

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000500

自噬相关蛋白 Atg5 在 BPA 所致肝脏脂质沉积中的作用研究

李 婷, 高茹菲, 杨淑敏, 刘露路, 甄乾娜, 向小姣, 肖晓秋, 李启富

(重庆医科大学附属第一医院内分泌科, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察自噬相关蛋白 Atg5 是否介导双酚 A(bisphenol A, BPA) 所致的肝脏脂质沉积。**方法:**将 HepG2 肝细胞分为对照组、BPA 不同浓度(1、10 $\mu\text{mol/L}$)干预组、阳性对照组即 200 $\mu\text{mol/L}$ 油酸(oleic acid, OA)联合 400 $\mu\text{mol/L}$ 软脂酸(Palmitic acid, PA), 分别给予上述不同干预 24 h。采用化学酶促-比色法定量检测细胞内甘油三酯(triglyceride, TG)含量, 油红 O 染色观察细胞内脂滴沉积情况。Real-time PCR 及 Western blot, 免疫荧光方法检测在不同干预情况下 HepG2 细胞内 Atg5 的表达水平。**结果:**①不同浓度 BPA 干预后, HepG2 细胞内 TG 含量均有不同程度的升高, 其中 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 组升高具有统计学意义(0.197 ± 0.033 ; 0.094 ± 0.014 , $P=0.031$); ②油红 O 染色结果与 TG 定量一致。③Real-time PCR 结果表明, 与对照组相比 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 组 Atg5 mRNA 表达并无明显变化(0.93 ± 0.088 ; 1.0175 ± 0.0624 , $t=0.811$, $P=0.428$); Western blot 结果显示与对照组相比 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 组其蛋白表达明显减少(0.519 ± 0.059 ; $t=0.8101$, $P=0.000$); 免疫荧光进一步检测发现, 与对照组相比 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 组 Atg5 荧光小点数量明显减少。**结论:**自噬相关蛋白 Atg5 可能介导 BPA 所致的肝脏脂质沉积的发生。

【关键词】双酚 A; 脂质沉积; 自噬; Atg5**【中图分类号】**R589.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-09-11

Regulation of Atg5 on hepatic lipid deposition induced by bisphenol A

Li Ting, Gao Rufe, Yang Shumin, Liu Lulu, Zhen Qianna, Xiang Xiaojiao, Xiao Xiaoqi, Li Qifu

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of autophagy related protein Atg5 on hepatic lipid deposition caused by bisphenol A (BPA) in HepG2 cells. **Methods:** HepG2 cells were cultured and divided into control group, different concentrations of BPA groups (1, 10 $\mu\text{mol/L}$), and positive control group (a mixture of free fatty acids (FFAs): oleate 200 $\mu\text{mol/L}$ plus palmitate 400 $\mu\text{mol/L}$), treated for 24 h. The content of intracellular triglyceride (TG) was measured by enzymic assay kit, and oil red O staining was used to determine the intracellular lipid droplet formation visually. Western blot and real-time PCR were used to detect the protein and mRNA expression of Atg5, respectively. Immunofluorescence was used to detect the expression of Atg5. **Results:** ①The level of TG was significantly higher in 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA group than in control group (0.197 ± 0.033 , 0.094 ± 0.014 , $P=0.031$). ②Oil red O staining also showed that 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA promoted lipid accumulation in HepG2 cells. ③The mRNA expression levels of Atg5 in 10 μM BPA group did not change compared with that in control group (0.93 ± 0.088 ; 1.0175 ± 0.0624 , $t=0.811$, $P=0.428$), however, the protein expression levels of Atg5 was lower in 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA group than that in control group (0.519 ± 0.059 ; $t=0.8101$, $P=0.000$). Besides, immunofluorescence indicated that the fluorescent dots were obviously reduced in 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA group than in control group. **Conclusion:** Atg5 could be involved in hepatic lipid deposition induced by BPA.

【Key words】bisphenol A; lipid accumulation; autophagy; Atg5

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指由非酒精性原因造成肝脏脂代

谢障碍, 导致脂质[主要是甘油三酯(triglycerides, TG)]在肝脏中大量沉积, 因此肝脏脂质沉积是其发生发展的重要病理过程^[1]。既往大量研究表明, NAFLD 与肥胖、2 型糖尿病、胰岛素抵抗、高血压、动脉粥样硬化等多种代谢性疾病关系密切, 严重威胁人类健康, 引起人们的广泛关注^[2]。近年来研究发现, 环境内分泌干扰物与肝脏脂质沉积的发生有着密切联系^[3]。

双酚 A(bisphenol A, BPA)作为环境内分泌干

作者介绍: 李 婷, Email: ltzb1711@163.com,

研究方向: 糖尿病与代谢性疾病。

通信作者: 李启富, Email: liqifu@yeah.net

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81370954、81170751、81300486); 国家临床重点专科建设项目。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150308.2351.026.html>
(2015-03-08)

扰物的代表性物质,可通过其类雌激素功能,干扰生物体内环境稳态,影响机体代谢过程^[4]。BPA 主要用于生产环氧树脂等多种材料,广泛存在于人类生活的各个方面,如婴儿奶瓶、食品包装材料等,这些物品中的 BPA 在高温、高酸条件下可渗入食品或饮料中被人体摄入^[5]。越来越多的证据表明,BPA 对能量代谢起着重要调节作用,可通过干扰与能量代谢相关的核受体而影响代谢性疾病如肥胖、代谢综合征等的发生发展^[6]。Trasande 等观察到尿 BPA 含量高的儿童发生肥胖的风险明显增加^[7]。此外,肝脏作为重要的能量代谢器官,在维持糖脂代谢平衡中起着重要作用,而近年来一系列研究表明 BPA 可引起肝脏糖脂代谢紊乱。Marmugi 等^[8]用 BPA 喂养 CD1 小鼠 28 d 后,小鼠肝脏发生脂质沉积。但目前 BPA 导致肝脏脂质沉积的具体机制尚未完全阐明。

自噬是生物体内一种相对保守的对物质进行分解代谢的过程,其通过自噬-溶酶体途径来维持生物体内环境稳定^[9]。2009 年,Singh R 等提出“脂质自噬”,即内质网通过对细胞内的脂滴进行包裹,最后经溶酶体内多种酶进行分解的过程^[10]。自噬受一系列自噬相关蛋白的调控,研究显示,自噬相关蛋白 Atg5 在自噬形成过程中必不可少。当机体受到自噬诱导信号刺激时,Atg5 活性增强,促进自噬发生,而沉默 Atg5 可抑制自噬的形成^[11-12]。另有研究表明,沉默或敲除 Atg5 可导致脂质沉积的发生^[10]。可见,Atg5 在脂代谢中起着重要作用,但在 BPA 导致的肝脏脂质沉积中 Atg5 是否起作用尚未有报道。因此本研究通过在体外构建 BPA 诱导的 HepG2 细胞脂质沉积模型,观察 Atg5 在脂质沉积过程中的变化情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

无酚红 DMEM 培养基、胎牛血清购于美国 Gibco 公司,100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素购于美国 Hyclone 公司,油酸及软脂酸、油红 O 染料、双酚 A 购于美国 Sigma 公司;TG 测定试剂盒购于浙江东瓯诊断产品有限公司;Lowry 法蛋白浓度测定试剂盒购于上海生工;RNA 提取试剂 Trizol 购于 invitrogen 公司;PrimeScript RT reagent kit 及 SYBR Premix Ex Taq TM II 均为日本 Takara 产品;细胞全蛋白提取试剂盒购于南京凯基生物公司;BCA 法蛋白定量试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;PCR 引物由 primer premier5.0 软件设计,由上海生工合成;DEPC 水购于北京鼎国公司; β -actin 鼠多抗 IgG、HRP 标记山羊抗兔抗体、HRP 标记山羊抗小鼠抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司,Atg5 兔单抗 IgG 购于北京博奥森生物技术有限公司,FITC-

羊抗兔 IgG 抗体购于康为世纪,DAPI、防荧光淬灭封片剂均购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞(来源于 ATCC)培养于含 10% 胎牛血清、1%青链霉素、2 mmol/L 谷氨酸、50 mmol/L 丙酮酸钠、1 g/L 葡萄糖的无酚红 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的细胞孵箱中静置常规培养,每 1~2 d 进行换液,当细胞融合达 90%左右密度时进行传代。

1.2.2 实验分组 当细胞融合至 70%左右,采用不同因素干预细胞 24 h,观察细胞脂质沉积及 Atg5 表达。分组为:(1)对照组(control);(2)不同浓度 BPA 干预组:BPA 终浓度为 1、10 μ mol/L;(3)阳性对照组(OA+PA);200 μ mol/L OA 联合 400 μ mol/L PA,分别干预 24 h 后进行相应指标检测。

1.2.3 油红 O 染色 将 HepG2 细胞接种于提前放置玻片的 24 孔板内,种入 1×10^5 个细胞,常规培养至适当密度后,加入不同干预因素处理 24 h 后进行油红 O 染色:吸去培养基,用 PBS 清洗 3 次;加入 4%多聚甲醛固定 30 min;PBS 洗净;油红 O 染色 30 min;PBS 清洗 3 次;苏木精复染细胞核 1 min,自来水充分进行冲洗后风干,甘油明胶进行封片,于 400 倍显微镜下观察脂质沉积情况并照相。

1.2.4 化学酶促-比色法检测细胞内甘油三酯水平 将细胞按照 5×10^5 的密度接种于 6 孔板中,长至适宜密度后干预 24 h,胰酶消化后常规收集 6 孔板内细胞;于细胞沉淀中加入 1 ml 正己烷、异丙醇混合抽提剂(2.0:3.5),超声破碎仪破碎细胞后离心;收集上清液真空干燥,用比色法检测 TG 含量。余下沉淀干燥后用 NaOH 溶液于室温溶解过夜,之后用 Lowry 法测定细胞总蛋白量,计算各组 TG 与细胞总蛋白的比值,得出各组细胞内 TG 的相对含量。

1.2.5 Western blot 将细胞接种于 75 cm^2 培养皿中,经实验干预后常规收集细胞,按试剂盒说明书提取细胞总蛋白后,并用 BCA 法测定蛋白浓度,蛋白上样量为 50 μ g。以 β -actin 为内参蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,待蛋白分离之后,将目的蛋白转至 PVDF 膜上,用 5% BSA 封闭 2 h;加入抗 Atg5 抗体(1:1 000)、抗 β -actin 抗体(1:500)于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日将膜取出 TBST 清洗 3 次,每次 10 min;二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,经 TBST 清洗 3 次后,用 ECL 化学发光法进行显色,并用法国 Vilber 凝胶成像系统进行成像,运用 Fusion 软件进行条带灰度值分析。

1.2.6 免疫荧光 将细胞按照 1.2.3 方法制作细胞爬片,经实验干预后,用 4%多聚甲醛固定,0.3% Triton 破膜,以 5%山羊血清封闭 2 h。洗去血清,于爬片上滴加 1:25 比例稀释的一抗,湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 日以 PBS 洗涤含细胞的爬片后,加 1:25 稀释的二抗(FITC 标记山羊抗兔 IgG),湿盒内 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h 后,再以 PBS 洗涤,加入 DAPI 染核,并用 PBS 洗涤,待爬片干后用防荧光淬灭剂封片,立即于荧光显微镜下观察,拍照。

1.2.7 Real-time PCR 将细胞按照 5×10^5 的密度接种于 6 孔板中,干预 24 h 后收集细胞。用 Trizol 法提取细胞内总 RNA,分光光度计(美国 Thermo 公司)检测所提 RNA 样品浓度及其纯度。根据 Takara 逆转录试剂盒说明书,以 1 μ g RNA

作为模版,将 RNA 逆转录为 cDNA,其中 20 μL 逆转录体系包括 5 $\times$ PrimeScript Buffer 4 μL 、PrimeScript RT Enzyme 1 μL 、Oligo dT Primer 1 μL 、Random 6 mers 1 μL 、RNase free H_2O 、1 μg 总 RNA。进行两步法逆转录反应,逆转条件为:第 1 步 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min;第 2 步 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,将逆转录的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。以 GAPDH 作为内参进行实时荧光定量 PCR,检测 Atg5 mRNA 的表达,引物序列见表 1。扩增反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 预变性;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。RT-PCR 的结果根据 Ct 值计算比较: $\Delta\text{Ct}=\text{Ct}_{\text{目的}}-\text{Ct}_{\text{GAPDH}}$; $\Delta\Delta\text{Ct}=\text{处理组}\Delta\text{Ct}-\text{对照组}\Delta\text{Ct}$;目的基因 mRNA 表达记为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

表 1 定量 PCR 引物序列

Tab.1 Primers sequence for real-time PCR

基因	引物序列
GAPDH	正义链:5'-CACCCACTCCTCCACCTTTGA-3'
	反义链:5'-CCACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'
Atg5	正义链:5'-GATACCAGAGGGCGGAAG-3'
	反义链:5'-CTAGCAGGACTCCAGGAAG-3'

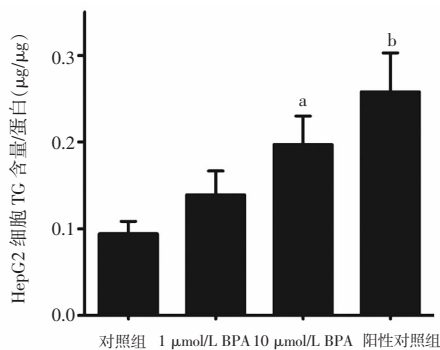
1.3 统计学方法

运用 SPSS 20.0 统计分析软件,所有数据均采用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示进行单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验,2 组数据采用独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同浓度 BPA 干预对 HepG2 细胞内 TG 含量的影响

以 OA 与 PA 联合处理作为阳性对照组,采用化学酶促-比色法检测各干预组 HepG2 细胞内 TG 含量。结果表明(图 1),4 组之间 TG 含量不完全相同 ($F=4.934, P=0.007$),与对照组相比,1 $\mu\text{mol/L}$ BPA 干预后肝细胞内 TG 含量增加,但无统计学差异 ($0.139 \pm 0.027, 0.094 \pm 0.0143; P=0.329$),10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 处理后肝细胞内脂质积聚明显增加 ($0.197 \pm 0.033, 0.094 \pm 0.014; P=0.031$)。



a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与对照组比, $P < 0.01, \bar{x} \pm s, n=8$

图 1 BPA 干预后 HepG2 细胞 TG 含量检测

Fig.1 Effects of BPA on TG content of HepG2 cells

2.2 油红 O 染色检测 HepG2 细胞内脂质积聚情况

运用油红 O 染色观察各干预组 HepG2 细胞内脂质积聚情况,结果显示(图 2),与对照组相比 1 $\mu\text{mol/L}$ BPA 组有少许脂滴存在,而 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 组细胞内有较为明显的红染脂滴聚集,提示 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 干预可致 HepG2 肝细胞发生明显脂质沉积,与 TG 定量结果一致。阳性对照组也观察到细胞内出现显著的脂滴聚集。

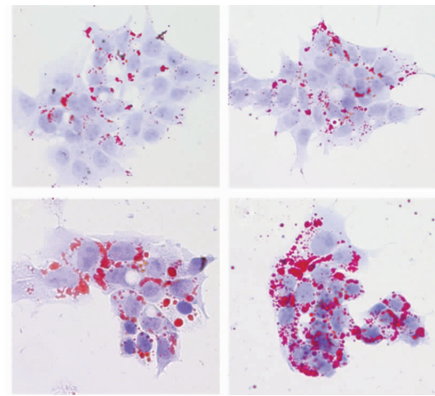
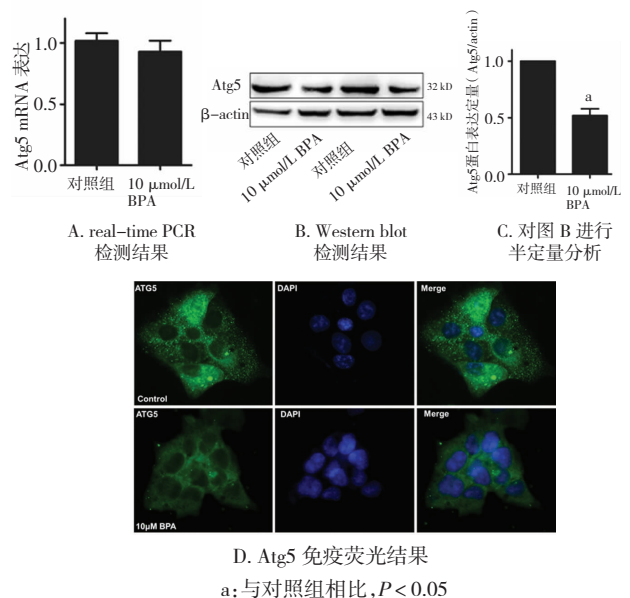
图 2 BPA 干预后 HepG2 细胞的脂质积聚情况 (油红 O, 400 $\times$)

Fig.2 Effects of BPA on lipid accumulation of HepG2 cells

(Oil red O staining, 400 $\times$)

2.3 BPA 对 HepG2 细胞内 Atg5 表达的影响

Real-time PCR 检测发现,与对照组相比 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 干预对 Atg5 mRNA 的表达并无明显影响 ($0.93 \pm 0.088, 1.018 \pm 0.062; t=0.811, P=0.428$; 图 3A)。Western blot 检测结果显示,与对照组相比 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 处理 HepG2 细胞 24 h 后,Atg5 蛋白表达明显减少 ($0.519 \pm 0.059; t=0.810, P=0.000$; 图 3B、3C)。同时,免疫荧光显示,与对照组相比 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 干预 24 h 后细胞内 Atg5 荧光小点数量明显减少(图 3D)。

图 3 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 干预后对 HepG2 细胞 Atg5 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)Fig.3 Effects of 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA on Atg5 expressions of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

3 讨 论

NAFLD是由多种原因导致的脂质在肝内蓄积的一种弥漫性脂肪浸润性疾病,其中脂代谢紊乱是其重要特征之一^[13]。目前,NAFLD已成为全球性的公共问题^[14],在发达国家及发展中国家的发病率不断增加^[15],因此,如何对其发生发展进行有效防治,逐渐成为大家的关注热点。多项研究表明,环境内分泌干扰物 BPA 与多种代谢性疾病如 NAFLD、糖尿病等关系密切^[16]。体内外研究表明,BPA 可导致肝脏脂质沉积^[8,17]。本研究用 BPA 干预 HepG2 肝细胞 24 h,运用 TG 定量及油红 O 染色观察到 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 干预后可以导致 HepG2 肝细胞发生严重脂质沉积。

脂质自噬作为近年来的研究热点,在肝脏脂代谢中起着重要作用。而脂质自噬在 BPA 所致的肝脏脂质沉积过程中是否发生变化,国内外尚未见相关报道。在脂质自噬的过程中,当细胞接受自噬诱导信号(如饥饿等)后,随着 Atg5 等信号的变化,自噬启动,来自于内质网、高尔基体等细胞器膜脱落后包绕在被降解的脂滴周围逐渐延伸,将要被降解的脂滴完全包绕形成富含脂质的自噬体,随后溶酶体对自噬体进行降解^[18-19]。有研究显示,小鼠肝细胞转染 siAtg5 后,可致 Atg5 水平降低,自噬形成减弱,细胞内 TG 水平增加,发生脂质沉积^[10]。本研究采用 BPA 干预 HepG2 肝细胞 24 h 后对 Atg5 这一自噬重要蛋白进行检测。结果发现 10 $\mu\text{mol/L}$ BPA 致脂质沉积同时,与自噬启动关系密切的 Atg5 mRNA 无明显变化,但 Atg5 蛋白表达较对照组显著降低、细胞内 Atg5 绿色荧光小点数量显著减少。提示 BPA 引起的脂质沉积可能与 Atg5 表达减少导致自噬减弱相关,但其具体机制有待进一步研究。

综上所述,本研究通过体外研究观察到 BPA 在导致肝脏脂质沉积的同时,可引起与自噬启动关系密切的 Atg5 表达显著降低,自噬减弱。该研究结果提示 Atg5 可能在 BPA 导致肝脏脂质沉积的过程中起着重要的调控作用。本研究从自噬出发,有助于阐明环境内分泌干扰物 BPA 在肝脏脂质沉积发生过程中的作用机制;并为深入研究环境内分泌干扰物导致其他代谢性疾病的发生提供新思路、新线索。

参 考 文 献

- [1] Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights[J]. *Science*, 2011, 332(6037): 1519-1523.
- [2] Loria P, Lonardo A, Targher G. Is liver fat detrimental to vessels?: intersections in the pathogenesis of NAFLD and atherosclerosis[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 115(1): 1-12.
- [3] Henley DV, Korach KS. Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(6 Suppl): S25-S32.
- [4] Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, et al. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption[J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(1): 75-95.
- [5] Welshons WV, Nagel SC, Vom SF. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(s6): s56-s69.
- [6] Carwile JL, Michels KB. Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003-2006[J]. *Environ Res*, 2011, 111(6): 825-830.
- [7] Trasande L, Attina TM, Blustein J. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents[J]. *JAMA*, 2012, 308(11): 1113-1121.
- [8] Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, et al. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver[J]. *Hepatology*, 2012, 55(2): 395-407.
- [9] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation[J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1717-1721.
- [10] Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1131-1135.
- [11] Romanov J, Walczak M, Ibricu I, et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation[J]. *EMBO J*, 2012, 31(22): 4304-4317.
- [12] Matsushita M, Suzuki N N, Obara K, et al. Structure of Atg5-Atg16, a complex essential for autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6763-6772.
- [13] Moore JB. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome[J]. *Proc Nutr Soc*, 2010, 69(2): 211-220.
- [14] Smith BW, Adams LA. Non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2011, 48(3): 97-113.
- [15] Fan JG, Zhu J, Li XJ, et al. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(3): 508-514.
- [16] Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011, 127(1-2): 27-34.
- [17] Grasselli E, Cortese K, Voci A, et al. Direct effects of Bisphenol A on lipid homeostasis in rat hepatoma cells[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(8): 1123-1129.
- [18] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. *Autophagy*, 2012, 8(4): 445-544.
- [19] Liu K, Czaja MJ. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(1): 3-11.

(责任编辑: 冉明会)