

[文章编号] 1671-587X(2013)02-0195-04

DOI:10.7694/jldxyxb20130201

不同浓度脂联素对 HepG2 细胞内甘油三酯含量的影响及其机制

阳 琰*, 邓华聪, 龙 健, 苏艳新, 瞿 华, 胡振平
(重庆医科大学附属第一医院内分泌科, 重庆 400016)

[摘 要] 目的: 观察不同浓度脂联素对 HepG2 细胞内载脂蛋白 A5(apoA5)mRNA 和蛋白表达水平及甘油三酯(TG)含量的影响, 探讨脂联素与 TG 之间的剂量依赖关系, 为研究脂联素降低 TG 含量的机制奠定基础。方法: 将正常生长的 HepG2 细胞分为对照组、低剂量脂联素组、中剂量脂联素组和高剂量脂联素组, 分别用不同浓度(0、12.5、25.0 和 50.0 mg · L⁻¹)脂联素作用 24 h, 酶法检测各组 HepG2 细胞内 TG 含量, 实时荧光定量 PCR 检测 HepG2 细胞内 apoA5 mRNA 表达水平, Western blotting 法检测 HepG2 细胞内 apoA5 mRNA 蛋白表达水平。结果: 与对照组比较, 脂联素各组 HepG2 细胞内 TG 含量均明显降低(P<0.05); 与低剂量脂联素组比较, 中、高剂量脂联素组 HepG2 细胞内 TG 含量均明显降低(P<0.05), 但高剂量组与中剂量组比较差异无统计学意义(P>0.05)。与对照组比较, 脂联素各组 HepG2 细胞内 apoA5 mRNA 和蛋白表达均明显增加(P<0.05); 与低剂量脂联素组比较, 中、高剂量脂联素组 HepG2 细胞内 apoA5 mRNA 和蛋白表达均明显增加(P<0.05), 但高剂量组与中剂量组比较差异无统计学意义(P>0.05)。结论: 脂联素能降低 HepG2 细胞 TG 含量, 并呈剂量依赖关系, 提示脂联素降低肝脏中 TG 含量可能与其增加 apoA5 表达有关。

[关键词] 脂联素; HepG2 细胞; 载脂蛋白 A5; 甘油三酯

[中图分类号] R363 [文献标志码] A

Influence of adiponectin with different doses on triglyceride contents in HepG2 cells and its mechanism

YANG Yan*, DENG Hua-cong, LONG Jian, SU Yan-xin, QU Hua, HU Zhen-ping
(Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the influence of adiponectin with different doses on apolipoprotein A5 (apoA5) mRNA and protein expression levels and triglyceride(TG) content in HepG2 cells and to investigate the relationship between adiponectin and TG and to establish foundation for study on the mechanism of adiponectin in decreasing TG content. **Methods** HepG2 cells were divided into control group, low dose adiponectin group, middle dose adiponectin group and high dose adiponectin group. The HepG2 cells in various groups were treated with different doses of adiponectin (0, 12.5, 25.0 and 50.0 mg · L⁻¹) for 24 h, then the TG contents in HepG2 cells in various groups were detected with enzyme method. The expression levels of apoA5 mRNA in HepG2 cells were detected with real time fluorescence quantitative PCR method. The expression levels of apoA5 protein in HepG2 cells were detected with Western blotting method. **Results** Compared with control group, the TG contents in HepG2 cells in different doses of adiponectin groups were decreased obviously (P<0.05). Compared with low dose group, the TG contents in HepG2 cells in middle dose group and high dose group were decreased obviously (P<0.05), but there

[收稿日期] 2012-09-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(30570744); 遵义医学院附属医院中青年科研启动基金资助课题[院字(2010)03号]; 遵义医学院博士启动基金资助课题(F-574)

[作者简介] 阳 琰(1980-), 女, 贵州省遵义市人, 副教授, 医学博士, 主要从事糖尿病及其并发症病因及防治研究。

[通信作者] 邓华聪(Tel: 023-65659595, E-mail: deng_huacong@yahoo.com.cn)

was no significant difference between high dose group and middle dose group ($P > 0.05$). Compared with control group, the gene and protein expression levels of apoA5 in HepG2 cells in different doses of adiponectin groups were increased obviously ($P < 0.05$). Compared with low dose group, the gene and protein expression levels of apoA5 in HepG2 cells in middle dose group and high dose group were increased obviously ($P < 0.05$), but there was no significant difference between high dose group and middle dose group ($P > 0.05$). **Conclusion** Adiponectin may decrease the TG content in HepG2 cells in an dose-dependent manner. It indicates that the mechanism of adiponectin in decreasing TG content may be related to increasing the expression of apoA5 in HepG2 cells.

Key words: adiponectin; HepG2 cells; apolipoprotein A5; triglyceride

高甘油三酯(hypertriglyceridemia, HTG)所致的脂毒性近年来已引起人们的高度重视。HTG能抑制胰岛素的信号传递,从而引起并加重胰岛素抵抗(insulin resistance, IR),使胰岛素的生物效应降低,又能引起葡萄糖刺激的胰岛素分泌障碍,并导致 β 细胞凋亡,使胰岛素分泌减少^[1],并与心血管病密切相关。人脂联素是脂肪细胞分泌的一种特异性蛋白质,载脂蛋白A5(apolipoprotein A5, apoA5)是目前所知唯一能够降低血浆甘油三酯(triglyceride, TG)的载脂蛋白,均与TG水平密切相关^[2-4]。但是,脂联素与apoA5和TG之间是否呈剂量依赖关系,目前国内外未见相关研究报告。因此,本研究拟通过观察比较不同浓度脂联素对HepG2细胞内apoA5 mRNA和蛋白表达水平及TG含量的影响,探讨脂联素与TG之间的剂量依赖关系,以及脂联素降低TG的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 HepG2细胞购自北京协和医院细胞库。人脂联素蛋白购自美国R&D公司。DMEM购于Gibco-BRL公司,胎牛血清购自杭州四季清公司。Trizol reagent、逆转录试剂盒和Taq酶均购自Takara公司。PCR引物由上海基康生物技术有限公司合成。apoA5抗体(ab36974)购自Santacruz公司。二抗和细胞蛋白抽提试剂盒均购自凯基生物技术研究。TG测定试剂盒购自北京中生北控公司。二甲亚砜(DMSO)购自上海博耀生物科技有限公司。

1.2 HepG2细胞培养与分组 用含10%胎牛血清的DMEM培养HepG2细胞,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,0.25%胰酶消化,每2~3d更换1次培养基并传代。用不同浓度脂联素(0、12.5、25.0、50.0 mg·L⁻¹)作用HepG2细胞24 h,取生长良好的HepG2细胞(80%),胰酶消化后,调节细胞密度至 2×10^5 mL⁻¹,接种于6孔培养板中传代培养,继续培养至细胞贴壁,显微镜

下观察细胞密度达5 000个细胞/孔,PBS漂洗2次;改用无血清的DMEM培养,分为4组(每组取3个复孔,所测结果取3孔平均值):对照组,无脂联素;低剂量组,12.5 mg·L⁻¹脂联素;中剂量组,25.0 mg·L⁻¹脂联素;高剂量组,50.0 mg·L⁻¹脂联素。

1.3 酶法检测各组细胞内TG含量 吸去6孔板中培养基,加入预冷PBS缓冲液2 mL洗2次,每次轻柔振荡数次以尽量去除培养液。细胞洗涤后,加入适量PBS缓冲液,用细胞刮将贴壁上细胞刮下,转至新的预冷的离心管中,1 000 r·min⁻¹、4℃离心10 min,弃去上清液,加入200 μ L异丙醇以抽提细胞中的脂质。-70℃/37℃反复冻融数次,在显微镜下观察,见细胞全部碎裂,9 000 r·min⁻¹离心10 min,将上清转移到另一清洁1.5 mL离心管中,加入1 mol·L⁻¹的NaOH 20 μ L,溶解管底蛋白沉淀12 h以上,BCA法测定蛋白含量。加入TG测定试剂,37℃孵育30 min。读取吸光度(A)值,根据标准品计算TG含量,并用TG含量除以蛋白含量,计算出细胞内TG含量(单位:mg·g⁻¹)。

1.4 实时荧光定量RT-PCR法检测apoA5 mRNA水平 提取细胞总RNA,以总RNA 1.5 μ g为逆转录反应模板,进行逆转录总的反应体积为20 μ L。人apoa5引物正义:5'-CATCCAGC-CTCCTGCGACTC-3';反义:5'-TCCCTACTC-CCTCACCTTG-3'。GAPDH引物正义:5'-TAGTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3';反义:5'-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3'。反应体系总体积为25 μ L, Sterile water 16.3 μ L, 10 \times Taq buffer 2.5 μ L, apoa5引物1(10 μ mol·L⁻¹) 0.75 μ L, apoa5引物2(10 μ mol·L⁻¹) 0.75 μ L, MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 1.5 μ L, 4dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 2 μ L, cDNA 1 μ L, Taq酶(5 U) 0.2 μ L。条件:95℃、5 min, 95℃、30 s, 退火温度61℃、30 s, 72℃、延长20 s, 循环37次,

72℃延长10 min。以待测样品目的基因的拷贝数平均值除以该样品内参基因的拷贝数平均值,得到目的基因的相对含量。样品中模板的拷贝数,可由SDS 软件通过所得到的 Ct 值从标准曲线上计算得到。

1.5 Western blotting 法检测 apoA5 蛋白水平
收集经上述处理后的细胞,取 30 μg 蛋白质加样,经 12% PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上,取抗 apoA5 一抗稀释度为 1 : 2 000,二抗稀释度为 1 : 1 000,碱性磷酸酶法显色,曝光。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计分析, apoA5 mRNA 水平和 TG 含量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组细胞内 apoA5 mRNA 和蛋白表达水平及 TG 含量为正态分布资料,应用随机区组设计资料的方差分析及两两比较分析各组之间的差异。

2 结果

2.1 各组 HepG2 细胞内 apoA5 mRNA 和蛋白表达水平 与对照组比较,脂联素各组 HepG2 细胞内 apoA5 mRNA 和蛋白表达水平均明显增加 ($P < 0.05$);与低剂量脂联素组比较,中、高剂量脂联素组 HepG2 细胞中 apoA5 mRNA 和蛋白表达水平均明显增加 ($P < 0.05$);与中剂量脂联素组比较,高剂量组 HepG2 细胞内 apoA5 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但有增加趋势。见表 1 和图 1。

2.2 各组 HepG2 细胞内 TG 含量 与对照组比较,脂联素各组 HepG2 细胞内 TG 含量均明显降低 ($P < 0.05$);与低剂量脂联素组比较,中、高剂量脂联素组 HepG2 细胞内 TG 含量均明显降低 ($P < 0.05$);但高剂量组与中剂量组 TG 含量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但有降低趋势。见表 1。

表 1 各组 HepG2 细胞中 apoA5 mRNA 表达及 TG 含量比较
Tab.1 Comparisons of apoA5 mRNA expressions and TG contents in HepG2 cells between various groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	apoA5 mRNA	TG(mg · g ⁻¹)
Control	1.10 ± 0.18	423 ± 57
Adiponectin		
Low dose	1.51 ± 0.32*	339 ± 42*
Middle dose	2.58 ± 0.41* [△]	235 ± 31* [△]
High dose	3.15 ± 0.67* [△]	228 ± 29* [△]

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs low dose adiponectin group.

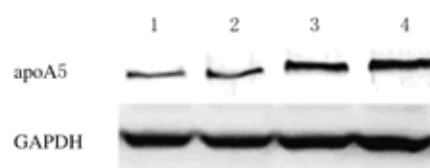


图 1 各组 HepG2 细胞中 apoA5 蛋白表达比较

Fig. 1 Comparisons of apoA5 protein expressions in HepG2 cells between various groups

Lane 1: Control group; Lane 2: Low dose adiponectin group; Lane 3: Middle dose adiponectin group; Lane 4: High dose adiponectin group.

3 讨论

研究^[5]认为: HTG 与 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的发生发展有密切联系,其机制可能为: ① HTG 血症引起 IR, 影响胰岛 β 细胞分泌功能; ② HTG 血症时游离脂肪酸 (FFA) 含量增高, FFA 在 β 细胞内氧化代谢增强, 抑制葡萄糖的氧化代谢, 从而引起葡萄糖刺激胰岛素分泌障碍, 从而导致 T2DM 发生。2012 年, 欧洲心脏病学会 (ESC) 和欧洲动脉粥样硬化学会 (EAS) 联合发布的血脂异常管理指南明确指出: 富含 HTG 的脂蛋白是心血管疾病的高危因素^[6]。因此, HTG 在脂毒性危害中占据非常重要的地位, 对 TG 代谢研究势必成为学术研究热点。

脂联素是由脂肪细胞分泌的一种激素蛋白, 已有资料显示脂联素在血脂代谢中发挥重要作用。人脂联素由 244 个氨基酸组成, ELISA 法测定正常人血浆脂联素浓度为 5 ~ 30 mg · L⁻¹^[7]。目前, 流行病学资料和临床研究^[8]显示: 脂联素与 IR、TG 呈负相关关系, 与高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C) 呈正相关关系。最近研究^[9-10]表明: 脂联素主要通过改变关键酶(脂蛋白酯酶、肝酯酶)的浓度及活性调节富含 TG 的脂蛋白的代谢。有研究^[11]发现: 血清脂联素水平与 TG 代谢密切相关, 并且发现 T2DM 并发 HTG 患者血清脂联素水平较单纯 T2DM 患者明显降低。apoA5 特异表达于肝脏, 肝脏 apoA5 表达降低可能是发生 HTG 的关键因子之一^[12-13]。脂联素和 apoA5 均与 TG 代谢密切相关^[14], 但是关于脂联素在肝脏调节 TG 是否 apoA5 表达有关, 目前国内外未见相关研究报告。本研究结果显示: 脂联素能升高 HepG2 细胞内 apoA5 mRNA 和蛋白表达及降低 TG 含量, 并呈剂量依赖关系, 当脂联素浓度达到 25 mg · L⁻¹, 其升高 apoA5 表达及降低 TG 作用

达到最大,与50 mg·L⁻¹脂联素比较差异均无统计学意义,说明脂联素浓度处于生理浓度高限时可以明显降低TG水平,这一作用可能与其能明显升高apoA5 mRNA和蛋白表达水平有关。

综上所述,脂联素能降低HepG2细胞内TG含量,两者之间具有剂量依赖关系,即随着脂联素浓度逐渐增加,apoA5 mRNA和蛋白表达水平逐渐增加,TG水平逐渐降低。本课题组前期人体实验^[15]结果显示:血浆脂联素水平与apoA5呈正相关关系,与TG呈负相关关系,故本文作者认为脂联素降低肝脏TG可能是通过增加apoA5表达而实现,但其具体机制有待进一步研究探索。

[参考文献]

- [1] Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, et al. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2003, 52(10): 2461-2474.
- [2] Cook JR, Semple RK. Hypoadiponectinemia cause or consequence of human "insulin resistance" [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(4): 1544-1554.
- [3] Lin J, Fang DZ, Du J, et al. Elevated levels of triglyceride and triglyceride-rich lipoprotein triglyceride induced by a high-carbohydrate diet is associated with polymorphisms of APOA5-1131T>C and APOC3-482C>T in Chinese healthy young adults [J]. *Ann Nutr Metab*, 2011, 58(2): 150-157.
- [4] Evans D, Aberle J, Beil FU. Resequencing the apolipoprotein A5 (APOA5) gene in patients with various forms of hypertriglyceridemia [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(2): 715-720.
- [5] Anger GJ, Piquette-Miller M. Impact of hyperlipidemia on plasma protein binding and hepatic drug transporter and metabolic enzyme regulation in a rat model of gestational diabetes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334(1): 21-32.
- [6] 赵水平. 甘油三酯在动脉粥样硬化性疾病中的地位及治疗措施[N]. 社区用药指导·循环, 第11版, 2011年9月23日.
- [7] Vu V, Liu Y, Sen S, et al. Delivery of adiponectin gene to skeletal muscle using ultrasound targeted microbubbles improves insulin sensitivity and whole body glucose homeostasis [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012 Nov 6. [Epub ahead of print]
- [8] Nishida M, Funahashi T, Shimomura I. Pathophysiological significance of adiponectin [J]. *Med Mol Morphol*, 2007, 40(2): 55-67.
- [9] Gardener H, Crisby M, Sjöberg C, et al. Serum adiponectin in relation to race-ethnicity and vascular risk factors in the Northern Manhattan Study [J]. *Metab Syndr Relat Disord*, 2012 Nov 5. [Epub ahead of print]
- [10] Liu Q, Yuan B, Lo KA, et al. Adiponectin regulates expression of hepatic genes critical for glucose and lipid metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(36): 14568-14573.
- [11] 吴文君, 卜瑞芳, 刘国萍, 等. 2型糖尿病合并高甘油三酯血症患者血清脂联素水平与脂联素基因多态性分析 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2008, 16(7): 402-404.
- [12] Sa'nchez-Moreno C, Ordoval' TM, Smith CE, et al. APOA5 gene variation interacts with dietary fat intake to modulate obesity and circulating triglycerides in a mediterranean population [J]. *J Nutr*, 2011, 141(3): 380-385.
- [13] Zheng XY, Zhao SP, Yu BL, et al. Apolipoprotein A5 internalized by human adipocytes modulates cellular triglyceride content [J]. *tBiol Chem*, 2012, 393(3): 161-167.
- [14] Hadarits F, Kisfali P, Mohás M, et al. Common functional variants of APOA5 and GCKR accumulate gradually in association with triglyceride increase in metabolic syndrome patients [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(2): 1949-1955.
- [15] 阳 琰, 邓华聪, 龙 健, 等. 空腹血糖受损与糖耐量减低者血浆载脂蛋白 A5、胰岛素抵抗及胰岛β细胞功能的比较 [J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(7): 725-728.

* 现工作于遵义医学院附属医院内分泌科