胡黄连中环烯醚萜苷类成分体外抗非酒精性脂肪性肝炎活性研究

陈　玉[1, 2, 3]，张可佳[2, 3]，李孝庆[4]，宋兆辉[2, 3]，余伯阳[1*]，鄂秀辉[2, 3*]

1. 中国药科大学 江苏省中药评价与转化重点实验室，江苏 南京　210009
2. 天士力控股集团有限公司研究院 现代中药开发中心，天津　300410
3. 天士力制药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室，天津　300410
4. 天士力控股集团有限公司研究院 药理毒理开发中心，天津　300410

摘　要：目的 探究胡黄连苷I、II、III、IV体外抗非酒精性脂肪性肝炎（NASH）的活性。**方法** 用1 mmol/L游离脂肪酸（FFA）诱导HepG2细胞24 h，建立体外NASH模型；MTT法检测胡黄连苷I、II、III、IV对细胞活力的影响，并依此优选3个安全给药浓度（0.25、0.50、1.00 mg/mL）干预体外NASH模型；油红O染色法镜下观察细胞内脂滴的变化情况；试剂盒法检测细胞培养上清液中超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、白介素-8（IL-8）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）的含量变化。**结果** 胡黄连苷I、II、III、IV对HepG2细胞的活力影响较小。FFA刺激24 h后，模型组与对照组比较，细胞内被染成明显的红色颗粒状脂滴，细胞培养上清液中SOD水平显著下降，MDA、TNF-α、IL-8水平显著上升，均有显著性差异（P＜0.05、0.01）。与模型组比较，不同浓度的胡黄连苷I、II、III、IV干预组，细胞内红色颗粒状脂滴减少，且以胡黄连苷II最为明显；SOD水平显著上升，MDA、TNF-α、IL-8水平显著下降（P＜0.05、0.01），且以胡黄连苷II、III、IV较为明显，但没有显著的剂量相关性。**结论** 胡黄连苷I、II、III、IV中胡黄连苷II的体外抗NASH的活性较显著。

关键词：非酒精性脂肪性肝炎；胡黄连苷I；胡黄连苷II；胡黄连苷III；胡黄连苷IV；氧化应激；炎症

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674-6376（2019）05-0846-06

DOI：10.7501/j.issn.1674-6376.2019.05.007

Anti-NASH activity of Iridoid Glycosides in *Picrorhizae Rhizoma in vitro*

CHEN Yu[1, 2, 3], ZHANG Kejia[2, 3], LI Xiaoqing[4], SONG Zhaohui[2, 3], YU Boyang[1], E Xiuhui[2, 3]

1. Jiangsu Provincial Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China
2. Research Center of Modern Chinese Medicine, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China
3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China
4. Research Center of Pharmacology and Toxicology,Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To discuss the anti-NASH activity of PicrosideI, PicrosideII, PicrosideIII and PicrosideIV *in vitro*. **Methods** Liver cells HepG2 were cultured and induced by FFA to establish NASH cell model. The cell viability were measured by MTT to select the safe drug concentration. Then safe concentrations of PicrosideI, PicrosideII, PicrosideIII and PicrosideIV were meanwhile added. The fat deposition in cells was observed by oil-red O staining method. The content of SOD, MDA, IL-8 and TNF-α were tested by Elisa. **Results** Three treatment groups were seted with the concentration of 0.25, 0.50 and 1.00 mg/mL. Compared with control group, the NASH cell model group was stained with obvious red granular lipid droplets. The levels of SOD were significantly higher in model group than the control group, while MDA, TNF-α and IL-8 significantly lower than control group (P < 0.05 and 0.01). Compared with the model group, the red granular lipid droplets decreased in the intervention groups of different concentrations of Picroside I, II, III and IV, especially Picroside II. SOD levels increased significantly, MDA, TNF-a and IL-8 levels decreased significantly (P < 0.05, 0.01), and Picroside II, III and IV were more obvious, but there was no significant dose correlation. **Conclusion** PicrosideIIcan improve cellular pathology and influence the levels of SOD, MDA, IL-8 and TNF-α obviously, showing

收稿日期：2019-01-18

第一作者：陈　玉（1992—），女，硕士在读，研究方向为中药新药研发。E-mail：yychen1123@163.com

***通信作者：**余伯阳，男，教授，博士生导师，研究方向为中药及复方药效物质基础及作用机理研究。E-mail：boyangyucpu@163.com

鄂秀辉，男，高级工程师，研究方向为中药新药研发。E-mail：exh@tasly.com

potential value on NASH treatment.

Key words: NASH; PicrosideI; PicrosideII; PicrosideIII; PicrosideIV; cell model

非酒精性脂肪性肝病（nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD），是一种遗传-环境-代谢应激相关性肝病，其与除酒精和其他明确因素如病毒性肝炎、药物性脂肪肝等外的胰岛素抵抗以及代谢综合征密切相关，包括单纯性脂肪肝（nonalcoholic fattyliver，NAFL）、非酒精性脂肪性肝炎（nonalcoholic steatohepatitis，NASH）和肝硬化（nonalcoholic cirrhosis，NAFC），其中NASH可以进展为肝纤维化、肝硬化、肝癌，最后发展至肝功能衰竭[1-3]。NASH全球发病率在3%～5%，在糖尿病人群中发病率为22%，NASH患者中有15%～25%会发展成为肝硬化[4-5]。NASH发病机制十分复杂，至今尚不明确，“二次打击学说”接受度较高：过量脂肪酸和三酰甘油在肝脏沉积，引起NAFL；在NAFL基础上引起慢性氧化应激，造成肝细胞线粒体和肝细胞本身的持续损伤和炎症，形成NASH[6-10]。因此，开展针对NASH的防治研究，对于阻止其进一步发展成肝硬化以及肝癌具有十分重要的意义。

胡黄连是我国传统中药，来源于玄参科植物胡黄连 *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell的根茎，具有退虚热、除疳热、清湿热之功效。现代药理学研究表明，胡黄连总苷具有抗乙型肝炎病毒、保肝利胆等多种药理活性[11-12]。迄今为止，学者们从胡黄连的根茎中主要分离得到了三大类苷类化合物，分别是环烯醚萜苷类、酚苷类、苯乙醇糖苷类，其中环烯醚萜苷类成分是主要化学成分，也是胡黄连的主要活性成分[13-17]。环烯醚萜苷类成分在胡黄连中含量非常丰富，目前已经分离得到多种，其中胡黄连苷I、II、III、IV含量最高，是胡黄连的主要效应成分，且为主要药效物质基础。本课题组前期研究发现，胡黄连总苷是治疗NASH的多靶点药物，它对NASH有明确的治疗效果，本研究通过游离脂肪酸（free fatty acid，FFA）诱导人体肝癌HepG2细胞建立体外NASH模型[17-21]，进一步研究胡黄连的主要单体成分胡黄连苷I、II、III、IV干预NASH的效能，为胡黄连的深入开发提供基础。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

胡黄连苷I（批号20180501、质量分数99.40%）、胡黄连苷II（批号20180502、质量分数99.98%）、胡黄连苷III（批号20180503、质量分数98.35%）、胡黄连苷IV（批号20180504、质量分数98.85%），由天士力现代中药开发中心提供；维生素E（聊城澳健生物技术有限公司，批号G20150980）；DMEM高糖培养基、胎牛血清（FBS）、0.25%Trypsin-EDTA、Pen Strep，购自Gibco公司；无菌PBS（碧云天公司Beyotime）；4%多聚甲醛溶液（南京森贝伽生物科技有限公司）；异丙醇（分析纯，天津市风船化学试剂科技有限公司）；超纯水（Milli-Q超纯水系统制备）；DMSO、MTT、油酸、棕榈酸、油红O染液、Triton™ X-100，购自Sigma公司；超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、白介素-8（IL-8）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）酶联免疫试剂盒，购自南京建成生物工程研究所。

1.2 细胞株

人体肝癌HepG2细胞，由天士力药理毒理研究中心提供。

1.3 实验仪器

HERACELL 150 i恒温CO_2培养箱（美国Thermo公司）；VS-1300U超净工作台（苏净集团安泰公司）；Allegra X-45R离心机（美国Beckman公司）；CKX1倒置显微镜（日本OLYMPUS公司）；移液器（德国Eppendorf公司）；Scepter手持细胞计数器（美国Millipote公司）；Infinite M200酶标仪（TECAN公司）；PL303分析天平（梅特勒公司）；移液管、离心管、注射器、滤膜（美国Corning公司）。

2 方法

2.1 细胞培养

将HepG2细胞接种于含10% FBS、1%青霉素、链霉素的DMEM高糖培养基的75T细胞培养瓶中，置37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下孵育。待细胞密度达到80%左右时用0.25%Trypsin-EDTA消化，进行传代培养。

2.2 NASH体外模型的建立

将处于对数生长期的HepG2细胞以2×10^5/孔、2 mL接种于6孔细胞培养板中，待细胞贴壁生长至60%～70%后，给予FFA 1 mmol/L（棕榈酸与油酸物质的量比为1∶2）刺激24 h[17]，设3个复孔。实验结束时留取细胞培养上清液后，用油红O染色，显微镜下观察细胞内脂滴的变化情况。

2.3 MTT法检测各药物对细胞活力的影响

将处于对数生长期的HepG2细胞以5×10^3/孔、200 μL接种于96孔细胞培养板中，待细胞贴壁生长至60%～70%后，设置空白组（仅含培养基，不接种细胞）、对照组（不加药）、维生素E、胡黄连苷I、II、III、IV 0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.000 0、2.000 0 mg/mL浓度组。给药时间为24 h，每组均设6个复孔。用MTT法测定细胞增殖情况，测定570 nm波长处的吸光度（A）值，计算细胞活力，以观察药物对细胞增殖的影响。

细胞活力＝$(A_{给药}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})$

2.4 胡黄连苷类成分对NASH体外模型的干预

将处于对数生长期的HepG2细胞以5 000/孔、200 μL接种于96孔细胞培养板中，待细胞贴壁生长至60%～70%后，设置对照组、模型组、维生素E（0.5、1.0、2.0 mg/mL）组、胡黄连苷I、II、III、IV（0.25、0.50、1.00 mg/mL）组，每组设6个复孔。对照组不加FFA及药物，模型组给予FFA 1 mmol/L，各给药组给予FFA 1 mmol/L与不同浓度的各药物，刺激24 h。实验结束时留取细胞培养上清液后，用油红O染色，显微镜下观察细胞内脂滴的变化情况。

2.5 油红O染色法

油红O染色步骤：PBS清洗细胞3次，洗净培养基；4%多聚甲醛固定10 min，PBS液清洗细胞2次，60%异丙醇浸润15 s；室温下油红O工作液染色10 min，60%异丙醇分化5～15 s，使间质清晰；蒸馏水终止染色，显微镜下可见细胞内的中性脂肪可被特异性地染成红色。

2.6 细胞上清液中SOD、MDA、IL-8、TNF-α水平测定

FFA与不同浓度的各药物共同刺激24 h后，收集细胞培养上清液，按试剂盒说明书进行SOD、MDA、IL-8、TNF-α的水平检测。

2.7 统计学处理

实验结果均以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 19.0统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 MTT法检测各药物对细胞活力的影响

如图1所示，胡黄连苷I、II、III、IV对HepG2细胞的活力影响较小，提示在该范围内细胞可以稳定生长。根据实验结果，筛选出细胞活力过半的药物浓度，并从中选取细胞活力相差不大的3个浓度进行后续实验，即维生素E给药浓度设为0.5、1.0、2.0 mg/mL，胡黄连苷I、II、III、IV给药浓度设为0.25、0.50、1.00 mg/mL。

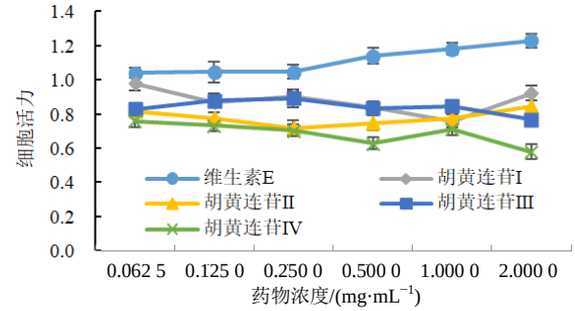


图1 细胞活力（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig. 1 Cellular activity ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.2 油红O染色对细胞内脂滴变化的观察

1 mmol/L FFA作用的模型组，可见细胞浆内被染成红色的颗粒状脂滴，并且呈明显的“印戒”形态。不同浓度的维生素E、胡黄连苷I、II、III、IV给药组，可见细胞内红色脂滴有所减少，以各药物的高浓度组较为明显，且以胡黄连苷II效果最为明显，见图2。

3.3 细胞培养上清液中SOD、MDA、TNF-α、IL-8水平变化

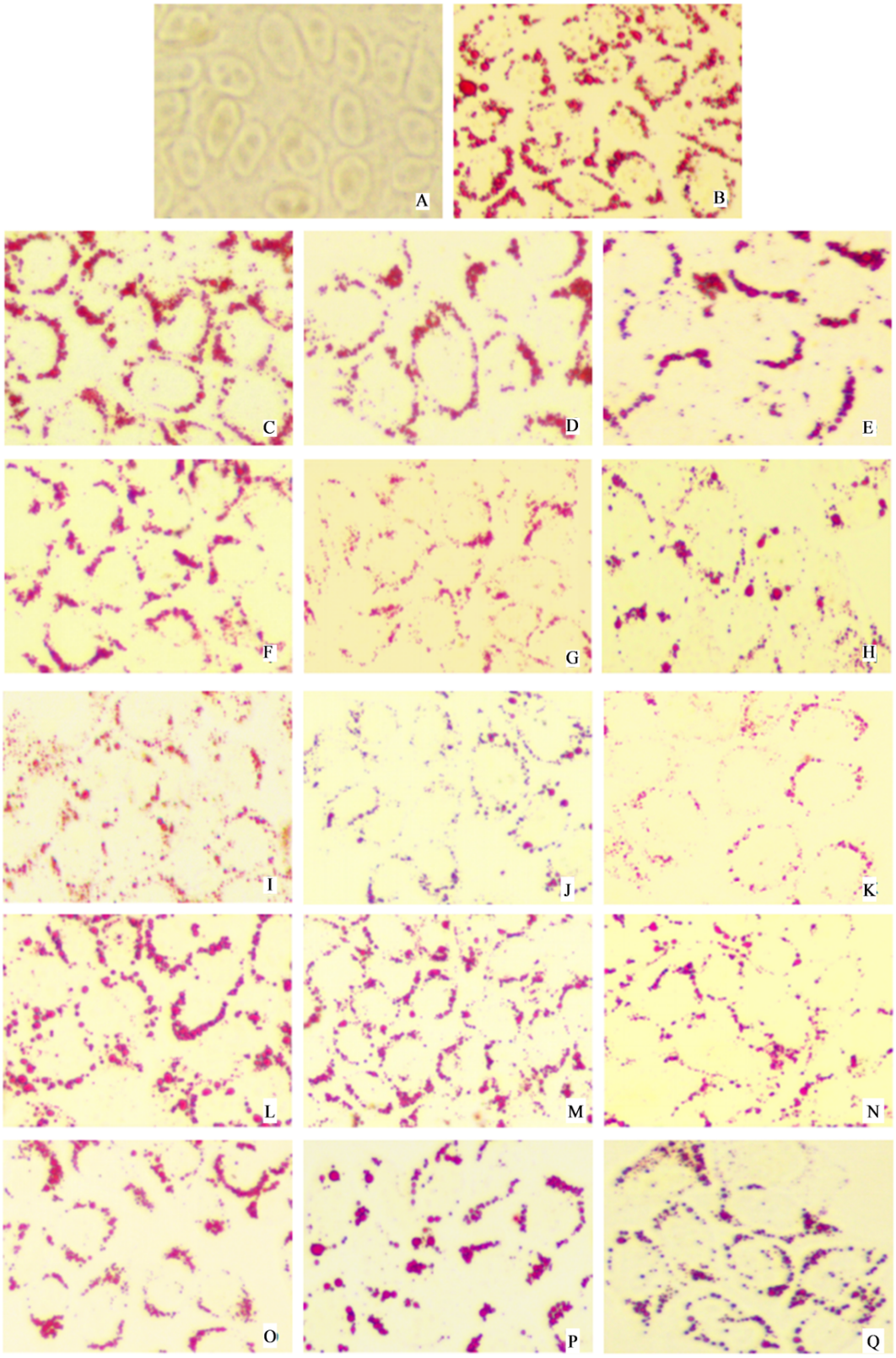
如图3所示，1 mmol/L FFA作用的模型组，其细胞培养上清液中SOD水平明显下降，MDA、TNF-α、IL-8水平明显上升，与对照组比较，差异有统计学意义（$P<0.05$、0.01）。

维生素E组结果显示，与模型组比较，高、中、低剂量组MDA、TNF-α、IL-8水平均显著下降（$P<0.01$），SOD水平无明显变化；3个剂量组之间，除低剂量SOD水平显著高于中剂量组（$P<0.05$）外，其余各指标无显著性差异。

胡黄连苷I组结果显示，与模型组比较，中剂量组SOD水平显著升高，高、中、低剂量组MDA、TNF-α、IL-8水平均显著下降（$P<0.05$、0.01）；高剂量组SOD、MDA水平显著低于中剂量组（$P<0.05$）；中剂量组MDA、TNF-α水平显著低于低剂量组（$P<0.05$）。

胡黄连苷II组结果显示，与模型组比较，高、中、低剂量组SOD水平显著升高，MDA、TNF-α、IL-8水平均显著下降（$P<0.05$、0.01）；3个剂量组之间，MDA水平有显著性差异（$P<0.05$），呈剂量相关性降低。

胡黄连苷III组结果显示，与模型组比较，高、中、低剂量组SOD水平显著升高，MDA、TNF-α、IL-8水平均显著下降（$P<0.05$、0.01）；与低剂量组比较，中、高剂量组MDA水平显著下降（$P<0.05$）；高剂量

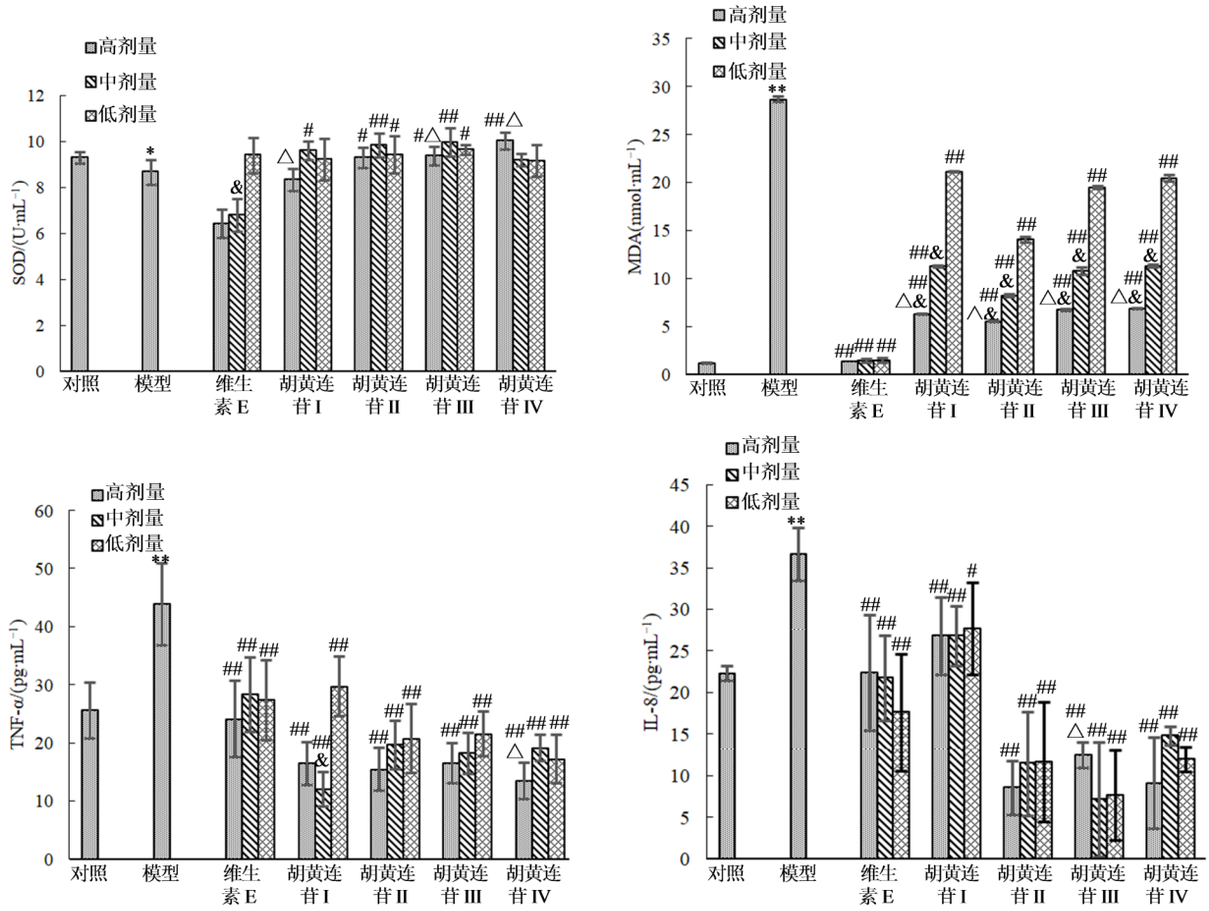


A-对照组；B-模型组；C～E-维生素E 0.5、1.0、2.0 mg·mL^{-1}；F～H-胡黄连苷I 0.25、0.50、1.00 mg·mL^{-1}；I～K-胡黄连苷II 0.25、0.50、1.00 mg·mL^{-1}；L～N-胡黄连苷III 0.25、0.50、1.00 mg·mL^{-1}；O～Q-胡黄连苷IV 0.25、0.50、1.00 mg·mL^{-1}

A-control group；B-model group；C-E-vitamin E 0.5，1.0，2.0 mg·mL^{-1}；F-H-berberine I 0.25，0.50，1.00 mg·mL^{-1}；I-K-berberine II 0.25，0.50，1.00 mg·mL^{-1}；L-N-berberine II I 0.25，0.50，1.00 mg·mL^{-1}；O-Q-berberine IV 0.25，0.50，1.00 mg·mL^{-1}

图2 药物干预NASH细胞模型24 h细胞内脂滴变化（油红O染色，×400）

Fig. 2 Lipid droplet changes of cell model after intervened 24 h（Oil Red O Staining，× 400）



与对照组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$；与中剂量组比较：$^{\triangle}P<0.05$；与低剂量组比较：$^{\&}P<0.05$

$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ *vs* control group；$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group；$^{\triangle}P<0.05$ *vs* medium dose group；$^{\&}P<0.05$ *vs* low dose group

图3 各组相关检测指标比对结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig. 3 Comparison of relevant test indicators ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组SOD水平显著低于中剂量组，IL-8水平显著高于中剂量组（$P<0.05$）。

胡黄连苷IV组结果显示，与模型组比较，高剂量组SOD水平显著升高，高、中、低剂量组MDA、TNF-α、IL-8水平均显著下降（$P<0.01$）；与低剂量组比较，中、高剂量组MDA水平显著下降（$P<0.05$）；高剂量组SOD水平显著高于中剂量组，TNF-α水平显著低于中剂量组（$P<0.05$）。

胡黄连苷II、III、IV对4个指标含量的影响较为显著，且除MDA外，均优于阳性药物维生素E，但没有显著的剂量相关性。结果提示，胡黄连II、III、IV对FFA诱导的HepG2细胞NASH模型的改善作用较为理想，具有较大的开发价值。

4 讨论

近年来，随着人们的生活水平不断提高，肥胖症和糖尿病在全球广泛流行，使得与其密切相关的NAFLD/NASH的患病率也逐年升高，已成为慢性肝病的首要原因[22-23]，因此，积极开发防治NAFLD/NASH的高效、安全、可靠的药物十分重要。本项目组前期研究发现胡黄连总苷具有体内抗NASH效果，但是由于胡黄连总苷中成分复杂多样限制了对其更深入的研究，因此，在明确胡黄连总苷有效性的基础上，在单体成分上对具有较大开发价值的胡黄连苷I、II、III、IV进行了初步的药效学探索。

本实验采用1 mmol/L FFA诱导HepG2细胞成功建立了NASH细胞模型，开展了胡黄连苷I、II、III、IV对脂肪样变、氧化应激水平、炎症水平指标的影响的体外药效学实验，结果显示，该细胞模型成模效果好，重复率高，与王允亮等[17]对HepG2细胞建立的NASH模型动态检测结果相近。MTT实验结果显示，胡黄连苷I、II、III、IV对HepG2细胞的活力影响较低，提示在该范围内细胞可以稳定生长。胡黄连苷I、II、III、IV对细胞内脂质沉积具有一定的改善作用，并且呈一定的剂量相关性，其中以胡黄连

苷II最为显著，提示胡黄连苷II具备较好的降脂效果。模型细胞培养上清液中SOD含量下降，MDA、TNF-α和IL-8含量上升，提示在FFA诱导下，细胞出现了氧化应激反应和炎症水平升高反应。对于SOD，除胡黄连苷I高剂量组外，各给药组均较模型组有一定升高；相较于模型组的MDA水平，各给药组均有明显降低且有显著性差异，各剂量组之间也具有显著性差异；TNF-α、IL-8检测结果表明，各给药组均较模型组有显著性降低。

胡黄连苷II可在一定程度上改善FFA诱导的HepG2细胞NASH模型的脂肪样变，增强抗氧化应激作用，减轻模型细胞的炎症水平，保护细胞免受进一步的氧化应激和炎症损伤，从而发挥其在抗NASH方面的潜在作用。结果提示，胡黄连苷II既在NASH“第一次打击”脂肪堆积方面发挥效果，又在“第二次打击”氧化应激和炎症调控方面体现优势，本研究结果为胡黄连苷II在治疗NASH方面提供参考。

参考文献

[1] Bellanti F, Villani R, Facciorusso A, et al. Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 111: 173-185.

[2] 张剑波, 赵文霞. 非酒精性脂肪性肝炎的临床治疗进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2016, 14(13): 146-148.

[3] 董 坤. 疏肝健脾方加减治疗非酒精性脂肪性肝炎的疗效及安全性分析 [J]. 世界最新医学信息文摘: 电子版, 2015, 15(78): 163.

[4] 王 慧, 徐中菊. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制研究进展 [J]. 世界中医药, 2016, 11(12): 2813-2816.

[5] Neuschwander-Tetri B A, Loomba R, Sanyal A J, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non -cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial [J]. Lancet, 2015, 385(9972): 956-965.

[6] Wahli W, Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation [J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 23(7): 351-363.

[7] Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction [J]. Pflugers Arch, 2010, 460 (4): 703-718.

[8] Tsochatzis E A, Manolakopoulos S, Papatheodoridis G V, et al. Insulin resistance and metabolic syndrome in chronic liver diseases: old entities with new implications [J]. Scand J Gastroenterol, 2009, 44(1): 6-14.

[9] Leahy J L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus [J]. Arch Med Res, 2005, 36(3): 197-209.

[10] 冷雪君, 颜学兵. 非酒精性脂肪性肝炎的药物治疗进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(18): 1645-1654.

[11] 张可佳, 孙宁宁, 杨 雪, 等. UPLC结合化学计量学方法的胡黄连指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 685-693.

[12] Gao H, Zhou Y W. Inhibitory effect of picroside II on hepatocyte apoptosis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26 (6): 729-736.

[13] Huang S X, Zhou Y, Nie Q J, et al. Two new iridoid glucosides from Picrorhiza scrophulariiflora [J]. J Asian Nat Prod Res, 2006, 8(3): 259-263.

[14] Wang H, Sun Y, Ye W C, et al. Antioxidative phenylethanoid and phenolic glycosides from Picrorhiza scrophulariiflora [J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52(5): 615-617.

[15] 朱仝飞, 陈日荣, 孙庆文, 等. 西藏胡黄连化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 263-265.

[16] 谢智勇, 胡红侠, 孔德云, 等. 西藏胡黄连中两个新化合物的鉴定 [J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(3): 221-226.

[17] 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, 260.

[18] 潘雪丰, 温彩霞, 许建华. 两种细胞系用于建立体外脂肪肝模型的比较 [J]. 广东药学院学报, 2010, 26(1): 85-89.

[19] 钟 岚, 范建高, 王国良, 等. 非酒精性脂肪性肝炎发病机制的实验研究 [J]. 中华消化杂志, 2001, 21(8): 484.

[20] 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: 20.

[21] Chen X M, Li L Z, Liu X H, et al. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis [J]. Life Sci, 2018, 203: 291-304.

[22] 刘天保. 异甘草酸镁联合降脂治疗非酒精性脂肪型肝炎及对肝功能的影响 [J]. 中外医疗, 2015, 34(16): 97-98.

[23] 王允亮, 叶 杨, 程佳伟, 等. 葛根素和小檗碱联合用药干预NASH细胞模型的实验研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015, 23(5): 321-326.