

# 二氢槲皮素通过 P2x7R- 炎症小体信号轴调控肝细胞中脂肪蓄积的分子机制研究

姜若男 商丽丽 王卓琰

白城市食品药品检验所 吉林白城 137018

**摘要：**二氢槲皮素 (TAX) 是一种具有强氧化性的二氢黄酮类化合物，主要存在于落叶松中。现有文献显示，TAX 主要应用于前列腺和乳腺癌的治疗，且具有保肝作用。本论文主要探究 TAX 对酒精性脂质蓄积是否具有抑制作用，若有抑制作用，则进而探究其产生抑制作用的分子机制。方法：用酒精处理人肝癌细胞 (HepG2) 诱导脂质蓄积来建立体外模型。通过油红 O 染色观察细胞脂质蓄积情况；通过蛋白印迹实验测定脂质蓄积及炎症相关蛋白表达情况。结果：TAX 可明显抑制因酒精引起的脂质蓄积，且能够有效恢复 AMPK 磷酸化；可抑制酒精诱导的 ACC 蛋白质水平，同时激活了 ACC 磷酸化；LPS 和 ATP 可引起成熟 IL-1 $\beta$  释放，TAX 可以抑制成熟的 IL-1 $\beta$  的释放，另外 P2x7R 抑制剂 (A438079)、Toll-like 受体 4 (TLR4) 抑制剂 (CLI-095)、Caspase-1 抑制剂 IV 同样具有抑制成熟 IL-1 $\beta$  释放的作用。结论：TAX 是通过 P2x7R-炎症小体通路实现对肝细胞中脂质蓄积的抑制作用。

**关键词：**酒精性脂肪肝；脂质蓄积；二氢槲皮素；P2x7R；IL-1 $\beta$

## 引言

近年来，脂肪肝发病率不断攀升，早期患者可以透过调整饮食、加强运动或者接受药物治疗缓解病情。但是严重病例可能恶化至肝硬化甚至罹患肝癌，危及其生活品质甚至生命安全<sup>[2,3]</sup>。脂肪肝可划分为酒精性与非酒精性两大类，前者源于长时间或短时之内的过量烟酒摄入<sup>[4]</sup>；后者的诱因尚未明确<sup>[5]</sup>。

急性酒精性脂肪肝是由于酒精过量摄入引起的酒精性肝病 (ALD)，常伴有肝细胞脂肪变性、损伤和炎症反应<sup>[6]</sup>。该病的显著特征在于体内脂肪酸合成增加，氧化减少，从而导致肝细胞内脂质积聚<sup>[7]</sup>。目前，ALD 已经成为我国第二大肝脏疾病，但对于各阶段 ALD 的有效药物治疗方案仍有待开发。因此，研发有效的 ALD 治疗药物成为当前研究的重点。

急性酒精性脂肪肝的脂肪变性表现为肝细胞内脂质堆积。酒精诱发的肝脂肪变性涉及到许多调节因子，例如 AMP 依赖的 AMP 激活激酶 (AMPK)。作为一种脂质调节激酶，AMPK 在酒精性脂肪肝的发展过程中起着至关重要的作用。活化的 AMPK 能促进乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 磷酸化，抑制其活性，从而调节脂肪酸的合成和氧化<sup>[8]</sup>。

二氢槲皮素 (TAX) 是一种具有强大抗氧化功能的二氢黄酮类化合物，广泛应用于医疗保健和食品行业，能够通过抑制脂肪酸合酶，阻止前列腺和乳腺癌细胞的脂肪生成活动。

炎症过程在 ALD 脂质堆积中起到了关键作用。内源性的肠道细菌 LPS 经由 TLR4 识别后启动炎症小体表达第一信号。乙醇摄入会提高循环及肝脏中的 ATP 水平，从而干扰肝脏的炎症状态。在此过程中，P2x7R 具有重要影响，高浓度的 ATP 成为 LPS 引发炎症反应的第二信使，进一步激活 NLRP3 炎症小体，释放出包括 IL-1 $\beta$  在内的促炎细胞因子。

IL-1 $\beta$  作为参与 ALD 损伤的关键炎症介质，本研究通过 TAX 药物干预，观察其对 IL-1 $\beta$  释放量以及肝细胞脂质积累的影响。

## 1 实验材料

### 1.1 实验药材

二氢槲皮素又称紫衫叶素，分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>，主要来源于松科植物落叶松<sup>[1]</sup>。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

HepG2 细胞放于 10% 胎牛血清、100ug/ml 链霉素和 100U/ml DMEM 中置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 环境中培养。处理前 1 小时, 细胞需接受 TAX 或相应抑制剂预处理, 之后分别暴露于 50mM 酒精 24 小时或 LPS (1 μg/ml) 刺激 4 小时, 以及 3mM ATP 刺激 30 分钟。

### 2.2 蛋白印迹分析

采用裂解缓冲液或核细胞质蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白, 经 8–12% SDS-PAGE 电泳分离后转膜至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶配制的 0.05% Tween 20 溶液中与特异性一抗孵育, 再与结合 HRP 的二抗孵育, 最后利用 Clarity ECL Western Blotting 底物 (Bio-Rad) 显色, 并借助 Bio-Rad Quantity One 软件进行光密度法定量。

### 2.3 细胞油红 O 染色

将 HepG2 细胞固定于 100g/L 甲醛液, 经磷酸盐缓冲液洗涤后, 加入 5g/L 油红 O 饱和液染色, 镜下观察染色效果。

## 3 实验结果

### 3.1 TAX 减轻由酒精诱导的肝细胞脂质蓄积

将 HepG2 细胞与 TAX 孵育 1 小时, 然后添加酒精 (HepG2 细胞中 50mM, 24h)。经观察酒精处理的 HepG2 细胞中的液滴明显被油红 O 染成红色 (400 倍原始放大倍率), 但是 TAX 能够抑制 HepG2 细胞中的脂质液滴的积累, 且抑制效果与浓度成正相关关系。

### 3.2 TAX 调节酒精诱导的肝细胞的脂质代谢

通过蛋白印迹分析确定肝脏中的 AMPK α、磷酸化 AMPK α、ACC、磷酸化 ACC 和成熟 IL-1 β 的蛋白表达水平。经酒精处理的 HepG2 细胞中, 磷酸化 AMPK α 和 AMPK α 的蛋白质表达显著降低, 经过 TAX 预处理后, AMPK 磷酸化得以恢复。且 TAX 逆转了酒精诱导的 ACC 蛋白质水平增加, 同时激活了 ACC 的磷酸化。

### 3.3 TAX 抑制肝细胞中 LPS/ATP 诱导的 IL-1 β 分泌

以不同浓度的 TAX、Caspase-1 抑制剂 (10 μM)、P2x7R 抑制剂 (A438079, 10 μM) 或 TLR4 抑制剂 (CLI-095, 1 μg/mL) 处理 HepG2 细胞 1 小时, 接着以 LPS (1 μg/mL) 刺激 4 小时, 并适时加入 ATP (3mM) 刺激 30 分钟。通过蛋白印迹法检测 HepG2 细胞内 P2x7R、pro-IL-1 β 及成熟 IL-1 β 的蛋白表达情况。

针对 P2x7R 受 LPS 调控激活 NLRP3 炎症小体, 从而促进 IL-1 β 分泌的机制, 研究发现, TAX 可阻断此信号通路。在正常 HepG2 细胞中, 尽管 P2x7R 表达较低, 但经 LPS 与 ATP 刺激后, 其表达量迅速增加。同时, LPS 与 ATP 亦能催化前体 IL-1 β 的生成及裂解。预先使用 TAX 处理, 可显著降低 LPS 与 ATP 刺激下 P2x7R 的表达及 IL-1 β 的生成。此外, P2x7R 抑制剂 A438079、Caspase-1 抑制剂 IV 和 TLR4 抑制剂 CLI-095 均能有效抑制 P2x7R 蛋白水平。

由此可见, TAX 通过 P2x7R-NLRP3 炎症小体途径抑制 IL-1 β 的产生。

## 4 讨论

炎症反应是 ALD 发病机制中的重要环节。酒精引起的肝脏内巨噬细胞产生如 IL-1 β、IL-18 等多个炎症因子。这些信号分子通过 IL-1 β 通路增强脂肪变性和炎症反应, 最终诱发肝损伤和脂质积累。

临床研究发现: 有研究表明: P2x7R 受 ATP 刺激后, 能促使 NLRP3 活化, 进而生成 Caspase-1, 进一步促进炎症因子 IL-1 β、IL-18 的合成与分泌。

实验结果显示, TAX 能够有效阻止酒精诱导的 HepG2 细胞脂质积累, 同时恢复酒精暴露下 AMPK 磷酸化的下降, 逆转酒精对 ACC 蛋白水平的影响, 激活 ACC 磷酸化, 从而抑制成熟 IL-1 β 的生成和释放。此外, P2x7R 抑制剂 (A438079)、Caspase-1 抑制剂 IV 以及 TLR4 抑制剂 (CLI-095) 都能显著降低 P2x7R 蛋白水平和成熟 IL-1 β 的产量。因此, 抑制 IL-1 β 的成熟释放可以有效阻断其参与的肝细胞脂质积累过程。

## 5 结论

乙醇可增加肠胃黏膜的渗透性, 进而提升血浆中的肠道菌群来源 LPS 水平, 这是通过 TLR4 受体感知的, 作为启动炎症反应的主要信号。另外, 乙醇还会提高身体的循环代谢和肝脏内部 ATP 的含量, 这与 ALD 患者的肝脏炎症有着紧密联系。其中, P2x7R 在炎症小体的触发过程中起到核心角色, 高浓度的 ATP 作为 LPS 引发炎症反应的次级信号, 能触发 NLRP3 炎症小体并导致炎症因子如 IL-1 β 的释放。活化的 NLRP3 会进一步刺激 Caspase-1 的产生, 后者对前 IL-1 β 进行加工, 使之转变为成熟的 IL-1 β。在此过程中, TAX 能有效地抑制成熟 IL-1 β 的生成和释放, 从而防止肝细胞内脂肪堆积。

综上，TAX 主要通过抑制 P2x7R 炎症小体信号通路来控制肝细胞内脂肪的积累。

#### 参考文献：

[1] 刘文丛, 刘兴龙, 孟令全, 沈立乾, 齐心, 丁传波, 郑毅男. 二氢槲皮素的研究进展 [J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(4): 444-448.

[2] 贾艳, 付怡静, 刘晓阳, 杨国庆. 我国酒精性脂肪肝病的研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014, 23(4): 376-379.

[3] 许嘉, 巴蕾, 吴文仓, 李勇. 脂肪肝的流行病学研究进展 [J]. 慢性病学杂志, 2013, 14(07): 539-542.

[4] 郑今花. 二氢槲皮素基于 NLRP3 炎症小体通路调控酒精性脂肪肝与炎症的机制研究 [D]. 延边大学, 2017.

[5] 潮蓉, 武小娟, 王羽辉, 苏倩倩, 吕雄文. P2X7R/NLRP3 信号通路在酒精性肝损伤中的作用 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(04): 491-495.

[6] Zeng, H.; Guo, X.; Zhou, F.; Xiao, L.; Liu, J.; Zhang, C.; Xing, M.; Yao, P.; Quercetin alleviates ethanol-induced liver steatosis associated with improvement of lipophagy. [J]. Food Chem Toxicol, 2019(125): 21-28.

[7] 吴梅, 乔春莹, 叶欢, 吴艳玲, 南极星, 廉丽花. 二氢槲皮素对高脂饲料联合酒精狂饮小鼠肝脏脂肪蓄积的干预机制 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(01): 147-148.

[8] Zhang, Y.; Li X.; Xia, K. L.; Jiang, M.; Cui B. W.; Wu, Y. L.; Nan, J. X.; Lian, L. H. Dihydroquercetin ameliorates alcoholic liver steatosis through P2x7R-NLRP3 inflammasome pathway [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2018, 32(4): 338-339.

#### 作者简介：

姜若男（1998—），女，汉，吉林省白城市人，本科，白城市食品药品检验所，检验员。