

番茄红素对巨噬细胞源性荷脂细胞胆固醇代谢及其相关蛋白 Srebp-1、Caveolin-1 表达的影响^Δ

李 熠^{1*}, 匡双玉^{2,3}, 匡稳定²(1.南华大学医学院, 湖南 衡阳 421001; 2.南华大学附属第二医院, 湖南 衡阳 421001; 3.湖南中医药大学药学院, 长沙 410007)

中图分类号 R965;R972^Δ.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1942-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.08

摘要 目的:研究番茄红素对巨噬细胞源性荷脂细胞胆固醇代谢及其相关蛋白固醇调节元件结合蛋白1(Srebp-1)、小凹蛋白1(Caveolin-1)表达的影响。方法:建立巨噬细胞源性荷脂细胞模型,采用高效液相色谱法考察不同浓度(12.5、25、50 μmol/L)番茄红素作用于荷脂细胞24 h及25 μmol/L番茄红素作用于荷脂细胞不同时间(12、24、48、72 h)后细胞内总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)和胆固醇酯(CE)的含量;蛋白印迹法检测番茄红素(25 μmol/L, 24 h)组及其与Srebp-1蛋白抑制剂ALLN(20 μmol/L, 24 h)联用组对荷脂细胞中Srebp-1、Caveolin-1蛋白表达的影响。另设立正常巨噬细胞组和荷脂细胞组进行比较。结果:与正常巨噬细胞组比较,荷脂细胞组细胞内TC、FC、CE含量均明显升高,Srebp-1、Caveolin-1蛋白表达明显减弱($P < 0.05$);与荷脂细胞组比较,番茄红素组荷脂细胞内TC、FC、CE含量均明显降低且呈一定的浓度和时间依赖性,Srebp-1、Caveolin-1蛋白表达明显增强($P < 0.05$);与番茄红素组比较,联用组细胞内Srebp-1、Caveolin-1蛋白表达均明显减弱($P < 0.05$)。结论:番茄红素能引起巨噬细胞源性荷脂细胞内TC、FC、CE含量降低,且可能与Srebp-1及Caveolin-1蛋白的表达上调有一定关系。

关键词 番茄红素;荷脂细胞;胆固醇;固醇调节元件结合蛋白1;小凹蛋白1;表达

Effects of Lycopene on the Cholesterol Metabolism and Its Related Protein Srebp-1, Caveolin-1 Expression in Macrophage-derived Cholesterol-loaded Cell

LI Yi¹, KUANG Shuang-yu^{2,3}, KUANG Wen-ding²(1. Medical College, University of South China, Hunan Hengyang 421001, China; 2. The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hunan Hengyang 421001, China; 3. College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of lycopene on the cholesterol metabolism and its related protein Srebp-1, Caveolin-1 expression in macrophage-derived cholesterol-loaded cells. METHODS: Macrophage-derived cholesterol-load cell model was established. The contents of total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and cholesterol esterase (CE) were determined by HPLC after cholesterol-load cells were treated with different concentrations of lycopene (12.5, 25 and 50 μmol/L) for 24 h or treated by 25 μmol/L lycopene for different time (12, 24, 48, 72 h); Western blotting assay was used to detect the effects of lycopene 25 μmol/L or combined with ALLN 20 μmol/L on the expressions of Srebp-1, Caveolin-1; above index were compared with normal macrophage group and cholesterol-loaded cell group. RESULTS: Compared with normal macrophage group, the contents of TC, FC and CE were increased significantly in cholesterol-loaded cell group, while protein expression of Srebp-1, Caveolin-1 were decreased significantly ($P < 0.05$); compared with cholesterol-loaded cell group, lycopene induced the decrease of TC, FC and CE content in dose and time-dependant manner and enhanced the protein expression of Srebp-1, Caveolin-1 ($P < 0.05$). Compared with lycopene group, the protein expression of Srebp-1, Caveolin-1 were decreased significantly in ALLN combination group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Lycopene can induce the decrease of TC, FC and CE content in macrophage-derived cholesterol-load cells, which may be associated with the up-regulation of protein expression of Srebp-1, Caveolin-1.

KEY WORDS Lycopene; Cholesterol-loaded cell; Cholesterol; Srebp-1; Caveolin-1; Expression

胆固醇代谢失调与动脉粥样硬化发生发展密切相关^[1-2],而巨噬细胞泡沫化是动脉粥样硬化发生发展过程中的一个重要环节^[3],能引起巨噬细胞源性荷脂细胞(简称荷脂细胞)胆固醇代谢变化的药物可能会对动脉粥样硬化起防治作用。番茄红素是类胡萝卜素中的一种,近年的研究发现,其可通过抗氧化、清除自由基、诱导细胞间信息传递、抑制增殖、增强免疫力等^[4-7]多种生物样作用,发挥抗癌抗癌、预防心血管疾病、提高免疫功能和延缓衰老等^[8-11]作用。本试验拟在荷脂细胞模型上探讨番茄红素对胆固醇代谢的影响,同时探讨番茄红素对与

胆固醇代谢密切相关的固醇调节元件结合蛋白1(Srebp-1)及小凹蛋白1(Caveolin-1)表达的影响。

1 材料

CO₂培养箱(美国 Shill 公司);Elx-800 酶联免疫检测仪(美国 Bio-Tek 公司);垂直电泳仪及转膜系统(美国 Bio-Rad 公司);高效液相色谱仪(日本三洋公司)。

番茄红素(粉末,纯度:95%)、胰蛋白酶和油红 O 均购自美国 Sigma 公司;小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);达尔伯克改良伊格尔(DMEM)培养基(美国 Gibco 公司);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂(美国 Hyclone Pierce 公司);兔抗鼠 Srebp-1、Caveolin-1 一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗及 Srebp-1 蛋白抑制剂 ALLN (N-acetyl-leucyl-

Δ 基金项目:衡阳市 2012 年科学技术发展计划项目(No.2012KJ8)
* 讲师,硕士研究生。研究方向:心血管病发病机制与防治。电话:0734-8281412。E-mail:liy9812@163.com

leucyl-norleucinal)均购自美国 Santa Cruz 公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。

鼠源单核细胞源性巨噬细胞 RAW264.7 细胞购自中国科学院上海细胞生物所细胞中心。

2 方法

2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调 RAW264.7 细胞至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$, 24 h 后换入含 0.1% 胎牛血清的 DMEM 培养基,使细胞静置 24 h 后,进行以下试验。

2.2 荷脂细胞模型的建立与胆固醇代谢考察

正常人血浆低密度脂蛋白(密度 1.040~1.063 kg/L)采用序列超速离心法制备。80 mg/L 的氧化型低密度脂蛋白与细胞 RAW264.7 共同孵育 48 h,高效液相色谱法检测细胞内胆固醇酯(CE)占总胆固醇(TC)的比例,大于 20% 但不超过 50% 时,即为荷脂细胞建模成功。然后以荷脂细胞为模型,不同浓度(12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$)番茄红素作用于细胞 24 h 以及 25 $\mu\text{mol/L}$ 番茄红素作用于细胞不同时间(12、24、48、72 h)后,高效液相色谱法检测细胞内 TC、游离胆固醇(FC)和 CE 的含量。另设立正常巨噬细胞组和荷脂细胞组进行比较。

2.3 细胞内脂质含量观察

将荷脂细胞培养于预先放有无菌盖玻片的 6 孔培养板,25 $\mu\text{mol/L}$ 番茄红素作用于细胞 24 h 后,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗盖玻片 3 次,每次 5 min,50% 异丙醇固定 1 min,油红 O 染色液染色 10 min,蒸馏水冲洗 3 次,每次 1 min,苏木素染色 5 min,分色和返蓝后,水性封片剂封片。显微镜下观察,细胞内脂质呈红色,细胞核呈蓝色,Hpias-1000 型图像分析系统收集图像,即番茄红素组脂质含量。定性观察、比较细胞内脂质含量。另设立正常巨噬细胞组和荷脂细胞组进行比较。

2.4 细胞内胆固醇的检测

参照文献^[12]方法,冻融裂解细胞,7.2% 三氯乙酸沉淀蛋白,800 \times g 离心 10 min,留上清进行胆固醇检测。采用 C_{18} 柱,柱温 4 $^{\circ}\text{C}$,流速 1 ml/min,250 nm 波长检测。胆固醇以峰面积定量,内标豆甾醇校准,以 mg/g 细胞蛋白为单位。分别检测 TC 与 FC 的含量,细胞内 CE 含量为 TC 与 FC 的差值。

2.5 蛋白印迹法检测 Srebp-1、Caveolin-1 蛋白表达

试验分为 4 组,即正常巨噬细胞组、荷脂细胞组、番茄红素(25 $\mu\text{mol/L}$ 作用于荷脂细胞 24 h)组和番茄红素+ALLN(25 $\mu\text{mol/L}$ 番茄红素和 20 $\mu\text{mol/L}$ ALLN 共同作用于荷脂细胞 24 h)组。蛋白印迹法检测各组细胞内 Srebp-1 及 Caveolin-1 蛋白表达情况。收集不同条件处理的细胞,三去污裂液裂解细胞,5 000 r/min 离心去除沉淀,BCA 试剂测定蛋白含量,上样缓冲液调各组蛋白浓度使各组一致,经 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h(积层胶 80 V,分离胶 120 V)后,电转移(4 $^{\circ}\text{C}$,100 mA,3 h)至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白分子质量标准的位置。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 1 h,按 1:1 000 加入兔抗鼠 Srebp-1、Caveolin-1 一抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,TBST 缓冲液洗 3 次,以 1:2 000 加入 HRP 标记羊抗兔二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5 h,TBST 缓冲液洗 3 次后,用荧光检测试剂盒显影、定影。结果用图像分析仪分析。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,检测各组细胞内 Srebp-1、Caveolin-1 蛋白的表达,再计算各组表达与正常巨噬细胞组表达的比例。

2.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 for Windows 软件作统计分析。两样本均数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 番茄红素对荷脂细胞胆固醇代谢的影响

与荷脂细胞组比较,番茄红素处理组细胞内 TC、FC、CE 含量呈现一定的剂量和时间依赖性下降趋势($P < 0.05$),说明番茄红素能一定程度地降低荷脂细胞内胆固醇含量。不同浓度番茄红素对荷脂细胞胆固醇水平的影响见表 1,番茄红素对荷脂细胞作用不同时间后胆固醇水平比较见表 2。

表 1 不同浓度番茄红素对荷脂细胞胆固醇水平的影响(mg/g 细胞蛋白, $n=3$)

Tab 1 Effects of different concentrations of lycopene on cholesterol level in model cells(mg/g prot, $n=3$)

组别	浓度, $\mu\text{mol/L}$	TC	FC	CE
正常巨噬细胞组		159 \pm 16	152 \pm 15	7 \pm 1
荷脂细胞组		456 \pm 42*	298 \pm 27*	158 \pm 15*
番茄红素组	12.5	324 \pm 30 [#]	254 \pm 24 [#]	70 \pm 6 [#]
	25	282 \pm 31 [#]	231 \pm 22 [#]	51 \pm 9 [#]
	50	286 \pm 31 [#]	233 \pm 26 [#]	53 \pm 5 [#]

与正常巨噬细胞组比较: * $P < 0.05$; 与荷脂细胞组比较: [#] $P < 0.05$
vs. normal macrophage group: * $P < 0.05$; vs. cholesterol-loaded cell group: [#] $P < 0.05$

表 2 番茄红素对荷脂细胞作用不同时间后胆固醇水平比较(mg/g 细胞蛋白, $n=3$)

Tab 2 Comparison of cholesterol level in cholesterol-loaded cells after treated with lycopene for different time(mg/g prot, $n=3$)

组别	时间, h	TC	FC	CE
正常巨噬细胞组		159 \pm 16	152 \pm 15	7 \pm 1
荷脂细胞组		456 \pm 42*	298 \pm 27*	158 \pm 15*
番茄红素组	12	375 \pm 34 [#]	262 \pm 23 [#]	113 \pm 11 [#]
	24	282 \pm 31 [#]	231 \pm 22 [#]	51 \pm 9 [#]
	48	290 \pm 28 [#]	238 \pm 23 [#]	52 \pm 5 [#]
	72	284 \pm 29 [#]	225 \pm 18 [#]	59 \pm 11 [#]

与正常巨噬细胞组比较: * $P < 0.05$; 与荷脂细胞组比较: [#] $P < 0.05$
vs. normal macrophage group: * $P < 0.05$; vs. cholesterol-loaded cell group: [#] $P < 0.05$

3.2 番茄红素对荷脂细胞内脂质含量的影响

与荷脂细胞组比较,番茄红素组细胞内脂质含量明显减少,结果见图 1。

3.3 番茄红素对荷脂细胞内 Srebp-1 及 Caveolin-1 蛋白表达的影响

与正常巨噬细胞组比较,荷脂细胞组细胞内 Srebp-1 与 Caveolin-1 蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。与荷脂细胞组比较,番茄红素组细胞内 Srebp-1 与 Caveolin-1 蛋白表达明显增强($P < 0.05$);应用 ALLN 干预后,Caveolin-1 蛋白表达随着 Srebp-1 蛋白表达下调而下调,结果见表 3。

4 讨论

目前,番茄红素对心血管系统的药理作用主要集中在降脂、抗氧化等方面,而且大部分实验建立在动物模型基础上,在细胞模型上的研究较少。

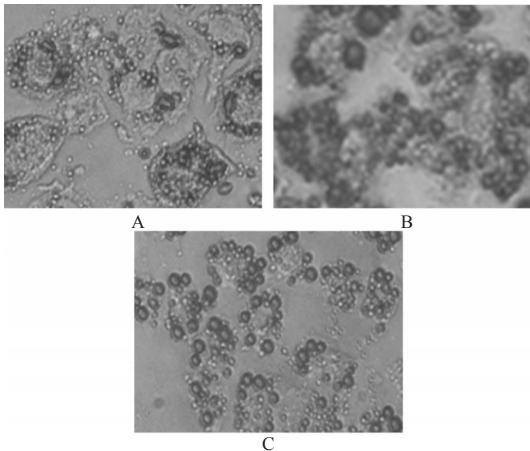


图1 各组细胞脂质含量显微镜观察结果

A.正常巨噬细胞组;B.荷脂细胞组;C.番茄红素组

Fig 1 Lipid content of cells in each group by microscope

A. normal macrophage group; B. cholesterol-loaded cell group; C. lycopene group

表3 各组细胞Serbp-1、Caveolin-1蛋白表达的比值比较

Tab 3 Comparison of protein expression ratio of Serbp-1 and Caveolin-1 in cells of each group

组别	Serbp-1	Caveolin-1
正常巨噬细胞组	1.0	1.0
荷脂细胞组	0.4*	0.5*
番茄红素组	1.4 [#]	1.6 [#]
番茄红素+ALLN组	0.1 [#]	0.9 [#]

与正常巨噬细胞组比较: * $P < 0.05$; 与荷脂细胞组比较: * $P < 0.05$
vs. normal macrophage group: * $P < 0.05$; vs. cholesterol-loaded cell group: [#] $P < 0.05$

本试验发现,番茄红素作用于荷脂细胞后,细胞内TC、FC、CE含量呈现一定的剂量和时间依赖性下降,为从胆固醇代谢的角度进一步探讨番茄红素对动脉粥样硬化的作用提供了一定的实验基础。

Caveolin-1作为参与荷脂细胞胆固醇转运的重要调节蛋白之一,在介导细胞内的胆固醇转运、维持细胞内外胆固醇平衡过程中起着重要作用。一方面,Caveolin-1参与B类I型清道夫受体介导的高密度脂蛋白受体选择性吸收胆固醇及CE,另一方面,Caveolin-1能将新合成的细胞内胆固醇由内质网转移到胞膜,促进胆固醇与胞外受体结合从而促进胆固醇的流出^[13]。同时文献^[14]报道,Caveolin的基因序列上存在固醇反应元件(Sre),能被Srebp-1识别,调节Caveolin的表达。

Srebp-1是膜结合的转录因子和细胞内胆固醇代谢的重要调控蛋白,其定位于内质网,由一个调节亚基和DNA结合亚基构成。调节亚基对细胞内FC含量高度敏感,当细胞内FC含量下降时,调节亚基与DNA结合亚基分离,后者进入核内与目的基因序列中Sre元件结合,调控基因转录^[15]。

笔者推测番茄红素可能通过影响Srebp-1的活性进而调节Caveolin-1的表达,从而影响荷脂细胞内胆固醇代谢。

参考文献

[1] Weingartner O, Lütjohann D, Ji S, et al. Vascular effects of diet supplementation with plant sterols[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(16): 1 553.
[2] Assmann G, Cullen P, Erbey J, et al. Plasma sitosterol ele-

vations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Münster (PRO-CAM) study[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006, 16(1): 13.

[3] Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis[J]. *Med Res Rev*, 2008, 28(4): 483.
[4] Ross AB, Vuong le T, Ruckle J, et al. Lycopene bioavailability and metabolism in humans: an accelerator mass spectrometry study[J]. *Am J Clin Nutr*, 2011, 93(6): 1 263.
[5] Liu X, Allen JD, Arnold JT, et al. Lycopene inhibits IGF-I signal transduction and growth in normal prostate epithelial cells by decreasing DHT-modulated IGF-I production in co-cultured reactive stromal cells[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(4): 816.
[6] Palozza P, Colangelo M, Simone R, et al. Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(10): 1 813.
[7] Livny O, Kaplan I, Reifen R, et al. Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells[J]. *J Nutr*, 2002, 132(12): 3 754.
[8] van Breemen RB, Sharifi R, Viana M, et al. Antioxidant effects of lycopene in African American men with prostate cancer or benign prostate hyperplasia: a randomized, controlled trial[J]. *Cancer Prev Res*, 2011, 4(5): 711.
[9] Schwarz S, Obermüller-Jevic UC, Hellmis E, et al. Lycopene inhibits disease progression in patients with benign prostate hyperplasia[J]. *J Nutr*, 2008, 138(1): 49.
[10] 张为国, 谢国建, 刘先军, 等. 番茄红素对胃癌细胞SGC-7901生长的抑制作用[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(3): 292.
[11] 曹钰, 姚尧. 番茄红素对大鼠局灶性脑缺血损伤的影响[J]. *华西药理学杂志*, 2006, 21(1): 45.
[12] 李熠, 匡双玉, 王北冰, 等. 姜黄素对巨噬细胞源性荷脂细胞胆固醇水平及Caveolin-1表达的影响[J]. *南华大学学报*, 2009, 37(1): 18.
[13] Uittenbogaard A, Smart EJ. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 25 595.
[14] Bist A, Fielding PE, Fielding CJ. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(20): 10 693.
[15] Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, et al. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low-density lipoprotein receptor gene[J]. *Cell*, 1993, 75(1): 187.

(收稿日期:2012-06-13 修回日期:2012-08-06)