

荷叶生物碱对 THP-1 单核细胞源性巨噬细胞泡沫化及 B 类 I 型清道夫受体表达的影响

常冠楠¹, 徐新², 张社兵²

(1. 潍坊市益都中心医院, 山东省青州市 262500; 2. 广东省粤北人民医院, 广东省韶关市 512000)

[关键词] 荷叶生物碱; 单核细胞株 THP-1; 氧化型低密度脂蛋白; B 类 I 型清道夫受体

[摘要] **目的** 观察荷叶生物碱对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)所致人 THP-1 巨噬细胞泡沫化及 B 类 I 型清道夫受体(SR-B I)表达的影响,探讨荷叶生物碱抗动脉粥样硬化的可能机制。**方法** 建立 THP-1 源性泡沫细胞模型后,采用不同剂量荷叶生物碱(0、25、50、100 mg/L)分组共孵育 24 h。油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积情况;分别用荧光定量 PCR、Western Blot 检测细胞中 SR-B I mRNA 水平和蛋白水平。**结果** 与空白对照组比较,ox-LDL 对细胞内脂滴积聚呈浓度依赖性;且细胞 SR-B I 的 mRNA 水平(分别为 1.00 ± 0.00 、 0.53 ± 0.04 、 0.30 ± 0.04 和 0.18 ± 0.03)及蛋白表达(分别为 1.00 ± 0.00 、 0.62 ± 0.10 、 0.39 ± 0.08 和 0.22 ± 0.05)呈浓度依赖性降低($P < 0.01$);加入荷叶生物碱干预后,细胞内脂滴随荷叶生物碱浓度的增加而减少,细胞 SR-B I mRNA 水平(分别为 0.32 ± 0.02 、 1.07 ± 0.02 、 1.28 ± 0.03 和 1.49 ± 0.03)及蛋白表达(分别为 0.28 ± 0.03 、 1.06 ± 0.02 、 1.32 ± 0.03 和 1.41 ± 0.02)浓度依赖性增加($P < 0.01$)。**结论** 荷叶生物碱上调人 THP-1 单核细胞源性泡沫细胞 SR-B I 的表达,促进细胞内胆固醇流出,可能是荷叶生物碱抗动脉粥样硬化的机制之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Nuciferine on SR-B I Expression and Foam Formation of Human THP-1 Derived Macrophage

CHANG Guan-Nan¹, XU Xin², and ZHANG She-Bing²

(1. Weifang Yidu Central Hospital, Qingzhou, Shandong 262500; 2. Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512000, China)

[KEY WORDS] Nuciferine; Monocyte Lines THP-1; Oxidized Low Density Lipoprotein; Scavenger Receptor Class B Type I

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of nuciferine on scavenger receptor class B type I (SR-B I) expression and foam formation in human THP-1 derived macrophage induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), and probe the possible mechanism of nuciferine in anti-atherosclerosis. **Methods** After the establishment of monocyte lines THP-1-derived foam cell, these foam cells were treated with nuciferine at different concentrations (0, 25, 50, 100 mg/L) for 24 h. The effect of nuciferine on foam cell was observed by oil red O staining; the levels of SR-B I mRNA and protein were measured by RT-PCR and Western Blot, respectively. **Results** Compared with control group, lipid droplets was increased while mRNA (1.00 ± 0.00 , 0.53 ± 0.04 , 0.30 ± 0.04 , 0.18 ± 0.03) and protein (1.00 ± 0.00 , 0.62 ± 0.10 , 0.39 ± 0.08 , 0.22 ± 0.05) expression of SR-B I were downregulated in ox-LDL groups in a dose-dependent manner ($P < 0.01$); after the intervention of nuciferine, lipid droplets was decreased while mRNA (0.32 ± 0.02 , 1.07 ± 0.02 , 1.28 ± 0.03 , 1.49 ± 0.03) and protein (0.28 ± 0.03 , 1.06 ± 0.02 , 1.32 ± 0.03 , 1.41 ± 0.02) expression of SR-

[收稿日期] 2011-08-31

[基金项目] 广东省科技计划项目(2009B030801066)和韶关科技计划项目[韶科(卫)2009-01]

[作者简介] 常冠楠, 硕士, 医师, 研究方向为冠状动脉粥样硬化, 原工作于广东省粤北人民医院, 现工作于山东省潍坊市益都中心医院。通讯作者徐新, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 在冠心病、高血压病等心血管疾病的诊断治疗方面有较深的造诣, 专长于心脏起搏器安装、冠状动脉支架术、二尖瓣狭窄球囊扩张、快速心律失常射频消融术等心脏介入手术。张社兵, 博士, 副主任医师, 从事心血管内科专业十余年, 熟悉各种心血管疾病的诊治, 尤其擅长各种心律失常的治疗以及心肌电生理、射频消融和心脏起搏器安置。

B I were upregulated in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusion** Nuciferine upregulates SR-B I expression in THP-1 derived macrophages, lessen the degree of foam formation. We probe that this may be the possible mechanism of nuciferine in anti-atherosclerosis.

在诸多发病因素中,血清低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)水平的升高是惟一不需要其他危险因素协同而足以诱发和推进动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生、发展的危险因素。正常情况下,胆固醇的代谢平衡依赖胆固醇的合成及胆固醇的逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)过程的动态平衡,此过程的关键步骤均需B类I型清道夫受体(scavenger receptor class B type I, SR-B I)的参与。SR-B I是第一个得到确证的高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)受体,其生物学功能主要为介导外周细胞脂质流出、肝细胞脂质转运、参与RCT从而具有抗As的作用。SR-B I的表达受应激、饮食、激素、代谢和药物等一系列因素的调节。越来越多的研究者将其视为一个药物靶点,通过干预SR-B I的表达,延缓甚至阻止As的发生发展。荷叶生物碱是一类碱性含氮化合物,目前国内研究表明荷叶水提物能降低高脂血症患者的总胆固醇、甘油三酯、LDL胆固醇水平,并且能显著升高血中HDL胆固醇的水平,从而起到抗As的作用^[1]。但荷叶生物碱作用于细胞胆固醇代谢的具体途径或机制未明。本研究旨在通过观察荷叶生物碱对人THP-1单核细胞源性巨噬细胞泡沫化和SR-B I表达的影响,以探讨荷叶生物碱在抗As中的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人THP-1细胞株购自中科院上海细胞生物所细胞中心;RPMI1640培养基(Gibco公司),胎牛血清(Hyclone公司),氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)(广州奕源生物科技有限公司),佛波酯(PMA)(北京百灵威生物科技有限公司),荷叶生物碱(中国药品生物制品检定所);总RNA提取试剂盒(天根生物工程有限公司),M-MLV试剂盒和实时荧光定量PCR试剂盒(Invitrogen公司),RIPA裂解液(中)和BCA蛋白含量测定试剂盒(碧云天生物技术研究所);兔抗人SR-B I和 β -actin多克隆抗体一抗(Abcam公司),鼠抗兔SR-B I多克隆抗体二抗和羊抗兔 β -actin多克隆抗体二抗(Santa Cruz公司);高速台式冷冻离心机Centrifuge 5417R(德国Eppendorf

公司)。

1.2 THP-1 细胞的培养及分化

人THP-1单核细胞生长于含10%胎牛血清、 1×10^8 U/L青霉素的RPMI1640完全培养基中,置37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱内培养,每3天换液1次,每周传代1次,传至2~3代用于实验。取对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 2×10^6 个/孔,接种于6孔培养板,每孔2 mL。用含80 ng/L PMA的RPMI1640培养基培养24 h,使单核细胞分化为巨噬细胞^[2],用于后续实验。

1.3 实验分组

(1)不同浓度ox-LDL刺激实验:将细胞分别用含不同浓度[0(空白对照组)、25、50和100 mg/L]ox-LDL的RPMI1640培养基共同孵育24 h。(2)荷叶生物碱干预实验:①空白对照组:THP-1细胞与RPMI1640培养基培养24 h;②ox-LDL刺激组:细胞与含50 mg/L ox-LDL的RPMI1640培养基共同孵育48 h;③不同浓度荷叶生物碱干预组:以50 mg/L ox-LDL预处理24 h后,以不同浓度(25、50和100 mg/L)荷叶生物碱干预24 h。

1.4 油红O染色观察细胞内脂质蓄积

将培养细胞的6孔培养板内液体轻轻吸去,用PBS洗3次,10%中性甲醛溶液固定30 min;油红O染色液染色10 min;PBS冲洗3次脱色;显微镜下观察细胞内脂质呈红色,图像分析系统收集图像并于显微镜下摄像保存。

1.5 实时荧光定量PCR检测SR-B I mRNA表达

按Trizol试剂盒说明书操作步骤提取总RNA,每组取1 μ g总RNA建立20 μ L的反应体系以用于逆转录。所用引物由上海英潍捷基生物公司合成。人SR-B I mRNA引物为上游5'-CTGTGGGT-GAGATCATGTGG-3',下游5'-GCCAGAAGTCAAC-CTTGCTC-3',扩增片长216 bp;人 β -actin引物为上游5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3',下游5'-GGGCACGAAGGC TCA TCA TT-3',扩增片长285 bp。SR-B I和 β -actin均按如下条件进行PCR(荧光定量PCR仪ABI 7300):50℃预变性2 min,95℃变性2 min,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共45个循环(β -actin 40个循环),最后72℃延伸10 min。反应结束后,收集数据,采取 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析,将实验组数据与对照组相比作为SR-B I

mRNA 相对表达量。实验重复 3 次。

1.6 Western Blot 检测 SR-B I 蛋白表达

收集不同条件处理的细胞,RIPA 裂解液(中)裂解细胞,BCA 法测定细胞总蛋白浓度,以 50 μg 总蛋白量上样于 10% SDS-PAGE,电转移(300 mA 2 h)至 PVDF 膜上,依次孵育一抗和二抗后用 Western 印迹荧光检测试剂盒(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)显影于 X 线片。将胶片进行扫描,用凝胶图象处理系统(Quantity One 软件)分析条带的灰度值。以对照组的面积灰度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,全部数据经方差齐性分析后,采用单因素方差分析,组间比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

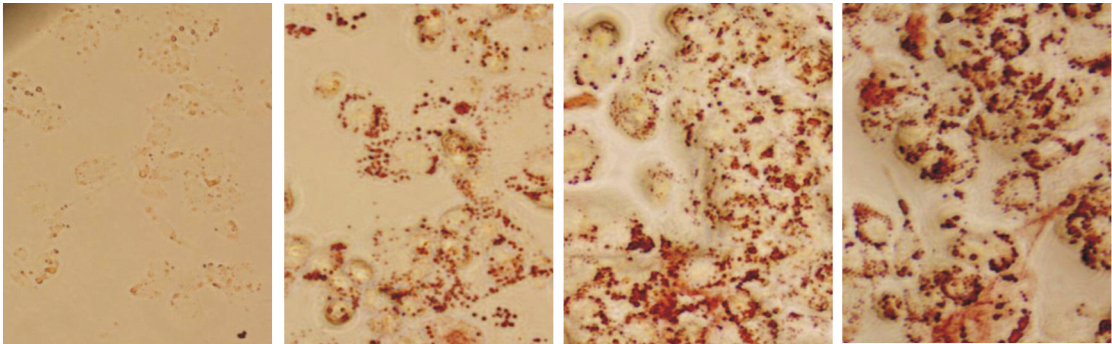


图 1. ox-LDL 对人 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化程度的影响 (油红 O 染色,400 ×) 从左到右依次为 0、25、50、100 mg/L ox-LDL 组。

Figure 1. Changes of cellular characteristics from macrophages into foam cells influenced by ox-LDL

表 1. ox-LDL 对 THP-1 源性巨噬细胞 SR-B I mRNA 和蛋白表达的影响 (n = 3)

Table 1. Effects of ox-LDL on the expression of SR-B I mRNA and protein in human THP-1 derived macrophage

ox-LDL 浓度 (mg/L)	SR-B I mRNA	SR-B I 蛋白
0 (空白对照组)	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
25	0.53 ± 0.04 ^a	0.62 ± 0.10 ^a
50	0.30 ± 0.04 ^{ab}	0.39 ± 0.08 ^{ab}
100	0.18 ± 0.03 ^{abc}	0.22 ± 0.05 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 25 mg/L ox-LDL 组比较;c 为 $P < 0.01$,与 50 mg/L ox-LDL 组比较。

2.3 荷叶生物碱对 THP-1 巨噬细胞泡沫化程度及 SR-B I 表达的影响

选择 50 mg/L ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细

2 结 果

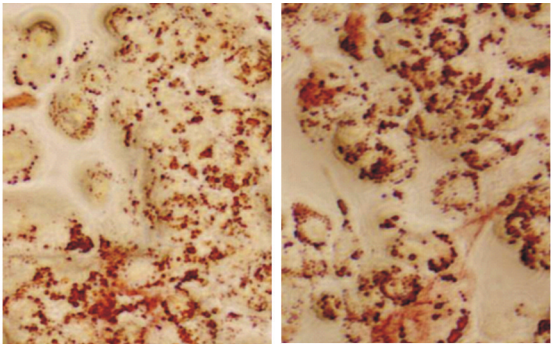
2.1 细胞培养及分化

人 THP-1 单核细胞经 PMA 诱导分化 24 h 后,倒置显微镜下观察发现细胞形状由圆形变为梭形、椭圆形或不规则形并有伪足伸出,且轻轻晃动细胞不随液体浮动,证明细胞已由悬浮状态变为贴壁状态,并证实 THP-1 细胞已分化为巨噬细胞。

2.2 ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞泡沫化程度及 SR-B I 表达的影响

油红 O 染色可观察到;ox-LDL 刺激组细胞内脂质蓄积较空白对照组明显增多,脂滴颗粒体积变大,且 ox-LDL 刺激细胞泡沫化有浓度依赖性特征(图 1)。

以不同浓度(0、25、50、100 mg/L) ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞 24 h,SR-B I mRNA 的表达水平,随着 ox-LDL 浓度的递增,呈浓度依赖性降低($P < 0.01$)。同样条件下,细胞 SR-B I 蛋白的表达水平也呈浓度依赖性降低($P < 0.01$;表 1 和图 2)。



胞,油红 O 染色显示细胞脂质蓄积明显增加,在不同浓度的荷叶生物碱干预下,细胞内脂滴明显减少、体积变小,且这种变化呈荷叶生物碱浓度依赖性。说明荷叶生物碱可减少 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化进程(图 3)。

图 2. ox-LDL 对 THP-1 源性巨噬细胞 SR-B I 蛋白表达的影响 1~4 依次为 0、25、50、100 mg/L ox-LDL 组。

Figure 2. Expression of SR-B I protein influenced by ox-LDL in human THP-1 derived macrophage

以 50 mg/L ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞

24 h,并以不同浓度(0、25、50、100 mg/L)的荷叶生物碱干预,结果表明,SR-B I mRNA 的表达均较 ox-LDL 刺激组细胞明显上调($P < 0.001$),并具有明显

浓度依赖性($P < 0.01$);同样条件下,细胞 SR-B I 蛋白的表达也呈荷叶生物碱浓度依赖性上调($P < 0.01$;表 2 和图 4)。

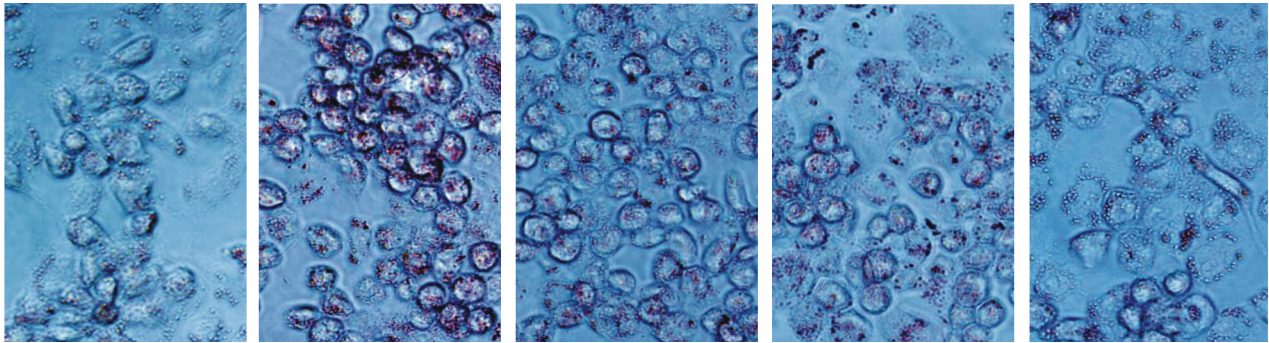


图 3. 荷叶生物碱对人 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化程度的影响(油红 O 染色,300 ×) 从左到右依次为空白对照组、ox-LDL 刺激组及 25、50 和 100 mg/L 荷叶生物碱干预组。

Figure 3. Changes of cellular characteristics from macrophages into foam cells influenced by nuciferine

表 2. 荷叶生物碱对 THP-1 源性巨噬细胞 SR-B I mRNA 和蛋白表达的影响($n = 3$)

分 组	SR-B I mRNA	SR-B I 蛋白
空白对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
ox-LDL 刺激组	0.32 ± 0.02 ^a	0.28 ± 0.03 ^a
25 mg/L 荷叶生物碱干预组	1.07 ± 0.02 ^{ab}	1.06 ± 0.02 ^{ab}
50 mg/L 荷叶生物碱干预组	1.28 ± 0.03 ^{ab}	1.32 ± 0.03 ^{ab}
100 mg/L 荷叶生物碱干预组	1.49 ± 0.03 ^{ab}	1.41 ± 0.02 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.001$,与 ox-LDL 刺激组比较。

慢演变为不稳定性斑块,最终引起危重的心脑血管事件。既往研究表明,血清胆固醇水平的升高与 As 的发生呈正相关^[3],其代谢程度主要取决于胆固醇摄取及 RCT 过程的平衡。在目前对脂质代谢的研究中,ox-LDL 由于其受体(清道夫受体 A 类、B 类中的 CD36 等)不被细胞内胆固醇浓度负反馈抑制^[4],可以在细胞内无限制蓄积,被认为是 As 最危险的致病因子之一。此外,ox-LDL 还可以通过巨噬细胞吸引和停滞、细胞毒性、介导心血管壁慢性炎症损伤等机制促进 As 的发生发展。既往研究表明,ox-LDL 可剂量依赖性下调巨噬细胞 SR-B I 表达^[5],促进巨噬细胞内胆固醇蓄积,导致细胞泡沫化,这是 ox-LDL 最终致 As 的机制之一。本研究结果也再次印证了这一点。

而在脂质代谢途径中 SR-B I 扮演了非常重要的角色,主要表现为促进外周细胞胆固醇的流出和肝细胞胆固醇的摄取^[6]。人类流行病学资料显示,肝脏 SR-B I 表达水平与 As 呈负相关;小鼠肝脏中 SR-B I 的下调或过表达会分别导致肝脏摄取 HDLC 明显减少或增多^[7]。本研究发现,通过药物干预增加 SR-B I 的表达,可以减轻巨噬细胞泡沫化程度,推测对 As 的发生发展能够起到一定的预防和治疗作用。

目前关于荷叶生物碱的研究,国外少有涉及,国内一些学者对其药理作用进行了一系列研究,证实了荷叶生物碱调脂^[8]、降血压、抗菌、抗病毒、清除自由基、抗氧化^[9]、抗衰老等作用。但其相关研究多限于人体实验和动物实验水平,在细胞水平上

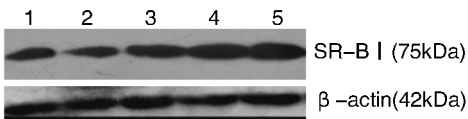


图 4. 荷叶生物碱对 THP-1 源性巨噬细胞 SR-B I 蛋白表达的影响 1 ~ 5 依次为空白对照组、ox-LDL 刺激组及 25、50 和 100 mg/L 荷叶生物碱干预组。

Figure 4. Expression of SR-B I protein influenced by nuciferine in human THP-1 derived macrophage

3 讨 论

As 是一个多因素导致的复杂疾病,除动脉壁内皮损伤外,脂质沉积是目前公认的 As 始动因素。沉积的脂质进一步加重吞噬细胞的黏附、血小板的聚集和炎性反应因子的释放,使纤维帽渐渐变薄,慢

的研究仍处于空白。本实验通过在细胞水平上的研究,发现荷叶生物碱可通过增加 THP-1 源性巨噬细胞 SR-B I 的表达,促进外周组织胆固醇的转运而发挥调控细胞内脂质代谢的作用,并推测这是荷叶生物碱抗 As 作用途径之一。荷叶生物碱是通过多种酶或受体发挥作用的,且在外周细胞和肝细胞之间又有不同的作用,其药理机制的阐明仍需进一步完善,其临床疗效也有待验证。荷叶生物碱来源广泛,价格低廉,药理作用多样,相信随着对其研究的不断深入,一定会有广阔的发展前景。

[参考文献]

[1] 关章顺, 吴俊, 喻泽兰, 等. 荷叶胶囊对人体血脂异常的调脂作用研究[J]. 心血管康复医学杂志, 2003, 12(4): 294-297.

[2] 曾颖, 谭玉林, 易光辉, 等. 阿托伐他汀对 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积及 CD36 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(10): 729-731.

[3] Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis[J]. Nature, 2002, 417: 750-754.

[4] Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury[J]. Trends Cardiovasc Med, 2007, 17(2): 48-54.

[5] Han J, Nicholson AC, Zhou X, et al. Oxidized low density lipoprotein decreases macrophage expression of scavenger receptor B-I [J]. J Biol Chem, 2001, 276(19): 16567-572.

[6] Niemeier A, Kovacs WJ, Strobl W, et al. Atherogenic diet leads to posttranslational downregulation of murine hepatocyte SR-BI expression [J]. Atherosclerosis, 2009, 202(1): 169-175.

[7] Pahofer KG. Beyond LDL-cholesterol: HDL-cholesterol as a target for atherosclerosis prevention [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2005, 113(8): 414-417.

[8] 涂长春, 李晓宇, 杨军平, 等. 荷叶生物总碱对肥胖高脂血症大鼠减肥作用的实验研究[J]. 江西中医学院学报, 2001, 13(3): 120-121.

[9] Lin HY, Kuo YH, Lin YL, et al. Antioxidative effect and active components from leaves of Lotus (Nelumbo nucifera) [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(15): 6623-629.

(此文编辑 许雪梅)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

作者声明

发表在我刊 2012 年第 20 卷第 3 期第 235 ~ 238 页《^{99m}Tc 标记抗心肌钙蛋白 T 单抗在急性心肌损伤大鼠模型中的生物学分布》一文,为广东省科技计划项目(2009B030801207)。