文章编号:1000-5404(2010)14-1487-04

论著

非酒精性脂肪变性肝细胞模型中 ATF4 基因的表达及其意义

王万东,陈东风 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科)

[摘要] **目的** 研究内质网应激相关蛋白活化转录因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)基因在油酸诱导脂肪变性的肝细胞模型中的表达变化及其意义。**方法** 以常规培养的 L02 肝细胞为对照,采用油酸诱导 L02 肝细胞脂肪变性,分别于 0、24、48、72 h 采用 RT-PCR 与 Western blot 方法动态监测 ATF4 基因的表达变化。**结果** 随着时间的增长,肝细胞脂肪变性程度加剧,肝细胞中 ATF4 mRNA 表达量 0、24、48、72 h 分别为(1.01±0.12)、(1.87±0.24)、(2.01±0.13)、(1.79±0.19),48 h 时达到峰值后开始缓慢下降;ATF4 蛋白表达量 0、24、48、72 h 分别为(0.31±0.16)、(0.57±0.14)、(0.91±0.20)、(0.89±0.17),直至 72 h 时仍维持在高水平状态,各实验组(24、48、72 h 组)与空白对照组(0 h 组)比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 脂肪变性肝细胞中 ATF4 表达增强,提示肝细胞脂肪变性可能引起内质网发生应激,其可能与非酒精性脂肪性肝病关系密切。

[关键词] 非酒精性脂肪肝; 细胞, 培养的; 活化转录因子 4
[中图法分类号] R394-33;R394.2;R575.5 **[文献标志码]** A

Expression and significance of activating transcription factor 4 in oleic acid-induced hepatocyte steatosis *in vitro*

Wang Wandong, Chen Dongfeng (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of activating transcription factor 4 (ATF4) in the hepatocyte steatosis models induced by oleic acid, and to explore the relationship between the expression of ATF4 and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** L02 cells were treated by 20 mg/ml oleic acid for 0, 24, 48 and 72 h respectively to induce the hepatocytes steatosis, and then the cells were collected and the total RNA and protein were extracted. Reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis were used to detect the expressions of ATF4 gene at different time points. **Results** With the development of deterioration of steatosis, the expression levels of ATF4 mRNA were 1.01±0.12, 1.87±0.24, 2.01±0.13, and 1.79±0.19 respectively correspondingly from 0 h to 72 h. The peak of ATF4 mRNA expression was reached at the 48th hour, and then showed the tendency of down-regulation. At the same time points, the protein expression of ATF4 were 0.31±0.16, 0.57±0.14, 0.91±0.20, and 0.89±0.17 separately, and the protein expression was maintained at a high level up to the 72nd hour. There were significantly differences compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusion** In the oleic acid-induced hepatocyte steatosis model, the expression of the ATF4 is enhanced persistently, suggesting where the endoplasmic reticulum stress response may happen. ATF4 may play an important role in the development and progression of NAFLD by up-regulating ATF4 expression.

[Key words] nonalcoholic fatty liver disease; cells, cultured; activating transcription factor 4

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30770968). Corresponding author: Chen Dongfeng, E-mail: chendf1981@126.com

近年来,非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是世界范围内最常见的肝脏疾患之一,欧美国家成人患病率高达 20%,我国的发病率也迅速增加[1]。NAFLD 是指除酒精摄入外,过量的甘油三酯(triglycerides,TG)在肝细胞内沉积,以肝实质脂肪变性为病理特征,同时伴随不同程度的肝细胞损伤、炎症和纤维化[2]。肝脏代谢综合征以及胰岛素抵抗是 NAFLD 的标志性事件[3]。越来越多的研究表明 NAFLD 是隐源性肝硬化的重要病因,甚至可发展成

[基金项目] 国家自然科学基金(30770968)
[通信作者] 陈东风,E-mail: chendf1981@126.com

为肝癌,但是其发病机制尚未完全清楚[4]。

肝细胞由于其活跃的蛋白合成和能量代谢功能,而含有丰富的内质网(endoplasmic reticulum,ER)。内质网是蛋白质代谢、储存离子钙以及应对各种应激信号的主要场所,对各种刺激极为敏感,当肝细胞受到诸如病毒感染、能量代谢异常、相关基因突变或者药物滥用等内外因素的刺激时均可能诱发内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)。肝细胞可通过适当的保护性反应如未折叠蛋白反应(unfolded protein response,UPR)来减轻ERS的负面效应,但是持续或过强的ERS就会造成肝细胞内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress response,ERSR),那样ERSR对肝细胞造成的损伤就不可避免了[5,6]。因此,本研究拟通过检测非酒精性脂肪变肝细胞中活化转录因子4(activating transcription factor 4, ATF4)基因的表达变化,探讨其在NAFLD发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

L02肝细胞购自中科院上海细胞库,RPMI1640培养基和胎牛血清均购自Gibco公司,RT-PCR (AMV)试剂盒、DNA Marker购自TaKaRa公司,Tripure、混合蛋白酶抑制剂Comlete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets为Roche公司产品,ATF4一抗(ab1371)购自Abcam公司,内参Beta Actin Antibody(NB600-501)购自Novus Biologicals公司,二抗抗山羊IgG-HRP(A4174)和抗小鼠IgG-HRP(A4416)均为Sigma公司产品,化学发光试剂盒Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate(34079)为Pierce公司产品,油酸为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 参照文献[7]方法,正常人L02肝细胞株用含10%胎牛血清的1640培养基培养于25 ml培养瓶,置于37 ℃、饱和湿度、含5% CO_2的培养箱中培养。将离体培养的肝细胞传代培养24 h后,待细胞生长稳定、融合度约达80%时,加入20 mg/ml油酸(油酸以0.5% DMSO溶解)诱导肝细胞脂肪变性,细胞隔天换液并加入新配制的油酸。最后分别于加入油酸诱导0、24、48、72 h收集细胞。设0 h为空白对照组,24、48、72 h为实验组。

1.2.2 引物设计 应用Primer Premier 5.0软件对ATF4基因(NCBI登录号NM_001675)进行引物设计,引物交由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。上游:5′-GTCTCCGTGAGCGTCCAT-3′,下游:5′-CAGAAGCCAACTCCCATT-3′;目标片段长度166 bp。内参照GAPDH上游:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′;下游:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGT-3′,扩增片段长度450 bp。

1.2.3 细胞总RNA提取及ATF4 mRNA的表达变化 将培养瓶中培养基弃去,并用预冷的PBS洗涤1次,沥干培养瓶中水分。每瓶中加入1 ml Tripure试剂,轻轻转动使试剂均匀覆盖细胞培养瓶底,细胞裂解后收集于1.5 ml离心管中。按照Roche公司Tripure试剂操作说明提取细胞总RNA,RNA操作相关物品均为RNAse Free,总RNA A260/A280的值均在1.8~2.0之间。总RNA定量后按照TaKaRa RT-PCR(AMV)试剂盒说明操作进行,ATF4基因PCR反应条件:94 ℃预变性5 min;94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30个循环;72 ℃ 10 min,最后4 ℃保存。内参基因GAPDH PCR反应条件:94 ℃预变性5 min;94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30个循环;72 ℃ 10 min,最后4℃保存。1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描PCR产物电泳结果,定量分析采用Bandscan软件测定各条带积分灰度值,将各检测基因与自身β-actin条带积分灰度值相比较得到其相对表达量。

1.2.4 细胞总蛋白的提取及ATF4蛋白表达变化 将培养瓶中培养基弃去,并用预冷的PBS洗涤1次,沥干培养瓶中水分。每瓶中加入100 μl RIPA裂解液,轻轻转动使裂解液均匀覆盖细胞培养瓶底,置于冰上裂解10 min。后用细胞刮将细胞收集于另一干净的1.5 ml离心管中。4 ℃,12 000 × g 离心15 min,取上清。BCA法蛋白定量后进行SDS-PAGE电泳,电泳完毕后以30 V恒压湿转过夜转印至PVDF膜,将转印膜用50 g/L脱脂奶粉封闭2 h,TBST洗膜3次,15 min/次;一抗孵育于4 ℃过夜,TBST洗膜3次,15 min/次;二抗孵育于常温下反应1 h,TBST洗膜3次,10 min/次,最后化学发光法显影。显影胶片采用分子生物学图像分析系统定量采集各条带积分灰度值。

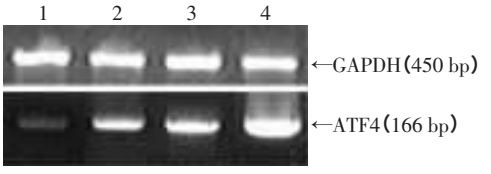
1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件,组间数据比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 油酸诱导肝细胞脂肪变性模型中ATF4 mRNA的表达变化

RT-PCR结果显示ATF4 mRNA表达随细胞脂肪变性程度加剧而升高,0、24、48、72 h各组相对积分灰度值分别为(1.01 ± 0.12)、(1.87 ± 0.24)、(2.01 ± 0.13)、(1.79 ± 0.19)。各实验组与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。ATF4 mRNA表达水平从24 h开始缓慢升高,48 h表达量升高明显,72 h达到峰值(图1)。



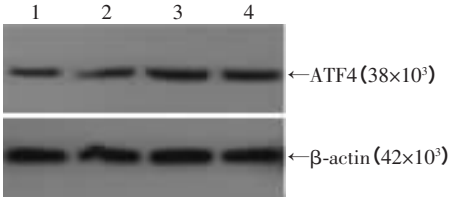
1: 0 h; 2: 24 h; 3: 48 h; 4: 72 h

图1 RT-PCR检测油酸诱导不同时间脂肪变肝细胞ATF4 mRNA的表达

2.2 油酸诱导肝细胞脂肪变性模型中ATF4蛋白的表达变化

Western blot分析结果显示,蛋白表达与mRNA表达趋势基本一致,随着肝细胞脂肪变性程度加剧,ATF4的蛋白表达水平亦呈上升趋势,蛋白表达于48 h达到高峰,72 h维持在高水平状态(图2)。各组积分灰度值分别为(0.31 ± 0.16)、(0.57 ±

0.14)、(0.91 ±0.20)、(0.89 ±0.17)。各实验组跟空白对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。



1: 0 h; 2: 24 h; 3: 48 h; 4: 72 h

图 2 Wesern blot 检测油酸诱导不同时间脂肪变肝细胞 ATF4 蛋白的表达

3 讨论

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是世界范围内最常见的慢性肝脏疾病之一,俗称脂肪肝,是指无酒精过量摄入,而以肝实质细胞脂肪变性为病理特征的肝病临床综合征。目前尚无理想的治疗药物,有研究显示,虫草菌丝可以阻止脂质在肝内进一步沉积[8]。NAFLD 包括一系列连续的组织学变化,从单纯的脂肪浸润到非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH),肝细胞气球样变和纤维化,最终可发展成为肝硬化、甚至肝癌[9,10]。NAFLD 的发病机制至今尚未完全明了,目前被广泛接受的是"二次打击"假说,第一次打击为胰岛素抵抗导致肝细胞摄入过多自由脂肪酸(free fatty acid, FFA)而引起脂肪变性;第二次打击包括氧化应激损伤、脂质过氧化及其异常细胞因子的作用导致肝小叶局部炎性变化造成脂肪性肝炎[11]。NAFLD 的实质还是肝细胞内能量代谢的异常,FFA 增加诱发肝细胞功能障碍,脂肪沉积的肝脏 ATP 合成和储存能力下降,导致肝细胞对氧化应激的反应性降低,从而造成细胞损伤和炎症反应的发生[12]。肝细胞内由于其特殊的功能地位而富含内质网,内质网的重要功能是蛋白质合成、加工修饰,同时也是细胞内其他膜性细胞器的重要来源,在内膜系统中占有中心地位,对应激信号极为敏感。肝细胞内脂质代谢异常是诱发内质网应激(ERS)的重要因素,ERS 既是细胞抵抗应激的生理反应,又是应激造成细胞损伤的重要机制,ERS 对决定应激细胞的结局(如抵抗、适应、凋亡等)有重要作用。ERS 在 NAFLD 的发生、发展及转归过程中扮演关键角色,近年来有关其信号通路与效应的研究非常活跃,围绕脂质代谢中非酯化脂肪酸摄入和新生脂肪合成做了大量有意义的工作。脂肪酸摄入过程中一系列酶类如脂肪酸运输蛋白(fatty acid transport protein, FATP)、脂肪酸易位酶(fatty acid translocase, FAT)、脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding protein, FABP)等控制的生化过程研究得比较深入,然而涉及肝细胞内新生脂肪合成的核转录因子及相关基因的表达仍旧不十分全面,目前研究较为集中的是固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding proteins, SREBPs)、碳水化合物效应元件结合蛋白(carbohydrate responsive element binding protein, ChREBP)、肝 X 受体 α(LXRα)等基因表达调控与 NAFLD 的关系[4]。

内质网发生应激通常会通过两种机制来维持细胞内环境稳态:热休克蛋白反应(heat-shock response, HSS)和未折叠蛋白反应(UPR)。GRP78 是热休克蛋白 70 家族的成员之一,是内质网应激的标志蛋白,在本实验室早期的研究[13,14]中,发现细胞脂质代谢异常可造成 GRP78 表达增高,启动内质网应激;同时,在大鼠模型中也证实了固醇调节结合蛋白-1c(SREBP-1c)表达增高,可加剧机体脂质代谢负担,造成内质网应激,是诱导脂肪性肝病的重要因素。然而与 HSS 作为纯粹的应激效应不同,UPR 可发生于真核细胞绝大多数亚细胞器内,是一种正常生理过程,帮助促进蛋白正确折叠和转运。双链 RNA 依赖蛋白激酶样内质网蛋白激酶(double stranded RNA-dependent like ER-resident protein kinase, PERK)是内质网上重要的酶类,它可以通过自身磷酸化以及磷酸化真核细胞起始转录因子 2α(eukaryotic translation initiation factor 2-alpha, eIF2α)来抑制蛋白的合成[15]。eIF2α 被磷酸化激活,活化转录因子 4(ATF4)表达量明显增加,ATF4 跟 CHOP 启动子结合诱导在 ERS 情况下相关基因的表达来促进蛋白的正确折叠、定位或者残留蛋白的降解[16]。PERK 通路是 ERS UPR 的重要通路,对缓解 ER 蛋白质代谢的压力,减少对细胞的损伤有重要作用[17]。在本研究中,从 UPR 的 PERK 途径探讨了 ERS 效应与 NAFLD 的关系,通过动态监测脂质过载造成肝细胞内脂肪变性模型中 ATF4 基因的表达情况,发现 ATF4 基因 mRNA 和蛋白表达水平均随着细胞脂肪变性程度加剧而显著升高,并在 72 h 后蛋白表达维持高水平而 mRNA 有下降趋势,分析原因可能由于细胞持续 ERS 后造成内质网应激反应(ERSR),细胞失代偿所致。ATF4 的持续高表达,即表明 UPR 维持在高水平运转,UPR 在 ERS 早期阶段以时间和效应方式在对应地抵消 ERSR,从而维持细胞的内环境稳态,然而,长时间 UPR 就会导致细胞病理性结果——ERSR 的出现;再则,ATF4 基因高表达的同时活化相关基因的转录和翻译,这在一定程度上也增加了蛋白合成和内质网的生理负担。ERSR 使细胞对活性氧自由基的敏感性增高,容易引起细胞氧化应激和一些炎症因子的产生。因此,ATF4 的高表达昭示了细胞 ERSR 处于活跃状况,此进程可形成对肝细胞的二次打击从而诱导

NAFLD甚至NASH的出现。

本研究从UPR的PERK侧面证明了ERS与NAFLD的关系。然而,细胞内具有复杂的信号网络关系,目前研究表明ERS介导细胞凋亡最终诱发NAFLD至少包括2种机制,即UPR和Ca^{2+}信号:UPR就包括从ER到细胞核的一系列信号传导通路;Ca^{2+}信号最为重要的第二信使本身参与了细胞内诸多信号转导过程,并且此2种机制之间也存在串扰。肝细胞过量的脂肪摄入通常被认为是NAFLD发生的关键因素,然而调控细胞内新生脂肪合成的复杂的网络关系的梳理被认为才是阐明NAFLD成因的重点和关键,随着研究的深入及研究成果的积累,构建ERS各信号通路网络的协同关系图对全面揭示NAFLD的发病机制具有重要作用,同时可对NAFLD的预防、治疗及新靶点药物的开发提供理论依据。

参考文献:

[1] Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis[J]. Diabetes Metab, 2008, 34(6 Pt 2): 634-637.

[2] Shen L, Fan J G, Shao Y, *et al*. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(5): 1106-1110.

[3] Musso G, Gambino R, Bo S, *et al*. Should nonalcoholic fatty liver disease be included in the definition of metabolic syndrome? A cross-sectional comparison with Adult Treatment Panel III criteria in nonobese nondiabetic subjects[J]. Diabetes Care, 2008, 31(3): 562-568.

[4] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Prog Lipid Res, 2009, 48(1): 1-26.

[5] Healy S J, Gorman A M, Mousavi-Shafaei P, *et al*. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 625(1/3): 234-246.

[6] Amodio G, Renna M, Paladino S, *et al*. Endoplasmic reticulum stress reduces the export from the ER and alters the architecture of post-ER compartments[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(12): 2511-2521.

[7] 杨林辉, 陈东风. 油酸诱导培养肝细胞脂肪变性模型的建立[J]. 重庆医学, 2007, 36(8): 698-700.

[8] 杨朝霞, 代东伶, 沈薇. 虫草菌丝和还原型谷胱甘肽对非酒精性脂肪肝大鼠模型治疗效果的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(22): 2176-2178.

[9] Adams L A, Lymp J F, St-Sauver J, *et al*. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study[J]. Gastroenterology, 2005, 129(1): 113-121.

[10] Delgado J S. Evolving trends in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Eur J Intern Med, 2008, 19(2): 75-82.

[11] Day C P, James O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. Gastroenterology, 1998, 114(4): 842-845.

[12] Adams L A, Lindor K D. Nonalcoholic fatty liver disease[J]. Ann Epidemiol, 2007, 17(11): 863-869.

[13] 闵敏, 陈东风, 王军, 等. 葡萄糖调节蛋白78在大鼠非酒精性脂肪性肝炎中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 79-81.

[14] 艾正琳, 陈东风. SREBP-1c在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1063-1065.

[15] Harding H P, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase[J]. Nature, 1999, 397(6716): 271-274.

[16] Harding H P, Novoa I, Zhang Y, *et al*. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells[J]. Mol Cell, 2000, 6(5): 1099-1108.

[17] Ji C, Kaplowitz N. ER stress: can the liver cope? [J]. J Hepatol, 2006, 45(2): 321-333.

(**收稿**:2010-04-12;**修回**:2010-06-10)

(编辑 吴培红)

正文中参考文献的标注方法

正文中参考文献的著录制度有顺序编码制和著者-出版年制。

1. 本刊采用顺序编码制,即按照正文中引用的文献出现的先后顺序用阿拉伯数字(从1开始)连续编码,并将序号置于方括号中。

2. 文内标注　　根据具体情况一般可按照下述3种格式标注。

a. 正文指明原始文献作者姓名时,序号标注于作者姓名之后的右上角。

例1:薛社普等[1]指出棉酚从体内排泄缓慢。

b. 正文未指明作者姓名或非原始文献作者时,序号标注于相关论述句末的右上角。

例2:动态心电图特别适用于无症状心肌缺血的发现[1-3]。

c. 正文直接述及文献序号,即文献作正文叙述的直接补语时,文献序号不用角码标注,与正文并排。

例3:本研究与文献[4,6]报道的结果一致。

3. 标注应尽可能靠近有关引文,写在标点符号之前。在同一处同时引用几条文献时,文献序号应放在1个方括号内。文献序号不连续时,用逗号分隔,如例3;连续时文献序号不必一一列出,可标注起止序号,用连接线连接,如例2。

本刊编辑部