

胡海娟,潘思轶.基于胆固醇外排、摄取与合成的柑橘果胶寡糖调控胆固醇代谢机制[J].华中农业大学学报,2022,41(5):152-160.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.05.019

基于胆固醇外排、摄取与合成的柑橘果胶寡糖 调控胆固醇代谢机制

胡海娟,潘思轶

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室/
果蔬加工与品质调控湖北省重点实验室,武汉 430070

摘要 为揭示柑橘果胶寡糖 H1(POS_{H1})对胆固醇代谢的调控机制,采用巨噬细胞模型,基于胆固醇代谢外排、摄取与合成机制对 POS_{H1} 调控胆固醇代谢进行了研究。结果显示:POS_{H1} 和 POS_{H1} 的肠道菌群发酵产物(P24)均通过显著上调肝 X 受体 α -ATP 结合盒转运体 ABCA1/ABCG1 通路中关键基因的蛋白表达量来促进巨噬细胞胆固醇外排。POS_{H1} 对巨噬细胞胆固醇摄取相关基因的蛋白表达无显著影响,但 P24 却可以通过显著抑制 A 类清道夫受体和分化抗原簇 36 的蛋白表达来抑制巨噬细胞对胆固醇的摄取。POS_{H1} 和 P24 均可通过显著抑制胆固醇合成基因 3-羟基-3 甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶蛋白的表达来抑制巨噬细胞胆固醇的合成。研究结果表明,POS_{H1} 通过促进胆固醇排出、抑制胆固醇摄取与合成调控胆固醇代谢,这是 POS_{H1} 调控胆固醇代谢的机制之一,且该机制与肠道菌群发酵 POS_{H1} 有关。

关键词 柑橘果胶;果胶寡糖;肠道菌群;胆固醇代谢;调控机制

中图分类号 TS201.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)05-0152-09

高胆固醇血症作为心血管疾病的高风险因子,胆固醇外排、摄取与合成在其病理发展过程中起到了重要作用。与正常人相比,家族性高胆固醇血症患者体内负责胆固醇外排的 ATP 结合盒转运体 A1 基因 (*ABCA1*) 和 ATP 结合盒转运体 G1 基因 (*ABCG1*) 表达被抑制,由此导致的胆固醇外排功能受损是先天性的^[1]。高胆固醇血症患者体内的胆固醇代谢紊乱,有大量胆固醇沉积。原花青素通过降低 *CD36* 和 *SR-A* 的表达水平来抑制巨噬细胞的胆固醇异常摄入^[2]。为了降低高胆固醇血症患者体内的胆固醇水平,抑制其内源合成也被认为是治疗高胆固醇血症的有效手段之一。薇甘菊茎提取物因可显著增加高胆固醇血症大鼠体内调控胆固醇合成的 3-羟基-3 甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGCR)活性,被认为是一种良好的抗高胆固醇活性物质^[3]。因此,促进胆固醇外排、抑制胆固醇摄取与合成是预防与治疗高胆固醇血症的重要措施。

巨噬细胞胆固醇代谢平衡稳态与高胆固醇血症的病理发展过程密切相关^[1],故巨噬细胞常被用于评价活性物质对胆固醇代谢调节作用及机制的研究^[4]。*ABCA1* 和 *ABCG1* 是在巨噬细胞胆固醇排出过程中起重要作用的一类膜蛋白,二者由核受体 *LXR α* 调控^[5]。其中,*ABCA1* 负责将胆固醇从细胞外排到贫脂的 apoA-I,*ABCG1* 则负责促进胆固醇外排到成熟 HDL 粒子这一过程^[5]。迷迭香酸通过增加 *ABCA1* 和 *ABCG1* 的表达来促进巨噬细胞胆固醇排出,被认为是一种可以预防胆固醇代谢异常的潜在功能因子^[6]。膳食纤维被肠道菌群利用后,会改变菌群及其代谢物组成,而肠道菌群产生的代谢物可以通过上调巨噬细胞中 *ABCA1* 基因的表达来促进胆固醇外排^[7]。巨噬细胞通过 *CD36* 和 *SR-A* 摄取修饰膜蛋白入胞,会促进胆固醇沉积,形成泡沫细胞,且该摄取不受细胞内胆固醇浓度的负反馈调节^[8]。蓝莓可以显著抑制小鼠巨噬细胞 *SR-A* 和 *CD36* 基因的表达,

收稿日期:2022-07-08

基金项目:财政部与农业农村部:国家柑橘产业技术体系(CARS-26-07B);中央高校基本科研业务费专项(2662020SPPY011);云南省重大科技专项(202102AE090054);湖北省重大科技专项(2022BBA0030)

胡海娟,E-mail:huhaijuan@163.com

通信作者:潘思轶,E-mail:siyipan401@163.com

进而减少巨噬细胞氧化型LDL的摄取和胆固醇沉积,使巨噬细胞的泡沫化得到延缓^[9]。尿石素A在显著上调*ABCA1*和*ABCG1*基因的表达来促进胆固醇排出的同时能够抑制巨噬细胞胆固醇合成酶HMGCR的转录和翻译,从而减少胆固醇在巨噬细胞的沉积^[10]。

笔者所在团队前期研究发现,柑橘果胶寡糖H1(POS_{H1})作为一种可以被肠道菌群水解利用的水溶性膳食纤维,其对高脂膳食小鼠胆固醇水平具有明显的改善效果,且POS_{H1}发挥调控胆固醇代谢作用与胆固醇排出和合成密切相关^[11],但具体机制还未见研究报道。因此,本研究采用巨噬细胞模型研究POS_{H1}及其肠道菌群发酵产物对胆固醇排出、摄取以及合成功能的影响与机制,旨在为揭示POS_{H1}的降胆固醇机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1)试验原料。本研究所用原料为实验室自制的柑橘果胶寡糖级分H1(以下均简称为POS_{H1}),由过氧化氢高温水解柑橘果皮果胶所得,方法见文献^[12]。THP-1细胞由卡罗林斯卡医学院Division of Clinical Chemistry提供。粪便接种液由瑞典卡罗林斯卡医学院Clinical Microbiology系Christian G. Giske教授实验室提供。

2)主要试剂。Gibco RPMI 1640培养基、Gibco胎牛血清、High capacity cDNA 反转录试剂盒、SYBR Green Master mix、LPS、蛋白Marker和蛋白酶抑制剂均购于Thermo Fisher Scientific公司。TRIzol Reagent购于美国Invitrogen公司。Pam₃CSK₄购于Bio-technie公司。PMA购于Sigma公司。引物合成由Integrated DNA Technologies公司合成。PierceTM Rapid Gold BCA Protein Assay Kit购于Elabscience公司。5×蛋白上样缓冲液购于Siwega生物科技有限公司。TRIS和甘氨酸购于德国Bio-FROxx公司。SDS和Tween 20购于Solarbio科技有限公司。甲醇购于国药集团化学试剂有限公司。ECL化学发光底物购于Bio-Rad公司。柯达医用X射线胶片购于Kodak公司。Ripa裂解液、PMSF和磷酸化蛋白抑制剂购于赛维尔生物科技有限公司。

3)仪器设备。101-2AB电热鼓风干燥箱,天津泰斯特仪器有限公司;BBS-SDC洁净工作台,济南鑫贝西生物技术有限公司;ABI StepOnePlus实时荧

光定量PCR仪,美国应用生物系统公司;Thermofisher Veriti 96 梯度PCR仪,美国应用生物系统公司;NanoDrop微量分光光度计,Thermo Fisher Scientific公司;Anaerobox IV厌氧培养箱,美国GENE SCIENCE公司;DYY-6C电泳槽,北京六一仪器厂;TGL-16高速离心机,苏州雨泽仪器有限公司;SMR16.1酶标仪,优尔生生命科学装备有限公司;AX-II暗匣,广东粤华医疗器械厂有限公司。

1.2 POS_{H1}体外培养肠道菌群

液体LB培养基配方:10 g胰蛋白胨、5 g酵母提取物、5 g氯化钠,1 mol/L NaOH调pH至7.4,去离子水定容至1 L,高压灭菌备用。POS_{H1}培养基:每100 mL液体LB培养基加入5 g POS_{H1}。

POS_{H1}体外培养:粪便接种液是将10人粪便经0.01 mol/L灭菌PBS缓冲液稀释为0.1 g/mL的粪便悬浮液,由瑞典卡罗林斯卡医学院Clinical Microbiology系的Christian G. Giske教授实验室提供。将该接种液按1%(V/V)接种到POS_{H1}培养基中,37.0 °C厌氧培养24 h,对照组为不加POS_{H1}的LB液体培养基。24 h后,4 °C、4 000 r/min离心10 min取上清液收集,该上清液即为肠道菌群发酵产物。对照组的肠道菌群发酵产物记为N24,POS_{H1}组的肠道菌群发酵产物记为P24。上清液过0.22 μm滤膜后,-80 °C储存待用。

1.3 THP-1细胞复苏与培养

取-80 °C冰箱冻存的细胞,将其于37 °C恒温水浴锅融化。随后,转移至15 mL无菌离心管离心;再加入8 mL含10% FBS、1% 10 U/mL青霉素和10 mg/mL链霉素混合液的RPMI 1640培养基,1 000 r/min离心5 min;离心结束后小心吸出上清,取1 mL培养液至离心管中,混匀吹打3次;将有细胞的1 mL培养液加至75 cm²培养瓶中,再加入12 mL RPMI 1640培养基(含10% FBS、1% 10 U/mL青霉素和10 mg/mL链霉素混合液)至75 cm²培养瓶。每天观察细胞1次,2~3 d后,细胞培养基变黄及细胞铺满整个视野时(低倍镜)可进行细胞传代。

细胞传代:将离心机转速调至1 000 r/min,15 mL离心管离心THP-1细胞5 min。小心弃去培养基,再加入3~5 mL培养基吹打混匀,并于无菌条件下将其转移至75 cm²细胞培养瓶内。补加RPMI 1640培养基(含10% FBS、1% 10 U/mL青霉素和10 mg/mL链霉素混合液)于培养箱内培养。

细胞培养条件:37 °C恒温,5% CO₂。

1.4 THP-1细胞分化

待THP-1细胞数目维持在 1×10^6 个/mL,生长状况良好,以 5.6×10^5 个/mL细胞均匀接种于12孔板中,每组6个复孔。在接种细胞的同时,给予100 ng/mL PMA诱导48 h,将THP-1单核细胞诱导为巨噬细胞,48 h后,小心弃去旧培养基,用灭菌PBS缓冲液充分洗涤2次,去除不贴壁细胞及死亡细胞。

1.5 POS_{H1}和P24处理THP-1巨噬细胞

向分化好的细胞中加入RPMI 1640培养基(含10% FBS、1% 10 U/mL青霉素和10 mg/mL链霉素混合液),分别给予POS_{H1}和P24,共15组。

1) POS_{H1}效果研究。分别为阴性对照组(NC)、POS_{H1} (5 mg/mL)、Pam₃CSK₄ (Pam, 20 ng/mL)、LPS (10 ng/mL)、POS_{H1}+Pam₃CSK₄ (PP)和POS_{H1}+LPS(PL),共6组。其中,Pam₃CSK₄和LPS(分别为TLR2和TLR4激动剂)组为阳性对照组。POS_{H1}预处理THP-1巨噬细胞1 h,其余组各加等体积灭菌PBS缓冲液;1 h后各组相应加入LPS或Pam₃CSK₄处理6 h(共计7 h)后,收集细胞用于PCR检测。

2) 肠道菌群发酵产物效果研究。分别为阴性对照组(NC)、P24 (1%, V/V)、N24 (1%, V/V)、Pam₃CSK₄ (Pam, 20 ng/mL)、LPS (10 ng/mL)、P24+Pam₃CSK₄ (P24P)、P24+LPS (P24L)、N24+Pam₃CSK₄ (N24P)和N24+LPS (N24L),共9组。其中,Pam₃CSK₄和LPS组(分别为TLR2和TLR4激动剂)为阳性对照组。P24或者N24预处理THP-1巨噬细胞1 h,其余组各加等体积灭菌PBS缓冲液;1 h后再加入LPS或Pam₃CSK₄处理6 h(共计7 h)后,收集细胞用于后续试验检测。

1.6 应用Western blot法检测蛋白的表达量

1) 细胞中总蛋白提取和变性。RIPA工作液使用时先加入各种抑制剂,1 mL RIPA工作液=790 μ L RIPA+100 μ L蛋白酶抑制剂母液(10 \times)+100 μ L磷酸化蛋白酶抑制剂母液(10 \times)+10 μ L 100 mmol/L PMSF母液。RIPA工作液配好后,放在冰上预冷。用TBS缓冲液润洗贴壁细胞2~3次,最后1次尽量吸干残留液。加入适当体积的细胞总蛋白提取试剂(使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂)于培养板/瓶内裂解3~5 min。期间反复震动培养板/瓶,使试剂与细胞充分接触。用细胞刮刀将细胞及试剂刮下,收集到1.5 mL离心管中。冰浴30 min,期间用

移液器反复吹打,确保细胞完全裂解。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心5 min,收集上清,即为总蛋白溶液。每个样品总蛋白溶液加入5 \times loading buffer,涡旋混匀,98 $^{\circ}$ C加热10 min,-80 $^{\circ}$ C保存。

2) SDS-PAGE电泳。根据蛋白的相对分子质量大小,配制10%的分离胶和5%的浓缩胶,为防止胶凝固应在加入TEMED后立即灌胶;将干净的玻璃板固定好,然后加入预先配制好的分离胶,并加水液封除去气泡。待胶凝固后,用滤纸吸干玻璃板中水分,然后加入浓缩胶并插入梳子,待胶再次凝固后轻轻拔出梳子;处理好的各组蛋白样品进行电泳。浓缩胶电压为80 V,分离胶电压为130 V,待条带到达玻璃板底部时结束电泳。

3) 转膜。PVDF膜于甲醇中活化1 min,将夹子的黑色面放入装有转移液的玻璃平皿中,从下到上依次放入1层海绵垫、3层滤纸、分离胶、PVDF膜、3层滤纸,最后盖上1层海绵垫,排掉气泡,夹紧夹子,加入预冷的转膜液,设定电流为250 mA,于冰浴中转膜1 h。

4) 封闭。将上一步转好的PVDF膜放入适量5%脱脂奶粉中,于脱色摇床上振荡封闭1 h。

5) 孵育一抗。一抗按照试剂与耗材表中的比例用一抗稀释液稀释,将封闭后的PVDF膜装入杂交袋中4 $^{\circ}$ C孵育过夜。用TBST洗5次,每次5 min。

6) 孵育二抗。二抗按照试剂与耗材表中的比例用5%脱脂奶粉稀释。将膜二抗中孵育1 h。用TBST洗5次,每次5 min。

7) 显影。滴加新鲜配制的ECL混合溶液到膜的蛋白面侧,发光检测;根据不同的光强度调整曝光条件,显影、定影。将胶片进行扫描存档,AlphaEaseFC软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.7 数据分析

所有试验至少重复3次,结果按平均值 \pm 标准误差(SEM)表示。采用Excel软件对试验数据进行整理,使用GraphPad Prism 7.0进行Mann-Whitney检验分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

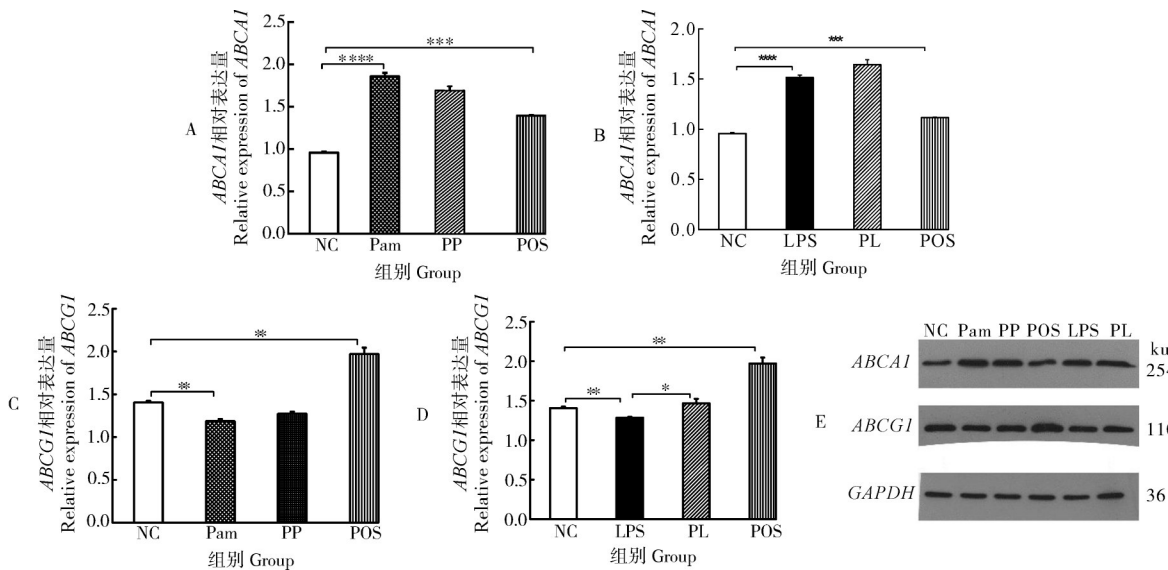
2 结果与分析

2.1 POS_{H1}对巨噬细胞胆固醇外排相关基因表达的影响

ABCA1和ABCG1是介导机体胆固醇外排的基因,且二者的表达受LXR α 受体的调控。POS_{H1}对巨

噬细胞胆固醇外排相关基因的表达影响如图1所示,和NC组相比,POS_{H1}显著促进了*ABCA1*和*ABCG1*的表达量,分别是NC组的1.16($P<0.001$)和1.4倍($P<0.01$)。*ABCA1*在LPS和Pam组的表达量显著高于NC组($P<0.0001$),但*ABCG1*在NC组的表达

量却显著高于LPS和Pam组($P<0.01$)。*ABCA1*的表达量在在PP和Pam以及PL和LPS均不存在显著组间差异。当LPS组有POS_{H1}添加时,显著促进*ABCG1*的表达,但POS_{H1}添加对Pam组*ABCG1*的表达量未造成显著影响。



NC、POS_{H1}、Pam、PP、LPS和PL分别代表阴性对照组、POS_{H1}、Pam、POS_{H1}+Pam、LPS和POS_{H1}+LPS组;每组数据用平均值±标准误差表示,*, $P<0.05$,**, $P<0.01$,***, $P<0.001$,****, $P<0.0001$ 。Macrophages were determined for protein expression of *ABCA1* and *ABCG1*. The cells were treated either PBS, POS_{H1}, Pam, LPS, POS_{H1}+Pam (PP), and POS_{H1}+LPS (PL). Values are presented as the means ± SEM. *, $P<0.05$;**, $P<0.01$;***, $P<0.001$;****, $P<0.0001$ 。下同 The same as below.

图1 POS_{H1}对巨噬细胞胆固醇外排基因*ABCA1*和*ABCG1*表达水平的影响

Fig.1 Effects of POS_{H1} on the expression of macrophage cholesterol efflux gene *ABCA1* and *ABCG1*

2.2 P24对巨噬细胞胆固醇外排相关基因表达的影响

P24对巨噬细胞胆固醇外排相关基因的表达影响如图2所示。*ABCA1*和*ABCG1*的表达量在P24组显著高于NC组,分别是NC组的2.65($P<0.001$)和1.12倍($P<0.05$)。和NC组相比,N24显著上调了*ABCA1*的表达($P<0.01$),但下调了*ABCG1*的表达($P<0.0001$)。同时,P24组*ABCA1*和*ABCG1*的表达量是N24组的1.31($P<0.05$)和3.44倍($P<0.0001$)。此外,P24的添加对LPS或者Pam组*ABCA1*和*ABCG1*的表达无任何显著促进作用,N24可以促进LPS组*ABCA1*和*ABCG1*以及Pam组*ABCG1*表达的显著增加,和二者在mRNA水平的变化趋势较为一致。

2.3 POS_{H1}和P24对巨噬细胞LXRα表达的影响

POS_{H1}和P24对LXRα的表达变化如图3所示。和NC或者N24相比,POS_{H1}和P24显著促进了LXRα的表达($P<0.001$)。和2个阳性对照组相比,仅POS_{H1}和LPS共处理组LXRα的表达显著上升

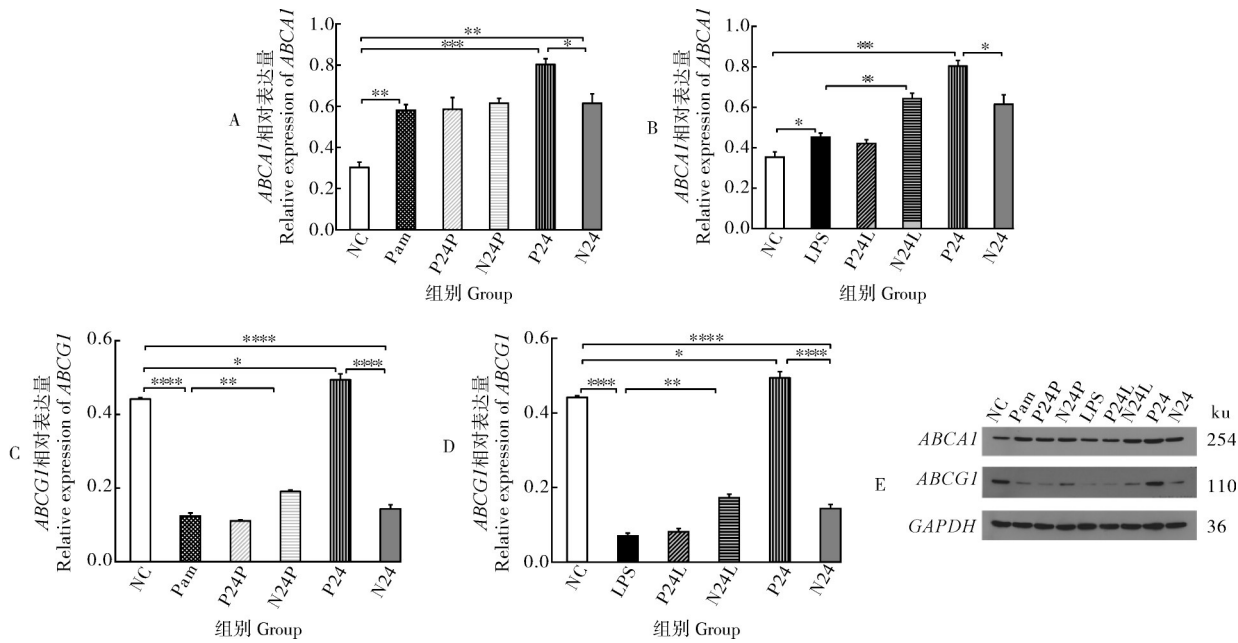
($P<0.0001$),其他POS_{H1}或者P24和LPS或Pam共处理组对LXRα的表达无明显变化。此外,N24可促进LPS组中LXRα的表达($P<0.01$)。

2.4 POS_{H1}对巨噬细胞胆固醇摄取相关基因表达的影响

清道夫受体是CD36和SR-A导致巨噬细胞胆固醇蓄积并大量摄取修饰膜蛋白入胞的关键基因,POS_{H1}对CD36和SR-A在巨噬细胞蛋白的表达量影响如图4所示。和NC组相比,CD36和SR-A基因的蛋白表达在LPS和Pam组被显著抑制。此外,POS_{H1}对LPS和Pam组的CD36和SR-A基因的蛋白表达造成显著影响,POS_{H1}和NC组的CD36和SR-A基因的蛋白表达无显著差异。

2.5 P24对巨噬细胞胆固醇摄取相关基因蛋白表达的影响

P24对清道夫受体CD36和SR-A基因的表达的影响如图5所示。和NC组相比,CD36和SR-A基因的表达在LPS和Pam组被显著抑制。虽然P24组CD36和SR-A基因的表达量显著高于N24组,但仍



NC、P24、N24、Pam、P24P、N24P、LPS、P24L 和 N24L 分别代表阴性对照组、POS_{H1} 的肠道菌群发酵产物、对照组的肠道菌群发酵产物、Pam、POS_{H1} 的肠道菌群发酵产物+Pam、对照组的肠道菌群发酵产物+Pam、LPS、POS_{H1} 的肠道菌群发酵产物+LPS 和对照组的肠道菌群发酵产物+LPS。Macrophages were determined for protein expression of *ABCA1* and *ABCG1*. The cells were treated either PBS, P24, N24, Pam, LPS, or P24+Pam (P24P), or P24+LPS (P24L), or N24+Pam (N24P), and N24+LPS (N24L).

图2 P24对巨噬细胞胆固醇外排基因 *ABCA1* 和 *ABCG1* 表达水平的影响

Fig.2 Effects of P24 on the expression of macrophage cholesterol efflux gene *ABCA1* and *ABCG1*

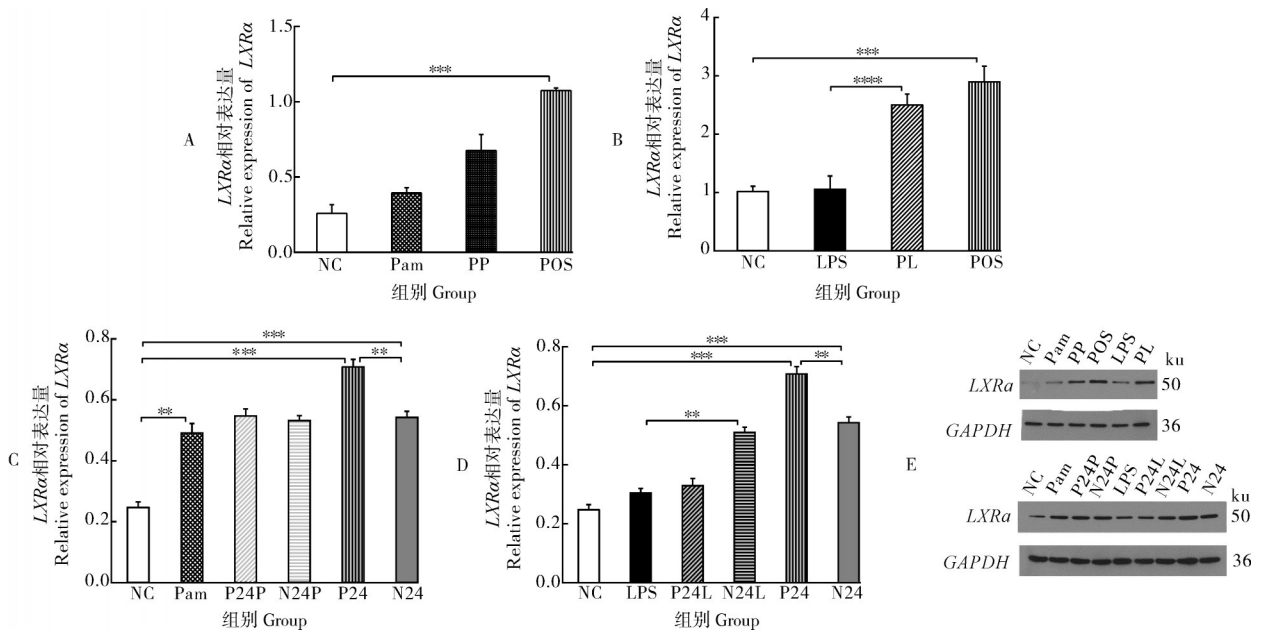


图3 P24对巨噬细胞胆固醇外排基因 *LXRα* 表达水平的影响

Fig.3 Effects of P24 on the expression of macrophage cholesterol efflux gene *LXRα*

然显著低于NC组相应基因的表达量。除了N24显著提高了LPS组 *CD36* 以及 Pam组 *SR-A* 的表达量以外,肠道菌群发酵产物无论是N24还是P24在阳性对照组的添加,并未能对 *CD36* 和 *SR-A* 基因的表达量造成显著变化。

2.6 POS_{H1}和P24对巨噬细胞胆固醇合成相关基因表达的影响

POS_{H1}和P24对胆固醇合成基因 *HMGCR* 的表达量影响结果如图6所示。和NC组相比,POS_{H1}和它的肠道菌群发酵产物P24均能显著抑制

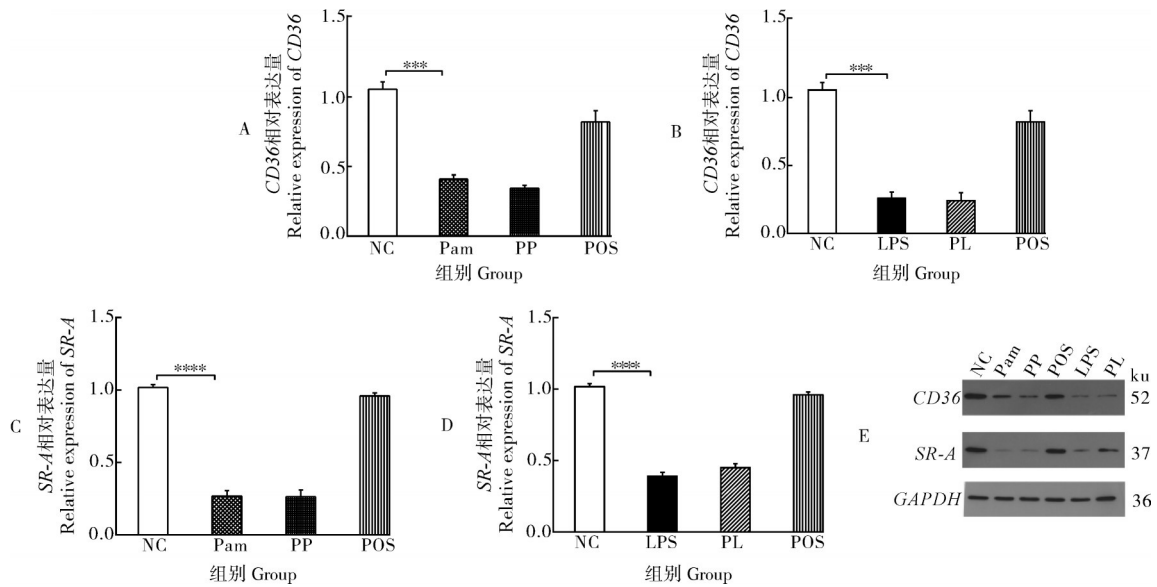


图4 POS_{HI}对胆固醇摄取基因CD36和SR-A表达水平的影响

Fig.4 Effects of POS_{HI} on the expression of cholesterol uptake gene CD36 and SR-A

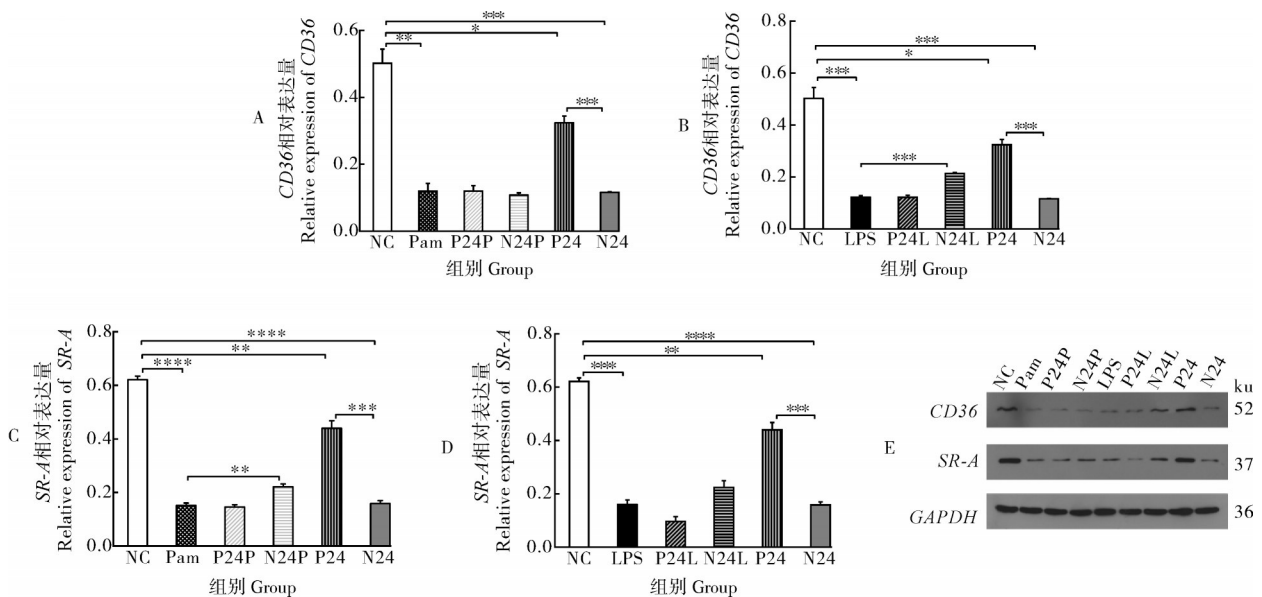


图5 P24对胆固醇摄取基因CD36和SR-A表达水平的影响

Fig.5 Effects of P24 on the expression of cholesterol uptake gene CD36 and SR-A

HMGC R 基因的 表达。除 POS_{HI} 可显著抑制 Pam 组 HMGC R 的 表达, P24 可显著抑制 LPS 组 HMGC R 的 表达外, POS_{HI} 和 P24 在 阳性 对 照 组 的 存 在 并 未 对 HMGC R 的 表 达 造 成 显 著 影 响。与 此 同 时, 虽 然 P24 组 HMGC R 基 因 的 表 达 量 显 著 高 于 N24 组 的, 但 其 表 达 与 NC 组 相 比 仍 被 显 著 抑 制。

3 讨 论

本 研 究 对 POS_{HI} 和 P24 对 巨 噬 细 胞 胆 固 醇 外 排、摄 取 与 合 成 的 影 响 进 行 了 考 察。ABCA1 和 ABCG1

是 巨 噬 细 胞 胆 固 醇 外 排 的 关 键 调 控 因 子^[13]。POS_{HI} 和 其 微 生 物 发 酵 上 清 液 P24 均 可 显 著 促 进 正 常 状 态 下 巨 噬 细 胞 ABCA1 和 ABCG1 基 因 的 表 达, 这 与 我 们 前 期 试 验 中 关 键 基 因 mRNA 的 变 化 结 果 一 致^[14], 证 明 POS_{HI} 和 P24 均 具 有 增 加 巨 噬 细 胞 胆 固 醇 外 排、促 进 胆 固 醇 逆 转 运 的 效 果。这 与 酶 解 制 备 的 山 楂 果 胶 寡 糖 通 过 促 进 巨 噬 细 胞 到 肝 脏 的 胆 固 醇 逆 转 运 的 研 究 报 道 一 致^[15]。其 他 寡 糖 如 壳 聚 糖 寡 糖 也 被 报 道 对 胆 固 醇 逆 转 运 有 促 进 效 果^[16]。此 外, 果 胶 寡 糖 作 为 一 种 新 型 膳 食 纤 维, 虽 然 不 能 被 人 体 直 接 吸 收 利

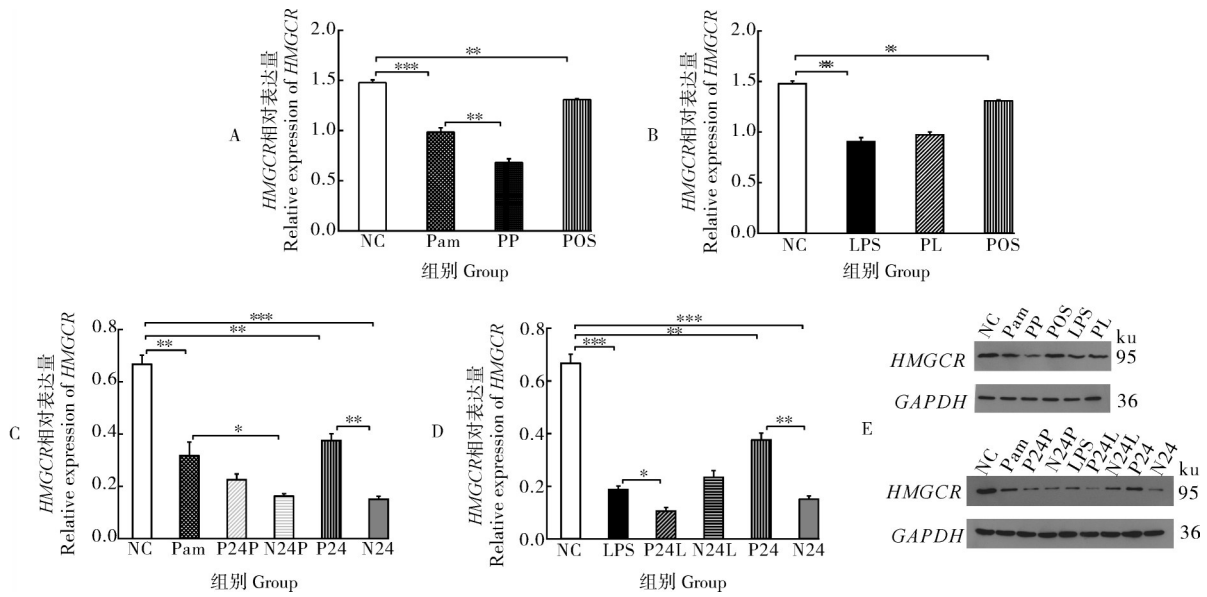


图6 POS_{H1}和P24对胆固醇合成基因 *HMGCR* 表达水平的影响

Fig.6 Effects of POS_{H1} and P24 on the expression of cholesterol synthesis gene *HMGCR*

用,但肠道菌群中却存在大量可分解利用果胶寡糖的酶,因此,果胶寡糖可以被肠道菌群选择性分解代谢,进而可调整肠道菌群及其代谢物的组成^[17-20]。肠道菌群作为一个高度复杂的微生态系统,除菌群自身组成影响宿主健康外,其所产生的发酵产物也是肠道菌群参与宿主代谢的重要途径^[21-22]。有研究^[23]报道,甘露寡糖通过调节肠道菌群发挥对胆固醇代谢的调节作用。乙酸、丙酸和丁酸作为肠道发酵产物中3种主要的短链脂肪酸,可通过增加胆固醇分解和促进血液胆固醇外排重新回到肝脏来降低仓鼠血浆中总胆固醇水平^[24]。研究表明,肠道微生物发酵LB培养基所产生的代谢物中含乙酸、丙酸和丁酸等短链脂肪酸^[25],这可能是与NC组相比,肠道微生物发酵LB培养基产生的代谢物N24可显著促进 *ABCA1* 基因表达的原因。本研究结果表明,与N24相比,肠道微生物发酵含PO_{S_{H1}}的LB培养基后所产生的代谢物P24仍可显著促进 *ABCA1* 的表达。本研究前期小鼠试验结果表明,PO_{S_{H1}}摄取可以显著改变小鼠肠道微生物代谢物中短链脂肪酸的组成,提高代谢物中乙酸、丙酸和丁酸的浓度,其中,PO_{S_{H1}}经肠道菌群发酵后粪便中的乙酸浓度和血清LDL-C存在显著负相关,丙酸和丁酸水平与血清TC浓度存在显著负相关^[11]。此外,肠道菌群发酵大豆壳多糖后引起的短链脂肪酸变化被报道可显著改善高蔗糖饮食大鼠血清的胆固醇水平^[26]。由此,我们推测P24对 *ABCA1* 基因表达的促进作用与发酵产物中短链脂肪酸含量的变化相关。对LPS诱导的巨噬细胞,

PO_{S_{H1}}可促进LPS诱导的炎症状态下巨噬细胞 *ABCG1* 基因的表达增加,P24的添加未看到显著变化。PO_{S_{H1}}和P24对Pam诱导的炎症状态下巨噬细胞 *ABCA1* 和 *ABCG1* 的表达均无影响,这可能与PO_{S_{H1}}本身结构相关,未酯化的半乳糖醛酸和Pam间存在静电相互作用^[27],PO_{S_{H1}}对胆固醇排出的作用可能受到了该种相互作用的影响,但目前还未有相关文献报道,还需更多的研究证实。LXR α 是巨噬细胞胆固醇代谢中调控 *ABCA1* 和 *ABCG1* 基因表达的核受体^[28]。本研究结果表明PO_{S_{H1}}可促进巨噬细胞 *ABCA1*、*ABCG1* 和 *LXR α* 基因的表达,且不同处理组中 *LXR α* 基因表达的变化和 *ABCA1* 以及 *ABCG1* 的变化是一致的,表明PO_{S_{H1}}和P24均通过LXR α -*ABCA1*/*ABCG1*通路促进巨噬细胞胆固醇的排出。

*CD36*和*SR-A*是参与巨噬细胞胆固醇摄取的关键基因^[29],本研究结果表明,PO_{S_{H1}}单独处理无法改变胆固醇摄取,但其经肠道菌群发酵后所产生的发酵产物P24却可以显著抑制巨噬细胞胆固醇摄取。同时,本研究结果表明PO_{S_{H1}}和P24均可通过抑制合成胆固醇的关键基因 *HMGCR* 的表达来抑制胆固醇合成,这和本研究前期小鼠试验结果一致^[11]。

参考文献References

- [1] ESCOLÀ -GIL J C, ROTLLAN N, JULVE J, et al. Reverse cholesterol transport dysfunction is a feature of familial hypercho-

- lesterolemia [J/OL]. Current atherosclerosis reports, 2021, 23 (6) : 29 [2022-07-08]. <https://doi.org/10.1007/s11883-021-00928-1>.
- [2] SHAO D Y, DI Y C, LIAN Z Y, et al. Grape seed proanthocyanidins suppressed macrophage foam cell formation by miRNA-9 via targeting ACAT1 in THP-1 cells [J]. Food & function, 2020, 11(2) : 1258-1269.
- [3] IBRAHIM A, SHAFIE N H, MOHDESA N, et al. *Mikania micrantha* extract inhibits HMG-CoA reductase and ACAT2 and ameliorates hypercholesterolemia and lipid peroxidation in high cholesterol-fed rats [J/OL]. Nutrients, 2020, 12(10) : 3077 [2022-07-08]. <https://doi.org/10.3390/nu12103077>.
- [4] XIE C H, KANG J, CHEN J R, et al. Phenolic acids are *in vivo* atheroprotective compounds appearing in the serum of rats after blueberry consumption [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2011, 59(18) : 10381-10387.
- [5] ZELCER N, TONONNOZ P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling [J]. The Journal of clinical investigation, 2006, 116(3) : 607-614.
- [6] NYANDWI J B, KO Y S, JIN H N, et al. Rosmarinic acid increases macrophage cholesterol efflux through regulation of ABCA1 and ABCG1 in different mechanisms [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(16) : 8791 [2022-07-08]. <https://doi.org/10.3390/ijms22168791>.
- [7] DU Y, LI X X, SU C Y, et al. Butyrate protects against high-fat diet-induced atherosclerosis via up-regulating ABCA1 expression in apolipoprotein E-deficiency mice [J]. British journal of pharmacology, 2020, 177(8) : 1754-1772.
- [8] 周云, 沃兴德. 巨噬源性泡沫细胞形成过程中的机理研究及其进展 [J]. 生命科学, 2010, 22(6) : 579-582. ZHOU Y, WO X D. The mechanism research of the macrophage-derived foam cell formation and its progress [J]. Chinese bulletin of life sciences, 2010, 22(6) : 579-582 (in Chinese with English abstract).
- [9] XIE C H, KANG J, CHEN J R, et al. Lowbush blueberries inhibit scavenger receptors CD36 and SR-A expression and attenuate foam cell formation in ApoE-deficient mice [J]. Food & function, 2011, 2(10) : 588-594.
- [10] 韩淇安, 刘红燕, 闫春红, 等. 尿石素A对巨噬细胞极化及巨噬-泡沫细胞形成的作用 [J]. 食品科学, 2017, 38(13) : 182-189. HAN Q, LIU H Y, YAN C H, et al. Effect of urolithin A on macrophage polarization and the formation of macrophage-derived foam cells [J]. Food science, 2017, 38(13) : 182-189 (in Chinese with English abstract).
- [11] HU H J, ZHANG S, LIU F, et al. Role of the gut microbiota and their metabolites in modulating the cholesterol-lowering effects of citrus pectin oligosaccharides in C57BL/6 mice [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2019, 67(43) : 11922-11930.
- [12] ZHANG S S, HU H J, WANG L F, et al. Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin [J]. Food chemistry, 2018, 244 : 232-237.
- [13] GELISSEN I C, HARRIS M, RYE K A, et al. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to ApoA-I [J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2006, 26(3) : 534-540.
- [14] HU H J, ZHANG S S, PAN S Y. Characterization of citrus pectin oligosaccharides and their microbial metabolites as modulators of immunometabolism on macrophages [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2021, 69(30) : 8403-8414.
- [15] ZHU R G, SUN Y D, HOU Y T, et al. Pectin penta-oligogalacturonide reduces cholesterol accumulation by promoting bile acid biosynthesis and excretion in high-cholesterol-fed mice [J]. Chemico-biological interactions, 2017, 272 : 153-159.
- [16] ZONG C L, YU Y, SONG G H, et al. Chitosan oligosaccharides promote reverse cholesterol transport and expression of scavenger receptor BI and CYP7A1 in mice [J]. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.), 2012, 237(2) : 194-200.
- [17] MARTENS E C, LOWE E C, CHIANG H, et al. Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts [J/OL]. PLoS biology, 2011, 9(12) : e1001221 [2022-07-08]. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001221>.
- [18] NAKAJIMA N, ISHIHARA K, MATSUURA Y. Dietary-fiber-degrading enzymes from a human intestinal *Clostridium* and their application to oligosaccharide production from nonstarchy polysaccharides using immobilized cells [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2002, 59(2/3) : 182-189.
- [19] ABBOTT D W, BORASTON A B. Structural biology of pectin degradation by *Enterobacteriaceae* [J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2008, 72(2) : 301-316.
- [20] GÓMEZ B, GULLÓN B, REMOROZA C, et al. Purification, characterization, and prebiotic properties of pectic oligosaccharides from orange peel wastes [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2014, 62(40) : 9769-9782.
- [21] MARTIN A M, SUN E W, ROGERS G B, et al. The influence of the gut microbiome on host metabolism through the regulation of gut hormone release [J/OL]. Frontiers in physiology, 2019, 10 : 428 [2022-07-08]. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00428>.
- [22] SCARPELLINI E, IANIRO G, ATTILI F, et al. The human gut microbiota and virome: potential therapeutic implications [J]. Digestive and liver disease, 2015, 47(12) : 1007-1012.
- [23] HOVING L R, KATIRAEI S, HEIJINK M, et al. Dietary mannan oligosaccharides modulate gut microbiota, increase fecal bile acid excretion, and decrease plasma cholesterol and atherosclerosis development [J/OL]. Molecular nutrition & food research, 2018, 62(10) : e1700942 [2022-07-08]. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700942>.
- [24] ZHAO Y, LIU J, HAO W, et al. Structure-specific effects of short-chain fatty acids on plasma cholesterol concentration in male Syrian hamsters [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(50) : 10984-10992.
- [25] WAN C, WU K, LU X, et al. Integrative analysis of the gut microbiota and metabolome for *in vitro* human gut fermentation modeling [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2021, 69(50) : 15414-15424.
- [26] LIN Q, YANG L N, HAN L, et al. Effects of soy hull polysaccharide on dyslipidemia and pathoglycemia in rats induced by a high-fat-high-sucrose diet [J]. Food science and human wellness,

- 2022, 11(1): 49-57.
- [27] SAHASRABUDHE N M, BEUKEMA M, TIAN L M, et al. Dietary fiber pectin directly blocks toll-like receptor 2-1 and prevents doxorubicin-induced ileitis [J/OL]. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 383 [2022-07-08]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00383>.
- [28] SILVERSTEIN R L, FEBBRAIO M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior [J/OL]. *Science signaling*, 2009, 2 (72) : re3 [2022-07-08]. <https://doi.org/10.1126/scisignal.272re3>.
- [29] MAI J T, LIU W H, FANG Y B, et al. The atheroprotective role of lipoxin A4 prevents oxLDL-induced apoptotic signaling in macrophages via JNK pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 278: 259-268.

Mechanisms of citrus pectin oligosaccharides regulating cholesterol metabolism based on efflux, uptake and synthesis of cholesterol

HU Haijuan, PAN Siyi

College of Food Science and Technology/Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education/Hubei Key Laboratory of Fruit & Vegetable Processing & Quality Control, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The mechanisms of pectin oligosaccharides H1 (POS_{H1}) regulating cholesterol metabolism based on the efflux, uptake and synthesis of cholesterol were studied using the macrophage model. Results showed that POS_{H1} and their microbiota fermentation metabolites (P24) promoted the efflux of cholesterol via increasing protein expressions of key genes in the liver X receptor- α -ATP-binding cassette transporter (ABC) A1/ ABCG1 pathway. Microbial degradation made POS_{H1} capable of inhibiting protein expressions of scavenger receptor A and cluster differentiating 36 to suppress cholesterol uptake, while POS_{H1} could not. Both POS_{H1} and P24 downregulated 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase at protein expression levels to inhibit cholesterol synthesis. It is indicated that POS_{H1} regulates cholesterol metabolism by promoting the efflux of cholesterol, inhibiting the uptake and synthesis of cholesterol, which is one of the mechanisms by which POS_{H1} regulates cholesterol metabolism, and this mechanism is related to the fermentation of POS_{H1} by gut microbiota.

Keywords citrus pectin; pectin oligosaccharides; gut microbiota; cholesterol metabolism; regulatory mechanisms

(责任编辑:陆文昌)