

· 实验研究 ·

非酒精性脂肪肝小鼠肝组织 PPAR α 和 UCP-2 表达*

李宏¹, 徐尚¹, 李晓冲¹, 张秀英¹, 刘万刚²

摘要:目的 探讨过氧化物酶增殖活化受体 α (PPAR α) 和解偶联蛋白 2 (UCP-2) 在非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 小鼠肝组织中的表达。方法 雄性成年 ICR 小鼠 30 只随机分成 3 组, 每组 10 只, 即对照组 (普通饲料)、模型 A 组 (普通饲料 4 周 + 高脂饲料 4 周)、模型 B 组 (高脂饲料 8 周), 分别测定肝脏指数并制作肝脏病理切片, 采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法, 测定小鼠肝组织中 PPAR α 和 UCP-2 mRNA 表达。结果 对照组、模型 A、B 组小鼠肝指数分别为 (3.89 \pm 0.87)%、(7.42 \pm 0.95)%、(9.38 \pm 1.07)%, 模型组小鼠肝指数均高于对照组 ($P < 0.01$), 模型小鼠肝脏脂肪变性明显; 模型 A、B 组小鼠肝组织中 PPAR α mRNA 表达量分别为 (0.63 \pm 0.33)、(0.45 \pm 0.19), 低于对照组的 (1.16 \pm 0.27) ($P < 0.01$), 模型 A、B 组小鼠肝组织中 UCP-2 mRNA 表达量分别为 (0.67 \pm 0.76)、(0.89 \pm 0.52), 高于对照组的 (0.25 \pm 0.13) ($P < 0.01$)。结论 发生 NAFLD 的小鼠肝组织中 PPAR α 和 UCP-2 mRNA 表达异常。

关键词:非酒精性脂肪肝病 (NAFLD); 过氧化物酶增殖活化受体 α (PPAR α); 解偶联蛋白 2 (UCP-2); 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

中图分类号: R 181.2*3 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2013)09-1313-03 DOI: 10.11847/zgggws2013-29-09-20

Expressions of PPAR α and UCP-2 mRNA in hepatic tissue in NAFLD mice

LI Hong*, XU Shang, LI Xiao-chong, et al (College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang Province 150030, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and uncoupling proteins 2 (UCP-2) in hepatic tissue in the mice with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Thirty mature male ICR mice were randomly divided into three groups (10 in each group). The mice in control group were fed with normal diet; the mice in experimental group A were fed with normal diet for 4 weeks; and then with high-fat diet for 4 weeks; and the mice in experimental group B were fed with high-fat diet for 8 weeks. Liver index were measured. The expressions of PPAR α and UCP-2 mRNA in hepatic tissue were examined with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The liver index for the mice in control group, experimental group A and experimental group B were 3.89 \pm 0.87, 7.42 \pm 0.95, and 9.38 \pm 1.07, respectively. In the mice of experimental group, the liver index was significantly higher than that of the control mice ($P < 0.01$). The steatosis of hepatic tissue in experimental group was obvious. PPAR α mRNA expressions in hepatic tissue of mice of experimental group A (0.63 \pm 0.33) and experimental group B (0.45 \pm 0.19) were dramatically decreased compared to normal group (1.16 \pm 0.27) ($P < 0.01$). UCP-2 mRNA expressions in hepatic tissue of mice of experimental group A (0.67 \pm 0.76) and experimental group B (0.89 \pm 0.52) were dramatically increased compared to normal group (0.25 \pm 0.13) ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of PPAR α and UCP-2 in hepatic tissue of NAFLD mice are abnormal.

Key words: NAFLD; PPAR α ; UCP-2; RT-PCR

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种无过量饮酒史、以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。NAFLD 常伴有肥胖及胰岛素抵抗^[1], 脂质代谢紊乱也常被认为是脂肪肝发生的关键环节之一, 然而其发病机制尚不完全清楚^[2]。目前, 针对 NAFLD

的治疗仍以预防为主, 并无特效的治疗药物。本研究通过反转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 技术检测 NAFLD 模型小鼠肝组织内过氧化物酶增殖活化受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor- α , PPAR α) 和解偶联蛋白 2 (uncoupling protein-2, UCP-2) mRNA 表达水平变化, 进一步了解 NAFLD 的发病机制。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 Trizol 试剂 (美国 invitrogen 公司), dNTP、Taq 酶及标准分子量 DNA-marker (日

* 基金项目: 国家自然科学基金 (31172369)

作者单位: 1. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;
2. 青冈县畜牧兽医局

作者简介: 李宏 (1986 -), 女, 山东鄄城人, 硕士在读, 研究方向: 兽医药理学与毒理学。

通讯作者: 张秀英, E-mail: zxy0451@hotmail.com

本 TaKaRa Biotech 公司), 一步法 cDNA 第一链反转录试剂盒 (哈尔滨海基生物科技有限公司)。台式高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); S1000 Thermal Cyclery 型 PCR 仪 (美国 Bio-RAD 公司); JY3000 + 型多用途电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); ChampGel™ 6000 全自动凝胶成像分析系统 (北京赛智创业科技有限公司); NanoDrop 2000 核酸蛋白分光光度计 (美国 Thermo 公司)。

1.2 实验动物与分组 雄性成年 ICR 小鼠 (中国农业科学院哈尔滨兽医研究所) 30 只, 体重 18 ~ 20 g。许可证号: SCXK (黑) 2006 - 009。将动物随机分成 3 组, 每组 10 只, 对照组以标准饲料喂养 8 周; NAFLD 模型 A 组以正常饲料喂养 4 周, 再以高脂饲料喂养 4 周; NAFLD 模型 B 组以高脂饲料喂养 8 周。

1.3 指标及检测

1.3.1 小鼠体重、肝重及肝指数测定 处死前分别测定各组小鼠的体重 (g) 和肝脏湿重 (g), 并计算肝指数 (肝指数 = 肝湿重/体重 × 100%)。

1.3.2 肝脏病理切片观察 将游离出的小鼠肝脏组织分成 2 份, 一部分固定于 4% 甲醛溶液中, 制作成石蜡切片, 苏木素-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE), 观察病理改变。其余肝脏组织于 -80 °C 低温冰箱内冻存备用。

1.3.3 RT-PCR 总 RNA 提取按照试剂盒说明书进行, 提取的总 RNA 经反转录后进行 PCR 反应。利用美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 在线资源, 参考小鼠 PPARα 基因和 UCP-2 基因的 mRNA 序列, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因作为内标基因, 应用 PrimerPremier 5.0 软件设计引物, 引物序列 (上海英俊生物技术有限公司合成) 如下: PPARα: 上游 5'-CACAATGCAATTCGCTTTGG-3'; 下游 5'-TCTTTC-CCGCGAGTATGA-3'。UCP-2: 上游 5'-CGGAGAT-ACCAGAGCACTGTC-3'; 下游 5'-TGGCATTTCGGGCAACATTGG-3'。GAPDH: 上游 5'-ACAGTCCAT-

GCCATCACTGCC-3'; 下游 5'-GCCTGCTTCACCAC-CTTCTTG-3'。PCR 扩增: 取上述反转录反应产物于 20 μL 反应体系中进行 PCR 反应。反应体系为: 0.8 μL cDNA 产物、0.2 μL Taq 酶、基因上下游引物各 0.8 μL, dNTP 1.6 μL, 2 μL 10 × Buffer, 13.8 μL ddH₂O。反应程序如下: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min。取 8 μL PCR 反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 利用 ChampGel™ 6000 全自动凝胶成像分析系统进行拍照。运用 BandsScan 软件进行图像分析, 计算目的基因 mRNA 相对表达量。

1.4 统计分析 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 组间均数的比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体重、肝脏湿重及肝指数变化 (表 1) 与对照组小鼠比较, NAFLD 模型组小鼠体重呈下降趋势, 肝指数明显升高 (*P* < 0.05)。

表 1 小鼠体重、肝脏湿重及肝指数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体重 (g)	肝重 (g)	肝指数 (%)
对照组	24.52 ± 1.33	1.00 ± 0.24	3.89 ± 0.87
模型 A 组	22.40 ± 1.12 ^a	1.68 ± 0.26 ^b	7.42 ± 0.95 ^b
模型 B 组	21.26 ± 1.82 ^b	2.02 ± 0.34 ^b	9.38 ± 1.07 ^b

注: 与对照组比较, a *P* < 0.05, b *P* < 0.01。

2.2 各组小鼠肝脏病理学变化 (图 1) 肉眼观察对照组小鼠肝脏无异常变化, 色泽鲜红, 表面光滑, 边缘锐利, 富有弹性。NAFLD 模型组小鼠肝脏体积增大, 呈奶黄色, 表面粗糙有油腻感, 可见小颗粒状突起, 边缘钝而厚。光镜观察对照组未显示明显病变 (图 1A), 模型 A 组小鼠可见肝细胞形态大体正常, 伴有肝细胞肿胀, 出现小泡性肝脂肪变, 肝细胞内有脂滴沉积, 肝小叶边缘区多量脂肪空泡 (图 1B); 模型 B 组小鼠可见肝细胞体积明显变大、脂肪变性明显, 胞质内脂滴大小不一, 包浆内充满多量脂肪空泡, 有淋巴细胞浸润灶 (图 1C)。

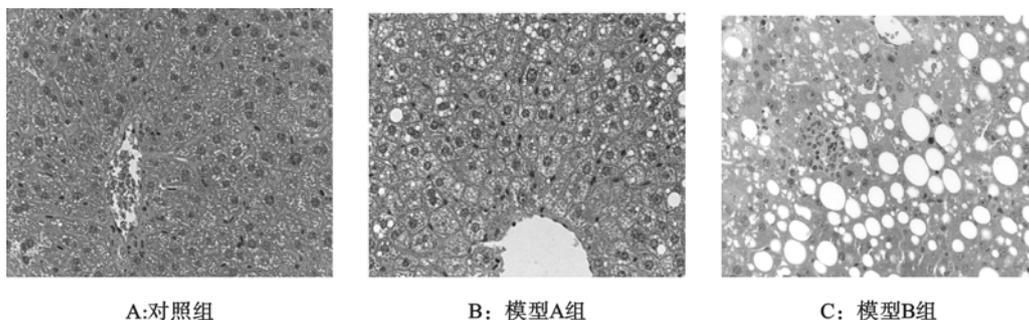
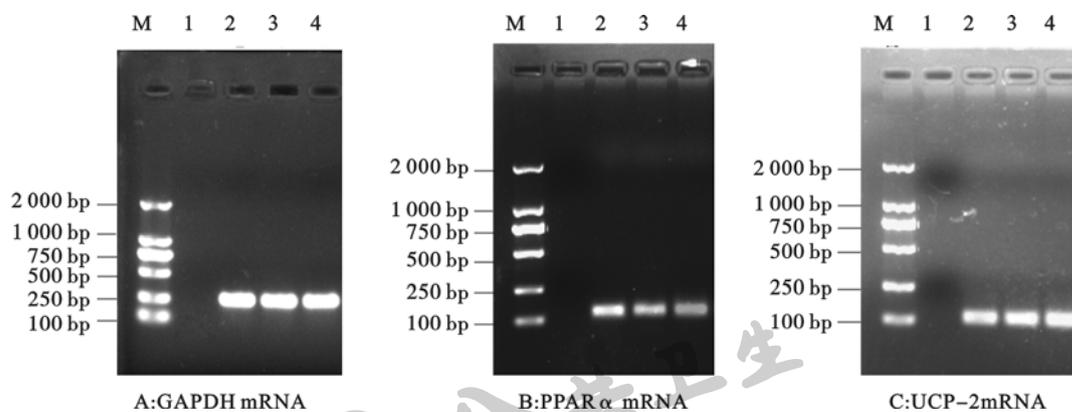


图 1 各组小鼠肝脏病理观察 (HE, ×400)

2.3 各组小鼠肝组织 PPAR α 和 UCP-2 mRNA 表达变化(图 2) 对照组、模型 A、B 组小鼠肝组织中 PPAR α mRNA 相对表达量分别为(1.16 \pm 0.27)、(0.63 \pm 0.33)和(0.45 \pm 0.19), 对照组比较, 模型 B 组小鼠肝组织 PPAR α mRNA 相对表达量下降

($P < 0.01$)。对照组、模型 A、B 组小鼠肝组织中 UCP-2 mRNA 相对表达量分别为(0.25 \pm 0.13)、(0.67 \pm 0.76)和(0.89 \pm 0.52), 与对照组比较, 模型组表达量升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。



注: M: DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 对照组; 3~4: 模型 A、B 组。

图 2 各组小鼠肝组织 GAPDH、PPAR α 和 UCP-2 mRNA 表达

3 讨论

脂质在肝脏内的蓄积对 NAFLD 的发生可能会产生直接影响^[3], 在 NAFLD 中脂质代谢相关基因表达水平改变会增加脂肪酸的合成^[4]。本研究结果显示, NAFLD 小鼠肝组织中 PPAR α 和 UCP-2 mRNA 表达量变化明显, 提示这 2 种基因可能在 NAFLD 形成的分子机制中发挥重要作用。PPAR α 在脂质代谢中起调节作用^[5], 其活化可促进脂肪酸氧化分解, 降低高密度脂蛋白水平。本研究结果表明, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 PPAR α mRNA 相对表达量下降, 提示可能引起一系列与脂质代谢相关的蛋白质和酶基因转录水平降低, 使肝脏线粒体内脂肪酸的 β 氧化能力减弱, 引发脂质堆积。脂肪沉积的肝细胞可发生脂性改变, 诱发和加剧胰岛素抵抗及炎症反应, 促进 NAFLD 发生^[6]。

解偶联蛋白是一种与机体能量代谢相关的线粒体载体蛋白^[7], UCP-2 可调节脂肪酸的 β 氧化, 促进线粒体内脂肪酸分解^[8]。肝脏内 UCP-2 基因可受多因素调节而表达升高, 使活性氧产量下降, 抑制脂质在肝脏内的沉积, 预防脂肪肝。本研究结果表明, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 UCP-2 mRNA 表达升高, 但肝脏却发生明显的脂性变化。提示 UCP-2 mRNA 表达量可能超过了机体的代偿能力。有研究显示, NAFLD 疾病发生时 UCP-2 基因表达上调可消耗腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)储备, 间接抑制脂质合成, 促进脂肪酸 β 氧

化, 减轻脂质在肝脏细胞内的蓄积。但 ATP 减少会使机体对外界刺激敏感性增加, 抗应激能力减弱, 使机体对“二次打击”的防御能力下降, 增加了 NAFLD 发生的可能性^[9]。在 NAFLD 发生过程中, UCP-2 的调节作用十分复杂, 其作用机制有待进一步研究。

参考文献

- Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Clin Liver Dis, 2004, 8(3): 575-594.
- 管石侠, 张宝, 马泰, 等. 脂肪肝合并腹型肥胖患者抵抗素与胰岛素抵抗关系[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(5): 687-688.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Progress in Lipid Research, 2009, 48(1): 1-26.
- 李莹, 顾长好, 张玮. 非酒精性脂肪肝发病机制的研究进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2009, 12(10): 1648-1650.
- Luquet S, Gaudel C, Holst D, et al. Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2005, 1740(2): 313-317.
- 施军平, 陈芝荃, 包剑锋, 等. 高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织 PPAR α 和 CRT-I mRNA 的表达[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(1): 52-55.
- 付荣霞, 孙长颖, 王舒然, 等. 饲料构成影响大鼠解偶联蛋白-2 基因的表达[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(7): 771-773.
- 梁坚, 王婉梅, 揭育丽, 等. 脂肪肝患者血清瘦素与胰岛素抵抗的关系[J]. 中国临床康复, 2004, 8(27): 5847-5849.
- 张一帆, 卿笃信. 解偶联蛋白 2 及其与脂肪肝的关系[J]. 医学信息, 2011(6): 2586.

收稿日期: 2012-11-14

(解学魁编辑 郑新校对)