

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)13-1164-04

苦参碱对单核细胞源性泡沫细胞形成及 PPAR- γ , caveolin-1 表达的影响

姜怡邓¹, 张慧萍², 曹 军¹, 李桂忠¹, 王树人³ (¹宁夏医学院基础学院病理生理学教研室, 宁夏 银川 750004; ²银川妇幼保健院妇产科, 宁夏 银川 750001; ³四川大学华西医学中心基础医学与法医学院, 四川 成都 760043)

Effect of matrine on PPAR- γ and caveolin-1 expressions in foam cells derived from monocytes

JIANG Yi-Deng¹, ZHANG Hui-Ping², CAO Jun¹, LI Gui-Zhong¹, WANG Shu-Ren³

¹Department of Pathophysiology, Ningxia Medical College, Yinchuan 750004, China, ²Department of Gynecology and Obstetrics, Maternal and Child Health Hospital, Yinchuan 750004, China, ³College of Pre-clinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 AIM : To study the effect of matrine on PPAR- γ and caveolin-1 expressions and cholesterol ester (CE) in foam cells derived from monocytes. **METHODS** : The accumulation of cholesterol in monocytes was measured by fluorescence spectrophotometric method. The lipid peroxide within cells was detected by TBARS method ; the foam cells were observed by oil red O staining. PPAR- γ mRNA and PPAR- γ , caveolin-1 levels were determined by RT-PCR and Western blot respectively. **RESULTS** : In the monocytes incubated with PMA and oxy-low density lipoprotein (ox-LDL), CE and lipid peroxide (MDA) increased from (3.4 \pm 0.6) mg/L, and (0.43 \pm 0.07) nmol/L to (64.8 \pm 6.8) mg/L and (8.50 \pm 1.23) nmol/L ($P < 0.05$) respectively, and foam cells increased from (4.7 \pm 2.2)% to (77.8 \pm 7.0)% ($P < 0.05$). In low, middle, high-dose matrine groups the contents of CE and MDA were (29.7 \pm 4.9) mg/L and (1.92 \pm 0.46) nmol/L, (5.8 \pm 1.3) mg/L and (0.6 \pm 0.08) nmol/L, (3.4 \pm 0.6) mg/L and (0.43 \pm 0.07) nmol/L respectively ; and the foam cells accounted for (46.2 \pm 5.8)%, (16.3 \pm 3.4)%, and (4.8 \pm 1.5)% respectively, the levels of PPAR- γ mRNA and PPAR- γ , caveolin-1 protein were (6.4 \pm 2.2), (0.6 \pm 0.08), (0.5 \pm 0.09), (7.4 \pm 2.2), (0.6 \pm 0.08), (0.6 \pm 0.07), (8.6 \pm 2.7), (0.6 \pm 0.06), (0.7 \pm 0.06) respectively. The above changes were alleviated in the matrine treatment groups and the differences were significant between

the matrine treatment and the ox-LDL + PMA groups ($P < 0.05$). **CONCLUSION** : The mechanism of anti-atherosclerosis by matrine may be related to its roles in reducing cholesterol accumulation and increasing the expression level of PPAR- γ and caveolin-1 in foam cells derived from monocytes.

【Keywords】 matrine ; foam cells ; PPAR- γ ; cholesterol ; caveolin-1

【摘要】目的 : 观察苦参碱对 ox-LDL 诱导的单核细胞源性泡沫细胞内胆固醇酯和 PPAR- γ , 小凹蛋白-1 表达的影响。方法 : 用荧光分光光度法测定胆固醇浓度 ; 采用 TBARS 法检测细胞内脂质过氧化产物 ; 用油红 O 染色法检测泡沫细胞的形成 ; 用荧光 RT-PCR 和 Western Blot 检测 PPAR- γ , caveolin-1 的表达。结果 : 单核细胞经 PMA 及 oxLDL 共同孵育后, 细胞内形成大量脂滴, 胆固醇酯 (CE) 和细胞内脂质过氧化产物 (MDA) 含量由 (3.4 \pm 0.6) mg/L, (0.43 \pm 0.07) nmol/L 升至 (64.8 \pm 6.8) mg/L, (8.50 \pm 1.23) nmol/L ($P < 0.05$), 泡沫细胞由 (4.7 \pm 2.2)% 升至 (77.8 \pm 7.0)% ($P < 0.05$), 而 PPAR- γ mRNA 和 PPAR- γ , 小凹蛋白-1 蛋白表达由 (4.4 \pm 0.8), (0.5 \pm 0.09), (0.6 \pm 0.09) 降至 (1.6 \pm 0.4), (0.33 \pm 0.09), (0.33 \pm 0.09) ($P < 0.05$), 苦参碱低、中、高干预组细胞内积聚的 CE 和 MDA 含量分别为 (29.7 \pm 4.9) mg/L, (1.92 \pm 0.46) nmol/L, (5.8 \pm 1.3) mg/L, (0.6 \pm 0.08) nmol/L, (3.4 \pm 0.6) mg/L, (0.43 \pm 0.07) nmol/L, 泡沫细胞为 (46.2 \pm 5.8)%, (16.3 \pm 3.4)%, (4.8 \pm 1.5)%, PPAR- γ mRNA 和 PPAR- γ , 小凹蛋白-1 蛋白表达为 (6.4 \pm 2.2), (0.6 \pm 0.08), (0.5 \pm 0.09), (7.4 \pm 2.2), (0.6 \pm 0.08), (0.6 \pm 0.07), (8.6 \pm 2.7), (0.6 \pm 0.06), (0.7 \pm 0.06) 与 ox-LDL + PMA 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 : 苦参碱减少 ox-LDL 诱导的单核细胞源性泡沫细胞的形成及细胞内胆固醇聚集, 增加泡沫细胞内 PPAR- γ , 小凹蛋白-1 的表达。

【关键词】 苦参碱 ; 泡沫细胞 ; 过氧化增殖物激活型受体- γ ; 胆固醇 ; 小凹蛋白-1

【中图分类号】 R965 **【文献标识码】** A

0 引言

动脉粥样硬化一个重要的特征是单核细胞进入损伤的动脉壁进而分化为巨噬细胞。这些巨噬细胞吞噬大量的脂质变为泡沫细胞^[1]。在人类和小鼠粥样斑块损伤中可见过氧化物酶增殖物激活受体

收稿日期 2006-10-25 ; 接受日期 2006-12-06

基金项目 : 宁夏自然科学基金 (NZ0534)

通讯作者 : 王树人, Tel (028) 85501268 Email jwcyj@163.com

作者简介 : 姜怡邓, 博士, 讲师, Tel (0951) 4083421 Email jiangyd@

nxmc.edu.cn

(PPAR- γ)明显表达,提示 PPAR- γ 在动脉粥样硬化中起重要作用。小凹蛋白-1(caveolin-1)具有结合和运载胆固醇的功能,并促进细胞内游离胆固醇流出,对维持正常细胞胆固醇的稳态起着重要调节作用^[2]。苦参中的活性成分苦参碱(Matrine)具有较为广泛的生物学作用^[3]。但其抗动脉粥样硬化的机制目前尚不清楚。本实验我们以 ox-LDL 诱导的单核细胞形成的泡沫细胞为实验模型,观察苦参碱对胆固醇脂 PPAR γ 小凹蛋白-1 表达的影响,进一步探讨苦参碱在动脉粥样硬化发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI-1640 培养基购自 GIBCO 公司;胎牛血清购自天津市正江高科技公司;牛血清白蛋白(BSA),佛波酯(PMA),油红 O,靛蓝胭脂红,胆固醇氧化酶,胆固醇酯酶均购自 Sigma 公司;胆酸钠美国 Amresco 公司。胆固醇购自 GourMet Cell Application 公司;苦参碱一种生物碱,具有四环的喹啉啶类结构,熔点 75.5~77.5℃,纯度 99%,溶于水,批号为 20040625,分子质量 248.36,宁夏中药厂提供。

1.2 方法 健康人血浆购自宁夏中心血站,按照常规方法分离、提纯,提取的 LDL 以含 0.1 g/L EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)4℃透析 48 h,过滤除菌,考马斯亮蓝 G-250 法定量蛋白。在分组干预时,使苦参碱终浓度达到以下分组的浓度^[4]。①对照组:对细胞没有任何干预;②ox-LDL + PMA 组:培养细胞中加入终浓度为 0.5 mg/L 的 PMA,100 mg/L 的 ox-LDL;③苦参碱低剂量组:培养细胞中加入终浓度为 0.5 mg/L 的 PMA,100 mg/L 的 ox-LDL,2.5 × 10⁻⁴ mol/L 的苦参碱;④苦参碱中剂量组:培养细胞中加入终浓度为 0.5 mg/L 的 PMA,100 mg/L 的 ox-LDL,5 × 10⁻⁴ mol/L 的苦参碱;⑤苦参碱高剂量组:培养细胞中加入终浓度为 0.5 mg/L 的 PMA,100 mg/L 的 ox-LDL,1 × 10⁻³ mol/L 的苦参碱,各组继续培养 48 h。

按文献[5]用荧光分光光度法测定各样品的胆固醇浓度,测定游离胆固醇时,反应液中省去胆固醇酯酶,胆固醇酯的含量用总胆固醇与游离胆固醇的差值获得。按照 MDA 测定试剂盒说明书的方法,检测 MDA 的含量及活性。显微镜下观察,细胞内脂质呈红色,细胞核呈蓝色。400 倍光镜下非重复计数 100 个细胞,计出泡沫细胞所占的数量。按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,提取的 RNA 溶于适量 DEPC 水中,备用。逆转录总反应体系为 50 μ L,总 RNA 10 μ g, oligdT 2 μ L,混匀短暂离心,70℃预变性 10 min,冰浴 5 min;加入 MMLV 逆转录酶 2 μ L, RNasin 1

μ L, dNTP 2 μ L, MMLV 缓冲液 10 μ L 40℃逆转录 60 min, 94℃ 5 min 灭活逆转录酶。荧光定量 PCR 引物序列资源自 GenBank 序列数据库。根据基因的相对量 = 2^{- $\Delta\Delta$ Ct},在该公式中,Ct 是热循环仪检测到反应体系中荧光信号的强度值, $\Delta\Delta$ Ct = [CtGI(待测样品) - CtGAPDH(待测样品)] - [CtGI(校正样品) - CtGAPDH(校正样品)]。GI 是目的基因,校正样品是任何被选做代表 1 倍目的基因表达量的样品,使用这一方法可以直接得到目的基因相对于管家基因的定量。

按文献方法[6]待测样品用 BCA 试剂测定蛋白含量后蛋白浓度以 BCA 法测定。采用 Bio-Rad Quantity 4.5.2 软件分析测定其区带的感光密度,以 β -actin 为内参照,用目的片段与 β -actin 的光密度比值表示蛋白质表达水平。

统计学处理:各样本测定值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行方差分析(ANOVA)及多样本均数的两两比较(LSD)。组间方差不齐时,采用非参数秩和检验,用 SPSS 11.0 统计学软件进行分析 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

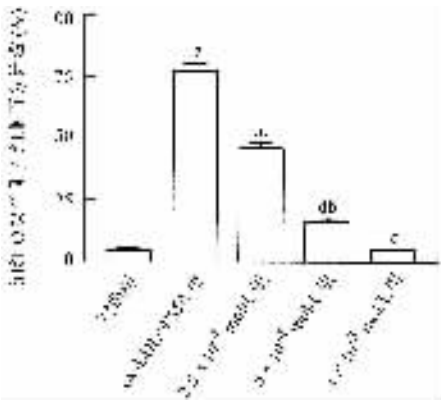
2.1 苦参碱对激活的人单核细胞内胆固醇积聚及脂质过氧化的影响 经 ox-LDL 处理后单核细胞内 TC, FC, CE 及 MDA 的含量均增加($P < 0.05$),苦参碱可减少 ox-LDL + PMA 所致的单核细胞内 TC, FC, CE 及 MDA 的含量的增加($P < 0.05$),但苦参碱低剂量组仍高于对照组(表 1)。

2.2 苦参碱对单核细胞泡沫化的影响 各组泡沫细胞的半定量结果如图 1,单核细胞的泡沫化形成如图 2,经 LDL + PMA 处理后油红 O 染色阳性细胞的百分计数均显著增加($P < 0.05$),苦参碱可显著缓解 LDL + PMA 所致的阳性细胞的增加($P < 0.05$),但苦参碱低剂量组仍高于对照组。

表 1 各组人单核细胞内胆固醇的积聚及脂质过氧化产物的比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

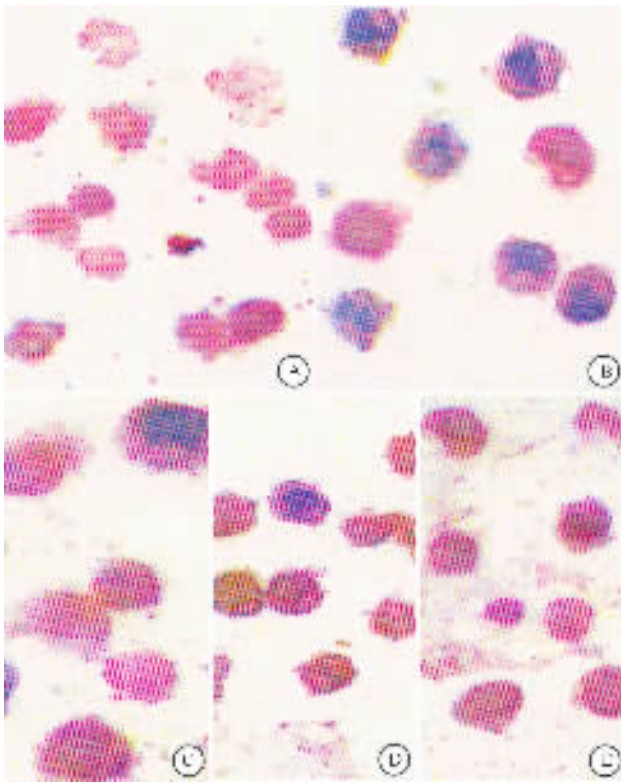
组别	TC (μ g/mg)	FC (μ g/mg)	CE (μ g/mg)	MDA (nmol/L)
A	13.6 \pm 1.3	10.9 \pm 1.8	3.4 \pm 0.6	0.43 \pm 0.07
B	101.2 \pm 9.3 ^a	36.6 \pm 6.9 ^a	64.8 \pm 6.8 ^a	8.50 \pm 1.23 ^a
C	31.0 \pm 3.4 ^{bc}	21.1 \pm 2.9 ^{bc}	29.7 \pm 4.9 ^{bc}	1.92 \pm 0.46 ^{bc}
D	16.8 \pm 3.1 ^d	11.0 \pm 1.8 ^d	5.8 \pm 1.3 ^d	0.60 \pm 0.08 ^d
E	14.6 \pm 1.6 ^d	10.2 \pm 1.9 ^d	3.4 \pm 0.6 ^d	0.43 \pm 0.07 ^d

A 对照组; B oxLDL + PMA 组; C 苦参碱低剂量组(2.5 × 10⁻⁴ mol/L); D 苦参碱中剂量组(5 × 10⁻⁴ mol/L); E 苦参碱高剂量组(1 × 10⁻³ mol/L)。* $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.001$ vs ox-LDL + PMA 组。



* $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.001$ vs ox-LDL + PMA 组.

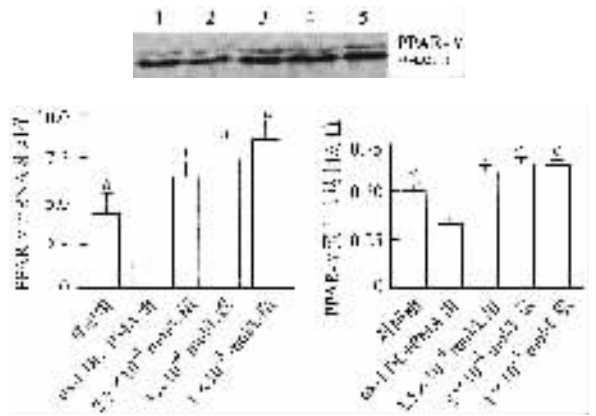
图1 油红 O 染色阳性细胞的百分计数 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)



A 对照组; B oxLDL+PMA 组; C 苦参碱低剂量组 (2.5×10^{-4} mol/L); D 苦参碱中剂量组 (5×10^{-4} mol/L); E 苦参碱高剂量组 (1×10^{-3} mol/L).

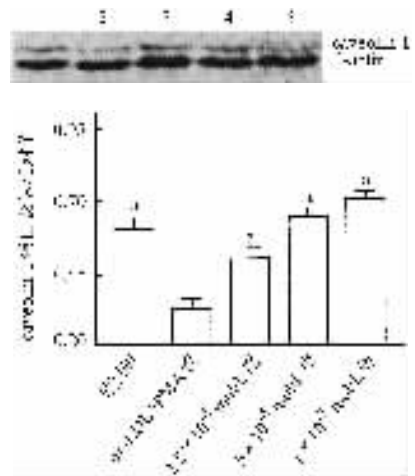
图2 油红 O 染色阳性的原代单核细胞 $\times 400$

2.3 泡沫细胞 PPAR- γ mRNA, 蛋白表达和小凹蛋白-1 蛋白表达的变化 经 LDL + PMA 处理后单核细胞内 PPAR- γ mRNA 和 PPAR- γ , 小凹蛋白-1 蛋白表达均下降 ($P < 0.05$), 苦参碱可增加 PPAR- γ mRNA 和 PPAR- γ , 小凹蛋白-1 蛋白表达 ($P < 0.05$), 苦参碱剂量组与对照组比较无统计学差异 (图 3 4).



1 对照组 2 oxLDL+PMA 组 3 苦参碱低剂量组 4 苦参碱中剂量组; 5 苦参碱高剂量组. * $P < 0.05$ RT-PCR 相对值与 oxLDL + PMA 组比较; ^c $P < 0.05$ Western Blot 蛋白表达相对值与 oxLDL + PMA 组比较.

图3 PPAR- γ 荧光 RT-PCR 相对值及 Western Blot 印迹相对值



1 对照组 2 oxLDL+PMA 组 3 苦参碱低剂量组 4 苦参碱中剂量组 5 苦参碱高剂量组. * $P < 0.05$ Western Blot 蛋白表达相对值与 ox-LDL + PMA 组比较.

图4 caveolin-1 Western Blot 印迹相对值

3 讨论

AS 的病因及发病机制尚不完全清楚, 研究表明, 巨噬细胞胆固醇的聚集和泡沫细胞形成贯穿了 AS 的整个过程^[7]. 抑制 caveolin-1 的表达可以使细胞内胆固醇流出受阻, 从而加剧胆固醇和胆固醇脂的堆积, 加重细胞泡沫化和动脉粥样硬化. PPAR- γ 主要参与脂代谢相关基因的转录基因调节, 可促使脂肪细胞分化. 研究显示, 单核巨噬细胞分化为泡沫细胞最突出的特征是脂代谢变化, 但调节脂代谢相关基因表达的 PPAR- γ 对血管局部单核巨噬细胞的作用知之甚少. 文献报道^[8]对体外细胞培养研究表明, 在人巨噬细胞及巨噬细胞源性泡沫细胞, 配体活化的 PPAR- γ 通过 caveolin-1 基因表达降低和 ApoAI 介导的胆固醇流出途径减少胆固醇酯合成, 结果提示 PPAR- γ 在

AS 起重要作用。

我们研究发现, $\rho\text{xLDL} + \text{PMA}$ 共同孵育的单核细胞明显泡沫化, 单核细胞内 TC, FC 和 CE 均显著增加, 而且细胞内 MDA 也明显增多, 这与以前的研究一致^[9]。在有苦参碱存在时, 泡沫细胞内积聚的 TC, FC 和 CE 均明显地减少; MDA 以及泡沫细胞的数量均显著减少, 同时单核细胞 PPAR- γ mRNA 和 PPAR- γ 小凹蛋白-1 蛋白表达增加, 这些结果说明, 苦参碱可能作用于胆固醇逆转过程的起始步骤, 苦参碱一方面抑制胆固醇酯化, 使胆固醇流出; 另一方面苦参碱使 PPAR- γ 表达上调, 同时 PPAR- γ 能使单核巨噬细胞转分化过程中小凹蛋白-1 蛋白表达水平明显增加, 小凹蛋白-1 主动转出胆固醇增加, 从而细胞内胆固醇聚积减少。提示苦参碱可能通过 PPAR- γ 小凹蛋白-1 表达增加抑制 AS 提前发生。

本实验结果显示苦参碱可能增强了 PPAR- γ mRNA 和 PPAR- γ 小凹蛋白-1 蛋白表达, 导致中泡沫细胞内积聚的 TC, FC 与 CE 减少; 从而达到治疗和预防动脉粥样硬化的作用, 但苦参碱如何调控 PPAR- γ , 小凹蛋白-1 的机制有待进一步研究。

【参考文献】

[1] Fong IW. Infections and their role in atherosclerotic vascular disease

- [J]. J Am Dent Assoc, 2002, 133(Suppl) 7s-13s.
- [2] Ge S, Pachter JS. Caveolin-1 knockdown by small interfering RNA suppresses responses to the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 by human astrocytes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(8): 6688-6695.
- [3] 王俊学, 王国俊. 苦参碱及氧化苦参碱的药理作用及临床应用[J]. 肝脏, 2000, 15(2): 116-117.
- [4] Zeng XK, Dai J, Remick DG, et al. homocysteine mediated expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human monocytes[J]. Circulation Research, 2003, 9(3): 311-321.
- [5] 蒋佩, 严鹏科, 莫中成, 等. 促进细胞内胆固醇流出抑制单核细胞源性泡沫细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(6): 1041-1045.
- [6] 高雪, 薛莹, 姜泓, 等. 结核分枝杆菌 furA 基因片段的克隆、表达和分离纯化[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(18): 1637-1640.
- [7] 王宗仁, 郑瑾, 马爱玲, 等. 中药芪丹通脉片对动脉粥样硬化大鼠主动脉内皮细胞及 PAI21 表达影响[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(14): 1290-1293.
- [8] Plenz GA, Hofnael O, Robenek H. Differential modulation of caveolin-1 expression in cells of the vasculature by statins[J]. Circulation, 2004, 109(2): e7-e8.
- [9] 唐朝克, 杨永宗. LXR 和 ABCA1 对体内胆固醇代谢的调节作用[J]. 生命的化学, 2003, 23(5): 381-384.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)13-1167-01

食管、贲门癌术后早期机械性幽门梗阻 22 例护理

张丽 (解放军总医院第一附属医院麻醉科, 北京 10001)

【关键词】食管肿瘤 幽门梗阻 护理

【中图分类号】R735.2 【文献标识码】B

1 临床资料 本组 22(男 16, 女 6)例, 年龄 41~74(平均 60)岁。全组均在全麻下行食道、贲门癌根治性切除。其中, 中段食管癌 13 例, 经左颈、左胸、左颈部食管胃吻合 11 例, 经右颈、右胸、腹部三切口颈部食管胃吻合 2 例, 贲门癌 9 例, 均行主动脉弓下食管胃吻合。左颈部食管胃吻合口瘘 2 例, 全组未发生吻合口狭窄。术后常规行持续胃减压, 胃肠功能恢复, 腹部不胀, 有肛门排气或大便、有饥饿感后, 于术后 4~7 d 拔除胃减压管, 24~48 h 后患者出现心慌、气促、胸闷、暖气、频繁呕吐, 上腹部疼痛、饱胀等症状, 进食后上述症状可加重。再次行胃减压, 引流出大量胃内容物后症状缓解。21 例于术后 8~15 d 再次手术治愈。证实梗阻原因: ①胃扭转 360° 6 例, 均为左颈部食管胃吻合, 发生吻合口瘘 2 例; 再次手术均行胃空肠侧吻合; ②重建食管裂孔缝合过紧 6 例, 其中 2 例

右颈、右胸、腹三切口者因食管裂孔扩张, 切开过小而致幽门梗阻; ③胸胃过于松弛折套扭曲 3 例; ④大网膜缠绕、环缩幽门 2 例; ⑤对侧纵膈胸膜破裂, 胃过度牵入对侧胸膜牵拉 4 例; ⑥纤维带压迫十二指肠 1 例。

2 讨论 机械性幽门梗阻一经确诊应及早再次手术予以解除, 拖延时日导致一般状况恶化, 营养障碍, 水电解质及酸碱代谢紊乱, 危及患者生命。溢出性呕吐可引起吸入性肺炎甚至或呕吐物窒息死亡。本组 1 例保守治疗过程中呕吐物窒息死亡, 应引以为戒。此类患者一般情况较差, 有不同程度的营养障碍、脱水、酸碱代谢紊乱、电解质失衡。进入手术室后, 护士应尽快建立有效静脉通道, 及时补充血容量, 纠正水、电解质失衡及酸碱代谢紊乱^[1-2]。护理上应做到防止窒息, 心理护理, 保持输液通道通畅, 纠正水、电解质失衡及酸碱代谢紊乱^[2]。特别心脏功能和呼吸道的护理, 因为老年患者多伴有不同程度心肺功能不全。护士应严密观察病情变化, 及时发现心肺功能不全的早期表现并报告医生, 在心肺功能的代偿期给予纠正, 对痰液稀薄, 咳白色泡沫样痰, 咳嗽频繁, 血丝痰等提示左心功能不全, 应报告医生给予适量强心、利尿剂, 调整输液速度, 限制输液量。

【参考文献】

- [1] 张庆河, 周爱荣, 冯先富, 等. 食管癌切除术后并发早期幽门梗阻 10 例[J]. 中华胸心血管外科杂志, 1992, 8(4): 270.
- [2] 张明芳, 马秀芳, 马秀莲. 食管、贲门癌术后并发幽门梗阻观察[J]. 中华护理杂志, 1996, 31(1): 16.

编辑 许昌泰

收稿日期 2007-04-18; 接受日期 2007-04-30

作者简介 张丽, 护师. Tel (010) 66848072 Email 'songbingyuan@

126.com