

# 壳寡糖对PNPLA3 I148M转基因小鼠肝脏脂质代谢的影响

王健<sup>1</sup>, 姜曼<sup>2</sup>, 辛永宁<sup>2,3</sup>, 宣世英<sup>2,3,4</sup> (1.青岛大学医学院附属青岛市市立医院, 青岛 266021; 2.青岛市消化疾病重点实验室, 青岛 266071; 3.青岛市市立医院 消化内二科, 青岛 266011; 4.中国海洋大学医药学院, 青岛 266003)

**摘要:** 目的 探讨壳寡糖对PNPLA3 I148M转基因小鼠肝脏脂质代谢的影响。方法 选取5周龄雄性PNPLA3 I148M转基因小鼠随机分为模型组和壳寡糖组, 以同龄C57BL/6J小鼠为对照组。壳寡糖组小鼠每日给予200 mg/kg壳寡糖, 模型组及对照组给予等量生理盐水。16周后, Western blot检测小鼠肝脏PNPLA3 I148M的表达。HE和油红O染色观察小鼠肝脏脂质蓄积情况, 并测定肝脏甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)含量。同时检测血清中TG、TC、ALT及AST水平。结果 模型组及壳寡糖组小鼠肝脏PNPLA3 I148M蛋白表达上调。HE染色示模型组小鼠肝脏发生明显脂肪变性, 壳寡糖组小鼠肝细胞内脂肪空泡较少, 未见明显脂肪变性; 油红O染色示壳寡糖可显著降低转基因小鼠肝细胞内红染脂滴的数量及体积。壳寡糖可减轻PNPLA3 I148M基因引起的TG增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 3组小鼠肝脏TC含量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。壳寡糖可降低PNPLA3 I148M转基因小鼠血清TG、TC水平, 而对ALT和AST水平无影响。结论 壳寡糖能减轻PNPLA3 I148M转基因小鼠肝脏脂质沉积, 为治疗NAFLD提供新的思路。

**关键词:** 寡糖类; 脂肪肝, 酒精性; 小鼠, 转基因

## Effect of chitosan oligosaccharide on hepatic lipid metabolism of PNPLA3 I148M transgenic mice

WANG Jian<sup>1</sup>, JIANG Man<sup>2</sup>, XIN Yong-ning<sup>2,3</sup>, XUAN Shi-ying<sup>2,3,4</sup> (1.Qingdao University Medical College Affiliated Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266021, China; 2.Digestive Disease Key Laboratory of Qingdao, Qingdao 266071, China; 3.Second Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, China; 4.Ocean University Medical College of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of chitosan oligosaccharide (COS) on hepatic lipid metabolism of PNPLA3 I148M transgenic mice. **Methods** Five-week-old male PNPLA3 I148M transgenic mice were randomly divided into model group and COS group. The C57BL/6J mice with the same age were selected as control group. The COS group was treated with 200 mg/(kg·d) COS. The same volume of saline was administered into the other two groups. After 16 weeks, the protein expression of PNPLA3 I148M in the liver of mice was detected by Western blot. The lipid accumulation of liver was observed by HE and oil red O staining. Triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) content in livers were measured. At the same time, serum TG, TC, ALT and AST levels were determined. **Results** The protein expression of PNPLA3 I148M in mice livers of model group and COS group was up-regulated. HE staining showed that significant fatty degeneration was observed in livers of model group and few fat vacuoles with no obvious steatosis was found in COS group. Oil red O staining showed COS could significantly reduce the number and volume of lipid droplets in hepatocytes of transgenic mice. COS inhibited the increase of TG induced by PNPLA3 I148M gene, with significant difference ( $P < 0.05$ ). No significant difference was observed on hepatic TC contents among the three groups ( $P > 0.05$ ). At the same time, we found COS down-regulated serum TC and TG levels, but had no effects on ALT and AST levels in PNPLA3 I148M transgenic mice. **Conclusions** COS can alleviate lipid deposition in the liver of PNPLA3 I148M transgenic mice, providing a new method for the therapy of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

**Key words:** Oligosaccharides; Fatty liver, alcoholic; Mice, transgenic

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 在全球范围内迅速流行, 成为新的公共健康问题<sup>[1]</sup>。目前临床缺乏有效治疗药物, 研发有效降肝脂药物成为亟待解决的问题<sup>[2]</sup>。Romeo等<sup>[3]</sup>进行的一项GWAS发现PNPLA3基因突变能引起肝脏内甘油三酯蓄积。随后不同地区进行的PNPLA3 I148M基因多态性研究进一步证实该基因与NAFLD发病显著相关<sup>[4-6]</sup>。能否针对PNPLA3基因寻找治疗NAFLD的可行药物成为研究的一个新方向。

壳寡糖作为一种新兴的海洋多糖, 具有多种生物学活性, 引起了人们极大的兴趣<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[8]</sup>表明壳寡糖可以降低血液中甘油三酯的含量, 而其作用尚不明确。本实验通过研究壳寡糖对PNPLA3 I148M 转基因小鼠肝脏内脂质含量的影响, 阐明遗传因素在NAFLD发病机制中的作用及壳寡糖治疗效果, 为寻求有效先导化合物, 进一步指导临床治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及主要试剂** 本研究选择SPF级5周龄健康雄性C57BL/6J小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, PNPLA3 I148M转基因小鼠 (C57BL/6J) 由上海思路迪公司构建。本研究所需试剂为壳寡糖 (大连中科格莱克生物科技有限公司)、油红 O (美国Sigma公司)、甘油三酯酶法测定试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司)、总胆固醇酶法测定试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司)、抗 $\beta$ -actin抗体 (美国Santa Cruz公司)、PNPLA3鼠抗人多克隆抗体 (英国Abcam公司)、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司)、ECL化学发光试剂盒 (美国Millipore公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 小鼠分组及给药情况** 选择20~25 g的同龄雄性小鼠分为对照组 (C57BL/6J正常小鼠)、转基因组 (PNPLA3 I148M转基因小鼠) 和壳寡糖组 (PNPLA3 I148M转基因小鼠+壳寡糖), 每组10只。饲养环境为SPF动物房, 室温控制 ( $23 \pm 2$ ) °C, 湿度50%~70%, 小鼠饲养时均正常饮食、饮水, 壳寡糖组小

鼠每日腹膜内注射200 mg/kg 的壳寡糖。对照组和模型组的小鼠给予同等体积的0.9%的NaCl溶液。16周后, 将小鼠禁食12小时过夜, 然后乙醚麻醉后迅速解剖, 经心脏取血留取血液标本, 迅速留取部分新鲜肝组织进行冰冻病理切片, 部分肝组织用4%甲醛固定, 其余肝组织用液氮快速冷冻, 置于-80 °C冰箱保存, 用于Western blot及组织甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 含量测定。

**1.2.2 Western blot检测小鼠PNPLA3 I148M蛋白的表达** 取小鼠部分肝脏, 加入蛋白裂解液置于冰上研磨, 裂解30分钟后, 4 °C 13000 r/min离心30分钟, 取上清液, BCA法测定蛋白浓度。各组分别取40  $\mu$ g 蛋白, 加入5  $\times$  SDS上样缓冲液, 95 °C煮沸5分钟使蛋白变性, 进行SDS-PAGE电泳, 然后点转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭2小时, 用鼠抗人多克隆一抗 (1:1000) 孵育过夜, 用TBST洗膜3次后, 以山羊抗鼠辣根酶标记二抗孵育2小时, 再次洗涤后, 加ECL化学发光剂, 曝光显影。Western blot的条带信号值用Quantity One 软件进行分析。

**1.2.3 血清生物化学检测** 血液标本在室温下静置, 3000 r/min离心10分钟, 取血清用日本OLYMPUS全自动生物化学分析仪酶法测定血清TG、TC、ALT、AST水平。

**1.2.4 组织病理学检查** 用4%甲醛固定小鼠肝组织标本, 石蜡包埋, 常规切片, HE染色, 光学显微镜下观察肝脏病理学改变如肝组织脂肪变、炎症细胞浸润等; 取小鼠肝脏用OCT包埋, 制备冰冻切片, 4%甲醛固定后, 0.5%油红O染色, 苏木素复染, 于光学显微镜下观察肝脏脂质堆积情况。

**1.2.5 肝脏组织TG、TC含量测定** 取一定量的肝脏组织, 用TG和TC (组织/细胞) 酶法测定试剂盒, 采用经典GPO Trinder反应, 用酶标仪 (Bio-Rad公司) 分别在570 nm及550 nm测其吸光度 ( $A$ ),  $A$ 值和TG与TC含量成正比, 以此计算TG与TC含量。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 17.0统计软件处理数据, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据间比较用 $t$ 检验。多组数据间比较采用One-Way ANOVA分析, 组间两两比较采用SNK法,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PNPLA3 I148M在转基因小鼠肝脏中的表达 提取模型组、壳寡糖组及对照组小鼠肝脏组织总蛋白,并用PNPLA3抗体进行Westem blot,分析PNPLA3 I148M在肝脏中的表达,结果显示模型组与壳寡糖组小鼠肝脏均有PNPLA3 I148M蛋白表达(图1),但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

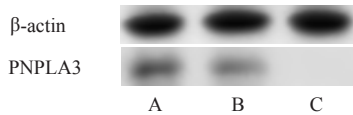


图1 Western blot 检测小鼠PNPLA3 I148M蛋白的表达

注: A为模型组小鼠, B为壳寡糖小鼠, C为对照组小鼠,  $\beta$ -actin为内参

2.2 小鼠肝组织脂质沉积情况 为观察小鼠肝脏内脂质堆积情况,将小鼠肝脏进行HE染色,在光学显微镜下进行观察。相较其他两组,转基因小鼠组肝脏组织结构排列紊乱,有大量的脂肪空泡,但3组均无炎性细胞堆积(图2)。肝脏油红O染色显示,和对照组相比转基因组小鼠肝细胞体积增大,发生脂肪变性,胞质中有大量的红染脂滴,胞核被推向周边。而壳寡糖治疗组细胞中的红染脂滴数量减少,脂质沉积减轻(图3)。

2.3 小鼠肝脏组织TG、TC含量测定 与对照组相比,转基因组小鼠肝脏TG含量明显增加,而壳寡

糖组小鼠肝细胞内TG的含量显著低于转基因组( $F = 27.4, P < 0.001$ ),差异有统计学意义(图4)。各组间肝脏TC含量差异无统计学意义。

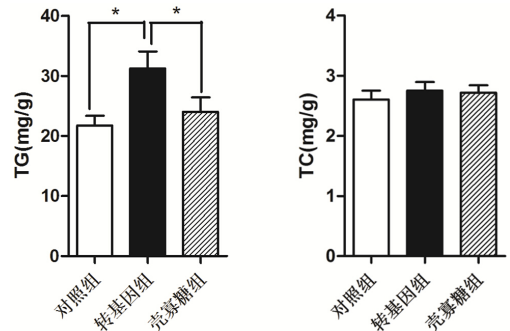


图4 各组小鼠肝脏TG、TC含量情况

注:  $*P < 0.05$

2.4 小鼠血清脂质及肝功能指标水平的变化 PNPLA3 I148M转基因小鼠组血清TG、TC、ALT和AST与对照组相比,差异无统计学意义。壳寡糖组血清TG低于转基因组( $t = 3.536, P = 0.002$ ),差异有统计学意义;壳寡糖组血清TC低于转基因组( $t = 0.598, P < 0.001$ ),差异有统计学意义;其ALT、AST水平差异无统计学意义,见表1。

3 讨论

非酒精性脂肪肝是临床最常见的慢性肝病之一。近年来,随着人们生活方式的改变,其发病率

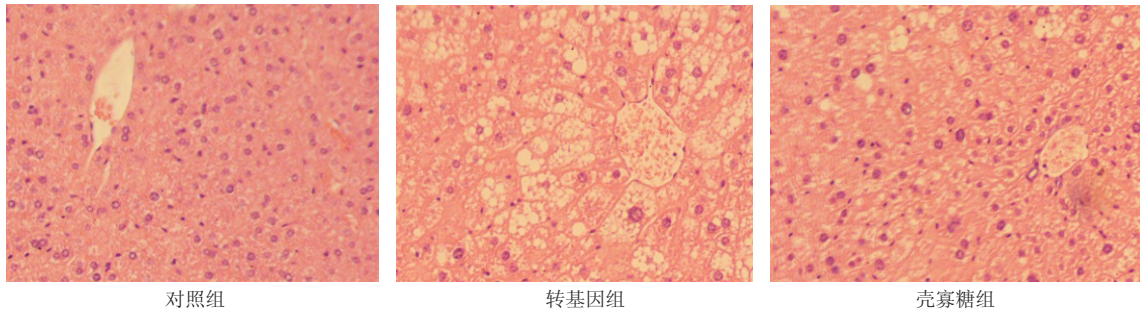


图2 各组小鼠肝脏HE染色(100×)

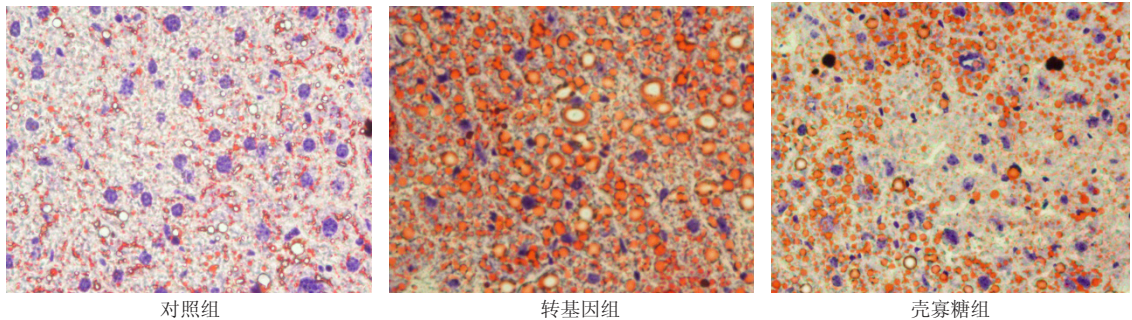


图3 各组小鼠肝脏油红O染色(400×)



表 1 各组小鼠血脂及肝功能相关指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 分组   | 血清TG (mmol/L)            | 血清TC (mmol/L)            | ALT (U/L)    | AST (U/L)    |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| 对照组  | 1.69 ± 0.09              | 3.01 ± 0.21              | 52.00 ± 3.18 | 64.00 ± 2.63 |
| 壳寡糖组 | 1.64 ± 0.15 <sup>a</sup> | 2.86 ± 0.22 <sup>b</sup> | 42.00 ± 3.63 | 67.00 ± 3.16 |
| 转基因组 | 1.86 ± 0.12              | 3.28 ± 0.14              | 45.00 ± 2.41 | 70.00 ± 4.02 |

注: 与转基因组比较, <sup>a</sup> $P=0.002$ , <sup>b</sup> $P<0.001$

迅速增加。NAFLD是由饮食、环境、代谢及遗传等多因素相互作用的结果<sup>[9]</sup>。由于热量摄入过多与能量消耗减少,引起的大量脂质在肝脏异常堆积造成NAFLD形成。针对其饮食、代谢等病因,目前主要采取调整饮食类型、改善生活方式、减轻体重等治疗方法<sup>[10]</sup>。而在遗传方面由于缺乏足够的认识,治疗方法尚属空白<sup>[11]</sup>。研究其相关发病机制,并针对性的寻找治疗药物是国内外研究的一个热点。

最近研究表明遗传因素在NAFLD的形成过程中发挥重要作用<sup>[12]</sup>,其中以PNPLA3 I148M多态性最受关注。为了进一步探讨PNPLA3 I148M多态性对NAFLD形成的影响,寻找非酒精性脂肪肝有效治疗药物,本课题组成功构建PNPLA3 I148M转基因小鼠。结果表明,与对照组小鼠相比,转基因小鼠肝脏TG含量增加,血清TG、TC含量差异无统计学意义,这与不同国家地区的人群实验结论一致。

壳聚糖作为一种海洋多糖具有多种生物学效应,如免疫调节、抗肿瘤、抗氧化及降脂作用<sup>[7]</sup>。Sumiyoshi等<sup>[13]</sup>发现低分子量壳聚糖可明显降低高脂饮食小鼠肝脏TG及TC含量。而壳聚糖的降解产物——壳寡糖,分子量低、水溶性高更容易被吸收,发挥生物活性。有研究<sup>[8,14]</sup>表明壳寡糖一方面可降低高脂饮食小鼠血清中TG含量,另一方面可明显缓解肝脏TG蓄积。但是壳寡糖对于遗传因素导致的脂肪肝作用尚不明确。本课题组通过PNPLA3 I148M转基因小鼠构建NAFLD模型,给予一定量壳寡糖治疗,研究壳寡糖对转基因小鼠脂质代谢的影响,发现壳寡糖可降低转基因小鼠血清TG、TC含量,同时减轻肝脏TG积累,而对血清ALT、AST水平无影响。进一步明确了壳寡糖对NAFLD转基因小鼠的降脂作用。

综上所述,本实验通过NAFLD转基因小鼠模型,研究PNPLA3 I148M与NAFLD的相关性,对该

病的发病机制有了新的认识。同时,证实壳寡糖可改善转基因小鼠肝脏内脂质堆积,从而为NAFLD的治疗提供潜在药物治疗方法和新的治疗思路。

#### 参考文献

- [1] Bacig MO, Lozano-Kuhne JP, Mapua CA, et al. Genetic variation I148M in patatin-like phospholipase 3 gene and risk of non-alcoholic fatty liver disease among Filipinos[J]. Int J Clin Exp Med,2014,7:2129-2136.
- [2] Malinowski SS, Byrd JS, Bell AM, et al. Pharmacologic therapy for nonalcoholic fatty liver disease in adults[J]. Pharmacotherapy,2013,33:223-242.
- [3] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease[J]. Nat Genet, 2008,40:1461-1465.
- [4] Lee SS, Byoun YS, Jeong SH, et al. Role of the PNPLA3 I148M polymorphism in nonalcoholic fatty liver disease and fibrosis in Korea [J]. Dig Dis Sci,2014,59:2967-2974.
- [5] Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, et al. Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese[J]. PLoS One,2012,7:e38322.
- [6] Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, et al. Influence of polygenetic polymorphisms on the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease of Chinese people[J]. J Gastroenterol Hepatol,2010,25:772-777.
- [7] Kang NH, Lee WK, Yi BR, et al. Modulation of lipid metabolism by mixtures of protamine and chitoooligosaccharide through pancreatic lipase inhibitory activity in a rat model[J]. Lab Anim Res,2012,28:31-38.
- [8] Wang D, Han J, Yu Y, et al. Chitosan oligosaccharide decreases very-low-density lipoprotein triglyceride and increases high-density lipoprotein cholesterol in high-fat-diet-fed rats[J]. Exp Biol Med (Maywood),2011,236:1064-1069.
- [9] Mashek DG, Greenberg AS. Serum TAG analysis differentiates between genetic and obesity-associated NAFLD[J]. Diabetes,2014,63:42-44.
- [10] Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, et al. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol,2010,7:251-264.
- [11] Zelber-Sagi S, Ratzu V, and Oren R. Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview of the epidemiological evidence[J]. World J Gastroenterol,2011,17:3377-3389.
- [12] Adams LA, White SW, Marsh JA, et al. Association between liver-specific gene polymorphisms and their expression levels with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology,2013,57:590-600.
- [13] Sumiyoshi M, Kimura Y. Low molecular weight chitosan inhibits obesity induced by feeding a high-fat diet long-term in mice[J]. J Pharm Pharmacol,2006,58:201-207.
- [14] Choi EH, Yang HP, and Chun HS. Chitoooligosaccharide ameliorates diet-induced obesity in mice and affects adipose gene expression involved in adipogenesis and inflammation[J]. Nutr Res,2012,32:218-228.

收稿日期: 2014-11-28