脂糖代谢研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001321

白细胞介素-1β 激活 HMGCoA 还原酶促进 HepG2 细胞脂质积聚

邹 阳,赵 蕾,杨 萍,韦 莉,阮雄中,陈压西
(重庆医科大学脂糖代谢重庆市重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:探讨白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)对 HepG2 细胞羟甲基戊二酸单酰辅酶 A(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A,HMGCoA)还原酶及脂质积聚的影响。**方法**:200 μg/mL 低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL)负荷下的 HepG2 细胞分别给予 0 ng/mL(对照组)、20 ng/mL(炎症组)IL-1β 处理 24 h。荧光定量 PCR(RT-PCR)、Western blot 分别测定 HMGCoA 还原酶 mRNA 及蛋白表达水平;薄层层析法检测 HMGCoA 还原酶活性;同位素标记法评估胆固醇合成情况;油红 O 染色及酶法定量检测细胞内脂质。**结果**:IL-1β 处理下,HepG2 细胞 HMGCoA 还原酶 mRNA 表达水平为对照组的(1.54 ± 0.04)倍(t=5.619,P=0.001)、蛋白表达水平为对照组的(1.92 ± 0.12)倍(t=7.745,P=0.002),且 HMGCoA 还原酶的酶活性为对照组的(1.73 ± 0.25)倍(t=2.476,P=0.048)。IL-1β 处理使 HepG2 细胞的胆固醇合成增多为对照组的(1.32 ± 0.11)倍(t=2.316,P=0.036)。IL-1β 处理的 HepG2 细胞内红染的脂滴显著多于对照组,且 IL-1β 处理组细胞内总胆固醇含量(22.43 ± 1.62)为对照组(14.90 ± 1.11)的 1.51 倍(t=3.845,P=0.018),胆固醇酯的含量(3.84 ± 0.20)为对照组(1.41 ± 0.05)的 2.72 倍(t=11.730,P=0.000)。**结论**:IL-1β 可以上调 HepG2 细胞 HMGCoA 还原酶的 mRNA 和蛋白表达水平,并增强其酶活性,促进 HepG2 细胞内胆固醇合成和脂质积聚。

【关键词】白细胞介素-1β;HepG2 细胞;胆固醇;羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶;非酒精性脂肪性肝病
【中图分类号】R575.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-02-26

IL-1β activates HMGCoAR and contributes to lipid accumulation in HepG2 cells

Zou Yang, Zhao Lei, Yang Ping, Wei Li, Ruan Xiongzhong, Chen Yaxi
(*Key Laboratory of Metabolism on Lipid and Glucose, Center for Lipid Research, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effects of interleukin-1β (IL-1β) on 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMGCoAR) and lipid accumulation in HepG2 cells. ***Methods***: Low density lipoprotein 200 μg/mL loaded HepG2 cells were treated with 0 ng/mL (control) or 20 ng/mL IL-1β for 24 hours. The mRNA and protein levels of HMGCoAR were measured by real-time PCR (RT-PCR) and Western blot respectively. HMGCoAR activity was evaluated by thin layer chromatography. Cholesterol synthesis was measured by isotopic labeling method. Intracellular lipids were visualized by oil red O staining and quantitatively analyzed by enzymatic method. ***Results***: IL-1β increased the mRNA levels of HMGCoAR to (1.54 ± 0.04) folds (t=5.619, P=0.001) and protein levels to (1.92 ± 0.12) folds (t=7.745, P=0.002), as well as its enzymatic activities to (1.73 ± 0.25) folds (t=2.476, P=0.048) in HepG2 cells. IL-1β also increased cellular cholesterol synthesis to (1.32 ± 0.11) folds (t=2.316, P=0.036). Markedly red-dyed lipid droplets were observed in IL-1β-treated HepG2 cells. In IL-1β-treated HepG2 cells, intracellular total cholesterol (22.43 ± 1.62) was increased to 1.51 folds comparing with that of control group (14.90 ± 1.11) (t=3.845, P=0.018), and cholesterol ester (3.84 ± 0.20) was increased to 2.72 folds comparing with that of control group (1.41 ± 0.05) (t=11.730, P=0.000). ***Conclusion***: IL-1β upregulates HMG-CoAR mRNA and protein levels, as well as its enzymatic activities, contributing to enhanced de novo cholesterol synthesis and lipid accumulation in HepG2 cells.

【Key words】interleukin-1β; HepG2 cell; cholesterol; 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A; non-alcoholic fatty liver disease

作者介绍:邹 阳,Email:714969322@qq.com,研究方向:脂糖代谢性疾病。
通信作者:赵 蕾,Email:laleinlz@hotmail.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31640043)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1627.026.html (2017-06-22)

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)是一组以肝细胞脂肪变性为病理特征的临床疾病,也是中国最常见的慢性肝病之一[1]。目前对 NAFLD 的发病机制尚未完全阐明。Day 和 James[2]在 1998 年提出了“两次打击”学说,认为:肝

细胞内脂质异常积聚是“第一次打击”，异常积聚的脂质进而引起肝脏炎症反应，形成了“第二次打击”，进一步损伤肝细胞。近年来，“两次打击”学说受到越来越多的挑战，人们提出了“多重平行打击”学说，认为炎症不局限于 NAFLD 发病机制中的第二次打击，炎症可以先于脂肪变性，是导致脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis，NASH）的始动因素[3-4]。但目前对炎症应激下肝细胞脂肪变性的机制尚不完全清楚，因此探讨炎症介导肝细胞内脂质积聚的机制，对 NAFLD 的防治具有重要意义。

脂肪变性的肝细胞中约有 90%的脂质为甘油三酯，既往已有大量研究探讨了甘油三酯在 NAFLD 中的作用[5-6]。然而近期的研究提示，尽管胆固醇与胆固醇酯在肝脏脂质中占比仅约 10%，但胆固醇具有比甘油三酯更强的“脂毒性”。胆固醇异常积聚能显著激活肝细胞内质网应激、氧化应激并促进凋亡，是导致单纯性脂肪性肝病（simple fatty liver，SFL）向 NASH 发展的关键因素[7-8]。羟甲基戊二酸单酰辅酶 A（3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A，HMG-CoA）还原酶是细胞内胆固醇合成的关键限速酶，其表达水平及酶活性的变化都直接影响着胆固醇的合成，在细胞维持其胞内胆固醇稳态过程中至关重要[9]。IL-1β 是由活化的巨噬细胞分泌的一种重要的炎症介质，参与脂肪变性等多种肝细胞病变[10-11]。因此，本文拟采用 IL-1β 处理的 HepG2 为体外模型，探讨炎症对肝细胞 HMGCoA 还原酶及细胞内脂质积聚的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 HepG2 由英国 UCL 大学皇家自由医学院肾病中心惠赠，由阅微基因技术公司通过 STR 方法鉴定；DMEM 培养基、胎牛血清购于美国 Hyclone；IL-1β 购于美国 R&D Systems（规格：每支 5 μg，批号：201-LB-005/CF）；Compactin 购于美国 Sigma（规格：每片 5 mg，批号：73573-88-3）；低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）为实验室制备；油红 O 购于中国上海生工生物工程公司；[^{14}C]乙酸购于英国 Amersham；细胞总蛋白质提取试剂盒购于中国凯基公司；β-肌动蛋白（β-actin）、HMGCoA 还原酶兔多克隆抗体 IgG及辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购于美国 Santa；RNA 提取试剂、逆转录试剂盒及 SYBER Premix 购于日本 Takara；PCR引物用 Primer Express V3.0 软件设计，由北京华大基因科技公司合成；[$^{3-14C}$]HMGCoA 购于英国 Perkin Elmer。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 HepG2 细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养，2 d 换液，4 d 传代。细胞约 80%融合时用于实验。实验分对照组（LDL 200 μg/mL）、炎症组（LDL 200 μg/mL+IL-1β 20 ng/mL）。HMGCoA 还原酶活性检测实验中使用 HMGCoA 还原酶抑制剂 Compactin 100 μmol/L 处理 HepG2 细胞[12]。实验前细胞改用含 1%胎牛血清的DMEM 培养基培养 12 h，给予相应处理 24 h 后进行各项指标检测。

1.2.2 qRT-PCR 检测 HMGCoA 还原酶 mRNA 转录水平 Trizol 法提取细胞总 RNA 后用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA，取 2 μL cDNA 作为模板，以 β-actin 为内参，qRT-PCR 检测 HMGCoA 还原酶 mRNA 转录水平，反应条件：50 ℃ 2 min，95 ℃ 5 min，95 ℃ 20 s，55 ℃ 20 s，72 ℃ 30 s，共 40 循环。结果采用 ΔΔCt 法计算。引物序列：β-actin 正义链：5'-CCTGG-CACCCAGCACAAT-3'，反义链：5'-GCCGATCCACACGGA-GTA-3'；HMGCoAR 正义链：5'-GGCCCAGTTGTGCGTCTT-3'，反义链：5'-TTTCGAGCCAGGCTTTCACT-3'。

1.2.3 Western blot 检测 HMGCoA 还原酶蛋白表达水平 按细胞蛋白提取试剂盒说明提取细胞总蛋白，BCA 法检测蛋白质浓度并标化，SDS-PAGE 电泳分离蛋白后电转至 PVDF 膜上，3% BSA 室温下封闭 1 h，加相应一抗后于 4 ℃下孵育过夜，加辣根过氧化物酶标记的二抗后于室温下孵育 1 h，ECL 化学发光试剂显影。

1.2.4 薄层层析法检测 HMGCoA 还原酶活性 HMGCoA 还原酶活性由改良的薄层层析法测定[13-15]。PEDK 缓冲液（50 mmol/L 磷酸氢二钾，1 mmol/L 乙二胺四乙酸，5 mmol/L 二硫赤藓糖醇，70 mmol/L 氯化钾）收集并匀浆细胞，10 000 g 离心 10 min，收集上清，4 ℃下 100 000 g 离心 90 min，收集微粒体沉淀，加入 PEDK 缓冲液重悬，用于 HMGCoA 还原酶活性及蛋白含量检测。样本加入 50 μL 反应体系（5.0 mmol/L 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，40 mmol/L 葡糖-6-磷酸，1 U 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，2.5 mg/mL 牛血清清蛋白，36.6 μmol/L [$^{3-14C}$]HMGCoA）中，于 37 ℃下反应 2 h，加 6N 盐酸终止反应，样品加入薄层层析板中，放入色谱槽中，加入苯/丙酮（1:1）作为溶剂的混合液中反应 45 min，使用 Bioscan System-200 Image Scanner 读取 Rf 值区间为 0.5~1.0 的放射值。结果以读取的总放射值和微粒体蛋白含量进行标化。

1.2.5 同位素标记法评估胆固醇合成情况[16] [^{14}C]乙酸处理细胞 1 h 后加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶解，再加入乙醇、氢氧化钾，于 80 ℃下皂化反应 3 h，加水稀释后用己烷提取非皂化的脂质，己烷层用 0.1 mol/L 醋酸钠清洗后使用微型闪烁计数器测量放射活性，非皂化的脂质所吸收的 14C 放射量即为胆固醇合成量。结果以改良的 Lowry 法测量的细胞总蛋白质浓度进行标化[17]。

1.2.6 油红 O 染色 油红 O 染色检测细胞内脂质积聚情况[18]。Ⅰ型胶原包被 6 孔板后接种细胞。油红 O 染色前细胞用 10%甲醛固定 15 min，1，2-丙二醇孵育 5 min，加入油红 O 工作液于室温下染色 30 min，苏木素复染 30 s，甘油明胶封片，显微镜下拍照。

1.2.7 化学酶法-比色法检测胆固醇含量 按 Gamble 等[19]描述的方法定量检测细胞内胆固醇。收集细胞后加入 1 mL 氯仿：甲醇（2:1）混合液，超声破碎细胞，沉淀中加入 1 mol/L 氢氧化钠，室温过夜溶解；Lowry 法检测总蛋白质含量。上清

液干燥后用化学酶促反应定量细胞内总胆固醇、胆固醇酯。分别计算胆固醇与总蛋白质比值，分析相对含量。

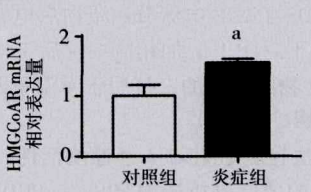
1.3　统计学分析

用 Graphpad Prism 7.00 软件进行统计分析，数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 t 检验对两样本进行比较检验，检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　IL-1β 促进 HepG2 细胞 HMGCoA 还原酶 mRNA 及蛋白表达

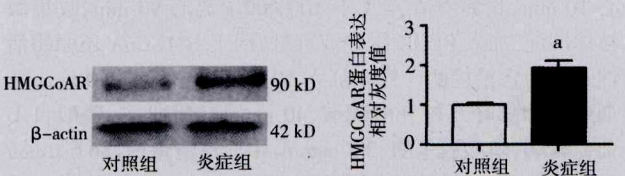
首先检测了 IL-1β 对 HepG2 细胞 HMGCoA 还原酶表达的影响。IL-1β 处理 HepG2 细胞后，细胞内 HMGCoA 还原酶 mRNA及蛋白表达水平分别为对照组的（1.54 ± 0.04）倍（t=5.619，P=0.001）、（1.92 ± 0.12）倍（t=7.745，P=0.002）（图 1、图2），表明炎症促进 HepG2 细胞 HMGCoA 还原酶表达。



a：炎症组与对照组比较，P<0.05

图 1　细胞 HMGCoAR mRNA 表达水平

Fig.1　Cell HMGCoAR mRNA expression level



a：炎症组与对照组比较，P<0.05

A. 免疫印迹检测 HMGCoAR 蛋白表达　　B. HMGCoAR 蛋白表达相对灰度值

图 2　细胞 HMGCoAR 蛋白表达水平

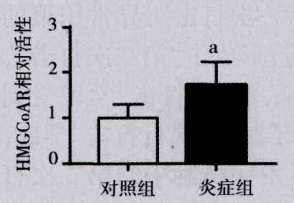
Fig.2　Cell HMGCoAR protein expression level

2.2　IL-1β 增强 HepG2 细胞 HMGCoA 还原酶活性

进一步检测了 HMGCoA 还原酶酶活性。IL-1β 处理 HepG2 细胞后，细胞内 HMGCoA 还原酶活性增强为对照组的（1.73 ± 0.25）倍（t=2.476，P=0.048）（图 3）。Compactin 是一种他汀类药物，对 HMGCoA 还原酶具有竞争性抑制作用，能显著抑制 HMGCoA 还原酶活性。如图 4 所示：100 μmol/L Compactin 能抑制 HepG2 细胞 HMGCoAR 酶活性，而 100 μmol/L Compactin 联合 IL-1β 处理组，抑制率为单独 Compactin 处理的 51%（P=0.010）。由此可见，炎症能增强 HepG2 细胞HMGCoA 还原酶酶活性。

2.3　IL-1β 促进 HepG2 细胞胆固醇合成

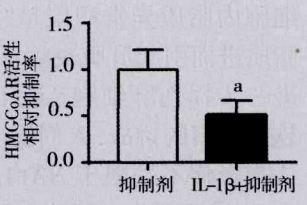
HMGCoA 还原酶是调节胆固醇合成的关键限速酶，细胞内胆固醇合成检测表明：IL-1β 处理的 HepG2 细胞内细胞胆固醇合成量为对照组的（1.32 ± 0.11）倍（t=2.316，P=0.036）（图 5），炎症促进了 HepG2 细胞胆固醇合成。



a：炎症组与对照组比较，P<0.05

图 3　细胞 HMGCoAR 活性

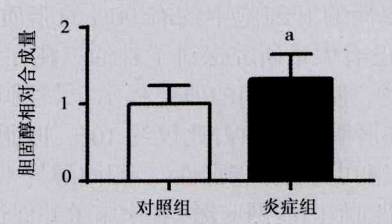
Fig.3　Cell HMGCoAR activity



a：IL-1β+ 抑制剂组与抑制剂组比较，P<0.05

图 4　细胞 HMGCoAR 活性抑制率

Fig.4　Cell HMGCoAR activity inhibition rate



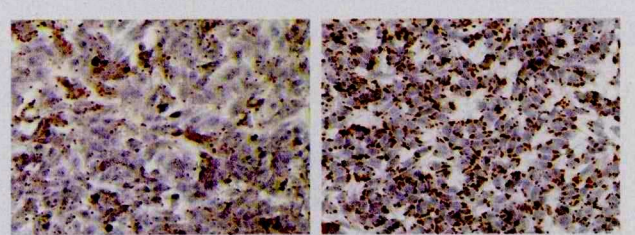
a：炎症组与对照组比较，P<0.05

图 5　细胞胆固醇合成情况

Fig.5　Cell cholesterol synthesis status

2.4　IL-1β 促进 HepG2 细胞脂质积聚

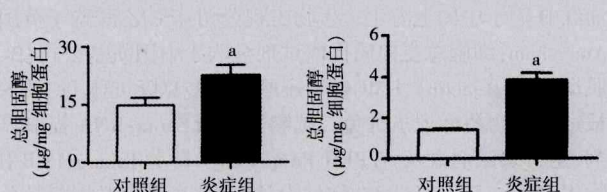
胆固醇合成是调节细胞内脂质代谢平衡的关键环节之一，本研究进一步检测了炎症对 HepG2 细胞脂质积聚的影响。油红 O 染色显示，IL-1β 处理下 HepG2 细胞红染的脂滴较对照组明显增加（图 6）；且 IL-1β 处理 HepG2 细胞后，细胞内总胆固醇含量（22.43 ± 1.62）为对照组（14.90 ± 1.11）的 1.51 倍（t=3.845，P=0.018），胆固醇酯的含量（3.84 ± 0.20）为对照组（1.41 ± 0.05）的 2.72 倍（t=11.730，P=0.000）（图 7A、B）。由此可见，炎症促进 HepG2 细胞脂质积聚。



A. 对照组　　B. 炎症组

图 6　细胞油红 O 染色结果（200×）

Fig.6　Cell oil red O staining result（200×）



A. 细胞总胆固醇含量　　B. 细胞胆固醇酯含量

a：炎症组与对照组比较，P<0.05

图 7　细胞总胆固醇、胆固醇酯含量

Fig.7　Cell TC and CE content

3 讨 论

目前已经公认 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞计数等炎症标志物是 NASH 的独立危险因素，且血清 CRP、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的含量与病变的严重程度、活动度成正相关[20-21]。本研究表明，炎症可以促进 HepG2 细胞内脂质积聚，尤其是胆固醇的积聚。肝细胞是主要的内源性胆固醇代谢的场所。正常情况下，肝细胞通过调节胆固醇合成、摄取、外排多通路维持胞内胆固醇的稳态；炎症应激下，肝细胞胆固醇摄取增多、外排减少[16]。本研究进一步表明，炎症应激使 HepG2 细胞胆固醇合成增多。

细胞内胆固醇的内源性合成十分复杂，有近 30 步酶促反应，其中 HMGCoA 还原酶是一关键限速酶[22]。本研究表明，炎症应激使 HepG2 细胞内 HMGCoA 还原酶表达水平升高。HMGCoA 还原酶转录受到固醇调节元件结合蛋白 2(sterol regulatory element-binding protein 2, SREBP2)的调控，当细胞内胆固醇水平较低时，细胞内胆固醇敏感器固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(SREBP cleavage-activating protein, SCAP)从内质网运载 SREBP2 至高尔基体，SREBP2 随后被酶解，活性片段进入细胞核启动 HMGCoA 还原酶基因表达，胆固醇合成增多；相反，当细胞内胆固醇充足时，SCAP 停止运载 SREBP2 至高尔基体，胆固醇合成减少[23]。既往研究提示：炎症扰乱 SCAP-SREBP2 信号通路，导致肝细胞内脂质积聚[24]，推测炎症促进 HMGCoA 还原酶表达水平升高与扰乱 SCAP-SREBP2 通路相关。同时，本研究还发现：炎症应激使 HepG2 细胞内HMGCoA 还原酶酶活性增强。HMGCoA 还原酶活性受到磷酸化作用调控：磷酸化作用使酶活性减弱，去磷酸化作用使酶活性增强[25]，推测炎症增强 HMGCoA 还原酶酶活性与扰乱其磷酸化修饰相关。他汀类药物作为 HMGCoA 还原酶的竞争性抑制剂，可以抑制内源性胆固醇合成，广泛应用于高胆固醇血症的临床治疗。本研究表明：他汀在炎症应激下对 HMGCoA 还原酶的抑制作用减弱，从而也部分地解释了临床上观察到的他汀抵抗现象。

综上所述，炎症能提高 HepG2 细胞 HMGCoA 还原酶 mRNA、蛋白表达水平及其酶活性，同时炎症也能促进 HepG2 细胞胆固醇合成及胞内脂质积聚。因此，监测炎症指标、控制炎症反应对 NAFLD 患者评估疾病进展、指导治疗具有临床意义。

参 考 文 献

[1] Sanyal AJ. NASH:a global health problem[J]. Hepatol Res,2011, 41(7):670-674.

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

[3] Tiniakos DG,Vos MB,Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis[J]. Annu Rev Pathol,2010,5:145-171.

[4] Tilg H,Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease:the multiple parallel hits hypothesis[J]. Hepatology, 2010,52(5):1836-1846.

[5] 魏苏宁，苏雪莹，徐国恒. 肝细胞甘油三酯代谢途径异常与脂肪肝[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2016，32(2)：123-132.

[6] 廖海林，肖新华. 甘油三酯在非酒精性脂肪肝沉积的机制研究进展[J]. 临床与病理杂志，2014，34(6)：831-836.

[7] Awad AS,Abd Al Haleem EN,El-Bakly WM,et al. Thymoquinone alleviates nonalcoholic fatty liver disease in rats via suppression of oxidative stress,inflammation,apoptosis[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,2016,389(4):381-391.

[8] Zhang XQ,Xu CF,Yu CH,et al. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol,2014,20(7):1768-1776.

[9] Groen AK,Bloks VW,Verkade H,et al. Cross-talk between liver and intestine in control of cholesterol and energy homeostasis[J]. Mol Aspects Med,2014,37:77-88.

[10] 付 静，柴 进，张 婷，等. IL-1β 对 HepG2 细胞核受体 RXRα 蛋白表达的影响[J]. 华南国防医学杂志，2013，27(1)：1-5.

[11] 李枫林，张 宝，管石侠，等. 非酒精性脂肪肝病大鼠 IL-1β、IL-18、TNF-α 水平的变化[J]. 安徽医科大学学报，2016，51(3)：351-354.

[12] 周 维，王 沛，陈压西，等. 白细胞介素 1β 对美伐他汀处理的 HepG2 细胞胞内胆固醇含量的影响[J]. 基础研究，2016，32(4)：343-345.

[13] Harwood HJ Jr,Schneider M,Stacpoole PW. Measurement of human leukocyte microsomal HMG-CoA reductase activity[J]. J Lipid Res, 1984,25(9):967-978.

[14] Panini SR,Sexton RC,Rudney H. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by oxysterol by-products of cholesterol biosynthesis.Possible mediators of low density lipoprotein action[J]. J Biol Chem,1984,259(12):7767-7771.

[15] Goldfarb S,Pitot HC. Improved assay of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase[J]. J Lipid Res,1971,12(4):512-515.

[16] Zhao L,Chen Y,Tang R,et al. Inflammatory stress exacerbates hepatic cholesterol accumulation via increasing cholesterol uptake and de novo synthesis[J]. J Gastroenterol Hepatol,2011,26(5):875-883.

[17] Markwell MA,Haas SM,Bieber LL,et al. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples[J]. Anal Biochem,1978,87(1):206-210.

[18] 谢云霞，赵 蕾，张艳艳，等. 棕榈酸上调 FAT/CD36 表达致 HepG2 细胞脂质积聚的机制研究[J]. 第三军医大学学报，2015，37(13)：1308-1313.

[19] Gamble W,Vaughan M,Kruth HS,et al. Procedure for determination of free and total cholesterol in micro- or nanogram amounts suitable for studies with cultured cells[J]. J Lipid Res,1978,19(8):1068-1070.

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)