

18 α -甘草次酸对游离脂肪酸致 HepG2 细胞脂毒性的保护作用

程媛, 李涓, 唐熠, 谭亿民

成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072

摘要:目的 探讨 18 α -甘草次酸对游离脂肪酸 (FFAs) 致 HepG2 细胞脂毒性的保护作用及经线粒体途径调节的分子机制。方法 给予 1 mmol/L FFAs, 油酸 (OA) - 棕榈酸 (PA) (2:1) 建立体外 HepG2 细胞脂肪变性模型, 细胞分为对照组、模型组和 18 α -甘草次酸低、中、高剂量 (10、20、40 μ mol/L) 组, 阳性药 (凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK, 10 μ mol/L) 组, 采用 MTT 法检测细胞活力, 用 Hoechst33258 染色法观察细胞凋亡; 免疫荧光染色法观察 Bax 蛋白激活情况; Western blotting 检测细胞色素 C 在线粒体和胞浆的分布情况; Caspase-3 酶活检测试剂盒测定细胞内 Caspase-3 活性。结果 18 α -甘草次酸能保护 FFAs 致 HepG2 细胞活力下降, 减少 HepG2 细胞脂性凋亡数量; 18 α -甘草次酸能下调 Bax 蛋白激活, 减少细胞色素 C 的释放, 从而阻止 Caspase-3 活性的增高, 且呈剂量相关性。结论 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞的脂毒性中存在保护作用, 其作用机制与抑制线粒体凋亡通路有关。

关键词: 18 α -甘草次酸; 游离脂肪酸; 线粒体; 脂性凋亡

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)07-1295-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.07.002

Protective effect of 18 α -glycyrrhetic acid on lipotoxicity in HepG2 cells induced by free fatty acids

CHENG Yuan, LI Juan, TANG Yi, TAN Yi-min

Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of 18 α -glycyrrhetic acid on lipotoxicity in HepG2 cells induced by free fatty acids (FFAs) and its potential cellular pathway. **Methods** The HepG2 cell steatosis model *in vitro* were incubated with 1 mmol/L FFAs, oleic acid (OA)-palmitic acid (PA) (2:1). The HepG2 cells were randomly divided into control group, model group, 18 α -glycyrrhetic acid 10, 20, and 40 μ mol/L groups, Z-VAD-FMK group. Cell viability was assessed by MTT method. Cell apoptosis was determined by Hoechst 33258. Bax activation was detected by immuno fluorescence staining. Mitochondrial dysfunction was analyzed by detecting cytochrome C release by Western blotting method. Caspase-3 enzyme activity was determined by Caspase-3 enzyme activity kit. **Results** 18 α -Glycyrrhetic acid could protect the decrease of HepG2 cell activity and reduce the number of lipid apoptosis in HepG2. 18 α -Glycyrrhetic acid could reduce the activation of Bax protein and decrease the release of cytochrome C. Thus, 18 α -glycyrrhetic acid could decrease the Caspase-3 enzyme activity, and they were dose-dependent. **Conclusion** 18 α -Glycyrrhetic acid has the protection of lipotoxicity in HepG2 cells induced by FFAs, and its mechanism may be related to inhibition of mitochondrial apoptosis pathway.

Key words: 18 α -glycyrrhetic acid; Free Fatty Acids (FFAs); lipoapoptosis; mitochondrion

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是一种代谢性肝损伤, 在病理上主要表现为肝细胞的脂肪变性及脂肪在肝脏内的蓄积^[1]。蓄积的脂质主要有三酰甘油 (TG)、胆固醇和游离脂肪酸 (FFAs) 等^[2]。其中, 游离脂肪酸有细胞毒性, 能引起肝细胞凋亡^[3]。其凋亡的

分子机制有线粒体、溶酶体和内质网的参与^[4]。研究发现 FFAs 通过激活 Bax 蛋白, 使线粒体稳定性下降, 引起线粒体内的细胞色素 C 向胞浆释放增加, 从而增加 Caspase-3 的活性, 激活 Caspase 依赖的线粒体凋亡通路^[5]。与其他通路相比, 线粒体介导凋

收稿日期: 2020-05-21

基金项目: 四川省科技厅科技支撑计划 (2014SZ0140); 成都中医药大学校基金资助项目 (ZRYB201003)

作者简介: 程媛 (1983—), 女, 主管药师, 硕士, 研究方向中药药理学。E-mail: 150120239@qq.com

亡通路在 FFAs 引起的肝细胞凋亡中起中心作用。NAFLD 目前的治疗手段有限,找到潜在的治疗药物很有意义。甘草属于豆科甘草属,有效成分是甘草酸、甘草次酸、甘草黄酮等^[6]。甘草酸在体内代谢为甘草次酸而发挥作用^[7]。临床上通常使用甘草酸制剂治疗肝炎与肝损伤^[8-9],也用于治疗非酒精性脂肪肝,但其具体的作用机制仍不十分清楚。在本课题组之前研究中发现, α 构型的甘草酸化合物异甘草酸镁在 NAFLD 的体外模型中,有抗脂性凋亡的作用^[10]。本文采用 FFAs 诱导 HepG2 细胞脂肪变性的体外模型,研究 18 α -甘草次酸对细胞脂毒性的保护作用及可能的分子机制。

1 实验材料

1.1 实验药品与试剂

18 α -甘草次酸,质量分数 $\geq 95\%$,产品批号 78K1615;MTT,产品批号 61K5318;尼罗红,产品批号 67K1273,均购自美国 Sigma 公司;DMEM 高糖培养基及胎牛血清,购自美国 Gibco 公司;无游离脂肪酸 BSA 购自美国 Calbiochem 公司;油酸(OA)产品批号 T20171109、棕榈酸(PA)产品批号 T20181009,均购自上海国药化学试剂厂;Hoechst33258 细胞凋亡检测试剂盒(产品批号 C1018)、Caspase-3 活力检测试剂盒(产品批号 C1116)、Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天生物技术研究;兔抗 cytochrome c、 β -actin antibodies 均购自美国 Trevigen 公司;山羊抗兔荧光二抗 IgG (H+L) 购自碧云天生物技术研究。凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 批号 145090V,美国 Calbiochem 公司。

1.2 细胞

人肝癌细胞 HepG2 (购自中国科学院上海细胞生物学研究所),由本实验室传代冻存保存。

1.3 实验仪器

BS210S 电子天平(德国 Sartorius 公司);IX71 倒置荧光相差显微镜(日本 Olympus 公司);NOVAPHTHTM 酶标仪(BIO-RAD 公司);Safire2 型微孔板测读仪(瑞士 TECAN 公司);蛋白电泳仪、凝胶成像仪均购自美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 造模及分组

HepG2 接种于含 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基(pH 7.2~7.4)中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,1~2 d

换液 1 次,0.25%胰酶消化并传代。取对数生长期的 HepG2 细胞用于实验,将 OA 和 PA 溶于 DMSO,配置成浓度分别为 666、333 mmol/L 的储备液,滤过除菌,4 $^{\circ}$ C 保存。临用前等体积混合,用无血清 DMEM 高糖培养基稀释到所需浓度,造模后^[11]加入,FFAs 终浓度为 1 mmol/L,其中 OA-PA (2:1)。细胞分为对照组、模型组,18 α -甘草次酸低、中、高剂量(10、20、40 μ mol/L)组,阳性药(凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK, 10 μ mol/L)组。造模后立即给药,给药组的剂量选择参照预实验设置,培养 24 h 后进行后续检测。

2.2 FFAs 对 HepG2 细胞体外脂肪变性模型的验证

将 HepG2 细胞吹散均匀接种到 24 孔板,贴壁生长 24 h 后分为对照组、模型组,OA-PA (2:1),FFAs 终浓度为 1 mmol/L,模型组造模方式同“2.1”项,每组 3 孔。继续培养 24 h 后弃上清,PBS 洗涤 1 次,每孔加入 300 μ L Hoechst 33258 染色液,室温避光染色 10 min。弃染色液,PBS 洗涤 3 次,加入 1 μ mol/mL 尼罗红染色液 300 μ L,室温避光染色 5 min,PBS 洗涤 1 次,荧光显微镜下观察。激发光源为 352 nm 紫外光时,激发 Hoechst 33258 染色的细胞核产生蓝色荧光;激发光源为 488 nm 可见光时,激发尼罗红染色的细胞内脂质产生红色荧光。最后把两张荧光照片叠加观察。比较对照组和模型组细胞内脂质情况,验证造模是否成功。

2.3 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞的保护作用

将 HepG2 细胞吹散均匀接种到 96 孔板,细胞培养及分组处理如“2.1”所述,每组 10 孔。24 h 后每孔加入 5% MTT 20 μ L,继续培养 4 h,小心吸出培养液,每孔加入 150 μ L DMSO,200 r/min 室温振摇 10 min 后于 570 nm 处检测吸光度(A)。

2.4 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞凋亡的影响

将 HepG2 细胞吹散均匀接种到 24 孔板,细胞培养及分组处理如“2.1”所述,24 h 后弃上清液,PBS 洗涤 1 次,每孔加入 500 μ L 4%多聚甲醛溶液,室温固定细胞 15 min,弃固定液,PBS 洗涤 3 次后每孔加入 300 μ L Hoechst 33258 染色液,室温避光染色 10 min,弃染色液,PBS 洗涤 3 次,在荧光显微镜下观察。每组取 10 个不同视野,凋亡细胞计数后取平均值。

2.5 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞凋亡相关蛋白 Bax 水平的影响

将盖玻片置于 24 孔板内,细胞培养及分组处理

如“2.1”所述, 24 h后弃上清液, PBS洗涤1次, 每孔加入0.5 mL固定液, 室温固定10 min, 去固定液, 用PBS洗3次。用封闭液室温封闭1 h, 去封闭液, 用1:1 000稀释的Bax一抗室温作用60 min, 去除一抗, 用1×TBST洗3次, 去洗涤液, 用1:500稀释的Cy3标记的荧光二抗室温作用2 h, 去除二抗, 用1×TBST洗3次。将贴有细胞的盖玻片甘油封片置于载玻片上, 在荧光显微镜下观察拍照。

2.6 18 α -甘草次酸对FFAs致HepG2细胞线粒体细胞色素C水平的影响

将HepG2细胞吹散均匀接种到70 cm细胞培养瓶中, 细胞培养及分组处理如“2.1”所述, 24 h后弃上清液, 冰预冷的PBS沉淀细胞, 取冰预冷的线粒体胞浆蛋白分离试剂Mito-Cyto Buffer重悬细胞, 转移到小容量玻璃匀浆器中, 用间隙严密的研杵研磨细胞35下。将细胞匀浆物转移到冰预冷的离心管, 4℃, 800 r/min离心5 min, 收集上清再次4℃, 12 000 r/min离心10 min。离心后的上清含胞浆成分, 沉淀含线粒体成分。将蛋白质样品稀释至相同且合适的浓度进行SDS-PAGE。电泳的电压为80 V, 30 min后改为120 V, 待示踪染料溴酚蓝至凝胶底部时停止电泳。卸胶后, 根据相对分子质量marker切取所需分子量范围的凝胶, 将蛋白转移至NC膜上。TBST洗涤5 min, 室温封闭1 h。膜装入杂交袋中, 加入一抗, 4℃孵育过夜。TBST洗膜5次, 辣根过氧化物酶标记的IgG羊抗鼠通用型二抗(1:1 000)室温孵育2 h。TBST洗膜5次。采用电化学发光检测(ECL)法显色检测胞浆和线粒体细胞色素C水平的变化。Bio-rad凝胶成像仪拍照, 以各条带光密度值代表相应蛋白质的表达量, 待测蛋白质表达量与内参照 β -actin表达量进行对比。

2.7 18 α -甘草次酸对FFAs致HepG2细胞Caspase-3活性的影响

将HepG2细胞吹散均匀接种到50 cm细胞培养瓶中, 细胞培养及分组处理如“2.1”所述, 24 h后弃上清液, 收集细胞, 加入裂解液, 冰浴裂解15 min。4℃16 000 r/min离心10 min。上清采用Caspase-3活性检测试剂盒测定caspase 3酶活性, 37℃孵育120 min, 于405 nm处检测吸光度。测定pNA标准曲线。样品的 A_{405} 扣除空白对照的 A_{405} , 即为样品中Caspase-3催化底物产生的吸光度。取少量样品用Bradford法测定蛋白浓度, 计算一个样品单位质量蛋白中所含的Caspase-3的酶活力单位。

2.8 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验分析。

3 结果

3.1 FFAs对HepG2细胞体外脂肪变性模型的验证

荧光显微镜观察结果显示, 对照组细胞质中红色荧光很少, 说明细胞内的脂质很少; 而1 mmol/L FFAs, OA-PA(2:1)造模后, 细胞质中红色荧光亮点增多, 说明FFAs大量进入细胞质, 表明体外脂肪变性模型造模成功, 方法稳定可进行后续实验。见图1。

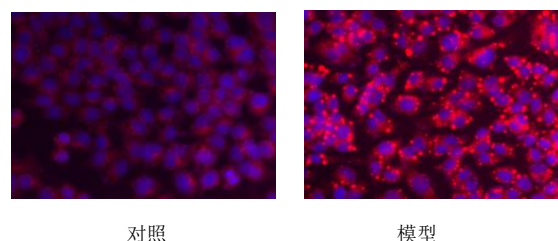


图1 FFAs对HepG2细胞体外脂肪变性模型的验证(200 $\times$)
Fig. 1 Validation of HepG2 cell *in vitro* steatosis model induced by FFAs(200 $\times$)

3.2 18 α -甘草次酸对FFAs致HepG2细胞的保护作用

与对照组相比, 模型组的A值显著降低, 显著抑制细胞的生长($P < 0.01$), 说明1 mmol/L FFAs对HepG2细胞有一定的细胞毒性。与模型组相比, 18 α -甘草次酸10、20、40 μ mol/L组A值显著升高($P < 0.05$ 、0.01), 说明18 α -甘草次酸与1 mmol/L FFAs共同作用24 h后, 能缓解FFAs的细胞毒性, 且缓解作用呈浓度相关性。见表1。

表1 18 α -甘草次酸对FFAs致HepG2细胞的保护作用($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Protective effect of 18 α -glycyrrhetic on HepG2 cells induced by FFAs ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	A
对照	—	0.847 $\pm$ 0.061
模型	—	0.547 $\pm$ 0.066**
Z-VAD-FMK	10	0.712 $\pm$ 0.058 ^{##}
18 α -甘草次酸	10	0.598 $\pm$ 0.056 [#]
	20	0.622 $\pm$ 0.050 [#]
	40	0.657 $\pm$ 0.057 [#]

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

3.3 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色检查细胞凋亡发现, 对照组细胞在视野中呈微弱蓝色, 表示无核固缩; 而模型组部分细胞的细胞核呈碎块状致密浓染, 表示发生凋亡。细胞凋亡计数统计表明, 对照组几乎没有凋亡细胞, 与对照组比较, 模型组凋亡细胞比例显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 18 α -甘草次酸 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡比例显著下降 ($P < 0.05$), 说明 18 α -甘草次酸能抑制游离脂肪酸引起的 HepG2 细胞凋亡, 抑制作用有浓度相关性。见表 2。

表 2 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of 18 α -glycyrrhetic on cell apoptosis of HepG2 cells induced by FFAs ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	凋亡细胞计数/%
对照	—	0.1 ± 0.3
模型	—	$9.3 \pm 1.2^{**}$
Z-VAD-FMK	10	$5.4 \pm 2.2^{##}$
18 α -甘草次酸	10	8.5 ± 1.4
	20	$7.8 \pm 1.3^{\#}$
	40	$7.2 \pm 1.6^{\#}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$

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

3.4 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞凋亡相关蛋白 Bax 水平的影响

免疫荧光染色结果显示, 对照组红色荧光微弱, 被激活的 Bax 蛋白少。与对照组比较, 模型组红色荧光增强, 说明 Bax 蛋白大量激活。与模型组相比, 18 α -甘草次酸 40 $\mu\text{mol/L}$ 组红色荧光明显减弱, 18 α -甘草次酸 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 组红色荧光也有一定程度的减弱, 说明 Bax 的激活随 18 α -甘草次酸浓度的增高而减少, 18 α -甘草次酸能抑制 FFAs 引起的 Bax 蛋白的激活, 见图 2。

3.5 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞线粒体细胞色素 C 水平的影响

与对照组相比, 模型组能使线粒体内细胞色素 C 水平减少, 而胞质中的细胞色素 C 水平增加, 说明 FFAs 使细胞色素 C 从线粒体释放增加。与模型组相比, 18 α -甘草次酸 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组线粒体内细胞色素 C 水平升高, 胞质中细胞色素 C 水平下降, 说明 18 α -甘草次酸能剂量相关性的抑制 FFAs 引起的细胞色素 C 从线粒体向胞质释放, 发挥稳定线粒体的作用。见图 3。

3.6 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞 Caspase-3 活性的影响

与对照组相比, 模型组 405 nm 处 A 值显著增

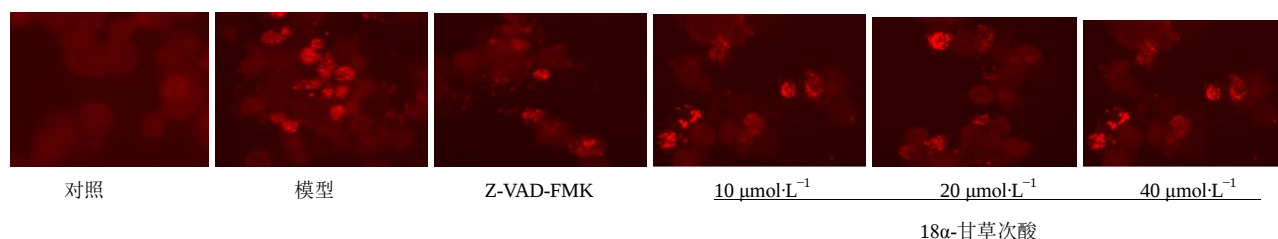


图 2 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞凋亡相关蛋白 Bax 水平的影响 (400 $\times$)

Fig. 2 Effects of 18 α -glycyrrhetic on apoptosis-related protein Bax levels of HepG2 cell induced by FFAs (400 $\times$)

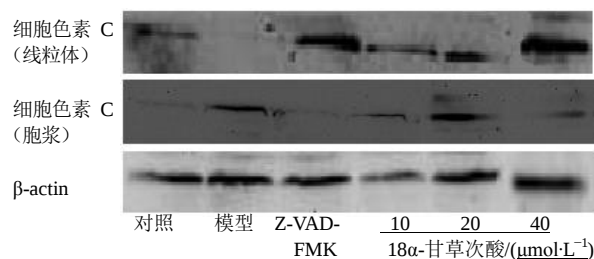


图 3 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞线粒体细胞色素 C 水平的影响

Fig. 3 Effects of 18 α -glycyrrhetic on mitochondrial cytochrome C levels of HepG2 cell induced by FFAs

高 ($P < 0.01$), 说明模型组 Caspase-3 酶活力显著增高。与模型组相比, 18 α -甘草次酸 20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组 Caspase-3 的 A 值显著下降 ($P < 0.05$ 、0.01), 说明 18 α -甘草次酸能浓度相关性的减少 FFAs 引起的 Caspase-3 酶活力增加。见表 3。

4 讨论

随着生活质量的提高, NAFLD 的发病率逐年上升, 呈大众化、低龄化的趋势, 现全球发病率达 25%^[12]。尽管其流行范围广, 目前治疗的手段非常有限。早期认为通过饮食调整和运动实现减轻体重、改善胰岛素抵抗是有效的基础治疗。但对控

表 3 18 α -甘草次酸对 FFAs 致 HepG2 细胞 Caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of 18 α -glycyrrhetic on Caspase-3 activities of HepG2 cell induced by FFAs ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A
对照	—	0.490 $\pm$ 0.053
模型	—	0.704 $\pm$ 0.041 ^{**}
Z-VAD-FMK	10	0.561 $\pm$ 0.088 ^{##}
18 α -甘草次酸	10	0.675 $\pm$ 0.063
	20	0.651 $\pm$ 0.059 [#]
	40	0.586 $\pm$ 0.054 ^{##}

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

制饮食和运动难以改善的 NAFLD 患者, 10%~30% 的会进展到非酒精性脂肪变性肝炎 (NASH) [13], 后者可进展为肝硬化, 甚至发生肝细胞肝癌。目前尚无疗效理想、作用明确的治疗药物, 临床上主要通过调节代谢、保肝护肝、调节肠道菌群来治疗。但这些药物都有不同程度的不良反应。如调节代谢的氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 噻唑烷二酮类曲格列酮有潜在的肝毒性 [14], 他汀类和贝特类降脂药物有肝功能损害的不良反 [15]; 长期高剂量服用保肝护肝药如抗氧化剂维生素 E 可能会出现前列腺癌和出血性中风风险 [16]。因此, 找到不良反应低的潜在治疗药物非常有意义。大量的研究显示, 低毒的中药提取物及化合物对 NAFLD 治疗有良好疗效, 目前临床使用复方甘草酸苷和甘草酸二胺治疗 NAFLD 效果显著 [17]。甘草酸由一分子甘草次酸和二分子葡萄糖醛酸组成, 有 18 α 和 18 β 两种立体异构体。在体内经肝脏代谢为甘草次酸而发挥作用。尽管临床上广泛使用, 但其发挥作用的具体分子机制仍不完全清楚, 值得深入研究。

目前非酒精性脂肪肝的发病机制尚未完全明确。近年来对发病机制的认识由“二次打击”学说向“多重打击”转变 [18]。胰岛素抵抗是发病机制中的一次打击, 形成肝脏脂肪储积和胰岛素抵抗的恶性循环。二次打击由脂质过氧化引起的氧化应激造成, 导致肝细胞功能失调和凋亡坏死。同时, 炎症因子 (IL-6、TNF- α) 释放、脂肪因子 (瘦素、脂联素等) 水平异常和肠道菌群紊乱对 NAFLD 的发生发展也非常重要, 形成多重打击 [19]。

研究发现二次打击中游离脂肪酸引起非酒精性脂肪肝细胞凋亡的机制与线粒体、溶酶体、Fas 受

体和内质网应激有关 [20]。在以上几种游离脂肪酸引起非酒精性脂肪肝脂毒性和脂性凋亡的机制当中, 线粒体是细胞发生凋亡的中心环节 [21], 而线粒体 - 细胞色素 C 途径是细胞凋亡的重要途径。体外研究发现, 线粒体 - 细胞色素 C 通路中线粒体释放细胞色素 C 受 Bcl-2 蛋白家族调控, 且是 Caspase 自身正反馈激活链中的关键步骤。FFAs 能激活 Bax, 胞浆内 Bax 异位到线粒体上, 使线粒体渗透性转换孔 (PTP) 开启, 引起线粒体通透性增加, 线粒体内的细胞色素 C 释放进入胞浆, 大量激活 Caspase-3, 再瀑布式激活 Caspase-2、6、8、10 等, 这些激活的 Caspase 最终激活脱氧核糖核酸酶 (CAD/DFF45), 水解核酸及细胞骨架蛋白, 引起 Caspase 依赖的线粒体凋亡通路。鉴于线粒体 - 细胞色素 C 途径在二次打击中的中心作用, 本文选择研究 18 α -甘草次酸是否通过抑制线粒体凋亡通路这一机制来发挥对游离脂肪酸致 HepG2 细胞脂毒性的保护作用, 探讨其对此凋亡通路上下游相关的 Bax 蛋白、细胞色素 C、Caspase-3 的影响。研究结果显示, 模型组能引起 Bax 蛋白激活, 使细胞色素 C 从线粒体向胞质释放增加, 从而引起 Caspase-3 活性增高, 细胞凋亡增加; 各剂量组 18 α -甘草次酸能减弱 Bax 蛋白荧光强度, 下调游离脂肪酸造成的 Bax 激活, 增加线粒体稳定性, 使细胞色素 C 释放减少, 最终 Caspase-3 活性下降, 脂性凋亡减少。说明 18 α -甘草次酸在游离脂肪酸诱导 HepG2 细胞脂肪变性的体外模型中能保护 HepG2 细胞, 减少脂毒性引起的细胞凋亡, 其作用机制与干预线粒体介导的细胞脂性凋亡有关。

本文采用的 FFAs 体外对 HepG2 细胞造模的方法是建立在文献 [11] 及课题组前期的研究基础之上。通常用高浓度 FFAs, OA - PA (2:1) 给予体外肝细胞, 复制 NAFLD 的主要特征 [22]。但是, 体外研究的数据不能真实反映体内实验, 还需要进一步利用 NAFLD 动物模型来验证 18 α -甘草次酸的治疗效果及分子机制。本文通过预实验结果, 确定了造模后 18 α -甘草次酸给药的剂量, 研究发现各剂量组能剂量相关性的抑制 Bax 激活、线粒体细胞色素 c 释放和 Caspase-3 的激活, 说明剂量选择适宜。

综上所述, 18 α -甘草次酸通过抑制线粒体 - 细胞色素 C 途径抑制肝细胞脂性凋亡, 18 α -甘草次酸可能是临床使用复方甘草酸苷和甘草酸二胺治疗 NAFLD 发挥作用的物质基础, 为开发甘草酸类化合物治疗 NAFLD 提供理论支持。

参考文献

- [1] 汪美汐, 彭宗根. 非酒精性脂肪性肝病实验模型 [J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(18): 1457-1462.
- [2] 麦爱芬. 高脂血症和游离脂肪酸与脂肪肝的相关性调查 [J]. 临床检验杂志, 2019, 8(4): 259-260.
- [3] 施红波, 傅君芬, 黄 邀, 等. 钙非依赖性磷脂酶 A₂ 抑制剂减少肝细胞脂性凋亡及改善胰岛素抵抗的研究 [J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(1): 27-31.
- [4] 王晓芳, 姜云瀚, 孙 军. 细胞死亡的新理论: 溶酶体线粒体轴理论 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(10): 892-896.
- [5] 吴鹏波, 宋 琪, 俞媛洁, 等. 二甲双胍对非酒精性脂肪性肝病细胞模型线粒体途径凋亡及氧化应激的影响 [J]. 中华肝脏病杂志, 2020, 28(1): 64-68.
- [6] 李 想, 李 冀. 甘草提取物活性成分药理作用研究进展 [J]. 江苏中医药, 2019, 51(5): 81-86.
- [7] 陈 静. 甘露糖化胆固醇配体修饰甘草次酸脂质体的肝靶向研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [8] 张玉琴. 甘草酸制剂用于病毒性肝炎治疗临床研究 [J]. 海峡药学, 2019, 31(2): 196-197.
- [9] 余梅香, 李紫薇, 杨婉花. 甘草酸二铵制剂治疗药物性肝损害有效性与安全性的系统评价 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 94-100.
- [10] Cheng Y, Zhang J, Shang J, *et al.* Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity in HepG2 cells by magnesium isoglycyrrhizinate *in vitro* [J]. *Pharmacology*, 2009, 84(3): 183-190.
- [11] 刘 江, 厉有名, 陈韶华, 等. 一种实用的体外非酒精性脂肪肝细胞模型 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2009, 38(6): 84-87.
- [12] Younossi Z M, Koenig A B, Abdelatif D, *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 4(1): 73-84.
- [13] 素 琴, 黄 缘. 酒精性脂肪肝病的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(23): 3410-3415.
- [14] 王全军, 呼 丹, 吴纯启, 等. 曲格列酮肝脏线粒体毒性通路分子起始事件(MIE) [C]. 海口: 2015年(第五届)药物毒理学会, 2015.
- [15] 周玉敏. 他汀类药联合其他药物用药致不良反应的临床特点分析 [J]. 世界最新医学信息文摘: 电子版, 2019, 19(10): 88.
- [16] 樊亚东, 贾建伟, 张晓雨, 等. 非酒精性脂肪性肝病发病机制和临床治疗研究进展 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2020, 30(1): 93-96.
- [17] 李 一, 李少昊. 异甘草酸镁联合多烯磷脂酰胆碱治疗非酒精性脂肪性肝炎 60 例分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2018, 29(6): 964-965.
- [18] Day C P, James O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits" [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842-845.
- [19] 刘昱含, 谢 青. 多重“打击”在非酒精性脂肪性肝病发病过程中的作用 [J]. 肝脏, 2016, 21(3): 219-221.
- [20] 程 媛, 尚 靖, 张陆勇. 脂毒性与非酒精性脂肪肝的研究进展 [J]. 华西医学, 2008, 23(6): 1482-1484.
- [21] 朱潇旭, 段小花, 李瑞霞, 等. 线粒体功能障碍与非酒精性脂肪肝发病关系的研究进展 [J]. 山东医药, 2018, 58(29): 108-111.
- [22] 李 玲, 查 敏, 张兰予, 等. 胰高血糖素样肽-1 通过 Foxo1/3 调控肝细胞脂质代谢研究 [J]. 中华内科杂志, 2019, 58(1): 39.