

消脂汤对 FFA 诱导 NASH 细胞模型的影响及其相关机制

朱青¹, 温天燕², 杨道炬², 王晓歌³, 袁冬生^{4*}

(1. 广州中医药大学热带医学研究所, 广州 510405; 2. 深圳市龙岗区中心医院, 深圳 518117;
3. 广州中医药大学临床药理研究所, 广州 510405; 4. 广州中医药大学
经济与管理学院, 广州 510405)

[摘要] 目的:探讨消脂汤对游离脂肪酸(FFA)诱导的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)细胞模型的作用及机制。方法:用 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA 诱导 HepG2 细胞建立 NASH 细胞模型,用消脂汤及非诺贝特干预 NASH 细胞模型;油红 O 染色观察细胞内脂滴含量;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测核转录因子- κ B(NF- κ B) p65, I κ B 激酶(IKK β), I κ B 磷酸化激酶[Phospho-IKK α/β (Ser^{176/180})],胰岛素受体底物 1 磷酸化蛋白[Phospho-IRS-1(Ser³⁰⁷)],胰岛素受体底物-1(IRS-1)蛋白表达。结果:FFA 刺激 24 h 后,模型组内脂滴含量,细胞上清液中 TNF- α , IL-6 含量高于正常组($P < 0.01$), IKK β , p-IKK α/β (Ser^{176/180}), p-IRS-1(Ser³⁰⁷), NF- κ B(核蛋白)表达明显增加($P < 0.01$), IRS-1 蛋白表达减少($P < 0.05$),各给药组 p-IKK α/β (Ser^{176/180}), p-IRS-1(Ser³⁰⁷), NF- κ B p65(核蛋白)表达减少($P < 0.01$),尤其是消脂汤高浓度组较非诺贝特 p-IKK α/β (Ser^{176/180}), p-IRS-1(Ser³⁰⁷)蛋白表达显著减少($P < 0.01$),各给药组 IRS-1 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。结论:消脂汤可改善 FFA 诱导的 NASH 细胞模型中脂质沉积及炎症反应,其机制可能与抑制细胞内 IKK α/β , IRS-1 Ser³⁰⁷ 的磷酸化及 IKK β , NF- κ B p65(核蛋白)表达有关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎; HepG2 细胞模型; 消脂汤; 游离脂肪酸; 核转录因子- κ B; I κ B 抑制蛋白激酶 α/β ; 胰岛素受体底物-1

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)23-0109-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017230109

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1402.054.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 14:02

Effect and Molecular Mechanisms of Xiaozhi Decoction on NASH Cell Model Induced by FFA in HepG2 Cell

ZHU Qing¹, WEN Tian-yan², YANG Dao-ju², WANG Xiao-ge³, YUAN Dong-sheng^{4*}

(1. Institute of Tropical Medicine of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. Longgang District Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518117, China;
3. Institute of Clinical Pharmacology of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 4. College of Economics and Management of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Xiaozhi decoction on free fatty acids (FFA) -induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) cell model. **Method:** The NASH model in HepG2 cells was induced by 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA. The NASH cell models were established by different concentrations of Xiaozhi decoction and fenofibrate. Oil red O staining was used to observe the content of lipid droplets. Cell supernatant (nuclear factor- κ -gene binding) NF- κ B p65, I κ B kinase beta (IKK β), Phospho-I κ B kinase alpha/beta

[收稿日期] 20170316(001)

[基金项目] 广东省省级科技计划项目(2014A020212596)

[第一作者] 朱青, 硕士, 从事中医药治疗肝病的基础与临床研究, Tel:020-36585419, E-mail: zhenyi19890121@163.com

[通讯作者] *袁冬生, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中医药治疗肝病的基础与临床研究, Tel:020-39357660, E-mail: ydshy@21.cn.com

[Phospho-IKK α/β (Ser^{176/180})], Phospho-insulin receptor substrate [Phospho-IRS-1 (Ser³⁰⁷)] and insulin receptor substrate-1 (IRS-1) protein were detected by Western blot. **Result:** The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in the supernatant fluid of the model group were significantly higher than those in control group ($P < 0.01$). Meanwhile, the expression of IRS-1 was reduced ($P < 0.05$), while the levels of IKK β , p-IKK α/β (Ser^{176/180}) and IRS-1 (Ser³⁰⁷) phosphorylation and nuclear translocation of NF- κ B p65 protein were increased in the model group ($P < 0.01$). The expressions of IKK α/β (Ser^{176/180}) and IRS-1 (Ser³⁰⁷) phosphorylation and nuclear translocation of NF- κ B p65 protein in each dose group were decreased ($P < 0.01$), especially in high-dose Xiaozhi decoction. The protein expression of IRS-1 was significantly increased ($P < 0.05$) in control group. **Conclusion:** Xiaozhi decoction can improve lipid deposition and inflammatory reaction in NASH cell model induced by FFA. The mechanism may be related to the inhibition of intracellular IKK α/β (Ser^{176/180}) and IRS-1 (Ser³⁰⁷) phosphorylation and IKK β , NF- κ B nuclear protein expression.

[**Key words**] non-alcoholic steatohepatitis (NASH); HepG2 cell model; Xiaozhi decoction; free fatty acids; nuclear factor- κ -gene binding (NF- κ B); IkkappaB kinase α/β (IKK α/β); insulin receptor substrate-1 (IRS-1)

非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 主要是指以单纯性脂肪变、门脉周围及肝小叶炎症为主要病理改变的疾病,是非酒精性脂肪性肝病进展的更严重的阶段^[1-3], 2% ~ 3% 的人群发展为肝硬化,其机制主要与脂质代谢紊乱、炎症和胰岛素抵抗 (IR) 等相关^[4],其中 IR 是关键,贯穿于“二次打击”的整个过程。早期实验研究消脂汤可改善非酒精脂肪性肝病小鼠模型的 IR,其机制与激活 PPAR α 途径相关^[5]。目前研究普遍认为 IR 是一个慢性非特异性炎症持续过程,炎症与 IR 存在潜在联系。研究表明水杨酸通过抑制 I κ B 激酶 β (IKK β) 逆转肥胖和饮食诱导的 IR^[6],实验发现缺失 IKK β 可使高脂喂养的小鼠免于发生 IR^[7]。NASH 发病机制关键是 IR,贯穿于疾病的整个进展过程^[8]。高浓度的游离脂肪酸 (FFAs) 易导致细胞内脂肪蓄积明显,导致肝细胞炎症反应、氧化应激等,导致肝细胞对胰岛素敏感性降低,产生 IR^[9-12]。

本研究通过高浓度游离脂肪酸 (FFAs) 诱导 HepG2 细胞建立 NASH 模型,以观察消脂汤对细胞模型脂质、细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6 (IL-6) 含量的影响,及对炎症相关蛋白如 IKK β ,核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65) 蛋白表达的影响,及胰岛素信号转导相关分子,如胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 蛋白表达影响,探讨消脂汤改善 IR 及抗炎的相关性,对二者相关性机制进行研究,探讨 IKK β 是否是消脂汤缓解炎症和改善 IR 的靶基因。

1 材料

1.1 细胞株 HepG2 细胞由广州中医药大学热带

医学研究所提供。

1.2 药物 消脂汤 (专利号中国, 201110416602.1), 方药组成为山楂 30 g, 何首乌 20 g, 决明子 20 g, 丹参 30 g, 虎杖 15 g, 白术 15 g, 泽泻 15 g, 柴胡 10 g, 中药饮片由广州中医药大学第一附属医院提供,由广州中医药大学中药学院王利胜教授鉴定为正品。复方煎剂浓缩为含生药 3.0 g \cdot mL⁻¹,后于超净台内无菌 PBS 稀释至 100 g \cdot L⁻¹ 的存储液,过滤灭菌,置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。非诺贝特胶囊 (法国利博福尼制药公司,批号 24586), 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解至浓度为 1 mmol \cdot L⁻¹ 的存储液,过滤灭菌,置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。药物均用无血清 DMEM 培养基稀释至需要浓度,现用现配;脂肪酸 (油酸-棕榈酸 2:1)。

1.3 试剂 棕榈酸 (PA), 油酸 (OA), fatty-acid-free bovine serum albumin (Sigma 公司,货号分别为 091M181V, 070MB58/V, 1028A0515); 油红 O (阿拉丁公司,批号 B1414022); 苏木素染液 (南京建成生物工程研究所,批号 20160428); TNF- α , IL-6 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒 (武汉华美生物公司,批号分别为 U13012199, U13012198); BCA 蛋白定量试剂盒 (弗德生物公司,批号 FD2001); 抗 IKK β , IRS-1 兔单克隆抗体 (Abcam 公司,批号分别为 ab124957, ab40777); Phospho-IKK α/β (Ser^{176/180}), Phospho-IRS-1 (Ser³⁰⁷), NF- κ B p65 兔单克隆抗体, β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体, β -tubulin 抗体 (CST 公司,批号分别为 2697, 2381, 8242, Bsm-33036M, 15115); HRP 标记山羊抗兔抗体 (Jackson Immunoresearch 公司,批号 111-035-003); HRP 标记山羊抗小鼠抗体 (Ckson

Immunoresearch 公司,批号 115-035-003 ja)。

1.4 仪器 M1000 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);706 型 Forma - 80 °C 超低温冰箱(美国 Thermo Scientific 公司);Neofuge 23R 型台式高速离心机 High Speed Bench-top Centrifuge(上海力申科学仪器有限公司);XK-8 型脱色摇床,DYY-7C 型电泳仪及转膜仪(北京六一仪器厂);MX328 型扫描仪(中国 Canon 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HepG2 细胞采用高糖 DMEM + 10% 血清的完全培养基培养,培养条件 37 °C 5% CO₂,待细胞长满至 70% ~ 80% 时用 0.25% 胰酶进行消化;取对数生长期的细胞用于实验。

2.2 模型建立和药物干预 取对数生长期的细胞,按 5×10^4 个/mL 接种到 96 孔板中,待细胞完全贴壁(24 h)后,弃去旧培养基,PBS 洗涤 3 次,用无血清 DMEM 培养基饥饿过夜,将细胞分为 6 组(每组 6 个复孔):正常组、模型组、消脂方高、中、低质量浓度(10,5,2.5 g·L⁻¹)组、非诺贝特(10 μmol·L⁻¹)组,药物浓度由细胞毒性预实验确定,首先通过噻唑蓝(MTT)比色实验确定药物的半抑制浓度(IC₅₀ 20 g·L⁻¹左右),在此基础上等梯度稀释(40,20,10,5,2.5,1.25 g·L⁻¹),最终选取有浓度依赖性的剂量,且细胞毒性小,即细胞存活率 80% 左右,药物组用相应药物 + FFA,正常组加等体积的 5% BSA,模型组加 FFA,刺激 24 h,进行后续实验。见图 1。

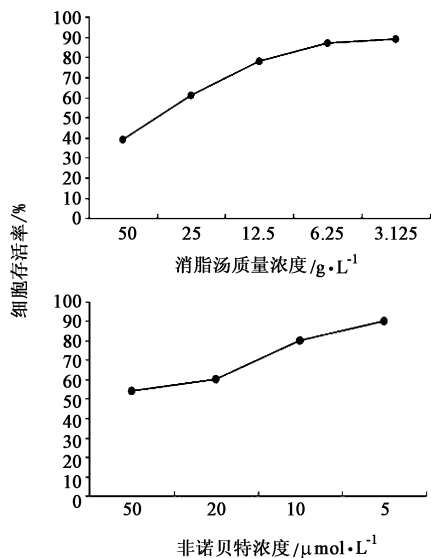


图 1 消脂汤对 HepG2 细胞炎症模型的影响

Fig.1 Effect of Xiaozhi decoction on inflammation model of HepG2 cells in each group

2.3 油红 O 染色及脂滴含量的测定 细胞干预结

束后,用 PBS 洗涤细胞,后用 4% 中性甲醛固定液固定 1 h,吸弃固定液,PBS 洗涤 3 次,加入配置好的油红 O 工作液染色 30 min,吸弃染色液,60% 异丙醇洗涤 1 次,PBS 洗涤 2 次,加入苏木素染液复染 1 min,PBS 洗涤 3 次,自然风干,倒置荧光相差显微镜下观察并拍照记录。脂滴含量的测定,用基于 ORO 比色测定法测量脂质累积的程度。洗涤染色的样品,然后置于 32 °C 培养箱中以除去过量水。向每个孔中加入 100% 异丙醇 100 μL 后,将 96 孔板孵育 10 min。然后将样品转移到另一个干净的 96 孔板中,用紫外分光光度计在 510 nm 处测量每孔吸光度 A^[13]。

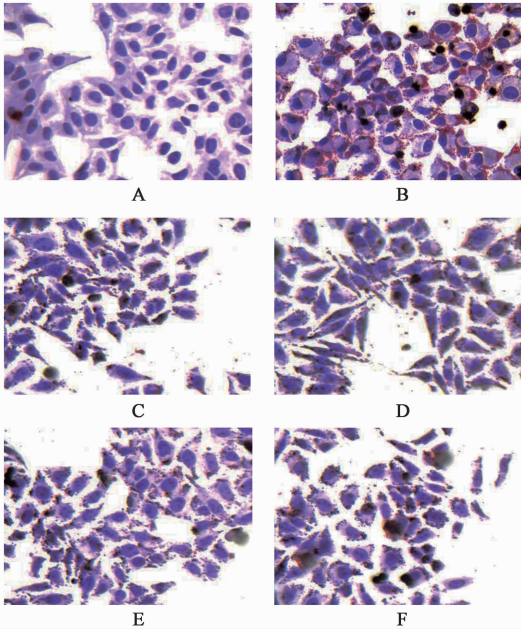
2.4 上清液 TNF-α,IL-6 指标检测 取对数生长期的细胞,按 5×10^5 个/mL 接种到 25 mm² 培养瓶中,待细胞融合率达 80% 后,弃去旧培养基,PBS 洗涤 3 次,用无血清 DMEM 培养基饥饿过夜,将细胞分为 6 组,正常组(5% BSA 高糖培养基),模型组(0.5 μmol·L⁻¹ FFA),消脂方(10,5,2.5 g·L⁻¹)组,非诺贝特组(10 μmol·L⁻¹),其中药物组用相应药物作用 12 h 后,除正常组外,各组依次加 FFA 刺激 24 h,实验结束后留取细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF-α,IL-6 含量,检测波长 490 nm。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 细胞培养方法同 2.4 项,刺激结束后,用预冷 PBS 冲洗细胞 2 ~ 3 次,彻底吸干残留液;加入适当体积的 RIPA(使用前加入蛋白酶抑制剂),用细胞刮刀将细胞及试剂刮下,收集细胞,冰浴 30 min,期间用移液器反复吹打,12 000 × g 离心 5 min,收集上清;按照细胞核蛋白抽提试剂盒提取细胞核蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒检测细胞蛋白浓度。将提取的总蛋白行 SDS-PAGE 电泳,结束后取下凝胶,将产物电转移到 PVDF 膜上,加入稀释的一抗(1:1 000, TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶,磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5% BSA),包括 β-actin, NF-κB, IKKβ, IRS-1, Phospho-IKKα/β(Ser^{176/180}), Phospho-IRS-1(Ser³⁰⁷), 4 °C 孵育过夜。二抗室温孵育 1 h,放入暗匣中曝光,将 PVDF 膜置于显影液中显色,最后用显影、定影试剂进行显影和定影,根据不同的光强度调整曝光条件,将胶片进行扫描存档,Image J 软件处理系统分析目标条带的灰度值。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据是正态分布,方差齐,采用单因素方差分析(F 检验),Bonferroni 法进行多重比较,P < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 消脂方对 HepG2 细胞内脂滴含量的影响 正常组细胞胞浆内未见红色脂滴;模型组可见细胞胞浆内大量红色脂滴,呈“印戒”状;各给药组细胞内脂滴明显减少,脂滴颗粒较小。见图 2。



A. 正常组;B. 模型组;C~E. 消脂方高、中、低浓度组;F. 非诺贝特组(图 3~5 同)

图 2 消脂方对 HepG2 细胞内脂滴含量的影响(油红 O 染色, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Xiaozhi decoction on lipid droplet content in each group of HepG2 cells (oil red O staining, $\times 400$)

3.2 消脂汤对细胞内脂滴含量的影响 与模型组比较,各给药组脂滴含量显著减少($P < 0.01$);与非诺贝特组比较,消脂汤高、中剂量组脂滴含量明显减少($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 消脂汤对 NASH 细胞模型脂滴的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Xiaozhi decoction on lipid content in NASH cell model($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度	脂滴 A
模型	-	1.000 \pm 0.000
消脂汤	10 g·L ⁻¹	0.612 \pm 0.080 ^{1,3)}
	5 g·L ⁻¹	0.689 \pm 0.048 ^{1,2)}
	2.5 g·L ⁻¹	0.789 \pm 0.106 ¹⁾
非诺贝特	10 μ mol·L ⁻¹	0.824 \pm 0.063 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与非诺贝特组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 消脂汤对细胞培养上清 TNF- α , IL-6 含量的影响 与正常组比较,模型组细胞培养上清中 IL-6, TNF- α 含量显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,

消脂方高、中浓度组细胞培养上清中 IL-6, TNF- α 含量明显减少($P < 0.05$),与非诺贝特组比较,消脂汤高、中浓度组细胞培养上清中 IL-6, TNF- α 含量显著减少($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 消脂汤对体外 NASH 细胞模型 IL-6, TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Xiaozhi decoction on IL-6 and TNF- α in NASH cell model *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度	IL-6	TNF- α
正常	-	45.891 \pm 12.262	52.181 \pm 4.066
模型	-	94.353 \pm 8.115 ²⁾	104.532 \pm 2.492 ²⁾
消脂汤	10 g·L ⁻¹	55.147 \pm 8.156 ^{4,6)}	61.916 \pm 5.584 ^{4,5)}
	5 g·L ⁻¹	64.329 \pm 5.143 ^{1,4,5)}	80.815 \pm 3.573 ^{1,4,5)}
	2.5 g·L ⁻¹	70.811 \pm 13.749 ^{1,3)}	97.012 \pm 7.582 ¹⁾
非诺贝特	10 μ mol·L ⁻¹	97.483 \pm 15.070 ²⁾	104.791 \pm 4.069 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与非诺贝特组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 消脂汤对 NASH 细胞模型中相关蛋白表达的影响

3.4.1 消脂汤对 NASH 细胞模型中 p-IRS1 (Ser³⁰⁷), IRS-1 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 IRS-1 蛋白表达显著减少($P < 0.01$),p-IRS1 (Ser³⁰⁷)蛋白表达显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 p-IRS1 (Ser³⁰⁷)蛋白表达显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,消脂汤中浓度组 IRS1 蛋白表达显著增加($P < 0.01$)。见图 3,表 3。

表 3 消脂汤对各组细胞 p-IRS1 Ser307, IRS1 蛋白相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Xiaozhi decoction on relative expressions of p-IRS1 Ser307 and IRS1 protein($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度	IRS-1/ β -actin	p-IRS1 (Ser ³⁰⁷)/ β -actin
正常	-	0.997 \pm 0.006	1.000 \pm 0.017
模型	-	0.893 \pm 0.006 ¹⁾	1.460 \pm 0.010 ¹⁾
消脂汤	10 g·L ⁻¹	0.843 \pm 0.006	0.840 \pm 0.017 ²⁾
	5 g·L ⁻¹	0.947 \pm 0.006 ²⁾	1.130 \pm 0.017 ²⁾
	2.5 g·L ⁻¹	0.883 \pm 0.006	1.293 \pm 0.006 ²⁾
非诺贝特	10 μ mol·L ⁻¹	0.780 \pm 0.010	0.846 \pm 0.021 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.4.2 消脂汤对 NASH 细胞模型中 p-IKK α / β , IKK β 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 p-IKK α / β (Ser^{176/180}), IKK β 蛋白表达显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 p-IKK α / β (Ser^{176/180}), IKK β 蛋白表达显著减少($P < 0.01$);

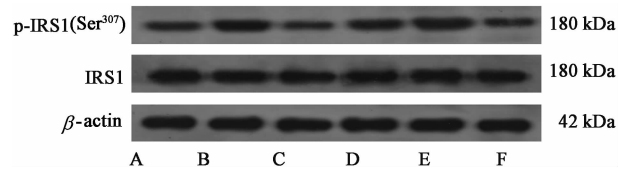


图 3 NASH 细胞模型中 p-IRS1 (Ser³⁰⁷), IRS1 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Xiaozhi decoction on expressions of p-IRS1 (Ser³⁰⁷) and IRS1 protein in NASH cell model

消脂汤高浓度组 p-IKK α / β (Ser^{176/180}), IKK β 蛋白表达较非诺贝塞特组减少 ($P < 0.01$)。见图 4, 表 4。

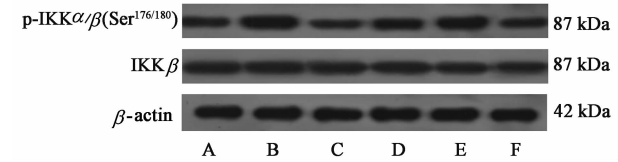


图 4 NASH 细胞模型中 p-IKK α / β (Ser^{176/180}), IKK β 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of Xiaozhi decoction on expressions of p-IKK α / β (Ser^{176/180}), IKK β protein in NASH cell model

表 4 消脂汤对各组细胞 IKK β , p-IKK α / β (Ser^{176/180}) 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Xiaozhi decoction on relative expressions of IKK β , p-IKK α / β (Ser^{176/180}) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度	p-IKK α / β (Ser ^{176/180}) / β -actin	IKK β / β -actin
正常	-	1.01 \pm 0.015	1.00 \pm 0.006
模型	-	1.467 \pm 0.006 ¹⁾	1.053 \pm 0.006 ¹⁾
消脂汤	10 g·L ⁻¹	0.817 \pm 0.015 ^{1,2,3)}	0.937 \pm 0.006 ^{1,2,3)}
	5 g·L ⁻¹	1.050 \pm 0.010 ^{1,2,3)}	0.877 \pm 0.006 ^{1,2,3)}
	2.5 g·L ⁻¹	1.186 \pm 0.006 ^{1,2,3)}	0.797 \pm 0.006 ^{1,2,3)}
非诺贝特	10 μ mol·L ⁻¹	0.840 \pm 0.015 ^{1,2)}	0.970 \pm 0.000 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与非诺贝特组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 5 同)。

3.4.3 消脂汤对 NASH 细胞模型中 NF- κ B (总蛋白), NF- κ B (核蛋白) 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组内 NF- κ B (核蛋白) 表达显著增多 ($P < 0.01$), NF- κ B (总蛋白) 无明显差异;各给药组 NF- κ B (核蛋白) 较模型组表达显著减少 ($P < 0.01$), 消脂汤高浓度组 NF- κ B (核蛋白) 较非诺贝特组显著减少 ($P < 0.01$); NF- κ B (总蛋白) 无明显差异。见图 5, 表 5。

4 讨论

越来越多的研究表明,传统的中药对于肝功能的恢复及血脂的控制较西药具有较好的疗效。中药有效成分、单味中药和中药复方在防治非酒精性脂

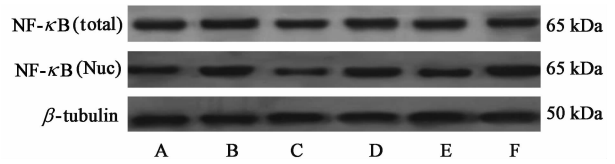


图 5 NASH 细胞模型中 NF- κ B (总蛋白), NF- κ B (核蛋白) 表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of NF- κ B (total protein) and NF- κ B (nuclear protein) expression in NASH cell model

表 5 消脂汤对各组细胞 NF- κ B (总蛋白), NF- κ B (核蛋白) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of Xiaozhi decoction on expressions of NF- κ B (total) and NF- κ B (Nuc) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度	NF- κ B (总蛋白) / β -tubulin	NF- κ B (核蛋白) / β -tubulin
正常	-	1.037 \pm 0.058	0.943 \pm 0.006
模型	-	1.240 \pm 0.078	1.210 \pm 0.000 ¹⁾
消脂汤	10 g·L ⁻¹	1.193 \pm 0.025 ³⁾	0.643 \pm 0.015 ^{1,2,3)}
	5 g·L ⁻¹	1.137 \pm 0.040	0.960 \pm 0.010 ²⁾
	2.5 g·L ⁻¹	1.000 \pm 0.010	0.797 \pm 0.006 ^{1,2,3)}
非诺贝特	10 μ mol·L ⁻¹	1.000 \pm 0.010	0.970 \pm 0.000 ^{1,2)}

肪性肝病方面具有较显著的优势,可弥补西药治疗效果单一,副作用的缺点。消脂汤是基于中医理论及多年临症经验制定的中医复方,早期动物实验研究表明,消脂汤对非酒精性脂肪性肝病大鼠模型^[5,14] 具有较好的治疗效果,其可改善 IR,减轻肝脏的氧化应激,进而减轻炎症反应,此外具有显著的降脂及改善肝功能的作用;体外实验表明,消脂汤可抑制脂肪细胞的分化,调节脂质代谢^[14]。本次实验在前期研究的基础上探讨消脂汤改善 IR 及炎症反应的相关性,对其机制进行探讨。

IR 是指靶组织细胞对胰岛素敏感性下降产生的病理状态,目前认为 IR 是一个慢性非特异性炎症持续过程。研究已表明消脂汤具有抗炎,改善 IR 和纠正脂质代谢紊乱的作用^[5,15]。基于 IR 是慢性非特异性炎症持续过程的概念,假设消脂汤的抗炎作用与改善胰岛素的作用相关。研究发现水杨酸(一种传统的抗炎剂)通过抑制 IKK β 逆转肥胖和饮食诱导的 IR^[16]。胰岛素信号转导蛋白不仅通过酪氨酸磷酸化的调节,而且丝氨酸/苏氨酸磷酸化也可调节胰岛素信号的转导。生理情况下,胰岛素与胰岛素受体结合,胰岛素受体磷酸化,导致 IRS 的酪氨酸磷酸化,随后激活其下游底物,将胰岛素信号转导至效应器。炎性因子可激活一系列激酶,使 IRS 的丝氨酸/苏氨酸发生磷酸化,从而干扰酪氨酸的磷酸

化,干扰胰岛素信号通路的下传,从而减弱了胰岛素信号转导引起 IR。同时,IRS 的丝氨酸/苏氨酸磷酸化还可增加 IRS 的降解,以及使 IRS 成为胰岛素受体激酶的抑制物。TNF- α , IL-6 可激活 IKK。IKK β 可激活炎症调节因子 NF- κ B,是炎症信号干扰胰岛素信号转导的枢纽^[17]。本研究探讨 IKK β 是否是消脂汤改善 IR 和缓解炎症的潜在分子靶点。

本研究通过用 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FFA 诱导 HepG2 细胞建立 NASH 细胞模型,油红 O 染色、脂滴含量及细胞上清液中 TNF- α , IL-6 含量显示模型组内脂滴较正常组增多,各药物组则减少,这表明消脂汤可减少 NASH 细胞脂质蓄积,减轻炎症反应。

研究表明丝氨酸 (Ser³⁰⁷) 磷酸化会促进 IRS-1 在肝细胞内的降解,影响胰岛素信号转导引起 IR^[18-19]。在本实验中,FFA 促进 IRS-1 (Ser³⁰⁷) 的磷酸化,而消脂汤或非诺贝特则抑制 IRS-1 (Ser³⁰⁷) 的磷酸化,FFA 促进 IRS-1 的降解,而这种作用可以被消脂汤所抑制。IKK 是胰岛素受体底物丝氨酸磷酸化激酶,可使 IRS-1 (Ser³⁰⁷) 磷酸化,导致正常酪氨酸磷酸化受到抑制,阻碍胰岛素信号转导,引起 IR^[20]。IKK 使 IRS-1 (Ser³⁰⁷) 磷酸化,而 IKK α (Ser^{176/180}) 和 IKK β (Ser^{177/181}) 磷酸化是 IKK 激活所必需的。IKK β 过度表达会减弱胰岛素信号转导,而缺失 IKK β 的高脂喂养小鼠则可避免发生 IR^[19]。本研究中,FFA 促进 IKK α/β (Ser^{176/180}) 磷酸化,导致 IKK 的激活,进而促进 IRS-1 Ser³⁰⁷ 的磷酸化,而消脂汤则可抑制 FFA 诱导的 IKK α/β (Ser^{176/180}) 磷酸化。

NF- κ B 作为可诱导核转录激活的因子普遍存在于组织细胞中,是启动和调节炎症的关键因子。生理状态下,NF- κ B 和 I κ B 形成复合物,以无活性形式存在于细胞浆中。TNF- α , IL-6 等炎症因子可使 IKK α/β 磷酸化^[21-22],激活 IKK,使其与 NF- κ B 解离,后 NF- κ B 转移至细胞核内,与特异性 DNA 序列结合,诱导相关基因的转录 (TNF- α , IL-6 等),发挥生物学效应^[22]。在本实验中,分别检测了细胞内总 NF- κ B 蛋白及细胞核 NF- κ B 蛋白,结果显示各组细胞中总 NF- κ B 蛋白表达无明显差异;FFA 诱导组内核 NF- κ B 蛋白的表达明显增加,而各消脂汤组内核 NF- κ B 蛋白表达显著减少,可能与其抑制 NF- κ B 核转移相关。

总之,本研究结果表明炎症与 IR 之间存在联系,与目前认为的“IR 是一个慢性非特异性炎症持续过程”相一致,而 IKK 是将炎症与 IR 联系起来的枢纽。IKK β 活性增加则促进 IR 的产生,反之则

抑制 IR。FFA 可使 IKK α/β 磷酸化,激活 IKK,引起 IRS-1 (Ser³⁰⁷) 磷酸化和 NF- κ B 核转移。IRS-1 (Ser³⁰⁷) 磷酸化使正常酪氨酸磷酸化受到抑制,引起 IR;NF- κ B 核转移导致炎症因子如 TNF- α 产生增多,二者相合,导致炎症反应的放大,加重 IR。本研究结果与前人研究结果相一致,表明消脂汤可改善 FFA 诱导的 NASH 细胞模型中脂肪蓄积,减轻炎症反应和 IR,机制与其抑制 IKK α/β , IRS-1 (Ser³⁰⁷) 的磷酸化,IKK β 及 NF- κ B 核蛋白表达相关。

[参考文献]

- [1] CAO H X, FAN J G. Fatty liver disease: a growing public health problem worldwide [J]. *J Digest Dis*, 2011,12(1):1-2.
- [2] Ahmed A, WONG R J, Harrison S A. Nonalcoholic fatty liver disease review: diagnosis, treatment, and outcomes [J]. *Clin Gastroenterol H*, 2015,13(12):2062-2070.
- [3] Kim N H, Park J, Kim S H, et al. Non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and subclinical cardiovascular changes in the general population [J]. *Heart*, 2014,100(12):938-943.
- [4] 朱青, 王晓歌, 王奇, 等. 消脂汤对非酒精性脂肪性肝炎小鼠肠道主要菌群的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017,23(14):164-170.
- [5] 杨道炬, 李常青, 廖向彬, 等. 消脂汤对非酒精性脂肪性肝病模型大鼠治疗的作用及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014,20(18):159-164.
- [6] YUAN M S, Konstantopoulos N, Lee J S, et al. Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK beta [J]. *Sciences*, 2001,293(5535):1673-1677.
- [7] Kim J K, Kim Y J, Fillmore J J, et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate [J]. *J Clin Invest*, 2001,108(3):437-446.
- [8] Orlik B, Handzlik G, Olszanecka-Glinianowicz M. The role of adipokines and insulin resistance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Postep Hig Med Dosw*, 2010,64(7):212-219.
- [9] YUAN Q H, ZHAO S D, WANG F W, et al. Palmitic acid increases apoptosis of neural stem cells via activating c-Jun N-terminal kinase [J]. *Stem Cell Res*, 2013,10(2):257-266.
- [10] Chavez-Tapia N C, Rosso N, Tiribelli C. Effect of intracellular lipid accumulation in a new model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *BMC Gastroenterol*, 2012,12(1):1-10.
- [11] 王允亮, 李健, 刘丽娟, 等. 游离脂肪酸诱导非酒精性脂肪性肝炎细胞模型的建立及动态监测 [J]. *中西医*

- 结合肝病杂志,2013,23(4):225-227.
- [12] WANG G L, FU Y C, XU W C, et al. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis *via* Sirt1-FOXO1 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380 (3): 644-649.
- [13] 杨道炬. 消脂方治疗非酒精性脂肪性肝病的药效学及机制的研究[D]. 广州:广州中医药大学热带医学研究所,2015.
- [14] 石磊,袁冬生,朱彩平,等. 消脂汤对四环素致小鼠脂肪肝模型的保护作用研究[J]. *热带医学杂志*,2008, 8(8):769-809.
- [15] YI P, LU F E, XU L J, et al. Berberine reverses free-fatty-acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through targeting IKK beta [J]. *World J Gastroenterol*,2008,14(6):876-883.
- [16] Feldstein A E, Werneburg N W, Canbay A, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression *via* a lysosomal pathway [J]. *Hepatology*,2004,40(1):185-194.
- [17] YUAN M S, Konstantopoulos N, Lee J S, et al. Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK beta [J]. *Science*,2001,293(5535):1673-1677.
- [18] Margioris A. Molecular mechanisms of insulin resistance [J]. *Diabetes Obes Metab*,2010,12:5-6.
- [19] Saltiel A R, Pessin J E. Insulin signaling pathways in time and space [J]. *Trends Cell Biol*,2002,12(2): 65-71.
- [20] Kern P A, Ranganathan S, Li C L, et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance[J]. *Am J Physiol-Endoc M*,2001,280(5):E745-E751.
- [21] Federici M, Hribal M L, Menghini R, et al. Timp3 deficiency in insulin receptor-haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation *via* increased TNF-alpha [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115 (12):3494-3505.
- [22] GAO Z G, Hwang D, Bataille F, et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex [J]. *J Biol Chem*, 2002,277(50):48115-48121.

[责任编辑 张丰丰]