

- Physiol, 2003, 284(3):R628-R638.
- [8] 崔慧慧, 李莉, 杨建一, 等. 感觉神经损伤性盐敏感性高血压大鼠心肾 ACE 和 ACE2 的表达[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(8):38-43.
- [9] Crowley SD, Tharoux PL, Audoly LP, et al. Exploring type I angiotensin (AT1) receptor functions through gene targeting [J]. Acta Physiol Scand, 2004, 181(4):561-570.
- [10] Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(47):17985-17990.
- [11] Georg N, Kerstin S, Jorg R, et al. Salt induces vascular AT1 receptor overexpression *in vitro* and *in vivo* [J]. Hypertension, 1998, 31(6):1272-1277.
- [12] 张强, 唐斌, 何芳, 等. 原发性高血压与 eNOS 基因多态性相关性分析[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(2):145-148.
- [13] Zhou MS, Jaimés EA, Raij L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress [J]. Hypertension, 2004, 44(6):186-190.

收稿日期: 2013-04-22

(解学魁编辑 张翠校对)

· 实验研究 ·

白藜芦醇和能量限制对大鼠肝脂肪变性影响*

刘天娥, 赵健亚, 陈刚, 王晓珂

摘要:目的 探讨白藜芦醇(RSV)和能量限制(CR)对高脂高糖膳食诱导性肥胖大鼠肝脏脂肪变性作用。方法 将40只SD大鼠随机分成模型组与对照组,分别以高脂高糖和基础饲料饲养8周,建立肥胖大鼠模型,8周末从模型组选出大于对照组平均体重+1.96倍标准差的肥胖大鼠随机分成肥胖组、白藜芦醇(250 mg/kg)及能量限制(60%/d)组,连续12周,于20周末观察大鼠肝脏脂肪变性改善状况。结果 20周末,肥胖组、白藜芦醇组、能量限制组和对照组大鼠平均体重分别为(759.30±16.75)、(689.30±8.55)、(586.10±11.35)和(598.00±9.8)g,肥胖组高于对照组($P<0.01$),白藜芦醇、能量限制组均低于肥胖组($P<0.05$);总能量摄入量以肥胖组最高,能量限制组最低;肥胖组、白藜芦醇组、能量限制组大鼠肝脏 Sirt1、PGC-1 α mRNA 表达分别为[(0.42±0.04)、(0.79±0.16)、(0.88±0.06)]和[(0.67±0.19)、(1.26±0.34)、(2.35±0.37)],与肥胖组比较,白藜芦醇组、能量限制组大鼠肝脏 Sirt1、PGC-1 α mRNA 表达升高($P<0.01$);肥胖组大鼠肝细胞内脂质空泡大量蓄积,白藜芦醇、能量限制组大鼠肝脂肪变性均相对较轻。结论 白藜芦醇可模拟能量限制作用,减少肝细胞脂肪变性,其机制可能与上调 Sirt1 和 PGC-1 α 的 mRNA 表达、提高线粒体脂肪酸 β 氧化作用有关。

关键词:高脂高糖膳食;肥胖;白藜芦醇;能量限制;脂肪变性

中图分类号:R 151.41 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2014)07-0915-03 DOI:10.11847/zgggws2014-30-07-20

Resveratrol and calorie restriction improve hepatic steatosis in obese rats

LIU Tian-e, ZHAO Jian-ya, CHEN Gang, et al (Department of Environmental Health, Institute of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu Province 226019, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of resveratrol (RSV) and caloric restriction (CR) on hepatic steatosis in obese rats fed with high fat/sugar diet. **Methods** Forty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a model and a control group and fed with high-fat/sugar and basic diet for 8 weeks. The obese rats with the average weight of 1.96 times standard deviation of the control group were picked out from the model group at the end of 8th week and then were randomly divided into obese, RSV (250 mg/kg) and CR (60%/d) groups. The improvements of hepatic steatosis of the rats were observed at the end of 20th week. **Results** At the end of 20th week, the mean body weight of rats in obese, RSV CR and control groups were 759.30±16.75, 689.30±8.55, 586.10±11.35, and 598.00±9.8 g, respectively, and the mean body weight of the obese group was higher than that of the control group ($P<0.01$) and that of RSV and CR group were lower than that of the obese group ($P<0.05$). Total energy intake in obese group was the highest, and that of the CR group was the lowest. The liver silent information regulator 1 (Sirt1), peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1 α (PGC-1 α) mRNA expression in obese, RSV, and CR groups were 0.42±0.04, 0.79±0.16, 0.88±0.06, and 0.67±0.19, 1.26±0.34, 2.35±0.37, respectively, and those in RSV and CR groups were higher than those of the obese group ($P<0.01$). The vacuolar accumulation was observed in liver cell of obese rats rats, and the rats in RSV and CR groups had relatively mild hepatic steatosis. **Conclusion** Resveratrol can simulate the energy restriction to reduce hepatic steatosis, and the mechanism may be related to the increased Sirt1 and PGC-1 α mRNA expression and fatty acid β -oxidation function.

Key words: high fat/sugar diet; obesity; resveratrol; calorie restriction; steatosis

* 基金项目:国家自然科学基金(21277078)

作者单位:南通大学公共卫生学院环境卫生学教研室,江苏 南通 226019

作者简介:刘天娥(1988-),女,湖南邵东人,硕士在读,研究方向:环境卫生学。

通讯作者:王晓珂, E-mail: wxkel11@hotmail.com

数字出版日期:2014-6-5 17:11

数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140605.1711.038.html

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 属临床常见肝病, 能量限制是其主要防治措施^[1], 但在长期临床实践中, 患者依从性很差^[2]。能量限制主要通过激活沉默信息调节因子-1 (silent information regulator 1, Sirt1) 增加机体代谢降低脂质沉积^[3]。近来有研究发现, 白藜芦醇可激活 Sirt1 及下游的过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator1 α , PGC-1 α) 活性, 调节能量和代谢平衡^[4], 具有模拟能量限制作用^[5-6]。因此, 本研究拟以白藜芦醇与能量限制干预高脂高糖膳食诱导性肥胖大鼠, 观察其改善肝脏脂肪变性的效应并探索其相关分子机制。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 白藜芦醇 (纯度 98%, 南京泽朗医药科技有限公司), 实时荧光定量 PCR 仪 (LightCycler 480 II, 上海罗氏诊断产品有限公司), Trizol 试剂和引物 (上海 Invitrogen 公司), RT-PCR 试剂和 SYBR Green II 酶 (日本 Takara 公司)。

1.2 实验动物与分组 健康 SD 雄性大鼠 40 只 (上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(沪)2008-0016) 随机分为模型组 ($n=32$) 和对照组 ($n=8$), 每天分别给予高脂高糖膳食饲料和基础饲料 (上海斯莱康实验动物有限公司), 自由饮水, 动物饲养环境温度: 20~25 °C, 相对湿度: 45%~70%, 通风良好。于第 8 周末从模型组大鼠中选取体重大于对照组平均体重 +1.96 倍标准差的大鼠 18 只 (肥胖大鼠), 随机分为肥胖组、白藜芦醇组及能量限制组, 每组 6 只, 与对照组大鼠同时继续饲养 12 周, 白藜芦醇组大鼠饲料中添加白藜芦醇 250 mg/kg, 于避光环境下喂食, 能量限制组平均每只大鼠每天喂食量限制为肥胖组摄食量的 60%。饲养期间称取并记录大鼠体重和摄食量。

1.3 病理组织学观察 于 20 周末将所有大鼠麻醉后处死, 摘取肝脏于 4% 福尔马林溶液中固定, 制作肝组织病理切片进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 于 400 \times 光显微镜下观察肝细胞结构及脂质蓄积情况。

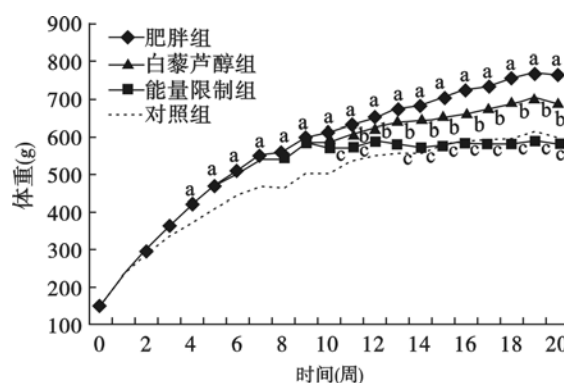
1.4 肝组织中 Sirt1、PGC-1 α 表达检测 采用实时荧光定量 PCR 法, 称取肝脏组织, 加入 Trizol 裂解, 分离得到总 RNA 并使用核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度。取 2.5 μ g 总 RNA 合成 cDNA, 反应体系 20 μ L, cDNA 合成方法按 Trizol 试剂说明书进行。取 1 μ L 的 cDNA, 加入 SYBR Green 1 和以下引物: β -actin 上游: 5'-CTCCGGAGTCCATCACAAATG-3', 下游: 5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'; Sirt1 上游: 5'-CATAGGTTAGGTGGCGAGTA-3', 下游: 5'-

TGAAGAGGTGTTGGTGGC-3'; PGC-1 α 上游: 5'-ACAAGACTATTGAGCGAACCC-3', 下游: 5'-TTGGCTTTATGAGGAGGA-3'; 置于 LC-480PCR 仪进行扩增, PCR 反应体系 10 μ L, PCR 扩增条件: 95 °C 5 s, 退火温度 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环, 得到 Ct 值。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算其相对量^[7]。

1.5 统计分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析, 以两组独立样本 t 检验进行两组数据之间比较, 以单因素方差分析进行多组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重变化 (图 1) 大鼠体重随饲养周期推移而逐渐增长, 从第 4 周开始肥胖组大鼠体重增长明显高于对照组 ($P < 0.01$); 与肥胖组比较, 白藜芦醇、能量限制组大鼠体重增长速度从第 11 周开始明显降低 ($P < 0.05$)。20 周末, 肥胖组、白藜芦醇组、能量限制组和对照组大鼠的平均体重分别为 (759.30 \pm 16.75)、(689.30 \pm 8.55)、(586.10 \pm 11.35) 和 (598.00 \pm 9.80) g, 肥胖组明显高于对照组 ($P < 0.01$), 白藜芦醇、能量限制组均明显低于肥胖组 ($P < 0.05$)。表明白藜芦醇可模拟能量限制干预作用明显抑制大鼠因高脂高糖膳食引起的肥胖。



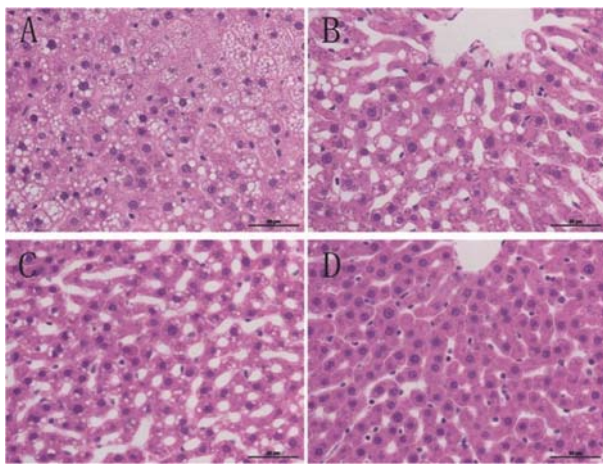
注: 与对照组比较, a $P < 0.01$; 与肥胖组比较, b $P < 0.05$, c $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠体重变化

2.2 大鼠摄食量、能量摄入量变化 结果显示, 肥胖组平均每只大鼠的总膳食量明显低于对照组 ($P < 0.05$), 白藜芦醇、能量限制组大鼠的总膳食量均低于肥胖组大鼠 ($P < 0.05$); 与肥胖组比较, 白藜芦醇、能量限制组大鼠的总能量摄入量均较低 ($P < 0.05$)。表明白藜芦醇可模拟能量限制促使大鼠减少摄食量从而降低能量在体内的过多蓄积。

2.3 肝脏组织学病理观察 (图 2) 与对照组比较, 肥胖组大鼠肝细胞呈现大量脂肪空泡融合, 细胞核挤向胞膜, 且肝细胞结构排列紊乱; 与肥胖组比较,

白藜芦醇、能量限制组大鼠肝细胞内脂质空泡明显减少,细胞结构分明。表明白藜芦醇和能量限制干预可充分改善高脂高糖膳食诱导性大鼠肝脏脂肪变性。



注:A:肥胖组;B:白藜芦醇组;C:能量限制组;D:对照组。

图2 大鼠肝脏组织病理观察(HE,400×)

2.4 大鼠肝脏 Sirt1、PGC-1 α 的 mRNA 表达 与对照组比较,肥胖组大鼠肝脏 Sirt1 和 PGC-1 α mRNA 表达均明显下调($P < 0.01$);与肥胖组比较,白藜芦醇和能量限制组大鼠肝脏 Sirt1 和 PGC-1 α mRNA 表达均上调($P < 0.01$),能量限制组 Sirt1 和 PGC-1 α mRNA 表达水平高于白藜芦醇组。

表1 大鼠肝脏 Sirt1 和 PGC-1 α 的 mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	Sirt1	PGC-1 α
对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
肥胖组	0.42 \pm 0.04 ^a	0.67 \pm 0.19 ^a
白藜芦醇组	0.79 \pm 0.16 ^b	1.26 \pm 0.34 ^b
能量限制组	0.88 \pm 0.06 ^b	2.35 \pm 0.37 ^b

注:与对照组比较,a $P < 0.01$;与肥胖组比较,b $P < 0.01$ 。

3 讨论

本研究结果显示,20 周高脂高糖膳食可以明显促进大鼠体重增加和肝细胞内脂质蓄积。有研究发现小鼠喂养高脂饲料 12 周后,其体重及脂肪指数增加,肝细胞中脂质急剧蓄积并伴随大小不等空泡出现,且症状随饲养时间延长而加重^[8],与本研究结果一致。本研究结果还显示,白藜芦醇和能量限制干预后,高脂高糖膳食组大鼠的体重显著降低,肝细胞内脂质基本被清除,脂肪变性现象得到明显改善,且白藜芦醇干预组的能量摄入明显降低。提示白藜芦醇能够模拟能量限制的作用,降低脂肪内的脂质蓄积,抑制非酒精性脂肪肝的形成。与相关研究结果一致^[9]。

Sirt1 是一种调节能量代谢的重要因子之一^[10],白藜芦醇能够模拟能量限制作用激活 Sirt1 通路促

进肝脏脂质氧化,增强线粒体生物功能,从而提高代谢功能延长寿命^[6,11]。PGC-1 α 作为 Sirt1 的下游调控因子,是线粒体能量代谢的关键调节器,与肝脏脂肪变性及胰岛素抵抗等多系统能量代谢紊乱密切相关^[12-13]。白藜芦醇可激活 PGC-1 α 活性部分地增强肝脏脂肪酸氧化作用并减少脂肪生成^[14]。Sirt1 和 PGC-1 α 在肝脏中的联合作用可使得线粒体脂肪酸 β 氧化功能增强^[15]。本研究结果表明,与肥胖组比较,白藜芦醇和能量限制组大鼠肝脏中 Sirt1 和 PGC-1 α 的表达明显上调。提示白藜芦醇模拟能量限制作用调节脂质代谢,改善大鼠肝脏脂肪变性作用可能与上调肝脏中 Sirt1 及 PGC-1 α 表达有关。

参考文献

- [1] Torres DM, Williams CD, Harrison SA. Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012, 10(8): 837-858.
- [2] Bugianesi E, Marzocchi R, Villanova N, et al. Non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH): treatment [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004, 18(6): 1105-1116.
- [3] Yamamoto M, Lwasa M, Lwata K, et al. Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(4): 498-503.
- [4] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α [J]. Cell, 2006, 127(6): 1109-1122.
- [5] 于飞,李岩溪,任亚浩,等.白藜芦醇对高脂模型小鼠代谢影响[J].中国公共卫生,2010,26(11):1401-1402.
- [6] Lam YY, Peterson CM, Ravussin E. Resveratrol vs. calorie restriction; data from rodents to humans [J]. Exp Gerontol, 2013, 48(10): 1018-1024.
- [7] Livah KJ, Schmitt TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2 $\Delta\Delta$ CT method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [8] Podrini C, Cambridge EL, Lelliott CJ, et al. High-fat feeding rapidly induces obesity and lipid derangements in C57BL/6N mice [J]. Mamm Genome, 2013, 24(5-6): 240-251.
- [9] Tauriainen E, Luostarinen M, Martonen E, et al. Distinct effects of calorie restriction and resveratrol on diet-induced obesity and fatty liver formation [J]. J Nutr Metab, 2011, 525094.
- [10] Schug TT, Li X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity [J]. Ann Med, 2011, 43(3): 198-211.
- [11] 许丹,朱明元,罗莉,等.白藜芦醇对衰老小鼠肝脏抗氧化能力影响[J].中国公共卫生,2006,22(4):467-468.
- [12] Wenz T. Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1 α under cellular stress [J]. Mitochondrion, 2013, 13(2): 134-142.
- [13] Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, et al. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements; muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis [J]. PLoS Biol, 2005, 3(4): e101.
- [14] Alberdi G, Rodriguez VM, Macarulla MT, et al. Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet [J]. Nutrition, 2013, 29(3): 562-567.
- [15] Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, et al. Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways [J]. FEBS Lett, 2008, 582(1): 46-53.