

雷公藤红素对非酒精性脂肪肝 L02 细胞内质网应激的影响及机制

姜霞, 姜慧玲, 杨帆, 肖业伟, 冯志强, 盘强文*

(西南医科大学, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的:**通过雷公藤红素干预非酒精性脂肪肝 L02 细胞模型来探讨雷公藤红素调节肝 L02 细胞脂质代谢紊乱及非酒精性脂肪肝 L02 细胞内质网应激的相关机制。**方法:**将肝 L02 细胞分为空白组,模型组,雷公藤红素低剂量组($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),雷公藤红素高剂量组($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和辛伐他汀组($\text{SIM}, 6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)进行培养。检测肝 L02 细胞内胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)含量变化;用油红 O 染色观察肝 L02 细胞脂质沉积情况;逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测各组肝 L02 细胞中内质网应激(ERS)相关信号分子活化转录因子 6(ATF6),葡萄糖调节蛋白 78(GRP78),肌醇需求酶 1(IRE1),固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(SCAP),固醇调节元件结合蛋白 1c(SREBP-1c)和固醇调节元件结合蛋白-2(SREBP-2)的 mRNA 转录以及蛋白表达水平。**结果:**非酒精性脂肪肝病(NAFLD)组肝 L02 细胞中 TC 及 TG 含量均高于空白组($P < 0.05$),雷公藤红素低、高剂量组及 SIM $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组肝 L02 细胞中 TC 及 TG 含量较 NAFLD 组均有不同程度减少($P < 0.05$)。油红 O 染色显示 NAFLD 组肝 L02 细胞内含有大量红染脂质颗粒沉积,而雷公藤红素低、高剂量组及 SIM $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组红染脂质颗粒较 NAFLD 组均有不同程度减少。RT-PCR 和 Western blot 结果显示,NAFLD 组肝 L02 细胞内 ERS 相关信号分子 ATF6,GRP78,IRE1,SCAP,SREBP-1c 和 SREBP-2 的 mRNA 转录和蛋白表达水平均高于空白组($P < 0.05$);雷公藤红素低、高剂量组和 SIM $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组肝 L02 细胞内 ATF6,GRP78,IRE1,SCAP,SREBP-1c 和 SREBP-2 的 mRNA 转录及蛋白表达水平均低于 NAFLD 组($P < 0.05$)。而雷公藤红素高剂量组与 SIM $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组间肝 L02 细胞内 ATF6,GRP78,IRE1,SCAP,SREBP-1c 和 SREBP-2 mRNA 转录及蛋白表达水平差异不具有统计学意义。**结论:**雷公藤红素可通过下调肝 L02 细胞 ERS 时相关信号分子 ATF6,GRP78,IRE1,SCAP,SREBP-1c 和 SREBP-2 的表达来减轻肝 L02 细胞脂质代谢紊乱,从而改善 NAFLD。

[关键词] 雷公藤红素;非酒精性脂肪肝;内质网应激;肝 L02 细胞

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0099-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191303

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190319.1123.006.html>

[网络出版时间] 2019-03-19 14:01

Effect and Mechanism of Celastrol on Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatic L02 Cells of Nonalcoholic Fatty Liver Disease

JIANG Xia, JIANG Hui-ling, YANG Fan, XIAO Ye-wei, FENG Zhi-qiang, PAN Qiang-wen*

(Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of celastrol in inhibiting the lipid metabolism disorder in hepatic L02 cells and its possible mechanism on endoplasmic reticulum stress (ERS) of non-alcoholic fatty liver cells by intervening non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) cell model with celastrol. **Method:** Hepatic L02 cells were divided into control group, model group, low-dose celastrol treatment group (Cel $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), high-dose celastrol treatment group (Cel $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and simvastatin group (SIM $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for cultivation. The

[收稿日期] 20181105(019)

[基金项目] 四川省教育厅项目(16ZB0198)

[第一作者] 姜霞,在读硕士,从事代谢紊乱与器官损害研究,E-mail:1119365791@qq.com

[通信作者] *盘强文,硕士,教授,从事代谢紊乱与器官损害研究,E-mail:qwpan@swmu.edu.cn

contents of total cholesterol (TC) and total triglyceride (TG) in hepatic L02 cells were detected, and the oil red staining was used to detect the lipid accumulation in hepatic L02 cells. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of endoplasmic reticulum stress (ERS)-related signal molecules activating transcription factor 6 (ATF6), glucose regulated protein 78 (GRP78), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein (SCAP), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) and sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) in hepatic L02 cell model respectively. **Result:** The contents of TC and TG in hepatic L02 cells of NAFLD group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The TC and TG contents in hepatic L02 cells of Cel 0.5 mg·L⁻¹ group, Cel 1 mg·L⁻¹ group and SIM 6 mg·L⁻¹ group were significantly lower than those in NAFLD group ($P < 0.05$). Oil red O staining showed that a large amount of red-stained lipid particles were deposited in the hepatic L02 cells of the NAFLD group, while the red-stained lipid particles in the Cel 0.5 mg·L⁻¹ group, the Cel 1 mg·L⁻¹ group, and the SIM 6 mg·L⁻¹ group were lower than the NAFLD group to different degrees. According to the results of RT-PCR and Western blot, the mRNA transcription and protein expression levels of ERS-related signaling molecules ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c and SREBP-2 in hepatic L02 cells of NAFLD group were higher than those of control group ($P < 0.05$). The mRNA transcription and protein expression levels of ERS-related signaling molecules ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c and SREBP-2 in hepatic L02 cells of Cel 0.5 mg·L⁻¹ group, Cel 1 mg·L⁻¹ group and SIM 6 mg·L⁻¹ group were lower than those of NAFLD group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the mRNA transcription and protein expression levels of ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c and SREBP-2 between the Cel 1 mg·L⁻¹ group and the SIM 6 mg·L⁻¹ group. **Conclusion:** Celastrol can reduce the lipid metabolism disorder in hepatic L02 cells by down-regulating the expressions of ERS-related signaling molecules ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c and SREBP-2 in hepatic L02 cells, so as to improve NAFLD.

[Key words] celastrol; non-alcoholic fatty liver disease; endoplasmic reticulum stress; hepatic L02 cells

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是一种与内质网应激 (ERS), 胰岛素抵抗等密切相关的以肝小叶细胞脂质变性为特征的获得性慢性代谢性肝损伤疾病。其病理进程包括非炎症的单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 及肝脏纤维化、肝硬化和肝细胞癌。多项研究提示在 NAFLD 中发现了 ERS, 且 ERS 与 NAFLD 的发生发展密切相关^[1-4]。有研究指出 ERS 信号通路分别有蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK)/真核细胞起始因子-2 α (eIF-2 α) 通路、肌醇需求酶 1 (IRE1)/X 盒结合蛋白-1 (XBP-1) 通路和活化转录因子 6 (ATF6) 3 条通路^[5]。研究证实在 NAFLD 发生发展过程中, ERS 3 条信号通路的标志物葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78), (活化转录因子 4 (ATF4), 固醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c) 的 mRNA 和蛋白水平均为高表达态势, 表明 ERS 可能参与了 NAFLD 的形成和发展过程^[6-8]。雷公藤红素是一种提取自中药材的三萜类化合物, 具有抗炎、抗氧化和抗癌的生物药理活性^[9], 其在几种慢性疾病的实验模型中显示出了预防治疗效果。雷公藤红素在临床已广泛用于治疗多种炎症

疾病、自身免疫性疾病、乳腺癌和肝细胞肝癌等^[10-11], 因其具有肝肾及生殖毒性等副作用, 临床还将其与多种药物联合运用, 利用药物间的协同增效减毒作用治疗多种疾病, 如与薏苡仁、蜈蚣、黄芪配伍治疗类风湿性关节炎关节病变, 与何首乌、黄芪、当归、金钱草、甘草片组成雷公藤复方汤剂不仅对血液系统减毒还可减轻对肾脏的损伤^[12], 有研究还证实雷公藤红素可减轻动物模型中的胰岛素抵抗并可通过抑制下丘脑细胞的 ERS 来减轻小鼠的瘦素抵抗, 从而减轻体质量^[13-14]。因此, 笔者推测雷公藤红素可能具有通过影响肝 L02 细胞的 ERS 进程来抑制 NAFLD 发生和发展的作用, 而此类研究国内外尚未见报道。本实验拟通过建立 NAFLD 细胞模型并以雷公藤红素进行干预, 观察肝 L02 细胞的脂质沉积情况及 ERS 相关信号分子的 mRNA 转录和蛋白表达水平的变化, 以探讨雷公藤红素调节肝 L02 细胞脂质代谢紊乱及 NAFLD L02 细胞内质网应激的相关机制。

1 材料

1.1 细胞 人肝 L02 细胞株 (西南医科大学临床

中心实验室)。

1.2 药物与试剂 雷公藤红素、辛伐他汀(大连美仑生物技术有限公司,批号分别为 34157-83-0,79902-63-9);软脂酸,噻唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司,批号分别为 P0500,298-93-1);油红 O,TAE(北京索莱宝科技有限公司,批号 313B058,T1060-500);1640 培养基(美国 HyClone 公司,批号 SH30809.01B);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 HB0205);总胆固醇(TC)与甘油三酯(TG)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 A111-1,A110-1); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(小鼠来源,合肥新恩源生物技术有限公司,批号 BL005A);trizol(美国 Ambion 公司,批号 15596026);cDNA 合成试剂盒,Es Taq Master Mix(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 CW2569M,CW0690M);BCA 蛋白浓度试剂盒(碧云天生物技术研究所,批号 P0010S);GRP78,ATF6,固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(SCAP),固醇调节元件结合蛋白-2(SREBP-2),IRE1 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-1219R,bs-1634R,bs-3862R,bs-2536R,bs-8680R);SREBP-1 多克隆抗体(上海斯信生物科技有限公司,批号 BS70008)。

1.3 仪器 BHC-1300 II A2 型生物安全柜(苏州苏洁净化设备有限公司);3111 型 CO₂ 培养箱(美国赛默飞公司);UPT-II-5T 型超纯水机(成都优普生物科技有限公司);201-1A 型电热恒温鼓风干燥箱(广州康恒仪器有限公司);IX73 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);ELx800 型吸收光酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);164-5050 型电泳仪,10025025 Rev A 型电转仪,1708265 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);DYCP-31BN 型核酸电泳仪(北京六一生物科技有限公司);2720 型 PCR 扩增仪[基因科技(上海)股份有限公司];5424R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);TDZ6B-WS 型台式低速离心机(上海卢湘仪离心机仪器);TY-80S 型脱色摇床(南京普阳科学仪器研究所)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 根据文献[15]报道及前期 MTT 比色法筛选 24,48,72 h 3 个时间点的质量浓度分别为 0.05,0.1,0.15,0.2,0.25,0.3,0.5,1,2 mg·L⁻¹ 的雷公藤红素及浓度分别为 1,2,4,6,8,10 μ mol·L⁻¹ 的辛伐他汀最佳作用浓度和时间的实验结果,显示超过 0.5 mg·L⁻¹ 的雷公藤红素刺激肝

L02 细胞 48 h 后,细胞存活率明显降低,当质量浓度超过 2 mg·L⁻¹ 刺激 L02 细胞 48 h 后存活率低于 50%,而超过 6 μ mol·L⁻¹ 的辛伐他汀刺激肝 L02 细胞 48 h 后存活率低于 80%。因此为明确雷公藤红素对非酒精性脂肪肝 L02 细胞的作用并尽可能降低雷公藤红素及辛伐他汀本身对肝 L02 细胞的毒性,选取 0.5,1 mg·L⁻¹ 的雷公藤红素及 6 μ mol·L⁻¹ 的辛伐他汀诱导 24 h 作为后续实验的浓度和时间。将肝 L02 细胞以 5 × 10⁴ 个/mL 分别接种于 24 孔板,6 孔板和 10 cm 培养皿,37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 48 h 后更换含 0.5% BSA 的 1640 培养基同步化处理 12 h,吸去培养液,把细胞随机分为以下 5 组:空白组基础培养基(含 5% FBS,1% 青链霉素和 1% 无脂肪酸 BSA 的 1640 培养基);模型组含 0.2 mmol·L⁻¹ 软脂酸的基础培养基;雷公藤红素低剂量组(0.5 mg·L⁻¹)含 0.2 mmol·L⁻¹ 软脂酸和 0.5 mg·L⁻¹ 雷公藤红素的基础培养基;雷公藤红素高剂量组(1 mg·L⁻¹)含 0.2 mmol·L⁻¹ 软脂酸和 1 mg·L⁻¹ 雷公藤红素的基础培养基;辛伐他汀组(6 mg·L⁻¹)含 0.2 mmol·L⁻¹ 软脂酸和 6 μ mol·L⁻¹ 辛伐他汀的基础培养基。分别培养 24 h 以完成造模、给药及后续油红 O 染色、胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)检测,RNA 提取和蛋白免疫印迹法(Western blot)蛋白提取。

2.2 指标检测

2.2.1 TC, TG 试剂盒检测 各组肝 L02 细胞内 TC 和 TG 含量的影响 将制备好的细胞悬液取出,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清;用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清;用 1% TritonX-100 冰上裂解细胞 40 min,裂解液直接用试剂盒测定,步骤严格按照说明书进行。

2.2.2 油红 O 染色检测 各组肝 L02 细胞内脂质沉积的情况 弃 24 孔板中培养液,预冷 PBS 漂洗 2 次,4% 多聚甲醛 500 μ L 固定 40 min,弃甲醛固定液,蒸馏水洗 2 次,每孔加 500 μ L 油红 O 工作液,37 °C 水浴 30 min 后弃油红 O 工作液,60% 异丙醇脱色 10 s,弃异丙醇,蒸馏水洗 2 次,苏木素复染细胞核 15 s,倒置显微镜下观察并拍照。

2.2.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 各组肝 L02 细胞内 ATF6,GRP78,IRE1,SCAP,SREBP-1c 和 SREBP-2 mRNA 相对表达水平 trizol 法提取肝细胞总 RNA,根据测得的总 RNA 浓度建立合适的逆转录反应体系,按照 cDNA 合成试剂盒说明书进行逆转录反应,之后按比例配好各分子反应体系再

按照94 ℃变性 30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸 30 s 步骤经过 30 个循环后,终延伸72 ℃,2 min 完成 PCR 扩增,将制备好的样品进行琼脂糖凝胶电泳,电泳完的胶直接放入 Bio-Rad 凝胶成像仪中曝光、显影、成像,用 Quantity one(4.6.2)分析条带灰度值,目的基因相对表达量 = 目的基因平均灰度值/ β -actin 的平均灰度值。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
ATF6	上游 5'-CTGAACTATGGACCTATGAG-3'	284
	下游 5'-GGTGGAGGAATGTAAAGC-3'	
GRP78	上游 5'-TAATCAGCCACCCGTAACAATC-3'	385
	下游 5'-ACCTCCCAGCTTCTCTTTATCT-3'	
IRE1	上游 5'-GCCATGGACTGGTGTAAC-3'	234
	下游 5'-GTTGCTCTGGCCTCTGTC-3'	
SCAP	上游 5'-TGGGTTGAGGAATGTGTGCTG-3'	157
	下游 5'-GAAGTAGCCGATGAGGATGATG-3'	
SREBP-1c	上游 5'-ACGGGAGGATGGACTGACTT-3'	129
	下游 5'-AGGCTTCTTTGCTGTGAGATG-3'	
SREBP-2	上游 5'-GACCACAATGCCTCTGATGA-3'	102
	下游 5'-GTCCGCCTCTCCTTCTTT-3'	
β -actin	上游 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'	205
	下游 5'-CTGGAAGGTGCACGCGAGG-3'	

2.2.4 Western blot 检测 各组肝 L02 细胞内 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 蛋白表达 取出铺满肝 L02 细胞的培养皿,用预冷 PBS 漂洗 3 次后加入含蛋白酶抑制剂(PMSF)的 RIPA 裂解液 500 μ L,将细胞刮下吸入离心管后在冰上裂解 15 min,12 000 r·min⁻¹低温离心 15 min,吸取上清液装入新的离心管,BCA 法检测蛋白浓度,蛋白样品变性,上样,电泳,转膜,5%脱脂牛奶封闭,4 ℃过夜孵育一抗,ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-2 (1:500),SREBP-1c (1:2 000), β -actin(1:1 000),PBST 洗涤 3 次,加入二抗(1:1 000)室温慢摇 1 h。PBST 室温漂洗 3 次,10 min/次,ECL 显影,用 Quantity one(4.6.2)分析条带灰度值,目的蛋白相对含量 = 目的蛋白平均灰度值/ β -actin 的平均灰度值。

2.3 统计学分析 统计分析采用 SPSS 17.0 软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行正态性检验及单因素方差

分析,组间比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 NAFLD 肝 L02 细胞中 TC 和 TG 含量的影响 与空白组比较,模型组肝 L02 细胞中 TC 和 TG 含量均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,雷公藤红素 0.5,1 mg·L⁻¹组及辛伐他汀组肝 L02 细胞 TC 和 TG 含量均明显降低($P < 0.05$);与雷公藤红素 0.5 mg·L⁻¹组比较,雷公藤红素 1 mg·L⁻¹组和辛伐他汀组肝 L02 细胞 TC, TG 含量明显降低($P < 0.05$);而雷公藤红素 1 mg·L⁻¹组与辛伐他汀 6 mg·L⁻¹组之间差异无统计学意义。见表 2。

表 2 雷公藤红素对 NAFLD 肝 L02 细胞中 TC 和 TG 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

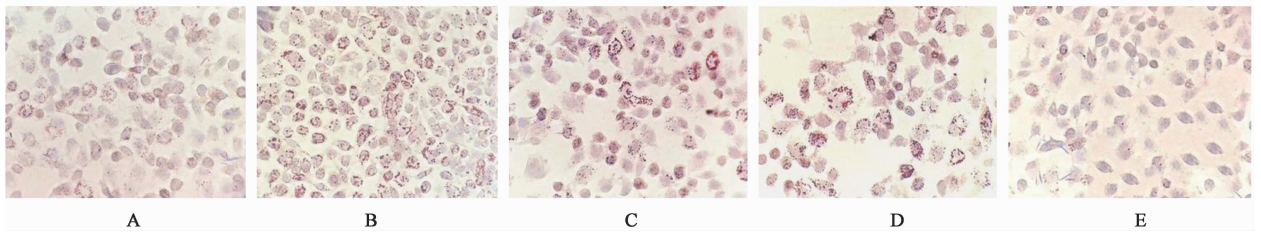
Table 2 Effect of celastrol on contents of TC and TG in hepatic L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TC	TG
空白	-	0.025 \pm 0.009	0.058 \pm 0.003
模型	-	0.118 \pm 0.015 ¹⁾	0.132 \pm 0.006 ¹⁾
雷公藤红素	0.5	0.080 \pm 0.001 ²⁾	0.097 \pm 0.007 ²⁾
	1	0.065 \pm 0.007 ²⁾	0.066 \pm 0.005 ^{2,3)}
辛伐他汀	6	0.063 \pm 0.014 ²⁾	0.065 \pm 0.009 ^{2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与雷公藤红素 0.5 mg·L⁻¹组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对 NAFLD 肝 L02 细胞脂肪沉积的影响 模型组油红 O 染色结果显示空白组肝 L02 细胞中红染颗粒少,肝 L02 细胞排列整齐;而模型组肝 L02 细胞含有大量的红染颗粒且发生脂肪变性;雷公藤红素 0.5,1 mg·L⁻¹组及辛伐他汀组红染颗粒较模型组不同程度减少。见图 1。

3.3 对 NAFLD 肝 L02 细胞内未折叠蛋白反应(UPR)相关信号分子 ATF6, GRP78, IRE1 和固醇调节级联反应相关信号分子 SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 mRNA 表达水平的影响 与空白组比较,模型组肝 L02 细胞内 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,雷公藤红素 0.5, 1 mg·L⁻¹组和辛伐他汀组肝 L02 细胞内 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$);而雷公藤红素 1 mg·L⁻¹组与辛伐他汀组间肝 L02 细胞内 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 mRNA



A. 空白组; B. 模型组; C. 雷公藤红素低剂量组; D. 雷公藤红素高剂量组; E. 辛伐他汀组(图 2, 3 同)

图 1 雷公藤红素对肝 L02 细胞脂肪沉积的影响(油红 O, ×400)

Fig. 1 Effect of celastrol on fat deposition in hepatic L02 cells(oil red O, ×400)

表达水平差异无统计学意义。见图 2, 表 3。

3.4 对 NAFLD 肝 L02 细胞内未折叠蛋白反应(UPR)相关信号分子 ATF6, GRP78, IRE1 和固醇调节级联反应相关信号分子 SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 蛋白表达水平的影响 与空白组比较, 模型组肝 L02 细胞内 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 蛋白相对表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 雷公藤红素 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 雷公藤红素 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和辛伐他汀组肝 L02 细胞内 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 蛋白相对表达水平均明显降低 ($P < 0.05$); 雷公藤红素 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和辛伐他汀组肝 L02 细胞内 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 蛋白相对

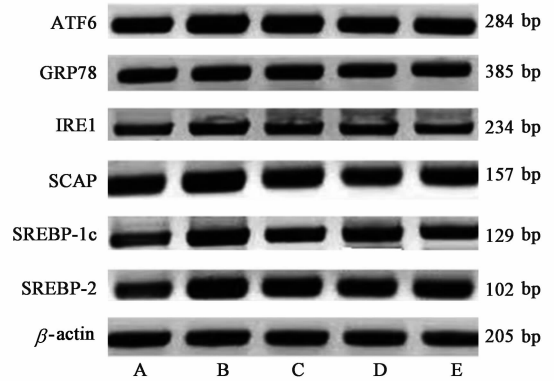


图 2 肝 L02 细胞中 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 mRNA 表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c and SREBP-2 mRNA expression in hepatic L02 cells

表 3 雷公藤红素对 NAFLD 肝 L02 细胞中 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of celastrol on ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c and SREBP-2 mRNA expression in hepatic L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	ATF6 / β -actin	GRP78 / β -actin	IRE-1 / β -actin	SCAP / β -actin	SREBP-1c / β -actin	SREBP-2 / β -actin
空白	-	1.338 ± 0.195	1.096 ± 0.083	0.745 ± 0.125	0.807 ± 0.138	0.619 ± 0.022	1.072 ± 0.020
模型	-	2.105 ± 0.226 ¹⁾	1.978 ± 0.124 ¹⁾	1.302 ± 0.049 ¹⁾	1.675 ± 0.069 ¹⁾	1.520 ± 0.141 ¹⁾	1.886 ± 0.090 ¹⁾
雷公藤红素	0.5	1.886 ± 0.228 ²⁾	1.766 ± 0.083 ²⁾	1.093 ± 0.112 ²⁾	1.136 ± 0.210 ²⁾	1.124 ± 0.080 ²⁾	1.450 ± 0.066 ²⁾
	1	1.506 ± 0.156 ²⁾	1.395 ± 0.072 ²⁾	0.887 ± 0.046 ²⁾	0.955 ± 0.162 ²⁾	0.929 ± 0.086 ²⁾	1.212 ± 0.024 ^{2,3)}
辛伐他汀	6	1.530 ± 0.327 ²⁾	1.444 ± 0.038 ²⁾	0.896 ± 0.184 ²⁾	0.903 ± 0.189 ²⁾	0.867 ± 0.022 ^{2,3)}	1.259 ± 0.059 ^{2,3)}

表达水平均低于雷公藤红素 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 ($P < 0.05$); 而雷公藤红素 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与辛伐他汀组间肝 L02 细胞内 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 蛋白相对表达水平差异无统计学意义。见图 3, 表 4。

4 讨论

雷公藤红素作为来自天然药材雷公藤的三萜类化合物, 是雷公藤多苷片和雷公藤片等制剂的主要有效成分, 是具有多种药理活性的天然药物, 尤以抗癌, 抗炎和抗氧化为主。YU 等^[16] 观察到雷公藤红素可通过提高胰岛素敏感性而降低果糖诱导的高血

压大鼠的血压, 并缓解高血压所致炎症反应。Kim 等^[17] 研究证实雷公藤红素在降低糖尿病小鼠血糖的同时, 还可显著改善 II 型糖尿病小鼠 (db/db) 糖尿病肾病, 并认为其作用与降低胰岛素抵抗有关。LIU 等^[14] 研究不仅证实雷公藤红素有降低机体能量代谢和治疗肥胖的作用, 还观察到其机制可能是显著抑制了下丘脑细胞的 ERS 所致。然而, 雷公藤红素是否能够预防和治疗 NAFLD, 其机制如何, 国内外尚未见报道。目前他汀是临床上治疗 NAFLD 的主要药物, 且有较好疗效, 但他汀类药物也存在导致肝功, 肾功损害和心肌酶谱改变等副作用, 因此,

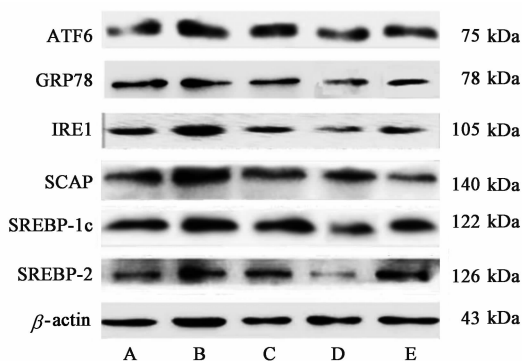


图 3 肝 L02 细胞中 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c and SREBP-2 protein expression in hepatic L02 cells

表 4 雷公藤红素对肝 L02 细胞中 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of celastrol on ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c and SREBP-2 protein expression in hepatic L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	ATF6/ β -actin	GRP78/ β -actin	IRE-1/ β -actin	SCAP/ β -actin	SREBP-1c/ β -actin	SREBP-2/ β -actin
空白	-	0.297 ± 0.077	0.795 ± 0.127	0.362 ± 0.063	0.203 ± 0.036	0.140 ± 0.004	0.613 ± 0.036
模型	-	0.774 ± 0.116 ¹⁾	2.824 ± 0.138 ¹⁾	1.435 ± 0.105 ¹⁾	1.276 ± 0.021 ¹⁾	0.753 ± 0.020 ¹⁾	2.048 ± 0.149 ¹⁾
雷公藤红素	0.5	0.600 ± 0.074 ²⁾	2.364 ± 0.088 ²⁾	0.815 ± 0.074 ²⁾	0.746 ± 0.075 ²⁾	0.541 ± 0.027 ²⁾	1.286 ± 0.199 ²⁾
	1	0.445 ± 0.148 ^{2,3)}	1.616 ± 0.088 ^{2,3)}	0.623 ± 0.086 ^{2,3)}	0.459 ± 0.110 ^{2,3)}	0.315 ± 0.032 ^{2,3)}	0.860 ± 0.088 ^{2,3)}
辛伐他汀	6	0.446 ± 0.149 ^{2,3)}	1.564 ± 0.199 ^{2,3)}	0.599 ± 0.124 ^{2,3)}	0.462 ± 0.068 ^{2,3)}	0.305 ± 0.026 ^{2,3)}	0.838 ± 0.080 ^{2,3)}

(UPR)将发挥调控作用以维持内质网的正常生理功能。GRP78 作为 ERS 的标志物之一,与其相关的 3 种分子为 IRE1, PERK 和 ATF6, 在 UPR 过程中发挥调节相关基因的转录和蛋白质的翻译的功能,帮助恢复蛋白质的正确构象,使蛋白正确折叠,从而减轻 ERS^[18]。此外,ERS 的持续存在还可激活固醇调节级联反应,从而加速脂肪肝病进程^[19]。固醇调节元件结合蛋白(SREBP)主要位于内质网膜上,是一种与肝脂质代谢紊乱有密切关系的 ERS 蛋白,其中 SREBP-1c 和 SREBP-2 通常与 SCAP 结合成复合物分布在 ER 中^[20],ERS 时,SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 被激活并表达,调控代谢相关酶的转录进而调控脂代谢,从而加重 NAFLD 中脂质的沉积^[21]。ZHANG 等^[22]观察到 ERS 通过促进 SREBP-1c 表达使脂肪合成增多。万颖指出在 ERS 诱导肝 L02 细胞脂质沉积这一过程中,SREBP-1c 在转录和转录后水平的表达均升高^[23]。Colgan 等^[24]发现 ERS 通过促进 SREBP-2 激活,进而导致胆固醇合成增多。内质网持续或过强的应激行为,势必造成肝 L02 细胞的损害。本研究结果提示模型组肝 L02 细胞中 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2

亟需寻找更经济有效且不良反应少的 NAFLD 防治药物来阻止甚至逆转 NAFLD 的肝脏损伤过程,以进一步提高 NAFLD 肝脏损伤的防治水平。本研究结果表明,雷公藤红素具有减轻肝 L02 细胞脂代谢紊乱,改善 NAFLD 的作用,且尤以较高剂量的雷公藤红素疗效更为显著,因此雷公藤红素有可能成为一种新的且更经济有效的防治 NAFLD 的药物。

NAFLD 的发病机制十分复杂,随着研究的深入,ERS 对 NAFLD 的影响日益受到关注。细胞内外环境稳态的改变导致内质网腔内大量未折叠蛋白质的聚集和内质网腔内钙稳态的改变,从而引发内质网功能紊乱导致 ERS。此时,未折叠蛋白反应

mRNA 和蛋白表达水平较高,这表明在 NAFLD 细胞模型中发生了 ERS 并启动了固醇调节级联反应;而雷公藤红素 0.5, 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组肝 L02 细胞中 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 mRNA 转录和蛋白水平表达都出现了下调,提示在雷公藤红素的作用下,其 ERS 有所缓解,肝 L02 细胞脂质沉积有所减轻,进而改善 NAFLD,其效果接近他汀的作用。

综上所述,雷公藤红素确实具有减轻肝 L02 细胞脂代谢紊乱,改善 NAFLD 的作用,其相关机制可能与下调肝 L02 细胞 ERS 中的 UPR 和固醇调节级联通路中关键分子 ATF6, GRP78, IRE1, SCAP, SREBP-1c 和 SREBP-2 的表达水平有关,但其具体作用机制尚未完全探明,有待进一步深入研究。而且,雷公藤红素直接使用毒性较大,这将成为其临床应用的瓶颈。因此,对雷公藤红素提纯工艺和分子结构改造的研究,力求在尽可能降低其毒性的前提下保留其药理活性,进而提高其疗效将是雷公藤红素重要的研究方向。

[参考文献]

[1] Pettinelli P, Obregón A M, Videla L A. Molecular

- mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nutr Hosp*, 2011, 26(3): 441-450.
- [2] 王健, 姜曼, 辛永宁, 等. 内质网应激在非酒精性脂肪性肝病发病机制中的作用 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(11): 1229-1232.
- [3] 刘佳, 李传飞, 宁波, 等. 内质网应激通过 SCAP/SREBP-1c 调控肝 L02 肝 L02 细胞脂质合成代谢 [J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(5): 443-448
- [4] FANG D, WAN Y, SHEN W, et al. Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 381(1/2): 127-137.
- [5] Ozcan U, CAO Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type2 diabetes [J]. *Science*, 2004, 306(5695): 457-461.
- [6] ZHOU X, HAN D, YANG X, et al. Glucose regulated protein 78 is potentially an important player in the development of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Gene*, 2017, 637: 138-144.
- [7] REN L P, YU X, SONG G Y, et al. Impact of activating transcription factor 4 signaling on lipogenesis in HepG2 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1649-1658.
- [8] LI X, XU Z, WANG S, et al. Emodin ameliorates hepatic steatosis through endoplasmic reticulum stress-sterol regulatory element binding protein 1c pathway in liquid-fructose feeding rats [J]. *Hepatol Res*, 2016, 46(3): E105-E117.
- [9] 徐佳, 伍春莲, 黄杰. 雷公藤红素通过影响 Akt 信号通路和整合素表达抑制肺癌细胞的转移 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(6): 1129-1133.
- [10] 王海波, 倪腾洋, 冯俊, 等. 南蛇藤提取物通过 Cofilin1 抑制胃癌 BGC-823 细胞转移的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 112-116.
- [11] 钟点, 陈渊, 赵伟. 雷公藤红素抗炎及免疫抑制的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2018, 25(1): 64-69.
- [12] 陶玲, 管咏梅, 陈丽华, 等. 雷公藤配伍减毒研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(4): 229-234.
- [13] Venkatesha S H, Moudgil K D. Celastrol and its role in controlling chronic diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 928: 267-289.
- [14] LIU J, Lee J, Salazarhernandez M A, et al. Treatment of obesity with celastrol [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 999-1011.
- [15] 王万东, 陈东风. 非酒精性脂肪变性肝细胞模型中 ATF4 基因的表达及其意义 [J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(14): 7-10.
- [16] YU X, TAO W, JIANG F, et al. Celastrol attenuates hypertension-induced inflammation and oxidative stress in vascular smooth muscle cells via induction of heme oxygenase-1 [J]. *Am J Hypertens*, 2010, 23(8): 895-903.
- [17] Kim J E, MI H L, Nam D H, et al. Celastrol, an NF- κ B inhibitor, improves insulin resistance and attenuates renal injury in db/db mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62068.
- [18] Rutkowski D T, WU J, Back S H, et al. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(6): 829-840.
- [19] Goldstein J L, DeBose-Boyd R A, Brown M S. Protein sensors for membrane sterols [J]. *Cell*, 2006, 124(1): 35-46.
- [20] Zorov D B, Juhaszova M, Sollott S J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(5): 509-517.
- [21] 皮振钧, 李斌, 刘俊科, 等. 内质网应激与肝细胞脂类代谢 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(23): 4579-4582.
- [22] ZHANG C, CHEN X, ZHU R M, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in fructose-fed mice [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 212(3): 229-240.
- [23] 万颖. 内质网应激通过 SREBP-1c-FAS 途径影响肝 L02 细胞脂质沉积 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013.
- [24] Colgan S M, TANG D, Werstuck G H, et al. Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(10): 1843-1851.

[责任编辑 周冰冰]