

茵陈醇提物抗游离脂肪酸对体外培养 HepG2 细胞脂毒性的作用及机制研究

陈少东^{1,2}, 冯琴¹, 彭景华¹, 许丽莉¹, 刘平¹, 刘成¹, 胡义扬^{1*}

(1. 上海中医药大学 附属曙光医院 上海中医药大学肝病研究所 肝肾疾病病证教育部重点研究室

上海市高校中医内科学 E 研究院, 上海 201203;

2. 厦门大学 医学院, 福建 厦门 361005)

摘要 目的:研究茵陈醇提物对游离脂肪酸刺激 HepG2 细胞所致肝脂毒性的抑制作用及机制。方法:制备大鼠的正常血清和药物血清,在经毒性试验确定无药物毒性的前提下,分设正常组、模型组和茵陈醇提物组(10%,1%,0.1% 3 个剂量),以相应浓度的正常血清和药物血清培养 HepG2 细胞,同时添加长链游离脂肪酸(FFA)刺激 HepG2 细胞 24 h。观察:细胞上清肿瘤坏死因子(TNF- α)含量(ELISA 法);细胞内甘油三酯(TG)含量、细胞脂肪油红 O 染色;细胞内磷酸化 B 抑制蛋白(P-I B)、组织蛋白酶 B(ctsb)、凋亡抑制基因相关 X 蛋白(Bax)蛋白表达(Western Blotting 法);细胞 TNF- α , ctsb 和 Bax 基因表达(real-time PCR);细胞内 ctsb 的表达和分布(免疫荧光法)。结果:模型组细胞内 TG 及上清 TNF- α 含量显著升高,分别达 $(590 \pm 186) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $(77 \pm 11) \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$, 细胞内 ctsb, P-I B 的蛋白表达以及 ctsb, TNF- α 的 mRNA 表达显著增强;而 10% 茵陈醇提物组细胞内 TG 和上清 TNF- α 含量较模型组显著降低,仅为 $(335 \pm 54) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $(55 \pm 7) \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$, 且显著抑制细胞内 ctsb, P-I B 的蛋白表达以及 ctsb, TNF- α 的 mRNA 表达。结论:茵陈醇提物对 FFA 诱导的 HepG2 细胞脂肪变性, TNF- α 分泌有显著的抑制作用,其作用与抑制 ctsb 等基因和蛋白表达有关。

关键词 茵陈醇提物;游离脂肪酸;HepG2 细胞;肝脂毒性

近年来临床实践和研究表明,中医药对非酒精性脂肪肝的治疗有良好的效应和前景^[1]。作者既往对“祛湿化痰复方”(由中药茵陈、栀子、虎杖、田基黄、姜黄组成)的研究表明,该方具有显著的抗脂肪肝效应,并存在抗氧化、抗脂毒性等作用^[2-5]。为进一步剖析复方综合药理作用的主效应中药,作者结合数学模型“均匀设计法”研究发现方中的茵陈(醇提)是该方针对抑制脂肪变性和 TNF- α 分泌作用环节的主效应中药^[6]。为此,作者采用游离脂肪酸诱导 HepG2 细胞肝脂毒性体外模型,对茵陈醇提物体外抗肝脂毒性作用及其机制进行了进一步深入研究。

[收稿日期] 2009-01-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672635);上海市优秀学科带头人计划项目(06XD14018);上海市教委重点学科建设项目(Y0302);上海高校创新团队(第一期);福建省自然科学基金项目(2009J05089);厦门大学医学院院长基金项目

[通信作者] *胡义扬, Tel: (021) 51328888-8111, E-mail: yyhuliver@163.com

[作者简介] 陈少东,医学博士,厦门大学医学院教师。E-mail: csd5035201@yahoo.com.cn

1 材料

1.1 细胞株

采用 HepG2 细胞,购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。

1.2 动物

SD 雄性大鼠, SPF 级, 300 g 左右,购自中国科学院上海实验动物中心,合格证号 SCXK(沪)2007-0005,用于制备药物血清。

1.3 药物

茵陈 *Herba artemisiae Scoporiae*, 购自上海华浦中药饮片有限公司,生产批号 2006080303。制备工艺:取茵陈 1 000 g,加 6 000 mL 90%乙醇回流提取 3 次,每次 3 h,合并滤液,60 °C 减压回收乙醇,得含生药 $0.33 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的茵陈醇提物。冷藏备用。

1.4 试剂

胎牛血清(FBS),批号 04-001-1B,PRM I Medium 1640 培养基干粉,批号 1285082(GBCO 公司)。棕榈酸(palmitic acid),批号 P0500、油酸(oleic acid),批号 O1008-1G(Sigma 公司)。甘油三酯(TG),批号 2006110332、乳酸脱氢酶(lactate dehy-

drogenase, LDH), 批号 20060606, 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒, 批号 2007110337 (南京建成生物制品研究所), BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 批号 P0012 (碧云天公司)。油红 O, 批号 WF20060307 (上海化学试剂站)。酶联免疫吸附分析 (ELISA) 人血浆 TNF- 检测试剂盒, 批号 KHC3012 (Biosource 公司)。P-I B 抗体 (mouse monoclonal IgG), 批号 9246, 多克隆 ctsb 抗体, 批号 06-480 (Cell Signaling Technology 公司)。Bax 抗体, 批号 ZM-0300 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。单克隆 GAPDH 抗体, 批号 KC-5G5 (康成生物科技公司)。多克隆兔抗羊抗, 批号 64356 (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc 公司)。Anti-rabbit IgG 多克隆抗, 批号 w10562 (Santa Cruz Biotechnology 公司)。ctsb 细胞免疫荧光抗体为 anti-rabbit IgG (H+L) CYTM5, 批号 62-6120 (美国 ZYMED 公司)。焦碳酸二乙酯 (DEPC), 批号 W6701 (Amresco 公司)。RNA 抽提试剂盒, 批号 2608A (上海华舜生物工程有限公司), cDNA 合成试剂盒 Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis Kit, 批号 K1622 (Fementas 公司)。DNA Marker, 批号 DRR041A, 荧光定量 PCR 试剂盒, 批号 BK4402 (TAKARA 公司), 溴化乙锭, 批号 E-8751 (Sigma 公司)。RNA 上样缓冲液, 批号 060492, DNA 上样缓冲液, 批号 0501084 (北京鼎国生物技术公司)。TAE 干粉 (Tris-Acetate-EDTA), 批号 BRL-25300 (迪申生物技术公司)。引物合成自生工公司, 其序列及片段长度 (表 1)。

表 1 目的基因引物序列及片段长度

目的基因	引物序列	片段 /bp
-actin	5'-TGACGAGGCCCAAGCAAGA-3' (F)	331
	5'-ATGGGCACAGTGTGGGTGAC-3' (R)	
TNF-	5'-GGCAGCCTTGTCCTTGAAAGAG-3' (F)	171
	5'-GTAGCCACGTCGTAGCAAACC-3' (R)	
ctsb	5'-AAGCTTCGATGCACGGGAAC-3' (F)	136
	5'-ATTGGTGTAGATGAG-3' (R)	
Bax	5'-GCCAGTGTCTCAAAGCCATC-3' (F)	143
	5'-CCAGTTGAAAGTTCGCCGTICAGAA-3' (R)	

1.5 主要仪器

Primo R 型低温高速离心机 and BB15 型 CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 公司)。HFsafe-1500 型生物安全柜 (HEAL FORCE 公司)。倒置生物显微镜 37XB (上海光学仪器厂)。Philips Tecnai 电子显微镜。M5 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)。FA1004 分

析电子天平 (美国 Denver 公司)。PCR 扩增仪 Rotor-Gene RG-3000 (美国基因公司)。JY200 电泳仪 (北京市君意机电技术公司)。Bio-Rad 电泳仪、XRC-1 型 X 射线暗匣 (上海医疗器械五厂)。复日 FR-980 生物电泳图像分析系统 (上海复日科技有限公司)。HP Scanjet XPA 型扫描仪 (惠普公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2 细胞株以 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 消化传代, 以含 10% 胎牛血清的 1640 培养液在含 5% CO₂ + 95% 空气的 37 °C 培养箱中培养。加药前以无血清 1640 洗涤 2 次。

2.2 药物血清制备

按 10 mL · kg⁻¹ 鼠重, 生药 0.33 g · mL⁻¹ 剂量给大鼠灌服药物, 2 次 /d, 连续 3 d, 末次灌胃结束后禁食, 1 h 后无菌条件下从腹腔静脉取血, 静置 3 ~ 4 h, 3 000 r · min⁻¹, 20 min, 4 °C 离心, 超净台上分离血清。将分离得到的血清置于 56 °C 水浴中 30 min 灭活, -70 °C 冷藏备用。

2.3 药物血清毒性试验

分别设 10%, 20%, 30% 胎牛血清组、正常大鼠血清组和茵陈醇提物药物血清组, 每组 3 皿, 作用于 HepG2 24 h 后, 取上清检测 LDH 活性。

2.4 分组与用药

2.4.1 茵陈醇提物体外抗肝脂毒性实验 HepG2 培养 24 ~ 48 h, 细胞长满 70% ~ 80%, 换液, 分正常组、模型组以及 10%, 1%, 0.1% 3 个剂量茵陈醇提物组, 每组各 4 皿。正常组、模型组添加 10% 正常大鼠血清, 10% 茵陈醇提物剂量组添加 10% 茵陈醇提物药物血清、1% 茵陈醇提物剂量组添加 10% 正常大鼠血清稀释 10 倍的 10% 茵陈醇提物药物血清, 0.1% 茵陈醇提物剂量组添加 10% 正常大鼠血清稀释 100 倍的 10% 茵陈醇提物药物血清, 不同茵陈醇提物组的血清浓度仍保持为 10%。除正常组外, 各组添加 FFA (油酸: 棕榈酸浓度为 0.5 × 10⁻³ mol · L⁻¹ 0.25 × 10⁻³ mol · L⁻¹)^[7]。刺激 24 h 收集上清及细胞, 检测细胞内 TG, 上清 TNF- 含量及进行细胞油红 O 染色。

2.4.2 茵陈醇提物体外抗肝脂毒性的作用机制研究 HepG2 培养 24 ~ 48 h, 细胞长满 70% ~ 80%, 换液, 分正常组、模型组、最佳效应茵陈醇提物剂量组 (取体外抗肝脂毒性实验所得效应强度最佳的剂

量组进行作用机制研究), 每组各 4 皿。正常组、模型组添加 10% 正常大鼠血清, 10% 茵陈醇提物剂量组添加 10% 茵陈醇提物药物血清。除正常组外, 各组添加 FFA。刺激 24 h 收集上清及细胞, 检测如下项目。

2.5 检测项目和方法

2.5.1 细胞内 TG 含量 参考 Heider JG 方法提取细胞层总脂质^[8], 冰上刮下细胞层后, 加入 3 mL 异丙醇洗净, 移入试管, 混匀 3 min (破膜), 分装 3 管。取出其中一套, 室温离心 ($3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min), 脂类溶于异丙醇, 下层沉淀为蛋白。取上清 80 以上水浴使异丙醇蒸发至干, 所得为脂类物质, 重新溶于 9 μL 异丙醇, 加入 900 μL 酶试剂, 采用 GPO-PAP 法, 酶标仪 546 nm 处测吸光度 (A), 求出各样本的 TG 含量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。下层沉淀溶于 200 μL $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, 取 30 μL 进行检测, 得蛋白浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。细胞内 TG 含量通过细胞层总蛋白含量进行校正, 得 TG 含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。

2.5.2 细胞油红 O 染色 细胞爬片取出后, 用预冷的 PBS 洗 3 遍, 吹干, 入 10% 甲醛固定 1 h。加油红 O 染液, 室温下 2 h, 再用 PBS 洗 3 遍。光学显微镜观察拍照。

2.5.3 细胞上清 TNF- α 含量 (ELISA 法) 以 50 μL 上清进行检测, 求出各样本的 TNF- α 含量 ($\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$), 最后用细胞层总蛋白浓度校正, 即 TNF- α 含量测定值 / 细胞层总蛋白 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 得 TNF- α 含量 ($\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

2.5.4 细胞 P-I B, ctsb, Bax 蛋白表达 Western Blotting 法^[9]。

2.5.5 细胞 ctsb 的表达和分布检测 细胞免疫荧光法^[10]。

2.5.6 细胞 TNF- α , ctsb, Bax 基因表达 real-time PCR 法^[11]。

2.6 统计方法

所有数据均使用 SPSS 11.0 软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据经过正态分布及齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析 Q 检验。

3 结果

3.1 茵陈醇提物药物血清对 HepG2 细胞的毒性

茵陈醇提物药物血清、胎牛血清以及正常大鼠血清, 相同浓度下, 两两比较上清 LDH 活性, 无统计学差异。但三者上清 LDH 活性均随浓度增加呈上

升趋势。提示一定浓度的大鼠血清也存在毒性作用。为了排除血清本身的影响, 故后续实验均添加 10% 或 10% 浓度以下的正常大鼠血清或药物血清 (表 2)。

表 2 不同浓度茵陈醇提物药物血清对 HepG2 细胞上清 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	LDH/U · g ⁻¹
10% 胎牛血清	487 ± 110
10% 正常大鼠血清	459 ± 120
10% 茵陈醇提物药物血清	484 ± 85
20% 胎牛血清	524 ± 75
20% 正常大鼠血清	516 ± 21
20% 茵陈醇提物药物血清	519 ± 58
30% 胎牛血清	558 ± 84
30% 正常大鼠血清	555 ± 43
30% 茵陈醇提物药物血清	556 ± 46

3.2 茵陈醇提物抗肝脂毒性的作用

3.2.1 细胞内 TG 含量及上清 TNF- α 蛋白表达变化 与正常组细胞内 TG 含量 (141 ± 13) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 相比, 模型组 FFA 刺激后升高, 达 (590 ± 186) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.01$)。各剂量茵陈醇提物组细胞内 TG 含量较模型组有所降低, 但以 10% 茵陈醇提物剂量组 (335 ± 54) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 效果最佳 ($P < 0.05$)。本实验结果重复 2 次, 结果一致。较之正常组细胞上清 TNF- α 蛋白含量 (48 ± 7) $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$, 模型组经 FFA 刺激后, 显著升高达 (77 ± 11) $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($P < 0.01$)。各剂量茵陈醇提物组均能抑制 TNF- α 的蛋白表达, 但仅 10% 茵陈醇提物剂量组下降明显, 为 (55 ± 7) $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($P < 0.01$) (表 3)。

3.2.2 细胞脂肪油红 O 染色变化 正常组 HepG2 细胞呈不规则多角形或卵圆形生长, 胞质染色浅淡或无明显着色。模型组在 FFA 刺激后, 胞质内广泛着色, 红色脂滴大面多。而 10% 茵陈醇提物剂量组的上述变化显著减轻 (图 1)。

3.3 10% 茵陈醇提物抗肝脂毒性作用及其对“FFA-ctsb-TNF- α ”通路的影响

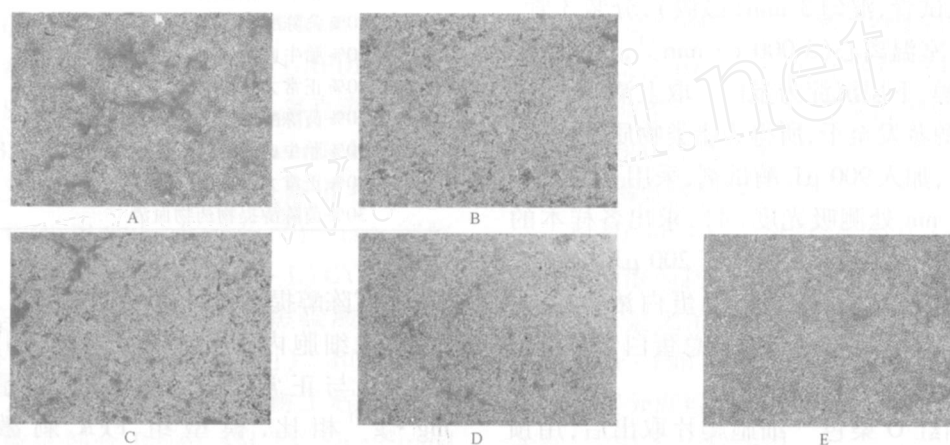
3.3.1 细胞 P-I B, ctsb, Bax 蛋白表达 较之正常组, 模型组细胞 P-I B, ctsb 蛋白表达均显著增加, 而 Bax 蛋白表达未见显著变化。10% 茵陈醇提物剂量组能显著抑制 P-I B, ctsb 蛋白表达 (图 2), 本实验重复 3 次, 结果一致。

3.3.2 细胞 TNF- α , ctsb 和 Bax 基因表达变化 较

表 3 细胞内 TG, 血清 TNF- α 含量变化 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

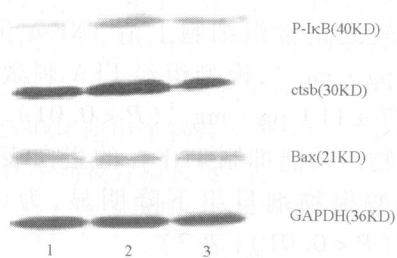
组别	剂量	TG/mg · g ⁻¹	TNF- α /pg · mg ⁻¹
正常	10%正常大鼠血清	141 \pm 13	48 \pm 7
模型	10%正常大鼠血清	590 \pm 186 ¹⁾	77 \pm 11 ¹⁾
0.1%茵陈醇提物	0.1%茵陈醇提物药物血清	483 \pm 187	64 \pm 17
1%茵陈醇提物	1%茵陈醇提物药物血清	430 \pm 77	63 \pm 17
10%茵陈醇提物	10%茵陈醇提物药物血清	335 \pm 54 ²⁾	55 \pm 7 ³⁾

注:与正常组比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。



A. 正常组; B. 模型组; C. 0.1%茵陈醇提物组; D. 1%茵陈醇提物组; E. 10%茵陈醇提物剂量组。

图 1 不同剂量茵陈醇提物组细胞脂肪油红 O 染色 ($\times 200$)



1. 正常组; 2. 模型组; 3. 10%茵陈醇提物组。

图 2 细胞 P-I κ B, ctsb, Bax 蛋白表达

之正常组,模型组细胞 TNF- α 和 ctsb 基因表达显著增加 ($P < 0.01$),但 Bax 基因表达未见显著变化。10%茵陈醇提物剂量组均能抑制 TNF- α 和 ctsb 基因表达 ($P < 0.05, P < 0.01$) (表 4)。

3.3.3 细胞内 ctsb 免疫荧光表达 细胞免疫荧光法显示,正常状态时,ctsb 呈点状分布(和溶酶体定位一致)。FFA 刺激后,ctsb 从溶酶体释放出来,广泛弥漫地分布在胞浆中,表达增加(荧光较强),而 10%茵陈醇提物组的上述变化受到明显抑制(图 3)。

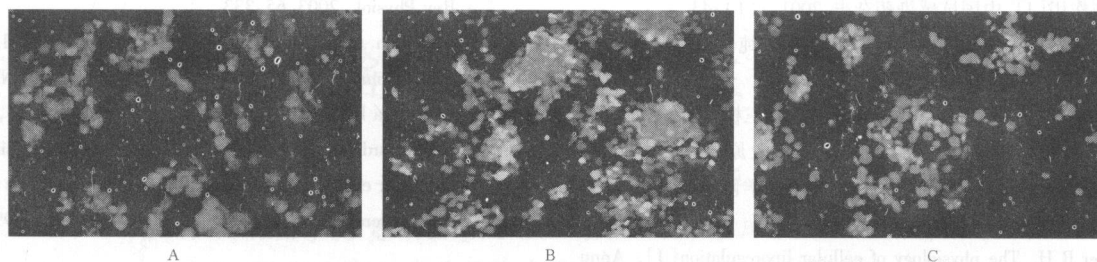
表 4 细胞 TNF- α , ctsb 和 Bax 基因表达变化 (密度积分比值) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	TNF- α	ctsb	Bax
正常	10%正常大鼠血清	1.53 \pm 0.48	1.62 \pm 0.53	1.42 \pm 0.59
模型	10%正常大鼠血清	3.77 \pm 0.54 ¹⁾	5.7 \pm 0.69 ¹⁾	1.35 \pm 0.79
10%茵陈醇提物	10%茵陈醇提物药物血清	2.35 \pm 0.28 ²⁾	3.48 \pm 0.36 ³⁾	0.92 \pm 0.56

4 讨论

茵陈具有利胆保肝、抗病原微生物、抗癌、抗动脉粥样硬化、兴奋平滑肌等多方面的活性^[12-15],本

研究发现,中药茵陈(醇提)显著的治疗脂肪肝效应与其抗肝脂毒性有关,且与“FFA-ctsb-TNF- α ”通路密切相关。



A. 正常组; B. 模型组; C. 10%茵陈醇提物组。

图 3 细胞内 ctsb 免疫荧光表达变化 (×200)

FFA 异常增多在非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 的发病中起着重要的作用。当 FFA 异常增多时,其很强的细胞毒性,可作为去垢剂损害细胞质、线粒体和溶酶体膜等,引起生物膜损伤^[16]。近年来, Feldstein 等人^[17] 研究发现, HepG2 细胞经 FFA 刺激后,刺激 Bax 向溶酶体内转位,促使 ctsb 释放到胞浆,激活 I- κ B 激酶 (IKK-) 使 I- κ B 磷酸化,导致核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 的活化,使之向细胞核内移位,启动炎症因子如 TNF- α 的基因转录、大量表达引起 TG 的蓄积、发生脂肪变性,造成肝脏脂毒性, TNF- α 又能进一步促进溶酶体渗透,激活 NF- κ B, 形成一个加重肝损伤的循环,即“FFA-ctsB-TNF- α 通路”。

本研究结果显示,在无细胞毒性剂量范围下 (10% 浓度药物血清),不同剂量茵陈醇提物 (10%, 1%, 0.1%) 具有抗 FFA 诱导 HepG2 细胞内 TG 变性、TNF- α 分泌的肝脂毒性作用,但以 10% 药物血清效应最强,提示该药的抗脂毒性作用具有剂量依赖性。

本研究结合 10% 茵陈药物血清对“FFA-ctsB-TNF- α 通路”的影响,探讨茵陈醇提物体外抗肝脂毒性作用机制。实验结果表明, HepG2 细胞经 FFA 刺激后, Bax 的蛋白和基因表达均未见显著性改变,提示 Bax 在本通路中的作用可能与 FFA 刺激后向溶酶体内转位,促使 ctsb 释放到胞浆,激活了 NF- κ B / I κ B 信号转导途径有关^[18]。经 FFA 刺激后,模型组 ctsb mRNA 及蛋白、p-I κ B 蛋白、TNF- α mRNA 及蛋白表达均显著升高。茵陈药物血清则可显著抑制上述作用环节,提示茵陈醇提物抗肝脂毒性的作用机制与有效抑制 ctsb mRNA 及蛋白表达有关,从而达到抑制 NF- κ B 的活化,通过 NF- κ B / I κ B 信号转导途径抑制 TNF- α mRNA 转录,以阻断 TNF- α 的生物活

性和靶效应。

以上结果表明,中药茵陈醇提物对 FFA 的肝脂毒性具有直接的、高强度的干预作用,其机制与有效抑制 ctsb 表达从而抑制 NF- κ B 活化等有关。

【参考文献】

- [1] 胡义扬. 加强中医药治疗脂肪性肝病的深入研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24 (1): 12
- [2] 冯琴, 张慧, 胡义扬, 等. 祛湿化痰方对单纯高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝的防治作用 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2006 (1): 26
- [3] 张慧, 冯琴, 胡义扬, 等. 祛湿化痰方对 CCl₄ 复合高脂低蛋白饮食诱导的大鼠脂肪肝的防治作用 [J]. 上海中医药杂志, 2006, 40 (3): 52
- [4] 张慧, 冯琴, 李红山, 等. 祛湿化痰方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠组织蛋白酶 B 和肿瘤坏死因子 α 表达的影响 [J]. 中西医结合学报, 2008, 23 (9): 51
- [5] 张慧, 胡义扬, 冯琴, 等. 祛湿化痰方对游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪沉积和 TNF- α 分泌的抑制作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27 (12): 1107
- [6] 陈少东, 胡义扬, 冯琴, 等. 基于均匀设计的祛湿化痰复方抗肝脂毒性作用的主效应中药分析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28 (5): 422
- [7] 胡义扬, 张慧, 陈少东, 等. 一种用于脂肪肝脂毒性药理研究的体外模型 [J]. 中华肝病杂志, 2008, 16 (2): 121
- [8] Heider J G, Boyett R L. The picomole determination of free and total cholesterol in cells in culture [J]. J Lipid Res, 1978, 19 (4): 514
- [9] 姜彬. 蛋白质免疫印记分析法实验条件的研究 [J]. 生物学研究方法与技术, 2008, 25 (5): 204
- [10] 白丽, 王晶. 活细胞免疫荧光法在免疫偶合物研究中的应用 [J]. 大理医学院学报, 2001, 12 (4): 1
- [11] 张新, 蒲晓允. PCR 法检测人类腺原体 U. Parvum 和 U. Urealyticum [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28 (17): 1784
- [12] 熊玉兰, 周钟鸣, 王彦礼, 等. 茵陈有效成分对四氯化碳损伤的原代培养大鼠肝细胞的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8 (1): 32
- [13] 杨家芬, 欧阳颖. 清热解毒中药对 3 种肠道寄生虫的体外

- 抑制作用 [J]. 中国抗感染药杂志, 2001, 1 (1): 43.
- [14] 杨太成, 赵树进, 冼江, 等. 茵陈提取物的纯化及体外抗肿瘤作用 [J]. 广东医学, 2002, 23 (2): 149.
- [15] 于永红, 胡昌兴, 孟卫星, 等. 茵陈、赤芍、三棱、淫羊藿对家兔实验性动脉粥样硬化病灶的消退作用及原癌基因 C2myc, C2fos, V2sis 表达的影响 [J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2001, 18 (2): 4.
- [16] Unger R H. The physiology of cellular liporegulation [J]. Annu Rev Physiol, 2003, 65: 333.
- [17] Feldstein A E, Wemeburg N W, Canbay A, et al Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- expression via a lysosomal pathway [J]. Hepatology, 2004, 40: 185.
- [18] Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, et al Cathepsin B act as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor [J]. J Cell Biol, 2001, 153: 999.

Research of Herba Artemisiae Scoporiae inhibits the hepatic lipotoxicity

CHEN Shaodong^{1,2}, FENG Qin¹, PENG Jinhua¹, XU Lili¹, LIU Ping¹, LIU Cheng¹, HU Yiyang^{1*}

(Institute of Liver Diseases of Shuguang Hospital, Key Laboratory for Liver-kidney Disease Pattern of Ministry of Education, E-institute of Shanghai Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; Medical College Xiamen University Xiamen 361005, China)

[Abstract] Objective: To study the efficiency and effect mechanism of Herba Artemisiae Scoporiae inhibits the hepatic lipotoxicity model *in vitro*. **Method:** Preparation rat regular serum and medicine serum. Under the safety of medicine thickness by toxicity testing, normal and model groups were added 10% normal rat serum, Herba Artemisiae Scoporiae group was added 10% medicine serum incubation for 24 h, FFA was added to all the groups but the normal incubation for 24 h. The indices were tested below: the content of serum tumor necrosis factor (TNF-) by ELISA, cellular triglyceride content (TG), Oil Red Staining; protein expression of cellular Bcl-2 Associated X protein (Bax), phospho-I B (P-I B) and Cathepsin B (ctsb) by Western Blotting; gene expression of cellular TNF-, Bax and ctsb by real-time PCR; the expression and distribution of ctsb observed by immunofluorescence. **Result:** After being incubated with FFA for 24 hours, TG deposition of HepG2 in the model group increased markedly. Compared with normal group, not only the content of serum TNF-, but also the protein expression of cellular ctsb, P-I B and mRNA expression of ctsb, TNF- increased significantly. Contrast to model group, TG deposition decreased markedly in the Herba Artemisiae Scoporiae group. The Herba Artemisiae Scoporiae inhibited TNF- content, the protein expression of cellular ctsb, P-I B and mRNA expression of TNF- significantly. **Conclusion:** Herba Artemisiae Scoporiae has a direct inhibition on HepG2 steatosis and TNF- secretion induced by long-chain FFA. The effect mechanism of Herba Artemisiae Scoporiae inhibits the hepatic lipotoxicity has close relationship with inhibition on the protein expression and mRNA expression of ctsb.

[Key words] Herba Artemisiae Scoporiae; free fatty acid; HepG2; hepatic lipotoxicity

[责任编辑 古云侠]