

姜黄素对爪蟾卵母细胞表达人低密度脂蛋白受体的影响

范春雷¹ 沃兴德¹ 罗艳² 卢德赵¹ 钱颖¹

摘要 目的 在爪蟾卵母细胞中建立人低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor , LDL-R)表达系统 ,并研究姜黄素降脂作用的分子机理。方法 将含人 LDL-R 的表达质粒 p3.7 LDL 导入细胞核中 ,用免疫荧光、配体荧光以及免疫胶体金标记透射电镜等方法检测细胞膜上 LDL-R 的表达情况 ;用不同浓度的姜黄素对爪蟾卵母细胞人 LDL-R 基因的表达进行干预 ,并用酶联免疫吸附分析法测定 LDL-R 的表达量。结果 人 LDL-R 基因在爪蟾卵母细胞膜上得到表达 ,姜黄素具有增强其表达的作用 ,且有明显的量效关系。结论 姜黄素降血脂和抗动脉粥样硬化的作用途径之一可能是通过促进 LDL-R 基因的表达 ,增加细胞对低密度脂蛋白胆固醇的吸收 ,从而降低血清胆固醇。

关键词 姜黄素 ;爪蟾卵母细胞 ;基因表达 ;低密度脂蛋白受体 ;血脂

Effect of Curcumin on Expression of Human Low Density Lipoprotein Receptors in *Xenopus Laevis* Oocytes
FAN Chun-lei , WO Xing-de , LUO Yan , et al *Department of Life Science , Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine , Hangzhou (310053)*

Abstract Objective To investigate the molecular mechanism of curcumin in reducing blood lipids by establishing gene expression system of human low density lipoprotein receptors (LDL-R) in *Xenopus Laevis* oocytes(XLO). **Methods** The expression of LDL-R on cytomembrane was determined using immuno-fluorescent , ligand-fluorescent and immune colloidal gold techniques after human LDL-R containing p3.7 LDL plasmid was led into nucleus. And the expression of LDL-R gene in XLO was quantitatively determined by ELISA after being interfered with different concentrations of curcumin. **Results** The human LDL-R gene could be expressed on XLO , which could be significantly enhanced by curcumin in a dose-dependent manner. **Conclusion** One of the paths of curcumin in reducing blood lipids and anti-atherosclerosis was improving LDL-R gene expression and increasing the LDL-cholesterol absorption of cells.

Key words curcumin ; *Xenopus Laevis* oocytes ; gene expression ; low density lipoprotein receptor ; blood lipids

从 20 世纪 80 年代起我们对中药姜黄中经醇提后得到的总姜黄素进行了大量实验 ,发现姜黄素除具有较强的抗氧化、抗感染、抗炎、抗凝、抗肿瘤作用外 ,能显著地降低血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和载脂蛋白 B-100(ApoB-100) ,能抑制平滑肌细胞增殖 ,抑制氧化修饰 LDL 促平滑肌细胞增殖和氧化 LDL 诱导的平滑肌细胞凋亡

等作用^[1]。姜黄素还可能通过促进肝、肾上腺对 LDL 的代谢 ,增加胆囊对 LDL 排泄 ,抑制脾对 LDL 的摄取 ,从而起到降血脂和抗动脉粥样硬化作用^[2]。为了进一步阐述姜黄素在受体水平的作用机理 ,我们建立了爪蟾卵母细胞人 LDL 受体(LDL-R)基因表达系统 ,分析姜黄素对人类 LDL 受体基因表达的影响 ,从受体水平研究姜黄素降低血清胆固醇的作用机理。

材料与方 法

1 材料 成年雌性非洲爪蟾 ,购自中国科学院上海细胞研究所 ,由本室饲养 ,可供常年使用 ;含人类 LDL-R 基因质粒 p3.7 LDL 由 Estonia , Tartu 大学分子和细胞生物学研究所惠赠。胶原酶、胰蛋白酶和透明质酸酶购自 Sigma 公司 ,Di I 购自美国 Biotium 公

基金项目 :国家自然科学基金资助项目(No. 30070932) ,浙江省中医药科研基金项目(No. 2003C013)

作者单位 :1. 浙江中医学院生命科学系(杭州 310053) ;2. 杭州师范学院生物化学教研室

通讯作者 范春雷 , Tel 0571 - 86613625 , Fax 0571 - 86613598 , E-mail snow@163.com

司, 超级新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所, 1640 培养基购自美国 GIBCOBRL 公司, 羊抗兔 IgG-HRP 和羊抗兔 IgG-FITC 购自华美生物工程公司, 兔抗牛 LDL-R 多克隆抗体由本室制备。

2 爪蟾卵母细胞的培养 冰块麻醉爪蟾, 下腹部酒精消毒后作 1 cm 左右切口, 取出卵母细胞块放入培养皿中, 用 Modified Barth's Solution (MBS) 培养液 [NaCl 51.43 g, KCl 0.75 g, NaHCO₃ 1.99 g, MgSO₄·7H₂O 2.02 g, MOPS 10.46 g, 用重蒸水定容至 500 ml 标为 A 液; 称取 Ca(NO₃)₂·4H₂O 0.78 g, CaCl₂·7H₂O 0.06 g, 用重蒸水定容至 500 ml 标为 B 液。用时 A 液、B 液各稀释 10 倍后 1:1 混合, Tris 调节 pH 至 7.4, 每 1000 ml 加庆大霉素 70 mg] 清洗 5 次, 加入 1 mg/ml 胶原酶, 置 20℃ 人工气候箱微微震荡, 消化过夜后倒去酶解液, 用无钙 MBS 培养液清洗 3 次以去除细胞之间的粘连。再用 MBS 培养液清洗 5 次。此后加入 MBS 培养液在 20℃ 人工气候箱中培养 1 h 左右, 挑选 V、VI 期正常发育的爪蟾卵母细胞。每 12 h 更换 1 次 MBS 培养液, 连续培养 3 天。用孕酮处理诱导卵母细胞成熟生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD) 的实验判别细胞的质量^[3]。

3 DiI-LDL 的制备 健康人血浆经超速离心后获得密度 1.019 ~ 1.060 部分, 进一步用 Sepharose 6B 凝胶柱过滤, 获得纯化的 LDL, 取 2 mg LDL 与 25 mg 不溶性马铃薯淀粉置于试管中涡旋震荡, 然后迅速用液氮冷冻、真空干燥器冷冻干燥。冻干粉储存于 4℃, 用时加入 5 ml -20℃ 的正庚烷, -20℃ 孵育, 每 10 min 涡旋震荡 1 次。1.5 h 后 2 000 r/min 4℃ 离心 10 min 弃沉淀。重复上述操作 1 次, 上清液中加入 4.5 mg DiI, -20℃ 孵育 2 h 后取出加入 -20℃ 的正庚烷 0.4 ml, 在冰浴中用高纯氮气吹干。加入 10 mmol/L 的 Tricine 和 0.01% 的叠氮钠 1 ml, 4℃ 冰箱中孵育 41 h, 每隔一定时间取出混匀 1 次。4℃ 2 000 r/min 离心 15 min, 取上清 12 000 r/min 离心 20 min, 重复 1 次, 所得的上清含 DiI-LDL, 于 4℃ 保存^[4]。以 Lowry 法测定上清液中的蛋白质浓度。

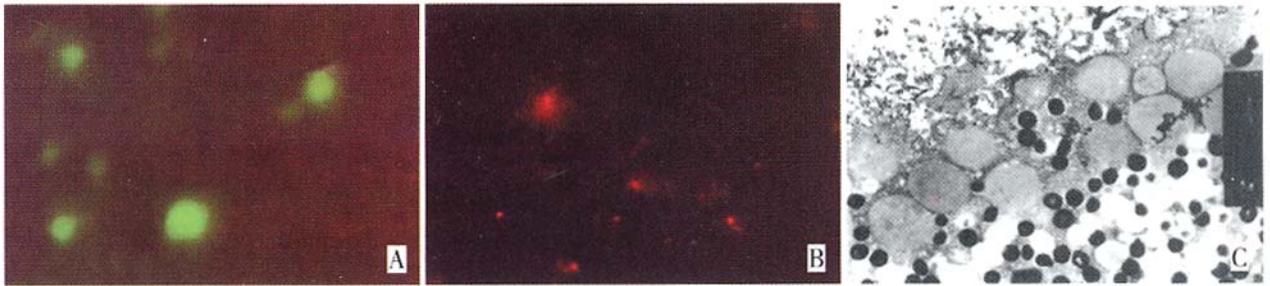
4 人 LDL-R 基因在爪蟾卵母细胞中的表达 取 V、VI 期卵母细胞 100 个分为 2 组, 在显微镜下进行卵母细胞核注射, 实验组每卵注入 20 ng/20nl p3.7 LDL。对照组每卵注入 20 nl 无菌水。两组细胞放入 20℃ 人工气候箱培养, 每 12 h 更换 1 次 MBS 培养液。2 天后取卵细胞以 1 mg/ml 的透明质酸酶 20℃ 消化 10 min, 用 MBS 清洗 3 遍。设计以下 3 组实验 (1) 取实验组和对照组各 20 个卵置 24 孔板, 每孔加 0.2 ml

含 0.5% 牛血清白蛋白的 MBS 培养液作用 1 h, MBS 清洗 3 遍。每孔加 1:500 稀释的兔抗牛 LDL-R 抗血清 0.2 ml, 37℃ 孵育 1 h, MBS 洗 3 遍, 用 4% 甲醛溶液固定 10 min, MBS 洗 3 遍, 每孔加 1:1 000 稀释的羊抗兔 IgG-FITC 0.2 ml, 37℃ 孵育 1.5 h。用 MBS 洗 3 遍后, 卵母细胞压碎涂片, 在荧光显微镜下观察。(2) 取实验组和对照组各 20 个卵, 在 1 ml 含 20 μg/ml DiI-LDL 的 MBS 培养液中 20℃ 人工气候箱孵育 5 h, 4% 甲醛固定 10 min, 用 MBS 洗 3 遍后将卵母细胞压碎涂片, 在荧光显微镜下观察。(3) 取实验组和对照组各 10 个卵置 24 孔板, 每孔加 0.2 ml 含 0.5% 牛血清白蛋白的 MBS 培养液作用 1 h, MBS 清洗 3 遍, 每孔加 1:500 稀释的兔抗牛 LDL-R 抗血清 0.2 ml, 20℃ 孵育 2 h, MBS 洗 3 遍, 每孔加 1:1 000 稀释的胶体金标记羊抗兔 IgG, 20℃ 孵育 2 h, MBS 洗 3 遍后用 5% 戊二醛固定液固定, 用透射电镜检测。

5 姜黄素对爪蟾卵母细胞存活率的影响 设立 0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 μg/ml 5 种姜黄素浓度, 每个浓度培养 50 个 V、VI 期卵母细胞, 20℃ 人工气候箱以含药 MBS 培养液培养 3 天, 每 12 h 更换 1 次含药 MBS 培养液。3 天后计算细胞的存活率。

6 姜黄素对人 LDL-R 基因表达的影响 取 600 个 V、VI 期爪蟾卵母细胞, 每个卵母细胞核注射 20 ng/20 nl 的 p3.7 LDL, 将其分为 3 个用药组和 1 个阴性对照组。3 个用药组分别用 0.3、0.6、0.9 μg/ml 的姜黄素 MBS 培养液培养, 阴性对照组以 MBS 培养液培养 20℃ 人工气候箱培养 2 天, 每 12 h 更换 1 次培养液。阴性对照组取 150 个细胞, 每卵注射 20 nl 无菌水, 以 MBS 培养液培养, 其余培养条件同前。2 天后各组卵母细胞平均分为 5 个复孔样本置 24 孔板, 以 1 mg/ml 的透明质酸酶 20℃ 人工气候箱消化 10 min, MBS 清洗 3 遍。含 0.5% 牛血清白蛋白的 MBS 培养液封闭 1 h, MBS 清洗 3 遍。然后每孔加 1:500 兔抗牛 LDL-R 抗血清 0.2 ml, 20℃ 孵育 1.5 h。以 MBS 洗 3 遍, 用 4% 甲醛溶液固定 10 min。以 MBS 洗 3 遍, 每孔加羊抗兔 IgG-Bio(1:500) 0.2 ml, 以 MBS 洗 3 遍, 各孔加 1:500 亲和素-HRP 0.2 ml, 20℃ 孵育 1.5 h。以 MBS 洗 3 遍, 每孔加显色液 0.1 ml, 暗箱显色 30 min 后每孔加 20% 的硫酸 0.1 ml 终止反应。3 000 r/min 离心 3 min, 每管取上清 0.1 ml, 酶标仪 492 nm 检测。

7 统计学方法 计量资料样本均数, 采用双尾 *t* 检验。



注:A:免疫荧光法检测到卵母细胞膜上有明显的 LDL-R 表达;B:DiI-LDL 配体荧光法检测到卵母细胞膜上有明显的 LDL-R 表达;C:金标法免疫电镜检测到胶体金颗粒被卵母细胞膜上表达的 LDL-R 吞入胞内

图 1 人 LDL-R 基因的表达

结 果

1 爪蟾及爪蟾卵母细胞的培养结果 本实验室饲养的非洲爪蟾生活良好,无死亡。剖腹手术所得的卵母细胞质量稳定,孕酮处理诱导卵母细胞成熟实验结果表明,MBS 连续培养 3 天的卵母细胞平均存活率达 95% 以上。

2 人 LDL-R 基因的表达 V、VI 期卵母细胞经核注射 p3.7 LDL 质粒,经 MBS 培养液培养 2 天后用免疫荧光法检测可见细胞膜上有明显的 FITC 绿色荧光(见图 1A)红色 DiI-LDL 配体荧光检测可见细胞膜上有明显的 DiI 红色荧光(见图 1B);免疫胶体金电镜检测可见细胞膜上有内吞的胶体金颗粒(见图 1C)。对照组未经核注射的卵母细胞则未见细胞膜有 FITC 绿色荧光和 DiI 红色荧光;免疫胶体金电镜也未检测到细胞膜上有内吞的胶体金颗粒。上述 3 个实验均证明本实验所构建的人类 LDL-R 基因表达质粒在爪蟾 V、VI 期卵母细胞中可以高效表达。

3 姜黄素对爪蟾卵母细胞存活率的影响 见表 1。爪蟾 V、VI 期卵母细胞用含不同浓度姜黄素的 MBS 培养液培养 3 天后,可见 0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下姜黄素浓度对 MBS 培养的爪蟾卵母细胞存活率可达 90% 以上,但 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上姜黄素浓度对 MBS 培养的爪蟾卵母细胞存活率有下降的趋势。

4 姜黄素对人 LDL-R 基因表达的影响 见表 2

姜黄素浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	细胞培养数 (个)	细胞存活数 (个)	细胞存活率 (%)
1.5	50	40	80
1.2	50	42	84
0.9	50	45	90
0.6	50	48	96
0.3	50	46	92
0.1	50	46	96
0	万方数据 50	48	96

2. 姜黄素可增加 LDL-R 基因表达量,与阴性对照组比较差异均有显著性,且有很好的量效关系。

表 2 姜黄素对人 LDL-R 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	核注射	复孔数	OD
姜黄素 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20ng p3.7LDL	5	0.155 \pm 0.034 *
姜黄素 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20ng p3.7LDL	5	0.185 \pm 0.036 **
姜黄素 0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20ng p3.7LDL	5	0.252 \pm 0.030 **
阴性对照	20ng p3.7LDL	5	0.124 \pm 0.002
正常对照	20ng 无菌水	5	0.066 \pm 0.005

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;正常对照与阴性对照细胞均用不含姜黄素 MBS 培养

讨 论

目前,虽然在中药降血脂抗动脉粥样硬化作用机理的研究中已作了大量的工作,但受到研究手段和方法学的限制,只停留在脂质、脂蛋白和载脂蛋白的分析测定,很少涉及到脂与脂蛋白代谢关键酶、脂蛋白受体和从基因水平研究这些降脂中药的作用部位和作用机制。现代细胞生物学、生物化学和分子生物学技术和方法为我们从微观角度阐明降脂中药的作用机理提供了可能性。

非洲爪蟾是一种较易获得的实验材料,爪蟾卵母细胞用于对中药作用机理的研究具有两大优点,一是卵母细胞中具备转录、修饰和胞内运输等必要的部件和功能,因此外源 mRNA 或 cDNA 能够被表达,产生具有功能性的蛋白质;二是卵母细胞具有较大的表面积,直径在 1.2 mm 左右,便于显微注射操作和对表达蛋白的检测等。目前已有许多实验将真核细胞膜蛋白和酶蛋白的 mRNA 注入到爪蟾卵母细胞中,证明其编码的蛋白质具有酶活性和能够整合到卵母细胞膜上并显示天然的膜功能。如邵煌等从新生大鼠脑组织中提取总的 RNA,经显微注射法注入非洲爪蟾卵母细胞后,其翻译系统能够利用外源 mRNA 合成具有催化活性的胆碱酯酶^[5]。顾饶胜等注射大鼠脑 N-甲基-D-天门冬氨酸受体研究丙戊酸钠对此受体的影响^[6]。杨绍

华等将大鼠睾丸的 mRNA 微注射进入爪蟾卵母细胞中研究大鼠睾丸 GABA 样受体在不同发育时期的表达情况^[7]; 聂辉等利用非洲爪蟾卵母细胞为表达体系研究了 P2X 和 P2Y 嘌呤受体的共存及相互作用^[8]。因此爪蟾卵母细胞作为“宿主”已被广泛地用于外源蛋白结构与功能研究的实验手段^[9,10]。

我们选择两栖类爪蟾卵母细胞作为实验平台,建立了爪蟾常规饲养方法和用酶解法制备去卵巢膜和滤泡膜的卵母细胞,使其损伤程度最小。在进行药物对 LDL-R 基因表达干预作用的研究中,必须了解爪蟾卵母细胞膜上是否有内源性 LDL-R,我们对未注射 LDL-R 表达质粒的卵母细胞进行测定,免疫荧光法、DiI-LDL 配体荧光法和金标免疫电镜均未检测到细胞膜上内源性 LDL-R 的表达。当卵母细胞核注入 LDL-R 基因表达质粒后则上述 3 种方法均可见到 LDL-R 的表达。因此实验证明我们所注射的人类 LDL-R 基因表达质粒能够在爪蟾卵母细胞中进行高效表达。

为了阐述姜黄素降血脂的作用机理,我们将人 LDL-R 基因的表达质粒导入爪蟾卵母细胞核中,观察姜黄素对 LDL 受体基因表达的干预作用。为了确定用药浓度,试验从 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 到 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5 个不同浓度的姜黄素对爪蟾卵母细胞存活率的影响。结果发现 0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下姜黄素浓度对 MBS 培养的爪蟾卵母细胞存活率可达到 90% 以上,但 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上姜黄素浓度对 MBS 培养的爪蟾卵母细胞存活率有下降的趋势,因此推测高浓度姜黄素对培养的卵母细胞有一定的毒副作用,而低浓度姜黄素则具有药效学作用。因此在姜黄素对人 LDL-R 基因表达影响的研究中,我们选择 0.3、0.6、0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 高中低 3 个剂量姜黄素浓度,实验证明姜黄素可增加 LDL-R 基因的表达量,且有很好的量效关系。

综上所述,我们得到以下几个结论(1)爪蟾 V、VI 期卵母细胞中没有内源性 LDL-R 表达,因此可以通过导入外源性 LDL-R 基因,使之很好的表达,并用于降脂中药在受体水平上的分析研究。(2)姜黄素能增加爪蟾卵母细胞对外源导入的 LDL-R 基因的表达,因此姜黄素可能通过促进 LDL-R 基因表达这一途径降低血清 TC、LDL-C 和 apoB-100 含量,起到降血脂和抗动脉粥样硬化作用。(3)爪蟾卵母细胞是一个良好的基因表达系统,可作为中药高效选择和新药开发,以及从分子水平上研究中药作用机理的实验平台,有助于从分子生物学水平上阐述中医基本理论,适用于中医不同治法、不同方药对不同疾病作用机理的研究。

万方数据

参 考 文 献

- 1 赵革平,沃兴德,洪行球,等.姜黄醇提取物对血管平滑肌细胞增殖的影响.浙江中医学院学报 1999;23(3):21—23.
Zhao GP, Wo XD, Hong XQ, et al. Effects of turmerol extracts on proliferation of vascular smooth muscle cells. J Zhejiang Coll TCM 1999;23(3):21—23.
- 2 沃兴德,洪行球,赵革平,等.姜黄素对低密度脂蛋白和脂蛋白(a)代谢的影响.中国动脉硬化杂志 1999;7(4):339—341.
Wo XD, Hong XQ, Zhao GP, et al. Effects of curcumin on the metabolism of low density lipoprotein and lipoprotein(a). Chin J Arteriosclerosis 1999;7(4):339—341.
- 3 Belelli D, Callachan H, Hill-Venning C, et al. Interaction of positive allosteric modulators with human and Drosophila recombinant GABA receptors expressed in Xenopus laevis oocytes. Br J Pharmacol 1996;118(3):563—576.
- 4 Larry S Barak, Watt W Webb. Florescent low density lipoprotein for observation of individual receptor complexes on cultured human fibroblasts. J Cell Biol 1981;90:595—604.
- 5 邵 煌,孙曼霁.大鼠胆碱酯酶 mRNA 在卵母细胞中的表达.中国应用生理学杂志 1996;12(2):136—139.
Shao H, Sun MJ. Expression of active acetylcholinesterase in xenopus Oocytes microinjected with mRNA from rat brain. Chin J Appl Physiol 1996;12(2):136—139.
- 6 顾饶胜,任 旷,何 玲,等.丙戊酸钠对大鼠脑 NMDA 受体的拮抗作用.吉林医学 1999;20(4):201—202.
Go RS, Ren K, He L, et al. Antagonistic effect of sodium valproate on brain NMDA receptors in rats. Jilin Med 1999;20(4):201—202.
- 7 杨绍华,武玮磷,胡菁华,等. γ -氨基丁酸(GABA)样受体基因在大鼠睾丸存在的初步研究.生殖与避孕 1998;18(3):136—140.
Yang SH, Wu WL, Hu JH, et al. Preliminary study on gamma-aminobutyric acids (GABAA)-like receptor in rat testis. Reprod Contraception 1998;18(3):136—140.
- 8 聂 辉,李之望.非洲爪蟾卵母细胞 P2X 和 P2Y 嘌呤受体的共存及相互作用.生理通讯 2002;21(1 S:S):30.
Nie H, Li ZW. Coexistence of and interaction between P2X and P2Y purinoceptors in the oocytes of xenopus laevis. CAPS News Commun 2002;21(1 S:S):30.
- 9 Ren D, Hall LM. Functional expression and characterization of skeletal muscle dihydropyridine receptors in Xenopus oocytes. J Biol Chem 1997;272(36):22393—22396.
- 10 Vulcu SD, Rupp J, Wiwie C, et al. The cAMP pathway sensitizes VR1 expressed in oocytes from xenopus laevis and in CHO cells. Pharmacology 2003;69(1):38—43.

(收稿 2004-05-17 修回 2005-01-28)