

论著

文章编号:1000-5404(2013)11-1088-05

TNF- α 促进 HepG2 肝细胞脂质积聚及其机制的初步研究

陈书梅, 杨淑敏, 张文龙, 吕琼, 叶鹏, 高茹菲, 梅玫, 汪志红, 李启富 (400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院内分泌科)

[摘要] 目的 探讨肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是否能够促进肝细胞脂质积聚, 并对其机制进行初步探讨。方法 将 HepG2 肝细胞分为空白对照组、单纯 TNF- α 组 (TNF- α 2 ng/mL 或 20 ng/mL)、软脂酸组 (软脂酸 0.08 mmol/L 或 0.2 mmol/L) 及联合组 (TNF- α 2 ng/mL 联合软脂酸 0.08 mmol/L、TNF- α 2 ng/mL 联合软脂酸 0.2 mmol/L、TNF- α 20 ng/mL 联合软脂酸 0.08 mmol/L、TNF- α 20 ng/mL 联合软脂酸 0.2 mmol/L), 处理 24 h, 应用化学酶促-比色法定量检测细胞内 TG 含量。进一步选取 TNF- α 20 ng/mL 和软脂酸 0.08 mmol/L, 通过油红 O 染色观察 HepG2 细胞内脂质积聚情况; 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 HepG2 细胞 SREBP-1、FAS、ACC α 的表达水平。结果 ①单纯 TNF- α 组 TG 含量 [TNF- α 2 ng/mL 组 (0.344 \pm 0.093) μ g/ μ g、TNF- α 20 ng/mL 组 (0.329 \pm 0.068) μ g/ μ g] 分别较空白对照组 [(0.192 \pm 0.048) μ g/ μ g] 显著升高 ($P < 0.05$); 联合组 [TNF- α 2 ng/mL 联合软脂酸 0.08 mmol/L 组 (0.451 \pm 0.096) μ g/ μ g、TNF- α 2 ng/mL 联合软脂酸 0.2 mmol/L 组 (0.821 \pm 0.257) μ g/ μ g、TNF- α 20 ng/mL 联合软脂酸 0.08 mmol/L 组 (1.032 \pm 0.286) μ g/ μ g、TNF- α 20 ng/mL 联合软脂酸 0.2 mmol/L 组 (2.134 \pm 1.049) μ g/ μ g] 分别较软脂酸组 [软脂酸 0.08 mmol/L 组 (0.247 \pm 0.069) μ g/ μ g、软脂酸 0.2 mmol/L 组 (0.341 \pm 0.031) μ g/ μ g] 显著升高 ($P < 0.05$); ②油红 O 染色进一步显示, TNF- α 促进肝细胞内脂质积聚。③实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测结果显示单纯 TNF- α 组与空白对照组相比, HepG2 细胞 SREBP-1、FAS、ACC α 的表达均增加 ($P < 0.05$); 联合组与软脂酸组相比, 肝细胞内 SREBP-1、FAS、ACC α 的表达水平明显上调 ($P < 0.05$)。结论 TNF- α 促进 HepG2 肝细胞内脂质积聚, 增加 SREBP-1、FAS、ACC α 的表达。

[关键词] TNF- α ; 软脂酸; SREBP-1; HepG2 肝细胞; 脂质积聚

[中图分类号] R322.47; R341.32; R349.15

[文献标志码] A

TNF- α promotes HepG2 hepatocytes lipid accumulation

Chen Shumei, Yang Shumin, Zhang Wenlong, Lyu Qiong, Ye Peng, Gao Rufeif, Mei Mei, Wang Zhihong, Li Qifu (Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on lipid accumulation in HepG2 cells and its underlying possible mechanism. **Methods** HepG2 cells were treated with TNF- α (2 or 20 ng/mL), palmitate (PA, 0.08 or 0.2 mmol/L), and TNF- α plus palmitate (combination of the 2 doses of 2 agents) for 24 h, respectively. The intracellular triglyceride (TG) was measured by enzymatic colorimetric method. Then TNF- α of 20 ng/mL and palmitate of 0.08 mmol/L was chosen for the further experiment. Lipid accumulation in the HepG2 cells was observed with Oil Red O staining. Real-time PCR and Western blot analysis were used to detect the expression of SREBP-1, FAS and ACC α at mRNA and protein levels. **Results** TG level was significantly higher in TNF- α treated cells (0.344 \pm 0.093 and 0.329 \pm 0.068 μ g/ μ g for the doses of 2 and 20 ng/mL) than in control cells (0.192 \pm 0.048 μ g/ μ g, $P < 0.05$). And that of the combination treatment cells (TNF- α 2 ng/mL plus PA 0.08 mmol/L: 0.451 \pm 0.096, TNF- α 2 ng/mL plus PA 0.2 mmol/L: 0.821 \pm 0.257, TNF- α 20 ng/mL plus PA 0.08 mmol/L: 1.032 \pm 0.286, TNF- α 20 ng/mL plus PA 0.2 mmol/L: 2.134 \pm 1.049 μ g/ μ g) was significant higher than the cells treated by PA alone (PA 0.08 mmol/L: 0.247 \pm 0.069, PA 0.2 mmol/L: 0.341 \pm 0.031 μ g/ μ g, all $P < 0.05$). Oil red O staining also showed that TNF- α promoted lipid accumulation in HepG2 cells. The expression of SREBP-1, FAS and ACC α at mRNA and protein levels was significantly higher in TNF- α treatment and the TNF- α plus PA

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170751); 国家临床重点专科建设项目(2011)

[通信作者] 李启富, E-mail: liqifu@yeah.net

汪志红, E-mail: towzh713@126.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130325.0917.004.html>(2013-03-25)

treatment cells than in control cells ($P < 0.05$). **Conclusion** TNF- α promotes lipid accumulation, and enhances the expression of SREBP-1, FAS and ACC α in HepG2 hepatocytes.

[Key words] TNF- α ; palmitate; SREBP-1; HepG2 hepatocytes; lipid accumulation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81170751) and the Foundation of National Clinical Key-discipline Construction (2011). Corresponding author: Li Qifu, E-mail: liqifu@yeah.net; Wang Zhihong, E-mail: towzh713@126.com

近年来,非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)在全球范围内呈现流行趋势。作为一组慢性肝脏疾病,NAFLD不仅包括单纯性脂肪性肝病以及由其演变的脂肪性肝炎、肝硬化,同时也是代谢综合征的重要组成部分,与肥胖、胰岛素抵抗、2型糖尿病等密切相关,严重威胁人类健康^[1-2]。然而,NFALD的发病机制至今尚不完全清楚,研究显示多种致病因素参与其发生、发展,而脂代谢异常被认为是各因素导致NAFLD的基本病理生理基础^[3]。固醇调节元件结合蛋白-1(sterol regulatory element-binding protein1, SREBP-1)是调节肝脏甘油三酯合成的重要转录因子,可以激活一系列参与脂质生成的关键基因,如脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)、乙酰CoA羧化酶 α (acetyl coenzyme A carboxylase α , ACC α),形成SREBP-1-FAS/ACC α 通路^[4]。该信号通路转导异常所引起的肝脏脂代谢紊乱是NAFLD发生、发展的重要环节^[5]。另外,炎症也与NAFLD密切相关^[6]。传统“二次打击”学说认为,炎症在NAFLD由单纯性脂肪性肝病进展为脂肪性肝炎的过程中起着重要作用^[7],现目前的研究也多关注炎症对NAFLD进展后期的影响,而炎症是否诱导或促进了NAFLD发病,尚不明确。因此本研究利用HepG2人肝癌细胞模型,观察炎症因子TNF- α 是否能够引起肝细胞脂质合成代谢紊乱,促进肝细胞脂质沉积,并对其可能的机制进行初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 材 料

改良型RPMI1640培养基、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素(HyClone);胎牛血清(Gibco);软脂酸、牛血清白蛋白、油红O(Sigma);重组人肿瘤坏死因子- α (欣百诺生物);甘油三酯(triglyceride, TG)检测试剂盒(浙江东瓯诊断产品有限公司);Lowry法蛋白浓度测定试剂盒(上海生工生物工程公司);Trizol RNA提取剂、PrimeScript RT reagent kit和SYBR Premix Ex TaqTM II(大连宝生物工程有限公司);细胞总蛋白提取试剂盒(凯基生物);BCA法蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);PCR引物通过TaqMan Primer Express软件设计,上海生工生物工程公司合成; β -actin兔多抗IgG、SREBP-1兔多抗IgG、FAS兔多抗IgG、ACC α 兔多抗IgG(Santa Cruz)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 HepG2人肝癌细胞系(上海中科院细胞库)用含10%胎牛血清的改良型RPMI1640培养基置于37 $^{\circ}$ C、

5% CO₂的孵箱环境中培养,每1~2天换液,待汇合度达90%~95%时传代。

1.2.2 实验分组 进行所有实验之前,均将HepG2细胞置于含0.2%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的无血清RPMI1640培养基中培养12 h,再用不同浓度的TNF- α (2、20 ng/mL)和软脂酸(0.08、0.2 mmol/L)分别或联合处理细胞,分为9组:(1)空白对照组:无血清RPMI1640+0.2% BSA;(2)单纯TNF- α 组:①TNF- α 2 ng/mL组:无血清RPMI1640+0.2% BSA+2 ng/mL TNF- α ;②TNF- α 20 ng/mL组:无血清RPMI1640+0.2% BSA+20 ng/mL TNF- α ;(3)软脂酸组:①软脂酸0.08 mmol/L组:无血清RPMI1640+0.2% BSA+0.08 mmol/L软脂酸;②软脂酸0.2 mmol/L组:无血清RPMI1640+0.2% BSA+0.2 mmol/L软脂酸;(4)联合组:①TNF- α 2 ng/mL联合软脂酸0.08 mmol/L组:无血清RPMI1640+0.2% BSA+2 ng/mL TNF- α +0.08 mmol/L软脂酸;②TNF- α 2 ng/mL联合软脂酸0.2 mmol/L组:无血清RPMI1640+0.2% BSA+2 ng/mL TNF- α +0.2 mmol/L软脂酸;③TNF- α 20 ng/mL联合软脂酸0.08 mmol/L组:无血清RPMI1640+0.2% BSA+20 ng/mL TNF- α +0.08 mmol/L软脂酸;④TNF- α 20 ng/mL联合软脂酸0.2 mmol/L组:无血清RPMI1640+0.2% BSA+20 ng/mL TNF- α +0.2 mmol/L软脂酸。各组细胞培养24 h后进行TG定量。

1.2.3 细胞内TG积聚水平检测 收集6孔板内细胞样本,加入正己烷、异丙醇混合抽提剂(2:3:5)。超声破碎后离心,取上清真空干燥,用化学酶促-比色法定量检测细胞内TG含量;余下沉淀溶于40 g/L NaOH溶液,24 h后用Lowry法测定细胞蛋白含量,计算各组TG与总蛋白比值,用于标化细胞内TG含量。根据TG定量的结果进一步选取TNF- α 20 ng/mL和软脂酸0.08 mmol/L进行后续实验。

1.2.4 油红O染色 在12孔板中放置玻片后种入HepG2细胞,培养、处理后进行油红O染色:将孔板中细胞用PBS清洗2次,10%中性甲醛固定30 min;PBS洗2次,异丙醇孵育2 min后吸净、晾干,油红O染色30 min;PBS洗2次,苏木精复染2 min,洗净、封片后于显微镜下观察染色情况。

1.2.5 总RNA的提取以及实时荧光定量PCR检测SREBP-1、FAS、ACC α mRNA的表达 Trizol法提取各组细胞总RNA,以1 μ g总RNA作为模板,按照逆转录试剂盒说明书进行两步法反转录反应,条件为:第1步42 $^{\circ}$ C 2 min;第2步37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s。实时荧光定量PCR以GAPDH作为内参,检测SREBP-1、FAS、ACC α mRNA的表达,扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s预变性;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40个循环。反应结束后,根据Ct值计算目的基因的相对表达量: Δ Ct = Ct_{目的} - Ct_{GAPDH}; $\Delta\Delta$ Ct = 处理组 Δ Ct - 对照组 Δ Ct;处理组目的基因的mRNA表达即为对照组的 $2^{-\Delta\Delta$ Ct}倍。引物序列见表1。

表1 各基因荧光定量PCR引物序列

基因	引物序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
GAPDH	ACCCACTGCTGCACCTTTGAC	110
	TCCACCACCCTGTGCTGTAG	
SREBP-1	CGCAAGGCCATCGACTACAT	70
	GACTTAGGTTCTCTGCTTGAGTTTC	
FAS	GCCGCCATCTACAACATC	119
	GTCCTCCACACTATGCTCAG	
ACC α	GGATCCGGCGCCTTACTT	73
	CTCCGATCCACCTCATAGTTGAC	

1.2.6 Western blot 检测 SREBP-1、FAS、ACC α 蛋白的表达

按试剂盒操作说明书提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,上样 40~60 μ g,进行 SDS-PAGE。待总蛋白分离后,再电转至 PVDF 膜,5% BSA 封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日将膜取出复温,TBST 清洗 3 次,每次 10 min;二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,TBST 清洗 3 次,每次 10 min,最后 ECL 光化学法显色,应用 Quantity One 软件进行分析。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度 TNF- α 和软脂酸对 HepG2 细胞 TG 含量的影响

与空白对照组比较,单纯 TNF- α 组(2、20 ng/mL)肝细胞内脂质积聚增加($P < 0.05$);同时,各联合组与相对应的软脂酸组相比,细胞内 TG 含量均显著增加($P < 0.05$),且 TNF- α 的作用随浓度增大而更为明显;另外,0.2 mmol/L 软脂酸处理也使胞内 TG 含量轻度增加,而 0.08 mmol/L 软脂酸对 HepG2 细胞内的 TG 水平没有明显影响($P > 0.05$,表 2)。由于本实验重点关注炎症对肝细胞脂质积聚的影响,而软脂酸仅作为在体外给细胞提供的 1 个脂质来源,因此我们选择 TNF- α 20 ng/mL 和软脂酸 0.08 mmol/L 进行后续实验。

表2 各组 HepG2 肝细胞 TG 含量的比较(μ g/ μ g, $n=6, \bar{x} \pm s$)

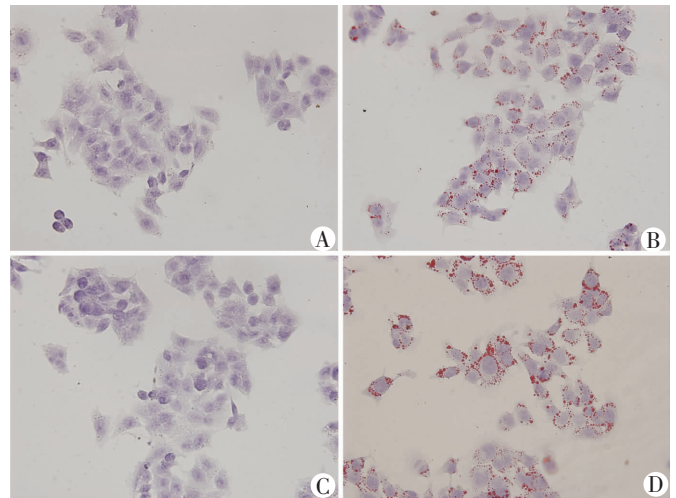
组别	TG 含量
空白对照组	0.192 \pm 0.048
TNF- α 2 ng/mL 组	0.344 \pm 0.093 ^a
TNF- α 20 ng/mL 组	0.329 \pm 0.068 ^a
软脂酸 0.08 mmol/L 组	0.247 \pm 0.069
软脂酸 0.2 mmol/L 组	0.341 \pm 0.031 ^a
TNF- α 2 ng/mL 联合软脂酸 0.08 mmol/L 组	0.451 \pm 0.096 ^b
TNF- α 2 ng/mL 联合软脂酸 0.2 mmol/L 组	0.821 \pm 0.257 ^c
TNF- α 20 ng/mL 联合软脂酸 0.08 mmol/L 组	1.032 \pm 0.286 ^b
TNF- α 20 ng/mL 联合软脂酸 0.2 mmol/L 组	2.134 \pm 1.049 ^c

a: $P < 0.05$,与空白对照组比较;b: $P < 0.05$,与软脂酸 0.08 mmol/L 组比较;c: $P < 0.05$,与软脂酸 0.2 mmol/L 组比较

2.2 油红 O 染色检测 HepG2 细胞内脂质积聚情况

采用油红 O 染色观察各组细胞内 TG 积聚情况,其结果与

TG 定量的结果相一致:镜下观察空白对照组未见明显红染脂滴;单纯 TNF- α 处理使得细胞内红染明显增加;而 TNF- α 联合软脂酸处理 HepG2 细胞后,胞内脂质集聚最为明显,较软脂酸组有明显增加(图 1)。

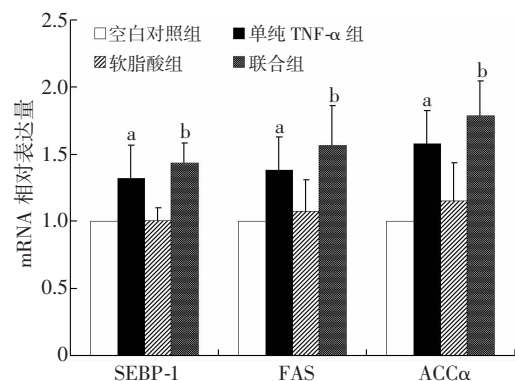


A:空白对照组;B:TNF- α 组;C:软脂酸组;D:联合组

图1 不同处理组 HepG2 细胞的脂质积聚情况 (油红 O $\times 400$)

2.3 TNF- α 对 HepG2 细胞 SREBP-1、FAS、ACC α mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR 检测结果显示,与空白对照组相比,单纯 TNF- α 组 HepG2 细胞 SREBP-1、FAS、ACC α mRNA 的表达均增加($P < 0.01$);当 TNF- α 联合脂肪酸进行干预时,SREBP-1、FAS、ACC α mRNA 的表达较软脂酸组明显增加($P < 0.01$,图 2)。



a: $P < 0.01$,与空白对照组比较;b: $P < 0.01$,与软脂酸组比较

图2 实时荧光定量 PCR 检测各组 HepG2 细胞 SREBP-1、FAS、ACC α mRNA 的表达($n=9$)

2.4 TNF- α 对 HepG2 细胞 SREBP-1、FAS、ACC α 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,与空白对照组相比,单纯 TNF- α 组 SREBP-1、FAS、ACC α 的蛋白表达分别上调 1.92 倍、1.90 倍和 1.87 倍($P < 0.05, P < 0.01$);与软脂酸组相比,联合组各指标蛋白表达上调的程度更为明显,分别为 3.54 倍、3.47 倍和 3.42 倍($P < 0.01$,图 3)。

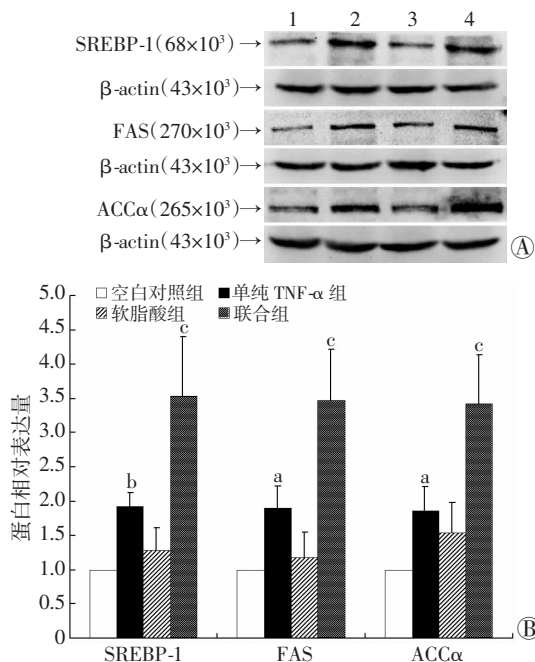


图3 Western blot 检测各组 HepG2 细胞 SREBP-1、FAS、ACC α 蛋白的表达

3 讨论

随着 NAFLD 发病率的不断地攀升,人们对其危害性的认识也逐渐增加,如何对其进行有效的防治,已成为相关领域研究者共同关注的热点问题。尽管 NAFLD 发病的确切机制还不清楚,但传统的“二次打击”学说为我们提供了 1 个理论框架^[7]。第 1 次打击主要是指良性的肝细胞内脂质沉积;第 2 次打击则包括肝细胞或活化的中性粒细胞释放炎症因子加重第 1 次打击所引起的肝组织损伤。基于上述理论,炎症被认为是 NAFLD 由单纯性脂肪性肝病进展为脂肪性肝炎的关键。另外,流行病学研究表明,肥胖患者发生 NAFLD 的概率明显增加^[1]。而众所周知,肥胖时机体处于一种慢性低度炎症状态^[8]。因此,炎症有可能在 NAFLD 发病前或者良性脂质沉积阶段就影响到了疾病的发生、发展。相较于现目前研究多集中于炎症在第 2 次打击中所起的作用^[9-11],本实验更关注炎症是否会诱导和促进 NAFLD 发病。在这一实验过程中,由于主要研究目的是观察炎症的作用,因此未使用高浓度软脂酸而是选择低浓度软脂酸,从而在体外给细胞提供一种脂质来源。HepG2 细胞是人源肝癌细胞株,具有与正常肝细胞相似的生物合成能力,是目前国际上公认的研究肝脏脂代谢的良好细胞模型^[12]。本研究观察到,与空白对照组相比,单纯 TNF- α 处理使肝

细胞内出现较为明显的脂质积聚;而当 TNF- α 联合低浓度软脂酸时,肝细胞内脂质积聚较软脂酸组明显增加。上述观察结果提示,TNF- α 能够促进肝细胞内脂质沉积。

SREBPs 是调控脂质合成的重要转录因子家族,包括 SREBP-1a、SREBP-1c、SREBP-2 3 个成员。SREBP-2 主要参与胆固醇合成;SREBP-1 主要参与脂肪酸和甘油三酯的合成,能够激活脂肪酸从头合成途径中的关键酶 FAS、ACC α 的表达;SREBP-1a 和 SREBP-1c 的区别在于,前者存在于机体的大部分组织,而后者主要分布于肝脏^[13]。既往研究显示,NAFLD 患者肝脏中 SREBP-1、FAS、ACC α 的表达是增加的,提示脂肪酸合成增多参与了肝脏脂质的沉积^[14-15]。我们课题组在先前的体内研究中观察到,慢性低度炎症能够使正常饮食喂养的 C57BL/6J 小鼠出现肝脏脂质沉积,同时上调肝脏中 SREBP-1、FAS、ACC α 的表达,而当炎症联合高脂喂养时,上述改变表现得更为明显^[16]。相较于之前的体内实验,本研究则是在体外这个影响因素更为单纯的条件下探讨炎症对肝细胞脂质积聚的影响。我们在 mRNA 和蛋白水平观察到,单纯 TNF- α 处理使 HepG2 细胞 SREBP-1、FAS、ACC α 的表达较空白对照组上调;当 TNF- α 联合低浓度软脂酸时,SREBP-1、FAS、ACC α 的表达较软脂酸组明显增加。因此,结果提示 TNF- α 可能通过干扰脂质合成途径促进肝细胞脂质积聚。

综上所述,本研究从体外水平观察到单纯 TNF- α 处理能够增加肝细胞内脂质积聚,上调 SREBP-1、FAS、ACC α mRNA 和蛋白的表达;而当 TNF- α 联合低浓度软脂酸时,则能明显加重肝细胞脂质积聚,且伴随 SREBP-1、FAS、ACC α 表达的明显上调。因此,本研究结果提示,炎症可能在肝细胞脂质沉积的过程中起着诱导和促进的作用,且这种作用有可能是通过干扰 SREBP-1-FAS/ACC α 途径来实现的。进一步的研究可通过基因敲除、过表达来证实本实验的猜想,以期 NAFLD 的早期防治提供新思路、新线索。

参考文献:

- [1] Moore J B. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome[J]. Proc Nutr Soc, 2010, 69 (2): 211 - 220.
- [2] Khashab M A, Liangpunsakul S, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease as a component of the metabolic syndrome[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2008, 10(1): 73 - 80.
- [3] Bakan I, Laplante M. Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation[J]. Curr Opin Lipidol, 2012, 23(3): 226 - 234.
- [4] Hagen R M, Rodriguez-Cuenca S, Vidal-Puig A. An allostatic control of membrane lipid composition by SREBP1[J]. FEBS Lett, 2010, 584

(12): 2689 - 2698.
[5] Chen X, Zhang C, Zhao M, *et al.* Melatonin alleviates lipopolysaccharide-induced hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in mice[J]. *J Pineal Res*, 2011, 51(4): 416 - 425.
[6] Tilg H, Moschen A R. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, 19(10): 371 - 379.
[7] Day C P, James O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842 - 845.
[8] Chiang S H, Bazuine M, Lumeng C N, *et al.* The protein kinase IKKepsilon regulates energy balance in obese mice[J]. *Cell*, 2009, 138(5): 961 - 975.
[9] Tosello-Trampont A C, Landes S G, Nguyen V, *et al.* Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- α production[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(48): 40161 - 40172.
[10] Kita Y, Takamura T, Misu H, *et al.* Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e43056.
[11] Miura K, Yang L, van-Rooijen N, *et al.* Toll-like receptor 2 and pal-

mitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice[J]. *Hepatology*, 2013, 57(2): 577 - 589.
[12] Babich H, Sardana M K, Borenfreund E. Acute cytotoxicities of polynuclear aromatic hydrocarbons determined *in vitro* with the human liver tumor cell line, HepG2[J]. *Cell Biol Toxicol*, 1988, 4(3): 295 - 309.
[13] Horton J D, Bashmakov Y, Shimomura I, *et al.* Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and re-fed mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(11): 5987 - 5992.
[14] Higuchi N, Kato M, Shundo Y, *et al.* Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepato Res*, 2008, 38(11): 1122 - 1129.
[15] Kohjima M, Higuchi N, Kato M, *et al.* SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(4): 507 - 511.
[16] Mei M, Zhao L, Li Q, *et al.* Inflammatory stress exacerbates ectopic lipid deposition in C57BL/6J mice[J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 110.

(收稿:2012-12-13;修回:2013-03-13)

(编辑 栾 嘉)

(上接 1087 页)

2 讨论

本例患者主要表现为视神经和脊髓受损,结合中枢神经系统 MRI 表现,符合以下 NMO 确诊标准,包括视神经炎、脊髓炎和 3 个支持性诊断标准中的至少 2 个: ≥ 3 个节段的连续脊髓损害 MRI 证据、发病时的脑部 MRI 不能诊断多发性硬化或血清 NMO-IgG 阳性^[2]。血清 NMO-IgG 阳性或 aquaporin-4 抗体阳性增加了诊断的特异性,特别是没有纵向脊髓损害且 MRI 不符合多发性硬化影像特征的患者和有纵向脊髓损害但脑部病灶类似于多发性硬化的患者。该患者有视神经炎和脊髓炎, MRI 提示脊髓损害 ≥ 3 个连续脊髓节段,脑部 MRI 无多发性硬化表现,诊断符合 NMO 确诊标准。使用激素治疗 NMO 同时未行有效抗结核治疗将导致结核播散的严重后果。结核性脑膜炎的确诊需脑脊液培养出结核菌,但阳性率低,且培养需大量脑脊液和数周时间,故对临床意义较小;用 PCR 检测脑脊液中分枝杆菌的 DNA 片段,是目前诊断结核性脑膜炎最快的方法,其缺点是容易出现假阳性,脑脊液腺苷脱氨酶(ADA)增高有助于结核性脑膜炎诊断,但 ADA 指标的特异性较低^[3]。Thwaites 等^[4]回顾了目前结核性脑膜炎的诊断和治疗进展的相关文献,发现改良的抗酸染色实验、干扰素- γ 释放实验及结核分枝杆菌抗原检测实验作为新的诊断结核性脑膜炎的实验均表现了良好的前景,但仍需进一步研究,目前尚缺乏有效的确诊结核性脑膜炎的实验室检查。结核性脑膜炎的诊断仍以临床特征结合脑脊液特点诊断为主。根据有结核病或接触史,亚急性起病,慢性迁延病程,有脑膜刺激征,腰穿压力增高,脑脊液淋巴细胞增多等特征性改变,可考虑结核性脑膜炎的临床诊断。该患者有亚急性起病,病程中有午后低热等结核中毒症状,脑膜刺激征,脑脊液有核细胞计数、蛋白升高,支持颅内感染,结合脑脊液特点及肺部 CT 提示活动性肺结核,故支持结核性脑膜

炎的诊断。结核性脑膜炎需与其他病原体所致颅内感染鉴别。化脓性脑膜炎、病毒性脑膜炎多为急性起病,无明显结核中毒症状,化脓性脑膜炎的脑脊液白细胞多大于 $1\ 000 \times 10^6/L$ 。新型隐球菌性脑膜炎患者常有慢性消耗性疾病或免疫缺陷疾病,隐匿起病,与结核性脑膜炎类似,有剧烈头痛、视力下降,但无结核中毒症状,脑脊液墨汁染色可检出隐球菌。结合患者病史及脑脊液检查特点可除外化脓性脑膜炎、病毒性脑膜炎及隐球菌性脑膜炎。该患者脊髓病灶需与结核瘤鉴别,结核性肉芽肿和结核瘤是脊髓结核的后期改变,髓内结核均是以结核瘤形式出现^[5],其 MRI 表现为水肿的脊髓内见高信号环形结节,核心部为等信号,环壁厚薄均匀, T₁WI 上为等信号,不易显示;增强扫描示环壁强化,水肿区及核心部干酪坏死区信号不强化,形成“靶征”,对髓内结核瘤的诊断具有特征性意义。根据影像学特点可排除髓内病变为脊髓内结核。

NMO 与结核性脑脊膜炎均属神经系统疾病,两病共存时,常规一元论无法解释患者临床表现,给诊断带来困难,临床医师应把握诊断及鉴别诊断要点,避免误诊及漏诊。

参考文献:

[1] Cloys D, Netsky M. Neuromyelitis optica[M]//Handbook of clinical neurology. 9th ed. Viken P J, Bruyn G W. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1970:426 - 436.
[2] Wingerchuk D M, Lennon V A, Pittock S J, *et al.* Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica[J]. *Neurology*, 2006, 66(10):1485 - 1489.
[3] 吴江. 神经病学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2012: 204 - 205.
[4] Thwaites G E. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculous meningitis[J]. *Curr Opin Neurol*, 2013, 26(3):295 - 300.
[5] 刘占标, 刘英祥, 宋铁雄. MRI 诊断脊髓结核一例[J]. *放射学实践*, 2004, 19(5): 350.

(收稿:2013-02-21;修回:2013-05-03)

(编辑 王小寒)