

脂易消对NAFLD大鼠Visfatin表达的影响

周岳君(浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 观察脂易消对实验性非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠肝组织内肥素(visfatin)的影响,探讨脂易消治疗NAFLD的作用机制。方法 采用高脂饮食制备NAFLD大鼠模型。大鼠分低、中、高剂量脂易消治疗组、易善复阳性对照组、生理盐水阴性对照组、正常对照组。采用RT-PCR法检测大鼠肝脏Visfatin mRNA的表达水平,ELISA法检测大鼠肝组织Visfatin蛋白的表达水平。结果 脂易消各治疗组大鼠肝组织Visfatin蛋白表达与Visfatin mRNA表达均明显降低($F = 19.9, P = 0.001; F = 36.1, P = 0.001$);但与易善复组相比,脂易消各治疗组大鼠肝组织Visfatin蛋白表达和脂易消中、高剂量组大鼠肝组织Visfatin mRNA表达均无显著性差异(P 分别为0.990、0.710、0.864、0.993、0.113),脂易消低剂量组与易善复组肝组织Visfatin mRNA表达水平存在统计学差异($P = 0.006$)。结论 脂易消能调控肝组织Visfatin表达,降低肝组织Visfatin蛋白表达和Visfatin mRNA表达水平,其疗效与易善复相似;其治疗NAFLD机理可能与脂易消调控肝组织Visfatin表达水平有关。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 大鼠; Visfatin

Effects of Zhiyixiao on the expression of Visfatin of NAFLD rats mode

ZHOU Yue-jun (Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Zhiyixiao on the Visfatin of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) rat in liver tissue and to discuss the mechanism of Zhiyixiao in treatment of NAFLD. **Methods** High-fat diet feeding NAFLD rats were divided into Zhiyixiao treatment group, Yishanfu treatment group, saline negative group and the normal control group. Each group was furtherly divided into three dosage subgroups. Visfatin mRNA in liver tissue was detected by RT-PCR, and Visfatin protein in liver tissue was measured by ELISA. **Results** The Visfatin protein and mRNA of Zhiyixiao treatment group were significantly lower in liver tissue ($F = 19.9, P = 0.001; F = 36.1, P = 0.001$) compared with Yishanfu group, each dose group had no significant difference ($P = 0.990, 0.710, 0.864, 0.993, 0.113$ respectively). **Conclusions** Zhiyixiao can reduce the expression of Visfatin protein and mRNA in liver tissue, whose efficacy is similar to Yishanfu, and the mechanism may relate to the regulation of Zhiyixiao on Visfatin expression in liver tissue.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); Rats; Visfatin

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和遗传易感密切相关的以肝细胞脂肪变性为主的临床病理综合征,发病率逐年增高^[1],已成为欧美等国慢性肝病中的第一大病种,其肝纤维化发生率高达25%,约1.5%~1.8%的患者有进展为肝硬化的可能^[2-4],在我国亦有超过乙型肝炎成为慢性肝病的首要病种的趋势^[5]。

NAFLD的发病机理至今尚未明确,近年研究认为,脂肪细胞因子在肝脂肪变性进程中起着十分重

要的作用^[6-8]。其中内肥素(Visfatin)因具有类胰岛素作用可降低血糖、参与脂肪代谢等生理环节而备受关注^[9-12]。本实验采用高脂NAFLD大鼠模型^[1],通过中药验方脂易消^[13-16]干预,阐明Visfatin与NAFLD发病的相关性,探讨NAFLD的发病机理,同时探讨中医药治疗NAFLD的作用机理。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雄性SD大鼠60只,体重(180±10)g,委托浙江中医药大学实验动物中心订购,饲养于室温23℃,湿度50%,明暗各12h实验环境,随机分笼喂养,自由饮水和采食,预养1周检验合格后进入实验应用。

1.2 主要实验器材 GKC可控硅恒温水浴锅(上海锦屏仪器仪表有限公司)、3000紫外线分光光度计(Pharmacin公司)、OLIMPUS显微镜(日本OLYMPUS公司)、Hoefer300电转仪(美国BioRad公司)、MyCycler PCR仪(美国BioRad公司); The BioRad iCycler Iq PCR仪(美国BioRad公司)、ZF-90型暗箱式紫外透射仪(上海顾村光电仪器厂)、DYY-6B型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂)、DNA离心干燥箱(上海安亭科学仪器厂)、ultrospec3300pro微量核酸测量仪(Amershan; 冷冻台式高速离心机, Heraeus)、可调微量加样枪(Thermo Labsystems)、-80 °C低温冰箱(Sanyo)、AR2130电子精密天平(Ohaus Corp. Pine Brook, NJ, USA)、YDS-3S液氮生物容器(四川亚西机器厂)、PCR管(广东惠州俊达塑料制品有限公司); Optical Caps (8 Caps/Strip) (Applied Biosystems; Cat # 4323032) (美国BioRad公司)、Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems; Cat # 4311971) (美国BioRad公司)等。

1.3 实验药物 脂易消(枳壳、半夏、荷叶、水飞蓟等)(浙江中医药大学中医门诊部); 易善复胶囊(北京万安特制药有限公司产品, 228 mg/粒, 批号: D1141); 生理盐水(浙江莎普爱思药业有限公司, 批号: 110313-3)。

1.4 主要试剂 M-MLV RTase (Invitrogen)、Taq酶、Oligod(T)₁₈引物、RNase抑制剂、dNTP、100 bp marker、PCR引物等。

1.5 实验方法

1.5.1 造模与分组 将60只清洁级SD雄性大鼠按每组10只随机分成脂易消低、中、高剂量治疗组, 易善复胶囊阳性对照组, 模型对照组和正常对照组6组。正常组喂养普通饲料, 其余各组喂养高脂饲料进行造模, 连续喂养12周后造模成功, 处死动物。

1.5.2 给药方法 实验用药剂量按照章元沛“等效剂量”方法计算^[17], 实验过程中易善复胶囊组灌以相当于成人临床用量6倍的易善复混悬液, 脂易消低、中、高剂量治疗组分别灌以相当于成人临床用量3、6、12倍的脂易消稀释液, 正常组和模型对照组均灌以同等容量的0.9%生理盐水。

1.5.3 标本采集 实验大鼠于连续喂养至第12周末次给药后当晚禁食12 h, 但不禁水, 次日上午用10%水合氯醛溶液(3 ml/kg)腹腔注射麻醉后标本采集: 立即取出肝组织, 称重并记录, 在肝叶中部切取适量肝组织, 于液氮中保存备用; 心脏取血, 分离血清, 保存于-20 °C冰箱备用。

1.5.4 指标检测 ①ELISA法检测Visfatin蛋白表达: 按照试剂盒操作说明进行, 通过绘制标准曲线求出肝组织标本中Visfatin蛋白浓度。②RT-PCR检测Visfatin mRNA表达: 严格按照试剂盒操作进行试剂的配置, 总mRNA的提取, 逆转录反应: 用提取得到的RNA在逆转录酶的作用下合成cDNA, 根据核苷酸序列用primer premier 5.0设计引物进行PCR引物合成, PCR反应, 琼脂糖凝胶电泳, 用暗箱式紫外透射仪检测实验结果并拍照。

1.6 统计学处理 统计分析使用SPSS 18.0统计分析软件。主要观察指标均进行正态性检验和方差齐性检验, 定量数据的统计描述用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)

表1 各组大鼠 Visfatin 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	Visfatin 浓度 (ng/L)
脂易消低剂量组	9	17.31 ± 0.27 ^{△#}
脂易消中剂量组	10	16.85 ± 0.44 ^{△#}
脂易消高剂量组	9	16.97 ± 0.58 ^{△#}
易善复组	10	17.19 ± 0.38 [△]
模型组	10	18.52 ± 1.38 [*]
正常组	10	16.02 ± 0.00

注: 6组总体上 Visfatin 蛋白表达 $F = 19.9$, $P = 0.001$; 低剂量组 vs. 正常组 $*P = 0.001$; 模型组 vs. 正常组 $*P = 0.003$; 低剂量组 vs. 模型组 $^{\Delta}P = 0.001$; 中剂量组 vs. 模型组 $^{\Delta}P = 0.001$; 高剂量组 vs. 模型组 $^{\Delta}P = 0.001$; 易善复组 vs. 模型组 $^{\Delta}P = 0.001$; 低剂量组 vs. 易善复组 $^{\#}P = 0.990$, 中剂量组 vs. 易善复组 $^{\#}P = 0.710$; 高剂量组 vs. 易善复组 $^{\#}P = 0.864$

表2 各组大鼠 Visfatin mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	Visfatin mRNA
脂易消低剂量组	9	0.8877 ± 0.38 ^{△#}
脂易消中剂量组	10	1.4401 ± 0.31 ^{△#}
脂易消高剂量组	9	1.0923 ± 0.14 ^{△#}
易善复组	10	1.5377 ± 0.73 [△]
模型组	10	3.0873 ± 0.56 [*]
正常组	10	0.8663 ± 0.30

注: Visfatin mRNA = Visfatin 灰度值 / 内参灰度值; 6组总体上 Visfatin mRNA 表达水平 $F = 36.1$, $P = 0.001$; 模型组 vs. 正常组 $*P = 0.001$; 低剂量组 vs. 模型组 $^{\Delta}P = 0.001$; 中剂量组 vs. 模型组 $^{\Delta}P = 0.001$; 高剂量组 vs. 模型组 $^{\Delta}P = 0.001$; 易善复组 vs. 模型组 $^{\Delta}P = 0.001$; 低剂量组 vs. 易善复组 $^{\#}P = 0.006$; 中剂量组 vs. 易善复组 $^{\#}P = 0.993$; 高剂量组 vs. 易善复组 $^{\#}P = 0.113$

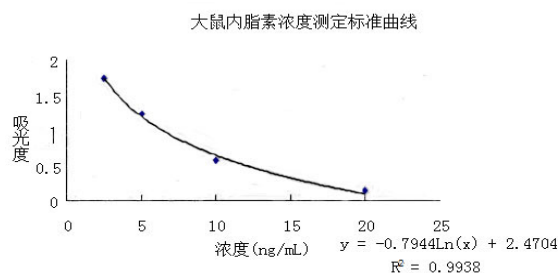


图1 大鼠内脂素浓度测定曲线

表示。本论文采用了方差分析比较6组Visfatin蛋白和Visfatin基因表达水平, 并采用Dunnett方法分别以模型组、正常组和易善复组作为统计学对照, 进行不同组之间蛋白和基因表的多重比较分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织Visfatin蛋白表达水平检测 脂易消低、中、高剂量治疗组, 易善复胶囊阳性对照组, 模型对照组和正常对照组6组总体上Visfatin蛋白表达水平存在着统计学差异 ($F = 19.9$, $P = 0.001$)。多重比较发现, 与正常组相比, 模型组、脂易消低剂量组大鼠肝组织Visfatin蛋白表达存在着统计学差异 ($P = 0.003$); 与模型组相比, 脂易消各剂量组及易善复组大鼠肝组织Visfatin蛋白表达存在着统计学差异 ($P = 0.001$); 与易善复组相比, 脂易消各组大鼠肝组织Visfatin蛋白表达均无显著差异 ($P = 0.990$; $P = 0.710$; $P = 0.864$), 见表1、图1。

2.2 肝组织Visfatin mRNA表达水平检测 RT-PCR检测Visfatin mRNA表达, 结果提示, 脂易消低、中、高剂量治疗组, 易善复胶囊阳性对照组, 模型对照组和正常对照组6组总体上Visfatin mRNA表达水平存在着统计学差异 ($F = 36.1$, $P = 0.001$)。大鼠肝组织Visfatin mRNA表达水平与正常组相比, 模型组存在着统计学差异 ($P = 0.001$); 与模型组相比, 脂易消各剂量组和易善复组大鼠肝组织Visfatin mRNA表达水平均存在着统计学差异 (P 值均为0.001); 与易善复组相比, 脂易消中、高剂量组大鼠肝组织Visfatin mRNA表达水平无明显差异 ($P = 0.993$ 、0.113), 低剂量组与易善复组存在着统计学差异 ($P = 0.006$)。

本实验结果提示Visfatin参与NAFLD的发生和发展, 模型组大鼠肝组织Visfatin mRNA及蛋白表达水平较正常组明显升高。且脂易消可抑制肝组织内Visfatin的合成和分泌(表2、图2)。

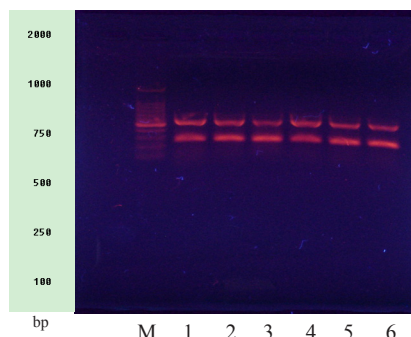


图2 大鼠肝组织 Visfatin mRNA 表达

注: M: Marker; 1脂易消低剂量治疗组; 2脂易消中剂量治疗组; 3脂易消高剂量治疗组; 4正常对照组; 5易善复治疗对照组; 6空白模型对照组

3 讨论

NAFLD是一种与胰岛素抵抗和遗传易感密切相关的以肝细胞脂肪变性为主的临床病理综合征, 发病率正呈低龄化并逐年增高, 但其发病机理至今未能明确, 目前认为脂肪细胞因子在肝脂肪变性进程中起着十分重要的作用, 其中Visfatin与的发生、发展的关系密切^[9-12]。本实验采用高脂NAFLD大鼠模型, 通过中药验方脂易消干预, 探讨Visfatin与NAFLD发病的相关性, 探讨NAFLD的发病机理和中医药治疗NAFLD的作用机理。实验结果显示, 脂易消能调控肝组织Visfatin表达, 显著降低肝组织Visfatin蛋白表达和Visfatin mRNA水平表达, 其疗效与易善复相似, 提示Visfatin参与了NAFLD的发生和发展, 与其发生、发展关系密切; 同时提示脂易消可能通过影响Visfatin的合成和分泌从而改善了NAFLD的生化指标。已经有实验证明Visfatin具有类胰岛素作用并可以降低血糖、参与脂质代谢及炎症反应, 其治疗NAFLD机理可能与脂易消影响和调控肝组织Visfatin表达水平有关, 其深层机理需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪肝病诊疗指南(2010年修订版)[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2010, 19: 483-487.
- [2] 范建高. 脂肪性肝病的流行现状及其自然史[J]. 现代实用医学, 2006, 18: 445-447.
- [3] Lee Y, Naseem RH, Duplomb L, et al. Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 13624-13649.
- [4] 郑全喜, 王昆, 刘超. 非酒精性脂肪肝病动物模型的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19: 357-360.
- [5] 卢书伟, 蔡皓东, 崔振宇. 脂肪肝的药物治疗[J]. 中国新药杂志, 2001, 10: 76-79.
- [6] 王萍, 李强. 非酒精性脂肪性肝病患者血清脂肪细胞因子研究进展

- [J]. 实用肝病杂志,2014,3:329-332.
- [7] 侯鹏高, 吕长淮. 非酒精性脂肪性肝病成因及相关因素研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2014,35:3355-3357.
- [8] 张艳, 郭传勇. 非酒精性脂肪性肝病发病机制及其相关基因研究进展[J]. 实用肝病杂志,2013,4:233-235.
- [9] Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin[J]. Science,2005,307:426-430.
- [10] 曲洪林, 李笑岩, 王东, 等. 非酒精性脂肪性肝病模型大鼠血清内脏脂肪素的变化及意义[J]. 滨州医学院学报,2011,4:244-245.
- [11] Rho YH, Chung CP, Solus JF. Adipocytokines, insulin resistance and coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum,2010,62:1259-1264.
- [12] 曲洪林, 白咸勇, 王东, 等. Visfatin在非酒精性脂肪性肝病发展过程中的表达及意义[J]. 生命科学研究,2012,6:511-515.
- [13] 周岳君. 脂易消治疗非酒精性脂肪肝的临床研究[J]. 医学研究杂志,2008,37:117-120.
- [14] 周岳君. 脂易消治疗非酒精性脂肪肝120例临床观察[J]. 中国中医药科技,2007,14:73-74.
- [15] 周岳君, 姚海清. 脂易消对非酒精性脂肪肝血脂及肝功能变化的影响[J]. 中华医药杂志,2007,7:149-150.
- [16] 周岳君, 姚海清, 俞仰光. 脂易消治疗非酒精性脂肪肝36例疗效观察[J]. 浙江中医学院学报,2005,29:18-19.
- [17] 章元沛. 药理学实验[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社,1996:239.

收稿日期: 2015-01-21

· 消息 ·

《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》征稿启事

《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》为中华医学会主办的感染病学专业学术电子期刊,是一本在载体形式上与纸媒体相互补的多媒体光盘期刊(CD-ROM)。本刊以电子期刊特有的表现形式,运用影视语言和多媒体技术登载有关感染病的专业论著、专家讲坛、临床病理讨论及学术会议等,图文声像并茂,是广大感染病工作者了解当前学科前沿、掌握最新技术的有效工具。本刊内容主要包括各种感染病的病原学、流行病学、免疫学、临床诊断及预防的实践经验和研究成果,以及本领域新技术、新方法的重要进展。本刊常设的主要栏目有述评、专家讲座、基础研究、临床研究、教学园地、经验交流、病例报告、疑难病例分析、综述、临床病例荟萃、设备技术介绍、国内外学术动态等。

本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)收录,且拥有中华人民共和国新闻出版总署等多种网上查询路径;在万方、中国知网、维普、CA等数据库均可查询。

本刊特色栏目:

- (1) 继续教育园地(视频);
- (2) 临床病例荟萃(病例分析、典型图像分析、专家点评)。

本刊的办刊宗旨是:

贯彻党和国家的卫生工作方针政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的办刊方针,反映我国感染病临床和科研工作的重大进展,促进国内外感染病学学术交流。

欢迎登陆本刊采编系统,您只需简单登陆,即可按照详细的提示进行投稿,并可免费下载本刊已刊出所有的PDF版文章。

本刊为双月刊,每期定价28元,全年定价168元。编辑部常年办理邮购,邮发代号:80-729,欢迎通过邮局或者直接电话至本刊编辑部订阅。

通讯地址:北京市朝阳区京顺东街8号

邮编:100015

电话:010-84322058

传真:010-84322059

Email:editordt@126.com

网址: <http://www.j-ditan.com>