

## 姜黄素下调 IDOL 水平促进肝细胞摄取血浆 LDLC

蒋素素<sup>1</sup>, 曾娅玲<sup>2</sup>, 宁洁<sup>3</sup>, 邵惊琦<sup>1</sup>, 袁育林<sup>1</sup>, 赵倩<sup>1</sup>, 袁凌志<sup>1</sup>, 龙石银<sup>1</sup>, 张彩平<sup>1</sup>, 廖端芳<sup>2</sup>

(1. 南华大学衡阳医学院生物化学与分子生物学教研室, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湖南中医药大学湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南省长沙市 410208; 3. 深圳市龙华区中心医院内分泌科, 广东省深圳市 518110)

[关键词] 姜黄素; 动脉粥样硬化; 低密度脂蛋白受体; 低密度脂蛋白受体诱导降解蛋白; 低密度脂蛋白胆固醇

[摘要] **目的** 明确姜黄素可通过下调低密度脂蛋白受体诱导降解蛋白(IDOL)来升高低密度脂蛋白受体(LDLR)的表达水平,从而促进肝细胞摄取低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)。**方法** 利用过表达 IDOL 和干扰 IDOL 慢病毒(OE/RNAi-IDOL)感染 HepG2 和 LO2 两种体外培养的肝细胞,倒置荧光显微镜观察病毒感染情况;Western blot 检测 IDOL 及 LDLR 蛋白表达;油红 O 染色观察细胞中脂质情况;酶法检测细胞内胆固醇含量;DiI-LDL 摄取实验检测肝细胞对 LDLC 的摄取能力;流式细胞术检测肝细胞膜 LDLR 分布丰度。**结果** 与明场比较,暗场下可见胞内呈绿色荧光;与对照组比较,三种不同干扰 IDOL 慢病毒感染的 HepG2 和 LO2 细胞中,仅 RNAi-IDOL-2 的 IDOL 蛋白表达显著降低,且相应组的 LDLR 蛋白表达显著增强( $P<0.01$ ),选择为后续 RNAi-IDOL 组所用;相反,OE-IDOL 慢病毒感染的 HepG2 和 LO2 细胞中, IDOL 表达显著增高,相应组内 LDLR 表达减弱;以上结果表明已获得 RNAi-IDOL-2 及 OE-IDOL 慢病毒感染的 HepG2 和 LO2 细胞模型。与无药物处理的 Control 组相比, RNAi-IDOL-2 及 OE-IDOL 慢病毒感染的肝细胞内经 25  $\mu\text{mol/L}$  姜黄素处理 24 h 后,油红 O 染色及胆固醇含量测定结果显示:细胞内脂滴含量和相对胆固醇含量均显著增加( $P<0.01$ );且 DiI-LDL 摄取及免疫流式细胞结果显示:肝细胞摄取 LDLC 的能力增强( $P<0.01$ );肝细胞膜表面 LDLR 分布丰度增多( $P<0.01$ );以上结果与阳性药物对照组的结果趋势一致。**结论** 姜黄素可以下调肝细胞内 IDOL 水平,提高细胞膜 LDLR 分布丰度,从而促进肝细胞摄取 LDLC。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Curcumin promotes the hepatocytes-uptake of plasma LDLC by down-regulating IDOL level

JIANG Susu<sup>1</sup>, ZENG Yalin<sup>2</sup>, NING Jie<sup>3</sup>, SHAO Jingqi<sup>1</sup>, YUAN Yulin<sup>1</sup>, ZHAO Qian<sup>1</sup>, YUAN Lingzhi<sup>1</sup>, LONG Shiyin<sup>1</sup>, ZHANG Caiping<sup>1</sup>, LIAO Duanfang<sup>2</sup>

(1. Department of Biochemistry & Molecular Biology, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Department of Metabolic Endocrinology, Shenzhen Longhua District Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518110, China)

[KEY WORDS] Curcumin; atherosclerosis; low density lipoprotein receptor; inducible degrader of LDLR; low density lipoprotein cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of Curcumin on that inducible degrader of the low density lipoprotein receptor (IDOL) regulating the uptake of low density lipoprotein cholesterol (LDLC) of hepatocytes. **Methods** HepG2 and LO2 cells (two kinds of hepatocytes) were infected with the constructed overexpression or RNA-interference IDOL (OE/RNAi-IDOL) lentivirus. The efficiency of the lentiviral infection experiment was evaluated by fluorescence microscopy. The expression of IDOL and low density lipoprotein receptor (LDLR) proteins was detected by Western blot. After HepG2 and LO2 cells were treated with Curcumin for 24 hours, intracellular lipid droplets were determined by red oil O

[收稿日期] 2020-11-07

[修回日期] 2021-01-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81670268、81600291);湖南省自然科学基金项目(2018JJ2348、2018JJ2346);广东省自然科学基金项目(2016A030313755)

[作者简介] 蒋素素,硕士研究生,研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化,E-mail 为 jiangss1215@163.com。通信作者张彩平,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化,E-mail 为 zhangcapi@163.com。

staining; cholesterol content was detected by using cholesterol testing kits; the uptake of LDLC by hepatocytes was detected by DiI-LDL uptake experiment; LDLR abundances of hepatocytes surfaces were determined by immune flow cytometry.

**Results** Compared with white light view, the phenomenon of the green fluorescence was observed both in HepG2 and LO2 cells infected by OE-IDOL and RNAi-IDOL lentivirus; Western blot results showed that both in HepG2 and LO2 cells infected by RNAi-IDOL-2 lentivirus, IDOL protein expression were decreased, while LDLR expression was increased ( $P < 0.01$ ); on the contrary, in HepG2 and LO2 cells infected by OE-IDOL lentivirus, IDOL protein expression was increased, while LDLR expression was decreased, the above results indicated that both HepG2 and LO2 cells infected by OE/RNAi-IDOL lentivirus had been acquired. Compared with the control group of HepG2 and LO2 cells without any treatment, after 25  $\mu\text{mol/L}$  Curcumin treatment for 24 hours in the OE/RNAi-IDOL lentivirus infected cells, both the intracellular lipid droplet content and relative cholesterol content were increased in the treatment group ( $P < 0.01$ ), meanwhile the uptake LDLC ability and cell surface LDLR abundances of hepatocytes were also enhanced ( $P < 0.01$ ), the same trend was also observed in the results of Rosuvastatin treatment group.

**Conclusion** The levels of IDOL protein in liver cells were down-regulated by Curcumin, which further promotes the uptake of LDLC of liver cells.

动脉粥样硬化性心血管疾病 (atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD) 是中国致死率高的疾病之一<sup>[1]</sup>, 而 ASCVD 的发生与血浆中低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 水平升高密切相关<sup>[2]</sup>。他汀类药物如瑞舒伐他汀 (Rosuvastatin) 通过阻断胆固醇的合成及上调低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 的表达来降低血浆 LDLC 浓度, 因此被广泛用于心血管疾病治疗<sup>[3]</sup>。然而, 他汀类药物对部分患者产生了不良反应, 包括肌病和糖尿病等<sup>[4-7]</sup>, 因此, 应继续开展新的降脂药物的研发并探索其机制。姜黄素 (Curcumin) 是来自姜黄根的黄色多酚类活性成分<sup>[8]</sup>, 可有效地控制高脂血症, 发挥抗动脉粥样硬化的作用, 但其降脂作用机制仍待深入研究<sup>[9-12]</sup>。

血浆中 LDLC 主要被 LDLR 识别、内吞加以清除, 并且 LDLR 严格受转录水平和转录后水平的调节。具有 E3 泛素连接酶活性的低密度脂蛋白受体诱导降解蛋白 (inducible degrader of the LDLR, IDOL) 是参与转录后调节 LDLR 蛋白稳定性的因素之一, 通过作用于 LDLR 的细胞质 C 末端尾部结构域, 使 LDLR 泛素化后在溶酶体降解<sup>[13-14]</sup>。在已有的研究结果表明 (含本课题组的前期结果), 姜黄素可以通过降低前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 的表达来促进体外培养的肝细胞摄取 LDLC<sup>[15-17]</sup>。IDOL 也是 LDLR 转录后调节的重要分子之一, 目前鲜有报道姜黄素调节 IDOL 在肝细胞代谢 LDLC 中的作用。

本文利用过表达/干扰 IDOL (overexpression or RNA-interference IDOL, OE/RNAi-IDOL) 的慢病毒

感染 HepG2 及 LO2 两种肝细胞, 加入瑞舒伐他汀作为阳性药物组, 通过检测细胞内胆固醇含量及胆固醇的摄取, 明确姜黄素通过 IDOL 调节肝细胞摄取 LDLC 的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品和试剂

HepG2 (人源性肝癌细胞) 及 LO2 (人源性永生化的肝细胞) 均购于中科院上海研究所细胞中心; OE/RNAi-IDOL 慢病毒载体 (上海吉凯基因有限公司, GV358/GV248); 姜黄素 (西格玛奥德里奇贸易有限公司, 08511); 瑞舒伐他汀 (上海易恩化学技术有限公司, R012409); 特级胎牛血清 (杭州天杭生物有限公司, 13011); 高糖 DMEM (GIBCO 公司, C11995500BT); BCA 蛋白质定量试剂盒 (碧云天公司, P0012); 兔抗 LDLR (ab52818)、兔抗 IDOL (ab74562) 均购于艾博抗有限公司; 兔抗人  $\beta$ -actin13E5 (Cell Signaling Technology 公司, 4970); HRP 标记的山羊抗兔二抗 (abs20040)、PIPA 裂解液 (Strong) (abs47014877) 均购于 Absin 公司; 人源性 LDL (广州奔源公司, YB-001); 油红 O 粉末 (AMRESCO 公司, 0684); 苏木精 (H8070)、4% 组织细胞固定液 (P1110)、Hoechst33342 (B8040)、DiI-LDL (L8930) 均购于 Solarbio 公司; 总胆固醇测定试剂盒 (CELL BIO-LABS, STA-384); 其余均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 慢病毒载体感染细胞并通过倒置荧光显微镜观测感染后细胞荧光强度

胰酶消化对数生长期 HepG2/LO2 细胞, 以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞数接种到 6 孔板中, 培养 24 h 后, 分别加入过表达及 3 种不同序列的干扰 IDOL 慢病毒载体的稀释液培养, 待病毒感染进细胞, 12 h 后更换

为新鲜 DMEM 培养基,48 h 后在 6 孔板加入 5 mg/L 嘌呤霉素 3~4 天,筛选出病毒感染成功的细胞转移至细胞培养瓶。在嘌呤霉素筛选后待细胞生长至对数生长期,荧光显微镜下明场与暗场对比观察荧光强度,初步评估慢病毒的感染情况。

### 1.3 Western blot 检测 IDOL 及 LDLR 蛋白表达

在各组呈对数生长期的细胞中加入细胞裂解液[1 000  $\mu$ L RIPA (Strong) + 5  $\mu$ L PMSF + 10  $\mu$ L coactail],细胞刮子收集细胞,冰上裂解半小时,离心后取上清液加入 5 $\times$ Loading Buffer,99.9  $^{\circ}$ C 煮 5 min 分装存放于-80  $^{\circ}$ C 冰箱,检测 IDOL、LDLR 蛋白表达。RNAi-IDOL-1/2/3 为慢病毒干扰 IDOL 的三种不同 RNAi 序列组,通过评估 IDOL 及 LDLR 的蛋白表达情况,进一步确定过表达及 3 种不同序列干扰 IDOL 的慢病毒感染肝细胞的效果,并筛选出干扰效果最佳一组进行下一步实验。

### 1.4 油红 O 染色半定量检测细胞内脂滴含量

胰酶消化对数生长期 HepG2/LO2 细胞,每孔接种  $1\times 10^5$  个细胞数到事先内置有方形盖玻片的 6 孔板中,培养 24 h 待细胞贴壁后,除空白组(Basal 组:不加实验处理因素)外其余各组均加入 25 mg/L 的 LDL,模拟高脂环境,药物组则分别加入 25  $\mu$ mol/L 姜黄素和 10  $\mu$ mol/L 瑞舒伐他汀共孵育 24 h,室温固定 35 min,油红 O 染色 5~8 min,苏木精染色 30 s,甘油封片,显微镜下细胞内脂滴被染成橙红色,细胞核则呈淡蓝色,FIJI 软件半定量分析各组内的脂滴情况。

### 1.5 酶法检测细胞内胆固醇含量

每孔接种  $2.25\times 10^4$  个对数生长期 HepG2/LO2 细胞到 6 孔板中,待细胞贴壁后,与实验 1.4 处理相同,分别加入 LDL 和药物孵育 24 h,4  $^{\circ}$ C PBS 洗 3 次,胰酶消化后收集细胞,1 200 r/min 离心 3 min,每管加入胆固醇提取裂解液 200  $\mu$ L( $V$ (氯仿): $V$ (异丙醇): $V$ (NP-40)=7:11:0.1),冰上裂解,30 min 后取上清液,60  $^{\circ}$ C 干燥箱过夜,取出上清后管内沉淀溶于 200  $\mu$ L 1  $\mu$ mol/L 的 NaOH 中,用蛋白质浓度测定试剂盒测定各组细胞内总蛋白含量用于标准化各组样本胆固醇数值。干燥箱中烘干过夜的胆固醇继续置入真空加热干燥仪内 60  $^{\circ}$ C,30 min。每管加入胆固醇分析稀释液 200  $\mu$ L,参考总胆固醇测定试剂盒说明书,将制备好的样品加入 96 孔板中,与相应的胆固醇反应试剂反应后,酶标仪 555 nm 测定其吸光度值。将样品所测得的吸光度值代入预先做出的胆固醇标准曲线的线性回归方

程当中,计算出样品中总胆固醇(total cholesterol, TC)和游离胆固醇(free cholesterol, FC)的含量。标化后胆固醇的浓度单位采用 TC 或 FC 与总蛋白浓度的比值(mmol/g)。

### 1.6 LDLC 摄取的检测

按每孔  $1\times 10^5$  个对数生长期细胞接种至 24 孔板中,培养 24 h,分组中 25-羟基胆固醇(25-HC)可抑制胆固醇的摄取,作为阴性对照;缺乏脂蛋白血清(LPDS)模拟缺乏脂环境,可促进 LDLC 的摄取,作为阳性对照;其余分组与实验 1.4 处理相同。加入药物孵育 24 h 后,更换培养液为 2% LPDS + DMEM;各组加 DiI-LDL 10 mg/L(Basal 组除外),避光 37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h;含 0.4% 牛血清白蛋白的 PBS 洗 2 次,再用普通 PBS 洗 3 次;加入细胞固定液 10 min, PBS 洗 3 次;Hoechst 33342 染色 20 min, PBS 洗 3 次;吸尽余液,滴加抗荧光淬灭液;荧光显微镜观察,DiI 染细胞膜呈橙红色荧光,Hoechst 33342 染细胞核呈蓝色荧光。

### 1.7 细胞表面 LDLR 丰度的检测

将细胞以每孔  $1.5\times 10^6$  个接种到 6 孔板中,在 37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁,与实验 1.4 处理相同,按照实验分组加入处理因素继续培养 24 h 后,收集细胞至 EP 管中,800 r/min 离心 5 min,加入含 0.5% BSA 的 PBS 室温孵育 30 min,800 r/min 再次离心 5 min,加入 300  $\mu$ L LDLR 一抗,稀释比为 1:200, PBS 洗 1~2 次后加入 300  $\mu$ L LDLR 特异性荧光二抗,稀释比为 1:400,加入 Normal IgG 抗体作为阴性对照,室温孵育 30 min 后流式细胞仪检测细胞表面 LDLR 荧光。

### 1.8 统计学分析

使用 GraphPad Prism 6.02、FIJI、Flow jo 软件进行分析。实验数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 慢病毒感染检测

分别在亮视野和蓝色激发光光源下观察 HepG2/LO2 细胞的形态及其荧光强度,结果显示:与无慢病毒(non lentivirus, non-Lv)感染的肝细胞相比,经嘌呤霉素筛选后镜下可见慢病毒感染的 HepG2 和 LO2 细胞内各组均可见绿色荧光(图 1),结果提示已获得过表达和 3 种不同序列干扰 IDOL 慢病毒感染的肝细胞模型。



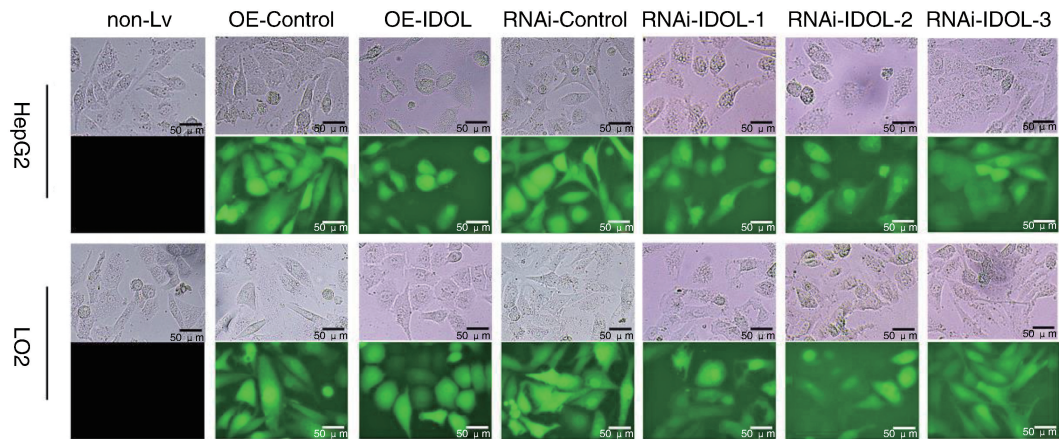


图 1. 慢病毒感染后肝细胞荧光表达

倒置荧光显微镜明场(HepG2 上图、LO2 上图)与暗场(HepG2 下图、LO2 下图)拍照结果。

Figure 1. Fluorescence expression after lentivirus infection

## 2.2 IDOL 和 LDLR 的蛋白表达水平

与 OE-Control 组比较, HepG2/LO2 细胞中 OE-IDOL 组的 IDOL 蛋白表达显著升高, LDLR 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ , 图 2A;  $P < 0.01$ , 图 2B)。与 RNAi-Control 组比较, HepG2 细胞中 RNAi-IDOL-2 组的 IDOL 表达降低, LDLR 表达升高 ( $P < 0.05$ , 图

2C); 同样 LO2 细胞中 RNAi-IDOL-2 组的 IDOL 表达降低, LDLR 表达升高 ( $P < 0.05$ , 图 2D); 其余 RNAi-IDOL 细胞模型中蛋白表达水平较 RNAi-Control 组均无显著性改变 ( $P > 0.05$ , 图 2C 和 2D), 故 HepG2 和 LO2 都选用 RNAi-IDOL-2 病毒构建体进行后续实验(下文描述为“RNAi-IDOL”组)。

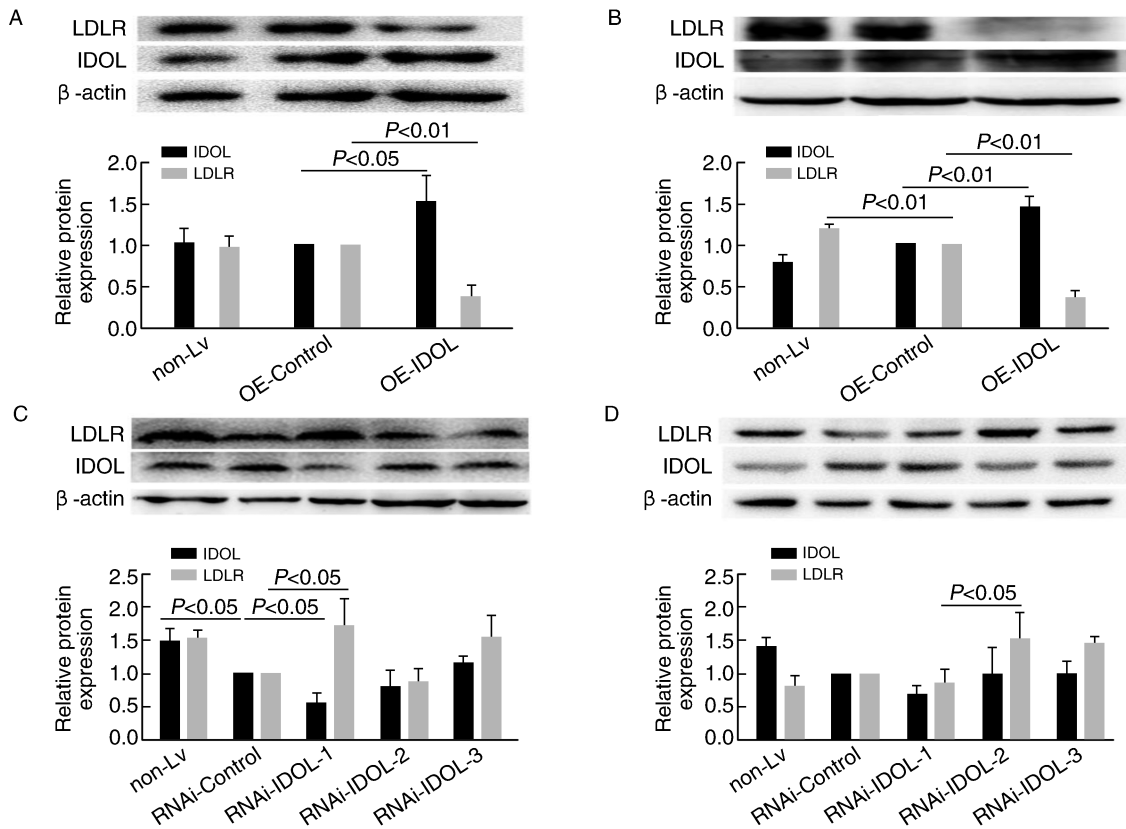


图 2. OE/RNAi-IDOL 慢病毒感染的 HepG2 和 LO2 细胞中 IDOL 和 LDLR 的蛋白表达水平 ( $n=3$ )

A 为 OE-IDOL 感染 HepG2 细胞, B 为 OE-IDOL 感染 LO2 细胞; C 为 RNAi-IDOL 感染 HepG2 细胞, D 为 RNAi-IDOL 感染 LO2 细胞。

Figure 2. Protein expression level of IDOL and LDLR in HepG2 and LO2 cells infected by OE/RNAi-IDOL lentivirus ( $n=3$ )



### 2.3 肝细胞内脂滴含量和胆固醇水平

相较于模拟高脂环境的 Control 组,加入姜黄素和瑞舒伐他汀处理组的细胞内相对脂滴含量、相对胆固醇含量均增多 ( $P<0.01$ ,图 3、图 4 和图 5); RNAi-IDOL 组与药物组具有相同的显著升高趋势 ( $P<0.01$ ),而高表达 IDOL 组则全部显著降低 ( $P<0.01$ ,图 3 和图 4)。与 RNAi-IDOL+Control 组相比

较, RNAi-IDOL+姜黄素组中脂滴含量和胆固醇含量则呈现显著升高 ( $P<0.05$ ,图 3、图 4 和图 5)。与 OE-IDOL+Control 组相比, OE-IDOL+姜黄素组脂滴含量和胆固醇含量显著升高 ( $P<0.05$ ,图 3、图 4 和图 5)。以上结果表明 IDOL 高表达会减少肝细胞内脂滴含量和胆固醇含量,加入姜黄素处理后可以升高肝细胞内脂滴含量和胆固醇含量。

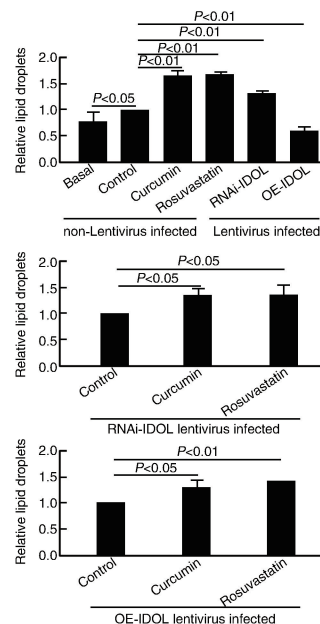
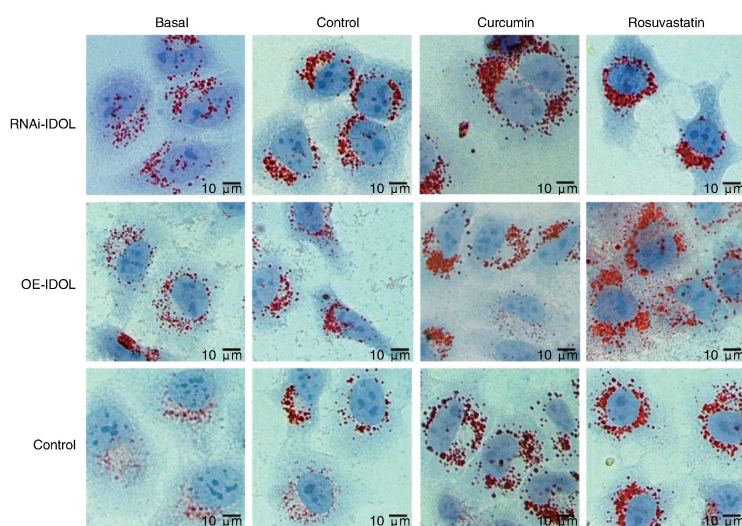


图 3. Curcumin 升高 HepG2 细胞内脂滴含量 ( $n=3$ )

HepG2 细胞与 Curcumin 共孵育 24 h 后,通过油红 O 染色观察细胞内脂滴变化情况。

Figure 3. Curcumin increased the intracellular lipid droplets in HepG2 cells ( $n=3$ )

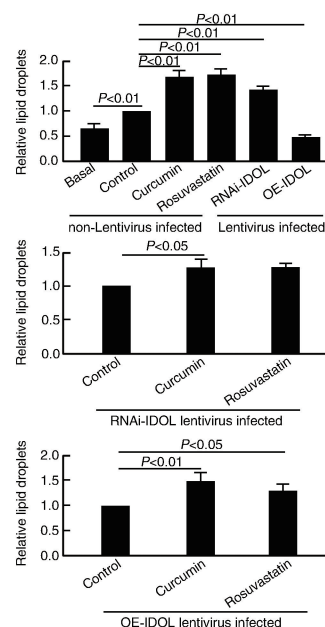
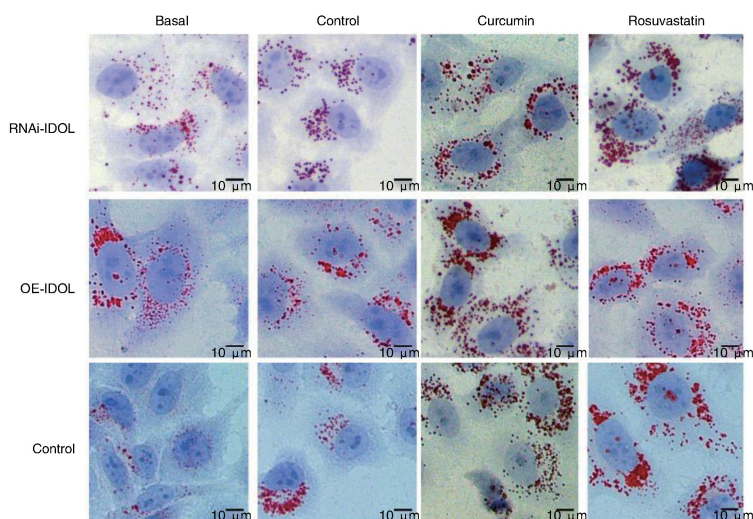


图 4. Curcumin 升高 LO2 细胞内脂滴含量 ( $n=3$ )

LO2 细胞与 Curcumin 共孵育 24 h 后,通过油红 O 染色观察细胞内脂滴变化情况。

Figure 4. Curcumin increased the intracellular lipid droplets in LO2 cells ( $n=3$ )

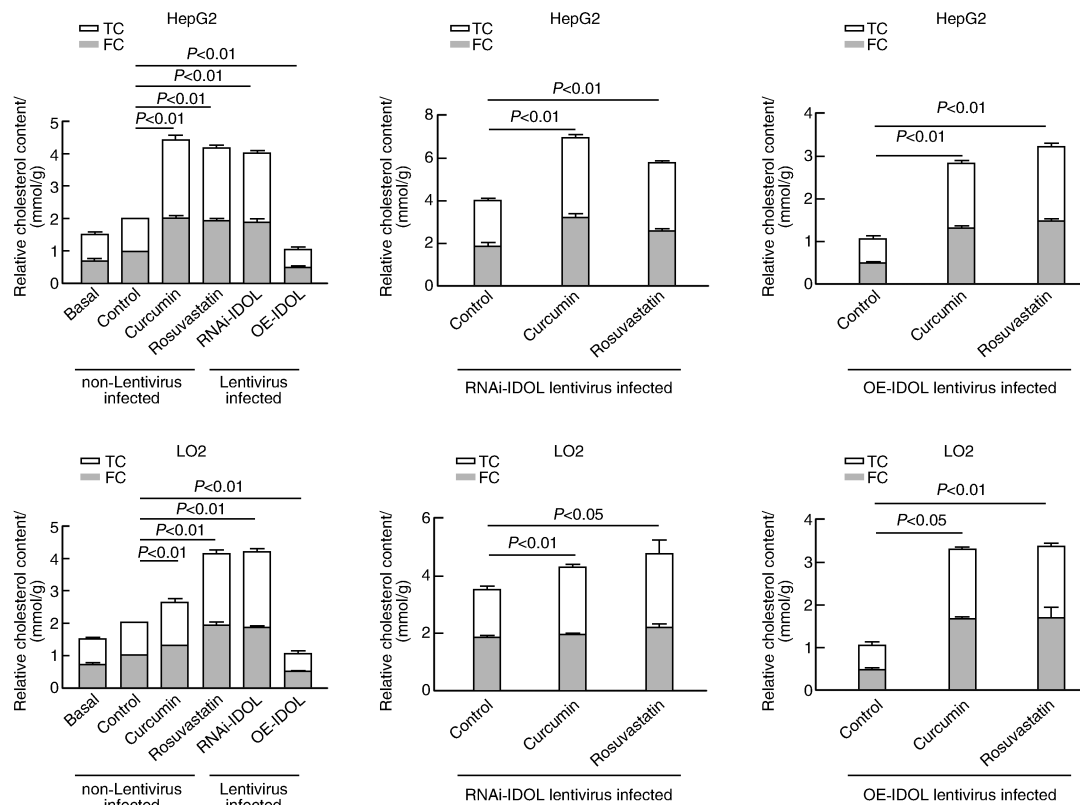


图 5. Curcumin 升高肝细胞内胆固醇含量 ( $n=3$ )

HepG2/LO2 细胞与 Curcumin 共孵育 24 h 后,通过胆固醇试剂盒检测细胞内胆固醇含量。

Figure 5. Curcumin increased the cholesterol content in HepG2/LO2 cells ( $n=3$ )

## 2.4 肝细胞摄取 LDLC 能力和细胞表面 LDLR 丰度检测

在 HepG2 和 LO2 两种肝细胞中,相较于 Control 组,姜黄素组细胞摄取 LDLC 量增多 ( $P < 0.01$ , 图 6 和图 7),并且 LDLR 丰度升高 ( $P < 0.05$ , 图 8), RNAi-IDOL 组细胞 LDLR 丰度升高 ( $P < 0.05$ , 图 8),而 OE-IDOL 组细胞表面 LDLR 丰度均降低 ( $P < 0.01$ , 图 8);与 RNAi-IDOL+Control 组相比,加入药物处理后的细胞内红色荧光和细胞膜表面 LDLR 荧光显著增强 ( $P < 0.01$ , 图 6 和图 7;  $P < 0.01$ , 图 8);与 OE-IDOL+Control 组相比,加入药物处理后的细胞内红色荧光和细胞膜表面 LDLR 荧光显著增强 ( $P < 0.01$ , 图 6 和图 7;  $P < 0.05$ , 图 8),以上结果表明 IDOL 表达升高会降低肝细胞表面 LDLR 丰度,加入姜黄素可以恢复 LDLR 在细胞膜的分布丰度,促进肝细胞摄取 LDLC。

## 3 讨论

动脉粥样硬化的特征为大、中动脉壁的脂质蓄积和炎症反应<sup>[18]</sup>。国内外心血管疾病治疗指南均

将 LDLC 列为进行脂质调节障碍类疾病治疗的主要目标<sup>[19-20]</sup>。目前临床上主要使用他汀类药物来降低血浆 LDLC 水平,这类降脂药具有显著的降低动脉粥样硬化性心血管疾病患病风险的作用<sup>[21]</sup>。因部分患者面临着对他汀药物不耐受的问题<sup>[22-23]</sup>,因此,多类型的调节血脂异常的药物与分子靶标的研究仍成为临床关注的焦点。

肝细胞通过 LDLR 介导的内吞作用清除血浆内约 75% 的 LDLC<sup>[24-25]</sup>,探究升高肝细胞膜 LDLR 分布丰度具有改善血脂异常的临床意义。LDLR 主要受转录水平及转录后水平的精细调节,转录后水平的调节因子集中在 PCSK9 和 IDOL 两者之间,其中 IDOL 可诱导 LDLR 泛素化在溶酶体中降解<sup>[13]</sup>。研究表明姜黄素明确的降脂作用<sup>[26-29]</sup>,且有报道其通过抑制 PCSK9 的表达促进肝细胞摄取脂质<sup>[15-17]</sup>,本文持续研究转录后调节 LDLR 的另外一因子 IDOL 在姜黄素降脂中的作用。

我们在研究中使用体外培养 HepG2 (人肝癌细胞) 和 LO2 (永生化肝细胞) 两种肝细胞作为实验对象,利用 LDLC 对细胞荷脂,来模拟高血脂环境<sup>[30]</sup>。为了明确 IDOL 在姜黄素促进肝细胞脂质摄取过程

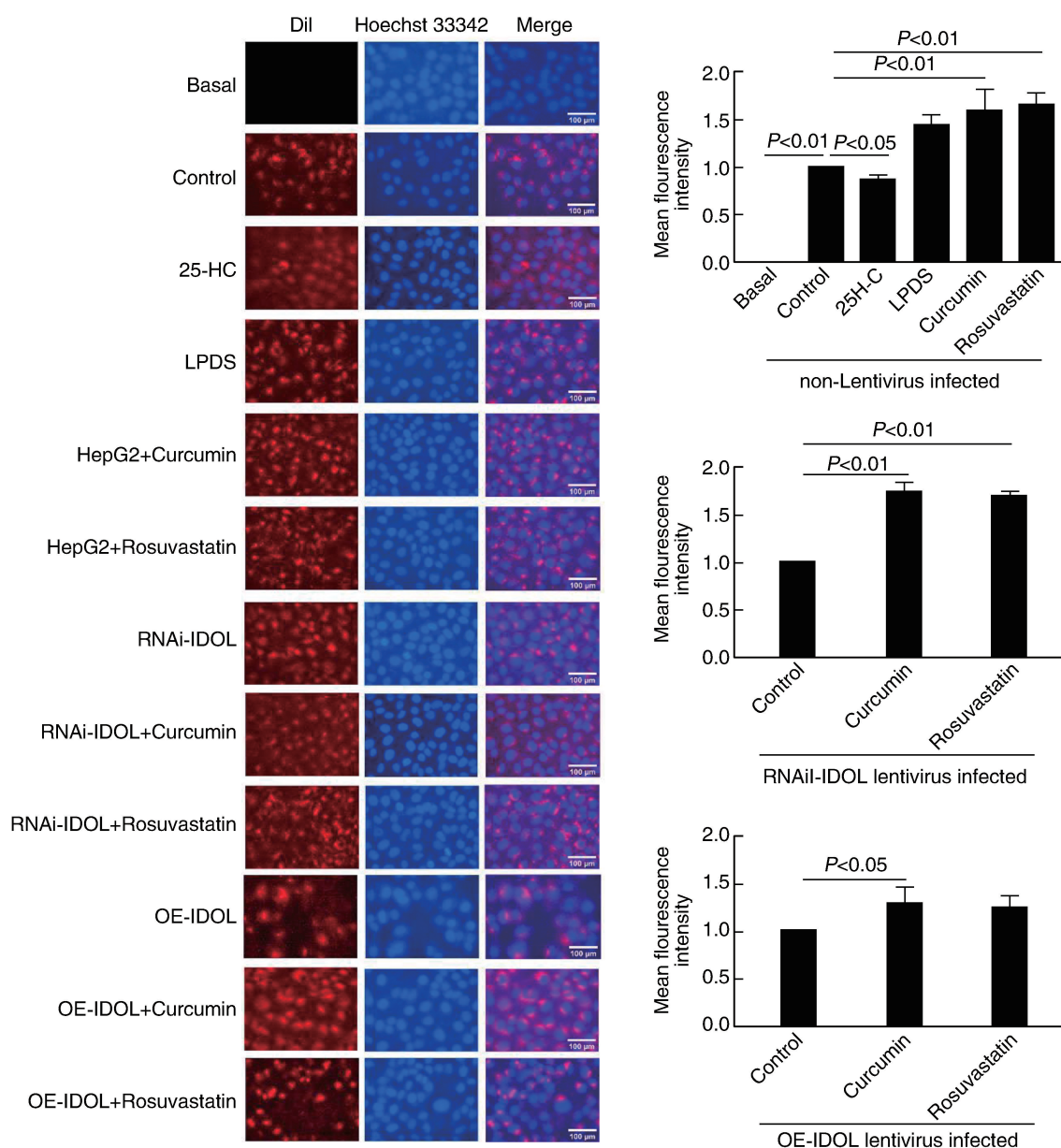


图 6. Curcumin 促进 HepG2 细胞摄取 LDLC ( $n=3$ )

与 DiI-LDL 体外共孵育后 HepG2 的细胞形态和荧光强度半定量统计分析。

Figure 6. Curcumin promoted the LDLC uptake in HepG2 cells ( $n=3$ )

中的作用,利用过表达和干扰 IDOL 慢病毒载体分别感染这两种肝细胞,通过免疫荧光显微镜观察细胞内绿色荧光强度及 Western blot 检测蛋白表达水平,筛选出慢病毒感染效果最佳的 OE-IDOL 和 RNAi-IDOL-2 的肝细胞系用于后续研究。

为了检测过表达及干扰 IDOL 慢病毒感染肝细胞后脂滴含量及胆固醇的含量,选用油红 O 染色和胆固醇酶法对其进行检测,干扰 IDOL 后可以观察到肝细胞内脂滴含量和胆固醇含量显著增多;过表达 IDOL 后肝细胞内脂滴含量和胆固醇含量显著减

少,经与姜黄素共孵育 24 h 后,可以观察到 RNAi-IDOL 和 OE-IDOL 肝细胞内脂滴和胆固醇含量较药物处理前均显著增多,与已报道的姜黄素作用后肝细胞内胆固醇含量显著增高的结果一致<sup>[31-32]</sup>,表明姜黄素可以通过抑制 IDOL 的表达,使肝细胞内的胆固醇含量升高。

为了明确细胞内胆固醇含量的增高是否与肝细胞摄取 LDLC 能力增强有关,我们进一步通过 DiI-LDL 摄取及免疫流式细胞术研究肝细胞 LDLR 摄取 LDLC 的能力,发现无药物处理的 RNAi-IDOL



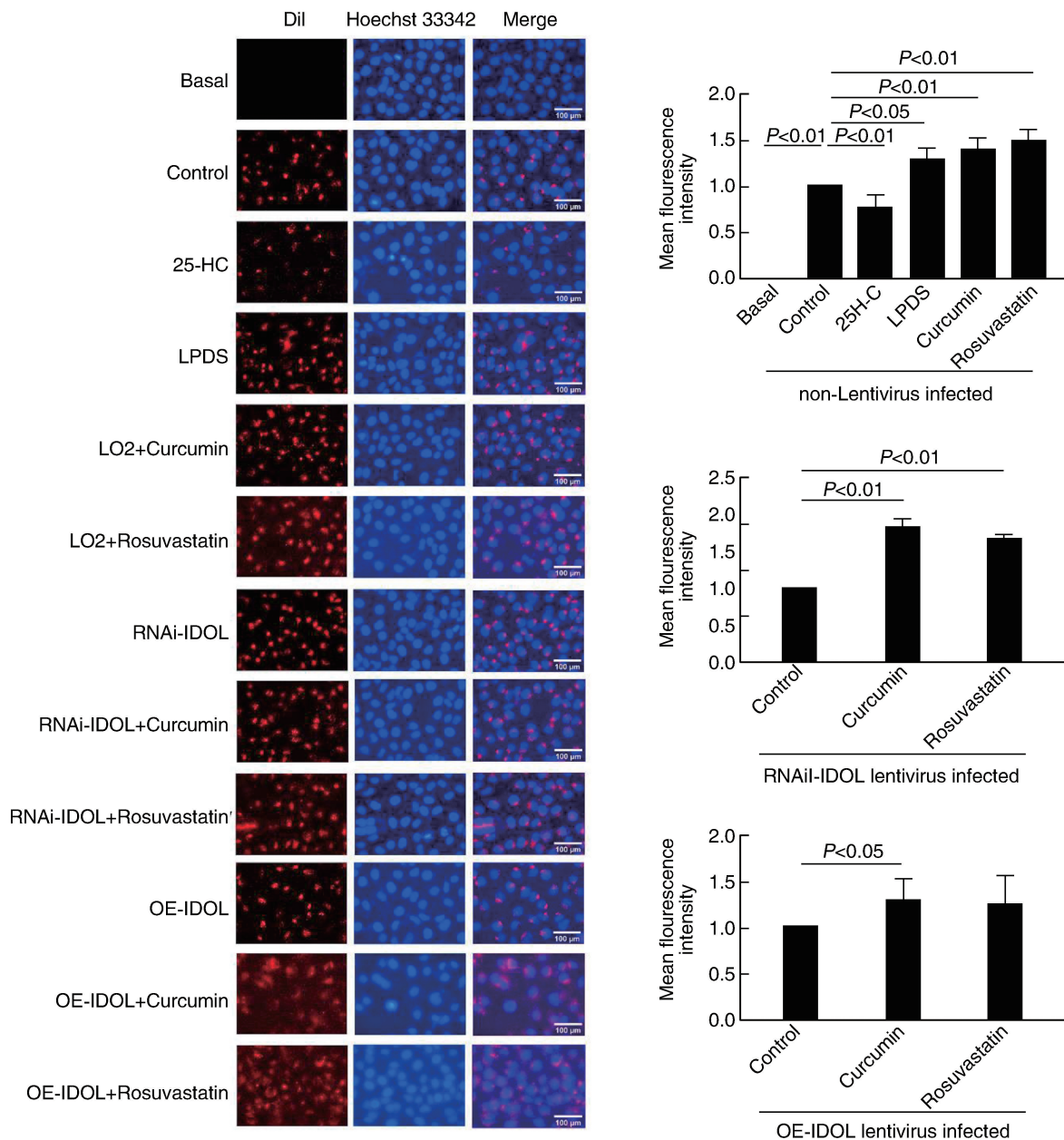


图 7. Curcumin 促进 LO2 细胞摄取 LDLC ( $n=3$ )

与 DiI-LDL 体外共孵育后 LO2 的细胞形态和荧光强度半定量统计分析。

Figure 7. Curcumin promoted the LDLC uptake in LO2 cells ( $n=3$ )

肝细胞内 LDLC 的摄取显著升高,细胞膜表面 LDLR 分布显著增多;OE-IDOL 肝细胞内 LDLC 的摄取显著降低,细胞膜表面 LDLR 分布显著减少;经与姜黄素作用后 RNAi-IDOL 和 OE-IDOL 慢病毒感染细胞摄取 LDLC 的能力均显著增强,以上研究结果表明姜黄素可显著抑制 IDOL 的蛋白表达,进而提高受 IDOL 转录后调节的 LDLR 蛋白水平,提示姜黄素可降低 IDOL 水平,升高细胞膜表面 LDLR 丰度,促进肝细胞摄取 LDLC。

综上所述,我们利用 LDLC 荷脂体外培养的肝细胞,初步证实姜黄素能够下调 IDOL 蛋白水平,升

高肝细胞膜表面 LDLR 分布丰度,从而促进肝细胞摄取 LDLC,以期为姜黄素作为临床降脂辅助治疗药物提供理论依据。

(致谢:本实验主要在南华大学生物化学与分子生物学教研室脂蛋白与动脉硬化实验室完成,感谢老师及同学的支持以及帮助)

#### [参考文献]

- [1] DONG Z, JING L, MIAO W, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications [J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(4): 203-212.

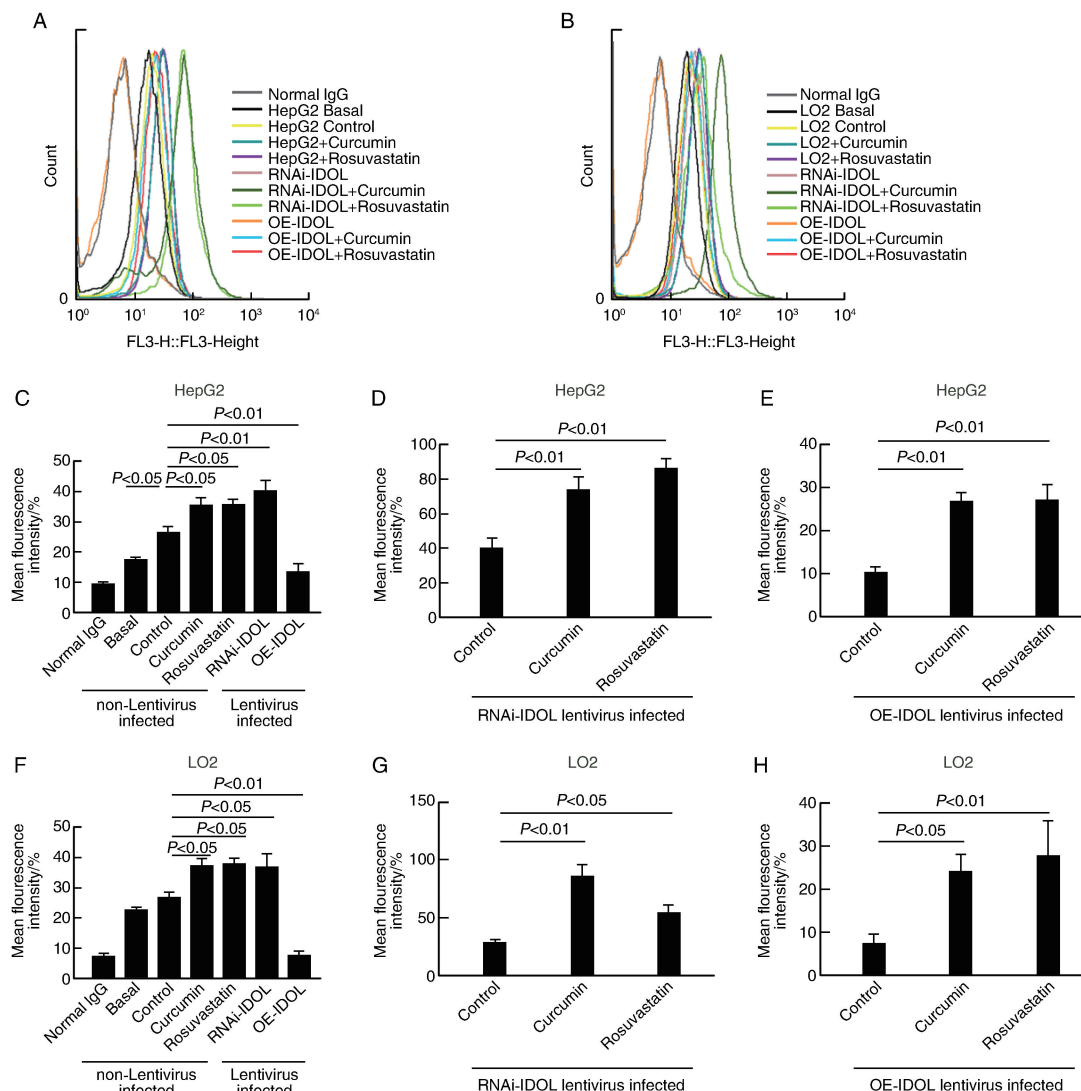


图 8. Curcumin 升高肝细胞膜表面 LDLR 分布丰度 ( $n=3$ )

A 为 HepG2 细胞流式结果图, B 为 LO2 细胞流式结果图; C、D、E、F、G、H 为相应统计分析结果。

Figure 8. Curcumin increased the LDLR abundance in HepG2/LO2 cells surface ( $n=3$ )

- [2] MACH F, BAIGENT C, CATAPANO A L, et al. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias; lipid modification to reduce cardiovascular risk [J]. Eur Heart J, 2020, 41(1): 111-188.
- [3] ISTVAN E S, DEISENHOFER J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase [J]. Science, 2001, 292(5519): 1160-1164.
- [4] SIMIC I, REINER Z. Adverse effects of statins-myths and reality [J]. Curr Pharm Des, 2015, 21: 1220-1226.
- [5] CHASMAN D, GIULIANINI F, MACFADYEN J, et al. Genetic determinants of statin-induced low-density lipoprotein cholesterol reduction: the justification for the use of statins in prevention: an intervention trial evaluating rosuvastatin (Jupiter) trial [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2012, 5(2): 257-264.
- [6] TURNER R M, PIRMOHAMED M. Statin-related myotoxicity: a comprehensive review of pharmacokinetic, pharmacogenomic and muscle components [J]. J Clin Med, 2019, 9(1): 22.
- [7] BOUTBIR J, SANVEE G M, PANAJATOVIC M V, et al. Mechanisms of statin-associated skeletal muscle-associated symptoms [J]. Pharmacol Res, 2020, 154: 104201.
- [8] GOEL A, KUNNUMAKKARA A B, AGGARWAL B B, et al. From kitchen to clinic [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75: 787-809.
- [9] ESMAILY H, SAHEBKAR A, IRANSHAH M, et al. An investigation of the effects of curcumin on anxiety and depression in obese individuals: a randomized controlled trial [J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(5): 332-338.
- [10] PANAHI Y, HOSSEINI M S, KHALILI N, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcuminoid-piperine combination in subjects with metabolic syndrome: a ran-

- domized controlled trial and an updated Meta-analysis[J]. Clin Nutr, 2015, 34(6): 1101-1108.
- [11] SAHEBKAR A. Curcuminoids for the management of hypertriglyceridaemia[J]. Nat Rev Cardiol, 2014, 11(2): 123.
- [12] TAKEMOTO M, LIAO J K. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(11): 1712-1719.
- [13] CALKIN A C, GOULT B T, ZHANG L, et al. FERM-dependent E3 ligase recognition is a conserved mechanism for targeted degradation of lipoprotein receptors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(50): 20107-20112.
- [14] SORRENTINO V, ZELCER N. Post-transcriptional regulation of lipoprotein receptors by the E3-ubiquitin ligase inducible degrader of the low-density lipoprotein receptor [J]. Curr Opin Lipidol, 2012, 23(3): 213-219.
- [15] 王楚瑶, 蒋素素, 向德彪, 等. 姜黄素通过调节 PCSK9 促进肝细胞摄取血浆 LDL-C[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(10): 1415-1421.
- [16] CAI Y, LU D, ZOU Y, et al. Curcumin protects against intestinal origin endotoxemia in rat liver cirrhosis by targeting PCSK9[J]. J Food Sci, 2017, 82(3): 772-780.
- [17] TAI M H, CHEN P K, CHEN P Y, et al. Curcumin enhances cell-surface LDLR level and promotes LDL uptake through downregulation of PCSK9 gene expression in HepG2 cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2014, 58(11): 2133-2145.
- [18] VEGA G L, GRUNDY S M. Current trends in non-HDL cholesterol and LDL cholesterol levels in adults with atherosclerotic cardiovascular disease [J]. J Clin Lipidol, 2019, 13(4): 563-567.
- [19] FERENC B A, GINSBERG H N, GRAHAM I, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel[J]. Eur Heart J, 2017, 38(32): 2459-2472.
- [20] GRUNDY S M, STONE N J, BAILEY A L, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA guideline on the management of blood cholesterol; a report of the American college of cardiology/American heart association task force on clinical practice guidelines[J]. Circulation, 2019, 139(25): e1082-e1143.
- [21] KAPUR N K, MUSUNURU K. Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk[J]. Vasc Health Risk Manag, 2008, 4(2): 341-353.
- [22] TARN D M, PLETCHER M J, TOSQUI R, et al. Primary nonadherence to statin medications: survey of patient perspectives[J]. Prev Med Rep, 2021, 22: 101357.
- [23] GRAVERSEN C B, LARSEN M L, SCHMIDT E B. Statin intolerance[J]. Ugeskr Laeger, 2015, 177(36): V03150271.
- [24] JEON H, BLACKLOW S C. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor[J]. Annu Rev Biochem, 2005, 74: 535-562.
- [25] RADHAKRISHNAN A, GOLDSTEIN J L, MCDONALD J G, et al. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance[J]. Cell Metab, 2008, 8(6): 512-521.
- [26] 周音频, 宁琳, 向立权, 等. 姜黄素增强脂多糖跨膜转运的机制及其抗动脉粥样硬化作用[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(7): 1617-1619.
- [27] NABAVI S F, DAGLIA M, MOGHADDAM A H, et al. Curcumin and liver disease: from chemistry to medicine [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2014, 13(1): 62-77.
- [28] LV Y L, JIA Y, WAN Z, et al. Curcumin inhibits the formation of atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice by suppressing cytomegalovirus activity in endothelial cells[J]. Life Sci, 2020, 257: 117658.
- [29] MAJEED M L, GHAFIL F A, FATIMA G, et al. Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory effects of curcumin on hypercholesterolemic male rabbits[J]. Indian J Clin Biochem, 2021, 36(1): 74-80.
- [30] 欧露, 张彩平, 刘英, 等. PCSK9 及 IDOL 在姜黄素促进 HepG2 细胞摄取 LDL-C 中的作用[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(9): 1286-1291.
- [31] 程静屏, 阳学风. 姜黄素对人肝 LO2 细胞胆固醇合成及转运蛋白表达的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(3): 6-11.
- [32] 滕耀红, 祝骥, 庞珍珍, 等. 姜黄素对非酒精性脂肪肝细胞胆固醇代谢的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(2): 115-120.
- (此文编辑 许雪梅)