

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.16.006

亚麻酸对肝癌细胞 HepG2 节律的调控研究*

刘佐君 张树菊 孟凡彪 钱民先 敖英[△]

(深圳大学医学部 广东 深圳 518060)

摘要 目的:探讨多不饱和脂肪酸亚麻酸对肝癌细胞 HepG2 节律钟的影响。**方法:**通过 50% 的马血清刺激诱导 HepG2 细胞同步化, 利用亚麻酸处理同步化后的 HepG2 细胞。进一步利用荧光定量 PCR 和 western-blot 检测节律钟关键基因的变化。**结果:**HepG2 细胞经过亚麻酸处理后节律钟关键基因芳烃受体核转位蛋白 3 (brain and muscle Arnt-like protein-1, BMAL1) 和蓝光受体蛋白 1 (Cryptochrome 1, CRY1) 在转录水平的表达水平有所降低。与此一致的是, 在蛋白质水平 CRY1 和 BMAL1 的表达同样受到亚麻酸的抑制。同时发现, CRY1 的转录水平的节律周期有明显的缩短。进一步研究发现, 亚麻酸对 HepG2 细胞的脂肪酸合成关键基因脂肪酸合酶 (Fatty acid synthase, FASN) 和硬脂酰辅酶 A 脱氢酶 (Stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1), 以及免疫促炎因子白细胞介素 -6 (Interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素 -8 (Interleukin-8, IL-8) 的 mRNA 的表达具有明显的抑制效应。**结论:**亚麻酸影响了肝癌 HepG2 细胞水平的节律基因的表达水平以及缩短了节律基因的周期, 并且对于 HepG2 细胞的脂肪酸合成以及免疫促炎因子有明显的抑制效应。

关键词:节律钟; 亚麻酸; 脂肪酸合成; 免疫促炎因子

中图分类号:R-33; R735.7; Q493.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)16-3028-04

Effects of Alpha-Linolenic Acid on the Circadian Expression Pattern of Human Liver Carcinoma HepG2 Cells *

LIU Zuo-jun, ZHANG Shu-ju, MENG Fan-biao, QIAN Min-xian, AO Ying[△]

(College of medicine, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong, 518060, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of alpha-Linolenic acid on the cell autonomous circadian rhythm of HepG2 cells.

Methods: The human liver carcinoma HepG2 cells were synchronized by 50% horse serum, and treated with BSA or 200 μ mol/L alpha-Linolenic acid. The oscillation profiles of circadian genes were examined by qRT-PCR and western blot. **Results:** alpha-Linolenic acid slightly inhibited the amplitude of the mRNA levels of several key clock components, including CRY1 and BMAL1. The circadian period length of CRY1 were reduced by alpha-Linolenic acid treatment. Western blot analysis revealed alpha-Linolenic acid treatment led to reduced protein levels of CRY1 and BMAL1. In addition, alpha-Linolenic acid dramatically inhibited oscillation of fatty acid synthesis (FASN and SCD1) and proinflammatory cytokines (IL-6 and IL-8). **Conclusions:** alpha-Linolenic acid inhibited amplitude of several circadian core clock genes, and reduced period length of CRY1. Meanwhile, alpha-Linolenic acid strongly inhibited expression of fatty acid synthesis and proinflammatory cytokines.

Key words: Circadian clock; Alpha-Linolenic acid; Fatty acid biosynthesis; Proinflammatory cytokine

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7; Q493.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)16-3028-04

前言

亚麻酸(alpha-Linolenic acid, ALA)是含有 18 个碳的 ω -3 类的长链非饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA)。研究表明, 亚麻酸是人体的必需氨基酸, 而且对于人体的健康具有很重要的作用。在动物体内的研究发现亚麻酸是另外两种重要的 PUFA, docosahexaenoic acid (DHA) 和 eicosapentaenoic acids (EPA) 的合成前体。大量的研究已经证明了 DHA 对于大脑的发育具有非常重要的作用^[1,2]。给怀孕小鼠喂食富含亚麻酸的食物可以有效地提高后代脑部的 DHA 水平, 并且显著增加

大脑的重量^[3]。然而, 在人体内亚麻酸转化成为 DHA 是非常有限的, 说明亚麻酸对于人体健康有独立于 DHA 的功能。确实如此, 在卷尾猴的相关研究中心发现, 当食物中缺乏亚麻酸时会导致脂肪肝以及减少的弹性组织等病理学特征^[4]。节律钟是从低等到高等生物都存在的一种进化上保守的、为了适应 24 小时昼夜变化的生物体内在的调控体系。生物节律的紊乱会导致一系列的代谢相关疾病, 包括糖尿病、肥胖等^[5]。在小鼠体的研究中发现, 模拟频繁的时差颠倒会导致小鼠出现非酒精性脂肪肝、肝炎肝硬化等症状^[6]。鉴于亚麻酸对于血脂调节的重要作用, 本研究旨在通过研究亚麻酸对人的肝癌 HepG2 细胞节律

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81601215); 深圳市科技创新基础研究项目(JCYJ20150525092941002)

作者简介: 刘佐君(1982-), 博士后, 主要研究方向: 衰老与生物节律, E-mail: ijing1982@szu.edu.cn

[△] 通讯作者: 敖英(1987-), 博士后, 主要研究方向: 衰老与肿瘤的发生发展机制, E-mail: kelleysweet@163.com, 电话: 18318723150

(收稿日期: 2017-11-28 接受日期: 2017-12-23)

钟的调控功能以及进一步对脂代谢和炎症相关基因的影响,阐明亚麻酸是否可能有益于缓解生物节律紊乱所导致的代谢相关疾病。

1 材料与方法

1.1 材料

人的肝癌 HepG2 细胞系来自本实验室冻存。胎牛血清(FBS)购自 pan-biotech 公司。亚麻酸购自 sigma 公司。TRIzol 和马血清(Horse serum)购自 invitrogen 公司。反转录试剂盒和荧光定量试剂盒购自宝生物公司。CRY1 和 BMAL1 的抗体购自 abcam 公司。Real-time PCR 仪购自美国 bio-rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组处理 HepG2 细胞培养于 DMEM 培养基含有 10% 的 FBS、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素中。细胞经过 50% 的马血清处理 2 小时诱导细胞同步化,然后培养在无血清的 DMEM 培养基中继续培养,实验组加入 200 $\mu\text{mol/L}$ 亚麻酸,对照组加入 BSA。细胞培养经过 24 小时后取样,每隔 4 小时取一次样共取六次。分别收取 24 h, 28 h, 32 h, 36 h, 40 h 和 44 h 不同时间点的细胞样品。细胞经过 TRIzol 裂解后提取 mRNA, 经过反转录成 cDNA 后利用 Realtime PCR 检测相关基因的表达变化。荧光定量 PCR 通过 BIO-RAD CFX Connect™ Real-time PCR 仪器进行检测和分析。读取基因扩增的 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因的相对表达量。

1.2.2 节律钟基因蛋白质表达的检测 马血清诱导同步化之后 24 小时开始取样们分别收取 24 h, 28 h, 32 h, 36 h, 40 h 和 44 h 不同时间点的细胞样品经过 SDS-loading buffer 裂解,煮沸 10 分钟。通过 SDS-PAGE 电泳转膜到含有正电荷的 PVDF 膜。TBST 含有 5% 的脱脂奶粉封闭 1 小时,加入一抗 4℃ 过夜

后,用 TBST 洗三遍,加入羊抗兔的二抗孵育 1 小时,后经过 TBST 洗三遍后经过化学发光显影。

1.2.3 节律周期以及相对震荡幅度分析 利用 JTK-CYCLE 软件进行分析^[7]。

1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验进行两两比较和双因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 亚麻酸对 HepG2 细胞节律基因 mRNA 的影响

首先我们观察到 HepG2 细胞经过 50% 马血清刺激后节律关键基因的表达都有明显的 24 小时的节律周期,说明 HepG2 细胞可以用来研究肝脏细胞的自主性节律。进一步比较亚麻酸处理和对照组节律钟关键基因转录水平发现,亚麻酸处理导致 CRY1 转录水平在血清刺激后的 28 到 36 小时有明显的降低。对照组与亚麻酸处理组 CRY1 的相对表达量诱导后 24 小时至 44 小时分别是 1.00 ± 0.07 vs 0.94 ± 0.12 , 1.26 ± 0.04 vs 1.09 ± 0.02 ($P < 0.05$), 1.62 ± 0.06 vs 1.28 ± 0.08 ($P < 0.01$), 1.34 ± 0.06 vs 1.12 ± 0.05 , 1.13 ± 0.14 vs 1.38 ± 0.07 , 1.31 ± 0.06 vs 1.26 ± 0.03 。BMAL1 的转录水平在 28 至 32 小时是有明显的降低。对照组与亚麻酸处理组在诱导后 24 小时至 44 小时 BMAL1 的相对表达量分别是 1.00 ± 0.09 vs 0.92 ± 0.13 , 1.31 ± 0.02 vs 0.69 ± 0.04 ($P < 0.001$), 1.52 ± 0.12 vs 0.59 ± 0.06 ($P < 0.01$), 1.05 ± 0.01 vs 1.17 ± 0.06 , 0.98 ± 0.04 vs 1.12 ± 0.13 , 1.00 ± 0.01 vs 0.99 ± 0.08 。此外,通过分析节律周期我们发现相比于对照组,亚麻酸处理明显缩短了 CRY1 的节律周期。见图 1。

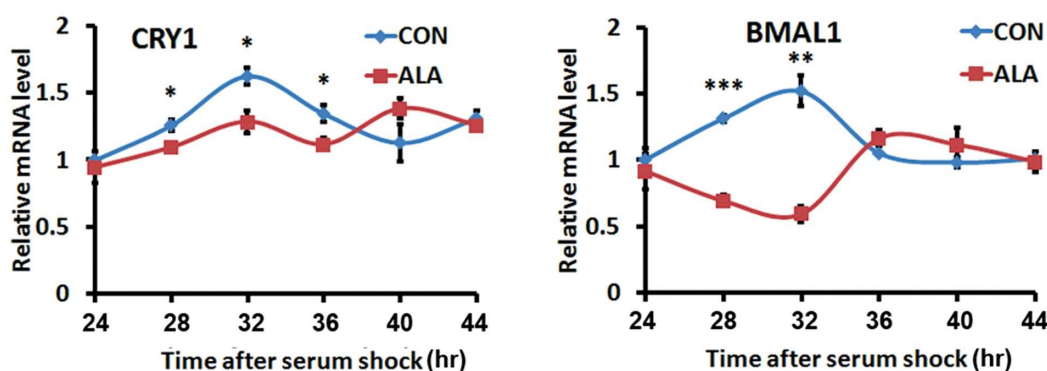


图 1 亚麻酸对 HepG2 细胞节律基因 mRNA 表达模式的影响

Fig.1 Effect of ALA to circadian genes mRNA expression

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with control group.

2.2 亚麻酸对 HepG2 细胞节律钟基因蛋白变化的影响

检测对照组与亚麻酸组 BMAL1 和 CRY1 的蛋白水平发现,亚麻酸处理组 BMAL1 的蛋白水平在马血清诱导后 28 至 36 小时有明显的降低,CRY1 蛋白在 28 至 32 小时有显著的降低。见图 2。

2.3 亚麻酸对 HepG2 细胞脂代谢合成基因的影响

肝脏是脂代谢调控的重要器官,节律紊乱会影响到肝脏脂

肪代谢,研究表明,脂肪酸合成受到节律钟的调控。因此,我们进一步检测了亚麻酸对脂肪酸合成关键基因的影响。首先我们发现脂肪酸合成关键基因 *FASN* 和 *SCD1* 在转录水平有明显的周期性表达模式,这表明 *FASN* 和 *SCD1* 受到细胞自主性周期的调控。相比于对照组,亚麻酸处理显著地降低了 *FASN* 和 *SCD1* 的表达水平。对照组与亚麻酸处理组 *FASN* 在诱导后 24 小时至 44 小时的相对表达水平分别为 1.01 ± 0.06 vs $0.32 \pm$

0.13($P<0.01$), 0.65 ± 0.02 vs 0.18 ± 0.07 ($P<0.01$), 1.06 ± 0.08 vs 0.26 ± 0.09 ($P<0.01$), 0.82 ± 0.03 vs 0.34 ± 0.04 ($P<0.001$), 0.51 ± 0.05 vs 0.40 ± 0.05 , 1.51 ± 0.07 vs 0.46 ± 0.05 ($P<0.001$)。对照组与亚麻酸处理组 *SCD1* 在诱导后 24 小时至 44 小时的

相对表达水平分别为 1.01 ± 0.12 vs 0.57 ± 0.11 , 1.12 ± 0.01 vs 0.44 ± 0.07 ($P<0.001$), 1.22 ± 0.11 vs 0.33 ± 0.06 ($P<0.01$), 1.15 ± 0.06 vs 0.45 ± 0.04 ($P<0.01$), 0.71 ± 0.10 vs 0.43 ± 0.04 , 1.63 ± 0.03 vs 0.45 ± 0.02 ($P<0.001$)见图 3。

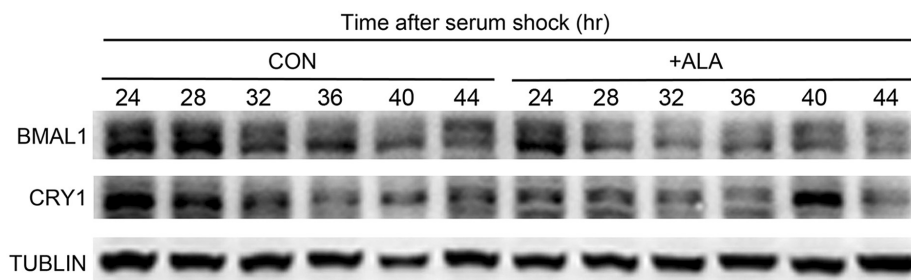


图 2 亚麻酸对 HepG2 细胞节律基因蛋白表达模式的影响

Fig.2 Effect of ALA to circadian genes protein expression

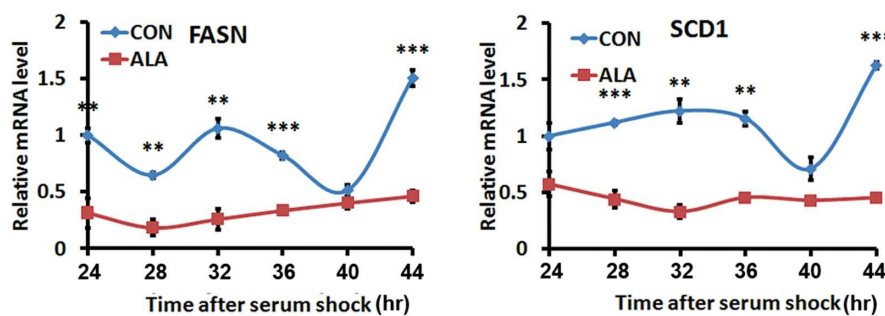


图 3 亚麻酸对 HepG2 细胞脂肪酸合成基因的节律性表达的影响

Fig.3 Effect of ALA to expression of hepatic lipid biothynthesis genes

2.4 亚麻酸对 HepG2 细胞免疫促炎因子表达的影响

免疫炎症反应和肥胖导致的代谢类疾病的产生具有非常紧密的关系。因此,我们进一步检测了亚麻酸对免疫促炎因子基因表达的影响。首先我们发现对照组中 *IL-6* 的转录有一个非常明显的震荡上升的表达模式,而 *IL-8* 的表达具有一个震荡的表达模式。而亚麻酸处理显著的降低了 *IL-6* 和 *IL-8* 的震荡表达。对照组与亚麻酸处理组 *IL-6* 在诱导后 24 小时至 44 小时的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.06 vs 1.47 ± 0.20 , $5.99 \pm$

0.20 vs 4.65 ± 0.21 , 4.63 ± 0.26 vs 3.03 ± 0.16 ($P<0.01$), 7.94 ± 0.37 vs 3.83 ± 0.14 ($P<0.01$), 6.27 ± 0.53 vs 2.83 ± 0.17 ($P<0.01$), 10.18 ± 0.71 vs 4.99 ± 0.48 ($P<0.01$)。对照组与亚麻酸处理组 *IL-8* 在诱导后 24 小时至 44 小时的相对表达水平分别为 1.03 ± 0.17 vs 0.101 ± 0.12 , 2.36 ± 0.19 vs 1.31 ± 0.18 ($P<0.05$), 1.77 ± 0.12 vs 1.17 ± 0.06 ($P<0.05$), 1.18 ± 0.13 vs 1.17 ± 0.08 , 1.54 ± 0.34 vs 1.31 ± 0.08 , 2.47 ± 0.41 vs 1.52 ± 0.22 。见图 4。

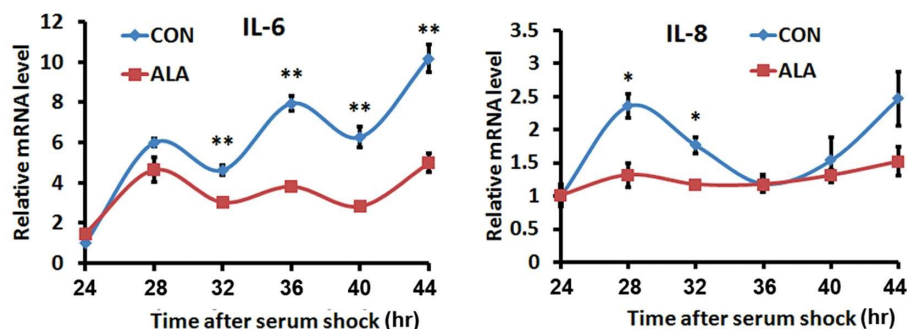


图 4 亚麻酸对 HepG2 细胞免疫促炎因子的节律性表达的影响

Fig.4 Effect of ALA to expression of proinflammatory cytokines

3 讨论

节律钟的分子水平的调控是由一系列的反馈负反馈调节环来维持的^[8]。简而言之,转录激活子 BMAL1 和 CLOCK 形成异源二聚体激活下游基因的表达,其下游最主要的两个下游基

因家族包括 Period(PER)和 Cryptochrome(CRY)。PER 和 CRY 随着表达水平的升高形成异源二聚体从细胞质进入细胞核与 BMAL1 和 CLOCK 形成复合物通过抑制 BMAL1 的转录活性而抑制其自身的表达。而另外一个调控环包括 Rev-erbs 和 RORs 两个家族的转录因子分别抑制和激活 BMAL1 的转录。

亚麻酸作为多不饱和脂肪酸对于人体的健康有重要作用,其主要研究集中于对于大脑发育的影响。我们通过研究亚麻酸对HepG2细胞自主性节律的影响发现,亚麻酸处理对于节律钟关键基因的表达水平有略微的抑制效应,包括BMAL1和CRY1。值得注意的是亚麻酸处理显著缩短了CRY1的节律表达周期。已经有研究发现CRY1蛋白质的稳定性降低会缩短小鼠以及细胞的节律周期,而且Cry1突变体小鼠也具有相同的表型^[9-11]。因此,亚麻酸有可能是影响了CRY1蛋白质的稳定性进一步影响了其mRNA的节律周期。然而亚麻酸是否能够影响体内的生物节律周期这还需要进一步的研究。人体内的节律钟是由下丘脑的视交叉神经上核来产生和维持的。研究表明,老年老鼠的生物节律周期有明显的延长^[12]。由于大多数的药物无法通过血脑屏障,而亚麻酸这种天然产物对大脑的有益作用是否可以影响到节律钟是非常值得进一步研究的课题。此外,在模拟倒时差的实验中发现老年老鼠需要更长的时间来适应时差的变化,亚麻酸是否有助于适应时差的颠倒也需要我们进一步的研究。

节律钟的紊乱会导致一系列的代谢相关疾病,包括肥胖、糖尿病和心血管疾病等^[13,14]。而高脂饮食喂养小鼠也会造成节律钟基因表达水平发生明显的变化^[15,16]。不仅如此,高脂饮食喂养小鼠还会导致生物节律周期出现明显的延长,这和老年老鼠的表型非常相似。我们发现,亚麻酸不仅影响了节律钟关键基因的变化,而且强烈地抑制了脂肪酸合成基因FASN和SCD1的节律表达。众所周知,免疫炎症反应对于肥胖相关疾病的发生具有重要的促进作用。我们同时发现亚麻酸强烈地抑制了免疫促炎因子IL-6和IL-8的表达,这说明亚麻酸也许可以治疗高脂饮食所导致的肥胖相关的疾病。

大量的研究发现膳食补充亚麻酸可以防止肥胖所导致的肝脏脂肪的堆积,抑制免疫炎症反应^[17-20]。而且,亚麻酸可以延长线虫的寿命^[21]。本实验通过研究亚麻酸对节律钟的影响从另一个方面说明了亚麻酸对节律钟,肝脏脂代谢以及炎症因子的调控作用。

综上所述,亚麻酸可以影响HepG2细胞的自主性生物节律基因的表达,以及调控CRY1的节律周期。亚麻酸对于脂肪酸合成酶基因以及免疫促炎因子基因的强烈抑制效应可能有助于缓解肥胖相关的病的产生。

参考文献(References)

- [1] McNamara RK, Vannest JJ, Valentine CJ. Role of perinatal long-chain omega-3 fatty acids in cortical circuit maturation: Mechanisms and implications for psychopathology [J]. *World J Psychiatry*, 2015, 5(1): 15-34
- [2] Crawford MA, Broadhurst CL, Guest M, et al. A quantum theory for the irreplaceable role of docosahexaenoic acid in neural cell signalling throughout evolution [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2013, 88(1): 5-13
- [3] Lenzi Almeida KC, Teles Boaventura G, Guzman Silva MA. Influence of omega-3 fatty acids from the flaxseed (*Linum usitatissimum*) on the brain development of newborn rats [J]. *Nutr Hosp*, 2011, 26(5): 991-996
- [4] Fiennes RN, Sinclair AJ, Crawford MA. Essential fatty acid studies in primates linolenic acid requirements of capuchins[J]. *J Med Primatol*, 1973, 2(3): 155-169
- [5] Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics[J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1349-1354
- [6] Kettner NM, Voicu H, Finegold MJ, et al. Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis [J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(6): 909-924
- [7] Hughes ME, Hogenesch JB, Kornacker K. JTK_CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets[J]. *J Biol Rhythms*, 2010, 25(5): 372-380
- [8] Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2012, 35: 445-462
- [9] Yoo SH, Mohawk JA, Slepka SM, et al. Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1091-1105
- [10] Kume K, Zylka MJ, Sriram S, et al. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop[J]. *Cell*, 1999, 98(2): 193-205
- [11] Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, et al. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1106-1118
- [12] Chang Hung-chun, Guarente L. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging [J]. *Cell*, 2013, 153(7): 1448-1460
- [13] Paschos GK, Ibrahim S, Song Weng-liang, et al. Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl[J]. *Nat Med*, 2012, 18(12): 1768-1777
- [14] Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes[J]. *Nature*, 2010, 466(7306): 627-631
- [15] Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, et al. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice [J]. *Cell Metab*, 2007, 6(5): 414-421
- [16] Eckel-Mahan KL, Patel VR, de Mateo S, et al. Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge[J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1464-1478
- [17] Patterson E, Wall R, Lisai S, et al. Bifidobacterium breve with alpha-linolenic acid alters the composition, distribution and transcription factor activity associated with metabolism and absorption of fat[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43300
- [18] Miotto PM, Horbatuk M, Proudfoot R, et al. alpha-Linolenic acid supplementation and exercise training reveal independent and additive responses on hepatic lipid accumulation in obese rats[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, 312(6): E461-E470
- [19] Su Huang, Liu Rui-jie, Chang Ming, et al. Effect of dietary alpha-linolenic acid on blood inflammatory markers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Eur J Nutr*, 2017
- [20] Saito S, Mori A, Osaki N, et al. Diacylglycerol Enhances the Effects of Alpha-Linolenic Acid Against Visceral Fat: A Double-Blind Randomized Controlled Trial[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2017
- [21] Qi Wen-bo, Gutierrez GE, Gao Xiao-lin, et al. The omega-3 fatty acid alpha-linolenic acid extends *Caenorhabditis elegans* lifespan via NHR-49/PPARalpha and oxidation to oxylipins[J]. *Aging Cell*, 2017, 16(5): 1125-1135