论　著

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001047

氧化苦参碱改善棕榈酸诱导的 HepG2 细胞脂质沉积及氧化应激的研究

费雯婕[1],张　琳[1],段力园[3],宋光耀[2],任路平[2]

(1. 河北医科大学研究生学院,石家庄　050017;2. 河北省人民医院内分泌科,石家庄　050051;
3. 河北省老年医学实验室,石家庄　050051)

【摘　要】目的:观察氧化苦参碱对高脂诱导的 HepG2 细胞脂质沉积的干预作用及其机制。**方法**:高脂干预法培养 HepG2 细胞建立非酒精性脂肪性肝(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)体外细胞模型。造模成功后随机分为高脂组(Pa 组)、氧化苦参碱组(Omt 组)和二甲双胍组(Met 组),同时设立正常培养基对照组(N 组)。药物干预 48 h 后收集细胞,利用相应试剂盒及 2,7-二氯氢化荧光素二乙酸酯(2,7-dichlorofuorescin diacetate ,DCFH-DA)荧光探针评估各组细胞内的脂质沉积水平和氧化应激状态;通过 PCR 和 Western blot 分别检测参与脂代谢关键分子的基因和蛋白表达。**结果**:与 Pa 组相比,氧化苦参碱及二甲双胍干预后可显著降低细胞内甘油三酯(triglyceride,TG)含量(P_{Omt}=0.023,P_{Met}=0.043),上调肉碱脂酰转移酶-1(carnitine palmitoyl transferase-1,CPT-1)的 mRNA 表达(P_{Omt}=0.000,P_{Met}=0.000),下调脂肪酸转位酶(fatty acid translocase,FAT/CD36)的 mRNA(P_{Omt}=0.000,P_{Met}=0.000)及蛋白表达水平(P_{Omt}=0.000,P_{Met}=0.000);DCFH-DA 荧光染色、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase,T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathion peroxidase,GSH-Px)及丙二醛(malondialdehyde,MDA)的测定结果显示药物干预可显著增强 T-SOD(P_{Omt}=0.007,P_{Met}=0.007)及 GSH-Px(P_{Omt}=0.183,P_{Met}=0.020)的活性,减少活性氧(reactive oxygen species,ROS)和 MDA(P_{Omt}=0.016,P_{Met}=0.001)的生成。**结论**:氧化苦参碱可改善高脂诱导的 HepG2 细胞细胞内脂质沉积,可能是通过改善脂代谢及细胞内氧化应激状态实现的。

【关键词】非酒精性脂肪性肝病;氧化苦参碱;氧化应激;HepG2 细胞;脂代谢

【中图分类号】R589.2　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-04-05

Effect of oxymatrine on lipid accumulation in Hepg2 cells exposed to palmitic acid

Fei Wenjie[1], Zhang Lin[1], Duan Liyuan[3], Song Guangyao[2], Ren Luping[2]

(1. Graduate Institute of Hebei Medical University; 2. Department of Endocrinology, General Hospital of Hebei; 3. Geriatric Laboratory of Hebei Province)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of oxymatrine on lipid accumulation in HepG2 cells exposed to high fat intervention and to elucidate the molecular mechanism. ***Methods***: Nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD) in HepG2 cells was induced by cultured with medium containing 0.25 mmol/L palmitic acid(Pa). The concentrations of triglyceride in HepG2 cells were measured by red oil O staining and triglyceride assay kit. After successful modeling, the Pa-medium group were randomly divided into 3 groups: Pa group (0.25 mmol/L), metformin(Met) group(0.2 mg/mL), oxymatrine(Omt) group(0.08 mg/mL). The normal-medium(N) group was established at the same time. After 48 h of drug intervention, the cells were collected respectively. Triglyceride content and the related markers of oxygen stress were measured by kits and 2,7-dichlorofuorescin diacetate(DCFH-DA) staining. The expressions of the key mediators involved in fatty acid transportation and oxidation were examined by real time PCR(qRT-PCR) and Western blot. ***Results***: Red oil O staining and measurement of triglyceride(TG) showed that there were lipid accumulation in HepG2 cells exposed to palmitic acid for 24 h, while the lipid accumulation ameliorated obviously after oxymatrine and metformin administration (P_{Omt}=0.023,P_{Met}=0.043). Compared with Pa group, oxymatrine and metformin administration increased the mRNA expression of carnitine palmitoyl transferase-1(CPT-1)(P_{Omt}=0.000,P_{Met}=0.000), and suppressed the mRNA(P_{Omt}=0.000,P_{Met}=

作者介绍:费雯婕,Email:lucyonestudent@126.com,研究方向:内分泌与代谢病。

通信作者:宋光耀,Email:sguangyao2@163.com。

基金项目:国家自然基金资助项目(编号:81370900)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161116.1654.010.html (2016-11-16)

0.000) and protein (P_{Oxm}=0.000, P_{Met}=0.000) expression of CD36 simultaneously. After the treatment with oxymatrine and metformin, the generation of reactive oxygen species(ROS) and malondialdehyde(MDA)(P_{Oxm}=0.016, P_{Met}=0.001) reduced significantly, while the activities of total superoxide dismutase(T-SOD)(P_{Oxm}=0.007, P_{Met}=0.007) and glutathion peroxidase(GSH-Px)(P_{Oxm}=0.183, P_{Met}=0.020) increased. ***Conclusion***: Oxymatrine could alleviate lipid accumulation in HepG2 cells exposed to palmitic acid through reducing the long-chain fatty acid uptake, increasing the β-oxydation and improving oxygen stress state.

【Key words】nonalcoholic fatty liver disease; oxymatrine; oxidative stress; HepG2 cells; lipid metabolism

非酒精性脂肪性肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是对一类与脂肪肝相关疾病的总称，前期主要表现为以肝内脂质沉积为主要特征的脂肪肝，后期可增加非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化及肝癌的发病风险。NAFLD 与 2 型糖尿病、代谢综合征、心脑血管疾病等多种代谢疾病密切相关。1998 年 Day 和 James[1]提出的 NAFLD“二次打击”学说，指出 NAFLD 的“初次打击”是肝脏脂质沉积、胰岛素抵抗及脂代谢调节异常，而炎症因子、线粒体功能障碍及氧化应激则为 NAFLD 的“二次打击”。因此，改善 NAFLD 脂质沉积及氧化应激状态成为 NAFLD 药物研发的热点。

氧化苦参碱是从中药苦参中提取的一种单体成分，属于苦参类生物碱，既往研究表明氧化苦参碱具有抗炎性反应、抗肿瘤、抗纤维化及免疫调节等多种药理学功能[2-4]。近来研究表明氧化苦参碱可显著改善 NAFLD 患者的肝功能，增强患者的胰岛素敏感性[5]，这种作用是否通过调节肝脏氧化应激途径目前尚不十分明确。

本课题组前期动物试验表明氧化苦参碱可改善胰岛素抵抗大鼠的胰岛素抵抗和脂代谢[6]。因此，本研究拟在体外细胞水平，通过高脂诱导 HepG2 细胞建立 NAFLD 体外细胞模型，进一步研究氧化苦参碱改善肝脏脂质沉积的分子机制，为临床用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人肝肿瘤系 HepG2 细胞购于江苏省江阴康众康民生物医药技术有限公司，批号：HUCL-0085。

1.1.2 药物与试剂 MEM 培养基、非必需氨基酸、胎牛血清(美国 Hyclone 公司)，青霉素、链霉素(华北制药有限公司)，胰酶、DMSO(北京索莱宝科技有限公司)、棕榈酸(Pa，美国 Sigma 公司)，盐酸二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司)，甘油三酯(triglyceride, TG)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathion peroxidase, GSH-Px)测试盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测试盒(南京建成生物工程公司)，脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)兔单克隆抗体、CD36 兔单克隆抗体、抗 β-actin 小鼠单克隆抗体(美国 Signalway Antibody 公司)、乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)兔单克隆抗体(美国 Cell Signal Technology 公司)、硬脂酰辅酶 A 脱饱和酶(stearoyl-CoA desaturase-1, SCD-1)鼠单克隆抗体(英国 Abcam 公司)，辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体、高灵敏度化学发光检测试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)；引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞常规培养 从液氮储存罐中取出冻存的细胞株，复苏培养，培养基为 MEM 培养基(含 10%胎牛血清，1%非必需氨基酸，1%双抗，88% MEM 培养基)，置 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养，24 h 后更换培养基，细胞为单层贴壁生长，当细胞贴壁大于 85%时(对数生长期)可传代培养。

1.2.2 HepG2 细胞 NAFLD 模型的建立 用 10% FBS 的 MEM 培养基在 37 ℃、含 5%CO_2 的细胞培养箱中孵育，当 HepG2 细胞生长至约 80%融合时，将细胞消化、吹打混匀，调整细胞密度为 10^6 个/L 左右，转移至 6 孔板或细胞培养瓶中。待细胞贴壁后，改用新配制的含 0.25 mmol/L Pa 的MEM 培养基，培养 24 h。

1.2.3 NAFLD 模型鉴定

1.2.3.1 油红 O 染色 称取 0.5 g 油红干粉溶于少量异丙醇中，然后加至异丙醇溶液中，形成 100 mL 体系，作为储存液 4 ℃避光长期保存。先轻缓倒去细胞培养基，并用 PBS 轻缓漂洗，加入 10%中性甲醛固定 30 min 后，配制油红 O 染色液，按照油红储存液与去离子水体积比为 3:2 的比例稀释油红储存液，滤纸过滤，室温静置 10 min；将油红 O 染色液轻缓导入培养皿中，染色 120 min 左右，再用去离子水轻缓漂洗，最后在显微镜下观察，拍照。

1.2.3.2 细胞内 TG 含量测定 采用 GPO-PAP 发测定，按照 TG 测定试剂盒提供的操作方法进行。

1.2.4 实验分组及干预 HepG2 细胞用含 10% FBS 的 MEM 培养基于 37 ℃、含 5% CO_2 的细胞培养箱中孵育，当细胞生长至 80%融合时，消化对数生长期的细胞，然后用上述培养液调整细胞密度为 10^6 个/L，转入 6 孔板、12 孔板、24 孔板、96 孔板或培养瓶中，按照下述方式进行干预后提取细胞分别进行相应指标的检测。对照组（normal group，N 组）用含 5% 胎牛血清的 MEM 培养基培养细胞 72 h。高脂组（palmitic acid group，Pa 组）用含 0.25 mmol/L 棕榈酸、5%胎牛血清的 MEM 培养基培养细胞 72 h。二甲双胍组（metformin group，Met 组）用含 0.25 mmol/L 棕榈酸、5%胎牛血清的 MEM 培养基培养细胞 24 h 后更换为含 0.2 mmol/L 二甲双胍、5%胎牛血清的 MEM 培养基继续培养细胞 48 h。氧化苦参碱组（oxymatrine group，Omt 组）用含 0.25 mmol/L 棕榈酸、5%胎牛血清的 MEM 培养基培养细胞 24 h 后更换为含 0.08 mg/mL 氧化苦参碱、5%胎牛血清的 MEM 培养基继续培养细胞 48 h。

1.2.5 qRT-PCR 法检测脂代谢信号通路相关基因 mRNA 的表达 建立 HepG2 细胞 NAFLD 模型，给予不同的药物干预 48 h 后收集各实验组细胞，用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA，并对 RNA 完整性及纯度进行鉴定，选取 RNA 完整性良好的 RNA 反转录为 cDNA，-20 ℃低温冰箱储存备用。引物使用 DNAMAN 软件进行设计，由上海生物工程有限公司合成。利用 ABI PRISM 7300 PCR 仪进行实时定量 PCR 扩增及荧光检测，PCR 反应参数如下：95 ℃预变性 5 min，随后 95 ℃变性 30 s，58 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，进行 40个循环。目的基因扩增完毕后，以 GAPDH 作为内参基因，计算各目的基因在不同样本中表达水平的相对定量值。GAPDH，正义链：CAAGAAGGTGGTGAAGCAGG，反义链：AAAGGTGGAGGAGTGGGTGT；CD36，正义链：AACTGTGGGCTCATCGC，反义链：GGTCTCCAACTGGCATTAGAA；肉碱脂酰转移酶-1（carnitine palmitoyl transferase-1，CPT-1），正义链：GGATTTCCATTCCTTCCCA，反义链：CTCGTGCGACATTTCTTGAT；脂肪酸合成酶（fatty acid synthase，FAS），正义链：ATGGAGGAGGTGGTGATTG，反义链：CGATGAGGTTGTCCCAGAA；乙酰辅酶 A 羧化酶（acetyl-CoA carboxylase，ACC），正义链：GTAATGCGGTATGGAAGTCG，反义链：TTGTCAGGAAGAGGCGG；硬脂酰辅酶 A 脱饱和酶（stearoyl-CoA desaturase-1，SCD-1），正义链：TGTGTCCCAGATGCTGTCAT，反义链：TCCGTGGCAATGCGTT。

1.2.6 Western blot 法检测各干预组中 FAS、ACC、SCD-1 及 CD36 蛋白表达水平的变化 选取欲处理的细胞，给予含 1 nmol/L 胰岛素的培养基刺激细胞 40 min 后收集细胞、提取蛋白，通过 BCA 法测蛋白浓度。取样品蛋白 50 μg，以聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，湿转移法将蛋白条带转移至 PVDF 膜，含 5%脱脂奶粉的 TBST（含 0.1% Tween20）封闭后依次加入一抗稀释液（β-actin 抗体稀释浓度为 1:5 000，FAS、ACC、SCD-1 及 CD36 抗体稀释浓度为 1:1 000），一抗于摇床上慢摇 4 ℃孵育过夜，次日洗涤后加入二抗稀释液（辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 稀释浓度均为1:5 000）室温摇床慢摇孵育 2 h，洗涤后用 ECL 化学发光法显像曝光，通过凝胶成像系统对 X 线片照像，并使用 AlphaEaseFC 软件进行分析。结果用磷酸化蛋白与其总蛋白的 IOD 值比值或目的蛋白与 β-actin 条带的 IOD 值的比值表示。

1.2.7 2,7- 二氯氢化荧光素二乙酸酯（2,7-dichloro-fuo-rescin diacetate，DCFH-DA）染色 预处理的细胞洗涤后加入 DCFH-DA 染色液，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中避光孵育 40 min 后，洗涤细胞，并在荧光显微镜下（波长 530 nm）观察，拍照留存。

1.2.8 T-SOD 及 GSH-PX 的活性及 MDA 含量的测定 按照相应试剂盒说明进行。

1.3 统计学分析

所有数据处理均采用 SPSS 13.0 软件统计，结果以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。两个样本均数间比较用 t 检验，多个样本均数间比较采用完全随机设计单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验，检验标准 α=0.05。

2 结 果

2.1 各组细胞内脂质沉积水平的评价

油红 O 染色显示 N 组少见细胞红染，Pa 组可见大量脂滴，而 Omt 组和 Met 组较 Pa 组明显减少。与 N 组相比，Pa 组 HepG2 细胞内 TG 含量明显升高（P=0.007）；而 Omt 组和Met 组细胞内 TG 含量较 Pa 组明显降低（P_{Omt}=0.023，P_{Met}=0.043），差异具有统计学意义（图 1，表 1）。

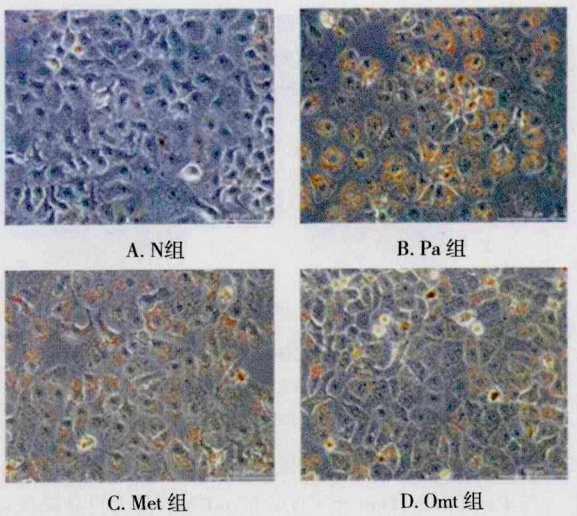


图 1 油红 O 染色比较各组细胞内脂质沉积

Fig.1 Comparison of the intracellular lipid accumulation between subgroups by oil red O staining

表 1 各组间细胞内 TG 含量的比较（mmol/mg 蛋白，$\bar{x} \pm s$）

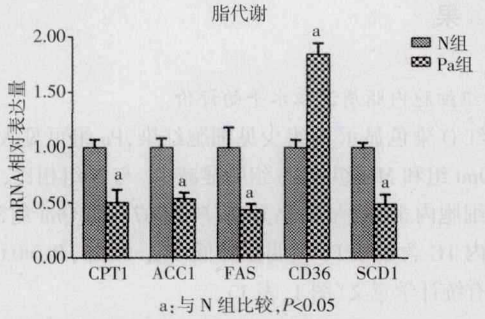
Tab.1 Comparison of the intracellular TG between subgroups（mmol/mg protein，$\bar{x} \pm s$）

组别	TG含量
N组	30.060 ± 3.907
Pa组	57.952 ± 8.935[a]
Met组	39.325 ± 7.195[b]
Omt组	34.942 ± 5.206[b]
F 值	3.417
P 值	0.037

注：a，与 N 组比较，$P<0.05$；b：与 Pa 组比较，$P<0.05$

2.2 棕榈酸干预后 HepG2 细胞内脂代谢相关指标的变化

与 N 组相比，Pa 组 FAS、ACC 及 CPT-1 的 mRNA 表达水平明显下降（$t_{FAS}=6.813$，$P_{FAS}=0.001$；$t_{ACC}=8.187$，$P_{ACC}=0.000$；$t_{CPT-1}=7.070$，$P_{CPT-1}=0.000$），CD36 的 mRNA 表达水平明显升高（$t_{CD36}=-4.737$，$P_{CD36}=0.001$）；Pa 组 FAS、ACC 及 SCD-1 的蛋白水平较 N 组明显降低[（1.043 ± 0.081）vs.（0.712 ± 0.069），$t_{FAS}=3.105$，$P_{FAS}=0.009$；（1.000 ± 0.065）vs.（0.561 ± 0.062），$t_{ACC}=4.851$，$P_{ACC}=0.000$；（1.000 ± 0.069）vs.（0.437 ± 0.063），$t_{SCD-1}=6.011$，$P_{SCD-1}=0.000$]，而 CD36 蛋白表达水平明显升高[（1.000 ± 0.077）vs.（1.894 ± 0.139），$t_{CD36}=-5.616$，$P_{CD36}=0.001$]，以上差异均有统计学意义（图 2、3）。



a：与 N 组比较，$P<0.05$

图 2 棕榈酸干预后脂代谢关键分子 mRNA 表达水平

Fig.2 mRNA levels of the key elements involved in lipid metabolism in HepG2 cells exposed to palmitic acid

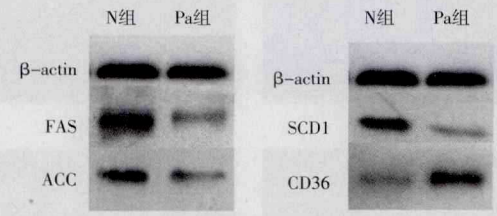
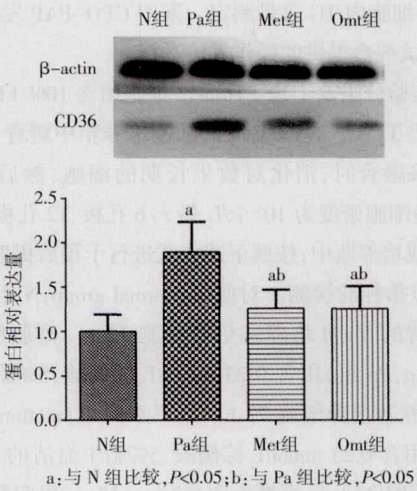


图 3 棕榈酸干预后脂代谢关键分子蛋白表达的变化

Fig.3 Protein levels of the key elements involved in lipid metabolism in HepG2 cells exposed to palmitic acid

2.3 药物干预后脂肪酸转运及氧化利用相关指标的变化

与 Pa 组相比，Omt 组 CD36 的 mRNA 表达明显降低（$P<0.001$），其蛋白表达明显下降[（1.894 ± 0.139）vs.（1.255 ± 0.104），$P=0.000$]，而 CPT-1 基因表达增高（$P<0.001$），以上差异均有统计学意义（图 4，表 2）。



a：与 N 组比较，$P<0.05$；b：与 Pa 组比较，$P<0.05$

图 4 各组间 CD36 蛋白水平的比较

Fig.4 Comparison of the protein levels of CD36 between subgroups

表 2 各组间 CD36 和 CPT-1 mRNA 表达水平的比较（$\bar{x} \pm s$）

Tab.2 Comparison of the mRNA expression levels of CD36 and CPT-1 between subgroups（$\bar{x} \pm s$）

组别	CD36	CPT-1
N组	0.680 ± 0.073	1.958 ± 0.073
Pa组	1.257 ± 0.097[a]	0.987 ± 0.116[a]
Met组	0.717 ± 0.046[b]	1.681 ± 0.053[ab]
Omt组	0.791 ± 0.062[b]	1.455 ± 0.051[ab]
F 值	13.802	27.790
P 值	0.000	0.000

注：a，与 N 组比较，$P<0.05$；b，与 Pa 组比较，$P<0.05$

2.4 药物干预对 HepG2 细胞氧化应激的影响

2.4.1 ROS 含量 分别在荧光显微镜下观察用 DCFH-DA 荧光探针孵育的各组细胞，与 N 组相比，Pa 组的细胞内的绿色荧光明显增强；氧化苦参碱及二甲双胍干预后可显著减少绿色荧光的强度（图 5）。

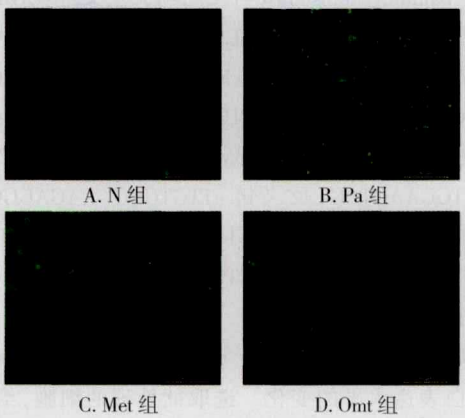


图 5 各组细胞内 ROS 含量的比较（200×）

Fig.5 Comparison of the ROS generation in HepG2 cells between subgroups assessed by DCFH-DA（200×）

2.4.2 抗氧化酶 T-SOD、GSH-Px 及脂质过氧化物 MDA 的含量 HepG2 细胞经棕榈酸干预后，抗氧化酶 GSH-Px、T-SOD 的活性较 N 组均明显下降（P_{GSH-Px}=0.003，P_{T-SOD}=0.003），脂质过氧化物 MDA 的含量明显增加（P_{MDA}=0.001），氧化苦参碱及二甲双胍干预后，细胞内 MDA 含量较 Pa 组均明显下降（P_{Omt}=0.016，P_{Met}=0.001），T-SOD（P_{Omt}=0.007，P_{Met}=0.007）的活性较 Pa 组增高，二甲双胍干预后 GSH-Px 较 Pa 组明显增高，差异具有统计学意义（P_{Met}=0.020），但氧化苦参碱干预组与Pa组相比，差异无统计学差异（P_{Omt}=0.183），见表 3。

表 3 各组间氧化应激指标水平的比较（$\bar{x} \pm s$）

Tab.3 Comparison of the level of oxygen stress markers between subgroups（$\bar{x} \pm s$）

组别	GSH-Px (U/mg 蛋白)	SOD (U/mg 蛋白)	MDA (nmol/mg 蛋白)
N组	152.822 ± 21.118	18.749 ± 1.882	9.896 ± 1.128
Pa组	74.651 ± 12.401[a]	10.017 ± 0.519[a]	18.939 ± 2.014[a]
Met组	131.003 ± 14.426[a]	17.788 ± 1.925[b]	13.236 ± 1.060[b]
Omt组	109.519 ± 13.600[b]	17.794 ± 1.921[b]	10.531 ± 1.371[b]
F 值	5.159	5.918	8.155
P 值	0.016	0.010	0.003

注：a，与 N 组比较，$P<0.05$；b：与 Pa 组比较，$P<0.05$

3 讨 论

NAFLD 是一类与中心性肥胖、胰岛素抵抗及其他代谢综合征因素密切相关的疾病，早期主要表现为肝脏脂质沉积，后期可出现肝小叶炎症反应、肝细胞气球样变、肝纤维化、肝硬化及肝细胞癌等多种病理过程[7]。既往大量研究显示高脂饮食可引起脂肪肝[8-9]。

正常情况下，进入细胞内的游离脂肪酸（free fatty acid，FFA）可通过再酯化为甘油三酯后转运出细胞和参加 β 氧化供能两种方式进行清除，因此本研究通过对肝脏脂质从头合成通路、脂肪酸转运及 β 氧化通路上关键分子的表达水平进行测定，进一步探讨高脂诱导肝细胞内脂质沉积的分子机制。

脂质从头合成过程[10]涉及一系列复杂的胞浆内聚合反应，在 FAS、ACC、二酰甘油酰基转移酶及 SCD-1 这些限速酶的作用下，乙酰辅酶 A 经过一系列代谢反应后最终形成棕榈酸盐，并与甘油以 3:1 的比例形成甘油三酯。本研究结果显示高脂干预 24 h 后，HepG2 细胞 FAS、ACC 及 SCD-1 的 mRNA 及蛋白表达受到抑制，表明高脂干预对 HepG2 细胞内脂质从头合成通路产生抑制作用，提示高脂干预 HepG2 细胞可能不是通过增加脂质从头合成通路导致脂质蓄积。该结果与之前对比高果糖和高脂饮食对肝脏脂代谢不同影响的研究结果一致[11]。

本研究同时测定了脂肪酸转运关键分子（CD36）和 β 氧化的限速酶（CPT-1）表达水平的变化。CD36 是一类高度糖基化的整合膜蛋白，广泛表达于脂肪细胞、骨骼肌细胞、肝细胞、免疫细胞、血管内皮细胞等多种细胞膜上。近年来研究发现 CD36 具有调节脂肪酸转运、免疫反应、炎症反应、血管生成、动脉粥样硬化形成及血栓形成等多种生物学效应[12]。CD36 主要参与调节组织器官从血循环中吸收长链脂肪酸的过程，既往研究发现 NAFLD 患者与肝脏脂肪含量正常的肥胖者相比，前者体内肝脏和骨骼肌细胞上的 CD36 表达明显增加[13]。本研究发现高脂干预 24 h 后，HepG2 细胞内 CD36 的表达水平较正常组明显升高，而氧化苦参碱和二甲双胍药物干预后可明显降低其表达，提示高脂干预可增强脂肪酸的跨膜转运，而药物干预则改善了脂肪酸负荷对其转运的增强作用，减少组织器官对血清中 FFA 的吸收。此外，高脂干预后 CPT-1 的表达较正常组明显降低，而药物干预后其 mRNA 的水平显著上升。综上所述，高脂干预可能是通过增强 FFA 的吸收、减弱 FFA 的氧化而引起肝细胞内脂质沉积，而氧化苦参碱和二甲双胍则通过抑制 FFA 吸收、增加 FFA氧化而直接改善高脂干预所致的细胞内脂质沉积。这一结果与氧化苦参碱可通过抑制脂质从头合成而改善高果糖喂养大鼠肝脏的脂质蓄积有所不同[6]。

氧化应激状态下，机体内活性氧产生过多，伴或不伴有机体抗氧化防御系统受损时，将从减少 ATP 和 NAD+的生成、破坏 DNA 结构、加速蛋白质降解、细胞膜脂质过氧化以及释放大量的炎症因子等多方面导致组织损伤。既往有研究表明通过高脂喂养建立的 NAFLD 动物模型，其体内活性氧及脂质过氧化物的水平明显增加。脂肪酸代谢的旁路途径在胞质内 FFA 蓄积的情况下，通过氧化物酶体 β 氧化和微粒体 ω 氧化，产生大量活性氧[14]。MDA 是膜脂质过氧化最重要的产物之一，是评价膜损伤程度的常用指标。本研究通过测定抗氧化酶系统 GSH-Px 与 T-SOD 的活性，以及脂质过氧化物 MDA 的含量，表

明氧化苦参碱和二甲双胍药物干预后可明显改善细胞内的氧化应激状态，增强抗氧化酶活性、减弱脂质过氧化，从而减轻肝脏脂质沉积的“二次打击”。

综上所述，氧化苦参碱可改善高脂诱导的肝细胞内脂质沉积及细胞内氧化应激状态，其作用可能通过减少 FFA 的吸收、增强 FFA 的氧化利用、增强细胞内抗氧化酶活性及减轻脂质过氧化而实现，具体分子机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?[J]. Gastroenterology, 1998, 114(4): 842-845.

[2] Guo C, Han F, Zhang C, et al. Protective effects of oxymatrine on experimental diabetic nephropathy[J]. Planta Med, 2014, 80(4): 269-276.

[3] Zhang K, Li YJ, Yang Q, et al. Neuroprotective effects of oxymatrine against excitotoxicity partially through down-regulation of NR2B-containing NMDA receptors[J]. Phytomedicine, 2013, 20(3-4): 343-350.

[4] Liu Y, Bi T, Dai W, et al. Oxymatrine synergistically enhances the inhibitory effect of 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo[J]. Tumour Biol, 2016, 37(6): 7589-7597.

[5] 余小虎，朱金水，顾国妹，等. 氧化苦参碱联合二甲双胍对非酒精性脂肪肝患者胰岛素抵抗及血清 TNFα 的影响[J]. 临床肝胆病杂志，2007，23(3)：195-196.

[6] Shi L, Shi L, Zhang H, et al. Oxymatrine ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in rats through peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(2): 439-445.

[7] Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(42): 15539-15548.

[8] van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB, Schaart G, et al. Three weeks on a high-fat diet increases intrahepatic lipid accumulation and decreases metabolic flexibility in healthy overweight men[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(4): E691-E695.

[9] Kelly MA, Usher MJ, Ujvari B, et al. Diet fatty acid profile, membrane composition and lifespan: an experimental study using the blowfly (Calliphora stygia)[J]. Mech Ageing Dev, 2014, 138: 15-25.

[10] Brumbaugh DE, Friedman JE. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Pediatr Res, 2014, 75(1-2): 140-147.

[11] Ren LP, Chan SM, Zeng XY, et al. Differing endoplasmic reticulum stress response to excess lipogenesis versus lipid oversupply in relation to hepatic steatosis and insulin resistance[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30816.

[12] Zhang Y, Zang J, Wang B, et al. CD36 genotype associated with ischemic stroke in Chinese Han[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 16149-16157.

[13] Aguer C, Foretz M, Lantier L, et al. Increased FAT/CD36 cycling and lipid accumulation in myotubes derived from obese type 2 diabetic patients[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28981.

[14] Liu W, Baker SS, Baker RD, et al. Antioxidant mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Curr Drug Targets, 2015, 16(12): 1301-1314.

（责任编辑：唐秋姗）

《重庆医科大学学报》
在线投稿网址：cyxb.alljournals.ac.cn