

# 视黄醇结合蛋白 4 在非酒精性脂肪肝病大鼠组织中的表达

徐 慧<sup>1,2</sup> 龚环宇<sup>1</sup> 陈丽敏<sup>1</sup> 彭 亦<sup>1</sup> 彭丹红<sup>1</sup>

(1 中南大学湘雅三医院感染科 湖南 长沙 410013; 2 湖南省长沙市卫生学校 湖南 长沙 410100)

**摘要 目的:**视黄醇结合蛋白 4(RBP4)在非酒精性肝脂肪变模型大鼠中的表达情况,以探求其在疾病发生、发展中的意义。**方法:**40 只 wistar 大鼠随机分为对照组和造模组,分析各组在 2、4、6、8 周 4 个时间点血清 ALT、AST、TG、TC 的变化及肝组织 RBP4 的表达情况。**结果:**随着造模时间延长,造模组大鼠肝脏脂肪变越来越明显,血清 ALT、AST、TG、TC 逐渐升高( $p < 0.05$ )。造模组肝组织 RBP4 的 mRNA 的表达随造模时间逐渐增强;造模组免疫组化结果发现,RBP4 的表达随造模时间逐渐增强( $p < 0.05$ )。**结论:**在大鼠非酒精性脂肪肝病模型中,RBP4 的表达随造模时间延长而增加,与同期对照组相比有统计学差异,因此 RBP4 可能作为一个敏感的指标反映非酒精性脂肪肝的发生及发展情况。

**关键词:**视黄醇结合蛋白 4;非酒精性脂肪肝;肝硬化

**中图分类号:**Q95-3,R574 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-642-04

## Expression of Retinol Binding Protein 4 in Non-alcoholic Fatty Liver Tissue of Rats

XU Hui<sup>1,2</sup>, GONG Huan-yu<sup>1</sup>, CHEN Li-min<sup>1</sup>, PENG Yi<sup>1</sup>, PENG Dan-hong<sup>1</sup>

(1 The third Xiangya Hospital; Central South University; Changsha; 410008; China; 2 Changsha Health School, Changsha, 410100)

**ABSTRACT Objective:** To research the influence of Retinol-Binding Protein 4 (RBP4) on the pathogenesis and the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by studying expression of RBP4 in NAFLD model in rats. **Method:** A total of 40 Wistar rats were randomly divided into two groups: the control group and the NAFLD model group. The levels of ALT,AST,TG,TC in serum together with the RBP4 expression in hepatic tissue were recorded and analyzed on two, four, six and eight weeks postoperation, respectively. **Results:** The model group rat liver fatty change is more and more obvious as time going. The levels of ALT, AST, TG, TC in model group rose gradually( $p < 0.05$ ). The mRNA expression of RBP4 in model group is significantly stronger than that in the control group( $p < 0.05$ ). The immunohistochemical expression of RBP4 in model group is significantly stronger than that in the control group( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** RBP4 expresses on hepatic cells in early stage of adipose degeneration in NAFLD rat model and increases with time. Thus, RBP4 may be used as a sensitive indicator for the pathogenesis and the development of NAFLD, which can assist in the early diagnosis of the disease.

**Key word:** Retinol-Binding Protein 4, Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Cirrhosis

**Chinese Library Classification:** Q95-3, R574 **Document Code:** A

**Article ID:**1673-6273(2011)04-642-04

NAFLD 是指除外酒精和其他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,包括单纯性脂肪肝及由其演变的脂肪性肝炎 (NASH) 和 NASH 相关性肝硬化 3 种类型。NAFLD 是 21 世纪全球重要的公共健康问题之一,亦是我国愈来愈重视的慢性肝病问题<sup>[1]</sup>。NAFLD 的发病可能与肥胖、胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)密切相关,同时国内外研究发现众多肥胖相关因子都在脂肪和能量代谢平衡方面起重要作用<sup>[2]</sup>。Yang 等于 2005 年利用基因芯片鉴定出一种新的脂肪因子视黄醇结合蛋白 4 (retinol-binding protein 4, RBP4), 且证实 RBP4 是视黄醇类结合蛋白家族中的一员,主要由肝细胞合成,其次为脂肪组织合成,研究发现血清中 RBP4 浓度升高与肥胖和胰岛素抵抗有关<sup>[3]</sup>,随后有人发现血清 RBP4 水平与 NAFLD 及肝脏转氨酶呈正相关<sup>[4]</sup>。然而 RBP4 在

大鼠非酒精性肝脂肪变组织表达情况及其临床意义尚不清楚。本研究利用 RT-PCR 及免疫组织化学方法研究 CCl<sub>4</sub> 及高脂饮食造模大鼠脂肪肝各时段 RBP4 在血清及肝组织中表达情况及其意义。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要试剂

迈新公司免疫组化试剂盒;RBP4 兔抗 (ab64194 1:200); Trizol 碧云天; 反转录试剂盒为 Fermentas 公司产品; TaKaRa Taq; CCl<sub>4</sub>, 购自武汉长江化工厂; 猪油为市售。

#### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型及分组** 雄性 6 周龄 Wistar 系大鼠 40 只, 体重 180-200g, 购自中南大学湘雅医学院动物实验中心, 随机分为对照组和实验组。对照组: 20 只, 按照常规方法饲养普通饲料; 造模组: 20 只, 用高脂饲料喂养(内含 20% 猪油、0.5% 胆固醇、0.2% 牛胆盐、79.3% 基础饲料), 首次以 40% CCl<sub>4</sub> 植物油溶液 0.4ml/100g 做背部后侧皮下注射, 其后 3 周内 40% CCl<sub>4</sub> 植物

作者简介:徐慧,讲师,硕士研究生,Tel:13574839146

E-mail: xhh1003@163.com, 19902221@qq.com

△通讯作者:龚环宇,主任医师,湘雅附三医院感染科主任

(收稿日期:2010-12-08 接受日期:2010-12-31)

油溶液 0.2ml/100g, 每周 2 次, 3 周后 40%CCl<sub>4</sub> 植物油溶液 0.1ml/100g 做背部后侧皮下注射每周 2 次。按照实验设计时间点, 于造模后第 2、4、6、8 周随机抽取 5 只对照组及 5 只造模组大鼠, 测量体重后, 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 经心脏穿刺取血后处死实验大鼠, 每只大鼠在同一肝叶切取小块组织置入 10% 甲醛缓冲液中固定, 从另一肝叶切取一块肝组织放入液氮保存。

**1.2.2 组织病理观察** 10% 甲醛缓冲液中固定的肝脏组织修整、脱水后, 再经石蜡包埋、切片 (切片厚度为 3 微米)、烘干 (60-65℃ 烤片 4h)。常规 HE 染色, 观察脂肪肝程度。病理诊断标准参照非酒精性脂肪肝病诊疗指南(2006 年 2 月中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组制定)的标准<sup>[5]</sup>。

**1.2.3 生化指标测定** 采用全自动生物化学分析仪测定血浆 ALT、AST、TG 及 TC。

**1.2.4 半定量 RT-PCR** 使用 Trizol 从各肝组织中提取总 RNA, RT-PCR 参照 sun 等<sup>[6]</sup>方法进行。引物序列分别如下: RBP4-F 为 5'-TTCTGCTGGGCAG ACTCCGGT-3', RBP4-R 为 5'-TCGTC-CCTTGCTGTAGCGC-3', 扩增片段长度 260bp; 内参 G3PDH 引物序列: F 为 5-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3, R 为 5-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3, 扩增片段长度 450bp。PCR 扩增: 将反转录合成的 cDNA 加入 Master Mix(2x) 12.5ul、引物 1ul、加水至总体积 25ul, 94℃ 预变性 3min, 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 45s, 进行 35 个循环, 最后 72℃ 再 5 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 取扩增产物 8ul 加入上样缓冲液 2ul 混匀后点样, 电压 100V, 电泳完毕后在溴化乙锭中染色, 紫外成像系统下观察并记录结果。分别以 RBP4/G3PDH 吸光度比值表示 RBP4 mRNA 相对表达量。

**1.2.5 免疫组织化学染色** 实验参照 Tang 等<sup>[7]</sup>采用常规免疫组织化学方法(辣根过氧化物酶连接法)。按 ab64194 二步法免疫组织化学检测试剂盒说明书进行, 一抗浓度 1:200。以正常肝组织作阳性对照, 用 PBS 液替代一抗做阴性空白对照, DAB 显色, 苏木精复染, 中性树胶封片。结果判定按染色强度计分: 0、1、2 及 3 分分别为无色、浅黄色、棕黄色及棕褐色; 在高倍镜(x400)下取 5 个不同视野, 各计数 200 个细胞, 按阳性细胞所占的百分比计分: 阴性为 0 分, 阳性细胞 ≤ 10% 为 1 分, 11%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分。染色强度与阳性细胞百分比的积分乘积为 0 为(-), 1~2 判断为(±), 3~4 判

断为(+), 6~9 判断为(++)

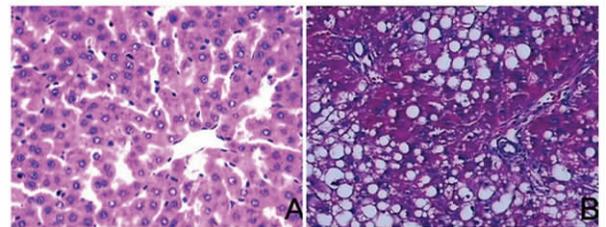
### 1.3 统计学分析

统计分析均采用 SPSS 13.0 统计软件, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据分析采用配对 T 检验或多样本均数比较采用方差分析和 LSD 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。等级资料采用 Kruskal-wallis 秩和检验。

## 2 结果

### 2.1 肝脏病理学改变

对照组大鼠肝脏呈暗红色、质软、包膜光滑, 无皱襞, 切面湿润有光泽且无油腻感, 各时间点无明显区别。2 周造模组大鼠肝脏增大, 包膜稍紧张, 边缘圆钝, 呈奶黄色, 有油腻感; 随着造模时间延长, 肝脏体积增大, 肝脏油腻感明显。HE 染色切片光镜下观察: 各时间点对照组大鼠肝脏基本无异常情况; 造模组 2 周可见肝小叶结构完整, 肝细胞索清晰, 仅少数肝细胞出现小泡样脂滴; 4 周时肝小叶结构稍显紊乱, 肝细胞索欠清晰, 部分肝细胞质疏松, 有较多的脂滴存在; 随着造模时间延长, 变性肝细胞增多, 胞质内充满脂质空泡; 第 8 周时见肝小叶结构明显紊乱, 肝细胞索模糊乃至消失, 肝细胞明显浊肿, 大多数肝细胞质充满脂滴, 脂肪变肝细胞 > 75%, 为重度脂肪变(图 1)。



A: 对照组 2 周(x200); B: 造模组 8 周(x400)

图 1 NAFLD 组 8 周大鼠肝脏病理 HE 染色

Fig.1 HE staining in liver pathology of NAFLD group after treat 8 weeks

### 2.2 大鼠肝功能指标变化

肝功能指标在对照组变化细微, 无统计学意义(P>0.05); 与对照组比较, 随着造模时间延长, 造模组大鼠 ALT、AST、TG 及 TC 逐渐升高且显著高于同期对照组水平(P<0.05); 造模组大鼠第 8 周是 ALT、AST、TG 及 TC 显著高于第 2、4 及 6 周(表 1; P<0.01)。

表 1 各组大鼠在 2、4、6、8 周血清中 ALT、AST、TG、TC 水平的变化  
Table 1 Change of ALT, AST, TG, TC levels in rats serum after treat 2,4,6,8 weeks

指标 Target	组别 Groups	2 weeks	4 weeks	6 weeks	8 weeks
ALT(U/L)	control group	35.40± 6.878	31.60± 5.595	30.20± 7.396	32.40± 4.827
	Model group	88.20± 9.121 ***	116.6± 11.48 ***	205.6± 17.95 ***	281.0± 16.87 ***
AST(U/L)	control group	120.6± 7.266	120.2± 12.50	124.2± 12.36	120.6± 10.71
	Model group	173.8± 11.78 **	244.2± 18.86 ***	351.8± 22.34 ***	453.8± 29.90 ***
TG(mmol/L)	control group	0.586± 0.088	0.582± 0.082	0.572± 0.109	0.544± 0.101
	Model group	0.806± 0.093 *	1.00± 0.076 **	1.698± 0.142 ***	2.098± 0.084 ***
TC(mmol/L)	control group	1.956± 0.120	1.952± 0.111	1.988± 0.120	1.938± 0.142
	Model group	3.830± 0.157 ***	5.18± 0.163 ***	7.694± 0.286 ***	9.108± 0.492 ***

Note: Compared with the control group: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

### 2.3 RT-PCR 检测 RBP4 mRNA 在大鼠肝脏表达

RT-PCR 检测发现 RBP4 mRNA 在造模组表达明显高于其对应时间点正常大鼠,正常大鼠肝组织 RBP4 mRNA 为较弱表达,造模第 2 周出现较对照组稍增强的表达,随着脂肪肝程度的加重逐渐增加,与正常组相比有显著性差异(图 2,P<0.05)。

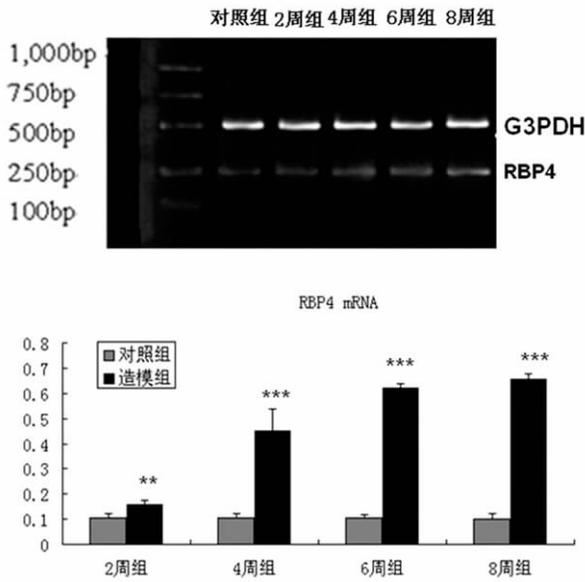
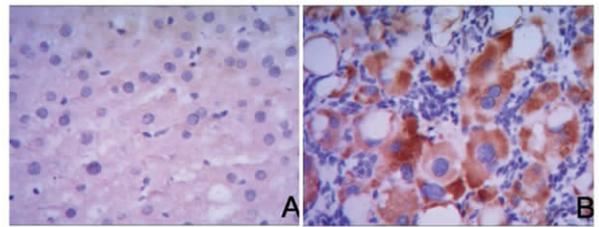


图 2 各组大鼠肝脏 RBP4 mRNA 的水平 (与对照组比较, \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001)

Fig. 2 Change of the RBP4 mRNA level in each group rat liver

### 2.4 RBP4 免疫组化结果

RBP4 表达于细胞质中,可见肝细胞质中散在分布浅黄色颗粒。NAFLD 组 2 周 RBP4 表达与对照组相轻度增强;4 周时 RBP4 表达开始明显增强,细胞质中棕黄色颗粒增多;随着肝细胞脂肪变程度加重,在 8 周时 RBP4 表达最强,细胞质中可见大量棕褐色颗粒沉积(图 4)。



A:对照组 2 周;B:造模组 8 周

图 3 大鼠肝脏 RBP4 免疫组化染色(二步法× 400)

Fig.3 Immunohistochemistry staining of NAFLD group in rat liver

与 RT-PCR 结果相一致,免疫组化染色发现,RBP4 在对照组大鼠只有一例为弱阳性表达,其余四例为阴性表达;造模半月后出现轻微脂肪变性,有三例弱阳性表达,另外两例为阴性表达;一月后则出现较为明显变性,为 2 例阳性表达,2 例弱阳性,剩余 1 例为阴性表达;一月半后大鼠肝脏均出现较为严重的脂肪变性,其中 1 例出现强阳性表达,3 例阳性,1 例弱阳性;2 月后 5 例大鼠均为严重脂肪变性,3 例强阳性,2 例阳性,差异具有统计学意义(表 2,P<0.05)。

表 2 免疫组化染色 RBP4 在各组中部高表达情况

Table 2 Immunohistochemical staining RBP4 is highly expressed in all groups

组别 Groups	-	±	+	++
control group	4	1	0	0
Model group after 2 weeks	2	3	0	0
Model group after 4 weeks	1	2	2	0
Model group after 6 weeks	0	1	3	1
Model group after 8 weeks	0	0	2	3

Note: Compared with the control group:\* p<0.05

## 3 讨论

近年来,随着人们生活质量的提高,非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)的发病率持续上升。已成为西方发达国家慢性肝病的首要病因并呈现全球化发病趋势,世界平均患病率约 20%<sup>[8]</sup>。在我国亦已成为仅次于慢性病毒性肝炎的第二大肝病<sup>[9,10]</sup>。根据目前最新的 NAFLD 诊疗指南中提出的 NAFLD 的诊断标准<sup>[11]</sup>,我们不难发现 NAFLD 诊断指标有一定的滞后性:如需要肝脏影像学改变、病理学改变或肝酶异常达半年以上。当患者出现肝脏影像学或病理学改变时,患者肝脏组织已经受到部分不可逆的破坏。因此,研发更加敏感的指标,早期诊断 NAFLD,具有极大的临床价值。

NAFLD 确切的发病机制尚不清楚,目前公认的是 1998 年 Day 和 James 提出的 "二次打击" 学说,即胰岛素抵抗( IR) 和氧化应激、脂质过氧化<sup>[12]</sup>。已有大量研究证实 IR 与 NAFLD 的发病密切相关。视黄醇结合蛋白(RBP) 4 是新近发现的一种脂肪因子,参与肥胖和 IR 的发生机制<sup>[13]</sup>。RBP4 与 NAFLD 相关的机制可能在于,RBP4 可能影响 NAFLD 患者视黄酸敏感转录因子如视黄酸受体和视黄酸 X 受体的转录活性,视黄酸 X 受体可与过氧化物酶体增生物激活受体( PPAR) 作为特异性异二聚体与 DNA 结合,而 PPAR 可调节脂肪酸代谢相关基因的转录活性<sup>[14]</sup>。另外一种可能机制为,RBP4 诱导的视黄酸代谢变化可能改变视黄醇组织水平。正常情况下,肝细胞内不发生脂质沉积,但当发生脂肪肝时,甘油三酯(TG)在肝细胞内沉积,Seo 等<sup>[14]</sup>研

究说明 RBP 的生物学作用是由视黄酸受体(RAR)和视黄醇 X 受体(RXR)介导的,而 RXR 是过氧化物酶增殖物激活受体家族的伴侣,它的调节包括脂肪酸代谢在内的基因转录,也提示 RBP 在肝脏脂肪沉积中的重要作用。RBP4 是视黄醇类结合蛋白家族中的一员,其相对分子质量为 21000,主要由肝细胞合成,其次为脂肪组织合成。由于 RBP4 具有以上生物学作用,同时具有分子量小和半衰期短的特点,因此,RBP4 可以较为敏感的反映肝功能损害程度,是反映肝脏疾病发展、转归的敏感指标。可用于评估 NAFLD 的发生、发展过程。

本实验通过小剂量 CCL4 及高脂饮食成功造模脂肪肝大鼠,并通过 RT-PCR 及免疫组织化学方法研究 RBP4 在 NAFLD 发生、发展中的变化。研究结果显示:随着造模时间的延长,造模组大鼠血清各项肝功能指标(ALT、AST、TG、及 TC)逐渐升高且显著高于同期对照组水平。而 RBP4 mRNA 及蛋白在正常大鼠肝脏呈阴性或弱阳性表达,而在脂肪变的大鼠肝脏呈阳性表达,且其表达强度与进展过程呈正相关性,提示其在大鼠肝脂肪变过程产生重要的作用,因此 RBP4 有望成为一个反映 NAFLD 疾病进程的敏感指标。RBP4 与胰岛素抵抗、脂质代谢异常有关<sup>[15]</sup>,而胰岛素抵抗、脂质代谢异常在 NAFLD 的发生、发展中起到重要作用<sup>[16]</sup>。因此 RBP4 也可以作为治疗 NAFLD 的一个新的目标因子。

总之,我们的研究发现 RBP4 在肝脏脂肪变性中呈高表达趋势,在其发生、发展中起着重要的作用,但是具体作用机制仍不清楚。接下来我们将致力于 RBP4 在 NAFLD 发生、发展中的作用机制研究,为诊断及治疗 NAFLD 打下坚实的基础。

#### 参考文献(References)

[1] Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol*, 2009;50: 204-210

[2] Ikegami H, Ogihara T. [Genetic susceptibility to diabetes and hypertension]. *Nippon Rinsho*, 2003 Jul;61(7):1105-12

[3] Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes [J]. *Nature* 2005;436: 56-62

[4] Seo JA, Kim NH, Park SY, Kim HY, Ryu OH, Lee KW, Lee J, Kim DL, Choi KM, Baik SH, Choi DS, Kim SG. Serum retinol-binding

protein 4 levels are elevated in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008;68: 555-600

[5] Hepatology of Chinese Medical Association and the credits will be alcoholic fatty liver disease Liver Disease Study Group. Non-alcoholic fatty liver disease diagnosis and treatment guidelines [J]. *Journal of Chinese Hepatology*, 2006, 14 (3): 161-163

[6] Sun S, Ning X, Liu J, Liu L, Chen Y, Han S, Zhang Y, Liang J, Wu K, Fan D. Overexpressed CacyBP/SIP leads to the suppression of growth in renal cell carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007; 356: 864-871

[7] Tang S, Yang G, Meng Y, Du R, Li X, Fan R, Zhao L, Bi Q, Jin J, Gao L, Zhang L, Li H, Fan M, Wang Y, Wu K, Liu J, Fan D. Overexpression of a novel gene gankyrin correlates with the malignant phenotype of colorectal cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010;9: 88-95

[8] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 2002;346: 1221-1231

[9] Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology*, 2006;44: 521-526

[10] Fan J G, Zhu J, Li XJ, et al. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China. *J Hepatol*, 2005;43: 508-514

[11] Zeng MD, Fan JG, Lu LG, Li YM, Chen CW, Wang BY, Mao YM. Guidelines for the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver diseases [J]. *J Dig Dis*, 2008;9: 108-112

[12] Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two hits. *Gastroenterology*, 1998;114: 842-849

[13] Graham TE, Yang Q, Blüher M, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*, 2006;354: 2552-2563

[14] Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 2004, 53 (Suppl 1): S43-S50

[15] Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Biol Chem*, 2004;279: 32345-32353

[16] von Eynatten M, Humpert PM. Retinol-binding protein-4 in experimental and clinical metabolic disease [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2008, 8: 289-299