

· 药理 ·

青钱柳总皂苷对游离脂肪酸诱导的 H4-II E 细胞 脂肪代谢的影响及作用机制

许光远¹, 孙文², 郭璇¹, 吴丽丽², 秦灵灵², 宋紫临¹, 田硕³, 刘铜华^{4*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100078; 2. 北京中医药大学 中医养生学研究所, 北京 100029;
3. 陕西中医药大学 第一临床医学院, 陕西 咸阳 712046; 4. 北京中医药大学 研究生院, 北京 100078)

[摘要] 目的:研究青钱柳总皂苷(CPS)对游离脂肪酸(FFA)诱导的 H4-II E 肝细胞脂肪代谢的影响和作用机制。方法:以 FFA 诱导的 H4-II E 大鼠肝细胞为模型,培养 72 h 后,采用 Neutral red 法检测 CPS(0,0.05,0.10,0.20,0.40 g·L⁻¹)对细胞活性的影响;根据细胞活性检测结果选择 CPS 低剂量组(CPS-L,0.10 g·L⁻¹)和高剂量组(CPS-H,0.20 g·L⁻¹)干预,油红 O(Oile red)染色并测定细胞内脂质含量;药物干预 2 h 后实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测肝细胞相应基因表达,药物干预 30 min 后,利用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞相应蛋白磷酸化水平。结果:与正常组比较,0.10,0.20 g·L⁻¹ CPS 干预后肝细胞活性明显升高($P < 0.05$);干预 72 h 后,Oile red 染色显示 FFA(20 μmol·L⁻¹)诱导后呈现大片红染的脂滴,细胞脂质含量显著增加($P < 0.01$),CPS 干预后细胞中红染的脂滴减少,细胞脂质含量较 FFA(20 μmol·L⁻¹)诱导组明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,CPS-L 和 CPS-H 组腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK),乙酰 CoA 羧化酶(ACC)蛋白磷酸化水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);胆固醇应答元件结合蛋白 1c(SREBP1c),脂肪酸合成酶(FAS)mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:CPS 能够显著降低体外 FFA 诱导肝细胞脂质沉积,可能是通过上调 AMPK,ACC 蛋白磷酸化水平,下调 SREBP1c,FAS mRNA 表达而发挥作用。

[关键词] 青钱柳总皂苷; 脂质沉积; 活化蛋白激酶/乙酰 CoA 羧化酶; 胆固醇应答元件结合蛋白 1c/脂肪酸合成酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0124-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017150124

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170511.0938.056.html>

[网络出版时间] 2017-05-11 9:38

Effect and Mechanism of CPS on Fat Metabolism in H4-II E Cells Induced by Free Fatty Acids

XU Guang-yuan¹, SUN Wen², GUO Xuan¹, WU Li-li², QIN Ling-ling², SONG Zi-lin¹,
TIAN Shuo³, LIU Tong-hua^{4*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

2. Institute of Health Cultivation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. The First Clinical College, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, China;

4. School of Graduate Studies, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Cyclocarya paliurus saponin (CPS) on

[收稿日期] 20161213(012)

[基金项目] 北京市教育委员会科学研究与研究生培养共建项目-科研项目;北京市中医养生学重点实验室,教育部中医养生学重点实验室项目

[第一作者] 许光远,博士,从事中医药防治糖尿病及其并发症的临床和基础研究,Tel:010-64286950,E-mail:xuguangyuan102@126.com

[通讯作者] *刘铜华,教授,博士生导师,从事中医药防治糖尿病及其并发症的临床和基础研究,E-mail:thliu@vip.163.com

FFA-induced H4-II E in hepatic cells. **Method:** FFA-induced H4-II E liver cells of rat were cultivated for 72 h, and then exposed to various concentrations of CPS (0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), and their viability was measured by Neutral red. According to the results of CPS cell activity, these cells were treated in the low-dose group (CPS-L, 0.10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and the high-dose group (CPS-H, 0.20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), Oil red staining was performed to determine lipid content in the cells. After treatment of the cells for 2 h, mRNA levels were measured by Real-time PCR, while phosphorylation levels of target proteins were detected by Western blot after treatment for 30 min. **Result:** It was found that the cell viability indexes in the cells intervened by 0.10, 0.20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CPS increased significantly, compared with normal group ($P < 0.05$). After treatment for 72 h, Oil red staining showed that FFA (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) -induced cells contained a large number of red lipid droplets, and lipid content increased significantly ($P < 0.01$). However, after treatment CPS, red lipid droplets decreased, and lipid content significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After intervention with CPS, phosphorylation levels of mitogen-activated protein kinase (AMPK), and acetylcoarboxylase (ACC) in CPS-L and CPS-H groups were higher than those in control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). And sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) and fatty acid synthase (FAS) mRNA expressions in CPS-L and CPS-H groups increased, compared with control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** CPS can play a significant role in reducing FFA-induced lipid deposition in liver cells *in vitro*; The mechanism may be correlated with up-regulation of AMPK, ACC protein and phosphorylation levels, and down-regulation of SREBP1c, FAS mRNA expressions.

[**Key words**] cyclocarya paliurus saponin (CPS); lipid deposition; mitogen-activated protein kinase (AMPK) /acetylcoarboxylase (ACC); sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) /fatty acid synthase (FAS)

随着人们生活方式和饮食习惯的改变,非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率也迅速增长,已逐渐成为我国第一大肝病。NAFLD以肝细胞脂肪变性和脂质过度沉积为主要病理特征^[1],且除过量饮酒、其他肝损伤因素,主要包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎及相关肝硬化^[2]等类型,作为代谢综合征(MS)的重要组成部分,与糖尿病、心脑血管疾病密切相关^[3]。研究表明,肝细胞脂肪堆积为NAFLD发生发展的关键环节^[4],改善肝细胞内脂肪代谢是治疗NAFLD的重要途径。目前临床上以抗氧化剂、胰岛素增敏剂、降脂药、保肝抗炎药等作为NAFLD治疗药物^[5],效果不明显,缺乏特效药物,因此NAFLD特效治疗药物的研究迫切需要。

青钱柳(CP)又名甜茶树、摇钱树、金钱柳,系双子叶纲胡桃科植物,是我国特有的树种^[6]。《中国中药资源志要》谓:“其树皮、叶味辛微苦,清热解毒、消肿止痛”^[7],民间长期应用表明,青钱柳叶具有调节血糖、激活胰岛功能、促进糖代谢、降脂等功效^[8]。实验研究表明,青钱柳叶及其提取物能够降低大鼠血脂^[9-10],改善血糖^[11]和抗氧化^[12],但其具体发挥药理作用的成分尚不明确,因此本实验提取青钱柳叶中总皂苷部位,通过体外实验观察青钱柳

总皂苷(CPS)对游离脂肪酸(FFA)诱导的大鼠肝细胞H4-II E脂质沉积影响并探讨其作用机制,为青钱柳叶有效药理成分研究和NAFLD特效治疗药物的研发提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞 大鼠肝癌细胞H4-II E由日本武库川女子大学东洋药物研究室赠予。常规复苏细胞,DMEM培养基:1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖+10%胎牛血清(10% FBS)+1%青霉素-链霉素,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养。

1.2 药物与试剂 青钱柳采自江西修水地区,由北京中医药大学中药学院徐瞰海教授鉴定为胡桃科植物青钱柳 *Cyclocarya paliurus* 干燥叶;青钱柳总皂苷由协和药物研究所提取;胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 1744349);油酸钠(Sodium oleate),Oil red O(美国 Sigma 公司,批号分别为 SLBM7742V, SLBM4444V);p-腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK) α , AMPK α ,p-乙酰 CoA 羧化酶(ACC),ACC, β -肌动蛋白(β -actin)抗体,Anti-rabbit 免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 12,0003,0003,0008,13,26)。DMEM 培养基,Block one,Block one-P(日本京都 Nacalai Tesque 公司,批号分别为 L4R2552, L4E0085, L5G4440);Rever Tra

Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(日本京都 Toyobo 公司,批号 546300)。

1.3 仪器 E9032 型酶标仪(美国 Promega 公司);Prism 7500 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司);BX53 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);Mini-PROTEAN Tera System 型垂直电泳仪、转移槽,ChemiDoc™ XRS + with Image Lab™ Software 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);HERA CELL 150i 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 药物提取 干燥青钱柳叶粉碎制成粗粉,8 倍量 85% 乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩得醇提浸膏。将醇提浸膏混悬分散于水 40 L 中,石油醚-水 1:1 萃取 3 次,脱脂处理后,用正丁醇 1:1 萃取 3 次,充分混匀,减压浓缩后干燥得到该部位的干燥粉末。

2.2 Neutral red 法检测 H4-II E 细胞活性 H4-II E 细胞常规复苏,培养 72 h 后,细胞长至 70% ~ 80%,胰酶消化后,调整细胞悬液密度为 5×10^4 个/mL,加入 12 孔板,1 mL/孔,分为正常组和青钱柳总皂苷(0.05,0.10,0.20,0.40 $g \cdot L^{-1}$)组,培养箱中 37 °C 5% CO₂ 培养 24 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 1 次,加入 0.05 $g \cdot L^{-1}$ 中性红溶液培养 3 h,PBS 洗 1 次,540 nm 处测定吸光度 A,计算细胞活性。

$$\text{细胞活性率} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.3 细胞分组与给药 H4-II E 细胞调整细胞悬液密度为 5×10^4 个/mL,接种于 12 孔板,1 mL/孔,共分为 4 组,3 孔/组。正常组给予含 5% FBS 的 DMEM 培养;模型组给予含 5% FBS 的 DMEM + 20 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ FFA 培养;青钱柳总皂苷低剂量组(CPS-L)给予含 5% FBS 的 DMEM + 0.10 $g \cdot L^{-1}$ CPS + 20 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ FFA 培养;青钱柳总皂苷高剂量组(CPS-H)给予含 5% FBS 的 DMEM + 0.20 $g \cdot L^{-1}$ CPS + 20 $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ FFA 培养,37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。

2.4 H4-II E 细胞 Oile red 染色及脂肪含量测定 H4-II E 细胞接种同 2.3 项,培养箱中 37 °C 5% CO₂ 培养 72 h 后,分组、加药同 2.3 项,加入 FFA 和 CPS,设正常组,培养 24 h 后,PBS 洗 1 次,10% 甲醛固定 10 min,60% 异丙醇置换,60% Oile red O 染色 15 min,PBS 洗 1 次,100% 异丙醇溶解,540 nm 处测定 A。

2.5 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 H4-II E 细胞相应基因表达 H4-II E 细胞接种、分组、

加药同 2.3 项,给药干预 2 h 后,PBS 洗 1 次,按照 RNA 提取试剂盒提取 RNA;反转录,向 RNA/Nuclease-free water 混合物 6 μL 中加入 4 \times DNA Master Mix,5 \times RT Master Mix 各 2 μL ,37 °C 15 min,98 °C 5 min,得到 cDNA。20 μL 反应体系,cDNA 稀释液 9.2 μL 加入引物 0.8 μL ,Thunderbird Sybr qPCR Mix 10 μL 于 ABI Prism 7500 型 PCR 仪进行反应,反应条件:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环;95 °C 15 s,60 °C 30 s,95 °C 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 mRNA 相对表达量。RNA 引物由 Thermo Fisher Scientific 公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
SREBP1c	上游 5'-CCATCGACTACATCCGCTTCTT-3'	22
	下游 5'-ACTTCGCAGGGTCAGGTTCTC-3'	21
FAS	上游 5'-CTGCGGAACTTCAGGAAATG-3'	21
	下游 5'-GGTTCGGAATGCTATCCAGG-3'	20
GAPDH	上游 5'-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3'	19
	下游 5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3'	21

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 H4-II E 细胞相关蛋白表达 药物干预 30 min 后的 H4-II E 细胞,以 Homoginized Buffer 提取总蛋白,加 2 \times 上样缓冲液,100 °C 5 min 蛋白变性,上样 20 μg /孔,100 V,2 h 电泳,预处理 PVDF 膜及滤纸,半干法凝胶转膜,100 A,1 h,膜在 TBS 溶液中室温下摇床洗 15 min;Blocking one/Blocking one-P 封闭 30 min,一抗(1:1 000)孵育,4 °C 过夜,洗膜后二抗(1:1 万)孵育,室温 1 h。洗膜后加 ECL 发光液,室温反应 1 min,凝胶成像系统成像,蛋白条带用 Image J 7.0 图像分析。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件处理数据,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;两组间比较,满足方差齐性时用 LSD 检验,不满足方差齐性时用非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CPS 对 FFA 诱导的 H4-II E 细胞活性的影响 与正常组比较,0.10,0.20 $g \cdot L^{-1}$ CPS 组可明显改善细胞活性($P < 0.05$);0.40 $g \cdot L^{-1}$ CPS 组可明显抑制细胞活性($P < 0.05$)。因此,选择 CPS 对细胞活性较强的 2 个质量浓度 0.10,0.20 $g \cdot L^{-1}$ 进行下一步实验。见表 2。

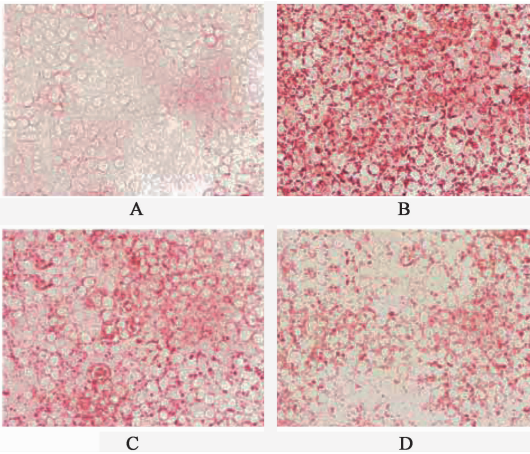
表 2 CPS 对 FFA 诱导的 H4-II E 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of CPS on activity of H4-II E cells induced by FFA ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	细胞活性/%
正常	-	100.00 \pm 7.87
CPS	0.05	97.95 \pm 4.17
	0.1	109.28 \pm 4.21 ¹⁾
	0.2	113.91 \pm 3.87 ¹⁾
	0.4	83.80 \pm 6.43 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 CPS 对 FFA 诱导的 H4-II E 细胞脂质沉积的影响 与正常组比较,细胞被 FFA ($20 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$) 诱导后呈现出明显脂肪沉积, Oil red 染色呈现大片红染的脂滴 ($P < 0.01$); CPS 治疗 24 h 后,与 FFA ($20 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$) 组比较, 0.10, 0.20 $g \cdot L^{-1}$ CPS 组红染脂滴均减少, 0.10, 0.20 $g \cdot L^{-1}$ CPS 较 FFA ($20 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$) 组 A 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。表明 CPS 能够显著降低 FFA 诱导的 H4-II E 细胞中脂肪沉积, 呈现剂量依赖性。见图 1, 表 3。



A. 正常组; B. 模型组; C. CPS-L 组; D. CPS-H 组

图 1 CPS 对 FFA 诱导的 H4-II E 细胞脂质沉积的影响 (油红 O 染色, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of CPS on H4-II E cell lipidosis induced by FFA (Oil red O staining, $\times 200$)

表 3 CPS 对 FFA 诱导的 H4-II E 细胞脂肪含量吸光度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of CPS on fat content A of H4-II E cells induced by FFA ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	FFA/ $\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$	脂肪含量
正常	-	-	0.63 \pm 0.08
模型	-	20	1.00 \pm 0.10 ¹⁾
CPS	0.1	20	0.84 \pm 0.10 ²⁾
	0.2	20	0.65 \pm 0.07 ³⁾

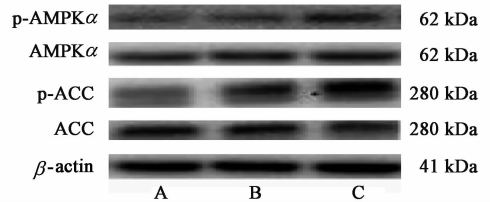
注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 4, 5 同)。

3.3 CPS 对 FFA 诱导的 H4-II E 细胞 AMPK α , ACC 蛋白磷酸化的影响 与模型组比较, 0.10, 0.20 $g \cdot L^{-1}$ CPS 组 AMPK α , ACC 蛋白磷酸化水平明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。CPS 能够提高 AMPK 信号通路蛋白磷酸化水平, 发挥降低脂质沉积作用。见图 2, 表 4。

表 4 CPS 对 FFA 诱导的 H4-II E 细胞 AMPK α , ACC 蛋白磷酸化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of CPS on phosphorylation levels of AMPK, ACC in H4-II E cells induced by FFA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	p-AMPK α /AMPK α	p-ACC/ACC
模型	-	0.34 \pm 0.10	0.76 \pm 0.19
CPS	0.1	0.74 \pm 0.11 ²⁾	1.68 \pm 0.18 ²⁾
	0.2	0.97 \pm 0.08 ³⁾	2.05 \pm 0.17 ³⁾



A. 模型组; B. CPS-L 组; C. CPS-H 组

图 2 H4-II E 细胞 AMPK α , ACC 蛋白磷酸化蛋白表达电泳

Fig. 2 Phosphorylation levels of AMPK, ACC in H4-II E cells induced by FFA

3.4 CPS 对 FFA 诱导的 H4-II E 细胞 SREBP1c, FAS mRNA 表达的影响 与模型组比较, 0.10, 0.20 $g \cdot L^{-1}$ CPS 组 SREBP1c, FAS mRNA 相对表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 说明 CPS 具有下调肝细胞脂肪酸合成相关基因表达的作用。见表 5。

表 5 CPS 对 FFA 诱导的 H4-II E 细胞 SREBP1c, FAS mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of CPS on SREBP1c, FAS mRNA expressions in H4-II E cells induced by FFA ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	SREBP1C	FAS
模型	-	1.03 \pm 0.07	0.97 \pm 0.03
CPS	0.1	0.89 \pm 0.10 ²⁾	0.76 \pm 0.07 ²⁾
	0.2	0.65 \pm 0.08 ³⁾	0.54 \pm 0.05 ³⁾

4 讨论

NAFLD 是一种慢性代谢性疾病, 与脂质代谢紊乱^[13]、炎症反应、氧化应激^[14]、胰岛素抵抗^[15]等关系密切, 其中脂质代谢紊乱是 NAFLD 发生发展的关键环节。肝脏作为人体脂质代谢的主要场所, 将膳食中脂质水解后生成的 FFA 或氧化利用为机体供能, 或再合成为甘油三酯 (triglyceride, TG), 以达到

脂质代谢正常运行。外源性 FFA 的异常增多或 FFA 氧化力障碍,可能导致 TG 在肝内异常沉积,肝细胞发生脂肪变性^[16],因此 FFA 变化与脂质代谢异常和 NAFLD 发生密切相关。青钱柳是民间常用保健茶,研究表明,青钱柳及其提取物明显降低小鼠血清 TG,FFA^[17];能够减少肝细胞内 TG 含量^[18];抑制 3T3 脂肪细胞分化^[19]。本研究中,利用 FFA 诱导 H4-II E 肝细胞建立肝细胞脂肪变性模型,油红 O 染色显示肝细胞内大量脂肪沉积;给予 CPS(0.10, 0.20 g·L⁻¹)干预后,肝细胞脂肪变性明显改善,细胞内脂质沉积显著降低。说明 CPS 能够改善肝细胞脂肪变性及降低细胞内脂质沉积。

AMPK 是一种能被单磷酸腺苷激活的蛋白激酶,作为细胞能量平衡的重要感受器,在肝脏脂肪代谢中发挥关键作用^[20]。研究表明,AMPK 活性增加可增强小鼠肝脏脂质分解,抑制脂质合成^[21]。AMPK 下游分子 ACC 是脂肪酸合成起始阶段的限速酶,催化乙酰 CoA 生成丙二酰 CoA (Malonyl-CoA),形成长链脂肪酸合成的前体。AMPK 通过磷酸化活化后促进 ACC 的磷酸化,从而降低 ACC 活性,减少 Malonyl-CoA 的生成,减低 FFA 生成^[22];此外 Malonyl-CoA 的生成减少可以促进长链脂肪酸向线粒体内转移进行 β 氧化。AMPK 信号通路是调节脂肪酸氧化/合成的重要途径,其中 AMPK α 及其下游靶分子 ACC 的磷酸化是 AMPK 活性的重要标志。为证明 CPS 通过调节 AMPK α 的磷酸化改善 H4-II E 细胞内的脂肪沉积,CPS(0.10, 0.20 g·L⁻¹)作用于 H4-II E 细胞 30 min 后,检测 p-AMPK α , AMPK α , p-ACC, ACC, β -actin 的蛋白表达。本研究发现, CPS(0.10, 0.20 g·L⁻¹)可以明显增加 FFA 诱导的 H4-II E 肝细胞中 AMPK, ACC 活性,其中 CPS(0.20 g·L⁻¹)效果更为明显。

SREBP1c 是脂肪酸合成基因的重要转录调节因子之一,主要分布在脂肪酸代谢旺盛的组织,调控 ACC, FAS 等脂肪酸合成过程中的关键酶^[23]。研究发现, SREBP1^{-/-} 肥胖小鼠较正常小鼠肝脏脂肪含量减少,脂肪酸水平降低^[24]。FAS 是内源性脂肪酸合成中的关键酶,通过催化乙酰 CoA 和丙二酰 CoA,参与长链脂肪酸的生成,其表达受 SREBP1c 调控。SREBP1c mRNA 水平过表达可导致 FAS mRNA 表达增加,造成 FFA 生成增多,脂质堆积^[25]。SREBP1c, FAS 是 AMPK 下游调节脂肪酸合成的重要调控因子,其 mRNA 表达受 AMPK 磷酸化调节。本研究发现,在 CPS(0.10, 0.20 g·L⁻¹)干预 FFA 诱

导的 H4-II E 肝细胞中, SREBP1c, FAS mRNA 表达明显降低,其中 CPS-H(0.20 g·L⁻¹)效果更为明显。

综上所述,青钱柳总皂苷能够降低体外 FFA 诱导的 H4-II E 肝细胞脂肪变性,减少肝细胞内脂质沉积,可能是通过增加 AMPK 活性;抑制 SREBP1c, FAS 基因表达发挥作用。为青钱柳开发利用提供实验依据。由于中药作用多靶点, NAFLD 发病机制的多样性,关于青钱柳总皂苷部位改善肝细胞脂肪代谢作用的分子机制待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 马圆圆, 吴雪, 刘晓钢, 等. 非酒精性脂肪肝患者肝组织中 Irisin 的表达[J]. 郑州大学学报:医学版, 2016, 51(4):517-520.
- [2] Hubscher S G. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Histopathology, 2006, 49(5):450-465.
- [3] El-Kader S M A, Ashmawy E M. Non-alcoholic fatty liver disease: the diagnosis and management[J]. World J Hepatol, 2015, 7(6):846-858.
- [4] Browning J D, Horton J D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury[J]. J Clin Invest, 2004, 114(2):147-152.
- [5] 徐亮, 宓余强. 非酒精性脂肪肝的药物疗法进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2015, 9(20):3666-3670.
- [6] 王晓红, 孔登, 李万忠. 青钱柳水提物对糖尿病肾病大鼠血脂、血凝和脂质过氧化的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(6):1-7.
- [7] 李楠, 赵静, 吴茹, 等. 青钱柳多糖对高脂血症大鼠脂代谢及对 PPAR α , FAS, GLUT4 基因 mRNA 表达的影响[J]. 现代食品科技, 2015, 31(4):29-35.
- [8] 刘姚, 叶振南, 傅凌韵, 等. 青钱柳多糖对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖分化的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(23):291-295.
- [9] YANG Z W, OUYANG K H, ZHAO J, et al. Structural characterization and hypolipidemic effect of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide in rat[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 91:1073-1080.
- [10] JIANG C, WANG Q, WEI Y, et al. Cholesterol-lowering effects and potential mechanisms of different polar extracts from *Cyclocarya paliurus* leave in hyperlipidemic mice[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 176:17-26.
- [11] WANG Q, JIANG C, FANG S, et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of ethanol and aqueous extracts of *Cyclocarya paliurus* leaves in type 2 diabetic rats[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(3):1119-1127.
- [12] TANG W, LIN L, XIE J, et al. Effect of ultrasonic

- treatment on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*[J]. Carbohydr Polym,2016,151:305-312.
- [13] 王燕,杨耀炯,王晶,等. 非酒精性脂肪肝患者脂代谢紊乱与血清补体 C3 的相关性研究[J]. 放射免疫学杂志,2011, 24(3):303-305.
- [14] Han Y H, Kim H J, Kim E J. et al. ROR α decreases oxidative stress through the induction of SOD2 and GPx1 expression and thereby protects against nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. Antioxid Redox Signal, 2014,21(15):2083-2094.
- [15] Ebrahimi-Mameghani M, Jamali H, Mahdavi R, et al. Conjugated linoleic acid improves glycemic response, lipid profile, and oxidative stress in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease;a randomized controlled clinical trial[J]. Croat Med J,2016,57(4):331-342.
- [16] 王辉,陈骁,项夏霖,等. 游离脂肪酸混合物对肝细胞脂毒性及脂代谢相关基因表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(7):1153-1157.
- [17] 胡文兵,赵静,陈婷婷,等. 青钱柳多糖对高脂血症小鼠的降血脂作用及机制初探[J]. 现代食品科技, 2015,11(31):39-44.
- [18] 段小群,刘永明,卢曦,等. 青钱柳多糖对体外诱导肝细胞脂肪变性的影响[J]. 中国现代医学杂志,2010, 18(20):2779-2782.
- [19] 刘姚,傅凌韵,叶振南,等. 青钱柳多糖对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖分化的影响[J]. 食品科学,2013,23(34):291-295.
- [20] Woods A, Vertommen D, Neumann D, et al. Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase(AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis [J]. J Biol Chem, 2003,278(31):28434-28442.
- [21] Stein S C, Woods A, Jones N A, et al. The regulation on AMP-actived protein kinase by phosphorylation [J]. Biochem J,2000,345(3):437-443.
- [22] Ha J, Daniel S, Broyles S S, et al. Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity [J]. J Biol Chem, 1994,269(35):22162-22168.
- [23] Ferré P, Foufelle F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis; clinical perspective [J]. Horm Res, 2007,68(2):72-82.
- [24] FAchouri Y, Hegarty B D, Allanic D, et al. Long chain fatty acyl-CoA synthetase 5 expression is induced by insulin and glucose; involvement of sterol regulatory element-binding protein-1c [J]. Biochimie, 2005, 87(12):1149-1155.
- [25] ZHANG B B, ZHOU G, LI C. AMPK; an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome [J]. Cell Metab 2009,9(5):407-416.

[责任编辑 张丰丰]