论著

文章编号:1000-5404(2009)07-0592-03

三七总皂苷对泡沫细胞内 ABCA1 和 LXRα mRNA 表达的影响

李卓莹,何雪峰,张海港,贾 乙,李晓辉 (第三军医大学新药研究中心暨药剂学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 观察三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)对泡沫细胞 ABCA1 和 LXRα mRNA 表达及脂质沉积的影响。**方法** 提取 SD 大鼠腹腔巨噬细胞纯化后,与高、中、低剂量 PNS(80、40、20 μg/ml)及氧化低密度脂蛋白共孵育 48 h。油红 O 染色观察细胞内脂质堆积情况,酶法测定细胞内总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)、胆固醇酯(CE)的含量,并计算 CE/TC 值。采用 RT-PCR 法检测泡沫细胞 ABCA1 和 LXRα mRNA 表达情况。**结果** 模型组细胞中 TC、FC、CE 含量及 CE/TC 值均显著高于对照组($P<0.05$);与模型组相比,PNS 高、中剂量组细胞内 TC、FC、CE 含量及 CE/TC 值均显著降低($P<0.05$)。PNS 高、中剂量组中 ABCA1 及 LXRα mRNA 的表达均显著高于模型组($P<0.01$)。**结论** PNS 可以上调 ABCA1 和 LXRα mRNA 表达并减少巨噬细胞源性泡沫细胞中脂质沉积。

关键词: 三七总皂苷;泡沫细胞;ABCA1;LXRα

中图法分类号: R285.5; R329.25; R392.12 **文献标识码:** A

Effects of *Panax notoginseng* saponins on mRNA expressions of ABCA1 and LXRα in foam cells

LI Zhuo-ying, HE Xue-feng, ZHANG Hai-gang, JIA Yi, LI Xiao-hui (Department of Pharmacoutics and Center for New Drugs Research, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on mRNA expressions of ABCA1 and LXRα and lipid deposition in foam cells. **Methods** Peritoneal macrophages obtained from SD rats after purification were incubated with ox-LDL for 48 h to establish foam cell model. PNS (20, 40, 80 μg/ml, respectively) were given for intervention. The cellular lipid accumulation was examined by oil red staining. The cellular contents of total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and cholesterol ester (CE) and the ratio of CE/TC were detected by enzymic methods. The mRNA levels of ABCA1 and LXRα were determined by RT-PCR. **Results** The contents of TC, FC, CE and CE/TC ratio in model group were significantly increased compared with control group ($P<0.05$). Compared with model group, 40 and 80 μg/ml PNS reduced the contents of TC, FC, CE and CE/TC ratio remarkably ($P<0.05$) and increased ABCA1 and LXRα mRNA expressions significantly ($P<0.01$). **Conclusion** PNS reduces lipid deposition and upregulates ABCA1 and LXRα mRNA expressions in foam cells.

Key words: *Panax notoginseng* saponins; foam cell; ABCA1; LXRα

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重危害人类健康的常见病。在 AS 形成过程中,巨噬细胞源性泡沫细胞的形成是动脉壁内膜下形成脂肪纹的启动步骤,也是决定斑块形成情况的关键因素,对斑块形成后的发展和转归有重要作用。三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)是三七中主要的活性成分,长期应用于心血管疾病的防治,效果显著[1]。本实验室既往研究表明,PNS 可以显著抑制泡沫细胞形成[2],但其机制尚少见报道。本实验通过建立体外泡沫细胞模型,观察 PNS 对泡沫细胞形成的影响并对其机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 20 只,体质量(200±10) g,由第三军医大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK-(军)2007015]。

1.2 主要试剂

三七总皂苷(纯度 99%,中科院云南植物研究所),总胆固

基金项目: 国家自然科学基金(30470465,30371768,30672641)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470465, 30371768, 30672641)

作者简介: 李卓莹,女,四川省资中县人,硕士研究生,助教,主要从事动脉粥样硬化发病机制及药物干预方面的研究。现在后勤工程学院门诊部。电话:(023)68753397-83,E-mail:li_zhuoying@hotmail.com

通信作者: 李晓辉, E-mail:lpsh008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-10-20;**修回日期:** 2008-11-05

醇(TC)试剂盒、游离胆固醇(FC)试剂盒(上海名典生物工程有限公司),蛋白质浓度检测试剂盒(北京博大泰克生物基因技术有限公司),氧化低密度脂蛋白(中国协和医科大学基础所),RPMI1640 培养基(美国 Sigma 公司),胎牛血清(杭州四季青生物材料工程研究所)。

1.3　腹腔巨噬细胞收集及纯化

大鼠腹腔内注射刺激剂(1% 蛋白胨 - 培养基溶液)10 ml,72 h 后以颈椎脱臼法处死,腹腔内注射无血清无酚红 RPMI 1640 培养液 10 ml,75% 乙醇浸泡 5 min。剖腹收集腹腔内液,1 500 r/min 离心 5 min 后收集细胞,用含 10% 胎牛血清的无酚红 RPMI1640 培养液调整细胞数至 1×10^{6} ml^{-1},将细胞接种到放有无菌盖玻片的 6 孔板中,每孔加细胞悬液 3 ml,置 5% CO_2、37 ℃ 孵箱培养 2 h 后弃上清液,PBS 洗去未贴壁细胞。

1.4　细胞分组

细胞培养 24 h 后分为对照组,模型组,PNS 低、中、高剂量组。①对照组:RPMI1640 培养液 3 ml(含 10% 胎牛血清);②模型组:RPMI1640 培养液 2.85 ml(含 10% 胎牛血清),加入 ox-LDL(1.6 mg/ml)150 μl;③PNS 低、中、高剂量组:RPMI1640 培养液 2.82 ml(含 10% 胎牛血清),加入 ox-LDL(1.6 mg/ml)150 μl和 PNS 30 μl(浓度分别为 2、4、8 mg/ml)。置 5% CO_2、37 ℃孵箱培养 48 h。

1.5　油红 O 染色观察泡沫细胞形态

PBS 冲洗盖玻片 3 次,4% 多聚甲醛室温下固定 1 h,0.3% 油红 O 染色 2 h;双蒸水冲洗 3 次,每次 1 min,水性封片剂封片,显微镜下观察并摄像。

1.6　细胞内总胆固醇、游离胆固醇及蛋白质测定

细胞内蛋白质测定用 Lowry 法,按试剂盒说明进行。细胞内的各种胆固醇含量用每克细胞蛋白质所含的 TC、FC 和胆固醇酯(CE)来表示,CE 的含量由 TC 和 FC 的差值获得。

1.7　大鼠腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞内 ABCA1、LXRα mRNA 检测

取各组细胞,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。逆转录合成 cDNA,取 1 μl cDNA 为模板进行 PCR 扩增。大鼠 ABCA1、LXRα 引物采用 Primer Priemer 5.0 PCR 引物设计软件自行设计,由上海生工合成。各引物序列见表 1。

表 1　引物序列及扩增产物大小

cDNA	引物序列	产物大小
ABCA1	正义链:5′-TGAGACCAACCAGGCAATCCA-3′ 反义链:5′-AGCCGAGAACTTCCTCGCATC-3′	136 bp
LXRα	正义链:5′-GATGTTCCCACGGATGCTAATG-3′ 反义链:5′-CAGGAATGTTTGCCCTCCTCA-3′	232 bp
β-actin	正义链:5′-TGTTGTCCCTGTATGCCTCT-3′ 反义链:5′-TAATGTCACGCACGATTTCC-3′	224 bp

PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min 后进入循环,95 ℃变性 30 s,退火(ABCA1:57 ℃;LXRα:59 ℃;β-actin:59 ℃)30 s,72 ℃延伸 30 s,循环数(ABCA1:27 次;LXRα:27 次;β-actin:26 次),最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,拍照。Quantity One 软件分析目的条带,计算灰度值,结果以 $D_x/D_{\beta\text{-actin}}$ 表示,x 为样本。

1.8　统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　形态学观察

油红 O 染色后光镜下观察显示,对照组细胞形态多呈圆形,无油红 O 染色阳性细胞;模型组及各 PNS 组油红 O 染色阳性细胞遍布;PNS 中、高剂量组细胞内红染物质较模型组明显减少,而 PNS 低剂量组细胞与模型组相比无明显变化(图 1)。

2.2　PNS 对细胞内胆固醇及胆固醇酯含量的影响

与对照组相比,模型组细胞内 TC、FC、CE 水平及 CE/TC 值均显著增高($P<0.05$)。与模型组相比,PNS 中、高剂量组细胞内 TC、FC、CE 水平及 CE/TC 值均显著降低($P<0.05$),PNS 低剂量组无明显变化($P>0.05$)。见表 2。

表 2　三七总皂苷对泡沫细胞内胆固醇和胆固醇酯的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TC(mg/g)	FC(mg/g)	CE(mg/g)	CE/TC(%)
对照组	18.37 ± 1.20	11.72 ± 2.30	6.65 ± 2.08	33.18 ± 9.87
模型组	93.66 ± 4.85[a]	43.43 ± 8.93[a]	50.23 ± 10.59[a]	53.49 ± 10.48[a]
PNS 低剂量组	89.24 ± 5.32	41.62 ± 8.22	47.62 ± 8.63	53.34 ± 9.10
PNS 中剂量组	60.27 ± 8.07[b]	31.76 ± 6.18[b]	29.51 ± 8.73[b]	39.47 ± 5.73[b]
PNS 高剂量组	56.24 ± 7.01[b]	29.90 ± 6.54[b]	25.55 ± 9.29[b]	37.56 ± 6.65[b]

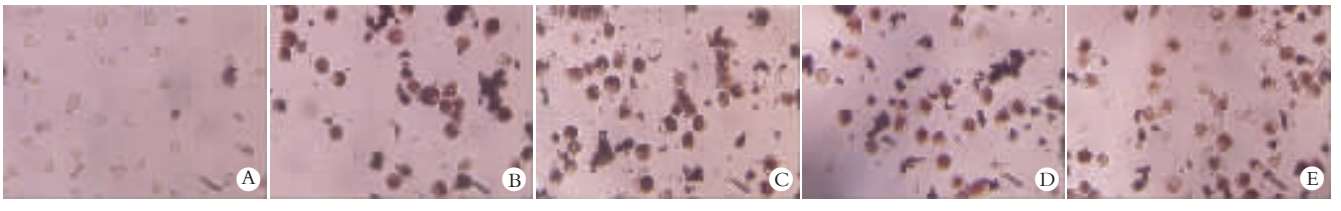
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

2.3　PNS 对大鼠腹腔巨噬细胞 ABCA1 mRNA 表达的影响

与对照组相比,模型组 ABCA1 mRNA 表达显著增加($P<0.05$);与模型组相比,PNS 中剂量及高剂量组能非常显著地增强 ABCA1 mRNA 表达($P<0.01$)。见图 2。

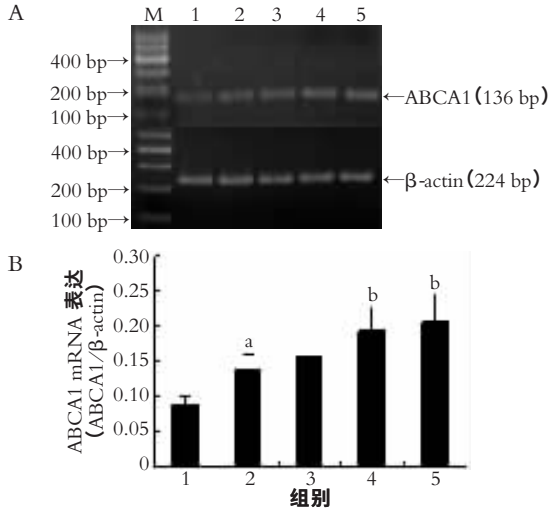
2.4　PNS 对大鼠腹腔巨噬细胞 LXRα mRNA 表达的影响

与对照组相比,模型组 LXRα mRNA 表达显著增加($P<0.05$);与模型组相比,PNS 中剂量组及高剂量组能非常显著地增加 LXRα mRNA 表达($P<0.01$)。见图 3。



A:对照组;B:模型组(PNS 0 μg/ml);C:PNS 低剂量组(PNS 20 μg/ml);D:PNS 中剂量组(PNS 40 μg/ml);E:PNS 高剂量组(PNS 80 μg/ml)

图 1　各组泡沫细胞形态学观察　(油红 O 染色 ×400)

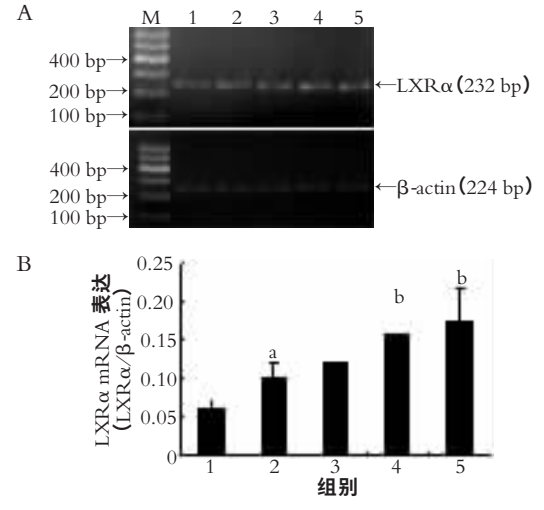


M:标准;1:对照组;2:模型组(PNS 0 μg/ml);3:PNS 低剂量组(20 μg/ml);4:PNS 中剂量组(40 μg/ml);5: PNS 高剂量组(80 μg/ml)

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与模型组比较

A:RT-PCR 电泳结果;B:ABCA1 mRNA 表达直方图

图 2 PNS 对大鼠腹腔巨噬细胞 ABCA1 mRNA 表达的影响



M:标准;1:对照组;2:模型组(PNS 0 μg/ml);3:PNS 低剂量组(20 μg/ml);4:PNS 中剂量组(40 μg/ml);5: PNS 高剂量组(80 μg/ml)

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.01$,与模型组比较

A:RT-PCR 电泳结果; B:LXRα mRNA 表达直方图

图 3 PNS 对大鼠腹腔巨噬细胞 LXRα mRNA 表达的影响

3 讨论

三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins,PNS)是五加科人参属植物三七根部提取的有效成分。本实验室既往研究发现,PNS 具有降低氧化应激、减轻炎症、减少泡沫细胞形成等防治 AS 的作用[2]。细胞内胆固醇酯积聚是泡沫细胞形成的关键步骤[3]。本实验结果显示,PNS 中、高剂量可以显著减少胆固醇酯在巨噬细胞源性泡沫细胞内的蓄积,提示 PNS 可显著抑制泡沫细胞的形成。细胞为保持其内部的胆固醇稳态环境,具有将胆固醇酯转运至细胞外的系统,其中经 ABCA1 介导的胆固醇外流是一个单向转运的过程,可以清除组织中过量的胆固醇[4]。在生理情况下,进入细胞内的胆固醇,特别是氧化型低密度脂蛋白胆固醇(ox-LDL)以及乙酰化低密度脂蛋白胆固醇(ac-LDL)均可引起 ABCA1 表达的增加。Joyce 等[5]研究发现,ABCA1 的过度表达可以使高脂喂饲的小鼠主动脉 AS 的形成降低 65%,提示 ABCA1 能通过从动脉壁中移出胆固醇发挥抗 AS 的作用。因此,本实验选择将 ABCA1 的表达情况作为观察指标,探究 PNS 抑制泡沫细胞内胆固醇酯蓄积的机制。结果显示,与对照组相比,ox-LDL 处理大鼠腹腔巨噬细胞 48 h 后,ABCA1 mRNA 表达明显增高($P<0.05$);与模型组相比,PNS 中、高剂量组可显著增高 ABCA1 mRNA 的表达($P<0.01$)。表明 PNS 能够在细胞自身调节的基础上,进一步上调 ABCA1 的表达,达到促进胆固醇酯外流、减少细胞内胆固醇酯沉积的作用。

LXRα 是 ABCA1 的上游调控元件[6],可直接调节 ABCA1 mRNA 的表达。与对照组相比,ox-LDL 可使巨噬细胞 LXRα mRNA 表达增高 37.8%($P<0.05$),提示 ox-LDL 导致的脂质沉积可以上调 LXRα mRNA 的表达,这是细胞为保持细胞内脂质负载稳定的方式。与模型组相比,PNS 高剂量组 LXRα mRNA 的表达提高 43.3%,中剂量组 LXRα mRNA 的表达提高 37.2%($P<0.01$),低剂量组无明显变化($P>0.05$)。此结果表明,PNS 可以剂量依赖性的上调 LXRα 水平,增加 ABCA1 mRNA 的表达,并促进胆固醇外流,抑制泡沫细胞形成。

参考文献:

[1] 沈 央, 方晓玲. 三七总皂苷脂质体的生理适应性及其对心脑血管的保护作用[J]. 中国临床药学杂志, 2004,13(5): 269-273.

[2] 贾 乙,李晓辉,邢 茂, 等. 三七总皂苷中 3 种单体不同配伍对小鼠巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响研究[J]. 中国药房, 2008,19(12): 881-883.

[3] Hirakata M, Tozawa R, Imura Y, *et al*. Comparison of the effects of pioglitazone and rosiglitazone on macrophage foam cell formation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(3):782-788.

[4] Tsubakio-Yamamoto K, Matsuura F, Koseki M, *et al*. Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 375(3):390-394.

[5] Joyce C W, Amar M J, Lambert G, *et al*. The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 mice and apoE-knockout mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(1):407-412.

[6] Rode S, Rubic T, Lorenz R L. alpha-Tocopherol disturbs macrophage LXRalpha regulation of ABCA1/G1 and cholesterol handling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369(3): 868-872.

(编辑 王小寒)