

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.11.003

辣椒素对体外肝细胞脂质代谢的影响研究*

孙玉¹, 刘佳^{2#}, 宁波¹, 杨朝霞^{1△}

(1. 重庆医科大学附属第二医院消化内科 400010; 2. 湖北省武汉市普仁医院消化与肝病科 430081)

[摘要] **目的** 探讨辣椒素对脂肪变肝细胞内脂质沉积的影响及自噬表达情况,为脂肪性肝病防治的研究提供新的思路和目标。**方法** 用油酸(40 μg/mL)诱导肝原代细胞 LO2 细胞株建立非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)细胞模型。实验分为空白对照组、油酸组、辣椒素组[油酸+辣椒素(100 μmol/L)]。油红 O 染色和三酰甘油试剂盒检测肝细胞内脂肪变程度;Western blot 检测自噬体标记分子 p62 和 LC3 的表达水平并计算 LC3-II/LC3-I 比值。**结果** 40 μg/mL 油酸处理 LO2 细胞 24 h 后,油红 O 染色观察,油酸组肝细胞中可见大小不等的橘红色脂滴,而空白对照组无明显橘红色脂滴形成,油酸在体外成功建立 NAFLD 模型。与油酸组相比,辣椒素组肝细胞内三酰甘油水平显著降低($P<0.05$),脂滴明显减少,p62 蛋白水平明显降低($P<0.05$),而 LC3-II/LC3-I 比值明显上调($P<0.05$)。**结论** 在体外利用油酸诱导 LO2 细胞株建立 NAFLD 模型,辣椒素刺激 NAFLD 细胞,上调 NAFLD 细胞自噬水平,减少细胞内脂质沉积,但具体机制还需进一步研究。

[关键词] 油酸;辣椒素;非酒精性脂肪性肝病**[中图分类号]** R575.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)11-1450-04

Effects of capsaicin on lipid metabolism of liver cells in vitro*

Sun Yu¹, Liu Jia^{2#}, Ning Bo¹, Yang Zhaoxia^{1△}

(1. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China; 2. Department of Gastroenterology and Hepatic, Puren Hospital of Wuhan City, Wuhan 430081, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of capsaicin on lipid deposition in liver cells and the expression of autophagy, to provide new ideas and targets for the study of fatty liver disease. **Methods** The model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) was established by inducing LGF cell line of liver primary cells with oleic acid (40 μg/mL). The experiment was divided into blank control group, oleic acid group, capsaicin group [oleic acid + capsaicin (100 μmol/L)]. The level of intracellular lipid was detected by oil red O staining and triglyceride (TG) kit. Western bolt was used to detect the expression level of autophagy marker molecule p62 and LC3, and to calculate the ratio of LC3-II/LC3-I. **Results** After treated with 40 μg/mL oleic acid for 24 h, the oil red O staining showed that orange-red lipid droplets were found in the oleic acid group, but there was no obvious orange-red lipid droplet formation in the blank group, which suggesting that the NAFLD cell model was established successfully by using 40 μg/mL oleic acid in vitro. Oil red O staining was observed, the cells in the capsaicin group were significantly less than the oleic acid group, and the content of triglyceride in the liver cells was significantly lower than that in the oleic acid group ($P<0.05$). Western bolt test results showed that capsaicin group p62 protein levels were significantly lower compared with the oleic acid group ($P<0.05$), while the LC3-II/LC3-I ratio was higher than that of oleic acid group ($P<0.05$). **Conclusion** NAFLD model was established by inactivating LO2 cell line with oleic acid in vitro. Capsaicin stimulated NAFLD cells, upregulated the autophagy level of NAFLD cells and reduced intracellular lipid deposition, but the specific mechanism need further study.

[Key words] oleic acid; capsaicin; nonalcoholic fatty liver disease

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种无过量酒精摄入,由遗传-环境-代谢应激相关因素所致的以肝细胞内脂质异常堆积为主要表现的临床病理综合征,与 2 型糖尿病、高血压和心脑血管疾病密切相关。近年,随着我国经济水平的提高,人们生活方式及膳食结构发生了显著改变,NAFLD 的发病率逐年增高,并出现低龄化,严重危害公众健康。我国流行病学调查显示,南方地区 NAFLD 发病率低于北方,该现象除了与经济水平及生活方式有关外同时饮食结构也密切相关^[1]。NAFLD 发病机制尚未完全明确,探

索 NAFLD 的发病机制,寻求有效可行的治疗方法成为当下研究热点。辣椒素 (capsaicin) 是辣椒的主要成分,而辣椒是世界各地广泛被消费的香辛料及蔬菜。随川菜、火锅在国内外的迅速发展,引发了人们对辣椒素的关注。早前有研究报道辣椒素具有抗炎、镇痛、抗氧化等功效^[2-4]。现有对于辣椒素的研究主要集中在抗肿瘤方面^[5],而辣椒素降脂方面的研究相对薄弱。有研究证实,在小鼠肝组织中,辣椒素可以促进脂质分解,减少脂质沉积^[6]。并且辣椒素能上调血管平滑肌细胞自噬表达,减少血管平滑肌细胞中泡沫细胞的形成^[7]。另有实验表明,自噬

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(81000357)。 作者简介:孙玉(1989-),在读硕士,主要从事非酒精性脂肪性肝病的研究。

并列第一作者:刘佳(1988-),住院医师,主要从事非酒精性脂肪性肝病的研究。 △ 通信作者,E-mail: yangzhx2003@163.com。

的增加可以减少肝脏脂质的沉积,而自噬功能受损同样可以导致肝细胞脂质的异常沉积^[8]。本研究用油酸作用于人正常肝细胞株 LO2 构建体外 NAFLD 细胞模型,再加用辣椒素处理脂肪变肝细胞,探讨辣椒素对脂肪变肝细胞内脂质沉积的影响及自噬表达情况,为脂肪性肝病防治的研究提供新的思路和靶点。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 人正常肝细胞株 LO2 由重庆医科大学肝病研究所提供。胎牛血清(Gibco 公司),三酰甘油检测试剂盒(长春汇力公司),辣椒素、油红 O 染色剂(Sigma 公司),兔抗 p62 多克隆抗体(货号:SC-25730)、兔抗 LC3 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,货号:SC-292354),青霉素-链霉素溶液(100×,碧云天公司),蛋白提取试剂盒(凯基公司),RPMI1640 培养基、0.25%胰酶(Hyclone 公司)。

1.2 方法

1.2.1 构建细胞模型及分组 LO2 细胞用含 10%胎牛血清、1%青链双抗的 RPMI1640 培养基进行培养。当细胞铺满瓶底,用 0.25%胰蛋白酶处理细胞进行传代培养。后续实验所用细胞为 5 d 以内,处于对数生长期的细胞。每 2~3 天传代 1 次,传 3 代后的细胞可用于实验。根据前期实验结果^[9],MTT 检测提示油酸浓度超过 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时吸光度值下降明显,对细胞增殖影响较大,故选取 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为油酸最佳诱导浓度,以 24 h 为最佳作用时间。实验分组:空白对照组为 10%FBS 的 RPMI1640 培养基培养 24 h;油酸组为 10%FBS 的 RPMI1640 培养液+油酸(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)培养 24 h;辣椒素组为 10%FBS 的 RPMI1640 培养液+油酸(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)+辣椒素(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)培养 24 h。

1.2.2 油红 O 检查各组 LO2 细胞内脂滴水平 预先将 1 cm×1 cm 大小的盖玻片置放于培养板内,5×10⁴/mL LO2 分别接种,每 6 孔为 1 个样本,细胞贴壁后开始干预,分别于 0、24 h 后取出,用 PBS 漂洗,4%多聚甲醛固定,油红 O 染色,60%异丙醇脱底色,苏木精细胞核复染,水封片,倒置显微镜下观察细胞内橘红色,脂滴水平并拍照。

1.2.3 检查细胞内三酰甘油水平 将细胞接种于培养板内,每 6 孔为 1 个样本,细胞贴壁后开始干预,分别于 0、24 h 后收集细胞,反复冻融裂解细胞,12 000 r/min 离心 20 min,取上清检测三酰甘油水平,按试剂盒说明进行操作,BCA 法检测蛋白水平,计算每毫克蛋白所对应的三酰甘油水平。

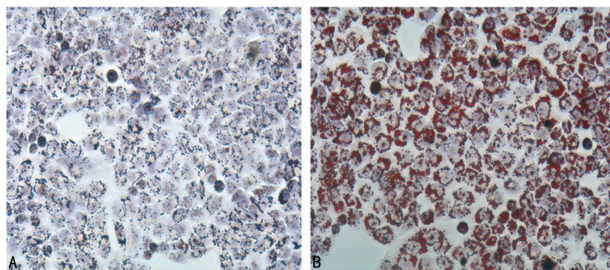
1.2.4 Western blot 检查肝细胞自噬蛋白 p62 及 LC3 的表达

按总蛋白提取试剂盒说明步骤提取细胞中总蛋白,BCA 法进行蛋白定量,分装后-80℃保存,避免反复冻融。蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后,电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,加入兔抗 LC3 多克隆抗体(1:1 000 稀释)、兔抗 p62 多克隆抗体(1:1 000 稀释)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释),ECL 显影,以 β -actin 为内参照。Quantity one4.52 图像分析软件进行图像分析,将每个样本的积分光密度值与 β -actin 的积分光密度值相比的值,代表其蛋白水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两个样本均数的比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 油酸在体外成功诱导建立 NAFLD 模型 油酸组细胞中即可见大小不等的橘红色脂滴,而空白对照组无明显橘红色脂滴形成。见图 1。



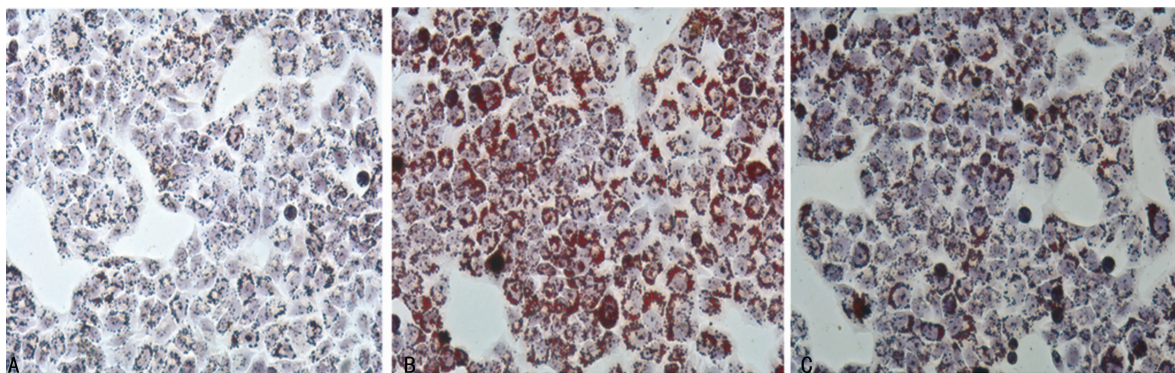
A:空白对照组;B:油酸组。

图 1 油红 O 染色观察 NAFLD 细胞模型肝细胞内脂滴变化(×200)

2.2 辣椒素对 NAFLD 细胞脂质沉积影响 辣椒素组细胞脂滴明显少于油酸组。见图 2。

2.3 辣椒素对脂肪变细胞自噬标志蛋白 p62 及 LC3-II/LC3-I 比值的影响 结果显示,辣椒素组较油酸组 p62 蛋白水平明显降低($P<0.05$),LC3-II/LC3-I 比值明显升高($P<0.05$)。见图 3。

2.4 辣椒素对 NAFLD 细胞内三酰甘油水平的影响 油酸组三酰甘油水平 56.65 $\mu\text{g}/\text{mg}$,与空白对照组 24.28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、辣椒素组 34.62 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。



A:空白对照组;B:油酸组;C:辣椒素组。

图 2 油红 O 染色观察各组 LO2 肝细胞内脂滴变化(×200)

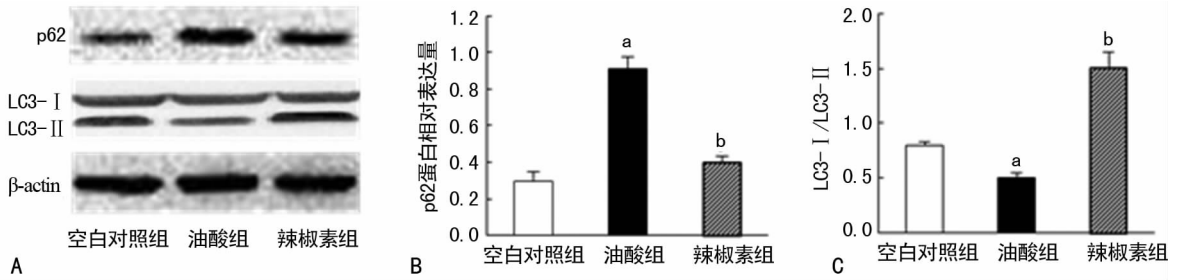


图3 Western blot 检测各组 LO2 肝细胞 p62、LC3 的蛋白表达

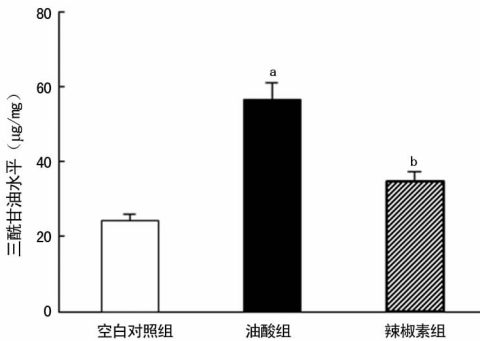


图4 各组 LO2 肝细胞内三酰甘油水平

3 讨论

NAFLD 是代谢综合征在肝脏的表现,近年来 NAFLD 发病率逐渐增加,成为当今常见的慢性疾病及公共卫生问题。其发病机制尚未完全明确,治疗方法具有一定的局限性。探索安全有效、经济的治疗方法是当前医务及科研工作人员迫切的任务。辣椒素是辣椒的主要成分,全世界人口中有 20% 食用辣椒,而我国是主要的辣椒生产及食用大国^[10]。依据人们日常经验和一些文献报道,食用辣椒具有一定的减肥效果^[11],其简单易得,食用安全的特性引发了科研工作者对辣椒素的探索。研究表明,辣椒素具有改善心肌重构、减轻动脉粥样硬化、改善胰岛素抵抗、降脂预防肥胖等作用^[11-15]。为此笔者猜想辣椒素是否可以改善 NAFLD 肝细胞脂质的沉积,进一步为辣椒素在肥胖相关代谢性疾病中的运用提供理论依据。

通常情况下获得人肝脏细胞相对困难,且个体差异大,难于稳定的传代培养,因此研究脂代谢合适的体外肝细胞系是相当重要的。脂肪酸诱导 LO2 细胞的脂肪变是研究 NAFLD 的合适实验模型,同时油酸可以模拟高脂环境引起细胞内脂质沉积^[16-19]。前期实验证明用 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 油酸为构建脂变肝细胞模型的最佳浓度,故本实验应用该浓度油酸刺激肝细胞株 LO2,构建 NAFLD 细胞模型,采用 100 $\mu\text{mo}/\text{L}$ 辣椒素作用于该细胞模型。本研究结果表明,油酸组的三酰甘油和油红 O 染色分别从定量和定性的角度证实 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 油酸诱导人正常肝细胞 LO2 发生了脂肪变;辣椒素组三酰甘油水平、脂滴明显少于油酸组,提示辣椒素可以有效抑制脂肪变肝细胞内三酰甘油的聚集。

细胞自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖的降解产物再利用的过程,可在营养匮乏、电离辐射、氧化应激等情况下被诱导,它可将细胞质内损坏蛋白质、脂质、糖类及功能异常细胞器降解或去除,从而使细胞内环境得以维持稳

态^[20-23]。近年越来越多研究表明自噬参与细胞内脂质的调节^[8,24],在长期高脂饮食喂养的 NAFLD 动物模型中,肝细胞自噬受到损伤,由此说明自噬可以有效调节脂质在肝脏的代谢过程,对过度脂质沉积诱导的肝损害具有保护作用^[25]。并且体外研究也证实自噬水平提高可以降低 NAFLD 细胞脂质沉积^[6]。p62 是一种多功能蛋白,作用于蛋白质降解酶体,可以促进错误或损伤蛋白质降解,在自噬过程中起到重要作用,细胞内 p62 的蓄积抑制自噬的发生。LC3 有 LC3-I 和 LC3-II 两种形式,分别定位于前自噬体和自噬体膜表面,LC3-II 的水平或 LC3-II/LC3-I 的比值与自噬的数量呈正相关,一定范围内 p62 蛋白水平与自噬水平呈负相关^[25-28]。因此 p62 的蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 比值可作为自噬发生的标记。本研究观察到,p62 和 LC3 在肝 LO2 细胞中具有一定基础水平表达,加入油酸(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理后,p62 表达水平有所上升、LC3-II/LC3-I 比值降低,说明脂肪变肝细胞模型中肝细胞自噬水平受到损伤,这也再次证实了自噬参与肝细胞脂质代谢过程^[24-25]。这与 Li 等^[6]在 HepG2 及小鼠构建的 NAFLD 的模型中研究结果一致。当脂肪变肝细胞 LO2 加入辣椒素其 p62 蛋白表达明显降低,而 LC3-II/LC3-I 比值显著高于油酸组,表明辣椒素可能通过上调脂肪变肝细胞自噬水平来减少肝细胞内脂质沉积。这与辣椒素能上调血管平滑肌细胞自噬表达,减少低密度氧化脂蛋白在血管平滑肌细胞中的沉积阻止了泡沫细胞的形成,具有异曲同工之处^[7]。

综上所述,本实验利用油酸诱导 LO2 细胞株建立体外肝细胞脂肪变模型,辣椒素刺激 NAFLD 细胞,上调 NAFLD 细胞自噬水平,减少细胞内脂质沉积,但具体机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] 石晓东,魏琪,何淑梅,等.中国东北地区成人非传染性慢性疾病的流行病学调查及影响因素分析[J].吉林大学学报(医学版),2011,37(2):379-384.
- [2] Liao HT, Lee HJ, Ho YC, et al. Capsaicin in the periaque-ductal gray induces analgesia via metabotropic glutamate receptor-mediated endocannabinoid retrograde disinhibition[J]. Brit J Pharmacol, 2011, 163(2): 330-345.
- [3] Sekine R, Satoh T, Takaoka A, et al. Antipruritic effects of topical crotamiton, capsaicin, and a corticosteroid on pruritogen-induced scratching behavior[J]. Exp Dermatol, 2012, 21(3): 201-204.
- [4] Devesa I, Planellscaes R, Fernándezballester G, et al.

- Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis[J]. *J Inflamm Res*, 2011, 4(1): 67-81.
- [5] Chien CS, Ma KH, Lee HS, et al. Dual effect of capsaicin on cell death in human osteosarcoma G292 cells[J]. *Euro J Pharmacol*, 2013, 718(1/2/3): 350-360.
- [6] Li Q, Li L, Wang F, et al. Dietary capsaicin prevents non-alcoholic fatty liver disease through transient receptor potential vanilloid 1-mediated peroxisome proliferator-activated receptor δ activation[J]. *Pflü Archiv Euro J Physiol*, 2013, 465(9): 1303-1316.
- [7] Li BH, Yin YW, Liu Y, et al. TRPV1 activation impedes foam cell formation by inducing autophagy in oxLDL-treated vascular smooth muscle cells[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(4): e1182.
- [8] Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism [J]. *Nature*, 2009, 458 (7242): 1131-1135.
- [9] 郑黎黎, 沈薇. HBx 与肝细胞脂肪变性关系及可能机制的细胞学研究[J]. *生物技术通报*, 2010(7): 185-190.
- [10] 郑龙辉, 陆红佳, 刘雄. 辣椒素生理功能研究进展[J]. *食品科学*, 2011, 32(3): 262-265.
- [11] Zhang LL, Yan LD, Ma LQ, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity [J]. *Circ Res*, 2007, 100 (7): 1063-1070.
- [12] Ma L, Zhong J, Zhao Z, et al. Activation of TRPV1 reduces vascular lipid accumulation and attenuates atherosclerosis[J]. *Card Res*, 2011, 92(3): 504-513.
- [13] Yang D, Luo Z, Ma S, et al. Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension[J]. *Cell Metab*, 2010, 12(2): 130-141.
- [14] Kwon DY, Kim YS, Shi YR, et al. Capsaicin improves glucose metabolism by improving insulin sensitivity better than capsaicin in diabetic rats[J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(6): 1078-1085.
- [15] Kang JH, Tsuyoshi G, Le NH, et al. Dietary capsaicin attenuates metabolic dysregulation in genetically obese diabetic mice[J]. *J Med Food*, 2011, 14(3): 310-315.
- [16] 陈莉, 汪春红, 黄邵鑫, 等. 不同溶剂中油酸对 LO2 和 HepG2 细胞生长和活力的影响[J]. *公共卫生与预防医学*, 2012, 23(3): 4-8.
- [17] Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis[J]. *Chem Biol Int*, 2007, 165(2): 106-116.
- [18] Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(5): 830-840.
- [19] 杨林辉, 陈东风. 油酸诱导培养肝细胞脂肪变性模型的建立[J]. *重庆医学*, 2007, 36(8): 698-700.
- [20] Dupont N, Codogno P. Autophagy transduces physical constraints into biological responses[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 24(16): 30238-30242.
- [21] Czaja MJ. Two types of autophagy are better than one during hepatocyte oxidative stress[J]. *Autophagy*, 2011, 7(1): 96-97.
- [22] Szumiel I. Radiation hormesis: Autophagy and other cellular mechanisms[J]. *Int J Rad Biol*, 2012, 88(9): 619-628.
- [23] Kuma A, Mizushima N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: With an emphasis on nutrient metabolism [J]. *Sem Cell Devel Biol*, 2010, 21(7): 683-690.
- [24] Czaja MJ. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications[J]. *Ajp Cell Physiol*, 2010, 298(5): C973-978.
- [25] Codogno P, Meijer AJ. Autophagy: a potential link between obesity and insulin resistance[J]. *Cell Metabolism*, 2010, 11(6): 449-451.
- [26] Maruyama Y, Sou YS, Kageyama S, et al. LC3B is indispensable for selective autophagy of p62 but not basal autophagy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(1): 309-315.
- [27] Rogov V, Dtsch V, Johansen T, et al. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy[J]. *Mol Cell*, 2014, 53(2): 167-178.
- [28] Dancourt J, Melia TJ. Lipidation of the autophagy proteins LC3 and GABARAP is a membrane-curvature dependent process[J]. *Autophagy*, 2014, 10(8): 1470-1471.

(收稿日期: 2016-10-21 修回日期: 2016-12-27)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的涉及人的生物医学研究论文, 作者应说明所在用的试验程序是否经过伦理审查委员会(单位性的、地区性的或国家性的)评估, 注明批准号。涉及患者(受试者)的应签订知情同意书。

《重庆医学》编辑部