

石榴皮多酚对脂变 L-02 肝细胞 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达的影响

梁 俊, 李建科*, 刘永峰, 张华峰, 马倩倩, 赵 伟

(陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要:研究了石榴皮多酚纯化物、安石榴苷和石榴鞣花酸对脂变 L-02 肝细胞胆固醇合成限速酶 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达的影响;采用 MTT 法筛选石榴皮多酚适宜浓度;体积分数 50% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基与 L-02 肝细胞孵育 48 h 建立脂肪变性肝细胞模型;实验分为正常组、模型组和治疗组,治疗组加入不同浓度的受施物,继续培养 48 h,采用 RT-PCR 法检测不同受施物对脂变 L-02 肝细胞 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达的影响;结果显示:石榴皮多酚均能呈剂量依赖性地减弱脂变 L-02 肝细胞 mRNA 表达,且以 100 $\mu\text{g/mL}$ 的安石榴苷标品抑制作用最强;表明石榴皮多酚降肝细胞总胆固醇作用是通过降低 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达实现的,安石榴苷是石榴皮多酚中降血脂的主要活性形式。

关键词:石榴皮多酚;安石榴苷;石榴鞣花酸;L-02 肝细胞;HMG-CoA 还原酶

中图分类号:TS 201.25 **文献标志码:**A **文章编号:**1673—1689(2013)09—0957—05

Effects of Pomegranate Peel Polyphenols(PPPs) on the Expression of HMG-CoA Reductase mRNA of Human L-02 Hepatocyte

LIANG Jun, LI Jian-ke*, LIU Yong-feng, ZHANG Hua-feng, MA Qian-qian, ZHAO-Wei

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The objective of this manuscript is to study the effects of Pomegranate Peel Polyphenols, Punicalagine and ellagic acid on the expression of HMG-CoA reductase mRNA of human L-02 hepatocyte. The model of steatotic L-02 hepatocyte was firstly established by cultured with 50% (V/V) fetal bovine serum for 48 hours, and the appropriate concentrations of PPPs were detected by MTT assay. Then the experiments were divided into three groups: normal group, model group and therapy group, different contents of PPPs is added to the therapy group. After 48 h cultured, the mRNA expression level of HMG-CoA reductase was detected by RT-PCR after 48 h cultured. It was found that the HMG-CoA reductase mRNA expression level was significantly inhibited by PPPs treatment groups, especially for the case of 100 $\mu\text{g/mL}$ Punicalagin group. From the aboved results, the possible mechanisms of PPPs decreasing the intracellur cholestol are related to

收稿日期: 2012-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171677)。

* 通信作者: 李建科(1960—), 男, 陕西扶风人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品营养与安全研究。Email: jiankel@snnu.edu.cn

downregulation of HMG-CoA reductase mRNA's expression, Punicalagin was the key component in PPPs on lipid-lowering.

Keywords: pomegranate peel polyphenols, punicalagin, ellagic acid, L-02 hepatocyte, HMG-CoA reductase

WHO 调查显示,心血管疾病已经成为 21 世纪危害人类生命的最主要杀手,而其最主要的始动因素就是动脉粥样硬化^[1]。糖尿病、肥胖、高血压及高血脂症等因素可促进动脉粥样硬化的发生发展,其中高血脂症扮演着重要角色^[2]。相关研究显示,胆固醇代谢异常与动脉粥样硬化密切相关^[3],因而调脂治疗心血管疾病成为主要措施之一。近年来,天然提取成分石榴皮多酚因具有抑制炎症发生、防癌抑癌^[4]、抗氧化和清除自由基^[5]、降血脂^[6]、降血压和预防心脑血管疾病等多种生理和药理活性而备受关注。如程霜等人^[6]研究发现,富集的石榴皮多酚可以明显降低高脂大鼠的血清总胆固醇、甘油三酯和肝总胆固醇的作用,但并不清楚降血脂和肝脂作用的成分;赵艳红等人^[5]进一步证明安石榴苷是石榴皮多酚纯化物的主要活性成分;B.Cerdá 等人^[7]对安石榴苷吸收代谢研究表明,安石榴苷吸收入血的活性形式为鞣花酸。究竟石榴皮多酚的何种成分或代谢产物发挥降血脂作用仍需分析研究。本实验在离体肝细胞株上应用高脂血清诱导脂肪变性,观察石榴皮多酚纯化物、安石榴苷和鞣花酸对 L-02 肝细胞胆固醇合成限速酶 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达的影响,研究石榴皮多酚的降脂作用活性形式及作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 石榴皮多酚纯化物 采用 XRD-6 树脂纯化制备,纯度为 87.81%,安石榴苷的纯度为 69.42%;安石榴苷标品:货号 E-0363,纯度 $\geq 96.0\%$;石榴鞣花酸标品:货号 E-0654,纯度 $\geq 98.0\%$;两种标品均购自上海同田生物技术股份有限公司,低温、避光、隔氧存放。

1.1.2 成年人 L-02 细胞 购自武汉大学典型物种保藏中心。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清:杭州四季清公司产品;RPMI-1640 基本培养基:美国 Gibco 公司产品;DMSO、胰蛋白酶、MTT、胰岛素-I6634 等均购自美

国 Sigma 公司;总 RNA 提取试剂盒、DEPC 处理水、RT-PCR 试剂盒、DNA maker:上海生物工程公司提供;HMG-CoA 还原酶引物和 GAPDH 内参引物:上海生物工程公司合成。

1.2 主要仪器设备

SW-CJ-2F 超净工作台:江苏吴江市净化设备厂制造;311 气套式 CO₂ 型恒温培养箱:美国 Thermo 公司制造;IX51 型倒置显微镜:日本 OLYMPUS 公司制造;台式低温离心机:美国 Thermo 公司制造;Nanodrop ND-2000 型微量核酸蛋白测定仪:美国 Thermo 公司制造;PCR 扩增仪:美国伯乐制造;水平电泳槽:北京六一仪器厂制造;凝胶成像系统:杭州朗基科学仪器有限公司制造;精密微量移液器 (0.5~10 μ L, 10~100 μ L, 100~1 000 μ L):德国 Eppendorf 公司制造;KQ3200DE 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司制造。

1.3 试验方法

1.3.1 成年人 L-02 肝细胞培养 L-02 肝细胞培养于 50 cm² 含 4 mL 体积分数 10% 的 FBS 正常培养基的细胞培养瓶中,置 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度的孵箱内培养,待细胞 80% 融合时用含质量分数 0.25% 的胰蛋白酶消化,传代。详见文献[8]。

1.3.2 脂变 L-02 细胞模型的建立 将处于对数生长期的 L-02 肝细胞以 2×10^4 cell/孔接种于 6 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中贴壁培养 48 h 后,改用造模培养液继续培养 48 h 建立脂肪变性肝细胞模型。详见文献[9]。

1.3.3 MTT 法筛选三种受施物作用浓度 将安石榴苷标品、石榴鞣花酸标品和石榴皮多酚纯化物用 DMSO 溶解,过滤除菌,用生理盐水稀释为不同浓度备用。将处于对数生长期的 L-02 肝细胞以 1×10^3 cell/孔接种于 96 孔板中,先利用造模培养液培养 48 h 建立脂变肝细胞模型,然后改用正常培养基培养,使 3 种受施物终质量浓度为 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 360 μ g/mL,继续培养 48 h,每个浓度设 4 个复孔。处理结束后每孔避光加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L,继续培养 4 h;小心吸弃孔中的培养液,

以150 μL/孔的量加入 DMSO 终止反应,振荡 10 min 使结晶充分溶解;于 570 nm 的波长于酶标仪上检测各孔吸光值,计算各药物浓度下 L-02 细胞的存活率:

细胞存活率=

$$\frac{(\text{试验组 A570}-\text{阴性对照组 A570})}{(\text{正常对照组 A570}-\text{阴性对照组 A570})} \times 100\%$$

详见文献[10]。

1.3.4 试验分组及处理 试验分正常组、模型组、治疗组,治疗组加入不同浓度的石榴皮多酚纯化物、安石榴苷标品和石榴鞣花酸,使其终质量浓度分别为 25、50、100 μg/mL,各组处理见表 1。

表 1 各试验组处理情况

Table 1 Experimental Groups and Treatments

组别	处 理
正常组	先用正常培养液培养 48 h,换液,继续用正常培养液培养 48 h
模型组	先用造模培养液培养 48 h,换液,用正常培养液继续培养 48 h
治疗组	先造模培养 48 h,换液,用含不同浓度受施物的正常培养液继续培养 48 h

1.3.5 RT-PCR 分析石榴皮多酚对脂变 L-02 肝细胞 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达的影响 脂变 L-02 肝细胞接种于 6 孔板中,按表 1 用不同浓度的受施物处理细胞后,弃去培养基,每孔加入 1 mL TRIzol,按试剂盒说明书提取总 RNA,取 1.5 mL 的 EP 管,每组均取 5 uL 总 RNA 作为模板,然后依次加入 Oligo(dT)₁₈primer 1 μL,5×Reaction Buffer 4 μL, RiboLock™RNase Inhibitor(20 u/μL) 1 μL,10 mmol/L dNTP Mix 2 μL,RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase(200 u/μL) 1 μL,最后加入 DEPC-H₂O 使总体积为 20 μL,轻轻混匀,置于 42 ℃水浴中孵育 60 min,然后置于 70 ℃水浴下孵育 5 min 终止反应,即得逆转录产物 cDNA,小心混匀,短暂离心 10 s,取 0.2 mL PCR 反应管,在冰上按表 2 顺序依次加入各试剂,试验所用引物见表 3。待上述试剂轻轻混匀,短暂离心,按下列程序进行后续的 PCR 扩增: HMG-CoAR PCR 扩增产物长度 246 bp,反应首次循环在 94 ℃预变性 3 min,变性、退火、延伸分别在 94 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 45 s 共 35 个循环,最后一次循环在 72 ℃延伸 10 min;GADPH PCR 扩增产物长度 486 bp,反应首次循环在 94 ℃预变性 3 min,

变性、退火、延伸分别在 94 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 45 s 共 35 个循环,最后一次循环在 72 ℃延伸 10 min。反应结束后,取 5 μL 扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并照相,利用 ImageMaster™ TotalLab 1.0 Software 软件分析各组目的产物及 GADPH 灰度值,用二者的比值代表目的产物的相对表达量:

$$\text{mRNA 相对表达量} = \frac{\text{产物电泳条带密度}}{\text{GADPH 产物条带密度}} \times 100\%$$

详见文献[11-12]。

表 2 加样顺序及剂量

Table 2 Dose and sequence of reagents

2×PCR Master/ μL	上游引物 (10 μmol/L)/μL	下游引物 (10 μmol/L)/μL	Sterilized ddH ₂ O/ μL	cDNA 模板/ μL	Total volume/ μL
25	2	2	20	1	50

表 3 PCR 所用引物序列及产物大小

Table 3 Sequences of Primers and the size of PCR Products

Genes	Primes(forward and reverse)	Product Length (bp)
HMG-CoAR	F:5'-TACCATGTCAGGGGTACGTC-3' R:5'-CAAGCCTAGAGACTAAATCATC-3'	246
GADPH	F:5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3' R:5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	486

1.3.6 数据处理 以上各试验组均重复 4 次,均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 统计软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 MTT 细胞增殖实验

图 1 结果所示:细胞存活率随着石榴皮多酚质量浓度的增加而呈逐渐下降的趋势,低质量浓度的石榴皮多酚对脂变后的 L-02 肝细胞增殖无明显抑制,表现为在 0~80 μg/mL 的范围内,细胞存活率均在 90%以上,但在高质量浓度的石榴皮多酚作用下,L-02 肝细胞出现了较多的死亡,表现出明显的增殖抑制效应,故在本实验中选定 0~100 μg/mL 的范围内与脂变肝细胞孵育 48h 进行后续的实验研究。

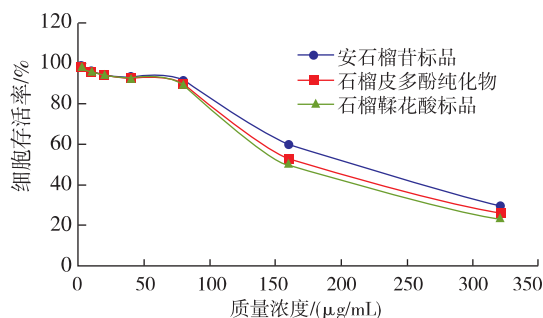
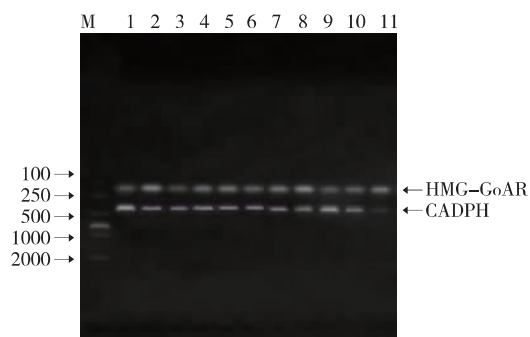


图1 不同质量浓度石榴皮多酚作用 48 h 后对脂变 L-02 肝细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 1 Effect of different concentrations of PPPs on the steatotic hepatocytes proliferation after 48 h cultivation

2.2 不同质量浓度的石榴皮多酚纯化物、安石榴苷标准品和石榴鞣花酸标准品对 HMG-CoA 还原酶 mRNA 相对表达量的影响

由图 2、3 可见：琼脂糖凝胶电泳结果显示，在 486 bp 处可见 GADPH 内参基因的条带；各组在 246 bp 处可见 HMG-CoA 还原酶的表达，正常肝细胞组表达较弱模型组肝细胞组表达明显增强；与模型组相比，脂变 L-02 肝细胞经不同质量浓度受施物处理后，HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达均有不同程度地减弱，并且表现出一定的剂量相关性，其中安石榴苷 50 $\mu\text{g/mL}$ 组、石榴皮多酚纯化物 100 $\mu\text{g/mL}$ 组差异显著 ($P<0.05$)；安石榴苷 100 $\mu\text{g/mL}$ 组 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达明显减弱，具统计学意义。



1正常组，2模型组，
3-5分别表示石榴皮多酚纯化物3个质量浓度100、50m、25 mg/L；
6-8表示鞣花酸标准品3个质量浓度100、50、25 mg/L；
9-11表示安石榴苷标准品3个质量浓度100、50、25 mg/L。

图2 不同质量浓度受施物对 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effects of PPPs on HMG-CoAR Expression

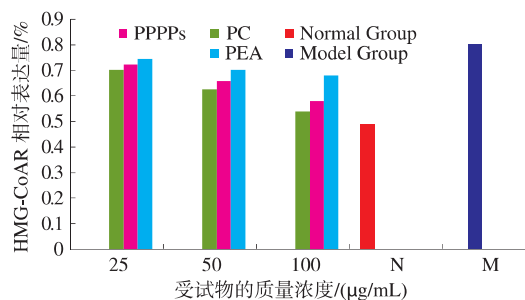


图3 不同质量浓度受试物对 HMG-CoA 还原酶 mRNA 相对表达量的影响

Fig. 3 Effects of PPPs on The Relative Expression Of HMG-CoAR

3 讨论

胆固醇生物体内的含量主要取决于自身的生物合成，HMG-CoA 还原酶是胆固醇生物合成的关键限速酶，该酶基因的表达和酶活性均受到生物体内胆固醇含量的反馈调节，即表现出酶活性抑制，胆固醇合成减少；酶活性激活，胆固醇合成增加。RT-PCR 实验结果显示，正常组肝细胞 HMG-CoA 还原酶呈弱表达，而经高脂血清处理后的模型肝细胞组 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达明显增强，充分表明在高脂环境下，肝细胞内的胆固醇合成明显增加。

石榴多酚因具有较多的药理生物活性受到广泛的关注，特别是其降总胆固醇和甘油三酯的作用^[6]，但其起降脂作用的成分及降脂作用具体的作用机制仍不清楚。本实验结果显示，经石榴皮多酚处理后的脂变肝细胞组 HMG-CoA 还原酶 mRNA 的相对表达较模型组均有不同程度的降低，并呈现出一定的剂量相关性，其中以安石榴苷减弱作用最明显，可以说明石榴多酚的降脂作用可以通过抑制 HMG-CoA 还原酶表达，从而阻断胆固醇的生物合成，进一步减少细胞内胆固醇的含量。

4 结语

实验结果显示，石榴皮多酚可减弱胆固醇合成限速酶 HMG-CoA 还原酶 mRNA 的表达，其中以安石榴苷标准品 100 $\mu\text{g/mL}$ 组效果最佳，进一步证实了安石榴苷是石榴皮多酚中起降脂作用的主要成分，同时也揭示了石榴皮多酚降胆固醇的作用可能是通过抑制胆固醇的合成途径实现的，但其过程是否或有无多因素的共同参与，还需进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 李建军. 心血管病进展与 2011 回顾炎症与冠状动脉粥样硬化性疾病研究进展[J]. 心血管病学进展, 2012, 33(1): 10-13.
LI Jian-Jun. Research progress of inflammation and atherosclerosis [J]. *Advances in Cardiovascular Diseases*, 2012, 33 (1): 10-13. (in Chinese)
- [2] 秦方, 阮蕾, 张廷杰. 动脉粥样硬化危险因素的现代认识[J]. 心血管病学进展, 2000, 21(1): 30-33.
QIN Fang, RUAN Lei, ZHANG Tin-Jie. A new knowledge of the risk factors of atherosclerosis [J]. *Advances in Cardiovascular Diseases*, 2000, 21(1): 30-33. (in Chinese)
- [3] 张勤婷, 李辉, 杜迎雪. 胆固醇与动脉粥样硬化性血管病变的研究[J]. 中国民康医学, 2006, 15: 640-641.
ZHANG Qin-ting, LI Hui, DU Ying-xue. Relationship between serum cholesterol and atherosclerotic vascular disease [J]. *Medical Journal of Chinese People's Health*, 2006, 15: 640-641. (in Chinese)
- [4] 杨建宇, 陈韵, 郑春兰, 等. 石榴的生物活性及其抗炎和抗肿瘤作用[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(S1): 430-438.
YANG Jian-yu, CHEN Yun, ZHANG Chun-lan, et al. The chemistry of punica granatum and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer [J]. *Journal of Yunnan University*, 2008, 30(S1): 430-438. (in Chinese)
- [5] 赵艳红, 李建科, 李国荣. 石榴皮多酚纯化及其抗氧化活性表征[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 31-37.
ZHAO Yan-hong, LI Jian-ke, LI Guo-rong. Purification with macroporous adsorbent resins and in vitro antioxidant evaluation of pomegranate peel polyphenols [J]. *Food Science*, 2010, 31(11): 31-37. (in Chinese)
- [6] 程霜, 郭长江, 杨继军, 等. 石榴皮多酚提取物降血脂效果的实验研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2005, 23(3): 160-163.
CHENG Shuang, GUO Chang-jiang, YANG Ji-jun, et al. Experimental study on hypolipidemic effect of polyphenolic extract from pomegranate peel [J]. *Journal of Preventive Medicine of Chinese of Peoples Liberation Army*, 2005, 2 (3): 160-163. (in Chinese)
- [7] Cerdá B, Llorach R, Cerón José J, et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice [J]. *European Journal of Nutrition*, 2003, 42(1): 18-28.
- [8] 陈慧梅, 廖红, 高静. 肝细胞培养方法研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2002, 24(3): 163-166.
CHEN Hui-mei, LIAO Hong, GAO Jing. The research progress of hepatocyte culture [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2002, 24(3): 163-166. (in Chinese)
- [9] 王炳芳, 朱韶杰, 田培营. 脂肪肝细胞模型的建立及其生物学特性[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 35(15): 3674-3677.
WANG Bing-fang, ZHU Shao-jie, TIAN Pei-ying. Establishment of a cellular model of non-alcoholic fatty liver and its biological characteristics [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2007, 35(15): 3674-3677. (in Chinese)
- [10] Fiona M Young, Wichaya Phungtamdet, Barbara J S Sanderson. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS [J]. *Toxicology in Vitro*, 2005, 19: 1051-1059.
- [11] Maria Notarnicola, Caterina Messa, Maria G Refolo, et al. Polyunsaturated fatty acids reduce Fatty Acid Synthase and Hydroxy-Methyl-Glutaryl CoA-Reductase gene expression and promote apoptosis in HepG2 cell line [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2011(10): 10.
- [12] 程静屏, 阳学风. 姜黄素对人肝 L-02 细胞胆固醇合成及转运蛋白表达的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(3): 6-11.
CHENG Jing-ping, YANG Xue-feng. Effects of curcumin on cholesterol synthesis and transport protein expression in human L-02 hepatocyte [J]. *Journal of Hubei University of Chinese Medicine*, 2011, 13(3): 6-11. (in Chinese)