

VI CONGRESO EPHAR

PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN ORAL

Fructose induces synthesis and reduces oxidation of liver fatty acids through CHREBP activation

A Rebollo^{a,b}, M Baena^b, N Roglans^{a,b,c}, M Alegret^{a,b,c}, JC Laguna^{a,b,c}

INTRODUCTION AND AIMS

During last few decades, the prevalence of obesity, metabolic syndrome and insulin resistance, among other metabolic disturbances, has raised considerably in many countries worldwide. Environmental factors (diet, physical activity), in tandem with predisposing genetic factors, may be responsible for this trend¹. Along with an increase in total energy consumption during recent decades, there has also been a shift in the type of nutrients, with an increased consumption of fructose, largely attributable to a greater intake of beverages containing high levels of fructose^{2,3}.

It has been accepted the rat as a good model for the study of fructose metabolism in humans⁴. A high-fructose diet in rats induces metabolic alterations similar to those found in the metabolic syndrome⁵. In fact, in previous studies, our research group showed that fructose administration (10% w/v) into drinking water during 14 days causes hypertriglyceridemia and fatty liver as a result of an induced synthesis and a reduced oxidation of liver fatty acids^{6,7,8}. These metabolic disturbances caused by liquid fructose consumption were observed both in male and in female rats. However, only in male rats they were caused by a state of hepatic leptin resistance^{7,8}. Therefore, the aim of this work was to determine the molecular mechanisms involved in the hypertriglyceridemia and hepatic steatosis induced by fructose supplementation in female rats.

METHODS

Female Sprague-Dawley rats had free access to water (n=8) or to a 10 %

(w/v) fructose solution (n=12). After 7 and 14 days, animals were sacrificed by decapitation under isoflurane anesthesia and plasma and liver samples were obtained for determining plasma analytes, liver triglycerides, liver enzyme activities and expression of enzymes and transcription factors related to fatty acid metabolism. To confirm possible molecular mechanisms, FaO rat hepatoma cells, and a primary culture of human hepatocytes were incubated for 24 hours in absence or presence of 25 mM fructose (n=4 for each treatment).

RESULTS AND DISCUSSION

As it can be observed in table 1, fructose-supplemented female rats, had increased plasma and liver triglyceride concentrations after 14 days but not at 7 days of treatment. The hepatic expression of lipogenic genes such as Liver Pyruvate Kinase (L-PK) and Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) was induced by fructose consumption both at 7 and 14 days, but the nuclear content of the transcription factor Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP), which induces liver lipogenesis after carbohydrate ingestion⁹, was only increased in the liver of those animals which had consumed fructose for 14 days. In regard to fatty acid -oxidation activity, it was reduced by fructose consumption both at 7 and 14 days, but the expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) and its target genes Acyl-CoA Oxidase (ACO) and Liver Carnitine Palmitoyl Transferase I (L-CPT-I), enzymes that strictly control fatty acid -oxidation activity, was only decreased after 2 weeks of fructose treatment, showing an important role of PPAR down-regulation in the

^a Unitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ^b Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain. ^c CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, Spain

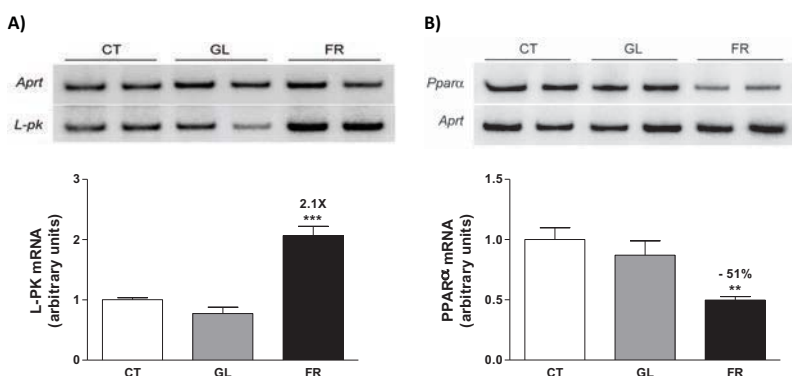


Figure 1. mRNA levels of L-PK (A) and PPARα (B) from FaO cells treated in absence (control cells, CT) or presence of 25 mM glucose (GL) or fructose (FR) during 24 hours. Results are expressed as mean ± SD of n=4 samples per each treatment group. Representative images of the corresponding α-³²P-dATP radiolabeled PCR assays are shown at the top of each figure. **p<0.01; ***p<0.001 vs CT.

onset of hypertriglyceridemia and hepatic steatosis induced by fructose.

On the other hand, incubation of FaO cells, a well-known rat hepatoma cell line, with 25 mM fructose also increased the nuclear content of ChREBP and the expression of its main target gene, L-PK. Moreover, fructose treatment to FaO cells reduced the expression of the nuclear receptor PPAR and its target genes, CYP4A1 and ACO. Furthermore, in a primary culture of human hepatocytes, fructose treatment also increased L-PK gene expression,

indicating the activation of ChREBP transcription factor, and down-regulated PPAR and L-CPT-I expression (Table 2).

Concerning the cause of PPAR down-regulation, Boergesen et al. have recently described that glucose can repress PPAR expression through the activation of ChREBP in β -pancreatic cells¹⁰. Interestingly, when we treated FaO cells in presence of glucose or fructose at 25 mM concentration during 24 h, we observed a down-regulation of PPAR expression only in those cells incubated with fructose and not with glucose (Figure 1A). Similarly, L-PK gene expression was only induced by fructose treatment, indicating that only fructose and not glucose was capable of activating ChREBP in FaO cells (Figure 1B).

Moreover, as Bricambert et al. showed that ChREBP acetylation leads to an increased binding activity of this transcription factor¹¹, we determined the acetylation degree of ChREBP. We observed an increase of the acetylation of this protein only in the livers of 14 days-fructose fed rats (Figure 2), occurring at the same time as down-regulation of PPAR expression.

Table 1. Fructose effects on lipid metabolism of Sprague-Dawley female rats (CT: control; FR: fructose)

	7 days		14 days	
	CT	FR	CT	FR
Plasma triglycerides (mg/dL)	58 ± 27	57 ± 13	63 ± 12	94 ± 17 [†]
Hepatic triglycerides (mg/g liver)	6.8 ± 0.6	8.2 ± 3.0	4.1 ± 2.3	7.7 ± 2.4 [†]
L-PK mRNA (a.u.)	1.02 ± 0.29	1.59 ± 0.14 ^{**}	1.00 ± 0.05	2.12 ± 0.64 ^{**}
SCD1 mRNA (a.u.)	1.00 ± 0.52	11.98 ± 5.06 ^{**}	1.00 ± 0.39	4.39 ± 2.53 ^{**}
ChREBP nuclear protein (a.u.)	1.00 ± 0.14	1.15 ± 0.23	1.00 ± 0.36	2.01 ± 0.87 [†]
FA β-oxidation activity (nmol ¹⁴ C-palmitoyl-CoA/min/mg protein)	0.53 ± 0.13	0.29 ± 0.08 [‡]	0.60 ± 0.07	0.35 ± 0.10 ^{**}
PPARα mRNA (a.u.)	1.00 ± 0.72	2.08 ± 0.40 [*]	1.00 ± 0.27	0.36 ± 0.22 ^{**}
ACO mRNA (a.u.)	0.99 ± 0.09	1.26 ± 0.12 ^{**}	1.02 ± 0.02	0.80 ± 0.11 [†]
L-CPT-I mRNA (a.u.)	1.00 ± 0.48	1.68 ± 0.69	1.0 ± 0.37	0.56 ± 0.21 [†]

‡p=0.07; †p=0.06; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs CT
a.u.: arbitrary units



Figure 2. Lys acetylation levels of ChREBP protein from liver total extracts of 7 and 14 days fructose-fed female rats. Representative images of the corresponding immunoprecipitation-Western Blot assays (IP: anti-acetyl-Lys; Blot: anti-ChREBP) are shown.

In summary, our results suggest that fructose can reduce fatty acid catabolism through the increase of the nuclear content and hyperactivation of ChREBP. We are now transfecting FaO cells with a siRNA

against ChREBP in order to confirm the involvement of ChREBP activation by fructose in the reduction of PPAR expression.

Table 2. Fructose effects on the expression of different enzymes and transcription factors related to lipogenesis or fatty acid catabolism on FaO cells and human hepatocytes in absence (control, CT) or presence of 25 mM fructose (FR) during 24 hours.

FaO cells		
	CT	FR
ChREBP nuclear protein (a.u.)	1.00 ± 0.15	1.40 ± 0.18*
L-PK mRNA (a.u.)	1.00 ± 0.05	1.90 ± 0.07***
PPAR α mRNA (a.u.)	1.00 ± 0.10	0.57 ± 0.06***
CYP4A1 mRNA (a.u.)	1.00 ± 0.09	0.48 ± 0.03**
ACO mRNA (a.u.)	1.00 ± 0.09	0.88 ± 0.03*
Human hepatocytes		
	CT	FR
L-PK mRNA (a.u.)	1.00 ± 0.06	1.86 ± 0.38*
PPAR α mRNA (a.u.)	1.00 ± 0.06	0.69 ± 0.15*
L-CPT-I mRNA (a.u.)	1.00 ± 0.05	0.73 ± 0.11**

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs CT

Bibliografía

- Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2007 Oct;86(4):899-906.
- Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002 Nov;76(5):911-22.
- Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010 May;7(5):251-64.
- Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002 May;282(5):E1180-E1190.
- Oron-Herman M, Kamari Y, Grossman E, Yeger G, Peleg E, Shabtay Z, et al. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens* 2008 Sep;21(9):1018-22.
- Roglans N, Vila L, Farre M, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, et al. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 2007 Mar;45(3):778-88.
- Vila L, Roglans N, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology* 2008 Nov;48(5):1506-16.
- Vila L, Roglans N, Perna V, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Alegret M, et al. Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose. *J Nutr Biochem* 2011 Aug;22(8):741-51.
- Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 2006 Aug;4(2):107-10.
- Boergesen M, Poulsen LC, Schmidt SF, Frigerio F, Maechler P, Mandrup S. ChREBP mediates glucose repression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2011 Apr 15;286(15):13214-25.
- Bricambert J, Miranda J, Benhamed F, Girard J, Postic C, Dentin R. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 2010 Dec 1;120(12):4316-31.

Normas para los autores de colaboraciones

Basadas en las "normas uniformes para los originales enviados a las revistas biomédicas", redactadas por el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas.

Actualidad en Farmacología y Terapéutica (AFT) es una revista de educación continuada que persigue informar y formar a los profesionales del medicamento, sobre los aspectos más actuales de la farmacoterapia. Por ello, publica solo artículos de revisión y actualización sobre los más variados aspectos de las propiedades de los fármacos, siempre en el contexto de su aplicación en la profilaxis y terapéutica de las enfermedades humanas. La información y contenido de sus distintas secciones se fundamentará en estudios serios y objetivos y se apoyará siempre en el más completo rigor científico. Todas sus secciones se editarán en lengua castellana.

Los trabajos deben ser inéditos y no estar en fase de publicación, o haberse publicado, en ninguna otra revista. Se redactarán siguiendo las instrucciones a los autores que se describen más abajo y se remitirán por **correo electrónico** a la siguiente dirección: luis.gandia@uam.es

Los manuscritos se acompañarán de una carta en la que se especificará que el trabajo no ha sido publicado, ni está en fase de publicación, en ninguna otra revista.

Los trabajos deben atenderse a las secciones de la revista, ajustarse en su confección a las normas dadas más abajo y redactarse en forma clara y concisa. Una vez aceptados, quedan como propiedad de los editores y no podrán ser reimpresos sin autorización de los mismos. Asimismo, los editores se reservan el derecho de realizar los cambios necesarios para conseguir una mayor homogeneidad en lo referente a la corrección, expresión y claridad idiomática de los mismos. En los trabajos sólo se utilizarán los nombres genéricos de los fármacos, en minúsculas.

La Redacción acusará recibo de los originales. En el plazo más breve posible (entre uno y dos meses), comunicará a sus autores la aceptación o no del trabajo, la fecha aproximada de su publicación y la sugerencia de posibles modificaciones. La responsabilidad del contenido de los trabajos recaerá exclusivamente sobre los autores que los firman.

Artículos originales

Los artículos con referencias al tratamiento de enfermedades concretas, harán énfasis en el tratamiento farmacológico, farmacocinética y pautas terapéuticas. Las referencias a la descripción de la enfermedad y a su diagnóstico deben ser mínimas (una página inicial, a lo sumo); el protagonista debe ser el medicamento y las alusiones a la enfermedad deben ser las mínimas para poder razonar las distintas opciones terapéuticas.

La extensión de los artículos no debe superar las 15 páginas a máquina, y unas 5 figuras o tablas. Constarán de las siguientes secciones:

Portada: Contendrá el título del trabajo en letras mayúsculas, iniciales del nombre de cada autor seguidas del o de los apellidos; departamento, servicio y centro en el que se ha realizado.

Presentación: Consistirá en una corta frase de no más de ocho líneas mecanografiadas, distinta del resumen, que resaltará el interés del trabajo e inducirá a su lectura. Se escribirá en hoja aparte.

Texto: El texto del trabajo debe iniciarse en hoja aparte y redactarse siguiendo una secuencia lógica en hojas consecutivas. Se organizará con epígrafes y subtítulos que faciliten su lectura.

Resumen: Se iniciará su redacción en hoja aparte y su extensión no será superior a las 200 palabras. Esta página debe ir al final, antes de la bibliografía.

Bibliografía: : Se citará en el texto mediante numeración correlativa, según el orden de aparición en el mismo. En la relación bibliográfica las referencias aparecerán, igualmente, con la numeración correlativa, con el mismo orden de aparición que en el texto, SIN ALFABETIZAR. Las citas bibliográficas deben seleccionarse escrupulosamente (20 como máximo), sin que la necesaria limitación (por razones de espacio) merme la calidad y el rigor científico de los trabajos.

Las referencias de artículos de revistas incluirán: apellidos e inicial del nombre/s del autor o autores en su totalidad, título, publicación (sin abreviaturas), año, volumen, primera y última página. *Ejemplo:*

Baron, E.J.; Gates, J.W.: Primary plate identification of group A beta-hemolytic streptococci utilizing a two-disk technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 1979; 10: 80-84.

Las referencias de libros incluirán: apellidos e inicial del nombre/s del autor o autores en su totalidad, título, editor/es la (si lo hay), editorial, lugar y año de publicación y páginas. *Ejemplo:*

Sabath, L.D.; Masten, J.M.: Análisis de los agentes antimicrobianos. En: Lennette, E. H.; Spaulding, E. H.; Truant, J. (ed.): *Manual de Microbiología Clínica*. Salvat, Barcelona, 1981, pp. 437-440.

Frases para entresacar: En otra hoja aparte, se reseñarán cinco frases entresacadas del texto, que resalten los aspectos más relevantes del mismo.

Iconografía: Las tablas, figuras, cuadros, gráficas, esquemas, diagramas, fotografías, etc., deben numerarse con números ordinales, utilizando, tanto en el texto como en su título, la palabra completa "sin abreviaturas" (V.G.: tabla 1, figura 3). Las tablas, en formato word, llevarán su título (a continuación del número correspondiente) en su parte superior. Las figuras, cuadros, gráficas, esquemas, diagramas y fotografías portarán su título, a continuación del número correspondiente en su parte inferior. Cada uno de estos materiales iconográficos se remitirá en formato digital (jpeg, tiff, eps), separados del artículo, en un archivo de imagen con una resolución de 300 ppp (puntos por pulgada).

Nota importante: no pegar las imágenes en un documento de word, puesto que reduce notablemente su calidad. Enviar siempre en los formatos anteriormente especificados.

Contacto:

Luis Gandía Juan.

Redactor Jefe.

Instituto Teófilo Hernando

Facultad de Medicina. UAM.

Avda. Arzobispo Morcillo, 4

28029-Madrid

Tlfo.: 91 497 53 96 Fax: 91 497 31 20

c.e.: luis.gandia@uam.es