牛磺酸对HepG2细胞胆固醇水平的影响

张 珊，郭俊霞，张艳贞，张 静，陈 文*
（北京联合大学应用文理学院，北京 100191）

摘 要：目的：探讨牛磺酸对人肝癌细胞HepG2总胆固醇（total cholesterol，TC）、游离胆固醇（free cholesterol，FC）、胆固醇酯（cholesterol ester，EC）水平及对胆固醇代谢限速酶——胆固醇7α-羟化酶（cholesterol 7α-hydroxylase，CYP7A1）蛋白表达的影响。方法：在培养液中添加终浓度为0.1、1、10、20 mmol/L的牛磺酸，分别在培养24、48 h后测定细胞内TC、FC及EC水平；在培养液中添加终浓度为20 mmol/L的牛磺酸，分别培养12、24、48、72 h后检测CYP7A1蛋白表达水平。结果：1、10、20 mmol/L的牛磺酸均可使HepG2细胞内TC、FC水平明显下降，且与牛磺酸浓度呈正比，但EC水平在牛磺酸浓度达1 mmol/L后即不随牛磺酸浓度的增加而进一步降低；培养48 h后HepG2细胞TC、FC水平的降低幅度大于24 h时；20 mmol/L牛磺酸使FC含量减少的作用强于对EC减少的作用；培养24 h后HepG2细胞中CYP7A1蛋白表达最强。结论：牛磺酸可增强CYP7A1蛋白表达，促进HepG2细胞内的胆固醇代谢，胆固醇降低程度与牛磺酸浓度及作用时间相关，作用48 h的效果明显优于24 h，且牛磺酸主要是降低了细胞内的FC水平。

关键词：牛磺酸；胆固醇；胆固醇7α-羟化酶（CYP7A1）；HepG2细胞

Effect of Taurine on Cholesterol Level of HepG2 Cells

ZHANG Shan, GUO Jun-xia, ZHANG Yan-zhen, ZHANG Jing, CHEN Wen*
(College of Applied Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Abstract: Objective: To study the effect of taurine on total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and cholesterol ester (EC) levels as well as the protein expression of the rate-limiting enzyme CYP7A1 involved in cholesterol metabolism in HepG2 cells. Methods: The levels of intracellular TC, FC and EC were determined after the cells were cultured for 24 and 48 h in DMEM supplemented with taurine at final concentrations of 0.1, 1, 10 and 20 mmol/L, respectively. The protein expression of CYP7A1 was detected after the cells were cultured for 12, 24, 48 and 72 h in DMEM with 20 mmol/L taurine. Results: The levels of intracellular TC and FC declined obviously after culture in the presence of 1,10 and 20 mmol/L taurine, suggesting a positive dose-effect relationship, but EC levels did not continue to decrease when the taurine concentration exceeded 1 mmol/L. A more pronounced decrease in intracellular TC and FC was observed when the culture time was prolonged from 24 to 48 h. Intracellular FC was reduced to a greater extent by 20 mmol/L taurine than intracellular EC. The highest protein expression of CYP7A1 was noted after 24 h culture. Conclusion: Taurine can enhance CYP7A1 expression and promote intracellular cholesterol metabolism, and the decrease of cholesterol is associated with taurine concentration and action duration, showing a superior effect at 48 h than at 24 h, and its main benefit is reducing intracellular FC.

Key words: taurine; cholesterol; cholesterol 7α-hydroxylase (CYP7A1); HepG2 cells
中图分类号：TS201.4 文献标志码：A 文章编号：1002-6630（2014）23-0284-04
doi:10.7506/spkx1002-6630-201423055

牛磺酸富含于海产品中，是一种结构简单的小分子含硫氨基酸。它主要以游离形式存在于哺乳动物的心脏、肝脏、视网膜等组织器官中，是蛋氨酸、半胱氨酸的代谢产物[1]。多年来，许多动物实验已证明牛磺酸可以显著降低饮食性高脂血症大鼠、小鼠、豚鼠血清和肝脏的总胆固醇含量[2-6]，临床实验也显示牛磺酸能有效降低志愿者的血清总胆固醇含量与动脉粥样硬化指数，从而降低心脑血管疾病的发病风险[7-8]。

虽然牛磺酸降胆固醇的体外研究报道不多，但有研究[9-11]显示牛磺酸能够增加人肝癌细胞HepG2和鼠肝

收稿日期：2014-06-27
基金项目：北京市自然科学基金项目（5142004）；北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室开放课题（Zk70201404）
作者简介：张珊（1990—），女，硕士研究生，研究方向为食品营养与功能。E-mail：zhang.shan12@163.com
*通信作者：陈文（1966—），女，教授，博士，研究方向为食品营养与功能。E-mail：wlchenwen@buu.edu.cn

癌细胞H4IIE的胆固醇降解限速酶——胆固醇7α-羟化酶（cholesterol 7α-hydroxylase，CYP7A1）mRNA水平，并降低HepG2细胞内总胆固醇的含量。因此，本实验拟以HepG2细胞为研究对象，探讨牛磺酸对细胞内总胆固醇（total cholesterol，TC）、游离胆固醇（free cholesterol，FC）、胆固醇酯（cholesterol ester，EC）水平及CYP7A1蛋白表达的影响，以期为牛磺酸降胆固醇作用及其分子机制的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HepG2细胞 中国协和医科大学基础医学研究所细胞中心；DMEM培养基 美国HyClone公司；胎牛血清 美国Gibco公司；胆固醇（纯度≥99%）、牛磺酸（纯度＞99%）、胆固醇氧化酶、辣根过氧化物酶、胆固醇酯水解酶、水合牛胆酸钠、苯酚、4-氨基安替比林 美国Sigma公司；CYP7A1一抗（兔抗人H-58：sc-25536）、CYP7A1二抗（山羊抗兔IgG-HRP：sc-2004） 美国Santa Cruz公司；β-actin一抗（兔抗人） 美国GenView公司；二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）试剂盒 北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

uQuant Bio-Tek酶标仪 美国Bio-Tek公司；电泳仪、转膜仪 美国Bio-Rad公司；凝胶成像系统 美国通用公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及处理

HepG2细胞复苏后，培养于含胎牛血清（体积分数10%）的DMEM培养基中，37 ℃、5% CO_2恒温培养，以1×10^5～2×10^5个/孔接种于6 孔板中。预实验结果显示，当牛磺酸终浓度达到20 mmol/L时，细胞的存活率约为88%，终浓度达到30 mmol/L时，细胞的存活率不到70%，故本实验中将牛磺酸的最大浓度设为20 mmol/L，即分别在培养基中添加终浓度为0.1、1、10、20 mmol/L的牛磺酸，并同时设置对照组，孵育24 h或48 h。

1.3.2 细胞内胆固醇水平测定[12-13]

用磷酸盐缓冲液冲洗细胞2 次，每孔细胞加入1 mL正己烷-异丙醇（2∶1，*V*/*V*），室温下慢摇，以提取细胞内脂类物质。4 ℃、10 000 r/min离心10 min，取上清液，通氮气40 min除去有机溶剂，以含TritonX-100（体积分数10%）的异丙醇130 μL振荡溶解上述脂类提取物。

按照表1配制TC、FC测定工作液。取50 μL脂类提取物，分别加入TC和FC测定工作液，37 ℃水浴30 min，用酶标仪于500 nm波长处测定吸光度。

表1 胆固醇测定工作液配制成分

Table 1 Preparation of working solutions for cholesterol detection

试剂	TC测定工作液/μL	FC测定工作液/μL
磷酸氢二钾缓冲液（0.1 mol/L）	192	198
胆固醇氧化酶（5 U/mL）	6	6
辣根过氧化物酶（50 U/mL）	6	6
水合牛胆酸钠（20 mmol/L）	15	15
TritonX-100（1%）	15	15
4-氨基安替比林（5.5 mmol/L）	45	45
苯酚（280 mmol/L）	15	15
胆固醇酯水解酶（25 U/mL）	6	0
总体积	300	300

1.3.3 细胞内蛋白质含量测定

细胞完成脂类物质提取后，加入裂解液冰上提取细胞内蛋白质，4 ℃、10 000 r/min离心10 min。取上清液即为测试样品，并以BCA试剂盒测定蛋白质含量。

胆固醇含量以胆固醇与蛋白质的比值（μg/mg pro）表示；胆固醇酯（EC）＝TC－FC。

1.3.4 Western blotting法测定CYP7A1蛋白表达

用裂解液裂解细胞并收集蛋白质，BCA试剂盒测定蛋白质含量。聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、脱脂奶粉封闭1 h，分别与CYP7A1抗体和内参β-actin抗体4 ℃孵育过夜。TBST缓冲液漂洗3 次后加入二抗，室温孵育2 h。以ECL高效化学发光试剂曝光成像并经ECL凝胶成像系统扫描。系统分析结果，分别计算各组CYP7A1与β-actin的灰度比值，代表每组CYP7A1的蛋白表达水平。

1.4 数据处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，经SPSS统计软件进行ANOVA方差分析。

2 结果与分析

2.1 牛磺酸对细胞胆固醇水平的影响

表2 不同浓度牛磺酸作用24 h对HepG2细胞TC、FC及EC水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 2 Effect of taurine concentration on intracellular TC, FC and EC levels after 24 h culture ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

μg/mg pro

组别	对照组	牛磺酸添加量/（mmol/L）			
		0.1	1	10	20
TC含量	232.1±11.9	231.8±11.9	216.7±9.7*	207.4±8.2*	195.9±9.1*
FC含量	161.9±10.8	162.2±10.4	152.6±9.2	143.9±8.1*	133.7±9.6*
EC含量	70.2±4.8	69.6±3.3	64.0±5.9*	63.6±3.5*	62.1±3.5*

注：*. 与对照组相比显著差异（$P<0.05$）。下同。

由表2可知，培养24 h后，0.1 mmol/L牛磺酸对HepG2细胞的TC、FC及EC水平无影响。当牛磺酸浓度为1、10、20 mmol/L时，细胞TC水平均显著低于对照组（$P<0.05$），下降幅度分别为6.7%、10.7%、15.6%，EC水平也显著低于对照组（$P<0.05$），分别降低了8.8%、9.4%、11.5%。FC水平则下降了6.0%、11.2%（$P<0.05$）、17.4%（$P<0.05$）。由以上结果可知，

细胞TC、FC水平的降低与牛磺酸浓度呈依赖关系，以牛磺酸浓度为20 mmol/L时胆固醇水平下降最多，EC水平则在牛磺酸达到1 mmol/L后不再随牛磺酸浓度的增加而进一步降低。

表3 不同浓度牛磺酸作用48 h对HepG2细胞TC、FC及EC水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Table 3 Effect of taurine concentration on intracellular TC, FC and EC levels after 48 h culture ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

μg/mg pro

组别	对照组	牛磺酸添加量/（mmol/L）			
		0.1	1	10	20
TC含量	236.6±4.2	227.3±4.5*	204.2±5.6*	184.0±5.7*	172.4±7.0*
FC含量	170.7±7.4	163.4±4.6	151.3±8.9*	131.3±5.6*	111.6±6.9*
EC含量	65.9±6.8	64.0±5.1	52.9±7.9*	52.7±9.9*	60.8±7.9

由表3可知，添加不同浓度的牛磺酸作用48 h后，HepG2细胞TC、FC、EC水平均有不同程度的降低。牛磺酸浓度为0.1 mmol/L时，细胞TC水平减少了3.9%（P<0.05）。当牛磺酸浓度为1、10、20 mmol/L时，细胞TC水平均显著低于对照组（P<0.05），下降幅度分别为13.7%、22.2%、27.1%，FC水平也显著低于对照组（P<0.05），下降幅度分别为11.39%、23.11%、34.62%，EC水平则分别减少了20.0%（P<0.05）、20.0%（P<0.05）、8.0%。由以上结果可以看出，细胞TC、FC水平的降低与牛磺酸浓度呈正比，以牛磺酸浓度为20 mmol/L时胆固醇水平下降最多，但EC水平则在牛磺酸达到1 mmol/L后不再随牛磺酸浓度的增加而进一步降低。

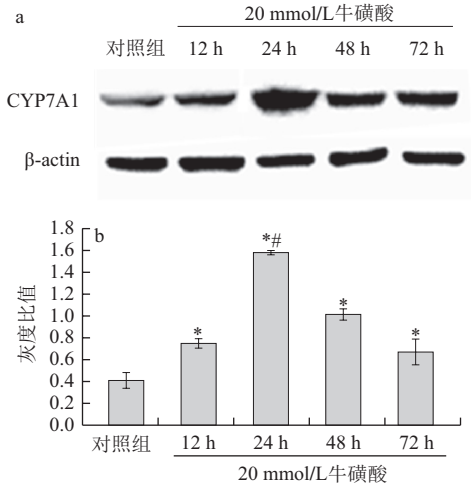
2.2 培养时间对细胞CYP7A1蛋白表达的影响

表4 不同培养时间对CYP7A1蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 4 Effect of culture time on the protein expression of CYP7A1 ($\bar{x}\pm s$, n = 3)

组别	对照组	20 mmol/L牛磺酸			
		12 h	24 h	48 h	72 h
灰度比值	0.41±0.07	0.74±0.05*	1.58±0.02*#	1.01±0.05*	0.68±0.10*

注：#. 与12、48、72 h组相比差异显著（P < 0.05）。下同。



a. Western blotting结果；b.蛋白灰度比值分析。

图1 不同培养时间对CYP7A1蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of culture time on the protein expression of CYP7A1

由2.1节结果可知，培养24、48 h，都是20 mmol/L外源性牛磺酸可最大程度降低细胞中胆固醇的水平。因此选择20 mmol/L牛磺酸探讨其对CYP7A1蛋白表达的影响。由表4、图1可知，添加20 mmol/L牛磺酸分别作用12、24、48、72 h，CYP7A1的蛋白表达均较对照组显著增强（P<0.05），其中以作用24 h时效果最为明显。

3 讨 论

机体维持胆固醇平衡的3 条途径分别是合成、降解、排出体外。胆固醇7α-羟化酶（CYP7A1）是胆固醇降解限速酶，是胆固醇降解为胆汁酸的关键酶，在胆固醇的代谢过程中起重要作用。

降低血清胆固醇是牛磺酸的重要生理功能之一。Yokogoshi等[14]研究结果显示，饲料中添加5%的牛磺酸可使高脂膳食诱导的高胆固醇血症大鼠肝脏CYP7A1 mRNA水平增加95%，并显著降低血清TC水平。Murakami等[15]研究证实，对于高脂膳食诱导的高胆固醇血症小鼠，长期给予牛磺酸可以促进胆固醇的降解，牛磺酸显著提高了小鼠胆汁中牛磺胆酸的比例，增加了粪便中胆汁酸的排出。到目前为止，多个研究小组已通过大鼠、小鼠、豚鼠等动物实验证明牛磺酸可以有效降低血清和肝脏中的胆固醇含量，提高肝脏CYP7A1的活性，并促进粪便中胆汁酸的排出，从而起到降低胆固醇和抗动脉粥样硬化的作用[6,16-17]。

关于牛磺酸对胆固醇代谢的影响大多是在整体动物水平上进行研究的，体外研究报道不多。HepG2细胞保留了正常人体肝细胞的多种生理特性[18-20]，因此牛磺酸降胆固醇作用的体外研究多以HepG2细胞为模型。Yanagita等[10]研究指出，在DMEM培养基中添加10^{-3} mol/L牛磺酸，培养24 h后HepG2细胞内胆固醇水平下降约19%，胆固醇酯的合成受到抑制。Lam等[9]研究表明，无论细胞是否在高胆固醇条件下培养，牛磺酸都会显著提高HepG2细胞CYP7A1 mRNA水平，促进胆固醇的降解。而Hoang等[11]曾用大鼠肝癌细胞H4IIE探讨了牛磺酸对胆固醇代谢的影响，结果显示在MEM培养基中添加10^{-4} mol/L牛磺酸，H4IIE细胞的CYP7A1 mRNA水平增加了3 倍之多，也表明牛磺酸通过提高CYP7A1表达而促进胆固醇降解。

细胞内胆固醇以游离和酯化两种形式存在，但是到目前为止，未见有在细胞水平系统研究牛磺酸对细胞内TC、FC、EC水平及CYP7A1表达影响的报道。因此，本实验以HepG2细胞为对象，探讨了牛磺酸对细胞内TC、FC、EC水平及CYP7A1蛋白表达水平的影响。结果显示，细胞内的TC由2/3的FC和1/3的EC组成，1、10、20 mmol/L的牛磺酸均可使HepG2细胞TC、FC水平明显下降，且与牛磺酸浓度呈正比；从培养时间上看，添加

牛磺酸对细胞培养48 h，TC、FC的降低幅度远远大于培养24 h，表明培养48 h作用时间充分，牛磺酸的降胆固醇效果更好；但无论培养24 h还是48 h，细胞EC水平则在牛磺酸达到1 mmol/L后就不再随牛磺酸浓度的增加而进一步降低；当牛磺酸浓度为20 mmol/L时，无论培养24 h还是48 h，细胞FC水平的降低都远远大于EC，表明牛磺酸降胆固醇作用主要是通过降低细胞内FC水平而实现的。以上结果提示，牛磺酸可以促进HepG2细胞胆固醇水平下降，且降低程度与外源性牛磺酸浓度及作用时间相关，在一定范围内，胆固醇水平的降低程度与牛磺酸浓度呈正比，作用48 h的效果明显优于24 h，且牛磺酸降胆固醇作用主要是降低了细胞内FC的水平。

依据20 mmol/L外源性牛磺酸可最大程度降低细胞中胆固醇水平的结果，选定20 mmol/L牛磺酸，采用Western blotting方法测定了其对CYP7A1蛋白表达的影响。结果显示，添加20 mmol/L牛磺酸培养24 h时，细胞CYP7A1的表达最强，这与Lam等[9]的研究结果基本一致。结合以上结果，牛磺酸作用48 h的降胆固醇作用要明显强于作用24 h，这可能是由于CYP7A1蛋白在合成后需经过后加工成为成熟的蛋白质以及其充分发挥降胆固醇作用都需要一定的时间才能完成所致。因此，虽然牛磺酸作用24 h使细胞内CYP7A1蛋白表达最强，但其降胆固醇作用在48 h时才能更好显现。

综上所述，牛磺酸可以增强HepG2细胞中CYP7A1蛋白的表达，20 mmol/L牛磺酸作用24 h时其表达最强；CYP7A1的表达促进了细胞内胆固醇的代谢，胆固醇降低程度与牛磺酸浓度及作用时间相关，作用48 h的效果明显优于24 h，且牛磺酸降胆固醇作用主要体现为降低了细胞内FC的水平。

参考文献：

[1] HUXTABLE R J. Physiological actions of taurine[J]. Physiological Reviews, 1992, 72(1): 101-163.

[2] CHEN Wen, GUO Junxia, CHANG Ping. The effect of taurine on cholesterol metabolism[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2012, 56(5): 681-690.

[3] SUGIYAMA K, OHISHI A, OHNUMA Y, et al. Comparison between the plasma cholesterol-lowering effects of glycine and taurine in rats fed on high cholesterol diets[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(6): 1647-1652.

[4] CHEN Wen, MATUDA K, NISHIMURA N, et al. The effect of taurine on cholesterol degradation in mice fed a high-cholesterol diet[J]. Life Sciences, 2004, 74(15): 1889-1898.

[5] MURAKAMI S, KONDO Y, TOMISAWA K, et al. Prevention of atherosclerotic lesion development in mice by taurine[J]. Drugs under Experimental and Clinical Research, 1999, 25(5): 227-234.

[6] KIBE A, WAKE C, KURAMOTO T, et al. Effect of dietary taurine on bile acid metabolism in guinea pigs[J]. Lipids, 1980, 15(4): 224-229.

[7] MURAKAMI S. Taurine and atherosclerosis[J]. Amino Acids, 2014, 46(1): 73-80.

[8] YAMORI Y, TAGUCHI T, HAMADA A, et al. Taurine in health and diseases: consistent evidence from experimental and epidemiological studies[J]. Journal of Biomedical Science, 2010, 17(Suppl 1): S6. doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S6.

[9] LAM N V, CHEN W, SURUGA K, et al. Enhancing effect of taurine on CYP7A1 mRNA expression in HepG2 cells[J]. Amino Acids, 2006, 30(1): 43-48.

[10] YANAGITA T, HAN S Y, HU Y, et al. Taurine reduces the secretion of apolipoprotein B100 and lipids in HepG2 cells[J]. Lipids in Health and Disease, 2008, 7: 38. doi: 10.1186/1476-511X-7-38.

[11] HOANG M H, JIA Y, JUN H, et al. Taurine is a liver X receptor-α ligand and activates transcription of key genes in the reverse cholesterol transport without inducing hepatic lipogenesis[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2012, 56(6): 900-911.

[12] SALE F O, MARCHESINI S, FISHMAN P H, et al. A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts[J]. Analytical Biochemistry, 1984, 142(2): 347-350.

[13] 陈昱杨. 炎症干扰细胞内胆固醇外排导致肝脏脂质异常积聚的分子机制[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.

[14] YOKOGOSHI H, MOCHIZUKI H, NANAMI K, et al. Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet[J]. The Journal of Nutrition, 1999, 129(9): 1705-1712.

[15] MURAKAMI S, KONDO Y, NAGATE T. Effects of long-term treatment with taurine in mice fed a high-fat diet: improvement in cholesterol metabolism and vascular lipid accumulation by taurine[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2000, 483: 177-186.

[16] NISHIMURA N, UMEDA C, ONA H, et al. The effect of taurine on plasma cholesterol concentration in genetic type 2 diabetic GK rats[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2002, 48(6): 483-490.

[17] CHEN Wen, SURUGA K, NISHIMURA N, et al. Comparative regulation of major enzymes in the bile acid biosynthesis pathway by cholesterol, cholate and taurine in mice and rats[J]. Life Sciences, 2005, 77(7): 746-757.

[18] DASHTI N. The effect of low density lipoproteins, cholesterol, and 25-hydroxycholesterol on apolipoprotein B gene expression in HepG2 cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(10): 7160-7169.

[19] YANAGITA T, YAMAMOTO K, ISHIDA S, et al. Effects of simvastatin, a cholesterol synthesis inhibitor, on phosphatidylcholine synthesis in HepG2 cells[J]. Clinical Therapeutics, 1994, 16(2): 200-208.

[20] AZUMA Y, KAWASAKI T, OHNO K, et al. Effects of NTE-122, a novel acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor, on cholesterol esterifications of apolipoprotein B-containing lipoprotein and bile acids in HepG2[J]. The Japanese Journal of Pharmacology, 1999, 79(2): 151-158.