DOI:10.16016/j.1000-5404.201509009

二氢杨梅素上调 SIRT1 信号通路改善 HepG2 细胞甘油三酯蓄积

李成凤,曾祥龙,黄 娟,杨济宁,张乾勇,糜漫天 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆市医学营养研究中心)

[摘要] **目的** 探究二氢杨梅素(dihydromyricetin,DHM)对肝细胞脂质代谢的影响及其与 SIRT1 信号通路的关系。**方法** 0.2 mmol/L 棕榈酸(palmitic acid, PA)处理 HepG2 细胞 24 h,诱导为脂肪变性肝细胞模型,再用 0、5、10、20 μmol/L DHM 及 20 μmol/L DHM + 2 μmol/L SIRT1 抑制剂(EX527)分别干预 24 h,CCK-8 检测细胞增殖活性,油红 O 染色检测细胞脂滴形成情况,酶偶联比色法检测甘油三酯(triglyceride, TG)含量,蛋白免疫印迹法检测沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)、固醇调节元件结合蛋白 1c(sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1c)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FAS)、乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)的表达。**结果** 0.2 mmol/L PA 和 5、10、20 μmol/L DHM 对细胞增殖活力没有显著影响($P>0.05$);5、10、20 μmol/L DHM 处理后明显减少脂肪变性的 HepG2 细胞脂滴蓄积和甘油三酯含量($P<0.01$),增加磷酸化的 AMPK(p-AMPK)和 SIRT1 的表达水平,并且降低脂质合成相关基因 SREBP-1c、FAS、磷酸化的 ACC(p-ACC)的蛋白表达,SIRT1 抑制剂能显著增加脂肪变性的 HepG2 细胞的甘油三酯含量($P<0.01$),削弱 DHM 对脂肪变性 HepG2 细胞 SREBP-1c、FAS、P-ACC 表达的抑制作用。**结论** DHM 通过上调脂肪变性 HepG2 细胞 SIRT1 信号通路改善肝细胞脂肪变性。

[关键词] HepG2 细胞;脂肪变性;二氢杨梅素;脂质代谢;SIRT1 信号通路
[中图法分类号] R282.71; R322.47; R349.31 [文献标志码] A

Dihydromyricetin improves triglyceride accumulation in HepG2 cells by regulating SIRT1 signaling pathway

Li Chengfeng, Zeng Xianglong, Huang Juan, Yang Jining, Zhang Qianyong, Mi Mantian (Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing Research Center for Medical Nutrition, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of dihydromyricetin (DHM) on lipid metabolism in hepatic cells and its relationship with silent information regulator 1 (SIRT1) signaling pathway. **Methods** HepG2 cells were treated by 0.2 mmol/L palmitic acid (PA) for 24 h to establish a model of hepatic steatosis, and then followed by the treatment of 0, 5, 10 and 20 μmol/L DHM or 20 μmol/L DHM plus 2 μmol/L EX527 (SIRT1 inhibitor) for 24 h. CCK-8 assay was used to detect the cell viability, oil Red O staining was employed to detect the intracellular lipid droplets, enzyme-coupled colorimetric assay was adopted to measure triglyceride (TG) content, and Western blotting was used to detect the protein expression of SIRT1, adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK), sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1c), fatty acid synthetase (FAS) and acetyl-CoA carboxylase (ACC). **Results** The results indicated that 0.2 mmol/L PA as well as 5, 10 and 20 μmol/L DHM had no significant effect on the proliferation of HepG2 cells ($P>0.05$), while 5, 10 and 20 μmol/L DHM significantly reduced the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273059)
[通信作者] 张乾勇,E-mail: zqianyong@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1340.014.html(2015-12-04)

accumulation of lipid droplets and level of TG in HepG2 cells, increased the protein expression levels of P-AMPK and SIRT1, and at the same time, reduced the protein levels of SREBP-1c, FAS and p-ACC. SIRT1 inhibitor, EX527, significantly increased the TG level ($P<0.01$), and weakened the reducing effect of DHM on the levels of SREBP-1c, FAS and p-ACC in HepG2 cells. **Conclusion** DHM improves hepatocyte fatty degeneration by up-regulating SIRT1 signaling pathway.

[**Key words**] HepG2 cells; steatosis; dihydromyricetin; lipid metabolism; silent information regulator 1 signaling pathway

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81273059). Corresponding author: Zhang Qianyong, E-mail: zqianyong@sina.com

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)是代谢综合征的一种表现形式,也是慢性肝病的发病主因,有进一步发展为肝硬化和肝癌的风险[1],且其治疗方式的选择有限[2]。近年研究发现天然黄酮类植物化合物二氢杨梅素(dihydromyricetin,DHM)具有良好的调节脂代谢的作用[3]。研究[4-6]显示 DHM 可能具有改善胰岛素抵抗、糖代谢等作用;DHM 含量占 45.01% 的藤茶提取物可以明显改善 NAFLD 小鼠肝脏脂肪变性,还可以降低肝脏及血清甘油三酯(triglyceride, TG)水平,具有潜在的治疗 NAFLD 的作用[7]。但针对 DHM 的体外研究比较少见,其作用机制还不是很清楚[8]。本研究通过建立体外肝细胞脂肪变性模型,使用不同浓度的 DHM 进行干预,分析 DHM 对脂肪变性肝细胞脂质合成及代谢的影响,并深入探讨 DHM 对脂肪变性肝细胞沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)信号通路的作用,进一步明确其中可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞

人肝癌细胞株(HepG2)购于中科院上海细胞所,DMEM 高糖培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购于美国 HyClone 公司,二氢杨梅素购自成都曼斯特公司,油红 O、棕榈酸(palmitic acid, PA)、EX527 为美国 Sigma 公司产品,CCK-8 试剂盒购于日本 Dojindo 公司,腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)、磷酸化的 AMPK(p-AMPK)购于美国 Abcam 公司,SIRT1 抗体购于美国 Affinity 公司,乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)、固醇调节元件结合蛋白 1c(sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1c)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FAS)、磷酸化的 ACC(p-ACC),购于美国 Santa Cruz 公司,β-actin 抗体购于北京中杉金桥公司,PVDF 膜为美国 Merck Millipore 公司产品,甘油三酯测定试剂盒购于北京普利莱公司。

1.2 细胞培养与实验分组

HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基培养,密度达到约 80% 时进行消化传代。HepG2 细胞用 0.2 mmol/L 棕榈酸处理 24 h 后再用不同浓度的 DHM 干预 24 h。实验分为 6 组:对照组、PA 组、PA +5 μmol/L DHM 组、PA +10 μmol/L DHM 组、PA +20 μmol/L DHM 组、20 μmol/L DHM 组。

1.3 细胞增殖活力测定

将 HepG2 细胞以 5×10^3/孔按照分组接种于 96 孔板中,每组设 4 个复孔,每孔 100 μL 体系,加入相应处理因素处理后,按 CCK-8 试剂盒说明书检测 HepG2 细胞增殖活力。

1.4 油红 O 染色

按照文献[9]的方法进行油红 O 染色,显微镜下观察 HepG2 细胞内脂滴情况。

1.5 细胞 TG 含量测定

根据分组情况将 HepG2 细胞按 1×10^6/mL 接种于 6 孔板内,干预结束即收集细胞沉淀,PBS 清洗 2 次。按照 TG 试剂盒说明书测定细胞 TG 含量。

1.6 Western blot 检测蛋白表达

不同干预因素处理 HepG2 细胞后提取总蛋白,按每孔 40 μg 蛋白上样,10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,湿式转膜法转移蛋白至 PVDF 膜。5% BSA 室温封闭 2 h 后,用一抗稀释液稀释的 SIRT1、AMPK、p-AMPK、SREBP-1c、FAS、p-ACC、ACC、β-actin 4 ℃ 孵育过夜,1×TBST 洗膜 3 次,加入对应的辣根过氧化酶标记的二抗,室温孵育 1 h,1×TBST 洗膜 3 次后,加入化学发光液,VILBER FUSION FX7 成像系统自动曝光,Image J 进行灰度值分析。

1.7 抑制 SIRT1 对 DHM 的效应的影响

HepG2 细胞经 PA 处理 24 h 后,用 20 μmol/L DHM、2 μmol/L EX527(SIRT1 抑制剂)单独或联合干预 24 h,检测各组细胞 TG 含量以及脂代谢有关基因的表达,操作方法同 1.3、1.5、1.6。

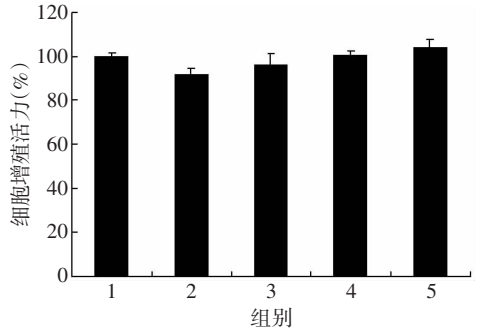
1.8　统计学分析

数据采用 Excel 进行采集录入,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 GraphPad Prism 6.0 软件对数据进行统计作图,多组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　DHM 对脂肪变性肝细胞增殖活力的影响

用 0.2 mmol/L PA 和不同浓度 DHM 单独或联合处理 HepG2 细胞,各组细胞增殖活力差异没有统计学意义($P>0.05$,图 1)。



1:对照组;2:PA 组;3:PA + 5 μmol/L DHM 组;4:PA + 10 μmol/L DHM 组;5:PA + 20 μmol/L DHM 组

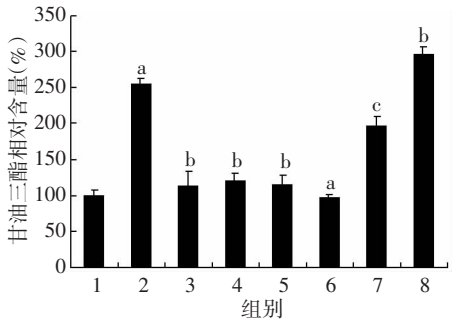
图 1　CCK-8 检测各组脂肪变性 HepG2 细胞增殖活力

2.2　DHM 抑制肝细胞脂肪变性

2.2.1　DHM 对脂肪变性 HepG2 细胞脂质蓄积的影响　PA 处理 HepG2 细胞 48 h 能显著增加细胞内脂质蓄积(图 2A、B);不同浓度 DHM 处理后,细胞内脂质蓄积程度随干预浓度升高而明显减少(图 2C ~ E);20 μmol/L DHM 也能在一定程度上减少细胞内正常的脂质蓄积(图 2F)。

2.2.2　DHM 对脂肪变性 HepG2 细胞 TG 含量的影响

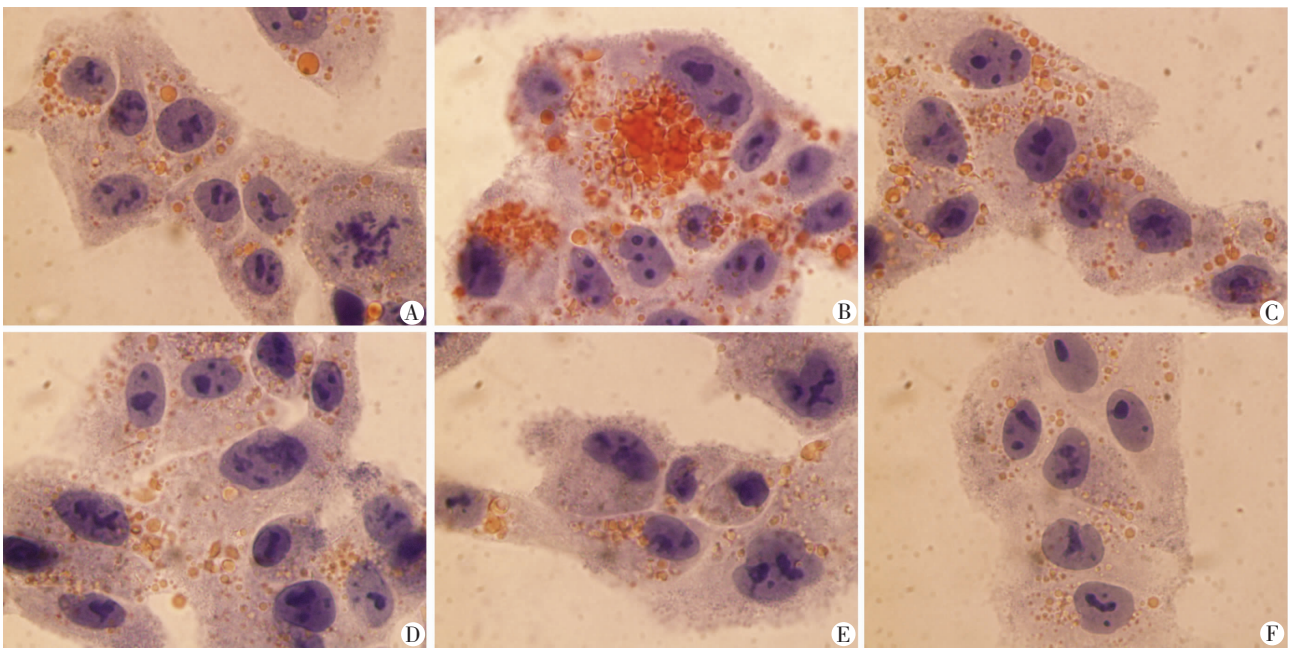
PA 处理细胞 48 h 后能显著增加细胞内的 TG 含量($P<0.05$),不同浓度 DHM 干预后 TG 含量明显降低($P<0.05$)。EX527 处理后 DHM(20 μmol/L)对细胞内 TG 含量的减少作用被显著抑制($P<0.01$);与 PA 组相比,EX527 处理后 TG 含量进一步升高($P<0.05$,图 3)。



1:对照组;2:PA 组;3:PA + 5 μmol/L DHM 组;4:PA + 10 μmol/L DHM 组;5:PA + 20 μmol/L DHM 组;6:20 μmol/L DHM 组;7:PA + 20 μmol/L DHM + EX527 组;8:PA + EX527 组

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较;c:$P<0.01$,与 PA + 20 μmol/L DHM 组比较

图 3　各组脂肪变性 HepG2 细胞甘油三酯含量的变化

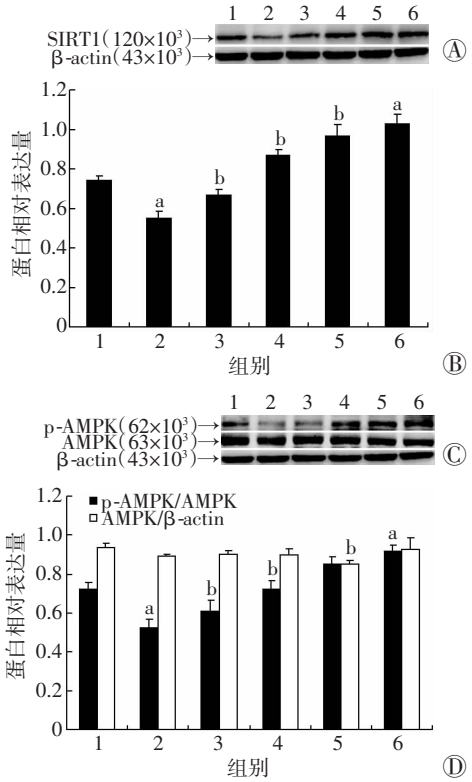


A:对照组;B:PA 组; C:PA + 5 μmol/L DHM 组;D:PA + 10 μmol/L DHM 组;E:PA + 20 μmol/L DHM 组;F:20 μmol/L DHM 组

图 2　油红 O 染色观察各组脂肪变性 HepG2 细胞脂质蓄积的变化　(倒置显微镜　×400)

2.3 DHM 对脂肪变性 HepG2 细胞 p-AMPK 和 SIRT1 蛋白表达的影响

PA 处理 HepG2 细胞后,p-AMPK 和 SIRT1 的蛋白表达明显降低($P<0.05$),使用不同浓度 DHM 干预 24 h 后,二者蛋白表达却随 DHM 浓度的升高而增加($P<0.05$、$P<0.01$,图 4)。



1:对照组;2:PA 组;3:PA + 5 μmol/L DHM 组;4:PA + 10 μmol/L DHM 组;5:PA + 20 μmol/L DHM 组;6:20 μmol/L DHM 组;A:Western blot 检测 SIRT1 表达;B:SIRT1 蛋白半定量分析;C:Western blot 检测 p-AMPK、AMPK 表达;D: p-AMPK、AMPK 蛋白半定量分析;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较

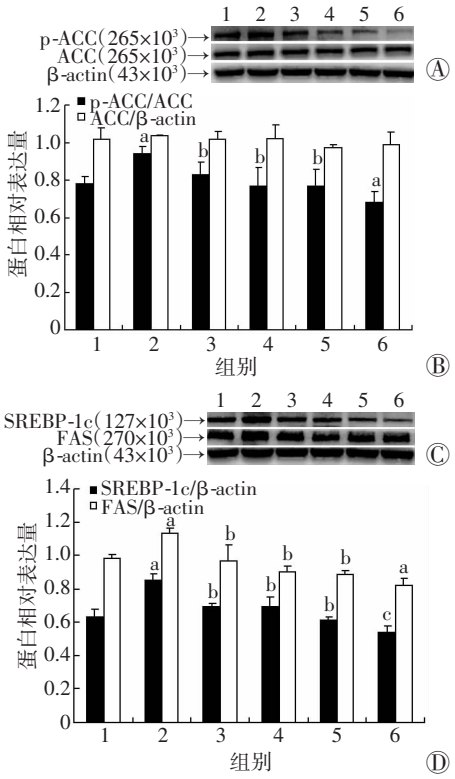
图 4 Western blot 检测各组脂肪变性 HepG2 细胞 SIRT1 和 p-AMPK 蛋白的表达

2.4 DHM 对脂肪变性 HepG2 细胞脂质合成相关基因蛋白表达的影响

PA 处理 HepG2 细胞 24 h 后,SREBP-1c、FAS、p-ACC 蛋白表达明显增加($P<0.05$),使用不同浓度 DHM 处理后降低了 SREBP-1c、FAS、p-ACC 蛋白表达($P<0.05$,图 5)。

2.5 抑制 SIRT1 后 DHM 对脂质合成相关基因蛋白表达的影响

与 PA 组比较,PA + 20 μmol/L DHM 组 SREBP-1c、FAS、p-ACC 表达被显著抑制($P<0.01$),EX527 处理后明显减弱了 20 μmol/L DHM 对脂质合成基因 SREBP-1c、FAS、p-ACC 表达的抑制作用($P<0.05$,图 6)。



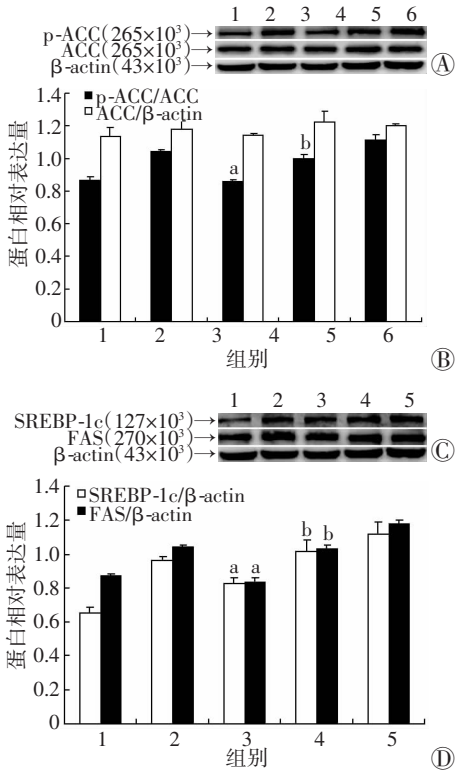
1:对照组;2:PA 组;3:PA + 5 μmol/L DHM 组;4:PA + 10 μmol/L DHM 组;5:PA + 20 μmol/L DHM 组;6:20 μmol/L DHM 组;A:Western blot 检测 p-ACC、ACC 表达;B:p-ACC、ACC 蛋白半定量分析 a:$P<0.05$,与对照组较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较;C:Western blot 检测 SREBP-1c、FAS 表达;D:SREBP-1c、FAS 蛋白半定量分析 a:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 PA 组比较

图 5 Western blot 检测各组脂肪变性 HepG2 细胞脂质合成蛋白的表达变化

3 讨论

近年来,在包括我国在内的许多国家,NAFLD 已经成为慢性肝损伤的重要病因。有学者预测,到 2020 年,NAFLD 导致的肝脏功能衰竭将成为肝移植的主要原因,造成极大的社会和经济负担,严重威胁人类健康[10]。因此,积极探索防治 NAFLD 的安全有效措施是一项十分迫切的任务。

NAFLD 发病机制十分复杂,目前尚未完全解释清楚。医学界普遍认可的是 Day 和 James 提出的“二次打击”学说[11],并在此基础上发展为“多重打击”学说。肝脏脂质代谢紊乱与脂质蓄积是 NAFLD 关键的发病诱因[12],在 NAFLD 病程中起着重要作用。文献[13]报道,NAFLD 患者脂代谢紊乱较常见,而富余脂



1:对照组;2:PA 组;3:PA + 20 μmol/L DHM 组;4:PA + 20 μmol/L DHM + EX527 组;5:PA + EX527 组;A:Western blot 检测 p-ACC、ACC 表达;B: p-ACC、ACC 蛋白半定量分析;C:Western blot 检测 SREBP-1c、FAS 表达;D:SREBP-1c、FAS 蛋白半定量分析;a:$P<0.01$,与 PA 组比较;b:$P<0.05$,与 PA + 20 μmol/L DHM 组及 PA + EX527 组比较

图 6 抑制 SIRT1 后 DHM 对脂肪变性 HepG2 细胞脂质合成蛋白的影响

质沉积是 NAFLD 发生发展的先决条件。近年研究表明,藤茶中的主要活性成分 DHM 具有减轻高脂对肝细胞的损伤、改善 NAFLD 的作用[4-5,14]。而我国藤茶资源丰富,来源广泛,取材方便,利于探究 DHM 对 NAFLD 的改善作用。

本研究通过构建肝细胞脂肪变性模型,模拟 NAFLD 发生时脂质蓄积对肝细胞的损伤作用,探究 DHM 对非酒精性脂肪肝体外模型的改善作用。首先,经油红 O 染色实验观察到 DHM 能使细胞内脂质蓄积明显减少,定量实验也证明 DHM 干预后细胞内 TG 含量显著降低。Western blot 检测显示:DHM 能增加 P-AMPK 及 SIRT1 蛋白表达水平,并且降低脂质合成相关基因 SREBP-1c、FAS、P-ACC 蛋白表达。越来越多的研究表明 SIRT1 在 NAFLD 的病程中起到了关键作用[15],SIRT1 的激活能够抑制脂质合成,调节脂代谢平衡[16]。而 SIRT1 上游靶点 AMPK 的激活能够抑制脂质积累和脂肪酸的增加[17],其磷酸化后通过下调 SREBP-1c 抑制 P-ACC 和 FAS 的表达[13,18],因此 SIRT1 信号通路在调节 NAFLD 脂质代谢平衡中发挥了重要作用,可能成为 NAFLD 治疗的新靶点及寻找防治新药的重要途径[19]。为进一步确定 SIRT1 信号通路在 DHM 改善肝细胞脂质蓄积中的作用,本研究使用 SIRT1 抑制剂 EX527 处理脂肪变性 HepG2 细胞,发现抑制 SIRT1 后 DHM 减少 HepG2 细胞 TG 含量和抑制脂质合成相关基因 SREBP-1c、FAS、P-ACC 表达的作用均被减弱,提示 DHM 通过上调 SIRT1 信号通路、抑制脂质合成、改善肝细胞脂肪蓄积。本研究还发现正常 HepG2 细胞在使用 20 μmol/L DHM 干预后,SIRT1 及 P-AMPK 蛋白表达水平较对照组有显著增加,脂质蓄积和 TG 含量也有明显减少,且 SREBP-1c、FAS、P-ACC 表达水平显著降低。提示 DHM 在激活 SIRT1 和 P-AMPK 表达、减少肝细胞脂质蓄积方面具有积极的作用。

综上所述,本研究发现 DHM 能够激活脂肪变性 HepG2 细胞中的 SIRT1 信号,降低相关脂质合成基因的蛋白表达,减少细胞内 TG 水平,改善肝细胞脂肪蓄积,为开发更加安全有效的 NAFLD 治疗药物提供理论支持,为 NAFLD 的临床防治提供新的思路。

参考文献:

[1] McPherson S, Hardy T, Henderson E, *et al*. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management[J]. J Hepatol, 2015, 62(5): 1148 - 1155. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.11.034

[2] Cohen J C, Horton J D, Hobbs H H. Human fatty liver disease: old questions and new insights[J]. Science, 2011, 332(6037): 1519 - 1523. DOI: 10.1126/science.1204265

[3] 唐瑛, 罗祖友, 严奉伟, 等. 藤茶总黄酮对小鼠的体内外抗氧化作用研究[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(12): 1449 - 1452. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-5213.2006.12.001

[4] Chen S, Zhao X, Wan J, *et al*. Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial[J]. Pharmacol Res, 2015, 99: 74 - 81. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.05.009

[5] Shi L, Zhang T, Liang X, *et al*. Dihydromyricetin improves skeletal muscle insulin resistance by inducing autophagy *via* the AMPK signaling pathway[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 409: 92 - 102. DOI: 10.1016/j.mce.2015.03.009

[6] 梁馨予, 张婷, 周永, 等. 杨梅素减轻高糖诱导的血管内皮细胞氧化应激损伤[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(21): 2301 – 2305. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2013.21.006

[7] 王俊杰, 舒洋, 曹欣, 等. 藤茶对非酒精性脂肪性肝病的治疗作用研究[J]. 中国全科医学, 2011, 14(20): 2248 – 2250. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2011.20.006

[8] Zhou Q, Chen K, Liu P, *et al*. Dihydromyricetin stimulates irisin secretion partially via the PGC-1alpha pathway[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 412: 349 – 357. DOI: 10.1016/j.mce.2015.05.036

[9] Zhang Y, Chen M L, Zhou Y, *et al*. Resveratrol improves hepatic steatosis by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway[J]. Mol Nutr Food Res, 2015, 59(8): 1443 – 1457. DOI: 10.1002/mnfr.201500016

[10] Musso G, Gambino R, Cassader M, *et al*. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2010, 52(1): 79 – 104. DOI: 10.1002/hep.23623

[11] Periasamy S, Chien S P, Chang P C, *et al*. Sesame oil mitigates nutritional steatohepatitis *via* attenuation of oxidative stress and inflammation: a tale of two-hit hypothesis[J]. J Nutr Biochem, 2014, 25(2): 232 – 240. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2013.10.013

[12] Delarue J, Lalles J P. Nonalcoholic fatty liver disease: roles of the gut and the liver and metabolic modulation by some dietary factors and especially long chain n-3 PUFA[J]. Mol Nutr Food Res, 2015, [Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/mnfr.201500346

[13] Zeng L, Tang W J, Yin J J, *et al*. Signal transductions and nonalcoholic fatty liver: a mini-review[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(7): 1624 – 1631. DOI:

[14] Xie J, Liu J, Chen T M, *et al*. Dihydromyricetin alleviates carbon tetrachloride-induced acute liver injury via JNK-dependent mechanism in mice[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(18): 5473 – 5481. DOI: 10.3748/wjg.v21.i18.5473

[15] Xu F, Li Z, Zheng X, *et al*. SIRT1 mediates the effect of GLP-1 receptor agonist exenatide on ameliorating hepatic steatosis[J]. Diabetes, 2014, 63(11): 3637 – 3646. DOI: 10.2337/db14-0263

[16] Colak Y, Ozturk O, Senates E, *et al*. SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Med Sci Monit, 2011, 17(5): HY5 – HY9. DOI: 10.12659/MSM.881749

[17] Nerstedt A, Johansson A, Andersson C X, *et al*. AMP-activated protein kinase inhibits IL-6-stimulated inflammatory response in human liver cells by suppressing phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)[J]. Diabetologia, 2010, 53(11): 2406 – 2416. DOI: 10.1007/s00125-010-1856-z

[18] Jeon T I, Osborne T F. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 23(2): 65 – 72. DOI: 10.1016/j.tem.2011.10.004

[19] Hou X, Xu S, Maitland-Toolan K A, *et al*. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase[J]. J Biol Chem, 2008, 283(29): 20015 – 20026. DOI: 10.1074/jbc.M802187200

(收稿:2015-09-02;修回:2015-10-08)

(编辑 吴培红)