

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000177

ob/ob 肥胖小鼠肝脏炎症及能量代谢相关转录因子表达特征

崔欢欢¹, 李继斌², 柴水琴¹, 明月¹, 王冬娟³, 彭川², 刘丹³, 肖晓秋¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院脂代谢实验室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学公共卫生与管理学院营养与卫生学教研室, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学附属儿童医院、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:以 ob/ob 基因敲除肥胖小鼠为研究模型, 探讨肥胖对小鼠肝脏炎症的影响以及 ob/ob 小鼠肝脏中与能量代谢相关转录因子: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α)、核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1, NRF1) 的基因表达特征。**方法:**选取以 C57BL/6J 为背景的雄性 ob/ob 肥胖小鼠 (以下简称 ob/ob 小鼠) 作为肥胖模型, 同龄正常 C57BL/6J 雄性小鼠作为对照, 2 组小鼠各 8 只, 于 SPF 级动物房饲养至 5 月龄, 处死后取肝组织, 石蜡包埋切片, HE 染色观察组织形态; 抗原 F4/80 免疫组化染色观察巨噬细胞浸润情况; RT-PCR 检测各转录因子 mRNA 表达水平。**结果:**5 月龄 ob/ob 小鼠体质量和肝脏质量高于对照组 ($t=9.66, P=0.000; t=9.98, P=0.000$); 石蜡切片 HE 染色结果显示 ob/ob 小鼠肝细胞胞浆内出现空泡状脂肪滴; F4/80 免疫组化结果显示 ob/ob 小鼠肝组织巨噬细胞浸润明显; RT-PCR 结果显示 ob/ob 小鼠肝组织转录因子 PGC-1 α 、PPAR α 、NRF1 的 mRNA 表达水平较对照组明显上调 ($t=3.02, P=0.009; t=5.64, P=0.000; t=2.93, P=0.011$)。**结论:**ob/ob 小鼠表现出显著的肥胖特征, 肝细胞出现明显脂质沉积, 肝组织炎性细胞浸润; 上述改变可能与肝脏能量代谢相关转录因子 PGC-1 α 、PPAR α 和 NRF1 的表达增加有关。

【关键词】ob/ob 小鼠; 脂肪肝; 炎症; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α ; 过氧化物酶体增殖物激活受体 α ; 核呼吸因子 1

【中图分类号】R333.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-24

Characteristics of expression of energy metabolism-related transcription factors in the liver of ob/ob mice

Cui Huanhuan¹, Li Jibin², Chai Shuiqin¹, Ming Yue¹, Wang Dongjuan³, Peng Chuan², Liu Dan³, Xiao Xiaoli¹

(1. Laboratory of Lipid and Glucose Metabolism, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Teaching and Research Section of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University; 3. Key Laboratory of Child Development and Disorders Cofounded by Provincial Government and Ministry of Education, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To examine the mRNA expression characteristics of hepatic energy metabolism-related transcription factors: peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) and nuclear respiratory factor 1 (NRF1) in ob/ob mice. **Methods:** Male ob/ob obese mice on a C57BL/6J genetic background were used as obese model ($n=8$) and normal male C56BL/6J mice as control ($n=8$). At the age of 5 months, liver samples were obtained after sacrificing. Liver morphologic analysis was performed by HE staining and macrophages were stained by immunohistochemistry method using F4/80 antibody. RT-PCR was performed to determine the mRNA expression levels of interested genes. **Results:** Both body weight and liver weight of the ob/ob mice were higher than those of control group ($t=9.66, P=0.000; t=9.98, P=0.000$). In the ob/ob group, HE showed lipid accumulation. Immunohistochemistry staining for F4/80 results showed more severe inflammatory cell infiltration in ob/ob group. Compared with those in control group, PGC-1 α , PPAR α , NRF1 mRNA expression levels increased significantly ($t=3.02, P=0.009; t=5.64, P=0.000; t=2.93, P=0.011$). **Conclusion:** The ob/ob mice are obese than normal controls. There are significant hepatic lipid accumulation and inflammatory cell infiltration in the livers of ob/ob mice, which may related with the increased expressions of

PGC-1 α , PPAR α and NRF1.

【Key words】ob/ob mice; fatty liver; inflammation; peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α ; peroxisome proliferator activated receptor α ; nuclear respiratory factor 1

作者介绍: 崔欢欢, Email: chh0816@126.com,

研究方向: 内分泌与代谢。

通信作者: 肖晓秋, Email: xiaoxq@cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (编号: 81030008); 国家

自然科学基金面上资助项目 (编号: 81270947)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000177.html>

肥胖已成为全球范围内主要的代谢性疾病,无论是在发展中国家还是在发达国家,因生活方式的改变而出现能量摄入过多,导致肥胖发病率逐年递增^[1]。肥胖不仅影响体形,与糖尿病、心血管病和肿瘤等疾病发生、发展也存在密切联系。肝脏在机体能量代谢方面发挥着重要的作用并参与下丘脑以及中脑对摄食量和能量平衡的调解^[2]。

肥胖往往伴随代谢综合征。近年来,参与肝脏糖脂代谢以及线粒体合成增殖的转录因子越来越多地受到人们关注,如核呼吸因子(nuclear respiratory factors, NRFS)、过氧化物酶增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α) 以及在线粒体合成、肝糖异生、调节脂肪酸氧化等方面发挥重要作用的过氧化物酶增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)^[3-6]。ob/ob 基因敲除小鼠在肥胖和代谢性疾病研究领域的使用越来越普遍,本研究主要观察了 ob/ob 基因敲除小鼠肥胖发生过程中肝脏的病理特征以及能量代谢相关转录因子在肝脏中的表达改变。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

以 C57BL/6J 为背景的雄性 ob/ob 小鼠作为肥胖模型,同龄正常 C57 小鼠作为同型对照,2 组小鼠各 8 只。饲养于 SPF 级动物房,光照 12 h,冬季温度 24 ℃~25 ℃,夏季温度 20 ℃~25 ℃,常年湿度 60%相对湿度,压差 40 kPa,定期消毒换笼子;给予标准饲料喂养至 150 d。

1.2 组织样本的收集

腹腔注射水合氯醛,待动物完全麻醉后颈椎脱臼处死。暴露腹腔,取全部肝脏组织称湿质量,观察大体形态。取肝右叶组织置于 4%多聚甲醛溶液固定 48~72 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明后石蜡包埋,切片,片厚 5 μ m,置 56 ℃烤箱 12 h。剩余组织放液氮罐,快速冷冻后置 -80 ℃冰箱保存。

1.3 肝组织形态学观察

石蜡切片进行 HE 染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察肝组织形态和脂肪变性程度;切片脱蜡、水化,以抗 F4/80 为一抗(抗 F4/80 抗体稀释浓度 1:100),并设阴性对照,按免疫组织化学常规步骤染色,显微镜下观察显示情况。

1.4 RT-PCR

肝组织总 RNA 提取采用 Trizol 法,采用 ABI 逆转录试剂盒制备 cDNA,使用 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪检测各目的基因 mRNA 表达水平,所用引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Tab.1 Sequences of primers for real-time PCR

基因	引物序列	退火温度(℃)	扩增产物长度(bp)
PGC-1 α	上游:TGAAGCCTATGAGCAGCAAG	60.5	95
	下游:TCTGCCTCTCTCTCTTTGG		
PPAR α	上游:GCCTCCCTGATGAATAAAGATG	59.9	108
	下游:AGGCTCCATAAAGTCACCAAAG		
NRF1	上游:TATCCGAAAGAGACAGCAGACA	60.0	159
	下游:TGAAGACAGGTTGGGTTTG		
β -actin	上游:ACTGCCGCATCCTCTTCCTC	53.8	399
	下游:CTCCTGCTTGCTGATCCACATC		

1.5 统计学分析

数值用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 2 组比较采用两独立样本 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 动物体质量和肝质量比较

对照组和 ob/ob 组小鼠在 150 d 时体质量分别 (24.71 ± 3.72) g 和 (41.50 ± 3.21) g ($t=9.66, P=0.000$)。ob/ob 小鼠体质量均较正常对照组高 20% 以上; 处死动物后分离肝脏, ob/ob 组小鼠肝质量 (2.38 ± 0.17) g 明显高于正常对照组 (1.62 ± 0.13) g ($t=9.98, P=0.000$), 2 组小鼠数量各 8 只, 结果见图 1 和图 2。

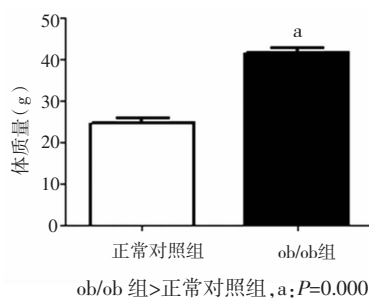


图 1 小鼠体质量 ($n=8$)

Fig.1 Body weight of the mice ($n=8$)

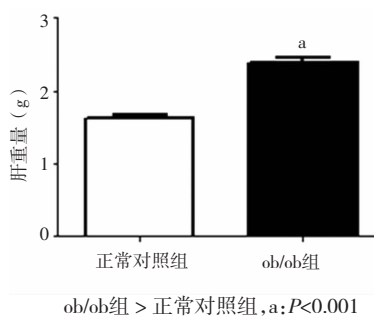


图 2 小鼠肝重量 ($n=8$)

Fig.2 Weight of the mice liver ($n=8$)

2.2 肝脏组织形态学

正常对照组小鼠肝脏外观呈暗紫红色、表面光滑、边缘锐利、质软有弹性;ob/ob 肥胖小鼠肝脏呈棕黄色、表面有细小颗粒感、肿大易碎、边缘圆钝、包膜稍紧张,见图 3。肝组织切片 HE 染色观察发现,对照组小鼠肝细胞大小和形态正常,肝索排列整齐,肝小叶结构正常;ob/ob 组小鼠出现肝细胞脂肪变性,以中央静脉周围最为显著,部分肝细胞气球样变,可见炎性细胞浸润,见图 4。免疫组织化学检测肝组织库普弗细胞膜特异性抗原 F4/80 表达情况发现,ob/ob 组小鼠肝脏组织库普弗细胞较正常对照组明显增加,主要集中于肝组织血管周围,见图 5。

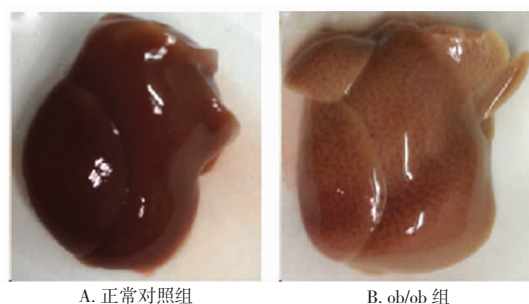
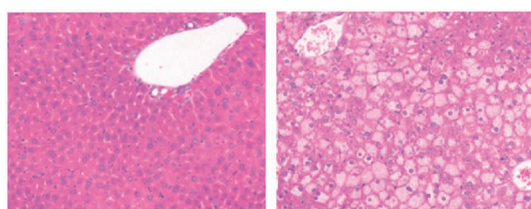


图 3 2 组肝脏大体形态

Fig.3 Comparison of hepatic morphology between two groups

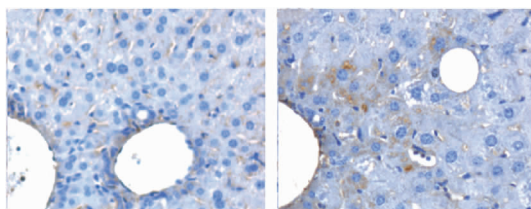


A. 正常对照组 B. ob/ob 组

ob/ob 组出现大面积的肝细胞脂肪变性

图 4 2 组肝脏 HE 染色对比 (10×10)

Fig.4 Comparison of hepatic HE staining between two groups (10×10)



A. 正常对照组 B. ob/ob 组

ob/ob 组肝组织库普弗细胞较对照组明显增加

图 5 肝组织免疫组化 F4/80 (10×20)

Fig.5 Immunohistochemistry F4/80 of hepatic tissues (10×20)

2.3 肝脏 PGC-1 α 、NRF1 和 PPAR α mRNA 表达水平

RT-PCR 检测结果发现,ob/ob 小鼠肝组织中 PGC-1 α 、PPAR α 和 NRF1 mRNA 表达水平平均高于正常对照组 C57/B6J 小鼠,2 组小鼠数量各 8 只,差异有统计学意义,比较分析结果见表 2。

表 2 PGC-1 α 、NRF1 和 PPAR α mRNA 在 2 组小鼠中的表达及其分析比较

Tab.2 Expression and comparison of PGC-1 α , NRF1 and PPAR α mRNA in the liver between two groups

组别	样本量 (n)	PGC-1 α	NRF1	PPAR α
正常对照组	8	0.378 $\pm$ 0.228	0.856 $\pm$ 0.235	0.443 $\pm$ 0.125
ob/ob	8	0.826 $\pm$ 0.352	1.357 $\pm$ 0.423	0.908 $\pm$ 0.196
t 值		-3.02	-2.93	-5.64
P 值		0.009	0.011	0.000

3 讨论

肥胖及肥胖相关疾病发病率的急剧上升是一个世界范围内的公共卫生问题^[7]。ob/ob 小鼠即瘦素基因敲除小鼠,存在胰岛素抵抗,后期可发展为 2 型糖尿病。因此,该动物模型已越来越多地被用于肥胖等代谢性疾病的研究。本实验结果显示 ob/ob 小鼠在 150 d 时,体质量明显高于正常对照组。同时,肝脏也出现一定程度的病理改变:除外观表现为体积和质量增大等脂肪变的特征外,肝脏组织在光镜下呈现肝细胞脂肪变性,并可见炎性细胞浸润。有文献报道,肥胖、2 型糖尿病、高脂血症等伴随的胰岛素抵抗,可引起肝内脂肪堆积(单纯性脂肪肝)^[8]。肝脏中的巨噬细胞又称库普弗细胞(kupffer cells, KCs),Huang 等^[9]报道 KCs 可干扰肝细胞脂质代谢及胰岛素的敏感性。F4/80 抗原是巨噬细胞特异性表面抗原,应用 F4/80 抗体为标记肝组织内的巨噬细胞提供了理想手段。本次实验进一步证实了肝脏炎性细胞浸润以 KCs 为主,KCs 可能通过其产生的细胞因子参与肥胖伴随的胰岛素抵抗和肝脂肪变性。

PGC-1 α 是近年来发现的核受体家族的转录激活蛋白,广泛参与能量代谢、线粒体生物合成等途径。PGC-1 α 可以调节许多与能量平衡相关的通路,同时也可控制组织线粒体合成,开启重要的组织特异性功能,包括糖异生、脂肪酸的 β 氧化、肌纤维类型转换、生酮作用和血红素的合成^[10-11]。Leone 等^[12]证实,PGC-1 α 缺失可导致多种组织氧化代谢障碍。正常情况下 PGC-1 α 在肝脏中的表达比其他有氧代谢组织低,然而在病理状态下肝脏 PGC-1 α 的表达量急剧上升^[13]。肝脏作为富集线粒体的功能器官,PGC-1 α 通过与 NRF1 结合共同作用于线粒体转录因子 A 的启动子促进线粒体多种蛋白的表达,从而直接调节线粒体的转录与复制,诱导线粒体增殖;

此外,PGC1- α 激活核受体 PPAR α ,共同促进 β 氧化过程如长链酯酰辅酶 A 脱氢酶和肉碱棕榈基转移酶 I 等基因的转录,从而参与脂肪酸的氧化过程。

线粒体功能损伤是胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的潜在发病机制之一,PGC-1 α 可调节多种组织中线粒体的生物合成及代谢。本实验结果显示,ob/ob 小鼠肝脏 PGC-1 α 、NRF1 和 PPAR α mRNA 表达水平较正常对照均显著升高,可能与本研究中 ob/ob 小鼠在肥胖状态下发生肝脏脂肪变性和炎症状态有关。病理状态下(如肥胖)肝脏 PGC-1 α 表达增高,可激活糖异生关键酶,使肝脏葡萄糖输出增加,空腹血糖升高,从而促进胰岛素抵抗发生;在胰岛素抵抗状态下,PPAR α 表达增强促进了脂肪动员增加,血液中游离脂肪酸增多,肌肉摄取葡萄糖能力下降,结果将导致肝细胞脂肪蓄积,并加重胰岛素抵抗程度。有诸多文献报道,PGC-1 α 已成为治疗肥胖、糖尿病等代谢疾病的新靶点。线粒体功能损伤是胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的潜在发病机制之一,PGC-1 α 可调节多种组织中线粒体的生物合成及代谢。因此,提高与恢复线粒体功能及其氧化能力可为治疗代谢性疾病提供新方法^[14]。

参 考 文 献

- [1] Visinoni S, Khalid NFI, Joannides CN, et al. The role of liver fructose-1,6-bisphosphatase in regulating appetite and adiposity[J]. Diabetes, 2012(61): 1122-1132.
- [2] Díaz-Muñoz M, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, et al. Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study [J]. Comparative Hepatology, 2010, 9(1): 5-10.
- [3] Baar K. Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respi-

ratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise[J]. Proc Nutr Soc, 2004, 63(2): 269-273.

[4] Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators[J]. Cell Metabolism, 2005, 1(6): 361-370.

[5] Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1, energy homeostasis, and metabolism[J]. Endocr Reviews, 2006, 27(7): 728-735.

[6] Yoon J C, Puigserver P, Chen G. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1[J]. Nature, 2001, 413(6852): 131-138.

[7] Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, et al. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults[J]. JAMA, 2012, 307(5): 491-497.

[8] 黄超, 陈源文, 徐雷鸣. 库普弗细胞与非酒精性脂肪性肝病关系的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2013, 22(3): 201-204.

[9] Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, et al. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance[J]. Diabetes, 2010, 59(2): 347-357.

[10] Puigserver P, Rhee J, Donovan J, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction[J]. Nature, 2003, 423(6939): 550-555.

[11] Handschin C, Lin J, Rhee J, et al. Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1 α [J]. Cell, 2005, 122(4): 505-515.

[12] Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, et al. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis[J]. PLoS Biol, 2005, 3(4): e101.

[13] Yoon JC, Puigserver P, Chen G, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1[J]. Nature, 2001, 413(6852): 131-138.

[14] Wu Z, Boss O. Targeting PGC-1 α to control energy homeostasis[J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(10): 1329-1338.

(责任编辑: 冉明会)

作者·编者·读者

更正说明

本刊 2014 年第 39 卷第 3 期第 361 页

1.5 实验模型制备

HaCaT 和 HSF 细胞紫外线照射的实验模型制备, 由于辐照剂量没有金标准, 故结合相关文献和预实验结果^[3], 将照射剂量确定为 35 mJ/cm²。对 HaCaT 细胞 B、C、D 组采用 UVB303 nm 灯管 5 根并排照射, 灯管与培养瓶的距离是 15 cm, 根据公式: UV 剂量=UV 辐照强度×时间, 照射剂量为 35 mJ/cm²; 同理, 对 HSF 细胞 II、III、IV、V、VI 组采用 UVA365 nm 灯管 5 根并排照射, 灯管与培养瓶的距离是 15 cm, 根据公式: UV 剂量=UV 辐照强度×时间, 照射剂量为 35 mJ/cm²。

将第一句红色字体改为分别确定照射剂量, 将第二句红色字体改为 36 J/cm²