· 实验研究 ·

白藜芦醇对小鼠非酒精性脂肪性肝炎干预作用*

邓颖勋[1], 纪桂元[2], 王宇琦[1], 蒋卓勤[1]

摘　要: 目的　探讨自噬通路在白藜芦醇(RSV)减轻蛋氨酸 - 胆碱缺乏(MCD)饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)中的作用及机制。**方法**　雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只, 随机分为对照组、模型组、白藜芦醇低、高剂量组(100、250 mg/kg)($n = 10$); 对照组和模型组小鼠分别喂饲基础饲料和 MCD 饲料, 白藜芦醇组在喂饲 MCD 饲料同时给予 RSV 灌胃, 4 周后测定小鼠体重、肝重、血清中谷丙转氨酶(ALT)含量, 分离小鼠肝脏, 测定甘油三酯(TG)和丙二醛含量, 苏木素 - 伊红染色观察肝组织形态学变化, 油红 O 染色观察脂肪变性情况, Western blot 检测自噬标志蛋白 LC3 及各通路蛋白的表达量。**结果**　与对照组比较, 模型组小鼠血清 ALT 和肝组织 TG 含量[分别为(144.17 ± 0.32) U/L 和(112.77 ± 0.88) mg/g]明显升高($P < 0.01$), 肝脏 LC3 Ⅱ 和腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)表达水平[分别为(1.27 ± 0.01)、(1.81 ± 0.09)]升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 高剂量白藜芦醇组小鼠血清 ALT 含量、肝组织 TG 含量[分别为(83.16 ± 0.40) U/L、(40.75 ± 0.19) mg/g]明显降低($P < 0.01$), LC3 Ⅱ、AMPK 蛋白表达水平[分别为(2.25 ± 0.14)、(3.01 ± 0.16)]明显升高($P < 0.01$); 蛋白激酶 B(Akt)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)表达水平无明显变化。**结论**　白藜芦醇可以改善 MCD 饮食诱导的 NASH, 其机制可能与激活自噬 AMPK 途径有关。

关键词: 白藜芦醇(RSV); C57BL/6J 小鼠; 非酒精性脂肪性肝炎(NASH); 自噬
中图分类号: R 575.5　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)01-0088-04　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-01-27

Resveratrol induces autophagy and its interference effect on nonalcoholic steatohepatitis in a murine model

DENG Ying-xun*, JI Gui-yuan, WANG Yu-qi, et al (* *School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province* 510080, China)

Abstract: Objective　To investigate the effects of resveratrol-induced autophagy on nonalcoholic steatohepatitis induced with methionine- and choline-deficient (MCD) diet in C57BL/6J mice and its potential molecular mechanisms. **Methods**　Forty male C57BL/6J mice were randomized into control group, MCD group, low-dose resveratrol group (100 mg/kg) and high-dose resveratrol group (250 mg/kg) (10 mice in each group); the mice of control group and MCD group were fed with standard or MCD diet, respectively, and the intervention group were fed with MCD diet and given resveratrol by gavage at the same time. After 4 weeks, serum alanine aminotransferase (ALT) level was determined and triglycide (TG) and malondialdehyde (MDA) levels in liver tissue were also determined. The mice were executed to obtain the liver tissue for observing hepatic pathological and lipid changes. The expressions of proteins involved in the autophagic pathways were analyzed with Western blot. **Results**　Compared with those of the control group, the serum ALT (144.17 ± 0.32 U/L) and liver TG (112.77 ± 0.88 mg/g) levels in mice of MCD group increased ($P < 0.01$); the expressions of microtubule-associated protein1 light chain 3 (LC3 Ⅱ) (1.27 ± 0.01) and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (1.81 ± 0.09) also increased ($P < 0.05$ for all). Compared with those of the MCD group, the ALT (83.16 ± 0.40 U/L) and the TG (40.75 ± 0.19 mg/g) significantly decreased in the mice of high-dose resveratrol group ($P < 0.01$ for all). Western blot revealed that the expression of LC Ⅱ (2.25 ± 0.14) and AMPK (3.01 ± 0.16) increased significantly in the mice treated with high-dose resveratrol ($P < 0.01$ for all), but protein kinase B (Akt) and mammalian target of rapamycin (mTOR) expression were not downregulated as expected. **Conclusion**　Resveratrol intervention could attenuate nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6J mice with MCD diet and the effect may be related to the induction of autophagy through activating AMPK signaling pathway.

Key words: resveratrol; C57BL/6J mice; nonalcoholic steatohepatitis; autophagy

非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指一种无过量饮酒史, 以肝实质细胞脂肪变性和脂肪蓄积为特征的临床病理综合征, 包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、脂肪性肝纤维化和肝硬化[1]。其中 NASH 占 30% ~50%, 是造成非酒精性脂肪性肝硬化及其相关并发症的重要因素。白藜芦醇(3,4,5 - 三羟基二苯乙烯, RSV)是一种含有芪

* **基金项目**: 国家自然科学基金(81200295)
作者单位: 1. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080; 2. 广东省疾病预防控制中心 广东省公共卫生研究院
作者简介: 邓颖勋(1989 -), 女, 陕西西安人, 硕士在读, 研究方向: 营养与疾病。
通讯作者: 蒋卓勤, E-mail: jiangzhq@ mail. sysu. edu. cn
数字出版日期: 2014 - 12 - 4 11:28
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20141204.1128.008.html

类结构非黄酮类多酚化合物,广泛存在于虎杖、葡萄、花生等多种植物中[2]。近年研究证实白藜芦醇可在抗炎、抗氧化活性、调节脂质代谢等多方面发挥预防 NAFLD 作用[3-5],但具体机制尚不完全清楚。自噬作为一种大分子物质降解机制,在维持细胞内物质的再循环和调节内环境的稳态以及机体生长、发育和衰老等过程中均具有重要作用。自噬通过调节脂质代谢、减少促凋亡基因表达等发挥 NAFLD 干预作用[6-7]。研究表明白藜芦醇可以通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP activated protein kinase, AMPK)和沉默信息调节因子 2(silent information regulator 2, SIRT2)诱导自噬,从而减缓 NAFLD 进程[8]。但作用机制还不十分清楚,本研究旨在观察白藜芦醇对 MCD 饮食诱导的 NASH 小鼠改善作用及机制,结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　实验动物　40 只雄性 C57BL/6J 小鼠(中山大学实验动物中心),SPF 级,许可证号:SYXK(粤):2012 - 0080,6 周龄,体重 18 ~ 22 g,饲养条件:温度 19 ~ 26 ℃,湿度 40% ~ 70%。实验前适应性喂养 1 周。

1.2　主要仪器与试剂　RLX800 酶标仪(美国 BIO-TEC 公司);光学显微镜(日本 Nikon 公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司)。蛋氨酸 - 胆碱缺乏(MCD)饲料(南通特洛菲饲料科技有限公司);白藜芦醇、油红 O(美国 sigma 公司);羧甲基纤维素钠(北京普博欣生物科技有限公司);甘油三酯(triglyceride, TG)试剂盒(日本 Wako 公司);丙二醛、血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)测试盒(美国 Cayman 公司);兔抗小鼠蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)多克隆抗体、兔抗微管相关蛋白 1 轻链(microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3)单克隆抗体、兔抗人 AMPKα 多克隆抗体、兔抗人哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)多克隆抗体(美国 CST 公司);过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(美国 Jackson 公司)。

1.3　分组与处理　40 只小鼠按体重随机分为对照组、模型组、白藜芦醇低、高剂量组,每组 10 只。对照组喂饲基础饲料,其余各组喂饲 MCD 饲料。白藜芦醇低、高剂量组分别每天给予 100、250 mg/kg 的 RSV 灌胃,对照组和模型组给予等量 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,连续 4 周。实验期间,小鼠自由摄食饮水。

1.4　指标与方法　实验期间记录小鼠体重及一般状况;4 周后,小鼠 0.6% 戊巴比妥腹腔麻醉(0.1 mL/100 g),摘眼球取血,离心分离血清,试剂盒法测定血清 ALT;分离肝脏,观察大体改变,石蜡包埋、切片,苏木素 - 伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色后于光学显微镜下观察小鼠肝脏病理改变,参照美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组指南进行 NAFLD 活动度积分(NAFLD activity score, NAS)评定;制作冰冻切片,油红 O 染色后于光学显微镜下观察肝组织脂滴形成情况;称取 150 ~ 200 mg 肝组织,试剂盒法测定肝组织 TG、丙二醛含量;称取 50 ~ 100 mg 肝组织,Western blot 法进行 LC3B、AMPK、Akt、mTOR 蛋白表达水平测定。

1.5　统计分析　结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 建立数据库,并进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferrni 法,检验水准为 $\alpha = 0.05$。

2　结　果

2.1　小鼠一般状况　对照组小鼠皮毛整洁、有光泽,运动活泼,食量排泄物均正常;模型组小鼠毛发粗糙、色泽暗淡,活动减少;白藜芦醇组小鼠均有不同程度的活动减少,饮食稍少,皮毛欠光泽;对照组小鼠肝脏外观呈暗红色,质地柔软,弹性好,边缘锐,切面光滑;模型组小鼠肝脏体积明显增大,颜色发黄,边缘圆钝,包膜紧张,切面油腻;白藜芦醇低、高剂量组小鼠肝组织颜色、质地、大小均介于对照组和模型组之间。

2.2　白藜芦醇对小鼠体重和肝重影响　对照组、模型组、白藜芦醇低、高剂量组小鼠体重分别为(26.54 ± 0.88)、(13.66 ± 0.90)、(14.23 ± 0.82)、(15.16 ± 0.75) g,肝重分别为(1.02 ± 0.89)、(0.61 ± 0.09)、(0.55 ± 0.61)、(0.57 ± 0.84) g;模型组小鼠体重、肝重明显低于对照组($P < 0.01$);与模型组比较,白藜芦醇组小鼠体重、肝重明显升高($P < 0.05$)。

2.3　白藜芦醇对小鼠生化指标影响(表 1)　与对照组比较,模型组小鼠血清 ALT 含量及肝组织 TG、丙二醛含量均明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,高剂量白藜芦醇组小鼠血清 ALT 含量、肝组织 TG、丙二醛含量明显降低($P < 0.01$)。

表 1　白藜芦醇对小鼠 ALT、TG、丙二醛含量影响

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别(mg/kg)	ALT (U/L)	TG (mg/g)	丙二醛 (nmol/mgprot)
对照组	57.21 ± 0.19	21.22 ± 0.82	2.14 ± 0.22
模型组	144.17 ± 0.32[a]	112.77 ± 0.88[a]	10.32 ± 0.30[a]
白藜芦醇组 100	113.33 ± 0.71[a]	85.44 ± 0.36[ab]	7.19 ± 0.68[ab]
250	83.16 ± 0.40[b]	40.75 ± 0.19[ab]	4.61 ± 0.58[ab]

注:与对照组比较,a $P < 0.01$;与模型组比较,b $P < 0.01$。

2.4　小鼠肝脏病理改变(图 1)　结果显示,对照组小鼠肝组织肝小叶结构完整,肝细胞索排列整齐,肝细胞无明显病变,细胞核位于细胞中央且结构清晰;模型组小鼠肝组织出现大量脂肪变性,肝细胞增大,胞浆内脂肪空泡大小不一,小叶内有小灶性炎性细胞浸润;白藜芦醇低剂量组小鼠肝组织脂肪变性较模型组减轻,胞浆内充满小脂滴,炎性细胞浸润减少;白藜芦醇高剂量组小鼠可见肝脏轻度脂肪变,肝小叶未见明显炎性细胞浸润。对照组、模型组、白藜芦醇低、高剂量组小鼠肝组织 NAS 积分分别为(1.45 ± 0.11)、(6.06 ± 0.21)、(3.93 ± 0.22)、(1.97 ± 0.21)分。与对照组比较,模型组 NAS 积分明显增高($P < 0.01$);与模型组比较,白藜芦醇组小鼠肝组织 NAS 积分明显降低($P < 0.05$)。

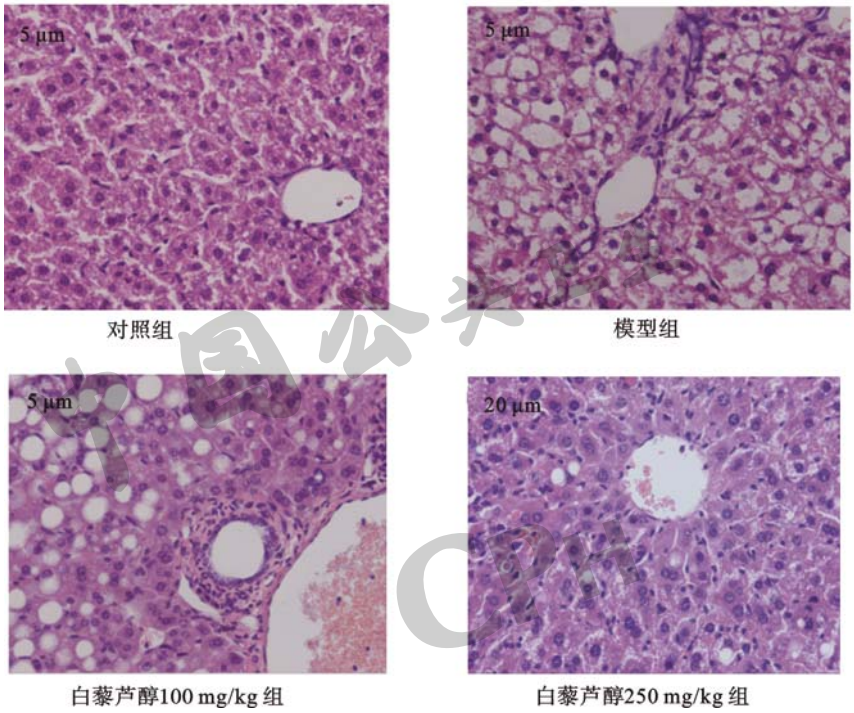


图 1　白藜芦醇对小鼠肝组织病理结构影响(HE, ×400)

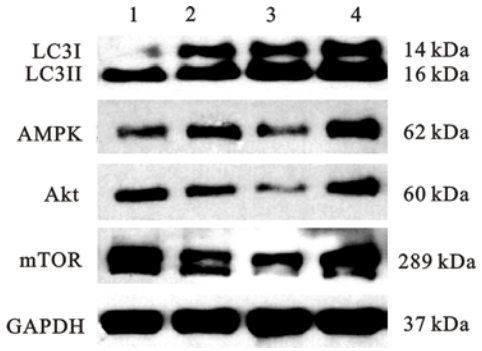
2.5　小鼠肝脏油红 O 染色观察　光镜下可见对照组小鼠肝组织有少量红色脂滴,而模型组小鼠肝组织可见大量橘红色脂滴形成,白藜芦醇低剂量组小鼠肝组织红色脂滴数量和体积较模型组均明显减少、变小,白藜芦醇高剂量组小鼠肝脏只见少量较小红色脂滴形成。

2.6　白藜芦醇对小鼠 LC3、AMPK、Akt、mTOR 蛋白表达影响(表 2、图 2)　与对照组比较,模型组 LC3Ⅱ表达水平明显升高($P < 0.05$);模型组小鼠肝组织 AMPK 表达水平较对照组明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,高剂量白藜芦醇组小鼠 AMPK 表达水平明显上调($P < 0.01$);与对照组比较,模型组小鼠肝组织 Akt 和 mTOR 水平降低($P < 0.05$);与模型组比较,高剂量白藜芦醇组小鼠肝组织 Akt 和 mTOR 水平均上调。

表 2　白藜芦醇对小鼠肝组织 LC3Ⅱ及通路蛋白表达影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别(mg/kg)	LC3Ⅱ	AMPK	Akt	mTOR
对照组	0.98 ± 0.07	1.02 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01
模型组	1.27 ± 0.01[a]	1.81 ± 0.09[b]	0.75 ± 0.02[a]	0.58 ± 0.04[b]
白藜芦醇组 100	1.34 ± 0.07	0.96 ± 0.78[c]	0.34 ± 0.18[c]	0.68 ± 0.13
250	2.25 ± 0.14[c]	3.01 ± 0.16[c]	1.20 ± 0.07[c]	1.32 ± 0.14[c]

注:与对照组比较,a $P < 0.05$,b $P < 0.01$;与模型组比较,c $P < 0.01$。



注:1:对照组;2:模型组;3、4:白藜芦醇低、高剂量组。

图 2　白藜芦醇对小鼠肝组织 LC3 及通路蛋白表达影响

3 讨　论

研究表明 MCD 饮食诱导雄性 C57BL/6J 小鼠模型是经典的 NASH 模型,最接近于人的组织学特征[9]。本研究结果显示,小鼠肝脏大体观察及肝组织病理形态均发生了明显改变,血清 ALT 和肝组织 TG 明显高于对照组,提示 NASH 模型构建成功。研究发现,白藜芦醇能够明显改善高脂饮食诱导的脂代谢紊乱和氧化应激水平,可有效改善高脂饲料喂养 C57BL/6J 小鼠脂代谢异常,其机制可能与促进肝脏 SIRT1 和 LXRα 表达有关[10]。本研究结果显示,白藜芦醇干预可以减轻小鼠的体重下降,改善肝脏脂肪变性,可以减轻肝脏脂肪变性和炎性细胞浸润,明显降低血清 ALT、肝组织 TG 和 MDA 水平。

自噬是真核细胞中普遍存在的一种物质降解途径,通过自噬 - 溶酶体介导,净化自身多余或受损的细胞器,以维持细胞内物质的再循环和调节内环境稳态,对机体生长、发育和衰老均起重要作用[11-12]。自噬通过自噬 - 溶酶体途径吞噬并降解脂滴从而调节细胞脂代谢和脂质沉积,减缓 NAFLD 进程。脂肪变性、高胰岛素血症等均可引起肝细胞自噬功能受损,而自噬功能受损反过来又会加重 NASH。因此,提高细胞内自噬功能对于治疗 NAFLD 具有重要意义。本研究结果显示,MCD 饮食喂养 4 周后,小鼠肝脏自噬体标志性蛋白 LC3 的表达量明显升高,提示 MCD 可以诱导肝细胞内自噬;与模型组比较,白藜芦醇组小鼠肝脏 LC3 表达量明显增加。自噬受很多细胞内信号通路调节,比较经典的是 AMPK 通路,而 Akt/mTOR 则是负向调节自噬[13]。进一步检测通路蛋白的表达发现,与模型组比较,白藜芦醇组小鼠肝脏 AMPK 水平明显上调,而 Akt/mTOR 水平未明显下调,提示白藜芦醇诱导的自噬可能是受 AMPK 通路调节。

参考文献

[1] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 12 版. 北京:人民卫生出版社,2005:2007 - 2009.

[2] Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(6): 493 - 506.

[3] Xin P, Han H, Gao D, et al. Alleviative effects of resveratrol on nonalcoholic fatty liver disease are associated with up regulation of hepatic low density lipoprotein receptor and scavenger receptor class B type I gene expressions in rats[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 52: 12 - 18.

[4] Gómez-Zorita S, Fernández-Quintela A, Macarulla MT, et al. Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress[J]. Br J Nutr, 2012, 107(2): 202 - 210.

[5] Bujanda L, Hijona E, Larzabal M, et al. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats[J]. BMC Gastroenterol, 2008, 8: 40.

[6] Rajat S, Susmita K, Yongjun W, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. Nature, 2009, 458(7242): 1131 - 1135.

[7] 刘凯,徐树莹,徐斌,等. 早期自噬在非酒精性脂肪肝中的保护作用[J]. 北京医学,2011,33(12):947 - 949.

[8] Shang J, Chen LL, Xiao FX, et al. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2008, 29(6): 698 - 706.

[9] Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(11): 1272 - 1282.

[10] 袁媛,詹志鹏,崔玉丰,等. 白藜芦醇对小鼠脂代谢及相关蛋白表达影响[J]. 中国公共卫生,2014,30(4):443 - 445.

[11] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069 - 1075.

[12] Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense[J]. Cell, 2005, 120(2): 159 - 162.

[13] Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling[J]. Cell Res, 2014, 24(1): 42 - 57.

收稿日期: 2014-07-14　　(解学魁编辑　韩仰欢校对)

中国公共卫生 CPH