

非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏 PPAR- γ 的表达

李晓翠¹ 孙丹莉^{2△} 张予蜀² 张振玉²

(1 南京医科大学 江苏 南京 210029 2 南京医科大学附属南京第一医院 江苏 南京 210006)

摘要 目的 研究 PPAR- γ 在非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)大鼠肝脏组织中的表达,探讨非酒精脂肪性肝病可能的发病机制。方法 雄性 SD 大鼠 30 只,随机分为 A(正常组)15 只普通饮食 B(高脂组)15 只高脂饮食。8 周后,自两组各随机抽取 2 只大鼠处死,光镜观察证实脂肪肝造模成功,继续喂养 4 周后处死所有大鼠,取血清做免疫生化检查,取肝组织标本,分别以光镜观察做出 NAS 评分,免疫组化和 PCR 法检测肝组织 PPAR- γ 蛋白的表达。结果 1.高脂饮食可以成功的复制 NAFLD 的大鼠模型 2.血清 GLU、TC、TG、HDL-C、LDL-C 在高脂组表达量较正常组明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$) 3. 免疫组化显示:高脂组 PPAR- γ 表达量较正常组升高 结论 1.高脂饮食可成功复制 NAFLD 模型 2.PPAR- γ 在 NAFLD 大鼠肝脏成脂性改变中具有重要作用。

关键字 盐酸小檗碱 非酒精性脂肪性肝病 PPAR- γ 免疫组化

中图分类号 Q95-3 R575 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)14-2620-04

Expression of PPAR-Gamma in Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats

LI Xiao-cui¹, SUN Dan-li^{2△}, ZHANG Yu-shu², ZHANG Zhen-yu²

(1 Nan jing medical university nanjing 210029, China;

2 Nanjing first hospital affiliated nanjign medical unversity nanjing 210006, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of PPAR-gamma in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats induced by high-fat feeding, and to investigate the possible mechanism of NAFLD. **Methods:** Thirty male SD rats were divided into two groups: Group A (normal group), fifteen rats were fed with normal diet; Group B (fatty group), fifteen rats were fed with high fat diet; 8 weeks later, two rats randomly selected from each group were sacrificed. Histological pathology showed that the NAFLD was established. All rats were sacrificed four weeks later. Serum was preserved for biochemical assay. Liver tissue were detected under light microscopy after HE staining. Expression of PPAR- γ protein and mRNA in hepatic cell were detected by immunohistochemistry. **Results:** 1. NAFLD model can be successfully replicated by high-fat diet 2. Compared with that in the control group, serum level of HDL-C, LDL-C, TC, TG, Glu of model group increased significantly($P < 0.05$); 3. The expression of PPAR- γ in the fatty group was higher than that in the normal group. **Conclusions:** 1. NAFLD model can be replicated successfully by high-fat diet 2. PPAR-gamma play the aliphatic compound effect in the NAFLD rats.

Key words: Nonalcoholic fatty liver disease; PPAR- γ ; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R575 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2620-04

前言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)以其患病率高、发病低龄化^[1]等特点越来越显示出临床重要性,NAFLD与2型糖尿病、代谢综合症及其相关心脑血管事件密切相关^[2]。但其发病机制尚无定论。有相关报道提示 PPAR- γ 对 NAFLD 的发生和进展具有作用^[3]。但大多数研究侧重于 PPAR- γ 在 NAFLD 炎症及纤维化中的作用,本实验采用高脂肪饲料诱导大鼠 NAFLD,观察其血脂变化及 PPAR- γ 的表达,以探讨其在 NAFLD 早期的表达情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

雄性健康 7 周龄 SD 大鼠 30 只,体重 180-200g,由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供。猪油及蛋黄粉为市售,胆固醇购自上海源聚生物科技有限公司,脱氧胆酸钠购自中国医药集团上海化学试剂公司。兔抗 PPAR- γ 单克隆抗体购自美国 Santa-Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 脂肪肝动物模型的制备 适应性喂养一周后,随机分为两组,正常组 15 只给予普通饲料,高脂组 15 只大鼠予 10%猪油、2%胆固醇、0.5%蛋黄粉、0.2%脱氧胆酸钠、87.2%基础饲料构成的高脂饲料喂养^[4]。定期称体重。饲养大鼠 8 周后,随机自两组中各取 2 只大鼠处死,称量肝湿重,取肝组织制片,常规 HE 染色,100 倍光镜下观察肝组织病理学变化,确认造模组大鼠脂肪肝形成。实验期间,所有大鼠均在清洁级动物实验室饲养,设置室温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,饲养室内 80W 日光灯照明,实行 12h 光/暗循环。

作者简介 李晓翠(1983-)女,硕士研究生,肝硬化与肝纤维化的基础与临床研究 15105169182 E-mail:lx1983117@163.com

△通讯作者 孙丹莉 E-mail: sundanli_nj@126.com

(收稿日期 2011-04-03 接受日期 2011-04-28)

1.2.2 标本采集 高脂组大鼠有 1 只因皮肤感染而剔除。确定造模成功后 继续喂养 4 周 大鼠禁食 8h 后 水合氯醛腹腔麻醉，采集腹腔静脉血液 分离血清 保留后用于检测生化指标。处死后摘取整个肝脏标本 滤纸吸干表面水分后称湿重，分别采取 40g/L 甲醛固定制备石蜡标本。

1.2.3 肝脏组织病理评分 根据 2010 年非酒精性脂肪性肝病诊疗指南^[5]，NAS 计分(0~8)分 (1)细胞脂肪变: 0 分(< 5%); 1 分(5% ~33%); 2 分(34% ~66%); 3 分(> 66%); (2) 小叶内炎症 (20 倍镜计数坏死灶): 0 分,无; 1 分(< 2 个); 2 分(2~4 个); 3 分(>4 个); (3)肝细胞气球样变: 0 分,无; 1 分,少见; 2 分,多见。肝纤维化分期(0~4): 0:无纤维化; 1a:肝腺泡 3 区轻度窦周纤维化; 1b: 肝腺泡 3 区中度窦周纤维化; 1c: 仅有门脉周围纤维化; 2: 腺泡 3 区窦周纤维化合并门脉周围纤维化; 3: 桥接纤维化; 4:高度可疑或确诊肝硬化。在同一名病理科医生指导对所有标本切片做病理评分。

1.2.4 免疫组化法观察肝脏组织 PPAR- γ 蛋白的表达 肝组织石蜡切片常规脱蜡水化 3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶后 正常血清封闭 滴加兔抗大鼠单克隆 PPAR- γ 特异性一抗 4℃过夜 次日滴加偶联二抗 室温 30min 后 DAB 显色 镜下控制显色时间 苏木精复染后封片观察。每组实验标本均设阴性

对照 以 PBS 代替一抗 结果显示阴性。

1.3 统计方法

采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析，所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示 采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 肉眼观察

正常组个体中等 皮毛光泽度好 反应灵敏 高脂组体型肥硕 皮毛光泽度欠佳。解剖后 取出整个肝脏组织 滤纸吸干表面水分 称量肝湿重。见正常组大鼠肝脏色泽鲜红 边缘锐利，质韧 高脂组大鼠肝脏体积增大 色偏黄 边缘钝 有油腻感 质硬 局部纤维组织增生。(如图 1)

2.2 肝脏组织 HE 染色结果

正常组 肝小叶轮廓清晰 由单层肝细胞构成的肝索围绕中央静脉呈放射状排列 肝细胞体积正常 细胞界限清楚 胞浆红染 胞核位于中央 未见炎细胞浸润。高脂组 肝小叶结构破坏 全小叶肝细胞脂肪变性 肝细胞体积增大水肿 胞浆内可见大小不等的脂肪空泡 并伴有一定量的点片状坏死灶 汇管区及小叶内淋巴细胞轻度浸润。(图 2)。而具体评分分布及结果分别见表 1 及表 2。

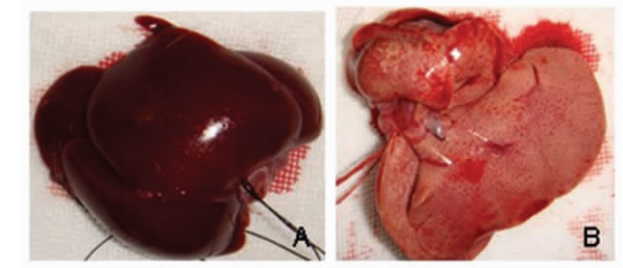
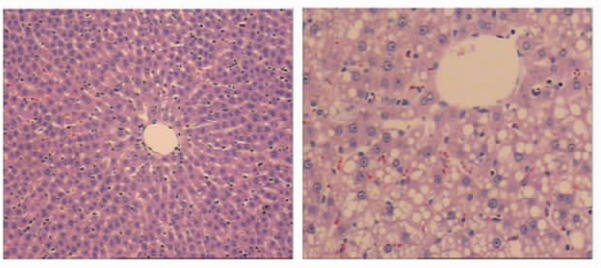


图 1 两组大鼠肝脏大体标本 :A:正常组;B 高脂组
Fig.1 The gross of the two group:A :Normal Group; B Fatty Group



Normal Group($\times 100$) Fatty Group($\times 200$)
图 2 两组大鼠肝脏组织光镜下表现(HE 染色)
Fig.2 The microscopic characteristics of the two group (HE)

表 1 两组大鼠肝脏病理评分分布结果
Table 1 NAS distribution of the two group

Group	N	Fatty Degeneration				Ballooning			Degeneration				Phlogosis of hepatic lobule				Fibrosis
Normal Group	13	0	1	2	3	0	1	2	0	1	2	3	0	1	2	3	4
Fatty Group	12	13	0	0	0	13	0	0	13	0	0	0	13	0	0	0	0
		0	0	0	12	0	5	7	0	4	5	3	12	0	0	0	0

表 2 各组大鼠肝脏病理评分结果如下($\bar{x} \pm s$)
Table 2 NAS of the two group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Fatty Degeneration	Ballooning Degeneration	Phlogosis of hepatic lobul	Fibrosis
Normal Group	13	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Fatty Group	12	3.00 $\pm$ 0.00 $^{\Delta}$	1.58 $\pm$ 0.51 $^{\Delta}$	1.91 $\pm$ 0.79 $^{\Delta}$	0.00 $\pm$ 0.00

注 :与正常组相比 $\Delta P < 0.01$
Note: compared with the normal group $\Delta P < 0.01$

2.3 肝脏免疫组化

PPAR- γ 主要定位于肝细胞核内 呈棕褐色团块状。正常组肝细胞核未见着色，高脂饮食组肝细胞胞核着色程度 +++。(图 3)

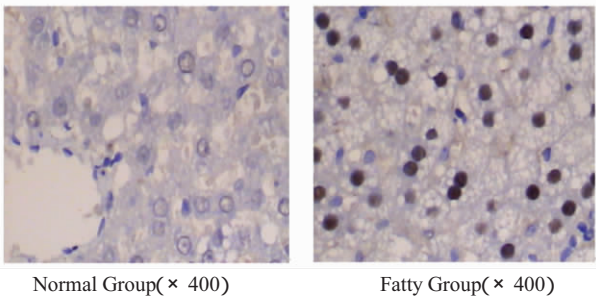


图3 两组大鼠肝脏组织 PPAR-γ 蛋白表达情况
Fig.3 The expression of PPAR-γ of the two group

表3 两组大鼠血清生化指标之间的比较($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Biochemical indexes of serum between the two group($\bar{x} \pm s$)

Group	Glu	TC	TG	HDL-C	LDL-C
Normal Group(n=13)	5.44± 0.85	0.98± 0.12	0.60± 0.07	1.02± 0.10	0.37± 0.36
Fatty Group(n=12)	9.75± 1.55 [△]	2.00± 0.29 [△]	1.34± 0.08 [△]	0.76± 0.05 [△]	1.40± 0.24 [△]

注 :与正常组相比 $\Delta P<0.05$
Note: compared with the normal group $\Delta P<0.05$

3 讨论

随着人们生活方式及饮食习惯的改变 ,非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的发病率正在逐年升高 ,在世界范围内成为慢性肝病的最常见病因之一^[6]。美国将近 1/3 成年人患有 NAFLD^[7] ,我国的发病率也逐年上升 ,2005 年统计数字为 15%^[8] ,日本占 14%。肥胖症、2 型糖尿病、高甘油三酯血症、体重增长过快、体重急剧下降(特别是原先肥胖者) ,与胰岛素抵抗有关的特殊综合征(如脂质萎缩性糖尿病、Mauriac 综合征)均为 NAFLD 的高危人群^[9]。

自发现 NAFLD 以来 ,对其重视程度逐年升高 ,关于 NAFLD 的发病机制研究的也越来越多 ,其中最具有说服力的是 Day 的 " 二次打击 " 学说 ,他认为初次打击主要为 IR ,IR 通过促进外周脂肪分解和高胰岛素血症引起肝细胞脂肪变性,而脂肪变性的肝细胞活力相对不足,从而为氧应激提供了足够的反应基质 ,结果导致脂肪变性的肝细胞对内、外源性损害因子的敏感性增强 ;二次打击主要为反应性氧化代谢产物增多 ,导致脂质过氧化伴细胞因子、线粒体解偶联蛋白 -2 和 Fas 配体被诱导活化 ,进而引起脂肪变性的肝细胞发生炎症、坏死甚至纤维化^[10]。肠道细菌发酵产生的乙醇和内毒素、肝毒性物质、缺氧以及铁负荷过重等因素 ,均可作为二次打击参与非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的发病。除非能及时阻止炎症 - 坏死循环 ,否则将发生进展性肝纤维化和肝硬化。

有关 NAFLD 的研究 ,大多以动物实验为主 ,常规应用高脂饲料可建立非酒精性脂肪性肝病模型 ,但其存在造模时间长 ,病变程度轻等缺点 ,且脂类物质的含量与造模所需天数成负相关^[11] ,有研究示含胆盐的高脂饲料造模效果明显优于不含胆盐的高脂饲料^[12]。本实验参考相关文献 ,采用含胆盐及高含量脂类物质的高脂饮食造模 ,8 周后即造模成功 ,从而证实了含胆盐的高脂饲料更容易形成高脂动物模型。

2.4 血清学指标
2.4.1 血清免疫学指标
PCIII(III 型前胶原) ,IV-C(IV 型胶原) ,LN(层粘连蛋白) ,HA(透明质酸酶)在正常组、高脂组之间没有统计学差异
2.4.2 血清生化指标
高脂组大鼠血清生化指标中的 Glu、TC、TG、LDL-C 与正常组比较明显升高 ,HDL-C 较正常组明显降低 ,且差异有统计学意义($P<0.05$)(表 3)。

PPAR-γ 的作用广泛 ,但其在发病过程的具体机制尚无定论。PPAR-γ 属于核受体超家族 ,是一类由配体激活的核转录因子。PPAR-γ 参与调节机体能量稳定和脂质代谢 ,其目的基因可直接参与脂肪细胞的分化成熟 ,并影响体内脂肪的合成及蓄积 ,故而有学者认为 PPAR-γ 在脂肪细胞系统调节中有至关重要的作用^[13]。肝脏组织切片免疫组化示 ,高脂饮食大鼠肝脏 PPAR-γ 的表达量较普通饲料高 ;高脂饮食组大鼠血脂成分 TC、TG、HDL-C、LDL-C ,较正常组大鼠有明显升高 ,差别具有统计学意义($P<0.05$) ,提示存在较为严重的血脂异常 ,从而证实了高脂饮食引起的非酒精性脂肪肝 ,可能与肝脏组织中 PPAR-γ 的高表达 ,促进了肝细胞的成脂性改变有关。

NAFLD 的发病与多种因素相关 ,但其发病机制尚不清晰 ,本实验在一定程度上提示了 PPAR-γ 可以通过肝细胞脂肪变性 ,促进 NAFLD 的发生和进展 ,为临床上药物治疗提供了一定的思路。

参 考 文 献(References)

[1] Wieckowska A, Feldstein AE. Nonalcoholic fatty liver disease in the pediatric population: a review [J]. Curr Opin Pediatr, 2005,17 (5): 636-641
[2] Adams LA, Waters OR, Knuiman MW, et al. NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up study [J]. Am J Gastroenterol, 2009 ,104(4): 861-867
[3] 郭睿, 李昌平. PPAR-γ 对非酒精性脂肪性肝病的作用, 西南军医 [J], 2008, 10(6),124-126
Guo Rui, Li Chang-ping. Role of PPAR-γ in NAFLD [J].Journal of Military Surgeon in Southwest China, 2008, 10(6):124-126
[4] 秦红波,曹浩强,华志元,等.高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪肝模型的建立[J].南京医科大学学报(自然科学版),2008,28(8),973-976
Qin Hong-bo, Cao Hao-qiang, Hua Zhi-yuan, et al. Establishment of nonalcoholic fatty liver model of rat induced by high fat diet [J]. Acta

universitatis medicinalis nanjing, 2008,28(8),973-976

- [5] 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南 [J]. 临床肝胆病学,2010,26(2): 120-124
Guidelines for diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver diseases[J].Journal of Clinical Hepatology, 2010,26(2):120-124
- [6] Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study[J]. Hepatology, 2005, 42:44- 52
- [7] Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis[J].Hepatology,2006,43:S99-112
- [8] Fan JG, Zhu J, Li XJ, et al. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China [J]. J Hepatol, 2005,43: 508- 514
- [9] 范建高,曾民德. 非酒精性脂肪性肝病的分类及其诊断策略[J].中华肝脏病杂志, 2003,11:127-128
Fan Jian-gao, Zeng Ming-de. Classification and diagnostic strategies of nonalcoholic fatty liver diseases[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2003,11:127-128
- [10] Day CP, James OF. Hepatic steatosis: Innocent bystander or guilty party? [J]. Hepatology,1998,27:1463-1466
- [11] 李大伟,张玲,夏作理. 建立高脂血症模型的动物选择与常用造模方法分析及改进[J].中国临床康复,2006,10(48):145-147
Li Da-wei, Zhang Ling, Xia Zuo-li. Choice of hyperlipidemia model animals as well as analysis and improvement of common method of establishing models [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006,10(48):145-147
- [12] 张智,闪增郁,向丽华,等.大鼠实验性高脂血症两种造模方法的比较[J].中国中医基础医学杂志, 2004,10(2):33-34
Zhang Zhi, Shan Zeng-yu, Xiang Li-hua, et al. Comparison of the Two Models on Experimental Hyperlipidemia of Rats [J]. Chinese Journal of Basic Medicine In Traditional Chinese Medicine, 2004,10 (2):33-34
- [13] Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, et al. PPAR γ knockdown by engineered transcription factors :exogenous PPAR γ 2 but not PPAR γ 1 reactivates adipogenesis[J]. Genes Dev, 2002, 16:27-32
- [14] Mack GJ, Compton DA. Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98:14434-14439
- [15] Chang MS, Huang CJ, Chen ML, et al. Cloning and characterization of hMAP126, a new member of mitotic spindle-associated proteins [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287:116-121
- [16] Manning AL, Bakhoum SF, Maffini S, et al. CLASP1, astrin and Kif2b form a molecular switch that regulates kinetochore-microtubule dynamics to promote mitotic progression and fidelity [J]. Embo J, 29: 3531-3543
- [17] Suzuki H, Yagi M, Suzuki K. Duplicated insertion mutation in the microtubule-associated protein Spag5 (astrin/MAP126) and defective proliferation of immature Sertoli cells in rat hypogonadic (hgn/hgn) testes [J]. Reproduction, 2006, 132:79-93
- [18] Fitzgerald CJ, Oko RJ, van der Hoorn FA. Rat Spag5 associates in somatic cells with endoplasmic reticulum and microtubules but in spermatozoa with outer dense fibers [J]. Mol Reprod Dev, 2006, 73: 92-100

(上接第 2604 页)

- [5] Du X, Kumar J, Ferguson C, et al. A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking [J]. Cell Biol, 2011, 192:121-135
- [6] Yan D, Olkkonen VM. Characteristics of oxysterol binding proteins [J]. Int Rev Cytol, 2008, 265:253-285
- [7] Yan D, Mayranpaa MI, Wong J, et al. OSBP-related protein 8 (ORP8) suppresses ABCA1 expression and cholesterol efflux from macrophages [J]. J Biol Chem, 2008, 283:332-340
- [8] Cheng TS, Hsiao YL, Lin CC, et al. Glycogen synthase kinase 3 β interacts with and phosphorylates the spindle-associated protein astrin [J]. J Biol Chem, 2008, 283:2454-2464
- [9] Cheng TS, Hsiao YL, Lin CC, et al. hNinein is required for targeting spindle-associated protein Astrin to the centrosome during the S and G2 phases [J]. Exp Cell Res, 2007, 313:1710-1721
- [10] Du J, Jablonski S, Yen TJ, Hannon GJ. Astrin regulates Aurora-A localization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 370:213-219
- [11] Gruber J, Harborth J, Schnabel J, et al. The mitotic-spindle-associated protein astrin is essential for progression through mitosis [J]. J Cell