

## NG701 通过减少 CD36 mRNA 表达抑制泡沫细胞形成

贾乙, 刘雅, 李晓辉\*

第三军医大学药学院, 重庆 400038

**摘要** **目的:** 观察 NG701 对泡沫细胞形成及 CD36 mRNA 表达的影响。**方法:** 利用大鼠腹腔提取的巨噬细胞与氧化低密度脂蛋白共培养得到巨噬细胞源性泡沫细胞, 加入不同浓度的 NG701, 观察泡沫细胞内胆固醇含量的变化, 并利用 RT-PCR 法对 CD36 mRNA 表达情况进行检测。**结果:** NG701 能够显著减少泡沫细胞内总胆固醇和胆固醇酯的含量, 降低 CE/TC 的值。并剂量依赖性的降低 CD36 mRNA 表达。**结论:** NG701 能通过减少 CD36 表达抑制巨噬细胞源性泡沫细胞的形成。

**关键词** 动脉粥样硬化; 泡沫细胞; 代谢产物; NG701; 三七总皂苷

**中图分类号:** R972.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2009)02-0084-04

## NG701 inhibition on formation of foam cell via down-regulating CD36 mRNA expression

JIA Yi, LIU Ya, LI Xiao-hui\*

College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**Abstract** **Objective:** To investigate the effect of NG701 on the formation of foam cell and the expression of CD36 mRNA. **Methods:** Macrophages were incubated with ox-LDL to establish the foam cell model. Different concentration of NG701 were given for intervention. The cellular lipid accumulation was examined by oil red staining. The cellular contents of total cholesterol (TC) and cholesterol ester (CE) were detected by enzymic methods. The levels of CD36 mRNA were determined by RT-PCR. **Results:** NG701 could significantly decrease the content of TC, CE, and CE/TC in foam cell in middle and high dose groups. RT-PCR assays showed that the expression of CD36 mRNA was down-regulated in a dose-dependent manner. **Conclusion:** NG701 could inhibit the formation of foam cell via down-regulating CD36 mRNA expression.

**Key words** Atherosclerosis; foam cell; metabolite; NG701; Panax notoginseng saponins

三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 是三七的主要生物活性部位, 本室既往研究表明, 口服 PNS 可以有效防治动脉粥样硬化的发生与发展<sup>[1~4]</sup>。但在进一步的研究中发现, 其单体组份及其配伍只能部分反映出 PNS 的药理作用。而且, 相关研究发现 PNS 的重要组分 Rb1 (质量分数 > 29%) 并不能以原型进入血液循环, 而是经过肠道内微生物代谢后成为 NG701 才能被吸收, 继而产生相应的药理作用。但目前国内外尚未见对 NG701 抗动脉粥样硬化作用的研究。鉴于泡沫细胞形成在动脉粥样硬化发病过程中的重要作用, 本实验以巨噬细胞源性泡沫细胞为模型, 观察了 NG701 对其形成的影响,

并初步探讨了其机制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

NG701 (质量分数 > 98%, 云南诺唯金参药业), 氧化低密度脂蛋白 (中国协和医科大学), 总胆固醇 (TC)、游离胆固醇 (FC) 测定试剂盒 (上海荣盛生物技术公司), EX Taq 酶 (Takara 公司)。

#### 1.2 巨噬细胞收集与纯化

取材前 1 d, 向大鼠 ip 1% 蛋白胨-培养基溶液 10 mL; 实验当日以颈椎脱臼法处死大鼠, 立即 ip 未加血清的无酚红 RPMI 1640 培养液 10 mL, 吸取腹腔液, 750 r/min 离心 5 min 后收集细胞, 用含 10%

收稿日期: 2009-07-22

作者简介: 贾乙 (1979—), 男, 辽宁沈阳人, 讲师, 博士, 从事心血管抗炎免疫药理学研究。Tel: 023-68753397, E-mail: jiayi1979@163.com。

\* 通讯作者 李晓辉, Tel: 023-68752318, E-mail: lpsh008@yahoo.com.cn。

胎牛血清的无酚红 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度至  $5 \times 10^6$  /mL, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 2 h; 除去未贴壁细胞, 得到巨噬细胞。

### 1.3 分组

细胞分为对照组、模型组、NG701 低、中、高剂量 (3、10、30 μmol/L) 组。在得到纯化后的大鼠腹腔源性巨噬细胞并培养 12 h 后按以下方法处理。模型组加含 60 mg/L ox-LDL 的无酚红 RPMI 1640 培养液, 用 NaCl 调节离子渗透压与其他组基本一致; NG701 各剂量组除按模型组处理外, 分别加 NG701 至相应浓度。各组细胞置 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱培养, 48 h 后, 收集各组细胞检测相应指标。

### 1.4 油红“O”染色法

细胞处理后, 用 PBS 冲洗盖玻片 3 次, 室温 4% 多聚甲醛固定 1 h。然后加入油红“O”工作液 (0.3%) 染色 2 h, 用双蒸水冲洗 3 次, 每次 1 min, 水性封片剂封片。显微镜下观察并摄像。

### 1.5 细胞内总胆固醇、胆固醇酯及蛋白质的测定

收集细胞, 加入异丙醇 1 mL, 超声破碎并 1 000 r/min 离心 10 min, 吸上清用 TC 试剂盒及 FC 试剂盒分别测定 TC、FC 值, 胆固醇酯 (CE) 的含量由 TC 和 FC 的差值获得; 沉淀物加入 0.1 mol/L 的 NaOH 200 μL 后用考马斯亮兰法检测蛋白质含量。细胞内的各种胆固醇含量用每克细胞蛋白质所含的 TC 和 CE 来表示。

### 1.6 RT-PCR 法测定 CD36 mRNA 表达情况

提取细胞内总 RNA, 逆转录为 cDNA, 通过 PCR 扩增法分析 CD36 mRNA 表达情况。引物设计如下:

CD36: 5' -GTGGCAAAGAATAGCAGCAAGA-3';  
5' -AAGATGGCTCCATTGGGTTGTA-3'。

β-actin: 5' -GGGAAATCGTGCGTGACATT-3';  
5' -CCAGGAAGGAAGGCTGGAAG-3'。

退火温度及循环数分别为 CD36: 57 °C, 28 个循环; β-actin: 55 °C, 26 个循环。取产物进行琼脂糖电泳, 紫外灯下照相。应用 Band scan 软件分析目的条带, 根据扩增条带的位置和灰度, 判断扩增产物多少。将处理组与对照组比较, 读取灰度值。以目的基因的灰度值和 β-actin 灰度值的比值表示其相对表达量。

### 1.7 统计学方法

所有实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 10.0 进行方差分析。

## 2 结果

### 2.1 油红“O”染色, 光镜观察结果

油红“O”染色后光镜下观察显示, 对照组细胞形态多呈圆形, 无油红“O”染色阳性细胞; 模型组及各 NG701 组油红“O”染色阳性细胞遍布; NG701 中、高剂量组细胞内红染物质较模型组明显减少, NG701 低剂量组细胞与模型组相比变化不明显。结果见图 1。

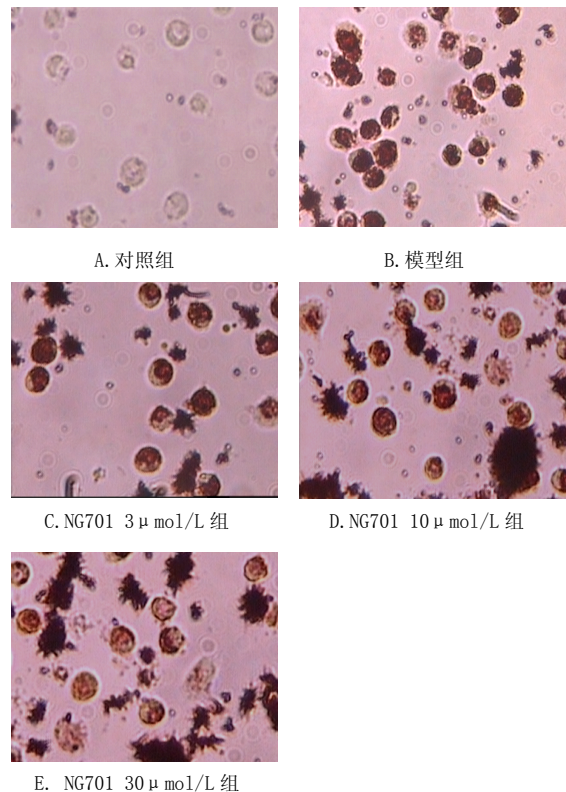


图 1 NG701 对大鼠巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响 (油红 O 染色)

Fig. 1 Effect of NG701 on formation of macrophage-derived foam cell of rats (oil red O staining)

### 2.2 各组细胞中 TC、CE 及 CE/TC 变化

模型组 TC、CE 及 CE/TC 较对照组增高, 并具有统计学差异; NG701 中、高剂量组细胞内 TC、CE 及 CE/TC 较模型组均有降低, 具统计学差异, 且其变化呈剂量依赖性。结果见表 1。

### 2.3 CD36 mRNA 表达情况

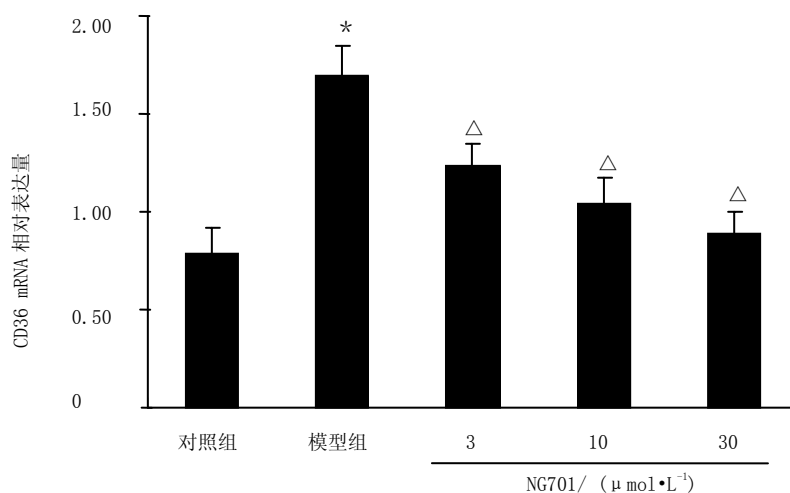
模型组中 CD36 mRNA 表达较对照组升高, 具有统计学差异。NG701 各剂量组细胞内 CD36 mRNA 均较模型组有降低, 具统计学差异, 且其变化呈剂量依赖性。结果见图 2。

表 1 NG701 对泡沫细胞中 TC、CE 及 CE/TC 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 1 Effect of NG701 on TC, CE, and CE/TC of foam cell ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	TC/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	CE/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	CE/TC (%)
对照组	—	10.03 ± 0.73	3.41 ± 0.70	33.82 ± 5.72
模型组	—	46.19 ± 1.07 *	27.64 ± 1.73 *	59.86 ± 3.92 *
NG701	3	43.14 ± 1.24 *	22.51 ± 1.85 * $\Delta$	52.25 ± 5.06 *
NG701	10	37.40 ± 1.48 * $\Delta$	19.25 ± 1.35 * $\Delta$	51.50 ± 3.74 * $\Delta$
NG701	30	31.09 ± 1.72 * $\Delta$	14.83 ± 1.30 * $\Delta$	47.74 ± 3.25 * $\Delta$

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较:  $\Delta P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs model group



与对照组比较: \* $P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $\Delta P < 0.01$

\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.01$  vs model group

图 2 NG701 对泡沫细胞内 CD36 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig.2 Effect of NG701 on CD36 mRNA expression of foam cell ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 3 讨论

近年来,心脑血管疾病已超过肿瘤,成为全球发病率和死亡率第一位的疾病。而动脉粥样硬化是冠心病、脑中风等心脑血管疾病的重要病理基础和关键环节,故对动脉粥样硬化的预防和治疗已成为医学界研究的热点。泡沫细胞的形成则是其早期变化的特征标志<sup>[5]</sup>。在内膜下,巨噬细胞吞噬 Ox-LDL 导致胆固醇积聚、巨噬细胞源泡沫细胞和脂肪斑的形成<sup>[6]</sup>。巨噬细胞源性泡沫细胞是动脉粥样硬化发病的基础,以巨噬细胞源性泡沫细胞为治疗靶点的治疗方法已成为研究热点。

三七是我国常用的传统名贵中药,为五加科人参属三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen

的干燥块根,味甘,微苦,性温,归肝、胃经,主产于云南、广西及四川等地,具有止血化瘀、活血定痛等功效。在我国有悠久的临床应用历史,在血液系统、心血管系统等多方面具有广泛的生物活性。PNS 作为中药三七的有效部位,其成分非常复杂。目前已从 PNS 中分离并鉴别到 50 余种单体成分,其中, Rb1 和 Rg1 各约占总皂苷的 28.5%,其次为 Rb2、R1 等。本室既往对 PNS 的药理作用进行了大量的研究,证明口服 PNS 具有显著的抗动脉粥样硬化形成的作用。但在研究中发现,某些既往被认为有重要作用的单体口服后并不能以原型进入血液循环发挥其药理作用,如口服 Rb1 后血液中未检测出 Rb1,只测出其代谢终产物 NG701<sup>[7]</sup>。提示口服 Rb1 后,

Rb1 本身难以通过胃肠道吸收入血,而是经过肠道内微生物代谢为 NG701 后方被吸收,继之产生药理作用。结合既往研究结果,推断 NG701 应具有一定的抗动脉粥样硬化活性,但国内外尚未见相关报道。本实验结果表明,NG701 能够显著减少泡沫细胞内总胆固醇和胆固醇酯的含量,并降低 CE/TC 的值,说明 NG701 确实具有抗泡沫细胞形成的作用。利用油红“O”染色法直接观察细胞内脂质含量的结果也提供了直观的证据。

为探讨其作用机制,选择了 CD36 作为观察指标。巨噬细胞不会主动吞噬低密度脂蛋白,只有当低密度脂蛋白被氧化修饰后,才被巨噬细胞相应受体识别并吞噬,形成巨噬细胞源性的泡沫细胞。巨噬细胞的脂质内吞是通过细胞表面受体介导的胞吞实现的,其中 B 类清道夫受体 CD36 被认为是 ox-LDL 的生理性受体。有研究发现<sup>[8]</sup>,在 APO-E 缺陷小鼠中仅使其巨噬细胞缺乏 CD36 表达就能显著地抗动脉粥样硬化,其整个主动脉病变较巨噬细胞能表达 CD36 的 APO-E 缺陷鼠的病变减少了 88.1%,重新导入表达 CD36 的巨噬细胞,其病变面积增加 2.11 倍。而在有关人巨噬细胞的研究中发现,CD36 表达缺陷的家族人群中很少患动脉粥样硬化,进一步研究发现,其单核巨噬细胞与 ox-LDL 的最大结合比正常人低 40%<sup>[9]</sup>。以上研究均证明了 CD36 在介导脂质内吞中的重要作用。

本研究结果显示,巨噬细胞与 ox-LDL 共培养可诱导 CD36 mRNA 的大量表达 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比,NG701 可非常显著地降低 ox-LDL 诱导的 CD36 mRNA 表达 ( $P < 0.01$ ),并呈剂量依赖性。说明 NG701 能够通过降低 CD36 mRNA 的表达而达到抑制巨噬细胞源性泡沫细胞形成的作用。

#### 参考文献:

- [1] Zhang Y G, Zhang H G, Zhang G Y, *et al.* Panax Notoginseng Saponins attenuate atherosclerosis in rats by regulating the blood lipid profile and an anti-inflammatory action[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(10): 1238-1244.
- [2] 何雪峰, 李晓辉, 李淑惠, 等. 三七总皂苷对家兔实验性动脉粥样硬化的预防作用[J]. *中药研究*, 2007, 18(6): 408-410.
- [3] 刘雅, 李晓辉. 三七总皂苷对动脉粥样硬化形成中炎症免疫因子的影响[J]. *中草药*, 2006, 36(5): 728-730.
- [4] 袁志兵, 李晓辉, 李淑惠, 等. 三七总皂苷改善兔动脉粥样硬化斑块稳定性的机制探讨[J]. *中草药*, 2006, 37(5): 741-743.
- [5] Boullier, A, Bird D A, Chang M K, *et al.* Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2001, 94(7): 214-222.
- [6] Okutsu R, Yoshikawa T, Nagasawa M. Cilostazol inhibits modified low-density lipoprotein uptake and foam cell formation in mouse peritoneal macrophages[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 17. [Epub ahead of print].
- [7] Paek I B, Moon Y, Kim J, *et al.* Pharmacokinetics of a ginseng saponin metabolite compound K in rats[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2006, 27(1): 39-45.
- [8] Febbraio M, Guy E, Silverstein R L. Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(12): 2333-2338.
- [9] Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, *et al.* Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36 deficient subjects[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(4): 1859-1865.