基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0179-04

甘利欣作用前后体外酒精性脂肪肝细胞模型甘油三酯水平变化及其可能作用机制

李龙辉[1],李龙江[2],汤为学[2],左国庆[1],廖 于[3]

(1. 重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010; 2. 重庆医科大学干细胞和组织工程研究室 病理生理学教研室 400016; 3. 重庆医药高等专科学校基础部,重庆 400051)

【摘 要】目的:研究甘利欣(Diammonium glycyrrhizinate, DIG)作用前后,体外诱导的酒精性脂肪肝(Alcoholic fatty liver, AFL)细胞模型甘油三酯(Triglyceride,TG)水平变化及其可能的作用机制。方法:MTT 法筛选最佳作用浓度,透射电镜观察细胞超微结构改变,全自动生化仪检测细胞内甘油三酯水平,免疫细胞化学(Immunocyto-chemistry,ICC)方法观察 PPARγ、SREBP-1、SCAP 的表达。结果:(1) MTT 法筛选出 2.273 μg/ml 为甘利欣最佳作用浓度。(2)透射电镜观察 Ld30 细胞发现胞浆内存在大量脂滴(3) 全自动生化仪测得 Ld30 细胞内甘油三酯浓度为(1.84 ± 0.16) mmol/L,甘利欣处理组为(1.05 ± 0.12) mmol/L,差异有统计学意义($P<0.01$)。(4)与 Ld30 组相比较,甘利欣处理组 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达明显减弱,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:甘利欣有减轻体外诱导的酒精性脂肪肝细胞脂肪变的作用,其作用机制可能是通过下调 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达,从而抑制了细胞内脂肪生成。

【关键词】甘利欣;甘油三酯;酒精性脂肪肝

【中国图书分类法分类号】575.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-01

Triglyceride level changes and potential mechanism on alcoholic fatty liver cell model induced in vitro: with or without diammonium glycyrrhizinate

LI Long-hui, et al

(*Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the triglyceride level changes with or without Diammounium Glycyrrhizinate (DIG) and the potential mechanism on alcoholic fatty liver cell model induced in vitro. *Methods*: MTT assay was used to screen the optimal concentration of ethanol and DIG injection. Ultra-microstructure was observed under transmission electron microscope. Intracellular triglyceride concentration was measured by hol-automatic biochemistry. Expressions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARγ), sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) and SREBP cleavage activating protein (SCAP) were determined by immunocyto-chemistry (ICC). *Results*: 1. The screened optimal DIG concentration was 2.273 μg/ml. 2. Masses of lipid droplets in cytoplasm were observed under transmission electron microscope. 3. Hol-automatic biochemistry measured intracellular triglyceride concentration to be (1.84 ± 0.16) mmol/L and (1.05 ± 0.12) mmol/L respectively in Ld30 group and DIG group, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). 4. The expression of PPARγ, SREBP-1, and SCAP in DIG group decreased, as compared with Ld30 group, and the difference was statistically significant. *Conclusion*: DIG is helpful to relieve steatosis of alcoholic fatty liver induced in vitro, and its possible mechanism is by down-regulating expressions of PPARγ, SREBP-1, and SCAP, thus lipogensis is inhibited in the liver cells.

【Key words】Diammonium glycyrrhizinate injection; Triglyceride level; Alcoholic fatty liver

在世界范围内,酗酒相关疾病已成为日益严重的公共卫生问题。饮酒人群中酒精性肝病的发病率高达 84%,在重度饮酒者中 80%以上有一定程度的酒精性脂肪肝(Alcoholic fatty liver, AFL),其中 10%~35%可发展为酒精性肝炎,10%~20%可发展为酒精性肝硬化;并且酒精性肝硬化的预后比较差[1~3]。由此可见,AFL 已经成为常见病、多发病,AFL 的防治不容忽视。此研究旨在观察甘利欣(Diammonium glycyrrhizinate, DIG)作用前后体外 AFL 细胞模型甘油三酯(Triglyceride, TG)水平的变化,以证实 DIG 是否具有减轻 AFL 细胞脂肪变的作用,并进一步探讨其可能的作用机制。

作者介绍:李龙辉 (1977-),女,博士,
研究方向:酒精性肝病。

通讯作者:廖 于,女,副教授,E-mail:cqzdyly@163.com。

基金项目:重庆市卫生局医学科研计划项目(2009-2-445)。

1 材料和方法

1.1 材料

L02 人正常肝细胞由重庆医科大学肝病研究所惠赠，胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司，RPMI-1640 培养基为美国 GBICO 公司产品，甘利欣注射液为正大天晴药业生产。PPAR-γ、SCAP 羊抗人多克隆抗体，购自 Santa Cruz 公司。SREBP-1 鼠抗人单克隆抗体，购自 Neomarker 公司。SP 试剂盒，购自北京中山生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养人正常肝细胞株 L02。以 MTT[4]法筛选出的亚致死量浓度乙醇作用于 L02 细胞，6 d 为周期传代，传代至第 30 代标记为 Ld30。将 DIG 注射液配成终浓度分别为 0.568、1.136、2.273、4.545、9.090 μg/ml 的工作液，依次加入种植有 Ld30 细胞的 96 孔培养板，MTT 法筛选出 DIG 最佳作用浓度。实验组：① 甘利欣处理组（DIG 组）将最佳作用浓度的 DIG 加入 Ld30 细胞培养液中，每 3 d 给 1 次药，6 d 传代 1 次，观察 30 d。② 脱离乙醇组 不给药和乙醇，仅以含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养 Ld30 细胞，6 d 传代 1 次，观察 30 d。

1.2.2 透射电镜观察细胞超微结构 取浓度为 5×10^4 个/ml 的对数生长期细胞 20 ml 接种于培养瓶中，培养 72 h 后消化细胞，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，4℃冷戊二醛溶液固定细胞团块 2 h，标本送重庆医科大学电镜室检测并照相。

1.2.3 全自动生化仪检测细胞内 TG 水平 计数细胞 10^6 个，1 500 r/min 离心 5 min，冷 PBS 洗 5 min × 3 次，参照完全裂解 2×10^5 个细胞需 200 μl 裂解液（Urea 8 mol/L，CHAPS 40 g/L，Tris-HCl 40 mmol/L，叠氮钠 0.02%，pH 7.4）这一标准裂解细胞。4℃剧烈振荡、裂解 30 min，低温离心 30 min，收集上清液，送重庆医科大学附属第一医院临床生化检验实验室检测。

1.2.4 免疫细胞化学法观察 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达 取浓度为 5×10^4 个 /ml 的对数生长期细胞接种于放有盖玻片的 24 孔板，培养 72 h 后，取出盖玻片 PBS 液冲洗 5 min × 3 次，95%乙醇固定 45 min，按 SP 试剂盒说明书操作。采用 Morphology 彩色显微图像分析系统对表达结果进行分析，光镜下 100 倍放大，随机选择 5 个视野，检测阳性染色平均光密度值（Mean optical density，MOD），阳性表达指数（=MOD × 阳性细胞百分比 × 100）。

1.2.5 统计学分析 用 SPSS 10.0 for Windows 统计软件处理。检测数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，计量资料采用 t 检验，$P>0.05$ 表示无显著性差异，$P<0.05$ 表示有显著性差异，$P<0.01$ 表示有极显著性差异。

2 结 果

2.1 不同浓度的 DIG 作用于 Ld30 细胞 72 h 后的 MTT 结果

由表 1 可知：不同作用浓度的甘利欣，对 Ld30 细胞生长影响也不同。各工作浓度的甘利欣均有一定程度的抑制细胞生长作用，比较各组抑制率的大小后发现，随甘利欣作用浓度的增加，抑制率先表现为增加趋势，到作用浓度为 2.273 μg/ml 时有所下降，然后再随作用浓度增加而增加。因此，选取 2.273 μg/ml 作为本实验中 DIG 的作用浓度。

2.2 透射电镜下细胞超微结构

Ld30 细胞表面微绒毛明显减少，细胞核大畸形，胞浆凝聚；数目不一、大小不等的均质性脂滴弥漫散在分布；观察 DIG 组：细胞表面有微绒毛，胞浆内仍可见脂滴，但数量相对减少（如图 1，2）。

表 1 不同浓度的甘利欣作用 Ld30 细胞 72 h 的 MTT 结果

组别	n	平均吸光度值	抑制率(%)
对照组	8	2.227 ± 0.023	-
0.568 μg/ml	8	2.036 ± 0.031	8.58
1.136 μg/ml	8	2.005 ± 0.020	9.97
*2.273 μg/ml	8	2.093 ± 0.022	6.02
4.545 μg/ml	8	2.029 ± 0.018	8.89
9.090 μg/ml	8	1.689 ± 0.014	24.4

抑制率 = $(1-\frac{\text{试验组平均吸光度值}}{\text{对照组平均吸光度值}})\times100\%$

* 最佳作用浓度

表 2 细胞内 TG 水平

	Ld30 组	DIG 处理组	脱离乙醇组	L02 组
TG(mmol/L)	1.84 ± 0.16	1.05 ± 0.12*	1.77 ± 0.27◆	0.11 ± 0.03▲
P 值		$P<0.01$	$P>0.05$	$P<0.01$

*Ld30 组与 DIG 处理组比较，$P<0.01$；◆Ld30 组与脱离乙醇组比较，$P>0.05$ ▲Ld30 组与 L02 组比较，$P<0.01$

抑制率 = $(1-\frac{\text{试验组平均吸光度值}}{\text{对照组平均吸光度值}})\times100\%$

* 最佳作用浓度

2.3 细胞内 TG 水平

与 Ld30 组相比，脱离乙醇组 TG 水平有降低，但差异无统计学意义（$P>0.05$）；而 DIG 组细胞内 TG 量减少却有极显著性差异（$P<0.01$）（如表 2）。

2.4 免疫细胞化学观察 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达

实验中 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达的强弱，根据 Morphology 彩色显微图像分析系统所测得 MOD 值和阳性表达指数来判定。结果表明：与 L02 组相比，Ld30 组 PPARγ、

表 3 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达的 MOD 值

	PPARγ	SREBP-1	SCAP
Ld30 组	0.0412 ± 0.151	0.326 ± 0.020	0.305 ± 0.080
DIG 处理组	0.122 ± 0.014*	0.114 ± 0.035*	0.125 ± 0.030*
L02 组	0.060 ± 0.005*	0.043 ± 0.006*	0.038 ± 0.002*
P 值	*P*<0.01	*P*<0.01	*P*<0.01

**相比于 Ld30 组，*P*<0.01

表 4 PPARγ、SREBP-1、SCAP 阳性表达指数

	PPARγ	SREBP-1	SCAP
Ld30 组	32.02 ± 3.45	28.86 ± 2.10	20.45 ± 2.80
DIG 处理组	3.80 ± 0.50*	5.43 ± 0.80*	4.28 ± 0.62*
L02 组	1.49 ± 0.22*	2.26 ± 0.35*	1.75 ± 0.15*
P 值	*P*<0.01	*P*<0.01	*P*<0.01

**相比于 Ld30 组，*P*<0.01

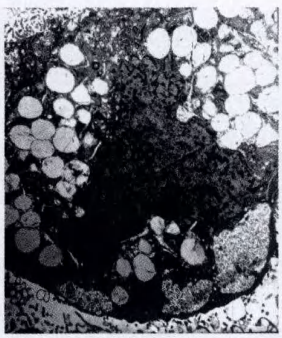


图 1 Ld30 组透射电镜 ×6 000



图 2 DIG 组 透射电镜 ×6 000

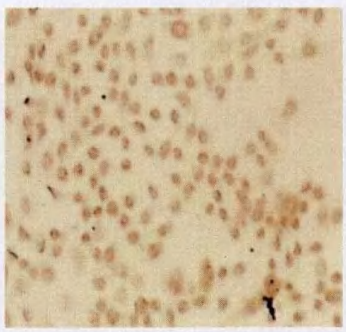


图 3 Ld30 组 PPARγ 表达 ICC ×100

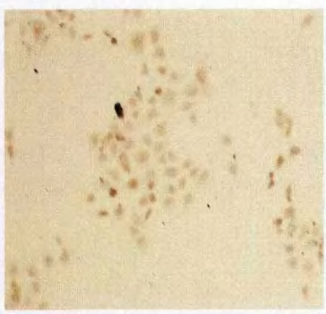


图 4 DIG 组 PPARγ 表达 ICC ×100

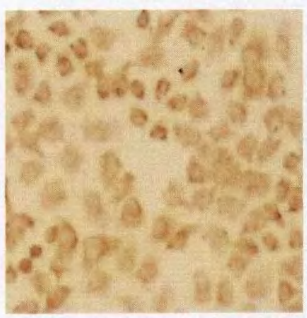


图 5 Ld30 组 SREBP-1 表达 ICC ×100

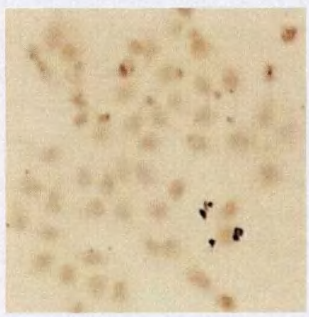


图 6 DIG 组 SREBP-1 表达 ICC ×100

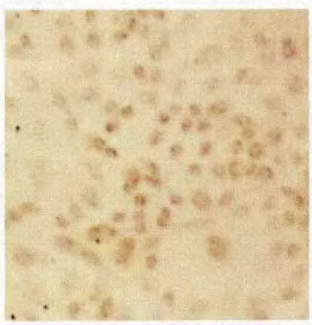


图 7 Ld30 组 SCAP 表达 ICC ×100

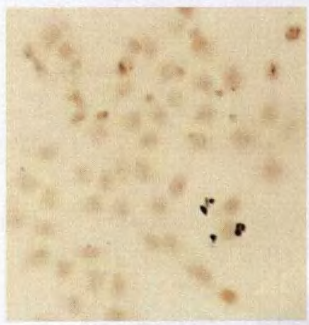


图 8 DIG 组 SCAP 表达 ICC ×100

SREBP-1、SCAP 表达明显增强;与 Ld30 相比,DIG 组 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达明显减弱(如表 3~4;图 3~8)。

3 讨 论

长期过度饮酒后引发酒精性肝病,由于其发病率随社会经济的发展呈上升趋势,因此与其相关的研究受到广泛关注。酒精性脂肪肝作为酒精性肝病的 3 种表现形式之一,也倍受关注。

酒精性脂肪肝的治疗,临床上亦尚无特效药,消除病因(戒酒)、应用降脂药物、抗纤维化等为目前主要治疗措施[5]。甘利欣注射液主要成分为甘草酸二铵,研究显示它具有抗炎、稳定细胞膜的作用;还能抑制 CYP2E1 的活性减少有毒物质的产生,从而抑制氧自由基和炎性因子的产生,减轻肝功能损害等作用,所以被用于各种肝炎和肝硬化的治疗[6]。本实验选用甘利欣注射液作用于体外酒精性脂肪肝细胞模型,观察 30 d。观察期满检测细胞内 TG 水平结果显示:甘利欣处理组细胞内 TG 明显降低,说明甘利欣可以减轻体外酒精性脂肪肝细胞模型的脂肪变性,为甘利欣临床治疗酒精性脂肪肝提供了理论依据。实验结果还显示:脱离乙醇组细胞内 TG 水平也有所降低,与消除病因的临床治疗措施相符。

酒精性脂肪肝的发病机制比较复杂,目前尚未完全明确。本实验结果显示:与人正常肝细胞 L02 相比,体外诱导的酒精性脂肪肝细胞模型内 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达显著增强,那么乙醇诱导的体外酒精性脂肪肝细胞模型的脂肪变性是否与 PPARγ、SREBP-1、SCAP 的表达有关呢?

PPARs 是一类配体依赖序列特异的核转录因子,为核受体超家族成员[7],包括 3 种亚型:PPARα、PPARβ(或称 PPARδ)和 PPARγ,目前对 PPAR 功能的研究主要集中于 PPARα 和 PPARγ[8]。PPARα 在肝脏、横纹肌、肾脏等代谢旺盛组织表达,活化后能增强脂肪酸 β—氧化,从而减少 TG 在肝脏蓄积。PPARγ 在脂肪组织高表达,在脂肪细胞分化中起重要作用,其活化后能使转运至肌肉和肝脏的脂肪酸减少,脂肪合成降低,从而改善胰岛素抵抗,抑制脂代谢,若过度表达则产生严重的脂代谢紊乱[9,10]。

SREBPs 是属于核转录因子家族的一类位于内质网上的膜连接蛋白,分为 3 型:SREBP-1a、SREBP-1c、SREBP-2。细胞内 SREBPs 在内质网合成后与 SREBP 裂解激活蛋白(SREBP cleavage-activating protein, SCAP)结合成复合物。SCAP 护送 SREBPs 到高尔基体,经位点 1 蛋白酶(S1P)和位点 2 蛋白酶(S2P)依次裂解,释放出其氨基末端片断,该片断进入胞核与靶基因启动因子的激素反应元件(Sterol response element, SRE)结合,调节相关基因的表达,进而调控脂肪酸和 TG 合成[11]。

You M 等[12]在研究脂肪肝发病机制时,观察大鼠 H4I-IEC3 和 McA-RH7777 肝癌细胞株发现:乙醇通过增加 SREBP-1 蛋白水平可以诱导 SREBP-1 启动子的表达增加,提示乙醇可能通过活化 SREBP-1 促进脂肪生成。最近有动物研究结果显示:正常肝细胞有一定量的 PPAR-γ 表达,在肝脂肪变明显及脂肪性肝炎形成时,PPAR-γ 的表达较强[13]。本实验结果与以上研究发现均吻合,证明之前关于酒精性脂肪肝发病机制与 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达有关这一猜想是一致的。经甘利欣处理后 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达又明显减弱,提示甘利欣可能正是通过下调 PPARγ、SREBP-1、SCAP 表达,减少细胞内 TG 生成,从而改善酒精性脂肪肝,但其确切的作用机制,仍有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Sussman S, Dent CW, Skara S, et al. Alcoholic liver disease(ALD): a new domain for prevention efforts[J]. Subst Use Misuse, 2002, 37(14): 1887-1904.

[2] Neuschwander-Tetri B A, Caldwell S H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference [J]. Hepatology, 2003, 37(5): 1202-1219.

[3] Stefano B, Giorgio B, Lucia M, et al. The epidemiology of fatty liver [J]. Eur J Gastroenterol & Hepatol, 2004, 6(11): 1087-1093.

[4] 汤为学,骆云鹏,王瑞雪. 人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法的建立[J]. 重庆医科大学学报, 1992, 17(2): 103-108.

[5] 王 君,龙朝霞. 酒精性脂肪肝的诊治[J]. 工企医刊, 2004, 17(5): 92-93.

[6] 黄 萍,刘 莉. 甘草酸二铵和丹参联合治疗酒精性肝病[J]. 中南药学, 2005, 3(2): 121-123.

[7] Martin G, Poirier H, Hennuyer N, et al. Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective retinoids suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target[J]. J Biol Chem, 2000, 275(17): 12612-12618.

[8] Landrier JF, Thomas C, Grober J, et al. Statin induction of liver fatty acid-binding protein(L-FABP) gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent[J]. J Biol Chem, 2004, 279(44): 45512-45518.

[9] Yuan G J, Zhang M L, Gong Z J. Effects of PPAR (agonist pioglitazone on rat hepatic fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(7): 1047-1051.

[10] Eeric R K, Alan M, Scott J C. Role of peroxisome proliferators-activated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(1): 22-28.

[11] Shimabukuro M, Zhou Y T, Levi M R, et al. Fatty acid induced beta-cell apoptosis: a link between obesity and diabetes [J]. PNAS, USA, 1998, 95(5): 2498-2052.

[12] You M, Fischer M, Deeg M A, et al. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) [J]. J Biol Chem, 2002, 277(32): 29342-29347.

[13] 鲁晓岚,罗金燕,王文勇,等. TNFα、Leptin-Rb、NF-κB 和 PPAR-γ 在酒精性肝病大鼠肝细胞中的表达[J]. 西安交通大学学报, 2008, 29(5): 508-512.

(责任编辑:关蕴良)