

脂联素、抵抗素和 Apelin 在脂肪变肝细胞中的表达及意义

霍 晴, 古 赛

(重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究脂肪细胞因子脂联素、抵抗素和 Apelin 在油酸诱导的肝细胞脂肪变性过程中的作用及意义。**方法:**以常规培养的人正常肝细胞株 L02 做为对照组, 采用油酸诱导 L02 细胞脂肪变性, 建立非酒精性脂肪变性肝细胞模型, 设置油酸诱导 24、48、72 h 各时相点为实验组。用油红 O 染色镜下观察对照组和实验各组肝细胞形态学变化, 用试剂盒检测肝细胞内甘油三酯(triglyceride, TG)水平, 并用实时荧光定量 PCR 与 Western blot 检测脂联素、抵抗素和 Apelin mRNA 和蛋白的表达。**结果:**24 h 肝细胞出现脂肪变性, 72 h 脂肪变性最严重; 各实验组肝细胞内 TG 含量较对照组均升高, 差异有统计学意义(LSD-*t* 值和 *P* 值分别为 8.477、0.000; 17.622、0.000; 39.251、0.000), 72 h 增高最明显; 实验组脂联素 mRNA 和蛋白的表达量均降低, 都于 24 h 开始降低, 72 h 表达最低, 与对照组相比差异有统计学意义(LSD-*t* 值和 *P* 值分别为 8.240、0.000, 16.940、0.000, 18.292、0.000; 13.283、0.000, 21.586、0.000, 27.030、0.000); 实验组抵抗素 mRNA 的表达上调, 于 24 h 开始增强, 72 h 表达最强, 与对照组相比差异有统计学意义(LSD-*t* 值和 *P* 值分别为 2.480、0.038; 12.003、0.000; 24.080、0.000), 而其蛋白质的表达上调, 于 48 h 开始增强, 72 h 表达最高, 与对照组比较差异有统计学意义(LSD-*t* 值和 *P* 值分别为 8.854、0.000; 13.301、0.000); 实验组 Apelin mRNA 和蛋白的表达均上调, 都于 24 h 开始增强, 72 h 表达最高, 与对照组相比差异有统计学意义(LSD-*t* 值和 *P* 值分别为 2.503、0.000, 9.720、0.000, 13.720、0.000; 5.629、0.000, 8.251、0.000, 15.953、0.000)。**结论:**油酸诱导的肝细胞脂肪变性模型中脂肪细胞因子脂联素表达下调、抵抗素和 Apelin 表达上调, 提示脂肪细胞因子脂联素、抵抗素和 Apelin 的表达的调控共同参与了肝细胞非酒精性脂肪变性。

【关键词】非酒精性脂肪肝; 脂联素; 抵抗素; Apelin

【中图分类号】R575.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-08-26

作者介绍: 霍 晴, Email: huoqingchongyi@163.com,

研究方向: 肝代谢障碍。

通信作者: 古 赛, Email: 1601792466@qq.com。

基金项目: 重庆市卫生局医学科研究资助项目(编号: 2011-2-077)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150308.2356.028.html>

(2015-03-08)

是下一步研究的重点。miRNA-486-5p 及 NRP2 的表达量与胃癌发生发展密切相关, 有望成为胃癌治疗的新靶点。

参 考 文 献

- [1] 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 等. 中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(1): 1-12.
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [3] Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, et al. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(5): 584-593.
- [4] Mees ST, Mardin WA, Sielker S, et al. Involvement of CD40 targeting miR-224 and miR-486 on the progression of pancreatic ductal adenocarcinomas[J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16(8): 2339-2350.
- [5] Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours[J]. Histopathology, 2005, 46(4):

396-402.

- [6] Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice[J]. Development, 2002, 129(20): 4797-4806.
- [7] Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins[J]. Nat Immunol, 2004, 5(1): 74-80.
- [8] Gray MJ, Van Buren G, Dallas NA, et al. Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(2): 109-120.
- [9] 周 琪, 梁后杰, 阎晓初, 等. 结肠癌组织 NRP2 的表达与淋巴结转移的关系[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(9): 797-802.
- [10] Wang J, Tian X, Han R, et al. Downregulation of miR-486-5p contributes to tumor progression and metastasis by targeting protumorigenic ARHGAP5 in lung cancer[J]. Oncogene, 2014, 33(9): 1181-1189.
- [11] Navon R, Wang H, Steinfeld I, et al. Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e8003.

(责任编辑: 唐宗顺)

Expression and significance of adiponectin, resistin and Apelin in hepatocyte steatosis

Huo Qing, Gu Sai

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression and significance of adipocytokines adiponectin, resistin and Apelin in hepatocyte steatosis induced by oleic acid. **Methods:** Routinely cultured human L02 cells were used as controls; L02 cells were induced by oleic acid for 24, 48, 72 h respectively to establish nonalcoholic hepatocyte steatosis models (model groups). Lipid droplets in cells were observed by oil red staining and the levels of triglyceride were measured with analyzed kit. The expressions of mRNA and protein of adiponectin, resistin and Apelin were measured by qPCR and Western blot. **Results:** Oil red O staining showed that hepatocyte steatosis occurred at 24 h after L02 cells being treated with oleic acid and hepatocyte steatosis increased greatly at 72 h. Triglyceride in hepatocytes of model groups also increased compared with that of control group. In model groups, the expression levels of adiponectin mRNA and protein decreased at 24 h and declined remarkably at 72 h, compared with those of control groups. The expression levels of resistin mRNA increased at 24 h and elevated remarkably at 72 h in model groups, compared with those in control group. The expression levels of resistin protein increased at 48 h and elevated remarkably at 72 h in model groups, compared with those in control group. The expression levels of Apelin mRNA and protein increased at 24 h and elevated remarkably at 72 h in model groups, compared with those in control group. **Conclusion:** The expressions of adiponectin are down-regulated while those of resistin and Apelin are up-regulated in hepatocyte steatosis model, indicating the regulation of adipocytokines. Adiponectin resistin and Apelin may be jointly involved in hepatocyte steatosis.

[Key words] nonalcoholic fatty liver disease; adiponectin; resistin; Apelin

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外酒精和其它明确的损肝因素所致的、以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征, 包括单纯性脂肪肝以及脂肪性肝炎、脂肪性肝硬化甚至肝癌^[1]。随着人们生活水平的提高和膳食结构的改变, NAFLD 成为隐源性肝硬化的主要危险因素之一, 但其发病机制尚不十分清楚。目前研究发现脂肪组织不仅被认为是储存能量的组织, 其作为最大的内分泌器官, 所分泌的多种脂肪细胞因子如脂联素、抵抗素和 Apelin 等, 共同参与了心血管系统、内分泌系统等众多系统慢性疾病的病理生理过程^[2-6], 其参与机制已成为研究热点。近期研究揭示脂联素、抵抗素参与了 NAFLD 的发生发展, 但机制尚不十分明了, 而 Apelin 的作用尚未探明, 本研究旨在脂肪变性肝细胞中探索脂联素、抵抗素及 Apelin 的变化, 为进一步揭示它们在 NAFLD 发生发展中的作用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

L02 细胞由重庆医科大学附属第二医院消化内科实验室惠赠, RPMI1640 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶均购自美国 Hyclone 公司; 油酸和油红 O 购自美国 Sigma 公司; 甘油三酯 (triglyceride, TG) 检测试剂盒购自南京建成生物研究所; 总

RNA 提取试剂购于日本 TaKaRa 公司, 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒均购自日本 Toyobo 公司; 蛋白提取试剂盒购自杭州碧云天生物技术研究所; 山羊抗人脂联素、鼠抗人抵抗素、兔抗人 Apelin 一抗、鼠抗 GAPDH 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊、山羊抗鼠、山羊抗兔二抗均购自北京中杉金桥公司, 化学发光试剂盒购于美国 Pierce 公司, 其余化学试剂均为国产分析纯产品。

1.2 肝细胞培养及细胞模型的建立

参照文献方法^[4], 正常人 L02 肝细胞株用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养于 25 cm² 培养瓶, 置于含 5% CO₂、饱和湿度的 37 °C 培养箱中培养。将离体培养的肝细胞传代培养 24 h 后, 待细胞生长稳定、融合度约为 70%~80% 时, 加入 20 μg/ml 油酸 (油酸以 0.5% 二甲基亚砷溶解) 诱导肝细胞脂肪变性, 细胞隔天换液并加入新配置的油酸。分别于加入油酸诱导后的 0、24、48、72 h 收集细胞, 设置 0 h 为空白对照组, 24、48、72 h 为实验组。

1.3 肝细胞组织学

细胞培养于放置有无菌盖玻片的 6 孔板内, 各组给予相应处理后, 10% 多聚甲醛固定 30 min, 0.5% 油红 O 染液室温避光染色 20 min, 60% 异丙醇漂洗后于倒置显微镜下观察细胞内橘红色脂滴的形成情况。

1.4 TG 含量检测

将处于对数生长期的 L02 细胞以 2 × 10⁵ 个/ml 浓度接种于 6 孔板内, 每孔 1 个样本, 每组设置 3 个复孔, 按实验分组处理细胞后收集。取上清按照试剂盒说明进行操作, 并采用 BCA 法测定蛋白含量, 计算每毫克蛋白所对应的 TG 含量。

1.5 脂联素、抵抗素和 Apelin mRNA 表达

收集细胞,按照 TaKaRa 公司 RNAiso plus 试剂说明提取总 RNA,分光光度计测定总 RNA 浓度,样本 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间。总 RNA 定量后各取 1 μg ,按照 Toyobo 公司 Rever Tra Ace-a-逆转录试剂盒说明书配置反应体系,先在 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min 去除总 RNA 溶液中基因组 DNA,然后按照以下条件(42 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 30 $^{\circ}\text{C}$ 20 min,99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min)逆转录合成得到 20 μl cDNA 溶液。采用实时荧光定量 PCR 检测各组细胞中脂联素、抵抗素和 Apelin 基因的 mRNA 水平。按照 SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix(Toyobo)说明书配置反应体系,每 20 μl 总反应体系包括 SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix(2 $\times$)试剂 10 μl 、上下游引物浓度为(10 $\mu\text{mol/l}$)各 0.5 μl 、逆转录所得 cDNA 模板 2 μl 、灭菌蒸馏水 7 μl 。基因 PCR 引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计,送于上海生工生物公司合成,引物序列见表 1。PCR 反应在实时荧光定量 PCR 检测系统(CFX 96,Bio-Rad,USA)中进行,所有反应均设置 3 个复孔,热循环条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,搜集荧光信号,40 个循环;65 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$ 每 5 s 升高 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 并收集荧光信号制备溶解曲线。以 GAPDH 基因为内参,应用 CFX96 Manager 软件进行数据分析。

表 1 Real-time PCR 引物序
Tab.1 Primer sequences of real-time PCR

基因名称	引物序列	产物长度 (bp)
脂联素	正义 5'-GAAGGCTGAGAAAGGAGATCC-3'	148
	反义 5'-TGAGCGGTATACATAGGCACC-3'	
抵抗素	正义 5'-ATCCAGGAGGTGCGCGGCTCC-3'	107
	反义 5'-AAGCCTCGGGGCAAGTAGCC-3'	
Apelin	正义 5'-GGCTGGAAGACGGCAATGTCC-3'	87
	反义 5'-ATTTCTCCGACCTCCCTGCC-3'	
GAPDH	正义 5'-ATCAGCAATGCCTCCTGCACC-3'	99
	反义 5'-ATGACTGTGTCATGAGTCC-3'	

1.6 脂联素、抵抗素和 Apelin 蛋白表达

将上述处理的细胞瓶里培养基弃去,并用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)洗涤 3 次,吸去残余的液体。每个培养瓶里加入 200 μl RIPA 裂解液和 2 μl PMSF,轻轻摇动使其均匀覆盖整个培养瓶底部,置于冰上充分裂解 30 min,刮去细胞裂解物至 1.5 ml 离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。BCA 法蛋白定量后进行 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离,然后 30 V 恒压湿转过夜转至 PVDF 膜,将膜用 5% 脱脂奶粉常温下摇床封闭 2 h 后加入山羊抗人脂联素(1:200)、鼠抗人抵抗素(1:200)、兔抗人 Apelin(1:200)一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,10 min/次;加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,最后 ECL 法显色。显影胶片采用 Quantity

One 软件成像及定量分析各条带积分灰度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肝细胞形态学改变

油酸处理 L02 细胞 0、24、48、72 h 后进行油红 O 染色显微镜下观察,发现对照组中几乎无橘红色脂滴(图 1A),实验组 24 h 细胞中即开始出现大小不等的橘红色脂滴(图 1B),48、72 h 组中橘红色脂滴明显增多甚至融合现象(图 1C 和 D)。

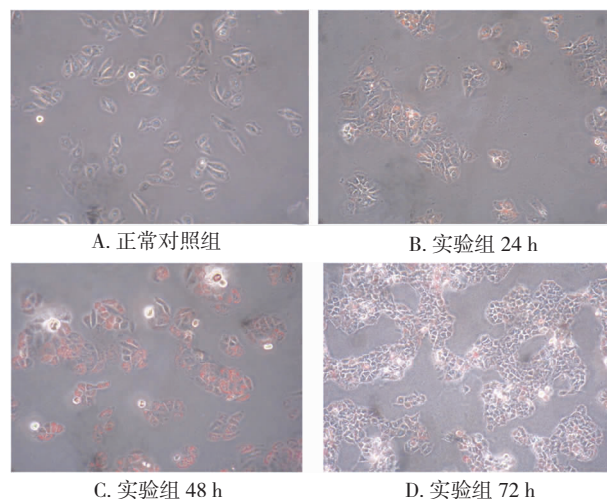


图 1 各组肝细胞油红 O 染色结果(200 $\times$)

Fig.1 Results of each hepatocyte by oil red staining (200 $\times$)

2.2 肝细胞内 TG 含量

0、24、48、72 h 肝细胞内 TG 含量($\mu\text{g}/\text{mg}$)逐渐升高,分别为(22.000 $\pm$ 2.124、33.726 $\pm$ 2.190、46.376 $\pm$ 2.870、76.294 $\pm$ 4.110),组间比较差异有统计学意义($F=570.265$, $P=0.000$);实验组 24、48、72 h 与对照组比较差异均有统计学意义(LSD- t 和 P 值分别为 8.477、0.000;17.622、0.000;39.251、0.000);实验组两两比较,24 h 与 48 h(LSD- $t=9.145$, $P=0.000$)、72h(LSD- $t=30.774$, $P=0.000$)比较,48 h 与 72 h 比较(LSD- $t=21.629$, $P=0.000$)差异均有统计学意义。

2.3 脂联素、抵抗素和 Apelin 的 mRNA 表达

0、24、48、72 h 脂联素 mRNA 的表达逐渐下降,组间比较差异有统计学意义($F=144.643$, $P=0.000$);实验组 24、48、72 h 与对照组比较差异有统计学意义(LSD- t 值和 P 值分别为 8.240、0.000;16.940、0.000;18.292、0.000);实验组两两比较,24 h 与 48 h(LSD- $t=8.700$, $P=0.000$)、72 h(LSD- $t=10.052$, $P=0.000$)比较,48 h 与 72 h 比较(LSD- $t=1.351$, $P=0.042$)差异均有统计学意义。0、24、48、72 h 抵抗素 mRNA 和 Apelin mRNA 的表

达均逐渐增加,组间比较差异均有统计学意义($F=238.858$, $P=0.000$; $F=80.485$, $P=0.000$);抵抗素和 Apein mRNA 实验组 24 h(LSD- t 值和 P 值分别为 2.480、0.038、2.503、0.037)、48 h(LSD- t 值和 P 值分别为 12.003、0.000、9.720、0.000)、72 h(LSD- t 值和 P 值分别为 24.080、0.000、13.720、0.000)与对照组比较差异均有统计学意义;实验组两两比较,24 h 与 48 h(LSD- t 值和 P 值分别为 9.522、0.000、7.217、0.000)、72 h 比较(LSD- t 值和 P 值分别为 21.600、0.000、11.217、0.000)、48 h 与 72 h 比较(LSD- t 值和 P 值分别为 12.077、0.000、4.000、0.004)差异均有统计学意义(表 2)。

2.4 脂联素、抵抗素和 Apelin 的蛋白表达

0、24、48、72 h 脂联素蛋白表达逐渐下降,各实验组与对照组比较差异均有统计学意义($F=276.643$, $P=0.000$);实验组 24、48、72 h 与对照组比较差异均有统计学意义(LSD- t 值和 P 值分别为 13.283、0.000;21.586、0.000;27.030、0.000);实验组两两比较,24 h 与 48 h(LSD- $t=8.303$, $P=0.000$)、72 h(LSD- $t=13.747$, $P=0.000$)比较,48 h 与 72 h 比较(LSD- $t=5.444$, $P=0.000$)差异均有统计学意义。0、24、48、72 h 抵抗素蛋白表达逐渐增加,组间比较差异有统计学意义($F=80.775$, $P=0.000$);实验组各组与对照组比较,24 h 无统计学意义(LSD- $t=1.120$, $P=0.271$),48 h(LSD- $t=8.854$, $P=0.000$)和 72 h(LSD- $t=13.301$, $P=0.000$)有统计学意义;实验组两两比较,24 h 与 48 h(LSD- $t=7.732$, $P=0.000$)、72 h(LSD- $t=12.180$, $P=0.000$)比较,48 h 与 72 h 比较(LSD- $t=4.447$, $P=0.000$)差异均有统计学意义。对照组 Apelin 蛋白表达极低,实验组其蛋白表达逐渐增加,组间比较差异有统计学意义($F=87.818$, $P=0.000$);实验组 24、48、72 h 与对照组比较差异均有统计学意义(LSD- t 值和 P 分别为 5.629、0.000;8.251、0.000;15.953、0.000);实验组两两比较,24 h 与 48 h(LSD- $t=2.623$, $P=0.013$)、72 h(LSD- $t=10.324$, $P=0.000$)比较,48 h 与 72 h 比较(LSD- $t=7.701$, $P=0.000$)差异均有统计学意义(图 2,表 3)。

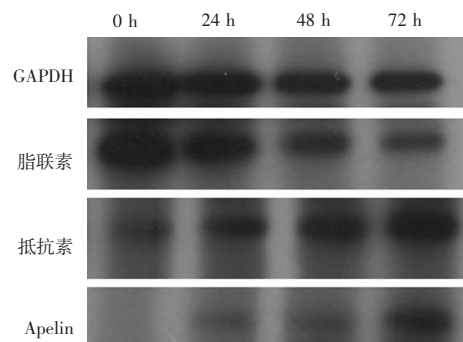


图 2 脂联素、抵抗素和 Apelin 的蛋白表达

Fig.2 Expression of protein of adiponectin, resistin and Apelin

3 讨论

随着社会的发展、生活方式的改变和饮食结果的调整,NAFLD 的发病率呈逐年上升趋势,已成为我国最常见的慢性肝病之一,其发病机制尚不十分清楚。大量研究表明其成因涉及多种因素,其中,“二次打击”学说^[9]是公认的引起 NAFLD 的重要机制之一,首次打击由胰岛素抵抗引起肝脏内脂质沉积,而“二次打击”主要是氧化应激损伤、脂质过氧化及脂肪细胞因子失衡所致,最终导致肝细胞损伤、炎症和肝纤维化的发生。

脂肪组织不仅是人体的能量储存器官,近年研究发现其可分泌多种脂肪细胞因子如脂联素、抵抗素、瘦素、网膜素、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin, IL)-6 等,它们与众多组织器官协同维持肝脏的代谢平衡,在 NAFLD 的发生和发展中起着重要作用^[6]。目前研究

表 2 脂联素、抵抗素和 Apelin mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab.2 Relative expression of mRNA of adiponectin, resistin and Apelin ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
脂联素	1.004 $\pm$ 0.114	0.590 $\pm$ 0.041 ^a	0.153 $\pm$ 0.147 ^{ab}	0.085 $\pm$ 0.017 ^{abc}	144.643	0.000
抵抗素	1.031 $\pm$ 0.310	5.501 $\pm$ 0.883 ^a	22.665 $\pm$ 3.335 ^{ab}	44.431 $\pm$ 2.737 ^{abc}	238.858	0.000
Apelin	1.025 $\pm$ 0.266	8.713 $\pm$ 2.024 ^a	30.876 $\pm$ 5.017 ^{ab}	43.160 $\pm$ 5.220 ^{abc}	80.485	0.000

注: a, 实验组各时相点与对照组比较均有统计学意义; b, 实验组 24 h 与实验各组比较差异有统计学意义; c, 实验组 48 h 与实验组 72 h 比较差异有统计学意义

表 3 脂联素、抵抗素和 Apelin 蛋白相对表达量的检测 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Tab.3 Relative values of protein of adiponectin, resistin and Apelin ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
脂联素	0.884 $\pm$ 0.046	0.598 $\pm$ 0.047 ^a	0.418 $\pm$ 0.046 ^{ab}	0.301 $\pm$ 0.044 ^{abc}	276.643	0.000
抵抗素	0.261 $\pm$ 0.036	0.293 $\pm$ 0.050	0.513 $\pm$ 0.060 ^{ab}	0.639 $\pm$ 0.085 ^{abc}	80.775	0.000
Apelin	0.027 $\pm$ 0.011	0.131 $\pm$ 0.035 ^a	0.180 $\pm$ 0.037 ^{ab}	0.323 $\pm$ 0.059 ^{abc}	87.818	0.000

注: a, 实验组各时相点与对照组比较均有统计学意义; b, 实验组 24 h 与实验各组比较差异有统计学意义; c, 实验组 48 h 与实验组 72 h 比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)

发现,脂联素、抵抗素和 Apelin 主要在脂肪细胞中表达,但损伤后的肝细胞也能表达和分泌部分脂肪细胞因子^[7]。范建高^[8]等研究发现高脂饮食非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏中成脂相关基因表达增强,如脂联素和抵抗素。但 Kasea 等^[9]发现与单纯性脂肪肝病病人相比,非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)患者肝脏中脂联素和受体 II 的表达水平降低。本研究发现正常的肝细胞有脂联素表达,经油酸诱导脂肪变性后的肝细胞中脂联素的表达下调,且随着脂肪变程度的加重,其表达呈逐渐下降趋势。有研究表明脂联素可通过其在肝细胞中的脂联素受体 II 结合激活 AMPK、PPAR- α 信号通路从而在 NAFLD 发生发展中发挥保护作用^[10]。

抵抗素是由脂肪细胞分泌的一种特殊蛋白,具有抵抗胰岛素并影响胰岛素相关的糖脂代谢的作用。研究显示^[11]NAFLD 患者血清抵抗素水平显著高于正常组,且血清中抵抗素水平与肝脏病变程度呈正相关。Szalowska 等^[12]发现抵抗素在肝脏组织中的表达高于脂肪组织。本实验研究发现正常的肝细胞表达少量的抵抗素,经油酸诱导脂肪变性后的肝细胞中抵抗素的表达上调,其上调幅度随着时间延长而增加。NAFLD 的发生发展涉及胰岛素抵抗和炎症因子的参与,而抵抗素可通过上调 SOCS-3(与胰岛素受体竞争结合)的基因表达而抑制胰岛素受体-2 的基因表达,使肝细胞呈现胰岛素抵抗^[13]。此外,抵抗素可诱导炎症因子如 TNF- α 、IL-6、IL-12 等的释放,同时,这些炎症因子也可上调抵抗素的表达进一步触发炎症的瀑布式反应,最终促进肝脏炎症反应和纤维化的发生。

Apelin 是新近发现的一种脂肪细胞因子,广泛分布于中枢神经系统和外周器官,如心脏、肺、肾脏、乳腺和脂肪组织,其在心血管、免疫、神经内分泌等诸多领域发挥着重要作用。研究表明,胰岛素可以刺激脂肪细胞中 Apelin 的合成,伴有胰岛素抵抗和高胰岛素血症的肥胖患者的血清中 Apelin 的水平显著升高^[14],Apelin 的表达与肥胖和胰岛素抵抗的发生发展有关。而 NAFLD 是代谢综合征(包括肥胖、糖尿病等)在肝脏的表现,可以推测 Apelin 的表达与 NAFLD 也有关系。同时在高脂饮食喂养的小鼠肝脏中显示 Apelin 和瘦素、胰岛素抵抗、氧化应激和炎症有密切关系^[15]。本实验研究发现正常的肝细胞不表达或很少表达 Apelin,但在油酸诱导的脂肪变肝细胞中 Apelin 的表达随着脂肪变程度的加剧逐渐上升,提示 Apelin 可能是肝细胞脂肪变的危险因子之一,但其如何促进肝细胞脂肪变的机制尚需

进一步揭示,且与脂联素、抵抗素等其它脂肪细胞因子间有无相互作用相互影响也值得深入研究。

综上所述,本研究发现脂肪细胞因子脂联素、抵抗素和 Apelin 能在油酸诱导的脂肪变性肝细胞中表达,且在基因和蛋白层面上,脂联素的表达下调以及抵抗素和 Apelin 的表达上调提示它们在肝细胞脂肪变过程中发挥作用。本实验为深入探讨脂肪细胞因子在临床 NAFLD 发病机制中所起的作用奠定了一定的实验基础,发挥的具体作用及其机制还有待于进一步深入实验研究。

参 考 文 献

- [1] Kainuma M, Fujimoto M, Sekiya N, et al. Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis[J]. *Gastroenterology*, 2006, 41(10): 971-980.
- [2] Tilg H. Adipocytokines in nonalcoholic fatty liver disease key players regulating steatosis, inflammation and fibrosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(17): 1893-1895.
- [3] Gandhi H, Upaganlawar A, Balaraman R. Adipocytokines: the pied pipers[J]. *J Pharmacol Pharmacother*, 2010, 1(1): 9-17.
- [4] 杨林辉, 陈东风. 油酸诱导培养肝细胞脂肪变性模型的建立[J]. *重庆医学*, 2007, 36(8): 698-700.
- [5] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"[J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842-845.
- [6] Miner J. The adipocyte as an endocrine cell[J]. *Journal of Animal Science*, 2004(82): 9352-9411.
- [7] Emmanuel AT, George V. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy[J]. *Mediators Inflamm*, 2009(10): 2-8.
- [8] 范建高, 方继伟, 陆元善, 等. 高脂饮食非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏成脂相关基因表达增强[J]. *中华消化杂志*, 2006, 26(5): 320-323.
- [9] Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Gut*, 2005(54): 117-121.
- [10] 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(11): 1288-1295.
- [11] Jiang LL, Li L, Hong XF, et al. Patients with nonalcoholic fatty liver disease display increased serum resistin levels and decreased adiponectin levels[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(6): 662-666.
- [12] Szalowska E, Elferink MG, Hoek A, et al. Resistin is more abundant in liver than adipose tissue and is not-regulated by lipopolysaccharide[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(8): 3051-3057.
- [13] Zhou L, Li Y, Xia T, et al. Resistin overexpression impaired glucose tolerance in hepatocytes[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2006, 17(3): 189-195.
- [14] Beltowski J. Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines up regulated in obesity? [J]. *Med Sci Monit*, 2006, 12(6): 112-119.
- [15] Garcia-Diaz D, Campion J, Milagro FI, et al. Adiposity dependent Apelin gene expression: relationships with oxidative and inflammation markers[J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 305(1-2): 87-94.

(责任编辑:冉明会)