论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201502072

芒果苷改善高果糖所致 HepG2 细胞内甘油三酯沉积机制研究

郑 旭[1],李丹阳[2],赵元阳[1],周 良[1],曹文富[3],曹纬国[3],姚 玲[3],王建伟[3] (400016 重庆,重庆医科大学:基础医学院干细胞与组织工程研究室[1],生命科学院脂糖代谢重点实验室[2],中医药学院中医药研究室[3])

[摘要] **目的** 研究芒果苷改善高果糖诱导的 HepG2 细胞内甘油三酯沉积的可能机制。**方法** 低糖(1 g/L 葡萄糖)条件下培养的 HepG2 细胞分为对照组(1 g/L 葡萄糖,无果糖)、果糖组(1 g/L 葡萄糖 +30 mmol/L 果糖)、果糖 + 芒果苷组(同时加入葡萄糖浓度 1 g/L +30 mmol/L 果糖 + 不同剂量的芒果苷,使其药物终浓度分别为 6.25、12.5、25、50 μmol/L),药物干预 24 h 之后,油红 O 染色观察细胞内脂滴的沉积情况,酶法测定细胞内甘油三酯(TG)的含量,Real-time PCR 检测碳水化合物反应元件结合蛋白(ChREBP)、固醇调节元件结合蛋白 1c(SREBP-1c)、肝型丙酮酸激酶(LPK)、二酯酰甘油酰基转移酶 2(DGAT-2) mRNA 表达的变化。**结果** 油红 O 染色结果显示,与对照组相比,果糖组的 HepG2 细胞脂滴显著增多,细胞内 TG 含量也明显升高($P<0.05$)。与果糖组对比,低剂量的芒果苷对果糖导致的细胞内脂滴的沉积无影响,较高剂量的芒果苷(25 μmol/L 和 50 μmol/L)使细胞内的脂滴数量明显减少,细胞内 TG 含量显著降低($P<0.05$),以 50 μmol/L 的芒果苷干预效果最好。Real-time PCR 结果显示,与对照组相比,果糖组 HepG2 细胞 ChREBP、SREBP-1c、LPK、DGAT-2 mRNA 明显升高,50 μmol/L 芒果苷能够下调 HepG2 细胞 ChREBP、LPK、DGAT-2 mRNA 的高表达($P<0.05$),但对 SREBP-1c mRNA 表达影响不明显。**结论** 芒果苷能够改善高果糖诱导的 HepG2 细胞内 TG 的沉积,可能与抑制脂质合成相关基因 ChREBP、LPK、DGAT-2 mRNA 的表达密切相关。

[关键词] 芒果苷;果糖;甘油三酯;ChREBP;LPK;DGAT-2

[中图法分类号] R282.71;R285.5;R575.5 [文献标志码] A

Mangiferin ameliorates high-fructose-induced triglyceride deposition in HepG2 cells

Zheng Xu[1], Li Danyang[2], Zhao Yuanyang[1], Zhou Liang[1], Cao Wenfu[3], Cao Weiguo[3], Yao Ling[3], Wang Jianwei[3] ([1]Laboratory of Stem cells and Tissue Engineering, College of Basic Medical Sciences, [2]Key Laboratory of Metabolism on Lipid and Glucose, Institute of Life Science, [3]Department of Traditional Chinese Medicine, College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the possible mechanism of mangiferin in ameliorating high-fructose-induced triglyceride (TG) deposition in HepG2 cells. **Methods** HepG2 cells were cultured in Dulbecco minimum essential medium with low fructose concentration (1 g/L glucose), and then the cells were divided into control group (no fructose), fructose group (30 mmol/L fructose), and fructose + mangiferin groups with different concentrations (6.25, 12.5, 25 and 50 μmol/L) of mangiferin. After intervention for 24 h, the lipid droplet deposition was observed by oil red O staining, and the content of triglyceride was detected by enzymatic method. Real-time PCR was used to determine the mRNA expression of carbohydrate response element binding protein (ChREBP), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), liver pyruvate kinase (LPK) and diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT-2). **Results** Compared with the control group, HepG2 cells in the fructose group showed more lipid droplets and higher TG content ($P<$

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81374033)

[通信作者] 王建伟,电话:(023)65714062,E-mail: wjwcq68@163.com

姚 玲,电话:(023)65714062,E-mail: 1927479534@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150722.1343.026.html(2015-07-22)

0.05). Compared with the fructose group, low doses of mangiferin had no effect on the lipid droplet deposition caused by fructose, while high doses of mangiferin (25 and 50 μmol/L) decreased lipid droplets and TG content significantly ($P<0.05$), of which 50 μmol/L mangiferin exhibited the best intervention effect. Real-time PCR result showed that, compared with the control group, the mRNA expressions of ChREBP, SREBP-1c, LPK, and DGAT-2 increased significantly in the fructose group. Although 50 μmol/L mangiferin could down-regulate the mRNA expressions of ChREBP, LPK, and DGAT-2 ($P<0.05$), it showed minimal effect on SREBP-1c mRNA expression. **Conclusion** Mangiferin ameliorates high-fructose-induced TG deposition in HepG2 cells through inhibiting over-expressions of lipid synthesis related genes including ChREBP, LPK and DGAT-2.

[**Key words**] mangiferin; fructose; triglyceride; carbohydrate response element binding protein; liver pyruvate kinase; diacylglycerol acyltransferase-2

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81374033). Corresponding author: Wang Jianwei, Tel: 86-23-65714062, E-mail: wjwcq68@163.com; Yao Ling, Tel: 86-23-65714062, E-mail: 1927479534@qq.com

非酒精性脂肪肝是非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的标志,可发展成严重的肝病,近年来发病率猛增,严重危害国民健康。对于脂肪肝目前尚无针对性的化学合成药物,而中医药则有显著特色和优势。

芒果苷(Mangiferin)是一种四羟基吡酮的碳糖苷,存在于芒果、连翘、海南五层龙[1]等多种植物中,其药理作用广泛,目前已被用于抗炎抗病毒、抗肿瘤、糖尿病、肥胖等[2-3],但其作用机制尚不清楚。我们课题组既往研究表明,芒果苷通过抑制肝脏DGAT2表达改善了高果糖引起的自发性高血压大鼠的脂肪肝[4]。本实验采用人肝癌细胞株HepG2细胞模型(HepG2细胞的生物学功能与正常肝细胞极为相似,长期以来一直是研究肝脏脂质代谢病理生理的良好细胞模型)进一步研究芒果苷对高果糖诱导的肝细胞甘油三酯(triglyceride,TG)沉积的作用及机制,探讨芒果苷对于脂质合成过程中的关键转录因子ChREBP、SREBP-1c以及其控制下游关键靶基因LPK,甘油三酯合成中的唯一限速酶DGAT-2 mRNA的影响,旨在为芒果苷防治NAFLD提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞

DMEM低糖培养基(HyClone公司,美国),胎牛血清(HyClone公司,美国),胰酶(HyClone公司,美国),果糖(Sigma公司,美国),芒果苷(Sigma公司,美国),四氮唑蓝(Amresco公司,美国),DMSO(Amresco公司,美国),油红O干粉(Sigma公司,美国),TG检测试剂盒(上海科欣生物技术研究所,中国),BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所,中国),总RNA提取试剂盒、cDNA逆转录试剂盒包括M-MLV酶、dNTP mix、RNase Inhibitor(TaKaRa公司,中国),SYBR® Premix、PCR Forward Premix、PCR Reverse Premix(宝生物公司,中国),人肝癌HepG2细胞由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2细胞用DMEM低糖(葡萄糖浓度1 g/L)培养基培养,加入体积分数10%的胎牛血清。细胞置于37 ℃的5% CO_2培养箱中培养,当细胞汇合率达85%时,用0.25%胰酶消化传代,每3~4天传代1次。

1.2.2 细胞分组与药物处理 取生长状态良好的细胞,当细胞汇合率达到70%时,将细胞分为对照组(1 g/L葡萄糖,无果糖),果糖组(1 g/L葡萄糖+30 mmol/L果糖),果糖+芒果苷组(1 g/L葡萄糖+30 mmol/L果糖+不同剂量的芒果苷)。

1.2.3 MTT实验 选择生长状态良好、对数生长期的细胞进行传代,胰酶消化之后,接种于96孔板内,调整细胞密度使每孔细胞达到5.0×10^3个,将其分为对照组,果糖组,果糖+芒果苷组(剂量分别为6.25、12.5、25、50、100、200 μmol/L),置于37 ℃,5% CO_2孵箱内培养24 h,然后每孔加入20 μL MTT溶液,继续培养4 h后终止,小心吸去孔内培养液,每孔加入150 μL DMSO,酶标仪检测490 nm处各孔的光密度值$D(490)$。增殖抑制率公式为:抑制率=[对照组$D(490)$-给药组$D(490)$]/对照组$D(490)\times100\%$。

1.2.4 油红O染色 取生长状态良好、对数生长期的细胞,胰酶消化后,调节细胞密度至1.0×10^5个/mL。采用爬片法接种培养,当细胞汇合率达到70%时,将细胞分为对照组,果糖组,果糖+芒果苷(剂量分别为

6.25、12.5、25、50 μmol/L),加药培养24 h之后,吸出孔内培养液,用PBS洗涤3次,用4%多聚甲醛固定1 h,PBS洗涤3次,先用60%异丙醇浸洗1遍,用油红O工作液浸染15 min后,然后60%异丙醇分色,再用苏木精复染5 min,水洗,甘油封片镜下观察并照相。

1.2.5 细胞内甘油三酯含量的测定 取生长状态良好、对数生长期的细胞,当细胞汇合率达到70%时,将细胞分为对照组,果糖组,果糖+芒果苷组(剂量分别为6.25、12.5、25、50 μmol/L),24 h后收集各组细胞于EP管中,向每个EP管加入200 μL异丙醇,用超声萃取仪裂解细胞2 min,裂解后静置于冰上30 min,4 ℃ 14 000 r/min离心15 min后取其上清液,按照说明书用甘油三酯试剂盒检测甘油三酯含量,残余下层沉淀按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书进行蛋白定量。甘油三酯的含量用相应样本的蛋白质含量加以校正,即甘油三酯量除以蛋白质含量来表示,结果表示为每毫克细胞总蛋白中所含的甘油三酯量(μg/mg)。

1.2.6 Real-time PCR 取生长状态良好、对数生长期的细胞,当细胞汇合率达到70%时,将细胞分为对照组,果糖组,果糖+芒果苷组(剂量为50 μmol/L),24 h后收集各组细胞,TRIzol法提取细胞总RNA,并按照cDNA逆转录试剂盒合成cDNA,采用美国伯乐CFX 96 Real-time PCR和大连宝生物SYBR® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ试剂盒,检测脂质合成相关基因碳水化合物反应元件结合蛋白(carbohydrate response element binding protein,ChREBP),固醇调节元件结合蛋白1c(sterol regulatory element binding protein-1c,SREBP-1c),肝型丙酮酸激酶(liver pyruvate kinase,LPK),二酯酰甘油酰基转移酶2(diacylglycerol acyltransferase-2,DGAT-2)的mRNA表达情况,相关引物序列如表1所示。反应条件:95 ℃预变性30 s,95 ℃变性5 s,60 ℃退火30 s,共40个循环,72 ℃延伸10 min。以β-actin为内参基因定量,数据采用标准曲线法进行统计分析,用目的基因与起始拷贝数比值表示目的基因的相对表达量。

表1 荧光定量PCR相关基因引物序列

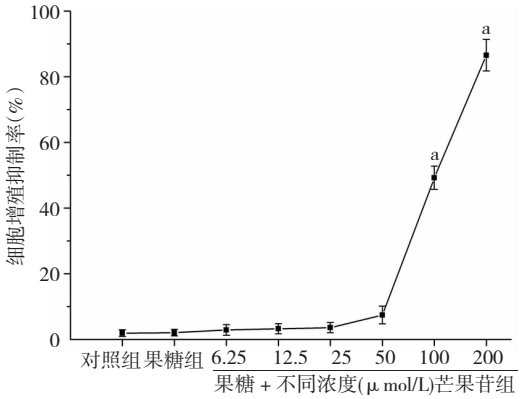
基因	上游引物(5′→3′)	下游引物(5′→3′)
β-actin	ACGGTCAGGTCATCACTATCG	GGCATAGAGGTCTTTACGGATG
ChREBP	GAAGACCCAAAGCCAAGATGC	TCTGACAACAAAGCAGGAGGTG
DGAT-2	GAGACTACTTTCCCATCCAG	GGTATCCAAAGATATAGTTCCT
LPK	CTCTGCCTACTGGACATTGA	ACCAGCTCCACTTCCGACTCT
SREBP-1c	CTGTCGTCT ACCATAAGCTGCAC	ATAGCATCTCCTGCACACTCAGC

1.2.7 统计学处理 采用SPSS 19.0统计分析软件进行数据处理,所有的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采用单因素方差分析,各组间两两多重比较采用LSD检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芒果苷对HepG2细胞活力的影响

不同浓度的芒果苷作用细胞24 h之后,用MTT法测定细胞活力。结果如图1显示,当芒果苷的浓度低于50 μmol/L时,随着药物浓度的升高,细胞活力几乎不受影响,当芒果苷浓度高于50 μmol/L时,随着药物浓度的升高,细胞的活力明显下降,100 μmol/L的芒果苷对细胞的抑制率为49.2%($P<0.05$),200 μmol/L的芒果苷对细胞的抑制率为86.5%($P<0.05$),所以为了排除药物毒性对细胞活力的影响,我们在后续的实验中采用50 μmol/L以下浓度的芒果苷进行实验。



a:$P<0.05$,与对照组比较

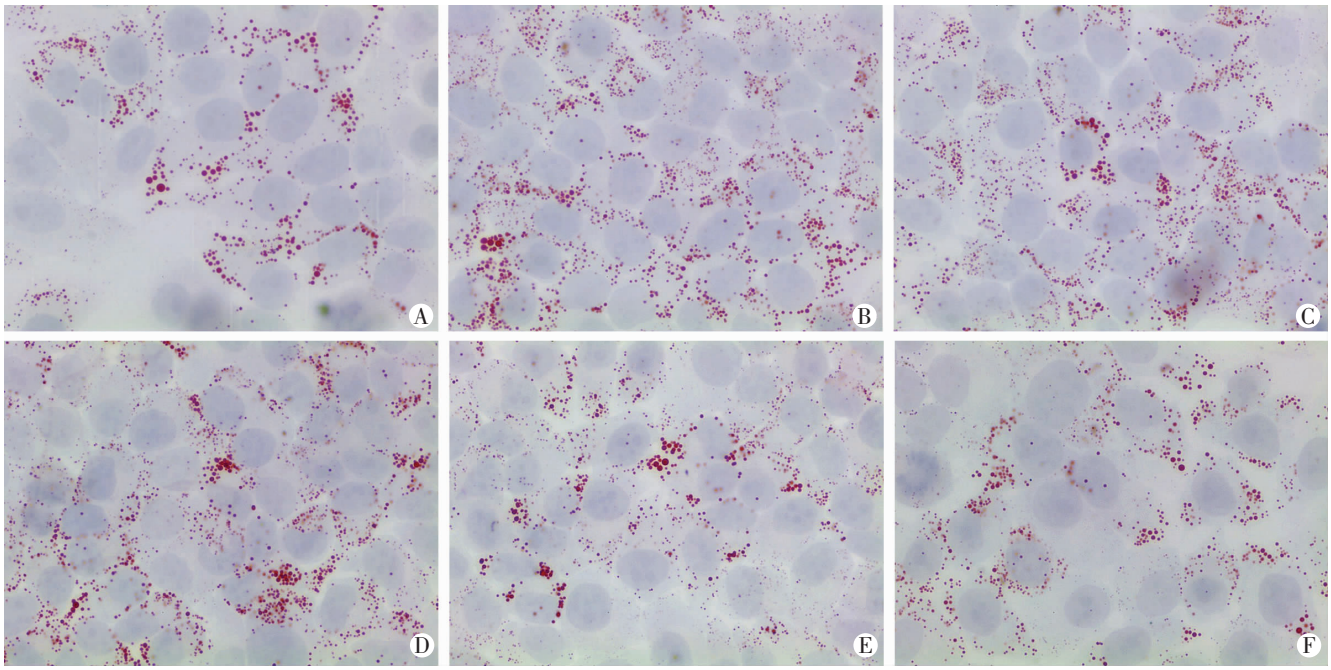
图1 不同浓度的芒果苷对HepG2细胞生长的抑制作用

2.2 油红O染色观察不同浓度的芒果苷对细胞脂滴沉积的影响

不同浓度的芒果苷作用HepG2细胞24 h之后,油红O染色结果如图2所示。与对照组相比,果糖组细胞内的脂滴数量明显增多;低剂量的芒果苷对果糖导致的细胞内脂滴的沉积无影响,较高剂量的芒果苷(25 μmol/L和50 μmol/L)使细胞内的脂滴数量明显减少,以50 μmol/L芒果苷改善作用最显著,提示芒果苷能减轻果糖导致的HepG2细胞内脂滴的沉积。

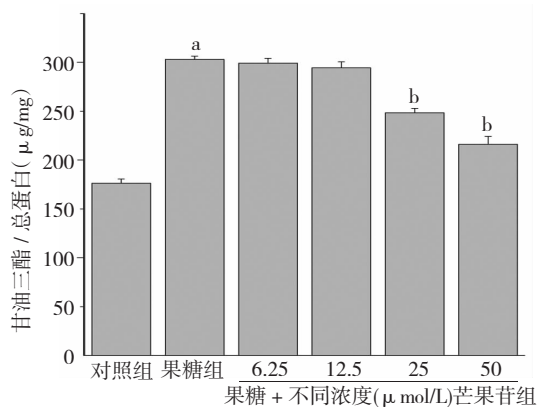
2.3 芒果苷对HepG2细胞内TG含量的影响

不同浓度的芒果苷作用HepG2细胞24 h之后,酶法测定细胞内TG的含量,结果如图3显示,与对照组相比,果糖组细胞内甘油三酯含量明显升高($P<0.05$),而芒果苷(25 μmol/L和50 μmol/L)干预24 h后,细胞内TG含量降低(与果糖组比较,$P<0.05$)。进一步证实了芒果苷能减轻果糖导致的HepG2细胞内TG沉积。从药物剂量上来看,以50 μmol/L药物剂量改善作用最显著,因此,在后续的Real-time PCR实验中,我们选用50 μmol/L芒果苷进行实验。



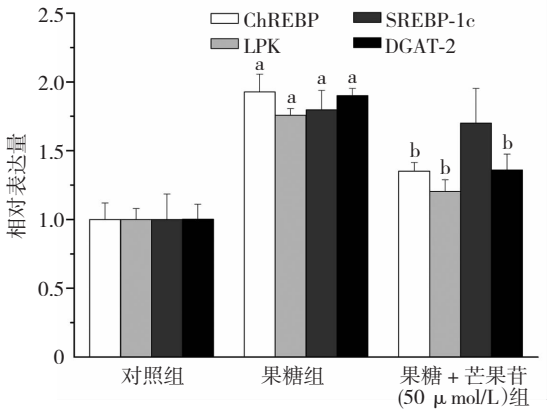
A：对照组；B：果糖组；C：果糖 + 芒果苷组(6.25 μmol/L)；D：果糖 + 芒果苷组(12.25 μmol/L)；E：果糖 + 芒果苷组(25 μmol/L)；F：果糖 + 芒果苷组(50 μmol/L)

图 2　油红 O 染色观察 HepG2 细胞甘油三酯沉积情况　(×40)



a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与果糖组比较

图 3　不同浓度的芒果苷对 HepG2 细胞内 TG 含量的影响　($\bar{x}\pm s, n=3$)



a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与果糖组比较

图 4　50 μmol/L 芒果苷对 HepG2 细胞 ChREBP、SREBP-1c、DGAT-2、LPK mRNA 表达量的影响　($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.4　Real-time PCR 检测 HepG2 细胞 ChREBP、SREBP-1c、DGAT-2、LPK mRNA 表达量的变化

用 50 μmol/L 的芒果苷作用细胞 24 h 后，Real-time PCR 检测细胞 ChREBP、SREBP-1c、DGAT-2、LPK mRNA 表达情况。结果如图 4 所示，与对照组相比，果糖组 HepG2 细胞 ChREBP、SREBP-1c、LPK、DGAT-2 mRNA 明显升高($P<0.05$)，而芒果苷能够下调 HepG2 细胞 ChREBP、LPK、DGAT-2 mRNA 的高表达($P<0.05$)，但对 SREBP-1c mRNA 表达影响则不明显。

3　讨论

随着人们生活水平的不断提高，高糖高脂饮食在人们食谱中所占的比重越来越大，打破了机体营养物质代谢平衡，以非酒精性脂肪肝病为主的一系列代谢性疾病在不断侵蚀着人体的健康，因此针对非酒精性脂肪肝病的发病机制和防治方法的研究显得尤为重要。我们既往研究表明，芒果苷能改善高果糖所致自发性高血压大鼠的脂肪肝[4]，与之相一致，本实验采用 HepG2 细胞模型体外研究，结果显示芒果苷亦能改善高果糖所致细胞内甘油三酯沉积。

脂质代谢是一个复杂的生理过程,诸多蛋白因子以及酶都以不同的形式参与这一反应,其中碳水化合物反应元件结合蛋白(ChREBP)和固醇调节元件结合蛋白(SREBPs)是脂质合成过程中最重要的转录因子。ChREBP可以结合到糖酵解和脂肪合成酶相关基因启动子区的糖类应答元件(ChRE)上,调节控制糖酵解过程的关键基因LPK和参与脂质合成酶基因FAS、ACC-1的表达[5-6],从而引起甘油三酯的从头合成。除此之外,ChREBP也可以与葡萄糖和脂质代谢中的另一种重要转录因子SREBP-1c协同合作,调节脂质合成酶基因的表达[7-8]。近年来的研究已经表明,在高果糖的刺激下,ChREBP和SREBP-1c基因可被激活,从而引起脂质从头合成,进而发生脂质沉积,脂肪肝变性[9]。本实验的结果显示,经过芒果苷干预24 h之后,果糖引起的HepG2细胞内ChREBP、LPK mRNA的高表达量均下调,说明芒果苷可抑制糖脂代谢关键转录因子ChREBP过度生成,从而降低了糖酵解关键基因LPK表达量,使得细胞糖酵解的速率降低,进而使得甘油三酯从头合成量减少。但是经药物干预之后的HepG2细胞SREBP-1c mRNA的表达量不受影响,这可能与SREBP-1c受胰岛素信号的调节,胰岛素是调节SREBP-1c的主要因素有关[10-11],但是也有报道经过大剂量芒果苷(50 mg/kg和150 mg/kg体质量)治疗之后的大鼠,SREBP-1c mRNA的表达量下调[12]。我们既往研究应用小剂量芒果苷(15 mg/kg体质量)没有对果糖所致SHR大鼠肝脏SREBP-1c mRNA和蛋白高表达产生影响[4],提示芒果苷干预SREBP-1c信号通路可能还与剂量有关。

DGAT-2是一种甘油酰基转移酶,是催化合成甘油三酯中的唯一限速酶,它的主要作用是使二酰甘油加上脂肪酸酰基辅酶A以共价键结合形成甘油三酯[13-14],DGAT-2高表达可使甘油三酯合成增多,过多的甘油三酯在胰岛中累积会对胰岛细胞产生毒害,最终导致糖尿病、肥胖等一系列病症。本实验发现芒果苷干预24 h之后,果糖所致HepG2细胞DGAT-2 mRNA高表达量明显下降,说明芒果苷可通过抑制DGAT-2的过度表达来调控甘油三酯的合成,这与本课题组既往的动物体内研究结果相一致[4]。

综上所述,芒果苷能够改善高果糖诱导的HepG2细胞内甘油三酯的沉积,可能与抑制脂质合成关键基因ChREBP、LPK、DGAT-2 mRNA的表达密切相关,这为今后的深入研究和药物研发提供了方向。

参考文献:

[1] Liu L, Yang M, Lin X, *et al*. Modulation of hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c-mediated gene expression contributes to Salacia oblonga root-elicited improvement of fructose-induced fatty liver in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(3): 1045-1052.

[2] Li Y, Huang T H, Yamahara J. Salacia root, a unique Ayurvedic medicine, meets multiple targets in diabetes and obesity[J]. Life Sci, 2008, 82(21/22): 1045-1049.

[3] Yoshikawa M, Shimoda H, Nishida N, *et al*. Salacia reticulata and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats [J]. J Nutr, 2002, 132(7): 1819-1824.

[4] Xing X, Li D, Chen D, *et al*. Mangiferin treatment inhibits hepatic expression of acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase-2 in fructose-fed spontaneously hypertensive rats: a link to amelioration of fatty liver [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014, 280(2): 207-215.

[5] Denechaud P D, Bossard P, Lobaccaro J M, *et al*. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver[J]. J Clin Invest, 2008, 118(3): 956-964.

[6] Flowers M T, Miyazaki M, Liu X, *et al*. Probing the role of stearoyl-CoA desaturase-1 in hepatic insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2006, 116(6): 1478-1481.

[7] Foufelle F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c [J]. Biochem J, 2002, 366(Pt 2): 377-391.

[8] Tappy L, Le K A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity [J]. Physiol Rev, 2010, 90(1): 23-46.

[9] Nagata R, Nishio Y, Sekine O, *et al*. Single nucleotide polymorphism (-468 Gly to A) at the promoter region of SREBP-1c associates with genetic defect of fructose-induced hepatic lipogenesis [J]. J Biol Chem, 2004, 279(28): 29031-29042.

[10] Shimomura I, Bashmakov Y, Horton J D. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus [J]. J Biol Chem, 1999, 274(42): 30028-30032.

[11] Mori T, Kondo H, Hase T, *et al*. Dietary phospholipids ameliorate fructose-induced hepatic lipid and metabolic abnormalities in rats [J]. J Nutr, 2011, 141(11): 2003-2009.

[12] Guo F, Huang C, Liao X, *et al*. Beneficial effects of mangiferin on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters[J]. Mol Nutr Food Res, 2011, 55(12): 1809-1818.

[13] Cases S, Stone S J, Zhou P, *et al*. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members [J]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 38870-38876.

[14] Wakimoto K, Chiba H, Michibata H, *et al*. A novel diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) is decreased in human psoriatic skin and increased in diabetic mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(2): 296-302.

(**收稿**:2015-02-10;**修回**:2015-03-31)

(编辑 张 维)