

## 非酒精性脂肪性肝病 FOXO1 的表达及意义

熊清芳, 谢玉桃, 谭德明, 侯环荣

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

**[摘要]** **目的** 研究非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者分叉头框家族转录因子 1(forkhead box-containing protein O subfamily-1, FOXO1)表达的变化, 以及转录因子和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基(G6PC)之间的关系。同时探讨 FOXO1 在 NAFLD 发病机制中的作用。**方法** 对临床与病理确诊的 NAFLD 患者, 用免疫组化法、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测肝组织 FOXO1 的表达以及 FOXO1、PEPCK 和 G6PC 的 mRNA 水平。**结果** 非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)组、非酒精性单纯性脂肪肝(simple steatosis, SS)组的胰岛素抵抗指数(insulin resistance index, IR)显著高于健康对照组( $P < 0.001$ ); NASH 组的血清丙氨酸转氨酶(ALT)显著高于 SS 组、对照组( $P < 0.001$  或  $P < 0.05$ ), 而 SS 组与对照组之差异无显著性( $P > 0.05$ ); 3 组的 FOXO1 阳性细胞数、FOXO1 mRNA、PEPCK mRNA、G6PC mRNA 随病情的加重逐渐增加, 组间差异有显著性( $P < 0.001$ )。FOXO1 mRNA 水平与 IR、炎症评分和脂肪变性评分、PEPCK mRNA 和 G6PC mRNA 表达正相关。**结论** 不能根据 ALT 正常与否决定是否肝穿刺活检。NASH 患者的 FOXO1 表达和活性增强, FOXO1 转录因子调节 PEPCK 和 G6PC 的表达, 并与胰岛素抵抗有关。推测脂肪变性和炎性反应参与了 FOXO1 的调节。

**[关键词]** 脂肪肝; 非酒精性脂肪性肝病; 分叉头框家族转录因子 1; 胰岛素抵抗

**[中图分类号]** R575.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)02-0081-04

## Expression and role of forkhead box-containing protein O subfamily-1 in patients with nonalcoholic fatty liver disease

XIONG Qing-fang, XIE Yu-tao, TAN De-ming, HOU Huan-rong (Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the expression of forkhead box-containing protein O subfamily-1 (FOXO1) in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and relationship with expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase catalytic subunit(G6PC), and to evaluate the effect of FOXO1 on the pathogenesis of NAFLD. **Methods** NAFLD patients were confirmed by clinical and pathological methods. Localization of FOXO1 was observed by immunocytochemistry; FOXO1, PEPCK and G6PC mRNA levels were observed by RT-PCR. **Results** The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were higher in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and simple steatosis (SS) group compared with control group ( $P < 0.001$ ); alanine transaminase (ALT) was higher in NASH group compared with SS and control group (both  $P < 0.001$ , or  $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between SS and control group ( $P > 0.05$ ); With the progress of disease, there were a gradual increase of percentage of hepatocytes with FOXO1 and mRNA levels of FOXO1, PEPCK and G6PC in three groups, there was significant difference between each group ( $P < 0.001$ ). FOXO1 mRNA levels were positive correlated with HOMA-IR, the degree of steatosis and necroinflammatory activity, the expression of both PEPCK mRNA and G6PC mRNA. **Conclusion** NAFLD patients with normal ALT should also undergo liver biopsy. Expression and activity of FOXO1 are increased in hepatocytes in NASH. FOXO1 mediates the effect of insulin on the gluconeogenic genes PEPCK and G6PC. Steatosis and inflammation are involved in FOXO1

[收稿日期] 2009-10-19

[基金项目] 湖南省自然科学基金(09JJ5031)

[作者简介] 熊清芳(1973-), 女(汉族), 湖北省通山县人, 医师, 主要从事肝病临床研究。

[通讯作者] 谢玉桃 E-mail: drXieyutao@tom.com

regulation.

[Key words] fatty liver; nonalcoholic fatty liver disease; forkhead box-containing protein O subfamily-1; insulin resistance

[Chin Infect Control, 2010, 9(2): 81 - 84]

肝胰岛素抵抗是非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的一个显著特点, 通常伴有高血糖。分叉头框家族转录因子 1 (forkhead box-containing protein O subfamily-1, FOXO1) 是一个胰岛素介导调节糖质形成基因磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 和葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基 (glucose-6-phosphatase catalytic subunit, G6PC) 的转录因子<sup>[1]</sup>。然而, 关于 NAFLD 患者胰岛素信号的调节和糖质形成基因间的相关机制仍不清楚。本研究评估 NAFLD 患者胰岛素抵抗与 FOXO1 表达和调节的关系, 揭示 FOXO1 在其发病中的作用, 为 NAFLD 的预防及治疗提供新思路。

### 1 对象与方法

1.1 研究对象 收集 2007 年 3 月—2008 年 10 月于中南大学湘雅医院行肝穿刺活检的 39 例病例, 其中非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 组 13 例、非酒精性单纯性脂肪肝 (Simple steatosis, SS) 组 14 例, 健康对照者 (对照组) 12 例。临床上 SS 组血清肝功能酶学指标基本正常, NASH 组血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 高于正常值上限 1.5 倍并持续 4 周以上; 并按 NAFLD 中华医学会肝脏病学分会的诊断标准<sup>[2]</sup> 纳入, 均不合并肝炎病毒感染, 同时排除了药物性肝炎、酒精性肝炎及自身免疫性肝炎, 亦排除结核、肿瘤等全身性疾病和其他器官系统疾病。本研究获得了本院伦理委员会的同意。

1.2 肝组织标本采集 在行肝活检、捐肝者知情同意的情况下, 术中留取 2 条直径约 1 cm × 4 cm 大小肝组织, 部分用 4% 甲醛溶液固定, 制成常规石蜡切片, HE 染色、免疫组织化学观察; 部分储存在液氮中, 用于提取总 RNA。

1.3 身高体重指数 (body mass index, BMI) 及生化指标测定 测量身高、体重, 计算 BMI [BMI = 体重 (kg) / 身高 (m)<sup>2</sup>]; 留取肝组织标本的同一天, 患者晨起后空腹采肘静脉血 5 mL, 不加抗凝剂, 3 500 r/min 离心 15 min, 用日本 Olympus AU2700 全自动

生化分析仪检测 ALT、空腹血糖 (FBG)、甘油三酯 (TG) 及总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C) 水平; 空腹胰岛素 (FINS) 水平用放射免疫法测定。采用稳态模式评估法 (HOMA) 计算胰岛素抵抗指数 (insulin resistance index, IR),  $HOMA-IR = FINS \times FBG / 22.5$ <sup>[3]</sup>。

1.4 病理学检查 石蜡包埋肝组织, 连续切片 (4 μm), HE 染色观察肝组织普通病理变化, 苏丹 IV 染色观察肝组织脂肪变程度, Gordon-Sweet 网状纤维染色及 Masson 三色染色观察纤维化程度, 参照 2005 年 NASH-CRN 推荐的 NAFLD 组织学观测方案进行半定量计分<sup>[4]</sup>。取积分总和的平均值作为各组病变程度的积分。

1.5 免疫组化 免疫组织化学反应按卵白素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物法 (ABC 法) 进行, FOXO1 抗体购自 Cell Signaling, Danvers 公司。

1.6 肝组织 FOXO1 mRNA、PEPCK mRNA、G6PC mRNA 检测 用 Trizol 试剂 (购自北京博大泰克公司) 一步法提取肝脏总 RNA, 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, 目的及内参引物由上海生工生物工程公司合成。FOXO1 F 5' - TCATCACCAAGGCCATCG - 3', R 5' - TCATCATGCTGTGGGAC - 3'; PEPCK F 5' - AGCCTCGACAGCCTGCCCCAGG - 3', R 5' - CCAGTTGTTGACCAAAGGCTTT - 3'; G6PC F 5' - AGACCAGTGA ACTACGG - GATG - 3', R 5' - ATGAATAGGACTGCGTGCC - 3'; β-actin F 5' - AGAGGGAAATCGTGCGTG - 3', R 5' - CTGGGTACATGGTGGTGCC - 3'。按照逆转录反应试剂盒操作合成 cDNA, 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 59℃ 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 35 个循环。产物经琼脂糖凝胶电泳、成像, 测量灰度值, 以与 β-actin 的灰度比值表示相对表达量。

1.7 统计学处理 年龄、肝功能、血脂、FBG、BMI、HOMA-IR 等水平以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 Kruskal-Wallis 法比较上述各组指标的组间差异; 若各组间差异显著, 则应用 Mann-Whitney U 检验进一步作两两比较。相关分析采用直线相关分析。应用 SPSS 8.0 统计软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 NAFLD 患者 BMI、血脂、HOMA-IR 的变化

NASH 组 BMI、HOMA-IR、LDL-C、ALT 值显著高于 SS 组 ( $P < 0.001$  或  $P < 0.05$ ); TC、TG、HDL-C 比较, 两组差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。与对照组

相比, NASH 组、SS 组的 BMI、HOMA-IR、HDL-C、TC、TG、LDL-C 差异均有显著性 ( $P < 0.001$  或  $P < 0.05$ ); NASH 组的 ALT 值与对照组相比, 差异有显著性 ( $P < 0.001$ ), 而 SS 组的 ALT 值与对照组差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。3 组间性别、年龄差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。详见表 1。

表 1 各组实验室指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Clinical characteristics in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	性别 (男:女,例)	年龄 (岁)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	HOMA-IR	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	ALT (U/L)
NASH 组	9:4	46.54 ± 9.31	30.24 ± 1.49**△△	6.45 ± 0.07**△△	3.39 ± 3.05*	5.21 ± 1.00*	0.59 ± 0.19**	3.59 ± 0.05*△△	79.30 ± 39.39**△
SS 组	8:6	42.29 ± 11.06	25.94 ± 0.79**	4.79 ± 0.30**	2.12 ± 1.21*	4.97 ± 1.06*	0.69 ± 0.30**	3.44 ± 0.11*	36.62 ± 23.30
对照组	7:5	38.50 ± 8.36	23.58 ± 1.93	1.98 ± 0.16	1.03 ± 0.27	3.95 ± 0.66	1.22 ± 0.13	2.03 ± 1.16	25.84 ± 6.70
F		2.14	68.41	12.54	4.81	6.34	31.38	21.84	14.05
P		0.13	0.00	0.00	0.01	0.004	0.00	0.00	0.00

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ ; 与 SS 组比较, △  $P < 0.05$ , △△  $P < 0.001$

### 2.2 肝组织 FOXO1 表达

NASH 组 FOXO1 阳性细胞数、脂肪变性评分、小叶内炎症评分、纤维化评分与 SS 组、对照组比较, 差异均有显著性 ( $P < 0.001$ ); SS 组 FOXO1 阳性细胞数、脂肪变性评分

与对照组比较, 差异有显著性 ( $P < 0.001$ ), 而小叶内炎症评分、纤维化评分两组差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。详见表 2。

表 2 各组 FOXO1 阳性细胞数、肝脏病变 NASH-CRN 方案评分结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Numbers of FOXO1 cells and NASH-CRN scores of liver histopathological changes in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	FOXO1 阳性细胞数(个)	脂肪变性(分)	小叶内炎症(分)	纤维化(分)
NASH 组	13	5.76 ± 0.27**△△	2.78 ± 0.12**△△	1.76 ± 0.07**△△	1.92 ± 0.05**△△
SS 组	14	4.47 ± 0.13**	2.54 ± 0.09**	0.16 ± 0.06	0.12 ± 0.05
对照组	12	0.96 ± 0.28	0.76 ± 0.05	0.12 ± 0.06	0.09 ± 0.06
F		76.46	51.95	40.47	71.32
P		0.00	0.00	0.00	0.00

与对照组比较, \*\*  $P < 0.001$ ; 与 SS 组比较, △△  $P < 0.001$

### 2.3 FOXO1 mRNA 与糖质形成基因变化

FOXO1、PEPCK、G6PC 的 mRNA 的表达在对照组、SS 组、NASH 组逐渐增加, 两两比较, 差异均有显著性 ( $P < 0.001$ )。详见表 3。

表 3 各组 FOXO1mRNA、PEPCK mRNA、G6PC mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ , 目的基因/ $\beta$ -actin 灰度比)

Table 3 Expression of FOXO1mRNA, PEPCK mRNA, and G6PC mRNA in each group ( $\bar{x} \pm s$ , target gene/ $\beta$ -actin mRNA)

组别	例数	mRNA		
		FOXO1	PEPCK	G6PC
NASH 组	13	5.73 ± 0.17**△△	3.67 ± 0.09**△△	2.25 ± 0.07**△△
SS 组	14	3.45 ± 0.09**	1.66 ± 0.08**	1.71 ± 0.07**
对照组	12	1.47 ± 0.07	1.27 ± 0.07	1.06 ± 0.08
F		54.84	56.59	69.12
P		0.00	0.00	0.00

与对照组比较, \*\*  $P < 0.001$ ; 与 SS 组比较, △△  $P < 0.001$

### 2.4 FOXO1 mRNA 与各参数的直线相关性分析

FOXO1 mRNA 水平与 HOMA-IR ( $R_2 = 0.96, P = 0.00$ ) 正相关, 与小叶内炎症评分 ( $R_2 = 0.88, P = 0.00$ ) 和脂肪变性评分 ( $R_2 = 0.884, P = 0.00$ ) 正相关, 但与纤维变性评分不相关 ( $R_2 = 0.08, P = 0.59$ )。FOXO1 mRNA 水平与 PEPCK mRNA ( $R_2 = 0.93, P = 0.00$ ) 和 G6PC mRNA ( $R_2 = 0.97, P = 0.00$ ) 表达相关联。

NAFLD 是指除外酒精和其他明确的肝损因素所致的, 以弥漫性肝大泡性脂肪变, 伴或不伴炎症为主要特征的临床病理综合征, 包括 SS、NASH 及肝

## 3 讨论

硬化<sup>[2]</sup>。因其具有高患病率、低龄化的发病趋势、慢性进展性的经过、与其他慢性肝病关联、对心血管事件发生的影响等特点,已成为临床普遍关注的研究热点。但其所导致的肝组织损伤机制仍未明确,胰岛素抵抗与其密切相关,并且是其重要的病理生理学环节之一。

实验模型表明,脂肪肝可直接诱发肝胰岛素抵抗,胰岛素信号转导通路下调在这一过程起重要作用<sup>[5]</sup>。叉头转录因子家族参与了多种生理活动,包括细胞周期的调节、凋亡和葡萄糖内环境的稳定,在胰岛素抵抗和 2 型糖尿病发病机制中可能起重要作用<sup>[6]</sup>。FOXO1 蛋白是 FOX 转录因子家族中的一个亚族,这一家族特色是能够被胰岛素/PI<sub>3</sub>K/Akt 信号通路所调节,在代谢、细胞增殖和氧化应激中起重要作用<sup>[7]</sup>。在正常状态下,FOXO1 位于细胞核内,一旦胰岛素激活 PI<sub>3</sub>K/Akt 信号通路,FOXO1 蛋白的丝氨酸 24、苏氨酸 256 和 319 磷酸化,磷酸化的 FOXO 蛋白从胞核中释放出来,进入胞浆,从而使之调控的基因转录停止。

目前 FOXO1 在人类脂肪肝形成中的作用国内外鲜有报道。本临床资料显示,NASH 组、SS 组的 BMI、HOMA-IR、TC、TG、LDL-C 比对照组高,说明胰岛素抵抗参与了 NAFLD 的发病机制;NASH 组的 ALT 比 SS 组、对照组高,但 SS 组与对照组差异不明显,证明 ALT 不能评估疾病严重程度及进展,也不是排除肝活检的一个有价值的指标。与国外报道<sup>[8]</sup>一致。

本研究结果显示,NASH 患者的 FOXO1 阳性细胞数明显增多。NASH 组的 FOXO1 mRNA 与 PEPCK mRNA、G6PC mRNA 和 HOMA-IR 指数呈正相关,表明 FOXO1 的转录活性增加,调节糖质

形成基因 PEPCK 和 G6PC 的表达,并与胰岛素抵抗有关;且 FOXO1 mRNA 的水平独立地同脂肪变性和炎症活动程度联系在一起,意味着脂肪变性和炎症反应参与了 FOXO1 的调节。

本研究首次证实了 FOXO1 参与了 NAFLD 的形成,但更具体的作用途径还有待进一步深入研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Barthel A, Schmol D, unterman T G. FoxO proteins in insulin action and metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2005, 16(4): 183 - 189.
  - [2] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[S]. 中华肝病杂志, 2006, 14(3): 161 - 163.
  - [3] Matthews D P, Hosker J P, Rudenski A S, *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man [J]. Diabetologia, 1985, 28(7): 412 - 419.
  - [4] Kleiner, David E, Brunt, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1313 - 1321.
  - [5] Samuel V T, Liu Z X, Wang A, *et al.* Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Clin Invest, 2007, 117(3): 739 - 745.
  - [6] 崔曼, 赵勇. FoxO 转录因子[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 24(3): 40 - 43.
  - [7] Garneau D, Revil T, Fiset J F, *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x [J]. J Biol Chem, 2005, 280(7): 22641 - 22650.
  - [8] Fracanzani A L, Valenti L, Bugianesi E, *et al.* Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: A role for insulin resistance and diabetes [J]. Hepatology, 2008, 48(3): 792 - 798.
- 
- (上接第 102 页)
- [3] 熊长明, 程显声, 杨方伦. 215 例感染性心内膜炎临床分析[J]. 中国循环杂志, 2001, 16(3): 203 - 204.
  - [4] Steckelberg J M, Wilson W R. Risk factors for infective endocarditis[J]. Infect Dis Clin North Am, 1993, 7(1): 9 - 19.
  - [5] 彭晓兰, 吴玉蕊, 谢慧能. 近 20 年风湿热及风湿性心脏病发病的回顾性分析(附 470 例报告) [J]. 海南医学, 2002, 13(3): 1 - 2.
  - [6] 韩秀珍, 李化兵. 关于《感染性心内膜炎诊断标准》的修改补充意见[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(1): 73 - 74.
  - [7] Habib G, Derumeaux G, Avierinos J F, *et al.* Value and limitations of the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis[J]. J Am Coll Cardiol, 1999, 33(7): 2023 - 2029.
  - [8] Hoen B, Alla F, Selton Suty C, *et al.* Changing profile of infective endocarditis: results of a 1-year survey in France[J]. JAMA, 2002, 288(1): 75 - 81.
  - [9] Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; International Society of Chemotherapy for Infection and Cancer, *et al.* Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. Eur Heart J, 2009, 30(19): 2369 - 2413.