

HepG2 细胞胰岛素抵抗模型中脂代谢的改变

周楠¹, 蒋维维², 刘娟¹, 戴焱焱¹, 杨帆¹, 李晓南^{1,3*}

(¹南京医科大学附属南京儿童医院儿童保健科,²新生儿外科,江苏 南京 210008;³南京医科大学儿科研究所,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)对肝细胞脂代谢酶的影响。方法:用不同浓度胰岛素刺激 HepG2 细胞,建立肝细胞 IR 模型;用油红 O 染色观察细胞形态及胞内脂滴形成;应用甘油三酯(triglyceride, TG)检测试剂盒检测细胞中 TG 含量;Real-time PCR 检测乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)、肝型脂肪酸结合蛋白(liver-type fatty acid-binding protein, L-FABP)、脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)、肉碱棕榈酰转移酶(carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1)、微粒体甘油三酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)等脂代谢相关因子及转录因子胆固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c)、过氧化物酶体增生生物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α)的 mRNA 表达水平。结果:用浓度 1×10^{-4} mol/L 的胰岛素刺激细胞 36 h 后形成 IR。IR 细胞内脂滴增多, TG 含量增加;IR 细胞内脂合成相关的 ACC、SREBP-1c 的 mRNA 水平较对照组升高;LPL、CPT1、MTP、PPAR α 的 mRNA 水平较对照组降低;L-FABP mRNA 水平与对照组相比无差异。结论:IR 通过提高肝细胞脂合成、降低脂氧化过程,导致肝细胞内脂质异常堆积。

[关键词] HepG2 细胞;胰岛素抵抗;肝脏脂代谢;非酒精性脂肪肝

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)06-705-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160612

Changes of lipid metabolism in HepG2 cells model of insulin resistance

Zhou Nan¹, Jiang Weiwei², Liu Juan¹, Dai Yanyan¹, Yang Fan¹, Li Xiaonan^{1,3*}

(¹Departments of Children Health Care, ²Neonatal Surgery, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008; ³Institute of Pediatric Research, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of insulin resistance on hepatic lipid metabolism. **Methods:** We used RPMI 1640 with different insulin concentrations to stimulate HepG2 cells, and cells were divided into the insulin resistance (IR) group and the control group. Oil red O staining was performed to observe the cell morphology and intracellular lipid droplets. Triglyceride was detected with the triglyceride assay kit. The expression of acetyl-CoA carboxylase (ACC), liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP), lipoprotein lipase (LPL), carnitine palmitoyltransferase1 (CPT1), microsomal triglyceride transfer protein (MTP) and transcription regulatory factors sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), and peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) were detected by real-time PCR. **Results:** HepG2 cell model of insulin resistance was induced after 1×10^{-4} mol/L insulin stimulated cells for 36 h. The intracellular lipid droplets and triglyceride content were increased in the IR group than in the control group. The mRNA expressions of ACC and SREBP-1c in the IR group were higher than in the control group, and L-FABP had no significant difference compared with the control group. The mRNA expressions of LPL, CPT1, MTP and PPAR α in the IR group were lower than those in the control group. **Conclusion:** Insulin resistance could induce abnormal lipid accumulation in HepG2 cells via increasing lipid synthesis and reducing lipid oxidation process.

[Key words] HepG2 cells; insulin resistance; hepatic lipid metabolism; non-alcoholic fatty liver disease

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(06): 705-709]

[基金项目] 国家自然科学基金(81273064)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xnli@njmu.edu.cn

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是代谢综合征表现之一,主要特征为弥漫性肝细胞大泡性脂肪变。脂代谢紊乱被认为是 NAFLD 发生发展的中心环节^[1]。肝脏脂代谢包括脂肪酸的摄入、合成、氧化和输出,当脂肪酸的摄入合成超过氧化输出时,过多的甘油三酯(triglyceride, TG)在肝脏中沉积,促使 NAFLD 的发生^[2]。而肝脏脂代谢涉及乙酰辅酶 a 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)、肝型脂肪酸结合蛋白(liver-type fatty acid-binding protein, L-FABP)、脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)、肉碱棕榈酰转移酶(carnitine palmitoyltransferase1, CPT1)、微粒体甘油三酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)及转录因子胆固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c)、过氧化物酶体增生物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α)等酶和核受体的调控,是维持肝脏脂代谢的关键环节。大量动物试验和临床研究表明,胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)可作为原发病因参与 NAFLD 的发生发展。但 IR 形成前期及持续状态下肝脏脂代谢相关基因表达谱会发生如何改变,是否与肥胖造成的脂代谢紊乱相一致尚不清楚。本研究通过 HepG2 细胞 IR 模型,探讨 IR 通过调节肝细胞脂代谢酶的基因表达参与 NAFLD 发生发展的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI1640 培养基、胰酶(南京维森特生物技术有限公司),胎牛血清(Gibco 公司,美国),胰岛素、油红 O、苏木素(Sigma 公司,美国);甘油三酯检测试剂盒(北京普利莱公司),BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo 公司,美国),DEPC(杭州碧云天生物技术有限公司),TRIzol(Invitrogen 公司,美国),反转录试剂盒(上海罗氏制药有限公司),SYBR Green PCR 混合液(Life 公司,美国),PCR 引物(上海基远生物技术有限公司),葡萄糖检测试剂盒(四川迈克生物技术股份有限公司);自动生化分析仪(DiaSys 公司,德国),DG 5032 型酶联免疫检测仪(南京华东电子设备有限公司);人肝癌细胞株 HepG2 细胞(中国科学院上海生科院细胞库)。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞培养、模型建立及鉴定

用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养

HepG2 细胞,在 37°C、5%CO₂ 的饱和湿度条件下培养,每 2~3 d 用 0.25%的胰蛋白酶消化细胞,按 1:3 进行传代,取对数生长期细胞用于实验。将细胞消化后,培养基调整细胞密度为 1×10⁵ 个/mL,转入 12 孔细胞培养板中继续培养,每块板均分为对照组及胰岛素刺激组。待细胞培养 12 h 后,对照组加入 RPMI 1640 培养基,胰岛素刺激组分别加入新配制的含 1×10⁻⁵、5×10⁻⁵、1×10⁻⁴ mol/L 胰岛素的 RPMI1640,于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24、36、48 h 后,取出培养基上清液,应用多功能自动生化仪葡萄糖测定试剂盒(葡萄糖-己糖激酶法)检测上清葡萄糖含量,计算葡萄糖消耗量。葡萄糖消耗量=对照组葡萄糖含量-抵抗组葡萄糖含量。选择葡萄糖消耗量最小的胰岛素作用浓度作为胰岛素最佳作用浓度^[3]。

1.2.2 油红 O 染色

油红 O 工作液配制:油红 O 溶于异丙醇配成 0.5%油红 O 贮备液,以 6:4 的比例将贮备液与蒸馏水混匀后过滤 2 次,至液体澄清为止,得到油红 O 工作液。按上述方法复制 IR 模型,培养结束后吸尽孔中培养基,用 PBS 清洗 2 遍,4%多聚甲醛固定 10 min,每孔加 500 μ L 油红 O 工作液,于室温下染色 15 min,洗净背景,在显微镜下观察细胞形态及脂滴形成。

1.2.3 细胞内 TG 含量检测

将细胞用胰酶消化后,加入裂解液进行裂解。离心后,取部分上层清液用试剂盒检测 TG 含量;剩余部分上清液可用 BCA 法蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。最后以每克蛋白浓度校正 TG 含量。

1.2.4 检测细胞脂代谢相关基因的表达水平

细胞转入 12 孔板后按照上述方法复制 IR 模型。模型建立后,每孔加入 TRIzol 0.5 mL,提取细胞总 RNA,进一步逆转录成 cDNA,建立 PCR 反应体系,上机扩增,得出实验数据分析,相关引物序列见表 1。

1.3 统计学方法

应用 SPSS20.0 统计软件进行分析,采用单因素方差分析,结果用均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰岛素对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的时间和剂量效应

不同浓度胰岛素作用下,随着时间的延长,培养上清葡萄糖含量呈现下降趋势;作用 24 h 后,上

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primers of RT-PCR

产物名称	正义链(5'→3')	反义链(5'→3')
ACC	CACGCTCAAGTCACCAAGAA	GCAAATGGGAGGCAATAAGA
SREBP-1c	TTCCCAGCCCCTCAGATAC	GAGAAGCACCAAGGAGACGA
L-FABP	TTCAAGTTCACCATCACC GC	TTATGTCGCCGTTGAGTTCG
LPL	TTCTCGTTGGCAGGGTTPGAT	CTGACACTGTTTTCACGCCA
CPT1	CAACTCAGATTCAGGCAGCA	CGATGTGCTTGCTGTCTCTC
MTP	CTGCTCAGACCTCAGACTCA	TCTCTGATGTCAGTCTACCA
PPAR α	CCAGCATCCTCTCTCCA ACT	AGGAAAACGAAGACCCAAAGAT
GAPDH	GTCGGAGTCAACGGATTTGG	CATGGGTGGAATCATATTGGA

清葡萄糖含量与对照组相比下降, 降糖作用明显。用 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} mol/L 的胰岛素作用于细胞 36 h 后, 上清葡萄糖含量明显低于对照组; 但 1×10^{-4} mol/L 胰岛素刺激组上清葡萄糖含量与对照组无差异;

1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用 48 h 后, 上清葡萄糖含量明显高于对照组, 说明细胞的 IR 状态持续存在, 因此选取 1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用 48 h 后的细胞作为 IR 细胞(表 2)。

表 2 不同浓度胰岛素作用细胞 24、36、48 h 后上清葡萄糖含量比较

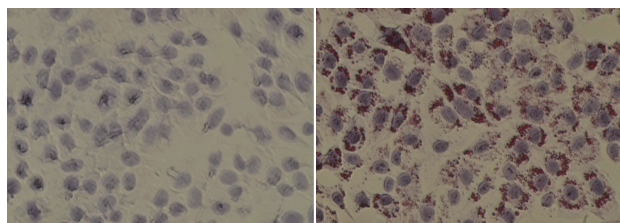
Table 2 Comparisons of glucose levels in supernatant after different concentrations of insulin stimulation for 24, 36, 48 h (mmol/L, $\bar{x} \pm s, n=6$)

作用时间	对照组	胰岛素刺激组		
		1×10^{-5} mol/L	5×10^{-5} mol/L	1×10^{-4} mol/L
24 h	8.12 ± 0.10	$7.53 \pm 0.76^*$	$6.13 \pm 0.71^*$	$7.08 \pm 0.05^*$
36 h	5.35 ± 0.07	$4.32 \pm 0.58^*$	$3.91 \pm 0.77^*$	5.11 ± 0.59
48 h	2.44 ± 0.46	$2.28 \pm 0.11^*$	$2.26 \pm 0.12^*$	$3.57 \pm 0.57^*$

与对照组比较, $*P < 0.05, n=6$ 。

2.2 IR 形成后 HepG2 细胞的形态学变化

用 1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用 HepG2 细胞 48 h 后, IR 细胞体积增大、细胞中红色脂滴明显高于对照组(图 1)。



正常细胞

IR 细胞

图 1 正常细胞与 IR 细胞形态学比较(油红 O 染色, $\times 400$)
Figure 1 Morphological comparison between normal and IR cells (Oil red staining, $\times 400$)

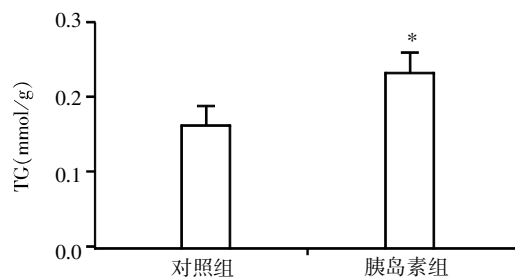
2.3 IR 形成后细胞 TG 含量的变化

用 1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用 HepG2 细胞 48 h 后, IR 细胞内 TG 含量明显高于对照组($P < 0.05$, 图 2)。

2.4 不同刺激时间对肝细胞脂肪酸合成和摄取相关基因 mRNA 表达的影响

1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用于 HepG2 细胞 24 h 时, 与对照组比较 ACC mRNA 水平降低, 但 36 h 后升高并持续至 48 h(图 3A); SREBP-1c mRNA 水平胰岛素在作用 24 h 无明显变化, 36 h 升高, 并持续

至 48 h(图 3B); 在胰岛素作用 24 h L-FABP mRNA 水平比对照组降低, 36 h 至 48 h 与对照组比较差异均无统计学意义(图 3C)。



与对照组比较, $*P < 0.05, n=6$ 。

图 2 1×10^{-4} mol/L 胰岛素刺激下 HepG2 细胞中 TG 含量变化

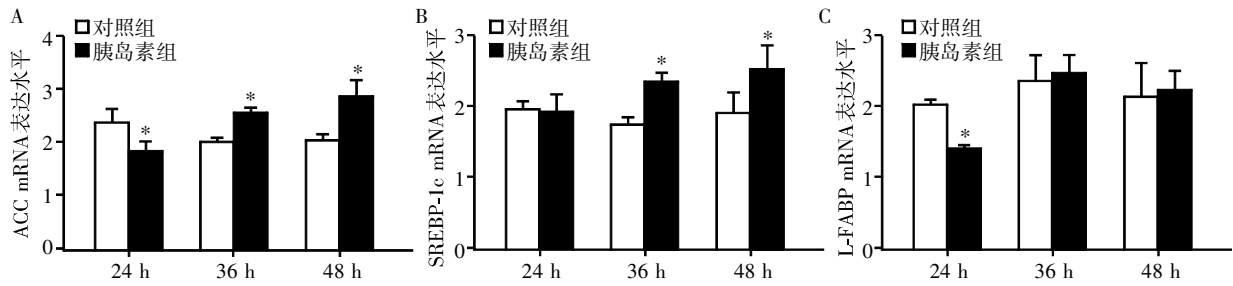
Figure 2 TG content of HepG2 cells with 1×10^{-4} mol/L insulin stimulation

2.5 不同刺激时间对肝细胞中 TG 水解酶、脂肪酸氧化输出相关基因 mRNA 表达的影响

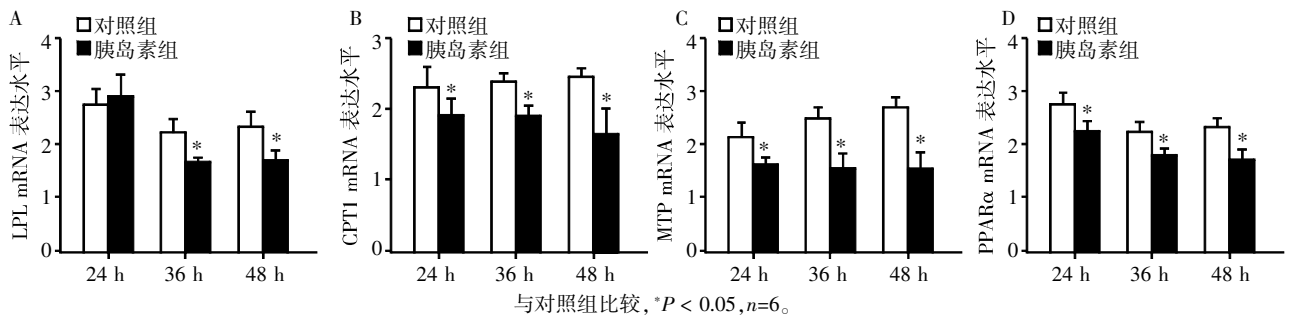
1×10^{-4} mol/L 胰岛素作用 HepG2 细胞 24 h 后, 与对照组比较, LPL mRNA 水平无明显变化, 36 h 后降低, 并持续至 48 h; CPT1、MTP、PPAR α mRNA 水平在 24 h 即明显下降, 并持续至 48 h(图 4)。

3 讨论

IR 是许多内分泌代谢失调相关疾病的共同病



与对照组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。
图 3 1×10^{-4} mol/L 胰岛素刺激不同时间 HepG2 细胞中 ACC(A)、SREBP-1c(B)、L-FABP(C) mRNA 水平的变化
Figure 3 Expressions of ACC(A), SREBP-1c(B), L-FABP(C) in HepG2 cells with insulin stimulation at different times



与对照组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。
图 4 1×10^{-4} mol/L 胰岛素刺激不同时间 HepG2 细胞中 LPL(A)、CPT1(B)、MTP(C)、PPARα(D) mRNA 水平的变化
Figure 4 Expressions of LPL(A), CPT1(B), MTP(C), PPARα(D) in HepG2 cells with insulin stimulation at different times

理生理基础。本研究通过体外构建肝细胞 IR 模型发现,IR 形成初期细胞内脂滴数目迅速增加,脂质氧化输出减弱;当 IR 持续存在,胞内脂滴进一步增多,肝细胞脂质合成增强,脂质氧化持续减弱,最终形成“脂肪肝”。大量动物实验和临床研究均证明,NAFLD 伴随 IR^[4-7],而伴有 IR 的孕母其子代同样会引发 NAFLD^[8];这些均提示 IR 可能是 NAFLD 的原发因素之一^[9]。

胰岛素是体内重要的合成激素,主要通过与其靶细胞膜表面的特异受体结合启动细胞代谢。当机体发生 IR,糖脂代谢紊乱导致内脏脂肪过度分解,随之释放大量游离脂肪酸流入肝细胞,造成肝脏的脂肪异位沉积^[10]。而肝脏是胰岛素的主要效应器官,参与肝脏脂代谢的酶和核受体均受胰岛素直接或间接调控。在 IR 引起的脂肪肝中,初次打击主要是 IR 导致肝细胞脂质堆积,而脂肪变性的肝细胞活力不足,并为脂质过氧化提供反应基质;二次打击主要为活性氧导致脂质过氧化损伤及其相关事件,引起脂肪性肝炎。IR 在肝细胞脂代谢异常发病机制中作用于多个环节,它可以直接控制肝细胞内许多与脂蛋白合成有关的酶促反应。其中 ACC 和 L-FABP 被证实与脂肪酸合成、摄入密切相关,而 SREBP-1c 参与其调控,它们均在 NAFLD 的发生发展中发挥着重要作用。动物实验发现 IR 时,ACC 及其核调控因子 SREBP-1c 的活性增强,与肝脏摄取葡萄糖降

低、摄入游离脂肪酸增多有关^[2,11-12]。本研究发现,IR 后肝细胞内 TG 含量增多,ACC mRNA 表达先降低后升高并持续至 48 h,提示在 IR 初期,细胞内 ACC 反馈性降低,随着 IR 进一步增强,ACC 表达逐步增加。SREBP-1c 表达水平与 ACC 表达变化相似。表明在 IR 下主要通过 SREBP-1c 途径调节 ACC 的表达,参与肝脏脂代谢。而 L-FABP mRNA 表达在 24 h 仅呈现一过性降低,说明 IR 对其调控表达无明显影响。另一方面,CPT1 和 MTP 分别是调控脂肪酸 β 氧化和 TG 输出的关键酶,受 PPARα 的正向调节。其他研究已发现,给予 CPT1 基因敲除的小鼠高脂膳食后会发生严重的 IR^[13];在 NAFLD 患者肝脏中,MTP 表达明显下降^[14];PPARα 激动剂 MHY908 添加至大鼠饮食中,可以有效改善 IR 及 2 型糖尿病^[15]。与之结果类似,本研究中在 IR 形成前,CPT1、MTP 及 PPARα mRNA 表达即降低,IR 形成后继续下降,并持续至 48 h,提示 CPT1、MTP 及 PPARα 对胰岛素的敏感性较 ACC、SREBP-1c、L-FABP 更强。除此之外,LPL 是胰岛素敏感酶,主要负责将 TG 脂蛋白中的 TG 水解成游离脂肪酸,胰岛素可以刺激 LPL 合成增加。临床调查发现伴有高 TG 血症的 2 型糖尿病和非糖尿病人群中,IR 导致 LPL 活性下降,VLDL 降解减慢,是导致 TG 升高的原因之一^[16]。本研究中,LPL 表达早期并无明显变化,IR 形成后表达下降,水解 TG 能力减弱,进一步解释了肝脏细胞中

TG 的异常堆积。综上所述,在 IR 形成初期,即明显减弱脂氧化酶活性,后期又伴有脂合成酶的异常表达,这些改变之间形成恶性循环,是促进脂肪肝难以逆转的重要原因。

此外,肥胖也是导致 NAFLD 的重要因素之一。研究发现,肥胖早期 ACC、SREBP-1c 明显升高,并持续至 NAFLD 形成;而 LPL、CPT1、MTP、PPAR α 的表达水平在早期并未发生明显变化,后期开始下降,考虑 IR 形成^[17]。因此,肥胖相关的 NAFLD,早期主要是通过促进脂质合成途径发挥作用;而 IR 早期通过减少脂质氧化,后期进一步促进脂质合成,使肝细胞内脂质异常堆积,引发疾病。虽然造成 NAFLD 的机制有差异,但两者最终均通过促进肝脏脂肪酸摄取合成、抑制氧化输出的叠加作用,才促使 NAFLD 的发生。

本研究通过体外建立 IR 模型,发现在 IR 下肝细胞脂肪酸合成摄入增加、氧化输出下降,导致胞内脂质堆积异常增多。证明 IR 的确是肝细胞脂肪变性的原发因素之一,并通过异常调节肝细胞脂代谢进一步加速疾病进展,为临床 NAFLD 的预防和治疗提供科学依据。

[参考文献]

[1] Park KS, Lee YS, Park HW, et al. Factors associated or related to with pathological severity of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Korean J Intern Med*, 2004, 19(1): 19-26

[2] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48(1): 1-26

[3] Li L, Li G, Wei H, et al. The endoplasmic reticulum stress response is associated with insulin resistance-mediated drug resistance in HepG2 cells[J]. *Neoplasma*, 2015, 62(2): 180-190

[4] Kessoku T, Yoneda M, Sumida Y, et al. Insulin resistance correlated with the severity of liver histology in Japanese NAFLD patients: a multicenter retrospective study[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2015, 49(2): 169-170

[5] Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(39): 16381-16385

[6] Jegatheesan P, Beutheu S, Ventura G, et al. Citrulline and nonessential amino acids prevent fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats [J]. *J Nutr*, 2015, 145(10): 2273-2279

[7] Luukkonen PK, Zhou Y, Sädevirta S, et al. Hepatic ce-

ramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J/OL]. *J Hepatol*, 2016 [2016-03-10]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827816000052> DOI:10.1016/j.jhep.2016.01.002

[8] Thorn SR, Baquero KC, Newsom SA, et al. Early life exposure to maternal insulin resistance has persistent effects on hepatic NAFLD in juvenile nonhuman primates [J]. *Diabetes*, 2014, 63(8): 2702-2713

[9] Bugianesi E, Zannoni C, Vanni E, et al. Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship? [J]. *Dig Liver Dis*, 2004, 36(3): 165-173

[10] Camporez JP, Kanda S, Petersen MC, et al. ApoA5 knock-down improves whole-body insulin sensitivity in high-fat-fed mice by reducing ectopic lipid content [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(3): 526-536

[11] 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 Health Dis*, 2013, 12: 109

[12] Zhang T, Zhao S, Li W, et al. High-fat diet from perilla oil induces insulin resistance despite lower serum lipids and increases hepatic fatty acid oxidation in rats [J]. *Lipids Health Dis*, 2014, 13: 15

[13] Kim T, Moore JF, Sharer JD, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1b deficient mice develop severe insulin resistance after prolonged high fat Diet feeding [J/OL]. *J Diabetes Metab*, 2014 [2016-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286342/>. DOI:10.4172/2155-6156.1000401

[14] Higuchi N, Kato M, Tanaka M, et al. Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Exp Ther Med*, 2011, 2(6): 1077-1081

[15] Park MH, Kim DH, Kim MJ, et al. Effects of MHY908, a new synthetic PPAR α/γ dual agonist, on inflammatory responses and insulin resistance in aged rats [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2016, 71(3): 300-309

[16] Miyashita Y, Shirai K, Itoh Y, et al. Low lipoprotein lipase mass in preheparin serum of type 2 diabetes mellitus patients and its recovery with insulin therapy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002, 56(3): 181-187

[17] Ji C, Dai Y, Jiang W, et al. Postnatal overfeeding promotes early onset and exaggeration of high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease through disordered hepatic lipid metabolism in rats [J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(11): 1108-1116