

脑心通对小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的活力及凋亡的影响

邓子亮¹, 蓝明明¹, 郭洪胜¹, 谭锦麟¹, 李婉怡¹, 周雅贤², 梁艳君², 王森¹, 王焱^{2,3}

1. 广东医科大学基础医学院, 广东 东莞 523808;

2. 东莞常安医院心血管内科, 广东 东莞 523000;

3. 广东医科大学第二临床医学院, 广东 东莞 523808

【摘要】 目的 研究脑心通(Naoxintong, NXT)对Raw264.7小鼠单核巨噬细胞系细胞活力和凋亡的影响及NXT的作用特点。方法 实验设置空白组(培养基100 μL)、对照组[细胞悬液100 μL + 1/10二甲亚砜(DMSO)原液1 μL]和三种浓度的NXT组。用CCK-8法检测空白组、对照组、1:1 000 NXT组、1:10 000 NXT组和1:100 000 NXT组经NXT作用12 h后Raw264.7细胞的活力。选取1:1 000 NXT组, CCK-8法检测作用1 h、3 h和6 h后Raw264.7细胞的活力。用Hoechst 33258细胞凋亡试剂盒检测对照组和1:1 000的NXT组的细胞凋亡程度。结果 与对照组比较, 1:1 000 NXT组和1:10 000 NXT组分别提高Raw264.7细胞活力至(108.2±5.35)%和(105.69±3.02)%, 差异均有统计学意义(P<0.05); 作用6 h内, NXT对Raw264.7细胞活力的提高效果均非常显著, 差异有统计学意义(P<0.05); 1:1 000的NXT DMSO浸取原液组细胞凋亡数量显著减少。结论 NXT可提高Raw264.7细胞活力, 降低细胞凋亡, 其最佳作用浓度1/1 000, 最佳作用时间1~6 h。

【关键词】 脑心通; Raw264.7细胞; 细胞凋亡; 细胞活力; CCK-8

【中图分类号】 R-332 【文献标识码】 A 【文章编号】 1003-6350(2019)08-0956-04

Effect of Naoxintong on the viability and apoptosis of mouse macrophage Raw264.7. DENG Zi-liang¹, LAN Ming-ming¹, GUO Hong-sheng¹, TAN Jin-lin¹, LI Wan-yi¹, ZHOU Ya-xian², LIANG Yan-jun², WANG Sen¹, WANG Yan^{2,3}. 1. School of Basic Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, CHINA; 2. Department of Cardiovascular Medicine, Chang'an Hospital of Dongguan, Dongguan 523000, Guangdong, CHINA; 3. The Second School of Clinical Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To study the effect of Naoxintong (NXT) on cell viability and apoptosis of Raw264.7 mouse mononuclear macrophage cell line and the functional characteristics of NXT. Methods The experiment set up a blank group (culture medium 100 μL), a control group (cell suspension 100 μL & 1/10 dimethyl sulfoxide (DMSO) stock solution 1 μL), and three NXT groups with different concentrations. CCK-8 assay was used to detect the viability of Raw264.7 cells in the blank group, control group, 1:1 000 NXT group, 1:10 000 NXT group, and 1:100 000 NXT

基金项目: 广东医科大学科研基金面上培育项目(编号: M2017033、M2016028); 广东医科大学大学生创新实验项目(编号: ZYDB002); 步长制药上市产品科研课题(编号: Wangyan2017-2020)

通讯作者: 王焱, E-mail: wy6806003@163.com

ic response of colorectal cancer cells by affecting Hif-1α stabilization [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 32.

[7] SHARMA S, KAUL D, ARORA M, et al. Oncogenic nature of a novel mutant AATF and its interactome existing within human cancer cells [J]. Cell Biol Int, 2015, 39(3): 326-333.

[8] XIE J, GUO Q. Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia-reperfusion [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(12): 3336-3346.

[9] HÖPKER K, HAGMANN H, KHURSHID S, et al. AATF/Che-1 acts as a phosphorylation-dependent molecular modulator to repress p53-driven apoptosis [J]. EMBO J, 2012, 31(20): 3961-3975.

[10] CALISKAN G, BARIS IC, AYAYDIN F, et al. Che1/AATF interacts with subunits of the histone acetyltransferase core module of SAGA complexes [J]. PLoS One, 2017, 12(12): e189193.

[11] DESANTIS A, BRUNO T, CATENA V, et al. Che-1 modulates the decision between cell cycle arrest and apoptosis by its binding to p53 [J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1764.

[12] HOPKER K, HAGMANN H, KHURSHID S, et al. Putting the brakes on p53-driven apoptosis [J]. Cell Cycle, 2012, 11(22): 4122-4128.

[13] SHI H, ZHANG A, HE Y, et al. Effects of p53 on aldosterone-induced mesangial cell apoptosis in vivo and in vitro [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 5102-5108.

[14] 姚亚兰. 调控p53对高糖培养下肾小球系膜细胞增殖活化的影响[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.

[15] 郭晓芳, 顾勤, 刘宁, 等. P53在急性肾损伤小鼠肾脏的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 11: 1971-1975.

(收稿日期: 2019-01-12)

group after 12 h of NXT treatment. The 1 : 1 000 NXT group was used to detect the viability of Raw264.7 cells by CCK-8 method after 1 h, 3 h and 6 h of NXT treatment. The degree of apoptosis in the control group and the 1 : 1 000 NXT group were measured using Hoechst 33258 apoptosis kit. **Results** Compared with the control group, the 1 : 1 000 NXT group and the 1 : 10 000 NXT group improved the viability of Raw264.7 cells to $(108.2\pm 5.35)\%$ and $(105.69\pm 3.02)\%$, respectively, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Within 6 hours of treatment, NXT had a significant effect on the improvement of Raw264.7 cells viability ($P<0.05$). The amounts of apoptotic cells in the 1:1 000 NXT group furtherly treated by DMSO were significantly reduced. **Conclusion** NXT can improve the activity of Raw264.7 cells and reduce apoptosis. The optimal concentration of NXT is 1/1 000, and the optimal action time is 1-6 h.

【Key words】 Naoxintong; Raw264.7 cells; Apoptosis; Cell viability; CCK-8

脑心通胶囊(Naoxintong, NXT)组方源于清代王清任《医林改错·卷下·痿痺论》的补阳还五汤,全方标本兼治、益气活血、化瘀通络,由黄芪、赤芍、丹参、当归、川芎、桃仁、红花、醋乳香、醋没药、鸡血藤、牛膝、桂枝、桑枝、地龙、全蝎、水蛭共16种中药组成。经国家食品药品监督管理局(CFDA)批准,被收录于2015年版《中国药典》的现代中药方剂中^[1]。临床上主要用于治疗冠心病、心绞痛、脑卒中等心脑血管疾病,具有脑心同治的功用^[2]。有研究证明,NXT具有良好的抗炎效果,可轻度保护OX-LDL作用下巨噬细胞活力,并在一定范围内剂量依赖性下调THP-1细胞IL-6和TNF- α 的表达,减轻细胞炎症反应^[3];而OX-LDL可通过TLR4途径介导动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)发生发展^[4]。更多研究表明,进展期斑块内细胞凋亡可加剧炎症反应,而NXT可抑制AS斑块进展^[5],减缓AS发生发展中斑块的形成^[6-7]。细胞凋亡是AS的重要特征之一,NXT通过增加PPAR α 蛋白水平来抑制H₂O₂诱导的H9c2细胞凋亡和自噬;相反,沉默的PPAR α 终止了对H₂O₂诱导的H9c2细胞的NXT保护作用,显著提高了H9c2细胞的活力^[8]。通过对脑梗死大鼠模型的研究发现,NXT能减少Caspase-3阳性表达,减少梗死体积,对局部病灶的脑缺血再灌注后的神经细胞凋亡有抑制作用^[9]。NXT还可通过增强CXCR4蛋白的表达促进细胞的迁移进而帮助治疗缺血性心脏病^[10]。Raw264.7小鼠单核巨噬细胞系,在炎症相关研究中应用广泛,本研究以Raw264.7细胞作为实验对象,研究NXT对Raw264.7细胞的活力以及该细胞凋亡结果的影响及其作用特点,为进一步研究NXT的抗炎效应在AS发生中的作用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器 Raw264.7细胞为广东医科大学张志珍教授赠送。步长脑心通为陕西步长制药有限公司生产(生产批号:180804),CCK-8检测试剂盒为日本同仁化学研究所产品(货号:CK04),Hoechst33258细胞凋亡试剂盒为广州捷倍斯生物科技有限公司生产(货号:G0448),DMEM basic(1X)培养基(货号:11885)、胎牛血清(货号:10091148)、胰酶(货号:15050065)和青霉素加链霉素双抗(货号:15070063)均

为美国Gibco公司生产。主要设备有:Thermo Fisher公司生产的160i二氧化碳培养箱,BIO-RAD公司生产的iMark酶标仪,宁波舜宇光学科技(集团)有限公司生产的XD倒置荧光显微镜,超净工作台,涡旋混匀器等。

1.2 实验方法

1.2.1 药物提取与稀释 将胶囊内的药物粉末称重后加入15 mL离心管中,按照0.1 g/mL(质量/体积比)加入二甲基亚砜(DMSO)原液。常温下置于涡旋混匀器上旋转浸取过夜,然后于2 500 r/min离心10 min,取上清液为药物原液,分装后于-20℃冰箱冻存备用。分别用无血清培养基以1:10、1:100和1:1 000的比例稀释成1/10、1/100和1/1 000原浓度药液制备工作液。

1.2.2 细胞培养 Raw264.7细胞培养于含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的160i培养箱中孵育生长。待细胞融合度达到80%左右,细胞呈类圆形有小触角状时收集细胞。先弃培养基,然后用2 mL无血清培养基轻轻吹下贴壁细胞,紧贴于培养板的细胞已分化,不适用于本实验的测定,当弃去。于1 000 r/min离心5 min后弃去上清液,再用2 mL无血清培养基洗一次即可1:2~1:3传代或用于实验。

1.2.3 CCK-8法检测细胞活力 药物浓度效应和时间效应检测在96孔培养板中进行,实验用细胞计数后,每孔加培养基100 μ L或含约5 000个细胞的细胞悬液100 μ L,接种于培养板中培养2 h以上,使细胞贴壁后检测。

1.2.3.1 浓度效应分组 药物作用时间为12 h,每组设4个复孔。各组处理方案如下:空白组:培养基100 μ L;对照组:细胞悬液100 μ L + 1/10 DMSO原液1 μ L;1:1 000 NXT组:细胞悬液100 μ L + 1/10原浓度药液1 μ L;1:10 000 NXT组:细胞悬液100 μ L + 1/100原浓度药液1 μ L;1:100 000 NXT组:细胞悬液100 μ L + 1/1 000原浓度药液1 μ L。

1.2.3.2 时间效应分组 空白组:培养基100 μ L;对照组:细胞悬液100 μ L + 1/10 DMSO原液1 μ L;NXT组:细胞悬液100 μ L + 1/10原浓度药液1 μ L;药

物分别作用1 h、3 h和6 h。

按如上分组培养细胞后,于不同时间镜下观察细胞数量和形态,然后向96孔板每孔加入10 μL CCK-8试剂;避光孵育2 h;用酶标仪检测细胞吸光值,设定450 nm波长,参比波长630 nm,根据如下公式计算细胞活力。

细胞存活率(%)=[(A_{检测组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})] \times 100%。

其中A_{检测组}表示药物检测孔的吸光度平均值,A_{空白组}表示培养基对照孔的吸光度平均值,A_{对照组}表示对照孔的吸光度平均值。

1.2.4 细胞凋亡的检测 收集细胞后,用无血清DMEM培养基重悬细胞,计数后调整细胞浓度到 $1 \times 10^4/\text{mL}$,按每孔2 mL细胞悬液(含细胞 2×10^4)接种到6孔板中,置37°C培养箱中培养2 h待细胞贴壁。对照组加入1/1 000 DMSO原液,实验组加入1/1 000的NXT DMSO浸取原液,放37°C培养箱中培养2 h以上待细胞贴壁。6 h后移除培养基,1~2 mL的磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次后,用0.5 mL/孔4%多聚甲醛固定细胞15 min,移除固定液后再用PBS洗3次,0.5 mL Hoechst 33258染色液避光染色5 min后移除染色液,PBS洗3次,用荧光显微镜观察细胞凋亡情况,自动曝光模式拍照。

1.3 统计学方法 采用Microsoft Excel软件整理分析数据,定量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NXT的浓度效应 将不同稀释度的NXT原液浸取液作用于Raw264.7细胞12 h后用CCK-8法检测细胞活力,以对照组作对照[(100 \pm 3.52)%],结果显示:1:1 000 NXT组和1:10 000 NXT组分别提高细胞活力到(108.2 \pm 5.35)%和(105.69 \pm 3.02)%,差异均有统计学意义($P < 0.05$);继续提高稀释度到1/100 000 [(97.61 \pm 6.77)%],差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 NXT的时间效应 1/1 000稀释的NXT浸取液作用于Raw264.7不同时间后检测,结果显示:以对照组作参考[(100 \pm 7.47)%],NXT作用1 h可提高细胞活力到(124.84 \pm 9.79)%,3 h和6 h的细胞活力分别为(122.98 \pm 6.25)%和(128.45 \pm 8.39)%,差异均有显著统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 NXT对Raw264.7细胞凋亡的影响 荧光显微镜下相同拍照参数下观察可发现,Hoechst 33258染色液可使正常细胞核着均匀蓝色。20倍镜下,相机自动曝光拍照后的对比见图1,DMSO对照组有较多的细胞核呈蓝白色致密浓染或碎片化浓染的凋亡细胞,NXT实验组细胞凋亡数量显著减少。

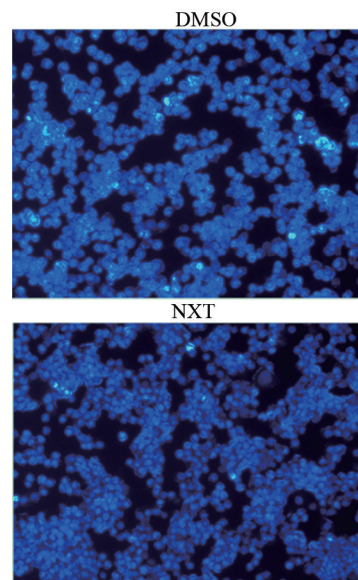


图1 NXT对Raw264.7细胞凋亡的影响

注:NXT稀释度1/1 000,作用时间6 h,自动曝光模式拍照,显微镜放大20 \times 。

3 讨论

2015年,我国城、乡居民因心脑血管疾病死亡占全部死因的比例分别为42.61%和45.01%,高于肿瘤及其他疾病,居于各类疾病的首位。随着影响心脑血管疾病的危险因素水平持续上升,该类疾病的发病率和死亡率逐步升高,心脑血管疾病的负担不断加重,防治工作形势日趋严峻^[1]。近几年,NXT被广泛用于心脑血管疾病的临床治疗。黄敏杰的研究数据表明^[2],采取常规方法联合步长脑心通治疗的心脑血管疾病患者,其总有效率为93.88%,明显高于采取常规治疗的患者(63.27%);联合治疗还能使患者心电图、脑供血状况产生良性变化,为之后的临床疗效的提高奠定了坚实的基础。NXT可以显著降低AS患者血浆中高敏C反应蛋白、激活蛋白酶-1及巨噬细胞游走抑制因子表达水平,从而减小AS斑块体积、降低炎症反应及改善血液粘滞度^[3]。NXT可显著降低脑梗死患者的同型半胱氨酸水平,减缓炎症反应的发生,后续可以改善一系列血管内皮的生理状态,起到对脑梗死治疗和预防的作用^[4]。另外,NXT显著促进内皮祖细胞(EPCs)的动员与归巢,小鼠血EPCs得到保护^[5]。这些数据支持了本研究所显示的NXT对小鼠单核细胞的保护作用。

本实验结果显示NXT影响细胞活力的主要因素有两点:(1)药物作用浓度:1/1 000~1/10 000稀释的NXT浸取液均可有效提高细胞活力,提高稀释度到1/100 000,NXT对细胞的保护作用基本消失。(2)药物作用时间:1/1 000稀释的NXT浸取液作用于细胞6 h内均可提高细胞活力。本研究表1结果中,NXT对细胞活力的提高比例较表2中低很多,这是因为表1中的数据是在NXT作用12 h后检测得到的。表1和表2数据结合,也可进一步说明NXT发挥作用较稳定较

好的时间范围是1~6 h。随时间延长,NXT的药物有效成分被代谢,作用效果会相对减弱,但药效依然可持续到12 h以上。该结果与脑心通使用说明书中一天3次服药的数据吻合,也证明NXT的作用时间窗较宽,可为患者服药时间的选择提供更大自由度和更多方便。

此外,与对照组相比,1:1 000 NXT组的细胞凋亡数量有明显减少,说明NXT能抑制细胞的凋亡。多方面文献也支持了本研究结果,何子龙等^[16]研究证明NXT可通过抑制水通道蛋白1(AQP1)表达和细胞凋亡,发挥心肌保护作用;王海燕等^[17]研究显示NXT可通过调节PI3K/Akt信号通路,对缺糖缺氧致乳鼠脑微血管内皮细胞凋亡发挥保护作用。耿潇等^[18]研究表明,NXT给药后,小鼠vasohibin-1蛋白表达降低,差异蛋白的改变可能提示NXT有调节和改善冠心病及缺血性脑血管疾病等心血管疾病的功效,该研究可能为心血管未病先防的分子机制研究提供了潜在的生物标志物。

综上所述,NXT可显著提高Raw264.7细胞的活力,抑制细胞凋亡。当药物稀释度为1:1 000,作用时间6 h内时具有较好的效果,最长有效时间达12 h。

任阳等^[19]研究证明NXT辅助治疗冠心病合并高血压患者疗效显著。同时具有改善患者血管内皮功能和血脂的功能。但是NXT是否通过上述作用保护单核巨噬细胞及血管内皮细胞,进而减缓AS的发生发展将是下一步的研究方向。

参考文献

[1] 赵涛,王一民,刘娜,等.从补阳还五汤到脑心通胶囊——脑心同治的思路探讨[J].世界中西医结合杂志,2012,7(10):900.

[2] 《脑心通胶囊临床应用中国专家共识》编写组.脑心通胶囊临床应用中国专家共识[J].中国中西医结合杂志,2017,37(9):1039-1042.

[3] 刘倩,王东琦,雷新军,等.脑心通对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)作用下的人THP-1细胞活力及炎症反应的影响[J].中医杂志,2009,50(10):1-4.

[4] GENG H, WANG A, RONG G, et al. The effects of ox-LDL in human atherosclerosis may be mediated in part via the toll-like receptor

4 pathway [J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2010, 342(1-2): 201-206.

- [5] 李金阳,姚剑挺,盛思琪,等.细胞凋亡和有效吞噬在动脉粥样硬化斑块中的作用[J].基础医学与临床,2018,38(4):548-552.
- [6] 文治勇.脑心通胶囊对颈动脉粥样硬化斑块影响的临床研究[J].实用心脑血管病杂志,2011,19(1):41-44.
- [7] LIANG Q, CAI Y, CHEN R, et al. The effect of Naoxintong Capsule in the treatment of patients with cerebral infarction and carotid atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis of randomized trials [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 1-9.
- [8] XU H, JIN J, CHEN L, et al. Naoxintong/PPAR α Signaling inhibits H9c2 cell apoptosis and autophagy in response to oxidative stress [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 1-10.
- [9] 郭和伏.探讨脑心通对大鼠脑缺血后神经细胞凋亡的保护作用[J].中外医疗,2012,31(21):1-2.
- [10] 杨岳,李慧影,张璐莎,等.脑心通胶囊提取物通过增强CXCR4表达促进心脏干细胞迁移[J].天津中医药大学学报,2016,35(2):99-103.
- [11] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2017》概要[J].中国循环杂志,2018,33(1):1-7.
- [12] 黄敏杰.步长脑心通胶囊治疗心脑血管疾病的临床效果[J].临床医学,2016,36(12):122-123.
- [13] 王起,王妮妮.脑心通对老年颈动脉粥样硬化斑块、高敏C反应蛋白、AP-1及MIF的影响[J].中药材,2017,40(3):727-729.
- [14] 陈勇军,张平,罗焱,等.脑心通胶囊对脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块和CRP及Hcy的影响[J].辽宁中医杂志,2017,44(9):1920-1921.
- [15] 邱丽珍,陈璐,李春晓,等.脑心通胶囊促进后下肢缺血损伤小鼠内皮祖细胞动员与归巢[J].中国中药杂志,2016,41(23):4416-4423.
- [16] 何子龙,赵晔,张毅,等.脑心通胶囊肠吸收液保护过氧化氢致H9c2心肌细胞损伤的作用机制及有效药味筛选[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(4):29-35.
- [17] 王海燕,周惠芬,何昱,等.脑心通胶囊对缺糖缺氧损伤脑微血管内皮细胞的保护作用及其机制[J].中草药,2018,49(14):3318-3325.
- [18] 耿潇,陈璐,赵步长,等.基于血清蛋白组学初步探讨脑心通胶囊防治心脑血管疾病的作用机制[J].中国中药杂志,2016,41(15):2864-2871.
- [19] 任阳,林芳.步长脑心通胶囊辅助治疗冠心病合并高血压患者的疗效及对内皮功能和血脂的影响[J].世界中医药,2018,13(5):1180-1186.

(收稿日期:2019-01-24)