

• 实验研究 •

银灵通胶囊减少人肝细胞系-5 细胞的脂肪积聚作用及机制研究

梁桂宁 徐贞俊 翁磊华 侯亚义

【摘要】 目的 观察银灵通胶囊对肝细胞系 (HHL)-5 细胞内甘油三酯含量、脂肪酸的氧化水平以及在脂肪氧化过程中起重要作用的代谢酶肉碱脂酰转移酶-1 β (CPT-1 β)、乙酰辅酶 A 羧化酶- β (ACC- β) 的影响。方法 检测在不同剂量银灵通胶囊水溶液作用下 HHL-5 细胞内甘油三酯含量、脂肪酸氧化水平, 用 Q-PCR 检测银灵通处理 HHL-5 细胞中 CPT-1 β 、ACC- β 的 mRNA 水平。结果 银灵通胶囊可降低 HHL-5 细胞内的甘油三酯含量, 与对照组比较, 银灵通胶囊溶液 0.5、1、2 mg/ml 剂量组分别降低 9.5%、14.3%、19.4%, HHL-5 细胞脂肪酸氧化水平分别增加 4.3%、6.9% 和 11.2%, 并呈一定的剂量效应关系, 但对 CPT-1 β 、ACC- β 没有影响。结论 银灵通胶囊可通过增强 HHL-5 细胞脂肪酸氧化水平减少 HHL-5 细胞的脂肪积聚。

【关键词】 银灵通胶囊; 甘油三酯含量; 脂肪酸氧化水平; 肉碱脂酰转移酶-1 β ; 乙酰辅酶 A 羧化酶- β

Yinlingtong capsules reduced the accumulation of fat in HHL-5 hepatocytes LIANG Gui-ning, XU Zhen-jun, WENG Lei-hua, HOU Ya-yi. "State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210093, China

Corresponding author: HOU Ya-yi, Email: yayihou@nju.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To study the effects of the Yinlingtong capsules on intracellular triglyceride, fatty acid oxidation levels and CPT-1 β /ACC- β in HHL-5 cells. **Methods** After treated HHL-5 cells with different doses Yinlingtong capsules, intracellular triglyceride content and the fatty acid oxidation level were detected by the kits. The CPT-1 β and ACC- β mRNA levels were detected by Q-PCR. **Results** Yinlingtong capsules could reduce triglyceride content (compared with the control group, triglyceride content of 0.5, 1 and 2 mg/ml dose group were reduced by 9.5%, 14.3% and 19.4%, respectively), enhance the level of fatty acid oxidation by a dose-response relationship (compared with the control group, the level of fatty acid oxidation of 0.5, 1 and 2 mg/ml dose group were increased 4.3%, 6.9% and 11.2%, respectively), but could not affect the CPT-1 β and ACC- β mRNA levels. **Conclusion** Yinlingtong capsules reduced the accumulation of fat in HHL-5 hepatocytes, and the specific impact mechanism needs to be further explored.

【Key words】 Triglyceride; Fatty acid oxidation level; CPT-1 β ; ACC- β

肝脏所含脂质大部分为甘油三酯 (TG), 各种致病因素均可致肝细胞内 TG 异常堆积, 导致脂肪肝^[1]。银灵通胶囊是由银杏叶提取物和灵芝孢子提取物配合而成的复方制剂, 富含银杏黄酮、内酯、灵芝多糖和三萜类化合物。研究证实, 银灵通胶囊具有调节脂类代谢作用, 可改善高血压、

高血脂和脂肪肝^[2]。本实验通过体外观察不同剂量的银灵通胶囊水溶液处理后的人肝细胞 HHL-5 细胞对脂肪代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料: 人肝细胞系 (HHL)-5 细胞株购于上海生命科学研究院; 哺乳动物高糖培养基 (DMEM 培养基) 和胎牛血清购于 Gibco 公司; TG 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购于碧云天生物科技有限公司; 3H-棕榈酸和 L-卡尼丁购于 Sigma 公司; RNA 提取试剂盒、cDNA 反转录试剂盒、

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4246.2013.03.010

作者单位: 210093 南京大学医学院&南京大学国家生物医药技术重点实验室 (梁桂宁、徐贞俊、翁磊华); 530021 南宁, 广西医科大学生理学教研室 (梁桂宁、侯亚义)

通信作者: 侯亚义, Email: yayihou@nju.edu.cn

Q-PCR 试剂盒购于 Takara 公司。

1.2 细胞培养方法: HHL-5 细胞培养于 5%CO₂、37℃ 环境中, 培养基为含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM, 于 70%~80% 融合度时经 0.25% 胰酶消化后, 分别经 0.5、1、2 mg/ml 的银灵通胶囊孵育 12 h 后, 收集细胞用于检测。

1.3 细胞内甘油三酯含量测定: 收集经银灵通胶囊处理的 HHL-5 细胞, 用 PBS 洗涤 3 次, 收集细胞。加入适量的冰预冷细胞免疫沉淀试验裂解液 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液后, 置于冰上 10 min。用细胞刮刮下细胞后, 收集在 1.5 ml 离心管中后, 用超声裂解仪 100~200 W 裂解 3 s, 共 2 次。低温高速离心 (4℃、12000 g, 2 min), 取上清液 50 μl, 用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白含量。其余上清液加入 2 倍体积的甲醇氯仿混合萃取液 (V/V=2:1), 充分混匀进行萃取, 静置 30 min 后, 然后离心 (4℃、12000 g, 2 min), 弃去上层溶液, 在 70℃ 条件下挥干下层溶液, 加入 20 μl PBS 溶解脂质, 再按照 TG 试剂盒说明书测定细胞内 TG 含量^[3]。结果用每克总蛋白中 TG 量表示 (mmol/g Pro)。

1.4 脂肪酸的氧化水平检测: 将 HHL-5 细胞在无血清 DMEM 培养基中饥饿 6 h, 用银灵通胶囊水溶液干预 1 h, 每孔加入 3H-棕榈酸 2 μCi/ml、L-卡尼丁 1 mmol/L, 孵育后吸弃培养基, 每孔加入 0.1 M 的 NaOH 100 μl 过夜, 取细胞消化液加入闪烁液, 用液闪计数器检测脂肪酸的氧化水平 (cpn)^[4]。

1.5 细胞中肉碱脂酰转移酶-1β (CPT-1β)、乙酰辅酶 A 羧化酶-β (ACC-β) mRNA 水平检测: 收集相应处理组的细胞, 吸去培养基后, 用无菌 PBS 洗 2 遍。每孔加入 1 ml 的核糖核酸提取试剂

(TRIzol) 溶液, 按照标准方法提取总 RNA, 用 cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA 链。用荧光定量聚合酶链式反应 (Q-PCR) 检测银灵通处理的 HHL-5 细胞中 CPT-1β、ACC 的 mRNA 水平。CPT-1β 引物序列: F 5'-AGGTGTCGTCAGGCCTATTTTG-3', R 5'-ACCACCTGTCGTAACA TCGG-3'。β-actin 作为内参基因: F 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', R 5'-CACCCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。ACC 引物序列: F 5'-TGATGTCAATCTC CCCGCAGC-3', R 5'-TTGCTTCTTCTCTGTTTTCTCCCC-3'^[5-6]。

1.6 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。所有实验数据以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验。P<0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 对 HHL-5 细胞 TG 含量的影响: 与对照组比较, 银灵通 0.5、1、2 mg/ml 三个剂量均可减少 HHL-5 细胞内 TG 含量, 分别减少了 9.5%、14.3%、19.4%, 呈一定的剂量效应关系, 其中银灵通胶囊 1 mg/ml、银灵通胶囊 2 mg/ml 组明显减少 (P<0.05), 见表 1。

2.2 对 HHL-5 细胞脂肪酸氧化的影响: 与对照组

比较, 银灵通胶囊 1 mg/ml 组、银灵通胶囊 2 mg/ml 组的脂肪酸氧化水平分别增加了 6.9% 和 11.2%, 呈一定的剂量效应关系 (P<0.05), 见表 1。

2.3 对 HHL-5 细胞脂肪酸代谢酶的影响: 与对照组比较, 银灵通水溶液 3 个剂量对 HHL-5 细胞中 CPT-1β、ACC-β 的 mRNA 水平无影响。表明对肝细胞脂肪代谢的影响可能不是通过改变 CPT-1β 和 ACC-β 酶的表达水平发挥作用, 见表 1。

表 1 银灵通胶囊各剂量组对 HHL-5 细胞甘油三酯含量、脂肪酸氧化水平、脂肪酸代谢酶 mRNA 的影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	甘油三酯		脂肪酸氧化		ACC-β	CPT-1β
	含量 (μg)/总蛋白 (mg)	降低率 (%)	氧化水平 (cpn, e+5)	增加率 (%)		
对照组	108.52±9.21		8.33±0.38		1	1
银灵通胶囊 0.5 mg/ml	98.16±4.52	9.50	8.69±0.51	4.30	0.95±0.03	0.95±0.23
银灵通胶囊 1.0 mg/ml	92.99±3.23*	14.30	8.90±0.28*	6.90	1.41±0.21	1.08±0.21
银灵通胶囊 2.0 mg/ml	87.42±7.58*	19.40	9.26±0.48*	11.20	0.86±0.22	1.11±0.28

注: HHL-5 细胞; 肝细胞系-5 细胞; ACC-β: 乙酰辅酶 A 羧化酶-β; CPT-1β: 肉碱脂酰转移酶-1β; 与对照组比较, *P<0.01

3 讨论

随着生活水平的提高, 高脂饮食造成的脂质代谢紊乱日益被人们重视。随着银灵通胶囊调节脂肪代谢的广泛运用, 其具体的机制研究越来越引起人们的关注。肝脏是体内参与脂质代谢的重要场所, HHL-5 肝细胞株较好地保留了肝细胞的多种生物学特性, 具有与人类肝细胞相似的代谢能力, 能够多代遗传并表达多种影响脂质代谢相关酶的基因, 是体外研究脂质代谢脂质代谢等的经典细胞模型。肝细胞内的 TG 可通过合成极低密度脂蛋白由肝细胞分泌或被用于氧化分解供能。当 TG 合成增多、转运或氧化障碍时, 均可导致 TG 堆积形成脂肪肝。本结果表明, 银灵通胶囊水溶液呈剂量依赖性的降低细胞内 TG 水平、增加肝 HHL-5 细胞脂肪酸的氧化水平。CPT-1 β 、ACC- β 在脂肪的氧化过程中起着重要作用, CPT-1 β 是脂肪酸氧化的限速酶, 能催化长链脂酰辅酶 A 与肉碱合成脂酰肉碱, 后者在线粒体内膜的肉碱原脂酰肉碱转位酶作用下, 通过内膜进入线粒体基质内, 参与脂肪酸的 β 氧化^[7]。ACC- β 催化反应生成的丙二酸单酰辅酶 A 是 ACC- β 的重要抑制物。

本实验结果表明, 银灵通胶囊具有降低 HHL-5 细胞内的 TG 含量、减少脂肪积聚作用, 并呈一定的剂量效应关系。0.5 mg/ml 虽有一定的降脂效应, 但与对照组相比没有明显统计学差异,

而在 1 mg/ml 与 2 mg/ml 的银灵通胶囊水溶液具有明显的降脂效应, 但这两个剂量组之间没有差异, 这表明在本实验体系下 1 mg/ml 即可能为饱和效应剂量。进一步实验表明, 银灵通胶囊对在脂肪氧化过程中起重要作用的代谢酶 CPT-1 β 、ACC- β 并未见影响, 因此其增强 HHL-5 细胞脂肪酸氧化水平的具体机制需要进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 郭宏, 许传芬, 郭冬. 非酒精性脂肪肝患者肝损害程度与代谢综合征各组分的关系. 中国医药, 2010, 5 (12): 1139-1141.
- [2] 孙梦颖, 梁敬钰, 冯燕, 等. 三萜酚酸酯类化合物的研究进展. 天然产物研究与开发, 2011, 23 (2): 369-373.
- [3] 陈佳, 谢作权, 叶赛, 等. 银杏叶提取物 GBE50 对 HepG2 细胞甘油三酯代谢的影响. 中国药理学通报, 2010, 26 (7): 961-964.
- [4] Djouadi F, Bonnefont JP, Munnich A, et al. Characterization of fatty acid oxidation in human muscle mitochondria and myoblasts. Mol Genet Metab, 2003, 78 (2): 112-118.
- [5] Takeo Iwata, Hisaaki Taniguchi, Masamichi Kuwajima, et al. The Action of D-Dopachrome Tautomerase as an Adipokine in Adipocyte Lipid Metabolism. PLoS One, 2012, 7 (3): 402-415.
- [6] Warnke I, Goralczyk R, Fuhrer E, et al. Dietary constituents reduce lipid accumulation in murine C3H10 T1/2 adipocytes: A novel fluorescent method to quantify fat droplets. Nutr Metab (Lond), 2011, 8 (1): 30-43.
- [7] Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. Diabetes, 2003, 52 (9): 2205-2212.

(收稿日期: 2012-11-05)

(本文编辑: 高荣慧)