

# 熊果酸对 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇逆转运及对 PPAR- $\gamma$ 的基因及蛋白表达的影响

王波<sup>1</sup>, 余珊<sup>1</sup>, 何江波<sup>1</sup>, 王磊<sup>2</sup>, 俞华<sup>1\*</sup>, 谢力<sup>1</sup>, 宁海涛<sup>1</sup>, 贾静<sup>1</sup>  
(1. 昆明学院医学院, 昆明 650031; 2. 昆明市第一人民医院, 昆明 650011)

**[摘要]** **目的:**观察不同质量浓度熊果酸(UA)对 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞促进胆固醇流出的影响及过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )转运蛋白的表达,探讨可能作用机制。**方法:**体外培养 RAW264.7 巨噬细胞,用 20 mg·L<sup>-1</sup>的氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)孵育 48 h 诱导成泡沫细胞,采用油红 O 染色,光镜下鉴定泡沫细胞形态变化,液体闪烁计数器检测胆固醇的流出率,并用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及酶联免疫吸附(ELISA)测定 PPAR- $\gamma$  的基因及蛋白表达。**结果:**巨噬细胞经 ox-LDL 诱 48 h 后转化为泡沫细胞,与空白组比较,10,15,20,25 mg·L<sup>-1</sup>质量浓度 UA 干预组泡沫细胞的胆固醇流出率上升( $P < 0.01$ );10,15,20,25 mg·L<sup>-1</sup>质量浓度 UA 干预组泡沫细胞内 PPAR- $\gamma$  的基因表达上调( $P < 0.01$ ),在一定质量浓度范围内呈剂量依赖性;10,15,20,25 mg·L<sup>-1</sup>质量浓度 UA 干预组泡沫细胞内 PPAR- $\gamma$  的蛋白表达增加( $P < 0.01$ ),差异有统计学意义。**结论:**经 20 mg·L<sup>-1</sup>ox-LDL 的诱导后,巨噬细胞分化为泡沫细胞,细胞内脂质大量增加,UA 促进巨噬细胞内胆固醇流出,可能与上调细胞内 PPAR- $\gamma$  的表达有关。

**[关键词]** 熊果酸; 动脉粥样硬化; RAW264.7 巨噬细胞; 胆固醇

**[中图分类号]** R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0127-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100127

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170308.0930.012.html>

**[网络出版时间]** 2017-03-08 9:30

## Effect of Ursolic Acid on Cholesterol Efflux and PPAR- $\gamma$ Gene and Protein Expression in RAW264.7 Macrophage-derived Foam Cells

WANG Bo<sup>1</sup>, YU Shan<sup>1</sup>, HE Jiang-bo<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>2</sup>, YU Hua<sup>1\*</sup>, XIE Li<sup>1</sup>, NING Hai-tao<sup>1</sup>, JIA Jing<sup>1</sup>  
(1. Medical College, Kunming University, Kunming 650031, China;  
2. Kunming First People's Hospital, Kunming 650011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of different concentrations of ursolic acid (UA) on cholesterol efflux and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) transporter expression in RAW264.7 macrophage-derived foam cells, and its possible mechanism. **Method:** RAW264.7 macrophages were cultured *in vitro* and incubated with 20 mg·L<sup>-1</sup> oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) for 48 hours to induce foam cells. Oil red O staining was used to identify morphological changes of foam cells. The mRNA and protein expressions of PPAR- $\gamma$  were detected by Real-time polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Macrophages were transformed into foam cells by being induced with ox-LDL for 48 h. Compared with the blank group, the cholesterol efflux rate of foamed cells in the UA intervention group increased at concentrations of 10, 15, 20, 25 mg·L<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ ), and were dose-dependently within a certain concentration range. At concentrations of 10, 15, 20, 25 mg·L<sup>-1</sup>, the protein expression of PPAR- $\gamma$  mRNA in foam cells in

**[收稿日期]** 20161205(035)

**[基金项目]** 云南省教育厅科学研究基金项目(2014Y387);云南省科技厅应用基础研究项目(2016FD109)

**[第一作者]** 王波, 硕士, 讲师, 从事中医、病理解剖学与病理生理学的研究, Tel:13529323847, E-mail:429548581@qq.com

**[通讯作者]** \*俞华, 副教授, 从事病原微生物与免疫学的研究, Tel:13888165922, E-mail:513783157@qq.com

the UA intervention group was up-regulated ( $P < 0.01$ ), and was dose-dependently within a certain concentration range. The protein expression of PPAR- $\gamma$  in foam cells of UA treated at concentrations of 10, 15, 20, 25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  increased ( $P < 0.01$ ), and the difference was statistically significant. **Conclusion:** After 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ox-LDL induced macrophages are differentiated into foam cells, a large number of intracellular lipid increases, and UA promotes macrophage cholesterol efflux, which may be related to increase in intracellular expression of PPAR- $\gamma$ .

**[Key words]** ursolic acid; atherosclerosis; RAW264.7 macrophage; cholesterol

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心血管疾病的主要病理基础,其引起的血栓形成和斑块破裂可诱发严重的心血管疾病(CVD),如冠心病、心肌梗死等。AS形成的病理基础是脂质代谢紊乱,胆固醇沉积并被巨噬细胞吞噬所致。而胆固醇逆转运是机体清除内源性胆固醇的重要途径,也是机体预防AS的关键<sup>[1]</sup>。经研究发现熊果酸(UA)具有抗动脉粥样硬化的作用,且安全,不良反应小<sup>[2]</sup>。UA又名乌索酸、乌苏酸是一种五环三萜类化合物,分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ ,相对分子质量456.68 Da,是从山楂、白花蛇舌草等多种植物叶或果实中提取,具有广泛的生物学效应,其抗动脉粥样硬化、降血脂等药理作用已被证实<sup>[3-5]</sup>,被广泛应用在医药化妆品原料和食品的乳化剂中。为了全面了解UA抗动脉粥样硬化的作用机制,课题组前期完成了用链脲霉素加高脂饲料制造的低密度脂蛋白缺乏小鼠模型进行实验发现,在造模开始时即在高脂饲料中添加0.2% UA喂食共11周,结果能预防进行性动脉粥样硬化发生。通过对UA用药数据分析发现UA对预防动脉粥样硬化的作用更好,使动脉损伤形成减少了53%<sup>[6]</sup>。从分子病理学角度分析,发挥抗动脉粥样硬化作用的UA和保护内皮细胞免受氧化低密度脂蛋白诱导的细胞毒性的机制与增加SIRT1蛋白和基因的表达有关<sup>[7]</sup>。

在上述研究中发现UA能减少主动脉弓动脉粥样硬化斑块形成面积,减少动脉损伤,抑制斑块形成,与文献报道结果相一致<sup>[7-9]</sup>。笔者前期研究发现UA用药后实验组Wistar大鼠股动脉内膜纤维细胞减少甚至消失,平滑肌增生,沉积脂质减少,单核巨噬细胞增生,说明UA对脂质沉积和泡沫细胞形成有一定的抑制作用<sup>[6]</sup>。但目前UA抗动脉粥样硬化,促进泡沫细胞胆固醇流出作用缺乏相关研究,故本研究以RAW264.7巨噬细胞为研究对象,采用不同质量浓度UA对RAW264.7巨噬细胞源性泡沫细胞促进胆固醇流出的影响及过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )转运蛋白的表达,探讨UA对胆固醇逆转运可能的作用机制,进一步为确定UA抗

动脉粥样硬化作用机制提供理论依据和实践基础,有利于动脉粥样硬化的防治和熊果酸的研究开发。

## 1 材料

对照品熊果酸(陕西旭煌植物科技发展有限公司,批号130126,纯度 $\geq 98\%$ );RPMI 1640培养基,新生牛血清( $\geq 98\%$ ),胰蛋白酶(江苏凯基生物技术有限公司,批号分别为12400-024,BS6215,24579);低密度脂蛋白试剂盒(LDL,长春汇力生物技术有限公司,批号K075);总RNA提取试剂盒(Trizol)[天根生化科技(北京)有限公司,批号74104];实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(北京凯瑞基生物科技有限公司,批号为PR6911); $\beta$ -actin,PPAR- $\gamma$ 引物(上海生工生物工程技术有限公司,批号分别为BM0627,21649);酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海超研生物技术有限公司,批号KA0445);兔抗小鼠PPAR- $\gamma$ 抗体(一抗),碱性磷酸酶标记的羊抗兔单克隆抗体(二抗)和 $\beta$ -actin小鼠抗人单克隆抗体(北京西美杰科技有限公司,批号分别为C0308,C0254,C0113)。

CX23型荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);TP1020型密闭式全自动组织脱水机,TB-718C型组织包埋机,CM1520型恒温冰冻切片机,TEC2601型恒温展片台,PAS8000 1型病理图像分析仪,DW-HW328型低温冰箱[徕卡显微系统(上海)贸易有限公司];ABI9700型全自动酶标仪,GT10-1型台式低温冷冻离心机(上海拜格生物科技发展有限公司);AU5800型全自动生化分析仪(美国贝克曼公司)。

RAW264.7小鼠巨噬细胞株购自上海汉博生物科技发展有限公司(批号TIB-71)。

## 2 方法

**2.1 LDL胆固醇的氧化修饰及鉴定<sup>[10]</sup>** 用pH 7.2,0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)将LDL质量浓度调整为1.6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,加入 $\text{CuSO}_4$ 使LDL溶液终浓度为10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,37  $^\circ\text{C}$ 氧化12 h,将溶液装入透析袋,将终浓度为0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙二胺四乙酸(EDTA)加入PBS溶液中,4  $^\circ\text{C}$ 条件下透析24 h

以终止氧化。滤膜过滤除菌, BCA 试剂定量蛋白。调整蛋白至  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

**2.2 细胞培养及实验分组** 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  条件下, 将 RAW264.7 小鼠巨噬细胞株放置在含  $10\%$  胎牛血清的 DMEM(低糖)培养基中, 待细胞进入对数生长期时, 接种至 6 孔培养板,  $4 \text{ mL/孔}$  (即细胞密度为  $4 \times 10^5$  个/孔), 用含  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)培养  $48 \text{ h}$ , 诱导其成为泡沫细胞。油红 O 染色观察巨噬细胞内脂质沉积情况, 然后随机分组进行实验。研究组分别用  $10, 15, 20, 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 UA 孵育细胞  $24 \text{ h}$ ; 空白组不做任何处理。

**2.3 油红 O 染色** RAW264.7 小鼠巨噬细胞株诱导其成为泡沫细胞后, 将培养基中的培养液吸收, 用 PBS 液冲洗 3 遍, 加  $50\%$  甲醛固定  $30 \text{ min}$ , 稀释油红储存液, 染色  $10 \text{ min}$  左右,  $6 \text{ 孔}$  加  $1.5 \text{ mL}$ , 用  $75\%$  乙醇/ $60\%$  异丙醇漂洗, 除去多余的染料, 苏木染色  $5 \text{ min}$ , PBS 漂洗, 水性封片剂封片。显微镜下观察并拍照收集图像。

**2.4 细胞生存率检测** RAW264.7 细胞接种于 6 孔培养板, 接种密度为  $4 \times 10^5$  个/孔, 细胞生存率检测采用噻唑蓝(MTT)法。各实验组处理后, 加入 MTT 使其终质量浓度为  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养箱内孵育  $4 \text{ h}$ , 加入助溶剂 DMSO, 使甲瓖颗粒完全溶解, 酶标仪波长  $570 \text{ nm}$  测定吸光度  $A_{570}$ 。

**2.5 胆固醇流出率的测定** 胆固醇流出率按文献方法测定<sup>[12]</sup>。RAW264.7 细胞用含  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ox-LDL 的培养液诱导  $48 \text{ h}$ , 经过实验处理  $24 \text{ h}$  后收集培养液,  $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $5 \text{ min}$ , 去除细胞碎片, 于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冻存, 为培养液放射强度的检测样品。细胞用 PBS 液洗 3 遍, 加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH  $200 \text{ } \mu\text{L}$ , 反复冻融 3 次裂解细胞, 为细胞裂解物放射强度的检测样品。各样品经 BCA 试剂定量蛋白后, 加入  $7.2\%$  三氯乙酸沉淀蛋白, 正己烷和无水乙醇抽提, 真空干燥, 闪烁液溶解, 液体闪烁计数器检测培养液和细胞裂解物的放射强度。

$$\text{胆固醇流出率} = \frac{\text{培养液放射强度}}{\text{培养液放射强度} + \text{细胞裂解物放射强度}} \times 100\%$$

**2.6 Real-time PCR 检测 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达** 收集各实验组细胞, 按总 RNA 试剂盒(DP419)说明书提取总 RNA, 并按说明书将 RNA 反转录合成 cDNA, 取逆转录产物进行 PCR 循环。PCR 扩增条件:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$   $10 \text{ s}$ , 之后  $95 \text{ }^\circ\text{C}$   $15 \text{ s}$ ,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$   $60 \text{ s}$  循环  $40$  次。PPAR- $\gamma$  上游引物:  $5' \text{-ATGGCAATTGAATGTCTGTC-3'}$ , 引物长度  $168 \text{ bp}$ , 下游引物  $5' \text{-TCCGC}$

$\text{CCAAACCTGATG-3'}$ , 引物长度  $136 \text{ bp}$ , 扩增片段长度  $360 \text{ bp}$ ; 选用  $\beta$ -actin 作为内参, 引物序列  $\beta$ -actin 上游:  $5' \text{-ATATCGCTGCGCTGGTCGTC-3'}$ , 引物长度  $168 \text{ bp}$ , 下游:  $5' \text{-AGGATGGCTGAGGGAGA GC-3'}$ , 引物长度  $136 \text{ bp}$ , 扩增片段长度  $268 \text{ bp}$ 。反应结束后, 取反应产物  $10 \text{ } \mu\text{L}$  进行  $2\%$  琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶图像分析系统摄图, 并分析各组目的基因及内参基因的灰度值, 以二者的比值代表基因 mRNA 的表达。

**2.7 Western blot 检测 PPAR- $\gamma$  蛋白表达** 将收集的细胞按常规方法提取总蛋白, 采用 BCA 蛋白浓度分析试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白质  $20 \text{ } \mu\text{g}$  进行垂直电泳、转膜,  $5\%$  脱脂牛奶封闭后分别加特异性一抗 PPAR- $\gamma$ ( $1:1\ 000$ ) 和  $\beta$ -actin( $1:2\ 000$ ), 室温摇床孵育  $2 \text{ h}$ , 分别加入相应的二抗( $1:2\ 000$ ), 室温孵育  $1 \text{ h}$ , 免疫印迹化学发光(ECL)显影。结果用 Lab-work 凝胶图像分析系统对胶片扫描, 以空白组的面积灰度值为  $100$  与实验组进行比较和半定量分析。

**2.8 统计学处理** 所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。数据分析采用单因素方差检验,  $P < 0.05$  表示差异有显著意义。

### 3 结果

**3.1 UA 对 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞的影响** 泡沫细胞生存率结果显示  $10, 15, 20, 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  4 个剂量组 UA 的  $A_{570}$  与空白组比较差异无统计学意义, 对 RAW264.7 巨噬细胞生存率无明显影响, 说明在  $10, 15, 20, 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度下熊果酸对 RAW264.7 巨噬细胞无显著的毒性, 因此后续实验选取  $10, 15, 20, 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  这 4 个剂量的 UA, 以保证细胞处于完好状态; 胆固醇流出率检测结果显示泡沫细胞胆固醇流出率随 UA 质量浓度增加而逐渐增加, 与空白组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 1, 图 1。

**3.2 UA 对泡沫细胞形成的影响** 油红 O 染色结果显示, 随着 UA 浓度增加  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组和  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组细胞内脂滴颗粒逐渐减少, 与空白组比较呈剂量依赖性, 说明熊果酸可抑制泡沫细胞形成, 促进脂质和胆固醇的流出, 见图 2。

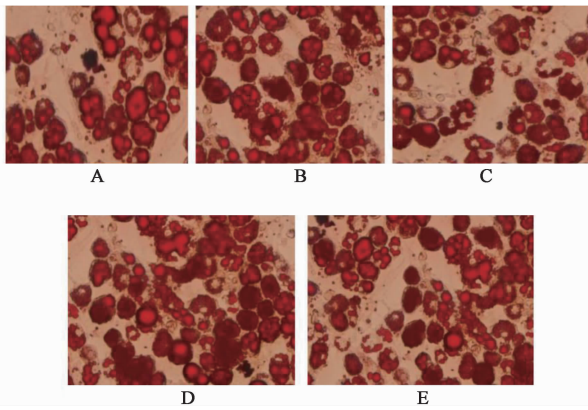
**3.3 UA 对泡沫细胞 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达的影响** 与空白组比较,  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组和  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组随着 UA 质量浓度的增加 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达逐渐增强( $P < 0.01$ )。见图 2。

表 1 熊果酸对泡沫细胞生存率、胆固醇流出率 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 1 Effect of ursolic acid on foam cell viability, cholesterol efflux rate ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	胆固醇流出率/%
空白	-	1.10 ± 0.07	6.12 ± 0.07
熊果酸	10	1.09 ± 0.12	8.09 ± 0.12 <sup>1)</sup>
	15	1.11 ± 0.09	9.11 ± 0.24 <sup>1,2)</sup>
	20	1.13 ± 0.07	12.13 ± 0.27 <sup>1,2,3)</sup>
	25	1.12 ± 0.06	12.67 ± 0.32 <sup>1,2,3,4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 15  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.01$  (图 2,3 同)。



A. 空白组; B. 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; C. 15  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; D. 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; E. 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组 (图 2,3 同)

图 1 熊果酸对泡沫细胞形成的影响 (油红 O,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of ursolic acid on foam cell formation (oil red O,  $\times 400$ )

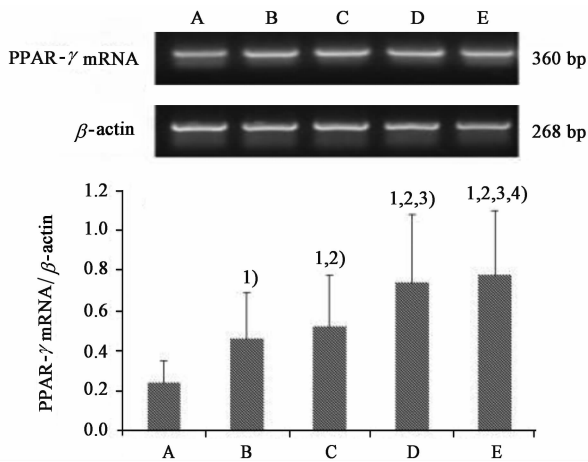


图 2 熊果酸对泡沫细胞 PPAR- $\gamma$  mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 2 Effect of ursolic acid on expression of PPAR- $\gamma$  mRNA in foam cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

### 3.4 UA 对泡沫细胞 PPAR- $\gamma$ 蛋白表达的影响

Western blot 检测 PPAR- $\gamma$  蛋白表达,结果显示随着 UA 的浓度增加,PPAR- $\gamma$  蛋白表达逐渐增强 ( $P <$

0.01)。见图 3。

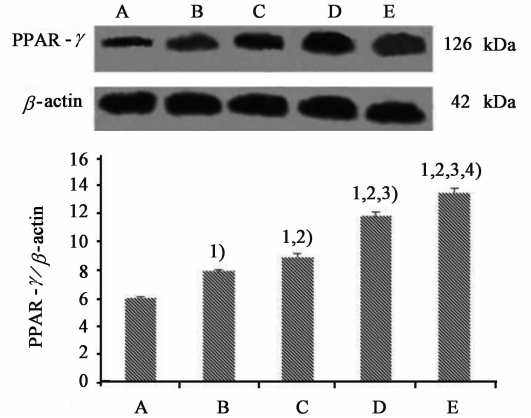


图 3 熊果酸对泡沫细胞 PPAR- $\gamma$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 3 Effect of ursolic acid on expression of PPAR- $\gamma$  in foam cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

## 4 讨论

巨噬细胞内胆固醇的沉积和逆转运受到抑制是 AS 发病机制的关键所在,降低胆固醇沉积,促进其流出是防治 AS 的重要方法。胆固醇逆转运是指胆固醇从泡沫细胞中流出,与载脂蛋白 A-1 (apolipoprotein A-1, Apo A-1) 结合,形成高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) 转运至肝脏,以胆汁形式排出的过程<sup>[13-17]</sup>,许多因素通过多种调控机制参与其中。

目前国内外对于 AS 研究热点是 PPAR- $\gamma$  mRNA 的调控在胆固醇逆转运中起到至关重要的作用。PPAR- $\gamma$  基因属于核受体超家族成员基因,作为转录调控因子能够启动脂肪形成,在调节脂类代谢中起到重要的作用。Mehrabi 等<sup>[18]</sup> 研究表明,在人巨噬细胞及巨噬细胞源性泡沫细胞中,配体活化的 PPAR- $\gamma$  通过 caveolin1 基因表达降低和 Apo A-1 介导的胆固醇流出途径减少胆固醇酯合成,结果提示 PPAR- $\gamma$  在 AS 起重要作用。Demina 等<sup>[19]</sup> 研究表明巨噬细胞的 LXR $\beta$ - $\gamma$  和 PPAR- $\gamma$  基因表达水平可能是动脉粥样硬化的发生、发展的重要因素。Ringseis 等<sup>[20]</sup> 通过体内外实验研究表明 PPAR- $\alpha$  合成活化剂和 PPAR- $\gamma$  能够通过激活基因参与胆固醇的平衡,减少巨噬细胞的泡沫细胞胆固醇蓄积。且有研究表明,PPAR- $\gamma$  可通过各种途径介导胆固醇的流出,对胆固醇的代谢发挥了重要作用<sup>[21-26]</sup>。

UA<sup>[27]</sup> 可增强巨噬细胞对病理性脂质的清除能力,对巨噬细胞内脂质的聚集有一定的抑制作用,可促进胆固醇流出。JIANG 等<sup>[28]</sup> 研究表明 UA 具有降低血脂和抗动脉粥样硬化的作用。发挥抗动脉粥

样硬化作用的 UA 和保护内皮细胞免受氧化低密度脂蛋白诱导的细胞毒性的发生机制与增加 SIRT1 的表达有关。Mancha-Ramirez 等<sup>[27]</sup>研究表明 UA 可作为预防与治疗高脂血症所致动脉粥样硬化的一种有效的化学成分。尽管如此,目前 UA 抗动脉粥样硬化,促进泡沫细胞胆固醇流出作用机制有待进一步研究。笔者前期研究发现 UA 用药后研究组 Wistar 大鼠股动脉内膜纤维细胞减少甚至消失,平滑肌增生,沉积脂质减少,单核巨噬细胞增生,说明熊果酸对脂质沉积和泡沫细胞形成有一定的抑制作用,促进平滑肌增生。本实验以 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞为研究对象,经 20 mg·L<sup>-1</sup>的 ox-LDL 诱导后,巨噬细胞分化为泡沫细胞,细胞内脂质大量增加,建立了巨噬细胞源性泡沫细胞模型。分别加入不同质量浓度 10,15,20,25 mg·L<sup>-1</sup>UA 后,通过液体闪烁计数器检测 UA 对泡沫细胞胆固醇流出的影响,笔者发现,与空白组比较,UA 组细胞内胆固醇的流出显著增加,且这种效应呈剂量依赖性,证明了 UA 能促进胆固醇流出,减少泡沫细胞形成,抑制动脉粥样硬化的形成。同时发现 PPAR- $\gamma$  mRNA 和 PPAR- $\gamma$  蛋白表达增强,提示 UA 上调 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞 PPAR- $\gamma$  基因和蛋白表达,促进巨噬细胞内胆固醇流出。因此,推测 UA 通过上调了 PPAR- $\gamma$  基因和蛋白表达促进胆固醇流出,具体机制有待进一步研究,为动脉粥样硬化的防治提供了新的理论依据和药物靶点,推动动脉粥样硬化药物治疗的发展。

本实验证明了 UA 能有效抑制 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞形成,促进泡沫细胞内胆固醇流出,抑制动脉粥样硬化。其作用机制与激活 PPAR- $\gamma$  信号通路,上调 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞 PPAR- $\gamma$  基因和蛋白表达有关。

#### [参考文献]

[1] 燕李晨,王庸晋,郭静. 黄芪多糖对 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出及 PPAR- $\gamma$  表达的影响[J]. 中国心血管病研究,2013,11(11):901-905.

[2] Libby P, Ridker P M, Hansson G K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [J]. Nature, 2011, 473(7347):317-325.

[3] Kunkel S D, Elmore C J, Bongers K S, et al. Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease: e39332 [J]. PLoS One, 2012, 7(6):e39332.

[4] 孙爱平,孙书明,张国俊,等. 熊果酸减轻 LPS 诱导的 TP1-1 细胞损伤[J]. 基础医学与临床,2014,34(1):

88-92.

[5] 张新华,朱莹. 熊果酸药理学的最新研究进展[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(9):1285-1289.

[6] Ullevig S L, ZHAO Q, Zamora D, et al. Ursolic acid protects diabetic mice against monocyte dysfunction and accelerated atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2011, 219(2):409-416.

[7] 张明发,沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的抗动脉粥样硬化作用[J]. 上海医药,2014,23(35):73-80.

[8] 刘宏胜,张雅敏,王树森,等. RP-HPLC 法测定保肝丸中五味子甲、乙、丙素及熊果酸[J]. 中草药,2015,46(24):3691-3694.

[9] 谢宝刚,钟琳,朱思琪,等. HPLC-UV 法同时测定六味地黄制剂中丹皮酚与熊果酸[J]. 中成药,2013,35(5):970-973.

[10] YANG Y C, WEI M C. A combined procedure of ultrasound-assisted and supercritical carbon dioxide for extraction and quantitation oleanolic and ursolic acids from *Hedyotis corymbosa* [J]. Ind Crop Prod, 2016, 79(1):7-17.

[11] XIONG G, SUN S, LI T, et al. Erratum to: subcellular localization of DAXX influence ox-LDL induced apoptosis in macrophages [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(11):7183-7190.

[12] 殷典贺,王秋月. 熊果酸抗炎、抗氧化作用及其机制的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2015,35(13):1022-1025.

[13] 曾璐,唐外姣,殷锦锦,等. 熊果酸改善肝细胞脂肪变性的实验研究[J]. 中药材,2015,38(5):1049-1052.

[14] 祝骥,滕耀红,王萍儿,等. 川芎嗪对泡沫细胞胆固醇逆转运的影响[J]. 中国中药杂志,2014,39(7):1255-1259.

[15] 刘杰,郑云梅,田志辉,等. 细胞胆固醇外流率的测定以及细胞外胆固醇和脂多糖对其的抑制作用[J]. 中国组织工程研究,2016,7(20):1000-1005.

[16] HUANG Y L, HUANG T S, LU F J. Humic acid induces the expression of ox-LDL receptor in HL-60 cells through activation of PPAR- $\gamma$  [J]. B Environ, 2003, 71(2):429-436.

[17] Zambrano S, Blanca A J, Ruiz-Armenta M V, et al. L-Carnitine protects against arterial hypertension-related cardiac fibrosis through modulation of PPAR- $\gamma$  expression [J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(7):937-944.

[18] Mehrabi M R, Thalhammer T, Haslmayer P, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) is highly expressed in human heart ventricles [J]. Biomed Pharmacotherapy, 2002, 56(8):407-410.

- [19] Demina Y P, Miroshnikova V V. Reduction of the level of LXR $\beta$  mRNA and PPAR- $\gamma$  mRNA in macrophages stimulated with a macrophage colony-stimulating factor in patients with atherosclerosis [J]. Russ J Genet Appl Res, 2015, 5(2): 155-158.
- [20] Ringseis R, WEN G D, Eder K. Conjugated linoleic acid isomers reduce cholesterol accumulation in acetylated LDL-induced mouse RAW264.7 macrophage-derived foam cells [J]. Lipids, 2008, 43(10): 913-923.
- [21] Zouari B K, Chouchane L, Jellouli K, et al. Correlation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) and retinoid X receptor-alpha (RXR-alpha) expression with clinical risk factors in patients with advanced carotid atherosclerosis [J]. Med Sci Monit, 2011, 17(7): 381-391.
- [22] Nicholson A C, Hajjar D P. CD36 oxidized LDL and PPAR gamma: pathological interactions in macrophages and atherosclerosis [J]. Vasc Pharmacol, 2004, 41(4/5): 139-146.
- [23] Moore K J, Rosen E D, Fitzgerald M L, et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake [J]. Nat Med, 2001, 7(1): 41-47.
- [24] Chawla A, Boisvert W A, Lee C H, et al. A PPAR- $\gamma$ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis [J]. Mol Cell, 2001, 7(1): 161-171.
- [25] LI A C. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ , and  $-\gamma$  [J]. J Clin Invest, 2004, 114(1): 1564-1576.
- [26] YU Y, Correll P H, Vanden Heuvel J P. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR- $\gamma$ -dependent mechanism [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1581(3): 89-99.
- [27] Mancha-Ramirez A M, Slaga T J. Ursolic acid and chronic disease: an overview of UA's effects on prevention and treatment of obesity and cancer [J]. Anti-infla Nutra Chro, 2012, 928(1): 75-96.
- [28] JIANG Q X, HAO R R, WANG W C. SIRT1/Atg5/autophagy are involved in the antiatherosclerosis effects of ursolic acid [J]. Mol Cell Biochem, 2016, 420(1): 171-184.

[责任编辑 邹晓翠]