

高脂饮食大鼠脂肪肝血清抵抗素的变化及多烯磷脂酰胆碱的干预作用

车财妍 李红山

摘要 **目的** 研究血清抵抗素在实验性脂肪肝中的变化及多烯磷脂酰胆碱的干预作用。**方法** 采用单纯高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝模型,随机分正常组、模型组和多烯磷脂酰胆碱组,造模 12 周,其多烯磷脂酰胆碱组在第 8 周起予以多烯磷脂酰胆碱灌胃干预 5 周。观察项目:肝组织 HE 染色,观察各组肝脂肪变性程度变化;肝组织甘油三酯(triglyceride, TG)、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)、血清抵抗素含量;肝组织 TG、FFA、血清抵抗素含量间的相关性分析。**结果** 模型组肝组织出现严重的脂肪变性,肝组织 TG、FFA 含量均显著升高(t 值分别为 14.85 和 19.61, $P < 0.01$);血清抵抗素含量亦显著升高($t = 12.94$, $P < 0.01$);多烯磷脂酰胆碱组的 TG、FFA 含量显著低于模型组($P < 0.01$),血清抵抗素含量亦显著低于模型组($P < 0.01$)。肝脏 TG、FFA 含量与血清抵抗素含量之间均呈正相关。**结论** 实验性脂肪肝大鼠的血清抵抗素水平显著升高,在脂肪肝病病理机制中有重要意义。多烯磷脂酰胆碱可显著降低脂肪肝大鼠的血清抵抗素水平,这可能是其防治脂肪肝作用的重要药理环节。

关键词 血清抵抗素 脂肪肝 多烯磷脂酰胆碱

中图分类号 R57

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.11.031

Changes of Serum Resistin on Fatty Liver Disease in Rats Induced with High-fat Diet and the Polyene Phosphatidylcholine Intervention.

Che Caiyan, Li Hongshan. Department of Liver Disease, Ningbo Number 2 Hospital, Zhejiang 315010, China

Abstract **Objective** To investigate the changes of the serum resistin in experimental fatty liver and the effect of Polyene phosphatidylcholine on fatty liver disease. **Methods** Fatty liver in SD male rats were induced with high-fat diet for 12 weeks. Rats were divided into normal, model and Polyene phosphatidylcholine group and administrated with Polyene phosphatidylcholine for five weeks at the beginning of the eighth week. The observing items including: Hepatic steatosis (HE staining); The serum resistin, hepatic triglyceride (TG) and free fatty acid (FFA); The correlation analysis among serum resistin, hepatic TG and FFA. **Results** Serious hepatic steatosis, increased hepatic TG and FFA were all observed in the model group ($P < 0.01$), as well as the increased serum resistin content ($P < 0.01$). Compared with model group, the triglyceride and free fatty acid content in liver tissue of polyene phosphatidylcholine group was reduced significantly ($P < 0.01$), and the serum resistin content in liver tissue of polyene phosphatidylcholine group was reduced significantly too ($P < 0.01$). Significant positive correlation was observed between hepatic TG, FFA and serum resistin. **Conclusion** Serum resistin significantly increased in experimental fatty liver in rats which probably plays very important roles in pathological mechanisms of fatty liver disease. Polyene phosphatidylcholine can decrease the serum resistin markedly, which probably is the key mechanism of its prevention and treatment effect on fatty liver disease.

Key words Serum resistin; Experimental fatty liver; Polyene phosphatidylcholine

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外过量饮酒和其他明确的损肝因素所致的肝细胞内脂质沉积^[1]。抵抗素是一种新近发现的重要脂肪细胞因子,其表达失衡可能在 NAFLD 的发生、发展中起着重要作用^[2]。本研究运用高脂饮食大鼠脂肪肝模型并以多烯磷脂酰胆碱干

预,观察血清抵抗素含量变化同时,分析其变化与肝组织甘油三酯(triglyceride, TG)、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)含量的关系,结合多烯磷脂酰胆碱干预效应以阐述抵抗素在实验性脂肪肝病病理机制中的意义。

材料与方法

1. 实验动物:SD 雄性大鼠 24 只,体重 150 ~ 180g,清洁级购自浙江省实验动物中心。宁波大学实验动物中心清洁级动物房饲养、造模与观察,自由饮水。实验动物批号:soxklfob20080033。

基金项目:宁波市自然科学基金资助项目(2012A610243)

作者单位:315010 宁波市第二医院肝病科

通讯作者:李红山,电子信箱:lihongshan_1982@126.com

2. 试剂和药物: 游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 试剂盒购自上海基免生物科技公司, 批号: DRY1198-201306; 甘油三酯 (triglyceride, TG) 试剂盒购自北京北化康泰临床试剂有限公司, 批号: 006304; 大鼠血清抵抗素 ELISA 检测试剂盒购自上海基免生物科技公司。批号: DRY6488-201307。多烯磷脂酰胆碱购自北京安万特制药有限公司, 配成浓度为 22.8mg/ml 的悬浊液备用。

3. 模型制备方法: 采用单纯高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝模型^[3]: 饲以大鼠高脂饲料 (88% 普通饲料 + 2% 胆固醇 + 10% 猪油), 共 12 周。饲料购自上海斯莱克实验动物有限公司。

4. 动物分组和给药: SD 雄性大鼠 24 只, 体重 150~180g, 随机取 8 只大鼠作为正常组, 另 16 只予高脂饲料。16 只大鼠造模 8 周开始, 随机分为模型组和多烯磷脂酰胆碱组各 8 只。多烯磷脂酰胆碱组灌胃给药 1ml/100g 鼠重, 模型组灌以相应容积的饮用水, 持续 5 周。

5. 观察项目和方法: 在造模和用药周期完成后, 用 2% 戊巴比妥钠 3ml/kg 腹腔注射麻醉, 打开腹腔。经下腔静脉采血, 离心后吸取血清, -70℃ 低温保存。

在同一肝叶和位置切取小块组织, 置入 10% 中性甲醛缓冲液中固定, 另定位取肝组织分装于离心管中低温保存。分别观测: ①肝组织 TG 含量, 生化试剂盒检测; ②肝组织常规 HE 染色, 并依据非酒精性脂肪性肝病诊疗指南, 光镜下判定各个样本的肝脂肪变性程度 ($F_0 \sim F_4$)^[4]; ③肝组织 FFA 含量、血清抵抗素含量, 试剂盒 ELISA 法检测。

6. 统计学方法: 所有数据均使用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示。组间比较采用单因素方差分析 LSD-*t* 检验 (最小显著差 *t* 检验)。等级资料用 Ridit 分析。相关分析采用 Bivariate 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠肝组织病理的变化: 实验结果显示, 模型组大鼠肝细胞存在大量的脂肪沉积, 表现为密集的小泡状脂肪变性, 有散在的点状坏死及轻度炎性细胞浸润, 多烯磷脂酰胆碱组的上述表现明显减轻 (图 1)。Ridit 分析结果显示, 模型组脂肪变性程度较正常组显著升高 ($t = 9.47, P < 0.01$), 多烯磷脂酰胆碱组脂肪变性程度较模型组显著降低 ($t = 3.27, P < 0.01$), 详见表 1。

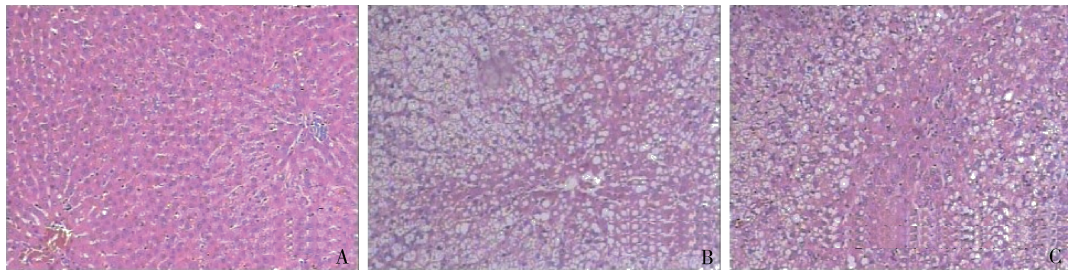


图 1 各组大鼠肝组织脂肪变性 (HE, ×100)
A. 正常组; B. 模型组; C. 多烯磷脂酰胆碱性

表 1 高脂饮食模型实验各组肝组织脂肪变性程度比较

组别	脂肪变性程度分级					合计
	F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	
正常组	8	0	0	0	0	8
模型组	0	0	0	4	4	8
多烯磷脂酰胆碱组	0	0	4	3	1	8
合计	8	0	4	7	5	24
Ridit 值	0.167	0.0	0.417	0.646	0.896	

2. 各组大鼠肝组织 TG、FFA 含量的变化: 模型大鼠肝组织 TG 和 FFA 含量大幅度升高 (其均值分别达正常组的 3.65 倍和 4.82 倍, 较之正常组 *t* 值分别为 14.85 和 19.61, P 均 < 0.01), 多烯磷脂酰胆碱组的肝组织 TG 和 FFA 含量显著低于模型组 (*t* 值分别为

3.27 和 6.18, P 均 < 0.01), 详见表 2。

3. 各组大鼠血清抵抗素含量的变化: 模型大鼠血清抵抗素含量明显升高 ($t = 12.94, P < 0.01$), 多烯磷脂酰胆碱组的血清抵抗素含量显著低于模型组 ($t = 7.67, P < 0.01$, 表 3)。

表 2 各组大鼠肝组织 TG、FFA 含量的变化			
组别	n	肝组织 TG (mg/g)	肝组织 FFA (umol/g)
正常组	8	25.77 ± 3.96 *	4.24 ± 0.24 *
模型组	8	94.05 ± 6.18	20.44 ± 1.94
多烯磷脂酰胆碱组	8	79.02 ± 10.29 *	15.34 ± 1.27 *

与模型组相比较, * P < 0.01

表 3 各组大鼠肝组织 TG、FFA 含量的变化		
组别	n	血清抵抗素 (mg/g)
正常组	8	9.84 ± 2.50 *
模型组	8	26.24 ± 2.84
多烯磷脂酰胆碱组	8	16.51 ± 2.19 *

与模型组相比较, * P < 0.01

4. 肝组织 TG、FFA 含量与血清抵抗素含量相关性分析:肝组织 TG 与 FFA 含量呈显著正相关($P=0.000$);肝组织 TG、FFA 含量均与血清抵抗素含量呈显著正相关($P=0.000$,表 4)。

表 4 肝组织 TG、FFA 含量与血清抵抗素含量相关性分析			
	肝组织 FFA	肝组织 TG	血清抵抗素
肝组织 FFA	1	0.928 * (0.000)	0.839 * (0.000)
肝组织 TG		1	0.837 * (0.000)
血清抵抗素			1

* 相关性在 0.01 水平具有显著性(双尾);括号内数值为 P 值, 括号上方数值为 r 值

讨 论

抵抗素是由脂肪细胞所分泌的一种富含半胱氨酸的肽类激素,具有抵抗胰岛素、增加肝糖原产生的作用,其主要整合器官在肝脏。其含量的增加可导致肝脏的糖脂代谢失衡,降低周围脂肪组织对胰岛素的敏感度并促进炎症细胞因子的产生,在脂肪肝的发生、发展中起着重要作用^[2,5]。因此,近年来关于抵抗素与慢性肝病的关系尤其是和脂肪性肝病的关系研究成为肝病领域研究的热点,有研究表明,其可以通过核因子 NF-κB 途径诱导肝细胞产生肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 等炎症细胞因子,加重肝组织的炎症反应,促进非酒精性脂肪性肝病发生和发展^[6]。

非酒精性脂肪性肝病是一种与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和遗传易感性密切相关的代谢应激性肝损伤,包括从单纯的肝脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎以致一部分最终发展为肝硬化,甚至演变为肝细胞癌^[1,7]。随着人们生活水平的提高和生活方

式的改变,脂肪肝的发生率呈逐年上升趋势,已成为危害我国人民群众身体健康的第 2 大肝病。然而,目前尚缺乏有效的治疗手段,因此,围绕 NAFLD 的发生和发展机制,探讨其可能的治疗靶点具有重要意义。本研究发现,模型组大鼠血清抵抗素含量显著高于正常组水平,同时相关分析结果显示,血清抵抗素含量与肝组织 TG、FFA 含量均呈显著正相关。充分证实高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝模型存在高抵抗素血症这一病理机制,并与肝脏脂质沉积程度和 FFA 含量密切关联,这一实验结果对血清抵抗素在脂肪肝病理机制中的重要意义提供了重要的证据。

多烯磷脂酰胆碱是由大豆中提取的磷脂精制而成,是临床上常用的护肝药物,对脂肪肝具有良好的治疗作用^[8]。本研究发现,多烯磷脂酰胆碱能改善脂肪肝大鼠肝脏脂肪变性程度,对模型组大鼠显著升高的肝组织 TG 和 FFA 含量,均有明显的降低作用,亦能显著降低模型组大鼠显著升高的血清抵抗素含量,再次证实多烯磷脂酰胆碱具有良好的防治实验性脂肪肝的作用,与既往研究结果一致^[9]。更重要的是,通过药物干预降低血清抵抗素含量,进而降低 FFA 和肝脏脂肪含量的结果,从而进一步证实了抵抗素在脂肪肝病理机制中的重要意义。

参考文献

- 中华医学会内分泌学分会肝病与代谢学组. 非酒精性脂肪性肝病与相关代谢紊乱诊疗共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2010, 26 (7): 531-534
- 聂颖, 聂菲, 古赛. 抵抗素在非酒精性脂肪性肝病中的作用[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(2): 233-234
- 李红山, 朱德东, 郑南红, 等. 基于均匀设计的防治非酒精性脂肪肝中药有效组分复方研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(10): 2497-2500
- 中华医学会肝病学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[J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3): 163-166
- 霍晴, 古赛. 脂联素、抵抗素和 Apelin 在脂肪变肝细胞中的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(3): 366-370
- 祁明美, 管小琴, 朱良荣, 等. 抵抗素对脂肪变性肝细胞核因子-κB 和肿瘤坏死因子 α 表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2012, 20 (1): 40-44
- Nur A. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(44): 16452-16463
- 谢双林. 多烯磷脂酰胆碱联合维生素 E 治疗非酒精性脂肪肝的疗效及安全性评价[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(9): 712-714
- 陈潇迪, 熊全, 张露云, 等. 多烯磷脂酰胆碱对大鼠非酒精性脂肪性肝病的防治作用观察[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15(6): 548-550

(收稿日期: 2016-02-24)
(修回日期: 2016-04-17)