

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.24.003

## 红背叶根对乙醇诱导的酒精性脂肪肝细胞模型的影响\*

沈海容<sup>1</sup>,王大东<sup>1</sup>,罗显克<sup>2</sup>,王保健<sup>2</sup>,吴晓莉<sup>2</sup>,农云翠<sup>1</sup>

广西壮族自治区民族医院:1. 消化内科二区;2. 消化内科一区,广西南宁 530000

**摘要:**目的 研究红背叶根对乙醇诱导的酒精性脂肪肝细胞模型的影响。方法 采用乙醇诱导建立酒精性脂肪肝的 L02 细胞模型,然后用不同水平红背叶根水提物处理该细胞模型(红背叶根组),设立对照组(未使用乙醇诱导的 L02 细胞)与模型组(80 mmol/L 乙醇诱导的酒精性脂肪肝 L02 细胞模型)。检测各组细胞上清液中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶(GGT)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平。结果 随着乙醇水平升高,L02 细胞的存活率逐渐下降,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。红背叶根组中,随着红背叶根水提物水平逐渐降低,酒精性脂肪肝 L02 细胞模型中细胞存活率逐渐升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组比较,模型组酒精性脂肪肝 L02 细胞模型的细胞上清液中 ALT、AST、GGT、MDA 水平明显升高,SOD 水平明显降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,红背叶根组 3 个水平下,酒精性脂肪肝 L02 细胞模型的细胞上清液中 ALT、AST、GGT、MDA 水平明显降低,SOD 水平明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 红背叶根在酒精性脂肪肝细胞模型中具有保肝、降酶、抗脂质过氧化的作用。

关键词:红背叶根; L02 细胞; 酒精性脂肪肝

中图分类号:R575.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)24-3561-04

## Effects of Radix Alchorneae Trewioid on alcoholic fatty liver cell model induced by ethanol\*

SHEN Hairong<sup>1</sup>, WANG Dadong<sup>1</sup>, LUO Xianke<sup>2</sup>, WANG Baojian<sup>2</sup>, WU Xiaoli<sup>2</sup>, NONG Yuncui<sup>1</sup>

1. Department of Gastroenterology Second Ward; 2. Department of Gastroenterology First Ward, National Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530000, China

**Abstract: Objective** To study the effect of Radix Alchorneae Trewioid on alcoholic fatty liver cell model induced by ethanol. **Methods** L02 cell model of alcoholic fatty liver was established by ethanol induction. Then, the cell model was treated with different levels of aqueous extract of Radix Alchorneae Trewioid (Radix Alchorneae Trewioid group). The control group (L02 cell not induced by ethanol) and model group (L02 cell model of alcoholic fatty liver induced by 80 mmol/L ethanol) were established. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST),  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the cell supernatant of each group were detected. **Results** With the increase of ethanol level, the survival rate of L02 cell decreased gradually, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). In the Radix Alchorneae Trewioid group, the cell survival rate in the alcoholic fatty liver L02 cell model increased gradually with the decrease of aqueous extract of Radix Alchorneae Trewioid levels, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the ALT, AST, GGT and MDA levels in the cell supernatant of the alcoholic fatty liver L02 cell model in the model group were significantly increased, the SOD level was significantly decreased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, at 3 levels of the Radix Alchorneae Trewioid group, the ALT, AST, GGT and MDA levels in the cell supernatant of the alcoholic fatty liver L02 cell model were significantly reduced, the SOD levels were significantly increased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Radix Alchorneae Trewioid can protect the liver, lower enzymes and resist lipid peroxidation in alcoholic fatty liver cell model.

Key words: Radix Alchorneae Trewioid; L02 cell; alcoholic fatty liver

\* 基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题(Z20180610)。

作者简介:沈海容,女,副主任医师,主要从事肝病方面的临床及实验研究。

目前,我国成人脂肪肝发病率为 12.5%~35.4%,且有逐年上升趋势,而由饮酒过量引起的酒精性脂肪肝的发病率也越来越高<sup>[1]</sup>。酒精性脂肪肝发生肝纤维化和肝硬化的进程相对较快,并可能进展为肝癌。因此,积极研发治疗酒精性脂肪肝的药物对临床意义重大。本课题组前期研究表明,红背叶根对肝纤维化大鼠具有保肝、降酶和抗肝纤维化的作用<sup>[2-3]</sup>,但是酒精性脂肪肝离体细胞模型研究尚未开展。本研究采用乙醇诱导的酒精性脂肪肝离体细胞模型,进一步探讨了红背叶根对酒精性脂肪肝的影响,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 红背叶根采自广东惠州,经南方医科大学中药鉴定与药用植物教研室鉴定为大戟科植物红背山麻杆的根。红背叶根水提物提取步骤:红背叶根干燥粉碎后,用蒸馏水溶解,离心取上清液,60℃水浴消毒 3 次。L02 细胞(人胎肝细胞系)购自中国科学院上海细胞库。

**1.2 仪器与试剂** 高糖 DMEM 培养液购自美国 Invitrogen 公司;小牛血清(56℃、30 min 灭活)购自浙江天杭生物科技有限公司;谷氨酰胺、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)购自美国 Sigma 公司;0.25%胰蛋白酶+0.02%乙二胺四乙酸、青-链霉素溶液购自吉诺生物医药技术有限公司;Biotek ELx800 全自动酶标仪购自美国 Biotek 公司;Olympus Bx60 倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** L02 细胞复苏后用含 10%小牛血清的 DMEM 培养液转入玻璃培养瓶中,置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃的培养箱中饱和湿度条件下常规方法培养,2 d 换液 1 次,3~4 d 用 0.25%胰蛋白酶消化,1:3 传代培养。

**1.3.2 乙醇诱导建立酒精性脂肪肝 L02 细胞模型** 将处于对数生长期的 L02 细胞消化后,以每孔 5×10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔板,培养 4 h,待细胞贴壁后,更换培养液为含 10% 小牛血清和不同水平乙醇(20、40、60、80、100 mmol/L)的 DMEM 培养液(乙醇组),设置不含乙醇的培养液为对照组。在 20 h 时,每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL。继续培养 4 h,弃去培养液,每孔加入 DMSO 200 μL,震荡 5 min 后,采用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度(A)值。乙醇组细胞存活率=A<sub>乙醇组</sub>/A<sub>对照组</sub>×100%。

**1.3.3 红背叶根对酒精性脂肪肝 L02 细胞模型中细胞存活率的影响** 以 80 mmol/L 乙醇建立的酒精性脂肪肝 L02 细胞模型作为模型组(80 mmol/L 乙醇处理 L02 细胞时,细胞存活率大于 50%,因此选取该水平乙醇建立酒精性脂肪肝 L02 细胞模型);分别用不

同水平的红背叶根水提物(12.500、6.250、3.125、1.560、0.780 mg/mL)作用于 80 mmol/L 乙醇建立的酒精性脂肪肝 L02 细胞模型(红背叶根组)。在给药 20 h 时,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h 后,弃去培养液,每孔加入 DMSO 200 μL,震荡 5 min 后,采用酶标仪检测 490 nm 波长处 A 值。模型组细胞存活率=A<sub>模型组</sub>/A<sub>对照组</sub>×100%,红背叶根组细胞存活率=A<sub>红背叶根组</sub>/A<sub>对照组</sub>×100%。

**1.3.4 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、γ-谷氨酰转移酶(GGT)水平检测** 选取红背叶根组中能使酒精性脂肪肝 L02 细胞模型中细胞存活率超过 50%的红背叶根水提物 3 个水平(3.125、1.560、0.780 mg/mL)下的细胞上清液,以及对照组、模型组的细胞上清液,进行细胞上清液中 ALT、AST、GGT 水平检测。操作方法:细胞培养液以 1 500 r/min 离心 5 min,取上清液备用;严格按各试剂盒使用说明书进行操作。

**1.3.5 超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平检测** 选取红背叶根组中能使酒精性脂肪肝 L02 细胞模型中细胞存活率超过 50%的红背叶根水提物 3 个水平(3.125、1.560、0.780 mg/mL)下的细胞上清液,以及对照组、模型组的细胞上清液,按照试剂盒说明书操作,采用酶标仪检测 450 nm 波长处 SOD 水平,检测 532 nm 波长处 MDA 水平。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同水平乙醇对 L02 细胞存活率的影响** 随着乙醇水平升高,L02 细胞的存活率逐渐下降,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

**2.2 红背叶根对酒精性脂肪肝 L02 细胞模型中细胞存活率的影响** 红背叶根组中,随着红背叶根水提物水平逐渐降低,酒精性脂肪肝 L02 细胞模型中细胞存活率逐渐升高,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

表 1 不同水平乙醇对 L02 细胞存活率的影响

组别	乙醇水平(mmol/L)	细胞存活率(%)
对照组	—	100.00
乙醇组	20	84.33*
	40	77.23*
	60	64.10*
	80	59.45*
	100	49.03*

注:与对照组比较,\**P*<0.05;—表示不含乙醇。

**表 2 红背叶根对酒精性脂肪肝 L02 细胞模型中细胞存活率的影响**

组别	红背叶根水提物水平(mg/mL)	细胞存活率(%)
对照组	—	100.00*
模型组	—	59.45
红背叶根组	12.500	22.80*
	6.250	37.10*
	3.125	51.60*
	1.560	63.00*
	0.780	75.13*

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;—表示不含红背叶根水提物。

**2.3 各组 ALT、AST、GGT 水平比较 与对照组比较,模型组酒精性脂肪肝 L02 细胞模型的细胞上清液**

**表 3 各组 ALT、AST、GGT 水平比较( $\bar{x} \pm s$ , U/L)**

组别	红背叶根水提物水平(mg/mL)	ALT	AST	GGT
对照组	—	2.108±0.108	2.388±0.120	1.903±0.101
模型组	—	4.185±0.166 $\Delta$	4.720±0.263 $\Delta$	4.013±0.118 $\Delta$
红背叶根组	3.125	2.605±0.135 $\Delta$ *	2.993±0.138 $\Delta$ *	2.070±0.111 $\Delta$ *
	1.560	3.003±0.126 $\Delta$ *	3.288±0.102 $\Delta$ *	2.570±0.397 $\Delta$ *
	0.780	3.198±0.118 $\Delta$ *	3.620±0.149 $\Delta$ *	2.870±0.105 $\Delta$ *

注:与对照组比较, $\Delta P < 0.05$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;—表示不含红背叶根水提物。

**表 4 各组 SOD、MDA 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	红背叶根水提物水平(mg/mL)	SOD	MDA
对照组	—	61.375±6.328	2.933±0.079
模型组	—	28.905±3.938 $\Delta$	8.878±1.355 $\Delta$
红背叶根组	3.125	50.658±3.795 $\Delta$ *	3.908±0.113 $\Delta$ *
	1.560	44.998±4.413 $\Delta$ *	4.820±0.367 $\Delta$ *
	0.780	38.433±2.433 $\Delta$ *	5.560±0.371 $\Delta$ *

注:与对照组比较, $\Delta P < 0.05$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;—表示不含红背叶根水提物。

**3 讨 论**

脂肪肝可分为酒精性脂肪肝与非酒精性脂肪肝。研究脂肪肝的发病机制时常用到酒精性脂肪肝细胞模型和非酒精性脂肪肝细胞模型。研究表明,动物模型存在个体差异较大,实验条件不易控制,整体影响因素众多等不利因素,而建立细胞模型能克服动物模型个体差异的影响,更好地控制实验条件,能针对性地探讨脂肪肝发病的细胞机制,且能有效缩短筛选治疗药物的时间<sup>[4]</sup>。本课题组前期研究已使用动物模型探讨过红背叶根的保肝机制<sup>[2-3]</sup>,但未进行过离体细胞模型的研究,且目前相关临床研究较少,因此,在本研究中采用酒精性脂肪肝离体细胞模型初步探讨了红背叶根对酒精性脂肪肝的影响。

中 ALT、AST、GGT 水平明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,红背叶根组 3 个水平(3.125、1.560、0.780 mg/mL)下,酒精性脂肪肝 L02 细胞模型的细胞上清液中 ALT、AST、GGT 水平明显降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3。

**2.4 各组 SOD、MDA 水平比较** 与对照组比较,模型组酒精性脂肪肝 L02 细胞模型的细胞上清液中 SOD 水平明显降低,MDA 水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,红背叶根组 3 个水平(3.125、1.560、0.780 mg/mL)下,酒精性脂肪肝 L02 细胞模型的细胞上清液中 MDA 水平明显降低,SOD 水平明显升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 4。

本研究中,随着乙醇水平升高,L02 细胞的存活率逐渐下降,提示在酒精性脂肪肝的发生、发展过程中,乙醇导致的肝损伤起到关键作用。本研究红背叶根组中,随红背叶根水提物水平的逐渐降低,乙醇诱导的酒精性脂肪肝 L02 细胞模型中细胞存活率逐渐升高,当其水平为 1.560、0.780 mg/mL 时,其所对应的细胞存活率高于模型组,提示该水平下红背叶根具有一定的保肝作用,与本课题组前期的动物模型研究结果一致。

脂质过氧化及氧化应激是急性肝损伤的一个发病机制。肝细胞发生过氧化损伤时,细胞膜通透性增加,ALT 和 AST 从肝细胞内释放,细胞培养液中的 ALT 和 AST 水平升高<sup>[5]</sup>。ALT 主要存在于肝细胞的细胞质中;AST 主要存在于肝细胞的细胞质和线粒体中;GGT 分布于肝细胞膜,乙醇能诱导微粒体生物转化,使 GGT 水平升高。ALT、AST 及 GGT 是肝细胞内的非特异性功能酶,当细胞发生损伤时其水平升高<sup>[6-7]</sup>。乙醇及其代谢物乙醛能促进脂质过氧化和线粒体的损伤,从而引起肝细胞损伤,使相关生化指标产生相应变化<sup>[6-8]</sup>。本研究结果显示,红背叶根可降低酒精性脂肪肝 L02 细胞模型的细胞上清液中 ALT、AST、GGT 水平,提示红背叶根在酒精性脂肪肝离体细胞模型中具有保肝、降酶的作用。

脂质氧化的主要降解产物 MDA 可直接与蛋白

和 DNA 结合,使之变性失活,因此 MDA 常用于反映人体内脂质过氧化程度及细胞氧化损伤的程度<sup>[9]</sup>。此外,MDA 可严重损伤肝细胞膜结构,导致肝细胞肿胀、坏死<sup>[10]</sup>。SOD 是人体内自由基的重要清除剂,可防止生物膜过氧化引起的毒性作用<sup>[11]</sup>。据报道,各类型肝病患者 SOD 水平均明显降低,且其与肝脏病理损伤严重程度有关<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,红背叶根还可以明显降低酒精性脂肪肝 L02 细胞模型的细胞上清液中 MDA 水平,明显提高 SOD 水平,提示红背叶根在酒精性脂肪肝离体细胞模型中具有抗脂质过氧化的作用。

本研究结果为红背叶根在酒精性脂肪肝中的临床应用提供了有力的数据支撑。但本研究的局限性在于使用的是体外实验模型,不能完全模拟体内的生理病理变化。

综上所述,红背叶根在酒精性脂肪肝细胞模型中具有保肝、降酶、抗脂质过氧化的作用,值得进一步临床试验验证后推广应用。

## 参考文献

- [1] 赵天宇. 解析脂肪肝: 肥胖饮酒是元凶, 坚持锻炼能痊愈 [N]. 北京科技报, 2018-01-08(30).
- [2] 沈海容, 杨静雯, 朱晓霞, 等. 红背叶根提取物对 Con-A 致小鼠急性肝损伤的保护作用研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(6): 1266-1268.
- [3] 杨静雯, 沈海容, 朱晓霞, 等. 红背叶根不同提取物对 Con-A 致急性肝损伤小鼠治疗作用的初步研究 [J]. 实用医学

杂志, 2014, 30(18): 2894-2897.

- [4] 张红锋, 杨慧萍, 王耀发. 乙醇和软脂酸诱导的脂肪肝离体细胞模型 [J]. 华东师范大学学报 (自然科学版), 2002, 46(4): 88-95.
- [5] 罗爱莲, 程胜邦, 沈磊, 等. 紫茉莉提取物对乙醇诱导 L-02 肝细胞损伤的影响 [J]. 大理大学学报, 2016, 1(10): 5-8.
- [6] XIU F W, MIN Y. Relationship between alcohol consumption and clinical manifestation of patients with fatty liver: a single-center study [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2011, 10(3): 276-279.
- [7] 林春兰, 蒋建伟, 严玉霞, 等. 茶多酚对酒精诱导的小鼠肝脂质过氧化和血清 ALT 活性变化的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(1): 110-112.
- [8] ZAKHARI S. Overview: how is alcohol metabolized by the body [J]. Alcohol Res Health, 2006, 29(3): 245-254.
- [9] 胡静, 陈新祥, 胡剑峰, 等. 姜黄素对乙醇诱导的人 L-02 肝细胞氧化损伤的保护作用研究 [J]. 医学理论与实践, 2013, 26(1): 3-4.
- [10] 肖碧琼, 赵国荣, 贺又舜, 等. 理脾护肝调脂丸对脂肪肝大鼠肝脏 MDA、SOD 影响的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 230-231.
- [11] 王君明, 崔瑛, 季莉莉, 等. 超氧化物歧化酶参与肝损伤的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 265-269.
- [12] 周艳丽, 张磊, 刘维. 白芍总苷对雷公藤多苷片所致小鼠急性肝损伤保护作用的实验研究 [J]. 天津中医药, 2007, 24(1): 61-63.

(收稿日期: 2020-03-20 修回日期: 2020-09-10)

(上接第 3560 页)

- [6] GOTERRIS L, MANCEBO-FERNANDEZ M A, AGUILAR-COMPANY J, et al. Molecular diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia by use of oral wash samples in immunocompromised patients: usefulness and importance of the DNA target [J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(12): e01287-e01319.
- [7] WANG D D, ZHENG M Q, ZHANG N, et al. Investigation of Pneumocystis jirovecii colonization in patients with chronic pulmonary diseases in the people's republic of China [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2015, 10: 2079-2085.
- [8] SANTOS C R, DE ASSIS A M, LUZ E A, et al. Detection of Pneumocystis jirovecii by nested PCR in HIV-negative patients with pulmonary disease [J]. Rev Iberoam Micol, 2017, 34(2): 83-88.
- [9] 鲁怀伟, 胡晓文, 徐傲, 等. 不同染色方法对肺孢子菌的诊断作用比较 [J]. 临床输血与检验, 2012, 14(2): 147-148.
- [10] MANSHARAMANI N G, BALACHANDRAN D, VERNOVSKY I, et al. Peripheral blood CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte counts during Pneumocystis carinii pneumonia in immu-

nocompromised patients without HIV infection [J]. Chest, 2000, 118(3): 712-720.

- [11] SAEED N K, FARID E, JAMSHEER A E. Prevalence of opportunistic infections in HIV-positive patients in Bahrain: a four-year review (2009-2013) [J]. J Infect Dev Ctries, 2015, 9(1): 60-69.
- [12] ESTEVES F, CALE S S, BADURA R, et al. Diagnosis of Pneumocystis pneumonia: evaluation of four serologic biomarkers [J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 21(4): e379.
- [13] VOGEL M, WEISSGERBER P, GOEPPERT B, et al. Accuracy of serum LDH elevation for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia [J]. Swiss Med Wkly, 2011, 141: 13184.
- [14] CORSONELLO A, PEDONE C, BATTAGLIA S, et al. C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) as inflammation markers in elderly patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. Arch Gerontol Geriatr, 2011, 53(2): 190-195.

(收稿日期: 2020-03-18 修回日期: 2020-09-26)