

# 木香烃内酯抑制乙醇诱导的肝细胞损伤与脂肪变性

班笃敬<sup>1</sup>, 魏 炜<sup>2</sup>, 申 超<sup>2</sup>, 缪雪华<sup>2</sup>, 刘文生<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>南京中医药大学, 南京 210023; <sup>2</sup>南京中医药大学附属南京市中西医结合医院普外科, 南京 210014

**摘要:** 探究木香烃内酯体外对乙醇诱导肝细胞损伤及脂肪变性的影响。建立乙醇导致人 LO2 肝细胞损伤模型, 检测木香烃内酯对细胞活力、ALT 和 AST 释放、脂质生成、脂质调控因子表达及 AMPK 活性的影响。发现乙醇在高于 100 mM 浓度时显著抑制肝细胞活力, 据此将 100 mM 浓度的乙醇作为体外刺激肝细胞的实验浓度。木香烃内酯能够逆转乙醇对肝细胞活力的抑制作用, 并降低乙醇导致的肝细胞 ALT、AST 的释放。木香烃内酯能够降低乙醇诱导的肝细胞脂质成分集聚, 降低细胞内 TG、TC 水平。此外, 乙醇导致肝细胞中重要的脂质调控转录因子 SREBP-1c 的表达显著上调, 使 PPAR $\alpha$  的表达显著下调; 而木香烃内酯能够减少 SREBP-1c 的表达并增加 PPAR $\alpha$  的表达。进一步发现, 木香烃内酯显著促进肝细胞中 AMPK 的磷酸化, 且 AMPK 抑制剂 BML-275 能够显著削弱木香烃内酯对 SREBP-1c 和 PPAR $\alpha$  的调控作用。综上, 木香烃内酯体外显著改善乙醇诱导的肝细胞损伤与脂肪变性, 该作用与激活 AMPK 进而调控 SREBP-1c 与 PPAR $\alpha$  的表达有关。本研究为将木香烃内酯作为抗酒精性脂肪肝候选药物研究提供实验依据。

**关键词:** 木香烃内酯; 酒精性脂肪肝; 肝细胞; 脂肪变性; AMPK

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)4-0608-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.4.008

## Costunolide inhibits ethanol-induced hepatocyte injury and steatosis

BAN Du-jing<sup>1</sup>, WEI Wei<sup>2</sup>, SHEN Chao<sup>2</sup>, MIAO Xeu-hua<sup>2</sup>, LIU Wen-sheng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

<sup>2</sup>Nanjing Integrative Medicine Hospital, Nanjing 210014, China

**Abstract:** To investigate the effects of costunolide on ethanol-induced hepatocyte injury and steatosis *in vitro* and the underlying mechanism. Ethanol-induced LO2 hepatocyte cell injury model was established *in vitro*. We examined the effects of costunolide on the release of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), the intracellular contents of total cholesterol (TG) and triglyceride (TC), the mRNA and protein expression of lipogenesis-related transcription factors and the activity of AMP-activated protein kinase (AMPK) in ethanol-stimulated LO2 cells. The results showed that ethanol at concentrations higher than 100 mM significantly suppressed the viability of LO2 cells, and ethanol at 100 mM was selected for establishing hepatocyte injury model *in vitro*. Costunolide restored the ethanol-induced inhibition of LO2 cell viability, and costunolide at 20  $\mu$ M exerted significant effects. Costunolide also reduced the supernatant levels of ALT and AST in ethanol-stimulated LO2 cells. Furthermore, costunolide concentration-dependently decreased the accumulation of lipid components in ethanol-stimulated LO2 cells, and reduced the intracellular levels of TG and TC. Molecular examinations showed that ethanol significantly upregulated the mRNA and protein expression of SREBP-1c and downregulated the mRNA and protein expression of PPAR $\alpha$  in LO2 cells. However, costunolide concentration-dependently reduced SREBP-1c expression and restored PPAR $\alpha$  expression at both mRNA and protein levels in ethanol-stimulated LO2 cells. Furthermore, costunolide significantly promoted AMPK phosphorylation, and AMPK specific inhibitor BML-275 remarkably abrogated the regulatory effects of costunolide on SREBP-1c and PPAR $\alpha$ . In conclusion, costunolide could significantly attenuate ethanol-induced hepatocyte injury and steatosis *in vitro*. These effects were associated with activation of AMPK and modulation of lipid metabolism-related transcription

收稿日期: 2018-07-23 接受日期: 2019-02-19

基金项目: 南京市卫生局基金 (YKK11069)

\* 通信作者 Tel: 86-25-85370757; E-mail: 13851401166@163.com

factors. These data provided experimental evidence for developing costunolide as a therapeutic option for alcohol fatty liver disease.

**Key words:** costunolide; alcohol fatty liver disease; hepatocyte; steatosis; AMPK

酒精性脂肪肝病(alcohol fatty liver disease, AFLD)是因长期大量摄入酒精导致的以肝细胞脂肪变性为主要表现的肝损害性疾病,若疾病持续进展,则会导致酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化,引起肝细胞坏死甚至肝功能衰竭<sup>[1]</sup>。近年来酒精性脂肪肝在我国的发病率有所升高,酒精已成为导致肝脏损伤的第二大因素。长期大量摄入酒精,可干扰脂肪氧化,同时促进脂肪生成,引发脂质代谢异常,脂肪在肝细胞内蓄积后引起肝细胞受损<sup>[2]</sup>。目前,酒精性脂肪肝的临床药物治疗研究鲜有突破。

木香炔内酯(costunolide)是一倍半萜内酯类化合物,是中药木香的主要化学成分和质控成分之一。近年来研究表明木香炔内酯具有广泛的药理活性,包括抗肿瘤、降血糖、抗菌、抗炎等作用<sup>[3]</sup>。新近研究还发现,木香炔内酯在动物模型中能够减轻脂多糖诱导的急性肝损伤,可以有潜力成为一个具有保肝作用的药物<sup>[4]</sup>。本研究建立乙醇体外诱导人LO2肝细胞损伤模型,考察木香炔内酯对肝细胞损伤及脂肪变性的保护作用与初步机制与可能靶标,为木香炔内酯用于酒精性脂肪肝的防治提供实验依据。

## 1 实验材料

### 1.1 主要药品与抗体

木香炔内酯(纯度99.08%)、AMPK抑制剂BML-275(纯度99.73%)购自美国MedChemExpress公司,溶解于DMSO备用。Western blot实验用一抗SREBP-1c、PPAR $\alpha$ 、p-AMPK、AMPK、GAPDH及二抗Goat Anti-Rabbit-IgG-HRP购自美国Cell Signaling Technology。

### 1.2 实验仪器

主要实验仪器如下:光学显微镜(日本Olympus公司)、超低温冰箱(日本Sanyo公司)、CO<sub>2</sub>细胞培养箱(日本Sanyo公司)、超纯水仪(美国Millipore公司)、核酸蛋白分析仪(美国Beckman公司)、Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司)、多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司)、电泳槽(美国Bio-Rad公司)、凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

人LO2肝细胞购自中科院上海细胞库。在含

10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的高糖DMEM培养基中,置于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养。

### 2.2 MTT实验检测细胞活力

LO2细胞接种于96孔板,每孔180  $\mu$ L,  $1 \times 10^4$ 个细胞/孔,加入乙醇和/或木香炔内酯处理48 h。后加入5 mg/mL MTT溶液20  $\mu$ L继续培养4 h。移除上清,每孔加入200  $\mu$ L DMSO充分溶解结晶物。在多功能酶标仪490 nm处测量各孔OD值,同时设置调零孔(培养基、MTT)与对照孔(细胞、培养基、MTT),每组6个复孔。药物处理组的细胞活力标示为对照组的百分比。

### 2.3 细胞上清肝酶水平的测定

LO2细胞接种于6孔板,加入乙醇或木香炔内酯处理48 h。取每组细胞上清液,按照试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)方法测定谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的活性。每组6个复孔,药物处理组的ALT或AST水平表示为对照组的倍数。

### 2.4 油红O染色

LO2细胞接种于放有无菌盖玻片的24孔培养板,加入乙醇和/或木香炔内酯处理48 h。后以PBS洗涤3遍,4%多聚甲醛固定30 min,0.5%油红O染液(购自碧云天生物技术公司)室温染色30 min,60%异丙醇漂洗30 s,蒸馏水洗30 s至背景透明,明胶甘油封片,显微镜下观察细胞内脂滴形成情况。

### 2.5 细胞内脂质含量测定

LO2细胞接种于6孔板,加入乙醇和/或木香炔内酯处理48 h。后弃上清,PBS洗涤细胞3遍,加入胰酶消化,收集细胞悬液,超声细胞粉碎机裂解细胞2 min,离心取上清,按试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)说明书方法检测上清中甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)的含量。每组6个复孔,药物处理组的TG或TC水平表示为对照组的倍数。

### 2.6 Real-time PCR检测

LO2细胞接种于6孔板,加入乙醇、木香炔内酯和/或BML-275处理48 h。细胞内RNA提取按照Trizol Reagent说明书进行,紫外分光光度计检测纯度和定量。cDNA的合成采用40  $\mu$ L逆转录反应体

系,其中 M-MLV 200 U,oligo(dT)(15 primer)10 ng/mL,4 × dNTP(10 mM)4 μL,5 × RT buffer 8 μL,无 RNase 水补至 40 μL。42 °C 反应 15 min,95 °C 灭活 M-MLV 酶 5 min。根据 Genebank 资料自行设计引物(表 1),由上海生工生物工程有限公司合成。以 GAPDH 作为内参物,PCR 扩增体系为 20 μL,包含

cDNA 2 μL,上下游引物(10 μM)各 1 μL,SYBR Premix Ex Taq 酶 10 μL,用 DEPC 水补至 20 μL。PCR 反应参数:95 °C 预变性 30 s;95 °C、5 s;60 °C、30 s,共扩增 40 个循环。测得目的基因扩增的动力学曲线与 Ct 值。目的基因 mRNA 的倍数改变通过与 GAPDH 相比较计算得出。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Gene	上游引物序列 Forward sequences	下游引物序列 Reverse sequences
SREBP-1c	5'-GCTGGCTCACCTTTCCAG-3'	5'-GGCCTCAGTATTCTGTCTTGC-3'
PPARα	5'-TTAGAGCGGAGCCAAGACTG-3'	5'-GCATTCTGTGACATCCCGAC-3'
GAPDH	5'-GGCCCTCTGGAAGCTGTG-3'	5'-CCGCTGCTTACCACCTTCT-3'

## 2.7 Western blot 检测

LO2 细胞接种于 6 孔板,加入乙醇、木香烯内酯和/或 BML-275 处理 48 h。用冰冷的 RIPA 裂解液进行细胞裂解,收集裂解物,-80 °C 储藏过夜。蛋白混合液融化,于 4 °C、12 000 rpm 下离心 15 min,吸取上清以 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白上样量为 50 μg,进行 SDS-PAGE 电泳,PVDF 转膜,非特异性封

闭;加入相应一抗,4 °C 过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗进行杂交。加入 ECL 发光液,以凝胶成像仪(Bio-Rad)进行成像与半定量分析。

## 2.8 统计学分析

实验数据使用 SPSS16.0 软件统计分析。数据以平均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间均数比较使用方差分析,*t* 检验,以  $P < 0.05$  为有显著性差异。

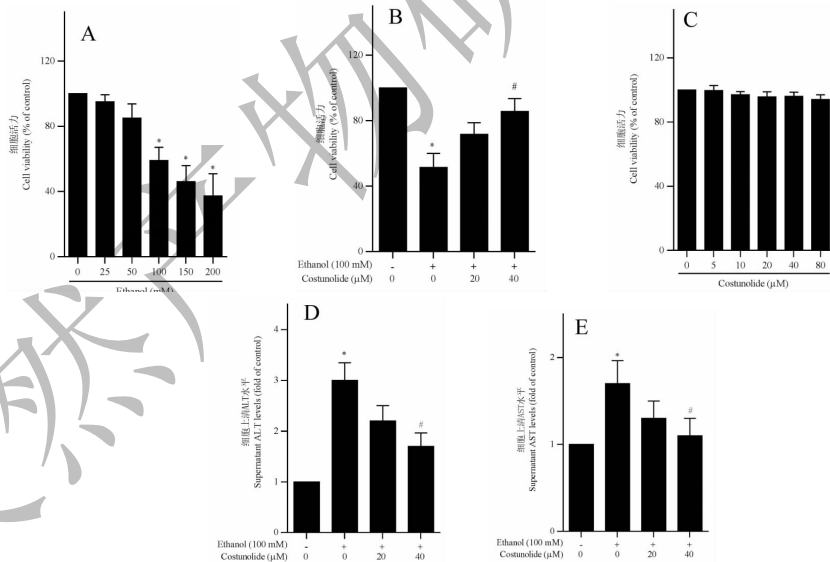


图 1 木香烯内酯抑制乙醇诱导的肝细胞损伤

Fig. 1 Costunolide inhibits ethanol-induced hepatocyte injury

注:(A) MTT 实验检测乙醇对 LO2 细胞活力的影响,与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;(B) MTT 实验检测木香烯内酯对乙醇刺激的 LO2 细胞活力的影响,与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,与乙醇组相比,# $P < 0.05$ ;(C) MTT 实验检测木香烯内酯在 0-80 μM 范围内对 LO2 细胞活力的影响;(D, E) 试剂盒检测木香烯内酯对乙醇刺激的 LO2 细胞上清 ALT 和 AST 水平的影响,与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,与乙醇组相比,# $P < 0.05$ 。

Note:(A) MTT assay for detecting the effects of ethanol on LO2 cell viability,\* $P < 0.05$ ;(B) MTT assay for detecting the effects of Costunolide on ethanol-induced LO2 cell injury,\* $P < 0.05$  vs control,# $P < 0.05$  vs ethanol;(C) MTT assay for detecting the effects of Costunolide at 0-80 μM on LO2 cell viability,(D,E) Measurements of supernatant ALT and AST levels in ethanol-stimulated LO2 cells treated with costunolide,\* $P < 0.05$  vs control,# $P < 0.05$  vs ethanol.

### 3 结果

#### 3.1 木香烃内酯抑制乙醇导致的肝细胞损伤

首先建立乙醇诱导的肝细胞损伤模型。MTT 检测结果显示,当乙醇浓度为 100 mM 或高于此浓度时显著抑制 LO2 细胞活力,呈剂量依赖性(图 1A)。据此选择浓度为 100 mM 的乙醇作为后续实验中诱导肝细胞损伤的条件。以 MTT 实验考察木香烃内酯对乙醇诱导肝细胞损伤的影响,发现木香烃内酯在 40  $\mu\text{M}$  浓度时可显著改善乙醇对 LO2 细胞活力的抑制作用(图 1B),但单独作用时,对 LO2 细胞活力没有显著影响(图 1C)。进一步考察木香烃内酯对乙醇刺激的肝细胞上清液中 ALT 和 AST 水平的影响,结果发现与对照组相比,乙醇导致 LO2 细胞上清液中 ALT 和 AST 水平显著升高,而木香烃内酯在 40  $\mu\text{M}$  浓度时显著降低乙醇刺激的 LO2 细胞上清液中 ALT 与 AST 含量(图 1D、1E)。上述结

果表明,木香烃内酯可以抑制乙醇诱导的肝细胞损伤。

#### 3.2 木香烃内酯抑制乙醇导致的肝细胞脂质生成

以油红 O 染色检测肝细胞中的脂滴堆积情况。结果显示,与对照组相比,100 mM 浓度的乙醇作用 48 h 后可明显促进 LO2 细胞中的脂质生成;而木香烃内酯在 20、40  $\mu\text{M}$  浓度时可抑制乙醇诱导的脂质生成(图 2A)。利用试剂盒检测 LO2 细胞中 TG 和 TC 的水平,结果显示与对照组对比,乙醇可显著升高 LO2 细胞中 TG 的水平,而木香烃内酯在 40  $\mu\text{M}$  浓度时显著降低乙醇刺激的 LO2 细胞中的 TG 含量(图 2B)。类似地,乙醇也可显著升高 LO2 细胞中 TC 的水平,而木香烃内酯在 20、40  $\mu\text{M}$  浓度时显著降低乙醇刺激的 LO2 细胞中的 TC 的含量(图 2C)。上述结果显示,木香烃内酯可以抑制乙醇诱导的肝细胞脂质生成。

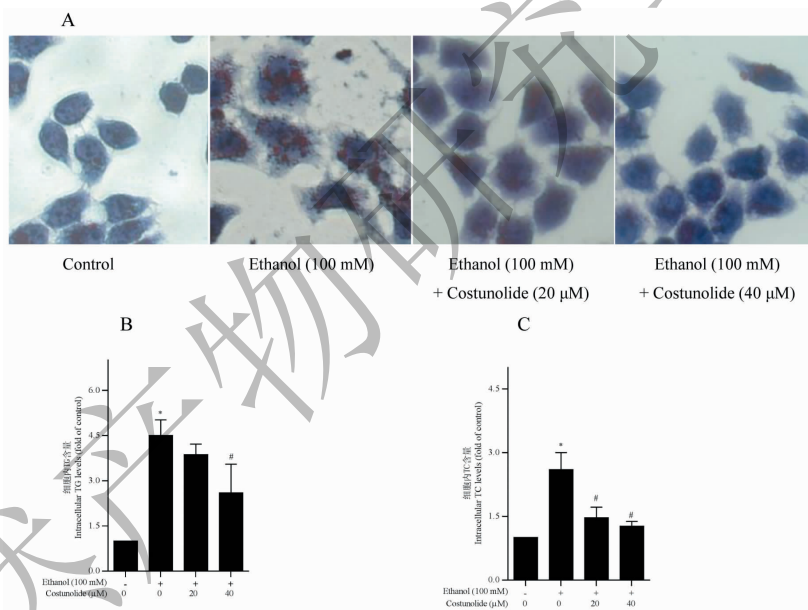


图 2 木香烃内酯抑制乙醇诱导的肝细胞脂质生成

Fig. 2 Costunolide inhibits ethanol-induced lipogenesis in hepatocytes

注:(A)油红 O 染色检测木香烃内酯对乙醇刺激的 LO2 细胞中脂质堆积的影响(放大倍数:400X);(B)试剂盒检测木香烃内酯对乙醇刺激的 LO2 细胞中 TG 含量的影响,与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与乙醇组相比,# $P < 0.05$ ;(C)试剂盒检测木香烃内酯对乙醇刺激的 LO2 细胞中 TC 含量的影响,与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,与乙醇组相比,# $P < 0.05$ 。

Note:(A) Oil-red O staining for evaluating the effects of costunolide on ethanol-induced lipid accumulation in LO2 cells (400X magnification);

(B) Measurement of intracellular TG levels in ethanol-stimulated LO2 cells treated with costunolide, \* $P < 0.05$  vs control, # $P < 0.05$  vs ethanol;

(C) Measurement of intracellular TC levels in ethanol-stimulated LO2 cells treated with costunolide, \* $P < 0.05$  vs control, # $P < 0.05$  vs ethanol.

#### 3.3 木香烃内酯调控肝细胞中脂质相关转录因子的表达

固醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c) 和过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) 是对肝细胞

中脂质的合成具有重要调控作用的转录因子,其中 SREBP-1c 具有正向调控脂质生成的作用<sup>[5]</sup>,而 PPAR $\alpha$  起到负向调节作用<sup>[6]</sup>。Real-time PCR 检测结果显示,与对照组相比,乙醇可显著促进 LO2 细

胞中 SREBP-1c 的 mRNA 表达,而抑制 PPAR $\alpha$  的 mRNA 表达;与乙醇模型组相比,木香烃内酯在 20 和 40  $\mu\text{M}$  浓度时显著降低 SREBP-1c 的 mRNA 表达并上调 PPAR $\alpha$  的 mRNA 表达(图 3A)。以 Western blot 检测 SREBP-1c 和 PPAR $\alpha$  的蛋白表达。结果显示,与对照组相比,乙醇可显著促进 LO2 细胞中

SREBP-1c 的蛋白表达,而抑制 PPAR $\alpha$  的蛋白表达;与乙醇模型组相比,木香烃内酯在 40  $\mu\text{M}$  浓度时显著降低 SREBP-1c 的蛋白表达并上调 PPAR $\alpha$  的 mRNA 表达(图 3B)。综合上述表明,木香烃内酯能够调控肝细胞中脂质相关转录因子的表达,与改善乙醇诱导的肝细胞脂肪变性相关。

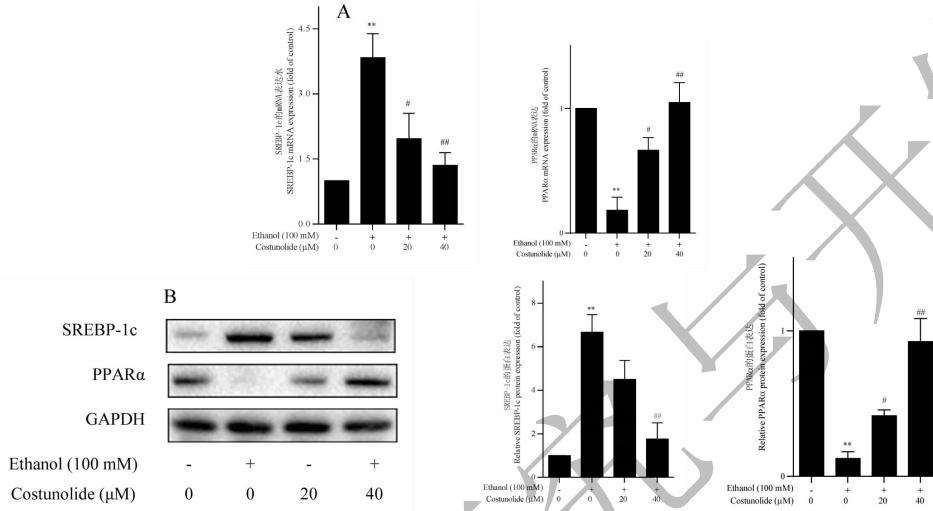


图 3 木香烃内酯调控肝细胞中脂质相关转录因子的表达

Fig. 3 Costunolide regulates the expression of lipogenesis-related transcription factors in hepatocytes

注:(A) Real-time PCR 检测木香烃内酯对乙醇刺激的 LO2 细胞中 SREBP-1c、PPAR $\alpha$  的 mRNA 表达的影响,与对照组相比, \* \*  $P < 0.01$ ,与乙醇组相比, #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.01$ ; (B) Western blot 检测木香烃内酯对乙醇刺激的 LO2 细胞中 SREBP-1c、PPAR $\alpha$  的蛋白表达的影响,与对照组相比, \* \*  $P < 0.01$ ,与乙醇组相比, #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.01$ 。

Note: (A) Real-time PCR analyses for evaluating the effects of costunolide on mRNA expression of SREBP-1c and PPAR $\alpha$  in ethanol-stimulated O2 cells treated with costunolide, \* \*  $P < 0.01$  vs control, #  $P < 0.05$  vs ethanol, ###  $P < 0.01$  vs ethanol; (B) Western blot analyses for evaluating the effects of costunolide on protein expression of SREBP-1c and PPAR $\alpha$  in ethanol-stimulated LO2 cells treated with costunolide, \* \*  $P < 0.01$  vs control, #  $P < 0.05$  vs ethanol, ###  $P < 0.01$  vs ethanol.

### 3.4 木香烃内酯依赖于激活 AMPK 调控肝细胞中脂质相关转录因子的表达

进一步探究木香烃内酯的可能作用靶标。腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)是细胞的能量感受器,在肝脏脂质代谢调节中也发挥重要作用,可以成为药物干预酒精性脂肪肝的分子靶标<sup>[7]</sup>。Western blot 检测结果显示,乙醇显著抑制 LO2 细胞中 AMPK 的磷酸化,而木香烃内酯在 20、40  $\mu\text{M}$  时显著上调乙醇刺激的 LO2 细胞中 AMPK 的磷酸化(图 4A),提示能够增强 AMPK 的活性。以 AMPK 的特异性抑制剂 BML-275 作为工具药,考察木香烃内酯对肝细胞脂质的调控是否依赖于激活 AMPK。Real-time PCR 检测结果显示,BML-275 在 10  $\mu\text{M}$  时显著削弱木香烃内酯对 SREBP-1c 基因表达的抑制作用,同时削弱对 PPAR $\alpha$  基因表达的上调作用(图 4B)。Western

blot 检测结果显示,BML-275 在蛋白水平也产生相似的作用(图 4C)。上述结果表明,木香烃内酯依赖于激活 AMPK 调控肝细胞中脂质调控相关转录因子的表达。

## 4 讨论

长期过量摄入酒精,肝脏无法将其完全代谢,将导致体内诸多生理、生化和代谢平衡失调,造成肝细胞损伤,进而引发酒精性肝脏疾病的发生。酒精性脂肪肝发展为肝纤维化和肝硬化的危险性比单纯性脂肪肝更高。一方面,酒精在肝脏通过 CYP2E1 代谢产生活性氧自由基,引起脂质过氧化连锁反应,在肝脏内生成脂质过氧化终产物,造成肝细胞损伤,导致肝细胞凋亡或坏死;另一方面,进入肝细胞的酒精在乙醇脱氢酶和微粒体乙醇氧化酶系的作用下转变为乙醛,再转变为乙酸,后一反应使氧化型辅酶 I

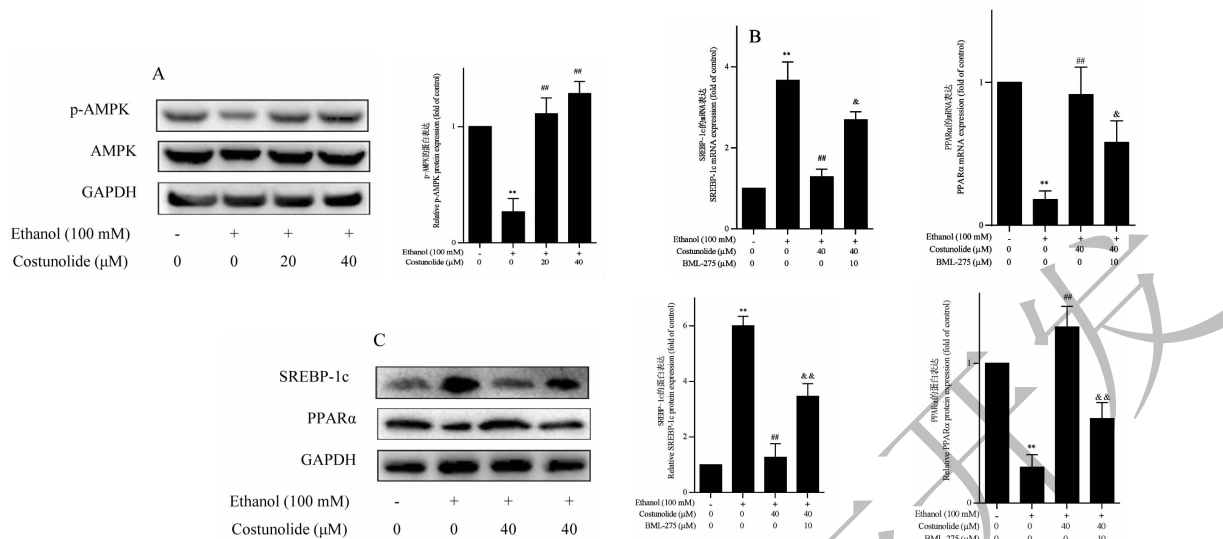


图4 木香烯内酯通过激活 AMPK 调控肝细胞中脂质相关转录因子的表达

Fig. 4 Activation of AMPK is required for costunolide to regulate the expression of lipogenesis-related transcription factors in hepatocytes

注:(A) Western blot 检测木香烯内酯对乙醇刺激的 LO2 细胞中 AMPK 磷酸化的影响,与对照组相比, \* \*  $P < 0.01$ ,与乙醇组相比,

##  $P < 0.01$ ; (B) Real-time PCR 检测木香烯内酯及其与 BML-275 联用时对乙醇刺激的 LO2 细胞中 SREBP-1c, PPAR $\alpha$  的 mRNA 表达

的影响,与对照组相比, \* \*  $P < 0.01$ ,与乙醇组相比, ##  $P < 0.01$ ,与木香烯内酯组相比, &  $P < 0.05$ ; (C) Western blot

检测木香烯内酯及其与 BML-275 联用时对乙醇刺激的 LO2 细胞中 SREBP-1c, PPAR $\alpha$  的蛋白表达的影响,与对照组相比, \* \*  $P < 0.01$ ,与乙醇组相比, ##  $P < 0.01$ ,与木香烯内酯组相比, &&  $P < 0.01$ 。

Note: (A) Western blot analyses for evaluating the effects of costunolide on AMPK phosphorylation in ethanol-stimulated LO2 cells treated with costunolide, \*  $P < 0.05$  vs control, ##  $P < 0.01$  vs ethanol; (B) Real-time PCR analyses for evaluating the effects of costunolide on mRNA expression of SREBP-1c and PPAR $\alpha$  in ethanol-stimulated LO2 cells treated with costunolide and/or BML-275, \* \*  $P < 0.01$  vs control, ##  $P < 0.01$  vs ethanol, &  $P < 0.05$  vs costunolide; (C) Western blot analyses for evaluating the effects of costunolide on protein expression of SREBP-1c and PPAR $\alpha$  in ethanol-stimulated LO2 cells treated with costunolide and/or BML-275, \* \*  $P < 0.01$  vs control, ##  $P < 0.01$  vs ethanol, &&  $P < 0.01$  vs costunolide.

(NAD) 转变为还原型辅酶 I (NADH), 因而 NADH 与 NAD 比值升高。NADH/NAD 比值的升高可抑制细胞线粒体内的三羧酸循环, 使肝内脂肪酸代谢发生障碍, 氧化分解减弱, 从而导致脂肪堆积于肝细胞中; 另外, NADH/NAD 比值的升高促进了脂肪酸的合成, 也导致脂肪在肝细胞中堆积, 最终导致了脂肪肝形成<sup>[81]</sup>。本研究发现, 乙醇在 100 mM 浓度下对人 LO2 肝细胞作用 48 h 可以显著抑制肝细胞的活力, 促进转氨酶的释放, 并增加细胞内脂质成分的生成与集聚, 提示形成了酒精体外诱导肝细胞损伤与脂肪变性的模型, 这一模型可用于考察药物体外对酒精性脂肪肝的干预作用。

木香烯内酯是一个受到广泛关注的药用天然产物。早先有研究发现木香烯内酯能够抑制机体胃肠道对酒精的吸收, 提示对酒精导致的肝损伤有潜在的保护作用<sup>[9]</sup>。越来越多的证据表明木香烯内酯对肝脏具有多种药理作用, 如通过阻断 NF- $\kappa$ B 信号

通路改善急性肝损伤<sup>[4]</sup>, 抑制肝细胞表达乙型肝炎病毒表面抗原<sup>[10]</sup>, 抑制肝脏中的氧化应激反应<sup>[11]</sup>, 以及阻断肝癌细胞的周期进而抑制其增殖<sup>[12]</sup>。据此, 本论文旨在探讨木香烯内酯对酒精性脂肪肝的潜在干预作用与机制, 发现木香烯内酯体外对正常肝细胞活力没有显著影响, 但可以显著改善酒精诱导的肝细胞损伤以及脂质成分的合成, 尤其是降低细胞内 TG 和 TC 水平的升高。肝脏是合成和贮存 TG 和 TC 的主要器官。脂肪性肝病以肝细胞内 TG 和 TC 蓄积过多和弥漫性肝细胞脂肪变性为主要病理特征。在酒精性脂肪肝进程中, 乙醇联合游离脂肪酸能够降低线粒体脂肪酸  $\beta$  氧化能力, 使 TG 和 TC 大量沉积于肝脏<sup>[13]</sup>。因此, 木香烯内酯抑制肝细胞内 TG 和 TC 生成的作用可能是其改善酒精性脂肪肝的重要途径之一。

本研究进一步从肝细胞脂质成分转录调控的角度探讨木香烯内酯的作用机制。SREBP 是调控脂

质代谢相关基因表达的关键核转录因子,共分为三种 SREBP 亚型,它们在脂质合成中各自起到不同的作用,其中 SREBP-1c 是肝脏脂质代谢的关键调控者,几乎参与所有肝脏甘油三酯和脂肪酸合成基因的转录。SREBP-1c 的过度表达将引起糖脂代谢的异常,使产脂量大幅提升,进而导致肝脏等非脂肪组织的脂质积聚<sup>[14]</sup>。PPAR $\alpha$  是一个主要在肝脏表达的核转录因子,参与调节脂肪酸  $\beta$  氧化及脂蛋白合成中相关基因的表达,促进肝脏脂代谢,改善胰岛素抵抗。PPAR $\alpha$  的缺乏或低表达可以使肝脏脂质的利用和脂肪酸的氧化发生障碍,导致肝脏甘油三酯沉积、糖脂代谢紊乱<sup>[15]</sup>。有研究发现,PPAR $\alpha$  的拮抗剂 GW6471 可加重糖尿病脂肪肝小鼠肝脏炎症反应,而 PPAR $\alpha$  的激动剂 WY14643 可提高糖尿病脂肪肝小鼠脂肪变性程度<sup>[16]</sup>。因此, SREBP-1c 与 PPAR $\alpha$  二者在细胞内脂质代谢方面产生相反的调控作用,并且存在相互关联,如有研究发现 PPAR $\alpha$  可抑制 SREBP-1c 的活性,从而减少脂肪酸和 TG 的合成<sup>[17]</sup>。本论文研究发现在乙醇刺激的 LO2 细胞中,木香烯内酯可显著下调 SREBP-1c 的表达并恢复 PPAR $\alpha$  的表达,这一作用可能是木香烯内酯抑制 LO2 细胞内 TG、TC 等脂质成分合成的上游事件。这些结果也提示木香烯内酯可以在转录水平抑制肝细胞内的脂质生成。进一步发现木香烯内酯的作用依赖于激活 AMPK。AMPK 是广泛表达的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合体,在应激情况下,AMPK 磷酸化后激活,通过限制合成代谢减少 ATP 的消耗和促进分解代谢增加 ATP 的生成来维持机体稳态<sup>[18]</sup>。本研究结果提示木香烯内酯减少乙醇诱导的肝细胞内的脂质含量可能与激活 AMPK,进而影响脂质相关转录因子相关。后续工作将进一步探究木香烯内酯如何激活肝细胞中的 AMPK。

综合本研究的结果表明,木香烯内酯可能通过激活 AMPK,调控脂质代谢相关转录因子 SREBP-1c 与 PPAR $\alpha$  的表达,进而减少肝细胞内的脂质生成与集聚。这一发现为木香烯内酯作为酒精性脂肪肝的潜在防治药物的进一步研究提供实验依据。

#### 参考文献

- Lívero FA, Acco A. Molecular basis of alcoholic fatty liver disease: From incidence to treatment [J]. *Hepatol Res*, 2016, 46:111-123.
- Ju C, Mandrekar P. Macrophages and alcohol-related liver inflammation [J]. *Alcohol Res*, 2015, 37:251-262.
- Lin X, Peng Z, Su C. Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone [J]. *Int*

- J Mol Sci*, 2015, 16:10888-10906.
- Wang Y, Zhang X, Zhao L, et al. Costunolide protects lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver injury in mice by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *J Surg Res*, 2017, 220:40-45.
- Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(S2):83-92.
- Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPAR $\alpha$  [J]. *Mol Metab*, 2014, 3:354-371.
- Sid B, Verrax J, Calderon PB. Role of AMPK activation in oxidative cell damage: Implications for alcohol-induced liver disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86:200-209.
- Wang S, Pacher P, De Lisle RC, et al. A mechanistic review of cell death in alcohol-induced liver injury [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2016, 40:1215-1223.
- Matsuda H, Shimoda H, Ninomiya K, et al. Inhibitory mechanism of costunolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Laurus nobilis*, on blood-ethanol elevation in rats; Involvement of inhibition of gastric emptying and increase in gastric juice secretion [J]. *Alcohol Alcoholism*, 2002, 37:121-127.
- Chen HC, Chou CK, Lee SD, et al. Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells [J]. *Antiviral Res*, 1995, 27:99-109.
- Eliza J, Daisy P, Ignacimuthu S. Antioxidant activity of costunolide and eremanthin isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188:467-472.
- Liu CY, Chang HS, Chen IS, et al. Costunolide causes mitotic arrest and enhances radiosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Radiat Oncol*, 2011, 6:56.
- Park HJ, Lee SJ, Song Y, et al. Schisandra chinensis prevents alcohol-induced fatty liver disease in rats [J]. *J Med Food*, 2014, 17:103-110.
- Ferré P, Foufelle F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: Clinical perspective [J]. *Horm Res*, 2007, 68(2):72-82.
- Lin Y, Xia Z, Yang F, et al. Research progress in the natural agonists for PPA receptors [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:998-1005.
- Kong L, Ren W, Li W, et al. Activation of peroxisome proliferator activated receptor alpha ameliorates ethanol induced steatohepatitis in mice [J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10:246.
- Gadji M, Crous AM, Fortin D, et al. EGF receptor inhibitors in the treatment of glioblastoma multiforme: Old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625(1-3):23-30.
- Cantó C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67:3407-3423.