

非酒精性脂肪性肝病细胞模型中自噬与脂质代谢的相互调节

闫蓉^{1a}, 牛春燕^{1a}, 于璐², 田宇^{1b}

(1 西安医学院第一附属医院 a. 消化内科; b. 检验科, 西安 710077; 2 河南省人民医院 内分泌科, 郑州 450003)

摘要:目的 探讨非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 中自噬与脂质代谢的相互作用。方法 体外人肝细胞培养 (脂肪变性) 制备 NAFLD 细胞模型, 雷帕霉素诱导细胞自噬, β -甲基腺嘌呤抑制细胞自噬, MTT 比色法测定细胞活力, ELISA 法检测各组细胞 TG、ALT、AST、LDH、GGT、Alb 水平, IF 法检测 LC3-II 的定位与分布, Western Blot 检测 LC3-II/LC3-I 比值。计量资料多组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验。结果 诱导自噬组的吸光度值和细胞活率与脂肪变组比较, 明显下降 (HL-7702 细胞 q 值分别为 4.160、4.110, SK-HEP-1 细胞 q 值分别为 4.407、4.032; P 值均 <0.05)。脂肪变组 TG、ALT、AST、LDH、GGT、Alb 水平与对照组相比, 明显升高 (HL-7702 细胞 q 值分别为 5.316、3.730、4.013、6.967、6.192、5.531, SK-HEP-1 细胞 q 值分别为 4.963、3.603、4.774、7.479、6.319、5.193; P 值均 <0.05)。诱导自噬组 TG、ALT、AST、LDH、GGT、Alb 水平与脂肪变组相比, 明显降低 (HL-7702 细胞 q 值分别为 4.978、3.695、3.960、5.130、4.695、3.192, SK-HEP-1 细胞 q 值分别为 3.846、5.575、4.184、5.019、4.203、3.049; P 值均 <0.05)。LC3-II 在各组肝细胞中的标记值, 诱导自噬组最高 (HL-7702 细胞为 90.1%, SK-HEP-1 细胞为 80.0%), 其次是脂肪变组 (HL-7702 细胞为 47.2%, SK-HEP-1 细胞为 48.4%) 及抑制自噬组 (HL-7702 细胞为 30.2%, SK-HEP-1 细胞为 45.5%)。诱导自噬组 LC3-II/LC3-I 比值与脂肪变组相比, 明显升高 (HL-7702 细胞 q 值为 6.786, SK-HEP-1 细胞 q 值为 5.926; P 值均 <0.05)。结论 自噬的上调有利于促进肝脏脂肪的清除, 而下调则促进脂质的聚积。

关键词: 脂肪肝; 自噬; 脂类代谢

中图分类号: R575.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-5256(2017)10-1981-06

Interaction between autophagy and lipid metabolism in cell models of nonalcoholic fatty liver disease

YAN Rong, NIU Chunyan, YU Lu, et al. (Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, China)

Abstract: Objective To investigate the interaction between autophagy and lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Human hepatocytes (steatosis) were cultured in vitro to establish a cell model of NAFLD. Rapamycin was used to induce autophagy and 3-methyladenine was used to inhibit autophagy. MTT colorimetry was used to measure cell viability. ELISA was used to measure the levels of triglyceride (TG), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), and albumin (Alb). IF method was used to determine the location and distribution of LC3-II. Western blot was used to measure LC3-II/LC3-I ratio. An analysis of variance was used for comparison of continuous data between groups, and the SNK- q test was used for further comparison between two groups. **Results** Compared with the steatosis group, the induced autophagy group had significant reductions in absorbance and cell viability (HL-7702 cells: $q = 4.160$ and 4.110 , $P < 0.05$; SK-HEP-1 cells: $q = 4.407$ and 4.032 , $P < 0.05$). Compared with the control group, the steatosis group had significant increases in the levels of TG, ALT, AST, LDH, GGT, and Alb (HL-7702 cells: $q = 5.316$, 3.730 , 4.013 , 6.967 , 6.192 , and 5.531 , $P < 0.05$; SK-HEP-1 cells: $q = 4.963$, 3.603 , 4.774 , 7.479 , 6.319 , and 5.193 , $P < 0.05$). Compared with the steatosis group, the induced autophagy group had significant reductions in the levels of TG, ALT, AST, LDH, GGT, and Alb (HL-7702 cells: $q = 4.978$, 3.695 , 3.960 , 5.130 , 4.695 , and 3.192 , $P < 0.05$; SK-HEP-1 cells: $q = 3.846$, 5.575 , 4.184 , 5.019 , 4.203 , 3.049 , $P < 0.05$). The induced autophagy group had the highest percentage of LC3-II-positive HL-7702 cells (90.1%) and LC3-II-positive SK-HEP-1 cells (80.0%), followed by the steatosis group (47.2% LC3-II-positive HL-7702 cells and 48.4% LC3-II-positive SK-HEP-1 cells) and the autophagy inhibition group (30.2% LC3-II-positive HL-7702 cells and 45.5% LC3-II-positive SK-HEP-1 cells). The induced autophagy group had a significant increase in LC3-II/LC3-I ratio compared with the steatosis group (HL-7702 cells: $q = 6.786$, $P < 0.05$;

doi: 10.3969/j.issn.1001-5256.2017.10.027

收稿日期: 2017-06-30; 修回日期: 2017-07-27。

基金项目: 陕西省教育厅科研基金(2013JK0788)

作者简介: 闫蓉(1983-), 女, 主治医师, 主要从事脂肪肝及胃肠动力性疾病研究。

通信作者: 牛春燕, 电子邮箱: nchy69@163.com。

SK-HEP-1 cells: $q=5.926, P<0.05$). **Conclusion** Upregulation of autophagy can promote the elimination of liver fat, while down-regulation of autophagy can promote lipid accumulation.

Key words: fatty liver; autophagy; lipid metabolism

近年来,非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)患病率逐年增加,已成为全球重要的公共健康问题^[1]。NAFLD的发病机制至今尚未完全明确,较为普遍接受的“二次打击学说”认为,初次打击为脂质聚积导致肝脏脂肪变及胰岛素抵抗,通过外周脂解增加(脂质过多)和高胰岛素血症引起肝细胞脂肪堆积、脂肪变,二次打击主要指氧化应激和脂质过氧化及细胞因子、线粒体功能异常等,导致肝细胞损伤、炎症、纤维化^[2]。最近的研究^[3-4]表明,自噬除了降解肝细胞内过多或损伤的细胞器和蛋白质外,还介导肝细胞内脂肪的代谢和分解,介导脂滴内贮存脂质的降解,提示自噬在NAFLD的发生、发展中具有重要病理生理意义。本实验通过对体外人肝细胞培养(脂肪变性)制备NAFLD模型,观察自噬的生物学特性,探讨NAFLD中自噬与脂质代谢的相互作用和可能的机制,为将来NAFLD治疗领域的分子靶向治疗相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 HL-7702细胞和SK-HEP-1细胞株(西安东澳生物科技有限公司),10%脂肪乳注射液(四川科伦药业股份有限公司),雷帕霉素(Selleck, S1039), β -甲基腺嘌呤(β -MA)(Selleck, S2767),LC3B(D11) XP[®] Rabbit mAb(CST, 3868S),Anti-PKC epsilon 抗体(Abcam, ab124806),油红O染色液(南京建成科技有限公司, D027),科研人甘油三酯(TG)ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, ml026468),科研人ALT检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, ml027133),科研人AST检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, ml024056),科研人乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, ml024518),科研人GGT检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, ml027457),科研人Alb检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, ml025061)。倒置荧光显微镜(OLYMPUS),冷冻离心机(Eppendorf),电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司),Mini-PROTEAN[®] Casting stand(Bio-Rad),Power Pac[™] HC高电流电泳仪(Bio-Rad),Mini-PROTEAN[®] 电泳槽(Bio-Rad),Mini Trans-Blot[®]转印槽(Bio-Rad),iMark[™]酶标仪(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及模型建立 将从液氮中取出的

HL-7702细胞和SK-HEP-1细胞在37℃水浴锅中快速融化后接种于10cm皿中,培养基分别是RPMI1640+10%FBS和MEM+10%FBS。将10cm皿中细胞废液弃除,用PBS清洗1次,滴加8滴胰酶,消化30s左右,加入完全培养基终止消化,用1ml的枪吹打细胞,收集细胞液于15ml离心管中,1000r/min离心5min;离心后弃上清,加入新的完全培养基,轻柔吹打细胞,制备单细胞悬液;按1:2的接种比例将细胞悬液接种于10cm皿中,在CO₂孵箱中培养。HL-7702、SK-HEP-1细胞分别用2%脂肪乳培养48h后,用油红O染色肝细胞出现红色脂滴,即为建模成功。另将普通培养的2种细胞株设为对照。

1.2.2 肝细胞自噬的调节 人肝HL-7702、SK-HEP-1脂肪变细胞传代培养至对数生长期后,诱导自噬组加入雷帕霉素(100nmol/L)培养48h;抑制自噬组加入3-MA(4.5mg/L)培养24h。

1.2.3 细胞活力与功能评价

1.2.3.1 油红O染色 分别取对数生长期HL-7702、SK-HEP-1细胞,以 5×10^4 /孔的密度接种于放玻片的24孔板上,细胞培养至密度达到60%~70%时,模型组加入2%脂肪乳(10%脂肪乳注射液稀释5倍),对照组加入不含脂肪乳的培养基。放入孵箱培养48h后,取出培养板,PBS洗3次,用4%多聚甲醛固定30min,PBS洗3次,油红O染液室温染色30min,37℃左右蒸馏水洗30s至背景透明,再用复染剂室温染色3min,蒸馏水洗30~60s,用水性封片剂封片,显微镜下观察细胞内的脂滴。

1.2.3.2 MTT比色法测定细胞活力 将T25培养瓶中的废液全部吸弃,消化后重悬细胞;吸取10 μ l细胞悬液,用血球计数板按照 3×10^4 /ml计数,接种到96孔板中,每孔100 μ l,在CO₂孵箱中过夜培养。接种细胞后第2天,更换培养基,模型组加入2%脂肪乳(10%脂肪乳注射液稀释5倍),对照组加入不含脂肪乳的培养基,置于37℃、5%CO₂培养箱中48h。每孔加20 μ l MTT溶液(5mg/ml),继续培养4h。去上清液,每孔加入150 μ l二甲亚砜,置摇床低速振荡10min,全自动酶联免疫检测仪490nm测吸光度值。

1.2.3.3 ELISA检测 分别取对数生长期HL-7702、SK-HEP-1细胞,以 5×10^5 /孔的密度接种于6孔板上,细胞培养至密度达到60%~70%时,模型组加入2%脂

肪乳(10%脂肪乳注射液稀释5倍);对照组加入不含脂肪乳的培养基;放入孵箱培养48h后,收集各组细胞,用冰的PBS清洗细胞3次,每孔加1ml PBS后,收集细胞悬液至EP管中,1000 r/min离心10 min,弃上清液,留细胞沉淀,用PBS调整至 1×10^6 个/ml。反复冻融3次裂解细胞,4℃、3000 r/min离心20 min,收集上清后,于-80℃保存备用。按ELISA试剂盒操作说明检测其中TG、ALT、AST、LDH、GGT、Alb水平。

1.2.4 肝细胞自噬相关蛋白在人肝细胞及脂肪变人肝细胞中活性状态的检测

1.2.4.1 IF法检测自噬相关蛋白微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) II 培养好的细胞经4%多聚甲醛室温固定30 min。PBS洗3次,每次5 min。0.3% TritonX-100室温通透15 min。PBS洗3次,每次5 min。一抗孵育:用10%山羊血清将一抗LC3-II(1:100)稀释,4℃孵育过夜。第2天吸去一抗,PBS洗3次,每次5 min。滴加二抗工作液[用2%山羊血清荧光二抗Alexa Fluor 594 donkey-rabbit(1:400)](稀释到工作时的浓度),37℃避光孵育30 min。吸去二抗,用PBS洗3次,每次5 min。滴加VECTASHIELD®+DAPI封片并染细胞核。立即用倒置荧光显微镜拍照,蓝色代表细胞核,红色荧光代表LC3-II。观察LC3-II的定位和分布。采用双盲法在光镜下随机选择20个肝细胞/片,记数肝细胞的阳性细胞及细胞总数,LC3-II在肝细胞中的标记值为阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.4.2 Western Blot检测自噬相关蛋白LC3-II/LC3-I 收集各组细胞,用冰的PBS清洗细胞3次,每个孔加1ml PBS后,收集细胞悬液至EP管中,1000 r/min离心10 min,弃上清液,留细胞沉淀,加入预冷的细胞裂解液裂解细胞,用移液枪反复吹打数次。将裂解好的细胞转移入预冷的离心管中,冰浴10 min,以使细胞充分裂解。在4℃条件下,12 000 r/min离心10 min。将上清转移至预冷的离心管中。用BCA蛋白定量试剂盒对提取的蛋白进行检测。检测后将蛋白样品分装成小份,-80℃贮存备用。取各组蛋白样品30 μg,加入相当于蛋白样品1/4体积的5 \times 蛋白上样缓冲液,沸水浴中煮5 min,然后进行SDS-PAGE分离蛋白。采用湿转法,将蛋白质转移至偏氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上。转膜结束后,将PVDF膜放在丽春红染色液中染色2~5 min,观察蛋白转移效果。标记出PVDF膜的右上角,将PVDF

膜转移至含有5% BSA的TBST封闭液中,室温封闭1.5 h。按1:800稀释抗体LC3B,按1:500稀释抗体 β -Actin于封闭液中,将PVDF膜放入皿中,加入一抗的稀释液,4℃过夜。次日,用TBST洗膜10 min \times 4次。按1:10 000稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(LC3B)于封闭液中,按1:10 000稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG(β -Actin)于封闭液中,将PVDF膜放入含稀释二抗的皿中,脱色摇床孵育1 h。孵育结束后,用TBST洗膜10 min \times 3次。暗室中,用滤纸轻轻将膜上的液体吸干,在增强化学发光反应混合液中反应2~3 min,压片显影。

1.3 统计学方法 采用SPSS20.0软件进行数据分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间数据比较采用方差分析,进一步两两比较采用SNK-q检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 油红O染色结果 对照组HL-7702细胞和SK-HEP-1细胞生长为不规则或卵圆形,胞质无明显红染或淡染,脂肪变组细胞胞质广泛染色,为红色脂滴,大而多(图1)。

2.2 MTT比色结果 对照组、脂肪变组HL-7702细胞及SK-HEP-1细胞生长良好,吸光度值和细胞活率组间比较,差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)。诱导自噬组HL-7702及SK-HEP-1细胞的吸光度值和细胞活率与脂肪变组比较,明显下降(P 值均 < 0.05)。抑制自噬组HL-7702及SK-HEP-1细胞的吸光度值和细胞活率与脂肪变组比较,差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05)(表1 2)。

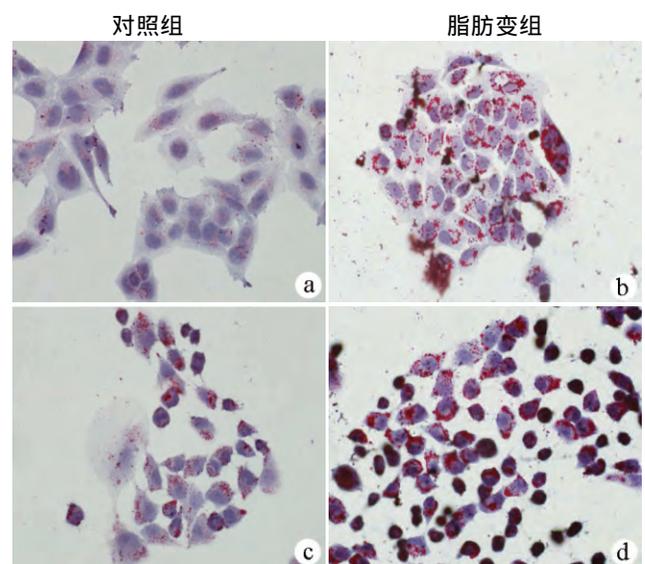


图1 对照组和脂肪变组HL-7702细胞和SK-HEP-1细胞内

脂滴油红O染色结果($\times 400$) a,b: HL-7702; c,d: SK-HEP-1

表1 各组 HL-7702 细胞吸光度值和细胞活率($\bar{x} \pm s$)

组别	吸光度值	细胞活率(%)
对照组	1.04 \pm 0.07	98.91 \pm 0.02
脂肪变组	0.95 \pm 0.03	90.08 \pm 0.08
诱导自噬组	0.68 \pm 0.03 ¹⁾	62.31 \pm 0.03 ¹⁾
抑制自噬组	0.82 \pm 0.03	76.90 \pm 0.05
F 值	5.443	7.942
P 值	0.026	0.011

注:与脂肪变组比较 1) q 值分别为 4.160、4.110 $P < 0.05$

表2 各组 SK-HEP-1 细胞吸光度值和细胞活率($\bar{x} \pm s$)

组别	吸光度值	细胞活率(%)
对照组	0.74 \pm 0.02	100.00 \pm 0.01
脂肪变组	0.69 \pm 0.03	92.89 \pm 0.06
诱导自噬组	0.48 \pm 0.02 ¹⁾	61.63 \pm 0.03 ¹⁾
抑制自噬组	0.64 \pm 0.01	85.49 \pm 0.04
F 值	4.371	7.519
P 值	0.033	0.014

注:与脂肪变组比较 1) q 值分别为 4.070、4.032 $P < 0.05$

组别	TG(mg/dl)	ALT(ng/ml)	AST(U/L)	LDH(U/L)	GGT(U/L)	Alb(mg/ml)
对照组	125.82 \pm 2.46	8.94 \pm 0.18	78.91 \pm 1.58	292.19 \pm 5.84	86.81 \pm 1.74	61.90 \pm 1.24
脂肪变组	143.31 \pm 2.93 ¹⁾	10.13 \pm 0.19 ¹⁾	89.54 \pm 1.79 ¹⁾	346.06 \pm 7.74 ¹⁾	104.52 \pm 2.03 ¹⁾	83.48 \pm 1.61 ¹⁾
诱导自噬组	130.63 \pm 2.61 ²⁾	9.51 \pm 0.19 ²⁾	83.33 \pm 1.67 ²⁾	315.56 \pm 6.31 ²⁾	92.13 \pm 1.84 ²⁾	73.58 \pm 1.47 ²⁾
抑制自噬组	137.70 \pm 2.75	9.82 \pm 0.20	88.82 \pm 1.78	341.68 \pm 6.83	101.80 \pm 2.04	81.23 \pm 1.62
F 值	4.452	3.257	3.670	5.377	4.343	3.987
P 值	0.035	0.046	0.043	0.024	0.037	0.040

注:与对照组比较 1) q 值分别为 5.316、3.730、4.013、6.967、6.192、5.531 $P < 0.05$;与脂肪变组比较 2) q 值分别为 4.978、3.695、3.960、5.130、4.695、3.192 $P < 0.05$

表4 各组 SK-HEP-1 细胞 ELISA 检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	TG(mg/dl)	ALT(ng/ml)	AST(U/L)	LDH(U/L)	GGT(U/L)	Alb(mg/ml)
对照组	121.02 \pm 2.42	9.02 \pm 0.18	85.34 \pm 1.65	270.01 \pm 5.43	88.90 \pm 1.78	61.90 \pm 1.24
脂肪变组	135.38 \pm 2.78 ¹⁾	9.76 \pm 0.20 ¹⁾	92.02 \pm 1.86 ¹⁾	365.03 \pm 7.06 ¹⁾	107.41 \pm 2.09 ¹⁾	83.48 \pm 1.61 ¹⁾
诱导自噬组	126.68 \pm 2.53 ²⁾	9.15 \pm 0.18 ²⁾	84.23 \pm 1.69 ²⁾	335.56 \pm 6.71 ²⁾	98.48 \pm 1.97 ²⁾	73.58 \pm 1.47 ²⁾
抑制自噬组	131.54 \pm 2.63	9.52 \pm 0.19	91.16 \pm 1.82	362.79 \pm 7.26	105.32 \pm 2.11	81.23 \pm 1.62
F 值	4.126	3.063	3.151	5.434	4.592	3.987
P 值	0.039	0.048	0.047	0.023	0.034	0.040

注:与对照组比较 1) q 值分别为 4.963、3.603、4.774、7.479、6.319、5.193 $P < 0.05$;与脂肪变组比较 2) q 值分别为 3.846、5.575、4.184、5.019、4.203、3.049 $P < 0.05$

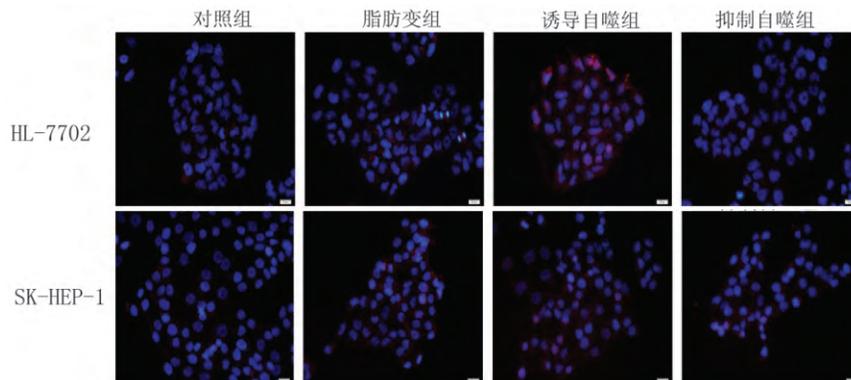


图2 LC3-II 在各组细胞的定位及分布

2.3 ELISA 检测结果 脂肪变组 HL-7702 及 SK-HEP-1 细胞 TG、ALT、AST、LDH、GGT、Alb 水平与对照组相比,明显升高(P 值均 < 0.05)。诱导自噬组 HL-7702 及 SK-HEP-1 细胞 TG、ALT、AST、LDH、GGT、Alb 水平与脂肪变组相比,明显降低(P 值均 < 0.05)。抑制自噬组 HL-7702 及 SK-HEP-1 细胞 TG、ALT、AST、LDH、GGT、Alb 水平与脂肪变组比较,差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05) (表 3)。

2.4 IF 法检测 LC3-II LC3-II 在各组细胞的定位及分布见图 2。LC3-II 在各组肝细胞中的标记值,诱导自噬组最高,其次是脂肪变组及抑制自噬组。脂肪变组 HL-7702 及 SK-HEP-1 细胞 LC3-II 标记值与对照组相比,明显升高(P 值均 < 0.05)。诱导自噬组 HL-7702 及 SK-HEP-1 细胞 LC3-II 标记值与脂肪变组相比,明显升高(P 值均 < 0.05)。抑制

表3 各组 HL-7702 细胞 ELISA 检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	TG(mg/dl)	ALT(ng/ml)	AST(U/L)
对照组	125.82 \pm 2.46	8.94 \pm 0.18	78.91 \pm 1.58
脂肪变组	143.31 \pm 2.93 ¹⁾	10.13 \pm 0.19 ¹⁾	89.54 \pm 1.79 ¹⁾
诱导自噬组	130.63 \pm 2.61 ²⁾	9.51 \pm 0.19 ²⁾	83.33 \pm 1.67 ²⁾
抑制自噬组	137.70 \pm 2.75	9.82 \pm 0.20	88.82 \pm 1.78
F 值	4.452	3.257	3.670
P 值	0.035	0.046	0.043

自噬组 HL-7702 及 SK-HEP-1 细胞 LC3-II 标记值与脂肪变组相比, 差异无统计学意义 (P 值均 > 0.05) (表 5)。

表 5 LC3-II 在各组肝细胞中的标记值($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	HL-7702 细胞	SK-HEP-1 细胞
对照组	14.00 ± 1.23	16.50 ± 1.45
脂肪变组	47.20 ± 2.15 ¹⁾	48.40 ± 2.09 ¹⁾
诱导自噬组	90.10 ± 2.33 ²⁾	80.00 ± 2.45 ²⁾
抑制自噬组	30.20 ± 1.01	45.50 ± 1.77
F 值	3.792	4.393
P 值	0.043	0.032

注: 与对照组比较 1) q 值分别为 7.318、7.424 $P < 0.05$; 与脂肪变组比较 2) q 值分别为 8.486、8.609 $P < 0.05$

2.5 Western Blot 检测 LC3-II/LC3-I 比值 LC3-II/LC3-I 比值中诱导自噬组最高, 其次是脂肪变组、对照组及抑制自噬组。脂肪变组 HL-7702 及 SK-HEP-1 细胞 LC3-II/LC3-I 比值与对照组相比, 差异无统计学意义 (P 值均 > 0.05)。诱导自噬组 HL-7702 细胞及 SK-HEP-1 细胞 LC3-II/LC3-I 比值与脂肪变组相比, 明显升高 (P 值均 < 0.05)。抑制自噬组 HL-7702 细胞及 SK-HEP-1 细胞 LC3-II/LC3-I 比值与脂肪变组相比, 无显著性差异 (P 值均 > 0.05) (图 3 表 6)。

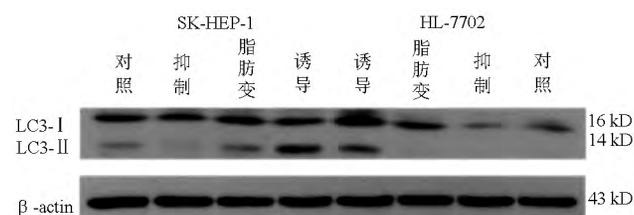


图 3 Western Blot 分析中各组 LC3 蛋白表达水平

表 6 各组 LC3-II/LC3-I 比值检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	HL-7702 细胞	SK-HEP-1 细胞
对照组	0.023 ± 0.005	0.443 ± 0.007
脂肪变组	0.030 ± 0.008	0.587 ± 0.006
诱导自噬组	0.772 ± 0.020 ¹⁾	1.146 ± 0.030 ¹⁾
抑制自噬组	0.014 ± 0.002	0.317 ± 0.010
F 值	3.462	4.581
P 值	0.043	0.034

注: 与脂肪变组比较 1) q 值分别为 6.786、5.926 $P < 0.05$

3 讨论

自噬是指一些需降解的蛋白质和细胞器等胞浆成分被包裹, 并最终运送至溶酶体降解的过程, 自噬

性降解产生的氨基酸和其他一些小分子物质可被再利用或产生能量。现已明确, 自噬的主要功能之一实际上是在细胞受到应激性的死亡威胁时保持细胞的存活, 这是真核细胞维持稳态、实现更新的一种重要的进化保守机制^[4]。参与自噬的信号调节机制非常复杂, 主要有: (1) 营养信号调节, 最主要的 2 个通路为, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1 通路, Ras/cAMP 依赖的蛋白激酶途径通路; (2) 胰岛素/生长因子通路; (3) 能量响应; (4) 应激响应(包括内质网应激、缺氧、氧应激、病原体感染)。参与自噬的基因主要有 Atg 家族的 31 种基因、Beclin I、LC3 I/II 等。在自噬整个过程中, 关键分子是位于启动阶段的 III 型磷脂酰肌醇-3-激酶和 TOR/mTOR 激酶。III 型磷脂酰肌醇-3-激酶通过磷酸化脂酰肌醇来募集胞浆中含 FYVE 或 PX 结构域的蛋白质, 用于自噬体膜的形成。3-MA 通过抑制该激酶, 可有效抑制自噬活性^[5]。mTOR 通过调控核糖体蛋白质 S6 的活性而发挥抑制细胞自噬活性的作用^[6]。mTOR 的特异性抑制剂雷帕霉素可抑制 mTOR 通路, 活化细胞自噬。本实验中, 各组细胞经 MTT 比色法测定细胞活力, 3-MA 抑制自噬组的吸光度值和细胞活率与脂肪变组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。雷帕霉素诱导自噬组的吸光度值和细胞活率与脂肪变组比较明显下降 ($P < 0.05$), 考虑与自噬导致细胞活力下降有关。

除维持生理状态下机体的稳态功能外, 越来越多的研究^[7]表明自噬与肿瘤发生、神经退化性疾病、心肌病、克罗恩病、脂肪肝、2 型糖尿病以及衰老有关, 并且具有抵御细胞内病原、抗原递呈的功能。本实验中, 诱导自噬组中反映脂质沉积及肝细胞损伤的指标, TG、ALT、AST、LDH、GGT、Alb 与脂肪变组相比, 明显降低 ($P < 0.05$)。抑制自噬组 TG、ALT、AST、LDH、GGT、Alb 与脂肪变组相比, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。考虑与自噬参与脂质代谢有关, 自噬的上调有利于促进肝脏脂肪的清除, 而下调则促进脂质的聚积^[9-10]。另外, 自噬还可减轻非酒精性脂肪性肝炎状态下的内质网应激和肝细胞损伤、改善胰岛素抵抗^[11-12]。

自噬过程由一系列自噬相关蛋白(Atg 蛋白)介导完成, 这些蛋白质在自噬体形成的不同阶段发挥作用。LC3 是自噬体膜上的标记蛋白。细胞内存在 2 种形式的 LC3 蛋白: LC3-I 和 LC3-II。LC3 蛋白在合成后其 C 端即被 Atg4 蛋白酶切割变成 LC3-I,

LC3 - I 散在分布于细胞浆内。当自噬体形成后, LC3 - I 和磷脂酰乙醇胺偶联形成 LC3 - II 并定位于自噬体内膜和外膜。与其他一些定位于自噬性结构膜上的 Atg 蛋白不同(仅在自噬过程的某一阶段发挥作用), LC3 - II 始终稳定地保留在自噬体膜上直到与溶酶体融合, 因此被用来作为自噬体的标记, 且 LC3 - II 的水平在某种程度上反映了自噬体的数量^[13]。本实验中采用 IF 法检测 LC3 - II。LC3 - II 在各组肝细胞中的标记值诱导自噬组最高, 其次是脂肪变组及抑制自噬组。诱导自噬组 LC3 - II 标记值与脂肪变组相比, 明显升高 ($P < 0.05$) 提示雷帕霉素可以显著激活细胞自噬, 增加自噬体数量。脂肪变组 LC3 - II 标记值与对照组相比, 明显升高 ($P < 0.05$), 提示脂肪变组细胞自噬体数量增加, 考虑与脂肪变导致细胞应激有关。

自噬发生后, 通过 Western Blot 可以检测到 2 个条带的蛋白质, 尽管 LC3 - II 与磷脂酰乙醇胺结合后实际分子质量大于 LC3 - I, 由于其疏水性较强, 在聚丙烯酰胺凝胶中的泳动速度要快于 LC3 - I。由于在自噬时细胞内 LC3 蛋白总的表达水平其实并无上调, 仅仅是一部分 LC3 - I 转变成了 LC3 - II, 自噬时应表现为 LC3 - I 的减少和 LC3 - II 的增加, 通过 LC3 - II/LC3 - I 或者 LC3 - II/(LC3 - I + LC3 - II) 即可反映自噬水平^[14]。本实验中, LC3 - II/LC3 - I 比值中诱导自噬组最高, 其次是脂肪变组及抑制自噬组。诱导自噬组 HL - 7702 细胞及 SK - HEP - 1 细胞 LC3 - II/LC3 - I 比值与脂肪变组相比, 明显升高 ($P < 0.05$)。提示与 IF 法检测 LC3 - II 相比, 采用 Western Blot 法检测 LC3 - II/LC3 - I 比值更能反映细胞真实的自噬水平。

自噬在 NAFLD 发生发展中的作用近年来受到越来越多的关注, 但 NAFLD 背景下自噬与脂质代谢之间的作用机制尚未明确。本课题研究的结果初步显示, 自噬的上调有利于促进肝脏脂肪的清除, 而下调则促进脂质的聚积; 自噬还可减轻非酒精性脂肪性肝炎状态下的肝细胞损伤。因此, 肝细胞自噬活性的调控有望成为治疗 NAFLD 的新靶点。

参考文献:

- [1] CHANG BX, ZOU ZS, LI BS, et al. 2015 The Japanese Society of Gastroenterology of Evidence - based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis

[J]. J Clin Hepatol, 2015, 31(7): 1027 - 1030. (in Chinese)

常彬霞, 邹正升, 李宝森, 等. 2015 年日本胃肠病学会非酒精性脂肪肝病/非酒精性脂肪性肝炎的循证医学临床治疗指南 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(7): 1027 - 1030.

- [2] MESHKANI R, ADELI K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease [J]. Clin Biochem, 2009, 42(6): 1331 - 1346.
- [3] GREEN DR, LEVINE B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern death cell fate [J]. Cell, 2014, 157(1): 65 - 75.
- [4] MARTINEZ - LOPEZ N, SINGH R. Autophagy and lipid droplets in the liver [J]. Annu Rev Nutr, 2015, 35: 215 - 237.
- [5] ESKELINEN EL, SAFTIG P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1793(4): 664 - 673.
- [6] HIROSAKO K, IMASATO H, HIROTA Y, et al. 3 - Methyladenine specifically inhibits retrograde transport of cation - independent mannose 6 - phosphate/insulin - like growth factor II receptor from the early endosome to the TGN [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(3): 845 - 852.
- [7] ROSENFELDT MT, RYAN KM. The multiple roles of autophagy in cancer [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(7): 955 - 963.
- [8] MIJALJICA D, PRESCOTT M, DEVENISH RJ. Autophagy in disease [J]. Methods Mol Biol, 2010, 648: 79 - 92.
- [9] CZAJA MJ. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 298(5): e973 - e978.
- [10] MARTINEZ - VICENTE M, TALLOZCY Z, WONG E, et al. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease [J]. Nat Neurosci, 2010, 13(5): 567 - 576.
- [11] YOSHIZAKI T, KUSUNOKI C, KONDO M, et al. Autophagy regulates inflammation in adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(1): 352 - 357.
- [12] CHRISTIAN P, SACCO J, ADELI K. Autophagy: emerging roles in lipid homeostasis and metabolic control [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1831(4): 819 - 824.
- [13] KIMURA S, FUJITA N, NODA T, et al. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3 [J]. Methods Enzymol, 2009, 452: 1 - 12.
- [14] KADOWAKI M, KARIM MR. Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy [J]. Methods Enzymol, 2009, 452: 199 - 213.

引证本文: YAN R, NIU CY, YU L, et al. Interaction between autophagy and lipid metabolism in cell models of nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Clin Hepatol, 2017, 33(10): 1981 - 1986. (in Chinese)

闫蓉, 牛春燕, 于璐, 等. 非酒精性脂肪性肝病细胞模型中自噬与脂质代谢的相互调节 [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(10): 1981 - 1986.

(本文编辑: 朱 晶)