

doi: 10.7541/2017.8

## 脂肪酸影响草鱼肝细胞脂质蓄积状态及诱导其凋亡的离体研究

李雪贤 孙健 吉红 陈昊杰

(西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 为探究外源脂肪酸对草鱼肝细胞脂质代谢及健康状况的影响及其机理, 体外培养草鱼肝细胞, 并采用不同浓度(0—1 mmol/L)油酸(Oleic acid)进行细胞孵育, 噻唑兰比色法(Methyl thiazolte trazoliu, MTT)和油红O染色提取法检测肝细胞活力及脂质蓄积状况, BODIBY和DAPI染色法观察肝细胞脂滴及细胞核情况, 流式细胞术检测肝细胞凋亡率变化, Real-time qPCR检测脂质合成标志基因过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$  (Peroxisome proliferation activated receptor, *PPAR $\gamma$* )和CCAAT/增强子结合蛋白 $\alpha$  (CCAAT/enhancer binding protein alpha, *C/EBP $\alpha$* )、凋亡相关基因*Caspase*家族等的表达情况。结果显示, 随着油酸处理浓度的增加, 肝细胞活力和细胞内脂质积累呈现先上升后下降的趋势, 分别在0.4和0.6 mmol/L时达到最大值( $P < 0.05$ ); 肝细胞凋亡率则先下降后上升, 在0.4 mmol/L油酸处理时最低, 1 mmol/L油酸处理时最高( $P < 0.05$ ); 此外, 0.4 mmol/L油酸处理抑制了肝细胞*Caspase-3b*和*Caspase-9*基因的表达, 上调*Bcl-2/Bax* mRNA比值( $P < 0.05$ ), 而0.8 mmol/L油酸处理显著促进*Caspase-3b*、*Caspase-8*、*Caspase-9*及凋亡诱导因子(Apoptosis inducing factor, *AIF*)基因的表达, 下调*Bcl-2/Bax*的mRNA比值( $P < 0.05$ )。研究表明, 一定浓度的脂肪酸可增强草鱼肝细胞活力, 促进胞内脂质积累, 抑制细胞凋亡, 而脂肪酸浓度过高则抑制肝细胞活力并诱导肝细胞凋亡, 其作用与脂肪酸影响脂质代谢及凋亡基因的表达有关。

**关键词:** 脂肪酸; 肝细胞; 凋亡; 草鱼

中图分类号: Q173

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2017)01-0056-09

脂肪酸作为重要的营养物质和信号分子, 对鱼类的生长、发育和繁殖具有多方面的作用<sup>[1]</sup>。机体内的游离脂肪酸(FFA)一方面经吸收、转运至贮存场所, 形成甘油三酯(TAG), 另一方面可以分解、代谢供应机体的能量需求<sup>[2]</sup>。肝脏是鱼体内最主要的代谢器官, 参与体内的消化、代谢、解毒及免疫等多种功能, 也是鱼类脂肪合成的主要场所, 其在鱼类脂代谢过程中起着重要的调节作用<sup>[3, 4]</sup>。肝脏是脂质代谢的主要场所, 当肝脏内积聚的FFA超过合成和分解代谢需要时, 细胞内FFA动态平衡被打破, TAG在肝细胞内大量储存, 导致肝细胞脂肪变性, 使肝脏对炎症反应和各种损伤因素的敏感性增高<sup>[5-7]</sup>。过量的脂质沉积还会导致细胞线粒体功能障碍, 造成脂毒性, 致使细胞的损伤和凋亡<sup>[8-10]</sup>。已有研究发现, 脂肪肝病变的大黄鱼肝脏中FFA含量显著上升, 说明过量的FFA进入肝脏, 造成大黄鱼肝脏脂

质积累<sup>[11]</sup>。这种因能量摄入过多导致肝细胞内过量蓄积脂质的肝病称为鱼类营养性脂肪肝<sup>[12]</sup>。尽管已有较多报道探讨了脂质对鱼类肝脏脂质代谢及健康状况的影响<sup>[13-16]</sup>, 但直接研究脂肪酸对肝细胞凋亡作用的报道还比较有限, 相关研究有待进一步深入。

为了深入系统地探讨脂肪酸对草鱼肝细胞脂质代谢及凋亡特性的影响及其作用机制, 本研究在离体条件下, 以油酸为代表, 研究不同浓度脂肪酸处理情况下草鱼肝细胞活力、脂质蓄积和细胞凋亡的状况, 为鱼类营养性脂肪肝的发病机制及防控对策的研究提供参考资料。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂

胎牛血清、M199培养基及无脂肪酸牛血清白

收稿日期: 2015-12-11; 修订日期: 2016-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372538)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31372538)]

作者简介: 李雪贤(1990—), 女; 硕士研究生; 主要从事水生动物营养与饲料学研究。E-mail: lxx0663@163.com

通信作者: 吉红(1967—), 男, 河南灵宝人; 博士生导师; 主要从事水生经济动物营养与饲料学研究。E-mail: jihong@nwsuaf.edu.cn

蛋白购自Gibco公司, 油红O、MTT、BODIPY、DAPI和油酸均购自Sigma公司, 碳酸氢钠、无水乙醇等化学试剂均为国产分析纯。Trizol、反转录试剂盒及荧光定量试剂盒购自TaKaRa公司, Annexin V-FITC/PI试剂盒购自北京全式金生物公司。油酸用无水乙醇配制成0.1 mol/L贮存液, 保存于-20℃, 使用前用2%无脂肪酸牛血清白蛋白的M199培养基将脂肪酸稀释成0.01 mol/L。

## 1.2 草鱼肝细胞的培养

草鱼肝细胞(L8824)购自中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。将肝细胞置于10%胎牛血清的M199培养液中, 并于28℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中培养。隔天换液, 待细胞生长至汇合后, 设置处理组和对照组。对照组使用10%胎牛血清的M199培养液培养, 处理组使用含不同浓度油酸的培养液培养。

## 1.3 MTT检测不同浓度油酸对肝细胞活力影响

草鱼肝细胞均匀接种于96孔板, 使用含不同浓度油酸(0、0.2、0.4、0.6、0.8和1 mmol/L)的培养液培养肝细胞24h后, 每孔加入20 μL的MTT (5 mg/mL), 于28℃、5% CO<sub>2</sub>条件下继续培养4h, 吸弃培养液后, 用PBS洗1次后, 每孔加入150 μL二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO), 28℃孵育10min, 溶解细胞中的甲臜。使用酶标仪于490 nm波长处测定吸光度值, 每组6个重复。

## 1.4 油红O染色提取法测定脂质含量

草鱼肝细胞均匀接种于96孔板, 使用上述不同浓度油酸培养细胞24h后, 弃去培养基, 每孔用PBS洗2次, 加入浓度为10%的甲醛固定液固定30min, PBS洗2次, 加入新鲜配制的油红O染液浸染15min, PBS清洗2次, 于倒置显微镜下观察细胞内脂滴的染色情况, 并拍照记录。随后向每孔加入150 μL的异丙醇萃取, 于490 nm波长处测定吸光度值, 每组6个重复。

## 1.5 BODIPY染色法和DAPI染色法观察肝细胞内脂滴和细胞核变化

草鱼肝细胞均匀接种于48孔板, 给予上述不同浓度油酸处理24h。弃去培养基, 每孔加入0.5 mL固定液, 固定30min。吸弃固定液, PBS洗两次, 同时加入BODIPY染色液和DAPI染色液染色15min。吸弃染色液, PBS洗两次, 每次5min。加入少量PBS(防止过干细胞皱缩), 荧光显微镜下观察并照相。

## 1.6 流式细胞术检测不同浓度油酸对肝细胞凋亡的影响

草鱼肝细胞均匀接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 使用含不同浓度油酸的培养基处理细胞24h, 收集细胞,

用预冷的PBS洗涤细胞, 并以100 μL冷结合缓冲液悬浮细胞, 加入10 μL Annexin V-FITC染液和10 μL PI染液混匀室温孵育15min, 再加入400 μL结合缓冲液, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 每组3个重复, 根据阴性对照设定适当的直线门。

## 1.7 Real-time PCR检测相关基因的mRNA的表达

草鱼肝细胞均匀接种于24孔板, 分别使用含0.4和0.8 mmol/L油酸培养基处理细胞24h后, 弃去培养基, PBS清洗2次, 提取总RNA, 并反转录。采用CFX-96实时定量PCR检测系统(Bio-Rad, USA)检测相关基因的mRNA表达水平。20 μL反应体系, 包括: 上下游引物(10 mmol/μL)各0.6 μL、cDNA 1 μL、2×SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 10 μL、灭菌双蒸水加至20 μL。反应条件: 95℃, 10s; 95℃, 15s, 57℃, 15s; 40个循环。根据扩增曲线得到的Ct值, 计算出目标基因与内参基因β-actin的比值2<sup>-ΔΔCt</sup>, 并以此计算出试验组目标基因相对于对照组目标基因的表达倍数2<sup>-ΔΔCt</sup>, 从而制作相对定量的图表, 每组3个重复。基因检测实时定量引物见表1。

## 1.8 统计分析

所有数据均以平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用SPSS18.0软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)以及邓肯(Duncan)多重比较对所得数据进行显著性检验分析。当P<0.05, 认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 油酸处理对草鱼肝细胞活力的影响

从图1可以看出, 随着油酸处理浓度的升高, 肝

表1 实时定量检测引物列表

Tab. 1 Primer used for quantitative real-time PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
PPAR $\gamma$	GATGGTTGGCATGTCACAC TTCCTGACAGTATGGCTC	60
C/EBP $\alpha$	ACCCACATACCACCCTCTCAACA TTCCCTCGATCGCCCATCTTCAT	60
Caspase-3a	CTGATGGGGCATCTGGACTG GTTGGTTCATGCCTGTCGTG	60
Caspase-3b	GCCAGGGTGTGATTGTAA AGGGAGGCTGGAAGTAAATA	60
Caspase-8	GACTAGAAGAGCAAGCCTG TGTACTCGGAGACACCTTTA	60
Caspase-9	GGGATAGATGACCAGATGGA TGTCCTCCAAGAGACATAG	60
AIF	CAGGAGTTTACGCATACCGC CCAATCAGCAGATAGGGAGC	60
Bcl-2	GGCGTCCCAGGTAGATAATA GACAATGGGTGGAACATAGAG	60
Bax	CTCAACCGACTCAAGATGT CGGCACGCAAAGTAGAA	60
β-actin	CGTGACATCAAGGAGAAG GAGTTGAAGGTGGTCTCAT	60

细胞活力先升高后降低( $P<0.05$ ),且油酸处理浓度为0.6 mmol/L时,肝细胞活力最高( $P<0.05$ ),但是当油酸浓度上升至0.8 mmol/L时,肝细胞活力显著下降,但相比于对照组仍有促进作用( $P<0.05$ ),而当油酸浓度达到1 mmol/L时,肝细胞活力被抑制( $P<0.05$ )。

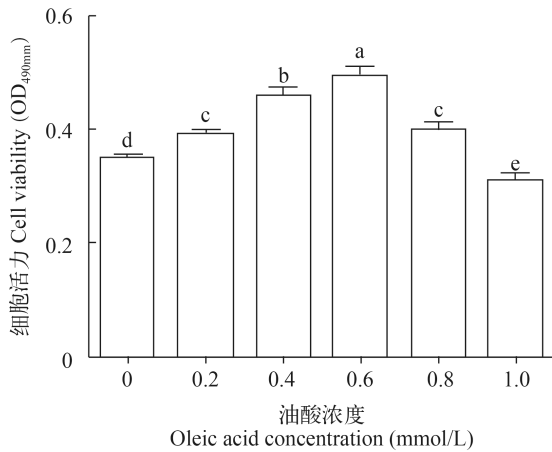


图1 不同浓度油酸对草鱼肝细胞活力的影响( $n=6, \bar{x}\pm SD$ )

Fig. 1 Viability of *Ctenopharyngodon idellus* hepatocytes cells after exposure to various doses of oleic acid ( $n=6, \bar{x}\pm SD$ )

## 2.2 油酸处理对草鱼肝细胞脂质蓄积的影响

**油红O染色及脂质提取结果** 对照组(图2A)细胞边缘清晰,呈多角形排列,细胞间结合紧密,无缝隙。油红O染色显示细胞内少见红色脂滴。而分别使用0.2、0.4和0.6 mmol/L浓度油酸处理后,肝细

胞多变为圆形或椭圆形,脂滴成环状位于细胞膜内侧,将细胞核挤向一侧(分别为图2B-D),但是当油酸处理浓度上升至0.8和1 mmol/L后,肝细胞间结合不再紧密,棱角不清,细胞数量减少(图2E, 2F)。油红O染色提取比色法(以OD值表示)定量分析细胞内TAG的含量,结果表明,随着油酸处理浓度的增加,肝细胞TAG含量逐渐增加( $P<0.05$ ),且在油酸浓度达到0.4 mmol/L时,肝细胞TAG含量达到最大值( $P<0.05$ )。在此之后随油酸的浓度的升高,肝细胞TAG含量显著降低( $P<0.05$ )(图3)。

**BODIPY和DAPI染色** 相比于对照组(图4A),随着油酸处理浓度的升高(0.2—0.6 mmol/L),肝细胞数量逐渐增加,脂滴增多变大,肝细胞核为圆形或椭圆形,呈现均匀的蓝色(分别为图4B-D)。而当油酸浓度达到0.8和1 mmol/L时,肝细胞数量下降,细胞内脂滴减少,细胞核变小,染色质凝集而呈现致密浓染,甚至出现碎块状,出现明显的凋亡特征(图4E, 4F,如图中箭头所示)。

## 2.3 油酸处理对草鱼肝细胞凋亡率的影响

相比于对照组(图5A),0.4 mmol/L浓度油酸处理的草鱼肝细胞凋亡率显著降低(图5C),但在此之后,随着油酸处理浓度的增加,肝细胞凋亡率显著上升( $P<0.05$ )。

## 2.4 油酸处理对草鱼肝细胞脂质生成基因和凋亡相关基因表达的影响

根据以上试验结果选择0.4和0.8 mmol/L浓度的油酸培养草鱼肝细胞,进行相关基因mRNA水平

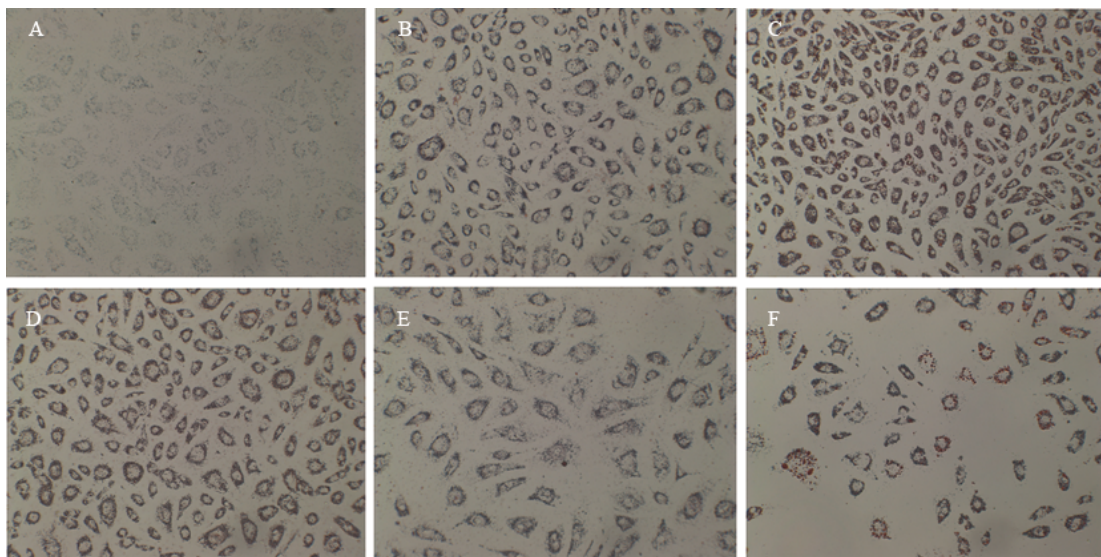


图2 油红O染色观察油酸诱导24h后草鱼肝细胞中的脂质积累和细胞形态变化

Fig. 2 Oil red O staining analysis of the accumulation of lipid droplets and morphological changes in *C. idellus* hepatocytes after 24 hours treatment with oleic acid

A. 0 ( $\times 100$ ); B. 0.2 mmol/L ( $\times 100$ ); C. 0.4 mmol/L ( $\times 100$ ); D. 0.6 mmol/L ( $\times 100$ ); E. 0.8 mmol/L ( $\times 100$ ); F. 1 mmol/L ( $\times 100$ )

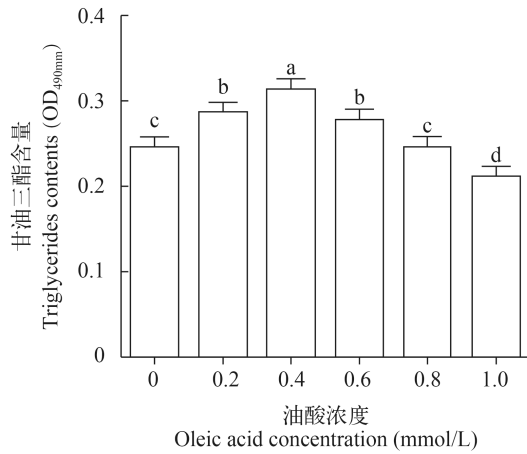


图3 不同浓度油酸处理后草鱼肝细胞中甘油三酯含量( $n=6$ ,  $\bar{x}\pm\text{SD}$ )

Fig. 3 Triglyceride content in oleic acid-treated *C. idellus* hepatocytes ( $n=6$ ,  $\bar{x}\pm\text{SD}$ )

的检测。如图6所示,两种油酸浓度处理肝细胞24h后, *PPAR $\gamma$* 和*C/EBP $\alpha$* 基因的mRNA表达量均显著上升( $P<0.05$ )。凋亡相关基因mRNA水平的检测发现,与对照组相比,0.4 mmol/L油酸抑制*Caspase-3b*和*Caspase-9*的mRNA表达( $P<0.05$ ),但对*Caspase-8*和*AIF*的mRNA表达并无影响。而当0.8 mmol/L油酸处理肝细胞时, *Caspase-3b*、*Caspase-8*、*Caspase-9*和*AIF*的mRNA表达均显著上升( $P<0.05$ )。计算*Bcl-2/Bax* mRNA比值,发现0.4 mmol/L油酸处理组的*Bcl-2/Bax*比值显著高于对照组,而0.8 mmol/L油酸处理组*Bcl-2/Bax*比值显著低于对照组( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

鱼类营养性脂肪肝是一种由于高能日粮的摄入,肝细胞中TAG合成量超过机体需要量,而在肝细胞内过量蓄积脂质为特征的营养性疾病<sup>[12]</sup>,体内循环的FFA在肝脂肪变性过程中起到了至关重要的作用<sup>[17]</sup>。正常生理状态时,肝细胞内脂肪酸首先在线粒体中进行 $\beta$ 氧化为机体提供能量,多余的脂肪酸在内质网中合成脂蛋白或构成细胞的结构脂肪;当脂肪酸过量输送至肝脏时,超过了肝细胞的处理能力,导致脂肪酸的 $\beta$ 氧化和脂蛋白合成障碍, TAG在肝细胞内大量蓄积进而导致细胞的脂肪变性<sup>[18, 19]</sup>。

目前,对鱼类营养性脂肪肝的研究最常采用的是动物模型,鲜有采用细胞模型进行研究的报道<sup>[20-22]</sup>。本研究采用不同浓度的油酸处理草鱼肝细胞,研究外源脂肪酸对草鱼肝细胞活力,脂质蓄积和凋亡的影响。研究发现,随着油酸处理浓度的增加,肝细胞活力和脂质含量均呈现先上升后下降的趋势。已有研究指出,油酸能够促进小鼠原代肝细胞内TAG富集及脂滴的积累,但对细胞凋亡的影响甚小<sup>[23]</sup>。Vinciguerra等<sup>[24]</sup>发现油酸的处理浓度在0.1 mmol/L以下时,并不能影响HepG2的活性,反而促进细胞的增殖;当油酸浓度升高到0.2 mmol/L时,细胞的活力显著下降, *Caspase-3*酶活性增加。但也有研究表明,0.2 mmol/L油酸并无细胞毒性,也不会诱导细胞凋亡<sup>[25]</sup>。Gomez-Lechon等<sup>[26]</sup>等用油酸处理人原代肝细胞,发现当油酸浓度上升至2 mmol/L时对细胞

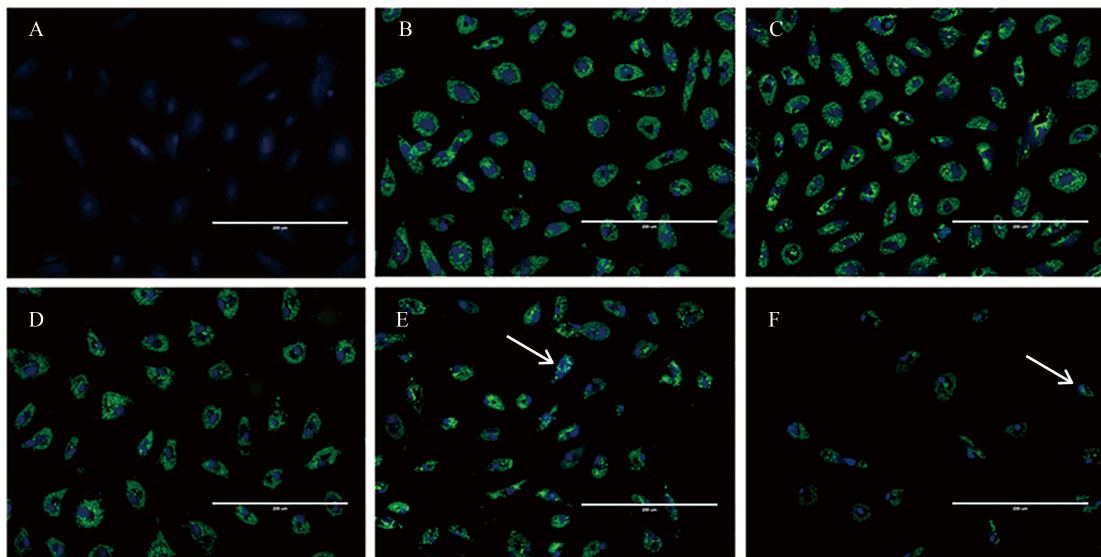


图4 BODIPY和DAPI染色检测油酸处理后草鱼肝细胞脂滴和细胞核的变化( $\times 200$ )

Fig. 4 BODIPY and DAPI staining analysis of lipid droplets and nuclear change in *C. idellus* hepatocytes after treatment with oleic acid ( $\times 200$ )

A. 0 ( $\times 200$ ); B. 0.2 mmol/L ( $\times 200$ ); C. 0.4 mmol/L ( $\times 200$ ); D. 0.6 mmol/L ( $\times 200$ ); E. 0.8 mmol/L ( $\times 200$ ); F. 1 mmol/L ( $\times 200$ )



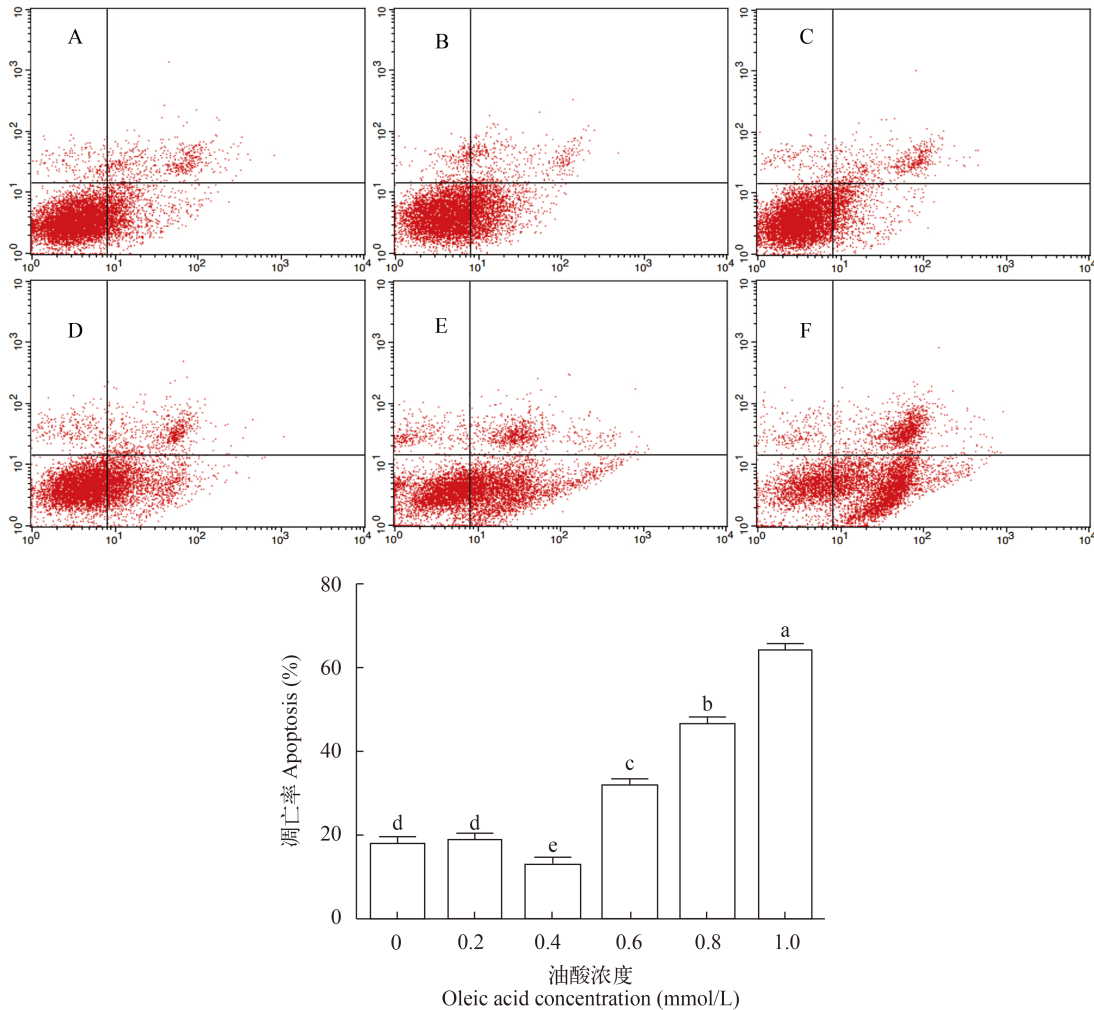


图5 Annexin V-FITC/PI流式细胞术检测油酸诱导草鱼肝细胞凋亡 ( $n=3, \bar{x} \pm SD$ )

Fig. 5 Apoptosis of *C. idellus* hepatocytes were analyzed by flow cytometry with Annexin V-FITC and PI staining ( $n=3, \bar{x} \pm SD$ )

四个象限: 上左. 损伤及碎片; 上右. 晚期凋亡细胞; 下左. 正常细胞; 下右. 早期凋亡细胞

Four quadrants: UL. Injured cells; UR. Late apoptotic cells; LL. Viable cells; LR. Early apoptotic cells. A. 0; B. 0.2 mmol/L; C. 0.4 mmol/L; D. 0.6 mmol/L; E. 0.8 mmol/L; F. 1 mmol/L

活性仍没有显著影响。Maestre等<sup>[27]</sup>研究显示, 油酸浓度超过0.5 mmol/L时, Ins-1细胞有一半以上发生凋亡。而Ariel等<sup>[28]</sup>发现, 使用1 mmol/L的油酸和棕榈酸混合物处理HepG2细胞可以刺激*TNF- $\alpha$* 的表达, 促进肝细胞脂毒性, 诱导细胞的凋亡。本研究发现, 油酸浓度在0.6 mmol/L以下时, 有促进细胞活力的作用; 而当浓度上升至0.8 mmol/L时, 细胞活力显著降低( $P < 0.05$ )。这可能是因为草鱼肝细胞可以吸收利用一定水平的脂肪酸, 而且低浓度的油酸可能通过激活AKT通路促进细胞的增殖和TAG的累积; 而当油酸的浓度超过了机体所能承受的阈值, 就会造成细胞的损伤和凋亡<sup>[29]</sup>。

众所周知, 转录因子PPAR $\gamma$ 在调节脂肪酸的摄取和贮存方面发挥着关键作用<sup>[30]</sup>。研究表明, 小鼠肝脏中特异性敲除PPAR $\gamma$ 后, 可以免受肝脏脂肪变

性的影响<sup>[31, 32]</sup>, 而过表达PPAR $\gamma$ 后, 小鼠肝脏发生脂肪变性, 成脂基因和脂肪合成相关基因被激活<sup>[33]</sup>。C/EBP $\alpha$ 被认为是调节脂肪细胞分化的关键转录因子<sup>[34]</sup>, 但有研究发现C/EBP家族在非酒精性脂肪肝(NAFLD)的形成中也发挥着重要的作用<sup>[35]</sup>。Zhang等<sup>[36]</sup>研究发现C/EBP $\alpha$ 的基因和蛋白表达在NAFLD的早中期升高, 而在后期降低。同时有研究证明NAFLD模型中PPAR $\gamma$ 和C/EBP $\alpha$ 的mRNA表达均显著升高, 说明PPAR $\gamma$ 和C/EBP $\alpha$ 对肝细胞脂质蓄积过程具有重要的作用<sup>[37]</sup>。在本试验中, 0.4和0.8 mmol/L两种浓度油酸处理时, PPAR $\gamma$ 和C/EBP $\alpha$ 的基因表达量都显著上调, 表明外源性脂肪酸造成肝细胞脂质积累很可能是通过促进PPAR $\gamma$ 和C/EBP $\alpha$ 的表达实现的。

细胞凋亡是多基因严密调控的结果。目前认

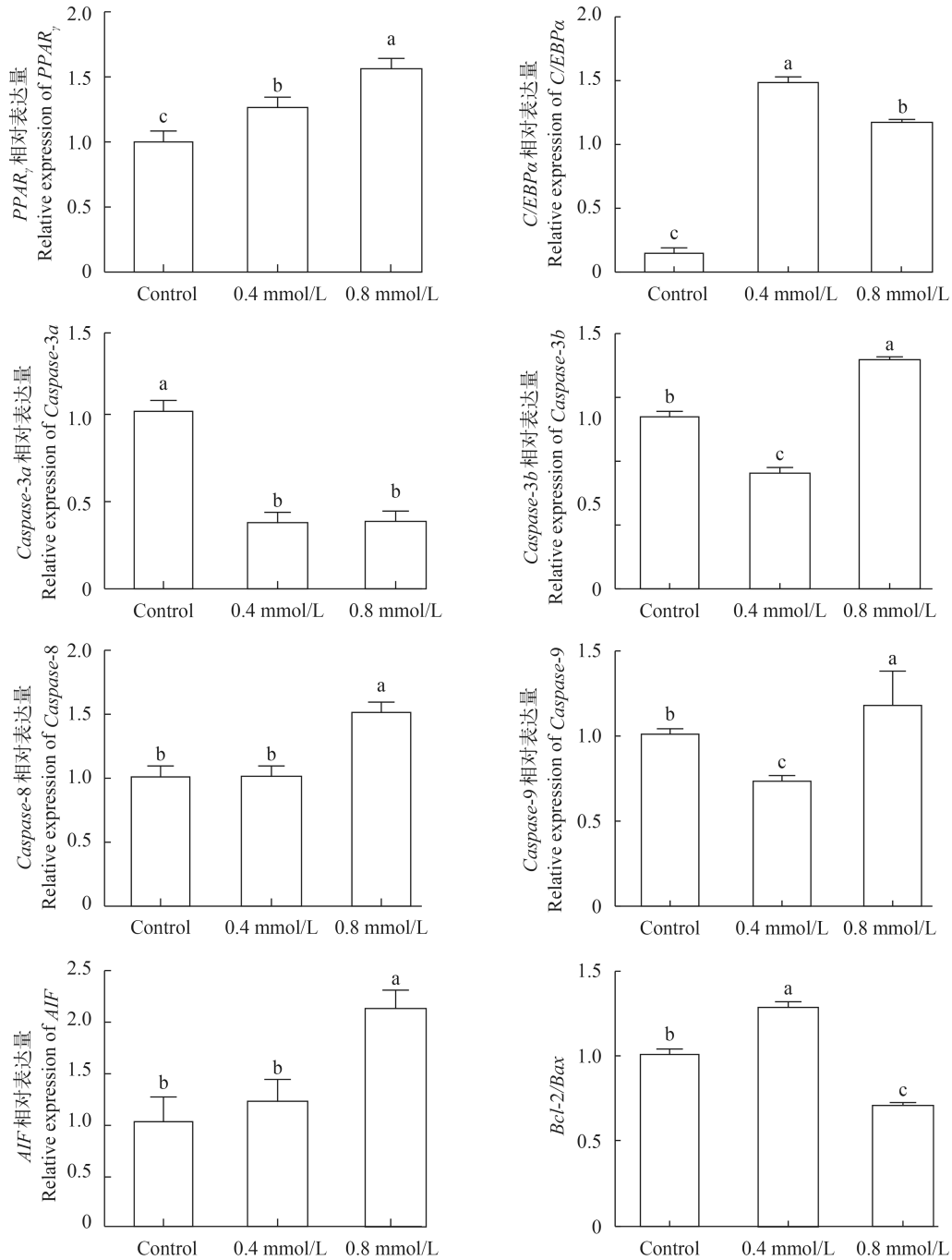


图6 Real-time PCR测定油酸诱导后草鱼肝细胞中相关基因的相对表达量( $n=3, \bar{x} \pm SD$ )

Fig. 6 The relative expression level of related genes in *C. idellus* hepatocytes after treatment with oleic acid were examined by Real-time PCR ( $n=3, \bar{x} \pm SD$ )

为, 细胞凋亡发生机制主要包括死亡受体信号转导通路、线粒体信号通路和内质网途径<sup>[38]</sup>, 而在肝细胞凋亡中, 通常将内质网凋亡途径包含在线粒体凋亡信号通路中<sup>[39]</sup>。Malhi等<sup>[40]</sup>发现过量的FFA能够激活JNK依赖的线粒体凋亡途径导致细胞色素C释放和促凋亡蛋白Bcl-2激活, 诱发细胞凋亡。Feldstein等<sup>[41]</sup>认为油酸处理肝细胞会使溶酶体失去稳定性, 进而激活NF- $\kappa$ B依赖的*TNF- $\alpha$* 表达, 导致细胞

的凋亡。在肝细胞凋亡过程中, Caspase家族也发挥着巨大的作用。本实验室研究发现, 草鱼的*Caspase-3*基因分为*Caspase-3a* (GenBank登录号KP145001)和*Caspase-3b* (GenBank登录号KP145002)两种亚型, 本试验检测了两种不同浓度油酸处理草鱼肝细胞时这两种基因亚型的表达状况, 发现*Caspase-3a*和*Caspase-3b*的表达模式完全不同。高低油酸浓度处理的肝细胞中, *Caspase-3a*的mRNA表达量都显著

下降;而Caspase-3b的mRNA表达量在低浓度油酸处理时显著下降,在高浓度油酸处理时显著上升( $P < 0.05$ )。同一基因两种基因型的不同表达,说明在FFA诱导的草鱼肝细胞凋亡中,Caspase-3b发挥主要作用。Caspase-8和Caspase-9是凋亡的启动者,二者活化后再激活下游的Caspase-3,触发凋亡的级联反应,导致细胞的凋亡<sup>[42]</sup>。凋亡诱导因子(AIF)可以引发不依赖于Caspase的细胞凋亡,当细胞受到凋亡刺激后,AIF释放,引起细胞核内染色体凝聚、DNA片段化<sup>[43]</sup>。本研究发现,当油酸处理浓度达到0.8 mmol/L时,肝细胞内Caspase-8、Caspase-9和AIF基因的mRNA水平显著上调( $P < 0.05$ )。而0.4 mmol/L油酸处理组,Caspase-9的基因表达量甚至低于对照组,说明0.8 mmol/L的油酸已经超过细胞对FFA的最大承受能力,可能已造成细胞的损伤。细胞受到凋亡刺激时,抗凋亡蛋白活性被抑制,并激活促凋亡蛋白活性,导致促凋亡因子释放<sup>[44]</sup>。Bcl-2/Bax mRNA的比值被称作凋亡开关,当二者比值升高时,抑制细胞的凋亡;比值降低时,促进细胞的凋亡<sup>[45]</sup>。在本研究中,0.4 mmol/L油酸处理肝细胞时,Bcl-2/Bax比值上升,显示抗凋亡因子占优势,细胞的凋亡被抑制;当油酸浓度上升至0.8 mmol/L时,Bcl-2/Bax mRNA比值显著下降,说明促凋亡因子起主导作用,细胞凋亡被激活。Shimabukuro等<sup>[46]</sup>也发现1 mmol/L的FFA混合物(油酸:棕榈酸2:1)能抑制胰岛B细胞Bcl-2的基因和蛋白表达,而添加瘦素可以使其恢复正常。而Maestre等<sup>[27]</sup>的研究发现,油酸孵育不仅使得INS-1细胞的Bcl-2蛋白表达下调,同时还会增加细胞色素C和AIF的释放量。提示FFA对细胞的毒性可能是通过损伤线粒体进行的<sup>[27]</sup>。

综上所述,本研究发现,随着油酸处理浓度的增加,肝细胞脂质蓄积量呈现一个先增加后降低的趋势,脂质合成基因的表达呈现相同的趋势。且低浓度的油酸并不会造成肝细胞的凋亡,反而促进肝细胞增殖,过高浓度的油酸则会导致细胞凋亡。这说明草鱼肝细胞可耐受一定水平的外源脂肪酸,但脂肪酸剂量过高时,则会引起细胞功能紊乱,导致细胞的凋亡,这可能与过量的FFA促使草鱼肝细胞中促凋亡因子Bcl-2和AIF被激活,诱发Caspase家族的级联反应,同时抑制了抗凋亡因子Bax的活性密切相关。

#### 参考文献:

[1] Watanabe T. Lipid nutrition in fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1982, **73**(1): 3—15

[2] Sheridan M A. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1988, **90**(4): 679—690

[3] Guo X Z, Liang X F, Fang L, et al. Effects of non-protein energy sources on serum biochemical indices and histology of liver in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(3): 582—587 [郭小泽, 梁旭方, 方刘, 等. 饲料中非蛋白能量源对草鱼血清生化指标和肝脏组织的影响. 水生生物学报, 2014, **38**(3): 582—587]

[4] Tocher D R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish [J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2003, **11**(2): 107—184

[5] Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2010, **1801**(3): 299—310

[6] Bradbury M W. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in Steatosis [J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2006, **290**(2): G194—G198

[7] Ji J, Zhang L, Wang P, et al. Saturated free fatty acid, palmitic acid, induces apoptosis in fetal hepatocytes in culture [J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2005, **56**(6): 369—376

[8] Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling V, Hoeks J, et al. Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2010, **1801**(3): 266—271

[9] Unger R H, Orci L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2002, **1585**(2): 202—212

[10] Gentile C L, Pagliassotti M J. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2008, **19**(9): 567—576

[11] Zeng D, Mai K S, Ai Q H. Effects of fatty liver syndrome on liver lipid composition, metabolism related enzymes and antioxidase in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, **38**(4): 542—546 [曾端, 麦康森, 艾庆辉. 脂肪肝病变大黄鱼肝脏脂肪酸组成, 代谢酶活性及抗氧化能力的研究. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2008, **38**(4): 542—546]

[12] Du Z Y. Causes of fatty liver in farmed fish: a review and new perspectives [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, **9**: 53 [杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考. 水产学报, 2014, **9**: 53]

[13] Ji H, Li J, Liu P. Regulation of growth performance and lipid metabolism by dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B:*

- Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, **159**(1): 49—56
- [14] Ji H, Cao Y Z, Liu P, *et al.* Effect of dietary HUFA on the lipid metabolism in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(5): 881—889 [吉红, 曹艳姿, 刘品, 等. 饲料中HUFA影响草鱼脂质代谢的研究. 水生生物学报, 2009, **33**(5): 881—889]
- [15] He A Y, Ning L J, Chen L Q, *et al.* Systemic adaptation of lipid metabolism in response to low-and high-fat diet in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Physiological Reports*, 2015, **3**(8): e12485
- [16] Li C, Liu P, Ji H, *et al.* Dietary n-3 highly unsaturated fatty acids affect the biological and serum biochemical parameters, tissue fatty acid profile, antioxidation status and expression of lipid-metabolism-related genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, **21**(3): 373—383
- [17] Du Z Y, Clouet P, Zheng W H, *et al.* Biochemical hepatic alterations and body lipid composition in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed high-fat diets [J]. *British Journal of Nutrition*, 2006, **95**(05): 905—915
- [18] Perry R J, Samuel V T, Petersen K F, *et al.* The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2014, **510**(7503): 84—91
- [19] Saponaro C, Gaggini M, Carli F, *et al.* The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: a critical point in metabolic homeostasis [J]. *Nutrients*, 2015, **7**(11): 9453—9474
- [20] Du Z Y, Clouet P, Huang L M, *et al.* Utilization of different dietary lipid sources at high level in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): mechanism related to hepatic fatty acid oxidation [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2008, **14**(1): 77—92
- [21] Kuwashiro S, Terai S, Oishi T, *et al.* Telmisartan improves nonalcoholic steatohepatitis in medaka (*Oryzias latipes*) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation [J]. *Cell and Tissue Research*, 2011, **344**(1): 125—134
- [22] Lu R H, Liang X F, Sun J J, *et al.* Establishment of a model of grass carp hepatocyte steatosis and analysis of lipid metabolism gene expression [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, **22**(1): 24—32 [卢荣华, 梁旭方, 孙君君, 等. 草鱼肝细胞脂变模型的建立及脂代谢基因表达分析. 中国水产科学, 2015, **22**(1): 24—32]
- [23] Mei S, Ni H M, Manley S, *et al.* Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011, **339**(2): 487—498
- [24] Vinciguerra M, Carrozzino F, Peyrou M, *et al.* Unsaturated fatty acids promote hepatoma proliferation and progression through downregulation of the tumor suppressor PTEN [J]. *Journal of Hepatology*, 2009, **50**(6): 1132—1141
- [25] Vock C, Gleissner M, Klapper M, *et al.* Oleate regulates genes controlled by signaling pathways of mitogen-activated protein kinase, insulin, and hypoxia [J]. *Nutrition Research*, 2008, **28**(10): 681—689
- [26] Gomez-Lechon M J, Donato M T, Martínez-Romero A, *et al.* A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis [J]. *Chemico-biological Interactions*, 2007, **165**(2): 106—116
- [27] Maestre I, Jordán J, Calvo S, *et al.* Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the  $\beta$ -cell line INS-1 [J]. *Endocrinology*, 2003, **144**(1): 335—345
- [28] Okamoto Y, Tanaka S, Haga Y. Enhanced GLUT2 gene expression in an oleic acid-induced in vitro fatty liver model [J]. *Hepatology Research*, 2002, **23**(2): 138—144
- [29] Vinciguerra M, Veyrat-Durebex C, Moukil M A, *et al.* PTEN down-regulation by unsaturated fatty acids triggers hepatic steatosis via an NF- $\kappa$ Bp65/mTOR-dependent mechanism [J]. *Gastroenterology*, 2008, **134**(1): 268—280
- [30] Cristancho A G, Lazar M A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, **12**(11): 722—734
- [31] Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, *et al.* Liver peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(36): 34268—34276
- [32] Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, *et al.* Liver-specific disruption of PPAR $\gamma$  in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, **111**(5): 737
- [33] Yu S, Viswakarma N, Batra S K, *et al.* Identification of promethin and PGLP as two novel up-regulated genes in PPAR $\gamma$ 1-induced adipogenic mouse liver [J]. *Biochimie*, 2004, **86**(11): 743—761
- [34] Linhart H G, Ishimura-Oka K, DeMayo F, *et al.* C/EBP $\alpha$  is required for differentiation of white, but not Brown adipose tissue [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, **98**(22): 12532—12537
- [35] Qiao L, MacLean P S, You H, *et al.* Knocking down liver CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  by adenovirus-transduced silent interfering ribonucleic acid improves hepatic gluconeogenesis and lipid homeostasis in db/db mice [J]. *Endocrinology*, 2006, **147**(6): 3060—3069
- [36] Zhang X, Yang J, Guo Y, *et al.* Functional proteomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease in rat models: Enoyl-coenzyme a hydratase down-regulation exacerbates hepatic steatosis [J]. *Hepatology*, 2010, **51**(4): 1190—1199
- [37] Pettinelli P, Videla L A. Up-regulation of PPAR- $\gamma$  mRNA



- expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011, **96**(5): 1424—1430
- [38] Jaeschke H, Bajt M L. Regulation of apoptotic signaling pathways in hepatocytes *in vivo* [J]. *Hepatology*, 2003, **37**(4): 942—945
- [39] Gottlieb R A. Mitochondria and apoptosis [J]. *Neurosignals*, 2001, **10**(3—4): 147—161
- [40] Malhi H, Bronk S F, Werneburg N W, *et al.* Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(17): 12093—12101
- [41] Feldstein A E, Werneburg N W, Canbay A, *et al.* Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway [J]. *Hepatology*, 2004, **40**(1): 185—194
- [42] Yin X M, Ding W X. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury [J]. *Current Molecular Medicine*, 2003, **3**(6): 491—508
- [43] Cregan S P, Dawson V L, Slack R S. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death [J]. *Oncogene*, 2004, **23**(16): 2785—2796
- [44] Ramalho R M, Cortez-Pinto H, Castro R E, *et al.* Apoptosis and Bcl-2 expression in the livers of patients with steatohepatitis [J]. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2006, **18**(1): 21—29
- [45] Scopa C D, Vagianos C, Kardamakis D, *et al.* bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with rectal cancer [J]. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 2001, **9**(4): 329—334
- [46] Shimabukuro M, Wang M Y, Zhou Y T, *et al.* Protection against lipoapoptosis of  $\beta$  cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, **95**(16): 9558—9561

## INFLUENCE OF FATTY ACIDS ON LIPID ACCUMULATION AND APOPTOSIS STATUS OF GRASS CARP *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* HEPATOCYTE *IN VITRO*

LI Xue-Xian, SUN Jian, JI Hong and CHEN Hao-Jie

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** To investigate the effects of fatty acids on hepatocyte lipid metabolism and health status of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), the normal grass carp hepatocytes were cultured with different concentrations of oleic acid (0—1 mmol/L) for 24h to measure cell viability and lipids content by methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay and oil red O staining, respectively. The lipid droplets and nuclear of hepatocytes were observed with BODIPY and DAPI staining. Hepatocyte apoptosis was analyzed by flow cytometry. Real-time qPCR was performed to detect the mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (*PPAR $\gamma$* ), CCAAT/enhancer binding protein alpha (*C/EBP $\alpha$* ) and apoptosis related genes [*Caspase3a*, *Caspase-3b*, *Caspase-8*, *Caspase-9*, apoptosis inducing factor (*AIF*), *Bcl-2*, *Bax*]. The results showed that the cell viability and intracellular lipid accumulation of hepatocytes increased significantly after treatment with 0.6 and 0.4 mmol/L oleic acid ( $P < 0.05$ ). The lowest hepatocytes apoptosis rate was in 0.4 mmol/L group and the highest was in 1 mmol/L oleic acid group ( $P < 0.05$ ). The mRNA levels of *Caspase-3b* and *Caspase-9* reduced significantly and the mRNA ration of *Bcl-2/Bax* was elevated by 0.4 mmol/L oleic acid ( $P < 0.05$ ). Consistently, 0.4 mmol/L oleic acid significantly reduced *caspase-3b*, *caspase-9* and *AIF* mRNA levels and increased the mRNA ratio of *Bcl-2/Bax* ( $P < 0.05$ ) and these genes showed opposite expression pattern in hepatocytes treated with 0.8 mmol/L oleic acid ( $P < 0.05$ ). These results demonstrated dosage-dependent role for fatty acids in grass carp hepatocytes viability and intracellular lipid accumulation via the regulation of the genes related to lipid metabolism and apoptosis.

**Key words:** Fatty Acids; Hepatocyte; Apoptosis; *Ctenopharyngodon idellus*