文章编号:1000-5404(2006)10-1063-03

论著

SREBP-1c在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义

艾正琳,陈东风 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042)

提 要:目的 观察高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)过程中肝组织固醇调节元件结合蛋白-1C(sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c)的表达,探讨SREBP-1c与NAFLD形成的关系。**方法** 建立大鼠高脂饮食NAFLD模型,用免疫组织化学染色与半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)动态观察NAFLD肝组织中SREBP-1c表达变化,并测定受其调控的脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)酶活性变化。**结果** 与正常对照组相比,NAFLD组大鼠血清FFA、TG水平,肝组织SREBP-1c蛋白表达,FAS酶活性在第2周时变化无显著差异($P>0.05$),而从第4周开始显著增加($P<0.05$),第12周时达高峰($P<0.01$);而SREBP-1c mRNA于2周时开始增加($P<0.05$),12周达高峰($P<0.01$)。**结论** 高脂饮食引起SREBP-1c表达增强,最初是一种适应性反应,随着SREBP-1c表达进一步增强,导致脂肪酸代谢失衡,甘油三酯(triglyceride, TG)合成增多,与NAFLD的发生关系密切。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病;固醇调节元件结合蛋白-1c;脂肪酸合成酶
中图法分类号: R341;R394.2;R575.02 **文献标识码:** A

Expression and significance of sterol regulatory element binding protein-1c in nonalcoholic fatty liver disease in rats

AI Zheng-lin, CHEN Dong-feng (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of sterol regulatory element binding proteins-1c (SREBP-1c) in the liver tissues during fatty diet-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats and to explore the relationship between the expression of SREBP-1c and nonalcoholic fatty liver disease. **Methods** Rat model of nonalcoholic fatty liver disease was established with fatty diet. The expression of protein and mRNA of SREBP-1c in the liver was dynamically detected by immunohistochemistry and reverse transcription and polymerase chain reaction. Meanwhile, fatty acid synthases (FAS) activity controlled by SREBP-1c was measured. **Results** Compared to pair-fed controls, the level of serum FFA and TG and the expression of SREBP-1c protein in NAFLD at the 2nd week showed no significant change ($P>0.05$), while at the 4th week significantly increased ($P<0.05$), and peaked at the 12th week ($P<0.01$). Meanwhile, the expression of SREBP-1c mRNA at the 2nd week was increased ($P<0.05$), and peaked at the 12th week ($P<0.01$). **Conclusion** Enhanced expression of SREBP-1c in fatty diet-induced NAFLD is adaptative reaction at early stage. The disturbance of fatty acid metabolism and the elevated triglyceride level resulted from enhanced SREBP-1c expression are closely related with NAFLD.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease; SREBP-1c; fatty acid synthetase

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病及演变机制较复杂,由多种因素共同参与,其中关键影响因素之一是血浆游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)及甘油三酯(triglyceride, TG)合成显著增加。固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding proteins, SREBPs)是一类位于内质网上的膜连接蛋白,SREBP-1c是其中的一个亚型,主要与脂肪酸代谢和糖代谢有关,是参与脂肪合成基因的主要转录调节因子[1]。本研究采用RT-PCR与免疫组织化学方法动态观察SREBP-1c在高脂饮食脂肪肝大鼠模型中的表达,及其调控脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)的活性变化,并探讨SREBP-1c与

作者简介:艾正琳(1977-),女,湖北省黄梅市人,硕士研究生,医师,主要从事非酒精性脂肪肝发病机制方面的研究。电话:(023)68757342
通讯作者:陈东风,电话:(023)68757362,E-mail:dfchen9@hotmaail.com
收稿日期:2005-11-29;修回日期:2006-01-13

NAFLD 的关系。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型建立

Wistar 成年雄性大鼠 48 只，体质量(180 ± 2.3) g (第三军医大学实验动物中心提供)。适应性饲养 1 周后，分为正常饮食组与 NAFLD 组，每组又分为 2、4、8、12 周 4 个时相点，各时相点随机分配 6 只动物。正常饮食组给予基础饲料(第三军医大学实验动物中心提供)，NAFLD 组给予高脂饲料(基础饲料 88%，猪油 10%，胆固醇 2%)，分别于 2、4、8、12 周从心脏采血测定血清学指标，并收集肝脏标本。

1.2 主要试剂

兔抗大鼠 SREBP-1 多克隆抗体(Santa Cruz 公司，sc-367)，PV-6001 二步法免疫组织化学检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司)，Trizol 试剂(博大泰克公司)，TaKaRa RT-PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒(大连宝生生物公司)，SREBP-1c β-actin 引物由北京赛百盛公司合成。

1.3 肝组织病理学

石蜡切片，常规 HE 染色，观察脂肪肝程度。石蜡切片 SREBP-1c 免疫组织化学染色。按 PV-6001 二步法免疫组织化学检测试剂盒说明书进行，一抗浓度 1∶200。以正常肝组织作阳性对照，用 PBS 液替代一抗做阴性空白对照，DAB 显色，苏木精复染，中性树胶封片。

1.4 血浆 FFA，TG 测定

采用全自动生物化学分析仪测定血浆 FFA、TG 水平。

1.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

采用 Trizol 一步法提取肝组织总 RNA，完成逆转录反应。引物序列：SREBP-1c 上游：5′-GCC ATC GAC TAC ATC CGC TTC TT-3′；SREBP-1c 下游：5′-TGG GCT TTC ACC TGG TTA TCC TC-3′，扩增片段长度 311 bp。β-actin 上游：5′-CTG AGA GGG AAA TCG TGC GT-3′；下游：5′-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT TG-3′，扩增片段长度 486 bp。PCR 扩增：将反转录合成的 cDNA 再加入 5 × RT Buffer 1 μl，TaKaRa Ex *Taq* HS 0.25 μl，上游引物 0.5 μl，下游引物 0.5 μl，RNase Free dH_2O 至总体积 50 μl，94 ℃ 预变性 2 min，94 ℃ 变性 30，56 ℃ 退火 30，72 ℃ 延伸 40，进行 30 个循环，最后 72 ℃ 再延伸 5 min。经 2% 琼脂糖凝胶电泳，利用 Image Master VDS-CL 凝胶分析系统 (Amersham Biosciense 公司) 对扩增产物条带进行扫描，分别以 SREBP-1c/β-actin 的吸光度比值作为 SREBP-1c mRNA 表达的相对含量。

1.6 FAS 酶活性测定

FAS 活性测定参照 Tian 等方法制定，于含有 1 mmol/L EDTA 的 pH 7，0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液中进行。底物浓度为乙酰 CoA 6 mol/L，丙二酰 CoA 12 mol/L，NADPH 37.5 mol/L，体积 2 ml，1 cm 光径，于 37 ℃ 水浴恒温 4 ~ 5 min。加入 50 μl 稀释后的高速离心上清液启动酶反应，于 340 nm 波长下连续监测吸光度变化，此为 NADPH 经 FAS 催化氧化为 NADP 所致。使用分光光度机(Beckman DU7500)在 340 nm 波长下测定分光度。空白对照实验使用去离子水进行。

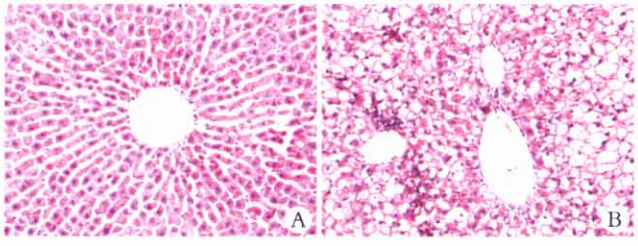
1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 肝组织病理学变化

HE 染色切片光镜下观察可见，对照组大鼠肝组织的形态学表现正常。NAFLD 组 2 周可见肝小叶结构完整，肝细胞索清晰，仅少数肝细胞出现小泡样脂滴；4 周时肝小叶结构稍显紊乱，肝细胞索欠清晰，部分肝细胞质疏松，有较多的脂滴存在；8 周时见肝小叶结构明显紊乱，肝细胞索模糊乃至消失，肝细胞明显浊肿，大多数肝细胞质充满脂滴，脂肪变肝细胞 > 75%，为重度脂肪变；12 周时肝小叶结构紊乱更加明显，广泛肝细胞变性，除有重度脂肪变外，还可见少许肝细胞坏死，汇管区可见炎细胞浸润，为脂肪性肝炎期(图 1)。

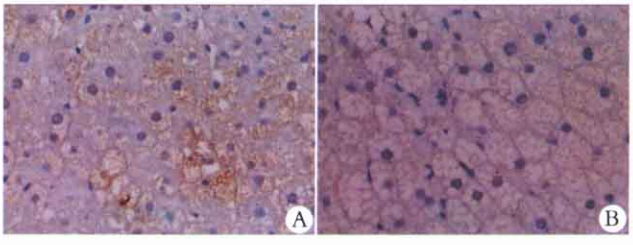


A：正常组；B：NAFLD 组 12 周大鼠

图 1 大鼠肝脏病理 HE 染色 (×200)

2.2 SREBP-1c 免疫组化结果

正常对照组 SREBP-1c 表达于胞浆质中，可见肝细胞质中散在分布浅黄色颗粒。NAFLD 组 2 周 SREBP-1c 表达与正常对照组相比无明显变化；4 周时 SREBP-1c 表达开始增强，细胞质中棕黄色颗粒增多，同时少数肝细胞核出现棕黄色阳性着色；随着肝细胞脂肪变程度加重，在 12 周时 SREBP-1c 表达最强，细胞质中可见大量棕褐色颗粒沉积，同时大部分细胞核也呈阳性着色(图 2)。



A：NAFLD 组 4 周；B：NAFLD 组 12 周

图 2 大鼠肝脏 SREBP-1c 免疫化学染色 (二步法 ×200)

2.3 血清 FFA、TG 水平变化

血清 FFA、TG 水平 2 周时与正常组相比变化不大，随着造模时间延长，FFA、TG 升高趋势愈加明显，12 周时最高，与对照组有显著性差异($P < 0.01$)(表 1)。

表 1　NAFLD 大鼠血清 FFA、TG(mmol/L，$\bar{x} \pm s$)

指标	组别	2 周	4 周	8 周	12 周
TG	正常组	0.48 ± 0.04	0.47 ± 0.03	0.46 ± 0.04	0.48 ± 0.03
	NAFLD 组	0.45 ± 0.09	0.71 ± 0.08[b]	0.96 ± 0.09[b]	1.23 ± 0.08[b]
FFA	正常组	0.24 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.01
	NAFLD 组	0.25 ± 0.02	0.33 ± 0.03[a]	0.54 ± 0.06[b]	0.61 ± 0.06[b]

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与正常组比较

2.4　RT-PCR 方法检测肝组织 SREBP-1c mRNA 表达

以 SREBP-1c/β-actin 的吸光度比值作为 SREBP-1c mRNA 表达的相对含量。NAFLD 组与正常对照组相比 SREBP-1c mRNA 从 2 周开始表达增多，随脂肪肝程度的加重逐渐增加，与正常组相比有显著性差异($P < 0.01$)(表 2)。

表 2　NAFLD 大鼠肝组织 SREBP-1c mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	2 周	4 周	8 周	12 周
正常组	0.56 ± 0.06	0.57 ± 0.06	0.57 ± 0.06	0.58 ± 0.06
NAFLD 组	0.83 ± 0.09[a]	0.86 ± 0.08[a]	0.91 ± 0.08[a]	0.95 ± 0.03[a]

a：$P < 0.01$，与正常组比较

2.5　肝组织 FAS 酶活性变化

2 周时与正常肝组织 FAS 酶活性相似，随着造模时间延长，FAS 酶活性逐渐升高，12 周时最高，与正常组相比有显著性差异($P < 0.01$)(表 3)。

表 3　NAFLD 大鼠肝组织 FAS 酶活性($nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$，$\bar{x} \pm s$)

组别	2 周	4 周	8 周	12 周
正常组	6.99 ± 0.59	7.28 ± 0.23	7.14 ± 0.79	7.10 ± 0.51
NAFLD 组	8.26 ± 0.03	17.62 ± 2.48[a]	19.89 ± 4.54[a]	24.64 ± 5.03[a]

a：$P < 0.01$，与正常组比较

3　讨论

SREBPs 是一种核转录因子，属于“碱性螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链”(basic-helix-loop-helix-leucine zipper，BHLH-Zip)超家族的一员。迄今为止，共发现 3 种：SREBP-la、SREBP-lc 和 SREBP-2[2]。SREBP-1c 主要在啮齿类动物和人类的肝脏和脂肪细胞表达。SREBP-1c 又称脂肪细胞定向和分化因子 1(ADD1)，通过转基因小鼠和基因剔除小鼠的研究发现 SREBP-1c主要与脂肪酸代谢和糖代谢有关[3,4]。

NAFLD 包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis，NASH)、脂肪性肝纤维化及肝硬化。单纯性脂肪肝是向 NASH 及肝纤维化发展的基础，其发病机制迄今尚未清楚，影响和导致脂肪肝形成的因素较多，当 FFA 输入肝细胞增多；肝细胞合成 FFA 增加或由碳水化合物转化成 TG 增多；FFA 在肝细胞线粒体氧化和利用减少，而酯化为 TG 增加；极低密度脂蛋白合成及分泌减少，TG 转运障碍等，均参与了脂肪肝的形成[5]。

目前，有关 SREBP-1c 与脂肪肝形成的关系国内外鲜有报道。本实验结果表明与正常对照组相比，NAFLD 组大鼠随着喂养时间的延长肝脂肪变性逐渐加重，同时免疫组化染色可见 SREBP-1c 蛋白表达逐渐增强，呈现相同变化趋势。SREBP-1c 直接参与调控有关脂肪酸、TG 合成和葡萄糖代谢相关酶基因的表达，它调节的靶基因包括低密度脂蛋白(LDL)受体、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)、FAS、葡萄糖激酶(GK)和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)等[6]。Joseph 等[4]研究发现鼠 FAS 基因 5′端有 SREBP-1c 的结合位点，而 FAS 是脂肪酸合成中的重要酶。我们发现 NAFLD 组从 2 周开始 SREBP-1c mRNA 表达增加，与高脂饮食时间相关，在 12 周时变化达到高峰。伴随着 SREBP-1c mRNA 转录的增加，受其调控的 FAS 转录亦增加，从而 FAS 酶合成增多。同时我们的实验结果也显示 NAFLD 组大鼠 FAS 酶活性增强，血浆 FFA、TG 明显增多，表明 SREBP-1c 及 FAS、FFA 的合成增加密切相关，当超过肝脏的转运能力，导致 TG 合成显著增加。正常情况下，大鼠肝脏 SREBP-1c 蛋白表达较低，当受到高脂饮食的诱导下，其表达明显增高，并与 NAFLD 的严重程度密切相关，表明高脂饲料的摄入可明显促进 FFA 及 TG 合成，诱导脂肪肝的形成。另外，SREBP-1c 的 mRNA 表达变化先于肝脏组织学改变，可能为高脂饮食后机体的适应性反应，随着高脂饮食摄入的增加，SREBP-1c 表达进一步增强，最终导致脂肪酸代谢失衡，TG 合成增多，引起 NAFLD 的发生。

参考文献：

[1] JUMP B D, BOTOLIN D, WANG Y, *et al*. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription [J]. J Nutr, 2005, 135(11): 2503 - 2506.

[2] YU-POTH S, YIN D, KRIS-ETHERTON P M, *et al*. Long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate LDL receptor protein expression in fibroblasts and HepG2 Cells [J]. J Nutr, 2005, 135(11): 2541 - 2545.

[3] WANG H, KOURI G, WOLLHEIM C B. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity [J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 17): 3905 - 3915.

[4] JOSEPH S B, LAFFITTE B A, PATEL P H, *et al*. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors [J]. J Biol Chem, 2002, 277(13): 11019 - 11025.

[5] 冯爱娟，王　军，陈东风. FATP4 在大鼠非酒精性脂肪肝中的作用[J]. 第三军医大学学报，2004，26(19)：1726 - 1728.

[6] COLEMAN R A, LEE D P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation [J]. Prog Lipid Res, 2004, 43(2): 134 - 176.

（编辑　陈聪连）