

较少受到肿瘤分泌的可溶性因子的影响，可以诱发出有效的抗肿瘤免疫反应。

4 参考文献

- 1 Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1755-1766
- 2 Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int J Cancer* 1997;70:706-715
- 3 Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:1096-1103
- 4 朱学军, 曹雪涛, 于益芝, 陈国友, 万涛, 马施华, 唐华, 章卫平. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定. 中国肿瘤生物治疗杂志 1997;4:302-306
- 5 李明松, 袁爱力, 张万岱, 刘思德, 吕爱民, 周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫. 世界华人消化杂志 1999;7:161-163
- 6 Ahmad M, Rees RC, Ali SA. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:844-854
- 7 Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2003;15:138-147
- 8 Espinoza-Delgado I. Cancer vaccines. *Oncologist* 2002;7(Suppl 3):20-33
- 9 Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Knop J, Schuler G, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induced a melanoma-antigen-specific anergy in CD8+T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999;93:1634-1642

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

不同剂量二甲双胍对肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病大鼠的防治作用

吴贵恺, 杨秋香, 李玉林, 荣绍元, 司艳菱, 刘信荣

吴贵恺, 司艳菱, 唐山市工人医院消化科 河北省唐山市 063000
 杨秋香, 唐山市协和医院 河北省唐山市 063004
 李玉林, 华北煤炭医学院附属医院消化科 河北省唐山市 063000
 荣绍元, 唐海县医院 河北省唐海县 063200
 刘信荣, 华北煤炭医学院附属医院 河北省唐山市 063000
 通讯作者: 吴贵恺, 063000, 河北省唐山市文化路27号, 河北省唐山工人医院消化科 quikaiw@163.com
 电话: 0315-3722233 传真: 0315-2814801
 收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-03-22

摘要 ■

目的: 探讨不同剂量二甲双胍对肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病的防治作用。

方法: 40只SD大鼠随机分为低剂量二甲双胍组, 中剂量二甲双胍组, 高剂量二甲双胍组, 模型组和正常组, 每组均8只。模型组和治疗组大鼠以高脂饲料喂养, 正常组大鼠以普通饲料喂养。低、中、高剂量二甲双胍治疗组大鼠高脂饮食2wk后分别以100mg/kg、200mg/kg、300mg/kg的二甲双胍每日一次灌胃治疗。模型组、正常组则给予等容积的蒸馏水每日一次灌胃。实验12wk处死各组大鼠, 测定血清转氨酶、血脂, HE染色观察肝脏病理改变。

结果: 12wk模型组大鼠血清ALT、AST、TG值明显升高, 肝脏表现为脂肪性肝炎, 治疗各组大鼠血清ALT、

TG明显下降($P<0.05$, $P<0.01$), 接近正常组水平, 肝脏表现为轻、中度脂肪肝。肝组织炎症活动计数明显下降($P<0.05$), 各治疗组之间血清ALT、AST、TG水平、肝细胞脂肪变性程度无显著差异。

结论: 二甲双胍对大鼠肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病有防治作用, 低、中、高剂量二甲双胍对非酒精性脂肪性肝病防治效果差异无显著。

吴贵恺, 杨秋香, 李玉林, 荣绍元, 司艳菱, 刘信荣. 不同剂量二甲双胍对肥胖、高脂血症非酒精性脂肪性肝病大鼠的防治作用. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1133-1135
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1133.asp>

0 引言

随着生活方式及膳食结构的改变, 非酒精性脂肪性肝病(NALFD)的发病率明显增高, 已成为全球普遍关注的医学问题和社会问题。肥胖、高脂血症性脂肪肝是临幊上最常见的非酒精性脂肪肝类型, 目前以节制饮食、增加运动和修正不良行为的减肥方法是公认NALFD有效的基础治疗方法。然而, 急剧地改变患者的饮食习惯和生活方式, 部分患者难以接受, 这就需要研究有效的药物治疗方

法,目前尚无有效的药物治疗方法。二甲双胍做为胰岛素受体增效剂用于治疗NALFD,国外已有动物实验^[1]及小样本病例报道^[2]。我们通过动物实验方法探讨二甲双胍对NALFD是否有防治作用,低、中、高剂量二甲双胍对NALFD防治作用有否差异,为二甲双胍用于人类治疗NALFD及剂量的选择提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 40只雄性SD大鼠,购自河南医科大学动物中心,体重150±10g,普通饲料喂养1wk后,随机分为5组,每组均8只。正常组普通饲料喂养;模型组,低剂量二甲双胍治疗组,中剂量二甲双胍治疗组及高剂量二甲双胍治疗组喂高脂饲料,按照我国学者范建高创立的方法,在普通饲料基础上加10%猪油,2%胆固醇3mo制备肥胖、高脂血症大鼠脂肪肝模型。实验动物自由饮水和进食,分笼饲养于20±2°C明暗各12h的动物实验室12wk。

1.2 方法 在高脂饲料喂养2wk后,低、中、高剂量组大鼠在喂高脂饲料的同时分别按100mg/(kg·d)、200mg/(kg·d)、300mg/(kg·d)(由成人剂量0.5g/d;1.0g/d;1.5g/d的10倍折算)给予二甲双胍每日一次灌胃,正常组与模型组给予等容积的蒸馏水每日一次灌胃。喂养12wk处死各组大鼠,鼠处死前,隔夜禁食,次日称量体重后,以1g/L水合氯醛麻醉,右心室取血处死,称取肝脏湿重,并从肝右叶中部切取2块肝组织,用40g/L甲醛固定后制备石蜡切片。

1.2.1 肝指数计算 处死大鼠时,称量体重,肝脏湿重,肝指数(%)=肝脏湿重/体重×100%

1.2.2 血清学指标检测 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬酸转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)。

1.2.3 病理学检查 石蜡切片HE染色观察肝脏病理学变化。按肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数之比值为0,<1/3,1/3-2/3和>2/3将肝细胞脂肪变性分为(-)-(++)4个等级,≥1/3诊断为脂肪肝。炎症活动度计分标准分为汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎屑样坏死(PN)、桥接坏死(BN)四项,每项根据病变程度分别计1-4分,因为PN、BN严重度与预后直接相关,故计分2倍于其他病变,计分公式为P+L+2PN+2BN。

表2 各组大鼠血清生化指标和肝脏炎症活动度记分结果

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	炎症活动度
正常组	8	38.50 ± 5.17	143.50 ± 21.25	0.72 ± 0.20	1.252 ± 0.18	0.53 ± 0.57
模型组	8	95.00 ± 40.50 ^b	247.76 ± 77.37	0.78 ± 0.22	2.24 ± 0.28 ^b	6.12 ± 1.35 ^b
低剂量组	8	44.40 ± 11.10 ^c	134.20 ± 30.22	0.49 ± 0.15 ^d	1.94 ± 0.32	3.23 ± 0.64 ^c
中剂量组	8	42.20 ± 10.20 ^c	143.00 ± 27.80	0.43 ± 0.17 ^d	1.71 ± 0.35	3.15 ± 0.58 ^c
高剂量组	8	41.80 ± 12.50 ^c	153.33 ± 26.70	0.50 ± 0.16 ^d	1.95 ± 0.33	3.02 ± 0.62 ^c

^bP<0.01 vs正常组, ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs模型组。

统计学处理 计量资料用均数±标准差(mean ± SD),组间比较采用单因素方差分析,等级资料采用秩和检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况 实验中5组大鼠均无死亡,模型组大鼠体重与正常组相比无显著差异,但肝指数均显著高于正常组($P<0.01$);治疗组体重低于模型组,肝指数低于模型组($P<0.05$),治疗组3组之间体重、肝指数无显著差异(表1)。

表1 各组大鼠体重和肝指数结果

组别	n	体重(g)	肝指数(%)
正常组	8	449.15 ± 26.80	2.83 ± 0.28
模型组	8	477.63 ± 48.10	5.19 ± 0.78 ^b
低剂量组	8	380.10 ± 47.20 ^a	3.28 ± 0.25 ^a
中剂量组	8	383.40 ± 46.50 ^a	3.14 ± 0.28 ^a
高剂量组	8	368.42 ± 46.70 ^a	3.47 ± 0.23 ^a

^aP<0.05 vs模型组, ^bP<0.01 vs正常组。

2.2 血清脂质变化 与正常组相比,模型组大鼠血清TC水平明显升高($P<0.05$),TC水平与正常组基本相似。与模型组相比,治疗各组血清TC无显著改变,而TC水平却显著下降($P<0.01$),各组间无明显差异(表2)。

2.3 血清转氨酶变化 模型组大鼠血清ALT、AST较正常组明显升高($P<0.01$);各治疗组大鼠血清ALT、AST显著下降($P<0.05$),接近正常组水平,治疗组各组间差异无显著性(表2)。

2.4 肝组织病理学变化 大体观察,正常组大鼠肝脏形态正常,模型组大鼠肝脏体积增大,饱满圆钝,色黄油腻,质地较脆。二甲双胍治疗3组大鼠肝脏形态均接近于正常组,肝脏体积略增大,边缘稍钝,暗红色。正常组大鼠肝组织切片HE染色未见明显异常。模型组大鼠肝组织切片可见弥漫性肝细胞脂肪变性,以大泡性脂肪变性为主,细胞核被挤到细胞周边。标本中出现小叶内炎症细胞浸润和散在的点状坏死;肝小叶内和汇管区出现以单核细胞、淋巴细胞为主的炎性细胞浸润,往往小叶内炎症较

汇管区炎症更明显，临近脂变肝细胞可见气球样变肝细胞，部分大鼠肝组织小叶内可见多个点片状坏死灶，并有1例出现碎屑样坏死，1例出现桥接坏死，2例出现脂肪囊肿，与正常组比较肝脏炎症活动度计数差异显著($P<0.01$)。各治疗组大鼠肝组织呈轻、中度肝细胞脂肪变性，无大泡性脂肪变形成，小叶内、汇管区炎症坏死减轻，未见碎屑样坏死和桥接坏死，肝脏炎症活动度计数较模型组明显下降($P<0.05$)，但组间差异无统计学意义(表2)。

3 讨论

非酒精性脂肪性肝病(NALFD)是一类肝组织学改变与酒精性肝炎类似但无过量饮酒史的临床综合征，主要包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、非酒精性脂肪性肝纤维化、非酒精性脂肪性肝硬化。统计学资料显示肥胖人群单纯性脂肪肝发病率为60%，NASH为20~25%，肝硬化为2~3%^[3]。NASH患者中肥胖者的比例高达69~100%^[4]，我们选用了高脂饲料喂养的肥胖、高脂血症脂肪肝大鼠动物模型作为研究模型，该模型与人类肥胖、高脂血症脂肪肝极为相似，故该模型适用于药物治疗的研究，其结果对人类具有指导作用。

临幊上发现节食、增加运动可提高机体组织对胰岛素的敏感性，从而改善NALFD肝功能及肝脏组织化改变，早期甚至可逆转NALFD。Day et al^[5]提出的二次打击学说被认为是NALFD统一发病机制学说，他认为胰岛素抵抗(IR)是肝脏脂肪堆积的首要原因，目前普遍认为IR和高胰岛素血症是NALFD的始动因素而非结果^[3]。2000年Lin首先报道了应用胰岛素增敏剂二甲双胍治疗具有胰岛素抵抗的遗传性瘦素缺乏的ob/ob小鼠脂肪肝获得较好的效果，Uygun和Marchesini et al^[2, 6]分别将二甲双胍应用人类NASH的治疗获得了血清转氨酶降低，肝脏缩小，肝脏脂肪变性减轻，无明显毒副作用的良好效果。目前，国内外尚无不同剂量二甲双胍对NALFD干预的研究。我们采用低、中、高三种剂量二甲双胍对高脂饲料喂养的大鼠进行干预，结果显示与模型组相比3个治疗组均获得了肝指数、血清转氨酶明显降低，各组肝脏组织学明显改善，只显示轻、中度脂肪变性，基本无脂肪大泡形成，肝小叶及汇管区炎性细胞浸润减轻的病理变化。治疗组无明显毒副作用，无1例死亡。统计学处理显示上述指标治疗组与模型组相比差异有显著性。而治疗组间各项指标差异无显著性。

众所周知，作为治疗糖尿病的二甲双胍具有抑制机体摄食能力，他对NALFD的防治作用是否简单的为抑制机体摄食作用所致？Lin的实验结果显示，每天进食同等能量的二甲双胍治疗组ob/ob小鼠与配对的对照组，只有治疗组各项指标及病理明显改善。提示二甲双胍治疗NALFD非抑制机体摄食量所致。二甲双胍主要通过以下几

个途径发挥对NALFD的防治作用：(1)通过增强外周组织对胰岛素的敏感性而增加对葡萄糖的利用，降低血糖但不增加胰岛素分泌，同时抗脂肪分解从而降低血清游离脂肪酸水平作用^[7-8]，减少肝细胞脂肪储积。(2)抑制肝细胞内TNF-α表达，从而解除TNF-α对胰岛素受体起始信号传递的抑制作用，减轻肝细胞的胰岛素抵抗，减少肝内脂肪分解及脂肪储积；(3)降低肝细胞固醇调节因子结合蛋白-1(SREBP-1)表达，从而减少脂肪酸合成酶(FAS)的激活，导致脂肪酸合成减少；(4)阻止解偶联蛋白-2(UCP-2)在肝细胞的表达，从而减轻对线粒体ATP合成酶的抑制，提高线粒体合成ATP的效率，阻止组织坏死和纤维化^[9]；(5)调节肝细胞内被认为是脂肪、糖代谢主要细胞调节因子的AMP激活酶活性，从而减少肝脏脂肪储积及炎性坏死^[10]。

二甲双胍治疗过程中最大的潜在危险是乳酸中毒，Lalau et al^[11]通过对二甲双胍治疗过程中出现乳酸中毒的病例报告进行分析，得出单纯应用二甲双胍一种药物治疗不出现乳酸中毒的结论。Marchesini和Uygun et al应用二甲双胍治疗人类NALFD 4 mo共54例，均未出现乳酸中毒，只有胃肠道反应。可见应用二甲双胍治疗NALFD是比较安全的。我们的实验结果提示：小剂量二甲双胍治疗NALFD，仍可起到较好的治疗效果，且可减少二甲双胍的副作用，值得在人类NALFD中进一步观察、应用。

4 参考文献

- Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 2000;6:998-1003
- Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, Ozgurtas T, Deveci S, Tuzun A, Yesilova Z, Gulsen M, Dagalp K. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:537-544
- 范建高, 丁晓东, 曾悦. 非酒精性脂肪性肝炎:美国肝脏病学会专题研讨会纪要. 肝脏 2003;8:59-61
- Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohol like liver disease in nonalcoholics: A clinical and histologic comparison with alcohol induced liver injury. *Gastroenterology* 1988;95:1056-1062
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001;358:893-894
- Hundal RS, Inzucchi SE. Metformin: new understandings, new uses. *Drugs* 2003;63:1879-1894
- Kirpichnikov D, Mcfarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med* 2002;137:25-33
- Ricquier D. Neonatal brown adipose tissue. UCP-1 and the novel uncoupling protein. *Biochem Soc Trans* 1998;26:120-123
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doepper T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001;108:1167-1174
- Lalau JD, Race JM. Lactic acidosis in metformin therapy: searching for a link with metformin in reports of metformin-associated lactic acidosis. *Diabetes Obes Metab* 2001;3:195-201