

FGF21 在小鼠非酒精性脂肪肝病程中的变化及与 SREBP 的相关性

郭云蔚, 巫织娥, 林显艺, 尉秀清
(中山大学附属第三医院消化内科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨成纤维细胞生长因子(FGF21)在小鼠非酒精性脂肪肝病程中肝组织和血清中的变化及其与胆固醇调节元件结合蛋白(SREBP)的相关性,探讨其中的可能机制。【方法】分别给予 C57BL/6 小鼠素食和高脂饮食喂养 1、9、18 周,Western blot 和实时荧光定量 RT-PCR 检测肝脏组织 FGF21 和 SREBP 的表达,并分析二者的相关性;ELISA 法检测小鼠血清的 FGF21 水平,分析血清 FGF21 水平与肝组织 FGF21 的蛋白和 mRNA 水平的相关性。【结果】高脂饮食喂养至 9 周时,小鼠肝脏的大体外观呈典型脂肪肝表现,至 18 周时 HE 染色可见肝细胞内大量的脂质颗粒聚集。与素食喂养小鼠相比,小鼠肝组织 FGF21 mRNA 水平在高脂饮食喂养至 9 周和 18 周时明显升高(均 $P < 0.05$),与高脂饮食的时间呈正相关($r = 0.952, P = 0.000$)并同时与 SREBP mRNA 水平正相关($r = 0.725, P = 0.000$)。而与素食喂养小鼠相比,小鼠肝组织 FGF21 蛋白在高脂饮食喂养至 9 周和 18 周时明显降低($P < 0.05$),SREBP 蛋白表达则呈相反的趋势。血清的 FGF21 水平,与素食喂养相比,在高脂饮食喂养至 9 周和 18 周时明显升高(均 $P < 0.05$),与高脂饮食的时间呈正相关($r = 0.944, P = 0.000$),与肝组织的 FGF21 蛋白水平负相关($r = -0.704, P = 0.000$),与 FGF21 mRNA 水平正相关($r = 0.910, P = 0.000$)。【结论】在小鼠脂肪肝的逐渐进展中,肝组织 FGF21 mRNA 水平升高,蛋白水平降低,血清水平升高,并伴随 SREBP 的表达升高,提示肝脏中 FGF21 转录合成增加同时分泌亦明显增加,并与肝脏脂质合成及沉积密切相关。

关键词:非酒精性脂肪性肝病;FGF21;SREBP

中图分类号:R54 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2016)01-0029-05

FGF21 Expression During the Course of Mice NAFLD and Its Correlation with SREBP

GUO Yun-wei, WU Zhi-e, LIN Xian-yi, WEI Xiu-qing

(Department of Gastroenterology, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: WEI Xiu-qing, E-mail: wei-xiuqing@163.com

Abstract:【Objective】To investigate the fibroblast growth factor 21 (FGF21) expression in liver tissue and serum from different stage of mice nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its correlation with SREBP.【Method】C57BL/6 mice were fed with chow diet and high fat diet (HFD) for 1, 9, and 18 weeks. Expressions of FGF21 and SREBP in liver tissue of mice were detected by western blot and real time RT-PCR. Serum FGF21 was examined using ELISA. The correlation of FGF21 and SREBP was statistically analyzed.【Result】The liver of mice exhibited typical appearance of fatty liver after 9 weeks of HFD. A large amount of fat granules accumulation was found in hepatocytes from mice fed with HFD for 18 weeks. Compared with mice fed with chow diet, FGF21 mRNA level in liver tissue from mice fed with HFD began dramatically higher on 9th and 18th week of HFD (both $P < 0.05$), with positive correlation to the duration of HFD ($r = 0.952, P = 0.000$) and the SREBP mRNA level ($r = 0.725, P = 0.000$). On the other hand, FGF21 protein expression in liver tissue from mice fed with HFD statistically decreased on 9th and 18th week of HFD compared with mice of chow diet (both $P < 0.05$). Opposite changes were found in the expression of SREBP protein. Furthermore, compared with mice of chow diet, serum FGF21 of HFD mice was obviously higher on 9th and 18th week of HFD (both $P < 0.05$), with positive correlation to the duration of HFD ($r = 0.944, P = 0.000$) and the FGF21 mRNA level of liver tissue ($r = 0.910, P = 0.000$), and

收稿日期:2015-05-11

基金项目:国家自然科学基金(81470848)

作者简介:郭云蔚,博士,副教授,研究方向:肝脏病,E-mail: guoyw1973@hotmail.com;尉秀清,通信作者,E-mail: wei-xiuqing@163.com

negative correlation to the protein expression of FGF21 in liver tissue ($r = -0.704, P = 0.000$). 【Conclusion】 In the course of mice NAFLD, FGF21 mRNA level of liver tissue increased, protein expression decreased, and serum level became higher, accompanying by the elevation of SREBP in liver. That suggests a high secretion of FGF21 would appear with a high level of transcription and synthesis of FGF21 in liver under HFD, which is closely correlated with hepatic steatosis.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease (NALFD); FGF21; SREBP

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(1):29-33;39]

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 属于代谢紊乱相关性疾病, 近年来由于饮食结构和生活习惯的变化, 在我国呈逐年上升趋势, 而它的发病机制较为复杂, 目前尚未完全明确^[1]。近来发现成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor 21, FGF21) 在肥胖和糖尿病为中心的代谢紊乱性疾病状态中有重要作用, 有可能成为一个新的治疗靶点, 但是它在代谢性疾病特别是脂肪肝疾病过程中的变化和具体的机制尚未完全明确, 并存在矛盾之处^[2-5]。本研究旨在模拟非酒精性脂肪肝的自然病程, 研究在此病程中 FGF21 从肝脏到血清的动态变化及其与脂质代谢的关键因子胆固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) 的相关性, 为今后进一步的分子信号通路研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

C57BL/6 小鼠购自广东省医学实验动物中心。用于 Western Blot 的抗体有一抗 FGF21 (abc64857; Abcam), SREBP (sc-8984; Santa Cruz), 二抗 β -actin (sc-47778; Santa Cruz)。用于 qRT-PCR 的 TaqMan 引物、探针和扩增反转录试剂盒购自 Applied Biosystems (Foster City, CA), 引物包括 FGF21 (Mm0084016_g1), SREBP (Mm00550338_m1), Mouse ribosome 18S rRNA_s1 (AIQJA2B)。此外还有含 FGF21 抗体的 ELISA 试剂盒 (University of Hong Kong)。

1.2 动物饲养、分组和标本收集

48 只 8 周龄大的 C57BL/6 小鼠分为素食组和高脂饮食组各 24 只, 分别给予素食 (chow diet, 脂肪含量占总热量 13%) 和高脂饮食 (high fat diet, HFD, 脂肪含量占总热量 58%) 喂养, 在 1 周、9 周、18 周末时各处死 8 只素食小鼠和 8 只高脂饮食小鼠 (未禁食), 称重同时收集外周血, 离心后取血清, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存用于 ELISA 检测。收集肝

脏标本, 部分标本 40 g/L 多聚甲醛溶液固定后用于 HE 染色, 部分标本液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存用于 western blot 检测和实时荧光定量 RT-PCR 检测。实验过程中对动物的饲养和处置符合医学伦理学的标准。

1.3 小鼠肝组织的 FGF21 和 SREBP mRNA 水平检测

采用 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 进行检测。Trizol 法提取小鼠肝组织总 RNA, 并测定 RNA 浓度和纯度, 根据 TaqMan 一步法实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒说明书配制 360 孔板反应混合液。反应体积为 $10\text{ }\mu\text{L}$, 包括 $5\text{ ng}/\mu\text{L}$ 的样本 $3\text{ }\mu\text{L}$, 含 Taq 酶、引物、逆转录酶、dATP、dCTP、dGTP、dUTP 等的混合液 $7\text{ }\mu\text{L}$, 放入 Applied Biosystems Real-Time PCR system, 设置逆转录 $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min, 扩增条件 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 1 min, 40 循环。反应结束后根据电脑给出的 Ct 值算出 FGF21 和 SREBP 的 mRNA 值和相对水平。

1.4 小鼠肝组织的 FGF21 和 SREBP 蛋白表达检测

采用 Western blot 法进行检测。捣碎肝脏, 用 PBS 洗涤 2 次去除肝脏内血液成分, 然后根据蛋白提取和 BCA 蛋白含量检测试剂盒说明提取肝组织蛋白并定量, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 半干法转膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入相应的一抗于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 磷酸盐吐温缓冲液洗 3 次, 每次约 10 min。用 HRP 标记的 1:5 000 二抗室温孵育 2 h, 磷酸盐吐温缓冲液洗 3 次, 每次 10 min。增强化学发光法检测目的蛋白 FGF21 和 SREBP 等的表达, 并根据灰度值算出蛋白表达的相对量。

1.5 小鼠血清 FGF21 水平检测

采用 ELISA 法检测小鼠血清 FGF21 水平, 根据试剂盒推荐的步骤进行, 内含的抗体经证实具有高度的 FGF21 特异性, 不和其他 FGF 家族成员有交叉反应。批内差异和批间差异为 5.1% 和 7.8%。

1.6 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析。计量资料正态性用 Shapiro-Wilk 检验, 以表示, 采用两独立样本 *t* 检验等统计分析方法, 相关分析分别采用 Spearman 和 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

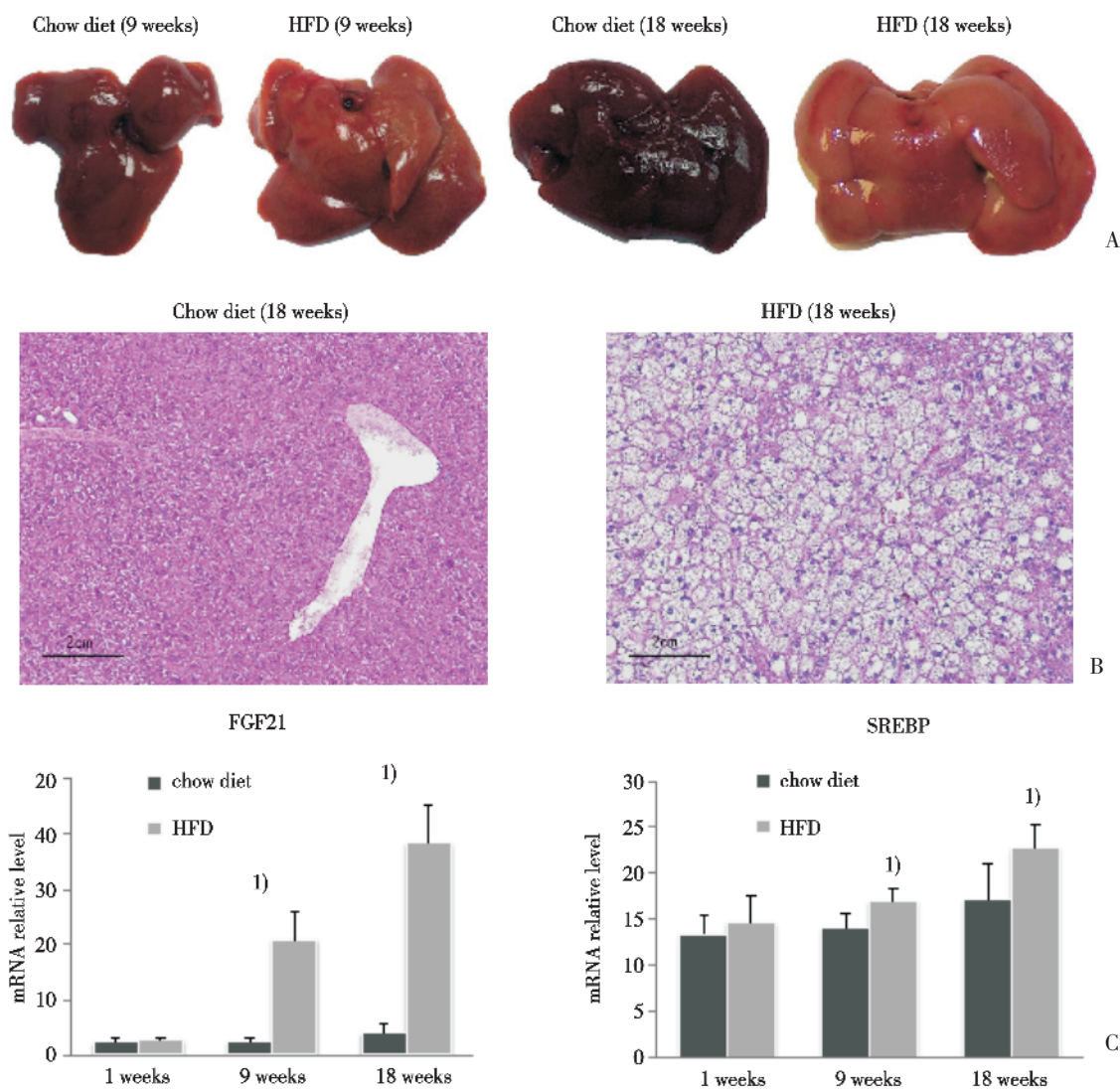
2 结 果

2.1 小鼠的非酒精性脂肪肝形成情况

高脂饮食喂养的小鼠在 1、9、18 周处死时的

体质量 (g) 分别为 $22.6 \pm 1.2, 34.7 \pm 3.6, 45.4 \pm 5.7$, 而素食喂养的小鼠分别为 $20.3 \pm 1.3, 27.1 \pm 3.0, 33.0 \pm 1.1$, 二组在 9、18 周时差异有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。与素食喂养的小鼠相比, 在高脂饮食 1 周末时, 小鼠肝脏脂肪变性不明显, 至高脂饮食 9 周时, 已出现典型的脂肪肝外形和明显肝细胞脂肪变性, 至高脂饮食 18 周时, 肝脏呈较为严重的黄色脂肪肝外形, HE 染色可见肝细胞有大量的脂质颗粒沉积 (图 1 A, B)。

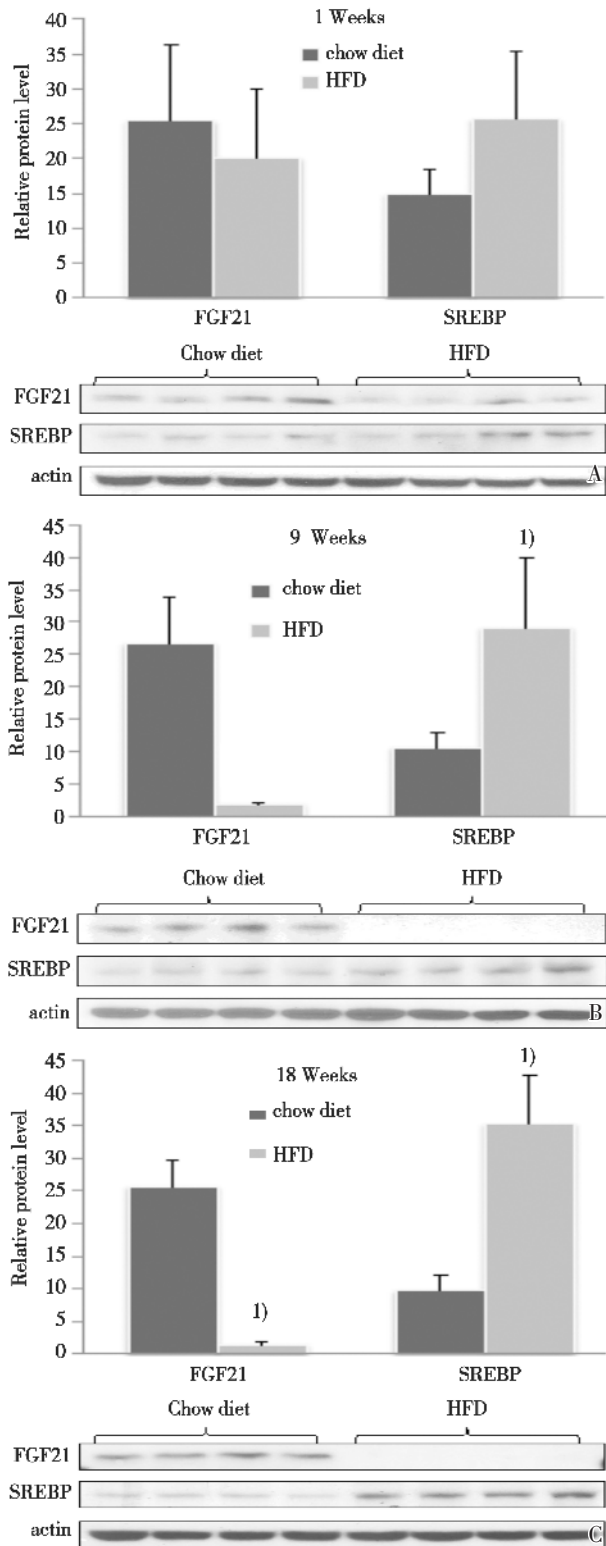
2.2 小鼠肝组织的 FGF21 和 SREBP mRNA 水平与素食喂养小鼠相比, 小鼠肝组织 FGF21



A: Livers from mice fed with chow diet for 9 weeks and HFD for 9 weeks and 18 weeks. B: HE stain of liver tissue from mice fed with chow diet and HFD for 18 weeks ($\times 100$). C-D: FGF21 and SREBP mRNA level of liver tissue from mice fed with chow diet and HFD for 1, 9, 18 weeks respectively. HFD: high fat diet. Values are mean \pm SE, $n = 8$, *t* test, ¹⁾ $P < 0.05$ vs chow diet group.

图 1 小鼠肝组织病理特点及 FGF21 和 SREBP mRNA 水平

Fig.1 Pathological features and FGF21 and SREBP mRNA levels of mice liver



A-C: Protein expression of FGF21 and SREBP in liver tissue from mice fed with chow diet and HFD for 1, 9, 18 weeks respectively. HFD: high fat diet. Values are mean \pm SE, $n = 8$, t test, 1) $P < 0.05$ vs chow diet group.

图 2 小鼠肝组织的 FGF21 和 SREBP 蛋白表达

Fig.2 Protein expression of FGF21 and SREBP in liver tissue of mice

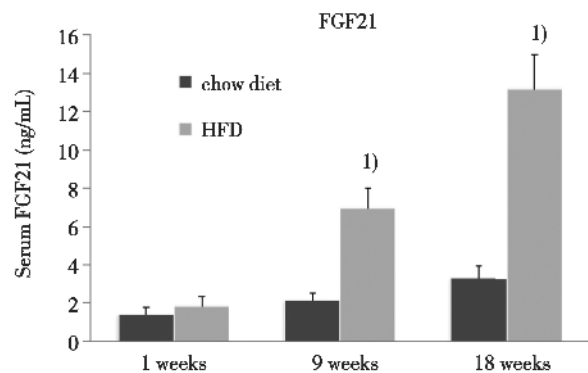
mRNA水平在高脂饮食喂养 1 周时升高不明显 ($P > 0.05$), 至 9 周和 18 周时明显升高 (P 皆 < 0.001)。高脂饮食时小鼠肝组织 FGF21 mRNA 水平与高脂饮食的时间呈正相关 ($r = 0.952, P < 0.001$)。与素食喂养小鼠相比, 小鼠肝组织 SREBP mRNA 水平亦在高脂饮食喂养 1 周时升高不明显 ($P > 0.05$), 至 9 周和 18 周时明显升高 ($P = 0.001, 0.003$)。高脂饮食时小鼠肝组织 FGF21 mRNA 水平与 SREBP mRNA 水平正相关 ($r = 0.725, P < 0.001$; 图 1C, D)。

2.3 小鼠肝组织的 FGF21 和 SREBP 蛋白表达

与素食喂养小鼠相比, 小鼠肝组织 FGF21 蛋白水平在高脂饮食喂养 1 周时降低不明显 ($P > 0.05$), 至 9 周和 18 周时明显降低至几乎消失 (P 皆 < 0.001)。与素食喂养小鼠相比, 小鼠肝组织 SREBP 的蛋白表达在高脂饮食喂养 1 周时升高不明显 ($P > 0.05$), 至 9 周和 18 周时明显升高 ($P = 0.001, 0.003$; 图 2A, B, C)。

2.4 小鼠血清 FGF21 水平

与素食喂养小鼠相比, 小鼠血清 FGF21 水平在高脂饮食喂养 1 周时升高不明显 ($P > 0.05$), 至 9 周和 18 周时明显升高 (P 皆 < 0.001 , 图 3)。高脂饮食时小鼠血清 FGF21 水平与高脂饮食的时间呈正相关 ($r = 0.944, P < 0.001$), 与肝组织的 FGF21 蛋白水平负相关 ($r = -0.704, P < 0.001$), FGF21



	1 weeks	9 weeks	18 weeks
chow diet	1.39 \pm 0.39	2.14 \pm 0.38	3.31 \pm 0.63
HFD	1.84 \pm 0.52	6.98 \pm 0.52	13.22 \pm 1.77
P value	0.451	0.000	0.000

Serum FGF21 level of mice fed with chow diet and HFD for 1, 9, 18 weeks respectively. HFD: high fat diet. Values are mean \pm SE, $n = 8$, t test, 1) $P < 0.05$ vs chow diet group.

图 3 小鼠血清的 FGF21 水平

Fig.3 Serum FGF21 level of mice

mRNA水平正相关($r = 0.910, P < 0.001$)

3 讨 论

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的发病与糖和脂肪代谢紊乱以及胰岛素抵抗密切相关,Day 等^[6]认为非酒精性脂肪肝的形成和肝脏损伤与“二次打击”有关等,但具体的机制尚未明确。

成纤维细胞生长因子(FGF21)于 2000 年首次在小鼠胚胎中发现,其主要由肝脏生成并分泌,在骨骼肌、脂肪细胞、胰腺 β 细胞亦有表达。近年的研究表明,它在肥胖和糖尿病为中心的代谢紊乱性疾病状态中有重要作用,有可能成为一个新的治疗靶点,但是它在代谢性疾病特别是脂肪肝疾病过程中的变化和具体的机制尚未完全明确,并存在矛盾之处。一方面,众多的动物和细胞模型研究提示,给予外源性的 FGF21,可以减轻胰岛素抵抗^[2,7-9];改善脂代谢,减少循环甘油三酯水平,降低甘油三酯在肝脏的沉积^[7];可以刺激机体对能量的代谢,提高代谢率,减轻体重^[2]。另一方面,在肥胖、脂肪肝和糖尿病患者外周血中,发现 FGF21 水平明显升高,并与疾病的严重程度密切相关^[4-5,10],但这种内源性的 FGF21 升高究竟对人体的代谢有什么样的作用及机制,目前尚未明确。作为患者个体,难以观察到代谢紊乱从初始到严重阶段的 FGF21 水平,亦难以收集从肝脏到外周血 FGF21 的完整数据,这即是本研究设计的初衷,目的为了模拟非酒精性脂肪肝的自然病程,研究在此病程中 FGF21 从肝脏到血清的动态变化,为进一步的分子机制研究提供基础。结果表明,在小鼠脂肪肝的发展过程中,肝组织 FGF21 的 mRNA 水平逐渐升高,蛋白水平逐渐降低,外周血 FGF21 水平逐渐升高,这种降低和升高的程度呈平行变化,说明在早期高脂饮食开始,FGF21 的在肝组织的合成增加就已经启动,同时伴随着分泌的增加,而且随着脂肪肝的进展,这种分泌增加异常迅速,甚至肝组织 FGF21 蛋白的保有量远低于素食小鼠肝组织,似乎在严重脂肪肝状态,FGF21 蛋白在肝组织一经合成,就迅速分泌入血,是什么机制促动了这种现象,而这种机制是机体代谢紊乱的结果,还是机体试图通过升高 FGF21 的合成和分泌在一定程度上纠正代谢紊乱,正是我们的兴趣所在,亦为我们下一步在细胞和动物模型中的分子机制研究

奠定基础。

在脂肪代谢紊乱和胰岛素抵抗的发生和发展过程中,胆固醇调节元件结合蛋白(SREBP)目前被认为是一个重要的中间核心因子,它主要在肝脏和脂肪细胞中表达,众多的代谢因子通过 SREBP 在机体代谢过程中发挥作用。研究表明,SREBP 的过度表达将造成非脂肪组织特别是肝脏的脂质聚集,引发胰岛素抵抗,造成脂肪肝^[11-14]。而我们的研究亦发现,随着小鼠脂肪肝的进展,肝组织 SREBP 在 mRNA 水平和蛋白水平均逐渐升高,并且和 FGF21 的变化密切相关,当然,这种相关是通过什么机制联系在一起的,有待进一步的研究。

综上所述,我们的研究提示在小鼠脂肪肝的逐渐进展中,小鼠肝脏中 FGF21 转录合成增加同时分泌亦明显增加,并与肝脏脂质合成沉积指标 SREBP 密切相关。

参考文献

- [1] FABBRINI E, MAGKOS F. Hepatic steatosis as a marker of metabolic dysfunction[J]. *Nutrients*, 2015, 7 (6): 4995-5019.
- [2] LEE MS, CHOI SE, HA ES, et al. Fibroblast growth factor-21 protects human skeletal muscle myotubes from palmitate-induced insulin resistance by inhibiting stress kinase and NF- κ B [J]. *Metabolism*, 2012, 61 (8): 1142-1151.
- [3] XU J, LLOYD DJ, HALE C, et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice[J]. *Diabetes*, 2009, 58(1): 250-259.
- [4] SEMBA RD, SUN K, EGAN JM, et al. Relationship of serum fibroblast growth factor 21 with abnormal glucose metabolism and insulin resistance: the baltimore longitudinal study of aging[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(4): 1375-1382.
- [5] LI H, FANG Q, GAO F, et al. Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride[J]. *J Hepatol*, 2010, 53(5): 934-940.
- [6] DAY CP, JAMES OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? [J]. *Hepatology*, 1998, 27 (6): 1463-1466.

(下转第 39 页 to page 39)