

高脂联合地塞米松诱导小鼠急性脂肪肝模型的实验研究*

吴利春,尹梦,侯梦莹,段丽,涂浩,刘朝奇[△]

(三峡大学医学院肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室,湖北宜昌 443002)

[摘要] **目的** 研究地塞米松配高糖高脂饲料导致小鼠急性脂肪肝模型对药物剂量与时间依存性特征,优化药物性脂肪肝模型的条件。**方法** 雄性昆明鼠分为对照组及高糖高脂饲料加腹腔注射地塞米松组,分3个时间点处死小鼠,检测小鼠体质量,肝质量,计算肝指数,检测血清及肝组织匀浆三酰甘油(TG),血清葡萄糖(GLU)含量,采用HE染色观察肝组织病理变化。肝组织提取总RNA反转录表达相关基因,肝组织提取总蛋白通过Western Blot检测相关蛋白表达。**结果** 与对照组比较,地塞米松模型组7d后,血及肝匀浆TG增高,肝指数增大,病理切片显示,脂肪肝形成。反转录PCR显示脂肪代谢相关基因表达有明显改变。Western Blot显示沉默信息调节因子1(SIRT1)明显下降。但是,随着地塞米松用量减少,时间延长,脂肪肝相关指标降低,脂代谢基因PPAR、FOXO3、FXR逐渐回升,LXR逐渐下降,蛋白SIRT1逐渐回升。**结论** 高糖高脂饲料加地塞米松大剂量腹腔注射可以建立小鼠急性脂肪肝模型,并且模型的维持对地塞米松的剂量和用药时间有依存性,对于药物干预实验具有指导意义。

[关键词] 地塞米松;高糖高脂饲料;脂肪肝模型**[中图分类号]** R331**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)17-2383-03**Experimental study of high fat diet plus dexamethasone for inducing acute fatty liver model in mice***Wu Lichun, Yin Meng, Hou Mengying, Duan Li, Tu Hao, Liu Chaoqi[△]

(Hubei Provincial Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Three Gorges

University, Yichang, Hubei 443002, China)

[Abstract] **Objective** To study the drug dosage and time dependency characteristics of high-fructose-high-fat-feeding plus dexamethason for inducing the mouse acute fatty liver model and to optimize the condition of drug-induced fatty liver model. **Methods** Male KM mice were divided into the normal control group and high-fructose-high-fat-feeding plus peritoneal injection of dexamethason group. The mice were killed at 3 different time points. The mouse body mass and liver mass were detected. The liver index was calculated. The serum and liver tissue homogenate TG and serum glucose(GLU) levels were detected. The liver tissue pathological change was observed by HE staining. Total RNA reverse expression related gene was extracted from the liver tissue. The total protein was extracted from the liver tissue and the related protein expression was detected by Western Blot. **Results** Compared with the control group, blood and liver homogenate TG after 7 d in the dexamethason model group was increased, the liver index was increased, the pathological section displayed that the fatty liver was formed, RT-PCR showed that lipid metabolism related gene expression had obvious change. Western Blot showed that SIRT1 was significantly decreased. But with the dexamethason dosage decrease and time extending, the fatty liver related indexes were decreased, lipid metabolic gene PPAR, FOXO3 and FXR were gradually increased, while LXR was gradually decreased and protein SIRT1 was gradually increased. **Conclusion** High-fructose-high-fat-feeding plus peritoneal injection of dexamethason could establish the mouse acute fatty liver model, moreover the model maintenance has dependency on dexamethason dosage and medication time, which has a guidance significance for the drug interventional experiment.

[Key words] dexamethason; high-fructose-high-fat-feeding; fatty liver

脂肪肝是一种代谢性疾病,是由各种原因引起的肝细胞内三酰甘油(TG)堆积过多的病变。近年来,随着人们生活水平的不断改善,脂肪肝的发病率也呈现升高趋势。因此,研究脂肪肝动物模型的制备对阐明脂肪肝发病机制及寻找有效的治疗方法显得尤为重要。小鼠脂肪肝模型是最常用的研究脂肪肝病变和药物筛选的模型^[1]。应用药物地塞米松等可以造成药物性脂肪肝模型。但地塞米松诱导的小鼠急性脂肪肝模型具有快速愈合的特点,对于后续的药物筛选带来困惑,因此,本实验探讨地塞米松诱导小鼠脂肪肝模型的药物剂量、持续时间关系及其可能的分子机制。

1 材料与方**1.1 材料****1.1.1 仪器** PCR仪(德国Biometra),458~1500 nm全波

长酶标仪(武汉新生福地贸易公司),高速离心机(德国Eppendorf),化学发光成像系统(上海欧翔科学仪器有限公司)。

1.1.2 试剂 反转录试剂盒(Takara公司),引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,地塞米松(郑州卓峰制药有限公司)、葡萄糖(GLU)测定试剂盒(GLU氧化酶法),TG测定试剂盒(GPO-PAP法),胆固醇(武汉科瑞生物技术公司)。**1.1.3 动物分组及处理** 雄性昆明小鼠24g左右,由三峡大学动物实验中心提供。48只随机分为对照组24只,模型组24只,每笼4只分开饲养。对照组普通饲料,模型组高糖高脂饲料(基础饲料加12%猪油,10%果糖,2%胆固醇混合后成型),各组自由饮水。模型组按100mg地塞米松/kg体质量腹腔注射4d,以后隔日腹腔注射33mg地塞米松/kg体质量,对照组同样时间点腹腔注射同等体积生理盐水。各组于实验的第7、

表 1 两组小鼠三阶段实验检测结果($\bar{x} \pm s$)

时间	n	体质量(g)	肝指数(g/100 g)	血清 GLU(mmol/L)	血清 TG(mmol/L)	肝脏 TG(mmol/L)
正常第 7 天	8	32.14±0.31	4.69±0.31	6.46±0.48	1.97±0.43	6.22±0.97
正常第 10 天	8	35.84±1.75	4.45±0.47	8.08±1.63	1.09±0.26	9.22±1.62
正常第 14 天	8	36.58±1.89	4.64±0.48	8.99±1.39	3.16±0.76	10.43±1.49
模型第 7 天	8	25.89±3.48**	9.01±0.87**	8.02±0.88*	2.08±0.23	16.60±4.10**
模型第 10 天	8	28.38±1.45**	8.58±0.74**	7.37±1.36	1.39±0.54	30.49±15.65**
模型第 14 天	8	30.69±2.56**	6.67±0.62**	7.98±1.22	1.94±0.65*	15.01±3.05**

*: $P < 0.05$, 与同期正常组相比; **: $P < 0.01$, 与同期正常组相比。

10、14 天分 3 次处死小鼠检测相关指标。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 血清处理及检测 小鼠眼眶取血, 静置 1 h 后 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清液按试剂盒方法进行血清 TG、GLU 检测。

1.2.2 肝脏处理及检测 小鼠处死后迅速取出完整肝脏, 擦净肝表面液体, 称质量。与肝门等距离纵切 2/3 右肝, 用 10% 甲醛固定, 摘除胆囊。剩下肝组织迅速冻存。

1.2.3 肝指数的测定 滤纸吸干肝脏表面水分后称其质量。计算肝指数: 肝指数 = 肝脏质量(g)/体质量(g) × 100%。

1.2.4 脂肪肝病诊断标准 肝组织 HE 染色, 取固定好的肝组织切取 2 mm × 5 mm 大小依次脱水染色, 图片分析组织结构病理变化。低倍镜下, 肝细胞脂肪变性占肝小叶 1/3 ~ 1/2 者为轻度脂肪肝; 占肝小叶 1/2 ~ 3/4 者为中度脂肪肝; 占肝小叶 3/4 以上或者肝细胞弥漫性脂肪变, 呈渔网状者为重度脂肪肝^[2]。

1.2.5 肝组织 TG 测定 取 100 mg 肝组织加 0.9 mL 生理盐水研磨匀浆后放入 4 mL EP 管, 加入 1 : 2 甲醇氯仿 0.9 mL, 摇匀静置 12 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 取底层有机溶剂相关剂量加入 96 孔板中, 溶剂挥发后直接按试剂检测盒要求检测 TG。

1.2.6 肝组织相关基因反转录 PCR 检测 用 80 mg 肝组织加 0.25 mL Trizol 冰上研磨, 按 Trizol 试剂盒说明书操作, 提取总 RNA 反转录成 cDNA, PCR 相关基因。PCR 相关引物如下, 内参 P_{APDH}: mFoxO3 上游引物 5'-CAG ACT CAC TCA GCC ACA GCG-3'; mFoxO3 下游引物 5'-TCG TTG CGA AGC ATC ACG-3'; mPPAR δ 上游引物 5'-TCC AGG ACA CCA TTC TGC G-3'; mPPAR δ 下游引物 5'-GCA AGG TCT CAC TCT CCG TCT TC-3'; mPPAR α 上游引物 5'-TGA TGA ACA AAG ACG GGA TGC-3'; mPPAR α 下游引物 5'-CCA CAA ACA GGG AAA TGT CAC TG-3'; mLXR 上游引物 5'-CAT TGC CAT CAG CAT CTT CTC TG-3'; mLXR 下游引物 5'-CGT GGG AAC ATC AGT GGG TC-3'; mFXR 上游引物 5'-GAC AGA GAG GCG GTG GAG AAG-3'; mFXR 下游引物 5'-AGG AGG CAG GCG AAA TGC-3'; mGAPDH 上游引物 5'-GGT TGT CTC CTG CGA CTT CAA-3'; mGAPDH 下游引物 5'-CCA CCC TGT TGC TGT AGC C-3'。PCR 相关反应参数: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物全部进行电泳, 用凝胶成像系统进行记录并分析。

1.2.7 肝组织相关蛋白 Western Blot 检测 取 80 mg 肝组织匀浆后, 加 10 倍裂解液, 12 000 r/min 离心 15 min, BCA 法测蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白进行 10% 聚丙烯酰胺电泳, 湿法电转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 加入 1 : 3 000 稀释的抗体, 4 °C 摇床过夜; TBST 缓冲液洗膜后, 加入 1 : 4 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体, 室

温孵育 1 h, 洗膜后用 ECL 化学发光成像系统检测显影, 以目的蛋白的灰度值除以内参 β -Act 的灰度值, 所得结果为目的蛋白的相对含量。

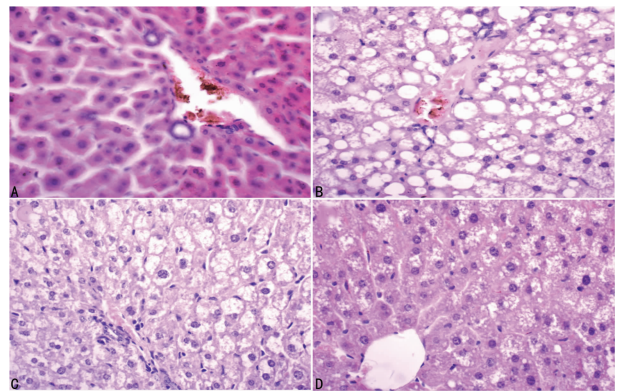
1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝指数变化 随着时间的延长, 实验组小鼠体质量明显低于正常组 ($P < 0.01$), 同时肝脏重量较正常组高, 与正常组比较模型组肝指数明显增高 ($P < 0.01$)。实验组的肝指数在第 7、10、14 天下降。见表 1。

2.2 TG 的测定 血清 TG 模型组第 7 天和第 10 天均高于正常组 ($P < 0.05$), 但第 14 天低于正常组 ($P > 0.05$)。肝 TG 模型组均明显高于同期对照组 ($P < 0.01$)。血清 GLU 除第 7 天模型组明显高于正常组 ($P < 0.05$), 其他两个时间点与正常组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 肝脏病理学变化 肝脏肉眼观察: 显示正常组小鼠肝脏颜色为均匀的暗红色, 边缘锐利, 质韧。模型组肝脏体第 7 天积明显增大, 颜色呈现红黄相间, 并随着时间的延长肝脏颜色保持脂肪变状态。肝脏显微镜观察: 正常组小鼠肝脏全部正常, 没有发生脂肪变性。模型组小鼠第 7 天肝脏轻度脂肪肝占 100%, 第 10 天模型轻度脂肪肝占 70%; 第 14 天模型组轻度脂肪肝占 60%。见图 1。

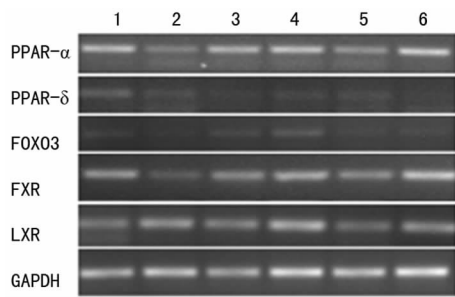


A: 正常组小鼠肝 HE 染色 ($\times 200$); B: 模型组第 7 天小鼠肝 HE 染色 ($\times 200$); C: 模型组第 10 天小鼠肝 HE 染色 ($\times 200$); D: 模型组第 14 天小鼠肝 HE 染色 ($\times 200$)。

图 1 肝脏病理学变化

2.4 各组小鼠脂肪代谢相关基因表达 见图 2。PPAR、FOXO3、FXR 模型组第 7 天明显低于正常组, 但第 10、14 天逐渐回升。LXR 模型组第 7 天明显上升, 但是第 10、14 天逐渐下降。

2.5 各组小鼠脂肪代谢相关蛋白表达 见图 3。相对正常组, 模型组沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 蛋白表达量有降低, 随着时间延长、剂量减少 SIRT1 蛋白表达量都有回升。



1、3、5:正常组第7、10、14天;2、4、6:模型组第7、10、14天。

图2 各组小鼠脂肪代谢相关基因表达

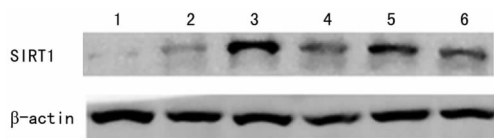


图3 各组小鼠脂肪代谢相关蛋白表达

3 讨论

理想的动物模型应当具备以下条件^[3]:与人类疾病特征相似;病变有一定发展过程,与人类发病过程接近;形成率高,病死率低,重复性好;造模方法简便易行。本实验所采用的常规高脂饲料,配方简单,于第7天开始肝组织出现明显的脂肪变性,成功的建立了脂肪肝动物模型,为后续脂肪肝的实验研究提供了坚实的基础。

本实验通过高糖高脂饲料加大剂量地塞米松腹腔注射可以诱导高脂血症和急性脂肪肝模型,肝指数、血糖、血脂、肝组织TG短期明显增高。并且,在药物剂量减少状况下,仍可以维持血糖、血脂、与脂肪代谢有关的基因和蛋白质表达异常在10d范围,为药物筛选提供了足够的给药时间。詹炳汇等^[4]报道的地塞米松脂肪肝维持4d,随后各项指标逐渐恢复正常,而本文通过降低地塞米松给药进一步维持可以延长脂肪肝模型时间。

SIRT1 是 NAD⁺ 依赖的蛋白去乙酰化酶,SIRT1 属于 Sir-tuin 家族,最初定义为 NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶家族,可使多种蛋白质的赖氨酸残基发生去乙酰化。SIRT1 是一个重要的能量稳态调控因子,肝脏中 SIRT1 可以通过调控 PPAR-α 来调控脂质稳态,介导机体对于禁食和饥饿的适应性调节^[5],SIRT1 能够促进生物体内脂肪的分解,降低脂肪的沉积^[6]。本研究发现地塞米松诱导的脂肪肝模型中 SIRT1 的表达明显降低,随着地塞米松剂量的降低,SIRT1 逐渐升高,与肝组织脂肪变有明显的相关性。

PPARα 是过氧化物酶体增殖物激活受体,可以促进脂肪酸的跨膜运输。有研究证实 SIRT1 可以激活 PPARα 促进脂肪酸的氧化稳定血糖^[7]。FXR 是类法尼醇 X 受体,LXR 是肝 X 受体,都可以被 SIRT1 去乙酰化参与能量代谢调节^[8]。FOXO3 是叉头蛋白盒转录因子也受 SIRT1 的调节^[9]。本研

究结果显示模型组第7天通过抑制 SIRT1 的表达,PPARα/δ、FXR、FOXO3 表达下降,使其 LXR 的表达水平上升,从而影响细胞脂质代谢及合成。

地塞米松是一种常用抗炎、抗过敏、退烧药物,研究其对肝脂肪代谢影响更具有临床意义。糖皮质激素作用机制传统观点是通过激素与胞内受体结合,调节相关基因、蛋白质表达发挥作用。地塞米松对肝脏脂肪代谢影响通过何种通路不明确,本实验发现大剂量地塞米松可以明显抑制 SIRT1、PPARα/δ、FOXO3 及 FXR 的表达,上调 LXR 的表达,其机制还需要进一步探讨。

参考文献

- [1] 王俊杰,方会龙,李纯伟,等.非酒精性脂肪肝模型小鼠的建立[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(24):4395-4399.
- [2] 刘嵩,卢笑从,葛建,等.高脂所致脂肪肝动物模型建立的动态研究[J].中国药理学通报,2006,22(11):1399-1403.
- [3] Ni HC, Li J, Jin Y, et al. The experimental animal model of hypedipiemia and hypedip idemic fatty liver in rats[J]. Chin Pharmacol Bull, 20(6):703-706.
- [4] 詹炳汇,蒋舒悦,蒋艺燕,等.地塞米松诱导小鼠急性药物性脂肪肝模型自愈特性的研究[J].福建医药杂志,2014,36(3):64-67.
- [5] Ide T, Shimano H, Yoshikawa T, et al. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor(LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism [J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(7):1255-1267.
- [6] Rodlgers JT, LerinC, Haas W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-lalpha and SIRT1[J]. Nature, 2005, 434(7029):113-118.
- [7] Purushotham A, Schug TT, Xu Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid Metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation [J]. Cell Metab, 2009, 9(4):327-338.
- [8] Li XL, Zhang SW, Blander G, et al. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR[J]. Mol Cell, 2007, 28(1):91-106.
- [9] Feige NC. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation[J]. Cell Metab, 2008, 8(5):347-358.

(收稿日期:2017-03-02 修回日期:2017-05-06)

(上接第 2382 页)

等.封闭负压引流(VSD)在慢性骨髓炎创面不愈合及软组织缺损中的应用[J].中国骨与关节损伤杂志,2010,25(7):643-644.

[13] 曾实,余化霖,沈光建.持续封闭式负压引流治疗大范围椎管内外感染并脑脊液漏[J].中国临床神经外科杂志,2012,9(2):114.

[14] 张宇,姚元章,孙士锦,等.反植皮法联合负压封闭引流技

术治疗严重创伤合并大面积皮肤撕脱伤 42 例[J].第三军医大学学报,2008,30(14):1389-1390.

[15] Chen SZ, Li J, Li XY, et al. Effects of vacuum-assisted closure on wound microcirculation: an experimental study [J]. Asian J Surg, 2005, 28(3):211-217.

(收稿日期:2017-03-02 修回日期:2017-05-06)