

# 桑根酮C对游离脂肪酸诱导人肝癌HepG2细胞脂质蓄积的改善作用

邢菊玲<sup>1\*</sup>, 刘芬<sup>1</sup>, 冯萌<sup>1</sup>, 郝梦娇<sup>2</sup>, 黄天来<sup>1</sup>, 周欣欣<sup>1</sup>, 汤湘江<sup>3#</sup>(1.广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2.中山大学药学院, 广州 510275; 3.广东省中医院/广州中医药大学第二附属医院大学城医院神经内科, 广州 510006)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)15-1868-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.15.13



**摘要** 目的:研究桑根酮C对游离脂肪酸诱导的人肝癌HepG2细胞脂质蓄积的改善作用。方法:将HepG2细胞分为对照组、模型组、非诺贝特组(10 μmol/L)和桑根酮C低、中、高浓度组(2、4、8 μmol/L),除对照组外,其余各组细胞加入1 mmol/L游离脂肪酸以诱导建立脂质蓄积模型,且各给药组加入相应含药培养基进行培养。采用油红O染色法观察细胞中脂质蓄积情况,并测定脂质水平和三酰甘油(TG)含量;采用实时荧光定量聚合酶链式反应法和Western blot法检测细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体α(PPARα)、肉碱棕榈酰转移酶1(CPT-1)、成脂甾醇元件结合蛋白固醇调节元件结合蛋白1c(SREBP-1c)、脂肪酸合成酶(FAS)、沉默信息调节因子1(SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅助激活物1α(PGC-1α)的mRNA和蛋白表达水平。结果:与对照组比较,模型组细胞核明显萎缩、体积变小,脂滴数明显增加;细胞中脂质水平、TG含量以及SREBP-1c、FAS的mRNA和蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),PPARα、CPT-1、SIRT1、PGC-1α的mRNA和蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,桑根酮C各浓度组细胞核萎缩不明显、体积大小正常,脂滴数明显减少;细胞中脂质水平、TG含量以及上述PPARα通路相关基因的mRNA和蛋白(桑根酮C低浓度组的SREBP-1c蛋白除外)表达水平均显著逆转( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:桑根酮C可改善HepG2细胞的脂质蓄积;其作用机制可能与调节PPARα信号通路、提高细胞脂质氧化能力、抑制脂质合成有关。

**关键词** 桑根酮C; HepG2细胞; 脂质蓄积; PPARα信号通路

## Improvement Effects of Sanggenone C on Lipid Accumulation in FFA-induced Human Liver Cancer HepG2 Cells

XING Juling<sup>1</sup>, LIU Fen<sup>1</sup>, FENG Meng<sup>1</sup>, HAO Mengjiao<sup>2</sup>, HUANG Tianlai<sup>1</sup>, ZHOU Xinxin<sup>1</sup>, TANG Xiangjiang<sup>3</sup>  
(1. School of TCM, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 2. School of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 3. Dept. of Neurology, Guangdong Provincial Hospital of TCM/University Town Hospital, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the improvement effects of sanggenone C on lipid accumulation in human liver cancer HepG2 cells induced by free fatty acid (FFA). **METHODS:** HepG2 cells were divided into control group, model group, fenofibrate group (10 μmol/L), sangerone C low, medium and high concentration groups (2, 4, 8 μmol/L). Except for control group, other groups were treated with 1 mmol/L FFA to induce lipid accumulation model, and administration groups were cultured with relevant medium containing drugs. The lipid accumulation was observed by oil red O staining, and lipid level and triglyceride (TG) content were also determined. Real-time PCR and Western blot assay were adopted to detect the mRNA and protein expression of PPARα, CPT-1, SREBP-1c, FAS, SIRT1 and PGC-1α in HepG2 cells. **RESULTS:** Compared with control group, the nucleus was atrophied significantly and the volume became smaller, and the number of lipid droplets was significantly increased; the level of lipid, TG content, mRNA and protein expression of SREBP-1c and FAS were significantly increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), mRNA and protein expression of PPARα, CPT-1, SIRT1 and PGC-1α were decreased significantly ( $P<0.01$ ). Compared with model group, no obvious nucleus atrophy and normal volume were observed in sangerone C groups, and the number of lipid droplets was significantly reduced; the levels of lipid, TG content, mRNA and protein expression of PPARα pathway related genes (except for SREBP-1c protein in saggerone C low concentration group) were significantly reversed ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS:** Sanggenone C can significantly improve the lipid accumulation of HepG2 cells, and its

mechanism may associated with regulating PPARα signaling pathway, improving cell lipid oxidation ability and inhibiting lipid synthesis.

**KEYWORDS** Sanggenone C; HepG2 cells; Lipid accumulation; PPARα signaling pathway

\* 硕士研究生。研究方向: 中药内分泌药理学。E-mail: 15562591483@163.com

# 通信作者: 副教授, 硕士生导师。研究方向: 中药新药与开发。E-mail: yanchengys@163.com

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种以外周脂肪分解增加、游离脂肪酸摄取增多、线粒体 $\beta$ -氧化减少和脂质在肝脏蓄积为主要特征的肝脏病变<sup>[1]</sup>。多项研究表明,NAFLD与胰岛素抵抗、肥胖、高脂血症、2型糖尿病和血脂异常等代谢性疾病等相关<sup>[2-3]</sup>,是诸多疾病的主要诱因。在我国,成年人的NAFLD患病率高达15%~30%,已取代乙型病毒性肝炎成为第一大慢性肝病<sup>[4]</sup>。目前,治疗NAFLD的药物主要包括抗氧化剂、他汀类药物、调脂类药物等<sup>[5]</sup>,但他汀类药物会导致肌肉毒性、肝毒性和糖尿病等不良反应<sup>[6]</sup>。现代研究表明,中药治疗NAFLD的疗效较好、毒副作用小,且中药中所含的黄酮类、苷类和生物碱类等成分可通过抗氧化、抗炎、抗纤维化、改善肝脏脂肪变性等多种途径来预防和治疗NAFLD<sup>[7]</sup>。

桑白皮是桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮,具有抗炎、抗癌、抗肿瘤、抗病毒、降血压、降血糖、降血脂、镇咳平喘和利尿等作用<sup>[8-9]</sup>,是治疗前列腺癌、高血压、高血脂和糖尿病等疾病的常用中药<sup>[10-11]</sup>。其中,桑根酮C(Sanggenone C)是桑白皮中的黄酮类有效成分之一,其化学结构明确(见图1),是桑白皮药材的质量控制指标<sup>[12]</sup>。

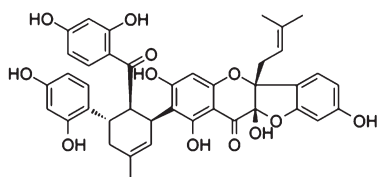


图1 桑根酮C的化学结构式

Fig 1 Chemical structural formula of sanggenone C

过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )信号通路在NAFLD的发病过程中具有重要的调节作用,能有效控制脂肪酸转运与氧化、脂质合成和分解等代谢过程,维持机体脂质代谢平衡<sup>[13]</sup>。PPAR $\alpha$ 表达上调会促进肉碱棕榈酰转移酶1(CPT-1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 辅助激活物1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )等的表达;其中,CPT-1位于线粒体外膜上,是长链脂肪酸氧化的关键调节酶和限速酶,其水平降低会直接加剧细胞内脂质堆积;PGC-1 $\alpha$ 能与PPAR $\alpha$ 协同作用,促进线粒体脂肪酸氧化、增加机体能量消耗,最终达到降脂的效果<sup>[14]</sup>。此外,在脂质合成过程中,PPAR $\alpha$ 还能促进成脂甾醇元件结合蛋白固醇调节元件结合蛋白1c(SREBP-1c)的转录过程,从而抑制脂肪酸合成基因脂肪酸合成酶(FAS)的表达,进而抑制肝脏中三酰甘油(TG)和脂肪酸的合成<sup>[15]</sup>。沉默信息调节因子1(SIRT1)在NAFLD的脂质代谢过程中发挥着至关重要的作用,其可激活PGC-1 $\alpha$ 的去乙酰化,从而间

接诱导脂肪酸的 $\beta$ -氧化,进而降低肝脏中TG水平<sup>[16]</sup>。目前,桑根酮C是否可通过PPAR $\alpha$ 信号通路发挥治疗NAFLD的作用,尚不明确。

基于此,本课题组选择常用于研究NAFLD的人肝癌HepG2细胞<sup>[17]</sup>,并以游离脂肪酸诱导其发生脂质蓄积,进而探讨桑根酮C调节脂质代谢的作用及可能机制,以期桑根酮C治疗NAFLD提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有MEGAFMGE2.0R型低温高速离心机(德国Hermle公司),TissueLyser LT型中低通量组织研磨器(德国Qiagen公司),VCX750型超声波细胞破碎仪(美国SONICS公司),164-5056型蛋白电泳仪及转膜仪、SmartSpec™ Plus型核酸蛋白测定仪、CFX96™型实时荧光聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国Bio-Rad公司),BX53型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司),RT-2100C型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Tanon 2500R型全自动化学发光成像仪(上海天能生命科学有限公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂有桑根酮C(成都克洛玛生物科技有限公司,批号CHB190106,纯度98%),非诺贝特(美国APEX BIO公司,批号B1943,纯度98%),油酸、棕榈酸(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为S30037、S30008),牛血清白蛋白(BSA,广州威佳科技有限公司,批号0219989625),油红O染色试剂盒、MTT试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1262、M8180),DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为1972985、1803122),TG试剂盒(南京建成生物科技有限公司,批号A110-1-1),TRIzol总RNA提取试剂、BCA蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为CW0580、10243、CW2333S),逆转录试剂盒、SYBR® Green Premix实时荧光定量扩增试剂盒(艾科瑞生物有限公司,批号分别为AG11701、AG11711),兔源PPAR $\alpha$ 单克隆抗体、兔源CPT-1单克隆抗体、兔源SREBP-1c单克隆抗体、兔源FAS单克隆抗体、兔源SIRT1单克隆抗体、兔源PGC-1 $\alpha$ 单克隆抗体、兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Affinity Biosciences公司,批号分别为AF5301、DF12004、AF6283、AF5342、DF6033、AF5395、AF7021、S0001),ECL化学发光试剂(美国Millipore公司,批号1808501);PCR引物由生工生物工

程(上海)股份有限公司合成(序列和产物长度信息见表1);其余试剂为实验室常用规格,水为纯净水。

表1 PCR引物序列和产物长度

Tab 1 Primer sequence and product length of PCR

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度, bp
PPAR $\alpha$	上游: TGGTGAGCATTTGGTTTC	141
	下游: TGCCTGATTTCCTCCC	
CPT-1	上游: GAGCACGGCAAGATGAG	100
	下游: GCAGCGATGTCTGGAAG	
SIRT1	上游: CCATACCCCATGAAGTGC	57
	下游: GCAGATGAGGCAAAGGTT	
PGC-1 $\alpha$	上游: CAGTAAATCTCGGGGATGA	150
	下游: AAAATTGCTTGGCTCCAC	
SREBP-1c	上游: CAAGTGGTGGGCTCTCT	132
	下游: CTGGGCAGGGTCTCTC	
FAS	上游: CGAGCTGCACCATCATCC	115
	下游: AAGGCATTGGGGTTGGC	
GAPDH	上游: CCTCCGTGTCCTCCACT	100
	下游: GCCTGCTTCACCACTTC	

### 1.3 细胞株

本研究所用肝癌HepG2细胞株,受赠于广州中医药大学中药学院药剂课题组。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将HepG2细胞复苏后,以含10%FBS和1%青链霉素的DMEM培养基(以下简称“完全培养基”)于37℃、5%CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养。待细胞融合度达80%~90%时,以胰酶消化传代,进行后续实验。

### 2.2 细胞存活率的检测

取对数生长期的细胞,按 $1.5 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板中,然后分为桑根酮C不同浓度组(2、4、8、16、32  $\mu\text{mol/L}$ ,浓度根据预实验结果设置),加入含相应药物的完全培养基。另设不加药物只加细胞的对照组、不加细胞和药物的调零孔,每组设6个复孔;培养24 h后,每孔加入MTT试剂20  $\mu\text{L}$ ,孵育4 h,弃去上清液;每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150  $\mu\text{L}$ ,振摇15 min,采用酶标仪于490 nm波长下检测各孔的吸光度(A),计算细胞存活率[细胞存活率=( $A_{\text{实验组}} - A_{\text{调零孔}}$ )/( $A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零孔}}$ ) $\times 100\%$ ]。

### 2.3 细胞分组、造模与给药

取对数生长期细胞,按 $2 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,然后分为对照组、模型组、非诺贝特组(10  $\mu\text{mol/L}$ ,浓度参考文献[18]设置)和桑根酮C低、中、高浓度组(2、4、8  $\mu\text{mol/L}$ ,浓度根据预实验结果设置)。参照文献[19]方法,对照组加入含1%BSA的完全培养基,模型组加入含1 mmol/L游离脂肪酸(将适量油酸和棕榈酸以含1%BSA的完全培养基溶解配制而成,以诱导脂质蓄积模

型)的完全培养基,给药组加入含相应药物和1 mmol/L游离脂肪酸的完全培养基,然后培养24 h。

### 2.4 细胞中脂质蓄积情况观察和脂质水平测定

取对数生长期的细胞,按 $2 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,按“2.3”项下方法分组、造模与给药,每组设3个复孔。细胞培养结束后,以PBS洗涤2~3次,加入固定液固定20~30 min;弃去固定液,水洗后加入60%异丙醇浸染5 min;弃去异丙醇,加入油红O染色液(临用时配制)浸染10~20 min;弃去染色液,水洗直至无多余染色液,再加入苏木素染色液复染1~2 min;弃去苏木素染色液,水洗,取部分于显微镜下观察细胞中脂质蓄积情况,并拍照记录。观察结束后,每孔加入异丙醇200  $\mu\text{L}$ ,振摇15 min以充分洗脱;将洗脱液依次加入96孔板中,采用酶标仪于490 nm波长下检测A值(A值越大,则表示细胞中脂质水平越高)。

### 2.5 细胞中TG含量的测定

取对数生长期细胞,按 $2 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,按“2.3”项下方法分组、造模与给药,每组设3个复孔。细胞培养结束后,采用超声波细胞破碎仪破碎细胞,然后收集细胞均浆液,采用BCA法测定细胞中蛋白浓度,并按照TG试剂盒说明书相关方法检测细胞中TG含量。

### 2.6 细胞中PPAR $\alpha$ 通路相关基因的mRNA表达水平的检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测。取对数生长期细胞,按 $2 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,按“2.3”项下方法分组、造模与给药,每组设3个复孔。细胞培养结束后,采用TRIzol法提取各组细胞的总RNA,然后根据试剂盒说明书相关方法,将其逆转录为cDNA。以cDNA为模板,进行PCR扩增。反应体系为:cDNA模板2  $\mu\text{L}$ , $2 \times \text{SYBR}^{\text{®}}$  Green Pro Taq HS Premix 10  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各0.5  $\mu\text{L}$ ,RNase free water 7  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:95℃,30 s;95℃,5 s,60℃,30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算PPAR $\alpha$ 、CPT-1、SREBP-1c、FAS、SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 的mRNA表达水平。

### 2.7 细胞中PPAR $\alpha$ 通路相关蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。取对数生长期细胞,按 $2 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,按“2.3”项下方法分组、造模与给药,每组设3个复孔。细胞培养结束后,弃去培养液,以PBS洗涤2~3次,加入适量RIPA裂解液提取总蛋白,并置于冰上充分裂解30 min后于4℃条件下以12 000 r/min离心15 min;取上清液采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白经煮沸变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳;转膜,以5%脱脂奶粉封闭2 h;加入

PPAR $\alpha$ —抗(稀释度为1:1 000)、CPT-1—抗(稀释度为1:1 000)、SREBP-1c—抗(稀释度为1:800)、FAS—抗(稀释度为1:800)、SIRT1—抗(稀释度为1:800)、PGC-1 $\alpha$ —抗(稀释度为1:800)、GAPDH—抗(稀释度为1:1 000),于4℃孵育过夜;以TBST缓冲液洗膜10 min $\times$ 3次,加入二抗(稀释度为1:3 000),室温孵育2 h;以TBST缓冲液洗膜10 min $\times$ 3次,加入ECL化学发光试剂,采用全自动化学发光成像分析仪成像。采用Image J 6.0软件进行分析,以目的蛋白灰度值与内参GAPDH灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

## 2.8 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行数据统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析;组间两两比较时,若方差齐则采用最小显著性差异法(LSD),若方差不齐则采用Dunnett's T3多重比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 桑根酮C对HepG2细胞存活率的影响

与对照组比较,桑根酮C 16、32  $\mu\text{mol/L}$ 组细胞存活率显著降低( $P < 0.01$ ),详见表2。因此,本研究选取对细胞活性无明显影响的2、4、8  $\mu\text{mol/L}$ 桑根酮C进行后续实验。

表2 各组细胞存活率的测定结果( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab 2 Survival rate of cells in each group( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %
对照组	100.00 $\pm$ 2.95	桑根酮C 8 $\mu\text{mol/L}$ 组	94.66 $\pm$ 5.66
桑根酮C 2 $\mu\text{mol/L}$ 组	97.88 $\pm$ 2.84	桑根酮C 16 $\mu\text{mol/L}$ 组	87.55 $\pm$ 7.42**
桑根酮C 4 $\mu\text{mol/L}$ 组	97.99 $\pm$ 3.50	桑根酮C 32 $\mu\text{mol/L}$ 组	17.53 $\pm$ 4.18**

注:与对照组比较,\*\* $P < 0.01$

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

### 3.2 桑根酮C对HepG2细胞中脂质蓄积和TG含量的影响

与对照组比较,模型组细胞的细胞核(镜下显蓝色)明显萎缩、体积变小,脂滴数(镜下显红色)明显增加,细胞中脂质水平和TG含量均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,桑根酮C各浓度组和非诺贝特组细胞的细胞核萎缩不明显、体积大小正常,脂滴数明显减少,细胞中脂质水平和TG含量均显著降低( $P < 0.05$ ),详见表3、图2。

### 3.3 桑根酮C对HepG2细胞中PPAR $\alpha$ 通路相关基因mRNA表达的影响

与对照组比较,模型组细胞中PPAR $\alpha$ 、CPT-1、SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 的mRNA表达水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),SREBP-1c、FAS的mRNA表达水平均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,桑根酮C各浓度组和非

表3 各组细胞中脂质水平和TG含量的测定结果( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

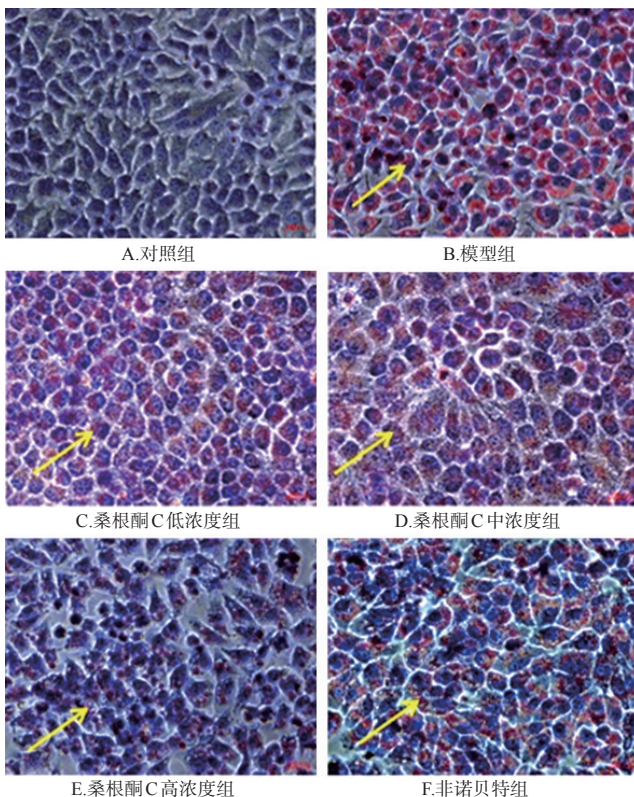
Tab 3 Lipid level and TG content of cells in each group( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	脂质水平	TG, mmol/L
对照组	0.76 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.04
模型组	1.59 $\pm$ 0.02**	0.50 $\pm$ 0.08**
桑根酮C低浓度组	1.42 $\pm$ 0.04**	0.39 $\pm$ 0.02*
桑根酮C中浓度组	1.31 $\pm$ 0.06**	0.36 $\pm$ 0.07*
桑根酮C高浓度组	0.90 $\pm$ 0.01*	0.28 $\pm$ 0.01**
非诺贝特组	1.00 $\pm$ 0.03**	0.30 $\pm$ 0.04**

注:与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, \* $P < 0.05$ ,

\*\* $P < 0.01$



注:黄色箭头为脂滴部位

Note: the yellow arrow indicates the area of lipid droplets

图2 桑根酮C对HepG2细胞中脂质蓄积影响的显微图像(油红O染色, $\times 400$ )

Fig 2 Effect of sanggenone C on lipid accumulation in HepG2 cells(oil red O staining,  $\times 400$ )

诺贝特组细胞中PPAR $\alpha$ 、CPT-1、SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 的mRNA表达水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),SREBP-1c、FAS的mRNA表达水平均显著降低( $P < 0.01$ ),详见表4。

### 3.4 桑根酮C对HepG2细胞中PPAR $\alpha$ 通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组细胞中PPAR $\alpha$ 、CPT-1、

表4 各组细胞中PPAR $\alpha$ 通路相关基因mRNA表达水平的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 4 mRNA expression of PPAR $\alpha$  pathway related gene of cells in each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	PPAR $\alpha$	CPT-1	SIRT1	PGC-1 $\alpha$	SREBP-1c	FAS
对照组	1.00 $\pm$ 0.08	1.01 $\pm$ 0.20	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.03
模型组	0.58 $\pm$ 0.09**	0.65 $\pm$ 0.05*	0.63 $\pm$ 0.04**	0.52 $\pm$ 0.03**	1.41 $\pm$ 0.02**	1.41 $\pm$ 0.02**
桑根酮C低浓度组	0.71 $\pm$ 0.05*	1.75 $\pm$ 0.23 <sup>##</sup>	1.35 $\pm$ 0.03 <sup>##</sup>	1.04 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup>	1.17 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>	1.20 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>
桑根酮C中浓度组	0.76 $\pm$ 0.06 <sup>##</sup>	1.92 $\pm$ 0.25 <sup>##</sup>	1.86 $\pm$ 0.24 <sup>##</sup>	1.29 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>	0.86 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>	0.89 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup>
桑根酮C高浓度组	1.53 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup>	2.68 $\pm$ 0.25 <sup>##</sup>	3.00 $\pm$ 0.26 <sup>##</sup>	2.30 $\pm$ 0.12 <sup>##</sup>	0.69 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>	0.66 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>
非诺贝特组	1.21 $\pm$ 0.10 <sup>##</sup>	2.34 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>	2.60 $\pm$ 0.35 <sup>##</sup>	1.08 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>	0.83 $\pm$ 0.09 <sup>##</sup>	0.77 $\pm$ 0.03 <sup>##</sup>

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 的蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ ), SREBP-1c、FAS的蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与模型组比较,桑根酮C各浓度组和非诺贝特组细胞中PPAR $\alpha$ 、CPT-1、SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 的蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),SREBP-1c(桑根酮C低浓度组除外)、FAS的蛋白表达水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),详见图3、表5。

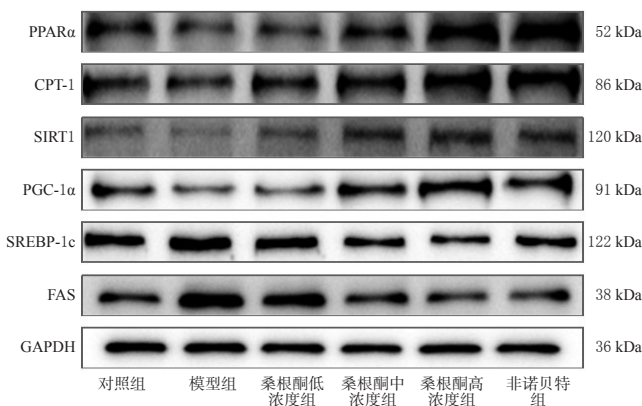


图3 桑根酮C对HepG2细胞中PPAR $\alpha$ 通路相关蛋白表达影响的电泳图

Fig 3 Electrophoretogram of the effects of sanggenone C on the expression of PPAR $\alpha$  signaling pathway related protein in HepG2 cells

#### 4 讨论

NAFLD被认为是代谢综合征在肝脏的一种表现形式,其发病机制较为复杂,主要包括胰岛素抵抗、脂代谢紊乱、炎症反应失调等<sup>[20]</sup>。目前较为公认的发病机制是“多次打击学说”,即以胰岛素抵抗为主的肝脏脂肪变性为“第一次打击”,以肝细胞内过氧化应激、内质网应激、肠道衍生内毒素、炎症级联反应等为“第二次打击”,以肝脏免疫紊乱导致肝纤维化、肝细胞缺血坏死和肝硬化

表5 各组细胞中PPAR $\alpha$ 通路相关蛋白表达水平的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 5 Protein expression of PPAR $\alpha$  pathway related protein of cells in each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	PPAR $\alpha$ / GAPDH	CPT-1/ GAPDH	SIRT1/ GAPDH	PGC-1 $\alpha$ / GAPDH	SREBP-1c/ GAPDH	FAS/ GAPDH
对照组	0.42 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.07	0.37 $\pm$ 0.08	0.44 $\pm$ 0.01
模型组	0.27 $\pm$ 0.02**	0.25 $\pm$ 0.03**	0.12 $\pm$ 0.01**	0.38 $\pm$ 0.09**	0.58 $\pm$ 0.13*	0.75 $\pm$ 0.06**
桑根酮C低浓度组	0.37 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>	0.44 $\pm$ 0.08 <sup>##</sup>	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>	0.67 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>	0.44 $\pm$ 0.14	0.60 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>
桑根酮C中浓度组	0.40 $\pm$ 0.03 <sup>##</sup>	0.47 $\pm$ 0.10 <sup>##</sup>	0.25 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>	0.79 $\pm$ 0.03 <sup>##</sup>	0.31 $\pm$ 0.11 <sup>#</sup>	0.52 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>
桑根酮C高浓度组	0.57 $\pm$ 0.06 <sup>##</sup>	0.59 $\pm$ 0.11 <sup>##</sup>	0.35 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>	1.13 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup>	0.22 $\pm$ 0.06 <sup>##</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>
非诺贝特组	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup>	0.52 $\pm$ 0.08 <sup>##</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>	0.90 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>	0.30 $\pm$ 0.10 <sup>#</sup>	0.39 $\pm$ 0.03 <sup>##</sup>

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

为“第三次打击”<sup>[21]</sup>。由此可见,肝脏脂质代谢紊乱引起的肝细胞内脂质沉积(尤其是TG过多聚积)是导致NAFLD的主要原因<sup>[22-23]</sup>。现有的建立NAFLD模型的细胞主要包括原代肝细胞、永生细胞系、诱导多能干细胞等,其中永生细胞系具有生长稳定、无限寿命、表型稳定、培养条件比原代肝细胞简单、易于在不同实验室内标准化等优点<sup>[17]</sup>,因此本研究选择永生细胞系的人肝癌HepG2细胞进行研究。

本研究以游离脂肪酸诱导HepG2细胞发生脂质蓄积,以探讨桑根酮C对NAFLD脂质代谢的改善作用及相关机制。结果显示,HepG2细胞经1 mmol/L游离脂肪酸诱导24 h后,细胞中脂滴数明显增加,脂质水平、TG含量均显著升高,表明脂质蓄积模型复制成功;经桑根酮C干预后,细胞中脂滴数明显减少,脂质水平、TG含量均显著降低,表明桑根酮C可减少HepG2细胞的脂质蓄积。

肝脏中脂质代谢离不开多种关键酶与蛋白的相互作用。研究表明,PPAR $\alpha$ 通路在控制脂肪酸转运与氧化、脂质合成和分解等代谢过程中具有重要作用<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,经游离脂肪酸诱导后,HepG2细胞中PPAR $\alpha$ 、CPT-1、SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 的mRNA和蛋白表达水平均显著降低,SREBP-1c、FAS的mRNA和蛋白表达水平均显著升高;经桑根酮C干预后,细胞中上述指标均显著逆转(桑根酮C低浓度组的SREBP-1c蛋白除外),表明桑根酮C能激活PPAR $\alpha$ 途径、提高肝细胞的脂质氧化能力、减少细胞中的脂质合成,从而减轻脂质蓄积。

综上所述,桑根酮C可改善HepG2细胞的脂质蓄积;其作用机制可能与调节PPAR $\alpha$ 信号通路、提高细胞脂质氧化能力、抑制脂质合成有关。

## 参考文献

- [1] 徐文静,范江霖. PPAR $\alpha$ 与FXR通路在非酒精性脂肪肝病中的交互作用[J]. 生命的化学, 2020, 40(9): 1500-1506.
- [2] KERSTEN S, STIENSTRA R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver[J]. Biochimie, 2017, 136: 75-84.
- [3] THANAPIROM K, TSOCHATZIS E A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the quest for effective treatments[J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2019, 8(1): 77-79.
- [4] 李生鹏,王全楚.非酒精性脂肪性肝病的流行病学进展[J].胃肠病学和肝病杂志, 2017, 26(10): 1085-1087.
- [5] 许炎煌,范建高.非酒精性脂肪性肝病治疗药物研究进展[J].上海医药, 2020, 41(19): 3-6.
- [6] NASCIMBENI F, PELLEGRINI E, LUGARI S, et al. Statins and nonalcoholic fatty liver disease in the era of precision medicine: more friends than foes[J]. Atherosclerosis, 2019, 284: 66-74.
- [7] 钱坤,刘亚云,张艳,等.中药抗非酒精性脂肪肝病分子机制的研究进展[J].中草药, 2020, 51(19): 5083-5092.
- [8] 王洪伟,盛邦跃,林超.桑白皮药理作用研究进展[J].中医学报, 2019, 34(6): 1183-1187.
- [9] 候宝林,施洋,赵俊芳,等.桑白皮化学成分及药理作用研究进展[J].辽宁中医杂志, 2020, 47(8): 212-214.
- [10] GUO H, XU Y, HUANG W, et al. Kuwanon G preserves LPS-induced disruption of gut epithelial barrier in vitro[J]. Molecules, 2016, 21(11): 1597.
- [11] ANN J Y, EO H, LIM Y. Mulberry leaves (*Morus alba* L.) ameliorate obesity-induced hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress in high-fat diet-fed mice[J]. Genes Nutr, 2015, 10(6): 46.
- [12] 段志涛,高英,周刚.桑白皮药材的质量标准研究[J].中药材, 2013, 36(4): 553-557.
- [13] 徐文静. PPAR $\alpha$ 参与脂代谢通路与非酒精性脂肪肝病[J].肝脏, 2020, 25(8): 894-896.
- [14] ZHANG Y F, YUAN Z Q, SONG D G, et al. Effects of cannabinoid receptor 1 (brain) on lipid accumulation by transcriptional control of CPT1A and CPT1B[J]. Anim Genet, 2014, 45(1): 38-47.
- [15] YAHAGHI L, YAGHMAEI P, HAYATI-ROODBARI N, et al. Betanin effect on PPAR-alpha and SREBP-1c expression in NMRI mice model of steatohepatitis with fibrosis[J]. Physiol Int, 2020, 107(1): 67-81.
- [16] 张中乐,沈红艺,倪红梅,等. SIRT1在非酒精性脂肪肝病脂质代谢机制中的作用研究进展[J].中西医结合肝病杂志, 2020, 30(5): 472-474.
- [17] 冯秋琪,任国艳,乔香君,等.脂肪肝细胞模型的研究进展[J].中国细胞生物学学报, 2020, 42(12): 2256-2265.
- [18] QU C, TANG L, ZHU Y. Effect of fenofibrate on the secretion of endothelium-derived contracting factors in hypertensive rats[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2012, 34(3): 239-243.
- [19] 刘晶晶.化痰祛痰方对FFA诱导HepG2细胞脂质沉积的影响及机制研究[D].沈阳:辽宁中医药大学, 2018.
- [20] 芮法娟,杨红丽,吕卓珍,等.非酒精性脂肪性肝病的流行病学研究进展[J].山东医药, 2020, 60(31): 89-92.
- [21] 刘勤,牛春燕.由“二次打击”到“多重打击”:发病机制的演变带给非酒精性脂肪性肝病的治疗启示[J].世界华人消化杂志, 2019, 27(19): 1171-1178.
- [22] JIAO H L, YE P, ZHAO B L. Protective effects of green tea polyphenols on human HepG2 cells against oxidative damage of fenofibrate[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35(9): 1121-1128.
- [23] 路然,洪天配.脂质代谢紊乱导致非酒精性脂肪性肝病的发病机制[J].临床肝胆病杂志, 2015, 31(7): 1050-1054.

(收稿日期:2021-04-16 修回日期:2021-06-05)

(编辑:唐晓莲)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅