

牛磺酸对 HepG2 细胞甘油三酯合成的影响研究

马于巽¹, 宋琪¹, 张静^{1,2}, 郭俊霞^{1,2}, 夏天则², 陈文^{1,2*}¹北京联合大学 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京, 100191;²北京联合大学生物化学工程学院食品科学系, 北京, 100023

摘要: 本文探讨牛磺酸对 HepG2 细胞甘油三酯合成的影响, 为牛磺酸预防/改善机体高脂状态的深入研究提供参考。在 DMEM 培养基中添加 0.05 mmol/L 油酸建立高甘油三酯细胞模型, 分别以终浓度为 1、5、10、20 mmol/L 的牛磺酸处理细胞 24、48、72 h, 测定细胞内甘油三酯水平; 并检测 5 mmol/L 牛磺酸作用 24 h 后细胞内固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c) 及脂肪合成相关酶乙酰辅酶 A 合成酶 (AceCS)、乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC)、脂肪酸合成酶 (FAS)、长链酰基辅酶 A 合成酶 1 (ACSL1) 的蛋白表达水平。1 mmol/L 牛磺酸作用 72 h, 5 和 10 mmol/L 牛磺酸作用 24、48、72 h, 20 mmol/L 牛磺酸作用 24 和 48 h 均可使高脂 HepG2 细胞内甘油三酯水平显著下降 ($P < 0.05$); 5 mmol/L 牛磺酸作用 24 h, 高脂 HepG2 细胞的 SREBP-1c、FAS、ACC、AceCS1、ACSL1 表达明显减少 ($P < 0.05$), 磷酸化 ACC 表达显著增加 ($P < 0.05$)。结论: 牛磺酸通过调控 SREBP-1c 及其下游靶基因而抑制高脂 HepG2 细胞脂肪酸/甘油三酯的合成。

关键词: 牛磺酸; 甘油三酯; 固醇调节元件结合蛋白 1c

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)5-0867-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.5.021

Effect of taurine on triglyceride synthesis in HepG2 cells

MA Yu-xun¹, SONG Qi¹, ZHANG Jing^{1,2}, GUO Jun-xia^{1,2}, XIA Tian-ze², CHEN Wen^{1,2*}¹Beijing Key Laboratory of Bioactive substances and Functional Foods, Beijing Union University, Beijing 100191, China;²Food Science Department, College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China

Abstract: The effect of taurine on triglyceride synthesis and its preliminary mechanism in oleic acid-treated HepG2 cells was researched in this article. A high triglyceride cell model was established by adding 0.05 mmol/L oleic acid to DMEM medium. HepG2 cells were treated with taurine at final concentration of 1, 5, 10 and 20 mmol/L for 24, 48 and 72 h, and the levels of intracellular triglycerides were determined. The expression of SREBP-1c and the enzymes of AceCS1, ACC, FAS and ACSL1, associated with fatty acid synthesis, were detected by western blot after HepG2 cells were incubated with 5 mmol/L taurine for 24 h. Intracellular triglycerides levels were decreased by 1 mmol/L taurine treatment for 72 h ($P < 0.05$), 5 and 10 mmol/L taurine treatment for 24/48/72 h ($P < 0.05$) and 20 mmol/L taurine treatment for 24/48 h ($P < 0.05$) in high-triglyceride cells. And the protein expression of SREBP-1c, FAS, ACC, AceCS1 and ACSL1 were reduced while p-ACC was increased by 5 mmol/L taurine treatment for 24 h ($P < 0.05$). Taurine inhibits the synthesis of fatty acid/triglyceride in oleic acid-treated HepG2 cells by regulating SREBP-1c and its downstream genes.

Key words: taurine; triglyceride; SREBP-1c

牛磺酸 (2-氨基乙磺酸, taurine) 是一种内源性含硫氨基酸, 可由甲硫氨酸和半胱氨酸合成, 也可由饮食提供, 在鱼类等海产品中含量丰富^[1]。牛磺酸结构简单且不参与蛋白质合成, 主要以游离形式

存在于哺乳动物的肝脏、肾脏、脂肪组织、视网膜等组织器官, 发挥维持视觉、调节渗透压、抗氧化、调节脂类代谢等作用^[1,2]。动物实验表明牛磺酸可减少实验动物体脂, 降低血液中甘油三酯水平, 改善脂肪肝^[3,4]。体外实验显示, 在大鼠 H4IIE 肝细胞和原代肝细胞中, 牛磺酸减少了棕榈酸和油酸导致的甘油三酯过度积累^[5], 而 Yanagita 等^[6]通过在 HepG2

收稿日期: 2019-08-28 接受日期: 2020-04-15

基金项目: 北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室开放课题 (122139918290104056)

* 通信作者 E-mail: wlchenwen@buu.edu.cn

细胞培养液中添加¹⁴C 标记的油酸,发现牛磺酸抑制了 50% ¹⁴C 标记的油酸合成甘油三酯,提示牛磺酸可抑制 HepG2 细胞甘油三酯合成。牛磺酸抑制甘油三酯合成相关酶的报道较少,并且关于牛磺酸降低细胞脂质的有效浓度报道不一,需要进一步深入的研究^[5-8]。

固醇调节元件结合蛋白(sterol-regulatory element binding proteins, SREBPs)是一种调节脂肪酸、甘油三酯和胆固醇合成代谢的关键核转录因子,有三种亚型:SREBP-1a、SREBP-1c 和 SREBP-2。SREBP-2 存在于大多数组织细胞中,主要参与调节胆固醇的合成;SREBP-1a 在肝脏及肾上腺较丰富,可调节脂肪酸、甘油三酯、胆固醇、磷脂等多种脂质的生物合成,高浓度时促进胆固醇的合成,低浓度时促进脂肪酸的合成^[9]。SREBP-1c 主要表达在肝脏和脂肪细胞中,主要参与肝脏脂肪酸合成和脂肪前体细胞的分化,是脂肪酸和甘油三酯合成中关键调控因子,可调控乙酰辅酶 A 合成酶(acetyl-CoA synthetase, AceCS)、乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FAS)、硬脂酰 CoA 去饱和酶 1(stearyl CoA desaturase 1, SCD-1)等脂肪酸合成相关的酶^[10,11]。

本实验以油酸(oleic acid, OA)建立 HepG2 细胞脂肪变性模型,探讨牛磺酸对正常与高脂条件下 HepG2 细胞的甘油三酯水平、SREBP-1c 及 FAS 等脂肪合成相关酶蛋白表达的影响,以期对牛磺酸预防/改善机体高脂状态的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HepG2 细胞购自协和医科大学基础医学研究所细胞中心;DMEM 细胞基础培养基、ECL 显影试剂盒、CCK-8 试剂盒购自美国 GenView 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;双抗(青霉素、链霉素)、RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;牛磺酸(纯度 >99%)、油酸(纯度 >99%)购自美国 Sigma 公司;甘油三酯(TG)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;SREBP-1c 一抗(AF4782, 兔抗)购自美国 Affinity 公司;FAS(3180)、AceCS1(3658)、ACSL1(9189)、ACC(3676)、p-ACC(11810)、GAPDH(2118)等一抗(兔抗)、二抗(7074S, 抗兔 IgG-HRP)购自美国 CST(Cell Signaling Technology)公司。

1.2 仪器与设备

酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司;电泳仪、转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统购自北京 Thmorgan 生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及处理

细胞培养:用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,37℃、5% CO₂ 恒温培养 HepG2 细胞,以 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个/孔接种于 6 孔板中。

牛磺酸对 HepG2 细胞甘油三酯的影响:在培养液中加入以 PBS 溶解的终浓度分别为 1、5、10、20 mmol/L 的牛磺酸,培养 24、48、72 h。

高脂模型的建立:以无水乙醇为溶剂,在培养液中加入终浓度分别为 0.05、0.1、0.2 mmol/L 的油酸,培养 6、12、24 h 后测定细胞内甘油三酯水平。

牛磺酸对高脂 HepG2 细胞甘油三酯的影响:设立对照组(N),高脂模型组(OA),在模型基础上加入 1、5、10、20 mmol/L 牛磺酸即牛磺酸组(O+T),共同培养 24、48、72 h。

1.3.2 细胞内甘油三酯测定^[12]

细胞培养一定时间后弃上清,用 PBS 洗 2 次,每孔加入 1 mL 正己烷-异丙醇(2:1, V/V)置于摇床上慢摇 1 h,以提取细胞内脂类物质;4℃、10 000 rpm 离心 10 min,上清通氮气除去有机溶剂;以 80 μL 含 10% TritonX-100 的异丙醇涡旋震荡溶解脂提取物后即得到待测样品。以甘油三酯测定试剂盒检测样品甘油三酯浓度。

1.3.3 细胞内蛋白含量的测定

细胞完成脂类物质提取后加入裂解液冰上提取细胞内总蛋白,4℃、12 000 rpm 离心 10 min,上清液即为待测样品。以 BCA 蛋白测定试剂盒测蛋白样品的浓度。

细胞内甘油三酯含量以甘油三酯与蛋白质比值($\mu\text{mol/g} \cdot \text{pro}$)表示。

1.3.4 细胞存活率测定

取 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个/孔细胞铺于 96 孔板中,设立:对照组(N),1、5、10、20 mmol/L 牛磺酸组(T),无水乙醇对照组(E),油酸组(OA),在油酸基础上加入 1、5、10、20 mmol/L 牛磺酸(O+T)。培养 24、48 h 后用 CCK-8 试剂盒在 450 nm 测定吸光度。以正常对照为 100%,计算细胞存活率。

1.3.5 Western blot

加入 PMSF 终浓度为 1 mmol/L 的裂解液提取

细胞内总蛋白,以 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,加入 SDS 蛋白电泳上样缓冲液后沸水浴 5 min 使蛋白充分变性。每孔上样 30 μg 样品蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入不同目的蛋白的一抗和内参 GAPDH 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗三次后加入二抗,常温孵育 2 h, TBST 洗三次后用 ECL 显影试剂盒显影。条带结果用凝胶图像分析系统进行目的蛋白及内参(GAPDH)灰度值分析,以目的蛋白灰度值与内

参蛋白灰度值之比作为所测目的蛋白的相对含量。

1.4 数据处理

实验数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA):假定方差齐性,用 Bonferroni 法;未假定方差齐性,用 Dunnett 法。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 牛磺酸对 HepG2 细胞甘油三酯水平的影响

表 1 牛磺酸对 HepG2 细胞甘油三酯水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of taurine on triglyceride level in HepG2 cells($\bar{x} \pm s, n = 10$) ($\mu\text{mol/g} \cdot \text{pro}$)

时间 Time (h)	正常对照 Control	牛磺酸 Taurine (mmol/L)			
		1	5	10	20
24	147.05 \pm 24.28	141.43 \pm 25.20	140.06 \pm 25.20	138.55 \pm 23.70	137.68 \pm 24.11
48	143.72 \pm 21.26	141.09 \pm 17.83	139.88 \pm 13.54	135.80 \pm 25.84	132.49 \pm 26.47
72	140.77 \pm 25.22	138.61 \pm 17.05	135.11 \pm 8.87	125.48 \pm 25.58	124.06 \pm 17.46

由表 1 可知,在 HepG2 细胞中添加 1、5、10、20 mmol/L 牛磺酸分别作用 24、48、72 h,甘油三酯水平有随牛磺酸浓度升高而降低的趋势,但是牛磺酸各剂

量组与正常对照组相比无显著差异,提示牛磺酸对正常 HepG2 细胞甘油三酯水平无显著影响($P > 0.05$)。

2.2 油酸对 HepG2 细胞甘油三酯水平的影响

表 2 油酸对 HepG2 细胞甘油三酯水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of oleic acid on triglyceride level in HepG2 cells($\bar{x} \pm s, n = 10$) ($\mu\text{mol/g} \cdot \text{pro}$)

时间 Time (h)	对照 Control	油酸 Oleic acid (mmol/L)			
		0.025	0.05	0.1	0.2
6	158.48 \pm 20.87	169.06 \pm 10.42	204.88 \pm 41.55*	241.70 \pm 32.06*	245.15 \pm 30.59*
12	156.40 \pm 25.42	164.67 \pm 21.98	252.30 \pm 44.39*	291.86 \pm 55.33*	316.02 \pm 26.37*
24	145.79 \pm 15.40	178.98 \pm 14.43*	219.13 \pm 20.33*	313.15 \pm 47.60*	412.59 \pm 38.07*

注:*与对照组相比, $P < 0.05$ 。

Note: * Compared with control, $P < 0.05$.

表 2 显示:0.025 mmol/L 油酸作用 24 h,细胞内甘油三酯水平升高 22.77% ($P < 0.05$);0.05 mmol/L 油酸作用 6 h,细胞内甘油三酯水平升高 29.28% ($P < 0.05$),作用 12 和 24 h 甘油三酯含量均升高 50% 以上($P < 0.05$);0.1、0.2 mmol/L 油酸

作用 12 和 24 h 甘油三酯含量均升高 80% 以上。故本实验选择 0.05 mmol/L 油酸来建立高脂模型。

2.3 牛磺酸对油酸处理的 HepG2 细胞甘油三酯水平的影响

表 3 牛磺酸对油酸处理的 HepG2 细胞甘油三酯水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of taurine on triglyceride level in HepG2 cells treated with oleic acid($\bar{x} \pm s, n = 10$) ($\mu\text{mol/g} \cdot \text{pro}$)

时间 Time (h)	对照组 Control	油酸 Oleic acid (0.05 mmol/L)				
		高脂模型组 Model	牛磺酸 Taurine 1 mmol/L	牛磺酸 Taurine 5 mmol/L	牛磺酸 Taurine 10 mmol/L	牛磺酸 Taurine 20 mmol/L
24	127.66 \pm 21.45	202.75 \pm 15.06*	190.47 \pm 22.49	176.68 \pm 18.68 [#]	175.47 \pm 18.01 [#]	178.56 \pm 13.11 [#]
48	124.20 \pm 19.87	181.62 \pm 23.67*	170.29 \pm 19.97	155.97 \pm 18.50 [#]	161.34 \pm 12.36 [#]	156.36 \pm 21.97 [#]
72	126.65 \pm 5.23	171.30 \pm 8.18*	145.08 \pm 14.13 [#]	147.99 \pm 6.13 [#]	157.86 \pm 8.04 [#]	157.63 \pm 16.93

注:*与对照组相比 $P < 0.05$;[#]与模型组相比 $P < 0.05$ 。

Note: * Compared with control, $P < 0.05$;[#] Compared with model, $P < 0.05$.

由表3可知,与对照组相比,0.05 mmol/L 油酸作用24和48 h 细胞内甘油三酯水平升高约50% ($P < 0.05$)。但培养72 h,细胞内甘油三酯水平仅升高35.25% ($P < 0.05$),提示随培养时间延长,细胞内甘油三酯水平并不持续升高。与高脂模型组相比:1 mmol/L 牛磺酸需作用72 h 才使甘油三酯水平明显下降 ($P < 0.05$),5 和 10 mmol/L 牛磺酸作用

24,48,72 h 以及 20 mmol/L 牛磺酸作用24 和 48 h 细胞内甘油三酯水平均明显下降 ($P < 0.05$),20 mmol/L 牛磺酸作用72 h 对细胞内甘油三酯水平无明显影响 ($P > 0.05$) 可能是由于随培养时间延长,细胞衰老,模型组甘油三酯水平下降。

2.4 牛磺酸和油酸对 HepG2 细胞存活率的影响

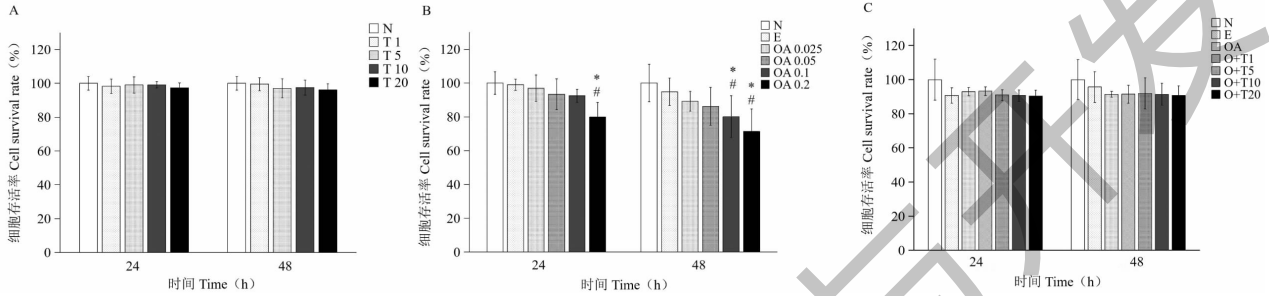


图1 牛磺酸和油酸对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig. 1 The effect of taurine and oleic acid on the viability of HepG2 cells

注:A:牛磺酸对细胞存活率的影响;B:油酸对细胞存活率的影响;C:油酸与牛磺酸共同作用对细胞存活率的影响;N:对照组;T1、T5、T10、T20 表示牛磺酸终浓度为1、5、10、20 mmol/L;E:无水乙醇对照组;OA 0.05、0.1、0.2 表示油酸终浓度为0.05、0.1、0.2 mmol/L;OA:油酸对照组;O+T1、O+T5、O+T10、O+T20 表示在油酸基础上添加终浓度为1、5、10、20mmol/L的牛磺酸;* 与对照组相比 $P < 0.05$;# 与乙醇对照组相比 $P < 0.05$ 。Note:A,B,C represent the effect of taurine,oleic acid and co-action of oleic acid and taurine on cell survival, respectively. N:Control;T1,T5,T10,T20:The concentration of taurine is 1,5,10,20 mmol/L;E:Absolute ethyl alcohol control group;OA 0.05,0.1,0.2:The concentration of oleic acid is 0.05,0.1,0.2 mmol/L;OA:Oleic acid control group;O+T1,O+T5,O+T10,O+T20:0.05mmol/L oleic acid with 1,5,10,20 mmol/L taurine;* Compared with control, $P < 0.05$;# Compared with absolute ethyl alcohol control, $P < 0.05$.

由图1A可知1~20 mmol/L 牛磺酸作用24和48 h,各组细胞存活率无明显差异。由图1B可知与正常对照和乙醇对照比0.1 mmol/L 油酸作用48 h 细胞存活率显著下降 ($P < 0.05$),0.2 mmol/L 油酸作用24和48 h 细胞存活率均显著下降 ($P < 0.05$)。由图1C可知在0.05 mmol/L 油酸基础上添加1~20 mmol/L 牛磺酸作用24和48 h,各组细胞存活率无明显差异 ($P > 0.05$)。

综合以上结果(表3、图1),0.05 mmol/L 油酸作用24h,细胞甘油三酯水平升高约50%,表示模型建立成功。油酸是脂溶性物质,易进入细胞,并在较短时间内合成甘油三酯。随培养时间延长,细胞衰老,细胞内甘油三酯水平下降,所以细胞甘油三酯含量并不随着油酸作用时间的延长而继续升高,而是维持在一定水平并略呈下降趋势。5 mmol/L 牛磺酸作用24 h 细胞甘油三酯水平即显著下降 ($P < 0.05$),所以本实验以0.05 mmol/L 油酸建立高脂模型,以5 mmol/L 牛磺酸作用24 h 进行后续 SREBP-1c 及脂肪合成相关酶蛋白表达的实验,此浓度和时间下牛磺酸和油酸对细胞存活率均无明显影响 ($P > 0.05$)。

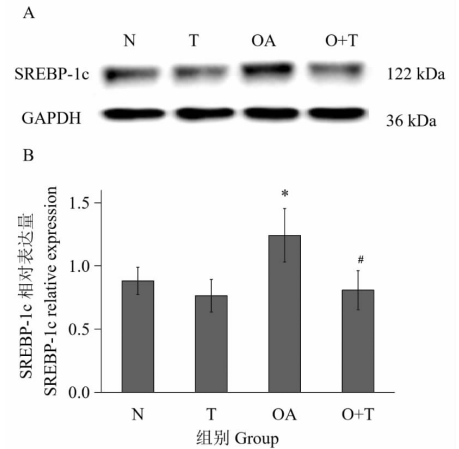


图2 牛磺酸对 HepG2 细胞 SREBP-1c 表达的影响

Fig. 2 The effect of taurine on the protein expression of SREBP-1c in HepG2 cells

注:A:SREBP-1c 和 GAPDH 蛋白条带图;B:SREBP-1c 相对表达柱状图;N:对照组;T:牛磺酸组;OA:油酸组;O+T:油酸+牛磺酸组;* 与正常对照组相比 $P < 0.05$;# 与模型对照组相比 $P < 0.05$ 。Note:A:SREBP-1c and GAPDH protein bands picture;B:SREBP-1c relative expression histogram;N:Control;T:Taurine;OA:Oleic acid;O+T:Oleic acid + taurine;* Compared with control, $P < 0.05$;# Compared with oleic acid group, $P < 0.05$.

2.5 牛磺酸对 HepG2 细胞 SREBP-1c 表达的影响

由图 2 可知,与对照组相比,5 mmol/L 牛磺酸对 SREBP-1c 表达无明显影响($P > 0.05$),高脂模型组 SREBP-1c 表达升高($P < 0.05$)提示油酸可增加 HepG2 细胞 SREBP-1c 的表达;与模型组相比,牛磺

酸使 SREBP-1c 表达下降($P < 0.05$),提示牛磺酸可能通过降低 SREBP-1c 表达而调控甘油三酯合成。

2.6 牛磺酸对 HepG2 细胞中甘油三酯合成相关酶表达的影响

图 3 显示:与对照相比,牛磺酸组 ACC 表达下

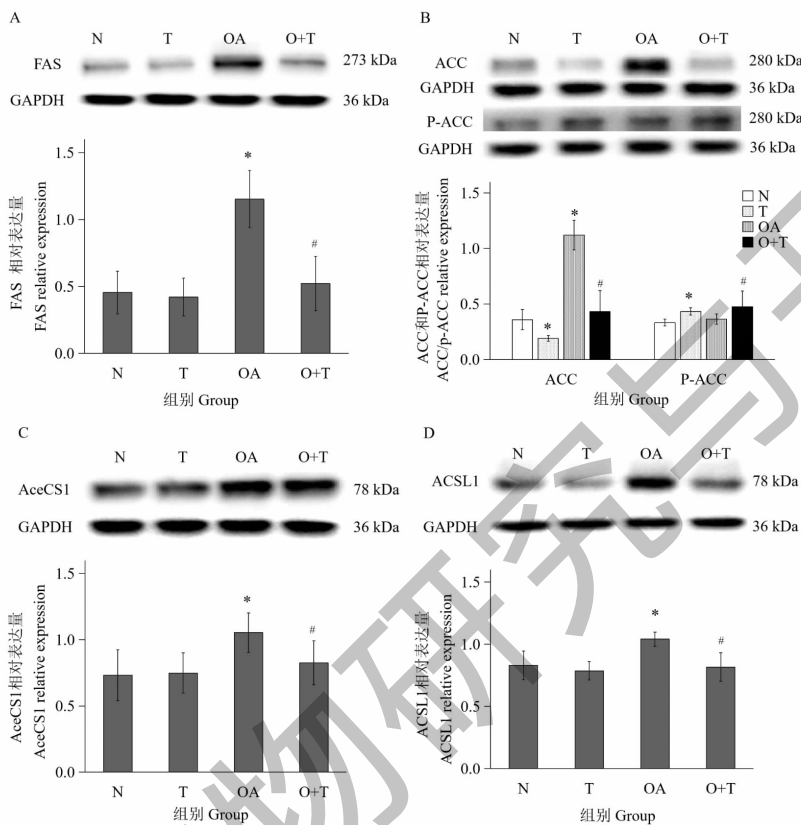


图 3 牛磺酸对 HepG2 细胞中甘油三酯合成相关酶表达的影响

Fig. 3 Effect of taurine on the protein expression of TG synthesis related enzymes in HepG2 cells

注:A、B、C、D 分别为 FAS、ACC/P-ACC、AceCS1、ACSL1 蛋白表达结果及目的蛋白相对表达量柱状图;N:对照组;T:牛磺酸组;OA:油酸组;O+T:油酸+牛磺酸组;*与正常对照组相比 $P < 0.05$ ；#与模型对照组相比 $P < 0.05$ 。Note:A、B、C、D represent the protein expression of FAS,

ACC/p-ACC, AceCS1, ACSL1 in HepG2 cells, respectively. N: Control; T: Taurine; OA: Oleic acid; O+T: Oleic acid + taurine; * Compared with control, $P < 0.05$; # Compared with oleic acid group, $P < 0.05$.

降($P < 0.05$), FAS、AceCS1、ACSL1 表达无明显变化,而高脂模型组 FAS、ACC、AceCS1、ACSL1 表达上升($P < 0.05$);与模型组相比,油酸+牛磺酸组 FAS、ACC、AceCS1、ACSL1 表达下降($P < 0.05$)。以上结果表明油酸可增加细胞 FAS、ACC、AceCS1、ACSL1 的表达,增加甘油三酯的合成;而牛磺酸能降低细胞 ACC 的表达,降低高脂 HepG2 细胞 FAS、ACC、AceCS1、ACSL1 的表达,提示牛磺酸通过抑制脂肪酸及甘油三酯合成相关酶的表达而抑制甘油三酯合成。图 3B 显示:与对照相比牛磺酸使 P-ACC 表达上升($P < 0.05$),与模型组相比油酸+牛磺酸组 P-ACC 表达增加($P < 0.05$),提示牛磺酸除影响

ACC 的表达外,还通过增加 ACC 磷酸化抑制其活性,从而抑制脂肪酸合成。

3 讨论

研究显示,在大鼠^[13]、小鼠^[14]、豚鼠^[4]、线虫^[15]等模式生物中,牛磺酸均表现出降低甘油三酯、减少体脂肪/肝脏脂肪蓄积的作用;临床实验^[16]和流行病学调查^[17]也显示口服牛磺酸或饮食习惯中富含牛磺酸能在一定程度上改善高血脂、肥胖,降低 BMI 以及动脉粥样硬化指数,降低高血脂症等代谢疾病和心血管疾病的发生率。

牛磺酸降甘油三酯作用的体外实验及机制研究较少。Gentile 等^[5]报道,牛磺酸能减少大鼠 H4IIE

肝细胞和原代肝细胞中甘油三酯过度积累,并降低棕榈酸介导的 caspase-3 活性、细胞凋亡、内质网应激和氧化应激,该研究提示在饮食中添加牛磺酸对预防非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发生有良好作用。Yanagita 等^[6]的研究显示,在培养基中添加 1 mmol/L 牛磺酸作用 24 h 可以使 HepG2 细胞内甘油三酯水平下降近 25%,而 Hoang 等^[7]报道 0.01 mmol/L 牛磺酸使正常 HepG2 细胞甘油三酯水平减少近 22%。两个研究团队的结果虽相似但在牛磺酸浓度上却相差了百倍之多。与他们的研究不同,本实验以 1、5、10、20 mmol/L 牛磺酸处理 HepG2 细胞 24、48、72 h,细胞内甘油三酯水平虽有下降趋势,但并无显著降低($P > 0.05$);以 0.05 mmol/L 油酸建立高脂模型后,对于油酸处理的 HepG2 细胞,牛磺酸则显示出明显的降低甘油三酯水平的作用,其中 1 mmol/L 牛磺酸作用 72 h、5/10 mmol/L 牛磺酸作用 24、48、72 h、20 mmol/L 牛磺酸作用 24/48 h 都可使细胞内甘油三酯含量显著下降($P < 0.05$)。

机体甘油三酯代谢的主要途径有合成代谢和分解代谢,但是关于牛磺酸促进甘油三酯代谢的作用机制研究,主要集中在促进脂肪分解代谢和脂肪酸 β 氧化,此外还有抑制炎症反应和提高抗氧化能力等方面^[5,13]。牛磺酸抑制甘油三酯合成的具体机制尚需深入研究。

SREBP-1c 主要参与肝脏脂肪酸合成和脂肪前体细胞的分化,是脂肪酸和甘油三酯合成中关键调控因子。SREBP-1c 的调控除了受细胞胆固醇水平影响外还受机体营养条件和激素水平的影响,它在营养过剩时表达升高,在饥饿禁食状态表达降低^[10,11]。有研究表明,无论是 ob/ob 小鼠还是高脂饮食诱导的肥胖小鼠,均存在肝脏 SREBP-1c 水平异常升高的现象,SREBP-1c 过度表达会引起糖脂代谢紊乱,导致非脂肪组织脂质积聚,引起组织病变,因此 SREBP-1c 过度表达与肥胖相关疾病如糖尿病、高脂血症、代谢综合征的发生和发展有着密切关系^[10,11]。Hoang 等^[7]曾报道,0.01 mmol/L 牛磺酸可抑制 HepG2 细胞 SREBP-1c 表达但不影响其下游靶基因 FAS 表达。与 Hoang 的结果不同,本研究显示牛磺酸对正常 HepG2 细胞 SREBP-1c 表达无影响,但当以油酸建立高脂模型时,0.05 mmol/L 油酸可增加细胞 SREBP-1c 的表达,5 mmol/L 牛磺酸则抑制了油酸诱导的 SREBP-1c 表达增加,提示正常

状态下牛磺酸不影响细胞 SREBP-1c 表达,仅在高脂状态下抑制 SREBP-1c 表达。

脂肪酸从头合成的二碳单位是乙酰辅酶 A,合成起始于 ACC 催化乙酰辅酶 A 转化为丙二酸单酰辅酶 A,乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 在 FAS 催化下经缩合、还原、脱水、再还原四步循环反应完成脂肪酸的合成^[18]。ACC 的活性受可逆磷酸化快速调控,磷酸化使 ACC 失活,去磷酸化使 ACC 被激活。FAS 和 ACC 都是脂肪酸生物合成过程中的关键酶,AceCS 可催化醋酸盐和辅酶 A 转变为乙酰辅酶 A,由 AceCS1 合成的乙酰 CoA 用于脂肪酸和脂类生物合成^[19]。FAS、ACC、AceCS1 的表达均受到 SREBP-1c 的调控^[10,11]。本研究显示:0.05 mmol/L 油酸诱导了 HepG2 细胞 FAS、ACC、AceCS1 的表达;5 mmol/L 牛磺酸作用 24 h 可减少正常细胞/高脂细胞 ACC 的表达、增加 p-ACC 的表达,并抑制高脂细胞 FAS、AceCS1 的表达。提示牛磺酸通过抑制 SREBP-1c 的表达抑制脂肪酸合成相关酶的表达,并且通过增加 ACC 磷酸化水平抑制其活性从而减少脂肪酸的合成。

长链酰基辅酶 A 合成酶(long chain acyl-CoA synthetases, ACSL)催化脂肪酸与辅酶 A 的连接,形成脂酰辅酶 A。ACSL1 主要表达在肝脏和脂肪细胞中,由 ACSL1 催化形成的脂酰辅酶 A 与 L- α -磷酸甘油是甘油三酯合成的前体。ACSL1 过度表达会导致脂代谢紊乱和甘油三酯沉积,Li^[20]用腺病毒转染大鼠原代肝细胞过度表达 ACSL1,检测到¹⁴C 标记的油酸盐与甘油二酯的结合增加,细胞内甘油三酯水平增加。本研究显示,油酸增加了 HepG2 细胞 ACSL1 表达,牛磺酸不影响正常细胞 ACSL1 表达,但可抑制高脂 HepG2 细胞的 ACSL1 表达。ACSL1 是 PPAR γ 的靶基因,这一结果提示牛磺酸除通过 SREBP-1c 途径抑制甘油三酯合成外还可能通过 PPAR γ 抑制甘油三酯合成。

4 结论

牛磺酸对 HepG2 细胞甘油三酯水平无影响,但能显著降低油酸诱导的高脂细胞的甘油三酯水平,明显减少高脂细胞 SREBP-1c、FAS、ACC、AceCS1、ACSL1 的表达,提高 p-ACC 的表达。这一结果提示牛磺酸通过调控 SREBP-1c 及其下游靶基因而抑制高脂细胞脂肪酸/甘油三酯的合成。深入的研究将进一步揭示在高脂膳食状态下牛磺酸营养的作用。

参考文献

- 1 Ripps H, Shen W. Review: taurine; a "very essential" amino acid [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 2673-2686.
- 2 Murakami S. Role of taurine in the pathogenesis of obesity [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59: 1353-1363.
- 3 Chen SW, Chen YX, Shi J, et al. The restorative effect of taurine on experimental nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Digest Dis Sci*, 2006, 51: 2225-2234.
- 4 Chang YY, Chou CH, Chiu CH, et al. Preventive effects of taurine on development of hepatic steatosis induced by a high-fat/cholesterol dietary habit [J]. *J Agr Food Chem*, 2011, 59: 450-457.
- 5 Gentile CL, Nivala AM, Gonzales JC, et al. Experimental evidence for therapeutic potential of taurine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Am J Phys Regulat Integr Compar Phys*, 2011, 301: 1710-1722.
- 6 Yanagita T, Han SY, Hu Y, et al. Taurine reduces the secretion of apolipoprotein B100 and lipids in HepG2 cells [J]. *Lipid Health Dis*, 2008, 7: 38.
- 7 Hoang MH, Jia Y, Jun HJ, et al. Taurine is a liver X receptor- α ligand and activates transcription of key genes in the reverse cholesterol transport without inducing hepatic lipogenesis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012 (56): 900-911.
- 8 Murakami S, Ono A, Kawasaki A, et al. Taurine attenuates the development of hepatic steatosis through the inhibition of oxidative stress in a model of nonalcoholic fatty liver disease *in vivo* and *in vitro* [J]. *Amin Acid*. 2018, 50: 1279-1288.
- 9 Jeon TI, Osbrone TF. SREBPs; metabolic integrators in physiology and metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(2): 65-72.
- 10 Fang DL, Wan Y, Shen W, et al. Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 381 (1-2): 127-137.
- 11 Choi YJ, Shin HS, Choi HS, et al. Uric acid induces fat accumulation via generation of endoplasmic reticulum stress and SREBP-1c activation in hepatocytes [J]. *Lab Invest*, 2014, 94: 1114-1125.
- 12 Chen YY. Inflammatory stress exacerbates hepatic cholesterol accumulation via disrupting cellular cholesterol export and the molecular mechanism [D]. Chongqing: Medical University of Chongqing (重庆医科大学), 2011.
- 13 Zhao YX, Cao XL, Guo JX, et al. The effect of taurine on weight loss and lipid reduction in rats [J]. *Sci Tech Food Ind (食品工业科技)*, 2018, 39: 324-329.
- 14 Batista TM, Ribeiro RA, da Silva PM, et al. Taurine supplementation improves liver glucose control in normal protein and malnourished mice fed a high-fat diet [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57: 423-434.
- 15 Kim HM, Do CH, Lee DH, et al. Characterization of taurine as anti-obesity agent in *C. elegans* [J]. *J Biomed Sci*, 2010, 17 (Suppl 1): S33.
- 16 Zhang M, Bi LF, Fang JH, et al. Beneficial effects of taurine on serum lipids in overweight or obese non-diabetic subjects [J]. *Amin Acid*, 2004, 26(3): 267-271.
- 17 Ishikawa M, Arai S, Takano M, et al. Taurine's health influence on Japanese high school girls [J]. *J Biomed Sci*, 2010, 17 (Suppl 1): S47.
- 18 Wang JY, Zhu SG, Xu CF. *Biochemistry (Third Edition: Second Volume) (生物化学: 第三版下册)* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002, 7: 257-264.
- 19 Luong A, Hannah VC, Brown MS, et al. Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins [J]. *Biol Chem*, 2000, 275: 26458-26466.
- 20 Li LO, Mashek DG, An J, et al. Overexpression of rat long chain acyl-CoA synthetase I alters fatty acid metabolism in rat primary hepatocytes [J]. *Biol Chem*, 2006, 281: 37246-37255.