2 各组细胞蛋白质 NF- κ B 及 TNF- α 的表达水平

- A. 不同药物干预细胞培养 24h, Western blot 法检测结果显示 NF- κ B、TNF- α 条带; B. 各组 NF- κ B/GAPDH 比值的柱状图;
C. 各组 TNF- α /GAPDH 比值柱状图;与对照组比较, * $P < 0.01$;与 Bap 组比较, # $P < 0.05$

3. 黄芪甲苷对 Bap 诱导 RAW264.7 巨噬细胞产生 ROS 的影响: Bap 组 (25.10 ± 1.06) 与正常组 (8.60 ± 0.40) 比较, ROS 明显升高 ($P < 0.05$); 黄芪

表 2 各组细胞蛋白质 NF- κ B 及 TNF- α 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NF- κ B	TNF- α
对照组	0.73 ± 0.03	0.67 ± 0.04
DMSO 组	0.76 ± 0.04	0.75 ± 0.05
Bap 组	0.89 ± 0.03	0.91 ± 0.05
黄芪甲苷组	0.75 ± 0.03	0.80 ± 0.04

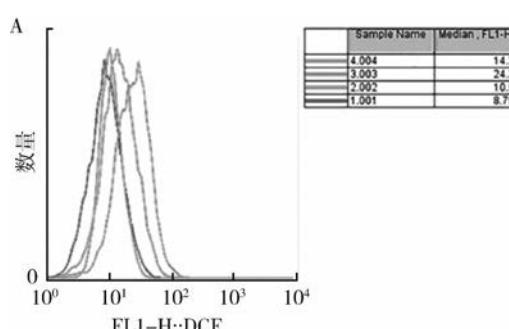
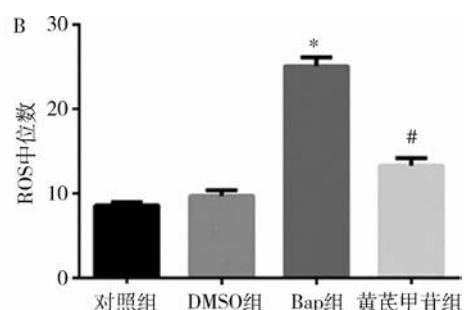


图 3 各组细胞 ROS 的表达水平

- A. 不同药物干预细胞培养 24h, 各组 ROS 的表达水平; B. 各组 ROS 中位数的柱状图;与对照组比较, * $P < 0.01$;与 Bap 组比较, # $P < 0.05$

甲苷组 (13.33 ± 0.87) 与 Bap 组比较, ROS 明显降低 ($P < 0.05$); 正常组与 DMSO 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3)。



本实验采用 Bap 刺激 RAW264.7 巨噬细胞作为

造模方法, 诱导 MMPs 和炎性因子表达的升高, 用黄芪甲苷预处理, 抑制 Bap 对 RAW264.7 巨噬细胞产

讨 论

生的损伤。结果显示 Bap 能够显著的诱导 RAW264.7 巨噬细胞 MMPs、NF- κ B、TNF- α 表达的升高,刺激刺激 RAW264.7 巨噬细胞产生 ROS。而黄芪甲苷能够有效的减轻 Bap 诱导 RAW264.7 巨噬细胞所产生的不良影响,抑制 MMPs 表达的升高,有效的清除 ROS。

吸烟是腹主动脉瘤的高危因素,3,4-苯并芘是一种烟草和煤焦油燃烧的副产物,是香烟烟雾的重要组成部分^[5]。研究表明,BaP 可引起血管壁的病理学改变,而且导致其他组织和细胞中诸如巨噬细胞浸润、MMPs 表达的上升、核转录因子(NF- κ B) 的激活等生物学反应,所有这些由 BaP 诱导的病理学改变与所观察到的在 AAA 的发展中的改变非常相似^[6,7]。

在笔者的前期研究中,通过在体实验发现 Bap 能够增加腹主动脉瘤的生成和促进血管壁 CD68 的浸润^[8]。一些研究表明,Bap 和其代谢产物具有促炎性作用和在体外和体内试验中激活 MMPs 表达的能力^[9]。此外,NF- κ B 在 Bap 引起的生物反应中是一个重要的介质^[10]。Curfs 等^[6]研究发现,长期暴露于 Bap 导致 ApoE 基因缺陷小鼠血管组织中巨噬细胞的浸润。Bap 活化 NF- κ B 的能力已经在血管平滑肌细胞、A549 细胞、NIH 3T3 细胞、表皮 CI41 细胞和星形胶质细胞中发现^[10]。Bap 可通过活化 NF- κ B 引起炎性介质 IL-8 的上调。考虑到 Bap 能诱导 MMPs 在其他细胞的表达,而且 NF- κ B 是 Bap 诱发的众多反应中的重要介质;更重要的是,在 C57/B6n 小鼠中 Bap 引起 AAA 高发和动脉壁的破坏与 AAA 发展中动脉壁的破坏非常相似且 NF- κ B 是 AAA 发展中病理改变的主要介质。笔者有理由推测 BaP 通过 NF- κ B 诱导巨噬细胞活化和浸润、诱导 MMPs 的表达,从而引起 AAA。所以本研究以 RAW264.7 巨噬细胞作为研究对象。

活性氧(ROS)与 AAA 的发展和 Bap 的生物学作用相关。ROS 在人类 AAA 组织与周围正常动脉组织相比产生的水平相当高。ROS 产生的增加是与浸润性的炎性细胞和 VSMCs 共同出现的^[11]。在动物研究中,抗氧化剂维他命 E 改善了在高脂血症中血管紧张素诱导的 AAA,而且三苯氧胺通过上调过氧化氢酶,从而减少了 AAA 的形成。这些数据提示 ROS 参与了 AAA 的形成。

黄芪为临床常用中药,性温,味甘,具有补气固表、敛疮生肌等功效,能够保护血管内皮、抗衰老、抗

氧化等作用^[3,4,12]。临幊上黄芪皂昔常用于治疗冠心病、心肌炎等疾病,具有一定疗效。本实验研究结果充分证实传统中药黄芪甲苷对 Bap 刺激 RAW264.7 巨噬细胞具有保护作用,这对于吸烟人口众多且 AAA 发生率呈逐年上升趋势的中国有其特殊意义。

参考文献

- Toghill BJ, Saratzis A, Harrison SC, et al. The potential role of DNA methylation in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm [J]. Atherosclerosis, 2015, 241(1): 121–129
- Zhang Y, Ramos KS. The development of abdominal aortic aneurysms in mice is enhanced by benzo(a)pyrene [J]. Vascular Health Risk Manage, 2008, 4(5): 1095–1102
- Li HB, Ge YK, Zhang L, et al. Astragaloside IV improved barrier dysfunction induced by acute high glucose in human umbilical vein endothelial cells [J]. Life Sci, 2006, 79(12): 1186–1193
- Xu C, Tang F, Lu M, et al. Astragaloside IV improves the isoproterenol-induced vascular dysfunction via attenuating eNOS uncoupling-mediated oxidative stress and inhibiting ROS-NF- κ B pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 33(1): 19–27
- Guo X, Luo L, Ma Y, et al. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on particulate organic matters [J]. J Hazardous materials, 2010, 173(1–3): 130–136
- Curfs DM, Lutgens E, Gijbels MJ, et al. Chronic exposure to the carcinogenic compound benzo[a]pyrene induces larger and phenotypically different atherosclerotic plaques in ApoE-knockout mice [J]. Am J Pathol, 2004, 164(1): 101–108
- Sharma A, Neekhra A, Gramajo AL, et al. Effects of Benzo(e)Pyrene, a toxic component of cigarette smoke, on human retinal pigment epithelial cells in vitro [J]. Investiga Ophthalmol Visual Sci, 2008, 49(11): 5111–5117
- Ji K, Zhang Y, Jiang F, et al. Exploration of the mechanisms by which 3,4-benzopyrene promotes angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice [J]. J Vascul Surg, 2014, 59(2): 492–499
- Weng MW, Hsiao YM, Chen CJ, et al. Benzo[a]pyrene diol epoxide up-regulates COX-2 expression through NF- κ B in rat astrocytes [J]. Toxicol Lett, 2004, 151(2): 345–355
- Hockley SL, Arlt VM, Jahnke G, et al. Identification through microarray gene expression analysis of cellular responses to benzo(a)pyrene and its diol-epoxide that are dependent or independent of p53 [J]. Carcinogenesis, 2008, 29(1): 202–210
- Gavrila D, Li WG, McCormick ML, et al. Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice [J]. Arterioscler Thromb Vascul Biol, 2005, 25(8): 1671–1677
- Ren S, Zhang H, Mu Y, et al. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review [J]. J Tradition Chinese Med, 2013, 33(3): 413–416

(收稿日期:2017-01-16)

(修回日期:2017-02-28)