

非诺贝特保护非酒精性脂肪性肝病小鼠 胰岛素抵抗作用机制的探讨

沈馨茹¹, 鲁云霞², 章秋¹

摘要 目的 研究非诺贝特改善非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 小鼠的胰岛素抵抗是否与内质网应激 (ERS) 有关。方法 采用高热量高胆固醇饮食 (HCD) 建立 NAFLD 小鼠模型, 非诺贝特 40 mg/(kg·d) 灌胃治疗 2 周, 葡萄糖耐量试验 (GTT) 和胰岛素耐量试验 (ITT) 分析胰岛素抵抗的改善作用, 检测血清血脂和丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 指标, HE 及油红 O 染色观察肝脏组织的病理学变化, Real-time PCR 和 Western blot 法检测过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、ERS 标志物葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 和转录因子 GADD153 (CHOP) 的表达。结果 与正常饮食 (SCD) 组相比, HCD 组小鼠胰岛素抵抗明显, 血清三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 明显降低 ($P < 0.01$), 肝细胞内有大小不等的脂滴形成, 可见气球样变的肝细胞及炎性细胞浸润; PPAR α 、GRP78 mRNA 及蛋白表达显著降低, CHOP mRNA 及蛋白表达显著升高。与 HCD 组相比, HCD + 非诺贝特 (HCF) 组小鼠血清 TG 明显降低 ($P < 0.05$), 肝细胞脂滴含量、变性肝细胞及浸润的炎细胞明显减少, PPAR α 、GRP78 mRNA 及蛋白表达明显升高, CHOP mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。结论 非诺贝特有明显的改善 NAFLD 小鼠胰岛素抵抗、降低 TG 的作用, 这可能与激活 PPAR α 及减轻 ERS 有关。

关键词 非诺贝特; 非酒精性脂肪性肝病; 胰岛素抵抗; 内质网应激; PPAR α

中图分类号 R 332; R 965.1; R 575

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0721-05

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指以除外酒精或其他明确的损肝因素所致的肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临

床病理综合征。近年来, 随着人们生活水平的提高和生活方式的改变, NAFLD 的发病率逐年上升, 已成为最常见的慢性肝脏疾病^[1]。NAFLD 除了可直接导致失代偿期肝硬化、肝细胞癌和移植肝复发外, 还可影响其他慢性肝病的进展, 并参与 2 型糖尿病和动脉粥样硬化的发病过程^[2]。NAFLD 的重要病理学特征之一是胰岛素抵抗^[3], 近年来文献^[4]报道其可能与内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 有关。非诺贝特是目前临床上较为常用的调脂药物, 其作用机制可能与降脂、抗炎和抗氧化应激等有关, 但尚无其参与 ERS 的相关报道^[5]。由于非诺贝特的药效学效应较明确, 该研究先用模拟人类高热量高胆固醇饮食 (high-calorie and high-cholesterol diet, HCD) 的比例制作的饲料诱导构建 NAFLD 小鼠模型, 然后给予单一剂量的非诺贝特干预, 初步探讨其保护作用是否与改变过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 以及 ERS 标志物葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 和转录因子 GADD153 (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP) 的表达有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8 周龄 C57BL/6 小鼠 36 只, 清洁级, 雄性, 体重 20 ~ 25 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 每笼 6 只, 温度 20 ~ 25 °C, 相对湿度 35% ~ 60%, 自由摄食饮水, 常规饲养 1 周后实验。

1.2 主要试剂 非诺贝特 (江苏神龙药业有限公司); 油红 O (美国 Sigma 公司); RNAiso Reagent、Real-time PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司); RT 试剂盒 (美国 Fermentas 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (上海生工生物工程有限公司); 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 鼠单克隆抗体 (康为世纪生物技术有限公司); 兔抗鼠 PPAR α 、CHOP 一抗 (美国 Santa Cruz 公司); 兔抗鼠 GRP78 一抗 (美国 Abcam 公司); 山羊抗兔及山羊抗鼠辣根过氧化物酶抗体 (武汉博士德生物技术有限公司); ECL 增强型发光剂 (美国 Pierce 公司); RIPA 裂解液 (碧云天生物技术

2014-03-20 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1208085MH168、1308085MH154); 安徽医科大学博士启动基金 (编号: XJ201013)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院内分泌科, 合肥 230022

²安徽医科大学生物化学教研室, 合肥 230032

作者简介: 沈馨茹, 女, 硕士研究生;

章秋, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: 13965015060@163.com

研究所)。

1.3 造模与分组 将 C57BL/6 小鼠随机分为正常饮食组 (SCD 组 $n=10$) 和 HCD 组 ($n=26$) ,SCD 组给予标准饲料喂养 (安徽医科大学动物实验中心提供 总热量 14.5 kJ/g ,含 66.9% 碳水化合物 24.8% 蛋白质 8.3% 脂肪) ;HCD 组给予高热量高胆固醇饲料喂养 (由 20% 猪油 20% 蔗糖 10% 蛋黄粉 1% 胆固醇和 49% 基础饲料混合压制成型) ,12 周后取体重明显增加的小鼠 20 只随机分为 HCD 组 ($n=10$) 和 HCD + 非诺贝特组 (HCF 组 $n=10$) ,HCD 组继续予以 HCD 喂养 2 周 ,HCF 组在给予 HCD 的同时予以非诺贝特 40 mg/(kg · d) 灌胃治疗 2 周。

1.4 葡萄糖耐量试验 (GTT) 和胰岛素耐量试验 (ITT) 小鼠禁食 12 h 后 ,灌胃给予葡萄糖 2 g/kg ,分别于 0、30、60、90、120 min 鼠尾采血测定血糖水平 ,行 GTT;小鼠禁食 4 h 后 ,腹腔注射胰岛素 0.1 U/kg ,分别于 0、30、60、90、120 min 采血测定血糖值 ,行 ITT。采血量约 5 μ l ,采血过程中小鼠生命体征平稳。

1.5 血清学检测 所有小鼠禁食 12 h ,CO₂ 窒息处死 摘眼球取血 3 000 r/min 离心 5 min ,分离血清 ,检测血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase ,ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartic transaminase ,AST)、三酰甘油 (triglyceride ,TG)、总胆固醇 (total cholesterol ,TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein-cholesterol ,HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein-cholesterol ,LDL-C) 水平。

1.6 HE 和油红 O 染色 将肝组织经 4% 多聚甲醛固定后进行石蜡包埋 5 μ m 切片 ,HE 染色 200 倍光镜下观察并采集图像。将肝组织进行冰冻切片 ,厚约 5 μ m 60% 异丙醇中稍洗 油红 O 染色约 1 h 60% 异丙醇洗去多余染液 苏木精染核 甘油明胶封片 400 倍光镜下观察并采集图像。

1.7 实时荧光定量 PCR TRIzol 法抽提肝脏组织总 RNA 2 μ g 总 RNA 经逆转录合成 cDNA 第一链 ,采用 Primer 5.0 软件设计引物。PPAR α 上游: 5'-

ACGATGCTGTCCCTCCTTGATG-3' ,下游: 5'-GTGT-GATAAAGCCATTGCCGT-3'; GRP78 上游: 5'-TGTG-GTACCCACCAAGAAGTC-3' ,下游: 5'-TTCAGCTGT-CACTCGGAGAAT-3'; CHOP 上游: 5'-ATATCTCATC-CCCAGGAAACG-3' ,下游: 5'-TCTTCCTTGCTCTTC-CTCCTC-3'; GAPDH 上游: 5'-TGTGTCCGTCGTG-GATCTGA-3' ,下游: 5'-CCTGCTCACCACCTTCTT-GAT-3'。在 StepOnePlus (美国 ABI 公司) 上进行扩增 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s 60 $^{\circ}$ C 40 s ,共 40 个循环 ,用比较 Ct 法 ($\Delta\Delta$ Ct 法) 分析结果。

1.8 Western blot 各组肝脏组织 50 mg ,RIPA 裂解液抽提总蛋白 ,BCA 法测蛋白浓度 ,12% SDS-PAGE 凝胶电泳 转移到 PVDF 膜上 ,封闭后分别用抗 GAPDH (1 : 800)、PPAR α (1 : 800)、GRP78 (1 : 600) 和 CHOP (1 : 1 000) 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜 ,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或抗鼠二抗室温孵育 1 h ,加入 ECL 发光剂反应 5 ~ 10 min ,暗室显影成像 ,实验重复 3 次。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,多组间比较采用单因素方差分析 ,两组间比较用 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 非诺贝特对 NAFLD 小鼠胰岛素抵抗的影响

GTT 结果表明: HCD 组小鼠空腹血糖值比 SCD 和 HCF 组高 注射葡萄糖 30 min 后血糖达到峰值 ,且明显高于 SCD 和 HCF 组 ,此后下降缓慢 ,血糖波动大; 与 HCD 组相比 ,HCF 组血糖波动较平稳 ,且峰值明显低于 HCD 组。ITT 结果表明: 在注射胰岛素 30 min 内 ,SCD 组小鼠血糖迅速下降 ,随后缓慢上升 ,HCD 组血糖下降缓慢 ,且始终维持在较高水平; HCF 组各时间点的血糖值介于 SCD 和 HCD 组之间 ,见图 1。

2.2 非诺贝特对 NAFLD 小鼠血清生化指标的影响 如表 1 所示 ,与 SCD 组小鼠相比 ,HCD 组小鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平显著升高 ,HDL-C 水平明显下降 ,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) ; 与

表 1 3 组小鼠的血液生化指标变化 ($n=10$ $\bar{x} \pm s$)

组别	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
SCD	0.44 \pm 0.07	1.67 \pm 0.29	1.78 \pm 0.39	0.21 \pm 0.05	39.20 \pm 5.71	68.40 \pm 10.14
HCD	0.73 \pm 0.14 **	2.42 \pm 0.45 **	1.29 \pm 0.26 **	0.49 \pm 0.09*	40.14 \pm 8.19	68.00 \pm 18.58
HCF	0.44 \pm 0.12#	2.21 \pm 0.25	1.56 \pm 0.18	0.42 \pm 0.27	41.14 \pm 7.38	74.57 \pm 13.21
F 值	3.864	7.044	4.148	3.809	0.104	0.412

与 SCD 组比较: * $P < 0.05$,** $P < 0.01$; 与 HCD 组比较: # $P < 0.05$

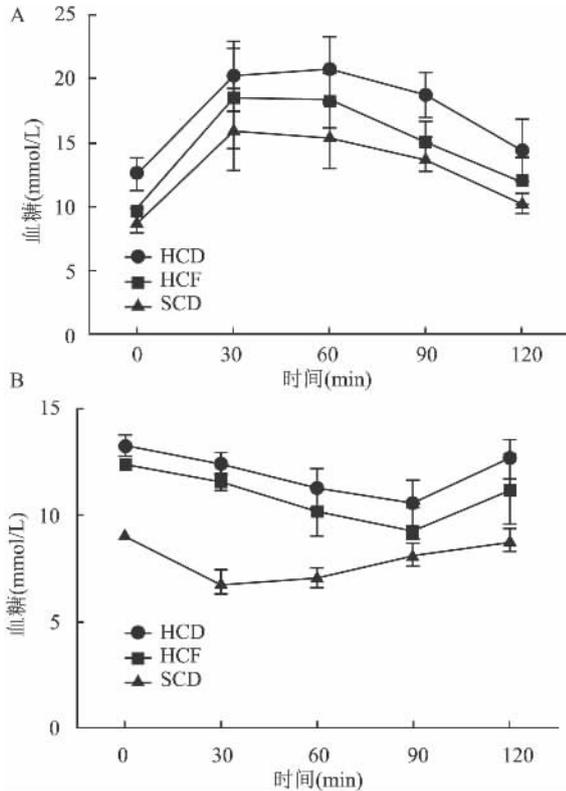


图1 各组小鼠 GTT 和 IIT
A: GTT; B: IIT

HCD 组比较, HCF 组中 TG 下降明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); ALT 和 AST 水平在 3 组间的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 非诺贝特对 NAFLD 小鼠肝脏组织病理学的影响 SCD 组小鼠肝细胞形态正常, 胞质清晰; HCD 组可见肝细胞内有大小不等的脂滴形成, 肝细胞有

气球样变, 中央静脉处有炎性细胞浸润; 而 HCF 组肝细胞脂肪变性程度及炎性细胞浸润较 HCD 组明显减少; 油红 O 染色同样表明了 HCD 组肝细胞内的脂滴明显多于 SCD 组, 而 HCF 组肝细胞内脂滴明显减少。见图 2。

2.4 非诺贝特对 PPAR α 、GRP78 和 CHOP mRNA 水平表达的影响 Real-time PCR 结果表明, 与 SCD 组比较, HCD 组小鼠肝脏组织内 PPAR α 、GRP78 mRNA 表达量明显降低, 而 CHOP mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$); 非诺贝特干预后能够显著增加肝脏组织内的 PPAR α 、GRP78 mRNA 的表达量, 减少 CHOP mRNA 的表达量 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.5 非诺贝特对 PPAR α 、GRP78 和 CHOP 蛋白水平表达的影响 Western blot 结果表明, 与 SCD 组相比, HCD 组小鼠肝脏组织表达的 PPAR α 、GRP78 蛋白水平显著下降, CHOP 的蛋白表达量明显升高 ($P < 0.05$); 非诺贝特干预后 PPAR α 、GRP78 的蛋白水平表达显著上升, CHOP 的蛋白表达量明显下调 ($P < 0.05$), 见图 4。

3 讨论

NAFLD 是一种与胰岛素抵抗和遗传易感性密切相关的代谢应激性肝病, 包含了一系列肝脏损伤状态, 包括单纯性脂肪肝 (simple steatosis, SFL)、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 及其最后的肝硬化和肝纤维化。本次研究采用高热量高胆固醇饲料喂养小鼠 12 周, HCD 组小鼠血清的 TG、TC、LDL-C 水平显著升高, HDL-C

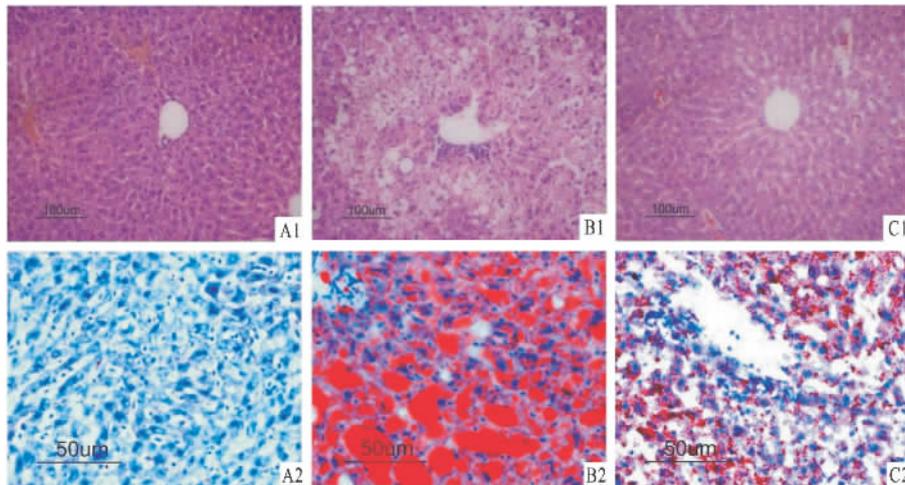


图2 各组肝组织病理学情况

1: HE 染色 $\times 200$; 2: 油红 O 染色 $\times 400$; A: SCD 组; B: HCD 组; C: HCF 组

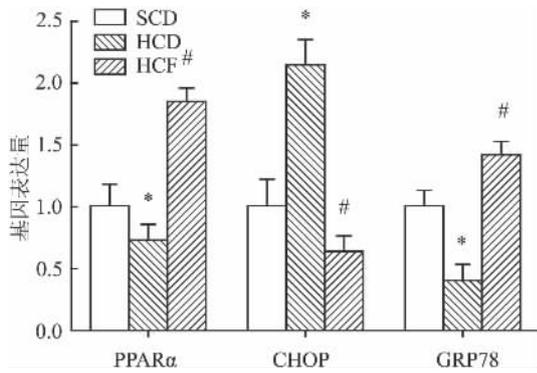


图3 非诺贝特对各组小鼠肝脏组织 PPARα、CHOP、GRP78 mRNA 表达水平的影响
与 SCD 组比较: * P < 0.05; 与 HCD 组比较: # P < 0.05

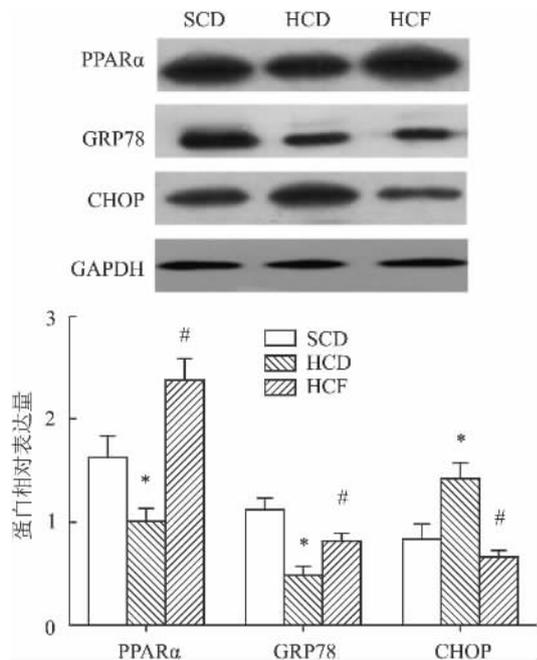


图4 非诺贝特对各组小鼠肝脏组织 PPARα、GRP78、CHOP 蛋白表达水平的影响
与 SCD 组比较: * P < 0.05; 与 HCD 组比较: # P < 0.05

水平明显下降;病理学检测显示 HCD 组小鼠肝细胞内有大小不等的脂滴形成,肝细胞部分气球样变,局部有炎性细胞浸润,表明已成功建立了 NAFLD 模型。

非诺贝特是 PPARα 的特异性激动剂,具有抗氧化应激、抑制炎症反应、抗凋亡等作用,可降低 2 型糖尿病血管并发症的风险^[6-8]。本实验采用该药治疗时,显示非诺贝特可明显降低 NAFLD 小鼠的血清 TG 水平,减少肝细胞内的脂滴,表明非诺贝特能够降低血脂和减轻肝脏脂肪沉积。然而,ALT 和 AST 水平在 3 组小鼠间的差异无统计学意义,之前曾有

文献^[9]报道 59% 的脂肪肝患者血清 ALT 是正常的,这些患者肝脏活检证实还未进展至 NASH 阶段,本次研究结果与其基本一致。

内质网是真核细胞内重要的细胞器,在维持细胞内稳态的平衡方面具有重要作用,当内质网稳态被破坏时,将会导致 ERS,而已知 ERS 在 NAFLD 的发生发展中扮演相当重要的角色^[10]。GRP78 是内质网中最重要的分子伴侣之一,可参与新生多肽链的折叠、装配和转运,研究^[11]表明在 ERS 的早期,GRP78 的表达迅速增加,可帮助变性蛋白重新折叠,恢复蛋白质的正确构象,减轻 ERS,同时将无法恢复的蛋白质转移降解,从而避免细胞进一步受到伤害。然而,持续过强的应激将会使内质网自稳态功能受到严重损害,GRP78 合成减少,同时 CHOP 的表达明显增加,从而启动细胞内的凋亡通路,使细胞死亡^[12]。本研究中非诺贝特能明显激活 PPARα 的表达,从而通过增加肝组织中 TG 的氧化分解来起降脂作用;另一方面通过增加 GRP78 的表达、降低 CHOP 的表达来减轻 ERS 进而激活下游的胰岛素信号通路来改善胰岛素抵抗;但 GRP78 mRNA 和蛋白水平的改变不太一致,可能与其转录后模板降解增加有关,其具体原因有待后期的进一步深入研究。

本研究结果表明:非诺贝特有明显的改善 NAFLD 小鼠的胰岛素抵抗、降低 TG 的作用,可能与激活 PPARα 及减轻 ERS 有关。然而非诺贝特具体影响 ERS 下游的哪条信号通路还需要进一步的实验来证实,其机制的阐明将为非诺贝特开发作为治疗 NAFLD 的药物奠定基础。

参考文献

[1] Tiniakos D G, Vos M B, Brunt E M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis[J]. Annu Rev Pathol, 2010, 5: 145 - 71.

[2] Adams L A, Waters O R, Knudman M W, 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 Gastroenterology, 2009, 104(4): 861 - 7.

[3] Cohen J C, Horton J D, Hobbs H H. Human fatty liver disease: old questions and new insights[J]. Science, 2011, 322(6037): 1519 - 23.

[4] Puri P, Mirshahi F, Cheung O, et al. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2008, 134(2): 568 - 76.

- [5] Michael S K , Anastazia K , Moses S E. Current role of fenofibrate in the prevention and management of non-alcoholic fatty liver disease [J]. World J Hepatol , 2013 , 5(9) : 470 - 8.
- [6] Vera T , Taylor M , Bohman Q , et al. Fenofibrate prevents the development of angiotensin II -dependent hypertension in mice [J]. Hypertension , 2005 , 45(4) : 730 - 5.
- [7] Miranda S , Gonzalez-Rodriguez A , Garcia-Ramirez M , et al. Beneficial effects of fenofibrate in retinal pigment epithelium by the modulation of stress and survival signaling under diabetic conditions [J]. J Cell Physiol , 2012 , 227(6) : 2352 - 62.
- [8] Walker A E , Kaplon R E , Lucking S M , et al. Fenofibrate improves vascular endothelial function by reducing oxidative stress while increasing endothelial nitric oxide synthase in healthy normolipidemic older adults [J]. Hypertension , 2012 , 60(6) : 1517 - 23.
- [9] Fracanzani A L , Valenti L , Bugianesi E , et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes [J]. Hepatology , 2008 , 48(3) : 792 - 8.
- [10] Abdelmalek M F , Diehl A M. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance [J]. Med Clin North Am , 2007 , 91(6) : 1125 - 49.
- [11] Hotamisligi G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis metabolic disease [J]. Cell , 2010 , 140(6) : 900 - 17.
- [12] Tajiri S , Yano S , Morioka M , et al. CHOP is involved in neuronal apoptosis induced by neurotrophic factor deprivation [J]. FEBS Lett , 2006 , 580(14) : 3462 - 8.

Protective effects of fenofibrate on insulin resistance in mice of nonalcoholic fatty liver disease and its partly mechanisms of action

Shen Xinru¹ , Lu Yunxia² , Zhang Qiu¹

(¹Dept of Endocrinology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022;

²Dept of Biochemistry and Molecular Biology , Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To study whether the protective effects of fenofibrate on insulin resistance in mice of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) are related to endoplasmic reticulum stress (ERS). **Methods** Male C57BL/6 mice were fed with high-calorie and high-cholesterol diet (HCD) to induce a model of NAFLD, then one of those two groups from HCD was treated with fenofibrate 40 mg/(kg · d) for 2 weeks (HCF). Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were used to analyze the improvement on insulin resistance. The serum levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT) and aspartic transaminase (AST) were detected. The pathological changes of livers were detected with HE and Oil Red O staining, the mRNA and protein expression of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), glucose regulated protein 78 (GRP78) and transcription factors GADD153 (CHOP) were detected with real-time quantification PCR and Western blot analysis respectively.

Results Compared with the SCD mice, the HCD mice showed significant insulin resistance, higher serum levels of TG, TC and LDL-C ($P < 0.01$, $P < 0.05$), lower serum level of HDL-C ($P < 0.01$), micro- and macrovesicular steatosis, ballooned hepatocytes and infiltration of inflammatory cells were observed in the liver, the expressions of PPAR α and GRP78 at mRNA and protein levels were decreased ($P < 0.05$), however, the expressions of CHOP at mRNA and protein levels were increased ($P < 0.05$). Fenofibrate intervention significantly improved insulin resistance and decreased the serum level of TG ($P < 0.05$). Fenofibrate also alleviated hepatic steatosis and inflammatory infiltration, and increased the mRNA and protein expressions of PPAR α and GRP78, decreased the mRNA and protein expression of CHOP ($P < 0.05$). **Conclusion** Fenofibrate significantly improves insulin resistance and decreases the serum level of TG in NAFLD mice, which may be related to activating PPAR α and relieving ERS.

Key words fenofibrate; nonalcoholic fatty liver disease; insulin resistance; endoplasmic reticulum stress; PPAR α