

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.026

采用 Changliver 细胞制备肝细胞脂肪变性模型的方法探索*

阿卜力克木·奥布力¹,程磊²,黄凤玲²,闫冬¹,迪丽阿热姆·尼加提¹,帕尔哈提·克热木¹,魏媛媛^{3△}
(新疆医科大学:1.药理学教研室;2.临床专业 2009 级本科生;3.生理学教研室,乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 探索油酸(OA)诱导建立人正常肝细胞 Changliver 脂肪变性的离体细胞模型的实验条件。方法 选用不同浓度油酸作用不同时间点诱导 Changliver 细胞,并用四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法检测细胞活性,油红 O 染色观察细胞内脂滴数量、甘油-3-磷酸氧化酶法检测细胞内三酰甘油(TG)含量。结果 采用 0.2 mmol/L OA 诱导 24 h 能建立较好的 Changliver 细胞脂肪变性模型,模型组细胞内 TG 水平为 (379.98±23.19) mg/g,空白组细胞内 TG 水平为 (185.03±12.68) mg/g,两组比较差异有统计意义($P<0.01$)。结论 0.2 mmol/L OA 油酸诱导的 Changliver 细胞 24 h 可建立比较稳定的脂肪变性模型。该模型为非酒精性脂肪性肝病的研究提供可靠的新途径。

关键词:脂肪肝;模型;油酸;Changliver 细胞

中图分类号:R695

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)33-4494-04

To explore the method of establishing hepatocellular steatosis models by Changliver cell*

Ablikim·ubul¹,Cheng Lei²,Huang Fengling²,Yan Dong¹,Dliarem·nijat¹,Parhat·kerem¹,Wei Yuanyuan^{3△}
(1. Department of Pharmacology;2. Clinical Major, Grade 2009;3. Department of Physiology;
Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

Abstract: Objective To explore the experimental condition for hepatocellular steatosis models of Changliver cell induced by oleic acid (Ileic acid, OA). **Methods** Changliver cells were induced by different concentration of oleic acid for different periods. MTT was used to detect hepatic cell activity, oil red 0 staining was used to observe intracellular lipid droplets accumulation, glycerin 3 phosphate oxidase method was applied to detect the contents of triglyceride (TG) in the Changliver cell. **Results** Hepatocellular steatosis models of Changliver cell can be established successfully by 0.2 mmol/L OA inducing for 24 hours. TG content in model cells was (379.98±23.19)mg/g, however, it was (185.03±12.68)mg/g in control cells, the difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** The proper condition for establishing hepatocellular steatosis models is 0.2 mmol/L OA inducing Changliver cells for 24 h. This model is the reliable choice for nonalcoholic fatty liver disease research.

Key words: fatty liver; model; oleic acid; Changliver cells

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率逐年增加,在较短的时间内可发展为不可逆的肝损害,例如:肝纤维化可达 25%,肝硬化可达 1.5%~8.0%,现已成为影响健康的重大隐患^[1]。目前研究 NAFLD 的体外细胞模型主要采用油酸(oleic acid, OA)诱导肝细胞造成脂肪沉积,多选用肝癌细胞 HepG2 作为建模对象,因其具有肿瘤学特性,易于培养、传代及反复冻存^[2-5]。采用人正常细胞建立脂肪变性模型的较少,利用 Changliver 肝细胞建模尚未见报道。由于 NAFLD 的肝细胞脂肪变性通常发生在正常细胞而非肿瘤细胞上,因此探索正常肝细胞株的建模方法更具有实用性。本研究选择 Changliver 张氏肝细胞株,利用 OA 诱导,明确其建模所需的具体浓度,作用时间等实验条件。为研究 NAFLD 提供一条新途径。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂 Changliver 张氏肝细胞株购自中国科学院上海细胞所,胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司、DMEM 细胞培养基购自美国 Gibco 公司、三酰甘油(TG)测定试剂盒购自英科新创生物工程公司,胰酶、油酸、噻唑蓝(MTT)粉、蛋白定量试剂盒、油红 O 均购自美国 Sigma 公司。全自动酶联免疫检测仪购自美国 Bio-Rad 公司,倒置相差免疫荧光显微镜购

自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Changliver 张氏肝细胞株置于 10% FBS, DMEM 完全培养基 4 mL, 5% CO₂ 孵箱中培养。当细胞达 80%~90% 密度时传代, 24~48 h 传 1 次,按细胞的多少约 1:2 或 1:3 传代于新的细胞培养瓶内。细胞生长稳定良好即可使用。将 Changliver 细胞以 10⁴ 个/孔接种于 96 孔培养板中,每孔内加入含细胞培养基 200 μL,在 37℃, 5% CO₂ 孵箱孵育 24 h。

1.2.2 OA 造模浓度的确立 分别用 DMSO 和 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0 mmol/L 不同浓度 OA 干预后(每组样本数为 6),予油红 O 染色,分别于 24、48 h 和 72 h 3 个时间点进行镜下观察,依据 MTT 结果,脂变率及镜下细胞脂变程度确定 OA 作用的最佳浓度和作用时间并作为模型组的 OA 浓度。

1.2.3 细胞形态学观察 每日用倒置显微镜观察培养细胞的生长状况及形态变化。组织学中当肝细胞内脂滴形成超过 5% 可定义为脂肪肝^[6]。

1.2.4 四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法检测细胞活力 将 Changliver 细胞接种于 96 孔培养板,置于 10% FBS RPMI-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160546);大学生创新性实验计划(CX2012030)。 作者简介:阿卜力克木·奥布力(1985-),在读研究生,主要从事药理学研究。 △ 通讯作者, Tel: (86991)4362449; E-mail: wei8923270@sina.com。

1640 完全培养基 5 mL。当细胞达 80%~90% 密度时传代, 24~48 h 传 1 次, 按细胞的多少约 1:2 或 1:3 传代于新的细胞培养瓶内。细胞进入指数生长期后将 Changliver 细胞以 10^4 个/孔接种于 96 孔培养板中, 每孔内加入含细胞培养基 200 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 孵箱孵育 24 h。观察细胞贴壁情况。分别设对照组和各浓度 OA 组(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0 mmol/L), 每组设 6 个复孔。各组细胞分别于作用 24、48、72 h 时, 于每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 继续孵育 4 h 后终止培养。吸去孔内培养液。每孔加入二甲亚砜(DMSO)溶液 100 μ L, 置于微板振荡器震荡 10 min, 以使结晶物充分溶解。全自动酶标仪 490 nm 处测量各孔的吸光度值(A 值)。记录结果, 并以时间为横坐标, A 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.5 细胞各时间点脂变率的计算 光镜下观察油红 O 染色的细胞片, 并对脂肪变性细胞计数。结果判定标准: 发生脂肪变性的细胞胞质内出现橘红色脂滴; 记录标准: 随机选取 6 个高倍视野, 每个视野计数 100 个细胞, 计算其平均脂变率。

1.2.6 细胞内 TG 的检测 将 Changliver 细胞接种于 6 孔板, 按上述分组予以处理, 24 h 后收集细胞, 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次, 加入 RIPA 细胞裂解液震荡, 冰上放置 30 min, 待细胞充分裂解, 4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min 离心 10 min 并取上清液。采用 BCA 法检测蛋白含量。以氧化酶法检测 TG 的含量, 于波长 500~550 nm 处, 空白孔调零, 测 A 值, 绘制标准曲线并计算 TG 浓度。计算结果表示为每克细胞总蛋白中所含的 TG 量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数的比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察 倒置显微镜观察可见对照组细胞排列紧密, 边缘清晰。经 OA 诱导后, Changliver 细胞明显生长旺盛, 边缘尚清晰。且较多细胞变圆、核大, 部分细胞核被挤到一侧, 类似印戒样改变。

2.2 MTT 法检测细胞活力 OA 浓度 0.2 mmol/L 时, Changliver 细胞的增殖几乎不受抑制, 细胞增殖程度跟空白组接近, 随着 OA 浓度的升高和时间的增长, 其细胞增殖受到不同程度的抑制, 见表 1、图 1。

表 1 不同浓度 OA 在不同时间点对 Changliver 细胞活力的影响 (A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
DMSO 组	6	0.605 \pm 0.037	0.630 \pm 0.039	0.645 \pm 0.038
对照组	6	0.619 \pm 0.046	0.627 \pm 0.042	0.662 \pm 0.018
0.2 mmol/L OA 组	6	0.610 \pm 0.013	0.613 \pm 0.018	0.616 \pm 0.019
0.4 mmol/L OA 组	6	0.619 \pm 0.003	0.524 \pm 0.006	0.426 \pm 0.006
0.6 mmol/L OA 组	6	0.604 \pm 0.014	0.521 \pm 0.009	0.414 \pm 0.013
0.8 mmol/L OA 组	6	0.551 \pm 0.054	0.490 \pm 0.027	0.357 \pm 0.052
1.0 mmol/L OA 组	6	0.550 \pm 0.013	0.484 \pm 0.013	0.379 \pm 0.021
2.0 mmol/L OA 组	6	0.556 \pm 0.041	0.424 \pm 0.049	0.322 \pm 0.050
3.0 mmol/L OA 组	6	0.516 \pm 0.018	0.345 \pm 0.046	0.340 \pm 0.038
4.0 mmol/L OA 组	6	0.485 \pm 0.059	0.342 \pm 0.042	0.309 \pm 0.023

2.3 油红 O 染色观察结果 油红 O 染色结果显示, 对照组细胞核呈紫蓝色, 边缘清晰, 细胞内未见明显橘红色脂滴(图 2),

OA 浓度为 0.2 mmol/L 和 0.4 mmol/L 时, 油红 O 染色见细胞内充满大小不等的橘红色脂滴, 有些甚至融合(图 3、4)。OA 浓度 0.6、0.8、1.0、2.0 mmol/L 时, 随着浓度的升高, 细胞内脂滴增多, 同时 OA 对细胞的毒性也增加, 细胞边缘不清晰, 形状不规则, 数量减少(图 9、10)。Changliver 细胞各浓度和时间点脂变率的比较, 见表 2。根据结果确定 Changliver 细胞建立脂肪变性条件为 0.2 mmol/L OA 培养细胞 24 h。

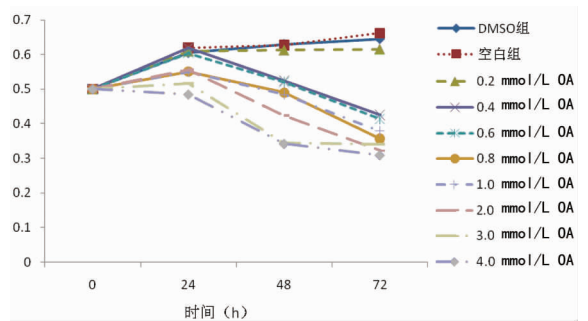


图 1 不同 OA 浓度下 Changliver 细胞生长曲线

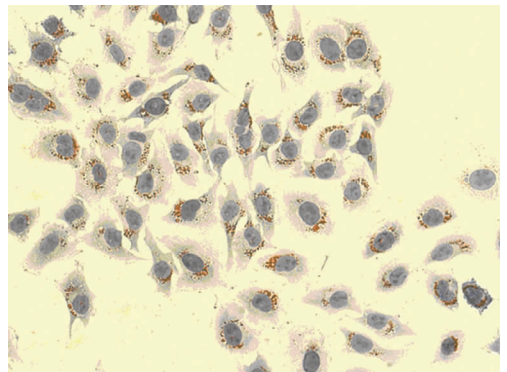


图 2 对照组油红 O 染色($\times 200$)

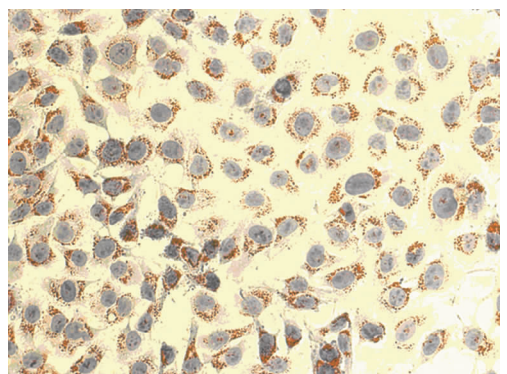


图 3 0.2 mmol/L OA 组油红 O 染色($\times 200$)

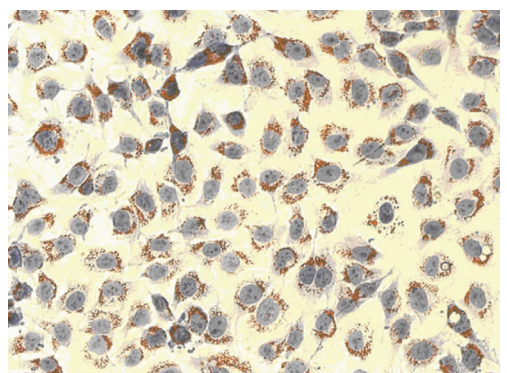


图 4 0.4 mmol/L OA 组油红 O 染色($\times 200$)

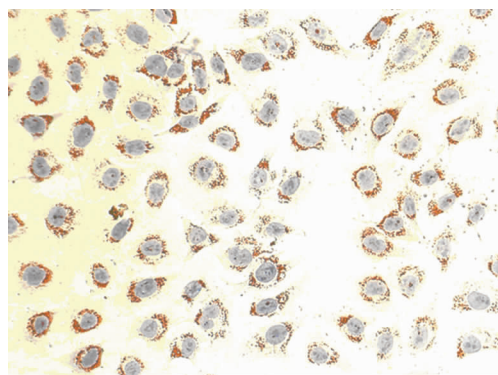


图 5 0.6 mmol/L OA 组油红 O 染色(×200)

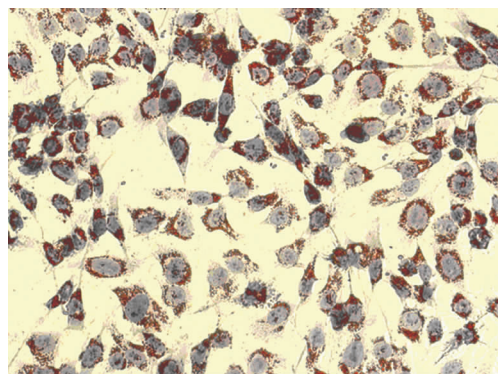


图 6 0.8 mmol/L OA 组油红 O 染色(×200)

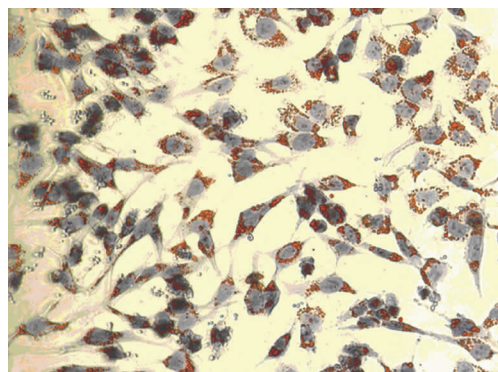


图 7 1.0 mmol/L OA 组油红 O 染色(×200)

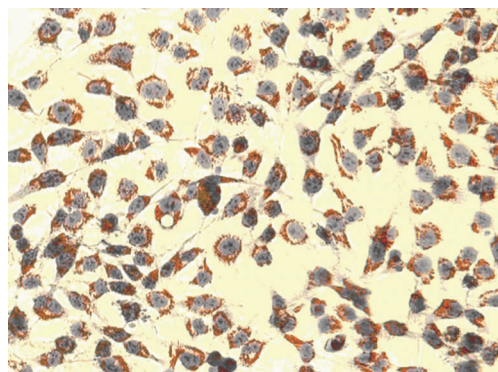


图 8 2.0 mmol/L OA 组油红 O 染色(×200)

表 2 各浓度 OA 作用下 Changliver 细胞不同时间点的脂变率($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
0.2 mmol/L OA 组	6	76.34±3.38	78.54±3.86	80.03±4.19
0.4 mmol/L OA 组	6	79.65±3.76	71.24±3.65	67.26±3.76

续表 2 各浓度 OA 作用下 Changliver 细胞不同时间点的脂变率($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
0.6 mmol/L OA 组	6	80.36±4.41	58.41±2.89	51.14±2.53
0.8 mmol/L OA 组	6	64.82±5.46	59.30±2.73	53.57±3.02
1.0 mmol/L OA 组	6	55.04±3.09	46.24±2.13	42.79±2.21
2.0 mmol/L OA 组	6	55.68±4.10	42.64±2.79	40.25±3.50
3.0 mmol/L OA 组	6	51.66±3.81	34.45±2.46	30.40±2.38
4.0 mmol/L OA 组	6	41.53±2.59	29.42±3.02	22.49±2.63

2.4 Changliver 细胞内 TG 含量的变化 Changliver 细胞模型组与对照组比较, TG 含量显著增高 ($P < 0.01$); 符合 NAFLD 的细胞模型要求。

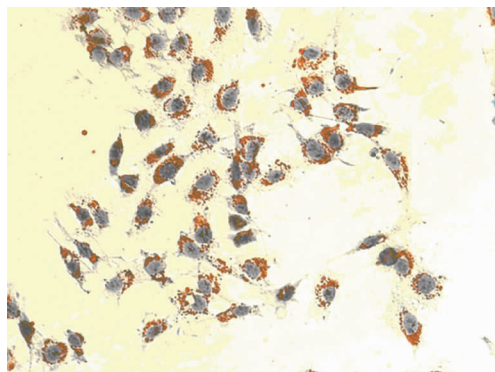


图 9 3.0 mmol/L OA 组油红 O 染色(×200)

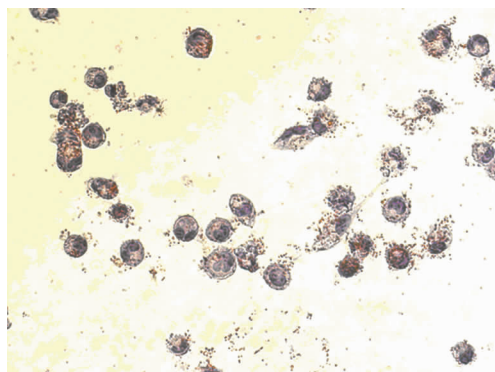


图 10 4.0 mmol/L OA 组油红 O 染色(×200)

表 3 石榴花多酚对 OA 诱导脂肪变形细胞内 TG 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TG(mg/g)
对照组	6	185.03±12.68
0.2 mmol/L OA 组	6	379.98±23.19 [#]

[#]: $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨 论

目前,制备肝细胞脂肪变模型的常用细胞是肝癌细胞 HepG2 和正常肝细胞 L02。本研究选用人正常肝细胞株 Changliver 细胞进行脂肪肝模型的制备,因其分化特性与正常肝细胞相似,具有 L02 细胞所没有的无限传代的特点,且培养方法与原代细胞相比相对简单,但不属于肿瘤细胞。因此,实验结果更接近于由正常肝细胞发展而来的非酒精性脂肪肝在体模型的特点,是体外研究 NAFLD 较为理想的细胞模型。但目前尚无关于 Changliver 细胞脂肪变建模的报道。

OA 是一种单不饱和脂肪酸,主要存在于植物油中,又被

称作十八(碳)烯酸。研究表明,肝细胞可摄取在链长为 C12~C18 的长链脂肪酸,将其酯化成中性脂滴后,储存于肝细胞内。依据此原理 Yasuyuki 等^[7]首次应用 OA 诱导 HepG2 细胞 24 h 后,成功造成人源性肝细胞株的脂肪变性模型。杨林辉等^[8]应用低浓度 OA 诱导 L02 细胞 72 h,建立肝细胞脂肪变性模型。

本实验选用不同浓度 OA 诱导 Changliver 细胞,在不同的时间点通过 MTT 检测和油红 O 染色明确建模所需的最佳诱导浓度和时间,依据 MTT 检测、油红 O 染色和 TG 检测验证,0.2 mmol/L 浓度 OA 作用细胞 24 h,细胞脂变明显。随着诱导时间的延长,超过 48 h 后,脂滴不再增加反而减少。当 OA \geq 0.2 mmol/L 时,脂变虽然有所增加,但细胞受损程度也逐渐增加,与杨林辉等^[8]在制备 HepG2 脂肪肝细胞造模中的现象相似。提示 OA 对细胞有一定的毒性,有研究认为当肝细胞内不饱和脂肪酸蓄积,可通过细胞色素 P4502E1 酶途径引起脂质过氧化,进一步促进细胞凋亡从而产生细胞毒性^[9]。Cui 等^[10]发现经 OA 诱导后的肝细胞中超氧化物酶-1(SOD-1)含量明显减少,这种自由基清除酶可以在脂质过氧化过程中保护细胞膜免受自由基的攻击。因此 OA 的细胞毒性与脂质过氧化及细胞的抗氧化能力降低有关。

综上所述,本实验造模方法所需时间较短,且细胞来源方便,性质稳定,是一种研究 NAFLD 的理想方法。

参考文献:

- [1] Kobashi-margain RA, Gutierrez-grobe Y, Ponciano-rodriguez G, et al. Prevalence of type 2 diabetes mellitus and chronic liver disease a retrospective study of the association of two increasingly common diseases in Mexico [J]. *Ann Hepatol*, 2010, 9(3): 282-288.
- [2] Feldstein AE, Werneburg NW. Free fatty acids promote

hepatic lipotoxicity by stimulating TNF alpha expression via alysosomal pathway [J]. *Hepatology*, 2004, 40(1): 185-194.

- [3] 吕业春,刘翼翔,吴薇,等. 蓝莓多酚对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪累积的干预作用[J]. *食品科学*, 2011, 32(17): 308-312.
- [4] Day CP, James OF. Steatohepatitis: atale of two "hits" [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842-845.
- [5] Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis[J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 165: 106-116.
- [6] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Nonalcoholic steatoheptitis clinical research network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2005, 41(6): 1313-1321.
- [7] Okamoto Y, Tanaka S, Haga Y. Enhanced GLUT2 gene expression in all oleic acid-induced in vitro fatty liver model [J]. *Hepatol Res*, 2002, 23(2): 138-144.
- [8] 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.
- [9] Sung M, Kim I, Park M, et al. Differential effects of dietary fatty acids on the regulation of CYP2E1 and protein kinase C in human hepatoma HepG2 cells [J]. *J Med Food*, 2004, 7(2): 197-203.
- [10] Cui W, Chen SL, Hu KQ. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells [J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2(1): 95-104.

(收稿日期:2014-05-20 修回日期:2014-07-25)

(上接第 4693 页)

- [4] 胡镇球,夏宗勤. 免疫放射分析剂量效应曲线的质量作用模型及其拟合[J]. *中华核医学杂志*, 1992, 12(4): 226-228.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-A Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices, approved guideline [S]. Wayne, PA: NCCLS, 1999.
- [6] 冯仁丰. 分析灵敏度(检测限)[J]. *上海医学检验杂志*, 2002, 17(3): 133-136.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP6-A Evaluation of the Linearity of Quantitative measurement Procedures; A Statistical Approach, Proposed Guideline [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2003.
- [8] 国家食品药品监督管理局. YY/T 1175-2010 中华人民共和国医药行业标准——肿瘤标志物定量测定试剂(盒)(化学发光免疫分析法)[S]. 北京:中国标准出版社, 2012.
- [9] 徐伟文. 体外诊断试剂研制常用技术指标之分析性能评估[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2(2): 140-144.
- [10] 董劲春. 过敏原特异性 IgE 抗体检测试剂盒的临床研究指南[J]. *标记免疫分析与临床*, 2011, 18(3): 213-216.

- [11] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP7-A2 Interference testing in clinical chemistry, approved guideline-second edition[S]. 2nd. Wayne, PA: NCCLS, 2005.
- [12] National Committee for Clinical Laboratory Standards. C28-A How to Define and Determine Reference Intervals in The Clinical Laboratory, Approved Guideline [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2000.
- [13] 中华人民共和国卫生部. WS/T 402-2012 中华人民共和国卫生行业标准——临床实验室检验项目参考区间的制定[S]. 北京:中国标准出版社, 2013.
- [14] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples, approved guideline[S]. 2nd. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
- [15] Gosling JP. A decade of development in immunoassay methodology[J]. *Clin Chem*, 1990, 36(8): 1408-1427.
- [16] Soini E, Hemmilä I. Fluoroimmunoassay: present status and key problems[J]. *Clin Chem*, 1979, 25(3): 353-361.

(收稿日期:2014-06-25 修回日期:2014-08-10)