

二甲双胍对非酒精性脂肪肝细胞模型 PGC-1 α 及脂质表达的影响

程 靖, 张 宝, 管石侠, 侯丽丽, 蒋建华

摘要 目的 观察不同浓度二甲双胍对非酒精性脂肪肝细胞模型过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 共激活因子-1 α (PGC-1 α) 基因表达的影响, 以及 PGC-1 α 的表达与肝脏细胞脂肪堆积的关系。方法 用 20 $\mu\text{g/ml}$ 油酸(油酸以 0.5% DMSO 溶解)诱导 L-02 细胞 72 h, 形成非酒精性脂肪变性肝细胞模型。对照组加入含 10% 胎牛血清的普通 1640 培养基。在模型组中分别添加含 2.5、5、7.5 mmol/L 终浓度的二甲双胍培养基继续培养 24 h 后收集细胞。采用 RT-PCR 法检测 L-02 细胞 PGC-1 α mRNA 的表达, 采用三酰甘油(TG)酶法测定试剂盒(组织细胞)检测 L-02 细胞中 TG 的变化。结果 当二甲双胍终浓度为 7.5 mmol/L 时, 细胞内 TG 明显减少, 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 二甲双胍终浓度为 7.5 mmol/L 组与终浓度为 2.5 mmol/L 组比较, 细胞内 TG 明显减少, 而细胞内 PGC-1 α mRNA 表达量明显增多, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 当二甲双胍终浓度为 2.5、7.5 mmol/L 时 L-02 细胞中 PGC-1 α mRNA 表达量明显增多, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。L-02 细胞中 PGC-1 α mRNA 的表达与 TG 水平呈负相关性($r = -0.581, P < 0.05$)。随着二甲双胍浓度的增加, 模型组 L-02 细胞线粒体损伤有所改善。结论 非酒精性脂肪肝细胞模型中 PGC-1 α 的表达减少而二甲双胍可改善 PGC-1 α 的表达水平, PGC-1 α 的表达和细胞内 TG 的水平呈负相关, 由此得出增加 PGC-1 α 的表达水平可减少脂肪在肝脏的堆积。
关键词 非酒精性脂肪肝; PGC-1 α ; 二甲双胍
中图分类号 R 589.2
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)03-0309-04

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确的肝损害因素所致的, 以弥漫性肝细胞大疱性脂肪变性为病理特征, 与高胰岛素血症、血脂异常、2 型糖尿病以及遗传—环境—代谢应激密切相关的临床综合征^[1]。二甲双胍作为一种降血糖药物可以在不刺激胰岛素

分泌的基础上改善胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和高胰岛素血症, 还可以直接作用于胰岛素靶细胞如肝脏细胞、脂肪细胞、肌肉细胞等, 通过受体后机制增加胰岛素的敏感性, 因而二甲双胍也被用于非酒精性脂肪肝的治疗。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 是一种核转录共激活因子, 在糖脂代谢是一种核受体转录辅助活化因子, 可通过激活糖异生、脂肪酸氧化、线粒体呼吸的关键酶参与了 IR、线粒体损伤和脂代谢紊乱的形成, 而这些目前已经被公认参与 NAFLD 的发生机制。该研究拟通过检测非酒精性脂肪肝细胞模型中 PGC-1 α 基因的表达变化, 探讨二甲双胍用于非酒精性脂肪肝治疗的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂 人肝细胞株(L-02)购自中国科学院上海细胞库; RPMI 1640 无糖无酚红培养基、1:125 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 链霉素、青霉素购自华北制药华胜公司; 二甲双胍购自美国 Sigma 公司; TG 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; TRIzol、2 \times Tap PCR Master Mix 及逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养与分组 参照文献^[2]方法建立模型组, 正常人 L-02 肝细胞株用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养于 25 ml 培养瓶, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、含 5% CO_2 的培养箱中培养。将离体培养的肝细胞传代培养 24 h 后, 待细胞生长稳定、融合度约达 80% 时, 加入 20 $\mu\text{g/ml}$ 油酸(油酸以 0.5% DMSO 溶解)诱导肝细胞脂肪变性, 细胞隔天换液并加入新配制的油酸。油酸作用 72 h 形成非酒精性脂肪变性肝细胞模型。对照组加入含 10% 胎牛血清的普通 1640 培养基。在模型组中分别添加含 2.5、5、7.5 mmol/L 终浓度的二甲双胍培养基分别建立低、中、高剂量组, 继续培养 24 h 后收集细胞。

1.3 非酒精性脂肪变性肝细胞模型的鉴定 电镜观察: 用 40 ml 培养瓶培养细胞, 油酸作用 72 h 用胰

2013-11-15 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 11040606M200); 安徽省科技年度项目(编号: 1301043019)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院临床营养科, 合肥 230022

作者简介: 程 靖, 女, 硕士研究生;

蒋建华, 女, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: Jjhua@yeah.net

酶消化收集细胞,并制作透射电镜标本行电镜观察。各组细胞内 TG 的生化检测:具体步骤见 1.5。

1.4 RT-PCR 法测定 PGC-1 α mRNA 的表达 细胞总 RNA 的提取采用 TRIzol 一步法,按说明书操作。逆转录合成单链 cDNA 后进行 PCR。引物设计及引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。PGC-1 α 上游引物序列为:5'-CAGCAAGTC-CTCAGTCCTCAC-3',下游引物:5'-TGCCTCCAAA GTCTCTCTCAG-3',产物大小 247 bp; β -actin 上游引物序列为:5'-GAAATAAGAACACCCCTTC-3',下游引物:5'-TTGCCGACAGGATGCAGAA-3',产物大小 100 bp。扩增条件为:预变性 95 °C 5min,进入循环 95 °C 50 s 55 °C 50 s 72 °C 50 s 32 个循环后 72 °C 10 min。将 PCR 产物在琼脂糖凝胶中进行电泳,置于凝胶图像分析系统,用 LabWorks 4.5 软件进行积分吸光度值(IA)测定,目的基因的 IA 与内参吸光度值的比值代表目的基因的相对表达含量。

1.5 各组细胞内 TG 的检测 采用 6 孔板,每孔植入约 1×10^5 个细胞,按上述方法分组处理,培养 24 h 后弃去上清液,收集各组培养板上的细胞,反复冻融裂解细胞,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液检测 TG。采用 TG 检测试剂盒,按试剂盒的说明书检测 TG 含量。

1.6 电镜观察 由安徽省立医院电镜室专业人员固定和处理细胞、切片,观察细胞器、线粒体和脂滴形成情况。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间计量资料比较采用 t 检验,同组不同浓度间比较采用方差分析,两因素间的相关性用直线相关分析法进行分析。

2 结果

2.1 电镜下观察有无线粒体损伤及脂滴变化 对照组细胞中可见少量大小不等的脂滴,线粒体呈椭圆形或圆形,嵴膜清晰。模型组细胞中脂滴明显增多(生化检测示模型组细胞内 TG 水平明显升高,说明油酸诱导造模成功),少数线粒体出现空泡样改变。低、中剂量组细胞中可见脂滴分布,线粒体空泡样改变有所减少。高剂量组细胞中可见较少脂滴,线粒体稍肿胀,但线粒体嵴膜清晰。见图 1。

2.2 不同浓度二甲双胍对 L-02 细胞内 TG 含量的影响 与对照组比较,模型组细胞内 TG 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比

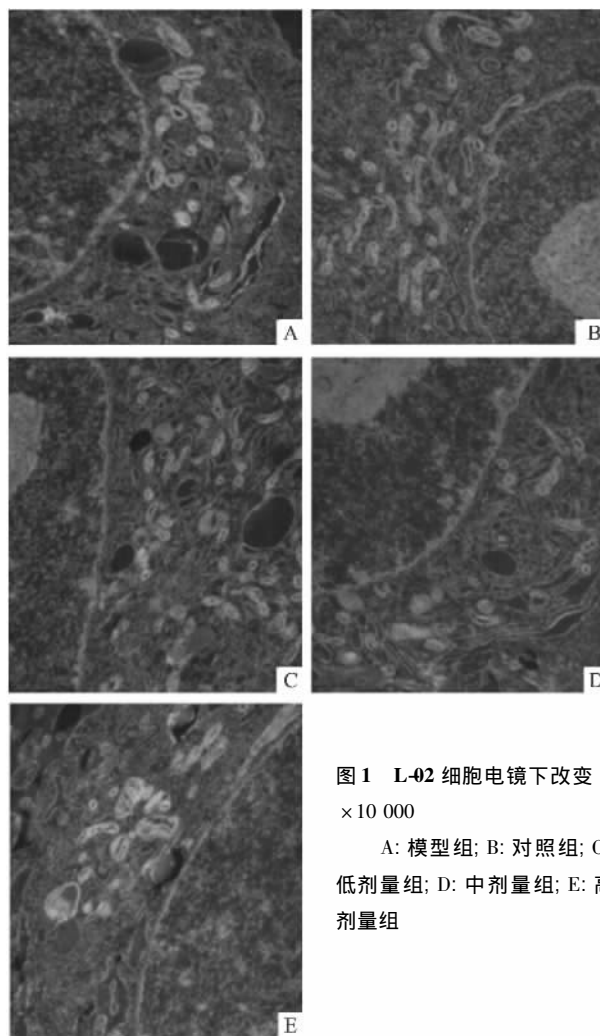


图1 L-02 细胞电镜下改变
 $\times 10\ 000$

A: 模型组; B: 对照组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组

较,高剂量组细胞内 TG 明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);与低剂量组比较,高剂量组细胞内 TG 明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表1 二甲双胍和 L-02 细胞内 TG 的含量($\bar{x} \pm s$)

组别	TG(mol/L)
模型	$0.90 \pm 0.06^{\#}\Delta$
对照	$0.59 \pm 0.07^*\Delta$
低剂量	$0.83 \pm 0.08^{\#}\Delta$
中剂量	$0.79 \pm 0.06^{\#}$
高剂量	$0.68 \pm 0.11^*\Delta$

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与低剂量组比较: $\Delta P < 0.05$; 与中剂量组比较: $P < 0.05$; 与高剂量组比较: $\Delta P < 0.05$

2.3 不同浓度二甲双胍对 L-02 细胞 PGC-1 α mRNA 变化的影响 与对照组比较,模型组 L-02 细胞中 PGC-1 α mRNA 表达量明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,低、中、高剂量组细胞内 PGC-1 α mRNA 表达量明显增多,差异有统

计学意义($P < 0.05$)。与低剂量组比较,高剂量组细胞内 PGC-1 α mRNA 表达量明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 二甲双胍和 PGC-1 α 灰度值($\bar{x} \pm s$)

组别	灰度值(PGC-1 α / β -actin)
模型	$0.72 \pm 0.05^{*\Delta \blacktriangle}$
对照	$1.03 \pm 0.13^*$
低剂量	$0.92 \pm 0.10^{*\blacktriangle}$
中剂量	$1.01 \pm 0.07^*$
高剂量	$1.10 \pm 0.08^{*\Delta}$

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与对照组比较: # $P < 0.05$; 与低剂量组比较: $\Delta P < 0.05$; 与中剂量组比较: $P < 0.05$; 与高剂量组比较: $\blacktriangle P < 0.05$

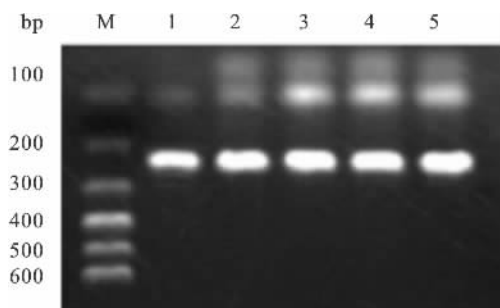


图 2 L-02 细胞 PGC-1 α mRNA 相对表达量

M: DNA Marker 600; 1: 模型组; 2: 对照组; 3: 低剂量组; 4: 中剂量组; 5: 高剂量组

2.4 肝细胞中 PGC-1 α 基因表达水平与 TG 的相关性 L-02 细胞中 PGC-1 α 基因的表达水平与细胞内 TG 的水平呈负相关($r = -0.581$, $P < 0.05$)。

3 讨论

NAFLD 患者经常伴有代谢综合征病症如肥胖、葡萄糖耐量受损、2 型糖尿病、高血脂和高血压等,这些伴随疾病不仅能增加发生心血管疾病的风险还可能进一步加重肝脏的损害。因此,对于 NAFLD 的治疗,关键在于改善与 IR 有关的代谢紊乱。胰岛素增敏药物二甲双胍在 NAFLD 的治疗中,不仅对改善 IR、肝脏血清酶学指标和体重有明确的疗效^[3],而且对肝脏脂肪变性、肝细胞损伤和 NAFLD 活动评分也有一定作用^[4]。而最近一些研究^[5-7]显示二甲双胍虽能改善 IR 等代谢紊乱症状但对肝脏组织学改善不明显,这可能与各研究中二甲双胍剂量、观察时间及评价方法不同等有关。所以对该药的具体疗效、治疗机制及其副作用仍有待研究。

二甲双胍作为一种口服降糖药可促进外周组织

对葡萄糖的利用和减少肝糖的输出。PGC-1 α 作为一种协同刺激因子,可与不同受体及转录因子结合发挥不同生理功能。PGC-1 α 在肝脏中的主要作用为促进肝糖异生及调节肝脏脂肪酸氧化。在肝脏中,PGC-1 α 对 PPAR- α 有协同刺激作用,可增加脂肪酸 β 氧化酶的转录活性。PGC-1 α 还可通过激活肝脏脂肪酸 β 氧化的限速酶肉毒碱棕榈酰基转移酶(CPT)的表达启动脂肪酸 β 氧化。有研究^[8]显示腺苷活化蛋白激酶 α (AMPK α) 活化可通过激活 PPAR α 和 PPAR γ 的复合激活因子 PGC-1 增加小鼠骨骼肌细胞的脂肪酸氧化。

本研究显示,与对照组肝脏细胞比较,油酸诱导的非酒精性脂肪肝细胞模型中 TG 的含量明显增多,而 PGC-1 α mRNA 的表达量明显下降。给予二甲双胍药物干预后,低、中、高剂量组细胞中的 TG 水平明显低于模型组,而 PGC-1 α mRNA 的表达量有所增加,且细胞中 PGC-1 α 基因的表达水平与细胞内 TG 的水平呈负相关,这提示改善 PGC-1 α 的表达可减少肝脏细胞中脂质的堆积。有研究^[9]显示二甲双胍可以增加人类骨骼肌细胞及心衰患者心肌细胞中 PGC-1 α 的表达。在人类的肌小管中,PGC-1 α 的过表达增加了棕榈酸的氧化速率和调节脂质代谢相关基因的 mRNA 表达,并促进了线粒体的生物合成功能^[10]。目前关于人肝脏细胞中 PGC-1 α 的表达水平及二甲双胍干预的体外实验较少,但有研究^[11]显示在成年小鼠的肝脏细胞中二甲双胍可阻止雷帕霉素靶蛋白复合物 2(TORC2)调节的 PGC-1 α 的上调,所以二甲双胍对肝脏细胞 PGC-1 α 表达的影响及具体分子机制还有待进一步研究。

综上所述,PGC-1 α 与脂肪酸氧化、线粒体生物功能和脂代谢紊乱密切相关,研究不同浓度二甲双胍对 PGC-1 α 表达的影响,可进一步明确二甲双胍用于 NAFLD 治疗的分子机制。二甲双胍已被证实为 AMPK 的激活剂,由此可推测二甲双胍可能通过活化细胞内调节因子 AMPK α 从而激动 PGC-1 α 基因的表达,以增加脂酶的活性和提高胰岛素敏感性,在调节肝脏的脂肪代谢功能和改善肝细胞脂肪变性等方面具有显著效果。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会脂肪肝病和酒精性肝病学会. 非酒精性脂肪肝病诊疗指南(2010 年修订版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3): 163-6.

- [2] 杨林辉,陈东风. 油酸诱导培养肝细胞脂肪变性模型的建立[J]. 重庆医学, 2007, 36(8) : 698 – 700.
- [3] Idilman R ,Mizrak D ,Corapcioglu D ,et al. Clinical trial: insulin-sensitizing agents may reduce consequences of insulin resistance in individuals with non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Aliment Pharmacol Ther* ,2008 ,28(2) : 200 – 8.
- [4] Loomba R ,Lutchman G ,Kleiner D E ,et al. Clinical trial: pilot study of metformin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Aliment Pharmacol Ther* ,2009 ,29(2) : 172 – 82.
- [5] Nar A ,Gedik O. The effect of metformin on leptin in obese patients with type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Acta Diabetol* ,2009 ,46(2) : 113 – 8.
- [6] Haukeland J W ,Konopski Z ,Eggesbø H B ,et al. Metformin in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized , controlled trial [J]. *Scand J Gastroenterol* ,2009 ,44(7) : 853 – 60.
- [7] Omer Z ,Cetinkalp S ,Akyildiz M , et al. Efficacy of insulin-sensitizing agents in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol* ,2010 ,22(1) : 18 – 23.
- [8] Lee W J ,Kim M ,Park H S ,et al. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2006 ,340(1) : 291 – 5.
- [9] Suwa M ,Egashira T ,Nakano H , et al. Metformin increases the PGC-1 protein and Aoxidative enzyme activities possibly *via* AMPK phosphorylation in skeletal muscle *in vivo* [J]. *J Appl Physiol* ,2006 ,101(6) : 1685 – 92.
- [10] Nikoli N ,Rhedin M ,Rustan A C , et al. Overexpression of PGC-1 α increases fatty acid oxidative capacity of human skeletal muscle cells [J]. *Biochem Res Int* ,2012 ,2012: 714074.
- [11] Shaw R J ,Lamia K A ,Vasquez D , et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin [J]. *Science* ,2005 ,310(5754) : 1642 – 6.

Effects of metformin on PGC-1 α and lipide expression in nonalcoholic fatty liver cell model

Cheng Jing , Zhang Bao , Guan Shixia , et al

(*Dept of Clinical Nutriology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022*)

Abstract Objective To observe the different concentrations of metformin on the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator-1 α (PGC-1 α) gene expression , and the relationship between lipide accumulation in nonalcoholic fatty liver cell model. **Methods** L-02 cells were treated by 20 μ g/ml oleic acid (oleic acid was solutioned by 0.5% DMSO) for 72 h to induce the nonalcoholic fatty liver cell model. The control group added ordinary 1640 culture medium containing 10% fetal bovine serum. The model group cells were cultured in the medium containing 2.5 , 5 , 7.5 mmol/L concentrations of metformin and continue to cultivate 24 h then collected cells. Use RT-PCR analysis of PGC-1 α mRNA expression , and triglycerides (tissue) enzymatic assay kit to detect changes of triglycerides in L-02 cells. **Results** When the concentration of metformin was 7.5 mmol/L in L-02 cells the triglyceride levels were reduced significantly compared with the model group , the difference was statistically significant ($P < 0.05$) . When the concentration of metformin was 7.5 mmol/L the triglyceride levels was reduced significantly compared with the group containing 2.5 mmol/L metformin , but the expression of PGC-1 α mRNA was increased significantly. These differences were all statistically significant ($P < 0.05$) . When the concentration of metformin was 2.5 , 5 , 7.5 mmol/L with L-02 cells , the expression of PGC-1 α mRNA was increased obviously compared with the model group and the difference was statistically significant ($P < 0.05$) . The expression of PGC-1 α mRNA and the triglyceride levels showed a negative correlation with L-02 cells ($r = -0.581$, $P < 0.05$) . With the increasing of the concentration of metformin in L-02 cells , mitochondria injury was improved in the model group. **Conclusion** The expression of PGC-1 α is reduced in nonalcoholic fatty liver cell model and metformin can improve the expression of PGC-1 α . It shows a negative correlation between the expression of PGC-1 α mRNA and the triglyceride levels , thus the increased expression of PGC-1 α can reduce the accumulation of fat in the liver.

Key words nonalcoholic fatty liver; PGC-1 α ; metformin