

青钱柳三萜化合物对游离脂肪酸诱导的脂肪变性的干预作用

赵梦鸽^{1,2}, 杨慧敏^{1,2}, 蒋翠花², 张健^{2*}, 殷志琦^{1**}

¹中国药科大学天然药物化学教研室 & 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009;

²江苏省中医药研究院转化医学实验室, 南京 210028)

摘要 为探究青钱柳三萜化合物对非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 的治疗作用, 采用混合脂肪酸 (FFAs) 诱导 HepG2 细胞建立体外脂肪变性模型。MTT 法筛选出无细胞毒性的青钱柳三萜化合物, 通过检测其对胞内三酰甘油 (TG) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的作用筛选出具有良好降脂和抗氧化活性的青钱柳单体化合物 **4** [2 α , 3 α , 23-三羟基-12, 20(30)-二烯-28-乌苏酸, TUA]。通过油红 O 染色检测 TUA 对游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞中脂滴含量的影响, 并同时检测其对 TG、活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA) 和 SOD 的作用。通过 Western blot 检测核因子相关因子 2 (Nrf2)、血红素氧合酶 1 (HO-1) 和 NAD (P)H 醌氧化还原酶 1 (NQO-1) 的蛋白表达情况。实验结果显示, TUA 可降低 FFAs 诱导的 HepG2 细胞脂质堆积和 TG 的含量, 减少 ROS 及脂质过氧化物 MDA 的含量, 同时升高 SOD 的活性。此外, TUA 还能增加抗氧化相关蛋白 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 的表达。当同时加入 TUA 和 Nrf2 抑制剂鹅胆子苦醇干预后, HepG2 细胞内 TG、ROS 和 MDA 含量增加, 而 SOD 的活性和 HO-1、NQO-1 的表达下降。实验结果表明, TUA 可能对 NAFLD 具有一定治疗作用, 其机制可能与 Nrf2 的激活有关。

关键词 青钱柳; 三萜化合物; TUA; 游离脂肪酸; 非酒精性脂肪肝; 抗氧化

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)03-0333-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180312

引用本文 赵梦鸽, 杨慧敏, 蒋翠花, 等. 青钱柳三萜化合物对游离脂肪酸诱导的脂肪变性的干预作用[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(3): 333-340.

Cite this article as: ZHAO Mengge, YANG Huimin, JIANG Cuihua, et al. Intervention effects of the triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* on free fatty acids-induced steatosis in HepG2 cells[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(3): 333-340.

Intervention effects of the triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* on free fatty acids-induced steatosis in HepG2 cells

ZHAO Mengge^{1,2}, YANG Huimin^{1,2}, JIANG Cuihua², ZHANG Jian^{2*}, YIN Zhiqi^{1**}

¹Department of Natural Medicinal Chemistry & State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Laboratory of Translational Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract To investigate the therapeutic effects of triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the model of NAFLD in HepG2 cells was induced by free fatty acids (FFAs). Cytotoxicity of the triterpenoids from *C. paliurus* was determined by MTT method, and the effects of triterpenoids without cytotoxicity on intracellular triglyceride (TG) and superoxide dismutase (SOD) were detected by the kits. Data indicated that compound **4** [2 α , 3 α , 23-trihydroxy-12, 20(30)-dien-28-ursolic acid, TUA] had hypolipidemic and antioxidant activities. After being treated with TUA and FFAs for 24 h, the intracellular lipid content was observed using Oil Red O staining, and intracellular TG, malondialdehyde (MDA), SOD and reactive oxygen species (ROS) levels were determined by the assay kits. The protein expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD (P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) were measured by

收稿日期 2017-08-01 ***通信作者** * Tel: 025-52362107 E-mail: zjwonderful@hotmail.com

** Tel: 025-86185371 E-mail: chyzq2005@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81503316); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20161460); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

Western blot. The results showed that TUA significantly increased SOD activity, and decreased intracellular TG, ROS and MDA levels in FFAs-induced HepG2 cells. Moreover, TUA dramatically improved Nrf2, NQO-1, and HO-1 expression. However, the dramatic increase in TG, ROS, MDA levels and the reduction in SOD, NQO-1 and HO-1 expression following Nrf2 inhibitor brusatol treatment were observed. In conclusion, these results suggest that TUA has the therapeutic effect on NAFLD which may be associated with Nrf2 activation.

Key words *Cyclocarya paliurus*; triterpenoids; TUA; free fatty acids; non-alcoholic fatty liver disease; antioxidant

This study was sponsored by the National Natural Science Foundation of China (No. 81503316), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20161460), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是指在除酒精和其他明确的损肝因素 (如毒素或药物) 所致的以肝实质细胞脂肪变性为主要表现的临床病理综合征, 包括单纯性脂肪肝以及由其演变的脂肪肝炎、脂肪肝纤维化和肝硬化^[1]。近年来, 随着人们生活水平的提高和饮食方式的改变, NAFLD 发病率逐渐升高^[2]。NAFLD 的发生与氧化应激密切相关, 核因子相关因子 2 (Nrf2)-抗氧化反应元件 (ARE) 通路是目前研究发现的重要内源性抗氧化应激信号通路, Nrf2 激活后能调控下游第 II 相解毒酶的表达, 发挥抗氧化作用, 从而保护肝脏^[3-4], 因此改善氧化应激的药物可能具有治疗 NAFLD 的作用^[5]。

青钱柳 [*Cyclocarya paliurus* (Batal) Ijinskaja] 又名摇钱树、麻柳, 为胡桃科青钱柳属植物, 是我国特有珍稀树种资源^[6]。现代药理研究表明, 青钱柳能够改善胰岛素抵抗, 具有降血糖和降血脂等作用^[6-8]。本课题组前期实验发现富含三萜化合物的青钱柳氯仿提取物具有抗氧化作用, 能够改善 NAFLD^[9-10]。青钱柳叶含有大量的三萜成分如阿江榄仁酸、齐墩果酸、熊果酸、青钱柳酸 A 和青钱柳酸 B 等^[11-12], 而青钱柳三萜化合物 (图 1) 是否为治疗 NAFLD 的有效成分, 目前尚不清楚。本文拟通过混合脂肪酸 (FFAs) 诱导的 HepG2 细胞模型研究青钱柳三萜化合物对 NAFLD 的作用, 并探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

供筛选的 11 个青钱柳三萜化合物分别为: $2\alpha, 3\beta, 19\alpha, 23$ -四羟基-12-烯-28-乌苏酸 (1)、 $1\alpha, 2\alpha, 3\alpha, 23$ -四羟基-12-烯-28-乌苏酸 (2)、 $3\beta, 23$ -二羟

基-12-烯-28-乌苏酸 (3)、 $2\alpha, 3\alpha, 23$ -三羟基-12, 20 (30)-二烯-28-乌苏酸 (4, TUA)、 $2\alpha, 3\alpha, 23$ -三羟基-12-烯-28-乌苏酸 (5)、青钱柳酸 B (6)、 $2\alpha, 3\beta, 23$ -三羟基-11, 13 (18)-二烯-28-齐墩果酸 (7)、阿江榄仁酸 (8)、cyclocarioside J (9)、cyclocarioside H (10)、青钱柳苷 C (11) (HPLC 面积归一化法测定纯度大于 98%, 中国药科大学天然药化教研室自制); 胎牛血清 (美国 ScienCell 公司, 批号: 20825); DMEM、胰蛋白酶、噻唑蓝 (MTT) (江苏凯基生物技术股份有限公司); 牛血清白蛋白 (BSA)、油酸和棕榈酸 (美国 Sigma Aldrich 公司); 三酰甘油 (TG) 检测试剂盒、油红 O 染液、超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、PMSF、ROS 检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); 鸦胆子苦醇 (brusatol, 成都植标化纯生物技术有限公司); 兔抗 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 多克隆抗体、兔抗 HO-1 (heme oxygenase-1) 多克隆抗体、兔抗 NQO-1 [NAD (P) H quinone oxidoreductase] 多克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

全波长多功能酶标仪 (美国赛默飞世尔科技有限公司); 超速控温离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); 荧光倒置显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司); A101439 电泳仪 (美国 Bio Rad 公司)。

1.3 细胞株

人肝癌细胞株 HepG2, 购自 ATCC 细胞库。HepG2 细胞用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的饱和湿度条件下培养, 每隔 3 天用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞, 按

1:2 比例进行传代,取对数生长期的细胞用于实验。

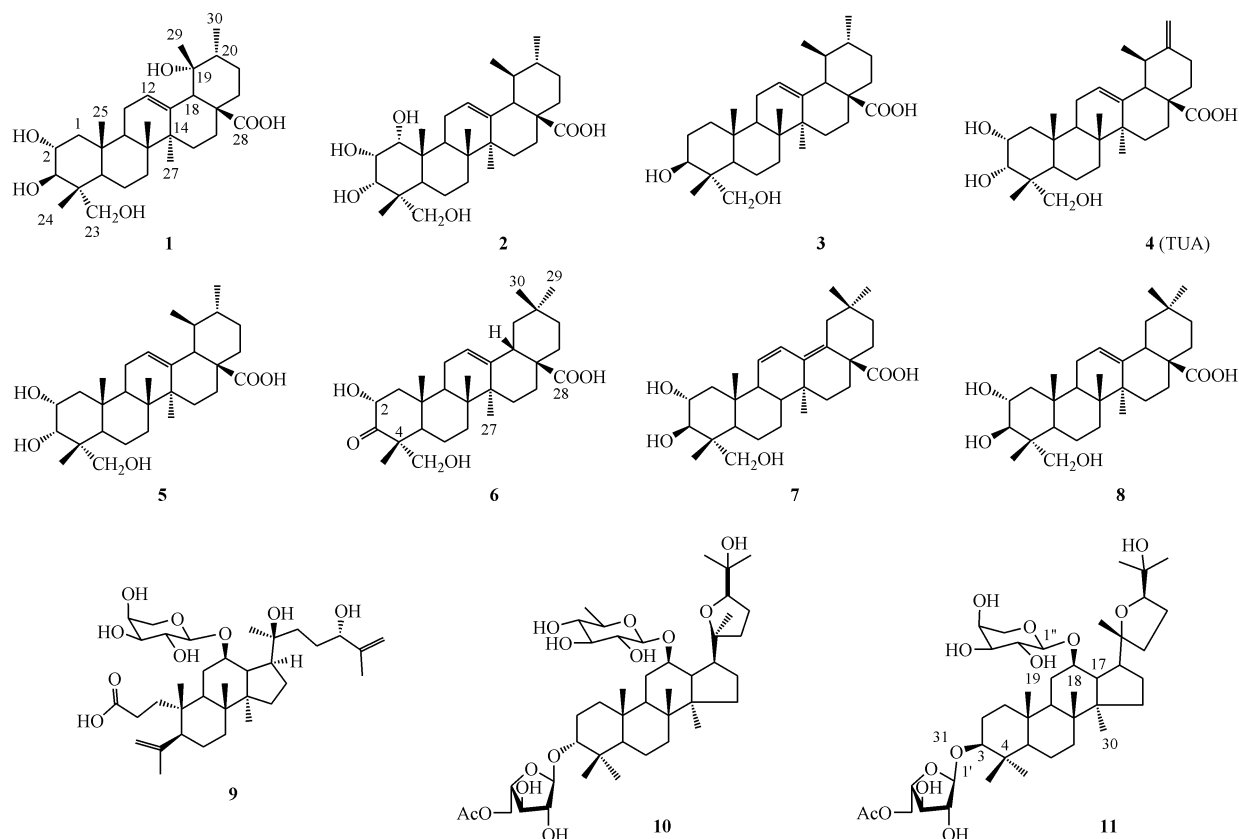


Figure 1 Structures of the triterpenoids from *Cyclocarya paliurus*

2 方法

2.1 脂肪变性模型建立及药物的配制

称取一定量的油酸和棕榈酸(物质的量比为 2:1)混合后置于 0.1 mol/L NaOH 溶液中,70 °C 水浴直至完全溶解,配成 100 mmol/L 混合脂肪酸溶液。然后用 10% BSA 溶液稀释,配成浓度为 5 mmol/L 的混合脂肪酸储备液,0.22 μm 滤膜过滤待用。混合脂肪酸使用终浓度为 1 mmol/L,与细胞共孵育 24 h 后,建立脂肪变性细胞模型。

取一定量的青钱柳三萜化合物 1~11,先用 DMSO 溶解至一定浓度,使 DMSO 浓度不超过药物最终使用浓度的千分之一,然后用 DMEM 稀释至相应浓度。

2.2 青钱柳三萜化合物活性成分筛选

2.2.1 青钱柳三萜化合物细胞毒性筛选 取生长状态良好的 HepG2 细胞进行消化传代,以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后吸去培养基,加入不含血清的 DMEM 饥饿 8 h 后,分别给予

10 μmol/L 青钱柳三萜化合物 1~11,空白组 (Blank) 加入不含血清的 DMEM 培养基,孵育 24 h 后吸去培养基,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL,孵育 4 h,吸去上清液,加入 DMSO 150 μL,酶标仪测定 490 nm 处的吸收度,计算细胞活力,实验平行 3 次。筛选无明显细胞毒性的化合物进行进一步活性筛选。

2.2.2 青钱柳三萜化合物对细胞内 TG 和 SOD 活力的影响 将 HepG2 细胞接种于 24 孔板,分别设置空白组 (Blank)、模型组 (Model) 和青钱柳三萜化合物给药组 (10 μmol/L)。空白组每孔加入含 10% BSA 的 DMEM 培养基,模型组每孔加入 1 mmol/L FFAs 的 DMEM 培养基,给药组每孔分别加入含 1 mmol/L 的 FFAs 和 10 μmol/L 青钱柳三萜化合物的 DMEM 培养基,孵育 24 h 后,试剂盒测定细胞胞浆中 TG 的含量和 SOD 的活性,细胞内总蛋白含量用 BCA 蛋白定量试剂盒测定,实验平行 3 次。筛选降脂和抗氧化活性较好的化合物进行后继机制探讨。

2.3 MTT法测定青钱柳三萜化合物对 HepG2 细胞活力的影响

MTT法测定1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 青钱柳三萜化合物对 HepG2 细胞存活率的影响,实验方法同“2.2.1”项。

2.4 油红 O 染色观察 HepG2 细胞内的脂滴积累

HepG2 细胞接种于 24 孔板,分别设置空白组(Blank)、模型组(Model)和青钱柳三萜化合物给药组(1、5、10 $\mu\text{mol/L}$)和青钱柳三萜化合物+抑制剂组(10 $\mu\text{mol/L}$ +40 nmol/L)。空白组每孔加入含 10% BSA 的 DMEM 培养基,模型组每孔加入含 1 mmol/L FFAs 的 DMEM 培养基,青钱柳三萜化合物给药组每孔分别含 1 mmol/L FFAs 和各浓度青钱柳三萜化合物的 DMEM 培养基,青钱柳三萜化合物+抑制剂组加入含 1 mmol/L 混合脂肪酸和 10 $\mu\text{mol/L}$ 青钱柳三萜化合物以及 40 nmol/L 鹅胆子苦醇的 DMEM 培养基,孵育 24 h 后,去除培养液,PBS 洗涤 2 遍,4% 多聚甲醛固定 15 min,弃去多聚甲醛,PBS 润洗 3 遍,加入油红 O 工作液染色,染色 15 min,弃去油红 O 染液,PBS 洗 3 遍,在显微镜下观察染色效果并拍照,然后用异丙醇洗脱细胞中的油红 O 染液并收集,在 510 nm 处用酶标仪测定其吸收度,实验平行 3 次。

2.5 HepG2 细胞内 TG 含量、MDA 含量和 SOD 活性的测定

将对数期的细胞消化后接种于 24 孔板中,分组给药方法同“2.4”项,孵育 24 h 后,试剂盒测定细胞中 TG、MDA 的含量 SOD 的活性,细胞内总蛋白含量用 BCA 蛋白定量试剂盒测定,实验平行 3 次。

2.6 细胞内 ROS 含量检测

接种单层细胞培养于 96 孔板中,分组给药方法同“2.4”项,培养 24 h 后,弃去培养基,PBS 洗 2 遍,加入 DCFH-DA 荧光探针,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 20 min,PBS 清洗 3 次以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA 探针,然后用全波长多功能酶标仪检测细胞荧光强度,激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,实验平行 3 次。

2.7 Western blot 分析

HepG2 细胞以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,分组给药方法同“2.4”项,培养 24 h 后,弃去

培养基,PBS 洗 2 遍,用试剂盒提取细胞核蛋白与细胞质蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,将蛋白质样品稀释至相同且合适的浓度进行 SDS-PAGE(电泳时间:85 V、20 min;120 V、80 min),然后转移至 PVDF 膜上在 5% 脱脂奶粉封闭液中室温封闭 1 h,加入一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,之后加入二抗(1:2 000)室温孵育 2 h,采用电化学发光检测法(ECL 法)显色检测抗氧化相关蛋白 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 的表达情况。对感光胶片条带进行灰度分析,以目的条带与内参照条带 β -actin 的比值或核内参 Lamin B1 的比值代表目的蛋白的相对表达量。

2.8 数据分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS22.0 统计软件进行统计,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异显著。

3 结果

3.1 青钱柳三萜化合物活性成分筛选

3.1.1 青钱柳三萜化合物对细胞活力的影响

MTT 实验结果显示,与空白组相比,青钱柳三萜化合物 **3**、**10** 和 **11** 的细胞活力均低于 80%,具有明显的细胞毒性($P < 0.01$);化合物 **1**、**2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8** 和 **9** 的细胞活力均在 90%,无明显的细胞毒性,故选择这些化合物进行活性筛选(图 2-A)。

3.1.2 青钱柳三萜化合物降脂作用考察

如图 2-B 所示,模型组与空白组相比细胞内 TG 含量明显升高,具有显著性差异($P < 0.01$),表明 1 mmol/L 混合脂肪酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积模型建立成功。与模型组相比,化合物 **2**、**4**、**5**、**6** 和 **9** 均能显著减少细胞内 TG 含量,其中化合物 **4**(TUA)降 TG 效果最佳。

3.1.3 青钱柳三萜化合物抗氧化活性考察

HepG2 细胞经混合脂肪酸刺激后,与空白组相比,HepG2 细胞内抗氧化酶 SOD 活性显著下降($P < 0.01$)。与模型组相比,化合物 **2**、**4**、**5**、**6** 和 **9** 能够显著增加 HepG2 细胞 SOD 活性且化合物 **4**(TUA)的抗氧化活性最好(图 2-C)。

综上所述,化合物 **4**(TUA)具有较好的降脂和抗氧化活性,故进一步考察其对 NAFLD 的干预作用和可能机制。

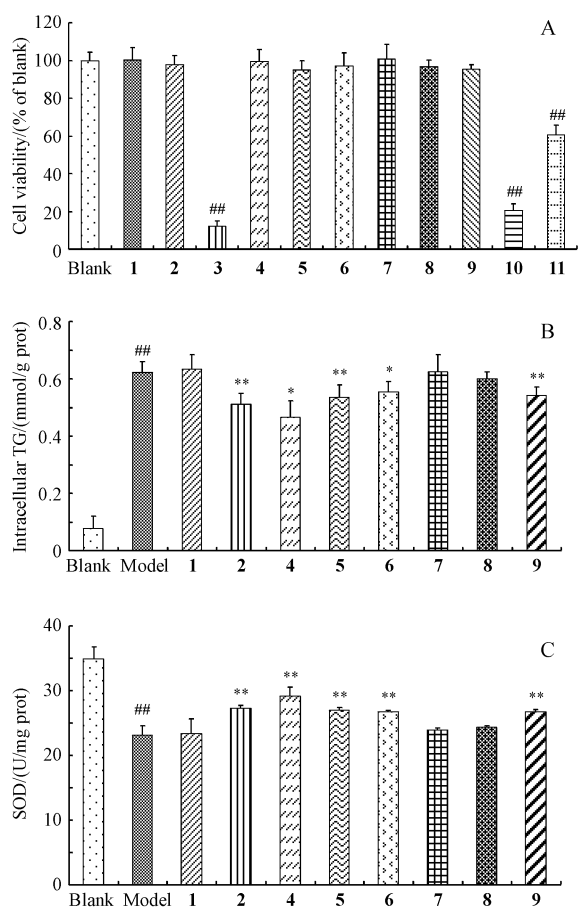


Figure 2 Lipid-lowering and antioxidant effects of the triterpenoids (Compd. 1–11) ($10 \mu\text{mol/L}$) from *C. paliurus* in free fatty acids (FFAs)-induced hepatic steatosis cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

A: Cell viability measured by MTT assay; B: Intracellular triglyceride (TG) content determined by the assay kits; C: Superoxid dismutase (SOD) activity determined by the assay kits

$P < 0.01$ vs blank group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 TUA 对细胞活力的影响

通过 MTT 检测不同浓度的 TUA 对 HepG2 细胞存活率的影响,筛选出对细胞毒性较小的样品浓度作为实验的加药浓度。如图 3 所示,1 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 TUA 加入 HepG2 细胞 24 h 后,细胞存活率均在 90% 以上,结合图 2-A 实验结果,说明 $10 \mu\text{mol/L}$ 及以下浓度的 TUA 无明显的细胞毒性,因此后续实验的给药浓度设定在 $1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 之间。

3.3 TUA 对 HepG2 细胞中脂质蓄积的改善作用

3.3.1 TUA 对 HepG2 细胞脂质沉积的作用 油红 O 染色结果显示,空白组中 HepG2 细胞边缘清晰,未见红色油滴沉积;与空白组相比,模型组中 HepG2 细胞内可见明显的红色脂滴环绕于胞核周围,脂肪堆积明显 ($P < 0.01$),而药物组与模型组

相比随着 TUA 给药剂量的增加,HepG2 细胞红色脂滴的数量逐渐减少,且脂滴变小,颜色变浅。当 TUA 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时,HepG2 细胞脂质沉积和脂滴的数量显著下降 ($P < 0.05$)。当同时加入 TUA ($10 \mu\text{mol/L}$) 和 Nrf2 抑制剂鸦胆子苦醇后,HepG2 细胞脂质沉积和脂滴的数量与 TUA ($10 \mu\text{mol/L}$) 组相比显著增加,表明 TUA 可以改善脂质堆积(图 4-A、4-B)。

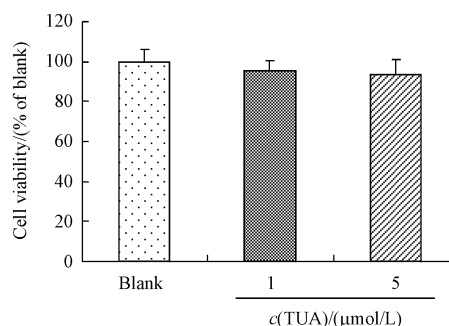


Figure 3 Cell viability of $2\alpha,3\alpha,23$ -trihydroxyurs-12,20(30)-dien-28-oic acid (Compd. 4, TUA) in HepG2 cells measured by MTT assay ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.3.2 TUA 对 HepG2 细胞 TG 的作用 如图 4-C 所示,模型组与空白组相比 TG 含量明显升高,具有显著性差异 ($P < 0.01$)。在 $1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内随 TUA 给药浓度的增加,与空白组相比,HepG2 细胞内 TG 的含量逐渐降低,表现明显的浓度依赖性。当 TUA 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞内 TG 的含量显著下降 ($P < 0.05$),TG 的清除率达 19.4%。与 TUA ($10 \mu\text{mol/L}$) 组相比,而 TUA ($10 \mu\text{mol/L}$) + 鸦胆子苦醇组细胞内 TG 的含量显著增加,表明 TUA 的降脂作用可能与 Nrf2 信号通路有关。综上可知,TUA 具有良好的体外降脂活性,可能对脂肪肝具有一定的防治作用。

3.4 TUA 对 HepG2 细胞氧化应激的影响

3.4.1 TUA 对 ROS 含量的影响 DCFH-DA 荧光探针与各组细胞共孵育后,模型组细胞内 ROS 与空白组相比显著增加 ($P < 0.01$),当给予 $10 \mu\text{mol/L}$ TUA 后,细胞内 ROS 与模型组相比显著降低 ($P < 0.05$),而 TUA ($10 \mu\text{mol/L}$) + 鸦胆子苦醇组与 TUA ($10 \mu\text{mol/L}$) 组相比,细胞内 ROS 显著增加(图 5-A)。

3.4.2 TUA 对抗氧化酶 SOD 活性及脂质过氧化物 MDA 的影响 HepG2 细胞经混合脂肪酸刺激后,与空白组相比,抗氧化酶 SOD 活力显著下降

($P < 0.01$) 而脂质过氧化物 MDA 的含量却明显增加($P < 0.01$) (图 5-B、5-C)。不同剂量的 TUA 干预后,与模型组相比,细胞内 SOD 活力明显升高($P < 0.01$),脂质过氧化物 MDA 的含量逐渐下降,

当给药浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞内 MDA 的含量显著下降($P < 0.05$)。当加入 Nrf2 抑制剂鸦胆子苦醇后,与 TUA ($10 \mu\text{mol/L}$) 组相比,细胞内 SOD 活力明显降低而细胞内 MDA 的含量显著增加。

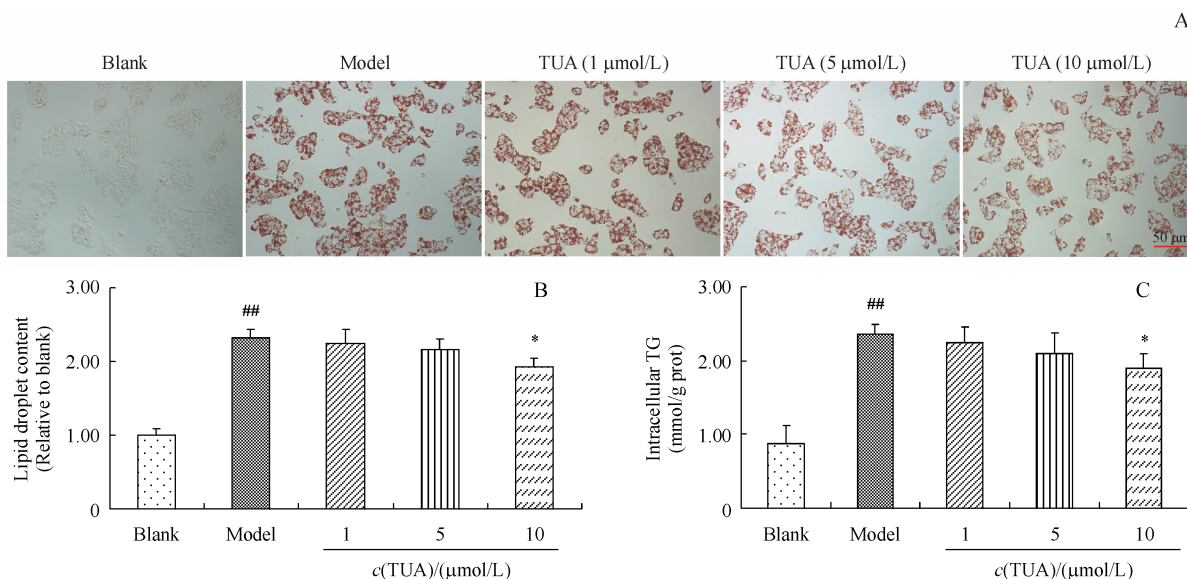


Figure 4 Effect of TUA ($10 \mu\text{mol/L}$) on lipid accumulation in FFAs-induced hepatic steatosis cells

A: Oil Red O staining ($\times 400$); B: Oil Red O colorimetric assay ($\bar{x} \pm s, n = 5$); C: Intracellular TG content ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

^{##} $P < 0.01$ vs blank group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

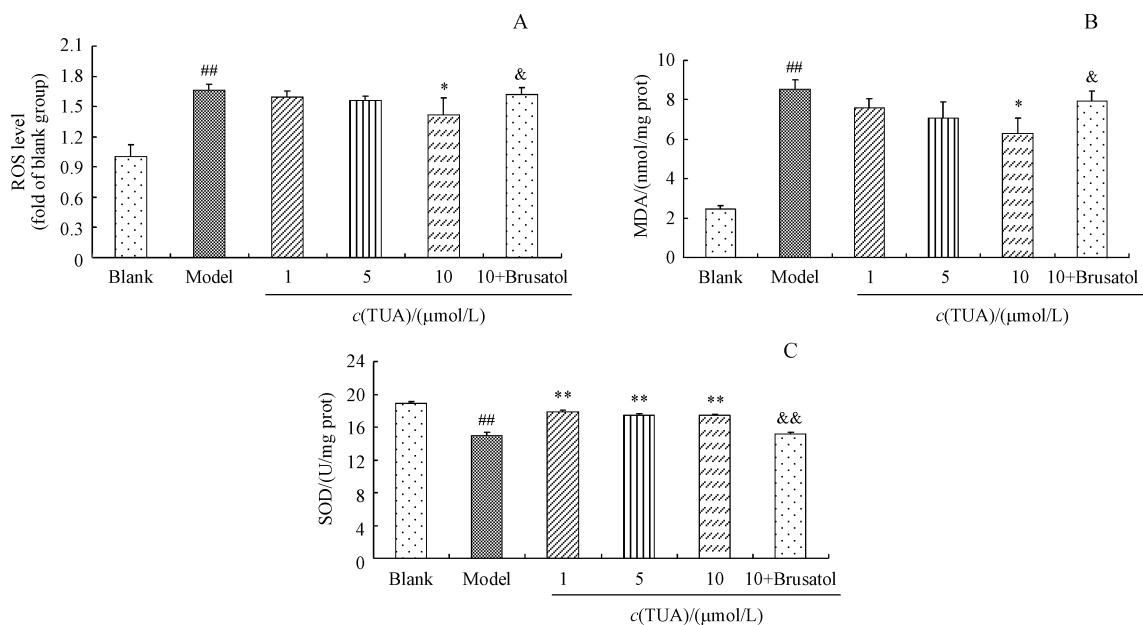


Figure 5 Effect of TUA on intracellular ROS level (A), SOD activity (B) and MDA content (C) in FFAs-induced HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

ROS: reactive oxygen species; MDA: malondialdehyde

^{##} $P < 0.01$ vs blank group; ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$ vs model group; ^{&&} $P < 0.01$ vs TUA group

3.5 TUA 对 HepG2 细胞抗氧化相关蛋白的影响

如图 6-A ~ 6-D 所示,与模型组相比, TUA 能够提高混合脂肪诱导的 HepG2 细胞内 Nrf2 和 Nrf2 所调控的抗氧化酶 HO-1 和 NQO-1 的蛋白表达量;

当 TUA 达到 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, Nrf2、HO-1 和 NQO1 的蛋白表达量显著增加($P < 0.01$);加入 Nrf2 的抑制剂鸦胆子苦醇后,同 TUA ($10 \mu\text{mol/L}$) 组相比, Nrf2、HO-1 和 NQO1 的蛋白表达量均显著降低。

如图 6-E 和 6-F 显示,与空白组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 的 TUA 能够显著增加 Nrf2 从细胞质转入细胞核 ($P < 0.01$),当加入鸭胆子苦醇后,Nrf2 从细胞质转入细胞核的量显著降低 ($P < 0.01$),且细胞质和

细胞核中的 Nrf2 表达量均降低。上述实验结果表明,TUA 可能具有激活 Nrf2 的作用,增加 Nrf2 的入核,从而提高其介导的抗氧化酶的表达,发挥抗氧化的作用。

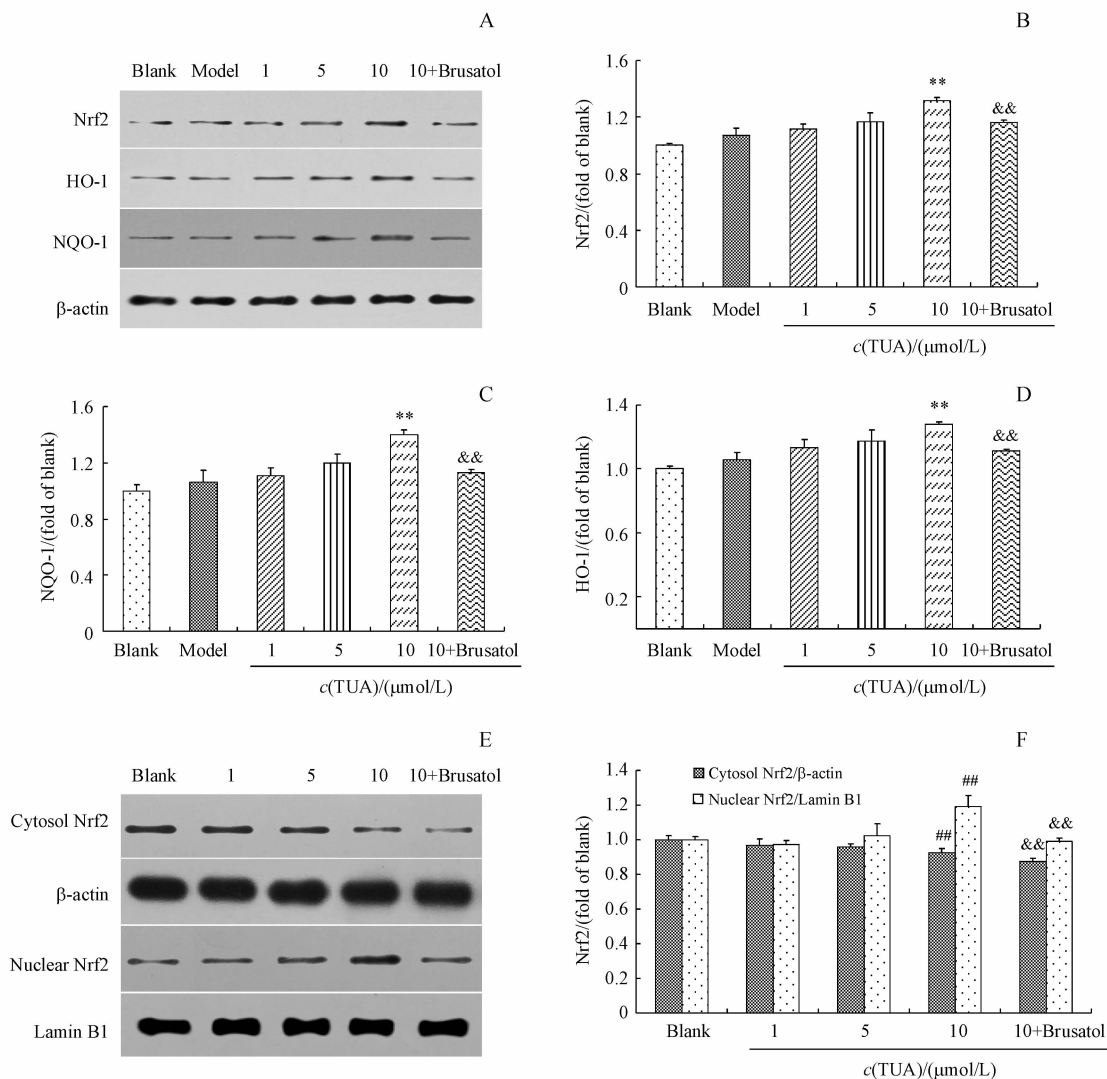


Figure 6 Effect of TUA on protein expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD (P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

A-D: Protein levels of Nrf2, HO-1 and NQO-1 were measured by Western blot in HepG2 cells treated with indicated concentrations of TUA with or without FFAs in the absence or presence of Nrf2 inhibitor brusatol; E, F: Cytosolic and nuclear levels of Nrf2 were analyzed in HepG2 cells treated with indicated concentrations of TUA in the absence or presence of Nrf2 inhibitor brusatol

$P < 0.01$ vs blank group; * $P < 0.01$ vs model group; && $P < 0.01$ vs TUA group

4 讨论

本研究采用 FFAs 刺激 HepG2 细胞,建立肝细胞脂肪变性模型,评价了 11 个青钱柳三萜化合物的生物活性,实验结果显示化合物 4 (TUA) 具有良好降脂和抗氧化活性,其机制可能是通过激活 Nrf2-ARE 通路,提高 Nrf2 介导的抗氧化酶表达,从

而改善肝脏脂肪变性。

本实验用 1.0 mmol/L 油酸和棕榈酸(物质的量比为 2:1)的游离脂肪酸作用于 HepG2 细胞 24 h 后,HepG2 细胞中脂滴积累明显,ROS 和 MDA 含量增加而 SOD 的活力下降,这与文献[13-14]等结果一致,表明肝细胞脂肪变性模型建立成功。

本研究共筛选了 11 个青钱柳三萜化合物的降

脂和抗氧化活性。化合物 1~5 为乌苏烷型三萜昔元,化合物 4(TUA) 的降脂和抗氧化效果最佳,化合物 2 和 5 也有降脂和抗氧化活性,且化合物 2 的活性略优于化合物 5,说明乌苏烷型三萜昔元药效较好,30 位环外双键、A 环 3 位 α 羟基和羟基数对活性有影响。化合物 6~8 为齐墩果烷型三萜昔元,化合物 6 具有降脂和抗氧化作用,但其作用低于化合物 4,说明齐墩果烷型降脂和抗氧化活性不如乌苏烷型,齐墩果烷型中 3 位氧化成羰基对其活性有利。化合物 9~11 为达玛烷型三萜皂苷,化合物 9 也具有一定降脂和抗氧化效果,说明达玛烷型三萜皂苷 A 环开环的化合物降脂和抗氧化活性优于 A 环闭环的化合物。

本实验发现 TUA 可显著减少 HepG2 细胞中脂质积累,降低 ROS 和 MDA 的含量并且增加 SOD 的活性,而鸦胆子苦醇可阻断这些作用,说明表明 TUA 可能是通过激活 Nrf2 保护肝脏,使其免受氧化应激损伤。

已有研究表明 HO-1 和 NQO-1 在调控肝脏 ROS 水平方面发挥着重要的作用,且 HO-1 和 NQO-1 主要受 Nrf2-ARE 通路调控^[15]。正常生理状况下,Nrf2 在细胞质中与胞浆蛋白伴侣分子 Keap1 结合处于被抑制状态,当发生氧化应激时,亲电子试剂或促氧化剂直接作用于 Keap1 的半胱氨酸残基,使 Nrf2 与其解偶联进入细胞核,与 ARE 结合,从而调控 HO-1 和 NQO-1 表达^[16]。本实验中发现 TUA 能够显著增加混合脂肪酸诱导 HepG2 细胞中 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 的蛋白表达,但当给予 Nrf2 的抑制剂鸦胆子苦醇干预后,Nrf2、HO-1 和 NQO-1 的蛋白表达量降低。此外,TUA 能够增加细胞核中的 Nrf2 表达而减少细胞质中的 Nrf2 的表达,增加 Nrf2 的入核,但当加入 Nrf2 的抑制剂鸦胆子苦醇后,Nrf2 的入核减少,且细胞质中的 Nrf2 表达量也减少,这可能与鸦胆子苦醇抑制 Nrf2 的作用机制有关。以上结果表明,TUA 可能是通过激活 Nrf2,增加 Nrf2 入核,从而活化 Nrf2-ARE 通路抵抗氧化应激,缓解 NAFLD 的发生。

参考文献

[1] Hardy T, Oakley F, Anstee QM, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum[J]. *Annu Rev Pathol*, 2016, **11**:451-496.

[2] Gariani K, Philippe J, Jornayvaz FR. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: from bench to bedside[J]. *Diabetes Metab*, 2013, **39**(1):16-26.

[3] Spahis S, Delvin E, Borys JM, et al. Oxidative stress as a critical factor in nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis[J]. *Antioxid Redox Sign*, 2017, **26**(10):519-541.

[4] Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity[J]. *Annu Rev Pharmacol*, 2013, **53**:401-426.

[5] Li WW, Ma FF, Zhang LY, et al. S-Propargyl-cysteine exerts a novel protective effect on methionine and choline deficient diet-induced fatty liver via Akt/Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, **2016**:4690857.

[6] Wang QQ, Jiang CH, Fang SZ, 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.

[7] Wu ZF, Gao TH, Zhong RL, et al. Antihyperlipidaemic effect of triterpenic acid-enriched fraction from *Cyclocarya paliurus* leaves in hyperlipidaemic rats [J]. *Pharm Biol*, 2017, **55**(1):712-721.

[8] Jiang CH, Yao N, Wang QQ, et al. *Cyclocarya paliurus* extract modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity by inhibition of inflammation in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, **153**(2):344-351.

[9] Lin Z, Wu ZF, Jiang CH, et al. The chloroform extract of *Cyclocarya paliurus* attenuates high-fat diet induced non-alcoholic hepatic steatosis in Sprague Dawley rats [J]. *Phytomedicine*, 2016, **23**(12):1475-1483.

[10] Wang YT, Zhao MG, Sheng XP, et al. Effect of triterpenic acid-enriched fraction from *Cyclocarya paliurus* on high glucose-induced pancreatic α cells insulin resistance[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(2):215-221.

[11] Xie MY, Xie JH. Review about the research on *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja[J]. *J Food Sci Biotechnol* (食品与生物技术学报), 2008, **27**(1):113-121.

[12] Li XL. Study on chemical constituents of *Cyclocarya paliurus* [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2012.

[13] Guo XX, Sha XH, Liu J, et al. Chinese Purple Yam (*Dioscorea alata* L.) extracts inhibit diabetes-related enzymes and protect HepG2 cells against oxidative stress and insulin resistance induced by FFA[J]. *Food Sci Technol Res*, 2015, **21**(5):677-683.

[14] Yin JJ, Luo YQ, Deng HL, et al. Hugin Qingzhi medication ameliorates hepatic steatosis by activating AMPK and PPAR α pathways in L02 cells and HepG2 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, **154**(1):229-239.

[15] Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, **20**(25):8082-8091.

[16] Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism[J]. *BMB Rep*, 2004, **37**(2):139-143.