

· 基础研究 ·

慈菇消脂丸含药血清对非酒精性脂肪肝细胞模型 Caspase-8、FasL、p-c-Jun 表达的影响

马燕花 师霞 武燕 何华 余臣祖

摘要 **目的** 探讨慈菇消脂丸含药血清对游离脂肪酸(FFA)混合物诱导的 HepG2 细胞非酒精性脂肪肝病模型凋亡相关蛋白 Caspase-8、FasL、p-c-Jun 表达的影响。**方法** 以 HepG2 细胞为研究对象,实验随机分为正常组(10%胎牛血清),模型组(500 $\mu\text{mol/L}$ FFA),中药低、中、高剂量组(500 $\mu\text{mol/L}$ FFA + 2%、4%、6%含药血清),阳性药组(500 $\mu\text{mol/L}$ FFA + 20 $\mu\text{mol/L}$ SP600125)。实验时间为 24 h,实验结束后,用油红 O 染色镜下观察细胞浆内变化。流式细胞术检测细胞凋亡率。实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 法检测 Caspase-8、FasL、p-c-Jun mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 与正常组比较,模型组细胞凋亡率增加($P < 0.01$),Caspase-8、FasL、p-c-Jun 蛋白及 mRNA 表达均升高($P < 0.05$);与模型组比较,各药物干预组及阳性药组细胞凋亡率均下降($P < 0.05$),除中药低剂量组对 FasL 蛋白表达及中药中剂量组对 FasL mRNA 表达无影响外,其余各组 Caspase-8、FasL、p-c-Jun mRNA 及 Caspase-8、p-c-Jun 蛋白表达均下降($P < 0.05$)。**结论** 慈菇消脂丸可以改善 HepG2 细胞脂肪变及凋亡,与下调 Caspase-8、FasL、p-c-Jun 表达相关。

关键词 HepG2 细胞;慈菇消脂丸;非酒精性脂肪肝病;Caspase-8;FasL;p-c-Jun

Effect of Cigu Xiaozhi Pill Containing Serum on the Expression of Caspase-8, FasL, and p-c-Jun in Non-alcoholic Fatty Liver Cell Model MA Yan-hua, SHI Xia, WU Yan, HE Hua, and YU Chen-zu
Clinical Medical School, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou(730000)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of the Cigu Xiaozhi Pill containing serum on the expression of apoptosis-related proteins Caspase-8, FasL and p-c-Jun in HepG2 cells of non-alcoholic fatty liver disease model induced by free fatty acids(FFA) mixture. **Methods** HepG2 cells were used as the study object, and were randomly divided into normal group (10% fetal bovine serum), model group (500 $\mu\text{mol/L}$ FFA), Cigu Xiaozhi Pill low, middle, high dose group (500 $\mu\text{mol/L}$ FFA + 2%, 4%, 6% drug-containing serum), positive drug group group (500 $\mu\text{mol/L}$ FFA + 20 $\mu\text{mol/L}$ SP600125). The experiment lasted for 24 hours. After the experiment, the changes in cytoplasm were observed under the microscope with oil red O staining. The apoptosis rate was determined by flow cytometry. The mRNA and protein expression levels of Caspase-8, FasL and p-c-Jun were detected by real-time quantitative PCR and Western Blot. **Results** Compared with the normal group, the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.01$), the expressions of Caspase-8, FasL, p-c-Jun protein and mRNA were significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the apoptosis rates of cells in each treatment group and positive drug group group were significantly decreased ($P < 0.05$). Except the FasL protein expression in the low - dose Chinese medicine group and FasL mRNA expression in middle-dose Chinese medicine group, the expressions of Caspase-8, FasL, p-c-Jun mRNA, Caspase-8 and p-c-jun protein in the other groups were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Cigu Xiaozhi Pill could improve the steatosis and apoptosis of HepG2 cells, which was related to the down-regulation of Caspase-8, FasL and p-c-Jun expression.

KEYWORDS HepG2 cells; Cigu Xiaozhi Pill; non-alcoholic fatty liver disease; Caspase-8; Fas-L; p-c-Jun

基金项目:国家自然科学基金地区基金项目(No. 81560753)

作者单位:甘肃中医药大学临床医学院(兰州 730000)

通讯作者:马燕花, Tel: 0931 - 5161217, E-mail: 617747928@qq.com

DOI: 10. 7661/j.cjim. 20191204. 236

有证据表明,非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)已成为全球慢性肝病的最主要病因^[1]。然而目前 NAFLD 的发病机制仍不清楚,可能与遗传、环境、代谢或应激反应有关^[2],研究发现脂性凋亡在 NAFLD 的发生进展中发挥重要作用。Kanda T 等^[3]检测到肝细胞凋亡的多少与脂肪肝的严重程度密切相关。Feldstein AE 等^[4]通过对非酒精性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)及单纯脂肪变性、酒精性肝炎和正常肝脏对照研究发现,NASH 组患者肝组织凋亡较其他组明显增高,而且凋亡相关因子胱冬肽酶-3 和胱冬肽酶-7 表达增加,肝细胞凋亡与肝脏纤维化和肝脏炎症活动性相关,与正常对照组相比 Fas 受体在 NASH 患者的肝组织中大量表达。

慈菇消脂丸是课题组自拟处方,院内制剂,有解毒化痰、消降浊脂之功效。本方药经多年临床应用,在治疗脂肪性肝病、肝纤维化、高脂血症及肥胖患者等方面已取得较好的疗效^[5,6]。本实验采用慈菇消脂丸含药血清干预游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)混合物诱导的 HepG2 细胞脂肪变细胞模型^[7],通过 RT-qPCR 技术和 Western Blot 技术检测 p-c-Jun、FasL、Caspase-8 基因和蛋白的表达水平,研究 JNK 应激信号通路在 FFA 混合物诱导 HepG2 细胞脂肪变细胞模型中的作用,为进一步阐述慈菇消脂丸在防治 NAFLD 中的作用机制提供理论基础。

材料与方法

1 动物及细胞 30 只普通级健康 Wistar 大鼠,体重为(200±20)g,雌雄各半。由中国农业科学院兰州兽医研究所提供。实验动物生产许可证号:SCXK(甘)2015-0001。实验动物使用许可证号:SYXK(甘)2015-0003。HepG2 细胞购自上海细胞库。

2 药物 慈菇消脂丸组方由山慈菇 10 g 法半夏 15 g 茯苓 20 g 柴胡 12 g 丹参 20 g 鹿虫 20 g 薏苡仁 30 g 黄芩 10 g 泽泻 15 g 枸杞子 20 g 生山楂 20 g 等 14 味中药组成,实验用中药材由甘肃中医药大学附属医院制剂中心提供。JNK 抑制剂(SP600125)、DMSO 购自美国 Santa Cruz 公司。

3 主要试剂及仪器 主要试剂:PureLink RNA 小量提取试剂盒、免疫印迹化学发光试剂(Thermo Fisher Scientific,美国,批号:1905212、1688800);第一链 cDNA 合成(逆转录)试剂盒、miRNA qPCR

检测试剂盒(Genecopoeia,美国,批号:B07W11101、306W11701);RIPA 裂解液(Sigma,美国,批号:1001787145);PVDF membranes(Merck,德国,批号:1934653);c-Jun-p-s63-antibody-y172、Anti-Fas Ligand antibody、Anti-Caspase-8 antibody(Abcam,英国,批号:GR3180886-1、GR321082-1、GR324663-1);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(BD-Pharmingen,批号:8012947)。主要仪器:微毛细管流式细胞分析仪(德国,默克);高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司);NanoDrop 2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

4 实验方法

4.1 含药血清的制备 SD 大鼠适应性饲养 3 天后,禁食 24 h,称重,随机分两组,分别为中药组(20 只)和空白组(10 只)。给药剂量按下面公式换算^[8]:给药剂量=临床常用量×动物等效面积系数×5,制备慈菇消脂丸药液浓度为 0.225 g/mL,空白组给予等剂量生理盐水灌胃。SD 大鼠每 100 g 体重灌 2 mL 药液或生理盐水,每日给药 2 次,早晚各 1 次,连续给药 1 周,于末次给药后 1 h 心脏取血,采用一次性非抗凝真空采血管收集全血,无菌操作。采集的全血于 4℃ 静置 2 h 后,低温离心机离心,3 500 r/min,离心 15 min,分离血清,分离的血清同组混合,经 56℃ 恒温灭活 30 min 处理后,在超净台上用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,-20℃ 保存备用。将收集到的慈菇消脂丸含药血清和空白血清,配制成含药血清浓度分别为 2%、4%、6% 的培养液各 10 mL 备用,各组培养液终浓度为 10%。

4.2 HepG2 细胞复苏与培养 HepG2 细胞,用含 10% 胎牛血清高糖 MEM 培养液,37℃、5% CO₂、95% O₂、100% 湿度的培养箱中培养。细胞培养 1~1.5 天换液 1 次。一般 2~3 天细胞生长至覆盖瓶底面积约 80% 时即可传代。传代时,弃去培养板中的培养液,轻轻加入 PBS 洗 2 遍。之后加入 1.0 mL 含 0.01% EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶的消化液,使消化液覆盖所有细胞表面,室温放置约 30~40 s 后,将培养板放在倒置显微镜下进行观察,当发现细胞变圆,细胞间隙增宽后,立即加入 2.0 mL 细胞培养液终止消化。吸取板内培养液,反复轻轻吹打板底细胞,直至细胞被全部吹下,收集细胞及培养液于离心管中,取一滴细胞悬液用细胞计数板在显微镜下计数,调整细胞浓度为 1×10⁵/mL,接种于细胞培养板,放置在 37℃、5% CO₂、95% O₂、100% 湿度的孵箱中培养。

4.3 HepG2 细胞分组 根据预实验观察结果确定建立 HepG2 细胞模型的游离脂肪酸浓度及作用时间。接种 HepG2 于 24 孔板中,待细胞贴壁生长至 60%~70% 后用于实验。实验随机分为正常组用 10% 胎牛血清 DMEM 培养液培养;模型组用 500 $\mu\text{mol/L}$ FFA (棕榈酸:油酸 = 1:2) 刺激;中药治疗组用 500 $\mu\text{mol/L}$ FFA 与不同浓度的慈姑消脂丸含药血清(2%、4%、6% 的中药配方水溶物)共同刺激;SP600125 组以 20 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 预先孵育 1 h,再以 500 $\mu\text{mol/L}$ FFA 干预。实验时间为 24 h,实验结束时留取细胞培养上清液后,用油红 O 染色镜下观察细胞浆内变化。

5 检测指标与方法

5.1 FFA 对 HepG2 细胞抑制率的影响 将 HepG2 细胞培养于 96 孔板中,实验分别设 250、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ FFA 混合物实验组、0.1% DMSO 对照组(无血清培养基)、空白对照组(无血清培养基)。作用时间分别为 12、18、24 h。每组均设 3 个平行孔。用 MTT 比色法测定细胞增殖情况(以吸光度 OD 值表示)。抑制率 IR (%) = $(1 - \text{实验组平均 OD 值} / \text{空白对照组平均 OD 值}) \times 100\%$ 。

5.2 油红 O 染色观察细胞内脂滴 0.1 g 油红 O 溶于 98% 异丙醇 100 mL,取 6 mL 加蒸馏水 4 mL 静置 10 min,过滤待用;PBS 将细胞冲洗 3 次,用滤纸吸去多余水份,10% 中性甲醛固定 10 min;油红 O 染液中浸染 15 min;60% 异丙醇洗去多染液,三蒸水冲洗 3 次;苏木素复染 5~10 min;三蒸水漂洗 10 min;显微镜观察,拍照。

5.3 流式细胞术测定细胞凋亡 采用 Annexin-PI 凋亡检测试剂盒分析细胞的凋亡情况。各实验组细胞经胰酶消化后,1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞用冰 PBS 洗涤细胞 2 次,1 000 r/min 离心 5 min。细胞重悬于 500 μL binding 缓冲液,分别加入 5 μL AnnexinV 和 5 μL PI,小心吹打混匀。室温避光放置 15 min,流式细胞仪随机计数 10 000 个细胞并计算凋亡细胞百分率,实验重复 3 次。

5.4 实时荧光定量 PCR 检测 p-c-Jun、FasL、Caspase-8 基因表达 利用 PureLink RNA Mini 抽提试剂盒提取细胞总 RNA;按照 All-in-One miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行第一链 cDNA 的合成,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。解冻并轻柔混匀试剂盒中的 All-in-One qPCR Mix。短暂离心使管中试剂集中于底部,冰上保存。根据定量 PCR 仪器需求,选择是否使用 50 $\times$ ROX Reference

Dye。qPCR 引物来自 GeneCopoeia,美国:Caspase-8 (货号: HQP018966), p-c-Jun (货号: HQP009853), FasL (货号: HQP009671), β -actin (货号: HQP016381)。RT-PCR 反应体系(见表 1)。反应条件:预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min,变性 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s,退火 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。表达结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算其相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 反应体系

组成成分	体积(μL)
2 $\times$ All-in-One qPCR Mix	10.0
PCR forward primer (2 $\mu\text{mol/L}$)	2.0
PCR reverse primer (2 $\mu\text{mol/L}$)	2.0
cDNA 模板	2.0
ROX Reference Dye d (30 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
去离子水	3.6

5.5 Western Blot 法检测 p-c-Jun、FasL、Caspase-8 蛋白水平 收集各实验组细胞,加入 200 μL 蛋白裂解液裂解细胞 30 min,提取各组细胞总蛋白。BAC 法按试剂盒说明书进行操作,测定蛋白质浓度。取 50 μg 蛋白质样本加入 $4 \times$ SDS 加样缓冲液,煮沸 5 min,上样。蛋白样品进行 10% 的 SDS-PAGE 胶电泳 2 h 分离蛋白,电泳电恒为 80 V。SDS-PAGE 蛋白胶湿转 1 h 至 PVDF 膜;用 5% 脱脂奶粉进行常温封闭 1 h,加入一抗(1:1 000),室温下孵育 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;PBST 缓冲液洗膜 6 次,5 min/次,分别加入 HRP 标记的二抗(1:10 000)作为,室温孵育 1 h;PBST 缓冲液洗膜 6 次,5 min/次,加入 ECL 发光液显色,压片显影。扫描摄取图像,并用 Quantity one 软件分析条带的灰度值,以 p-c-Jun、FasL、Caspase-8 与 β -actin 灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

6 统计学方法 应用 SPSS 22.0 统计数据,统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较应用 ANOVA 单因素方差分析 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 FFA 对 HepG2 细胞抑制率比较(图 1) 随着 FFA 浓度和作用时间的延长,对 HepG2 细胞增殖的抑制率逐渐增加,当 1 000 $\mu\text{mol/L}$ FFA 作用 12 h 以上即有 70% 以上的细胞增殖受到抑制。

2 油红 O 染色观察细胞内脂滴变化(图 2) 各实验组随着 FFA 浓度的加大及作用时间的延长,可见细胞胞浆内被染成红色的颗粒状脂滴逐渐增多,并且呈环状位于细胞膜内侧(箭头所示)。以 FFA 500 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 作用最为明显。

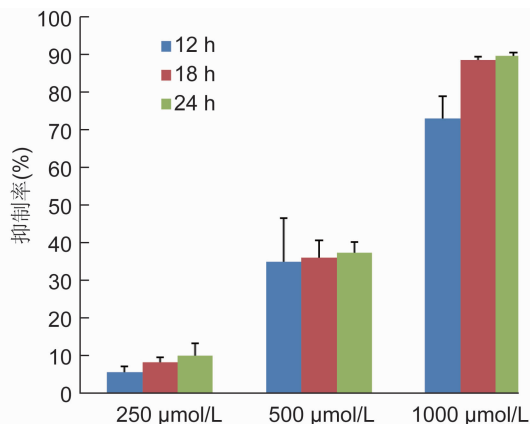
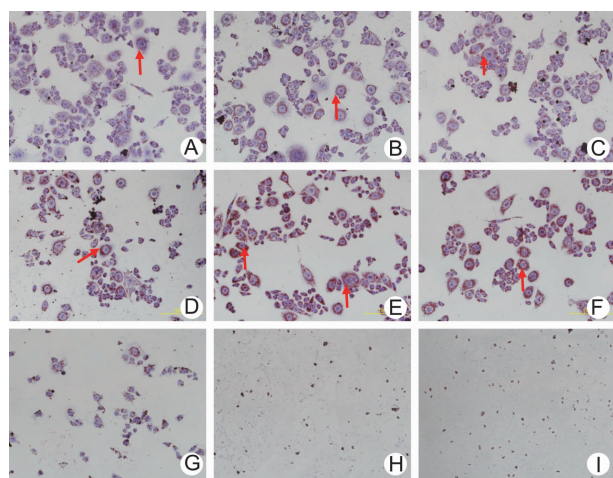


图1 不同浓度和时间 FFA 对 HepG2 细胞抑制率



注:A 为 250 μmol/L 12 h; B 为 250 μmol/L 18 h; C 为 250 μmol/L 24 h; D 为 500 μmol/L 12 h; E 为 500 μmol/L 18 h; F 为 500 μmol/L 24 h; G 为 1 000 μmol/L 12 h; H 为 1 000 μmol/L 18 h; I 为 1 000 μmol/L 24 h

图2 不同浓度、时间 FFA 作用 HepG2 细胞 (油红 O 染色, ×40)

3 各组细胞凋亡率比较(表 2, 图 3) 与正常组比较,模型组细胞凋亡率增加($P < 0.01$);与模型组比较,中药低、中、高剂量组及阳性药组细胞凋亡率均下降($P < 0.01$)。与阳性药物组比较,中药高剂量组细胞凋亡率显著下降($P < 0.01$);中药中剂量组细胞凋

表 2 各组 HepG2 细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	早期凋亡率 + 晚期凋亡率
正常	6	21.57 ± 0.53
模型	6	53.07 ± 0.53 *
中药低剂量	6	33.98 ± 0.53 △
中药中剂量	6	44.60 ± 0.53 ▲△
中药高剂量	6	26.92 ± 0.53 ▲△
阳性药	6	34.17 ± 0.53 △

注:与正常组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, △ $P < 0.01$;与阳性药组比较, ▲ $P < 0.01$

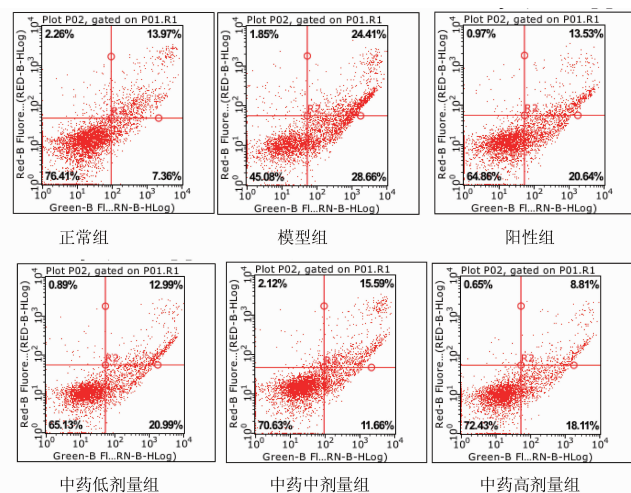


图3 流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡

亡率下降不及阳性药组($P < 0.01$);中药低剂量组细胞凋亡率下降与阳性药组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 各组 HepG2 细胞 Caspase-8、FasL、p-c-Jun mRNA 表达比较(表 3) 与正常组比较,模型组 Caspase-8、FasL、p-c-Jun mRNA 表达量上调($P < 0.01$)。与模型组比较,除了中药中剂量组 FasL 表达量外,中药其他各剂量组和阳性药组均能下调 Caspase-8、FasL、p-c-Jun mRNA 表达量($P < 0.01$);且在下调 Caspase-8 mRNA 表达方面,中药各剂量组作用优于阳性药组($P < 0.01$),在下调 p-c-Jun mRNA 表达方面,阳性药组作用优于中药高、中剂量组($P < 0.05$)。

5 各组 HepG2 细胞 Caspase-8、FasL、p-c-Jun 蛋白表达比较(表 4) 与正常组比较,模型组 Caspase-8、FasL、p-c-Jun 表达增多($P < 0.05$)。与模型组比较,除中药低剂量组 FasL 表达无显著减少外,各中药治疗组及阳性药组 Caspase-8、FasL、p-c-Jun 表达均减少($P < 0.05$);且中药治疗组与阳性药组比较,差异无统计学意义,中药低、中、高剂量组比较,亦差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

NAFLD 的疾病谱包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和脂肪性肝硬化四个从轻到重的病理阶段,发病机制目前仍然不是很清楚,但研究发现凋亡在 NAFLD 的发生发展中发挥了重要作用,认为 NAFLD 是在环境因素、宿主遗传学及肠道微生物群等因素共同作用下,导致脂毒性,引起肝细胞凋亡、炎症、纤维化,从而导致 NASH、肝硬化和肝细胞癌的发生^[9]。

表 3 各组 Caspase-8、FasL、p-c-Jun mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Caspase-8 (CT 值)	Caspase-8 相对表达量	FasL (CT 值)	FasL 相对 表达量	p-c-Jun (CT 值)	p-c-Jun 相对表达量
正常	6	28.06 ± 0.13	1.00 ± 0.07	37.10 ± 0.00	1.00 ± 0.02	26.92 ± 0.04	1.00 ± 0.05
模型	6	28.51 ± 0.08	1.63 ± 0.09 *	34.46 ± 0.70	14.70 ± 7.03 *	26.74 ± 0.02	2.51 ± 0.02 *
中药低剂量	6	28.31 ± 0.05	0.58 ± 0.02 $\Delta\Delta\Delta$	34.33 ± 0.83	3.89 ± 1.05 Δ	26.72 ± 0.11	0.80 ± 0.07 Δ
中药中剂量	6	29.14 ± 0.12	0.41 ± 0.04 $\Delta\Delta\Delta$	35.71 ± 0.63	2.92 ± 0.04	26.58 ± 0.05	1.10 ± 0.04 $\Delta\Delta$
中药高剂量	6	28.98 ± 0.02	0.32 ± 0.02 $\Delta\Delta\Delta$	35.94 ± 0.39	2.26 ± 0.40 Δ	26.56 ± 0.03	1.13 ± 0.66 $\Delta\Delta$
阳性药	6	27.77 ± 0.16	0.98 ± 0.11 Δ	35.25 ± 0.65	5.94 ± 2.54 Δ	27.44 ± 0.08	0.56 ± 0.03 Δ

注:与正常组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与阳性药组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 4 各组 Caspase-8、FasL、p-c-Jun 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Caspase-8	FasL	p-c-Jun
正常	6	2.00 ± 0.79	0.50 ± 0.21	0.50 ± 0.22
模型	6	4.05 ± 0.33 **	1.57 ± 0.52 *	1.53 ± 0.56 *
中药低剂量	6	2.35 ± 0.79 Δ	0.81 ± 0.88	0.68 ± 0.74 Δ
中药中剂量	6	2.38 ± 0.64 Δ	0.55 ± 0.37 Δ	0.57 ± 0.43 Δ
中药高剂量	6	2.03 ± 0.90 $\Delta\Delta$	0.60 ± 0.46 Δ	0.38 ± 0.35 Δ
阳性药	6	1.93 ± 0.96 $\Delta\Delta$	0.59 ± 0.38 Δ	0.45 ± 0.21 Δ

注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

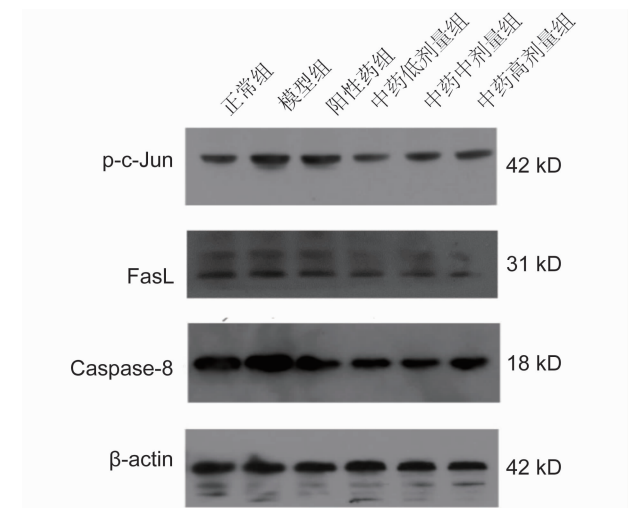


图 4 各组 Caspase-8、FasL、p-c-Jun 蛋白条带图

JNK 信号通路能够被多种细胞外刺激因素激活,广泛参与调节细胞的凋亡、增殖、代谢、运动及 DNA 损伤修复等。最近的研究证实,JNK 通路的激活与肝细胞的炎症、凋亡密切相关^[10]。FFAs 介导的内质网应激通过激活 JNK 信号通路参与人脂肪肝炎的发生^[11]。MLK 是一种通过磷酸化作用激活 MAPK 通路的丝/苏氨酸蛋白激酶,MLK 通过激活 JNK 参与人类 NASH 的发生^[12]。JNK 通过磷酸化 c-Jun 和 ATF-2 激活转录因子 AP-1 (AP-1 是 Jun-Jun、Jun-Fos 或 Jun-ATF 的二聚体),促进细胞凋亡,而 FasL 的启动子中包含有 AP-1 顺式作用元件,因此,JNK 信号通路的激活使

FasL 表达增强,促进细胞凋亡。研究表明,NASH 患儿的可溶性 Fas 和可溶性 FasL 水平明显高于非 NASH 患儿^[13]。Caspase-8 为 Fas 与 FasL 下游的效应分子,是死亡受体 (Fas、DR4、DR5) 介导的细胞凋亡途径中的核心成分,即关键的启动子。Fas、FasL、Caspase-8 的表达是 NAFLD 的重要促发因素^[14]。研究发现在啮齿类动物中,当肝细胞中 Caspase-8 表达缺乏时,可以减少蛋氨酸-胆碱缺乏 (methionine choline deficiency, MCD) 依赖的细胞凋亡增加,减少促炎细胞因子的表达^[15]。

中医学认为 NAFLD 的病因主要归结为“浊”、“毒”之邪,慈菇消脂丸是以山慈菇为君药的中药复方,山慈菇有化痰解毒、消脂散结之功效;泽泻、山楂以祛脂化浊;丹参、廬虫以逐瘀通络;柴胡、黄芩、法半夏以疏肝理脾;决明子清肝降脂;整体组方立法解毒化痰、消降浊脂为主。本实验采用 FFA 混合物 (棕榈酸:油酸为 1:2) 作用于 HepG2 细胞,观察肝细胞脂毒性凋亡,同时以 SP600125 (JNK 激酶特异性抑制剂) 作为阳性对照,运用慈菇消脂丸含药血清进行干预治疗。通过油红 O 染色观察细胞形态学,模型组细胞内有大量脂滴堆积,证实 500 $\mu\text{mol/L}$ FFA 作用 24 h 可明显诱导 HepG2 细胞脂肪变性。流式细胞术检测,模型组细胞凋亡明显,Western Blot 法和实时荧光定量 PCR 法检测模型组 Caspase-8、FasL、p-c-Jun mRNA 及蛋白表达上调;中药治疗组及阳性药组能有效减轻 HepG2 细胞凋亡,同时不同程度下调 Caspase-8、FasL、p-c-Jun mRNA 及蛋白表达。一方面说明,JNK 信号通路参与了肝细胞脂性凋亡的发生,其主要通过下游分子 Caspase-8、FasL、p-c-Jun 发挥作用,阻断 JNK 信号通路能显著抑制肝细胞脂性凋亡,另一方面也证实中药慈菇消脂丸治疗脂肪肝的分子基础,可能通过调控 JNK 信号通路实现。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73–84.
- [2] Wang YC, Kong WZ, Jin QM, et al. Effects of salvianolic acid B on liver mitochondria of rats with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(35): 10104–10112.
- [3] Kanda T, Matsuoka SC, Yamazaki MM, et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(25): 2661–2672.
- [4] Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steato-hepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(2): 437–443.
- [5] 杨少军, 邱晓青, 王晋阳. 慈菇消脂胶囊治疗非酒精性脂肪性肝病痰湿内阻证 90 例临床观察[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2017, 9(5): 67–68.
- [6] 杨少军, 孟陆亮, 张立清, 等. 慈菇消脂丸治疗脂肪肝的临床研究[J]. *中国中医药报*, 2009, 16(5): 343–344.
- [7] 殷锦锦, 唐外姣, 曾璐, 等. 人肝细胞系 L-02 细胞单纯肝脂肪变性细胞模型的建立与应用[J]. *基础研究*, 2014, 34(6): 837–842.
- [8] 张宏, 王旭昀, 刘美奇, 等. 中药含药血清实验动物灌胃给药剂量探讨[J]. *吉林中医药*, 2015, 35(6): 623–625.
- [9] Povero D, Feldstein AE. Novel molecular mechanisms in the development of non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Diabetes Metab J*, 2016, 40(1): 1–11.
- [10] Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipopapoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(17): 12093–12101.
- [11] Ibrahim SH, Akazawa Y, Cazanave SC, et al. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibition attenuates hepatocyte lipopapoptosis[J]. *J Hepatol*, 2011, 54(4): 765–772.
- [12] Ibrahim SH, Gores GJ, Hirsova P, et al. Mixed lineage kinase 3 deficient mice are protected against the high fat high carbohydrate diet-induced steatohepatitis[J]. *Liver Int*, 2014, 34(3): 427–437.
- [13] Alkhouri N, Alisi A, Okwu V, et al. Circulating soluble fas and fas ligand levels are elevated in children with nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(8): 2353–2359.
- [14] Li CP, Li JH, He SY, et al. Roles of Fas/FasL, Bcl-2/Bax, and Caspase-8 in rat nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2): 3991–3999.
- [15] Hatting M, Zhao G, Schumacher F, et al. Hepatocyte Caspase-8 is an essential modulator of steatohepatitis in rodents[J]. *Hepatology*, 2013, 57(6): 2189–2201.

(收稿: 2018-11-14 在线: 2020-01-03)

责任编辑: 白 霞

《中国中西医结合杂志》第 16 次荣获“百种中国杰出学术期刊”

2019 年 11 月 19 日, 中国科技论文 2018 年统计结果在京发布。《中国中西医结合杂志》被收录为“中国科技核心期刊”并再次荣获“百种中国杰出学术期刊”。

中国科学技术信息研究所每年出版《中国科技期刊引证报告》发布中国科技论文与引文数据库收录的中国科技论文核心期刊的二十余项文献计量指标, 从 1999 年开始以此为基础, 研制了中国科技期刊综合评价指标体系, 对期刊进行综合评定。2018 年引证报告中, 《中国中西医结合杂志》在中西医结合期刊中总评分排名第 1, 与去年一致; 影响因子排名第 1, 较去年提升 1 名; 总被引频次排名第 2, 与去年一致。2002 年开始, 中国科学技术信息研究所每年评选一次百种中国杰出学术期刊。此次是《中国中西医结合杂志》自 2002 年首次评选以来, 第 16 次入选, 充分彰显我刊的学术影响力。

杂志的发展离不开广大作者、读者以及专家的大力支持, 在此表示由衷的感谢。杂志也愿与广大科研工作者一起努力, 共同促进中西医结合事业发展。