

[文章编号] 1007-3949(2010)18-10-0775-04

• 实验研究 •

大蒜素对 Caco-2细胞胆固醇排出的影响

赵战芝, 胡艳, 宋砚明, 雷建军, 姜志胜, 王佐

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

[关键词] 大蒜素; 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 观察大蒜素对肠道细胞系 Caco-2细胞胆固醇外排及胆固醇转运基因 ABCG5/ABCG8表达的影响, 探讨大蒜素对肠道细胞胆固醇转运的影响及机制。方法 Caco-2细胞随机分为对照组, 胆固醇微胶粒组, 胆固醇微胶粒加大蒜素组和大蒜素组 4组。处理末, 采用油红 O 染色观察细胞内脂滴, 高效液相色谱法测细胞内胆固醇含量, 免疫印迹法测 ABCG5和 ABCG8的蛋白表达。结果 与对照组比较, 胆固醇微胶粒增加 Caco-2细胞内脂滴和胆固醇含量 ($P < 0.05$), 而大蒜素减少胆固醇微胶粒处理后细胞内脂滴和胆固醇含量, 增加细胞内胆固醇排出率 (70.30% 比 20.92%, $P < 0.05$)。大蒜素显著上调 Caco-2细胞 ABCG5和 ABCG8的蛋白水平。结论 大蒜素促进细胞内胆固醇排出, 其机制可能与上调 ABCG5和 ABCG8表达相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Allicin on Cholesterol Efflux in Caco-2 Intestinal Epithelial Cell

ZHAO Zhan-Zhi, HU Yan, SONG Yan-Ming, LEI Jian-Jun, JIANG Zhi-Shen, and WANG Zuo

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

[KEY WORDS] Allicin; Caco-2 Cell; ATP Binding Cassette G5; ATP Binding Cassette G8; Cholesterol Excretion

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of allicin on cholesterol excretion and expression of ABCG5 and ABCG8 in Caco-2 cells. **Methods** Caco-2 cells were randomly divided into control group, cholesterol group, cholesterol plus allicin group, and allicin group. After treatment, oil O staining, high performance liquid chromatography and western blot were performed. **Results** Cholesterol treatment of Caco-2 cells showed increased intracellular lipid droplet and cholesterol contents compared with control group ($P < 0.05$). However, Allicin significantly decreased lipid droplet and cholesterol contents in cholesterol-treated Caco-2 cells, increased efflux of cholesterol from the cells into the medium. Furthermore, allicin up-regulated the expression of ABCG5 and ABCG8 in Caco-2 cell. **Conclusion** These results suggest that allicin contributes to excretion of cholesterol from Caco-2 cell, which is related to up-regulation of ABCG5 and ABCG8 expression.

高胆固醇血症是动脉粥样硬化和冠心病的独立危险因素, 肠道胆固醇吸收是体内血胆固醇的主要来源, 因此促进肠道细胞内胆固醇排出, 是减少肠道胆固醇吸收、进而有效防止血胆固醇水平升高的重要途径。三磷酸腺苷结合盒转运子 (ATP binding cassette transporter, ABC) G5和 G8是 ABC超家族 G亚家族中的新成员。原位杂交结果显示 ABCG5和 ABCG8定位于吸收肠段上皮细胞微绒毛, ABCG5和 ABCG8可将小肠上皮细胞内胆固醇转运至胞外、

抑制肠道内胆固醇过度吸收^[1]。

大蒜素, 即二烯丙基硫代亚磺酸酯, 是大蒜油中的主要成分。业已证明大蒜素具有抗动脉粥样硬化^[2]和调节血脂效应^[3-5]。Kojuri等^[4]报道, 大蒜素明显降低高脂血症病人血总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平, 但其降胆固醇的作用机制尚未阐明。本研究在肠道细胞 Caco-2细胞模型上观察大蒜素对肠道细胞内胆固醇排出及 ABCG5和 ABCG8表达的影响。

[收稿日期] 2010-07-08

[修回日期] 2010-08-28

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (09JJ6044)、湖南省教育厅课题 (07C617)

[作者简介] 赵战芝, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治, E-mail为 zhaozz99@126.com。胡艳, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治。宋砚明, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治。通讯作者王佐, 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, E-mail为 sn121101@163.com。

1 材料和方法

1.1 主要材料

大蒜素购自江苏正大清江制药有限公司; 胆固醇购自 Sigma公司; 油红 O, 牛磺胆酸钠和磷酸卵磷脂购自 Solarbio公司; 抗 ABCG5和 ABCG8抗体购自 Santa Cruz公司; 抗 β -actin 抗体、辣根过氧化物

酶标记的兔抗山羊和羊抗兔二抗、Western blotting 荧光检测试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 胆固醇混合微胶粒的制备

参照文献[6,7]的方法。先将牛磺胆酸酯溶于甲醇、磷酸卵磷脂和胆固醇溶于氯仿,然后以 50:1:10(W:W:W)的比例混合三者,冻干法干燥,再以无血清的高糖 DMEM 水化。水化后,37℃温育 2 h,0.45 μm 的滤膜过滤备用。

1.3 Caco-2细胞的培养及处理

参照文献[8]的方法将 Caco-2细胞置于培养瓶内,加入含有 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 培养基,在 37℃,5% CO₂ 培养箱中静置培养,每两天换一次培养基。待细胞形成具有生物屏障性质的融合层或数量符合要求时,即用于实验研究。随机分为 4组:(1)对照组仅用含有 10% 新生牛血清的高糖 DMEM 培养;(2)胆固醇微胶粒组:培养基中加入 1 mL 制备好的胆固醇微胶粒混合液培养 48 h 换新鲜培养基培养 20 h;(3)大蒜素组:培养基中加入 0.1 mL 大蒜素(浓度为 5 g/L)培养 48 h 换新鲜培养基培养 20 h;(4)胆固醇微胶粒+大蒜素处理组:培养基中加入 1 mL 胆固醇微胶粒混合液和 0.1 mL 大蒜素培养 48 h 换新鲜培养基培养 20 h。

1.4 高效液相色谱分析胆固醇

收集细胞培养上清,并用细胞裂解液裂解细胞,离心,取上清。然后分别吸取 100 μL 细胞培养上清和细胞裂解液,加入 200 μL 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液。加入豆甾醇作为内标。采用正己烷抽提、三氯化铬氧化衍生。真空干燥后,用 100 μL 异丙醇:乙腈(V/V 20:80)溶解样品,取 50 μL 上样于高效液相色谱仪。采用 C-18柱,柱温 4℃,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 μg/g 细胞蛋白为单位。胆固醇排出率 = 培养上清胆固醇 / (培养上清胆固醇 + 裂解液胆固醇)。

1.5 油红 O 染色

将 Caco-2细胞培养于 6孔培养板内,分组处理后,钙福尔马林固定 15 min,50% 异丙醇洗 1 s,油红 O 染色 20 min,苏木素染色 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。

1.6 免疫印迹法检测 Caco-2细胞 ABCG5和 ABCG8蛋白表达

收集细胞,提取细胞总蛋白,用 BCA 法进行蛋白质定量。取 50 μg 蛋白质加入 5×SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸使蛋白质变性。10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质,200 mA 2 h 将蛋白质转移至

PVDF膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入一抗 anti-ABCG5 (1:400)、anti-ABCG8 (1:500)、anti-β-actin (1:500),4℃ 过夜,TBST 洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗膜,然后用 Western blotting 荧光发光剂激发荧光,显示于 X 光片,显影、定影后进行图像分析。

1.7 统计学分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 14.0 进行统计处理,组间比较采用方差分析及 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大蒜素减少 Caco-2细胞内脂质含量

油红 O 染色各组细胞,结果显示 Caco-2细胞与胆固醇微胶粒孵育后,细胞内聚积大量红色脂滴(图 1B),而加用大蒜素处理后,细胞内脂滴较胆固醇微胶粒单独孵育组明显减少(图 1C)。大蒜素单独孵育组细胞内脂滴也较对照组减少(图 1D,1A)。

2.2 大蒜素促进 Caco-2细胞内胆固醇排出

与对照组细胞比较,经胆固醇微胶粒处理后,细胞内胆固醇含量明显增加。同时给予大蒜素处理后,细胞内胆固醇含量明显减少,而细胞外胆固醇含量明显增加,胆固醇排出率是胆固醇微胶粒单独处理组的 3.4 倍,差异具有显著性($P < 0.05$,表 1)。

表 1. 大蒜素对 Caco-2细胞胆固醇排出的影响(μg/mg 蛋白, $n = 5$)

分 组	细胞内胆固醇	培养上清胆固醇	胆固醇排出率
对照组	46 ± 11	6 ± 2	11.54%
胆固醇微胶粒组	397 ± 43 ^a	105 ± 28 ^a	20.92% ^a
胆固醇微胶粒 + 大蒜素组	147 ± 21 ^{ab}	348 ± 28 ^{ab}	70.30% ^{ab}
大蒜素组	21 ± 4	28 ± 6	57.14%

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与胆固醇微胶粒组比较。

2.3 大蒜素增加 Caco-2细胞 ABCG5和 ABCG8蛋白表达

胆固醇微胶粒能上调细胞 ABCG5和 ABCG8蛋白表达,而大蒜素无论单独还是与胆固醇微胶粒共育细胞,均能显著上调细胞 ABCG5和 ABCG8蛋白表达($P < 0.05$,图 2和表 2)。

3 讨论

机体每天从饮食中摄取胆固醇,其中 50% ~ 60% 的膳食胆固醇经小肠吸收。因此,机体维持胆固醇代谢平衡的重要途径是减少肠道对胆固醇的吸

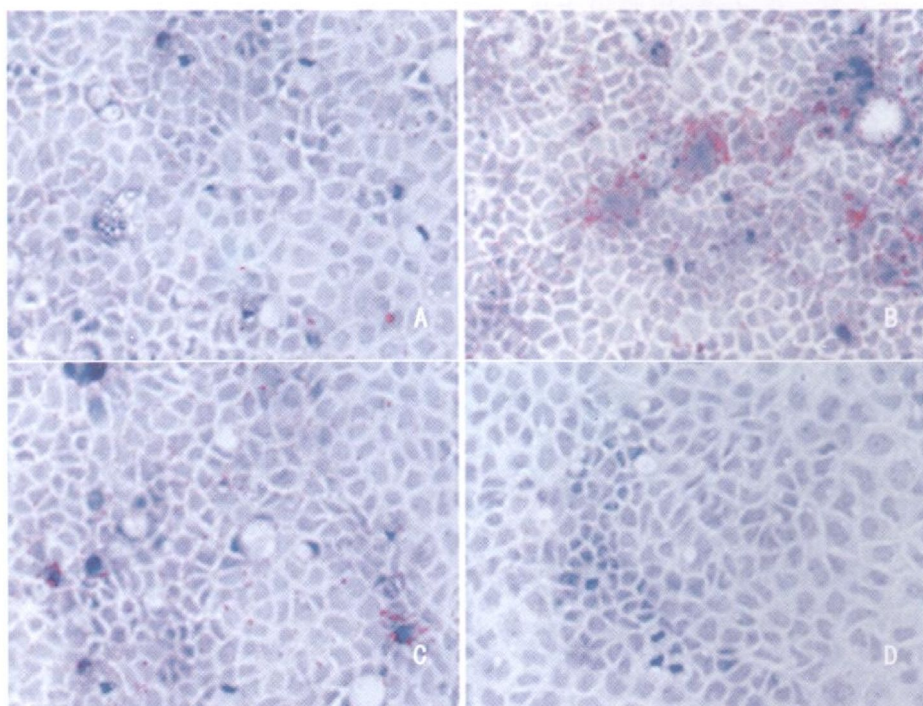


图 1 大蒜素对 Caco-2 细胞内脂质蓄积的影响 A 为对照组, B 为胆固醇微胶粒组, C 为胆固醇微胶粒 + 大蒜素组, D 为大蒜素组。

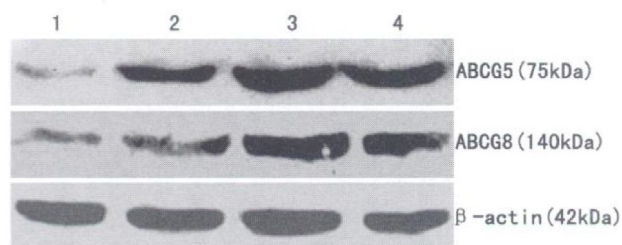


图 2 大蒜素对 Caco-2 细胞中 ABCG5 和 ABCG8 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为胆固醇微胶粒组, 3 为胆固醇微胶粒 + 大蒜素组, 4 为大蒜素组。

表 2 大蒜素对 Caco-2 细胞中 ABCG5 和 ABCG8 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	ABCG5/ β -actin	ABCG8/ β -actin
对照组	0.127 \pm 0.025	0.153 \pm 0.031
胆固醇微胶粒组	0.353 \pm 0.055 ^a	0.397 \pm 0.025 ^c
胆固醇微胶粒 + 大蒜素组	0.557 \pm 0.080 ^{bd}	0.600 \pm 0.125 ^{bd}
大蒜素组	0.443 \pm 0.067 ^b	0.467 \pm 0.051 ^a

a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.001$, c 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; d 为 $P < 0.05$ 与胆固醇微胶粒组比较。

收。研究发现大蒜素饲喂明显减少 apo E-/- 小鼠主动脉斑块面积^[2]。高胆固醇血症是动脉粥样硬化

的独立危险因素。进一步的研究发现,大蒜素明显降低高脂血症病人及动脉粥样硬化小鼠总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平^[4,5],表明大蒜素可通过降低血胆固醇水平而防止动脉粥样硬化的发生发展。但大蒜素降低血胆固醇水平的机制尚未阐明。Caco-2 细胞是人结肠腺癌细胞,培养成熟的 Caco-2 细胞可以形成致密的单细胞层组织,分化出细胞绒毛面和基底面,类似于小肠上皮细胞。Cai 等^[7]曾以 Caco-2 细胞为模型研究胆固醇吸收和排出。本室也曾采用 Caco-2 细胞为模型观察胆固醇排出及 ABCG5 和 ABCG8 表达^[9]。本研究建立 Caco-2 单细胞层,观察大蒜素对 Caco-2 细胞胆固醇排出的影响及机制。通过实验发现大蒜素显著促进 Caco-2 细胞内胆固醇排出、降低细胞内脂滴和胆固醇水平,上调 ABCG5 和 ABCG8 表达。

ABCG5 和 ABCG8 是 ABC 超家族 G 亚家族成员,属于跨膜转运蛋白,表达于小肠的绒毛膜和肝,参与调节小肠对胆固醇的吸收和肝脏对固醇的分泌^[1]。在体实验显示,过表达 ABCG5 和 ABCG8 可减少肠道胆固醇吸收、增加胆固醇从胆汁分泌,缩小主动脉粥样斑块面积^[10]。体外实验发现,培养细胞过表达 ABCG5 和 ABCG8 可增加细胞内固醇排出到细胞外^[11]。上述结果表明,上调 ABCG5 和 ABCG8

表达或增强其功能活性,可减少小肠对胆固醇的吸收,防止血胆固醇水平升高。Ikeda等^[12]报道大豆蛋白增加 ABCG5和 ABCG8表达,降低大鼠血清和肝脏的胆固醇水平。本研究结果显示胆固醇微胶粒明显增加 Caco-2细胞内胆固醇含量,并一定程度增加 Caco-2细胞 ABCG5和 ABCG8表达。胆固醇负荷可诱导细胞产生 ABCA1^[13]。因此推测胆固醇微胶粒组 ABCG5和 ABCG8的表达可能与细胞内胆固醇水平增加而代偿性上调相关。而大蒜素较胆固醇微胶粒更显著增加 Caco-2细胞 ABCG5和 ABCG8表达,增加细胞内胆固醇排出率、降低细胞内胆固醇含量。除此,大蒜素单独孵育也明显增加 Caco-2细胞 ABCG5和 ABCG8表达,进一步证实了大蒜素上调 ABCG5和 ABCG8的效应,且其不受细胞内胆固醇含量的影响。目前,大蒜素促进 Caco-2细胞 ABCG5和 ABCG8表达的机制尚未阐明,需进一步研究。

总之,现在的结果表明,大蒜素通过上调 Caco-2细胞 ABCG5和 ABCG8表达,促进细胞内胆固醇排出,降低细胞内胆固醇含量,可能是其防治高胆固醇血症的重要机制。

[参考文献]

- [1] Matsuo M. ATP-binding cassette proteins involved in glucose and lipid homeostasis [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010 **74** (5): 90-92-929
- [2] Gonen A, Harats D, Rabinkov A, et al. The antiatherogenic effect of all-cis: possible mode of action [J]. *Pathobiology*, 2005 **72** (6): 325-

334

- [3] Sobenin A, Andrianova N, Demilova ON, et al. Lipid-lowering effects of time-released garlic powder tablets in double-blinded placebo-controlled randomized study [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2008 **15** (6): 334-338
- [4] Kojuri J, Vosoughi AR, Akrami M. Effects of anethum graveolens and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients [J]. *Lipids Health Dis*, 2007 **6** (1): 1-5
- [5] 李睿坤, 李继锋, 周晓莹, 等. 大蒜素对动脉粥样硬化小鼠血脂代谢的影响 [J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2007 **1** (1): 29-33
- [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] Cai L, Eckhardt ER, Shi W, et al. Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells [J]. *J Lipid Res*, 2004 **45** (2): 253-262
- [8] Hidalgo LJ, 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
- [9] 王佐, 胡艳, 宋砚明, 等. 苦瓜蛋白 MD28对 Caco22细胞胆固醇排出及 ABCG5和 ABCG8表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009 **17** (10): 811-814
- [10] Wilund KR, Yu L, Xu F, et al. High-level expression of ABCG5 and ABCG8 attenuates diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice [J]. *J Lipid Res*, 2004 **45** (8): 1429-436
- [11] Tachibana S, Hirano M, Hirata T, et al. Cholesterol and plant sterol efflux from cultured intestinal epithelial cells is mediated by ATP-binding cassette transporters [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007 **71** (8): 1886-895
- [12] Ikeda I, Kudo M, Hanada T, et al. Dietary soy protein isolate and its undigested high molecular fraction upregulate hepatic ATP-binding cassette transporter G5 and ATP-binding cassette transporter G8 mRNA and increase biliary secretion of cholesterol in rats [J]. *J Nutr Sci Vitam inol (Tokyo)*, 2009 **55** (3): 252-256
- [13] Oram JF, Lawn RM. ABCA1: the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol [J]. *J Lipid Res*, 2001 **42** (8): 1173-1179

(此文编辑 李玲玲)