

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.10.009

FABP4 对脂多糖诱导 Kupffer 细胞 NF- κ B 活化和炎症的影响 *陶 梅¹ 赵曙光² 赵 丽² 张 哲² 李武良¹ 王晓叶^{1Δ}

(1 西安交通大学附属西安市第九医院消化内科 陕西 西安 710054; 2 空军军医大学附属唐都医院消化内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究脂肪型脂肪酸结合蛋白(FABP4)对脂多糖(LPS)诱导 Kupffer 细胞(KCs)NF- κ B 通路活化和炎症反应的影响。**方法:**通过梯度离心的方法分离大鼠 KCs,按照 1×10^5 接种于 6 孔板,贴壁后饥饿 24 h,不同浓度脂多糖(LPS, 0、5、10 和 20 ng/mL)刺激 24 h,提取蛋白和 RNA,通过 Western-Blot 检测 NF- κ B 通路蛋白表达变化,利用荧光定量 PCR 检测 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 表达变化;利用 RNAi 沉默 KCs FABP4 表达,通过 Western-Blot 和荧光定量 PCR 检测其对 LPS 诱导 NF- κ B 通路活化的影响;分别利用 FABP4 细胞因子刺激和慢病毒上调 FABP4 的表达,通过 Western-Blot 和荧光定量 PCR 检测其对 KCs NF- κ B 通路和炎症反应的影响。**结果:**LPS 能够以浓度依赖的方式(0、5、10 和 20 ng/mL)诱导 KCs FABP4 mRNA 和蛋白的表达,以 20 ng/mL 最为明显($P < 0.05$);沉默 FABP4 可以显著减弱 LPS(20 ng/mL)诱导的 p-p65 和 p-I κ B α 的表达,以及炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-6 的释放($P < 0.05$);外源性 FABP4(10 ng/mL 和 20 ng/mL)刺激 24h 后,能够明显诱导 p-p65 和 p-I κ B α 的表达,促进炎症因子(IL-1 β 和 IL-6)的合成($P < 0.05$);利用慢病毒上调 FABP4,可以显著诱导 p-p65 和 p-I κ B α 的表达以及炎症因子(IL-1 β 和 IL-6)的表达($P < 0.05$),而抗氧化剂 NAC(10 μ M)处理,则显著减弱此效应($P < 0.05$)。**结论:**FABP4 介导了 LPS 刺激 KCs NF- κ B 通路的活化和炎症反应。

关键词:NAFLD; Kupffer 细胞; FABP4; NF- κ B; 炎症反应**中图分类号:**R-33; R575.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)10-1845-07The Role of FABP4 on LPS induced Kupffer Cells NF- κ B Pathway Activation and Inflammation Response*TAO Mei¹, ZHAO Shu-guang², ZHAO Li², ZHANG Zhe², LI Wu-liang¹, WANG Xiao-ye^{1Δ}

(1 Department of Gastroenterology, Ninth Hospital of Xi'an, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

2 Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of FABP4 on LPS induced Kupffer cells NF- κ B pathway activation and inflammation response. **Methods:** Liver Kupffer cells were isolated from SD rats using gradient centrifugation. Isolated KCs were inoculated into 6 well cell culture plate with the density of 1×10^5 /mL, then were treated with different concentrations LPS (0, 5, 10, 20 ng/mL) for 24 hours. NF- κ B pathway activation was examined through Western-Blot. IL-1 β and IL6 expressions were detected through qRT-PCR. Then KCs were treated with LPS for 24 hours after FABP4 knockdown and NF- κ B pathway activation was examined. Further, KCs were treated with recombination FABP4 cytokines (10 and 20 ng/mL) or transfected with FABP4 lentivirus and NF- κ B pathway activation was examined. Lastly, KCs transfection with FABP4 lentivirus were treated with NAC (10 μ M) and then NF- κ B pathway activation were examined. **Results:** Exogenous LPS (0, 5, 10, 20 ng/mL) treatment could significantly promote the expression of FABP4 in Kupffer cells on both mRNA and protein levels in concentration-dependent pattern with most obvious at 20 ng/mL ($P < 0.05$). Knockdown of FABP4 could significantly alleviate LPS induced p65 and I κ B phosphorylation and inflammation factors (IL-1 β and IL6) expressions in KCs ($P < 0.05$). Exogenous FABP4 cytokines (10 and 20 ng/mL) treatment or transfection with FABP4 lentivirus could significantly promote p65 and I κ B phosphorylation with IL-1 β and IL6 expressions in KCs ($P < 0.05$). And NAC (10 μ M) treatment could significantly alleviate NF- κ B pathway activation and inflammation factors expressions in KCs after FABP4 lentivirus transfection ($P < 0.05$). **Conclusions:** FABP4 is involved in LPS induced Kupffer cells NF- κ B pathway activation and inflammation response.

Key words: NAFLD; Kupffer cells; FABP4; NF- κ B; Inflammation**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R575.5 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2019)10-1845-07

* 基金项目:陕西省社会发展科技攻关项目(2016SF-303);西安市科技计划项目(2016045SF/YX01(4))

作者简介:陶梅,硕士,主任医师,主要研究方向:非酒精性脂肪性肝病, E-mail: wu-taomei@163.com

 Δ 通讯作者:王晓叶,大学本科,主治医师,主要研究方向:非酒精性脂肪性肝病, E-mail: 864140783@qq.com

(收稿日期:2018-09-24 接受日期:2018-10-20)

前言

库普弗细胞(Kupffer cells, KCs)活化释放炎症因子是非酒精性脂肪性肝病(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)发病的始发环节。KCs 作为肝脏的固有免疫细胞,是防治 NAFLD 的重要靶细胞^[1,2]。炎症和胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)是 NAFLD 的两个主要特征。研究表明^[3,4],高脂饮食产生代谢性内毒素血症诱导 NAFLD, LPS 是其关键致病因子。LPS 通过诱导 KCs 活化,导致 NF- κ B 核转位,上调炎症因子如 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 等的合成,诱发肝脏早期 IR,导致 NAFLD 的发生。抑制 KCs 功能或选择性剔除 KCs 可有效减轻 LPS 诱导的肝损害,防止高脂饮食引起 NAFLD^[5]。

脂肪酸结合蛋白(Fatty acid bind proteins, FABPs)是一组同源性的低分子(相对分子质量为 14 000~15 000)胞浆蛋白,组织特异性强,目前发现的 9 种 FABPs 中,脂肪型 FABP (A-FABP/FABP4)在 NAFLD 发病中的作用受到重视。FABP4 主要存在于脂肪细胞及巨噬细胞,小部分可释放入血液^[6]。LPS 诱导的急性肝损伤或高脂饮食导致的 NAFLD 小鼠,增高的 FABP4 主要表达于 KCs, GdCl₃ 选择性封闭 KCs 后,无论是 LPS 刺激还是高脂饮食均无 FABP4 表达^[7]。FABP4 可能通过影响脂代谢及炎症反应,参与肥胖相关的 IR,但其具体的作用机制,尚需进一步研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 300 $\pm$ 50 g, 购自第四军医大学实验动物中心, 该研究通过第四军医大学实验动物伦理审查。

1.2 实验试剂

LPS、IV 型胶原酶和 Percoll 分离液购自 Sigma 公司; RPMI1640 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; 反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂购自 Takara 公司; NAC 和 RIPA 裂解液购自江苏碧云天生物有限公司; 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂购自 MCE 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo 公司; SDS 凝胶电泳试剂盒购自康为世纪生物有限公司; CD163 多克隆抗体和 FABP4 多克隆抗体购自 Abcam 公司, p65、p-p65、p-I κ B α 和 I κ B α 抗体购自 CST 公司; HRP 标记的抗兔二抗购自 CST 公司; Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; DAPI 染色液购自江苏碧云天生物技术有限公司; 人源 FABP4 细胞因子购自 R&D 公司; FABP4 慢病毒和 FABP4 小干扰以及人 FABP4(货号: HQP005072)、大鼠 FABP4(货号: RQP051590)、大鼠 IL-1 β (货号: RQP051122)和大鼠 IL-6(货号: RQP048925)引物购自广州复能有限公司, 引物序列见表 1; ECL 超敏发光液购自 ZETA 公司。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 The PCR primers

Genes	Primers	
Rat FABP4	Foward	CGTAGAAGGGGACTTGGTCTG
	Reverse	CCCCACCATCCAGGGTTATG
Rat IL-1 β	Foward	CCTTGTCGAGAATGGGCAGT
	Reverse	CAGGGAGGGAAACACACGTT
Rat IL-6	Foward	CACTTCACAAGTCGGAGGCT
	Reverse	AGCACACTAGGTTTGCCGAG

1.3 实验方法和步骤

1.3.1 SD 大鼠 KCs 分离、培养和鉴定 KCs 分离培养参考既往文献^[8]。通过 DAB 染色和免疫荧光标记 CD163 进行鉴定: 分离的 KCs 培养 48 h 后, 消化收集细胞, 接种于免疫荧光小室(2000/个), 贴壁后, 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗涤 3 $\times$ 5 min, 免疫荧光封闭液封闭 30 min, 加一抗(兔抗大鼠 CD163 多克隆抗体 1:250), 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBST 洗涤 3 $\times$ 5 min, 加二抗(Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 1:200)室温孵育 2 h, PBST 洗涤 3 $\times$ 5 min, DAPI 染色 30 min, PBST 洗涤 3 $\times$ 5 min, 抗荧光猝灭封片液封片, 共聚焦显微镜下观察。

1.3.2 细胞转染 将分离的 KCs 按照 1 $\times$ 10⁵ 接种于六孔板, 贴壁后, 分别利用 LipofectamineTM 2000 转染 FABP4 小干扰和对照质粒, 1 mL Opti-MEM 加 2 μ g 质粒和 5 μ L LipofectamineTM 2000, 转染 16 h 后, 更换正常培养基或进行后续处理。慢病毒转染根据说明书, 利用 24 孔板, 每孔铺 10000 个细胞, 贴壁后, 根据病毒 MOI 值和病毒滴度, 计算所需加入病毒量, 1 mL 体系加入 5 μ g polybrene, 转染 12 h 后, 更换正常培养基, 待细胞

长至 80-90 % 后, 转入 25 cm² 细胞培养瓶, 通过嘌呤霉素进行筛选 2-3 周, 建立稳定表达人源 FABP4 的 KCs, 通过 qRT-PCR 和 WB 验证转染效果, 并进行后续实验。

1.3.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 六孔板培养并收集细胞, 按照 RNA 提取试剂盒说明, 提取细胞总 RNA 并定量。PBS 洗涤三次, 加入 700 μ L QIAzol, 室温放置 3-5 min, 吹打并收集裂解细胞。加入 140 μ L 氯仿, 漩涡振荡器剧烈震荡 15 s, 室温静置 3 min, 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 15 min, 收集上层上清约 350 μ L, 加入 525 μ L 无水乙醇, 转入滤柱, 12000 rpm 离心 15 s, 弃滤液, 加入 500 μ L RWT, 12000 rpm 离心 15 s, 弃滤液, 加入 500 μ L RPE, 12000 rpm 离心 15 s 洗涤两次, 弃滤液, 加入 30 μ L 无酶水重悬 RNA 沉淀, 即为提取的总 RNA。按照 1:100 的比例, 稀释 RNA 至 200 μ L 并定量, 测定 OD_{260/280}。反转录采用 Takara 反转录试剂盒, 10 μ L 体系(6 μ L 无酶水、2 μ L RNA 加 2 μ L 反转录 Mix), 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s, 至 4 $^{\circ}$ C 后取出即为 cDNA, 稀释 3-5 倍进行下一步定量 PCR。定量 PCR 体系为 20 μ L(无酶水 6.4 μ L、cDNA 2 μ L、前后引物个 0.8 μ L 加 TB Green 10 μ L)。

PCR 反应采用三步法, 即 95℃ 预变性 10 min、95℃ 变性 10 s、60℃ 退火 20 s、72℃ 延伸 15 s。GAPDH 作为内参。

1.3.4 Western-Blot 六孔板培养并收集细胞, 按照蛋白提取试剂盒说明, 提取细胞总蛋白并定量, 全程冰上操作。RIPA 蛋白裂解液预先加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂。PBS 洗涤三次, 加入 100 μ L RIPA 裂解液冰上裂解 5 min, 利用细胞刮刮下细胞, 转移至 1.5 mL 离心管, 静置 5 min, 超声裂解 7-8 次, 12000 rpm 于 4℃ 离心 15 min, 吸取上清, 即为总蛋白, 加入 1/4 量 5 $\times$ loading buffer, 100℃ 煮沸变性 10 min。蛋白定量根据试剂盒说明进行。根据试剂盒说明配制 10% 电泳凝胶, 每孔加入约 30 μ g 蛋白, 上层浓缩胶 40 mA, 下层分离胶 60 mA, 转膜采用半干转方法 (25 V, 35 min), 10% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加一抗 (1:1000), 4℃ 过夜, TBST 洗涤 3 $\times$ 5 min, 加 HRP 标记抗兔二抗 (1:2000), 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 $\times$ 5 min, ECL 超敏发光

液显影。 β -actin 作为内参。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 各组数据表示为 $\bar{x} \pm SD$, 组间比较采用 One-Way ANOVA 和 Dunnet's t 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 刺激 KCs 表达 FABP4 的作用

通过梯度离心, 成功分离 KCs。贴壁初期细胞呈圆形, 贴壁 24 后, 部分细胞呈梭型, DAB 染色呈“煎蛋”样改变, CD163 阳性 (图 1)。将分离的 KCs 分为空白对照组和 LPS 浓度梯度组 (5、10 和 20 ng/mL), 刺激 24 h, 结果显示外源性 LPS 刺激, 能够明显以浓度依赖的方式诱导 FABP4 mRNA 和蛋白的表达, 以 20 ng/mL 浓度最为明显, 较 NC 组升高 14 倍 (图 2)。

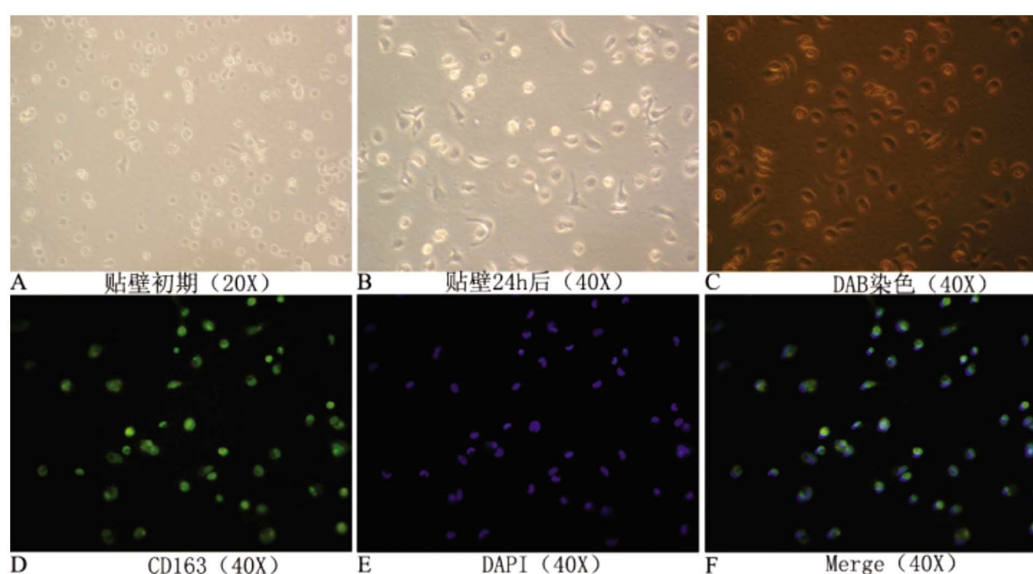


图 1 分离的 Kupffer 细胞形态及免疫荧光

Fig. 1 Cellular morphology of KCs and immunofluorescence

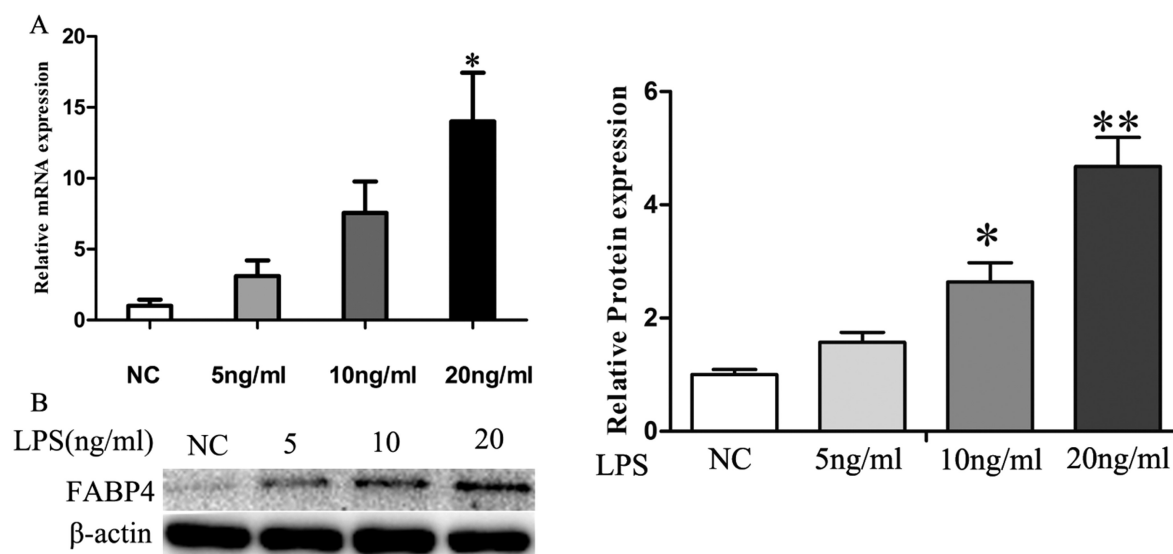


图 2 外源性 LPS 刺激分离的 KCs 表达 FABP4 mRNA(A)和蛋白(B), *P<0.05 vs NC

Fig. 2 Exogenous LPS treatment could significantly promote the expression of FABP4 in KCs on both mRNA (A) and protein levels (B), *P<0.05 vs NC

2.2 沉默 FABP4 对 LPS 刺激 KCs NF- κ B 信号通路活化和炎症因子表达的影响

利用 siRNA 成功敲低 KCs FABP4 的表达 (图 3A 和 B)。

RT-PCR 结果显示,沉默 FABP4 后,LPS 刺激 KCs 炎症细胞因子的合成显著减弱,同时 NF- κ B 通路的 p-p65 和 p-I κ B α 的表达也明显减少(图 3C 和 D)。

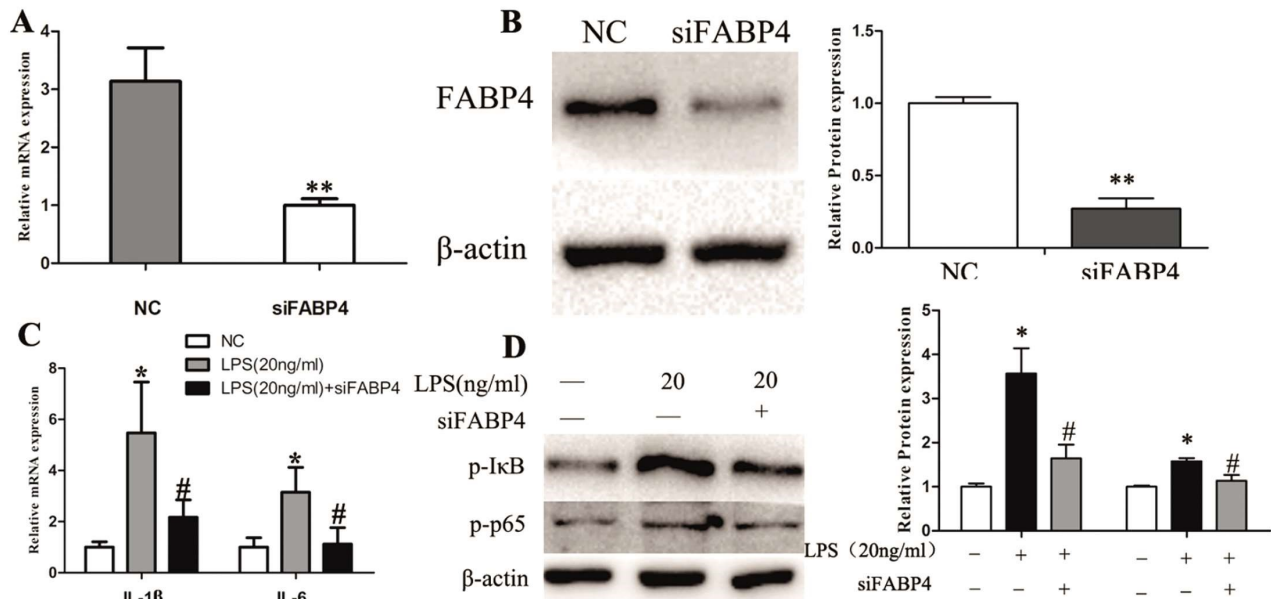


图 3 siRNA 沉默 KCs FABP4 表达(A:qRT-PCR;B:WB),** $P<0.01$ vs NC;沉默 FABP4 显著减弱 LPS 刺激 KCs 表达 IL-1 β 和 IL-6(C),以及减弱 NF- κ B 信号通路活性(D),* $P<0.05$ vs NC;# $P<0.05$ vs LPS 刺激组

Fig. 3 Knockdown of FABP4 by siRNA (A:qRT-PCR;B:WB), ** $P<0.01$ vs NC; Knockdown of FABP4 could significantly alleviate LPS induced inflammation factors expressions (C) and NF- κ B pathway activation (D) in KCs, * $P<0.05$ vs NC; # $P<0.05$ vs LPS Group

2.3 上调 FABP4 对 KCs NF- κ B 通路活化和炎症因子表达的影响

给予人源 FABP4 细胞因子(10 ng/mL 和 20 ng/mL)刺激 24 h, 结果显示,FABP4 可以浓度依赖的方式诱导 KCs p-p65 和 p-I κ B α 的表达上调,同时明显促进 IL-1 β 和 IL-6 的合成,分别升高约 7 倍和 5 倍(图 4);利用慢病毒成功在大鼠 KCs 上调人源 FABP4 的表达(图 5),也可以诱导 p-p65 和 p-I κ B α 的表达,同时促进 IL-1 β 和 IL-6 的表达(图 6 A,B);而给予 NAC (10 μ M) 处理后,可以显著抑制 FABP4 诱导的 p-p65 表达和 IL-1 β 、IL-6 的合成(图 6 C,D)。

3 讨论

NAFLD 是除外酒精和其他明确的肝损害因素所致的,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、非酒精性脂肪性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化和肝癌,是临床常见的慢性肝病。在欧美等西方发达国家,普通成人 NAFLD 患病率为 20%~33%,我国 NAFLD 发病率约为 20.9%^[9],且呈现迅速增长及低龄化趋势,已成为我国肝病及隐匿性肝硬化的主要病因之一。

FABPs 作为细胞内的脂质伴侣,参与细胞的脂肪转运和代谢。目前 FABPs 家族包括 9 个成员(FABP1-9),不同亚型分布在不同的组织和细胞。FABP4 又称为脂肪细胞型 FABP (A-FABP),因其主要表达于脂肪细胞。脂肪细胞分化过程中,FABP4 表达明显上调,同时 FABP4 可以被脂肪酸、地塞米松和胰岛素通过 PPAR γ 转录调控^[6]。FABP4 可以激活激素敏感型脂肪酶(HSL),进而调控脂解过程,抑制 FABP4 的脂肪细胞,脂解作用明显减弱^[10],说明 FABP4 在脂肪细胞内脂质代谢和转运过程中发挥着关键作用,因此,FABP4 表达的失调,可能

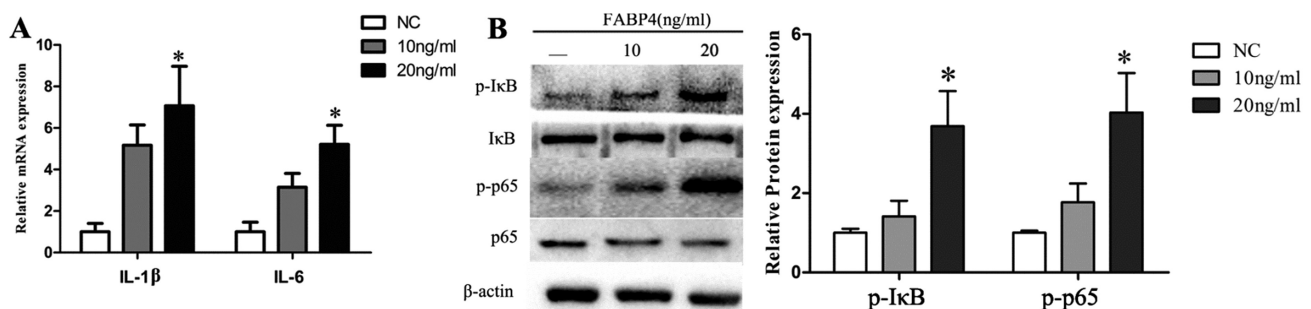


图 4 外源性 FABP4 细胞因子处理 KCs 促进 NF- κ B 信号通路活化(A)和炎症因子的表达(B),* $P<0.05$ vs NC

Fig. 4 Exogenous FABP4 cytokines treatment could significantly promote NF- κ B pathway activation

(A) and inflammation factors expressions (B) in KCs, * $P<0.05$ vs NC

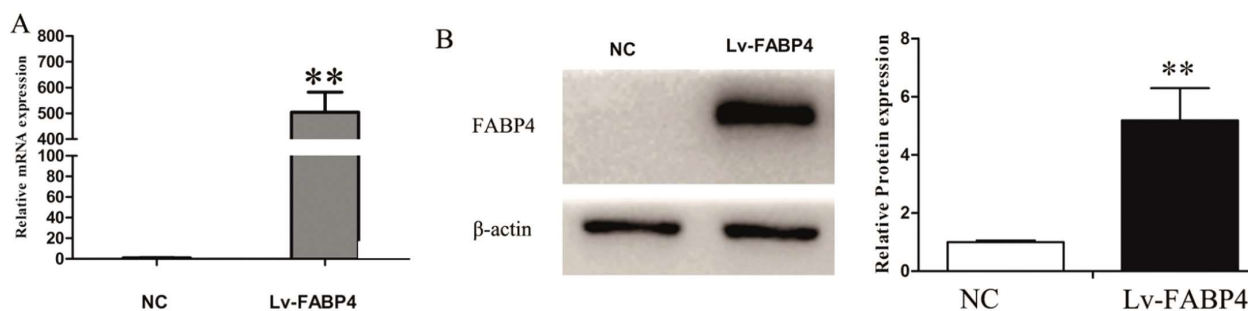


图 5 KCs 转染 FABP4 慢病毒后 FABP4 表达 (A:qRT-PCR;B:WB), ** $P<0.01$ vs NC

Fig. 5 KCs were transfected with FABP4 expression lentivirus (A:qRT-PCR;B:WB), ** $P<0.01$ vs NC

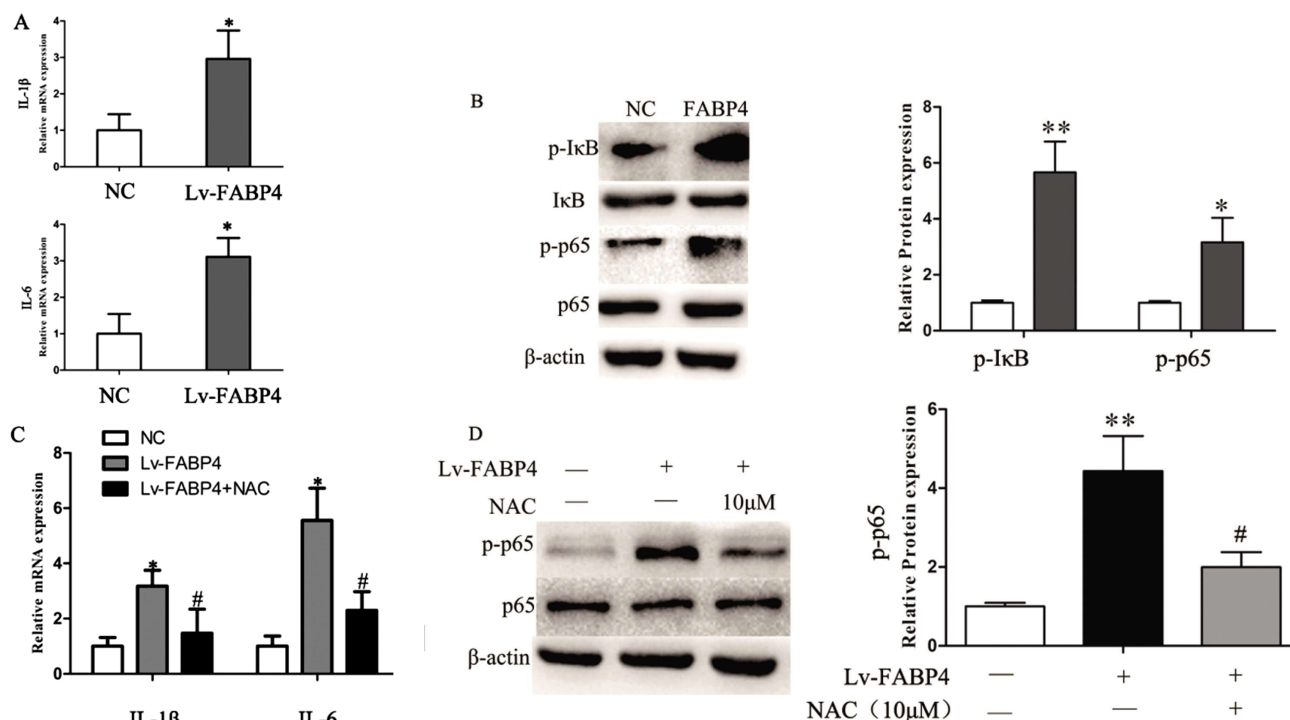


图 6 上调 KCs FABP4 表达,显著促进炎症因子的表达 (A)和 NF- κ B 通路的活化 (B),* $P<0.05$ vs NC;而给予 NAC 处理,则可以显著减弱 FABP4 诱导的炎症因子表达 (C)和 p65 活化 (D),* $P<0.05$ vs NC;# $P<0.05$ vs FABP4 上调组

Fig. 6 Transfection with FABP4 lentivirus could significantly promote inflammation factors expressions (A) and NF- κ B pathway activation (B) in KCs, * $P<0.05$ vs NC. And NAC treatment could significantly alleviate inflammation factors expressions (C) and NF- κ B pathway activation (D) in KCs after FABP4 lentivirus transfection, * $P<0.05$ vs NC; # $P<0.05$ vs FABP4 transfection group

会导致脂肪组织脂质代谢失调。对 FABP4 与代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 的研究发现,超重及肥胖人群血清 FABP4 水平比正常体重人群高,并与腰围、血压、血脂紊乱、空腹胰岛素及 IR 呈正相关,FABP4 水平反映了 MS 的严重程度^[11]。因此,有学者提出 FABP4 可作为 MS 新的生物学标志^[12,13]。NAFLD 与 MS 关系密切,甚至被认为是 MS 的肝脏表现。在几个不同种族的研究人群发现,NAFLD 患者肝脏 FABP4 mRNA 和循环 FABP4 水平均增高^[14,15],血液中 FABP4 水平与肝脏活检的炎症和纤维化程度正相关^[14]。IR 是 MS 的多种代谢异常病理生理基础。FABP4 影响到 MS 的各个方面,可能是 IR、脂质代谢和炎症的核心调节者。有 MS 的妇女血清中 C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 和 FABP4 浓度增高,且 CRP 和 FABP4 与体重指数 (Body Mass Index, BMI) 和腰围强烈相关,这两种标志物与脂质和 IR 也呈中度相关^[16]。因此, FABP4 近来被认为是 MS 的新的血清学标志,抑制 FABP4 表

达可能改善 MS 代谢紊乱。人群研究发现,PPAR γ 激活剂可增加 2 型糖尿病人 FABP4 mRNA 表达、提高细胞内 FABP4 水平、增加 FABP4 的分泌,短期给予健康妇女过量饮食,会引起 PPAR γ 及 FABP4 表达增加,脂肪组织的增加与 PPAR γ 及 FABP4 mRNA 上调有关^[15]。如果通过药物抑制 FABP4 的功能,就可控制脂质信号转导、代谢反应和炎症反应,对肥胖、IR、2 型糖尿病、动脉粥样硬化等一系列代谢及炎症性疾病发挥治疗作用。研究发现高脂饮食喂养的 FABP4 $^{-/-}$ 小鼠较 WT 小鼠血浆游离脂肪酸浓度高,胆固醇和甘油三酯水平降低,且未发生 IR 及糖尿病,脂肪细胞中亦无 TNF- α 表达^[17]。FABP4 加重 LPS 或高脂饮食所致的肝脏脂肪蓄积,通过与 JNK 和 c-Jun 形成反馈环路参与 KCs 的炎症反应,药物抑制 FABP4 减轻了肝脏损伤与干扰 FABP4 与 JNK/c-Jun 间的反馈有关。

同时,巨噬细胞同样高表达 FABP4,在单核细胞向巨噬细胞分化过程中,FABP4 表达逐渐升高^[18]。FABP4 是巨噬细胞炎

症因子合成的重要调节者,FABP4^{-/-}巨噬细胞不能产生TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和MCP-1等细胞因子^[19]。此外,FABP4还可以通过抑制PPAR γ -LXR α -ABCA1通路促进巨噬细胞胆固醇的积聚和泡沫细胞的形成^[20]。FABP4通过与JNK和转录因子AP-1之间的正反馈,促进LPS诱导的巨噬细胞炎症反应,上调炎症细胞因子合成^[21]。FABP4选择性抑制剂BMS309403通过与FABP4竞争结合部位,可以延缓2型糖尿病和动脉粥样硬化的进展^[22]。

KCs是肝脏的巨噬细胞,也是防治NAFLD的重要靶细胞^[2-4]。近年证实,肠道正常菌群与高脂饮食相互作用产生代谢性内毒素血症,LPS活化KCs是NAFLD发病的始发环节,通过肝脏局部炎症诱导肝细胞IR^[1,2]。通过补充益生元或益生菌,则可以显著改善高脂饮食诱导的肠道菌群改变和KCs活化。Matsumoto K等的研究提示,在MCD诱导的小鼠脂肪性肝炎模型中,给予低聚果糖后,肠道菌群失调明显减轻,同时,由于CD14阳性的KCs数量和TLR表达明显降低,因此,肝脏脂肪变性和炎症反应显著缓解^[23]。而通过直接抑制KCs功能或选择性剔除KCs可有效减轻LPS诱导的肝损害,防止高脂饮食引起NAFLD^[3]。一方面,活化的KCs能够触发肝脏脂肪沉积并释放大量炎症细胞因子^[24,25],另一方面,KCs还可以通过释放IL-10等抗炎因子,干扰肝脏浸润的单核细胞来源的巨噬细胞的炎症反应^[26]。因此,KCs在NAFLD向NASH进展过程中扮演着关键的角色,其机制为KCs的细胞极化状态(M1-M2)改变。在单纯性脂肪肝患者肝脏内,M2极化的KCs显著高于NASH患者^[27]。M1极化的KCs通过释放IL-1和IL-6等炎症因子,促进肝脏脂肪变和炎症反应,而M2极化的KCs则发挥抗炎作用。研究显示,在HFD诱导的小鼠NASH模型中,失活M2极化的KCs显著加重肝脏炎症反应。同时,M2极化的KCs能够促进M1极化KCs的细胞凋亡,进而发挥保护效应^[27]。因此,KCs极化状态转换,是NASH发病的关键触发因素,同时,也可能是NASH治疗的关键靶细胞,抑制KCs NLRP3通路活化显著减弱棕榈酸诱导小鼠的肝脏炎症和NASH^[28,29]。

本研究中,我们成功利用梯度离心的方法分离肝脏KCs,体外证实LPS可以直接诱导KCs表达FABP4,提示FABP4可能参与了KCs的炎症反应过程。进一步通过沉默FABP4证实,降低FABP4表达后,可以显著减弱NF- κ B信号通路的活化和炎症细胞因子的释放,而上调FABP4则可以直接诱导NF- κ B信号通路的活化和炎症细胞因子的释放。说明FABP4作为细胞因子,可以直接调控肝脏巨噬细胞的炎症反应。既往研究证实,FABP4可以直接抑制脂肪细胞PPAR γ ^[30],进而抑制脂肪生成,同时还可以抑制巨噬细胞PPAR γ 表达和VLDL诱导的泡沫细胞活化^[20]。上述研究结果提示,FABP4可以同时调控脂肪沉积和炎症反应。由于FABP4主要表达于脂肪细胞和巨噬细胞,因此,我们推测,在NASH发病过程中,FABP4可以通过旁分泌和自分泌的方式,激活并放大肝脏KCs炎症信号级联反应,进而参与肝脏炎症和IR的发生,此结果进一步证实,脂肪组织和巨噬细胞是NASH发生的关键靶点。然而,FABP4诱导KCs细胞炎症反应的机制并不清楚。既往研究提示,FABP4可以抑制小神经胶质细胞和巨噬细胞UCP2表

达^[31,32],进而抑制氧化应激,而ROS是NLRP3通路和NF- κ B通路活化的最重要因素^[33,34]。因此,我们推测,FABP4促进KCs炎症反应的效应可能与氧化应激有关。我们的结果也证实,通过NAC抑制ROS水平,可以显著抑制FABP4诱导的KCs炎症因子的释放。

因此,FABP4直接参与了肝脏KCs炎症信号通路NF- κ B的活化和炎症因子的合成,可能是NAFLD发生和进展的关键细胞因子介质,具有潜在的治疗靶点作用。

参考文献(References)

- [1] Grunhut J, Wang W, Aykut B, et al. Macrophages in Nonalcoholic Steatohepatitis: Friend or Foe? [J]. *Eur Med J Hepatol*, 2018, 6(1): 100-109
- [2] Li P, He K, Li J, et al. The role of Kupffer cells in hepatic diseases[J]. *Mol Immunol*, 2017, 85: 222-229
- [3] Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, Picardi A. The role of intestinal microbiota in the pathogenesis of NAFLD: starting points for intervention[J]. *Arch Med Sci*, 2018, 14(3): 701-706
- [4] Krishnan S, Ding Y, Saedi N, et al. Gut Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Modulate Inflammatory Response in Hepatocytes and Macrophages[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(4): 1099-1111
- [5] Zhao YY, Yang R, Xiao M, et al. Kupffer cells activation promoted binge drinking-induced fatty liver by activating lipolysis in white adipose tissues[J]. *Toxicology*, 2017, 390: 53-60
- [6] Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, et al. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases [J]. *Clin Med Insights Cardiol*, 2015, 8(Suppl 3): 23-33
- [7] Hoo RL1, Lee IP, Zhou M, et al. Pharmacological inhibition of adipocyte fatty acid binding protein alleviates both acute liver injury and non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(2): 358-364
- [8] 张哲, 赵曙光, 倪阵, 等. 一种改良大鼠肝脏 kupffer 细胞分离方法 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2012, 21(11): 1060-1064
- [9] Zhu JZ, Dai YN, Wang YM, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Economy[J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(11): 3194-3202
- [10] Smith AJ, Sanders MA, Juhlmann BE, et al. Mapping of the hormone-sensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP). Identification of the charge quartet on the AFABP/aP2 helix-turn-helix domain [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(48): 33536-33543
- [11] Chen MC, Hsu BG, Lee CJ, et al. High serum adipocyte fatty acid binding protein level as a potential biomarker of aortic arterial stiffness in hypertensive patients with metabolic syndrome [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 473: 166-172
- [12] Li JC, Wu DA, Hou JS, et al. High Serum Adipocyte Fatty Acid Binding Protein Is Associated with Metabolic Syndrome in Patients with Type 2 Diabetes[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 8380279
- [13] Stefanska A, Ponikowska I, Sypniewska G. A-FABP concentration is more strongly associated with cardiometabolic risk factors and the occurrence of metabolic syndrome in premenopausal than in postmenopausal middle-aged women[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 645762

- [14] Milner KL, van der Poorten D, Xu A, et al. Adipocyte fatty acid binding protein levels relate to inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2009, 49(6): 1926-1934
- [15] Kim YC, Cho YK, Lee WY, et al. Serum adipocytespecific fatty acid-binding protein is associated with nonalcoholic fatty liver disease in apparently healthy subjects[J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22: 289-292
- [16] Stefanska A, Sypniewska G, Blaszkiewicz B, et al. Comparison between C-reactive protein and adipocyte fatty acid-binding protein as a component of metabolic syndrome in middle-aged women[J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(4): 304-306
- [17] Furuhashi M, Tuncman G, Görgün CZ, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2 [J]. *Nature*, 2007, 447(7147): 959-965
- [18] Jiang Y, Ma S, Zhang H, et al. FABP4-mediated homocysteine-induced cholesterol accumulation in THP-1 monocyte-derived macrophages and the potential epigenetic mechanism [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1): 969-976
- [19] Xu H, Hertzel AV, Steen KA, et al. Loss of Fatty Acid Binding Protein 4/aP2 Reduces Macrophage Inflammation Through Activation of SIRT3[J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 30(3): 325-334
- [20] Boss M, Kemmerer M, Brüne B, et al. FABP4 inhibition suppresses PPAR γ activity and VLDL-induced foam cell formation in IL-4-polarized human macrophages[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 240(2): 424-430
- [21] Hui X, Li H, Zhou Z, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH2-terminal kinases and activator protein-1[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 10273-10280
- [22] Floresta G, Pistarà V, Amata E, et al. Adipocyte fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors. A comprehensive systematic review[J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 138: 854-873
- [23] Matsumoto K, Ichimura M, Tsuneyama K, et al. Fructo-oligosaccharides and intestinal barrier function in a methionine-choline-deficient mouse model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (6): e0175406
- [24] Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, et al. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2010, 59: 347-357
- [25] Clementi AH, Gaudy AM, van Rooijen N, et al. Loss of Kupffer cells in diet-induced obesity is associated with increased hepatic steatosis, STAT3 signaling, and further decreases in insulin signaling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792: 1062-1072
- [26] Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17: 306-321
- [27] Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2014, 59(1): 130-42
- [28] Cai C, Zhu X, Li P, et al. NLRP3 Deletion Inhibits the Non-alcoholic Steatohepatitis Development and Inflammation in Kupffer Cells Induced by Palmitic Acid[J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 1875-1883
- [29] He K, Zhu X, Liu Y, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome by thioredoxin-interacting protein in mouse Kupffer cells as a regulatory mechanism for non-alcoholic fatty liver disease development [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37657-37672
- [30] Garin-Shkolnik T, Rudich A, Hotamisligil GS, et al. FABP4 attenuates PPAR γ and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR γ in adipose tissues[J]. *Diabetes*, 2014, 63(3): 900-11
- [31] Duffy CM, Xu H, Nixon JP, et al. Identification of a fatty acid binding protein4-UCP2 axis regulating microglial mediated neuroinflammation[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2017, 80: 52-57
- [32] Steen KA, Xu H, Bernlohr DA. FABP4/aP2 Regulates Macrophage Redox Signaling and Inflammasome Activation via Control of UCP2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(2): e00282-16
- [33] Angajala A, Lim S, Phillips JB, et al. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1605
- [34] Zhang J, Wang X, Vikash V, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 4350965