

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.26.007

n-3 多不饱和脂肪酸对大鼠非酒精性脂肪肝的改善作用

喻日成, 罗建华, 刘 倩
(贵州省人民医院内分泌科, 贵阳 550000)

[摘要] **目的** 探讨 n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 PUFA)对高脂诱导的 Wister 大鼠非酒精性脂肪性肝(NAFLD)的改善作用。**方法** Wister 雄性大鼠 30 只,分为正常组、模型组、n-3 PUFA 组。采用高脂喂养建立 NAFLD 模型,实验 20 周后,每组抽出 7 只大鼠检测血清及肝脏总胆固醇(TG)及三酰甘油(TC);其余 3 只大鼠肝脏苏木精-伊红(HE)染色;应用实时定量 PCR(Real time-qPCR)及 Western blot 检测肝脏组织单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α) mRNA 及蛋白水平。**结果** 模型组大鼠血清及肝脏 TG、TC 水平明显高于对照组($P<0.01$),加入 n-3 PUFA 后血清及肝脏的 TG、TC 水平明显下降($P<0.05$)。HE 染色能明显观察到模型组大鼠肝细胞脂肪变性,而 n-3 PUFA 有明显改善效果。模型组大鼠炎症分子 MCP-1、iNOS、TNF-α 基因表达水平明显高于对照组($P<0.05$),而 n-3 PUFA 组与模型组比较,MCP-1、iNOS、TNF-α 炎症分子的表达水平明显下降($P<0.05$)。**结论** 高脂喂养能引起大鼠肝脏严重的脂肪变性及炎性反应,而 n-3 PUFA 起明显的改善作用。

[关键词] 脂肪肝,酒精性;脂肪酸类,不饱和;n-3 多不饱和脂肪酸;非酒精性脂肪肝病;单核细胞趋化蛋白-1
[中图法分类号] R589.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)26-3620-03

Improvement effect of n-3 polyunsaturated fatty acid on rat nonalcoholic fatty liver disease

Yu Richeng, Luo Jianhua, Liu Qian

(Department of Endocrinology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the improvement effect of n-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) on rat nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD) induced by high fat diet. **Methods** Thirty Wister male rats were divided into the control group, model group and n-3 PUFA group. The high fat feeding was adopted to establish NAFLD model. After 20 weeks of experiment, 7 cases were extracted from each group for detecting serum and liver total cholesterol (TC) and triacylglyceride(TG); other 3 cases were performed the liver HE staining, the levels of MCP-1, iNOS, TNF-α mRNA protein were detected by using the Real time quantitative PCR(qPCR) and Western blot. **Results** The TC and TG levels in serum and livers of the model group were significantly higher than those in the control group($P<0.01$), but which were evidently decreased after adding n-3 PUFA($P<0.05$). The HE staining clearly observed the rat hepatic cells fatty degeneration in the model group, while polyunsaturated fatty acid had obvious improvement effect on it. The inflammatory molecule MCP-1, iNOS, TNF-α gene expression levels in the model group were significantly higher than those in the control group($P<0.05$), while the expression levels of MCP-1, iNOS and TNF-α in the n-3PUFA group were significantly decreased compared with the model group. **Conclusion** High fat feeding can cause the severe fatty degeneration in rat liver, but polyunsaturated fatty acid can play obvious improvement effect.

[Key words] fatty liver, alcoholic; fatty acids, unsaturated; n-3 Polyunsaturated fatty acid; nonalcoholic fatty liver disease; monocyte chemotactic protein-1

亚太地区的非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患病率为 12%~24%,已成为一种危害极大的公共卫生问题^[1]。NAFLD 是由非酒精因素引起的肝内严重的脂肪变性,与脂代谢异常、胰岛素抵抗、肥胖及代谢综合征关系密切^[2]。n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA)能抑制脂质合成、促进脂质分解,同时也有抗炎和增加胰岛素敏感性的作用^[3]。本研究对 n-3 PUFA 对大鼠 NAFLD 胰岛素抵抗及肝脏炎症的影响进行探讨,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级 Wister 雄性大鼠 30 只,初始体质量(160±10)g,中南大学湘雅医学院动物中心提供。RNA 提取

试剂盒购自 Qiagen 公司;逆转录试剂盒购自 Applied Biosystems 公司;LightCycler® TaqMan® Master 购自 Roche 公司;单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、β-肌动蛋白(β-actin)一抗购自 BD Biosciences 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养及标本留取 30 只 Wister 雄性大鼠,分为 3 组:正常组,模型组, n-3 PUFA 组,每组 10 只。正常组喂基础饲料(蛋白质 22%,脂肪 12%,碳水化合物 66%),模型组喂高脂饲料(蛋白质 9%,脂肪 66%,碳水化合物 25%),8 周后 n-3 PUFA 组加入 1.0 g/d n-3 PUFA。喂养 20 周后,每周抽出 3

作者简介:喻日成(1976—),副主任医师,博士,主要从事糖尿病慢性并发症及肥胖方面研究。

表 1 Real-time PCR 引物

基因	正向(5'-3')	反向(5'-3')
PPIA	CAGGTCCTGGCATCTTGTCC	ATGCCCCGAAAGTCAAAAGAA
MCP-1	TGAGCCATGGGAACAAGGAAGTCT	TGTGCTGGTCTGTGATAGGCACAT
iNOS	CTGCTGGTGGTGACAAGCACATTT	ATGTCATGAGCAAAGGCGCAGAAC
TNF-α	CTTCGTCTACTGAACTTGG	GTGCTTGATCTGTTGTTTCC

只大鼠,取肝脏同一部位经固定后行苏木精-伊红(HE)染色,其余 7 只大鼠断头处死后分离血清,进行相关指标的测定,肝脏取出后用液氮速冻并保存于-80℃,用于后续实验。

1.2.2 指标测定 采用酶法试剂盒测定血清三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC),操作过程按说明书进行。称取肝脏 100 g,加入 900 μL 异丙醇作为介质充分匀浆,3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,检测 TG、TC。取 3 只大鼠同一部位肝脏经 4%多聚甲醛固定,行常规 HE 染色。

1.2.3 实时定量 PCR(Real time-qPCR)检测 MCP-1、iNOS、TNF-α 基因 mRNA 表达

1.2.3.1 总 RNA 制备 取肝脏组织 100~150 mg,匀浆,加入 1 mL TRIzol,按 Qiagen 试剂盒说明书介绍的方法提取总 RNA,采用 Nanodrop ND1000 测量 RNA 的浓度。

1.2.3.2 cDNA 合成 按逆转录试剂盒说明合成 cDNA,每个反应体系含:1.0 μg RNA,2.0 μL 10×RT 缓冲液,0.8 μL dNTP,2.0 μL 随机引物,1.0 μL 逆转录酶,总反应体系 20.0 μL,反应条件:25℃ 10 min,37℃ 120 min,85℃ 5 min,4℃ 后取出样品,-20℃ 保存。

1.2.3.3 PCR 扩增 PCR 总反应体系为 10.0 μL,含 cDNA 模板 2.0 μL,TaqMan® Master 5.0 μL,ddH₂O 2.5 μL,正、反向引物各 0.5 μL(表 1)。PCR 反应条件:95℃ 10 min;95℃ 5 s,60℃ 1 min,72℃ 20 s,45 个循环;72℃ 5 min。每个 qPCR 重复 3 次,以 PPIA 为管家基因,目的基因的相对表达量通过公式 2^{-ΔΔCt} 计算。

1.2.4 Western blot 检测 MCP-1、iNOS、TNF-α 蛋白的表达

(1)大鼠肝脏总蛋白提取:取大鼠肝脏组织 100 mg,加入 1 mL RIPA 裂解液,充分匀浆后提取总蛋白,通过二喹啉甲酸(BCA)方法测量蛋白浓度。(2)将 30 μg 的蛋白样品加入 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳点样孔,100 V 电压电泳 2 h。(3)电泳完的凝胶转聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%的脱脂牛奶封闭,MCP-1、TNF-α、iNOS 及 β-actin 一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,加辣根过氧化物酶标记的二抗常温下 30 min,TBST 洗 3 次。(4)化学发光法显影、定影,将胶片进行扫描拍照,用凝胶图像处理系统分析目标带的相对分子质量和净光密度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数的比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

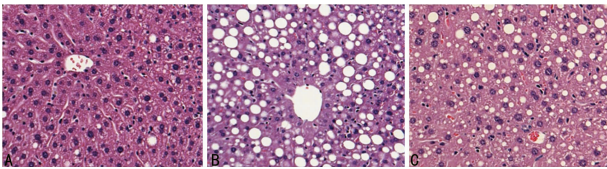
2.1 各组大鼠血清及肝脏 TC、TG 水平 模型组大鼠血清及肝脏 TG、TC 水平明显高于对照组(*P*<0.05),加入 n-3 PUFA 后血清及肝脏的 TG、TC 水平较模型组明显下降(*P*<0.05),见表 2。

2.2 各组大鼠 HE 染色结果 光镜下对照组大鼠肝组织结构完整,肝细胞排列紧密,肝小叶结构正常,细胞核位于细胞中央,核大而圆,无脂滴;模型组大鼠肝脏内有弥漫性肝细胞脂肪变性,脂肪浸润明显,肝细胞内可见大小不一的脂滴;n-3 PUFA 组肝细胞脂肪变性较模型组明显改善,仅见轻度脂肪沉积,见图 1。

表 2 n-3 PUFA 降低大鼠肝脏及血清 TC、TG 水平($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

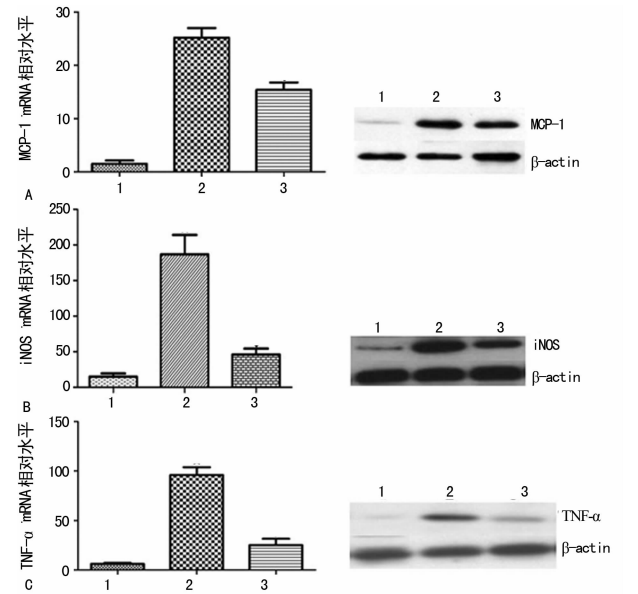
组别	血清		肝脏	
	TC	TG	TC	TG
对照组	1.03±0.28 ^a	0.94±0.21 ^a	9.04±1.87 ^a	12.07±4.53 ^a
模型组	1.54±0.26	1.38±0.32	15.43±2.46	25.02±5.46
n-3 PUFA 组	1.21±0.14 ^a	1.32±0.58 ^a	12.98±2.34 ^a	19.07±3.83 ^a

^a:*P*<0.01,与模型组比较



A:对照组;B:模型组;C:n-3 PUFA 组

图 1 光镜下大鼠肝脏组织病理改变(HE,×400)



A: MCP-1; B: iNOS; C: TNF-2; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: n-3 PUFA 组

图 2 大鼠肝脏 MCP-1、iNOS、TNF-α 基因表达

2.3 n-3 PUFA 对大鼠肝脏组织炎症分子基因表达的影响

Real time-qPCR 及 Western blot 结果显示:模型组大鼠炎症分子 MCP-1、iNOS、TNF- α mRNA 及蛋白表达水平明显高于对照组($P<0.05$),而 n-3 PUFA 组与模型组比较,MCP-1、iNOS、TNF- α 炎症分子的 mRNA 及蛋白表达水平平均明显下降($P<0.05$),见图 2。

3 讨 论

多个临床研究证实增加饮食中 n-3 PUFA 水平能降低三酰甘油水平、降低血压、减少肝脏炎症、改善胰岛素抵抗^[4-5]。非酒精性肝硬化患者行肝脏活检发现 n-3/n-6 多不饱和脂肪酸水平降低^[6]。有研究表明饮食中 n-3PUFA 能通过孕烷 X 受体(PXR)及法尼醇 X 受体(FXR)信号通路改善 NAFLD 纤维化及硬化^[7]。本研究采用国内外广泛应用的方法,利用高脂喂养建立大鼠 NAFLD 病模型。本研究结果表明高脂喂养大鼠 20 周后,大鼠血清 TG、TC 明显高于正常对照组,肝脏组织的 TG、TC 亦明显高于对照组。肝脏组织的 HE 染色观察到高脂喂养的大鼠存在严重的脂肪变性,而对照组大鼠的肝细胞形态正常,这些结果表明通过高脂喂养成功建立了大鼠的 NAFLD 模型。

NAFLD 的发病机制目前尚不明确,有研究表明肝脏的炎症及纤维化在 NAFLD 的发病环节中起重要作用,一些炎症因子如 TNF- α 及活性氧(ROS)通过上调肝脏转化生长因子- β (TGF- β)及 α -平滑肌肌动蛋白(SMA)参与 NAFLD 的发病过程^[8-9]。本研究结果表明高脂喂养大鼠建立 NAFLD 模型后肝脏组织的炎症因子 MCP-1、iNOS、TNF- α 表达明显上调,结果与国外研究一致。TNF- α 是肝脏炎症的重要标志物,在肝脏的损害及肝纤维化中起重要作用^[10]。MCP-1 促进巨噬细胞浸润肝脏,国外研究表明 MCP-1 基因敲除的小鼠肝脏巨噬细胞的浸润减少,肝脏的炎性反应减轻^[11]。n-3 PUFA 具有明显的抗炎及改善胰岛素抵抗作用,能减少脂肪组织及肝脏组织的炎症分子如 TNF- α 的表达^[12]。本研究结果表明 NAFLD 模型组大鼠加入 n-3 PUFA 喂养 20 周后,肝脏组织脂肪变性明显改善,肝脏组织 TC、TG 水平明显降低,炎症分子 MCP-1、iNOS、TNF- α 表达明显下调。有研究表明 n-3 PUFA 通过激活过氧化物酶增殖活化受体- α (PPAR- α)及下调类固醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)的基因表达增加肝脏脂肪酸氧化。n-3 PUFA 亦可通过核因子 kappa B 通路减少肝脏及脂肪组织的炎性反应,明显减少肝脏组织 TNF- α 的表达^[13-14]。

n-3 PUFA 具有明显抗炎及改善脂代谢作用,能明显减少 NAFLD 大鼠肝脏脂肪变性及肝脏组织 TG、TC 水平,减少肝脏组织的炎性反应,为临床工作中 NAFLD 防治提供一定的理论依据。

参考文献

[1] Farrell GC,Chitturi S,Lau GK,et al. Guidelines for the assessment and management of non-alcoholic fatty liver disease in Asia-Pacific region; executive summary[J]. J Gastroenterol Hepatol,2007,22(6):775-777.

[2] Sakurai M,Takamura T,Ota T,et al. Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Gastroenterol Hepatol 2007,42(4):312-317.

[3] Delarue J, Li CH, Cohen R, et al. Interaction of fish oil and a glucocorticoid on metabolic responses to an oral glucose load in healthy human subjects [J]. Br J Nutr, 2006,95(2):267-272.

[4] Davidson MH. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids [J]. Am J Cardiol, 2006, 98(4A):27-33.

[5] Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation [J]. OCL, 2004, 11(1):38-45.

[6] Elizondo A, Araya J, Rodrigo R, et al. Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients [J]. Obesity, 2007, 15(1):24-31.

[7] Saraswathi V, Perriotte-Olson C, Ganesan M, et al. A combination of dietary N-3 fatty acids and a cyclooxygenase-1 inhibitor attenuates nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. J Nutr Biochem, 2017, 42(4):149-159.

[8] Minicis S, Seki E, Paik YH, et al. Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis [J]. Hepatology, 2010, 52(4):1420-1430.

[9] Carpino G, Nobili V, Renzi A, et al. Macrophage activation in pediatric nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) correlates with hepatic progenitor cell response via Wnt3a pathway [J]. PLoS One, 2016, 11(6):e0157246.

[10] Li Z, Yang S, Lin H, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2003, 37(2):343-350.

[11] Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury [J]. Gut, 2012, 61(3):416-426.

[12] Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance [J]. J Clin Invest, 2003, 112(12):1821-1830.

[13] Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids [J]. Prog Lipid Res, 2008, 47(2):147-155.

[14] Yuan F, Wang H, Tian Y, et al. Fish oil alleviated high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via regulating hepatic lipids metabolism and metaflammation; a transcriptomic study [J]. Lipids Health Dis, 2016, 15(20):219-233.