

葉酸補充對高脂暴露人類肝癌細胞株 Hep3B 自噬作用與脂質代謝分子表現之影響

李貞瑩¹ 許瑞芬^{1*}

Effects of folic acid supplementation on autophagy and lipid metabolism biomarkers in high fat-exposed Hep3B

Zhen-Ying Li¹, Rwei-Fen S. Huang^{1*}

¹Department of Nutritional Science, Fu Jen Catholic University, New Taipei City, Taiwan

(Received: January 06, 2023. Accepted: March 15, 2023.)

Abstract High fat leads to metabolic disorders and lipid accumulation in liver and hepatocarcinoma cell lines. Studies have reported the effect of autophagy on lipid degradation. It's known that folic acid supplementation (FAS) regulate lipid metabolism, inflammation and other pathways to reduce fatty liver. Studies have shown that FAS downregulate autophagic markers in liver of high fat fed rats, but the mechanism is still unclear. The aim of this study was to investigate whether FAS on Hep3B improves high fat induced hepatic TG accumulation is regulated by autophagy. The study was designed to detect hepatocarcinoma cell lines Hep3B with similar human liver lipid metabolism. After FAS, 0.4mM oleic acid (OA) was given for 24 hours to induce TG accumulation, then detected autophagy markers. The results showed that (1) There's no effect on 24H OA-exposed autophagy biomarkers. FAS reduce protein expression of (Beclin1) in OA-exposed Hep3B. (2) BafA1, an autolysosome inhibitor, reversed the effect of FAS, up-regulated autophagosome marker (LC3II), and more LC3 puncta was seen by immunofluorescence staining. (3) Oil red O staining found that FAS had no effect on 24H OA-exposed TG accumulation. Above all, it shows that FAS may downregulate early autophagy marker in OA-exposed Hep3B, but there's no effects on TG accumulation caused by short-term high fat treatment, which needs to be further explored through long-term high fat treatment.

Keywords: *Non-alcoholic fatty liver disease, High fat, Autophagy, Folic acid*

前 言

自噬作用是細胞質中的物質，如胞器和蛋白質等，透過溶酶體降解和回收的機制⁽¹⁾ 研究顯示在肝臟中，自噬作用的下降與脂肪變性進展為脂肪性肝炎有關，且自噬作用的抑制會導致脂肪堆積增加與NAFLD 進展。自噬的誘導主要由 AKT/mTOR 和 AMPK 訊息傳導路徑控制，並依賴於兩種大分子復

* Corresponding author: Rwei-Fen Syu Huang

TEL: 886-2-2905-2512

Fax: 886-2-2902-1215

TEL: 886-2-2905-3619

E-mail: 034825@mail.fju.edu.tw

Address: No.510, Zhongzheng Rd., Xinzhuang Dist., New Taipei City 24205, Taiwan (R.O.C.) Fu Jen Catholic University Department of Nutritional Science

合物 ATG1/ULK1 和 Class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) complex 的活化和調控，通常透過 ATG 蛋白、Beclin1 和 LC3-II 的表現來研究典型的自噬作用狀態。當細胞走向自噬作用時會從細胞膜或內質網膜形成雙層膜，膜上會接上如蛋白質與脂質等物質，而後藉由此雙層膜將包裹住形成自噬泡 (autophagosome)，後自噬泡再與溶酶體 (lysosome) 融合形成自噬溶酶體 (autolysosome)，藉由溶酶體內酵素將包裹的物質分解。有研究顯示在 NAFLD 和 NASH 患者的肝臟以及高脂肪飲食的 NAFLD 小鼠模型中，自噬作用均受損。脂肪吞噬 (lipophagy) 是一種溶酶體對細胞內脂滴的選擇性降解，越來越多的證據報導脂肪吞噬在 NAFLD 失調。與健康受試者相比，NAFLD 患者中脂滴、脂質溶酶體 (lipolysosome) 和自噬體 (autophagosome) 數量增加⁽²⁾。高脂肪飲食之小鼠與棕櫚酸高脂誘導 Huh7 人類肝細胞，皆發現 p62 (sequestosome 1) 與 LC3II/LC3I1 (light chain 3) 比值上升，並於 Huh7 細胞中發現溶酶體指標 LAMP1 (lysosome-associated membrane protein 1) 的表現增加，顯示自噬作用的抑制與溶酶體的作用⁽²⁾。脂肪吞噬對於脂滴的作用和肝損傷的預防扮演重要角色，尤其是在脂肪變性的早期階段⁽³⁾。將 HepG2 細胞與飽和棕櫚酸接觸會增加 Rubicon (一種與 Beclin1 相互作用的負調節蛋白) 的表現，增加 p62 和 LC3-II 的表達，並減少自噬體-溶酶體融合 (autophagosome-lysosome fusion)，導致後期自噬作用受到抑制。用富含飽和脂肪酸的高脂肪飲食小鼠表使 AMPK1 失活並過度活化 mTOR，抑制自噬作用並增加小鼠肝臟的脂毒性⁽⁴⁾。脂質代謝酵素的失調也會導致自噬功能受損，從而在 NAFLD 的發展中發揮重要作用⁽⁵⁾。在一研究中 59 位 NAFLD 患者中，發現脂滴與溶酶體的結合以及 p62 的表現量與 NAS 分數及 NAFLD 的進展階段有關⁽²⁾。因此自噬過程的調節被認為可以成為脂肪肝疾病的新治療策略⁽⁶⁾。

在過去研究中，高脂介入對肝癌細胞株 Hep3B 會造成脂肪堆積、增加發炎反應、產生纖維化、粒線體功能失調等現象，並且透過一些藥物與天然物質能夠改善此細胞損傷⁽⁷⁻⁹⁾。而葉酸補充對於改善脂肪肝作用在人體、動物、細胞模式研究中已有探討其中的作用機轉與調控因素。在高脂飲食餵養的葉酸補充治療大鼠中，與脂質新合成、 β -氧化和脂質攝取相關的基因表現得到改善⁽¹⁰⁾。補充葉酸可

以通過恢復肝臟中的 AMPK 活化來改善膽固醇和葡萄糖代謝⁽¹¹⁾，或透過 SIRT1 上調 PPAR α 來改善肝臟脂質代謝⁽¹⁰⁾，而降低脂肪肝。一研究探討葉酸補充對免疫和自噬的影響，將 Wistar 大鼠隨機分成實驗組，分別用含 40% 脂肪的高脂飲食 (HFD) 或標準飲食餵養 8 週。再依組別用不同劑量的葉酸 (分別為 50、100 和 150 mg/kg 體重) 給予。進行血液和組織分析。結果顯示與對照組相比，NAFLD 大鼠血清 IL-22 升高，肝 LC3B 表達降低。葉酸的給予發現改善疾病指標、促發炎細胞因子和 LC3B 表達的減少，這些結果突出了葉酸調節促發炎細胞因子和自噬作用，而對疾病進展產生有利的影響⁽¹²⁾。

綜合先前文獻結果可知高脂影響甲基營養素代謝與肝臟脂肪堆積，以及有越來越多研究探討自噬作用在脂肪肝中的調節作用。已知葉酸對於降低脂肪肝的作用，且部分文獻指出葉酸調節自噬作用與脂肪肝之相關。但目前尚未有研究探討葉酸的補充對降低脂肪肝是否透過調節自噬作用機轉。因此本研究目的為探討葉酸的補充在 Hep3B 細胞株是否透過調控自噬作用改善脂肪肝。

材料與方法

研究設計：以肝癌細胞 Hep3B 給予高脂模式誘導，或以葉酸補充預培養細胞，再以高脂誘導細胞，透過油紅染色檢測其脂滴堆積，以西方墨點法檢測自噬作用途指標蛋白表現，並利用自噬相關抑制劑，抑制自噬指標以了解自噬作用與脂質代謝之調節，利用免疫螢光染色觀察自噬體在細胞中的分布。探討葉酸的補充對肝癌細胞株自噬作用調控與脂肪肝的影響。

(一) 細胞培養

培養細胞之 DMEM 基本配方為高醣培養液，即為正常培養基。對照組與實驗組的 Hep3B (ATCC HB-8064) 均培養在此 DMEM 培養基 (D7777, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。Hep3B (ATCC HB-8064) 人類肝癌細胞培養於 DMEM 高醣培養液。肝癌細胞對照組維持在 DMEM 高醣培養基中。油酸組 (OA)，將油酸以 0.4 mM 的濃度添加到含 1% 胎牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) DMEM 高醣培養基中以誘導脂肪肝細胞

模型。將細胞種到 6 well 中 (2×10^5 cells/ml/well) 中並生長至 50-60%，加入葉酸 (Sigma, St. Louis, MO) 補充培養三天，再依組別加入油酸培養液培養 24 小時。

(二) 藥劑配置

油酸 (Sigma, St. Louis, USA) 溶於 100% 乙醇配製成 100 mM stock，保存於 -20°C 。葉酸粉末以 0.1M NaOH 溶解再以 PBS 定量配置成 100 mM stock，存於 -20°C 。巴非黴素 (Bafilomycin A1, BafA1) 以二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解配置成 100 μM stock，存於 -20°C 。依據實驗需求再稀釋至所需濃度。

(三) 油紅染色

油紅粉末溶於異丙醇中配置，再以水 3：油紅 2 稀釋並過濾成 working buffer。細胞用 10% 福馬林固定 60 分鐘，蒸餾水洗滌，油紅染色 20 min，在以蒸餾水洗滌數次後，以顯微鏡觀察，多功能微量盤分析儀以波長 492 nm 定量。

(四) 西方墨點法

將細胞培養液移除，以 trypsin 收取細胞，使用冰 PBS 清洗 2 次，加入 1X RIPA buffer 混勻，並收取置於冰上作用 15 分鐘，以 13200 rpm， 4°C 離心 30 分鐘，取上清液即為全蛋白質萃取液。以胎牛血清白蛋白標準品定量蛋白，以 TECAN Infinite 200 PRO 波長 595 nm 測定其吸光值，計算樣品蛋白質濃度。定量之蛋白質萃取液與 4X sample buffer (Tris-HCl/SDS, pH 6.8, 10% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 30% glycerol, 1.2 mg bromophenol blue) 混合， 100°C 乾浴加熱 10 分鐘後置於冰上冷卻，加入 SDS-polyacrylamide page，以 100V 進行電泳。

取下電泳完成之膠片，以 100 V 轉漬 1 小時將膠體所分離的蛋白質轉移到 PVDF 膜上。轉漬完成的 PVDF 膜以 blocking buffer 置於 shaker 上，以 55rpm 室溫反應 30 分鐘共 2 次，加入 TBST buffer (含 20 mM Tris、150mM NaCl 和 0.1% Tween-20, pH 7.6) 置於 shaker 上，以 55rpm 室溫清洗 5 分中共 3 次，加入一級抗體 (以 1:500-1:2000 稀釋於 5% BSA 之 TBST buffer) [Antibodies for GAPDH, LAMP2, ATGL, ACC1 (GeneTex, Irvine, CA, USA), LC3B, p62, Beclin1 (ABclonal), PEMT

(CUSABIO, Houston, TX, USA), SREBP1 (Affinity Biosciences), p-AMPK (Cell Signaling Technology)]， 4°C 反應 18 小時以上。移除一級抗體，以 TBST buffer 置於 shaker 上，以 55rpm 室溫清洗 5 分鐘 3 次，加入二級抗體 (anti-rabbit IgG antibody 1:10000 稀釋於 blocking buffer)，室溫反應 1 小時。最後 PVDF 膜以 TBST buffer 置於 shaker 上，以 55 室溫清洗 5 分中共 3 次，將 PVDF 膜與顯影劑反應，使用 UVP 進行自動顯影 (UVP Chem Studio Imaging System-Analytikjena)。

(五) 免疫螢光染色

細胞以 10^3 /ml/well 密度種於 Chamber slide，隔天細胞貼附後依組別給予含藥劑之培養基加入，至指定時間時吸除培養基，以 PBS 每次 5 分鐘清洗三次，再以 4% 福馬林固定 30 分鐘，以 PBS 每次 5 分鐘清洗三次，再加入 0.1% TritonX-100 室溫 10 分鐘將細胞打洞，以 PBS 每次 5 分鐘清洗三次，加入 2% BSA 阻斷 (blocking) 1 小時後，以 PBS 每次 5 分鐘清洗三次，加入一級抗體 LC3B，以 1% BSA 稀釋，置於 4°C 過夜。隔天吸除一級抗體後以 PBS 每次 5 分鐘清洗三次，加入以 1% BSA 稀釋之螢光二級抗體 [Goat Anti-Rabbit IgG antibody (DyLight594)]，於室溫避光作用 1 小時，再加入 DAPI 染劑 50 μl 作用 10 分鐘 [DAPI solution (GeneTex, Irvine, CA)]，以 PBS 每次 5 分鐘清洗三次，移除玻片的格架，滴上封片膠並蓋上蓋玻片進行封片，風乾後即可上機觀察或置於 4°C 保存 (台大貴儀中心 Leica SP5 confocal microscope Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)。

統計分析

實驗數據採用 SPSS 20.0 套裝軟體進行統計分析。結果之數值皆以平均數 (mean) \pm 標準差 (SD) 表示。使用 Student's *t*-test 比較 OA 組與 control 組間差異、葉酸組與 OA 組間差異、抑制劑組與葉酸組間差異。使用 One-way ANOVA 分析不同葉酸劑量與 OA 組之差異，以 Tukey post hoc test 進行事後比較。所有統計數據， $p < 0.05$ 表示達統計上顯著差異。

結 果

一、葉酸補充劑量對高脂暴露 Hep3B 自噬作用指標蛋白質表現之影響

先前文獻多以油酸做為細胞誘導高脂之模式，並且油酸為最常見之脂肪酸，進而對 Hep3B 細胞以 0.4 mM 油酸作用 24 小時，觀察在高脂的調控。以葉酸 2 uM、50 uM、100 M 的劑量預培養，再給予油酸誘導 24 小時，探討葉酸補充對於自噬作用在高脂的調節作用，以西方墨點法檢測自噬作用相關蛋白表現量。相較於對照組，Hep3B 細胞經由油酸處理 24 小時後自噬作用指標 Beclin1、p62 與 LC3BII/LC3BI 表現量並無顯著差異（圖一，A-D）。相較於 OA 組，葉酸補充劑量（2, 50 與 100 uM）降低 OA 處理 Hep3B 細胞之 Beclin1 與 LC3BII/LC3BI 表現量，特別在葉酸補充 2 uM 有顯著影響（ $p < 0.05$ ）。50 uM 葉酸為細胞培養基正常葉酸濃度（2 uM）的 25 倍，相當於人類服用葉酸補充劑可能達到的濃度劑量倍數，故接續實驗以此補充劑量探討對 OA 處理 Hep3B 細胞自噬作用指標之影響。

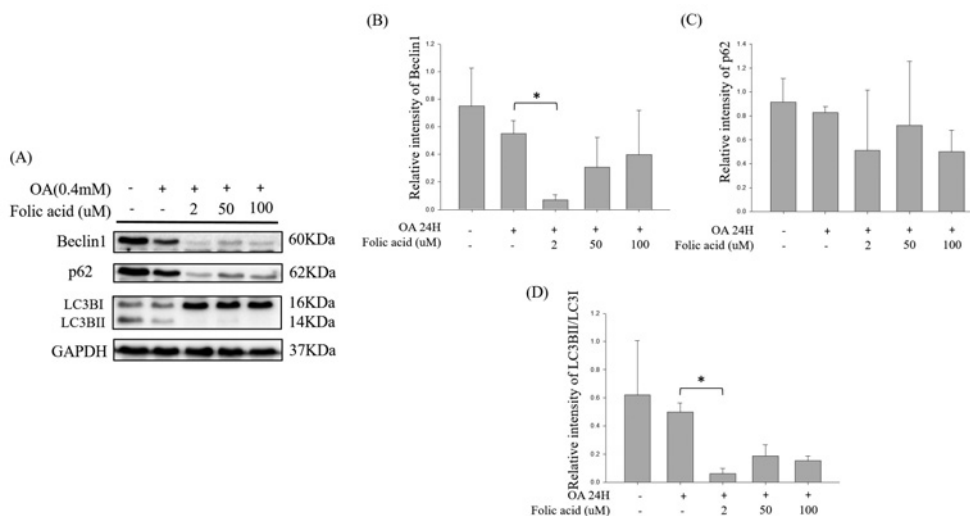
細胞分別於不同濃度葉酸培養基（2, 50, 100 uM）培養三天，再經由 0.4 mM 油酸誘導 24 小時。

（A）透過西方墨點法分析自噬作用蛋白表現，並以 GAPDH 作為控制蛋白。（B）Beclin1 蛋白表現之定量。（C）p62 蛋白表現之定量。（D）LC3II/

LC3I 蛋白表現之定量。所有數值皆以 mean \pm SD 表示。控制組與油酸組統計使用 Student's *t*-test, * $p < 0.05$ 表有統計顯著差異。油酸組與各濃度葉酸組統計使用 One-way ANOVA, Tukey hoc post-test, * $p < 0.05$ 表示統計顯著差異。（ $n = 3\sim 6$ ）（圖一）

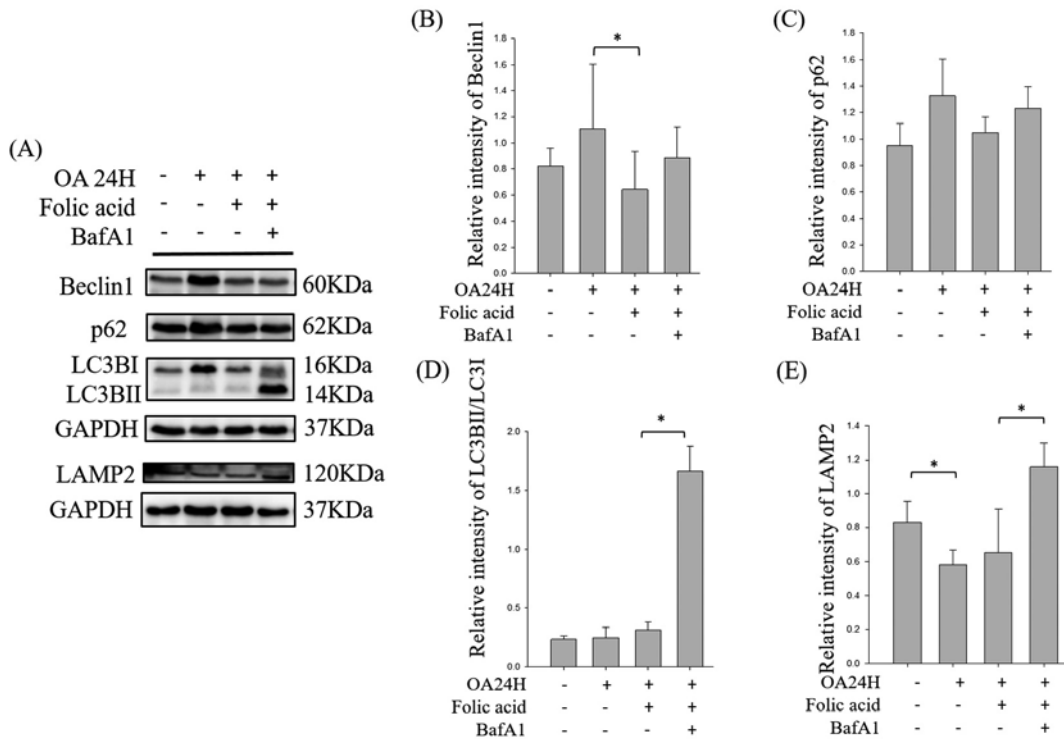
二、葉酸補充與自噬抑制劑對油酸處理 Hep3B 自噬蛋白指標表現之影響

相較於控制組，24 小時油酸處理 Hep3B 後，雖然對 Beclin1，p62 與 LC3II/LC3I 蛋白表現量未有顯著影響（圖二，A-D），惟 OA 處理顯著降低 LAMP2 蛋白表現量（圖二，A and E），推測油酸對自噬作用後期形成 autolysosome 可能有所調節。BafA1 為抑制自噬作用後期 autophagosome 與 lysosome 結合形成 autolysosome 階段，導致 autolysosome 無法順利成行程以完成自噬作用。在指標表現部分，會因為無法形成 autolysosome 而使得自噬作用停滯於 autophagosome 階段以及無法降解 p62，而使得 autophagosome 之形成指標 LC3II 增加。為探討葉酸補充對油酸誘導 Hep3B 自噬作用的詳細作用機轉，利用加入自噬 autolysosome 形成之抑制劑 BafA1，以了解葉酸在自噬作用中的影響階段。圖二顯示，BafA1 介入於 50 uM 葉酸與油酸處理之 Hep3B 細胞中，顯著增加 LC3II/LC3I（圖二，A and D）與 LAMP2 表現（圖二，A and E）。顯示葉酸補充對於油酸誘導自噬作用可能影響自噬 autolysosome



圖一 葉酸補充劑量對 OA 暴露 Hep3B 自噬作用指標蛋白質表現之影響

Figure 1. Effects of folic acid supplementation on molecular markers of autophagy in OA-exposed Hep3B cells



圖二 葉酸補充與自噬抑制劑對油酸誘導 Hep3B 自噬蛋白指標表現之影響

Figure 2. Effect of folate supplementation and autophagy inhibitor on autophagy markers expression in OA-exposed Hep3B

some 階段。

細胞分別於控制組與補充 50 uM 葉酸組培養三天，在依組別給予 BafA1 (125 uM) 培養 2 小時，而後依組別培養於油酸 24 小時。(A) 透過西方墨點法分析自噬作用蛋白表現，並以 GAPDH 作為控制蛋白。(B) Beclin1 蛋白表現之定量。(C) p62 蛋白表現之定量。(D) LC3II/LC3I 蛋白表現之定量。(E) LAMP2 蛋白表現之定量。所有數值皆以 mean ± SD 表示。控制組與油酸組、油酸組與葉酸組、葉酸組與抑制劑組之間統計使用 Student's *t*-test, * *p* < 0.05 表有統計顯著差異。(n = 3~6) (圖二)

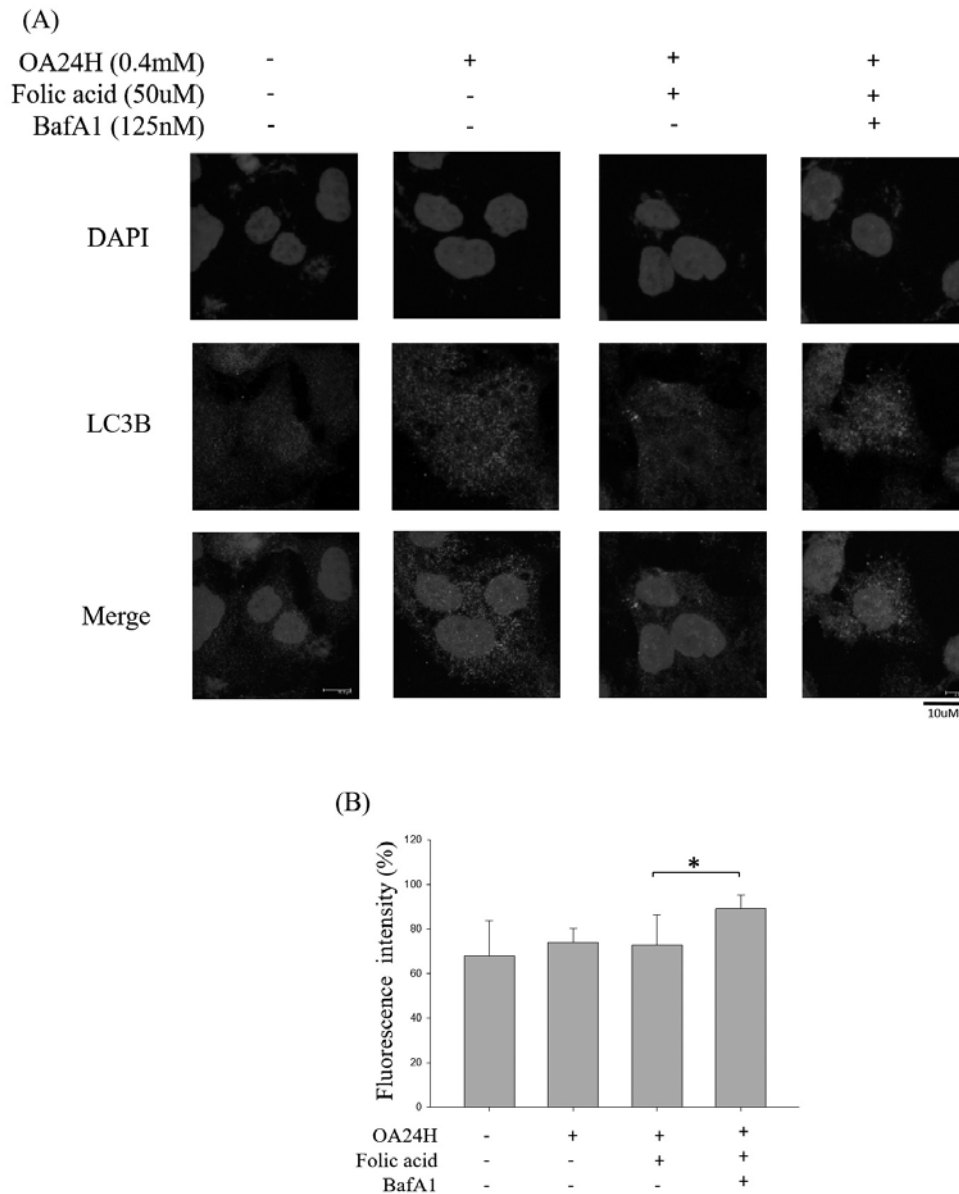
三、葉酸補充與自噬抑制劑對油酸處理 Hep3B 自噬體形成之影響

以免疫螢光染色之 Confocal 影像探討自噬抑制劑對於葉酸補充調節油酸處理自噬體形成作用影響。結果顯示，BafA1 處理葉酸補充與油酸暴露組，顯著增加 LC3 聚集螢光 (圖三, A and B)，顯示 BafA1 抑制葉酸補充與油酸誘導的自噬作用的後期 autolysosome 階段。

細胞分別於控制組與補充 50 uM 葉酸組培養三天，在依組別給予 BafA1 (125 uM) 培養 2 小時，而後依組別培養於油酸 24 小時。固定細胞之後利用一級抗體 (anti-LC3B antibody) 與螢光二級抗體 (secondary anti-rabbit antibody conjugated to DyLight 594) 反應，並以 DAPI stain 染細胞核。經由封片後透過共軛焦顯微鏡觀察。(A) 顯微鏡下所觀察之影像 (紅色: LC3B, 藍色: 細胞核)。(B) 定量表示各組間 LC3B (紅色) 比例 (%)。(n = 3) (圖三)

四、葉酸補充與自噬抑制劑對油酸處理 Hep3B 細胞的脂肪代謝指標影響

接續探討葉酸補充與自噬抑制劑是否影響油酸處理 Hep3B 細胞的脂肪代謝指標 (圖四)。以油酸高脂處理 Hep3B 細胞 24 小時，相較對照組，脂解酶 (Adipose triglyceride lipase: ATGL) 蛋白表現顯著降低；葉酸補充沒有調轉，而自噬抑制劑顯著反轉油酸抑制脂解酶表現 (圖四, A and D)。顯示高脂處理可能透過自噬作用抑制脂解反應。針對油酸處理 Hep3B 細胞補充葉酸顯著增加 SREBP1 (Sterol



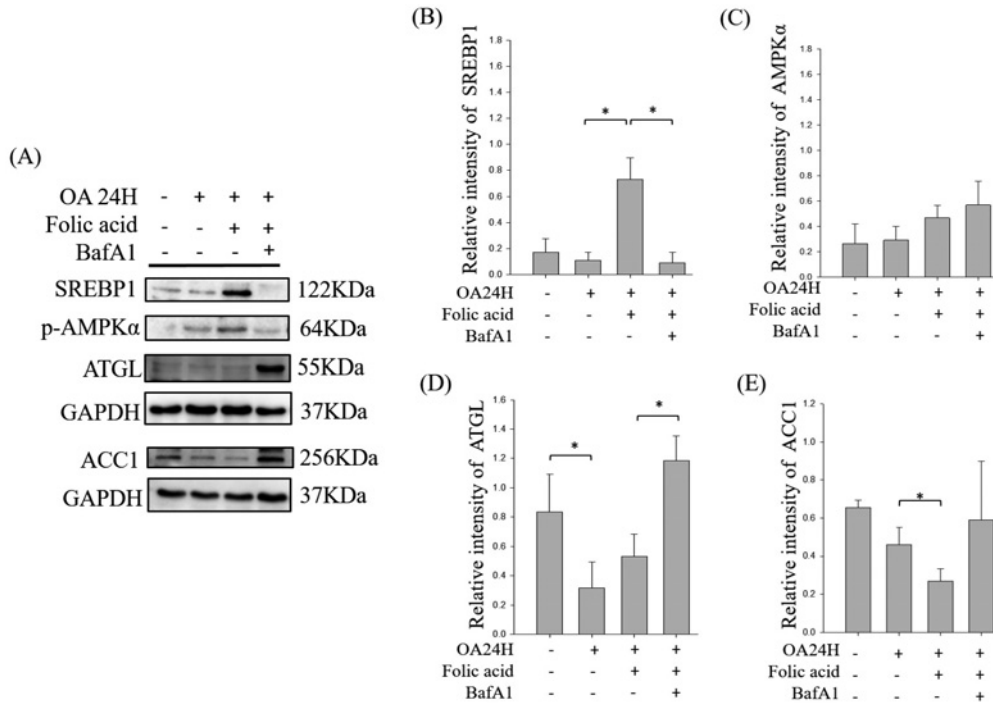
圖三 葉酸補充與自噬抑制劑對油酸處理 Hep3B 自噬體形成之影響

Figure 3. Effect of folic acid supplementation and autophagy inhibitor on autophosome formation in OA-exposed Hep3B cells

regulatory element-binding protein 1, SREBP1) 蛋白表現 (圖四, A and B) 與降低脂質合成速率限制酵素 ACC1 表現 (ACC1 acetyl-CoA carboxylase 1, ACC1) (圖四, A and E)。抑制劑 BafA1 的處理組會反轉葉酸補充組對於 SREBP1 的增加 (圖四: A and B)，顯示葉酸補充可能藉由促進自噬作用後期 (autolysosome) 與脂質代謝上游分子 SREBP1 蛋白表現，增加脂解並降低脂肪合成作用有所關聯。

細胞分別於控制組與補充 50 uM 葉酸組培養三

天，在依組別給予 BafA1 (125 uM) 培養 2 小時，而後依組別培養於油酸 24 小時。(A) 透過西方墨點法分析脂質代謝作用相關蛋白表現，並以 GAPDH 作為控制蛋白。(B) SREBP1 (Sterol regulatory element-binding protein 1) 蛋白表現之定量。(C) p-AMPK α 蛋白表現之定量。(D) ATGL (Adipose triglyceride lipase) 蛋白表現之定量。(E) ACC1 (ACC1 acetyl-CoA carboxylase 1) 蛋白表現之定量。所有數值皆以 mean \pm SD 表示。控制組與油酸



圖四 葉酸補充與自噬抑制劑對油酸處理 Hep3B 細胞的脂肪代謝指標影響

Figure 4. Effect of folic acid supplementation and autophagy inhibitor on lipid metabolism in OA exposed-Hep3B

組、油酸組與葉酸組、葉酸組與抑制劑組之間統計使用 Student's *t*-test, **p* < 0.05 表有統計顯著差異。

(*n* = 3~6) (圖四)

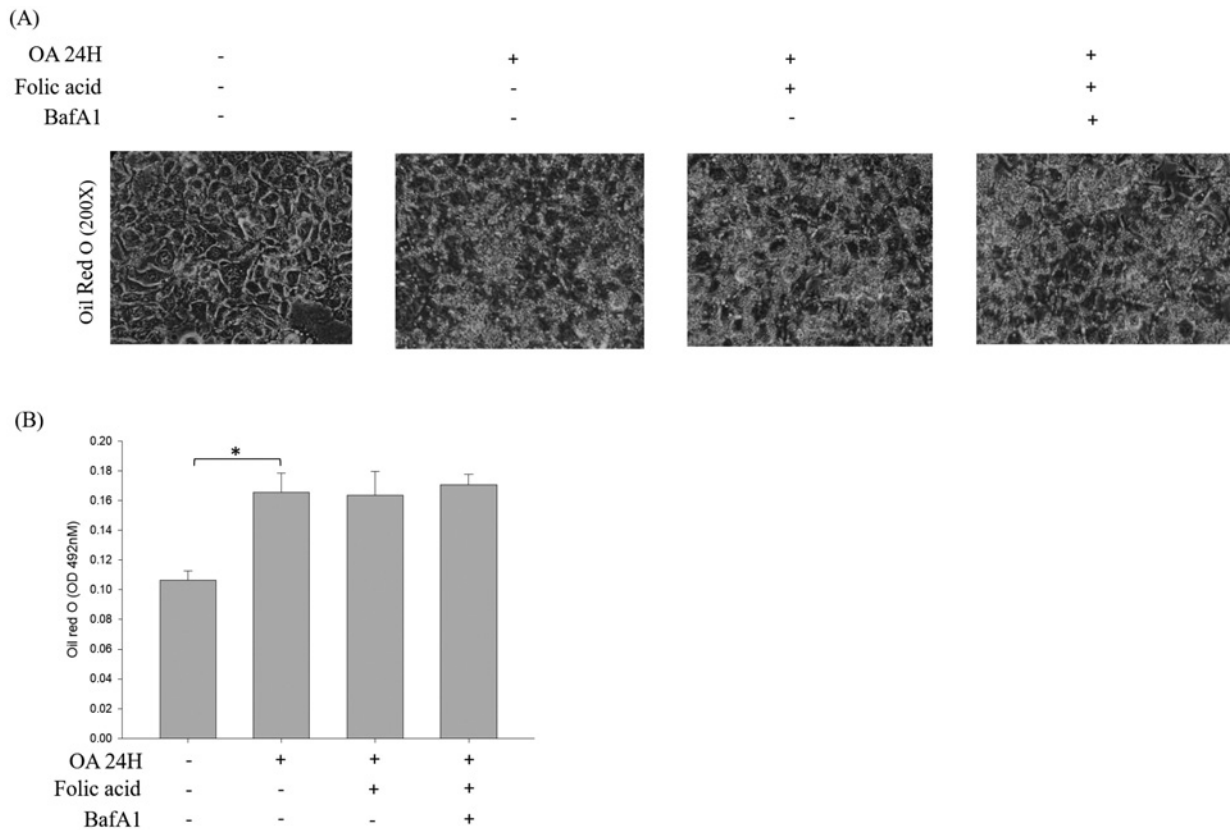
五、葉酸補充與自噬抑制劑對油酸誘導 Hep3B 脂肪堆積之影響

最後擬了解葉酸補充是否調節油酸誘導脂肪堆積。從油紅染色及其定量得知油酸誘導 24 小時造成 Hep3B 細胞脂滴堆積增加。葉酸補充或介入自噬抑制劑對油酸誘導脂滴增加，在油酸處理 24 小時未顯示葉酸降低脂滴堆積的顯著影響性 (圖五, A and B)。葉酸補充調節自噬與脂質代謝指標表現，是否需要更長時間方能觀察到降低脂肪堆積之效應，則需後續實驗加以驗證。

Hep3B 細胞分別於控制組與補充 50 μM 葉酸組培養三天，在依組別給予 BafA1 (125 μM) 培養 2 小時，而後依組別培養於油酸 24 小時。(A) 顯微鏡下油紅染色之影像，放大倍率 200 倍。(B) 以 492 nm 波長檢測定量油滴。所有數值皆以 mean ± SD 表示。控制組與油酸組、油酸組與葉酸組、葉酸組與抑制劑組之間統計使用 Student's *t*-test, **p* < 0.05 表有統計顯著差異。(n = 3~5) (圖五)

討 論

NAFLD 中的脂質的代謝在先前研究中提出會受到自噬作用功能受損所影響⁽²⁾。先前報導中，高脂飲食動物模式會增加自噬作用中 LC3II 與 p62 蛋白表現，且在高脂飲食 16 週 LC3 增加幅度達最高，而 p62 在高脂飲食 2 週時則是先降低蛋白表現⁽¹³⁾。在以棕櫚酸誘導 HepG2、Huh7 細胞高脂模式中，LC3II 在高脂 24 小時表現量上升，而 p62 則為下降，顯示自噬作用在高脂誘導 NAFLD 進展的前期是增加⁽¹¹⁾。在以 1 mM 油酸處理 HepG2 細胞高脂誘導脂肪堆積研究中，發現油酸誘導 24 小時相較對照組自噬指標 LC3II 與 Beclin1 蛋白表現降低⁽¹⁴⁾。而在本研究當中，對於 Hep3B 細胞以油酸高脂誘導細胞 24 小時造成細胞脂肪增加，油酸處理顯著降低 LAMP2 蛋白表現量，推測油酸對自噬作用後期形成 autolysosome 可能有所調節。在自噬作用早期階段，即在自噬體的形成過程中，細胞質的 LC3 (LC3I) 透過 Atg7 和 Atg3 酵素形成 LC3-II。當自噬體 (autophagosome) 與溶酶體融合時，LC3-II 被溶酶體蛋白酶降解。因此 LC3-II 的升高被用作自噬減少的指標。p62 為自噬所需的自噬受體，將



圖五 葉酸補充與自噬抑制劑對油酸誘導 Hep3B 脂肪堆積之影響
Figure 5. Effect of folic acid supplementation and autophagy inhibitor on TG accumulation in OA exposed-Hep3B cells

多泛素化物 (polyubiquitinated cargo) 與自噬體結合。因此 p62 的累積為自噬受阻的另一個指標。脂肪吞噬 (lipophagy) 特別指脂質在自噬的作用，其受損在 NAFLD 的發展中起著致病作用，溶酶體是降解脂肪最後階段的關鍵細胞器，而脂酶體 (lipolysosome) 代表載有脂肪的溶酶體，由特定的水解酶使脂質分解代謝在其中發生⁽²⁾。

一項大鼠高脂飲食誘導 NAFLD 研究中，以葉酸 (50、100 和 150 mg/kg 體重) 給予補充治療。進行血液和組織分析，結果顯示與對照組相比，NAFLD 大鼠血清 IL-22 升高，肝 LC3B 表達降低，葉酸的給予發現改善疾病指標、促發炎細胞因子和 LC3B 表達的減少⁽¹²⁾。而在本研究中，葉酸 50 uM 補充對油酸處理 24 小時之 Hep3B 細胞具有降低 Beclin1 表現的現象。BafA1 介入於 50 uM 葉酸與油酸處理之 Hep3B 細胞中，顯著增加 LC3II/LC3I 與 LAMP2 表現。顯示葉酸補充對於油酸調節自噬作用可能影響自噬 autolysosome 階段。成熟的自噬體

與溶酶體 (lysosome) 融合形成自噬溶酶體 (autolysosome)，分離的細胞質物質在溶酶體相關膜蛋白 (LAMP) 的幫助下降解，抑制自噬溶酶體的形成會導致溶酶體無法順利利用溶酶體相關膜蛋白結合自噬體形成自噬溶酶體⁽¹⁵⁾。自噬後期抑制劑 BafA1 對於葉酸補充在油酸誘導 24 小時增加 LC3II 與 LAMP2 蛋白表現，且與免疫螢光染色圖增加 LC3 聚集相符，顯示抑制自噬後期反轉葉酸補充在油酸中作用，因此葉酸補充對油酸誘導細胞是有走至自噬後期 autolysosome 階段。

然而葉酸在油酸 24 小時並未降低脂滴堆積，透過抑制劑的加入也未對脂滴堆積有顯著影響。因此葉酸補充對於油酸誘導的脂肪堆積調節可能尚未透過自噬作用影響，可能需透過更長時間油酸高脂作用以觀察當中調節。而葉酸也可能夠過其他途徑調節脂肪堆積，在先前有許多文獻中探討葉酸降低 NAFLD 的機制，在小鼠以高脂飲食誘導脂肪肝再合併葉酸補充，會回復 AMPK 磷酸化並降低肝臟

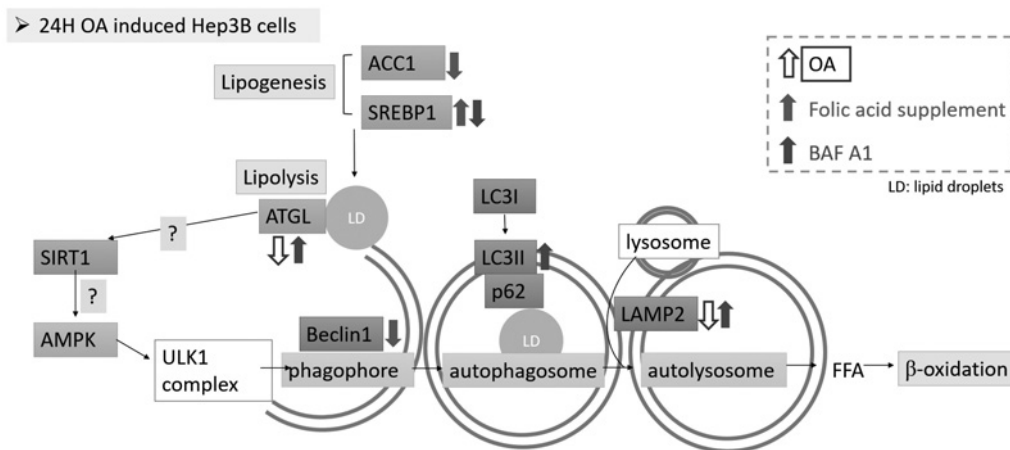
TG 與膽固醇值⁽¹¹⁾。棕櫚酸誘導 HepG2 細胞脂肪堆積增加模式中，葉酸補充也會透過回復 AMPK 磷酸化而降低脂質合成。棕櫚酸誘導 Huh7 細胞與高脂飲食誘導之大鼠，經葉酸的補充會透過增加脂肪酸 α 氧化 (PPAR α) 與降低脂質合成酶 SREBP1c、ACC、FASN 而降低脂肪肝^(10,11)。本研究在葉酸補充後，增加 SREBP1 表現與降低 ACC1 表現，顯示葉酸補充對於油酸誘導之脂質合成作用影響，AMPK 表現則未有影響，可能為本研究模式使用油酸與先前研究所使用棕櫚酸不同，在脂質代謝中所參與及扮演的角色有所不同而可能產生不同影響。脂質代謝指標可能因著油酸與葉酸作用時間點的差異而有先後變化，目前尚無法確定當中脂質生合成作用的增減有影響脂肪堆積。在抑制自噬後期所看到對於 SREBP1 的降低與 ATGL 的增加表現可能降低了脂質合成作用，但也未反映於脂肪堆積上。因此需透過更進一步油酸高脂不同時間點長期作用下，來觀察並檢測探討葉酸補充對於自噬作用與脂質代謝對於高脂脂肪堆積的調節作用 (圖六)。

結 論

葉酸補充對油酸處理 24 小時 Hep3B 細胞株會調節自噬通量走至自噬後期 autolysosome 階段。autolysosome 抑制劑 BafA1 處理反轉葉酸補充組對於 SREBP1 的增加，顯示葉酸補充可能藉由促進自噬作用後期調節脂質代謝上游分子與增加脂解並降低脂肪合成作用有所關聯。但對於短期高脂造成脂肪堆積尚未有影響，需透過長期高脂進一步探討。

致 謝

感謝科技部補助研究計畫經費 (MOST 109-2320-B-030-012-MY3) 支持本研究計畫案執行。感謝蘇純立教授 (師大營養科學學位學程) 對執行本研究的技術與專業指導。



圖六 葉酸補充對高脂暴露人類肝癌細胞株 Hep3B 自噬作用與脂質代謝分子表現之可能機轉

Figure 6. Plausible mechanisms by which folic acid supplementation modifies autophagy and lipid metabolism biomarkers in high fat-exposed Hep3B

參考文獻

1. Klionsky, T.Y.a.D., Autophagy molecular machinery for self-eating, *Cell Death Differ.* 2005; 12:1542-1552.
2. Simone Carotti, K.A., Francesca Zalfa et al., Lipophagy Impairment Is Associated With Disease Progression in NAFLD. *Front Physiol.* 2020;11:850.
3. Grefhorst, A., et al., The Role of Lipophagy in the Development and Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:601627.
4. Li, S., et al., Sirtuin 3 acts as a negative regulator of autophagy dictating hepatocyte susceptibility to lipotoxicity. *Hepatology.* 2017;66:936-952.
5. Niture, S., et al., Emerging Roles of Impaired Autophagy in Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Int J Hepatol.* 2021;2021:6675762.
6. Wang, K., Molecular mechanism of hepatic steatosis: pathophysiological role of autophagy. *Expert Rev Mol Med.* 2016;18:e14.
7. Szuster-Ciesielska, A., et al., Metformin inhibits both oleic acid-induced and CB1R receptor agonist-induced lipid accumulation in Hep3B cells: The preliminary report. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2019;33:2058738419832714.
8. Huang, J., et al., 7alpha,25-Dihydroxycholesterol Suppresses Hepatocellular Steatosis through GPR183/EBI2 in Mouse and Human Hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2020; 374:142-150.
9. Yoo, J., et al., Fenofibrate, a PPARalpha agonist, reduces hepatic fat accumulation through the upregulation of TFEB-mediated lipophagy. *Metabolism.* 2021;120:154798.
10. Xin, F.Z., et al., Folic acid attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis via deacetylase SIRT1-dependent restoration of PPARalpha. *World J Gastroenterol.* 2020; 26:2203-2220.
11. Sid, V., et al., Folic acid supplementation during high-fat diet feeding restores AMPK activation via an AMP-LKB1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;309:R1215-25.
12. Youssry, S. and M.A. Kamel, Effect of folate supplementation on immunological and autophagy markers in experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Eur Cytokine Netw.* 2019;30:135-143.
13. Hao Ding, G.G., Yujen Tseng, Yanyun Ma, Jun Zhang, Jie Liu, Hepatic autophagy fluctuates during the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2020;19:516-522.
14. Balachander, G.J., S. Subramanian, and K. Ilango, Rosmarinic acid attenuates hepatic steatosis by modulating ER stress and autophagy in oleic acid-induced HepG2 cells. *RSC Adv.* 2018;8:26656-26663.
15. Liu, Y. and B. Levine, Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ.* 2015;2: 67-76.

葉酸補充對高脂暴露人類肝癌細胞株 Hep3B 自噬作用與脂質代謝分子表現之影響

李貞瑩¹ 許瑞芬^{1*}

¹輔仁大學學校財團法人輔仁大學營養科學系

(收稿日期：112 年 01 月 06 日。接受日期：112 年 03 月 15 日)

摘要 高脂誘導在肝臟與肝癌細胞株會造成代謝失調而形成脂肪堆積。研究已有報導自噬作用對於清除脂肪之作用。已知葉酸補充對會調節脂質代謝、發炎反應等途徑降低脂肪肝。而葉酸補充會降低高脂飲食大鼠肝臟自噬表現，但其作用機制不明確。因此本研究目的為探討葉酸補充對肝癌細胞株改善高脂誘導肝脂肪堆積是否透過自噬作用調控。研究選用似人類肝脂肪代謝之肝癌細胞株 Hep3B，補充葉酸後給予油酸 0.4 mM 處理 24 小時誘導脂肪堆積，檢測自噬指標。結果顯示 (1)相較對照組，油酸介入後對自噬作用指標皆無顯著影響。葉酸補充與油酸處理相較油酸介入組降低自噬前期 Beclin1 蛋白表現。(2)在葉酸補充與油酸處理中加入 autolysosome 抑制劑 BafA1，會反轉葉酸補充與油酸之 autophagosome 指標（上調 LC3II），且由免疫螢光染色看到較多的 LC3 聚集。(3)油紅染色發現葉酸補充對油酸 24 小時處理之脂肪堆積未有影響。整體結果顯示，葉酸補充對油酸以高脂誘導 Hep3B 細胞株會調節降低自噬前期作用，但短期高脂造成脂肪堆積尚未有影響，需透過長期高脂進一步探討。

關鍵詞：非酒精性脂肪肝、高脂、自噬作用、葉酸

* 通訊作者：許瑞芬

通訊作者辦公室電話 (Tel)：886-2-2905-2512

通訊作者傳真電話 (Fax)：886-2-2902-1215

通訊作者實驗室電話 (Tel)：886-2-2905-3619

通訊地址：24205 新北市新莊區中正路 510 號輔仁大學營養科學系

E-mail：034825@mail.fju.edu.tw