

苦瓜蛋白 MD28对 Caco-2细胞胆固醇排出及 ABCG5和 ABCG8表达的影响

王佐, 胡艳, 宋砚明, 张晓蕾, 雷建军, 张凯

(南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 苦瓜蛋白 MD28 Caco-2细胞; 三磷酸腺苷结合盒转运子 G5 三磷酸腺苷结合盒转运子 G8 胆固醇排出

[摘要] 目的 探讨苦瓜蛋白 MD28对 Caco-2细胞胆固醇排出及其相关基因 ABCG5和 ABCG8表达的影响, 明确苦瓜蛋白 MD28的降胆固醇机制。方法 Caco-2细胞分为四组: Caco-2细胞对照组、Caco-2细胞模型组、Caco-2细胞模型+苦瓜蛋白 MD28处理组和 Caco-2细胞+苦瓜蛋白 MD28处理组。加相应的处理因素处理后, 高效液相色谱法测量细胞内胆固醇含量, 油红 O 染色观察细胞内脂滴, 逆转录聚合酶链反应和 Western blotting 分别检测细胞中 ABCG5和 ABCG8的 mRNA 和蛋白表达。结果 高效液相色谱测定结果显示, 与 Caco-2细胞模型组比较, 苦瓜蛋白 MD28处理的细胞中胆固醇含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。油红 O 染色显示, 加苦瓜蛋白 MD28处理组脂质沉积均相应低于没有加苦瓜蛋白 MD28处理组。Caco-2细胞模型组 ABCG5和 ABCG8的 mRNA 和蛋白水平均有轻微上调, 但与 Caco-2细胞对照组比较无显著性差异, 而经苦瓜蛋白 MD28处理后, ABCG5和 ABCG8明显上调 ($P < 0.01$), 且与 Caco-2细胞模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。结论 苦瓜蛋白 MD28能够显著上调人结肠腺癌细胞 Caco-2中 ABCG5和 ABCG8的表达, 其降低胞内胆固醇作用与增强胞内胆固醇的排出有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Momordicin-28 on Cholesterol Efflux and Expression of ABCG5 and ABCG8 in Caco-2 Intestinal Epithelial Cell

WANG Zuq, HU Yan, SONG Yan-Ming, ZHANG Xiao-Lei, LEI Jian-Jun, and ZHANG Kai

(Institute of Cardiovascular Disease, Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Momordicin-28 Caco-2 Cell ATP Binding Cassette G5 ATP Binding Cassette G8 Cholesterol Efflux

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of momordicin-28 on cholesterol efflux and expression of related genes in Caco-2 cell and to illuminate the role of momordicin-28 in lowering cholesterol. **Methods** Caco-2 cells were divided into four groups: Caco-2 cell group (control group), Caco-2 cell model group (treat cell with cholesterol), Caco-2 cell model and momordicin-28 group (treat cell with cholesterol and momordicin-28) and Caco-2+ momordicin-28 group (treat cell with momordicin-28). TC was measured by HPLC. Gene and protein expression was analyzed by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting respectively. **Results** HPLC illustrated TC was lower in momordicin-28 treat group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Oil red staining illustrated lipidoses of Caco-2 cell were higher in the model group than that in the momordicin-28 treat group. The expression of ABCG5 and ABCG8 mRNA and protein of momordicin-28 treat group were higher than other groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Momordicin-28 can facilitate efflux of cholesterol from Caco-2 cell and up-regulate expression of ABCG5 and ABCG8 in Caco-2 cell.

苦瓜为葫芦科植物苦瓜的果实, 性味苦寒, 是一种日常食用蔬菜和民间药物。前期研究发现, 苦瓜能够显著降低兔血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 以及血管壁总胆固醇^[1], 有抗兔动脉粥样硬化的作用。苦瓜蛋白 MD28是从苦瓜果肉中

分离出来的一种分子量为 28 kDa 的水溶性蛋白质^[2]。本课题组前期研究发现, MD28 具有抑制泡沫细胞形成^[3]及降脂作用^[4]。其能显著降低 LDLC 以及血管壁总胆固醇特别是血清总胆固醇水平, 并在动物整体水平发现 MD28 能上调肠上皮胆固醇排出相关的基因表达^[4], 但其是否促进肠上皮细胞胆固醇排出并不清楚, 因此本研究拟从胆固醇的转运入手, 观察 MD28 对 Caco-2 细胞胆固醇排出的影响及胆固醇转运基因 ABCG5 和 ABCG8 表达的影响, 进一步深入研究 MD28 降血清胆固醇的机制。

[收稿日期] 2009-09-17 [修回日期] 2009-10-05

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (07JJ3034); 湖南省教育厅课题 (07C617)

[作者简介] 王佐, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事抗动脉粥样硬化药物筛选, Email: smt121101@163.com。

1 材料和方法

1.1 材料

Caco-2细胞系购自中国科学院上海细胞库; MD28为自制色谱纯,在 SDS-PAGE 胶为单一条带; ABCG5和 ABCG8抗体购自 Santa Cruz公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; BCA 蛋白含量测定试剂盒购自 Hyclone-Pierce公司; 其余试剂为国产分析纯。

1.2 实验分组及处理

参照文献[5]方法培养 Caco-2细胞,参照文献[6]制备胆固醇混合微胶粒,实验分为4组: ①Caco-2细胞对照组(用含10%新生牛血清的高糖 DMEM 培养基培养); ②Caco-2细胞模型组(用含10%新生牛血清的高糖 DMEM 培养基培养,第2天加入1 mL胆固醇微胶粒混合液); ③Caco-2细胞模型+MD28处理组(用含10%新生牛血清的高糖 DMEM 培养基培养,第2天在培养基中加入1 mL胆固醇微胶粒混合液和0.1 mL制备好的 MD28储备液); Caco-2细胞+MD28处理组(用含10%新生牛血清的高糖 DMEM 培养基培养,第2天在培养基中加入0.1 mL MD28储备液)。所有各组待第4天细胞铺满瓶底后可用于实验。

1.3 高效液相色谱分析胆固醇

参照文献[7]的方法,待细胞处理结束后,倒掉培养基, PBS洗3遍,加入细胞裂解液200 μ L,反复冻融3次裂解细胞,BCA法定量蛋白后,7.2%三氯乙酸沉淀蛋白,800 g离心10 min,取上清进行胆固醇检测,以豆甾醇为内标。取100 μ L上清液,加入8.9 mol/L氢氧化钾溶液200 μ L,水解胆固醇酯后为总胆固醇检测样品。各样品分别与内标液混匀,用正己烷和无水乙醇抽提后,1.5 mol/L三氯化铬进行氧化衍生并真空干燥,100 μ L乙腈-异丙醇(80:20)溶解样品,上样于高效液相色谱仪。采用C-18柱,柱温4 $^{\circ}$ C,流速1 mL/min,250 nm紫外分光检测,胆固醇以峰面积定量,内标校准,以 μ g/g细胞蛋白为单位。分别检测胞内和胞外的总胆固醇水平,以二者的差值计算胆固醇排出。

1.4 Caco-2细胞油红O染色

参照文献[8]的方法,将Caco-2细胞培养于放有消毒盖玻片的6孔培养板内,细胞按上述分组处理方法处理后,用 PBS洗3次,钙福尔马林固定15 min, PBS轻洗2次,50%异丙醇洗1 s,用事先配好的油红O染色20 min, PBS轻洗2次,镜下观察细胞有无染色,然后用70%酒精洗1~2 s,流水冲洗后苏木素染色5 min,流水冲洗5 min,1%盐酸酒精分

色1 s,水性封片剂封片,显微镜下观察并摄像。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测 Caco-2细胞中 ABCG5和 ABCG8 mRNA 水平

将Caco-2细胞接种于50 mL细胞培养瓶,按上述分组处理细胞,待细胞铺满瓶底80%以上时收集各组细胞用于实验。Trizol试剂提取各组细胞或者小鼠小肠组织的总RNA,溶于无RNase水中,紫外分光光度计测定OD₂₆₀/OD₂₈₀的比值在1.8~2.0之间。取总RNA 2 μ g,逆转录合成cDNA,再取逆转录产物1.0 μ L进行PCR循环。人 β -actin引物序列上游5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA-3',下游5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3',产物大小为564 bp; ABCG5引物序列上游5'-CTG AGG TTG CCC GAT TTG-3',下游5'-ATT TGG ATT TTG GAC GAT A-3',产物大小为124 bp; ABCG8引物序列上游5'-CTC AGG TCC CTT GGT TTG-3',下游5'-TGC CCA CTT CTC ACT TTG-3',产物大小为118 bp。 β -actin反应条件:94 $^{\circ}$ C变性5 min,94 $^{\circ}$ C变性20 s,59 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,重复循环40次。ABCG5与ABCG8的反应条件:94 $^{\circ}$ C变性15 min,94 $^{\circ}$ C变性15 s,52 $^{\circ}$ C(ABCG8为56 $^{\circ}$ C)退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,重复循环45次。反应结束后取样,1.2%琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色。UVP型凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析,以目的基因与内参吸光度值减去背景值的比值得出待测基因的mRNA水平。

1.6 Western blotting检测 Caco-2细胞中 ABCG5和 ABCG8蛋白

蛋白变性后放入-20 $^{\circ}$ C冰箱中备用。用10% SDS聚丙烯酰胺凝胶进行电泳(积层胶60 V,分离胶90 V),湿转至PDVF膜,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白质分子质量标准位置。5%脱脂牛奶4 $^{\circ}$ C封闭过夜,加入稀释的一抗(羊多克隆抗体ABCG5为1:400,羊多克隆抗体ABCG8为1:500),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST洗涤10 min \times 3次,加入稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记兔抗羊IgG为1:2000),室温孵育1 h,TBST洗15 min \times 3次,蛋白质印迹荧光检测试剂盒显示于X光片。结果用Labwork凝胶图像分析系统对胶片扫描,目的蛋白各组的面积灰度值减去背景灰度值与经过同样处理的 β -actin灰度值的比值进行比较。

1.7 统计学方法

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS12.0统计软件进行统计处理,组间比较采用方差分析及 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2 1 MD28对 Caco-2细胞内胆固醇及胆固醇酯含量的影响

与 Caco-2细胞对照组相比, Caco-2细胞模型组经过胆固醇微胶粒处理的细胞内总胆固醇含量明显

增加 ($P < 0.01$); 在给予 MD28处理后, 细胞内总胆固醇含量明显减少, 细胞外胆固醇含量明显增加 ($P < 0.01$); Caco-2细胞 + MD28处理组细胞内胆固醇也显著低于 Caco-2细胞对照组 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 MD28对 Caco-2细胞胆固醇蓄积及排出的影响 ($\mu\text{g/g}$ $n = 5$)

分 组	细胞内总胆固醇含量	细胞外总胆固醇含量	胆固醇排除量
Caco-2细胞对照组	46 ± 11	6 ± 2	- 40 ± 6
Caco-2细胞模型组	397 ± 43 ^b	105 ± 28 ^b	- 292 ± 35 ^b
Caco-2细胞模型 + MD28处理组	178 ± 16 ^c	325 ± 47 ^c	147 ± 32 ^c
Caco-2细胞 + MD28处理组	23 ± 8 ^a	37 ± 9 ^c	14 ± 8 ^a

a为 $P < 0.05$ 与 Caco-2细胞对照组比较; b为 $P < 0.01$ 与 Caco-2细胞对照组比较; c为 $P < 0.05$ 与 Caco-2细胞模型组比较。

2 2 MD28对 Caco-2细胞脂质蓄积的影响

Caco-2细胞模型组细胞内脂质蓄积最多, MD28处理后脂滴明显减少; Caco-2细胞 + MD28处理组与 Caco-2细胞对照组相比脂滴也明显减少 (图 1)。

2 3 MD28对 Caco-2细胞 ABCG5和 ABCG8 mRNA和蛋白表达的影响

MD28处理组 ABCG5和 ABCG8 mRNA 表达与 Caco-2细胞对照组相比明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。MD28处理组 ABCG5和 ABCG8 蛋白表达与相对应的对照组相比也明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 表 2, 图 2和 3)。

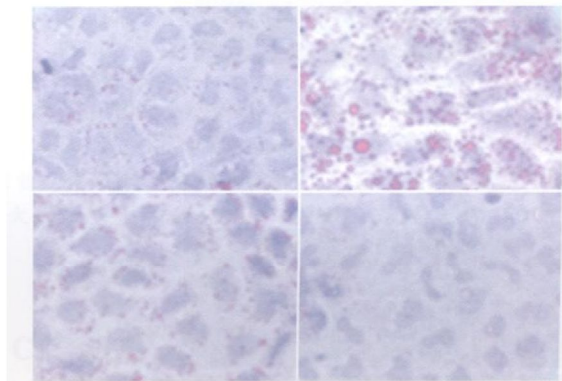


图 1 MD28对 Caco-2细胞内脂质蓄积的影响 左上为 Caco-2细胞对照组, 右上为 Caco-2细胞模型组, 左下为 Caco-2细胞模型组 + MD28处理组, 右下为 Caco-2细胞 + MD28处理组。

表 2 MD28对 Caco-2细胞 ABCG5和 ABCG8 mRNA和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 3$)

分 组	ABCG5 mRNA	ABCG8 mRNA	ABCG5蛋白	ABCG8蛋白
Caco-2细胞对照组	0.015 ± 0.009	0.087 ± 0.005	0.103 ± 0.006	0.131 ± 0.004
Caco-2细胞模型组	0.093 ± 0.028	0.216 ± 0.017	0.144 ± 0.031	0.263 ± 0.025
Caco-2细胞模型 + MD28处理组	0.314 ± 0.051 ^{ab}	1.056 ± 0.043 ^{ab}	0.652 ± 0.064 ^{ab}	0.835 ± 0.047 ^{ab}
Caco-2细胞 + MD28处理组	0.116 ± 0.039 ^a	0.421 ± 0.036 ^a	0.476 ± 0.033 ^a	0.579 ± 0.027 ^a

a为 $P < 0.05$ 与 Caco-2细胞对照组比较; b为 $P < 0.01$ 与 Caco-2细胞模型组比较。

3 讨论

机体维持胆固醇代谢平衡有两个途径, 一是减少肠道吸收, 二是通过逆向转运将外周组织中多余的胆固醇运输到肝脏并排泄到胆汁中。三磷酸腺苷结合盒转运子 (ABC)超家族成员 ABCA1主要功能与胆固醇的逆向转运有关。ABCA1为载脂蛋白 A iv依赖的细胞脂质外运所必需^[9], 参与细胞胆固醇的外运。本课题组前期的研究已经证实了 MD28能够通过上调 THP-1细胞 ABCA1的表达而抑制其泡沫化^[3], 说明 MD28能够通过胆固醇的逆向转运而

降低胆固醇水平。然而还不能完全解释 MD28降低血清胆固醇的作用。

ABCG5和 ABCG8是 ABC超家族 G亚家族的新成员^[10], 其与 ABCA1和 ABCG1共同参与胆固醇逆向转运 (RCT), 在减少肠道吸收胆固醇和促进肝脏排泄固醇, 控制血浆固醇水平, 维持机体固醇平衡中发挥重要作用。Yu等^[11]将人类 ABCG5和 ABCG8基因转入小鼠中, 发现这些基因在肝脏和小肠中高表达, 饮食中胆固醇吸收减少了 50%。给予小鼠高胆固醇饮食可诱导它们表达^[12]。ABCG5和 ABCG8在肝脏及近段小肠上皮细胞中高表达, 在极

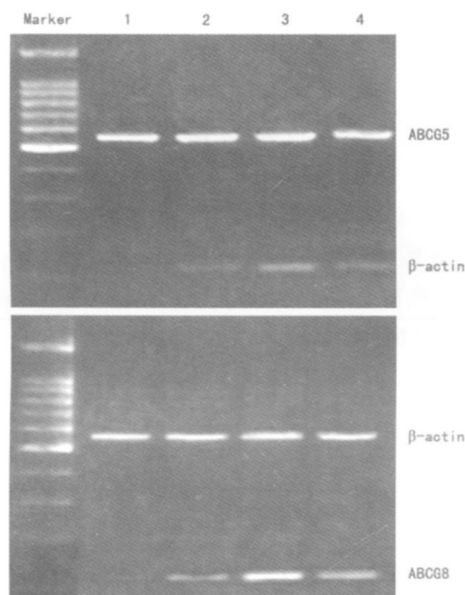


图2. MD28对Caco-2细胞中ABCG5和ABCG8 mRNA的影响 1为Caco-2细胞对照组,2为Caco-2细胞模型组,3为Caco-2细胞模型组+MD28处理组,4为Caco-2细胞+MD28处理组。

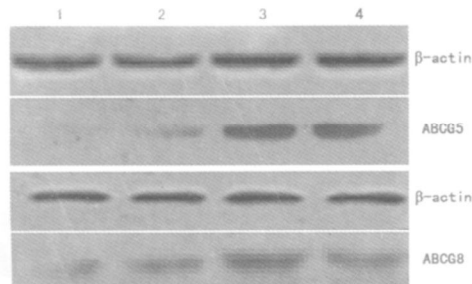


图3. MD28对Caco-2细胞中ABCG5和ABCG8蛋白表达的影响 1为Caco-2细胞对照组,2为Caco-2细胞模型组,3为Caco-2细胞模型组+MD28处理组,4为Caco-2细胞+MD28处理组。

性细胞上,ABCG5和ABCG8共表达时位于细胞围成管腔的一极,与ABCA1位于肝细胞基底侧不同,原位杂交发现这些基因产物沿吸收肠段小肠上皮细胞微绒毛排列^[13],用免疫荧光法检测小肠中ABCG5和ABCG8的表达时,荧光排列在小肠上皮细胞的外缘^[14],提示这两个基因在阻止小肠吸收和促进肝脏排泄固醇中发挥作用。ABCG5和ABCG8有可能形成功能性异二聚体发挥作用^[14]。

本研究以Caco-2细胞作研究胆固醇转运的细胞模型。Caco-2细胞来源于人的结肠腺癌细胞,培养成熟的Caco-2细胞可以形成致密的单细胞层组织,分化出细胞绒毛面,与小肠细胞类似。因此,这种细胞可以模拟小肠上皮细胞,广泛用于药物吸收过程中物理和生化屏障以及其他各种相关的实验研究。国外早已把Caco-2细胞模型作为研究药物摄取、外排及跨细胞转运等吸收机制及胆固醇的吸收与排出的有效工具^[15 16]。

本研究发现,在给予MD28处理后,细胞内胆固醇含量有减少的趋势,且MD28可以显著上调ABCG5和ABCG8表达,说明MD28能够促进细胞内胆固醇排出可能在减少胞内胆固醇沉积中发挥重要作用。另外,模型组与对照组相比,ABCG5和ABCG8的表达也会相应的增加,说明高脂高胆固醇饲料本身也能反馈性地激活这两个基因的表达。

[参考文献]

- [1] 王佐,吕运成,唐朝克,等. 苦瓜抗兔动脉粥样硬化实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(3): 514-518
- [2] 王佐,李双杰,杨永宗. 苦瓜蛋白的分离纯化及其体外CaXB3型病毒作用的研究[J]. 南华大学学报, 2002, 30(1): 1-3
- [3] 王佐,唐朝克,吕运成,等. 苦瓜蛋白对THP-1巨噬细胞源性泡沫细胞形成及三磷酸腺苷结合盒转运体A1的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(1): 27-30
- [4] 宋砚明,王佐,郭正宇,等. 苦瓜蛋白对载脂蛋白E基因敲除小鼠动脉粥样硬化形成及小肠胆固醇转运相关基因表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(1): 35-38
- [5] Hidalgo J, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability[J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 736-749
- [6] Eckhardt ER, Wang DQ, Donovan M, et al. Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers[J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(4): 948-956
- [7] 唐朝克,易光辉,王佐,等. 干扰素-γ对THP-1巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出和ABCA1表达的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(2): 127-133
- [8] Hovgaard L, Brändsted H, Buur A, et al. Drug delivery studies in Caco-2 monolayers. Synthesis, hydrolysis and transport of O-cyclopropane carboxylic acid ester prodrugs of various beta-blocking agents[J]. *Pharm Res*, 1995, 12(3): 387-392
- [9] Ors E, Broccardo C, Kaminski WE, et al. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abcl-deficient mice[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(2): 192-196
- [10] Hazard SE, Patel SR. Sterolins ABCG5 and ABCG8: regulators of whole body dietary sterols[J]. *Pflügers Arch*, 2007, 453(5): 745-752
- [11] Yu L, Li Hawkins J, Hammer RE, et al. Over expression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(5): 671-780
- [12] Bjorkhem I, Boberg K, Leitersdorf E. Inborn errors in bile acid biosynthesis and storage of sterols other than cholesterol[M]. In: *The metabolism and molecular bases of inherited disease*. Volume II. Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (editors). McGraw-Hill, New York, USA, 2001: 2863-913
- [13] Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, et al. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(21): 18793-800
- [14] Lee MH, Lu K, Hazard S, et al. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption[J]. *Nat Genet*, 2001, 27(1): 79-83
- [15] During A, Dawson HD, Harrison EH. Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-B1, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe[J]. *J Nutr*, 2005, 135(10): 2305-312
- [16] Collett A, Tanianis-Hughes J, Hallifax D, et al. Predicting P-glycoprotein effects on oral absorption: correlation of transport in Caco-2 with drug pharmacokinetics in wild-type and mdr1a(-/-) mice in vivo[J]. *Pharm Res*, 2004, 21(5): 819-826

(此文编辑 文玉珊)