

乳源免疫调节肽对酒精诱导性肝细胞损伤的干预机制

刘琛 雷婷 周娟 赵梦静 秦宜德

摘要 目的 研究乳源免疫调节肽(PGPIP)对肝细胞酒精性脂肪变性的干预机制。方法 MTT法筛选正常肝细胞株(LO₂)酒精诱导的最佳浓度和PGPIP最佳用药范围,在肝细胞内加入酒精和不同浓度的PGPIP进行干预,连续造模3个月,建立能稳定遗传的酒精诱导脂肪变性的肝细胞模型,观察PGPIP对肝细胞脂肪变性的防治效果。油红O染色法观察LO₂细胞脂肪变性程度,RT-PCR法检测脂肪合成相关基因(ACC、PPAR- γ)的表达。结果 成功建立了能稳定遗传的酒精诱导脂肪变性的肝细胞模型,并筛选出酒精诱导LO₂脂肪变性的最佳浓度和PGPIP最佳用药范围。PGPIP可以防治和缓解脂肪变性,PGPIP可能通过降低ACC的基因表达,升高PPAR- γ 的基因表达来实现。结论 PGPIP可防治和放缓肝细胞酒精性脂肪病变,机制可能是减少脂肪合成。

关键词 PGPIP; LO₂; 脂肪变性; 脂肪合成

中图分类号 R 332; R 392.11; R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0892-04

资料^[1]显示男性每日摄入乙醇>40 g,女性每日摄入乙醇>30 g,就有可能导致肝脏损伤,如果任其继续发展,可能导致酒精性脂肪肝,甚至肝硬化。乳源免疫调节肽(immunomodulating peptide, PGPIP)是最典型的免疫调节肽,是位于 β -酪蛋白63~68残基上的6个氨基酸残基组成的短肽^[2]。研究^[3]显示PGPIP可以减轻酒精造模小鼠脂肪变性程度,延缓酒精肝发展。该研究通过酒精诱导脂肪变性的肝细胞模型,旨在探讨PGPIP对酒精性脂肪肝的防治作用及对受损后肝细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人正常肝细胞株(LO₂)由安徽医科大学生物化学与分子生物学实验室保存。

1.2 药物与试剂 PGPIP购自上海楚肽生物科技有限公司,纯度98.23%; MTT、DMEM培养基购自

美国Gibco公司;胎牛血清购自天津康源生物技术有限公司; RT-PCR试剂盒购自美国Fermentas公司。

1.3 方法

1.3.1 筛选酒精最佳浓度和PGPIP用药浓度 用0.25%胰蛋白酶消化细胞,按照每孔6 000、4 000、2 000个细胞种植在96孔板上,细胞贴壁后第1组使用正常培养基DMEM作为正常对照组,后5组细胞的DMEM培养基分别加入不同浓度酒精(0.1%、0.25%、0.5%、1.0%、2.0%、4.0%),每日换液分别培养24、48、72 h后在490 nm波长下测吸光度(optical density, OD)值。细胞抑制率(%) = (对照组 OD₄₉₀ - 实验组 OD₄₉₀) / 对照组 OD₄₉₀ × 100%。筛选酒精最佳浓度。再次分组第1组正常对照组使用正常培养基DMEM,第2组酒精对照组的DMEM培养基加入筛选好浓度的酒精,后5组实验组的DMEM培养基除了含有酒精还加入不同浓度的PGPIP(1 × 10⁻⁵、1 × 10⁻⁴、1 × 10⁻³、1 × 10⁻²、1 × 10⁻¹ g/L)连续培养LO₂细胞1个月,在酒精对照组LO₂细胞出现脂肪变性后,取各组对数期LO₂细胞用胰蛋白酶消化,按照每孔6 000、4 000、2 000个细胞种植在96孔板上,分别培养24、48、72 h,在490 nm波长下测量各孔OD值,计算细胞存活率(%) = (实验组 OD₄₉₀ / 酒精对照组 OD₄₉₀) × 100%,筛选出PGPIP最佳作用浓度。

1.3.2 酒精性脂肪肝细胞模型的建立 筛选出酒精和PGPIP最佳作用浓度后,将细胞分为:①正常对照组: DMEM培养; ②酒精对照组: DMEM + 酒精培养; ③低浓度PGPIP组: DMEM + 酒精 + PGPIP(1 × 10⁻⁴ g/L); ④中浓度PGPIP组: DMEM + 酒精 + PGPIP(1 × 10⁻³ g/L); ⑤高浓度PGPIP组: DMEM + 酒精 + PGPIP(1 × 10⁻² g/L)。以上各组均隔天换液,每4 d传代,连续培养2个月后的细胞方可用于后续试验。

1.3.3 油红O染色 取不同组别连续刺激培养的LO₂细胞,在6孔板爬片培养(玻片需提前泡酸、高压灭菌),细胞汇合率达80%后,用胰蛋白酶消化成悬液,1 000 r/min离心5 min, PBS洗涤3次(60 s/次),4%多聚甲醛固定1 h,100%丙二醇洗涤2 min,

2015-03-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81472448)

作者单位: 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

作者简介: 刘琛,女,硕士研究生;

秦宜德,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: qinyide@hotmail.com

避光条件下用 0.5% 的油红 O 染色过夜,隔天用 98% 丙二醇洗涤 5 min,85% 丙二醇洗涤 10 min,60% 异丙醇脱色。苏木精染色细胞核 10 min,流水中蓝化 20 min,烤箱烘烤 2 h,甘油明胶封片,烘箱过夜,显微镜拍照。

1.3.4 RT-PCR 法检测相关基因表达 利用 Primer 5.0 软件设计 β -actin、乙酰辅酶 A 羧代酶(acetyl-coA carboxylase, ACC)、过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (peroxisome proliferators activated receptor gamma, PPAR- γ) 引物序列,送至上海生工合成引物。使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,用 Fermentas 试剂盒逆转录为 cDNA,加入引物 PCR 扩增。琼脂糖电泳扩增产物,采集图像进行光密度扫描,用目的基因与 β -actin 光密度比值衡量相应基因表达高低,重复 3 次试验。引物序列见表 1。

表 1 β -actin、ACC、PPAR- γ 引物序列、片段大小和退火温度

基因	引物序列(5'-3')	片段大小 (bp)	退火温度 (°C)
β -actin	F: CCGGAAATCGTGCCTGAC	434	54.6
	R: TGGAAAGGTGGACAGCGAGG		
ACC	F: CAGCGAGCAGAAGTCATACG	200	53.0
	R: GCATAACCTGAAACGAGAGGA		
PPAR- γ	F: GGAAGACCACTCCACTCTCT	273	53.0
	R: TCTCCACAGACACGACATTCA		

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间计量资料采用成组设计的方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 酒精诱导脂肪变性 LO₂ 细胞模型的建立 与正常对照组比较,酒精组细胞抑制率均有上升,差异有统计学意义($P < 0.05$),尤其是 1.0% 酒精刺激之后细胞抑制率明显上升。表明随着酒精浓度升高,细胞活性降低,细胞活性与酒精浓度成反比。选取 0.5% 的酒精浓度作为诱导 LO₂ 酒精性脂肪变性的最佳酒精浓度 ($F_{24h} = 158.708, F_{48h} = 113.605, F_{72h} = 176.690$) ,见图 1。

2.2 PGPIP N 对 LO₂ 细胞脂肪变性的防治作用

2.2.1 PGPIP N 对酒精性脂肪变性 LO₂ 细胞存活率的影响 与正常对照组比较,各用药组存活率均下降,除了酒精对照组和 1×10^{-5} g/L PGPIP N 用药组,其他差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与酒精对照组比较,加入不同浓度 PGPIP N 培养的酒精诱导变性肝细胞存活率均有上升,除了 1×10^{-5} g/L

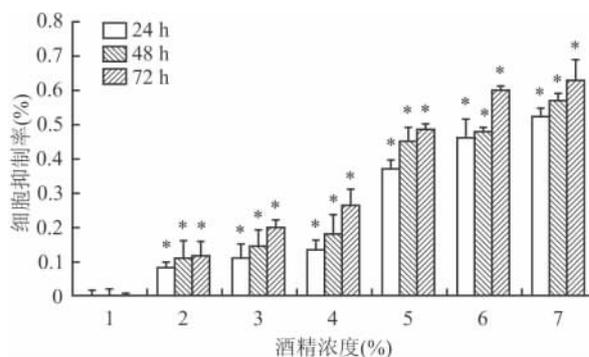


图 1 酒精浓度对 LO₂ 细胞增殖抑制率影响 (n = 4)

1: 正常对照组; 2: 0.1% 酒精; 3: 0.25% 酒精; 4: 0.5% 酒精; 5: 1.0% 酒精; 6: 2.0% 酒精; 7: 4.0% 酒精; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$

PGPIP N 用药组,其他差异均有统计学意义($P < 0.05$),以 1×10^{-2} g/L 最为明显。细胞活性在一定范围内随着培养时间和 PGPIP N 上升而增高。因此选取 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-2} g/L 作为 PGPIP N 最佳用药浓度 ($F_{24h} = 7.417, F_{48h} = 7.773, F_{72h} = 8.591$) ,见图 2。

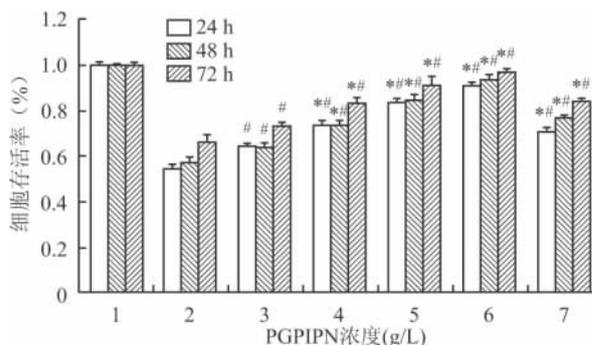


图 2 PGPIP N 对酒精性脂肪变性 LO₂ 细胞存活率影响 (n = 4)

1: 正常对照组; 2: 酒精对照组; 3: PGPIP N 浓度为 1×10^{-5} g/L; 4: PGPIP N 浓度为 1×10^{-4} g/L; 5: PGPIP N 浓度为 1×10^{-3} g/L; 6: PGPIP N 浓度为 1×10^{-2} g/L; 7: PGPIP N 浓度为 1×10^{-1} g/L; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与酒精对照组比较: # $P < 0.05$

2.2.2 PGPIP N 对酒精性脂肪变性 LO₂ 细胞脂肪合成的影响 油红 O 染色显示正常对照组的肝细胞没有红色脂肪粒,胞质可出现少量未着色颗粒物质;酒精对照组染色后在靠近胞膜的位置出现大量红色脂滴,出现“环状”或者“印戒”样细胞,各脂滴出现融合现象;而经过 PGPIP N 干预的酒精性脂肪变性肝细胞,随着 PGPIP N 浓度升高出现脂滴减少、脂滴间融合现象减少,见图 3。

2.2.3 RT-PCR 法检测相关基因的变化 PGPIP N 可以在脂肪合成方面(图 4)下调 ACC mRNA,上调

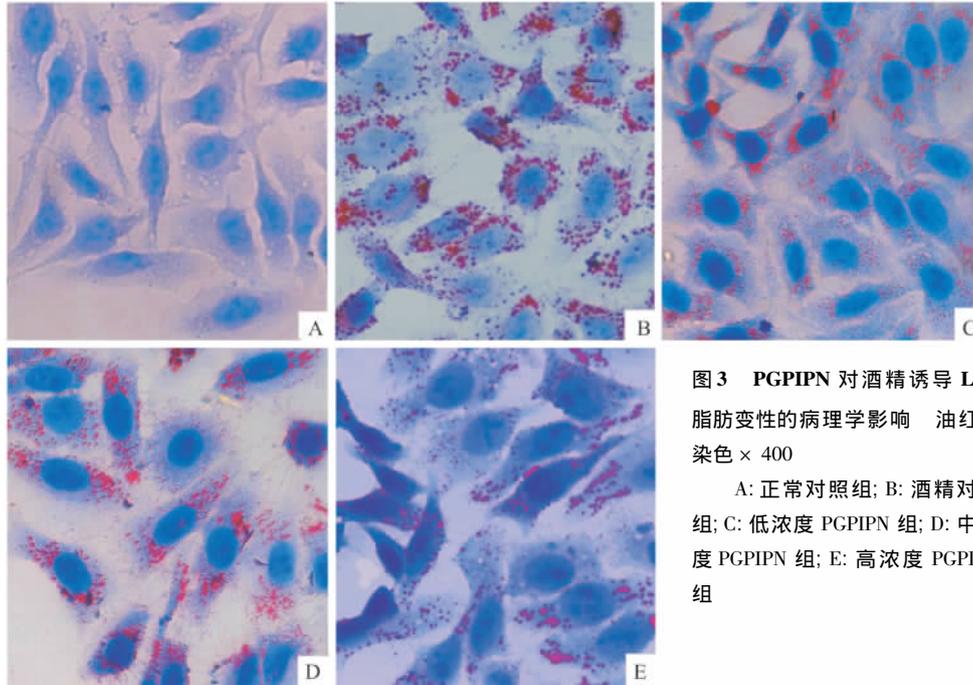


图3 PGPIPn 对酒精诱导 LO₂ 脂肪变性的病理学影响 油红 O 染色 × 400
A: 正常对照组; B: 酒精对照组; C: 低浓度 PGPIPn 组; D: 中浓度 PGPIPn 组; E: 高浓度 PGPIPn 组

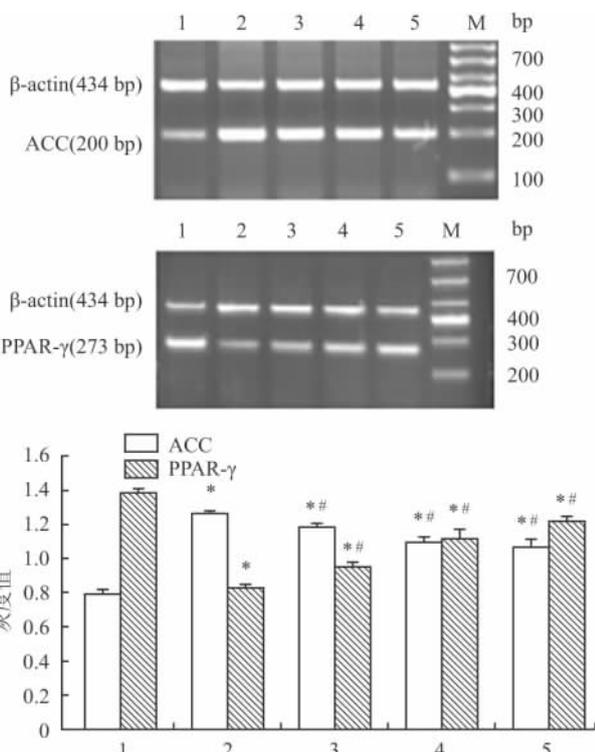


图4 酒精与不同浓度 PGPIPn 长期作用 LO₂ 后对 ACC 和 PPAR-γ mRNA 表达的影响

M: DNA Marker DL1 000; 1: 正常对照组; 2: 酒精对照组; 3: 低浓度 PGPIPn 组; 4: 中浓度 PGPIPn 组; 5: 高浓度 PGPIPn 组; 与正常对照组比较: * P < 0.05; 与酒精对照组比较: # P < 0.05

PPAR-γ mRNA, 且随着 PGPIPn 用药时间延长和浓度增加更加明显, 用药组与正常对照组比较差异有统计学意义, 用药组与酒精对照组比较差异也有统

计学意义 ($F_{ACC} = 285.170$ 、 $F_{PPAR-\gamma} = 183.231$, $P < 0.05$)。

3 讨论

酒精性脂肪肝在欧美等国发病率较高, 但是随着国内生活水平和饮食习惯的改变, 我国的酒精肝发病率也出现上升的趋势。肝脏是酒精代谢主要场所, 在酒精长期刺激下肝细胞容易出现脂肪变性, 其可能的机制和脂肪代谢紊乱有关。

ACC 在脂肪合成中起重要作用, 是脂肪酸合成限速酶, 其活性或基因表达增加可以促进脂肪合成^[4]。本实验证明酒精对照组的 ACC 表达量明显增高; PGPIPn 可以明显下调 ACC 表达, 且随着 PGPIPn 浓度增大表达量下降更加显著, 说明在酒精的作用下, 肝细胞脂肪合成增多, 而 PGPIPn 可能通过下调 ACC 而减少脂质蓄积, 改善脂肪变性。

PPAR-γ 属于 PPAR 3 种亚型之一, 在脂肪组织高表达, 正常肝脏里 PPAR-γ 表达量仅为脂肪组织的 10% ~ 30%, PPAR-γ 可促进脂肪酸在肝脏的 β-氧化, 起到降脂作用。活化的 PPAR-γ 还能促进细胞分泌脂联素, 其能改善肝细胞对胰岛素敏感性, 脂联素通过增强 PPAR-α 活性, 也能促使脂肪酸 β 氧化, 减少肝细胞脂肪堆积^[5]。脂质过氧化会降低 PPAR-γ 表达, 促进肝脏三酰甘油蓄积, 加重肝脏脂肪变性, 促进脂肪肝形成^[6]。PPAR-γ 具有促进酒

精性脂肪肝细胞的分化,其活化后使转运至肌肉和肝脏的脂肪酸减少,脂肪合成降低,防止脂肪堆积^[7]。该实验的酒精对照组脂肪变性严重,PPAR- γ 表达量明显降低,相反 PGPIP 用药组 PPAR- γ 表达量较酒精对照组有上升趋势,且具有浓度依赖性,肝细胞脂肪变性减轻。提示 PGPIP 可能通过激活 PPAR- γ 促进肝细胞 β -氧化,减少脂质蓄积,改善肝细胞脂肪变性。

正常肝细胞经过长期酒精诱导后脂肪生产增多, β -氧化减弱,脂肪酸清除减缓,脂肪堆积,造成 PPAR- γ 表达减弱,发生脂肪变性,而 PGPIP 可以缓解酒精对 PPAR- γ 的抑制作用,改善酒精性脂肪变性。

酒精性脂肪肝发病机制复杂,目前没有专门药物,主要防治手段包括戒酒、清淡饮食和加强锻炼。小分子肽具有抗肿瘤、抗疲劳、增强抵抗力等多重作用,所以本实验选用 PGPIP 作用于体外酒精性脂肪肝,结果显示 PGPIP 组油红 O 染色脂肪合成减少,同时 RT-PCR 显示 ACC mRNA 表达下降,PPAR- γ mRNA 表达上升。可能的机制是通过降低 ACC 表达、激活 PPAR- γ 表达,减少脂肪合成,减轻脂肪变性,从而达到防治和缓解酒精性脂肪肝病的目的。

的,但其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 郑睿行,马力. 免疫调节肽的概述[J]. 生命科学仪器, 2008, 6(10): 9-12.
- [2] Wang W, Gu F, Wei C, et al. PGPIP, a therapeutic hexapeptide, suppressed human ovarian cancer growth by targeting BCL2 [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60701.
- [3] 杨浩然,魏彩,唐宜桂,等. 乳源免疫调节肽对小鼠酒精性脂肪肝的防治作用[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(4): 336-40.
- [4] 彭丽红,阳学凤,傅念,等. 姜黄素对脂肪变性 HL-7702 细胞乙酰辅酶 A 羧化酶表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(12): 948-9.
- [5] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects [J]. Nature, 2003, 423(6941): 762-9.
- [6] Seo Y S, Kim J H, Jo N Y, et al. PPAR agonists treatment is effective in a nonalcoholic fatty liver disease animal model by modulating fatty-acid metabolic enzymes [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(1): 102-9.
- [7] Eerie R K, Alan M, Scott J C. Role of peroxisome proliferators-activated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(1): 22-8.

The effect and the mechanism of immunomodulating peptide on alcoholic fatty liver cells model

Liu Chen, Lei Ting, Zhou Juan, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effect of immunomodulating peptide (PGPIP) on mechanism on alcoholic fatty liver cells model induced *in vitro* in human. **Methods** The liver cells (LO₂) proliferation with the optima concentration of alcohol and PGPIP *in vitro* were assayed by MTT method. Liver cells were treated with alcohol and different concentrations of PGPIP for 3 months, then stable model of alcoholic fatty liver cells were established with screening concentration, aiming to observing the prevention and mitigation effects of PGPIP on alcoholic fatty liver cell. Oil Red O staining was used to detect the degree of LO₂ cells steatosis. The expressions of genes of fat synthesis related genes (ACC, PPAR- γ) were tested by RT-PCR. **Results** An alcohol induced fatty liver cells model was established successfully. The best concentration of alcohol and PGPIP was already screened. PGPIP could prevent and mitigate alcoholic fatty degeneration of the liver cells. The mechanism may be associated with decreasing expression of ACC (mRNA) and increasing expression of PPAR- γ (mRNA) induced by PGPIP. **Conclusion** PGPIP can reduce alcoholic fatty degeneration of the liver cells, which may relate to slow fat synthesis.

Key words PGPIP; LO₂; steatosis; fat synthesis