

# 菝葜乙酸乙酯提取物对 THP-1 源性荷脂细胞 胆固醇蓄积及 SREBP-1 表达的影响

匡双玉<sup>1,2</sup>, 李熠<sup>3</sup>, 匡稳定<sup>2</sup>, 刘塔斯<sup>1\*</sup>

(1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410007; 2. 南华大学附属第二医院, 湖南 衡阳 421001;  
3. 南华大学医学院, 湖南 衡阳 421001)

**[摘要]** 目的: 观察菝葜乙酸乙酯提取物对人单核/巨噬细胞系(THP-1)源性荷脂细胞胆固醇蓄积的影响, 并初步探讨类固醇调节因子结合蛋白-1(SREBP-1)蛋白表达在其中的作用。方法: 以 THP-1 源性荷脂细胞为模型, 洛伐他汀( $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )做阳性对照, 菝葜乙酸乙酯提取物不同浓度( $0, 40, 80, 160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )作用于细胞 24 h 以及  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  作用于细胞不同时间( $0, 12, 24, 48 \text{ h}$ ), 高效液相色谱法测定细胞内总胆固醇(TC), 游离胆固醇(FC), 胆固醇酯(CE)的含量, 油红 O 染色观察菝葜乙酸乙酯提取物对 THP-1 源性荷脂细胞中脂滴形成的影响, Western blot 印迹法检测细胞内 SREBP-1 蛋白表达变化。结果: 菝葜乙酸乙酯提取物明显降低 THP-1 源性荷脂细胞中脂滴含量, 细胞内 TC, FC, CE 水平呈现一定的剂量和时间依赖性下降趋势, 同时 SREBP-1 蛋白表达上调。结论: 菝葜乙酸乙酯提取物能引起 THP-1 源性荷脂细胞 TC, FC, CE 含量下降, 且这种作用与 SREBP-1 蛋白表达上调有一定关系。

**[关键词]** 菝葜; 乙酸乙酯提取物; 胆固醇; 类固醇调节因子结合蛋白-1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0137-06

**[doi]** 10.11653/syfy2014030137

## Effect of Ethyl Acetate Extract from *Smilax china* on Cholesterol Accumulation and SREBP-1 Expression in THP-1-derived Lipid-loaded Cells

KUANG Shuang-yu<sup>1,2</sup>, LI Yi<sup>3</sup>, KUANG Wen-ding<sup>2</sup>, LIU Ta-si<sup>1\*</sup>

(1. Medicine College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;  
2. Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China;  
3. Medical College, University of South China, Hengyang 421001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of ethyl acetate extract from *Smilax china* on the cholesterol metabolism in monocyte/macrophage cell line (THP-1) -derived lipid-loaded cells, and to investigate the effect of the expression of sterol regulatory element binding protein (SREBP-1) and caveolin-1 in this process. **Method:** The ethyl acetate extract with different density ( $0, 40, 80, 160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were used to detect the level of total cholesterol (TC), free cholesterol (FC), cholesterol ester (CE) by using high performance liquid phase analytic process and the expression of SREBP-1 by Western blot at different time ( $0, 12, 24, 48 \text{ h}$ ) in THP-1 derived lipid-loaded cells. **Result:** The ethyl acetate extract from *S. china* had some effects on THP-1-derived lipid-loaded cells, the lipid droplet density decreased in cells and the level of TC, FC, CE was decreased with a dose and time-dependent manner. The expression of SREBP-1 was upregulated. **Conclusion:** The ethyl acetate extract from *S.*

**[收稿日期]** 20130405(006)

**[基金项目]** 湖南省研究生科研创新项目(CX2012B344);长沙市科技局计划项目(K1203018-31)

**[第一作者]** 匡双玉, 博士研究生, 从事中药质量与资源研究, Tel:18207424148, E-mail:kuangshuangyu@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 刘塔斯, 教授, 从事中药质量与资源研究工作, Tel:0731-88458234, E-mail:liutasi@126.com

*china* can decreased the level of TC, FC, CE in THP-1 derived lipid-loaded cells, and it is contributed to the up-regulation of SREBP-1 expression at some degree.

[Key words] *Smilax china*; ethyl acetate extract; cholesterol; SREBP-1.

菝葜系百合科菝葜属植物菝葜的干燥根茎,具有消肿解毒、祛风利湿、抗炎镇痛等功效<sup>[1]</sup>。其药理作用广泛,国内外研究主要包括抗炎、抑菌、抗肿瘤、免疫调节、对心血管系统作用及降糖作用等<sup>[2-9]</sup>。其对心血管系统的作用研究主要集中在对血流动力学的影响方面,而其抗动脉粥样硬化作用的研究较少。菝葜的化学成分中主要含有皂苷类与黄酮类化合物<sup>[10-12]</sup>,而国内外研究发现,皂苷类与黄酮类化合物是中药抗动脉粥样硬化作用的两类主要成分,笔者推测菝葜可能也具有抗动脉粥样硬化作用。本文拟在细胞层面观察菝葜乙酸乙酯提取物对 THP-1 源性荷脂细胞胆固醇蓄积的影响,同时探讨其对与胆固醇代谢密切相关的 SREBP-1 蛋白表达的影响。

## 1 材料

**1.1 药材** 菝葜药材(采自湖南衡阳集兵镇),经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为 *Smilax china* L.

**1.2 仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Shill 公司),Elx-800 酶联免疫检测仪(美国 Bio-Tek 公司),垂直电泳仪及转膜系统(美国 BioRad 公司),高效液相色谱仪(日本三洋公司),UV-2500 型紫外分光光度计(日本岛津),AY220 型电子分析天平(日本岛津)。

**1.3 试剂** SREBP-1 一抗(Santa Cruz 公司),油红 O(Sigma 公司),人单核/巨噬细胞(THP-1 细胞)(中科院上海细胞生物所细胞中心),小牛血清(购于杭州四季青公司),RPMI 1640 培养基(Gibco 公司),其他试剂均为进口或国产分析纯。

## 2 方法

**2.1 菝葜化学成分提取与分离** 按照文献[13]方法,菝葜根先粉碎,然后于 100 ℃ 水解,水解完后水洗至中性,干燥后以 8 倍量的乙酸乙酯回流提取 2 h,重复回流提取 2 次,乙酸乙酯提取液真空旋转蒸发干燥。

**2.2 THP-1 细胞的培养** 用含 10% 胎牛血清且已加入 2.5 g 碳酸氢钠的 RPMI 1640 培养基调细胞密度至 1 × 10<sup>6</sup>/mL,3 ~ 4 d 后换入含 0.1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,2 ~ 8 ℃ 冷冻后做相应处理。

**2.3 荷脂细胞模型的建立** 正常人血浆低密度脂蛋白(密度 1.040 ~ 1.063 kg·L<sup>-1</sup>)采用序列超速离

心法制备。以 160 nmol·L<sup>-1</sup> 的佛波酯诱导 THP-1 细胞 24 h 后分化成为巨噬细胞,继与 80 mg·L<sup>-1</sup> 的氧化型低密度脂蛋白孵育 48 h。

**2.4 对 THP-1 源性荷脂细胞胆固醇蓄积的影响** 以 THP-1 荷脂细胞为模型,菝葜乙酸乙酯提取物分别以不同质量浓度(0,40,80,160 mg·L<sup>-1</sup>)作用于模型细胞 24 h 以及 80 mg·L<sup>-1</sup> 菝葜乙酸乙酯提取物分别作用于模型细胞不同时间(0,12,24,48 h)后,高效液相色谱法测定细胞内总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)、胆固醇酯(CE)的含量。

**2.5 菝葜乙酸乙酯提取物对 THP-1 源性荷脂细胞脂滴含量的影响** 80 mg·L<sup>-1</sup> 的菝葜乙酸乙酯提取物作用于 THP-1 源性荷脂细胞 24 h 后,油红 O 染色法观察细胞内脂滴含量的变化。

**2.6 油红 O 染色** 将细胞培养于预先放有无菌盖玻片的 6 孔培养板,处理结束后,用 PBS 冲洗盖玻片 3 次,每次 5 min,50% 异丙醇固定 15 min,油红 O 染色液染色 10 min,蒸馏水冲洗 3 次,每次 1 min,苏木素染色 5 min,分色和返蓝后,HPIAS-1000 型图像分析系统收集图像。

**2.7 细胞内胆固醇的检测** 参照文献[14]方法制备样品,采用 C<sub>18</sub> 柱,柱温 4 ℃,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,250 nm 紫外光检测,胆固醇以峰面积定量,内标校准,以 μg·mg<sup>-1</sup> 细胞蛋白为单位。细胞内胆固醇酯含量为总胆固醇与游离胆固醇的差值。

**2.8 菝葜乙酸乙酯提取物对 THP-1 源性荷脂细胞 SREBP-1 表达的影响** 实验分 3 组:正常对照组;荷脂细胞组;80 g·L<sup>-1</sup> 菝葜乙酸乙酯提取物作用于 THP-1 源性荷脂细胞 24 h 组。Western-blot 检测细胞内 SREBP-1 蛋白表达。在收获好的细胞中加入三去污剂裂解缓冲液进行细胞裂解,于 4 ℃ 离心 10 min,弃除沉淀,BCA 法进行蛋白质定量,取 30 μg 蛋白质加入 2 × SDS 凝胶加样缓冲液中,在 100 ℃ 加热 10 min 以使蛋白质变性。聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转 PDVF 膜,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白质相对质量标准位置。封闭液封闭 2 h,按 1:500 加入一抗,4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,按 1:1 000 的稀释倍数加入辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,用蛋白质印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片。结果用 Labwork 凝胶

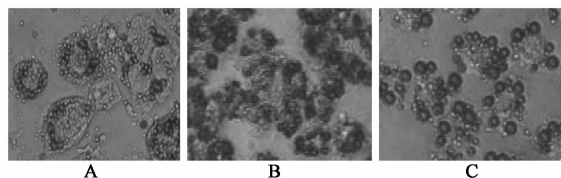
图像分析系统对胶片扫描,以对照组的面积灰度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。

**2.9 统计学处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.0 for windows 软件作统计分析,两样本均数比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

**3 结果**

**3.1 对 THP-1 源性荷脂细胞胆固醇蓄积的影响** 与正常组比较,荷脂细胞组 TC,FC,CE 水平显著升高 ( $P < 0.05$ );与荷脂细胞组比较,菝葜乙酸提取物低、中、高剂量组 TC,FC,CE 均显著降低 ( $P < 0.01$ )。细胞内 TC,FC,CE 呈现一定的剂量和时间依赖性下降趋势,见表 1~2。

**3.2 对 THP-1 源性荷脂细胞脂滴含量的影响** 结果表明,荷脂细胞组细胞内脂滴较正常组明显增加;菝葜乙酸乙酯提取物组细胞内的脂滴含量较荷脂细胞组明显降低,见图 1。



A. 正常组;B. 对照组(荷脂细胞组);  
C. 菝葜乙酸乙酯提取物 80 g·L<sup>-1</sup>组(图 2 同)  
图 1 菝葜乙酸乙酯提取物作用于 THP-1 源性荷脂细胞对脂滴含量的影响油红 O 染色

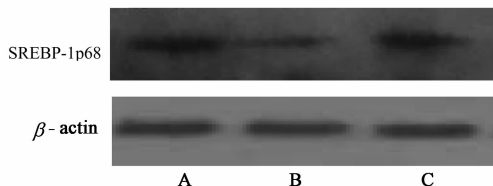


图 2 菝葜乙酸乙酯提取物对 THP-1 源性荷脂细胞 SREBP-1 表达的影响

表 1 菝葜乙酸乙酯提取物

对荷脂细胞胆固醇水平影响的量效变化( $\bar{x} \pm s, n =$ ) mg·g<sup>-1</sup>

组别	终质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	TC	FC	CE
正常对照	-	162 ± 14	150 ± 15	12 ± 2
荷脂细胞	-	805 ± 65 <sup>1)</sup>	470 ± 33 <sup>1)</sup>	335 ± 35 <sup>1)</sup>
菝葜提取物	40	500 ± 53 <sup>2)</sup>	320 ± 34 <sup>2)</sup>	180 ± 17 <sup>2)</sup>
	80	310 ± 25 <sup>2)</sup>	243 ± 24 <sup>2)</sup>	67 ± 8 <sup>2)</sup>
	160	320 ± 27 <sup>2)</sup>	250 ± 26 <sup>2)</sup>	70 ± 6 <sup>2)</sup>
洛伐他汀	80	305 ± 19 <sup>2)</sup>	235 ± 27 <sup>2)</sup>	70 ± 10 <sup>2)</sup>

注:与正常对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与荷脂细胞组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , (表 2 同)。

表 2 80 mg·L<sup>-1</sup>菝葜乙酸乙酯提取物

对荷脂细胞胆固醇水平影响的时效变化( $\bar{x} \pm s, n =$ ) mg·g<sup>-1</sup>

组别	时间/h	TC	FC	CE
正常对照	-	162 ± 14	150 ± 15	12 ± 2
荷脂细胞	-	805 ± 65 <sup>1)</sup>	470 ± 33 <sup>1)</sup>	335 ± 35 <sup>1)</sup>
菝葜提取物	12	430 ± 37 <sup>2)</sup>	294 ± 32 <sup>2)</sup>	136 ± 15 <sup>2)</sup>
	24	310 ± 25 <sup>2)</sup>	243 ± 24 <sup>2)</sup>	67 ± 8 <sup>2)</sup>
	48	314 ± 36 <sup>2)</sup>	248 ± 26 <sup>2)</sup>	66 ± 6 <sup>2)</sup>

**3.3 对 THP-1 源性荷脂细胞 SREBP-1 表达的影响**

荷脂细胞内 SREBP-1 蛋白表达较正常组低;菝葜乙酸乙酯提取物作用后,荷脂细胞内 SREBP-1 蛋白表达上调。见图 2。

**4 讨论**

从中草药中寻找防治动脉粥样硬化的有效药物一直是人们关注的课题。国内已开展了大量、多角

度的研究,现代药理学从调节血脂、抗氧化、血管内皮细胞功能及血液流变学等多方面对中药抗动脉粥样硬化作用进行了研究。同时国内外研究发现,皂苷类与黄酮类化合物是中药抗动脉粥样硬化作用的两类主要成分。文献报道,菝葜中含有伪原薯蓣皂苷元、甲基原薯蓣皂苷元、纤细薯蓣皂苷、甲基原纤细薯蓣皂苷、薯蓣皂苷次皂苷、二氢山柰酚、黄杞苷和槲皮素 4'-O-β-D-葡萄糖苷等。

本文在细胞层面观察菝葜乙酸乙酯提取物对 THP-1 源性荷脂细胞胆固醇蓄积的影响,同时探讨其对与胆固醇代谢密切相关的 SREBP-1 蛋白表达的影响,为从菝葜中开发抗动脉粥样硬化新药提供一定的理论支持。

SREBPS 是膜结合的转录因子和细胞内胆固醇代谢的重要调控蛋白,它定位于内质网,由一个调节亚基和 DNA 结合亚基构成。调节亚基对细胞内游离胆固醇(FC)浓度高度敏感,当细胞内游离胆固醇浓度下降时,调节亚基与 DNA 结合亚基分离,后者进入核内与目的基因序列中 SRE 元件结合,调控基因转录<sup>[15]</sup>。

本文初步探讨了菝葜乙酸乙酯提取物对与胆固醇代谢密切相关的 SREBP-1 蛋白表达的影响,为菝葜乙酸乙酯提取物抗动脉粥样硬化作用的机制研究提供了一个新的方向。

[参考文献]

[1] 郝利君,冯芳,郝小芳. 菝葜的研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2010,24(1):70.

# 基于小鼠游泳计算机自动控制系统的人参抗疲劳作用研究

龚梦鹃<sup>1</sup>, 谢媛媛<sup>2</sup>, 邹忠杰<sup>1\*</sup>

(1. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 2. 清华大学化学系, 北京 100084)

**[摘要]** 目的: 基于小鼠游泳计算机自动控制系统, 考察人参的抗疲劳作用。方法: 将小鼠随机分成5组, 人参低、中、高剂量组每天分别灌胃给予2.5, 5, 10 g·kg<sup>-1</sup>的人参水煎液, 空白组和气虚模型组则灌胃给予等体积的蒸馏水, 连续灌胃14 d, 每天1次。除空白组给足量饲料外, 其余4组限制饲料(125 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。选用已完善的小鼠游泳计算机自动控制系统, 观察人参对游泳计算机自动管理系统的指标评价体系的影响及对气虚小鼠体重, 运动后血乳酸(LAC)和尿素氮(BUN)的影响。结果: 10 g·kg<sup>-1</sup>人参水煎液能延长气虚小鼠负重游泳的下沉时间(ST)和死亡时间(TD), 增加不动时间(IT)、游泳时间(SWT)、首次下沉时间(FST)、游泳距离(SWD)及不动时间比率(ITR), 减少游泳时间比率(SWR); 并能明显增加气虚小鼠体重; 降低运动后的血乳酸(LAC)、血清尿素氮(BUN)。结论: 人参能提高气虚小鼠的抗疲劳能力, 且从行为学上看人参可使不动时间比率延长、游泳时间比率缩短而增加耐力。

**[关键词]** 人参; 气虚; 抗疲劳

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0140-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014030140

**[收稿日期]** 20130408(009)

**[基金项目]** 广东省科技厅项目(2012B060300035)

**[第一作者]** 龚梦鹃, 硕士, 副教授, 从事神经药理学研究, Tel: 18719379003, E-mail: gongmengjuan@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 邹忠杰, 副教授, 从事中药药效学评价, E-mail: zouzongjie@hotmail.com

- [2] 吴永宁, 陈东生, 付磊, 等. 菝葜三种提取物活血化痰药理作用研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(6): 448.
- [3] 王涛, 王鹏. 菝葜乙酸乙酯提取物抗癌活性的实验研究[J]. 肿瘤基础与临床, 2007, 20(3): 234.
- [4] 阮金兰, 邹健. 菝葜的抗炎活性成分研究[J]. 医药导报, 2005, 24(8): 670
- [5] 赵钟祥, 金晶, 方伟, 等. 菝葜多酚类成分抗氧化活性的研究[J]. 医药导报, 2008, 27(7): 765.
- [6] 赵钟祥, 冯育林, 阮金兰, 等. 菝葜化学成分及其抗氧化活性的研究[J]. 中草药, 2008, 3(7): 975.
- [7] Yuanli Li, Guoping Gan, Huizhan Zhang, et al. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome *in vitro* anticancer effects on human cancer cell lines[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 113: 115.
- [8] Si Etm Lee, Eun Mi Ju, Jeong Hee Kim. Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root[J]. Exp Mol Med, 2001, 33(4): 263.
- [9] Shu Xiao-Shun, Gao Zhong-Hong, Yang Xiang-Liang. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 103: 327.
- [10] 阮金兰, 邹健, 蔡亚玲. 菝葜化学成分研究[J]. 中药材, 2005, 28(1): 24.
- [11] 杨立勇, 李雨生, 王祥培, 等. 菝葜药材 HPLC 指纹图谱的鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 104.
- [12] 舒孝顺, 高中洪, 杨祥良. 菝葜乙酸乙酯提取物对大鼠和小鼠的抗炎作用[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 39.
- [13] 李熠, 匡双玉, 王北冰, 等. 姜黄素对巨噬细胞源性荷脂细胞胆固醇水平及 caveolin-1 表达的影响[J]. 南华大学学报, 2009, 37(1): 18.
- [14] Yokoyama C, Wang X. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low-density lipoprotein receptor gene [J]. Cell, 1993, 75: 187.

[责任编辑 聂淑琴]