

二甲双胍对实验性大鼠脂肪肝的治疗作用

李岩, 阚志超, 商国强, 邵宏

李岩, 阚志超, 天津市第三中心医院肝内科 天津市 300170
商国强, 天津市第三中心医院病理科 天津市 300170
邵宏, 天津市第三中心医院急诊科 天津市 300170
李岩, 男, 1973-01-09 生, 天津市人, 汉族, 1996 年天津医科大学临床医学本科毕业, 现为天津医科大学 2002 级消化内科研究生, 主要从事肝病方面研究。
通讯作者: 阚志超, 300170, 天津市第三中心医院肝内科。
li_yan629@yahoo.com.cn
电话: 022-84112181
收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-06

Therapeutic effects of metformin on rats with fatty liver

Yan Li, Zhi-Chao Kan, Guo-Qiang Shang, Hong Shao

Yan Li, Zhi-Chao Kan, Department of Gastroenterology, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China
Guo-Qiang Shang, Department of Pathology, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China
Hong Shao, Department of Emergency Management, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China
Correspondence to: Zhi-Chao Kan, Department of Gastroenterology, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China. li_yan629@yahoo.com.cn
Received: 2005-04-26 Accepted: 2005-05-06

Abstract

AIM: To investigate the changes of the liver function, histology, fatty metabolism and contents of insulin and leptin after treated with metformin in rats with fatty liver.

METHODS: Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into three groups: control group ($n = 10$), model group ($n = 11$) and metformin group ($n = 11$). During the whole experiment, the rats in control group were fed with normal food, and the rats in the other two groups were fed with a high caloric laboratory chow. Then the rats in the metformin group were given metformin 170 mg/(kg·qd) while the ones in the other groups were given distilled water of the same volume by stomach irrigation for eight weeks. Then all the animals were sacrificed. Liver index (liver/body weight ratio), Activities of serum liver-associated enzymes, blood lipids, free fatty acids (FFA), leptin, fasting blood glucose (FBG), fasting plasma insulin (FPI), HOMA insulin resistance index (HOMA-IR), liver triglycerides, liver cholesterol, liver tissue malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and the liver histology of rats in all the groups were detected and analyzed.

RESULTS: Significant insulin resistance, disorder of fatty

metabolism and liver function and increased expression of leptin were detected in rats of model group. FBG and FPI showed an increasing tendency, but there was no significant difference among the three groups. The liver histology in the model group showed moderate to severe steatosis. After treated with metformin, the levels of serum ALT ($1\ 184.40 \pm 244.38$ vs 819.83 ± 143.86 nkat/L, $P < 0.05$), AST ($3\ 802.76 \pm 1\ 532.81$ vs $2\ 959.26 \pm 540.44$ nkat/L, $P < 0.05$), TG (2.28 ± 0.50 vs 1.17 ± 0.36 mmol/L, $P < 0.05$) were decreased significantly. HOMA-IR (15.20 ± 7.96 vs 13.10 ± 5.22 , $P < 0.05$) in the metformin group were significantly lower, and the levels of serum leptin (2.47 ± 0.21 vs 2.19 ± 0.20 μ g/L, $P < 0.05$) decreased markedly. The liver histology in the metformin group was improved significantly.

CONCLUSION: Metformin is effective in the treatment of rats with fatty liver induced by high fat feeding.

Key Words: Metformin; Rat; Leptin; Fatty liver; Insulin resistance

Li Y, Kan ZC, Shang GQ, Shao H. Therapeutic effects of metformin on rats with fatty liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1102-1105

摘要

目的: 观察二甲双胍治疗脂肪肝大鼠在生化、病理、脂肪代谢、胰岛素及瘦素各方面指标的变化。

方法: 雄性 Wistar 大鼠 32 只, 按体重层次随机分为 3 组, 对照组(A)10 只、模型组(B)11 只、二甲双胍组(C)11 只, 对照组饲以普通鼠饲料, 其余两组均饲以高脂饲料。饲养 8 wk 后病理证实脂肪肝已形成。随后进行灌胃治疗, C 组 170 mg/(kg·d) 每天 1 次 5 mL 灌胃, A 组及 B 组大鼠灌服等量蒸馏水, 各组按原饲料进行饲养。8 wk 后, 全部处死, 取血及肝组织, 测定血中 ALT、AST、TG、CHO、INS、FBS、FFA、Leptin。肝组织匀浆测定肝组织 TC、TG、SOD、MDA。观察肝脏组织学变化。

结果: 脂肪肝大鼠存在明显脂肪代谢紊乱, 肝功能异常, 胰岛素抵抗及 leptin 表达增高; 二甲双胍能显著改善肝功能, ALT($1\ 184.40 \pm 244.38$ vs 819.83 ± 143.86 nkat/L, $P < 0.05$), AST($3\ 802.76 \pm 1\ 532.81$ vs $2\ 959.26 \pm 540.44$ nkat/L, $P < 0.05$)、降低血甘油三酯(2.28 ± 0.50 vs 1.17 ± 0.36 mmol/L, $P < 0.05$), 降低 leptin 高表达(2.47 ± 0.21 vs 2.19 ± 0.20 μ g/L, $P < 0.05$)、改善胰岛素抵抗($15.20 \pm$

7.96 vs 13.10 ± 5.22, $P < 0.05$), 并改善肝组织学。

结论: 二甲双胍对实验性大鼠脂肪肝有一定治疗效果。

关键词: 二甲双胍; 大鼠; 脂肪肝; 胰岛素抵抗; 瘦素

李岩, 阎志超, 高国强, 邵宏. 二甲双胍对实验性大鼠脂肪肝的治疗作用. 世界华人消化杂志. 2005;13(9):1102-1105
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1102.asp

0 引言

非酒精性脂肪肝 (NAFLD), 是一种肝组织学改变与酒精性肝病相类似, 但无过量饮酒史的临床病理综合征。NAFLD 主要与肥胖、糖尿病及高脂血症有关, 提示脂肪肝与代谢综合征密切相关^[1]。Sanyal 和 Marchesini *et al*^[2-3] 用高胰岛素正常葡萄糖钳夹实验研究显示, NAFLD 存在胰岛素抵抗, 瘦素和胰岛素之间相互作用, 出现高瘦素、高胰岛素水平, 从而诱发胰岛素抵抗。瘦素还通过促进胰岛素抵抗改变肝细胞的胰岛素信号, 增加肝细胞内脂肪酸含量, 在脂肪肝发病中起到重要作用^[4]。国内外均有使用二甲双胍治疗脂肪肝的报道^[5-6], 我们进一步研究二甲双胍在实验性脂肪肝大鼠中对胰岛素抵抗、脂质过氧化及瘦素方面的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 Wistar 大鼠 32 只, 体重 245-340 g, 平均 279.65 ± 16.44 g。由天津军事医学研究所实验动物中心提供。胆固醇购自北京鼎国生物技术发展公司; 猪油为市售; FFA、MDA、SOD 测试试剂盒: 南京建成生物工程公司; ALT、AST 试剂盒: 上海荣盛生物有限公司; Leptin、INS 试剂盒: 北京北方生物技术研究; 盐酸二甲双胍: 上海施贵宝公司生产。研成粉末, 双蒸水溶解配成 17.0 g/L 混悬液, 其余试剂均为分析纯品。甘油三酯测试试剂盒: 南京建成生物工程公司; 胆固醇测试试剂盒: 南京建成生物工程公司。分光光度计 (BioPhotometer) - 德国 Eppendorf 公司; Sigma 冷冻离心机 - 德国 Sigma 公司; -80℃ 超低温冰箱 - 美国 Forma 公司; 120 型全自动生化分析仪 - 日本东芝公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型建立 32 只大鼠在动物房内适应性喂养 1 wk 后, 随机分为两组: 模型组 22 只, 正常对照组 (A) 10 只。模型组饲以高脂饲料, 高脂饲料配方为: 普通饲料 + 1% 胆固醇 + 14% 猪油 (质量比), 由天津市华容实验动物中心饲料厂配制; 正常对照组饲以普通饲料, 实验动物自由饮水和进食。8 wk 后随机抽取模型组中 2 只大鼠脱颈处死, 病理证实脂肪肝已形成。再将模型组 20 只大鼠按体重层次随机分为 2 组: 模型对照组 (B): 10 只; 二甲双胍组 (C): 10 只。二甲双胍

组给 170 mg/(kg · d) (按成人剂量 1.5 g/d 折算) 溶于 5 mL 蒸馏水中灌胃; 正常对照组、模型对照组给以同量蒸馏水灌胃, 各组按原饲料进行饲养。8 wk 后, 称重, 全部脱颈处死, 处死前夜禁食水, 取血及肝组织待测。

1.2.2 观察指标及检测方法 (1) 观察大鼠食欲、体重、毛发、状态及死亡情况。实验结束测体重及肝重。(2) 血清指标测定: 测定丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、甘油三酯 (TG)、胆固醇 (CHO)、空腹血糖 (FBS)、游离脂肪酸 (FFA); 放免法测定空腹胰岛素 (FINS)、瘦素 (leptin)。胰岛素抵抗指数计算: 胰岛素抵抗指数 (HOME-IR) = (FBS × FINS) / 22.5^[7]。(3) 肝组织匀浆的制备及保存: 自肝右叶取新鲜肝组织 0.15 g 在 4℃ 下制成 10% 的肝匀浆, 12 000 g 离心 15 min 后取上清保存于 -20℃, 以备测肝丙二醇 (MDA), 超氧化物歧化酶 (SOD)。再取新鲜肝组织 0.1 g 用氯仿: 甲醇 (1:1, V/V) 混合液在 4℃ 下制成 100 g/L 的肝匀浆, 静置抽提 48 h, 12 000 g, 离心 15 min, 然后取上清液可溶部分用酶法测定肝组织胆固醇, 甘油三酯。

1.2.3 组织病理学标本的制备 取肝左叶用 40 g/L 甲醛溶液固定, 石蜡包埋, HE 染色, 光镜下观察组织学改变。

统计学处理 数据采用均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示, 使用 SPSS11.5 进行单因素方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 一般情况 实验中, 高脂饮食大鼠较 A 组体重增加迅速, 且皮毛发黄, 蓬乱不顺滑。与 A 组相比, B 组、C 组大鼠体重明显高于 A 组 ($P < 0.05$)。C 组大鼠较 B 组体重有所减轻, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。A 组与 C 组肝指数 (肝重 / 体重 × 100%) 均小于模型对照组, 差别均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

表1 脂肪肝大鼠体重及肝指数的变化

组别	n(只)	体重(g)	肝指数
正常对照组(A):	10	309.97 ± 19.70	3.76 ± 0.39
模型对照组(B):	10	372.07 ± 23.01 ^a	4.12 ± 0.30 ^a
二甲双胍组(C):	10	359.09 ± 36.27 ^a	3.76 ± 0.14 ^c

^a $P < 0.05$ vs A 组; ^c $P < 0.05$ vs B 组。

2.2 各组转氨酶结果 A 组、C 组 ALT、AST 值均低于 B 组 ($P < 0.05$), 提示 B 组大鼠出现脂肪性肝炎, 使用二甲双胍能降低 ALT、AST, 有统计学意义 ($P < 0.05$), B 组、C 组 CHO 含量均较 A 组高 ($P < 0.05$), C 组 CHO 含量较 B 组偏低, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。B 组 TG 含量高于其他两组 ($P < 0.05$)。B 组 FFA 含量高于其他两组 ($P < 0.05$), 治疗后 C 组 FFA 含量虽较 B 组明

表2 脂肪肝大鼠转氨酶、FFA及血脂的变化

组别	n	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)	CHO(mmol/L)	TG(mmol/L)	FFA(mmol/L)
正常对照组(A)	10	683.47 ± 83.52	2 775.39 ± 419.92	1.78 ± 0.16	1.27 ± 0.34	306.65 ± 34.62
模型对照组(B)	10	1 184.40 ± 244.38 ^a	3 802.76 ± 1532.81 ^a	2.26 ± 0.33 ^a	2.28 ± 0.50 ^a	567.73 ± 25.41 ^a
二甲双胍组(C)	10	819.83 ± 143.86 ^c	2 959.26 ± 540.44 ^a	2.20 ± 0.26 ^a	1.17 ± 0.36 ^c	401.85 ± 22.13 ^c

^a*P*<0.05 vs A组; ^c*P*<0.05 vs B组.

表3 脂肪肝大鼠肝脂的变化

组别	n	TC(mg/dl)	TG(mg/dl)	MDA(nmol/mgprot)	SOD(nmol/mgprot)
正常对照组(A)	10	35.59 ± 3.66	54.44 ± 10.27	2.79 ± 0.13	78.65 ± 3.49
模型对照组(B)	10	96.91 ± 7.85 ^a	96.26 ± 12.20 ^a	3.85 ± 0.20 ^a	36.84 ± 3.94 ^a
二甲双胍组(C)	10	90.03 ± 4.55 ^{ac}	70.90 ± 19.06 ^{ac}	3.39 ± 0.12 ^{ac}	78.34 ± 3.30 ^c

^a*P*<0.05 vs A组; ^c*P*<0.05 vs B组.

显下降,但与A组相比仍明显升高(表2).

2.3 各组肝脂、肝组织中MDA和SOD结果 TC、TG含量顺序为B组>C组>A组,且均有统计学意义(*P*<0.05). MDA含量B组>C组>A组,且均有统计学意义(*P*<0.05). 而B组SOD活力较另外两组降低,差别有统计学意义(*P*<0.05,表3).

2.4 血糖、胰岛素、胰岛素抵抗指数及瘦素 空腹血糖各组之间无显著性差异,但B组最高,然后依次是C组及A组.各组的胰岛素水平结果与血糖结果类似.但使用胰岛素抵抗指数计算后发现,B组高于A组,且有显著性差异(*P*<0.05),C组胰岛素抵抗指数低于B组高于A组,但无统计学意义.血清瘦素结果B组>C组>A组,且有显著性差异(*P*<0.05,表4).

表4 脂肪肝大鼠FBS、FINS、INS抵抗指数及瘦素的变化

组别	n	FBS(mmol/L)	INS(μu/L)	INS抵抗指数	瘦素(μg/L)
正常对照组(A)	10	6.66 ± 1.58	31.13 ± 8.57	8.89 ± 2.04	1.79 ± 0.23
模型对照组(B)	10	8.39 ± 2.38	39.30 ± 11.93	15.20 ± 7.96 ^a	2.47 ± 0.21 ^a
二甲双胍组(C)	10	7.90 ± 2.55	36.75 ± 11.12	13.10 ± 5.22	2.19 ± 0.20 ^{ac}

^a*P*<0.05 vs A组; ^c*P*<0.05 vs B组.

2.5 病理学变化 A组和C组的大鼠肝脏肉眼观察呈鲜红色,边缘锐利,表面光滑. B组的大鼠肝脏体积增大,边缘变钝,颜色呈黄褐色,可见表面白色斑点,切面油腻感. A组大鼠肝小叶完整,肝细胞呈多边形,围绕中央静脉呈放射状,偶见肝细胞脂肪变性,未见炎性细胞浸润. 肝窦清晰可见,肝索排列整齐,肝小叶汇管区基本结构包括小叶间胆管、小叶间动脉、小叶间静脉清晰可见(图1A). B组大鼠肝细胞弥漫性脂肪变性,肝细胞轻度肿胀. 汇管区、小叶内有炎细胞浸润,炎症细胞以单核细胞、淋巴细胞为主. 部分出现点状坏死、灶性坏死,未见纤维化(图1B). C组肝细胞趋于正常,仅见少量局灶性轻度肝细胞脂肪变性,未见炎性细胞浸润及纤维化(图1C).

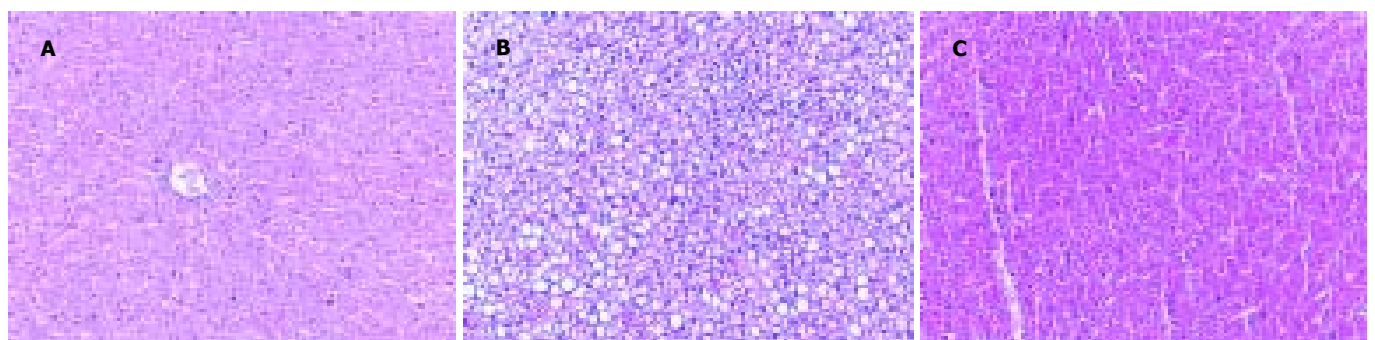


图1 实验大鼠肝组织病理变化, ×100. A: 正常对照组; B: 模型组; C: 二甲双胍组.

3 讨论

瘦素(leptin)是由Ob基因编码,脂肪组织分泌的肽类激素.1998年由Potter *et al*^[8]在活化的肝星状细胞中发现leptin的mRNA和蛋白.瘦素的主要作用是调节机体脂肪的稳定,还可以调节胰岛素、肾上腺素、生长激素、甲状腺素的分泌,促进生殖、造血、免疫及血管增生,并且具有排钠利尿作用^[9].Tobe *et al*^[10]在研究血浆leptin水平与脂肪肝关系实验中发现,脂肪肝患者血浆leptin水平明显高于对照组,而且与转氨酶的升高平行.

我们通过高脂饮食成功复制出大鼠脂肪肝模型,模型组动物转氨酶水平、血脂、肝脂、胰岛素抵抗指数、血清MDA、leptin均明显升高.这与国内外文献报道相一致.血糖及胰岛素水平未见明显差别可能与喂养时间较短有关.

二甲双胍是双胍类降糖药物,通过改善胰岛素敏感程度,促进外周组织摄取葡萄糖而起到降糖作用.本实验中脂肪肝大鼠模型,虽然血糖及胰岛素水平升高,但无显著性差异.经过计算胰岛素抵抗指数较正常组明显升高且有统计学意义,提示其已存在胰岛素抵抗.通过二甲双胍治疗,转氨酶下降,血脂、肝脂、胰岛素抵抗指数下降,与治疗前有明显差异,肝组织学基本恢复正常,提示二甲双胍对实验性大鼠脂肪肝有效.而血清胆固醇无明显下降可能与用药时间较短有关.治疗后,大鼠肝组织MDA下降,SOD升高($P<0.05$),提示肝内脂质过氧化程度减轻,抗氧化物质增多.

近年来研究表明,与脂肪肝发病及胰岛素抵抗密切相关.肥胖时,leptin水平升高,有效生物学作用明显下降,胰岛素水平亦明显升高,出现胰岛素抵抗.leptin抵抗可能参与了肝脏脂肪变性的形成^[11-12].我们发现模型组动物体重增加,leptin明显升高,提示有leptin抵抗.Kieffer *et al*^[13]通过突变鼠体外培养胰岛 β 细胞试验,发现了leptin对突变鼠胰岛 β 细胞的胰岛素抑制不足,可导致高胰岛素血症、胰岛素抵抗.Seufert *et al*^[14]认为在脂肪组织与胰岛之间可能存在“脂肪—胰岛内分泌轴”,脂肪组织与胰岛之间通过瘦素与胰岛素形成一个双向反馈环.但在病理状态下,胰岛素对leptin的敏感性下降,由于leptin和胰岛素之间相互作用,出现高leptin、高

胰岛素水平.与肥胖有关的高循环leptin水平可能是通过两个步骤引起肝脏脂肪变性:(1)促进胰岛素抵抗,提高胰岛素水平;(2)改变肝细胞的胰岛素信号,增加肝细胞内脂肪酸含量^[4].经过二甲双胍治疗后,leptin降低,其机理可能与胰岛素抵抗改善、血脂降低等多方面因素有关.但二甲双胍治疗与leptin之间的具体关系尚需要进一步研究.

4 参考文献

- 1 Cortez-Pinto H, Camilo ME, Baptista A, De Oliveira AG, De Moura MC. Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 1999;18:353-358
- 2 Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterlin RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steato hepatitis: Association of Insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192
- 3 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tommasetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850
- 4 Kaplan LM. Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterology* 1998;115:997-1001
- 5 Nair S, Diehi AM, Wiseman M, Farr GH Jr, Perrillo RP. Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:23-28
- 6 高志强, 陆付耳, 董慧, 徐丽君, 王开富, 邹欣. 二甲双胍干预高脂饲养所致大鼠脂肪肝的研究. *中华肝脏病杂志* 2005;13:101-104
- 7 Kanauchi M. A new index of insulin sensitivity obtained from the oral glucose tolerance test applicable to advanced type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1891-1892
- 8 Potter JJ, Womak L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:178-182
- 9 Collins S, Kuhn CM, Petro AE, Swick AG, Chrnyk BA, Surwit RS. Role of leptin in fat regulation. *Nature* 1996;380:677
- 10 Tobe K, Ogura T, Tsukamoto C, Imai A, Matsuura K, Iwasaki Y, Shimomura H, Higashi T, Tsuji T. Relationship between serum leptin and fatty liver in Japanese male adolescent university students. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3328-3335
- 11 Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity. *Hepatology* 2002;36:403-409
- 12 Campillo B, Sherman E, Richardet JP, Bories PN. Serum leptin levels in alcoholic liver cirrhosis: relationship with gender, nutritional status, liver function and energy metabolism. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:980-988
- 13 Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG, Habener JF. Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic β cells. *Diabetes* 1997;46:1087-1093
- 14 Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: Implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:670