

沙鼠非酒精性脂肪性肝病形成中氧化应激及细胞因子的变化及意义

毛晓娟, 俞建顺, 李剑霜, 高 凯, 严茂祥, 陈芝芸

(浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006)

【摘要】 目的 研究长爪沙鼠非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 形成中氧化应激及细胞因子的动态变化及意义。**方法** 48 只雄性长爪沙鼠随机分为正常组和模型组, 每组 24 只, 分别给予普通饲料和高脂饲料喂养, 在实验第 4 周、第 8 周和第 16 周末每组分别处理 8 只沙鼠, 化学法动态检测肝组织匀浆 MDA 含量以及 SOD、GSH-PX 和 T-AOC 活力, 液相悬浮芯片技术动态检测血清 TNF- α 、INF- γ 、IL-10 等细胞因子水平。**结果** 随 NAFLD 疾病的进展, 沙鼠肝组织 MDA 含量逐渐增加, 且均较正常组明显增高 ($P < 0.01$); T-AOC 水平先略升高后降低, 4 周、16 周时较正常组显著下降 ($P < 0.05$); SOD 水平先显著增高后明显降低, 4 周时较正常组明显增高 ($P < 0.05$), 8 周、16 周时明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); GSH-PX 水平呈逐渐下降趋势, 8 周、16 周时较正常组明显降低 ($P < 0.05$)。血清细胞因子 TNF- α 、INF- γ 随 NAFLD 进展逐渐增加, IL-10 水平则逐渐降低, 在 8 周、16 周时与正常组有统计学差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 高脂诱导的长爪沙鼠 NAFLD 模型氧化应激相关指标及炎症细胞因子随着单纯脂肪肝向脂肪性肝炎、肝纤维化及肝硬化的发展而出现显著变化, 参与 NAFLD 的发生和发展。

【关键词】 长爪沙鼠; 非酒精性脂肪性肝病; 氧化应激; 细胞因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2015) 09-0028-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.009.006

Dynamic changes of oxidative stress and cytokines in gerbils with nonalcoholic fatty liver disease and their significance

MAO Xiao-juan, YU Jian-shun, LI Jian-shuang, GAO Kai, YAN Mao-xiang, CHEN Zhi-yun

(The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China)

【Abstract】 Objective To explore the dynamic changes of oxidative stress and cytokines in Mongolian gerbils with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and their significance. **Methods** Forty-eight healthy male gerbils were randomly divided into normal group and model group, 24 in each group. Gerbils of the model group were fed with high fat diet while those of the normal group with normal diet. Eight gerbils in each group were killed at the end of 4 w, 8 w and 16 w, respectively. MDA content and SOD, GSH-PX and T-AOC activity in the liver tissue were detected by chemical method, and serum TNF- α , INF- γ and IL-10 levels were determined using liquid suspension chip. **Results** With the development of NAFLD, MDA content in liver increased gradually, and the MDA contents were all significantly higher than those of the normal group ($P < 0.01$); T-AOC level slightly increased, and then decreased, the levels at 4 w and 16 w were markedly decreased compared with those of the normal group ($P < 0.05$); SOD level was significantly increased and

[基金项目] 浙江省省级公益性技术应用研究计划项目 (NO. 2012C37088)。

[作者简介] 毛晓娟 (1989 -), 女, 硕士, 研究方向: 消化系统疾病。E-mail: xjmao8808@163.com。

[通讯作者] 陈芝芸 (1963 -), 女, 医学硕士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向: 消化系统疾病。E-mail: zhiych123@163.com。

then markedly reduced, the level of the model group at 4 w was significantly increased ($P < 0.05$), while that at 8 w and 16 w were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The level of GSH-PX was decreased gradually, the levels at 8 w and 16 w were significantly lower than those of the normal group ($P < 0.05$). With the progression of NAFLD, serum TNF- α and IFN- γ were increased gradually, while the level of IL-10 decreased gradually, and the levels at 8 w and 16 w were significantly lower than those of the normal group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** The oxidative stress-related indicators and inflammatory cytokines in the gerbil NAFLD models induced by high fat diet are significantly changed as simple fatty liver develops into steatohepatitis, liver fibrosis and cirrhosis, and participate in the development and progression of NAFLD.

【Key words】 Mongolian gerbil; Nonalcoholic fatty liver disease; Oxidative stress; Cytokine; Liver fibrosis; Steatohepatitis

长爪沙鼠又称为长爪沙土鼠、黑爪蒙古沙鼠、蒙古沙鼠、砂耗子和黄耗子等,属啮齿目、仓鼠科、沙鼠亚科、沙鼠属动物。目前我国有三个较大的长爪沙鼠封闭种群,分别饲养于浙江、北京和广州。长爪沙鼠在医学领域作为实验动物已有 20~30 年的历史,被广泛应用于糖脂代谢相关性疾病、寄生虫病、传染病、脑血管疾病和肿瘤等多方面的医学研究中。利用长爪沙鼠建立的非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)模型在病理生理上与人类 NAFLD 相似,弥补了以往使用的 SD 或 Wistar 大鼠其血脂紊乱性质与人类 NAFLD 患者的临床表现存在较大差异甚至出现相反结果这一缺陷^[1],并且造模时间可大大缩短。笔者所在项目组前期采用高脂饲料喂养长爪沙鼠,结果 4 周时就出现了重度的肝细胞脂肪变(单纯性脂肪肝);8 周时脂肪性肝炎的病理表现明显,出现大量炎细胞的浸润、肝小叶散在的坏死灶及肝细胞气球样变,窦周的纤维化,部分门脉周围的纤维化;16 周时间质纤维化加重,部分形成假小叶,有早期肝硬化的表现,在 16 周较短的时间内高脂喂养的沙鼠涵盖了 NAFLD 疾病谱的各个阶段,因此是 NAFLD 研究的良好模型^[2]。本研究动态观察沙鼠 NAFLD 的不同阶段氧化应激指标及细胞因子的变化情况,探讨其在沙鼠 NAFLD 发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

Z:ZCLA 长爪沙鼠 48 只,雄性,清洁级,体重 40 g~60 g,由浙江省医学科学院实验动物中心提供,动物许可证号【SCXK(浙)2008-0033】,饲养在浙江中医药大学动物实验研究中心【SYXK(浙)2008-0115】,室温(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度在 50%~60%,光照 12h 明暗交替,适应性饲养 1 周后开始实

验。

1.2 主要试剂及仪器

胆固醇为上海思吉生物制品有限公司产品,3 号胆盐为杭州微生物试剂有限公司产品,苏木素、伊红染料为 Sigma 进口分装产品,Masson 染色试剂盒为中国福州迈新生物技术有限公司产品,Bio-Plex 小鼠液相悬浮芯片试剂盒(包括以下抗体包被的微球:TNF- α 、IFN- γ 、IL-10)为美国 Bio-Rad 公司产品,总蛋白定量测试盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。德国 Beckman Allegra X-15R centrifuge 离心机,美国 Bio-Rad 公司 Bio-Plex 200 液相悬浮芯片系统。

1.3 实验方法

长爪沙鼠随机分为正常组 24 只和模型组 24 只,两组又各分 4 周、8 周及 16 周 3 个时相点。正常组给予普通饲料喂养,模型组给予高脂饲料(普通饲料 80.5%、蛋黄粉 10%、猪油 7%、胆固醇 2%、胆盐 0.5%)喂养,自由进食及饮水,在实验第 4 周、8 周及 16 周末 3 个时相点两组分别随机处理沙鼠 8 只。各处理沙鼠眼眶取血,分离血清,采用液相悬浮芯片技术动态检测 3 个时相点沙鼠血清 TNF- α 、INF- γ 及 IL-10 水平;取肝组织,以 0.9% NaCl 制成肝组织匀浆,分别采用考马氏亮兰法测定 3 个时相点肝组织匀浆蛋白浓度、硫代巴比妥酸(TBA)法测定肝匀浆 MDA 含量、黄嘌呤氧化酶法测定肝匀浆 SOD 活力、分光光度法测定 GSH-PX 和 T-AOC 活力。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,独立样本的 t 检验进行两组之间均数的比较, $P < 0.05$ 表示差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 NAFLD 沙鼠肝匀浆氧化应激指标的动态变化

正常组 4 周、8 周及 16 周三个时相点沙鼠肝组织匀浆 MDA 含量随喂养时间延长略有增加,但各时相点之间差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组 MDA 含量则随造模时间的延长而显著增加,8 周、16 周组较 4 周组以及 16 周组较 8 周组均显著增加($P < 0.01$),且模型组各时相点较正常组同一时相点均明显增高($P < 0.01$)。

正常组肝匀浆 T-AOC 水平随喂养时间延长略有增加,但各时相点之间差异无统计学意义($P > 0.05$);模型组沙鼠在 8 周较 4 周稍增高至 16 周又降低的趋势,但 3 个时相点之间无统计学差异($P > 0.05$),而 4 周、16 周时相点较正常组同一时相点显著下降($P < 0.05$),模型 8 周组则与正常组同一时相点差异无统计学意义($P > 0.05$)。

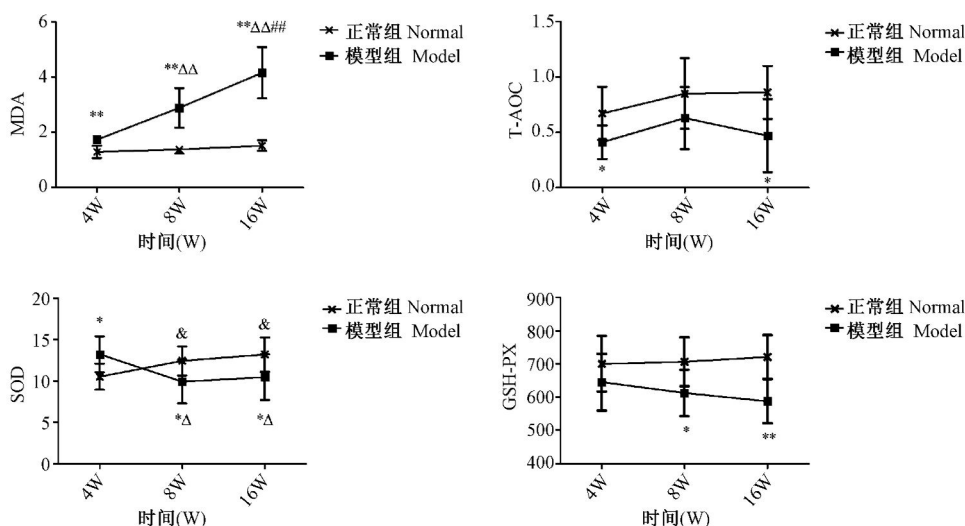
正常组肝匀浆 SOD 水平随喂养时间延长逐渐增加,8 周、16 周组较 4 周时明显升高($P < 0.05$);而模型组 SOD 水平随造模时间延长出现先增高后显著下降趋势,8 周、16 周组较 4 周组明显降低($P < 0.05$),同时模型组 4 周时即较同一时相点正常组

明显增高($P < 0.05$),而模型组 8 周和 16 周时则均较同一时相点正常组显著降低($P < 0.05$),正常组肝匀浆 GSH-PX 水平随喂养时间延长均略有增加,而模型组则随造模时间延长呈逐渐下降趋势,但各时相点之间差异均无统计学意义($P > 0.05$),模型组 8 周、16 周时较正常组同一时相点明显降低($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)(图 1)。

2.2 NAFLD 沙鼠血清 TNF- α 、IFN- γ 、IL-10 水平的动态变化

正常组沙鼠血清 TNF- α 、IFN- γ 水平在 4 周、8 周及 16 周三个时相点基本持平或略有增高($P > 0.05$),模型组沙鼠随造模时间延长逐渐增加,在 8 周、16 周时相点较 4 周时相点显著增高($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),且模型组 4 周时与正常组同一时相点差异无统计学意义($P > 0.05$),而 8 周、16 周时则较正常组同一时相点显著增高($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

正常组沙鼠血清 IL-10 水平随喂养时间增加而略有降低($P > 0.05$),模型组沙鼠随造模时间延长逐渐下降,在 16 周时相点较 4 周时相点显著减少($P < 0.05$);且模型组 4 周时相点与正常组同一时相点差异无统计学意义($P > 0.05$),而 8 周、16 周时相点则较正常组同一时相点显著减少($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)(图 2)。



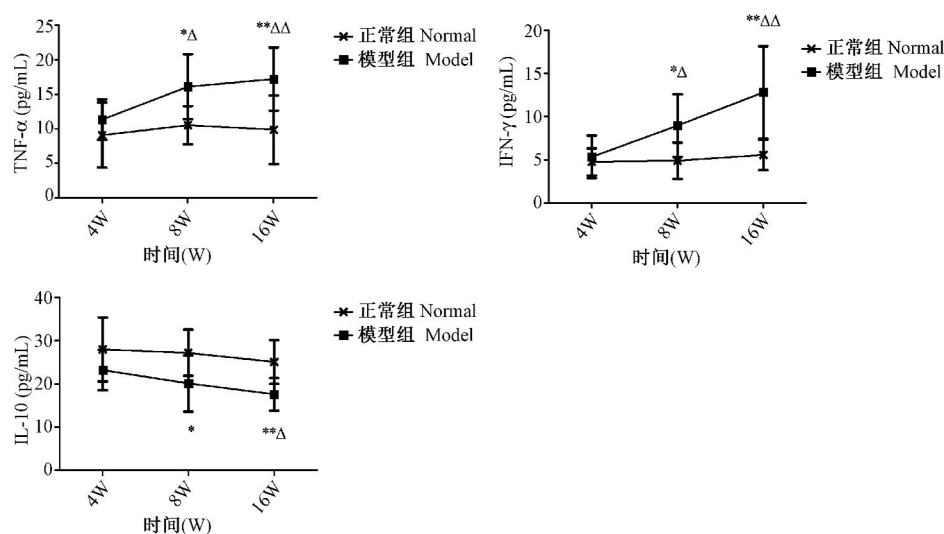
注:与同一时相点正常组比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 4 周模型组比 $^{\Delta}P < 0.05$,

$^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与 8 周模型组比 $^{\#\#}P < 0.01$;与 4 周正常组比 $^{\&}P < 0.05$

图 1 NAFLD 沙鼠肝组织氧化应激水平的动态变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the normal group at the same time point; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, compared with the model group at 4 weeks; $^{\#\#}P < 0.01$, compared with the model group at 8 weeks; $^{\&}P < 0.05$, compared with the normal group at 4 weeks

Fig. 1 The dynamic changes of oxidative stress in the gerbils with nonalcoholic fatty liver disease($\bar{x} \pm s, n = 8$)



注:与同一时相点正常组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 4 周模型组比 $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

图 2 NAFLD 沙鼠血清细胞因子水平的动态变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, pg/mL)

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the normal group at the same time point;

$^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$, compared with the model group at 4 weeks

Fig. 2 The dynamic changes of serum cytokines in the gerbils with nonalcoholic fatty liver disease ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, pg/mL)

3 讨论

随着生活水平的提高,NAFLD 的患病率逐渐增高。NAFLD 的疾病谱包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化、肝硬化甚至部分可进展为肝细胞癌^[3],其具体发病机制至今尚未完全明了,目前认为脂质代谢紊乱、胰岛素抵抗、氧化应激、细胞因子、肝脏固有免疫等多种因素参与 NAFLD 的发病过程^[4-5],对于这些因素如何相互作用,比较认可的是“二次打击”学说,即首先是胰岛素抵抗导致的脂肪在肝脏沉积、肝细胞脂肪变性使肝脏受到第一次打击,接着是氧化应激和脂质过氧化损伤,导致炎性细胞因子等释放增加,引起肝脏炎症反应和肝细胞受损使得肝脏受到第二次打击,病程向脂肪性肝炎、肝纤维化和肝硬化进展^[6,7]。

氧化应激和脂质过氧化是 NAFLD 肝细胞损伤的催化剂,在 NAFLD 的进展中起关键作用。近年来研究发现,在 NAFLD 的早期氧化应激和脂质过氧化损伤可能已发挥致病作用,它们参与 NAFLD 的发生并促进其发展^[8]。本研究发现,高脂喂养的模型组沙鼠在 4 周(单纯脂肪肝阶段)肝匀浆脂质过氧化产物 MDA 的含量即较同一时相点正常组显著提高,随疾病的进展,8 周(NASH 阶段)、16 周(脂肪性肝纤维化及早期肝硬化阶段)进一步增加,且均

较同一时相点正常组明显增高。而模型组 T-AOC 水平 8 周时相较 4 周时相点有增高趋势,至 16 周又再度降低,模型组三个时相点均较同一时相点正常组水平降低,其中 4 周、16 周与正常组同一时相点比差异有统计学意义,8 周则与正常组同一时相点无统计学差异;模型组肝匀浆 SOD 水平随造模时间延长出现先增高后下降趋势,4 周时相点较正常组同一时相点明显增高,8 周、16 周则均较正常组同一时相点显著降低;GSH-PX 水平随疾病进展逐渐下降趋势,其中 8 周、16 周时相点较正常组同一时相点明显降低。研究表明,沙鼠长期高脂饮食,脂质在肝脏沉积,肝脏摄取脂肪酸过多,氧化应激、脂质过氧化反应增强,活性氧(reactive oxygen species, ROS)、MDA 等产物增加,使肝细胞受损;过多的 ROS、MDA 等耗竭 SOD、GSH 等抗氧化因子,总抗氧化能力下降,使促氧化物与抗氧化物之间的动态平衡失调,机体为了抵抗脂质过氧化反应使抗氧化因子 SOD 等反馈性地升高;由于高脂饮食等病因的持续存在,氧化应激、脂质过氧化反应进一步增强,ROS、MDA 等对肝细胞损伤加重,病变向脂肪性肝炎、肝纤维化和肝硬化进展,形成恶性循环,可见氧化应激、脂质过氧化参与了沙鼠 NAFLD 的发生及发展过程。

长期高脂饮食可导致肝脏脂质蓄积,氧化应激

增强,同时诱导肝细胞对内、外源性损伤因子敏感性增高,激活转录因子 NF- κ B,引起多种促炎细胞因子如 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 等过表达,这些细胞因子可介导肝脏的炎症反应和纤维化等^[9],直接或间接地造成肝细胞受损;同时,促炎细胞因子的过表达,正反馈后又促进氧化应激的增强,形成恶性循环,加剧 NAFLD 的进展。而一些抗炎细胞因子 IL-10、脂联素等则能产生抗炎作用并抵抗肝纤维化的形成。本研究发现,NAFLD 模型组沙鼠血清 TNF- α 、IFN- γ 水平随疾病的进展逐渐增高,在单纯脂肪肝阶段的 4 周时相点与正常组无统计学差异,而在脂肪性肝炎 8 周和肝纤维化阶段的 16 周时相点则较正常组同一时相点显著增高;而血清抗炎细胞因子 IL-10 水平随疾病的进展逐渐下降,在 4 周时相点与正常组无统计学差异,在 8 周、16 周时相点则较正常组同一时相点明显降低;表明长期高脂饮食可诱导促炎细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 的分泌,抑制抗炎细胞因子 IL-10 的表达,进一步促进脂肪变加重和炎症、纤维化的进展;研究提示,细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-10 参与 NAFLD 肝脏炎症反应的发病机制。

NAFLD 的发病机制复杂多样,本研究中氧化应激相关指标及炎症细胞因子随着单纯脂肪肝向脂肪性肝炎、肝纤维化及肝硬化的进展而出现显著变化,它们在 NAFLD 的发生、发展中至关重要。因此,选取沙鼠作为对 NAFLD 发病机制的探讨及药物临床前有效性评价实验模型具有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] 徐黎明,石巧娟,徐磊,等. 蒙古沙鼠非酒精性脂肪性肝病模型的建立与评价[J]. 浙江预防医学, 2007, 19(11): 1-2, 7.
- [2] 俞建顺,严茂祥,王德军,等. 高脂饮食对长爪沙鼠生化及主要脏器组织病理学的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(4): 38-43, 47.
- [3] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝病杂志, 2006, 14(3): 161-163.
- [4] Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(39): 16381-16385.
- [5] Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in non-alcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis [J]. Hepatology, 2010, 52(5): 1836-1846.
- [6] Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sentürk H. From fatty liver to fibrosis: a tale of "second hit" [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(8): 1158-1165.
- [7] Takaki A, Kawai D, Yamamoto K, et al. Molecular mechanisms and new treatment strategies of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(5): 7352-7379.
- [8] Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(1): 59-69.
- [9] Hassan K, Bhalla V, El Regal ME, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(34): 12082-12101.

[修回日期]2015-08-10