

· 临床研究 ·

ChREBP 及其靶基因在高脂大鼠非酒精性脂肪肝中的表达*

李小山¹, 何松^{2△}

(1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆万州 404120; 2. 重庆医科大学附属第二医院消化内科 404020)

摘要:目的 探讨碳水化合物反应元件结合蛋白(ChREBP)及其靶基因 A 羟化酶(ACC)、脂肪酸合成酶(FAS)在高脂大鼠非酒精性脂肪肝(NAFLD)模型中的动态表达及作用。方法 选取 SD 大鼠 24 只, 随机分为高脂组和对照组。两组均于喂养第 12 周末处死。HE 染色观察肝脏脂肪变性, 逆转录酶链免疫反应(RT-PCR)和 Western blot 方法测定两组大鼠肝脏组织中 ChREBP、ACC、FAS 的 mRNA 表达和蛋白水平, 染色质免疫共沉淀分析 ChREBP 与 ACC、FAS 基因启动子碳水化合物应答元件(ChRE)结合情况。结果 成功构建高脂饮食大鼠 NAFLD 模型, 血生化指标(ALT、AST、TC、TG)明显升高, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); 高脂组大鼠肝组织 ChREBP mRNA、蛋白及 ChRE DNA 的表达水平降低, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); 而 ACC、FAS mRNA、蛋白的表达水平增高, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 高脂饮食可抑制 ChREBP 的表达, 在高脂饮食导致的 NAFLD 形成过程对 ACC、FAS 的表达起负性调控作用; ACC、FAS 的表达通过其他调控途径升高而参与 NAFLD 的形成过程。

关键词:非酒精性脂肪肝; 碳水化合物反应元件结合蛋白及其靶基因; 染色质免疫共沉淀

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.21.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)21-2125-03

Expression of ChREBP and its target gene in nonalcoholic fatty liver of high fat rat*

Li Xiaoshan¹, He Song^{2△}

(1. Chongqing Three Gorges Medical College, Wanzhou 404120, China; 2. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing 404020, China)

Abstract: Objective To investigate the dynamic expressions and effects of ChREBP as well as its target genes ACC and FAS in rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Methods Twenty four rats were divided randomly into hyperlipidemia group and control group and were sacrificed after twelve weeks's feeding. Adipose degeneration of liver was observed by hematoxylin and eosin stain. Expressions of ChREBP, ACC and FAS in both mRNA and protein levels were detected using RT-PCR and Western blot respectively. Binding conditions between ChREBP and carbohydrate response element (ChRE) of ACC and FAS were analyzed with chromatin immunoprecipitation assay (CHIP). Results Rat models with NAFLD fed on high fat diets were successfully prepared, and the level of ALT, AST, TC and TG in their blood increased ($P < 0.01$), expressions of ChREBP mRNA and protein and of ChRE DNA in liver decreased ($P < 0.01$), levels of mRNA and protein of ACC and FAS increased ($P < 0.01$), as compared to the control group. Conclusion Expression of ChREBP could be inhibited by high fat diet. NAFLD induced by high fat diet has a negative effect on expression of ACC and FAS. Increased levels of ACC and FAS participate in formation of NAFLD through other regulatory pathways.

Key words: nonalcoholic fatty liver; carbohydrate response element binding protein and its target gene; chip assay

近年来,随着生活水平的提高,饮食结构和生活方式的改变,使肥胖、高脂血症、糖尿病及由此引起的非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率明显升高。据统计,全世界大约 10%~30% 的成年人有 NAFLD,而在肥胖和糖尿病群体中,70% 以上有 NAFLD,更为严重的是 10%~50% 的肥胖儿童也有 NAFLD^[1-2]。NAFLD 是遗传-环境-代谢应激相关因素所致,以肝细胞内脂肪堆积为主的临床病理综合征^[3]。包括肝细胞的脂肪沉积、脂肪性肝炎、肝纤维化和肝硬化。其发病具体机制尚不完全明了,其中脂质代谢异常被认为是最关键和基础的环节之一^[4]。

本研究通过观察高脂饮食 NAFLD 大鼠肝组织中碳水化合物反应元件结合蛋白(ChREBP)及其靶基因表达水平改变,以探讨 ChREBP 在 NAFLD 形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性清洁级 SD 大鼠,体质量 200~220 g,重庆医科大学动物中心提供,合格证号:960024。

1.1.2 高脂饲料 88% 普通饲料、10% 猪油联合 2% 胆固醇^[5](上海化工公司生产)。

1.1.3 试剂 CHIP 试剂盒(Millipore Upstate 公司); ChREBP、ACC、FAS 抗体(美国 Santa Cruz 公司);逆转录酶链免疫反应(RT-PCR)RNA 试剂盒(天根生物科技有限公司);血清胆固醇及三酰甘油检测试剂盒(北京普利来公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模 选取雄性清洁级 24 只 SD 大鼠,正常喂养 1 周随机平均分为对照组和高脂组,对照组给予普通饲料喂养,高脂组给予高脂饲料喂养,自由饮水和进食。两组均于喂养第 12 周末处死。方法为隔夜禁食,次日晨腹腔注射 10% 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉,从腹主动脉采血,3 000 r/min 离心 20 min,分离血清,测定各组 ALT、AST、TC、TG。取肝右叶相同部

* 基金项目:重庆市卫生局医学科研基金资助项目(2008-2-213)。

△ 通讯作者, Tel: 13808336120; E-mail: hedoctor65@sina.com。

位 0.5 g 组织置于 1.5 mL EP 管, -70°C 冰箱冻存, 用于 RT-PCR 等检测; 另取肝左叶相同部位组织进行 HE 染色观察。

1.2.2 血清生化检测 ALT、AST、TC、TG 在全自动生化分析仪上测定。

1.2.3 HE 染色 取部分左叶肝组织用 10% 中性甲醛固定后, 石蜡切片进行 HE 染色, 光镜下评估肝脂肪变性和炎症活动情况。

1.2.4 RT-PCR 检测 低温下取各组肝组织, TRIzol 提取总 RNA, 测定其浓度及纯度, 进行逆转录与产物扩增。引物序列参考 GenBank 核苷酸系列资料, 由上海生物工程公司合成纯化, 以 β -actin 作为内参, RT-PCR 反应条件如下: 94°C 预变性 5 min, 94°C 30 s; 退火温度 (ChREBP、FAS 59°C , ACC、 β -actin 61°C), 30 s; 72°C 30 s, 34 个循环; 72°C 10 min 总延伸。反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果经自动电泳凝胶成像分析仪采集图像, 测定灰度值。结果判定以 ChREBP、ACC、FAS 与 β -actin 灰度值之比作为其 mRNA 的相对表达量。

1.2.5 Western blot 测定大鼠肝组织中 ChREBP、ACC、FAS 的蛋白水平 取 0.1 g 肝组织粉碎匀浆后, 用 PMSF 提取总蛋白, Lowry 法蛋白定量, 取预染蛋白 Marker $5\ \mu\text{L}$ (Fermentas 公司) 和 50 μg 蛋白上样电泳 (10% SDS-PAGE 凝胶)、转印 ($45\ \text{V}$, 4°C 过夜)、5% 正常牛血清清蛋白封闭、一抗 (兔抗鼠 IgG, 1:1000) 37°C 孵育 2 h; 二抗室温孵育 2 h。ECL 化学发光显色, 结果经自动电泳凝胶成像分析仪采集, 用 Quantity One 图像分析软件计算各组蛋白条带的灰度值 (densitometry unit, DU), 并与 β -actin 的灰度值进行比值分析, 以该比值表示各组蛋白的相对表达水平。

1.2.6 染色质免疫共沉淀 (Chip assay) 参照试剂盒说明方法进行, 对获得的 ChRE DNA 再进行实时定量 PCR。引物序列参考 GenBank 资料, 由上海生物工程公司合成纯化, 以 β -actin 作为内参, 其反应条件为: 预变性 95°C 30 s, 95°C 5 s, 60°C 31 s, 共 40 个循环。结果用 Percentage of Inputs 来表示 ($\bar{x}\pm s$)。Input 指用每次实验中将超声断裂后样品的 1% 直接进行解交联纯化得到的 DNA 进行 Real-time PCR 反应, 用来消除样品间由于细胞数等差异引起的数据偏差。

1.3 统计学处理 实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS16.0 统计学分析软件进行分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 ALT、AST、TC、TG 检测结果 与对照组比较, 高脂组大鼠血清 ALT、AST、TC、TG 的表达明显升高 ($P<0.01$)。ALT、AST 的变化提示肝脏病变进入脂肪性肝炎阶段, 生化指标的改变与镜下所见基本一致, 见表 1。

表 1 各组血清 ALT、AST、TC、TG 检测结果 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
对照组	48.7 \pm 4.89	159.4 \pm 27.320	1.424 \pm 0.31	0.301 \pm 0.078
高脂组	98.6 \pm 21.55*	286.1 \pm 46.370*	2.104 \pm 0.455*	0.613 \pm 0.056*

*: $P<0.01$, 与对照组比较。

2.2 大鼠肝脏组织病理改变 对照组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞呈多边形围绕中央静脉呈放射状分布, 大小一致 (彩插 IV 图 1)。高脂组大鼠肝组织可见中到重度脂肪变 (彩插 IV 图 1)。

2.3 大鼠肝组织中 ChREBP、ACC、FAS mRNA 表达情况 高脂组大鼠肝组织 ChREBP mRNA 表达量较对照组显著降低

($P<0.01$); 而 ACC、FAS mRNA 表达量较对照组显著升高 ($P<0.01$), 见表 2、图 2。

表 2 各组 ChREBP、ACC、FAS mRNA 表达结果 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	ChREBP	ACC	FAS
对照组	0.34 \pm 0.05	0.19 \pm 0.02	0.31 \pm 0.03
高脂组	0.18 \pm 0.03*	0.51 \pm 0.05*	0.79 \pm 0.10*

*: $P<0.01$, 与对照组比较。

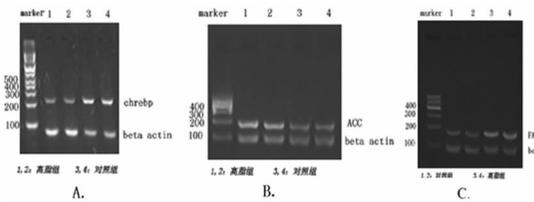


图 2 大鼠脂肪肝表达情况 (HE \times 200)

2.4 大鼠肝组织中 ChREBP、ACC、FAS 蛋白水平情况 高脂组大鼠肝组织 ChREBP 蛋白表达量较对照组显著降低 ($P<0.01$); 而 ACC、FAS 蛋白表达量较对照组显著升高 ($P<0.01$), 见表 3、图 3。

表 3 各组 ChREBP、ACC、FAS 蛋白水平 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	ChREBP	ACC	FAS
对照组	0.25 \pm 0.07	0.18 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02
高脂组	0.13 \pm 0.03*	0.33 \pm 0.04*	0.28 \pm 0.04*

*: $P<0.01$, 与对照组比较。

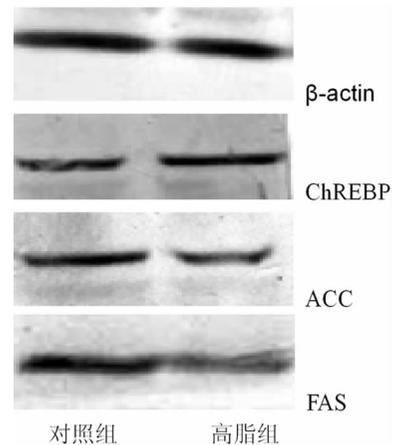


图 3 对照组与高脂组 ChREBP、ACC、FAS 蛋白表达情况

2.5 大鼠肝组织中 ChRE DNA 表达情况 高脂组大鼠肝组织中 ChRE DNA 表达量较对照组显著降低 ($P<0.01$), 结果用 Percentage of Inputs ($\bar{x}\pm s$) 表示 (表 4)。

表 4 实时定量 PCR 检测各组 ChRE DNA 表达结果 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	ChRE DNA (%)
对照组	0.64 \pm 0.08
高脂组	0.35 \pm 0.05*

*: $P<0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

2001 年, Yamashita 等^[6]发现了一种与肝丙酮酸激酶(LPK)基因启动子区的碳水化合物反应元件(carbohydrate response element, ChRE)相结合的蛋白质,即碳水化合物反应元件结合蛋白(ChREBP)。ChREBP 蛋白由 864 个氨基酸构成^[7],广泛表达于哺乳动物的各种组织中,并且在肝、脂肪、小肠、肾和肌肉等组织中的表达较高^[8]。目前,大量研究已经揭示 ChREBP 的靶基因主要是乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)和脂肪酸合成酶(FAS)、肝丙酮酸激酶(LPK)、磷酸果糖激酶(PFK)等参与脂质合成、糖酵解和糖异生过程的酶类^[9]。这些酶基因的启动子区域都含有一段保守的 DNA 序列(CAC GTG nnn nnC ACG TG)可以和 ChREBP 相结合,称为碳水化合物反应元件(carbohydrate response element, ChRE)。

本研究通过高脂饮食这一方式成功构建大鼠非酒精性脂肪肝模型,生化检测显示高脂组血清中 ALT、AST、TC、TG 水平较对照组显著升高,高脂组大鼠肝组织 HE 染色显示脂肪沉积明显、肝细胞中形成大量脂质小滴并有不同程度的炎性细胞浸润和坏死,呈现典型的非酒精性脂肪肝的表现。高脂组大鼠 ChREBP mRNA 及蛋白表达较对照组显著降低,其结果与相关研究结果一致,ChREBP 的 mRNA 表达水平可被多不饱和脂肪酸所抑制^[10-11]。而反映 ChREBP 与 ACC、FAS 结合情况的 ChRE DNA 水平也显著降低,说明在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝形成过程中 ChREBP 对 ACC、FAS 的调控降低。但实验结果显示高脂组大鼠 ACC、FAS mRNA 及蛋白表达较对照组显著增高,说明 ACC、FAS 在受到 ChREBP 调控的同时还受到其他基因的调控^[12]。固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding proteins, SREBPs)就是其重要的调节因子之一^[13-14]。同时 Iizuka 等^[15]研究表明 ChREBP 和 SREBPs 可以独立地调节肝细胞内的脂质代谢,这一结论与本研究结果相吻合。

总之,本研究明确了 ChREBP 在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝形成过程中对 ACC、FAS 等靶基因无正性调控作用,而 ACC、FAS 等脂质合成酶在 SREBPs 等调控基因的作用下表达上调从而参与高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝形成。

参考文献:

- [1] Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China[J]. J Hepatol, 2009, 50(1): 204-212.
- [2] Delgado JS. Evolving trends in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Eur J Intern Med, 2008, 19(2): 7-16.
- [3] Lieber CS. CYP2E1: from ASH to NASH[J]. Hepatol Res, 2004, 28: 1-11.
- [4] Park KS, Lee YS, Park HW, et al. Factors associated or related to with pathological severity of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Korean J Intern Med, 2004, 19: 19-26.
- [5] 鲁晓岚, 罗金燕, 胡长根, 等. 三种大鼠脂肪肝模型比较[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2005, 14(3): 243-248.
- [6] Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, et al. A glucose responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(16): 9116-9121.
- [7] Cairo S, Merla G, Urbinati F, et al. WBSCR14, a gene mapping to the Williams-Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(6): 617-627.
- [8] Iizuka K, Bruick RK, Liang G, et al. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(22): 7281-7286.
- [9] Ishii S, Iizuka K, Miller BC, et al. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(44): 15597-15602.
- [10] Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, et al. Mechanism for fatty acids "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 3829-3835.
- [11] Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage[J]. Biochemical Pharmacology, 2002, 63: 2075-2080.
- [12] Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, et al. SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes[J]. J Lipid Res, 2007, 48(7): 1581-1591.
- [13] Chen YX, Huang AL, Ruan XZ. Nuclear transcription factors and lipid homeostasis in liver[J]. Chin Med J, 2007, 120(24): 2290-2296.
- [14] 艾正琳, 陈东风. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肝 X 受体 α 和固醇调节元件结合蛋白-1c 的表达及意义[J]. 重庆医学, 2007, 36(8): 689-691.
- [15] Iizuka K, Horikawa Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome[J]. Endocr J, 2008, 55: 617-624.

(收稿日期: 2010-11-23 修回日期: 2011-04-11)

《重庆医学》——中国科技论文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!