

PCSK9/LDLR 通路介导姜黄素烟酸酯 促进 HepG2 摄取脂质 *

张彩平^{1, 3)**} 孙少卫^{2, 3)**} 龚勇珍^{2, 4)} 欧露³⁾ 林丽美²⁾郑兴³⁾ 度勤慧^{2, 4)} 雷小勇³⁾ 廖端芳^{2, 4)***}⁽¹⁾ 南华大学医学院, 衡阳 421001; ⁽²⁾ 湖南中医药大学干细胞中药调控与应用研究室, 长沙 410208;⁽³⁾ 南华大学药学与生物科学学院, 衡阳 421001; ⁽⁴⁾ 湖南中医药大学中国-卢森堡中医药合作研究中心, 长沙 410208)

摘要 为研究 PCSK9/LDLR 通路介导姜黄素烟酸酯(CurTn)降低血浆低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 减少动脉内膜下脂质沉积的分子机制, 用 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素烟酸酯与 25 mg/L LDL 共孵育 HepG2 细胞 24 h, 分别采用油红 O 染色、胆固醇荧光定量试剂盒、DiI-LDL 摄取检测细胞内胆固醇含量及 LDL 摄取情况, 用逆转录定量聚合酶链反应(RT-Q-PCR)检测 LDLR 及 SREBP2 的 mRNA 表达, 蛋白质印迹检测 LDLR、SREBP2 及 PCSK9 蛋白表达。随姜黄素烟酸酯作用浓度的增高细胞内脂滴显著增多, 细胞内游离胆固醇(FC)、总胆固醇(TC)含量增高, 细胞内胆固醇摄取增多; RT-Q-PCR 和蛋白质印迹检测发现, 与对照组(Control)比较, 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素烟酸酯处理组 LDLR 蛋白表达增高, SREBP2 mRNA 表达水平升高, PCSK9 蛋白表达降低, 但对 LDLR mRNA 及 SREBP2 蛋白表达无影响。结果表明: 姜黄素烟酸酯通过降低 PCSK9、减少 LDLR 降解、升高 LDLR 蛋白表达, 促进 HepG2 细胞摄取胆固醇。初步说明 CurTn 可能通过抑制 PCSK9 介导 LDLR 溶酶体降解, 促进肝脏清除血浆 LDL-C 水平。

关键词 姜黄素烟酸酯(CurTn), 低密度脂蛋白受体(LDLR), 低密度脂蛋白(LDL), 前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 9 型(PCSK9), 胆固醇调节元件结合蛋白 2 型(SREBP2)

学科分类号 R363

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0111

低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)是致动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)最重要的危险因素^[1], 有研究者提出, 降低 LDL-C 应作为治疗 ASCVD 的主要目标^[2]。血浆中 LDL-C 主要经 LDL 受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)内化代谢, 在肝脏转化成胆汁酸或直接经胆管排出, 是体内清除血浆 LDL-C 的最主要的去路^[3-4]。临床针对血脂异常的防治除饮食治疗和改善生活方式之外, 还采用药物进行调脂治疗。他汀通过竞争性抑制细胞内胆固醇合成, 已成为降血脂的首选药物。研究表明, 他汀类通过调节 LDLR 表达增高, 降低血浆 LDL-C 水平^[5], 但同时也升高了介导 LDLR 溶酶体降解作用的前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 9 型(pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)的表达^[6], 使他汀类药物单用大剂量降

脂作用受限, 寻求以 PCSK9 为作用靶点的药物, 将为进一步增强联合他汀降低血脂药物开发提供理论依据。

姜黄素烟酸酯(curcumin trinitotinate, CurTn)是本课题组根据姜黄素中的 2 个羟基和烟酸中的羧基合成的具有多个功能基团的酯类衍生物, 已申请中国专利:CN101805285A^[7]。分子对接结果显示, 姜黄素烟酸酯(CurTn)与 LDLR、PCSK9 对接效果显著高于姜黄素和烟酸^[8-9], 提示 CurTn 参与

* 国家自然科学基金项目(31371161, 81173047), 湖南省自然科学基金(2015JJ6077, 2014JJ1024), 湖南省“十二五”药理学重点学科项目(2011 年), 南华大学“十二五”科技创新团队项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0731-88458002, E-mail: dfliao66@aliyun.com

收稿日期: 2015-04-23, 接受日期: 2015-07-03

PCSK9/LDLR 调节细胞内胆固醇代谢. 将 CurTn 作用于 As 动物模型 apoE^{-/-} 小鼠, 显著降低了血浆 LDL-C 水平, 并使主动脉内膜下脂质沉积显著减少^[10]. 为进一步探究 CurTn 降低血浆 LDL-C 的作用机制, 本研究以 HepG2 细胞为实验对象, 与 LDL 及姜黄素烟酸酯(CurTn)共同孵育 24 h, 观察细胞胆固醇摄取、LDLR、PCSK9 的变化及其规律, 为开发 CurTn 为临床调脂药物提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2 细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库); DMEM 培养基和无支原体胎牛血清(Gibco 公司); 人源性 LDL(广州奔源公司); 油红 O 和 DMSO(Amresco 公司); 胆固醇定量荧光检测试剂盒 K603-100(Bio-vision 公司); 人源性 LPDS BT-931 (BTI 公司); DiI-LDL 及 Hoechst33342 (Sigma 公司); 细胞总 RNA 抽提试剂盒 LN-0108A、Universal Reverse Transcription Kit LR-0103A 及 Com SYBR qPCR Mix LK-0107BA(上海诺伦生物医药技术有限公司); 兔抗人 LDLR ab52818 和 PCSK9 ab181142 一抗(Abcam 公司); 山羊抗人 SREBP2 AF7119 一抗(R&D 公司); 辣根过氧化物酶标记的二抗, 山羊抗兔和兔抗山羊抗体(上海优维宁生物科技有限公司). 其余均为进口或国产分析纯试剂.

1.2 实验分组

1: Basal; 2: Control (25 mg/L LDL); 3: CurTn 5 μ mol/L (25 mg/L LDL+CurTn 5 μ mol/L); 4: CurTn 10 μ mol/L (25 mg/L LDL+CurTn 10 μ mol/L); 5: CurTn 15 μ mol/L (25 mg/L LDL+CurTn 15 μ mol/L); 6: EZE 30 μ mol/L (25 mg/L LDL+Ezetimibe 30 μ mol/L). HepG2 细胞在 5% CO₂、37℃ 条件下用含有 10% 胎牛血清和 1% 青 - 链霉素的 DMEM 培养液贴壁生长 24 h 后, 再按上述分组加处理因素继续培养 24 h, 各组 3 个复孔, 实验重复 3 次.

1.3 油红 O 染色

HepG2 细胞培养至对数期, 1 $\times$ 10⁵ 个细胞 / 孔接种至预先放置好无菌盖玻片的 6 孔板内, 加处理因素孵育 24 h 后, 4%多聚甲醛固定 30 min, 油红 O 染色 8 min, 苏木素染色 4 s, 甘油封片, 显微镜观察, 细胞内脂质颗粒呈红色, 细胞核呈蓝色.

1.4 胆固醇荧光定量测定

将 HepG2 细胞培养至对数期, 1 $\times$ 10⁵ 个细胞 / 孔

接种 6 孔板内, 加处理因素孵育 24 h 后, 收获 6 孔板内生长的细胞(约 1 $\times$ 10⁶ 个细胞 / 孔), 加入 500 μ l (氯仿: 异丙醇: NP-40=7: 11: 0.1)液, 超声破碎细胞, 13 000 r/min 离心 10 min, 小心转移上清(避免产生气泡)至新 1.5 ml 离心管中, 50℃ 空气干燥去除氯仿, 真空干燥 30 min 去除微量有机溶剂, 用 200 μ l 的 Cholesterol Assay buffer 溶解干粉脂质, 用 10 μ l 样品提取液检测, 按照荧光定量胆固醇测定操作说明进行, 荧光酶标仪检测细胞内胆固醇含量($E_x(535\text{ nm})/E_m(590\text{ nm})$), BCA 蛋白质定量标准化各样本的胆固醇值, 标准化后胆固醇的浓度以单位质量蛋白质(质量单位: μ g)中总胆固醇(游离胆固醇)的质量(质量单位: ng)表示, 单位为 ng/ μ g.

1.5 DiI-LDL 摄取检测

将 HepG2 细胞培养至对数期, 1 $\times$ 10⁵ 个细胞 / 孔接种 6 孔板内, 药物孵育 24 h 后, 更换培养液为 2% LPDS+DMEM, 各组加 DiI-LDL 10 mg/L (Basal 组除外), 避光 37℃ 孵育 4 h, 含 0.4% 牛血清白蛋白的 PBS 洗 2 次, PBS 洗 3 次, 含 4% 多聚甲醛的 PBS 固定 10 min, PBS 洗 3 次, Hoechst33342 染色 20 min, PBS 洗 3 次, 吸尽余液, 滴加抗荧光猝灭液, 荧光显微镜观察, DiI 染细胞膜呈橙红色荧光, Hoechst33342 染细胞核呈蓝色荧光.

1.6 逆转录定量聚合酶链反应 (RT-Q-PCR) 检测

将 HepG2 细胞培养至对数期, 1 $\times$ 10⁶ 接种于 50 ml 培养瓶中, 加处理因素孵育 24 h 后, 经胰酶消化, TRIZOL 提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 引物序列见(表 1). 定量 PCR 扩增 β -actin、LDLR、SREBP2, 95℃ 变性 3 min, 95℃ 12 s; 62℃ 40 s, 40 个循环. 配好反应体系后, 将各个样品逐一加入 96 孔板中, 每个样品设置 3 个复孔, 实时定量 PCR 反应在 ABI7500(美国 ABI 公司)的实时定量 PCR 系统上进行, 重复 3 次.

Table 1 Primer sequence for Real time PCR

Name	Sequence	Length of PCR products/bp
β -Actin	F: CCCTGGCACCCAGCAC	70
	R: GCCGATCCACACGGAGTAC	
LDLR	F: GACTGGTCAGATGAACCCATCAAAG	86
	R: AGGTCATTGCAGACGTGGGAAC	
SREBP2	F: CAGCAGCCTTTGATATACCAAGATG	79
	R: AGGATGTCACCAGGCTTTGGAC	

1.7 蛋白质印迹 (Western blotting)

将 HepG2 细胞培养至对数期, 1×10^6 接种于 50 ml 培养瓶中, 加处理因素孵育 24 h 后, 冰上裂解 30 min, 收集细胞裂解液. 4°C 13 000 r/min 离心 15 min, 留取上清, BCA 蛋白质定量. 100°C 煮沸 5 min, 于 -20°C 保存. 5% 浓缩胶和 8% 的分离胶进行电泳, 恒压 80 V 浓缩胶, 120 V 分离胶; 电泳分离蛋白质, 300 mA 3 h 将蛋白转移至 PVDF 膜上. 5% 脱脂牛奶封闭 2 h; 加兔抗人一抗(β -actin、LDLR、SREBP2 及 PCSK9 均为 1:1 000), 4°C 过夜, TBST 洗脱一抗 15 min. 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(1:5 000), 室温孵育 45 min, TBST 洗脱二抗 20 min; Tanon ECL 高敏成像系统检测, 目的蛋白与 β -actin 的光密度比值作为各目

的蛋白相对表达水平.

1.8 统计学分析

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用单因素方差分析, 采用 SPSS13.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结 果

2.1 HepG2 细胞油红 O 染色结果

CurTn 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 处理 HepG2 细胞 24 h, 油红 O 染色结果显示:与 Control 比较, 随 CurTn 浓度增高细胞内脂滴显著增多, 呈小颗粒状分布, 30 $\mu\text{mol/L}$ EZE 阳性药物处理 24 h 后脂滴亦显著增多, 而 Control 与 Basal 组比较, 细胞内脂滴差异不显著(图 1).

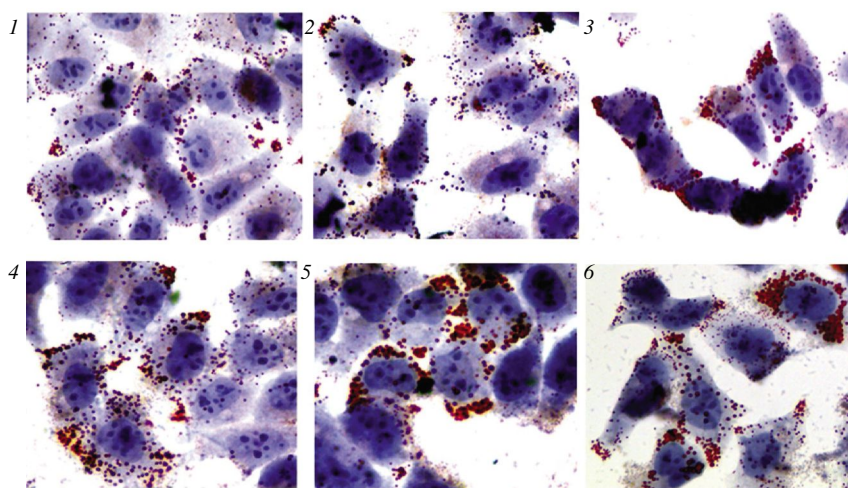


Fig. 1 Oil red O staining of HepG2 cells treated with CurTn co-incubated with LDL

HepG2 cells, treated with 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ CurTn, were co-incubated with LDL 25 mg/L for 24 h respectively, oil red O staining showed that intracellular lipid droplets increased significantly with the concentration of CurTn increased. Intracellular lipid droplets is red, and nucleus is blue (40 $\times$). 1: Basal; 2: Control; 3: CurTn 5 $\mu\text{mol/L}$; 4: CurTn 10 $\mu\text{mol/L}$; 5: CurTn 15 $\mu\text{mol/L}$; 6: EZE 30 $\mu\text{mol/L}$.

2.2 CurTn 对 HepG2 细胞胆固醇含量的影响

细胞内总胆固醇(TC)和游离胆固醇(FC)的定量荧光检测结果显示:与 Control(FC: $(60.34 \pm 5.78) \text{ ng}/\mu\text{g}$; TC: $(82.37 \pm 5.74) \text{ ng}/\mu\text{g}$)比较, CurTn 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 处理 24 h 后细胞内 FC、TC(FC: $(97.8 \pm 5.27) \text{ ng}/\mu\text{g}$, $(117.98 \pm 7.64) \text{ ng}/\mu\text{g}$; TC: $(104.55 \pm 7.69) \text{ ng}/\mu\text{g}$, $(127.68 \pm 6.43) \text{ ng}/\mu\text{g}$)显著增高($P < 0.05$); EZE 30 $\mu\text{mol/L}$ 处理组 FC、TC($(96.09 \pm 7.23) \text{ ng}/\mu\text{g}$;

$(136.26 \pm 8.82) \text{ ng}/\mu\text{g}$)呈显著性增高($P < 0.05$)(图 2).

2.3 CurTn 对 HepG2 细胞 DiI-LDL 摄取的影响

DiI-LDL 及 Hoechst33342 荧光染色结果显示:与 Control 比较, 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ CurTn 处理组橙红色荧光显著增高; EZE 30 $\mu\text{mol/L}$ 处理组橙红色荧光显著高于 Control 组(图 3), 表明 CurTn 促进 HepG2 细胞摄取 DiI-LDL.

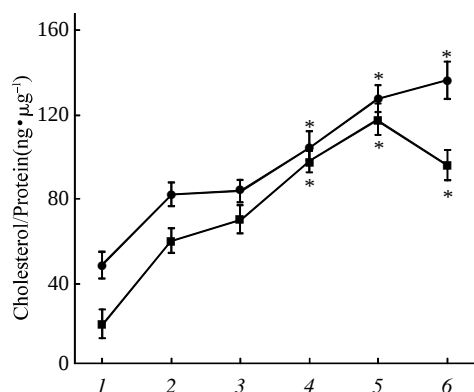


Fig. 2 Cholesterol content of HepG2 cells is detected by Cholesterol Quantitation Fluorometric Kit

HepG2 cells, treated with 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ CurTn, were co-incubated with LDL 25 mg/L for 24 h respectively, cholesterol quantitation fluorometric assay was performed. $*P < 0.05$ versus control group. 1: Basal; 2: Control; 3: CurTn 5 $\mu\text{mol/L}$; 4: CurTn 10 $\mu\text{mol/L}$; 5: CurTn 15 $\mu\text{mol/L}$; 6: EZE 30 $\mu\text{mol/L}$. ■—■: FC; ●—●: TC.

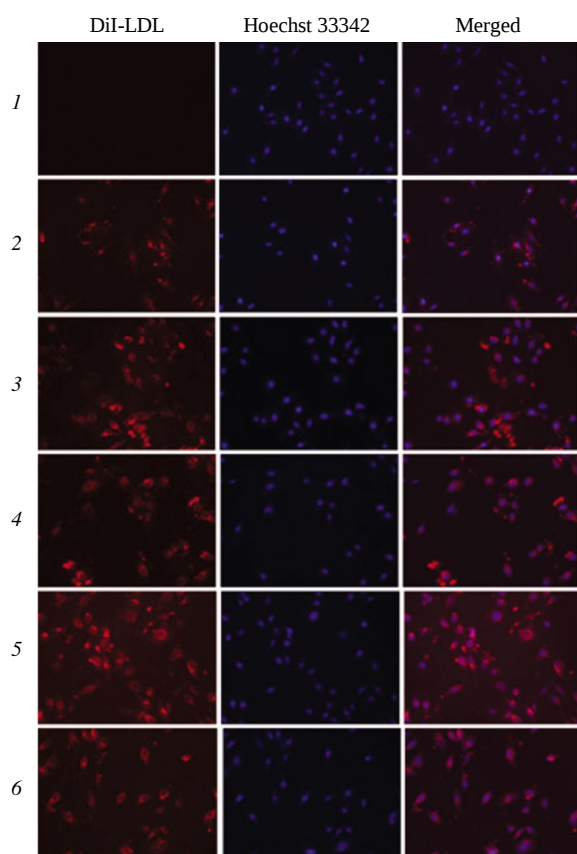


Fig. 3 DiI-LDL uptake by HepG2 cells treated with CurTn for 24 h

HepG2 cells were treated with 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ CurTn for 24 h, then incubated with DiI-LDL for 4 h. DiI-LDL uptake was detected by fluorescence microscopy (20 $\times$). 1: Basal; 2: Control; 3: CurTn 5 $\mu\text{mol/L}$; 4: CurTn 10 $\mu\text{mol/L}$; 5: CurTn 15 $\mu\text{mol/L}$; 6: EZE 30 $\mu\text{mol/L}$.

2.4 CurTn 对 HepG2 细胞 LDLR mRNA 及蛋白质表达的影响

为进一步研究姜黄素烟酸酯(CurTn)促进 HepG2 细胞摄取脂质的机制, 我们检测介导 LDL-C 内化代谢的 LDLR mRNA 及蛋白质表达, 结果显示: 与 Control 比较, 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ CurTn 升高 LDLR 蛋白表达, 但对 mRNA 表达差异无显著性, EZE 30 $\mu\text{mol/L}$ 升高 LDLR mRNA 及蛋白质表达($P < 0.05$)(图 4).

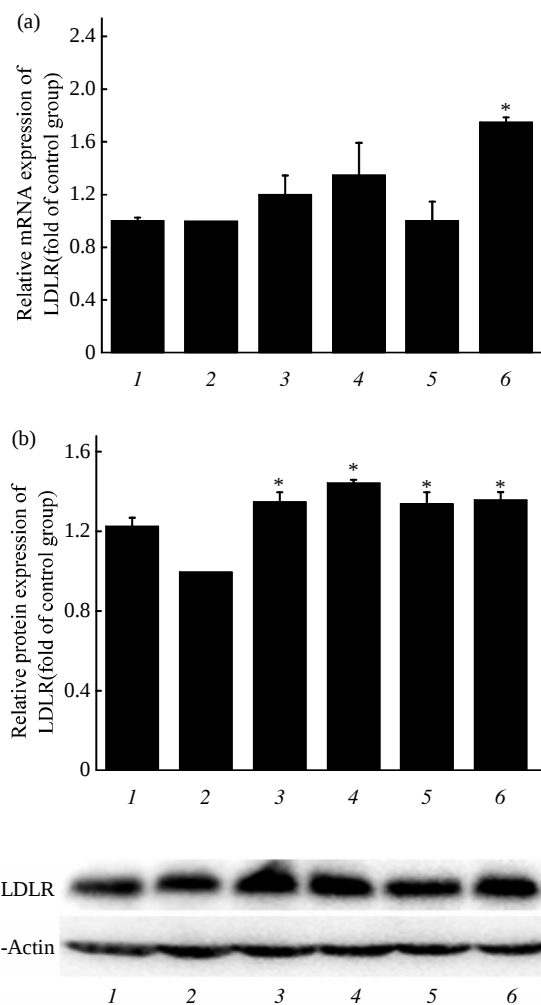


Fig. 4 Effect of CurTn on the expression of LDLR mRNA(a) and protein(b) in HepG2 cells

$*P < 0.05$ versus control group. 1: Basal; 2: Control; 3: CurTn 5 $\mu\text{mol/L}$; 4: CurTn 10 $\mu\text{mol/L}$; 5: CurTn 15 $\mu\text{mol/L}$; 6: EZE 30 $\mu\text{mol/L}$.

2.5 CurTn 对 HepG2 细胞 SREBP2 mRNA 及蛋白质表达的影响

为了鉴别 CurTn 是否通过转录水平调节 LDLR 蛋白质表达增高, 我们检测调节 LDLR 表达的核转

录因子 SREBP2 mRNA 及蛋白质表达, 结果显示: 与 Control 比较, 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ CurTn 升高 SREBP2 mRNA 表达($P < 0.05$), 但对蛋白质表达无

影响, EZE 30 $\mu\text{mol/L}$ 升高 SREBP2 mRNA 及蛋白质表达($P < 0.05$)(图 5), 提示 CurTn 可能不是通过 SREBP2 转录水平调节 LDLR 蛋白表达增高。

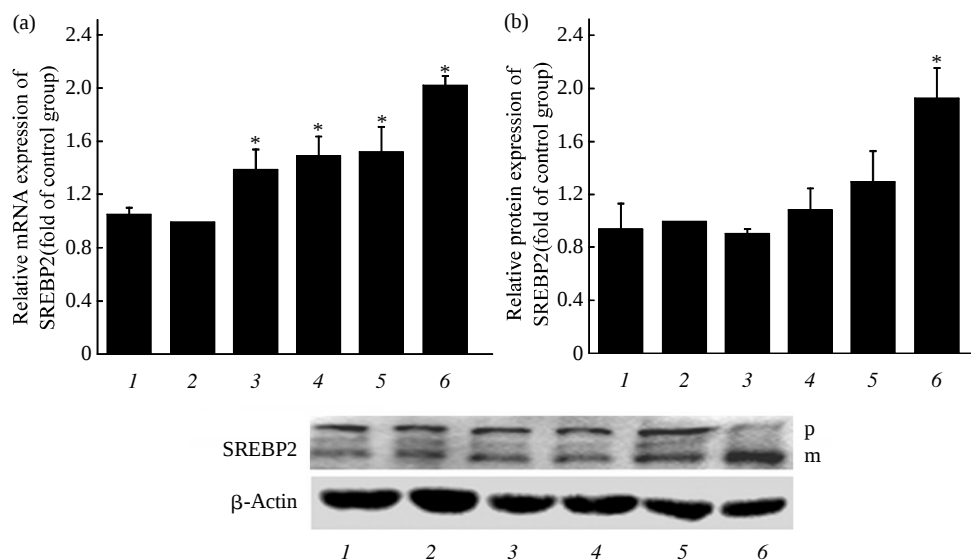


Fig. 5 Effect of CurTn on the expression of SREBP2 mRNA(a) and protein(b) in HepG2 cells

* $P < 0.05$ versus control group. 1: Basal; 2: Control; 3: CurTn 5 $\mu\text{mol/L}$; 4: CurTn 10 $\mu\text{mol/L}$; 5: CurTn 15 $\mu\text{mol/L}$; 6: EZE 30 $\mu\text{mol/L}$. p: Precursor; m: Mature protein.

2.6 CurTn 对 HepG2 细胞 PCSK9 蛋白表达的影响

CurTn 是否通过抑制 PCSK9 引起 LDLR 蛋白表达增高, 我们进一步检测 PCSK9 蛋白表达, 结果显示: 与 Control 比较, 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ CurTn 显著抑制 PCSK9 蛋白表达($P < 0.05$), EZE 30 $\mu\text{mol/L}$ 升高 PCSK9 蛋白表达($P < 0.05$)(图 6), 提示 CurTn

可能通过抑制 PCSK9 蛋白表达, 减少了 LDLR 溶酶体降解, 使 LDLR 蛋白表达增高。

3 讨 论

美国心脏病学会与美国心脏协会均指出: 降低 LDL-C 可显著减少 ASCVD 事件风险, 并将 LDL-C 作为主要干预靶点, 主张大剂量使用他汀类药物, 以求使 LDL-C 降低 50% 以上^[11]。他汀类药物作为防治 ASCVD 应用最广泛的处方类药物, 主要通过竞争性抑制 HMGCoA 还原酶 (3-hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGCR) 的作用, 使细胞内胆固醇的合成降低^[12]。他汀类还通过激活核转录因子胆固醇调节元件结合蛋白 2 (sterol regulatory element-binding protein 2, SREBP2) 促进 LDLR 的表达, 进而促进细胞摄取 LDL, 降低血浆 LDL-C 水平^[15]。因 LDLR 和 PCSK9 均是 SREBP2 的下游靶基因, 他汀类通过 SREBP2 激活 LDLR 表达增高的同时, 却也升高了 PCSK9 的表达^[6], 使他汀类药物单用大剂量降脂作用受限。虽然 PCSK9 单克隆抗体 AMG145 在临床 I 和 II 期试验阶段显著降低血浆 LDL-C 水平, 减少 ASCVD 风险, 并顺利通过临床 III 期实验阶段^[13]。然而因自身的免疫原性、价格昂贵及使用方式均导

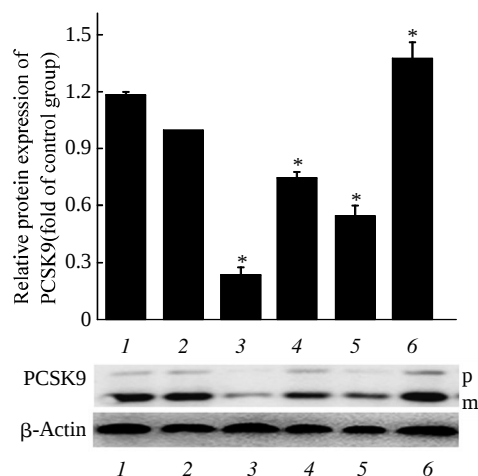


Fig. 6 Effect of CurTn on the expression of PCSK9 protein in HepG2 cells

* $P < 0.05$ versus control group. 1: Basal; 2: Control; 3: CurTn 5 $\mu\text{mol/L}$; 4: CurTn 10 $\mu\text{mol/L}$; 5: CurTn 15 $\mu\text{mol/L}$; 6: EZE 30 $\mu\text{mol/L}$. p: Precursor; m: Mature protein.

致生物制剂 PCSK9 单克隆抗体作为药物开发存在一定的局限性。

结合我们的初期研究结果：姜黄素烟酸酯 (CurTn) 降低了血浆 LDL-C 水平，并减缓 As 进程^[10]。本研究采用 CurTn 作用于体外培养 HepG2 细胞，油红 O 染色及荧光胆固醇定量均显示细胞内胆固醇含量显著增高；DiI-LDL 摄取实验表明，CurTn 使 HepG2 细胞摄取 LDL 增多，提示 CurTn 可能通过肝细胞摄取 LDL，降低血浆 LDL-C 水平。为了探究 CurTn 降低血浆 LDL-C 的作用靶点，我们用 RT-Q-PCR 和 Western blotting 检测 LDLR 及 SREBP2 的 mRNA 及蛋白质表达，结果表明，CurTn 升高 LDLR 蛋白质表达，但对其 mRNA 无影响；CurTn 使 SREBP2 mRNA 水平升高，但不影响其蛋白质表达，提示 CurTn 可能不是通过 SREBP2 调节 LDLR 蛋白表达。进一步通过 Western blotting 检测 PCSK9 蛋白表达，结果显示 CurTn 显著抑制 PCSK9 蛋白表达，表明 CurTn 可能通过抑制 PCSK9 使 LDLR 经溶酶体途径降解减少，增高 LDLR 蛋白表达，促进肝脏清除血浆 LDL-C。

Ezetimibe 单独使用时可降低 LDL-C 15%~18%，他汀类联合 Ezetimibe 则可降低血浆 LDL-C 60%左右^[14]。有研究结果显示 Ezetimibe 升高肝组织 SREBP2 的 mRNA 及蛋白质表达^[15]，并同时增高 LDLR 及 PCSK9 蛋白表达^[16]。本研究中以 Ezetimibe 作为阳性对照药物，促进 HepG2 细胞胆固醇摄取，并在转录及翻译水平平均升高 SREBP2 表达，同时使 LDLR 及 PCSK9 蛋白表达增高。我们的研究结果与前述 Muraoka 等^[15]及 Xu 等^[16]报道结果一致。因 PCSK9 介导 LDLR 经溶酶体途径降解，使 LDLR 内化循环减少，进而抑制血浆 LDL-C 的清除，致使具有升高 PCSK9 蛋白表达作用的他汀类及 Ezetimibe 单用降脂作用受限，需要联合用药进一步降低血浆 LDL-C 水平。CurTn 使 LDLR 蛋白表达增高，PCSK9 蛋白表达降低，可以弥补以上两种药物降脂作用的不足，联合 CurTn 用于降脂作用，有着可观的临床应用前景。有研究表明，姜黄素通过抑制有别于 SREBP2 的肝细胞核因子 1 α (hepatocyte nuclear factor 1 α , HNF-1 α) 的转录机制，降低 PCSK mRNA 及其蛋白质表达，降低 LDLR 溶酶体降解，进而升高 LDLR 蛋白表达，但对 LDLR mRNA 表达无影响^[17]。结合我们的研究结果，提示：CurTn 可能通过抑制 HNF-1 α 、抑制 PCSK9 转录和翻译水平表达进而使 LDLR 表达增

高，这将是本文后续研究中着重阐明的主要目标。

参 考 文 献

- [1] 2014 年中国胆固醇教育计划血脂异常防治建议专家组, 中华心血管病杂志编辑委员会, 血脂与动脉粥样硬化循证工作组, 等. 2014 年中国胆固醇教育计划血脂异常防治专家建议. 中华心血管病杂志, 2014, **42**(8): 633-636
In 2014 China Cholesterol Education Program dyslipidemia prevention advice experts group, Editorial Committee of Chinese Journal of cardiovascular disease, Lipid and atherosclerosis evidence-based Working Group, *et al.* Chin J Cardiol, 2014, **42**(8): 633-636
- [2] Jacobson T A, Ito M K, Maki K C, *et al.* National Lipid Association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: part 1-executive summary. J Clin Lipidol, 2014, **8**(5): 473-488
- [3] Brown M S, Goldstein J L. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. Proc Natl Acad Sci USA, 1974, **71**(3): 788-792
- [4] Goldstein J L, Brown M S. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. J Biol Chem, 1974, **249**(16): 5153-5162
- [5] Rudling M, Angelin B, Ståhle L, *et al.* Regulation of hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and cholesterol 7 α -hydroxylase mRNAs in human liver. J Clin Endocrinol Metab, 2002, **87**(9): 4307-4313
- [6] Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, **24**(8): 1454-1459
- [7] 廖端芳, 郑 兴, 庾勤慧, 等. 含姜黄素烟酸酯衍生物及其制造方法和用途, 中国专利, 2010, CN101805285A
Liao D F, Zheng X, Tuo Q H, *et al.* CN patent, 2010, CN101805285A
- [8] 李亚梅, 廖端芳. 应用 Discovery Studio 软件预测姜黄素烟酸酯抗动脉粥样硬化的作用靶点. 中国医药导报, 2013, **10**(17): 16-21
Li Y M, Liao D F. Chin Med Herald, 2013, **10**(17): 16-21
- [9] 廖端芳, 张彩平, 龚勇珍, 等. 姜黄素酯的设计与 PCSK9 介导的调脂机制研究 // 中国生物化学与分子生物学会. 第十二届全国脂质与脂蛋白学术会议论文汇编, 杭州: 中国生物化学与分子生物学会, 2014: 17
Liao D F, Zhang C P, Gong Y Z, *et al.* Study on curcumin esters design and its lipid regulation mechanism mediated by PCSK9// The Twelfth National Symposium on Lipid and Lipoprotein Assembly. Hangzhou, CSBMB, 2014: 17
- [10] 龚勇珍, 姚海伦, 孙少卫, 等. SREBP-1/ 小凹蛋白 1 介导烟酸姜黄素酯对 ApoE^{-/-} 小鼠的抗动脉粥样硬化作用. 中国动脉硬化杂志, 2014, **22**(12): 1189-1194
Gong Y Z, Yao H L, Sun S W, *et al.* Chin J Arterioscler, 2014,

- 22(12):1189-1194
- [11] Ray K K, Kastelein J J, Boekholdt S M, *et al.* The ACC/AHA 2013 guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults: the good the bad and the uncertain: a comparison with ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias 2011. *Eur Heart J*, 2014, **35**(15): 960-968
- [12] Baigent C, Keech A, Kearney P M, *et al.* Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, 2005, **366**(9493): 1267-1278
- [13] Desai N R, Giugliano R P, Zhou J, *et al.* AMG 145, a monoclonal antibody against PCSK9, facilitates achievement of national cholesterol education program-adult treatment panel III low-density lipoprotein cholesterol goals among high-risk patients: an analysis from the LAPLACE-TIMI 57 trial (LDL-C assessment with PCSK9 monoclonal antibody inhibition combined with statin therapy-thrombolysis in myocardial infarction 57). *J Am Coll Cardiol*, 2014, **63**(5): 430-433
- [14] Masana L, Pedro-Botet J, Civeira F. IMPROVE-IT clinical implications. Should the "high-intensity cholesterol-lowering therapy" strategy replace the "high-intensity statin therapy"? *Atherosclerosis*, 2015, **240**(1): 161-162
- [15] Muraoka T, Aoki K, Iwasaki T, *et al.* Ezetimibe decreases SREBP-1c expression in liver and reverses hepatic insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Metabolism*, 2011, **60** (5): 617-628
- [16] Xu RX, Liu J, Li XL, *et al.* Impacts of ezetimibe on PCSK9 in rats: study on the expression in different organs and the potential mechanisms. *J Transl Med*, 2015, **13**(87): 1-7
- [17] Tai M H, Chen P K, Chen P Y, *et al.* Curcumin enhances cell-surface LDLR level and promotes LDL uptake through downregulation of PCSK9 gene expression in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res*, 2014, **58**(11): 2133-2145

PCSK9/LDLR Pathway Mediates Curcumin Trinicotinate Promoting Lipid Uptake of HepG2*

ZHANG Cai-Ping^{1,3)**}, SUN Shao-Wei^{2,3)**}, GONG Yong-Zhen^{2,4)}, OU Lu³⁾, LIN Li-Mei²⁾,
ZHENG Xing³⁾, TUO Qin-Hui^{2,4)}, LEI Xiao-Yong³⁾, LIAO Duan-Fang^{2,4)***}

⁽¹⁾ Medical College, University of South China, Hengyang 421001, China;

⁽²⁾ Division of Stem Cell Regulation and Application, State Key Laboratory of Chinese Medicine Powder and Medicine Innovation in Hunan(incubation), Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

⁽³⁾ College of Pharmacy and Biological Sciences, University of South China, Hengyang 421001, China;

⁽⁴⁾ Sino-Luxembourg Cooperative Research Centre for Chinese Medicine, Hunan University of China, Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) is a major risk factor for the atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD). Over 70% of circulating LDL-C is metabolized by binding hepatic LDL receptor (LDLR). Therefore, elevation of LDLR expression would reduce the progression of ASCVD. In order to study the molecular mechanism of Curcumin Nicotinate (CurTn) reducing lipid deposition of arterial intima by lowering plasma LDL-C, HepG2 cells were treated with 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ CurTn co-incubated with 25 mg/L LDL for 24 h. Cellular lipid was detected by oil red O staining. Cholesterol content was detected by cholesterol quantitative fluorometric kit. LDL uptake was visualized by DiI-LDL and Hoechst33342. The mRNA expression of LDLR and SREBP2 was analyzed by quantitative Real-time PCR (RT-Q-PCR) and protein expression of LDLR, SREBP2 and PCSK9 by Western blotting. Oil Red O staining showed that lipid droplets increased significantly in 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ CurTn groups. The content of Cholesterol and DiI-LDL uptake were higher in 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ CurTn groups than in control group. RT-Q-PCR and Western blotting showed that CurTn increased LDLR protein expression and decreased PCSK9 protein expression, although CurTn also increased SREBP2 mRNA expression. CurTn had no effect on LDLR mRNA expression in HepG2 cells. These results suggest that PCSK9/LDLR pathway may play a key role in lowering serum LDL-C and attenuating ASCVD risk by CurTn.

Key words CurTn, LDLR, LDL, PCSK9, SREBP2

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0111

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31371161, 81173047), Natural Science Foundation of Hunan Province (2015JJ6077, 2014JJ1024), The Construct Program of the Pharmaceutical Science Key Discipline in Hunan Province and the Innovation Team in University of South China.

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-88458002, E-mail: dfliao66@aliyun.com

Received: April 23, 2015 Accepted: July 3, 2015