

p-JAK1/p-STAT3 通路在蓝莓益生菌血清干预肝细胞脂肪变性中的作用*

祝娟娟, 程明亮[△], 周明玉, 赵雪珂

贵州医科大学附属医院 感染科 (贵阳 550001)

【摘要】 目的 建立体外肝细胞脂肪变性模型,探讨白介素-22(IL-22)调控的磷酸化酪氨酸蛋白激酶-1(p-JAK1)/磷酸化信号转导激活转录因子-3(p-STAT3)信号通路在蓝莓益生菌血清改善肝细胞脂肪变性实验中的作用机制。**方法** 制备蓝莓益生菌原液,并制备大鼠 10% 蓝莓益生菌低、中、高剂量血清及生理盐水血清。建立游离脂肪酸(FFA)诱导的正常肝细胞株 L-02 细胞脂肪变性模型,设立正常组,模型组,蓝莓益生菌低、中、高剂量血清组。定量检测细胞内三酰甘油(TG)含量;油红 O 染色检测细胞内的脂质沉积;RT-PCR 和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测各组 IL-22、p-JAK1、p-STAT3、胆固醇调节元件蛋白-1c(SREBP-1c)的基因表达;免疫荧光及 Western blot 检测各组 IL-22、p-JAK1、p-STAT3、SREBP-1c 的蛋白表达。**结果** FFA 诱导刺激 24 h 后,模型组细胞 TG 含量高于正常组($P < 0.01$),细胞内可见大量脂质沉积,且 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 基因表达及蛋白表达均较正常组减弱(P 均 < 0.01),SREBP-1c 基因及蛋白表达较正常组升高(P 均 < 0.01);与模型组相比,蓝莓益生菌低、中、高剂量血清组的 TG 逐渐降低(P 均 < 0.01),细胞内的脂肪沉积逐渐减轻,高剂量血清组 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 的基因表达和蛋白表达较模型组、低剂量血清组、中剂量血清组增强(P 均 < 0.01),SREBP-1c 的表达降低($P < 0.01$)。**结论** 蓝莓益生菌通过对 p-JAK1/p-STAT3 信号通路的调节,参与拮抗肝细胞脂肪变性的作用。

【关键词】 蓝莓益生菌血清 肝细胞 脂肪变性 白介素-22 磷酸化酪氨酸蛋白激酶-1 磷酸化信号转导激活转录因子-3 信号通路

The Effect of p-JAK1/p-STAT3 Signaling Way in Intervening NAFLD by Blueberry Probiotic Serum ZHU Juanjuan, CHENG Ming-liang[△], ZHOU Ming-yu, ZHAO Xue-ke. Department of Infection, the Hospital Affiliated of Guizhou Medical University, Guiyang 550001, China

[△] Corresponding author, E-mail: chengml@21cn.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of interleukin-22 (IL-22)-mediated phosphor-Janus kinase-1 (p-JAK1)/phosphor-signal transducer and activator of transcription 3 (p-STAT3) signaling way in the experiment of improving non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by blueberry probiotic serum. **Methods** The rat serums with low-, medium-, and high-dose of 10% blueberry probiotics, as well as saline were prepared. NAFLD model was built by inducing normal liver cell line L-02 with free fatty acid (FFA). NAFLD model cells were cultured with saline serum (model group), low-, medium-, and high-dose blueberry probiotics serums (low-, medium-, and high-dose serum groups), respectively. Normal liver cell group (normal group) was cultured with saline serum. Oil Red O staining was used to detect the lipid deposition in the cells; the intracellular level of triglyceride (TG) was quantitatively determined; the gene and protein expressions of IL-22, p-JAK1, p-STAT3, sterol-regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) were detected by RT-PCR, Western blot and immunofluorescence methods. **Results** Twenty-four hours after modeling, a large amount of lipid deposition could be observed in model group. Compared with normal group, model group showed lower gene and protein expression levels of IL-22, p-JAK1 and p-STAT3 ($P < 0.01$), and higher SREBP-1c and TG levels ($P < 0.01$). Compared with model group, TG level and the lipid deposition in low-, medium-, and high-dose blueberry probiotics serum groups were gradually reduced. High-dose serum group showed higher gene and protein expression levels of IL-22, p-JAK1, p-STAT3 and lower SREBP-1c compared with the model, low-, and medium-dose serum groups ($P < 0.01$). No significant differences in gene and protein levels between low- and medium-dose serum groups were found ($P > 0.05$).

* 贵州省科技厅社会攻关项目(No. 黔科合 SY[2010]3017 号)、黔东南苗族侗族自治州林业局科研基金项目(No. ZLYJZFCG-2012-7)和贵州省卫计委科技项目(No. gzwjkj2016-1-02)资助

[△] 通信作者, E-mail: chengml@21cn.com

Conclusion The blueberry probiotics could antagonize the NAFLD via p-JAK1/p-STAT3 signaling way.

【Key words】 Blueberry probiotics serum Hepatocyte Steatosis IL-22 p-JAK1 p-STAT3 Signaling way

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)已成为全世界最常见的肝脏疾病之一^[1-2]。该病包括多种不同的组织病理学结果:如脂肪性肝炎、肝纤维化及肝硬化^[3]。白介素-22(IL-22)是抗炎因子白介素-10(IL-10)家族成员,与IL-10在结构上存在明确的相关性^[4],是重要的护肝因子,在多种肝脏疾病中呈现保护作用^[5-6]。酪氨酸蛋白激酶-1(JAK1)/信号转导激活转录因子-3(STAT3)信号通路是近年来发现的由细胞因子刺激的信号转导通路,参与细胞增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要的生物学过程。研究发现,JAK1/STAT3信号通路受IL-22调控,其作用机制主要是通过IL-22激活STAT3,下调脂肪酸转运蛋白(FATP)的表达而发挥治疗酒精性脂肪肝的作用^[7]。目前,临床尚缺乏治疗NAFLD的特效药物^[8],通过饮食调节是治疗NAFLD的重要手段。蓝莓营养成分丰富,富含花青素及多种多酚类物质,具有很好的抗氧化性、抗炎、增强机体免疫力作用。研究显示:蓝莓具有良好的护肝作用,逆转肝纤维化^[9],并且联合益生菌后能有效减轻肝脏炎症,改善肝细胞脂肪变性^[10]。基于上述研究基础,本实验拟采用混合游离脂肪酸(FFA)体外诱导正常人肝细胞L-02脂肪变性,并通过检测蓝莓益生菌对IL-22调控的磷酸化JAK1/磷酸化STAT3(p-JAK1/p-STAT3)信号通路的影响,探讨二者参与拮抗NAFLD的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、细胞株、益生菌和蓝莓 Wistar大鼠,雄性,清洁级,体质量(180±20)g,购自贵州医科大学动物实验中心,分笼普通饲料喂养,自由饮食,用于制备蓝莓益生菌血清。正常人肝细胞株L-02购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。益生菌干片(婴儿双歧杆菌、动物双歧杆菌、乳杆菌:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心)。蓝莓选用贵州麻江兔眼园兰蓝莓,-20℃冻存,临时解冻提取原浆,其成分包括花青素、微量元素、类黄酮、维生素等^[11]。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基、胎牛血清、青链霉素、0.25%含EDTA胰蛋白酶(美国Gibco);油

酸、棕榈酸(美国Sigma);三酰甘油(TG)试剂盒(南京建成生物工程研究所); β -actin、IL-22、JAK1、STAT3、胆固醇调节元件蛋白-1c(SREBP-1c)基因引物合成(上海生工生物工程技术有限公司);anti-IL-22、anti-JAK1(phosphoY1022+Y1023)、anti-STAT3(phosphoY705)、anti-SREBP-1c(英国Abcam);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、Triton X-100(中国Solarbio);FITC荧光标记羊抗兔IgG、Alexa Flour594标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥);细胞活性检测试剂盒(CCK8试剂盒,日本同仁化学研究所);Maxima SYBR Green/ROX qPCR预混液(美国Thermo Scientific);ViiA7 Real-time PCR System(美国Applied Biosystems)。

1.2 蓝莓益生菌原液及血清制备

益生菌干片磨至粉末状后加入蓝莓原浆中混匀,使益生菌含量达 10^8 CFU/mL^[12]。Wistar大鼠随机分成4组:生理盐水对照组,蓝莓益生菌低、中、高剂量组(0.25、0.5、1 mL/100 g)^[13]。分别灌胃5 d,2次/d,于末次灌胃后2 h再重复灌胃1次,第2次灌胃1 h后股动脉取血。3 000 r/min离心20 min,混匀同组大鼠血清,50℃水浴30 min灭活补体,0.22 μ m微孔滤器过滤除菌,-20℃保存备用。

1.3 肝细胞脂肪变性模型建立及细胞分组

正常人肝细胞株L-02复苏培养,细胞呈贴壁生长,24 h更换培养液,细胞约80%~90%融合度时,用0.25%含EDTA胰蛋白酶收集细胞并传代。取对数生长期的细胞进行实验。L-02细胞用1 mmol/L混合FFA[油酸(OA):软脂酸(PA)=2:1]诱导细胞脂肪变性^[14]。将细胞分为正常组,细胞脂肪变性模型组(简称模型组),蓝莓益生菌低、中、高剂量血清组。将各组细胞以 1×10^5 mL⁻¹密度接种于6孔板中,37℃、体积分数为5% CO₂恒温培养箱中培养24 h后弃培养基。正常组与模型组加入含10%生理盐水血清培养基,蓝莓益生菌低、中、高剂量血清组分别添加含10%相对应血清的培养基培养24 h,然后除正常组外,各组添加1 mmol/L混合FFA培养24 h。

1.4 蓝莓益生菌血清对细胞增殖的影响

细胞增殖采用CCK8试剂盒检测。将L-02细

胞以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种 $100 \mu\text{L}$ 于 96 孔培养板,按 1.3 分组处理 72 h,每组设 6 个平行孔,按 CCK8 试剂盒说明操作,最后在酶标仪 450 nm 读取吸光度(A_{450})值。以正常组细胞增殖活力为 100%,按常规计算其他各组细胞增殖活力。

1.5 蓝莓益生菌血清对 FFA 诱导的 L-02 细胞 TG 水平及细胞内脂滴的影响

按 1.3 分组处理细胞 72 h 后,采用 TG 试剂盒检测 TG 水平。BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测细胞总蛋白含量,结果表示为每克细胞总蛋白含量中所含的 TG 量(mg/g prot)。细胞内脂滴检测采用油红 O 染色观察。将细胞接种于 6 孔板内,同时放入玻片,制作细胞爬片,按 1.3 分组处理细胞 72 h, PBS 轻洗细胞爬片 3 次,体积分数为 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 轻洗 3 次,加油红 O 染液避光染色 30 min, 60% 异丙醇洗去多余染液,苏木素染核 10 s,蒸馏水轻洗 3 次,甘油明胶封片。显微镜下观察细胞内脂滴情况。

1.6 免疫荧光检测蓝莓益生菌血清对细胞 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 及 SREBP-1c 蛋白表达的影响

将细胞接种于 6 孔板内,同时放入玻片,制作细胞爬片,按 1.3 分组处理细胞 72 h, PBS 轻洗细胞爬片 2 次(每次 3 min),加入体积分数为 4% 多聚甲醛固定,按常规操作,IL-22、p-JAK1、p-STAT3 一抗 1:100, SREBP-1c 一抗 1:200, 4 °C 孵育过夜,次日予冷 PBST 轻洗 3 次(每次 5 min),滴加浓度为 1:100 FITC 标记或 Alexa Flour594 标记山羊抗兔 IgG 二抗 1 mL,避光孵育 2 h,冷 PBST 轻洗 3 次(每次 5 min),加入 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 避光孵育 30 min, PBS 轻洗 3 次(每次 5 min),激光扫描共聚焦显微镜下观察并采图。

1.7 RT-PCR 和 qRT-PCR 检测蓝莓益生菌血清对细胞 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 及 SREBP-1c 基因表达的影响

收集培养 72 h 的细胞, Trizol 提取各组细胞总 RNA。RNA 逆转录合成 cDNA 按试剂盒说明书操作。引物序列见附表。PCR 反应体系(50 μL)。反应条件基本一致:预变性, 94 °C、2 min; 变性, 94 °C、30 s; 退火, 55 °C、30 s; 延伸, 72 °C、30 s, 变性、退火、延伸经 35 个循环; 终延伸, 72 °C、2 min。琼脂糖电泳检测扩增片段。以目的基因/ β -actin 的灰度值比值表示各组细胞目的基因相对含量。qRT-PCR 反应体系(20 μL)。反应条件:第 1 阶段, 50 °C、2 min; 第 2 阶段, 95 °C、10 min; 第 3 阶段, 95 °C、15 s, 60 °C、

1 min, 40 个循环, 反应结束后作熔解曲线。扩增曲线上设定循环基线和阈值, β -actin 为内参照, 以目的基因 Ct 值减去内参照 Ct 值为 ΔCt , 最终以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值计算目的基因的相对表达量。

附表 基因引物序列

Table Gene sequences of primers

Gene	Primer sequence
β -actin	Sense, 5'-CCTGGCACCAGCAACAAT-3'
	Antisense, 5'-GGCCGGACTCGTCATAC-3'
IL-22	Sense, 5'-TGGGGAGAACTGTTCCACG-3'
	Antisense, 5'-TGTGCTTAGCCTGTTGCTGA-3'
p-JAK1	Sense, 5'-CCGCGACGTGGAGAATATCA-3'
	Antisense, 5'-CTCAAAGTAGCTCAGGGCAC-3'
p-STAT3	Sense, 5'-AGTATTGTCCGGCAGAGAGC-3'
	Antisense, 5'-GACATCGGCAGGTCAATGGT-3'
SREBP-1c	Sense, 5'-CCTGGCTATTGACCCACC-3'
	Antisense, 5'-TTCAATGGAGTGGGTGCAGG-3'

1.8 Western blot 检测蓝莓益生菌血清对细胞 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 及 SREBP-1c 蛋白表达的影响

收集培养 72 h 细胞, 提取蛋白后进行含量测定, 取蛋白质样品 10 μg , 进行凝胶电泳、转膜、封闭, 用 IL-22 一抗(1:1 000)、p-JAK1 一抗(1:1 000)、p-STAT3 一抗(1:5 000)、SREBP-1c 一抗(1:500) 4 °C 孵育过夜, 二抗(1:20 000) 避光孵育 2 h, ECL 曝光显影, Gel Doc EQ 凝胶成像仪扫描, 测定各显色条带的灰度值, 以目的条带与 β -actin 灰度值的比值为目的蛋白的相对含量。

1.9 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析, 分析前行方差齐性检验, 方差齐时用 LSD 法, 方差不齐时用 Tamhane 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蓝莓益生菌血清对 L-02 细胞增殖活力的影响

以正常对照组细胞增殖活力为 100%, 模型组细胞增殖活力为 96.4%, 蓝莓益生菌低、中、高剂量血清组细胞增殖活力分别为 92.5%、91.3% 和 93.2%。与正常组相比, 模型组, 蓝莓益生菌低、中、高剂量血清组间细胞增殖活力差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 蓝莓益生菌血清对 L-02 细胞 TG 水平及细胞内脂滴的影响

与正常组比较, 模型组细胞 TG 含量增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 蓝莓益生菌低、中、高剂量血清组细胞 TG 含量降低($P < 0.01$); 与低、中剂量血清组比较, 高剂量血清组细胞 TG 含量下降($P <$

0.01), 见图 1。

由图2可见, 正常组细胞可见细胞形态正常, 胞

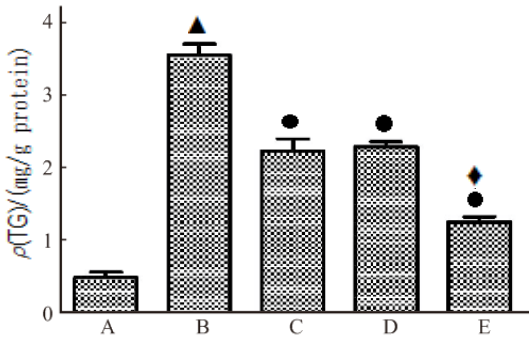


图 1 各组 L-02 细胞 TG 含量检测

Fig 1 Concentration of triglycerides in L-02 cells

A, B, C, D, E: Normal group, model group, low-, medium-, and high-dose blueberry probiotics serum groups. ▲ $P < 0.01$, vs. normal group; ● $P < 0.01$, vs. model group; ◆ $P < 0.01$, vs. low-, medium-dose blueberry probiotics serum groups

浆中无脂滴沉积; 用 1 mmol/L 混合 FFA 诱导 L-02 细胞 24 h 后, 可见模型组 L-02 细胞形状不规则或呈椭圆形, 胞浆内可见大量红色脂滴, 经不同剂量的蓝莓益生菌血清干预后, 胞浆内的脂滴较模型组明显减少, 且在蓝莓益生菌高剂量血清组中减少更为显著。

2.3 免疫荧光检测蓝莓益生菌血清对 L-02 细胞 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 及 SREBP-1c 蛋白表达的影响

见图 3。IL-22 和 p-STAT3: 正常组细胞轮廓清晰, 模型组细胞轮廓消失, 胞内绿色荧光强度较正常明显减弱, 经不同剂量蓝莓益生菌血清干预后, 细胞内的绿色荧光强度较模型组明显增强, 其中蓝莓益生菌高剂量血清组的绿色荧光强度较低、中剂量组增强明显。p-JAK1: 正常组细胞核呈红染, 可见少量胞浆呈红染, 模型组红染的胞核较正常组明显减弱, 而蓝莓益生菌血清组 p-JAK1 表达较模型组

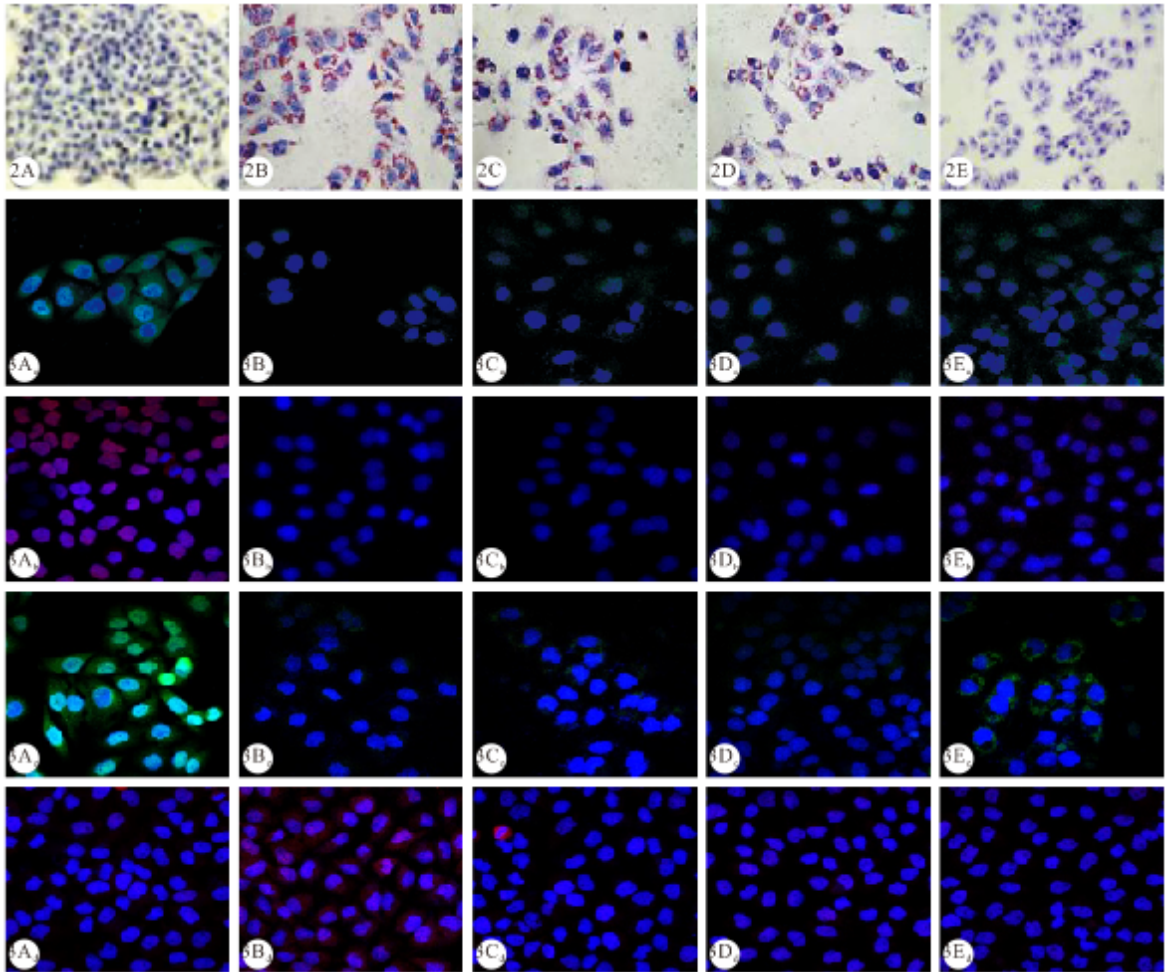


图 2 各组 L-02 细胞油红 O 染色。×200

Fig 2 Oil red O staining of L-02 cells. ×200
fluorescence scope. ×200

图 3 免疫荧光检测各组细胞 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 及 SREBP-1c 蛋白的表达。×200

Fig 3 Protein expressions of IL-22, p-JAK1, p-STAT3 and SREBP-1c under immuno-

A, B, C, D, E: Denotes the same as that in fig 1; a, b, c, d: IL-22, p-JAK1, p-STAT3 and SREBP-1c proteins

明显升高,其中高剂量血清组的表达量较低、中剂量血清组明显增强。SREBP-1c: 正常组细胞核呈蓝色,可见少量胞浆亦呈红染,模型组红染的胞浆较正常组明显增多,而蓝莓益生菌血清组胞浆表达较模型组明显减少,其中高剂量血清组的表达量较低、中剂量血清组减少。

2.4 蓝莓益生菌血清对 L-02 细胞 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 及 SREBP-1c 基因表达的影响

见图 4。琼脂糖电泳检测扩增片段结果显示,与正常组比较,模型组 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 表达明显减少,SREBP-1c 明显升高,蓝莓益生菌低、中、高剂量血清组 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 表

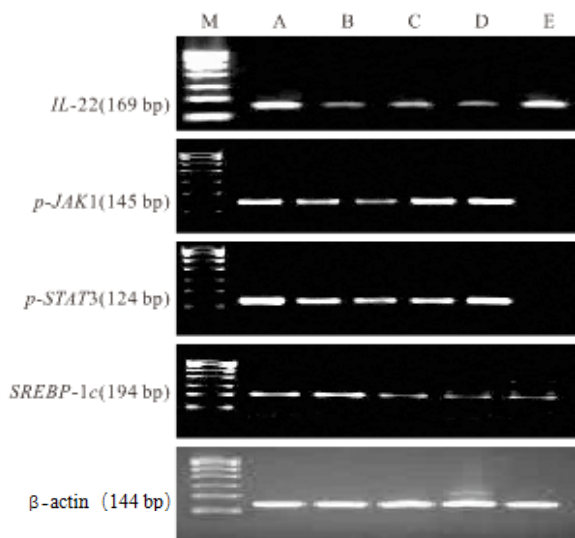


图 4 各组 L-02 细胞 PCR 扩增产物

Fig 4 PCR amplification products in L-02 cells

M; Marker; A, B, C, D, E; Denotes the same as that in fig 1

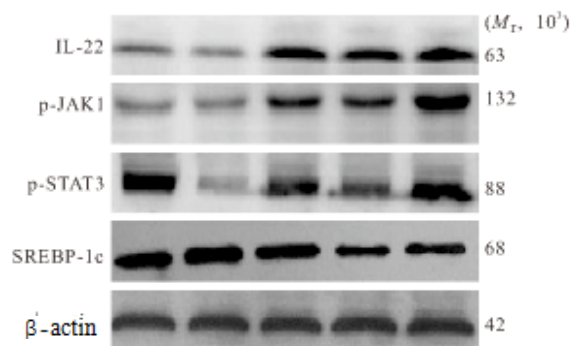


图 6 Western blot 检测各组 L-02 细胞 IL-22、p-JAK1、p-STA73 和 SREBP-1c 蛋白的表达

Fig 6 Protein expressions of IL-22, p-JAK1, p-STAT3, SREBP-1c of L-02 cells detected by Western blot

A, B, C, D, E; Denotes the same as that in fig 1. ▲P<0.01, vs. normal group; ●P<0.01, vs. model group; ◆P<0.01, vs. low-, medium-dose blueberry probiotics serum groups

达较模型组增加,SREBP-1c 明显降低,且高剂量血清组改变更为显著。

以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因 mRNA 的相对表达量结果见图 5。结果与琼脂糖电泳检测结果相似。各组间 IL-22 mRNA、p-JAK1 mRNA、p-STAT3 mRNA、SREBP-1c 表达差异均有统计学意义(P<0.01)。

2.5 Western blot 检测蓝莓益生菌血清对 L-02 细胞 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 及 SREBP-1c 蛋白表达的影响

见图 6。IL-22、p-JAK1、p-STAT3 及 SREBP-1c 蛋白检测结果与基因检测结果相似。与正常组比较,模型组 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 蛋白表达明

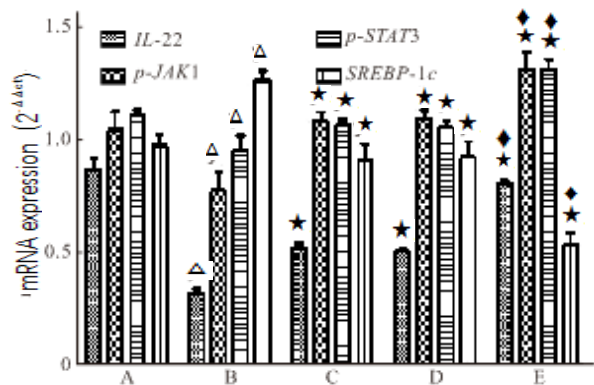
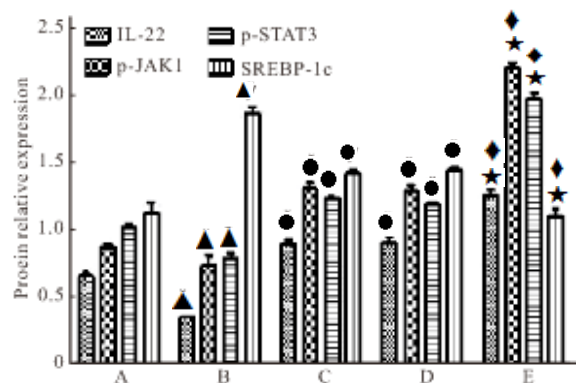


图 5 L-02 细胞 IL-22、p-JAK1、p-STAT3、SREBP-1c mRNA 表达
Fig 5 mRNA expressions of IL-22, p-JAK1, p-STAT3, SREBP-1c in L-02 cells

A, B, C, D, E; Denotes the same as that in fig 1. △P<0.01, vs. normal group; ★P<0.01, vs. model group; ◆P<0.01, vs. low-, medium-dose blueberry probiotics serum groups



显减少, SREBP-1c 蛋白表达升高, 蓝莓益生菌低、中、高剂量血清组 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 蛋白表达较模型组增加, SREBP-1c 蛋白表达明显降低, 且高剂量血清组改变更为显著。

3 讨论

NAFLD 被视为全球最常见的慢性肝病之一, 并已成为危害公共健康的问题。随着疾病进展可发展至肝硬化、肝癌。近年来免疫炎症对 NAFLD 的影响逐渐受到重视, 肝内多种具有免疫功能的细胞(如枯否细胞、自然杀伤细胞)受到细菌、病毒、药物或其他一些代谢产物(如脂多糖 LPS)刺激后, 可通过 LPS/TLR4 信号通路下游的衔接分子 MyD88 诱导促炎因子(如 IL-21、CXCL-10)和抗炎因子(如 IL-10)的产生^[15]。促炎因子激活相关信号通路上调 SREBP-1c 等具有脂肪合成功能的基因表达, 导致肝细胞内的 TG 和胆固醇聚集, 而发生 NAFLD。JAK1/STAT3 信号通路主要由三个成分组成: 酪氨酸激酶相关受体、酪氨酸激酶 JAK 和转录因子 STAT, 其中酪氨酸激酶相关受体包括许多细胞因子, 细胞因子与相应受体结合后引起受体分子二聚化, 受体与偶联的 JAK 激酶相互接近并通过交互的酪氨酸磷酸化作用而活化, 继而催化结合在受体上的 STAT 蛋白以二聚体形式进入细胞与靶基因结合调控基因转录。YANG 等^[16]的研究显示, 抗炎因子家族中的 IL-22 作为 JAK/STAT 信号通路的相关受体可通过激活 STAT3 通路下调 TG 合成的相关基因改善因肥胖所致的脂肪肝; KONG 等^[17]通过 IL-22 治疗乙醇诱导的肝损伤的研究发现, IL-22 可通过其受体 IL-22RA1 激活 JAK1/STAT3 信号通路, 下调 FATP 表达, 达到改善肝细胞脂肪变性的作用。我们推测, 由 IL-22 调控的 p-JAK1/p-STAT3 信号通路参与了拮抗 NAFLD, 其作用机制可能是通过调控该信号通路下游的具有脂肪合成功能的基因表达而实现。

目前临床上并没有针对 NAFLD 的特效药物, 通过饮食调节, 从 NAFLD 的早期阶段介入预防, 早期控制, 避免其进展为终末期肝病具有重大意义。益生菌作为肠道微生态调节剂可用于 NAFLD 的治疗, 以改善肠道微生态环境, 减轻内毒素血症, 从而减轻肝细胞炎症, 达到治疗 NAFLD 的目的^[18]。蓝莓素有“浆果之王”的美称, 不仅是一种果品, 更是一种具有保健功能的食品。相关研究发现, 蓝莓富含花青素、类黄酮及多酚类等物质具有抗氧化、抗炎、

抗肿瘤、调节免疫、降血脂等功效^[19-20], 且蓝莓中的花青素能激活免疫系统, 使免疫球蛋白不受自由基的侵害, 激活巨噬细胞, 增强人体的免疫力。本团队在前期研究中发现: 蓝莓对急性酒精性脂肪肝有保护作用^[21], 其机制可能是蓝莓能有效抑制 TNF- α , 下调 SREBP-1c 的表达, 合理改善脂代谢, 减少脂质沉积于肝脏。WANG 等^[9]研究发现, 蓝莓对肝星状细胞活性也有抑制作用, 能有效减少炎症介质的产生, 达到逆转肝纤维化的功效。陆爽等^[13]通过应用高剂量的蓝莓血清能有效促进 HSC-T6 细胞凋亡, 改善肝纤维化。相关的报道也显示: 蓝莓对益生菌的生长有促进作用, 同时, 益生菌能增强蓝莓的生物活性, 二者有协调作用^[22]。将蓝莓与益生菌联合, 可减轻炎症因子对肝细胞损伤, 同时能调节脂质代谢, 减少肝细胞脂肪变^[10, 23]。

上述研究从宏观角度提升了蓝莓的综合作用, 而益生菌又能增强其总体活性, 故本实验将蓝莓与益生菌联合运用, 通过混合游离脂肪酸体外诱导正常人肝细胞 L-02 脂肪变性, 构建肝细胞脂肪变性模型, 模拟了 NAFLD 发生时脂肪蓄积对肝细胞的损伤作用, 将不同剂量的蓝莓益生菌血清作为干预因素, 通过对 IL-22 调控磷酸化的 JAK1/STAT3 信号的影响, 探明二者参与改善 NAFLD 的作用机制。本研究发现: 不同剂量的蓝莓益生菌血清能显著改善肝细胞脂肪变性程度。油红染色后可见模型组胞浆内有大量红色脂滴, 而蓝莓益生菌低、中、高剂量组胞浆内的脂滴较模型组明显减少, 其中高剂量血清组的脂滴减少更为显著, TG 检测发现, 经不同剂量蓝莓益生菌血清干预后 TG 较模型组降低, 而高剂量血清组的 TG 降低最为显著($P < 0.01$); 结合 CCK8 检测发现, 不同剂量的蓝莓益生菌血清干预后与模型组相比, L-02 细胞增殖活力无明显变化($P > 0.05$), 表明我们所使用浓度范围的血清对 L-02 细胞活性无影响, 排除了各组 TG 差异是由细胞数量不同所致的可能性。通过对 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 及 SREBP-1c 基因和蛋白的表达进行检测发现: 蓝莓益生菌高剂量血清组的 IL-22、p-JAK1、p-STAT3 基因和蛋白的表达均高于模型组, 蓝莓益生菌低、中剂量血清组($P < 0.01$), SREBP-1c 基因和蛋白的表达较模型组降低($P < 0.01$), 但低、中剂量血清组间的差异无统计学意义。由此可见, IL-22、p-JAK1、p-STAT3 基因和蛋白随着蓝莓益生菌血清剂量升高而呈现高表达, SREBP-1c 的表达降低, 结合 TG 及油红 O 染色, 说

明蓝莓益生菌的联合应用,能显著改善肝细胞脂肪变性程度,减少 TG 的合成。因此,我们推测蓝莓益生菌拮抗 NAFLD 的作用机制系通过加强 IL-22 表达,激活 p-JAK1/p-STAT3 信号通路,下调 SREBP-1c 的表达,发挥改善 NAFLD 的作用。

由于蓝莓益生菌血清成分复杂,本研究仅初步探讨其通过增强 IL-22 表达调控 p-JAK1/p-STAT3 信号通路的影响,分析其有参与拮抗 NAFLD 作用的机制,但具体血清中的何种成分发挥了作用,是否还存在其他的作用机制,还有待更深层次的研究。

参 考 文 献

- [1] MARIANA VM, HELENA CP. Non-alcoholic fatty liver disease: what the clinician needs to know? *World J Gastroenterol*,2014,20(36):12956-12980.
- [2] JUAN PA, ROBERTO C, RODRIGO Z, *et al.* Management of nonalcoholic fatty liver disease: an evidence-based clinical practice review. *World J Gastroenterol*,2014,20(34):12182-12201.
- [3] KAREEM H, VARUN B, MOHAMMED EER, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease;a comprehensive review of a growing epidemic. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (34): 12082-12101.
- [4] IYER SS, CHENG G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*,2012,32(1):23-63.
- [5] MASTELIC B, DO ROSARIO AP, VELDHONEN M, *et al.* IL-22 protects against liver pathology and lethality of an experimental blood-stage malaria infection. *Front Immunol*, 2012,3: 85 [2016-03-21]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00085/full>. doi: 10.3389/fimmu.2012.00085.
- [6] CHESTOVICH PJ, UCHIDA Y, CHANG W, *et al.* Interleukin-22; implications for liver ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*,2012,93(5):485-492.
- [7] KI SH, PARK O, ZHENG M, *et al.* Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology*,2010,52(4):1291-1300.
- [8] CHALASANI N, YOUNOSSE Z, LAVINE JE, *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*,2012,55(6):2005-2023.
- [9] WANG Y, CHENG M, ZHANG B, *et al.* Dietary supplementation of blueberry juice enhances hepatic expression of metallothionein and attenuates liver fibrosis in rats. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e58659 [2016-03-06]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058659>.
- [10] REN T, HUANG C, CHENG M. Dietary blueberry and bifidobacteria attenuate nonalcoholic fatty liver disease in rats by affecting SIRT1-mediated signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*,2014,2014:465059 [2016-03-06]. <https://dx.doi.org/10.1155/2014/469059>.
- [11] 文光琴, 聂飞, 方品武. 蓝莓果实理化成分含量比较分析与功能评价. *北方园艺*,2012(13):27-30.
- [12] OSMAN N, ADAWI D, AHRNE S, *et al.* Endotoxin- and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and blueberry. *Dig Liver Dis*,2007,39(9):849-856.
- [13] 陆爽, 程明亮, 杨德猛, 等. 蓝莓对大鼠肝星状细胞 T6 凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响. *中华医学杂志*,2015,95(31):2560-2564.
- [14] 殷锦锦, 唐外娇, 曾璐, 等. 人肝细胞系 L-02 单纯肝脂肪变性细胞模型的建立与应用. *南方医科大学学报*,2014,34(6):837-842.
- [15] WU M, WANG H, SHI J, *et al.* Gene expression profiles identify both MyD88-independent and MyD88-dependent pathways involved in the maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate: a novel adjuvant. *Hum Vaccin Immunother*,2014,10(12):3711-3721.
- [16] YANG L, ZHANG Y, WANG L, *et al.* Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *J Hepatol*,2010,53(2):339-347.
- [17] KONG X, FENG D, MATHEWS S, *et al.* Hepatoprotective and anti-fibrotic functions of interleukin-22: therapeutic potential for the treatment of alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*,2013,28 (Suppl 1):56-60.
- [18] ESLAMPARAST T, POUSTCHI H, ZAMANI F, *et al.* Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease:a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am J Clin Nutr*,2014,99(3):535-542.
- [19] FERNANDES I, MARQUES F, FREITAS VD, *et al.* Antioxidant and anti-proliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins. *Food Chem*,2013,141(3):2923-2933.
- [20] VENDRAME S, DAUGHERTY A, KRISTO AS, *et al.* Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption improves inflammatory status in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*,2013,24(8):1508-1512.
- [21] 赵雪珂, 吴荣敏, 姚玉梅, 等. 蓝莓对小鼠急性酒精性脂肪肝 TNF- α -R1 和 SREBP-1c 影响的初步研究. *重庆医科大学学报*,2015,20(3):43-46.
- [22] 刘奕炜, 周方, 郝建新, 等. 蓝莓汁及其提取物对嗜酸乳杆菌 NCFM 体外生长的影响. *中国乳品工业*,2013,41(2):13-16.
- [23] BRANNING C, HAKANSSON A, AHRNE S, *et al.* Blueberry husks and multi-strain probiotics affect cloinic fermentation in rats. *Br J Nutr*,2009,101(6):859-870.