

## 苜蓿皂苷对 BRL 细胞胆固醇转运和分泌关键基因表达的影响

刘伯帅，张冬强，朱晓艳，袁德地，陈言言，王成章，史莹华

(河南农业大学牧医工程学院，河南郑州 450002)

**摘要** 为了探讨苜蓿皂苷对胆固醇转运和分泌的影响,本试验采用 qRT-PCR 的方法测定了大鼠 BRL 肝细胞中低密度脂蛋白受体(LDLR)和三磷酸腺苷结合盒转运体(ABCG5/8) mRNA 的表达情况,进而分析苜蓿皂苷对胆固醇代谢的影响。方法:采用 50%胎牛血清诱导 BRL 细胞,建立脂变细胞模型。将正常和脂变 BRL 细胞分为 4 组:正常对照组,苜蓿皂苷组,脂变模型组,脂变皂苷组。运用 qRT-PCR 检测 BRL 细胞内 LDLR 和 ABCG5/8 mRNA 的表达情况。结果表明:加入苜蓿皂苷后,正常 BRL 细胞 LDLR 和 ABCG5/8 mRNA 表达量上升,而苜蓿皂苷对脂变 BRL 细胞各基因的影响不大。

**关键词** 苜蓿皂苷; BRL 肝细胞; 基因表达; 影响

### **Effects of Alfalfa Saponins on Cholesterol Transport and Secretion of Key Gene Expression in BRL Cells**

Liu Bo-shuai, Zhang Dong-qiang, Zhu Xiao-yan, Yuan De-di,

Chen Yan-yan, Wang Cheng-zhang, Shi Ying-hua

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, 450002)

**Abstract:** In order to study the effects of alfalfa saponins (AS) on cholesterol metabolism, the mRNA expression of LDLR and ABCG5/8 that involved in cholesterol metabolism were detected in BRL cells using real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Methods: Using 50% FBS to induce BRL cells to establish hyperlipidemic cell model. The normal and hyperlipidemic BRL cells were divided into 4 groups: normal control group, alfalfa saponins group, hyperlipidemic model group and hyperlipidemia saponins group. The mRNA expression of ABCG5/8 and LDLR in BRL cells was detected by qRT-PCR. Results: AS significantly increased the mRNA expression of LDLR and ABCG5/ABCG8 in normal BRL cells, while AS had no effects on these genes in hyperlipidemic BRL cells.

**Keywords:** Alfalfa saponins; BRL cells; Gene expression; Cholesterol metabolism

随着社会现代化的发展,人们的生活质量得到不断的提高,但是也带来了不利的影响。血脂异常,尤其是饮食中胆固醇水平的升高是导致动脉粥样硬化和冠状动脉心脏疾病发生的主要因素。据统计,全世界大约每年有 1000 多万人由于患有高血脂症而死亡。我国大约有 9000 万人患有高血脂病,而且

随着人们生活水平的不断提高，高血脂人群也在不断的增多，并有年轻化的趋势。先前许多大规模临床试验证实，胆固醇水平的降低能够显著改善心血管疾病患者的心肌缺血症状、缓解心绞痛、改善心脏功能，从而减少心血管事件的发生。中草药和植物提取物在降血脂方面的应用历史悠久、资源丰富、效果明显、且副作用较小，长期服用耐受性好，具有得天独厚的优势。植物提取物具有来源广泛、毒副作用小、降脂作用明显等优点，因此成为近年来降脂药物研究开发的重点和热点。大量研究表明，植物中的活性物质，如皂苷类、甾醇类、酮类、生物碱类、萜类等，都具有降低机体胆固醇的作用。其中皂苷类物质的降脂效果最明显，也最受关注。苜蓿皂苷是从紫花苜蓿中提取的具有独特生物学活性的物质，是由糖中羟基或非糖类化合物的羟基以缩醛链脱水缩合而成的环状缩醛链物，其结构为五环三萜烯类化合物。大量的试验研究证明，苜蓿皂苷能够降低动物体内胆固醇的含量，良好的抗动脉粥样硬化的作用使其成为降低胆固醇药物和绿色饲料添加剂的理想原料。本课题组的前期试验表明，苜蓿皂苷具有降低大鼠体内胆固醇含量的作用，并且是通过调控胆固醇代谢相关基因的表达来实现的。为了进一步研究苜蓿皂苷对胆固醇转运和分泌的影响，本试验在细胞水平上初步探讨了其调控胆固醇代谢的机理，为其在安全、绿色、健康畜产品生产中的广泛应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用苜蓿皂苷由河北省沧州市宝恩生物科技有限公司提供。由苜蓿草粉经醇提法与大孔树脂柱分离纯化得到。经薄层层析法检测其主要成分为苜蓿皂苷，经紫外分光光度法检测其中总皂苷含量为 51%。大鼠 BRL 肝细胞购于中国科学院上海生科院细胞资源中心。

### 1.2 细胞计数

(1) 制备浓度适中的细胞悬液

(2) 将计数板及盖片擦拭干净，并在计数板上盖好盖片。

(3) 吸出 15 μL 细胞悬液，沿着盖片边缘缓慢滴加，直至悬液充满盖片和计数板之间，静置 3 min 左右，注意盖片下不要有气泡，也不能让悬液流入旁边槽中。

(4) 数计数板四大格中的所有细胞，压线细胞只计左侧和上方的，避免重复计数。镜下两个或细胞团按单个细胞计数，若细胞团 10% 以上，说明分散不好，需重新制备细胞悬液。

(5) 细胞数/mL=四大格细胞总数/4×10<sup>4</sup>

### 1.3 BRL 细胞的培养

将 BRL 细胞接种于 25 cm 培养瓶中，加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液，铺满瓶底即可，置于 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每两天更换一次新鲜培养液，定期将培养瓶置于显微镜下观察，当细胞生长至瓶底 70% 左右时即可传代或冻存。

(1) 脂变 BRL 细胞模型的建立

BRL 细胞接种于 50 mL 的细胞培养瓶中，10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液，于 37 °C，5% 二氧化碳培养箱中培养，待细胞贴壁长满瓶底，胰酶消化，计数后传代。接种于 6 孔板中，每孔接种约 1.5×10<sup>5</sup> 个细胞，待细胞长满 80% 后，更换新鲜培养基，在培养基中加入 50% 胎牛血清，继续培养

## 第六届中国苜蓿发展大会

24-48 h 至出现细胞内脂滴或泡沫样物沉积，即制成脂变肝细胞模型。将所得细胞改置于含 0.1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中，使其静止 24 h 后，再做相应的处理。

### (2) 实验分组：

细胞用六孔板培养，实验分为 4 个组，每组六个重复，具体分组情况如下：

正常对照组：六孔板每孔添加 2.9 ml 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液，培养 24 h 后换液，培养 48 h 后，置于 0.1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中静止 24 h，加入 100  $\mu$ l 的培养基培养 24 h。

苜蓿皂苷组：六孔板每孔添加 2.9 ml 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液，培养 24 h 后换液，培养 48 h 后，置于 0.1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中静止 24 h，加入 100  $\mu$ l 的 300  $\mu$ g/ml(终浓度为 100  $\mu$ g/ml) 苜蓿皂苷溶解液，培养 24 h。

脂变模型组：六孔板每孔添加 2.9 ml 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液，培养 24 h 后成 50% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液培养 48 h 后、置于 0.1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中静止 24 h，加入 100  $\mu$ l 的培养基培养 24 h。

脂变皂苷组：六孔板每孔添加 2.9 ml 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液，培养 24 h 后成 50% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液培养 48 h 后、置于 0.1% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中静止 24 h，加入 100  $\mu$ l 的 300  $\mu$ g/ml(终浓度为 100  $\mu$ g/ml) 苜蓿皂苷溶解液，培养 24 h。

### 1.4 MTT 法测定苜蓿皂苷对 BRL 细胞活性的影响

(1) 胰酶消化对数期细胞，终止消化后离心收集，制成细胞悬液，细胞计数调整其浓度至  $2 \times 10^4$  个/ml。

(2) 将细胞悬液制备好后，轻轻混匀，96 孔板每孔加入 100  $\mu$ l，这样待测细胞的密度为 2000 个/孔(边缘孔用无菌 PBS 填充)。每加 6 个孔混匀一次，以确保接种的细胞密度在各孔之间完全相同。

(3) 将接种好的细胞培养板放入培养箱中培养，培养 24 h 后添加苜蓿皂苷 50  $\mu$ l，4 个梯度，终浓度分别为 50、100、200、250  $\mu$ g/ml，设 6 个复孔。

(4) 5% CO<sub>2</sub>，37 °C 孵育 24 小时，倒置显微镜下观察药物的作用效果。

(5) 每孔加入 10  $\mu$ l MTT 溶液 (5 mg/ml，即 0.5% MTT)，继续培养 4 h。

(6) MTT 加入培养 4 h 后，3000 rpm 离心 5 min 后移液器将上清移走，注意不能把结晶移走。每孔加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砜，置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解。在酶标仪在 490 nm 波长处测量各孔的吸光值。

### 1.5 mRNA 相对表达量测定

#### 1.5.1 细胞总 RNA 提取

(1) 匀浆的制备：大鼠 BRL 肝细胞：吸去细胞培养皿中的上清，每 10 cm<sup>2</sup> 培养皿面积加 1 ml Trizol，枪头上下吹打几次，转移到 EP 管中。

(2) 室温下静置孵育 5 min，使组织或细胞完全溶解。

(3) 加入 200  $\mu$ l 三氯甲烷，盖好盖子。

(4) 用手剧烈摇晃 15 s。

(5) 4 °C 下，12000 g，离心 15 min，可见液体分为三层。

- (6) 45 度倾斜离心管, 移液枪吸收上层水相 400  $\mu\text{l}$  左右, 移入新的离心管中, 操作过程中应避免碰到中间相与有机相。
- (7) 每 1 ml Trizol 加入 0.5 mL 异丙醇, 轻轻翻转摇匀。
- (8) 室温下孵育 10 min。
- (9) 4 °C, 12 000 g 离心 10 min。
- (10) 弃去上清液, 只留下 RNA 沉淀。
- ((11))每 1 ml Trizol 加入 1 ml 75% 的乙醇, 洗涤 RNA 沉淀。
- (12) 涡旋震荡数秒, 4 °C, 7500 g 离心 5 min, 弃去洗涤液。
- (13) 空气或真空干燥 5~10 min, 干燥不要太彻底, 以免 RNA 难以溶解。
- (14) 将其重新溶于 50  $\mu\text{l}$  不含 RNA 酶的水中, 用枪头轻轻吹打, 55°C~60 °C, 10~15 min 使 RNA 完全溶解。
- (15) RNA 保存于-80 °C 冰箱, 以备后续试验使用。

### 1.5.2 RNA 浓度的测定

采用 Thermo 微量紫外分光光度计 260 nm 处测定总 RNA 浓度, 并记录 OD260/OD280 比值, 结果在 1.8~2.0 之间的样本满足要求。

### 1.5.3 总 RNA 的质量检测

用英国 Syngene 公司电泳凝胶成像系统检测电泳结果。

### 1.5.4 RNA 反转录过程

采用大连宝生物工程公司提供的 Reverse Transcriptase M-MLV (Rnase H<sup>-</sup>) 试剂盒

### 1.5.5 引物设计与合成

根据 Genebank 大鼠 GAPDH、ABCG5/ABCG8、LDLR DNA 序列运用 Primer 5.0 设计引物, 本试验所设计的各种引物结果如下表:

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers of real-time fluorescence quantitative PCR

基因名称	物种	基因库登记号	引物序列(5'-3')	
GAPDH	大鼠	NC_005103.3	上游	ACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG
			下游	TCAAAGGTGGAAGAACATGGGAGTT
ABCG5	大鼠	NC_005105.2	上游	GATTCCAGTGGCGAGCG
		8027647..806442	下游	CGACCAAGAGGAGGACGAT
ABCG8	大鼠	NC_005105.2	上游	ATGAACCTGGAGGACGGACT
		8064631..8083271	下游	CCATAGATGATGACATAGGCAC
LDLR	大鼠	NC_005107	上游	CTTGCCCTGATGGTATGC
			下游	AATGGTGGATGTCCCCTG

### 1.5.6 荧光定量 PCR

## 第六届中国苜蓿发展大会

本试验采用 SYBR qPCR Mix 为荧光染料，经过摸索确定最佳反应体系如下：SYBR qPCR Mix 5  $\mu\text{l}$ , DEPC 处理水 3.8  $\mu\text{l}$ , 模版量 1  $\mu\text{l}$ , 上下游引物各 0.1  $\mu\text{l}$ , 反应体系为 10  $\mu\text{l}$ 。按照以下条件设定 RT-PCR 仪器，进行 PCR 反应：95 °C 预变性 2 min；95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 此步骤 40 个循环；Melting Curves, 20 °C 保存 10min。根据本试验条件，采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对数据进行分析处理。

### 1.6 统计分析

试验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析(One way ANOVA)，Duncan 氏法进行组间多重比较，以  $P < 0.05$  表示差异显著， $P < 0.01$  表示差异极显著，结果用“平均值±标准差”

## 2 结果与分析

### 2.1 苜蓿皂苷对 BRL 细胞活性的影响

由表 2 可知苜蓿皂苷添加终浓度为 50、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时，BRL 细胞活性与对照组相比差异不大，而 200、250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时 BRL 肝细胞活性升高且差异极显著( $P < 0.01$ )。

表 2 苜蓿皂苷对 BRL 细胞活性的影响

Table 2 Effects of alfalfa saponins on activity of BRL cells

苜蓿皂苷浓度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	BRL 细胞活性
Concentration of alfalfa saponins ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	BRL cells activity
0	0.57±0.03A
50	0.57±0.02A
100	0.62±0.08A
200	0.70±0.05B
250	0.74±0.03B

注：同列肩标大写字母不同表示差异极显著( $P < 0.01$ )，同列肩标小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )，下表同。

Note: within a column followed by different superscripts are different, a lower case letter means a significant difference ( $P < 0.05$ ), a capital letter means a highly significant difference ( $P < 0.01$ ), the same as in the following tables.

### 2.2 苜蓿皂苷对 BRL 细胞 LDLR 的影响

由表 3 可知：和正常对照组相比较，苜蓿皂苷组 LDLR 表达量提高了 3.35 倍且差异极显著( $P < 0.01$ )，ABCG5 和 ABCG8 表达量升高，分别为对照组的 1.75、3.27 倍，且差异达到显著水平( $P < 0.05$ )；脂变模型组 LDLR 表达量下降到 0.38 倍但差异不显著( $P > 0.05$ )，脂变皂苷组 LDLR 表达量略有上升，但差异并不显著( $P > 0.05$ )。脂变对照组和脂变皂苷组 ABCG5、ABCG8 表达量均不显著( $P > 0.05$ )，和脂变模型组相比较，脂变皂苷组 LDLR 的表达量有所上升但差异并不显著( $P > 0.05$ )；ABCG5、ABCG8 的表达量均有不同程度的下降，但差异不显著( $P > 0.05$ )。

表 3 苜蓿皂苷对 BRL 细胞 LDLR 的影响

Table 3 Effects of alfalfa saponins on mRNA expression of LDLR in BRL cells

组别 Group	低密度脂蛋白受体 LDLR
正常对照组 Normal control group	1.00±0.40A
苜蓿皂苷组 Alfalfa saponins group	3.35±0.43B
脂变模型组 Hyperlipidemic model group	0.38±0.12A
脂变皂苷组 Hyperlipidemia saponins group	1.11±0.20A

## 2.3 苜蓿皂苷对 BRL 细胞 ABCG5/8 的影响

表 4 苜蓿皂苷对 BRL 细胞 ABCG5/8 的影响

Table 4 Effects of alfalfa saponins on mRNA expression of ABCG5/8 in BRL cells

组别 Group	三磷酸腺苷结合盒转运体 G5 ABCG5	三磷酸腺苷结合盒运体 G8 ABCG8
正常对照组 Normal control group	1.00±0.21A	1.00±0.12A
苜蓿皂苷组 Alfalfa saponins group	1.75±0.17B	3.27±0.15B
脂变模型组 Hyperlipidemic model group	1.34±0.19AB	1.61±0.17AB
脂变皂苷组 Hyperlipidemia saponins group	0.74±0.10AB	1.27±0.10AB

## 3 讨论

## 3.1 苜蓿皂苷对 BRL 细胞活性的影响

苜蓿皂苷具有溶血作用，将皂苷水溶液注射入血液，低浓度时即可使红细胞破裂。一般认为溶血作用与皂苷和红细胞膜中胆固醇的相互作用有关。本试验用 MTT 法检测苜蓿皂苷对 BRL 大鼠肝细胞生长的影响，以确定苜蓿皂苷对这种细胞是否具有毒性，并确定细胞培养过程中苜蓿皂苷的添加量，为后续试验打下基础。试验结果表明，苜蓿皂苷浓度小于 100 μg/ml 时对 BRL 肝细胞的活性并无影响，故选取 100 μg/ml 作为细胞培养过程中苜蓿皂苷的添加量。

## 3.2 苜蓿皂苷对胆固醇转运和分泌的影响

LDLR 是位于细胞表面的跨膜受体，主要功能是参与 LDL 的代谢过程，血浆中 LDL 携带的胆固醇主要是通过肝细胞 LDLR 清除，LDLR 对 LDL 的吞噬与清除是 LDL 代谢过程中最关键的环节。LDLR 途径在降低血清胆固醇的含量，调节低密度脂蛋白代谢和保持血液中胆固醇正常浓度方面起着非常重要的作用。血清中近 2/3 的 LDL-C 是通过这一内吞途径清除的，LDL-C 被摄入量的多少取决于 LDLR

的数量和活性，因此 LDLR 对维持血浆中的 LDL-C 和胆固醇浓度发挥着重要作用。大量研究表明植物活性能够通过调节 LDLR 的表达来调控机体内胆固醇的含量。罗艳等(2005)研究表明姜黄素能够显著降低血液中胆固醇的含量，其机理可能为姜黄素显著增加 LDL 受体的数量和活性从而起到降胆固醇的作用。窦晓兵进一步研究了其机理，结果表明姜黄素可以通过激活 SRE.1 促进 LDLR 的表达或者是通过逆转变受 Insig2 抑制的 SREBP 通路上调 LDLR 的表达。刘凯等研究了大槐台剂对实验大鼠脏器摄取 LDL 和胆固醇排泄的影响，结果表明大槐台剂可以显著增强脏器对 LDL 的摄取，有效促进胆固醇自体内的排出。本试验结果表明，和正常对照组相比，苜蓿皂苷组 LDLR mRNA 表达量极显著升高；脂变模型组添加皂苷后，LDLR mRNA 的表达量虽有上升但差异不显著。说明苜蓿皂苷可通过调控 LDLR 的表达来加速正常肝细胞内胆固醇的吞噬与清除。

ABCG5 和 ABCG8 是 ABC 超家族 G 亚家族的新成员，ABCG5/8 是胆固醇进入胆汁的关键蛋白。其表达量增加后肝脏胆固醇分泌增加，中性固醇排泄选择性增多以及胆固醇合成代偿性增加；阻断这对基因后血浆和肝脏胆固醇水平对于饮食胆固醇含量的应答明显增加。在肝内表达的 ABCG5/8 分子对胆汁胆固醇的分泌具有决定作用。Cong-Hong Yu 等研究发现，ABCG5/8 基因敲除的小鼠中，胆汁胆固醇分泌急剧减少。而在 ABCG5/8 转基因鼠中胆汁酸胆固醇明显增多，粪便中性胆固醇也明显增多。本试验结果显示，添加苜蓿皂苷后正常 BRL 细胞中 ABCG5/8mRNA 表达量显著上升，添加苜蓿皂苷对脂变模型组影响不大。说明苜蓿皂苷可通过调控 ABCG5/8 的表达来增加正常肝细胞内源性胆固醇的分泌，从而减少胆固醇的含量。袁德地等的研究表明苜蓿皂苷可显著影响高脂大鼠肝脏 ABCG5/8 的表达，推测苜蓿皂苷对高脂大鼠肝脏 ABCG5/8 的影响可能是代偿性的而非直接作用，具体的作用机制还需进一步研究。

### 4 结论

- (1) 添加苜蓿皂苷后正常 BRL 细胞中 LDLR、ABCG5/8 的表达量显著升高，说明苜蓿皂苷可通过加速胆固醇的转运和分泌来调控正常肝细胞内胆固醇的代谢。
- (2) 苜蓿皂苷对脂变 BRL 细胞内胆固醇的转运和分泌影响不大。

### 参考文献（略）