DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.011

论著

文章编号:1000-5404(2004)19-1726-03

FATP4在大鼠非酒精性脂肪肝中的作用

冯爱娟,王 军,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 研究脂肪酸转运蛋白(fatty acid transport protein4, FATP4)基因在大鼠非酒精性脂肪肝形成中的作用。方法 建立高脂饮食脂肪肝模型,用半定量逆转录聚合酶链反应(reverse translation polymerase chain reaction, RT-PCR)与蛋白质印迹(Western blot)方法测定脂肪肝肝组织中FATP4表达变化。结果 高脂饮食脂肪肝大鼠肝脏中FATP4于2周时其mRNA及蛋白表达增强,于12周时表达最为明显,与正常组比较相差显著($P<0.05$)。结论 高脂饮食引起FATP4表达增强,最初是一种适应性反应,随着FATP4表达进一步增强,导致脂肪酸代谢失衡,可能引起脂肪肝的发生。

关键词:大鼠;非酒精性脂肪肝模型;脂肪酸转运蛋白;逆转录聚合酶链反应;蛋白质印迹
中图法分类号:R394;R446.9;R575.502 文献标识码:A

Roles of fatty acid transport protein 4 in nonalcoholic fatty liver rats

FENG Ai-juan, WANG Jun, CHEN Dong-feng (Department of Internal Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the roles of fatty acid transport protein 4 (FATP4) in rat model of nonalcoholic fatty liver. Methods The fatty liver rat model of high fatty diet (H) was established with a control group (C). The expression of FATP4 genes in fatty liver rats was examined by semi-quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. Results In group H, protein and mRNA expressions of FATP4 increased at 2 week, especially at 12 week after high fatty diet ($P<0.05$). Conclusion The high expression of FATP4 at the early stage is a kind of adaptive reaction. The up-regulated expression of FATP4 may lead to metabolic imbalance of fatty acid, finally resulting in the nonalcoholic fatty liver.

Key words: rats; nonalcoholic fatty liver; FATP4; RT-PCR; Western blot

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)是一种以无过量饮酒史的肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为特征的临床病理综合征。其发病机制至今尚未完全明确,目前研究结果显示,多种因素参与了非酒精性脂肪肝的发病过程,在诸多因素中脂质代谢异常被认为是最关键和基础的环节之一。大量研究证实脂肪酸转运蛋白(fatty acid transport protein4, FATP4)参与脂肪酸的摄取与转运,在脂质代谢中起重要作用。为探讨FATP4与非酒精性脂肪肝的关系,本研究拟观察其在高脂饮食脂肪肝大鼠模型中的表达。

1 材料与方法

1.1 动物实验和分组

Wistar成年雄性大鼠40只(第三军医大学大坪医院实验动物中心提供),体质量176~188 g,平均182 g。将实验动物按照随机区组设计分组方法分为正常饮食组(control group, C)与高脂饮食组(high fatty diet group, H),各组又分为2、4、8、12周4个时相点,各时相随机分配5只。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),高脂饮食组给予高脂饲料(基础饲料88%,猪油10%,胆固醇2%),分别于2、4、8、12周时收集肝脏标本。

1.2 取材和组织蛋白提取

分别于2、4、8、12周以速眠新1 ml/kg肌肉注射麻醉大鼠,股动脉抽血,送检血清ALT。然后阻断肝动脉与肝静脉,留取肝组织标本,每块肝组织0.8 cm×0.4 cm,质量约100 mg,加入RIPA裂解液1 ml(裂解液组成:1 ml 1.5 mol/L NaCl+5 ml 100 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)+100 μl 100 g/L SDS+100 μl 500 mmol/L DTT+100 μl NP-40+Complete Mini 1片+三蒸水补足容量至10 ml),冰上裂解1 h,移入1.5 ml的EP管中离心,取上清液,用Folin酚法测定蛋白浓度。

1.3 Western blot法检测

取100 μg上述各组肝组织总蛋白上样进行聚丙烯凝胶电泳,采用8%的分离胶,5%的积层胶,上样后60 V恒压电泳约50 min,待溴酚蓝至积层胶与分离胶交界处,换恒压80 V电泳

作者简介:冯爱娟(1973-),女,河北省安国市人,硕士,主治医师,主要从事脂肪肝相关方面的研究。电话:(023)68719640
通信作者:陈东风,电话:(023)68757362
收稿日期:2004-02-15;修回日期:2004-06-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 h, 使溴酚蓝全部电泳出分离胶底部。电转法将分离胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上(20 V, 17 h)。膜用 50 g/L 的脱脂奶粉+10 g/L BSA 的 1× TBST 溶液封闭 12 h, 再用 FATP4 多克隆抗体(1∶200, 美国 Santa cruz) 4 ℃下孵育 12 h, 二抗室温孵育 60 min。用发光试剂检测结合的辣根过氧化物酶标记的二抗, X 线片显影。

1.4　肝脏甘油三酯(TG)检测

采用甘油三酯检测试剂盒, 按照说明书进行操作。

1.5　总 RNA 提取

采用宝灵曼公司的 Tripure 试剂提取组织总 RNA。按试剂盒说明操作, 最后加入灭活 RNA 酶去离子水 10 μl 重新溶解 RNA 待用。

1.6　引物设计

采用 primer design 软件设计, 由上海生物工程公司合成。FATP4 上游: 5′ CTA GAC ACC TAC TCC ATT GCT GTG 3′; FATP4 下游: 5′ AGT GGT AGA GAG GTA GGC AGT CAT 3′, 扩增片段长度 556 bp。内参照β-actin 上游: 5′ CCT AGC ACC AGT AAG ATC AA 3′; 下游: 5′ AGC CAT GCC AAA TGT CTC AT 3′, 扩增片段长度: 243 bp。

1.7　RT-PCR 检测

反转录合成 cDNA: 反应体系总体积 40 μl。在 0.5 ml 薄壁管中加入样品总 RNA 4.0 μg, RNasin 1.33 μl (40 U), 加 DEPC-去离子水至 20 μl; 70 ℃变性 10 min, 然后冰上放置 2 min 以上; 加入逆转录 5× 反应缓冲液 8 μl, Oligo (dT)18 2 μl (0.2 μg), 10 mmol/L dNTP 4 μl, 加入 M-MuLV 逆转录酶 2 μl(400 个单位), 25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μl; 37 ℃反应 60 min。70 ℃变性 10 min 终止反应, −20 ℃保存备用。同时设立阴性对照, 即用 DEPC-去离子水代替样品总 RNA。FATP4 扩增条件: 95 ℃变性 75 s, 50 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 循环 32 圈。RT-PCR 产物的鉴定和产量分析各组的同一目的 mRNA 以相同的条件同时进行逆转录及 PCR 扩增, 扩增产物在同一张琼脂糖凝胶(1%)上进行电泳。凝胶照相后, 于 Gel Doc 2000 凝胶图像分析系统进行扫描, 用 BandScan 软件分析, 测定产物条带的积分光密度(IOD)。

1.8　统计学处理

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 软件行双因素方差分析。

2　结果

2.1　高脂饲料饮食组血清 ALT 变化

高脂组(H)于 2 周时无明显变化, 与正常组(C)比较无差异($P>0.05$), 4 周后开始增高, 于 12 周时明显增高(表 1)。

表 1　C 组和 H 组不同时相点血清 ALT 的变化(U/L, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　ALT levels of rat serum in groups C and H at different time (U/L, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	2 week	4 week	8 week	12 week
C	20	38.56±1.875 5	39.64±2.108 9	41.78±2.552 1	49.2±1.618 6
H	20	42.06±1.436 9	52.78±5.047 2*	58.52±5.466 4*	70.42±5.317 2*

$F_g=29.00$, $F_t=4.15$, $P=0.006$;　*: $P<0.05$, *vs* C

2.2　高脂饲料饮食组肝组织 TG 检测

高脂组于 2 周时无明显变化, 与正常组比较无差异($P>0.05$), 4 周后开始增高, 于 12 周时明显增高(表 2)。

表 2　C 组和 H 组不同时相点血清 TG 的变化(U/L, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　TG concentrations of rat serum in groups C and H at different time (U/L, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	2 week	4 week	8 week	12 week
C	20	22.38±0.602 8	22.46±0.660 3	25.34±0.596 3	24.76±0.643 1
H	20	24.82±0.922 2	32.58±1.617 2*	43.24±1.445 9*	55.7±1.692 6*

$F_g=352.8$, $F_t=4.15$, $P=0.008$;　*: $P<0.05$, *vs* C

2.3　高脂饮食组肝组织 FATP4 mRNA 表达

FATP4 mRNA 于 2 周开始表达增强, 与对照组比较相差显著[(0.61±0.07) *vs* (0.51±0.05), $P<0.05$], 4、8、12 周分别为(0.88±0.07)、(1.13±0.20)、(1.19±0.15), 与正常组比较均有显著意义($P<0.05$)。

2.4　高脂饮食组肝组织 Western blot FATP4 表达

FATP4 于 2 周开始表达增强, 与对照组比较相差显著[(6 608.2±37.2) *vs* (6 474.2±27.4), $P<0.05$], 4、8、12 周分别为(8 639.6±61.94)、(10 504±177.18)、(10 813.4±111.7)、(1.13±0.20)、(1.19±0.15), 与正常组比较均有显著意义($P<0.05$)。

3　讨论

非酒精性脂肪肝是肝脏最常见的疾病之一, 随着人民生活水平的提高及饮食结构的西方化, 脂肪肝的发病率呈逐年上升趋势。脂肪肝的发生最终取决于肝脏对脂肪酸的摄取、氧化、合成、酯化和甘油三酯的转运出肝脏是否能保动态平衡。大量研究证实 FATP 参与脂肪酸的摄取与转运, 在脂质代谢中起重要作用[1]。FATP4 是跨膜转运蛋白超家族中的一员, 存在于肝细胞和小肠粘膜细胞胞膜, 对长链脂肪酸具有高度亲和力, 从而参与脂肪酸的摄取与转运[2]。在肝脏, 长链脂肪酸一般通过位于肝细胞膜上的脂肪酸结合蛋白(plasma membrane fatty acid binding protein, FABPpm)、FATP 摄取入胞, 进入细胞内的脂肪酸在胞浆脂肪酸结合蛋白(cytoplasmic fatty acid binding protein, FABPc)的辅助下被转入到线粒体、过氧化物酶体、内质网等进行β-氧化、酯化, 从而调控细胞内的脂肪酸代谢, 最终使体内脂肪酸代谢保持相对平衡[3]。大量研究报道其在肥胖、糖尿病的形成过程中具有重要的作用[4]。本实验结果显示高脂饮食 4 周开始出现脂肪变, 随着时间的延长, 肝细胞脂肪变性和炎细胞浸润越为明显, 血清 ALT 及肝脏内 TG 明显呈上升趋势, 而肝组织 FATP4 mRNA 及蛋白表达于 2 周时即开始增高, 12 周时表达

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

最为明显，与正常对照组相比相差显著（$P<0.05$）。FATP4 的 mRNA 及蛋白表达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，FATP4 表达明显增强，导致脂肪酸代谢失衡，从而可能引起脂肪肝的发生和发展。

参考文献：

[1] Hirsch D, Stahl A, Lodish H F. A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(15): 8625-8629.

[2] Storch J, Thumser A E. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1486(1): 28-44.

[3] Dutta Roy A K. Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(10): 1360-1372.

[4] Memon R A, Fuller J, Moser A H, *et al*. Regulation of putative fatty acid transpoters and acyl-CoA synthetase in liver and adipose tissue in ob/ob Mice[J]. Diabetes, 1999, 48(2): 121-127.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)19-1728-01

肺癌肾上腺转移的螺旋 CT 诊断价值

Diagnostic value of spiral CT in adrenal metastasis from lung cancer

罗香国，刘 岭，罗东风，唐肇普 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所影像诊断科，重庆 400042）

肺癌有无远处转移对临床治疗方法的选择，尤其是能否手术、手术方法的选择及其预后判断起决定性的作用。肾上腺是肺癌肺外常见的转移部位。笔者搜集 28 例肺癌肾上腺转移的临床及螺旋 CT 的相关资料，对其规律及特征进行分析总结。

1 材料和方法

28 例中，男 25 例，女 3 例，34～72 岁，平均 54 岁。本组病例为本院住院病人，均经临床及病理证实。

全部病例均采用 Siemens Somatom Plus4 螺旋 CT 扫描机，对胸腹部及头颅进行扫描。前者采用准直宽度 5 mm，床进速度 7.5 mm，后者用 8 mm 层厚和间隔扫描。其中肾上腺扫描采用准直宽度 3 mm，床进速度 3～4.5 mm/s，螺距 21～1.5，重建层厚 1.5～2.0 mm。个别肿块较大者扫描方法同胸腹部。28 例中 15 例作了增强扫描，采用 300 mgI/dl 优维显 100 ml，注射速率 3 ml/s，分别于 30、60 s 扫描，扫描参数同平扫。

2 结果

肺癌肾上腺转移，男性 25 例，占 89.3%；女性仅 3 例，占 10.7%；男女之比为 8.3∶1。肺癌中以腺癌肾上腺转移的比例最高。28 例中，腺癌 13 例，占 46.4%，其次是鳞癌 7 例，小细胞癌 3 例，鳞腺癌 3 例，低分化癌 2 例。28 例中单侧肾上腺转移 23 例，左侧 16 例，右侧 7 例；双侧肾上腺转移 5 例，共计 33 个肾上腺转移肿瘤。本组病例均未出现与肾上腺转移相关的临床症状和体征。

肺癌肾上腺转移瘤的大小差异很大，本组中瘤体范围为 0.6～8.0 cm，其中 2.0～4.0 cm，共计 27 个，占 81.8%。转移瘤的形态大致可分为类圆形、椭圆形和不规则形，33 个转移瘤中有 30 个为类圆形，多见于 4 cm 以下的肿瘤，占 91%；不规则分叶状肿瘤见于直径在 4 cm 以上的肿瘤 3 个。肿瘤越大，形态越不规则。肺癌肾上腺转移瘤呈不均匀密度的软组织块影，CT 值 18～46 Hu。本组 28 例中 15 例（17 个肿瘤）作了增强扫描，均呈不均匀的明显强化，CT 值增加 24～58 Hu，且可清楚显示囊性坏死的低密度区。肾上腺位于肾周脂肪间隙的后上方，周围有较多的脂肪组织，所以肾上腺转移瘤一般界限清楚，且可清楚显示周围组织的浸润情况。本组中有 3 例与周围组织界限不清，累及肾上极，表现为周围脂肪间隙消失、模糊。

肺癌，特别是分化差的腺癌、小细胞未分化癌远处转移率甚高。有人曾对 100 例肺癌患者术前应用螺旋 CT 扫描颅脑及胸腹部，其中 11 例发现脑内、肝脏或肾上腺转移[3]。螺旋 CT 采用螺旋扫描、容积采集，扫描速度快、方式多，覆盖范围大，图像重建及后处理手段丰富，使得一次注射造影剂后多部位联合扫描成为可能，尤其是螺旋 CT 扫描不受呼吸动度的影响，一次憋气可以完成大范围兴趣区的扫描，薄层扫描及多层面的容积重建，对明确肾上腺有无肿块及判断肿块与周围结构的关系都很有帮助。

肺癌远处转移的部位主要集中在头腹部。28 例肺癌肾上腺转移病例中，合并颅内转移 4 例，肝脏转移 3 例，肋骨及椎体转移 2 例。

3 讨论

肺癌肾上腺转移较常见，发生率为 18%～38%[1]，CT 易于显示，尤其是螺旋 CT，更具有其独特的优越性。Sandler 等[2]报道了 110 例肺癌病人，肾上腺转移率为 10%，但与肾上腺转移瘤相

（下转 1731 页）

作者简介：罗香国（1966－），男，河北省石家庄市人，主治医师，讲师，主要从事螺旋 CT 诊断介入治疗方面的研究，发表论文 10 余篇。电话：（023）68757527

收稿日期：2003-01-20；修回日期：2003-06-19

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net