

SCD-1 下调大鼠非酒精性脂肪肝肝脏能量储存的机理研究

陆元善¹ 范建高² 丁晓东² 方继伟² 蔡晓波² 杨兆瑞³

(上海交通大学附属第一人民医院:1 检验科,2 消化科,3 病理科 上海 200080)

摘要 目的:探讨硬脂酰 CoA 去饱和酶-1(SCD-1)对高脂饮食引起大鼠非酒精性脂肪肝肝脏能量储存下降的机理。方法:30 只 SD 大鼠随机分为实验组和对照组,前者用高脂饮食分别喂养 8 wk、16 wk 和 24 wk,后者同期予正常饮食。采用 RT 实时荧光 PCR 分析大鼠肝脏 SCD-1 mRNA、 β -actin mRNA 及 UCP2 mRNA 与 β -actin mRNA 的比值,荧光素酶-荧光素测定肝脏 ATP 含量。结果:肝组织 HE 染色显示实验组大鼠肝脏内有弥漫性肝细胞脂肪变性,8 wk 达到脂肪肝诊断标准。8 wk 表现为单纯性脂肪肝,16~24 wk 进展为脂肪性肝炎。8 wk、16 wk 和 24 wk 时实验组和对照组 SCD-1 mRNA 的测定值分别为 0.39 ± 0.18 和 0.83 ± 0.28 ($P < 0.05$), 0.44 ± 0.17 和 0.81 ± 0.30 ($P < 0.05$), 0.47 ± 0.23 和 0.88 ± 0.22 ($P < 0.01$);肝 UCP2 mRNA 的测定值依次为 5.41 ± 1.94 和 3.56 ± 1.43 ($P > 0.05$), 9.56 ± 2.95 和 3.68 ± 1.74 ($P < 0.05$), 13.74 ± 3.17 和 3.79 ± 1.65 ($P < 0.01$);肝匀浆 ATP 含量为 2.40 ± 0.54 和 2.96 ± 0.43 ($P > 0.05$), 2.26 ± 0.55 和 3.00 ± 0.42 ($P < 0.05$), 1.74 ± 0.45 和 2.79 ± 0.40 ($P < 0.01$)。结论:长期高脂饮食促使脂肪在肝内蓄积形成非酒精性脂肪肝,同时加重氧化应激对肝细胞的打击和肝脏的炎症反应。

关键词: 高脂饮食;非酒精性脂肪肝;硬脂酰 CoA 去饱和酶-1;解偶联蛋白 2

中图分类号: R365 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2008)03-0411-03

Study on Mechanism of Effect of Stearoyl-CoA Desaturase-1 on ATP Storage in Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Caused by Fat-Rich Diet

LU Yuan-shan¹, FAN Jian-gao², DING Xiao-dong², FANG Ji-wei², CAI Xiao-bo², YANG Zhao-rui³

(Shanghai First People's Hospital, Jiaotong University, 1 Department of Laboratory, 2 Department of Gastroenterology and hepatology, 3 Department of Pathology; Shanghai 200080, China)

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) decreasing energy storage in nonalcoholic fatty liver caused by fat-rich diet. **Methods:** A total of 30 Sprague Dawley rats were divided into experimental and control group. The rats in experimental group were fed with fat-rich diet, consisting of 10 % lard oil and 2 % cholesterol, while those in control group were fed with normal diet. The rats were sacrificed at the 8th, 16th, and 24th week, respectively. The ATP contents of hepatic cell were measured by luminescent-fluorescein method. The ratios of hepatic SCD-1 mRNA and UCP2 mRNA to β -actin mRNA were analyzed by real-time fluorescence reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** The hepatocytes stained with Haematoxylin & Eosin showed diffuse hepatocyte adipose degeneration in experimental group, met the diagnostic standard of fatty liver at the 8th week. Simple fatty liver was observed at the 8th week, and steatohepatitis came into formation from the 16th to 24th week. The ratio of SCD-1 mRNA to β -actin mRNA was (8 wk: 0.39 ± 0.18 vs 0.83 ± 0.28 , $P < 0.05$; 16 wk: 0.44 ± 0.17 vs 0.81 ± 0.30 , $P < 0.05$; 24 wk: 0.47 ± 0.23 vs 0.88 ± 0.22 , $P < 0.01$) at the 8th, 16th and 24th week, respectively. The ratio of UCP2 mRNA to β -actin mRNA was (8 wk: 5.41 ± 1.94 vs 3.56 ± 1.43 , $P < 0.05$; 16 wk: 9.56 ± 2.95 vs 3.68 ± 1.74 , $P < 0.05$; 24 wk: 13.74 ± 3.17 vs 3.79 ± 1.65 , $P < 0.01$) at the 8th, 16th and 24th week, respectively. The contents of ATP were (8 wk: 2.40 ± 0.54 vs 2.96 ± 0.43 , $P > 0.05$; 16 wk: 2.26 ± 0.55 vs 3.00 ± 0.42 , $P < 0.05$; 24 wk: 1.74 ± 0.45 vs 2.79 ± 0.40 , $P < 0.01$). **Conclusion:** Long fat-rich diet may result in excessive fat deposition and formation of nonalcoholic fatty liver, and it may aggravate hepatocellular attack by oxidative stress and Hepatic inflammation.

Key words: fat-rich diet; nonalcoholic fatty liver; stearoyl-CoA desaturase-1; adenosine triphosphate; uncoupling protein 2

Chinese Library Classification: R365 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2008)03-0411-03

前言

硬脂酰 CoA 去饱和酶(stearoyl-CoA desaturase, SCD, E.C. 1.14.99.5)是单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA)生物合成的限速酶,与细胞色素 b5 还原酶、细胞色素 b5 构成复合酶系催化 MUFA 的形成^[1],在脂肪酸代谢中起重要的调节作用。已有的研究提示 SCD-1 在脂质代谢、体重控制和

能量生成中起关键作用^[2]。

非酒精性脂肪肝是由中性脂肪在肝脏中沉积引起,而高脂饮食是非酒精性脂肪肝形成的重要原因之一^[3,4]。对高脂饮食引起的脂肪肝动物模型的研究发现,非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏 SCD-1 表达下调和 ATP 储存下降^[5]。SCD-1 表达下调使得肝细胞内游离的饱和脂肪酸(free saturated fatty acid, SFA)增加,SFA 增加诱发脂凋亡和脂质过氧化,造成肝细胞功能障碍和炎症反应。ATP 储存能力下降,使肝细胞的功能状态和生命力下降,对再次打击的耐受能力降低,加重 SFA 对肝细胞的损伤。线粒体氧化磷酸化合成 ATP 受多种因素调节,其中的解

作者简介:陆元善,(1965-),男,医学硕士,主任技师,

主要从事血脂及其相关疾病研究。

△通讯作者:陆元善,Email: Luyuanshan@126.com。

(收稿日期:2007-10-06 接受日期:2007-11-20)

偶联蛋白(uncoupling protein, UCP)具有使线粒体呼吸链解耦联作用,使刺激线粒体呼吸的质子驱动力降低,ADP磷酸化为ATP减少^[6]。本文通过对高脂饮食引起肝脏脂肪病变动物模型肝细胞的 SCD-1 和 UCP2 进行研究,探讨 SCD-1 影响脂肪肝大鼠肝脏 ATP 储存能力的作用机理,从而为非酒精性脂肪肝的预防和治疗提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠购自中科院上海实验动物中心斯莱克公司,体重 150g 左右(140~160g)。胆固醇纯品购自上海生化试剂商店,猪油自备,Taq DNA 聚合酶、dNTP 及逆转录试剂均为 Promega 产品,荧光素酶-荧光素、标准 ATP 粉剂和荧光素酶缓冲液均购自中科院上海植物生理研究所。FG-100 型发光光度计、MJ 扩增仪、低温离心机和全自动酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 非酒精性脂肪肝模型建立 30 只大鼠正常喂养 1 wk 后,随机分成 2 组,对照组 15 只,实验组 15 只。对照组以普通饲料喂养,实验组以 2%胆固醇、10%猪油和 88%标准大鼠饲料构成的高脂饲料喂养。于实验开始后第 8wk、16wk 和 24wk 分别处死 5 只对照组和 5 只实验组大鼠。大鼠以 0.1g/kg 体重氯胺酮予以麻醉,腹主动脉采血。称取肝湿重后,迅速从肝右叶固定部位切取 1 块肝组织,以 40g/L 的中性福尔马林固定后制备成石蜡切片,剩余肝组织经标记后投入液氮罐中冷冻保存备用。

1.2.2 总 RNA 提取 从液氮中取出肝组织,称取 0.1g,置 Eppendorf 管中,加入 1ml Trizol,研磨至匀浆。在匀浆中加入 0.2ml 氯仿,剧烈震荡 15 秒,室温孵育 5 分钟。4℃,12000r/min 离心 15 分钟,将无色水相移至另一 Eppendorf 管。加入 0.5ml 异丙醇,室温孵育 15 分钟,再 4℃ 12000r/min 离心 10 分钟,弃上清。沉淀加入 75%乙醇 1 ml,洗涤沉淀物。4℃ 7500r/min 离心 5 分钟,弃上清。沉淀用 20μl DEPC 水溶解。取 1μl 溶解好的 RNA 溶液,DEPC 水稀释至 100μL,微量分光光度计检测 RNA 纯度和浓度。

1.2.3 RT 实时定量 PCR 严格按产品说明书操作。取总 RNA 2μg,加入随机引物 2μL,用无 RNA 酶去离子水添至总体积 12

μL,70℃水浴 5 分钟。取出立即置冰中,快速冷却。然后加入 10mmol/L dNTP 0.8μL、10X 缓冲液 2μL、25mmol/L MgCl₂ 3μL、RNA 酶抑制剂 0.7μL 和逆转录酶 0.5μL,37℃、20 分钟,42℃、30 分钟,95℃、3 分钟,4℃、5 分钟,产物置 -80℃保存备用。取 10X 缓冲液 2.5μL、25mmol/L MgCl₂ 3μL、10 mmol/L dNTP 0.8 μL、cDNA 2μL、25 μmol/L 引物各 0.5μL、Taq DNA 聚合酶 1 uL、20X SYBR green I 1.25μL,去离子水加至 25μL。按 95℃、3 分钟变性,然后 95℃、20 sec,56℃、30sec 和 72℃、30sec,40 个循环。β-actin 的引物为:5'-AACCCTAAGGCCAAC CGT GAAAAG-3' 和 5'-TCATGAGTAGTCTGTCAGGT-3'; UCP2 的引物为:5'-AGCATGGTA AGGGC ACAGGGC-3' 和 5'-AGC-ATGGTAAGGGCACAGTG-3'; SCD-1 的引物为:5'-TGCTGA-TGTGCTT CATCCTG-3' 和 5'-GGGAAACCAGGATATTCT-CC-3'。

1.2.4 ATP 测定 按参考文献^[9]叙述的方法进行。先绘制标准曲线,再取冷冻的肝脏组织 0.15~0.35g 加入 1ml 腺苷酸提取液中,电动匀浆后测定 ATP 含量。

1.3 统计学处理

8 wk、16 wk 及 24 wk 的对照组与实验组对应指标用 t 检验,统计软件为 SSPS 9.0。

2 结果

2.1 一般情况及肝脏病理

实验过程中未发生大鼠死亡,2 组大鼠体重均呈进行性增长,8 wk、16 wk 及 24 wk 实验组大鼠的体重、肝脏湿重和腹腔内脂肪均显著高于对照组(表 1)。肝脏大体观察,对照组大鼠肝脏形态、质地、颜色均正常;实验组大鼠的肝脏体积增大,外形饱满圆钝,色泽灰黄,切面油腻,质地较脆。光镜下,肝组织 HE 染色显示实验组大鼠肝脏内有弥漫性肝细胞脂肪变,8 wk 达到脂肪肝诊断标准。16 wk 时,大鼠肝脏内往往数个坏死灶融合成片,汇管区炎症较严重。24 wk 高脂组呈中重度脂肪肝,肝脏炎症程度较重。SCD-1、UCP2 和 β-actin 的扩增产物分别为 201 bp、479 bp 和 241 bp。实验组大鼠的肝脏 SCD-1 mRNA 水平及 ATP 含量均较同期的对照组低(表 1)。

表 1 大鼠肝湿重、腹腔内脂肪、SCD-1/β-actin mRNA 比值、UCP2/β-actin 比值及肝 ATP 含量(mean±SD)

Table 1 The liver wet weight, abdominal fat weight, ratio of SCD-1/β-actin mRNA and UCP2/β-actin, and hepatocytes ATP content in rats(mean±SD)

Group	n	Liver wet weight (g)	Abdominal fat weight (g)	SCD-1/β-actin	UCP2/β-actin	ATP (× 10 ⁻⁸ μmol/L/g)
N8wk	5	11.46 ± 0.82	12.78 ± 0.71	0.83 ± 0.28	3.54 ± 1.43	2.96 ± 0.43
H8wk	5	15.22 ± 2.41 ^a	13.90 ± 0.77 ^a	0.39 ± 0.18 ^a	5.41 ± 1.94	2.40 ± 0.54
H16wk	5	13.50 ± 0.61	14.02 ± 2.10	0.81 ± 0.30	3.68 ± 1.74	3.00 ± 0.42
H16wk	5	16.16 ± 1.47 ^b	19.20 ± 3.56 ^a	0.44 ± 0.17 ^a	9.56 ± 2.95 ^a	2.26 ± 0.55 ^a
N24wk	5	12.66 ± 1.34	14.28 ± 3.46	0.88 ± 0.22	3.79 ± 1.65	2.79 ± 0.40
H24wk	5	17.98 ± 1.95 ^b	19.52 ± 1.02 ^b	0.47 ± 0.23 ^b	13.74 ± 3.17 ^b	1.74 ± 0.45 ^b

Note: N: control group, H: experimental group; aP<0.05, bP<0.01 vs control group.

3 讨论

研究发现 UCP 及其同类物可使线粒体氧化磷酸化解耦联,导致线粒体合成 ATP 效率降低,使机体内的能量以热的形式释放,提示 UCP 与线粒体的能量储备有关。UCP1 与呼吸链

解耦联的关系已经明确。UCP2 与 UCP1 在基因序列上有 57~59%的同源性^[9],推测 UCP2 也具有解耦联功能。将 UCP2 基因通过 pxU1 质粒导入肌细胞内,发现随着 UCP2 表达增加其线粒体膜电位降低^[9]。将 UCP2 整合到脂质体内后,发现 UCP2 具有催化质子返流的活性^[9]。在 ob/ob 小鼠肝细胞的研究

表明,UCP2 的解偶联作用可增加线粒体内膜对质子的通透性,推测 UCP2 可作为质子通道驱除氧化呼吸时形成的质子梯度,从而刺激呼吸,阻止 ATP 合成,促进能量以热能的形式释放^[9]。我们在前期研究中发现,高脂饮食引起的非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞 SCD1 表达导致 ATP 储存降低,ATP 的降低可能与 UCP2 的解偶联功能有关^[5]。

目前共发现 5 种 UCP,其分布各不相同,其中 UCP2 主要见于肝脏。在正常肝脏中,仅枯否细胞有 UCP2 表达,但肥胖性脂肪肝肝细胞内见 UCP2 表达增加。本研究发现非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞 UCP2 表达增加,ATP 的含量较对照组下降,与 Chavin 和 Junnila 实验结果相一致^[9,10]。当机体对能量的需求增加时,ADP 水平升高,通过 F0-F1ATP 合成酶转运的质子增加,使 $\Delta\mu\text{H}^+$ 降低。质子转运的动力来自高水平 $\Delta\mu\text{H}^+$, $\Delta\mu\text{H}^+$ 降低可使 UCP2 的质子通道作用关闭,以维持较高的 $\Delta\mu\text{H}^+$,于是以 $\Delta\mu\text{H}^+$ 储存的能量通过 F0-F1ATP 合成酶将 ADP 磷酸化转化为 ATP,此时 ATP 合成迅速增加而无须增加燃料的代谢和线粒体的呼吸^[9]。我们认为,UCP2 表达增加时,UCP2 与 $\Delta\mu\text{H}^+$ 之间的平衡受到破坏, $\Delta\mu\text{H}^+$ 的降低不能关闭 UCP2 的质子通道作用,使 $\Delta\mu\text{H}^+$ 持续降低,氧化呼吸时形成的质子梯度遭到破坏,阻止 ATP 合成。

有学者报道实验组肝细胞 SCD1 表达下调,使肝细胞内的游离脂肪酸增加(free fat acid, FFA),尤其是 SFA 增加,增加的脂肪酸一方面使脂肪变性的肝细胞中活性氧代谢产物(reactive oxygen species, ROS)增多。ROS 形成增多的同时线粒体氧化呼吸链中细胞色素 C 含量降低并诱导 UCP2 的表达,线粒体内 ATP 储备降低^[11]。另一方面使脂肪变性的细胞发生脂凋亡, SFA 和不饱和脂肪酸尽管可引起相等数量的细胞发生脂肪变性,但通过 JNK 激活所引起的凋亡状况则不一样, SFA 引起的凋亡水平较高,细胞凋亡与线粒体膜的去极化和细胞色素 C 释放有关。JNK- 依赖的脂凋亡与 Bax 的活化有关。Bax 是线粒体功能丧失的媒体,小分子干扰 RNA 去除 Bim,可减少 Bax 的活化和细胞死亡。饱和脂肪酸诱导 JNK- 依赖的肝细胞凋亡,通过活化 Bim 和 Bax,激活线粒体凋亡途径^[12,13]。

FFA 增加可使脂肪酸 β 氧化增加,使 UCP2 mRNA 表达增多^[8]。反过来,UCP2 可调节脂肪酸的氧化,限制活性氧代谢产物 ROS 的形成,降低细胞氧化底物的效率为代价,易使脂肪蓄积导致细胞脂肪变性^[6,14]。肥胖时,脂质氧化可向电子传递链提供过量的电子,在产生超过机体需要能量的同时产生大量的 ROS,导致氧应激。氧应激诱导视网膜色素上皮细胞的凋亡,凋亡是由于线粒体膜电势降低、细胞色素 c 释放及 tBH 作用^[15]。增多的脂肪酸通过诱导 UCP2 的表达来降低 $\Delta\mu\text{H}^+$,限制过量脂质代谢的脂毒性作用。UCP2 可限制蓄积脂质的脂毒性作用已在胰岛 β 细胞中得到证实^[16]。

高脂饮食引起肝 SCD-1 的表达下调,促使脂肪在肝内蓄积形成非酒精性脂肪肝。同时使肝细胞内游离脂肪酸增加,诱导 UCP2 表达升高和脂凋亡,ATP 的合成和储存下降,加重氧化应激对肝细胞的打击和肝脏的炎症反应。

参考文献(References)

[1] Heinemam FS, Ozols J. Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms [J].

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty Acids, 2003,68 (2): 123-133

[2] Miyazaki M, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism [J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty Acids. 2003,68(2):113-121

[3] Lu Yuan-shan, Fan Jian-gao, Fang Ji-wei, et al. Expressions of stearoyl-CoA desaturase-1 on rats fed with fat-rich diet and the effects of rosiglitazone [J]. Chinese Hepatology, 2004, 9 (3):159-162 (In Chinese)

[4] Lu Yuan-shan, Fan Jian-gao, Fang Ji-wei, et al. Roles of leptin and stearoyl-CoA desaturase-1 in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease induced by a fat-rich diet [J]. World Chin J Digestol, 2005, 13 (19):2327-2331 (In Chinese)

[5] Lu Yuan-shan, Fan Jian-gao, Fang Ji-wei, et al. Relationship between hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 expression and adenosine triphosphate content in rats with nonalcoholic fatty liver caused by fat-rich diet [J]. World Chin J Digestol, 2006, 14 (36):3450-3456 (In Chinese)

[6] Boss O, Hagen T, Lowell B. Uncoupling protein 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism [J]. Diabetes, 2000, 49 (2):143-156

[7] Voehringer DW, Hirschberg DL, Xiao J, et al. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitize apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 94 (6):2680-2685

[8] Ricquier C, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP [J]. Biochem J, 2000,345 (2): 161-179

[9] Chavin KD, Yang SQ. Obesity induced expression of uncoupling protein 2 in hepatocytes and promote ATP depletion [J]. J Biol Chem, 1999, 274(9):5692-5700

[10] Junnila M, Rahko T, Sukura A, et al. Reduction of carbon tetrachloride-induced hepatotoxic effect by oral administration of betaine in male Han-Wistar rats: a morphometric histological study [J]. Vet Pathol, 2000,37(3):231-238

[11] Diehl AM, Hoek JK. Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis control "the benefits of losing control" [J]. J Bioenerg Biomembr, 1999,31(5): 493-506

[12] Malhi H, Braonk SF, Werneburg NW, et al. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipopapoptosis [J]. JBC, 2006,281 (17): 12093-12101

[13] Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway [J]. Hepatology, 2004,40(1):185-94

[14] Li LX, Skorpén F, Egeberg K, et al. Uncoupling protein-2 participates in cellular defense against oxidative stress in clonal beta-cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001,282(1):273-277

[15] Hanson JM, Go YM, Jones DP. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling [J]. Annu rev pharmacol toxicol, 2006,46:215-234

[16] Klingenberg M, Echtay KS. Uncoupling protein: the issues from a biochemist point of view [J]. Biochim Biophys Acta, 2001,1504(1): 128-143