



青岛农业大学学报(自然科学版)

Journal of Qingdao Agricultural University(Natural Science)

ISSN 1674-148X,CN 37-1459/N

《青岛农业大学学报(自然科学版)》网络首发论文

题目：藻蓝蛋白通过调节 NF- κ B 通路影响游离脂肪酸诱导的非酒精性脂肪肝细胞模型

作者：孙孟筱，郝建华，王伟，孙晶晶，江承程，张海峰

收稿日期：2024-05-19

网络首发日期：2024-06-18

引用格式：孙孟筱，郝建华，王伟，孙晶晶，江承程，张海峰. 藻蓝蛋白通过调节 NF- κ B 通路影响游离脂肪酸诱导的非酒精性脂肪肝细胞模型[J/OL]. 青岛农业大学学报(自然科学版). <https://link.cnki.net/urlid/37.1459.N.20240617.1726.002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

藻蓝蛋白通过调节 NF- κ B 通路影响游离脂肪酸诱导的非酒精性脂肪肝细胞模型

孙孟筱¹, 郝建华², 王伟², 孙晶晶², 江承程², 张海峰¹

(1. 内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古呼和浩特 010110; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东青岛 266071)

收稿日期: 2024-05-19

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2023TD71); 内蒙古医科大学附属医院重点实验室开放基金(2022NYFYSYS012); 内蒙古卫生委员会医疗卫生技术项目(202201236); 内蒙古自治区直属大学基础研究基金(YKD2023MS045)

作者简介: 孙孟筱(1997—), 女, 山东淄博博山区人, 在读硕士, 研究方向为海洋产物资源与酶工程相关。

E-mail: 1439141349@qq.com

通信作者: 张海峰和郝建华为并列通信作者。

张海峰(1980—), 男, 内蒙古赤峰松山区人, 教授, 博士, 研究方向为脂肪肝相关。E-mail: 1980zhanghaifeng@163.com

郝建华(1976—), 男, 山东青岛市南区人, 研究员, 博士, 研究方向为海洋产物资源与酶工程相关。E-mail: haojh@ysfri.ac.cn

摘要: 旨在探索藻蓝蛋白(phycocyanin, PC)对游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)诱导的非酒精性脂肪性肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)细胞模型的保护作用及其可能机制。采用 FFA 溶液处理人肝癌细胞株 HepG2 (human hepatocellular carcinoma cell), 建立 NAFLD 细胞模型, 用不同浓度的 PC 对 HepG2 细胞作用 24 h, 进行油红 O 染色并检测甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)的水平, 检测核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β) 的 mRNA 表达水平, 检测 TNF- α 、NF- κ B 亚基 p65、核因子 κ B 抑制因子激酶 (inhibitor of kappa B kinase, IKK)、核因子 κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 等总蛋白及相关磷酸化蛋白表达水平。油红 O 染色结果显示, PC 处理 FFA 诱导的 HepG2 细胞后, 与模型组相比, 试验组细胞内脂质堆积情况明显改善, TC、TG、LDL-C、ALT、AST 水平下降, HDL-C 水平上升 ($P < 0.05$)。定量逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)结果显示, 与模型组相比, 试验组 NF- κ B、TNF- α 、IL- 1β 、IL-6 的 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.05$)。而免疫印迹试验 (immunoblotting) 结果则显示试验组 TNF- α 、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-IKK β /IKK β 、p-I κ Ba/I κ Ba 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$)。表明 PC 对 NAFLD 细胞模型有一定的保护作用, 可能机制是 PC 降低 NAFLD 细胞模型中 TNF- α 、IL-6 和 IL- 1β 等促炎性细胞因子水平, 抑制 IKK、I κ B 和 NF- κ B p65 磷酸化。这提示 PC 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路抑制炎症反应, 减轻 NAFLD 影响。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 藻蓝蛋白; NF- κ B

中图分类号: R471.5

文献标识码: A

Phycocyanin Regulates NF- κ B Signaling Pathway to Affect the FFA-induced Non-alcoholic Fatty Liver Cell Model

SUN Mengxiao¹, HAO Jianhua², WANG Wei², SUN Jingjing²,
JIANG Chengcheng², ZHANG Haifeng¹

(1. Basic Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, 010110, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The aim of this study was to explore the protective effect of phycocyanin (PC) on free fatty acid (FFA)-

induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) cell model and its possible mechanism. Human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) was treated with a FFA solution to establish a NAFLD cell model. HepG2 cells were treated with various concentrations of PC for 24 hours. Levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) were assessed using oil red O staining. The mRNA expression levels of nuclear factor kappa-B (NF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected. Expression levels of total proteins such as TNF- α , NF- κ B p65, inhibitor of kappa B kinase (IKK), inhibitor of NF- κ B (I κ B), and related phosphorylated proteins were detected. Results of oil red O staining showed that after PC treatment of FFA-induced HepG2 cells, the lipid accumulation in the experimental group significantly improved compared with the model group. Levels of TC, TG, LDL-C, ALT and AST decreased, while the HDL-C level increased ($P < 0.05$). Results of reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) showed that mRNA expression levels of NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in experimental groups decreased compared with model groups ($P < 0.05$). Results of immunoblotting test indicated a decrease in expression levels of TNF- α , p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, p-IKK β /IKK β , and p-I κ B α /I κ B α proteins in experimental groups ($P < 0.05$). All results showed that PC had a protective effect on the NAFLD cell model. The possible mechanism is that PC can reduce levels of proinflammatory cytokine such as TNF- α , IL-6 and IL-1 β in the NAFLD cell model, and inhibit the phosphorylation of IKK, I κ B and NF- κ B p65. This suggests that PC may inhibit inflammatory reaction by regulating NF- κ B signaling pathway to mitigate the impact of NAFLD.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease; phycocyanin; nuclear factor kappa-B(NF- κ B)

藻蓝蛋白 (phycocyanin, PC) 是蓝细菌、红藻和隐藻中的一种具有荧光和抗氧化特性的蓝色色素^[1], 其结构主要包括 α 和 β 两种亚基, 天然状态下, 这些亚基通常以杂聚体的形式存在^[2]。PC 有抗肿瘤^[3]、抗氧化和炎症^[4-5]、抗病毒^[6]、提高机体免疫力^[7]等作用, 可以帮助调节脂质和碳水化合物代谢, 控制肥胖、心血管疾病和糖尿病等慢性疾病的发生^[8-9]。

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指非酒精因素引起的肝脂肪变性, 表现为肝脏过度的脂肪积累, 在组织学上与酒精性脂肪性肝病几乎没有区别。NAFLD 是目前欧美国家慢性肝病的主要原因, 也是人类最常见的慢性肝病之一^[10-12]。NAFLD 的一个标志是炎症反应和脂肪积累平行发生^[13], 而 TNF- α /NF- κ B 信号通路异常是导致慢性肝脏炎症持续存在的关键因素^[14]。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种多功能促炎性细胞因子, 参与多种疾病的发病过程; 核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 则是一种关键转录因子, 能够调控众多炎症相关基因的表达。TNF- α 与其受体的结合, 可以激活 NF- κ B 信号通路, 进而触发一系列的炎症反应^[15]。抑制 NF- κ B 通路的异常激活, 有望减轻肝脏炎症, 阻止疾病的进展, 甚至实现 NAFLD 的逆转。本研究通过探究 PC 对促炎性细胞因子及 NF- κ B 信号通路的影响, 来探讨抑制 NAFLD 的发生机制, 为药物的深入开发和应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

胆红素氨基琼脂糖亲和树脂由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供, 人肝癌细胞株 HepG2 由内蒙古医科大学附属医院临床医学研究中心提供, 钝顶螺旋藻藻泥由中国科学院青岛生物能源与过程研究所提供。HepG2 细胞专用培养基购于武汉普诺赛生命科技有限公司, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒、D-PBS 缓冲液、油酸、棕榈酸、油红 O 染色试剂盒、胰蛋白酶、Tween20-TBS 缓冲液均购于北京索莱宝科技有限公司, 甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、谷草转氨酶 (AST/GOT)、谷丙转氨酶 (ALT/GPT) 试剂盒均购于南京建成科技有限公司, 总 RNA 提取试剂盒以及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司, NovoScript[®] Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) 和 NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus 均购于苏州近岸蛋白质科技股份有限公司, TNF- α 、NF- κ B p65、IKK β 、I κ B α 、 β -actin 以及二抗抗体购于苏州

1.2 仪器与设备

Unique20 纯水仪, 武汉瑞斯捷科技有限公司; GI54DS 高压蒸汽灭菌锅, 致微(厦门)仪器有限公司; AKTA explorer 10s 快速工艺开拓系统, 美国通用电气公司; Infinite M200Pro 酶标仪, 帝肯(上海)实验器材有限公司; ABI7500 快速实时荧光定量 PCR 仪, 赛默飞世尔科技公司; Powerpac3000 电泳仪, 美国伯乐公司; FUSION FX6. EDGE 化学发光多色荧光成像系统, 法国 Vilber Lourmat 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 PC 的制备

将钝顶螺旋藻藻泥用二次水清洗、离心后收集沉淀, 按照 1 g : 10 mL 加入 pH=7、10 mmol/L 的 D-PBS。充分混匀后反复冻融: 在-20 °C和室温之间冻融 2 次, 每次 2 h; 然后于-20 °C冷冻过夜, 次日取出, 4 °C放置 24 h。1 \times 10⁴ r/min 低温离心 20 min, 取上清, 得 PC 粗提液。使用胆红素氨基琼脂糖亲和树脂、快速工艺开拓系统对 PC 粗提液进行纯化, 得到纯度大于 4 的 PC, 4 °C 暂存。

1.3.2 细胞培养及分组

HepG2 细胞于二氧化碳恒温培养箱中培养, 条件为: 温度 37 °C, CO₂ 质量分数 5%。取处于对数生长期的细胞开展试验。在细胞融合度达到 60%~70%时进行铺板, 并于 24 h 后给药, 药物处理 24 h。试验设置对照组(正常生长的细胞, NC)、模型组(FFA 处理的细胞, MO)、试验组(经过 FFA 和 PC 溶液处理的细胞)。

1.3.3 细胞活性检测

取对数生长期的细胞铺 96 孔板, 每孔 100 μ L 培养基和 1 \times 10⁴ 个细胞, 用不同质量浓度(0、0.01、0.1、1、10、100、500、1000、2000 μ g/mL)的 PC 溶液处理 HepG2 细胞, 单组设 6 个复孔。同步设置空白组(无细胞、只含培养基)。分别在培养 24、36、48、60 h 时, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 并置于培养箱中孵育 2 h 后, 在波长 450 nm 处测定吸光度(absorbance, A)。吸光度可以反映细胞活力 V , 如式(1)所示。根据细胞活力筛选 3 个合适质量浓度的 PC 溶液进行后续试验, 并按照 PC 质量浓度由低到高分别将 3 个试验组处理记作 L、M、H。

$$V = \frac{A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: $A_{\text{加药组}}$, 含细胞、CCK-8 和药物的样品在波长 450 nm 处的吸光度; $A_{\text{空白}}$, 含培养基和 CCK-8, 但不含细胞的样品在波长 450 nm 处的吸光度; $A_{\text{对照组}}$, 含细胞和 CCK-8, 但不含药物的样品在波长 450 nm 处的吸光度。

1.3.4 FFA 诱导 HepG2 细胞脂肪变性模型

将 HepG2 细胞密度调整为 3 \times 10⁵ mL⁻¹, 平铺于 6 孔板, 于 37 °C、CO₂ 质量分数 5%的培养箱中培养, 直到细胞贴壁。加入游离脂肪酸(free fatty acid, FFA, 由物质的量比为 2 : 1 的油酸与棕榈酸制成)溶液, 使 FFA 终浓度为 1 mmol/L, 处理 24 h。

1.3.5 PC 对 FFA 诱导的 NAFLD 细胞模型的影响

使用油红 O 染色检测细胞内脂质堆积。按照油红 O 染色试剂盒说明书, 对各组(对照组、模型组、试验组)细胞进行染色, 显微镜下观察脂滴染色情况, 并使用质量分数 100%的异丙醇从染色细胞中提取油红 O, 使用酶标仪在波长为 500 nm 处测定油红 O 的吸光度^[16]。

收集对照组、模型组、试验组细胞并使用细胞裂解液分别裂解后, 低速离心并取上清液, 检测蛋白含量, 检测甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的水平。

通过定量逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 NF- κ B 和促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的 mRNA 表达水平。按照 RNA 提取试剂盒说明书分别提取对照组、模型组、试验组细胞总 RNA, 并测定 RNA 的纯度及浓度, 按照试剂盒说明书进行逆转录, 逆转录体系为 20 μ L。之后按照试剂盒说明进行实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR), 反应程序设置如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 45 次循环。使用 β -actin 作为内参基因, 检测 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平, 所用引物序列见表 1。

表 1 细胞 qPCR 分析引物序列

Table 1 Cell qPCR analysis of primer sequences

基因 Gene	序列 (5'-3') Sequence
β -actin	F: AGCCATGTACGTAGCCATCCA R: TCTCCGGAGTCCATCACAATG
NF- κ B	F: CCGTGAGGCTGTTTGGTTTGA R: TCTTATGGCTGAGGTCTGGTCT
TNF- α	F: GGCCAAGCCCTGGTATGAG R: RTAGTCGGGCCGATTGATCTC
IL-1 β	F: AACCTCTTCGAGGCACAAGG R: AGCCATCATTTCACCTGGCGA
IL-6	F: AGTGAGGAACAAGCCAGAGC R: CAGGGGTGGTTATTGCATCT

通过免疫印迹 (immunoblotting) 试验检测 TNF- α 、NF- κ B p65、IKK、I κ B 等总蛋白及相关磷酸化蛋白表达水平。按照蛋白提取试剂盒说明书提取各组细胞蛋白, 同时对蛋白进行定量, 计算上样量后, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 进行分离 (10 V, 30 min; 80 V, 30 min; 160 V, 30 min), 转 PVDF 膜 (4 $^{\circ}$ C, 200 mA, 120 min), 用质量分数 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜 (一抗及稀释体积比: β -actin, 1 : 5 000; TNF- α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、IKK、p-IKK、I κ B、p-I κ B, 1 : 1 000), Tween20-TBS 洗膜 4 次 (每次 10 min), 室温孵育二抗 1 h, Tween20-TBS 洗膜 4 次 (每次 10 min), 使用增强化学发光法 (ECL) 进行显影, 使用 Image J 软件进行灰度分析, 最后计算蛋白相对表达量。

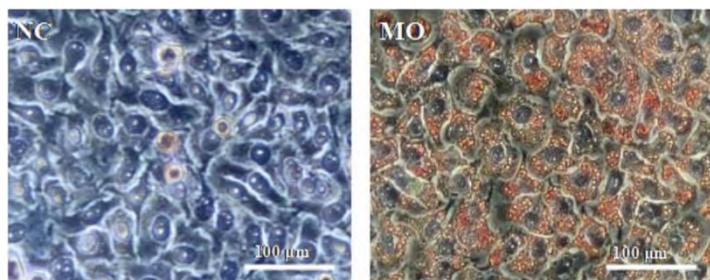
1.4 统计分析

使用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析, 所有数据均符合正态分布。数据差异性采用单因素方差分析 (多组间) 和 Dunnett's t 检验 (两组间)。将 $P < 0.05$ 设为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 NAFLD 细胞模型的构建

油红 O 染色结果如图 1 所示, FFA 诱导的 HepG2 细胞染色后, 核周围有明显的红色脂滴, 说明造模成功。



NC. 对照组; MO. 模型组。

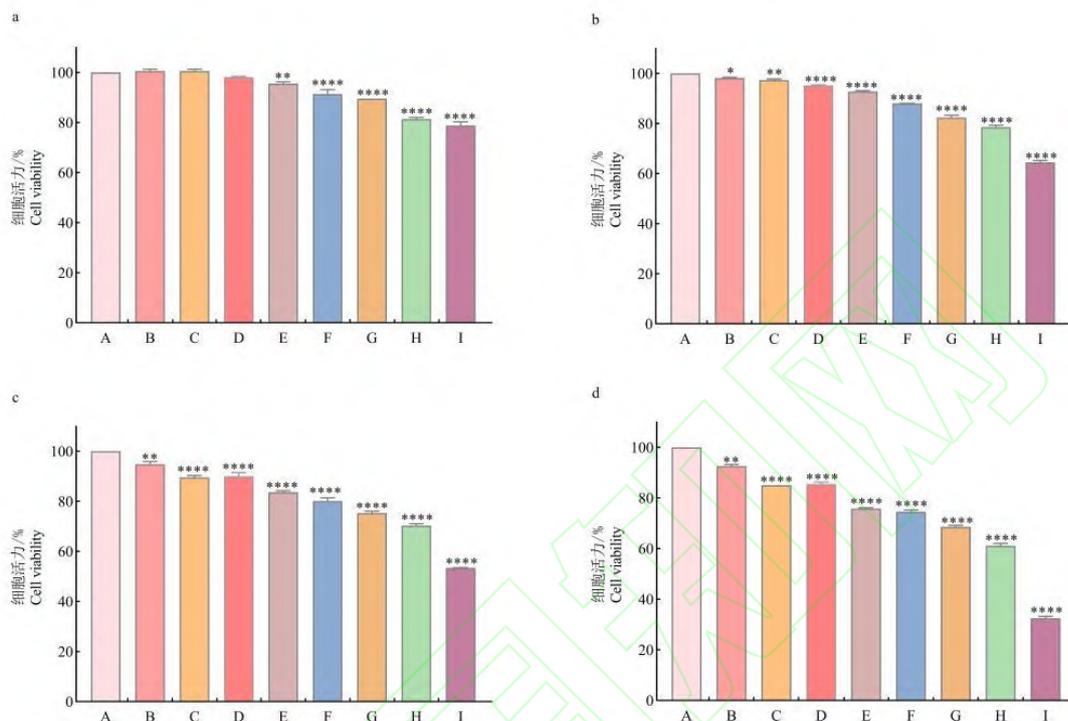
图 1 油红 O 染色后的 HepG2 细胞

Fig. 1 HepG2 cells stained with oil red O

注: 显微镜放大倍数为 400。

2.2 对 HepG2 细胞活性的影响

由图 2 可知, PC 对 HepG2 细胞活性的影响呈剂量依赖性和时间依赖性: PC 质量浓度越高、处理时间越久, PC 对细胞增殖的抑制作用越强。但 PC 质量浓度为 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 时, PC 处理对细胞造成较大的毒性影响, 因此后续试验 PC 质量浓度选取 10、100、1 000 $\mu\text{g/mL}$, 处理时间选取 24 h, 分别用 L、M、H 表示 3 个处理。



a、b、c、d. 分别用 PC 处理 24、36、48、60 h;

A、B、C、D、E、F、G、H、I. PC 质量浓度分别为 0、0.01、0.1、1、10、100、500、1 000、2 000 $\mu\text{g/mL}$ 的处理。

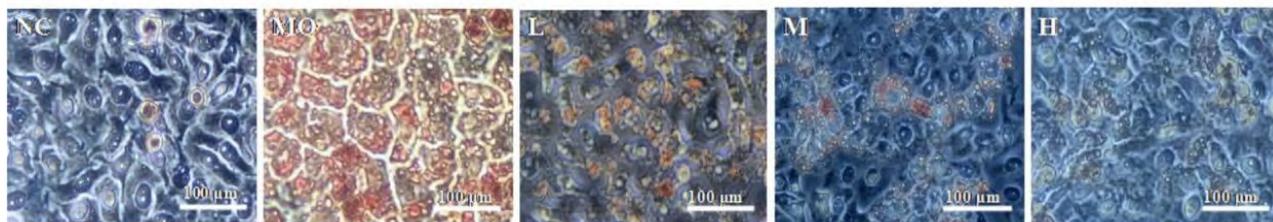
图 2 不同质量浓度的 PC 处理组的细胞活力

Fig. 2 Viability of cells treated with different concentrations of PC

注: *、**、***、****, 与对照组 (不含 PC) 相比, 分别为 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$ 。

2.3 对细胞模型脂质堆积和血脂水平的影响

油红 O 染色结果如图 3 所示, 与模型组相比, 经 PC 干预后, 试验组 L、M、H 的细胞红色脂滴随着 PC 质量浓度的增大而明显减少, 说明 PC 显著改善了 FFA 诱导 HepG2 细胞的脂质堆积现象。



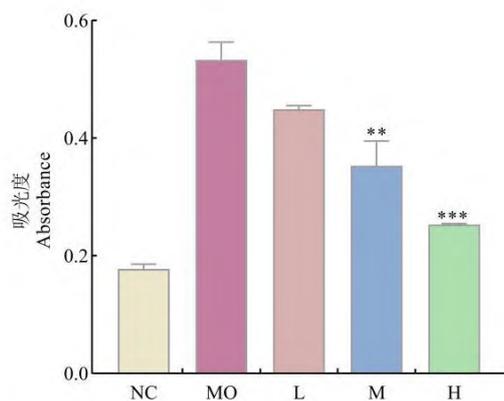
NC. 对照组; MO. 模型组; L、M、H. 试验组, PC 质量浓度分别为 10、100、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 3 FFA 和 PC 处理的 HepG2 细胞脂质堆积显微照片

Fig. 3 Effect of FFA and PC on lipid accumulation in HepG2 cells

注: 显微镜放大倍数为 400; 使用油红 O 染色。

PC 质量浓度不同的 3 个处理 (L、M、H), 油红 O 的吸光度 (图 4) 随着 PC 质量浓度的增大而降低, 进一步证明 PC 干预可明显降低 FFA 诱导的 HepG2 细胞脂质含量, 改善 HepG2 细胞的脂肪变性。



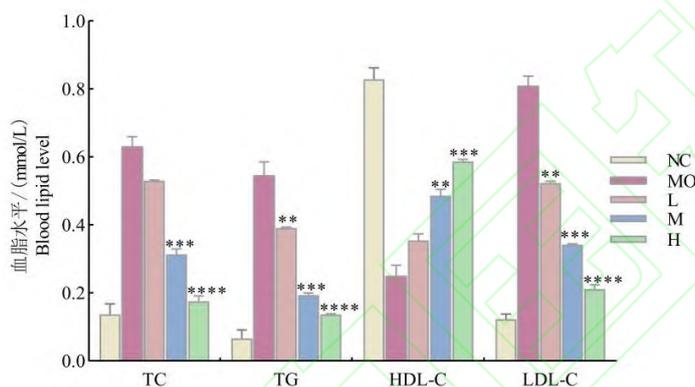
NC. 对照组; MO. 模型组; L、M、H. 试验组, PC 质量浓度分别为 10、100、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 4 不同处理的 HepG2 细胞提取的油红 O 吸光度

Fig. 4 Absorbance of oil red O extracted from different treated HepG2 cells

注: **, ***, 与模型组相比, 分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 。

PC 对细胞 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 水平的影 响如图 5 所示。与对照组相比, 模型组细胞 TC、TG、LDL-C 水平均显著升高 ($P < 0.05$), HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$), 表明 FFA 诱导细胞出现脂质堆积和脂代谢紊乱现象。经 PC 干预后, 与模型组相比, 试验组 L、M、H 的细胞 TC、TG、LDL-C 水平均显著降低 ($P < 0.05$), 而 HDL-C 水平均显著升高 ($P < 0.05$)。



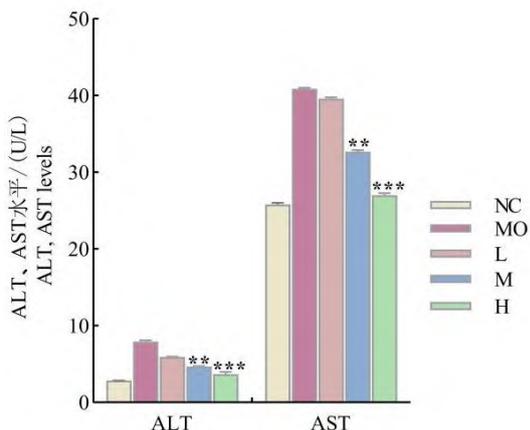
NC. 对照组; MO. 模型组; L、M、H. 试验组, PC 质量浓度分别为 10、100、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 5 不同处理 HepG2 细胞的 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平

Fig. 5 Levels of TC, TG, HDL-C, and LDL-C in different treated HepG2 cells

注: **, ***, ****, 与模型组相比, 分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$ 。

由图 6 可知, 模型组细胞 ALT、AST 水平与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$), 说明 FFA 诱导了肝细胞损伤。试验组 L、M、H 细胞 ALT、AST 水平与模型组相比均显著降低 ($P < 0.05$), 且 PC 质量浓度越大, ALT、AST 水平越低。这说明 PC 可以改善 FFA 诱导的 HepG2 细胞脂代谢紊乱和脂质堆积情况, 同时可以减轻 FFA 诱导的 HepG2 细胞损伤。



NC. 对照组; MO. 模型组; L、M、H. 试验组, PC 质量浓度分别为 10、100、1 000 μg/mL。

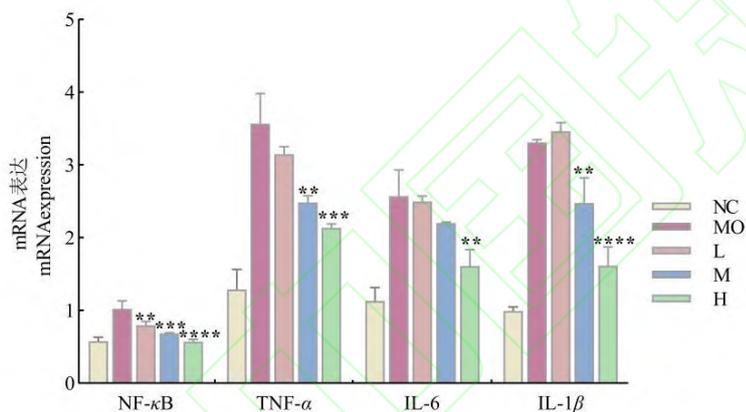
图 6 不同处理的 HepG2 细胞 ALT、AST 水平

Fig. 6 Levels of ALT, AST in different treated HepG2 cells

注: **, ***, 与模型组相比, 分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 。

2.4 对促炎性细胞因子 mRNA 表达水平的影响

由图 7 可知, 与对照组相比, 模型组细胞的 NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-1β 的 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05$), 经 PC 干预后, 与模型组相比, 促炎性细胞因子的 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.05$), 表明 PC 可能通过抑制促炎性细胞因子的表达达到抑制炎症反应的效果。



NC. 对照组; MO. 模型组; L、M、H. 试验组, PC 质量浓度分别为 10、100、1 000 μg/mL。

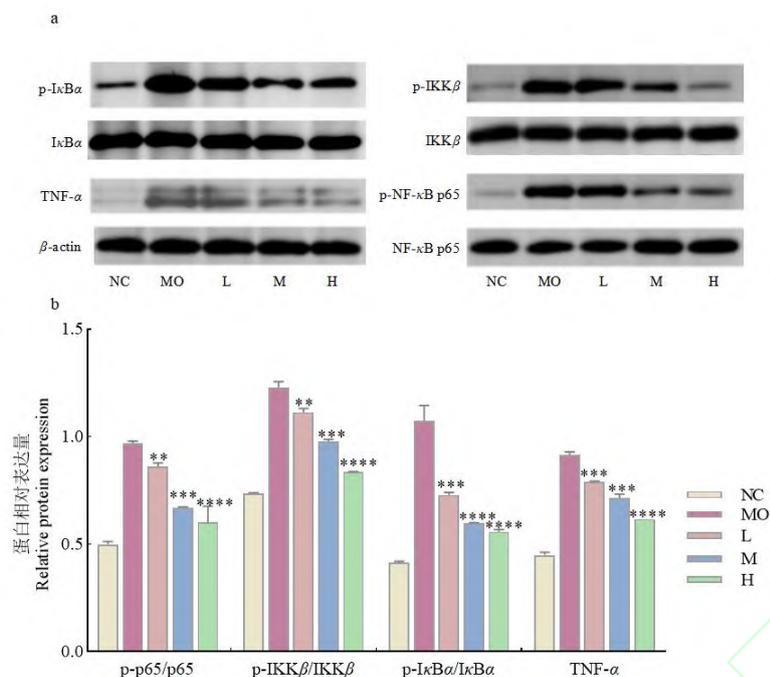
图 7 不同处理的 HepG2 细胞促炎性细胞因子的 mRNA 表达水平

Fig. 7 mRNA expression levels of proinflammatory cytokine in different treated HepG2 cells

注: **, ***, ****, 与模型组相比, 分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$ 。

2.5 对 NF-κB 通路相关蛋白表达水平的影响

根据免疫印迹试验结果 (图 8), 与对照组比较, 模型组细胞的 TNF-α、p-NF-κB p65/NF-κB p65、p-IKKβ/IKKβ、p-IκBα/IκBα 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), 试验组均显著降低 ($P < 0.05$), 表明 FFA 促进了 TNF-α/NF-κB 通路活化, 而 PC 干预不仅可以下调 TNF-α 蛋白的表达, 还能抑制 IKK、IκB 和 NF-κB 的磷酸化, 进而抑制 NF-κB 通路的活化。



a. 蛋白电泳; b. 蛋白表达水平; NC. 对照组; MO. 模型组; L、M、H. 试验组, PC 质量浓度分别为 10、100、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图 8 不同处理的 HepG2 细胞 NF- κ B 通路相关蛋白表达水平

Fig. 8 Protein expression levels associated with NF- κ B pathway in different treated HepG2 cells

注: **, ***, ****, 与模型组相比, 分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$ 。

3 讨论

NAFLD 是一种可以预防和治愈的疾病, 但如果不及时治疗, 慢性炎症会逐步发展为脂肪性肝纤维化、肝硬化, 甚至变为肝衰竭、肝细胞癌等^[17-18]。维护人类肝脏的健康, 需要提高人们对 NAFLD 的认识和重视程度, 并采取有效的预防和治疗措施。NF- κ B 信号通路是人体内调控自然免疫和炎症反应的重要途径, NF- κ B 信号通路的持续和过度激活影响着多种疾病的发生和发展。NF- κ B 主要由 p65 和 p50 两种亚基构成, 核因子 κ B 抑制蛋白 I κ B 主要调节 NF- κ B 的激活及转录, 静默状态下 NF- κ B 与 I κ B 在细胞浆内结合而呈非活性状态。核因子 κ B 抑制因子激酶 IKK 介导的 I κ B 磷酸化是激活 NF- κ B 的主要原因^[19-20]。本研究发现, PC 几乎不影响 IKK β 、I κ B α 和 NF- κ B p65 表达, 而磷酸化的 p-IKK β 、p-I κ B α 和 p-NF- κ B p65 表达在 PC 干预后均显著降低, 提示 PC 可以通过抑制 IKK β 、I κ B α 和 NF- κ B p65 的磷酸化来抑制 NF- κ B 信号通路的活化。

研究表明, NF- κ B 被激活后能促进促炎性细胞因子的表达, 促炎性细胞因子又进一步增强 NF- κ B 的活性, 使炎症反应加剧^[17]。TNF- α 等促炎性细胞因子诱导 NF- κ B 的活化, NF- κ B 在受损的肝细胞中被激活后又启动 TNF- α 、白细胞介素-6、白细胞介素-1 β 等多个基因的转录。这些受 NF- κ B 调控的基因产物参与了肝脏炎症、肝纤维化、肝再生和细胞凋亡^[15]。本文的 qPCR 试验结果表明, PC 可显著降低 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 等促炎性细胞因子的表达, 提示 PC 也可以通过抑制相关促炎性细胞因子来抑制 NF- κ B 信号通路的活化, 进而减轻 NAFLD 细胞模型的脂质堆积和损伤。

目前, 国内外学者逐渐重视从海洋中寻找低毒、高效的抗炎、抗肿瘤药物。PC 有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和促进免疫等活性, 对多种疾病都有很好的预防和治疗效果, 多项体内外试验证明 PC 安全无毒, 口服 PC 也十分安全^[7]。口服后, PC 会在胃肠道被消化酶消化, 其酶解产物的抗氧化等功能甚至强于 PC。Cervantes-Llanos 等^[21]发现, 口服藻蓝胆素 (phycocyanobilin, PCB) 可改善动物的临床状况, 降低脑 IL-6 等促炎性细胞因子的表达水平; Minic 等^[22]在体外使用多肽酶消化 PC, 获得的染色质肽显示出强大的抗氧化活性, 能有效地保护红细胞免受自由基诱导的溶血影响, 且对癌细胞具有细胞毒性活性, 可显著促进人

体健康。

综上所述, 本研究发现 PC 可以抑制促炎性细胞因子的表达, 抑制经典的 NF- κ B 通路活化。研究结果不仅为 PC 对 NAFLD 分子靶向治疗应用提供了新的理论依据, 同时也展示了 PC 在医药领域广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] ERIKSEN N T. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80: 1-14.
- [2] 汪琼, 王静, 陈嘉蕙, 等. 念珠藻葛仙米藻蓝蛋白 α 与 β 亚基因克隆、表达及其单体结构模拟[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39 (5): 2154-2160.
- [3] CHEN H X, QI H T, XIONG P. Phycobiliproteins—a family of algae-derived biliproteins: productions, characterization and pharmaceutical potentials[J]. Marine Drugs, 2022, 20 (7): e450.
- [4] 陈红兵, 郭云良, 孙圣刚, 等. 藻蓝蛋白对大鼠脑缺血再灌注后神经元损伤的保护作用[J]. 中国全科医学, 2004, 7 (8): 527-530.
- [5] ROMAY C, ARMESTO J, REMIREZ D, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae[J]. Inflammation Research, 1998, 47: 36-41.
- [6] SHIH S-R, TSAI K-N, LI Y-S, et al. Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*[J]. Journal of Medical Virology, 2003, 70: 119-125.
- [7] GROVER P, BHATNAGAR A, KUMARI N, et al. C-phycocyanin—a novel protein from *Spirulina platensis*- in vivo toxicity, antioxidant and immunomodulatory studies[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28 (3): 1853-1859.
- [8] 张蕊, 马璇, 刘琳, 等. 藻蓝蛋白对 2 型糖尿病大鼠胰岛细胞 NF κ B 和 I κ B 表达的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2010, 29 (1): 26-29.
- [9] ZIYAEI K, ABDI F, MOKHTARI M, et al. Phycocyanin as a nature-inspired antidiabetic agent: a systematic review[J]. Phytomedicine, 2023, 119: e154964.
- [10] LABRECQUE D R, ABBAS Z, ANANIA F, et al. World gastroenterology organisation global guidelines: nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2014, 48 (6): 467-473.
- [11] CHALASANIN N, YOUNOSSI Z, LAVINE J E, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases[J]. Hepatology, 2018, 67 (1): 328-357.
- [12] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2018, 15: 11-20.
- [13] TILG H, MOSCHEN A R. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2008, 19 (10): 371-379.
- [14] 孙婷婷, 李京涛, 魏海梁, 等. TNF α /NF- κ B 信号通路调控非酒精性脂肪性肝病的研究现状[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35 (9): 2095-2098.
- [15] CHEN Z E, YU R, XIONG Y, et al. A vicious circle between insulin resistance and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Lipids in Health and Disease, 2017, 16 (1): e203.
- [16] MA P, HUANG R R, JIANG J Y, et al. Potential use of C-phycocyanin in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 526 (4): 906-912.
- [17] MEDINA J, FERNÁNDEZ-SALAZAR L I, GARCÍA-BUEY L, et al. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Diabetes Care, 2004, 27 (8): 2057-2066.
- [18] FALCK-YTTER Y, YOUNOSSI Z M, MARCHESINI G, et al. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes[J]. Seminars in Liver Disease, 2001, 21 (1): 17-26.
- [19] O'DEA E, HOFFMANN A. NF- κ B signaling[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 2009, 1: 107-115.
- [20] KARIN M, BEN-NERIAH Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity[J]. Annual Review of Immunology, 2000, 18: 621-663.
- [21] CERVANTES-LLANOS M, LAGUMERSINDEZ-DENIS N, MARÍN-PRIDA J, et al. Beneficial effects of oral administration of C-phycocyanin and phycocyanobilin in rodent models of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Life Sciences, 2018,

194: 130-138.

- [22] Minic S L, Stanic-Vucinic D, Mihailovic J, et al. Digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from C-phycocyanin, a blue-colored biliprotein of microalga *Spirulina*[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 147: 132-139.

（责任编辑：王雨生）

