

瘦素及其受体在非酒精性脂肪性肝炎发病机制中的作用

赵彩彦, 王亚东, 周俊英, 李婧(河北医科大学第三医院 感染科, 石家庄 050051)

摘要: 目的 探讨瘦素(LP)及其受体在非酒精性脂肪性肝炎(NASH)大鼠肝组织中的表达及意义。方法 采用高脂饮食制备Wistar大鼠NASH模型; ELISA法测定大鼠血清瘦素(LP)浓度; 全自动生化分析仪检测各组大鼠血清空腹血糖(FBG)、甘油三酯(TG)水平; 比色法测定血清游离脂肪酸(FFA)含量; 放射免疫法测定血清胰岛素(FINS)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平, 并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR); HE、苏丹IV、Masson三重染色光镜下观察肝组织病理变化; 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组织化学染色分别检测肝组织OB-Rb mRNA和蛋白的表达。结果 模型组大鼠血清瘦素、TG、FFA、HOMA-IR、TNF- α 均较正常对照组明显升高; 模型组大鼠肝组织表现为不同程度的脂肪变性、炎症坏死及窦周纤维化; 肝组织OB-Rb mRNA和蛋白的表达则较正常对照组显著减弱; 相关分析显示: 模型组大鼠肝组织瘦素受体蛋白表达与血清瘦素水平、血清游离脂肪酸、TNF- α 、胰岛素敏感指数、肝细胞脂肪变性、炎症活动度呈显著负相关, 相关系数 r 分别为-0.83、-0.71、-0.74、-0.65、-0.83、-0.87, $P < 0.01$ 。多元线性回归分析显示, 瘦素受体表达减弱是肝脂肪变性的独立影响因素。结论 肝组织瘦素受体表达减弱是NASH瘦素抵抗的重要病理机制之一, 瘦素抵抗与胰岛素抵抗相互作用, 共同促进了NASH的发生发展。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 瘦素受体; 瘦素抵抗; 胰岛素抵抗

Role of leptin and leptin receptor in liver of rat with non-alcoholic steatohepatitis

ZHAO Cai-yan, WANG Ya-dong, ZHOU Jun-ying, LI Jing(Department of Infectious Diseases, The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of leptin and its receptor in the livers of rats with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) induced by fat-riched diet. **Methods** The male Wistar rat model of NASH was established by fat-riched diet. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for quantitative measurement of serum leptin of rat. Triglyceride, free fatty acid, fasting blood glucose, fasting insulin and TNF- α were also assayed by auto-biochemical analyzer, colorimetric method and radio-immune assay, respectively. Insulin resistance index were calculated according to HOMA model. The pathology of liver was analyzed by means of HE, Sudan IV and Masson staining. The expression of OB-Rb mRNA and protein were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immuno histochemistry staining analysis separately. **Results** The serum concentrations of leptin, TG, FFA, HOMA-IR, TNF- α in model group were increased significantly. Expression of OB-Rb mRNA and protein in rats of NASH group were weaker obviously than that in normal control group. Steatosis, inflammation and fibrosis were presented at different extent in the livers of rats with NASH. The expression of leptin receptor in steatotic liver negatively correlated with serum leptin concentration ($r = -0.83$), FFA ($r = -0.71$), TNF- α ($r = -0.74$), insulin resistance index ($r = -0.65$), hepatic steatosis ($r = -0.83$) and hepatic inflammation ($r = -0.87$) and it had an independent effect on hepatic steatosis. **Conclusions** The low expression of leptin receptor in steatotic liver is one of the pathogenesis of leptin resistance in NASH. Leptin resistance and insulin resistance interact to accelerate the development of NASH.

Key words: Non-alcoholic steatohepatitis; Leptin receptor; Leptin resistance; Insulin resistance

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是肥胖、高血脂等代谢紊乱所致的以肝细胞脂肪变性、肝小叶内炎症为主的临床病理综合征,部分患者可逐渐发展为肝纤维化甚至肝硬化,其发病机制不明。近年来研究发现,NASH患者或啮齿类NASH动物模型多存在高瘦素血症,表现为瘦素抵抗。瘦素抵抗可能在NASH发病中起重要作用,但其发生及作用机制不明。本文用高脂饮食制备了大鼠NASH模型,以研究肝组织瘦素受体表达与瘦素抵抗的关系,阐明瘦素抵抗在NASH发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 胰岛素、TNF- α 放射免疫试剂盒购自北京福瑞生物工程公司;FFA试剂盒购自南京建成生物工程公司;瘦素(Leptin) ELISA试剂盒由美国DRG公司提供;胆固醇、总RNA提取试剂盒购自北京鼎国生物工程公司;随机引物、RNasin、dNTP、AMV 反转录酶、Taq DNA聚合酶均购自美国Promega公司;OB-Rb扩增引物和GAPDH由北京奥科生物工程公司设计合成;OB-Rb多克隆抗体、免疫组化试剂盒购自北京中山试剂公司;雄性Wistar大鼠体重(195 ± 15) g,由河北医科大学动物实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 模型建立与标本制备 雄性Wistar大鼠40只,6周龄,体重(195 ± 15) g。正常喂养一周后随机分为正常对照组20只,以标准饲料喂养;高脂模型组20只,以高脂饲料(即在标准饲料基础上加2%胆固醇和10%猪油)喂养复制NASH大鼠模型,20周末隔夜空腹股动脉放血处死全部大鼠。4℃离心分离血清,用于TG、FFA、FBG、FINS、TNF- α 及瘦素水平的测定;肝右叶中部快速切取两块肝组织,10%中性福尔马林固定,石蜡包埋、切片,用于HE、苏丹IV、Masson及免疫组织化学染色观察;余肝组织置液氮速冻后,-80℃冰箱保存,用于OB-Rb mRNA检测。

1.2.2 血清学指标检测 用Olympus全自动生化仪检测大鼠血清FBG、TG水平;比色法测定FFA;放射免疫法测定FINS、TNF- α 水平,严格按照说明书操作,并计算胰岛素抵抗指数($HOMA-IR =$

$FBG \times FINS / 22.5$)。

1.2.3 普通病理学观察 石蜡切片HE染色观察肝组织普通病理变化(炎症坏死程度)。苏丹IV染色观察肝细胞脂肪变性程度,以胞浆内出现红色颗粒为阳性。Masson 三重染色观察纤维化程度,绿染部分为胶原纤维。多功能病理图像分析仪测定脂肪变性和胶原纤维面积百分比,每张切片选取四周及中央五个区域,10倍物镜下计算平均面密度(阳性面积与统计场面积百分比)。炎症活动度积分标准分为汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎屑样坏死(PN)、桥接坏死(BN)四项,每项根据病变程度分别计1~4分,■为PN、BN严重度与预后直接相关,故2倍记分于其他病变。记分公式为: $P + L + 2PN + 2BN$ 。■富有经验的病理科医师在不知分组的情况下作出评分,将各种病理变化评分相加得到总积分。

1.2.4 OB-Rb蛋白免疫组织化学染色观察 采用Envision两步法进行,石蜡切片脱蜡至水,PBS冲洗,高压修复抗原,3% H_2O_2 室温孵育10分钟封闭非特异性抗原,PBS清洗5分钟,滴加1:50兔多克隆抗OB-Rb抗体,4℃过夜,PBS冲洗3次滴加抗兔IgG,37℃孵育1小时,PBS冲洗3次,DAB显色,苏木素复染封片观察。每次实验均设阴性对照,以0.01 mol/L PBS代替一抗,结果显示为阴性。结果判定:OB-Rb阳性细胞胞浆被染成棕黄色,采用多功能病理图像分析仪定量分析,每张切片选取四周及中央五个区域, $\bar{x} \pm s$ 计算平均面密度。

1.2.5 RT-PCR检测肝组织中OB-Rb mRNA的表达 肝组织总RNA采用Trizol一步法试剂盒提取,逆转录合成cDNA,再以适量cDNA为模板,在Taq DNA聚合酶作用下扩增OB-Rb 基因片段,并以GAPDH为内参照。OB-Rb PCR引物序列如下:上游:5'-ATCAGATCATCCACCCAATGT-3',下游5'-TCCTGGAGGATTCTGATGTCA-3',扩增片段为234 bp的OB-Rb基因片段;GAPDH 引物如下:上游5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游5'-CCACCACCCTGTTGCTGTA-3',扩增片段为452 bp的GAPDH基因片段;PCR产物在8%聚丙烯酰胺凝胶上80伏恒压电泳2小时,0.5 μ g/ml溴化乙锭

溶液中染色10分钟,通过法■BIO-PROFIL图像分析系统进行吸光度扫描,计算OB-Rb的相对表达量。

1.2.6 统计学处理 采用SPSS 12.0统计软件处理实验数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验,双侧 $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 为有显著统计学差异。相关分析采用直线相关分析及多元线性■归。

2 结果

2.1 血清学指标变化 NASH模型组大鼠血清TG、FFA、HOMA-IR、TNF- α 及瘦素含量明显高于正常对照组($P < 0.01$),见表1。

2.2 肝组织基本病理改变 正常大鼠肝脏呈红褐色,明亮有光泽,HE染色可见肝板以中央静脉为中心呈放射状排列,Sudan IV染色未发现肝细胞脂肪变性,Masson三重染色亦未见中央静脉及汇管区胶原纤维沉积。模型组大鼠肝脏体积明显增大,呈浅黄色或土黄色,与周围组织有黏连,切面油腻感,无光泽,镜下肝细胞浊肿、气球样变,伴小叶内点、灶状坏死及炎细胞浸润,肿胀的肝细胞出现中、重度脂肪变性,Sudan IV染色

可见脂肪变性的肝细胞胞浆中有大块红色颗粒,以中央静脉周围最为明显,Masson三重染色显示窦周和/或中央静脉周围纤维化。组织病理学评分与对照组比较均显著增高($P < 0.01$)。见图1~3、表2。

2.3 大鼠肝组织OB-Rb mRNA和蛋白表达变化 与正常对照组相比,模型组大鼠肝组织OB-Rb mRNA表达量明显减弱($P < 0.01$) (图4,表3)。正常对照组肝脏存在OB-Rb蛋白表达,阳性颗粒弥漫于细胞浆,肝小叶中央静脉周围肝细胞最为显著,而模型组表达明显降低(图5,表3)。

2.4 相关性分析 模型组大鼠肝组织瘦素受体蛋白的表达与血清瘦素浓度、血清游离脂肪酸、TNF- α 、胰岛素敏感指数、肝细胞脂肪变性、炎症活动度呈显著负相关,相关系数 r 分别为 -0.83 、 -0.71 、 -0.74 、 -0.65 、 -0.83 、 -0.87 , $P < 0.01$ 。

采用多元逐步■归分析法以肝脂肪变性(Y)为应变量,以瘦素受体蛋白表达(X_1)、血清瘦素浓度(X_2)、血清游离脂肪酸(X_3)、胰岛素敏感指数(X_4)为自变量建立■归方程,在 $\alpha = 0.05$

表1 各组大鼠血清学指标的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	FFA (mmol/L)	TG (mmol/L)	HOMA-IR	TNF- α (μ g/L)	瘦素 (ng/ml)
正常组	383.45 \pm 61.91	0.97 \pm 0.08	1.13 \pm 0.25	1.56 \pm 0.39	4.57 \pm 0.82
模型组	734.80 \pm 65.01	3.02 \pm 0.11	2.68 \pm 0.56	3.00 \pm 0.62	13.52 \pm 1.33

注:与正常组比较 $P < 0.01$

表2 各组大鼠肝组织病理评分($\bar{x} \pm s$) (%)

组别	脂肪变性	炎症与坏死	胶原纤维
正常组	1.47 \pm 0.97	0.75 \pm 0.53	2.82 \pm 1.29
模型组	45.46 \pm 14.88	3.91 \pm 1.05	10.29 \pm 2.49

注:与正常组比较, $P < 0.01$

表3 各组大鼠肝组织OB-Rb mRNA和蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	OB-Rb mRNA	OB-Rb蛋白
正常组	0.66 \pm 0.10	38.58 \pm 6.38
模型组	0.33 \pm 0.10	13.89 \pm 3.84

注:与正常组比较, $P < 0.01$

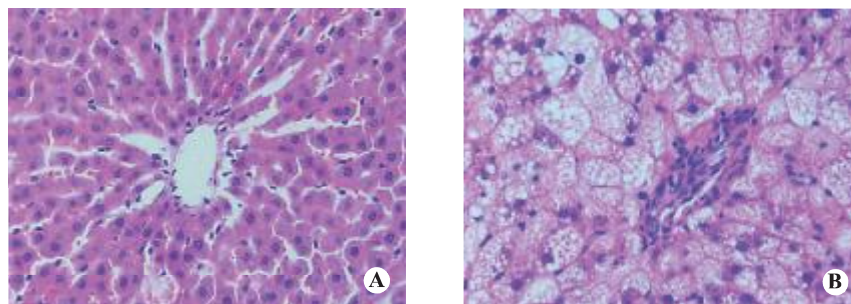


图1 大鼠HE染色病理观察(HE, 200×)

注: A: 正常对照肝细胞正常, 小叶结构清晰, 肝索排列整齐; B: 模型组肝细胞重度脂肪变性, 伴大量炎症细胞浸润及组织坏死

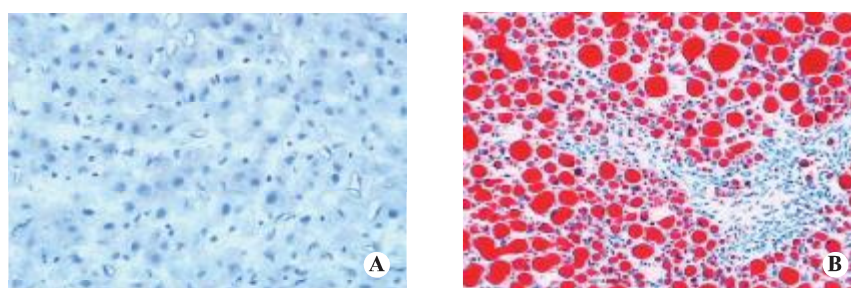


图2 大鼠肝细胞脂肪变性观察(苏丹IV, 200×)

注: A: 正常对照肝细胞无明显脂肪变性, 仅局部胞浆中可见少量细小红色颗粒;
B: 模型组肝细胞胞浆中有大块红色颗粒, 以中央静脉周围最为明显

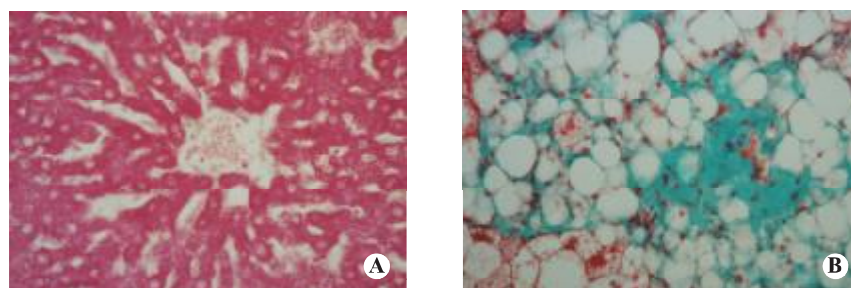


图3 大鼠纤维化程度比较(Masson, 200×)

注: A: 正常对照未见窦周及中央静脉周围纤维化; B: 模型组肝组织可见明显窦周及中央静脉周围纤维化

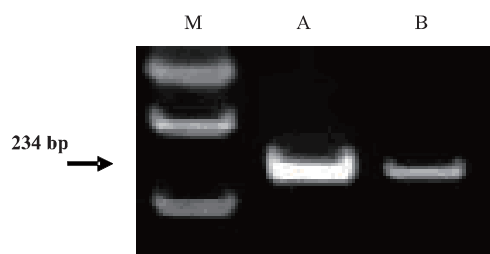
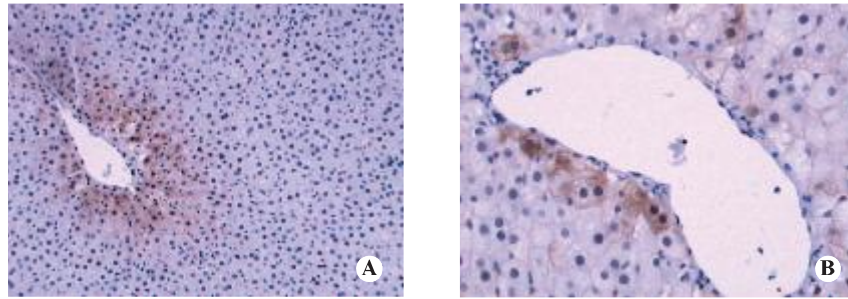


图4 各组肝组织中OB-Rb mRNA 表达水平的变化

注: M: DNA分子量标准; A: 正常对照; B: 高脂模型组



■ 5 各级肝组织中OB-Rb蛋白表达的变化

A: 正常对照组织 (100×); B: 高脂模型组织 (200×)

水准进入方程的只有瘦素受体表达这一变量, 回归方程为: $Y = 60.78 - 1.39 X_1$, 确定系数: $R^2 = 0.686$ 。瘦素受体蛋白的表达下降是肝脂肪变性的独立影响因素。

3 讨论

瘦素是由脂肪细胞分泌的一类与糖、脂代谢密切相关的脂肪因子, 其通过与受体结合, 活化细胞内转导信号, 在食物摄入、能量支出等诸多生理机能和代谢通路上发挥重要调节作用。作为一种分泌型蛋白类激素, 瘦素必需通过靶细胞膜上的受体及相应的胞内信号转导而发挥作用。瘦素受体 (OB-R) 是瘦素的高亲和力受体, 属 I 类细胞因子超家族。由于 OB-R 基因拼接形式不同, OB-R 可以产生至少 6 种拼接异构体, 包括 OB-Ra~f, 大致可分为长型和短型两种^[1,2]。其中 OB-Rb 是长型受体, 含有胞内信号转导区, 是瘦素最主要的功能性受体。

高脂饮食饲养雄性 Wistar 大鼠成功制备 NASH 大鼠模型后, 采用 ELISA 方法测定两组大鼠血清瘦素浓度, 模型组大鼠血清瘦素浓度显著高于对照组, 同时出现肥胖、高脂血症、胰岛素抵抗等一系列代谢紊乱。尽管模型组动物体内有很高的瘦素水平, 还是发生了代谢紊乱、NASH, 表明机体对瘦素的作用不敏感或无反应, 这种现象称为瘦素抵抗。

为研究 NASH 瘦素抵抗机制, 本研究采用 RT-PCR 和免疫组化方法半定量分析了瘦素受体在大鼠肝组织的表达。模型组大鼠肝组织瘦素受体表达较对照组明显减弱, 瘦素受体表达减弱使瘦素

的作用无法正常发挥, 成为瘦素抵抗的重要机制之一。

以肝脂肪变性为应变量的多元线性回归分析表明, 瘦素受体表达减弱是肝脂肪变性的独立影响因素, 提示脂肪肝发生发展过程中有瘦素抵抗参与。瘦素抵抗通过上调固醇调节元件结合蛋白-1 (SREBP-1) 基因的表达, 使瘦素特异抑制肝脏脂酰辅酶 A 去饱和酶-1 (SCD-1) mRNA 表达能力下降^[3,4], 促进了肝内脂质合成, 导致脂肪肝。胰岛素抵抗是 NASH 发病的基础, 本研究显示, 瘦素受体表达与胰岛素抵抗指数呈显著负相关, 表明瘦素抵抗可通过胰岛素抵抗促进 NASH 的发生。瘦素直接抑制基础胰岛素的分泌, 还可通过减少内源性葡萄糖的生成、促进外周组织对葡萄糖的利用、抑制葡萄糖刺激的胰岛素分泌, 防止高胰岛素血症进而防止胰岛素抵抗。一旦发生瘦素抵抗则不可避免出现胰岛素抵抗。胰岛素抵抗导致外周脂肪动员增强, 血清游离脂肪酸增多, 肝脏摄取增多, 同时肝内脂肪酸的氧化利用减少, 酯化形成甘油三酯增多, 肝细胞脂肪转运出肝能力受损, 肝细胞内脂肪堆积, 形成脂肪肝。由于胰岛素与瘦素的信号转导有交叉通路^[5], 瘦素抵抗与胰岛素抵抗相互作用, 形成恶性循环, 共同促进肥胖大鼠肝脏发生脂肪变性。

本研究同时表明瘦素受体表达与肝组织炎症评分和血清 TNF- α 水平也呈明显负相关。在 NASH 患者体内普遍存在着内毒素血症, 细菌 LPS 致使免疫细胞分泌 TNF- α , 后者诱导脂肪细胞产生大量瘦素。瘦素一方面激活各种免疫细胞及其吞噬功能

以清除侵入的病原微生物,另一方面避免TNF- α 诱导的有害炎症反应瀑布,对机体具有保护作用。一旦发生瘦素抵抗,则上述保护作用消失,促进了肝组织炎症的发生发展。

脂肪肝组织瘦素受体表达下降的原因未明,目前国内外尚无脂肪肝瘦素受体表达的直接报道。郭震煜等^[6]通过体外实验证明游离脂肪酸可以抑制酪氨酸激酶活性,对瘦素的信号转导造成一定的抑制作用,并对瘦素受体的基因表达水平产生抑制,下调瘦素受体的表达。本研究中,模型血清游离脂肪酸水平明显上升,与肝瘦素受体表达含量呈负相关,表明NASH肝组织瘦素受体表达减少可能是通过高游离脂肪酸发挥作用。本研究同时发现,高瘦素血症与瘦素受体表达呈明显负相关,推测高瘦素血症对瘦素受体的表达有负反馈调节,但机制不明。

上述结果说明瘦素受体表达减弱是瘦素抵抗的重要机制之一,瘦素抵抗与胰岛素抵抗相互作用,

共同促进了NASH的发生发展,但对于瘦素受体表达减弱的机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R [J]. Cell, 1995, 83: 1263-1271.
- [2] Kiehl D, Clark JS, Cicchanowicz A. Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue [J]. Metabolism, 1998, 47: 844-847.
- [3] Tobe K, Suzuki R, Aoyama M, et al. Increased expression of the sterol regulatory element-binding protein-1 gene in insulin receptor substrate-2/ (-/-) mouse liver [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 38337-38340.
- [4] Smith JT, Mark PJ, Waddell BJ. Developmental increases in plasma leptin binding activity and tissue mRNA expression in the rat [J]. J Endocrinol, 2005, 184: 535-541.
- [5] Szanto I, Kahn CR. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 2355-2360.
- [6] 郭震煜, 高妍, 丛琳, 等. 游离脂肪酸对大鼠肝细胞瘦素受体基因、蛋白表达及酪氨酸磷酸化的影响[J]. 医学研究生学报, 2003, 16: 659-662

收稿日期: 2007-07-24

• 消息 •

《中国临床医生》征稿启事

《中国临床医生》杂志创刊于1972年,系中华人民共和国卫生部主管、人民卫生出版社主办的国家级医药卫生专业期刊,现为月刊,是国家科技论文统计源期刊,国家新闻出版总署精品期刊阵营“中国期刊方阵”双效期刊。以面向基层、突出实用性、规范继续教育为特色,为没有进修机会的医务工作者搭建一个适宜医学提高的学习平台,并与中国医师协会培训部共同主办继续教育栏目,答题合格者,授予相应的学分。

办刊宗旨是帮助临床医生提高对多发病、常见病的诊疗水平,扩大知识面,了解医药信息及临床进展,交流防治疾病的经验,文章内容强调新颖、实用,使基层读者看得懂、学得会、用得上。

主要栏目有专家专论、专题笔谈、讲座、继续医学教育园地、论著与经验交流、综述、名老中医临床荟萃、思考病案及病案讨论、中医与中西医结合、医疗纠纷防范与处理等。

来稿请寄:北京市丰台区方庄方群里3区3号楼人民卫生出版社《中国临床医生》编辑部收;邮政编码:100078

编辑部电话:010-67616688-806; 010-67617401; Email: jcpphysician@sohu.com

来稿请注明联系人详细地址、邮编、电话、传真、Email,以便于及时联系。