

宫内缺氧对子代大鼠脂肪肝发病的影响

苏瑞娟, 吕国荣, 王振华, 李伯义, 刘彦英, 何韶铮, 金鹏

■背景资料

流行病学调查发现, 出生时状况不良与个体晚年多种代谢性疾病的发病有关, 故提出假说认为先天性宫内状况不良可能导致基因突变, 从而引发个体晚年多种疾病的发生, 其中包括糖尿病、动脉粥样硬化等。

苏瑞娟, 吕国荣, 王振华, 李伯义, 刘彦英, 何韶铮, 金鹏, 福建医科大学第二附属医院超声科 福建省泉州市
福建省自然科学基金资助课题, No. C0540002
通讯作者: 吕国荣, 362000, 福建省泉州市, 福建医科大学附属第二医院超声科, sulon1015@yahoo.com.cn
电话: 0595-22525702
收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-13

Influence of intrauterine hypoxia on pathogenesis of fatty liver in offspring rats

Rui-Juan Su, Guo-Rong Lv, Zhen-Hua Wang, Bo-Yi Li, Yan-Ying Liu, Shao-Zheng He, Peng Jin

Rui-Juan Su, Guo-Rong Lv, Zhen-Hua Wang, Bo-Yi Li, Yan-Ying Liu, Shao-Zheng He, Peng Jin, Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 36200, Fujian Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. C0540002
Correspondence to: Guo-Rong Lv, Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 36200, Fujian Province, China. sulon1015@yahoo.com.cn
Received: 2006-02-06 Accepted: 2006-02-13

Abstract

AIM: To study the roles of simple fetal hypoxia, or combined with high-fat diet and the second hypoxia, in adiposis hepatica of offspring rats.

METHODS: Rat intrauterine hypoxia models were established, and then their offspring were exposed to high-fat diet or/and second hypoxia. The histogram of hepatic ultrasound was measured by B-ultrasound examination. Pathological observation was performed by HE staining for calculating the number of fatty degenerative hepatic cells in the offspring rat with CMIAS system.

RESULTS: The number of the fatty degenerative cells in liver tissues was significantly different between the intrauterine hypoxia group and controls, the high-fat diet group and controls, as well as between the second hypoxia group and controls ($F = 13.348, 45.45, 18.541$, respectively; all $P < 0.05$). Moreover, there was an interactive effect between intrauterine hypoxia and high-fat

diet, or intrauterine hypoxia and high-fat diet (F values for the number of the fatty degenerative cells were 5.723 and 5.933, respectively, both $P < 0.05$). In addition, a positive correlation ($r = 0.810$, $P < 0.05$) was observed between the number of fatty degenerative cells in the offspring liver tissues and the B-ultrasound gray scale value.

CONCLUSION: Intrauterine hypoxia may increase the risk of fatty liver in the offspring of rats exposed to long-term high-fat diet.

Key Words: Intrauterine hypoxia; Fatty liver; Ultrasound histogram

Su RJ, Lv GR, Wang ZH, Li BY, Liu YY, He SZ, Jin P. Influence of intrauterine hypoxia on pathogenesis of fatty liver in offspring rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(11):1048-1051

摘要

目的: 探讨宫内缺氧及出生后联合高脂饮食和追加缺氧对子代大鼠脂肪肝发病的影响。

方法: 建立大鼠宫内缺氧模型, 并对子代大鼠施加高脂饮食和追加缺氧干预, 测量子代大鼠肝脏超声灰阶值, 处死后取肝脏组织, 行常规HE染色, 用CMIAS多功能真彩色病理图像分析系统行半自动定量分析肝脏脂肪变性细胞数目。

结果: 宫内缺氧、高脂饮食和追加缺氧的主效应(在脂肪变性细胞数 F 值分别为: 13.348, 45.45, 18.541; 均 $P < 0.05$) 在脂肪肝发病中均有促进作用; 在脂肪肝的发病中, 宫内缺氧与高脂饮食、高脂饮食与追加缺氧间的交互作用(在脂肪变性细胞数 F 值分别为: 5.723, 5.933; 均 $P < 0.05$) 存在; 超声灰阶均值与脂肪变性细胞数间呈正相关($r = 0.810$, $P < 0.05$)。

结论: 宫内缺氧可增加子代大鼠对高脂饮食所致的脂肪肝的敏感性。

关键词: 宫内缺氧; 脂肪肝; 超声直方图

苏瑞娟, 吕国荣, 王振华, 李伯义, 刘彦英, 何韶铮, 金鹏. 宫

内缺氧对子代大鼠脂肪肝发病的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1048-1051

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1048.asp>

0 引言

成人慢性疾病, 包括心血管疾病、代谢性疾病等的发生, 与胎儿时期在子宫内营养缺乏、缺氧、胎盘功能不良等因素密切相关, 流行病学调查亦显示出二者间较高的相关性^[1-3], 基于此, Barker *et al*提出了胎儿期宫内不良环境可引起成人慢性疾病的假说^[3]. 脂肪肝作为代谢性疾病的一种, 正日益引起重视, 有研究表明, 肝脏脂肪堆积和胰岛素抵抗在非酒精性脂肪肝的发病中占有重要地位, Samuel *et al*^[4]发现, 高脂饮食引起的脂肪堆积可致胰岛素抵抗的发生, 从而引起脂肪肝的发生. 鉴于上述研究结果, 我们建立大鼠宫内缺氧模型, 并给予高脂饮食及追加缺氧作为暴露因素, 旨在从动物实验的角度探讨Barker假说, 并考察宫内缺氧在非酒精性脂肪肝发病中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 孕龄7 d的SD大鼠20只(大鼠年龄10月龄, 体质量300-350 g), 75 cm×65 cm×35 cm的缺氧箱一个, S-450型氧气检测报警仪一台(IST-AIM公司生产). 压缩氧气(浓度>990 mL/L), 压缩氮气(浓度>990 mL/L)(由泉州制氧厂提供), 碱石灰. 高脂饲料(成分: 基础饲料92.3 g/kg, 胆固醇2 g/kg, 猪油5 g/kg, 胆酸钠0.5 g/kg, 丙基硫氧嘧啶0.2 g/kg). AlokaSSD-1700彩色超声诊断仪. 3.5 MHz探头. 100 g/L Na₂S溶液.

1.2 方法 孕龄7 d的SD大鼠置入缺氧箱中, 箱内氧气浓度控制在100±10 mL/L之间, 每日缺氧8 h, 孕15 d后改为每日缺氧4 h, 直至分娩. 同时将相同孕龄SD大鼠20只作为对照组, 置入相同玻璃箱, 持续通入空气, 时间同缺氧组. 将出生子鼠按三因素两水平析因设计、完全随机原则分为8组(表1): 正常对照组, 宫内缺氧组, 高脂饮食组, 追加缺氧组, 宫内缺氧+高脂饮食组, 宫内缺氧+追加缺氧组, 宫内缺氧+高脂饮食+追加缺氧组, 高脂饮食+追加缺氧组, 每组6只(雌雄各3只). 普通饮食喂养子代大鼠至12月龄, 按实验设计给予高脂饲料喂养至15月龄; 12月龄子代大鼠给予追加缺氧, 方法同前, 每日缺氧8 h, 共4 wk.

将子代大鼠用100 g/L Na₂S溶液脱毛后,

表 1 三因素两水平实验设计表(只)

		追加缺氧 ¹	
		+	-
宫内缺氧	高脂饮食	6	6
	普通饮食	6	6
无宫内缺氧	高脂饮食	6	6
	普通饮食	6	6

¹+: 追加缺氧; -: 无追加缺氧.

AlokaSSD-1700彩色超声诊断仪, 探头频率3.5 MHz, 沿右肋缘下行肝脏扫查, 固定增益条件(G80, R10)和放大倍数取右肾刚刚消失、肝裂出现断面冻结, 调出HIST-B功能中自动取样测量菜单, 取样面积固定为0.5 cm×0.5 cm, 于距皮肤约0.8 cm处, 肝裂上、下、旁分别取样, 记录三处的灰阶平均值. 然后将上述子代大鼠处死, 取肝脏的检测部位组织, 常规固定、包埋制片及HE染色, 使用CMIAS多功能真彩色病理图像分析系统(半自动定量分析)计算鼠肝组织单位视野(系统统一设定)下脂肪变性细胞数目.

统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件包对数据进行分析, 用完全随机分组三因素两水平析因设计, 并对各因素的主效应及交互作用行方差分析, 采用线性相关分析超声灰阶均值与脂肪变性细胞数之间的关系. $P<0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 肝组织学表现 常规HE染色, 空白对照组肝小叶轮廓清晰, 肝细胞排列整齐, 胞质丰富、均匀淡染, 肝小叶单位(CMIAS病理图像分析系统统一设定)视野内未见明显脂肪变性细胞(图1A); 单纯宫内缺氧组可见散在脂肪变性细胞, 固定单位视野内一般小于10个(图1B), 且程度较轻. 宫内缺氧+高脂饮食组肝细胞体积变大, 胞质空泡状(脂滴被溶解), 胞核受挤压偏向一侧(图1C); 宫内缺氧+高脂饮食+追加缺氧组病变严重, 一肝小叶内几乎所有肝细胞均受累(图1D). 单纯追加缺氧组脂肪变性不明显, 余组肝脏细胞脂肪变性程度介于上述病变程度之间.

2.2 肝脏脂肪变性细胞计数统计分析结果 宫内缺氧与无宫内缺氧之间、高脂饮食与无高脂饮食之间、追加缺氧与无追加缺氧之间, 子代大鼠肝组织脂肪变性细胞数均有显著差异(图2); 宫内缺氧与高脂饮食之间、高脂饮食与追加缺氧之间、追加缺氧与宫内缺氧之间存在交互作用, 宫内缺氧与追加缺氧之间,

■创新盘点

本实验建立哺乳动物SD大鼠的宫内缺氧模型, 并将子鼠喂养至中老年, 同时暴露于相关危险因素[高脂饮食和(或)追加缺氧], 观察宫内缺氧对脂类代谢病之一——脂肪肝的影响.

■应用要点

探讨宫内缺氧对成年个体脂肪肝发病的影响,为脂肪肝发病机制的研究提供新的方向,并可为重新认识宫内缺氧的危害提供依据,提高对胎儿宫内缺氧的重视,通过改善宫内氧供避免或降低宫内缺氧对个体的不良影响。

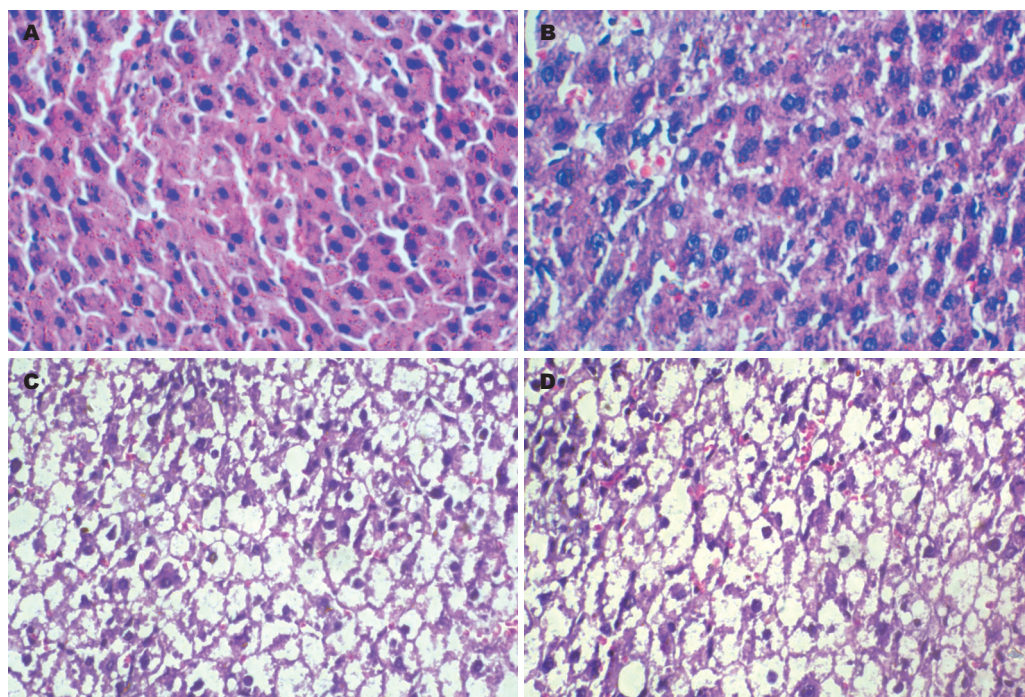


图1 大鼠肝脏组织切片 (HE × 400). A: 单纯无宫内缺氧组; B: 单纯宫内缺氧组; C: 宫内缺氧+高脂饮食组; D: 宫内缺氧+高脂饮食+再缺氧组。

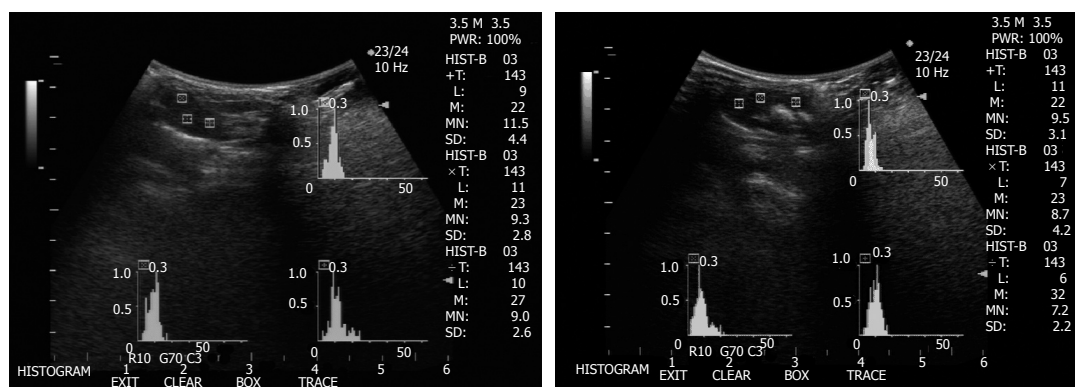


图2 子代大鼠肝脏直方图的测量。

宫内缺氧、高脂饮食及追加缺氧三者之间尚不能认为有交互作用(表2)。

2.3 不同干预因素下子代大鼠肝脏灰阶均值统计分析结果 宫内缺氧与无宫内缺氧之间、高脂饮食与无高脂饮食之间,子代大鼠肝脏灰阶均值均有显著差异(图2); 宫内缺氧与高脂饮食之间、高脂饮食与追加缺氧之间存在交互作用; 宫内缺氧与追加缺氧之间, 宫内缺氧、高脂饮食及追加缺氧三者之间尚不能认为有交互作用(表2)。超声灰阶均值与子代大鼠肝脏脂肪变性细胞数间呈正相关($r = 0.810, P < 0.01$, 图3)。

3 讨论

流行病学调查表明^[1-3], 宫内供氧状况不佳的低

体重儿或头身比例失衡(瘦或矮)新生儿与多种成人慢性疾病的发病间存在相关性, 如冠心病、糖尿病、高脂血症等。本实验中, 我们通过组织病理学、半自动细胞计数、超声灰阶均值等三个角度观察到, 宫内缺氧组子代大鼠肝脏中脂肪变性细胞数目多于同条件下的非宫内缺氧组, 其差异有统计学意义($F = 13.348, P < 0.05$)。可能原因是宫内缺氧引起某些基因表达的改变, 这一过程由低氧诱导因子-1(HIF-1)介导^[5], HIF-1的目的基因主要包括调节能量代谢、血管增生等功能的相关基因, 这些基因受损后可致能量代谢功能异常, 如胰岛素抵抗等, 而胰岛素抵抗正是非酒精性脂肪肝发生的重要因素之一^[6]。据文献报道, 高脂饮食可引起肝脏脂肪

表 2 各组子代大鼠肝脏脂肪变性细胞数目及灰阶均值

干预因素	肝脏脂肪变性细胞数		肝脏灰阶均值	
	F值	P值	F值	P值
宫内缺氧	13.348	<0.05	25.081	<0.05
追加缺氧	18.541	<0.05	3.813	>0.05
高脂饮食	45.45	<0.05	39.586	<0.05
宫内缺氧+高脂饮食	5.723	<0.05	5.272	<0.05
宫内缺氧+追加缺氧	1.591	>0.05	0.055	>0.05
高脂饮食+追加缺氧	5.933	<0.05	7.752	<0.05
宫内缺氧+高脂饮食+追加缺氧	6.884	>0.05	1.297	>0.05

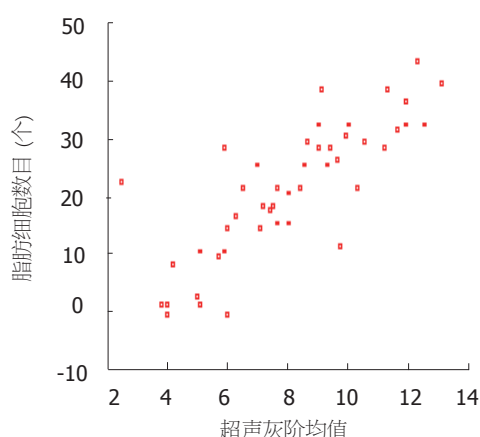


图 3 超声直方图均值与脂肪变性细胞数呈正相关。

堆积, 这种堆积削弱胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)和胰岛素受体底物-2(IRS-2)的酪氨酸磷酸化作用, 从而抑制胰岛素的活性, 这一过程与PKC- ϵ 和JNK-1活性受抑有关^[3]。此二者可影响IRS-1及IRS-2酪氨酸磷酸化过程并减弱胰岛素促进肝糖原合酶, 将血浆中葡萄糖转化为肝糖原的活性, 导致胰岛素抵抗的发生^[7]。当宫内缺氧和高脂饮食二者相加时, 作用协同, 将更加明显。本实验中, 宫内缺氧与高脂饮食的交互作用在脂肪肝的发生中有显著性意义($F = 5.723$, $P < 0.05$), 从动物实验的角度证实了上述观点。

宫内缺氧与追加缺氧在脂肪肝的发生中未见明显作用($F = 1.591$, $P > 0.05$), 说明: 高脂饮食是脂肪肝发生的一个重要条件; 单纯的宫内缺氧并不一定引起脂肪肝的发生, 可能只是促发了基础基因的改变。当宫内缺氧子代成鼠暴露于高脂饮食下时, 宫内缺氧的作用更加凸现出来, 宫内缺氧与高脂饮食间的交互作用表现为($F = 5.723$, $P < 0.05$)。Barker鉴于流行病学显示出胎儿期宫内营养不良或氧供不佳与个体晚年疾病

的发生存在相关性, 提出了Barker假说, 本结果从动物实验角度给其提供了新的佐证。另外, 通过超声直方图测量灰阶均值, 并与病理观察指标肝脏脂肪变性细胞数目做相关分析, 可以看出, 超声灰阶均值与脂肪变性细胞间有较好的相关性($r = 0.810$, $P < 0.01$), 表明超声直方图测量灰阶均值作为超声诊断脂肪肝的一种量化手段, 可以弥补既往超声诊断依靠经验, 缺乏客观标准的不足, 与病理学又有较好的一致性, 有一定的临床价值。

总之, 本实验的结果为研究多种老年性疾病的发病机制提供了新的启示和方向, 同时也引起临床工作者对胎儿时期宫内营养及氧供等状态的进一步重视, 利于优生优育工作的开展。

4 参考文献

- 1 Ruijtenbeek K, Kessels CG, Janssen BJ, Bitsch NJ, Fazzi GE, Janssen GM, De Mey J, Blanco CE. Chronic moderate hypoxia during in ovo development alters arterial reactivity in chickens. *Pflugers Arch* 2003; 447: 158-167
- 2 Ruijtenbeek K, Kessels LC, De Mey JG, Blanco CE. Chronic moderate hypoxia and protein malnutrition both induce growth retardation, but have distinct effects on arterial endothelium-dependent reactivity in the chicken embryo. *Pediatr Res* 2003; 53: 573-579
- 3 Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1344S-1352S
- 4 Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 32345-32353
- 5 Bohr I. Hypercholesterolemic diet applied to rat dams protects their offspring against cognitive deficits. Simulated neonatal anoxia model. *Physiol Behav* 2004; 82: 703-711
- 6 王广华. 非酒精性脂肪肝发病机制研究进展. *中国康复理论与实践* 2004; 10: 243-244
- 7 丁效蕙, 赵景民. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制及治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 371-375

电编 张敏 编辑 潘伯荣

同行评价

该研究目的明确, 实验合理, 研究结果对于阐明宫内缺氧与脂肪肝发生的关系有参考价值。统计学分析方法应用适当, 结果可信, 图片质量较好。文章条理较清晰。