

仙人掌多糖对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 胆固醇蓄积及其相关基因表达的影响

李恒^{1,2}, 罗齐军², 卢向阳¹, 曾富华^{1,2*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.岭南师范学院生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘 要: 采用 PMA 和 ox-LDL 构建 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型, 观察不同浓度(5、10、15 nmol/L)仙人掌多糖(ODP-Ia)对泡沫细胞内脂质、胆固醇蓄积以及介导胆固醇流出的 *ABCA1*、*ABCG1*、*SR-BI* 基因表达的影响。结果显示: THP-1 巨噬细胞泡沫化后胞内蓄积了大量脂质, 高剂量(15 nmol/L)ODP-Ia 能够显著减少胞内脂质、胆固醇蓄积, 并增强 *ABCA1*、*ABCG1*、*SR-BI* mRNA 及蛋白表达(与单独 ox-LDL 处理组比较, $P<0.05$), 但效果均次于阳性对照依折麦布组($P<0.05$), 低、中剂量(5、10 nmol/L)ODP-Ia 作用效果均不显著。本研究结果表明, ODP-Ia 可通过增强 *ABCA1*、*ABCG1*、*SR-BI* 基因表达来减少胞内胆固醇蓄积。

关 键 词: 仙人掌多糖; THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞; 胆固醇蓄积

中图分类号: Q539.50

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2017)02-0135-05

Effect of *Opuntia dillenii* Haw. polysaccharides on cholesterol accumulation and its associated gene expression in THP-1 macrophage-derived foam cells

LI Heng^{1,2}, LUO Qijun², LU Xiangyang¹, ZENG Fuhua^{1,2*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.College of Life Science and Technology, Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China)

Abstract: In this study, THP-1 cells were induced into macrophages and THP-1 macrophage-derived foam cell by phorbolmyristate acetate (PMA) and oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL), and then treated with different concentrations(5, 10, 15 nmol/L) of ODP-Ia, to investigate the beneficial effects of ODP-Ia on the cholesterol accumulation in the THP-1 macrophage derived foam cell. Meanwhile, the mRNA expression and protein levels of ATP binding cassette transporter *ABCA1*, ATP binding cassette transporter *ABCG1* and scavenger receptor class B type I (*SR-BI*) that mediate cholesterol efflux were observed. The result showed that, the lipid content and the cholesterol content were increased significantly after the THP-1 cells were induced into the THP-1 macrophage derived foam cell, and then were significantly decreased after treating with 15 nmol/L ODP-Ia. The data also demonstrated that, compared with the ox-LDL treated group, the high dose group (15 nmol/L ODP-Ia treated group) showed significantly increase in the mRNA and protein expressions of *ABCA1*, *ABCG1* and *SR-BI* ($P<0.05$). However, the high dose group was inferior to the ezetimibe treated group ($P<0.05$). And there were no significant differences among the low dose (5 nmol/L) group, the medium dose (10 nmol/L) group and the ox-LDL treated group. In summary, ODP-Ia promoted cholesterol efflux of THP-1 macrophage derived foam cell by up-regulation of *ABCA1*, *ABCG1* and *SR-BI*.

Keywords: *Opuntia dillenii* Haw. polysaccharides; THP-1 macrophage-derived foam cells; cholesterol accumulation

仙人掌,又名仙巴掌、观音掌、霸王、火掌等,为仙人掌科植物,它的种类繁多,约有 70~110 个属、2 000 余种^[1]。本试验用的仙人掌为广泛分布于热带及亚热带地区的非人工种植的 *Opuntia dillenii* Haw.。从该仙人掌提取分离出来的多糖组分 ODP-Ia(*Opuntia dillenii* Haw. polysaccharides-Ia)具有多种生物活性(抗氧化、辅助降血糖、调节免疫功能、辅助降血脂等)^[2-9]。本课题组早期的研究已经证实 ODP-Ia 由鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖 4 种单糖组成,纯度为 94.60%,相对分子质量为 339 000^[2]。ODP-Ia 可以显著降低 STZ 小鼠体内的总胆固醇水平,并且可以减缓高脂血症大鼠的肝脏和血管病变,减轻主动脉粥样硬化斑块的病变程度,但具体分子机制尚未明确^[2]。THP-1 细胞系已成为巨噬细胞或泡沫细胞相关疾病研究的常见离体细胞系。研究发现,阿魏酸^[10]和泡菜提取物^[11]可以增加 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1、ABCG1 mRNA 表达,进而促进胆固醇的流出。本研究中,以仙人掌为原料,从中提取多糖组分 ODP-Ia,拟通过体外细胞试验探讨 ODP-Ia 能否通过 RCT 促进胆固醇流出,为 ODP-Ia 用于高胆固醇血症的预防和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜仙人掌采自广东湛江东海岛附近,经岭南师范学院陈燕教授鉴定为 *Opuntia dillenii* Haw.。

主要药品试剂:THP-1 细胞系(中南大学湘雅中心实验室细胞库);胎牛血清 FBS(Gibco,赛默飞世尔科技公司);1640 培养基(Hyclone);佛波酯 PMA、低密度脂蛋白 Ox-LDL(联科生物技术有限公司);逆转录试剂盒(Fermentas);总胆固醇酶法测定试剂盒 E1015(北京普利莱基因技术有限公司);油红 O、Trizol(Sigma);引物及探针(生工生物工程(上海)股份有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(博微生物科技股份有限公司);Taq 酶(Genstar);ABCA1 鼠抗、ABCG1 兔抗、SR-BI 兔抗、HRP 标记二抗(Proteintech)。

主要仪器设备:超净工作台(无锡易纯净设备有限公司);直热式二氧化碳培养箱(上海三藤电子有限公司);倒置荧光显微镜(江南仪器股份有限公司);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司);荧光定量 PCR 仪、荧光 PCR 板(赛默飞世尔科技公司);电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 仙人掌中 ODP-Ia 的水提工艺

称取仙人掌干粉→热水浸提→2 900 r/min 离心 15 min 得上清液,合并上清液→减压浓缩到原体积的 1/4~1/3→三氯乙酸法去蛋白(质量浓度为 10% 三氯乙酸溶液,与多糖溶液按体积比 1:1 混匀,室温静置 2 h)→8 000 r/min 离心 20 min→取上清液调 pH 至中性→3 倍体积 95%乙醇沉淀→8 000 r/min 离心 20 min→白色沉淀+与减压浓缩前等体积的超纯水复溶→4℃透析 3 d(每天换水 1 次)→透析后,记录透析袋内多糖溶液体积并测定糖含量→减压浓缩至原体积的 1/4~1/3→3 倍体积 95%乙醇醇沉→离心得白色沉淀→无水乙醇洗涤沉淀→冻干得精制仙人掌多糖干粉→干粉溶解后,经 DEAE-Sephacrose Fast Flow 柱(2.5 cm×30 cm)分离得 2 组分(ODP-I 及 ODP-II)→ODP-I 经过 Sephadex G-150 凝胶柱(1.5 cm×75 cm)分离得 2 组分(ODP-Ia 与 ODP-Ib)。

1.2.2 THP-1 细胞培养及泡沫细胞模型建立

THP-1 悬浮细胞于 10%FBS 的 1640 培养基中,37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,半量换液,一分为二进行细胞传代。细胞进入对数生长期后,加入 160 nmol/L PMA,培养 6 h,使其转为巨噬细胞(电镜 100 倍观察,拍照,鉴别)。然后更换为不含血清(只含 0.3% BSA)的 1640 培养基,加入 50 ng/mL 的 ox-LDL,37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h,使其诱导为泡沫细胞(光镜 100 倍观察,拍照,鉴别)。

1.2.3 ODP-Ia 的干预试验

试验设以下处理:未泡沫化的巨噬细胞为空白组,泡沫细胞为对照组,在泡沫细胞的基础上,分别加入 1、2、3 μL ODP-Ia 母液(浓度为 1 μmol/L,使体系中 ODP-Ia 终浓度分别为 5、10、15 nmol/L(低、中、高剂量组)),1 nmol/L 依折麦布(阳性对照组)干预 24 h。各处理分别以空白组、对照组、ODP-Ia 低剂量组、ODP-Ia 中剂量组、ODP-Ia 高剂量组和阳性对照组命名。

1.2.4 油红 O 染色

将诱导好的泡沫细胞用 PBS 洗 3 次,每次 1 min,4%多聚甲醛固定细胞 15 min,0.3% 油红 O 室温染色 15 min(此时盖紧瓶盖,避免异丙醇挥发产生油红 O 染料沉淀),50%异丙醇洗 3 次,每次 1 min,

于 400 倍显微镜下观察并拍照。

1.2.5 泡沫细胞内胆固醇蓄积量的测定

采用《全国临床检验操作规程》推荐的酶学方法,结合经典 GPO Trinder 酶学反应,按照总胆固醇酶法测定试剂盒的操作步骤进行检测。

1.2.6 RT-PCR 检测 *ABCA1*、*ABCG1* 和 *SR-BI* mRNA 表达水平

收集各处理的细胞,用 Trizol 提取总 RNA,取 2 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA,然后取 10 μ L 逆转录产物进行 PCR 循环。引物及探针设计见表 1。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 60 s。循环 40 次。试验结果显示目的基因与内参基因 *GAPDH* 的扩增效率基本相同,故可以采用 $\Delta\Delta C_t$ 法^[12]对试验数据进行分析,计算各基因相对于内参基因 *GAPDH* 的表达量。

表 1 引物及探针序列

Table 1 Primer sequences

基因		引物及探针序列
<i>GAPDH</i>	正向	5'-CTGACTTCAACAGCGACACCCA-3'
	反向	5'-CCACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'
	探针	5'-CCAGCCCCAGCGTCAAAGGT-3'
<i>ABCA1</i>	正向	5'-CTCCTCCACCCAAATCTACCA-3'
	反向	5'-GCATCTTCCTCAGTGCCAT-3'
	探针	5'-ATGCCCGCAGACAATACGAGACA-3'
<i>ABCG1</i>	正向	5'-AAAAGTCTGCAATCTTGTGCCAT-3'
	反向	5'-TCCCGAACCCTCTCACC-3'
	探针	5'-ATCACCGTACTCGCCGGATGCAA-3'
<i>SR-BI</i>	正向	5'-GCGACTACATCGTCATGCCAAC-3'
	反向	5'-GATCTCACCCACAGTGCGGTTTC-3'
	探针	5'-CACCGCCGCACCCAAGACCA-3'

1.2.7 蛋白质免疫印迹法(Western blot) 检测 *ABCA1*、*ABCG1* 和 *SR-BI* 蛋白表达水平

用预冷 PBS 洗涤细胞后,用 RIPA 裂解液裂解蛋白,然后按照 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明操作,提取并测定蛋白浓度。根据每个样品总蛋白量(50~100 μ g)计算各样品取样量,并与上样缓冲液按比例混合后煮沸 5 min 取 20 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳(缩胶电泳电压为 80 V,分离胶电泳电压为 120 V)。待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳。转膜,用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,用 TBST 洗 3 次后加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 洗 3 次后加入二抗(稀释比例 1:3 000),孵育 45~60 min。孵育结束,用 TBST 洗 3 次,进行 ECL 显色曝光。将曝光后的底片扫描,并用 Quantity one 专业灰度分析软件进行分析,以 *GAPDH* 为内参,计算并比较各处理组蛋白表达量。

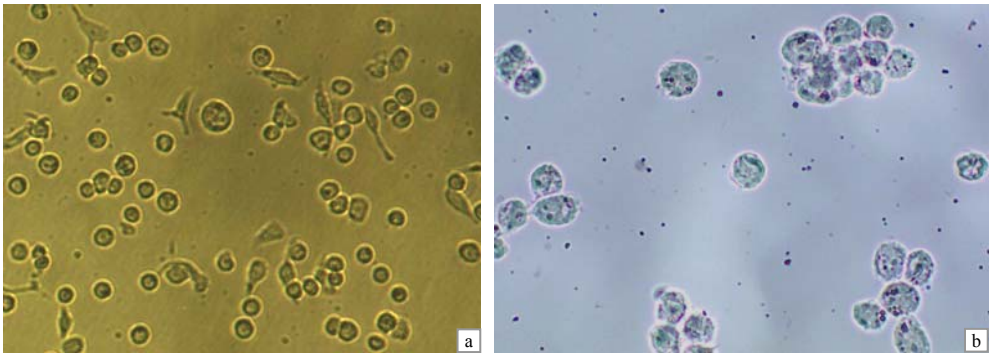
1.2.8 数据统计分析

采用 Excel 2007 进行绘图分析,运用 SPSS 17.0 进行方差分析及两两比较(SNK-q 检验)。

2 结果与分析

2.1 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的建立

如图 1-a 所示,培养的 THP-1 悬浮细胞加入 PMA 刺激 6 h 后,悬浮细胞大部分贴壁,摇晃后不悬浮。形状由圆形变成双极性、多角形等不规则形状,并有伪足伸出,表明巨噬细胞诱导成功。图 1-b 所示,加入 ox-LDL 培养巨噬细胞 48 h 后,巨噬细胞吞噬大量 ox-LDL,产生大量脂质,细胞胀大,经油红 O 染色后,可观察到胞内脂质变成红色,戒环样包绕在细胞核周围,说明泡沫化成功。



a 巨噬细胞;b 油红O染色。

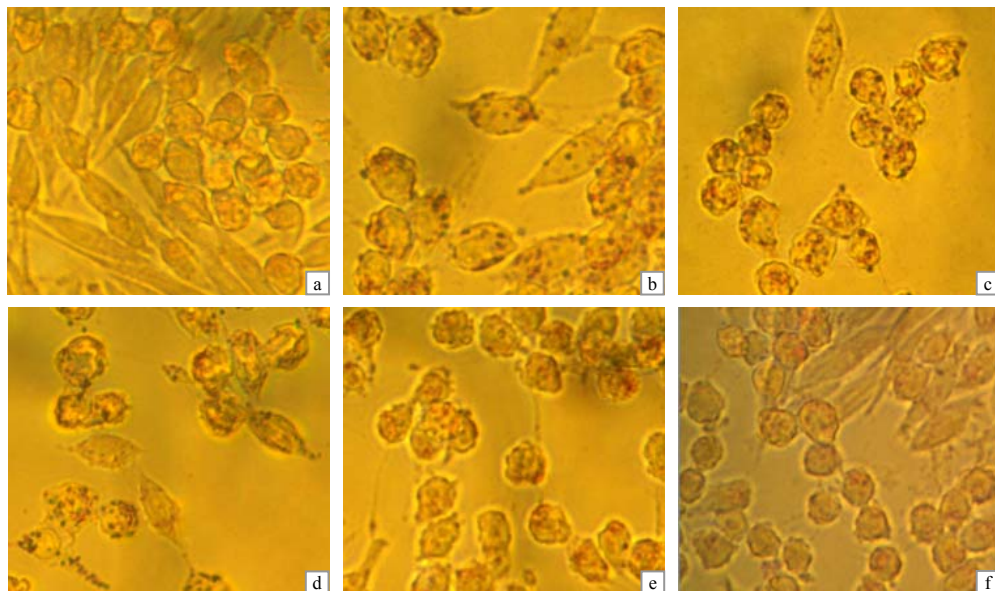
图 1 巨噬细胞的电镜观察及泡沫细胞的光镜观察结果

Fig.1 Macrophages and foam cells oil red O staining maps

2.2 ODP-Ia 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中脂质蓄积的影响

如图 2-a 所示, 未泡沫化的巨噬细胞内没有脂质蓄积; 加入 ox-LDL 泡沫化后产生大量脂质(图

2-b)。经 15 nmol/L ODP-Ia 和依折麦布干预能减少泡沫细胞中脂质的蓄积(图 2-e、图 2-f), 且两者产生的效果相当; 5、10 nmol/L ODP-Ia 对脂质蓄积的改善效果较小(图 2-c、图 2-d)。



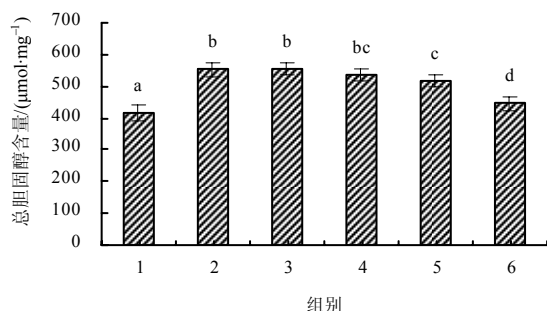
a 空白组; b 泡沫细胞组; c ODP-Ia 低剂量组; d ODP-Ia 中剂量组; e ODP-Ia 高剂量组; f 阳性对照组。

图 2 ODP-Ia 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中脂质蓄积的影响效果

Fig.2 Effect of ODP-Ia on cholesterol accumulation in THP-1 macrophage-derived foam cells

2.3 ODP-Ia 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇蓄积的影响

如图 3 所示, 高剂量 ODP-Ia 和依折麦布干预均能显著降低泡沫细胞中总胆固醇含量(与只用 ox-LDL 组比较, $P<0.05$), 但低、中剂量组的作用不明显, 表明 ODP-Ia 干预剂量需达到 15 nmol/L 才具有促进细胞总胆固醇外流的效果。此外, ODP-Ia 干预的效果比阳性对照依折麦布的弱 ($P<0.05$)。



1 空白组; 2 泡沫细胞组; 3 ODP-Ia 低剂量组; 4 ODP-Ia 中剂量组; 5 ODP-Ia 高剂量组; 6 阳性对照组。

图 3 各别 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇蓄积量

Fig.3 The cholesterol accumulation in THP-1 macrophage-derived foam cells of all dose groups

2.4 ODP-Ia 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中 ABCA1、ABCG1、SR-BI mRNA 表达的影响

表 2 显示, 加入 ox-LDL 泡沫化后, 泡沫细胞中 ABCA1、ABCG1、SR-BI mRNA 的表达显著下降(与空白组比较, $P<0.05$)。但是加入高剂量 ODP-Ia 或依折麦布后, 这些基因的表达显著增强(与只用 ox-LDL 组比较, $P<0.05$)。低、中剂量 ODP-Ia 没有改善的效果, 阳性对照组依折麦布的改善效果优于 ODP-Ia 高剂量组。

表 2 各别 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞部分基因表达量

Table 2 The ABCA1, ABCG1 and SR-BI mRNA expression in THP-1 macrophage-derived foam cells of all dose groups

组别	基因表达量		
	ABCA1	ABCG1	SR-BI
空白组	(1.06±0.02)a	(1.05±0.10)a	(1.20±0.22)a
泡沫细胞组	(0.37±0.08)d	(0.38±0.05)d	(0.54±0.06)c
ODP-Ia 低剂量组	(0.37±0.10)d	(0.31±0.07)d	(0.52±0.11)c
ODP-Ia 中剂量组	(0.39±0.05)d	(0.41±0.05)d	(0.58±0.16)c
ODP-Ia 高剂量组	(0.68±0.05)c	(0.77±0.12)c	(0.89±0.14)b
阳性对照组	(0.80±0.12)b	(0.89±0.10)b	(1.22±0.15)a

不同字母表示 SNK-q 检验在 0.05 水平上差异显著。

2.5 ODP-Ia 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中 ABCA1、ABCG1、SR-BI 转录的影响

ODP-Ia 干预后,THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中 ABCA1、ABCG1、SR-BI 蛋白表达的趋势与相应 mRNA 的表达趋势一致,如表 3 所示。高剂量组 ODP-Ia 可以显著增加泡沫细胞中 ABCA1、ABCG1、SR-BI 蛋白的表达水平(与只用 ox-LDL 组比较, $P<0.05$)。但是,除了高剂量组 ODP-Ia 对 ABCG1 表达的促进作用具有统计学意义外,低、中剂量组的改善作用均不明显。阳性对照依折麦布的作用效果均比高剂量组 ODP-Ia 的效果强($P<0.05$)。

表 3 各组别 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞部分蛋白表达量
Table 3 The ABCA1,ABCG1 and SR-BI fluore scence intensity in THP-1 macrophage-derived foam cells of all dose groups

组别	蛋白表达量		
	ABCA1	ABCG1	SR-BI
空白组	(0.67±0.02)a	(0.74±0.04)a	(0.64±0.02)a
泡沫细胞组	(0.15±0.04)d	(0.30±0.07)c	(0.07±0.01)c
ODP-Ia 低剂量组	(0.11±0.02)d	(0.29±0.02)c	(0.05±0.03)c
ODP-Ia 中剂量组	(0.14±0.06)d	(0.20±0.07)d	(0.06±0.02)c
ODP-Ia 高剂量组	(0.30±0.04)c	(0.59±0.04)b	(0.38±0.10)b
阳性对照组	(0.48±0.04)b	(0.69±0.01)a	(0.56±0.06)a

不同字母表示SNK-q检验在0.05水平上差异显著。

3 结论与讨论

ABCA1 和 ABCG1 同属于 ATP 结合转运蛋白超家族,两者都是跨膜糖蛋白,两者均在胆固醇外流过程中发挥重要作用,但功能不完全相同。ABCA1 能够将胆固醇转运到 apoA-1 脂蛋白,ABCG1 则负责将胞内胆固醇转运至成熟的高密度脂蛋白颗粒 HDL^[13]。SR-BI 属于清道夫受体家族,是 HDL 的高亲和力受体,介导胆固醇双向转运,既介导 HDL-C 的选择性摄取,又介导胆固醇从血管壁上流出^[14],因此,ABCA1、ABCG1、SR-BI 的表达水平与胆固醇外流率密切相关。本研究结果表明 ODP-Ia 增加了 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中 ABCA1、ABCG1、SR-BI mRNA 的表达及蛋白表达,能促进胞内胆固醇流出,减少胞内的脂质蓄积,由此推测促进胆固醇逆转运是 ODP-Ia 改善高脂血症大鼠肝脏和血管的病变,减轻动脉粥样硬化斑块的病变程度的机制之一,但是确切定论尚需后续进一步研究。

参考文献:

[1] 王志利,张秀花,陈杏禹.食用仙人掌及栽培技术[J].北

方园艺,2007(4):105-106.
[2] ZHAO L Y,LAN Q J,HUANG Z C,et al .Antidiabetic effect of a newly identified component of *Opuntia adillenii* polysaccharides[J].Phytomedicine,2011,18:661-668.
[3] ZHAO L Y,LAN Q J,HUANG Z C,et al .Hypolipidemic effects and mechanisms of the main component of *Opuntia dillenii* Haw . polysaccharides in high-fat emulsion-induced hyperlipidemic rats[J]. Food Chem, 2012,134(2):964-971.
[4] 黄卫,曾富华,杨小舟.仙人掌多糖对高脂血症大鼠血脂的影响[J].中医研究,2008,21(6):13-16.
[5] 杨小舟,黄卫,曾富华,等.仙人掌多糖对高脂血症大鼠体内抗氧化作用的研究[J].时珍国医国药,2009,20(10):2440-2442.
[6] SCHEPETKIN I A,XIE G,KIRPOTINA L N,et al .Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*[J]. Int Immunopharmacol, 2008,8(10):1455-1466.
[7] HUANG X,LI Q,LI H G .Neuroprotective and antioxidative effect of cactus polysaccharides in vivo and in vitro [J].Cell Mol Neurobiol,2009,29(8):1211-1221.
[8] ZHAO M M,YANG N,YANG B,et al .Structural characterization of water-soluble polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladodes in relation to their anti-glycatedactivities [J]. Food Chem, 2007,105:1480-1486.
[9] YANG Q,CHEN H,ZHOU X,et al .Optimum extraction of polysaccharides from *Opuntia dillenii* and evaluation of its antioxidant activities[J]. Carbohydr Polym, 2013,97(2):736-742.
[10] 陈阜新,汪莲开.阿魏酸对巨噬细胞泡沫样化过程中胆固醇流出的影响及可能机制[J].中国中药杂志,2015,40(3):533-537.
[11] YERANG,YUN H J,YONG K M,et al .Kimchi methanol extract and the kimchi active compound, 3'-(4'-hydroxyl-3',5'-dimethoxyphenyl) propionic acid, down regulate CD36 in THP-1 macrophages stimulated by ox-LDL[J].Journal of Medicinal Food,2014,17(8):886-932.
[12] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method[J]. Methods, 2001,25(4):402-408.
[13] HEE J J,MINH H H,SIOK K Y,et al .Induction of ABCA1 and ABCG1 expression by the liver X receptor modulator cineole in macrophage[J].Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013,23(2):579-583.
[14] MIRANDA V E,BOSI ST,HILDEBRAND R B,et al .Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development[J]. American Journal of Pathology, 2004,165(3):785-794.

责任编辑:尹小红
英文编辑:梁和