

甲基尿石素 A 对油酸诱导的 Huh-7 细胞脂质累积的改善作用及其机制研究^Δ

张 聪*,周俊旋,盛 磊,马俊俏,李 歆,郑国华,刘思丹,邱振鹏[#](湖北中医药大学药学院,武汉 430065)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0741-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.05

摘 要 目的:研究甲基尿石素 A 对油酸诱导的人肝癌 Huh-7 细胞脂质累积的改善作用及机制。方法:采用油酸诱导建立细胞脂质累积模型。取 Huh-7 细胞,分为对照组(培养基)和模型组(1 mmol/L 油酸)、低剂量药物组(1 mmol/L 油酸+10 μmol/L 甲基尿石素 A)和高剂量药物组(1 mmol/L 油酸+20 μmol/L 甲基尿石素 A),采用油红 O 染色法观察细胞中脂质累积情况;采用三酰甘油(TG)酶法测定细胞内 TG 含量,采用聚合酶链式反应(PCR)法检测细胞中脂肪酸合成酶(FASN)、胆固醇调节元件结合蛋白 1(SREBP-1)、过氧化物酶体增殖剂激活受体α(PPAR-α)、PPAR-γ 的 mRNA 表达水平;采用 Western blotting 法检测细胞中 FASN 的蛋白表达水平。结果:采用油酸诱导后,细胞膜周围出现大量脂滴累积;细胞内脂质及 TG 含量均显著升高,FASN、SREBP-1、PPAR-γ 的 mRNA 表达水平及 FASN 的蛋白表达水平均显著升高,PPAR-α 的 mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$)。采用甲基尿石素 A 干预后,细胞膜周围的脂滴明显减少;细胞中脂质及 TG 含量均显著降低,FASN、SREBP-1、PPAR-γ 的 mRNA 表达水平及 FASN 的蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:甲基尿石素 A 对油酸诱导的 Huh-7 细胞脂肪累积有一定的改善作用,其机制可能与下调 FASN、SREBP-1、PPAR-γ 等相关因子的表达,抑制脂肪酸从头合成、促进脂质代谢有关。

关键词 甲基尿石素 A;油酸;人肝癌 Huh-7 细胞;脂质累积;机制

Study on Improvement Effect of Methylated Urolithin A on Oleic Acid-induced Lipid Accumulation in Huh-7 Cells and Its Mechanism

ZHANG Cong, ZHOU Junxuan, SHENG Lei, MA Junqiao, LI Xin, ZHENG Guohua, LIU Sidan, QIU Zhengpeng (College of Pharmacy, Hubei University of TCM, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effect and mechanism of methylated urolithin A on oleic acid-induced lipid accumulation in human liver cancer Huh-7 cells. METHODS: Oleic acid was adopted to induce lipid accumulation model cells. Huh-7 cells were divided into control group (culture medium), model group (1 mmol/L oleic acid), low-dose group (1 mmol/L oleic acid+10 μmol/L methylated urolithin A) and high-dose group (1 mmol/L oleic acid+20 μmol/L methylated urolithin A). Oil red O staining was used to observe lipid accumulation in cells. Triglyceride(TG) enzyme assay was applied to determine the TG content in cells. PCR was employed to detect the mRNA expression of FASN, SREBP-1, PPAR-α and PPAR-γ in cells. Western blotting was used to determine the protein expression of FASN in cells. RESULTS: After induced by oleic acid, a large amount of lipid droplet accumulated around the cells; the intracellular lipid and TG content, mRNA expression levels of FASN, SREBP-1 and PPAR-γ, protein expression levels of FASN were increased significantly, while mRNA expression level of PPAR-α was decreased significantly ($P<0.01$). After intervened with methylated urolithin A, lipid droplet around the cells decreased significantly; the contents of lipid and TG in cells were decreased significantly, while the mRNA expression levels of FASN, SREBP-1 and PPARγ and protein expression level of FASN were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Methylated urolithin A can improve oleic acid-induced lipid accumulation in Huh-7 cells, the mechanism of which may be associated with inhibiting fat synthesis, promoting lipid metabolism and down-regulating the expression of metabolism-related factors as FASN, SREBP-1 and PPAR-γ.

KEYWORDS Methylated urolithin A; Oleic acid; Human liver cancer Huh-7 cells; Lipid accumulation; Mechanism

非酒精性脂肪肝(NAFLD)是一种常见慢性肝脏疾病^[1],其病理特征主要为肝细胞内脂质大量堆积,其中以

三酰甘油(TG)的累积为主^[2],可进一步发展至肝硬化、肝细胞癌等^[3]。“双重打击学说”作为 NAFLD 的发病机制已被广泛认可,即脂质在肝脏细胞质内的聚集(即“第一次打击”)触发了一系列的细胞毒性事件(即“第二次打击”),从而导致肝损伤^[4]。因此,抑制肝细胞内脂质堆积成为了预防和治疗 NAFLD 的重要途径。

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603338)

* 硕士研究生。研究方向:中药新制剂与新剂型。E-mail: 18086411092@163.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:中药药理及毒理学。E-mail: Whuqq@hotmail.com

尿石素类(Urolithins)化合物是存在于石榴等水果及其他坚果中的鞣花单宁经体内肠道菌群作用后代谢而成的一类具有不同酚羟基的二苯并呋喃-6-酮衍生物,其具有抗癌、降脂、抗炎、抗氧化等作用^[5]。Kang I等^[6]研究发现,尿石素A、B、D均可减少脂肪肝细胞中TG的累积。但尿石素类化合物分子结构中含有多个酚羟基,易被氧化^[7],故其化学性质不稳定、生物利用度较低,限制了其广泛应用。甲基尿石素A是尿石素A结构上第8位的羟基中氢原子被甲基取代后的产物,其与尿石素A、B等具有相似的药理学作用,且因甲基取代使其化学性质比尿石素A更为稳定,故其生物利用度得以提高;此外,甲基尿石素A相较于尿石素A等更易合成、成本更低,因此更具开发应用价值^[8-9]。Qiu Z等^[10]研究表明,甲基尿石素A与尿石素A、B具有相似的抗炎、抗增殖作用。但目前关于甲基尿石素A改善脂质累积方面的作用尚未见研究报道。基于此,本课题组采用油酸诱导人肝癌Huh-7细胞建立脂质累积模型,考察甲基尿石素A对脂质累积的改善作用并探讨其分子机制,为该化合物的进一步开发应用提供理论基础。

1 材料

1.1 仪器

MCO-15AC型CO₂培养箱(日本Sanyo公司);xMark型酶标仪、Trans-Blot® Turbo™全能型蛋白转膜系统、Power Pac Basic型电泳仪、TC20型细胞计数器、CFX96型实时荧光定量-聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);Allegra 64R型高速冷冻离心机(美国Beckman Coulter公司);CKX31型倒置显微镜(日本Olympus公司);XB 220A型分析天平(瑞士Precisa公司)。

1.2 药品与试剂

甲基尿石素A原料药[武汉大学人民医院药学部周本宏教授合成惠赠,纯度(高效液相色谱法):>97%];油酸[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号:O108484];CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所,批号:CK04);组织细胞TG酶法测定试剂盒(北京普利莱技术有限公司,批号:E1013);BCA蛋白定量试剂盒、ECL超敏化学发光液、M-PERTM哺乳动物蛋白抽提试剂、Invitrogen™ TRIzol™ RNA提取试剂、Invitrogen™ SuperScript™ IV逆转录酶(美国Thermo Fisher Scientific公司);蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(北京康为世纪生物科技有限公司);脂肪酸合成酶(FASN)、胆固醇调节元件结合蛋白1(SREBP-1)、过氧化物酶体增殖剂激活受体α(PPAR-α)、PPAR-γ、β-actin的上下游引物(美国Invitrogen公司);兔FASN单克隆抗体、兔β-actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(美国CST公司,批号分别为C20G5、4970、7074);荧光定量PCR试剂(上海星汉生物科技有限公司);胎牛血清(美国Gibco公司);牛血清白

蛋白(BSA,北京索莱宝科技有限公司);DMEM高糖培养基、PBS(pH 7.4)、0.25%胰蛋白酶溶液、青霉素-链霉素双抗(美国Hyclone公司);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶试剂盒(美国EpiZyme Scientific公司);油红O染液(武汉谷歌生物科技有限公司);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 细胞

人肝癌Huh-7细胞购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所。

2 方法

2.1 细胞培养

Huh-7细胞用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的DMEM高糖培养基(以下简称“培养基”),在37℃、5%CO₂的培养箱中培养(以下培养条件相同)。取对数生长期细胞,先经胰蛋白酶消化后,再进行后续试验。

2.2 药物溶液配制

2.2.1 油酸溶液 吸取油酸10 μL,加入0.1 mol/L NaOH溶液305 μL,于70℃水浴中加热30 min,制成100 mmol/L的油酸母液;以10%BSA溶液稀释制成10 mmol/L的油酸溶液,以0.22 μm滤膜滤过即得,于-20℃条件下保存,备用。

2.2.2 甲基尿石素A溶液 称取甲基尿石素A原料药48.2 mg,以二甲基亚砜1 mL溶解制成200 mmol/L的母液,于-20℃条件下保存,备用。临用时以培养基稀释制成20 mmol/L的溶液,以0.22 μm滤膜滤过后使用。

2.3 造模/给药浓度筛选

2.3.1 油酸造模浓度筛选 (1)取对数生长期Huh-7细胞,以5×10⁴个/孔的密度接种于12孔培养板,每孔1 mL,培养24 h后,分为对照组和不同浓度油酸组。其中,对照组加入培养基,其余组分别加入含油酸终浓度为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L的培养基,培养24 h。取细胞用PBS清洗3次,75%乙醇固定20 min,在避光条件下以油红O染液染色30 min^[11],PBS清洗后在显微镜下观察细胞内脂质累积情况;然后每孔加入60%异丙醇0.5 mL,室温放置15 min以充分溶解细胞上附着的染液^[12];采用酶标仪于485 nm波长处测定各孔吸光度(A),A值越大则表明脂质含量越高。(2)取对数生长期Huh-7细胞,以8×10³个/孔的密度接种于96孔板,每孔100 μL,培养24 h后,分为对照组和不同浓度药物组(加样量同“(1)”项下),培养24 h。另设不含细胞、只加入培养基的空白组。每孔加入CCK-8试剂10 μL,继续培养2 h后,采用酶标仪于450 nm波长处测定各孔A值,并计算细胞存活率[细胞存活率=(A_{给药组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})×100%]。每组设置4个复孔,试验重复3次。

2.3.2 甲基尿石素A给药浓度筛选 按“2.3.1(2)”项下方法接种细胞、培养,分为对照组和不同浓度甲基尿石素A组,并另设空白组。其中,空白组、对照组同法处

理,其余组分别加入含甲基尿石素 A 终浓度为 5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基,培养 24 h。按“2.3.1(2)”项下方法,自“每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL ……”起同法操作,测定并计算细胞存活率。每组设置 4 个复孔,试验重复 3 次。

2.4 甲基尿石素 A 对细胞中脂质累积的影响考察

取对数生长期 Huh-7 细胞,以 8×10^4 个/孔的密度接种于 12 孔培养板,每孔 1 mL,培养 24 h 后,分为对照组、模型组(剂量根据“2.3.1”项结果确定)、低剂量药物组(剂量根据“2.3.2”项结果确定)和高剂量药物组(剂量根据“2.3.2”项结果确定)。其中,对照组加入培养基,其余组分别加入含相应终浓度油酸或油酸+甲基尿石素 A 的培养基,培养 24 h。然后按“2.3.1(1)”项下方法,自“取细胞用 PBS 清洗 3 次,75%酒精固定 20 min……”起同法操作,进行油红 O 染色,观察细胞内脂质累积情况并测定各孔 A 值。每组设置 3 个复孔,试验重复 3 次。

2.5 甲基尿石素 A 对细胞中 TG 含量的影响考察

取对数生长期 Huh-7 细胞,以 5×10^6 个/皿的密度接种于细胞培养皿,每皿 5 mL,培养 24 h 后,按“2.4”项下方法分组、给药及培养。按照 TG 酶法测定试剂盒说明书步骤,测定细胞中 TG 含量。每组设置 3 个复孔,试验重复 3 次。

2.6 甲基尿石素 A 对细胞中 FASN、SREBP-1、PPAR- α 、PPAR- γ 的 mRNA 表达的影响考察

采用 PCR 法检测。取对数生长期 Huh-7 细胞,以 2×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔培养板,每孔 2 mL,培养 24 h 后,按“2.4”项下方法分组、给药及培养。采用 TRIzol 试剂抽提细胞 RNA,并采用逆转录酶逆转录成 cDNA 后检测 FASN、SREBP-1、PPAR- α 、PPAR- γ 的 mRNA 表达水平。PCR 反应体系(10 μL)组成:cDNA 0.5 μL ,上下游引物 1.0 μL ,2 $\times$ Taq PCR Mix 5.0 μL ,双蒸水 3.5 μL 。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,共 40 个循环(引物序列见表 1)。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[13]计算相关基因的 mRNA 表达水平(Ct 表示每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数)。每组设置 3 个复孔,试验重复 3 次。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因名称	引物序列	序列长度, bp
β -actin	正向:5'-GTCCACCGCAAATGCTTCTA-3'	190
	反向:5'-TGCTGTACCTTCACCGTTTC-3'	
FASN	正向:5'-TGGTCTTTCTGTGCTTGATT-3'	80
	反向:5'-GGAGTCTTGGCAGGGTGGA-3'	
SREBP-1	正向:5'-GGCACGGGAGGATGGACT-3'	130
	反向:5'-GCTTCTTTGCTGTGAGATGACC-3'	
PPAR- α	正向:5'-CCAGTGGAGCATTGAACAT-3'	223
	反向:5'-GTGACATCCCGACAGAAAGG-3'	
PPAR- γ	正向:5'-CTCTCCGTAATGGAAGACCAC-3'	184
	反向:5'-CAGGCTCCACTTGTATTGCAC-3'	

2.7 甲基尿石素 A 对细胞中 FASN 的蛋白表达的影响考察

采用 Western blotting 法检测。取对数生长期 Huh-7 细胞,按“2.5”项下方法接种、分组、给药及培养。用胰蛋白酶消化并收集细胞,加入含有蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的哺乳动物蛋白抽提试剂(三者体积比为 1:1:98),冰上裂解 30 min;在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液稀释 10 倍,采用 BCA 法进行蛋白定量。加入蛋白上样缓冲液,混匀,于 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,−20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待测。取变性后的蛋白样品 40 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h;分别加入 FASN、 β -actin 一抗(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,然后以 TBST 缓冲液清洗 10 min $\times$ 3 次;加入二抗(1:8 000),室温孵育 1 h,以 TBST 缓冲液清洗 10 min $\times$ 3 次;加入 ECL 化学发光液显影。采用凝胶成像仪检测,以 Image J 1.8.0 软件进行分析,以 β -actin 为内参计算相对灰度值,用来表示目标蛋白的表达水平。每组设置 3 个复孔,试验重复 3 次。

2.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验进行组间比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 油酸和甲基尿石素 A 的造模/给药浓度

油红 O 染色结果显示,1.0~2.5 mmol/L 的油酸均能使细胞中形成大量脂滴累积;当油酸浓度 ≥ 2.0 mmol/L 时,细胞形态萎缩、数量减少。细胞存活率检测结果显示,随着油酸或甲基尿石素 A 作用浓度的升高,细胞存活率随之下降;当油酸 ≤ 1.0 mmol/L 时,细胞存活率 $> 80\%$;当甲基尿石素 A 浓度 ≤ 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率 $> 80\%$ 。因此,选择 1.0 mmol/L 为油酸的造模浓度,10、20 $\mu\text{mol/L}$ 为甲基尿石素 A 的给药浓度,在这一浓度条件下,两者对细胞均无明显毒性。不同浓度油酸作用下各组细胞脂质累积情况显微图见图 1,不同浓度油酸或甲基尿石素 A 作用下各组细胞存活率见图 2。

3.2 甲基尿石素 A 对细胞中脂肪累积的影响

与对照组比较,模型组细胞镜下可见有明显的脂肪累积现象,细胞膜周围有大量红色脂滴;A 值检测结果显示,细胞中脂质含量显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,低、高剂量药物组细胞镜下可见红色脂滴明显减少;A 值检测结果显示,细胞中脂质含量显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。各组细胞脂质累积情况显微图见图 3,脂质含量检测结果见图 4。

3.3 甲基尿石素 A 对细胞中 TG 含量的影响

与对照组比较,模型组细胞中 TG 含量显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,低、高剂量

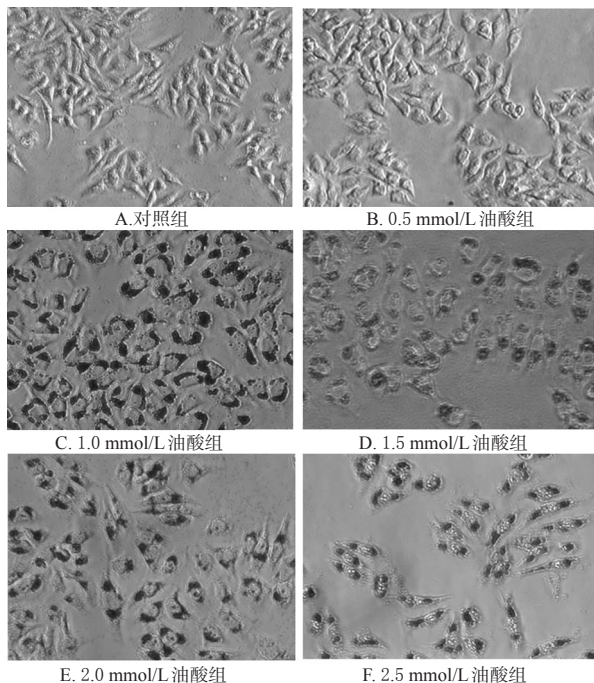


图1 不同浓度油酸作用下各组细胞脂质累积情况显微镜图(油红O染色,×200)

Fig 1 Micrographs of lipid accumulation in cells of each group under different dose of oleic acid condition (oil red O staining, ×200)

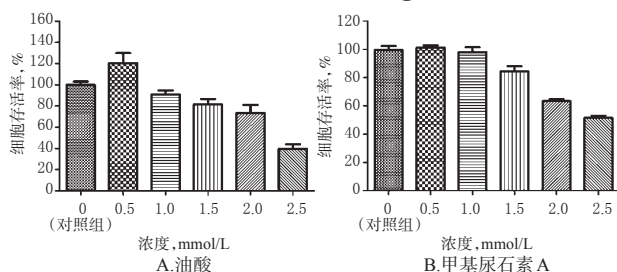


图2 不同浓度油酸或甲基尿石素A作用下各组细胞存活率($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig 2 Cell viability in each group under different dose of oleic acid or methylated urolithin A condition ($\bar{x} \pm s, n=4$)

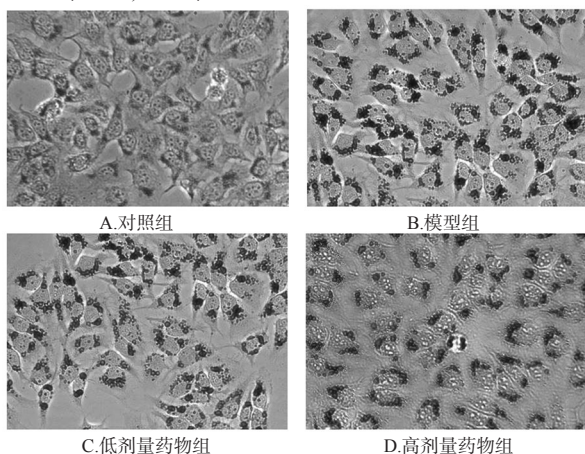
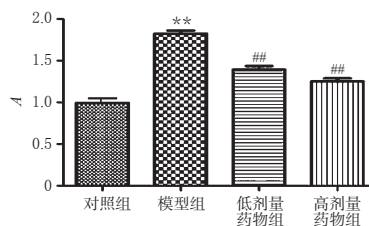


图3 各组细胞脂质累积情况显微镜图(油红O染色,×200)

Fig 3 Micrographs of lipid accumulation in cells of each group (oil red O staining, ×200)



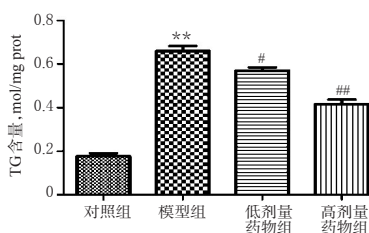
注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$

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

图4 各组细胞脂质含量检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 4 Results of lipid content in cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物组细胞中TG含量均显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组细胞中TG含量测定结果见图5。



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, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

$P<0.01$

图5 各组细胞中TG含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 5 Results of TG content in cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 甲基尿石素A对细胞中FASN、SREBP-1、PPAR- α 、PPAR- γ 的mRNA表达的影响

与对照组比较,模型组细胞中FASN、SREBP-1、PPAR- γ 的mRNA表达水平均显著升高,PPAR- α 的mRNA表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,低、高剂量药物组细胞中FASN、SREBP-1、PPAR- γ 的mRNA表达水平均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$);而PPAR- α 的mRNA表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组细胞中FASN、SREBP-1、PPAR- α 、PPAR- γ 的mRNA表达水平检测结果见图6。

3.5 甲基尿石素A对细胞中FASN蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组细胞中FASN的蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,低、高剂量药物组细胞中FASN蛋白的表达水平均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组细胞FASN的蛋白电泳图见图7,蛋白表达水平检测结果见图8。

4 讨论

NAFLD的典型特征是肝细胞内脂质积聚,而TG作为积聚脂质的主要成分,其积聚主要是由其合成与转化

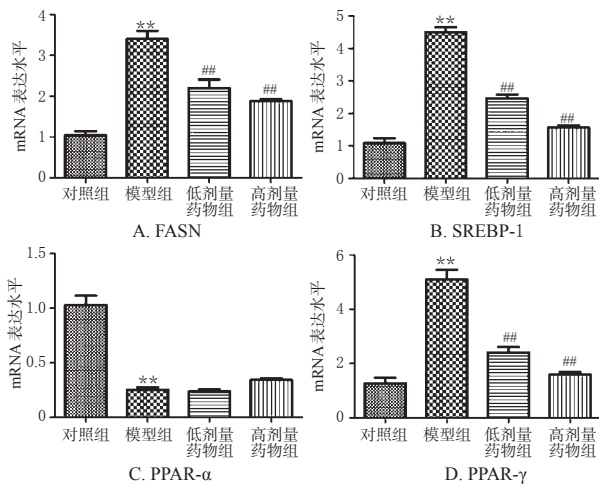
状态下肝细胞损伤的优点^[16]。肝癌细胞具有易于培养、稳定等特点^[17],是目前研究NAFLD常用的细胞模型。因此,本研究以人肝癌Huh-7细胞为对象,采用油酸诱导建立体外脂质累积细胞模型。

FASN是脂肪合成的关键酶,可催化乙酰辅酶A和丙二酰辅酶A从头合成长链软脂酸棕榈酸酯的所有步骤,其编码基因的表达直接影响脂肪酸的合成,对调控机体脂肪酸累积具有重要意义^[18]。Kim KH等^[19]研究证实,抑制FASN的表达能抑制肝脂质累积,改善肝脂肪变。SREBP-1是调节肝脂质代谢的关键转录因子,PPARs对肝细胞内脂质合成、运输和储存具有重要的调节作用^[20]。FASN、SREBP-1、PPAR- α 和PPAR- γ 均为调节脂肪酸从头合成和TG合成的关键因子,PPAR- γ 的表达增强能促进前脂肪细胞向脂肪细胞分化^[21];SREBP-1的表达增强能激活FASN的表达;FASN的表达增强,能促进脂质合成,显著增加脂质在体内沉积^[22]。PPAR- α 是线粒体脂肪酸 β 氧化过程中的关键酶,能使脂肪酸从线粒体内膜转运到线粒体基质中被代谢^[16]。由此可见,FASN、SREBP-1、PPAR- γ 对机体脂质累积具有正向调节作用,而PPAR- α 对脂质累积具有负向调节作用。本研究发现显示,油酸诱导后,细胞中FASN、SREBP-1、PPAR- γ 的mRNA表达水平及FASN的蛋白表达水平均显著升高,PPAR- α 的mRNA表达水平显著降低,提示肝细胞中脂质累积可能是由于脂肪酸的从头合成增强,从而激活脂质摄取和抑制脂质分解而引起的。采用甲基尿石素A干预后,能明显抑制油酸诱导的细胞中脂质累积,降低细胞中TG含量;细胞中FASN、SREBP-1、PPAR- γ 的mRNA和FASN的蛋白表达水平均显著降低,而PPAR- α 的mRNA表达水平无显著变化。由此推测,甲基尿石素A可能主要通过抑制脂肪酸从头合成途径来抑制脂质累积,而并未激活脂肪酸 β 氧化途径,故对PPAR- α 的mRNA表达无显著影响。

综上所述,甲基尿石素A可能通过下调FASN、SREBP-1、PPAR- γ 等相关因子的表达,抑制脂肪酸从头合成、促进脂质代谢,从而降低细胞内TG含量、改善油酸诱导的细胞中脂质累积状态,在NAFLD的防治领域具有一定的药用潜力。

参考文献

- [1] 李春苗,罗雁,张砚,等.非酒精性脂肪性肝病发生和进展的综合影响因素[J].医学综述,2017,23(17):3401-3405.
- [2] 张畅,辛永宁,宣世英.非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J].中国药物经济学,2015,10(S2):262-263.
- [3] MACHADO MV, CORTEZ-PINTO H. Non-alcoholic fatty liver disease: what the clinician needs to know[J].



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

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

图6 各组细胞中FASN、SREBP-1、PPAR- α 、PPAR- γ 的mRNA表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 6 Results of mRNA expression levels of FASN, SREBP-1, PPAR- α and PPAR- γ in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

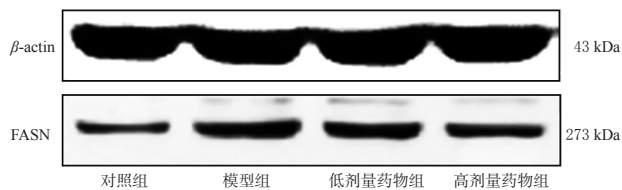
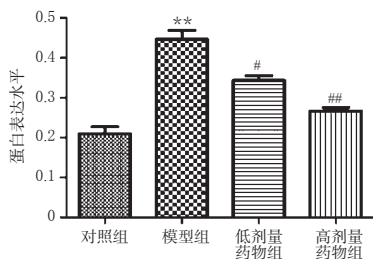


图7 各组细胞中FASN的蛋白电泳图

Fig 7 Protein electrophoresis of FASN in cells of each group



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, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图8 各组细胞中FASN蛋白的表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 8 Results of protein expression levels of FASN in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

之间的不平衡引起的^[14]。研究表明,机体脂肪酸过量累积能促进脂肪细胞分化及脂质合成相关转录因子的生成,使大量脂肪堆积,从而引起肥胖^[15]。脂肪酸的大量积聚会对肝细胞造成慢性损伤,这一过程与NAFLD的慢性肝脂肪变性相似^[14]。油酸是人体内天然存在的一种脂肪酸,以其为诱导剂建立脂质累积模型的方法已被广泛应用,具有成本低、耗时短、可较好地模拟NAFLD

World J Gastroenterol, 2014, 20(36): 12956–12980.

- [4] 董姝, 刘平, 孙明瑜. 非酒精性脂肪肝发病机制: “二次打击”学说研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(7): 551–555.
- [5] TOMÁS-BARBERÁN FA, GONZÁLEZ-SARRÍAS A, GARCIA-VILLALBA R, et al. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: metabolites as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017. DOI: 10.1002/mnfr.201500901.
- [6] KANG I, KIM Y, TOMAS-BARBERAN FA, et al. Urolithin A, C, and D, but not iso-urolithin A and urolithin B, attenuate triglyceride accumulation in human cultures of adipocytes and hepatocytes[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(5): 1129–1138.
- [7] MENA P, DALL’ASTA M, CALANI L, et al. Gastrointestinal stability of urolithins: an in vitro approach[J]. *Eur J Nutr*, 2017, 56(1): 99–106.
- [8] ZHOU B, WANG J, ZHENG G, et al. Methylated urolithin A, the modified ellagitannin-derived metabolite, suppresses cell viability of DU145 human prostate cancer cells via targeting miR-21[J]. *Food Chem Toxicol*, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.10.005.
- [9] 邱振鹏. WNT7B在肝细胞癌中的作用及urolithins抗肿瘤机制研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2014.
- [10] QIU Z, ZHOU B, JIN L, et al. In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013. DOI: 10.1016/j.fct.2013.06.025.
- [11] 秦红霞, 赵玲, 王宇豪, 等. 两种脂肪细胞内脂滴染色方法的比较研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2014, 23(6): 544–547.
- [12] 李甜, 廖茂梁, 郑雅楠, 等. 泽泻汤对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的抑制作用[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(5): 772–775.
- [13] CHEN GH, LUO Z, HOGSTRAND C, et al. SREBP1, PPARG and AMPK pathways mediated the Cu-induced change in intestinal lipogenesis and lipid transport of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Food Chem*, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.07.048.
- [14] HWANG YJ, WI HR, KIM HR, et al. Pinus densiflora Sieb. et Zucc. alleviates lipogenesis and oxidative stress during oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells[J]. *Nutrients*, 2014, 6(7): 2956–2972.
- [15] ŽÁČEK P, BUKOWSKI M, MEHUS A, et al. Dietary saturated fatty acid type impacts obesity-induced metabolic dysfunction and plasma lipidomic signatures in mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2018. DOI: 10.1016/j.jnuthbio.2018.10.005.
- [16] 张靖伟, 姚英俊, 梁媛, 等. 油酸对 C57/BL6J 小鼠脂肪干细胞体外成脂分化的影响[J]. 大连工业大学学报, 2017, 36(5): 333–337.
- [17] LI J, ZHU L, ZHANG YM, et al. Sheng-jiang powder ameliorates high fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease via inhibiting activation of Akt/mTOR/S6 pathway in rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018. DOI: 10.1155/2018/6190254.
- [18] LI L, PILO GM, LI X, et al. Inactivation of fatty acid synthase impairs hepatocarcinogenesis driven by AKT in mice and humans[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(2): 333–341.
- [19] KIM KH, HONG SP, KIM K, et al. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARGamma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(4): 883–888.
- [20] 杨谷良, 潘敏雄, 向福, 等. PPAR γ 调控脂肪细胞增殖和分化机理研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 254–260.
- [21] CHOI WI, JEON BN, PARK H, et al. Proto-oncogene FBI-1 (pokeron) and SREBP-1 synergistically activate transcription of fatty-acid synthase gene (FASN)[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(43): 29341–29354.
- [22] EHARA T, KAMEI Y, YUAN X, et al. Ligand-activated PPARalpha-dependent DNA demethylation regulates the fatty acid beta-oxidation genes in the postnatal liver[J]. *Diabetes*, 2015, 64(3): 775–784.

(收稿日期: 2018-09-07 修回日期: 2019-01-25)

(编辑: 段思怡)

《中国药房》杂志——中文核心期刊, 欢迎投稿、订阅