

· 药物研究 ·

熊果酸对肝细胞胆固醇代谢的影响*

梁奎英¹, 初霞²

(1. 哈尔滨工程大学医院内科, 哈尔滨 150001; 2. 哈尔滨医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室, 哈尔滨 150081)

摘要 目的 探讨熊果酸对人肝癌细胞 HepG2 及小鼠肝细胞 AML-12 胆固醇代谢的影响及其相关机制。方法 0, 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸处理 HepG2 及 AML-12 细胞 24 h, 应用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)、Western blotting 检测细胞内胆固醇代谢关键基因胆固醇 7 α -羟化酶 (CYP7A1) mRNA 和蛋白表达, 应用酶法检测细胞内胆固醇浓度。结果 与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸组比较, 20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸组 HepG2 及 AML-12 细胞内 CYP7A1 mRNA 及蛋白表达水平均显著增加 (均 $P < 0.05$), 相应的细胞内胆固醇浓度也随之下降 (均 $P < 0.05$)。结论 一定浓度的熊果酸能够降低肝细胞内胆固醇浓度, CYP7A1 可能参与了调节过程。

关键词 熊果酸; 胆固醇代谢; 胆固醇 7 α -羟化酶

中图分类号 R282.71; R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)01-0009-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.01.002

Effects of Ursolic Acid on Cholesterol Metabolism in Hepatic Cells

LIANG Kuiying¹, CHU Xia² (1. Department of Internal Medicine, Hospital of Harbin Engineering University, Harbin 150001, China; 2. Department of Nutrition and Food Hygiene, Public Health College, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

ABSTRACT Objective To explore the effects and mechanism of ursolic acid (UA) on cholesterol metabolism in human hepatocellular carcinoma HepG2 and mouse hepatocyte AML-12. **Methods** HepG2 and AML-12 cells were treated with different concentrations of UA (0, 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 24 h, then the mRNA and protein expression of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) and intracellular cholesterol level was detected by RT-PCR, Western blotting and enzymatic method, respectively. **Results** Compared with 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ UA, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ UA significantly increased the expressions of CYP7A1 mRNA and protein ($P < 0.05$), and decreased intracellular cholesterol level in HepG2 and AML-12 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** A certain concentration of UA can reduce the level of cholesterol in HepG2 and AML-12 cells. CYP7A1 may be involved in the regulation process.

KEY WORDS Ursolic acid; Cholesterol metabolism; Cholesterol 7 α -hydroxylase

熊果酸是一种广泛存在于天然植物中的弱酸性五环三萜类化合物, 又名乌索酸、乌苏酸, 广泛分布于熊果、山楂、白花蛇舌草、乌梅、夏枯草等植物中。研究显示, 熊果酸具有多种生物学效应, 如抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒及减轻体质量等^[1-5]。其显著的调节

糖及脂质代谢紊乱、改善胰岛素抵抗的作用尤为引人注目^[6-8]。熊果酸可显著降低肥胖和糖尿病小鼠的血浆胆固醇水平^[9-10]。WANG 等^[11]证实熊果酸能够降低高脂血症兔的血浆胆固醇浓度。这些研究均表明熊果酸对胆固醇代谢方面具有一定调节作用, 然而其相关机制研究却相对较少且不明确。笔者主要探讨熊果酸对人肝癌细胞株 HepG2、小鼠正常肝细胞株 AML-12 胆固醇分解代谢的影响及其机制, 为熊果酸在降低胆固醇、抗动脉粥样硬化、防治心血管疾病的临床应用方面提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 熊果酸 (美国 Sigma 公司, 含量 $\geq 98.5\%$, 批号: 89797); 人肝癌细胞株 HepG2 (批号: HB-8065) 及小鼠正常肝细胞株 AML-12 (批号: CRL-2254) 均购自美国 ATCC 公司; 高糖达尔伯克必需基本

收稿日期 2015-05-20 修回日期 2015-12-31

基金项目 * 国家自然科学基金资助项目 (81202191); 黑龙江省普通高等学校营养与食品卫生学重点实验室开放课题 (YYKFKT1209)

作者简介 梁奎英 (1970-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 主任医师, 学士, 从事中西医结合治疗心脑血管疾病的基础研究。电话: 0451-87502730, E-mail: kuiyingliang@sina.com。

通信作者 初霞 (1983-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 副研究员, 博士, 从事营养相关疾病的分子机制研究。电话: 0451-87502730, E-mail: cx831128@163.com。

培养液 (DMEM) (批号:11965118)、DMEM/F12 培养液(批号:11320082)、胎牛血清(批号:10099133)和胰酶(批号:25200056)均购自美国 Gibco 公司;胰岛素(批号:I3536)、转铁蛋白(批号:T4382)、亚硒酸钠(批号:S5261)、地塞米松(批号:D4902)、噻唑蓝(MTT,批号:CGD1)及二甲亚砜(DMSO,批号:D4540)均购自美国 Sigma 公司;细胞内总胆固醇测定试剂盒购自北京普利莱公司(批号:E1015);TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司(批号:15596026);高容量 cDNA 反转录试剂盒(批号:4368813)及 SYBR Green PCR Master Mix 染料(批号:4367659)购自美国 Applied Biosystems 公司;兔抗人胆固醇 7 α -羟化酶(cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1)(批号:sc-25536)、 β -actin 多克隆抗体(批号:sc-130656)及羊抗兔二抗(批号:sc-2030)均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 仪器 酶标仪(型号 SpectraMax[®] M2, 美国 Molecular Devices 公司);聚合酶链反应(PCR)仪(型号 T100[™] Thermal Cycler,美国 BIO-RAD 公司);实时荧光定量 PCR 仪(RT-PCR, 型号 7500, 美国 Applied Biosystems 公司);电泳仪(型号 DYY-6C, 北京六一仪器厂);电泳、转印槽(型号 Mini-PROTEAN[®] Tetra 和 Mini Trans-Blotting[®] 电泳转印槽, 美国 BIO-RAD 公司);凝胶成像系统(型号 FluorChem E, 美国 ProteinSimple 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 HepG2 细胞用含有 10% 胎牛血清的新鲜高糖 DMEM 培养液, AML-12 细胞用含有 10% 胎牛血清、5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰岛素、5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 转铁蛋白、5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亚硒酸钠、40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 地塞米松的 DMEM/F12 培养液,均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳(CO_2)培养箱中传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.3.2 MTT 法检测细胞的存活率 应用 DMSO 配制 60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 熊果酸贮存液,根据先前的研究^[6]及相关资料^[12-13],设定熊果酸浓度分别为 10, 20, 40 和 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对接种于 96 孔培养板的 HepG2 细胞进行干预, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 熊果酸组为对照组,每组设 4 个复孔。处理 24 h 后,加入 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL ,继续孵育 4 h。终止培养,弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,震荡溶解,酶标仪 570 nm 波长处检测各孔吸光度(A)值。计算细胞的存活率($\%$) = [(实验组 A 值 - 空白组 A 值)/(对照组 A 值 - 空白组 A 值)] \times 100%。

1.3.3 细胞内胆固醇浓度检测 取对数生成期的 HepG2、AML-12 细胞接种于 6 孔培养板,分别加入终

浓度为 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的熊果酸作用 24 h,将 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组设立为对照组。收集细胞后,根据细胞内总胆固醇测定试剂盒流程进行操作,并以细胞的蛋白量进行校正。

1.3.4 RT-PCR 检测 CYP7A1 mRNA 表达 应用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,然后采高容量 cDNA 反转录试剂盒合成 cDNA。RT-PCR 引物采用 Primer Premier 5 版软件设计,引物序列见表 1。应用 SYBR Green RT-PCR 技术检测 CYP7A1 mRNA 表达水平。以 β -actin 作为内参对照。整个体系在 RT-PCR 仪中进行扩增,然后作相对定量分析。

表 1 CYP7A1 和 β -actin 的引物序列
Tab. 1 Primer sequences of CYP7A1 and β -actin

基因名称	引物序列	扩增长度/bp
CYP7A1 (人)	Sense: 5'-AGAAATCTACCCAGACCCTT-3'	171
	Anti-sense: 5'-TTGATTTCTGGATAGCGAA-3'	
CYP7A1 (鼠)	Sense: 5'-TTCTTTGATCTGGGGGATTG-3'	176
	Anti-sense: 5'-GTTTGCTTTGCTTTGCTCTT-3'	
β -actin (人)	Sense: 5'-ACTATCGGCAATGAGCG-3'	220
	Anti-sense: 5'-GAGCCAGGGCAGTAATCT-3'	
β -actin (鼠)	Sense: 5'-GACGGCCAGGTCATCACTAT-3'	140
	Anti-sense: 5'-CGGATGTCAACGTCACACTT-3'	

1.3.5 Western blotting 检测 CYP7A1 表达 HepG2 及 AML-12 细胞分别给予终浓度为 0, 10, 20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的熊果酸处理 24 h,提取总蛋白,并测定蛋白浓度。10% 蛋白质聚丙烯酰胺分离,应用电转移方法,将蛋白转至聚偏氟乙烯膜上,5% 牛血清清蛋白封闭 30 min,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜。用含 1% 聚山梨酯的 TBS(TBST)洗涤 3 次后,加入碱性磷酸酶标记的二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后,加入显色剂,显色后拍摄图像保存,并以 β -actin 作为内参对照进行分析。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 版统计软件对数据进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 熊果酸对 HepG2 细胞存活率的影响 MTT 结果显示 0, 10, 20, 40 和 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 熊果酸处理后, HepG2 细胞存活率分别为 (101.51 \pm 4.51)%, (95.75 \pm 5.56)%, (93.72 \pm 3.86)%, (91.53 \pm 4.63)% 和 (77.48 \pm 3.88)%。与对照组的细胞存活率比较,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 熊果酸显著降低 HepG2 细胞存

活率($t = 6.89, P < 0.05$), 而 10, 20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸对细胞存活率的影响不明显, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明高浓度熊果酸对 HepG2 细胞具有一定的毒性作用, 因此选择 0 ~ 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为研究熊果酸对肝细胞内胆固醇代谢影响的浓度范围。

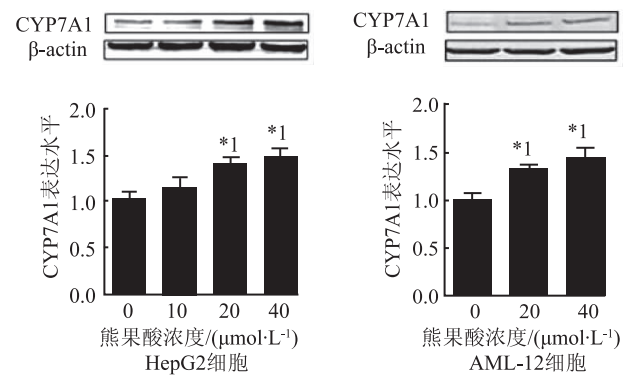
2.2 熊果酸对 HepG2、AML-12 细胞内胆固醇代谢水平的影响 不同浓度熊果酸处理 HepG2、AML-12 细胞 24 h 后, 检测细胞内胆固醇水平变化。0, 10, 20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸处理后, HepG2 细胞内胆固醇含量分别为(0.460 ± 0.013), (0.440 ± 0.019), (0.390 ± 0.017), (0.370 ± 0.014) $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$; 经过 0, 20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸处理后, AML-12 细胞内胆固醇含量分别为(0.340 ± 0.019), (0.280 ± 0.015), (0.26 ± 0.023) $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。与对照组比较, 随着熊果酸浓度的增加, 两种细胞内总胆固醇浓度均逐渐降低, 20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组尤为显著(HepG2 细胞 $t = 5.22, 6.87, P < 0.05$; AML-12 细胞 $t = 3.55, 4.93, P < 0.05$)。

2.3 熊果酸对 HepG2、AML-12 细胞内 CYP7A1 mRNA 及蛋白水平的影响 不同浓度熊果酸处理 HepG2 及 AML-12 细胞 24 h 后, 检测细胞内 CYP7A1 mRNA 及蛋白表达(图 1)。0, 10, 20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理后, HepG2 细胞内 CYP7A1 mRNA 相对水平分别为 $1.000 \pm 0.053, 1.090 \pm 0.114, 1.540 \pm 0.087, 1.730 \pm 0.106$; 0, 20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸处理后, AML-12 细胞内 CYP7A1 mRNA 相对水平分别为 $1.000 \pm 0.064, 1.450 \pm 0.093, 1.590 \pm 0.085$ 。与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸组比较, 20 和 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸组 CYP7A1 的 mRNA 水平增高(HepG2 细胞 $t = 7.92, 10.51, P < 0.05$; AML-12 细胞 $t = 6.39, 8.50, P < 0.05$), 蛋白水平也显著增加(HepG2 细胞 $t = 5.82, 7.06, P < 0.05$; AML-12 细胞 $t = 4.85, 6.58, P < 0.05$)。

3 讨论

研究表明, 血浆胆固醇的升高是心血管疾病的重要因素^[12-13]。因此, 降低血中胆固醇水平对预防动脉粥样硬化等心血管疾病的发生和发展具有重要意义。熊果酸具有降低血浆胆固醇水平的作用^[9-11], 然而其相关的调节机制目前尚不明确。排除饮食因素影响, 血中胆固醇的升高是由于内源性合成的增加和(或)分解代谢的减少。肝脏既是胆固醇合成的重要场所, 又是胆固醇分解的主要器官, 故肝脏组织或细胞亦成为探讨胆固醇代谢的重要研究对象。人肝癌细胞 HepG2 及小鼠正常肝细胞 AML-12 多用于肝脏脂质代谢方面的研究, 因此本研究选用这两种细胞作为实验

对象, 探讨熊果酸对胆固醇分解代谢的影响及其相关机制。



与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸组比较, * $P < 0.05$

图 1 熊果酸对 HepG2 及 AML-12 细胞内 CYP7A1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Compared with 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ursolic acid group, * $P < 0.05$

Fig. 1 Effects of ursolic acid on the protein expression of CYP7A1 in HepG2 and AML-12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

熊果酸能够显著抑制多种肿瘤细胞增殖, 诱导其发生凋亡^[14-17]。HepG2 属于肿瘤细胞, 因此笔者首先应用 MTT 法确定了熊果酸对 HepG2 细胞的毒性浓度。结果显示, 高浓度熊果酸($80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)显著降低了 HepG2 细胞的存活率, 而低浓度熊果酸并没有此作用, 因此, 笔者选择 0 ~ 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围用于研究熊果酸对肝细胞内胆固醇代谢的影响。

CYP7A1 是肝脏组织中促使胆固醇分解成胆汁酸的限速酶, 在体内胆固醇代谢平衡的维持中起到关键作用^[18-21]。本研究结果显示, 在一定的浓度范围内(0 ~ 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 随着熊果酸水平增加, HepG2 及 AML-12 细胞内 CYP7A1 mRNA 及蛋白表达水平逐渐上升, 同时细胞内胆固醇水平也逐渐降低, 说明熊果酸至少部分通过上调 CYP7A1 表达, 加速了细胞内胆固醇的分解, 进而降低了胞内的胆固醇浓度。然而, 熊果酸是通过何种途径增加 CYP7A1 的表达, 以及是否还有其他蛋白、通路等参与熊果酸对细胞内胆固醇的调节作用, 这些疑问还有待于进一步的研究与探讨。

综上所述, 一定浓度范围内的熊果酸能够降低肝细胞内的胆固醇浓度, 可能机制是熊果酸上调 CYP7A1 表达, 进而促进细胞内胆固醇的分解代谢。

参考文献

- [1] SHISHODIA S, MAJUMDAR S, BANERJEE S, et al. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappa B activation induced by carcinogenic agents through suppression of Ikappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: correlation

- with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1 [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15):4375–4383.
- [2] TSAI S J, YIN M C. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells [J]. *J Food Sci*, 2008, 73(7):174–178.
- [3] BAGLIN I, MITAINE-OFFER A C, NOUR M, et al. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2003, 3(6):525–539.
- [4] KIM J, JANG D S, KIM H, et al. Anti-lipase and lipolytic activities of ursolic acid isolated from the roots of *Actinidia arguta* [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(7):983–987.
- [5] JAYAPRAKASAM B, OLSON L K, SCHUTZKI R E, et al. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry (*Cornus mas*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(1):243–248.
- [6] CHU X, HE X, SHI Z, et al. Ursolic acid increases energy expenditure through enhancing free fatty acid uptake and β -oxidation via an UCP3/AMPK-dependent pathway in skeletal muscle [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(8):1491–1503.
- [7] JIA Y, KIM S, KIM J, et al. Ursolic acid improves lipid and glucose metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice by activating peroxisome proliferator-activated receptor alpha and hepatic autophagy [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(2):344–354.
- [8] LI S, LIAO X, MENG F, et al. Therapeutic role of ursolic acid on ameliorating hepatic steatosis and improving metabolic disorders in high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e86724.
- [9] SUNDARESAN A, HARINI R, PUGALENDI K V. Ursolic acid and rosiglitazone combination alleviates metabolic syndrome in high fat diet fed C57BL/6J mice [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2012, 31(3):323–333.
- [10] JANG S M, KIM M J, CHOI M S, et al. Inhibitory effects of ursolic acid on hepatic polyol pathway and glucose production in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Metabolism*, 2010, 59(4):512–519.
- [11] WANG Y L, WANG Z J, SHEN H L, et al. Effects of artesunate and ursolic acid on hyperlipidemia and its complications in rabbit [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 50(3/4):366–371.
- [12] Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH) Collaborative Group, ARMITAGE J, BOWMAN L, et al. Intensive lowering of LDL cholesterol with 80 mg versus 20 mg simvastatin daily in 12 064 survivors of myocardial infarction: a double-blind randomised trial [J]. *Lancet*, 2010, 376(9753):1658–1669.
- [13] LIU H H, LI J J. Aging and dyslipidemia: a review of potential mechanisms [J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 19(1):43–52.
- [14] KIM D K, BAEK J H, KANG C M, et al. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication [J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(5):629–636.
- [15] LI J, GUO W J, YANG Q Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15 [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(3):493–495.
- [16] BAEK J H, LEE Y S, KANG C M, et al. Intracellular Ca^{2+} release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells [J]. *Int J Cancer*, 1997, 73(5):725–728.
- [17] HUANG M T, HO C T, WANG Z Y, et al. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(3):701–708.
- [18] HUBACEK J A, BOBKOVA D. Role of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in nutrigenetics and pharmacogenetics of cholesterol lowering [J]. *Mol Diagn Ther*, 2006, 10(2):93–100.
- [19] GILARDI F, MITRO N, GODIO C, et al. The pharmacological exploitation of cholesterol 7 α -hydroxylase, the key enzyme in bile acid synthesis: from binding resins to chromatin remodelling to reduce plasma cholesterol [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 116(3):449–472.
- [20] CHIANG J Y. Bile acids: regulation of synthesis [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(10):1955–1966.
- [21] LI T, MATOZEL M, BOEHME S, et al. Overexpression of cholesterol 7 α -hydroxylase promotes hepatic bile acid synthesis and secretion and maintains cholesterol homeostasis [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3):996–1006.