

张中华,张倩,吕涛,等. *Srebp-1* 基因促进 WSHc 大鼠非酒精性脂肪肝形成 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(7): 1000-1009.

ZHANG Z H, ZHANG Q, LYU T, et al. *Srebp-1* gene promotes the formation of non-alcoholic fatty liver in WSHc rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(7): 1000-1009.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.07.007

Srebp-1 基因促进 WSHc 大鼠非酒精性脂肪肝形成

张中华,张倩,吕涛,丁月,方明笋,蔡月琴,凌云,张利棕*

(浙江中医药大学,动物实验研究中心,杭州 310053)

【摘要】 目的 通过高脂饮食诱导 Wistar-SD 高脂血症易感(WSHc)大鼠建立非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)模型,从 *Srebp-1* 基因揭示该大鼠 NAFLD 的发病机制。**方法** 取 30 只 6 周龄的 WSHc 大鼠,高脂饲养 2 周后,分为高脂对照组、高脂 + AAV 空载组、高脂 + AAV 组,每组 10 只。高脂 + AAV 空载组、高脂 + AAV 组分别于门静脉注射不含病毒的载体和含 shRNA(short hairpin RNA)病毒的载体。另取 10 只同周龄的 WSHc 大鼠饲养正常饲料作为正常对照组。每 2 周检测血清 ALT、AST、TBIL、ALP、TBA、GLU、CHOL 和 TG 水平。继续饲养 8 周后处死动物,取肝行苏木素-伊红(HE)、油红“O”、Masson 和天狼星红染色,观察各组大鼠肝组织形态、脂质沉积和纤维化情况。利用 RT-qPCR 检测肝 *Srebp-1*、*Aacs*、*FASN*、*LDLR* 等脂质代谢相关基因的表达;分离培养 WSHc 大鼠肝细胞,分为正常对照组和高脂对照组,RT-qPCR 检测 *Srebp-1* 基因表达;并构建 *Srebp-1* 敲除组,检测肝细胞 TG 含量,油红“O”染色观察脂肪聚集。**结果** 高脂饲养 10 周后,WSHc 大鼠血清 ALT($P < 0.001$),ALP($P < 0.001$),TBA($P < 0.05$),GLU($P < 0.001$),CHOL($P < 0.001$)显著升高,肝脂质异常沉积形成大泡性脂滴并见纤维化病变,*Srebp-1* 表达水平显著升高($P < 0.001$);与高脂对照组 WSHc 大鼠相比,高脂 + AAV 组 ALT($P < 0.05$),GLU($P < 0.01$)降低,肝脂质沉积情况减轻,视野下未见大泡性脂滴,*FASN*($P < 0.05$),*LDLR*($P < 0.01$)等基因表达明显升高。此外,高脂对照组肝细胞的 *Srebp-1* 表达明显升高($P < 0.001$);*Srebp-1* 基因敲除以后,细胞 TG 降低,且脂滴聚集程度减轻。**结论** WSHc 大鼠 NAFLD 模型肝 *Srebp-1* 基因能影响血脂代谢和肝脂质沉积,还能调控肝脂代谢相关基因的表达;体外实验表明,*Srebp-1* 低表达可减轻肝细胞脂毒性损伤,这表明 WSHc 大鼠 NAFLD 形成与 *Srebp-1* 基因异常高表达密切相关。

【关键词】 WSHc 大鼠;非酒精性脂肪肝病;*Srebp-1*

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2025)07-1000-10

Srebp-1 gene promotes the formation of non-alcoholic fatty liver in WSHc rats

ZHANG Zhonghua, ZHANG Qian, LYU Tao, DING Yue, FANG Mingsun, CAI Yueqin, LING Yun, ZHANG Lizong*

(Animal Experimental Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: ZHANG Lizong. E-mail: ryan_zlz@163.com

【Abstract】 Objective This study sought to establish a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) model in Wistar-SD hypercholesterolemia (WSHc) rats induced by a high-fat diet and to reveal the pathogenesis of NAFLD in these rats through the *Srebp-1* gene. **Methods** After 2 weeks of dietary treatment, thirty 6-week-old WSHc rats were

【基金项目】浙江省基础公益研究计划项目(LGD21C040004)。

Funded by Zhejiang Provincial Basic Public Welfare Research Program(LGD21C040004)。

【作者简介】张中华,女,硕士,助理实验师,研究方向:实验动物与动物实验。Email:738424936@qq.com

【通信作者】张利棕,男,硕士,高级实验师,研究方向:实验动物与动物实验。Email:ryan_zlz@163.com

divided into High-fat control group, HFD + AAV no load group, and HFD + AAV group, with 10 rats in each group. The HFD + AAV no load group and HFD + AAV group were intravenously injected with a vector virus and an shRNA-containing virus, respectively. WSHc rats were fed with a normal fat diet as a normal control group. Serum levels of ALT, AST, TBIL, ALP, TBA, GLU, CHOL, and TG were measured every 2 weeks. After a further 8 weeks of feeding, the rats were euthanized and livers were excised for HE staining, Oil Red O staining, Masson staining, and Sirius red staining to observe the morphology, lipid deposition, and fibrosis of the liver tissues. RT-qPCR was performed to detect the expression of lipid metabolism-related genes namely *Srebp-1*, *Aacs*, *FASN* and *LDLR* in the livers. Furthermore, hepatocytes were isolated, cultured, and divided into a normal control group and a high-fat control group. Next, expression of the *Srebp-1* gene was detected by RT-qPCR. *Srebp-1* knockout (KO) hepatocytes were constructed, then TG content was detected and the lipid accumulation was observed by Oil Red O staining.

Results After 10 weeks of high-fat diet treatment, serum ALT ($P < 0.001$), ALP ($P < 0.001$), TBA ($P < 0.05$), GLU ($P < 0.001$), and CHOL ($P < 0.001$) significantly increased in WSHc rats. Abnormal lipid deposition with formation of large vacuolar lipid droplets and fibrotic lesions in livers were observed. The mRNA expression of *Srebp-1* noticeably increased in WSHc rats ($P < 0.001$). Moreover, compared with the high-fat control group, the ALT ($P < 0.05$) and GLU ($P < 0.01$) in the HFD + AAV group decreased, and liver lipid deposition and the formation of large vacuolar lipid droplets were alleviated. Expressions of genes such as *FASN* ($P < 0.05$) and *LDLR* ($P < 0.01$) were significantly upregulated. Additionally, there was a significant increase in the expression of *Srebp-1* in hepatocytes of the high-fat control group ($P < 0.001$), while after *Srebp-1* gene knockout, cellular TG levels decreased and the degree of lipid droplet aggregation was reduced. **Conclusions** The *Srebp-1* gene plays a regulatory role in hepatic lipid metabolism and deposition, modulating the expression of lipid metabolism-related genes in WSHc rats with NAFLD. In vitro experiments demonstrated that downregulation of *Srebp-1* alleviates lipotoxic injury in hepatocytes, suggesting that the development of NAFLD in WSHc rats is closely associated with abnormally high expressions of the *Srebp-1* gene.

【Keywords】 WSHc rats; non-alcoholic fatty liver disease; *Srebp-1*

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 又称代谢相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD) 是全球主要的慢性肝病,除肥胖和糖尿病外,影响全球约 25% 的人口^[1],临床表现在没有过多饮酒的情况下,肝细胞出现以脂肪变性和脂质沉积为特征的一种病理综合征^[2]。尽管该疾病在全球的影响力不断增加,但其发病的确切机制尚不清楚,目前也无批准的治疗方法可用于治疗 NAFLD。研究发现,NAFLD 包括广泛的肝病理,从单纯脂肪变性 (non-alcohol-associated fatty liver, NAF) 到非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcohol steatohepatitis, NASH),若不加以干预,最终可发展为更严重的慢性肝病,包括肝硬化和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)^[3]。NAFLD 发生取决于多种因素的综合作用;第一阶段是在高脂饮食的诱导下,肝的摄取、合成、分泌或降解改变,进而引起肝脂肪酸代谢的不平衡,

甘油三酯 (triglyceride, TG) 和游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 在体内不断增多并引起脂肪肝积聚,导致肝细胞发生脂肪变性;第二阶段是诱发肝炎症、内质网应激 (endoplasmicreticulum stress, ERS)、氧化应激、线粒体功能障碍,造成肝细胞严重坏死,最终发展为肝硬化和 HCC^[4-5]。

本研究采用的高脂血症易感 (Wistar-SD hypercholesterolemia, WSHc) 大鼠是本动物实验研究中心偶然发现并保种培育的一种通过高胆固醇饲料饲喂易发生高胆固醇血症的特色实验大鼠品系^[6]。基础研究发现,WSHc 大鼠经高脂饲喂 2 周时,血清 TC 值大于 6.0 mmol/L 的发生率为 90%,在高脂饲喂第 8 周时达到峰值,并可稳定保持处于高于临床诊断标准的高血脂状态,且易形成临床相似的左心室重构和早期动脉粥样硬化等心血管并发症^[7]。为探讨 WSHc 大鼠易发高脂血症的机制,本课题组利用转录组学分析经高脂诱导后的大鼠肝,使用蛋白质-蛋白质相互作

用网络和 Cluster One 聚类中的信息探索了识别的基因谱,发现胆固醇调控因子结合蛋白 1 (sterol regulatory element binding protein 1, SREBP1) 为核心基因,提示 *Srebp-1* 基因过表达可能是引起 WSHc 大鼠高血脂和 NAFLD 的重要影响因素。

SREBPs 是位于内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 的膜结合转录因子,作为内质网中无活性前体,当细胞中的胆固醇水平超过阈值浓度,便会转移到高尔基体释放出转录活性形式^[8]。SREBP-1 在哺乳动物细胞中有 3 种亚型: SREBP-1a、SREBP-1c 和 SREBP-2^[9]。SREBP-2 主要调控胆固醇合成酶的表达, SREBP-1c 是肝中主要的 SREBP-1 亚型,调控脂肪酸和 TG 合成酶编码基因的表达^[10-11]。有研究发现 SREBP-1 的靶基因包括:乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, ACC)^[12-13]、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthetase, FASN)^[14]、低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR)^[15] 等与脂肪合成和葡萄糖代谢有关的基因,能够激活低密度脂蛋白受体和胆固醇合成酶的编码基因,主要参与脂肪酸、甘油三酯和胆固醇合成和代谢,过量表达能导致肝细胞内脂质过度蓄积加速 NAFLD 的发展^[16]。本文进一步探讨 WSHc 大鼠 NAFLD 易发机制,构建 *Srebp-1* 基因敲减 WSHc 大鼠,并分离 WSHc 大鼠肝细胞构建 *Srebp-1* KO 细胞,研究 *Srebp-1* 基因在 NAFLD 进程中的作用,提高 WSHc 大鼠这一特色实验动物新品系的应用价值和科学价值,为 NAFLD 的研究和相关药物研发提供合适的、机制明确的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

来源于上海斯莱克实验有限公司【SCXK (沪) 2012-0002】的 SPF 级 8 周龄, 120 ~ 140 g 的雄性 Wistar 大鼠 1 只,经高脂诱导 2 周出现血脂升高异常,而后由本课题组繁殖,取其繁殖的后代 SPF 级 6 周龄 160 ~ 180 g 的雌性 WSHc 大鼠 40 只,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障实验室【SYXK (浙) 2021-0012】。饲养条件为:室温 (22 ± 2) °C,相对湿度 50% ~ 60%,在 IVC 笼内饲养,自由饮食,光照 12 h 明暗交替,噪

声 < 50 dB。在实验过程中按“3R”原则给予人道的关怀。本研究获得浙江中医药大学实验动物伦理审查委员会批准通过 (IACUC-202212-01)。

1.1.2 主要试剂与仪器

腺病毒购自上海吉凯基因科技有限公司;普通基础饲料购自仪征安立卵生物科技有限公司;谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) (货号:210819101)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) (货号:210830201)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) (货号:211006302)、血清碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) (货号:211026101)、血清总胆汁酸 (total bile acid, TBA) (货号:210714102)、葡萄糖 (glucose, GLU) (货号:210607101)、总胆固醇 (total cholesterol, CHOL) (货号:210901101)、三酰甘油 (triylglycerides, TG) (货号:210823101) 检测试剂盒均购自美康生物科技股份有限公司;苏木素和 EOSIN-Y 伊红染液,购自 Thermo 公司;蛋白提取试剂盒购自凯基生物;预染蛋白 Marker 购自美国 Thermo Scientific;近红外染料标记的二抗 (Li-COR) 天狼猩红染色试剂盒 (货号:S8060) 购自索莱宝公司;油红 O 染料 (货号:G1260) 购自索莱宝公司, RNA Extraction Kit, RT kit 和 SYBR Green qPCR Master Mix, 购自 TaKaRa 公司。滨松 NanoZoomer S60 数字切片扫描仪 (滨松光子公司); NDP 图像软件采集 (滨松光子公司); Odyssey 近红外双色激光成像系统 (美国 LI-COR, Odyssey CLx); 垂直电泳系统 (美国 BIO-RAD, mini-PROTEAN); 蛋白转移系统 (美国 BIO-RAD, PowerPac); 生物样品均质机 (法国 BIRTIN, Precellys 24); 生化培养箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂, SPC-150BZ); 生物安全柜 (美国 Thermo, 1300A2); 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI, Stepone plus); 微量核酸测定仪 (美国 Thermo, nanodrop); PCR 仪 (美国 Bio-Rad, S1000); 移液器 (德国 Eppendorf, Research)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立

SPF 级 6 周龄的雌性 WSHc 大鼠 30 只,进行高脂饲料 (high-fat diet, HFD) 饲喂 2 周, HFD 配方: 1% 胆固醇、10% 起酥油、10% 蛋黄粉、0.5% 3 号胆盐、78.5% 基础饲料。取 10 只高脂饲喂的大

鼠作为高脂对照组,另取同周龄雌性 WSHc 大鼠 10 只饲喂普通饲料作为正常对照组。每天观察大鼠的精神、活动、被毛色泽、饮食、饮水等,每周称量大鼠的体质量。

1.2.2 shRNA 病毒载体的构建与干预

取上述高脂饲料饲喂的大鼠 10 只,利用 NCBI 数据库中 *Srebp-1* 转录本序列 (NM_001276707.1),构建 AAV 载体, H13184 pRLenti-EF1a-EGFP-P2A-Puro-CMV-Srebf1-3Flag, 由和元生物公司合成。高脂 + AAV 组大鼠门静脉注射含有 shRNA 的病毒载体,对 WSHc 大鼠 *Srebp-1* 进行抑制,另取 10 只高脂饲喂大鼠注射空载体病毒作为高脂 + AAV 空载组,注射操作在生物安全柜中进行。

1.2.3 血清生化指标检测

各组大鼠每 2 周 1 次检测血液生化,禁食 12 h,颌下静脉取血,3000 r/min 离心 10 min,分离血清,测定血清 ALT、AST、TBIL、ALP、GLU、CHOL、TG 含量。在 WSHc 大鼠注射腺相关病毒 8 周后,禁食 12 h,安乐死后立即心脏取血,并于 3000 r/min 离心 10 min,分离血清,测定血清 ALT、AST、TBIL、ALP、GLU、CHOI、TG 含量。

1.2.4 苏木素-伊红(HE)染色

WSHc 大鼠注射病毒 8 周后,动物禁食 12 h,安乐死后,每组取肝组织标本,经中性甲醛固定后,常规脱水、石蜡包埋后切片,切片厚度为 4 μ m,制成的肝组织切片留存供下一步染色备用。切片置 60 $^{\circ}$ C 烤箱烘烤 2 h;二甲苯 I、二甲苯 II 各 15 min;无水乙醇 I、II 各 10 min;95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇各 2 min;自来水冲洗 1 min;苏木素染液染 5 min;流水冲洗 2 min;0.5%盐酸酒精分化 5 s;流水冲洗 1 min;0.5%稀氨水返蓝 20 s;流水冲洗 3 min;0.5%伊红染液染色 2 min;流水冲洗 1 min;80%乙醇、95%乙醇各 30 s;无水乙醇 I、II 各 2 min;二甲苯 I、二甲苯 II 各 5 min;中性树胶封固后显微镜下观察染色结果。

1.2.5 Masson 染色

脱蜡至水步骤与上述 HE 染色相同,而后用苏木素染色液染核 1 min,蒸馏水冲洗后用 1%盐酸酒精分化 3 min,充分冲洗;加入 Masson 丽春红染液复红 10 min,1%磷钼酸溶液洗分化 3 min,不用水洗,直接经 1%苯胺蓝染液染 5 min;最后依次

在 95%、100%乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固后镜下观察并拍照。

1.2.6 油红“O”染色

组织冰冻切片后 10%中性甲醛固定 5 min,清洗后加入配制好的油红“O”工作液染色 10 min;60%异丙醇分化,清洗后加入苏木素染液染核 1 min;超纯水清洗后显微镜观察染色结果。

1.2.7 天狼星红染色

常规石蜡切片脱蜡至水,将切片入饱和苦味酸天狼星红染色液内染色 8 min;而后置于无水乙醇中漂洗数分钟。将制作好的切片于 60 $^{\circ}$ C 烤箱烤干后,用二甲苯透明 5 min,中性树胶封片,显微镜镜检,并采集分析图像。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 法 (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 检测肝组织中 *Srebp-1* 及下游基因转录

在干冰上取新鲜肝组织 20 mg 左右,置于预冷并放置磁珠的均质管中,加入试剂盒中的 Buffer RL,立即在均质机组织破碎机中进行高速震荡破碎,随后按照 TaKaRa RNA Extraction Kit 试剂盒说明书提取总 RNA。初步提取的 RNA 用 Nanodrop 微量核酸测定仪测定其浓度和纯度。随后加入 5 \times PrimeScript RT Master Mix 进行逆转录为 cDNA。得到的 cDNA 用 TaKaRa 荧光定量试剂盒 SYBR Premix Ex TaqTM II 在实时荧光定量 PCR 仪中进行扩增,RT-qPCR 检测肝组织中 *Srebp-1* 基因和下游 *Aacs*、*FASN*、*LDLR* 的 mRNA 表达水平。PCR 的扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。熔解曲线反应条件:从 55 $^{\circ}$ C 开始,每 30 s 升高 0.5 $^{\circ}$ C,直到 95 $^{\circ}$ C,循环一次。内参基因为 β -actin,各组基因表达差异采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法进行分析。RT-qPCR 引物信息如表 1 所示,引物序列由生工生物工程(上海)有限公司设计并合成。

1.2.9 肝细胞原代分离培养

取新生 3 d 的 WSHc 大鼠处死,放入 75%乙醇中消毒 10 min,无菌手术器械开腹取肝,置于预冷的含双抗 PBS 液中反复漂洗,除去肝包膜,将肝剪碎成 5 mm \times 5 mm \times 5 mm 的组织块,PBS 洗 2 次,将组织块移入无菌 50 mL 离心管中,用 0.25%胰酶于 37 $^{\circ}$ C 消化 5 min,去胰酶,加入 0.03% IV 胶原酶 10 mL。于 37 $^{\circ}$ C 120 r/min 水

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')	扩增片段长度/bp Amplified fragment length/bp	退火温度/℃ Annealing temperature/℃	基因序列号 Gene ID
<i>Srebp-1</i>	F:CGACTACATCCGCTTCTTAC R:CACCAGGCTCTTTCAGTGATT	100	60	78968
<i>Aacs</i>	F:GAAGATGGGCGTGAAGAAA R:ACTCCAAATGGCTCCAATAC	106	60	65984
<i>FASN</i>	F:GACCCTGACTCCAAGTTATTC R:GCAGCTCCTTGTATACTTCTC	100	60	50671
<i>LDLR</i>	F:TCTTCGGAGCCATCCTCCTG R:CTCGTCCTCCGTGGTCTTCT	98	60	300438
<i>β-actin</i>	F:GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA R:GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	150	60	81822

浴摇床中消化 15 min, 移液器吹打充分, 静置取上清, 余下加入 0.03% IV 胶原酶 10 mL 重复以上步骤。3 ~ 4 次后直到几乎完全消化。过 200 目筛, 离心去上清, 破红, 10 ~ 15 倍 PBS 稀释, 继续离心去上清。用 15% 血清完全培养基重悬后接种于 T25 培养瓶中。利用大鼠肝实质细胞提取试剂盒提取肝细胞, 调整好密度的细胞接种在胶原包被的培育板中, 培育 24 h 后换液, 除去红细胞。

1.2.10 腺病毒转染

在生物安全柜中, 取 10 μL 腺病毒原液加入 990 μL 的 Ep 管中做 1 : 100 稀释 (10^{-2}); 然后以此为起点用完全培养基将病毒浓度稀释为 10^{-4} 浓度。将原细胞培养基弃去, 换成含腺病毒培养基继续培养 48 h 后换液。荧光显微镜观察转染效率, PCR 检测转染效果, 确定构建 *Srebp-1* 基因敲除 (knockout, KO) 组简称 *Srebp-1* KO 组。

1.2.11 肝细胞鉴定和造模

将每毫升 6×10^5 个肝细胞悬液接种于置有玻片的 6 孔培养板, 置于 37 °C, 5% CO₂ 孵育箱中培养, 待细胞 80% ~ 90% 融合后, 取出爬片, PBS 洗 2 次。高脂对照组的细胞铺板 24 h 后, 采用棕榈酸 (palmitic acid, PA) 和油酸 (oleic acid, OA) 联用处理, 0.2 mmol/L PA + 0.4 mmol/L OA 处理 24 h^[17-18]。

1.2.12 细胞 TG 含量测定

造模后收细胞, 裂解 (1% Triton-X100, PBS 稀释) 40 min, 生化检测仪检测。

1.2.13 细胞油红“O”染色

收集各组细胞培养液, 去上清, 轻轻加入 PBS

洗 1 遍; 100% 异丙醇润洗 1 次, 后去除; 加入工作液每孔 1 mL, 室温孵育 30 min, 后回收; 用 PBS 洗 2 遍后拍照, 在生物安全柜中取 10 μL 腺病毒原液加入 990 μL 的 Ep 管中做 1 : 100 稀释 (10^{-2}); 取 12 mL 油红 O 母液加入 8 mL 的纯水 (3 : 2), 配制成工作液, 滤纸过滤后浸染。

1.3 统计学分析

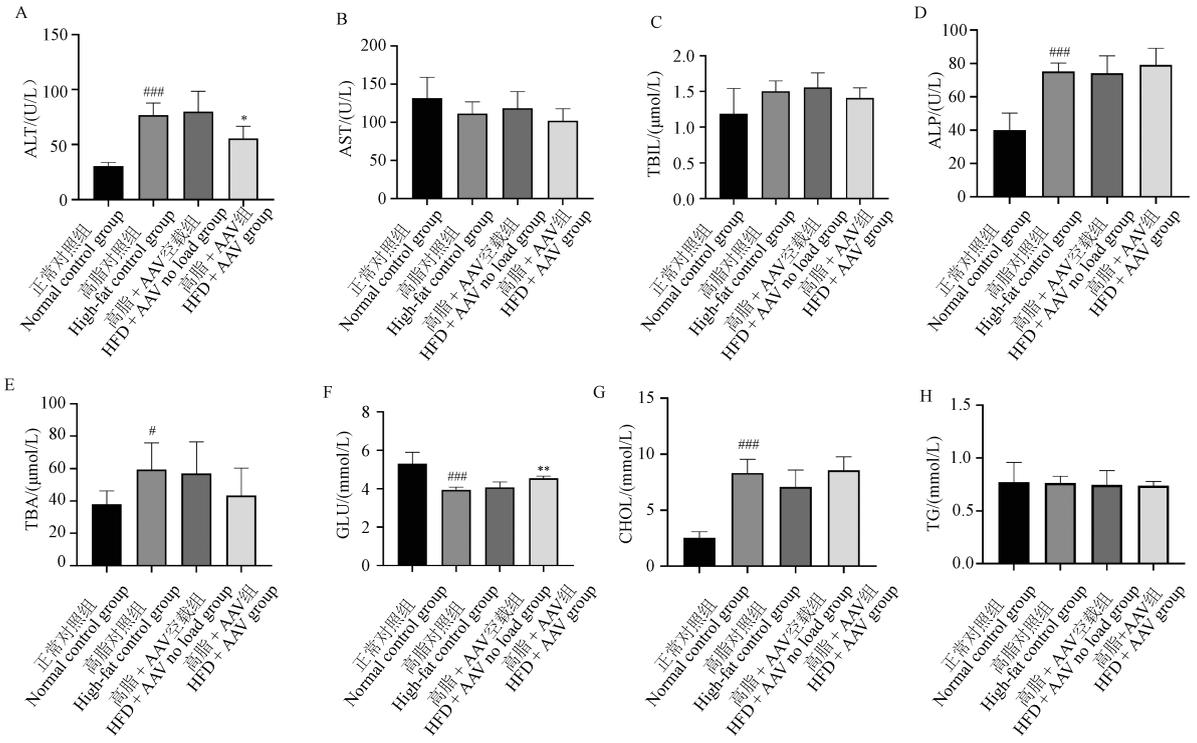
实验数据通过 SPSS 25.0 软件进行分析, 对于不同分组的数据实行非配对 *t* 检验, 并用 GraphPad Prism 8.0 软件作图。检测结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 高脂诱导对 WHSc 大鼠的影响

与正常对照组相比, 高脂对照组大鼠在高脂饲喂 8 周后, 血清 ALT ($P < 0.001$, 图 1A), ALP ($P < 0.001$, 图 1D), TBA ($P < 0.05$, 图 1E), GLU ($P < 0.001$, 图 1F), CHOL ($P < 0.001$, 图 1G) 浓度显著升高, 而 AST, TBIL 和 TG (图 1B, 图 1C, 图 1H) 含量未出现明显变化, 说明在高脂饲料的诱导下, WHSc 大鼠易出现 NAFLD 临床鉴定的血清生化指征, 且较为稳定。

病理染色结果发现 (图 2), 正常对照组大鼠肝结构清晰, 肝细胞胞浆丰富、形态完好、肝细胞索排列整齐。高脂对照组大鼠肝组织经 HE 染色镜检发现, 肝空泡样变, 大泡状、空泡变大, 胞核被脂滴挤向一侧, 高脂对照组以大泡性脂肪变为



注:A:各组大鼠 ALT 水平;B:各组大鼠 AST 水平;C:各组大鼠 TBIL 水平;D:各组大鼠 ALP 水平;E:各组大鼠 TBA 水平;F:各组大鼠 GLU 水平;G:各组大鼠 CHOL 水平;H:各组大鼠 TG 水平;与正常对照组相比, $^*P < 0.05$, $^{###}P < 0.001$;与高脂对照组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。(下同)

图 1 各组大鼠血液生化指标

Note. A. ALT levels of rats in each group. B. AST levels of rats in each group. C. TBIL levels of rats in each group. D. ALP levels of rats in each group. E. TBA levels of rats in each group. F. GLU levels of rats in each group. G. CHOL levels of rats in each group. H. TG levels of rats in each group. Compared with the normal control group, $^*P < 0.05$, $^{###}P < 0.001$. Compared with the high-fat control group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Biochemical indicators of blood in each group of rats

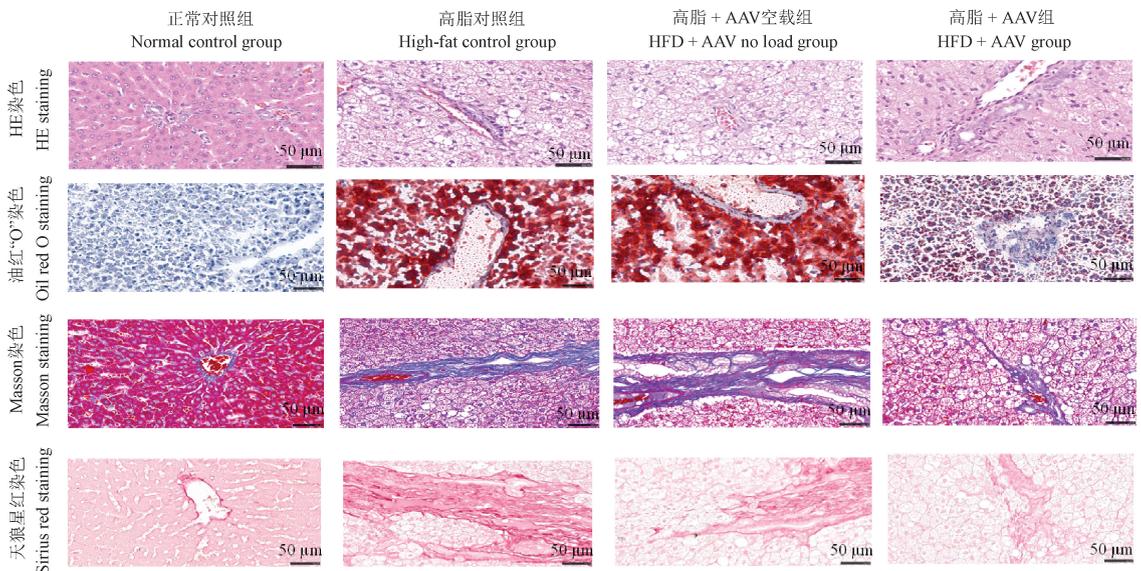
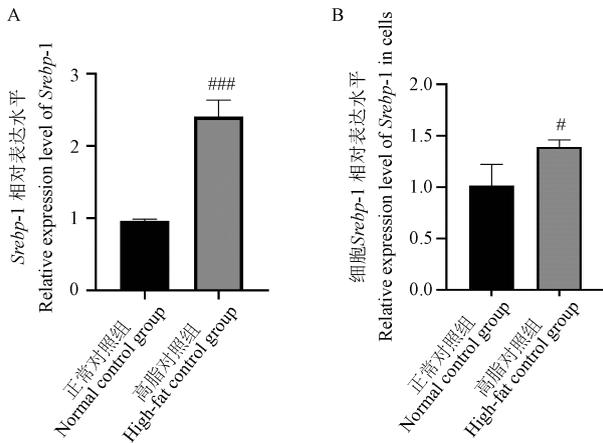


图 2 各组大鼠肝 HE、油红“O”、Masson 和天狼星红染色

Figure 2 Liver stained by HE, Oil red O, Masson and sirius red staining in each group of rats

主,即呈空泡状并伴有小泡性脂肪变性;经油红“O”染色镜下示肝出现重度脂质沉积;Masson 和天狼星红染色见肝细胞排列紊乱,正常肝索状结构消失,且胶原纤维大量增生,聚集成条索状,并伴有炎性细胞浸润。可见,WHSc 大鼠经高脂诱导易出现肝细胞脂质沉积,导致肝脂肪变性等典型的 NAFLD 病理变化。

RT-qPCR 结果见,经高脂诱导的 WHSc 大鼠肝组织中 *Srebp-1* 的相对表达量显著性上调至两倍($P < 0.001$,图 3A);同样,在高脂对照组大鼠肝细胞中 *Srebp-1* 相对表达水平升高($P < 0.05$,图 3B),预示 *Srebp-1* 在 WHSc 高脂对照组大鼠中发挥重要作用。



注:A:各组大鼠肝组织中 *Srebp-1* 的相对表达水平;B:各组大鼠肝细胞中 *Srebp-1* 的相对表达水平。

图 3 *Srebp-1* 在各组大鼠肝组织和肝细胞中的相对表达水平

Note. A. Relative expression level of *Srebp-1* in liver tissues of different groups of rats. B. Relative expression levels of *Srebp-1* in liver cells of different groups of rats.

Figure 3 Relative expression level of *Srebp-1* in liver tissues and liver cells of rats in each group

2.2 *Srebp-1* 对 WHSc 大鼠生理指标和血脂代谢的影响

与高脂对照组相比,高脂 + AAV 组大鼠血清 ALT($P < 0.05$,图 1A),GLU($P < 0.01$,图 1F)浓度降低,AST,TBIL,ALP,TBA,CHOL 和 TG(图 1B ~ 图 1E,图 1G,图 1H)含量未出现明显变化。说明 *Srebp-1* 基因的缺失可能影响 WHSc 大鼠血脂代谢。

2.3 *Srebp-1* 对 WHSc 大鼠肝脂质沉积的影响

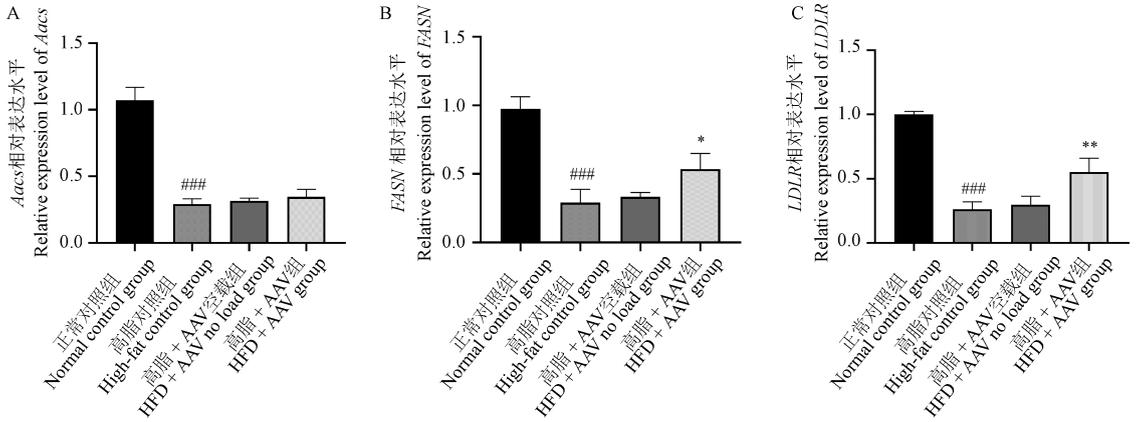
HE 染色结果显示(图 2),与高脂对照组相比,高脂 + AAV 组 WHSc 大鼠肝细胞质中空泡状减轻,细胞核多位于细胞中央,未出现大泡状脂肪变性。油红“O”染色结果显示(图 2),与高脂对照组相比,高脂 + AAV 组 WHSc 大鼠肝细胞脂质沉积情况减轻,视野中未见大量脂质沉积。Masson 染色和天狼星红染色结果显示,与高脂对照组相比,高脂 + AAV 组 WHSc 大鼠肝细胞排列结构清晰,有少量胶原纤维增生,其间有少量炎性细胞存在(图 2)。说明 *Srebp-1* 基因在 WHSc 大鼠肝脂质沉积过程中发挥重要作用,*Srebp-1* 缺失会减缓 NAFLD 进程。

2.4 *Srebp-1* 调控 WHSc 大鼠肝组织脂肪代谢相关基因表达水平

RT-qPCR 结果发现,与正常对照组相比,WHSc 大鼠经高脂诱导后,肝组织脂肪代谢相关基因 *Aacs*,*FASN*,*LDLR* 的相对表达量显著降低($P < 0.001$,图 4A ~ 图 4C)。与高脂对照组大鼠相比,高脂 + AAV 组 WHSc 大鼠肝组织中 *FASN*,*LDLR* 相对表达量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 4B,图 4C)。该结果提示,*Srebp-1* 基因被干预后可升高 WHSc 大鼠肝组织中脂肪代谢相关基因的表达,这可能是 *Srebp-1* 基因调控 WHSc 大鼠 NAFLD 的重要机制之一。

2.5 *Srebp-1* 缺失可减轻肝细胞脂毒性损伤

与正常对照组大鼠肝细胞对比,高脂对照组大鼠肝细胞中 TG 含量显著升高($P < 0.05$,图 5),油红“O”染色结果图见高脂诱导的肝细胞中脂肪聚集程度加重,预示着脂肪沉积(图 6)。为探究 *Srebp-1* 在肝细胞脂质代谢中的作用,本实验通过腺病毒转染构建了 *Srebp-1* KO 肝细胞,并采用 0.2 mmol/L PA + 0.4 mmol/L OA 联用诱导造模。检测 TG 指标显示,与高脂对照组相比,*Srebp-1* KO 组中 TG 浓度下降($P < 0.05$,图 5);同时,油红“O”染色结果显示(图 6),与正常对照组相比,*Srebp-1* KO 组细胞脂滴颗粒密度下降,并未形成大片空泡脂肪聚集。由此说明,*Srebp-1* KO 组肝细胞脂肪聚集减少,与高脂对照组大量脂肪聚集引发氧化应激损伤肝细胞相比,*Srebp-1* 缺失可减轻肝细胞脂毒性损伤。



注:A:各组大鼠肝 *Aacs* 的相对表达水平;B:各组大鼠肝 *FASN* 的相对表达水平;C:各组大鼠肝 *LDLR* 的相对表达水平。

图 4 各组大鼠肝中脂肪代谢相关基因的相对表达水平

Note. A. Relative expression level of *Aacs* in the livers of rats in each group. B. Relative expression level of *FASN* in the livers of rats in each group. C. Relative expression level of *LDLR* in the livers of rats in each group.

Figure 4 Relative expression levels of fat metabolism-related genes in the livers of different groups of rats

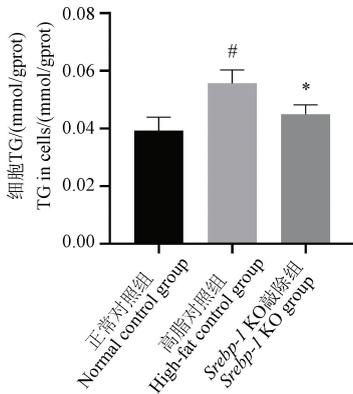


图 5 各组大鼠肝细胞中 TG 含量

Figure 5 TG content in rat hepatocytes of each group

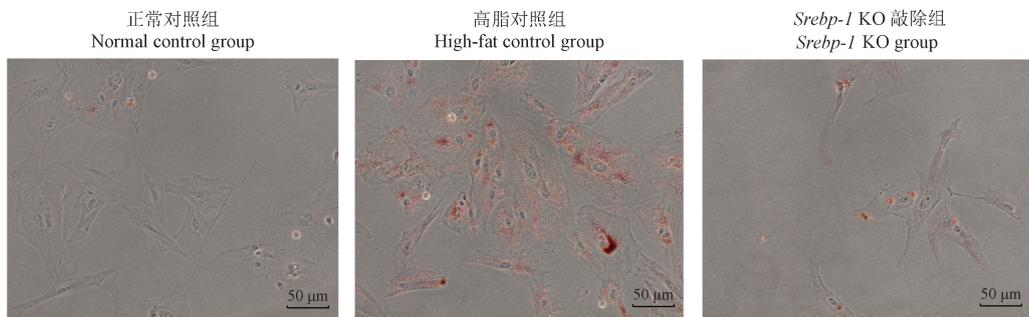


图 6 各组大鼠肝细胞油红“O”染色结果

Figure 6 Hepatocytes from various groups of rats stained with Oil red O

经高脂饲料诱导后血清总胆固醇显著升高^[7]。众所周知,血脂代谢紊乱是 NAFLD 发生的一个重要信号^[19],本研究继续研究 WSHc 大鼠的血液生化指标,发现与正常 WSHc 大鼠相比,WSHc 大鼠血清 ALT, ALP, TBA, GLU, CHOL 等水平显著

3 讨论

NAFLD 是全球最常见的慢性肝病之一,成人患病率可高达 45%,严重威胁人类生命健康^[1]。动物模型是研究疾病发生发展规律的重要手段和关键环节,而当前常用的无论啮齿类动物模型,亦或是禽类和猴类都无法模拟人类 NAFLD 的全部病理特征,在实际应用过程中存在局限。WSHc 大鼠是本课题组所在动物研究中心发现并封闭培育和开发研究的一个新的大鼠品系。前期研究发现,与普通 Wistar 大鼠相比,WSHc 大鼠

升高,预示 WSHc 大鼠经高脂诱导易发并稳定保持高血脂症,与 NAFLD 临床水平接近。肝脂质沉积是 NAFLD 最具特征性的临床病变。经过单纯肝脂质沉积会进入脂肪性肝炎阶段,表现为肝细胞大泡性或以大泡性为主的混合型脂肪变^[20]。

本研究发现 WSHc 大鼠 NAFLD 的脂肪变性更严重,且出现大泡性脂肪变性,脂质沉积和炎症细胞浸润,更符合人类脂肪性肝炎的临床病变。因此,研究人员认为 WSHc 大鼠可能是研究 NAFLD 的理想模型动物,可以模拟多种人 NAFLD 临床特征。

为进一步研究 WSHc 大鼠高脂血症易感机制,分析其独特的脂代谢模式,对 WSHc 大鼠的脂肪代谢相关基因的表达分析,发现 WSHc 大鼠肝组织 *Srebp-1* 基因表达异常升高。有报道称,*Srebp-1* 基因参与肝脂质代谢过程,若机体出现 *Srebp-1* 持续高表达会加速 NAFLD 的发生^[21]。研究人员前期的肝转录组分析研究也发现,WSHc 大鼠肝 *Srebp-1* 通路基因出现高表达,推测 WSHc 大鼠的 NAFLD 易感性可能与 *Srebp-1* 的高表达有关。因此,本研究通过腺病毒载体抑制 WSHc 大鼠肝中 *Srebp-1* 基因的表达,探讨 *Srebp-1* 在 WSHc 大鼠 NAFLD 发生发展中的作用,为 WSHc 大鼠 NAFLD 研究中的应用提供依据。

转录因子 *Srebp-1* 是脂肪生成的核心驱动因素,调节多种脂生成酶的表达,这些酶参与胆固醇、脂肪酸和甘油三酯的生物合成^[22]。观察 *Srebp-1* 敲减 WSHc 大鼠肝组织中其他脂肪代谢相关基因的表达水平,其中脂肪代谢相关基因 *FASN* 和低密度脂蛋白 *LDLR* 的表达水平升高。基于此,研究人员推测, *Srebp-1* 自发性升高在 WSHc 大鼠 NAFLD 病变进程中起到了关键作用。当 *Srebp-1* 缺失后,其他脂肪代谢相关基因代偿性高表达^[23]。有研究提出, *Srebp-1* 还是无数生理和病理生理细胞过程的枢纽,在转录和转录后调控中发挥作用^[9]。发现 *Srebp-1* 缺失组 ALT 浓度降低,而 ALT 是肝细胞损伤的标记物,临床中 NAFLD 患者与肝纤维化重症患者血清的 ALT 水平平均显著高于正常人群^[24]。通过组织病理学染色对比发现, *Srebp-1* 缺失后肝脂肪沉积情况减轻,未发生大泡性脂肪变性,停留在单纯肝脂质沉积初级阶段,说明 *Srebp-1* 基因敲减会减缓 NAFLD 进程。此外,研究人员还发现 *Srebp-1* 缺失后, WSHc 大鼠血清 GLU 浓度降低,说明 *Srebp-1* 基因还参与血糖的调节。糖尿病与 NAFLD 一样是代谢性疾病,未来可以继续研究 *Srebp-1* 基因在 WSHc 大鼠代谢过程中的调控作用,探讨糖尿

病与 NAFLD 的联合发生或相互影响。

NAFLD 患者肝内游离脂肪酸不断增加,抑制肝糖原的利用,进而导致脂质成分在肝细胞中沉积,引起内质网应激,造成肝细胞脂毒性损伤^[25]。*Srebp-1* 参与内质网应激和细胞死亡的调控。在骨肉瘤细胞中, *Srebp-1* 的过表达抑制细胞增殖,上调蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 的表达和磷酸化,并放大 PERK 激活的未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR), 导致内质网应激诱导的细胞凋亡和自噬^[26]。沉默 *Srebp-1* 可减弱这种应激反应^[27]。在构建的 *Srebp-1* KO 肝细胞中发现,与高脂对照组相比, *Srebp-1* 敲除组的细胞脂滴颗粒密度下降, TG 浓度也相应降低,说明 *Srebp-1* 是调控 WSHc 大鼠易发 NAFLD 的核心基因,在高脂诱导下,通过其高表达启动肝细胞内质网应激,引起炎症反应和肝细胞脂毒性损伤等一系列生理和病理反应。但是,新生 WSHc 大鼠分离肝细胞与成年 WSHc 大鼠模型的脂代谢和基因表达存在差异,如何建立更完美的 *Srebp-1* KO 肝细胞中进行体外实验是一大难点。NAFLD 患者肝细胞严重硬化会发展成为 HCC。在一项研究中发现, *Srebp-1* 在 HCC 发生、进展、转移和治疗耐药中发挥重要作用,揭示了 *srebp-1* 靶向策略在 HCC 预防和治疗中的潜力^[27]。那么, WSHc 大鼠 NAFLD 模型中, *Srebp-1* 是否可以成为药物治疗作用的靶点同样值得思考。

参 考 文 献 (References)

- [1] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [2] COTTER T G, RINELLA M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: the state of the disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1851-1864.
- [3] FARRELL G C, LARTER C Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2006, 43(2 Suppl 1): S99-S112.
- [4] MUSSO G, GAMBINO R, CASSADER M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48(1): 1-26.
- [5] VACCA M, ALLISON M, GRIFFIN J L, et al. Fatty acid and glucose sensors in hepatic lipid metabolism: implications

- in NAFLD [J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(3): 250–261.
- [6] 马全鑫, 张利棕, 戎亦骊, 等. 新型高脂血症易感 (WSHc) 大鼠非酒精性脂肪肝病模型的建立与病理特点研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 314–322.
- MA Q X, ZHANG L Z, RONG Y L, et al. Establishment and pathological characteristics of a non-alcoholic fatty liver disease model in a new type of hyperlipidemia-susceptible (WSHc) rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(3): 314–322.
- [7] 马全鑫, 陈姣姣, 郁晨, 等. 一种新型高脂血症易感大鼠的血脂水平与心血管并发症 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 25–31.
- MA Q X, CHEN J J, YU C, et al. Blood lipid levels and cardiovascular complications in a new type of hyperlipidemia-susceptible rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(1): 25–31.
- [8] BROWN M S, GOLDSTEIN J L. Cholesterol feedback; from schoenheimer's bottle to scap's MELADL [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50: S15-S27.
- [9] HORTON J D, GOLDSTEIN J L, BROWN M S. SREBPs; activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1125–1131.
- [10] SHIMOMURA I, SHIMANO H, KORN B S, et al. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(52): 35299–35306.
- [11] BODEN G, SALEHI S, CHEUNG P, et al. Comparison of *in vivo* effects of insulin on SREBP-1c activation and INSIG-1/2 in rat liver and human and rat adipose tissue [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, 21(6): 1208–1214.
- [12] OPPI-WILLIAMS C, SUAGEE J K, CORL B A. Regulation of lipid synthesis by liver X receptor α and sterol regulatory element-binding protein 1 in mammary epithelial cells [J]. *J Dairy Sci*, 2013, 96(1): 112–121.
- [13] IBRAHIM S H, HIRSOVA P, MALHI H, et al. Animal models of nonalcoholic steatohepatitis; eat, delete, and inflame [J]. *Dig Dis Sci*, 2016, 61(5): 1325–1336.
- [14] LOPEZ J M, BENNETT M K, SANCHEZ H B, et al. Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(3): 1049–1053.
- [15] OH S Y, PARK S K, KIM J W, et al. Acetyl-CoA carboxylase beta gene is regulated by sterol regulatory element-binding protein-1 in liver [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(31): 28410–28417.
- [16] BENNETT M K, LOPEZ J M, SANCHEZ H B, et al. Sterol regulation of fatty acid synthase promoter: coordinate feedback regulation of two major lipid pathways [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(43): 25578–25583.
- [17] SUN L, MARIN DE EVSIKOVA C, BIAN K, et al. Programming and regulation of metabolic homeostasis by HDAC11 [J]. *EBioMedicine*, 2018, 33: 157–168.
- [18] THAYER T E, LINO CARDENAS C L, MARTYN T, et al. The role of bone morphogenetic protein signaling in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 9831.
- [19] KIM D, TOUROS A, KIM W R. Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome [J]. *Clin Liver Dis*, 2018, 22(1): 133–140.
- [20] PALEKAR N A, NAUS R, LARSON S P, et al. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Liver Int*, 2006, 26(2): 151–156.
- [21] DORN C, RIENER M O, KIROVSKI G, et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010, 3(5): 505–514.
- [22] SOZEN E, DEMIREL-YALCINER T, SARI D, et al. Deficiency of SREBP1c modulates autophagy mediated lipid droplet catabolism during oleic acid induced steatosis [J]. *Metabol Open*, 2021, 12: 100138.
- [23] MOSLEHI A, HAMIDI-ZAD Z. Role of SREBPs in liver diseases: a mini-review [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2018, 6(3): 332–338.
- [24] VERMA S, JENSEN D, HART J, et al. Predictive value of ALT levels for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Liver Int*, 2013, 33(9): 1398–1405.
- [25] GAGGINI M, MORELLI M, BUZZIGOLI E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease [J]. *Nutrients*, 2013, 5(5): 1544–1560.
- [26] HU Q, MAO Y, LIU M, et al. The active nuclear form of SREBP1 amplifies ER stress and autophagy via regulation of PERK [J]. *FEBS J*, 2020, 287(11): 2348–2366.
- [27] SU F, KOEBERLE A. Regulation and targeting of SREBP-1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2024, 43(2): 673–708.