

# 薯蓣皂苷元对人肝L-02细胞胆固醇代谢及Caveolin-1表达的影响

匡双玉<sup>1,2\*</sup>, 李熠<sup>3</sup>, 匡稳定<sup>2</sup>(1.湖南中医药大学药学院,长沙 410007;2.南华大学附属第二医院,湖南衡阳 421001;3.南华大学医学院,湖南衡阳 421001)

中图分类号 R97;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)35-3286-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.07

**摘要** 目的:研究薯蓣皂苷元对人肝L-02细胞胆固醇代谢的影响,并初步探讨胆固醇转运蛋白(Caveolin-1)在其中的表达变化。方法:正常人肝L-02细胞与50%胎牛血清共同孵育24 h,以复制脂变肝细胞模型。不同质量浓度薯蓣皂苷元(0、20、40、80 μmol/L)作用于细胞24 h与40 μmol/L薯蓣皂苷元作用于细胞不同时间(0、6、12、24、48 h),油红O染色观察细胞内脂滴情况,高效液相色谱法检测细胞内总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)、胆固醇酯(CE)的含量,Western blot法检测Caveolin-1蛋白的表达。结果:0、20、40、80 μmol/L浓度下,薯蓣皂苷元可减少脂变人肝L-02细胞内TC、FC、CE含量,同时Caveolin-1蛋白表达上调,并呈现一定的剂量依赖性;在0、6、12、24、48 h时间点下,40 μmol/L薯蓣皂苷元可减少脂变人肝L-02细胞内TC、FC、CE含量,同时Caveolin-1蛋白表达上调,并呈现一定的时间依赖性。油红O染色,可见薯蓣皂苷元作用下,脂变人肝L-02细胞内脂滴减少。结论:薯蓣皂苷元能降低脂变人肝L-02细胞胆固醇含量,同时上调Caveolin-1表达。

**关键词** 薯蓣皂苷元;肝细胞;胆固醇;胆固醇转运蛋白

## Effects of Diosgenin on Cholesterol Metabolism and Caveolin-1 Expression in Human Hepatocyte L-02

KUANG Shuang-yu<sup>1,2</sup>, LI Yi<sup>3</sup>, KUANG Wen-ding<sup>2</sup>(1.College of Pharmacy, Hunan University of TCM, Changsha 410007, China; 2. The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hunan Hengyang 421001, China; 3. Medical College, University of South China, Hunan Hengyang 421001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of diosgenin on cholesterol metabolism in human hepatocyte L-02, and to investigate the expression of caveolin-1. METHODS: Human hepatocyte L-02 was incubated with 50% fetal bovine serum for 24 h to induce fatty degeneration model of hepatic cells. After exposed to different concentrations of diosgenin (0, 20, 40, 80 μmol/L) for 24 h and diosgenin 40 μmol/L for 0, 6, 12, 24 and 48 h, lipid the lipid droplet of hepatocyte L-02 was observed by oil red O staining. The contents of TC, FC and CE were determined by HPLC, and the protein expression of caveolin-1 was detected by Western blot assay. RESULTS: Different concentrations of diosgenin (0, 20, 40, 80 μmol/L) could inhibit the decrease of TC, FC and CE in human hepatocyte L-02; the expression of caveolin-1 was up-regulated in dose-dependent manner. Diosgenin 40 μmol/L could inhibit the decrease of TC, FC and CE in human hepatocyte L-02 at 0, 6, 12, 24 and 48 h; the expression of caveolin-1 was up-regulated in time-dependant manner. Results of oil red O stain showed that the lipid droplet of hepatocyte L-02 was decreased after exposed to diosgenin. CONCLUSIONS: Diosgenin can decrease the level of cholesterol in human hepatocyte L-02 and up-regulate the expression of caveolin-1.

**KEY WORDS** Diosgenin; Hepatocyte; Cholesterol; Caveolin-1

薯蓣皂苷元是一种重要的甾体皂苷元,广泛存在于薯蓣科、百合科、蔷薇科、石竹科等多种植物中,是多种中(成)药的有效成分之一,也是合成甾体激素类药物的重要原料,并具有抗肿瘤<sup>[1-2]</sup>、抗心血管系统疾病<sup>[3-4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>等药理活性。文献报道,薯蓣皂苷元能降低高脂喂食大鼠血浆胆固醇水平<sup>[7]</sup>,减少肠道胆固醇吸收<sup>[8]</sup>,但对肝脏胆固醇合成与转运的作用鲜有报道。本研究拟在脂变人肝L-02细胞模型上观察薯蓣皂苷元对胆固醇代谢的影响,同时探讨在此过程中与胆固醇转运蛋白(Caveolin-1)的表达的变化情况。

## 1 材料

### 1.1 仪器

CO<sub>2</sub>培养箱(美国Shill公司);Elx-800型酶联免疫检测仪

\* 主管药师,博士研究生。研究方向:中药质量与中药药理学。  
E-mail:kuangshuangyu@yahoo.com.cn

(美国Bio-Tek公司);垂直电泳仪及转膜系统(美国Bio Rad公司);LC-2010型高效液相色谱仪(日本岛津公司);CX31型显显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.2 药品与试剂

薯蓣皂苷元、胰蛋白酶(美国Sigma公司);小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);DMEM培养基(美国Gibco公司);BCA蛋白定量试剂(美国Hyclone公司);Caveolin-1一抗(美国Santa Cruz公司);其余试剂均为分析纯。

### 1.3 细胞

人肝L-02细胞购自武汉大学典型物保藏中心。

## 2 方法

### 2.1 人肝L-02细胞培养

人肝L-02细胞在10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基中,置于37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的孵箱内培养。用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液调细胞密度至1×10<sup>5</sup> ml<sup>-1</sup>,

24 h后换入含0.1%胎牛血清的RPMI-1640培养液中,使细胞静止24 h后,作相应处理。

## 2.2 脂变细胞模型的复制

人肝L-02细胞达 $1 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ 时用完全培养基重新悬浮,并以1:3(V/V)的比例传代,取对数生长期细胞,更换新鲜培养液后,按参考文献<sup>[9]</sup>在培养液中加入50%胎牛血清,继续培养24 h至出现细胞内脂滴或泡沫样物沉积,即制成脂变人肝L-02细胞模型。将所得细胞改置于含0.1%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,使其静止24 h后,再作相应的处理。

## 2.3 油红O染色<sup>[10]</sup>

将细胞培养于预先放有无菌盖玻片的6孔培养板上,处理结束后,用PBS冲洗盖玻片3次,每次5 min,50%异丙醇固定1 min,油红O染色液染色10 min,蒸馏水冲洗3次,每次1 min,苏木素染色5 min,分色和返蓝后,水性封片剂封片。显微镜下观察,细胞内脂质呈红色,细胞核呈蓝色,HPIAS-1000型图像分析系统收集图像。试验分为3组,即阴性对照(正常人肝L-02细胞)组、模型(脂变人肝L-02细胞)组、薯蓣皂苷元(40  $\mu\text{mol/L}$ )组。

## 2.4 细胞内胆固醇的检测

待细胞处理结束后,弃去培养基,PBS洗3遍,加入0.1 mol/L NaOH 500  $\mu\text{l}$ ,反复冻融3次裂解细胞,BCA试剂定量蛋白后,7.2%三氯乙酸沉淀蛋白,离心半径8 cm 800 r/min离心10 min,留上清液进行胆固醇检测。以豆甾醇为内标并作标准曲线,取100  $\mu\text{l}$ 上清液,加入8.9 mol/L KOH溶液200  $\mu\text{l}$ ,水解胆固醇酯(CE)后为细胞内总胆固醇(TC)样品,加1 mol/L NaOH 200  $\mu\text{l}$ 为游离胆固醇(FC)样品。各样品分别与内标液混匀,用正己烷和无水乙醇抽提后,1.5 mol/L的三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥,100  $\mu\text{l}$ 乙腈-异丙醇(80:20,V/V)溶解样品,上样于高效液相色谱仪。采用 $\text{C}_{18}$ 柱,柱温4  $^{\circ}\text{C}$ ,流速1 ml/min,250 nm波长处紫外光检测,胆固醇以峰面积定量,内标校准,以 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 细胞蛋白为单位。细胞内CE含量为TC与FC的差值,检测细胞内TC、FC、CE的含量。以不同浓度薯蓣皂苷元(0、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ )作用于细胞24 h(即为模型与薯蓣皂苷元低、中、高浓度组)以及40  $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷元作用于细胞0、6、12、24、48 h(即为模型与薯蓣皂苷元①、②、③、④组),同时设正常人肝L-02细胞为阴性对照组,普罗布考(40  $\mu\text{mol/L}$ )作用于模型细胞24 h为阳性对照组。

## 2.5 Western blot法检测Caveolin-1蛋白的表达

收集不同条件处理的人肝L-02细胞,三去污裂解液裂解细胞,离心半径8 cm 5 000 r/min离心15 min去除沉淀,BCA试剂测定蛋白含量,上样缓冲液调各组蛋白浓度达一致,经10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,电泳2 h(积层胶80 V,分离胶120 V)后电转移(4  $^{\circ}\text{C}$ ,100 mA,3 h)至PDVF膜上,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白分子量标准的位置。用含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h,按1:1 000(V/V)加入兔抗鼠Caveolin-1一抗,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,TBST洗3次,1:2 000(V/V)加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育0.5 h,TBST洗3次后,用Western blot荧光检测试剂盒显影、定影,结果以图像分析仪分析。

## 2.6 统计学方法

实验用SPSS 11.0软件作统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 薯蓣皂苷元对脂变人肝L-02细胞胆固醇代谢的影响

与阴性对照组比较,模型组人肝L-02细胞TC、FC、CE含量显著增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,薯蓣皂苷元高、中、低浓

度组或薯蓣皂苷元①、②、③、④组人肝L-02细胞TC、FC、CE含量显著减少( $P < 0.05$ )。薯蓣皂苷元对脂变人肝L-02细胞胆固醇代谢影响的浓度-效应与时间-效应变化见表1、表2。

表1 薯蓣皂苷元对脂变人肝L-02细胞胆固醇代谢影响的剂量-效应变化( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 The dose-depending effects of cholesterol metabolism in human hepatocyte L-02 by diosgenin ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	TC,g/g	FC,g/g	CE,g/g
阴性对照组	2.37±0.25	1.93±0.18	0.44±0.09
模型组	4.68±0.37*	2.43±0.15*	2.25±0.12*
薯蓣皂苷元低浓度组	3.85±0.35*	2.31±0.27*	1.54±0.16*
薯蓣皂苷元中浓度组	3.15±0.33*	2.27±0.27*	0.88±0.09*
薯蓣皂苷元高浓度组	3.02±0.28*	2.24±0.47*	0.78±0.11*
普罗布考组	2.86±0.24*	2.14±0.21*	0.72±0.08*

与阴性对照组比较: \* $P < 0.05$ ;与模型组比较: \* $P < 0.05$

vs.negative control group: \* $P < 0.05$ ;vs.model group: \* $P < 0.05$

表2 薯蓣皂苷元对脂变人肝L-02细胞胆固醇代谢影响的时间-效应变化( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 The time-depending effects of cholesterol metabolism in human hepatocyte L-02 by diosgenin ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	TC,g/g	FC,g/g	CE,g/g
阴性对照组	2.37±0.25	1.93±0.18	0.44±0.09
模型组	4.68±0.37*	2.43±0.15*	2.25±0.12*
薯蓣皂苷元①组	4.24±0.48*	2.42±0.28*	1.82±0.21*
薯蓣皂苷元②组	3.92±0.38*	2.37±0.26*	1.55±0.18*
薯蓣皂苷元③组	3.15±0.33*	2.27±0.27*	0.88±0.09*
薯蓣皂苷元④组	3.12±0.17*	2.28±0.32*	0.84±0.07*
普罗布考组	2.86±0.24*	2.14±0.21*	0.72±0.08*

与阴性对照组比较: \* $P < 0.05$ ;与模型组比较: \* $P < 0.05$

vs.negative control group: \* $P < 0.05$ ;vs.model group: \* $P < 0.05$

### 3.2 薯蓣皂苷元对脂变人肝L-02细胞Caveolin-1的影响

与阴性对照组比较,模型组人肝L-02细胞Caveolin-1蛋白表达显著减弱( $P < 0.05$ );与模型组比较,薯蓣皂苷元高、中、低浓度组或薯蓣皂苷元①、②、③、④组Caveolin-1蛋白表达显著增强( $P < 0.05$ )。薯蓣皂苷元对脂变人肝L-02细胞Caveolin-1蛋白表达的浓度-效应与时间-效应变化见图1、图2。

### 3.3 薯蓣皂苷元对脂变肝细胞内脂滴含量的影响

阴性对照组细胞核蓝染,胞浆内可见少量脂滴;模型组细胞胞浆内有大量脂滴存在;薯蓣皂苷元组脂变肝细胞内脂滴含量明显变少。人肝L-02细胞内脂滴含量油红O染色见图3。

## 4 讨论

胆固醇在肝细胞内的异常沉积与胆固醇的代谢异常有关。胆固醇的代谢包括胆固醇合成、转化与分泌。肝脏是人体胆固醇合成的重要器官,血浆内胆固醇约60%~80%来自肝脏。

肝细胞内合成的胆固醇,可部分羟化转变为胆汁酸,也可向肝细胞外进行转运,如向胆管分泌。Smart实验室发现,膜转运蛋白Caveolin可与热休克蛋白56(HSP56)、Cyclophilin 40、Cyclophilin A形成胆固醇转运复合物,参与细胞内胆固醇外向转运<sup>[10]</sup>。

如何减少肝细胞胆固醇的合成,增加其外向转运,一直以来是人们思索的问题<sup>[11]</sup>。Son IS等<sup>[7]</sup>通过研究薯蓣皂苷元对高胆固醇喂食大鼠的抗氧化和降血脂作用,结果表明,薯蓣皂苷元能通过改善脂质成分和调节氧化应激改善高胆固醇血症。另外,Temel RE等<sup>[8]</sup>研究表明,薯蓣皂苷元可通过刺激胆

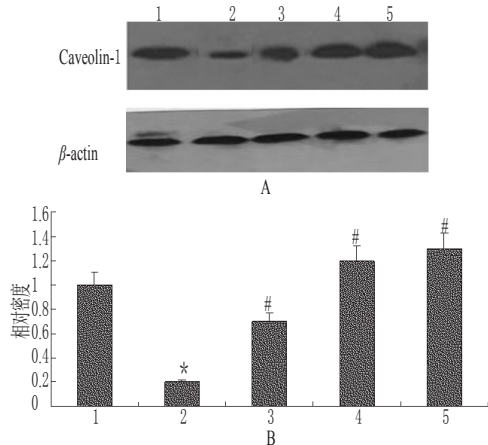


图1 薯蓣皂苷元对脂变人肝L-02细胞Caveolin-1表达影响的剂量-效应变化( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A.蛋白的表达;B.统计数据;1.正常对照组;2.模型组;3.薯蓣皂苷元低浓度组;4.薯蓣皂苷元中浓度组;5.薯蓣皂苷元高浓度组  
与阴性对照组比较: \* $P<0.05$ ;与模型组比较: # $P<0.05$

Fig 1 The dose-depending effects of the expression of caveolin-1 in human hepatocyte L-02 by diosgenin( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A.expression of protein;B.statistical data;1.normal control group;2.model group;3.diosgenin low-concentration group;4. diosgenin medium-concentration group;5.diosgenin high-concentration group  
vs.negative control group: \* $P<0.05$ ;vs.model group: # $P<0.05$

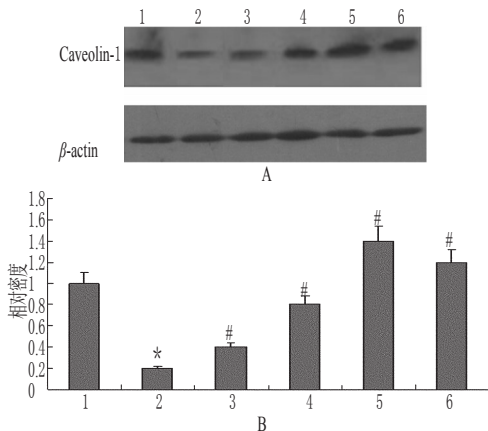


图2 薯蓣皂苷元对脂变人肝L-02细胞Caveolin-1表达影响的时间-效应变化( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A.蛋白的表达;B.统计数据;1.正常对照组;2.模型组;3.薯蓣皂苷元①组;4.薯蓣皂苷元②组;5.薯蓣皂苷元③组;6.薯蓣皂苷元④组  
与阴性对照组比较: \* $P<0.05$ ;与模型组比较: # $P<0.05$

Fig 2 The time-depending effects of the expression of caveolin-1 in human hepatocyte L-02 by diosgenin( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A.expression of protein;B. statistical data;1.normal control group;2.model group;3.diosgenin ① group;4. diosgenin ② group; 5.diosgenin ③ group;6.diosgenin ④ group  
vs.negative control group: \* $P<0.05$ ;vs.model group: # $P<0.05$

汁胆固醇的分泌和减少肠道胆固醇吸收来促进粪便中胆固醇的排泄。笔者推测,薯蓣皂苷也可能影响肝细胞胆固醇代谢。

本研究在离体肝细胞株上应用高脂血清诱导脂肪变性,应用薯蓣皂苷元作用于脂变人肝L-02细胞模型,结果表明,薯蓣皂苷元能降低细胞内胆固醇水平,并能使与胆固醇转运密切相关的Caveolin-1蛋白表达上调,从细胞角度为进一步探讨

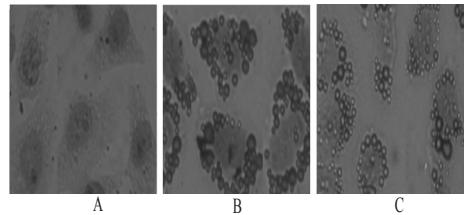


图3 人肝L-02细胞内脂滴含量油红O染色图

Fig 3 Red O staining results of lipid droplet of human hepatocyte L-02 cells

A.阴性对照组;B.模型组;C.薯蓣皂苷元低浓度组

A. negative control group ; B.model group; C. diosgenin low-concentration group

薯蓣皂苷元防治脂肪肝的临床应用提供了一定的理论基础。

### 参考文献

- [ 1 ] Cailleteau C, Liagre B, Beneytout JL. A proteomic approach to the identification of molecular targets in subsequent apoptosis of HEL cells after diosgenin induced megakaryocytic differentiation[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(4):785.
- [ 2 ] Srinivasan S, Koduru S, Kumar R, et al. Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(4):961.
- [ 3 ] Dias KL, Correia Nde A, Pereira KK, et al. Mechanisms involved in the vaso dilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric artery[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 574(2/3):172.
- [ 4 ] Jayachandran KS, Vasanthi HR, Rajamanickam GV. Antiliperox idative and membrane stabilizing effect of diosgenin, in experimentally induced myocardial infarction [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 327(1/2):203.
- [ 5 ] Huang CH, Ku CY, Jan TR. Diosgenin attenuates allergen-induced intestinal inflammation and IgE production in a murine model of food allergy[J]. *Planta Med*, 2009, 75(12):1300.
- [ 6 ] Magdalena KB, Merce UL, Mitka M, et al. Invitro effect of diosgenin, isolated from asparagus officinalis, in a dopamine model of oxidative stress in isolated rat synaptosomes[J]. *Toxicol Lett*, 2007, 172(1):S19.
- [ 7 ] Son IS, Kim JH, Sohn HY, et al. Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (dioscorea spp) on high-cholesterol fed rats[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(12):3063.
- [ 8 ] Temel RE, Brown JM, Ma Y, et al. Diosgenin stimulation of fecal cholesterol excretion in mice is not NPC1L1 dependent[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(5):915.
- [ 9 ] 范建高,曾明德.脂肪性肝病[M].北京:人民卫生出版社, 2005:204.
- [ 10 ] Annette Uittenbogaard and Eric J. Smart, Palmitoylation of Caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to Caveolae[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(33), 25595.
- [ 11 ] 毛贵元,蔡光明.脂肪肝的治疗及研究进展[J].中国药房, 2011, 22(22):2089.

(收稿日期:2012-09-07 修回日期:2012-12-06)