

薯蓣皂苷元对 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 表达及胆固醇流出的影响

吕运成^{1,2}, 王佐¹, 姚峰¹, 谢巍^{1,2}, 唐艳艳¹, 欧阳宇甲², 唐朝克¹
(南华大学医学院 1. 心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 生命科学研究中心;
2. 临床应用解剖研究室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 薯蓣皂苷元; ATP 结合盒转运体 A1; 巨噬细胞; 胆固醇流出

[摘要] **目的** 探讨薯蓣皂苷元(Dgn)对巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1(ABCA1)表达及其介导胆固醇流出的影响。**方法** 用 Dgn 或结合 ABCA1 小干扰 RNA(siRNA)处理 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 后, Western blot 检测 ABCA1 蛋白水平, HPLC 检测胞内总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)及胆固醇酯(CE)含量, 液体闪烁计数器检测胞内胆固醇流出, 油红 O 染色观察胞内脂滴情况。**结果** Dgn 呈浓度依赖性上调巨噬细胞 ABCA1 的表达, 促进胞内胆固醇流出, 降低胞内 TC、FC 和 CE 含量, 抑制胞内脂质蓄积和泡沫细胞形成。而 ABCA1 siRNA 与 Dgn 共处理细胞后, 明显抑制 Dgn 促胆固醇流出作用, 胞内脂质蓄积和泡沫细胞形成明显加剧。**结论** Dgn 通过促进巨噬细胞 ABCA1 表达和胆固醇流出, 抑制胞内脂质蓄积和泡沫细胞形成。

[中图分类号] R96 [文献标识码] A

Effect of Diosgenin on ABCA1 Expression and Cholesterol Efflux in THP-1-derived Macrophage

LV Yun-Cheng^{1,2}, WANG Zuo¹, YAO Feng¹, XIE Wei^{1,2}, TANG Yan-Yan¹, OU-YANG Yu-Jia², and TANG Chao-Ke¹
(1. Institute of Cardiovascular Research & Life Science Research Center; 2. Laboratory of Clinical Anatomy, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Diosgenin; ABCA1; Macrophage; Cholesterol Efflux

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of diosgenin (Dgn) on ABCA1 expression and cholesterol efflux in THP-1 derived macrophage. **Methods** ABCA1 expression was detected by Western blot. Cholesterol efflux was detected with liquid scintillator; intracellular total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and cholesterol ester (CE) were determined with HPLC; and intracellular lipid droplet was stained with oil red O in THP-1-derived macrophage treated with Dgn, alone or in combination with ABCA1 siRNA. **Results** Dgn upregulated macrophage ABCA1 expression in dose-dependent manner. Dgn obviously facilitated macrophage cholesterol efflux, resulting in a decrease in intracellular level of TC, FC, CE and lipid droplet, and the foam cell formation. However, the action of Dgn-facilitating cholesterol efflux was almost entirely abrogated in THP-1 derived macrophage cocultured with ABCA1 siRNA, causing excessive lipid accumulation and increase formation of foam cells. **Conclusion** Dgn promotes macrophage ABCA1 expression and cholesterol efflux, which suppresses intracellular lipid accumulation and foam cell formation.

薯蓣皂苷元(diosgenin, Dgn)是多种治疗心血管疾病药物中含有的有效成分,广泛存在于薯蓣科、百合科、豆科等植物中。它有抗炎、抗氧化、降脂、抗心血管系统疾病等作用,具有广泛的应用前景^[1-2]。

Dgn 具有调节体内胆固醇代谢作用。文献报道

Dgn 通过竞争性与胆汁酸作用而抑制胆固醇的吸收^[1]。肠内 Dgn 吸收后进入肝脏,通过上调肝细胞 ATP 结合盒转运体 G5(ATP-binding cassette transporter G5, ABCG5)、ATP 结合盒转运体 G8(ATP-binding cassette transporter G8, ABCG8)和 Caveolin-1 的表达,加速胆固醇分泌到胆管内^[2-4]。Dgn 喂养的

[收稿日期] 2014-4-28

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(14JJ2091);湖南省教育厅资助科研项目(12C0339)

[作者简介] 吕运成,硕士,博士研究生,讲师,研究方向为动脉粥样硬化的病因及发病学,E-mail 为 anthony0723@163.com。通讯作者唐朝克,博士,教授,研究方向为动脉粥样硬化的病因及发病学,E-mail 为 tangchaoke@qq.com。

小鼠血浆高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平升高, 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平降低, 粪便内固醇含量显著增加, 肝细胞脂质含量明显减少^[5]。临床实验证明薯蓣皂苷片明显降低血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、TG、低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白含量, 减轻动脉壁脂质浸润及斑块形成^[1]。

鉴于 ATP 结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 在巨噬细胞胆固醇代谢和抑制动脉粥样硬化进展中的重要作用^[6-11], 目前有关 Dgn 对 ABCA1 表达和巨噬细胞胆固醇代谢的影响鲜有报道。在本研究中, 我们将观察 Dgn 对人 THP-1 源性巨噬细胞 ABCA1 表达及胆固醇流出的影响, 探讨 Dgn 对外周巨噬细胞胆固醇代谢的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与处理

THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养, 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中静置培养。实验前 THP-1 细胞需用 160 nmol/L 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 孵育细胞 24 h, 诱导其分化成巨噬细胞。处理前所有细胞换用含 2 g/L 牛血清白蛋白的 RPMI 1640 培养液, 同时加入 50 mg/L ox-LDL 或 1 mCi/L [³H]胆固醇共孵育。

1.2 Dgn 贮存液配制与稀释

原粉为美国 Sigma 公司产品, 按照说明书要求, 溶于酒精中配制成 100 mmol/L 的贮存液, 不用过滤, 无菌分装, -80℃ 保存备用。工作液中酒精浓度 0.5%。分组实验时, 无菌吸取贮存液加入培养液中, 稀释为 10、20、40、80 μmol/L。

1.3 Western blot 检测 ABCA1 蛋白

THP-1 细胞用 PMA 诱导分化为巨噬细胞后, 用 50 mg/L ox-LDL 诱导形成泡沫细胞, 分为 5 组: (1) 空白对照组, 培养液中不加入 Dgn; (2) 10 μmol/L 组: 培养液中加入 10 μmol/L Dgn; (3) 20 μmol/L 组: 培养液中加入 20 μmol/L Dgn; (4) 40 μmol/L 组: 培养液中加入 40 μmol/L Dgn; (5) 80 μmol/L 组: 培养液中加入 80 μmol/L Dgn。24 h 后收集处理的细胞, 加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 4℃ 离心 10 min, 弃去沉淀。以 4:1 加入 5×SDS 凝胶加样缓冲液, 100℃ 加热 10 min。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 12 V 恒压半干转膜 45 min 后,

丽春红染色 5 min 观察转膜效果。5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 按 1:1000 加入羊抗人 ABCA1 一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 1:1000 加入辣根过氧化物酶标记的小鼠抗羊二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 用 Tanon 5500 免疫荧光检测系统激发荧光, Tanon MP 软件摄取图像, Tanon CAL 软件分析获取各条带的光密度值。

1.4 小分子干扰 RNA 的转染

预先设计人 ABCA1 的小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 序列: ABCA1 sense: 5'-GGAUUUUUUGCUCAGAUUGtt-3', antisense: 5'-CAAUCUGAGCAAAAAAUCCTT-3'。用 Lipofecta-mine™ 2000 转染试剂将 siRNA 转染至荷脂 THP-1 巨噬细胞 (2 × 10⁶ cells/well)。具体操作严格按试剂盒说明书进行。

1.5 液体闪烁计数法检测胞内胆固醇流出

THP-1 细胞用 24 孔板培养, 用 PMA 诱导分化为巨噬细胞后, 用 PBS 液洗涤细胞, 同时加入 50 mg/L ox-LDL 和 1 mCi/L [³H]胆固醇孵育标记 24 h, 用 PBS 洗涤细胞, 再用含 2 g/L 牛血清白蛋白 RPMI 1640 培养液培养细胞 24 h。将细胞分为 3 组: (1) Con 组: 空白对照, 培养液中不加入 Dgn 与 ABCA1 siRNA; (2) Dgn 组: 培养液中加入 40 μmol/L Dgn; (3) Dgn + ABCA1 siRNA 组: 培养液中加入 40 μmol/L Dgn 并转染 40 nmol/L ABCA1 siRNA; 24 h 后再用 PBS 液洗涤细胞, 重悬于 10 mg/L apoA1 的新鲜培养基孵育 12 h, 用闪烁计数法分别检测培养液和细胞的 [³H]胆固醇, 胆固醇流出用培养液 CPM 除以总 CPM (培养液 CPM + 细胞 CPM), 再乘以 100% 来表示 [CPM: 每分钟记数 (counts per minute)]。

1.6 高效液相色谱 (HPLC) 检测胞内胆固醇水平

按照本课题组之前方法进行^[12-13]。将细胞如上分 3 组处理后, 用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 测量 THP-1 源性巨噬细胞内的 TC、胆固醇酯 (cholesterol ester, CE) 和游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 含量, 结果以内标校准, 计算峰面积后, 以细胞蛋白 (单位 mg/g) 做统计分析, 并计算胆固醇酯与总胆固醇的比值。

1.7 油红 O 染色

取无菌 6 孔培养板, 每孔均放入消毒盖玻片, 加 THP-1 细胞悬液 2 mL/孔, 分别用 PMA 和 ox-LDL 诱导形成 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞, 将其细胞分为 3 组: (1) Con 组: 空白对照, 培养液中不加入 Dgn 与 ABCA1 siRNA; (2) Dgn 组: 培养液中加入 40 μmol/L Dgn; (3) Dgn + ABCA1 siRNA 组: 培养液中加入 40

$\mu\text{mol/L}$ Dgn 并转染 40 nmol/L ABCA1 siRNA;24 h 后用 PBS 液洗涤细胞,在含 10 mg/L apoAI 无血清的新鲜培养液中培养细胞 12 h,之后,再用 PBS 溶液轻轻洗涤细胞 2 次,加 4% 多聚甲醛固定细胞 5 min,以 PBS 溶液清洗 1 min 后,加稀释好的油红 O 工作液 60℃ 烤箱染色 15~20 min,以去离子水清洗 2~3 次,每次 1~2 min,50% 异丙醇镜下分色后,用苏木素染核 5~7 min 后去离子水清洗 5 min,用 0.5% 盐酸酒精快速分色并以流水返蓝后,在显微镜下观察并拍照,显示的鲜红色颗粒即为脂滴。

1.8 统计学分析

所有实验均重复 3 次。实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用组间比较的方差分析及两两比较的 LSD-t 检验,由 SPSS 18.0 统计软件完成。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 Dgn 对巨噬细胞 ABCA1 表达的影响

Western bolt 检测显示 Dgn 呈浓度依赖性上调巨噬细胞 ABCA1 的表达。浓度为 80 $\mu\text{mol/L}$ 时,ABCA1 表达增加尤为显著。这就表明 Dgn 可促进巨噬细胞 ABCA1 的表达(图 1)。

2.2 Dgn 对巨噬细胞胆固醇流出的影响

与对照组比较,Dgn 组巨噬细胞胆固醇流出显著增加。而在转染 ABCA1 siRNA 的巨噬细胞中,Dgn 促胆固醇流出作用几乎完全解除。这些结果表明 Dgn 通过 ABCA1 途径促进巨噬细胞胆固醇流出(图 2)。

2.3 Dgn 对巨噬细胞胆固醇含量的影响

HPLC 检测结果显示,与对照组比较,Dgn 明显减少荷脂 THP-1 巨噬细胞内 TC、FC 和 CE 的含量。而在转染 ABCA1 siRNA 的巨噬细胞内 TC、FC 和 CE 的含量增加(表 1)。各组间 CE/TC 百分比变化差异无显著性。这些结果证实 Dgn 降低胞内胆固

醇含量,抑制巨噬细胞内脂质蓄积。

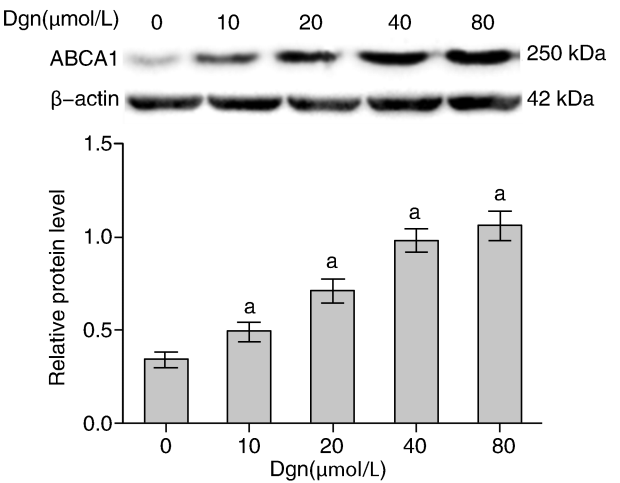


图 1. 不同浓度的 Dgn 处理巨噬细胞 24 h 后 ABCA1 表达的变化 a 为 $P < 0.05$,与空白对照组比较。

Figure 1. ABCA1 protein levels are assayed in macrophage treated with different concentration of Dgn for 24 h

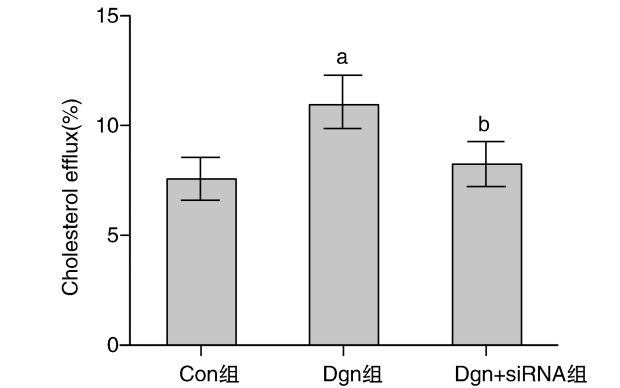


图 2. 40 $\mu\text{mol/L}$ LM Dgn 处理荷脂巨噬细胞 24 h 后胆固醇流出的情况。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 Dgn 组比较。

Figure 2. Cholesterol efflux is assayed in macrophage treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ Dgn, alone or in combination with 40 nmol/L ABCA1 siRNA for 24 h

表 1. Dgn 对荷脂 THP-1 巨噬细胞内胆固醇含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1. The level of TC, FC and CE in cholesterol-laden macrophage treated with Dgn, alone or in combination with ABCA1 siRNA

分 组	TC (mg/g)	FC (mg/g)	CE (mg/g)	CE/TC (%)
Con 组	347.78 ± 29.14	155.51 ± 15.66	192.27 ± 17.17	55.28%
Dgn 组	316.94 ± 25.48 ^a	144.12 ± 14.83 ^a	172.82 ± 16.40 ^a	54.53%
Dgn + siRNA 组	351.10 ± 29.05 ^b	157.54 ± 15.41 ^b	193.56 ± 19.14 ^b	55.13%

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 Dgn 组比较。

2.4 Dgn 对巨噬细胞内脂滴的影响

与对照组比较,Dgn 组巨噬细胞内脂滴数量少,体积小,分布稀疏且多位于细胞周围区域。而 Dgn

+ ABCA1 siRNA 组的巨噬细胞与对照组相似,胞内脂滴数量多,体积大,分布稠密甚至覆盖胞核,成泡沫细胞特征(图 3)。

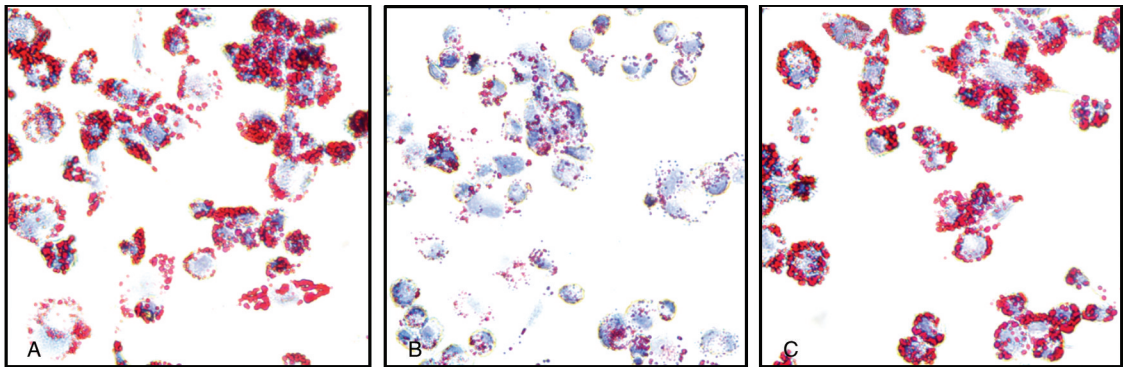


图 3. 40μmol/L Dgn 处理荷脂巨噬细胞 24 h 后胞内脂滴的情况(×40) A 为 Con 组 B 为 Dgn 组,C 为 Dgn + siRNA 组。
Figure 3. Macrophage lipid droplet is dying with oil red O after being treated with 40 μmol/L Dgn, alone or in combination with 40 nmol/L ABCA1 siRNA for 24 h(×40)

3 讨论

本研究通过观察 Dgn 对巨噬细胞 ABCA1 表达、胆固醇流出及胞内脂滴情况,并进一步用 siRNA 干预 ABCA1 来观察 Dgn 对胆固醇代谢的影响,我们发现 Dgn 促进巨噬细胞 ABCA1 表达和胆固醇流出,从而减少胞内脂质蓄积,抑制巨噬细胞的形成。

Dgn 上调巨噬细胞 ABCA1 的表达,从而促进胞内脂质流出。Uemura 等^[14]发现 Dgn 并不激活甚至抑制 TO901317 介导的肝细胞内肝 X 受体 α(liver X receptor α, LXRα) 活化,但未进一步检测 Dgn 对 ABCA1 表达的影响。本研究发现 Dgn 呈浓度依赖性的上调巨噬细胞 ABCA1 的表达,那么 Dgn 是否通过 LXRα 途径来上调 ABCA1 有待进一步研究。ABCA1 表达上调势必促进巨噬细胞胆固醇的流出,抑制细胞内脂质蓄积。液体闪烁计数器测定巨噬细胞胆固醇流出、HPLC 检测胞内胆固醇含量和油红 O 染色显示胞内脂滴就证实了 Dgn 通过 ABCA1 途径促进巨噬细胞胆固醇流出的作用。采用 ABCA1 siRNA 与 Dgn 共处理巨噬细胞后,明显抵消 Dgn 促胆固醇流出作用,导致胞内脂质蓄积和泡沫细胞形成加剧。

Dgn 促进巨噬细胞胆固醇流出,为其抗动脉粥样硬化的重要作用机制。Dgn 通过促进 ABCA1 表达及其介导的外周巨噬细胞胆固醇流出,促进胆固醇逆向转运,减少外周脂质蓄积和泡沫细胞形成。已有研究表明 Dgn 降低鼠 LDLC 水平特别是 ox-LDL,增加 HDLC 水平^[15-16]。Dgn 上调肝细胞 AB-

CG5、ABCG8 的表达,促进脂质的分泌排泄^[3-5]。Dgn 还通过竞争机制抑制肠道胆固醇的吸收,减少胆固醇进入体内,缓解病理状态下体内胆固醇逆向转运的压力^[1]。此外,文献报道 Dgn 抑制 CRP-1、MCP-1、TNF-α 等炎症因子水平,减少血管壁内单核巨噬细胞浸润,降低局部的炎症水平^[15]。Dgn 还可对抗高脂血症诱导的氧化应激对内皮的损伤作用,减少氧自由基诱导的内皮细胞凋亡^[16-19]。这些机制均参与了 Dgn 抗动脉粥样硬化效应。

总之,本文探讨了 Dgn 促进巨噬细胞 ABCA1 的表达和胞内胆固醇流出的新作用。Dgn 通过上调 ABCA1 表达,从而促进巨噬细胞内胆固醇流出,减少胞内脂质蓄积和泡沫细胞形成,最终抑制血管壁内脂质沉积和动脉粥样硬化病变的发生发展。本研究不仅阐述了 Dgn 通过调控巨噬细胞 ABCA1 表达的抗动脉粥样硬化机制,而且为以 ABCA1 为靶点防治动脉粥样硬化提供了潜在的药物选择。

[参考文献]

[1] 侯娟,何文辉,王明霞,等. 薯蓣皂苷的药理作用[J]. 河北医药, 2004, 26 (1): 71.
[2] 匡双玉,李熠,匡稳定. 薯蓣皂苷元对人肝 L-02 细胞胆固醇代谢及 Caveolin-1 表达的影响[J]. 中国药房, 2013, 24 (35): 3 286-288.
[3] Kamisako T, Ogawa H. Regulation of biliary cholesterol secretion is associated with ABCG5 and ABCG8 expressions in the rats: effects of diosgenin and ethinyl estradiol[J]. Hepatol Res, 2003, 26(4): 348-352.
[4] Kamisako T, Ogawa H. Alteration of the expression of a-

- denosine triphosphate-binding cassette transporters associated with bile acid and cholesterol transport in the rat liver and intestine during cholestasis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20(9): 1 429-434.
- [5] Cayen MN, Dvornik D. Effect of diosgenin on lipid metabolism in rats[J]. *J Lipid Res*, 1979, 20(2): 162-174.
- [6] Zhao Y, Van Berkel TJ, Van Eck M. Relative roles of various efflux pathways in net cholesterol efflux from macrophage foam cells in atherosclerotic lesions[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2010, 21(5): 441-453.
- [7] Westerterp M, Bochem AE, Yvan-Charvet L, et al. ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation[J]. *Circ Res*, 2014, 114(1): 157-170.
- [8] 唐朝克. 以 ABCA1 为靶点防治动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(11): 879-884.
- [9] 唐艳艳, 陈五军, 路倩, 等. ABCA1 的胞内运输及功能研究新进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 40(6): 510-519.
- [10] 张敏, 王建平, 赵源征, 等. 瑞舒伐他汀对颈动脉斑块 ABCA1、RXR α 表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(16): 3 914-916.
- [11] 卢德赵, 林韬琦, 王萍儿, 等. 丹参酮 II A 对泡沫细胞胆固醇平衡的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(5): 402-406.
- [12] Lu Q, Tang SL, Liu XY, et al. Tertiary-butylhydroquinone upregulates expression of ATP-binding cassette transporter A1 via nuclear factor E2-related factor 2/heme oxygenase-1 signaling in THP-1 macrophage-derived foam cells[J]. *Circ J*, 2013, 77(9): 2 399-408.
- [13] 欧阳新平, 周寿红, 田绍文, 等. 槟榔碱对泡沫细胞胆固醇流出和 ABCA1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(4): 289-294.
- [14] Uemura T, Goto T, Kang MS, et al. Diosgenin, the main aglycon of fenugreek, inhibits LXR α activity in HepG2 cells and decreases plasma and hepatic triglycerides in obese diabetic mice[J]. *J Nutr*, 2011, 141(1): 17-23.
- [15] Park HJ, Byeon HE, Koo HJ, et al. Anti-atherosclerotic effects of diosgenin in ApoE-deficient mice[J]. *FASEB J*, 2011, 25(1): 980, 982.
- [16] Gong G, Qin Y, Huang W, et al. Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 184(3): 366-375.
- [17] Liu K, Zhao W, Gao X, et al. Diosgenin ameliorates palmitate-induced endothelial dysfunction and insulin resistance via blocking IKK β and IRS-1 pathways[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 223(2): 350-358.
- [18] Son IS, Kim JH, Sohn HY, et al. Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(12): 3 063-071.
- [19] 李蓉, 蔡辉. 内皮细胞凋亡与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(12): 2 649-652.

(此文编辑 李小玲)