

研究论文

n-3多不饱和脂肪酸通过增加肝脏脂氧素A₅含量改善高同型半胱氨酸血症引起的肝脏脂肪变性

宋浩, 段进杰, 李侃, 姚柳*, 朱毅

天津医科大学生理学病理生理系, 天津 300070

摘要: 非酒精性脂肪性肝病与高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)均为世界范围内的重要健康问题, 二者发病密切相关。我们前期报道了HHcy引起脂肪肝的作用机制, 但n-3多不饱和脂肪酸(n-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA)在其中的作用尚未有明确报道。本研究通过给予6周龄C57BL/6雄性小鼠高蛋白饮食(2% high methionine diet, HMD), 通过ELISA技术检测血浆同型半胱氨酸的水平, 以明确HHcy模型的建立。同时添加或不添加n-3 PUFA喂养, 以明确n-3 PUFA在HHcy引起肝脏脂肪变性中的作用及机制。结果显示, n-3 PUFA显著改善了HHcy引起的肝脏脂质沉积。qRT-PCR分析发现n-3 PUFA抑制了HHcy诱导的脂肪酸摄取关键基因Cd36的表达。进一步分析发现Cd36的表达降低与n-3 PUFA引起的芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, Ahr)活性抑制相关。利用PUFA靶向代谢组学分析发现, 与HMD组相比, n-3 PUFA明显增加了肝脏二十碳五烯酸代谢产物脂氧素A₅ (lipoxin A₅, LXA₅)的含量。用LXA₅处理分离的原代肝细胞, 阻断了同型半胱氨酸诱导的Cd36表达上调和Ahr激活, 减轻了脂质沉积。以上结果表明, n-3 PUFA通过增加肝脏LXA₅的含量, 抑制HHcy引起的Ahr-Cd36信号通路的激活, 改善肝脏的脂肪变性。本研究结果预期可为非酒精性脂肪性肝病的临床治疗开辟新的途径。

关键词: 高同型半胱氨酸血症; 肝脏脂肪变性; 脂氧素A₅; 芳香烃受体; Cd36

中图分类号: R33

n-3 Polyunsaturated fatty acid attenuates hyperhomocysteinemia-induced hepatic steatosis by increasing hepatic LXA₅ content

SONG Hao, DUAN Jin-Jie, LI Kan, YAO Liu*, ZHU Yi

Department of Physiology and Pathophysiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and hyperhomocysteinemia (HHcy) both are major health problems worldwide, whose incidence are closely related with each other. We previously reported the mechanism of HHcy-caused hepatic steatosis, but the role of n-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) in HHcy-induced hepatic steatosis remains unclear. In this study, 6-week-old C57BL/6 male mice were given a high methionine diet (HMD, 2% methionine diet), and plasma homocysteine levels were measured by ELISA to confirm the establishment of an HHcy model. Meantime, mice were fed HMD with or without n-3 PUFA supplement for 8 weeks to determine the role and mechanism of n-3 PUFA in hepatic steatosis induced by HHcy. Results showed that n-3 PUFA significantly improved hepatic lipid deposition induced by HHcy. qRT-PCR analysis demonstrated that n-3 PUFA inhibited the upregulation of Cd36, a key enzyme of fatty acid uptake, caused by HHcy. Further, the inhibition of hepatic Cd36 expression was associated with the inactivation of aryl hydrocarbon receptor (Ahr) induced by n-3 PUFA. Of note, mass spectrometry revealed that hepatic content of lipoxin A₅ (LXA₅) was significantly increased in HMD+n-3 PUFA-fed mice compared with that in HMD-fed mice. In primary cultured hepatocytes, LXA₅ treatment markedly reversed homocysteine-evoked Cd36 upregulation and Ahr activation, which

Received 2021-01-23 Accepted 2021-04-08

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82070305, 81700506) and the Natural Science Foundation of Tianjin, China (No. 19JCQNJC10100).

*Corresponding author. Tel: +86-22-83336591; E-mail: yaoliu@tmu.edu.cn

resulted in reduced lipid accumulation. In conclusion, we demonstrate that n-3 PUFA inactivates HHcy-induced Ahr-Cd36 pathway by increasing hepatic LXA₅ content, which alleviates hepatic steatosis. Thus, our results may provide a potential strategy for treatment of NAFLD.

Key words: hyperhomocysteinemia; hepatic steatosis; lipoxin A₅; aryl hydrocarbon receptor; Cd36

非酒精性脂肪性肝脏疾病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是世界范围内最普遍的慢性肝脏疾病, 其发病率呈急剧上升趋势。NAFLD 以肝内脂肪堆积为重要特征, 包含肝脏脂肪变性、脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌等一系列病理表现。高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHcy) 是心血管疾病、糖尿病、免疫性以及神经退行性疾病的重要危险因素, 与 NAFLD 的发病亦密切相关。相关研究显示同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 可促进巨噬细胞和肝细胞脂肪酸摄取关键基因 Cd36 的表达, 参与泡沫细胞形成及肝细胞的脂肪变性^[1,2]。我们的前期研究结果显示 HHcy 可通过配体依赖方式激活芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, Ahr), 上调脂肪酸摄取关键基因 Cd36 的表达, 促进肝脏的脂肪变性^[3]。但目前对于 HHcy 引起的肝脏脂肪变性尚无有效的干预手段。

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 指含有两个或两个以上双键且碳链长度为 18~22 个碳原子的直链脂肪酸, 其中距羧基远端的双键在倒数第 3 个碳原子和倒数第 6 个碳原子的 PUFA 称为 n-3 PUFA 和 n-6 PUFA。n-3 PUFA 主要包括 α -亚麻酸、二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 和二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 等; n-6 PUFA 主要包括亚油酸和花生四烯酸 (arachidonic acid, AA)。相关研究表明, n-6 PUFA 及其代谢产物在炎症相关疾病中有重要调控作用, 而 n-3 PUFA 及其代谢产物因其显著的降脂、降压、抗血栓形成等功效, 在临床上用于降低心血管事件的发生率^[4]。Huang 等对人群的研究发现饮食摄取 n-3 PUFA 可改善与 Hcy 升高相关的心血管疾病发生^[5]。而 Gonzalez-Periz 等报道 n-3 PUFA 可通过 EPA 代谢产物消退素 E1 和 DHA 代谢产物保护素 D1 改善肥胖引起的胰岛素抵抗和肝脏脂肪变性^[6]。我们前期研究也证实 n-3 PUFA 中 EPA 代谢产物 17,18-EEQ、5-HEPE 和 9-HEPE 可通过抑制脂肪组织炎症改善短期高脂饮食引起的肝脏脂质沉积^[7]。以上研究提示 n-3 PUFA 及其代谢产物可能在 HHcy 引起的肝脏脂肪变性中发挥重要保护作用, 但具体机制尚不明确。

本研究将探究 n-3 PUFA 对 HHcy 引起的肝脏脂肪变性的保护作用及机制, 以期 NAFLD 的临床治疗开辟新的途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 L-蛋氨酸和 DL-Hcy 购买自 Sigma-Aldrich 公司 (美国); Hcy ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 对照组饲料 (chow diet)、高蛋氨酸饮食 (high methionine diet, HMD) 饲料和 HMD+n-3 PUFA 饲料均购自 Mediceance 公司 (中国, 扬州); RNA 提取试剂盒购自 BioTeke 公司 (中国, 北京); 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 试剂购自北京全式金生物技术有限公司; qRT-PCR 引物由 Invitrogen 公司 (中国, 上海) 合成。油红 O 购自 Sigma; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 甘油三酯 (triglyceride, TG) 及胆固醇 (cholesterol, CHOL) 测定试剂盒购自北京中北生物科技股份有限公司。

1.2 动物实验 按照本实验室前期方法建立 HHcy 模型^[3]。即选取 6 周龄 C57BL/6 小鼠, 分别给予对照饮食 (Chow)、2% L-蛋氨酸饮食 (HMD)、2% L-蛋氨酸 + 3% n-3 PUFA 饮食 (HMD+n-3 PUFA) 喂养, 饮食成分见表 1, 每天称重并记录饮食量、体重, 共喂养 8 周。实验结束后, 所有动物均用异氟醚深度麻醉, 经心脏灌注 10 mL PBS 缓冲液。离心分离血清, 采用 ELISA 试剂盒测定血浆总 Hcy 水平, 利用 ALT、TG 和 CHOL 试剂盒检测血浆 ALT、TG 和 CHOL 水平。取肝脏组织切片后进行油红 O 染色。取脂肪组织称重。本实验所需小鼠均购自于北京华阜康生物科技股份有限公司。本实验的研究方案和实验动物使用均符合动物伦理规范, 获得天津医科大学动物护理与使用专业委员会批准。

1.3 原代肝细胞培养 选用 5~6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 腹腔注射麻醉; 暴露腹腔, 分离下腔静脉, 静脉留置针穿刺后快速推入肝素钠; 分别给予预热灌流液 1 (1 × Krebs-Ringer 缓冲液, 50 mmol/L EGTA) 和灌流液 2 (1 × Krebs-Ringer 缓冲液, I 型胶原酶和

2 mol/L CaCl₂) 灌流, 将肝脏组织的血液灌流出, 并灌入胶原酶进行消化, 取下肝脏; 将肝脏置于 400 目的筛网上, 用预冷 1640 培养液将细胞冲下并收集细胞; 静置 5 min 后, 吸出上层培养液, 将沉淀的细胞悬液移至离心管中; 加入预冷 1640 培养液, 离心, 弃上清, 重复 3 次; 用含 10% 血清的 1640 培养液培养细胞, 细胞贴壁 6 h 后换液, 用于后续实验^[8]。

1.4 油红 O 染色 将肝脏组织冰冻切片室温平衡 15 min, 或将原代肝细胞弃掉细胞培养基, 利用 4%

多聚甲醛固定 10 min; 清洗后利用 60% 异丙醇同化 5 min; 油红 O 染色 30 min; 最后用 50% 甘油封片, 避光保存。

1.5 肝脏脂质的提取及测定 切取约 30 mg 肝脏组织, 精确称量, 记录重量; 将肝脏组织于 1 mL 萃取液 (氯仿: 甲醇 = 2: 1) 中匀浆; 静置 16 h; 加入蒸馏水, 12 000 g 离心 10 min; 吸取下层有机相, 氮气吹干; 用含 5% Triton X-100 的溶液溶解吹干的有机相; 用 TG 及 CHOL 测定试剂盒测定肝脏组织中 TG 及 CHOL 的含量。

表1. 实验饮食成分组成
Table 1. Composition of the experimental diets

Ingredient	Chow (%)	HMD (%)	HMD+n-3 PUFA (%)
Casein	14.00	14.00	14.00
Cornstarch	46.38	41.38	38.38
Dextrinized cornstarch	15.50	18.50	18.50
Sucrose	10.00	10.00	10.00
Cellulose	5.00	5.00	5.00
Soybean oil	4.00	4.00	4.00
L-methionine	—	2.00	2.00
n-3 PUFA	—	—	3.00
Complex minerals and multivitamins	5.12	5.12	5.12
Total	100	100	100

HMD, 2% high methionine diet; HMD+n-3 PUFA, 2% high methionine diet and 3% n-3 PUFA; Both of these diets are based on AIN-93G rodent diets.

表2. 小鼠qRT-PCR引物序列
Table 2. Mouse primer sequences for qRT-PCR

Gene	Sense	Antisense
<i>Lxra</i>	5'-TGCCATCAGCATCTTCTCTG-3'	5'-GGCTCACCAGCTTCATTAGC-3'
<i>Srebp1</i>	5'-ACTTCTGGAGACATCGAAAC-3'	5'-GGTAGACAACAGCCGCATC-3'
<i>Fasn</i>	5'-TGGGTTCTAGCCAGCAGAGT-3'	5'-ACCACCAGAGACCGTTATGC-3'
<i>Acc</i>	5'-TGGTCGTGACTGCTCTGTGC-3'	5'-GTAGCCGAGGGTTCAGTTCC-3'
<i>Chrebp</i>	5'-TTACTGGAAGCGGCGCATCG-3'	5'-CCAAGCAGCACAGGCACCAC-3'
<i>Fatp2</i>	5'-GATGCCGTGTCCGTCTTTTAC-3'	5'-GACTTCAGACCTCCACGACTC-3'
<i>Cd36</i>	5'-TGGTCAAGCCAGCTAGAAA-3'	5'-CCCAGTCTCATTAGCCAC-3'
<i>Ppara</i>	5'-GTGGGTGGTTGAATCGTGAG-3'	5'-GCAGTGGAGTTTGGGTGG-3'
<i>Cpt1a</i>	5'-ACGTTGGACGAATCGGAACA-3'	5'-GGTGGCCATGACATACTCCC-3'
<i>Acox1</i>	5'-CCGTCGAGAAATCGAGAACT-3'	5'-ATTGAGGCCAACAGGTTCCA-3'
<i>Scad</i>	5'-ATGTGCCAGAGGAGCTGAGT-3'	5'-TGATCCACTGTTGCTTCTGC-3'
<i>Mcad</i>	5'-AACTAAACATGGGCCAGCGA-3'	5'-CAGCTGCGACTGTAGGTCTG-3'
<i>Lcad</i>	5'-GCATCAACATCGCAGAGAAA-3'	5'-ACGCTTGCTCTTCCCAAGTA-3'
<i>apoB</i>	5'-TCACCATTGCCCCTCAACCTAA-3'	5'-GAAGGCTCTTTGGAAGTGTA AAC-3'
<i>Mtp</i>	5'-ATCATCATTTGGAGCCCTGGT-3'	5'-CATTCTTCAGGGCCAGCA-3'
<i>Cyp1a1</i>	5'-GGCCACTTTGACCCTTACAA-3'	5'-CAGGTAACGGAGGACAGGAA-3'
<i>Cyp1a2</i>	5'-CACTAACGGCAAGAGCATGA-3'	5'-TCTGAAGCTTGCTGACGAGA-3'
<i>β-actin</i>	5'-GCTGTCCCTGTATGCCTCTG-3'	5'-TTTGATGTCACGCACGATTT-3'

1.6 qRT-PCR 将肝组织和肝细胞匀浆, 提取总 RNA, 逆转录为 cDNA 模板, 进行 qRT-PCR。引物序列见表 2。每个 PCR 体系包括: 10 μ L 2 $\times$ SYBR Premix、0.5 μ L 上游引物、0.5 μ L 下游引物、4 μ L cDNA、5 μ L ddH₂O。PCR 参数设置如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s 后进入循环扩增, 在 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s 的程序中进行 40 个循环, 根据扩增曲线, 利用不同样品 β -actin 表达和 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法归一化目的基因的表达。

1.7 质谱分析 切取约 50 mg 肝脏组织, 称量后记录重量; 将肝脏组织溶于 1 mL 甲醇 (含抗氧化剂, 甲酸和内标), 匀浆; 12 000 g 离心 10 min; 取上清, 转入新离心管; 加入乙酸乙酯和蒸馏水后, 涡旋 2 min; 4 000 g 离心 10 min; 收集上层有机相, 转入新离心管; 再次加入乙酸乙酯, 涡旋 2 min, 重复萃取一次; 12 000 g 离心 10 min; 收集上层有机相; 氮气吹干样品, 产物复溶于 30% 的乙腈中, 进行质谱检测^[9]。

1.8 数据分析 采用 GraphPad Prism 5 Demo (GraphPad Software, Inc.) 软件分析、作图。所有实验结果以 mean $\pm$ SEM 表示。两组间比较采用组间 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 作为有显著性统计学意义的标准。

2 结果

2.1 n-3 PUFA改善了HHcy引起的肝脏脂肪变性

分别给予 6 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 Chow 饮食、HMD 饮食以及 HMD+n-3 PUFA 饮食喂养 8 周。血浆 Hcy 检测结果显示, 与 Chow 组相比, HMD 显著增加了血浆 Hcy 的水平, n-3 PUFA 不影响 HMD 引起的 Hcy 水平升高 (表 3)。肝脏组织切片进行油红 O 染色发现, 与 Chow 组相比, HMD 喂养诱导

的 HHcy 小鼠肝脏中脂质沉积明显增加; 而相较 HMD 喂养组, HMD+n-3 PUFA 组小鼠肝脏脂质沉积明显减少 (图 1A)。进一步对肝脏的脂质进行抽提并分析, 发现 HMD 增加了肝脏 TG 含量, HMD+n-3 PUFA 显著降低了 HMD 喂养引起的肝脏 TG 水平增加, 两种饮食均不影响肝脏 CHOL 的水平 (图 1B 和 C)。与 Chow 组相比, HMD 和 HMD+n-3 PUFA 均不影响小鼠的体重、进食量、脂肪重/体重比, 血浆 ALT、TG 和 CHOL 水平; 但 HMD 和 HMD+n-3 PUFA 均明显提高肝重/体重比 (表 3)。以上结果提示 n-3 PUFA 对 HHcy 引起的肝脏脂肪变性有重要保护作用。

2.2 n-3 PUFA抑制了HHcy引起的肝脏Cd36表达上调和转录因子Ahr激活

肝脏的脂质合成、摄取与氧化、分泌之间的失衡是导致肝脏脂肪变性的重要因素。为此, 我们检测了参与肝脏脂质合成、摄取、氧化、分泌通路关键基因的表达。结果显示, 与 Chow 组相比, HHcy 显著增加了长链脂肪酸转运蛋白 2 (fatty acid transporter 2, *Fatp2*) 和脂肪酸转位酶 Cd36 的表达, 而 n-3 PUFA 明显抑制了 HHcy 引起的 Cd36 表达, 但不影响 *Fatp2* 的水平。此外, HHcy 和 n-3 PUFA 均不影响脂质合成基因 (包括 *Lxra*、*Fasn*、*Acc*、*Srebp1*、*Chrebp*)、脂质氧化基因 (包括 *Ppara*、*Cpt1a*、*Acox1*、*Scad*、*Mcad*、*Lcad*) 和脂质分泌基因 (包括 *apoB*、*Mtp*) 的表达 (图 2A~D)。我们的前期研究结果也证实 HHcy 可通过上调参与脂肪酸摄取的关键基因 Cd36 的表达, 促进肝脏的脂肪变性^[3]。以上结果提示 n-3 PUFA 可能通过抑制 Cd36 表达, 抑制肝脏的脂质摄取, 改善 HHcy 引起的肝脏脂肪变性。

Cd36 是 *Ppara*、*Ppar γ* 、*Lxr*、*Pxr* 和 *Ahr* 等转录

表3. 8周对照饮食、高蛋氨酸饮食和高蛋氨酸添加n-3 PUFA饮食喂养小鼠相关变量指数

Table 3. Related variable indices in mice fed a chow diet, HMD or HMD+n-3 PUFA for 8 weeks

Variable index	Chow	HMD	HMD+n-3 PUFA
Food intake (g/day)	2.82 $\pm$ 0.17	2.84 $\pm$ 0.18	3.02 $\pm$ 0.16
Body weight (g)	25.53 $\pm$ 0.28	25.85 $\pm$ 0.52	25.93 $\pm$ 0.40
Liver/body weight ratio	0.037 $\pm$ 0.001	0.046 $\pm$ 0.002**	0.045 $\pm$ 0.002**
Fat mass/body weight ratio	0.010 $\pm$ 0.000	0.011 $\pm$ 0.000	0.010 $\pm$ 0.000
Plasma Hcy (μ mol/L)	5.17 $\pm$ 0.92	25.43 $\pm$ 0.43**	25.10 $\pm$ 0.54**
Plasma ALT (U/L)	24.08 $\pm$ 1.80	25.03 $\pm$ 0.99	21.87 $\pm$ 2.38
Plasma TG (mg/dL)	37.69 $\pm$ 3.30	39.18 $\pm$ 2.65	38.68 $\pm$ 2.63
Plasma CHOL (mg/dL)	62.70 $\pm$ 7.02	70.16 $\pm$ 4.02	61.73 $\pm$ 4.45

HMD, 2% high methionine diet; HMD+n-3 PUFA, 2% high methionine diet and 3% n-3 PUFA; Hcy, homocysteine; ALT, alanine aminotransferase; TG, triglyceride; CHOL, cholesterol. Data are mean $\pm$ SEM. ** $P < 0.01$ vs chow group ($n = 6$ for each group).

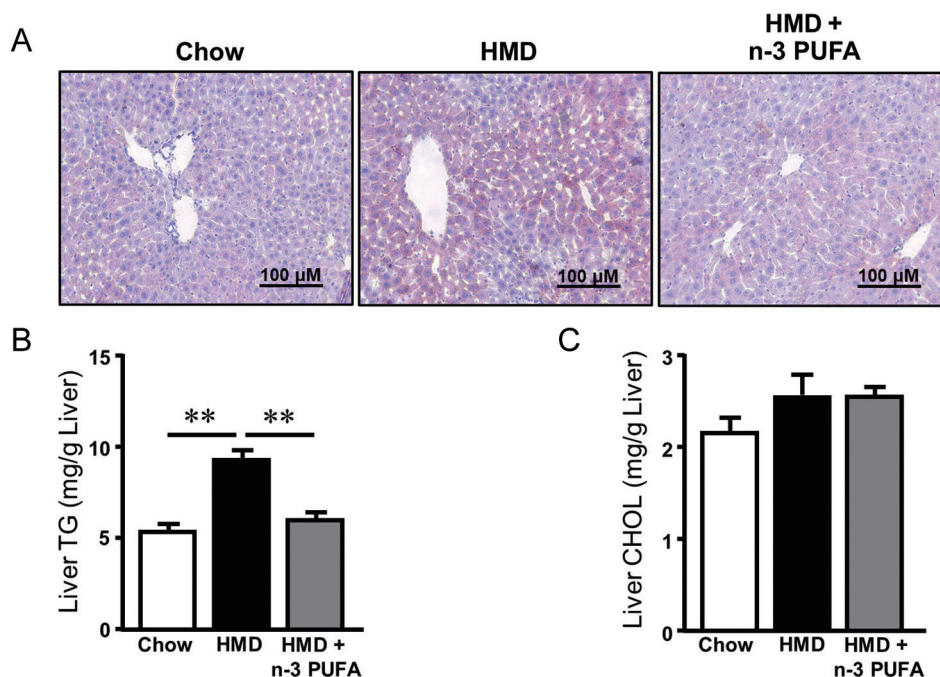


图 1. n-3 PUFA改善了HHcy引起的肝脏脂肪变性

Fig. 1. n-3 PUFA alleviated HHcy-induced hepatic steatosis *in vivo*. Male C57BL/6 mice (6-week-old) were fed a standard chow diet and HMD with or without n-3 PUFA for 8 weeks. A: Representative oil red O staining for lipid deposition in liver. Scale bar, 100 μm. B, C: Hepatic triglyceride (TG) and cholesterol (CHOL) contents. HMD, 2% high methionine diet; HMD+n-3 PUFA, 2% high methionine diet+3% n-3 PUFA. Quantified data are mean ± SEM of 6 mice in each group. ***P* < 0.01.

因子的重要靶基因, 我们的前期研究已证实 HHcy 通过上调 Ahr-Cd36 信号通路参与了肝脏的脂肪变性^[3]。为此我们检测了不同处理组小鼠肝脏 Ahr 靶基因的表达, 结果显示与 HMD 组相比, HMD+n-3 PUFA 组肝脏 Ahr 靶基因 Cyp1a1 和 Cyp1a2 的表达显著降低 (图 2E)。以上结果提示, n-3 PUFA 通过抑制肝脏 Ahr 的激活, 降低脂肪酸摄取的关键基因 Cd36 的表达, 改善 HHcy 引起的肝脏脂肪变性。

2.3 n-3 PUFA增加了肝脏脂氧素A₅ (lipoxin A₅, LXA₅)的含量

在体内, n-3 PUFA 可与 n-6 PUFA 使用共同代谢酶代谢产生结构类似但功能不同的代谢产物。已有的研究表明, n-6/n-3 PUFA 代谢失衡是 NAFLD 发病的重要危险因素^[10, 11]。我们前期研究结果显示, HMD 通过增加肝脏 AA 的脂氧化酶 (lipoxygenase, LOX) 通路代谢产物脂氧素 A₄ (lipoxin A₄, LXA₄) 的含量, 以配体依赖的方式激活 Ahr-Cd36 信号通路, 促进肝脏的脂肪变性^[3]。LXA₅ 是 AA 与 EPA 共用同种 LOX 产生的 EPA 代谢产物, 其分子量与 LXA₄ 相近, 结构与 LXA₄ 相似。为进一步明确 LXA₅ 是否参与了 HHcy 引起的肝脏脂肪变性, 我们利用

PUFA 靶向代谢组学分析发现, HMD 喂养小鼠肝脏 LXA₅ 的含量低于对照组, 而 HMD+n-3 PUFA 喂养组小鼠肝脏 LXA₅ 的含量显著高于 HMD 组 (图 3)。以上结果提示, n-3 PUFA 可能通过其 EPA 代谢产物 LXA₅ 改善了 HHcy 引起的肝脏脂肪变性。

2.4 LXA₅阻断了Hcy引起的Ahr-Cd36信号通路激活和肝细胞脂质沉积

分离和培养原代肝细胞, 给予 Hcy (100 μmol/L) 处理, 同时添加或不添加 LXA₅ (100 nmol/L) 处理 24 h, 发现 Hcy 显著上调肝细胞 Cd36 的表达, 而 LXA₅ 抑制了 Hcy 引起的 Cd36 表达上调 (图 4A); 同时发现 LXA₅ 抑制了 Hcy 引起的 Ahr 靶基因 Cyp1a1 和 Cyp1a2 的表达上调 (图 4B)。利用油红 O 染色对肝脏的脂质沉积进行分析, 发现 LXA₅ 处理明显减轻了 Hcy 引起的肝细胞脂质沉积 (图 4C)。以上结果提示, LXA₅ 可通过抑制 Ahr-Cd36 信号通路改善 Hcy 引起的肝细胞脂质沉积。

3 讨论

n-3 PUFA 在代谢紊乱中具有重要保护作用。我们的前期研究证实, n-3 PUFA 通过其 EPA 代谢产

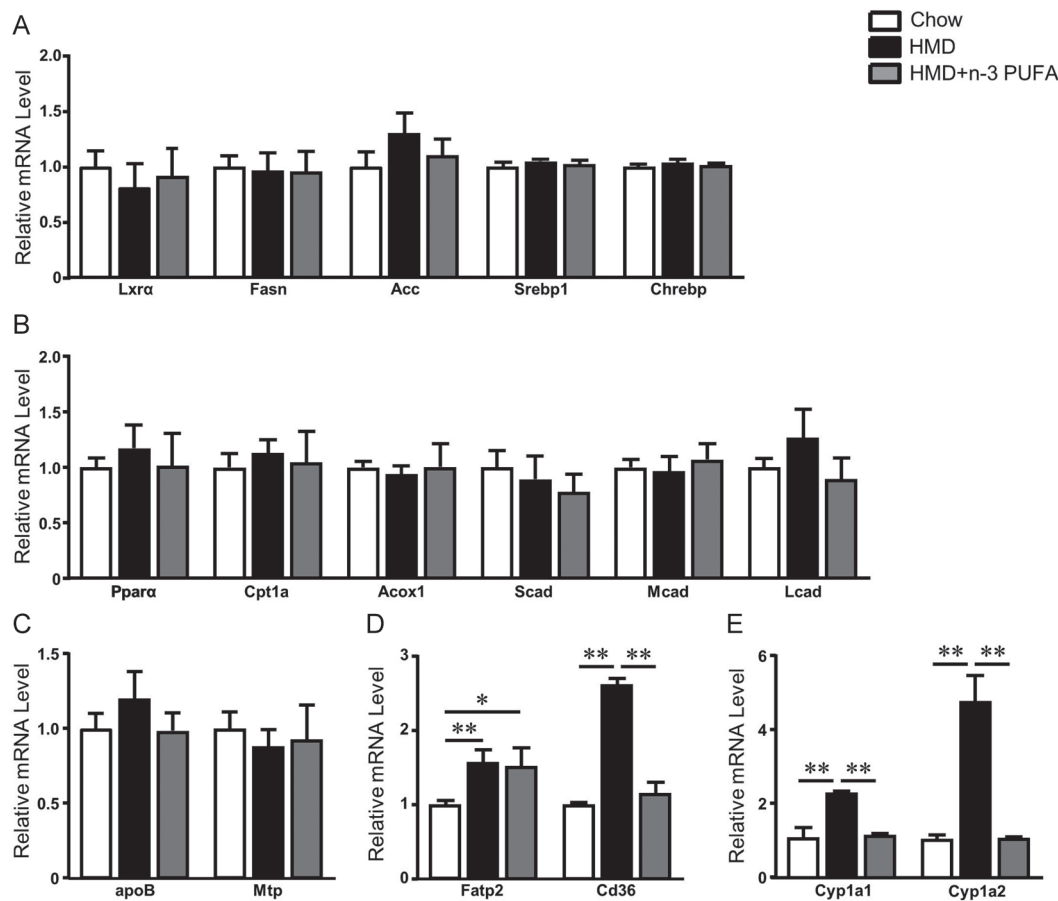


图 2. n-3 PUFA抑制了HHcy引起的Cd36表达上调和转录因子Ahr激活

Fig. 2. n-3 PUFA inhibited HHcy-induced Cd36 expression and the activation of transcriptional factor Ahr *in vivo*. A–D: qRT-PCR analysis of mRNA levels of genes involved in hepatic lipogenesis, fatty acid oxidation, TG secretion, and fatty acid uptake. E: qRT-PCR analysis of mRNA levels of Ahr target genes Cyp1a1 and Cyp1a2 expression in mice fed a chow diet or HMD with or without n-3 PUFA for 8 weeks. Lxr, nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3; Fasn, fatty acid synthase; Acc, acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha; Srebp1, sterol regulatory element binding transcription factor 1; Chrebp, MLX interacting protein-like; Ppara, peroxisome proliferator activated receptor alpha; Cpt1a, carnitine palmitoyltransferase 1a; Acox1, acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl; Scad, acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain; Mcad, acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain; Lcad, acyl-coenzyme A dehydrogenase, long-chain; apoB, apolipoprotein B; Mtp, microsomal triglyceride transfer protein; Fatp2, fatty acid transporter 2; Cd36, CD36 molecule; Cyp1a1, cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1; Cyp1a2, cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2. Quantified data are mean $\pm$ SEM of 6 mice in each group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

物 17,18-EEQ、5-HEPE 和 9-HEPE 抑制脂肪组织的炎症反应, 减缓了小鼠急性高脂饮食引起的 NAFLD 的发生^[7]; n-3 PUFA 显著改善了急性心肌梗死患者恢复期的脂质代谢紊乱和内皮功能障碍, 可能与其 DHA 和 EPA 代谢产物 16,17-EDP 和 EEQs 的水平升高有关^[12]。但 n-3 PUFA 及其代谢产物对 HHcy 引起的肝脏脂肪变性的作用及机制尚不明确。本研究的结果显示, n-3 PUFA 通过其 EPA 代谢产物 LXA₂ 抑制肝脏 Ahr-Cd36 信号通路激活, 减轻了 HHcy 引起的肝脏脂肪变性。

相关研究表明, n-3 PUFA 可显著抑制单核细胞 Cd36 的表达, 对减缓动脉粥样硬化的发生和发展有重要作用^[13]。众多研究证实, Cd36 的表达增加参与了脂肪肝的形成^[14]。本研究证实 HMD 中添加 n-3 PUFA 显著降低了肝脏组织 Cd36 的表达, 提示 n-3 PUFA 可能通过抑制肝细胞的脂质摄取从而改善肝脏的脂质沉积。

n-3 PUFA 与 n-6 PUFA 在体内使用共同的代谢酶代谢产生结构类似但功能不同的代谢产物。AA 可通过环氧化酶代谢产生前列腺素 E₂, 上调磷酸

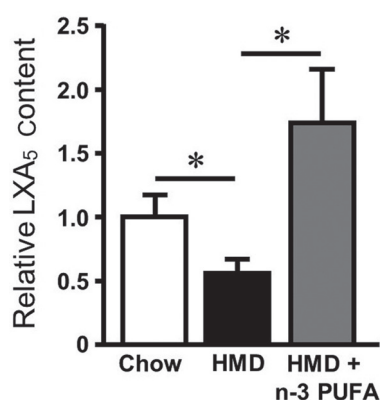


图 3. n-3 PUFA增加了肝脏组织脂氧素A₅的含量

Fig. 3. n-3 PUFA targeted metabolomics analysis for relative content of lipoxin A₅ (LXA₅) in liver of mice fed an 8-week chow diet or HMD with or without n-3 PUFA. Quantified data are mean $\pm$ SEM of 6 mice in each group. * P < 0.05.

化 AKT 的表达, 促进肿瘤细胞增殖; 而由环氧化酶代谢产生的 EPA 代谢产物前列腺素 E3 则通过下调 AKT 的表达抑制肿瘤细胞增殖^[15]。LXA₅ 是 AA 与 EPA 共用同种 LOX 产生的 EPA 代谢产物, 是体内重要的抗炎介质, LXA₅ 水平降低也是导致肝功能衰竭的重要因素^[16]。而 LXA₅ 是否在肝脏脂肪变性中发挥作用尚未有报道。本研究发现 HMD 喂养小鼠肝脏 LXA₅ 水平降低, 而 n-3 PUFA 处理显著增加了肝脏组织 LXA₅ 的水平, 提示 LXA₅ 是肝脏脂肪变性的重要保护因素。进一步的分析发现 LXA₅ 可通过抑制 Ahr 的激活和下调脂肪酸摄取关键基因 Cd36 的表达改善 Hcy 引起的肝细胞脂质沉积, 提示 LXA₅ 可能通过竞争抑制 LXA₄ 对于 Ahr-Cd36 信号通路的激活, 改善 HHcy 所致的肝脏脂肪变性。

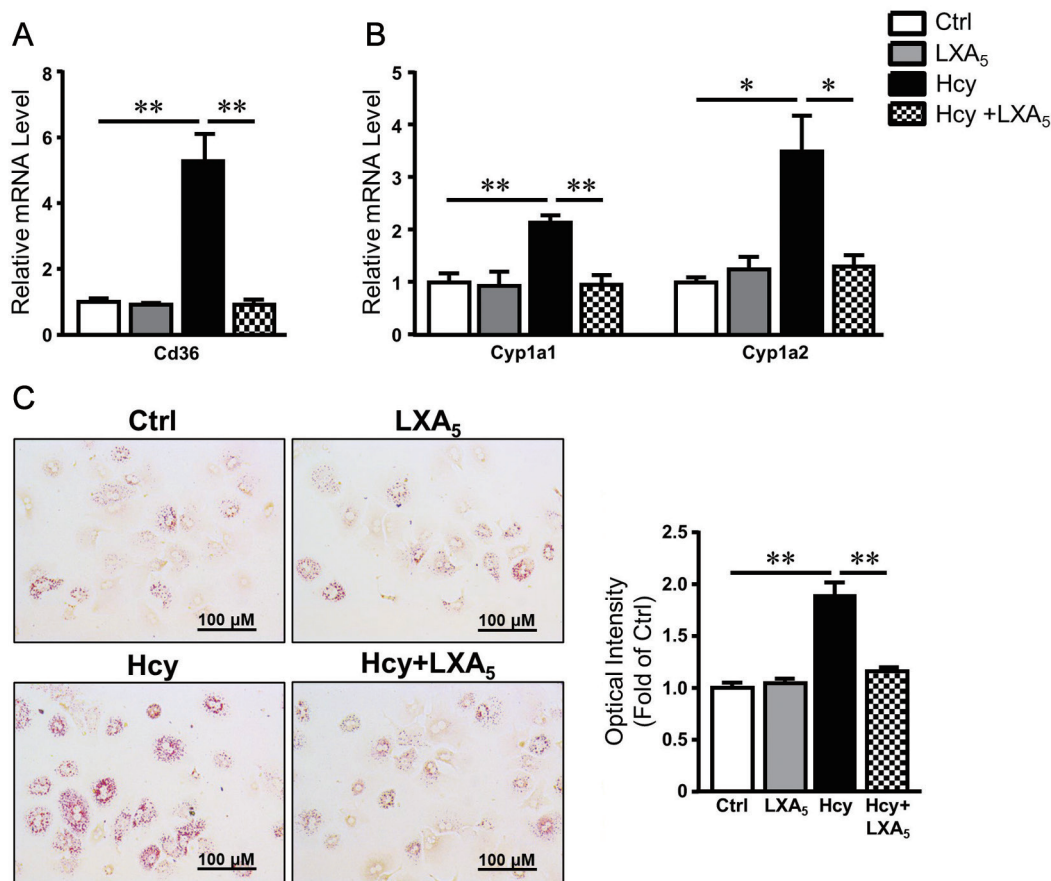


图 4. LXA₅阻断了Hcy引起的Ahr-Cd36信号路径激活和肝细胞脂质沉积

Fig. 4. LXA₅ blocked Hcy-induced Ahr-Cd36 pathway and lipid accumulation in hepatocytes. Primary hepatocytes were incubated with homocysteine (Hcy) or Hcy+lipoxin A₅ (LXA₅) for 24 h. A, B: qRT-PCR analysis of mRNA levels of Cd36 and Ahr target genes Cyp1a1 and Cyp1a2. C: Representative oil red O staining (left) and densitometry quantification (right) of lipid deposition, respectively. Scale bar, 100 μ m. Quantified data are mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments. * P < 0.05; ** P < 0.01.

综上所述, 本研究发现 n-3 PUFA 改善了 HHcy 引起的肝脏脂肪变性, 其作用机制可能是通过 LXA₅ 抑制 Ahr 的激活, 降低 Cd36 的表达, 减少肝脏的脂质沉积。这一研究结果预期可为治疗 HHcy 引起的肝脏脂肪变性提供新的治疗思路和途径。

参考文献

- Ide N, Keller C, Weiss N. Aged garlic extract inhibits homocysteine-induced CD36 expression and foam cell formation in human macrophages. *J Nutr* 2006; 136(3 Suppl): 755S–758S.
- Liang HJ, Xie XN, Song XH, Huang MH, Su T, Chang XL, Liang B, Huang DY. Orphan nuclear receptor NR4A1 suppresses hyperhomocysteinemia-induced hepatic steatosis *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Lett* 2019; 593(10): 1061–1071.
- Yao L, Wang CJ, Zhang X, Peng LY, Liu WL, Zhang XJ, Liu YJ, He JL, Jiang CT, Ai D, Zhu Y. Hyperhomocysteinemia activates the aryl hydrocarbon receptor/CD36 pathway to promote hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2016; 64(1): 92–105.
- Artiach G, Carracedo M, Plunde O, Wheelock CE, Thul S, Sjoval P, Franco-Cereceda A, Laguna-Fernandez A, Arnardottir H, Back M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids decrease aortic valve disease through the resolvin E1 and ChemR23 axis. *Circulation* 2020; 142(8): 776–789.
- Huang T, Tucker KL, Lee YC, Crott JW, Parnell LD, Shen J, Smith CE, Ordovas JM, Li D, Lai CQ. Methylene-tetrahydrofolate reductase variants associated with hypertension and cardiovascular disease interact with dietary polyunsaturated fatty acids to modulate plasma homocysteine in puerto rican adults. *J Nutr* 2011; 141(4): 654–659.
- Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Moran-Salvador E, Titos E, Martinez-Clemente M, Lopez-Parra M, Arroyo V, Claria J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J* 2009; 23(6): 1946–1957.
- Wang CJ, Liu WL, Yao L, Zhang X, Zhang XJ, Ye CJ, Jiang HF, He JL, Zhu Y, Ai D. Hydroxyeicosapentaenoic acids and epoxyeicosatetraenoic acids attenuate early occurrence of nonalcoholic fatty liver disease. *Br J Pharmacol* 2017; 174(14): 2358–2372.
- Yao L, Cao BY, Cheng Q, Cai WB, Ye CJ, Liang J, Liu WL, Tan L, Yan M, Li BC, He JL, Hwang SH, Zhang X, Wang CJ, Ai D, Hammock BD, Zhu Y. Inhibition of soluble epoxide hydrolase ameliorates hyperhomocysteinemia-induced hepatic steatosis by enhancing beta-oxidation of fatty acid in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2019; 316(4): G527–G538.
- Yao L, He JL, Li BC, Yan M, Wang H, Tan L, Liu MM, Lv X, Lv HZ, Zhang X, Chen C, Wang DW, Yu Y, Huang Y, Zhu Y, Ai D. Regulation of YAP by mammalian target of rapamycin complex 1 in endothelial cells controls blood pressure through COX-2/mPGES-1/PGE2 cascade. *Hypertension* 2019; 74(4): 936–946.
- Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106(6): 635–643.
- Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007; 46(4): 1081–1090.
- Yuan M, Zhang Y, Hua T, Liu XL, Liu T, Yuan RY, Li GP, Zhu Y, Zhang X. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation improves lipid metabolism and endothelial function by providing a beneficial eicosanoid-pattern in patients with acute myocardial infarction: A randomized, controlled trial. *Clin Nutr* 2021; 40(2): 445–459.
- Dai Perrard XY, Lian Z, Bobotas G, Dicklin MR, Maki KC, Wu H. Effects of n-3 fatty acid treatment on monocyte phenotypes in humans with hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol* 2017; 11(6): 1361–1371.
- Zhou B, Jia LJ, Zhang ZJ, Xiang LP, Yuan YW, Zheng PL, Liu B, Ren XX, Bian H, Xie LW, Li Y, Lu JL, Zhang HJ, Lu Y. The nuclear orphan receptor NR2F6 promotes hepatic steatosis through upregulation of fatty acid transporter CD36. *Adv Sci (Weinh)* 2020; 7(21): 2002273.
- Yang PY, Cartwright C, Chan D, Ding JB, Felix E, Pan Y, Pang JH, Rhea P, Block K, Fischer SM, Newman RA. Anti-cancer activity of fish oils against human lung cancer is associated with changes in formation of PGE2 and PGE3 and alteration of Akt phosphorylation. *Mol Carcinog* 2014; 53(7): 566–577.
- Lopez-Vicario C, Checa A, Urdangarin A, Aguilar F, Alcaraz-Quiles J, Caraceni P, Amoros A, Pavesi M, Gomez-Cabrero D, Trebicka J, Oettl K, Moreau R, Planell N, Arroyo V, Wheelock CE, Claria J. Targeted lipidomics reveals extensive changes in circulating lipid mediators in patients with acutely decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2020; 73(4): 817–828.