

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.03.003

文章编号: 1005-8982 (2019) 03-0015-08

GH/IGF1 轴对非酒精性脂肪肝病脂代谢的影响及可能机制研究*

邹琳¹, 李铁岩², 钱丽娟³, 童学科³, 费悦³, 徐霞红³, 余会元³

(1. 宁夏医科大学, 宁夏 银川 750004; 2. 同济大学附属东方医院 心脏外科, 上海 200120; 3. 上海市浦东新区公利医院 感染科, 上海 200135)

摘要: **目的** 探讨非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 中生长激素 / 胰岛素样生长因子 1 (GH/IGF1) 轴对肝内脂代谢的影响。**方法** 利用 1 nmol 的游离脂肪酸 (FFA) 诱导人肝细胞 HL-7702 (L02) 复制 NAFLD 细胞模型, 检测模型中生长激素受体 (GHR)、胰岛素样生长因子 1 (IGF1)、胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP3) 基因及蛋白表达情况; 再将 NAFLD 细胞模型设为未加药组、25 ng/ml rhGH 组、250 ng/ml rhGH 组、50 ng/ml rhIGF1 组及 500 ng/ml rhIGF1 组, 分别检测各组用药 24 h 后脂肪酸合成酶 (FASN)、固醇调节元件结合蛋白 (SREBP-1C)、过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPAR- γ) 的 mRNA 表达, 以及 GHR、IGF1、IGFBP3 mRNA 水平; 同时检测 24、48 和 72 h 时模型三酰甘油 (TAG) 的变化。正常细胞作为各组的对照组 (L02 组)。**结果** FFA 诱导 NAFLD 模型 24 h 后, 各组细胞中 GHR、IGFBP3 mRNA 表达与 L02 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), GHR mRNA 表达高于 L02 组, IGFBP3 mRNA 表达低于 L02 组, 但 IGF1 mRNA 表达与 L02 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。FFA 诱导 48 h 时 IGF1、IGFBP3 蛋白水平与 L02 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), IGF1、IGFBP3 蛋白水平均低于 L02 组。正常肝细胞与 NAFLD 细胞在 25 ng/ml rhGH、250 ng/ml rhGH、50 ng/ml rhIGF1 及 500 ng/ml rhIGF1 4 种干预 24 h 后, 细胞内 TAG 含量与未加药组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TAG 含量均高于未加药组; 但 72 h 后细胞内 TAG 含量低于未加药组 ($P < 0.05$)。干预 24 h 时 NAFLD 细胞的 PPAR- γ mRNA 与未加药组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), PPAR- γ mRNA 水平低于未加药组; NAFLD 细胞中 4 种干预后 GHR、IGF1、IGFBP3 mRNA 表达与未加药组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), GHR、IGF1、IGFBP3 mRNA 表达高于未加药组, 但 NAFLD 细胞组 GHR、IGF1、IGFBP3 mRNA 表达低于 L02 组 ($P < 0.05$)。**结论** NAFLD 中 GH/IGF1 轴表达抑制; GH/IGF1 轴参与调控肝内 TAG 代谢, 并通过抑制 PPAR- γ 参与调控 NAFLD 中脂代谢; GH/IGF1 轴与 FFA 之间可能存在负反馈调节。

关键词: 非酒精性脂肪肝病 / 脂肪肝; 生长激素 / 胰岛素样生长因子 1 轴; 胰岛素样生长因子结合蛋白 3; 过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ ; 脂肪代谢

中图分类号: R575.5

文献标识码: A

Role and potential mechanism of GH-IGF1 axis in lipid metabolism of nonalcoholic fatty liver disease*

Lin Zou¹, Tie-yan Li², Li-juan Qian³, Xue-ke Tong³, Yue Fei³, Xia-hong Xu³, Hui-yuan She³
(1. Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Department of Cardiac Surgery, Shanghai East Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China; 3. Department of Infectious Diseases, Shanghai Pudong New Area Gongli Hospital, Shanghai 200135, China)

收稿日期: 2018-05-10

* 基金项目: 上海市浦东新区公利医院青年基金 (No: 2017YQNJJ-07); 同济大学青年优秀人才培养行动计划 (No: 2016KJ063)

[通信作者] 余会元, E-mail: shehuiy@sina.com

[作者简介] 邹琳, 现在上海市浦东新区公利医院工作

Abstract: Objective To explore the role and potential mechanism of GH/IGF1 axis in lipid metabolism of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Cellular model of NAFLD in L02 cells was established by co-incubation of free fat acid (FFA). mRNA and protein levels of GHR, IGF1 and IGFBP3 were measured by qPCR and ELISA. Cells were treated with rhGH (25 ng/ml, 250 ng/ml) or rhIGF1 (50 ng/ml, 500 ng/ml). Cells in control group received no insults. Expression of FASN, SREBP-1C, PPAR- γ , GHR, IGF1, and IGFBP3 were identified. **Results** Treatment with FFA for 24 hours induced a significant increase of GHR and decrease of IGFBP3 when compared with those in control group ($P < 0.05$). Treatment with FFA for 48 hours induced a significant decrease of IGF1 and IGFBP3 comparing with those in control group ($P < 0.05$). Cells co-cultured with rhGH (25 ng/ml, 250 ng/ml) or rhIGF1 (150 ng/ml, 500 ng/ml) for 24 hours experienced a dramatic increase in TG, GHR, IGF1, and IGFBP3 and an obvious decrease in PPAR- γ when compared with those in NAFLD group ($P < 0.05$). Co-culture of cells with rhGH (25 ng/ml, 250 ng/ml) or rhIGF1 (150 ng/ml, 500 ng/ml) for 48 hours induced decrease of TAG comparing with NAFLD group ($P < 0.05$). **Conclusions** GH/IGF1 axis is involved in mediating lipid metabolism probably through PPAR- γ signaling pathway.

Keywords: NAFLD/fatty liver; GH/IGF1 axis; IGFBP3; PPAR- γ ; lipid metabolism

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是目前全球最常见的慢性肝病, 发病率高达 25% ~ 40%, 在我国城市人口中的患病率高达 27%, 儿童发病率为 2.1%, 若合并肥胖, 发病率上升至 68.2%^[1-2]。预计到 2030 年 NAFLD 将成为肝移植的最主要原因^[3-4]。脂质代谢异常以及胰岛素抵抗被普遍公认为 NAFLD 进展的第一重打击, 同时激素代谢紊乱也与 NAFLD 发病密切相关^[5-7]。生长激素 / 胰岛素样生长因子 1 (GH/IGF1) 轴也被称为生长轴, 由垂体释放的 GH 与肝细胞膜上的生长激素受体 (GHR) 相结合并通过 “JAK2-STAT5b” 通路促进肝细胞合成并释放 IGF1, 共同参与调节机体的生长、发育、代谢, 以及各类激素的平衡。越来越多的研究发现^[8-10]NAFLD 患者, 包括儿童血清中的 GH 水平升高、IGF1 和胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP3) 水平下降, 并且 IGF1、IGFBP3 下降程度与 NAFLD 脂肪变性程度呈正相关, 提示 GH/IGF1 轴可能参与 NAFLD 发病过程, GH、IGF1 参与 NAFLD 的脂质调节^[11], 但具体的调节机制仍不清楚。本实验通过复制 NAFLD 细胞模型, 观察不同剂量的 GH、IGF1 干预下的肝内三酰甘油 (TAG) 合成和脂肪酸合成酶 (FASN)、固醇调节元件结合蛋白 (SREBP-1C)、过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPAR- γ) 的变化, 进一步探讨 GH/IGF1 轴在 NAFLD 中对脂代谢的影响及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人正常肝细胞 HL-7702 (L02) 细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所, FBS (10270-106) 购自美国 Gibco 公司, DMEM 培养基 (SH30021.01B)、

双抗 (SV30010)、磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (SH30256.01B) 购自美国 Hyclone 公司, 0.25% 胰酶 (150050-065)、Random Primer 购自美国 Invitrogen 公司, DMSO (D2650)、BSA (B2064)、油酸 (O1383)、棕榈酸 (P5585)、油红 O (O0625) 染色购自美国 Sigma 公司, BCA 法蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司, TAG 测试盒、Trizol (B610409-0100)、DEPC 原液 (B548110-0200) 购自南京建成生物工程研究所, 人重组 IGF-I (100-11)、人重组 GH (100-40) 购自美国 peprotech 公司, IGF1 (E04580h)、IGFBP3 (E04590h) 试剂盒购自美国 CUSABIO 公司, 三氯甲烷 (氯仿) (分析纯 AR, 500 ml)、无水乙醇分析纯 AR (500 ml) 购自上海国药集团化学试剂有限公司, 异丙醇分析纯 AR (500 ml) 购自上海展云化工有限公司, dNTPs 购自上海兆维科技发展有限公司, M-MLV M170B、Oligo dT (50 μ .mol) 购自美国 Promega 公司, RNasin (2313A)、SYBR Green I qPCR mix 购自日本 TaKaRa 公司, 引物购自上海捷瑞生物合成公司。

1.2 仪器与设备

二氧化碳 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司), 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司), 7500 real-time PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司), 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞解冻、传代 液氮中取出冻存 L02 细胞, 37℃ 水浴中解冻, 冷冻细胞刚解冻为液体时迅速取出, 在生物安全柜中转移到 15 ml 离心管中, 加入 5 ml 培养基, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸去上清液, 细胞沉淀重悬 5 ml 培养基中, 转移到 T25 培养瓶中, 上下左右

混匀,放入5% CO₂培养箱中培养。取对数生长期的细胞,当细胞生长至70%~80%融合度时,进行传代。吸去培养基,PBS清洗2次,加入0.25%胰酶溶液,孵育1~5 min,显微镜下观测消化进程,观察到细胞变圆,轻拍培养瓶有少量细胞漂起即可加入含血清培养基终止消化,重悬消化细胞,转移到15 ml离心管中,1 000 r/min离心5 min收集细胞,按1:3或1:4比例接种到新培养瓶中培养。

1.3.2 NAFLD 细胞模型复制 将油酸和软脂酸按2:1比例配成20 mmol FFA母液,并加入到DMEM高糖完全培养液中,配成1 mmol的高脂完全培养基,细胞贴壁后放入高脂培养基中,继续放置在5% CO₂的37℃恒温培养箱中继续培养。诱导24、48及72 h后收获细胞,称取0.25 g油红O干粉,溶于少量异丙醇中,然后加异丙醇至50 ml,配成油红O染色液进行细胞染色。染色时,吸去细胞培养液,用PBS轻柔漂洗后加入10%中性甲醛固定15 min,然后用油红O染液染色10 min,PBS漂洗后用苏木精复染5 min,双蒸水(ddH₂O)漂洗后,显微镜下观察并拍照,以细胞质内出现橘红色的脂滴为脂质变性细胞。

1.3.3 rhGH和rhIGF1刺激NAFLD细胞及分组 为观察GH/IGF1轴对脂质代谢影响,分别选择25 ng/ml rhGH、250 ng/ml rhGH、50 ng/ml rhIGF1、500 ng/ml rhIGF1加入正常细胞和NAFLD细胞培养中,加药24 h后开始收集细胞并进行相关检测。见表1。

表1 rhGH、rhIGF1干预浓度与分组

对照组及干预浓度	NAFLD细胞组及干预浓度
对照组(L02)	NAFLD组(L02 NAFLD)
L02+25 ng/ml rhGH	L02 NAFLD+25 ng/ml rhGH
L02+250 ng/ml rhGH	L02 NAFLD+250 ng/ml rhGH
L02+50 ng/ml rhIGF1	L02 NAFLD+50 ng/ml rhIGF1
L02+500 ng/ml rhIGF1	L02 NAFLD+500 ng/ml rhIGF1

1.3.4 TAG检测 TAG主要采用GP-PAP酶法检测。将制备好的GH、IGF1干预后的L02细胞、NAFLD细胞以及未加药组的细胞悬液分别取出,1 000 r/min,离心10 min,弃上清液,留细胞沉淀;用PBS清洗2次,同样1 000 r/min,离心10 min,弃上清液,留细胞沉淀。将收集的细胞采用1%的Triton X-100进行化学裂解,分别在细胞收集样本中加入200 μl,冰水浴条件下裂解30 min。将裂解后的细胞混合液分成2部分,一

部分采用BCA法蛋白定量,一部分进行TAG检测,将各2.5 μl的裂解细胞悬液分别加入96孔板中,并设置空白对照以及2.26 mmol/L标准品(甘油)对照;分别加入250 μl工作液,充分混匀后37℃孵育10 min,反应达到平衡后颜色在60 min内稳定。空白管调测OD值,采用酶标仪测量标准孔及待测样品500 nm的OD值,绘制标准曲线并计算TAG浓度。

1.3.5 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

采用Trizol法提取NAFLD细胞总RNA,通过Nanodrop ND-2000鉴定提取的RNA浓度以及纯度,确定后进行mRNA逆转录,先按RNA 1 μg, Oligo dT (50 μmol) 1 μl, Rnase-Free-H₂O加至10 μl配置反应液一,并在70℃孵育5 min,然后迅速冰浴3 min,将反应液一, 5×M-MLV buffer 4 μl, M-MLV (200 u/μl) 1 μl, RNasin (40 u/μl) 0.25 μl, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μl, 并Rnase-Free-H₂O加至20 μl,配置后混匀,采用42℃ 60 min, 70℃ 15 min反应条件进行逆转录,获得的cDNA放入-20℃冰箱冷冻保存。将cDNA稀释10倍,通过Primer 5.0软件设计引物序列(见表2), β-actin作为内参设置对照, qRT-PCR反应体系:样本cDNA 2 μl, 10 μmol正向引物0.4 μl, 10 μmol反向引物0.4 μl, SYBR Green I qRT-PCR mix 10 μl, ddH₂O加至20 μl反应体系,反应程序:95℃预变性

表2 PCR引物列表

引物名称	引物序列	长度 / bp
FASN	正向: 5'-CGCCCGCTCTGGTTCATC-3'	171
	反向: 5'-AAAGGTGCTCTCGTCTGTGCT-3'	
PPARG	正向: 5'-ACGAAGACATTCCATTACAAGAAC-3'	200
	反向: 5'-ATCTCCACAGACACGACATTCA-3'	
SREBF1	正向: 5'-GCTTCAGCTTATCAACAACCAAGAC-3'	139
	反向: 5'-TGTGGCAGGAGGTGGAGACAA-3'	
GHR	正向: 5'-AGTGCAACCAGATCCACCCATT-3'	100
	反向: 5'-GCGTGGTCTCCCATCTCAC-3'	
IGFBP3	正向: 5'-AAAAGCAGTGTCCGCCCTTCCA-3'	100
	反向: 5'-TCCTTCCCCTTGGTGGTGTAG-3'	
rhIGF1	正向: 5'-TTTCAACAAGCCACAGGGT-3'	113
	反向: 5'-CGCAATACATCTCCAGCCTCC-3'	
β-actin	正向: 5'-CTACCTCATGAAGATCCTCACCGA-3'	84
	反向: 5'-TTCTCCTTAATGTCACGCACGATT-3'	

5 min, 95℃变性 10 s, 60℃退火 20 s, 72℃延伸 20 s, 共 40 个循环, 熔解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

1.3.6 细胞上清液中 IGF1、IGFBP3 含量检测 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测上清液 IGF1、IGFBP3 含量, 将制备好的 L02 细胞和 NAFLD 细胞悬液, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃细胞, 留取上清液待测; 进行标准品的制备, 使标准品稀释浓度分别为 500.0、250.0、125.0、62.5、31.2、15.6、7.8 和 0.0 ng/ml, 在 96 孔板的酶标板孔中分别加入空白对照, 标准品以及样品 100 μ l, 37℃温浴 2 h 后, 分别加入 100 μ l 酶 Biotin 抗体, 37℃温浴 1 h 并洗涤 5 次, 依次加入 100 μ l 的显色剂 HRP, 37℃温浴 1 h 并洗涤 5 次和 90 μ l 的显色剂 TMB, 避光, 37℃温浴 30 min 后加入 50 μ l 终止液, 450 nm 波长进行测量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 Graphpad Prism 5.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布采用单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验, 多时间点比较采用重复测量设计的方差分析, 非正态分布采用 Wilcoxon、Mann-Whitney *U* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NAFLD 细胞模型制备

1 nmol FFA 高脂培养基培养 L02 细胞 24、48 和 72 h 后, 通过倒置显微镜可见 L02 组的细胞边缘清晰可见, 核大, 其内可见核分裂相, 核膜完整, 细胞胞浆丰富, 油红 O 染色后, 仅在细胞边缘可见少量小的红染脂滴。L02 NAFLD 组可见细胞变圆, 胞浆内及细胞周围可见大量红染的脂滴, 细胞核大, 部分被挤到一

侧, 呈印戒样改变。见图 1。

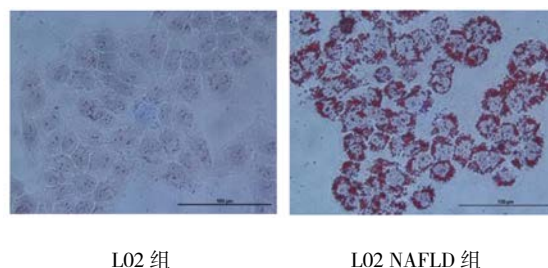


图 1 L02 组和 L02 NAFLD 组细胞脂滴沉积情况 (油红 O 染色 $\times 400$)

2.2 NAFLD 细胞 GH/IGF1 轴功能改变

2.2.1 GHR、IGF1、IGFBP3 mRNA 表达比较 L02 NAFLD 组细胞中 GH/IGF1 轴功能抑制与 L02 组比较, 差异有统计学意义, 其中 GHR mRNA 表达高于 L02 组 ($P < 0.05$)。IGFBP3 mRNA 表达低于 L02 组 ($P < 0.05$), IGF1 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), L02 NAFLD 组轻度减少。见表 3 和图 2。

2.2.2 IGF1、IGFBP3 蛋白表达比较 两组细胞上清液中 IGF1、IGFBP3 的蛋白表达见图 3。24 h 时, 两组上清液中 IGF1、IGFBP3 未见明显差异。48 h 时, L02 NAFLD 组与 L02 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), L02 NAFLD 组 IGF1 和 IGFBP3 均低于 L02 组 (见表 4)。

表 3 两组细胞 GHR、IGF1、IGFBP3 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	GHR	IGF1	IGFBP3
L02 组	0.539 \pm 0.095	0.385 \pm 0.086	0.867 \pm 0.112
L02 NAFLD 组	0.854 \pm 0.103	0.366 \pm 0.045	0.359 \pm 0.069
<i>t</i> 值	2.238	0.186	3.613
<i>P</i> 值	0.040	0.855	0.002

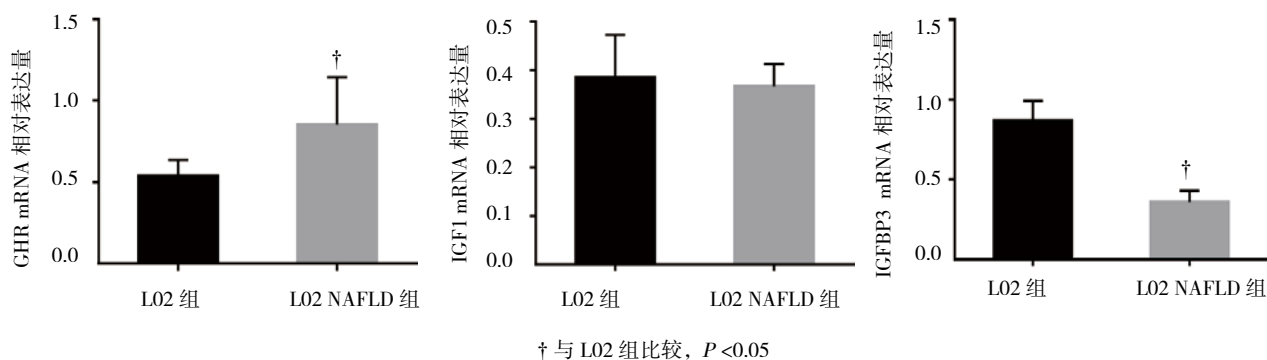


图 2 两组细胞 GHR、IGF1、IGFBP3 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

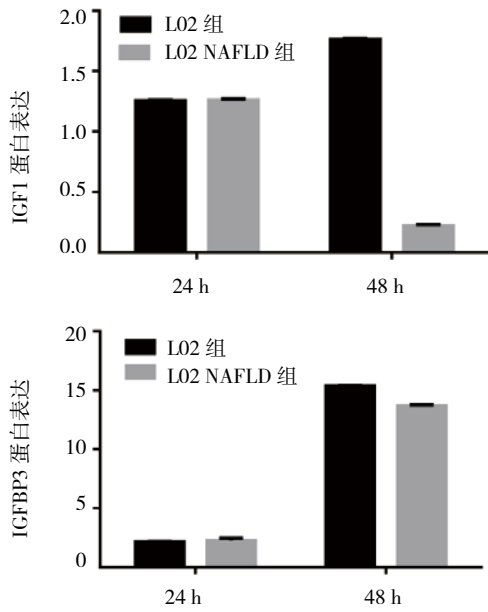


图3 两组细胞 IGF1、IGFBP3 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

表4 两组细胞 48 h IGF1、IGFBP3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IGF1	IGFBP3
L02 组	0.385 ± 0.086	0.359 ± 0.069
L02 NAFLD 组	0.366 ± 0.045	0.867 ± 0.112
<i>t</i> 值	23.370	4.410
<i>P</i> 值	0.002	0.037

2.3 TAG 含量比较

两组细胞中 24、48 和 72 h 的 TAG 含量比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的 TAG 含量有差异 ($F=229.91, P=0.000$);② L02 NAFLD 组和 L02 组的 TAG 含量有差异 ($F=616.96, P=0.000$), L02 NAFLD 细胞组 TAG 含量升高;③ L02 NAFLD 组与 L02 组的 TAG 变化趋势有差异 ($F=629.920, P=0.000$)。见表 5 和图 4。

2.4 两组细胞 FASN、SREBP-1C、PPAR- γ mRNA 表达比较

L02 NAFLD 组中 PPAR- γ 和 SREBP-1C mRNA 与 L02 组比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$), L02 NAFLD

表5 两组细胞 TAG 含量比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
L02 组	0.289 ± 0.001	0.252 ± 0.002	0.246 ± 0.004
L02 NAFLD 组	0.411 ± 0.014	0.401 ± 0.015	0.464 ± 0.010

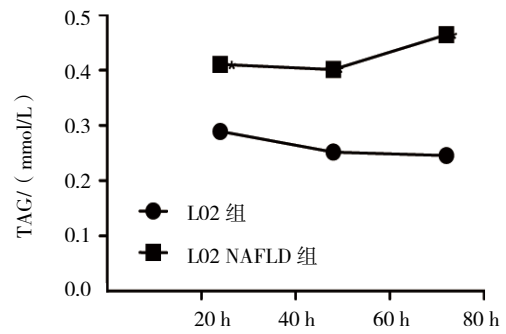


图4 两组细胞 TAG 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组中 PPAR- γ mRNA 表达高于 L02 组, SREBP-1C mRNA 表达低于 L02 组。见表 6 和图 5、6。

表6 两组细胞 FASN、SREBP-1C、PPAR- γ mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	FASN	SREBP-1C	PPAR- γ
L02 组	0.554 ± 0.103	0.510 ± 0.090	0.599 ± 0.048
L02 NAFLD 组	0.593 ± 0.105	0.309 ± 0.034	0.837 ± 0.078
<i>t</i> 值	0.267	2.790	2.580
<i>P</i> 值	0.793	0.027	0.024

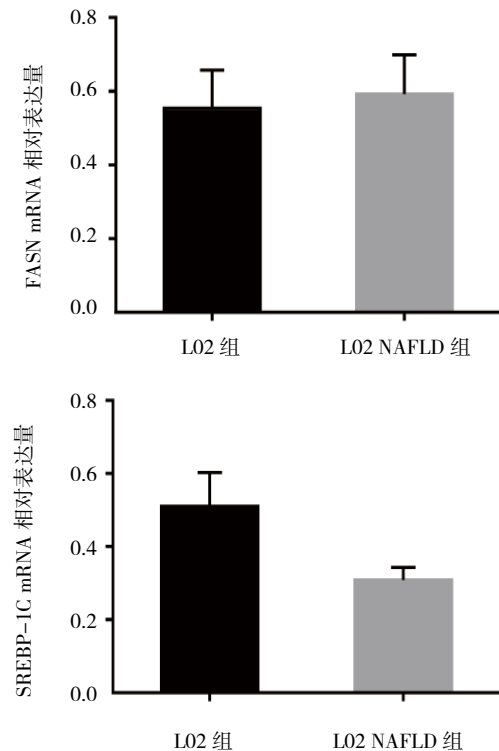


图5 两组细胞 FASN、SREBP-1C mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

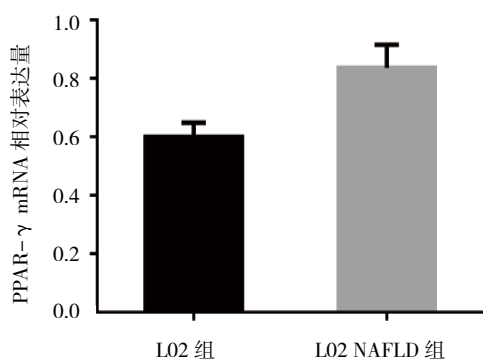


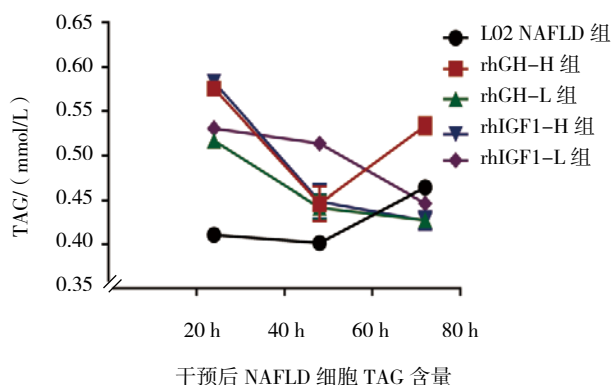
图 6 两组细胞 PPAR-γ mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.5 rhGH、rhIGF1 干预后 TAG 含量变化

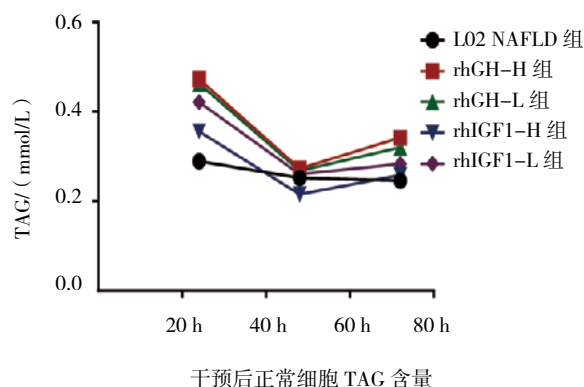
NAFLD 细胞中, rhGH 干预组: 25 ng/ml (rhGH-L)、250 ng/ml (rhGH-H) 和 rhIGF1 干预组: 50 ng/ml (rhIGF1-L)、500 ng/ml (rhIGF1-H) 分别干预 24、48 和 72 h 后, 通过重复测量设计的方差分析检测 TAG 含量, 其中 L02 NAFLD 组为未加药组。结果: ①不同时间点的 TAG 含量有差异 ($F=172.330, P=0.000$); ②不同干预组间的 TAG 含量有差异 ($F=20.460, P=0.000$); ③不同干预组间的 TAG 变化趋势有差异 ($F=49.320, P=0.000$)。而在正常细胞 (L02) 中, 结果: ①不同时间点的 TAG 含量有差异 ($F=15\ 922.060, P=0.000$); ②不同干预组间的 TAG 含量有差异 ($F=3\ 958.550, P=0.000$); ③不同干预组间的 TAG 变化趋势有差异 ($F=624.850, P=0.000$)。见表 7 和图 7。

表 7 两组细胞在不同干预条件下 TAG 变化 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

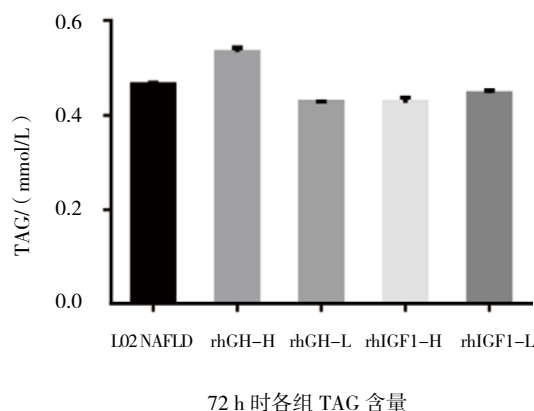
组别	24 h	48 h	72 h
正常细胞组			
未干预组	0.289 ± 0.001	0.252 ± 0.002	0.246 ± 0.004
rhGH-H 组	0.473 ± 0.004	0.273 ± 0.001	0.342 ± 0.003
rhGH-L 组	0.463 ± 0.005	0.268 ± 0.002	0.320 ± 0.001
rhIGF1-H 组	0.356 ± 0.002	0.215 ± 0.001	0.258 ± 0.024
rhIGF1-L 组	0.421 ± 0.003	0.261 ± 0.002	0.283 ± 0.003
NAFLD 组			
未干预组	0.411 ± 0.014	0.401 ± 0.015	0.446 ± 0.009
rhGH-H 组	0.576 ± 0.004	0.446 ± 0.039	0.534 ± 0.018
rhGH-L 组	0.517 ± 0.004	0.441 ± 0.027	0.427 ± 0.002
rhIGF1-H 组	0.583 ± 0.003	0.448 ± 0.037	0.427 ± 0.020
rhIGF1-L 组	0.531 ± 0.009	0.514 ± 0.016	0.446 ± 0.010



干预后 NAFLD 细胞 TAG 含量



干预后正常细胞 TAG 含量



72 h 时各组 TAG 含量

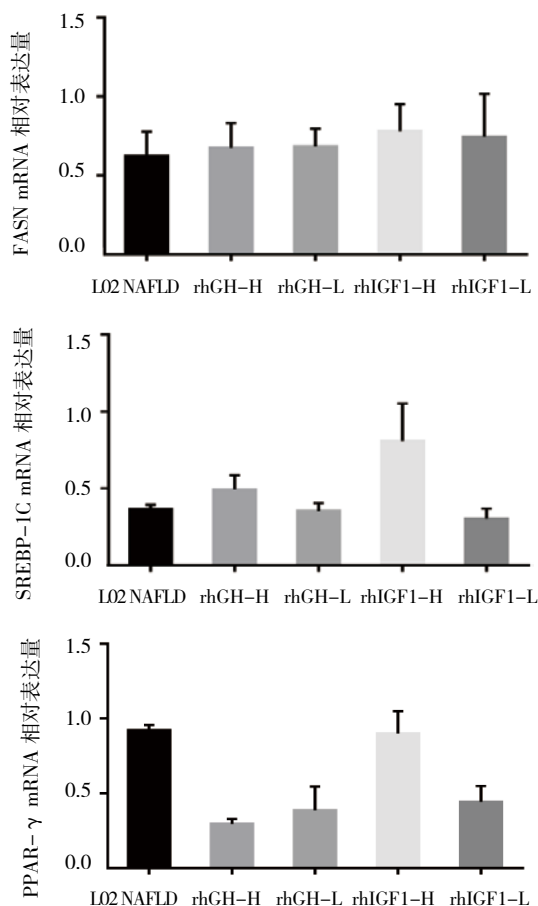
图 7 两组细胞经 rhGH、rhIGF1 干预后 TAG 含量 ($\bar{x} \pm s$)

2.6 rhGH、rhIGF1 干预后 FASN、SREBP-1C、PPAR-γ mRNA 表达比较

在 NAFLD 细胞中, 与未加药组 (L02 NAFLD) 比较, rhGH-H, rhGH-L, rhIGF1-L 干预下的 NAFLD 中 PPAR-γ mRNA 表达差异有统计学意义 ($t=8.990, 7.530$ 和 $4.280, P=0.002, 0.006$ 和 0.012), 3 组干预下的 PPAR-γ mRNA 低于未加药组; rhIGF1-H 干预下的 NAFLD 中 SREBP-1C mRNA 表达差异有统计学意义 ($t=-5.190, P=0.028$), SREBP-1C mRNA 表达高于未加药组。见表 8 和图 8。

表8 rhGH、rhIGF1干预后 FASN、SREBP-1C、PPAR- γ mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	FASN	SREBP-1C	PPAR- γ
未加药组	0.623 \pm 0.266	0.364 \pm 0.048	0.923 \pm 0.058
rhGH-H组	0.677 \pm 0.269	0.494 \pm 0.195	0.297 \pm 0.053 [†]
rhGH-L组	0.684 \pm 0.189	0.353 \pm 0.089	0.388 \pm 0.027 [†]
rhIGF1-H组	0.782 \pm 0.295	0.973 \pm 0.197 [†]	0.900 \pm 0.259
rhIGF1-L组	0.746 \pm 0.271	0.465 \pm 0.162	0.443 \pm 0.185 [†]

注: † $P < 0.05$ 图8 rhGH、rhIGF1干预下 NAFLD 中 FASN、SREBP-1C、PPAR- γ mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

NAFLD 是累及肝脏及多个肝外组织的肝脏代谢综合征, NAFLD 患者多易合并糖尿病、高脂血症、高胰岛素血症, 肥胖、冠状动脉粥样硬化性心脏病(以下简称冠心病)等疾病, 研究发现 2 型糖尿病患者合并脂肪肝的可能性高达 80%, 并且进展为 NASH 的风险较单纯脂肪肝高 2 ~ 4 倍^[12], NAFLD 患者发生动脉

粥样硬化和冠心病的风险明显升高^[13], 而这些疾病与机体的脂质代谢紊乱和异常沉积密切相关。脂质代谢研究一直是 NAFLD 研究的重点和热点。

GH/IGF1 轴在 NAFLD 人群表现 GH 抵抗, IGF1、IGFBP3 水平下调, 并与 NAFLD 的严重程度呈正相关^[14-15], 血清低水平 IGF1 的肝癌患者的疾病进展时间缩短和生存时间更短, 低水平 IGF1 与肝癌风险升高密切相关, 且早于肝癌诊断至少 5 年^[16]。

本研究结果提示, 由 FFA 诱导 L02 细胞的 NAFLD 细胞模型中, IGF1、IGFBP3 mRNA 以及蛋白水平均下调, 机体出现 GH 抵抗, GH/IGF1 轴功能被抑制, 这与临床中观察到的 GH、IGF1 变化一致。NAFLD 细胞中, 24、48 和 72 h 的细胞内 TAG 含量均较正常细胞升高, 脂合成基因 PPAR- γ 的合成增加, PPAR- γ 是脂质合成的重要调控基因, 可以诱导肝内脂质堆积, 促进 TAG 合成^[17-18], PPAR- γ 及其靶点 CD36 可以促进游离脂肪酸的吸收, PPAR- γ 的高表达可以诱导成脂性基因 FASN、SREBP-1 表达转录增加^[19]。经不同浓度 rhGH、rhIGF1 干预后, 可以看到正常细胞和 NAFLD 细胞在早期(24 h)细胞内 TAG 含量均升高, 但 72 h 后时细胞内 TAG 含量明显下降。其中 NAFLD 细胞中 PPAR- γ mRNA 表达水平下调, 说明 GH、IGF1 可能通过下调 PPAR- γ 从而减少肝细胞内脂质合成。另外, NAFLD 组细胞中 GHR、IGF1、IGFBP3 mRNA 表达低于正常细胞, 且细胞中 TAG 含量升高不及正常细胞, 说明 FFA 与 GH/IGF1 轴之间可能存在负调控, 而在人体骨骼肌中也发现, 随着 FFA 浓度升高, 骨骼肌中 STAT5b 磷酸化水平明显下调^[20]。

综上所述, GH/IGF1 轴在 NAFLD 中受抑制, GH/IGF1 可能通过抑制 PPAR- γ 参与调控 NAFLD 中脂代谢, 并与 FFA 之间存在负反馈调节。

参考文献:

- [1] SCHNEIER A T, CITTI C C, DIETERICH D T. Management and diagnosis of fatty liver disease[J]. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 2015, 9(5): 671.
- [2] FAN J G. Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China[J]. Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2013, 28(S1): 11-17.
- [3] GOH G B, MCCULLOUGH A J. Natural history of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Digestive Diseases & Sciences, 2016, 61(5): 1226-1233.
- [4] DAN L D, NEUMAN M G. Non-alcoholic fatty liver disease: an update on diagnosis[J]. Clujul Med, 2018, 91(2): 147-150.
- [5] ROCKALL A G, SOHAIB S A, EVANS D, et al. Hepatic steatosis

- in cushing's syndrome: a radiological assessment using computed tomography[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2003, 149(6): 543-548.
- [6] GOLTZ D, SCHÖTTA K, ZHOU H, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and cirrhosis in young adult patients with hypothalamic-pituitary dysfunction[J]. *Der Pathologe*, 2013, 34(4): 318-322.
- [7] ROMANOWSKI M D, PAROLIN M B, FREITAS A C, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome and its correlation with metabolic syndrome[J]. *Arquivos De Gastroenterologia*, 2015, 52(2): 117-123.
- [8] VÖLZKE H, NAUCK M, RETTIG R, et al. Association between hepatic steatosis and serum IGF1 and IGFBP-3 levels in a population-based sample[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2009, 161(5): 705-713.
- [9] CHISHIMA S, KOGISO T, MATSUSHITA N, et al. The relationship between the growth hormone/insulin-like growth factor system and the histological features of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Internal Medicine*, 2017, 56(5): 473-480.
- [10] LIANG S, CHENG X, HU Y, et al. Insulin like growth factor 1 and metabolic parameters are associated with non-alcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents[J]. *Acta Paediatrica*, 2017, 106(2): 298-303.
- [11] LIU Z, CORDOBA-CHACON J, KINEMAN R D, et al. Growth hormone control of hepatic lipid metabolism[J]. *Diabetes*, 2016, 65(12): 3598-3609.
- [12] GROUP N A F L D S, LONARDO A, BELLENTANI S, et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: focus on high-risk groups[J]. *Digestive & Liver Disease*, 2015, 47(12): 997-1006.
- [13] SIDDIQUI M S, STERLING R K, LUKETIC V A, et al. Association between high-normal levels of alanine aminotransferase and risk factors for atherogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(6): 1271-1279.
- [14] FUSCO A, MIELE L, D'UONNOLO A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with increased GHBP and reduced GH/IGF-I levels[J]. *Clinical Endocrinology*, 2012, 77(4): 531-536.
- [15] ICHIKAWA T, NAKAO K, HAMASAKI K, et al. Role of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 in development of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology International*, 2007, 1(2): 287-294.
- [16] WANG J, LI Y C, DENG M, et al. Serum insulin-like growth factor-1 and its binding protein 3 as prognostic factors for the incidence, progression, and outcome of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46): 81098.
- [17] YAMAZAKI T, SHIRAIISHI S, KISHIMOTO K, et al. An increase in liver PPAR γ 2 is an initial event to induce fatty liver in response to a diet high in butter: PPAR γ 2 knockdown improves fatty liver induced by high-saturated fat[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011, 22(6): 543-553.
- [18] SCHADINGER S E, BUCHER N L R, SCHREIBER B M, et al. PPAR γ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes[J]. *American Journal of Physiology Endocrinology & Metabolism*, 2005, 288(6): e1195.
- [19] KINEMAN R D, MAJUMDAR N, SUBBIAH P V, et al. Hepatic PPAR γ is not essential for the rapid development of steatosis following loss of hepatic GH signaling, in adult male mice[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(5): 2015-2077.
- [20] MØLLER N, GORMSEN L C, SCHMITZ O, et al. Free fatty acids inhibit growth hormone/signal transducer and activator of transcription-5 signaling in human muscle: a potential feedback mechanism[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009, 94(6): 2204-2207.

(张西倩 编辑)