

皱纹盘鲍内脏脂质对人肝癌细胞 HepG2 脂质调节作用研究

陈贝¹, 张伯超¹, 吴毓敏², 乔琨¹, 曲海东³, 许旻¹, 潘南¹, 刘智禹¹

(1. 福建省水产研究所, 国家海水鱼类加工技术研发分中心(厦门), 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建厦门 361013)

(2. 闽南师范大学生物科学与技术学院, 福建漳州 363000) (3. 厦门大学环境与生态学院, 福建厦门 361013)

摘要: 本研究探讨了皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)内脏脂质(*Haliotis discus hannai* visceral lipid, HDHL)对人肝癌细胞 HepG2 的脂质代谢的影响, 对 HDHL 脂肪酸成分、HepG2 细胞活性、细胞内胆固醇和甘油三酯含量以及脂肪酸代谢相关 mRNA 基因的表达情况进行了研究。研究发现 HDHL 中不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量 59.50%, 其中多不饱和脂肪酸占 29.71%。HDHL 与 HepG2 细胞共孵培养 24 h 及 48 h 后, 浓度为 0~240 $\mu\text{g/mL}$ 的 HDHL 对 HepG2 细胞无毒性影响。30~240 $\mu\text{g/mL}$ HDHL 可显著降低 HepG2 总胆固醇含量, 30~120 $\mu\text{g/mL}$ HDHL 共孵 HepG2 细胞后, 细胞内甘油三酯含量显著降低。qPCR 结果显示 HDHL 可显著降低 HepG2 细胞脂肪酸合成相关基因 *SREBP1c*、*ACC1*、*FAS* 和脂肪酸转运吸收相关基因 *CD36* mRNA 水平的表达, 提高线粒体脂肪酸氧化基因 *CPT1* 的表达。因此, HDHL 可能通过抑制脂肪酸合成和脂肪酸转运, 增强线粒体中脂肪酸氧化等途径有效调节细胞脂质代谢, 该研究为脂质调节功能食品的开发提供理论依据。

关键词: 人肝癌细胞; 皱纹盘鲍; 内脏脂质; 脂质代谢

文章编号: 1673-9078(2019)04-22-29

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.004

Lipid-Modulating Effects of Visceral Lipids from *Haliotis discus hannai* on HepG2 Cells

CHEN Bei¹, ZHANG Bo-chao¹, WU Yu-min², QIAO Kun¹, QU Hai-dong³, XU min¹, PAN Nan¹, LIU Zhi-yu¹

(1. National Research and Development Center for Marine Fish Processing (Xiamen), Key Laboratory of Cultivation and Highvalue Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361013, China)

(2. School of Biological Science and Biotechnology, Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China)

(3. College of the Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361013, China)

Abstract: In this study, the effects of the visceral lipids from *Haliotis discus hannai* (HDHL) on lipid metabolism of human hepatoma cell line, HepG2 cells, were investigated. The HDHL fatty acid composition, HepG2 cell activity, and the content of intracellular cholesterol and triglycerides as well as the mRNA expression of fatty acids metabolism-related genes were examined. It was found that the unsaturated fatty acids in HDHL accounted for 59.50% of the total fatty acids, of which polyunsaturated fatty acids accounted for 29.71%. After an incubation of HDHL and HepG2 cells for 24 h and 48 h, respectively, HDHL at 0~240 $\mu\text{g/mL}$ had no toxic effect on HepG2 cells, whereas, HDHL at 30~240 $\mu\text{g/mL}$ could significantly reduce the total cholesterol content of HepG2, with HDHL at 30~120 $\mu\text{g/mL}$ causing a significant decrease in the content of intracellular triglycerides. The qPCR results revealed that in HepG2 cells, HDHL could significantly reduce the mRNA expression of fatty acid synthesis-related genes *SREBP1c*, *ACC1* and *FAS* as well as fatty acid transport and absorption-related gene *CD36*, while increasing the expression of mitochondrial fatty acid oxidation gene *CPT1*. Therefore, HDHL might regulate cell lipid metabolism through inhibiting the synthesis and transportation of fatty acids while enhancing the oxidation of fatty acids in mitochondria. This study provides a theoretical basis

收稿日期: 2018-11-08

基金项目: 海洋公益性行业科研专项 (201405016)

作者简介: 陈贝 (1983-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 海洋活性物质研发

通讯作者: 刘智禹 (1972-), 男, 博士, 教授级高工, 研究方向: 水产品加工与综合利用研究

for the development of lipid-regulating functional foods.

Key words: human hepatoma cell HepG2; *Haliotis discus hannai*; visceral lipids; lipid metabolism

海洋脂质由于自身独特的功能特性,如脂质调节、抗肿瘤、抗炎和增强智力等,成为开发海洋功能食品和海洋药物的重要资源之一,备受人们关注。目前海洋脂质的提取主要集中于鱼类、藻类、贝类这三类海洋生物,主要包括脂肪酸、磷脂、固醇和甘油酯等^[1]。皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)又称虾夷盘鲍,是我国沿海鲍科中最具经济价值的种类之一。皱纹盘鲍的加工和食用主要以腹足为主,其内脏包含消化腺及生殖腺,一般作为鲍加工的废弃物丢弃或用于饲料生产。但实际上,鲍内脏含有丰富的脂质成分,且总脂以甘油三酯和磷脂为主,含有大量的不饱和脂肪酸,胆固醇和游离脂肪酸含量较低。因此鲍内脏是良好的海洋脂质资源,可作为脂质提取和脂质调节因子开发的原材料进行深度开发。人肝癌细胞 HepG2 细胞具有糖脂代谢等正常的生理功能,并且易于培养,很早以前即是国际公认的研究降脂作用的细胞系^[2]。

本研究在已获得的皱纹盘鲍内脏脂质(*Haliotis discus hannai* visceral lipid, HDHL)乙醇提取工艺的研究基础上,对其脂肪酸成分进行分析。通过细胞增殖实验观察鲍脂质对 HepG2 细胞活性影响。检测孵育 HDHL 后 HepG2 细胞中甘油三酯和胆固醇含量,验证 HDHL 对 HepG2 细胞内脂质累积的干预作用。并分析不同浓度 HDHL 对 HepG2 细胞脂质代谢相关基因表达的影响,探讨其脂质调节机制,为开发脂质调节功能性食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞及受试药物

HepG2 人肝癌细胞购买于中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库(KCB200537YJ)。HDHL 提取物由福建省水产研究所张伯超博士提供,提取方法主要是以鲍内脏为原料,利用 95%乙醇作为溶剂,在 35℃进行索氏萃取 2 次,每次 3 h。采用活性炭对磷脂进行脱色处理,并利用大孔树脂 D101 进行纯化得到 HDHL。HDHL 的主要成分分析按照国外标准 AOAC 996.06 进行测定,结果见表 2。

1.1.2 主要试剂及耗材

DMEM/High Glucose 细胞培养基购自 HyClone 公司; Trypsin-EDTA Solution、青霉素/链霉素购自 BBI Life Sciences 公司;胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;

DMSO 购自 Sigma 公司;细胞增殖及细胞毒性检测试剂 MTS 及 PMS 分别购自 Promega 公司和 Sigma 公司;甘油三酯(TG)、总胆固醇(T-CHO)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒(DP430)购自天根生化科技(北京)有限公司;PrimerScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)试剂盒购自 Takara 公司;FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) qPCR 试剂盒购自 Roche 公司;细胞培养耗材均购自 Corning 公司和 Fisher 公司。

1.1.3 主要实验设备

Galaxy 170S 二氧化碳培养箱, Eppendorf 德国; Class II BSC 生物安全柜, ESCO 新加坡; DMI8 倒置显微镜, Leica 德国; Infinite200Pro 酶标仪, Tecan 瑞士; 5702R 台式冷冻离心机, Eppendorf 德国; 5810R 高速冷冻离心机, Eppendorf 德国; TissueLyser II 高通量组织研磨仪, Qiagen 德国; LightCycler®96 qPCR 仪, Roche 瑞士; BSA224S 分析天平, Sartorius 德国; GI54DWS 高温蒸汽灭菌锅, 致微仪器有限公司; Unique R30 纯水仪, 锐思捷科学仪器有限公司。

1.1.4 主要溶液配制

HepG2 细胞完全培养基: DMEM/High Glucose 细胞培养基, 10% FBS, 1%青霉素/链霉素。

MTS 储液: 称取 84 mg MTS 溶解于 42 mL DPBS 中, 温和搅拌 15 min 至 MTS 完全溶解, 调 pH 至 6.0~6.5, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 避光-20℃保存。PMS 储液: 1.84 mg PMS 粉末溶解于 2 mL DPBS 中, 0.22 μm 滤膜过滤, 避光-20℃保存。MTS/PMS 混合液: 2.0 mL MTS 储液与 100 μL PMS 轻柔混匀。

1.2 实验方法

1.2.1 HepG2 细胞培养

HepG2 细胞置于 37℃, 含 5% CO₂ 浓度的培养箱培养, 显微镜下观察当汇合率达 80%~90%即可进行 1:2 或 1:3 传代。

1.2.2 细胞活性测定

采用 MTS/PMS 法测定 HepG2 细胞活性, 测定方法参照 CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) 试剂盒说明书。以 1×10⁵ cfu/mL 细胞密度接种 HepG2 细胞于 96 孔细胞培养板中, 培养过夜后将 96 孔板完全培养基替换为无血清 DMEM 高糖培养基, 饥饿处理 12 h。随后将各浓度鲍鱼内脏脂质(0~960 μg/mL)与细胞分别共孵育培养

24 h 或 48 h。将 MTS/PMS 混合液和新鲜无血清 DMEM 高糖培养基以 1:5 的比例混匀,得到细胞活性测定工作液。吸出细胞孔中培养基,每孔加入 120 μ L 细胞活性测定工作液,37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光孵育 45 min,酶标仪检测 490 nm 吸光值。

1.2.3 细胞内甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (T-CHO) 测定

以 2×10^5 cfu/mL 细胞密度接种 HepG2 细胞于 6 孔细胞培养板中,细胞经 0 μ g/mL、30 μ g/mL、60 μ g/mL、120 μ g/mL、240 μ g/mL 和 480 μ g/mL HDHL 分别孵育处理 24 h 后,移除培养基上清,用 DPBS 缓冲液清洗细胞 1~2 次,细胞刮刀将细胞刮下,重悬于 400 μ L DPBS 中,用组织研磨仪进行细胞破碎后取破碎上清进行检测。具体检测步骤参照南京建成试剂盒说明书。

1.2.4 脂肪酸代谢通路相关基因 qPCR 测定

以 2×10^5 cfu/mL 细胞密度接种 HepG2 细胞于 24 孔细胞培养板中,细胞分别经 30 μ g/mL 和 120 μ g/mL HDHL 孵育处理 24 h 后,移除培养基上清,每孔加入 300 μ L 细胞裂解液,细胞总 RNA 提取参考天根培养

细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒说明书。利用 PrimerScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time) 反转录获得 1 μ g cDNA。将 cDNA 以 3^1 、 3^2 、 3^3 、 3^4 、 3^5 倍梯度稀释,并以此为模板,使用 Power SYBR Green PCR Master Mix 分别配制各基因的 qPCR 体系。qPCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 600 s; 三步法循环扩增 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s (40 个循环)。分析各基因特异引物的扩增效率及熔解曲线,以扩增效率达到 90%~110%,熔解曲线为单峰的引物作为目的基因的特异引物。各目的基因的特异引物序列及扩增片段长度如表 1 所示。

根据标准曲线的结果,选择模板 cDNA 的最佳稀释倍数、目的基因的特异性引物及引物浓度,同时使用 18s rRNA 作为内参基因进行 qPCR 反应。使用 LightCycle[®] 96 SW 1.1 软件分析 qPCR 反应的荧光信号值,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的相对表达量。

1.2.5 数据处理

使用 SPSS 软件对数据进行统计分析,单因素方差 (one way ANOVA) 分析方法分析组间差异,*表示与对照组有显著性差异 ($p < 0.05$)。

表 1 脂质代谢相关基因 qPCR 引物列表

Table 1 Primer sets of lipid metabolism associated genes for qPCR analysis

基因	引物名称	序列 (5'-3')	Genebank No.或参考文献	PCR 产物长度/bp
脂肪酸合成 相关基因	SREBF1c-F3	GGAGGGGTAGGGCCAACGCGCT	NM001321096.2	80
	SREBF1c-R3	CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC	[3]	
	ACC1-F	GAGGGCTAGGTCTTTTGAAG	NM198834.2	389
	ACC1-R	CCACAGTGAAATCTCGTTGAGA	[4]	
	ACC2-F	ACCAGAAGCCCCAAGAAAC	NM001093.3	380
	ACC2-R	CGACATGCTCGGCCTCATAG	[4]	
脂质吸收 相关基因	FAS-F1	CCTGGCTGCCTACTACATCG	AY451392.1	102
	FAS-R1	CACATTTCAAAGGCCACGCA		
	CD36-F3	TGTCCTGGCTGTGTTTGGAG	L06850.1	286
	CD36-R3	AGACTGTGTTGTCCTCAGCG		
脂肪酸氧化 相关基因	FATP5-F	ACACACTCGGTGTCCCTTTC	[5]	99
	FATP5-R	CTACAGGGCCCACTGTCAAT		
	PPAR α -F1	GGAAAGCCCACTCTGCCCCCT	XM011530239.2	235
	PPAR α -R1	AGTCACCGAGGAGGGGCTCGA	[5]	
	CPT1-F	AAATCAATCGGACTCTGGAAACG	NM001876.3	189
	CPT1-R	TCTTGGTGGCAGCACTCATCTT	[6]	
	ACOX-F	TCCTGCCCACCTTGCTTCAC	NM004035.6	367
	ACOX-R	TTGGGGCCGATGTCACCAAC	[4]	
内参基因	CYP2E1-F1	CCCAAAGGATATCGACCTCA	NM000773.3	106
	CYP2E1-R1	AGGGTGTCTCCACACACTC	[5]	
	18s rRNA-F	CGGCTACCACATCCAAGGAA	M10098.1	187
	18s rRNA-R	GCTGGAATTACCGCGGCT	[7]	

2 结果与分析

2.1 HDHL 成分分析

依据食品中总脂肪、饱和脂肪、不饱和脂肪的测定标准 AOAC 996.06, 利用气相色谱内标法对 HDHL 的脂肪成分进行分析。其中, 总脂肪酸含量=饱和脂肪酸+不饱和脂肪酸+反式脂肪酸。结果显示, 提取的 HDHL 中不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量 59.50%, 其中多不饱和脂肪酸占 29.71%, ω -3 脂肪酸和 ω -6 脂肪酸含量分别为 11.31 和 10.93 g/100 g。

表 2 HDHL 脂肪成分分析

Table 2 Analysis of lipid composition in HDHL

项目	脂肪酸含量 (g/100 g)	占总脂肪酸 比例/%
总脂肪酸	75.23	
饱和脂肪酸	29.74	39.53
不饱和脂肪酸	44.76	59.50
单不饱和脂肪酸	22.41	29.79
多不饱和脂肪酸	22.35	29.71
反式脂肪酸	0.73	0.97

2.2 HDHL 提取物对 HepG2 细胞活性的影响

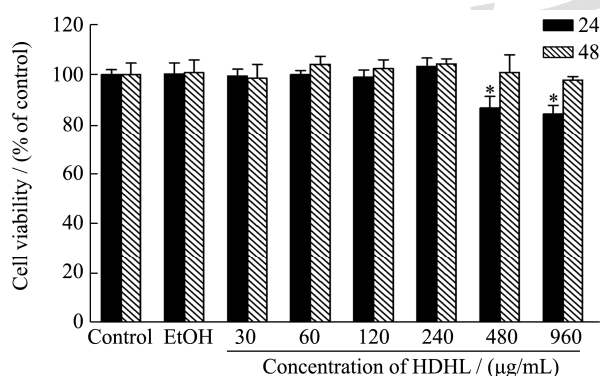


图 1 HDHL 对 HepG2 细胞活性影响

Fig.1 Viability of HepG2 cell following exposure to HDHL

注: 与对照组比较, * $p < 0.05$ 。下图同。

本研究通过细胞活性检测 HDHL 提取物对 HepG2 细胞存活率的影响, 选取无细胞毒性的 HDHL 样品浓度进行干预细胞脂肪积累的活性评价。以不添加任何物质以及加入 EtOH 的 HepG2 细胞分别作为空白对照组和溶剂对照组。实验结果表明, HDHL 与 HepG2 细胞共培养 24 h, 高浓度的 HDHL 具有一定的细胞毒性, 当浓度达到 480 μ g/mL 时开始对 HepG2 细胞产生活性抑制作用。浓度在 30~240 μ g/mL 的 HDHL 分别作用于 HepG2 24 h 或 48 h, 对 HepG2 细胞活性均无抑制作用。因此以 240 μ g/mL 作为 HDHL 提取物

干预 HepG2 脂质积累的上限浓度。

2.3 HDHL 提取物对 HepG2 细胞内甘油三酯

及总胆固醇含量的影响

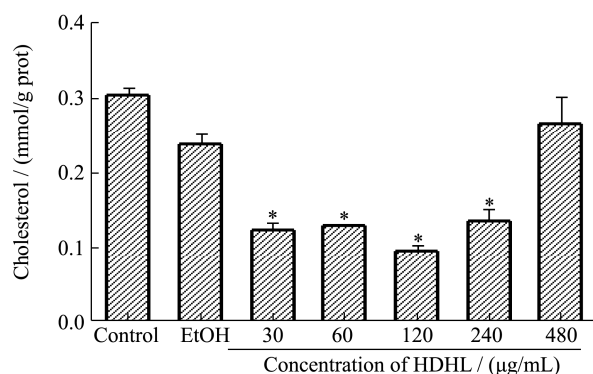


图 2 HepG2 细胞总胆固醇含量检测

Fig.2 Effect of HDHL on TC accumulation in HepG2 cell

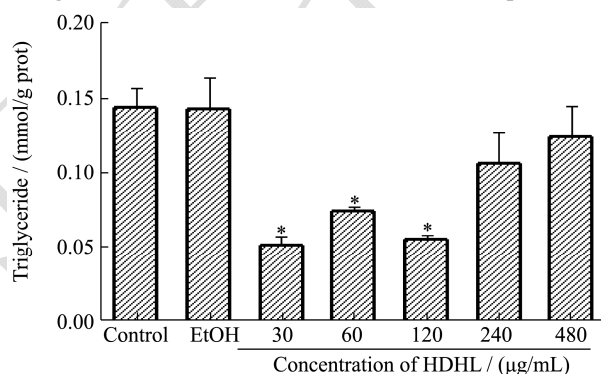


图 3 HepG2 细胞甘油三酯含量检测

Fig.3 Effect of HDHL on TG accumulation in HepG2 cell

细胞内总胆固醇 (图 2) 和甘油三酯 (图 3) 含量测定结果显示, 30~240 μ g/mL HDHL 可显著降低 HepG2 总胆固醇含量, 30~120 μ g/mL HDHL 共孵 HepG2 细胞后, 细胞内甘油三酯含量显著降低。

2.4 HDHL 提取物对 HepG2 细胞脂肪酸代谢

相关基因 mRNA 表达的影响

根据 HepG2 细胞活性及胞内甘油三酯和总胆固醇含量测定结果, 选取 30 μ g/mL 和 120 μ g/mL 作为 HDHL 提取物对 HepG2 细胞脂肪酸代谢相关基因 mRNA 表达影响的作用浓度。实验涉及的 10 个目的基因包括固醇调节元件结合转录因子 (sterol regulatory element binding transcription factor 1c, *SREBF1c*)、乙酰辅酶 A 羧化酶 1 (acetyl-coenzyme A carboxylase 1, *ACC1*)、乙酰辅酶 A 羧化酶 2 (acetyl-coenzyme A carboxylase 2, *ACC2*)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, *FAS*)、脂肪酸转运蛋白 5 (fatty

acid transport proteins 5, *FATP5*)、脂肪酸移位酶 (fatty acid translocase, *FAT/CD36*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (Peroxisome proliferator activated receptor α , *PPAR α*)、肉碱脂酰转移酶 (carnitine palmityl transferase, *CPT1*)、乙酰辅酶 A 氧化酶 (acyl CoA oxidase, *ACOX*)、细胞色素 P450 2E1 (cytochrome P450 2E1, *CYP2E1*)，均为脂肪酸合成、脂滴形成、脂质吸收或脂肪酸氧化等脂质代谢相关信号通路上的关键基因。

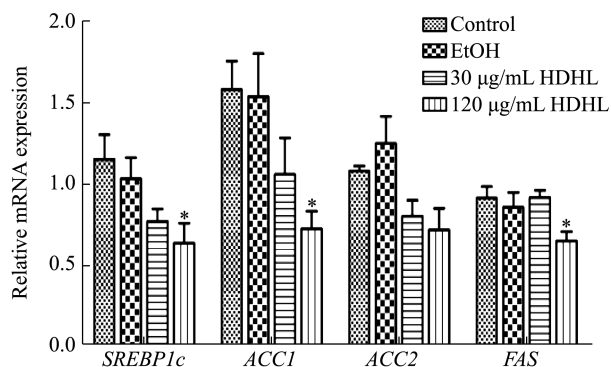


图4 HepG2 细胞脂肪酸合成相关基因 mRNA 表达

Fig.4 Effect of HDHL on mRNA expression of lipid synthesis associated genes

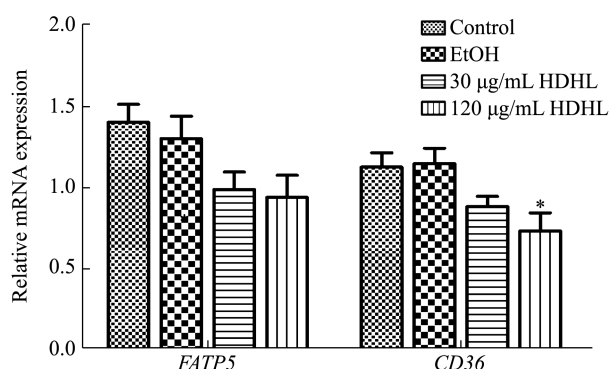


图5 HepG2 细胞脂质吸收相关基因 mRNA 表达

Fig.5 Effect of HDHL on mRNA expression of lipid uptake associated genes

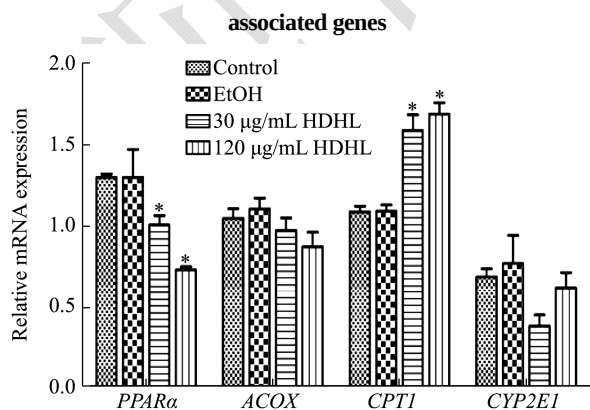


图6 HepG2 细胞脂肪酸氧化相关基因 mRNA 表达

Fig.6 Effect of HDHL on mRNA expression of lipid oxidation associated genes

研究结果显示, 当 HDHL 提取物浓度达 120 $\mu\text{g/mL}$ 时, 与对照组相比 HepG2 细胞脂肪酸合成相关基因 *SREBP1c*、*ACC1*、*FAS* 含量有明显降低 (图4), 脂质吸收相关基因 *CD36* 表达被显著抑制 (图5)。30 $\mu\text{g/mL}$ 和 120 $\mu\text{g/mL}$ 的 HDHL 可显著诱导 HepG2 细胞脂肪酸氧化相关基因 *CPT1* mRNA 的表达 (图6)。因此, 研究结果推断 HDHL 可能是通过抑制脂肪酸合成和脂肪酸转运, 同时增强线粒体中脂肪酸氧化从而对 HepG2 细胞脂质累积起到干预作用。

3 讨论

早有研究发现肝脏组织中脂肪酸组成的改变会影响其脂质代谢基因的表达^[8]。在高脂膳食情况下, 适当增加膳食中不饱和脂肪酸而减少膳食中饱和脂肪酸可降低非酒精性脂肪肝的发病风险^[9]。时皎皎等人研究观察到单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸组大鼠肝脏组织中 *FAS* mRNA 表达较对照组及饱和脂肪酸组显著降低^[10]。海洋生物源脂质是不饱和脂肪酸的重要来源, Tillander 等人研究表明为高脂肪饮食的 C57BL/6J 小鼠添加鱼油和磷虾油均可促进血脂降低并调节脂质体内平衡, 但二者效率不同, 作用机制也不尽相同^[11]。本研究首先对 HDHL 提取物中脂肪酸进行了测定, 结果显示 HDHL 富含不饱和脂肪酸, 其含量达到总脂肪的 59.5%, HDHL 可显著降低 HepG2 细胞中 TG 和 T-CHO 含量, 具有潜在的脂质调节作用, 最后对其作用机制进行了初步探讨。

脂肪酸合成受到复杂而精细的信号传导途径的调控 (图7)。SREBP1 是固醇调节元件结合蛋白家族成员, 属核转录因子, 直接参与脂肪酸、甘油三酯合成和葡萄糖代谢相关酶基因的表达调控。受 SREBP-1c 调节的靶基因包括 *ACC*、*FAS*、*SCD*、葡萄糖激酶 (*GK*) 和磷酸烯醇式丙酮酸激酶 (*PEPCK*) 等众多基因^[12]。其过度表达会引起体内糖脂代谢紊乱, 脂肪合成成倍上升, 从而引发肝脏等非脂肪细胞组织的脂质异常蓄积^[13]。在肥胖、胰岛素抵抗和脂肪肝等代谢疾病中均可观察到 SREBP-1c 的过度表达^[14]。因此, 抑制 SREBP-1c 表达可减轻肝脏脂肪聚积从而改善脂代谢。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。ACC1 主要存在于细胞质之中, 其表达最为活跃的组织为肝脏和脂肪组织。研究显示, 敲除肝脏 *ACC1* 基因可降低肝脏脂质合成作用缓解脂肪蓄积, 但对脂肪酸氧化并无影响^[15]。FAS 是脂肪酸合成的主要限制酶, 抑制 FAS 就可以减少脂肪酸的合成, 从而降低 TG 生成, 是肥胖和脂肪肝等疾病的新靶点。脂肪酸合成过程中的关键酶及其转录调控因子已成为

评价活性物质是否具有改善脂质代谢作用的重要指标。本研究中 HDHL 提取物可显著降低 HepG2 细胞中 *SREBP-1c* 的表达,同时伴随 *FAS* 和 *ACC* 等脂质合成信号通路相关基因的下调,可推测 HDHL 可能通过抑制 *SREBP-1c* 的表达,继而影响脂质合成相关基因的转录,导致脂肪酸合成受阻,从而减少脂质累积。脂肪酸合成抑制活性在其他海洋生物源脂质中也得到了证实。Bargut 等研究指出添加高鱼油含量的饮食可通过抑制 *SREBP-1c* 和 *FAS* 的表达减少 C57BL/6 小鼠的肝脏脂肪生成,同时促进 *PPAR-α* 和 *CPT-1* 的表达从而促进 C57BL/6 小鼠 β 氧化,预防肝损伤^[16]。Liu 等通过对肥胖小鼠饮食中添加海参 (*Cucumaria frondosa*) 酯化磷脂 (EPA-PL) 发现, EPA-PL 可有效

缓解体内脂肪蓄积,降低血清和肝脏 TG、TC 水平,调节小鼠脂肪细胞因子的分泌,通过调节 *SREBP-1c*、*FAS*、*G6PDH*、*ACC*、*SCD-1* 和 *CPT-1a* 等脂质调节相关基因抑制脂肪酸合成并促进其氧化分解^[17]。除了海洋生物脂质之外,多种海洋活性物质也具有类似的活性,例如海参皂苷^[18]可显著抑制脂肪酸合成过程中的关键限速酶活力,并使 *FAS*、*ME*、*G6PDH* 及 *SREBP-1c* 的 mRNA 表达下调。腔昆布多酚提取物可显著改善小鼠高脂肪饮食诱导的肝脂质积累,对其作用机理进行深入研究发现其可通过激活 *AMPKα* 通路抑制 *ACC* 活性,从而影响脂质合成^[19]。因此这些健康天然的海洋源活性成分可为肥胖或脂肪肝等疾病的预防开辟新途径。

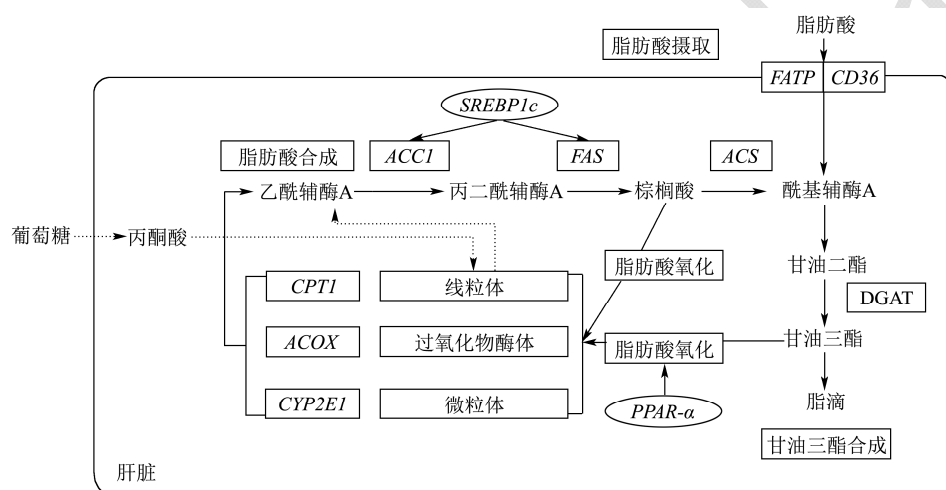


图7 脂肪酸代谢相关基因示意图

Fig.7 Illustration of lipid metabolism associated genes

脂肪酸氧化主要发生在线粒体、过氧化物酶体及微粒体中。在哺乳动物中,脂肪酸降解的主要途径为 β -氧化,在线粒体和过氧化物酶体中发生^[20],其中线粒体是进行 β 氧化主要场所,进行碳链长度小于20的脂肪酸代谢,而过氧化物酶体则完成极长链脂肪酸氧化^[12]。微粒体是脂肪酸 α -氧化和 ω -氧化的主要场所。本研究通过共孵育 HDHL 后这三种脂肪酸氧化途径中关键基因的表达量变化,分析 HDHL 对脂肪酸降解的影响。*CPT1* 是线粒体脂肪酸 β 氧化过程中的关键调节酶,对脂肪的分解供能具有重要的调控作用^[21]。它可以作为衡量线粒体氧化能力的重要指标,其活力越高说明肝脏中脂肪分解代谢越旺盛,脂肪酸越不易在肝内积累。Nyman 等以高脂饮食饲喂 *CPT1a* 杂合子及显性纯合子小鼠 28 周后发现杂合子小鼠肝脏出现脂肪变性现象^[22],可见 *CPT1a* 缺陷使肝脏脂肪沉积、细胞结构损伤。本研究 HDHL 作用于 HepG2 细胞 24 h 后对 *CPT1* 基因表达的诱导作用说明 HDHL 可通过增强脂肪酸在线粒体中的氧化作用从而减少肝

细胞脂质累积。为高脂饮食小鼠补充 2.5% 磷虾油也可观察到 *CPT1* 活性和肉毒碱水平的显著增加,表明磷虾油的添加促进了小鼠肝脏脂肪酸的氧化,从而有效防止大鼠肝脏中 TG 和 T-CHO 的积累^[23]。

细胞中长链脂肪酸的摄取主要通过被动扩散和蛋白质介导转运两种方式。蛋白质介导转运所涉及的细胞质膜相关蛋白包括 *FAT/CD36*、细胞质膜脂肪酸结合蛋白 (*FABPpm*) 和 *FATP*, 其中 *CD36* 可促进长链脂肪酸穿透细胞膜, *CD36* 的高表达可促进心脏和骨骼肌中的脂质蓄积^[24]。长链脂肪酸的摄取与 *CD36* 从胞内至细胞膜的招募直接相关。近年研究发现,高脂脂肪酸摄取的饮食会增加肝脏中 *CD36* 的表达,并且 *CD36* 的高表达同 LCFA 摄取和肝脏中脂质的沉积直接相关^[25]。非酒精性脂肪肝患者的肝活检样品中 *CD36* 也存在高表达的现象^[26]。植物酚酸化合物绿原酸缓解肝脏脂肪累积的机制研究中,绿原酸可降低高脂饲料诱导的大鼠肝脏的重量、缓解肝脏脂肪的累积,同时降低 *FAS*、*ACC* 等脂肪合成以及脂肪酸摄入相关

的基因相关基因 *AP2* 和 *FAT/CD36* 的表达^[27]。Li 等研究发现壳寡糖的添加对肝脏细胞脂质积累具有显著的抑制作用,并可在 mRNA 和蛋白质水平降低 *CD36* 的表达从而降低 HepG2 细胞中的脂肪酸摄取^[28]。本研究中 HDHL 可在转录水平抑制细胞中 *FAT/CD36* 基因的 mRNA 的表达,因此可推测 HDHL 通过降低 HepG2 脂肪酸摄入预防肝细胞脂质累积。

4 结论

本研究对 HDHL 的脂肪酸组成进行了分析,研究了 HDHL 对人肝癌细胞 HepG2 脂质代谢的影响。研究发现,HDHL 中含丰富的不饱和脂肪酸,可显著降低 HepG2 细胞内总胆固醇和甘油三酯含量。进一步研究发现 HDHL 可显著降低 HepG2 细胞脂肪酸合成相关基因 *SREBP1c*、*ACCI*、*FAS* 和脂肪酸转运吸收相关基因 *CD36* mRNA 水平的表达,提高线粒体脂肪酸氧化基因 *CPT1* 的表达。因此,HDHL 可能通过抑制脂肪酸合成和脂肪酸转运,增强线粒体中脂肪酸氧化等途径有效调节细胞脂质代谢,对 HepG2 细胞脂质累积具有潜在的预防作用。

参考文献

- [1] 董诗婷,陈弘培,赵慧,等.海洋生物功能性脂类的研究进展[J].农产品加工,2017,7:59-64
DONG Shi-ting, CHEN Hong-pei, ZHAO Hui, et al. The reasearch progress of marine functional lipids [J]. Farm Products Processing, 2017, 7: 59-64
- [2] Wang S, Pessah M, Infante J F, et al. Lipid and lipoprotein metabolism in Hep G2 cells [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1988, 961: 351-363
- [3] Shimomura I, Shimano H, Horton J D, et al. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells [J]. The Journal of Clinical Investigation, 1997, 99: 838-845
- [4] Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, et al. The effects of unsaturated fatty acids on lipid metabolism in HepG2 cells [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2009, 45: 6-9
- [5] Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, et al. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology Research : the Official Journal of the Japan Society of Hepatology, 2009, 39: 366-373
- [6] Wan Y, Liu L Y, Hong Z F, et al. Ethanol extract of *Cirsium japonicum* attenuates hepatic lipid accumulation via AMPK activation in human HepG2 cells [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2014, 8: 79-84
- [7] Krockenberger M, Dombrowski Y, Weidler C, et al. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D [J]. Journal of Immunology, 2008, 180: 7338-7348
- [8] Arendt B M, Comelli E M, Ma D W, et al. Altered hepatic gene expression in nonalcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids [J]. Hepatology, 2015, 61: 1565-1578
- [9] 刘裕,高燕翔,冉莉,等.不同膳食脂肪酸对大鼠肝脏 *SREBP-1c* 基因表达和非酒精性脂肪肝发生的影响[J].第三军医大学学报,2016,38:2002-2007
LIU Yu, GAO Yan-xiang, RAN Li, et al. Effects of dietary fatty acids on expression of gene sterol-regulatory elementary binding protein-1c and occurrence of non-alcoholic fatty liver disease in rats [J]. Journal of Third Military Medical University, 2016, 38: 2002-2007
- [10] 时皎皎,糜漫天,韦娜,等.不同膳食脂肪酸构成对大鼠肝脏脂代谢相关基因表达的影响[J].重庆医学,2012,41:1252-1254
SHI Jiao-jiao, MI Man-tian, WEI Na, et al. Effect of fatty acid compositions in different diets on expression of lipid metabolism related genes in rat liver [J]. Chongqing Medicine, 2012, 41: 1252-1254
- [11] Tillander V, Bjorndal B, Burri L, et al. Fish oil and krill oil supplementations differentially regulate lipid catabolic and synthetic pathways in mice [J]. Nutrition & Metabolism, 2014, 11: 20
- [12] 胡晓倩.海参皂苷对脂质代谢的影响及其机制研究 [D].青岛:中国海洋大学,2010
HU Xiao-qian. Study on effects and mechanism of saponins of sea cucumber on lipid metabolism [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010
- [13] 童国玉.固醇调节元件结合蛋白 1c 的研究进展[J].国外医学.内分泌学分册,2002:328-331
TONG Guo-yu. Research progress of sterol regulatory element-binding protein 1c [J]. Foreign Medical Sciences (Section of Endocrinology), 2002: 328-331
- [14] Zamora-Valdes D, Ponciano-Rodriguez G, Chavez-Tapia N C, et al. The endocannabinoid system in chronic liver disease [J]. Annals of Hepatology, 2005, 4: 248-254
- [15] Mao J, Demayo F J, Li H, et al. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride

- accumulation without affecting glucose homeostasis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103: 8552-8557
- [16] Bargut T C, Frantz E D, Mandarim-de-Lacerda C A, et al. Effects of a diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in mice [J]. Lipids, 2014, 49: 431-444
- [17] Liu X, Xue Y, Liu C, et al. Eicosapentaenoic acid-enriched phospholipid ameliorates insulin resistance and lipid metabolism in diet-induced-obese mice [J]. Lipids in Health and Disease, 2013, 12: 109
- [18] Hu X Q, Wang Y M, Wang J F, et al. Dietary saponins of sea cucumber alleviate orotic acid-induced fatty liver in rats via PPARalpha and SREBP-1c signaling [J]. Lipids in Health and Disease, 2010, 9: 25
- [19] Jeon H J, Choi H S, Lee Y J, et al. Seapolynol extracted from ecklonia cava inhibits adipocyte differentiation *in vitro* and decreases fat accumulation *in vivo* [J]. Molecules, 2015, 20: 21715-21731
- [20] Poirier Y, Antonenkov V D, Glumoff T, et al. Peroxisomal β -oxidation-A metabolic pathway with multiple functions [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1763: 1413-1426
- [21] Gutieres S, Damon M, Panserat S, et al. Cloning and tissue distribution of a carnitine palmitoyltransferase I gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology B, 2003, 135: 139-151
- [22] Nyman L R, Tian L, Hamm D A, et al. Long term effects of high fat or high carbohydrate diets on glucose tolerance in mice with heterozygous carnitine palmitoyltransferase-1a (CPT-1a) deficiency: Diet influences on CPT1a deficient mice [J]. Nutrition & Diabetes, 2011, 1: e14
- [23] Ferramosca A, Conte A, Burri L, et al. A krill oil supplemented diet suppresses hepatic steatosis in high-fat fed rats [J]. PloS One, 2012, 7: e38797
- [24] Koonen D P, Glatz J F, Bonen A, et al. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1736: 163-180
- [25] Koonen D P, Jacobs R L, Febbraio M, et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity [J]. Diabetes, 2007, 56: 2863-2871
- [26] Miquilenacolina M E, Limacabello E, Sanchezcampos S, et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C [J]. Gut, 2011, 60: 1394-1402
- [27] 黄康. 绿原酸对大鼠肝脏脂肪代谢调节机制研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014
- HUANG Kang. Regulatory mechanism of Chlorogenic Acid on Hepatic Lipid Metabolism in Rats [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014
- [28] Li X, Zhao M, Fan L, et al. Chitobiose alleviates oleic acid-induced lipid accumulation by decreasing fatty acid uptake and triglyceride synthesis in HepG2 cells [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 46: 202-211

(上接第 236 页)

- [11] 马栎, 宋斌, 李逸鹤, 等. 马铃薯面条加工工艺研究[J]. 现代面粉工业, 2016, 30(3): 10-13
- MA Li, SONG Bin, LI Yi-he, et al. Study on processing technology of potato noodles [J]. Modern Flour Industry, 2016, 30(3): 10-13
- [12] 陆婉珍. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京: 中国石化出版社, 2007
- LU Wan-zhen. Modern Near Infrared Spectroscopy Analytical Technology [M]. Beijing: China Petrochemical Press, 2007
- [13] Sánchez Camerero C C, Núñez Sánchez N, Casano S, et al. The potential of near infrared spectroscopy to estimate the content of cannabinoids in *Cannabis sativa* L.: A comparative study [J]. Talanta, 2018, 190: 147
- [14] Kalinova J, Moudry J. Content and quality of protein in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) varieties [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2006, 61(1): 43-47
- [15] 严衍禄. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005
- YAN Yan-lu. Basic and application of near infrared spectroscopy [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005
- [16] 翁诗甫. 傅里叶变换红外光谱分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010
- WENG Shi-fu. Fourier transform infrared spectroscopy analysis [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010