

[文章编号] 1000-4718(2008)10-2029-04

黄芪多糖对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫 细胞胆固醇流出的影响*

杨志红¹, 龚伟¹, 陈凤玲², 周闻白¹, 张烁¹, 李连喜¹, 梁文昌¹, 杨叶虹¹, 胡仁明^{1,Δ}
(复旦大学¹附属华山医院内分泌科,²内分泌糖尿病研究所,上海 200040)

[摘要] 目的:以 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞为研究对象,观察不同浓度黄芪多糖对胆固醇流出和 ABCA1 基因表达的影响。方法:将 THP-1 细胞诱导分化成泡沫细胞,用不同浓度黄芪多糖对其干预 24 h,γ 计数器检测胆固醇流出,RT-PCR 及流式细胞仪检测 ABCA1 的表达。结果:黄芪多糖呈剂量依赖性(10-100 mg/L)促进胆固醇流出;增加 ABCA1 的表达。结论:黄芪多糖可能通过增加 ABCA1 的表达而促进胆固醇流出。

[关键词] 黄芪多糖;巨噬细胞;胆固醇;ATP 结合匣式转运子

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effect of astragalus polysaccharides on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells

YANG Zhi-hong¹, GONG Wei¹, CHEN Feng-ling², ZHOU Wen-bai¹, ZHANG Shuo¹, LI Lian-xi¹, LIANG Wen-chang¹, YANG Ye-hong¹, HU Ren-ming¹

(¹Department of Endocrinology, Huashan Hospital, ²Institute of Endocrinology and Diabetology, Fudan University, Shanghai 200040, China. E-mail: renminghu@fudan.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effect of astragalus polysaccharides (Aps) on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells. **METHODS:** After exposed to Aps at different doses, cholesterol efflux and ABCA1 protein levels in cultured THP-1 macrophage-derived foam cells were determined by a γ counter and flow cytometry, respectively. **RESULTS:** Aps increased cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells with dose dependent pattern and resulted in an increase in the expression of ABCA1 protein in THP-1 macrophage-derived foam cells. **CONCLUSION:** The increase in cholesterol efflux by Aps might be related to the up-regulation of ABCA1.

[KEY WORDS] Astragalus polysaccharide; Macrophages; Cholesterol; ATP binding cassette transporter

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种严重威胁人类健康的疾病,由 AS 所致心血管疾病已成为我国居民死亡的主要原因。黄芪多糖(astragalus polysaccharides, Aps)是黄芪的主要活性成分之一,近代对其药理活性的研究日渐广泛和深入。但对其研究主要集中在其增强免疫功能方面,其它一些功能还未完全阐明。

三磷酸结合盒腺苷转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1)是一种整合膜蛋白,它以 ATP 为能源,促进细胞内游离胆固醇和磷脂的流出,在胆固醇逆转运和 HDL 生成的起始步骤中起重要作用,ABCA1 功能障碍将导致巨噬细胞内大量的胆固醇沉积而成为泡沫细胞,继而浸润血管壁,促进

As 的发生发展^[1-3]。本实验以 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞为研究对象,探讨黄芪多糖在 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中的作用及其对 ABCA1 表达的影响,以了解其可能的分子机制。

材 料 和 方 法

1 材料与试剂

THP-1 细胞由中国科学院上海细胞生物研究所细胞库提供。RPMI-1640 培养基、青霉素购自 Gibco,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Hyclone,逆转录-多聚酶链反应试剂盒、Hotstar PCR 试剂盒为 Qiagen 产品;牛血清白蛋白(BSA)、佛波酯(phorbolmyristateacetate, PMA)、乙酰化低密度脂蛋白

[收稿日期] 2007-06-19 [修回日期] 2008-06-09

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30670999)

Δ 通讯作者 Tel:021-62489999; E-mail: renminghu@fudan.edu.cn

(Ac-LDL)、载脂蛋白 A-I (apoprotein A-1, apoA-I) 为 Sigma 产品;总 RNA 提取试剂盒 (Trizol) 为 Invitrogen 产品;ABCA1 和 β -actin 引物均由上海赛百盛生物工程公司合成;RIPA 裂解液和 PMSF 蛋白酶抑制剂购自上海申能博彩公司,ABCA1 多克隆抗体购自 Biosource,羊抗兔 IgG、生物素化分子量标准、生物素抗体和增强化学发光显色试剂盒购自 Cell Signaling;其它试剂均为进口或国产分析纯。

2 细胞培养及泡沫细胞模型建立

THP-1 细胞用含有 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中静置培养,培养液中加 Hepes 10 mmol/L 和青霉素、链霉素各 1.0 × 10⁵ U/L,在每次实验前用 160 nmol/L PMA 孵育 THP-1 细胞 24 h,使其诱导分化成巨噬细胞;然后在含 50 mg/L Ac-LDL 培养液中培养 48 h,诱导成泡沫细胞。

3 胆固醇流出实验

胆固醇流出分析按文献^[4]描述的方法进行,THP-1 细胞诱导分化成巨噬细胞后,用 0.5 mCi [³H]胆固醇和 50 mg/L (Ac-LDL) 及含有 10% FBS RPMI-1640 培养液共孵育 48 h 之后,用 PBS 液洗涤细胞,再用不同浓度 Aps (10-100 mg/L) 以及含 2 g/L BSA RPMI-1640 培养液培养细胞 24 h 之后,再用 PBS 液洗涤细胞,在无血清含 10 mg/L apoA-I 新培养液中培养细胞 12 h,用闪烁计数法分别检测培养液和细胞的 [³H]胆固醇,胆固醇流出率 = (培养液 counts · min⁻¹值 ÷ 总 counts · min⁻¹值) × 100%,其中总 counts · min⁻¹值 = (培养液 counts · min⁻¹值 + 细胞 counts · min⁻¹值)。

4 逆转录聚合酶链反应

THP-1 巨噬细胞在含 50 mg/L Ac-LDL 培养液中培养 48 h,然后用无血清培养液加各种浓度黄芪多糖培养细胞 24 h,PBS 液洗涤细胞,用 10 mg/L apoA-1 继续培养细胞 12h,收集各组细胞,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取各组细胞总 RNA 2 μg 逆转录合成 cDNA,再取逆转录产物 1 μL 进行 PCR 循环:94 °C,温育 15 min,94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,共 30 个循环,末次循环 72 °C 10 min。ABCA1 (GenBank 序列号:AF285167) 的引物序列:上游 5' - GCT-GCTGAAGCCAGGGCATGGG - 3',下游 5' - GT-GGGCAGTGGCCATACTCC - 3',PCR 扩增产物长度为 306 bp。 β -actin 引物序列:上游 5' - AGCGAGCATCCCCAAAGTT - 3',下游 5' - GGGCACGAAGGCTCATCATT - 3',扩增产物长度为 268 bp。反应结束后,取反应产物 10 μL 进行 1.5%

琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,UVP 型凝胶图像分析系统摄图,并分析各组目的基因及 β -actin 基因灰度值,以二者的比值代表 ABCA1 mRNA 的表达。

5 油红 O 染色

在 24 孔板中加入处理洁净的盖玻片,加入对数生长期 THP-1 细胞进行诱导分化成泡沫细胞,吸弃培养液,用 PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,吸去固定液,油红 O 染色液室温染色 60 min,水性封片剂封片,显微镜下观察。

6 流式细胞仪检测 THP-1 细胞 ABCA1 的表达

各组细胞经处理后,4% 多聚甲醛室温下固定 30 min,再用含 1% FBS 的 PBS 洗 3 遍,每次 5 min,加入含 1% FBS、1.5% ABCA1 I 抗的 PBS,置室温 60 min,用含 1% FBS 的 PBS 洗 3 遍,按 1:200 加入 FITC 标记的羊抗兔 II 抗,室温避光反应 30 min。胰酶消化细胞,含 1% FBS 的 PBS 洗 3 遍后,移入测试管,上机检测细胞平均荧光强度。阴性对照不加 FITC 标记的羊抗兔 II 抗,代之以小鼠 IgG。避光 30 min 后用流式细胞仪检测。每份标本收集 10 000 个细胞进行检测。

7 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件分析数据,两个均数间的比较采用 *t* 检验。

结 果

1 THP-1 巨噬细胞源性泡沫化

用 50 mg/L Ac-LDL 与 THP-1 巨噬细胞共同培养 48 h。THP-1 巨噬细胞经油红 O 染色,发现细胞内有大量脂滴存在,符合泡沫细胞的形态特点,见图 1。

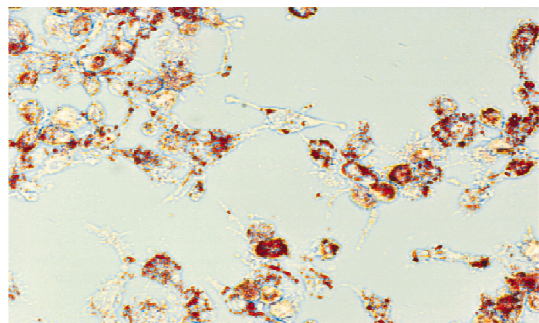


Fig 1 Oil red O staining of THP-1 macrophage-derived foam cells (×200).

图 1 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞油红 O 染色

2 Aps 对泡沫细胞胆固醇流出的影响

用 50 mg/L Ac-LDL 与 THP-1 巨噬细胞共同培养 48 h 使其泡沫化后,加不同浓度 Aps 作用 24 h,

检测胆固醇流出。结果显示,Aps 对泡沫细胞胆固醇流出的影响随 Aps 浓度增加而逐渐增加,与对照组比较有显著差异($P < 0.05$),见表 1。

表 1 Aps 对泡沫细胞胆固醇流出的影响

Tab 1 The action of astragalus polysaccharides (Aps) on cholesterol efflux in THP - 1 macrophage - derived foam cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Aps concentration (mg/L)	Ratio of cholesterol efflux (%)
0	7.16 ± 0.25
10	7.55 ± 0.15
20	8.42 ± 0.11 *
50	12.51 ± 0.66 *
100	14.95 ± 0.27 *

* $P < 0.05$ vs control (0 mg/L).

3 Aps 对细胞 ABCA1 mRNA 表达的影响

不同浓度 Aps 干预巨噬细胞源性泡沫细胞后,抽提细胞总 RNA,进行逆转录聚合酶链反应,结果显示:随着 Aps 浓度的增加,ABCA1 基因表达逐渐增加,见表 2、图 2。

表 2 Aps 干预巨噬细胞源性泡沫细胞后 ABCA1 mRNA 表达变化

Tab 2 The effect of astragalus polysaccharides (Aps) on the mRNA expression of ABCA1 in THP - 1 macrophage - derived foam cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Aps concentration (mg/L)	ABCA1/ β -actin
0	0.966 ± 0.038
10	1.120 ± 0.104
20	1.230 ± 0.143
50	1.360 ± 0.176 *
100	1.440 ± 0.139 *

* $P < 0.05$ vs control (0 mg/L).

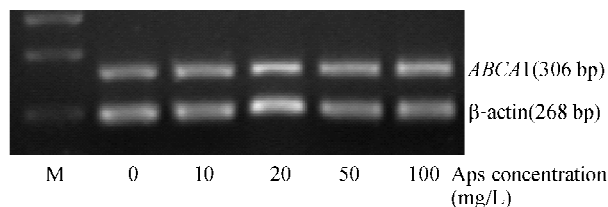


Fig 2 The effect of astragalus polysaccharides (Aps) on the mRNA expression of ABCA1 in THP - 1 macrophage - derived foam cells.

图 2 Aps 对巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 mRNA 表达的影响

4 流式细胞仪检测 THP - 1 细胞 ABCA1 的表达

ABCA1 为膜蛋白,本试验利用 FITC 标记的羊抗兔 II 抗标记 ABCA1 蛋白,利用流式细胞仪检测不同浓度 Aps 干预巨噬细胞源性泡沫细胞后 ABCA1 的

表达,观察到随着 Aps 浓度的增加,ABCA1 的荧光强度逐渐增强,与对照组相比差异显著,见表 3。

表 3 不同浓度 Aps 干预巨噬细胞源性泡沫细胞后 ABCA1 荧光强度

Tab 3 The effect of astragalus polysaccharides (Aps) on fluorescence intensity of ABCA1 in THP - 1 macrophage - derived foam cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Aps concentration (mg/L)	fluorescence intensity of ABCA1
0	7.16 ± 0.25
10	7.55 ± 0.15
20	8.42 ± 0.11
50	12.51 ± 0.66 *
100	14.95 ± 0.27 *

* $P < 0.05$ vs control (0 mg/L).

讨 论

黄芪为豆科多年生草本植物,具有补气益卫、托毒生肌之功能。其主要活性成分为黄芪皂甙和黄芪多糖。黄芪多糖是水提取液中所分得的均一多糖部分,主要由 Aps I、II 组成。黄芪多糖 I 是杂多糖,由 D - 葡萄糖、D - 半乳糖和 L - 阿拉伯糖组成,克分子比为 1.75:1.63:1,平均分子量约为 36 300,黄芪多糖 II 为葡聚糖,平均分子量为 12 300,由 α - (1 \rightarrow 4) - D - 葡萄糖的缩合键组成。自 1982 年提取以来,对其进行的一系列研究表明,它对机体的免疫功能有广泛的影响^[5]。黄芪多糖有调节细胞因子活性作用,可能通过抑制和清除活性氧自由基,从而保护胰岛 β 细胞不再受免疫性损害^[6]。另外,目前国内已经开展了多项研究以探讨黄芪多糖在免疫调节、保护心肌、降血糖、延缓衰老和促进机体代谢等方面的作用^[7]。在动物实验中发现黄芪多糖具有双向性调节血糖的作用,可使葡萄糖负荷后的小鼠的血糖水平下降,并能明显对抗肾上腺素引起的高血糖反应。高血糖状态时常合并存在高甘油三酯血症,研究也发现黄芪多糖可使糖尿病大鼠血糖血脂明显下降,改善其物质代谢^[8]。

胆固醇在巨噬细胞中蓄积形成泡沫细胞是 AS 最早期的病理变化,也是脂纹和 AS 损害形成的初级阶段。巨噬细胞摄取氧化低密度脂蛋白和富含甘油三酯的脂蛋白而转化成泡沫细胞。巨噬细胞向外排出胆固醇可减慢其泡沫化进程,其中关键的调节因子是 ABCA1。在肝、肾、肾上腺、肠等都有 ABCA1 mRNA 表达,在动脉粥样硬化病变处,巨噬细胞源性泡沫细胞也有大量的 ABCA1 mRNA 表达^[9]。虽然巨噬细胞中的 ABCA1 mRNA 和蛋白质的基础水平

较低,但两者都可由胆固醇负荷诱导产生^[10]。ABCA1积极参与细胞内脂质包括胆固醇的跨膜输出,其缺陷可以导致 HDL 缺乏和泡沫细胞形成,因此被认为与动脉粥样硬化密切相关。

已知细胞内胆固醇流出有 3 种不同的途径^[11]。第一,血浆 HDL 颗粒通过被动扩散促进胆固醇流出。游离胆固醇分子自发地从细胞膜释放,经水相扩散,通过碰撞结合于 HDL 颗粒;第二,清道夫受体 B-I(SR-BI)也使胆固醇从细胞流出到 HDL 颗粒,抑制 HDL 与 SR-BI 结合的抗体可阻碍胆固醇流出;第三,ABCA1 介导的磷脂和胆固醇从细胞主动流出到无脂载脂蛋白如 apoA-I,apoA-I 与 ABCA1 结合并相互作用而导致胆固醇流出。被动扩散和 SR-BI 介导的胆固醇流出涉及细胞与 HDLs 之间胆固醇的双向交换。而 ABCA1 与载脂蛋白介导的胆固醇和磷脂流出只是单向转运过程。ABCA1 介导细胞内胆固醇流出到 apoA-I 之后,再由卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)使胆固醇酯化并有 apoE 分子的加入使得 HDL 颗粒增大。ABCA1 在引起巨噬细胞和其它细胞胆固醇流出到无脂载脂蛋白起着重要的作用。

由于流式细胞技术能较敏感地从单个细胞水平定量或半定量检测细胞蛋白,因此,本实验采用流式细胞技术检测的方法来判断黄芪多糖对 THP-1 细胞源性泡沫细胞 ABCA1 表达的影响。我们观察到在活细胞量一致时,随着黄芪多糖浓度的增加,ABCA1 的平均荧光强度逐渐增加,胆固醇流出的比例也逐渐增加,且与对照组比较,差异显著。唐朝克等^[12,13] 研究观察到三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在 THP-1 细胞源泡沫细胞胆固醇流出中起着重要的作用,其表达增加,胆固醇流出亦明显增加,我们实验结果与其一致。

我们观察到明显减少巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇酯聚积,可促进胆固醇流出和增加 ABCA1 的表达。我们推测黄芪多糖促进胆固醇流出与其上调 ABCA1 的表达有关,具体机制有待进一步研究,这些实验结果为 Aps 的临床应用提供了实验依据和理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] Bodzioch M, Ors6 E, Klucken J, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease[J]. *Nat Genet*, 1999, 22(4): 347-351.
- [2] 陈志坚, 王彦富, 廖玉华, 等. 血管紧张素 II 对 THP-1 源性泡沫细胞 ATP 结合盒转运子 A1 的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(2): 316-320.
- [3] Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, et al. A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis[J]. *Mol Cell*, 2001, 7(1): 161-171.
- [4] Lin G, Bornfeldt KE. Cyclic AMP specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(2): 663-669.
- [5] 聂淑琴, 薛宝云, 杨庆, 等. 黄芪注射液对小鼠免疫功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 1999, 5(2): 33-36.
- [6] 郝艳红, 李庆章, 魏平. 黄芪多糖和香菇多糖对鸡体内 LPO 含量的影响[J]. *东北农业大学学报*, 1998, 29(2): 140-142.
- [7] 单俊杰, 王顺香, 刘涤, 等. 黄芪多糖的化学和药理研究进展[J]. *上海中医药大学学报*, 2000, 14(3): 61-63.
- [8] 张朝云, 叶红英, 俞茂华, 等. 黄芪多糖对糖尿病大鼠心肌超微结构的影响[J]. *复旦学报(医学科学版)*, 2001, 28(6): 476-478.
- [9] 唐朝克, 杨永宗. ABCA1 在动脉粥样硬化发生与发展中的作用[J]. *生命的化学*, 2003, 23(2): 138-140.
- [10] Langmann T, Klucken J, Reil M, et al. Molecular cloning of the human ATP binding cassette transporter-1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257(1): 29-33.
- [11] Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, et al. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(5): 712-719.
- [12] 唐朝克, 易光辉, 唐国华, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在泡沫细胞胆固醇流出中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(4): 304-308.
- [13] 唐朝克, 杨永宗, 易光辉, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(8): 1084-1088.