

• 食品生物技术 •

几丁寡糖对脂肪酸代谢紊乱的抑制作用及分子机制

易凡琪^{1,2}, 郑军平², 李琼瑜², 焦思明², 杜昱光², 叶云¹, 刘洪涛²

1 西南医科大学附属医院药剂科, 四川 泸州 646000

2 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

易凡琪, 郑军平, 李琼瑜, 等. 几丁寡糖对脂肪酸代谢紊乱的抑制作用及分子机制. 生物工程学报, 2017, 33(4): 630–641.

Yi FQ, Zheng JP, Li QY, et al. Inhibition of chitin oligosaccharide on dyslipidemia and the potential molecular mechanism exploration, 2017, 33(4): 630–641.

摘要: 旨在从细胞学实验及整体动物水平探讨几丁寡糖 (NACOS) 对机体脂代谢紊乱的抑制作用及其潜在的分子机制。在细胞学实验中, HepG2 细胞被分为 4 组, 即对照组、棕榈酸 (Palmitic acid, PA) 组、几丁寡糖 (NACOS) 组、NACOS+PA 组。在体内实验中, 将雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组 ($n=5$), 即正常对照 (NCD) 组、高脂饮食 (HFD) 组、NACOS 组、NACOS+HFD 组, 实验共 20 周。主要检测方法如下: 采用油红 O 染色检测细胞脂质沉积, RT-PCR 方法检测脂代谢调控分子及炎症因子的转录表达水平, Western blotting 方法检测 MAPKs 及 PI3K/Akt 通路中相关蛋白激酶的蛋白磷酸化水平。细胞学实验表明, NACOS 对 HepG2 没有明显的细胞毒性作用, 并能显著降低细胞内脂滴颗粒的沉积, 下调肝细胞及小鼠肝脏组织中脂代谢相关调控因子 (PGC1 α , Cox5b 及 Mead) 及炎症因子 IL-1 β 的转录表达水平 ($P<0.05$ 或 0.01), 抑制肝细胞及肝脏组织中 p38、ERK1/2 及 Akt 蛋白激酶的激活 ($P<0.05$ 或 0.01)。基于上述研究, NACOS 可抑制肝脏线粒体脂肪酸氧化和脂质从头合成途径, 阻断炎症反应的发生, 从而预防脂代谢紊乱的发生。

关键词: 几丁寡糖, 高脂饮食, 脂肪酸, 脂代谢紊乱, 炎症

Received: December 16, 2016; **Accepted:** January 23, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31570801).

Corresponding authors: Yun Ye. Tel: +86-830-3165750; E-mail: yeyun8622@163.com

Hongtao Liu. Tel: +86-10-82545039; E-mail: liuhongtao@ipe.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 31570801) 资助。

网络出版时间: 2017-02-16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170216.1026.002.html>

Inhibition of chitin oligosaccharide on dyslipidemia and the potential molecular mechanism exploration

Fanqi Yi¹, Junping Zheng², Qiongyu Li², Siming Jiao², Yuguang Du², Yun Ye¹, and Hongtao Liu²

¹ College of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China

² State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: The inhibitory effect of NACOS on dyslipidemia and potential molecular mechanisms by *in vitro* and *in vivo* experiments were investigated. For *in vitro* study, four experimental groups were designed by using HepG2 cells, including the control group, palmitic acid (PA) treatment alone group, NACOS treatment alone group and NACOS + PA treatment group. For *in vivo* study, male C57BL/6 mice were divided into four groups ($n=5$) at random including the normal control group (NCD), high fat diet (HFD) group, NACOS treatment alone group, NACOS+HFD group, which were treated for 20 weeks. The used methods in this study were as follows: the observation of lipid droplet deposition in HepG2 cells by oil red O staining, the detection of mRNA levels of lipid metabolism-related regulators and inflammatory cytokine by RT-PCR method, the monitoring of MAPKs and PI3K/Akt pathway activation by Western blotting method. The *in vitro* study shows that, NACOS had no toxicity on the viability of HepG2 cells at 25–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and significantly reduced the deposition of lipid droplet. Also, based on both *in vitro* and *in vivo* investigation, NACOS evidently down-regulated the expression of lipid metabolism-related regulators (PGC1 α , Cox5b, Mcad) and inflammatory cytokine (IL-1 β) at mRNA level ($P<0.05$ or 0.01), and suppressed the activation of p38, ERK1/2 and Akt in HepG2 cells and lever tissues from HFD-fed mice ($P<0.05$ or 0.01). Based on the above, NACOS may inhibit the oxidation of liver mitochondrial fatty acid and the lipid biosynthesis, block the inflammatory responses and prevent the HepG2 cells and C57BL/6 mice from lipidemia.

Keywords: chitin oligosaccharides, high fat diet, fatty acid, lipidemia, inflammation

几丁质 (Chitin) 又名壳多糖、甲壳质, 广泛存在于昆虫和甲壳类动物 (虾、蟹等) 的外骨骼、多种植物和真菌的细胞壁及一些绿藻中, 是海洋环境中碳、氮及能量存在的主要形式之一, 其在自然界中的含量仅次于纤维素^[1]。几丁质是由 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 通过 β -1, 4-糖苷键连接而成的多糖, 分子式为 $(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$ 。几丁质具有良好的组织相容性和生物降解性, 安全无毒, 无刺激性, 无抗原性^[2]。几丁质不溶于水、有机溶剂及碱液, 在酸中不稳定, 易发生糖苷键的断裂, 形成聚合度不等的水溶性片段, 采用适当的方法将其降解, 可得到不同聚合度和乙酰度的水溶性几丁寡糖

(Chitin oligosaccharides, NACOS)。研究表明, 小分子几丁寡糖的聚合度、乙酰度及乙酰化位点不同时, 将表现出不同甚至完全相反的生物学活性。文献证实, 不同结构的几丁寡糖亦表现出多种药理活性, 如抗氧化、抗菌、抗肿瘤及增强机体免疫功能等^[3–6]。

过多的脂肪聚集不但会扰乱机体内糖和脂肪的代谢, 还会引起代谢与免疫调节通路的整合^[7]。伴随着脂肪组织及肝脏的脂肪酸蓄集, 上述组织和/或器官中炎症细胞的浸润及炎症反应标记物的增高亦将随之出现。文献报道, 肥胖机体内存在一种慢性、低度的炎症状态, 学者称之为代谢性炎症^[8]。代谢性炎症可影响机体的

主要代谢器官如肝脏、脂肪、骨骼肌等,导致胰岛素抵抗、血脂升高和肝脂肪沉积等系统性代谢紊乱。肝脏也是肥胖机体炎症通路激活的主要器官,其炎症反应同样可通过器官的交互作用引起系统性炎症和代谢紊乱^[9]。本研究使用棕榈酸刺激肝细胞产生过量脂滴积累,及高脂饮食诱导小鼠产生脂肪肝,旨在研究 NACOS 预处理对肝细胞及小鼠肝脏组织脂代谢紊乱的保护作用和潜在的分子机制。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂与材料

人肝癌细胞系购于中国科学院细胞库;壳寡糖购自大连格莱克生物科技有限公司;棕榈酸 (Palmitic acid, PA) 购自美国 OCROS 公司;MEM 培养基及青霉素/链霉素购自 Gibco 公司;胎牛血清 (FBS) 购自北京康源世纪有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒及油红 O 染液购自西安赫特生物科技有限公司;RNA 抽提试剂盒及 Ultra SYBR Green 试剂盒购自 Promega 公司。

几丁寡糖 (NACOS) 由实验室制备,主要流程如下:1) 取 5.0 g 壳寡糖 (分子量为 300-1 700 Da,脱乙酰度为 90%),溶于 50 mL 水中,分别加入 3 mL 甲醇及 0.1 g 4-二甲氨基吡啶,再加入乙酸酐 4.37 mL,于 60 °C 下反应 4 h;2) 在反应液中加入 5 倍体积的丙酮,得到灰白色沉淀,过滤后用丙酮洗涤 2-3 遍,置于真空干燥箱中干燥 2 h,得到灰白色 NACOS;3) 经 LC-MS 及核磁共振分析,确定 NACOS 的乙酰度为 97%,聚合度为 3-10。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理

HepG2 细胞用 MEM 常规培养基培养 (含

10% FBS 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素及 1% 非必需氨基酸),培养温度 37 °C,5% CO₂ 浓度。细胞融合度达 80% 后,以 0.125% 胰酶消化传代 (含 0.02% EDTA)。

药物处理如下:1) 待细胞融合度为 80% 左右时,以不同浓度的 NACOS 预处理 12 h;2) 弃上清,以无血清培养基洗涤 2 次;3) 加入含 PA (100 μmol/L) 的新鲜培养基 (1% 或 10% FBS),根据实验设定时间进行培养;4) 处理完毕,弃上清,收集细胞并进行后续相关实验。

1.2.2 细胞活性实验

1) 收集对数生长期 HepG2 细胞,调整细胞悬液的浓度为 10⁴/mL,接种于 96 孔培养板,每孔 150 μL;2) 细胞融合度达到 80% 左右时,弃上清,以无血清培养基洗涤 2 次;3) 加入不同浓度的 NACOS 和/或 PA,进行药物处理;4) 处理完毕,弃上清,以无血清培养基洗涤 2 次;5) 加入 100 μL 含 MTT (5 mg/mL) 的新鲜培养基,继续培养 3 h;5) 弃上清,每孔加入 100 μL 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶充分溶解;6) 使用酶联免疫检测仪,于 490 nm 处测量各孔的光吸收值;7) 计算细胞活力,活力% = (给药 OD-空白 OD)/(对照 OD-空白 OD) × 100%。

1.2.3 油红 O 染色

1) HepG2 细胞接种于六孔培养板中,待细胞融合度为 80% 左右时,进行药物处理;2) 药物处理完毕,弃上清,以预冷 PBS 清洗 2 次;3) 4% 多聚甲醛固定 30 min;4) PBS 漂洗 1 min 后,60% 异丙醇冲洗 15 s;5) 油红 O 工作液染细胞 1 min 后,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。

1.2.4 动物实验

本研究所用实验动物由北京维通利华科技

有限公司提供,系4周龄清洁级雄性C57BL/6小鼠,体重18–20 g。高脂饲料(蛋白 碳水化合物 脂=20 35 45, Kcal%)及基础饲料(蛋白 碳水化合物 脂=20 70 10, Kcal%)均购自北京维通利华科技有限公司。饲养条件控制在20–25 °C,自然照明,自由饮水和摄食。

小鼠随机分为4组($n=5$),具体分组及药物处理如下:1) 正常对照组(Normal chow diet, NCD),饲以基础饲料+正常饮水;2) 高脂模型组(High fat diet, HFD),饲以高脂饲料+正常饮水;3) NACOS组:饲以基础饲料+NACOS(1 mg/mL)水溶液;4) NACOS+高脂模型组:饲以高脂饲料,以浓度为1 g/L的NACOS替代正常饮水。饲养20周后,麻醉后杀死小鼠,分别提取肝脏组织中的mRNA和蛋白质进行实验检测。

1.2.5 样品RNA提取及RT-PCR反应

RNA提取流程如下:1) 称取40 mg新鲜肝脏组织,加入800 μ L Trizol,放入1.5 mL离心

管中,研磨均匀;2) 每毫升匀浆液加入0.2 mL氯仿,剧烈振荡15 s,室温放置3 min;3) 4 °C、12 000 r/min离心15 min,将上层无色水相转移至一新的离心管中;4) 加入等体积异丙醇,颠倒均匀,室温放置10 min;5) 离心10 min,条件同上;6) 弃上清,加入75%乙醇800 μ L,洗涤沉淀,涡旋3 s;7) 离心3 min,条件同上;8) 弃上清,室温放置2–3 min,加入50 μ L DEPC水溶解;9) 确定各样品RNA浓度,并使用cDNA逆转录试剂盒合成cDNA。细胞样品RNA提取及逆转录步骤同上。

RT-PCR反应使用UltraSYBR试剂盒,反应体系为25 μ L,组成如下:1 μ L cDNA,10 μ L SYBR Green,1 μ L上、下游引物(上海生工公司合成,引物序列见表1),13 μ L去离子水。反应参数设置为:50 °C 1 min;95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 1 min;上述反应条件下,共40个循环。

表1 RT-PCR实验引物序列表

Table 1 The primers for RT-PCR

Primers	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
hPGC1 α	TCTGAGTCTGTATGGAGTGACAT	CCAAGTCGTTACATCTAGTTCA
mPGC1 α	CCCTGCCATTGTTAAGACC	TGCTGCTGTTCTGTTTTC
hIL-1 β	AAA AGCTTGGTGATGTCTGG	TTTCAACACGCAGGACAGG
mIL-1 β	CGACAA AATACCTGTGGCCT	TTCTTTGGGTATTGCTTGGG
hACC1	ATGTCTGGCTTGACCTAGTA	CCCCAAAGCGAGTAACAAATTCT
mACC1	CTGCCATCCCATGTGCTAAT	AGCAGTCGTTCCCCTTCATT
hCOX5b	ATGGCTTCAAGGTTACTTCGC	CCCTTTGGGGCCAGTACATT
mCOX5b	GCTGCATCTGTGAAGAGGACAAC	CAGCTTGTAATGGGTTCCACAGT
hMCAD	TGGATAACCAACGGAGGAAAAG	CTGGGGTATCTGCTTCCACA
mMCAD	TAAAGCCCTTTTCCCCTGAA	CCCTGTGGAGAAGCTGATGA
h β -Actin	ACGGCATCGTCACCAACTG	GAGCCACACGCAGCTCATT
m β -Actin	AGGTGACAGCATTGCTTCTG	GCTGCCTCAACACCTCAAC

1.2.6 Western blotting 蛋白检测

1) HepG2 细胞种于六孔培养板中, 经不同浓度的药物处理后, 预冷 PBS 清洗 1 次; 2) 加入 RIPA 裂解液, 用细胞刮刀轻轻刮下细胞, 收集到 1.5 mL 离心管中; 3) 4 °C 条件下离心 15 min (12 000×g), 收集离心上清液; 4) 经 BCA 法定量各组蛋白样品后, 加入适量上样缓冲液, 混匀后 95 °C 变性; 5) 样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离目的条带, 以湿转法将目的条带转移至 PVDF 膜上; 6) 经 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 加入 p-p38、p38、p-ERK1/2、ERK1/2、p-Akt、Akt 及 β -actin 一抗, 4 °C 孵育过夜; 7) TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 8) 加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗, 室温孵育 1 h; 9) TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 10) 免疫反应复合物用 ECL 化学发光试剂盒检测。

1.2.7 统计学分析

实验数据应用 SPSS 软件进行统计学处理, 资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果与分析

2.1 PA 和 NACOS 处理对 HepG2 细胞活力的影响

MTT 细胞活性实验表明, PA 在 25–200 $\mu\text{mol/L}$ 范围内对 HepG2 细胞的活力没有明显的抑制作用 (图 1A), 表明 PA 在该浓度下没有细胞毒性。另外, NACOS (100 $\mu\text{mol/L}$) 可略微增加 HepG2 的活力, 但没有统计学差异, 且 NACOS 与 PA 联合进行药物处理时亦没有表现出细胞毒作用 (图 1B)。

2.2 PA 及 NACOS 对 HepG2 细胞脂代谢调控因子及炎症因子转录表达的影响

RT-PCR 实验结果表明, HepG2 细胞经 PA (100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 3–12 h 后, 过氧化物酶体增

殖体受体共激活因子-1 α (PGC1 α)、炎症因子 IL-1 β 、乙酰辅酶 A1 (ACC1)、细胞色素氧化酶亚单位-5b (Cox5b)、中链酰基辅酶 A 脱氢酶 (Mead) 均表现出不同程度的升高 ($P < 0.05$ 或 0.01), 并在作用 6 h 后达峰值 (图 2A)。与 PA 单处理组相比, HepG2 细胞经 NACOS 预处理 15 h 后可明显抑制 PA 诱导的前述因子的转录激活 ($P < 0.01$) (图 2B), 而 NACOS 单处理则对各因子的转录水平没有明显的影响。上述结果表明, NACOS 可抑制 PA 刺激引起的 HepG2 细胞脂代谢的紊乱及相关炎症因子的过表达。

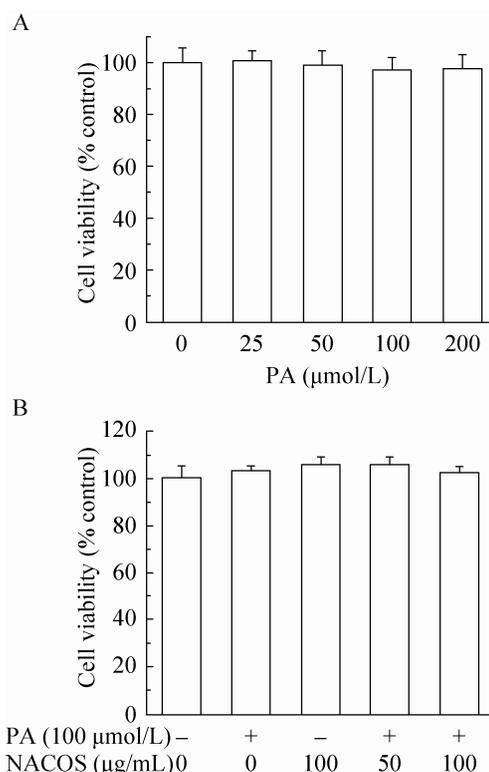


图 1 PA 及 NACOS 处理对 HepG2 细胞活力的影响 (A: PA 对 HepG2 细胞活力的影响; B: NACOS 与 PA 共处理对 HepG2 细胞活力的影响)

Fig. 1 Effects of PA and NACOS on the viability of HepG2 cells. (A) Effect of PA treatment on the viability of HepG2 cells. (B) Effect of NACOS plus PA treatment on the viability of HepG2 cells.

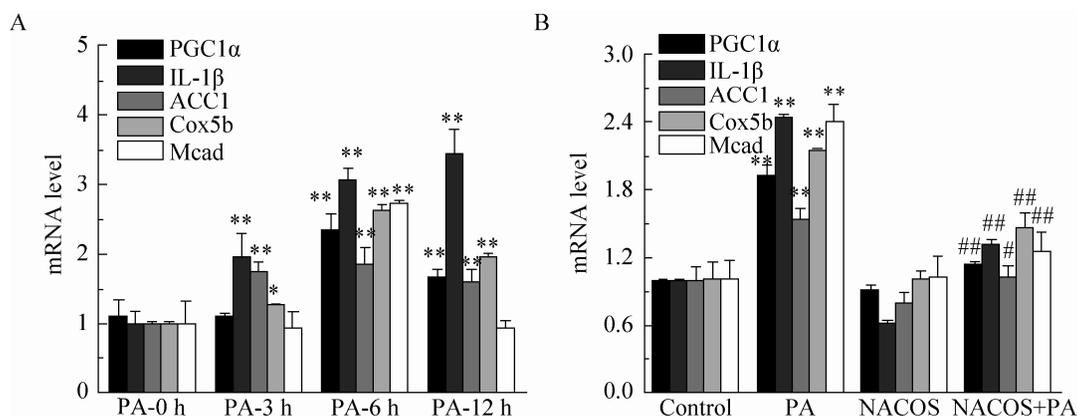


图 2 PA 及 NACOS 对 HepG2 细胞脂代谢调控分子及炎症因子在转录水平的影响 (A: PA 对 HepG2 细胞脂代谢调控分子及炎症因子转录表达的影响; B: NACOS 对 PA 诱导的 HepG2 细胞脂代谢调控分子及炎症因子过表达的抑制作用。* $P < 0.05$ 或 ** $P < 0.01$, VS 对照组; # $P < 0.05$ 或 ## $P < 0.01$, VS PA 单处理组)

Fig. 2 Effects of PA and NACOS on the expression of lipid metabolism-related regulators and inflammatory cytokines in HepG2 cells at mRNA level. (A) Effect of PA on the expression of lipid metabolism-related regulators and inflammatory cytokines in HepG2 cells at mRNA level. (B) Inhibitory effect of NACOS on PA-induced over-expression of lipid metabolism-related regulators and inflammatory cytokines in HepG2 cells at mRNA level. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$, compared to the control group; # $P < 0.05$ or ## $P < 0.01$, compared to the group treated with PA alone.

2.3 NACOS 对 PA 诱导的 MAPKs 及 PI3K/Akt 通路激活的抑制作用

Western blotting 结果显示, HepG2 细胞经 PA (100 $\mu\text{mol/L}$) 刺激后, 丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen activated protein kinases, MAPKs) 及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K; Protein kinase B, Akt) 通路中的 p38、ERK1/2、Akt 激酶迅速激活, 其磷酸化水平在 0–1 h 内呈时间依赖性增加。其中, p-ERK1/2 及 p-Akt 在 0.5 h 时达峰值 ($P < 0.05$, vs 对照组), 而 p-p38 则在 1 h 时达最高水平 ($P < 0.01$, vs 对照组) (图 3A、3B)。

为研究 NACOS 对 PA 诱导的 MAPKs 及 PI3K/Akt 通路激活的抑制作用, HepG2 经 NACOS (50–100 $\mu\text{g/mL}$) 预处理 15 h 后, 再由 PA (100 $\mu\text{mol/L}$) 作用 0.5 h。结果表明, NACOS

预处理可显著抑制 p-p38、p-ERK1/2 及 p-Akt 的表达水平 ($P < 0.05$, vs 对照组), 提示 NACOS 可能通过阻断 MAPKs 及 PI3K/Akt 通路达到抑制 HepG2 细胞脂代谢紊乱的作用 (图 3C、3D)。

2.4 NACOS 对 HepG2 细胞脂滴形成的抑制作用

为探讨 NACOS 对肝细胞中脂滴形成的抑制作用, HepG2 细胞经 NACOS 预处理 15 h 后, 再用 PA (100 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 24 h。待处理完毕, 细胞采用油红 O 染色, 然后显微镜观察细胞浆中油红脂滴形成的变化。结果显示, 对照组在光学显微镜下可见肝细胞轮廓清晰, 细胞内呈现的红色脂肪颗粒极少, 而 PA 处理后则细胞浆中的红色脂肪颗粒呈显著聚集趋势。与 PA 单处理相比, NACOS 预处理可明显抑制 PA 诱导所致的 HepG2 细胞中脂滴的形成 (图 4)。

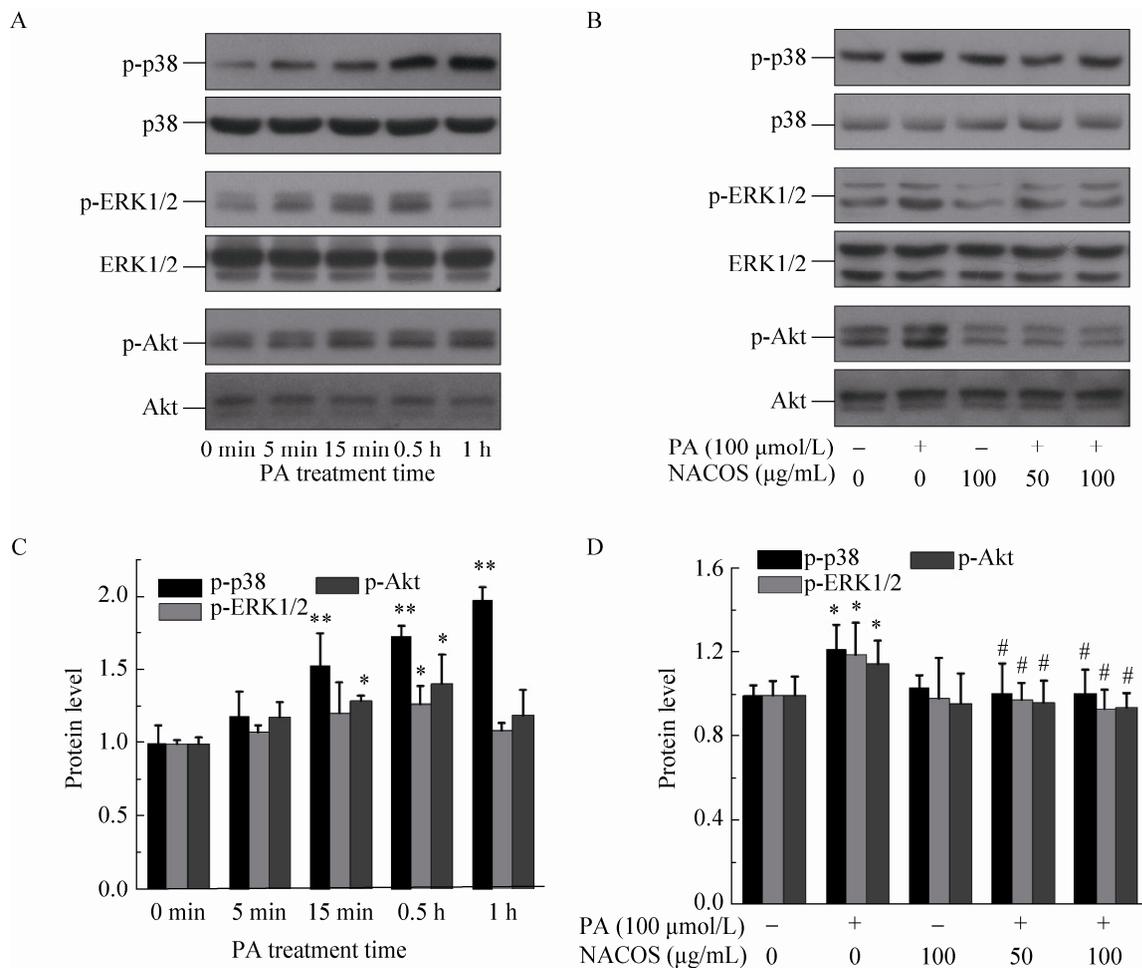


图3 PA及NACOS处理对HepG2细胞MAPKs及PI3K/Akt通路的影响(A、B: PA处理对HepG2细胞MAPKs及PI3K/Akt通路的作用; C、D: NACOS预处理对PA诱导的MAPKs及PI3K/Akt通路激活的抑制作用。* $P < 0.05$ 或** $P < 0.01$, vs对照组; # $P < 0.05$, vs PA单处理组)

Fig. 3 Effects of PA and NACOS on the activation of MAPKs and PI3K/Akt pathways in HepG2 cells. (A, B) Effect of PA on the activation of MAPKs and PI3K/Akt pathways in HepG2 cells; (C, D) Inhibitory effects of NACOS pre-treatment on the PA-induced activation of MAPKs and PI3K/Akt pathways. * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$, compared to the control group; # $P < 0.05$, compared to the group treated with PA alone.

2.5 NACOS处理对脂代谢紊乱小鼠体重及饮食的影响

为进一步确定NACOS对机体脂代谢紊乱的预防作用,我们考察了高脂模型C57BL/6小鼠在给予NACOS后各项生理指标的变化(图5)。结果表明,与给予基础饲料的正常对照组(NCD)

小鼠比较,高脂模型组(HFD)小鼠的平均体重显著增加($P < 0.01$)。相反,当脂代谢紊乱小鼠同时给予NACOS(1 mg/mL,溶于日常饮水中)处理时,可显著抑制其体重的增加($P < 0.05$ 或0.01)。此外,无论高脂饲料抑或NACOS均对小鼠的采食量及饮水量没有明显影响。

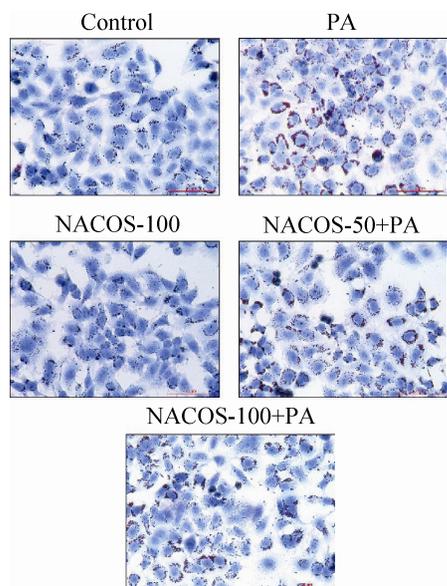


图4 NACOS 预处理对 PA 诱导所致的 HepG2 细胞中脂滴形成的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effect of NACOS pre-treatment on PA-induced formation of lipid droplet in HepG2 cells.

2.6 NACOS 对脂代谢紊乱小鼠肝脏组织脂代谢调控相关分子及炎症因子转录表达的影响

我们检测了 NACOS 处理对脂代谢紊乱小鼠肝脏组织脂代谢调控相关分子及炎症因子转录表达的影响 (图 6)。RT-PCR 实验结果表明, HFD 组小鼠较 NCD 组小鼠肝脏组织中 PGC1 α 、ACC1 及 Mcad 显著升高 ($P < 0.05$ 或 0.01), 炎症因子 IL-1 β 亦增加明显 ($P < 0.05$), 但 HFD 处理对 Cox5b 的转录表达无显著影响。与 HFD 组比较, 脂代谢紊乱小鼠经 NACOS 处理后, 其肝脏组织中脂代谢调控因子 PGC1 α 、Mcad 及 ACC1 的转录水平均不同程度地受到抑制, 炎症因子 IL-1 β 亦显著降低, Cox5b 转录表达水平变化不明显。上述结果表明, NACOS 处理可有效逆转高脂饮食喂养所致的小鼠肝脏脂代谢紊乱。

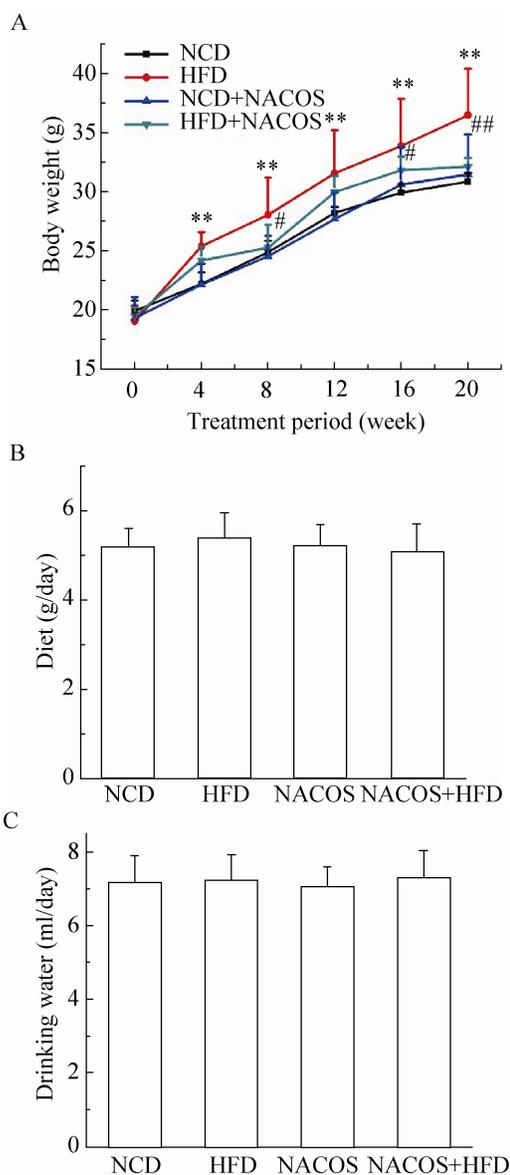


图5 NACOS 处理对脂代谢紊乱小鼠体重及饮食的影响 (A: NACOS 对脂代谢紊乱小鼠体重增加的抑制作用; B: NACOS 对脂代谢紊乱小鼠采食量的影响; C: NACOS 对脂代谢紊乱小鼠饮水量的影响。 ** $P < 0.01$, vs NCD 组; # $P < 0.05$ 或 ## $P < 0.01$, vs HFD 组)

Fig. 5 Effects of NACOS on body weight, diet and drinking water of mice with HFD feeding. (A) Effect of NACOS on the body weight of mice with HFD feeding. (B) Effect of NACOS on the diet of mice with HFD feeding. (C) Effect of NACOS on drinking water of mice with HFD feeding.

2.7 NACOS 对小鼠肝脏组织 MAPKs 及 PI3K/Akt 通路的影响

为进一步探讨 NACOS 抑制小鼠脂代谢紊乱的分子机制,我们检测了各实验组小鼠肝脏组织中 MAPKs 及 PI3K/Akt 通路的表达变化(图 7)。Western blotting 结果显示,与 NCD 组小鼠相比,HFD 组小鼠肝脏的 p-p38、p-Akt 蛋白的表达水平显著增高 ($P<0.05$),而 p-ERK1/2 则无明显差别(图 7A、7B)。与 HFD 组相比,MACOS 可显著抑制高脂饮食喂养所致 p-p38 及 p-Akt 的激活 ($P<0.01$ 或 0.05)。此外,NACOS 亦可降低 p-ERK1/2 的蛋白表达水平 ($P<0.05$)。

3 讨论

肝脏是人体代谢最活跃的合成和分解代谢器官之一,肝脏对糖、脂、蛋白的代谢均有直接的影响。以往研究表明,高脂喂养后可致使小鼠肝脏内脂质沉积和肝脏胰岛素抵抗的发生,同时伴有各种肝细胞内事件的发生,如线粒体脂肪酸氧化功能障碍^[10]、脂质从头合成增加^[11]、内质

网应激^[12-13]和炎症通路激活^[14]等,但脂肪肝发生的始动机制、各种肝内细胞事件的发生顺序及其与脂肪肝发生的关系均尚未阐明。本文通过

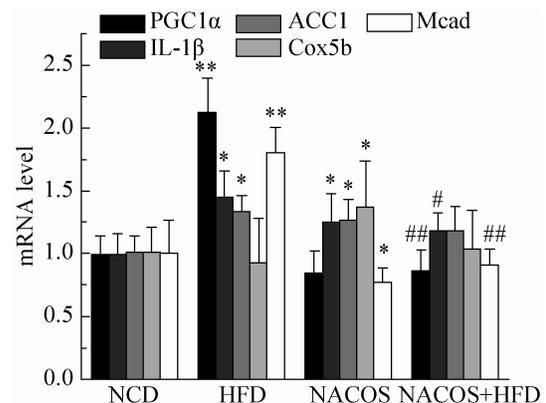


图 6 NACOS 处理对脂代谢紊乱小鼠肝脏组织中相关调控分子及炎症因子转录表达的影响 (* $P<0.05$ 或 ** $P<0.01$, vs NCD 组; # $P<0.05$ 或 ## $P<0.01$, vs HFD 组)

Fig. 6 Effect of NACOS on the mRNA expression of lipid metabolism-related regulators and inflammatory cytokine in liver tissues from HFD-fed mice. * $P<0.05$ or ** $P<0.01$, compared to the NCD group; # $P<0.05$ or ## $P<0.01$, compared to the HFD group.

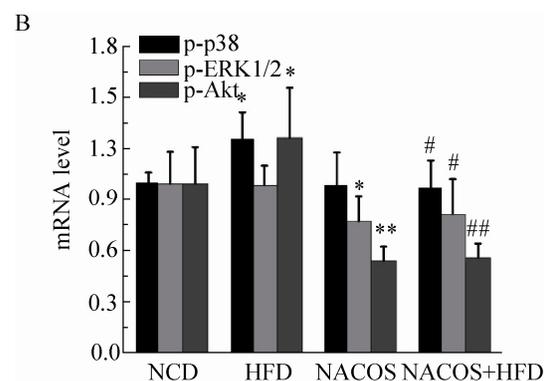
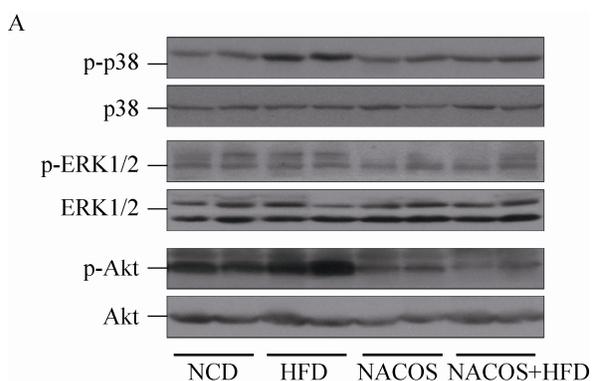


图 7 NACOS 处理对脂代谢紊乱小鼠肝脏组织 MAPKs 及 PI3K/Akt 通路的影响 (* $P<0.05$ 或 $P<0.01$, vs NCD 组; # $P<0.05$ 或 ## $P<0.01$, vs HFD 组)

Fig. 7 Effects of NACOS on the activation of MAPKs and PI3K/Akt pathway in liver tissues from HFD-fed mice. * $P<0.05$ or ** $P<0.01$, compared to the NCD group; # $P<0.05$ or ## $P<0.01$, compared to the HFD group.

PA 刺激肝细胞产生过量脂滴, 采用高脂饮食诱导小鼠产生脂肪肝, 检测 NACOS 处理与否时小鼠机体及其肝脏的生理、病理学改变, 全面评价了 NACOS 对早期脂肪肝形成的抑制作用及潜在的分子作用机制。

不健康的饮食习惯可导致脂肪肝的发生, 其中脂类的过量摄入是饮食因素中导致脂肪肝的最常见原因^[15]。临床和动物研究已证明, 过量饱和脂肪酸摄入将引起肝内的脂质沉积^[15-16]。本研究通过体外构建肝细胞脂肪变性模型, 以 PA 刺激模拟高脂饮食下脂肪蓄积对肝细胞的损伤作用, 以 NACOS 作为干预因素, 考察 NACOS 对肝脂代谢紊乱的预防作用。通过油红染色, 从形态学上观察到, 在 PA 诱导损伤的 HepG2 细胞中, 有大量脂滴产生, 而 NACOS 预处理则可有效降低细胞内脂滴的聚集程度。体内实验进一步发现, NACOS 处理可抑制高脂饮食所致的 C57BL/6 小鼠的体重增加及脂代谢紊乱的发生。

肝脏的一个重要功能是维持正常机体血浆葡萄糖浓度的稳态, 当机体摄入能量过剩时, 过多的葡萄糖可通过脂质从头合成途径转化为脂肪贮存在肝脏, 内源性糖异生形成的葡萄糖或外源的果糖等在肝细胞中首先转化为乙酰辅酶 A 羧化酶 ACC1, 后者是肝脏脂质从头合成的关键酶。生理状态下肝内脂质仅有 5% 来源于内源性脂质从头合成途径^[13], 然而在病理状态下肝内源性脂质从头合成途径将成为肝内脂质沉积的重要来源。另外, ACC1 基因敲除或表达减少均可减少高脂饮食诱导的肝脏脂质沉积^[17]。本实验中, 在 HepG2 细胞及小鼠肝脏内, PA 及高脂饮食均能导致脂质合成酶 ACC1 的显著增高 ($P < 0.05$), 而 NACOS 处理则可不同程度地下调 ACC1 在转录水平的增加。

线粒体是真核细胞能量代谢的中心, 也是脂肪酸氧化的细胞场所, 肝内线粒体脂肪酸氧化的改变以及功能的异常与肥胖等代谢疾病的发生发展相关, 如线粒体脂肪酸氧化的减少, 可出现脂质堆积^[18]。PGC-1 α 表达于骨骼肌、心肌、肝脏、棕色脂肪组织等能量代谢活跃的组织^[19], 可调节线粒体生物发生、调控适应性产热、调控骨骼肌细胞内脂肪氧化累积等生理过程^[20]。研究发现, PGC-1 α 基因敲除后, 小鼠的脂肪酸氧化基因表达下调^[21]。此外, MCAD 是中链脂肪酸 β 氧化第一步的关键酶, 在脂肪酸氧化中起着重要作用, 而 PGC-1 α 可以调控 MCAD 的表达水平^[22]。本实验从转录水平检测了线粒体生成和代谢等相关因子, 包括 PGC1 α 、MCAD 及 Cox5b, 以对脂肪肝发生早期时的线粒体功能改变进行评估。本实验中, 体外与体内实验均表明, 脂肪酸的过量摄入将导致线粒体合成的上游因子 PGC1 α 及细胞色素氧化酶 Cox5b 的转录表达水平上调 ($P < 0.01$), 而 NACOS 处理则可显著抑制其上调 ($P < 0.01$)。上述结果提示, 在脂肪肝发生的早期存在肝脏线粒体功能障碍和脂肪酸氧化功能障碍, 而 NACOS 则可能通过逆转线粒体氧化功能损伤, 进而增加脂肪酸分解代谢, 以阻断肝细胞脂质的沉积。

过多的脂肪在体内聚集不但会干扰体内脂肪的代谢, 还会引起代谢和免疫反应通路的异常^[7]。伴随肝脏脂肪组织的聚集, 炎症细胞的浸润及炎性反应的发生亦随之出现。多项研究表明, 肥胖机体内存在一种慢性、低度的炎症状态, 学者称之为代谢性炎症^[8]。慢性炎症反应在脂肪肝的形成和发展过程中起到了关键作用, 但其发生的分子机制至今尚不明了。最近有观点认为, 肝脏也是肥胖机体炎症通路激活的重

要器官, 肝脏的炎症反应同样可通过器官的交互作用引起系统性炎症和代谢紊乱^[9]。因此, 本研究重点检测了炎症相关因子 IL-1 β 在 HepG2 细胞及小鼠肝脏内的表达变化, 结果表明, PA 及高脂饮食均能导致 IL-1 β 转录的显著增加 ($P < 0.01$ 或 0.05), 而 NACOS 共处理则能明显降低其表达水平 ($P < 0.01$ 或 0.05)。

研究证明, 脂肪肝与炎症通路相关。MAPKs 信号通路存在于大多数细胞内, 是细胞膜表面受体与决定性基因表达间起连接作用的重要调节酶, 可以将细胞外刺激信号传递给细胞核, 是细胞应激及损伤反应的主要信号通路之一, 能被多种炎症刺激激活, 在炎症的发生、发展过程中起到重要的调控作用。其中主要有 p38 分裂原激活蛋白激酶 (p38 MAPK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-jun-N-terminal kinases, JNK) 和细胞外信号调节蛋白激酶 (Extracellular signal-regulated protein kinase, ERK) 三条途径。其中, p38 MAPK 通路和 JNK 通路主要对炎症细胞因子和多种类型的细胞应激信号进行转导, 而 ERK 通路主要对细胞的生长、分裂和分化信号进行转导。本实验表明, PA 及高脂饮食可明显增加 p38 或/和 ERK1/2 的磷酸化水平 ($P < 0.05$), 而 NACOS 能显著抑制两种激酶的磷酸化发生 ($P < 0.05$), 提示 NACOS 可能通过抑制 MAPKs 通路的激活而下调了炎症反应的发生。

机体内葡萄糖的代谢主要通过胰岛素依赖的 PI3K/AKT 信号通路进行。胰岛素受体通过酪氨酸的磷酸化激活其受体激酶, 与胰岛素受体底物 (IRS) 发生作用。磷酸化的 IRS 与 PI3K 发生作用, 促进其活化和 Akt 的磷酸化, 随后通过激活葡萄糖转运载体-4 (GLUT4) 的跨膜转运, 完成对葡萄糖的吸收和利用。当出现胰

岛素抵抗时, 此通路受到抑制, 胰岛素作用出现障碍, 使其无法发挥正常生物学功能。本实验表明, 无论 PA 诱导所致的 HepG2 细胞抑或发生脂代谢紊乱的小鼠肝脏组织, 其增加的 Akt 磷酸化均可被 NACOS 有效地抑制 ($P < 0.05$ 或 0.01), 提示 NACOS 将可能通过 PI3K/AKT 信号通路抑制胰岛素抵抗的发生。

与本研究结果相似, 研究表明 NACOS 的去乙酰化产物壳寡糖对高血脂的形成也具有明显抑制效果。动物实验发现, 壳寡糖 (分子量为 1–10 kDa) 可显著降低大/小鼠血浆的低密度脂蛋白、胆固醇及甘油三酯, 并能增加高密度脂蛋白的血浆水平, 且壳寡糖的降脂效果与其聚合度呈负相关^[23–24]。因此, 聚合度可能是影响甲壳类寡糖抑制脂代谢紊乱的重要因素之一。此外, 乙酰度的高低对该类寡糖的生物学活性是否也有较大影响, 即相同聚合度的 NACOS 与壳寡糖之间的活性是否有差别, 尚需要在将来的研究中进一步阐释。

综上所述, 本实验从生理功能和分子生物学机制两方面评价了 NACOS 在早期脂肪肝形成时对肝内线粒体脂肪酸氧化、脂质合成途径及线粒体相关途径的抑制作用, 并通过抑制 MAPKs 炎症信号通路和胰岛素依赖的 PI3K/AKT 信号通路, 达到调控脂代谢紊乱及炎症激活的作用。

REFERENCES

- [1] Yao WS, Wang X, Hou HR, et al. Advances in preparation of chitooligosaccharides. *Shandong Sci*, 2006, 19(3): 27–31 (in Chinese). 姚婉生, 王雪, 侯海荣, 等. 几丁寡糖制备的研究进展. *山东科学*, 2006, 19(3): 27–31.
- [2] Wu QJ, Wu HC. Chitin fibers-decomposable material of the 21th century. *J Donghua Univ Nat Sci Ed*, 2004, 30(1): 133–138 (in Chinese).

- 吴清基, 吴鸿昌. 甲壳素——21 世纪的绿色材料. 东华大学学报: 自然科学版, 2004, 30(1): 133–138.
- [3] Ngo DN, Lee SH, Kim MM, et al. Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells. *J Funct Food*, 2009, 1(2): 188–198.
- [4] Ngo DN, Kim MM, Kim SK. Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells. *Carbohydr Polymer*, 2008, 74(2): 228–234.
- [5] Wang SL, Lin HT, Liang TW, et al. Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. *Bioresour Technol*, 2008, 99(10): 4386–4393.
- [6] Suzuki K, Tokoro A, Okawa Y, et al. Effect of N-acetylchito-oligosaccharides on activation of phagocytes. *Microbiol Immunol*, 1986, 30(8): 777–787.
- [7] Ferrante AJ Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med*, 2007, 262(4): 408–414.
- [8] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 2006, 444(7121): 860–867.
- [9] Kerner A, Avizohar O, Sella R, et al. Association between elevated liver enzymes and C-reactive protein: possible hepatic contribution to systemic inflammation in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(1): 193–197.
- [10] Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, 2004, 114(2): 147–152.
- [11] Özcan U, Yilmaz E, Özcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 2006, 313(5790): 1137–1140.
- [12] Puri P, Mirshahi F, Cheung O, et al. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 2008, 134(2): 568–576.
- [13] Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, et al. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 116(7): 539–564.
- [14] Singh R, Wang YJ, Xiang YQ, et al. Differential effects of JNK1 and JNK2 inhibition on murine steatohepatitis and insulin resistance. *Hepatology*, 2009, 49(1): 87–96.
- [15] Moore JB. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc*, 2010, 69(2): 211–220.
- [16] Westerbacka J, Lammi K, Häkkinen AM, et al. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(5): 2804–2809.
- [17] Mao JQ, DeMayo FJ, Li H, et al. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(22): 8552–8557.
- [18] Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, et al. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*, 2006, 6(1): 1–28.
- [19] Ruas JL, White JP, Raor RR, et al. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell*, 2012, 151(6): 1319–1331.
- [20] Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*, 2006, 116(3): 615–622.
- [21] Koos H, Satoh H, Herzig S, et al. PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- α -dependent induction of TRB-3. *Nat Med*, 2004, 10(5): 530–534.
- [22] Summermatter S, Troxler H, Santos G, et al. Coordinated balancing of muscle oxidative metabolism through PGC-1 α increases metabolic flexibility and preserves insulin sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(1): 180–185.
- [23] Wang DX, Han JJ, Yu Y, et al. Chitosan oligosaccharide decreases very-low-density lipoprotein triglyceride and increases high-density lipoprotein cholesterol in high-fat-diet-fed rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(9): 1064–1069.
- [24] Huang LL, Chen J, Cao PQ, et al. Anti-obese effect of glucosamine and chitosan oligosaccharide in high-fat diet-induced obese rats. *Mar Drugs*, 2015, 13(5): 2732–2756.

(本文责编 郝丽芳)