

苜蓿皂苷对细胞胆固醇逆向转运的影响

陈言言，张冬强，朱晓艳，袁德地，刘伯帅，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 为了研究苜蓿皂苷对胆固醇逆向转运的影响,本试验以大鼠BRL肝细胞、小鼠ANA-1巨噬细胞为研究对象,从细胞和分子水平上研究了苜蓿皂苷对胆固醇逆向转运的影响及其机理。方法:以大鼠BRL肝细胞建立了脂变肝细胞模型,以小鼠ANA-1细胞构建了荷脂巨噬细胞模型,并测定了大鼠BRL肝细胞和小鼠ANA-1巨噬细胞中与胆固醇逆向转运相关的受体ATP结合盒转运体A1(ABCA1)、清道夫受体B1(SR-B1)mRNA表达量的变化。结果表明:(1)正常BRL细胞ABCA1表达量上升,而苜蓿皂苷对脂变BRL细胞各基因的影响不大。(2)苜蓿皂苷对正常和荷脂ANA-1细胞ABCA1、SR-B1mRNA表达量影响均不大。

关键词 苜蓿皂苷; BRL肝细胞; ANA-1巨噬细胞; 逆转录; mRNA表达

Effects of Alfalfa Saponins on Reverse Cholesterol Transport in Cell

CHEN Yan-yan, ZHANG Dong-qiang, YUAN De-di,

LIU Bo-shuai, WANG Cheng-zhang, SHI Ying-hua

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

Abstract: The experiment was conducted to investigate the effects of alfalfa saponins (AS) on mRNA expression of ABCA1 and SR-B1, and to discuss the effects of AS on reverse cholesterol transport from molecular and cellular level. Methods: BRL and ANA-1 cells were used as materials, the hyperlipidemic BRL and ANA-1 cell model were established. Then the mRNA expressions of ABCA1 and SR-B1 were detected using qRT-PCR technique. Results: (1) AS significantly increased the mRNA expressions of ABCA1 in normal BRL cells, while AS had no effects on hyperlipidemic BRL cells. (2) AS had no effects on mRNA expressions of ABCA1 and SR-B1 both in normal and hyperlipidemic ANA-1 cells.

Keywords: Alfalfa saponins; BRL cells; ANA-1 macrophages cells; Reverse transcription; mRNA expression

苜蓿是一种优良的多年生豆科牧草,素有“牧草之王”的美称,在畜牧业上应用广泛,随着对苜蓿研究的深入,苜蓿所含有的多种生物活性物质越来越受到研究者的重视。苜蓿皂苷是一种从苜蓿中提

取的具有独特生物学活性的物质，由糖中羟基或非糖类化合物的羟基以缩醛链(苷链)脱水缩合而成的环状缩醛物，其机构为五环三萜烯类化合物。苜蓿皂苷的主要生物学功能是：促进胆固醇排泄、降血脂、减轻动脉硬化、抗菌、提高动物机体对抗原的特异性抗体的水平、抗氧化、清除自由基、镇痛、促生长、促蛋白消化合成及减少氮磷排泄的作用。但苜蓿皂苷调节胆固醇代谢的机制尤其是对胆固醇逆向转运方面的研究报道很少。本试验在细胞水平上研究了苜蓿皂苷对胆固醇逆向转运的影响，并对其分子机理进行了初步探讨，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和参考。

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、小鼠 ANA-1 巨噬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。镜下俩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 \times 10⁴

1.3 BRL 细胞的培养

将 BRL 细胞接种于 25 cm² 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% CO₂ 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 \times 10⁵ 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 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) 试验分组：

细胞用六孔板培养，试验分为 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 μl 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 μl 的 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 后换成 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 μ l 的培养基培养 24 h。

脂变皂昔组: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 后换成 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 μ l 的 300 μ g/ml (终浓度为 100 μ g/ml) 苜蓿皂昔溶解液, 培养 24 h。

1.4 ANA-1 细胞的培养

将 ANA-1 细胞接种于 25 cm² 培养瓶中, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 铺满瓶底即可, 置于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。注意更换新鲜培养液。密度达到 2×10⁶ cells/ml, 更换培养基, 定期将培养瓶置于显微镜下观察, 观察细胞形态。

(1) 荷脂 ANA-1 细胞模型的建立

试验前以无血清的 RPMI-1640 培养细胞 12 h, 使试验用细胞处于静止状态。用 50mg/L 的 ox-LDL 作用于巨噬细胞 48 h, 造成荷脂 ANA-1 细胞模型。

(2) 试验分组

细胞用六孔板培养, 试验分为 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 RPMI-1640 培养液, 培养 48 h 后置于 0.1% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中静止 24 h, 加入 100 μ l 的培养基培养 24 h

苜蓿皂昔组:六孔板每孔添加 2.9 ml 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 培养 48 h 后置于 0.1% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中静止 24 h, 加入 100 μ l 300 μ g/ml (终浓度为 100 μ g/ml) 苜蓿皂昔溶解液的培养基培养 24 h。

荷脂模型组: 六孔板每孔添加 2.8 ml 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 100 μ l 1.45 μ g/ μ l 的 ox-LDL (终浓度 50 mg/L) 培养 48 h 后置于 0.1% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中静止 24 h, 加入 100 μ l 的培养基培养 24 h。

荷脂皂昔组: 六孔板每孔添加 2.8 ml 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 100 μ l 1.45 μ g/ μ l 的 ox-LDL (终浓度 50 mg/L) 培养 48 h 后置于 0.1% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中静止 24 h, 加入 100 μ l 300 μ g/ml (终浓度为 100 μ g/ml) 苜蓿皂昔溶解液的培养基培养 24 h。

1.5 指标测定与方法

1.5.1 MTT 法测定苜蓿皂昔对 BRL、ANA-1 细胞活性的影响

1.5.1.1 MTT 溶液的配制

将 20ml FBS 加入 50ml 离心管中, 再吸取 500-1000 μ l FBS 与 MTT 混匀, 再移入离心管中混匀。要多重复几次, 使 MTT 不残留于小管内。混匀后, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除去溶液中的细菌, 每管分装 1ml, 避光 (锡箔纸包住) 保存于 -20 ℃。

1.5.1.2 细胞活性的测定方法

用浓度为 2×10⁴ 个/ml 的细胞悬液以每孔接种于 96 孔板, 每孔 100ul, 培养 24h 后加入不同剂量的苜蓿皂昔, 终浓度分别为 50、100、200、250 μ g/ μ l。每组 6 个复孔, 5%CO₂, 37℃ 培养 24h, 显微

镜观察其效果；加入 10 μl MTT 孵育，4h 后加入 3000rpm 离心 5min 后移走上清，每孔加 DMSO 150 μl 震荡 10min，以无细胞空白孔为零点，在波长 490nm 处检测各孔吸光值。

1.6 mRNA 相对表达量测定

1.6.1 细胞总 RNA 提取

(1) 匀浆的制备

BRL 细胞：吸去细胞培养皿中的上清，每 10 cm² 培养皿面积加 1 ml Trizol，枪头上下吹打几次，转移到 EP 管中。

ANA-1 细胞：将细胞悬液转移到 15 ml 离心管中 1000 rpm 离心 5 min，弃上清，每 5-106 个细胞添加 1 ml Trizol，枪头吹打几次后转移到 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 μl 三氯甲烷，剧烈摇晃 15s。

(4) 4℃ 下，12000 g，离心 15 min，液体分为三层。

(5) 45 度倾斜离心管，吸收上层水相 400 μl 左右，移入新的离心管，操作过程中应避免碰到中间相与有机相。

(6) 每 1 ml Trizol 加入 0.5 ml 异丙醇，轻轻翻转摇匀。

(7) 室温下孵育 10 min。4℃，12000 g 离心 10 min。

(8) 弃去上清液，只留下 RNA 沉淀。

(9) 每 1 ml Trizol 加入 1 ml 75% 的乙醇，洗涤 RNA 沉淀。

(10) 涡旋震荡数秒，4℃，7500 g 离心 5 min，弃去洗涤液。

(11) 空气或真空干燥 5~10 min，干燥不要太彻底，以免 RNA 难以溶解。

(12) 将其重新溶于 50 μl 不含 RNA 酶的水中，用枪头轻轻吹打，55℃~60℃，10~15 min 使 RNA 完全溶解。

(13) RNA 保存于-80℃ 冰箱，以备后续试验使用。

1.6.2 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。

1.6.3 总 RNA 的质量检测

用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性

1.6.4 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-) 试剂盒，按照说明书进行操作

1.6.5 引物设计与合成

根据 Genebank 大鼠 GAPDH、ABCA1、SR-B1DNA 序列，小鼠 β-Actin、ABCA1、SR-B1DNA 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	TCAAAGGTGGAAGAACGGAGTT
ABCA1	大鼠	NC_005104	上游	GTTGCCCCGAATCGTCTGT
			下游	CCAAGTTCTTCATCAAATCAT
SR-B1	大鼠	NC_005111	上游	TTCGTTTCCAGCCAGACAG
			下游	CCGTGCGGTTCATAAAGG
β -Actin	小鼠	NC_000071.6	上游	CCAACCGTGAAAAGATGACC
			下游	ATCACAAATGCCTGTGGTACG
ABCA1	小鼠	NC_000070	上游	GAGCAAAGCCAAGCATCTTC
			下游	AGCAGGGACCACATAATTGC
SR-B1	小鼠	NC_000071	上游	AATGGAACGGACTCAGCAAG
			下游	AGGATTGGGTGTCATGAAG

1.6.6 荧光定量 PCR

本试验采采用 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 μ l, DEPC 处理水 3.8 μ l, 模板量 1 μ l, 上下游引物各 0.1 μ l, 总体系为 10 μ l。按照以下条件设定 RT-PCR 仪器, 进行 PCR 反应: 95℃预变性 2 min ; 95℃变性 15 s , 95℃变性 15 s , 60℃退火 20 s , 72℃延伸 30 s; 此步骤 40 个循环; Meilting Cule, 20℃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。

1.7 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、ANA-1 细胞活性的影响

由表 2 可知苜蓿皂苷添加终浓度为 50、100 μ g/ml 时, BRL 细胞活性与对照组相比差异不大, 而 200、250 μ g/ml 时 BRL 肝细胞活性升高且差异极显著($P < 0.01$)。添加不同浓度的苜蓿皂苷对 ANA-1 巨噬细胞活性的影响均未达到显著水平, 但随着皂苷浓度的上升, ANA-1 巨噬细胞活性有下降趋势。

表 2 苜蓿皂苷对 BRL、ANA-1 细胞活性的影响

Table 2 Effects of alfalfa saponins on activity of BRL and ANA-1 cells

皂苷浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	BRL 肝细胞 BRL cells	ANA-1 巨噬细胞 ANA-1 cells
Concentration of alfalfa saponins ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
0	0.57±0.03A	0.80±0.03a
50	0.57±0.02A	0.84±0.01a
100	0.62±0.08A	0.84±0.03a
200	0.70±0.05B	0.82±0.06a
250	0.74±0.03B	0.76±0.05a

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 ABCA1、SR-B1 的影响

由表 3 可知，和正常对照组相比较，苜蓿皂苷组 ABCA1 表达量升高了 5.97 倍，差异达到极显著($P < 0.01$)、脂变模型组升高了 1.46 倍，脂变皂苷组升高了 1.47 倍，但差异并不显著($P > 0.05$)，苜蓿皂苷组 SR-B1 的表达量升高 1.69 倍但差异并不显著($P > 0.05$)，脂变模型组和脂变皂苷组则分别降低了 0.17、0.35 倍，但差异并不显著($P > 0.05$)。和脂变模型组相比较，脂变皂苷组 ABCA1 的表达量没有明显变化($P > 0.05$)，SR-B1 的表达量略有升高但差异不显著($P > 0.05$)。

表 3 苜蓿皂苷对 BRL 细胞 ABCA1、SR-B1 的影响

Table 3 Effects of alfalfa saponins on ABCA1 and SR-B1 mRNA expression in BRL cells

组别 Group	ATP 结合盒转运子 A1		清道夫受体 B1
	ABCA1	SR-B1	
正常对照组 Normal control group	1.00±0.12A	1.00±0.06a	
苜蓿皂苷组 Alfalfa saponins group	5.97±0.18B	1.69±0.07a	
脂变模型组 Hyperlipidemic model group	1.46±0.22A	0.17±0.01a	
脂变皂苷组 Hyperlipidemia saponins group	1.47±0.13A	0.35±0.32a	

2.3 苜蓿皂苷对 ANA-1 细胞 ABCA1、SR-B1 的影响

由表 4 可知，和正常对照组相比较，苜蓿皂苷组 ABCA1 表达量降低了 0.59 倍，但差异不显著($P > 0.05$)，荷脂模型组降低了 0.24 倍，荷脂皂苷组降低了 0.26 倍，差异均达到显著水平($P < 0.01$)，苜蓿皂苷组 SR-B1 的表达量下降了 0.60 倍但差异并不显著($P > 0.05$)，荷脂模型组和荷脂皂苷组则分别升高了 4.56、4.07 倍，差异极显著($P < 0.01$)。和荷脂模型组相比较，荷脂皂苷组 ABCA1、SR-B1 的表达量均没有明显变化($P > 0.05$)。

表 4 苜蓿皂苷对 ANA-1 细胞 ABCA1、SR-B1 的影响

Table 4 Effects of alfalfa saponins on ABCA1 and SR-B1 mRNA expression in ANA-1 cells

组别 Group	ATP 结合盒转运子 A1		清道夫受体 B1 SR-B1
	ABCA1		
正常对照组 Normoal control group	1.00±0.04a		1.00±0.16A
苜蓿皂苷组 Alfalfa saponins group	0.59±0.15ab		0.60±0.1A
荷脂模型组 Hyperlipidemic model group	0.24±0.07bc		4.56±0.02B
荷脂皂苷组 Hyperlipidemia saponins group	0.26±0.02bc		4.07±0.45B

3 讨论

3.1 苜蓿皂苷对 BRL、ANA-1 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 细胞、ANA-1 细胞生长的影响，以确定苜蓿皂苷对这两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，苜蓿皂苷各个剂量对 ANA-1 巨噬细胞的影响差异均不显著，但浓度高于 100 μg/ml 时，ANA-1 巨噬细胞活性有下降趋势，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 苜蓿皂苷对胆固醇逆向转运的影响

胆固醇逆转运(RCT)是指除提供生理需要外，外周细胞包括巨噬细胞中多余的胆固醇从外周细胞流出，经一系列转运，最后被转运至肝脏，以胆汁内胆固醇及胆盐的形式排出体外的过程。RCT 是机体排出多余胆固醇的主要途径，也是机体抗动脉粥样硬化的重要机制之一。本试验选取了胆固醇逆向转运过程中的两种关键受体 ABCA1、SR-B1，研究苜蓿皂苷对其 mRNA 表达量的影响。ATP 结合盒转运体 A1 是 ATP 结合盒转运体(ABC) 超家族的成员之一，能促进细胞内胆固醇流出而参与胆固醇的逆向转运过程，从而清除组织过量的胆固醇。它是近年来新发现的启动细胞内胆固醇外流、形成 HDL、增加 RCT 的关键基因，对脂质代谢和动脉粥样硬化的发生及发展具有重要影响。大量研究表明高表达 ABCA1 的转基因小鼠可以升高血清中 HDL 含量，降低 LDL 含量，加速体内胆固醇的流出，同时，ABCA1 在巨噬细胞清除过多的胆固醇，阻止动脉粥样硬化进展方面发挥重要作用。本试验研究表明添加苜蓿皂苷后正常 BRL 细胞中 ABCA1 的表达量显著升高，说明苜蓿皂苷可增加正常肝细胞 ABCA1 的表达，增加胆固醇的逆向转运。而添加苜蓿皂苷后脂变 BRL 细胞和荷脂 ANA-1 细胞中 ABCA1 表达量变化并不大。表明苜蓿皂苷主要影响正常肝细胞胆固醇的逆向转运，而对脂变细胞胆固醇的逆向转运无影响。

SR-B1 是在分子水平上得到确认的第一个高密度脂蛋白受体，是肝细胞表面最重要受体之一，其表达水平的高低与 HDL 水平呈负相关，不仅参与介导胆固醇酯的选择性摄取，还参与介导外周细胞胆固醇的流出；由于其参与胆固醇逆转运过程的两端，因此对于体内胆固醇的代谢平衡十分重要。

第六届中国苜蓿发展大会

Mariet 等的研究发现肝脏 SR-B1 低水平表达的小鼠血浆中胆固醇的水平升高了 50-70%，HDL 中脂质增加；而在 SR-B1 的表达模型中，小鼠血浆 HDL 水平明显下降，胆固醇和胆固醇酯从胆汁的排出明显增多，具有显著的抗动脉粥样硬化作用。本试验研究结果表明，苜蓿皂苷对正常和脂变 BRL 和 ANA-1 细胞 SR-B1 的表达均没有影响。前人的研究表明苜蓿皂苷可显著影响大鼠肝脏 SR-B1 的表达，推测苜蓿皂苷对大鼠肝脏 SR-B1 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 ABCA1 的表达量显著升高，说明苜蓿皂苷可通过调控 ABCA1 的表达来增加正常肝细胞胆固醇的逆向转运。
- (2) 苜蓿皂苷对正常和脂变 BRL 和 ANA-1 细胞中 SR-B1 的表达量均无影响。 (参考文献略)