

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01055

内质网应激诱导肝细胞脂肪沉积及可能机制

万 颖, 房殿亮, 沈 薇*, 宁 波*

重庆医科大学附属第二医院消化科, 重庆 400010

[摘要] **目的** 利用毒胡萝卜素诱导肝细胞内质网应激模型, 观察在内质网应激状态下肝细胞脂肪沉积情况, 并初步探讨其分子机制。**方法** 以人 L02、HepG2 肝细胞株为研究靶细胞, 将两种细胞均分为正常对照组和实验组(培养液内含毒胡萝卜素 $1 \mu\text{mol/L}$), 采用三酰甘油(TG)试剂盒、油红 O 染色检测肝细胞脂肪沉积情况, 实时荧光定量 PCR 法检测 SREBP-1c、LXR α 的 mRNA 表达情况, 蛋白质印迹法检测 GRP78、SREBP-1c、LXR α 的蛋白表达情况。**结果** 蛋白质印迹结果显示, 实验组 GRP78 的表达较对照组升高($P < 0.05$), 表明肝细胞内质网应激模型建立成功。在内质网应激状态下, 毒胡萝卜素作用 48 h 后实验组 L02 与 HepG2 细胞脂肪沉积均较对照组增加($P < 0.01$)。与对照组相比, 实验组 L02 和 HepG2 细胞 SREBP-1c 在基因水平和蛋白水平表达均升高($P < 0.05$), 而 LXR α 在基因水平和蛋白水平的表达均无变化。**结论** 内质网应激可能通过上调 SREBP-1c 诱导肝细胞脂肪沉积, 而 LXR α 未参与该过程。

[关键词] 内质网应激; 肝细胞; 脂肪沉积; 固醇调节元件结合蛋白 1c; 肝 X 受体

[中图分类号] R 575.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)10-1055-05

Endoplasmic reticulum stress-induced fatty depositon in hepatocytes and the possible mechanism

WAN Ying, FANG Dian-liang, SHEN Wei*, NING Bo*

Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

[Abstract] **Objective** To observe the fatty deposition in thapsigargin-induced endoplasmic reticulum stress model in hepatocytes and to discuss the possible mechanism. **Methods** Hepatocytes (L02 cell and HepG2 cell line) were divided into control group and experimental group (treated with $1 \mu\text{mol/L}$ thapsigargin). Fatty deposition in the hepatocytes was observed by biochemical assay and oil red O staining. Real-time PCR was used to test the expression of SREBP-1c and LXR α mRNA. And Western blotting analysis was used to examine the expression of protein of GRP78, SREBP-1c and LXR α . **Results** Western blotting analysis showed that GRP78 protein expression in the experimental group was remarkably higher than that in the control group ($P < 0.05$), indicating the successful establishment of the endoplasmic reticulum stress model in hepatocytes. The hepatocyte fatty deposition in the experimental group was significantly more than that in the control group 48 h after thapsigargin exposure ($P < 0.01$). The expression of SREBP-1c mRNA and protein in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the expression of LXR α mRNA and protein was not significantly between the two groups. **Conclusion** Endoplasmic reticulum stress may induce hepatocyte fatty deposition through up-regulating SREBP-1c, and LXR α is not involved in the process.

[Key words] endoplasmic reticulum stress; hepatocytes; fatty deposition; sterol regulatory element binding protein 1c; liver X receptors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(10):1055-1059]

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是由非酒精性因素引起的肝细胞脂质过量蓄积而导致的一种慢性代谢紊乱性疾病。由于 NAFLD 在国内外的发病率逐年上升, 阐明其发生、发展的分子学机制以便为临床治疗提供实验基

础显得十分必要^[1-2]。近年来, 不断有研究提示内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)与 NAFLD 的发生存在相关性^[1-3]。本研究通过建立肝细胞 ERS 模型, 了解 ERS 能否诱导肝细胞脂肪沉积, 并且通过定量 PCR 和蛋白质印迹法观察固醇调

[收稿日期] 2012-07-09

[接受日期] 2012-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81000357)。Supported by National Natural Science Foundation for Young Scholars in China (81000357)。

[作者简介] 万 颖, 硕士生。E-mail: wanying0326@126.com

* 通信作者(Corresponding authors)。Tel: 023-63693345, E-mail: shenwei315@126.com; Tel: 023-63693345, E-mail: ningbo.bo@163.com

节原件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBP)-1c、肝 X 受体(liver X receptors, LXRs)的表达变化,探讨 ERS 诱导肝细胞脂肪沉积的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料 人 L02、HepG2 肝细胞株由我院消化科实验室提供。胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);RPMI 1640 培养基(Hyclone 公司,美国);高糖 DMEM 培养基(Gibco 公司,美国);毒胡萝卜素(thapsigargin, Sigma-Aldrich 公司,美国);三酰甘油试剂盒(长春汇力生物技术有限公司);油红 O 染色剂(Sigma 公司,美国);SREBP-1c、LXRs、 β -actin 引物(上海生工生物工程技术有限公司);实时荧光定量 PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];全蛋白、核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);GRP78 抗体(Santa Cruz 公司,美国);SREBP-1c、LXRs 抗体(Abcam 公司,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 CCK-8 比色法测定细胞增殖 根据前期预实验结果,选取 48 h 为最佳实验时间点。取对数期 L02 细胞,制备单细胞悬液,按每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,每组均设空白和药物对照孔,并设置相应复孔;孵箱培养细胞 12 h 后贴壁,加入含不同浓度毒胡萝卜素的培养液;作用 48 h 后,加入 10 μ l CCK-8,在培养箱内培养 60 min 后,酶标仪(Bio-Tek 公司,美国)450 nm 波长测定光密度值,计算细胞增殖抑制率,确定毒胡萝卜素的最佳实验浓度。

1.2.2 细胞培养及分组 将 L02、HepG2 细胞分别用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640、高糖 DMEM 培养液进行培养,置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中。细胞均分为正常对照组(培养液中不加药物)和实验组(培养液中加入最佳实验浓度的毒胡萝卜素)。

1.2.3 细胞内三酰甘油的检测 毒胡萝卜素处理后收集细胞,按三酰甘油检测试剂盒说明书进行操作;并进行蛋白质定量,计算每毫克蛋白质所对应的三酰甘油含量(μ g/mg)。

1.2.4 油红 O 染色 毒胡萝卜素处理细胞后,甲醛固定 30 min,油红 O 染剂染色 1 h,异丙醇清洗 30 s,苏木精复染细胞核 30 s,水封片显微镜下观察。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 法检测 SREBP-1c 和 LXRs mRNA 的表达 提取细胞总 RNA,反转录成

cDNA。SREBP-1c 上游引物: 5'-ACA CAG CAA CCA GAA ACT CAA G-3',下游引物: 5'-AGT GTG TCC TCC ACC TCA GTC T-3',扩增长度为 153 bp; LXRs 上游引物: 5'-ATG CCG AGT TTG CCT TGC-3',下游引物: 5'-CAT CCG TGG GAA CAT CAG T-3',扩增长度为 164 bp; β -actin 上游引物: 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3',下游引物: 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3',扩增长度为 205 bp。PCR 条件均为: 95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算对照组与实验组 SREBP-1c、LXRs 的 mRNA 相对表达量。

1.2.6 蛋白质印迹检测葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、SREBP-1c(前体蛋白和活性蛋白)、LXRs 蛋白的表达 毒胡萝卜素处理肝细胞后,根据蛋白提取试剂盒说明书步骤提取蛋白,定量保存。GRP78、SREBP-1c、LXRs 分别采用胞浆蛋白、全蛋白和核蛋白进行检测,电泳、转膜后,分别加入 GRP78 一抗(1:400 稀释)、SREBP-1c 一抗(1:600 稀释)或 LXRs 一抗(1:1000 稀释),然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000 稀释),ECL 显影。Quantity one 软件分析蛋白表达。

1.3 统计学处理 计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 软件统计分析,采用两样本均数比较的 *t* 检验分析组间差异。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 ERS 模型的建立

2.1.1 毒胡萝卜素细胞增殖的影响 CCK-8 检测结果显示,48 h 时不同浓度的毒胡萝卜素对 L02 细胞的增殖均具有抑制作用,随浓度增加,抑制作用增强。毒胡萝卜素 0.5、1、2、4、8、16 μ mol/L 浓度下的细胞增殖抑制率分别为 (9.247 \pm 0.071)%、(9.958 \pm 0.079)%、(11.118 \pm 0.034)%、(13.218 \pm 0.046)%、(17.027 \pm 0.026)%、(29.897 \pm 0.064)%。当毒胡萝卜素浓度超过 4 μ mol/L 时,其对细胞增殖的抑制作用增强。为降低毒胡萝卜素对细胞的毒性,结合相关文献^[8],采用 1 μ mol/L 作为毒胡萝卜素最佳实验浓度。

2.1.2 GRP78 的表达分析 毒胡萝卜素 1 μ mol/L 刺激肝细胞 48 h 后,实验组 L02 细胞、HepG2 细胞中 GRP78 相对表达量均较对照组 L02 细胞、HepG2 细胞增加($P < 0.05$,图 1)。说明肝细胞 ERS 模型构建成功。

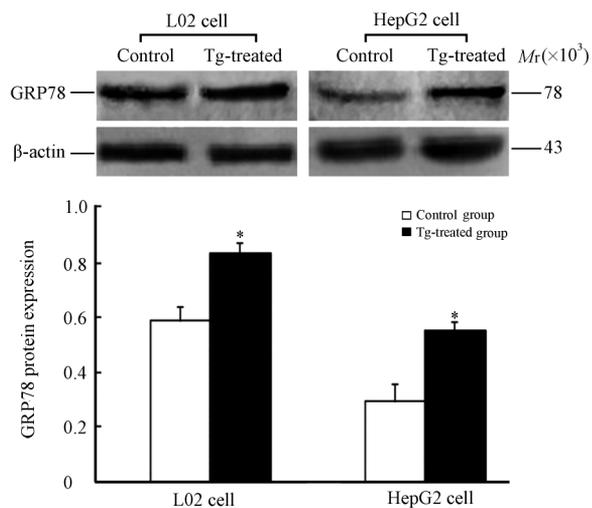


图 1 毒胡萝卜素刺激后肝细胞 GRP78 蛋白的表达
Fig 1 Expression of GRP78 protein after thapsigargin exposure in each group

Tg: Thapsigargin (1 $\mu\text{mol/L}$). * $P < 0.05$ vs control group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 肝细胞脂肪沉积程度检测

2.2.1 三酰甘油含量 由图 2 可见,与对照组相比,毒胡萝卜素刺激 L02 细胞和 HepG2 细胞后,实验组三酰甘油的含量均增加($P < 0.01$)。

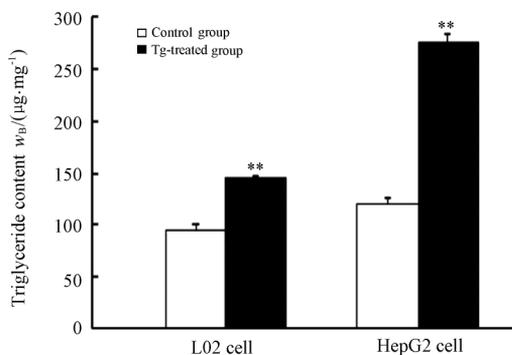


图 2 毒胡萝卜素刺激后肝细胞三酰甘油含量检测
Fig 2 Triglyceride measurement after thapsigargin exposure in each group

Tg: Thapsigargin (1 $\mu\text{mol/L}$). ** $P < 0.01$ vs control group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2.2 油红 O 染色结果 如图 3 所示,与对照组相比,经毒胡萝卜素处理后的肝细胞形态改变、脂肪沉积明显。

2.3 肝细胞 SREBP-1c、LXR α mRNA 的表达情况 如图 4 所示,在 L02 和 HepG2 细胞中,与对照组比较,实验组 SREBP-1c mRNA 表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 LXR α mRNA 的表达量,实验组与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 SREBP-1c、LXR α 蛋白的表达情况 分别检测

SREBP-1c 前体蛋白和活性蛋白,由图 5 可知, SREBP-1c 在蛋白水平,前体蛋白(125 000)实验组较对照组增加($P < 0.05$),并且活性蛋白(68 000)与前体蛋白呈现一致的趋势。然而, LXR α 蛋白表达实验组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

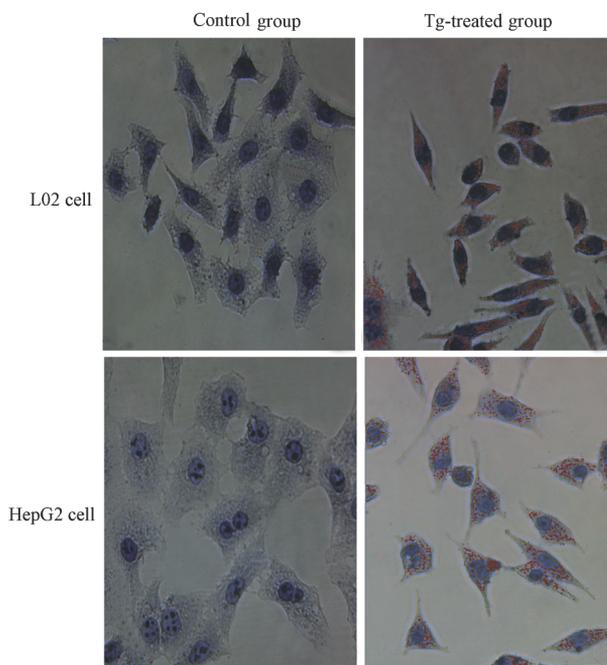


图 3 毒胡萝卜素刺激 L02 细胞、HepG2 细胞后油红 O 染色结果

Fig 3 Oil-red O staining of lipid droplets in the liver cells L02 and HepG2 challenged with Tg
Tg: Thapsigargin (1 $\mu\text{mol/L}$). Original magnification: $\times 200$

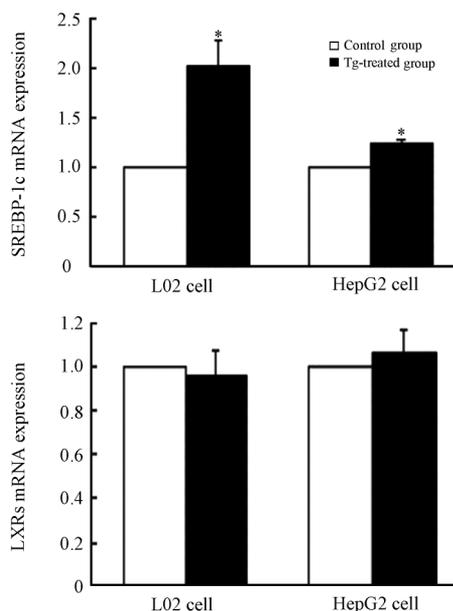


图 4 毒胡萝卜素刺激后 SREBP-1c、LXR α 在肝细胞中 mRNA 表达
Fig 4 Expression of SREBP-1c and LXR α mRNA after thapsigargin exposure in each group

Tg: Thapsigargin (1 $\mu\text{mol/L}$). * $P < 0.05$ vs control group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

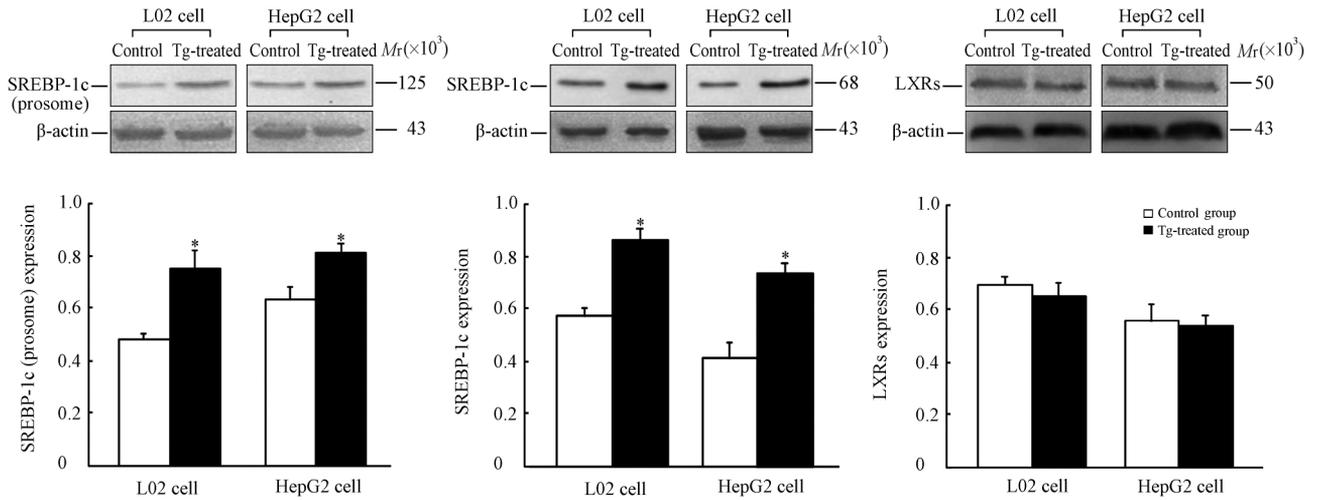


图5 毒胡萝卜素刺激肝细胞后 SREBP-1c 和 LXR_s 的表达

Fig 5 Expression of SREBP-1c and LXR_s protein after thapsigargin exposure in each group

Tg: Thapsigargin (1 μmol/L). * P<0.05 vs control group. n=3, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

内质网是细胞内蛋白质合成、折叠和修饰的场所,在应激状态下,出现未折叠蛋白质增多、错误折叠蛋白质在内质网沉积以及钙离子失衡并由此导致细胞一系列反应,称之为 ERS^[3]。ERS 是机体的一种自我保护机制,可维持机体的内环境稳态。GRP78,又称免疫球蛋白结合蛋白(Bip),是热休克蛋白 70 家族的成员之一,存在于细胞质内质网膜上,是内质网应激的标志蛋白。ERS 状态下,GRP78 的表达明显增加。我们前期的研究中发现,饱和脂肪酸诱导肝细胞脂变过程中存在 ERS,GRP78 表达增加^[4]。那么 ERS 是否会促进肝细胞脂代谢异常呢?毒胡萝卜素是内质网 Ca²⁺-ATP 酶泵抑制剂,可破坏内质网的钙离子稳态,诱导 ERS 的发生^[5]。本研究结果显示毒胡萝卜素刺激肝细胞后,实验组较对照组 GRP78 的表达明显上升,证明毒胡萝卜可诱导肝细胞发生 ERS,这与 Zhang 等^[6]的报道一致。三酰甘油水平增高合并总胆固醇升高是 NAFLD 主要的血脂特点,尤其是三酰甘油增高与 NAFLD 的关系最为密切^[7]。我们对肝细胞内的三酰甘油含量进行测定,结果发现实验组的三酰甘油含量较对照组升高,证明在 ERS 状态下,肝细胞脂肪沉积增加。油红 O 染色进一步证实了这一点。毒胡萝卜素作为 ERS 的药物激动剂,并不能直接促使肝细胞合成脂质,因而可以认为是毒胡萝卜素诱导肝细胞 ERS 的发生,诱导脂代谢基因表达改变从

而引起了肝细胞脂肪沉积,该结果在人肝癌细胞 Huh-7 中也得到了证实^[8]。

然而,ERS 诱导肝细胞脂肪沉积的可能机制又是什么呢?SREBP-1c 是一种碱性螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链转录因子,翻译合成后以前体蛋白(约 125 000)结合于内质网膜上,经过两次裂解变成活性蛋白(约 68 000),从内质网膜转移到细胞核内激活脂肪生成所需酶类的转录,增加脂肪酸和三酰甘油的合成^[9-10]。ERS 时,SREBP-1c 被激活,因而我们推测 ERS 通过 SREBP-1c 诱导肝细胞脂肪沉积。定量 PCR 结果显示,药物刺激后,与对照组相比,实验组 SREBP-1c mRNA 表达上调,证明在基因水平,ERS 状态下 SREBP-1c 的表达增加。而在蛋白水平,由于其包含前体蛋白和活性蛋白两部分,为了解它们在该过程中起到的作用,我们均对其进行检测,结果发现,两者实验组较对照组均增加。因此我们认为,ERS 可能通过上调 SREBP-1c 诱导肝细胞脂肪沉积。王万东等^[11]在 L02 肝细胞脂变模型的 ERS 状态下,转染质粒干扰 SREBP-1c 后发现肝细胞脂变程度减轻,该研究从侧面印证了 SREBP-1c 在 ERS 诱导肝细胞脂肪沉积中具有重要作用。

LXR_s 是肝细胞内高表达的核激素受体,同时也是 SREBP-1c 转录的有效激活因子,体内实验已证实 LXR_s 在 SREBP-1c 表达调控中起着重要作用^[10]。为探讨 LXR_s 与 ERS 诱导肝细胞脂肪沉积有无相关性,我们也从基因水平和蛋白水平对其进行检测。然而,实验结果显示,在 ERS 状态下,

LXR_s 实验组表达并未较对照组增加。提示 LXR_s 可能并未参与 ERS 诱导肝细胞脂肪沉积这一过程, 这与 Lee 等^[8]的研究相符。

综上所述, 本研究从体外实验证实了 ERS 可能通过上调 SREBP-1c 诱导肝细胞脂肪沉积, 而 LXR_s 并未参与该过程。目前, 对于 ERS 诱导肝细胞脂肪沉积的具体机制还不十分清楚, 我们将通过后续研究对该机制进行深入探讨, 以期发现治疗 NAFLD 的新靶点。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Lewis J R, Mohanty S R. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update[J]. Dig Dis Sci, 2010, 55: 560-578.
- [2] Pettinelli P, Obregon A M, Videla L A. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Nutr Hosp, 2011, 26: 441-450.
- [3] Rutkowski D T, Kaufman R J. A trip to the ER: coping with stress[J]. Trends Cell Biol, 2004, 14: 20-28.
- [4] 拜明军, 沈 薇, 洪江龙. 不同性质脂肪酸对脂肪变性 L02 肝细胞凋亡和葡萄糖调节蛋白 78 表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21: 843-847.

- [5] Zhao Z Q, Walczysko P, Zhao M. Intracellular Ca²⁺ stores are essential for injury induced Ca²⁺ signaling and re-endothelialization[J]. J Cell Physiol, 2008, 214: 595-603.
- [6] Zhang Y, Dong L, Yang X, Shi H, Zhang L. α -Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes[J]. Lipids Health Dis, 2011, 10: 81.
- [7] 王 莹, 蔡东联, 王 鸿, 黄 莺, 张 蕾. 饮食诱导肥胖与肥胖抵抗型非酒精性脂肪肝大鼠的对比研究[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31: 959-963.
- Wang Y, Cai D L, Wang H, Huang Y, Zhang L. A comparative study of diet-induced obesity and diet-induced obesity-resistant non-alcoholic fatty liver in rats[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31: 959-963.
- [8] Lee J S, Mendez R, Heng H H, Yang Z Q, Zhang K Z. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation[J]. Am J Transl Res, 2012, 4: 102-113.
- [9] Sato R. SREBPs, protein interaction and SREBPs[J]. FEBS J, 2009, 276: 622-627.
- [10] Ferre P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c[J]. Diabetes Obes Metab, 2010, 2: 83-92.
- [11] 王万东, 王 军, 樊丽琳, 熊 吉, 孙文静, 陈东风, 等. 干扰固醇调节原件结合蛋白-1c 表达对细胞炎症趋化因子配体 2 和成纤维细胞生长因子 21 的影响[J]. 中华肝病杂志, 2011, 19: 664-669.

[本文编辑] 徐 佳, 孙 岩

《军医大学学报(英文版)》征稿、征订启事

《军医大学学报(英文版)》(*Journal of Medical Colleges of PLA*)是由第二、三、四军医大学及南方医科大学(原第一军医大学)共同主办、国内外公开发行(CN 31-1002/R, ISSN 1000-1948)的高级药理学综合性英文学术刊物, 1986年6月创刊。本刊主要报道基础、临床、预防、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果、新理论、新技术和新方法。辟有专家论坛、基础研究、临床研究、经验交流、短篇报道、个案报告等栏目。

本刊为中国英文版科技论文统计源期刊, 并被纳入中国期刊网、万方数据库和中文科技期刊数据库等国内所有重要检索系统, 已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstract Journal)、波兰《哥白尼索引》(IC)和荷兰《斯高帕斯》(Scopus)等国际知名检索系统收录, 期刊全文已进入爱思唯尔(Elsevier)科技出版集团所属的 ScienceDirect 全文数据库(<http://www.elsevier.com/locate/jmcpla>)。

为了弘扬科研创新精神, 推动医学事业发展, 促进海内外学术交流, 本刊面向全国和海外作者征稿。

来稿要求: 来稿请附中文的文题、作者姓名、单位名称及较详细的中文摘要和 3~8 个关键词, 参考文献放在文末。来稿务必写清个人通讯地址及联系电话, 编辑部在接到稿件 30 日内通知作者稿件是否被采用。

刊发周期: 由全国相关学科领域的知名专家和权威人士进行审稿, 对审稿通过的论文 2~6 个月内安排刊出。国家、省部级基金资助和重点攻关项目稿件优先发表。

本刊为双月刊, A4 开本, 80 g 铜版纸彩色印刷, 每期定价 15 元, 全年 90 元。可在当地邮局订阅(邮发代号 4-725), 漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地 址: 上海市翔殷路 800 号《军医大学学报(英文版)》编辑部, 邮编: 200433

联系人: 徐 佳 电话: 021-81870788 转 818 分机

E-mail: jydxxb@yahoo.com.cn