

锌 alpha2 糖蛋白在小鼠 NAFLD 发展中的动态变化

肖新华,李 菡,杨娇娇,冉 莉,杨 靖,刘江华,文格波

(南华大学附属第一医院内分泌科,湖南,衡阳,421001)

摘要: **目的** 建立高脂饲料喂养的非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)小鼠模型,动态观察锌 alpha2 糖蛋白(ZAG)的表达变化,初步探讨 ZAG 与 NAFLD 的关系。 **方法** 将 48 只 8 周龄 C57BL/6 小鼠随机分成高脂饮食组(HFD 组)和标准饮食组(SD 组),分别给予高脂饲料和标准饲料饲养 4 周、8 周、12 周和 16 周。HE 染色分析肝脏组织病理学改变。酶联免疫吸附法(ELISA)检测肝脏甘油三酯(TG)含量、血清 ZAG 以及炎症因子水平。荧光实时定量聚合酶链反应(PCR)检测肝脏 ZAG 的 mRNA 表达。 **结果** 4 周开始,HFD 组小鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)较 SD 组小鼠明显升高($P < 0.05$),且随非酒精性脂肪性肝病的发展而持续增加。8 周起 HFD 组小鼠白细胞介素 6(IL-6)、IL-8 以及 IL-1 β 水平逐渐升高($P < 0.05$)。4 周起,HFD 组小鼠肝脏 ZAG mRNA 表达逐渐下降($P < 0.05$),而血清 ZAG 浓度从 8 周开始明显降低($P < 0.05$)。 **结论** 肝脏 ZAG 表达水平降低可能参与 NAFLD 的发生。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 锌 alpha2 糖蛋白; 高脂饮食; 肥胖; 小鼠

中图分类号:R589.2 **文献标识码:**A

Dynamic Observation of Zinc alpha2 Glycoprotein in Mice of Non-alcoholic Fatty Liver Disease

XIAO Xinhua, LI Han, YANG Jiaojiao, et al

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To establish a nonalcoholic fatty liver disease model induced by high fat diet and observe the dynamic changes of Zinc alpha2 glycoprotein. **Methods** All of 48 C57BL/6 mice were randomly divided into high fat diet (HFD) group and standard diet(SD)group. The serum IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β and ZAG were assayed by ELISA kit at the 4th, 8th, 12th and 16th week. Hepatic triglyceride content was detected by ELISA kit. The liver tissues of mice were stained by HE. The mRNA expression of ZAG in liver was detected by real-time PCR. **Results** Compared with SD group, the level of serum TNF- α was significantly increased in HFD group from the 4th week ($P < 0.05$). From the 8th week, the weight gain, liver index, hepatic triglyceride content, IL-6, IL-8 and IL-1 β were increased gradually ($P < 0.05$). The mRNA level of ZAG in liver of mice induced by HFD was gradually decreased from the 4th week ($P < 0.05$). From the 8th week, the serum ZAG in HFD group was decreased compared to SD group ($P < 0.05$). **Conclusion** The mouse model of NAFLD could be successfully established with high fat diet. The low expression level of ZAG in liver could be associated with the development of NAFLD.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease; Zinc alpha2 glycoprotein; high fat diet; obesity; mice

收稿日期:2013-01-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270925),湖南省自然科学基金重点项目(12JJ2050)。

作者简介:肖新华,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:肥胖症及肥胖相关性肝病,E-mail:dr.xiaoxh@hotmail.com. 并列第一作者李菡,硕士研究生,研究方向:肥胖症及肥胖相关性肝病,E-mail:hanli198610@sina.com. 通讯作者文格波,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:糖尿病,E-mail:gb_wen@yahoo.com.cn.

营养性肥胖导致非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的发病率不断增加^[1]。NAFLD 是一种以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征,其疾病谱包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化和肝硬化。锌 alpha2 糖蛋白 (Zinc alpha2 glycoprotein, ZAG) 是近年来新发现的一种脂肪细胞因子,有研究发现其在肝脏及脂肪组织高表达^[2],但目前尚未见有 ZAG 与 NAFLD 关系的相关报道。本研究通过高脂喂食 C57BL/6 小鼠构建 NAFLD 模型,观察不同时期小鼠肝脏 ZAG mRNA 表达变化、血清 ZAG 及炎症因子水平的变化,初步探讨 ZAG 在 NAFLD 中的变化及意义。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

组织甘油三酯酶法测定试剂盒购于普利莱基因技术有限公司 (货号 E1003-2)。小鼠炎症因子 ELISA 试剂盒购于欣博盛生物公司,逆转录试剂盒 (Thermo Scientific),小鼠 ZAG 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒 (Abnova 公司),UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒,引物合成购于上海生工公司。饲料均由南华大学实验动物中心配制。

酶标仪 (美国 ECX808),倒置相差显微镜 TS100-F (日本尼康),Srtorius 电子秤 (北京赛多利斯有限公司),荧光定量 PCR 仪 (美国罗氏)。

1.2 动物及分组

48 只 8 周龄 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠 (购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2011-0003),体重 20 ~ 26 g。所有小鼠饲养于南华大学实验动物中心,采用 IVC 笼具喂养,室内温度 20℃ ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 70%,同时采用空气净化流动换气,所需饲料、饮用水均通过高压消毒。小鼠进食、饮水不受限制,昼夜时间为 12 h/12 h,实验过程中所涉及的动物实验操作均严格按照国家动物伦理委员会要求进行。

所有小鼠适应性喂养 1 周后,根据体重随机分为标准饮食组 (SD 组) 和高脂饮食组 (HFD 组),每组 24 只,标准饮食组给予普通标准饲料,高脂饮食组给予高脂饲料 (84% 标准饲料 + 14% 猪油 + 2% 胆固醇)。两组小鼠分别于喂养第 4、8、12、16 周末时各随机抽取 6 只,测定相关指标。

1.2 方法

利用酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒检测小鼠血清炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、IL-8、IL-1 β 及 ZAG。分离小鼠肝脏,用冰盐水冲洗后,称量并记录肝湿重,计算肝脏指数 (肝脏指数% = 肝湿重/体重 $\times$ 100%),同时观察肝脏色泽、质地。组织甘油三酯 (TG) 酶法测定肝脏 TG 含量;Trizol 法提取肝脏总 RNA,利用 SYBR 绿色染料试剂盒进行荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测肝脏 ZAG mRNA 的水平。引物序列如下: mouse ZAG, Forward, 5'-GGA CAC TAC AGG GTC TCA CAC CTT-3', Reverse, 5'-TGA AAT CCT CTC CGT CGT AGG C-3'; mouse β -actin: Forward, 5'-ACG GCC AGG TCA TCA CTA TTG-3', Reverse 5'-CAA GAA GGA AGG CTG GAA AAG A-3'。切取每块肝脏相同部位肝叶组织用 10% 甲醛固定,进行 HE 染色。参照 2005 年推荐的 NASH-CRN 非酒精性脂肪性肝病组织病理学观察方法,利用半定量计分法,脂肪变性为 0 ~ 3 分: 0 分 < 5%; 1 分 5% ~ 33%; 2 分 > 33% ~ 66%; 3 分 > 66%^[3]。

1.3 统计学分析

所有实验数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS13.0 统计软件分析。两组间比较用 t 检验、多组间比较用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠肝脏外观及病理变化

与 SD 组比较,8 周末 HFD 组小鼠肝脏体积增大,包膜紧张,颜色逐渐变浅变黄,边缘变钝,有油腻感,夹之易碎。至 16 周末,其肝脏外观明显肿大,形态极不规则,颜色呈浅黄色 (图 1)。肝脏组织学显示,8 周末 HFD 组小鼠可见中央静脉周围脂肪空泡增多,至 16 周末,肝小叶内发生弥漫性脂肪变,正常肝脏组织结构消失 (图 1)。肝脏组织脂肪变性情况如表 1 所示,高脂喂养小鼠 4 周 (评分为 0 分) 无明显脂肪变性,随时间延长,肝脏脂肪变性程度逐渐加重,第 8 周时脂肪变性明显 (评分 1.33 ± 0.52 分) ($P < 0.05$); 造模 12 周脂肪变程度虽加重 (评分 1.67 ± 0.53 分) ($P < 0.05$),但与 8 周比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 至第 16 周,出现典型肝脂肪变性 (评分 2.83 ± 0.41 分) ($P < 0.05$)。

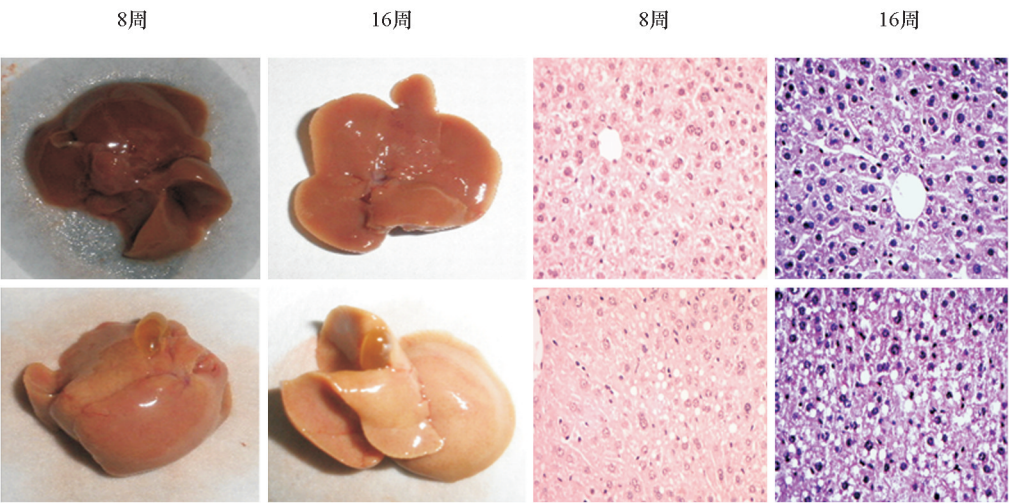


图1 肝脏的大体形态及组织 HE 染色

表1 高脂组造模不同时间小鼠肝脏脂肪变性的情况(只, $n=6$)

脂肪变性分级	4 周	8 周	12 周	16 周
<5%	6	0	0	0
5% ~ 33%	0	4	0	0
33% ~ 66%	0	2	4	1
>66%	0	0	2	5

2.2 小鼠的体重、肝脏指数及肝脏 TG 含量的变化

8 周开始, HFD 组较 SD 组小鼠体重增加明显递增、肝脏指数和肝脏 TG 含量逐渐增加, 16 周末分别为 SD 组小鼠的 2.4 倍、2.0 倍和 3.5 倍 ($P<0.05$) (表 2)。

表2 两组小鼠体重增加、肝脏指数和肝脏 TG 含量的变化

时间	体重增加(g)			肝脏指数(%)			肝脏 TG 含量(mmol/L)		
	SD 组	HFD 组	P 值	SD 组	HFD 组	P 值	SD 组	HFD 组	P 值
4 周	1.47 ± 0.96	1.77 ± 0.67	0.718	4.41 ± 0.15	4.50 ± 0.29	0.062	0.76 ± 0.05	0.82 ± 0.15	0.069
8 周	1.98 ± 0.44	3.72 ± 0.65	0.034	3.91 ± 0.17	4.66 ± 0.34	0.022	0.73 ± 0.12	0.95 ± 0.27	0.026
12 周	4.13 ± 0.63	6.98 ± 1.57	0.045	3.87 ± 0.17	5.37 ± 0.49	0.040	0.68 ± 0.07	1.19 ± 0.16	0.024
16 周	4.63 ± 0.91	11.02 ± 2.40	0.035	3.56 ± 0.39	6.07 ± 0.14	0.033	0.62 ± 0.11	2.17 ± 0.40	0.032

2.3 炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-8 及 IL-1β 的变化

8 周开始, HFD 组小鼠血清 IL-6、IL-8 及 IL-1β 浓度逐渐升高, 持续至 16 周末, HFD 组小鼠炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-8 与对照组比较, 有统计学差别 ($P<0.05$)。而 TNF-α 的变化最早, 从第 4 周开始, HFD 组小鼠血清 TNF-α 浓度高于对照组 ($P<0.05$) (表 3)。

2.4 小鼠肝脏 ZAG mRNA 表达及血清 ZAG 的变化

荧光定量 PCR 结果显示, HFD 组小鼠肝脏 ZAG mRNA 表达水平平均低于 SD 组 ($P<0.05$)。第 8 周时 HFD 组小鼠肝脏 ZAG mRNA 表达水平最低。HFD 组血清 ZAG 浓度从第 8 周开始均低于 SD 组 ($P<0.05$), 并呈递减趋势 (图 2)。

3 讨 论

非酒精性脂肪性肝病是一种临床病理综合征, 包含不同程度的病程阶段, 其过程首先由单纯性脂肪肝开始, 逐渐发展为脂肪性肝炎 (NASH), 最终演变为肝纤维化甚至硬化。在发达国家, NAFLD 患病率约为 20% ~ 30%^[4], 是西方国家里最常见的肝病; 近年来国内也大约有 12% ~ 15% 患病率, 并有逐年增长趋势^[5]。此外, NAFLD 与肥胖、2 型糖尿病以及高脂血症密切相关。其中, T2DM、肥胖人群 NAFLD 发病率高达 70% ~ 90%^[6]。因此, 深入了解 NAFLD 的发病机制对 NAFLD 防治尤其重要。

表 3 两组小鼠血清炎症因子的变化

时间	IL-6 (pg/mL)			TNF-α (pg/mL)			IL-8 (pg/mL)			IL-1β (pg/mL)		
	SD 组	HFD 组	P 值	SD 组	HFD 组	P 值	SD 组	HFD 组	P 值	SD 组	HFD 组	P 值
4 周	8.81 ± 0.76	15.27 ± 1.56	0.123	15.15 ± 0.44	32.57 ± 1.36	0.046	13.05 ± 1.40	19.45 ± 3.12	0.960	15.75 ± 0.67	21.76 ± 1.18	0.274
8 周	8.85 ± 0.61	20.48 ± 2.85	0.020	15.58 ± 0.41	39.21 ± 3.02	0.002	12.70 ± 1.43	26.21 ± 3.17	0.037	18.22 ± 1.36	37.68 ± 5.52	0.002
12 周	10.39 ± 1.03	31.64 ± 3.18	0.048	16.96 ± 1.10	65.75 ± 7.27	0.009	14.19 ± 1.25	46.89 ± 4.72	0.002	21.72 ± 1.39	49.99 ± 5.03	0.037
16 周	10.05 ± 0.72	36.59 ± 2.55	0.010	21.61 ± 1.28	88.30 ± 10.88	0.012	20.96 ± 1.49	58.49 ± 4.90	0.011	24 ± 0.41	70.37 ± 4.59	0.039

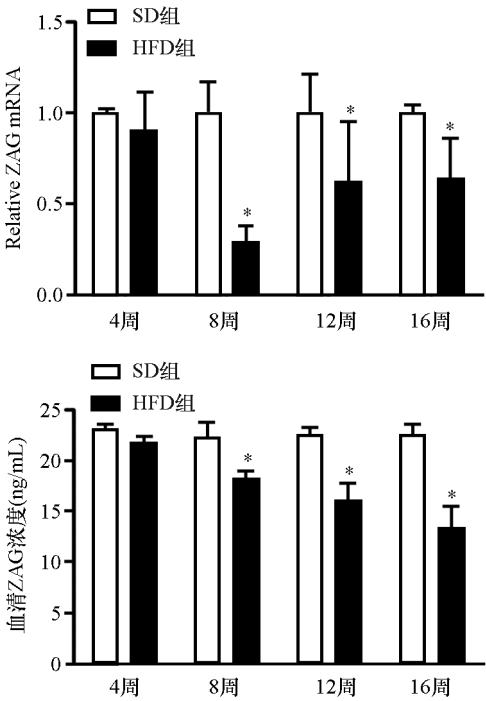


图 2 小鼠肝脏 ZAG mRNA 表达及血清 ZAG 的变化 与 SD 组比较, *: $P < 0.05$

近年来,NAFLD 动物模型的种类越来越多^[7],考虑营养失调型动物模型需要具备简单、经济、方便等特点,因此,人们通常选择鼠类。而在 NAFLD 鼠类模型中,尤其以 C57BL/6 小鼠最为常见。原因在于 C57BL/6 小鼠是一种品系稳定,易于繁殖的近交系动物。高脂饮食可诱导其产生肥胖和胰岛素抵抗,而上述病理过程恰好具备人类 NAFLD 的一系列特征性改变^[8]。高脂饮食主要通过 Toll 样受体 (TLRs) 相互作用引起机体的炎症反应。Toll 样受体与配体结合后,激活下游的 NF-κB,使 NF-κB 从细胞质转移至细胞核内,调控炎症相关靶基因的表达,如 IL-1、IL-6 和 TNF-α 等。本研究通过比较不同时期两组小鼠组织病理学变化发现,由于高脂喂养 4 周时间较短,相关炎症指标以及组织学无明显变化;自 8 周开始,高脂组小鼠有不同程度肝脂肪变

的组织学变化。本研究发现,第 8 ~ 12 周模型小鼠的各项炎症指标维持在高水平的稳定状态,是建立模型的较好周期。8 ~ 16 周均能较好反映 NAFLD 的主要病理学特征,这也是大多数研究报道选择 8 周 ~ 12 周左右作为 NAFLD 造模时间的原因^[9-10]。结合肝脏脂肪变性程度和炎症因子水平,本研究认为高脂饮食喂养 16 周造模更合理。

近年来,研究发现多种脂肪细胞因子参与 NAFLD 的发病,例如:脂联素、瘦素、肿瘤坏死因子等。锌 α2 糖蛋白 (ZAG) 是一种能强烈促进脂肪分解,减少脂肪蓄积的新型脂肪细胞因子。NAFLD 被认为是肥胖及代谢综合征在肝脏中的表现,肥胖人群肝脏 ZAG 含量测定时发现,肥胖患者肝脏 ZAG 水平也明显降低^[2,11],但其原因和意义尚不明确。ZAG 是一种广泛分布于人体,分子量为 41 kDa 可溶性糖蛋白,其晶体结构与主要组织相容性复合体 I 类分子高度同源。因能被锌盐沉淀,且与血浆 α2 球蛋白有类似的电泳特性而得名。ZAG 在机体多个器官组织表达,包括脂肪组织、肾脏、乳腺、皮肤、唾液腺、气管、胰腺、肝脏以及前列腺等,尤以脂肪组织和肝脏表达较高^[12]。作为一种新型脂肪细胞因子,ZAG 被证实具有强大的脂肪分解作用,在脂肪的利用与脂肪组织的丢失中扮演至关重要的角色^[13-16]。多数学者通过对肥胖患者以及肥胖小鼠模型中脂肪组织 ZAG 的表达情况的研究,结果发现这些肥胖患者和小鼠脂肪组织 ZAG 表达减少。相反,诱导肥胖小鼠 ZAG 过表达后,其脂肪组织明显减少,体重明显减轻从而使肥胖得到改善^[17]。但是该结果多数基于脂肪组织及细胞的研究。

众所周知,肝脏甘油三酯 (TG) 异常蓄积是 NAFLD 发病的关键环节,而炎症因子活化是其进展的重要机制。NAFLD 肥胖小鼠的肝脏和脂肪组织中,ZAG 表达减少可能与 TNF-α 表达增加有关^[11]。另外,研究者还发现,用 TNF-α 分别处理人前脂肪细胞系 SGBS 细胞后,脂肪细胞 ZAG 表达水平明显

降低^[18]。本文通过高脂诱导小鼠发生 NAFLD, 不同时期检测检测肝脏及血清 ZAG, 血清炎症因子在 NAFLD 过程中的表达变化。研究结果发现, 高脂诱导的 NAFLD 小鼠肝脏及血清 ZAG 明显减少, 多种炎症因子显著增加, 提示提示 ZAG 可能参与 NAFLD 的发生发展。但 ZAG 在 NAFLD 发生发展中究竟起什么作用仍需进一步的探索和研究。

参考文献:

- [1] Masato Y, Shuhei N, Kazuhiko N, et al. Involvement of a periodontal pathogen, porphyromonas gingivalis on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease [J]. BMC Gastroenterol, 2012, 12:1-10.
- [2] Selva DM, Lecube A, Hernández C, et al. Lower zinc-alpha2-glycoprotein production by adipose tissue and liver in obese patients unrelated to insulin resistance [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(11):4499-4507.
- [3] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2005, 41(6):1313-1321.
- [4] Musso G, Gambino R, Cassader M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update [J]. Obes Rev, 2010, 11(6):430-445.
- [5] Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China [J]. J Hepatol, 2009, 50(1):204-210.
- [6] Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. N Engl J Med, 2010, 363(14):1341-1350.
- [7] 潘勤, 范建高. 高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝病动物模型的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2009, 29:255-257.
- [8] 李芳芳, 李佳, 厉有名. 高脂饮食致非酒精性脂肪肝大鼠血清瘦素水平的变化 [J]. 中南医学科学杂志, 2009, 37(5):502-503.
- [9] Wang X, Cao Y, Fu Y, et al. Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease [J]. Lipids Health Dis, 2011, 10:234.
- [10] Xu L, Kim JK, Bai Q, et al. 5-Cholesten-3 β , 25-diol 3-sulfate decreases lipid accumulation in diet-induced nonalcoholic fatty liver disease mouse model [J]. Mol Pharmacol, 2013, 83(3):648-658.
- [11] Mracek T, Gao D, Tzanavari T, et al. Downregulation of zinc- α 2-glycoprotein in adipose tissue and liver of obese ob/ob mice and by tumour necrosis factor- α in adipocytes [J]. J Endocrinol, 2010, 204(2):165-172.
- [12] Bing C, Bao Y, Jenkins J, et al. Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(8):2500-2505.
- [13] Mracek T, Ding Q, Tzanavari T, et al. The adipokine zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG) is downregulated with fat mass expansion in obesity [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2010, 72(3):334-341.
- [14] Russell ST, Tisdale MJ. Studies on the anti-obesity activity of zinc- α 2-glycoprotein in the rat [J]. Int J Obes (Lond), 2011, 35(5):658-665.
- [15] Russell ST, Tisdale MJ. Studies on the antiobesity effect of zinc- α 2-glycoprotein in the ob/ob mouse [J]. Int J Obes (Lond), 2011, 35(3):345-354.
- [16] Bing C, Mracek T, Gao D, et al. Zinc- α 2-glycoprotein: an adipokine modulator of body fat mass [J]. Int J Obes (Lond), 2010, 34(11):1559-1565.
- [17] Gong FY, Deng JY, Zhu HJ, et al. Fatty acid synthase and hormone-sensitive lipase expression in liver are involved in zinc-alpha2-glycoprotein-induced body fat loss in obese mice [J]. Chin Med Sci J, 2010, 25(3):169-175.
- [18] Bao Y, Bing C, Hunter L, et al. Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes [J]. FEBS Lett, 2005, 579(1):41-47.

(此文编辑: 朱雯霞)