

基于肝脂调控为核心的中药调血脂活性和评价方法研究

李建超^{1,2}, 钟颖², 李荣荣^{1,2}, 宋绪钰², 黄娜娜², 孙蓉^{2,3*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033

3. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

摘要:目的 构建适宜于评价中药以“肝脂调控”为核心的调血脂活性和评价的“多细胞来源”“稳定性好”的非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)体外细胞模型,以利于精准发现中药脂代谢调控活性物质并评价其调血脂药理学作用特征。**方法** 选择人肝癌 HepG2 细胞系及小鼠肝实质 AML12 细胞系,对造模试剂(油酸及棕榈酸)、造模方法、作用浓度以及作用时间和溶媒选择进行文献和实验研究,并以 CCK-8 及油红 O 实验确定最佳造模浓度,进而循形人体肝脂代谢轮廓,采用 Western blotting 法检测细胞中脂代谢相关蛋白的表达情况,作为模型评价标准。**结果** 经文献和实验研究发现,10%无脂酸钠牛血清白蛋白(fatty acid free bovine serum albumin, BSA)为油酸溶媒,20% BSA 为棕榈酸溶媒稳定性好;500 μmol/L 油酸及 500 μmol/L 油酸+棕榈酸(体积比 2:1)造模,作用 24 h,可显著增加细胞内脂质积累($P < 0.001$),且不影响细胞活性,证明造模成功;单独使用棕榈酸造模,对 2 种细胞损伤都较大,模型不适宜于调血脂物质发现与评价;500 μmol/L 油酸及 500 μmol/L 油酸+棕榈酸造模后,脂肪从头合成相关蛋白固醇调节元件结合蛋白-1(sterol regulatory element-binding protein-1, SREBP-1)、乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)及脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FASN)的表达无显著变化,脂肪分解相关蛋白三酰甘油脂肪酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)的表达显著升高($P < 0.05$ 、 0.001),激素敏感脂肪酶(hormone sensitive lipase, HSL)的磷酸化显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),脂肪酸氧化相关蛋白过氧化物酶体增殖物激活受体 α(peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPARα)的表达无显著差异,肉碱棕榈酰转移酶 1A(carnitine palmitoyl transferase 1A, CPT1A)的表达显著增加($P < 0.05$)。**结论** 500 μmol/L 油酸及 500 μmol/L 油酸+棕榈酸(体积比 2:1)造模 24 h,均可显著增加 HepG2、AML12 细胞中的脂质积累,成功构建 NAFLD 体外细胞模型,且具有稳定、经济、高效的特点。

关键词: 肝脂代谢; 体外模型; 非酒精性脂肪性肝病; 游离脂肪酸; 油酸; 棕榈酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)10-3158-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.013

Lipid-regulating activity and evaluation method of traditional Chinese medicine based on liver lipid regulation

LI Jian-chao^{1,2}, ZHONG Ying², LI Rong-rong^{1,2}, SONG Xu-yu², HUANG Na-na², SUN Rong^{2,3}

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

3. Shandong University, Institute of Advanced Medical Sciences, Jinan 250012, China

Abstract: Objective To construct an *in vitro* cell model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) with “multi-cell origin” and “good stability”, which is suitable for lipid-regulating activity and evaluation with “liver lipid regulation” as the core of traditional Chinese medicine, so as to facilitate the accurate discovery of lipid-regulating active substances of traditional Chinese medicine and evaluate their pharmacological effects of lipid regulation. **Methods** HepG2 cell line of human hepatocellular carcinoma and AML12 cell line of mouse liver parenchyma were selected, modeling reagents (oleic acid and palmitic acid), modeling methods, action

收稿日期: 2023-02-07

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFC3502100); 国家自然科学基金面上项目(82274197); 国家自然科学基金面上项目(81773997); 济南市科研带头人工作室项目(202228099)

作者简介: 李建超, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学与毒理学。E-mail: lijianchao0117@163.com

*通信作者: 孙蓉, 博士生导师, 教授, 从事中药药理学与毒理学研究。E-mail: sunrong107@163.com

concentration, action time and solvent selection were studied by literature and experiments. CCK-8 and oil red O experiments were used to determine the optimal modeling concentration, and then the contour of human liver lipid metabolism was followed. The expressions of lipid metabolism-related proteins in cells was detected by Western blotting as a model evaluation standard. **Results** It was found that 10% fatty acid free bovine serum albumin (BSA) was oleic acid solvent and 20% BSA was palmitic acid solvent with good stability. 500 $\mu\text{mol/L}$ oleic acid and 500 $\mu\text{mol/L}$ oleic acid + palmitic acid (volume ratio 2 : 1) treated for 24 h could significantly increase the intracellular lipid accumulation ($P < 0.001$) without affecting the cell activity, which proves that the modeling is successful. Palmitic acid modeling alone caused great damage to both kinds of cells, so the model was not suitable for the discovery and evaluation of lipid-lowering substances. After modeling with 500 $\mu\text{mol/L}$ oleic acid and 500 $\mu\text{mol/L}$ oleic acid + palmitic acid, expressions of de novo lipogenesis synthesis related proteins sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FASN) were not significantly increased, but the expression of lipolysis related protein adipose triglyceride lipase (ATGL) was significantly increased ($P < 0.05, 0.001$), and phosphorylation of hormone sensitive lipase (HSL) was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the expression of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), a protein related to fatty acid oxidation, had no significant difference, while the expression of carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** 500 $\mu\text{mol/L}$ oleic acid and 500 $\mu\text{mol/L}$ oleic acid + palmitic acid (volume ratio of 2 : 1) can significantly increase the lipid accumulation in HepG2 and AML12 cells, and successfully construct the cell model of NAFLD *in vitro*, which is stable, economical and efficient.

Key words: liver lipid metabolism; *in vitro* model; non-alcoholic fatty liver disease; free fatty acid; oleic acid; palmitic acid

脂代谢功能紊乱是指长期能量摄入与代谢失衡导致大量脂质堆积,引起内分泌环境紊乱和异位脂质积累,导致脂毒性代谢应激,进而促进肝脏、脂肪组织和骨骼肌等靶器官的代谢功能失调与慢性炎症^[1]。肝脏是参与脂肪代谢的主要器官,作为脂质平衡的中心调节器,是脂蛋白摄取、形成、输出和循环的主要加工中心^[2-3]。非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD)是指5%~10%的肝细胞出现大泡状脂肪变性,或肝内三酰甘油(triglyceride, TG)质量分数超过5.5%^[4]。NAFLD已经发展成为全球最常见的慢性肝病,且增长迅速,约25%的人口患有NAFLD^[5-6]。近年来,我国的NAFLD发病率明显上升,已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病。高发病率的NAFLD严重影响了人类的生活健康,给社会造成沉重的经济负担。因此,有效调控肝脂代谢稳态的治疗手段在当下社会显得愈发重要^[6]。

中医本无NAFLD的病名,其最早记载于《难经》中,属于中医“肝癖”“痰证”“胁痛”“积聚”等范畴,调肝化浊、健脾利湿、养血柔肝等是其有效治法^[7-10]。鉴于目前西医临床针对NAFLD尚缺乏特效治疗策略,亟需在中医药临床丰富的有效经验中发现并开发创新中药。目前NAFLD动物模型制备存在造模时间长、价格昂贵现象,不适宜于中药调控肝脂代谢的活性成分高效筛选,体外细胞模型构建方法统一性较差,如细胞系选择、油酸及棕榈

酸造模浓度、单用还是合用、溶媒选择、造模时间及评价指标等方面,文献各不相同,差异较大。因此,亟需建立与临床发病机制相吻合、适宜于以“肝脂调控”为核心的中药调血脂活性和评价方法研究,且不同细胞来源的稳定、经济、高效的NAFLD体外细胞模型,以更好地适应创新中药发现、不同药理学特征的评价研究,也为建立统一的模型标准提供数据支撑。

1 材料

1.1 细胞系

小鼠肝实质细胞 AML12 细胞系购自中国科学院干细胞库,人肝癌 HepG2 细胞系购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.2 药品与试剂

油酸(批号 30138518)、棕榈酸(批号 30139518)购自上海国药集团化学试剂有限公司;青霉素-链霉素(批号 S110JV)、DMEM/F12 (1 : 1)培养基(批号 L310KJ)、胰岛素-转铁蛋白-硒添加剂(批号 S450J7)购自上海源培生物科技股份有限公司;DMEM培养基(批号 C11995500BT)、胎牛血清(批号 A3160801)购自美国 Gibco 公司;地塞米松(批号 D1756)、油红 O(批号 O0625)购自美国 Sigma 公司;无脂肪酸牛血清白蛋白(fatty acid free bovine serum albumin, BSA, 批号 ST025)、蛋白酶抑制剂混合物(批号 P1050-1)、磷酸酶抑制剂混合物(批号 P1050-2)购自上海碧云天生物技术有限公司;

CCK-8 试剂盒 (A311-02)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 E112-01)、高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒 (批号 E412-01) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; TG 测定试剂盒 (批号 A110-1-1) 购自南京建成生物工程研究所; 酮体含量检测试剂盒 (批号 BC5065) 购自北京索莱宝科技有限公司; 固醇调节元件结合蛋白-1 (sterol regulatory element-binding protein-1, SREBP-1) 一抗 (批号 ab28481)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 一抗 (批号 ab126285)、肉碱棕榈酰转移酶 1A (carnitine palmitoyl transferase 1A, CPT1A) 一抗 (批号 ab234111) 购自英国 Abcam 公司; 乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 一抗 (批号 3676S)、脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FASN) 一抗 (批号 3180S)、三酰甘油脂肪酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL) 一抗 (批号 2138S)、激素敏感脂肪酶 (hormone sensitive lipase, HSL) 一抗 (批号 4107S)、磷酸化 HSL (phosphorylated HSL, p-HSL) 一抗 (批号 45804S) 购自美国 CST 公司; β -肌动蛋白 (β -actin) 一抗 (批号 20536-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 GB23303) 购自武汉赛维尔生物科技股份有限公司。

1.3 仪器

精密电子天平 (瑞士梅特勒-托利多有限公司); CKX53 型倒置生物显微镜 (日本 Olympus 公司); HH-S 型恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器厂); 5200 型全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司); Multiskan Go-1510 型全波长酶标仪、3111 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SDS PAGE 凝胶电泳及转膜电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 文献检索

检索中国知网 (CNKI) 中以 HepG2 为细胞模型, 研究中药调血脂活性的期刊文献, 以“NAFLD”“HepG2”为主题词, 时间为 2018 年 1 月 1 日至 2023 年 2 月 4 日; 以“NAFLD”“HepG2”“Traditional Chinese Medicine”为主题词在 PubMed 数据库中搜索近 5 年文献, 通过阅读标题与摘要首先排除与中药、中药方剂及中药活性成分研究无关的文献; 然后进行全文阅读, 筛选出明确标识造模方法的文献

纳入统计。

2.2 油酸、棕榈酸储存液的配制

将油酸加入到 0.1 mol/L NaOH 溶液中, 置于 75 °C 水浴锅中皂化 30 min, 得 20 mmol/L 油酸溶液, 之后加入到等体积的 20% BSA 溶液中充分混匀, 得 10 mmol/L 油酸储存液 (含 10% BSA)。

将棕榈酸加入到 0.1 mol/L NaOH 溶液中, 置于 75 °C 水浴锅中皂化 30 min, 得 40 mmol/L 棕榈酸溶液, 之后加入到等体积的 40% BSA 溶液中充分混匀, 得 20 mmol/L 棕榈酸储存液 (含 20% BSA)。

将储存液于超净台中过 0.22 μ m 微孔滤膜, 置于 4 °C 冰箱保存。使用时用相应的细胞培养基稀释至所需浓度, 油酸+棕榈酸组为油酸与棕榈酸体积比 2:1 配制。

2.3 细胞培养

AML12 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 胰岛素-转铁蛋白-硒添加剂、1% 青霉素-链霉素、40 ng/mL 地塞米松的 DMEM/F12 培养基培养; HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养。细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。

2.4 CCK-8 实验

细胞以 1×10^6 个/mL 接种于 96 孔板中, 贴壁生长 24 h, 设置对照组、油酸组、棕榈酸组和油酸+棕榈酸组, 对照组仅加入培养基, 其余各组分别加入 125、250、500、800、1000 μ mol/L 相应药物, 继续培养 24 h, 用 CCK-8 试剂盒测定细胞活力。

2.5 油红 O 实验

细胞以 1×10^6 个/mL 接种于 12 孔板中, 贴壁生长 24 h, 设置对照组、油酸组和油酸+棕榈酸组, 对照组仅加入培养基, 其余各组分别加入 125、250、500、800、1000 μ mol/L 相应药物, 继续培养 24 h。用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 在 60% 异丙醇中孵育 2 min。然后在 37 °C 下用 60% 油红 O 染色 20 min, 60% 异丙醇脱色 15 s 后, 在磷酸盐缓冲液中漂洗 3 次。采用倒置生物显微镜拍摄图片。染色后的样品在 100% 异丙醇中室温摇晃 30 min, 提取油红 O, 在 510 nm 处测定吸光度 (A) 值。

2.6 TG 及酮体含量检测

细胞以 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中, 贴壁生长 24 h, 设置对照组、油酸组和油酸+棕榈酸组, 对照组仅加入培养基, 其余各组分别加入 500 μ mol/L 相应药物, 继续培养 24 h。按说明书要求,

收取培养基上清液检测酮体含量, 收集细胞匀浆检测细胞内 TG 含量。

2.7 Western blotting 检测脂代谢相关蛋白表达

细胞以 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中, 贴壁生长 24 h, 设置对照组、油酸组和油酸+棕榈酸组, 对照组仅加入培养基, 其余各组分别加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 相应药物, 继续培养 24 h。收集细胞, 加入 RIPA 缓冲液裂解, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂奶粉, 封闭 1 h, 加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 加入二抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h; 最后使用 ECL 化学发光检测试剂盒, 在全自动化学发光图像分析系统中显影^[11]。

2.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 统计软件对实验数据进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对符合正态分布的两组数据进行非配对双尾 *t* 检验。

3 结果

3.1 利用 HepG2 细胞建立 NAFLD 模型的应用现状

HepG2 细胞是人肝癌细胞, 保留了正常肝细胞的糖脂代谢功能, 是应用最广泛的 NAFLD 体外模型之一^[12]。利用 CNKI 数据库, 以“NAFLD”“HepG2”为主题词搜索最近 5 年期刊文献 106 条, 筛选出与中药脂代谢研究相关且明确标识造模方法的文章 49 篇, 利用 PubMed 数据库, 搜索最近 5 年

期刊文献 64 条, 筛选出有效文章 38 篇。其中单独使用油酸造模的 24 篇, 占 28%; 单独使用棕榈酸造模的 20 篇, 占 23%; 使用油酸+棕榈酸造模的 43 篇, 占 49%。造模所用浓度从 100~1000 $\mu\text{mol/L}$ 不等。造模或造模同时给药作用时间多为 24 h, 约占 91%。

3.2 不同浓度脂肪酸对肝细胞活性的影响

3.2.1 对 HepG2 细胞活性的影响 采用 125~1000 $\mu\text{mol/L}$ 油酸、棕榈酸、油酸+棕榈酸处理 HepG2 细胞, 作用 24 h, 可见不同浓度的脂肪酸均可浓度相关性地降低 HepG2 细胞活力。油酸浓度达到 800 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活性显著降低 ($P < 0.001$)。棕榈酸浓度达到 125 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活性显著降低 ($P < 0.01$), 说明棕榈酸对细胞的损伤更大。油酸+棕榈酸浓度达到 1000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活性才出现显著降低 ($P < 0.001$), 说明油酸可一定程度抑制棕榈酸对细胞的伤害(图 1-A)。

3.2.2 对 AML12 细胞活性的影响 采用 125~1000 $\mu\text{mol/L}$ 油酸、棕榈酸、油酸+棕榈酸处理 AML12 细胞, 作用 24 h, 可见油酸浓度达到 800 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活性出现显著降低 ($P < 0.01$)。棕榈酸浓度达到 500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活性显著降低 ($P < 0.001$)。油酸+棕榈酸浓度达到 1000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞活性仍没有表现出显著降低(图 1-B)。相较于 HepG2 细胞来说, 脂肪酸对 AML12 细胞的伤害更小。

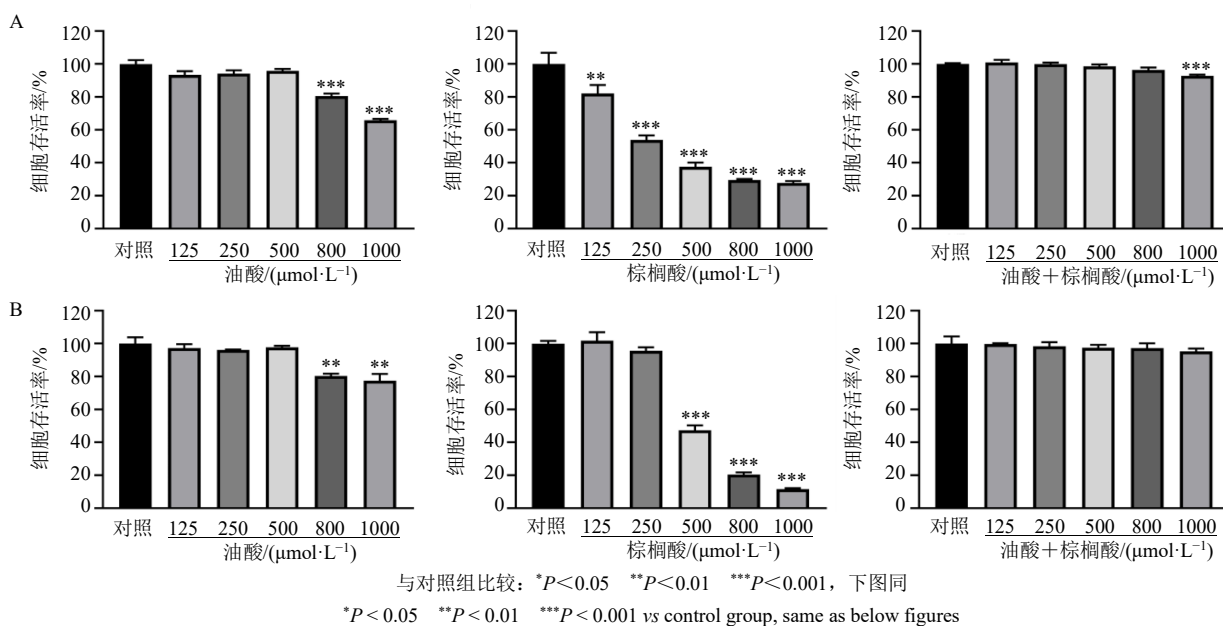


图 1 不同浓度脂肪酸对 HepG2 细胞 (A) 及 AML12 细胞 (B) 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effects of different concentrations of fatty acids on viability of HepG2 cells (A) and AML12 cells (B) ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.3 不同浓度脂肪酸对肝细胞脂肪超载的影响

3.3.1 对 HepG2 细胞脂肪超载的影响 采用 125~1000 $\mu\text{mol/L}$ 油酸、油酸+棕榈酸处理 HepG2 细胞 24 h, 细胞固定后, 进行油红 O 染色, 可见油酸、油酸+棕榈酸均呈浓度相关性地增加 HepG2 细胞的脂质积累 ($P<0.05$ 、 0.01 , 图 2-A)。结合 CCK-8 实验结果, 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸及 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸+棕榈酸在未导致 HepG2 细胞活力明显下降的情况下, 成功诱导了 NAFLD 细胞模型。接着检测干预后细胞内 TG 的含量, 发现与对照组比较, 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸及 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸+棕榈酸均可显著增加 HepG2 细胞内 TG 积累 ($P<0.001$, 图 2-B)。

3.3.2 对 AML12 细胞脂肪超载的影响 采用 125~1000 $\mu\text{mol/L}$ 油酸、油酸+棕榈酸处理 AML12 细胞 24 h, 细胞固定后, 进行油红 O 染色, 可见油酸、油酸+棕榈酸均呈浓度相关性地增加 AML12 细胞的脂质积累 ($P<0.01$ 、 0.001 , 图 2-C)。结合 CCK-8 实验结果, 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸及 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸+

棕榈酸在不影响 AML12 细胞活力的情况下, 成功诱导了 NAFLD 细胞模型。同样的, 如图 2-D 所示, 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸及 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸+棕榈酸可显著增加 AML12 细胞中 TG 含量 ($P<0.001$)。

由于棕榈酸对 2 种细胞的损伤都较大, 且低剂量的棕榈酸并不足以诱导 2 种细胞产生显著的脂质堆积。所以按照当前棕榈酸配制方法, 并不推荐单独使用棕榈酸构建 NAFLD 细胞模型。

3.4 不同浓度脂肪酸对脂代谢的影响

3.4.1 对脂肪从头合成 (De novo lipogenesis, DNL) 的影响 如图 3-A 所示, 与对照组比较, 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸组和 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸+棕榈酸组的 HepG2 细胞中 SREBP-1、ACC 及 FASN 的蛋白表达没有出现显著升高。同样的, 在 AML12 细胞中也未观察到显著差异。表明在此模型中, 脂肪酸的引入并没有显著激活肝脏 DNL 的生理过程。

3.4.2 对脂肪分解的影响 接着对调控肝细胞脂肪分解速率的蛋白进行了检测, 结果表明, 在 2 种细

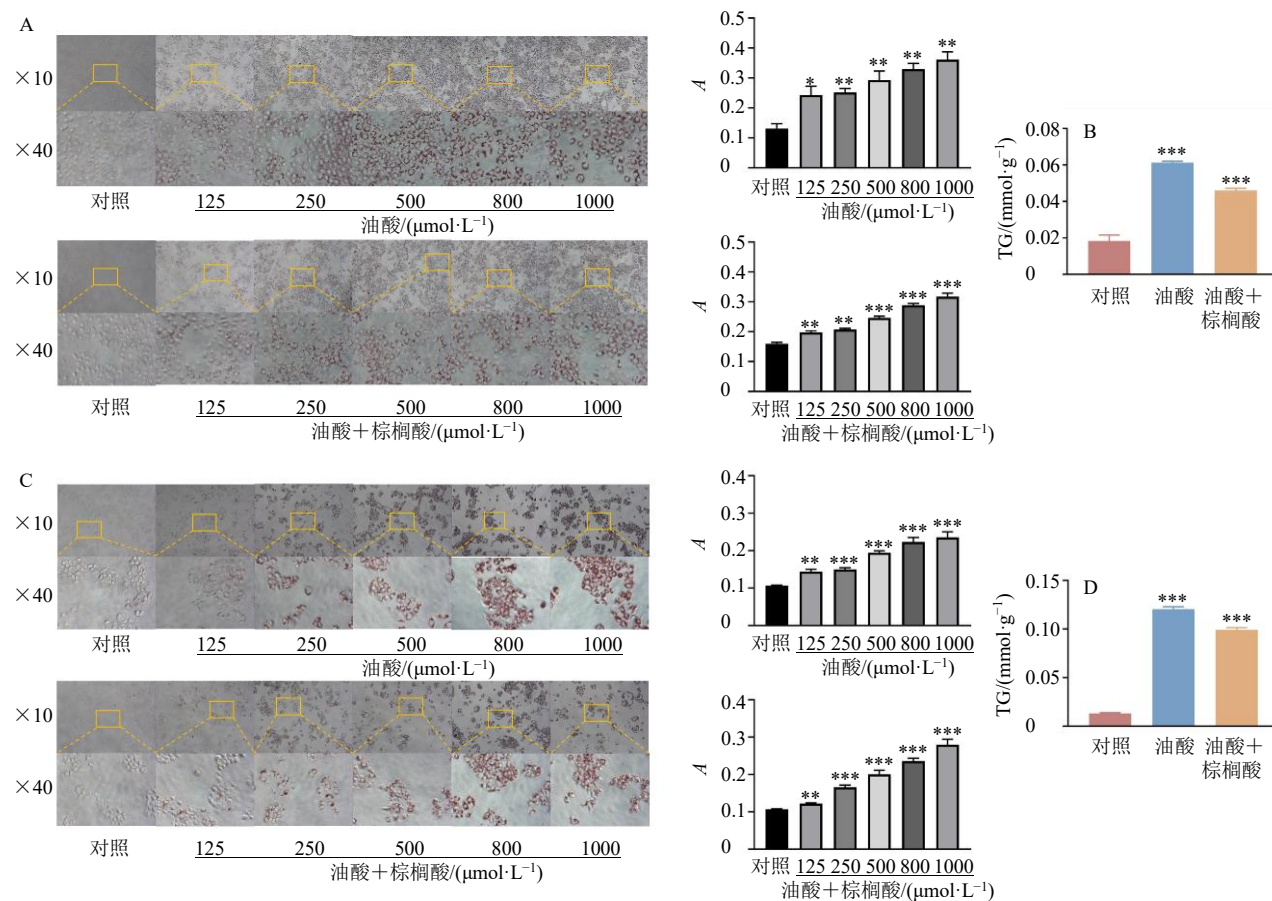
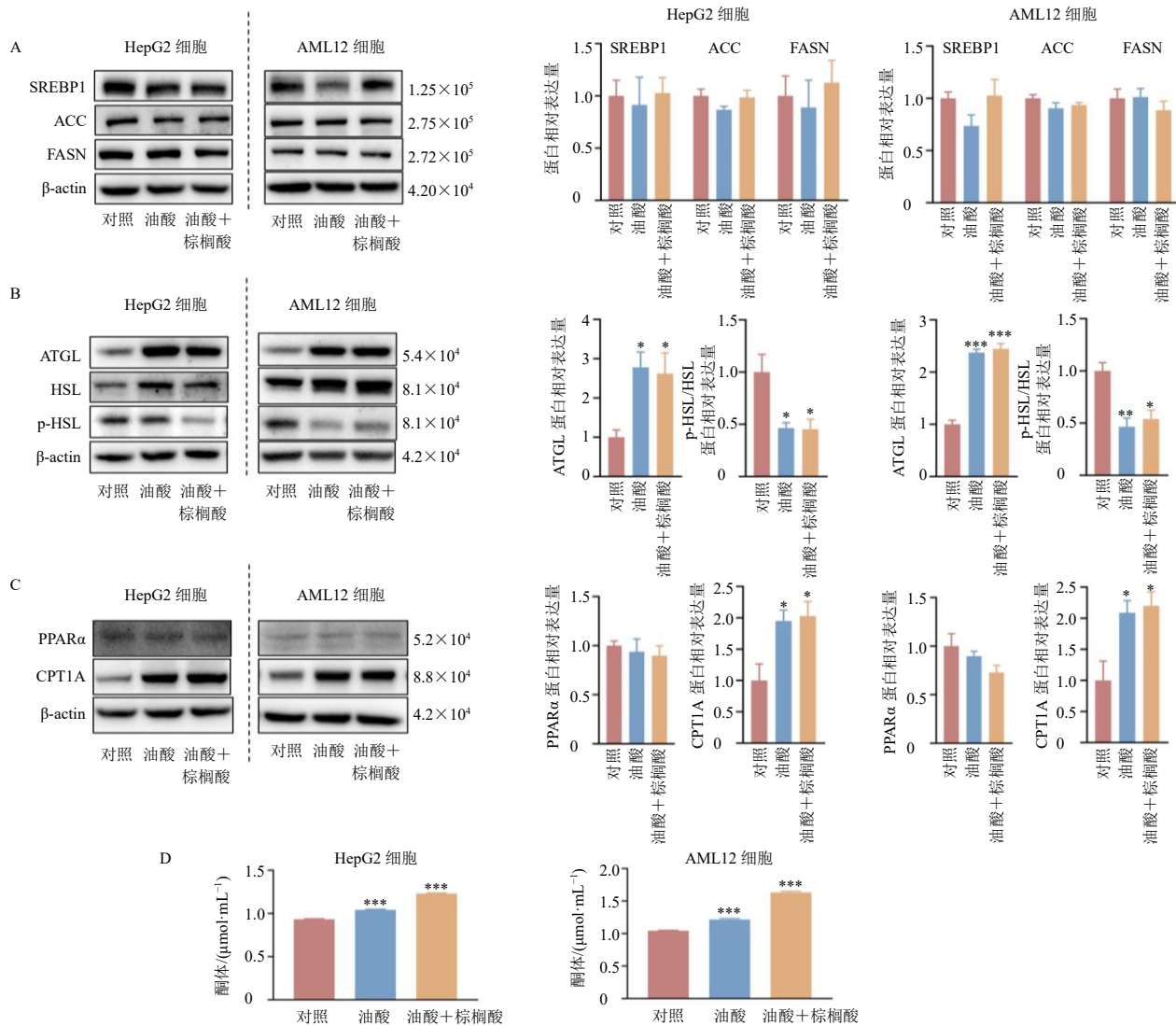


图 2 不同浓度脂肪酸对 HepG2 细胞 (A、B) 及 AML12 细胞 (C、D) 油红 O 染色及细胞内 TG 累积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 Effects of different concentrations of fatty acids on oil red O staining and intracellular TG accumulation in HepG2 cells (A, B) and AML12 cells (C, D) ($\bar{x} \pm s, n=3$)



A-脂肪从头合成相关蛋白表达 B-脂肪分解相关蛋白表达 C-脂肪酸氧化相关蛋白表达 D-酮体含量
 A-de novo lipogenesis related proteins expressions B-lipolysis related proteins expressions C-fatty acid oxidation related proteins expressions
 D-ketone bodies content

图3 不同浓度脂肪酸对 HepG2 细胞及 AML12 细胞脂代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of different concentrations of fatty acids on lipid metabolism in HepG2 and AML12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胞系的细胞模型中，ATGL 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.001$)，而 HSL 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)，图 3-B)。说明肝细胞中脂肪超载激活 TG 第一步水解的同时抑制了脂肪酸的进一步生成，HSL 活性的降低促使肝细胞中脂质的进一步积累。

3.4.3 对脂肪酸氧化的影响 如图 3-C 所示，在 HepG2 细胞模型中，与对照组比较，油酸组和油酸+棕榈酸组的 PPARα 蛋白表达水平虽然存在降低趋势但未出现显著差异，CPT1A 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)，表明过量的脂肪酸促进了肝细

胞中脂肪酸的氧化。在 AML12 细胞模型中观察到同样的现象。为了进一步说明脂肪酸氧化的变化，检测了细胞培养基中酮体含量的变化情况，发现在 HepG2 细胞和 AML12 细胞中，500 μmol/L 油酸和 500 μmol/L 油酸+棕榈酸均显著升高了酮体的含量 ($P < 0.001$)，图 3-D)。

4 讨论

NAFLD 是指除酒精外和其他明确的损肝因素所致的，以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征^[13]。游离脂肪酸可用于肝脏摄取和再酯化为 TG，是肝中 TG 库的主要来源，在

NAFLD 的发生发展中起着重要作用^[14]。棕榈酸和油酸是最丰富的游离脂肪酸，与正常人群相比，NAFLD 患者血浆中棕榈酸和油酸的含量显著增加^[15]。研究表明棕榈酸对肝细胞有显著的细胞毒性效应，通过联合油酸可减轻细胞损伤^[16]。

文献研究发现，目前在以肝脂调控为核心的中药调血脂活性物质发现和评价中所使用的模型较为多样，统一性较差。HepG2 细胞是人肝癌细胞，具有生长速度快、易于培养、脂滴形态学变化明显等特点，被广泛用于肝脂代谢的研究中^[12]。AML12 细胞是小鼠正常肝细胞，属于永生化细胞，具有稳定的表型，存在过氧化物酶体和胆小管样结构，更容易标准化，适用于多种肝脏疾病的研究^[17]。本研究利用油酸、棕榈酸在体外分别诱导人源 HepG2 细胞及鼠源 AML12 细胞脂肪变性，并通过检测脂代谢相关蛋白的表达阐释模型特点。

在造模时间的选择上，根据不同的实验目的，多选择 1~48 h，其中应用最多的为 24 h（占 94%）^[18-21]。根据中药的作用特点、细胞生长周期及前期实验结果，选择 24 h 作为本研究中 2 种细胞模型的造模时间。另外，目前可供选择的脂肪酸溶媒也较多，文献中多存在对溶媒表述不清的现象。常使用的包括甲醇、乙醇、二甲亚砜等有机溶剂，但都对细胞有较大的毒性作用，且溶解不充分，导致模型稳定性差。本研究选择毒性较小的 BSA 作为溶媒，可与游离脂肪酸稳定结合，同时更加符合脂肪酸在体内的运输特点^[22]。实验结果表明，500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸及 500 $\mu\text{mol/L}$ 油酸+棕榈酸干预细胞 24 h 后，在不影响细胞活性的情况下能够显著增加细胞内脂质积累。虽然在 800 $\mu\text{mol/L}$ 甚至更高浓度的油酸+棕榈酸组中 HepG2 细胞及 AML12 细胞的活力仍未下降，但综合考虑药效验证敏感性，选择 500 $\mu\text{mol/L}$ 作为构建 NAFLD 体外模型的最佳剂量，在此浓度下，继续验证了脂代谢相关蛋白的表达情况。

DNL 主要发生在肝脏中^[23]。乙酰辅酶 A 在 ACC 的作用下转化为丙二酰辅酶 A，继而通过 FASN 转化为脂肪酸主要为棕榈酸，最终经过延长、酯化等步骤形成 TG^[23-24]。研究发现，NAFLD 患者的 DNL 速率显著增加，是导致肝脏脂质沉积的主要因素之一^[25]。患者肝脏脂肪中 15%~38% 的棕榈酸酯来自 DNL，显著高于正常群体^[26]。一方面大量棕榈酸的产生可引发炎症和细胞凋亡；另一方面 DNL 的上调促使细胞转向合成代谢而不是分解代谢，导致肝

脏脂质堆积^[4]。SREBP-1 是 DNL 速率的主要调控因子，在 NAFLD 患者中表达增强，同时促进 ACC 及 FASN 的表达^[23]。在本研究的模型中，SREBP-1、ACC 及 FASN 的表达并未出现显著升高。培养基中添加大量的游离脂肪酸使得 DNL 进程并未激活。

脂肪分解是 TG 分解为非酯化游离脂肪酸及甘油进入体循环的生理过程^[4]。其中，ATGL 是水解 TG 的第一步，也是限速步骤，生成甘油二酯和脂肪酸^[27]。研究表明，肝脏中 ATGL 的缺失可以减轻肝脏炎症及内质网应激，减缓病程的发展^[19]。HSL 是一种多功能的酶，主要调控二酰甘油酯的分解，其蛋白磷酸化可显著激活蛋白活性，促进脂解速率^[28-29]。最后，单甘酯脂肪酶（monoglyceride lipase, MGL）将单酰甘油水解为甘油和脂肪酸。ATGL、HSL 和 MGL 的生理活性受不同蛋白质和辅助激活剂的相互调节，共同确保脂解速率以适应代谢需要^[30]。在本研究的模型中，过量 TG 的积累显著促进了肝细胞中 ATGL 的表达，以激活 TG 水解的第一步。然而，过量的游离脂肪酸负向调控了进一步的脂解过程，抑制 HSL 的磷酸化。

氧化供能是肝内脂肪酸代谢的主要途径。脂肪酸的氧化由 PPAR α 调节，长链脂肪酸依赖位于外膜的 CPT1 进入线粒体中^[1,31]。PPAR α 的激活诱导了线粒体、过氧化物酶体和细胞色素中脂肪酸氧化相关基因的转录^[32]。然而，这些过程会产生相当数量的活性氧、氧化应激和有毒的二元酸，进一步促进炎症产生^[33]。丙酮是肝脏中脂肪酸氧化的中间产物，包括乙酰乙酸、 β -羟丁酸和丙酮。在 2 种模型中，酮体的含量显著升高，PPAR α 的表达呈降低趋势，但未出现显著差异，CPT1A 的表达呈现不同程度的显著增加，说明细胞中多余的脂肪酸大量进入线粒体中，易造成线粒体 DNA 的氧化损伤，加剧线粒体功能障碍和氧化应激。

从上述结果可以看出，人源肝癌细胞 HepG2 与鼠源正常肝细胞 AML12 所建立的模型差异并不明显，在不超生理浓度的情况下，细胞内脂质积累均随脂肪酸浓度的增加而增加；但与 HepG2 细胞相比，AML12 细胞对脂肪酸引起的细胞毒性耐受力更强，尤其是单独使用棕榈酸时，在浓度达到 250 $\mu\text{mol/L}$ 时，细胞活性仍未出现显著差异。从 TG 检测可以看出，在相同的作用条件下 AML12 的脂质积累更加严重，说明 AML12 细胞对脂肪酸变化更加敏感。

本实验选用的脂肪酸浓度相对较低,对细胞伤害较小。因此,更加适宜于反映 NAFLD 疾病初期病理特征,对于后续疾病出现的炎症及细胞损伤,可采用更高剂量的脂肪酸进行诱导;另外,实验采用单一因素即脂肪酸浓度增加作为造模条件,不能全面反映 NAFLD 临床中复杂的多重致病因素^[34],因此,在药物发现或药效评价中可根据需求,注意结合其他体外模型进行交互验证。

综上,500 μmol/L 油酸、500 μmol/L 油酸+棕榈酸(体积比 2:1)作用于 HepG2 细胞及 AML12 细胞可成功诱导 NAFLD 体外细胞模型,影响肝细胞脂肪分解和脂肪酸氧化相关蛋白的表达,具有脂质堆积稳定、成模周期较短、经济高效的特点。适用于中药及中药方剂中调血脂活性物质的广泛筛选,为有效治疗 NAFLD 的创新中药发现及不同药理学特征的评价研究提供模型参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Yoon H, Shaw J L, Haigis M C, et al. Lipid metabolism in sickness and in health: Emerging regulators of lipotoxicity [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(18): 3708-3730.

[2] Nguyen P, Leray V, Diez M, et al. Liver lipid metabolism [J]. *J Animal Physiol Animal Nutr*, 2008, 92(3): 272-283.

[3] Zheng Q, Li X J Y, Huang N N, et al. Saikosaponins ameliorate hyperlipidemia in rats by enhancing hepatic lipid and cholesterol metabolism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 305: 116110.

[4] Yki-Järvinen H, Luukkonen P K, Hodson L, et al. Dietary carbohydrates and fats in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(11): 770-786.

[5] Watanabe S, Hashimoto E, Ikejima K, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatol Res*, 2015, 45(4): 363-377.

[6] Lazarus J V, Mark H E, Anstee Q M, et al. Advancing the global public health agenda for NAFLD: A consensus statement [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(1): 60-78.

[7] 李文怡, 袁成民. 非酒精性脂肪性肝病的中西医治疗 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(4): 919-923.

[8] 童光东, 邢宇锋, 周晓玲, 等. 肝癖(非酒精性脂肪性肝炎)诊疗方案 [J]. *中国肝脏病杂志: 电子版*, 2021, 13(1): 1-9.

[9] 张声生, 李军祥. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(12): 2270-2274.

[10] 刘静, 孙蓉. 小柴胡汤对非酒精性脂肪性肝炎模型小鼠的保护作用研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(14): 3708-3716.

[11] Li J C, Wu K Y, Zhong Y, et al. Si-Ni-SAN ameliorates obesity through AKT/AMPK/HSL pathway-mediated lipolysis: Network pharmacology and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302: 115892.

[12] 罗燕, 和兴萍, 李雪, 等. 几种细胞脂肪变性模型的建立与比较分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(8): 2074-2077.

[13] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018年更新版) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(5): 947-957.

[14] Kawano Y, Cohen D E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(4): 434-441.

[15] Puri P, Wiest M M, Cheung O, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2009, 50(6): 1827-1838.

[16] Leamy A K, Egnatchik R A, Young J D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Prog Lipid Res*, 2013, 52(1): 165-174.

[17] Kanuri G, Bergheim I. *In vitro* and *in vivo* models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 11963-11980.

[18] Luo W, Ye L, Hu X T, et al. MD2 deficiency prevents high-fat diet-induced AMPK suppression and lipid accumulation through regulating TBK1 in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(3): e777.

[19] Fuchs C D, Radun R, Dixon E D, et al. Hepatocyte-specific deletion of adipose triglyceride lipase (adipose triglyceride lipase/patatin-like phospholipase domain containing 2) ameliorates dietary induced steatohepatitis in mice [J]. *Hepatology*, 2022, 75(1): 125-139.

[20] da Silva Lima N, Fondevila M F, NÓvoa E, et al. Inhibition of ATG3 ameliorates liver steatosis by increasing mitochondrial function [J]. *J Hepatol*, 2022, 76(1): 11-24.

[21] Zhang J, Tan J, Wang M K, et al. Lipid-induced DRAM recruits STOM to lysosomes and induces LMP to promote exosome release from hepatocytes in NAFLD [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(45): eabh1541.

[22] Liu Y X, Qiao Z C, Liu W Q, et al. Oleic acid as a protein ligand improving intestinal absorption and ocular benefit of fucoxanthin in water through protein-based encapsulation [J]. *Food Funct*, 2019, 10(7): 4381-4395.

[23] Ipsen D H, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular

- mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(18): 3313-3327.
- [24] Badmus O O, Hillhouse S A, Anderson C D, *et al.* Molecular mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD): Functional analysis of lipid metabolism pathways [J]. *Clin Sci*, 2022, 136(18): 1347-1366.
- [25] Smith G I, Shankaran M, Yoshino M, *et al.* Insulin resistance drives hepatic *de novo* lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Clin Investig*, 2020, 130(3): 1453-1460.
- [26] Batchuluun B, Pinkosky S L, Steinberg G R. Lipogenesis inhibitors: Therapeutic opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(4): 283-305.
- [27] Zechner R, Zimmermann R, Eichmann T O, *et al.* FAT SIGNALS: Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(3): 279-291.
- [28] Tardelli M, Bruschi F V, Trauner M. The role of metabolic lipases in the pathogenesis and management of liver disease [J]. *Hepatology*, 2020, 72(3): 1117-1126.
- [29] Anthonsen M W, Rönstrand L, Wernstedt C, *et al.* Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties *in vitro* [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(1): 215-221.
- [30] Morigny P, Boucher J, Arner P, *et al.* Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: Pathways, dysfunction and therapeutics [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(5): 276-295.
- [31] Li X J Y, Ge J D, Li Y J, *et al.* Integrative lipidomic and transcriptomic study unravels the therapeutic effects of saikosaponins A and D on non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11): 3527-3541.
- [32] Wang Y P, Nakajima T, Gonzalez F J, *et al.* PPARs as metabolic regulators in the liver: Lessons from liver-specific PPAR-null mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2061.
- [33] Rao M S, Reddy J K. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(1): 43-55.
- [34] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1038-1048.

[责任编辑 李亚楠]