

二氢姜黄素对油酸诱导的非酒精性脂肪肝体外模型的预防作用与机制研究

喻青青, 孟沫然, 刘亚云, 程银祥, 陈 勇*

湖北大学 中药生物技术湖北省重点实验室, 湖北大学生物资源绿色转化协同创新中心, 湖北 武汉 430062

摘要:目的 研究二氢姜黄素对非酒精性脂肪肝(NAFLD)的预防作用与机制。方法 HepG2 细胞经 0.5 mmol/L 油酸(OA)与二氢姜黄素(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)同时处理 24 h 后,检测细胞内三酰甘油(TG)、活性氧自由基(ROS)、一氧化氮(NO)含量以及细胞对荧光 D-葡萄糖同系物(2-NBDG)的摄取能力;采用 RT-qPCR 和 Western blotting 方法检测细胞中糖脂代谢与氧化应激相关基因固醇调节元件结合蛋白 1c(SREBP-1C)、Patatin 样磷脂酶结构域蛋白 3(PNPLA3)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(pAKT)、蛋白激酶 B(AKT)和核转录因子 Nrf2(Nrf2)的 mRNA 与蛋白表达量。结果 与对照组相比,OA 处理组细胞内 TG、ROS 及 NO 含量明显上升,对 2-NBDG 的摄取能力降低,SREBP-1C 和 PNPLA3 的 mRNA 及蛋白表达上调,PPAR α 、PI3K、pAKT/AKT 和 Nrf2 的蛋白表达下调;与 OA 处理组相比,OA+二氢姜黄素组细胞内 TG 与 NO 含量降低,对 2-NBDG 的摄取能力升高,SREBP-1C 和 PNPLA3 的 mRNA 与蛋白表达下调,PPAR α 、PI3K 和 Nrf2 的蛋白表达及 pAKT/AKT 上调。结论 二氢姜黄素对体外 NAFLD 细胞模型的预防作用机制包括:通过抑制脂合成关键基因(SREBP-1C 和 PNPLA3)及诱导脂氧化关键基因 PPAR α 的表达,预防肝细胞脂堆积;通过上调 PI3K 的表达及 pAKT/AKT 水平,缓解胰岛素抵抗,促进肝细胞对葡萄糖的摄取;通过上调 Nrf2 的表达量,降低细胞内 NO 含量,缓解肝细胞的炎症反应及氧化损伤。

关键词: 非酒精性脂肪肝; 二氢姜黄素; HepG2 细胞; L02 细胞; 油酸; 预防作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)05-1092-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.016

Preventive effect and underlying mechanism of dihydrocumin on NAFLD in oleic acid-treated HepG2 cells

YU Qing-qing, MENG Mo-ran, LIU Ya-yun, CHENG Yin-xiang, CHEN Yong

Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Hubei University, Wuhan 430062, China

Abstract: Objective To evaluate the preventive effect of dihydrocumin (DHC) on an *in vitro* model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and investigate the signal transduction pathways underlying DHC treatment. **Methods** Oleic acid (OA, 0.5 mmol/L) induced hepatic steatosis was established in HepG2 cells as *in vitro* model of NAFLD. After cells were co-treated by OA and DHC (0, 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, the cellular contents of triglyceride (TG), reactive oxygen species (ROS) and NO were determined by cellular biochemical assays. Signaling pathways involved in glucolipid metabolism and oxidative stress including SREBP-1C, PNPLA3, PPAR α , PI3K, the phosphorylation of AKT (pAKT), AKT, and Nrf2 on the mRNA and protein levels were determined by RT-qPCR and Western blotting. The glucose uptake was determined by fluorospectrophotometry using 2-NBDG as a fluorescence probe. **Results** Compared with the control group, the content of TG, ROS and NO was significantly increased, the uptake of 2-NBDG was decreased, and the expression of SREBP-1C and PNPLA3 on the mRNA and protein levels were up-regulated and the protein expression levels for PPAR α , PI3K and Nrf2, as well as the ratio of pAKT to AKT were down-regulated in OA-induced cells. Compared with OA treated group, DHC decreased the levels of cellular TG and NO, as well as the mRNA and protein expression levels of SREBP-1C and PNPLA3, and increased the uptake of 2-NBDG, while at the same time increasing the cellular glucose uptake and the protein expression levels of PPAR α , PI3K, pAKT/AKT, and Nrf2 in OA-induced HepG2 cells. **Conclusion** DHC protected OA-induced hepatic steatosis by inhibiting lipid accumulation and oxidative/nitrative stress and increasing hepatic insulin sensitivity. Furthermore, the effect of DHC is likely associated with its role in the regulation of SREBP-1C,

收稿日期: 2017-09-27

基金项目: 湖北省生物产业专项(2016-080-092211); 教育部大学生创新创业训练计划项目(201610512001)

作者简介: 喻青青(1993—),女,在读硕士生,研究方向为药理学。Tel: (027)88663590 E-mail: 965896568@qq.com

*通信作者 陈 勇(1966—),男,教授,博士生导师,研究方向为药理学。Tel: (027)88663590 E-mail: 1740952455@qq.com

PNPLA3, PPAR α , Nrf2, PI3K and AKT signaling pathways. DHC may have the effects on relieving the resistance of insulin and promoting the uptake of glucose in the hepatocytes by upregulating PI3K expression and pAKT/AKT level. Through increasing the expression of Nrf2 and reducing the content of NO in the cells, DHC could alleviate the inflammatory reaction and oxidative damage of liver cells.

Key words: NAFLD; dihydrocumin; HepG2 cells; L02 cells; OA; prevention function

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)是与胰岛素抵抗、肥胖和血脂异常等密切相关的一组获得性的代谢应激相关性肝病,包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)及其相关的肝纤维化、肝硬化,乃至肝细胞癌^[1]。目前其发病机制尚未阐明,普遍接受的是“二次打击”学说^[2-3]:第一次打击是肝脏脂堆积,一般与胰岛素抵抗相关,即通过胰岛素抵抗引起的高胰岛素血症,一方面促进了外周脂肪组织的脂肪分解,使血液中游离脂肪酸增多,肝脏摄取的游离脂肪酸增加;另一方面导致游离脂肪酸 β 氧化障碍,大量的游离脂肪酸蓄积在肝脏酯化成三酰甘油(TG)。第二次打击是肝脏过量脂堆积激活炎症通路,并增加肝细胞脂质过氧化与纤维化形成。有20%~30%的成年人患有NAFLD,这些人患肥胖和心血管等疾病的风险会增加,目前临床上没有治疗NAFLD的有效药物,一直以来均采用抗氧化剂、胰岛素增敏剂、调脂药等用于NAFLD的临床治疗^[4-6]。

姜黄素是从姜科、天南星科中的一些植物的根茎中提取的一种多酚化合物,具有多种药理活性,如抗氧化、抗肿瘤、抗炎、调脂及肝脏保护等^[7-10]。二氢姜黄素是姜黄素的代谢产物,其药理活性尚未见文献报道,可能具有与姜黄素类似的药理活性。因此,本研究以油酸(OA)处理的HepG2细胞为模型,考察二氢姜黄素对NAFLD体外模型的预防作用与机制。

1 材料

1.1 主要仪器

iMARKTM 酶标仪、My CyclerTM Thermal Cycler RT-PCR 仪、CFX ConnectTM Real-Time System PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司); 5415R 台式低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); Imager2000 凝胶成像分析仪(美国 Alpha Innotech 公司); Hfsafe1200 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); HEAR Cell CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司); DSF-80 系列倒置荧光显微镜(上海巴拓仪器有限公司); DYY-6C 型电泳仪、DYC-40A 电转仪、DYC-40A 型垂直电泳槽及 DYY-6C 型水平电泳槽(北京市六一仪器厂)。

1.2 主要试剂

二氢姜黄素(质量分数 $\geq 98\%$, 货号 B20360), 上海源叶生物有限公司; OA(质量分数 98%, 货号 A1529012), 上海阿拉丁公司; 兔抗人多克隆抗体包括过氧化物酶体增殖激活受体- α (PPAR α)抗体、固醇调节元件结合蛋白 1C(SREBP-1C 抗体)、蛋白激酶 B(AKT)抗体、pAKT 抗体、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抗体、核转录因子(Nrf2)抗体(沈阳万类生物科技有限公司); 兔抗人多克隆抗体 Patatin 样磷酸酯酶结构域蛋白 3(PNPLA3)抗体(Abcam 公司); 鼠抗人单克隆抗体 β -actin 抗体(Santa 公司); DMEM 培养基、胎牛血清(FBS), Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒(日本东洋纺公司); SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Bio-Rad 公司); BCA 蛋白含量测定试剂盒(美国 Thermo ScientificTM 公司); 化学发光液(ECL)、活性氧(ROS)检测试剂盒、TG 试剂盒、一氧化氮(NO)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 荧光 D-葡萄糖同系物(2-NBDG, Invitrogen 公司)。

1.3 细胞

人正常肝细胞系 L02 为华中科技大学生命科学院馈赠; 人肝癌细胞系 HepG2 购买于武大菌种保藏中心。

2 方法

2.1 MTT 实验检测二氢姜黄素对正常肝细胞增殖的影响

取生长状态良好的对数生长期的 HepG2 细胞和 L02 细胞接种于 96 孔板(每孔 4×10^3 个细胞), 在 37 °C、5% CO₂ 下培养 24 h。待细胞贴壁之后, 加入含药培养基, 二氢姜黄素浓度分别为 0、5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$, 同时设 DMSO 空白组(不含药物, 含有 DMSO 的培养基), 培养 24 h。每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL , 在 37 °C、5% CO₂ 下继续培养 4 h。弃掉板中培养液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 室温振荡溶解紫色结晶, 用微孔板分光光度计检测每孔于 570 nm 处吸光度(A)值。

2.2 对 OA 诱导的 L02 细胞和 HepG2 细胞的影响

2.2.1 细胞培养与给药处理 HepG2 和 L02 细胞均

培养于 DMEM 培养基 (含 10% FBS 及 1% 青霉素和链霉素), 取生长状态良好的对数生长期的细胞接种于 6 孔板 (每孔 2×10^5 个细胞), 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。待细胞贴壁之后, 再同时给予 0.5 mmol/L OA 和二氢姜黄素 (0、5、10、20 μmol/L) 处理 24 h。各组细胞设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

2.2.2 HepG2 和 L02 细胞中活性氧 (ROS) 含量的测定 经药物处理后收集各孔细胞, 用荧光酶标仪检测各孔的荧光值 (激发波长 485 nm, 发射波长 535 nm); 用 BCA 法测定每孔蛋白浓度, 计算各孔荧光值与蛋白浓度比值, 即为各孔 ROS 相对含量。

2.2.3 HepG2 细胞中 TG 含量的测定 经给药处理后收集各孔细胞, 用 TG 试剂盒检测各孔 TG 含量, 用 BCA 蛋白定量试剂盒检测各孔蛋白含量, 计算各孔细胞内 TG 含量。

2.2.4 HepG2 细胞内 NO 含量的测定 经给药处理后收集各孔细胞, 用 NO 试剂盒检测各孔 NO 含量。

2.2.5 HepG2 细胞葡萄糖摄取能力的测定 经给药处理后, 各孔细胞先用无糖 DMEM 培养基 (含 10% FBS) 处理 3 h, 再用 50 μmol/L 2-NBDG 处理 0.5 h。收集各孔细胞, 检测荧光值 (激发波长 485 nm, 吸收波长 535 nm) 及蛋白浓度, 计算各孔细胞葡萄糖摄取率 (细胞葡萄糖摄取率=各孔荧光值/各孔的细胞浓度, 以含有油酸、不含药物组为 100%, 计算各组相对葡萄糖摄取率)。

2.2.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 HepG2 细胞脂代谢相关基因表达 经给药处理后收集各孔细胞, 用 Trizol 试剂提取总 RNA。总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 和 5 S 条带分析 RNA 的完整性, 经分光光度法检测 260 和 280 nm 下 A 值, 计算二者比值, 分析 RNA 纯度。取 3 μg 总 RNA 用逆转录试剂盒反转录为 cDNA。RT-qPCR 采用 SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒, 目标基因 SREBP-1C、PNPLA3 和 PPARα 及内参 β-actin 引物序列见表 1, 其他定量 PCR 条件为预变性 95 °C、5 min, 变性 95 °C、30 s, 退火 58.4 °C、30 s, 延伸 72 °C、30 s, 39 次循环。

2.2.7 Western blotting 检测相关蛋白表达 经药物处理后, 各孔细胞用含有 PMSF 和 cocktail 裂解液处理 40 min, 裂解液经 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液检测蛋白含量。取 20~70 μg 总蛋白经 SDS-PAGE (10% 分离胶, 5% 浓缩胶) 分离并转印至 PVDF 膜。膜用含 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 于 4 °C 分别与不同一抗 (β-actin, 1:500; PNPLA3, 1:

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primers of RT-qPCR

基因	引物序列 (5'→3')
PNPLA3	正向: CTGTACCCTGCCTGTGGAAT 反向: TCGAGTGAACACCTGTGAGG
SREBP-1C	正向: CGACATCGAAGACATGCTTCAG 反向: CGACATCGAAGACATGCTTCAG
PPARα	正向: GGGGACATTCTGTGTTCCAG 反向: CAAGTAGAGTGCCAGGCAAG
β-actin	正向: TCACCCACACTGTGCCCATCT 反向: CAGCGGAACCGCTCATTGCC

1 000; SREBP-1C, 1:500; PPARα, 1:500; PI3K, 1:500; pAKT, 1:500; AKT, 1:500; Nrf2, 1:500) 温孵过夜。用 TBST 洗膜 (10 min×4 次) 后再与山羊抗小鼠 IgG 二抗稀释液 (1:8 000) 室温孵育 2 h、TBST 洗膜 (10 min×4 次)。最后用 ECL 显色、暗室曝光、X-光胶片扫描, 并使用 Image J 软件对 X-光胶片进行灰度定量分析。

2.3 数据统计

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 17.0 统计分析软件、采用单因素方差分析处理实验数据, 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 对正常 HepG2 细胞和 L02 细胞增殖的影响

MTT 实验结果表明, 0~20 μmol/L 二氢姜黄素对 HepG2 细胞增殖没有明显影响, 在 50~100 μmol/L 时有显著抑制作用。0~50 μmol/L 二氢姜黄素对 L02 细胞活性没有明显影响, 在 100 μmol/L 时有显著抑制作用。结果见图 1。

3.2 对 HepG2 和 L02 细胞中 ROS 的影响

HepG2 细胞经 OA 处理后, 细胞内 ROS 含量较对照组有一定升高, 经 OA 与二氢姜黄素同时处理后, 胞内 ROS 含量较 OA 组呈剂量依赖性升高 (图 2-A); L02 细胞经 OA 处理后, 胞内 ROS 含量显著升高, 经 OA 与二氢姜黄素同时处理后, 胞内 ROS 含量较 OA 组呈剂量依赖性降低 (图 2-B)。

3.3 对 HepG2 细胞内 TG 的影响

OA 组 TG 含量明显高于对照组, 二氢姜黄素与 OA 同时作用于 HepG2 细胞后, 中、高浓度二氢姜黄素组细胞内 TG 含量明显低于 OA 组, 但仍高于对照组 (图 3)。

3.4 对 HepG2 细胞内 NO 含量的影响

OA 组细胞内 NO 含量显著高于对照组, 经 OA 与二氢姜黄素联合处理 24 h 后, 细胞内 NO 含量呈

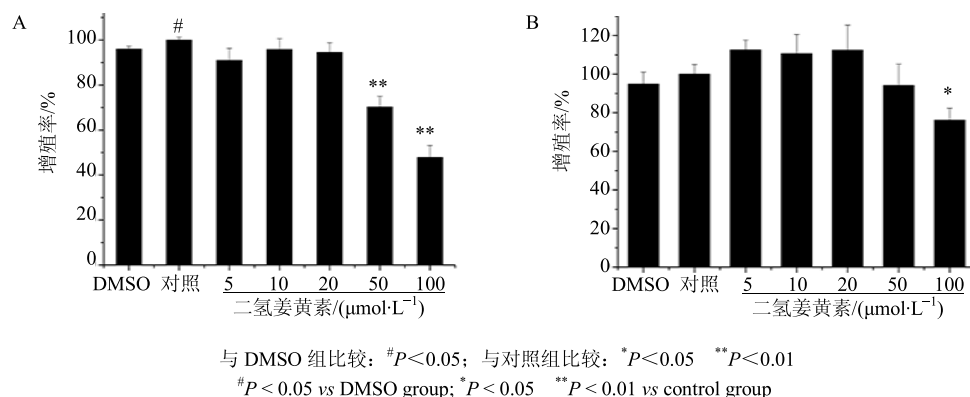


图 1 二氢姜黄素对正常 HepG2 (A) 和 L02 (B) 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of dihydrocurcumin on proliferation of normal HepG2 (A) and L02 (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

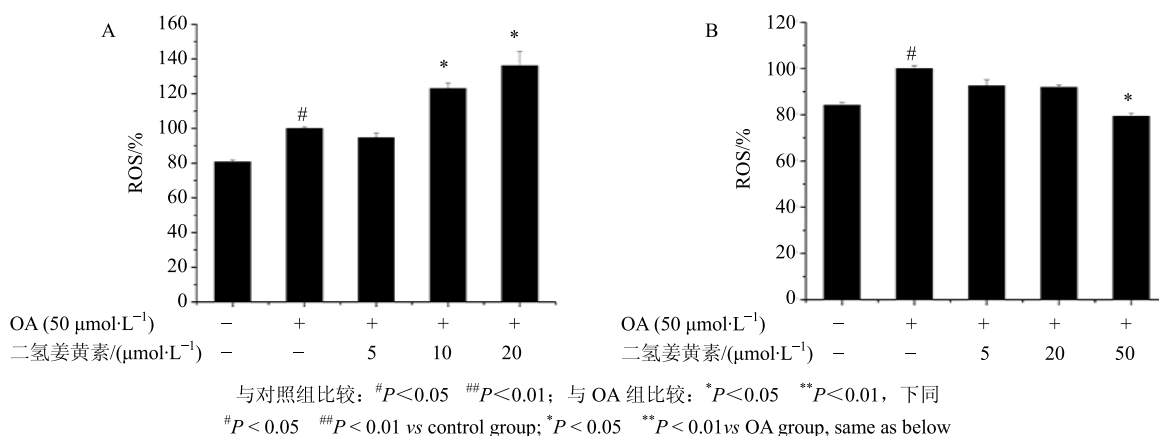


图 2 二氢姜黄素对 OA 处理的 HepG2 (A) 和 L02 (B) 细胞内 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of dihydrocurcumin on intracellular content of ROS in HepG2 (A) and L02 cells (B) treated with OA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

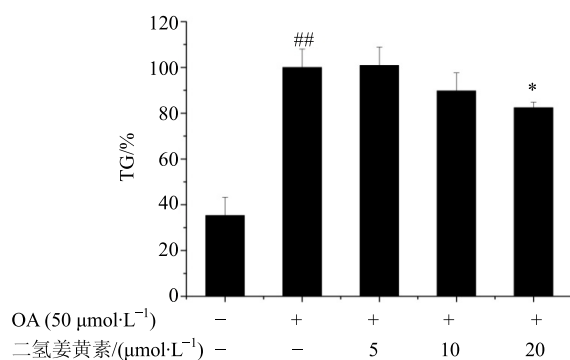


图 3 二氢姜黄素对 OA 处理的 HepG2 细胞内 TG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of dihydrocurcumin on intracellular content of triglyceride in HepG2 cells treated with OA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

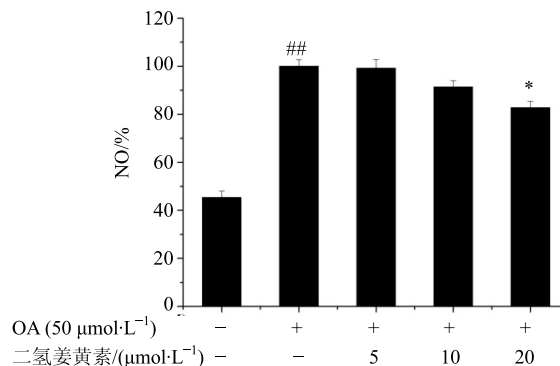


图 4 二氢姜黄素对 OA 处理的 HepG2 细胞内 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of dihydrocurcumin on intracellular content of NO in HepG2 cells treated with OA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

浓度依赖性地降低,且在二氢姜黄素高浓度时与 OA 组相比有显著性差异(图 4)。

3.5 对 HepG2 细胞葡萄糖摄取能力的影响

OA 组细胞对葡萄糖的摄取能力明显低于对照

组,二氢姜黄素与 OA 同时处理 HepG2 细胞后,明显提高了细胞对葡萄糖的摄取能力,尤其在高浓度时,细胞对葡萄糖的摄取能力提高了 2 倍以上(图 5)。

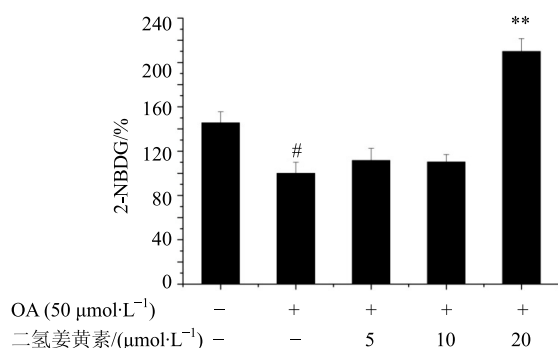


图 5 二氢姜黄素对 OA 处理的 HepG2 细胞荧光葡萄糖摄取能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of dihydrocumin on glucose uptake in HepG2 cells treated with OA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

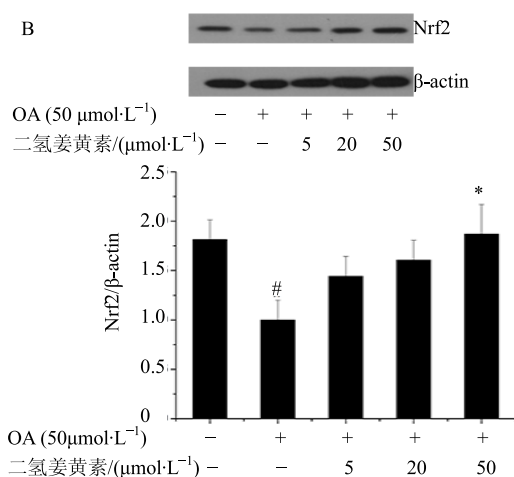
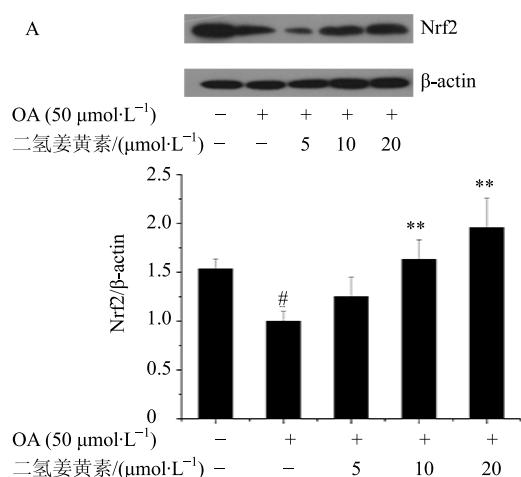


图 6 二氢姜黄素对 OA 处理的 HepG2 (A) 及 L02 (B) 细胞中 Nrf2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of dihydrocumin on protein levels of Nrf2 in HepG2 (A) and L02 (B) cells treated with OA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

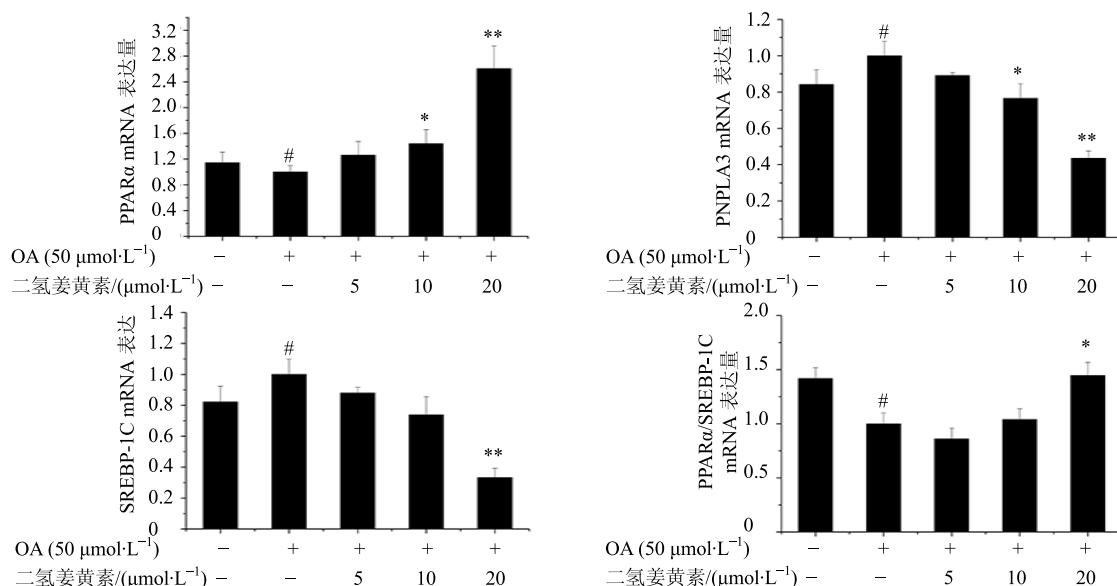


图 7 二氢姜黄素对 OA 处理的 HepG2 细胞中 PPARα、PNPLA3 和 SREBP-1C mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of dihydrocumin on mRNA expression of PPARα, PNPLA3, and SREBP-1C in HepG2 cells treated with OA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 对 HepG2 和 L02 细胞中 Nrf2 表达的影响

细胞经 OA 处理后, Nrf2 蛋白表达量较对照组降低, 经 OA 与二氢姜黄素同时处理后, Nrf2 蛋白表达量较 OA 组呈剂量依赖性升高 (图 6)。

3.7 对 HepG2 细胞脂代谢相关基因表达的影响

与对照组相比, OA 组 PPARα mRNA 的表达显著降低, PNPLA3 和 SREBP-1C mRNA 的表达显著上调, PPARα 与 SREBP-1C mRNA 的比值显著降低; 二氢姜黄素与 OA 同时处理 HepG2 细胞后, 浓度依赖性降低细胞 PNPLA3 和 SREBP-1C 的 mRNA 表达, 上调 PPARα mRNA 的表达及 PPARα 与 SREBP-1C mRNA 的比值 (图 7)。二氢姜黄素对上述基因蛋白表达的影响与对 mRNA 表达的影响基本一致 (图 8)。

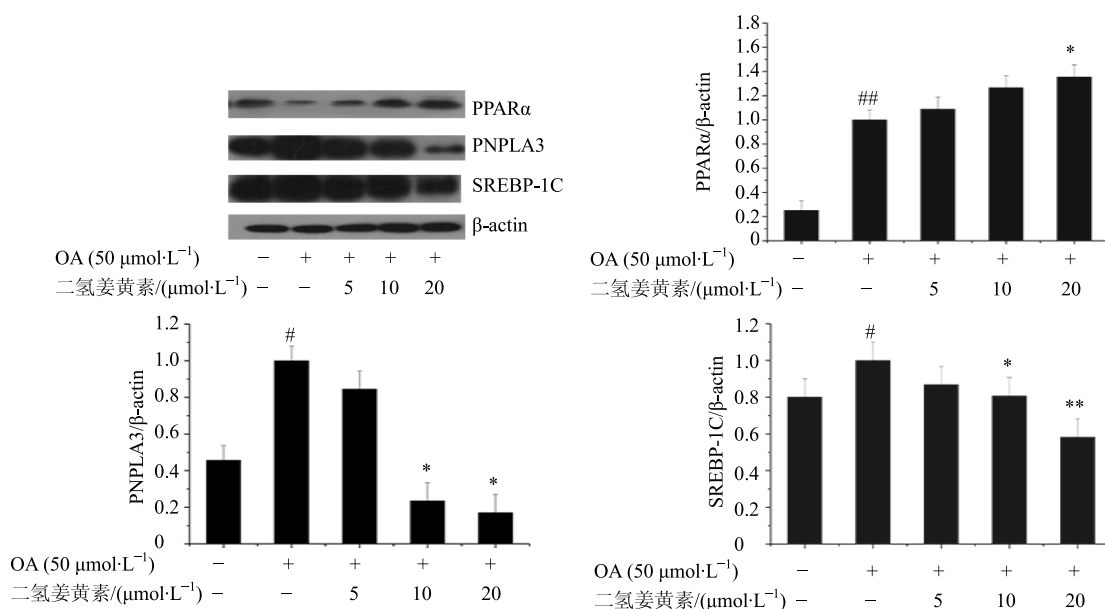


图 8 二氢姜黄素对 OA 处理的 HepG2 细胞中 PPARα、PNPLA3 和 SREBP-1C 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of dihydrocurcumin on the protein levels of PPARα, PNPLA3, and SREBP-1C in HepG2 cells treated with OA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 对 HepG2 细胞中 PI3K、pAKT 和 AKT 蛋白表达的影响

与对照组相比, OA 组 PI3K 蛋白表达量及 pAKT/AKT 显著降低; 经二氢姜黄素与 OA 同时处理后, PI3K 蛋白表达量及 pAKT/AKT 较 OA 组有一定程度升高, 且呈浓度依赖性 (图 9)。

4 讨论

以 OA 处理的 HepG2 细胞作为研究 NAFLD 的体外细胞模型比较常见^[11-12], 对阐明 NAFLD 发病机制及抗 NAFLD 药物筛选具有积极的意义。NAFLD 的发生发展需要经过 2 个阶段, 第 1 阶段主要特征为脂质在肝细胞空泡中积累, 这是 NASH 病变的前提条件, 且一般与胰岛素抵抗相关; 第 2 阶段特征为氧化应激紊乱和炎症, 肝脂堆积与脂变性

能诱导肝细胞脂质过氧化与炎症因子如 NO、TNF-α 和 IL-8 等的表达与释放, 导致肝纤维化^[13]。

SREBP-1C 在调节脂质生成 (如脂肪酸和 TG 的合成) 方面起着重要作用^[14]。PNPLA3 是 Patatin 样脂酶家族成员之一, 受到 SREBP-1C 的直接调控, 是 NASH 的易感基因, 具有调节糖脂代谢功能^[15-16]。PPARα 参与肝细胞脂肪酸氧化, 对维持细胞内脂肪酸平衡, 缓解 NASH 具有重要意义^[17-18]。本研究发现二氢姜黄素与 OA 同时处理 HepG2 细胞 24 h, 能降低细胞内 TG 含量, 抑制 SREBP-1C 与 PNPLA3 的表达, 上调 PPARα 的表达, 表明二氢姜黄素可通过拮抗肝脂代谢关键基因表达紊乱, 预防 OA 诱导的肝细胞脂堆积。

在 NASH 的发病过程中, 抑癌基因 PTEN 会过

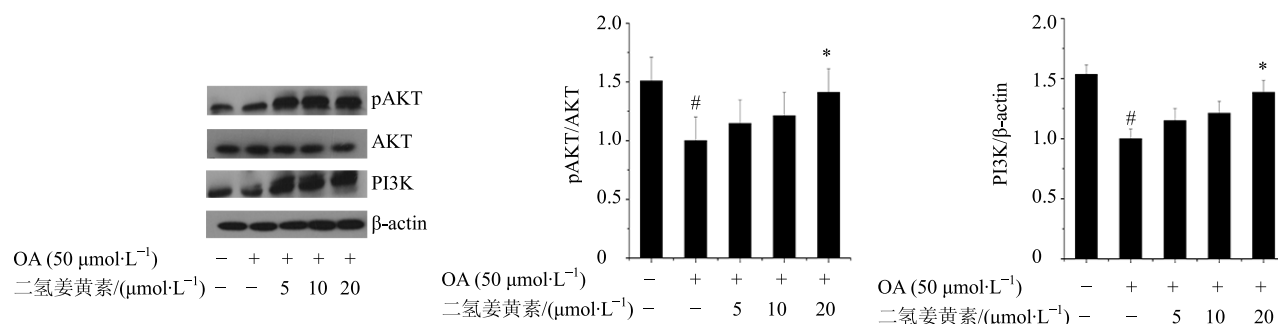


图 9 二氢姜黄素对 OA 处理的 HepG2 细胞中 PI3K、pAKT 和 AKT 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of dihydrocurcumin on protein levels of PI3K, pAKT, and AKT in HepG2 cells treated with OA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表达并对 PI3K/AKT 途径进行负调控,降低肝脏胰岛素敏感性,最终导致肝脂变性及肝纤维化^[19]。增加胰岛素敏感性可促进肝细胞对葡萄糖的摄取能力,抑制 NASH 的发展。本研究发现二氢姜黄素与 OA 同时处理 HepG2 细胞 24 h,能增强细胞对葡萄糖的摄取能力,上调 PI3K 蛋白表达及 pAKT/AKT,表明二氢姜黄素可通过调控 PI3K/AKT 途径,促进肝细胞对葡萄糖的摄取能力,预防 OA 诱导的肝细胞胰岛素抵抗。

肝细胞的氧化损伤会导致细胞的纤维化^[20]。本研究发现 OA 与二氢姜黄素同时处理 HepG2 细胞 24 h,能浓度依赖性提高胞内 ROS 含量及细胞 Nrf2 蛋白表达量。结果似乎相互矛盾,因为 Nrf2 的表达上调说明给药增强了肝细胞的抗氧化能力^[21-22]。文献报道抗癌药物如芹菜素、草质素处理 HepG2 细胞,能够诱导 ROS 的生成导致肝癌细胞的凋亡,从而发挥抗癌作用^[23-24]。因此,推测二氢姜黄素也可能具有与姜黄素类似的抗肿瘤作用,即二氢姜黄素可通过上调 Nrf2 的表达抑制 OA 诱导的 HepG2 细胞氧化应激反应,也可通过 ROS 增生诱导癌细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用。为了验证上述推测,检测了 OA 与二氢姜黄素同时处理 L02 细胞(非癌肝细胞系) 24 h 后胞内的 ROS 含量及细胞 Nrf2 蛋白表达量,发现给药后胞内 ROS 含量降低、细胞 Nrf2 蛋白表达量升高,实验结果支持了笔者的推断。NO 是硝化应激的关键指标,与肝细胞的炎症反应^[25]及氧化损伤密切相关^[26]。本研究发现二氢姜黄素能浓度依赖性抑制 OA 诱导的 HepG2 细胞内 NO 增多,说明二氢姜黄素可通过抑制硝化应激途径,降低胞内 NO 含量,缓解 OA 诱导的肝细胞氧化损伤与炎症反应。

综上,本研究发现二氢姜黄素对 OA 诱导的 HepG2 细胞的脂堆积、胰岛素抵抗、氧化应激损伤及炎症反应均具有一定的预防作用,且预防作用机制与其对肝脂代谢关键基因(PPAR α , SREBP-1C 和 PNPLA3)及胰岛素信号通路 PI3K/AKT 途径的调控有关。这为进一步开展姜黄素类化合物抗 NAFLD/NASH 研究提供了有益参考。

参考文献

- [1] Dietrich P, Hellerbrand C H. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2014, 28(4): 637-653.
- [2] Mary E R. Nonalcoholic fatty liver disease: A systematic

review [J]. *Clin Rev Educ*, 2015, 313(22): 2263-2273.

- [3] Yuki K, David E C. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(4): 434-441.
- [4] Lisa B V W, Mary E R. The role of insulin-sensitizing agents in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2011, 4(4): 249-263.
- [5] Fabio N, Raluca P, Stefano B, et al. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines [J]. *J Hepatol*, 2013, 59(4): 859-871.
- [6] Yoshihisa T, Keiichiro S, Hiroshi I, et al. Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(13): 3777-3785.
- [7] 孙永, 彭明利. 姜黄素及其衍生物在肝脏相关疾病中防治作用的研究进展 [J]. *药学学报*, 2014, 49(11): 1483-1490.
- [8] 李军, 熊琨, 龚元, 等. 基于信号转导通路的姜黄素抗氧化机制研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(13): 2373-2380.
- [9] 赵爽, 程学敏, 黎海娟, 等. 姜黄素干预中枢神经系统疾病生物学机制研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(3): 512-518.
- [10] 常明向, 吴梅梅, 李瀚旻. 姜黄素与甘草次酸联用对肝癌 HepG-2 细胞增殖的抑制作用 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(1): 42-47.
- [11] Wei C, Stephen L C, Ke Q H. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells [J]. *Amer J Transl Res*, 2010, 2(1): 95-104.
- [12] Hui Y L, Qu F C, Yan X, et al. Prolonged treatment of primary hepatocytes with oleate induces insulin resistance through p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(19): 14205-14212.
- [13] Tushar P P, Komal R, Sanket S, et al. Swertiamarin ameliorates oleic acid induced lipid accumulation and oxidative stress by attenuating gluconeogenesis and lipogenesis in hepatic steatosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, doi:10.1016/j.biopha.2016.07.028.
- [14] Sirine A, Sandrine L, Stephanie D, et al. Genetic linkage and expression analysis of SREBP and lipogenic genes in fat and lean chicken [J]. *Compar Biochem Physiol Part B*, 2004, 137(4): 433-441.
- [15] Stefano R, Julia K, Chao X, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1461-1465.
- [16] Céline D, Céline R, Francoise L, et al. Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse

- and human hepatocytes [J]. *J Hepatol*, 2011, 55(1): 145-153.
- [17] Alexandra M, Arnaud P, Edwin F, *et al.* Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD [J]. *Hepatology*, 2016, 65(7): 1202-1214.
- [18] Nasrin Z, Shahnaz K, Gholamreza H, *et al.* Amelioration by chicory seed extract of diabetes-and oleic acid-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) via modulation of PPAR α and SREBP-1 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, doi:10.1016/j.fct.2013.04.018.
- [19] Satoru M, Mayumi K, Yasuko K. Roles for PI3K/AKT/PTEN pathway in cell signaling of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *ISRN Endocrinol*, 2013, doi:10.1155/2013/472432.
- [20] Giuseppe P. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress [J]. *Mol Asp Med*, 2000, 21(3): 49-98.
- [21] Choongho L. Collaborative power of Nrf2 and PPAR γ activators against metabolic and drug-induced oxidative injury [J]. *Oxid Med Cell Long*, 2017, doi.org/10.1155/2017/1378175.
- [22] Moi P, Chan K, Cao A, *et al.* Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 1994, 91(21): 9926-9930.
- [23] Soo I C, Choon S J, So Y C, *et al.* Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: Involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(10): 1328-1335.
- [24] Yan Q, Qisen X, Li Y, *et al.* Herbacetin induces apoptosis in HepG2 cells: Involvements of ROS and PI3K/Akt pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51(1): 426-433.
- [25] Liang L, Mahesh S, Se-woong K, *et al.* Herbacetin inhibit inducible nitric oxide synthase via JNK and nuclear factor- κ B in LPS-stimulated RAW 264. 7 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, doi:10.1016/j.ejphar.2015.08.032.
- [26] Claudio N, Louis J I. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(8): 1103-1108.