

利拉鲁肽对人 HepG2 肝细胞脂代谢的影响及作用机制

朱红霞¹,高 静¹,邓晓龙¹,朱 筠^{2*}

(¹新疆医科大学第五附属医院内分泌科,新疆 乌鲁木齐 830011;²新疆医科大学第一附属医院内分泌科,新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘要] 目的:建立 HepG2 肝细胞脂肪变性模型,了解利拉鲁肽是否可改善 HepG2 细胞内脂代谢状态,并对相关机制进行初步探讨。方法:软脂酸钠诱导建立 HepG2 肝细胞脂肪变性模型,并给予利拉鲁肽干预。油红 O 染色确定 HepG2 肝细胞脂肪变性模型的建立。Western blot 检测 HepG2 中脂质合成和分解关键酶蛋白水平的变化情况及 HepG2 中 PI3K 信号通路活化情况。采用 PI3K 信号通路抑制剂预处理 HepG2 细胞,观察 PI3K 信号通路在软脂酸钠诱导建立 HepG2 肝细胞脂肪变性中的作用。结果:油红 O 染色结果显示模型建立成功。Western blot 结果显示,软脂酸钠诱导可显著升高 HepG2 中固醇调节元件结合蛋白 1c (sterol regulatory element-binding protein1c,SREBP1c)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase,FAS)的蛋白水平,降低脂肪甘油三酯脂酶(adipose triglyceride lipase,ATGL)的蛋白水平($P < 0.01$),并上调 HepG2 中 PI3K 信号通路活化水平;与软脂酸钠组相比,利拉鲁肽干预可显著降低 HepG2 中 SREBP1c、FAS 的蛋白水平,升高 ATGL 的蛋白水平,并抑制 HepG2 中 PI3K 信号通路活化水平;阻断 HepG2 中的 PI3K 信号通路后,软脂酸钠诱导 HepG2 脂肪变性的能力显著降低($P < 0.01$)。结论:利拉鲁肽可通过调节 HepG2 中的 PI3K 信号通路,进而改善 HepG2 细胞的脂代谢情况。

[关键词] 利拉鲁肽;肝细胞;脂质代谢;PI3K 信号转导通路

[中图分类号] R364.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)09-1211-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150905

Effects of liraglutide on lipid metabolism in human HepG2 liver cells and its related mechanism

Zhu Hongxia¹,Gao Jing¹,Deng Xiaolong¹,Zhu Yun^{2*}

(¹Department of Endocrinology,the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,Urumqi 830011;

²Department of Endocrinology,the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,Urumqi 830054,China)

[Abstract] **Objective:** We established a HepG2 hepatic steatosis model to observe whether liraglutide improves lipid metabolism in HepG2 liver cells, and discuss the related mechanisms. **Methods:** Sodium palmitate was performed to induce HepG2 steatosis model, and liraglutide intervention was given. Oil Red O staining was performed to determine the establishment of HepG2 hepatic steatosis model. Key enzyme of lipid synthesis and degradation as well as the activation of PI3K signaling pathway in HepG2 liver cells were detected by Western blotting assay. To observe the effect of PI3K signaling pathway in sodium palmitate induced HepG2 hepatic steatosis, HepG2 liver cells was pretreated with PI3K signaling pathway inhibitor. **Results:** Oil Red O staining showed that the model was successfully established. Western blotting assay showed that sodium palmitate significantly increased the expression of sterol regulatory element-binding protein1c (SREBP1c) and fatty acid synthase (FAS) protein levels in HepG2 liver cells, and decreased adipose triglyceride lipase (ATGL) protein levels ($P < 0.01$); sodium palmitate activated PI3K signaling pathway in HepG2 liver cells. Compared with sodium palmitate, liraglutide significantly decreased the expression of SREBP1c and FAS protein levels in HepG2 liver cells, and increased ATGL protein levels; liraglutide inhibited PI3K signaling pathway in HepG2 liver cells. After blocking PI3K signaling pathway, sodium palmitate-induced steatosis of HepG2 liver cells was significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion:** By regulating PI3K signaling pathway in HepG2 liver cells, liraglutide improves lipid metabolism in HepG2 liver cells.

[Key words] liraglutide; liver cells; lipid metabolism; PI3K signaling pathway

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(09): 1211-1215]

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2015211C182)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhujun6677@163.com

2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 在全球发病率不断增加, 75%的 T2DM 患者合并不同程度的脂肪肝^[1-3]。脂质异常及胰岛素抵抗是导致 T2DM 患者发生脂肪肝的危险因素。内质网应激通过影响脂代谢相关基因在 T2DM 以及脂肪肝的形成过程中具有重要作用。利拉鲁肽为长效人胰升糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 类似物, 可以刺激内源性胰岛素释放, 降低血糖、血甘油三酯及游离脂肪酸水平^[4-6], 但其对肝细胞脂代谢的影响目前研究的还不是很清楚。此外, 已知 PI3K 信号通路与肝细胞糖代谢密切相关^[7], 且脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 可诱发肝细胞脂肪沉积, 而抑制 PI3K 信号通路后这种作用消失, 提示 LPS 可通过激活 PI3K 信号通路诱导肝细胞脂肪沉积。那么, 利拉鲁肽是否可通过调节 PI3K 信号通路的活化情况, 进而影响肝细胞的脂代谢目前还未见文献报道。据此, 本研究通过软脂酸钠诱导建立肝细胞脂肪变性模型, 观察利拉鲁肽在改善肝细胞脂肪变性中的作用, 并观察了 PI3K 信号通路在肝细胞脂肪变性中的作用。结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

人 HepG2 肝细胞 (中国医学科学院基础医学研究所), 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。鼠抗人 p-Akt 抗体、鼠抗人固醇调节元件结合蛋白 1c (sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP1c) 抗体、鼠抗人脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 抗体及鼠抗人脂肪甘油三酯脂酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL) 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国), 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (Snata Cruz 公司, 美国); PI3K 信号通路抑制剂 (Sigma 公司, 美国), 蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (Thermo 公司, 美国), CytoBuster 蛋白提取试剂 (Novagen 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞处理

软脂酸钠诱导组采用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 与 Hanks 平衡盐溶液 (Hanks balanced salt solution, HBSS) 的混合物配制软脂酸钠或油酸钠, 使用前用培养基稀释到所需浓度 (油酸与软脂酸摩尔比为 2:1, 总浓度为 2 mmol/L); 对照组加入相同终浓度的 BSA/HBSS; 利拉鲁肽组在软脂酸钠诱导的基础上加用利拉鲁肽干预, 浓度为

25、50、100 mmol/L。所有细胞处理时间为 12 h。

1.2.2 油红 O 染色方法

细胞接种于盖玻片上, 按 1.2.1 处理, 随后以 PBS 洗涤细胞 2 次, 用 4% 的多聚甲醛固定细胞 30 min, 再以 PBS 洗涤 2 次, 油红 O 染色 2 h。自来水冲洗 3 次, 苏木素复染细胞核, 水封片。倒置显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.2.3 细胞总蛋白提取

上述细胞以预冷 PBS 洗涤 2 次, 400 g 离心 5 min; 吸去上清中的 PBS, 于沉淀中加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂及适量蛋白提取试剂, 涡旋混匀, 室温放置 15 min; 12 000 g 4°C 离心 15 min; 所得细胞总蛋白分装, -80°C 冻存。

1.2.4 Western blot

上述提取的细胞总蛋白经 5% 浓缩胶和 10% SDS-PAGE 分离胶分离后, 转印至 PVDF 膜上, 以含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐溶液和 Tween 20 (Tris-Buffered Saline and Tween 20, TBST) 室温封闭 1 h, 加入一抗 4°C 过夜孵育。第 2 天用 0.1% TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入相应的辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗, 室温孵育 1 h。0.1% TBST 洗膜后, 以 Super-signal West Femto/Pico HRP 敏感化学发光底物对条带进行显色。Actin 作为内参对照。所有实验至少重复 3 次。

1.2.5 PI3K 信号通路活化检测及阻断实验

采用 PI3K 信号通路下游分子 Akt 磷酸化水平代表 PI3K 信号通路的活化情况。阻断 PI3K 信号通路实验中, 细胞预先以 PI3K 抑制剂 LY294002 预处理 1 h, LY294002 处理浓度为 5 μ mol/L。

1.3 统计学方法

采用 SPSS15.0 统计软件进行数据分析。多组数据间比较采用 Anova 分析方法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HepG2 脂肪变模型建立情况检测

油红 O 染色结果所示 (图 1), 与对照组相比, 软脂酸钠诱导组 HepG2 肝细胞内脂滴数量显著增加, 脂滴间出现相互融合, 形成较大的颗粒, 提示 HepG2 肝细胞脂肪变模型建立成功。

2.2 利拉鲁肽对 HepG2 脂代谢指标蛋白的影响

与对照组相比, 软脂酸钠诱导可显著升高 HepG2 细胞中 SREBP1c、FAS 的蛋白水平 ($P < 0.01$), 降低

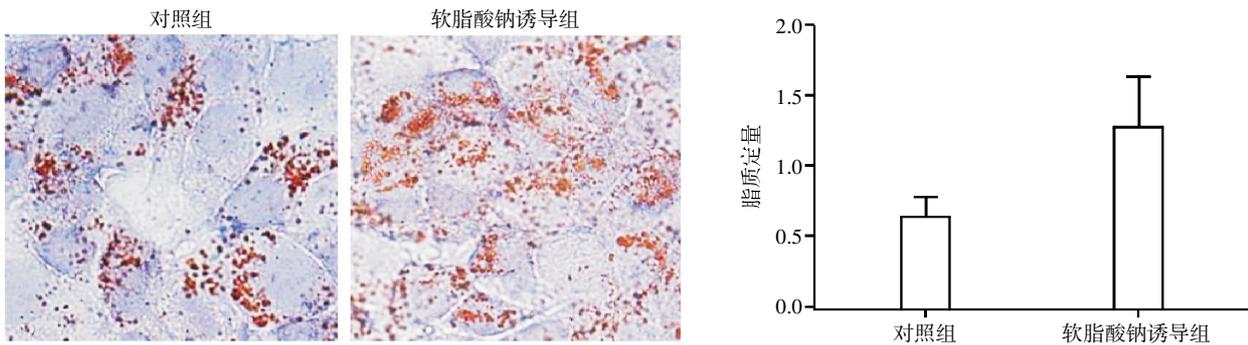


图 1 油红 O 染色检测模型建立情况

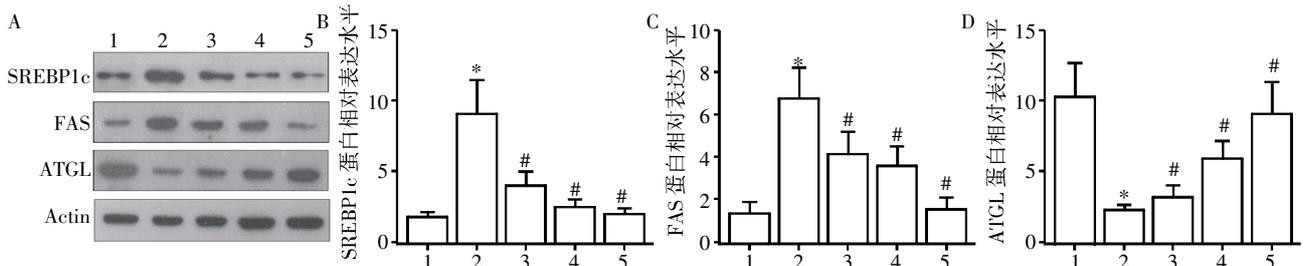
Figure 1 Model establishment situation detected by Oil Red O staining

ATGL 的蛋白水平 ($P < 0.01$); 与软脂酸钠组相比, 利拉鲁肽干预可显著降低 HepG2 细胞中 SREBP1c、FAS 的蛋白水平 ($P < 0.01$), 升高 ATGL 的蛋白水平 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.3 利拉鲁肽对 HepG2 细胞 PI3K 信号通路活化

的影响

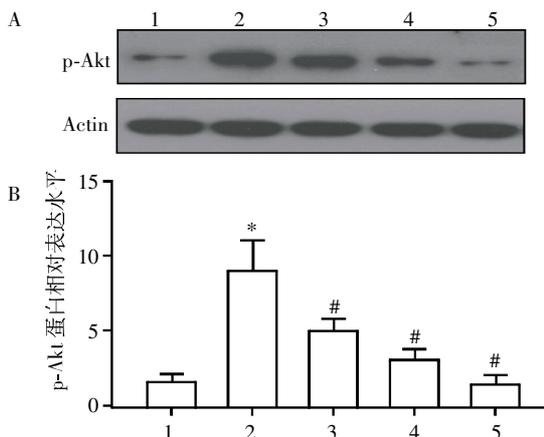
软脂酸钠诱导可显著升高 HepG2 细胞中 PI3K 信号通路的活化水平 ($P < 0.01$); 与软脂酸钠组相比, 利拉鲁肽干预可显著降低 HepG2 肝细胞中 PI3K 信号通路的活化水平 ($P < 0.01$, 图 3)。



A: Western blot 检测各组蛋白表达结果; B: SREBP1c 蛋白定量结果; C: FAS 蛋白定量结果; D: ATGL 蛋白定量结果。1: 对照组; 2: 软脂酸钠组; 3: 25 mmol/L 利拉鲁肽组; 4: 50 mmol/L 利拉鲁肽组; 5: 100 mmol/L 利拉鲁肽组。与对照组相比, * $P < 0.01$; 与软脂酸钠组相比, # $P < 0.01$ 。

图 2 Western blot 检测 HepG2 肝细胞中 SREBP1c、FAS 和 ATGL 表达情况

Figure 2 Expression of SREBP1c, FAS and ATGL in HepG2 cells was detected by Western blot



A: 各组 p-Akt 蛋白表达 Western blot 检测结果; B: p-Akt 蛋白表达定量分析结果。1: 对照组; 2: 软脂酸钠组; 3: 25 mmol/L 利拉鲁肽组; 4: 50 mmol/L 利拉鲁肽组; 5: 100 mmol/L 利拉鲁肽组。与对照组相比, * $P < 0.01$; 与软脂酸钠组相比, # $P < 0.01$ 。

图 3 Western blot 检测 HepG2 肝细胞中 PI3K 信号通路活化情况

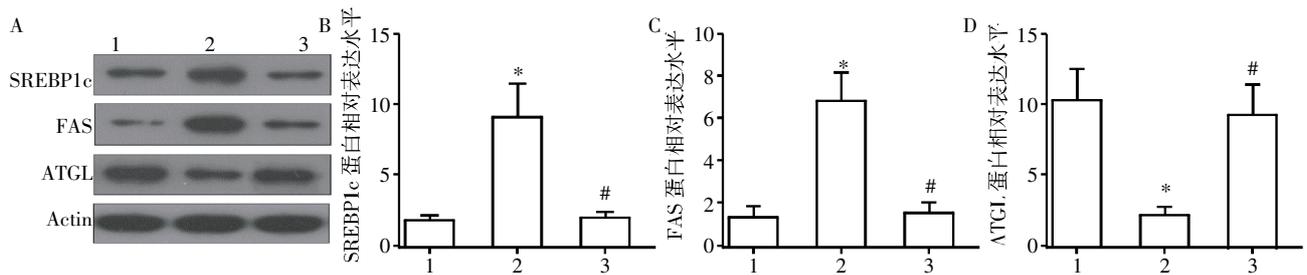
Figure 3 Activation of PI3K signaling pathway in HepG2 cells was detected by Western blot

2.4 PI3K 信号通路在 HepG2 脂肪变性中的作用

软脂酸钠诱导可显著升高 HepG2 细胞中 SREBP1c、FAS 的蛋白水平 ($P < 0.01$), 降低 ATGL 的蛋白水平 ($P < 0.01$); 当给予 PI3K 抑制剂预处理 HepG2 细胞后, 软脂酸钠诱导 SREBP1c、FAS 蛋白水平升高及 ATGL 蛋白水平降低的作用被显著阻断 ($P < 0.01$, 图 4)。

3 讨论

脂肪肝是指由于各种原因引起的肝细胞内脂肪堆积过多的病变。约 75% 的 T2DM 患者合并不同程度的脂肪肝^[1-3]。脂质异常是导致 T2DM 患者发生脂肪肝的危险因素。胰升糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是一种促胰岛素胃肠肽, 主要由肠内分泌 L-细胞所产生的, 具有降低血糖、延迟胃排空、增加饱腹感和降低体重的作用^[8-11]。利拉鲁肽为长效人 GLP-1 类似物, 与天然的 GLP-1 有 97% 的同



A: 各组蛋白表达 Western blot 检测结果; B: SREBP1c 蛋白定量结果; C: FAS 蛋白定量结果; D: ATGL 蛋白定量结果。1: 对照组; 2: 软脂酸钠组; 3: PI3K 抑制剂预处理组。与对照组相比, * $P < 0.01$; 与软脂酸钠组相比, # $P < 0.01$ 。

图 4 PI3K 信号通路在 HepG2 肝细胞脂肪变性中的作用

Figure 4 Effect of PI3K signaling pathway in HepG2 cells steatosis

源性。Ⅲ期大型临床研究一致表明,利拉鲁肽具有控制血糖、血压和血脂的作用^[12-14]。在临床试验中,利拉鲁肽治疗后患者的体重指数和腰/臀比均显著降低。26 周和 52 周糖尿病治疗作用研究显示,利拉鲁肽降低体重的效果主要是通过减少机体脂肪量,而不是减少肌肉组织。然而目前关于利拉鲁肽对肝细胞脂代谢的影响及相关机制研究目前还不是很清楚。

细胞内脂肪的含量主要由合成和分解两方面决定。固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding protein1c, SREBP) 是调节脂肪合成的关键基因^[15]。SREBP 家族主要包括有 SREBP1a、SREBP1c 和 SREBP2, 其中 SREBP1c 可激活 FAS, 进而调节细胞内的脂代谢^[16]。在脂肪分解方面, ATGL 是脂肪水解的关键酶。本研究通过软脂酸钠诱导建立 HepG2 细胞脂肪变性模型, 观察 HepG2 细胞脂肪变性过程中 SREBP1c、FAS 及 ATGL 蛋白水平的变化情况, 同时给予不同剂量的利拉鲁肽干预, 观察利拉鲁肽干预对 SREBP1c、FAS 及 ATGL 蛋白水平的影响。结果显示, 软脂酸钠诱导 HepG2 肝细胞脂肪变性后, HepG2 细胞中 SREBP1c、FAS 的蛋白水平显著升高($P < 0.01$), 而 ATGL 的蛋白水平显著降低($P < 0.01$); 给予利拉鲁肽干预后, 利拉鲁肽可显著降低 HepG2 肝细胞中 SREBP1c、FAS 的蛋白水平($P < 0.01$), 升高 ATGL 的蛋白水平($P < 0.01$)。提示利拉鲁肽可通过调节 HepG2 肝细胞中脂代谢关键基因(SREBP1c、FAS 及 ATGL)而调节 HepG2 肝细胞的脂代谢。

文献报道, 利拉鲁肽可通过调节蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (proteintyrosine phosphatase-1B, PTP-1B) 和 PI3K/Akt 信号转导通路而发挥降血糖作用^[17]。且 LPS 可诱发肝细胞脂肪沉积, 而抑制 PI3K 信号通路后这种作用消失, 提示 LPS 可通过激活 PI3K 信号通路诱导肝细胞脂肪沉积。那么利拉鲁肽是否可通

过调节 PI3K 信号通路的活化情况, 进而影响肝细胞的脂代谢目前还未见文献报道。本研究结果显示, 软脂酸钠诱导 HepG2 肝细胞脂肪变性后, HepG2 中 PI3K 信号通路被显著活化, 而阻断 PI3K 信号通路后, 软脂酸钠诱导 HepG2 中 SREBP1c、FAS 蛋白水平升高及 ATGL 蛋白水平降低的作用被显著阻断 ($P < 0.01$)。提示软脂酸钠是通过激活 PI3K 信号通路, 进而诱发肝细胞脂肪变性。给予利拉鲁肽干预后, 利拉鲁肽可显著降低 HepG2 中 PI3K 信号通路活化情况。综上所述, 本研究结果证实, 利拉鲁肽可通过调节 HepG2 中的 PI3K 信号通路, 进而改善 HepG2 肝细胞脂代谢情况。本研究为应用利拉鲁肽治疗脂肪肝提供了一定的科学依据。

[参考文献]

- [1] 潘瑞蓉, 王济芳, 高毅娜, 等. 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝患者的代谢及其脂肪摄取特点[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2013, 33(3): 386-389
- [2] 苏咏明, 温敏杰. 老年 2 型糖尿病合并脂肪肝与血脂的相关分析[J]. 广东医学, 2005, 26(2): 211-212
- [3] 桑谊荃, 马向华, 倪娟, 等. 视黄醇结合蛋白 4 与新诊断 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝的关系研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2013, 33(5): 646-650
- [4] Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP[J]. Gastroenterology, 2007, 132(6): 2131-2157
- [5] Sharma S, Mells JE, Fu PP, et al. GLP-1 analogs reduce hepatocyte steatosis and improve survival by enhancing the unfolded protein response and promoting macroautophagy[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25-269
- [6] Mundil D, Cameron-Vendrig A, Husain M. GLP-1 receptor agonists: a clinical perspective on cardiovascular effects[J]. Diab Vasc Dis Res, 2012, 9(2): 95
- [7] Jiang X, Tang X, Zhang P, et al. Cyanidin-3-O-β-glucoside protects primary mouse hepatocytes against high glucose-induced apoptosis by modulating mitochondrial dysfunction and the PI3K/Akt pathway[J]. Biochem

- Pharmacol, 2014, 90(2):135-144
- [8] Flint A, Raben A, Astrup A, et al. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(3):515-520
- [9] Herrmann C, Göke R, Richter G, et al. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients[J]. *Digestion*, 1995, 56(2):117-126
- [10] Imeryüz N, Yeğen BC, Bozkurt A, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(4 Pt 1):G920-G927
- [11] Meier JJ, Nauck MA. The potential role of glucagon-like peptide 1 in diabetes[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2004, 5(4):402-410
- [12] Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, et al. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomised, parallel-group, multinational, open-label trial(LEAD-6)[J]. *Lancet*, 2009, 374(9683):39-47
- [13] Zinman B, Gerich J, Buse JB, et al. Efficacy and safety of the human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide in combination with metformin and thiazolidinedione in patients with type 2 diabetes(LEAD-4 Met+TZD)[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(7):1224-1230
- [14] Nauck M, Frid A, Hermansen K, et al. Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes)-2 study[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(1):84-90
- [15] Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes[J]. *Progr Lipid Res*, 2001, 40(6):439-452
- [16] Coleman R, Lee D. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation[J]. *Progr Lipid Res*, 2004, 43(2):134-176
- [17] Ji W, Chen X, Lv J, et al. Liraglutide exerts antidiabetic effect via PTP1B and PI3K/Akt2 signaling pathway in skeletal muscle of KKAY mice[J]. *Int J Endocrinol*, 2014, 2014:312452

[收稿日期] 2015-03-25

.....

(上接第 1204 页)

- [11] Fremont RD1, Koyama T, Calfee CS, et al. Acute lung injury in patients with traumatic injuries; utility of a panel of biomarkers for diagnosis and pathogenesis[J]. *J Trauma*, 2010, 68(5):1121-1127
- [12] Kaiser FJ, Osmanovic A, Rakovic A, et al. The dystonia gene DYT1 IS repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6)[J]. *Ann Neurol*, 2010, 68(4):554-559
- [13] Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, et al. The protein product of the tumor suppressor gene, meanoma differentiation associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24[J]. *J Immunol*, 2002, 168(12):6041-6046
- [14] Craig VJ, Quintero PA, Fyfe SE, et al. Pro-fibrotic activities for matrix metalloproteinase-8 during leomycin-mediated lung injury[J]. *J Immunol*, 2013, 190(8):4283-4296
- [15] Marchetti F, Venkatachalam S. The multiple roles of Bub1 in chromosome segregation during mitosis and meiosis[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(1):58-63

[收稿日期] 2015-04-17