维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0934-04

水通道蛋白 9 在培养肝细胞脂肪变性模型中的表达及意义

赵丰莹,梅浙川

(重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨油酸诱导的脂肪变性肝细胞模型中水通道蛋白 9(Aquaporin-9,AQP9)的表达及意义。方法:用油酸诱导正常肝细胞株 L-02 建立肝细胞脂肪变模型。采用油红 O 染色观察细胞内的脂滴,并检测细胞内甘油三脂,游离脂肪酸,甘油含量,RT-PCR 法和 Western blotting 法分别检测 AQP9 mRNA 和蛋白的表达。结果:油红 O 染色显示 24h 开始出现脂肪变性,72h 脂肪变性最重;模型组 TG、FFA、甘油含量均在各时相点较对照组显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);模型组 AQP9 mRNA 的表达上调,于 24h 开始增高,72h 表达最强,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$);AQP9 蛋白的表达 24h 开始增高,72h 最强,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:油酸诱导的脂肪变性肝细胞模型 AQP9 的表达增强,细胞内 TG、FFA、甘油的合成增加,AQP9 可能参与了肝细胞的脂代谢及脂肪变性的形成。

【关键词】油酸;脂肪变肝细胞;甘油三酯;游离脂肪酸;甘油;AQP9

【中国图书分类法分类号】R575.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-07

Expression and role of AQP9 in models of cultured steatosis hepatocytes

ZHAO Feng-ying,et al

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

【Abstract】*Objective*:To explore the expression and role of AQP9 in the models of cultured steatosis hepatocytes. *Methods*: Steatosis models of hepatocytes was established by adding oleic acid to the growing L-02 cell strain. The expression of AQP9 mRNA was measured with RT-PCR and the protein expression of AQP9 were measured by Western blotting. Lipid droplets in the hepatocytes were observed by oil red staining and the contents of triglyceride,FFA and glycerol in hepatocytes were measured with analyzed kit. *Results*:Through oil red staining.a few lipid droplets were observed at 24h and steatosis hepatocyte increased greatly at 72h. Triglyceride,FFA and glycerol contents in hepatocytes of model groups also increased,as compared with the control group($P<0.01$). In model groups,mRNA expression of AQP9 increased at 24h,and elevated remarkably at 72h as compared with the normal control group($P<0.05$),and protein expression of AQP9 increased at 24h,and elevated remarkably at 72h compared with the control group($P<0.05$). *Conclusion*:The overexpression of AQP9 in model groups could lead to disturbance of lipid metabolism and probably AQP9 participates the process of steatosis of hepatocytes.

【Key words】 Oleic acid;Steatosis hepatocyte;Triglyceride;FFA;Glycerol;AQP9

非酒精性脂肪肝(Nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)是一种无过量饮酒史,肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为特征的临床病理综合征。随着生活水平的提高和生活方式的改变,NAFLD 已成为严重威胁人们身心健康的常见疾病[1]。其发病机制较为复杂,至今尚未完全明确,多数人认为与脂质代谢紊乱、胰岛素抵抗(Insulin resistance,IR)、细胞因子,氧应激及脂质过氧化反应等因素密切相关。水甘油通道蛋白(Aquaglyceroporin)是水通道蛋白(Aquaporins,AQPs)家族的一个亚家族,它们对水、甘油等小分子溶质有选择性跨膜转运作用。我们的前期实验发现 AQP9 作为水甘油通道蛋白的一员在血窦面肝细胞膜表达非常丰富,提示其很可能参与了肝脏与血液间甘油等物质转运。众所周知甘油是脂肪代谢的重要产物,其正常转运对肝脏脂肪代谢起着重要作用。作为肝脏上唯一的甘油通道,AQP9 是否参与了脂肪肝的形成目前尚不清楚。鉴于此,本课题拟在体外诱导肝细胞脂肪变模型的基础上,研究水甘油通道 AQP9 在脂肪肝中的表达变化及可能的作用机制。

作者介绍:赵丰莹(1981-),女,硕士,
研究方向:非酒精性脂肪肝的发病机制。

通讯作者:梅浙川,男,教授,E-mail:meizhechuan@21cn.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 正常肝细胞的培养 人正常肝细胞株 L-02,购于中科院上海细胞库,用含 10%小牛血清 (杭州四季青生物)的 1640(HYCLONE)培养液传代培养。山羊抗人 AQP9 多克隆抗体(SANTA CRUZ 公司),兔抗山羊二抗(北京中杉生物),BIOZOL(升博公司),油酸(SIGMA 公司),油红 O(SIGMA 公司),甘油三脂检测试剂盒(南京建成生物研究所),游离脂肪酸检测试剂盒(南京建成生物研究所),甘油检测试剂盒(普利莱基因技术有限公司),RT - PCR 试剂盒(TAKARA 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 非酒精性脂肪肝模型的建立 正常成人肝细胞株 L-02,用含 10%小牛血清的 1640 培养基培养于 96 孔板中,分别加入不同浓度的油酸,用 MTT 比色法确定诱导细胞形成脂肪变性的最佳浓度,然后在正常培养基添加该浓度的油酸培养 72h,用油红 O 染色进行鉴定。实验分组,对照组和模型组,同时设立 24、48、72h 等时相点。

1.2.2 肝细胞内甘油三脂,游离脂肪酸,甘油含量的测定 细胞种植于 6 孔板内,每孔为 1 个样本,每组设 6 个样本,分别培养 24、48、72h 后收集细胞,反复冻融裂解细胞,3 000 r/min 离心 10min,取上清检测甘油三脂,游离脂肪酸,甘油的含量,方法按试剂盒说明进行。

1.2.3 RT - PCR 技术检测肝细胞 AQP9 mRNA 的表达 细胞种植于 50ml 的培养瓶内,分为对照组和模型组,模型组分别于培养 24、48、72h 后收集细胞,模型组分别于培养 24、48、72h 后收集细胞。用冰预冷 PBS 冲洗 3 遍,加入 BIOZOL 试剂 1ml,吹打细胞,按照 BIOZOL 说明书操作,提取细胞总 mRNA,电泳分析其完整性,测纯度,定量,-70℃保存。引物由设计,合成,AQP9:sense:5'-ATGGAGGAATGACCAACAACA-3'anti-sense:5'-AACCCATTGACTTCATTACGG-3' 扩增片段长度 206bp;β-actin sense5'-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3'anti-sense:5'-GCCAGGTTCAGCAGGGGCA-3' 扩增片 650bp,采用 TAKARA 逆转录试剂盒,按操作说明将组织总 RNA 中的 mRNA 逆转录成;扩增条件:94℃预变性 2min 后,94℃变性 30s,57℃退火 30s,72℃延伸 1min,循环 32 次。RT-PCR 产物的鉴定和产量分析:各组的同一目的 mRNA 以相同的条件同时进行逆转录及 PCR 扩增,扩增产物在同一张琼脂糖凝胶上进行电泳,电压 80V,电泳 30min,长波紫外灯下观测并照相,电泳结果用 Quantity One(美国 Bio-Rad 公司)分析系统进行电泳条带光密度分析,计算目的产物与内参产物的光密度值的比值作为相对含量的表达水平。

1.2.4 Western Blotting 技术检测肝细胞 AQP9 蛋白的表达

细胞种植于 100ml 培养瓶中,分别设置对照组和模型组,对照组收集培养 72h 的细胞,模型组分别于培养 24、48、72h 后收集细胞。在培养瓶中,分别加入预冷细胞裂解液 100μl,冰上裂解 30min,4℃ 12 000r/min,取上清并用考马司亮兰法测定蛋白浓度,各组约取 20~25μl,不等细胞蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳采用 12%分离胶,5%浓缩胶,上样后 60V 横压电泳,待溴酚蓝至浓缩胶与分离胶交界处,换 120V 横压电泳,使溴酚蓝全部电泳出分离胶底部,电转法将分离胶上的蛋白转移到 PVDF 膜(100V,1h)。用封闭液封闭 1h 后,一抗 4℃下孵育过夜,二抗 37℃下孵育 60min,用 ECL 发光显影,凝胶成像仪保存图片。

1.3 统计学处理

所有统计数据用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 油红染色显示培养肝细胞脂肪变性

对照组细胞边缘清晰,细胞内围绕橘红色脂滴,油酸诱导浓度为 20μg/ml,处理 72h 的肝细胞油红 O 染色见细胞内有大小不等的橘红色脂滴聚集(图 2~4),表明成功建立了肝细胞脂肪变性模型。

2.2 肝细胞内 TG 含量的比较

实验结果表明:模型组肝细胞中甘油三脂含量较对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$),各时相点比较差异有统计学意义($P<0.05$),提示肝细

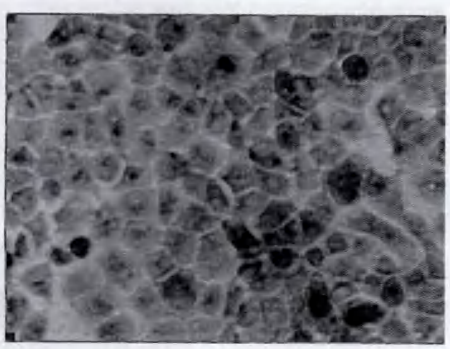


图 1 对照组 油红 O 染色×400

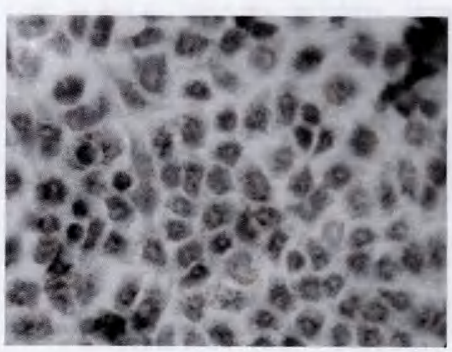


图 2 油红 O 染色 24h×200

维普资讯 http://www.cqvip.com

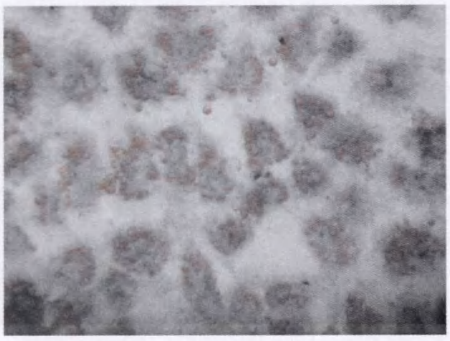


图 3 油红 O 染色 48h×400

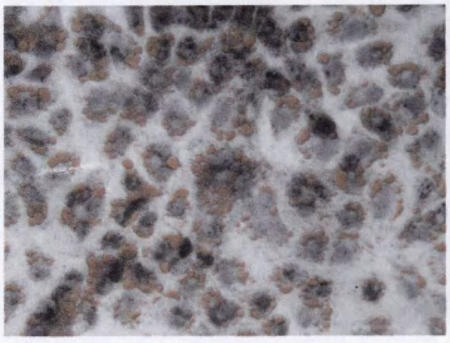


图 4 油红 O 染色 72h×200

胞内 TG 合成随时间延长而增加(见表 1)。

2.3 肝细胞内 FFA 含量的比较

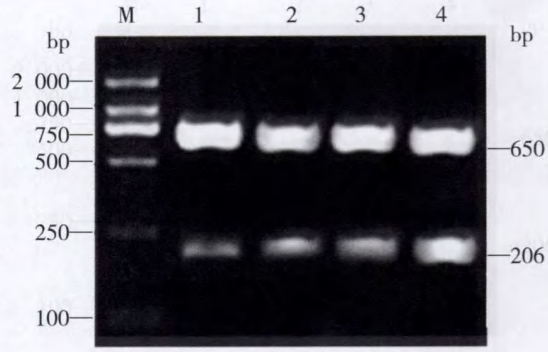
实验结果表明:模型组肝细胞中 FFA 含量较对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$),各时相点比较差异有统计学意义($P<0.05$),提示肝细胞内 FFA 合成随时间延长而增加(见表 1)。

2.4 肝细胞内甘油含量的比较

实验结果表明:模型组肝细胞中甘油含量较对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$),各时相点比较差异有统计学意义($P<0.05$),提示肝细胞内甘油合成随时间延长而增加(见表 1)。

2.5 肝细胞内 AQP9 mRNA 和蛋白的比较

实验结果表明:各组各时相点均有 AQP9 mRNA 的阳性扩增带,扩增长度为 206bp。模型组从 24h 开始 mRNA 转录增多,72h 增加最明显,提示模型组肝细胞 mRNA 表达较对照组增加,差异有统计学意义



M. Maker; 1. 对照组; 2. 24h; 3. 48h; 4. 72h

图 5 RT-PCR 显示 AQP9 mRNA 的表达

($P<0.05$)(见图 5、表 2)。

各组各时相点均有 AQP9 蛋白的阳性扩增带,模型组从 24h 开始表达增强,72h 增加最明显,提示模型组肝细胞 AQP9 蛋白表达较对照组增加,差异

表 1 培养肝细胞内的 TG、FFA、甘油的含量(μmol/L)

组别	TG		FFA		甘油	
	对照组	模型组	对照组	模型组	对照组	模型组
0h	24.98 ± 0.53	--	22.52 ± 0.63	--	12.85 ± 0.25	--
24h	25.11 ± 0.57	42.45 ± 0.64	22.60 ± 0.67	34.72 ± 0.72	12.90 ± 0.26	21.36 ± 0.54
48h	25.79 ± 0.60	57.80 ± 0.91	23.32 ± 0.71	47.48 ± 0.82	13.01 ± 0.28	37.64 ± 0.63
72h	26.69 ± 0.54	97.66 ± 1.23	24.14 ± 0.70	79.24 ± 0.98	13.14 ± 0.31	61.27 ± 0.82

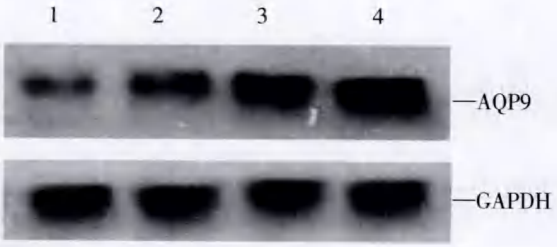
注:与对照组比较,$P<0.01$

表 2 培养肝细胞内 AQP9 mRNA 和蛋白的含量(积分吸光度 A)

组别	对照组	模型组		
		24h	48h	72h
AQP9 mRNA	0.12 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.62 ± 0.02
AQP9 蛋白	0.44 ± 0.03	0.67 ± 0.05	0.93 ± 0.07	1.21 ± 0.09

注:与对照组比较,$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com



1. 对照组；2. 24h；3. 48h；4. 72h

图 6 Western Blotting 显示 AQP9 蛋白的表达

有统计学意义($P<0.05$)(见图 6、表 2)。

3 讨 论

非酒精性脂肪肝自 1958 年首次正式报道至今,已经成为全球范围内普遍存在而日显重要的疾病。随着生活方式及医疗水平的提高,NAFLD 的患病率逐年升高,目前全球的平均发病率大约是 20%左右[2]。NAFLD 的发病机制较为复杂,至今尚未完全明确近年来,Day 等提出的"二次打击"学说已被大多数学者所接受,其中,脂代谢异常和 IR 为 NAFLD 发病机制的第一次打击;细胞因子、氧应激以及脂质过氧化等则是第二次打击[3]。

水通道蛋白是一种对水具有特殊通透性的细胞膜蛋白,广泛分布于机体中于水代谢密切相关的组织和器官。迄今为止,已有 13 种 AQPs(AQP0～12)在哺乳动物中被分离克隆,介导着不同类型细胞的跨膜水转运过程。AQP3、AQP7、AQP9 和 AQP10 作为其亚型,因对水和甘油等小分子溶质均具有通透性被成为水甘油通道[4]。其中,AQP3 作为水甘油通道在哺乳动物皮肤基底层角质细胞表达与皮肤的水甘油转运密切相关[5],而 AQP10 则是小肠上唯一的水甘油通道,其介导了小肠上水甘油的物质转运[6]。目前已在动物肝脏检测到 AQP9、8、0,且我们的前期实验也发现肝脏中唯一的水甘油通道 AQP9 在血窦面肝细胞膜表达非常丰富,提示作为肝脏上摄取甘油的特异性通道,其很可能参与了肝脏与血液间甘油等物质转运。众所周知,肝脏是物质代谢的中枢,而甘油则是联系三大代谢的重要中间产物,甘油的正常转运对肝脏脂质代谢功能的起着重要作用。近期国外对脂肪代谢的最新研究表明,脂肪组织中的水甘油通道 AQP7 与脂肪细胞中脂肪过度积聚有关[7]。H.Kuriyama 等[8]发现,在禁食和进食 2 种不同营养状态下,胰岛素水平的改变引起肝脏 AQP9 mRNA 及脂肪组织 AQP7 mRNA 的表达发生相似的变化,表明了脂肪及肝脏的甘油通道可能在脂肪代谢过程中有协同作用。我们知道 IR 是 NAFLD 重要的发病机制之一,在 IR 的小鼠模型中,AQP9 的表达是上调的[8]。也有报道表明游离脂肪酸能够上调 AQP9 增加对甘油的利用[9]。综上所述,我们有理由推测在肝脏,水甘油通道 AQP9 很可能与肝细胞脂质代谢异常,脂肪堆积有关。

本实验发现用油酸作用于培养的 L-02 肝细胞 24h 后,AQP9 mRNA 表达及蛋白表达增强,随造膜时间的延长,AQP9 mRNA 和蛋白的表达逐渐增加,到 72h 表达最强,与正常对照组比较差异有统计学意义,同时模型组脂肪变细胞增多,游离脂肪酸、甘油、甘油三脂含量都有明显增加,且均在 72h 时增加最明显,油红染色亦显示此时肝细胞脂肪变最重。以上表明随着 AQP9 表达增加,肝细胞内 TG 含量也增加,肝细胞脂肪变性加重。推测是随着 AQP9 表达增加,通过 AQP9 进入肝细胞内的甘油增加,在甘油激酶的作用下转化为 3- 磷酸甘油增多,同时促进 FFA 吸收增加,最终导致甘油三脂的合成增加,故肝细胞脂肪蓄积,发生脂肪变性。这提示 AQP9 可能在肝细胞脂肪变性中扮演了重要角色,AQP9 本身可能参与了肝细胞脂肪变性过程,与肝细胞脂肪变性密切相关,且 AQP9 mRNA 与蛋白表达是同步变化的。

研究结果提示,由 AQP9 介导的脂代谢异常可能是肝细胞脂肪变性的重要机制。进一步探讨 AQP9 在脂质代谢中的具体机制及其调节通路,有助于阐明非酒精性脂肪肝的发病机制,为脂肪肝的治疗和预防提供新的线索。

参 考 文 献

[1] Neuschwander-Tetri BA,Caldwell SH.Nonalcoholic steatohepatitis: summary of and AASLD single topic coference[J]. Hepatology,2003; 37(5):1202-1219.

[2] Lyn Patrick ND.Nonalcoholic fatty liver disease:relationship to insulin sensitivity and Oxidative stress[J]. Alter Med Rev,2002;7(4): 276-291.

[3] Day CP,James OF.Steatohepatitis:a tale of two "hits" [J]? Gastroenterology,1998;114(4):842-845.

[4] Masyuk AI,LaRusso NF.Aquaporin in the hepatobiliary system [J]. Hepatology,2006;43(s2):S75-81.

(下转第 1018 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

或扩大受损的椎管径,为脊髓神经恢复创造条件;(2)是矫正脊柱畸形,恢复压缩椎体高度和脊柱正常序列;(3)是重建脊柱的稳定,恢复患能早期活动,减少并发症,并为全面康复训练创造条件[1]。前路手术在直视下切除致压物达到椎管前方的完全减压,再损伤脊髓神经的可能性小,能为神经功能的恢复创造条件,手术发现多数患者的上位椎间盘与骨折椎体一起破裂并随椎体后壁折块向后移位压迫脊髓神经,术中切除破裂的椎间盘尤为重要。椎体间植骨并内固定可以重建脊柱正常序列, 纠正畸形,达到重建承载大部应力负荷的脊柱前柱,改善术后神经功能至获得更加稳定的脊柱融合。

胸腰椎爆裂骨折为不稳定骨折,以及患者对预期生活质量的期盼,要求医院应采取积极的治疗方法,在患者全身情况许可无手术禁忌时彻底减压重建脊柱正常序列和稳定性,早期离床活动,纠正和防止后期腰痛的发生。伴神经损伤的胸腰椎爆裂骨折采取前路减压重建稳定性已得到认可[2]。对于神经损伤的胸腰椎爆裂骨折通过清除椎管内骨块可以预防迟发性神经损伤和继发性椎管狭窄,手术后可早期活动。

Z-plate 钢板可撑开又可压缩,这样便可进一步恢复椎体高度和矫形并压紧由减压后的椎体髂骨所构建的移植复合体,使内固物和所固定的椎体髂骨及骨碎块牢固和紧密联结一起,进一步促进植骨融合。在扩大了椎管及椎间孔的面积和容积同时加强脊柱重建结构的强度,增加脊柱承载能力并有效维持脊柱正常生理弧度和椎间盘高度,使脊柱即刻获得稳定减少卧床时间,提高手术疗效,方便护理。患者在背心支具或皮腰围保护下较早起坐行走。该内固定物为钛合金材料,生物相容性好,不影响影像学检查和术后评价,该内固定系统属短节段固定,愈合后对脊柱活动度影响小。钢板边缘圆钝,不损伤周围组织,固定后周边死腔小,降低切口感染。

手术体会:①本手术为限期手术,完成辅检力争早作,骨折时间延长增大手术难度。②对节段血管结扎并缝扎,椎体滋养血管骨蜡止血,可明显减少术中出血量。③手指轻揉分开胸膜后间隙大大减少胸膜破损,即使胸膜部分破损,通过术侧肺正压通气下妥善修补,不放胸腔闭式引流,对肺功能影响小,方便围手术期患者的管理,减少肺部并发症。④肋骨修复髂骨明显降低髂嵴凹陷患者不适感。⑤安放螺栓钢板时患者保持侧卧 90° 以防螺栓钢板倾斜,拧入螺栓时应将其基底部凿平否则螺栓可能突入椎间盘或影响钢板与椎体侧面的贴附。

脊柱前路手术损伤大,失血多,需要一定技术条件。本组患者数量偏少,随访时间有限,长期疗效有待临床进一步总结。

参 考 文 献

[1] 涂 强,许建中.胸腰椎爆裂性骨折研究进展[J]. 临床骨科杂志,2003;6(2):184-185.

[2] 康鹏德,裴福兴,龚 全,等.老年骨质疏松性胸腰椎爆裂骨折的前路减压内固定治疗[J]. 中国骨与关节损伤杂志,2005;20(7):437-439.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 937 页)

[5] Ha ra-Chikuma M,Verkman AS.Aquaprin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin[J]. Biol Cell,2005;97(7):479-486.

[6] Ishbashi K,Morinaga T,Kuwahara M,et al. Cloning and identification of a new member of water channel(AQP 10) as an aquglyceroporin[J]. Biochim Biophys Acta,2002;1576(3):335-340.

[7] Hara-Chikuma M,Sohara E,Rai T,et al. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7 deficient mice:adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation[J]. J. Biol. Chem,2005;280(16):15493-15496.

[8] Hiroshi K,Lichiro S,Ken K,et al.Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glyce-rol channels,aquaporin adipose and aquaporin 9[J]. Diabetes,2002;51(10):2915-2921.

[9] Lee DH,Park DB,Lee YK,et al.The effects of thiazolidinedione treatment on the reaulations of aquaglycero-porins and alycerol kinase in OLETF rats[J]. Metabolism,2005;54(10):1282-1289.

(责任编辑:冉明会)