

## 蛇床子素通过激活过氧化物酶体增植物激活受体 $\alpha$ 调节肝细胞内脂肪酸代谢

沈洪<sup>1\*</sup>, 周峰<sup>2\*</sup>, 薛洁<sup>3</sup>, 谢梅林<sup>3</sup>

(1. 湖州师范学院医学院药理学教研室, 浙江湖州 313000; 2. 苏州市第五人民医院药剂科, 江苏苏州 215006, 3. 苏州大学药学院药理学系, 江苏苏州 215123)

**摘要:**目的 探讨蛇床子素是否通过激活过氧化物酶体增植物激活受体 (PPAR) $\alpha$  调节肝细胞内的脂肪酸代谢。方法 大鼠肝细胞在用蛇床子素 12.5 ~ 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 后, 用比色法测定细胞内甘油三酯 (TG) 和游离脂肪酸 (FFA) 含量, 用逆转录聚合酶链反应法测定 PPAR $\alpha$  mRNA 表达的变化。PPAR $\alpha$  抑制剂 MK886 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  预处理肝细胞 2 h 后, 观察蛇床子素 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 后对细胞内 TG 和 FFA 含量以及 PPAR $\alpha$  调控的靶基因包括固醇调节元件结合蛋白 (SREBP)-1/2、脂肪酸合酶 (FAS)、二脂酰甘油酰基转移酶 (DGAT)、肉碱软脂酰转移酶 (CPT)-1a、脂肪酸转运蛋白 (FATP) 4 和肝脂肪酸结合蛋白 (L-FABP) mRNA 表达的影响。结果 蛇床子素 12.5 ~ 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  可明显降低肝细胞内 TG 和 FFA 的含量 ( $P < 0.01$ ), 同时也能明显增加肝细胞内 PPAR $\alpha$  mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ )。在用 PPAR $\alpha$  抑制剂 MK886 预处理后, 蛇床子素降低肝细胞内 TG 和 FFA 的作用则明显被减弱 ( $P < 0.01$ ), 同时抑制 SREBP-1/2, FAS 和 DGAT mRNA 表达的作用明显减弱或完全消失 ( $P < 0.01$ ), 增加 CPT-1a, FATP4 和 L-FABP mRNA 表达的作用也明显减弱或完全消失 ( $P < 0.01$ )。结论 蛇床子素通过激活肝细胞中 PPAR $\alpha$  后可降低细胞中的 TG 和 FFA 含量, 其机制与激活 PPAR $\alpha$  后随后抑制 SREBP-1/2, FAS 和 DGAT 的基因表达以及增加 CPT-1a, FATP4 和 L-FABP 的基因表达有关。

**关键词:** 蛇床子素; 脂肪酸; 过氧化物酶体增植物激活受体  $\alpha$ ; 肝细胞

中图分类号: R285.5, R963 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2013)02-0174-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.009

血液中的游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 在脂肪酸转运蛋白 (fatty acid transporter protein, FATP) 和肝脂肪酸结合蛋白 (liver fatty acid binding protein, L-FABP) 作用下可被肝细胞摄取和转运。肝细胞也可以乙酰辅酶 A 为原料, 在脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FAS) 作用下合成脂肪酸 (fatty acid, FA), 合成的 FA 又可在二脂酰甘油酰基转移酶 (diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 作用下进一步合成甘油三酯 (triglycerides, TG); 肝中的 FA 也可在肉碱软脂酰转移酶-1a (carnitine palmitoyltransferase-1a, CPT-1a) 作用下促使 FA 进行  $\beta$  氧化, 使用于 TG 合成的 FA 减少。过氧化

物酶体增植物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) $\alpha$  可以调控参与 FA 代谢的这些酶和转运体<sup>[1-5]</sup>, 而且 PPAR $\alpha$  也可通过调节固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element-binding protein, SREBP), 包括 SREBP-1 和 SREBP-2 而抑制 FAS 的表达<sup>[6-7]</sup>。

蛇床子素 (osthole) 是一种香豆素类化合物, 其化学名称为 7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素, 广泛存在于伞形科植物蛇床子和独活等植物中。本课题组首先发现蛇床子素具有调节血脂和肝脂、明显减轻动物脂肪肝程度的作用<sup>[8-10]</sup>, 进一步的研究发现, 蛇床子素可明显增加肝组织中 PPAR $\alpha/\gamma$  mRNA 和蛋白的表达<sup>[11]</sup>, 提示蛇床子素可能通过激活肝细胞中 PPAR $\alpha$  而调节细胞中的 TG 和 FA 含量。为此本文利用 PPAR $\alpha$  选择性抑制剂, 对 PPAR $\alpha$  介导的与 FA 代谢相关的上述这些基因的表达进行研究, 以确定蛇床子素是否通过激活 PPAR $\alpha$  而发挥调节 FA 代谢的作用, 为其将来的临床应用提供可靠的药理学依据。

基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y2100755)

作者简介: 沈洪 (1969 -), 女, 副教授, 硕士, 主要从事中药药理学研究; 周峰 (1986 -), 男, 药师, 硕士, 主要从事中药药理学研究。

通讯作者: 谢梅林, E-mail: xiemeilin@suda.edu.cn, Tel: (0512)69566553

\*: 共同第一作者。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与试剂

蛇床子素,白色粉末,纯度 >98%,由西安绿泉生物技术有限公司提供。MK886,为 PPAR $\alpha$  选择性抑制剂<sup>[12]</sup>,购自 Cayman 化学公司,纯度 >99%。TG 测定试剂盒,购自浙江伊利康生物技术有限公司。FFA 和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。Trizol,购自 Invitrogen 公司。M-MLV 逆转录酶( $2 \times 10^8 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ),Taq 聚合酶( $3 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ),dNTP( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )和 DNA 100 bp marker,均购自 Fermentas 公司。琼脂糖购自 Biowest 公司。RPMI 1640 培养基和小牛血清,购自 Gibco 公司。本文所用引物均由上海生物工程科技有限公司合成,PPAR $\alpha$ , SREBP-1/2, FAS, DGAT, CPT-1a, FATP4 和 L-FABP 引物序列见表 1。其余试剂均为分析纯。

### 1.2 细胞株

BRL 大鼠肝细胞,由中科院上海细胞所提供。

### 1.3 主要仪器

二氧化碳培养箱(Heraeus 公司),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),DYY-8B 型稳压稳流电泳仪和 DYY-III 31D 型电泳槽(北京市六一仪器厂),

GELMate 2000 型电泳系统(Toyobo Biotech 公司),数码凝胶图像处理系统(GIS2008H,上海天能科技有限公司),722N 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

### 1.4 细胞分组处理

BRL 大鼠肝细胞采用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基培养,将细胞数调整为  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  后接种于 6 孔培养板中,每孔加 2.0 ml 细胞悬液,待细胞贴壁融洽后分为 7 组,即溶媒(0.1% DMSO)对照组,蛇床子素 12.5, 25, 50 和  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组, MK886  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组, MK886  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  + 蛇床子素  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组。MK886 + 蛇床子素组细胞先用 MK886  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  预处理 2 h 后,再加入蛇床子素,在蛇床子素作用于细胞 24 h 后,按下述方法检测相应的指标。

### 1.5 比色法检测肝细胞内 TG 和 FFA 含量

收获细胞后,用 PBS 重复洗 3 次,加入 PBS 500  $\mu\text{l}$  后放入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱反复冻融 3 次,然后按照试剂盒说明书上提供的比色法进行测定细胞内 TG 和 FFA 的含量。

### 1.6 逆转录 PCR 法检测 PPAR $\alpha$ , SREBP-1/2, FAS, DGAT, CPT-1a, FATP4 和 L-FABP mRNA 表达

收获细胞后,按照试剂盒说明书上提供的方法

Tab. 1 Primers used in RT-PCR analysis

Gene	Primer sequence	Length/bp	Annealing temperature/ $^\circ\text{C}$
PPAR $\alpha$	Sense: 5'-AAGCCATCTTCACGATGCTG-3' Antisense: 5'-TCAGAGGTCCCTGAACGGTG-3'	509	56
SREBP-1	Sense: 5'-GGAGCCATGGATTGCACATT-3' Antisense: 5'-AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA-3'	191	54
SREBP-2	Sense: 5'-CCGGTAATGATGGGCCAAGAGAAAG-3' Antisense: 5'-AGGCCGGGGGAGACATCAGAAG-3'	400	57
FAS	Sense: 5'-GCAACTGTGCGTTAGCCAC-3' Antisense: 5'-TGTTTCAGGGGAGAAGAGACC-3'	709	54
DGAT	Sense: 5'-TGGTCCCTACTATCCAGAACTCCA-3' Antisense: 5'-CCAATGATGAGTGTCACCCACAC-3'	492	60
CPT-1a	Sense: 5'-TATGTGAGGATGCTGCTTCC-3' Antisense: 5'-GACAAGCTTAGCTCTCCGAG-3'	629	60
FATP4	Sense: 5'-TGGATGAGCTGGGCTACC-3' Antisense: 5'-GTTGCTAGTGGGGCTTGC-3'	200	58
L-FABP	Sense: 5'-GGCGATGGGTCTGCCTGAGGA-3' Antisense: 5'-TTCGCACTCCTCCCCAAGGT-3'	151	60
GAPDH	Sense: 5'-GCCATCAACGACCCCTTCATT-3' Antisense: 5'-CGCCTGCTTACCACCTTCTT-3'	702	56

PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; SREBP: sterol regulatory element-binding protein; FAS: fatty acid synthase; DGAT: diacylglycerol acyltransferase; CPT-1a: carnitine palmitoyltransferase-1a; FATP: fatty acid transporter protein; L-FABP: liver fatty acid binding protein; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

提取总 RNA, 取 2 μg 用于逆转录至 cDNA, 按下列条件进行 PCR 扩增: 95℃ 变性 5 min, 继之 95℃ 30 s、退火(退火温度见表 1) 30 ~ 45 s, 72℃ 延伸 40 s, 共扩增 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。反应结束后用 2 % 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物, 凝胶扫描图像采用 Band Leader 软件分析, 计算与内参 GAPDH 的积分吸光度 (integrated absorbance, IA) 的比值。

### 1.7 统计学分析

实验结果数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, SPSS 18.0 统计软件处理, 采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 方法,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 蛇床子素对肝细胞内 TG 和 FFA 含量的影响

与溶媒对照组相比较, 在给予蛇床子素 12.5 ~ 100 μmol·L<sup>-1</sup> 作用 24 h 后, 肝细胞内的 TG 和 FFA 水平随着蛇床子素浓度的增加均逐步降低 ( $P < 0.01$ )。如预先用 PPARα 抑制剂 MK886 1 μmol·L<sup>-1</sup> 处理 2 h 后, 蛇床子素 100 μmol·L<sup>-1</sup> 降低肝细胞内 TG 和 FFA 的作用则被明显减弱 ( $P < 0.01$ )。单用 MK886 1 μmol·L<sup>-1</sup> 处理的肝细胞内 TG 和 FFA 水平反较溶媒对照组升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) (表 2)。

**Tab.2 Effect of osthole on triglycerides (TG) and free fatty acid (FFA) contents in cultured rat hepatocytes**

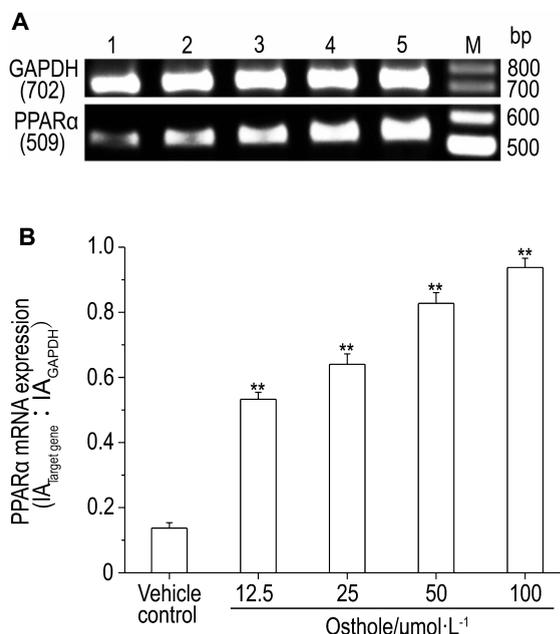
Drug/μmol·L <sup>-1</sup>	TG/ mg·g <sup>-1</sup> protein	FFA/ μmol·g <sup>-1</sup> protein
0.1%DMSO (vehicle control)	288 ± 4	801 ± 28
Osthole 12.5	222 ± 1 **	684 ± 17 **
25	197 ± 13 **	630 ± 31 **
50	147 ± 11 **	448 ± 30 **
100	98 ± 10 **	225 ± 16 **
MK886 1	329 ± 19 *	968 ± 14 **
MK886 1 + Osthole 100	240 ± 13 ** #	732 ± 26 * #

After the hepatocytes were pretreated with MK886 for 2 h, osthole was added and incubated for 24 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with vehicle control group; #  $P < 0.01$ , compared with osthole 100 μmol·L<sup>-1</sup> group.

### 2.2 蛇床子素对 PPARα mRNA 表达的影响

结果如图 1 显示, 与溶媒对照组相比较, 在给予

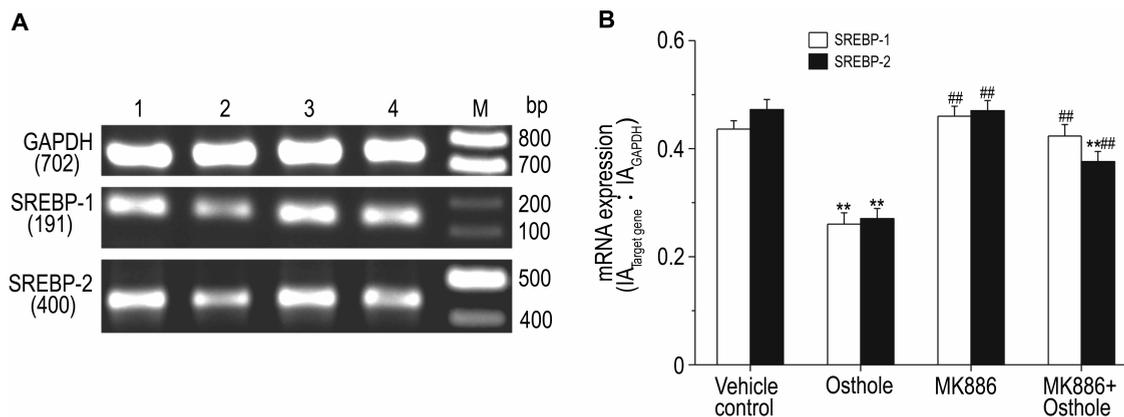
蛇床子素 2.5 ~ 100 μmol·L<sup>-1</sup> 作用 24 h 后, 可见肝细胞内的 PPARα mRNA 表达水平随着蛇床子素浓度的增加逐步增多 ( $P < 0.01$ ), 并呈明显的剂量依赖趋势 ( $r = 0.95$ ,  $P < 0.05$ )。



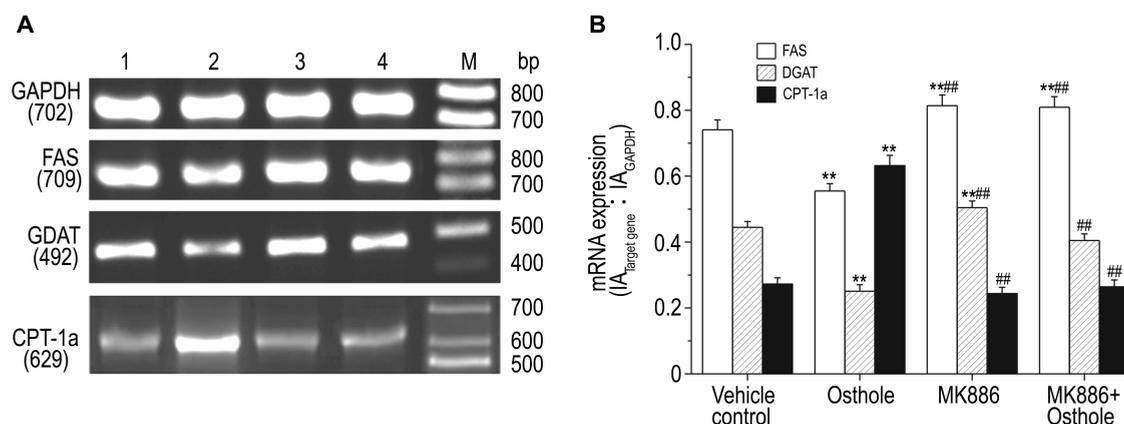
**Fig.1 Effect of osthole on PPARα mRNA expression in cultured rat hepatocytes.** The cultured rat hepatocytes were treated with osthole for 24 h. The PPARα mRNA expression in hepatocytes was then determined by reverse transcription polymerase chain reaction. Lane 1: vehicle control; lane 2: osthole 12.5 μmol·L<sup>-1</sup>; lane 3: osthole 25 μmol·L<sup>-1</sup>; lane 4: osthole 50 μmol·L<sup>-1</sup>; lane 5: osthole 100 μmol·L<sup>-1</sup>; M: marker.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with vehicle control group.

### 2.3 蛇床子素对 MK886 预处理的肝细胞中 SREBP-1/2, FAS, DGAT, CPT-1a, FATP4 和 L-FABP mRNA 表达的影响

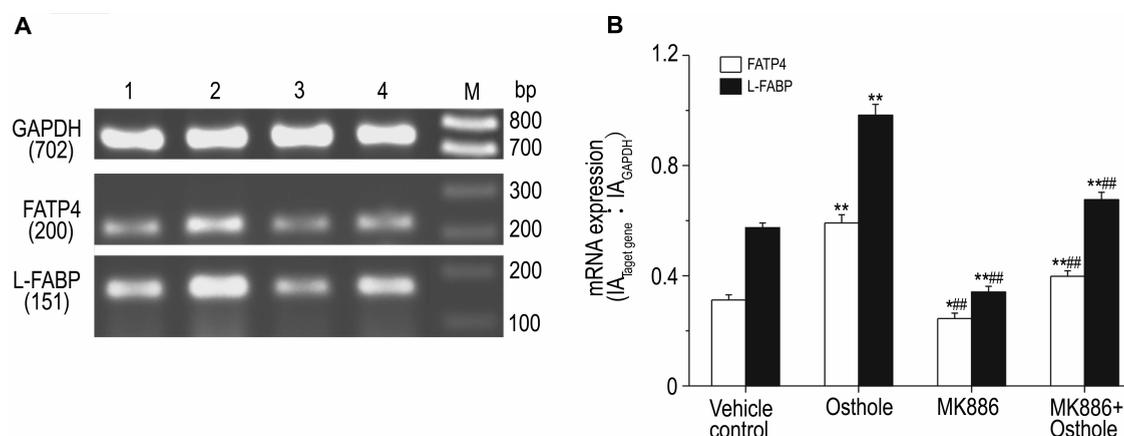
如图 2 ~ 图 4 显示, 与溶媒对照组相比较, 肝细胞给予蛇床子素 100 μmol·L<sup>-1</sup> 作用 24 h 后, 其中的 SREBP-1/2, FAS 和 DGAT mRNA 的表达明显降低 ( $P < 0.01$ ), 而 CPT-1a, FATP4 和 L-FABP mRNA 的表达明显增加 ( $P < 0.01$ )。若预先用 PPARα 抑制剂 MK886 1 μmol·L<sup>-1</sup> 预处理 2 h 后, 蛇床子素抑制 SREBP-1/2, FAS 和 DGAT mRNA 表达的作用则明显减弱或完全消失 ( $P < 0.01$ ), 蛇床子素增加 CPT-1a, FATP4 和 L-FABP mRNA 表达的作用也明显减弱或完全消失 ( $P < 0.01$ )。MK886 本身对 FAS 和 DGAT mRNA 表达有促进作用 ( $P < 0.01$ ), 而对 FATP4 和 L-FABP mRNA 表达有抑制作用 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。



**Fig.2 Effect of osthole on mRNA expressions of sterol regulatory element-binding protein-1/2 (SREBP-1/2) in cultured rat hepatocytes pretreated with MK886.** The hepatocytes were pretreated with MK886 for 2 h, osthole was then added and incubated with cells for 24 h. B was the semiquantitative result of A. Lane 1: vehicle control; lane 2: osthole 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; lane 3: MK886 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; lane 4: MK886 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + osthole 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; M: marker.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with vehicle control group; ##  $P < 0.01$ , compared with osthole 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group.



**Fig.3 Effect of osthole on mRNA expressions of fatty acid synthase (FAS), diacylglycerol acyltransferase (DGAT), and carnitine palmitoyltransferase (CPT)-1a in cultured rat hepatocytes pretreated with MK886.** See Fig.2 for the treatments. B was the semiquantitative result of A. Lane 1: vehicle control; lane 2: osthole 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; lane 3: MK886 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; lane 4: MK886 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + osthole 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; M: marker.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with vehicle control group; ##  $P < 0.01$ , compared with osthole 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group.



**Fig.4 Effect of osthole on mRNA expressions of fatty acid transporter protein (FATP)4 and liver fatty acid binding protein (L-FABP) in cultured rat hepatocytes pretreated with MK886.** See Fig.2 for the treatments. B was the semiquantitative result of A. Lane 1: vehicle control; lane 2: osthole 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; lane 3: MK886 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; lane 4: MK886 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + osthole 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; M: marker.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with vehicle control group; ##  $P < 0.01$ , compared with osthole 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group.

### 3 讨论

脂肪肝的主要病理特征是大量的 TG 在肝细胞内蓄积,但蓄积的 TG 对肝一般不会产生严重的毒性作用,反而由于 TG 的合成增加可降低肝内 FA 的蓄积而减少 FA 氧化所产生的活性氧自由基,从而可防止脂肪肝损伤的进一步发展<sup>[13-14]</sup>,因此有学者认为 FA 在脂肪肝的发生和发展中起着极其重要的作用<sup>[15]</sup>。众所周知,肝中的 PPAR $\alpha$  主要参与调节肝脏的脂质代谢平衡<sup>[16]</sup>。作者先前的研究已证明,蛇床子素可降低高脂饲养动物血及肝中的 TG 和 FFA 含量<sup>[8-9,17]</sup>,同时也可增加肝组织中的 PPAR $\alpha$  表达<sup>[11]</sup>,但蛇床子素是否通过作用于 PPAR $\alpha$  后介导相关靶基因而降低肝中的 TG 和 FFA 含量,仍尚不清楚。

本研究在体外培养的大鼠肝细胞上,发现蛇床子素可剂量依赖性地降低肝细胞中的 TG 和 FFA 含量,同时也能增加肝细胞中的 PPAR $\alpha$  mRNA 表达。这一结果完全与动物体内的结果相一致<sup>[11]</sup>。为了进一步确定蛇床子素降低肝细胞内 TG 和 FFA 与激活 PPAR $\alpha$  的关系,我们观察了在用 PPAR $\alpha$  选择性抑制剂 MK886 预处理情况下,蛇床子素对 PPAR $\alpha$  介导的相关靶基因的影响。结果表明,蛇床子素抑制 SREBP-1/2、FAS 和 DGAT 的 mRNA 表达的作用明显降低或完全消失,同样地,蛇床子素增加 CPT-1a、FATP4 和 L-FABP 的 mRNA 表达的作用也明显减弱或完全消失。这些结果提示蛇床子素降低肝中的 TG 和 FFA 含量,一方面与激活 PPAR $\alpha$  后抑制 SREBP-1/2 及下游基因 FAS 和 DGAT 表达作用有关,从而降低 FA 和 TG 的合成;另一方面也与激活 PPAR $\alpha$  后增加 CPT-1a、FATP4 和 L-FABP 表达作用后增强对 FA 的利用有关,从而使肝细胞中的 FA 和 TG 水平降低。

总之,蛇床子素降低肝中 TG 和 FFA 含量,主要可能与通过激活 PPAR $\alpha$  后随后抑制肝中 FAS 的表达而减少 FA 的合成,以及增加 CPT-1a 和抑制 DGAT 的表达后增强对 FA 的氧化利用有关。

#### 参考文献:

- [1] Kwon HJ, Hyum SH, Choung SY. Traditional Chinese Medicine improves dysfunction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and microsomal triglyceride transfer protein on abnormalities in lipid metabolism in ethanol-fed rats[J]. *Biofactors*, 2005, **23**(3):163-176.
- [2] Ringseis R, Muschick A, Eder K. Dietary oxidized fat prevents ethanol-induced triacylglycerol accumulation and in-
- creases expression of PPARalpha target genes in rat liver [J]. *J Nutr*, 2007, **137**(1):77-83.
- [3] Sun F, Xie ML, Xue J, Wang HB. Osthole regulates hepatic PPAR alpha-mediated lipogenic gene expression in alcoholic fatty liver murine [J]. *Phytomedicine*, 2010, **17**(8-9):669-673.
- [4] Yong EL, Li J, Liu MH. Single gene contributions: genetic variants of peroxisome proliferator-activated receptor (isoforms alpha, beta/delta and gamma) and mechanisms of dyslipidemias [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2008, **19**(2):106-112.
- [5] Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(27):16710-16714.
- [6] König B, Koch A, Spielmann J, Hilgenfeld C, Hirche F, Stangl GI, et al. Activation of PPARalpha and PPARgamma reduces triacylglycerol synthesis in rat hepatoma cells by reduction of nuclear SREBP-1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, **605**(1-3):23-30.
- [7] Knight BL, Hebbachi A, Hauton D, Brown AM, Wiggins D, Patel DD, et al. A role for PPARalpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver [J]. *Biochem J*, 2005, **389**(Pt 2):413-421.
- [8] Song F, Xie ML, Zhu LJ, Zhang KP, Xue J, Gu ZL. Experimental study of osthole on treatment of hyperlipidemic and alcoholic fatty liver in animals [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, **12**(27):4359-4363.
- [9] Zhang Y, Xie ML, Zhu LJ, Gu ZL. Therapeutic effect of osthole on hyperlipidemic fatty liver in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, **28**(3):398-403.
- [10] Sun F, Xie ML, Zhu LJ, Xue J, Gu ZL. Inhibitory effect of osthole on alcohol-induced fatty liver in mice [J]. *Dig Liver Dis*, 2009, **41**(2):127-133.
- [11] Zhang Y, Xie ML, Xue J, Gu ZL. Osthole improves fat milk-induced fatty liver in rats: modulation of hepatic PPAR-alpha/gamma-mediated lipogenic gene expression [J]. *Planta Med*, 2007, **73**(8):718-724.
- [12] Kehrer JP, Biswal SS, La E, Thuillier P, Datta K, Fischer SM, et al. Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) alpha by MK886 [J]. *Biochem J*, 2001, **356**(Pt 3):899-906.
- [13] Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2007, **45**(6):1366-1374.
- [14] Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(6):3077-3082.
- [15] Verna EC, Berk PD. Role of fatty acids in the pathogenesis of obesity and fatty liver: impact of bariatric surgery

- [J]. *Semin Liver Dis*, 2008, **28**(4):407-426.
- [16] Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, **281**(6):G1333-G1339.
- [17] Du R, Xue J, Wang HB, Zhang Y, Xie ML. Osthol ameliorates fat milk-induced fatty liver in mice by regulation of hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c/2-mediated target gene expression [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, **666**(1-3):183-188.

## Osthole regulates fatty acid metabolism in hepatocytes by activation of PPAR $\alpha$

SHEN Hong<sup>1\*</sup>, ZHOU Feng<sup>2\*</sup>, XUE Jie<sup>3</sup>, XIE Mei-lin<sup>3</sup>

(1. Department of Pharmacology, Medical School, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000, China; 2. Department of Pharmacy, the Fifth People's Hospital of Suzhou, Suzhou 215006, China; 3. Department of Pharmacology, College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To determine whether osthole regulates fatty acid metabolism in hepatocytes of rats by activating peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$ . **METHODS** Rat hepatocytes were cultured and treated with osthole 12.5 – 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 h, before triglycerides (TG) and free fatty acid (FFA) contents in hepatocytes were determined by colorimetric method. PPAR $\alpha$  mRNA expression was determined by reverse transcription polymerase chain reaction. In order to determine whether the lipid-regulating effect of osthole was associated with activation of PPAR $\alpha$ , hepatocytes were pretreated with PPAR $\alpha$  inhibitor MK886 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 2 h before incubation with osthole 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 h. TG and FFA contents, PPAR $\alpha$ -regulated target genes including sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1/2, fatty acid synthase (FAS), diacylglycerol acyltransferase (DGAT), carnitine palmitoyltransferase (CPT)-1a, fatty acid transporter protein (FATP)4, and liver fatty acid binding protein (L-FABP) mRNA expressions in hepatocytes were examined. **RESULTS** Osthole 12.5 – 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  could significantly reduce TG and FFA contents and enhance the PPAR $\alpha$  mRNA expression in hepatocytes of rats ( $P < 0.01$ ), but reduction of TG and FFA contents were significantly alleviated after pretreatment with PPAR $\alpha$  inhibitor MK886 ( $P < 0.01$ ). Similarly, the reduction of SREBP-1/2, FAS and DGAT mRNA expressions as well as the increment of CPT-1a, FATP4 and L-FABP mRNA expressions in hepatocytes of rats by osthole were also alleviated or abrogated after pretreatment with PPAR $\alpha$  inhibitor MK886 ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** Osthole can decrease TG and FFA contents in hepatocytes. The mechanisms might be associated with activation of PPAR $\alpha$ , subsequent reduction of SREBP-1/2, FAS and DGAT gene expressions and increment of CPT-1a, FATP4 and L-FABP gene expressions.

**Key words:** osthole; fatty acids; peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; hepatocytes

**Foundation item:** The project supported by grants from the Provincial Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y2100755)

**Corresponding author:** XIE Mei-lin, E-mail: xiemeilin@suda.edu.cn, Tel: (0512)69566553

\*: Co-first authors.

(收稿日期: 2012-09-19 接受日期: 2013-01-04)

(本文编辑: 乔虹)