

## 黄花倒水莲皂苷 C 抑制 ox-LDL 诱导的 LOX-1 的表达

柏勇平<sup>1</sup>, 张国刚<sup>1,\*</sup>, 石瑞正<sup>1</sup>, 李元建<sup>2</sup>, 谭桂山<sup>3</sup>, 陈嘉<sup>4</sup>

(中南大学 1. 湘雅医院心内科, 长沙 410008; 2. 药学院药理学系, 长沙 410078;  
3. 药学院药物化学系, 长沙 410013; 4. 湘雅医院放疗科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:观察黄花倒水莲皂苷 C 抑制氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体(oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)表达的作用。方法:培养人脐静脉内皮细胞株(HUVEC-12),随机分为:对照组、ox-LDL (50 mg/L)组和氧化型低密度脂蛋白(50 mg/L) + 黄花倒水莲皂苷 C (1, 3, 10  $\mu$ mol/L)组,通过 RT-PCR 和 Western blot 蛋白印迹分析检测 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达。结果:ox-LDL 上调 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达,黄花倒水莲皂苷 C 明显抑制 ox-LDL 诱导的 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达,且呈浓度依赖性。结论:黄花倒水莲皂苷 C 明显抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达。

[关键词] 黄花倒水莲皂苷 C; 氧化型低密度脂蛋白; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体

[中图分类号] R392.12 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2006)05-0659-04

## Inhibitory effect of reinoside C on LOX-1 expression induced by ox-LDL

BAI Yong-ping<sup>1</sup>, ZHANG Guo-gang<sup>1,\*</sup>, SHI Rui-zheng<sup>1</sup>,

LI Yuan-jian<sup>2</sup>, TAN Gui-shan<sup>3</sup>, CHEN Jia<sup>4</sup>

(1. Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078;

3. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013;

4. Department of Radiotherapy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of reinoside C (RC) on the expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor (LOX)-1 mRNA and LOX-1 protein induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** HUVECs were cultured with ox-LDL (50 mg/L) for 24 h in the absence or presence of RC (1, 3, and 10  $\mu$ mol/L). The expressions of LOX-1 mRNA and LOX-1 protein were examined by RT-PCR and Western-blot. **Results** Incubation with ox-LDL (50 mg/L) significantly raised the expression of LOX-1 mRNA and LOX-1 protein, which was concentration-dependent. **Conclusion** RC can inhibit the increased expression of LOX-1 mRNA and LOX-1 protein induced by ox-LDL in HUVECs.

**Key words:** reinoside C; oxidatively low-density lipoproteins; lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006, 31(5):0659-04]

氧化型低密度脂蛋白(oxidatively low-density lipoproteins, ox-LDL)导致的内皮功能障碍在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)病理过程中起着关键作用<sup>[1]</sup>,但 ox-LDL 损伤内皮的分子机制仍不明确。血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)是近年发现的新型 ox-LDL 特异性受体,主要存在于内皮细胞表面,研究发现它与以往的清道夫受体无任何同源性,是内皮细胞摄取和代谢 ox-LDL 的主要受体,可介导 ox-LDL 的生物学活性,在 AS 中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。

黄水倒水莲(Polygala aureocauda Dunn, PAD)主产于江西、福建、两广和云南,其味甘,微苦,性平<sup>[3]</sup>。现代研究证明,其根含皂苷、多糖、有机酸、氨基酸等成分,具有降血脂,抗炎,改善心肌缺血等作用<sup>[4]</sup>。黄花倒水莲皂苷 C(reinoside C, RC)是从黄水倒水莲中提取的一种单体成份<sup>[5]</sup>。本课题拟通过体外培养内皮细胞,检测 RC 对 ox-LDL 诱导的 LOX-1 mRNA 及 LOX-1 蛋白表达的影响,为开发新的抗动脉粥样硬化药物提供理论依据。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 人脐静脉血内皮细胞株:HUVEC-12(湘雅医学院细胞培养中心),RC 由中南大学药学院提纯,经 HPLC 分析,纯度 > 90.0%;DMEM 培养基、Trizol 系 Gibco 产品;小牛血清购自杭州四季青;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购至于江苏碧云天生物有限公司;RT-PCR 试剂均为 MBI 产品;PCR Marker 购自北京鼎国生物技术有限公司;Bland leader 凝胶图像分析软件;羊抗人 LOX-1 多克隆抗体和鼠抗羊 IgG 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司(美国)。

### 1.2 方 法

1.2.1 血浆 LDL 的提取和 LDL 的氧化 健康人新鲜血浆,用密度梯度超速离心法分离制备 LDL(密度为 1.019 ~ 1.063 kg/L)。分离的 LDL 置于磷酸缓冲液(0.01 mol/L, pH7.4)充分透析 24 h,以 BCA 法测定 LDL 蛋白含量。将提取的 LDL 置于终浓度为 10 μmol/L 的 CuSO<sub>4</sub> 中充分氧化 24 h,0.2 mmol/L EDTA 终止氧化。用硫代巴比妥法测定脂质过氧化终产物 MDA 的含量,以鉴定 ox-LDL 的氧化程度[LDL:(5.26 ± 0.96) mol/(L·g);ox-LDL:(26.03 ± 5.26) mol/(L·g)]。

1.2.2 人脐静脉血内皮细胞的培养 取 HU-

VEC-12 细胞株,解冻复苏后加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基制成细胞悬液,接种于培养瓶中置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养(37 °C)。待细胞长满瓶底 80% 左右时将细胞转移至 6 孔培养板(1 × 10<sup>6</sup>/孔),细胞 80% 融合时换成含 1% 小牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h,使细胞达到同步化,然后分别加入不同的处理因素。

1.2.3 实验设计 随机将 6 孔板细胞分为:(1)空白对照组。用含 1% 小牛血清的 DMEM 培养液孵育 HUVEC 细胞 24 h;(2)ox-LDL 处理组。用含 50 mg/L ox-LDL 的培养液孵育 HUVEC 细胞 24 h;(3)RC + ox-LDL 组。在加入 ox-LDL(50 mg/L)前 4 h 分别加入终浓度为 1, 3, 10 μmol/L 的 RC。收集细胞,通过 RT-PCR 和 Western blot 蛋白印迹分析检测 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达,RC 溶于双蒸水中。

### 1.2.4 RT-PCR 检测 LOX-1 mRNA 的表达

Trizol 试剂盒提取总 RNA,紫外分光光度计检测 A<sub>260</sub> 和 A<sub>280</sub> 吸光度,计算纯度和含量,A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 均在 1.8 ~ 2.0 之间。取 2 μg 总 RNA 进行逆转录后取 2.5 μL 行 PCR 反应,β-actin 为内参照。PCR 扩增 LOX-1 片断(193 bpm),以 β-actin(472 bp)作参照的 LOX-1 上游引物:5'-TTA CTC TCC ATG GTG GTG CC-3';下游引物:5'-AGC TTC TTC TGC TTG TTG CC-3';内参 β-actin 上游引物:5'-AAA TCG TGC GT ACA TTA A-3';下游引物:5'-CTC GTC ATA CTC CTG CTT G-3'。上述引物由上海生物工程公司合成。PCR 反应体系 50 μL,反应条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,57 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1.5 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。取 8 μL PCR 产物于 2% 的琼脂糖凝胶电泳并用成像系统扫描摄片,用 Bland leader 凝胶图像分析软件分析电泳条带的积分光密度值。以目的基因/β-actin 的比值表示目的基因 mRNA 的表达水平。

1.2.5 Western blot 分析 LOX-1 蛋白表达 用 4 °C 预冷的细胞裂解液将内皮细胞裂解,测定蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电转移至硝酸纤维素膜上。转移后的硝酸纤维素膜经脱脂奶粉封闭 1 h,洗涤后置于 1:1000 稀释的羊抗人 LOX-1 多克隆抗体中 4 °C 过夜,经二抗孵育,DAB 显色,计算机扫描蛋白条带后进行灰度扫描分析。

1.3 统计学处理 所有数据均以均数 ± 标准

差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。用 one-way ANOVA 进行统计学处理,组间差异采用 LSD 检验。双侧  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

RC 对 ox-LDL 诱导的内皮细胞 LOX-1 mRNA 及蛋白的影响:用含 50 mg/L ox-LDL 的培养液孵

育内皮细胞 24 h 后,ox-LDL 组 (50 mg/L) 与对照组相比内皮细胞 LOX-1 mRNA 和蛋白表达均明显增加,两者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),RC (1,3,10  $\mu\text{mol/L}$ ) 明显抑制 ox-LDL 诱导的 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达,与 ox-LDL 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),且呈浓度依赖性 (图 1, 图 2)。

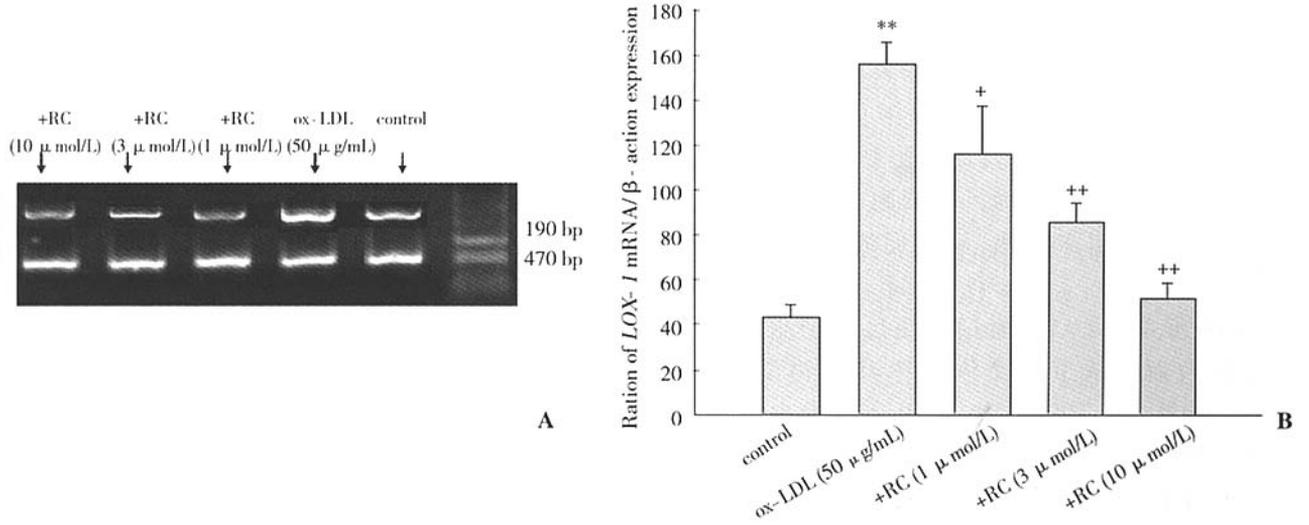


图 1 RC 对 ox-LDL 诱导的内皮细胞 LOX-1 mRNA 表达的影响 A: RT-PCR 分析内皮细胞 LOX-1 mRNA 表达水平代表图; B: 内皮细胞中 LOX-1 mRNA 表达水平的灰度分析 ( $n=6$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control, +  $P < 0.05$  vs ox-LDL, ++  $P < 0.01$  vs ox-LDL)

Fig. 1 Influence of reinoside C on LOX-1 mRNA expression in HUVECs induced by ox-LDL A: mRNA band of LOX-1 and  $\beta$ -actin determined by RT-PCR; B: Histogram of LOX-1 mRNA expressing value ( $n=6$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control, +  $P < 0.05$  vs ox-LDL, ++  $P < 0.01$  vs ox-LDL)

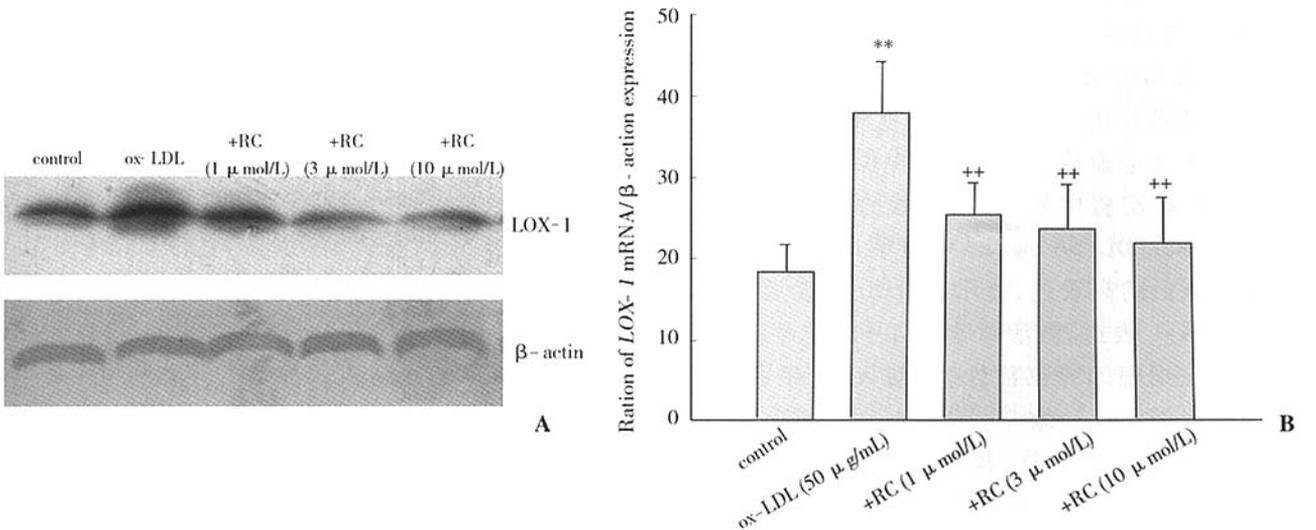


图 2 RC 对 ox-LDL 诱导的内皮细胞 LOX-1 蛋白表达的影响 A: Western-Blot 分析内皮细胞 LOX-1 蛋白表达水平代表图; B: 内皮细胞中 LOX-1 蛋白表达水平的灰度分析 ( $n=6$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control, ++  $P < 0.01$  vs ox-LDL)

Fig. 2 The influence of reinoside C on LOX-1 protein expression in HUVECs induced by ox-LDL A: Protein band of LOX-1 and  $\beta$ -actin determined by Western-Blot; B: Histogram of LOX-1 protein expressing value ( $n=6$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control, +  $P < 0.05$  vs ox-LDL, ++  $P < 0.01$  vs ox-LDL)

### 3 讨 论

高脂血症是 AS 的主要危险因素之一,血浆的主要成分胆固醇 60%~70% 以低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)形式存在。当血浆 LDL 水平升高时,动脉内膜因为 LDL 或其他因素作用,可产生氧自由基及其代谢产物,使进入内膜的 LDL 发生氧化,成为 ox-LDL。ox-LDL 可改变内皮细胞表面分子,导致内皮通透性增加和内皮功能损伤,使一氧化氮(nitric oxide, NO)释放减少、内皮素释放增加,并可表达黏附分子、分泌化学趋化蛋白,使血流中的单核细胞与内皮细胞黏附并大量进入内皮下,摄取脂质转化为巨噬细胞,并进一步摄入脂质而转化为泡沫细胞,从而促进 AS 的发生和发展<sup>[6]</sup>。

传统认为,ox-LDL 通过激活巨噬细胞和平滑肌细胞表面的清道夫受体发挥其生物学效应。Sawamura 等<sup>[7]</sup>于 1997 年在牛主动脉内皮细胞上发现一种新型的 ox-LDL 特异受体,即 LOX-1。LOX-1 属于 C 型血凝素家族,II 型膜蛋白结构,和已知的 ox-LDL 的清道夫受体没有任何同源性,主要存在于内皮细胞表面。近来的研究显示,LOX-1 可介导 ox-LDL 诱导的黏附分子表达、基质金属蛋白酶表达及 CD40/CD40L 信号通路的激活等生物学活性<sup>[8]</sup>。而且,LOX-1 在 AS 斑块内表达水平明显升高,斑块内可检测到 LOX-1 的配体<sup>[9]</sup>。这些研究结果均提示,LOX-1 在 AS 发生、发展过程中起着重要的作用。对 LOX-1 的检测以及抗 LOX-1 治疗可能为心血管疾病的防治提供新思路。

作者在实验中发现,在培养的人脐静脉内皮细胞中,ox-LDL(50 mg/L)可诱导 LOX-1 mRNA 及 LOX-1 蛋白的高表达,提示 ox-LDL 可能通过上调受体 LOX-1 表达,激活细胞内信号传导通路,从而改变内皮细胞的分泌活性,推动 AS 发生和发展,这与国内外研究一致<sup>[10]</sup>。

PAD 主产于江西、福建、两广和云南。其味甘,微苦,性平;具有补益气血,健脾祛湿,活血化淤等功效<sup>[3]</sup>。现代研究证明,其根含皂苷、多糖、有机酸、氨基酸等成分,具有降血脂、抗衰老、抗炎,改善心肌缺血,免疫调节等作用<sup>[4]</sup>。有研究表

明,RC 为其主要化学成分之一<sup>[5]</sup>。本实验结果表明,RC 可明显抑制 ox-LDL 诱导的 LOX-1 mRNA 及 LOX-1 蛋白表达,提示 RC 不仅具有降血脂的作用,而且可抑制 LOX-1,从而抑制动脉粥样硬化的发生和发展。本研究为将其开发为新的抗动脉粥样硬化药物提供了部分理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Grafe M, Auch-Schweik W, Hertel H, et al. Human cardiac microvascular and macrovascular endothelial cells respond differently to oxidatively modified LDL[J]. *Atherosclerosis*, 1998, 137(2): 87-95.
- [2] Li D Y, Chen H J, Romeo F, et al. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302(2): 601-605.
- [3] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志(第四十三卷,第三分册)[M]. 北京:科学出版社,1997:151-152.
- [4] 陈新宇,黄胜光,杨春华,等. 水莲皂苷对高血脂症患者高、低密度脂蛋白等的影响[J]. *湖南中医学院学报*, 1999, 9(3): 33-35.
- [5] 徐康平,黄伟,谭健兵,等. 水莲皂苷降血脂活性成分研究[J]. *中药材*, 2006, 29(1): 16-19.
- [6] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Nature*, 2002, 420(5532): 868-874.
- [7] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein[J]. *Nature*, 1997, 386(6620): 73-77.
- [8] Li D Y, Liu L, Chen H J, et al. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2003, 23(5): 816-821.
- [9] Downs J R, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS[J]. *JAMA*, 1998, 279(20): 1615-1622.
- [10] Bao M, Lou Y. Flavonoids from seabuckthorn protect endothelial cells (EA.hy926) from oxidized low-density lipoprotein induced injuries via regulation of LOX-1 and eNOS expression[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 48(1): 834-841.

(本文编辑 傅希文)