脂糖代谢研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001350

CD36在棕榈酸诱导的HepG2细胞炎症反应中的作用

韦 莉,杨 萍,陈压西,阮雄中,赵 蕾
(重庆医科大学脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室、脂质研究中心,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:探讨白细胞分化抗原36(cluster of differentiation 36,CD36)是否参与了棕榈酸诱导的HepG2细胞炎症反应。**方法**:给予HepG2细胞不同浓度的棕榈酸(0.00、0.08、0.16、0.32、0.64 mmol/L)处理24 h,使用实时荧光定量PCR方法检测CD36和炎症因子的mRNA表达水平,Western blot检测CD36蛋白表达水平。然后利用小RNA干扰技术,构建低表达CD36的HepG2细胞(CD36RNAi HepG2)和对照细胞(NCi HepG2)模型。通过实时荧光定量PCR检测棕榈酸负荷的NCi HepG2和CD36RNAi HepG2中炎症因子的表达情况,荧光探针DCFH DA法检测细胞内活性氧含量,Western blot检测细胞核内的核转录因子-κB的蛋白表达水平。**结果**:棕榈酸能够上调HepG2细胞中CD36及炎症因子——肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)和白介素-6(interleukin-6,IL-6)的表达。棕榈酸浓度分别为0.00、0.08、0.16、0.32及0.64 mmol/L时,CD36的mRNA表达相对值分别为(1.001 ± 0.078)、(1.510 ± 0.341)(q=4.763,P=0.007)、(1.780 ± 0.070)(q=7.301,P=0.000)、(2.510 ± 0.141)(q=14.16,P=0.000)及(2.103 ± 0.150)(q=10.34,P=0.000)。TNF-α的mRNA表达相对值分别为(1.000 ± 0.098)、(1.571 ± 0.177)(q=1.598,P=0.141)、(1.725 ± 0.274)(q=2.016,P=0.071)、(2.113 ± 0.341)(q=3.102,P=0.011)及(5.282 ± 0.855)(q=11.940,P=0.000)。IL-6的mRNA表达相对值分别为(0.999 ± 0.047)、(1.791 ± 0.596)(q=1.486,P=0.168)、(2.119 ± 0.294)(q=2.107,P=0.061)、(2.808 ± 0.147)(q=3.398,P=0.007)及(6.916 ± 1.284)(q=11.130,P=0.000)。抑制HepG2细胞中CD36表达,可以显著降低棕榈酸所诱导的细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)增加和核转录因子-κB在核内分布的增强,降低HepG2细胞内炎症因子表达水平。NCi HepG2、NCi HepG2+棕榈酸组及CD36 RNAi HepG2+棕榈酸组的ROS相对含量分别为(1.000 ± 0.113)、(1.968 ± 0.293)(与NCi组相比,t=6.888,P=0.000)、(0.519 ± 0.129)(与NCi+棕榈酸组相比,t=10.106,P=0.000)。NCi HepG2、NCi HepG2+棕榈酸组及CD36 RNAi HepG2+棕榈酸组的核转录因子-κB的蛋白相对值分别为(0.997 ± 0.093)、(2.443 ± 0.085)(与NC相比,t=19.892,P=0.000)、(1.607 ± 0.107)(与NCi+棕榈酸组相比,t=10.607,P=0.000)。抑制HepG2细胞中CD36表达后,棕榈酸浓度分别为0.08、0.16、0.32及0.64 mmol/L时,NCi HepG2及CD36 RNAi HepG2组的TNF-α的表达水平分别为(1.004 ± 0.113)和(0.185 ± 0.071)(t=10.716,P=0.000);(1.009 ± 0.160)和(0.221 ± 0.028)(t=8.389,P=0.001);(1.008 ± 0.163)和(0.173 ± 0.011)(t=8.780,P=0.001);(1.009 ± 0.163)和(0.147 ± 0.013)(t=9.013,P=0.000)。抑制HepG2细胞中CD36表达后,棕榈酸浓度分别为0.08、0.16、0.32及0.64 mmol/L时,NCi HepG2及CD36 RNAi HepG2组的IL-6的表达水平分别为(1.044 ± 0.347)和(0.207 ± 0.033)(t=4.121,P=0.015);(1.006 ± 0.139)和(0.198 ± 0.007)(t=10.110,P=0.001);(1.001 ± 0.052)和(0.125 ± 0.006)(t=28.443,P=0.000);(1.012 ± 0.188)和(0.114 ± 0.015)(t=8.367,P=0.001)。**结论**:棕榈酸能够上调HepG2细胞CD36表达,促进HepG2炎症反应;抑制CD36可能通过减少氧化应激、抑制核转录因子-κB信号通路,进而改善棕榈酸诱导的HepG2细胞炎症。

【关键词】CD36;棕榈酸;HepG2;炎症
【中图分类号】R575.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-02-27

作者介绍:韦 莉,Email:weili06@126.com,
研究方向:脂质代谢与器官损害。
通信作者:赵 蕾,Email:lalein@hotmail.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:316400013)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170626.1148.022.html (2017-06-26)

[20] Pearce SG,Thosani NC,Pan JJ. Noninvasive biomarkers for the diagnosis of steatohepatitis and advanced fibrosis in NAFLD[J]. Biomark Res,2013,1(1):7.
[21] Wang S,Zhang C,Zhang G,et al. Association between white blood cell count and non-alcoholic fatty liver disease in urban Han Chinese: a prospective cohort study[J]. BMJ Open,2016,6(6):e010342.
[22] Miziorko HM. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis[J]. Arch Biochem Biophy,2011,505(2):131-143.
[23] Goldstein JL,Rawson RB,Brown MS. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis[J]. Arch Biochem Biophys,2002,397(2):139-148.
[24] Ma KL,Ruan XZ,Powis SH,et al. Anti-atherosclerotic effects of sirolimus on human vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2007,292(6):H2721-2728.
[25] Zhang X,Song Y,Feng M,et al. Thyroid-stimulating hormone decreases HMG-CoA reductase phosphorylation via AMP-activated protein kinase in the liver[J]. J Lipid Res,2015,56(5):963-971.

(责任编辑:张辉洁)

Role of CD36 in palmitate acid-induced inflammation of HepG2 cells

Wei Li, Yang Ping, Chen Yaxi, RuanXiongzhong, Zhao Lei

(*Key Laboratory of Metabolism on Lipid and Glucose, Center for Lipid Research, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate whether cluster of differentiation 36(CD36) is involved in the palmitic acid induced inflammation of HepG2 cells. ***Methods***: HepG2 cells were treated with different concentrations of palmitic acid(0.00, 0.08, 0.16, 0.32 and 0.64 mmol/L) for 24 h. Protein and mRNA levels of CD36 were detected respectively by Western blot and real-time PCR. The mRNA expression of inflammatory cytokines was detected by real-time PCR. Small RNA interference was used to inhibit CD36 expression in HepG2 cells(CD36RNAi HepG2). Intracellular reactive oxygen species(ROS) was detected by fluorescent probe DCFH DA(2',7'-dichlorofluorescin diacetate). P65-nuclear transcription factor κB protein expression in nuclear was detected by Western blot. ***Results***: Palmitic acids upregulated CD36, tumor necrosis factor-alpha(TNF-α) and interleukin-6(IL-6) expression in HepG2 cells. When HepG2 cells were treated with different concentrations of palmitic acid(0.00, 0.08, 0.16, 0.32 and 0.64 mmol/L), CD36 mRNA levels in HepG2 cells were (1.001 ± 0.078), (1.223 ± 0.294)(q=4.763, P=0.007), (1.510 ± 0.341)(q=7.301, P=0.000), (1.780 ± 0.070)(q=14.16, P=0.000) and (2.510 ± 0.141)(q=10.34, P=0.000). TNF-α mRNA levels were (1.000 ± 0.098), (1.571 ± 0.177)(q=1.598, P=0.141), (1.725 ± 0.274)(q=2.016, P=0.071), (2.113 ± 0.341)(q=3.102, P=0.011), (5.282 ± 0.855)(q=11.940, P=0.000). IL-6 mRNA levels were (0.999 ± 0.047); (1.791 ± 0.596)(q=1.486, P=0.168); (2.119 ± 0.294)(q=2.107, P=0.061); (2.808 ± 0.147)(q=3.398, P=0.007); (6.916 ± 1.284)(q=11.130, P=0.000). When CD36 was inhibited, intracellular ROS levels and P65-nuclear transcription factor κB expressions in nuclear were significantly reduced, compared with those of negative control HepG2 cells(NCi HepG2). The levels of inflammatory cytokines in CD36 RNAi HepG2 cells were also significantly lower than those in NCi HepG2 cells. In NCi HepG2 group, NCi HepG2+palmitic acid group and CD36 RNAi HepG2+palmitic acid group, the ROS levels were (1.000 ± 0.113), (1.968 ± 0.293)(compared with those of NCi HepG2 cells, t=6.888, P=0.000), (0.519 ± 0.129)(compared with those of NCi+ palmitic acid HepG2 cells, t=10.106, P=0.000). In NCi HepG2 group, NCi HepG2+palmitic acid group and CD36 RNAi HepG2+palmitic acid group, the P65-nuclear transcription factor κB levels were (0.997 ± 0.093), (0.443 ± 0.085)(compared with those of NCi HepG2 cells, t=19.892, P=0.000), (1.607 ± 0.107)(compared with those of NCi+ palmitic acid HepG2 cells, t=10.607, P=0.000). When NCi and CD36 RNAi HepG2 cells were treated with different concentrations of palmitic acid (0.08, 0.16, 0.32 and 0.64 mmol/L), TNF-α mRNA levels in NCi and CD36RNAi HepG2 cells were (1.004 ± 0.113) and (0.185 ± 0.071)(t=10.716, P=0.000), (1.009 ± 0.160) and (0.221 ± 0.028)(t=8.389, P=0.001), (1.008 ± 0.163) and (0.173 ± 0.011)(t=8.780, P=0.001); (1.009 ± 0.163) and (0.147 ± 0.013)(t=9.013, P=0.001). In NCi and CD36 RNAi HepG2 cells, which were treated with different concentrations of palmitic acid(0.08, 0.16, 0.32 and 0.64 mmol/L), IL-6 mRNA levels were (1.044 ± 0.347) and (0.207 ± 0.033)(t=4.121, P=0.015); (1.006 ± 0.139) and (0.198 ± 0.007)(t=10.110, P=0.001); (1.001 ± 0.052) and (0.125 ± 0.006)(t=28.443, P=0.000); (1.012 ± 0.188) and (0.114 ± 0.015)(t=8.367, P=0.001). ***Conclusion***: Palmitate increases CD36 expression and induces inflammation in HepG2 cells. Inhibition of CD36 reduces oxidative stress and prevents NF-κB signaling pathway activation, resulting in attenuation of inflammation stress in the presence of palmitate in HepG2 cells.

【Key word】CD36; palmitate acid; HepG2 cells; inflammation

随着生活水平的提高，非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发生率日益上升，患病率达 15%左右，在我国已成为仅次于慢性病毒性肝炎的第二大肝病[1]。NAFLD 包括脂肪性肝炎(steatohepatitis, SS)及非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)。与 SS 不同，NASH 是一种以肝细胞脂肪变性、气球样变、弥散性肝小叶轻度炎症和(或)肝中央静脉、肝窦周围胶原沉积等为病理特征的慢性肝脏炎性疾病[2]，肝脏炎症是 NASH 的标志性事件，也是导致 NASH 的关键因素之一[3]。目前普遍认为 NASH 病人产生肝脏炎症的原因与高游离脂肪酸血症(free fatty acid, FFA)密切相关：NASH 病人血清中 FFA 含量显著增加，可以促进肝细胞中细胞因子的生成，从而导致炎症的发生[4]。

脂肪酸转位酶(fat acid translocase, FAT)又名白细胞分化抗原 36(cluster of differentiation 36, CD36)，是一种广泛存在于各种组织细胞的膜糖蛋白，参与长链脂肪酸的跨膜转运，并可结合未经修饰的脂蛋白，如极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白及高密度脂蛋白，在肝脏脂肪酸转运过程中起重要作用[5]。最近研究提示：CD36 能与 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)形成多聚体，并诱导 TLR4/6 磷酸化，激活巨噬细胞和小胶质细胞炎症反应[6]。但是 CD36 在肝细胞炎症中的作用，目前尚未见相关报道。

棕榈酸是一种长链饱和脂肪酸，也是游离脂肪

酸中含量最高的组成成分，并且具有较强的致炎能力，常被用于诱导细胞炎症[7]。因此本研究拟采用人肝癌细胞 HepG2 细胞为细胞模型，观察不同浓度棕榈酸对 HepG2 细胞 CD36 表达和炎症的影响；并且构建低表达 CD36 的 HepG2 细胞，进一步确认 CD36 在棕榈酸诱导的 HepG2 细胞炎症中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株

HepG2 购自美国模式培养物集存库（American Type Culture Collection，ATCC）。

1.2 主要试剂

棕榈酸及牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）购于美国 Sigma 公司；胎牛血清及 DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司；Trizol RNA 抽提试剂、SYBR Green PCR Master Mix 及逆转录试剂盒购自日本 Takara 公司；FAT/CD36 兔多克隆抗体 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司；硝酸纤维膜及电化学发光法显色剂购自瑞典 Pharmacia&Upjohn 公司；β-肌动蛋白（β-actin）鼠多克隆抗体 IgG、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗购于中国北京中杉金桥公司。细胞总蛋白质提取试剂盒及细胞核蛋白质提取试剂盒购自中国南京凯基生物公司，过氧化氢检测试剂盒购自碧云天生物技术公司。转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 购自 Roche 公司。PCR 引物采用 TaqMan Primer Express 软件设计，由北京六合华大基因科技公司合成。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 细胞用含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养，1~2 d 换液，3~4 d 传代。

1.3.2 实验分组 在细胞生长至汇合度达 90%时，将细胞培养基更换为含 0.2 % BSA 的 DMEM 培养液进行无血清培养，24 h 后给予不同浓度棕榈酸[7]（0.00、0.08、0.16、0.32、0.64 mmol/L）处理细胞 24 h（棕榈酸的配制：用 PBS 作为溶剂配制 10%BSA 溶液，然后将棕榈酸钠盐溶解于 10% BSA 溶液，配制成相应浓度的棕榈酸），检测 CD36 以及炎症因子的 mRNA 表达情况，及 CD36 的蛋白表达水平。构建低表达 CD36 的 HepG2 细胞（CD36RNAi HepG2）和对照细胞（NCi HepG2）模型，检测 0.32 mmol/L 棕榈酸负荷的 NCi HepG2 和CD36RNAi HepG2 中炎症因子的 mRNA 水平、细胞内活性氧含量及细胞核转录因子-κB（nuclear factor-kappaB，NF-κB）p65 的蛋白表达水平。

1.3.3 小干扰 RNA（small interference RNA，siRNA）的合成及转染 由上海吉玛公司设计和合成针对人 CD36 基因的 siRNA（CD36-siRNA，正义链：5'-GGCUGUGUUUGGAGGUAUUCUTT-3'，反义链：5'-AGAAUACCUCCAAACACAGCCTT-3'）和阴性对照 siRNA（NC-siRNA，正义链：5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'，反义链：5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'）。

将 HepG2 细胞种于 24 孔板，等细胞融合度约 80%时，将 CD36-siRNA 及 NC-siRNA 分别转染到 HepG2 细胞：50 μL MEM 培养基加入 0.5 μg DNA，短暂轻柔漩涡，加入 1.5 μL X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent，短暂轻柔漩涡，室温孵育 15~30 min（15 ℃~25 ℃），将转染复合物逐滴加入到细胞中，7~8 h 在显微镜下观察转染效率。

1.3.4 qRT-PCR 检测 mRNA 的表达 使用 RNAiso Plus 提取细胞总 RNA，然后用 PrimeScript® RT reagent Kit 将总RNA 反转录成 cDNA，反转录条件是：37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s，保存于-20 ℃。再以 2 μL cDNA 作为模板，β-actin 作为内参，qRT-PCR 检测靶基因的 mRNA 表达。PowerSYBR Green PCR Master Mix 试剂盒进行扩增反应条件：50 ℃ 2 min，95 ℃ 5 min 预变性；95 ℃ 20 s，55 ℃ 20 s，40 个循环。反应体系为 25 μL，用 ΔΔCt 计算基因的表达水平[8]，公示如下：ΔCt=目的基因 Ct 值-β-actin 基因 Ct 值，ΔΔCt=实验组 ΔCt -对照组 ΔCt，实验组相对于对照组基因表达水平的倍数=$2^{-\Delta\Delta Ct}$。设计的引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab.1 Primers for RT- PCR

基因名称	引物序列
CD36	正义链：5'-ACGGGCTGAGCAAGGTTGA-3'
	反义链：5'-TTCGTTGGGTGGGTAGATGG-3'
IL-6	正义链：5'-AGTCCTGATCCAGTTCCTGC-3'
	反义链：5'-AAGCTGCGCAGAATGAGATG-3'
TNF-α	正义链：5'-AGGACCAGCTAAGAGGGAGA-3'
	反义链：5'-CCCGGATCATGCTTTCAGTG-3'
β-actin	正义链：5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'
	反义链：5'-GCCGATCCACACGGAGTA-3'

1.3.5 Western blot 分别按照全蛋白提取试剂盒及核蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白及核蛋白，用 BCA 法测定蛋白含量并进行标化，蛋白上样量为 80~100 μg。β-actin 作为细胞总蛋白的内参蛋白，Laminb1 作为细胞核蛋白的内参蛋白。样品加变性缓冲液在沸水中煮 5 min，SDS PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜，5%脱脂牛奶室温封闭 2 h，一抗（1:2 000，β-actin/ Laminb1 为 1:4 000）4 ℃孵育过夜，TBST 洗 3 次，每次 10 min，二抗 37 ℃孵育 1 h，TBST 漂洗 3 次，每次 10 min，化学发光试剂盒进行显色，ImageJ 定量。

1.3.6 ROS 含量测定 使用 10μmol/L 的 2',7'-二氯荧光素二醋酸盐荧光探针（2',7'-dichlorofluorescin diacetate，DCFH-DA）孵育细胞 40 min，37.0 ℃。然后用 ROS 测定试剂盒检测细胞相对荧光强度（relative fluorescence intensity，RFU），激发波长 488 nm，发射波长 520 nm，使用试验组的荧光强度测定值与对照组的比值作为活性氧（reactive oxygen species，ROS）的相对含量测定值。

1.4 统计学分析

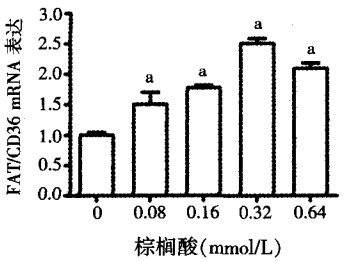
所有数据采用 GraphPad Prism 5 统计分析软件进行处理，所得到的数值均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多样本均

数比较用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t 法，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 棕榈酸促进 HepG2 细胞 CD36 表达

qRT-PCR 结果显示，随着负荷的棕榈酸浓度增加，HepG2 细胞中 CD36 表达也随之增加（方差分析 F=29.015，P=0.000）。棕榈酸 0.00、0.08、0.16、0.32 及 0.64 mmol/L 组的 CD36 的mRNA 表达相对值分别为（1.001 ± 0.078），（1.510 ± 0.341）（q=4.763，P=0.007），（1.780 ± 0.070）（q=7.301，P=0.000），（2.510 ± 0.141）（q=14.16，P=0.000）及 2.103 ± 0.150（q=10.34，P=0.000）。从棕榈酸 0.08 mmol/L 开始，均能上调HepG2 细胞中 CD36 表达，差异有统计学意义，如图 1 所示。

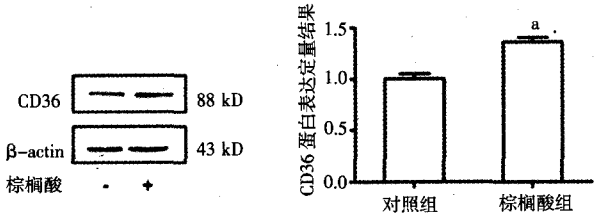


a：与 0 mmol/L 棕榈酸相比，P<0.01

图 1 荧光定量 PCR 检测棕榈酸对 HepG2 细胞 CD36 的 mRNA 表达影响（n=3）

Fig.1 Real-time PCR detection of palmitic effect on CD36 mRNA expression of HepG2 cells（n=3）

进一步使用 Western blot 进行检测发现，对照组及棕榈酸组的 CD36 蛋白表达定量值分别为（1.003 ± 0.078）及（1.360 ± 0.079）。在棕榈酸刺激下，HepG2 细胞中 CD36 蛋白的表达水平明显增加，与对照组相比，差异有统计学意义（t=5.563，P=0.005），如图 2 所示。



a：与对照组相比，P<0.01

A. Western blot 检测 CD36 蛋白表达　　B. CD36 蛋白表达相对值

图 2 Western blot 检测棕榈酸对 HepG2 细胞 CD36 蛋白表达的影响（n=3）

Fig.2 Western blot detection of palmitic effect on CD36 protein expression of HepG2 cells（n=3）

2.2 棕榈酸促进 HepG2 细胞炎症因子的表达

RT-PCR 结果显示，随着负荷的棕榈酸浓度增加，HepG2 细胞中炎症因子 TNF-α（方差分析 F=44.566，P=0.000）及 IL-6（方差分析 F=38.196，P=0.000）的 mRNA 表达也随之增加。从 0.32 mmol/L 棕榈酸浓度开始，TNF-α 及 IL-6 的 mRNA 增加有统计学意义，见表 2。

表 2 RT-PCR 检测棕榈酸对 HepG2 的 TNF-α 和 IL-6 表达的影响

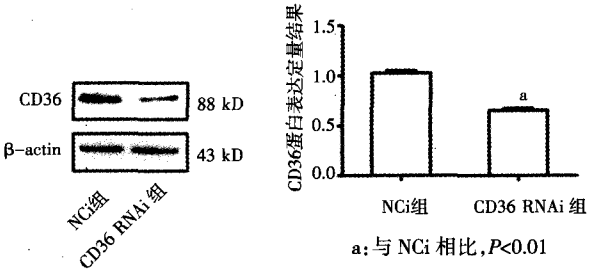
Tab.2 RT-PCR detection of palmitic effects on TNF-α and IL-6 of HepG2 cells

棕榈酸浓度（mmol/L）	TNF-α	IL-6
0.00	1.000 ± 0.098	0.999 ± 0.047
0.08	1.571 ± 0.177[a]	1.791 ± 0.596[e]
0.16	1.725 ± 0.274[b]	2.119 ± 0.294[f]
0.32	2.113 ± 0.341[c]	2.808 ± 0.147[g]
0.64	5.282 ± 0.855[d]	6.916 ± 1.284[h]
F 值	38.996	38.196
P 值	0.000	0.000

注：TFN-α 两两比较结果，与 0.00 μmol/L 相比，a：q=1.598，P=0.141；b：q=2.016，P=0.071；c：q=3.102，P=0.011；d：q=11.940，P=0.000。IL-6 两两比较结果，与对照组比较，e：q=1.486，P=0.168；f：q=2.107，P=0.061；g：q=3.398，P=0.007；h：q=11.130，P=0.000

2.3 构建低表达 CD36 的 HepG2 细胞模型

将 CD36-siRNA 瞬时转入 HepG2 细胞，成功构建了低表达 CD36 的 HepG2 细胞（CD36 RNAi 组）和阴性对照HepG2 细胞（NCi HepG2）。Western blot 进行检测发现，NCi 组及 CD36 RNAi 组的 CD36 蛋白表达定量值分别为（1.030 ± 0.040）及（0.650 ± 0.035）。与 NCi 组相比，CD36 RNAi 组的 HepG2 细胞中 CD36 蛋白的表达量降低 36.89%，差异有统计学意义（t=12.257，P=0.000），如图 3 所示，表明低表达CD36 的HepG2 细胞系建立成功。



a：与 NCi 相比，P<0.01

A. Western blot 检测 CD36 蛋白表达　　B. CD36 蛋白表达相对值

图 3 Western blot 检测 CD36 干扰的 HepG2 细胞中 CD36 蛋白表达情况（n=3）

Fig.3 Western blot detection of CD36 protein expression in CD36-deficient HepG2 cells（n=3）

2.4 抑制 CD36 表达能够降低 HepG2 细胞炎症因子的生成

RT-PCR 检测结果显示，在不同浓度的棕榈酸负荷下，CD36 RNAi 组的中 TNF-α（方差分析 F=44.566，P=0.000）及 IL-6（方差分析 F=38.196，P=0.000）的表达均降低，见表 3 及表 4。

表 3 RT-PCR 检测 CD36 抑制的 HepG2 中 TNF-α 的生成水平（mmol/L）

Tab.3 RT-PCR detection of TNF-α levels in CD36-deficient HepG2 cells（mmol/L）

组别	0.08	0.16	0.32	0.64
对照组	1.004 ± 0.113	1.009 ± 0.160	1.008 ± 0.163	1.009 ± 0.163
CD36 RNAi 组	0.185 ± 0.071	0.221 ± 0.028	0.173 ± 0.011	0.147 ± 0.013
t 值	10.716	8.389	8.780	9.013
P 值	0.000	0.001	0.001	0.001

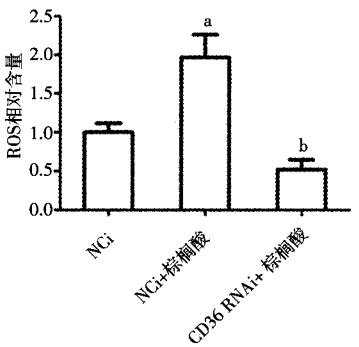
表 4 RT-PCR 检测 CD36 抑制的 HepG2 中 IL-6 的生成水平（mmol/L）

Tab.4 RT-PCR detection of IL-6 levels in CD36-deficient HepG2 cells（mmol/L）

组别	0.08	0.16	0.32	0.64
对照组	1.044 ± 0.347	1.006 ± 0.139	1.001 ± 0.052	1.012 ± 0.188
CD36 RNAi 组	0.207 ± 0.033	0.198 ± 0.007	0.125 ± 0.006	0.114 ± 0.015
t 值	4.121	10.110	28.443	8.367
P 值	0.015	0.001	0.001	0.001

2.5 抑制 CD36 表达能够降低 HepG2 细胞中 ROS 的含量

荧光探针检测结果显示，NCi 组、NCi+棕榈酸组及 CD36 RNAi+棕榈酸组的 ROS 相对含量分别为（1.000 ± 0.113），（1.968 ± 0.293）及（0.519 ± 0.129）。棕榈酸刺激的 HepaG2 细胞中，ROS 含量增加，与 NCi 组相比，差异有统计学意义（t=6.888，P=0.000）。而同样在棕榈酸刺激下，低表达 CD36 的 HepG2 细胞中 ROS 的含量减弱，与 NCi+棕榈酸组相比，差异有统计学意义（t=10.106，P=0.000），如图 4 所示。



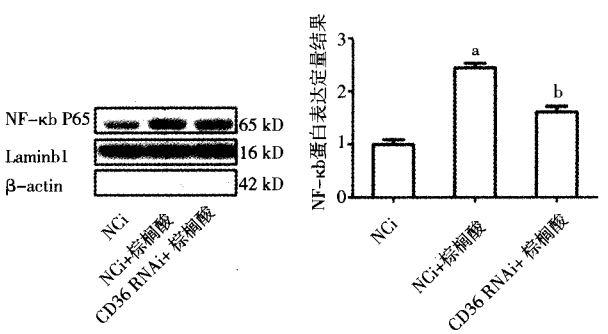
a：与 NCi 相比，P<0.01；b：与对照 + 棕榈酸组相比，P<0.01

图 4 荧光探针检测 CD36 抑制的 HepG2 细胞中 ROS 的产生（n=5）

Fig.4 Dichlorofluorescindiacetate detection of ROS levels in CD36-deficient HepG2 cells（n=5）

2.6 抑制 CD36 表达能够降低 HepG2 细胞核中 NF-κB 的含量

Western blot 检测结果显示，NCi 组、NCi+棕榈酸组及 CD36 RNAi+棕榈酸组的 NF-κB 蛋白相对含量分别为：（0.997 ± 0.093），（2.443 ± 0.085）及（1.607 ± 0.107）。棕榈酸刺激的HepaG2 细胞中，NF-κB 蛋白含量增加，与 NCi 组差异有统计学意义（t=19.892，P=0.000）。而同样在棕榈酸刺激下，低表达 CD36 的HepG2 细胞中 NF-κB 的含量减弱，与 NCi+棕榈酸组相比，差异有统计学意义（t=10.607，P=0.000），如图 5 所示。



a：与 NCi 相比，P<0.01；b：与对照 + 棕榈酸组相比，P<0.01

A. Western blot 检测 NF-κb P65 蛋白表达　　B. NF-κb P65 蛋白表达相对值

图 5 Western blot 检测 CD36 抑制的 HepG2 细胞 NF-κB 蛋白的生成（n=3）

Fig.5 Western blot detection of NF-κB protein expression in CD36-deficient HepG2 cells（n=3）

3 讨 论

近年来代谢性综合征（metabolic syndrome，MS）的发病率逐年升高，已经成为严重影响我国人民健康的一类多发病及常见病[9]。NAFLD 被认为是 MS 的肝脏表现，其中单纯性脂肪肝预后良好，NASH 预后则较差，约 1/3 的 NASH 病人可进展为晚期肝纤维化和肝硬化，并可能导致肝功能衰竭和肝细胞肝癌[10]，因此探讨 NASH 的发病机制对防治 NAFLD及相关终末期肝病具有尤为重要的意义。

Hotamisligil[11]于 2006 年提出了“代谢性炎症”的概念，主要指由营养物和代谢产物所触发、多种细胞和细胞因子共同参与的全身性、系统性的低峰度炎症。目前公认，在代谢性炎症是 MS 的核心环节，有大量炎性分子的参与，比如 C 反应蛋白、白介素、肿瘤坏死因子等，广泛参与了 NAFLD、糖尿病和

动脉粥样硬化等疾病发生发展的全过程[12]。

在本研究中观察了棕榈酸对肝细胞炎症的影响，发现棕榈酸能够显著上调 HepG2 细胞炎症因子、ROS 及核内 NF-κB 的含量。既往研究表明：饱和脂肪酸能活化 NADPH 氧化酶、促进 ROS 生成增加，从而引发氧化应激。氧化应激在代谢性炎症的产生和发展中起到了重要的作用[13]。ROS 可以通过活化丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）激活 NF-κB 通路。ROS 还可通过增强对 NF-κB 抑制蛋自的解离，促进 NF-κB 与 DNA 结合的活性，或者通过共价修饰 NF-κB 中一些氨基酸残基，从而改变 NF-κB 活性[14]。进一步，NF-κB 作为机体重要的炎症反应的转录调节因子，能够启动其下游多种炎症因子如 TNF-α、IL-6、IL-12 转录，参与炎症反应[15]。因此，本研究提示：高脂血症（尤其是高棕榈酸血症）可以刺激肝细胞产生炎症反应，不仅导致肝脏局部炎症，促进 NASH；还可以释放入血，参与全身性代谢性炎症和 MS 的发生。

膜糖蛋白 CD36 能够识别众多致炎性的内源性代谢产物，如氧化低密度脂蛋白（oxidized lowdensity lipoprotein，ox-LDL）、淀粉样蛋白、饱和脂肪酸等[16]，被认为是调节机体代谢性炎症的重要分子。肝细胞特异性 CD36 缺失可以保护小鼠发生高脂所诱导的肝脏脂肪变性。在本研究也发现：抑制CD36 表达能够改善棕榈酸所诱导的 HepG2 细胞炎症反应。既往研究已经证实：CD36 与细胞间活性氧的产生有着密切的关系[17-18]。CD36 位于线粒体外膜，是长链脂肪酰辅酶 A 的上游，可以调节线粒体脂肪酸的转运和 β 氧化[19]。CD36 还可通过细胞内 MAPK等信号转导通路来调节活性氧的形成[20]。因此我们进一步检测了抑制 CD36 表达对细胞内活性氧和 NF-κB 信号通路的影响。结果表明：抑制 CD36 表达能够降低棕榈酸诱导的 HepG2 细胞内 ROS 含量，进而抑制 NF-κB 信号通路活化。

综上所述，本研究结果表明，棕榈酸能够上调 HepG2 细胞 CD36 表达，促进 HepG2 炎症反应。抑制 CD36 可能通过减少氧化应激、抑制 NF-κB 信号通路，进而改善棕榈酸诱导的 HepG2 细胞炎症。本文为深入研究 CD36 在肝脏代谢性炎症中的作用提供了初步的实验证据，同时提示 CD36 可能是防治 NASH 的潜在靶点。

参 考 文 献

[1] Dyson JK，Anstee QM，McPherson S. Non-alcoholic fatty liver diseasea practical approach totreatment[J]. Frontline Gastroenterol，2014，5(4)：277-286.

[2] Björnsson E，Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. Scand J Gastroenterol，2007，42：1023-1030.

[3] Petta S，Valenti L，Bugianesi E，et al. A "systems medicine" approach to the study of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Dig Liver Dis，2016，48(3)：333-342.

[4] Ioannou GN. The role of cholesterol in the pathogenesis of NASH [J].Trends Endocrinol Metab，2016，27(2)：84-95.

[5] Pepino MY，Kuda O，Samovski D，et al. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism[J]. Annu Rev Nutr，2014，34：281-303.

[6] Stewart CR，Stuart LM，Wilkinson K，et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Tolllike receptor 4 and 6 heterodimer[J]. Nat Immunol，2010，11(2)：155-161.

[7] Miura K，Yang L，vanRooijen N，et al. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice[J]. Hepatology，2013，57(2)：577-589.

[8] 仝 莎，陈 曜，赵 蕾，等. TNF-α 对 HepG2 细胞 LXRα 介导的胆固醇外流的影响及其分子机制[J]. 中国病理生理杂志，2013，29(2)：193-199.

[9] Sarrafzadegan N，Khosravi-Boroujeni H，Lotfizadeh M. Magnesium status and the metabolic syndrome：asystematic review and meta-analysis [J]. Nutrition，2016，32(4)：409-417.

[10] Kashi MR，Torres DM，Harrison SA. Current and emerging therapies in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Semin Liver Dis，2008，28(4)：396-406.

[11] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders[J]. Nature，2006，444(7121)：860-867.

[12] Kanwar P，Kowdley KV. The metabolic syndrome and its influence on nonalcoholic steatohepatitis[J]. Clin Liver Dis，2016，20(2)：225-243.

[13] Cruz JC，Flôr AF，França-Silva MS，et al. Reactive oxygen species in the paraventricular nucleus of the hypothalamus alter sympathetic activity during metabolic syndrome[J]. Front Physiol，2015，23(6)：384-389.

[14] Schuliga M. NF-kappaB signaling in chronic inflammatory airway disease[J]. Biomolecules，2015，5(3)：1266-1283.

[15] D' Ignazio L，Bandarra D，Rocha S. NF-κB and HIF crosstalk in *immune responses*[J]. *2016，283(3)：413-424.*

[16] Stewart CR，StuartLM，WilkinsonK，et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Tolllike receptor 4 and 6 heterodimer[J]. Nat Immunol，2010，11(2)：155-161.

[17] Hua W，Huang HZ，Tan LT，et al. CD36 mediated fatty acid-induced podocyte apoptosis via oxidative stress[J]. PLoS One，2015，10(5)：e0127507.

[18] Kotla S，Singh NK，Rao GN. ROS via BTK-p300-STAT1-PPARγ signaling activation mediates cholesterol crystals-induced CD36 expression and foam cell formation[J]. Redox Biology，2017，11：350-364.

[19] Smith BK，Jain SS，RimbaudS，et al. FAT/CD36 is located on the outer mitochondrial membrane，upstream of long-chain acyl-CoA synthetase，and regulates palmitate oxidation[J]. Biochem J，2011，437(1)：125-134.

[20] Li W，Febbraio M，Reddy SP，et al. CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs[J]. J Clin Invest，2010，120 (11)：3996-4006.

（责任编辑：张辉洁）