

· 论 著 ·

体外诱导的酒精性脂肪肝细胞模型的建立、鉴定及机制探讨*

廖 于¹, 李龙辉², 左国庆^{2△}, 吴海峰¹, 秦观海¹, 宋世卿¹, 袁 英¹, 邱 烈¹, 周天寒¹, 朱照静¹

(1. 重庆医药高等专科学校基础部 400051; 2. 重庆医科大学附属第二医院消化内科 400010)

摘要:目的 建立体外诱导的酒精性脂肪肝细胞模型,初步探讨酒精性脂肪肝发生的机制。方法 采用 MTT 法观察乙醇对人正常肝细胞株 L02 生长的影响,筛选最佳乙醇诱导浓度,全自动生化仪检测细胞内三酰甘油(TG)水平,油红 O 染色法观察细胞内脂滴,透射电镜观察细胞超微结构,免疫细胞化学方法观察 PPAR γ 、SREBP-1、SCAP 的表达。结果 MTT 法筛选出浓度 0.28% 的乙醇作为建立体外诱导的酒精性脂肪肝细胞模型的作用浓度;与 L02 细胞相比,0.28% 乙醇诱导至第 30 代细胞(Ld30 细胞)内 TG 显著增多($P < 0.05$);油红 O 染色发现 Ld30 细胞内大量桔红色颗粒聚积;透射电镜观察超微结构发现胞浆中有许多大小不一的脂滴。Ld30 细胞 PPAR γ 、SREBP-1、SCAP 的 MOD 值和阳性表达指数均显著增高($P < 0.05$)。结论 本研究在体外成功建立酒精性脂肪肝的细胞模型,提示酒精性脂肪肝发生的机制可能与 PPAR γ 、SREBP-1、SCAP 上调有关。

关键词:酒精性脂肪肝;细胞模型;机制

中图分类号:R365.575

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)08-0902-03

Establishment and identification of alcohol induced steatotic hepatocytes model*

LIAO Yu¹, LI Long-hui², ZUO Guo-qing^{2△}, et al.

(1. Department of Fundamental Courses, Chongqing Medical And Pharmaceutical College, Chongqing 400051, China;

2. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To establish and identify the alcohol induced steatotic hepatocytes model, and to explore the mechanism. **Methods** The effect of alcohol on a normal hepatocytes line, L02, was observed using MTT method. The best concentration of alcohol was screened out. The triglyceride (TG) concentration was measured by Automatic Biochemical Tester and Analyzer, the lipid droplets were observed by Oil Red O Method, the ultrastructure of the hepatocytes were observed by Transmission Electron Microscope, and the expression of PPAR γ , SREBP-1 and SCAP was observed by immunocytochemical method. **Results** The 0.28% alcohol was chosen as the best concentration of alcohol for the induction of steatotic hepatocytes. Comparing with normal L02 cells, TG was significantly increased in the Alcohol induced steatotic hepatocytes of passage 30 (Ld30) ($P < 0.05$). Lots of orange particles, which were stained by Oil Red O, were found inside the Ld30 cells. Many lipid droplets with different size were found inside the cytoplasm when observed by TEM. And the MOD value and index of positive cells of the PPAR γ , SREBP-1, SCAP for the Ld30 cells were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** An alcohol induced steatotic hepatocytes model is established successfully. The possible mechanism for the hepatocytes steatosis can be related with the upregulation of PPAR γ , SREBP-1 and SCAP.

Key words: alcohol induced steatotic hepatocytes; cell model; mechanism

为了研究酒精性脂肪肝的发病机制,许多研究者通常都采用建立大鼠酒精性脂肪肝动物模型的方法。但传统的动物模型存在个体差异大、实验条件不易控制、不易观察指标、影响因素多等不利因素,已远远不能满足亚细胞和分子水平上研究的需要。相比较而言,细胞模型能较好地克服个体差异的影响,容易控制实验条件,更能针对性地研究细胞水平上的发病机理。最近,非酒精性脂肪肝的细胞模型已有报道^[1]。本研究采用乙醇长时间作用于在体外培养的人正常肝细胞(L02 株)的方式,模拟酒精性脂肪肝的发病过程,建立酒精性脂肪肝的细胞模型并初步探讨酒精性脂肪肝发生的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 L02 人正常肝细胞由重庆医科大学肝病研究所惠赠,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,美国 GBICO 公司 RPMI-1640 培养基,PPAR γ 、SCAP 羊抗人多克隆抗体,购自 Santa Cruz 公司。SREBP-1 鼠抗人单克隆抗体,购自 Neomarker 公司。SP 试剂盒,购自北京中山生物技术公司。

1.2 正常肝细胞的培养 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液传代培养人正常肝细胞株 L02。

1.3 MTT^[2]实验筛选最佳乙醇诱导浓度

1.3.1 实验分组 实验设试剂对照组(只加 RPMI-1640 培养液)、L02 细胞对照组(只加 L02 细胞悬液)及 5 个实验组(乙醇终浓度分别为 0.28%、0.57%、1.14%、2.27%、4.55%)。接种好细胞后,药物实验组每孔即刻加入乙醇工作液 20 μ L(工作浓度 3.125%、6.25%、12.5%、25%、50%的 20/220 即为终浓度),每组均设 8 个平行孔。

1.3.2 用 MTT 比色法测定细胞活力 结合细胞形态观察,选择亚致死量作为诱导细胞形成脂肪肝的最佳浓度。

1.3.3 按下式计算各种药物浓度下 L02 细胞的活性 抑制率 = $(1 - \frac{\text{实验组平均 A 值}}{\text{L02 细胞对照组平均 A 值}}) \times 100\%$

1.4 酒精性脂肪肝细胞模型的建立 取对数生长期 L02 细胞,以 0.1% 胰蛋白酶溶液消化细胞,离心,制成单细胞悬液,计数,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL。接种 L02 细胞于 20 mL 培养瓶内,设对照组和诱导组。对照组:用 RPMI-1640(含 10% FBS 液)培养基培养;诱导组:用含有诱导浓度乙醇的

* 基金项目:重庆市卫生局医学科研计划资助项目(2009-2-445)。

△ 通讯作者,电话:(023)63832133;Email:cqzgqly@163.com。

RPMI-1640(含 10% FBS 液)培养基培养,培养 3 d 后,分别更换新的 RPMI-1640(含 10% FBS 液)培养基再培养 3 d,之后便以 6 d 为周期进行诱导,传代。在倒置显微镜下观察细胞浆内变化。将 0.28%乙醇诱导至第 30 代细胞命名为 Ld30 细胞。

1.5 模型的鉴定

1.5.1 细胞内三酰甘油(TG)水平的测定 分别取对数生长期的 L02 细胞、诱导后细胞,以 0.1%胰蛋白酶溶液消化细胞,离心,制成单细胞悬液,计数。计数上述各组细胞各 10^6 个,1 500 r/min 离心 5 min,冷 PBS 洗 5 min \times 3 次,参照完全裂解 2×10^5 个细胞需 200 μ L 裂解液这一标准裂解细胞,4 $^{\circ}$ C 剧烈振荡、裂解 30 min,低温离心 30 min,收集上清液用全自动生化分析仪检测。

1.5.2 油红 O 染色法观察细胞内脂滴 取对数生长期 L02 细胞,以 0.1%胰蛋白酶溶液消化细胞,离心,制成单细胞悬液,计数,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL。接种浓度为 5×10^4 个/mL 的 L02 和诱导后细胞于放有盖玻片(预先经泡酸、清洗、高温灭菌)的 24 孔板内,每孔加 1 mL 细胞悬液。细胞培养 72 h 后,将 24 孔板置于倒置显微镜下观察。将倒置显微镜观察后的玻片从 24 孔板中取出,PBS 洗 5 min \times 3 次,4%多聚甲醛固定 20 min。PBS 液洗细胞 2 次,异丙醇漂洗数秒,油红 O 染色 10 min,蒸馏水终止染色,光镜下观察,拍照。

1.5.3 透射电镜观察细胞超微结构 取对数生长期 L02 和诱导后细胞,以 0.1%胰蛋白酶溶液消化细胞,离心,制成单细胞悬液,计数,调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL。分别取 20 mL L02 和诱导后细胞接种于培养瓶中,培养 72 h,0.1%胰蛋白酶消化细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,4 $^{\circ}$ C 冷 PBS 重悬细胞后,移至 EP 管,以 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,重复 3 次。4 $^{\circ}$ C 冷戊二醛溶液固定细胞团块 2 h。弃固定液,冷 PBS 轻洗 2 次,保存于 4 $^{\circ}$ C 冷 PBS 液中。标本送重庆医科大学电镜室检测并照相。

1.6 免疫细胞化学观察 PPAR γ 、SREBP-1、SCAP 表达 取浓度为 5×10^4 个/mL 的对数生长期细胞接种于放有盖玻片的 24 孔板,培养 72 h 后,取出盖玻片 PBS 液冲洗 5 min \times 3 次,95%乙醇固定 45 min,按 SP 试剂盒说明书操作。采用 Morphology 彩色显微图像分析系统对表达结果进行分析,光镜下 100 倍放大,随机选择 5 个视野,检测阳性染色平均光密度值(mean optical density,MOD),阳性表达指数(=MOD \times 阳性细胞百分比 \times 100)。

1.7 统计学方法 用 SPSS10.0 for Windows 统计软件处理。检测数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 检测结果 不同浓度的乙醇作用于人正常肝细胞株 L02 72 h 后的 MTT 检测结果,见表 1。

表 1 不同浓度的乙醇作用 L02 细胞 72 h 的 MTT 检测结果

组别	<i>n</i>	A 值	抑制率(%)
对照组	8	2.156 \pm 0.393	—
0.28%组	8	2.022 \pm 0.148	6.2
0.57%组	8	2.001 \pm 0.383	7.2
1.14%组	8	1.916 \pm 0.349	11.1
2.27%组	8	1.775 \pm 0.551	17.7
4.55%组	8	1.454 \pm 0.014	32.5

从表 1 可知,随着乙醇作用浓度的增加,细胞抑制率也随之升高;抑制率越高,则细胞活力越低。由于 1.14%、2.27%、4.55%组的细胞活力均小于 90%,不考虑选为诱导浓度。0.28%组与 0.57%组相比,选取细胞活力更高的 0.28%乙醇浓度作为建立酒精性脂肪肝细胞模型的诱导浓度。

2.2 细胞内 TG 水平测定 见表 2。由表 2 可知,与 L02 细胞相比,Ld30 细胞内 TG 显著增多($P<0.05$)。

表 2 细胞内 TG 水平

项目	L02 组	Ld30 组
TG(mmol/L)	0.11 \pm 0.03	1.84 \pm 0.16
<i>P</i>	—	<0.05

2.3 油红 O 染色^[3]结果 油红 O 染色后在光镜下观察,对照组 L02 细胞核仁清楚可见,细胞浆内有少量未着色颗粒样物质;诱导后的 Ld30 细胞胞核居中,因未着色而呈透亮状态,胞浆中大量被染成橘红色的颗粒,分布在靠近细胞膜的区域,使整个细胞形态类似“印戒”(插图 I 图 1、2)。

2.4 透射电镜结果 透射电镜下观察,对照组 L02 细胞核大而圆,核内染色质丰富,核仁明显;胞浆内可见线粒体呈圆形或长圆形,内质网丰富,未见明显脂滴。Ld30 细胞核大畸形,胞浆凝聚;胞浆内线粒体肿大甚至破裂,嵴减少、变短,内质网扩张成囊泡样,清晰可见数目不一、大小不等、电子密度中等的均质性脂滴弥漫散在分布(图 3、4)。

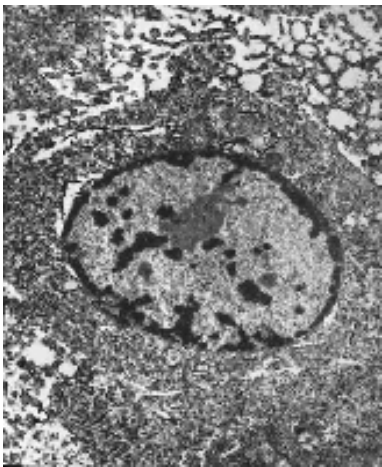


图 3 对照组 L02 细胞(透射电镜 $\times 6\ 000$)

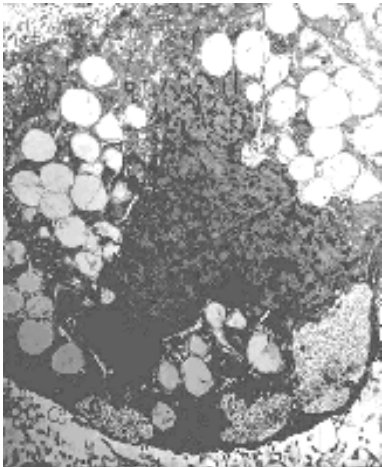


图 4 Ld30 细胞(透射电镜 $\times 6\ 000$)

2.5 免疫细胞化学结果 见表 3、4。

表 3 PPAR γ 、SREBP-1、SCAP 表达的平均光密度值

组别	PPAR γ	SREBP-1	SCAP
L02 细胞	0.060 \pm 0.005	0.043 \pm 0.006	0.038 \pm 0.002
Ld30 细胞	0.412 \pm 0.151	0.326 \pm 0.020	0.305 \pm 0.080
P	<0.05	<0.05	<0.05

表 4 PPAR γ 、SREBP-1、SCAP 阳性表达指数

组别	PPAR γ	SREBP-1	SCAP
L02 细胞	1.49 \pm 0.22	2.26 \pm 0.35	1.75 \pm 0.15
Ld30 细胞	32.02 \pm 3.45	28.86 \pm 2.10	20.45 \pm 2.80
P	<0.05	<0.05	<0.05

由表 3、4 可见,与 L02 细胞相比,Ld30 细胞 PPAR γ 、SREBP-1、SCAP 的 MOD 值和阳性表达指数均显著增高($P<0.05$)。

3 讨 论

长期过度饮酒后引发乙醇性肝病,其发病率随社会经济的发展呈上升趋势,与其相关的研究也受到广泛关注。Tsukamoto 等^[4]建立的胃瘘管灌注含乙醇液体饲料大鼠模型再现了与人乙醇性肝病类似的肝脂肪变性、炎症、坏死和纤维化等病理变化,因此,该动物模型受到普遍推崇。但是,动物模型存在个体差异大、影响因素多、实验条件不易控制、不易观察指标等不利因素;并且胃瘘管灌注模型需要专用的价格较贵的灌注装置。与之相比,细胞模型不存在个体差异、能较好控制实验条件,张红锋等^[5]曾用乙醇和软脂酸作用于 L02 细胞 7 d,观察它们对 L02 细胞的急性损伤作用。本研究成功建立体外诱导的酒精性脂肪肝细胞模型,为研究其发生机制提供新的方法和途径。

本研究在建立酒精性脂肪肝的细胞模型过程中,采用了 MTT 法来筛选乙醇的诱导浓度。发现 0.28%、0.57%、1.14%、2.27%、4.55%各工作浓度乙醇对细胞生长都有一定的抑制作用,并与浓度呈正相关。为了筛选一个仅影响细胞代谢又不致死的作用浓度,故选取抑制率最低的 0.28%作为诱导浓度。0.28%浓度的乙醇作用 L02 细胞 72 h 后,细胞存活率约 90%,进一步证明选取 72 h 作为观察时间是可行的、适合的。在倒置显微镜下观察发现 L02 细胞经乙醇诱导后,自第 5 代起细胞浆内开始出现颗粒,胞浆透亮度下降。采用特殊的油红 O 染色进行观察,油红 O 主要用于脂肪染色,可将中性脂肪染成桔红色或桔黄色。油红 O 染色后,普通光镜下观察到胞浆可见桔红色颗粒,提示有脂滴滞留在细胞内;油红 O 染色发现 Ld30 细胞(继续诱导至第 30 代的细胞)内有大量桔红色颗粒聚积。透射电镜观察发现胞浆中的确有许多大小不一的脂滴。上述现象均提示 L02 经 0.28%浓度乙醇长期诱导后,细胞发生了脂肪变。进一步检测细胞内 TG 水平发现 Ld30 细胞内 TG 显著增加,更加明确了 L02 细胞脂肪变的事实。无论是普通光镜下的特殊染色观察、透射电镜观察的定性,还是测量细胞内 TG 水平的定量,都证实了人正常肝细胞株 L02 细胞经 0.28%浓度的乙醇长期作用后发生脂肪变,即转变成酒精性脂肪肝细胞这一事实。至此,酒精性脂肪肝的细胞模型成功建立;加之诱导作用 7 个多月后细胞还能继续诱导传代,也证明模型是稳定的。

PPARs 是一类配体依赖序列特异的核转录因子,为核受体超家族成员^[6]。包括 3 种亚型:PPAR α 、PPAR β (或称 PPAR δ)和 PPAR γ ,它们的配体各异,包括天然和合成 2 大类。PPARs 被配体激活后,与视黄醇类受体(retinoid X receptor, RXR)结合形成异源二聚体,再与位于靶基因启动子中特定的 DNA 序列即过氧化物酶体增殖物反应元件(peroxisome proliferator response element, PPRE)结合,驱动靶基因的转录。最近有研究结果显示:PPAR γ 不仅与脂肪细胞的分化与成熟、胰岛素抵抗和血糖调节有关,还与肝脏炎症反应的发生与调控有关^[7]。SREBPs 是属于核转录因子家族的一类位于内质网上的膜连接蛋白,分为 3 型:SREBP-1a、SREBP-1c、SREBP-2。细胞内 SREBPs 在内质网合成后与 SREBP 裂解激活蛋白(SREBP cleavage-activating protein, SCAP)结合成复合物。当细胞内胆固醇浓度下降时,SCAP 感知到此信息,然后护送 SREBPs 到高尔基体,经位点 1 蛋白酶(S1P)和位点 2 蛋白酶(S2P)依次裂解,释放出其氨基末端片段,该片段进入胞核与靶基因启动因子的激素反应元件(sterol response element, SRE)结合,调节相关基因的表达^[8]。本研究发现与 L02 细胞相比,Ld30 细胞 PPAR γ 、SREBP-1、SCAP 的 MOD 值和阳性表达指数均有统计学意义($P<0.05$),表明乙醇诱导作用使 PPAR γ 、SREBP-1、SCAP 表达显著增强,提示酒精性脂肪肝发生的可能机制是通过调控 PPAR γ 、SREBP-1、SCAP 表达,促进细胞内脂肪生成。本研究为下一步的药物干预酒精性脂肪肝的实验研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 陈东风,王春华.体外非酒精性脂肪肝细胞模型线粒体通透转换孔的变化及其与细胞凋亡的关系[J].中华肝病杂志,2007,15(11):837.
- [2] 汤为学,骆云鹏,王瑞雪.人实体瘤抗癌药物敏感试验 MTT 法的建立[J].重庆医科大学学报,1992,17(2):103.
- [3] 张哲,陈辉.实用病理组织染色技术[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1988:128.
- [4] Tsukamoto H,Reiderberger RD,French SW,et al. Long-term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat[J]. Am. J Physiol,1984,247(3):595.
- [5] 张红锋,杨慧萍,王耀发.乙醇和软脂酸作用于脂肪肝离体细胞模型[J].华东师范大学学报,2002,4(5):88.
- [6] Martin G,Poirier H,Hennuyer N,et al. Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective retinoids suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target[J]. J Biol Chem,2000,275(17):12612.
- [7] Kon K,Ikejima K,Hirose M,et al. Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride[J]. Biochem Biophys Res Commun,2002,291(1):55.
- [8] 童国玉,李果.类固醇调节元件结合蛋白 1c 的研究进展[J].国外医学内分泌学分册,2002,22(5):328.