

Alpha-亚麻酸对 HepG2 细胞脂肪酸合成关键基因的影响

李 微¹, 张 涛¹, 解现星¹, 孟 威², 刘慧芳³, 肖霖力⁴, 李春风², 刘 源¹

(1. 中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 吉林大学动物科学学院, 长春 130062;
3. 青岛农业大学动物科技学院, 山东 青岛 266109; 4. 北京农学院动物科学院, 北京 102206)

【摘要】 目的 探讨不同剂量 Alpha-亚麻酸 (ALA) 对硬脂酸培养后的 HepG2 细胞脂肪酸合成基因表达的影响。**方法** HepG2 细胞分为对照组 (NC) 以及含有 0.5 mmol/L 硬脂酸的培养液培养高脂组 (HF), 培养 36 h 后应用实时定量 PCR 检测脂肪酸合成关键基因 *SREBP1C*、*FAS* 及 *ACC* 表达; 基因表达存在显著差异后分别用 10%、20%、50%、70%、100% ALA 替代硬脂酸培养 36 h, 实时定量 PCR 和免疫印迹法检测上述基因 mRNA 水平及蛋白表达。**结果** 硬脂酸处理后 HepG2 细胞 *SREBP1C*、*FAS* 及 *ACC* 基因显著升高 ($P < 0.001$), ALA 替代组 *SREBP1C* 基因 mRNA 表达水平均显著低于高脂组 ($P < 0.001$), 0.5 mmol/L ALA 组及 0.35 mmol/L ALA 组 *FAS* 显著低于高脂组 ($P < 0.001$), 各替代组 *ACC* 基因 mRNA 水平与高脂组无统计学差异; 替代组 *SREBP1C* 及 *FAS* 蛋白表达水平显著低于高脂组, 而 *ACC* 蛋白表达量与高脂组无明显差异。**结论** 硬脂酸促进 HepG2 细胞脂肪酸合成, ALA 通过抑制 *SREBP1C* 及 *FAS* 基因表达来减弱脂肪酸合成。

【关键词】 Alpha-亚麻酸; 脂肪酸合成; 基因表达

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 09-0005-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.009.002

The effects of Alpha-linolenic acid on the related key gene expressions of fatty acid synthesis in HepG2 cells

LI Wei¹, ZHANG Tao¹, XIE Xian-xing¹, MENG Wei², LIU Hui-fang³, XIAO Lin-li⁴, LI Chun-feng², LIU Yuan¹

(1. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

2. College of Animal Science, Jilin University, Changchun 130062, China;

3. College of Animal Science, Qingdao Agricultural University, Shandong Qingdao 266109, China;

4. College of Animal Science, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of different doses Alpha-Linolenic acid (ALA) on the expressions of fatty acid synthesis-related genes in HepG2 cells. **Methods** HepG2 cells were divided into two groups, normal control group (NC) and high fat group (HF) in which cells were firstly cultured for 36h in the medium contained 0.5mmol/L stearic acid. Real-time quantitative PCR was taken to detect mRNA expression of genes *SREBP1C*, *FAS* and *ACC* which are related to fatty synthesis. While there are significant differences in fatty synthesis, 10%, 20%, 50%, 70% and 100% ALA took the place of stearic acid, 36h later, real-time quantitative PCR and Western blotting were taken to detect mRNA and protein expression of genes related to fatty synthesis. **Results** *SREBP1C* mRNA expression of ALA substitution groups were significantly lower than the high-fat group ($P < 0.001$). The *FAS* of 0.5 mmol/L ALA group and

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31272386)。

[作者简介] 李微(1986-), 女, 硕士, 研究方向: 实验动物营养及代谢异常动物模型。E-mail: beian910@yeah.net。

[通讯作者] 刘源, 研究员, 主要从事实验动物营养及代谢异常动物模型研究。E-mail: bj_liuyuan@163.com。

0.35 mmol/L ALA group were significantly lower than the high-fat group ($P < 0.001$). ACC genes mRNA level was not significantly different from high-fat group. SREBP1C and FAS protein expression were significantly lower than the high-fat group, but ACC showed no significant difference. **Conclusions** Saturated fatty acids promote hepatocyte fatty acid synthesis, ALA abates fatty acid synthesis by inhibiting FAS and SREBP1C gene expression.

【Key words】 Alpha-Linolenic acid; Fatty acid synthesis; Gene expression

随着社会的发展、人们生活水平的提高和生活方式的改变,热量摄入增加、体力活动减少及肥胖不断流行,脂代谢紊乱发生率逐年攀升。流行病学调查资料显示我国目前有高血压患者 1.6~2 亿。脂代谢紊乱已成为重大卫生问题,引起了世界各国的广泛关注。长期饱和脂肪酸饮食是脂代谢紊乱发生的重要原因之一,饱和脂肪酸摄入量过高可导致血清中胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇升高,继而引发脂肪肝、动脉粥样硬化、冠心病等疾病。

研究表明饱和脂肪酸抑制 SREBP1 活性,从而抑制脂肪酸的合成^[1],SREBP1C 是固醇调节元件结合蛋白家族成员,属核转录因子,是脂肪酸合成关键调控基因之一,前体 SREBP 经过剪切成为成熟 SREBP^[2],核内 SREBP 的稳定性受泛素化^[3]、磷酸化和乙酰化的调节^[4]。成熟型 SREBP1C 调节 ACC 及 FAS 表达,乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)催化乙酰辅酶 A 生成丙二酰辅酶 A,是脂肪酸合成限速酶,脂肪酸合成酶(FAS)是脂肪酸合成的主要限制酶,催化丙二酰辅酶 A 生成软脂酰辅酶 A 的全部过程。大量研究表明多不饱和脂肪酸(PUFA)不仅是细胞的能量来源及组成成分,同时也是重要的调节物质,调控营养代谢疾病(如糖尿病、冠心病等)的发展过程^[5],临床试验证明高甘油三酯血症患者(≥ 500 mg/dl)每天服用 n-3PUFA 约 4 g 能够使血清甘油三酯水平降低 45%^[6]。ALA 为由食物提供的植物来源 n-3PUFA,主要存在于植物的种子、果实及其油脂中,在体内可经生物化学途径合成 EPA 和 DHA。ALA 可降血脂但不引起肝脏积累脂质,对脂代谢紊乱引起的疾病有重要预防和治疗意义。本研究旨在探讨不同剂量 ALA 对饱和脂肪酸处理后的肝细胞脂肪酸合成的影响,对阐明 ALA 在脂肪酸合成及脂肪肝形成的作用有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验细胞及分组

人肝癌母细胞 HepG2 细胞由军事医学科学院微生物所细胞库赠予。细胞分组:不加替代物的对

照组(NC),加含 0.5 mmol/L 硬脂酸的培养液培养的高脂组(HF),和以 ALA 代替硬脂酸,代替比例分别为 10%、20%、50%、70%、100% 的 ALA 替代组。

1.2 仪器及试剂

DMEM 高糖培养基(Gibco, USA);胎牛血清(Hyclone, USA);硬脂酸、ALA(sigma aldrich, USA);反转录试剂盒(TaKaRa DRR037A, Japan);BIO-RAD IQ5 real-time PCR 仪;蛋白酶抑制剂(Roche, Switzerland);小鼠抗人 β -actin(abcam, UK)、兔抗人 SREBP1c(abcam, UK)、小鼠抗人 FAS 抗体(abcam, UK);辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体(中衫金桥, China)、山羊抗兔抗体(中衫金桥, China);Western blotting 发光检测试剂盒(英格恩, China);蛋白质预染 marker(Fermentas);X 光胶片、显影液、定影液(Kodak, USA)。

1.3 细胞处理方法

HepG2 细胞、培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。收集对数生长期 HepG2 细胞,以 0.25% 胰酶消化后制成细胞悬液,并接种于 10 cm 培养皿中,5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。细胞贴壁后加入含 0.5 mmol/L 硬脂酸的培养液培养 36 h,收集细胞用于基因表达检测。之后加入不同替代浓度 ALA 代替硬脂酸培养 36 h 后收集细胞用于基因和蛋白表达检测。

1.4 测定指标

1.4.1 实时定量 PCR:每皿细胞加入 1 mL Trizol 后用细胞铲铲下细胞,收集于 2 mL 离心管,室温放置 10 min,充分裂解后按照 Trizol 操作说明步骤提取细胞总 RNA。反转录体系为 20 μ L,每管加入总 RNA 1 μ g,按照 TaKaRa DRR037A 反转录试剂盒操作,37℃ 反应 30 min,85℃ 5 s。反转录后的 cDNA 用于实时定量 PCR 反应,引物由北京博迈德公司合成,其中 SREBP1C 上游引物:5'-GTGGCGGCTGC ATTGAGACTGAAG-3',下游引物:5'-AGGTACC CGAGGGCATCCGAGAAT-3',产物长度:362 bp,退火温度:66℃;FAS 上游引物:5'-CAAGAACTGCA CGGAGGTGT-3',下游引物:5'-AGCTGCCAGAG TCGGAGAAC-3',产物长度:569 bp,退火温度:

60℃; ACC 上游引物: 5'-GCTGCTCGGATCACTA GTGAA-3', 下游引物: 5'-TTCTGCTATCAGTCTGT CCAG-3', 产物长度: 339 bp, 退火温度: 56℃; β -actin 上游引物: 5'-TTCTGCTATCAGTCTGTCCAG-3', 下游引物: 5'-TTAGTTGCGTTACACCCTTTC-3', 产物长度: 156 bp, 退火温度: 56℃。反应体系: SYBR Premix Ex Taq II (2 ×) 12.5 μ L, cDNA 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L (10 pmol), 加入 dH₂O 至 25 μ L。反应条件: 95℃ 预变性 30 s, 进行 40 个循环, 每个循环包括 95℃ 变性 30 s, 各退火温度退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min; 然后 72℃ 反应 10 min, 95℃ 作用 30 s, 60℃ 作用 1 min; 60℃ 作用 20 s, 该步进行 70 个循环。每个样品设置 3 个重复, 同时空白对照及 5 倍梯度稀释进行反应。引物扩增效率分别为 107.6% (SREBP1C), 122.7% (FAS), 98.7% (ACC), 106.2% (β -actin, 56℃), 99.4% (β -actin, 66℃), 104.1% (β -actin, 60℃)。

1.4.2 Western Blotting 检测: 分别提取各组细胞总蛋白, 进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 分别用 β -actin、SREBP1C、FAS、ACC 抗体检测蛋白表达。其中 β -actin 作为内参。

1.5 统计学方法

用 SAS 9.0 软件对数据进行统计分析, 对照组与高脂组应用成组设计 T 检验分析数据, 高脂组与 ALA 处理组间差异采用单因素多水平方差分析。

2 结果

2.1 基因表达

2.1.1 硬脂酸培养细胞基因表达

与对照组相比, 高脂组 SREBP1C、FAS、ACC 均出现显著升高 ($P < 0.001$) (表 1)。

表 1 HepG2 细胞脂肪酸合成基因相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 1 Relative expression of fatty acid synthesis related genes in HepG2 cell

项目 (Item)	相对表达 (Relative expression)		p
	对照组 (NC)	高脂组 (HF)	
SREBP1C	0.936 $\pm$ 0.032	1.079 $\pm$ 0.052 ^a	<0.001
FAS	0.658 $\pm$ 0.046	0.953 $\pm$ 0.062 ^a	<0.001
ACC	0.813 $\pm$ 0.052	1.135 $\pm$ 0.074 ^a	<0.001

注: 与对照组比, a 表示 $P < 0.001$ 。

Note: a means $P < 0.001$ vs NC group.

2.1.2 ALA 替代基因表达

ALA 替代各组 SREBP1C 表达均显著低于高脂组 ($P < 0.001$), 且呈现浓度依赖性, 即 ALA 替代

比例越高对 SREBP1C 表达抑制作用越强; 0.5 mmol/L ALA 组及 0.35 mmol/L 组 FAS 表达显著低于高脂组 ($P < 0.001$), 其余各组均低于高脂组, 但无统计学差异; 0.1 mmol/L ALA 替代 ACC 基因表达略增强, 其余各组呈现抑制趋势, 但 ACC 表达则无统计学差异 (图 1)。

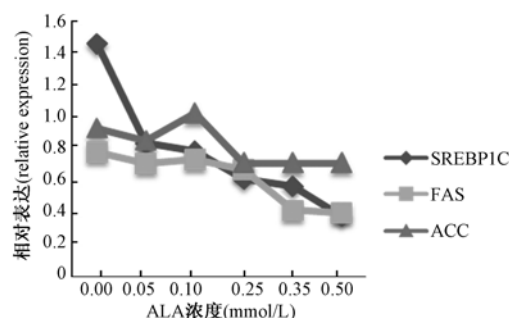


图 1 ALA 替代培养 HepG2 细胞 SREBP1C、FAS 及 ACC 基因表达

Fig. 1 Gene expressions of SREBP1C, FAS and ACC in ALA cultured HepG2 cell

2.2 蛋白表达

ALA 替代各组脂肪酸合成基因 SREBP1C、FAS 蛋白表达降低, 且呈现浓度依赖作用, 即随着替代比例上升, 蛋白表达抑制作用也上升; 而 ACC 则无明显差异。

3 讨论

饱和脂肪酸可导致脂质代谢相关基因异常, 并一定程度上损害肝细胞, 研究显示饱和脂肪酸可通过激活 Caspase-3 和 Caspase-9 引起 L02 细胞凋亡^[7]。饱和脂肪酸影响肝细胞脂肪沉积, 肝细胞中脂肪沉淀过多可能导致脂肪肝。研究表明饱和脂肪酸可通过抑制 AMPKa-2 mRNA 表达, 调整 HL mRNA 的表达来抑制 HepG2 细胞内肝脂肪酶 HL 活性, 减少肝细胞脂肪分解作用, 使脂肪在 HepG2 细胞内堆积^[8]。本实验中硬脂酸处理 HepG2 细胞后 FAS、ACC 及 SREBP1C 基因 mRNA 水平升高显著, 可见硬脂酸促进 HepG2 细胞脂肪酸合成基因表达, 促使 HepG2 细胞脂肪酸合成增加, 而脂肪酸合成增加可加重肝细胞脂肪沉积, 进而形成脂肪肝。

Mater, M. K 等^[8]研究表明 PUFA 能够降低肝脏 SREBP1C 基因 mRNA 水平, 同时可抑制 SREBP1C 蛋白表达。Fukumitsu. S 等^[9]利用 ALA 干预 3T3-L1 脂肪细胞时发现, 300 μ mol/L ALA 干预后 SREBP1C 及 FAS mRNA 表达显著降低, 这与

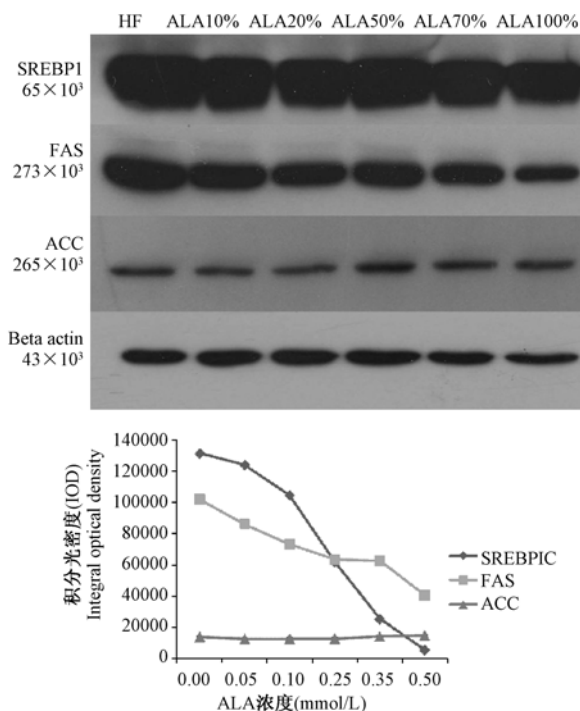


图2 ALA 替代培养 HepG2 细胞
SREBP1C、FAS 及 ACC 蛋白表达

Fig. 2 Expressions of SREBP1C, FAS and ACC in
ALA cultured HepG2 cells

本实验结果吻合,本实验中 ALA 各组 *SREBP1C* 表达均显著低于饱和脂肪酸组 ($P < 0.001$),蛋白表达表现出相同的浓度敏感性,可见 ALA 可以缓解由饱和脂肪酸导致的脂肪酸合成基因 *SREBP1C* 表达上调,且 *SREBP1C* 对 ALA 替代存在浓度依赖。*SREBP1* 是固醇调节元件结合蛋白家族成员,属核转录因子,Yahagi. N 等^[10]通过过表达 *SREBP1* 基因小鼠与野生型小鼠进行比较发现,饲喂不饱和脂肪酸能够使野生型小鼠成熟型 *SREBP1* 减少,而前体未见减少,*FAS*、*ACC* 表达降低,但转基因小鼠则无此反应,该现象证实成熟型 *SREBP1* 调控着 *FAS*、*ACC* 的表达。

脂肪酸合成酶(*FAS*)是脂肪酸合成限制酶,催化棕榈酸酯从头合成的所有步骤^[11]。0.5 mmol/L ALA 组、0.35 mmol/L ALA 组 *FAS* 表达显著低于饱和脂肪酸组 ($P < 0.001$),各浓度 ALA 组蛋白表达呈现浓度依赖性降低,这说明 ALA 可缓解由饱和脂肪酸导致的 *FAS* 升高,替代浓度越高缓解作用越明显。另有研究表明 ALA 能够使高脂饮食或者添加肝脏 X 受体 LXR 激动剂的大鼠肝脏脂肪沉积减轻,并抑制 *SREBP1C* 表达^[12],*SREBP1C* 能够被 LXR 调节,二者均能够调节 *FAS* 表达^[13],故 ALA 可缓解饱

和脂肪酸促进作用,能够通过不同途径抑制 *SREBP1C* 及 *FAS* 表达。

本实验中 HepG2 细胞 ALA 各浓度组结果显示 *ACC* 基因和蛋白表达均无明显差异,即 ALA 对于缓解由硬脂酸导致的 *ACC* 基因表达增强作用不明显。Shen. Q. W 等^[14]用 ALA 处理 C2C12 细胞发现 ALA 可通过促进 AMPK α 磷酸化间接激活 *ACC*,使后者表达加强,与本实验研究结果不同可能与选取的细胞类型及处理方式有关。

综上,硬脂酸处理后 HepG2 细胞脂肪酸合成关键基因 mRNA 表达增强,随着 ALA 替代硬脂酸浓度升高,ALA 对脂肪酸合成关键基因 *SREBP1C* 及 *FAS* 表达的抑制作用增强,ALA 能够缓解硬脂酸的表达促进作用,但 *ACC* 表达无明显差异。

参考文献:

- [1] You M, Cao Q, Liang X, et al. Mammalian sirtuin 1 is involved in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice[J]. Nutr, 2008, 138(3): 497-501.
- [2] 卓伟华,王继文,蒋立. 固醇调节元件结合蛋白在动物脂肪代谢中的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2005, 2: 41-43.
- [3] Liu TF, Tang JJ, Li PS, et al. Ablation of gp78 in liver improves hyperlipidemia and insulin resistance by inhibiting SREBP to decrease lipid biosynthesis[J]. Cell Metab, 2012, 16(2): 213-225.
- [4] 赵小平,杨法军. SREBP 介导的基因表达的调控(英文)[J]. 生物物理学报, 2012, 4: 287-294.
- [5] Clarke SD, Baillie R, Jump DB, et al. Fatty acid regulation of gene expression. Its role in fuel partitioning and insulin resistance[J]. Ann N Y Acad Sci, 1997, 827: 178-187.
- [6] Samuel S, Peskin B, Arondekar B, et al. Estimating health and economic benefits from using prescription omega-3 fatty acids in patients with severe hypertriglyceridemia[J]. Am J Cardiol, 2011, 108(5): 691-697.
- [7] 龚受基,刘仲华,黄建安,等. 软脂酸诱导的 HepG2 细胞糖脂代谢紊乱及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2011, 10: 1383-1387.
- [8] Mater MK, Thelen AP, Pan DA, et al. Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription[J]. J Biol Chem, 1999, 274(46): 32725-32732.
- [9] Fukumitsu S, Villareal MO, Onaga S, et al. alpha-Linolenic acid suppresses cholesterol and triacylglycerol biosynthesis pathway by suppressing SREBP-2, SREBP-1a and -1c expression[J]. Cytotechnology, 2013, 65(6): 899-907.
- [10] Yahagi N, Shimano H, Hastay AH, et al. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic

(下转第 13 页)

- [12] 艾厚喜,左玮,王晓锋,等. 莫诺苷对二磷酸腺苷诱导兔血小板聚集钙离子的影响[J]. 中国康复理论与实践,2012, 18(2): 131-133.
- [13] 程华,孙芳玲,王晓锋,等. 莫诺苷对二磷酸腺苷诱导局灶性脑缺血再灌注大鼠血小板聚集的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(2): 101-103.
- [14] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [15] Wu MV, Hen R. The Young and the Restless: Regulation of Adult Neurogenesis by Wnt Signaling[J]. *Cell Stem Cell*,2013, 12(2):139-140.
- [16] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. *Dev Cell*,2009,17(1):9-26.
- [17] 左玮,王起忠,王文,等. Wnt 信号对神经发生和血管新生的调控[J]. 中国康复理论与实践,2011,17(3):243-246.
- [18] Viti, J., Gulacsi, A., Lillien, L., 2003. Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2[J]. *J. Neurosci.* 23, 5919-5927.
- [19] Enrique M. Toledo, Marcela Colombres, *et al.* Inestrosa, Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation [J]. *Progress in Neurobiology*, 2008, (86): 281-296.
- [20] Sierra J, Yoshida T, Joazeiro CA, *et al.* The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes[J]. *Genes Dev.*, 2006,20(5): 586-600.
- [21] Rina Rosin-Arbesfeld, Adam Cliffe, Thomas Brabletz, *et al.* Nuclear export of the APC tumour suppressor controls β -catenin function in transcription[J]. *EMBO J*,2003,22(5):1101-1113.
- [22] Jin K, Wang X, Xie L, *et al.* Transgenic ablation of double cortin-expressing cells suppresses adult neurogenesis and worsens stroke outcome in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2010, 107(17): 7993-8001.
- [23] 李慧,黄景阳,陈海丽,等. 脑缺血再灌注后大鼠海马 Wnt7b 的表达[J]. 山东大学学报(医学版),2013,52(2):7-11.

[修回日期]2014-06-11

(上接第7页)

- gene expression by polyunsaturated fatty acids[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(50): 35840-35844.
- [11] 周国利,金海国. 脂肪酸合成酶基因(FASN)的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 9: 3559-3560+3578.
- [12] Park KG, Min AK, Koh EH, *et al.* Alpha-lipoic acid decreases hepatic lipogenesis through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent pathways[J]. *Hepatology*, 2008, 48(5): 1477-1486.
- [13] 王冰. 肝X受体上调肝脏和肾脏脂肪酸合成酶的表达及机制[D], 2007, 大连医科大学.
- [14] Shen QW, Zhu MJ, Tong J, *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase is involved in AMP-activated protein kinase activation by alpha-lipoic acid in C2C12 myotubes[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293(4): C1395-C1403.

[修回日期]2014-08-26