

高脂高糖食致小鼠脂肪肝 SR - B1 表达

李莉, 张锦, 刘聪, 周一军, 彭阳, 孟馨

李莉, 张锦, 刘聪, 周一军, 彭阳, 孟馨, 中国医科大学附属第一医院内分泌科 辽宁省沈阳市 110001

李莉, 女, 1971-03-06 生, 四川省重庆市人, 汉族. 1995 年中国医科大学硕士毕业, 内分泌科讲师, 主治医师, 博士生, 研究方向为代谢性疾病.

项目负责人: 李莉, 110003, 辽宁省沈阳市三好街 36 号, 中国医科大学附属第一医院内分泌科. lilysy90@hotmail.com

电话: 024-83956986

收稿日期: 2003-11-11 接受日期: 2003-12-06

High fat and sugar diet induces fatty liver and expression of scavenger receptorB1 in C57BL/6J mice

Li Li, Jin Zhang, Cong Liu, Yi-Jun Zhou, Yang Peng, Xin Meng

Li Li, Jin Zhang, Cong Liu, Yi-Jun Zhou, Yang Peng, Xin Meng, Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Li Li, Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lilysy90@hotmail.com
Received: 2003-11-11 Accepted: 2003-12-06

Abstract

AIM: To investigate the liver pathology and the expression of scavenger receptor B1(SR-B1) in C57BL/6J mice with high fat and sugar diet, and the relationship between them.

METHODS: Ten normal diet, female C57BL/6J mice, fifteen high fat and sugar diet female C57BL/6J mice, five fed 8 weeks and ten fed 16 weeks, were measured serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), fasting blood glucose (FBG) insulin (INS) and liver weight, content of lipid and the expression of SR-B1 in serum and livers.

RESULTS: In the 16-week-old mouse with high fat and sugar diet, serum TC, and FBG were significantly higher than those of normal diet mouse (2.31 ± 0.16 mmol/L, 6.9 ± 1.8 mmol/L, and 2.04 ± 0.15 , 5.1 ± 1.9 mmol/L, $P < 0.05$. INS was also higher, but it was not statistically significant (12.5 ± 4.2 kU/L, 10.8 ± 4.0 kU/L, $P > 0.05$); serum HDL-C was lower than normal (fed high fat and sugar diet for 16 wk, 0.92 ± 0.14 mmol/L; fed for 8 wk, 0.67 ± 0.23 mmol/L; normal mice, 0.97 ± 0.08 mmol/L). High fat and sugar diet mouse had fatty liver, and the mouse was fed for 16 weeks was more severe than that fed for 8 weeks. The content of TG and TC in the liver of high fat and sugar mouse was higher than that of normal diet mouse, and the mouse fed for 16 weeks was more than 2 times of that in normal mouse. The expression of SR-B1 protein in the liver of high fat and sugar diet mouse was the higher than that of normal mouse, and the mouse fed for 16 weeks was higher than that fed for 8 weeks.

CONCLUSION: High fat and sugar diet leads to fatty liver

in the mice. The expression of SR-B1 in the liver is higher than that of normal control significantly, which may be related to the development of fatty liver.

Li L, Zhang J, Liu C, Zhou YJ, Peng Y, Meng X. High fat and sugar diet induces fatty liver and expression of scavenger receptorB1 in C57BL/6J mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):673-675

摘要

目的: 探讨进高脂高糖食糖尿病小鼠肝脏改变、肝脏 SR-B1 表达及二者的关系.

方法: 正常 C57BL/6J 小鼠 10 只, 进高脂高糖食 8 及 16 wk C57BL/6J 小鼠, 分别 5 只及 10 只. 测定血脂、血清胰岛素(INS)及空腹血糖, 肝脏质量、肝脏脂质含量及 SR-B1 蛋白表达.

结果: 高脂高糖食 16 wk 的小鼠血清总胆固醇(TC)、空腹血糖(FBG)明显高于正常小鼠(分别为 2.31 ± 0.16 mmol/L, 6.9 ± 1.8 mmol/L; 及 2.04 ± 0.15 , 5.1 ± 1.9 mmol/L, $P < 0.05$, 胰岛素高于正常小鼠, 但是无显著性(分别为 12.5 ± 4.2 kU/L, 10.8 ± 4.0 kU/L, $P > 0.05$). 高脂高糖食的小鼠血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)低于正常(高脂高糖食喂养 16 wk 小鼠为 0.92 ± 0.14 mmol/L, 喂养 8 wk 为 0.67 ± 0.23 mmol/L, 正常小鼠为 0.97 ± 0.08 mmol/L). 高脂高糖食小鼠肝脏有明显脂肪变性, 16 wk 重于 8 wk 的小鼠. 进高脂高糖食小鼠肝脏的 TC 和 TG 含量显著高于正常动物, 16 wk 的小鼠达到正常小鼠的 2 倍以上. 高脂高糖食小鼠肝脏 SR-B1 表达高于正常动物, 16 wk 强于 8 wk 的小鼠.

结论: 高脂高糖食可使 C57BL/6J 小鼠出现脂肪肝, SR-B1 蛋白表达增高, SR-B1 可能参与脂肪肝形成.

李莉, 张锦, 刘聪, 周一军, 彭阳, 孟馨. 高脂高糖食致小鼠脂肪肝 SR-B1 表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):673-675

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/673.asp>

0 引言

脂肪肝是常见的肝脏疾病^[1-6], 单纯的脂肪肝可转化为肝纤维化、肝硬化, 甚至肝功能衰竭^[7-14], 因而越来越受到重视. 高热量摄入是肥胖和脂肪肝的常见原因. 清道夫受体 B1(SR-B1)是近年发现的高密度脂蛋白(HDL)受体, 在肝脏表达丰富, 参与脂质代谢. 我们观察进高脂高糖食小鼠肝脏变化及 SR-B1 表达, 探讨肝脏 SR-B1 表达与进高脂高糖食糖尿病小鼠肝脏改变的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 ♀ C57BL/6J 小鼠 6-8 周龄, SPF 级, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司. 正常对照组 10 只, 喂以正常鼠食含 40 g/kg 脂肪, 240 g/kg 蛋白, 45 g/kg 粗纤维) 16 wk; 进高糖高脂食组 15 只, 喂以高糖高脂食含 355 g/kg 脂肪(占总热量的 58%, 主要是猪油), 366 g/kg 碳水化合物(主要是蔗糖), 其中 5 只喂以正常食 8 wk, 之后喂以高糖高脂食 8 wk, 为 A 亚组; 10 只喂以高脂高糖食 16 wk, 为 B 亚组.

1.2 方法 禁食 12 h 后, 腹腔注射 100 ml/L 水合氯醛 4 ml/kg 麻醉之后眶窦取血, 分离血清, 采用日本日立 7600-020 全自动生化分析仪, 选择性遮蔽法测定血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C); 酶法测定空腹血糖(FBG); 放免法测定血清胰岛素(INS)(试剂购于北京原子能研究所). 将动物肝脏洗尽血迹, 测定肝质量. 取少量剪成小块, 置 110 °C 烘至恒质量, 精确称取干燥后的肝脏. 磨成细粉, 加氯仿: 甲醇(2:1, V/V), 抽提定容, 再按上述测定血清脂质的方法测脂质含量. 取肝脏一部分 40 g/L 甲醛固定后, 做石蜡切片, HE 染色. 取 -70 °C 保存的各组动物肝组织 100 mg, 提取细胞膜蛋白, LOWRY 法蛋白定量, 经 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印于 NC 膜, 先后加入一抗及二抗 Western blotting 方法, 一抗采用兔抗小鼠的 SR-B1 多克隆抗体(购自美国 Novus 生物工程公司)二抗采用小鼠抗兔抗体(购自北京中山生物工程公司), 显色至条带呈现, 采用 GIS-700D 数码凝胶图像处理系统扫描测定肝脏 SR-B1 的表达.

统计学处理 所有数据以 mean±SD 表示, 采用 t 检验.

2 结果

2.1 血清 TC、HDL、TG、INS 及 FBG 水平 高脂高糖食小鼠血清 TC 高于正常小鼠, B 亚组高于 A 亚组, B 亚组与正常小鼠间有显著差异($P < 0.01$); 血清 HDL-C 及 TG 低于正常小鼠, A 亚组与正常动物间有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表 1; 血清 FBG 及 INS 高于正常小鼠, B 亚组高于 A 亚组, B 亚组的 FBG 与正常小鼠间有显著差异($P < 0.05$).

表 1 高脂高糖食小鼠血清 TC, HDL, TG, INS 及 FBG 水平(mean±SD)

	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	FBG (mmol/L)	INS (kU/L)
正常食组	2.04 ± 0.15	0.97 ± 0.08	0.57 ± 0.07	5.1 ± 1.9	10.8 ± 4.0
高脂高糖食 A 组	2.23 ± 0.52	0.67 ± 0.23 ^a	0.45 ± 0.06 ^b	5.4 ± 1.7	11.8 ± 2.7
B 组	2.31 ± 0.16 ^b	0.92 ± 0.14	0.50 ± 0.16	6.9 ± 1.8 ^a	12.5 ± 4.2

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 正常组.

2.2 肝脏病理改变 高脂高糖食小鼠肝脏有明显脂肪变性, B 组重于 A 组. A 动物肝细胞排列紊乱, 肝细胞体积增大, 核大, 内可见空泡, 胞质内见大小及数量不等

的脂肪空泡; B 组动物肝细胞排列紊乱, 肝细胞增大, 核大小不等, 胞质内有大的脂肪空泡(图 1).

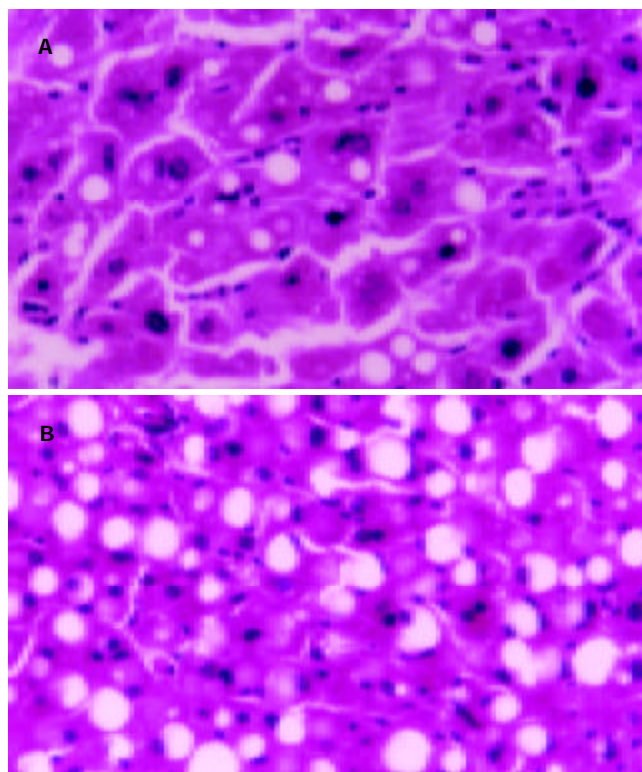


图 1 高脂高糖食小鼠肝脏弥漫性脂肪变性 HE × 200. A: 8 wk 中度; B: 16 wk 重度.

2.3 肝脏脂质含量 高脂高糖食小鼠肝脏的 TC 和 TG 含量显著高于正常动物, B 组高于 A 组. (表 2)

表 2 高脂高糖食小鼠肝脏干质量中脂质含量(mean±SD)

	n	肝质量(g)	TC(mmol/g)	TG (mmol/g)
正常食组	10	0.96 ± 0.04	0.028 ± 0.011	0.063 ± 0.023
高脂高糖食 A 组	5	0.95 ± 0.07	0.037 ± 0.008	0.148 ± 0.072 ^a
B 组	10	1.02 ± 0.11	0.058 ± 0.025 ^b	0.157 ± 0.017 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 正常组.

2.4 肝脏 SB-B1 表达 进高脂高糖食小鼠肝脏 SB-B1 表达密度($\times 10^5$)高于正常动物(vs 3.36 ± 0.28 , $P < 0.05$), 并且 B 组高于 A 组(4.36 ± 0.32 vs 3.97 ± 0.31 , $P < 0.05$)(图 2).

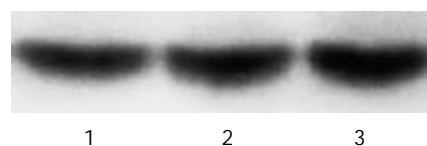


图 2 进高脂高糖食小鼠肝脏 SR-B1 蛋白表达. 1, 2, 3: 正常食, 高脂高糖食 8 及 16 wk.

3 讨论

C57BL/6J 小鼠进高脂高糖食后将出现肥胖、血清胰岛

素水平升高及血糖高^[15]。高脂饮食和肥胖又是脂肪肝的诱发因素^[16-19]。高脂及高糖饮食可使肝脏合成 TG 增多, 分解减慢, 导致高 TG 血症^[20-21]。高胰岛素血症时, 丙二酰辅酶 A 生成增多, 导致肉碱酰转移酶变构, 从而抑制了肉碱酰转移酶的活性, 使 β 氧化作用下降, 肝细胞内游离脂肪酸酯转化为 TG; 血糖轻度升高时, NADPH 供应充分, 乙酰辅酶 A 转变成胆固醇增多; 脂质沉积于肝细胞内导致脂肪肝, 因此 2 型糖尿病是非酒精性脂肪肝的常见病因。本研究中进高脂高糖食小鼠血清 TC 显著高于正常小鼠, TG 低于正常小鼠, 与国外学者研究结果一致^[15]。与国外学者结果比较, 血脂的变化不大可能由于两组小鼠后期进食量较少, 并且本实验中血清脂质水平均为空腹水平。进高脂高糖食的小鼠肝脏重量高于正常小鼠, 进食 16 wk 的小鼠肝脏中 TC 和 TG 的含量显著高于正常鼠, 均大于正常小鼠的 2 倍; 病理检查亦显示实验组肝脏出现明显的脂肪肝表现。并且随进高脂高糖食时间的延长血糖和 INS 有升高的趋势, 肝脏的脂质含量随之增加, 病理改变也逐渐加重, 说明糖代谢的改变与脂肪肝的改变是同时出现的。实验中肝脏的脂质含量的改变比血清中 TC 和 TG 变化大, 是因为肝脏的脂质含量主要决定于肝脏的摄取和利用脂质的能力及肝脏本身合成脂质速度, 而循环中脂质水平只是为肝脏摄取提供原料。另外由于条件所限, 仅测定了空腹血脂, 而未测定餐后血脂, 需进一步研究餐后血脂与肝脏脂质含量的关系。目前关于肝脏 TG 含量增高的研究较多, 增高的机制已较清楚, 肝脏中胆固醇含量增高还未受到重视, 胆固醇性脂肪肝的形成机制还不清楚。

HDL 是富含胆固醇的一种脂蛋白, 具有抗动脉粥样硬化作用。SR-B1 是首先被确认的 HDL 的受体, 广泛表达于肝脏、产类固醇组织、小肠刷状缘、动脉粥样硬化病变部位, 主要通过参与胆固醇的逆向转运及 HDL 代谢, 影响动脉粥样硬化的形成。研究已发现肝脏过度表达 SR-B1, 但动脉粥样硬化显著减少; SR-B1 活性消失后动脉粥样硬化加重。说明肝脏表达 SR-B1 影响从动脉壁到肝脏的胆固醇逆向转运的总速度。Sehayek et al 发现肝脏 SR-B1 的表达不仅参与摄取胆固醇, 还与向胆汁中分泌胆固醇有关。由于其具有摄取和排泄胆固醇的作用, 亦有可能参与胆固醇性脂肪肝的形成。研究显示进高脂高糖食 8 wk 和 16 wk 的小鼠肝脏 SR-B1 约为正常小鼠的 1.2 及 1.3 倍, 支持上述假设。Tu et al 向肝细胞培养液中加入不同浓度的葡萄糖, 发现肝细胞 SR-B1 表达增高, 提示进高脂高糖食小鼠肝脏 SR-B1 表达增加可能由血糖升高所致, 也可能与糖尿病患者脂肪肝的危险性高有关。另外 SR-B1 属于清道夫受体, 不仅可与 HDL 结合, 还可结合氧化低密度脂蛋白 (OX-LDL) 及糖基化终末产物。研究已发现糖基化终末产物可使单核巨噬细胞 SR-B1 表达升高, OX-LDL 可使单核巨噬细胞 SR-B1 表达降低。对肝细胞的影响还未见报道, 是否与血清中 INS、TC、OX-LDL 及糖基化终

末产物水平有关? 是否上述因素通过 SR-B1 影响脂肪肝的形成? 还需进一步研究。

总之, 高脂高糖食可使 C57BL/6J 小鼠出现脂肪肝、肝脏中 TG 和 TC 的含量显著高于正常, SR-B1 蛋白表达增高, SR-B1 可能参与脂肪肝形成。需进一步运用基因敲除和基因转入等技术证实。

4 参考文献:

- 1 范建高. 中国脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:6-10
- 2 张一珏. 脂肪肝的临床及流行病学特征. 华人消化杂志 1998;6 (特刊 7): 442-443
- 3 Shen L, Fan JG, Shao Y, Zeng MD, Wang JR, Luo GH, Li JQ, Chen SY. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey. *World J Gastroenterol* 2003;9:1106-1110
- 4 Wang JT, Liu YL. Non-alcoholic fatty liver disease: the problems we are facing. *Hepatobil Pancreat Dis Int* 2003;2:334-337
- 5 Harrison SA, Di Bisceglie AM. Advances in the understanding and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Drugs* 2003;63:2379-2394
- 6 Kojima S, Watanabe N, Numata M, Ogawa T, Matsuzaki S. Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol* 2003;38:954-961
- 7 徐正婕, 范建高, 王国良, 丁晓东, 田丽艳, 郑晓英. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型. 世界华人消化杂志 2002;10:392-396
- 8 Deng YQ, Fan XF. Liver fibrosis indexes in nonalcoholic fatty liver disease. *Zhejiang Daxue Xuebao Yixueban* 2003;32:241-243
- 9 Hui JM, Kench JG, Chitturi S, Sud A, Farrell GC, Byth K, Hall P, Khan M, George J. Long-term outcomes of cirrhosis in non-alcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:420-427
- 10 Jorgensen RA. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Nurs* 2003;26:150-154
- 11 Kuwabara H, Yoshii Y, Mori H, Fujiwara S, Eiraku S, Kojima H, Miyaji K, Hongo Y, Katsu K. Nonalcoholic steatohepatitis-related cirrhosis with subacute liver failure: an autopsy case. *Dig Dis Sci* 2003;48:1668-1670
- 12 Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2042-2047
- 13 Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 2004;444:3-12
- 14 Jepsen P, Vilstrup H, Møllemlær L, Thulstrup AM, Olsen JH, Baron JA, Sørensen HT. Prognosis of patients with a diagnosis of fatty liver—a registry-based cohort study. *Hepatogastroenterology* 2003;50:2101-2104
- 15 Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998;136:17-24
- 16 Schwimmer JB, Deutsch R, Rauch JB, Behling C, Newbury R, Lavine JE. Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2003;143:500-505
- 17 Tagle Arrospide M. Non-alcoholic fatty liver. *Rev Gastroenterol Peru* 2003;23:49-57
- 18 Larrey D. From hepatic steatosis due to obesity to cirrhosis, in the absence of alcoholic intoxication. *Presse Med* 2003;32:512-518
- 19 Aguila MB, Pinheiro Ada R, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003;23:363-370
- 20 韩萍, 成军, 李莉. 非酒精性脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1038-1040
- 21 董菁, 成军. 脂肪肝形成分子机制的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1035-1037