

建立L-02肝细胞脂肪变模型方法比较及脂肪乳诱导脂变条件的优化

胡启蒙¹, 陈朝银², 庄馨英¹, 张旭¹, 梁杏¹, 赵声兰¹

1. 云南中医学院中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

【摘要】目的:比较二甲亚砜(DMSO)溶解油酸、乙醇溶解油酸、无水乙醇、50%胎牛血清和医用脂肪乳对L-02肝细胞的影响, 优化L-02肝细胞脂肪变性模型的良好条件与方法。**方法:**用含10%胎牛血清PRMI-1640培养液培养细胞, 细胞均匀分布进入对数生长期后随机分为正常对照组、DMSO组、DMSO+油酸组、乙醇+油酸组、乙醇组、50%胎牛血清组和医用脂肪乳组, 分别用DMSO+油酸、乙醇+油酸、0.4%乙醇、50%胎牛血清(FBS)和20%医用脂肪乳培养48 h, 用MTT法检测细胞活力, 油红O染色观察细胞数、细胞内脂滴, 用试剂盒检测细胞内甘油三酯及蛋白质。用医用脂肪乳培养L-02肝细胞, 研究医用脂肪乳诱导L-02肝细胞脂肪变性的浓度和时间。**结果:**DMSO组和乙醇组细胞生长呈下降趋势, DMSO+油酸组和乙醇+油酸组细胞生长均呈现先升高后降低趋势。甘油三酯和蛋白质测定表明, 医用脂肪乳能很好地诱导L-02肝细胞脂肪变性, 医用脂肪乳含量10%, 造模培养49 h, 细胞脂变效果最好。**结论:**医用脂肪乳诱导L-02肝细胞, 脂变率高、脂变细胞形态好, 适合L-02肝细胞脂变模型的建立。

【关键词】L-02肝细胞; 脂肪变性; 医用脂肪乳; 油酸

【中图分类号】Q28; R-332

【文献标识码】A

【文章编号】1005-202X(2015)04-0469-05

Assessment on different methods for establishing hepatocyte L-02 steatosis models and optimization of the steatosis induced by medical fat emulsion

HU Qi-meng¹, CHEN Chao-yin², ZHUANG Xin-ying¹, ZHANG Xu¹, LIANG Xing¹, ZHAO Sheng-lan¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. School of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To optimize the hepatocyte L-02 steatosis models by respectively comparing the effects of oleic acid dissolved by Dimethyl sulfoxide (DMSO), oleic acid dissolved by ethanol, absolute ethanol, 50% fetal bovine serum (FBS) and medical fat emulsion on hepatocyte L-02. **Methods** Hepatocyte L-02 were cultured in PRMI-1640 supplemented with 10% FBS. When the hepatocyte L-02 distributed evenly and entered the logarithmic phase, they were randomly divided into seven groups, the normal control group and other six groups respectively cultured in oleic acid dissolved by DMSO, oleic acid dissolved by ethanol, 0.4% ethanol, 50% FBS and 20% medical fat emulsion. The hepatocyte in every group were cultured for 48 h. The viability of cells was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method, and the cell counts and intracellular lipid droplets could be observed by oil red O staining under optical microscope. The content of triglyceride (TG) in cells and the concentration of BCA protein were detected by corresponding detection kits. The concentration and time of hepatocyte L-02 steatosis induced by medical fat emulsion were researched by culturing hepatocyte L-02 in medical fat emulsion. **Results** The cell growths in DMSO group and ethanol group showed a decreased trend, while the cell growths in oleic acid + DMSO group and oleic acid + ethanol group showed a firstly increased and then decreased trend. The measured results of TG and

【收稿日期】2015-02-25

【基金项目】国家自然科学基金(21466037); 科技部科技支撑计划项目(2011BAD46B03)

【作者简介】胡启蒙(1988-), 男, 河南郑州人, 硕士, 执业中药师。Tel: 1478788680; E-mail: 2517390724@qq.com。

【通信作者】赵声兰(1962-), 女, 云南昆明人, 教授。Tel: 13330431529; E-mail: 13330431529@163.com。

BCA indicated that the hepatocytes L-02 steatosis could be successfully induced by medical fat emulsion, and the best steatosis effect was based on 10% medical fat emulsion and the culture time of 49 h. **Conclusion** Medical fat emulsion is suitable to establish the hepatocytes L-02 steatosis models for it can induce hepatocytes L-02 with higher steatosis ratio and better growth morphology of steatosis cells.

Key words: hepatocyte L-02; steatosis; medical fat emulsion; oleic

前言

随着人们饮食结构和生活方式的改变, 高血脂及高血脂引起的疾病受到越来越多的关注^[1]。L-02 肝细胞和脂肪变性的 L-02 肝细胞体外模型被用来研究肝细胞脂质蓄积和肝细胞脂代谢等相关问题^[2], 能否成功建立脂肪变性的 L-02 肝细胞模型, 直接关系到利用 L-02 肝细胞进行脂代谢、脂代谢异常调控、化合物的降脂作用和降脂机理等研究。本研究分别采用油酸(OA)、无水乙醇、胎牛血清(FBS)和医用脂肪乳作用于 L-02 肝细胞, 造成肝细胞脂代谢紊乱, 模拟脂代谢紊乱所致脂肪肝的发病过程, 并结合甘油三酯(TG)含量、蛋白质(BCA)浓度、细胞内脂滴数量等脂肪肝常规检测指标, 寻找建立 L-02 肝细胞脂肪变性模型的良好方法。在此基础上, 研究不同含量的医用脂肪乳和培养时间对 L-02 肝细胞的影响, 确定医用脂肪乳诱导 L-02 肝细胞脂肪变性的适宜浓度和时间, 为评价和筛选具有降脂、调控脂代谢异常的化合物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

L-02 肝细胞(中国科学院昆明动物研究所), 1640 培养基(Hyclone 公司), FBS(杭州四季青生物工程有限公司), OA 和二甲基亚砷(DMSO)(Sigma 公司), TG、BCA 测定试剂盒(南京建成生物有限公司), 四甲基偶氮唑盐(MTT)(MP 公司), 油红(O)(北京鼎国昌盛生物技术有限公司)。

1.2 设备与材料

CO₂培养箱(MCO-20AIC), 酶标仪(M200 PEO), 倒置显微镜(TS 100), 酶标板(BeaverBio™), 25 cm²培养瓶(BeaverBio™), 0.22 μm 微孔滤膜(Rephile)。

1.3 细胞培养与分组^[3-4]

用含 10% FBS 的 1640 培养基传代培养 L-02 肝细胞至对数生长期后随机分为 6 组: ①正常对照组; ② DMSO 组: 浓度分别为 0.1%、0.3%、0.5%、0.7%; ③ DMSO+OA 组: OA 0.3 μg/mL+DMSO 0.06%、OA 0.6 μg/mL+DMSO 0.12%、OA 1.2 μg/mL+DMSO 0.24%、

OA 2.4 μg/mL+DMSO 0.48%、OA 4.8 μg/mL+DMSO 0.96%; ④乙醇组: 浓度分别为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%; ⑤0.4%乙醇+OA 组: OA 分别为 5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L; ⑥0.6%乙醇+OA 组: OA 分别为 5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L。每组设 6 个复孔。

1.4 L-02 肝细胞脂肪变性的造模^[2-5]

用含 10% FBS 的 1640 培养基传代培养 L-02 肝细胞, 待细胞生长至对数期时吸出培养液, 每孔分别加入待研究的上述造模液 2 mL, 每组设 6 个复孔, 培养 48 h, 一部分用 O 染色, 观察细胞数目、细胞内脂滴和细胞形态, 另一部分用试剂盒测定细胞上清液的 TG 和 BCA。

1.5 细胞存活率检测

用 MTT 法检测, 细胞存活率(%)= 实验组 A 值/正常对照组 A 值×100%。

1.6 统计学处理

应用 SPSS17.0 软件, 采用 One way Anova 检验, 两两比较采用 SNK 法。P<0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 DMSO、乙醇和 OA 对 L-02 肝细胞存活率及几种诱导剂对 L-02 肝细胞脂肪变性的影响

DMSO、乙醇和 OA 对 L-02 肝细胞存活率的影响见表 1。以 DMSO 为溶剂, 0.5% 及以上的 DMSO 组的细胞存活率显著低于正常对照组(P<0.05), 说明较高浓度的 DMSO 对 L-02 肝细胞有毒性作用, 加入 OA 后, 随着 OA 浓度增加细胞存活率先增加后下降, 根据 OD 值及细胞生长状态, 选取 1.2 mg/L OA 为 OA 造模的诱导剂进行造模。以乙醇作溶剂, 0.2% 的低浓度乙醇不影响 L-02 肝细胞分裂生长, 且表现出一定的促进 L-02 肝细胞生长作用。0.8% 乙醇组活细胞数减少较多, 细胞大量浮起和坏死, 加入 OA 后, 0.6% 乙醇和 20 mg/L OA 组细胞生长状态良好, 浮起和坏死的细胞很少, 根据 OD 值及细胞生长状态, 选取乙醇 0.6% 和 OA 20 μg/mL 为造模诱导剂进行造模。

几种诱导剂对 L-02 肝细胞形态及细胞内脂滴的影响见图 1。图 1 显示, 20 mg/L OA+0.6% 乙醇,

表 1 DMSO、乙醇和油酸对 L-02 肝细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s$, 48 h)
Tab.1 Effects of DMSO, ethanol and oleic acid on the survival rate of hepatocyte L-02 ($Mean\pm SD$, 48 h)

Group	Inductive agent concentration	A value	Cell survival rate(%)
Control	0	1.383 9 \pm 0.060 0	100.0
	0.1%	1.393 8 \pm 0.090 0	100.7
DMSO	0.3%	1.256 1 \pm 0.080 0	90.5
	0.5%	1.231 2 \pm 0.090 0	89.1
	0.7%	1.214 7 \pm 0.010 0	87.6
	Oleic acid 0.3 mg/L, DMSO 0.06%	1.177 4 \pm 0.020 0	84.7
	Oleic acid 0.6 mg/L, DMSO 0.12%	1.235 2 \pm 0.070 0	89.1
Oleic acid + DMSO	Oleic acid 1.2 mg/L, DMSO 0.24%	1.350 2 \pm 0.060 0	97.8
	Oleic acid 2.4 mg/L, DMSO 0.48%	1.331 8 \pm 0.080 0	96.3
	Oleic acid 4.8 mg/L, DMSO 0.96%	1.261 2 \pm 0.030 0	91.3
	0.2%	1.412 0 \pm 0.060 0	102.1
	0.4%	1.257 9 \pm 0.060 0	90.5
Ethanol	0.6%	1.228 3 \pm 0.040 0	88.4
	0.8%	1.042 0 \pm 0.070 0	75.3
	Oleic acid 5 mg/L, Ethanol 0.4%	1.227 4 \pm 0.080 0	88.4
Oleic acid + Ethanol	Oleic acid 10 mg/L, Ethanol 0.4%	1.316 1 \pm 0.070 0	94.9
	Oleic acid 20 mg/L, Ethanol 0.4%	1.431 1 \pm 0.090 0	103.6
	Oleic acid 30 mg/L, Ethanol 0.4%	1.302 4 \pm 0.090 0	94.1
	Oleic acid 40 mg/L, Ethanol 0.4%	1.203 9 \pm 0.040 0	86.9
	Oleic acid 5 mg/L, Ethanol 0.6%	1.242 2 \pm 0.060 0	89.8
	Oleic acid 10 mg/L, Ethanol 0.6%	1.451 2 \pm 0.060 0	105.1
	Oleic acid 20 mg/L, Ethanol 0.6%	1.589 7 \pm 0.080 0	114.4
	Oleic acid 30 mg/L, Ethanol 0.6%	1.183 9 \pm 0.070 0	85.5
	Oleic acid 40 mg/L, Ethanol 0.6%	0.971 6 \pm 0.050 0	70.2

Note: DMSO: Dimethyl sylfoxide

1.2 mg/L OA+0.24% DMSO, 含 50% FBS 培养液、医用脂肪乳和 0.4%乙醇造模组出现的脂滴明显多于正常对照组($P<0.05$), 但 0.4%乙醇造模组出现的脂滴低于其他 4 组($P<0.05$)。医用脂肪乳和含 50% FBS 培养液造模组出现的脂滴数量多于 20 mg/L OA+0.6%乙醇造模组和 1.2 mg/L OA+0.24% DMSO 造模组($P<0.05$), 但两个 OA 造模组的细胞形态明显, 边缘清晰, 细胞核大, 细胞内脂肪滴大。含 50% FBS 培养液造模组的细胞形态模糊, 边缘融合, 细胞内出现较多体积很大的脂滴, 细胞核被挤到边上, 形成明显的印戒状损伤细胞。医用脂肪乳造模组的细胞形态相对含 50%FBS 培养液造模组有较好的细胞形态, 脂滴数量明显多于 OA 造模组($P<0.05$)。各试验组 TG、BCA 和 TG/BCA 见表 2。表 2 可见, 0.4%乙醇组、1.2 mg/L OA+0.24% DMSO 组的 TG/BCA 与正常组相比无显著性差异, 20 mg/L OA+0.6%乙醇组、含 50% FBS 培养液组的 TG/BCA 与正常组相比均具有

显著性差异($P<0.05$), 医用脂肪乳组的 TG/BCA 与正常组相比具有显著性差异($P<0.01$)。综合细胞存活率、细胞形态、胞内脂滴及胞内 TG/BCA, 医用脂肪乳能较好地诱导 L-02 肝细胞脂肪变性, 故选择医用脂肪乳进行造模浓度和培养时间的研究。

2.2 培养时间对医用脂肪乳诱导 L-02 肝细胞脂肪变性的影响

取对数生长期的 L-02 肝细胞, 用 0.25%胰蛋白酶消化, 细胞计数后用正常培养液配置成单个细胞悬液, 以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板上, 加培养液, 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度的 CO₂ 培养箱培养 48 h, 待细胞充分贴壁生长至 80 % 后, 正常对照组继续给予含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液培养 14 h, 模型组给予医用脂肪乳, 分别诱导培养 14 h、25 h、37 h、49 h、61 h, 测定细胞内 TG 和 BCA 含量, 结果见图 2。与正常组培养 14 h 比较, 医用脂肪乳造模组培养 14 h, TG 含量明显高于正常组($P<0.05$), 培养 14 h~49 h, 细胞内

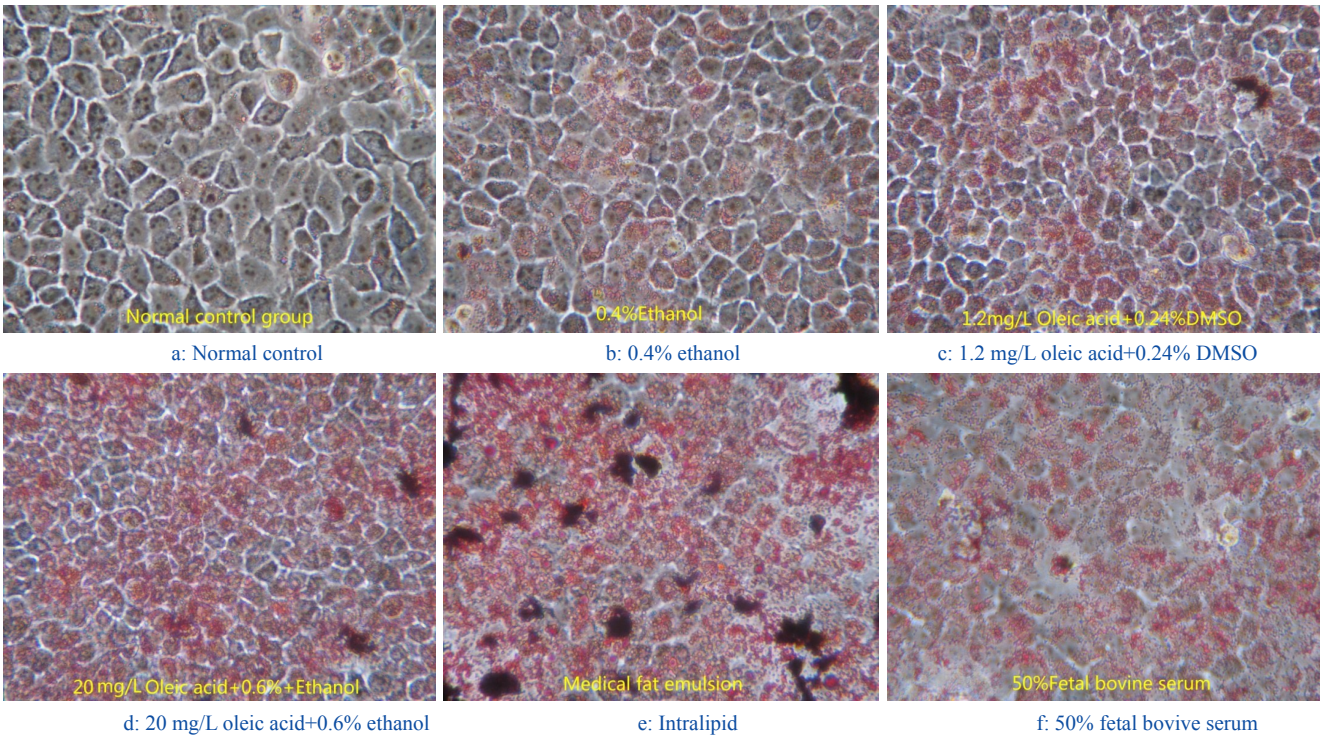


图 1 几种诱导剂对肝 L-02 肝细胞形态及胞内脂滴的影响
Fig.1 Effects of several inducers on the morphology of hepatocyte L-02 and intracellular lipid droplets

表 2 试验组 TG 和 BCA ($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 TG and BCA in the experimental groups (Mean \pm SD)

Item	Control	0.4% Group	1.2 mg/L Oleic acid+ 0.24% DMSO	20 mg/L Oleic acid+ 0.6% ethanol	50% Fetal bovine serum	Intralipid
TG(mg/mL)	0.150 0 \pm 0.005 0	0.107 0 \pm 0.006 0	0.110 0 \pm 0.000 2	0.188 0 \pm 0.006 0	0.197 9 \pm 0.010	1.075 0 \pm 0.010
BCA(mg/mL)	0.106 0 \pm 0.060 0	0.074 8 \pm 0.006 0	0.092 0 \pm 0.002 0	0.083 0 \pm 0.020 0	0.084 4 \pm 0.030	0.075 7 \pm 0.060
TG/BCA	1.411 0	1.430 0	1.195 0	2.261 0*	2.345 0*	14.196 0**

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

TG、脂肪滴及 BCA 随诱导培养时间的延长而增加, 细胞生长持续上升, 但当诱导培养时间达 61 h, TG 和 BCA 开始下降, 诱导培养时间过长可能对细胞有一定损伤, 故选择 49 h 为医用脂肪乳诱导培养 L-02 肝细胞脂肪变性造模的适宜时间。

2.3 医用脂肪乳用量对 L-02 肝细胞脂肪变性的影响

取对数生长期的 L-02 肝细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 细胞计数后用正常培养液配置成单个细胞悬液, 以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板上, 加培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的 CO_2 培养箱培养 48 h, 待细胞充分贴壁生长至 80% 后, 正常对照组继续给予含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液培养 49 h, 模型组 A 给予含 10% FBS、2.5% 医用脂肪乳的培养液 (10 mL FBS+2.5 mL 20% 医用脂肪乳, 用无血清的培养液定容到 100 mL)、模型组 B 给予含 10% FBS、5% 医用脂肪乳的培养液 (10 mL FBS+5 mL 20% 医用

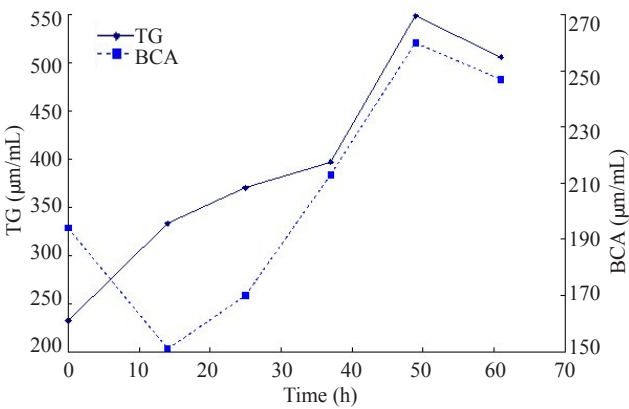


图 2 培养时间对医用脂肪乳诱导人肝 L-02 细胞脂肪变性的影响
Fig.2 Effects of culture time on the steatosis of hepatocyte L-02 induced by medical fat emulsion

脂肪乳, 用无血清的培养液定容到 100 mL)、模型组 C 给予含 10% FBS、10% 医用脂肪乳的培养液 (10 mL FBS+10 mL 20% 医用脂肪乳, 用无血清的培养液定

容到 100 mL)培养 49 h,用 TG 和 BCA 测定试剂盒检测细胞内 TG 和 BCA,结果见表 3。含 10%医用脂肪乳的培养液诱导培养的 L-02 肝细胞内的 TG、BCA 及

TG/BCA 明显高于含 2.5%和 5%医用脂肪乳的培养液 ($P<0.05$),故含 10%医用脂肪乳的培养液为医用脂肪乳诱导培养 L-02 肝细胞脂肪变性造模的适宜用量。

表 3 脂肪乳浓度对 L-02 肝细胞内 TG、BCA 及 TG/BCA 的影响
Tab.3 Effects of fat emulsion concentration on TG, BCA and TG/BCA in hepatocyte L-02

Item	Control	Group A	Group B	Group C
TG(mg/mL)	0.103±0.010	0.699±0.030	0.736±0.040	0.960±0.050*
BCA(mg/mL)	0.165±0.030	0.150±0.040	0.128±0.090	0.147±0.090*
TG/BCA	0.627	4.662	5.737	6.512*

* $P<0.05$ vs group A or group B

3 讨论

DMSO 作为脂溶性溶剂,能快速穿透细胞膜,常用于药物的媒介^[7],溶解性好,但超过某一浓度时对细胞有害^[8]。乙醇毒性小,能很好地溶解油酸。乙醇作为媒介,并不是浓度越高越好,需要针对具体药物而论。目前诱导细胞变性的油酸浓度尚无统一参考范围,这可能与溶媒种类和浓度有关。

本研究发现低浓度的乙醇能促进 L-02 肝细胞生长,随乙醇浓度的增加肝细胞死亡数量持续上升,与文献[6]结果一致,但乙醇+OA 组的 L-02 肝细胞最佳脂变浓度 OA 20 μg/mL+乙醇 0.6%,与文献[6]乙醇+软脂酸组 L-02 肝细胞最佳脂变浓度软脂酸 5 μg/mL+乙醇 0.4%有一定差距,可能是 OA 与软脂酸虽然同属脂肪酸,但其结构和生物活性不同,对 L-02 肝细胞的影响不同。L-02 肝细胞的脂肪变性与脂肪酸的种类、浓度及诱导培养时间密切相关。

通过 5 种不同方法建立 L-02 肝细胞脂变模型的比较发现,医用脂肪乳造模法的 TG/BCA 浓度最高,脂肪变性率高,细胞形态好,在此基础上得出了医用脂肪乳建立 L-02 肝细胞脂变模型的良好造模条件为 10%医用脂肪乳培养 49 h。医用脂肪乳价格低,对细胞毒性低,脂变率高,取材和使用方便,各大医院药店均有售,是一种良好的 L-02 肝细胞脂肪变性的诱导剂。

【参考文献】

[1] 崔 璨, 闫永彬, 彭 勃. 高血脂症性脂肪肝的研究近况[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(19): 2770-2772.
Cui C, Yan YB, Peng B. Recent research on hyperlipidemia fatty

liver[J]. Modern Journal of Integrated Chinese Traditional and Western Medicine, 2007, 16(19): 2770-2772.
[2] 殷锦锦, 唐外姣, 曾 璐, 等. 人肝细胞系 L-02 细胞单纯肝脂肪变性细胞模型的建立与应用[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(6): 837-842.
Yin JJ, Tang WJ, Zeng L, et al. Establishment and application of simple hepatic steatosis cell model of human L-02 cell lines[J]. Journal of Southern Medical University, 2014, 34(6): 837-842.
[3] 陈 莉, 汪春红, 黄邵鑫, 等. 不同溶剂中油酸对 LO₂ 和 HepG2 细胞生长和活力的影响[J]. 公共卫生与预防医学, 2012, 23(3): 4-8.
Chen L, Wang CH, Huang SX, et al. Oleic acid in different solvents effects on the growth and viability of LO₂ and HepG2 cell [J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2012, 23(3): 4-8.
[4] 张红锋, 杨慧萍, 王耀发. 乙醇和软脂酸诱导的脂肪肝离体细胞模型[J]. 华东师范大学学报, 2002, 4: 88-95.
Zhang HF, Yang HP, Wang YF. Ethanol and palmitic acid induced fatty liver cell model *in vitro*[J]. Journal of East China Normal University, 2002, 4: 88-95.
[5] 刘 晓, 朱月永, 任 杰, 等. 医用脂肪乳诱导的肝脂肪变性细胞模型的建立[J]. 肝脏, 2010, 15(6): 446-448.
Liu X, Zhu YY, Ren J, et al. The establishment of fatty degeneration model of liver cell induced by medical fat emulsion [J]. Chinese Hepatology, 2010, 15(6): 446-448
[6] 周红宇, 阳学风. 两种建立肝细胞脂变模型方法的对比[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(17): 2623-4.
Zhou HY, Yang XF. Comparison of two establishment methods of fatty degeneration model of liver cell[J]. Journal of Practical Medicine, 2007, 23(17): 2623-4.
[7] 扎拉嘎胡, 陈 莉, 买 霞, 等. DMSO 诱导 MCF-7 细胞凋亡的研究[J]. 解剖科学进展, 2008, 14(1): 58-60.
Zha La GH, Chen L, Mai X, et al. Study on DMSO induced MCF-7 cell apoptosis[J]. Progress of Anatomical Sciences, 2008, 14(1): 58-60.
[8] 吴 迪, 巴哈尔古丽·卡哈尔, 吴桂荣, 等. 溶媒二甲基亚砷对细胞生长和活力的影响研究[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(5): 489-491.
Wu D, Bahaerguli K, Wu GR, et al. Study on the effect of solvent DMSO on cell growth and viability [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2010, 33(5): 489-491.