



黄连素对高脂诱导的斑马鱼肝脏细胞脂质代谢的影响

刘瑾, 张美娟, 于成兵, 杨烁烁, 张京, 徐建雄, 徐维娜*

(上海交通大学农业与生物学院, 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

摘要: 为研究黄连素对高脂诱导的斑马鱼肝脏细胞脂质代谢组学的影响, 实验以斑马鱼细胞为材料, 通过棕榈酸钠 (0.25 mmol/L, 24 h) 诱导肝脏细胞脂质沉积模型, 经黄连素 (25 μ mol/L, 6 h) 处理后收集细胞。采用高效液相色谱-质谱联用技术进行脂质代谢组学分析, 对不同处理的斑马鱼肝脏细胞的脂质代谢物进行筛选、鉴定, 并对脂代谢相关因子的基因表达进行检测。结果显示, 与对照组相比, 高脂组共筛选出 1 761 个差异离子, 其中鉴定出 147 种差异表达的代谢产物基因, 123 个表达升高、24 个降低; 高脂+黄连素组共筛选出 2 728 个差异离子, 其中鉴定出 346 种差异表达的代谢产物, 139 个升高、207 个降低。与高脂组相比, 高脂+黄连素组共筛选出 1 605 个差异离子, 其中鉴定出 259 种差异表达的代谢产物, 45 个升高、204 个降低。进一步对不饱和脂肪酸代谢通路研究发现, 差异代谢产物二高- γ -亚麻酸 (DGLA) 和二高- α -亚麻酸 (ETA) 含量在高脂组中显著上升, 而添加了黄连素后含量显著下降; 与对照相比, 高脂+黄连素组的 DGLA 和 ETA 含量并无显著差异。通过检测 DGLA 和 ETA 分解相关酶的基因 (*atgl*、*hsl*) 表达量发现, 与对照组相比, 高脂组二者均显著降低, 添加了黄连素后均显著升高; 检测合成相关酶基因 (*acc*、*elovl6*、*elovl7a*、*scdb*、*fas* 和 *fads2*) 的表达量发现, 与对照组相比, 高脂组细胞内 *acc*、*elovl6* 和 *scdb* 的表达量显著升高, *fads2* 表达量显著降低, 而添加了黄连素后细胞内 *fads2* 的表达量显著升高, *fas*、*elovl6* 和 *scdb* 表达量显著降低。综上所述, 高脂诱导通过抑制脂质分解相关基因表达, 促进脂质合成相关基因的表达, 进而引起脂肪在细胞中的过度沉积, 而添加适量黄连素可以显著改善这一现象。

关键词: 斑马鱼; 肝脏细胞; 高脂; 黄连素; 脂质代谢组学

中图分类号: Q 786; S 963.73

文献标志码: A

鱼类脂肪过度沉积是人工养殖鱼类中十分常见的现象。高脂日粮的广泛应用是造成这一后果的重要原因。长期和过量使用高脂日粮常常会导致脂肪在鱼体脏器或组织中出现过度沉积, 尤其是肝脏^[1], 产生脂毒性、引发脂肪肝^[2]。

肝脏是鱼体中脂肪合成的主要场所, 其中 90% 的脂肪都是在肝脏中合成。肝脏中脂肪过度沉积会对鱼体的健康产生负面影响^[3]。在哺乳动

物中, 学者们通过构建细胞培养系统建立了由游离脂肪酸诱导的脂肪肝模型^[4]。在鱼类研究中, 通过建立游离脂肪酸诱导的肝细胞脂肪沉积模型或肝损伤模型, 来研究脂代谢的作用机制^[5]。如周文豪等^[6-7]用油酸诱导建立的团头鲂及花鲈的肝细胞脂肪沉积模型。

中草药是当前抗免疫应激剂的研究重点。黄连素 (berberine) 是从中药黄连 (*Coptis chinensis*) 中

收稿日期: 2020-12-25 修回日期: 2021-02-13

资助项目: 国家自然科学基金 (31472292)

第一作者: 刘瑾, 从事动物营养学研究, E-mail: sherlocked@sjtu.edu.cn

通信作者: 徐维娜 (照片), 从事水产动物营养学研究, E-mail: xuweina@sjtu.edu.cn



分离出的一种季铵生物碱,具有护肝、抗氧化、抗炎、低血糖和降脂的作用^[8-9]。可以有效减轻脂肪沉积引起的肝脏损害^[10]。研究表明,黄连素通过激活与脂肪酸分解相关基因来抑制脂肪酸合成基因,从而可以缓解脂肪肝的病症。在高脂日粮中添加黄连素可以改善脂肪沉积和代谢紊乱的情况^[11]。本实验室前期研究发现,黄连素作为一种功能性饲料添加剂可以显著抑制氧化应激的过程、降低细胞凋亡并且增强高脂日粮饲喂的鱼体的免疫力^[12]。

在前期研究的基础上,本实验以斑马鱼(*Danio rerio*)肝脏细胞为体外实验研究对象,应用棕榈酸钠为高脂模型诱导剂,通过细胞代谢组学分析黄连素对高脂诱导的斑马鱼肝脏细胞脂代谢产生的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

DMEM-F12培养基、DMEM培养基、L-15培养基、胎牛血清(Gibco);青链霉素、鼠上皮生长因子、胰岛素、DPBS和0.25%胰蛋白酶购自赛默飞世尔科技有限公司;总RNA提取试剂盒购自OMEGA公司;反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

高速冷冻离心机(5804 R, Eppendorf, 德国);实时荧光定量PCR仪(StepOnePlusTM, 美国应用生物系统公司);多功能酶标仪(SYNERGY 2, 美国BioTek公司)等。

1.2 棕榈酸钠(SP)诱导斑马鱼肝脏细胞脂质沉积

斑马鱼肝脏细胞CRL-2643购自美国模式培养物收集中心(American Tissue Culture Collection, ATCC)。用含5%胎牛血清、1%青链霉素、50 ng/mL鼠上皮生长因子及1%胰岛素的混合培养基(50% L-15、30% DMEM/F12及20% DMEM)于28 °C, 5% CO₂条件下培养至70%~80%融合后,用含SP浓度为0.10、0.20、0.25、0.50和0.75 mmol/L的培养液培养24 h。使用细胞油红O染色并观察细胞着色情况,并测定细胞活性、细胞内的甘油三酯(TG)含量。

1.3 黄连素处理

根据“棕榈酸钠诱导斑马鱼肝脏细胞脂质沉积”部分结果建立的脂质沉积模型,用相应浓度SP处理24 h后,更换含不同浓度(0、2.5、5.0、10.0、25.0和50.0 μmol/L)的黄连素工作液(0.1%

DMSO)处理6 h后,测定细胞活性和细胞内TG水平。另处理细胞,对细胞进行细胞油红O染色。

1.4 细胞脂质代谢组学分析

另培养斑马鱼肝脏细胞,分别设对照组(control)、棕榈酸钠诱导的脂质沉积模型组(SP)、棕榈酸钠+黄连素处理组(SP+BBR),黄连素处理浓度根据“黄连素处理”部分结果确定。具体操作:正常培养肝脏细胞,待细胞70%融合后,各组分别更换细胞工作液,对照组为正常细胞工作液,SP组和SP+BBR组均更换为0.25 mmol/L的棕榈酸钠工作液。继续培养细胞24 h后,更换细胞工作液,对照组和SP组为正常细胞工作液,SP+BBR组更换为25.0 μmol/L的黄连素工作液。处理细胞6 h后收集细胞。每组设置6个重复($n=6$)分别进行脂质组学分析和细胞内脂质代谢关键因子水平测定。

液相色谱及质谱仪检测 色谱参数采用100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm进行分离。色谱柱柱温为55 °C,流速为0.4 mL/min,其中A流动相为乙腈(CAN):H₂O=60:40(体积比),0.1%甲酸(FA)和10 mmol/L甲酸氨,B流动相为异丙醇(IPA):CAN=90:10(体积比),0.1%FA和10 mmol/L甲酸氨。对代谢物采用以下梯度进行洗脱:0~2 min,40%~43%流动相B;2.0~2.1 min,43%~50%流动相B;2.1~7.0 min,50%~54%流动相B;7.0~7.1 min,54%~70%流动相B;7.1~13 min,70%~99%流动相B;13.0~13.1 min,39%~40%流动相B;13.1~15.0 min,40%流动相B。每个样本的上样体积为5 μL。

质谱参数 对从色谱柱上洗脱下来的小分子,利用高分辨串联质谱Xevo G2-XS QTOF(Waters, 英国)分别进行正、负离子模式采集。正离子模式下,毛细管电压和锥孔电压分别为3 kV和40 V;负离子模式下,毛细管电压及锥孔电压分别为2 kV和40 V。采用MSE模式进行centroid数据采集,一级扫描范围正离子模式为100~2 000 Da,负离子模式为50~2 000 Da,扫描时间为0.2 s,对所有母离子按照19~45 eV的能量进行碎裂,采集所有的碎片信息,扫描时间为0.2 s。在数据采集过程中,每3 s对LE信号进行实时质量校正。同时,每隔10个样本进行1次混合后质控样本的采集,用于评估在样本采集过程中仪器状态的稳定性。

1.5 脂代谢相关基因mRNA表达量检测

按照Total-RNA试剂盒(Omega)说明书提取

细胞中的总 RNA, 按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书进行反转录, 采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术检测细胞中脂代谢相关基因 (*atgl*、*hsl*、*fas*、*acc*、*elov6*、*elov7a*、*fads2* 和 *scdb*) 的表达量。实验所需引物由 Primer premier 5.0 软件设计, 待测基因的引物序列详见表 1, 并由英潍捷基 (上海)

贸易有限公司合成。在冰上配制反应液, 充分混匀, 将配置好的混合液, 分装至各反应管中, 每管 18 μ L。加入样品 cDNA 后充分离心, 进行扩增反应。具体反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环及 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算样品待测基因的相对表达量。

表 1 目的基因引物序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of primers of target genes

目的基因 target genes	登录号 accession no.	上游引物(5'-3') forward primers	下游引物(5'-3') reverse primers
<i>atgl</i>	XM_003201386	GCGTGACGGATGGAGAAA	AGGCCACAGTAAACAGGAATAT
<i>hsl</i>	XM_003200544	CGGCAAGGACAGGACAGT	GCATGGAGAAAGAGGAGCT
<i>fas</i>	NM_009306806.1	GGAGCAGGCTGCCTCTGTGC	TTGCGGCCTGTCCCCTCTCT
<i>acc</i>	NM_001271308.1	GCGTGCCGAACAATGGCAG	GCAGGTCCAGCTTCCCTGCG
<i>elov6</i>	GeneID:317738	CAATGAAGATGAGGCGAT	CACTGTGATGTGATGATACCA
<i>elov7</i>	NC_007119.7	AAGAGCAGTCAGGTGTCGTT	CGTGTGTATGCGTGGTAGTA
<i>fads2</i>	NM_131645.2	CAGCATCACGCTAAACCCAAC	AGGGGAGGACCAATGAAGAAG
<i>scdb</i>	NM_001020705.1	AGTTTTCTGAGACGGATGC	GATGTTGTGGTCGTAGGGT
β -actin	AY222742	TCTGGTGTGGTGTGACCCA	GGTGAAGCTGTAGCCACGCT

1.6 数据统计与分析

代谢组学数据统计 采用多变量 PLS-DA 模型前 2 个主成分的 VIP 值, 结合单变量分析差异倍数 (Fold-Change) 和 q -value 值来筛选差异表达的代谢物。筛选条件: ① VIP ≥ 1 ; ② Fold-Change ≥ 1.2 或者 ≤ 0.8333 ; ③ q -value < 0.05 , 三者取交集, 得到共有的离子即差异离子。代谢通路分析基于 KEGG 数据库。

脂代谢相关基因 mRNA 表达量 采用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 当数据符合正态分布且方差齐次时, 采用 Duncan 检验; 当方差不齐次时, 采用 Mann-Whitney U 检验。数据以平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示, $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 棕榈酸钠诱导斑马鱼肝脏细胞脂质沉积

细胞活性 与对照组相比, 随着棕榈酸钠浓度增加, 细胞活性逐渐下降, 呈剂量效应。当棕榈酸钠浓度为 0.25 mmol/L 时, 细胞活性显著降低 ($P < 0.05$), 约为 50%; 当棕榈酸钠浓度为 0.50 mmol/L 或 0.75 mmol/L 时, 细胞活性低于 50% (图 1)。

甘油三酯含量 细胞内油红 O 染色结果显示,

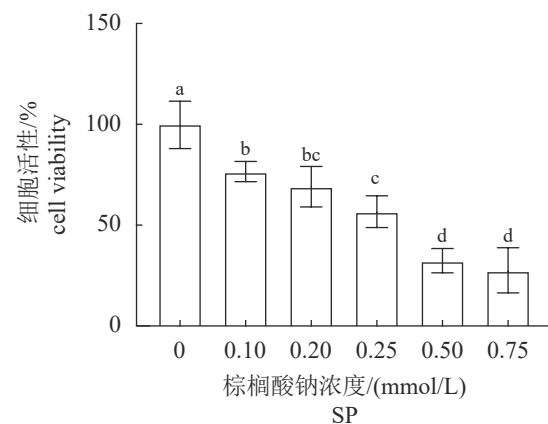


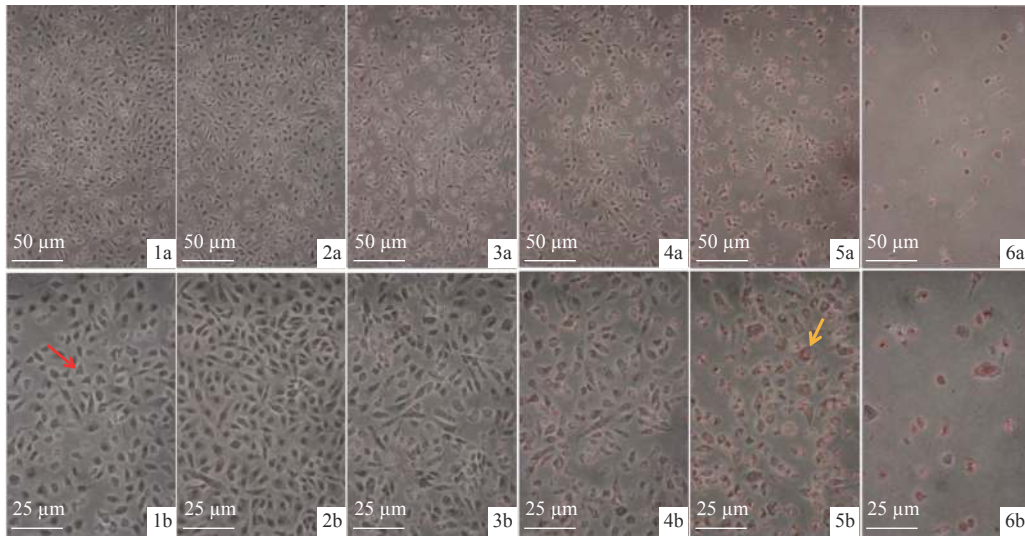
图 1 不同浓度棕榈酸钠对斑马鱼肝脏细胞活性的影响

标注不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同

Fig. 1 Effects of different concentrations of sodium palmitate on *D. rerio* liver cell viability

Different letters showed significant differences ($P < 0.05$); the same below

与对照组相比, 当棕榈酸钠浓度为 0.10 mmol/L 时, 斑马鱼肝脏细胞内无明显的脂质出现; 当棕榈酸钠浓度大于等于 0.20 mmol/L 时, 斑马鱼肝脏细胞内出现不同程度的脂质被染成橘红色 (图版 I)。细胞内 TG 含量测定结果显示, 当棕榈酸钠浓度为 0.25 mmol/L 时, 细胞内 TG 含量较对照组显著升高 ($P < 0.05$)。随着棕榈酸浓度继续增加, 细胞内 TG 含量亦继续增加 (图 2)。



图版 I 不同浓度棕榈酸钠对斑马鱼肝脏细胞中脂肪沉积的影响

1a 1b、2a 2b、3a 3b、4a 4b、5a 5b、6a 6b 的棕榈酸钠浓度分别为 0、0.10、0.20、0.25、0.50 和 0.75 mmol/L；红色箭头为斑马鱼肝脏细胞，黄色箭头为被油红 O 染色的脂滴；a 和 b 分别表示不同放大倍数，下同

Plate I Effects of different concentrations of sodium palmitate on *D. rerio* liver cell lipid accumulation

The sodium palmitate concentrations of 1a 1b, 2a 2b, 3a 3b, 4a 4b, 5a 5b, and 6a 6b are 0, 0.10, 0.20, 0.25, 0.50 and 0.75 mmol/L; the red arrows are *D. rerio* liver cells, and the yellow arrows are lipid droplets stained with oil red O; a and b represent different magnification, respectively, the same below

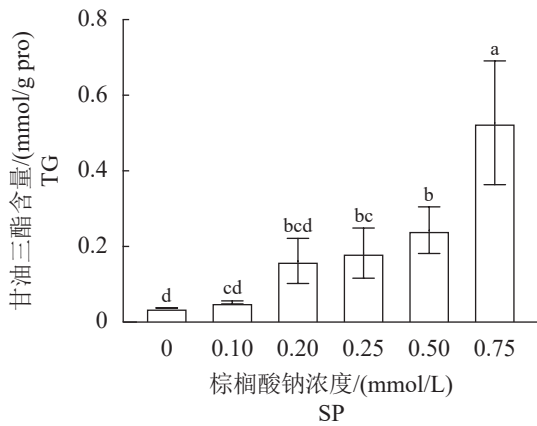


图 2 不同浓度棕榈酸钠对斑马鱼肝脏细胞中 TG 含量的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of sodium palmitate on *D. rerio* liver intracellular TG content

综合细胞活性及细胞内脂肪沉积情况，0.25 mmol/L SP 处理细胞 24 h 可建立稳定的肝脏细胞脂肪过度沉积模型。

2.2 黄连素处理对细胞活性和甘油三酯的影响

细胞活性 按照前述脂肪沉积(高脂)模型的方式处理细胞 24 h 后，分别再添加 10、25 和 50 μmol/L 的黄连素溶液处理细胞 6 h，结果显示，与高脂组相比，添加适量黄连素(25 μmol/L)对细

胞活性有显著升高的趋势 ($P<0.05$)(图 3)。

甘油三酯含量 细胞内油红 O 染色结果显示，与对照组相比，高脂组的肝细胞被油红 O 溶液明显染色。与高脂组相比，高脂+黄连素组的肝细胞染色较轻(图版 II)。同时，通过 TG 测定试剂盒定量测定细胞内 TG 含量。与对照组相比，高脂组和高脂+黄连素组的细胞内 TG 含量显著增加 ($P<0.05$)，而黄连素组的 TG 含量显著降低 ($P<$

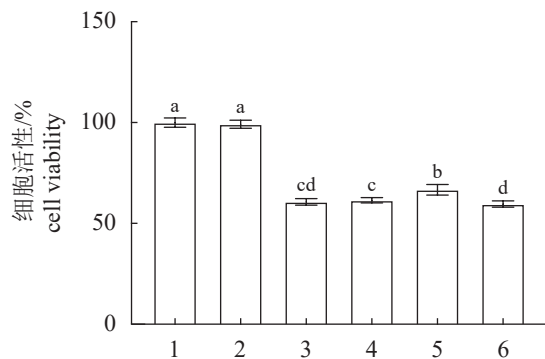
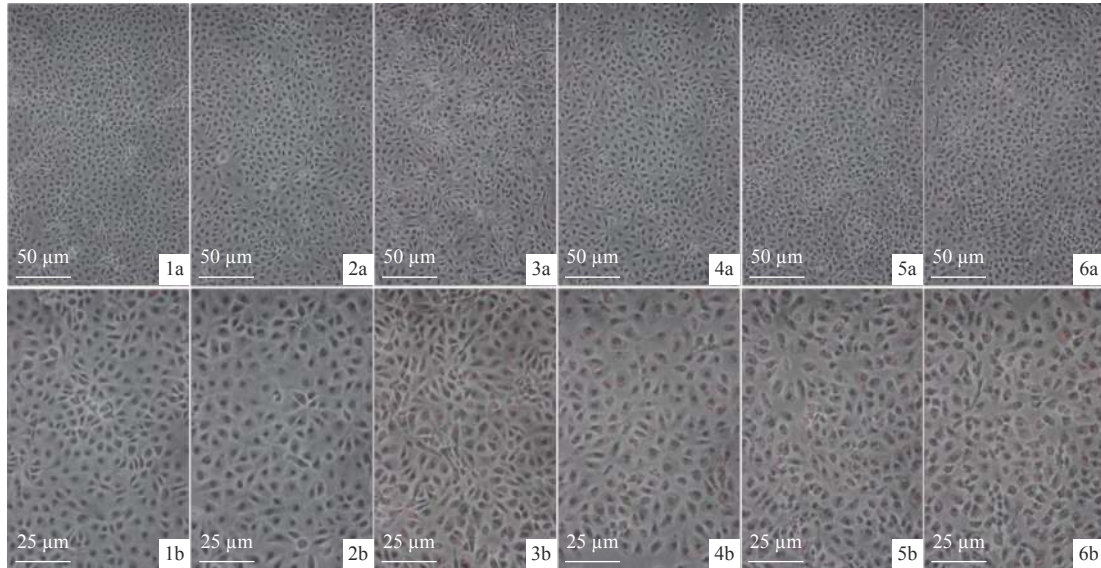


图 3 不同浓度黄连素对高脂处理斑马鱼肝脏细胞活性的影响

1. 对照组，2. DMSO 组，3. SP 组，4. SP+10 μmol/L BBR 组，5. SP+25 μmol/L BBR 组，6. SP+50 μmol/L BBR 组

Fig. 3 Effects of berberine on viability of *D. rerio* liver cell induced by sodium palmitate

1. control group, 2. DMSO group, 3. SP group, 4. SP+10 μmol/L BBR group, 5. SP+25 μmol/L BBR group, 6. SP+50 μmol/L BBR group



图版 II 不同浓度黄连素对高脂斑马鱼肝脏细胞中脂肪沉积的影响

1. 对照组, 2. DMSO 组, 3. SP 组, 4. SP+10 μmol/L BBR 组, 5. SP+25 μmol/L BBR 组, 6. SP+50 μmol/L BBR 组

Plate II Effects of berberine on TG content of CRL-2643 induced by sodium palmitate

1. control group, 2. DMSO group, 3. SP group, 4. SP+10 μmol/L BBR group, 5. SP+25 μmol/L BBR group, 6. the SP+50 μmol/L BBR group

0.05)。与高脂组相比, 高脂+黄连素组细胞内 TG 含量明显降低 ($P<0.05$)(图 4)。

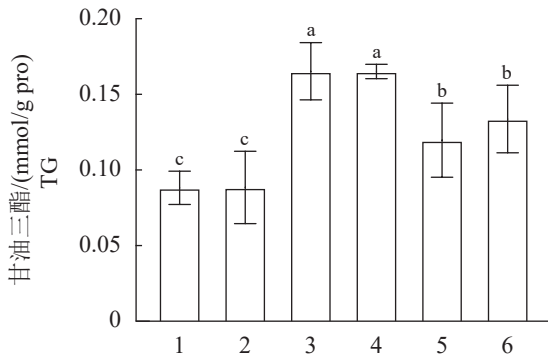


图 4 不同浓度黄连素对高脂斑马鱼肝脏细胞中 TG 含量的影响

Fig. 4 Berberine effects on TG content of CRL-2643 induced by sodium palmitate

2.3 细胞脂质代谢组学分析

脂质组学单变量及多变量分析 用 25 μmol/L BBR 处理棕榈酸钠诱导的细胞 6 h 后, 提取细胞进行细胞脂质代谢组学分析, 每组设置 6 个重复 ($n=6$)。分别在正、负离子模式下进行采集, 得到正、负离子模式下的数据进行两两比较。运用火山图展示组间数据的差异, 红色部分代表 2 组之间的差异离子, 紫色部分代表无显著差异离子。结果显示, 对照组与高脂组 (图 5-a, b)、对

照组与高脂+黄连素组 (图 5-c, d)、高脂组与高脂+黄连素组 (图 5-e, f) 之间均存在差异离子。

PLS-DA 判别分析模型得分图 偏最小二乘得分图反映的是各组间的分离情况。衡量各代谢物的表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力, 从而辅助标志代谢物的筛选 (通常以 $VIP>1.0$ 作为筛选标准)。在正离子模式下, 各组之间的分区清晰 (图 6-a); 在负离子模式下, 由于棕榈酸钠的作用, 高脂组与高脂+黄连素组有部分区域重合 (图 6-b)。

脂质组学差异离子筛选 高脂组与对照组相比组共筛选出 1 761 个差异离子 (ESI+: 1 058 个; ESI-: 703 个) 其中鉴定出 147 种差异表达的代谢产物, 123 个升高、24 个降低。高脂+黄连素组与对照组相比组共筛选出 2 728 个差异离子 (ESI+: 1 922 个; ESI-: 806 个) 其中鉴定出 346 种差异表达的代谢产物, 139 个升高、207 个降低。高脂+黄连素组与高脂组相比共筛选出 1 605 个差异离子 (ESI+: 1 572 个; ESI-: 33 个) 其中鉴定出 259 种差异表达的代谢产物, 45 个表达升高、204 个表达降低 (表 2)。

为了直观地考察不同组间差异离子的变化趋势, 根据各离子的相对量绘制热图。在正离子模式下, 与对照组相比, 高脂组中有 630 个差异离子上调, 428 个差异离子下调; 高脂+黄连素组中有 861 个差异离子上调, 1 061 个差异离子下调。

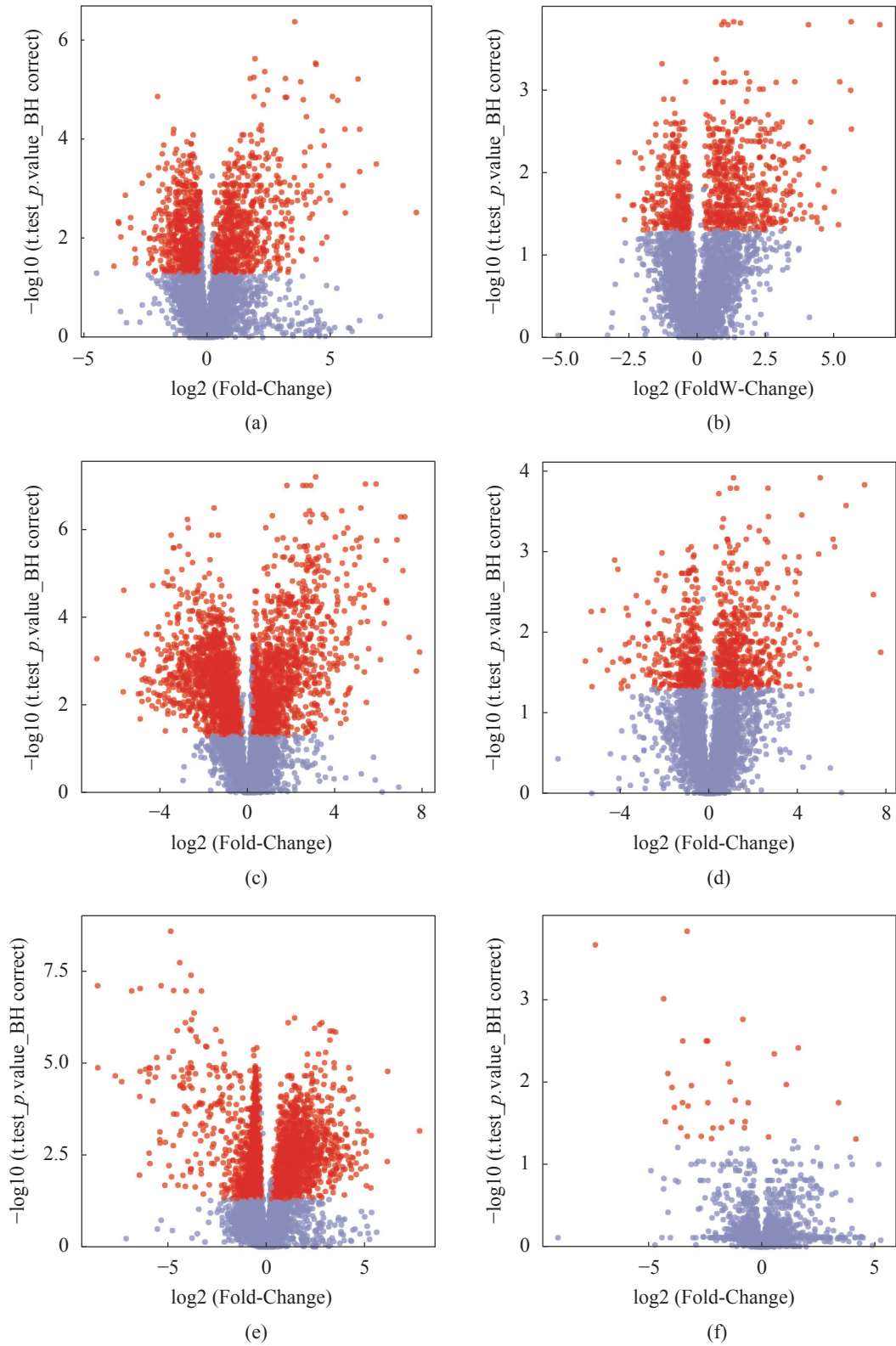


图 5 正离子和负离子模式下火山图

(a)(c)(e) 为正离子模式, (b)(d)(f) 为负离子模式; Fold-Chang \leq 0.833 3 或 \geq 1.2 且 p -value $<$ 0.05 的点标注为红色, 其余标注为紫色

Fig. 5 Volcano plot in positive ion and negative ion scan modes

(a) (c) (e) are positive ion mode, (b) (d) (f) are negative ion mode; the points with Fold-Chang \leq 0.833 3 or \geq 1.2 and p -value $<$ 0.05 are labeled as red, and the rest are purple

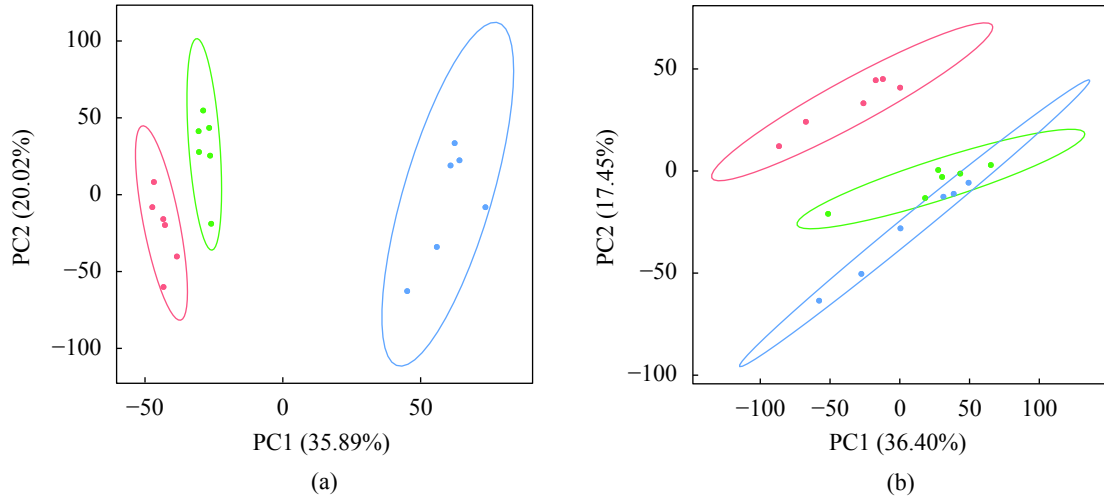


图 6 正离子和负离子模式下 PLS-DA 判别分析模型得分图

(a) 正离子模式, (b) 负离子模式; 横坐标代表第一主成分 PC1, 纵坐标代表第二主成分 PC2; 图中每个点代表一个样品, 3 种颜色符号的离散程度分别代表了 3 组样本在 PC1 和 PC2 轴上的分布趋势, 红色代表对照组, 绿色代表 SP 组, 蓝色代表 SP+BBR 组

Fig. 6 PCA-DA scores scatter plot in positive ion and negative ion scan modes

(a) positive ion mode, (b) negative ion mode; the first principal component PC1 was regarded as abscissa, ordinate represents the second principal component PC2; each point in the figure represents a sample, and the dispersion degree of the three color symbols respectively represents the distribution trend of the three groups of samples on the PC1 and PC2 axes, red represents the control group, green represents the SP group, and blue represents the SP + BBR group

表 2 差异离子表

Tab. 2 Screening of different ions

模式 modes	分组 groups	差异离子 differential ions	上调 up	下调 down
Pos (ESI+)	SP/Cont(高脂/对照)	1058	630	428
Neg(ESI-)	SP-Cont(高脂/对照)	703	504	199
Pos (ESI+)	SP+BBR/Cont(高脂+黄连素/对照)	1922	861	1061
Neg(ESI-)	SP+BBR/Cont(高脂+黄连素/对照)	806	487	319
Pos (ESI+)	SP+BBR/SP(高脂+黄连素/高脂)	1572	454	1118
Neg(ESI-)	SP+BBR/SP(高脂+黄连素/高脂)	33	28	5

注: 上样模式包括2种, 分别是正离子上样模式(Pos, ESI+)和负离子上样模式(Neg, ESI-) Notes: Mode includes two ways of sampling mode, positive mode (Pos, ESI+) and negative mode (Neg, ESI-)

与高脂组相比, 高脂+黄连素组中有 454 个差异离子上调, 1 118 个差异离子下调。在负离子模式下, 与对照组相比, 高脂组中有 504 个差异离子上调, 199 个差异离子下调; 高脂+黄连素组中有 487 个差异离子上调, 319 个差异离子下调。与高脂组相比, 高脂+黄连素组中有 28 个差异离子上调, 5 个差异离子下调。(图 7)

差异表达的代谢产物对应代谢通路分析

代谢通路分析可帮助确定差异表达的代谢产物的主要生化途径和信号转导途径。将鉴定出的差异表达代谢产物与 KEGG 数据库进行比对, 共筛选出脂肪酸代谢、亚油酸代谢、不饱和脂肪酸代谢等 16 条代谢通路(表 3)。

本研究中, 重点关注不饱和脂肪酸代谢通路当中筛选出的差异表达代谢产物, 即二高-γ-亚麻酸 (DGLA) 和二高-α-亚麻酸 (ETA)(图 1, 图 2)。代谢组学结果显示, 与对照组相比, 高脂组筛选出的 DGLA 和 ETA 含量显著上升 (P<0.05)。与高脂组相比, 高脂+黄连素组的 DGLA 和 ETA 含量显著下降 (P<0.05)。与对照组相比, 高脂+黄连素组的 DGLA 和 ETA 含量并无显著差异 (P>0.05)。

细胞脂代谢相关基因的 mRNA 表达水平与对照组相比, 高脂组细胞内脂质分解相关基因 *atgl*、*hsl* 的表达量均显著降低 (P<0.05), 添加了黄连素后均显著升高 (P<0.05)(图 8)。

与对照组相比, 高脂组细胞内 *elov16* 和 *scdb*

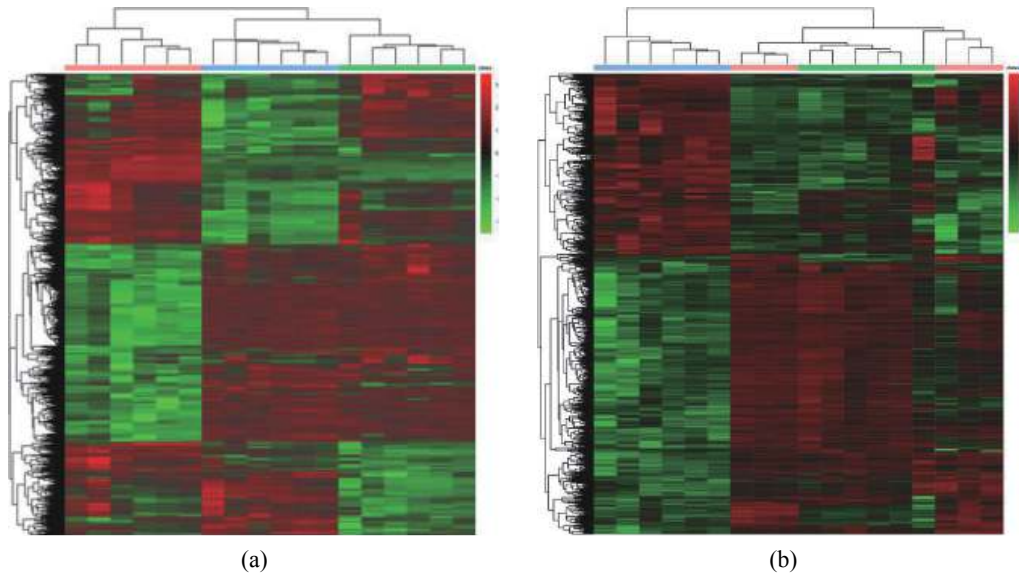


图 7 正离子和负离子模式下的差异离子聚类分析图

(a) 为正离子模式, (b) 为负离子模式; 蓝色代表 Con 组, 绿色代表 SP 组, 红色代表 SP+BBR 组; 图中的每一行代表一个差异离子, 每一列代表一个样本, 不同颜色表示不同的离子强度, 颜色从绿色到红色, 表示强度从低到高

Fig. 7 The heat maps of differential ions tendency in positive ion and negative ion mode

(a) is positive ion mode, (b) is negative ion mode; blue represents the Con group, green represents the SP group, and red represents the SP+BBR group; each line represented a differential ion and each cross represented a liver sample; different colors represented different abundance intensity, intensity showed a gradual increase from green color to red color

的表达量显著升高 ($P < 0.05$), *fads2* 表达量显著降低 ($P < 0.05$), *fas*、*acc* 和 *elovl7a* 的表达量无显著变化 ($P > 0.05$)。与高脂组相比, 高脂+黄连素组的细胞内 *fads2*、*fas*、*elovl6*、*scdb* 和 *acc* 表达量显著降低 ($P < 0.05$), *elovl7a* 的表达量无显著变化 ($P > 0.05$)(图 9)。

3 讨论

本实验利用棕榈酸钠建立了斑马鱼肝脏细胞脂肪沉积模型, 最适棕榈酸钠浓度为 0.25 mmol/L, 处理时间为 24 h。棕榈酸钠浓度的筛选标准为斑马鱼肝脏细胞内出现明显脂肪沉积, 细胞活性大于 50%。有研究表明, 脂肪酸可以增加细胞内脂肪沉积^[13]、降低细胞活性^[14]。本实验结果显示, 当细胞内甘油三酯含量随着棕榈酸钠浓度的升高逐渐升高时, 肝脏细胞活性逐渐下降, 此研究结果与 Hu 等^[15] 及 Jambor 等^[14] 的研究结果一致。Zhao 等^[16] 用 0.25 mmol/L 棕榈酸来诱导 NIT-1 胰腺 β 细胞产生脂肪沉积, 与本实验所筛选出的棕榈酸钠浓度一致。Xiao 等^[17] 用 0.4 mmol/L 棕榈酸诱导 HepG2 细胞产生脂肪沉积; Ricchi 等^[18] 发现, 0.33 mmol/L 棕榈酸可显著增加 HepG2 和 HuH-7

细胞内甘油三酯的含量, 0.66 mmol/L 棕榈酸可诱导 WRL-68 细胞内出现明显的脂肪沉积。以上实验中棕榈酸钠的浓度与本实验不同, 可能是由于细胞的类型、来源以及培养条件不同导致的。综上所述, 不同浓度的棕榈酸或棕榈酸盐可用来诱导细胞内产生脂肪沉积。

本实验筛选出黄连素浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$, 处理时间为 6 h。本研究表明, 黄连素可以改善 0.25 mmol/L 棕榈酸钠诱导的肝细胞脂质蓄积。黄连素作为调节剂, 在减轻棕榈酸钠诱导的脂质蓄积^[16]、减轻脂肪酸诱导的氧化应激^[19] 和细胞凋亡^[20] 中起着重要作用。Zhao 等^[16] 报道, BBR 通过减少 NIT-1 胰腺 β 细胞的脂肪生成和增加脂质氧化作用, 可以抑制棕榈酸诱导的脂质积累。黄连素可以减轻由油酸诱导的内皮细胞脂质蓄积, 可能是由于 AMPK-eNOS 信号通路的激活^[21]。

本实验室的前期研究也表明, 黄连素作为功能性饲料添加剂可以显著抑制细胞的氧化应激水平, 减少细胞凋亡并增强高脂饮食饲喂鱼的免疫力^[22]。Hasanein 等^[23] 报道了黄连素能够减轻醋酸铅诱导的褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 脂质过氧化反应。Lee 等^[24] 研究发现, 黄连素可能通过抑制脂

表 3 差异表达的代谢产物代谢通路鉴定表

Tab. 3 Pathways of differential metabolites

代谢通路 pathway	物质名称 substance name
脂肪酸代谢 fatty acid metabolism	棕榈酰肉碱 palmately carnitine
萜类骨架代谢 terpenoid backbone biosynthesis	双反式, 聚-顺式-十一碳二烯基二磷酸酯 di-trans, poly-cis-undecaprenyl diphosphate
聚糖代谢 N-glycan biosynthesis	磷酸四烷基酯 olichyl-4 phosphate
鞘脂代谢 sphingolipid metabolism	磷酸氨纶 sphinganine-phosphate
神经活性配体-受体互作 neuroactive ligand-receptor interaction	MG(0: 0/20: 4(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)/0: 0), 磷酸sphinganine, N-油酰基多巴胺 MG(0:0/20:4(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)/0:0), sphinganine-phosphate, N-Oleoyl Dopamine
类固醇激素代谢 steroid hormone biosynthesis	22R-羟基胆固醇, 20-羟基胆固醇, 胆固醇, 21-脱氧皮质醇, 11-脱氧皮质醇, 皮质酮 22R-hydroxycholesterol, 20-hydroxycholesterol, cholesterol, 21-deoxycortisol, 11-deoxycortisol, corticosterone
视黄醇代谢 retinol metabolism	全反式13,14-二氢视黄醇, 9-顺式视黄醇, 11-顺式视黄醇 all-trans-13,14-dihydroretinol, 9-cis-retinol, 11-cis-retinol
胆汁酸代谢 primary bile acid biosynthesis	羟基胆固醇, 7 α -羟基-5 β -胆甾烷-3- α , 24S-羟基胆固醇, 25-羟基胆固醇, 7 α -羟基胆固醇, 5 β -胆甾醇3 α , 7 α , 12 α , 26-四醇, 7 α , 25-二羟基胆甾烯酮, 7 α , 26-二羟基胆甾烯-4-en-3-one, 7 α , 12 α -二羟基胆甾烯-4-en-3-one, 7 α , 24-二羟基胆甾烯-4-en-3-one, 胆甾醇, 5 β -胆甾醇3 α , 7 α -二醇27-hydroxy-cholesterol, 7 α -hydroxy-5 β -cholestan-3-one, 24S-hydroxy-cholesterol, 25-hydroxy-cholesterol, 7 α -hydroxy-cholesterol, 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol, 7 α ,25-dihydroxycholestenone, 7 α ,26-dihydroxycholest-4-en-3-one, 7 α ,12 α -dihydroxycholest-4-en-3-one, 7 α ,24-dihydroxycholest-4-en-3-one, cholesterol, 5 β -cholestane-3 α ,7 α -diol
脂肪酸降解 fatty acid degradation	棕榈酰肉碱 palmitoylcarnitine
代谢途径 metabolic pathways	22R-羟基胆固醇, δ -生育酚, dolichyl-4磷酸酯, 7 α -羟基-5 β -胆甾醇-3- α , 20-羟基胆固醇, 7 α -羟基胆固醇, 比绍莫- γ -亚麻酸, 松香油, 紫杉醇4(20), 11(12)-dien-5- α -ol, 5 β -cholestane-3 α , 7 α , 12 α , 26-tetrol, 1 α , 25-dihydroxy Vitamin D3/1 α , 25-dihydroxy cholecalciferol/calcitriol, (24R)-24,25-二羟基维生素D3/(24R)-24,25-二羟基胆钙化醇, 7 α , 12 α -dihydroxy cholest-4-en-3-one, 3S-squalene-2,3-epoxy, cycloeucaenol, lanosterol, tus妥叶醇, 谷甾醇, 胆甾醇, 齐莫烯醇, 11-脱氧皮质醇, 皮质酮, 叶氢醌, 5 β -胆甾醇3 α , 7 α -二醇22R-hydroxycholesterol, delta-tocopherol, dolichyl-4 phosphate, 7 α -hydroxy-5 β -cholestan-3-one, 20-hydroxycholesterol, 7 α -hydroxy-cholesterol, bishomo-gamma-linolenic acid, abietol, taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol, 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α ,26-tetrol, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3/1 α ,25-dihydroxycholecalciferol/calcitriol, (24R)-24,25-dihydroxyvitamin D3/(24R)-24,25-dihydroxycholecalciferol, 7 α ,12 α -dihydroxycholest-4-en-3-one, 3S-squalene-2,3-epoxide, cycloeucaenol, lanosterol, obtusifoliol, lathosterol, cholesterol, zymostenol, 11-deoxycortisol, corticosterone, phyllohydroquinone, 5 β -cholestane-3 α ,7 α -diol
亚油酸代谢 linoleic acid metabolism	b二高- γ -亚麻酸 ishomo-gamma-linolenic acid
不饱和脂肪酸代谢 biosynthesis of unsaturated fatty acids	二高- γ -亚麻酸, 二高- α -亚麻酸 bishomo-gamma-linolenic acid, bishomo- α -linolenic acid
泛醌和其他萜类醌代谢 ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	δ -生育酚, 叶氢醌/ δ -tocopherol, phyllohydroquinone
类固醇代谢 steroid biosynthesis	1 α , 25-二羟基维生素D3/1 α , 25-二羟基胆甾醇/骨化三醇, (24R)-24,25-二羟基维生素D3/(24R)-24,25-二羟基胆钙化醇, 24-亚乙基碘酚, 3S-角鲨烯-2,3-环氧化物, 环桉脑油, 羊毛甾醇, Ob妥酚、,固醇, 胆甾醇, zymostenol1 α ,25-di-hydroxy vitamin D3/1 α ,25-di-hydroxy cholecalciferol/calcitriol, (24R)-24,25-di-hydroxy vitamin D3/(24R)-24,25-dihydroxycholecalciferol, 24-ethylidene iophenol, 3S-squalene-2,3-epoxide, cycloeucaenol, lanosterol, obtusifoliol, lathosterol, cholesterol, zymostenol
甘油磷脂代谢 glycerophospholipid metabolism	sn-3-O-(香叶基香叶基)甘油1-磷酸 sn-3-O-(geranylgeranyl) glycerol 1-phosphate
铁症病 ferroptosis	辅酶 Q10, PE(18: 0/22: 4(7Z, 10Z, 13Z, 16Z)), PE(18: 0/20: 4(5Z, 8Z, 11Z, 14Z))Coenzyme Q10, PE(18:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)), PE(18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))

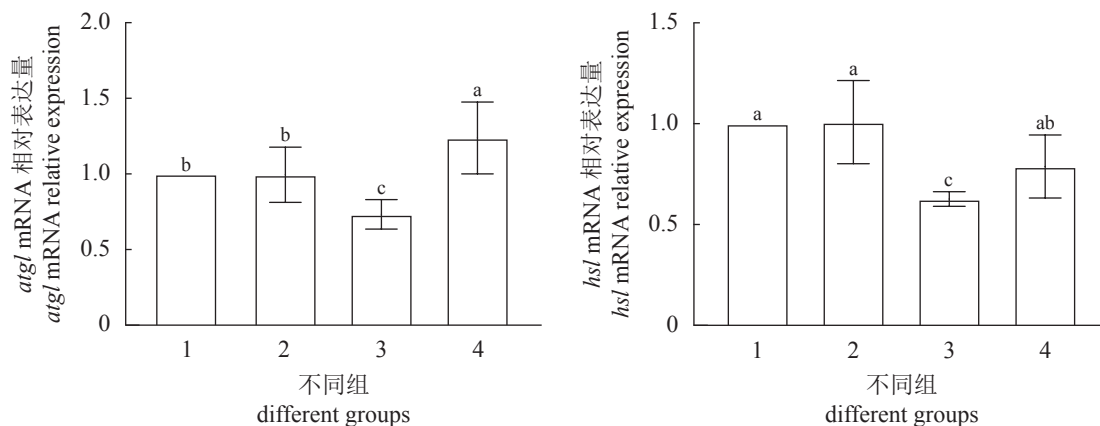


图 8 斑马鱼肝脏细胞脂代谢分解相关基因表达

1. 对照组, 2. DMSO 组, 3. SP 组, 4. SP+BBR 组; 结果以平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE)($n=6$) 表示, 图中不同字母表示二者之间差异显著 ($P<0.05$); 下同

Fig. 8 Expression of genes related to lipid metabolism in *D. rerio* liver cells

1. control group, 2. DMSO group, 3. SP group, 4. SP+BBR group; data was expressed as mean \pm SE ($n=6$); bars assigned with different letters were significantly ($P<0.05$) different; the same below

质过氧化、NF- κ B 信号通路的激活和肠杆菌生长, 改善结肠炎。基于上述结果, 推测黄连素可以调节氧化应激和免疫水平, 影响细胞活力、细胞凋亡, 从而改善细胞的代谢能力。

本实验重点研究不饱和脂肪酸代谢通路当中筛选出的差异表达代谢产物, 即二高- γ -亚麻酸 (DGLA) 和二高- α -亚麻酸 (ETA)。与对照组相比, 二者含量在高脂组中均显著升高, 且添加了黄连素后均显著降低。结合 KEGG 代谢通路比对结果显示 (图 1, 图 2), DGLA 和 ETA 对应的代谢通路为亚油酸代谢通路和不饱和脂肪酸代谢通路。通过检测 2 种物质代谢通路中参与脂质分解的酶基因 (*atgl*、*hsl*) 及参与脂质合成的酶基因 (*acc*、*elovl6*、*scdb*、*fads2*、*fas* 和 *elovl7a*) 的 mRNA 表达量变化, 发现其中部分发生了显著的变化。推测 DGLA 和 ETA 2 种物质与高脂日粮诱导的团头鲂肝脏内脂肪过度沉积存在密切关系, 并且可能是通过调控代谢通路中相关酶的基因表达量实现的。

DGLA 是一种由亚油酸经去饱和和碳链延伸反应生成的含有 20 个碳原子的 n-6 系列多不饱和脂肪酸^[25], ETA 是一种含有 20 个碳原子的 n-3 系列多不饱和脂肪酸^[26]。Kimura 等^[27]的研究结果显示, 用 2 种富含 n-3 长链多不饱和脂肪酸油饲喂褐家鼠, 高脂饲料饲喂组褐家鼠体内 n-3 多不饱和脂肪酸含量低。Ide 等^[28]指出多不饱和脂肪酸 (PUFA) 在肝脏脂肪酸代谢及机体脂肪含量调控方面扮演着重要角色。Navarro-Herrera 等^[29]研究结果显示, DGLA 具有调控脂肪沉积的作用。Tsurutani

等^[30]报道, DGLA 与体内脂肪沉积和 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗相关。赵鸿昊^[31]的研究发现, 由于人工日粮的饲喂造成草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 肌肉脂肪含量升高, 应用活体代谢组学的方法, 同样发现了差异代谢物 DGLA 含量的显著升高, 与本实验共同印证了 DGLA 在脂肪沉积中的重要作用。

atgl、*hsl* 是脂质分解过程中的关键酶基因。*atgl* 不仅在催化脂肪细胞水解甘油三酯起始步骤中的起关键作用, 而且在非脂肪细胞的脂滴降解过程中也起重要作用^[32]。在过去 30 年, 普遍认为 HSL 是作用于脂肪细胞的主要脂质体降解脂肪酶, 而 Voshol 等^[33]发现, 敲除 *hsl* 的小鼠 (*Mus musculus*) 变胖失败, 来自这些小鼠的细胞显示出具有甘油三酯脂肪酶活性, 表明 *hsl* 不仅在脂肪细胞中发挥重要作用, 在其他细胞中可能也发挥着重要作用。肉碱脂酰转移酶在脂肪酸氧化过程中具有重要作用。实验结果显示, 与对照组相比, 模型组细胞内 *atgl*、*hsl* 的表达量显著降低, 提示棕榈酸钠可能是通过下调 *atgl*、*hsl* 的表达抑制脂质分解过程而引起细胞内脂肪过度沉积的。

ACC、FAS、ELOVL6、ELOVL7A、SCDB 均为脂质合成过程中的关键酶。ACC 是脂肪酸合成第一阶段的限速酶, 可以催化乙酰 CoA 转化为丙二酰 CoA; FAS 是脂肪酸合成过程中的关键酶, 可以催化乙酰 CoA 和丙二酰 CoA 生成脂肪酸, 参与酰基转移酶、缩合、还原、脱水以及再还原的过程; ELOVL6 主要参与十六碳向十八碳的延

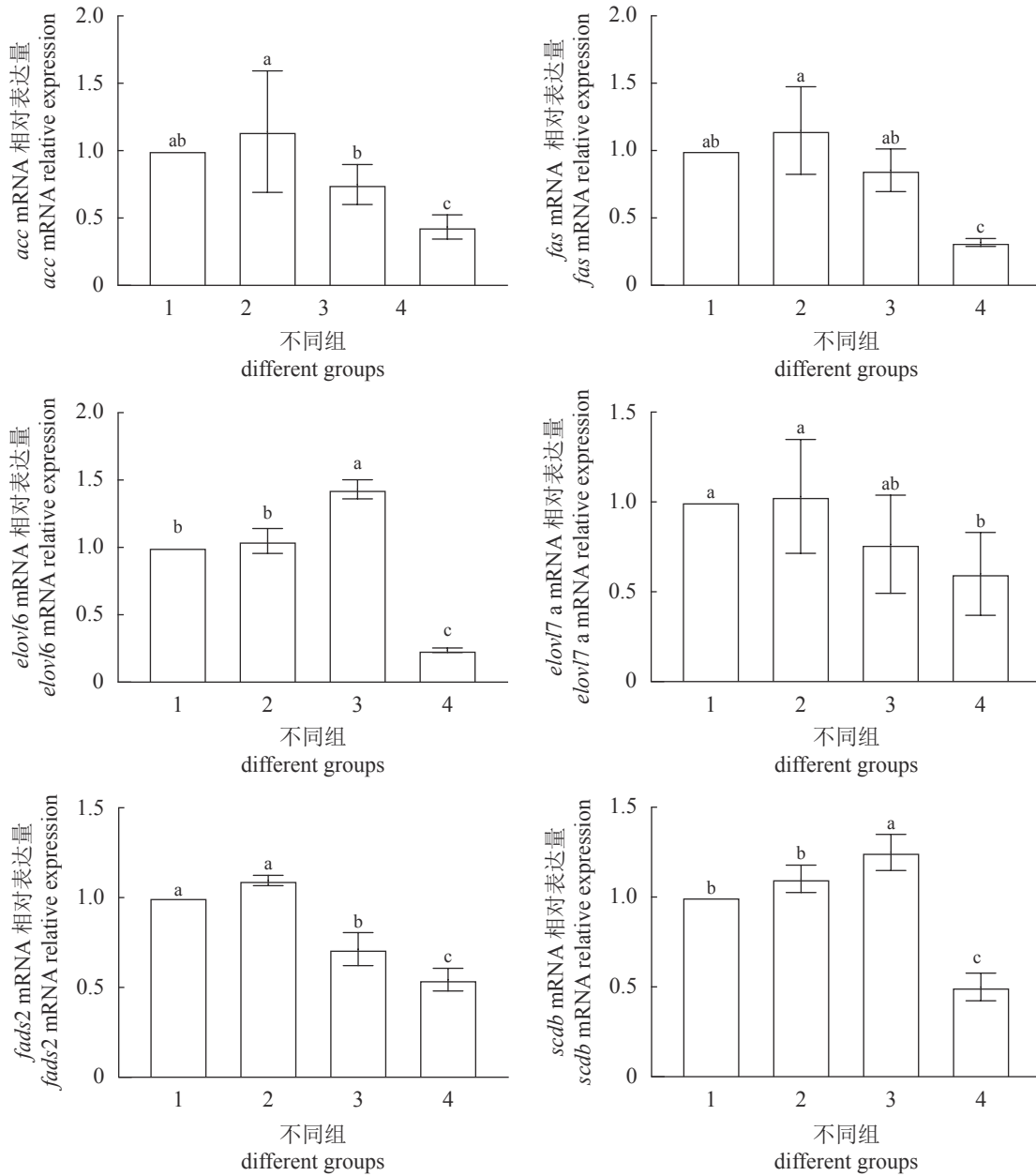


图 9 斑马鱼肝脏细胞脂质代谢合成相关基因表达

Fig. 9 Expression of genes related to lipid synthesis in *D. rerio* liver cells

长过程; ELOVL7A 主要参与 ALA 向 ETA 的转化; FADS2 主要参与形成 δ6 和 δ8 双键; SCDB 主要参与 δ9 双键的形成。

与对照组相比, 高脂组细胞内 *elovl6* 和 *scdb* 的 mRNA 表达量显著上升, *fads2* 表达量显著下调, *acc*、*elovl7a* 及 *fas* 表达量无显著变化, 棕榈酸钠可能是通过上调 *elovl6* 及 *scdb* 促进脂质合成进而引起脂肪过度沉积的。

本实验构建了斑马鱼肝脏细胞的高脂诱导模型和黄连素处理模型, 通过细胞活力、甘油三酯

含量等指标, 脂代谢相关基因的表达量结合细胞脂质组学的结果分析, 验证了黄连素能够下调 DGLA 和 ETA 含量, 从而有效缓解棕榈酸钠诱导给细胞带来的高脂损伤。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Lu K L, Xu W N, Li X F, et al. Hepatic triacylglycerol secretion, lipid transport and tissue lipid uptake in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed high-fat

- diet[J]. *Aquaculture*, 2013, 408-409: 160-168.
- [2] 杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1628-1638.
- Du Z Y. Causes of fatty liver in farmed fish: a review and new perspectives[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1628-1638 (in Chinese).
- [3] Lu K L, Xu W N, Liu W B, *et al.* Association of mitochondrial dysfunction with oxidative stress and immune suppression in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high-fat diet[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2014, 26(2): 100-112.
- [4] Chu J H, Wang H, Ye Y, *et al.* Inhibitory effect of schisandrin B on free fatty acid-induced steatosis in L-02 cells[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2011, 17(19): 2379-2388.
- [5] Du J L, Jia R, Cao L P, *et al.* Effects of Rhizoma Alismatis extract on biochemical indices and adipose gene expression in oleic acid-induced hepatocyte injury in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(3): 747-768.
- [6] 周文豪. 蛋白激酶 AMPK 在团头鲂脂肪肝发生中的作用及羟基酪醇对脂肪代谢的调控 [D]. 厦门: 集美大学, 2019.
- Zhou W H. Effects of AMPK on fatty liver of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) and the regulation of hydroxytyrosol on lipid metabolism[D]. Xiamen: Jimei University, 2019 (in Chinese).
- [7] 李磊, 周文豪, 蔡林森, 等. 油酸诱导花鲈肝细胞脂肪沉积模型的建立及二甲双胍对脂肪沉积的影响[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2020, 25(1): 1-7.
- Li L, Zhou W H, Cai L S, *et al.* Oleic acid inducing hepatocyte steatosis model in seabass (*Lateolabrax japonicus*) and effect of metformin on fat deposition[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2020, 25(1): 1-7 (in Chinese).
- [8] Ma X L, Chen Z J, Wang L, *et al.* The pathogenesis of diabetes mellitus by oxidative stress and inflammation: its inhibition by berberine[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 782.
- [9] Huang C H, Huang Z W, Ho F M, *et al.* Berberine impairs embryonic development *in vitro* and *in vivo* through oxidative stress - mediated apoptotic processes[J]. *Environmental Toxicology*, 2018, 33(3): 280-294.
- [10] Lu K L, Wang L N, Zhang D D, *et al.* Berberine attenuates oxidative stress and hepatocytes apoptosis *via* protecting mitochondria in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed high-fat diets[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(1): 65-76.
- [11] Zhou W H, Rahimnejad S, Lu K L, *et al.* Effects of berberine on growth, liver histology, and expression of lipid-related genes in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed high-fat diets[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(1): 83-91.
- [12] Lu K L, Zhang D D, Wang L N, *et al.* Molecular characterization of carnitine palmitoyltransferase IA in *Megalobrama amblycephala* and effects on its expression of feeding status and dietary lipid and berberine[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 191: 20-25.
- [13] 卢荣华, 梁旭方, 孙君君, 等. 草鱼肝细胞脂变模型的建立及脂代谢基因表达分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(1): 24-32.
- Lu R H, Liang X F, Sun J J, *et al.* Establishment of a model of grass carp hepatocyte steatosis and analysis of lipid metabolism gene expression[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(1): 24-32 (in Chinese).
- [14] Jambor de Sousa U L, Koss M D, Fillies M, *et al.* CPT1a over-expression increases long-chain fatty acid oxidation and reduces cell viability with incremental palmitic acid concentration in 293T cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 338(2): 757-761.
- [15] Hu X C, Ge X, Liang W, *et al.* Effects of saturated palmitic acid and omega-3 polyunsaturated fatty acids on Sertoli cell apoptosis[J]. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2018, 64(5): 368-380.
- [16] Zhao L, Jiang S J, Lu F E, *et al.* Effects of berberine and cinnamic acid on palmitic acid-induced intracellular triglyceride accumulation in NIT-1 pancreatic β cells[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2016, 22(7): 496-502.
- [17] Xiao X H, Li H, Qi X Y, *et al.* Zinc alpha2 glycoprotein alleviates palmitic acid-induced intracellular lipid accumulation in hepatocytes[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 439: 155-164.
- [18] Ricchi M, Odoardi M R, Carulli L, *et al.* Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2009, 24(5): 830-840.
- [19] Sun Y X, Yuan X L, Zhang F F, *et al.* Berberine ameliorates fatty acid-induced oxidative stress in human hepatoma cells[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11340.
- [20] Sun J Y, Chen X M, Liu T, *et al.* Berberine protects

- against palmitate-induced apoptosis in tubular epithelial cells by promoting fatty acid oxidation[J]. *Medical Science Monitor*, 2018, 24: 1484-1492.
- [21] 周慧, 刘敬, 侯文锋, 等. 小檗碱活化AMPK-eNOS减轻油酸所致人主动脉内皮细胞损伤[J]. *食品科学*, 2018, 39(5): 213-219.
- Zhou H, Liu J, Hou W F, *et al.* Protective Effect of berberine on oleic acid-induced injury in human aortic endothelial cells via AMPK-eNOS activation[J]. *Food Science*, 2018, 39(5): 213-219 (in Chinese).
- [22] Chen Q Q, Liu W B, Zhou M, *et al.* Effects of berberine on the growth and immune performance in response to ammonia stress and high-fat dietary in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 165-172.
- [23] Hasanein P, Ghafari-Vahed M, Khodadadi I. Effects of isoquinoline alkaloid berberine on lipid peroxidation, antioxidant defense system, and liver damage induced by lead acetate in rats[J]. *Redox Report*, 2017, 22(1): 42-50.
- [24] Lee I A, Hyun Y J, Kim D H. Berberine ameliorates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation, enterobacterial growth and NF- κ B activation[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 648(1-3): 162-170.
- [25] Wang J C, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence[J]. *Circulation Research*, 2012, 111(2): 245-259.
- [26] Kim E J, Kim M K, Jin X J, *et al.* Skin aging and photoaging alter fatty acids composition, including 11, 14, 17-icosatrienoic acid, in the epidermis of human skin[J]. *Journal of Korean Medicine Science*, 2010, 25(6): 980-983.
- [27] Kimura F, Endo Y, Fujimoto K, *et al.* Administration of two oils rich in n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids to rat pups of dams fed a diet high in fat and low in n-3 polyunsaturated fatty acids[J]. *Fisheries Science*, 2005, 71(2): 431-440.
- [28] Ide T, Ono Y, Kawashima H, *et al.* Interrelated effects of dihomo- γ -linolenic and arachidonic acids, and sesamin on hepatic fatty acid synthesis and oxidation in rats[J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, 108(11): 1980-1993.
- [29] Navarro-Herrera D, Aranaz P, Eder-Azanza L, *et al.* Dihomo-gamma-linolenic acid induces fat loss in *C. elegans* in an omega-3-independent manner by promoting peroxisomal fatty acid β -oxidation[J]. *Food & Function*, 2018, 9(3): 1621-1637.
- [30] Tsurutani Y, Inoue K, Sugisawa C, *et al.* Increased serum dihomo- γ -linolenic acid levels are associated with obesity, body fat accumulation, and insulin resistance in Japanese patients with type 2 diabetes[J]. *Internal Medicine*, 2018, 57(20): 2929-2935.
- [31] 赵鸿昊. 养殖密度和投喂模式对草鱼肌肉品质和代谢调控的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- Zhao H H. The effects of stocking density and feeding models on muscle quality and metabolic regulations of grass carp *Ctenopharyngodon idella* decomposition[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [32] Smirnova E, Goldberg E B, Makarova K S, *et al.* *atgl* has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells[J]. *EMBO Reports*, 2006, 7(1): 106-113.
- [33] Voshol P J, Haemmerle G, Ouwens D M, *et al.* Increased hepatic insulin sensitivity together with decreased hepatic triglyceride stores in hormone-sensitive lipase-deficient mice[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(8): 3456-3462.

Effects of berberine on lipid metabolism of *Danio rerio* liver cells induced by high fat

LIU Jin, ZHANG Meijuan, YU Chengbing, YANG Shuoshuo,
ZHANG Jing, XU Jianxiong, XU Weina*

(Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, College of Agriculture and Biology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Excessive deposition of fish fat is a very common phenomenon in artificially farmed fish. The widespread use of high-fat diets is an important cause for this consequence. Long-term and excessive use of high-fat diets can cause fat deposition in fish organs or tissues. Liver cells are the main place for fat synthesis in fish, and 90% of the fat is synthesized in liver cells. Excessive fat deposits in the liver can have a negative impact on the health of the fish. Chinese herbal medicine is the current research focus of anti-immune stress agents. Berberine is an alkaloid isolated from the traditional Chinese medicine *Rhizoma Coptidis*. It has the effects of protecting the liver, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemia and lipid-lowering. Preliminary research in our laboratory found that berberine as a functional feed additive can significantly inhibit the process of oxidative stress, reduce cell apoptosis and enhance the immunity of fish fed with high-fat diets. In order to explore the effect of berberine on the lipid metabolism of *Danio rerio* liver cells induced by high fat, *D. rerio* cells were used as experimental materials, and sodium palmitate (0.25 mmol/L, 24 h) was used to induce liver cell lipid deposition models. After treatment with berberine (25 μ mol/L, 6 h), the cells were collected. Using high performance liquid chromatography-mass spectrometry technology for lipid metabolomics analysis, the lipid metabolites of different treatments of *D. rerio* liver cells were screened and identified, and the gene expression of lipid metabolism-related factors was detected. The results showed that compared with the control group, a total of 1 761 differential ions were screened in the high-fat group, among which 147 differential metabolites were identified, and 123 were increased and 24 were decreased; the high-fat + berberine group screened a total of 2 728 differential ions, among which 346 differential metabolites were identified, 139 increased and 207 decreased. Compared with the high-fat group, the high-fat + berberine group screened a total of 1 605 differential ions, of which 259 differential metabolites were identified, and 45 increased and 204 decreased. Further studies on the metabolic pathways of unsaturated fatty acids found that the content of differential metabolites dihomo- γ -linolenic acid (DGLA) and dihomo- α -linolenic acid (ETA) increased significantly in the high-fat group, and the addition of berberine would make their content decrease significantly; compared with the control group, there was no significant difference in the content of DGLA and ETA in the high-fat + berberine group. By detecting the expression of DGLA and ETA decomposition-related enzyme genes (*atgl*, *hsl*), it was found that compared with the control group, both of the high-fat group were significantly reduced, and both were significantly increased after the addition of berberine; detection of the expression levels of synthesis-related enzyme genes (*acc*, *elovl6*, *elovl7a*, *scdb*, *fas* and *fads2*), showed that compared with the control group, the high-fat group intracellular *acc*, *elovl6* and *scdb* expression were significantly increased, *fads2* expression decreased significantly, and *fads2* expression in cells increased significantly after berberine was added, and *fas*, *elovl6* and *scdb* expressions were significantly decreased. To sum up, the induction of high fat inhibits the expression of lipid-related genes, promotes the expression of lipid-synthesis-related genes, and causes excessive deposition of fat in cells. Adding a proper amount of berberine can promote the expression of lipid-related genes and inhibit the expression of lipid synthesis-related genes, thereby down-regulating the content of DGLA and ETA, effectively alleviated the damage induced by sodium palmitate to liver cells.

Key words: *Danio rerio*; liver cells; high fat; berberine; lipid metabolomics

Corresponding author: XU Weina. E-mail: xuweina@sjtu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31472292)