苦参碱对油酸诱导的脂肪变性Chang Liver细胞的影响及机制Δ

阳丽梅*，庄　捷，陈芬燕，黄旭慧#（福建省立医院/福建医科大学省立临床医学院药学部，福州　350001）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）12-1456-04
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.12.09

摘　要　目的　探讨苦参碱对油酸诱导的脂肪变性Chang Liver细胞的改善作用及可能的机制。**方法**　将Chang Liver细胞分为空白组、模型组和苦参碱低、中、高浓度组（0.1、0.5、1.0 mmol/L）。除空白组外，其余各组细胞使用1.0 mmol/L油酸处理24 h建立脂肪变性细胞模型，苦参碱各剂量组加入相应浓度药物干预24 h。检测细胞活性，观察细胞内脂滴形态，测定细胞中的脂质含量，检测细胞中肝功能指标[丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）、总胆红素（TBIL）、碱性磷酸酶（ALP）]含量和法尼醇X受体（FXR）、细胞色素P450 7A1（CYP7A1）、成纤维细胞生长因子19（FGF19）的mRNA及蛋白表达水平。**结果**　油酸和苦参碱对Chang Liver细胞活性无明显影响。经油酸处理后的细胞内可见橘红色脂滴；与空白组比较，其相对脂质含量、肝功能指标水平均显著升高，FXR、CYP7A1、FGF19 mRNA及蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。经低、中、高浓度苦参碱干预后，上述指标均显著逆转（$P<0.05$）。**结论**　苦参碱可通过调控FXR/CYP7A1/FGF19信号通路来改善油酸诱导的脂肪变性Chang Liver细胞的脂质含量和肝功能指标。

关键词　苦参碱；Chang Liver细胞；脂代谢；非酒精性脂肪性肝病

Effect and mechanism of matrine on steatosis Chang Liver cells induced by oleic acid

YANG Limei, ZHUANG Jie, CHEN Fenyan, HUANG Xuhui (Dept. of Pharmacy, Fujian Provincial Hospital/Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of matrine (MT) on steatosis Chang Liver cell model induced by oleic acid (OA) and its possible mechanism. **METHODS** Chang Liver cells were divided into blank group, model group and MT low-dose, medium-dose group and high-dose groups (0.1, 0.5, 1.0 mmol/L). Except for blank group, the other groups were treated with 1.0 mmol/L OA for 24 h to establish steatosis model, and MT groups were given corresponding concentrations of drugs for 24 h. The activities of steatosis Chang Liver cells were observed; the morphologies of intracellular lipid droplets were observed and lipid content was also determined. The contents of liver function indexes [alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total bilirubin (TBIL), alkaline phosphatase (ALP)], as well as mRNA and protein expressions of farnesoid X receptor (FXR), cytochrome P450 7A1 (CYP7A1) and fibroblast growth factor 19 (FGF19) were all detected. **RESULTS** OA and MT had no significant effect on the activity of Chang Liver cells. After OA treatment, orange lipid droplets formed in cytoplasm; compared with blank group, relative lipid content and the levels of liver function indexes were increased significantly, while the mRNA and protein expressions of FXR, CYP7A1 and FGF19 were down-regulated significantly ($P<0.05$). After treatment of low, medium and high concentrations of MT, above indexes were all reversed significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** MT could significantly improve the lipid content and liver function indexes of steatosis Chang Liver cells induced by OA though regulating FXR/CYP7A1/FGF19 signaling pathway.

KEYWORDS　matrine; Chang Liver cells; lipid metabolism; nonalcoholic fatty liver disease

非酒精性脂肪性肝病（nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD）的发病率逐年增加，已成为影响人们健康的重大隐患[1]。苦参碱是豆科植物苦豆子、苦参的活性成分，是苦参碱类生物碱的代表[2]，具有抗炎、抗免疫性肝损伤、改善肝脏微循环、促进胆汁分泌等作用，临床可用于急慢性黄疸型肝炎、胆汁淤积性肝炎的治疗[3-4]。本课题组前期研究证实，苦参碱可通过调控法尼醇X受体（farnesoid X receptor，FXR）-细胞色素P450（CYP）7A1通路改善大鼠胆汁淤积性肝损伤[4]。胆汁酸代谢异常在NAFLD发病中起了较为重要的作用，而FXR作为一种可被胆汁酸激活的核受体，可调控小异二聚体配体、成纤维细胞生长因子19（fibroblast growth factor 19，FGF19）、胆汁酸外排转运体等的表达，在胆汁酸合成、转运和代谢中发挥重要作用[5-8]。基于此，本研究选择FXR的下游靶基因*FGF19*作为探索新方向，利用油酸诱导的脂肪变性Chang Liver细胞模型探讨苦参碱对NAFLD的改善作用及可能的机制，为拓展苦参碱在肝病治疗中的应用范围提供参考。

Δ **基金项目**　福建省卫生健康科研人才-中青年骨干人才培养项目（No.2019-ZQN-34）

＊ **第一作者**　副主任药师，硕士。研究方向：临床药理学。电话：0591-88216353。E-mail：yanglimei_214@163.com

通信作者　主任药师。研究方向：临床药理学。电话：0591-88216353。E-mail：huangys1024@163.com

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Ts2-FL型倒置显微镜（日本Nikon公司），PowerPac 200型蛋白垂直电泳仪、ChemiDoc Touch型化学发光成像系统、680型酶标仪（美国Bio-Rad公司），QuantStudio 1型荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国ABI公司）等。

1.2 主要药品与试剂

苦参碱原料药（纯度≥98%，批号X05J6M6）购自上海源叶生物科技有限公司；油红O（批号O405866）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；胰蛋白酶（批号0457）购自美国Amresco公司；CCK8试剂盒（批号ab228554）购自阿达玛斯试剂有限公司；Total RNA提取试剂（批号9109）购自日本Takara公司；逆转录试剂盒（gDNA清除剂）、NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus（批号分别为E047-01A、E096-01B）均购自创亚化工（上海）有限公司；兔源FXR抗体、小鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG（H+L）、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG（H+L）（批号分别为13194-1-AP、60004-I-Ig、SA00001-1、SA00001-2）均购自美国Proteintech公司；兔源FGF19、CYP7A1抗体（批号分别为PB1116、A01601）均购自博士德生化科技有限公司；人丙氨酸转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）、总胆红素（total bilirubin，TBIL）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（批号分别为JL45974、JL12187、JL20094、JL13265）均购自上海江莱生物科技有限公司；其余试剂均为分析纯或实验室常用规格。

1.3 细胞

人正常肝细胞系Chang Liver由武汉塞维尔生物科技有限公司提供，货号SE0021。

2 方法

2.1 细胞培养

Chang Liver细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 g/mL链霉素的RPMI-1640培养基中，于37 ℃、5%CO_2下培养，待细胞融合至80%左右开始传代。

2.2 细胞分组与给药

将细胞分为空白组、模型组和苦参碱低、中、高浓度组。空白组不进行干预；模型组细胞饥饿24 h后加入1.0 mmol/L油酸（根据文献[9]和预实验结果得到）继续培养24 h建立脂肪变性细胞模型；苦参碱低、中、高浓度组细胞先按模型组方法建模后再加入0.1、0.5、1.0 mmol/L苦参碱溶液（用二甲基亚砜配成2 mmol/L的母液，临用前用生理盐水制成所需溶液[10]）继续培养24 h。

2.3 细胞活性检测

取对数生长期的Chang Liver细胞，以5×10^8个/L接种于6孔板中，每孔100 μL，待细胞密度达80%～90%时，将细胞消化计数，按8×10^7个/L接种于96孔板中，培养至细胞达60%融合时，按“2.2”项下方法分组、给药、培养，每组设8个复孔。待细胞培养结束后，按CCK8试剂盒说明书操作，用酶标仪检测450 nm波长处的光密度（optical density，OD），计算细胞存活率。细胞存活率＝实验组平均OD值/空白组平均OD值×100%。

2.4 细胞内脂滴观察及脂质含量测定

按“2.3”项下方法取细胞，分组、给药、培养，每组设8个复孔。待细胞培养结束后，弃培养基，用预热的磷酸盐缓冲液（PBS）清洗3次，加入4%多聚甲醛固定30 min，以60%异丙醇溶液漂洗数秒，用油红O避光染色30 min，再用60%异丙醇溶液分色，苏木精复染，PBS漂洗，甘油明胶封片，用倒置显微镜观察脂滴形态并拍照。取上述经油红O处理后的细胞，每孔加入异丙醇200 μL，孵育15 min后抽提，取抽提液200 μL加入96孔板中，用酶标仪检测490 nm波长处的OD值，计算相对脂质含量。相对脂质含量＝实验组平均OD值/空白组平均OD值×100%。

2.5 细胞中肝功能指标检测

按“2.3”项下方法取细胞，分组、给药、培养，每组设3个复孔。待细胞培养结束后，取培养液，按试剂盒说明书操作，检测其中ALT、AST、TBIL、ALP的含量。

2.6 细胞中FXR、CYP7A1、FGF19 mRNA表达检测

按“2.3”项下方法取细胞，分组、给药、培养，每组设3个复孔。待细胞培养结束后，取各组细胞，弃培养液，用PBS清洗2次，加入1 mL的Total RNA提取试剂，吹打混匀，室温放置5 min，移至离心管中，加入氯仿200 μL，充分混匀，室温静置5 min，离心12 min（4 ℃下，转速12 000 r/min，下同）。取400 μL上清液至新的离心管中，加入异丙醇400 μL，混匀，－20 ℃下放置15 min，离心10 min，弃上清液，静置，加入1 mL预冷的75%乙醇，离心5 min，弃上清液，加入20 μL ddH_2O，充分溶解RNA，测定RNA浓度及纯度后，逆转录成cDNA，并进行PCR扩增。反应体系为：2×qPCR SuperMix Plus 12.5 μL，7.5 μmol/L基因引物2.0 μL，逆转录产物2.5 μL，ddH_2O 8.0 μL。扩增条件为：95 ℃预变性1 min；95 ℃变性20 s，56 ℃退火20 s，72 ℃延伸30 s，共40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算细胞中FXR、CYP7A1、FGF19 mRNA的表达水平。引物由福州尚亚生物技术有限公司合成，序列和产物大小见表1。

表1 引物序列与产物大小

基因	上游引物（5′-3′）	下游引物（5′-3′）	产物大小/bp
GAPDH	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT	113
FXR	CAGGAGCCACTTCTTGATGT	TGGTGATGATTGAATGTCCGTAA	119
CYP7A1	TCTACCCAGACCCTTTGACTTT	GCGAACAATCTTCCAGGACATAT	151
FGF19	CAATGTGTACCGATCCGAGAAG	TGGGCAGGAAATGAGAGAGT	110

2.7 细胞中FXR、CYP7A1、FGF19蛋白表达检测

按“2.3”项下方法取细胞，分组、给药、培养，每组设3个复孔。待细胞培养结束后，取各组细胞，用PBS清洗2～3次，裂解，离心，提取总蛋白。蛋白变性后电泳，转膜、封闭，加入一抗（FXR、CYP7A1、FGF19、GAPDH抗体，稀释比分别为1∶2 000、1∶2 000、1∶800、1∶10 000）、二抗（相应的辣根过氧化物酶标记的IgG，稀释比均为1∶5 000）孵育，显影后，用Image Lab软件分析，以目标蛋白与内参（GAPDH）的灰度值比值评价目标蛋白的表达水平。

2.8 统计学分析

采用SPSS 25.0软件进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 细胞活性和脂质含量变化

油酸和苦参碱对Chang Liver细胞活性无明显影响，结果见图1。经油酸处理后的Chang Liver细胞内可见橘红色脂滴，与空白组比较，其相对脂质含量显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，经低、中、高浓度苦参碱干预后的Chang Liver细胞内橘红色脂滴明显减少，其相对脂质含量均显著降低（$P<0.05$）。结果见图2。

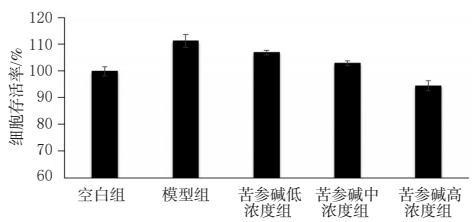
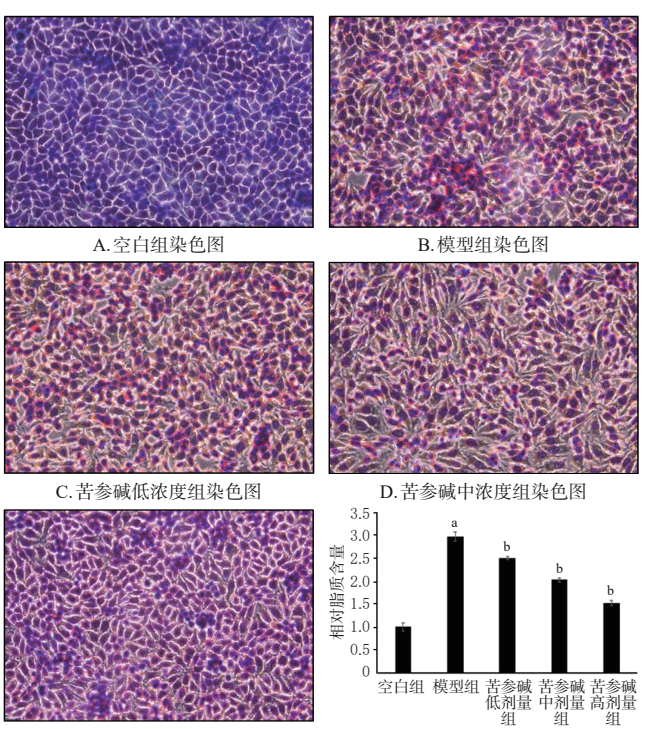


图1 各种细胞活性变化（$n=8$）



a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

图2 各组细胞脂质变化（油红O染色，×100）

3.2 细胞中肝功能指标变化

与空白组比较，模型组细胞中ALT、AST、TBIL、ALP含量均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，苦参碱低、中、高浓度组细胞中ALT（苦参碱低浓度组除外）、AST、TBIL、ALP含量均显著降低（$P<0.05$），结果见表2。

表2 各组细胞中肝功能指标变化（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

分组	ALT/（ng/mL）	AST/（U/L）	TBIL/（μmol/L）	ALP/（U/L）
空白组	0.358±0.011	35.375±0.455	18.313±0.304	36.814±1.502
模型组	0.604±0.026[a]	48.472±6.445[a]	24.629±0.621[a]	51.047±1.162[a]
苦参碱低浓度组	0.532±0.020	41.340±1.139[b]	22.751±0.393[b]	44.992±0.997[b]
苦参碱中浓度组	0.478±0.015[b]	39.569±0.798[b]	21.122±0.295[b]	42.531±0.261[b]
苦参碱高浓度组	0.389±0.014[b]	37.715±0.450[b]	18.880±0.432[b]	37.770±0.299[b]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.3 细胞中FXR、CYP7A1、FGF19 mRNA表达变化

与空白组比较，模型组细胞中FXR、CYP7A1、FGF19 mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，苦参碱低、中、高浓度组细胞中FXR、CYP7A1、FGF19 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$），结果见表3。

表3 各组细胞中FXR、CYP7A1、FGF19 mRNA表达变化（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

分组	FXR	CYP7A1	FGF19
空白组	1.000±0.041	1.000±0.071	1.000±0.072
模型组	0.339±0.033[a]	0.233±0.017[a]	0.359±0.028[a]
苦参碱低浓度组	0.493±0.037[b]	0.353±0.017[b]	0.508±0.029[b]
苦参碱中浓度组	0.553±0.024[b]	0.497±0.028[b]	0.570±0.005[b]
苦参碱高浓度组	0.808±0.036[b]	0.825±0.001[b]	0.776±0.014[b]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

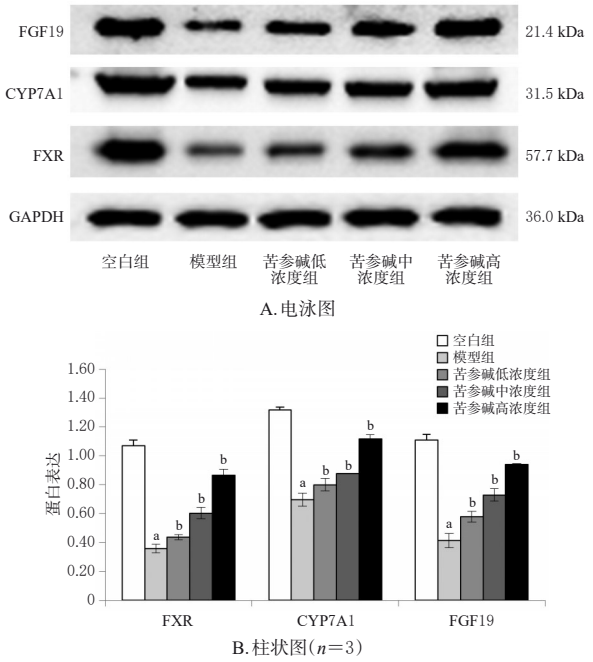
3.4 细胞中FXR、CYP7A1、FGF19蛋白表达变化

与空白组比较，模型组细胞中FXR、CYP7A1、FGF19蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，苦参碱低、中、高浓度组细胞中FXR、CYP7A1、FGF19蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$），结果见图3。

4 讨论

既往的研究证实了苦参碱在NAFLD中的治疗潜力。唐彬等[11]探索了苦参碱对脂肪肝模型大鼠的改善作用，结果显示，苦参碱能够显著降低肝指数和肝组织以及血清中的脂质指标，阻止肝细胞变性坏死，抑制炎症损伤。艾正琳等[12]研究了苦参碱的抗氧化作用并观察其治疗NAFLD模型大鼠的疗效，结果显示，苦参碱可以显著降低模型大鼠的ALT和AST水平。本课题组前期研究证实，苦参碱对大鼠胆汁淤积性肝损伤以及石胆酸诱导的肝损伤细胞系均有较好的改善作用[4,10]。本研究进一步采用体外研究方法，证实苦参碱不仅可以降低Chang Liver细胞的脂质含量，还可以改善Chang Liver细胞的肝功能指标，因此推测苦参碱在NAFLD的治疗中也具有较好的潜力。

FXR是核受体超家族中的重要一员，其不仅参与机体的胆汁酸代谢，还在糖类、脂质和烃类等物质的代谢过程中发挥了重要作用，能维持机体的代谢平衡和正常



a:与空白组比较,$P<0.05$;b:与模型组比较,$P<0.05$

图3　各组细胞中FXR、CYP7A1、FGF19蛋白表达变化

功能[13]。已有研究证实,FGF19、FGF21水平变化与NAFLD的发生、发展密切相关,其中FGF19是肝脏脂质代谢所必需的调节因子[13—15]。林浩等[16]研究发现,高剂量的奥贝胆酸能显著上调FXR蛋白及其基因的表达,并抑制CYP7A1蛋白及其基因的表达,显著改善NAFLD模型大鼠肝功能及肝组织病理状态。于露等[17]研究发现,双蒺调脂汤可上调清道夫受体B成员1/CYP7A1/FXR信号通路的表达,促进胆汁酸合成,从而降低高胆固醇模型大鼠的血脂水平,改善肝脏脂质代谢。于温温等[18]研究发现,贻贝多糖可通过显著上调脂蛋白E基因敲除小鼠肝组织中FXR、CYP7A1的蛋白表达来改善高脂饮食诱导的NAFLD。由此可见,不同的药物对FXR/CYP7A1信号通路的影响不尽相同,这可能是由于FXR调节机体代谢的过程复杂,参与调控的转运体、代谢酶和信号通路繁多的缘故。本研究结果显示,经油酸处理后的Chang Liver细胞中FXR、CYP7A1、FGF19蛋白和mRNA表达均显著降低,经苦参碱干预后,上述蛋白和mRNA表达均显著回调,且随着苦参碱浓度增加,回调比例也随之增加。

综上所述,苦参碱可通过调控FXR/CYP7A1/FGF19信号通路来改善油酸诱导的脂肪变性Chang Liver细胞的脂质含量和肝功能指标。

参考文献

[1] 阿卜力克木·奥布力,程磊,黄凤玲,等.采用Chang liver细胞制备肝细胞脂肪变性模型的方法探索[J].重庆医学,2014,43(33):4494-4497.

[2] 李桂,董松涛,董占军.基于抗氧化应激作用改善肝纤维化的天然产物的研究概况[J].中国药房,2019,30(19):2731-2736.

[3] 刘晶晶,牟艳玲.苦参碱抗肿瘤作用机制的研究进展[J].中国药房,2017,28(19):2707-2711.

[4] 阳丽梅,黄旭慧,张倩文,等.苦参碱预防大鼠胆汁淤积性肝损伤作用机制的研究[J].福建医药杂志,2019,41(5):8-12.

[5] 康丽.基于胆汁酸转运体和代谢酶的何首乌致肝损伤机制研究[D].武汉:华中科技大学,2017.

[6] 李静.基于FXR调控胆汁酸稳态的柴胡低极性部位抗抑郁作用研究[D].太原:山西大学,2021.

[7] 冯红.法尼醇X受体在齐墩果酸诱导的小鼠胆汁淤积型肝损伤中的作用[D].遵义:遵义医科大学,2020.

[8] 高雪彬,黄国慧,辛妍,等.胆汁酸代谢异常在非酒精性脂肪性肝病病程进展中的作用[J].海南医学,2022,33(4):518-521.

[9] 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.

[10] 阳丽梅,陈淑芳,黄旭慧,等.苦参碱调控PXR-CYP3A4通路对石胆酸诱导肝损伤细胞系的保护作用[J].中国药学杂志,2020,55(21):1802-1806.

[11] 唐彬,艾正琳,姚树坤.苦参碱对高脂-脂肪肝模型大鼠肝脏COX-2、iNOS表达的影响[J/OL].中华临床医师杂志(电子版),2013,7(5):2011-2015[2023-01-02].http://dx.doi.org/10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.05.038.

[12] 艾正琳,谢步善,姚树坤.苦参碱治疗非酒精性脂肪性肝炎大鼠的效果观察[J].临床肝胆病杂志,2016,32(11):2163-2166.

[13] ALVAREZ-SOLA G,URIARTE I,LATASA M U,et al.Fibroblast growth factor 15/19(FGF15/19)protects from diet-induced hepatic steatosis:development of an FGF19-based chimeric molecule to promote fatty liver regeneration[J].Gut,2017,66(10):1818-1828.

[14] 肖艳新,王君,赵新翠.非酒精性脂肪肝患者血清FGF19、FGF21水平变化及相关因素分析[J].现代消化及介入诊疗,2020,25(12):1637-1640.

[15] ZHOU M,LEARNED R M,ROSSI S J,et al.Engineered FGF19 eliminates bile acid toxicity and lipotoxicity leading to resolution of steatohepatitis and fibrosis in mice[J].Hepatol Commun,2017,1(10):1024-1042.

[16] 林浩,梁大伟,曾建峰,等.奥贝胆酸对非酒精性脂肪肝大鼠法尼醇X受体及细胞色素P450家族成员7A1基因表达的影响[J].解剖学报,2018,49(1):49-55.

[17] 于露,鲁海菲,李若绮,等.双蒺调脂汤对高胆固醇血症大鼠肝组织SRB1/CYP7A1/FXR信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(3):47-55.

[18] 于温温,张金华,刘云娜,等.贻贝多糖对高脂饮食诱导的载脂蛋白E基因敲除小鼠非酒精性脂肪肝的改善作用[J].食品工业科技,2022,43(24):369-376.

(收稿日期:2023-01-03　修回日期:2023-06-01)

(编辑:邹丽娟)