

载脂蛋白 AI 和 B 在脂肪肝中的调节作用

高颖 (河北省正定县农牧产品检测检验中心, 河北正定 050800)

摘要 为研究载脂蛋白 AI (apoAI) 和载脂蛋白 B (apoB) 在脂肪肝中的调节作用, 采用原代肝细胞体外培养来培养大鼠肝细胞。正常贴壁培养的肝细胞分别用 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L 的 DL-乙硫氨酸处理, 在 24、48 h 时测定对照组及处理组细胞裂解液中 apoAI、apoB、低密度脂蛋白 (LDL)、高密度脂蛋白 (HDL) 的含量。结果表明, 肝脏极低密度脂蛋白 (VLDL) 的合成限速关键物质是 apoB, 而 VLDL 又对甘油三酯 (TG) 起主要输出作用。apoB 的降低可能是肝脏脂肪变性发展的重要因素, 因此确立 apoB 作为脂肪性肝炎的预测指标。

关键词 细胞培养; 脂肪肝; 载脂蛋白; 脂蛋白

中图分类号 S852.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)12-0086-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.12.024



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Regulating Function of Apolipoprotein AI and B in Fatty Liver

GAO Ying (Agricultural and Livestock Products Analysis Center in Zhengding County, Zhengding, Hebei 050800)

Abstract In order to investigate regulating metabolism of apoAI, apoB on fatty liver, rat hepatocytes were cultured by the method of primary cultured hepatocytes *in vitro* culture. The normal adhered hepatocytes were treated with 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mmol/L DL-ethionine and the concentration of apoAI, apoB, LDL, HDL in cell lysate for 24 and 48 hours between treating respectively were measured. The results showed that VLDL was a major terminal route of lipoprotein B in the liver, and composition of apoB was the compositive rate-limiting step in VLDL. The significant factor of liver fatty degeneration incriminated apoprotein B degrading, thus apoB was established as a preindex on nonalcoholic steato-hepatitis.

Key words Hepatocyte culture; Fatty liver; Apoprotein; Lipoprotein

载脂蛋白、细胞膜脂蛋白受体、脂代谢酶是介入脂蛋白代谢过程的主要因素, 这是一个复杂的相关联的动态过程。载脂蛋白是血浆脂蛋白的主要成分, 而 apoB 参与低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的识别, 是构成其的主要蛋白质。LDL 通过 apoB 与 LDLR 结合进入细胞内, 抑制内源性胆固醇的合成并降低 LDLR 数目, 对胆固醇代谢起着自我反馈的作用^[1-2]。因此, 载脂蛋白对血浆脂蛋白的代谢效率起控制性作用。笔者通过体外培养肝细胞、添加药物、生化指标测定等方法来检测肝细胞内载脂蛋白和脂蛋白的含量变化, 分析载脂蛋白对调节脂蛋白、甘油三酯含量的作用, 从新的角度展开载脂蛋白在体内对脂代谢相互作用的研究, 以期对药物研发提供新的实验手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物。SD 大鼠, 雄性, 100~150 g, 清洁级, 健康, 由河北省实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂。根据参考文献^[3-5]配制预灌流液、细胞洗液, 培养基, 预热至 37 °C, 备用。载脂蛋白 AI 试剂盒、载脂蛋白 B 试剂盒、直接高密度脂蛋白试剂盒、直接低密度脂蛋白试剂盒, 置于室温下备用。

1.1.3 主要仪器。二氧化碳恒温培养箱, 为日本 SANYO 公司产品; 超净工作台, 为德国 Heraeus 公司产品; 倒置相差显微镜成像系统, 为 OLYMPUS 公司产品; 24 孔细胞培养板, 为 NUNC 公司产品; A-6 型半自动生化分析仪, 为北京松上技术有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 原代肝细胞的分离与培养。取成年 SD 大鼠, 速眠新麻醉, 采用二步灌流法获取肝细胞^[6-10]。用 200 目尼龙网布过滤, 收集滤液, 以 800 r/min 离心 3 min, 去上清液, 将肝细胞加入培养基中重新悬浮, 用移液管吹打几次, 混匀, 再次离心, 重复 2 次。计数板染色, 观察细胞总数和细胞活力, 24 孔板铺入细胞, 二氧化碳恒温培养箱中培养 24 h。

1.2.2 DL-乙硫氨酸处理大鼠肝细胞。待细胞附着贴壁培养 24 h 后, 用倒置相差显微镜观察细胞生长情况。用 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mmol/L DL-乙硫氨酸处理贴壁生长良好的肝细胞, 分为对照组 (A) 和处理组 (B、C、D、E、F), 每组 6 个重复, 24 h 换液 1 次。将细胞与裂解液一并转入离心管, 混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。

1.2.3 生化指标测定。按照试剂盒说明书, 利用生化分析仪分别测定 A、B、C、D、E、F 组 24 和 48 h 细胞裂解液中 apoAI、apoB、LDL、HDL 的含量。

1.2.4 数据统计与分析。采用单因子方差分析 (One-way ANOVA), 0.01 < P < 0.05 表示差异显著, 0 < P < 0.01 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 DL-乙硫氨酸对 apoAI 和 apoB 含量的影响 肝细胞中测定的生化指标结果表明, DL-乙硫氨酸作用 24 h 时, 处理组各组 apoAI 含量与对照组差异极显著 (0 < P < 0.01); 处理组 B、C、D、E 组 apoB 含量与对照组差异极显著 (0 < P < 0.01), F 组与对照组差异不显著 (P > 0.05)。作用 48 h 时, 处理组各组与对照组 apoAI、apoB 含量差异极显著 (0 < P < 0.01) (表 1)。

表 1 DL-乙硫氨酸对肝细胞作用 24 和 48 h 后 apoAI 和 apoB 含量的变化

Table 1 Changes of apoAI, apoB contents with DL-ethionine treated hepatocytes for 24 and 48 hours

g/L

组别 Group	载脂蛋白 AI apoAI		载脂蛋白 B apoB	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A (CK)	0.558±0.004	0.548±0.005	1.661±0.014	1.570±0.010
B	0.571±0.002**	0.553±0.001**	1.633±0.009**	1.557±0.002**
C	0.570±0.003**	0.556±0.002**	1.602±0.007**	1.539±0.003**
D	0.576±0.001**	0.574±0.003**	1.589±0.010**	1.515±0.008**
E	0.577±0.002**	0.578±0.002**	1.564±0.003**	1.513±0.008**
F	0.582±0.004**	0.582±0.004**	1.541±0.023*	1.507±0.005**

注: * 表示与对照组(A)差异显著(0.01<P<0.05), ** 表示与对照组(A)差异极显著(0<P<0.01)

Note: * indicated significant differences with control group(A) (0.01 <P <0.05); ** indicated extremely significant differences with control group(A) (0<P <0.01)

2.2 DL-乙硫氨酸对 LDL 和 HDL 含量的影响 肝细胞中测定的生化指标结果表明,DL-乙硫氨酸作用 24 h 时,处理组各组 LDL 含量与对照组差异极显著(0<P<0.01);处理组

各组 HDL 含量与对照组差异极显著(0<P<0.01)。作用 48 h 时,处理组各组与对照组 LDL 与 HDL 含量差异极显著(0<P<0.01)(表 2)。

表 2 DL-乙硫氨酸对肝细胞作用 24 与 48 h 后 LDL 和 HDL 含量的变化

Table 2 Changes of LDL, HDL contents with DL-ethionine treated hepatocytes for 24 and 48 hours

mmol/L

组别 Group	低密度脂蛋白 LDL		高密度脂蛋白 HDL	
	24 h	48 h	24 h	48 h
A (CK)	0.079±0.004	0.072±0.002	0.312±0.005	0.189±0.003
B	0.097±0.007**	0.092±0.002**	0.335±0.002**	0.206±0.003**
C	0.116±0.001**	0.096±0.003**	0.354±0.009**	0.218±0.002**
D	0.128±0.002**	0.102±0.002**	0.360±0.002**	0.222±0.002**
E	0.133±0.004**	0.107±0.009**	0.397±0.005**	0.243±0.004**
F	0.148±0.002**	0.124±0.002**	0.409±0.008**	0.292±0.005**

注: * 表示与对照组(A)差异显著(0.01<P<0.05), ** 表示与对照组(A)差异极显著(0<P<0.01)

Note: * indicated significant differences with control group(A) (0.01 <P <0.05); ** indicated extremely significant differences with control group(A) (0<P <0.01)

3 讨论

肝细胞分解代谢脂蛋白与细胞膜上的脂蛋白受体结合物受载脂蛋白的影响。血液不能直接转运疏水性物质,其也不能直接进入组织细胞中,因此甘油三酯和胆固醇都必须与血液中的特殊蛋白质和极性类脂合成脂蛋白,以便在血液中运输并进入肝细胞。肝内的脂蛋白被 VLDL 运到肝外组织去贮存和利用。

该试验中 apoAI 和 apoB 含量的变化趋势,分别与 HDL、LDL 的变化相关。肝脏内蛋白质的合成障碍减少了负责将 TG 转运出肝脏的载脂蛋白 B 的复合物,从而使 VLDL 转运不出去,TG 含量升高,DL-乙硫氨酸代替甲基而提供乙基就是利用了这一点。apoAI 和 HDL 的含量随着 DL-乙硫氨酸浓度的增加而升高。HDL 的合成场所主要在肝脏内,当乳糜微粒(CM)和 VLDL 中的甘油三酯水解时,apoAI 脱离其表面形成 HDL。apoA 是运输 HDL 的主要载脂蛋白,这证实了 apoAI 的含量越高,形成的 HDL 也越多。apoB 控制着 VLDL 的转运,当 apoB 含量下降时肝细胞内的 VLDL 含量增加,TG 含量也升高。

载脂蛋白 B 的相关性研究用于心血管疾病、脂蛋白血

症、肥胖和胆囊疾病的临床应用更加实用化,为患者提供早期预测、实施正确的治疗方案和进行治疗效果的评估奠定基础。

参考文献

- [1] 袁立英,赵瑾,罗德红,等.肾脏疾病中载脂蛋白 A1、载脂蛋白 B 测定及其临床意义[J].中国社区医师,2017,33(27):124-125.
- [2] 杨开燕,钟翔,卢玉俊,等.血浆载脂蛋白的研究进展[J].临床荟萃,2012(14):1268-1271.
- [3] 徐叔云,卞如瀛,陈修,等.实验药理学[M].北京:人民卫生出版社,2002:5812-5841.
- [4] SEGLEN P O.Isolation of hepatocytes by collagenase perfusion[J].In vitro biological systems,1993,1:231-243.
- [5] PICHARD L, RAULET E, FABRE G, et al.Human hepatocyte culture [J].Methods in molecular biology, 2006,320:283-293.
- [6] MAKABEL B, ZHAO Y Y, WANG B, et al.Stability and structure studies on alisol a 24-acetate[J].Chem Pharm Bull, 2008,56(1):41-45.
- [7] 周星辉,王丙力,谭焕然.大鼠肝实质细胞原代培养模型的研究及其功能鉴定[J].中国临床药理学与治疗学,2005,10(7):743-746.
- [8] 徐哲,白雪帆,滕光菊,等.大鼠肝细胞分离、原代培养及生物学特性研究[J].医学研究生学报,2003,16(5):342-344,351.
- [9] NAKAGIRI R, ODA H, KAMIYA T.Small scale rat hepatocyte primary culture with application for screening hepatoprotective substances [J].Biosci Biotechnol Biochem,2003,67(8):1629-1635.
- [10] 徐旭,席文恭,于冰,等.乙硫氨酸对小鼠脂肪代谢影响的研究[J].实验动物科学,2009,26(5):5-6.