论著

文章编号:1000-5404(2012)01-0066-04

不同膳食脂肪酸对肝细胞 SREBP-1c 表达及脂代谢的影响

田晓媛,张乾勇,冉 莉,糜漫天 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市医学营养研究中心,重庆市营养与食品安全重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨不同膳食脂肪酸构成对肝细胞脂代谢及固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol-regulatory elementary binding protein-1c, SREBP-1c)表达的影响。**方法** 以 HepG2 肝细胞为研究对象,分为空白对照组、二十碳五烯酸(EPA)组、棕榈酸(PA)组、EPA 和亚油酸(LA)1∶1混合组、PA 和油酸(OA)1∶1混合组,EPA、PA 单独处理组终浓度为 150 μmol/L,混合处理组各组分浓度为 75 μmol/L,总浓度为 150 μmol/L,处理细胞 24 h。采用油红 O 染色观察细胞内脂滴的变化,测定甘油三酯(TG)含量来评价细胞内脂质含量;采用 RT-PCR、Western blot 法检测 SREBP-1c mRNA 及蛋白的表达。**结果** PA 组、PA 和 OA 1∶1混合组 SREBP-1c mRNA 及蛋白的表达上调,EPA 和 LA 1∶1混合组、EPA 组 SREBP-1c mRNA 及蛋白的表达下调,与对照组相比差异显著($P<0.05$)。与对照组相比,EPA 和 LA 1∶1混合组、EPA 组肝细胞内 TG 含量显著减少($P<0.05$);PA 和 OA 1∶1混合组、PA 组肝细胞内 TG 含量显著增加($P<0.05$)。**结论** PA、OA 上调肝细胞 SREBP-1c 的表达并促进细胞内 TG 的合成,可能促进肝细胞脂肪变性;而 EPA、LA 下调肝细胞 SREBP-1c 的表达并显著降低肝细胞内 TG 含量,减轻肝细胞脂肪变性。

[关键词] 脂肪酸;脂代谢;SREBP-1c;肝细胞
[中图法分类号] R151.2;Q493.5;R322.47 [文献标志码] A

Effect of different dietary fatty acids on expression of sterol-regulatory elementary binding protein-1c and lipid metabolism in hepatic cells

Tian Xiaoyuan, Zhang Qianyong, Ran Li, Mi Mantian (Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Medical Nutrition Research Center, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of different dietary fatty acid compositions on expression of sterol-regulatory elementary binding protein-1c (SREBP-1c) and lipid metabolism in hepatic cells. **Methods** HepG2 cells were divided into control group, eicosapntemacnioc acid (EPA) group, palmitic acid (PA) group, 1∶1 EPA and linoleic acid (LA) mixture group, 1∶1 PA and oleic acid (OA) mixture group. The final concentration of EPA and LA was 150 μmol/L in EPA group and PA group respectively, and 75 μmol/L in EPA and LA mixture group and PA and OA mixture group respectively. The total concentration was 150 μmol/L 24 h after the HepG2 cells were treated. Changes of lipid droplet and its level in HepG2 cells were observed with oil red staining. Expression level of SREBP-1c mRNA and protein was measured by RT-PCR and Western blotting respectively. **Results** The expression level of SREBP-1c mRNA and protein was significantly higher in PA group and 1∶1 PA and OA mixture group, and significantly lower in EPA group and 1∶1 EPA and LA mixture group than in control group ($P<0.05$). The lipid level in hepatic cells was significantly lower in EPA group and 1∶1 EPA and LA mixture group than in control group ($P<0.05$), and significantly higher in PA group and 1∶1 PA and OA mixture group ($P<0.05$). **Conclusion** PA and OA up-regulate the expression of SREBP-1c and promote the synthesis of lipid by promoting the fatty degeneration in hepatic cells, while EPA and LA down-regulate the expression of SREBP-1c and decrease the lipid level by reducing the fatty degeneration in hepatic cells.

[**Key words**] fatty acid; lipid metabolism; sterol-regulatory elementary binding protein-1c; hepatic cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30972469). Corresponding author: Zhang Qianyong, Tel: 86-23-68752643, E-mail: zqianyong@yahoo.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30972469)
[通信作者] 张乾勇,电话:(023)68752643,E-mail:zqianyong@yahoo.com

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量饮酒史而以肝实质细胞脂肪变性和脂肪蓄积为特征的临床综合征,近年来其发病率不断增加,但发病机制尚未完全明确,目前研究显示多种因素参与了其发病过程,其中脂代谢异常被认为是最关键和基础的环节之一。固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol-regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c)是肝脏脂质代谢的关键调控者[1-2],参与NAFLD 的发病,激活 SREBP-1c 不仅促进肝脏脂肪酸和甘油三酯的合成,还抑制甘油三酯的转运[3-5]。有报道表明膳食脂肪摄入过多、膳食脂肪酸不平衡[尤其是饱和脂肪酸较多而 n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 polyunsaturated fatty acid, n-3PUFA)较少]等是导致脂肪肝的主要危险因素[6-7]。n-3PUFA 的摄入量与 NAFLD 的患病率呈负相关[6],NAFLD 患者血中和肝组织中 PUFA 含量降低,但各种不同膳食脂肪酸的构成在 NAFLD 形成过程中的作用鲜见报道,且各种脂肪酸构成与 SREBP-1c 之间的关系如何尚不明确。本实验用不同脂肪酸构成干预 HepG2 肝细胞,并探讨其对肝细胞 SREBP-1c mRNA 表达及脂代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HepG2 肝细胞株购自中科院上海细胞所,二十碳五烯酸(eicosapntemacnioc acid,EPA)、亚油酸(linoleic acid,LA)、油酸(oleic acid, OA)、棕榈酸(palmitic acid, PA)均购自美国 Sigma 公司,油红 O 为美国 Sigma 公司产品 ,RT-PCR 试剂盒购自杭州博日公司,SREBP-1c 和 GAPDH(作为内参)引物由北京赛百盛公司合成,SREBP-1c 鼠抗人单克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,β-actin 兔抗人多克隆抗体为美国 Bioworld 公司产品,山羊抗鼠和抗兔辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞培养及实验分组

人 HepG2 肝细胞株,接种于 25 cm^2 培养瓶,用含 10 % 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,37 ℃(5% CO_2) 细胞培养箱内培养,待细胞生长至 80% ~90% 密度时用胰蛋白酶消化,按 1∶3 比例传代。HepG2 肝细胞株培养后分为 5 组。空白对照组以含 10 % 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养;150 μmol/L EPA 组;EPA 和 LA 1∶1混合组(75 μmol/L EPA 和 75 μmol/L LA);150 μmol/L PA 组;PA 和 OA 1∶1混合组(75 μmol/L PA 和 75 μmol/L OA)。

1.3 油红染色

细胞培养于放有无菌盖玻片的 24 孔培养板内,各组予相应处理 24 h 后,PBS 洗涤 2 遍,用 4% 多聚甲醛固定 20 min,0.5% 油红 O 染液室温染色 30 min,60% 异丙醇漂洗 30 s,蒸馏水洗 30 s 至背景透明,明胶甘油封片。于倒置显微镜下观察细胞内脂滴形成情况。

1.4 化学比色试验测定细胞内甘油三酯含量

油红 O 室温染色 1 h 后,吸弃染色剂,PBS 洗去未着色的染料,吸弃 PBS,待水分彻底蒸发后,各孔加入 1 ml 异丙醇,室温振荡摇匀 30 min,充分洗涤与脂肪结合的油红 O,用分光光度计在 520 nm 处测各孔光密度值[$D(520)$]。

1.5 RT-PCR 法检测 SREBP-1c mRNA 的表达

细胞种植于 6 孔培养板内,不同处理组处理细胞 24 h 后终止培养,用冰预冷的 PBS 液冲洗培养孔 2 遍,各加入 Biozol 试剂 1 ml,吹打细胞,室温静置 10 min,按 Biozol 说明书操作,提取细胞总 RNA,电泳分析其完整性, 以核酸蛋白分析仪检测 RNA 浓度及 $D(260)/D(280)$ 比值,并保存于 -80 ℃备用;RT-PCR 按照试剂盒说明完成。SREBP-1c 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min,94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,35 个循环,72℃再延伸 5 min。引物采用 Primer Premier 软件设计,由赛百盛公司合成。SREBP-1c: 正义链: 5′-ACTTCCCTGGCCTATTTGACC-3′, 反义链: 5′-GGCATGGACGGGTACATCTT-3′, 扩增片段长度 217 bp; GAPDH: 正义链: 5′-CGGGAAACTGTGGCGTGATG-3′反义链:5′-CAAAGGTGGAGGAGTGGG-3′, 扩增片段长度 311 bp。PCR 产物 4 μl 与 1 μl 的 6 × Buffer 上样混合,2% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 30 min,Bio-Rad 凝胶图像分析仪扫描各条带,Quantity One 对条带进行分析。

1.6 Western blot 检测细胞 SREBP-1c 蛋白的表达

收集各组细胞, 加入蛋白裂解液置于冰上裂解 30 min 后, 4 ℃, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。各组分别取 40 μg 蛋白, 加入 5 × SDS 上样缓冲液, 95 ℃煮沸 5 min 使蛋白变性, 进行 SDS-PAGE 电泳,然后电转移至 0.22 μm 的 PVDF 膜上。5% 的 BSA 封闭 2 h,用 1∶500 稀释的鼠抗人单克隆一抗 4 ℃孵育过夜,用 TBST 振摇洗膜10 min × 3 次,以 1∶6 000 稀释的羊抗鼠辣根酶标记二抗室温孵育 2 h 后,再次 TBST 振摇洗膜 10 min × 3 次,加 ECL 化学发光试剂,曝光显影,避光晾干后扫描存盘,用 Quantity One 软件对条带进行灰度值分析,以目的蛋白与内参照 β-actin 灰度比值代表目的蛋白表达水平。

1.7 统计学分析

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件。各组数据间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组肝细胞油红染色情况的比较

空白对照组见少数细胞脂肪变性,EPA 和 LA 1∶1混合组和 EPA 单独组可见细胞内少量橘红色脂滴聚集;PA 和 OA 1∶1 混合组内可见大量大小不等的脂滴聚集;PA 单独组脂肪变性细胞最多,细胞内脂滴数量明显增多,且呈现典型脂肪细胞形态,胞体变大、变圆。

2.2 细胞内 TG 含量的比较

采用化学比色法定量分析细胞内脂肪(主要是 TG)的含量。与空白对照组相比,EPA 和 LA 1∶1混合组、EPA 组肝细胞内甘油三酯含显著减少($P<0.05$);PA 和 OA 1∶1 混合组、PA 组肝细胞内 TG 含量显著增加($P<0.05$,表 1)。

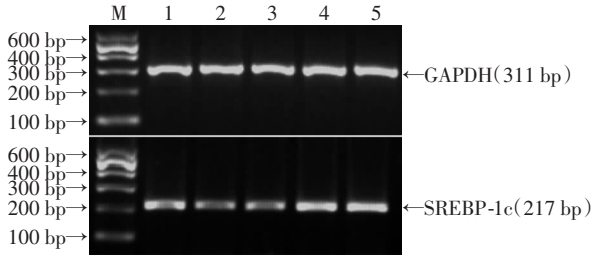
表1 各组肝细胞TG含量、SREBP-1c mRNA和蛋白表达的比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TG[$D(520)$]	SREBP-1c mRNA	SREBP-1c 蛋白
空白对照组	0.154±0.009	0.45±0.03	0.56±0.03
EPA和LA 1:1混合组	0.126±0.012[a]	0.26±0.04[a]	0.28±0.03[a]
EPA组	0.121±0.017[a]	0.21±0.03[a]	0.15±0.03[a]
PA和OA 1:1混合组	0.182±0.015[a]	0.68±0.04[a]	0.87±0.03[a]
PA组	0.184±0.018[a]	0.73±0.03[a]	0.74±0.02[a]

a: $P<0.05$, 与空白对照组比较

2.3 各组肝细胞SREBP-1c mRNA表达的变化

由图1可以看出各组肝细胞SREBP-1c mRNA均有不同程度的表达,PA组、PA和OA 1:1混合组SREBP-1c mRNA的表达上调,与空白对照组相比差异显著($P<0.05$);EPA和LA 1:1混合组、EPA组SREBP-1c mRNA的表达下调,与空白对照组相比差异显著($P<0.05$,图1)。

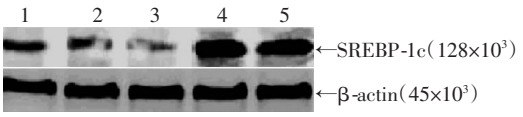


M:标准; 1:空白对照组; 2:EPA和LA 1:1混合组; 3:EPA组; 4:PA和OA 1:1混合组; 5:PA组

图1 RT-PCR检测各组肝细胞SREBP-1c mRNA表达

2.4 各组肝细胞SREBP-1c蛋白表达的变化

由图2可以看出各组肝细胞SREBP-1c蛋白均有不同程度的表达,PA组、PA和OA 1:1混合组SREBP-1c蛋白的表达上调,与空白对照组相比差异显著($P<0.05$);EPA和LA 1:1混合组、EPA组SREBP-1c蛋白的表达下调,与空白对照组相比差异显著($P<0.05$,表1)。



1: 空白对照组; 2:EPA和LA 1:1混合组; 3:EPA组; 4:PA和OA 1:1混合组; 5:PA组

图2 Western blot检测各组肝细胞SREBP-1蛋白表达

3 讨论

NAFLD已经成为全球的主要公共问题之一。15%~30%的成年人有NAFLD,而在肥胖和糖尿病群体中,70%以上有NAFLD,可见NAFLD对人类健康的威胁非常大。NAFLD的病因和发病机理一直争论不休,更为糟糕的是迄今为止尚未发现治疗NAFLD的特效药物[8]。尽管大多数单纯性脂肪肝患者短期内无明显肝功能损伤,但长期的脂肪肝有发展成NASH,肝硬化甚至肝癌的危险,可见NAFLD已严重威胁人类的身体健康,必须引起高度重视。SREBP-1c是重要的核转录因子,几乎参与所有肝脏脂肪酸和甘油三酯的合成基因的转录活化,其功能异常对NAFLD有显著影响,SREBP-1c转基因小鼠在20周龄时可以自然地发生NAFLD[9]。膳食脂肪酸摄入过多或脂肪酸不平衡,可导致血浆中饱和脂肪酸升高,会激活肝脏的SREBP-1c,促进脂肪酸和甘油三酯合成基因的表达,从而导致肝脏甘油三酯合成增加,流出减少,使肝脏脂肪蓄积增多。

PUFA为一类具有多种生物学功能的营养素,国内外已有大量人群研究表明n-3PUFA在临床上能降低患者转氨酶水平、血浆TNF浓度和改善NAFLD肝脏状况[10-11],且Ishii等[10]通过动物实验发现n-3PUFA可通过抑制肝脏脂肪合成和蓄积对脂肪肝起到缓解作用,但目前对所涉及的可能的分子机制研究较少。PA与OA是正常人肝脏及NAFLD患者肝脏中存在最普遍的两种脂肪酸[12],有研究发现单独应用OA可对肝细胞造成慢性损伤,与NAFLD的慢性肝脂变相似[13],Gomez-Lechon等[14]在建立肝细胞脂肪变细胞模型时发现用PA和OA 1:2混合液处理肝细胞,其甘油三酯含量增加显著,脂肪变性情况较严重。

基于以上分析,并结合我国现阶段居民日常膳食特点,本实验分别选用单独EPA、EPA和LA 1:1混合液、单独PA、PA和OA 1:1混合液,处理细胞24 h后发现,PA单独组,PA和OA 1:1混合组SREBP-1c mRNA及蛋白表达增强,说明PA单独组,PA和OA 1:1混合组能上调人肝细胞SREBP-1c mRNA及蛋白表达水平;LA和EPA 1:1混合组,EPA单独组表达下降,说明LA和EPA 1:1混合组和EPA单独组能下调人肝细胞SREBP-1c mRNA及蛋白表达水平。

油红O是脂肪染色的最敏感染料,其结果显示PA和OA 1:1混合组、PA单独组细胞胞质内出现了较多的脂滴颗粒,肝细胞脂肪变性较重,甘油三酯含量明显增加;而在LA和EPA 1:1混合组和EPA单独组只有少量细胞脂肪变性,甘油三酯含量减少。以上结果表明随着SREBP-1c表达增加,肝细胞内TG合成也增加,肝细胞脂肪变性加重。由此可见,OA、PA混合液及单独的PA通过上调SREBP-1c的表达,使肝脏脂肪蓄积增多,而EPA与LA混合液及单独的EPA可通过下调SREBP-1c的表达,减少肝脏甘油三酯合成。推测在日常膳食中增加EPA和/或LA等PUFA可能对NAFLD的发生、发展起到保护作用。进一步探讨各种脂肪酸构成在肝细胞脂肪变性发生发展中的作用,有助于阐明非酒精性脂肪肝的发病机制,为其预防和治疗提供新的思路。

参考文献：

[1] 张乾勇. 类固醇调节元件结合蛋白对脂类代谢调节作用[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(增刊): 100 - 103.
[2] Raghow R, Yellaturu C, Deng X, *et al*. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis[J]. Trends Endocrinol Metab, 2008, 19(2): 65 - 73.
[3] Rubin D, Schneider-Muntau A, Klapper M, *et al*. Functional analysis of promoter variants in the microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) gene[J]. Hum Mutat, 2008, 29(1): 123 - 129.
[4] Tu W C, Cook-Johnson R J, James M J, *et al*. Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression[J]. Prostaglandings, Leukot Essent Fatty Acids, 2010, 83(2): 61 - 68.
[5] Kim G, Kim G H, Oh G S, *et al*. SREBP-1c regulates glucose-stimulated hepatic clusterin expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 408(4): 720 - 725.
[6] Morisco F, Vitaglione P, Amoruso D, *et al*. Foods and liver health [J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(1/2): 144 - 150.
[7] Gentile C L, Pagliassotti M J. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Nutr Biochem, 2008, 19(9): 567 - 576.
[8] Sanal M G. The blind men see´the elephant-the many faces and liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(6): 831 - 844.
[9] Nakayama H, Otabe S, Ueno T, *et al*. Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis[J]. Metabolism, 2007, 56(4): 470 - 475.
[10] Ishii H, Horie Y, Ohshima S, *et al*. Eicosapentaenoic acid ameliorates steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in hepatocyte-specific Pten-deficient mice[J]. J Hepatol, 2009, 50(3): 562 - 571.
[11] Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, *et al*. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Dig Liver Dis, 2008, 40(3): 194 - 199.
[12] Araya J, Rodrigo R, Videla L A, *et al*. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Clin Sci (Lond), 2004, 106(6): 635 - 643.
[13] Feldstein A E, Werneburg N W, Canbay A, *et al*. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression *via* a lysosomal pathway[J]. Hepatology, 2004, 40(1): 185 - 194.
[14] Gomez-Lechon M J, Donato M T, Martinez-Romero A, *et al*. A human hepatocellular *in vitro* model to investigate steatosis[J]. Chem Biol Interact, 2007, 165(2): 106 - 116.

（**收稿**：2011-09-08；**修回**：2011-10-28）
（编辑　吴培红）

（上接 65 页）

2　讨论

Cantrell 综合征新生儿的发病率为 1/6.5 万，男女之比为 1.35∶1[1]。其特点为：胸骨体下端缺陷、前膈缺损、脐膨出、异位心、心内发育异常。在临床上胸骨发育异常，即胸骨下裂伴有其他中线处畸形称为 Cantrell 综合征，其中先天性心脏发育异常为必要部分，室间隔缺损、房间隔缺损、肺动脉瓣狭窄、法洛四联症及左心室憩室的发生率分别为：100%、53%、3%、20% 及 20%[2]。胚胎发育过程中如头襞发育异常，可产生 Cantrell 综合征。Cantrell 等认为此种畸形是在胚胎期第 2 ~ 3 周中胚层外侧的节段发育障碍，使膈肌的横向膈膜发育受限，上腹部正中的中胚层成对的折迭后迁移受阻。Takaya 等[3]研究发现，Cantrell 综合征除了上述 5 大特点外，一些病例还合并了右室双流出道，双主动脉干，肺静脉引流畸形等。Kotzot 等[4]研究指出：Cantrell 综合征是与 X 连锁的相关疾病，是在 Xq 25 - 26 发生了相关的基因异常。

既往对 Cantrell 综合征的诊断主要是依靠超声检查[7]，但是超声很难从整体上观察病变及病变周围的情况，这对临床诊断有一定的局限性，容易导致漏诊和误诊。CTA 可以弥补这一不足：从整体、多角度去观察病变及其周围关系，对于病变的测量更为准确，更能从客观上去判断病变和疾病间的鉴别诊断。本例患儿超声诊断中提示右旋心，CTA 上显示实为左心室憩室及其来源。同时，CTA 在图像分辨率、扫描时间、鉴别诊断上也显得尤为有优势，比如心脏的时相扫描，可以减少因患儿运动产生的伪影所致的误诊及漏诊。一些轻度的胸骨下裂合并的正中线结构发育的异常，其临床可以无明显表现，然而，通过 MIP、VR 可以早期对该病变进行诊断，减少漏诊率，从而提高了患者的生存率；对于 Cantrell 综合征的鉴别诊断，如腹裂、脐疝、孤立的脐带移位、羊膜索综合征等[5-6]，可以从 CTA 提供的相关参数进行较为准确的鉴别。

参考文献：

[1] Vazquez-Jimenez J F, Muehler E G, Daebritz S, *et al*. Cantrell's syndrome: a challenge to the surgeon[J]. Ann Thorac Surg, 1998, 65(4): 1178 - 1185.
[2] Cantrell J R, Haller J A, Ravitch M M. A syndrome of congenital defects involving the abdominal wall, sternum, diaphragm, pericardium, and heart[J]. Surg Gynecol Obstet, 1958, 107 (5): 602 - 614.
[3] Takaya J, Kitamura N, Tsuji K, *et al*. Pentalogy of Cantrell with a double-outlet right ventricle: 3.5-year follow-up in a prenatally diagnosed patient[J]. Eur J Pediatr, 2008, 167(1): 103 - 105.
[4] Kotzot D, Schwabegger A H. Etiology of chest wall deformities--a genetic review for the treating physician[J]. J Pediatr Surg, 2009, 44(10): 2004 - 2011.
[5] 张正国, 王毅, 张伟国. 新生儿 Cantrell 综合征的影像表现一例[J]. 中华放射学杂志, 2009, 43(5): 554 - 555.
[6] Chen C P. Syndromes and disorders associated with omphalocele (Ⅱ): OEIS complex and Pentalogy of Cantrell[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2007, 46(2): 103 - 110.

（**收稿**：2011-07-16；**修回**：2011-07-26）
（编辑　汪勤俭）