

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.16.004

饱和脂肪酸诱导肝细胞系建立代谢相关脂肪性肝病细胞损伤模型*

王雅芝 申元英 宁晓县 李艳丽 郭 乐[△]

(大理大学基础医学院 云南 大理 617000)

摘要 目的:探讨不同脂肪酸对肝细胞系脂质积累、细胞损伤的影响,选择合适诱导试剂及肝细胞系建立一种具有严重细胞损伤及炎症反应的晚期代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)体外细胞模型。**方法:**以油酸(OA)或棕榈酸(PA)或其混合物分别处理 HepG2 和 LO2 细胞,以 CCK8 检测细胞存活率;以油红 O 染色及甘油三酯酶法检测细胞脂质积累程度;以 qRT-PCR 检测凋亡相关蛋白、纤维化相关蛋白、自噬相关蛋白、炎症因子的 mRNA 表达水平。**结果:**0.25 mmol/LPA 作用 HepG2 细胞 24 h 可显著诱导甘油三酯(TG)和脂质积累,但对 LO2 细胞无明显影响;0.25 mmol/L PA 处理两种细胞系可诱导显著的细胞损伤及炎症,OA 可缓解 PA 对细胞的损伤作用。**结论:**利用 PA 处理 HepG2 细胞可引起一定程度的脂质积累,诱导显著的细胞损伤及炎症,是合适的 MAFLD 体外细胞模型。

关键词:代谢功能障碍相关脂肪性肝病;HepG2 细胞;饱和脂肪酸;棕榈酸

中图分类号:R-33;R575.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)16-3014-06

Saturated Fatty Acids Induced Liver Cell Lines to Establish a Cell Injury Model of MAFLD in Vitro*

WANG Ya-zhi, SHEN Yuan-ying, NING Xiao-xian, LI Yan-li, GUO Le[△]

(School of basic medicine, Dali University, Dali, Yunnan, 617000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of different fatty acids on lipid accumulation and cell injury in liver cell lines, and to choose a suitable reagent and liver cell lines to establish a cell model of advanced metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) with severe cell damage and inflammatory response. **Methods:** HepG2 and LO2 cells were exposed to oleic acid (OA) or palmitic acid (PA) or their combination at ratios of 2:1 respectively. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was carried out to assess cell proliferation; the degree of lipid accumulation was detected by oil red O staining and triglyceride enzyme assay; the mRNA expression levels of apoptosis-related proteins, fibrosis-related proteins, autophagy-related proteins, and inflammatory factors were detected by qRT-PCR. **Results:** HepG2 cells were treated with 0.25 mmol/L PA for 24 h, which significantly induced the accumulation of TG and lipids, but had no significant effect on LO2 cells. Two cells were treated with OA alone or a mixture of OA and PA-induced lower cytotoxicity with less weakened functional capacity than did PA alone. **Conclusion:** HepG2 cells were treated with PA alone is more suitable for establishing a kind of serious liver cell injury and inflammation of MAFLD cell model.

Key words: Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease; HepG2 cells; Saturated fatty acids; Palmitic acid

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R575.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)16-3014-06

前言

代谢功能障碍相关脂肪性肝病,曾用名非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD),随着学者们对 NAFLD 的研究和认知逐渐深入,其发展可能有多种潜在的机制和途径,最新的国际专家组共识建议以肝脏炎症活动度和纤维化程度来描述疾病进程^[1,2]。目前的临床研究中,MAFLD 人群由于主要驱动因素和疾病调控因素方面存在较大异质性,对疾病的药物治疗研究造成巨大挑战,探索疾病模型与疾病亚型的共同特征可能有助于克服这一挑战^[3]。MAFLD 是由代谢应激

引起的包括从营养超负荷到持续性肝损伤的一系列病理过程,临床上 10~30% MAFLD 患者为脂肪性肝炎,表现为炎症及纤维化显著,若不及时干预可能进展至肝硬化、肝癌和肝功能衰竭^[4]。有研究表明,肝脏脂质积累是代谢功能障碍早期的敏感指标,MAFLD 进展到晚期,肝脏表现出严重的炎症、纤维化,而肝纤维化往往伴随着氧化应激增强、高促炎细胞因子的释放、细胞损伤加重^[5,6]。

对于疾病研究模型的建立,倪家敏等^[7]通过高糖高脂饲料饲喂成功建立了肝脏病理改变可见广泛的脂肪变性和大量的肉芽肿性炎症但未见纤维化的 NAFLD 动物模型。细胞模型由

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No.81960371);云南省科技厅青年项目(202001AU070014)

作者简介:王雅芝(1999-),女,硕士研究生,主要研究方向:炎症与感染免疫,E-mail: haniayy@163.com

△ 通讯作者:郭乐(1989-),男,博士,副教授,主要研究方向:病毒感染与天然免疫,E-mail: guole0622@126.com,电话:13208723040

(收稿日期:2022-01-24 接受日期:2022-02-21)

于实验条件可控、影响因素少已被广泛应用于 NAFLD 的体外研究,越来越多的证据支持使用体外模型作为研究脂肪变性肝细胞后果的合适工具^[89]。分离的人肝细胞的使用仍然受到立法和伦理因素的限制,原代肝细胞在体外培养过程中逐渐失去其肝脏特异性功能和形态,而肝癌来源细胞培养与原代肝细胞相比,具有高可用性、易操作和无限的寿命,其中 HepG2 细胞起源于人类肝细胞癌,保留了肝实质细胞分泌脂蛋白等生化功能,是研究人类脂质代谢的理想模型,除此之外,一种人正常肝永生细胞系 LO2 常用于建立肝脂肪变性体外模型^[10-12]。因此,通过诱导 HepG2 或 LO2 细胞系来建立 MAFLD 体外模型是一个可广泛应用于实验室的研究模型。

已有的研究表明,脂肪肝中最丰富的脂肪酸是饱和脂肪酸:如棕榈酸和单不饱和脂肪酸:如油酸^[13,14]。大量研究中,研究者们选择通过 OA、PA 或 PA 与 OA 比例为 1:2 混合的游离脂肪酸处理 HepG2 细胞或 LO2 细胞建立 NAFLD 模型,然而,PA 和 OA 如何促进肝细胞系中脂肪变性和细胞毒性的发展以及对细胞损伤、纤维化及炎症的影响还没有被充分描述。因此,亟待通过区分不同类型脂肪酸和损伤刺激对肝细胞系的影响,建立一种肝细胞损伤严重的晚期 MAFLD 体外细胞模型,为研究针对 MAFLD 肝脏细胞损伤的治疗方法提供基础。本文拟通过验证 PA、OA 或两者混合物诱导 HepG2、LO2 细胞系后细胞脂质积累、细胞存活率及凋亡、纤维化、自噬及炎症等的影响,建立一种 MAFLD 体外细胞模型,为研发出 MAFLD 的良好的治疗方式提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 HepG2、人正常肝细胞 LO2 购自中国科学院昆明细胞库;DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;0.25 %胰酶 Trypsin-EDTA 购自北京索莱宝科技有限公司;20 %无脂肪酸牛血清白蛋白、甘油三酯酶法检测试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司;油酸钠、棕榈酸钠购自西安鲲鹏科技有限公司;油红 O 染料购自上海迈瑞尔化学技术有限公司;苏木素染液购自武汉赛维尔生物科技有限公司;CCK8 试剂盒购自白鲨生物科技;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;第一链 cDNA 反转录试剂、通用型荧光定量 qPCR 试剂购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞和 LO2 细胞均使用含 10 %胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5 %的 CO₂ 培养箱中培养,待细胞汇合度达到 70 %~80 %时,用 0.25 %胰酶-EDTA 消化细胞,按 1:3 传代。取对数生长期的 HepG2 细胞和 LO2 细胞进行实验。

1.2.2 建模 HepG2 细胞和 LO2 细胞铺板 18 h 后,将培养基换为含 5 %胎牛血清、0.5 %无脂肪酸牛血清白蛋白的 DMEM 培养基。将两种细胞系暴露于 PA、OA 或其 1:2 混合物诱导处理 24 h、48 h,进行 CCK8 测定细胞存活率、甘油三酯酶法检测,实验重复 3 次。

1.2.3 CCK8 检测细胞存活率 96 孔板每孔加入 10 μ L CCK8 溶液,在 37 °C 温箱孵育 45 min,用酶标仪检测在 450 nm 处的

吸光值,计算细胞存活率 / %=[(A 实验组 -A 空白组)/(A 对照组 -A 空白组)] $\times$ 100 %。

1.2.4 TG 含量测定 向 6 孔板中加入 0.1 mL 裂解液,混匀后室温静置 10 min。取适量上清液 70 °C 金属浴加热 10 min,室温 2000 r/min 离心 5 min,吸取上层清液用于酶学测定。甘油-3-磷酸氧化酶法测 TG 含量:用 96 孔微板每孔加样品和浓度梯度甘油标准品 10 μ L,依试剂说明书加工作液,混匀,37 °C 温箱孵育 15 min,用酶标仪检测在 550 nm 处的吸光值,绘制标准曲线、计算 TG 浓度(μ mol/L)。二辛可酸(BCA)法检测细胞内蛋白含量:用 96 孔微板每孔加样品和浓度梯度蛋白标准品 20 μ L,按照试剂说明书加工作液、混匀,37 °C 温箱孵育 30 min,用酶标仪检测 562 nm 处的吸光值,绘制标准曲线、计算蛋白质浓度(μ g/ μ L),以蛋白浓度校正 TG 含量。

1.2.5 油红 O 染色检测脂质积累 根据前面实验结果选择 0.25 mol/L PA、0.5 mol/L OA 及终浓度为 0.75 mol/L 混合物处理两种细胞系 24 h 后,吸去 6 孔板中的培养基,以 PBS 洗;4 %多聚甲醛固定细胞 20 min;PBS 洗涤;60 %异丙醇润洗 30 S;每孔加 0.22 μ m 过滤器过滤后的油红 O 染液 1~2 mL,室温下避光染色 30 min;吸出油红 O 染液,60 %异丙醇漂洗;加入苏木素浅染 1 min;PBS 洗涤;倒置显微镜下观察可见中性脂肪被特异性染为红色,细胞核染为蓝色,红色脂质分布于核周胞质中。

1.2.6 提取 RNA 和实时荧光定量 PCR 采用 Trizol 法提取细胞内 RNA 并将其逆转录为 cDNA,通过实时荧光定量 PCR 实验检测基因表达变化。采用比较阈值循环法(2^{- $\Delta\Delta$})评价靶基因的相对 mRNA 表达量,以 GAPDH 的表达作为内参。使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,按照 Δ G 绝对值小于 10;退火温度(T_m)在 58~62 °C 之间;GC 含量在 40 %-60 %;无连续 3 个相同的碱基;产物大小在 100~300 bp;引物长度 18~25 bp 的原则筛选,并通过 NCBI(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>):Primer-BLAST 验证引物特异性,相关引物序列见表 1。

1.3 统计学方法

数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理和分析。两组间的比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK8 法检测细胞活力

与对照组相比,HepG2 和 LO2 细胞的存活率均随饱和脂肪酸 PA 浓度的增加而下降,以 PA 刺激后的下降幅度明显大于 OA 组或混合物组,提示 PA 具有较大的细胞毒性;终浓度为 0.5、0.75 和 1 mol/L 混合物的细胞毒性比用含相同浓度 PA 单独诱导的细胞毒性更低,尽管总脂肪酸浓度是 PA 的三倍高,这表明 OA 对 PA 诱导的细胞毒性具有保护作用,见图 1。

2.2 细胞内 TG 的检测

对于 HepG2 细胞,与对照组相比,以 0.25 mol/L PA 诱导 TG 积累最为显著(24 h: $P<0.01$;48 h: $P<0.01$),0.25 mol/L PA 与相同浓度的 OA 相比较,TG 水平较高,提示以较低浓度的 PA 处理 HepG2 细胞即可诱导显著的 TG 积累。对于 LO2 细胞,与对照组相比,单纯 PA 处理 48 h 随 PA 浓度的增加,细胞内 TG 水平升高,PA 浓度达 0.33 mol/L 后 TG 积累明显($P<0.$

05);单纯 PA 与混合物相比,在不同浓度 PA 基础上加入 2 倍 细胞系中脂肪酸对细胞致脂作用存在差异,见图 2。
浓度的 OA 可显著促进细胞内 TG 积累。这一结果表明,不同

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences

Gene		Primer sequence(5'-3')
GAPDH	F	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	R	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
Bax	F	CGGGTTGTCGCCCTTTTCTA
	R	GAGGAAGTCCAATGTCCAGCC
Bcl-2	F	CAGTGTGGTCTCCGAATGTCTG
	R	GCCTCTGTTCTTCCCTCTACA
Cleaved caspase-3	F	TGGAAGCGAATCAATGGACTCT
	R	TGAATGTTCCCTGAGGTTTGC
α -SMA	F	TATGCCTCTGGACGCACAAC
	R	GCTCAGCAGTAGTAACGAAGGAA
Col.I	F	CCCGGGTTTCAGAGACAAC
	R	TCCACATGCTTTATCCAGCAATC
LC3-II	F	ACCCTGAGTCTTCTCTTCAGGT
	R	GTTGCGCTTCACAAC
P62/SQSTM1	F	GCCATTGCGGAGCCTCATCT
	R	CAGCCATCGCAGATCAGATTG
Beclin-1	F	AGGCAGTGGCGGCTCCTATTC
	R	TGAGGACACCCAGGCAAGACC
NLRP3	F	CAACCTCACGTCACACTGCT
	R	TTTCAGACAACCCAGGTTC
TNF- α	F	CGAGTGACAAGCCTGTAGC
	R	GGTGTGGGTGAGGAGCACAT

Note: F(forward); R(reverse); Bcl-2(B-cell lymphoma-2); Bax(Bcl-2 associated protein X); α -SMA(α -smooth muscle actin); Col.I(collagen type I); LC3 (microtubules associated protein light chain 3); NLRP3(nod-like receptor protein 3); TNF- α (tumor necrosis factor- α).

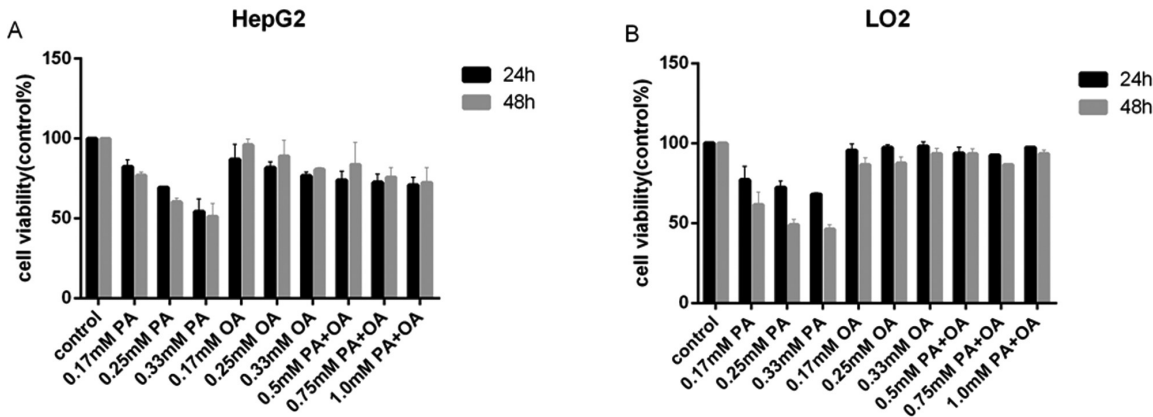


图 1 CCK8 检测不同浓度脂肪酸处理 24 h 或 48 h 后的细胞存活率

Fig.1 Cell viability detected by CCK8 assay after treatment with different concentrations of fatty acids at 24 h/48 h

Note: The effects of different concentrations, different times of PA, OA, and the mixture of 1:2 on the cell viability of HepG2 cells (A) or LO2 cells (B).

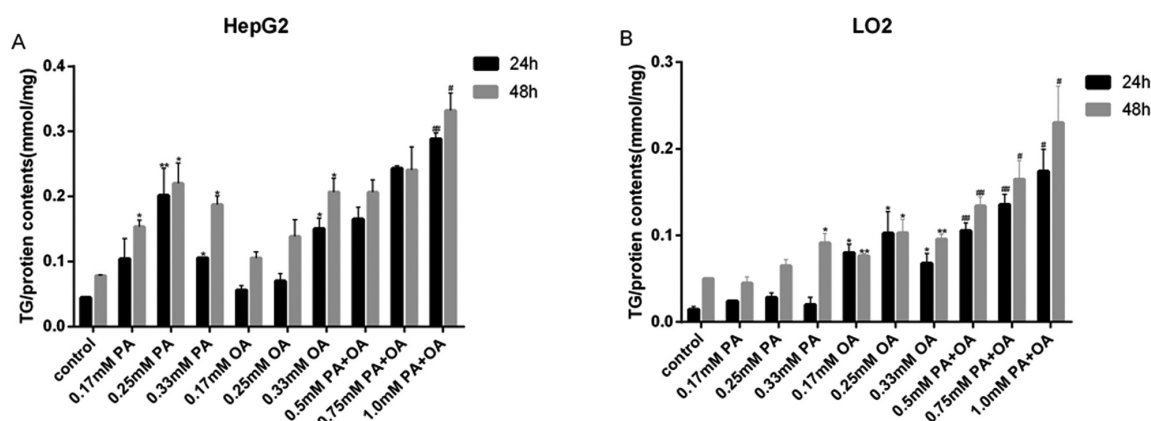


图2 TG酶法检测不同浓度脂肪酸处理24h或48h后的TG水平。

Fig.2 Triglyceride levels detected by Triglyceride assay kit after treatment with different concentrations of fatty acids at 24 h/48 h

Note: Effects of different concentrations, different times of PA, OA, and a mixture of 1:2 on TG accumulation in HepG2 cells (A) or LO2 cells (B).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. PA group.

2.3 油红O染色观察肝细胞脂质积累

油红O染色结果显示,与对照组相比,单纯OA或混合物处理24h,对于HepG2细胞、LO2细胞均可引起细胞内大量红

色脂质沉积;而0.25 mol/L PA可引起HepG2细胞脂质沉积,LO2细胞则不明显,染色观察结果与细胞内TG含量的测定结果一致,见图3。

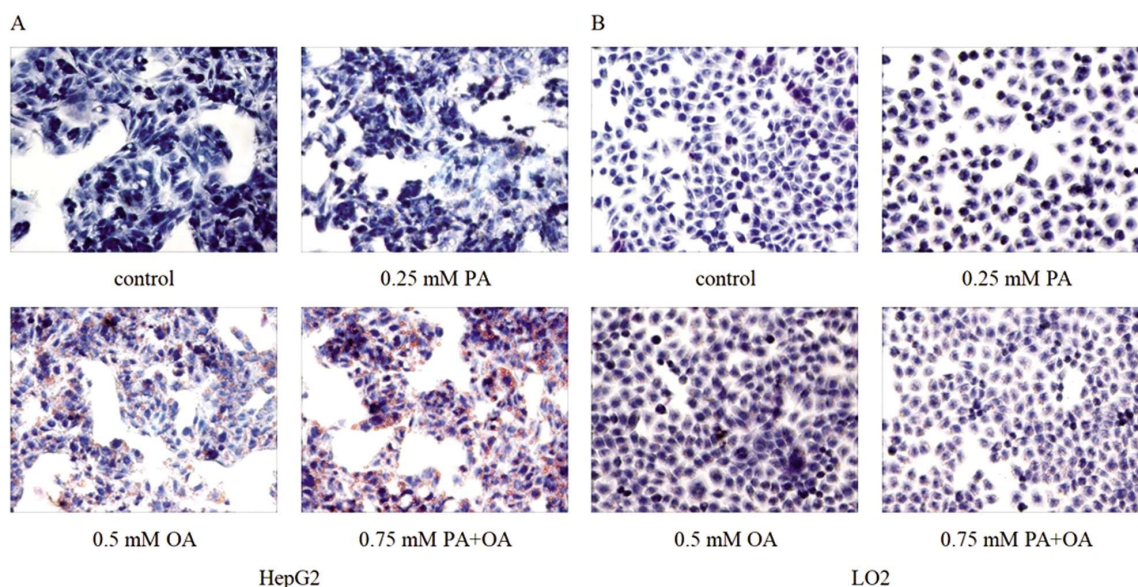


图3 油红O染色观察不同脂肪酸处理24h后的脂质积累($\times 200$)

Fig.3 The degree of lipid accumulation observed by oil red O staining after 24 hours of treatment with different fatty acids($\times 200$)

Note: Oil red O staining to observe lipids deposition after 24 h induction of HepG2 cells (A) or LO2 cells (B) by 0.25 mol/L PA, 0.5 mol/L OA, and the final concentration of 0.75mol/L PA, OA (1:2) mixture.

2.4 qRT-PCR检测凋亡、纤维化、自噬、焦亡相关蛋白及炎症因子mRNA表达变化

qRT-PCR结果显示,与对照组相比,0.25 mol/L PA诱导HepG2细胞及LO2细胞内Bax、Cleaved caspase-3、 α -SMA、Col.I、LC3-II、Beclin-1、NLRP3、TNF- α mRNA相对表达水平上调($P < 0.05$),而抗凋亡基因Bcl2 mRNA相对表达水平下调($P < 0.05$),提示单纯PA可显著诱导HepG2细胞及LO2细胞的细胞损伤。与对照组相比,0.25 mol/L PA处理HepG2细胞后自噬激活;对于LO2细胞,与对照组相比,0.25 mol/L PA处理LO2细胞后自噬活性受抑制、自噬通量受损;而0.5 mol/L OA可促进自噬激活。与0.25 mol/L PA组相比,0.5 mol/L OA及

0.75 mol/L混合物均可诱导HepG2细胞及LO2细胞内Bax、Cleaved caspase-3、NLRP3、TNF- α mRNA相对表达水平下调($P < 0.05$),提示OA对PA诱导的HepG2细胞凋亡及炎症具有逆转作用,见图4。

3 讨论

随着人们饮食结构和生活习惯的改变,当前我国肥胖和代谢综合征患病率增长迅速,MAFLD患病率已经赶超欧美等发达国家并已成为我国肝病和代谢领域的新挑战,对国民健康和社会发展构成严重威胁。肝脏代谢功能障碍早期主要表现为脂质过度积累、脂肪变性,因此,建立疾病早期脂肪变性体外模型

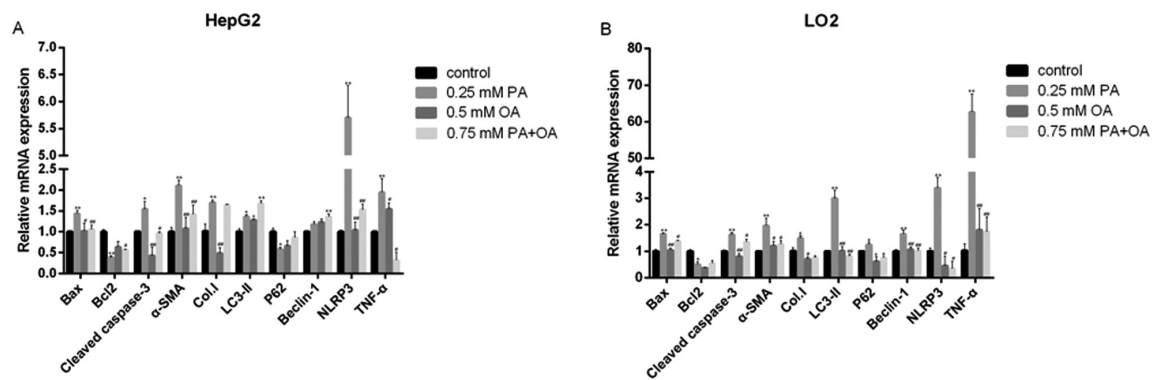


图4 qRT-PCR 检测凋亡、纤维化、自噬及炎症相关蛋白的 mRNA 相对表达水平

Fig.4 The mRNA expression levels of apoptosis-related proteins, fibrosis-related proteins, autophagy-related proteins, and inflammatory factors were detected by qRT-PCR

Note: 0.25 mol/L PA, 0.5 mol/L OA and the final concentration of 0.75mol/L PA, OA (1:2) mixture induced apoptosis-related protein (Bax, Bcl-2, Cleaved caspase-3), fibrosis-related proteins (α -SMA, Col.I), autophagy-related proteins (LC3- II, P62/SQSTM1, Beclin-1), inflammatory factors (NLRP3, TNF- α) relative expression levels in HepG2 cells (A) or LO2 cells (B) for 24 h. * P <0.05, ** P <0.01 vs. control group; # P <0.05, ## P <0.01 vs. PA group.

是基于细胞的脂肪超载^[9]。随着疾病进展到后期,肝脏内脂质代谢异常,肝细胞在长期脂质过度积累的刺激下免疫反应损伤及氧化应激损伤加重,细胞表现出一系列炎症变化^[6,15],提示建立晚期 MAFLD 体外细胞模型应以显著细胞损伤、炎症为评估指标。由于 MAFLD 恶化的不良结果及当前缺乏对其有效的治疗手段,亟待建立一种晚期代谢相关脂肪性肝病体外细胞模型,为研发出 MAFLD 的良好治疗方式提供基础,这对于更好的研究 MAFLD 疾病的发生、发展非常关键。

肝脏细胞、脂肪细胞中 TG 含量的上调在以往研究中往往被认为是细胞脂肪变性加重的表征^[16,17],然而,在最近的研究中,有证据表明细胞中游离脂肪酸的酯化转化为 TG 不是一个有毒的事件,而是肝脏解毒过程的一部分^[18]。非酯化饱和脂肪酸(如 PA)的积累具有肝毒性,因为它们能够诱导肝细胞脂肪凋亡^[19,20],相比之下,不饱和脂肪酸(如 OA)相对来说是无毒的,这可能是由于 OA 能够迅速酯化并并入甘油三酯。此外,单不饱和脂肪酸可以通过将有毒脂肪酸转移到甘油三酯存储中,从而抑制饱和脂肪酸引起的肝脏脂肪毒性,我们的研究发现 PA 具有较大的细胞毒性,并且 OA 对 PA 诱导的细胞毒性具有保护作用,这一结果与 Chen 等人^[18]的文献数据一致。然而,OA 是如何发挥对 PA 细胞毒性缓解作用的,目前尚不清楚。可能的解释是,OA 不仅参与脂质吸收或合成,也调节许多脂质代谢及细胞损伤基因的表达,提示 OA 的影响可能是一个复杂的过程。

最近的研究中以 PA 处理 HepG2 细胞或 LO2 细胞用于研究脂细胞凋亡、脂质积累或脂肪酸代谢^[21-23];此外存在部分研究通过 PA 与脂多糖共同处理 HepG2 细胞或 LO2 细胞引起肝细胞损伤及焦亡发生^[24,25]。与以往研究相同,PA 诱导 HepG2 细胞发生细胞凋亡、焦亡等病理变化,导致严重的细胞损伤,OA 和 PA 的混合阻止了细胞凋亡发生和 NLRP3 炎症小体的激活,肝细胞脂肪凋亡是 MAFLD 发病的关键过程,与进行性炎症和纤维化相关,同样,我们的研究中也验证了这一点。不同的是,我们发现 HepG2 细胞以单纯 PA 处理即可诱导显著脂质累积,而在 LO2 细胞中则不明显,揭示不同细胞系中脂肪酸对细胞的致脂作用存在差异。本研究提供了不同脂肪酸诱导两种肝细胞

系(LO2 和 HepG2)后细胞中脂肪凋亡、焦亡及纤维化等的变化,由于分别是正常细胞和肿瘤细胞,对脂肪酸处理的反应会略有不同。Fu 等人^[26]以 OA 处理 HepG2 细胞成功诱导发生脂肪变性,建立单纯性肝细胞脂肪变性模型。最新的国际专家组共识中还提到肝脂肪变性不能作为论证 MAFLD 细胞模型建立成功的局限指标,需综合炎症因子表达、细胞死亡、自噬激活及纤维化发生等指标对体外模型进行评估^[1,27]。依据脂质积累显著、细胞毒性较低的建模条件,我们选择 PA、OA 及混合物诱导细胞 24 h 后检测细胞内基因表达变化,验证 PA、OA 与混合物在两种细胞系中对炎症、凋亡、自噬等的影响。纤维化是疾病不良结局的重要指标,在本研究中 PA 诱导肝细胞系纤维化相关蛋白基因表达上调,初步验证了肝细胞存在纤维化趋势,肝纤维化是细胞受损后的修复反应,在慢性肝病向肝硬化发展的过程中发挥重要作用。肝细胞内脂质蓄积与自噬活性的改变密切相关^[28],在无自噬的情况下,细胞可能无法通过酸性脂肪酶处理脂滴,这可能导致脂滴积累和游离脂肪酸有效性降低,导致线粒体 β 氧化和 ATP 生成减少,对肝细胞自噬的药物或基因抑制已被证明可以降低 β -氧化率,并引起明显的脂质积聚^[29]。在 HepG2 细胞中,以 PA、OA 或两者混合物处理 HepG2 细胞后引起自噬小体形成且被正常清除,自噬激活;而 LO2 细胞以 PA 处理后虽存在自噬小体形成,但自噬体降解抑制,自噬通量受损;以 OA 单独处理 LO2 细胞自噬激活。此外,Zhang 等人^[30]的研究发现不同诱导时间下饱和棕榈酸盐诱导细胞激活自噬或自噬抑制,其中 Bax/Bak 的状态是自噬在棕榈酸盐暴露下的促生存或促死亡功能的决定因素。提示以不同脂肪酸、不同浓度条件、不同时间条件处理细胞后对自噬状态的影响尚待进一步完善。

细胞模型由于实验条件可控、影响因素少已被广泛应用于 MAFLD 的体外研究,现有研究中建立 MAFLD 细胞模型的方式多样,而模型中诱导试剂对细胞脂肪变性、损伤和炎症等作用未被充分描述。因此,本研究通过以不同浓度的 PA、OA 或两者比例为 1:2 的混合物分别诱导 HepG2、LO2 细胞 24 h、48 h,检测细胞活力、TG 及脂滴沉积,明确不同诱导试剂对细胞

细胞的脂肪毒性及致脂作用,发现以较低浓度的 PA 较短时间作用会降低细胞存活率、增加细胞 TG 积累。基于以上实验结果选择合适浓度的诱导试剂处理合适时间后检测了凋亡、纤维化、自噬相关蛋白及炎症因子基因水平的相对表达变化,结果显示与空白对照组及 OA 或混合物组相比较,以较低浓度的 PA 处理 24 h 可诱导严重的细胞损伤,考虑到 PA 对 LO2 细胞毒性较大,且诱导脂滴形成不明显,拟选择 HepG2 细胞作为更合适的 MAFLD 体外细胞模型。我们通过区分不同的脂肪酸对肝细胞系的影响,提供脂质积累、细胞凋亡、细胞焦亡、自噬、纤维化等基因水平变化的数据,为 MAFLD 机制研究选择合适试剂诱导细胞构建模型提供参考,并以棕榈酸诱导 HepG2 细胞建立一种细胞损伤严重、炎症明显增加且向肝纤维化发展的晚期 MAFLD 体外细胞模型,为针对 MAFLD 晚期肝脏细胞损伤、炎症反应等治疗靶点和分子机制的进一步研究提供基础。

参考文献(References)

- [1] ESLAM M, NEWSOME P N, SARIN S K, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement[J]. J hepatol, 2020, 73(1): 202-209
- [2] 薛芮, 范建高. 代谢相关脂肪性肝病新定义的国际专家共识简介[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(06): 1224-1227
- [3] ESLAM M, SANYAL A J, GEORGE J. International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease [J]. Gastroenterology, 2020, 158(7): 1999-2014.e1
- [4] 舒筠然, 李俊琪, 刘琼. 非酒精性脂肪性肝病的流行病学和危险因素分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(09): 2085-2090
- [5] ROTMAN Y, NEUSCHWANDER-TETRI B A. Liver fat accumulation as a barometer of insulin responsiveness again points to adipose tissue as the culprit[J]. Hepatology, 2017, 65(4): 1088-1090
- [6] VILAR-GOMEZ E, CALZADILLA-BERTOT L, WAI-SUN WONG V, et al. Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients with Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Multi-National Cohort Study [J]. Gastroenterology, 2018, 155 (2): 443-457.e17
- [7] 倪家敏, 周飞, 黄璧生, 等. 高糖高脂诱导大鼠代谢相关脂肪性肝病模型的建立[J]. 药物评价研究, 2021, 44(03): 487-491
- [8] COLE B K, FEAVEY R E, WAMHOFF B R, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) models in drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2018, 13(2): 193-205
- [9] KOZYRA M, JOHANSSON I, NORDLING A, et al. Human hepatic 3D spheroids as a model for steatosis and insulin resistance [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 14297
- [10] WILLEBRORDS J, PERREIRA I V, MAES M, et al. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research[J]. Prog Lipid Res, 2015, 59: 106-125
- [11] DONATO M T, JOVER R, Gómez-Lechón M J. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering [J]. Curr Drug Metab, 2013, 14(9): 946-968
- [12] DASHTI N, WOLFBauer G. Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin[J]. J Lipid Res, 1987, 28(4): 423-436
- [13] MARRA F, SVEGLIATI-BARONI G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis[J]. J Hepatol, 2018, 68(2): 280-295
- [14] CHEON H G, CHO Y S. Protection of palmitic acid-mediated lipotoxicity by arachidonic acid via channeling of palmitic acid into triglycerides in C2C12[J]. J Biomed Sci, 2014, 21(1): 13
- [15] CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE J E, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases [J]. Hepatology, 2018, 67(1): 328-357
- [16] VERGANI L. Fatty Acids and Effects on In Vitro and In Vivo Models of Liver Steatosis[J]. Curr Med Chem, 2019, 26(19): 3439-3456
- [17] MATO J M, ALONSO C, NOUREDDIN M, et al. Biomarkers and subtypes of deranged lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(24): 3009-3020
- [18] CHEN X, LI L, LIU X, et al. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis[J]. Life sciences, 2018, 203: 291-304
- [19] LEE J Y, CHO H K, KWON Y H. Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells[J]. Metabolism, 2010, 59(7): 927-34
- [20] CAO J, FENG X X, YAO L, et al. Saturated free fatty acid sodium palmitate-induced lipopapoptosis by targeting glycogen synthase kinase-3 β activation in human liver cells [J]. Dig Dis Sci, 2014, 59(2): 346-357
- [21] 范明娟, 聂玉强, 詹琪, 等. 利拉鲁肽联合锌 α 2 糖蛋白对棕榈酸诱导的 HepG2 细胞凋亡、脂质代谢和炎症因子表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(22): 2856-2861
- [22] FANG K, WU F, CHEN G, et al. Diosgenin ameliorates palmitic acid-induced lipid accumulation via AMPK/ACC/CPT-1A and SREBP-1c/FAS signaling pathways in LO2 cells [J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 255
- [23] XIAO Q, ZHANG S, YANG C, et al. Ginsenoside Rg1 Ameliorates Palmitic Acid-Induced Hepatic Steatosis and Inflammation in HepG2 Cells via the AMPK/NF- κ B Pathway[J]. Int J Endocrinol, 2019, 2019: 7514802
- [24] LI Y, WANG C, LU J, et al. PPAR δ inhibition protects against palmitic acid-LPS induced lipidosis and injury in cultured hepatocyte L02 cell[J]. Int J Med Sci, 2019, 16(12): 1593-1603
- [25] GAUL S, LESZCZYNSKA A, ALEGRE F, et al. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis[J]. J Hepatol, 2021, 74(1): 156-167
- [26] FU X, ZHU J, ZHANG L, et al. Long non-coding RNA NEAT1 promotes steatosis via enhancement of estrogen receptor α -mediated AQP7 expression in HepG2 cells[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 1782-1787
- [27] KAWAGUCHI T, TSUTSUMI T, NAKANO D, et al. MAFLD: Renovation of clinical practice and disease awareness of fatty liver[J]. Hepatol Res, 2021 [Epub ahead of print]
- [28] TANAKA S, HIKITA H, TATSUMI T, et al. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. Hepatology, 2016, 64 (6): 1994-2014
- [29] MAO Y, YU F, WANG J, et al. Autophagy: a new target for nonalcoholic fatty liver disease therapy[J]. Hepat Med, 2016, 8: 27-37
- [30] ZHANG E, LU X, YIN S, et al. The functional role of Bax/Bak in palmitate-induced lipopapoptosis [J]. Food Chem Toxicol, 2019, 123: 268-274