

甲基供体与非酒精性脂肪肝关联性研究及其对脂代谢调节基因甲基化影响的机制探讨

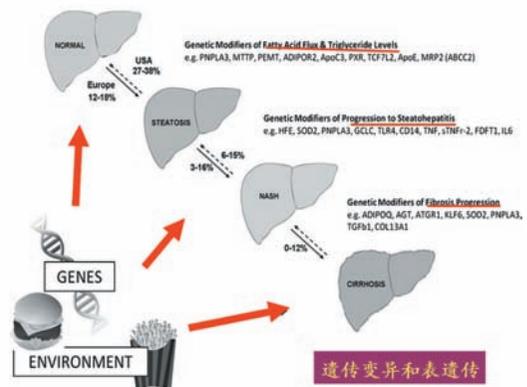
朱惠莲

(中山大学公共卫生学院营养学系 教授)

中山大学
SUN YAT-SEN UNIVERSITY

甲基供体与NAFLD关联性研究及其对脂代谢调节基因甲基化影响的机制探讨

朱惠莲
中山大学公共卫生学院
Tel: 020-87331811
Email: zhuhl@mail.sysu.edu.cn



NAFLD流行现状

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是指一种无过量饮酒 (<20g/d 男性, <10g/d 女性) 的以超过5%的肝实质细胞出现甘油三酯的蓄积和脂肪变性为特征的临床病理综合征。

患病率高	低龄化
欧美国家, 20-33% 亚太洋, 5-30% 中国, 20.8%	欧洲6-20岁, 36-44% 肥胖, 糖尿病

Am J Epidemiol 2013, 178(1):38-45
中华肝病杂志 2005;2:83-88

Hepatology, 2009;49(1):306-317.
J Gastroenterol Hepatol 2007;22:788-93.

21世纪全球最受关注的公共健康问题之一

甲基供体

富含甲基(-CH₃)的物质
甲基供体, 又称供甲基物质

蛋氨酸 胆碱 甜菜碱 叶酸

NAFLD发病机制

Genetic defects: MBOAT2, PNPLA3, F3H, FEN1, APOA2, APOC3, F3H, TCF7L2, APOE, MBOAT2 (ABCC2)

Life style: Obesity, Hypercaloric diet, Insulin resistance

↑ FFA's, ↓ Apolipoprotein B-100

NAFLD → NASH → Second hit: Insulin resistance, Oxidative stress, Inflammation, Fibrogenesis → Cirrhosis

第一次打击: 肥胖, 高热量饮食, 胰岛素抵抗

第二次打击: 胰岛素抵抗, 氧化应激, 炎症, 纤维化

↑ Insulin resistance, ↑ Oxidative stress, ↑ Inflammation, ↑ Fibrogenesis

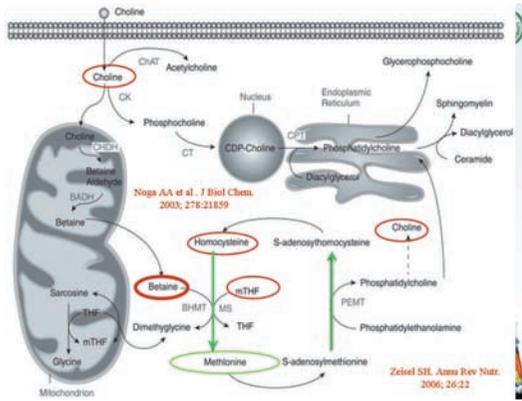
↑ Insulin resistance, ↑ Oxidative stress, ↑ Inflammation, ↑ Fibrogenesis

↑ Insulin resistance, ↑ Oxidative stress, ↑ Inflammation, ↑ Fibrogenesis

甲基供体的代谢

• 所有甲基供体代谢交织在一个动态循环中-蛋氨酸循环

Eur J Clin Nutr, 2008,62(3):386-394.



甲基供体的代谢

- 甜菜碱是蛋氨酸循环中重要的甲基供体，当它供给不足，会引起蛋氨酸循环的紊乱，从而引起高同型半胱氨酸，引起机体各种病理过程，包括肝脏脂肪变性。

Eur J Clin Nutr, 2008,62(3):386-394.

Am J Clin Nutr, 2005;81(2):440-444.

甜菜碱对高脂诱导脂代谢紊乱大鼠脂代谢的影响

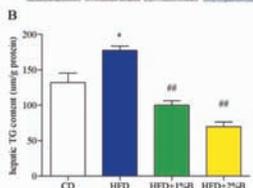
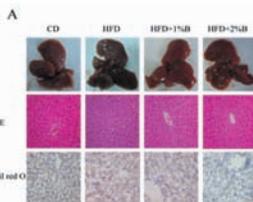
我们的研究

甜菜碱能使脂代谢紊乱大鼠的肝脏TG、TC显著下降，降低肝脏MDA含量。

组别	n	肝脏 MDA (nmol/mg pro)	肝脏 SOD (U/mg pro)	肝脏 TG(mmol/100g)	肝脏 TC(mmol/100g)
高脂血症模型组	8	18.25±6.75	7.02±0.77	1.81±0.69	2.07±0.71
0.75 g/kg甜菜碱组	8	16.96±4.90	6.50±0.88	1.46±0.52*	1.90±0.74*
1.5 g/kg甜菜碱组	8	14.58±4.25*	6.09±1.13	1.07±0.29*	1.14±0.44*
3g/kg甜菜碱组	8	11.48±5.09*	6.12±0.54	0.92±0.44**	1.00±0.40**

* 与高脂血症模型组相比，差异有统计学意义 (P<0.05)
与0.75 g/kg甜菜碱组相比，差异有统计学意义 (P<0.05)

吕史地, 等.甜菜碱对高脂膳食诱导大鼠脂代谢紊乱的干预研究
食品科学 2008,29(6), pp 409-411.



我们的研究

Betaine and NAFLD

CD diet: D12450B
HFD diet: D12451
Purchased from Research Diets (New Brunswick, NJ, USA)

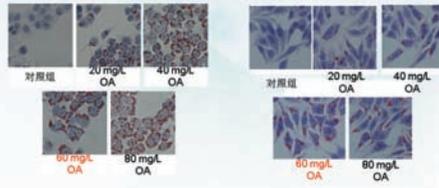
Abdelmalek MF, et al. Betaine for nonalcoholic fatty liver disease: results of a randomized placebo-controlled trial *Hepatology*. 2009

- RCT: 34 肝活检诊断NASH肝炎患者
- 口服甜菜碱(20 g daily)或安慰剂12个月
- 结果:
- 未观察到NAFLD的活性评分、肝纤维化分级的变化
- 升高的胰岛素、血糖和炎症反应以及降低的抗氧化状态未得到改善
- 脂肪性肝炎的分级(steatosis grade)降低
- 结论: 甜菜碱对脂肪性肝炎没有改善作用, 但有可能进一步阻止病情的进展。



实验一:甜菜碱对脂肪变性肝细胞甲基和脂代谢的影响

油酸(OA)负荷复制L02、HepG2脂变细胞



L02细胞 (24h)

HepG2 (24h)

甜菜碱对脂肪变性肝细胞内脂滴形成的影响

各甜菜碱组与模型组相比，细胞内脂滴形成情况下未见明显区别。

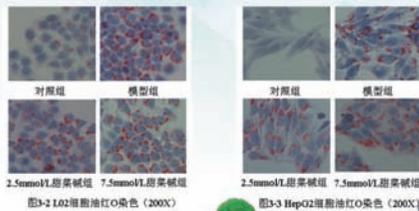


图2-2 L02细胞油红O染色 (200X)

图3-3 HepG2细胞油红O染色 (200X)

甜菜碱对脂肪变性肝细胞内及培养基TG浓度的影响

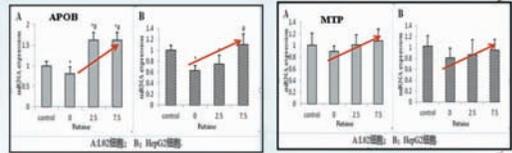
各甜菜碱组L02细胞内TG较模型组增加，但差异无统计学意义。
甜菜碱组HepG2细胞内TG较模型组明显增高。

表 3-8 细胞内 TG 浓度 (nmol/mg 蛋白, n=3)

组别	L02			HepG2		
	TG ($\bar{x} \pm s$)	p^1	p^2	TG ($\bar{x} \pm s$)	p^1	p^2
对照组	19.0±6.2	~	<0.01	21.4±1.9	~	<0.01
模型组	60.0±12.2	<0.01	~	73.3±4.9	<0.01	~
2.5 mM 甜菜碱组	62.3±5.6	<0.01	0.79	85.5±6.4	<0.01	0.02
7.5 mM 甜菜碱组	65.7±13.1	<0.01	0.47	85.3±5.6	<0.01	0.01

p^1 vs. the control group; p^2 vs. the model group, by LSD-t test.

甜菜碱增加了脂肪变性肝细胞脂质转运相关基因mRNA表达



脂肪变性肝细胞APOB、MTP↓，脂质运输能力↓
甜菜碱↑APOB、MTPmRNA，VLDL↑，培养基

TG↑

甜菜碱对脂肪变性肝细胞内及培养基TG浓度的影响

7.5mmol/L甜菜碱组HepG2细胞培养基中TG浓度较模型组增高；
2.5mmol/L甜菜碱组L02细胞培养基中TG较模型组增高。

表 3-9 细胞培养基中 TG 浓度 ($\mu\text{mol/L}$, n=3)

组别	L02			HepG2		
	TG ($\bar{x} \pm s$)	p^1	p^2	TG ($\bar{x} \pm s$)	p^1	p^2
对照组	1.93±0.4	~	0.01	5.8±3.1	~	<0.01
模型组	29.2±8.2	0.01	~	34.9±2.9	<0.01	~
2.5 mmol/L 甜菜碱组	54.6±13.4	<0.01	0.02	40.3±3.4	<0.01	0.21
7.5 mM 甜菜碱组	49.9±13.9	<0.01	0.07	48.7±5.6	<0.01	<0.01

p^1 vs. the control group; p^2 vs. the model group, by LSD-t test.

甜菜碱对脂肪变性肝细胞Hcy浓度的影响

表 3-10 HepG2 细胞内 Hcy 含量 (nmol/mg 蛋白, n=3)

组别	Hcy ($\bar{x} \pm s$)	p^1	p^2
对照组	1.03±0.07	~	0.05
模型组	1.18±0.12	0.05	~
2.5 mmol/L 甜菜碱组	1.06±0.07	0.62	0.12
7.5 mmol/L 甜菜碱组	1.03±0.08	0.90	0.04

p^1 vs. the control group; p^2 vs. the model group, by LSD-t test.

甜菜碱干预能降低脂肪变性肝细胞内的Hcy水平

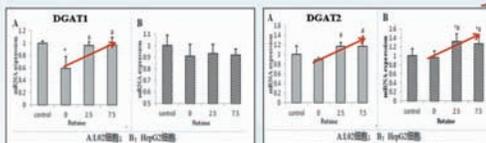
甜菜碱对脂肪变性肝细胞内及培养基TG浓度的影响

- 本研究中甜菜碱干预后细胞内甘油三酯含量并未减少反而增加，这与我们的期望是相反的，因此我们对某些脂代谢相关基因mRNA表达水平进行了检测。

- Hcy与肝细胞单纯性脂肪变性进展为NASH有关
- Hcy↓——↓氧化应激、凋亡、炎症、纤维化
- 脂质过氧化物蓄积→激活caspase3→CK-18↑ (Begriffe K,2006;Feldstein AE,2004)
- CK-18: 可反映肝细胞凋亡的程度，与NAFLD严重程度成正比——是NASH的生物标记物 (Tautani M,2010; Feldstein AE,2009)，比ALT、AST更敏感



甜菜碱增加脂肪变性肝细胞脂质合成基因mRNA表达



- 模型组DGAT表达下降，可能是细胞自身的一种保护机制，在外部脂酸充足的情况下下调脂质的合成以相对减轻脂质沉积。
- 甜菜碱能逆转DGAT表达的下降，促进细胞内TG合成——同时也增加了细胞内脂酸的消耗。
- 甜菜碱对脂肪变性肝细胞的保护作用可能并非通过减轻细胞内的脂质沉积，而是通过加速细胞内多余脂酸的消耗，减轻脂质过氧化带来的损害而实现的。

甜菜碱对脂肪变性肝细胞及培养基中CK-18浓度的影响

模型组L02、HepG2细胞中CK-18含量明显增加。甜菜碱组L02细胞较模型组降低。7.5mmol/L甜菜碱组HepG2细胞中较模型组明显下降。

表 3-13 细胞内 CK-18 含量 (pg/mg 蛋白, n=3)

组别	L02			HepG2		
	CK-18 ($\bar{x} \pm s$)	p^1	p^2	CK-18 ($\bar{x} \pm s$)	p^1	p^2
对照组	5.02±0.68	~	<0.01	18.12±0.50	~	<0.01
模型组	19.48±1.87	<0.01	~	28.99±1.25	<0.01	~
2.5 mmol/L 甜菜碱组	6.21±0.85	0.23	<0.01	27.24±0.67	<0.01	0.23
7.5 mmol/L 甜菜碱组	7.88±1.00	<0.01	<0.01	22.97±0.32	<0.01	<0.01

p^1 vs. the control group; p^2 vs. the model group, by LSD-t test.

甜菜碱对脂肪变性肝细胞及培养基中 CK-18 浓度的影响

模型组培养基中ck-18最高，甜菜碱组L02细胞较模型组下降。HepG2培养基中各甜菜碱组中CK-18与模型组相比呈现出下降趋势，但差别无统计学意义。

表 3-14 细胞培养基 CK-18 含量 (ng/L, n=3)

组别	L02			HepG2		
	CK-18($\bar{x} \pm s$)	p^1	p^2	CK-18($\bar{x} \pm s$)	p^1	p^2
对照组	9.55±3.73	—	<0.01	12.35±1.89	—	<0.01
模型组	31.86±4.09	<0.01	—	28.19±3.52	<0.01	—
2.5 mmol/L 甜菜碱组	22.57±3.54	<0.01	0.01	27.04±3.31	<0.01	0.57
7.5 mmol/L 甜菜碱组	25.92±3.58	<0.01	<0.01	26.10±3.96	<0.01	0.24

p^1 vs. the control group, p^2 vs. the model group, by LSD-t test.

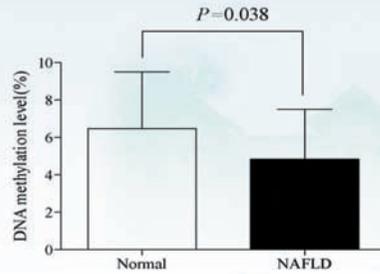
不同病理程度下血清中胆碱、Hcy水平和甜菜碱/胆碱比值的比较 (脂肪变)

factor	n	Hcy	P	Betaine/ choline	P
Steatosis stage					
0	19	8.84±1.88	0.002	4.32±1.75	0.008
1	14	12.33±2.47		2.83±0.90	
2	11	13.18±4.93		3.13±1.01	
3	9	15.17±7.17		3.14±0.71	
NO (0)	19	9.26(7.45,9.90)	<0.001	4.32±1.75	0.005
YES (1-3)	34	13.39(11.09,14.84)		3.01±0.88	
Mild(0-1)	33	10.19(7.76,12.43)	0.008	3.25(2.85,4.23)	0.304
Moderate to severe(2-3)	20	13.44(11.27,14.84)		3.04(2.90,3.93)	
Mild to moderate (0-2)	44	11.12(8.36,13.69)	0.050	3.18(2.83,4.10)	0.633
Severe (≥3)	9	13.44(11.27,14.96)		3.05(2.96,3.60)	

小结

- 甜菜碱通过增加APOB和MTP的表达提高肝细胞脂质清除能力，虽然其增加了DGAT的表达，从而促进TG合成，但这个过程可加速细胞内脂肪酸的代谢，使其免受脂肪酸过氧化所造成的危害
- 甜菜碱能降低脂肪变性肝细胞Hcy的浓度，减少脂肪变性肝细胞CK-18的浓度，从而减缓脂肪肝的进程。

NAFLD的病理改变与肝脏全基因组DNA甲基化水平的关系



甜菜碱对脂肪变性肝细胞内供甲基能力的影响 甜菜碱对脂肪变性肝细胞SAM/SAH的影响

模型组HepG2细胞内SAM/SAH下降。7.5mmol/L甜菜碱组SAM/SAH较模型组升高。

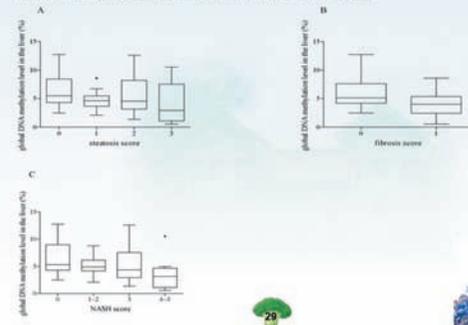
表 3-12 HepG2 细胞内 SAM/SAH 比值 (n=3)

组别	SAM/SAH ($\bar{x} \pm s$)	p^1	p^2
对照组	42.26±2.63	—	<0.01
模型组	30.00±3.24	<0.01	—
2.5 mmol/L 甜菜碱组	34.51±4.23	0.08	0.21
7.5 mmol/L 甜菜碱组	36.50±4.94	0.08	0.05

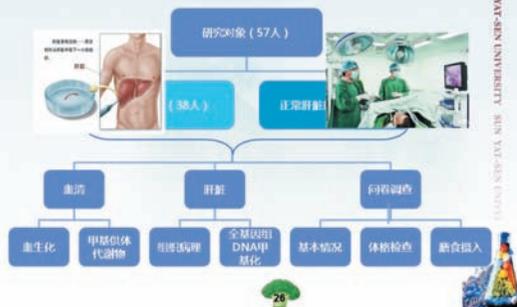
p^1 vs. the control group, p^2 vs. the model group, by LSD-t test.

甜菜碱有助于纠正脂肪变性肝细胞中甲基化反应的失衡?

2.2 NAFLD的病理改变与肝脏全基因组DNA甲基化水平的关系



人群实验



小结



本课题由“达能营养中心膳食营养研究与宣教基金”资助

- Wang LJ, Zhang HW, Zhou JY, Liu Y, Yang Y, Chen XL, Zhu CH, Zheng RD, Ling WH, Zhu HL. Betaine attenuates hepatic steatosis by reducing methylation of the MTP promoter and elevating genomic methylation in mice fed a high fat diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2014,25,329-336(IF=4.592)
- 陈力, 王丽君, 谭耀宗, 周特雅, 朱志远. 甜菜碱对脂肪变性HepG2细胞Hey、SAM/SAH及脂代谢相关基因mRNA表达的影响. 华南预防医学. 2013,39(03):1-6.



中山大學
SUN YAT-SEN UNIVERSITY

Thank You !

