

## 二甲双胍对人肝细胞 Huh7 脂质蓄积的影响及作用机制

郑洁, 唐志晗

(南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病  
国际科技创新合作基地 衡阳医学院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 二甲双胍; 低密度脂蛋白受体; Huh7 细胞; 脂质蓄积

[摘要] 目的 研究二甲双胍对肝细胞脂质蓄积的影响及作用机制。方法 体外培养人源 Huh7 肝细胞, 细胞随机分为空白对照组及 5 mmol/L 二甲双胍、10 mmol/L 二甲双胍、15 mmol/L 二甲双胍处理组, 确定最佳浓度后, 使用 LDL 荷脂, 然后分为空白对照组、LDL 处理组和 LDL+15 mmol/L 二甲双胍处理组。实验终点, 采用细胞增殖及毒性检测试剂盒检测细胞存活率, 油红 O 染色和 BODIPY 脂质探针检测细胞内脂质含量, Dil-LDL 检测细胞脂质摄取能力, Western blot 分析固醇调节元件结合蛋白 2(SREBP-2)、SREBP-1c、低密度脂蛋白受体(LDLR)和前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(PCSK9)蛋白的表达情况。结果 二甲双胍可抑制 LDL 诱导的肝细胞脂质蓄积, 降低 SREBP-2、SREBP-1c、LDLR 和 PCSK9 的蛋白表达。结论 二甲双胍可能通过减少转录因子 SREBP-2 和 SREBP-1c, 下调 LDLR 表达, 从而抑制细胞脂质蓄积。

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

### Effect and mechanism of metformin on lipid accumulation in Huh7 hepatocytes

ZHENG Jie, TANG Zhihan

(Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease & Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001)

[KEY WORDS] metformin; low density lipoprotein receptor; Huh7; lipid accumulation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of metformin on lipid accumulation in Huh7 hepatocytes. **Methods** Huh7 cells were cultured in vitro and divided into: blank control group, 5 mmol/L, 10 mmol/L and 15 mmol/L metformin treatment group. After determining the optimal concentration, LDL was used to load fat, and then divided into: blank control group, LDL group, LDL+15 mmol/L metformin treatment group. Cell proliferation and toxicity test kits were used to detect cell survival rate, oil red O and BODIPY lipid probes were used to detect intracellular lipid content, Dil-LDL was used to detect cell lipid uptake capacity, and Western blot analysis was performed on sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), low density lipoprotein receptor (LDLR) and proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) protein expression. **Results** Metformin can inhibit LDL-induced lipid accumulation in Huh7 hepatocytes and reduce protein expression of SREBP-2, SREBP-1c, LDLR, and PCSK9. **Conclusion** Metformin reduces intracellular lipid uptake by reducing LDLR expression and inhibiting the expression of the transcription factors SREBP-2 and SREBP-1c.

脂肪性肝病(fatty liver disease, FLD)是指病变主要在肝小叶,以弥漫性肝细胞大泡型脂肪变为病理特征的临床综合征,病理上包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和脂肪性肝硬化四种

类型。自 2013 年以来,为了进一步规范 FLD 诊疗流程,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会每年都在更新《脂肪性肝病诊疗规范化的专家建议》,2019 版建议中明确指出 FLD 主要是指非酒精性脂肪性

[收稿日期] 2019-10-16

[修回日期] 2020-03-09

[基金项目] 湖南省科技计划项目(2015JC3081)

[作者简介] 郑洁,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础,E-mail 为 441311759@qq.com。通信作者唐志晗,教授,博士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础,E-mail 为 tangzhihan98@163.com。

肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)<sup>[1]</sup>。最新研究表明:在亚洲地区 NAFLD 的总体患病率为 29.62%。而我国大陆一般人群中患病率为 29.81%<sup>[2]</sup>。尽管 NAFLD 的发病率很高,但目前还没有特定靶向药物治疗。因此,寻找新的降脂药物并探讨其有关的作用机制对进一步提高临床控制率具有重要的学术价值和临床应用潜力。

二甲双胍(metformin, Met)来源于植物 Galena Offivinalib(法国丁香),是治疗 2 型糖尿病的一种双胍类降糖药物,并在临床实践中表现出很好的降糖效果<sup>[3]</sup>。随着研究的深入以及其良好的安全性而广泛应用于临床。已有研究证实二甲双胍可以调节肝脂肪变性<sup>[4]</sup>,但是其具体作用机制尚不完全明确。因此,本研究拟在细胞水平探讨二甲双胍对低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)诱导的肝细胞脂质蓄积的影响及作用机制,为二甲双胍应用于 NAFLD 的临床治疗提供新的科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞、试剂及仪器

人源 Huh7 肝细胞系购于广州吉妮欧生物科技有限公司;细胞培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购于 Gibco 公司;二甲双胍(甲福明盐酸盐)、DAPI 购于 Sigma 公司;胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司;胰酶细胞消化液购于 Biosharp 公司;油红 O 染液、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)均购于索莱宝公司;细胞蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、高灵敏度化学发光试剂盒购于北京康为世纪公司;细胞增殖及毒性检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)、LDL、DiI-LDL 均购于广州奕源生物科技有限公司;BODIPY 购于 Thermo Fisher Scientific 公司;前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(proprotein convertase subtilisin/kexin 9, PCSK9)、低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)、固醇调节元件结合蛋白 1c(sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c)、固醇调节元件结合蛋白 2(sterol regulatory element binding protein-2, SREBP-2)、 $\beta$ -tubulin 和  $\beta$ -actin 和 GAPDH 等抗体购于 Proteintech 公司。仪器均由南华大学心血管疾病研究所提供。

### 1.2 细胞培养及实验分组

Huh7 细胞于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,当细胞生长融合达 80% 以上时进行传代。实验首先分为空白对照组、5

mmol/L 二甲双胍、10 mmol/L 二甲双胍、15 mmol/L 二甲双胍处理组,确定最佳浓度后,使用 LDL 荷脂,然后分为空白对照组、LDL 处理组和 LDL+15 mmol/L 二甲双胍处理组,按分组加入药物处理 24 h 后收集样本。

### 1.3 CCK-8 检测细胞活力

置备 Huh7 细胞悬液按 8 000 个细胞/孔接种于 96 孔板中,每组 3 个复孔,将孔板于 37 °C 培养箱中培养 24 h 以完全贴壁后,更换培养液并按实验分组分别加入不同浓度的药物处理 24 h。之后每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂孵育 2 h。酶标仪测定 490 nm 波长处的吸光度(OD 值),计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(加药处理组的 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)。

### 1.4 油红 O 检测细胞脂质含量

在 24 孔板中按  $1 \times 10^5$  个细胞/孔种植 Huh7 细胞,待细胞生长融合后按上述实验分为空白对照组、50 mg/L LDL 处理组、50 mg/L LDL+不同浓度(5、10、15 mmol/L)二甲双胍处理组。处理 24 h 后,倒掉旧培养液,用 PBS 洗涤 Huh7 细胞 3 次,弃掉 PBS,加入 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min。固定后用蒸馏水洗涤,加入油红 O 工作液染色 20 min,蒸馏水再次洗涤 3 次以上,除去多余的染料。苏木精染色 5 s,蒸馏水漂洗 3 遍,甘油封片,显微镜观察。

### 1.5 BODIPY 检测细胞脂质含量

在 24 孔板中按  $1 \times 10^5$  个细胞/孔种植 Huh7 细胞,待细胞生长融合后按上述实验分组分别加入 50 mg/L LDL 以及终浓度为 0、5、10、15 mmol/L 的二甲双胍处理 24 h,之后,避光每孔加入 5  $\mu$ mol/mL BODIPY 孵育 20 min,吸掉原培养基,PBS 洗 3 次,DAPI 染核 5 min,再次 PBS 洗涤 3 次,甘油封片,荧光显微镜观察脂质含量。

### 1.6 DiI-LDL 检测脂质摄取能力

在 24 孔板中按  $1 \times 10^5$  个细胞/孔种植 Huh7 细胞,待细胞生长融合后按上述实验分组分别加入终浓度为 0、5、10、15 mmol/L 的二甲双胍处理 24 h,避光加入 20 mg/L DiI-LDL,继续在培养箱中培养 4 h,处理完毕,吸弃残留培养基,PBS 洗 3 次,用 DAPI 染核 5 min,PBS 洗 3 次,荧光显微镜观察各组细胞内 DiI-LDL 的含量。

### 1.7 Western blot 检测 SREBP-2、SREBP-1c、PCSK9 和 LDLR 蛋白的表达

将培养后的细胞裂解离心提取蛋白,通过 BCA 蛋白定量法确定蛋白浓度,取等质量等体积蛋白样品之后依次进行电泳、转膜、封闭、一抗 4 °C 过夜孵

育 (SREBP-2、SREBP-1c、PCSK9、LDLR、 $\beta$ -tubulin、 $\beta$ -actin 及 GAPDH 蛋白抗体)、二抗室温孵育 1 h, 采用凝胶成像系统进行检测。

### 1.8 统计学分析

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。使用 GraphPad Prism 5 比较和分析获得的值。使用单因素方差分析进行组间差异显著性检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 二甲双胍对 Huh7 细胞存活率无影响

分别用 0、5、10 和 15 mmol/L 二甲双胍预处理 Huh7 细胞 24 h, 与 0 mmol/L 处理组 (空白对照组) 相比, 5、10 和 15 mmol/L 二甲双胍处理组细胞存活率无明显差异 ( $P > 0.05$ , 图 1), 说明 15 mmol/L 二甲双胍处理 Huh7 细胞 24 h 对 Huh7 细胞的生长没有明显抑制作用, 提示二甲双胍在本实验浓度范围内对 Huh7 细胞没有毒性作用。

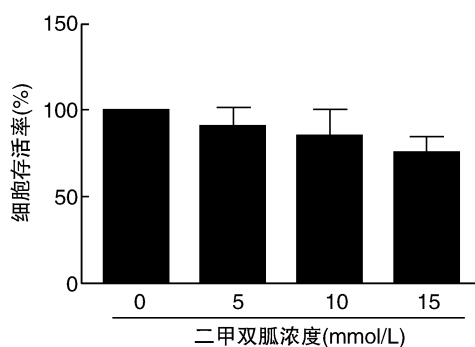


图 1. 不同浓度二甲双胍对 Huh7 细胞存活率的影响 ( $n=4$ )  
Figure 1. Effect of different concentrations of metformin on the survival rate of Huh7 cells ( $n=4$ )

### 2.2 二甲双胍减少 LDL 诱导的 Huh7 细胞脂质蓄积

油红 O 染色结果显示, 与空白对照组相比, LDL 处理组 Huh7 细胞内红色脂滴明显增多; 而与 LDL 处理组相比, 不同浓度二甲双胍处理组 Huh7 细胞内红色脂滴存在不同程度减少, 这说明二甲双胍能降低 LDL 诱导的 Huh7 细胞脂质蓄积 (图 2)。为进一步验证, 采用 BODIPY 脂质绿色荧光探针检测细胞内脂质情况, 结果显示, 与空白对照组相比, LDL 处理组绿色荧光标记的脂质明显增多; 而与 LDL 处理组相比, 随着二甲双胍浓度增高, 细胞中绿色荧光减弱, 这与油红 O 染色观察的结果一致 (图 2)。

### 2.3 二甲双胍抑制 Huh7 细胞对 Dil-LDL 的摄取

Huh7 细胞加或不加二甲双胍处理 24 h 后, 再加 Dil-LDL 处理细胞 4 h。荧光显微镜观察结果表明, 与空白对照组相比, Dil-LDL 处理组橙红色荧光强度明显增高; 与 Dil-LDL 处理组相比, 不同浓度二甲双胍处理组橙红色荧光强度逐渐减弱, 说明二甲双胍能抑制 Huh7 细胞对 Dil-LDL 的摄取 (图 3)。

### 2.4 二甲双胍减少 Huh7 细胞中 LDLR 的表达

分别用 0、5、10 和 15 mmol/L 二甲双胍处理 Huh7 细胞 24 h, Western blot 检测结果显示, 与 0 mmol/L 二甲双胍处理组相比, 5、10 和 15 mmol/L 二甲双胍处理细胞后 LDLR 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ ; 图 4), 以 15 mmol/L 处理组降低最为明显。进一步 Western blot 检测结果显示, Huh7 细胞加入 LDL 处理的情况下二甲双胍仍能够下调 LDLR 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ; 图 4)。

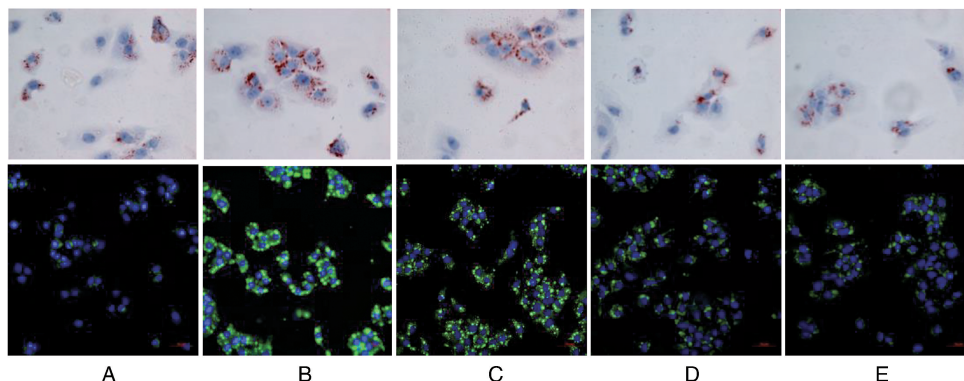


图 2. 不同浓度二甲双胍对 LDL 诱导的 Huh7 细胞脂质蓄积的影响 上图为油红 O 染色结果 (40 $\times$ ); 下图为 BODIPY 脂质绿色荧光探针结果 (20 $\times$ )。A 为空白对照组, B 为 LDL 处理组, C 为 LDL+5 mmol/L Met 处理组, D 为 LDL+10 mmol/L Met 处理组, E 为 LDL+15 mmol/L Met 处理组。

Figure 2. Effect of different concentrations of metformin on LDL-induced lipid accumulation in Huh7 cells

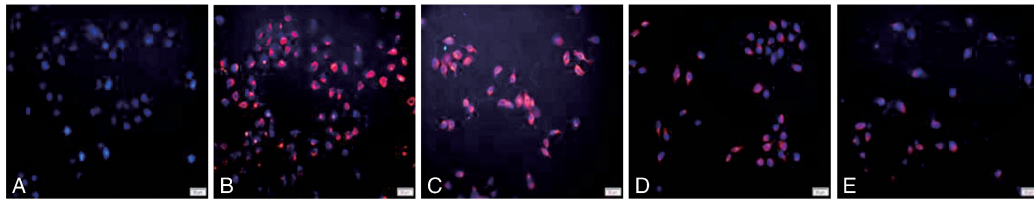


图3. 不同浓度二甲双胍对 Huh7 细胞摄取 DiI-LDL 能力的影响(20×) A 为空白对照组, B 为 DiI-LDL 处理组, C 为 DiI-LDL+5 mmol/L Met 处理组, D 为 DiI-LDL+10 mmol/L Met 处理组, E 为 DiI-LDL+15 mmol/L Met 处理组。

Figure 3. Effect of different concentrations of metformin on LDL-induced lipid uptake in Huh7 cells(20×)

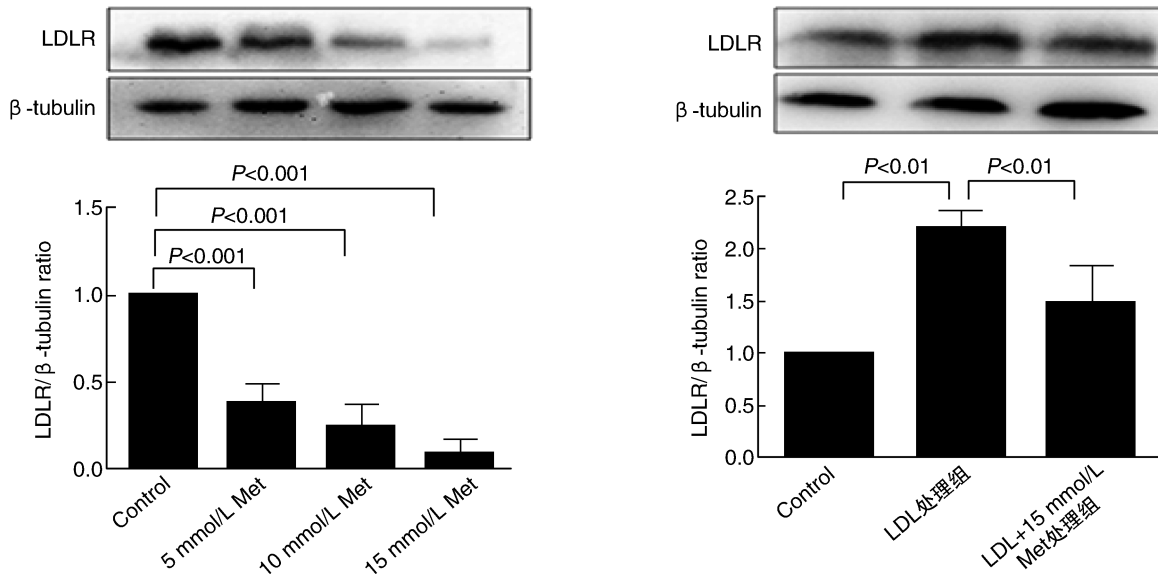


图4. 二甲双胍抑制 Huh7 细胞中 LDLR 表达( $n=3$ )

Figure 4. Metformin inhibits LDLR expression in Huh7 cells( $n=3$ )

### 2.5 二甲双胍减少 Huh7 细胞中 SREBP-2、SREBP-1c、PCSK9 的表达

分别选用 0、5、10、15 mmol/L 二甲双胍处理 Huh7 细胞 24 h, Western blot 检测结果显示,与 0 mmol/L 二甲双胍处理组相比,5、10、15 mmol/L 二甲双胍处理细胞后 SREBP-2、SREBP-1c 和 PCSK9 表达水平明显降低( $P < 0.01$ ; 图 5)。进一步 Western blot 检测结果显示, Huh7 细胞加入 LDL 处理的情况下 15 mmol/L 二甲双胍仍能下调 SREBP-2、SREBP-1c 和 PCSK9 的蛋白表达( $P < 0.01$ ; 图 5)。

## 3 讨论

NAFLD 临床病理主要以弥漫性肝细胞大泡性脂肪病变为主。由于其病因较多,发病机制尚未完全明确。脂质摄入异常或甘油三酯增多造成肝脏脂质代谢的合成、降解和分泌失衡,导致脂质在肝细胞内异常沉积引起的肥胖、2 型糖尿病、高脂血症

等单独或共同成为 NAFLD 的易感因素<sup>[5]</sup>。二甲双胍作为 2 型糖尿病的一线首选药物虽然已有 60 余年,近年来随着研究的深入,陆续发现二甲双胍除有降糖功能外,还对心血管疾病、肿瘤和多囊卵巢综合征等疾病具有一定的治疗作用。其中,二甲双胍对于脂质代谢的调节作用愈发受到重视。

本研究通过使用 LDL 诱导 Huh7 细胞脂质蓄积,在此基础上研究二甲双胍对 LDL 诱导的 Huh7 细胞脂质蓄积的作用。结果显示,采用油红 O 和 BODIPY 检测结果显示细胞内脂质蓄积明显增加,随后进行二甲双胍处理,胞内脂质蓄积减少。这提示二甲双胍可抑制 LDL 诱导的 Huh7 细胞脂质蓄积,这与已有动物实验研究报道相一致<sup>[6]</sup>。

随后对二甲双胍抑制 LDL 诱导 Huh7 细胞脂质蓄积的机制进行研究,其可能与二甲双胍降低 LDLR 表达途径相关。我们采用荧光显微镜观察发现,二甲双胍抑制 Huh7 细胞对 DiI-LDL 的摄取。这提示二甲双胍通过减少摄取 LDL 降低脂质蓄积。

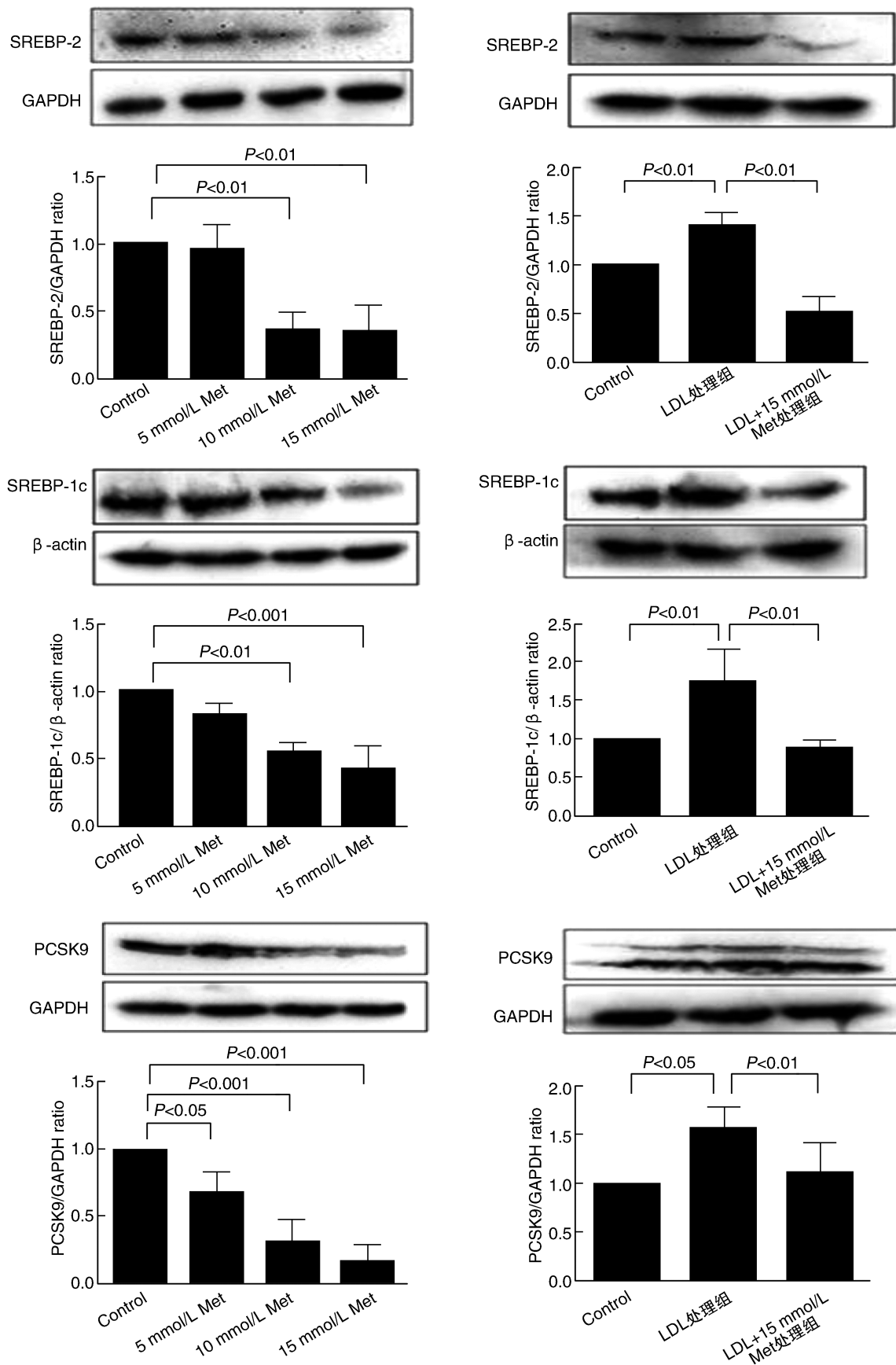


图 5. 二甲双胍抑制 Huh7 细胞中 SREBP-2, SREBP-1c 和 PCSK9 表达 (n=3)

Figure 5. Metformin inhibits SREBP-2, SREBP-1c, and PCSK9 expression in Huh7 cells (n=3)

LDLR 是一类跨细胞膜上的糖蛋白,广泛存在于体内组织细胞中,如成纤维细胞、平滑肌细胞、血管内皮细胞、肾上腺和肝脏等,但以肝细胞最为丰富。并与相应的脂蛋白配体作用,具有吸收和内化脂蛋白特别是 LDL 胆固醇的功能。低密度脂蛋白(LDL)由极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)经脂蛋白脂肪酶(Lipoprotein lipase, LPL)水解失去部分甘油三酯(triglyceride, TG)转变而来,为胆固醇含量最高的一种脂蛋白,担任由肝脏向周围组织转运胆固醇的任务。LDL 与 LDLR 结合并摄取至细胞内在溶酶体途径进行降解。Sharma 等<sup>[7]</sup>人发现二甲双胍降低转移性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞胆固醇含量和胆固醇调节分子,如 HMGCoR、LDLR,从而发挥抗癌作用。本研究发现使用 LDL 处理 Huh7 细胞 LDLR 表达显著增加,而加入二甲双胍处理后 LDLR 表达下降,这提示二甲双胍确实是通过降低 LDLR 表达从而降低肝脏脂质蓄积的。

值得注意的是,为了维持胆固醇的稳态,LDLR 的表达在转录水平上受到固醇调节元件结合蛋白 SREBP-2 和 SREBP-1c 的严格调控。体外实验发现二甲双胍可刺激 AMPK 活性降低 SREBP-2 和 SREBP-1c 表达最终降低细胞内胆固醇含量<sup>[8-12]</sup>。而我们的研究发现二甲双胍能直接抑制 SREBP-2 和 SREBP-1c 的表达,也能抑制 LDL 诱导的 SREBP-2 和 SREBP-1c 的表达上调。这些结果表明二甲双胍降低脂质蓄积可能是通过减少转录因子 SREBP-2 和 SREBP-1c 表达,进一步使得 LDLR 表达降低,从而使肝细胞对胞外脂质摄取减少,进而降低胞内脂质蓄积。此外,有研究表明,PCSK9 通过与 LDLR 蛋白的 EGF-胞外结构域结合,触发其在溶酶体中的降解,从而在蛋白水平减少 LDLR 表达<sup>[13-14]</sup>。而我们的结果显示二甲双胍在抑制 LDLR 蛋白表达的同时,PCSK9 表达水平也是降低的。这可能是因为 PCSK9 也受到 SREBP-2 和 SREBP-1c 调控的原因。这提示二甲双胍可能主要是通过下调转录调控因子 SREBP-2 和 SREBP-1c 的表达从而抑制 LDLR 表达,而与 PCSK9 关系并不大。

综上所述,本研究发现二甲双胍可以抑制 LDL 处理的 Huh7 细胞中 LDLR、SREBP-2、SREBP-1c 和 PCSK9 的表达,减少 Huh7 细胞脂质蓄积。本研究证实了二甲双胍降低脂质蓄积的机制是通过 SREBP/LDLR 这一途径,这为肝细胞脂质蓄积调控

提供了一个新的靶点,也为临床上应用二甲双胍治疗 NAFLD 提供了新的证据支持。

#### [参考文献]

- [1] 中国研究型医院学会肝病专业委员会,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会,中华医学会肝病学会脂肪肝与酒精性肝病学组,等. 脂肪性肝病诊疗规范化的专家建议(2019年修订版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(11): 2426-2430.
- [2] Li J, Zou B, Yeo YH, et al. Prevalence, incidence, and outcome of non-alcoholic fatty liver disease in Asia, 1999-2019: a systematic review and meta-analysis[J]. *Null*, 2019, 4(5): 389-398.
- [3] Kothari S, Dhama-Shah H. Antidiabetic drugs and statins in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2019, 9(6): 723-730.
- [4] Tang X, Li J, Xiang W, et al. Metformin increases hepatic leptin receptor and decreases steatosis in mice[J]. *J Endocrinol*, 2016, 230(2): 227-237.
- [5] 陈思, 赵金珍, 胡晶, 等. 他汀类药物在治疗非酒精性脂肪肝病中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(3): 297-303.
- [6] Kita Y, Takamura T, Misu H, et al. Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e43056.
- [7] Sharma A, Bandyopadhyaya S, Chowdhury K, et al. Metformin exhibited anticancer activity by lowering cellular cholesterol content in breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0209435.
- [8] Zhang F, Sun W, Chen J, et al. SREBP-2, a new target of metformin? [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 4163-4170.
- [9] Jiang X, Yu J, Wang X, et al. Quercetin improves lipid metabolism via SCAP-SREBP2-LDLR signaling pathway in early stage diabetic nephropathy[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 827-839.
- [10] Liu J, Jin X, Yu CH, et al. Endoplasmic reticulum stress involved in the course of lipogenesis in fatty acids-induced hepatic steatosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(3): 613-618.
- [11] Min QQ, Qin LQ, Sun ZZ, et al. Effects of metformin combined with lactoferrin on lipid accumulation and metabolism in mice fed with high-fat diet [J]. *Nutrients*, 2018, 10(11). DOI: 10.3390/nu111628.
- [12] Zarei M, Pujol E, Quesada-López T, et al. Oral administration of a new HRI activator as a new strategy to improve high-fat-diet-induced glucose intolerance, hepatic steatosis, and hypertriglyceridaemia through FGF21 [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(13): 2292-2305.
- [13] Tang ZH, Li TH, Peng J, et al. PCSK9: A novel inflammation modulator in atherosclerosis? [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2345-2355.
- [14] Li HH, Li J, Zhang XJ, et al. 23, 24-Dihydrocucurbitacin B promotes lipid clearance by dual transcriptional regulation of LDLR and PCSK9[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(3): 327-335.

(此文编辑 许雪梅)