

[文章编号] 1007-3949(2004)12-01-0027-04

•实验研究•

苦瓜蛋白对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的形成及三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的影响

王 佐, 唐朝克, 吕运成, 李榕娟, 危当恒, 万载阳, 杨保堂, 刘录山, 易光辉, 杨永宗

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 苦瓜蛋白对泡沫细胞形成和三磷酸腺苷结合盒转运体的影响; 方法, 高效液相色谱测定法; 苦瓜蛋白; 泡沫细胞, 巨噬细胞源; 三磷酸腺苷结合盒转运体; 胆固醇酯与总胆固醇比值

[摘要] 为研究苦瓜蛋白对泡沫细胞形成的作用及其机制, 用离心、超滤和色谱技术从苦瓜(*Momordica charantia* L) 果肉中提取苦瓜蛋白(Momordicin), THP-1 细胞经 160 nmol/L PMA 孵育 24 h, 诱导其分化成巨噬细胞, 然后用 25 mg/L 乙酰化低密度脂蛋白孵育 48 h, 使其泡沫化, 以观察苦瓜蛋白对泡沫细胞形成的影响。用高效液相色谱法分析细胞内胆固醇和胆固醇酯的变化, 用逆转录-聚合酶链反应技术检测苦瓜蛋白对三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的影响。结果发现, 经苦瓜蛋白作用后, 细胞内总胆固醇及胆固醇酯均显著减少(对照组总胆固醇为 634 ± 21 , 苦瓜蛋白处理组为 257 ± 26 , $P < 0.01$; 对照组胆固醇酯为 339 ± 21 , 苦瓜蛋白处理组为 93 ± 9 , $P < 0.01$)。胆固醇酯与总胆固醇比值从对照组的 62.9% 下降到 36.2%。同时, 细胞内三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达显著上调($P < 0.05$)。提示苦瓜蛋白抑制 THP-1 单核巨噬细胞源性泡沫细胞的形成可能与上调三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Momordicin on THP-1 Macrophage-Derived Foam Cells and ATP Binding Cassette Transporter A1

WANG Zuo, TANG Chao-Ke, LU Yun-Cheng, LI Rong-Juan, WEI Dang-Heng, WAN Zai-Yang, YANG Bao-Tang,

LIU Lu-Shan, YI Guang-Hui, and YANG Yong-Zong

(Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Momordicin; Foam Cell, Macrophage Derived; ATP Binding Cassette Transporter A1

[ABSTRACT] **Aim** To study the inhibitory effect and mechanisms of Momordicin on foam cell. **Methods** Momordicin (28 kDa) was purified from the juice of *Momordica charantia* L by eccentricity, super-filtration and chromatography technology. After incubated with 160 nmol/L PMA for 24 h, THP-1 was induced to macrophage, this macrophage was induced to foam cell by incubated with 25 mg/L ac-LDL for 48 h, and the effect of Momordicin on foam cell was measured, cholesteryl and cholesteryl ester within THP-1 were measured by high performance liquid chromatography (HPLC), and regulated effect of Momordicin on ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) was measured by RT-PCR. **Results** A positive inhibitory effect of Momordicin on foam cell was found. Total cholesterol (TC) and cholesteryl ester (CE) were reduced remarkably by Momordicin ($P < 0.01$), CE/TC was reduced from 62.9% to 36.2% by Momordicin, ABCA1 was up-regulated by Momordicin ($P = 0.035$) remarkably. **Conclusions** The inhibitory effect of Momordicin on foam cell may related to its activity of up-regulating ABCA1.

泡沫细胞形成是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)及继发其它疾病的重要环节^[1], 细胞泡沫化途径及调控因素, 已成为防治 As 及继发性疾病的新作用靶点和药物筛选靶标。传统中草药中蕴含丰富的抗 As 成份, 提取和筛选那些成份是我国民族医学中一个有巨大潜力和有发展前途的研究方向。基于对苦瓜蛋白长达 6 年的研究, 根据预实验结果, 本文报告

对苦瓜蛋白影响泡沫细胞胆固醇流出的研究结果, 为把苦瓜蛋白开发成防治 As 的药物打基础。

1 材料和方法

1.1 材料

THP-1 细胞由中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库提供, 逆转录-聚合酶链反应试剂盒为美国 Promega 公司产品; 牛血清白蛋白(BSA)、载脂蛋白 A_{IV}、Phorbol myristate acetate (PMA)、22(R)-hydroxycholesterol (22(R)-Hch) 和 4, 4'-diisothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonic acid (DIDS) 为 Sigma 公司产品; 总 RNA 提取试剂盒(Trizol) 为上海生物工

[收稿日期] 2003-10-13

[修回日期] 2004-01-19

[作者简介] 王佐, 病理生理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化发病机制及其防治。唐朝克, 在读博士研究生。杨永宗, 病理生理学教授, 博士研究生导师, 此文通讯作者。

程公司产品; ABCA1 和 GAPDH 引物均由上海生物工程公司合成; 其他试剂均为进口或国产分析纯。CP100MX 超速离心机为日本 Tokyo 产品。

1.2 苦瓜蛋白的制备

本地产新鲜苦瓜 (*Momordica Charantia* L.), 购于衡阳市郊。参照文献[2]制备苦瓜蛋白, 现简述。苦瓜果肉匀浆, 在 pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液浸泡过夜后, 再 10 kr/min 离心 15 min, 取上清, 用分子质量 50 kDa 截流超滤, 除去分子质量 50 kD 以上的成份, 所得粗提液, 经 PEG6000(聚乙二醇 6000)脱水透析(透析袋截流分子质量 8 kDa)除去分子质量少于 8 kDa 的低分子成份, 然后用 SCX 阳离子交换柱分离, 测定抗病毒活性峰(抑制 HepG2), 最后用 C18 反相柱分离, 测定活性峰(纯品), 并经 SDS-PAGE 纯度鉴定。

1.3 低密度脂蛋白的分离、乙酰化修饰及鉴定

参照文献[3-5]所用方法进行, 现简述。

1.3.1 分离 将 210 mL 人血浆(购于衡阳市中心血站)置超速离心机作序列超速离心。首先 4℃、42 000 r/min 离心 18 h, 吸出上层乳白色液体(VLDL)及次层淡黄色液体(IDL), 收集下层液体, 然后加入固体 KBr 17.9 g 使最终密度为 1.063 kg/L, 并加血浆密度标准缓冲液使总体积为 210 mL, 再置超速离心机中, 于 42 000 r/min、4℃下离心 20 h, 吸出漂浮于离心管顶部橙黄色液体即得 LDL。提纯的 LDL 在含 200 μmol/L EDTA 的 BPS 液中透析 48 h, 过滤除菌, BCA 法定量蛋白, 用 PBS 液调节蛋白浓度至 1 g/L, 4℃保存。

1.3.2 乙酰化修饰 16 mL LDL 中加入 1 mL 0.15 mol/L NaCl 和 1 mL 饱和醋酸钠, 冰浴中不断搅拌, 然后醋酸酐 24 μL 以小液滴(2 μL/滴)形式于冰浴中不断搅拌下 1 h 内全量加入, 加入后继续搅拌 30 min, 将反应溶液移入透析袋中, 在乙酰化 LDL 透析液(0.15 mol/L NaCl, 0.3 mmol/L EDTA)中 4℃透析 24 h。过滤除菌, 4℃保存备用。

1.3.3 鉴定 取乙酰化前后的 LDL, 经 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 2.5% 考马斯亮蓝常规染色, 脱色后可见清晰的 LDL 条带, 同时采用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 苦瓜蛋白对 THP-1 泡沫化的干预实验

THP-1 细胞用含有 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液, 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养。培养液中加入 HEPES 10 mmol/L 和青霉素、链霉素各 1.0 × 10⁵ u/L, 在每次实验前用 160 nmol/L PMA 孵育 THP-1 细胞 24 h, 使其诱导分化成巨噬细胞。在此基础上

再进行苦瓜蛋白对 THP-1 细胞泡沫化抑制实验, 实验共分 2 组, 即泡沫化对照组和苦瓜蛋白组。对照组用 25 mg/L 乙酰化 LDL, 苦瓜蛋白组同时加入 25 mg/L 乙酰化 LDL 和 5 g/L 苦瓜蛋白, 在 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液共同孵育 48 h。之后, 通过油红 O 染色在光镜观察, 并用 HPLC 的方法^[6]测定细胞内的胆固醇和胆固醇酯, 鉴定泡沫细胞及苦瓜蛋白对 THP-1 泡沫细胞形成的影响。

1.5 细胞内胆固醇与胆固醇酯测定

参照文献[6], 取 5 μL 样品进样, C18 反相柱, 以异丙醇: 正庚烷: 乙腈为流动相, 非梯度洗脱, 1 mL/min, 柱温 40℃, 检测波长 216 nm, 检测到第 8 min。胆固醇用外标法峰面积定性定量, 单位为 mg/g 蛋白, 胆固醇酯经胆固醇酯酶水解, 测得总胆固醇量, 总胆固醇减去游离胆固醇的值代表胆固醇酯的量, 以 mg/g 蛋白为单位。

1.6 ATP 结合盒转运体 A1 检测

参照文献[7]进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。THP-1 细胞(1 × 10⁷ 个细胞/瓶)在含有 25 mg/L 乙酰化 LDL 培养液中培养 48 h, 然后用无血清培养液加各种影响因素培养细胞 24 h, PBS 液洗涤细胞, 用 10 mg/L 载脂蛋白 A iv 继续培养细胞 12 h, 收集各组细胞。按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA。取各组细胞总 RNA 2 μg 逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 1 μL 进行 PCR 循环。94℃, 温育 5 min, 94℃变性 1 min, 60℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 34 个循环, 末次循环 72℃, 延伸 10 min。ABCA1(基因库序列号: AF285167)的引物序列: 上游引物序列为 5'-GCTGCTGAAGCCAGGGCATGGG-3', 下游引物序列为 5'-GTGGGGCAGTGGCCATACTCC-3', PCR 扩增产物长度为 306 bp。GAPGH 的引物序列: 上游 5'-TCACCATCTCCAGGAGCGAG-3', 下游 5'-TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG-3', PCR 扩增产物长度为 697 bp。反应结束后, 取反应产物 10 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, UVP 型凝胶图像分析系统摄图, 并分析各组目的基因及 GAPGH 基因灰度值, 以二者的比值大小代表 ABCA1 的表达的高低。

1.7 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用方差分析及 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 苦瓜蛋白对 THP-1 细胞泡沫化的影响

两组细胞如图 1(Figure 1) 所示, 在光镜下对照组细胞由于吞噬脂质体积增大(A, 箭头所示), 油红 O 染色可见胞浆内有较多的脂质颗粒。苦瓜蛋白组细胞的形状基本与正常细胞相似, 但也有少数细胞体积增大(B, 箭头所示), 大部分细胞内红染颗粒较

少, 但也有个别细胞浆内红染颗粒较多, 且与体积增大一致。说明苦瓜蛋白对 THP-1 细胞泡沫化有抑制作用, 随后的 HPLC 对细胞内胆固醇(酯) 定性和定量分析也予证实。

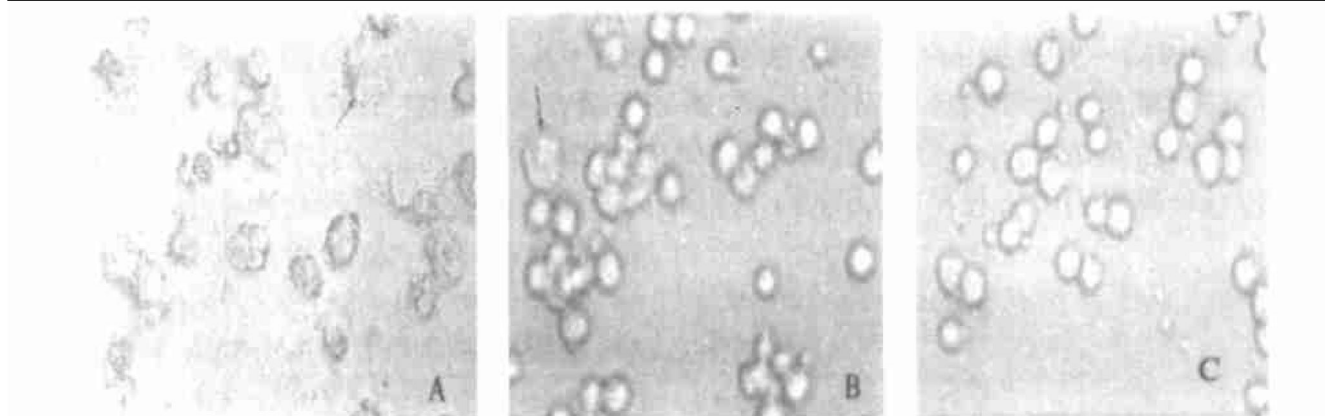


图 1. 苦瓜蛋白对 THP-1 细胞泡沫化的抑制作用 A 为用乙酰化 LDL 处理 THP-1 细胞 48 h, 箭头所示为泡沫化细胞; B 为 5 g/L 苦瓜蛋白处理组, 箭头所示为储存较多脂质的细胞; C 为正常组细胞。

Figure 1. The inhibitory effect of Momordicin on foam information of THP-1

2.2 苦瓜蛋白对细胞内胆固醇及胆固醇酯含量的影响

细胞内胆固醇和胆固醇酯的原始记录如图 2 (Figure 2) 所示, 定量结果见表 1 (Table 1)。可见经 25 mg/L 乙酰化 LDL 处理 THP-1 细胞 48 h 后胆固醇酯显著增加, 占总胆固醇的 50% 以上(62.9%), 符合泡沫细胞的特征。而经 5 g/L 苦瓜蛋白干预后, 细胞内总胆固醇、胆固醇酯均显著减少($P < 0.01$), 另外, 胆固醇酯与总胆固醇的比值也明显减少。

2.3 苦瓜蛋白对 THP-1 细胞 ATP 结合盒转运体 A1 表达的影响

THP-1 细胞 ATP 结合盒转运体 A1 的表达如图

3 (Figure 3) 所示, 定量结果见表 2(Table 1)。可见经苦瓜蛋白处理后, THP-1 细胞 ATP 结合盒转运体 A1 的表达增加, 与对照组比较, 吸光度比值差异有显著性统计学意义($P < 0.05$)。

表 1. 两组细胞内胆固醇和胆固醇酯含量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of cholesterol and cholesterol ester of two groups

分 组	n	TC	FC	CE	CE/TC
对照	5	634 ± 21	235 ± 14	339 ± 21	62.9%
苦瓜蛋白	5	257 ± 26 ^a	164 ± 17	93 ± 9 ^a	36.2% ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较

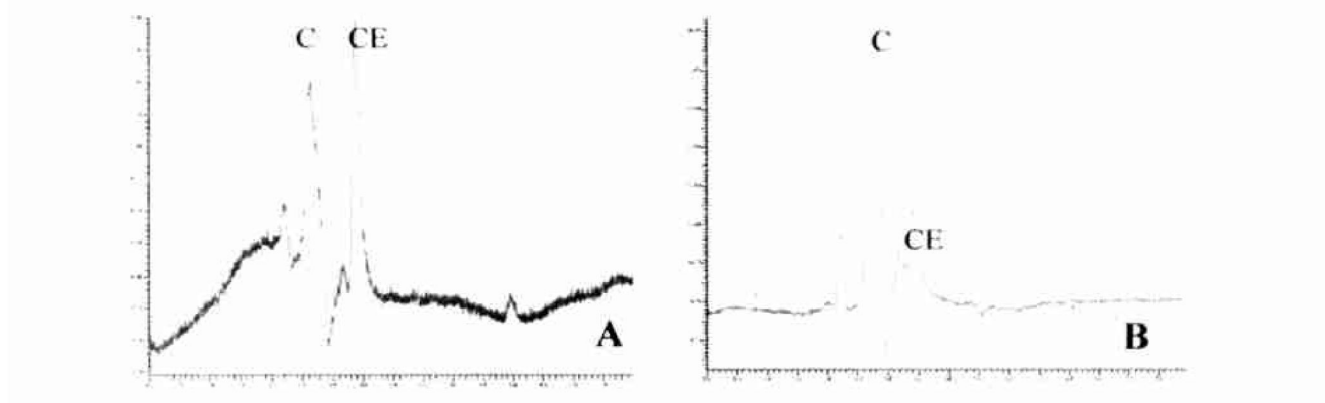


图 2. 高效液相色谱测定 THP-1 细胞内的胆固醇和胆固醇酯 A 为乙酰化 LDL 处理 THP-1 细胞 48 h 的对照组; B 为 5 g/L 苦瓜蛋白处理组。C 峰为游离胆固醇峰, CE 峰为胆固醇酯峰。

A 为乙酰化 LDL 处理 THP-1 细胞 48 h 的对照组; B 为 5 g/L 苦瓜蛋白

Figure 2. Measurement cholesterol and cholesterol ester by high performance liquid chromatography

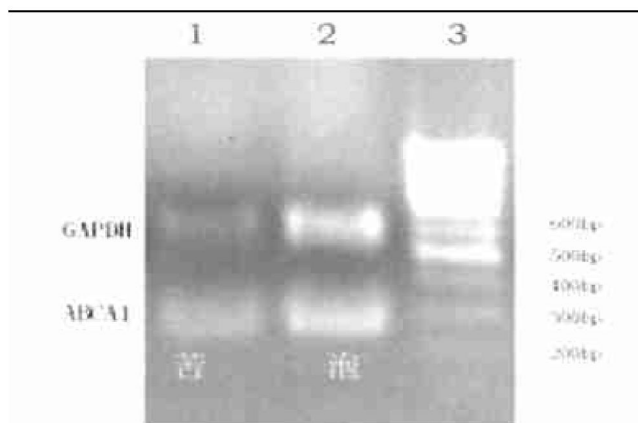


图3. 苦瓜蛋白对 ABCA1 抑制作用的逆转录聚合酶链反应分析结果 1 为对照组, 2 为苦瓜蛋白组, 3 为内对照 GAPDH。PCR 产物长度为 697 bp, ABCA1 为 306 bp。

Figure 3. The inhibitory effect of Momordicin on ABCA1 by RT-PCR analysis

表2. 两组 THP-1 细胞 ATP 结合盒转运体 A1 的表达比较

Table 2. Comparison of expression of ATP binding cassette transporter A1 in THP-1 cell of two groups

分 组	n	吸光度比值
对照	5	1.46 ± 0.26
苦瓜蛋白	5	2.54 ± 0.53 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

苦瓜(*Momordica charantia* L)为葫芦科植物苦瓜的果实,不但是一种日常食用蔬菜,也是一种常用的民间药物^[8],性味苦寒,《滇南本草》:入心、脾、胃三经,《本草求真》:入心、肝、肺三经。具有消暑涤热、清心明目、益气解毒、滋养强壮等功效^[9],常用于治疗“消渴、痢疾、赤眼疼痛、痈肿丹毒、恶疮”等疾病^[10]。本植物的根、茎、叶、花、种子、果实均可供药用。近年来,国内外学者从苦瓜果实、种仁中分离纯化多种有效成分,发现具有明显的抗病毒,抗肿瘤、调节免疫、抗生育、降血糖等多种生物活性^[11],有很高的药用价值。Jayasooriya 等^[12]发现苦瓜能持续的升高高密度脂蛋白胆固醇(HDL)的作用,并显著降低动脉粥样硬化大鼠模型血清中的总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG),我们发现苦瓜蛋白能抑制核因子 kB 的活化^[13]和肿瘤坏死因子 α 的生成,并上调 GSHPX 和 SOD,降低丙二醛^[14],在氧化应激中发挥重要作用。进一步的研究发现三磷酸腺苷结合盒转运体 1(ATP binding cassette transporter 1, ABCA1)是

一种整合膜蛋白,它以 ATP 为能源,促进细胞内游离胆固醇和磷脂的流出,在胆固醇逆转运(RCT)和 HDL 生成的起始步骤中起重要作用,被称作 RCT 守门人^[15]。由于苦瓜蛋白能明显抑制的 THP-1 泡沫化,而其又上调 ABCA1,据此我们推测,苦瓜蛋白的抑制 THP-1 泡沫化作用与其上调 ABCA1 有关。进一步深入的研究正在进行之中。

根据以上苦瓜蛋白降脂(胆固醇)、抑制肿瘤增生、抑制泡沫化、抗炎(抑制炎症因子的活性及产生)及调节氧化应激的功能等抗动脉粥样硬化发病环节的研究基础,水到渠成地促使我们在动物模型上进行苦瓜蛋白的抗 As 研究,为把苦瓜蛋白这一来源广泛、价格低廉的蛋白单体开发成为一种抗动脉粥样硬化民族医药药物打下坚实的基础。

[参考文献]

- [1] Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Elec Microsc*, 2002, **35**: 179-203
- [2] 王 佐,李双杰,杨永宗. 苦瓜蛋白的分离纯化及其体外抗 CoXB3 型病毒作用的研究. *南华大学学报(医学版)*, 2002, **30**: 1-3
- [3] 唐朝克,杨永宗,易光辉,王 燕,危当恒,王 佐. 三磷酸腺苷结合盒转运体 1 在 THP-1 巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇流出中的作用. *中国病理生理杂志*, 2003, **19**: 1084-088
- [4] 袁中华,杨永宗,杨小毅,谭健苗,万载阳. 消斑肽加速氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞凋亡. *中国病理生理杂志*, 2001, **17**: 935-937
- [5] 唐朝克,甘 露,燕春艳,刘俊文,王 双,杨峻浩,等. 氧化型低密度脂蛋白对 THP-1 巨噬细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11**: 497
- [6] 王 佐,李全忠,杨向东,肖尚志,杨永宗. 高效液相色谱分析氧化低密度脂蛋白处理的 U937 细胞内胆固醇及胆固醇酯. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6**: 317-320
- [7] 唐朝克,杨峻浩,易光辉,王 佐,刘录山,万载阳,等. 油酸对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达和胆固醇流出的影响. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35**: 1077-082
- [8] Grist NR, Reid D. Epidemiology of viral infections of the heart. In: Banatvala JE. *Viral Infection of the Heart*. London, UK: Edward Arnold, 1993; 23-31
- [9] 江苏新医学院. *中药大辞典(上册)*. 上海:上海科学技术出版社, 1986; 1281
- [10] Ng TB, Chang WY, Yeung HW. Proteins with abortifacient, ribosome inactivative, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from cucurbitacea plants. *Gen Pharmacol*, 1992, **23**: 579-584
- [11] 李双杰,张宝林,邓 晖,王 佐,李湘斌,危当恒. 苦瓜蛋白体外抗柯萨奇 B3 病毒感染的实验研究. *湖南医科大学学报*, 1999, **24**: 583-584
- [12] Jayasooriya AP, Sakono M, Yukizaki C, Kawano M, Yamamoto K, Fukuda N. Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *J Ethnopharmacol*, 2000, **72**: 331-336
- [13] 王 佐,李双杰,杨永宗. 苦瓜蛋白对 BALB/C 小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎核因子 kB 的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**: 479-482
- [14] 王 佐. 苦瓜蛋白对 BALB/C 小鼠 CVB3 心肌炎的治疗作用及其机制研究. *中南大学 2000 级博士论文*,长沙.
- [15] 唐朝克,贺修胜,易光辉,王 佐,袁中华,刘录山,等. 肝 X 受体 α 在泡沫细胞胆固醇流出中的调控作用. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**: 940-944

(此文编辑 胡必利)