

AcSDKP 对非酒精性脂肪性肝炎体外模型脂质代谢功能的影响及分子机制研究^{*}

白洁 纪文静 柯月 丁永年

(新疆医科大学第二附属医院消化科, 新疆 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 探究 N-乙酰-丝-天冬-赖-脯氨酸(AcSDKP)对游离脂肪酸(FFA)诱导人肝细胞 L02 的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)体外模型脂质代谢功能的影响及机制。方法 将 L02 细胞分为对照(NC)组、FFA 组和不同浓度 AcSDKP 处理组(FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组、FFA+100 nM AcSDKP 组),油红 O 染色检测各组 L02 细胞脂质沉积,试剂盒检测各组 L02 细胞中甘油三酯(TG)含量,ELISA 实验检测各组 L02 细胞上清液中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平及丙二醛(MDA)含量,Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组 L02 细胞凋亡率,实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分析各组 L02 细胞中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、脂肪酸合成酶(FASN)、甾醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)mRNA 与蛋白的水平。结果 与 FFA 组比较,FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组、FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞中脂滴沉积明显减少,ALT、AST 水平显著降低($P < 0.05$),MDA 含量显著减少($P < 0.05$),细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$),AMPK mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量显著上调($P < 0.05$),FASN 和 SERBP-1c mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量显著下调($P < 0.05$)。且与 FFA+1 nM AcSDKP 组和 FFA+10 nM AcSDKP 组比较,FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞中脂质沉积更少,ALT、AST 水平也显著降低($P < 0.05$),MDA 含量显著减少($P < 0.05$),细胞凋亡率进一步降低($P < 0.05$),同时,AMPK 蛋白相对表达量显著上调($P < 0.05$),FASN 和 SERBP-1c mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量显著下调($P < 0.05$)。结论 AcSDKP 能够减少 FFA 诱导人肝细胞 L02 内脂质沉积,促进细胞脂质代谢并抑制细胞凋亡,该作用可能与其调节 AMPK/FASN/SERBP-1c 表达有关。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病;N-乙酰-丝-天冬-赖-脯氨酸;脂质代谢;分子机制

【中图分类号】 R575.5 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 12. 002

Effect of AcSDKP on lipid metabolism in NASH model and its molecular mechanism

BAI Jie, JI Wenjing, KE Yue, DING Yongnian

(Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of N-acetyl-filament-aspartate-Lyophil-proline (AcSDKP) on lipid metabolism in vitro model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) induced by free fatty acid (FFA) in human hepatocyte L02 and its mechanism. **Methods** L02 cells were divided into control (NC) group, FFA group and AcSDKP treatment groups with different concentrations (FFA+1nM AcSDKP group, FFA+10nM AcSDKP group, FFA+100nM AcSDKP group), lipid deposition of L02 cells in each group was detected by oil red O staining, the content of triglyceride (TG) in L02 cells of each group was detected by the kit, the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and malondialdehyde (MDA) in the supernatant of L02 cells of each group were detected by ELISA, the apoptosis rate of L02 cells of each group was detected by Annexin V-FITC/PI double staining method, the mRNA and protein levels of adenylate activated protein kinase (AMPK), fatty acid synthetase (FASN) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) in L02 cells of each group were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot analysis. **Results** Compared with FFA group, lipid droplets deposition in L02 cells in FFA+1nM AcSDKP group,

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01C355)

通讯作者:丁永年,主任医师,E-mail:bessiegod@163.com

引用本文:白洁,纪文静,柯月,等. AcSDKP 对非酒精性脂肪性肝炎体外模型脂质代谢功能的影响及分子机制研究[J]. 西部医学,2024,36(12):

1722-1728. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 12. 002

FFA+10nM AcSDKP group and FFA+100nM AcSDKP group were significantly decreased, the level of ALT and AST were significantly decreased ($P<0.05$). MDA content was significantly decreased ($P<0.05$), apoptosis rate was significantly decreased ($P<0.05$), AMPK mRNA relative expression level and protein relative expression level were significantly up-regulated ($P<0.05$), FASN and SERSP-1c mRNA relative expression level and protein relative expression level were significantly down-regulated ($P<0.05$). Moreover, compared with FFA+1nM AcSDKP group and FFA+10nM AcSDKP group, the lipid deposition in L02 cells in FFA+100nM AcSDKP group was less, and the levels of ALT and AST were also significantly decreased ($P<0.05$), MDA content was significantly decreased ($P<0.05$), the apoptosis rate was further decreased ($P<0.05$), while AMPK protein relative expression was significantly up-regulated ($P<0.05$), FASN and SERSP-1c mRNA relative expression and protein relative expression were significantly down-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** AcSDKP can reduce lipid deposition in L02 induced by FFA, promote lipid metabolism and inhibit cell apoptosis, which may be related to the regulation of AMPK/FASN/SERP-1c expression.

【Key words】 Nonalcoholic fatty liver disease; N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline; Lipid metabolism; Molecular mechanism

非酒精性脂肪性肝病(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是全球最常见的慢性肝病,流行病学研究显示,NAFLD 的患病率在世界范围内逐年增加,西方和亚洲国家的发病率分别约为 30% 和 25%^[1]。非酒精性脂肪性肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis, NASH)属于 NAFLD 的病理进展阶段,通常表现为肝小叶炎症和肝细胞气球样变性,伴有脂肪变性环境下的肝细胞损伤,其纤维化进展比 NAFLD 更快,最终会导致肝功能衰竭、肝硬化和肝细胞癌^[2-3]。NAFLD 发病机制复杂、诊断困难,不少患者将会进展为 NASH,并伴随胰岛素抵抗和脂质代谢紊乱,然而,目前尚无 FDA 获批的 NAFLD 与 NASH 有效防治药物。N-乙酰-丝-天冬-赖-脯氨酸(N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline, AcSDKP)是一种内源性免疫调节肽,由胸腺素 β_4 水解产生,普遍分布在血浆、尿液和各器官中^[4]。目前大量研究表明,AcSDKP 表现出与许多生理病理过程有关,例如抗炎、抑制纤维化、促进血管生成、减少细胞凋亡等,因而能够在脑、心脏、肝脏和肾脏等疾病中发挥一定的组织保护作用^[5-9]。但关于 AcSDKP 是否在 NASH 中发挥肝保护作用尚未明确。本研究通过采用游离脂肪酸(Free fat acid, FFA)诱导人肝细胞 L02 建立 NASH 体外模型,观察 AcSDKP 对 NASH 主要病理机制脂质代谢紊乱的影响,并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与主要试剂 人肝细胞 L02 购于武汉普诺赛生命科技有限公司,棕榈酸和油酸购于美国 Sigma 公司,AcSDKP 购于瑞士 Bachem 公司,胎牛血清、DMEM 培养及胰酶购于美国 Gibco 公司,油红 O 染色液购于北京伊塔生物科技有限公司,甘油三酯(Triglyceride, TG)含量购于上海抚生实业有限公司,丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)

和天冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase, AST)水平的 ELISA 检测试剂盒购于广州博辉生物科技有限公司,丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量 ELISA 检测试剂盒购于上海西唐生物科技有限公司,Annexin V-FITC/PI 双染法凋亡检测试剂盒购于上海生工生物工程股份有限公司,Trizol 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司,cDNA 第一链合成试剂盒和实时荧光定量 PCR 检测试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司,RIPA 裂解液购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,BCA 法蛋白浓度测定试剂盒和 ECL 显影液购于北京索莱宝科技有限公司,PVDF 膜购于美国 Thermo Fisher 公司,兔抗 AMPK、FASN、SERP-1c、GAPDH 抗体及山羊抗兔 IgG 抗体购于英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组处理 将冻存的 L02 复苏,添加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基后,在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,定期更换培养液,进行常规传代处理。将对数生长期的 L02 细胞分为对照(NC)组、模型组(FFA 组)、不同浓度 AcSDKP 处理组(FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组、FFA+100 nM AcSDKP 组)。①对照组:L02 细胞在正常培养基中培养 24 h。②FFA 组:L02 肝细胞在含 1 mmol/L FFA(按照棕榈酸:油酸=1:2 比例配置)的培养基中培养 24 h。③不同浓度 AcSDKP 处理组:L02 细胞在含 1 mmol/L FFA 与不同浓度 AcSDKP (1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L)的培养基中同时培养 24 h,3 组细胞分别记为 FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组、FFA+100 nM AcSDKP 组。

1.2.2 油红 O 染色 将各处理组 L02 细胞用 PBS 洗涤 3 次,4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗涤后

加入 60% 异丙醇, 室温静置 5 min, 滴加油红 O 工作液覆盖细胞, 室温避光染色 30 min, PBS 洗涤细胞 3 次, 使用显微镜观察脂质沉积情况并捕获图像, 橙红色或红色染色代表脂滴。

1.2.3 细胞内 TG 含量检测 将 L02 细胞按照“1.2.1”中方法分组处理后, 收集细胞, 4000 r/min 离心 10 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 根据制造商试剂盒说明书步骤测定各组 L02 细胞内 TG 含量。

1.2.4 ELISA 实验 收集各处理组 L02 细胞上清液, 4 000 r/min 离心 10 min, 去除颗粒物, 按照 ALT、AST、MDA 的检测试剂盒说明书操作, 在 450 nm 处测定各孔的 OD 值, 根据获得的标准曲线来分析 ALT、AST 水平及 MDA 含量。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 双染法 使用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, PBS 洗涤后, 添加 $1 \times$ Binding Buffer 重悬, 在流式管内加入细胞悬液, 并加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 染液室温孵育 10 min, 再加入 $10 \mu\text{L}$ Propidium iodide 标记, 4 h 内通过流式细胞仪检测评估各组 L02 细胞凋亡情况, CellQuest 软件分析数据。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法 在各处理组 L02 细胞中分别加入 Trizol 试剂提取总 RNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 超微可见分光光度计测定 RNA 浓度与纯度, -80°C 保存备用。取适量 RNA 样品解冻, 按照 cDNA 第一链合成试剂盒, 立即逆转录合成 cDNA。运用实时荧光定量 PCR 法检测 AMPK、FASN 及 SERP-1c mRNA 的表达水平, 以 β -actin 作为内参基因, 按照试剂盒说明配制扩增反应体系, 轻柔混匀, 在定量检测系统上设定条件为: 95°C , 10 min; 95°C , 15 s; 60°C , 60 s, 40 个循环。扩增结束后获取 Ct 值, 根据 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析数据, 计算各

目的基因的 mRNA 相对表达量。

1.2.7 Western blot 采用 RIPA 裂解液裂解各处理组 L02 细胞, 12 000 rpm 常规离心 20 min, 吸取上清, BCA 法测定样品浓度。将蛋白样品与上样缓冲液混匀, 通过 100°C 沸水浴加热致蛋白变性。将等量蛋白样品上样至凝胶孔内, 进行电泳分离并电转至 PVDF 膜上, 将膜浸入 5% 脱脂奶粉室温处理 1 h。结束后, 将膜与兔抗 AMPK、FASN、SERP-1c 抗体液 (1:1 000) 共置于 4°C 下孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 再与对应山羊抗兔 IgG 抗体液 (1:5 000) 共置于室温下孵育 2 h, 再次洗膜, 避光加入 ECL 显影, 凝胶成像仪采集图像, ImageJ 软件检测蛋白条带的灰度值, 以 GAPDH 作为内参蛋白, 计算各目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析 GraphPad Prism 7.0 软件分析实验数据, 绘制统计图。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用单因素方差分析法进行多组间数据比较, 采用 LSD-*t* 检验进行组间两两数据比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AcSDKP 对 FFA 诱导下 L02 细胞内脂质沉积的影响 经过油红 O 染色后观察到 5 组 L02 细胞内呈现不同程度的红色染色, 代表胞质内脂滴含量。与 NC 组比较, FFA 组 L02 细胞内红色染色区域明显增加, 说明脂滴含量增多, 造成了脂质堆积现象; 与 FFA 组比较, FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组及 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞内红色染色区域明显减小, 说明脂滴沉积减少; 且随着 AcSDKP 处理浓度的增加, 经 FFA 处理的 L02 细胞内脂滴含量也随之减少。见图 1。

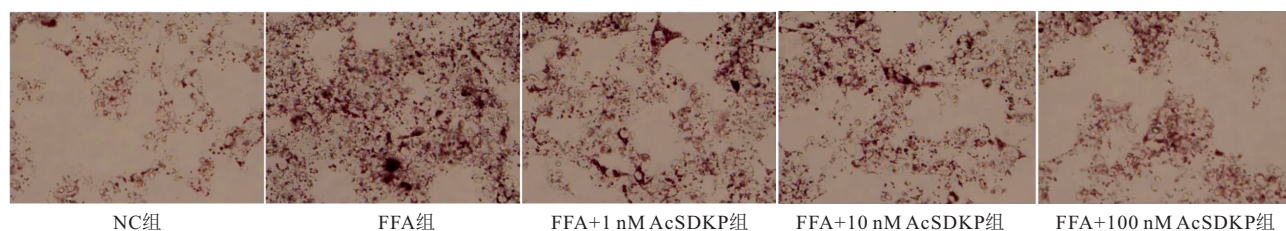


图 1 各组 L02 细胞内脂质沉积情况 (油红 O 染色, $100\times$)

Figure 1 Lipid deposition in L02 cells of each group

2.2 AcSDKP 对 FFA 诱导下 L02 细胞内 TG 含量的影响 对 5 组 L02 细胞内 TG 含量检测结果显示, 与 NC 组比较, FFA 组 L02 细胞 TG 含量显著增加 ($P < 0.05$); 与 FFA 组比较, FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组及 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞 TG 含量显著减少 ($P < 0.05$); 与 FFA+

1 nM AcSDKP 组比较, FFA+10 nM AcSDKP 组和 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞 TG 含量均显著减少 ($P < 0.05$), 且 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞 TG 含量也显著少于 FFA+10 nM AcSDKP 组 ($P < 0.05$)。见图 2。

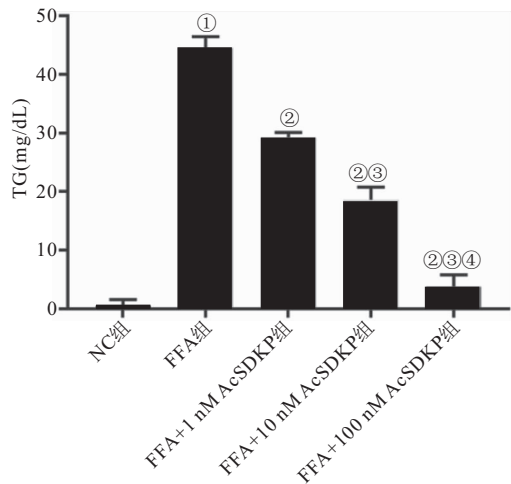


图2 各组 L02 细胞 TG 含量比较

Figure 2 Comparison of TG content in L02 cells in each group

注:与 NC 组比较,① $P<0.05$;与 FFA 组比较,② $P<0.05$;与 FFA+1 nM AcSDKP 组比较,③ $P<0.05$;与 FFA+10 nM AcSDKP 组比较,④ $P<0.05$ 。

2.3 AcSDKP 对 FFA 诱导下 L02 细胞中 ALT、AST 水平及 MDA 含量的影响 经过 ELISA 测定 5 组 L02 细胞上清液中 ALT、AST 水平和 MDA 含量,结果显示,与 NC 组比较,FFA 组 L02 细胞上清液 ALT、AST 水平显著升高($P<0.05$),MDA 含量显著

增加($P<0.05$);与 FFA 组比较,FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组及 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞上清液 ALT、AST 水平显著降低($P<0.05$),MDA 含量显著减少($P<0.05$);与 FFA+1 nM AcSDKP 组比较,FFA+10 nM AcSDKP 组和 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞上清液 ALT、AST 水平显著降低($P<0.05$),MDA 含量显著减少($P<0.05$),且 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞上清液 ALT、AST 水平要显著低于 FFA+10 nM AcSDKP 组($P<0.05$),MDA 含量也显著少于 FFA+10 nM AcSDKP 组($P<0.05$)。见图 3。

2.4 AcSDKP 对 FFA 诱导下 L02 细胞凋亡率的影响 通过对 5 组 L02 细胞凋亡率进行检测,结果显示,与 NC 组比较,FFA 组 L02 细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与 FFA 组比较,FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组及 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞凋亡率显著降低($P<0.05$);与 FFA+1 nM AcSDKP 组比较,FFA+10 nM AcSDKP 组和 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞凋亡率显著低于 FFA+10 nM AcSDKP 组($P<0.05$)。见图 4。

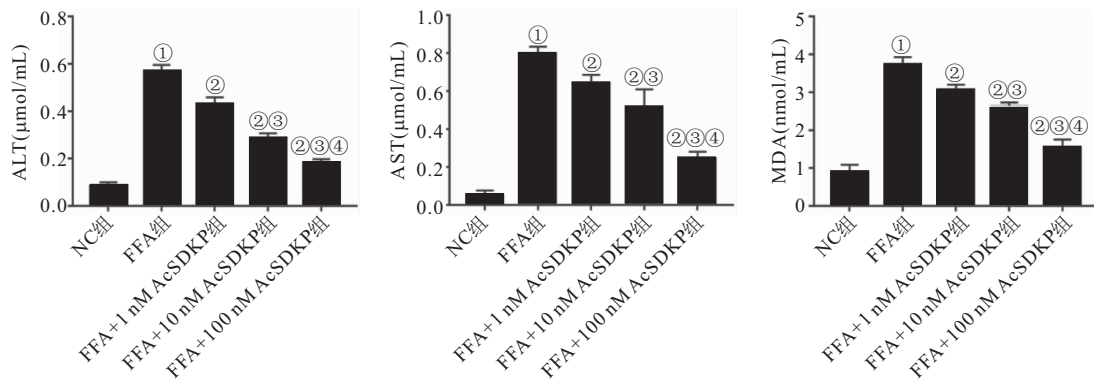


图3 各组 L02 细胞中 ALT、AST 及 MDA 水平比较

Figure 3 Comparison of ALT, AST and MDA levels in L02 cells in each group

注:与 NC 组比较,① $P<0.05$;与 FFA 组比较,② $P<0.05$;与 FFA+1 nM AcSDKP 组比较,③ $P<0.05$;与 FFA+10 nM AcSDKP 组比较,④ $P<0.05$ 。

2.5 AcSDKP 对 FFA 诱导下 L02 细胞中 AMPK、FASN 及 SERP-1c mRNA 表达水平的影响 对 5 组 L02 细胞中 AMPK、FASN 及 SERP-1c 在 mRNA 水平上的表达进行检测发现,与 NC 组比较,FFA 组 L02 细胞中 AMPK mRNA 相对表达量显著下调, FASN 和 SERP-1c mRNA 相对表达量显著上调($P<0.05$);与 FFA 组比较,FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组及 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞中 AMPK mRNA 相对表达量显著上

调,FASN 和 SERP-1c mRNA 相对表达量则显著下调($P<0.05$);与 FFA+1 nM AcSDKP 组比较,FFA+10 nM AcSDKP 组和 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞中 FASN 和 SERP-1c mRNA 相对表达量显著下调($P<0.05$),FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞中 FASN 和 SERP-1c mRNA 相对表达量显著低于 FFA+10 nM AcSDKP 组($P<0.05$);但 FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组及 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞中 AMPK mRNA 相对表达

量之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

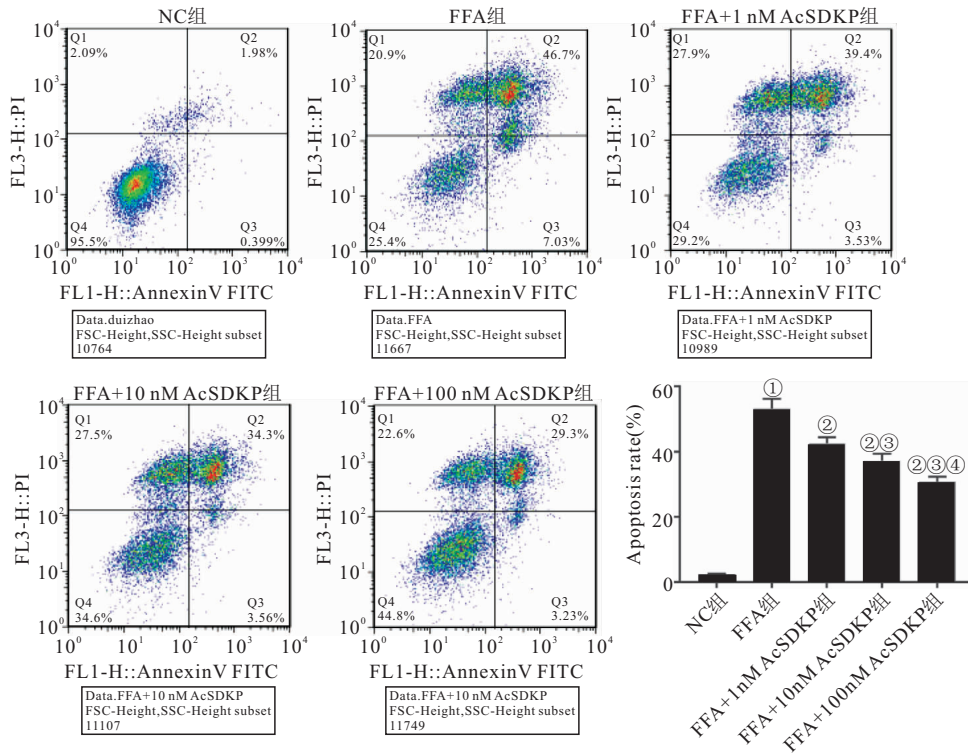


图 4 各组 L02 细胞凋亡率比较

Figure 4 Comparison of apoptosis rate of L02 cells in each group

注:与 NC 组比较,① $P < 0.05$;与 FFA 组比较,② $P < 0.05$;与 FFA+1 nM AcSDKP 组比较,③ $P < 0.05$;与 FFA+10 nM AcSDKP 组比较,④ $P < 0.05$ 。

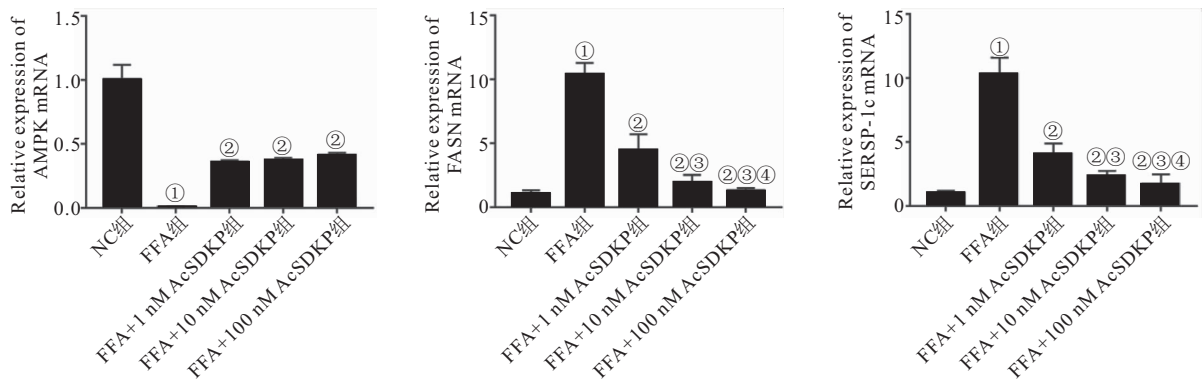


图 5 各组 L02 细胞中 AMPK、FASN 及 SERSP-1c mRNA 表达水平比较

Figure 5 Comparison of mRNA expression levels of AMPK, FASN and SERSP-1c in L02 cells of each group

注:与 NC 组比较,① $P < 0.05$;与 FFA 组比较,② $P < 0.05$;与 FFA+1 nM AcSDKP 组比较,③ $P < 0.05$;与 FFA+10 nM AcSDKP 组比较,④ $P < 0.05$ 。

2.6 AcSDKP 对 FFA 诱导下 L02 细胞中 AMPK、FASN 及 SERSP-1c 蛋白表达水平的影响 5 组 L02 细胞中 AMPK、FASN 及 SERSP-1c 在蛋白水平上的表达检测结果显示,与 NC 组比较,FFA 组 L02 细胞中 AMPK 蛋白相对表达量显著下调,FASN 和 SERSP-1c 蛋白相对表达量显著上调 ($P < 0.05$);与 FFA 组比较,FFA+1 nM AcSDKP 组、FFA+10 nM AcSDKP 组及 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞中 AMPK 蛋白相对表达量显著上调,FASN 和 SERSP-

1c 蛋白相对表达量显著下调 ($P < 0.05$);与 FFA+1 nM AcSDKP 组比较,FFA+10 nM AcSDKP 组和 FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞中 AMPK 蛋白相对表达量显著上调,FASN 和 SERSP-1c 蛋白相对表达量显著下调 ($P < 0.05$),同时,与 FFA+10 nM AcSDKP 组比较,FFA+100 nM AcSDKP 组 L02 细胞中 AMPK 蛋白相对表达量进一步显著上调,且 FASN 和 SERSP-1c 蛋白相对表达量进一步显著下调 ($P < 0.05$)。见图 6。

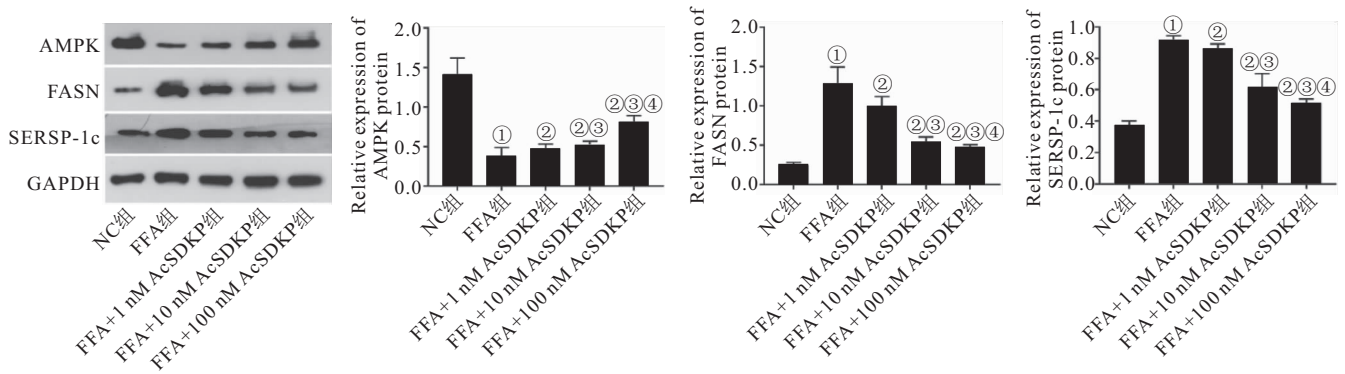


图6 各组 L02 细胞中 AMPK、FASN 及 SERSP-1c 蛋白表达水平比较

Figure 6 Comparison of the expression levels of AMPK, FASN and SERSP-1c in L02 cells of each group

注:与 NC 组比较,① $P < 0.05$;与 FFA 组比较,② $P < 0.05$;与 FFA+1 nM AcSDKP 组比较,③ $P < 0.05$;与 FFA+10 nM AcSDKP 组比较,④ $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来,生活方式的改变和日常饮食中脂肪含量的增加提高了肥胖、高脂血症和糖尿病的发病率,从而也增加了 NASH 的风险。在这些代谢性疾病的致病性发展过程中,脂质合成与脂质分解之间的平衡被打破,导致脂肪生成过度和脂质积累过多,引起脂质代谢紊乱^[10-12]。脂质代谢参与 NASH 的病理进程,从脂肪变性、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌都有脂质代谢参与。肝细胞中 TG 的异常积累致使肝脂肪变性,这是 NASH 的标志性特征, TG 在肝细胞中的异常积累还会引起 NASH 下肝细胞死亡、炎症和纤维化特征^[13-14]。ALT 和 AST 是评估肝损伤的重要指标,降低两者水平是改善 NASH 患者的有效途径^[15]。MDA 是脂质过氧化反应的主要代谢产物,其水平升高代表脂质过氧化程度异常增加^[16]。本研究结果显示,经过 FFA 诱导的 L02 细胞内脂滴沉积明显增多, TG 含量也显著增加,由此推测 FFA 导致 L02 细胞内脂质代谢紊乱,造成了脂质沉积。此外,本研究还检测到细胞上清液 ALT、AST 水平显著升高, MDA 含量也显著增加。以上结果均说明,利用 FFA 诱导 L02 细胞成功建立体外 NASH 模型。

AcSDKP 作为一种具有多功能生物活性的四肽,目前已发现其在多种疾病中发挥治疗作用。AcSDKP 能够减轻四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化程度,并抑制 TGF- β 1 诱导的肝星状细胞凋亡^[17]; AcSDKP 抑制葡萄糖代谢异常,减少糖尿病小鼠肾组织中胶原蛋白-I 和纤连蛋白的积累,从而改善糖尿病肾损伤^[18]; AcSDKP 水平较低的转基因小鼠更容易受到葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎的影响,并表现出更严重的肠道炎症反应,通过输注外源性 AcSDKP 能显著减轻小鼠的病理症状和肠粘膜炎症反应^[19]; AcSDKP 具有对抗寡聚

体 A β 1-42 诱导人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞凋亡的作用,其可降低 Cyt c 释放、增加抑凋亡蛋白的表达,以发挥抗细胞凋亡的作用^[20]。本研究检测结果显示, AcSDKP 能够降低 FFA 诱导的 L02 细胞内脂滴沉积,减少 TG、MDA 含量,降低 ALT、AST 水平,并抑制细胞凋亡,由此说明, AcSDKP 可减少 FFA 诱导的 L02 细胞中脂质沉积,对损伤干细胞起到保护作用。

AMPK 是一种关键的代谢调节剂,通过调节一系列代谢酶的磷酸化水平,充当脂肪酸、胆固醇和葡萄糖稳态的中枢调节剂,维持肝脏正常功能。AMPK 激活后会抑制脂肪酸合成代谢途径,刺激分解代谢途径,抑制 ATP 消耗并增加 ATP 产生,减少脂肪酸累积和脂质合成,以恢复机体能量稳态^[21-22]。AMPK 激活还降低了 SREBP-1c 的转录激活, SREBP-1c 是调节脂肪生成基因的关键转录因子,能够调节脂质生物合成酶的表达,进而促进脂肪酸的合成^[23]。FASN 是脂肪酸从头合成所需的关键酶,其表达增加会促进脂肪酸合成,使肝内脂质沉积,引发肝细胞损伤^[24]。目前研究表明, AMPK 的缺失会加速 NASH 的病理进程,并已在 NASH 小鼠中检测到 AMPK 活性降低,这提示 AMPK 信号激活可作为 NASH 的潜在治疗靶点^[25]。为了探究 AcSDKP 调控 NASH 中脂质代谢的分子机制,本研究检测了 AMPK 信号通路与下游分子 FASN 及 SERSP-1c 的表达水平,检测结果显示,经 FFA 诱导的 L02 细胞中 AMPK 表达水平显著下调, FASN、SERSP-1c 表达水平显著上调,而同时加入 AcSDKP 处理的细胞, AMPK 表达水平显著上调, FASN、SERSP-1c 表达水平显著下调,该结果表明 AcSDKP 可能通过激活 AMPK 来抑制 FASN、SERSP-1c 表达水平,从而改善 FFA 诱导的 L02 细胞中脂

质代谢异常。

4 结论

AcSDKP 能够调节 FFA 诱导的 L02 细胞脂质代谢异常,降低细胞中脂质沉积、TG 含量,并抑制 ALT、AST 水平和减少 MDA 含量,该作用可能与其激活 AMPK 信号通路进而抑制 FASN、SERP1c 表达水平有关。本研究对于 NASH 的预防和治疗具有重要意义,后续需设计动物实验进一步探究 AcSDKP 在 NASH 中的治疗效果,并探明 AcSDKP 具体作用途径。

【参考文献】

- [1] CHAO H W, CHAO S W, LIN H, *et al.* Homeostasis of glucose and lipid in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2):298.
- [2] ROMERO-GÓMEZ M. Non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Med Clin (Barc)*, 2022, 159(8):388-395.
- [3] GUPTA T. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: beyond the boundaries of the liver[J]. *World J Gastroenterol*, 2022, 28(36):5380-5382.
- [4] ROMERO C A, KUMAR N, NAKAGAWA P, *et al.* Renal release of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline is part of an antidiabetic peptidergic system in the kidney[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 316(1):F195-F203.
- [5] PEJMAN S, KAMAREHEI M, RIAZI G, *et al.* Ac-SDKP ameliorates the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibition of ER stress and oxidative stress in the hippocampus of C57BL/6 mice[J]. *Brain Res Bull*, 2020, 154: 21-31.
- [6] KUMAR N, YIN C. The anti-inflammatory peptide Ac-SDKP: Synthesis, role in ACE inhibition, and its therapeutic potential in hypertension and cardiovascular diseases[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 134:268-279.
- [7] WANG J, QIAN Y, GAO X, *et al.* Synthesis and identification of a novel peptide, Ac-SDK (Biotin) proline, that can elicit antifibrosis effects in rats suffering from silicosis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:4315-4326.
- [8] LIU S, JIN R, ZHENG G, *et al.* Ac-SDKP promotes KIF3A-mediated β -catenin suppression through a ciliary mechanism to constrain silica-induced epithelial-myofibroblast transition [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 166:115411.
- [9] CAI J, CHEN Q, MEHRABI NASAB E, *et al.* Immunomodulatory effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-proline and vasoactive intestinal peptide on chronic obstructive pulmonary disease pathophysiology [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2022, 36(6): 1005-1010.
- [10] HE J, ZHANG P, SHEN L, *et al.* Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17):6356.
- [11] 马欢, 赵新华, 张丽丽. 不同剂量咖啡对非酒精性脂肪性肝病模型大鼠脂质代谢的影响[J]. *西部医学*, 2020, 32(1):38-42.
- [12] BALLARD-HERNANDEZ J, SALL J. Dyslipidemia update [J]. *Nurs Clin North Am*, 2023, 58(3):295-308.
- [13] AZZU V, VACCA M, VIRTUE S, *et al.* Adipose tissue-liver cross talk in the control of whole-body metabolism: implications in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7):1899-1912.
- [14] BILGIC S, REMALEY A T, SNIDERMAN A D. Triglyceride-rich lipoprotein cholesterol and cardiovascular risk [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2023, 34(6):259-266.
- [15] XIONG Y, PENG Q, CAO C, *et al.* Effect of different exercise methods on non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis and meta-regression[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18(6):3242.
- [16] MIRMIRAN P, HADAVI H, MOTTAGHI A, *et al.* Effect of dietary patterns on oxidative stress in patients with metabolic syndrome: tehran lipid and glucose study[J]. *Caspian J Intern Med*, 2018, 9(4):376-385.
- [17] WEI A, ZHAO F, HAO A, *et al.* N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP) mitigates the liver fibrosis via WTAP/m6A/Ptch1 axis through hedgehog pathway[J]. *Gene*, 2022, 813:146125.
- [18] SRIVASTAVA S P, GOODWIN J E, KANASAKI K, *et al.* Metabolic reprogramming by N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline protects against diabetic kidney disease[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(16):3691-3711.
- [19] SHI Y, ZHOU M, YAN J, *et al.* N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline mitigates experimental colitis through inhibition of intestinal mucosal inflammatory responses via MEK-ERK signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:593.
- [20] 翟婉莹, 钱亦华, 马凯歌, 等. AcSDKP 对抗 β -淀粉样蛋白诱导细胞凋亡作用[J]. *阿尔茨海默病及相关病杂志*, 2020, 3(1):56-60.
- [21] STEINBERG G R, HARDIE D G. New insights into activation and function of the AMPK[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(4):255-272.
- [22] SHARMA A, ANAND S K, SINGH N, *et al.* AMP-activated protein kinase: An energy sensor and survival mechanism in the reinstatement of metabolic homeostasis [J]. *Exp Cell Res*, 2023, 428(1):113614.
- [23] CHEN Y C, CHEN R J, PENG S Y, *et al.* Therapeutic targeting of nonalcoholic fatty liver disease by downregulating SREBP-1C expression via AMPK-KLF10 axis[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8:751938.
- [24] OFARRELL M, DUKE G, CROWLEY R, *et al.* FASN inhibition targets multiple drivers of NASH by reducing steatosis, inflammation and fibrosis in preclinical models[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):15661.
- [25] STRZYZ P. AMPK against NASH[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4):181.

(收稿日期:2023-09-06;修回日期:2024-04-19;编辑:黎仕娟)