

本文引用: 谭娅琴, 王德桂, 郭中秋, 等. 吡格列酮对非乙醇性脂肪肝大鼠肝脏脂质沉积的影响[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31 (4): 256-259.

【基础研究】

吡格列酮对非乙醇性脂肪肝大鼠肝脏脂质沉积的影响

谭娅琴, 王德桂, 郭中秋, 廖庆辉, 万新红, 史治宙, 陈玉华

(深圳市龙岗区人民医院内分泌与代谢病科, 广东 深圳 518172)

摘要: 目的 观察吡格列酮对非乙醇性脂肪肝 (NAFLD) 大鼠肝脏内质网应激 (ERS) 的影响, 为在肝脏脂质代谢中的作用提供理论依据。方法 30 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分为正常对照组、生理盐水组和吡格列酮组, 每组 10 只。生理盐水组和吡格列酮组大鼠用高脂饮食饲养 12 周成功建立 NAFLD 模型。吡格列酮组大鼠用吡格列酮治疗 12 周, 生理盐水组大鼠给予生理盐水处理。肝脏病理切片行苏木精-伊红及油红 O 染色。测量大鼠体质量、肝湿质量, 计算肝质量/体质量 (肝/体比), 检测血清谷氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG) 及肝脏组织中 TC、TG 水平; Western blot 法检测大鼠肝脏组织 ERS 相关蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 的表达情况。结果 生理盐水组大鼠肝细胞均出现不同程度脂肪变性, 伴小叶内、汇管区炎性细胞浸润; 吡格列酮组多数肝细胞结构恢复正常, 细胞质内脂滴空泡明显减少。生理盐水组与正常对照组比较大鼠体质量、肝脏质量、肝/体比、血清及肝脏组织中 TC、TG 水平、血清 AST、ALT 水平、肝脏组织 GRP78 表达水平显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 吡格列酮组与生理盐水组比较大鼠体质量、肝脏质量、血清及肝脏组织中 TC 和 TG 水平、血清 AST 和 ALT 水平、肝脏 GRP78 水平均显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 吡格列酮可能通过改善高脂饮食诱导大鼠肝细胞的 ERS 水平来纠正脂质代谢异常。

关键词: 肝脏脂质沉积; 内质网应激; 吡格列酮

中图分类号: R575 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239 (2014) 04-0256-04

Protective effect of pioglitazone on hepatic steatosis in rats with nonalcoholic fatty liver

TAN Ya-qin, WANG De-gui, GUO Zhong-qiu, LIAO Qing-hui, WAN Xin-hong, SHI Zhi-zhou, CHEN Yu-hua

(Department of Endocrinology and Metabolism, Longgang District People's Hospital, Shenzhen 518172, Guangdong Province, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of pioglitazone on liver endoplasmic reticulum stress (ERS) in rats with nonalcoholic fatty liver in order to provide theory basis for its effect on hepatic steatosis. **Methods** Thirty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group, normal saline group and pioglitazone group, with ten rats in each group. Male SD rats were fed by high fat diet for 12 weeks to establish nonalcoholic fatty liver model. The rats in pioglitazone group were treated with pioglitazone for twelve weeks, the rats in normal saline group were treated with normal saline for twelve weeks. Liver sections were stained by hematoxylin eosin and oil red O staining. The body weight, liver weight and liver weight/body weight ratio were measured. The serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST), triglycerides (TG) and total cholesterol (TC) in both serum and liver were measured. Protein expression of ERS: Glucose regulated protein 78 (GRP78) was tested by Western blot. **Results** The liver cells in normal saline group showed different degree of fatty degeneration, with lobular and periportal inflammatory cell infiltration; in the pioglitazone group, the majority of liver cells regained normal structure, cytoplasmic lipid droplet vacuoles decreased significantly. Compared with the normal control group, the body weight, liver weight, liver weight/body weight ratio, the content of TC and TG in serum and liver tissue, the levels of AST and ALT in serum, the protein expression of ERS related protein: GRP78 of the normal saline group were statistically increased, there were statistical significances ($P < 0.05$). Compared with normal saline group, the body weight, liver weight, the content of TC and TG in serum and liver tissue, the levels of AST and ALT in serum, the protein expression of ERS related protein: GRP78 in the pioglitazone group were statistically decreased, there were statistical significances ($P < 0.05$). **Conclusion**

Pioglitazone can correct the lipid dysbolism through ameliorating the hepatocellular ERS level in high-fat fed rats.

Key words: hepatic steatosis; endoplasmic reticulum stress; pioglitazone

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.04.005

收稿日期: 2013-12-02

作者简介: 谭娅琴 (1981-), 女, 湖南邵阳人, 硕士, 主治医师, 研究方向: 糖尿病、甲状腺疾病、非乙醇性脂肪肝、肾上腺疾病。

通信作者: 陈玉华 (1969-), 女, 湖南安化人, 硕士, 主任医师, 研究方向: 糖尿病及其并发症、甲状腺疾病、非乙醇性脂肪肝。

吡格列酮属于噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,研究显示该药能升高血清高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C),降低三酰甘油(triacylglycerol, TG)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C),减少肝脏脂肪含量,降低转氨酶水平^[1-3],因而越来越多的研究开始关注其对肝脏脂质代谢的保护作用,但其作用机制尚未完全明确,对于在非乙醇性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)中与内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)的相互作用缺乏相关报道。本研究旨在探讨吡格列酮对 NAFLD 大鼠 ERS 的影响,以期为临床治疗提供相关理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物 近交系健康雄性清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30 只,4 周龄,体质量(170.35 ± 30.16)g,由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 胆固醇购自北京鼎国生物试剂公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、考马斯亮蓝蛋白定量检测试剂盒购自南京建成生物试剂公司;胰岛素放射免疫检测试剂盒购自中国同位素公司;油红 O 染料、3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)购自美国 Sigma 公司;盐酸吡格列酮片由杭州中美华东制药有限公司生产(国药准字 H20060664);兔抗鼠葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78)抗体、兔抗鼠 β -actin 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;三羟甲基氨基甲烷缓冲液和吐温-20 (Tris-buffered saline and Tween 20, TBST)为美国 Amersham 公司出品;其他试剂为国产分析纯。

1.3 主要仪器 医用超净工作台(北京中建北方环境科技有限公司);JA2003 型电子天平(上海精科天平仪器厂);YX400AI 高压蒸汽消毒器(上海天达仪器有限公司);普通离心机(上海医疗器械三厂);低温高速离心机(德国 Heraeus 公司);Digital camera 光学显微镜(日本 Olympus 公司);DY89-1 电动玻璃匀浆机(江西医疗器械厂);BCD-211WB 普通医用冰箱(青岛海尔公司);超低温冰箱(日本 Sanyoo 公司);HPIAS21000 型图像分析系统(武汉同济医学华海公司);日本光电 7170A 全自动生化分析仪(日本岛津公司);OLS200 型恒温水浴箱(美国 Grant 公司);电热恒温干燥箱(武汉科学仪器厂);SDS-PAGE 电泳仪和转膜仪(美国 Hoefer),

HQ45A 恒温摇床(武汉科学仪器厂)。

1.4 动物模型制备 大鼠均在层流架中喂养,规律投食,自由饮水,室温 24 ℃,明暗各 12 h。每 2 d 用紫外线灯消毒 1 次,以保持无菌环境。普通饲料由中南大学湘雅医学院实验动物中心加工制作;自制高脂饲料配比(质量分数):基础饲料 84%、猪油 14%、胆固醇 2%。为适应环境,先将 30 只实验大鼠放在层流架上饲以普通饲料 1 周,然后根据随机数字表法分为正常对照组 10 只(普通饲料喂养 12 周)和高脂饮食组 20 只(高脂饲料喂养 12 周),每 2 周测体质量,并观察各组大鼠毛色、食量、粪便颜色及行为变化等。高脂饮食组再随机分为 2 组:吡格列酮组 10 只,吡格列酮 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,研碎后用高压消毒水充分溶解,每日 1 次灌胃给药,持续 12 周;生理盐水组 10 只,给予同吡格列酮组等体积的生理盐水灌胃,每日 1 次,持续 12 周。

1.5 肝质量/体质量比(肝/体比)测定 12 周末,禁食过夜,每只大鼠分别测体质量,门静脉取血,离心取血清待测,股动脉放血处死大鼠,迅速摘取肝脏,比较色泽外观,滤纸稍吸干后测肝脏质量。肝/体比 = 肝脏质量/体质量 $\times 100\%$ 。

1.6 肝功能、血脂及肝组织中 TC、TG 水平测定 经门静脉取血后,分离血清,用于丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)、谷氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)测定。取 0.1 g 新鲜肝组织用氯仿:甲醇(体积比 1:1)混合液在 4 ℃ 下制成质量分数 10% 的肝匀浆,静置抽提 48 h, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液可溶部分检测肝组织 TG、TC 水平。以上指标均采用酶法进行分析测定。

1.7 肝组织病理切片 (1)苏木精-伊红(hematoxylin and eosin stain, HE)染色:在大鼠肝脏右叶最大叶距边缘 0.5 cm 取 0.5 g 肝组织,体积分数 10% 甲醛固定,先后用苏木精及伊红染色,体积分数 95% 乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋切片后,中性树胶封片,光学显微镜下观察肝脏组织学形态。(2)油红 O 染色:取新鲜肝右叶组织,冷生理盐水冲洗干净,用滤纸吸干多余液体,立即放入液氮中。切片后采用油红 O 染色,中性树胶封片。显微镜下观察肝脏组织形态、肝小叶结构、脂肪变程度、肝细胞变性、坏死、炎性细胞浸润及增生等情况。

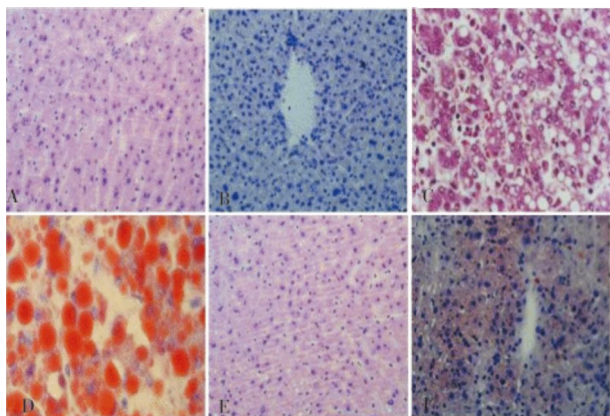
1.8 Western blot 检测 ERS 相关蛋白 GRP78 的表达 兔抗鼠 GRP78 抗体、兔抗鼠 β -actin 抗体均

1:1 000 (体积比) TBST 稀释, DAB 显色。采用 Mi-os2000 图像分析系统对目的条带进行密度分析, 以 β -actin 作为对照, 蛋白含量以目的条带成像灰度值与 β -actin 成像灰度值的比值来表示。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用两样本 t 检验及完全随机设计资料的方差分析, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏组织形态学观察 正常对照组肝细胞结构正常, 呈多边形, 大小较一致, 边界清楚, 细胞核圆而清晰, 1~2 个, 位于细胞中央, 细胞质丰富, 无脂滴及炎性细胞浸润, 肝索以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝小叶轮廓清晰, 肝细胞肝窦排列规则, 汇管区清晰 (图 1A); 油红 O 染色未见明显脂滴 (图 1B)。生理盐水组大量肝细胞肿胀、水样变性, 细胞质内见大小不等、数量不一的脂滴空泡, 脂滴绕于细胞核周围或细胞质一侧, 将细胞核挤向一边, 有的融合成大脂滴, 核被挤向边缘, 成印戒形, 严重者脂滴互相融合, 形成大的脂肪空泡, 均出现不同程度脂肪变性, 并伴小叶内、汇管区炎性细胞浸润 (图 1C); 油红 O 染色见肝细胞内有大量橘红色脂滴, 细胞核被挤压靠近细胞膜, 类似于脂肪细胞 (图 1D)。吡格列酮组多数肝细胞结构恢复正常, 肝小叶较清晰, 细胞质内脂滴空泡明显减少, 可见少量炎性细胞 (图 1E); 油红 O 染色见肝细胞内橘红色脂滴明显减少 (图 1F)。



A: 正常对照组肝脏 HE 染色; B: 正常对照组肝脏油红 O 染色; C: 生理盐水组肝脏 HE 染色; D: 生理盐水组肝脏油红 O 染色; E: 吡格列酮组肝脏 HE 染色; F: 吡格列酮组肝脏油红 O 染色。

图 1 各组大鼠肝脏组织形态学观察 ($\times 40$)

Fig.1 Observation of liver tissue morphology of rats in different groups ($\times 40$)

2.2 各组大鼠的体质量、肝脏质量及肝/体比比较

结果见表 1。生理盐水组大鼠体质量、肝脏质量及肝/体比较正常对照组比较显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 吡格列酮组大鼠体质量及肝脏质量较生理盐水组显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但肝/体比下降不明显, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 正常对照组、生理盐水组、吡格列酮组大鼠体质量、肝脏质量及肝/体比比较

Tab.1 Comparison of body weight, liver weight and liver weight/body weight ratio in rats among normal control group, physiological saline group and pioglitazone group

| ($\bar{x} \pm s$) | | | | |
|---------------------|----------|---------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 组别 | <i>n</i> | 体质量/g | 肝脏质量/g | 肝/体比 |
| 正常对照组 | 10 | 357.65 \pm 12.98 | 7.72 \pm 1.23 | (2.12 \pm 0.23) % |
| 生理盐水组 | 10 | 381.26 \pm 20.12 ^a | 9.65 \pm 1.17 ^a | (2.65 \pm 0.17) % ^a |
| 吡格列酮组 | 10 | 360.20 \pm 30.50 ^b | 8.41 \pm 1.22 ^b | (2.34 \pm 0.12) % |

注: 与正常对照组比较^a $P < 0.05$; 与生理盐水组比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠血清及肝脏组织中 TC、TG 水平比较

结果见表 2。生理盐水组大鼠血清及肝脏组织中 TC、TG 水平较正常对照组显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 吡格列酮组大鼠血清及肝脏组织中 TC、TG 水平较生理盐水组显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 正常对照组、生理盐水组、吡格列酮组大鼠血清及肝脏组织中 TC、TG 水平比较

Tab.2 Comparison of TC and TG levels in serum and liver tissue in rats among normal control group, physiological saline group and pioglitazone group

| ($\bar{x} \pm s$) | | | | | |
|---------------------|----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 组别 | <i>n</i> | 血清 TC/ (mmol \cdot L ⁻¹) | 血清 TG/ (mmol \cdot L ⁻¹) | 肝脏 TC/ (mmol \cdot L ⁻¹) | 肝脏 TG/ (mmol \cdot L ⁻¹) |
| 正常对照组 | 10 | 1.20 \pm 0.40 | 0.53 \pm 0.16 | 4.80 \pm 0.30 | 9.60 \pm 1.30 |
| 生理盐水组 | 10 | 2.35 \pm 0.30 ^a | 0.89 \pm 0.69 ^a | 8.60 \pm 0.50 ^a | 20.03 \pm 3.34 ^a |
| 吡格列酮组 | 10 | 1.57 \pm 1.00 ^b | 0.62 \pm 0.13 ^b | 5.96 \pm 0.50 ^b | 10.27 \pm 1.22 ^b |

注: 与正常对照组比较^a $P < 0.05$; 与生理盐水组比较^b $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠肝功能变化

结果见表 3。生理盐水组大鼠血清 AST、ALT 水平较正常对照组显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 吡格列酮组大鼠血清 AST、ALT 水平较生理盐水组显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠 GRP78 表达

结果见表 4。生理盐水组大鼠肝脏组织 GRP78 表达水平较正常对照组显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 吡格列酮组大鼠肝脏 GRP78 水平较生理盐水组显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 正常对照组、生理盐水组、吡格列酮组大鼠血清 AST、ALT 水平比较

Tab.3 Comparison of serum AST and ALT in rats among normal control group, physiological saline group and pioglitazone group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 血清 AST/(U · L ⁻¹) | 血清 ALT/(U · L ⁻¹) |
|-------|----|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常对照组 | 10 | 133.06 ± 18.68 | 34.15 ± 3.40 |
| 生理盐水组 | 10 | 177.80 ± 27.47 ^a | 59.62 ± 11.30 ^a |
| 吡格列酮组 | 10 | 130.35 ± 20.13 ^b | 36.70 ± 11.02 ^b |

注:与正常对照组比较^a $P < 0.05$;与生理盐水组比较^b $P < 0.05$ 。

表 4 正常对照组、生理盐水组、吡格列酮组大鼠 GRP78 表达水平比较

Tab.4 Comparison of GRP78 level in rats among normal control group, physiological saline group and pioglitazone group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | GRP78 | β-actin | GRP78/β-actin |
|-------|----|--------------------------|-------------|--------------------------|
| 正常对照组 | 10 | 1.00 ± 0.05 | 0.51 ± 0.02 | 1.96 ± 0.20 |
| 生理盐水组 | 10 | 1.51 ± 0.11 ^a | 0.50 ± 0.03 | 3.02 ± 0.04 ^a |
| 吡格列酮组 | 10 | 0.89 ± 0.15 ^b | 0.55 ± 0.04 | 1.71 ± 0.03 ^b |

注:与正常对照组比较^a $P < 0.05$;与生理盐水组比较^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

NAFLD 是指无过量饮酒史、病毒感染及其他特殊病因所致的肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床常见肝病^[4],由于该病对人类健康的威胁不断增加,对其发病机制的研究逐渐成为热点。

为阐明 NAFLD 的发病机制,研究更为有效的防治方法,成功建立动物模型尤为重要,目前已有多种 NAFLD 的动物造模方法^[5]。本实验采用高脂饮食喂养 SD 大鼠,模拟人类 NAFLD 发病过程,12 周末,模型组大鼠体质量、肝脏质量及肝/体比显著增加,肝细胞内有不同程度的脂肪变性,血清及肝脏组织中 TC、TG 水平增加,转氨酶升高,均提示该动物模型是一种较理想的 NAFLD 模型。

吡格列酮作为噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,通过与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 结合而改善胰岛素敏感性,有研究显示,该药能升高血清 HDL-C,降低 TG 和 LDL-C,减少肝脏脂肪含量,降低转氨酶水平^[1-3],因而越来越多的研究开始关注其对肝脏脂质代谢的保护作用。而本研究发现,吡格列酮治疗 12 周后,大鼠体质量及肝质量均显著下降,肝功能明显改善,血清及肝脏组织中 TC、TG 水平明显降低,说明吡格列酮对 NAFLD 有积极的治疗作用。内质网是蛋白折叠、糖脂代谢、Ca²⁺ 稳态调节和脂蛋白分泌的关键部位^[6-7]。国内外研究显示,肝脏细胞的

ERS 与 NAFLD 的发生、发展密切相关^[8]。它既是细胞维持稳态的生存手段,又是导致细胞功能受损甚至凋亡的重要因素,目前其具体机制仍不十分明确。GRP78/免疫球蛋白结合蛋白 (immunoglobulin binding protein, BIP) 在 ERS 中发挥了关键作用,是 ERS 的标志蛋白,应激时 GRP78/BIP 表达上调作用明显^[9],导致肝脏细胞的脂质合成增加或脂质沉积,进而形成 NAFLD。有研究表明减轻 ERS 后,肝脏的脂质沉积能得到有效缓解^[10-11]。本研究结果表明,吡格列酮治疗显著降低了 NAFLD 大鼠肝脏中的 ERS 相关蛋白 GRP78 的表达水平,提示吡格列酮可能是通过改善 ERS,减少肝脏的脂质沉积,从而发挥对 NAFLD 的保护作用,但其具体机制仍需进一步探讨。

参考文献:

[1] McEneny J, McPherson P A, McGinty A, *et al.* Pioglitazone protects HDL (2&3) against oxidation in overweight and obese men [J]. *Ann Clin Biochem*, 2013, 50 (Pt 1): 20-24.

[2] Razavizade M, Jamali R, Arj A, *et al.* The effect of pioglitazone and metformin on liver function tests, insulin resistance, and liver fat content in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized double blinded clinical trial [J]. *Hepat Mon*, 2013, 13 (5): e9270.

[3] Nakaya H. Roles of PPARgamma in preventing the development of atherosclerosis in LDL receptor null mice [J]. *Nihon Rinsho*, 2010, 68 (2): 229-234.

[4] Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data [J]. *Hepatology*, 2013, 58 (3): 593-608.

[5] 陈世清, 刘杞, 孙航, 等. 脂肪肝胰岛素抵抗大鼠模型的建立 [J]. *中华肝脏杂志*, 2005, 13 (2): 105-108.

[6] Kaufman R J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls [J]. *Genes Dev*, 1999, 13 (10): 1211-1233.

[7] Fu S, Watkins S M, Hotamisligil G S. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling [J]. *Cell Metab*, 2012, 15 (5): 623-634.

[8] Tripathi Y B, Pandey V. Obesity and endoplasmic reticulum (ER) stresses [J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 240.

[9] Gardner B M, Pincus D, Gotthardt K, *et al.* Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5 (3): a013169.

[10] Li Y, Xu S, Giles A, *et al.* Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver [J]. *FASEB J*, 2011, 25 (5): 1664-1679.

[11] Jung T W, Lee K T, Lee M W, *et al.* SIRT1 attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in HepG2 cells via induction of oxygen-regulated protein 150 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 422 (2): 229-232.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)