

# 盐酸二甲双胍对非酒精性脂肪肝大鼠脂肪组织肿瘤坏死因子 基因表达的影响

江庆澜<sup>1</sup>, 李瑜元<sup>1</sup>, 曾 峥<sup>1</sup>, 周永健<sup>1</sup>, 杜 洪<sup>1</sup>, 黄 健<sup>1</sup>, 何 淼<sup>2</sup>

(1. 广州市第一人民医院, 广东 广州 510180; 2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘 要:**【目的】以逆转录(RT)和实时定量聚合酶链式反应(real-time qPCR)方法检测和分析非酒精性脂肪肝(NAFLD)大鼠模型的药物干预效果。【方法】以高脂饲料饲喂雄性 Wistar 大鼠 12 周诱发 NAFLD, 然后转以基础饲料饲养, 并分别进行盐酸二甲双胍干预与蒸馏水灌喂对照, 每组 8 只, 为期 4 周。从大鼠脂肪组织提取总 RNA 并逆转录成为 cDNA, 通过 real-time qPCR 检测肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) mRNA 的相对水平, 以 t 检验分析两组间数据的差异。【结果】干预组大鼠脂肪组织的 TNF- $\alpha$  mRNA 相对水平平均值(0.063 $\pm$ 0.006)比对照组(0.126 $\pm$ 0.015)下降, 其差异显著( $t=4.662$ ,  $P=0.001$ )。【结论】盐酸二甲双胍可以显著地降低 NAFLD 大鼠脂肪组织 TNF- $\alpha$  基因的表达水平, 能够调节肝脏脂肪代谢和改善肝细胞脂肪变性。

**关键词:** 非酒精性脂肪肝病; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 干预; 基因表达; 盐酸二甲双胍

中图分类号: R575.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0383-04

## Tumor Necrosis Factor $\alpha$ Gene Expression in Adipose Tissue of Non-alcoholic Fatty Liver Disease Rats Intervened by Metformin Hydrochloride

JIANG Qing-lan<sup>1</sup>, LI Yu-yuan<sup>1</sup>, ZENG Zeng<sup>1</sup>, ZHOU Yong-jian<sup>1</sup>, DU Hong<sup>1</sup>, HUANG Jian<sup>1</sup>, HE Miao<sup>2</sup>

(1. The First Municipal People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, China;  
2. Life Sciences School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:**【Objective】To detect and analyze the effect of medical intervention for the rat model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) using the reverse transcription (RT) and real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time qPCR). 【Methods】The male Wistar rats were fed with high fatty chow for 12 weeks to induce NAFLD. And then, two groups of these rats were fed with the low fatty chow, and separately intervened by metformin hydrochloride or controlled by distill water for 4 weeks. Each group consisted of 8 rats. The total RNA of adipose tissue was extracted and reversely translated into cDNA. The relative level of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) mRNA was detected in the real-time qPCR. The data difference between two groups was analyzed by t-test. 【Results】The relative level of TNF- $\alpha$  mRNA in adipose tissue of intervenient group (0.063 $\pm$ 0.006) was decreased than that of control group (0.126 $\pm$ 0.015). Their difference was significant ( $t=4.662$ ,  $P=0.001$ ). 【Conclusion】Metformin hydrochloride can significantly decrease the expression level of the TNF- $\alpha$  gene in adipose tissue of NAFLD rats. It can adjust the adipose metabolism of liver and improve the steatosis in liver cell.

**Key words:** non-alcohol fatty liver disease; tumor necrosis factor  $\alpha$ , intervention; gene expression; metformin hydrochloride

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):383-386,400]

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是由于各种原因引起肝脏脂肪代谢功能障碍而导致肝细胞内脂肪 (主要为甘油三

酯) 蓄积过多的病理变化, 可由肝脏本身和肝外因素所致, 常见原因有营养缺乏、肥胖、糖尿病、妊娠、糖皮质激素、肝炎及药物或毒物的损伤等<sup>[1]</sup>, 具

收稿日期: 2005-08-20

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(5000424); 广东省科技计划项目(2003A3050803); 广州市卫生机构重点专科科研基金资助项目(2004Z001)

作者简介: 江庆澜(1957-), 女, 广东南海人, 副主任技师, 博士. E-mail: qinglanj@hotmail.com

体的发病机理尚未完全清楚,其中 NAFLD 的发病因素与肥胖最为密切。由于临床上取材的限制,动物模型在探索脂肪肝的发病机制、评价诊断方法、筛选防治药物等领域均有重要作用<sup>[2]</sup>,高脂饲料喂养是最常用的动物模型诱发 NAFLD 方法<sup>[3]</sup>。二甲双胍具有降低血糖、血甘油三酯和总胆固醇的功效,可改善胰岛素敏感性和引起胃肠不适而减少摄食量,能够明显改善 NAFLD 患者的肝功能和肝组织学指标<sup>[4]</sup>,在脂肪肝大鼠干预的研究结果表明,该药具有显著降低血脂、肝脂以及改善肝功能的功效<sup>[5]</sup>。应用二甲双胍治疗 NAFLD 的临床报道显示,患者口服该药物后血清转氨酶下降<sup>[6]</sup>,但该药的具体疗效、治疗机制及其副作用仍有待研究<sup>[4]</sup>。TNF- $\alpha$  作为一种细胞因子,在正常情况下主要是由脂肪组织产生,其血清水平与机体脂肪含量相关。TNF- $\alpha$  可促进胰岛素抵抗,影响肝内的糖代谢和引起肝脂变性,从而促进 NAFLD 的形成和发展<sup>[4]</sup>,TNF- $\alpha$  的抑制品可改善 NAFLD 病例的病况<sup>[7]</sup> 以及改善实验动物的胰岛素敏感性、肝细胞脂肪变性和肝炎的状况<sup>[8]</sup>。盐酸二甲双胍是临床常用的 2 型糖尿病治疗药物,国内外尚无关于该药影响脂肪组织 TNF- $\alpha$  mRNA 水平的报告。本研究以目前最有效的定量检测方法——实时定量 PCR 技术检测 Wistar 大鼠脂肪组织的 TNF- $\alpha$  mRNA 水平并以此作为检验 NAFLD 干预效果和药物筛选的一个分子生物学指标,探讨盐酸二甲双胍对 NAFLD 大鼠的干预效果,为今后个性化治疗做一种探索性的基础研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动 物

清洁级 Wistar 雄性大鼠购自广州医学院实验动物中心(合格证号:2002A044),体质量 180~230 g,共 32 只,随机分为基础饲料组、高脂饲料组、对照组和干预组四组,每组 8 只。大鼠自由饮水进食,分笼饲养在该中心的清洁级动物室(合格证号:2002B025)。饲养室内以 80 W 日光灯照明,实行 12 h 光/暗循环,设置室温(25 $\pm$ 1)。除基础饲料组大鼠外,其余各组饲喂高脂饲料 12 周,以取得脂肪肝大鼠模型。

### 1.2 高脂饲料与药物

高脂饲料按质量由 86.3%基础饲料、5%猪油、

8%蛋黄粉、0.2%胆酸钠(北京双旋生物培养基制品厂,批号 20030617)和 0.5%胆固醇(上海源聚生物科技有限公司,批号 031005)配制而成。干预药物为盐酸二甲双胍(美迪康,深圳市中联制药有限公司,国药准字 H44024853)。

### 1.3 干预与对照

经 12 周饲养后,解剖高脂饲料组和基础饲料组大鼠,并进行肝组织病理切片检查,确认高脂饲料组大鼠均已形成脂肪肝后,才将其余两组脂肪肝大鼠改喂基础饲料,参照药品说明书的成人用药量为 1~2 g/d 折算和预实验效果,在自由饮食的条件下,两组大鼠均在每天的上、下午分别进行 1 次灌胃,进行为期 4 周的药物干预与对照实验,其中干预组按体质量以 1.2 g/(kg·d) 的药物水溶液灌胃,对照组则以 7 mL/(kg·d) 的蒸馏水灌胃。

### 1.4 组织标本保存

所有动物在最后 1 次饲喂或给药后禁食 15 h 后,以 70 g/L 水合氯醛腹腔注射,大鼠麻醉后取出肝,在肝大叶距边缘约 4 mm 处切下小块组织,以 100 mL/L 的甲醛溶液固定,供病理切片用。剥离体内最大的脂肪组织块—附睾脂肪组织,立即置-85 超低温冰箱保存,以提取总 RNA。

### 1.5 肝组织病理学检查

固定后的肝组织块以石蜡包埋、切片行 HE 染色,在 200 倍的光学显微镜下观察和摄影。

### 1.6 总 RNA 提取

根据试剂盒 TRIZOL Reagent (Invitrogen 15596-026) 的使用方法,以 300 mg 冷藏的脂肪组织提取总 RNA,并用试剂盒 Rnase-Free DNase Set (QIAGEN 79254) 消化总 RNA 样品中所含的 DNA。然后,在 20  $\mu$ L 的 RNA 溶液中加入 0.6  $\mu$ L 的 500 mmol/L 的 EDTA 溶液,在 65 $^{\circ}$ C 加热 5 min,使 DNA 酶失活。所取得的 RNA 样品保存在-85 超低温冰箱。

### 1.7 逆转录反应

使用试剂盒 ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System (Promega 179215),以 Oligo(dT)<sub>15</sub> 引物进行逆转录反应,所合成 cDNA 并将样品保存在-20 超低温冰箱。

### 1.8 实时定量聚合酶链式反应

根据大鼠的  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 序列,合成看家基因和目标基因的引物(上海博亚生物技术有限公司)。看家基因  $\beta$ -actin

的引物对序列为 5 - attgtgatggactccggaga- 3 和 5 - ctccgtcaggatcttcatga- 3 , 扩增的 DNA 片段长度为 132 bp。目标基因 TNF- 的引物对序列为 5 - tgccgtgtggtaactctacct - 3 和 5 - cacattgagctgcacgtact - 3 , 扩增的 DNA 片段长度为 135 bp。

实时定量 PCR 使用试剂盒 QuantiTect™ SYBR Green PCR (QIAGEN 204143), 20 μL 的 PCR 反应混合液中含有: 10 μL 的 2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 7 μL 的 RNase Free Water, 2 μL 的 3 μmol/L 引物对混合液和 1 μL 的 cDNA (100 ng)。在荧光定量 PCR 仪 (MJ Research, DNA Engine Opticon™ 2 System) 进行实时定量 PCR, 反应条件设定: 预热变性, 95 °C, 15 min; 变性, 94 °C, 15 s; 退火, 51 °C, 30 s; 延伸, 72 °C, 30 s; 读板, 检测荧光值。重复由变性到读板步骤 44 次, 共进行 45 个循环的扩增。在完成 45 个循环的扩增反应后, 以 0.2 °C/s 的间隔从 65 °C 至 90 °C 读板, 获得溶解曲线。在同一实时定量 PCR 中, 所有样品都是复管检测。

采用内参照样品的 β-actin cDNA 的 PCR 产物 (模板浓度 0.0001~10 ng/reaction) 进行共 6 个点的 10 倍稀释梯度系列的扩增<sup>[9]</sup>, 起始模板浓度的对数与对应的 PCR 产物的阈值循环 (Threshold cycle, C<sub>T</sub>) 数值构成标准曲线图。

### 1.9 数据和统计分析

样品的荧光量的数据和扩增曲线图由荧光定量 PCR 仪的支持软件 Opticon MONITOR™ Analysis software version 2.02 (MJ Research) 实时产生。以阈值循环比较定量法 [Comparative C<sub>T</sub> (C<sub>T</sub>) quantification method]<sup>[9-11]</sup> 进行目标基因表达量分析, 各样品目标基因的相对表达水平通过其参考基因进行 mRNA 的定量校准。采用成对双样本平均值分析的 t- 检验方法, 比较基础饲料组与高脂饲料组之间以及干预组与对照组之间目标基因相对表达量的差异, 当 P < 0.05 时, 可认为具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 肝组织的病理改变

经 12 周高脂饲料喂养的大鼠肝脏组织每单位面积 1/3 以上的肝细胞内出现明显脂滴, 为大泡和小泡相伴的混合性肝细胞脂肪变性 (图 1A), 经 4 周的盐酸二甲双胍水溶液干预后, 肝细胞内

的脂变大泡基本消失 (图 1B)。对照组的脂变大泡趋于减少, 但改善状况不及干预组明显。

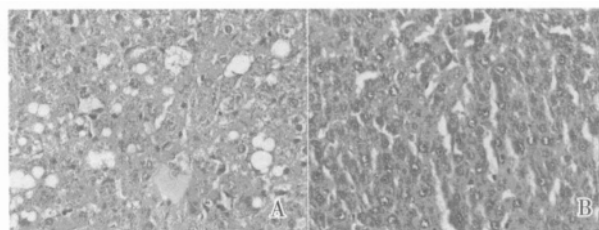


图 1 非酒精性脂肪肝大鼠的肝组织切片  
Fig.1 Sides of liver tissue of NAFLD rat  
A. Before intervention; B. After intervention

### 2.2 标准曲线和线性范围

参考基因 β-actin 定量标准曲线 (图 2) 的相关系数 (correlation coefficient, r) 表明内参样品 DNA 的对数浓度与阈值循环数间具有极强的线性关系,  $r^2=1.000$ 。

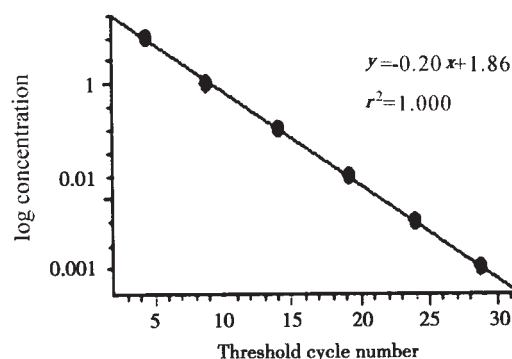


图 2 参考基因 β-actin 的标准曲线  
Fig.2 Standard curve of reference gene β-actin

### 2.3 PCR 产物的确定

β-actin 和 TNF- 的溶解曲线均表明它们的熔点分别在 84.4 °C 和 83.0 °C, 参考基因和目标基因的 PCR 产物均呈单一的峰, 峰形状都较尖锐 (图 3), 表明实验中未出现污染、引物二聚体和假阳性的现象, 经电泳后观察, 证实所有的 PCR 产物都是目的条带。

### 2.4 脂肪组织的 TNF- mRNA 水平的变化

实时定量 PCR 结果和配对 t- 检验显示, 经过 12 周高脂饲料的喂养, NAFLD 大鼠脂肪组织的 TNF- mRNA 相对表达量平均值 ( $3.637 \pm 0.736$ ) 比基础饲料组大鼠的平均值 ( $3.917 \pm 0.822$ ) 稍有所下降。

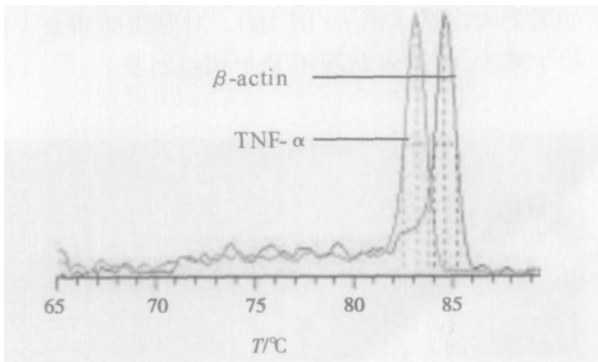


图3 参考基因  $\beta$ -actin 和目标基因 TNF- $\alpha$  的溶解曲线  
Fig.3 Melting curves of reference gene  $\beta$ -actin and target gene TNF- $\alpha$

降, 配对 t 检验结果显示差异不显著。NAFLD 大鼠经过 4 周的盐酸二甲双胍干预之后, TNF- $\alpha$  mRNA 的相对表达量平均值( $0.063 \pm 0.006$ )比蒸馏水对照组大鼠的平均值( $0.126 \pm 0.015$ )下降, 配对 t 检验表明差异显著 ( $t=4.662, P=0.001$ )。

### 3 讨论

近几年来, 国内外对于临床和动物模型的 NAFLD 发病途径及其干预药物的研究渐趋于在遗传缺陷和基因表达差异等方面进行。NAFLD 作为一种遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 与遗传因素、肥胖、环境因素、氧应激、脂质代谢异常、脂质氧化障碍、胰岛素抵抗和免疫反应损害等密切相关, 这对于研究具体的发病机理有着极大的难度。在 NAFLD 病例, 脂肪组织 TNF- $\alpha$  mRNA 水平的增加可以抑制其脂酶的活性, 显著地影响到血清中甘油三酯浓度上升, 而血清 TNF- $\alpha$  的增加可抑制胰岛素受体的酪氨酸激酶活性, 造成胰岛素抵抗的增加和引发炎症, 脂酶活性的抑制和胰岛素抵抗导致的肝脂积累可能是 NAFLD 发病的关键环节<sup>[12,13]</sup>。病例或 ob/ob 小鼠实验报道, NAFLD 肝组织 TNF- $\alpha$  mRNA 水平有所增加<sup>[4]</sup>, 影响肝内糖、脂代谢并促进 NAFLD 的形成和发展。

在本研究中, 经 12 周的高脂饲料喂养, 实验大鼠肝组织病理切片显示肝细胞出现大、小泡混合性的脂肪变性, 高脂饲料组 NAFLD 大鼠脂肪组织的 TNF- $\alpha$  mRNA 相对表达量比基础饲料组的正常大鼠稍有下降而无显著差异。这提示, 以高脂饲料喂养实验大鼠, 在短期内诱发 NAFLD 的过程

并非是由于同时的脂酶活性抑制和胰岛素抵抗等因素所致, 而是过量摄入的食物脂类超过了动物本身脂酶的消化能力, 导致脂类在肝细胞内积聚和引起病变, 高脂饲料组 NAFLD 大鼠脂肪组织 TNF- $\alpha$  mRNA 相对水平稍有所下降, 可能是在短期内该组织在基因转录水平上对机体高脂状况和 TNF- $\alpha$  含量增加的反馈性调节。本项实验结果显示, 以高脂饲料对正常大鼠诱发 NAFLD 的机理及病程发展与过量摄食高脂、高营养和高能量食物所致的 NAFLD 病例相似。然而, 在 NAFLD 的实际病例中, 往往致病原因复杂且发病进展经历较长的时程, 采用不同方法建立 NAFLD 动物模型, 以分别研究各种诱因致病的机理和干预效果以及应用于临床个性化治疗显得尤为必要。

NAFLD 大鼠被改喂基础饲料及经过 4 周的干预和对照实验之后, 干预组大鼠肝细胞的大泡性脂变现象基本消失, 对照组大鼠肝细胞的脂变程度也有所改善, 脂变大泡减少或趋于消退。这表明, 经过一段时间的食物结构调整之后, 短期内过度摄入高脂、高营养食物所致的 NAFLD 病症可以逆转。干预组和对照组大鼠在 NAFLD 的逆转过程中, 脂肪组织 TNF- $\alpha$  基因的低水平转录有利于增加脂酶活性、改善肝细胞脂肪变性和促进肝脂的消减, 其脂肪组织的 TNF- $\alpha$  mRNA 相对水平均下降并低于基础饲料组的正常大鼠, 这种现象可能是对于机体仍然存在高含量 TNF- $\alpha$  的适应性调整。

本项研究结果显示, 经盐酸二甲双胍干预 4 周之后, NAFLD 大鼠脂肪组织的 TNF- $\alpha$  基因的相对表达量比对照组显著下降。这表明, 盐酸二甲双胍可降低脂肪组织 TNF- $\alpha$  基因的表达水平, 以增加脂酶的活性和提高胰岛素敏感性, 在调节肝脏的脂肪代谢功能和改善肝细胞脂肪变性等方面具有临床效果, 这对于使用该药治疗 NAFLD, 尤其是伴有胰岛素抵抗和发炎症的病例应是一种可行的考虑。

#### 参考文献:

- [1] 陈泽民. 脂肪肝及酒精性肝病中西医结合治疗[J]. 中华消化杂志, 2002, 22 (8): 489- 490.
- [2] 孙大裕. 脂肪肝动物模型的研究进展[J]. 中华消化杂志, 2002, 22 (5): 305- 306.
- [3] BUGIANESI E, ZANNONI C, VANNI E, et al. Non- (下转第 400 页 to page 400)

脏病学角度进行早期干预是我们这项研究的最终目的。

参考文献:

- [1] SAMANI N J, THOMPSON J R, O TOOLE L, et al. A meta - analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin - converting enzyme gene with myocardial infarction [J]. *Circulation*, 1996, 94 (4) : 708- 712.
- [2] NASSAR B A, DUNN J, TITLE L M, O NEILL B J, et al. Relation of genetic polymorphisms of apolipoprotein E, angiotensin converting enzyme, apolipoprotein B-100, and glycoprotein IIIa and early - onset coronary heart disease [J]. *Clin Biochem*, 1999, 32(4): 275- 282.
- [3] FATINI C, ABBATE R, PEPE G, et al. Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile [J]. *Eur Heart J*, 2000,21(8):633- 635.
- [4] LEFER A M. Nitric oxide:nature s naturally occurring leukocyte inhibitor [J]. *Circulation*, 1997, 95 (3):553- 554.
- [5] COLOMBO M G, ANDREASSI M G, PARADOSSI U, et al. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298 - >

Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease [J]. *Heart*, 2002, 87 (6):525- 528.

- [6] ROSSI G P, CESARI M, ZANCHETTA M, et al. The T- 786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(6): 930- 937.
- [7] WIEMER G, LINZ W, HATRIK S, et al. Angiotensin- converting enzyme inhibition alters nitric oxide and superoxide release in normotensive and hypertensive rats[J]. *Hypertension*,1997, 30(5):1183- 1190.
- [8] CHEN Q, REIS S E, KAMMERER CM, et al. ApoE polymorphism and angiographic coronary artery disease severity in the Women s Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study [J]. *Atherosclerosis*, 2003, 169 (1): 159- 167.
- [9] MANSUR A P, ANNICCHINO - BIZZACCHI J, FAVARATO D, et al. Angiotensin- converting enzyme and apolipoproteins genes polymorphism in coronary artery disease[J]. *Clin Cardiol* ,2000, 23(5):335- 340.

(编辑 黄小延)

(上接第 386 页 from page 386)

alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause- effect relationship? [J]. *Dig Liver Dis*, 2004, 36 (3):165- 173.

- [4] 方继伟,范建高. 二甲双胍对 NAFLD 的治疗作用及其机制[J].*国外医学消化系疾病分册*, 2004,24 (6):372- 374.
- [5] 高志强,陆付耳,董 慧,等.二甲双胍干预高脂饲养所致大鼠脂肪肝的研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005,13 (2):101- 104.
- [6] MARCHESINI G, BRIZI M, BIANCHI G, et al. Metformine in non- alcoholic steatohepatitis [J]. *Lancet*, 2001,358 (9285):893- 894.
- [7] LI Z, YANG S, LIN H, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2003, 37 (2):343- 350.
- [8] KOTEISH A, MAE D A. Animal models of steatohepatitis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2002, 16 (5):679- 690.
- [9] ANDR P, CATHERINE M, OLIVIER B, et al. Rat pro- inflammatory cytokine and cytokine related mRNA

quantification by real - time polymerase chain reaction using SYBR green[J]. *BMC Immunology*, 2004, 5 (1):3- 14.

- [10] CHEN Y P, HIGGINS J A, GUNDERSEN- RINDAL D E. Quantitation of a glyptapanteles indiensis polydnavirus gene expressed in parasitized host, *Lymantria dispar*, by real- time quantitative RT- PCR[J]. *J Virol Methods*, 2003, 114 (2):125- 133.
- [11] 吴明玮,洗励坚,李晓梅,等. 二氢嘧啶脱氢酶、胸苷酸合成酶、c- myc 和 p53 基因在小鼠肝组织中表达的昼夜节律性研究[J]. *癌症*, 2004, 23 (3):235- 242.
- [12] YASUO M, AYAKO K, ATSUHIKO T, et al. Relationship between serum tumor necrosis factor- and insulin resistance in obese men with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diab Res Clin Prac* , 2001, 52 (2):119- 123.
- [13] HUI J M, HODGE A, FARRELL G C, et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- alpha or adiponectin? [J]. *Hepatology*, 2004, 40 (1):185- 194.

(编辑 王晓鹰)