

· 基础研究 ·

肝再生增强因子调控线粒体功能稳态在棕榈酸诱导肝细胞脂毒性细胞模型中的作用

周 光,施晓雷*

南京医科大学鼓楼临床医学院(南京鼓楼医院)普外科,江苏 南京 210008

[摘要] **目的:**研究肝细胞脂毒性细胞模型中线粒体内肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)与线粒体功能障碍之间的关系。**方法:**以无脂肪酸的10%牛血清蛋白(bull serum albumin, BSA)处理L-O2细胞为对照(BSA组),0.2 mmol/L棕榈酸(palmitic acid, PA)处理L-O2细胞为脂毒性细胞模型(PA组),并在构建ALR过表达(ALR-OE组)及对照(Vector组)细胞后,分别接受BSA和PA处理,CCK-8法检测细胞活力、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)检测试剂盒检测脂毒性、JC-1染色分析线粒体膜电位、流式凋亡检测分析细胞凋亡,Western bolt检测ALR、Bax、Bcl-2、细胞色素C等蛋白表达水平。**结果:**与BSA组相比,PA组细胞内脂滴增多、细胞活力下降50%、LDH释放增加13倍,线粒体内ALR表达则明显降低。BSA处理下Vector组和ALR-OE组无明显差异,而PA刺激后ALR-OE组相较于Vector组,细胞活力增加约16%,LDH释放减少约40%,线粒体膜电位增加约18%,细胞色素C释放减少,细胞凋亡减少。**结论:**ALR参与肝细胞脂毒性的发生,靶向调控ALR可在一定程度上抑制脂毒性的发生。

[关键词] 线粒体;肝细胞脂毒性细胞模型;肝再生增强因子

[中图分类号] R575.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)10-1421-05

doi:10.7655/NYDXBNS20191003

Role of augmenter of liver regeneration in cell model of palmitic acid induced hepatocyte lipotoxicity by mediating regulation of mitochondrial homeostasis

Zhou Guang, Shi Xiaolei*

Department of General Surgery, Affiliated Drum Tower Clinical Medical College of Nanjing Medical University (Nanjing Drum Tower Hospital), Nanjing 210008, China

[Abstract] **Objective:** To study the relationship between mitochondrial augmenter of liver regeneration (ALR) and mitochondrial dysfunction in cell model of hepatocyte lipotoxicity. **Methods:** The 10% fatty acid-free bull serum albumin treated L-O2 cells were used as the control group (BSA group), and L-O2 cells treated with 0.2 mmol/L palmitic acid (PA) as a cell model of hepatocyte lipotoxicity (PA group). Meanwhile, the ALR overexpression group (ALR-OE group) and the empty vector transfected control cell group (Vector group) were constructed and treated with BSA or PA, respectively. cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) release, mitochondrial membrane potential changes, apoptosis and related protein expression levels were detected subsequently. **Results:** Compared with the BSA group, the intracellular lipid droplet increased, the cell viability decreased by about 50%, and the LDH release increased by 13 times, the expression of ALR in the mitochondria was significantly decreased in the PA group. There were no significant differences between the Vector group and the ALR-OE group under BSA treatment conditions. However, the cell viability increased by about 16%, LDH release is reduced by about 40%, mitochondrial membrane potential is increased by about 18%, cytochrome C release is reduced, and apoptosis decreases in the ALR-OE group compared with the Vector group under PA stimulation. **Conclusion:** ALR is involved in the onset of hepatocellular lipotoxicity, and targeting the regulation of mitochondrial ALR can inhibit the onset of lipotoxicity to a certain extent.

[Key words] mitochondria; cell model of hepatocyte lipotoxicity; augmenter of liver regeneration

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(10): 1421-1425]

[基金项目] 国家自然科学基金(81872359, 81670566);中央高校基本科研业务费专项资金(021414380449)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: njsxl2000@163.com

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是目前最常见的慢性肝脏疾病之一^[1]。外源性脂肪在肝脏内代谢形成的脂毒性加速NAFLD的进展。除了增加有氧运动消耗脂肪外^[2],调控脂毒性已成为NAFLD治疗的热点^[3-4]。线粒体功能障碍加速了肝细胞脂毒性的进展^[5-6],维持线粒体功能稳态,抑制肝细胞脂毒性为治疗NAFLD提供了新思路。

肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)是肝脏内的细胞因子^[7-8],其主要存在于线粒体内^[9-10],在肝细胞脂毒性环境中,ALR与线粒体功能障碍是否存在联系目前尚未见报道。本文主要研究肝细胞脂毒性环境中,线粒体内ALR与线粒体功能障碍是否存在联系,以及靶向调控ALR是否可以抑制肝细胞脂毒性的发展。

1 材料和方法

1.1 材料

人正常肝细胞系L-O2购于上海中科院细胞库,RPMI1640培养基、胎牛血清(Gibco公司,美国)、棕榈酸(palmitic acid, PA, Sigma-Aldrich公司,美国)、无脂肪牛血清白蛋白(bull serum albumin, BSA)、线粒体膜电位(JC-1)检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司),Cell Counting Kit 8(CCK-8, MCE公司,美国),ALR质粒(苏州金维智公司),Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国),细胞线粒体分离试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),油红O染色试剂盒(南京建成生物工程研究所),GAPDH、Bax、Bcl-2、COX IV、细胞色素C抗体(Abcam公司,美国),ALR抗体(武汉三鹰Proteintech公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理

L-O2细胞常规培养于含10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)以及链霉素(100 μg/mL)的RPMI1640完全培养基,于37℃培养箱中培养,次日换液。

1.2.2 油红染色

于6孔板加入细胞 1×10^5 个/孔,24 h后分别以10% BSA、0.2 mmol/L PA处理,孵育24 h后弃上清,多聚甲醛固定细胞,PBS轻洗细胞1次,加入油红O工作液,室温条件下避光染色15 min。弃油红O工作液,PBS轻洗3次,苏木素染细胞核30 s,PBS轻洗若干次使其返蓝,光镜观察。

1.2.3 CCK-8法检测细胞活力

按照3 000个/孔密度将细胞种于96孔板中,每组设4个复孔。24 h后分别以BSA、PA处理24 h,弃

上清,每孔加入100 μL含有10% CCK-8的工作液,继续孵育1.5 h,测定450 nm处的吸光度,计算相应细胞活力。

1.2.4 乳酸脱氢酶检测

细胞以2 000个/孔的密度种于96孔中,分别以BSA及PA处理24 h,400 g离心细胞培养板5 min,各孔取上清液120 μL于新的96孔板中,避光条件下加入60 μL LDH检测工作液,混匀后室温避光孵育30 min,检测490 nm处的吸光度,根据公式[(PA处理组吸光度-空白对照孔吸光度)/(BSA处理组吸光度-空白对照孔吸光度)]计算细胞LDH相对释放量。

1.2.5 质粒转染

采用脂质体Lipofectamine 2000转染法进行ALR过表达实验,以 2×10^4 个/mL密度种6孔板,贴壁24 h后,以质粒:Lipofectamine 2000=1:2的体积比制备质粒转染体系:将500 μL无血清无抗生素的Opti-MEM培养基、2.5 μL ALR质粒、5 μL Lipofectamine 2000依次加入无菌的1.5 mL EP管中,充分混匀后静置20 min。加入相应孔中,继续培养48 h,最后提取细胞总蛋白验证质粒转染效果,作为过表达组(ALR-OE组),以加入空白对照质粒转染的细胞为Vector组。

1.2.6 线粒体抽提

Vector组及ALR-OE组细胞分别接受BSA及PA处理24 h,收集细胞并加入含PMSF的线粒体分离试剂冰浴15 min,于玻璃匀浆器中匀浆细胞悬液30次,转移至1.5 mL EP管中,4℃ 1 000 g离心10 min,留上清,4℃ 3 500 g离心10 min,离心结束后分离上清和沉淀,沉淀即为细胞线粒体,上清即为去除线粒体的胞浆成分,用于后续Western blot实验。

1.2.7 JC-1流式检测

Vector及ALR-OE组细胞分别接受BSA及PA处理24 h,收集细胞,PBS洗涤细胞1遍,常温1 200 g离心5 min,0.5 mL JC-1工作液重悬细胞,于培养箱孵育15 min,孵育结束后,室温1 200 g离心5 min,弃上清,1 mL缓冲液重悬细胞,重复上述离心步骤,弃上清,用0.5 mL缓冲液重悬细胞,最后BD Accuri C6流式仪行流式分析。

1.2.8 细胞凋亡检测

Vector及ALR-OE组细胞分别接受BSA及PA处理24 h后,收集细胞,PBS洗涤细胞1遍,室温1 200 g离心5 min,弃上清,用200 μL含2.5 μL FITC以及2.5 μL PI的缓冲液重悬细胞沉淀,室温避光孵育20 min,室温1 200 g离心5 min,弃上清,缓冲液

重悬沉淀, BD Accuri C6 流式仪检测细胞凋亡情况。

1.2.9 Western blot

细胞及线粒体成分中加入适量裂解液冰上裂解 30 min, 4 °C 12 000 g 离心 15 min, 取上清, BCA 法测定相应蛋白浓度。取 30 μg/泳道的蛋白样品于 SDS-PAGE 进行电泳, 将蛋白转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, 一抗 ALR、GAPDH、Bax、Bcl-2、COX IV、细胞色素 C 抗体, 4 °C 孵育过夜 (GAPDH 抗体以 1:10 000 稀释, 其余均以 1:1 000 稀释), 隔日 TBST 洗涤 3 次后孵二抗 2 h, TBST 洗涤 3 次, 加入化学显影液曝光, 所有实验重复 3 次, 并使用 Image J 软件对条带进行灰度值分析。

1.3 统计学方法

利用 Graphpad Prism 6.0 软件对数据进行统计分析, 数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用 *t* 检验, 多组比较时先采用单因素方差分析进行比较, 再采用 SNK 法进行两两比较。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PA 体外刺激抑制线粒体内 ALR 的表达

与 BSA 组相比, PA 刺激 L-O2 细胞 24 h 后细胞内脂滴明显增多 (图 1A), 细胞活力降低约 50%, LDH 的释放增加约 13 倍 (图 1B, C), 这表明 PA 刺激在诱导细胞脂肪变的同时也增加了细胞脂毒性。此外本实验分别提取 BSA 组和 PA 组线粒体蛋白, Western blot 显示 PA 刺激后线粒体内 ALR 表达明显降低

(图 1D)。

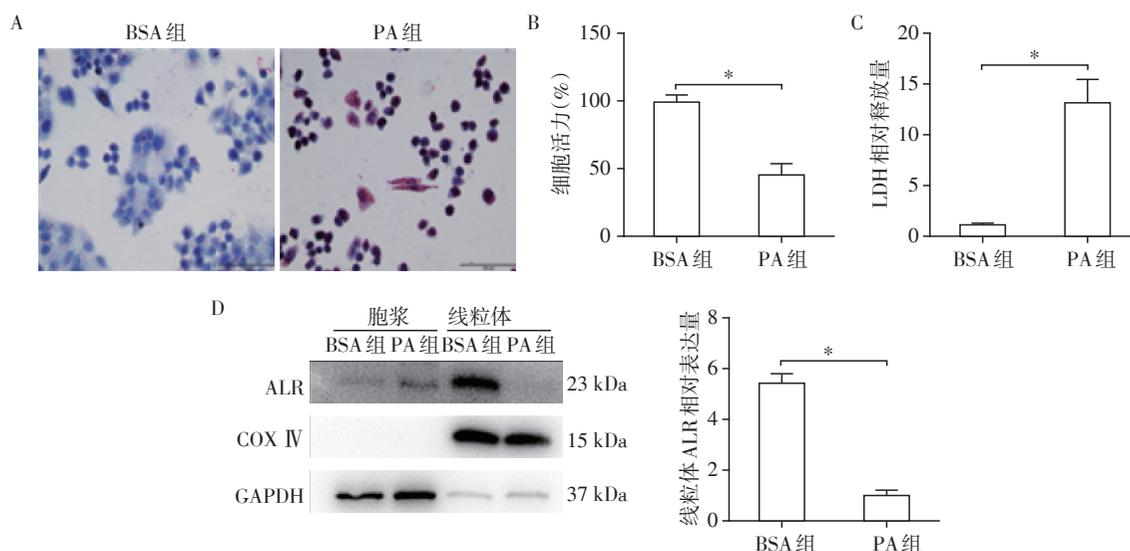
2.2 ALR 过表达减轻 PA 诱导的脂毒性、抑制线粒体功能障碍

为了研究线粒体内 ALR 是否参与 PA 诱导的肝细胞脂毒性的发生, 本研究采用质粒转染方式过表达 ALR (ALR-OE)。Western blot 结果表明相较于 Vector 组, ALR-OE 组细胞总蛋白内 ALR 表达明显增加 (图 2A), 同时其线粒体内 ALR 表达也明显增加 (图 2B), 表明 ALR 过表达达到预期效果。

BSA 处理对于 ALR-OE 组及 Vector 组的细胞活力、LDH 释放、线粒体功能等方面均无影响。与此相比, 在 PA 刺激下, Vector 组细胞活力下降 30%, LDH 释放增加约 12 倍 (图 3A、B), 反映正常线粒体膜电位 JC-1 二聚体的含量下降约 26%, 细胞色素 C 外泄则明显增加 (图 3C、D、E), 表明 PA 诱导 Vector 组细胞线粒体功能障碍。ALR-OE 组在 PA 处理后细胞活力相较于 Vector 组升高 16%、LDH 的释放也减少约 33% (图 3A、B), 线粒体膜电位升高 15%, 细胞色素 C 外泄明显减少 (图 3C、D、E)。表明 ALR 对 PA 诱导的脂毒性以及线粒体功能障碍均有明显抑制效果。

2.3 ALR 过表达抑制 PA 诱导的凋亡

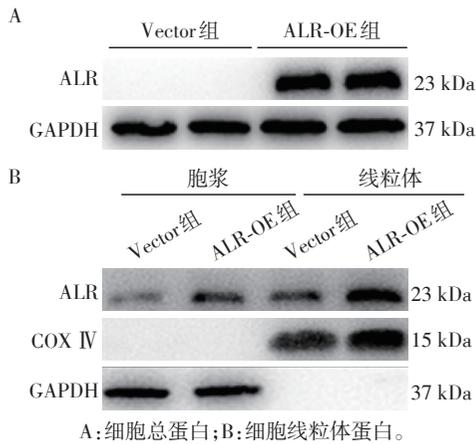
凋亡是肝细胞脂毒性重要特征之一, BSA 处理对 ALR-OE 组和 Vector 组的细胞凋亡无影响。PA 刺激后 Vector 组凋亡率增加 13.4% (图 4A), Western blot 结果表明 Bax 表达增加, Bcl-2 表达降低 (图 4B)。ALR 过表达明显减少 PA 诱导的细胞凋亡 (图



A: 油红 O 染色 (×400); B: 细胞活力; C: LDH 释放; D: 线粒体 ALR 表达及其量化结果, COX IV 为线粒体内参蛋白; 两组比较, *P < 0.01, n=3。

图 1 PA 体外诱导肝细胞脂毒性模型

Figure 1 PA induces cell model of hepatocyte lipotoxicity *in vitro*



A: 细胞总蛋白; B: 细胞线粒体蛋白。

图2 ALR 过表达效果验证

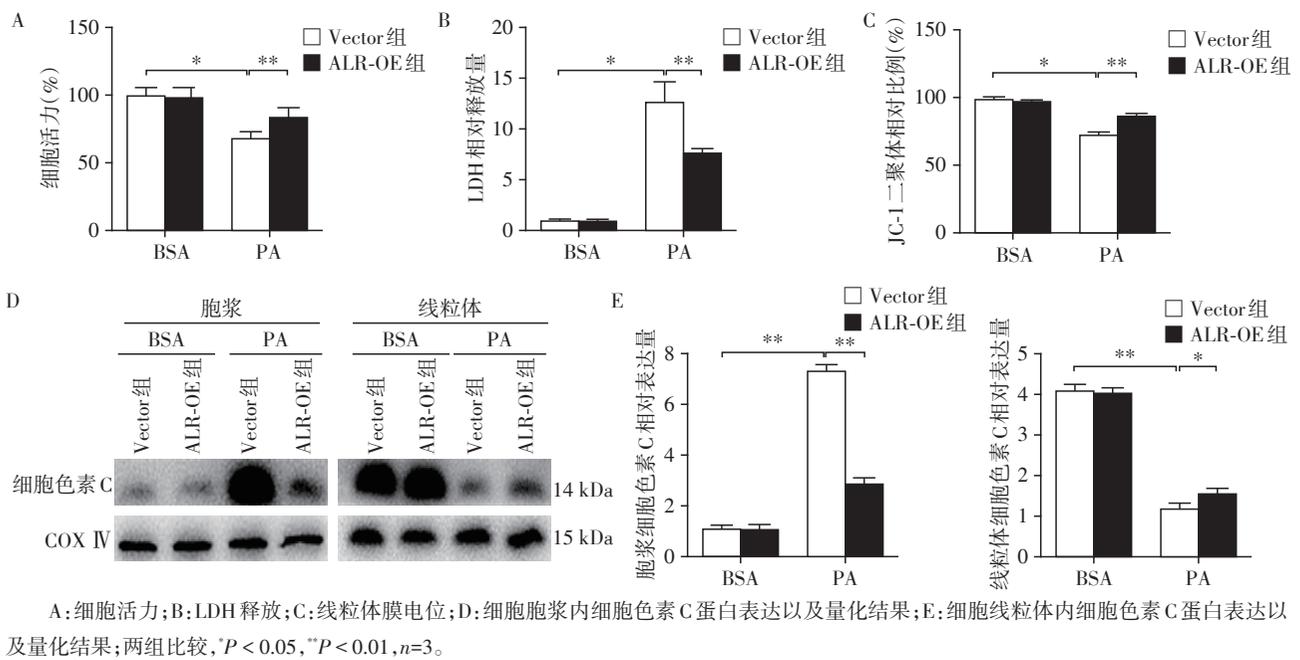
Figure 2 Validation of ALR over-expression

4A), 逆转上述凋亡蛋白的表达改变(图4B), 表明线粒体内ALR可以有效抵抗PA诱导的凋亡。

3 讨论

人体高脂饮食后, 体内过量的脂质无法完全代谢, 游离脂肪酸含量增加, 在非脂肪组织内累积达到毒性水平产生的有害影响称为脂毒性^[11]。在NAFLD初期, 肝脏内游离脂肪酸代谢引发脂毒性肝损伤, 加速NAFLD的进展^[12]。研究表明, 以PA为代表的长链饱和脂肪酸可增加细胞脂毒性^[13-14], 因此本研究采用0.2 mmol/L的PA刺激L-O2细胞24 h诱导肝细胞脂毒性的发生。

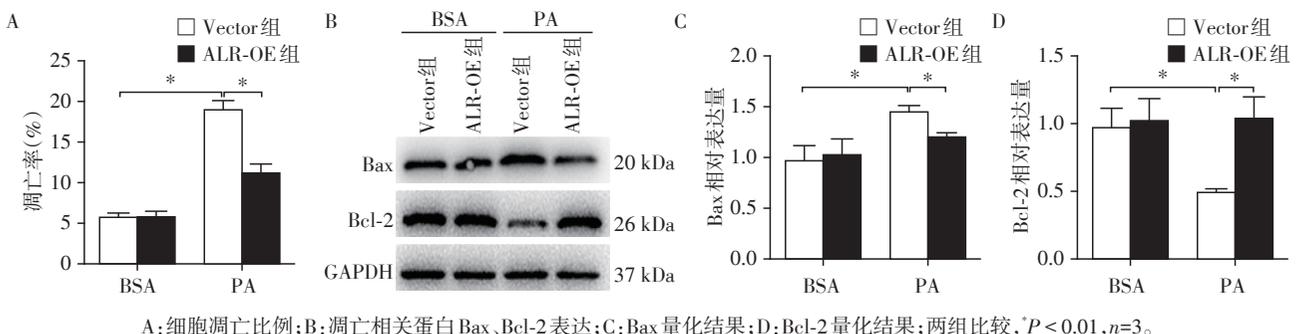
目前大量研究发现, 线粒体功能障碍与脂毒性关系密切。Park和Yang等^[5-6]研究均表明, 线粒体功能障碍导致的氧化应激增加是饱和脂肪酸产生脂毒性的重要因素之一。Zhang等^[12]研究发现, 肝细胞内线粒体自噬缺失导致的NLRP3炎症小体活



A: 细胞活力; B: LDH释放; C: 线粒体膜电位; D: 细胞胞浆内细胞色素C蛋白表达以及量化结果; E: 细胞线粒体内细胞色素C蛋白表达以及量化结果; 两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=3$ 。

图3 ALR抑制PA诱导的脂毒性以及线粒体功能障碍

Figure 3 ALR inhibits PA-induced lipotoxicity and mitochondrial dysfunction



A: 细胞凋亡比例; B: 凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2表达; C: Bax量化结果; D: Bcl-2量化结果; 两组比较, * $P < 0.01$, $n=3$ 。

图4 ALR抑制PA诱导的凋亡

Figure 4 ALR inhibits PA-induced apoptosis

化可加剧脂肪酸的脂毒性,加速NAFLD的进展。因此破坏线粒体功能稳态可以诱导脂毒性。本研究构建的肝细胞脂毒性细胞模型中,PA刺激也可诱导线粒体功能障碍,表现为线粒体膜电位显著降低,细胞色素C外泄增加,细胞凋亡增加。

ALR在肝细胞脂毒性发生中的作用目前未见明确报道。本研究发现,PA刺激L-O2细胞可诱导线粒体功能障碍,线粒体内ALR表达显著降低。已有研究证实,ALR与线粒体功能稳态存在密切联系,ALR通过促进线粒体生物合成,抑制Drp1介导的线粒体裂解等多种方式恢复受损的线粒体功能,维持细胞存活^[15-16],因此,在肝细胞脂毒性环境中,线粒体内低表达的ALR与线粒体功能障碍之间可能存在相关性。本实验通过质粒转染的方式构建线粒体ALR过表达的L-O2细胞,PA刺激后发现,ALR过表达可以显著恢复受损的线粒体膜电位,抑制细胞色素C外泄,抑制凋亡,这都表明线粒体内ALR与线粒体功能障碍密切相关,线粒体内过表达ALR可以在一定程度修复线粒体功能障碍,减轻肝细胞脂毒性的进展。

总之,本研究探讨了肝细胞脂毒性细胞模型中线粒体内ALR与线粒体功能障碍之间的关系,结果表明靶向调控线粒体内ALR可以维持线粒体功能稳态,在一定程度上抑制肝细胞脂毒性的进展,为NAFLD的治疗提供了新的潜在干预靶点和理论依据。

[参考文献]

[1] Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(1):11-20

[2] 付洋洋,孟美美,荣宁,等.有氧运动与抗阻运动对非酒精性脂肪肝患者影响效果研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(4):528-531

[3] Li M, Xu C, Shi J, et al. Fatty acids promote fatty liver disease via the dysregulation of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase/hydrogen sulfide pathway [J]. *Gut*, 2018, 67(12):2169-2180

[4] Li ST, Dou XB, Song ZY. SIRT3 acts as a negative regulator of autophagy dictating hepatocyte susceptibility to lipotoxicity[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1):764A

[5] Park JS, Lee DH, Lee YS, et al. Dual roles of ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1) in cytoprotection

against lipotoxicity[J]. *Autophagy*, 2019, 56(3):1-20

[6] Yang L, Wei J, Sheng F, et al. Attenuation of palmitic acid-induced lipotoxicity by chlorogenic acid through activation of SIRT1 in hepatocytes [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 55(4):314-316

[7] Labrecque DR, Bachur NR. Hepatic stimulator substance: physicochemical characteristics and specificity [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1982, 242(3):G281-G288

[8] Labrecque DR, Wilson M, Fogerty S. Stimulation of HTC hepatoma-cell growth-*in vitro* by hepatic stimulator substance (HSS)- interactions with serum, insulin, glucagon, epidermal growth-factor and platelet derived growth-factor [J]. *Exp Cell Res*, 1984, 150(2):419-429

[9] Weiss TS, Lupke M, Ibrahim S, et al. Attenuated lipotoxicity and apoptosis is linked to exogenous and endogenous augmenters of liver regeneration by different pathways [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9):184-186

[10] Zhang J, Li Y, Jiang SJ, et al. Enhanced endoplasmic reticulum SERCA activity by overexpression of hepatic stimulator substance gene prevents hepatic cells from ER stress-induced apoptosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 306(3):C279-C290

[11] Duncan JG. Lipotoxicity: what is the fate of fatty acids? [J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(7):1375-1376

[12] Zhang NP, Liu XJ, Xie L, et al. Impaired mitophagy triggers NLRP3 inflammasome activation during the progression from nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Lab Invest*, 2019, 99(6):749-763

[13] Wang XJ, Ribeiro MD, Iracheta-Vellve A, et al. Macrophage-specific hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to impaired autophagic flux in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2019, 69(2):545-563

[14] Win S, Tin AT, Le BH, et al. Sab (Sh3bp5) dependence of JNK mediated inhibition of mitochondrial respiration in palmitic acid induced hepatocyte lipotoxicity [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(6):1367-1374

[15] Huang LL, Long RT, Jiang GP, et al. Augmenter of liver regeneration promotes mitochondrial biogenesis in renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Apoptosis*, 2018, 23(11/12):695-706

[16] Zhang C, Huang J, An W. Hepatic stimulator substance resists hepatic ischemia/reperfusion injury by regulating Drp1 translocation and activation [J]. *Hepatology*, 2017, 66(6):1989-2001

[收稿日期] 2019-05-23