

荷叶生物碱对 THP-1 源性巨噬细胞 CD36 及 PPAR γ 表达的影响

沈白¹, 徐新¹, 张社兵¹, 陶军²

(1. 韶关市粤北人民医院心内科, 广东省韶关市 512025; 2. 中山大学附属第一医院心血管内科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 荷叶生物碱; 氧化型低密度脂蛋白; 环格列酮; CD36; 过氧化体增殖物激活型受体 γ

[摘要] **目的** 观察荷叶生物碱对 THP-1 源性巨噬细胞 CD36 和过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ) 表达的影响, 探讨荷叶生物碱干预 CD36 表达及其信号传导途径。**方法** THP-1 单核细胞分化为巨噬细胞后, 随机分为四组: 空白对照组、ox-LDL 组、荷叶生物碱组、环格列酮组, 油红 O 染色观察 THP-1 巨噬细胞内脂质变化, RT-PCR 和 Western blot 检测 CD36 和 PPAR γ 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 与空白对照组比较, 经 ox-LDL 干预后, THP-1 巨噬细胞内脂质蓄积增加, CD36 和 PPAR γ 的表达增加; 与 ox-LDL 组比较, 经荷叶生物碱干预后, THP-1 巨噬细胞内脂质积蓄减少, CD36 和 PPAR γ 的表达减少; 与荷叶生物碱组比较, 经环格列酮干预后, THP-1 巨噬细胞内脂质无明显变化, CD36 和 PPAR γ 的表达增加。**结论** 荷叶生物碱通过下调 CD36 的表达抑制巨噬细胞泡沫化进展, 荷叶生物碱可能是通过下调 PPAR γ 来抑制 CD36 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Nuciferine on CD36 and PPAR γ Expressions of THP-1 Derived Macrophage

SHEN Bai¹, XU Xin¹, ZHANG She-Bing¹, and TAO Jun²

(1. Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512025, China; 2. The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Nuciferine; Oxidized Low Density Lipoprotein; Ciglitazone; CD36; Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of nuciferine on the expressions of CD36 and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in THP-1 derived macrophages, and the signal transduction pathway. **Methods** THP-1 derived macrophages were randomly divided into groups of normal, oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), nuciferine and ciglitazone. Macrophage cells were valued by oil red O staining. The expressions of CD36 and PPAR γ were measured by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** Compared with normal group, lipid droplets were increased while mRNA and protein expressions of CD36 and PPAR γ were upregulated in ox-LDL group. Compared with ox-LDL group, lipid droplets were decreased while mRNA and protein expressions of CD36 and PPAR γ were downregulated in nuciferine group. Compared with nuciferine group, lipid droplets had no difference while mRNA and protein expressions of CD36 and PPAR γ were upregulated in ciglitazone group. **Conclusions** Nuciferine downregulates CD36 expression in THP-1 derived macrophages, lessen the degree of foam formation. Nuciferine downregulates CD36 expression by downregulating PPAR γ expression.

CD36 属于 B 类清道夫受体, 是氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 主

要特异性受体。巨噬细胞表面的 CD36 能黏附和吞噬 ox-LDL 从而使巨噬细胞转变为泡沫细胞。有研

[收稿日期] 2014-12-19

[修回日期] 2015-02-12

[基金项目] 广东省科技计划项目(2013B021800091)

[作者简介] 沈白, 硕士研究生, 医师, 主要从事动脉粥样硬化研究。通讯作者徐新, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病的诊治及心脏介入手术, E-mail 为 03xuxin@163.com。张社兵, 博士, 副主任医师, 主要从事心血管疾病的诊治及心脏介入手术。

究表明,过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 在清道夫受体 CD36 的表达过程中起着重要的调节作用^[1]。环格列酮属于噻唑烷二酮类药物,是 PPAR γ 的特异性激动剂,可以通过激活 PPAR γ 的表达来上调 CD36 的表达。荷是睡莲科植物,其荷叶提取物含有荷叶生物碱,具有降血脂、预防动脉粥样硬化等功能。本研究以 THP-1 细胞为实验对象,观察在巨噬细胞泡沫化的过程中加入荷叶生物碱后 CD36 和 PPAR γ 表达的变化;同时设计加入环格列酮来验证上调 PPAR γ 后是否可以抑制荷叶生物碱干预 CD36 的表达,从而探讨荷叶生物碱对 CD36 的表达影响及可能的信号传导途径。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

THP-1 单核细胞株(中国科学院上海细胞库);荷叶生物碱(中国药品生物制品检定所);ox-LDL(奕源生物);胎牛血清(Gibco 公司);佛波酯(易佰生物);环格列酮(捷威斯生物);总 RNA 提取试剂盒(天根生物);M-MLV 试剂盒和荧光实时定量 PCR 试剂盒(Invitrogen 公司);BCA 蛋白含量试剂盒(Sigma 公司);PCR 引物(英潍捷基);CD36、PPAAR γ 和 GADPH 一抗(Abcam 公司);二抗(Santa 公司);显微镜(Olympus);高速冷冻离心机和二氧化碳培养箱(Sigma 公司);其它试剂为进口或国产分析纯。

1.2 THP-1 细胞的培养与分化^[2]

用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养液(加入 1% 青霉素和链霉素)培养 THP-1 细胞,在 37℃、5% CO₂ 的条件下培养。每 2 天换液一次,4~5 天传代一次,传至 3 代后用于实验。离心获得细胞,用含 80 μ g/L 佛波酯的无血清培养基调整细胞浓度,以每孔约 1×10^7 个细胞接种于 6 孔培养板,培育 24 h,诱导转化成巨噬细胞。显微镜下观察细胞形态变化。

1.3 实验分组

诱导分化为巨噬细胞后倒去上层培养液,用 PBS 清洗 2 遍后按培养液成分不同随机分为四组:①ox-LDL 组:培养基含终浓度为 50 mg/L ox-LDL;②荷叶生物碱组:培养基含终浓度为 50 mg/L 荷叶生物碱及 50 mg/L ox-LDL;③环格列酮组:培养基含终浓度为 50 μ mol/L 环格列酮、50 mg/L 荷叶生物碱及 50 mg/L ox-LDL;④空白对照组:细胞中不加药物,其余条件和以上三组一样。共同孵育 24 h。

1.4 油红 O 染色观察 THP-1 细胞内脂质

将培养细胞的 6 孔板上层培养基倒去,PBS 清洗后置于中性甲醛中固定 20 min,油红 O 染色 30 min,苏木素染色 5 min,染色后 6 孔板置于显微镜下,可见红色为脂滴,蓝色为细胞核,拍摄保存。

1.5 RT-PCR 检测 CD36 和 PPAR γ 的 mRNA 表达

收集细胞,提取总 RNA,用分光光度计检测 RNA 纯度(OD_{260nm/280nm} 在 1.8~2.0 之间),按说明书进行逆转录。CD36 的引物序列:上游 5'-CTC CCA AAG TGC TGG GAT TA-3',下游 5'-AGC CTT TGG GGG TCT TTC TA-3',扩增片段 246 bp;PPAR γ 的引物序列:上游 5'-CGG TTG ATG TCT CCA GCA TT-3',下游 5'-AGC AAG GTA CTT CTG AAA CC-3',扩增片段 382 bp。将每组的 cDNA 加入反应体系中,CD36、PPAR γ 及 β -actin 进行 PT-PCR。收集数据,基因表达相对量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示,实验重复 3 次。

1.6 Western blot 检测 CD36 和 PPAR γ 的蛋白表达

收集细胞,提取蛋白,BAC 法测定总蛋白浓度。以每孔 20 μ g 总蛋白上样于 10% SDS-PAGE 胶,80 V、40 min 浓缩,120 V、90 min 进行电泳分离,80 V 转膜 150 min,用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,1:1000 稀释的一抗 4℃ 孵育过夜,洗膜,1:2000 稀释的二抗摇晃室温孵育 1 h,洗膜,用荧光检测试剂激发荧光后凝胶化学发光系统呈像,以 GADPH 为内参,Quantity One 软件分析条带的灰度值。实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

所得实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性分析后,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 佛波酯诱导后细胞形态的改变

THP-1 细胞用含 80 μ g/L 的佛波酯无血清培养基孵育 24 h 后诱导分化为巨噬细胞,显微镜下,悬浮生长的 THP-1 细胞逐渐变为贴壁生长,由规则圆形(图 1A)逐渐变成不规则梭形,并伸出伪足(图 1B)。

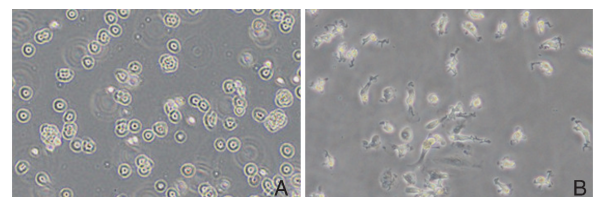


图 1. 佛波酯诱导后 THP-1 单核细胞形态变化

Figure 1. Morphological changes of THP-1 monocytes induced by phorbol ester

2.2 油红 O 染色后 THP-1 细胞内脂质变化

与空白对照组相比,ox-LDL 组细胞内脂质蓄积明显增多,脂质颗粒体积变大,数量变多,这证实了 ox-LDL 可促进 THP-1 巨噬细胞泡沫化;与 ox-LDL 组相比,荷叶生物碱组细胞内脂质蓄积明显减少,

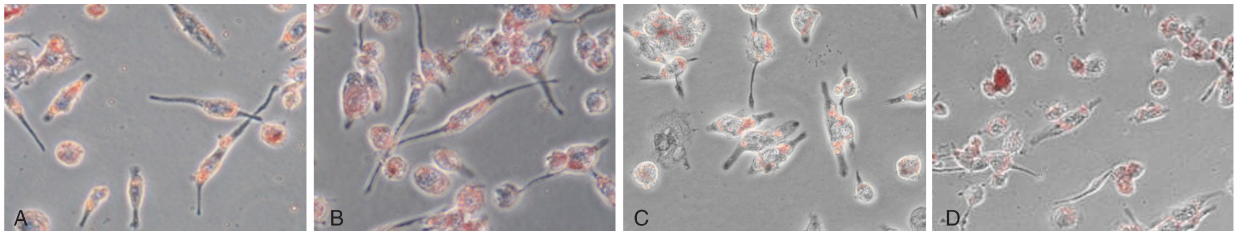


图 2. 油红 O 染色观察 THP-1 细胞内脂质变化 A 为空白对照组,B 为 ox-LDL 组,C 为荷叶生物碱组,D 为环格列酮组。

Figure 2. Lipid changes in THP-1 cells were observed by oil red O staining

2.3 ox-LDL 干预后 CD36 和 PPAR γ 的表达

RT-PCR 结果显示,ox-LDL 干预后 CD36 和 PPAR γ mRNA 的相对表达量与空白对照组比较增加($P < 0.01$;表 1)。Western blot 结果显示,与空白对照组比较,ox-LDL 干预后 CD36 和 PPAR γ 的蛋白表达增加($P < 0.01$;图 3 和 4)。这证实了 ox-LDL 可以促进 CD36 和 PPAR γ 的表达。

2.4 荷叶生物碱干预后 CD36 和 PPAR γ 的表达

RT-PCR 结果显示,荷叶生物碱干预下 CD36 和 PPAR γ mRNA 的相对表达量较 ox-LDL 组减少($P < 0.01$;表 1)。Western blot 结果显示,荷叶生物碱干预后 CD36 及 PPAR γ 蛋白表达较 ox-LDL 组减少($P < 0.01$;图 3 和 4)。说明荷叶生物碱可以抑制 CD36 和 PPAR γ 的表达。

2.5 环格列酮干预后 CD36 和 PPAR γ 的表达

RT-PCR 结果显示,环格列酮干预下 CD36 和 PPAR γ mRNA 的相对表达量较荷叶生物碱组增加($P < 0.01$;表 1);Western blot 结果显示,环格列酮干预后 CD36 和 PPAR γ 蛋白的表达量较荷叶生物碱组增加($P < 0.01$;图 3 和 4)。说明环格列酮对 CD36 及 PPAR γ 的表达有促进作用。

表 1. CD36 和 PPAR γ mRNA 的相对表达量($n = 3$)

分 组	CD36 mRNA	PPAR γ mRNA
空白对照组	1 \pm 0	1 \pm 0
ox-LDL 组	4.06 \pm 0.46 ^a	2.13 \pm 0.16 ^a
荷叶生物碱组	0.40 \pm 0.05 ^b	0.50 \pm 0.03 ^b
环格列酮组	2.11 \pm 0.04 ^c	3.04 \pm 0.10 ^c

a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 ox-LDL 组比较;c 为 $P < 0.01$,与荷叶生物碱组比较。

脂质颗粒体积变小,数量变少,说明荷叶生物碱可以抑制 THP-1 巨噬细胞泡沫化;与荷叶生物碱组比较,环格列酮组细胞内脂质蓄积情况无明显差异,说明环格列酮对 THP-1 巨噬细胞泡沫化无明显影响(图 2)。

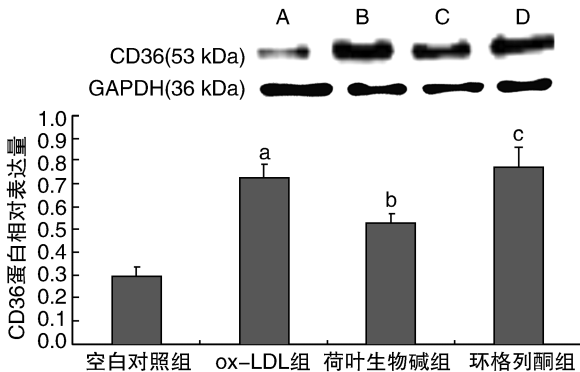


图 3. CD36 蛋白的表达($n = 3$) A 为空白对照组,B 为 ox-LDL 组,C 为荷叶生物碱组,D 为环格列酮组。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 ox-LDL 组比较;c 为 $P < 0.01$,与荷叶生物碱组比较。

Figure 3. The protein expressions of CD36 in different groups($n = 3$)

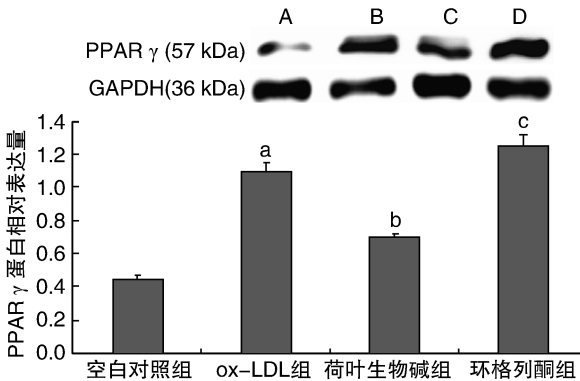


图 4. PPAR γ 蛋白的表达($n = 3$) A 为空白对照组,B 为 ox-LDL 组,C 为荷叶生物碱组,D 为环格列酮组。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 ox-LDL 组比较;c 为 $P < 0.01$,与荷叶生物碱组比较。

Figure 4. The protein expressions of PPAR γ in different groups($n = 3$)

3 讨论

动脉粥样硬化是常见疾病,其发病机制尚未完全明了,发病机制学说众多,其中多数学者支持的是“内皮损伤-应答”学说,ox-LDL 在动脉粥样硬化形成过程中发挥重要的作用,有吸引及滞留单核细胞、细胞毒性(使内皮细胞功能受损)及通过清道夫受体介导进入巨噬细胞等作用^[3-4],清道夫受体介导 ox-LDL 的摄取在动脉粥样硬化的发展中有重要作用,氧化特异性抗体可减缓动脉粥样硬化的进展^[5],而清道夫受体 CD36 是 ox-LDL 主要特异性受体^[6]。CD36 广泛存在于各种细胞表面中,比如单核/巨噬细胞、血管内皮细胞等,可与反应蛋白、凋亡细胞、阴离子磷脂等配体结合,生物学作用涉及动脉粥样硬化、炎症和脂质代谢的调节等多个方面^[7-8]。Park 等^[9]研究发现,CD36 是介导 ox-LDL 进入细胞的主要受体。泡沫细胞内的低密度脂蛋白绝大部分是经 CD36 黏附和摄取的,比例占到 50%。

PPAR γ 是调控 CD36 表达的关键^[10-11]。有研究表明,进入细胞内的 ox-LDL 不仅不会通过负反馈抑制 CD36 的表达,反而可以诱导 CD36 表达上调。这也说明这种摄取脂质的方式无反馈性调节,其机制可能是通过激活 PPAR γ 来调节脂类物质的代谢。有证据显示,蛋白激酶 B 也参与 ox-LDL 诱导 CD36 上调^[12]。另外,曲格列酮、IL-4 等也可以上调 CD36 的表达,但是在 PPAR γ 基因敲除的巨噬细胞却无法上调 CD36 表达,提示它们有可能是通过 PPAR γ 起作用的^[13]。多数他汀类药物能下调 CD36 的表达,这与他汀类药物能促进 PPAR 发生磷酸化有关^[14]。噻唑烷二酮类是 PPAR γ 激活剂,能通过上调 PPAR γ 的表达来上调 CD36 的表达^[15-16]。环格列酮是噻唑烷二酮类药物,虽然环格列酮有潜在的致动脉粥样硬化作用,但有研究证明环格列酮不会促进动脉粥样硬化的形成,其原因在于环格列酮不仅上调介导脂质内流的清道夫受体 CD36 的表达,还会诱导胆固醇流出相关受体蛋白基因的激活,促进脂质外流。

荷叶是睡莲科植物的叶子,荷叶中有生物碱及黄酮等生物活性物质^[17]。荷叶生物碱多属于阿朴啡生物碱,具有多种药理作用。有研究表明其具有抑制高脂血症、抗动脉粥样硬化、抗氧化、抗衰老、抑菌、抗病毒、降压、抗心率失常等功能^[18-19]。研究发现荷叶生物碱通过干预巨噬细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1、B 类 I 型清道夫受体及低密度脂蛋

白受体 1 等受体减少细胞内脂质蓄积^[20-22]。

本研究中,ox-LDL 干预后,THP-1 巨噬细胞内脂滴数量及大小明显增加,形成泡沫细胞,说明 ox-LDL 促进巨噬细胞泡沫化,CD36 及 PPAR γ 的表达也是增加的,且 ox-LDL 并没有通过负反馈调节抑制 ox-LDL 的主要特异性受体 CD36,反而是促进其表达,同时 PPAR γ 的表达是上升的,这证实了 ox-LDL 有可能通过激活 PPAR γ 来调节 CD36 的表达。在加入荷叶生物碱干预后,细胞内的脂质蓄积明显较单纯 ox-LDL 干预减少,这说明荷叶生物碱能抑制巨噬细胞泡沫化的进展,同时 CD36 及 PPAR γ 的表达减少,这说明了荷叶生物碱是通过干预 CD36 的表达来减少巨噬细胞吞噬 ox-LDL,并且提示 CD36 的表达可能是通过调节 PPAR γ 的表达来调控的。在荷叶生物碱干预的基础上加入 PPAR γ 激动剂环格列酮,结果发现环格列酮可以通过上调 PPAR γ 的表达来抑制荷叶生物碱下调 CD36 的趋势,证实荷叶生物碱可能通过下调 PPAR γ 来抑制 CD36 的表达。加入环格列酮后巨噬细胞泡沫化程度无明显改变,这可能与环格列酮不仅能促进介导胆固醇流入细胞的清道夫受体 A 和 CD36,而且还促进介导胆固醇流出的受体三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 等受体的表达有关。由此实验可得出细胞内存在“ox-LDL-PPAR γ -CD36”调节环路的假说,荷叶生物碱通过下调 PPAR γ 的表达来抑制 CD36 的表达,减少 THP-1 巨噬细胞吞噬 ox-LDL,抑制巨噬细胞泡沫化,从而影响动脉粥样硬化的进展。

[参考文献]

- [1] Rodrigue WA, Caron V, Bilodeau S, et al. Scavenger receptor CD36 mediates inhibition of cholesterol synthesis via activation of the PPAR γ /PGC-1 α pathway and Insig1/2 expression in hepatocytes[J]. *FASEB J*, 2014, 28 (4): 1910-923.
- [2] 王术玲, 潘华新, 王培训. THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及鉴定[J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 20 (3): 281-284.
- [3] Frodermann V, van Puijvelde GH, Wiertz L, et al. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptotic dendritic cells as a novel therapy for atherosclerosis[J]. *J Immunol*, 2015, 194 (5): 2208-218.
- [4] Yu BL, Zhao SP, Huang XS. Oxidized low-density lipoprotein: A double-edged sword on atherosclerosis[J]. *Med Hypotheses*, 2007, 69 (3): 553-556.
- [5] Tsimikas S, Miyanohara A, Hartvigsen K, et al. Human oxidation-specific antibodies reduce foam cell formation and

- atherosclerosis progression[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58 (16): 1 715-727.
- [6] Kao ES, Tseng TH, Lee HJ, et al. Anthocyanin extracted from *Hibiscus attenuate* oxidized LDL-mediated foam cell formation involving regulation of CD36 gene[J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 179 (2-3): 212-218.
- [7] Park YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis[J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46: e99.
- [8] Febbraio M, Silverstein RL. CD36: implications in cardiovascular disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39 (11): 2 012-030.
- [9] Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119 (1): 136-145.
- [10] Rios FJ, Jancar S, Melo IB, et al. Role of PPAR-gamma in the modulation of CD36 and FcgammaRII induced by LDL with low and high degrees of oxidation during the differentiation of the monocytic THP-1 cell line [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2008, 22 (5-6): 549-556.
- [11] Wu CW, Chu ES, Lam CN, et al. PPARgamma is essential for protection against nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Gene Ther*, 2010, 17 (6): 790-798.
- [12] Munteanu A, Taddei M, Tamburini I, et al. Antagonistic effects of oxidized low density lipoprotein and alpha-tocopherol on CD36 scavenger receptor expression in monocytes: involvement of protein kinase B and peroxisome proliferator activated receptor-gamma[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (10): 6 489-497.
- [13] Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake[J]. *Nat Med*, 2001, 7 (1): 41-47.
- [14] Ruiz-Velasco N, Domínguez A, Vega MA. Statins upregulate CD36 expression in human monocytes, an effect strengthened when combined with PPAR-gamma ligands putative contribution of Rho GTPases in statin-induced CD36 expression [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67 (2): 303-313.
- [15] Mo ZC, Chen X, Long ZF, et al. Effect of ciglitazone on THP-1 macrophage CD36 expression and cholesterol influx [J]. *Chin J of Cell Mol Immunol*, 2011, 27 (6): 685-687.
- [16] Ballesteros I, Cuartero MI, Pradillo JM, et al. Rosiglitazone-induced CD36 up-regulation resolves inflammation by PPAR γ and 5-LO-dependent pathways[J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 95 (4): 587-598.
- [17] 罗金波, 肖文军, 刘仲华. 荷叶生物碱类成分的研究进展[J]. *今日药学*, 2008, 18 (3): 9-12.
- [18] Guo F, Yang X, Li X, et al. Nuciferine prevents hepatic steatosis and injury induced by a high-fat diet in hamsters [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (5): e63770.
- [19] Zhang L, Tu ZC, Wang H, et al. Response surface optimization and physicochemical properties of polysaccharides from *Nelumbo nucifera* leaves [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 74: 103-110.
- [20] 杨莉军, 常冠楠, 徐新, 等. 氧化低密度脂蛋白、荷叶生物碱对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 表达的影响[J]. *心血管康复医学杂志*, 2012, 21 (1): 21-25.
- [21] 常冠楠, 徐新, 张社兵. 荷叶生物碱对 THPP-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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (7): 611-615.
- [22] 郭良才, 徐新, 张社兵, 等. 荷叶生物碱抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 源性巨噬细胞低密度脂蛋白受体 1 的表达 [J]. *中华高血压杂志*, 2013, 21 (4): 357-360.
- (此文编辑 文玉珊)