

非酒精性脂肪性肝病患者肝组织脂联素表达及其意义

赵彩彦¹, 孔令波¹, 李亚², 王亚东¹, 周俊英¹, 甄真¹ (1.河北医科大学第三医院感染科, 石家庄 050051; 2. 河北医科大学第三医院 中心实验室, 石家庄 050051)

摘要: 目的 探讨肝组织脂联素表达在非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 发病机制中的作用及地位, 为NAFLD的预防及治疗提供新思路。方法 47例NAFLD患者及20例正常对照均测量身高、体重, 计算体重指数 (BMI); 分别应用ELISA方法测定血清脂联素 (adiponectin) 浓度、血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 浓度; 采用稳态模式评估法, 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR); 对肝组织进行HE、Masson染色及脂联素免疫组织化学染色, 对脂联素表达量进行半定量分析。结果 非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 组肝组织脂联素表达较对照组及单纯性脂肪肝组显著减少, 与血清脂联素浓度呈显著正相关, 与血清TNF- α 浓度、ALT、HOMA-IR及肝组织炎症、纤维化程度呈负相关, 而与脂变程度不相关。多元线性逐步回归分析显示, 肝组织脂联素表达是肝组织炎症及纤维化发生的保护因素。结论 肝组织脂联素表达在NAFLD患者肝组织炎症及纤维化发生发展中起保护性作用。

关键词: 脂联素; 脂肪肝; 非酒精性

The expression and significance of adiponectin in patients' liver with nonalcoholic fatty liver disease
ZHAO Cai-yan¹, KONG Ling-bo¹, LI Ya², WANG Ya-dong¹, ZHOU Jun-ying¹, ZHEN Zhen¹. (1. Department of Infectious Diseases, the Third Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China; 2. The Central Laboratory, the Third Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression changes and the significance of adiponectin in patients' liver with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Forty seven patients with NAFLD and 20 healthy persons were enrolled in our study. Serum adiponectin and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were quantified by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The level of body mass index (BMI), alanine aminotransferase (ALT), fasting blood glucose, and fasting insulin were also assayed. Insulin resistance (IR) was estimated by the homeostasis model assessment (HOMA). The histological manifestation of liver was analyzed by HE and Masson staining. Expression of adiponectin in liver was detected by immunohistochemical staining, and the relative quantity of adiponectin was assessed by semiquantitative analysis. **Results** The relative quantity of adiponectin in liver of NASH patients was remarkably lower than that in simple steatotic liver and normal liver. The expression of adiponectin in liver was correlated positively with the level of serum adiponectin and negatively correlated with the level of serum TNF- α , ALT, HOMA-IR and the degree of hepatic inflammation and fibrosis. The expression of adiponectin in liver was a protective factor of hepatic inflammation and fibrosis. **Conclusions** The expression of adiponectin in liver acts as a protective factor in the development of inflammation and fibrosis in NAFLD.

Key words: Adiponectin; Fatty liver; Nonalcoholic

通讯作者: 赵彩彦 Email: zhaoxy2005@163.com

近年来,关于脂肪细胞因子与代谢综合征关系的研究成为热点。非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是代谢综合征在肝脏的表现。脂联素(adiponectin)是一种近年新发现的脂肪细胞因子,有胰岛素增敏、抗炎等作用。本研究应用免疫组织化学染色方法,研究脂联素在NAFLD患者肝组织的表达情况及其与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平及肝组织病理改变的关系,揭示肝组织表达的脂联素在NAFLD发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2006年7月~2007年6月于本院就诊的NAFLD患者47例,其中男26例,女21例,平均年龄(44.1 ± 13.6)岁,符合中华医学会肝病病学分会脂肪肝和酒精性肝病学会2006年2月修订的NAFLD临床诊断标准^[1],其中16例行肝组织活检经病理证实。根据有无ALT升高或肝组织病理结果,分为非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)组及单纯性脂肪肝组。对照组20例,男10例,女10例,平均年龄(41.2 ± 12.7)岁,其中健康献血员15例,行肝血管瘤切除术者5例。

1.2 材料 脂联素单克隆抗体,购自英国Abcam公司;脂联素及TNF- α 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购于美国RB公司。

1.3 体重指数(body mass index, BMI)及生化指标测定 所有研究对象均测量身高及体重,计算 $BMI = \text{体重(kg)} / \text{身高(m)}^2$;ALT、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)用日本Olympus AU2700全自动生化分析仪检测;空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)水平用放射免疫法测定。采用稳态模式评估法(homeostasis model assessment, HOMA)计算胰岛素抵抗指数, $HOMA-IR = FINS \times FBG / 22.5$,取自然对数后呈正态分布。

1.4 血清脂联素及TNF- α 浓度 以ELISA法测定血清脂联素及TNF- α 浓度。

1.5 病理检查 将肝活检组织及肝血管瘤切除术中所取正常肝组织进行石蜡包埋,制成5 μm 厚连续切片。HE染色观察普通病理,每张切片随机选择10个视野,20倍物镜下计算平均脂变肝细胞百分比;炎症活动度根据美国NASH临床研究协会2005年制定的NAFLD组织学评分系统^[2]进行评分,积分标准分为小叶内炎症(L)(0~3分)、肝细胞气球样变性(B)(0~2分)、汇管区炎症(P)(0~1分),由富有经验的病理科医生在不知分组的情况下作出评分,计算各种病理变化评分的总积分,记分公式为 $L+B+P$ 。Masson染色观察纤维化程度。

1.6 免疫组织化学染色 采用Power VisionTM二步法:将石蜡包埋的肝组织制成5 μm 厚连续切片;常规脱蜡至水;高压修复抗原;3%双氧水室温孵育10分钟;胃蛋白酶消化,37℃孵育30分钟;滴加鼠抗人脂联素单克隆抗体,4℃过夜;滴加山羊抗小鼠IgG抗体-HRP多聚体,37℃孵育30分钟;滴加DAB显色剂,显色2分钟,自来水终止显色;苏木精复染,中性树胶封片。PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照。棕黄色着色为阳性表达。

1.7 病理图像分析 肝组织脂联素表达量及胶原纤维含量采用多功能病理图像分析仪(北京航空航天大学图像中心研制)进行分析。20倍物镜下计算平均面密度(阳性面积与统计场面积百分比),以平均面密度作为半定量分析指标。

1.8 统计学处理 实验结果采用均数 \pm 标准差表示。NASH组、单纯性脂肪肝组及对照组之间的比较用单因素方差分析或用Kruskal-Wallis H检验, LSD- t 法或Nemenyi法进行组间比较,相关分析用直线相关及多元线性逐步回归。应用SPSS 13.0统计软件分析实验数据。

2 结果

2.1 BMI和生化指标及血清脂联素浓度 各组患者及正常对照BMI、HOMA-IR、ALT、TNF- α 、血清脂联素浓度结果如表1所示,单纯性脂肪肝组、

NASH组BMI及HOMA-IR显著高于对照组 ($P < 0.01$), 单纯性脂肪肝病与NASH组之间差异无显著统计学意义 ($P > 0.05$); NASH组ALT、TNF- α 显著高于单纯性脂肪肝病及对照组 ($P < 0.01$), 单纯性脂肪肝病与对照组之间差异无显著统计学意义 ($P > 0.05$); 血清脂联素浓度在3组各不相同, 从高到低依次为对照组、单纯性脂肪肝病、NASH组 ($P < 0.01$)。

2.2 肝组织病理学变化 在16例行肝组织活检的患者中, 单纯性脂肪肝病与NASH各占8例。单纯性脂肪肝病患者肝细胞存在不同程度脂肪变性; NASH组患者肝组织存在肝细胞脂肪变性, 小叶内有炎性细胞浸润、点状或灶性坏死, 有窦周纤维化, 汇管区可见炎性细胞浸润, 向小叶内延伸, 偶见P-V桥接坏死。

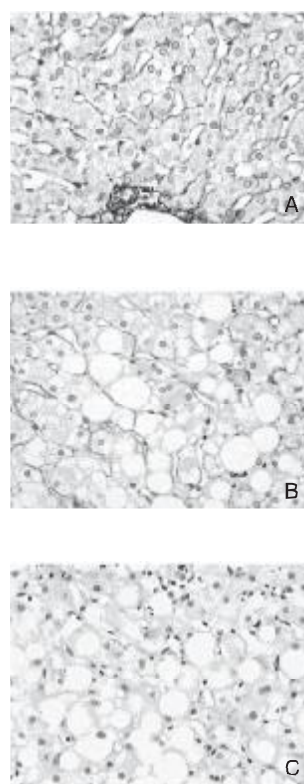
2.3 肝组织脂联素表达 肝组织免疫组织化学染色可见脂联素主要表达于肝窦内皮细胞及汇管区血管内皮细胞, 在炎性坏死区域也有表达 (图1), 单纯性脂肪肝病及对照组肝组织脂联素表达量显著高于NASH组 ($P < 0.01$), 单纯性脂肪肝病与对照组间差异无显著统计学意义 ($P > 0.05$) (表2)。

2.4 相关性分析

2.4.1 血清脂联素浓度的相关分析 在所有NAFLD患者, 血清脂联素浓度与BMI、HOMA-IR、血清ALT、TNF- α 浓度呈显著负相关, 相关系数 r 分别为 -0.623 ($P < 0.01$)、 -0.614 ($P < 0.01$)、 -0.809 ($P < 0.01$)、 -0.664 ($P < 0.01$)。

2.4.2 肝组织脂联素表达的相关分析 在行病理

检查的NAFLD患者中, 肝组织脂联素表达量与血清脂联素浓度呈显著正相关, 相关系数 r 为 0.821 ($P < 0.01$); 与BMI、HOMA-IR、血清ALT、TNF- α 浓度、肝组织炎症活动度及胶原纤维含量呈负相关, 相关系数 r 分别为 -0.550 ($P < 0.05$)、 -0.529 ($P < 0.05$)、 -0.805



■1 肝组织脂联素表达 (免疫组织化学染色, $200\times$)
A: 对照组; B: 单纯性脂肪肝病组; C: NASH组

表 1 3组BMI、生化指标及血清脂联素浓度与对照组比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BMI (kg/m^2)	HOMA-IR (对数值)	ALT (U/L)	TNF- α (pg/ml)	脂联素浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
对照组	20	20.34 ± 2.12	1.18 ± 0.20	18.65 ± 3.08	2.02 ± 0.16	3.81 ± 0.41
单纯性脂肪肝病组	28	27.87 ± 2.82^a	2.18 ± 0.28^a	21.46 ± 8.35	2.16 ± 0.16	2.80 ± 0.57^a
NASH组	19	28.27 ± 1.88^a	2.19 ± 0.33^a	75.32 ± 13.90^{ab}	2.66 ± 0.38^{ab}	1.26 ± 0.32^{ab}
F/H		72.971	96.367	40.542	32.316	159.246
P		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: BMI: 体重指数; HOMA-IR: 胰岛素抵抗指数; 与对照组比较, $^aP < 0.01$; 与单纯性脂肪肝病组比较, $^bP < 0.01$

表 2 3组肝组织脂联素表达量及肝组织病理改变($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	脂联素表达量(%)	肝脏脂肪变性(%)	炎症活动度	胶原纤维量(%)
对照组	5	4.19 ± 0.77	1.20 ± 1.04	0	2.00 ± 0.21
单纯性脂肪肝组	8	3.34 ± 0.34	42.50 ± 19.51 ^a	0	2.23 ± 0.25
NASH组	8	1.79 ± 0.57 ^{ab}	42.86 ± 18.78 ^a	3.63 ± 1.06	5.87 ± 1.19 ^{ab}
F/H		32.525	10.945	17.667	15.731
P		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与单纯性脂肪肝组比较,^b $P < 0.01$

($P < 0.01$)、 -0.739 ($P < 0.01$)、 -0.783 ($P < 0.05$)、 -0.798 ($P < 0.01$);与肝脏脂肪化变性程度不相关($P > 0.05$)。

2.5 多元线性逐步回归 对行病理检查的NAFLD患者,采用多元逐步回归法,以肝组织炎症(Y)为应变量,以肝组织脂联素表达量(X_1)、血清脂联素浓度(X_2)、BMI(X_3)、HOMA-IR(X_4)及血清TNF- α 浓度(X_5)为自变量建立回归方程,在0.05水准,肝组织脂联素表达量及血清TNF- α 浓度进入方程, $Y = -3.401 - 57.473X_1 + 2.83X_5$, $R^2 = 0.756$ 。说明NAFLD患者肝组织局部表达的脂联素在肝组织炎症发生中起保护性作用。

以肝组织胶原纤维含量(Y)为应变量,以肝组织脂联素表达量(X_1)、血清脂联素浓度(X_2)、BMI(X_3)、HOMA-IR(X_4)及血清TNF- α 浓度(X_5)为自变量建立回归方程,在0.05水准,肝组织脂联素表达量及血清TNF- α 浓度进入方程, $Y = -0.031 - 0.507X_1 + 0.035X_5$, $R^2 = 0.836$ 。说明NAFLD患者肝组织局部表达的脂联素在肝组织纤维化的发生中起保护性作用。

3 讨论

NAFLD发生与IR及肥胖密切相关。本研究也证实,NAFLD患者的HOMA-IR及BMI水平均显著高于正常对照。血清脂联素浓度及肝组织脂联素表达量均与HOMA-IR及BMI呈负相关,提示脂联素表达减少与NAFLD的发生相关。脂联素在NAFLD的发生发展中起着保护性作用。尽管有研究报道,脂联素通过减少脂质合成、增加脂肪酸氧化,减少肝脏脂质含量^[3]。但在本研究中,肝组

织脂联素表达量在单纯性脂肪肝组与对照组之间无明显差异,在NASH组却显著降低,并且与肝组织炎症及纤维化程度密切相关,与肝脂变程度不相关,这提示肝组织表达的脂联素在肝脏主要发挥其抗炎、抗纤维化作用。

本研究发现血清脂联素浓度及肝组织脂联素表达量均与炎症因子TNF- α 水平呈负相关,肝组织脂联素表达量与肝组织炎症程度呈负相关,多元逐步回归分析提示NAFLD患者肝组织局部表达的脂联素在肝组织炎症的发生中起保护性作用。脂联素刺激抗炎因子的释放、抑制炎症因子的产生是其抗炎作用的主要体现。脂联素可以抑制脂肪组织C反应蛋白及TNF- α 产生;通过环磷腺苷/蛋白激酶A依赖的信号途径抑制内皮细胞IL-8、血管细胞黏附分子-1及反应性氧簇产生;通过刺激环氧合酶-2/前列腺素E2途径抑制心肌细胞TNF- α 产生;通过抑制Toll样受体介导的NF- κ B活化减少巨噬细胞TNF- α 及IL-6产生,通过增加IL-10产生增加金属基质蛋白酶组织抑制剂-1产生^[4]。在肝脏,脂联素可能通过这些途径发挥其抗炎作用。脂联素表达减少使其在肝脏的抗炎作用减弱,导致炎症的发生发展。另外,脂联素与TNF- α 可以抑制对方的表达,并抑制对方在靶器官的作用^[5],在肝组织发生炎症后,表达增加的TNF- α 可能抑制了脂联素在肝脏的表达及其抗炎作用,使脂联素抑制TNF- α 的作用减弱,由此形成恶性循环,使炎症进一步发展。

本研究中,肝组织脂联素表达量与肝组织胶原纤维含量呈负相关,多元逐步回归分析提示

NAFLD患者肝组织局部表达的脂联素在肝组织纤维化的发生中起保护性作用。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor, TGF- β_1)及肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)在肝纤维化发生中起着关键作用。有研究发现,与相同处理条件下野生型小鼠相比,脂联素基因敲除小鼠在经四氯化碳刺激12周后,血浆TGF- β_1 、结缔组织生长因子水平明显升高,肝脏发生广泛纤维化,证实脂联素可以通过抑制TGF- β_1 、结缔组织生长因子表达阻止肝纤维化的发生^[6]。另外,在小鼠HSC培养过程中发现,静止状态HSC可以表达脂联素mRNA及脂联素蛋白,脂联素通过减少 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和增殖细胞核抗原表达抑制活化HSC的增殖与迁移,并促进其凋亡,抑制肝纤维化的发生发展^[7]。另外, TNF- α 除了参与炎症反应外,还可以通过激活HSC等途径参与肝纤维化的发生。所以,脂联素的抗纤维化作用还与其对TNF- α 抑制作用相关。

本研究显示,脂联素主要表达于肝窦内皮细胞、汇管区血管内皮细胞,炎症区域也有表达,肝细胞没有表达。现在已经发现了I、II两型G蛋白耦联脂联素受体,其中II型主要表达于肝细胞膜^[8],脂联素在上述细胞及区域表达后,通过旁分泌途径作用于肝细胞膜上受体。脂联素与其受体结合后通过活化磷酸腺苷活化的蛋白激酶以及激活p38丝裂原激活的蛋白激酶两个途径,引起下游一系列分子活性的改变,发挥其生物学作用^[9]。

本研究中,NASH组患者肝组织脂联素表达较单纯性脂肪肝病及对照组减少,单纯性脂肪肝病与对照组之间无差异,而血清脂联素浓度在NASH组低于单纯性脂肪肝病及对照组,单纯性脂肪肝病

组低于对照组。在NAFLD发生时,脂联素在其他组织的表达量也发生改变,并影响血清脂联素浓度。有研究证实,在NAFLD患者,脂肪组织脂联素mRNA表达量减少^[10]。

总之,本研究发现脂联素以其特有的生物学特性,在NAFLD的发生发展中起保护性作用,通过一定途径促进肝组织脂联素表达可以预防和治疗NASH。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学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]. 中华肝病杂志,2006,14: 161-163.
- [2] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology,2005,41:1313-1321.
- [3] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase[J]. Nat Med,2002,8: 1288-1295.
- [4] Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor[J]. Clin Chim Acta,2007,380:24-30.
- [5] Yokota T, Oritani K, Takahashi I, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages[J]. Blood,2002,96:1723-1732.
- [6] Kamada Y, Tamura S, Kiso S, et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin[J]. Gastroenterology,2003,125:1796-1807.
- [7] Ding X, Saxena NK, Lin S, et al. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology[J]. Am J Pathol,2005,166: 1655-1669.
- [8] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects[J]. Nature,2003,423:762-769.
- [9] 刘利梅,赵亚莉,李丽,等. 脂联素的信号转导通路[J]. 生理科学进展,2005,36:130-132.
- [10] 杨辉,李瑜元,袁玉强,等. 非酒精性脂肪肝病者胰岛素抵抗与脂联素基因表达的关系[J]. 中华肝病杂志,2007,15:525-528.

收稿日期: 2008-06-16