甜菊醇调控巨噬细胞 ABCA1 蛋白表达

李 妍[1]，杨艳宇[1]，刘婷婷[1]，李 月[2]，李 成[*1]
（1. 大连工业大学 生物工程学院，辽宁 大连 116034；2. 营口市环境监测站，辽宁 营口 115000）

摘要：甜菊糖能够降低机体的胆固醇水平，而甜菊醇（steviol，STE）是甜菊糖在机体内的主要天然水解物。作者研究了甜菊醇对小鼠巨噬细胞 J774A.1 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 蛋白（ATP-binding cassette transporter A1，ABCA1）的调控作用，并探讨其可能的分子机制。首先，利用 MTT 方法建立了甜菊醇的使用条件及浓度。采用免疫蛋白印记、细胞免疫荧光以及荧光定量 PCR 方法，发现在环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）的类似物 8-（4-硫代氯苯基）腺苷-3′，5′-环磷酸盐（8-（4-chlorophenylthio）adenosine 3′，5′-cyclic monophosphate，CPT）的协作下，甜菊醇能够显著提高 ABCA1 在蛋白质水平和基因转录水平的表达；且甜菊醇可以显著上调 ABCA1 的上游调控基因肝 X 受体（LXRα）和过氧化物酶体增殖物激活受体（PPARα）的 mRNA 表达水平和蛋白质表达水平，但对过氧化物酶体增殖物激活受体（PPARγ）的表达无明显调控作用。结果表明，甜菊醇能够调控 ABCA1 蛋白表达的机制，可能与 PPARα、LXRα 的表达有关。本研究为后续治疗和预防动脉粥样硬化具有指导意义，对甜菊糖食品的应用提供了一定的参考作用。

关键词：甜菊醇；ABCA1 蛋白；LXRα；PPARα；mRNA 表达，蛋白质表达
中图分类号：Q 291　**文章编号**：1673-1689（2020）11-0088-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.11.012

ABCA1 Protein Expression in Macrophages Regulated by Steviol

LI Yan[1]，*YANG Yanyu*[1]，*LIU Tingting*[1]，*LI Yue*[2]，*LI Cheng*[*1]
（1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China；2. Environmental Monitoring Station of Yingkou, Yingkou 115000, China）

Abstract：Stevioside is demonstrated to regulate the cholesterol levels in body. The steviol is the main natural hydrolysate of stevioside in the intestine. The regulation of adenosine triphosphate binding cassette transporter A1 protein （ABCA1） in mouse macrophages J774A via steviol was studied and its possible molecular mechanism was investigated. The conditions and concentration of steviol were first established by MTT method. The detection of western blot, immunofluorescence and quantitative fluorescence PCR confirmed that steviol could significantly increase the expression of ABCA1 at protein and gene transcription level in collaboration with 8-（4-chlorophenylthio） adenosine 3',5'-cyclic monophosphate （CPT）, the analogue of cyclic adenosine monophosphate （cAMP）. Moreover, steviol could significantly up-regulate the expression levels of both mRNA and

收稿日期：2019-10-29
基金项目：大连市科技创新基金项目（2018J11CY028）；大连市高层次人才创新支持计划项目（2018Q41）；辽宁省自然科学基金重点项目（20170520043）。
* **通信作者**：李 成（1985—），女，博士，讲师，硕士研究生导师，主要从事功能糖的转化及其作用机制方面的研究。E-mail：lichenghi@126.com

protein in upstream regulatory genes LXRα and PPARα of ABCA1, however, insignificant regulation on the expression of PPARγ was observed. The regulation of the ABCA1 protein expression through steviol might be related to the expression of PPARα and LXRα. This study is extremely instructive to the subsequent treatment and prevention of atherosclerosis, providing a reference for the application of stevioside in food.

Keywords: steviol, ABCA1 protein, LXRα, PPARα, mRNA expression, protein expression

甜菊糖作为一种天然甜味剂,是从甜叶菊中提取的一种低热量的天然甜味剂,对高血压、糖尿病、肥胖病等具有治疗作用[1-4]。有研究表明,甜菊糖喂养的小鼠,其体内胆固醇及血糖等指标有不同程度的下降,认为甜菊糖对动脉粥样硬化导致的疾病具有重要的调控作用[5-6]。动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)是冠心病、脑梗死、外周血管病等相关心脑血管类疾病的重要成因[7-8]。研究表明,当血管内的巨噬细胞不断吞噬胆固醇后,出现"泡沫化"现象,形成泡沫细胞,泡沫细胞渗透到动脉壁后,细胞内胆固醇释放,促进 AS 的病程发展[9]。介导巨噬细胞内胆固醇流出的主要蛋白质是 ABCA1 蛋白,它能够有效介导巨噬细胞胆固醇的外流,对巨噬细胞内胆固醇流出的调节起关键作用[10-12]。因此,寻找能够提高 ABCA1 蛋白表达的小分子药物前体,对 AS 的预防及治疗都具有非常重要的意义。

研究表明,甜菊糖在机体消化道的下段会被盲肠内微生物分解为甜菊醇[3]。因此,研究人员认为,甜菊糖被食用后,甜菊醇是其进入机体并参与代谢系统的主要化学成分。据此推测,甜菊醇作为甜菊糖的衍生物,是调控机体胆固醇代谢的主要物质[13],但其使用条件尚不明确。作者以小鼠巨噬细胞 J774A.1 为模型,检测了甜菊醇对胆固醇转运重要蛋白 ABCA1 表达的影响,初步探讨了甜菊醇调控 ABCA1 的作用机制,为后续治疗和预防 AS 奠定了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料 小鼠单核巨噬细胞 J774A.1:上海富衡生物有限公司。

1.1.2 主要试剂 DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)、25%胰蛋白酶、青霉素/链霉素:Gibco 公司;CPT 和 STE:Sigma 公司;NP-40 裂解液、蛋白酶抑制剂、PMSF、DAPI 染色液、Alexa Fluor 555 荧光二抗、抗荧光猝灭剂、山羊血清工作液、ECL 显影液:上海碧云天公司;qRT-PCR 试剂盒、RNA 提取试剂盒:北京天根有限公司;兔抗鼠 PPAR-α 一抗、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、兔抗鼠 β-actin 一抗、兔抗鼠 ABCA1 一抗、兔抗鼠 LXRα 一抗:北京全式金公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 MultiskanGo 酶标仪:Thermo Scientific(中国)公司;CO_2 细胞培养箱:三洋电机株式会社;倒置荧光显微镜:奥林巴斯(中国)有限公司;LightCycler 480 Ⅱ 荧光定量 PCR:罗氏诊断产品(上海)有限公司;Tanon-5200Multi 凝胶成像仪:上海天能科技有限公司。

1.1.4 引物 利用 Primer 5.0 软件分别设计反转录内参引物 qT-GADPH、qT-ABCA1、qT-LXRα、qT-PPARγ、qT-PPARα 的荧光定量 PCR 引物,特异性引物序列见表 1。

表 1 各个基因的引物序列

Table 1 Sequence of different primers

引物名称	引物序列(5′-3′)
qT-GADPH-p1	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
qT-GADPH-p2	GGGGTCGTTGATGGCAACA
qT-ABCA1-p1	AAAACCGCAGACATCCTTCAG
qT-ABCA1-p2	CATACCGAAACTCGTTCACCC
qT-LXRα-p1	GGACACCTACATGCGGCGGAAATGC
qT-LXRα-p2	GGTCGGGTGCAATGGGCCAAGGCGT
qT-PPARγ-p1	TGTCGGTTTCAGAAGTGCCTTGC
qT-PPARγ-p2	TTTCCTGCTAAGATCGCCCTCGC
qT-PPARα-p1	AGGCTGTAAGGGCTTCTTTCG
qT-PPARα-p2	ATCTTTCAGGTCGTGTTCACAGGTA

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 在 10%胎牛血清的 DMEM 培养液(100 U/mL 的青霉素和 100 U/mL 的链霉素)中进行培养,置于体积分数 5% CO_2,饱和湿度为 100%的恒温细胞培养箱中

孵育培养,每 48 小时换一次液,细胞密度达 80%以上时进行一次传代,使用倒置显微镜观察细胞的生长情况。

1.2.2 CPT 处理小鼠巨噬细胞 J774A.1 设置了 6 个 CPT 浓度梯度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μmol/L),与小鼠巨噬细胞 J774A.1 细胞共同孵育 24 h,以 DMEM 培养基处理的细胞作对照组,利用MTT[14]检测 CPT 对细胞活性的影响。

1.2.3 STE 处理小鼠巨噬细胞 J774A.1 确定了 CPT 的添加浓度后,不同浓度的 STE(5、10、25、50、75、100、125 μmol/L)处理 24 h 后,MTT 法分析其对小鼠巨噬细胞(J774A.1)活性的影响。

1.2.4 反转录获得 cDNA 第一链 4 ℃、3 000 r/min 离心 5 min 后收集细胞。采用天根微量样品总 RNA 提取试剂盒提取各个处理组细胞样品的总 RNA[15]。琼脂糖电泳鉴定后,参照反转录试剂盒的使用说明,以细胞总 RNA 为模板,反转录获得 cDNA 第一链。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测目标基因的表达情况 以各组的 cDNA 为模板,利用荧光定量 PCR 法检测 ABCA1、LXRα、PPARγ 和 PPARα 的表达情况,内参基因为 GADPH。其中,反应条件 95 ℃,20 s;*Tm* 根据各组引物的退火温度确定;56 ℃,20 s;72 ℃,20 s;40 个循环,采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算各个基因的相对表达量[16]。

1.2.6 提取细胞全蛋白质 每组细胞样品加入 80 μL 裂解液(2% NP40 中加入蛋白酶抑制剂、EDTA、3 μL 100 mmol/L PMSF),冰上重悬细胞,静置 30 min。13 000 r/min 离心收集上清液。采用凯基 BCA 蛋白质含量检测试剂盒(BCA 法),对获得的全蛋白质提取物进行蛋白质定量。

1.2.7 免疫蛋白印记检测目标蛋白质的表达情况 取各组样品的全蛋白质提取物,进行 SDS-PAGE 电泳分离,转至 PVDF 膜后,进行免疫蛋白印记(Western-Blot)检测 ABCA1、LXRα 和 PPARα 的表达情况。凝胶成像仪分析免疫印迹条带的相对灰度值,以反映各个蛋白质的相对表达量,每组相对灰度值的计算以 β-actin 蛋白作为内参。

1.2.8 免疫荧光技术检测目标蛋白质在细胞内的表达情况 各组细胞用 4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤 3 次后加入 0.1% Triton X-100 处理 10 min,加入山羊血清工作液(5%),湿盒内室温封闭 2 h 后加入稀释好的一抗(1:200 兔抗小鼠,3%山羊血清工作液),4 ℃过夜孵育。加入稀释好的 Alexa Fluor 555 荧光二抗(1:2 500)后,室温、避光孵育 1 h。DAPI(每孔 10 μL)复染细胞核 15 min 后,滴加抗荧光猝灭剂,各组样品置于荧光显微镜下观察。

1.2.9 统计学分析 采用 SPSS 软件对数据进行分析处理[17]。两组间数据比较采用单因素 *T* 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析。以 $p<0.05$(*)表示数据间差异显著,$p<0.01$(**)表示数据间差异极显著。数据中的误差线表示至少 3 个生物学重复的标准误差。

2 结果与分析

2.1 单独的 STE 不能调控 J774A.1 细胞 ABCA1 的表达

检测了 STE 对 J774A.1 细胞 ABCA1 蛋白表达的调控作用。首先检测了 STE 对细胞的毒性作用。MTT 检测结果发现,在较大的浓度范围内(0~100 μmol/L),STE 对小鼠巨噬细胞几乎无毒性;125 μmol/L 的 STE 作用于巨噬细胞时,J774.1 细胞出现了一定程度的死亡,存活率为 87.1%($p<0.05$),见图 1(a)。选取适中浓度的 STE(50 μmol/L)进行后续实验,结果见图 1(b)。和对照组比较,50 μmol/L

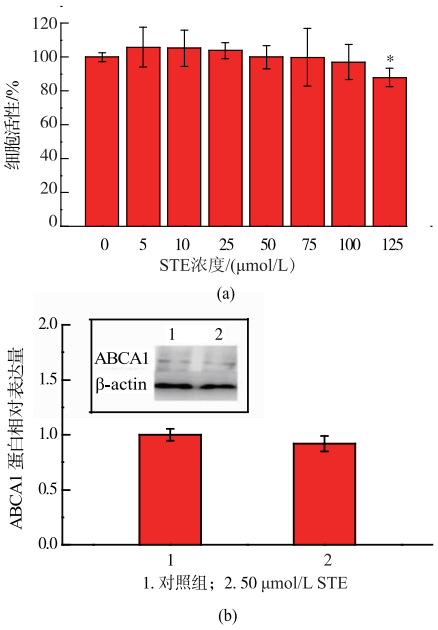


图 1 STE 对小鼠巨噬细胞(J774A.1)活性的影响以及 STE 对 ABCA1 蛋白表达的调控

Fig. 1 Effects of STE on the activity of mouse macrophages J774A.1 and the function of STE on the expression of ABCA1

STE 处理的细胞的 ABCA1 的表达量没有出现明显的变化。这表明,单独的 STE 不会影响小鼠巨噬细胞 J774A.1 上 ABCA1 的表达。

2.2 确定 STE/CPT 的使用浓度

因为甜菊醇可以降低小鼠肠道细胞的 ATP 含量[6],从而影响第二信使 cAMP,而 ABCA1 的表达会受 cAMP 含量的影响。基于上述原因,在使用 STE 的同时,将加入 cAMP 类似物 CPT[18]来调控胞内的 cAMP 水平。利用 MTT 法首先确定了 CPT 可使用浓度,结果见图 2(a)。在较低的 CPT 浓度范围时(≤0.8 μmol/L),CPT 的添加未对细胞造成任何损伤和毒性。当 CPT 浓度升至 1.0 μmol/L 时,J774A.1 细胞出现了一定程度的损伤。基于MTT 结果,确定 0.2~0.8 μmol/L 的 CPT 浓度均可用于后续研究,作者选择 0.4 μmol/L 的 CPT 与 STE 共同处理细胞。

在添加 CPT 的基础上,引入不同浓度(0、5、10、25、50、75、100、125 μmol/L)的 STE。由于 CPT 和 STE 的共同引入,对小鼠巨噬细胞 J774A.1 的活性均有一定的毒副作用。当 STE 为 5~50 μmol/L 时,细胞的活性>90%;随着 STE 浓度的增加(75~125 μmol/L),细胞的活性降至对照细胞活性的 70%左右,见图 2(b)。选取 50 μmol/L STE 和 0.4 μmol/L CPT 共同处理细胞,研究其对小鼠巨噬细胞 ABCA1 蛋白表达的作用。

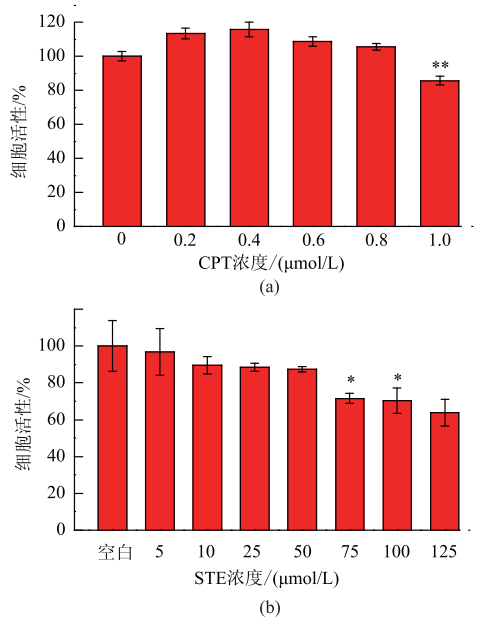
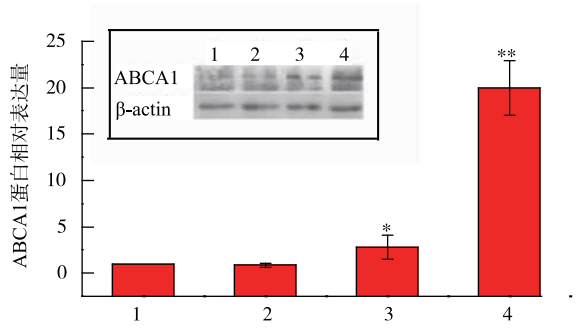


图 2 CPT 和 CPT/STE 对 J774A.1 细胞活性的影响

Fig. 2 Effects of CPT and CPT/STE on the activity of J774A.1

2.3 STE/CPT 上调 J774A.1 细胞 ABCA1 蛋白的表达

设置了 4 个实验组,Western blot 检测不同处理条件下小鼠巨噬细胞内 ABCA1 的表达情况,结果见图 3。与对照组相比,单独 STE 不能影响 ABCA1 的表达。CPT 处理后,ABCA1 的表达出现上调,灰度值约是对照组的 2.8 倍(p<0.05)。STE/CPT 处理组细胞内 ABCA1 的表达大幅上调,灰度值约是对照组的 20 倍(p<0.01)。免疫印迹结果初步表明,在 CPT 的基础上,STE 可以显著上调小鼠巨噬细胞内 ABCA1 在蛋白质水平的表达。



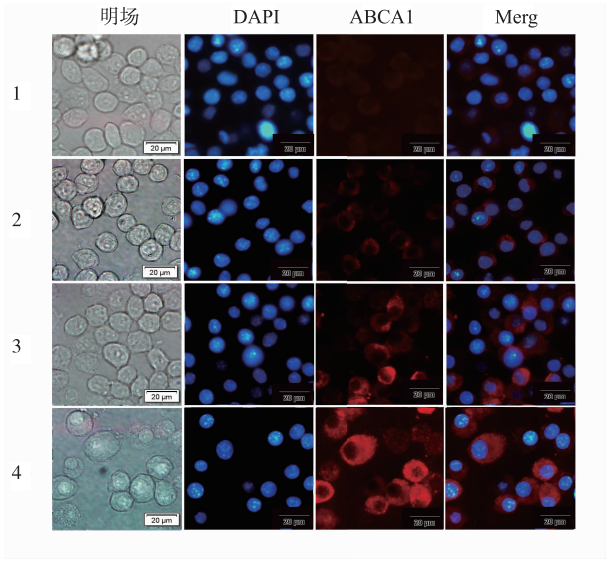
1:DMEM 培养基对照组;2:50 μmol/L STE;3:0.4 μmol/L CPT;4:50 μmol/L STE 和 0.4 μmol/L CPT。

图 3 Western blot 检测 ABCA1 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of ABCA1 protein detected by western blot

进一步利用细胞免疫荧光技术在细胞水平直接检测 ABCA1 的蛋白质表达情况,结果见图 4。其中,蓝色荧光为 DAPI 染色后的细胞核,红色荧光为 Alexa Fluor 555 二抗特异识别的 ABCA1 蛋白。结果表明,对照组细胞和单独 STE 处理的细胞内,ABCA1 的表达量相对较低,视野内没有出现明显的红色荧光;CPT 处理后,细胞内依稀可见红色荧光,但强度较弱;当用 STE/CPT 处理时,胞内红色荧光的强度明显增加,见图 4。细胞免疫荧光的结果与 Western Blot 几乎一致,即单独的 STE 对小鼠巨噬细胞 J774A.1 上 ABCA1 的表达没有明显的调控作用,但是在 CPT 的基础上,STE 的添加可以显著增加 ABCA1 在蛋白质水平的表达。

荧光定量 PCR 进一步检测 STE 对 ABCA1 蛋白在 mRNA 水平的调控作用,结果见图 5。相较于对照组,单独 STE 处理时,细胞 ABCA1 的 mRNA 水平没有明显变化;单独的 CPT 处理时,细胞内 ABCA1 的表达量出现了明显上调,约是对照组的

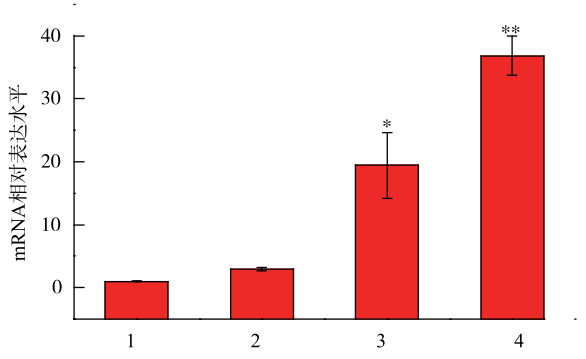


1:DMEM 培养基对照组;2:50 μmol/L STE;3:0.4 μmol/L CPT;4:50 μmol/L STE 和 0.4 μmol/L CPT。

图 4 免疫荧光检测细胞(J774A.1)上 ABCA1蛋白的表达情况

Fig. 4 Expression of ABCA1 protein in J774A.1 cells detected by immunofluorescence

19.4 倍左右($p<0.05$);但是,当细胞以 STE/CPT 共同处理时,相较于其它组别,ABCA1 的mRNA 水平大幅度上调,是对照组的 36.9 倍左右($p<0.01$)。这表明在 CPT 的基础上,STE 也能提高小鼠巨噬细胞 ABCA1 在 mRNA 水平上的表达。



1:DMEM 培养基对照组;2:50 μmol/L STE;3:0.4 μmol/L CPT;4:50 μmol/L STE 和 0.4 μmol/L CPT。

图 5 荧光定量 PCR 检测细胞(J774A.1)中 ABCA1 蛋白的 mRNA 表达情况

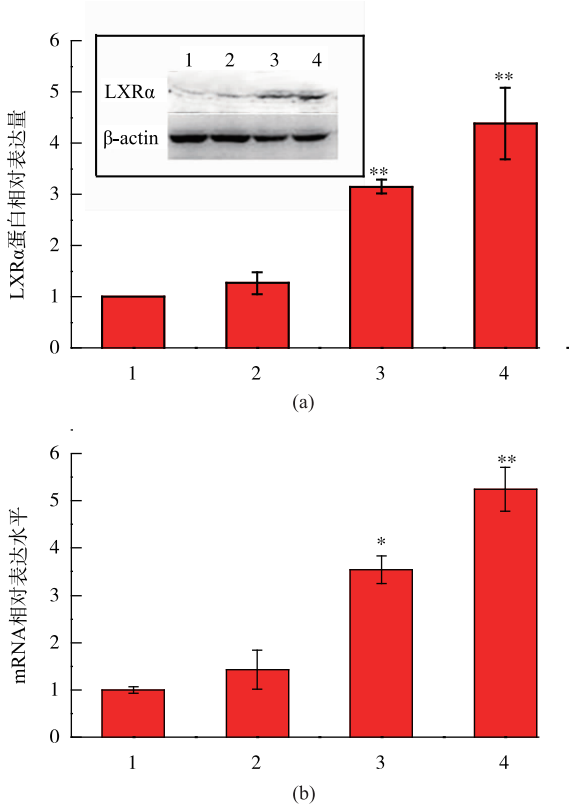
Fig. 5 Expression of ABCA1 mRNA detected by QRT-PCR

结果表明,单独 STE 不能调控 ABCA1 的表达,可能是细胞内 ATP 转化被抑制,降低了 cAMP 的浓度,从而影响了细胞信号通路的转导过程;而 CPT 的添加可以抵消 STE 对细胞能量转化途径的负作用。同时,在 CPT 的基础上,STE 能显著提高小鼠巨噬细胞(J774A.1)ABCA1 蛋白在蛋白质及 mRNA 水平上的表达。

2.4 STE 调控 ABCA1 表达机制的初步探讨

ABCA1 在体内受多种因素调节,研究发现,LXRα 和 PPAR 家族受体被认为是调控 ABCA1 基因表达的主要核受体[19]。LXRα 主要是通过和视黄醇类 X 受体 RXR 组成的异源二聚体 LXR/RXR 来识别 ABCA1 基因启动子上的 DR-4 元件,进而启动 ABCA1 的表达[20]。PPAR 家族受体不能直接调控 ABCA1 基因启动子的表达,而是通过 LXRα 进行间接调控,因此 PPAR→LXRα 是研究较多的 ABCA1 调控通路。

Western Blot 和 qRT-PCR 检测发现,STE/CPT 均能上调 LXRα 在蛋白质和 mRNA 转录水平的表达,结果见图 6。在蛋白质水平上,单独 STE 处理后



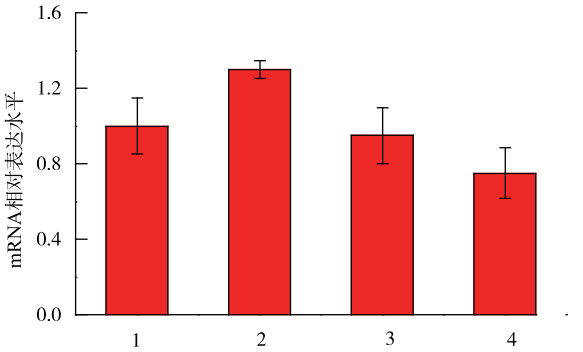
1:DMEM 培养基对照组;2:50 μmol/L STE;3:0.4 μmol/L CPT;4:50 μmol/L STE 和 0.4 μmol/L CPT。

图 6 STE/CPT 共同作用对 LXRα 蛋白和 mRNA 表达水平的影响

Fig. 6 Effect of STE/CPT on the expression of LXRα protein and mRNA

细胞内 LXRα 没有出现明显变化;CPT 可以提高 LXRα 蛋白的表达量约 3 倍(p<0.01);当 STE/CPT 共同作用后,LXRα 的表达量是对照组的 4 倍左右(p<0.01),见图 6(a)。在 mRNA 水平上,相比于对照组和 STE 处理组,CPT 处理时,LXRα 的 mRNA 水平约是对照组的 3.6 倍 (p<0.05);STE/CPT 共同处理时,LXRα 的 mRNA 水平显著提高, 约是对照组的 5.2 倍(p<0.01),见图 6(b)。这表明 STE/CPT 能在 mRNA 和蛋白质水平上显著提高 ABCA1 上游调控因子 LXRα 的表达。

研究发现,PPARs 家族受体能够调控胆固醇的有两个成员,PPARα 和 PPARγ,LXRα 是二者下游的靶基因[21]。荧光定量检测结果发现,STE/CPT 共同处理 24 h 后,PPARγ 的 mRNA 表达没有出现变化,即 STE/CPT 不能调控 PPARγ 的表达水平,见图 7。



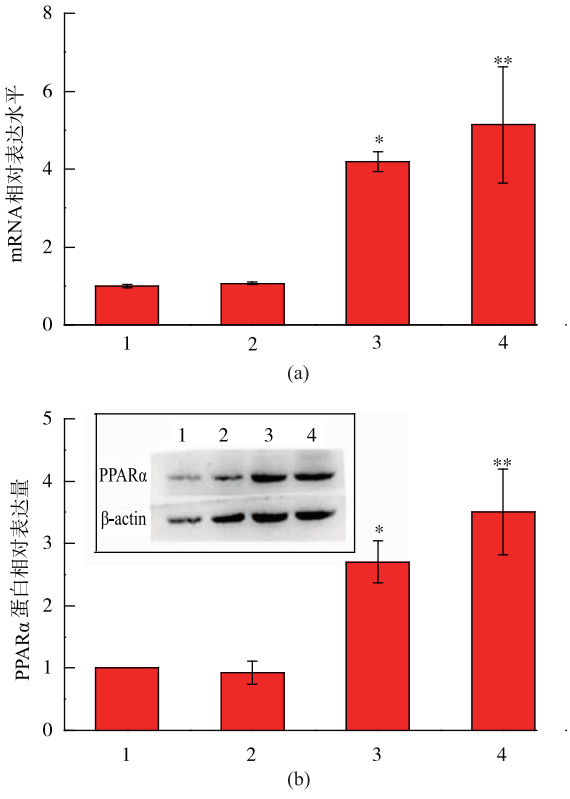
1:DMEM 培养基对照组;2:50 μmol/L STE;3:0.4 μmol/L CPT;4:50 μmol/L STE 和 0.4 μmol/L CPT。

图 7　STE/CPT 共同作用对 PPARγ mRNA 表达的影响

Fig. 7　Effect of STE/CPT interaction on PPARγ mRNA expression

进一步分析了 STE/CPT 对 PPARα 表达的影响,结果见图 8。相较于对照组,单独 CPT 处理时,细胞内 PPARα 的表达量出现了明显上调, 是对照组的 4 倍左右(p<0.05);当细胞以 STE/CPT 共同处理时,单独的 STE 和单独 CPT 处理组中,PPARα 的 mRNA 水平显著上调, 约是对照组的 5.13 倍(p<0.05),见图 8(a)。因此,STE/CPT 共同处理后,可以在转录水平上显著提高调控因子 PPARα 的表达水平。Western Blot 结果表明,单独的 STE 处理不影响 PPARα 蛋白的表达量,单独 CPT 处理使 PPARα 蛋白的表达量提高了 2 倍多。STE/CPT 共同作用后,PPARα 蛋白表达量约是对照组的 3.4 倍 (p<0.01),见图 8(b)。这表明,STE/CPT 可以显著提高小鼠巨噬细胞 J774A.1 PPARα 在蛋白质水平上的表达。

综上所述, 初步推测 STE/CPT 能上调 ABCA1 的表达可能是通过 PPARα–LXRα–ABCA1 的通路途径。



1:DMEM 培养基对照组;2:50 μmol/L STE;3:0.4 μmol/L CPT;4:50 μmol/L STE 和 0.4 μmol/L CPT。

图 8　STE/CPT 共同作用对 PPARα mRNA 和蛋白质表达水平的影响

Fig. 8　Effects of STE/CPT on the expression of PPARα mRNA and protein

3　结　语

胆固醇是细胞膜的重要组成部分,在机体的信息传递、胆汁酸合成以及激素合成中扮演着重要的角色。目前心脑血管类疾病的发病率一直居高不下, 然而过多的胆固醇会引发动脉粥样硬化性疾病。机体对胆固醇分泌的调节机制非常复杂,其中胆固醇逆转运是机体胆固醇代谢的重要途径,也是近年来国内外研究的热点。ABCA1 在胆固醇的逆转运过程中具有重要作用,如果能够根据机体脂肪代谢的需要,有效地调节 ABCA1 的表达水平,对机体的脂代谢和 AS 的治疗具有重要意义。

甜菊糖,又称甜菊糖、甜菊糖苷,是从植物甜叶菊中提取的新型天然甜味剂。国外早有使用甜叶菊作为药草和代糖的历史。我国是甜菊糖的主要生产国。目前,甜菊糖已在世界各地广泛应用于食品、饮料、调味料的生产。甜菊糖的热量极低,摄入人体后不被吸收,也是糖尿病和肥胖病患者适用的甜味剂。研究表明,甜菊糖兼具有药理活性,能够预防动脉粥样硬化、高血糖、高血压等疾病,还可以作为免疫增强剂使用[22-24]。研究发现,甜菊糖会被肠道内的微生物降解为甜菊醇,部分甜菊醇会被肠道吸收,经由肝脏,然后通过血液,最后从肾脏排出体内[25]。据此推测甜菊糖的许多生理功与甜菊醇具有密切关系。研究发现,STE 可以有效地调节小鼠巨噬细胞 ABCA1 的 mRNA 和蛋白质的表达水平,这一结果给 AS 相关疾病药物的开发提供了相关的理论依据。

由于甜菊醇可以降低小鼠肠道细胞对葡萄糖的吸收,从而降低肠道细胞内的 ATP 含量;另外,甜菊醇对细胞的呼吸链也有明显的抑制作用,从而使胞内 ATP 的生成和转化出现抑制,降低了其 ATP 含量[6,26-28]。我们知道,细胞内重要的第二信使cAMP 来源于 ATP 的转化,当胞内 ATP 下降时必然会导致 cAMP 的转化受阻,而 ABCA1 的表达与胞内 cAMP 的水平密切相关。研究发现 cAMP 及其类似物会调控巨噬细胞 RAW264 的质膜蛋白ABCA1 的表达[29]。基于上述原因,我们推断,甜菊醇的加入应该通过抑制 ATP 的形成,从而影响了胞内 cAMP 的生成,使 ABCA1 的表达受到抑制。本研究也证实了单独的 CPT 同样也可以显著上调小鼠巨噬细胞 ABCA1 的表达水平。基于上述原因,在使用 STE 的同时,加入 cAMP 类似物 CPT 来调控胞内 cAMP 水平。STE 必须在添加了 cAMP 类似物 CPT 的基础上,才能显著提高巨噬细胞胆固醇转运蛋白 ABCA1 的表达水平。

ABCA1 在体内受多种因素调节,包括上调 ABCA1 基因表达的 LXR 家族受体、PPAR 家族受体和炎症因子 TGF-β,以及下调 ABCA1 基因表达的 TNF-α、IL-1β 和 TNFγ 等,其中 LXR 家族受体被认为是调控 ABCA1 基因表达的主要核受体[19]。研究发现,STE/CPT 能够上调机体重要的核转录受体 LXRα 蛋白的表达。PPAR 家族受体也是研究较多的调控因子,近期有研究发现,仙人掌多糖能够通过 PPARγ→LXRα 途径调控 ABCA1 的表达[30]。我们前期也检测了 STE 对 PPARγ 受体表达的影响,但是结果发现,STE 不能调控 PPARγ 的表达。因为 PPAR 是一个成员众多的受体家族,PPARs 家族受体 PPARα 也能参与机体的胆固醇的调控。进一步结果表明,STE 能够上调机体重要的核转录受体 PPARα 在蛋白质水平和 mRNA 水平的表达。基于上述结果,我们初步推测,STE/CPT 能够上调 ABCA1 的表达可能是通过 PPARα-LXRα-ABCA1 的通路途径。

参考文献:

[1] 王一凡,任岱,周凤贤,等. 甜菊糖食品中营养成分的研究[J]. 中国现代医学杂志,1997,7(3):63-64.
[2] 文曜. 21 世纪的新型甜味剂 - 甜菊糖[J]. 化工之友,2001,5:10.
[3] 隋晓辰,孙景文,校秋燕,等. 甜菊糖的体内代谢和生物活性研究进展[J]. 食品工业科技,2014,35(24):366-370.
[4] 曹芳,冯文静,陈明,等. 甜菊糖苷降血糖作用研究[J]. 中国药物与临床,2009,9(2):127.
[5] PARK J E,CHA Y S. Stevia rebaudiana bertoni extract supplementation improves lipid and carnitine profiles in C57BL/6J[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,2010,90(7):1099-1105.
[6] TOSKULKAO C,SUTHEERAWATTANANON M,PIYAHACTURAWAT P. Inhibitory effect of steviol,a metabolite of stevioside,on glucose absorption in evened hamster intestine in vitro[J]. **Toxicology Letters**,1995,80:153-159.
[7] 王伟. ABCG1 基因功能调节在动脉粥样硬化及巨噬细胞胆固醇外流中的作用研究[D]. 北京:北京协和医学院,2013.
[8] 李颖庆,唐朝克,文红艳. 载脂蛋白 A-I 与 ATP 结合盒转运体 Al[J]. 医学分子生物学杂志,2005,2(5):385-388.
[9] FARESE R V,WALTHER T C. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T[J]. **Cell**,2009,139(5):855-860.
[10] YU X H,FU Y C,ZHANG D W. Foam cells in atherosclerosis[J]. **Clinica Chimica Acta**,2013,23:245-252.
[11] YANG L,LEE O,CHEN J. Human acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 (acat1) sequences located in two different chromosomes (7 and 1) are required to producea novel ACAT1 isoenzyme with additional sequence at the N terminus[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2004,279(44):46253- 46262.

[12] WU C H,LUAN,X,ZHANG S,et al. Chlorogenic acid protects against atherosclerosis in ApoE-/- mice and promotes cholesterolefflux from RAW264.7 macrophages[J]. **Plos One**,2014,9(9):95452.
[13] 胡艳秋,石浩. 甜菊醇及其衍生物的研究进展[J]. 浙江化工,2011,42(1):10-14.
[14] WANG X,COLLINS H L,RANALLETTA M,et al. Macrophage abcal and abcgl,but not sr-bi,promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo[J]. **Journal of Clinical Investigation**,2007,117:2216-2224.
[15] 车明月,穆贤,李学一,等. 海参铜锌超氧化物歧化酶原核表达载体的构建、表达及活性鉴定[J]. 大连工业大学学报,2018,37(1):5-9.
[16] LI C,ZHAO Y,LIU T,et.al. The distributeon and function characterization of the i type lysozyme from *Apostichopus japonicus* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**,2018,74:419-425.
[17] REPA J J,TURLEY S D,LOBACCAROJ M A,et al. Regulation of absorption and ABCA1- mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers[J]. **Science**,2000,289(5484):1524-1529.
[18] FAVARI E,ZANOTTI I,ZIMETTI F,et al. Probucol inhibits ABCA1-mediated cellular lipid efflux [J]. **Arteriosclerosis, Thrombosis,and Vascular Biology**,2004,24(12):2345-2350.
[19] WONG J,QUINN C M,GELISSEN I C,et al. The effect of statins on ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages is influenced by cellular cholesterol levels andextent of differentiation[J]. **Atherosclerosis**,2008,196(1):180-189.
[20] SRIVASTAVA N. ATP binding cassette transporter A1-Key roles in cellular lipid transport and atherosclerosis[J]. **Molecular and Cellular Biochemistry**,2002,237(1):155-164.
[21] ZADELAAR A S,BOESTEN L S,JUKEMA J W,et al. Dual PPARalpha/ gamma agonist tesaglitazar reduces atherosclerosis in insulin-resistant and hypercholesterolemic ApoE*3Leiden mice[J]. **Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology**,2006,26(11):2560-2566.
[22] GEERAERT B,CROMBE F,HULSMANS M,et al. Stevioside inhibits atherosclerosis by improving insulin signaling and antioxidant defense in obese insulin-resistant mice[J]. **International Journal of Obesity**,2010,34(3):569-577.
[23] FERREIRA E,NEVES F D R,DA COSTA M A D,et al. Comparative effects of *Stevia rebaudian* a leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis[J]. **Planta Medica**,2006,72(8):691-696.
[24] SEHAR I,KAUL A,BANI S,et al. Immune up regulator response of a non-caloric natural sweetener,stevioside[J]. **Chemico-Biological Interactions**,2008,173(2):115-121.
[25] NAKAYAMA K,KASAHARA D & YAMAMOTO F. Absorption,distribution,metabolism and excretion of stevioside in rats[J]. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**,1986,27:1-8.
[26] BOONKAEWWAN C ,AO M ,TOSKULKAO C ,et al. Specific immunomodulatory and secretory activities of stevioside and steviol in intestinal cells[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2008,56(10):3777-3784.
[27] SALEHI B ,LóPEZ D M,LóPEZ M S,et al. *Stevia rebaudiana Bertoni* bioactive effects:from in vivo to clinical trials towards future therapeutic approaches[J]. **Phytotherapy Research:PTR**,2019,33(11):111-119.
[28] KELMER B A,ALVAREZ M,BRACHT A. Effects of *Stevia rebaudiana* natural products on rat liver mitochondria [J]. **Biochemical Pharmacology**,1985,34:873-882.
[29] ORAM J F,LAWN R M,GARVIN M R,et al. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2000,275(44):34508-34511.
[30] 李恒,罗齐军,卢向阳,等. 仙人掌多糖对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇蓄积及其相关基因表达的影响[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2017,43(2):135-139.