

网络出版时间: 2017-7-20 23:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170720.2354.019.html>

◇预防医学研究◇

高脂饮食对 NAFLD 模型大鼠肠道菌群及血清 LPS 水平的影响

程 靖 李枫林 张 宝 管石侠 侯丽丽 蒋建华

摘要 目的 观察高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 模型大鼠肠道菌群及血清内毒素 (LPS) 水平的变化, 探讨肠道菌群改变及 LPS 血症在 NAFLD 发病过程中的作用。方法 雄性 SD 大鼠 12 只随机分为对照组和高脂组, 对照组以普通饮食饲养, 高脂组给予高脂饲料喂养, 于实验第 16 周末处死大鼠, 采用全自动生化分析仪测定血清生化指标, 电镜观察两组大鼠肝脏病理改变, ELISA 法检测血清 LPS、白介素 (IL)-1 β 、IL-18 水平的变化, 通过实时荧光定量 PCR 法检测粪便大肠杆菌和乳酸杆菌的表达水平。结果 高脂组大鼠血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、三酰甘油、总胆固醇、极低密度脂蛋白水平较对照组明显升高, 高密度脂蛋白水平明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与对照组相比, 高脂组大鼠血清 LPS、IL-1 β 、IL-18 水平明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 高脂组大鼠的大肠杆菌显著升高, 而乳酸杆菌明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。血清 LPS 水平与大肠杆菌量存在相关性。结论 高脂饮食诱导的 NAFLD 模型大鼠存在 LPS 血症和肠道菌群的改变, 不合理的饮食结构及粪便菌群的改变在 NAFLD 的发病过程中起着重要的作用。

关键词 高脂饮食; 非酒精性脂肪肝; 肠道菌群; 内毒素

中图分类号 R 575.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)09-1341-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.019

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外酒精和其他明确肝脏损伤因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性为主要特征的临床病理综合征^[1]。至今关于 NAFLD 的发病机制的研究尚未完全统一, 越来越多的研究^[2]报道菌群紊乱、细菌移位及肠道黏膜屏障的改变等所致的肠源性内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 血症在 NAFLD 的发病过程中起着重要的作用。代谢性疾

病的慢性炎症学说已经被众多研究证实, 研究^[3]表明高脂膳食引起的肠道菌群变化可能导致了这种慢性炎症的发生。长期进食高脂食物可引起肠道内正常的优势菌群减少甚至消失, 而革兰阴性菌的数量却大大增加并释放 LPS, 引起 LPS 血症。而“代谢性 LPS 血症”对 NAFLD 患者体内长期低水平全身性炎症反应的发生具有重要的诱导作用。该研究旨在通过高脂饮食建立 NAFLD 动物模型, 通过观察体内炎症水平、LPS 水平及肠道菌群的变化探讨高脂饮食在 NAFLD 发病过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级雄性 SD 大鼠 12 只, 鼠龄 7 周, 160 ~ 200 g, 购自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 饲料配方 普通饲料配方为玉米 30%、小麦 36%、鱼粉 9%、豆粕 20%、麸皮 3%、骨粉 2% 和盐 0.75 kg/500 kg, 总能量为 13.55 KJ/g。高脂饲料配方为: 80% 普通饲料 + 20% 猪油。蛋白质、脂肪、碳水化合物产热比为 14.6 : 48.6 : 36.7。

1.1.3 主要试剂 LPS、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-18 ELISA 试剂盒购自苏州卡尔文生物科技有限公司; 大肠埃希菌 (*Escherichia coli* 1.356) 购自中国科学院普通微生物菌种保藏管理中心; 安徽医科大学微生物实验室分离培养出的乳酸杆菌作为乳酸杆菌属标准菌株。

1.1.4 主要仪器 μ Quant 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); Universal 320/320R 型低温高速离心机 (德国 Hettich 公司); 核酸测定仪 (美国 Thermo 公司); LightCycler 480 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); Mini-PROTEAN2 电泳装置、转移装置、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 健康清洁级雄性 SD 大鼠 12 只, 按每笼 3 只, 分笼饲养在 23 ~ 26 $^{\circ}$ C 的动物室内, 经 1 周适应性饲养之后, 随机将 12 只大鼠

2017-05-09 接收

基金项目: 安徽省年度重点科研项目 (编号: 1604a0802081)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院临床营养科, 合肥 230022

作者简介: 程 靖, 女, 医师, 硕士;

蒋建华, 女, 主任医师, 副教授, 责任作者, E-mail: Jjhua@yeah.net

分成对照组和模型组,每组6只,对照组予以普通饲料喂养,模型组给予高脂饲料喂养诱导NAFLD大鼠模型,自由摄食和饮水,每日早晨、傍晚各投食1次,环境温度和湿度适宜,每周称重1次,喂养16周。

1.2.2 标本处理 16周末,两组大鼠禁食12h,腹主动脉采血后处死大鼠,常规制备血清后于-70℃冰箱保存备测;用无菌镊子取大鼠结肠粪便约0.2g于无菌管中,-70℃保存备测。

1.2.3 观察指标及生化指标的测定 取肝脏组织,测定大小并拍照,肉眼观察形态学改变;取肝脏,称量湿肝重并计算肝指数,肝指数(%) = 湿肝重/体重 × 100%;取1mm³肝组织,用4℃ 2.5%戊二醛溶液固定,环氧树脂包埋,切超薄片,枸橼酸铅染色,在透射电镜下观察肝细胞超微结构变化。取腹主动脉血,分离血清,用全自动生化分析仪测定血清生化指标谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、三酰甘油(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein cholesterol, HDL-c)、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)水平。

1.2.4 血清LPS、IL-1β、IL-18水平的测定 取分离血清,采用ELISA法检测血清LPS、IL-1β、IL-18水平,试剂配制和操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.5 肠道大肠杆菌和乳酸杆菌的检测 处死大鼠,取大鼠结肠粪便0.2g,利用粪便DNA提取试剂盒提取大鼠粪便标本的细菌基因组DNA。复苏并培养大肠杆菌、乳酸杆菌标准菌株,刮取菌落,用细菌DNA提取试剂盒提取标准菌株DNA;取大肠杆菌和乳酸杆菌的标准菌株DNA,分别与数个粪便样品DNA进行常规PCR扩增反应,待PCR反应结束后,将标准菌和样品的PCR产物进行凝胶电泳,用凝胶分析系统观察结果并拍照;电泳条带在紫外灯下观察,割下明亮条带,利用普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收提纯标准菌株DNA溶液,并检测其浓度及光密度值。计算出1μl标准品的基因拷贝数(大肠杆菌1.68 × 10¹³,乳酸杆菌1.43 × 10¹³)。用无酶水依次按10倍梯度稀释各标准品浓度,使大肠杆菌和乳酸杆菌均成10⁷~10¹¹拷贝/μl,并作为最终反应标准品来进行RT-PCR反应,生成标准曲线。分别进行待测粪便样品DNA大肠杆菌和乳酸杆菌的RT-PCR反应,反应结束后根据标准曲线分析并计算样品的浓度。

1.3 统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布变量组间比较用t检验,组间相关分析采用直线相关性分析, P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体质量和肝指数变化 16周末,对照组和高脂组大鼠体质量差异无统计学意义;高脂组大鼠肝指数较对照组大鼠明显升高,差异有统计学意义(P < 0.05),见表1。

表1 两组大鼠体质量、肝指数的比较(n=6, $\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	高脂组	t 值
体重(g)	512.10 ± 28.20	487.68 ± 31.88	1.405
肝湿重(g)	15.07 ± 1.53	25.81 ± 2.19*	-9.855
肝指数(%)	2.85 ± 0.14	5.32 ± 0.43*	-13.488

与对照组比较: * P < 0.05

2.2 肝脏形态和病理学改变 肉眼观对照组大鼠肝脏呈暗红色,质地柔软,边缘锐利,未见明显异常改变;高脂组大鼠肝脏体积增大,色泽较正常肝脏暗淡,呈苍白色,表面粗糙,可见结节及灶状改变,肝缘略变钝,质地尚软,见图1。电镜下,正常对照组肝细胞核周隙正常,线粒体丰富且形态正常,内质网排列整齐,胞质内未见脂滴;高脂组第16周末细胞体积明显增大,肝细胞内质网形态尚正常,线粒体明显肿胀,少数线粒体嵴消失,胞质内有多数脂滴,见图2。

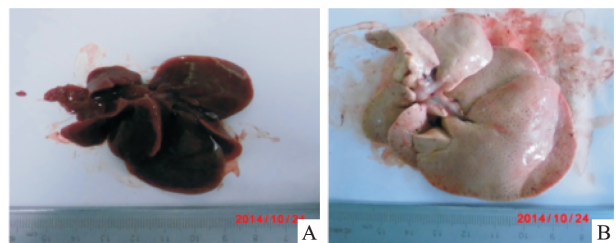


图1 大鼠肝脏形态学变化
A:对照组;B:高脂组

2.3 生化指标的比较 与对照组相比,模型组大鼠血清ALT、AST、TG、TC、VLDL水平均明显升高, HDL-c水平明显降低,差异均有统计学意义(P < 0.05);两组间血糖水平差异无统计学意义。见表2。

2.4 血清LPS的比较 与对照组相比,模型组大鼠血清LPS水平明显升高,差异有统计学意义(P <

0.05)。见图3。

2.5 血清 IL-1 β 、IL-18 浓度的比较 与对照组大鼠血清 IL-1 β (24.41 \pm 1.81) pg/ml、IL-18 (94.65 \pm 14.03) pg/ml 相比,模型组大鼠血清 IL-1 β (30.99 \pm 3.07) pg/ml、IL-18 (141.22 \pm 17.93) pg/ml 水平明显升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

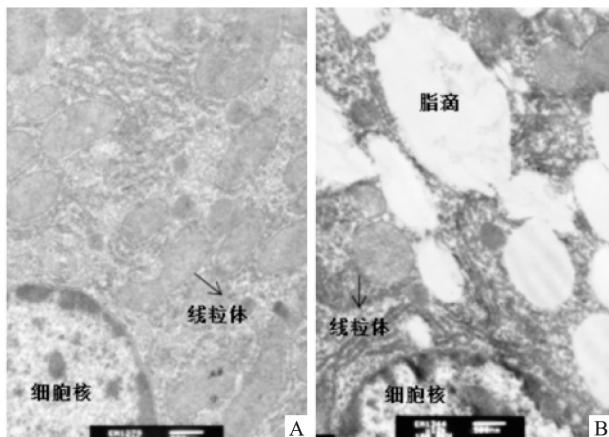


图2 大鼠肝脏病理学变化 $\times 12\ 000$
A: 对照组; B: 高脂组

表2 两组生化指标的比较 ($n = 6 \bar{x} \pm s$)

生化指标	对照组	高脂组	t 值
ALT (U/L)	37.20 \pm 9.28	126.40 \pm 30.37*	-6.281
AST (U/L)	93.80 \pm 12.36	322.00 \pm 19.27*	-22.287
TG (mmol/L)	0.44 \pm 0.04	0.71 \pm 0.02*	-14.098
TC (mmol/L)	1.76 \pm 0.13	6.00 \pm 0.27*	-31.033
VLDL (mmol/L)	0.16 \pm 0.04	0.31 \pm 0.06*	-4.669
HDL-c (mmol/L)	1.73 \pm 0.07	1.01 \pm 0.06*	1.918
FBG (mmol/L)	11.47 \pm 2.30	10.79 \pm 1.84	0.567

与对照组比较: * $P < 0.05$

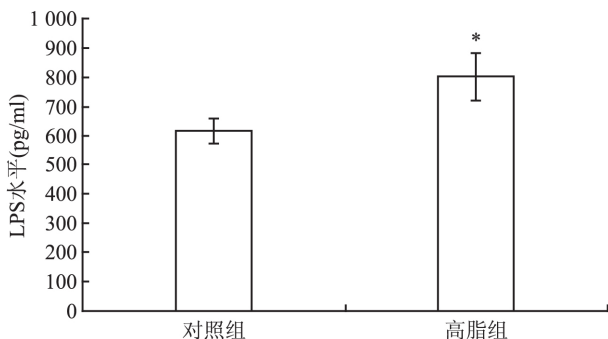


图3 大鼠血清 LPS 的变化
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.6 肠道菌群的变化

2.6.1 两种细菌 DNA 的普通 PCR 产物电泳结果 乳酸杆菌和大肠杆菌两种标准菌株给予各自的特异引物并经普通 PCR 反应后,可见粪便样本与标准菌

株的 PCR 产物的特异性条带,并且与实验预期的片段长度一致。除目的条带外,粪便样本的扩增产物未见明显非特异性条带,说明 PCR 引物特异性较好,也表明标准菌株可用于实时荧光定量 PCR 反应。见图4。

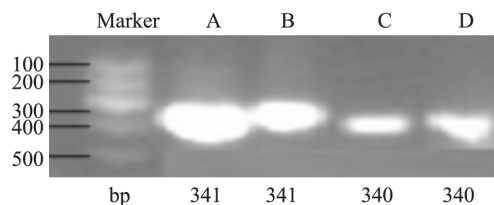


图4 PCR 产物凝胶电泳图

A: 乳酸杆菌标准品; B: 正常对照粪便标本; C: 大肠杆菌标准品; D: 正常对照粪便标本

2.6.2 融解曲线 RT-PCR 反应结束后可见单峰的融解曲线,表明扩增产物主要是目的 DNA 片段与荧光染料的结合物,溶解曲线表现为相对单一的峰值,提示可避免出现假阳性结果。见图5。

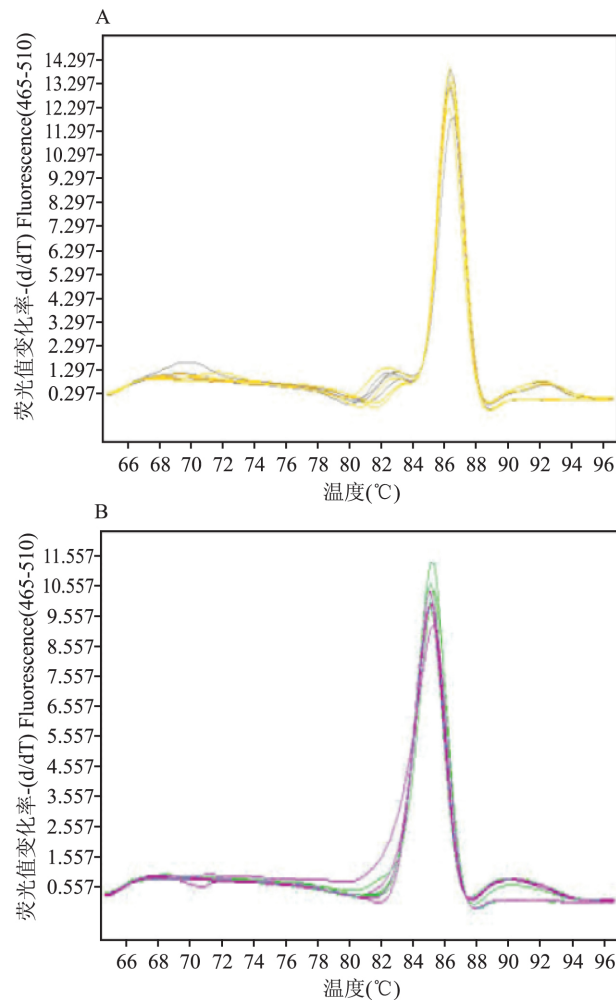


图5 细菌融解曲线
A: 对照组; B: 高脂组

2.6.3 大鼠粪便标本细菌的定量结果 LC480 系统软件可计算出各标本的两种菌的拷贝数,再进行计算得到定量数据。分析后显示,与对照组大鼠大肠杆菌(4.92 ± 1.00)、乳酸杆菌(8.87 ± 0.66)含量的对数值相比,高脂组大鼠大肠杆菌含量的对数值(10.18 ± 1.19)显著升高,而乳酸杆菌(2.81 ± 0.51)明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 相关性分析 高脂组大鼠粪便大肠杆菌水平较对照组明显升高,且与血清 LPS 水平呈正相关性($r = 0.735, P < 0.05$)。

3 讨论

目前已经证实不良的生活方式和饮食习惯增加了代谢综合征和 NAFLD 的风险^[4]。高脂饮食是肥胖发生的主要因素之一,而肥胖是代谢综合征、NAFLD 的重要危险因素。另外,饮食结构的改变对肠道菌群的构成也有很大的影响,随着特定个体的饮食规律发生改变,其消化道菌群的构成比例也发生相应的改变^[5]。用高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型,其厚壁菌群的比例有所增加而拟杆菌门的比例却减少,即厚壁菌群/拟杆菌的比值增加^[6]。人群研究^[7]也显示将肥胖患者随机分成脂肪限制低能量饮食组和碳水化合物限制低能量饮食组,1 年后研究显示两组肥胖患者肠道菌群中拟杆菌门比例增加,硬壁菌门比例降低。肠道菌群与宿主的营养、代谢、免疫等方面有着密切的关系,肠道菌群紊乱,特别是小肠细菌的过度生长,可发生在 20% ~ 75% 的慢性肝脏疾病中,甚至出现在许多肝脏疾病的早期阶段,包括酒精性脂肪肝和 NAFLD^[8]。高脂饲料喂养不仅可以使小鼠发生肥胖,还可改变小鼠的肠道菌群构成比例,使其肠道革兰阴性菌的比例增加,从而导致脂多糖产生增多^[9];另外,菌群构成比例的失调可以增加肠道上皮的通透性,从而使脂多糖由肠道入血增多,产生“代谢性 LPS 血症”^[10]。另有研究^[3]显示,LPS 可通过结合固有免疫细胞表面的 CD14-Toll 样受体 4 复合物激活中性粒细胞和单核细胞产生细胞因子和炎性介质等,使机体产生慢性系统炎症。在 NAFLD 患者及动物模型中,由于小肠细菌的过度生长和肠道通透性增加,肠道细菌产物如 LPS 及细菌 DNA 等可通过门静脉系统转移到肝脏并激活肝脏免疫细胞表面的 Toll 样受体,从而促进大量炎性因子和趋化因子的释放,最终导致 NAFLD 的发生与发展^[11]。

本研究通过高脂饮食诱导建立 NAFLD 动物模

型,通过肉眼观察可见高脂组大鼠肝脏体积明显增大,且伴有结节及灶状改变,通过电镜观察可见高脂组肝脏细胞体积明显增大,线粒体明显肿胀,少数线粒体嵴消失,胞质内有多数脂滴,且伴有肝指数和血脂水平升高,因此本研究通过高脂饮食成功建立了 NAFLD 动物模型。高脂组大鼠血清 ALT、AST 水平明显升高,并伴有血清 LPS、IL-1 β 、IL-18 水平的升高,提示 NAFLD 组大鼠体内存在 LPS 血症和肝脏及全身系统的炎症反应。有研究^[12]提示,高脂饮食引起的肝脏、脂肪组织及血清中炎症因子的增加与血中 LPS 升高有关。而血清 LPS 水平升高引起机体炎性反应的机制可能是 LPS 与脂多糖结合蛋白结合,再结合 CD₁₄,激活 Toll 样受体 4 形成 CD₁₄-Toll 样受体 4 复合物并由 Kupfer 细胞提呈,引发了重要的炎症级联反应,包括激活有丝分裂原激活蛋白激酶、Jun 氨基末端激酶、P38 等,引起促炎性基因的转录,参与早期炎症的发展和代谢性疾病的发生^[13]。本实验还显示高脂组大鼠粪便大肠杆菌水平较对照组明显升高,乳酸杆菌明显减少,且大肠杆菌水平与血清 LPS 水平呈正相关性,进一步证实高脂饮食诱导的 NAFLD 模型大鼠存在肠道菌群的改变。肠道菌群紊乱尤其是肠道革兰阴性杆菌如大肠杆菌等过度生长繁殖,可导致肠道定植抗力下降及肠道屏障功能受损引起 LPS 移位、LPS 血症形成,由 LPS 启动刺激肝脏 Kupffer 细胞所产生的大量炎性细胞因子如 IL-1 β 、IL-18 等,进一步引起氧自由基释放增多,可引起肝细胞凋亡、坏死^[14-15],对肝细胞形成“二次打击”^[16],导致脂肪性肝炎,若“二次打击”持续存在,非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)可进一步发展为肝纤维化、肝硬化。

综上所述,高脂饮食诱导的 NAFLD 模型大鼠存在 LPS 血症、肠道菌群失调及革兰阴性杆菌过度生长的现象,提示肠道微生态失衡可能参与了 NAFLD 的发生发展。进一步研究肠道菌群在 NAFLD 发病过程中的作用,对明确 NAFLD 的发病机制及防治有着重要的意义。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010 年修订版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3): 163-6.
- [2] Machado M V, Cortez-Pinto H. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease [J]. Ann Hepatol, 2012, 11(4): 440-9.
- [3] Cani P D, Delzenne N M. The role of the gut microbiota in energy

- metabolism and metabolic disease[J]. *Curr Pharm Des* ,2009 ,15 (13) :1546 –58.
- [4] Henaó-Mejía J ,Elinav E ,Thaiss C A , et al. The intestinal microbiota in chronic liver disease[J]. *Adv Immunol* ,2013 ,117:73 –97.
- [5] Walker A W ,Ince J ,Duncan S H , et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota[J]. *ISME J* ,2011 5(2) :220 –30.
- [6] Ley R E ,Bäckhed F ,Turnbaugh P , et al. Obesity alters gut microbial ecology[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2005 ,102(31) :11070 –5.
- [7] Ley R E ,Turnbaugh P J ,Klein S , et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity[J]. *Nature* ,2006 444(7122) :1022 –3.
- [8] Pinzino M R ,Celesia B M ,Di Rosa M , et al. Microbial translocation in chronic liver diseases[J]. *Int J Microbiol* ,2012 :694629.
- [9] Cani P D ,Bibiloni R ,Knauf C , et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. [J]. *Diabetes* ,2008 57(6) :1470 –81.
- [10] de La Serre C B ,Ellis C L ,Lee J , et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* ,2010 299(2) :G440 –8.
- [11] Li D Y ,Yang M ,Edwards S , et al. Nonalcoholic fatty liver disease: for better or worse , blame the gut microbiota[J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* ,2013 37(6) :787 –93.
- [12] Cani P D ,Amar J ,Iglesias M A , et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance[J]. *Diabetes* ,2007 56(7) :1761 –72.
- [13] Aron-Wisniewsky J ,Gaborit B ,Dutour A , et al. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: new insights[J]. *Clin Microbiol Infect* ,2013 19(4) :338 –48.
- [14] Hirose M ,Nishikawa M ,Qian W , et al. Mannose-conjugated alendronate selectively depletes Kupffer cells and inhibits endotoxemic shock in the mice[J]. *Hepato Res* ,2006 ,36(1) :3 –10.
- [15] Higuchi Y ,Kawakami S ,Yamashita F , et al. The potential role of fucosylated cationic liposome/NFκB decoy complexes in the treatment of cytokine-related liver disease[J]. *Biomaterials* ,2007 ,28(3) :532 –9.
- [16] Day C P ,James O F. Steatohepatitis: a tale of two “hits” [J]. *Gastroenterology* ,1998 ,114(4) :842 –5.

Effects of high fat diet on intestinal flora and serum LPS levels in NAFLD model rats

Cheng Jing , Li Fenglin , Zhang Bao , et al

(Dept of Clinical Nutriology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the changes of intestinal flora and serum lipopolysaccharide(LPS) levels in rats with nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD) induced by feeding with fat diet , and to explore the changes of intestinal flora and the role of endotoxin in the pathogenesis of NAFLD. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group and high fat group. The control group was fed with normal diet , high fat group was fed with high fat diet. The rats were sacrificed at the end of 16th week. Biochemical indexes were measured by automatic biochemical analyzer , the pathological changes of liver in two groups were observed by electron microscope , the changes of serum LPS , IL-1 β , IL-18 levels detected by ELISA , and the expression of *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Lactobacillus* in fecal were detected by real-time fluorescence quantitative PCR method. **Results** The levels of serum ALT , AST , TC , TG and VLDL in high fat were significantly higher than those of control group. The serum level of LPS , IL-1 β , IL-18 were significantly increased in high fat group , and the difference was statistically significant ($P < 0.05$) ; Compared with the control group , *E. coli* in high fat group was significantly increased , while the *Lactobacillus* was significantly decreased ($P < 0.05$) . There was a correlation between the level of serum endotoxin and the amount of *E. coli*. **Conclusion** There is change of intestinal flora and endotoxin in NAFLD model rats induced by high fat diet. Irrational dietary structure and changes in fecal flora play important roles in the pathogenesis of NAFLD.

Key words high fat diet; nonalcoholic fatty liver; intestinal flora; lipopolysaccharide