文章编号:1000-5404(2009)01-0079-03

论著

葡萄糖调节蛋白78在大鼠非酒精性脂肪性肝炎中的表达及意义

闵 敏,陈东风,王 军,艾正琳,樊丽琳,严丽丽 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042)

摘 要:目的 观察高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis,NASH)过程中内质网应激标志物葡萄糖调节蛋白78的表达变化,探讨内质网应激在NASH发病机制中的作用。**方法** 建立大鼠高脂饮食诱导NASH模型,检测血清ALT、AST、FFA、TG和肝组织MDA的变化,用RT-PCR与Western blot方法检测NASH形成过程中肝组织GRP78在基因和蛋白水平的表达变化。**结果** NASH组大鼠血清ALT、AST、FFA、TG和肝组织MDA水平均较对照组有不同程度的升高。肝组织GRP78基因和蛋白表达也随NASH加重而增强,16周时升高最为显著($P<0.01$)。**结论** 高脂饮食可诱导GRP78表达增强,启动内质网应激,导致脂质异常沉积,其可能与NASH的发病机制密切相关。

关键词:非酒精性脂肪性肝炎;内质网应激;葡萄糖调节蛋白78
中图法分类号:R341;R575.502 **文献标识码**:A

Expression and significance of glucose regulated protein GRP78 in nonalcoholic steatohepatitis of rats

MIN Min, CHEN Dong-feng, WANG Jun, AI Zheng-lin, FAN Li-lin, YAN Li-li (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone, glucose regulated protein 78 (GRP78), in the liver tissues during fatty diet-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in rats and explore the role of endoplasmic reticulum stress in pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Methods** Rat model of nonalcoholic steatohepatitis were established with fatty dieting. Blood samples were collected to detect serum aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), free fatty acid (FFA) and triglyceride (TG). Liver tissues were obtained to measure malondialdehyde (MDA) content. The expression of GRP78 in the liver was detected with RT-PCR and Western blot analysis. **Results** Compared with the control group, the serum contents of ALT, AST, FFA and TG and liver content of MDA in NASH were increased. The expression of GRP78 at protein and gene levels were increased in NASH in a time-dependent manner, and reached peak in 16 weeks ($P<0.01$). **Conclusion** Enhanced expression of GRP78 could be induced by fatty diet. The excessive expression of GRP78 could result in the endoplasmic reticulum stress, and thus lead to fatty acid abnormal deposition, which might be closely involved in NASH.

Key words: nonalcoholic steatohepatitis; endoplasmic reticulum stress; glucose regulated protein 78

非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis,NASH)作为非酒精性脂肪性肝病的关键性中间阶段,其发病机制与脂质过氧化、氧化应激等密切相关[1],而这些也正是引起内质网应激的重要因素。葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78,GRP78)在缺氧、氧化应激等状态下大量表达以维持内质网的稳定,被认为是内质网应激的标志性蛋白[2]。近年来对于内质网应激信号通路及其效应在代谢综合征中的研究十分广泛[3],但在非酒精性脂肪性肝炎中鲜有报道。因此,我们用高脂饮食制作动物模型,采用RT-PCR和Western blot等方法在基因和蛋白水平上观察GRP78在NASH形成过程中的表达变化,以探讨内质网应激与NASH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30只,体质量180~200 g(本院实验动物中心提供)。适应性饲养1周后,分为对照组(C组,6只)与NASH组(24只),NASH组又分为4、8、12、16周4个时相点,各时相点随机分配6只动物。C组给予基础饲料(本院实验动物中心提供),NASH组给予高脂饲料(基础饲料87.5%,猪油10%,胆固醇2%,胆盐0.5%),分别于4、8、12、16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GRP78多克隆抗体(abcam公司),辣根酶标记山羊抗兔IgG(中杉金桥),BioBRK RT-PCR Kit ReverTra Ace试剂

基金项目:国家自然科学基金(30770968)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30770968)
作者简介:闵 敏,女,湖北省天门市人,硕士研究生,医师,主要从事非酒精性脂肪性肝病方面的研究。E-mail:minmin823@sina.com
通信作者:陈东风,E-mail:chendf1981@126.com
收稿日期:2008-07-01;修回日期:2008-07-24

盒(成都博瑞克公司),TaKaRa *Taq* PCR 试剂盒,肝组织丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成公司)。GRP78、GAPDH 引物由上海生工合成。

1.3 方法

1.3.1 肝组织病理学观察 留取约 1 cm×1 cm×1 cm 大小肝组织,4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,常规 HE 染色,观察脂肪变及炎症程度。病理诊断标准参照非酒精性脂肪性肝病诊疗指南制定的标准[4]。

1.3.2 血清 ALT、AST、FFA、TG 测定 心脏采血后,4 000 r/min 离心 5 min,采用全自动生物化学分析仪测定血清 ALT、AST、FFA、TG 水平。

1.3.3 肝组织 MDA 含量测定 按试剂盒说明书进行。

1.3.4 RT-PCR 检测 GRP78 mRNA 的表达 采用 Trizol 一步法提取肝组织总 RNA,完成逆转录反应。引物序列:GRP78 上游:5′-TAATCAGCCCACCGTAACAATC-3′;下游:5′-ACCTCCCAGCTTCTCTTTATCT-3′,扩增片段长度 385 bp。GAPDH 上游:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′;下游:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,扩增片段长度 450 bp。PCR 扩增:将反转录合成的 cDNA 2 μl 加入 10×PCR Buffer 5 μl,$MgCl_2$ 3 μl,TaKaRa *Taq* 0.25 μl,dNTP Mixture 4 μl,上游引物 1 μl,下游引物 1 μl,灭菌蒸馏水至总体积 50 μl,GAPDH 为内参照,扩增参数:94 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 40 s,进行 30 个循环,最后72 ℃再延伸 5 min。DNA 标准(DL2000)确定 PCR 产物大小,经 2% 琼脂糖凝胶电泳,利用 Quantity One 凝胶分析系统(Bio-Rad 公司)对扩增产物条带进行扫描,分别以 GRP78/GAPDH 的吸光度比值作为 GRP78 mRNA表达的相对含量。

1.3.5 Western blot 检测 GRP78 蛋白表达 取右叶肝组织 100 mg 加入 RIPA 裂解液 1 ml 中,冰浴下匀浆至匀浆液均匀无颗粒。将裂解液吸入 1.5 ml EP 管中,置冰上裂解 60 min。4 ℃,12 000×*g* 离心 15 min。取上清,重复离心 1 次(4 ℃,12 000×*g*,15 min)。BCA 法蛋白定量后,取50 μg/15 μl 蛋白,样本放沸水振荡水浴 5 min 变性,5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,转移至硝酸纤维膜,5% 脱脂奶粉 37 ℃摇床封闭 2 h,兔抗大鼠 GRP78 抗体 1∶2 000 浸泡滤膜,4 ℃过夜,洗涤后加入辣根过氧化酶结合的抗兔 IgG 1∶8 000,洗膜后化学发光试剂检测,X 线片显影。定量分析采用分子生物学图像分析系统测定各目的条带积分灰度值,所测结果为扣除背景的积分光密度。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 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

光镜观察显示对照组大鼠肝小叶结构规则,细胞形态正常,无炎症细胞浸润(图 1A)。高脂饲养 4 周后,NASH 组可见小叶中央区部分肝细胞脂肪变,脂肪变肝细胞数 5% ~30%,无明显炎性细胞浸润,仅为单纯脂肪变性,为 NASH-F1G0 期。NASH 8 周组可见多数肝细胞胞质疏松呈空泡状,有较多的脂滴沉积,小叶中央区出现部分气球样变,脂肪变肝细胞数 30% ~50%,腺泡内有散在点状坏死,为 NASH-F2G1 期(图 1B)。NASH 12 周组大多数肝细胞内充满脂滴,出现明显气球样变,脂肪变肝细胞数 50% ~75%,腺泡内点灶状坏死增多,门管区轻度炎症,为 NASH-F3G2 期(图 1C)。NASH 16 周组出现广泛弥漫性肝细胞脂肪变性和气球样变,胞质内充满大量脂肪空泡,脂肪变肝细胞数 >75%,门管区出现中度炎症,为 NASH-F4G3 期(图 1D)。

2.2 血清 FFA、TG、ALT、AST 含量变化

高脂饮食喂养 4 周后,NASH 组血清中 ALT、AST、FFA、TG 含量开始增高,以后逐步升高,16 周上升最为明显,NASH 各组与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$, 表 1)。

表 1 NASH 大鼠血清 ALT、AST、FFA、TG 含量变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	FFA(mmol/L)	TG(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
对照组	0.22±0.03	0.18±0.03	25.88±2.28	79.44±6.29
NASH 组 4 周	0.40±0.04[b]	0.33±0.03[b]	39.95±4.58[a]	141.52±3.50[a]
8 周	0.54±0.03[b]	0.44±0.04[b]	54.35±3.66[b]	164.33±3.46[b]
12 周	0.65±0.03[b]	0.71±0.12[b]	69.88±3.98[b]	207.18±5.39[b]
16 周	0.79±0.08[b]	1.52±0.08[b]	157.25±55.82[b]	239.87±3.60[b]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较

2.3 肝脏 MDA 含量变化

高脂饮食 4 周后,NASH G0 期肝内 MDA 含量较对照组明显升高($P<0.05$),之后肝内 MDA 含量随时间增加而逐步增高,与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$,表 2)。

2.4 大鼠肝组织 GRP78 mRNA 的表达

各组各时相点均有 GRP78 mRNA 的阳性扩增条带。NASH 组从 4 周开始,大鼠肝组织 GRP78 基因 mRNA 转录增多,16 周时增高幅度最明显。NASH 组各时相点与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$、$P<0.01$,表 2、图 2)。

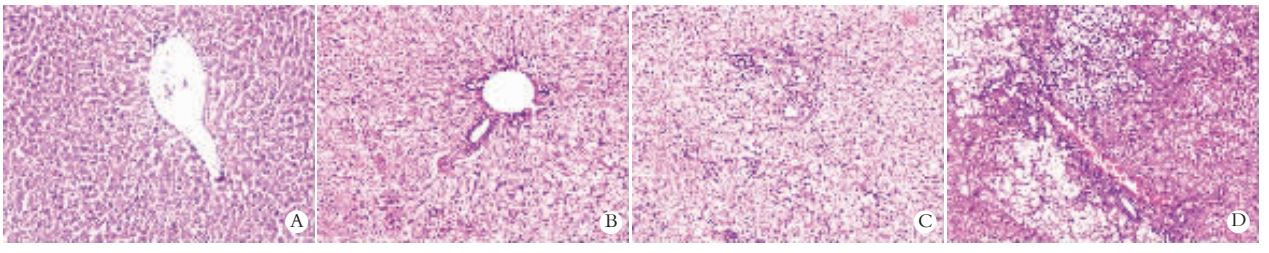
2.5 大鼠肝组织 GRP78 蛋白的表达

由图 3 可见各组各时相点均有 GRP78 蛋白的阳性扩增条带。NASH 组从 4 周开始肝组织 GRP78 蛋白含量增加,随脂肪肝程度的加重逐渐增多,16 周时最为显著。NASH 组各时相点与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.01$,表 2、图 3)。

表 2 NASH 大鼠肝组织 GRP78 mRNA 及蛋白表达变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

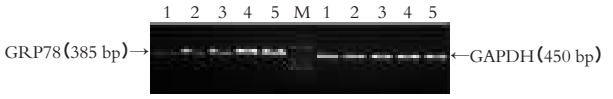
组别	MDA 含量	GRP78 mRNA	GRP78 蛋白
对照组	4.03±0.21	0.27±0.04	13.46±1.61
NASH 组 4 周	5.12±0.32[a]	0.63±0.14[a]	17.91±1.63[b]
8 周	5.89±0.52[b]	0.81±0.11[b]	21.14±1.88[b]
12 周	6.45±0.11[b]	0.96±0.14[b]	22.11±2.33[b]
16 周	7.56±0.38[b]	1.27±0.26[b]	25.38±1.90[b]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较



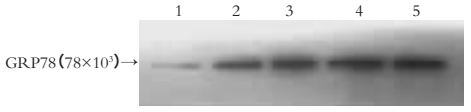
A:对照组;B:NASH 组 8 周;C:NASH 组 12 周;D:NASH 组 16 周

图 1 大鼠肝脏组织病理学观察 (HE×200)



M：标准；1：对照组；2～5：NASH 组 4、8、12、16 周

图 2　大鼠肝组织 GRP78 mRNA RT-PCR 扩增产物电泳结果



1：对照组；2～5：NASH 组 4、8、12、16 周

图 3　大鼠肝组织 GRP78 Western blot 电泳结果

3　讨论

GRP78 又称免疫球蛋白结合蛋白(Bip),是热休克蛋白 70 家族的成员之一,存在于细胞质内质网膜上,是内质网应激的标志蛋白。肝细胞内有丰富的内质网,是蛋白质合成、折叠、运输以及储存钙的主要场所,对各种刺激极为敏感,当功能紊乱时出现错误折叠与未折叠蛋白在腔内聚集以及细胞内钙平衡紊乱的状态,称为内质网应激。它是细胞启动的一种自我保护反应机制,有利于细胞内环境稳态的恢复和维持细胞存活,但当氧化应激、脂质过氧化等应激过重,内质网无法恢复平衡时,细胞将启动内质网相关的凋亡程序[5]。

本研究在对大鼠血清 ALT、AST 的检测中显示,NASH 组 G0 期较对照组升高($P<0.05$),但肝脏病理学仅见单纯性脂肪变,而未见明显炎症表现,提示肝细胞存在轻度损害,细胞膜的通透性增加,导致部分 ALT 和 AST 释放入血。检测肝组织 MDA 含量也较对照组升高($P<0.05$),MDA 是脂质过氧化的终末产物,含量的高低反应了体内自由基过氧化的程度,其含量增高提示肝细胞存在脂质过氧化[6]。此时 GRP78 表达增强能够维持内质网的稳定,引导蛋白质正确折叠,改善细胞生理状态,起到暂时保护细胞、延缓炎性细胞浸润及炎症介质释放的作用。但在 NASH G1～G3 期时,血清 ALT、AST 明显升高($P<0.01$),肝脏 MDA 含量进一步增多($P<0.01$),病理学可见气球样肝细胞出现逐渐增多,点灶状坏死日趋明显,门管区炎症程度不断加重,此时 GRP78 的表达不断增强且在炎症最重的 G3 期达到高峰($P<0.01$),提示此时肝脏存在明显的脂质过氧化,肝细胞耗氧量明显增加,体内产生大量自由基,致使其反应产物 MDA 增多,脂质过氧化反应增强,超过细胞自身处理能力,继而引起内质网应激级联反应,通过活化 NF-κB 信号通路造成肝脏炎症程度不断加重。而 ALT、AST 作为反映肝细胞损伤程度的指标,在此时随着 GRP78 表达增强而逐步增高也提示由于各种应激因素程度的不断加重,保护机制不能与损伤抗衡,导致肝脏发生实质性损害,最终引起分布在细胞质中的 ALT、AST 大量释放入血。

另外,血清 FFA 和 TG 也随脂肪变程度的增加而升高,在 G3 期时达到高峰($P<0.01$),研究表明 FFA 可直接损伤肝脏细胞的生物膜,并能够通过多种途径导致肝实质细胞脂肪变性和坏死、炎性细胞浸润和纤维化等改变。当肝细胞摄取过多的 FFA,超过了线粒体对 FFA 的氧化能力,促使其合成 TG 增加,肝内 TG 蓄积达到一定程度,即形成脂肪肝。与此同时,由于 FFA 是脂质过氧化反应的底物之一,其又可作为内质网应激的启动因素,加重氧应激-脂质过氧化损伤,进一步促进内质网应激的发生,从而诱发 NASH。

本研究结果显示高脂饮食可造成脂质过氧化,诱导 GRP78 表达增高,启动内质网应激,而其他学者研究也表明,内质网应激后启动固醇调节级联反应,其与脂质代谢密切相关[7]。我们既往研究发现,在 NASH 大鼠模型中,固醇调节结合蛋白-1c(SREBP-1c)表达增高,过度表达的 SREBP-1c 引起其下游调控的 FAS 活性增高,使 FFA 合成异常增多,导致 NASH[8]。因此可以推测,随着高脂饮食喂养时间的延长,氧化应激与脂质过氧化的加重,GRP78 表达随肝脏炎症日趋加重而增强,启动内质网应激,随之引发固醇调节级联反应,导致肝细胞或成脂相关酶含量增加,细胞 FFA、TG 合成增加,脂质异常堆积,在肝细胞脂肪变的背景下进而发生炎症,最终导致 NASH 的发生。

参考文献:

[1] Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, *et al*. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet[J]. Hepatology, 2007, 46(5): 1392－1403.

[2] Lee A S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress[J]. Methods, 2005, 35(4): 373－381.

[3] Marciniak S J, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease[J]. Physiol Rev, 2006,86(4):1133－1149.

[4] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志,2006,14(3):161－163.

[5] Borradaile N M, Han X, Harp J D, *et al*. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death[J]. J Lipid Res, 2006,47(12):2726－2737.

[6] Matsumura F. On the significance of the role of cellular stress response reactions in the toxic actions of dioxin[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(4): 527－540.

[7] Pahl H L. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus[J]. Physiol Rev,1999,79(3):683－701.

[8] 艾正琳,陈东风, 刘重阳, 等. 固醇调节元件结合蛋白-1c 在大鼠非酒精性脂肪性肝炎中的表达及意义[J]. 重庆医学,2007,36(8): 695－697.

(编辑　汪勤俭)