

[文章编号] 1000-4718(2006)09-1829-04

甘氨酸对非乙醇性脂肪性肝病大鼠肝组织 PPAR α 表达的影响*

李 夏¹, 韩德五², 赵龙凤²

(¹山西职工医学院病理生理教研室, ²山西医科大学肝病研究所, 山西 太原 030001)

[摘要] 目的: 观察甘氨酸对非乙醇性脂肪性肝病大鼠肝组织过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 基因表达的影响。方法: 采用 20% 玉米油饲料喂饲大鼠建立非乙醇性脂肪性肝病模型为对照组, 甘氨酸组以 20% 甘氨酸液灌胃, 每天 1 g。于第 14 周末检测动物脂质水平以及血浆内毒素、肿瘤坏死因子、游离脂肪酸含量, 并做病理切片。以逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 检测大鼠肝组织 PPAR α mRNA 表达。结果: 甘氨酸对非乙醇性脂肪性肝病大鼠 PPAR α 基因表达有明显增强作用, 同时肝内甘油三酯 (TG) 蓄积减少, 肝细胞的损伤与炎症反应减轻。结论: 甘氨酸可上调非乙醇性脂肪性肝病大鼠肝组织 PPAR α 基因的表达, 并显著地降低病鼠的内毒素水平, 从而减轻病鼠的肝脂变与脂肪性肝炎的程度。

[关键词] 甘氨酸; 内毒素; 肝疾病, 非乙醇性脂肪性; 过氧化物酶体增殖物激活受体

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effect of glycine on the expression of peroxisome proliferator - activated receptor α in the rat nonalcoholic fatty liver

LI Xia¹, HAN De - wu², ZHAO Long - feng²

(¹Department of Pathophysiology, Shanxi Medical College for Continuing Education, ²The Institute of Hepatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To observe the effect of glycine on the expression of peroxisome proliferator - activated receptor α (PPAR α) in hepatic tissues of nonalcoholic fatty liver disease rats. **METHODS:** The nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) model of Wistar rats was established by feeding with 20% maize oil - containing diets. The animals were respectively fed with control diets and control diets plus glycine (Gly, 1 g/d, intragastric infusion at the same time). The rats were sacrificed at 14 weeks, the concentrations of lipids, endotoxin, tumor necrosis factor - α , malondialdehyde, free fatty acid in plasma and hepatic tissues were determined. The hepatic pathological changes were observed, and hepatic tissues were collected to measure the expression of PPAR α mRNA by the reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT - PCR). **RESULTS:** The expression of PPAR α mRNA in the hepatic tissue was upregulated and the level of endotoxin decreased remarkably in Gly treatment group compared to the NAFLD group. Moreover, fatty liver and steatohepatitis showed improvement in Gly treatment group. **CONCLUSION:** Glycine upregulates the expression of PPAR α mRNA in hepatic tissues and attenuates steatohepatitis.

[KEY WORDS] Glycine; Endotoxins; Liver diseases, nonalcoholic fatty; Peroxisome proliferator - activated receptor

近年来,高脂血症、糖尿病、肥胖等发病率逐渐增高。在上述脂肪代谢障碍的病理情况下,常并发非乙醇性脂肪肝、非乙醇性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)等非乙醇性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)。大量研究发现,肝硬化、乙醇性肝病等均伴有肠源性内毒素血症(intestinal endotoxemia, IETM),内毒素在其发病中

具有重要作用^[1,2]。我所先前的研究发现,非乙醇性脂肪性肝病时存在 IETM,内毒素在 NAFLD 的发生发展中参与作用^[3]。甘氨酸可降低血浆肠源性内毒素水平,并能阻断内毒素生物学效应的发挥^[4]。据文献报道,游离脂肪酸在肝内氧化有 3 种形式:即线粒体和过氧化物酶体的 β 氧化以及微粒体的 ω 氧化,它们均受过氧化物酶体增殖物激活受体 α (per-

[收稿日期] 2004 - 12 - 15 [修回日期] 2005 - 06 - 28

* [基金项目] 山西省高校科技研究开发项目 (No. 2003101)

E - mail: smuhan@public.ty.sx.cn

oxisome proliferator - activated receptor α , PPAR α) 的调控^[5]。1990 年发现 PPAR 以来,已证明存在 3 种亚型:PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 。PPAR α 主要在肝细胞表达,在肝脏脂质转运与脂肪酸氧化中起重要作用^[6]。本实验旨在阐明甘氨酸对由摄入过多玉米油所致的脂肪性肝病大鼠的肝组织中过氧化物酶体增殖物激活受体基因表达和同时病鼠伴发 IETM 的影响。

材 料 和 方 法

1 动物和主要试剂

雄性 Wistar 大鼠 24 只,体重(180 ± 12)g,山西医科大学实验动物中心提供。

甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)试剂盒,购自日本 Olympus 公司。鲎试剂盒购自上海伊华临床医学科技公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒,由解放军总医院科技开发中心放免所提供;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、游离脂肪酸(FFA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。玉米油购自市售山东某油脂工业公司。甘氨酸,北京化学试剂公司进口分装。Trizol RNA 提取液,上海生工生物工程有限公司提供。PPAR α 基因 PCR 扩增的引物购自上海生工生物工程有限公司。

大鼠 PPAR α 基因 PCR 扩增引物参考文献^[7]设计为:PPAR α 上游引物:5' - ATCGGCCTGGCCTTCTAAC - 3';下游引物:5' - GTCTCTGTAGATCTCTTGC - 3',扩增片段的长度为 239 bp; β - actin 引物序列为:5' - TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC - 3';5' - TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG - 3',扩增长度为 348 bp。上述引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

台式冷冻离心机,英国 CECIL 公司出品;PCR 仪,美国 MJ Rsearch 公司产品;一次性成像系统,紫外凝胶成像系统 JSD7500。

2 方法

2.1 实验分组及处理 24 只雄性 Wistar 大鼠,正常喂养 3 d 后,随机分为 3 组:正常对照组(control):普通饲料喂养;玉米油组(NAFLD):饲以动物含 20% 玉米油的饲料,正常饮水;玉米油加甘氨酸组(Gly):饲以含 20% 玉米油饲料的同时,20% 甘氨酸灌胃,每天 1 g。在 14 周 1% 戊巴比妥钠(30 mg · kg⁻¹, ip)麻醉动物,无菌无热原污染条件下取血,迅速取肝,进行以下检测。

2.2 血清、肝 TG、TC 含量测定 腹主动脉取血,室温放置 30 min,离心分离血清。取肝脏冰浴制备 10% 肝匀浆液上清。用酶法在全自动生化分析仪测定血清、肝 TG、TC 含量。

2.3 血浆 ALT、TNF- α 含量测定 腹主动脉取血制备血浆后,按照试剂盒操作步骤分别测定血浆 ALT 活性及 TNF- α 含量。

2.4 血浆 FFA、内毒素(endotoxin, ET)含量测定 腹主动脉取血,制备血浆,按试剂盒操作步骤分别测定 FFA、ET 含量。

2.5 病理组织学检查 取肝左叶用 10% 甲醛溶液固定,分别进行石蜡包埋和冰冻切片,HE 及苏丹 IV 染色。

2.6 PPAR α mRNA 表达检测

①总 RNA 抽提:加入 Trizol 试剂常规一步法提取。②RT 反应:反应总体积为 50 μ L,其中:5 \times buffer 10 μ L,25 mmol Dntp 8 μ L,RNasin 0.5 μ L,AMV 反转录酶 1 μ L,Random primer 1 μ L,RNA 10 μ g。混匀,离心,42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h。95 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。冰浴中加 DEPC 水 50 μ L,混匀,离心,-70 $^{\circ}$ C 保存待用。③PCR 反应:冰浴中构建 PCR 扩增体系,反应总体积 50 μ L,其中:cDNA 10 μ L,10 \times buffer 5 μ L,MgCl₂ 3 μ L,2.5 mmol Dntp 4 μ L,引物 sense 1 μ L,引物 anti-sense 1 μ L,Taq 酶 0.5 μ L,消毒双蒸水 25.5 μ L。 β - actin 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 4 min,94 $^{\circ}$ C 1 min,57 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min 循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 5 min。PPAR α :94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,循环 30 次,延伸 7 min。④产物分析:JDS 7500 型紫外凝胶成像系统观察电泳结果。AlphaEaseTM 图像分析软件对表达量进行半定量分析。

4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行多组间方差检验。

结 果

1 甘氨酸对各组大鼠脂质含量的影响

由表 1 可见,NAFLD 组大鼠血清中 TC、肝匀浆中 TG、TC 含量高于正常对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Gly 组大鼠血清 TC、肝组织 TG、TC 均低于 NAFLD 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 3 组大鼠血清、肝匀浆 TG、TC 的含量

Tab 1 Contents of TG and TC in rat serum and hepatic tissue of three groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	TG		TC	
	Serum (mmol · L ⁻¹)	Liver (mmol · g ⁻¹)	Serum (mmol · L ⁻¹)	Liver (mmol · g ⁻¹)
Control	0.61 ± 0.06	141.24 ± 22.01	2.69 ± 0.12	5.83 ± 0.54
NAFLD	0.66 ± 0.05	350.27 ± 47.24*	3.56 ± 0.44*	16.74 ± 3.36**
Gly	0.62 ± 0.04	155.31 ± 99.99*	2.96 ± 0.45*	12.69 ± 4.39**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ vs NAFLD group.

2 甘氨酸对各组大鼠血浆 ALT、TNF-α 含量的影响

由表 2 可见,食用 20% 玉米油 14 周后,大鼠血浆 ALT、TNF-α 含量均高于对照组 ($P < 0.05$); Gly 组血浆 TNF-α 含量明显低于 NAFLD 组 ($P < 0.05$)。

表 2 3 组大鼠血浆 ALT、TNF-α 的含量

Tab 2 Contents of ALT and TNF-α in rat plasma of three groups ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Group	ALT ($U \cdot L^{-1}$)	TNF-α ($\mu g \cdot L^{-1}$)
Control	23.52 ± 2.41	0.9875 ± 0.1162
NAFLD	35.27 ± 4.25*	1.2333 ± 0.1193*
Gly	30.48 ± 5.93	1.0451 ± 0.1250#

* $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs NAFLD group.

3 甘氨酸对各组大鼠血浆 FFA、ET 水平的影响

表 3 可见,NAFLD 组大鼠血浆 FFA、ET 水平均高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); Gly 组 FFA 和 ET 明显低于 NAFLD 组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

4 病理组织学检查

由图 1、图 2 可见,模型组大鼠呈不同程度的弥漫性肝细胞脂肪变性,脂变肝细胞增大,肝窦受压变窄,伴小叶内炎症细胞浸润,部分动物合并汇管区炎

症及肝细胞点状坏死。上述改变均以肝腺泡 3 区变化最为明显。甘氨酸组大鼠肝细胞脂肪变性较轻。肝组织苏丹 IV 染色显示,正常大鼠肝细胞内无脂滴; NAFLD 组肝组织明显脂肪变性,肝细胞内有较大的脂滴; Gly 组肝组织内脂变较轻。

5 大鼠肝组织 PPARα mRNA 的表达

琼脂糖凝胶电泳结果显示: NAFLD 组大鼠 PPARα mRNA 的表达最弱, Gly 组与 NAFLD 组相比,表达上调。分析 3 组大鼠肝组织 PPARα mRNA 的相对表达值分别为 Control 组: 0.9932 ± 0.4515 ; NAFLD 组: 0.6136 ± 0.3154 ; Gly 组: 0.9803 ± 0.3986 (图 3、图 4)。

表 3 3 组大鼠血浆 FFA、ET 的含量

Tab 3 Contents of FFA and ET in rat plasma of three groups ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Group	FFA ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	ET ($\times 10^3 EU \cdot L^{-1}$)
Control	266.59 ± 45.97	0.601 ± 0.062
NAFLD	699.63 ± 174.57**	1.772 ± 1.139*
Gly	414.45 ± 98.38##	0.713 ± 0.059#

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs NAFLD group.

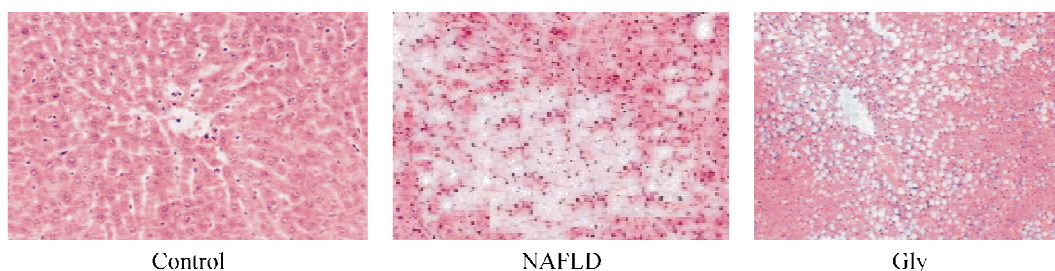


Fig 1 The pathohistological changes of liver (HE staining, $\times 100$).

图 1 各组大鼠肝脏组织学变化

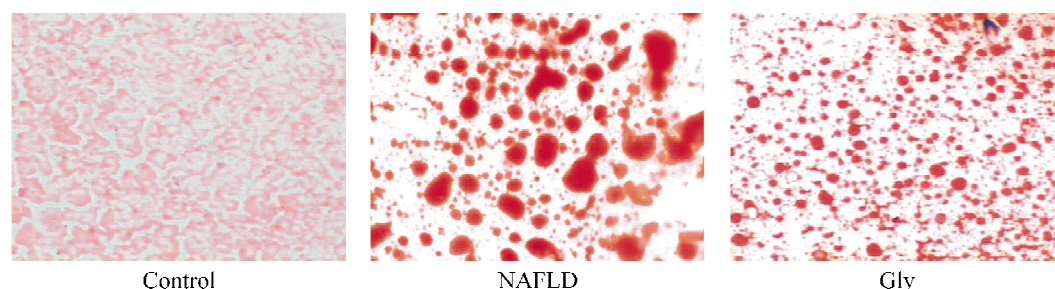


Fig 2 The pathohistological changes of liver (Sudan IV staining, $\times 200$).

图 2 各组大鼠肝脏组织学变化

讨 论

NAFLD 是与乙醇性肝病相类似但无过量饮酒史的临床综合征,单纯性脂肪肝和非乙醇性脂肪肝为其主要类型。NASH 与肝硬化和肝癌的发生有关,进而发生肝功能衰竭^[8]。PPARα 是一类能被过氧化物酶体增殖物(如脂肪酸及其衍生物、贝特类降脂药

等)激活的核转录因子,调控编码脂质代谢、脂质运输有关功能蛋白的基因表达。PPARα 与其配体结合后,能增加脂肪酸转运蛋白、脂酰辅酶 A 合成酶的表达,促进肝脏的脂肪酸摄取;影响脂肪酸和胆固醇在血浆中的转运;增加血浆高密度脂蛋白胆固醇水平和脂蛋白酯酶活性,刺激低密度脂蛋白胆固醇摄取,水解极低密度脂蛋白。

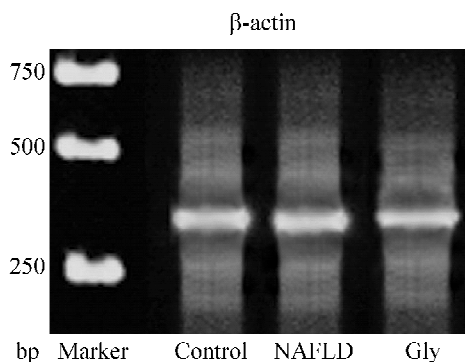


Fig 3 Expression of β -actin in rat liver.

图3 大鼠肝组织 β -actin 表达

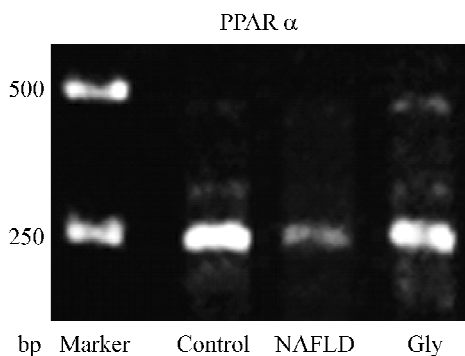


Fig 4 Expression of PPAR α mRNA in rat liver.

图4 大鼠肝组织 PPAR α mRNA 的表达

本实验结果显示,NAFLD 组大鼠脂质与血浆内毒素水平高于对照组,说明内毒素在 NAFLD 发生中可能具有一定作用。NAFLD 组肝组织 PPAR α mRNA 的表达低于对照组,血浆 TNF- α 含量高于对照组,可能与内毒素促使 TNF- α 释放,从而发挥其肝细胞损伤作用有关。由于肝组织 PPAR α mRNA 的表达下调,影响肝组织线粒体和过氧化物酶体的 β 氧化代谢,而使肝细胞脂肪变性^[9],影响肝脏脂肪代谢。NAFLD 组由于内毒素等因素作用致使血浆 MDA、FFA 水平明显升高,所发生的脂质过氧化损伤与游离脂肪酸的细胞毒性作用在脂肪性肝炎发生发展中起着重要作用。

Gly 组大鼠的脂质含量、血浆 ET、TNF- α 、FFA、MDA 水平虽仍高于正常组,却明显低于 NAFLD 组,肝组织 PPAR α mRNA 的表达也显著下调。说明 Gly 可降低内毒素水平,减轻或延缓 NAFLD 的发生和发展。Gly 对非乙醇性脂肪性肝病肝脏的保护作用机制可能是:(1)影响内毒素分子结构和活性,有效降低内毒素的作用^[10]。(2)降低肠粘膜通透性,使内毒素在肠道的吸收减少^[11,12]。(3)通过阻断 Cl⁻ 通道,抑制 Na⁺/H⁺ 交换,阻止细胞内 Na⁺ 超载,保护细胞不发生肿胀死亡。(4)上调肝脏 PPAR- α mRNA 的表达,减轻脂质代谢紊乱,从而使 NAFLD 大鼠

脂肪肝减轻与炎症反应减弱^[13]。甘氨酸通过上述作用,可使 NAFLD 病变减轻,也从而证实了肠源性内毒素血症在 NAFLD 的发展过程中发挥了继发性损伤作用。

[参 考 文 献]

[1] 韩德五. 肠源性内毒素血症与肝病[M]. 北京: 中国科技出版社, 2004. 9-19.

[2] Nolan JP. Endotoxin as mediators of hepatic injury - an idea whose time has come again[J]. Hepatology, 1989, 10(5): 887-891.

[3] 赵龙凤,贾军梅,韩德五. 肠源性内毒素血症在非乙醇性脂肪性肝炎发病中的作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(10): 632-635.

[4] 刘近春,韩德五,许瑞龄,等. 甘氨酸在肝硬化发生发展过程中对肝组织 CD14 基因及其蛋白表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2002, 10(3): 181-184.

[5] Aoyama T, Peters JM, Iritani N, et al. Altered constitutive expression of fatty acid metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator activated receptor alpha[J]. J Biol Chem, 1998, 273(10): 5678-5684.

[6] Kersten S, Seydout J, Peters JM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting[J]. J Clin Invest, 1999, 103(11): 1489-1498.

[7] Costet P, Legendre C, More J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis[J]. J Biol Chem, 1998, 273(45): 29577-29585.

[8] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和乙醇性肝病学组. 非乙醇性脂肪性肝病诊断标准[J]. 中华肝脏病学杂志, 2003, 11(2): 71.

[9] Galli A, Price D, Crabb D. High-level expression of rat class alcohol dehydrogenase is sufficient for ethanol-induced fat accumulation in transduced hela cells[J]. Hepatology, 1999, 29(40): 1164-1170.

[10] Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B, et al. Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of kupffer cells[J]. Hepatology, 1999, 29(3): 737-745.

[11] 戚仁斌,陆大祥,颜亮,等. 甘氨酸和多粘菌素 B 拮抗内毒素活性及其机制的研究[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(12): 1078-1082.

[12] 刘靖,陆大祥,王华东,等. 甘氨酸对小鼠体重及脂质代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(6): 1143-1146.

[13] Ikejima K, Qu W, Stachlewit RF, et al. Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel[J]. Am J Physiol, 1997, 272(6 Pt 1): G1581-G1586.