脂糖代谢研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001322

西罗莫司抑制脂肪酸摄取改善小鼠肝脏脂质积聚

谭 伟,陈 曜,王 川,阮雄中,陈压西,杨 萍
(重庆医科大学脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:研究西罗莫司对小鼠肝脏脂质积聚的影响及机制初探。**方法**:6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,随机分为 3 组:A 组为普通饮食组(n=12),B 组为高脂饮食组(n=9),C 组为高脂饮食加隔天注射西罗莫司组(n=7),喂养 14 周。全自动生化分析仪检测血清生化指标。酶联免疫吸附法和酶偶联比色法分别检测肝脏游离脂肪酸(free fatty acid,FFA)和甘油三酯(triglyceride,TG)的含量。Western blot 检测脂肪酸转运酶(fatty acid translocase,FAT/CD36)蛋白的表达水平。荧光显微镜观察原代肝细胞对荧光标记 FFA 的动态摄取。**结果**:与 A 组相比,B 组小鼠体质量(q=6.68,P=0.000),血清 TG(q=4.88,P=0.045),高密度脂蛋白(high-density lipoprotein,HDL)(q=6.311,P=0.002),谷草转氨酶(aspirate aminotransferase,AST)(q=8.84,P=0.001)水平明显增高,肝脏组织 TG(q=14.4,P=0.000),FFA(q=18.0,P=0.000)也明显增高。C 组小鼠较 B 组体质量(q=7.99,P=0.000),血清 TG(q=4.636,P=0.050),AST(q=5.16,P=0.016)及肝脏 TG(q=8.91,P=0.000)和 FFA(q=14.1,P=0.000)都显著降低。Western blot 结果显示 C 组小鼠肝脏 CD36 的蛋白表达水平较 B 组明显降低。FFA 动态摄取实验通过定量荧光强度显示西罗莫司能明显抑制肝细胞对 FFA 的摄取速度(各时间点 P 均<0.05)。**结论**:西罗莫司能抑制肝细胞对外源性 FFA 的摄取,减轻肝脏脂质积聚,其作用机制可能与 CD36 相关。

【关键词】西罗莫司;脂肪酸;脂肪酸转运酶 CD36
【中国分类号】R589.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-02-23

Sirolimus ameliorates liver lipid accumualtion in mice by inhibiting fatty acid uptake

Tan Wei, Chen Yao, Wang Chuan, Ruan Xiongzhong, Chen Yaxi, Yang Ping
(*Chongqing Key Laboratory of Lipid and Glucose Metabolism, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To study the effects of sirolimus on hepatic lipid accumulation in mice and to expose the related mechanisms. ***Methods***: Six-eight week C57BL/6J mice were randomly divided into three groups: mice in group A were fed with normal chaw food, mice in group B were fed with high fat diet, and mice in group C were fed with high fat diet plus sirolimus injected every other day. All mice were fed for 14 weeks. Serum biochemical parameters were analyzed by an automatic biochemical analyzer. The levels of free fatty acid(FFA) and triglyceride(TG) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-coupled colorimetric assay respectively. The hepatic fatty acid translocase(FAT/CD36) protein levels were determined by Western blot. Fluorescence microscopy was used to observe the time-dependent FFA uptake by the primary hepatocytes. ***Results***: Compared with those of group A, the body weight(q=6.68, P=0.000), serm TG(q=4.88, P=0.045), high-density lipoprotein(HDL)(q=6.311, P=0.002), aspirate aminotransferase (AST)(q=6.311, P=0.001), and liver TG(q=14.4, P=0.000), FFA(q=18.0, P=0.000) levels of group B were highly increased. The body weight(q=7.99, P=0.000), serum TG(q=4.636, P=0.050), AST(q=5.16, P=0.016), liver TG(q=8.91, P=0.000) and FFA(q=14.1, P=0.000) were significantly lower in group C than in group B. The expression of FAT/CD36 in the liver was significantly lower in group C than in group B. The time-dependent FFA uptake experiment showed that sirolimus decreased the efficiency of fluorescent FFA uptake into hepatocytes. ***Conclusion***: Sirolimus can inhibit the uptake of FFA by hepatocytes and reduce the lipid accumulation in the liver, which may be related to CD36.

【Key words】sirolimus; free fatty acid; CD36

作者介绍:谭 伟,Email:410062142@qq.com,
研究方向:脂质代谢与器官损害。
通信作者:杨 萍,Email:yp_apple@yeah.net。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81400786);重庆市科委基础与前沿研究计划资助项目(编号:cstc2015jcyjA10001)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1628.028.html (2017-06-22)

非酒精性脂肪肝（nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD）已成为亚洲地区最常见的肝病，在中国的发病率高达 20.9%[1]。NAFLD 的发病机制有许多，公认的是“二次打击”学说：一次打击是由肝脏合成脂肪酸增加和外周血游离脂肪酸（free fatty acid，FFA）升高等导致的肝脏脂质聚集；二次打击是由氧化应激、脂质过氧化等导致肝细胞炎症的发生，最终发展为肝炎肝硬化[2]。有研究表明，NAFLD 患者肝脏脂肪约 59%来自血清中 FFA[3]，提示 FFA 向肝脏的异常转运在 NAFLD 中的重要作用。众所周知，FFA 可以通过被动扩散和脂肪酸转运蛋白介导的主动转运 2 种方式进入细胞内，其中，脂肪酸转酶（fatty acid translocase，FAT/CD36）在 FFA 的跨膜转运中有着非常重要的作用。有研究表明，NAFLD 患者肝脏 CD36 蛋白表达量明显增高[4-5]。

近年来，越来越多的研究表明西罗莫司能够调节脂质代谢，并在代谢性疾病如动脉粥样硬化[6]、肾移植后高脂血症[7]、胰岛素抵抗[8]中有着潜在的治疗作用。本研究旨在通过体内模型探讨西罗莫司对小鼠肝脏脂质积聚的影响，及求证西罗莫司是否通过影响肝细胞对外源性 FFA 摄取从而调解脂质代谢，为 NAFLD 防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠，由重庆医科大学实验动物中心提供。动物许可证号：SYXK（渝）2012-0001.

1.2 试剂与材料

普通饮食（含 10%脂肪）和高脂饮食（含 60%脂肪）均购自美国 Research Diets 公司；西罗莫司购自美国 Sigma 公司；CD36 抗体购自美国 Novus biologicals 公司；β-Actin 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司；FFA 检测试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司；TG 检测试剂盒购自浙江东瓯诊断产品有限公司；BCA 蛋白定量试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司；ECL 化学发光试剂盒购自 Bio-Rad 公司；辣根酶标记的山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥公司；异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记的棕榈酸购自美国英杰公司。胎牛血清和 DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司。牛血清蛋白（BSA）购自生工生物工程有限公司。软脂酸购自美国 Sigma 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立 年龄、体质量相当的 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组：A 组为普通饮食组（n=12），B 组为高脂饮食组（n=9），C 组为高脂饮食加隔天注射西罗莫司组（n=7）。A 组小鼠[体质量（18.38±1.20）g]给予普通饮食喂养同时隔天注射溶媒（0.2%羧甲基纤维素钠，0.25%Tween80），B 组小鼠[体质量（18.41±0.91）g]给予高脂饮食喂养同时隔天注射溶媒，C 组小鼠[体质量（18.12±0.69）g]给予高脂饮食喂养的同时，隔天注射西罗莫司（2 mg/kg 体质量），背部皮下注射，注射量为 0.2 mL。环境温度 22 ℃~28 ℃，每日光照时间及黑暗时间各 12 h，饮水自由。每周称取体质量，喂养 14 周后，收取小鼠血清标本及肝脏组织标本待用。

1.3.2 小鼠血清指标的测定 小鼠喂养 14 周麻醉后处死，左心室取血，离心后取血清 400 μL，-80 ℃保存。血清与生理盐水各 150 μL 混合后，日立 7080 型全自动生化分析仪检测血清生化指标。

1.3.3 小鼠肝脏组织苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色 小鼠肝脏组织用 10%甲醛固定 24 h 后送石蜡包埋贴片。石蜡切片 60 ℃烤箱 30 min 后，将切片依次放入二甲苯（2 次 15 min），100%、95%、85%、75%、50%酒精中各 5 min，经蒸馏水清洗后开始染色。伊红染色 5 s，自来水中洗去浮色。再用苏木精染色 10 min，显微镜下观察细胞核结构及颜色是否清晰。切片经蒸馏水短洗后，依次放入 50%、75%、85%酒精中 5 min.后二甲苯内透明（2 次 10 min），中性树胶封片，显微镜下观察并拍片。

1.3.4 酶偶联比色法 取 50 mg 肝组织放入 2 mL EP 管内，加入 1 mL 抽提液（正庚烷:异丙醇=2:3.5）[8]，超声破碎仪破碎组织（能量 21%，总时间 2 min，放电 1 s，暂停 1 s），振荡离心，上层含有脂质的有机相真空干燥 1.5 h 后用 200 μL 有机溶剂反复吹打振荡至完全溶解，再按照试剂盒说明书检测肝脏组织 TG 含量。下层含蛋白成分的白色沉淀至于室温干燥 15 min 后，加入 1 mol/L NaOH 反复吹打振荡至完全溶解，BCA 试剂盒测蛋白浓度。根据测得 TG 总量及蛋白总量计算 TG 的含量。

1.3.5 酶联免疫吸附法 取 50 mg 肝组织放入 2 mL EP 管内，加入 1 mL 抽提液（氯仿:正庚烷:甲醇=56:42:2）[8]，其余方法同前，提取肝脏脂质成分和蛋白，再按照试剂盒说明书，测定肝脏组织 FFA 总量及 BCA 测蛋白总量，计算 FFA 含量。

1.3.6 Western blot 法 RIPA 提取肝脏组织全蛋白，BCA 试剂盒蛋白定量并标化，每孔上样量为 50~100 μg，以 β-actin 为内参。样品与上样缓冲液充分混匀后沸水浴 5 min，SDS-PAGE 凝胶电泳，转印到硝酸纤维素膜，3%BSA 37 ℃封闭 1~2 h，一抗 4 ℃过夜，TBS-T（1%tween-20）洗涤 15 min×3 次。二抗室温孵育 1 h，TBS-T（1%tween-20）洗涤 15 min×3 次。ECL 化学发光法显色检测各蛋白表达水平。

1.3.7 原代肝脏细胞提取 3 只 C57BL/6J 小鼠腹腔注射 0.2 mL 1 000 U/mL 肝素钠，约 10 min 后注射 0.2 mL 10%水合氯醛麻醉。固定好小鼠后，打开腹腔和胸腔，暴露并分离下腔静脉肝下段，剪断门静脉；通过蠕动泵将缓冲 A 液（PBS 中含有 2.5 mmol/L EGTA，0.1%葡萄糖，1:50）以 13 r/min 的速度灌注 2 min，结扎下腔静脉肝上段后继续以 8 r/min 灌注 A 液至肝脏偏白。以 6 r/min 速度灌注 B 液（PBS 中含有 0.5 mg/mL 4 型胶原酶和 5 mmol/L $CaCl_2$）直至肝脏纤维支架完全消化。将

肝脏转移至 4 ℃预冷洗液中，撕开包膜，使肝细胞流出，并用 100 μm 细胞滤器过滤，4 ℃、100 r/min、5 min 条件下离心 3 次后培养基重悬细胞分别在 3 个 24 孔板内种板，4 h 后换液，37 ℃孵箱培养。取少量细胞悬液台盼蓝染色，检测细胞活率。用小鼠细胞白蛋白特异性抗体细胞免疫化学染色，鉴定提取细胞是否为肝原代细胞。

1.3.8 原代肝细胞 FFA 动态摄取实验 将 3 个 24 孔板内小鼠肝脏原代细胞每 24 h 换液 1 次，细胞形态稳定 3 d 后，0.2%BSA 的无血清培养基培养 24 h，每个 24 孔板内选 6 个孔，再按照以下处理分为 2 组：①对照组：0.2%BSA+0.08 mmol/L 软脂酸；②西罗莫司处理组：0.2%BSA+0.08 mmol/L 软脂酸+10 ng/mL 西罗莫司。处理 24 h 后，弃培养基 PBS 清洗 3 次。在照相 0 s 时在 24 孔板内加入含 0.02 mmol/L 的 FITC 标记的棕榈酸的 PBS 250 μL。荧光显微镜下每隔 5 s 照相 1 次，观察 3 min。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析，所得实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。3 组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 Tukey 多重比较检验，不同时间点测量的两组间采用重复测量方差分析，同一时间两组间的比较采用 Bonferroni 矫正。检验水准 α=0.05。

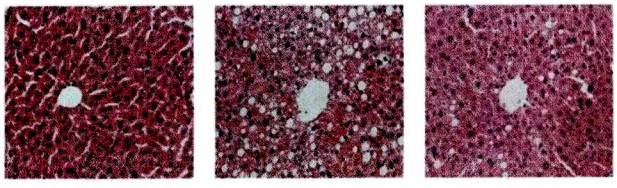
2 结 果

2.1 西罗莫司能够降低高脂饮食喂养小鼠的血脂水平，并且改善肝功能

各组小鼠初始体质量无统计学差异（A 组 vs. B 组：q=0.115，P=0.996；B 组 vs. C 组：q=0.787，P=0.844）。喂养 14 周后，与 A 组小鼠相比较，B 组小鼠体质量明显增加[(25.93 ± 1.49) vs. (23.23 ± 1.42)，q=6.680，P=0.000]，血清中 TG 水平[(11.88 ± 1.57) vs. (8.28 ± 1.90)，q=4.880，P=0.045]，高密度脂蛋白（high-density lipoprotein，HDL）浓度[(1.52 ± 0.09) vs. (1.02 ± 0.11)，q=6.311，P=0.002]和谷草转氨酶（aspirate amino-transferase，AST）水平[(239.3 ± 46.23) vs. (97.00 ± 25.22)，q=6.311，P=0.001）也明显增加（表 1）。结果表明高脂饮食喂养能够诱导小鼠体质量增加，血脂增加，并且损害肝功能。而C 组小鼠与 B 组小鼠相比，体质量明显降低[(22.23 ± 0.64) vs. (25.93 ± 1.49)，q=7.990，P=0.000]，血清 AST 水平[(156.25 ± 17.63) vs. (239.3 ± 46.23)，q=5.160，P=0.016]、TG 水平[(8.46 ± 1.44) vs. (11.88 ± 1.57)，q=4.636，P=0.050]、直接胆红素（direct bilirubin，DBIL）水平[(3.33 ± 0.16) vs. (3.72 ± 0.18)，q=5.330，P=0.005]均明显降低，但 HDL 水平[(1.44 ± 0.30) vs. (1.52 ± 0.09)，q=1.000，P=0.076]没有明显差异（表 1）。

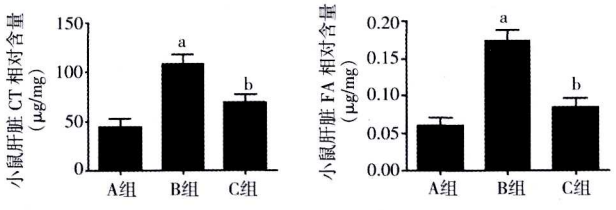
2.2 西罗莫司能够减轻高脂饮食喂养小鼠的肝脏脂质积聚

如图 1A 所示：A 组小鼠肝细胞大小形态正常，未见脂质积聚，B 组小鼠肝组织脂滴明显增多，有严重的脂质堆积，而 C 组小鼠肝脏较 B 组小鼠肝脏组织中脂滴数量显著降低。脂质定量结果显示，3 组间两两比较结果有明显差异（TG：F=52.86，P=0.000；FFA：F=89.59，P=0.000），与 A 组小鼠相比，B组小鼠肝脏 TG 含量[(108.50 ± 10.12) vs. (44.48 ± 8.25)，q=14.400，P=0.000]及 FFA 含量[(0.17 ± 0.02) vs. (0.06 ± 0.01)，q=18.000，P=0.000]均明显增高，而 C 组小鼠 TG 含量[(68.92 ± 8.14) vs. (108.50 ± 10.12)，q=8.910，P=0.000]及 FFA 含量[(0.09 ± 0.01) vs. (0.06 ± 0.01)，q=14.100，P=0.000）较 B 组小鼠则明显降低（图 1B、C）。



A组 B组 C组

A. 各组小鼠肝脏组织 HE 染色(400×)



a：B 组与 A 组相比，P<0.05；b：C 组与 B 组相比，P<0.05

B. 各组小鼠肝脏组织 TG 含量 C. 各组小鼠肝脏组织 FFA 含量

图 1 各组小鼠肝脏脂质含量的检测（n=6）

Fig.1 Analysis of lipid content in the liver of mice from each group（n=6）

表 1 各组小鼠体质量及血清生化指标（$\bar{x} \pm s$，n=7~12）

Tab.1 Body weight and serum metabolic parameters of mice（$\bar{x} \pm s$，n=7~12）

指标	A 组	B 组	C 组	F 值	P 值
初始体质量(g)	18.38 ± 0.35	18.41 ± 0.30	18.13 ± 0.26	0.08	0.836
体质量(g)	23.20 ± 1.42	25.9 ± 1.49[a]	22.2 ± 0.64[b]	18.35	0.000
TG(mmol/L)	8.28 ± 1.90	11.88 ± 1.57[a]	8.46 ± 1.44[b]	7.56	0.008
HDL(mmol/L)	1.02 ± 0.11	1.52 ± 0.09[a]	1.44 ± 0.30	11.77	0.001
AST(IU/L)	97.00 ± 25.22	239.3 ± 46.23[a]	156.25 ± 17.63[b]	19.53	0.001
DBIL(μmmol/L)	3.70 ± 0.17	3.72 ± 0.18	3.33 ± 0.16[b]	9.58	0.002

注：a，B 组与 A 组相比，P<0.05；b：C 组与 B 组相比，P<0.05

2.3 西罗莫司能够降低高脂饮食喂养小鼠肝脏 CD36 的表达

图 2 结果显示，高脂饮食喂养能够显著上调小鼠肝脏组织 CD36 蛋白表达水平，而注射西罗莫能够明显降低由高脂饮食导致的肝脏组织 CD36 表达增加。

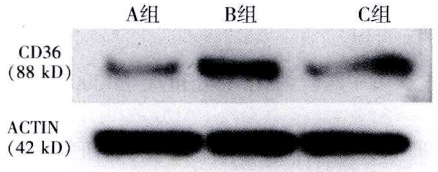
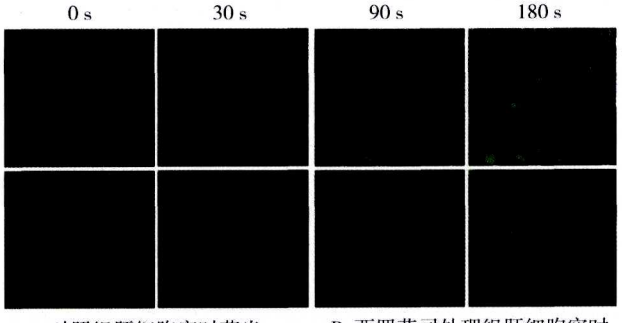


图 2 Western blot 检测各组小鼠肝脏 CD36 蛋白表达

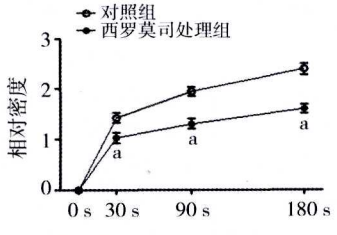
Fig.2 The expression of CD36 protein in the liver from each group was detected by Western blot

2.4 西罗莫司能够抑制肝细胞对游离脂肪酸的摄取

所提取肝脏原代细胞经白蛋白染色显示为棕色，表明所提取的细胞为肝实质细胞（结果未展示）。培养后进行处理，荧光显微镜观察对照组和西罗莫司处理组细胞内荧光强度高低。荧光显微镜结果显示细胞内荧光强度随时间的增加而增强（F=5 996，P=0.000），西罗莫司处理组小鼠肝脏原代细胞在相同的时间摄取 FFA 的速度明显低于对照组（F=1 027，P=0.000），细胞内荧光强度在 30 s（t=8.220，P=0.000）、90 s（t=15.100，P=0.000）、180 s（t=20.400，P=0.000）均低于对照组，且差异具有统计学意义（图 3）。



A. 对照组肝细胞实时荧光表达情况（400×）　B. 西罗莫司处理组肝细胞实时荧光表达情况（400×）



C. 两组肝细胞相对荧光亮度定量

对照组：0.2% BSA+0.08 mmol/L 软脂酸；西罗莫司处理组：0.2% BSA+0.08 mmol/L 软脂酸 +10 ng/mL 西罗莫司

a：西罗莫司组与对照组相比，P<0.05

图 3 西罗莫司对原代肝细胞摄取游离脂肪酸的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.3 Effects of sirolimus on the uptake of free fatty acids in primary hepatocytes（$\bar{x}\pm s$，n=3）

3 讨 论

大环内脂化合物西罗莫司在临床上常用来抑制器官移植后免疫反应的发生[9]，目前其降脂作用也已被广泛认可。研究发现，西罗莫司能通过改善 IRS1 的异常磷酸化[8]，抑制过氧化物酶受体 γ 的表达[10]及抑制胆固醇调节元件结合蛋白向胞核聚集[11]等多种途径减少脂肪生成。鉴于西罗莫司在脂肪组织中的明显降脂作用，越来越多的研究开始关注西罗莫司对肝脏的影响，以期能减少肝脏脂质积累。最新研究发现西罗莫司能通过调节 T 细胞/辅助 T 细胞的平衡缓解 NAFLD 炎症反应[12]和恢复自噬的通量减弱或阻止 NAFLD 的发展[13]。然而，血清 FFA 向肝脏的异常转运作为 NAFLD 脂质积聚的最主要来源，西罗莫司对此环节的影响并无报道。

本研究主要聚焦于西罗莫司对肝脏摄取外源性 FFA 的影响，为西罗莫司治疗 NAFLD 提供新的策略和方向。14 周高脂饮食喂养 C57BL/6J 小鼠后，小鼠体质量、血清 TG 以及肝脏组织的 TG、FFA 明显增多，成功建立非酒精性脂肪肝的体内模型。注射西罗莫司的小鼠尽管同样给予高脂饮食，体质量及血清 TG 却并没有增加，验证了西罗莫司抑制脂肪生成的作用。小鼠肝脏组织 TG、FFA 在注射西罗莫司后较仅高脂饮食小鼠明显减少，说明西罗莫司能够显著改善肝脏的脂质积聚。尽管有研究报道西罗莫司能够增加大鼠原代肝细胞中脂肪酸的氧化，抑制脂肪酸的酯化及脂质新生[14]，本实验结果显示西罗莫司能够降低肝脏组织脂肪酸转运酶 CD36 蛋白的表达，提示西罗莫司在外源性 FFA 向肝细胞内转运中可能也有一定的作用。本研究中，通过肝脏原代细胞对 FFA 的动态摄取实验发现，西罗莫司能够降低小鼠原代肝细胞对 FFA 的摄取速度。综合以上研究结果，西罗莫司能减少肝细胞对外源性 FFA 的摄取并改善小鼠肝脏脂质积聚，作用机制可能与其能降低 CD36 蛋白表达有关，而进一步的机制还有待深入研究。

参 考 文 献

[1] Li Z, Xue J, Chen P, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in mainland of China: a meta-analysis of publishen studies[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, 29(1): 42-51.

[2] Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem[J]. Clin Med, 2011, 11(2): 176-178.

[3] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Clin Invest, 2005, 115(5): 1343-1351.

[4] Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, et al. Gene expression in human NAFLD[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(5): 1281-1287.

脂糖代谢研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001323

体内研究脂肪酸摄取新方法的建立和评估

刘 军[1],左国庆[2],阮雄中[1],陈压西[1],杨 萍[1]
(1. 重庆医科大学脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室,重庆 400016;2. 重庆市中医院消化内科,重庆 400021)

【摘 要】**目的**:利用荧光标记的长链脂肪酸,建立一种用于评估动物外周组织游离脂肪酸摄取能力的新方法,为研究体内脂肪酸代谢提供新途径。**方法**:小鼠腹腔注射和尾静脉注射氟化硼二吡咯荧光标记脂肪酸类似物(BODIPY FL C16),荧光显微镜下观察肝脏和脂肪组织荧光强度。对肝脏和脂肪组织进行脂质抽提,并用酶标仪检测血清、肝脏和脂肪组织相对荧光强度。**结果**:腹腔和尾静脉注射 BODIPY FL C16 后均能在小鼠血清[(32 096 ± 2 053)RFU;(22 933 ± 2 430) RFU],肝脏[(40.90 ± 5.08) RFU/mg;(25.70 ± 6.53) RFU/mg]和脂肪组织[(576 ± 90) RFU/mg;(4.990 ± 0.586) RFU/mg]检测到增强的荧光信号(P=0.000);腹腔注射 BODIPY FL C16 的浓度与外周组织的荧光强度呈正相关(P=0.000);腹腔注射 BODIPY FL C16 在 30~100 min 能够维持一个相对脂肪酸代谢的稳态。**结论**:成功建立了一种体内研究荧光标记脂肪酸摄取的新方法,该方法具有稳定性、重现性,能够准确地反映外周组织脂肪酸摄取情况。

【关键词】脂肪酸;代谢性疾病;肝脏;脂肪
【中图分类号】R332 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-02-22

Establishment and evaluation of a new method for studying fatty acid uptake *in vivo*

Liu Jun[1], *Zuo Guoqing*[2], *Ruan Xiongzhong*[1], *Chen Yaxi*[1], *Yang Ping*[1]
(*1. Chongqing Key Laboratory of Lipid and Glucose Metabolism, Chongqing Medical University;*
2. Department of Gastroenterology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】***Objective***: To establish a new method for assessing fatty acid uptake of peripheral tissues in animals by using the fluorescence labeled long chain fatty acid, and to provide a new way to study fatty acid metabolism *in vivo*. ***Methods***: The fluorescence intensity of the liver and adipose tissue was observed under a fluorescence microscope after intraperitoneal (ip) or intravenous (iv) injection of Dipyrromethene Boron Difluoride fluorescence labeled fatty acids analog (BODIPY FL C16) in mice. While the relative fluorescence intensity of the serum, liver and adipose tissue was detected with a microplate reader. ***Results***: Enhanced

作者介绍:刘 军,Email:822201013@qq.com,
研究方向:糖脂代谢及器官损害。
通信作者:杨 萍,Email:yp_apple@yeah.net。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81400786);重庆市科委基础与前沿研究计划资助项目(编号:cstc2015jcyjA10001)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1628.030.html (2017-06-22)

[5] Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sanchez-Campos S, et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C[J]. Gut, 2011, 60(10): 1394-1402.

[6] 王和峰,翟纯刚,庞文会,等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在巨噬细胞自噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(3):390-397.

[7] 韦 星,蔡 明,李 响,等. 阿西莫司联合小剂量阿托伐他汀治疗肾移植术后混合型高脂血症的疗效与安全性[J]. 器官移植,2015,6(6):392-396.

[8] 吴 瑜,赵 蕾,李 青,等. 高脂饮食致 C57BL/6J 小鼠脂肪组织中胰岛素受体底物蛋白 1 异常磷酸化的分子机制[J]. 重庆医科大学学报,2013,38(4):350-354.

[9] 苏凤云,刘爱军,苏定冯. 西罗莫司的药理学作用研究进展[J]. 药学实践杂志,2011,29(5):336-338.

[10] Kim JE, Chen J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis[J]. Diabetes, 2004, 53(11): 2748-2756.

[11] Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth[J]. Cell Metab, 2008, 8(3): 224-236.

[12] 蔡旭华,朱伟华,李伟平. 西罗莫司对非酒精性脂肪肝大鼠调节性 T 细胞/辅助性 T 细胞 17 平衡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(1):36-39.

[13] González-Rodríguez A, Mayoral R, Agra N, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1179.

[14] Brown NF, Stefanovic-Racic M, Sipula IJ, et al. The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes[J]. Metabolism, 2007, 56(11): 1500-1507.

(责任编辑:张辉洁)