

对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯对人肝癌细胞 HepG2 脂肪累积的干预作用^Δ

黄黎敏*, 许军#, 刘燕华, 王增涛, 梁观明, 方加龙, 胡越, 徐伟(江西中医药大学药物化学学科组, 南昌 330004)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3063-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.12

摘要 目的: 研究对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯(AZ)对人肝癌细胞 HepG2 脂肪累积的干预作用。方法: 取对数生长期 HepG2 细胞, 用油酸诱导复制脂肪累积模型, 分为模型组、阳性对照(辛伐他汀 100 μg/ml)组和 15.63、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μg/ml AZ 组, 另设正常对照组。采用 MTT 法检测各组细胞的存活率; 按试剂盒操作检测各组细胞中甘油三酯(TG)含量, 计算 TG 清除率; 油红 O 染色观察各组细胞内脂滴形态。结果: 与正常对照组比较, 模型组和 15.63~125 μg/ml AZ 组细胞的存活率差异无明显变化, 250~1 000 μg/ml AZ 组细胞存活率降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模型组细胞中 TG 含量增加; 与模型组比较, 阳性对照组和 62.5、125 μg/ml AZ 组细胞中 TG 含量降低, TG 清除率依次为 $(28.58 \pm 0.15)\%$ 、 $(14.51 \pm 0.09)\%$ 、 $(29.72 \pm 0.16)\%$, 以上差异均具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模型组细胞出现大量脂滴, AZ 组随给药浓度的增加, 脂滴逐渐变少、变小。结论: AZ 对 HepG2 细胞脂肪累积具有干预作用。

关键词 对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯; 人肝癌细胞 HepG2; 脂肪累积; 油酸

Intervention Effects of (*E*)-4-[2-(4-Chlorophenoxy)-2-Methylpropanoyloxy]-3-Methoxyphenyl Acrylic Acid on Fat Accumulation in Human Hepatoma HepG2 Cells

HUANG Li-min, XU Jun, LIU Yan-hua, WANG Zeng-tao, LIANG Guan-ming, FANG Jia-long, HU Yue, XU Wei (Laboratory of Pharmacochimistry, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the intervention effects of (*E*)-4-[2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoyloxy]-3-methoxyphenyl acrylic acid (AZ) on fat accumulation in human hepatoma HepG2 cells. METHODS: Oleic acid was used to induce fat accumulation in HepG2 cells in logarithmic phase for establishing models of fat accumulation, which were divided into a model group, a positive control group (100 μg/ml simvastatin), and the groups of 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1 000 μg/ml AZ, and a normal control group was set up. MTT method was used to detect the survival rates of all groups of cells, kit was performed to determine the contents of triglyceride (TG) in all groups of cells and calculate the clearance rates, and oil red O stain was conducted to observe the lipid droplet morphology of all groups of cells. RESULTS: Compared to the normal control group, the model group and the groups of 15.63-125 μg/ml AZ demonstrated no obviously different survival rate of cells, and the groups of 250-1 000 μg/ml AZ had lower survival rate of cells. There was statistically significance ($P < 0.05$). The contents of TG in the cells of the model group were higher than those in the cells of the normal control group. The positive control group and the groups of 62.5 and 125 μg/ml AZ had lower contents of TG in the cells compared to the model group, showing a TG clearance rate of $(28.58 \pm 0.15)\%$, $(14.51 \pm 0.09)\%$ and $(29.72 \pm 0.16)\%$ respectively. There was statistically significance ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). There were much more lipid droplets in the cells of the model group than in those of the normal control group. The lipid droplets in AZ groups gradually became less in quantity and smaller with the increasing in drug concentration. CONCLUSIONS: AZ has intervention effect on fat accumulation in HepG2 cells.

KEYWORDS (*E*)-4-[2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoyloxy]-3-methoxyphenyl acrylic acid; Human hepatoma HepG2 cells; Fat accumulation; Oleic acid

脂肪肝是遗传-环境-代谢应激相关因素所致的以肝细胞脂肪累积和脂肪变性为主的临床病理综合征^[1]。近年来随着生活水平不断提高、生活习惯和饮食结构的改变, 患脂肪肝的

Δ 基金项目: 江西省科技专项(No.20121BBG70022); 江西中医药大学校级科研课题(No.2012FC003)

* 硕士研究生。研究方向: 药物化学结构修饰。E-mail: 496764732@qq.com

通信作者: 教授。研究方向: 药物活性物质开发。电话: 0791-87118908。E-mail: xujun881@163.com

人群不断增多, 且起病渐趋低龄化。研究证明, 游离脂肪酸是产生脂毒性的主要介质, 可以产生潜在的细胞毒性, 并能引发脂质的过量累积^[2]。脂肪酸诱导的人肝癌细胞 HepG2 脂肪累积模型与脂肪肝的病理学特征具有很大的相似性^[3]。

对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯(AZ)是采用化学结构修饰原理, 对中药活性成分阿魏酸进行结构改造, 将其与对氯苯氧异丁酸发生酰氯化反应所得到的一种全新化合物^[4]。临床前动物实验研究表明, AZ 能较好地使在胃肠道吸收进入血液, 代谢为对氯苯氧异丁酸^[5]。通过对其药效学的深入研究,

已证明AZ是一种有效的降血脂候选药物^[6],且AZ对高脂饲料所致大鼠高脂血症有显著的改善作用^[7]。本文通过油酸诱导的HepG2细胞脂肪累积模型来评价AZ对肝细胞脂肪累积的干预作用,报道如下。

1 材料

1.1 仪器

TS100-F型倒置显微镜(日本Nikon公司);TDZ4A-WS型低速台式离心机(长沙湘仪离心机有限公司);3-18KS型高速台式离心机(美国Sigma公司);ELX-800型酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 药品与试剂

AZ(江西中医药大学药物化学学科组自制,批号:2012120,纯度:>99%);辛伐他汀对照品(中国食品药品检定研究院,批号:060501,纯度:>98%);胎牛血清(批号:10099-141)、非必需氨基酸(批号:11140-050)购自美国Gibco公司;胎牛血清蛋白(BSA,北京索来宝有限公司,批号:9021055);甘油三酯(TG)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号:136271);油酸(天津市大茂试剂厂,批号:20131106,分析纯);RIPA细胞裂解液(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:E311-02)。

1.3 细胞

人肝癌细胞HepG2(中国科学院细胞库)。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 AZ溶液 精密称取AZ 10.00 mg,置于10 ml量瓶中,用0.1 ml的二甲基亚砜(DMSO)溶液溶解,加入高糖DMEM培养基液定容,过滤除菌,制备成1 000 μg/ml的AZ贮备液,分别精密稀释成500、250、125、62.5、31.25、15 μg/ml备用。

2.1.2 辛伐他汀溶液 精密称取辛伐他汀对照品10.00 mg,置于10 ml量瓶中,用0.1 ml的DMSO溶液溶解,加入高糖DMEM培养基定容,即得1 000 μg/ml的辛伐他汀贮备液,再精密稀释成100 μg/ml,过滤除菌,备用。

2.1.3 油酸溶液 取油酸10 μl,加0.1 mol/L NaOH溶液0.316 ml,70 ℃水浴中溶解,即得0.1 mol/L油酸液;精密称取0.500 0 g BSA,用磷酸盐缓冲液(PBS)制备成10% (m/V) BSA溶液;将油酸液逐滴滴入10% BSA溶液中,制备成 1.0×10^{-3} mol/L的油酸溶液,过滤除菌,备用。

2.2 细胞培养

将HepG2细胞置于含10% BSA的高糖DMEM培养液中,37 ℃、5% CO₂下培养,当细胞生长达到80%~90%时传代。取对数生长期细胞接种于96孔培养板和24孔培养板中培养,用于试验。

2.3 复制模型^[8]

将HepG2细胞以 8×10^4 ml⁻¹细胞密度接种于96孔培养板中,在37 ℃、5% CO₂下孵育24 h后,弃培养基,加入浓度为 1.0×10^{-3} mol/L的油酸溶液,复制脂肪累积模型。

2.4 MTT法测定细胞存活率

取对数生长期的HepG2细胞,用胰蛋白酶消化细胞,按 8×10^4 ml⁻¹细胞密度接种于96孔板,在37 ℃、5% CO₂下孵育24 h,分为模型组和15.63、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μg/ml AZ组,另设正常对照(含细胞不加药)组和空白(不含细胞不加药)组,每组6个平行孔。除正常对照组和空白组不复制模型外,其余各组细胞按“2.3”项下方法复制模型。加药后继续

培养24 h,弃上清液,加入MTT终质量浓度为0.5 mg/ml的无血清培养液200 μl,37 ℃继续培养,4 h后终止培养。弃上清液,加入150 μl DMSO,低速振荡10 min,采用全自动酶标仪于490 nm波长处测定光密度(OD)。按公式计算细胞存活率,细胞存活率(%) = $(OD_{\text{试验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。式中,OD_{试验组}为给药组的OD;OD_{对照组}为正常对照组的OD;OD_{空白组}为空白组的OD。

2.5 细胞内TG含量的检测

取对数生长期的HepG2细胞,接种于24孔板,置于37 ℃、5% CO₂下孵育24 h,分为模型组、阳性对照(辛伐他汀100 μg/ml)组和15.63、31.25、62.5、125 μg/ml AZ组,另设正常对照(含细胞不加药)组,每组6个平行孔。除正常对照组外其余各组细胞复制脂肪累积模型。加药后培养24 h,弃去培养液,用PBS洗2~3遍,再用RIPA裂解液,充分裂解后,以离心半径150 mm、6 000 r/min离心10 min,取上清液,用TG试剂盒测定各组细胞中TG含量。按公式计算TG的清除率, TG清除率 = $(\text{模型组TG含量} - \text{给药组TG含量}) / \text{模型组TG含量} \times 100\%$ 。

2.6 细胞内脂滴形态

取“2.5”项下各组细胞加药24 h,弃去培养液,用PBS洗2次,加10%多聚甲醛固定30 min;除去甲醛溶液, PBS洗2次;每孔加入0.5 ml油红O工作液(油红O溶于异丙醇配成0.5%油红O贮备液,以6:4的比例将贮备液与蒸馏水混匀后过滤2次,至液体澄清为止,即得油红O工作液)染色45 min;除去油红O工作液,用适量的60%的异丙醇快速冲洗,晾干;倒置显微镜下观察细胞内脂滴形态。

2.7 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 t 检验法,组间比较采用ANOVA-One Way检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞存活率变化

与正常对照组比较,250、500、1 000 μg/ml AZ作用后细胞存活率降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),其余各组比较差异无统计学意义,表明15.63~125 μg/ml的AZ对细胞存活率基本无影响。因此本试验选择AZ溶液的质量浓度为125、62.5、31.25、15.63 μg/ml。各组细胞的存活率测定结果见表1。

表1 各组细胞的存活率测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Determination results of the survival rates of all groups of cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度, μg/ml	细胞存活率, %
正常对照组		100.00 ± 0.00
模型组		99.12 ± 3.29
AZ组	15.63	103.56 ± 2.25
	31.25	103.14 ± 2.67
	62.5	104.38 ± 3.29
	125	95.35 ± 3.46
	250	81.02 ± 1.07*
	500	70.54 ± 2.91*
	1 000	45.50 ± 2.37*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$

3.2 细胞TG含量变化

与正常对照组比较,模型组细胞TG含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照组和62.5、125

μg/ml AZ组细胞TG含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组细胞中TG含量及其清除率结果见表2。

表2 各组细胞中TG含量及其清除率结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 The contents and clearance rates of TG in all groups of cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度, μg/ml	TG含量, mg/10 ⁶ 个细胞	TG清除率, %
正常对照组		1.633 ± 0.132	
模型组		6.328 ± 0.154*	
阳性对照组	100	4.517 ± 0.046 ^{##}	28.58 ± 0.15
AZ组	15.63	6.226 ± 0.089	3.04 ± 0.47
	31.25	6.112 ± 0.071	3.36 ± 0.18
	62.5	5.395 ± 0.043 [#]	14.51 ± 0.09
	125	4.398 ± 0.057 ^{##}	29.72 ± 0.16

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$, vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.3 细胞内脂滴形态

与正常对照组比较,模型组细胞形态明显发生变化,细胞出现大量的脂滴,且细胞变圆,并出现相互融合现象。AZ组细胞随着AZ质量浓度的增加,细胞红色脂滴出现减少的趋势,且脂滴变小,125 μg/ml AZ组细胞与阳性对照组细胞脂滴形态相近。试验结果表明,125 μg/ml的AZ溶液能有效减少HepG2细胞内脂滴数量。各组细胞的油红O染色图见图1。

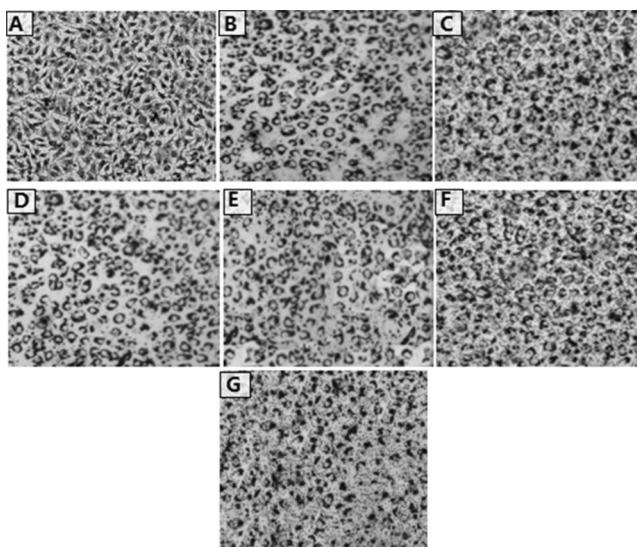


图1 各组细胞的油红O染色图(×20)

A. 正常对照组; B. 模型组; C. 阳性对照组; D. 15.63 μg/ml AZ组; E. 31.25 μg/ml AZ组; F. 62.5 μg/ml AZ组; G. 125 μg/ml AZ组

Fig 1 Oil red O stain of all groups of cells(×20)

A. normal control group; B. model group; C. positive control group; D. group of 15.63 μg/ml AZ; E. group of 31.25 μg/ml AZ; F. group of 62.5 μg/ml AZ; G. group of 125 μg/ml AZ

4 讨论

脂肪肝是指由于各种病因引起的肝细胞内脂肪堆积过多的病变。脂肪性肝病正严重威胁人类的健康,成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病。其特点是肝细胞发生显著脂肪变性,可导致肝脏实质损伤、肝细胞坏死、炎症并且继发肝纤维化、肝硬化^[10]。

本文通过油酸诱导HepG2细胞建立模型,在细胞水平上研究AZ对肝细胞脂肪积累的干预作用。通过前期试验可知,1.0×10⁻³ mol/L以下油酸对HepG2细胞存活率没有显著影响,且1.0×10⁻³ mol/L油酸可使HepG2细胞中TG含量达到较高水平,故本试验以1.0×10⁻³ mol/L油酸复制模型。

通过MTT法测定HepG2细胞存活率的结果可知,从AZ质量浓度达到250 μg/ml开始出现了细胞毒性,细胞存活率下降,AZ溶液越高对HepG2细胞的毒性越明显,而AZ的质量浓度在15.63~125 μg/ml范围内对HepG2细胞没有毒性。通过用TG试剂盒检测HepG2细胞内TG含量结果表明,15.63、31.25 μg/ml AZ溶液对HepG2细胞内TG含量没有明显影响,62.5 μg/ml AZ溶液对其具有清除作用,而125 μg/ml AZ溶液对HepG2细胞内TG的清除率达到(29.72 ± 0.16)%,比阳性对照组的效果更好。通过倒置显微镜观察油红O染色的HepG2细胞发现,15.63、31.25 μg/ml AZ溶液对HepG2细胞脂滴堆积的抑制作用不明显,125 μg/ml AZ溶液对HepG2细胞内的脂滴堆积有较强的抑制作用。

综上所述,AZ溶液在体外试验中显示出良好的降低脂肪积累的能力,可进一步进行体内实验以研究其在脂肪肝防治方面是否具有药用价值。

参考文献

- [1] 范建高.代谢综合征与脂肪肝[J].国外医学内分泌学分册,2002,22(5):273.
- [2] 谢芳英.游离脂肪酸对胰岛微血管内皮细胞的脂毒性及非诺贝特的保护作用[D].广州:南方医科大学,2009.
- [3] Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-α expression via a lysosomal pathway[J]. *Hepatology*, 2004,40(1):185.
- [4] Chen XB, Xu J, Zhao P, et al. Lipid lowering activity of (E)-3-[4-[2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoyloxy]-3-methoxyphenyl] acrylic acid (AZ) in hyperlipidemic rats [EB/OL]. [2014-10-11].<http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.ieee-000005966150>.
- [5] 汪风华,许军,唐祯,等.氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯代谢物在大鼠体内的药动学[J].中国医院药学杂志,2012,32(11):844.
- [6] 赵坡,许军,陈小兵,等.对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯的小鼠急性毒性和大鼠长期毒性[J].中国药理学与毒理学杂志,2011,25(4):391.
- [7] 唐祯,许军,徐彭,等.阿魏酸结构改造新化合物对大鼠高脂血症的影响及机制[J].时珍国医国药,2013,24(6):1369.
- [8] 魏颖,谷瑞增,林峰,等.刺玫果提取物缓解油酸诱导的HepG2细胞脂肪堆积作用[J].食品科技,2013(7):230.
- [9] 章斌,刘艳,张春风,等.漏芦对油酸诱导HepG2细胞脂肪积累的干预作用[J].亚太传统医药,2013,9(5):10.
- [10] 梁玉刚.苦参素的药理作用研究进展[J].中国药房,2005,16(6):465.

(收稿日期:2014-10-11 修回日期:2015-01-25)

(编辑:邹丽娟)