

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.36.002

灯盏花素在不同时间点对 HepG2 肝细胞 TG 含量的影响及机制探讨*

阳 琰¹, 高 琳^{1△}, 邓华聪², 晏永慧¹, 李显文¹, 王小英¹, 廖 鑫¹, 张 晗¹, 陈其荣¹, 王 茜¹
(1. 遵义医学院附属医院内分泌科 563003; 2. 重庆医科大学附属第一医院 400016)

摘要:目的 通过观察灯盏花素在不同时间点对 HepG2 肝细胞内过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR- α)、载脂蛋白 A5(apoA5)表达和三酰甘油(TG)含量的影响,旨在初步探讨灯盏花素与 PPAR- α 、apoA5、TG 之间的时间依赖关系,为进一步探索灯盏花素调节 TG 代谢的具体机制奠定一定的基础。方法 在前期实验基础上选取 100 mmol/L 灯盏花素,处理 HepG2 细胞不同时间点:(1)0 h(空白对照组);(2)6 h 组;(3)12 h 组;(4)24 h 组;(5)36 h 组;(6)48 h 组;检测各组细胞内 PPAR- α 、apoA5 基因、蛋白表达水平和 TG 含量。结果 灯盏花素可升高 HepG2 细胞内 PPAR- α 、apoA5 表达,降低 TG 含量($P < 0.05$),并呈时间依赖性。结论 灯盏花素能降低肝细胞内 TG 含量,其机制可能通过使 PPAR- α 表达水平增加,从而增加 apoA5 表达水平而实现的。

关键词:灯盏花素;过氧化物酶体增殖物激活受体- α ;载脂蛋白 A5;三酰甘油

中图分类号:R915

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)36-4852-02

Initial investigation on effect of breviscapine on triglyceride in HepG2 cells in different time points and its mechanism

Yang Yan¹, Gao Lin^{1△}, Deng Huacong², Yan Yonghui¹, Li Xianwen¹,
Wang Xiaoying¹, Liao Xin¹, Zhang Han¹, Chen Qirong¹, Wang Qian¹

(1. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China;
2. the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To initially investigate the time-dependent relation between breviscapine with peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α), apolipoprotein A5 (apoA5) and triglyceride(TG) in HepG2 cells in different time points by observing the effect of breviscapine on the expression and contents of PPAR- α , apoA5 and TG in order to lay a certain foundation for further exploring the concrete mechanism for its regulating TG metabolism. **Methods** On the basis of earlier stage experiment, 100 mmol/L breviscapine was selected to treat the HepG2 cells at different time points (0, 6, 12, 24, 36, 48 h). The levels of PPAR- α and apoA5 gene and protein, and the TG content in HepG2 cells were detected. **Results** Breviscapine could increase the levels of PPAR- α and apoA5 gene and protein and decrease the TG content in HepG2 cells ($P < 0.05$), moreover which showed the time-dependence. **Conclusion** Breviscapine may decrease the TG level in HepG2 cells, its mechanism may be realized by increasing the expression of PPAR- α , thus increasing the expression of apoA5 in HepG2 cell.

Key words: breviscapine; peroxisome proliferator-activated receptor- α ; apolipoprotein A5; triglyceride

高三酰甘油(hypertriglyceridemia, HTG)血症在胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)相关性疾病如肥胖、2 型糖尿病(T2DM)、冠心病等的发展中起重要作用^[1]。HTG 血症与 T2DM 发病率增多有关。HTG 血症是 T2DM 发生的独立危险因素,以 HTG 为标志的脂代谢异常常伴 IR,其可能发生在糖代谢紊乱之前^[2]。因此,HTG 血症的危害已经引起内分泌学者的高度重视。灯盏花素(breviscapine)是从菊科短亭飞蓬属植物中提取出来的黄酮类有效成分,是灯盏乙素和少量甲素的混合物,其中灯盏乙素含量占 95% 以上,灯盏花素药理活性广泛,具有抗血小板、抗血栓等作用,被广泛应用于临床治疗,并具有降低 TG 的作用^[3],但其具体作用机制不清楚。目前发现 TG 与肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体- α (peroxisome proliferator-activated receptor- α , PPAR- α)、载脂蛋白 A5 (apolipoprotein A5, apoA5) 基因表达密切相关^[4],但灯盏花素降低 TG 是否也与 PPAR- α 、apoA5 基因表达有关,目前国内外未见相关研究报道。因此,本

研究拟通过观察灯盏花素在不同时间点对 HepG2 肝细胞内 PPAR- α 、apoA5 表达及三酰甘油含量的影响,旨在初步探讨灯盏花素降低三酰甘油的可能机制,为进一步探索灯盏花素调节 TG 代谢的具体机制奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 HepG2 细胞购于协和医院细胞库。灯盏花素注射液购于昆明龙津药业股份有限公司。DMEM 购于 Gibco-BRL 公司,胎牛血清购于杭州四季青公司。实时荧光定量 PCR 试剂盒购于 Takara 公司。apoA5 抗体(ab36974)购于 Santa Cruz 公司。二抗和细胞蛋白抽提试剂盒均购于宝生物公司。三酰甘油测定试剂盒购于北化康泰临床试剂公司。

1.2 细胞培养与分组 HepG2 细胞被培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,0.25% 胰酶进行消化,每 2~3 天更换 1 次培养基并进行传代。HepG2 肝细胞接种于 6 孔板中,12 h 后长至融合度为 80% 左

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460168);贵州省科学技术基金资助项目(黔科合 J 字 LKZ[2013]19 号);遵义医学院博士启动基金(F-574);贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目(黔省专合字[2008]110 号);贵州省科技合作项目(黔科合区域合[2010]7004 号)。

作者简介:阳琰(1980-),副教授,博士,主要从事糖尿病及并发症病因及防治方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:lgzyc@sina.com。

右,更换为无血清的 DMEM 培养基,在浓度依赖实验的基础上,选取 100 mmol/L 灯盏花素进行时间依赖实验。加入 100 mmol/L 灯盏花素,不同干预时间点(0、6、12、24、36、48 h),分别定义为:(1)0 h组(空白对照);(2)6 h组;(3)12 h组;(4)24 h组;(5)36 h组;(6)48 h组;每组取 3 个复孔,所测结果取 3 孔平均值。

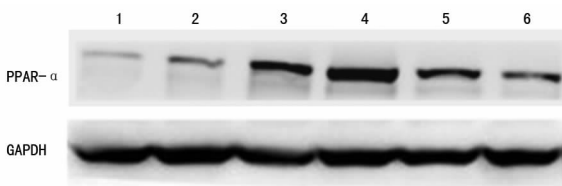
1.3 测定各组细胞 apoA5 基因及 TG 含量 PPAR- α 引物正义:5'-ACT TAT CCT GTG GTC CCC GG-3';反义:5'-CCG ACA GAA AGG CAC TTG-3';apoA5 引物正义:5'-ACG CAC GCA TCC AGC AGA-3';反义:5'-TGA AAG ATT CGG AAA C-3';GAPDH 引物正义:5'-TAG TTG CGT TAC ACC CTT TCT-3';反义:5'-TGC TGT CAC CTT CAC CG-3'。提取细胞总 RNA,以总 RNA 1.5 μ g 为逆转录反应模板,进行逆转录总的反应体积是 20 μ L。反应体系总体积为 25 μ L,sterile water 16.3 μ L,10 \times Taq buffer 2.5 μ L,引物 1(10 μ M) 0.75 μ L,引物 2(10 μ M) 0.75 μ L,MgCl₂ (25 mM) 1.5 μ L,4dNTP(2.5 mM) 2 μ L,cDNA 1 μ L,Taq 酶 5 U (0.2 μ L)。条件:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,退火温度 30 s,72 $^{\circ}$ C 延长 20 s,循环 34 次,72 $^{\circ}$ C 延长 10 min。按照 TG 试剂盒说明书进行操作(酶法测定)。

1.4 测定各组细胞 apoA5 蛋白表达 收集经上述处理后的细胞,用 BCA 法定量测定各组细胞 apoA5 蛋白表达水平。取 30 μ L 蛋白质加样,经 12%PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上,取 apoA5 一抗的稀释度为 1:2 000,二抗的稀释度为 1:1 000,碱性磷酸酶法显色,曝光。

1.5 统计学处理 应用 SPSS16.0 统计软件包进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,正态分布资料应用随机区组设计资料的方差分析及其两两比较,分析各组细胞内 apoA5 基因、蛋白表达及 TG 含量的差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

在 0~24 h 之内,HepG2 肝细胞内 PPAR- α 、apoA5 基因及蛋白表达水平随着灯盏花素作用时间增加而增加,当达到 36 h 后 HepG2 肝细胞内 PPAR- α 、apoA5 基因及蛋白表达水平开始下降,48 h 下降最明显,但均高于空白对照组($P<0.05$);而肝细胞内三酰甘油含量在 0~24 h 之内随着灯盏花素作用时间增加反而降低,至 24 h 时降到最低($P<0.05$),36 h 后又开始升高,48 h 升高最明显,但均低于空白对照组($P<0.05$),见表 1,2,图 1,2。



1:空白对照组(0 h);2:6 h;3:12 h;4:24 h;5:36 h;6:48 h。

图 1 灯盏花素在不同时间点对 HepG2 肝细胞 PPAR- α 蛋白表达的影响

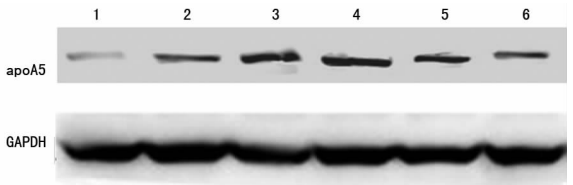
表 1 灯盏花素在不同时间点对 HepG2 肝细胞 PPAR- α 、apoA5 mRNA 表达及 TG 的影响($\bar{x}\pm s$)

时间(h)	PPAR- α	apoA5	TG(mg/g)
0(空白对照)	0.823 \pm 0.113	0.0027 \pm 0.0003	1228.8 \pm 144.2
6	1.323 \pm 0.153*#	0.0051 \pm 0.0008*#	849.3 \pm 104.4*#
12	3.132 \pm 0.421*#	0.0069 \pm 0.0011*#	628.2 \pm 85.1*#

续表 1 灯盏花素在不同时间点对 HepG2 肝细胞 PPAR- α 、apoA5 mRNA 表达及 TG 的影响($\bar{x}\pm s$)

时间(h)	PPAR- α	apoA5	TG(mg/g)
24	4.357 \pm 0.075*#	0.0121 \pm 0.0018*#	422.2 \pm 67.2*#
36	1.631 \pm 0.023*#	0.0059 \pm 0.0010*#	712.3 \pm 77.4*#
48	1.172 \pm 0.014*#	0.0042 \pm 0.0006*#	952.3 \pm 94.1*#

*: $P<0.01$,与不同时间比较;#: $P<0.05$,与空白对照组比较。



1:空白对照;2:6 h;3:12 h;4:24 h;5:36 h;6:48 h。

图 2 灯盏花素在不同时间点对 HepG2 肝细胞 apoA5 蛋白表达的影响

3 讨 论

2011 年欧洲心脏病学会(ESC)和欧洲动脉粥样硬化学会(EAS)联合发布的血脂异常管理指南明确指出,TG 在脂毒性危害中占据非常重要的地位。肝脏是三酰甘油代谢的重要器官,高三酰甘油血症是糖尿病发生、发展的重要病理生理基础和特征^[5]。肝脏中有许多调控三酰甘油代谢的基因表达,其中 apoA5 基因与 TG、IR、代谢综合征密切相关^[6-7],因此,从 apoA5 基因出发进行研究,可能对于阐明 T2DM、HTG 血症的发生、发展有非常重要的意义。

在临床治疗中,多数糖尿病患者均具有高 TG 血症,在进行降糖治疗过程中,应积极考虑降脂治疗,但传统降脂药物可能驱使血脂更集中于肝脏进行代谢,反而促使脂质贮积并损害肝功能^[8],尤其对于糖尿病合并脂肪肝的患者极为不利。近年研究表明灯盏花素的药理作用非常广泛,被广泛应用于临床治疗,其疗效肯定,除扩张微血管、降低血液黏稠度、改善微循环外,还具有降低血脂,尤其是 TG,并对糖尿病性肝脏损害有一定的治疗和保护作用^[9],但其具体作用机制仍不清楚。因此,本研究通过观察灯盏花素在不同时间点对人 HepG2 细胞内 TG 含量的影响,旨在初步探讨灯盏花素降低肝脏内 TG 的机制,可能为防治糖尿病性脂肪肝提供一点新的思路和靶点。

本研究结果发现,在 0~24 h 随着灯盏花素作用时间的增加,HepG2 肝细胞内 PPAR- α 、apoA5 基因、蛋白表达水平也随之增加,当达到 36 h 后又开始下降,48 h 下降最明显,但均高于空白对照组($P<0.05$);而肝细胞内 TG 含量在 0~24 h 随着灯盏花素作用时间增加而降低,至 24 h 时 TG 含量降到最低($P<0.05$),36 h 后又开始上升,48 h 升高最明显,但均低于空白对照组($P<0.05$)。由此可推测,灯盏花素能降低肝脏 TG 含量,并具有时间依赖性,其机制可能是通过增加 PPAR- α 的表达,进而增加 apoA5 表达从而使 TG 含量降低,但其具体机制有待进一步研究探索。

参考文献:

[1] Hirabara SM, Curi R, Maechler P, et al. Saturated fatty acid induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells[J]. J Cell Physiol, 2010, 222(1):187-194.
 [2] Sanyal D, Ghosh S, Mukherjee P, et al. (下转第 4856 页)

不能手术的大龄患者肺血管病通常仍可逆,仍可根治。本研究 49 例患者中肺组织病理 H-E 分级为 I ~ III 级共 47 例,按照 H-E 分级法这 47 例是可逆的。这些患者肺动脉压术后通常都下降,肺血管病仍可逆转。本组术前诊断性药物治疗,目的是选择出那些对肺动脉高压药物反应好的患者,这些药物反应好的患者是可以手术根治的。术中取肺组织活检进行肺组织病理分级,如果 H-E 分级为 I ~ III 级,则肺病理改变仍是可逆的,和诊断性治疗的结果是一致的,仍可以手术根治。

本研究 49 例患者中,38 例(77.6%)H-E I 级,5 例(10.2%)H-E II 级,4 例(8.2%)H-E III 级,仅 2 例(4%)H-E IV 级伴丛样病变。术后平均肺动脉压和肺血管阻力均明显下降($P < 0.01$),无手术死亡病例。随访显示中期结果优良。平均随访(117.6 ± 56.6)个月。98%(48/49)的患者心功能 NYHA I 级,平均肺动脉压正常。1 例心功能 NYHA II 级,口服西地那非,2 例丛样病变患者肺动脉高压仍可逆,术后平均肺动脉压下降,主肺动脉直径缩小,经皮血氧饱和度正常,体质量和身高增长。丛样病变通常是肺动脉高压严重及不可逆的征象。2 例丛样病变患者肺动脉高压逆转的原因可能是:(1)丛样病变也许不能代表整个肺血管的状态;(2)内皮素受体拮抗剂有助于肺动脉高压逆转,有资料表明内皮素受体拮抗剂具有抗增生,逆转肺血管重构的作用;(3)丛样病变通常很少见,它的血流动力学意义也许被高估;(4)肺血管床发育有助于肺动脉高压逆转^[5-6]。

本研究表明,随着当代先进肺动脉高压治疗的进步,重度肺动脉高压先天性心脏病患者能安全有效地进行手术治疗。以下因素使这类患者能手术:(1)肺血管病在结构上可逆;(2)先进肺动脉高压治疗能有效降低重度肺动脉高压患者肺血管阻力;(3)西地那非和波生坦可长期口服;(4)心外科的发展有助于提高重度肺动脉高压患者手术安全性和有效性。术前肺动脉压增高的大龄患者是术后肺动脉高压的高危人群。术后肺动脉高压是决定心脏手术患者术后病死率和并发症的主要因素。肺动脉高压危象特点是肺血管阻力急剧升高,导致急性右心室衰竭,心输出量急剧降低。近年来先进肺动脉高压治疗越来越多在术前预防性和术后治疗性应用,减少了术后肺动脉高压风险。长期口服西地那非和波生坦可治疗术后残留肺动脉高压。先进肺动脉高压治疗加上心脏外科进步,有效降低肺血管阻力,减少围术期风险,扩大了根治术指征^[7-8]。

通过诊断性治疗选择重度肺动脉高压先天性心脏病患者肺血管病变通常可逆,仍可行根治术。此类患者远期疗效仍需更多病例更长时间随访证实。重度肺动脉高压先天性心脏病患者的肺血管病通常是可逆的,但结论尚缺乏直接的病理结果支持。

参考文献:

- [1] Diller GP, Gatzoulis MA. Pulmonary vascular disease in adults with congenital heart disease[J]. *Circulation*, 2007, 115(8):1039-1050.
- [2] Ikonomidis JS, Hilton EJ, Payne K, et al. Selective endothelin-A receptor inhibition after cardiac surgery: a safety and feasibility study[J]. *Ann Thorac Surg*, 2007, 83(6):2153-2161.
- [3] Beghetti M, Galiè N. Eisenmenger syndrome a clinical perspective in a new therapeutic era of pulmonary arterial hypertension[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 53(9):733-740.
- [4] Klepetko W, Mayer E, Sandoval J, et al. Interventional and surgical modalities of treatment for pulmonary arterial hypertension[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(12):73-80.
- [5] Kurzyna M, Dabrowski M, Bielecki D, et al. Atrial septostomy in treatment of end-stage right heart failure in patients with pulmonary hypertension[J]. *Chest*, 2007, 131(4):977-983.
- [6] Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(1):1425-1436.
- [7] Garg N, Sharma MK, Sinha N. Role of oral sildenafil in severe pulmonary arterial hypertension: clinical efficacy and dose response relationship[J]. *Int J Cardiol*, 2007, 120(3):306-313.
- [8] Ali O, Wharton J, Gibbs JS, et al. Emerging therapies for pulmonary arterial hypertension[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2007, 16(3):803-818.

(收稿日期:2014-04-08 修回日期:2014-07-19)

(上接第 4853 页)

- Dyslipidemia, metabolic syndrome, and liver enzymes in impaired glucose tolerance and new onset untreated, type 2 diabetes Indian subjects [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2012, 16(2):434-435.
- [3] Xu XX, Zhang W, Zhang P, et al. Superior renoprotective effects of the combination of breviscapine with enalapril and its mechanism in diabetic rats [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(1):820-827.
 - [4] Ramakrishnan L, Sachdev HS, Sharma M, et al. Relationship of APOA5, PPAR- γ and HL gene variants with serial changes in childhood body mass index and coronary artery disease risk factors in young adulthood [J]. *Lipids Health Dis*, 2011(10):68.
 - [5] Feher M, Greener M, Munro N. Persistent hypertriglyceridemia in statin-treated patients with type 2 diabetes mel-

- litus [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2013(6):11-15.
- [6] Chien KL, Hsu HC, Chen YC, et al. Association between sequence variant of c. 553 G > T in the apolipoprotein A5 gene and metabolic syndrome, insulin resistance, and carotid atherosclerosis [J]. *Transl Res*, 2009, 154(3):133-141.
 - [7] Gonzales JC, Gordts PL, Foley EM, et al. Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(6):2742-2751.
 - [8] Busaranogla M, Acbay O, Sonsuz A. A controlled trial of gemfibrozil in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Hepatol*, 1999, 31(2):384.
 - [9] Wang M, Xie C, Cai RL, et al. Studies on antioxidant activities of breviscapine in the cell-free system [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36(6):1199-1207.

(收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-08-19)