

非酒精性脂肪肝大鼠脂质代谢及病理变化的动态观察

楼琦¹, 石巧娟^{1,2}, 郭红刚¹, 李巍¹, 卢领群¹, 周文伟¹, 萨晓婴¹

(1. 浙江省医学科学院实验动物中心, 杭州 310013; 2. 浙江大学医学院药理学教研室 杭州 310031)

【摘要】 目的 通过高脂饮食建立 NAFLD 大鼠模型, 连续监测 4~16 周模型动物肝功能、脂质代谢、胰岛素抵抗及肝细胞凋亡在 NAFLD 进展过程中的变化情况及其相互关系, 为该模型在脂肪肝发病机制、脂肪肝治疗药物评价等方面的应用提供参考依据。方法 SD 大鼠 50 只, 除正常对照组外, 其余动物饲喂高脂饲料, 分别检测 4, 8, 12, 16 周大鼠血清 GLU、CHO、TG、HDL、LDL、GPT、GOT 及胰岛素水平, 肝脏组织切片进行病理学及细胞凋亡观察, 进一步分析大鼠肝功能、脂质代谢、胰岛素抵抗及肝细胞凋亡对肝组织病理改变的影响。结果 模型组大鼠 4 周后就出现肝功能损伤, 脂质代谢紊乱、胰岛素抵抗, 肝细胞凋亡 8 周后明显增加, 肝细胞脂变及炎症为肝组织病理变化的主要特征, 且造模时间越长, 病变程度越严重。结论 经过高脂饲料的喂养, SD 大鼠在 4~16 周内可形成病变程度逐步加重的 NAFLD 模型, 肝功能损伤, 脂质代谢紊乱及肝细胞凋亡是引起非酒精性脂肪肝中脂肪变性和炎症的重要因素, 该模型可应用于脂肪肝治疗药物评价等方面。

【关键词】 非酒精性脂肪肝; 胰岛素抵抗; 细胞凋亡; 病理; 脂质代谢

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)03-0005-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.03.002

The Dynamic Observation of Lipid Metabolism and Pathological Changes in Non-alcoholic Fatty Liver Rats

LOU Qi¹, SHI Qiao-juan^{1,2}, GUO Hong-gang¹, LI Wei¹, LU Ling-qun¹, ZHOU Wen-wei¹, SA Xiao-ying¹

(1. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Zhejiang Center of Laboratory Animals, Hangzhou 310013, China;

2. Department of Pharmacology, Medical School, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

【Abstract】 Objective To investigate the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), provide a reference for the evaluation of fatty liver therapeutic effect, the liver function, lipid metabolism, insulin resistance and liver apoptosis of NAFLD rats established by high cholesterol feeding were continuously monitored from 4~16 weeks. **Methods** 40 NAFLD rats established by high cholesterol feeding were randomly divided into the 4, 8, 12, 16 weeks model group and a group of normal rats were set up for control, the serum GLU, CHO, TG, HDL, LDL, GPT, GOT and insulin were tested, the liver apoptosis and pathological changes were observed, then analyzed the effect of the liver function, lipid metabolism, insulin resistance and apoptosis on the pathological changes in non-alcoholic fatty liver rats. **Results** After 4 weeks of high

[基金项目] “十一五”科技支撑计划重点项目(2009BAI83B02); 浙江省医药卫生计划项目(2006QN001, 2009A001)。

[作者简介] 楼琦(1983-), 男, 助理实验师, 研究方向: 实验动物疾病模型, E-mail: louqi@126.com。

[通讯作者] 萨晓婴(1952-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: saxiaoyin@163.com。

cholesterol feeding, the rats had got the liver injury, disorder of lipid metabolism, insulin resistance. Liver cell apoptosis were increased obviously, and pathological changes were characterized by cell steatosis and inflammatory, the lesions became more serious with time went on. **Conclusions** Rats established by high cholesterol feeding could get the nonalcoholic fatty liver disease and the lesions became more serious with time over during 4 ~ 16 weeks. Lipid metabolism disorder and insulin resistance were the important cause of liver cell steatosis and inflammatory. The model we established is suitable for the evaluation of fatty liver therapeutic effect.

【Key words】 Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD); Insulin resistance (IR); Apoptosis; Pathology; Lipid metabolism

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种无过量饮酒史 (酒精摄入量 < 20 g/d), 而以肝细胞脂质贮积和脂肪变性为特征临床病理综合症。根据其疾病发展的不同阶段主要分为: 单纯脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和脂肪性肝硬化 4 个病理过程^[1,2]。随着人们饮食结构、生活方式的改变, 日常膳食脂肪为代表的高热量食物成分所占比例明显增加, 使与代谢异常密切相关的 NAFLD 的发病率大幅上升, 并已成为医学关注和研究的焦点^[3,4]。目前 NAFLD 的发病机制仍尚未阐明, 多种因素与其发生发展相关, 目前认为主要有炎症、氧自由基、胰岛素抵抗、脂质代谢紊乱、铁超载等作用因素^[5-9]。

本实验通过高脂饮食建立 NAFLD 大鼠模型, 连续监测模型动物 4 ~ 16 周肝功能指标、血脂、血糖及胰岛素水平, 同时通过 TUNEL 法检测肝细胞凋亡水平, 并对肝组织进行病理学的动态观察, 探讨肝功能、脂质代谢、糖代谢及肝细胞凋亡在 NAFLD 进展过程中的变化情况、及相互作用关系, 也为该模型在脂肪肝发病机制、脂肪肝治疗药物评价等方面的应用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 清洁级雄性 SD 大鼠 50 只购自浙江省医学科学院实验动物中心 (生产许可证号: SCXK (浙) 2008-0033; 使用许可证号: SYXK (浙) 2008-0033)。大鼠普通饲料及高脂饲料由浙江省医学科学院实验动物中心加工生产, 高脂饲料在相关配制方法的基础上进行了改进, 配方为: 普通饲料 80.5%、蛋黄粉 10%、猪油 7%、胆固醇 2%、三号胆盐 0.5%^[10-13]。

1.1.2 实验试剂: 蛋黄粉为浙江省长兴县艾格生物制品有限公司产品。胆固醇, 三号胆盐购于华东医

药股份有限公司。食用猪油购于超市。谷草转氨酶 (GOT), 谷丙转氨酶 (GPT), 血糖 (GLU), 胆固醇 (CHO), 甘油三酯 (TG), 高密度脂蛋白 (HDL), 低密度脂蛋白 (LDL) 诊断试剂盒购自上海丰汇医学科技有限公司; 胰岛素放免试剂盒 (IMK414) 购自中国原子能科学研究院, 由杭州市第二人民医院完成盲样检测。TUNNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒为 BIO-HIGH TECH 公司产品。

1.1.3 实验仪器: 意大利 AUTOLAB 全自动生化分析仪、日本 OLYMPUS 生物显微镜, 美国 Media Cybernetics 公司多功能真彩色细胞图象分析管理系统, 德国莱卡切片机, 低温高速台式离心机。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立

清洁级雄性 SD 大鼠 50 只, 大鼠适应环境 3 d 以后, 随机分为 5 组, ①正常对照组, ②4 周模型组 ③8 周模型组 ④12 周模型组 ⑤16 周模型组, 每组 10 只, ①组给予基础饲料, 其余 4 组饲喂高脂饲料, 自由进水进食, 观察动物一般情况, 每周称体重。每隔 4 周依次处理 ② ~ ④ 组, 16 周后将 ① 组和 ⑤ 组动物一并处理。动物处理前禁食 12 h, 以乙醚麻醉大鼠, 称重, 腹主动脉采血, 分离血清; 迅速取出肝脏并称重, 计算肝脏指数 (肝脏湿重/体重); 取最大叶肝脏用 10% 中性甲醛固定, 作肝组织病理学观察, 其余肝脏 -70℃ 冻存备用。

1.2.2 血清相关指标的测定

GLU 测定采用氧化酶法; CHO 测定采用 CHOD-PAP 法; TG 测定采用 GPO-PAP 法; HDL、LDL 测定采用直接法; GPT、GOT 测定采用连续监测法; 胰岛素测定采用放射免疫法; 具体操作按试剂盒说明书进行。

胰岛素抵抗指数 = 空腹血糖含量 × 空腹胰岛素含量 / 22.5。

1.2.3 病理学检查

肝组织用福尔马林固定、石蜡切片、HE 染色观

察肝组织病理学变化。所有切片通过盲法阅片作出诊断,每张切片观察 5 个 ×200 视野,对肝脂肪变性和炎症细胞浸润程度分级,评分。肝脂肪变性根据脂滴细胞所占面积/总细胞所占面积之比值分为 0, <1/3, 1/3 ~ 2/3 和 >2/3 4 个等级,达到 2 级或以上诊断为脂肪肝。炎症活动度计分:分为汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎屑样坏死(PN)和桥接坏死(BN)4 项,每项根据病变程度分别计 1, 2, 3, 4 分,因为碎屑样坏死和桥接坏死严重度与预后直接相关,计分公式为 P + L + 2PN + 2BN。

1.2.4 TUNNEL 法测定肝细胞凋亡

肝脏组织以中性甲醛固定,多聚赖氨酸为切片粘合剂,进行常规石蜡包埋、切片、脱蜡、水化,按 TUNNEL 检测试剂盒说明书操作。滴加蛋白酶 K (20 μg/mL 溶于 PBS 中),室温孵育 30 min, PBS 冲洗 2 遍,滴加 50 μL TUNNEL 反应混合物,在湿盒中 37℃ 孵育 60 min, PBS 冲洗,加入 50 μL 转化剂 POD,在湿盒中 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 2 遍,加入 50 μL DAB 底物溶液,室温孵育 10 min。封片,在光镜下分析结果,根据凋亡细胞的形态特征判断凋亡细胞:单个细胞,周围无炎症反应及坏死,胞浆收缩,细胞核中有棕黄色颗粒或核碎片者为阳性细胞。每张切片观察 10 个高倍镜 (10 × 40) 视野,对阳性细胞进行计数,取其平均值。

统计学处理所有数据均使用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差 (X ± S) 表示,进行方差齐性检验,方差齐者采用单因素方差分析,方差不齐者采用 H 检验,比较模型组与对照组及模型组间在血清学、病理学及细胞凋亡程度上的差别;计数资料采用 χ² 检验;采用多元线性回归分析,评估肝组织病理学改变与肝功能,脂质代谢,糖代谢及肝细胞凋亡的相关性。P < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验期间正常对照组大鼠活动度好,饮食正常,皮毛整洁;高脂模型组大鼠嗜睡,毛色偏黄,10 周后动物有不同程度的精神萎靡,活动减少,皮毛凌乱的情况。在整个实验过程中,各组大鼠体重持续上升,各组间无显著性差异(见图 1)。实验结束时,各组大鼠全部存活。

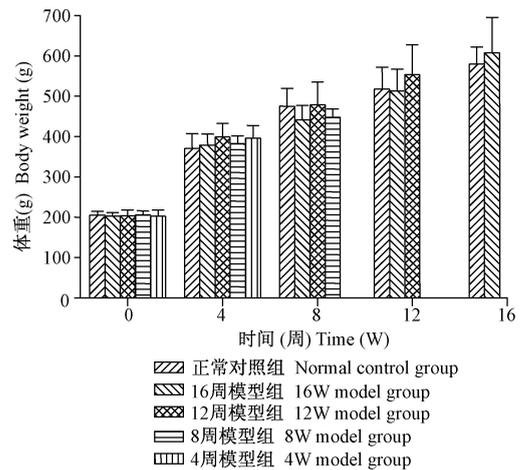


图 1 各组大鼠体重变化

Fig. 1 Changes of body weight of animals in groups

2.2 血清生化指标的分析

各组大鼠血脂代谢 TG、CHO、HDL-C、LDL-C 含量的变化见表 1。第 4 周起模型大鼠血清 CHO、LDL-C 与正常对照组比较明显升高,有显著性差异,并随造模时间的延长而逐步上升。TG、HDL-L 在造模 4 ~ 8 周期间,呈明显下降趋势,12 周后又有所反弹,与正常对照组基本持平,16 周则有进一步升高的趋势。总体数据体现了模型组大鼠具有脂质代谢紊乱的特征。

表 1 各组血清 CHO、TG、HDL-C、LDL-C 水平比较

Tab.1 The comparison of serum CHO, TG, HDL-C, LDL-C level in the rats of all the groups

| 组别 Group | CHO (mmol/L) | TG (mmol/L) | HDL-C (mmol/L) | LDL-C (mmol/L) |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 The control group | 1.28 ± 0.37 | 0.55 ± 0.13 | 1.09 ± 0.17 | 0.93 ± 0.16 |
| 4 周模型组 4W model group | 1.69 ± 0.64 [▲] | 0.45 ± 0.18 ^{▲▲} | 1.19 ± 0.15 ^{▲▲} | 1.07 ± 0.24 ^{▲▲} |
| 8 周模型组 8W model group | 1.94 ± 0.69 [▲] | 0.31 ± 0.12 ^{▲▲} | 0.95 ± 0.16 ^{▲▲} | 1.13 ± 0.34 ^{▲▲} |
| 12 周模型组 12W model group | 2.32 ± 0.37 [▲] | 0.56 ± 0.21 | 1.06 ± 0.05 | 1.38 ± 0.38 ^{▲▲} |
| 16 周模型组 16W model group | 2.56 ± 0.36 [▲] | 0.62 ± 0.20 | 1.10 ± 0.29 | 1.36 ± 0.48 ^{▲▲} |

注:与正常对照组比较, ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01

Note: ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01 compared with the control group

各组大鼠肝功能指标 GOT, GPT 及脏器系数的变化见表 2。与正常对照组比较, 各模型组 GOT, GPT, 脏器系数显著升高, 且均具有统计学意义, 且各个值与随着造模时间呈良好的时效关系。说明模型组大鼠 4 周后就出现肝功能损伤及肿胀, 且造模时间越长, 损伤、肿胀程度越严重。

各组大鼠 GLU, 胰岛素水平及胰岛素抵抗指数见表 3, 各组间 GLU 水平未见明显差异。与正常对照组比较, 高脂模型组胰岛素水平及胰岛素抵抗指数显著升高, 且均具有统计学意义, 表明模型组大鼠在造模 4 周后即发生明显的胰岛素抵抗, 但对糖代谢无明显影响。

2.3 肝组织形态学及病理观察

2.3.1 肉眼观察 正常对照组大鼠肝脏形态正常。高脂模型组大鼠第 4 周起肝脏外形稍饱满圆钝, 色红, 质地较脆; 8~16 周, 随着造模时间的延长, 肝脏体积增大, 色泽土黄, 包膜紧张, 切面油腻, 实验结束时, 肝脏明显增大, 包膜紧张, 边缘较钝, 质地略软, 色变黄, 表面呈花斑状, 触之似泥块并有油腻感, 部分大鼠肝脏有黄白色的局灶性脂肪沉积。

2.3.2 光镜观察 ①正常对照组肝小叶结构完整, 轮廓清晰, 肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝小叶肝细胞分界清晰, 胞核圆, 位于细胞中央, 偶见双核, 胞质丰富, 肝窦中枯否细胞清晰可见, 汇管区偶见淋巴细胞浸润。(见彩插 1 图 2①)

4 周模型组 肝小叶结构基本完整清晰, 肝索放射状排列明显, 部分肝细胞体积增大, 胞浆内充满大小不等的脂肪空泡, 脂肪空泡将细胞核挤向一侧, 尤其以肝小叶交汇处脂变更为明显, 肝细胞以气球样变为主, 在中央静脉及汇管区周边脂变程度较轻。肝窦变窄, 仅有枯否细胞处可见明显肝窦。汇管区可见炎性细胞浸润, 偶见肝细胞坏死灶。(见彩插 1 图 2②)

8 周模型组 肝小叶结构不清晰, 肝索放射状排列不明显, 大部分细胞肿胀, 并大小不均, 细胞轮廓模糊, 胞核消失或被脂肪空泡挤向一侧。肝细胞以气球样变为主, 汇管区及小叶内炎症细胞浸润和散在的点状坏死增多。(见彩插 1 图 2③)

12 周模型组 肝索排列紊乱, 肝细胞肿胀, 呈中~重度脂肪变, 均可见到小叶内炎症, 炎症细胞主要以单个核细胞为主, 炎症程度明显加重, 点状或小灶性, 部分大鼠可见数个炎症坏死灶融合成片, 汇管区亦可见到以淋巴细胞为主炎症细胞浸润, 但程度较小叶内轻。(见彩插 1 图 2④)

16 周模型组 肝细胞脂变进一步严重, 常见炎症坏死灶融合成片, 但未见明显的肝纤维化发生。(见彩插 1 图 2⑤)。

与正常对照组比较, 随着造模时间的延长, 动物肝细胞脂肪变性及组织炎症进一步加重。(见表 4)。

2.4 肝细胞凋亡检测

经 TUNNEL 染色, 阳性物质成棕黄色, 主要位

表 2 各组血清 GOT、GPT 水平及肝脏系数比较

Tab. 2 The comparison of serum GOT, GPT level and organ indexes in the rats of all the groups

| 组别 Group | GOT(U/L) | GPT(U/L) | 肝脏系数% Liver Indexes |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 The control group | 193.2 ± 34.6 | 63.1 ± 19.9 | 1.97 ± 0.45 |
| 4 周模型组 4W model group | 228.5 ± 35.8 ^{▲▲} | 81.0 ± 16.8 ^{▲▲} | 3.65 ± 0.32 ^{▲▲} |
| 8 周模型组 8W model group | 321.1 ± 73.3 ^{▲▲} | 113.8 ± 30.2 ^{▲▲} | 4.09 ± 0.42 ^{▲▲} |
| 12 周模型组 12W model group | 363.8 ± 53.7 ^{▲▲} | 201.2 ± 56.6 ^{▲▲} | 5.95 ± 0.53 ^{▲▲} |
| 16 周模型组 16W model group | 464.5 ± 77.2 ^{▲▲} | 307.2 ± 65.7 ^{▲▲} | 6.80 ± 2.92 ^{▲▲} |

注:与正常对照组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$

Note: [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$ compared with the control group

表 3 各组血清 GLU, 胰岛素水平及胰岛素抵抗指数比较

Tab. 3 The comparison of serum GLU, insulin level and insulin resistance indexes in the rats of all the groups

| 组别 Group | GLU(mmol/L) | 胰岛素 Insulin (μ Lu/mL) | 胰岛素抵抗指数 Insulin Resistance Index |
|-------------------------|-------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 正常对照组 The control group | 5.23 ± 0.64 | 13.65 ± 5.06 | 3.11 ± 1.38 |
| 4 周模型组 4W model group | 5.15 ± 0.91 | 24.74 ± 12.87 ^{▲▲} | 5.45 ± 2.43 ^{▲▲} |
| 8 周模型组 8W model group | 5.11 ± 0.53 | 19.36 ± 7.39 ^{▲▲} | 4.38 ± 1.62 ^{▲▲} |
| 12 周模型组 12W model group | 5.19 ± 0.51 | 22.60 ± 13.70 ^{▲▲} | 5.29 ± 3.74 ^{▲▲} |
| 16 周模型组 16W model group | 5.25 ± 0.24 | 24.59 ± 6.72 ^{▲▲} | 4.56 ± 1.44 [▲] |

注:与正常对照组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$

Note: [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$ compared with the control group

于细胞核内,常聚集于核膜附近或核质呈现均匀的染色(见表4,彩插1图3①~⑤)。正常对照组大鼠肝组织 TUNNEL 染色阳性细胞少见,在中央静脉周围可偶见有染色阳性的凋亡细胞。模型组随着造模时间的延长及肝细胞脂变、炎症、坏死的加重, TUNEL 染色阳性的凋亡细胞数量逐渐增加,明显高于对照组($P < 0.05$)。模型组发生凋亡的肝细胞常位于脂肪变严重以及炎症细胞浸润区域附近。

2.5 相关性分析

分析实验大鼠肝功能、脂质代谢、糖代谢及肝细胞凋亡对肝组织病理改变的影响。行多元线性相关分析表明(见表5), GOT, GPT, 肝重, 肝脏系数, TUNNEL 染色阳性细胞数与肝组织炎症成呈正相关($P < 0.01$), GOT, GPT, CHO, LDL, 胰岛素, 胰岛素抵抗指数, 肝重, 肝脏系数, TUNNEL 染色阳性细胞数与肝脂肪变性程度成正相关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而与 TG, HDL 等无相关性, 以上结果说明肝功能损伤, 脂质代谢紊乱及肝细胞凋亡是引起非酒精性脂肪肝中脂肪变性和炎症

的重要因素。

3 讨论

细胞凋亡 (apoptosis) 又名程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD), 为生物体内广泛存在的特定基因控制, 以细胞 DNA 降解为特征, 无明显细胞溶解的细胞自杀过程。细胞凋亡具有重要的生物学意义, 机体通过细胞凋亡可以清除衰老、受损或有害的细胞, 从而保持细胞微环境的正常^[14]。细胞凋亡的机制一旦失调将会导致疾病的发生。对肝脏而言, 生理状况下的细胞凋亡可以消除衰老的细胞, 清除受损伤或有癌前病变的细胞从而调节正常肝细胞数量, 维持肝脏正常体积; 但在病理条件下的肝细胞凋亡参与严重疾病的发生发展, 肝癌、酒精性肝炎、病毒性肝炎、自身免疫性肝炎等肝病的发病机制均已证明与肝细胞凋亡有密切关系^[15]。近些年来有研究认为在 NAFLD 进展过程中随着肝细胞炎症、坏死的增多, 细胞凋亡指数也明

表 4 各组肝组织病理变化及细胞凋亡程度比较

Tab. 4 The comparison of liver pathology and apoptosis in the rats of all the groups

| 组别 Group | 例数 | 肝脂肪变性程度 Pimelosis degree of liver | | | | 肝组织炎症程度 Inflammation degree of liver | TUNNEL 染色阳性细胞 TUNNEL Staining Positive Cells |
|-------------------------|----|--------------------------------------|-----|-----|-----|---|---|
| | | 0 级 | 1 级 | 2 级 | 3 级 | | |
| 正常对照组 The control group | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.02 ± 0.48 |
| 4 周模型组 4W model group | 10 | 0 | 4 | 6 | 0 | 1.13 ± 0.36 ^{▲▲} | 3.14 ± 0.89 |
| 8 周模型组 8W model group | 10 | 0 | 2 | 6 | 2 | 2.34 ± 0.56 ^{▲▲} | 5.28 ± 0.72 ^{▲▲} |
| 12 周模型组 12W model group | 10 | 0 | 0 | 7 | 3 | 5.11 ± 1.75 ^{▲▲} | 7.96 ± 1.32 ^{▲▲} |
| 16 周模型组 16W model group | 10 | 0 | 0 | 2 | 8 | 8.02 ± 2.74 ^{▲▲} | 9.27 ± 2.27 ^{▲▲} |

注:与正常对照组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$
 Note: ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ compared with control group

表 5 肝功能、脂质代谢、糖代谢及肝细胞凋亡对肝组织病理改变相关性分析 (R 值)

Tab. 5 The correlation analysis of liver pathology between liver function, lipid metabolism, carbohydrate metabolism and hepatocyte apoptosis (R value)

| 指标 Indexes | 肝组织炎症积分 Inflammation score of liver | 肝脂肪变性程度 Pimelosis degree of liver |
|---|--|--------------------------------------|
| GOT | 0.622 ^{▲▲} | 0.757 ^{▲▲} |
| GPT | 0.729 ^{▲▲} | 0.715 ^{▲▲} |
| CHO | -0.095 | 0.871 ^{▲▲} |
| TG | 0.065 | 0.053 |
| HDL | -0.155 | 0.066 |
| LDL | 0.087 | 0.441 ^{▲▲} |
| GLU | -0.443 | -0.304 |
| 体重 Body weight | 0.165 | -0.211 |
| 肝重 Liver weight | 0.611 ^{▲▲} | 0.675 ^{▲▲} |
| 肝脏系数 Liver indexes | 0.504 ^{▲▲} | 0.753 ^{▲▲} |
| 胰岛素 Insulin | 0.110 | 0.375 ^{▲▲} |
| 胰岛素抵抗指数 Insulin Resistance Index | -0.018 | 0.258 [▲] |
| TUNEL 染色阳性细胞 TUNNEL Staining Positive Cells | 0.766 ^{▲▲} | 0.824 ^{▲▲} |

注:与正常对照组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$
 Note: ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ compared with the control group

显增加。Feldstein 等^[16,17] 对非酒精性脂肪肝患者肝活组织标本应用 TUNNEL 法检测发现肝细胞凋亡明显增加,并且细胞凋亡随肝纤维化和脂肪性肝炎炎症病变程度增加而增加。本实验研究表明正常对照组大鼠肝组织 TUNNEL 染色阳性细胞少见,在中央静脉周围可偶见有染色阳性的凋亡细胞。模型组随着造模时间的延长及肝细胞脂变、炎症、坏死的加重,TUNNEL 染色阳性的凋亡细胞数量逐渐增加,表明连续的肝细胞凋亡可能调节炎症,甚至是肝纤维化进程,该结果与国外研究一致^[18,19],其机制可能为在脂肪肝发生发展过程中,肝组织中细胞色素氧化酶 P450 2E1 表达增强,氧应激和脂质过氧化损伤加重,以及枯否细胞激活等途径导致肝细胞凋亡和坏死的发生,由此也说明了 NAFLD 肝细胞凋亡在由单纯性脂肪肝转变为肝细胞炎症、坏死甚至是肝纤维化过程中起重要作用。

已有研究发现脂肪肝与代谢综合征密切相关,胰岛素抵抗可能在脂肪肝形成过程中起了重要的作用,甚至有人提出将脂肪肝作为代谢综合征的组成成分之一^[20]。Marchesini 等用稳态模式评估法判断胰岛素抵抗 (HOMA-IR),研究了脂肪肝与胰岛素抵抗之间的关系,结果发现,脂肪肝病人存在空腹和餐后高胰岛素血症,餐后高甘油三酯血症及明显的胰岛素抵抗,而且在瘦的脂肪肝病人得到了相同的结果。Marchesini^[21,22] 用高胰岛素正常葡萄糖钳夹试验,发现在胰岛素输注率 40 mU/(m²·min) 时,脂肪肝病人与正常对照组葡萄糖输注率分别为 19.5 ± 5.7 μmol/(kg·min) 和 37.2 ± 9.4 μmol/(kg·min),两组的肝糖合成较基线水平分别下降 63% ± 9% 和 82% ± 14%,证实了脂肪肝病人均存在胰岛素抵抗。

DAY 通过实验研究提出,IR 可能作为原发因素参与了脂肪肝的发生发展,并以“二次打击”学说对非酒精性脂肪肝的发生发展进行阐述^[23]。其初次打击主要是胰岛素抵抗,通过促使外周脂肪分解增加和胰岛素血症引起肝细胞脂肪堆积,并诱导其对损害因子的敏感性增高。在此阶段,由于机体组织适应性反应机制的抗氧化、抗细胞凋亡、瘦素的抗脂肪毒性等防御功能可与上述因素相抗衡,故大多数单纯脂肪肝的结构和功能改变是可逆的^[24,25]。

二次打击主要是氧应激,最后导致炎症和纤维化。在脂肪的演变中,发生肿瘤坏死因子-瘦素-胰岛素反馈轴改变,胰岛素抵抗进一步削弱了抗葡萄

糖变性和抗脂肪变性的能力,适应性反应出现缺陷,细胞防御机制减弱,另外,缺氧、内毒素、药物等作为附加因素实行多重打击^[26-28]。本实验进一步证明:SD 大鼠在高脂饲料喂养 4 周即可引起胰岛素水平的增加,发生胰岛素抵抗,并在 4 ~ 16 周的造模期间,胰岛素抵抗持续存在,由于造模时间的延长,病理变化逐步加强,因此,在脂肪肝的发展中,胰岛素抵抗造成的肝细胞代谢异常,作为第一次打击的基础,起到了重要的作用。在脂肪肝治疗的方法中如减少胰岛素抵抗,减少反应性氧化体系的生成增多,减少肝脂质过氧化等因素,就有可能阻碍脂肪肝的形成。

参考文献:

- [1] 范建高,曾民德. 脂肪性肝病[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:137.
- [2] Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem [J]. Clin Med, 2011,11(2):176-178.
- [3] 黄春明,李瑜元. 非酒精性脂肪肝的流行病学[J]. 现代消化及介入诊疗,2009,14(4):233-237.
- [4] Ahmed MH, Abu EO, Byrne CD. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): New challenge for general practitioners and important burden for health authorities? [J]. Prim Care Diabetes,2010,4(3):129-137.
- [5] Arrese M, Karpén SJ. Nuclear receptors, inflammation, and liver disease: insights for cholestatic and fatty liver diseases[J]. Clin Pharmacol Ther, 2010,87(4):473-478.
- [6] Cuadrado A, Orive A, Garcia-Suarez C, et al. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma [J]. Obes Surg,2005,15:442-446.
- [7] Yang S, Lin HZ, Hwang J, et al. Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition? [J]. Cancer Res,2001,61(13):5016-5023.
- [8] Wiecekowska A, Zein NN, Yerian LM, et al. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology,2006,44(1):27-33.
- [9] Adams LA, Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Post grad Med J, 2006 May;82(967):315-22.
- [10] 钟民涛,黄敏,卢静,等. 长爪沙鼠速发型高脂血症模型的初步建立 [J]. 中国实验动物学报,2006,14(3):217-221.
- [11] 王芄芄,黄磊,伍晓雄,等. 高脂饮食对小鼠脂质代谢和 leptin 基因表达水平的影响 [J]. 中国实验动物学报,2008,16(1):40-44.
- [12] Koteish A, Mae Diehl A. Animal models of steatohepatitis [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2002,16(5):679-690.
- [13] 石巧娟,刘月环,楼琦,等. 非酒精性脂肪肝大鼠 PPAR α 基因表达及脂代谢和胰岛素水平的变化 [J]. 中国比较医学杂

- 志,2009,19(8):26-30.
- [14] Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver [J]. *Am J Med*,2000, 108(7):567-574.
- [15] Benedetti A, Marucci L. The significance of apoptosis in the liver [J]. *Liver*,1999,19(6):453-463.
- [16] Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Gastroenterology*,2003,125(2):437-443.
- [17] Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, et al. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice [J]. *J Hepatol*,2003,39(6):978-983.
- [18] Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA. Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and Fas-antibody-induced liver injury [J]. *Hepatology*,1998,28(3):761-767.
- [19] Jaeschke H. Inflammation in response to hepatocellular apoptosis[J]. *Hepatology*,2002,35(4):964-966.
- [20] Sanyal AJ, Campbell-Sangert C, Mirshahi F, et al. Non-alcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities [J]. *Gastroenterology*, 2001, 120(5):1183-1192.
- [21] Marchesini G, Moscatiello S, Di Domizio S, et al. Obesity-associated liver disease[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008,93(11 Suppl 1):S74-S80.
- [22] Marchesini G, Pagotto U, Bugianesi E, et al. Low ghrelin concentrations in nonalcoholic fatty liver disease are related to insulin resistance[J]. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003, 88(12):5674-5679.
- [23] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits" [J]. *Gastroenterology*,1998,114(4):842-845.
- [24] Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatol Res*,2005,33(2):161-166.
- [25] Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, et al. Nonalcoholic steatohepatitis:What we know in the new millennium[J]. *Am J Gastroenterol*,2002,97:2714-2724.
- [26] Cuadrado A, Orive A, Garcia-Suarez C, et al. Non-alcoholic steatohepatitis(NASH) and hepatocellular carcinoma [J]. *Obes Surg*, 2005,15(3):442-446.
- [27] Yang S, Lin HZ, Hwang J, et al. Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: is obesity-related hepatic steatosis a premalignant condition? [J]. *Cancer Res*, 2001,61(13):5016-5023.
- [28] Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, et al. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*,2006,44(1):27-33.

[修回日期]2011-11-30