

血管生成抑制剂ZM 306416对 高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性 肝病小鼠的保护作用

赵维良¹, 王治霞¹, 喇登海², 姚元滨³ (1.青海省康乐医院 消化内科, 西宁 810000; 2.青海省中西医结合医院 内科, 西宁 810001; 3.青海省人民医院 内科, 西宁 810007)

摘要: **目的** 探讨血管生成抑制剂ZM 306416调节内脏脂肪的功能, 分析其对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病 (non-alcohol fatty liver disease, NAFLD) 小鼠的保护作用及可能机制。 **方法** 将32只C57BL/6J小鼠按照随机数字表法分为3组: 高脂饮食组 (含130 kcal 1%的脂肪饲料, 11只, HFD组)、低脂饮食组 (含45 kcal 1%的脂肪饲料, 11只, LFD组) 和高脂饮食-ZM组 (添加0.8% ZM 306416, 10只, HFD-ZM组), 饲养15周, 定时检测小鼠体质量。处死小鼠后, 检测小鼠血清生物化学指标, 包括丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 水平。采用免疫组织化学分析附睾脂肪组织中血管性假血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 阳性细胞数; 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测各组织中相关基因的表达。 **结果** 与HFD组相比, HFD-ZM组小鼠体质量 [(37.53±3.64) g vs (45.17±3.22) g]、VAT质量 [(2.25±0.85) g vs (3.34±0.54) g]、内脏脂肪细胞大小 [(7854.9±60.4) mm² vs (10800.6±52.7) mm²]、vWF阳性细胞 [(47.32±6.2) 个 vs (31.2±5.4) 个]、血管密度 [(320.47±10.66) % vs (184.26±14.94) %] 及附睾组织中血管生成因子 *VEGF-A* mRNA相对表达量 (0.54±0.16 vs 0.24±0.12) 均显著降低 (P 均< 0.05), 而抗血管生成因子 *TSP-1* 的mRNA相对表达量 (0.32±0.07 vs 0.42±0.14) 显著升高 (P < 0.05); HFD-ZM组小鼠ALT [(122.47±4.11) U/L vs (95.28±2.21) U/L]、AST [(172.17±5.20) U/L vs (124.39±2.54) U/L]、TG [(4.91±1.13) mmol/L vs (3.56±1.07) mmol/L]、FFA [(1640.55±22.51) μEq/L vs (1131.62±18.33) uEq/L] 和TC [(8.10±2.11) mmol/L vs (6.11±2.19) mmol/L] 水平均显著降低, 差异均有统计学意义 (P 均< 0.05), 小鼠肝小叶及门管区可见少量胶原纤维增生, 主要位于小叶中央静脉周围, α -SMA阳性细胞数目显著减少。与HFD组相比, HFD-ZM组脂肪酸氧化基因mRNA相对表达量 (*CPT-1*: 1.64±0.17 vs 0.97±0.24; *MCAD*: 1.23±0.18 vs 0.91±0.16) 显著升高 (P 均< 0.05)、脂肪形成相关基因mRNA相对表达量 (*PPAR γ* : 0.63±0.24 vs 1.03±0.27) 显著降低 (P < 0.05)、胆固醇生成相关基因mRNA相对表达量 (*FXR*: 0.76±0.03 vs 0.65±0.10; *HMGCR*: 1.04±0.14 vs 0.89±0.17) 显著升高 (P 均< 0.05), 炎症相关基因 (*TNF- α* : 0.57±0.13 vs 1.01±0.23; *CD68*: 1.02±0.19 vs 1.62±0.09; *MCP-1*: 0.59±0.11 vs 1.01±0.09; *MARCO*: 0.54±0.13 vs 1.02±0.12; *ICAM-1*: 0.94±0.20 vs 1.56±0.13; *VCAM-1*: 1.12±0.23 vs 1.89±0.16) 和肝纤维化相关基因 (*TGF β* : 0.64±0.16 vs 1.02±0.19; α -SMA: 0.66±0.11 vs 1.03±0.06) mRNA相对表达量显著降低 (P 均< 0.05), 抗氧化基因 (*SOD2*:

0.83 ± 0.12 vs 0.71 ± 0.13) 和凋亡基因 (*Bcl-2*: 0.78 ± 0.12 vs 0.58 ± 0.03) mRNA相对表达量显著升高 (P 均 < 0.05)。结论 血管生成抑制剂ZM 306416可通过调控小鼠内脏脂肪生成、调节肝脏脂肪变性来改善内脏脂肪组织功能和脂质代谢, 抑制由高脂饮食诱导的小鼠NAFLD。

关键词: 脂肪性肝病, 非酒精性; 炎症; 纤维化; 脂肪组织; 血管生成抑制剂

Protective effects of angiogenesis inhibitor ZM 306416 on non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in mice

Zhao Weiliang¹, Wang Zhixia¹, La Denghai², Yao Yuanbin³ (1.Department of Gastroenterology, Qinghai Recreation Hospital, Xining 810000, China; 2.Department of Internal Medicine, Qinghai Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Xining 810001, China; 3.Department of Internal Medicine, Qinghai People's Hospital, Xining 810007, China)

Abstract: Objective To investigate the angiogenesis inhibitor ZM 306316 in regulating visceral fat function and analyze the protective effect on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by high-fat diet in mice and its possible mechanism. **Methods** Total of thirty-two C57BL / 6J mice were randomly divided into high fat diet group (130 kcal 1% fat diet, 11 cases, HFD group), low fat diet group (45 kcal 1% fat diet, 11 cases, LFD group) and high fat diet-ZM group (0.8% ZM 306416 was added, 10 cases, HFD-ZM group), the mice were fed on different diets for 15 weeks. The body weight of the mice were measured regularly. The serum biochemistry index of the mice were detected, including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and free fatty acids (FFA). The number of vascular pseudophlebrand factor (von Willebrand factor, vWF) positive cells in epididymal adipose tissue was analyzed by immunohistochemistry. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) was used to detect the expression of relevant genes in each tissue. **Results** The body mass [(37.53 ± 3.64) g vs (45.17 ± 3.22) g], VAT mass [(2.25 ± 0.85) g vs (3.34 ± 0.54) g], visceral adipocyte size [(7854.9 ± 60.4) mm² vs (10800.6 ± 52.7) mm²], vWF positive cells (47.32 ± 6.2 vs 31.2 ± 5.4), vascular density [(320.47 ± 10.66)% vs (184.26 ± 14.94)%] and angiogenic factor *VEGF-A* mRNA relative expression (0.54 ± 0.16 vs 0.24 ± 0.12) of mice in HFD-ZM group were significantly lower than those in HFD group, and the relative mRNA expression of the anti-angiogenic factor *TSP-1* was significantly higher (0.32 ± 0.07 vs 0.42 ± 0.14), the differences were statistically significant (all P < 0.05). The level of ALT [(122.47 ± 4.11) U/L vs (95.28 ± 2.21) U/L], AST [(172.17 ± 5.20) U/L vs (124.39 ± 2.54) U/L], TG [(4.91 ± 1.13) mmol/L vs (3.56 ± 1.07) mmol/L], FFA [(1640.55 ± 22.51) μEq/L vs (1131.62 ± 18.33) μEq/L] and TC [(8.10 ± 2.11) mmol/L vs (6.11 ± 2.19) mmol/L] of mice in HFD-ZM group were significantly lower than those in HFD group, the differences were statistically significant (all P < 0.05). A small amount of collagen fibroplasia was seen in the liver lobe and portal canal, mainly around the central vein, with a significant decrease in the number of α-SMA positive cells. Compared with those in HFD group, the relative mRNA expression of fatty acid oxidation genes (*CPT-1*: 1.64 ± 0.17 vs 0.97 ± 0.24; *MCAD*: 1.23 ± 0.18 vs 0.91 ± 0.16) of mice in HFD-ZM group increased significantly (all P < 0.05), the relative mRNA expression of adipogenesis gene (*PPARγ*: 0.63 ± 0.24 vs 1.03 ± 0.27) decreased significantly (P < 0.05), the relative mRNA expression of cholesterol generation related genes (*FXR*: 0.76 ± 0.03 vs 0.65 ± 0.10; *HMGCR*: 1.04 ± 0.14 vs 0.89 ± 0.17) increased significantly (all P < 0.05), the relative mRNA expression of inflammation-related genes (*TNF-α*: 0.57 ± 0.13 vs 1.01 ± 0.23; *CD68*: 1.02 ± 0.19 vs 1.62 ± 0.09; *MCP-1*: 0.59 ±

0.11 vs 1.01 ± 0.09 ; *MARCO*: 0.54 ± 0.13 vs 1.02 ± 0.12 ; *ICAM-1*: 0.94 ± 0.20 vs 1.56 ± 0.13 ; *VCAM-1*: 1.12 ± 0.23 vs 1.89 ± 0.16) and liver fibrosis-related genes (*TGF β* : 0.64 ± 0.16 vs 1.02 ± 0.19 ; *α -SMA*: 0.66 ± 0.11 vs 1.03 ± 0.06) decreased significantly (all $P < 0.05$), the relative mRNA expression of antioxidant genes (*SOD2*: 0.83 ± 0.12 vs 0.71 ± 0.13) and apoptotic genes (*Bcl-2*: 0.78 ± 0.12 vs 0.58 ± 0.03) increased significantly (all $P < 0.05$).

Conclusions ZM 306416, an angiogenesis inhibitor, can improve visceral adipose tissue function and lipid metabolism by regulating adipogenesis and liver steatosis, and can inhibit NAFLD induced by high-fat diet in mice.

Key words: Fatty liver disease, non-alcoholic; Inflammation; Fibrosis; Adipose tissue; Angiogenesis inhibitor

血管生成是指已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而形成新的血管,其生成过程受到严格调节。在正常生理条件下,血管生成仅发生在胚胎发育、伤口愈合和月经期间^[1]。近期有研究发现血管生成异常与许多疾病有关,如癌症、类风湿关节炎、银屑病和增生性视网膜病等^[2,3]。正常情况下成年后多数组织停止生长,但脂肪组织可在整个生命周期中增殖退化。脂肪组织的生长和扩张需要形成的新生血管为脂肪细胞提供氧气和营养^[4],因此脂肪组织的生长依赖于促进血管生成的物质,并且能被血管生成抑制剂所抑制。已研究表明抗血管生成的膳食补充剂Ob-X可减少脂肪组织质量,并通过抑制血管生成来抑制肥胖^[5,6]。这提示血管生成抑制剂具有减少脂肪组织生成、抑制肥胖的作用。

非酒精性脂肪性肝病(non-alcohol fatty liver disease, NAFLD)是一种代谢综合征,与代谢疾病(例如肥胖症、胰岛素抵抗、高血压和血脂异常)密切相关,其典型特征是肝脏的病理改变,从简单的脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH),同时伴随纤维化和不可逆性肝硬化^[8]。研究表明,NAFLD与内脏脂肪组织(visceral adipose tissue, VAT)炎症和炎症因子(如炎症性脂肪因子和脂质)升高密切相关;此外,NAFLD与肥胖以及伴随内脏肥胖的过度营养代谢并发症密切相关,而内脏脂肪的数量与NAFLD肝脏炎症和纤维化严重程度直接相关^[9-12]。由前人的研究可知:血管生成抑制剂对NAFLD具有潜在的治疗作用,但有关二者的相关研究目前鲜有报道。血管生成抑制剂ZM 306416是一种血管内皮细胞生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)抑制剂,其IC₅₀为0.33 $\mu\text{mol/L}$,作用机理为通过抑制VEGFR1抑制血管生成。其通过使血管内皮生长因子和VEGFR表达减少,阻断其信号转导通路或耗竭肿瘤细胞产生

的血管内皮生长因子而抑制肿瘤血管的生成,切断肿瘤供血,达到抑制肿瘤生长、发展和转移的目的。基于此,本课题将初步探讨血管生成抑制剂ZM 306416对高脂饮食诱导的NAFLD小鼠模型的保护作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 32只6~8周龄的野生型健康雄性C57BL/6J小鼠购于青海省实验动物中心[合格证号:SCXK(青)2017-0008],体质量23~28 g,饲养于青海省人民医院SPF级实验动物中心,自由饮食与进水,通风良好,温度20~26℃,湿度45%~60%,每日光照12 h。

1.2 主要仪器与试剂 全自动血液化学分析仪(日立公司,日本)、Trizol试剂(Grand Island,美国)、SYBR Green PCR Master Mix(Invitrogen公司,美国)、实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)试剂盒(日本TaKaRa公司)、SICDIA NEFAZYME试剂盒(Shinyang Chemical公司,韩国)。

1.3 动物模型的建立及分组 C57BL/6J小鼠适应性喂养1周后,将其按照随机数字表分为3组:高脂饮食组(含130 kcal 1%的脂肪饲料,New Brunswick公司,美国,11只,HFD组)、低脂饮食组(含45 kcal 1%的脂肪饲料,New Brunswick公司,美国,11只,LFD组)、高脂饮食-ZM组(添加0.8% ZM 306416,New Brunswick公司,美国,10只,HFD-ZM组),饲养于动物实验中心,自由饮水,连续饲养15周,每日称量小鼠体质量。15周后,在LFD及HFD组随机各取1只小鼠,颈椎脱臼处死取肝脏组织观察其病理变化。NAFLD模型建立成功的标准为在光学显微镜下观察可见小鼠肝细胞内大量弥漫的脂肪空泡,电子显微镜证实小鼠肝细胞内存在大量脂滴。

1.4 标本的采集 在研究的最后一日各组小鼠禁食8 h, 眼眶取血后小鼠颈椎脱臼处死。血液于4000 r/min下离心5 min (离心半径10 cm), 分离血清后保存于-80℃冰箱供后续血清分析检测。另取附睾、腹膜和肠系膜白色脂肪组织并收集VAT, 将肝脏和附睾脂肪组织在液氮中快速冷冻, 并储存在-80℃中备用。

1.5 血清生物化学指标的检测 采用全自动血液化学分析仪测量小鼠血清生物化学指标, 包括丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 的水平。采用SICDIA NEFAZYME试剂盒检测血清中游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 水平。

1.6 肝组织病理观察 将收集的各组肝脏组织标本于10%甲醛溶液中固定24 h, 用石蜡包埋。常规肝组织石蜡切片 (5 μm), 依据标准流程进行脱蜡及水化, 所有组织切片分别用苏木精-伊红、甲苯胺蓝和马森染色, 光学显微镜下观察肝脂肪变性情况。采用图像分析系统 (Image Pro-Plus, 英国) 进行染色结果分析。

1.7 免疫组织化学分析 将附睾脂肪组织于10%甲醛溶液中固定24 h, 石蜡包埋。常规石蜡切片 (3 μm), 并在微波炉中照射以恢复表位。切片与兔抗鼠血管性假血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 一抗 (Chemicon, 美国, 1:200) 4℃孵育过夜, PBS洗涤3次, 每次15 min, 随后用山羊抗兔二抗 (Chemicon, 美国) 以及链霉亲和素碱性磷酸酶溶液 (Chemicon, 美国) 常温孵育2 h, 加入新鲜制备的血管着色剂 (Chemicon, 美国), 血管密度用脂肪细胞的数量标准化。

1.8 FQ-PCR检测各组织中相关基因的表达 按照Trizol试剂盒说明书提取肝脏和附睾脂肪组织总RNA, 将其逆转录生成cDNA模板。依据FQ-PCR说明书, 采用AccuPower®GreenStar™qPCR PreMix (Bioneer, 韩国) 进行PCR扩增。表1为用于基因表达分析的PCR引物 (Integrated DNA Technologies, 美国)。反应条件为: 95℃变性5 min; 60℃退火40 s; 72℃延伸10 s, 80个循环。采用标准曲线以每μl拷贝数计算转录浓度, 相对表达水平 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算靶基因cDNA与β-actin cDNA的比率。靶基因包括: 酰基辅酶A氧化酶 (acyl-Coenzyme A oxidase, ACOX)、α-SMA、B淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、半胱氨酸

天冬氨酸蛋白酶3 (cysteine-based aspartate protease 3, Caspase3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶8 (cysteine-based aspartate protease 8, Caspase8)、CD68、胶原蛋白α1 (Collagenα1)、肉毒碱棕榈酰转移酶 (carnitine palmitoyl transterase-1, CPT-1)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS)、成纤维细胞生长因子2 (fibroblast growth factor 2, FGF-2)、法尼醇X受体 (farnesoid receptor, FXR)、抗3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGCR)、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、胶原结构巨噬细胞受体 (recombinant macrophage receptor with collagenous structure, MARCO)、中链乙酰辅酶A脱氢酶 (medium-chain acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, MCAD)、人巨噬细胞趋化蛋白-1 (human macrophage chemoattractant protein-1, MCP-1)、核因子E2相关因子2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf-2)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPARγ)、超氧化物歧化酶2 (superoxide dismutase 2, SOD2)、固醇调节元件结合蛋白1c (sterol-regulatory element-binding protein 1c, SREBP-1c)、转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGFβ)、血小板反应蛋白抑制剂 (inhibitor of thrombospondin, TSP-1)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、血管内皮生长因子A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、极长链酰基辅酶A脱氢酶 (very long-chain acyl coenzyme A, VLCAD)。

1.9 统计学处理 采用SPSS 23.0统计软件进行数据分析。体质量、VAT质量、内脏脂肪细胞大小、相对血管密度、ALT、AST、TG、FFA、TC及相关基因mRNA相对表达量等计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 组内两两比较采用LSD-*t*检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体质量、VAT质量和脂肪细胞大小 实验结束时3组小鼠体质量、VAT质量、内脏脂肪细胞大小差异有统计学意义 ($F = 3.172, P = 0.010$; $F = 5.161, P = 0.021$; $F = 0.837, P = 0.014$)。与LFD组小鼠相比, HFD组小鼠结束时体质量、VAT质量、内脏脂肪细胞大小显著增加 ($t = 0.552$,

$P = 0.017$; $t = 7.442$, $P = 0.001$; $t = 8.411$, $P = 0.023$); 与HFD组小鼠相比, HFD-ZM小鼠结束时体质量、VAT质量、内脏脂肪细胞大小显著降低 ($t = 1.019$, $P = 0.014$; $t = 1.537$, $P = 0.017$; $t = 0.804$, $P = 0.021$), 见表2。

2.2 ZM 306416对小鼠VAT血管化的影响 与LFD组小鼠相比, HFD组小鼠vWF阳性细胞和血管密度显著增加 ($t = 1.561$, $P < 0.001$; $t = 1.047$, $P < 0.001$); 与HFD组小鼠相比, HFD-ZM组小

鼠vWF阳性细胞和血管密度显著降低 ($t = 2.776$, $P < 0.001$; $t = 1.432$, $P < 0.001$)。由PCR检测结果可知: 与LFD组相比, HFD组小鼠附睾组织中*VEGF-A*和*FGF-2* mRNA相对表达显著升高, 抗血管生成因子*TSP-1* mRNA相对表达量显著降低 ($t = 0.417$, $P < 0.001$; $t = 0.861$, $P < 0.001$; $t = 1.051$, $P = 0.030$); 与HFD组相比, HFD-ZM组小鼠附睾组织中*VEGF-A* mRNA相对表达量显著降低, *TSP-1* mRNA相对表达量显著升高 ($t = 1.541$,

表1 FQ-PCR 的引物序列

基因	GenBank登录号	正向引物序列	反向引物序列
<i>ACOX</i>	NM_001271898	5'-GCACCATGCCATTCGATACA-3'	5'-CCACTGCTGTGAGAATAGCCGT-3'
α - <i>SMA</i>	NM_007392	5'-CTGGAGAAGAGCTACGAAGTGC-3'	5'-CTGATCCACATCTGCTGGAAGG-3'
<i>Bcl-2</i>	NM_009741.5	5'-TCGCTACCGTCGTGACTTC-3'	5'-AAACAGAGGTCGCATGCTG-3'
<i>Caspase3</i>	NM_009810.3	5'-ACGCAGCCAACCTCAGAGA-3'	5'-ATGAACCACGACCCGCTCT-3'
<i>Caspase8</i>	NM_001277926.1	5'-TGCTTGACTACATCCACAC-3'	5'-CCAACTCGTCACTTCTCTTG-3'
<i>CD68</i>	NM_009853	5'-AACAGGACCTACATCAGAGC-3'	5'-CTGTAGCCTTAGAGAGAGCA-3'
<i>Collagen1</i>	NM_007742	5'-GCCCCAACCCCAAGGAAAAGAAGC-3'	5'-CTGGGAGGCCTCGGTGGACATTAG-3'
<i>CPT-1</i>	NM_L07736	5'-TGTGTGAGGATGCTGCTTCC-3'	5'-CTCGGAGAGCTAAGCTTGTC-3'
<i>EAS</i>	NM_007988	5'-CTTGGGTGCTGACTACAACC-3'	5'-GCCCTCCCGTACACTCACTC-3'
<i>FGF-2</i>	NM_076905.1	5'-AGATTGGTTTGCTAAGA-3'	5'-GCAAAGTGGAATAATGA-3'
<i>FXR</i>	NM_001163504	5'-TGGATTGCTACAACAAACAGAGA-3'	5'-GTCTGAAACCTGGAAGCTTTTT-3'
<i>HMGCR</i>	NM_008255.2	5'-CGAGGAAAGACTGTGTTTG-3'	5'-CACGTTCTTGAAGATCTTG-3'
<i>ICAM-1</i>	NM_010493	5'-AGCTAGCGGACCAGATCC-3'	5'-ATACAGCACGTGCAGTTCC-3'
<i>MARCO</i>	NM_010766	5'-GAAACAAAGGGGACATGGG-3'	5'-TTCACACCTGCAATCCCTG-3'
<i>MCAD</i>	NM_007382	5'-GACATTTGGAAGCTGCTAGTG-3'	5'-TCACGAGCTATGATCAGCCTCTG-3'
<i>MCP-1</i>	NM_011331	5'-TGATCCCAATGAGTAGGCTGGAG-3'	5'-ATGTCTGGACCCATTCC0TTCTTG-3'
<i>Nrf-2</i>	NM_010902.4	5'-TTGGCAGAGACATTCCCAT-3'	5'-GCTGCCACCGTCACTGGG-3'
<i>PPARγ</i>	NM_013124	5'-ATTCTGGCCACCAACTTCGG-3'	5'-TGGAAGCCTGATGCTTTATCCCCA-3'
<i>SOD2</i>	NM_013671.3	5'-ATTAACGCGCAGATCATGCA-3'	5'-TGTCCTCCACCATTTGAACCTT-3'
<i>SREBP-1c</i>	NM_BC056922	5'-CTTCTGGAGACATCGAAAC-3'	5'-GGTAGACAACAGCCGCATC-3'
<i>TGFβ</i>	NM_011577	5'-ACCGCAACAACGCCATCTAT-3'	5'-GTAACGCCAGGAATTGTTGC-3'
<i>TNF-α</i>	NM_001278601	5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3'	5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTGC-3'
<i>TSP-1</i>	NM_031148746	5'-GTTTGTTAAGAAACAATATCC-3'	5'-GCCCTTTGATATGTGAGGGTACT-3'
<i>VCAM-1</i>	NM_011693	5'-GGAAATGCCACCCTCACCTTA-3'	5'-GATTTGGCCCCCTCATTCCTT-3'
<i>VEGF-A</i>	NM_768148.1	5'-GTGGACATCTTCCAGGCACC-3'	5'-GCAGATGTGACAAGCCAAGG-3'
<i>VLCAD</i>	NM_AF017176	5'-CGTCAGAGGTGTACTTTGATGG-3'	5'-CATGGACTCAGTCACATACTGC-3'

注: *ACOX* 为酰基辅酶 A 氧化酶 (acyl-Coenzyme A oxidase), α -*SMA* 为 α -平滑肌激动蛋白 (α -Smooth muscle actin), *Bcl-2* 为 B 淋巴细胞瘤 -2 (B-cell lymphoma-2), *Caspase3* 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteine-based aspartate protease 3), *Caspase8* 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 (cysteine-based aspartate protease 8), *Collagen1* 为胶原蛋白 $\alpha 1$, *CPT-1* 为肉毒碱棕榈酰转移酶 (carnitine palmitoyl transferase-1), *EAS* 为脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase), *FGF-2* 为成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2), *FXR* 为法尼醇 X 受体 (farnesoid receptor), *HMGCR* 为抗 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase), *ICAM-1* 为细胞间黏附分子 -1 (intercellular cell adhesion molecule-1), *MARCO* 为胶原结构巨噬细胞受体 (recombinant macrophage receptor with collagenous structure), *MCAD* 为中链乙酰辅酶 A 脱氢酶 (medium-chain acetyl-Coenzyme A dehydrogenase), *MCP-1* 为人巨噬细胞趋化蛋白 -1 (human macrophage chemoattractant protein-1), *Nrf-2* 为核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), *PPAR γ* 为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), *SOD2* 为超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2), *SREBP-1c* 为固醇调节元件结合蛋白 1c (sterol-regulatory element-binding protein 1c), *TGF β* 为转化生长因子 - β (transforming growth factor- β), *TSP-1* 为血小板反应蛋白抑制剂 (inhibitor of thrombospondin), *TNF- α* 为肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor- α), *VCAM-1* 为血管细胞黏附分子 -1 (vascular cell adhesion molecule-1), *VEGF4* 为血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A), *VLCAD* 为极长链酰基辅酶 A 脱氢酶 (very long-chain acyl coenzyme A)。

$P = 0.043$; $t = 1.506$, $P = 0.012$)。见表3、图1。

2.3 各组小鼠血清ALT、AST和脂质水平 与LFD组小鼠相比, HFD组小鼠血清ALT、AST、TG、FFA和TC水平均显著升高 ($t = 0.307$, $P < 0.001$; $t = 0.121$, $P < 0.001$; $t = 1.520$, $P < 0.001$; $t = 2.154$, $P < 0.001$; $t = 2.009$, $P < 0.001$) ; 与HFD组小鼠相比, HFD-ZM组小鼠ALT、AST、TG、FFA和TC水平均显著降低 ($t = 0.155$, $P < 0.001$; $t = 1.761$, $P < 0.001$; $t = 0.170$, $P < 0.001$; $t = 1.844$, $P < 0.001$; $t = 2.499$, $P < 0.001$) , 见表4。

2.4 肝组织病理学改变情况 HE染色提示与LFD组小鼠相比, HFD组小鼠肝组织出现微泡和大泡, 脂肪明显变性, 肝细胞体积增大, 细胞内充满大小

不等脂滴空泡; 与HFD组小鼠相比, HFD-ZM组小鼠肝组织内脂肪变性明显改善, 肝细胞体积缩小, 细胞内少见脂滴空泡。肝脏脂肪组织炎症染色结果表明, 与LFD组小鼠相比, HFD组小鼠肝组织中存在大量巨噬细胞浸润, 可见炎症浸润带, CD68阳性细胞数目显著增加, 与HFD组小鼠相比, HFD-ZM组小鼠肝组织中巨噬细胞浸润明显减轻, 仅局部存在炎症浸润, CD68阳性细胞数目显著减少。肝脂肪纤维化染色结果表明LFD组小鼠肝组织中可见少量胶原纤维, 肝细胞间、中央静脉周围均未见明显纤维组织增生, 未见肝窦周间隙 α -SMA阳性细胞; HFD组小鼠肝小叶及门管区存在大量胶原纤维增生, 以中央静脉周围、肝细胞间及肝窦间隙处尤

表2 各组小鼠体质量、VAT 质量和内脏脂肪细胞大小 ($\bar{x} \pm s$)

组别	体质量 (g)		VAT质量 (g)	内脏脂肪细胞大小 (mm ²)
	起始时	结束时		
LFD组	18.32 \pm 2.62	31.02 \pm 2.53	0.82 \pm 0.46	5102.4 \pm 13.9
HFD组	18.17 \pm 1.98	45.17 \pm 3.22*	3.34 \pm 0.54*	10800.6 \pm 52.7*
HFA-ZM组	18.24 \pm 2.42	37.53 \pm 3.64*#	2.25 \pm 0.85*#	7854.9 \pm 60.4*#
F值	12.007	3.172	5.161	0.837
P值	0.521	0.010	0.021	0.014
LFD组 vs HFD组 (t值、P值)	-	0.552、0.017	7.211、0.001	8.411、0.023
LFD组 vs HFA-ZM组 (t值、P值)	-	5.171、0.020	1.121、0.003	0.651、0.009
HFD组 vs HFA-ZM组 (t值、P值)	-	1.019、0.014	1.537、0.017	0.804、0.021

注: * 与 LFD 组比较, $P < 0.05$; # 与 HFD 组比较, $P < 0.05$; “-” 为未进行相关分析。

表3 各组小鼠 VAT 血管化分析数据 ($\bar{x} \pm s$)

组别	mRNA相对表达量			相对血管密度 (%)	vWF阳性细胞数 (个)
	VEGF-A	FGF-2	TSP-1		
LFD组	0.18 \pm 0.09	0.40 \pm 0.12	0.40 \pm 0.11	101.27 \pm 7.57	17.5 \pm 4.6
HFD组	0.54 \pm 0.16*	0.72 \pm 0.24*	0.32 \pm 0.07*	320.47 \pm 10.66*	47.3 \pm 6.2*
HFA-ZM组	0.26 \pm 0.12*#	0.69 \pm 0.14*	0.42 \pm 0.14*#	184.26 \pm 14.94*#	31.2 \pm 5.4*#
F值	2.446	1.551	1.680	1.314	2.907
P值	< 0.001	< 0.001	0.029	< 0.001	< 0.001
LFD组 vs HFD组 (t值、P值)	0.417、< 0.001	0.861、< 0.001	1.051、0.030	1.561、< 0.001	1.047、< 0.001
LFD组 vs HFA-ZM组 (t值、P值)	1.688、0.040	5.139、0.029	1.211、0.318	1.714、< 0.001	1.372、< 0.001
HFD组 vs HFA-ZM组 (t值、P值)	1.541、0.043	0.654、0.112	1.506、0.012	2.776、< 0.001	1.432、< 0.001

注: * 与 LFD 组比较, $P < 0.05$; # 与 HFD 组比较, $P < 0.05$ 。

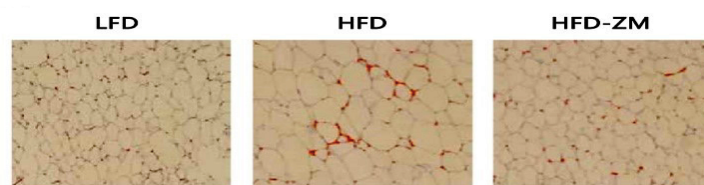


图1 各组小鼠内脏脂肪组织 (VAT) 中 vWF 阳性细胞 (免疫组织化学染色, $\times 100$)

为显著，肝窦周间隙 α -SMA阳性细胞不断增加；与HFD小鼠相比，HFD-ZM组小鼠肝小叶及门管区可见少量胶原纤维增生，主要位于小叶中央静脉周围， α -SMA阳性细胞数目明显减少。见图2。

2.5 肝组织中NAFLD相关基因表达

2.5.1 脂肪酸氧化基因和脂肪形成相关基因 与LFD组小鼠相比，HFD组小鼠脂肪酸氧化相关基因*CPT-1*、*MCAD*的mRNA相对表达量均显著降低（ $t = 0.174$ ， $P < 0.001$ ； $t = 0.617$ ， $P < 0.001$ ）；与HFD组小鼠相比，HFD-ZM组小鼠脂肪酸氧化相关基因*CPT-1*、*MCAD*的mRNA相对表达量均显著升高（ $t = 1.983$ ， $P < 0.001$ ； $t = 2.424$ ， $P <$

0.001），见表5。与LFD组小鼠相比，HFD组小鼠脂肪形成相关基因*PPAR γ* 的mRNA相对表达量显著升高（ $t = 1.524$ ， $P < 0.001$ ）；与HFD组小鼠相比，HFD-ZM组小鼠脂肪形成相关基因的*PPAR γ* 的mRNA相对表达量显著降低（ $t = 1.539$ ， $P < 0.001$ ），见表6。

2.5.2 胆固醇生成相关基因 与LFD组小鼠相比，HFD组小鼠中胆固醇生成相关基因*FXR*和*HMGCR* mRNA相对表达量显著降低（ $t = 0.811$ ， $P < 0.001$ ； $t = 0.499$ ， $P < 0.001$ ）；与HFD小鼠相比，HFD-ZM组小鼠*HMGCR* mRNA相对表达量显著增加（ $t = 1.004$ ， $P < 0.001$ ），见表7。

表 4 各组小鼠血清 ALT、AST 和脂质水平（ $\bar{x} \pm s$ ）

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	TG (mmol/L)	FFA (μ Eq/L)	TC (mmol/L)
LFD组	61.31 \pm 3.27	89.36 \pm 1.52	2.65 \pm 0.78	1350.37 \pm 28.66	2.72 \pm 1.01
HFD组	122.47 \pm 4.11 [*]	172.17 \pm 5.20 [*]	4.91 \pm 1.13 [*]	1640.55 \pm 22.51 [*]	8.10 \pm 2.11 [*]
HFA-ZM组	95.28 \pm 2.21 ^{*#}	124.39 \pm 2.54 ^{*#}	3.56 \pm 1.07 ^{*#}	1131.62 \pm 18.33 ^{*#}	6.11 \pm 2.19 ^{*#}
F值	1.107	1.506	1.212	0.834	1.009
P值	0.006	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
LFD组 vs HFD组 (t值、P值)	0.307、< 0.001	0.121、< 0.001	1.520、< 0.001	2.154、< 0.001	2.009、< 0.001
LFD组 vs HFA-ZM组 (t值、P值)	1.655、< 0.001	2.986、< 0.001	2.377、< 0.001	1.421、< 0.001	1.092、< 0.001
HFD组 vs HFA-ZM组 (t值、P值)	0.155、< 0.001	1.761、< 0.001	0.170、< 0.001	1.844、< 0.001	2.499、< 0.001

注：^{*} 与 LFD 组比较， $P < 0.05$ ；[#] 与 HFD 组比较， $P < 0.05$ 。

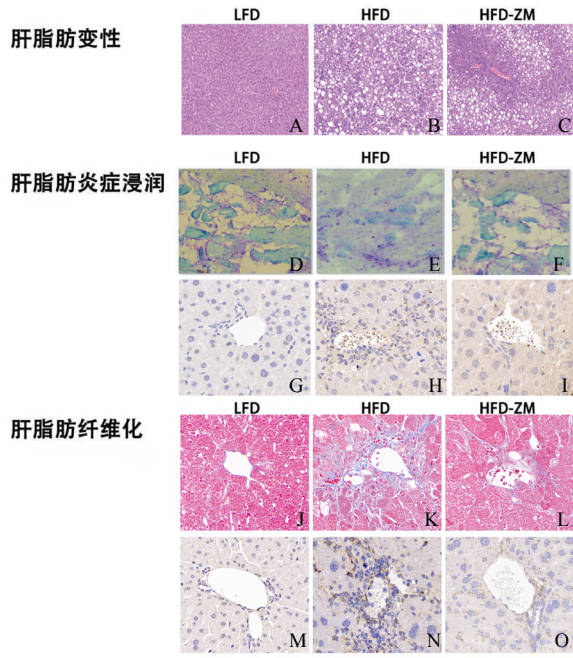


图 2 LFD 组、HFD 组和 HFD-ZM 组小鼠肝组织病理图

注：A~C为肝组织 HE 染色（ $\times 100$ ），HFD 组小鼠肝组织中出現微泡和大泡，细胞体积增大，细胞内充满大小不等脂滴空泡；D~F为肝组织甲苯胺蓝染色切片（ $\times 400$ ），HFD 组小鼠肝组织中存在大量的巨噬细胞的浸润，可见炎症浸润带；G~I为肝脏 CD68 阳性巨噬细胞的免疫组织化学检测（ $\times 400$ ），HFD 组 CD68 阳性细胞数目显著增加；J~L为肝组织 Masson 三色染色切片（ $\times 100$ ），HFD 组小鼠肝小叶及门管区存在大量胶原纤维增生；M~O为采用抗 α -SMA 抗体染色的肝切片（ $\times 200$ ），HFD 组肝窦周间隙 α -SMA 阳性细胞增加。

2.5.3 炎症相关基因和肝纤维化相关基因 与HFD组小鼠相比，HFD-ZM组小鼠肝脏中炎症基因（*TNF-α*、*CD68*、*MCP-1*、*MARCO*、*ICAM-1*和*VCAM-1*）mRNA相对表达量和肝纤维化相关基因*TGFβ* mRNA相对表达量均显著降低（*P*均＜0.05），见表8、表9。

2.5.4 抗氧化基因与凋亡基因 与LFD组小鼠相比，HFD组小鼠*Bcl-2* mRNA相对表达量显著降低（*t* = 0.402, *P* < 0.001）；与HFD组小鼠相比，HFD-ZM组小鼠*SOD2*和*Bcl-2* mRNA相对表达量显著升高（*t* = 1.212, *P* = 0.010; *t* = 1.432, *P* < 0.001），见表10、表11。

表5 各组小鼠脂肪酸氧化相关基因 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>ACOX</i>	<i>CPT-1</i>	<i>MCAD</i>	<i>VLCAD</i>
LFD组	1.34 ± 0.16	2.08 ± 0.18	1.31 ± 0.11	1.52 ± 0.21
HFD组	1.01 ± 0.29*	0.97 ± 0.24*	0.91 ± 0.16*	0.94 ± 0.27*
HFA-ZM组	1.38 ± 0.20 [#]	1.64 ± 0.17 [#]	1.23 ± 0.18 [#]	1.37 ± 0.17 [#]
<i>F</i> 值	1.214	1.097	1.592	1.143
<i>P</i> 值	0.187	< 0.001	< 0.001	0.259
LFD组 vs HFD组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	-	0.174、< 0.001	0.617、< 0.001	-
LFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	-	1.362、< 0.001	1.550、< 0.001	-
HFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	-	1.983、< 0.001	2.422、< 0.001	-

注：* 与 LFD 组比较，*P* < 0.05；[#] 与 HFD 组比较，*P* < 0.05；“-” 为未进行相关分析。

表6 各组小鼠脂肪形成相关基因 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>FAS</i>	<i>PPARγ</i>	<i>SREBP-1c</i>
LFD组	0.74 ± 0.10	0.61 ± 0.07	0.71 ± 0.11
HFD组	1.02 ± 0.13*	1.03 ± 0.27*	0.97 ± 0.09*
HFA-ZM组	0.79 ± 0.17 [#]	0.63 ± 0.24 [#]	0.76 ± 0.17 [#]
<i>F</i> 值	2.030	1.544	1.614
<i>P</i> 值	0.501	0.014	0.201
LFD组 vs HFD组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	-	1.524、< 0.001	-
LFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	-	1.781、0.723	-
HFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	-	1.539、< 0.001	-

注：* 与 LFD 组比较，*P* < 0.05；[#] 与 HFD 组比较，*P* < 0.05；“-” 为未进行相关分析。

表7 各组小鼠胆固醇生成相关基因 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>FXR</i>	<i>HMGCR</i>
LFD组	0.92 ± 0.12	1.03 ± 0.11
HFD组	0.65 ± 0.10*	0.89 ± 0.17*
HFA-ZM组	0.76 ± 0.03 [#]	1.04 ± 0.14 [#]
<i>F</i> 值	0.461	1.001
<i>P</i> 值	0.046	0.018
LFD组 vs HFD组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	0.811、< 0.001	0.499、< 0.001
LFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	1.002、0.411	0.678、0.117
HFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	0.274、0.106	1.004、< 0.001

注：* 与 LFD 组比较，*P* < 0.05；[#] 与 HFD 组比较，*P* < 0.05。

表 8 各组小鼠肝脏炎症相关基因 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>TNF-α</i>	<i>CD68</i>	<i>MCP-1</i>	<i>MARCO</i>	<i>ICAM-1</i>	<i>VCAM-1</i>
LFD组	0.61 ± 0.11	0.64 ± 0.12	0.58 ± 0.08	0.51 ± 0.13	0.83 ± 0.22	0.91 ± 0.17
HFD组	1.01 ± 0.23 [*]	1.62 ± 0.09 [*]	1.01 ± 0.09 [*]	1.02 ± 0.12 [*]	1.56 ± 0.13	1.89 ± 0.16
HFA-ZM组	0.57 ± 0.13 [#]	1.02 ± 0.19 [#]	0.59 ± 0.11 [#]	0.54 ± 0.13 [#]	0.94 ± 0.20	1.12 ± 0.23
<i>F</i> 值	0.733	1.230	1.499	1.606	1.580	1.239
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
LFD组 vs HFD组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	1.022、< 0.001	0.700、< 0.001	0.269、< 0.001	0.560、< 0.001	0.511、< 0.001	0.487、< 0.001
LFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	0.563、0.244	0.309、< 0.001	1.099、0.538	1.053、0.106	1.611、0.154	1.722、0.187
HFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	0.454、< 0.001	1.026、< 0.001	0.679、< 0.001	1.355、< 0.001	1.841、< 0.001	1.021、< 0.001

注：^{*}与 LFD 组比较， $P < 0.05$ ；[#]与 HFD 组比较， $P < 0.05$ 。

表 9 各组小鼠肝纤维化相关基因 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>TGFβ</i>	<i>α-SMA</i>	<i>Collagen α1</i>
LFD组	0.57 ± 0.14	0.53 ± 0.13	0.62 ± 0.16
HFD组	1.02 ± 0.19 [*]	1.03 ± 0.06 [*]	1.04 ± 0.14
HFA-ZM组	0.64 ± 0.16 [#]	0.66 ± 0.11 [#]	0.74 ± 0.19
<i>F</i> 值	2.144	1.896	1.114
<i>P</i> 值	0.017	0.032	0.664
LFD组 vs HFD组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	1.041、< 0.001	0.909、< 0.001	-
LFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	1.953、0.065	2.837、0.118	-
HFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	1.873、< 0.001	1.901、< 0.001	-

注：^{*}与 LFD 组比较， $P < 0.05$ ；[#]与 HFD 组比较， $P < 0.05$ ；“-”为未进行相关分析。

表 10 各组小鼠抗氧化基因 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>Nrf2</i>	<i>SOD2</i>
LFD组	1.26 ± 0.13	0.79 ± 0.14
HFD组	1.18 ± 0.07 [*]	0.71 ± 0.13
HFA-ZM组	1.23 ± 0.16	0.83 ± 0.12 [#]
<i>F</i> 值	1.457	1.113
<i>P</i> 值	0.809	0.021
LFD组 vs HFD组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	-	0.092、0.194
LFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	-	1.001、0.294
HFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	-	1.212、0.010

注：^{*}与 LFD 组比较， $P < 0.05$ ；[#]与 HFD 组比较， $P < 0.05$ 。

表 11 各组小鼠凋亡基因 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>Bcl-2</i>	<i>Caspase3</i>	<i>Caspase8</i>
LFD组	0.72 ± 0.13	0.62 ± 0.09	0.89 ± 0.14
HFD组	0.58 ± 0.03 [*]	0.61 ± 0.14	0.82 ± 0.16
HFA-ZM组	0.78 ± 0.12 [#]	0.63 ± 0.08	0.83 ± 0.07
<i>F</i> 值	1.511	1.654	0.843
<i>P</i> 值	< 0.001	0.404	0.329
LFD组 vs HFD组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	0.402、< 0.001	-	-
LFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	0.720、0.146	-	-
HFD组 vs HFA-ZM组 (<i>t</i> 值、 <i>P</i> 值)	1.432、< 0.001	-	-

注：^{*}与 LFD 组比较， $P < 0.05$ ；[#]与 HFD 组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

新形成的脂肪组织取决于持续的血管生成,新生血管为其提供氧气和营养,支撑其进一步生长。血管生成抑制剂如血管生成抑制素、内皮抑素和夫马菌素醇等可抑制小鼠脂肪的生成,进而降低脂肪组织质量和体质量^[13,14]。内脏/腹腔内脂肪增加是其他部位(如肝脏和心脏)异位脂肪增加的标志,内脏脂肪积聚与肥胖合并症和肝病风险增加密切相关。HFD喂养小鼠后12~24周,附睾白色脂肪组织开始出现炎症且不再进一步扩张,与肝脂肪变性相吻合,并先于NASH发生^[15]。

脂肪酸合成增加和脂肪酸氧化减少是造成肝细胞胞质堆积(即脂肪变性)的主要原因。PPAR α 通过脂肪酸摄取、 β -氧化以及线粒体和过氧化物酶体转运相关靶基因的激活诱导TG积累,进而调控肝脏脂肪酸氧化功能,同时PPAR α 诱导的脂肪酸分解代谢可抑制肝脂肪沉积^[16-18]。肝纤维化是细胞外基质蛋白(包括胶原蛋白)的广泛积累,在大多数类型的慢性肝病中广泛发生^[19,20]。 α -SMA是引起进行性纤维化的肝星状细胞的标志物,通过促进纤维化基因(如TGF- β , 胶原 α 1和 α -SMA)mRNA的表达诱导细胞外基质产生和沉积,促进肝纤维化过程^[21,22]。HFD喂养可引起小鼠肝脏肝胶原蛋白的积累和 α -SMA的表达,导致血管周围明显纤维化^[23,24]。

冠状结构是巨噬细胞在单个脂肪细胞周围“冠状”结构中的排列,正常脂肪组织通常有5%~10%的巨噬细胞,而肥胖者脂肪组织巨噬细胞最多可达到50%,脂肪细胞肥大(白色脂肪组织功能障碍)与冠状结构形成密切相关,决定白色脂肪组织巨噬细胞浸润,促进肝脂肪变性发展为NASH^[25-27]。研究表明在NASH肥胖人群中,脂肪组织中巨噬细胞渗透通过诱发炎症基因表达TNF- α 、CD68、MCP-1、MARCO、ICAM-1和VCAM-1引起肝脏炎症,促进脂肪变性以及肝纤维化的发展,明显增加肝损伤,导致肝损伤的循环标志物ALT和AST水平增高^[28]。

本研究结果表明,血管生成抑制剂ZM 306416可调控炎症基因表达从而抑制肝脏炎症的发展,减少正调节抗氧化应激转录因子表达激发的肝脏氧化应激,上调SOD2和Bcl-2 mRNA水平,减少线粒体活性氧水平,并发挥抗氧化反应和抗凋亡作用,同时通过抑制脂肪酸氧化酶和脂肪生成酶FAS及其调节剂SREBP-1c的表达增加脂肪酸氧化,减少脂肪生成,调节肝脏脂肪变性进而改善VAT功能和脂质代谢,抑制由高脂饮食诱导的NAFLD,而在使用血管生成抑制剂ZM 306416时最大潜在危险是动脉血栓事件。

参考文献

- VILLALAIN C. Angiogenesis biomarkers and fetal growth restriction[J]. BJOG,2022,129(11):1878.
- 区俏影, 陆家昌, 麦惠玲. 瑞舒伐他汀钙片对非酒精性脂肪肝患者血脂指标及动脉弹性的影响[J]. 现代诊断与治疗,2019,30(19):3384-3386.
- JUN D W, HAN J H, KIM S H. Association between low thigh fat and non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol,2018,23(5):888-893.
- 刘祥兰, 徐颖, 张钰泉, 等. 猪苓多糖降血脂抗大鼠酒精性脂肪肝的药理实验研究[J]. 中成药,2013,35(8):1760-1764.
- 沙丽艳, 朴熙绪, 姜春萌, 等. 甘正复方对非酒精性脂肪肝大鼠PPAR γ 和CYP2E1表达的影响[J]. 大连医科大学学报,2010,32(2):137-141.
- 刘冬敏, 黄建安, 刘仲华. 肠道微生物与茶及茶多酚的相互作用在调节肥胖及并发症中的作用[J]. 天然产物研究与开发,2018,30(9):1640-1648.
- SCHUPPAN D, SCHATTENBERG J M. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches[J]. J Gastroenterol Hepatol,2013,28(Suppl 1):68-76.
- WATANABE S, HASHIMOTO E, IKEJIMA K, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis[J]. J Gastroenterol,2015,50(4):364-377.
- 郝志民, 赵云昇, 朱维平, 等. 新加越鞠丸对非酒精性脂肪肝大鼠脂联素及瘦素影响的实验研究[J]. 中西医结合杂志,2013,8(3):237-239,321.
- HAKUTU R, NAKAI Y, HAMADA T, et al. Regular statin use and incidence of postendoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis[J]. J Clin Gastroenterol,2020,54(10):905-910.
- 段绍杰, 刘尊敬, 陈佳良, 等. 脂质蓄积指数、内脏脂肪指数对非酒精性脂肪性肝病的预测价值[J]. 临床肝胆病杂志,2022,38(1):129-134.
- AGARWAL R, WISNU W. The effect of statin therapy on mortality in adult patients with liver cirrhosis: an evidence-based case report[J]. Acta Med Indones,2022,54(3):491-499.
- 杨伟, 李耘, 冯明. 老年型糖尿病伴原发性非酒精性脂肪肝患者胰岛素抵抗与血清抵抗素关系[J]. 疑难病杂志,2013,12(4):308-309.
- SHIMIZU S, KAWAHARA R, SIMIZU S. Methionine aminopeptidase-2 is a pivotal regulator of vasculogenic mimicry[J]. Oncol Rep,2022,47(2):1-9.
- 郭达, 杨陈, 陈天武, 等. 脂肪肝的MRI研究进展[J]. 西部医学,2017,29(4):574-577,581.
- 冯文焕, 袁雪雯, 董国玉, 等. 艾塞那肽对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏NF- κ B、TNF- α 、TGF- β 1表达的影响[J]. 中国糖尿病杂志,2014,20(10):771-774.
- WANG Y, SONG X, WANG Y, et al. Specific interaction of insulin receptor and GLP-1 receptor mediates crosstalk between their signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun,2022,636(Pt 2):31-39.
- NAR H, SCHNAPP G, HUCKE O, et al. Action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on sars-cov-2 main protease[J]. Chem Med Chem,2021,16(9):1425-1426.
- 李丽文. 体检人群中2型糖尿病患者非酒精性脂肪肝的患病率和危险因素分析[J]. 医学食疗与健康,2022,20(3):117-120.
- 黄丽玲, 吴春城, 梁惠卿, 等. 血清标志物壳多糖酶3样蛋白1评价肝纤维化的研究[J]. 医学信息,2021,34(10):32-35.
- ZHENG R, VARNEY S D, WU L, et al. Integrin α 4 β 1 is required for

- IL-1 α - and Nrf2-dependent, Cox-2 induction in fibroblasts, supporting a mechanism that suppresses α -SMA expression[J]. *Wound Repair Regen*,2021,29(4):597-601.
- [22] 胡钺, 梅舒雅, 徐侨翌, 等. 乳酸-转化生长因子- β 1途径促进肺成纤维细胞活化介导机械通气相关性肺纤维化的机制研究[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*,2021,42(3):227-233.
- [23] TAN P, LIANG H, NIE J, et al. Establishment of an alcoholic fatty liver disease model in mice[J]. *Am J Drug Alcohol Abuse*,2017,43(1):61-68.
- [24] YU S J, KIM W, KIM D, et al. Visceral obesity predicts significant fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Medicine*,2015,94(48):e2159.
- [25] 王琦, 谢雯. 非酒精性脂肪性肝病临床研究的热点及难点[J]. *中国临床医生杂志*,2020,48(1):1-3.
- [26] 万美喧, 黄显俊, 徐立. 酒精性肝病的发病机制和新靶点治疗进展[J]. *世界最新医学信息文摘*,2021,21(41):108-109.
- [27] PARK B, LEE H, WOO S, et al. Reduction of adipose tissue mass by the angiogenesis inhibitor ZM 306416 from *melissae officinalis*[EB/OL]. (2015-11-23)[2021-08-20]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0141612>.
- [28] 魏苏宁, 苏雪莹, 徐国恒. 肝细胞甘油三酯代谢途径异常与脂肪肝[J]. *中国生物化学与分子生物学报*,2016,32(2):123-132.

收稿日期: 2021-08-20

赵维良, 王治霞, 喇登海, 等. 血管生成抑制剂ZM 306416对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病小鼠的保护作用[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2023,15(2): 36-46.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿参考文献格式的要求

本刊执行 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》。采用顺序编码制著录, 依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出, 并将序号置于方括号中, 排列于文后。内部刊物、未发表资料(不包括已被接受的待发表资料)、个人通信等请勿作为文献引用, 确需引用时, 可将其在正文相应处注明。日文汉字请按日文规定书写, 勿与我国汉字及简化字混淆。同一文献作者不超过3人全部著录; 超过3人可以只著录前3人, 后依文种加表示“等”的文字。作者姓名一律姓氏在前、名字在后, 外国人的名字采用首字母缩写形式, 缩写名后不加缩写点; 不同作者姓名之间用“,”隔开, 不用“和”、“and”等连词。请于文献题名后增加标注文献类型标志项目, 示例如下:

[1] 陈登原. 国史旧闻 [M]. 北京: 中华书局, 2000:29.

[2] 袁训来, 陈哲, 肖书海, 等. 蓝田生物群: 一个认识多细胞生物起源和早期演化的新窗口 [J]. *科学通报*, 2012,55(34):3219.

[3] 余建斌. 我们的科技一直在追赶: 访中国工程院院长周济 [N/OL]. *人民日报*, 2013-01-12(2). [2013-03-20]. http://paper.people.com.cn/rmrb/html/2013-01/12/nw.D110000renmrb_20130112_5-02.htm.

本刊编辑部