

高脂饮食致非酒精性脂肪性肝病大鼠小肠、肝脏中 NOD 样受体蛋白 3 及相关炎症因子的表达 *

夏恩蕊, 张素妍, 田格格, 李 浩, 杜玉锐, 张顺贞[△]

(云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 目的 观察高脂饮食致非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)大鼠小肠、肝脏中 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)及相关炎症因子表达情况。方法 SD 雄性大鼠 20 只适应性喂养 1 周后,随机分为正常组、模型组,每组 10 只,正常组普通饲料喂养,模型组高脂饲料喂养。8 周末取材,观察肝 HE 及油红 O 染色病理切片,检测各组血清和肝脏中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、白介素-18(IL-18)、白介素-1 β (IL-1 β)。RT-PCR、免疫组化检测肝、肠 NLRP3 表达。结果 与正常组相比,模型组大鼠肝脏表现出明显的脂肪变性和炎症病变,肝脏、血清中 ALT、AST、TG 显著升高($P<0.05$),TC 升高,差异不明显,IL-18、IL-1 β 显著升高($P<0.05$);肝脏、小肠 NLRP3 表达量亦显著升高($P<0.05$)。结论 NAFLD 可引起大鼠小肠、肝脏中 NLRP3 及相关炎症因子上调。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病;NOD 样受体蛋白 3 炎症小体;炎症因子

中图分类号: R575.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2021)05-0013-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.05.003

Expression of Nod-like Receptor Protein 3 in Intestine and Liver of Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-fat Diet

XIA Enrui, ZHANG Suyan, TIAN Gege, ZHANG Shunzhen

(School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the expression of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) and related inflammatory factors in the small intestine and liver of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) rats caused by high-fat diet. **Methods** After one week of adaptive feeding, 20 SD male rats were randomly divided into a normal group and a model group with 10 rats in each group. The normal group was fed with ordinary diet and the model group was fed with high-fat diet. Samples were collected at the end of the 8th week to observe liver HE and Oil Red O stained pathological sections, and detect alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), cholesterol (TC), triglycerides (TG), and interleukin 18 (IL) in serum and liver -18), interleukin 1 β (IL-1 β). Detect the expression of NLRP3 in liver and intestine. **Results** Compared with the normal group, the liver of the model group showed obvious steatosis and inflammatory lesions. The ALT, AST and TG in the liver and serum were significantly increased ($P<0.05$), and the TC was increased, but the difference was not significant. IL-18 and IL-1 β were significantly increased ($P<0.05$); the expression of NLRP3 in the liver and small intestine was also significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** NAFLD can cause up-regulation of NLRP3 and related inflammatory factors in the small intestine and liver of rats.

KEY WORDS: nonalcoholic fatty liver disease; NOD-like receptor protein 3; inflammasomes; inflammatory cytokines

收稿日期: 2021-06-18

* 基金项目: 国家自然科学基金(81760818);云南省高校中医证候微观辨证重点实验室(20190720);云南省科技厅中医联合专项[2018FF001(-042)];云南省科技厅中医联合专项-重点项目(202101AZ070001-008)

第一作者简介: 夏恩蕊(1997-),女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治肝胆疾病。

[△]通信作者: 张顺贞, E-mail: 694415176@qq.com

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种与胰岛素抵抗和遗传易感密切相关的代谢应激性肝损伤, 疾病谱包括非酒精性脂肪肝变、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化和肝细胞癌^[1]。随着肥胖发病率的增加, NAFLD 已成为全球关注的主要健康问题之一。NLRP3 是一种模式识别受体 (PRRs), 隶属于 NOD 样受体家族 (NOD-like receptor, NLRs), 是 NLRP3 炎症小体的组成部件之一^[2]。在病原体相关分子模式 (PAMPs) 或损伤相关分子模式 (DAMPs) 的刺激下, NLRP3 可出现上调, 启动炎症小体的组装, 介导大量 IL-18、IL-1 β 的释放^[3-5]。NAFLD 上调肝脏中 NLRP3, 进而诱导 IL-18、IL-1 β 的增加^[6], 这一过程是单纯脂肪肝进展到 NASH 及肝纤维化的关键因素之一^[7]。本研究旨在探讨 NAFLD 模型大鼠小肠、肝脏中 NLRP3 及相关炎症因子表达情况。

1 材料与仪器

1.1 动物 SD 雄性大鼠 (180~220 g) 20 只 [购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK (湘) 2016-0002, 实验单位使用许可证编号: SYXK (滇) K2013-0002]。

1.2 试剂 高脂饲料 (82.5% 普通饲料、10% 猪油、2% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、5% 蛋黄粉)^[8]。普通饲料由楚商生物有限公司提供。

ALT、AST、IL-18、IL-1 β 、脂多糖 ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, MM-0047R)。TC、TG 生化试剂盒 (南京建成, 20190824)。Ultrapure RNA Kit RNA 提取试剂盒 (康为世纪, CW0581S); HiFiScript cDNA Synthesis Kit (康为世纪, CW2569M); UltraSYBR Mixture (康为世纪, CW0957M)。NLRP3 抗体 (abcam, ab214185)、SP 免疫组化试剂盒 (中杉金桥科技公司, 2004C1009)、DAB 显色试剂盒 (中杉金桥科技公司, 2024G0331)。

1.3 仪器 垂直板电泳装置 (TanonVE-180P RE)、垂直板电泳胶转膜仪装置 (Tanon VE-586)、荧光定量 PCR 仪 (Heal Force, CG)、石蜡切片机 (Thermo, Finesse 325)、显微镜 (奥林巴斯, CX23)。

2 方法

2.1 动物分组及取材 将 20 只 SD 雄性大鼠随机分为 2 组, 即正常组、高脂饮食组, 每组各 10 只。正

常对照组给予普通饲料, 高脂饮食组给予高脂饲料。4 周末每组取 2 只验模, 8 周末处死动物, 收集血清、肝脏及小肠样本。肝大叶置于 4% 多聚甲醛固定, 室温保存。其余肝脏和小肠分装一份置于 RNA 保存液中, 其余分装后 -80℃ 保存。血清样本分装后 -80℃ 保存。

2.2 血清肝功能变化 血清 4℃ 解冻, 根据试剂盒说明书检测大鼠血清 ALT、AST、TC、TG 水平。

2.3 肝脏组织病理切片 取 4% 多聚甲醛固定的肝大叶, 常规操作制备肝组织石蜡切片, HE 染色后显微镜下 (10×40 倍) 拍摄病理图片。

2.4 ELISA 试剂盒检测大鼠血清、肝脏炎症因子 按试剂盒说明书操作, 检测血清、肝组织中的 IL-18、IL-1 β 。

2.5 RT-PCR 法检测大鼠肝脏、小肠组织中 NLRP3 mRNA 表达量 按试剂盒步骤提取 RNA, 测定浓度和纯度。利用 Primer3 软件设计引物序列, 由华大基因合成, 以 RT-PCR 方法检测 NLRP3 mRNA 水平。

2.6 免疫组化法检测大鼠肝脏、小肠组织中 NLRP3 蛋白表达水平 肝脏切片进行常规脱蜡复水、抗原修复、过氧化物酶结合、抗原封闭。NLRP3 一抗 4℃ 孵育过夜, 37℃ 复温 30 min, PBS 冲洗, 滴加二抗, 37℃ 孵育 20 min, PBS 冲洗。DAB 显色 5 min, PBS 冲洗, 苏木精复染 5 min, 盐酸酒精分化 1~3 s, 自来水冲洗 10 min, 常规脱水, 透明, 封片, 镜检。

2.7 统计学分析 通过 SPSS20.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。免疫组化结果使用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行阳性率统计。

2.8 伦理学审查 本研究方案经由云南中医药大学实验动物伦理委员会审批 (批号: R-06201947), 符合实验室动物管理与使用准则。

3 结果

3.1 肝组织病理学变化

3.1.1 肝脏形态观察 正常组大鼠肝脏呈暗红色, 表面光滑, 边缘锐利, 体积较小。模型组大鼠肝脏颜色明显偏黄, 表面有脂肪粒凸起, 有油腻感, 体积较大。如图 1。

3.1.2 HE 染色 正常组大鼠肝组织肝索清晰, 肝细胞形态规则, 沿肝索有序排列, 细胞核边缘清晰, 胞质

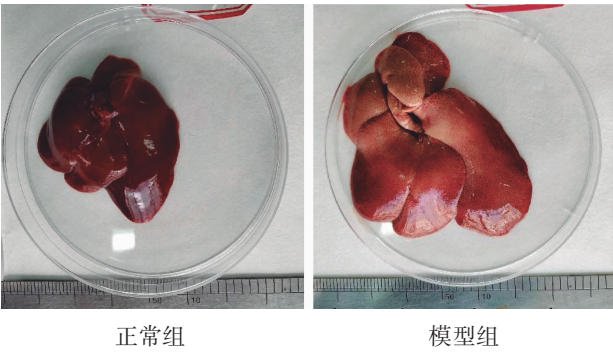


图 1 肝脏形态

未见明显脂肪空泡及炎性病变。高脂饮食组大鼠肝细胞排列紊乱,可见明显的肝细胞气球样变,细胞大小不一,出现大量脂肪空泡,部分细胞核边缘模糊或不可见。如图 2。

3.1.3 油红 O 染色 正常组肝组织基本无橘红色脂滴,细胞核清晰。模型组大鼠可见大量圆形脂肪空泡,以及大面积橘红色脂滴,细胞核边缘多不清晰,细胞形态不规则,与正常组相比,出现明显的脂肪变性。如图 3。

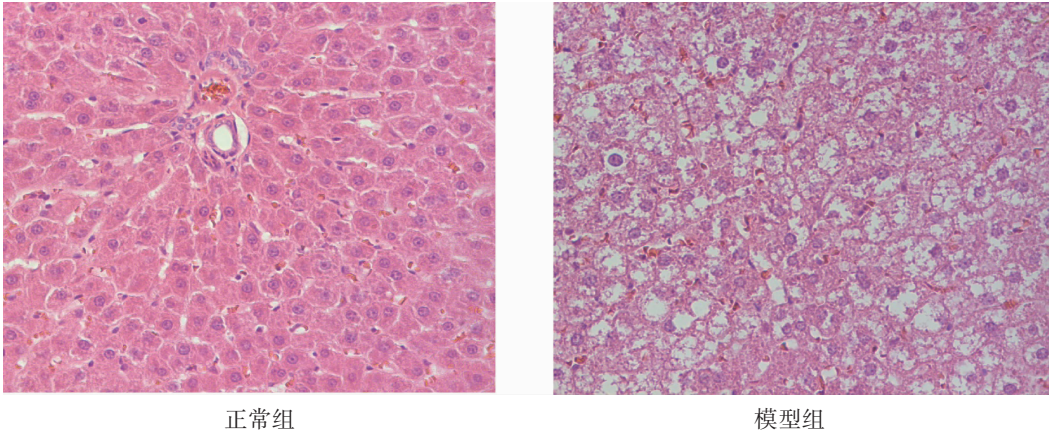


图 2 肝组织病理切片(HE 染色病理切片,×400)

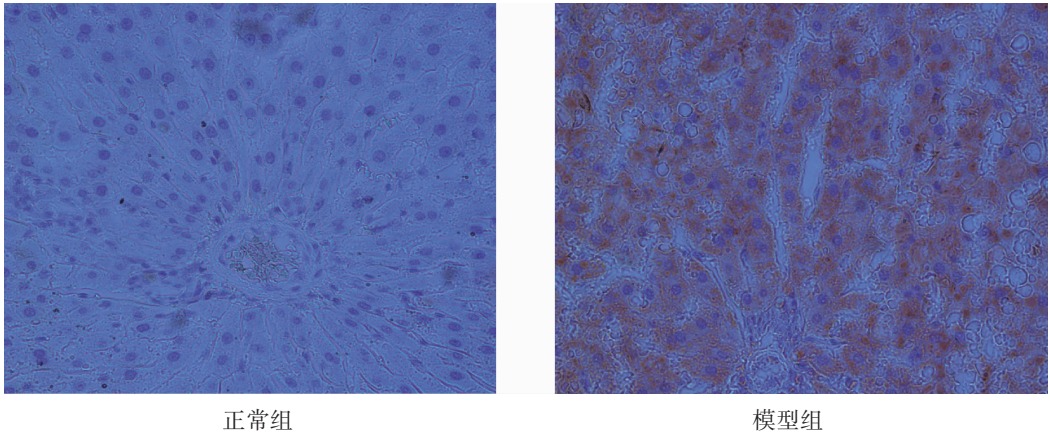


图 3 肝组织病理切片(油红 O 染色病理切片,×400)

3.2 生化指标 检测结果显示,模型组大鼠血清肝功能指标 ALT、AST 显著高于正常组($P<0.05$),提示模型组大鼠存在肝脏细胞受损情况。此外,模型组大鼠肝脏中 TC、TG 显著高于正常组($P<0.05$),血清中 TG 显著升高($P<0.05$),TC 有上升趋势,但与正常组无显著差异($P>0.05$)。如表 1。

3.2.1 肝脏、血液中炎症因子 ELISA 试剂盒检测结果显示,与正常组相比,模型组肝脏中 IL-1 β 、IL-18 显著升高 ($P<0.05$),血清中 IL-1 β 显著升高 ($P<$

0.05)。如表 2。

3.2.2 RT-PCR 检测肝脏、小肠中 NLRP3mRNA 表达量 RT-PCR 结果表明,模型组大鼠肝脏、小肠 NLRP3mRNA 表达量显著升高($P<0.05$)。如表 3。

3.2.3 免疫组化法检测肝脏、小肠中 NLRP3 表达量与正常组相比,模型组大鼠肝脏、小肠 NLRP3 表达量显著升高,且 $P<0.05$,如表 4。从免疫组化图片中可以看出,模型组大鼠较正常组大鼠的棕色区域更多,即 NLRP3 阳性表达更高,如图 4。

表 1 大鼠生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT		AST		TC		TG	
		肝脏 /(ng·L ⁻¹)	血清 /(ng·L ⁻¹)	肝脏 /(ng·L ⁻¹)	血清 /(ng·L ⁻¹)	肝脏 /(mmol·gprot ⁻¹)	血清 /(mmol·L ⁻¹)	肝脏 /(mmol·gprot ⁻¹)	血清 /(mmol·L ⁻¹)
正常组	8	15.78±1.93	15.72±1.32	47.08±4.32	47.29±2.6	0.58±0.20	0.67±0.18	7.82±2.49	1.11±0.26
模型组	8	21.55±2.02 [▲]	21.99±1.09 [▲]	67.1±5.37 [▲]	69.8±4.27 [▲]	0.94±0.20 [▲]	0.91±0.13	10.35±1.93 [▲]	1.33±0.46 [▲]
F 值		0.19	0.25	0.67	1.21	0.80	0.51	0.24	1.24
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05

注:与正常组相比, [▲]P<0.05。

表 2 大鼠炎症因子表达量比较($\bar{x} \pm s$, ng·L⁻¹)

组别	n	IL-1β		IL-18	
		肝脏	血清	肝脏	血清
正常组	8	37.77±1.82	45.28±9.65	164.23±35.55	106.72±16.64
模型组	8	43.31±1.71 [▲]	65.2±17.19 [▲]	196.13±35.63	139.76±11.07 [▲]
F 值		0.116	1.556	0.218	1.437
P 值		<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

注:与正常组相比, [▲]P<0.05。

表 3 大鼠 NLRP3mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3mRNA	
		肝脏	小肠
正常组	3	0.01±0.004	0.002±0.001
模型组	3	0.031±0.001 [▲]	0.221±0.109 [▲]
F 值		4	15.659
P 值		<0.05	<0.05

注:与正常组相比, [▲]P<0.05。

表 4 大鼠 NLRP3 阳性率($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3 阳性率/%	
		肝脏	小肠
正常组	3	0.0065±0.004	0.0037±0.005
模型组	3	0.0402±0.0133 [▲]	0.0349±0.0121 [▲]
F 值		3.284	7.454
P 值		<0.05	<0.05

注:与正常组相比, [▲]P<0.05。

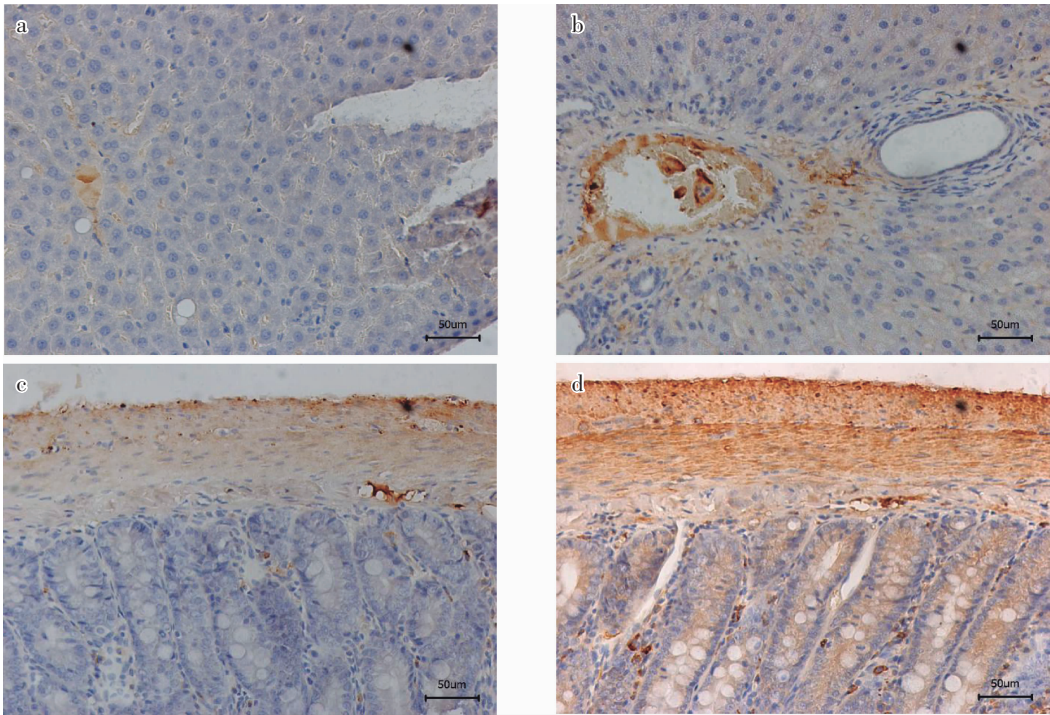


图 4 NLRP3 表达量(免疫组化染色, ×400)

注: a.正常组肝脏, b.模型组肝脏, c.正常组小肠, d.模型组小肠

4 讨论

孙林林等^[8]对高脂模型进行改良,添加胆酸钠及蛋黄粉增加肝脏对胆固醇的吸收,加快了成模速度,该改良模型 8 周出现炎症反应,12 周则形成明显的肝脏纤维化。本实验证实该模型成模较快,比普通高脂模型有更好的炎症反应。

“肠-肝轴”在 1988 年由 Marshall 提出^[9],其认为肠道与肝脏由于门静脉的连接和相同的胚胎起源,二者在生理病理方面相互影响^[10]。肝肠之间可通过门静脉进行物质交换,而肠道菌群及其它物理化学因素的改变,可能造成肠道屏障损伤,肠内有害物质(如 LPS)进入门静脉,激活小肠和肝脏固有免疫,上调炎症因子,进一步加重了肝内炎症和代谢紊乱^[11]。课题组对 NAFLD 肝、肠 NLRP3 和相关炎症因子变化进行探讨,发现 NAFLD 大鼠中小肠、肝脏中 NLRP3 表达显著升高,肝脏、血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-18 显著上升。NAFLD 不仅能够激活肠道的固有免疫,且能通过门静脉引起肝脏免疫反应的激活,并进一步增加炎症因子的释放。

有研究认为高脂饮食改变肠道菌群,诱发肠道炎症,肠道屏障功能减弱后,LPS 可从肠道入血,并经门静脉进入肝脏,激活 Toll 样受体 4(TLR4),使肝 NLRP3 炎症小体活化,随后 IL-18、IL-1 β 释放增加,肝脏炎症反应加剧^[12-14]。

NLRP3 炎症小体的激活途径多样,微生物、胆汁酸等其它因素是否参与 NAFLD 模型大鼠小肠、肝脏内 NLRP3 的调节尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志,2018,34(5):947-957.
- [2] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y H, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13):3328.
- [3] TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6):805-820.
- [4] MARTINON F, BURNS K, TSCHOPP J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β [J]. Mol Cell, 2002, 10(2):417-426.
- [5] SHI J J, GAO W Q, SHAO F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(4):245-254.
- [6] 尹抗抗, 聂娟, 唐标. 降脂理肝汤抑制 NLRP3 炎症小体活化减轻高脂饮食诱导的大鼠非酒精性脂肪肝病[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(22):2716-2720.
- [7] WREE A, MCGEOUGH M D, PEÑA C A, et al. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD[J]. J Mol Med (Berl), 2014, 92(10):1069-1082.
- [8] 孙林林, 石军, 郝菁华, 等. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型的建立[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(3):254-257.
- [9] MARSHALL J C. The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses[J]. Can J Physiol Pharmacol, 1998, 76(5):479-484.
- [10] 王全楚, 步子恒, 李青上. 肠肝轴的现代概念及其在肝脏疾病中的作用[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2015, 24(9):1155-1158.
- [11] 郭一, 李军祥, 毛堂友, 等. 炎症小体 NLRP3 在高脂饲料饲喂诱导的 NASH 大鼠肝、肠中的表达及葛根芩连汤干预研究[J]. 环球中医药, 2018, 11(2):185-190.
- [12] SPENCER M D, HAMP T J, REID R W, et al. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency[J]. Gastroenterology, 2011, 140(3):976-986.
- [13] ZHU L X, BAKER S S, GILL C, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH[J]. Hepatology, 2013, 57(2):601-609.
- [14] LIANG Y J, ZHANG Y P, DENG Y J, et al. Chaihu-Shugan-San decoction modulates intestinal microbe dysbiosis and alleviates chronic metabolic inflammation in NAFLD rats via the NLRP3 inflammasome pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018:9390786.
- [15] 敬梦辉, 蒋元烨, 范伏岗, 等. 非酒精性脂肪性肝病动物实验模型最新研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2017,

- 26(18):2049–2052.
- [16] 张建华. 槲皮素对高脂诱导 NAFLD 大鼠肝损伤的保护作用及其机制的研究[D]. 南京:南京大学,2016.
- [17] 孙晓琦,方南元,薛博瑜. 炎性小体在脂多糖诱导小鼠巨噬细胞中的表达及大黄素干预作用[J]. 中华中医药杂志,2015,30(10):3747–3749.
- [18] COLL R C,Robertson A A,CHAE J J,et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Nat Med*,2015,21(3):248–255.
- [19] GURUNG P, ANAND P K, MALIREDDI R K, et al. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes[J]. *J Immunol*,2014,192(4):1835–1846.
- [20] CAI C,ZHU X W,LI P Z,et al. NLRP3 deletion inhibits the non-alcoholic steatohepatitis development and inflammation in Kupffer cells induced by palmitic acid[J]. *Inflammation*,2017,40(6):1875–1883.
- [21] SCHORN C,FREY B,LAUBER K,et al. Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome [J]. *J Biol Chem*,2011,286(1):35–41.
- [22] LEE G S,SUBRAMANIAN N,KIM A I,et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP[J]. *Nature*,2012,492(7427):123–127.
- [23] 姜华,闫宜青,江维,等. NLRP3 炎症小体活化、调控机制及相关疾病机制[J]. 中国科学: 生命科学,2017,47(1):125–131.
- [24] 薛丽君,肖琨珉,彭红叶,等. 非酒精性脂肪性肝病饮食相关动物模型研究进展[J]. 解放军医学杂志,2020,45(2):224–228.
- [25] KAYAGAKI N,WONG M T,STOWE I B,et al. Non-canonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4[J]. *Science*, 2013, 341(6151):1246–1249.
- [26] MU J,CHENG F F,WANG Q G,et al. Sini powder ameliorates the inflammatory response in rats with stress-induced non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting the nuclear factor kappa-B/pyrin domain-containing protein 3 pathway[J]. *J Tradit Chin Med*,2020,40(2):253–266.
- [27] YING Y Q, ZHANG H T, YU D, et al. Gegen Qinlian Decoction ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in rats via oxidative stress,inflammation,and the NLRP3 signal axis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6659445.