

利福平诱导小鼠脂肪肝实验模型的研究

黄家惠¹ 陈 熙¹ 张 程² 陶 莉¹ 何 薇¹ 齐 军¹ 张大刚¹ 徐德祥²

摘要 目的 观察利福平(RIF)引起的小鼠肝脏脂肪变及其动态演变过程,为进一步探讨药物性脂肪肝的机制奠定基础。方法 将42只成年健康雄性ICR小鼠随机分为7组(对照组、RIF 8 h、24 h、3 d、1周、2周、4周组),经灌胃给予RIF处理(200 mg/kg),末次给药后禁食6 h处死小鼠,采集血液及肝脏组织。计算肝脏系数;检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性;HE染色观察肝脏组织病理学改变;检测血清中三酰甘油(TG)、胆固醇酯(TCH)、高密度脂蛋白(HDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)水平;检测肝脏组织中TG水平;油红O染色检测肝脏组织脂质沉积。结果 与对照组比较,RIF处理组小鼠肝脏重量、系数均从24 h开始逐渐升高,4周时达到高峰;与对照组比较,24 h、3 d、1周、2周组ALT水平逐渐升高,4周组ALT水平显著升高。HE染色显示,8、24 h组肝脏组织无明显变化,3 d组可见小的空泡,而从1周开始出现显著增多的大的圆形空泡。8、24 h组血清中TG和VLDL水平较对照组轻度升高,3 d时升高最明显,而1、2、4周组中呈下降趋势,且显著低于对照组。RIF处理各组血清TCH、HDL水平均较对照组降低。肝脏组织TG含量从8 h开始明显升高,1周时达峰值,之后2、4周组呈下降趋势但仍显著高于对照组。油红O染色结果显示,8、24 h组肝脏组织中可见少量脂质沉积,从3 d组开始出现显著增多的大圆形脂滴。结论 RIF能引起小鼠肝脏组织中脂质沉积,且呈明显的时间效应关系。

关键词 小鼠;利福平;脂肪肝;脂质沉积

中图分类号 R 575.5; R 978.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0937-05

导致药物性肝损伤的药物(包括中草药)有100余种,随着临床药物的不断增多,药物性肝损伤的发病率也呈逐年上升的趋势^[1]。药物性肝损伤

主要有肝细胞死亡、脂肪变性、胆汁淤积、肝窦状隙损害、肝纤维化与肝硬化、肝癌变等类型,其中药物性脂肪肝约占药物性肝损伤的2%,并有不断增加的趋势^[2-3]。研究^[4]表明,抗结核药物是导致急性药物性肝损伤的主要原因。前期研究^[5-7]表明,单次或连续给予利福平(rifampicin, RIF)均可诱发小鼠肝内胆汁淤积, RIF所致的胆汁淤积与肝细胞紧密连接蛋白ZO-1和occludin完整性破坏有关;连续给予小鼠RIF 1周可引起小鼠肝脏组织三酰甘油(triglyceride, TG)含量明显升高,油红O染色也显示小鼠肝脏组织中可见大量脂质沉积。但RIF对肝脏脂质代谢的影响鲜有报道,该研究旨在建立实验动物模型的基础上观察RIF引起的小鼠肝脏脂肪变及其动态变化过程,为进一步探讨其机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器 RIF购自美国Sigma公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TG试剂盒购自浙江东瓯诊断产品有限公司。

1.2 实验动物来源和处理 清洁级健康ICR成年雄鼠,4~5周龄,重20~23 g,购自安徽医科大学实验动物中心。实验前适应性喂养1周,自由饮食、昼夜均衡,温度20~25℃,湿度(50±5)%。随机分为7组:对照组、RIF 8 h组、24 h组、3 d组、1周组、2周组、4周组,每组6只,见图1。早上9点小鼠空腹灌胃给予RIF(200 mg/kg)处理,在取材前8 h和24 h给予8 h组和24 h组灌胃1次,3 d组、1周组、2周组、4周组给药频率为1次/d,末次给药后禁食6 h处死小鼠,采集血液及肝脏组织,肝组织称重,取0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm大小肝组织2块,1块立即用于制备冰冻切片,1块置于4%多聚甲醛溶液中,用于制备石蜡切片;其余肝组织切成小块,置于液氮中速冻后转入-80℃冰箱保存待用。RIF不同时间点处理示意图见图1。

1.3 肝脏系数计算 称取小鼠体重及肝脏重量,计算肝脏系数(%)=(肝脏重量/体重)×100%。

1.4 ALT水平测定 通过赖氏比色法测定ALT水平,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2015-04-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81001480);2013年高等学校博士学科点专项(编号:20133420110005);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH120);安徽省高校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2011A159);安徽省高等学校省级优秀青年人才基金项目(编号:2011SQRL058ZD)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院消化内科,安徽省消化系统疾病重点实验室,合肥 230022

²安徽医科大学卫生毒理学系,合肥 230032

作者简介:黄家惠,女,硕士研究生;

陈 熙,女,博士,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,

E-mail: ayfychenxi@gmail.com

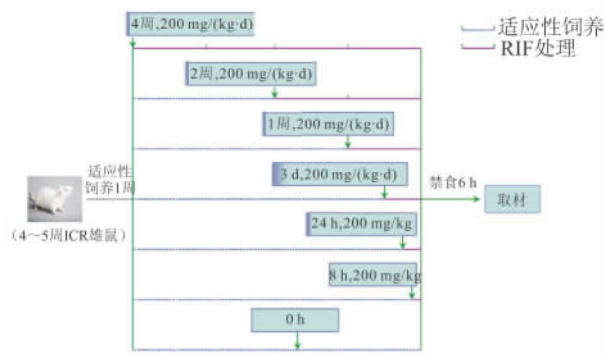


图1 RIF 不同时间处理示意图

1.5 HE 染色法观察肝组织病理学变化 取受试动物部分肝组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 12 ~ 24 h 后,经梯度乙醇溶液脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片、HE 染色、中性树胶封片后,于光学显微镜下观察肝组织病理学改变并摄片。

1.6 血清肝生化指标检测 TG、总胆固醇(total cholesterol, TCH)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL) 和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL) 的测定采用酶比色法,采用安徽医科大学第一附属医院检验科全自动生化分析仪(瑞士罗氏公司 RL7600D 全自动生化分析仪)检测。

1.7 肝组织 TG 含量测定 参照 Zhou et al^[8] 的方法,萃取肝脏组织脂质后,肝组织 TG 含量的测定按照 TG 试剂盒说明书进行检测。

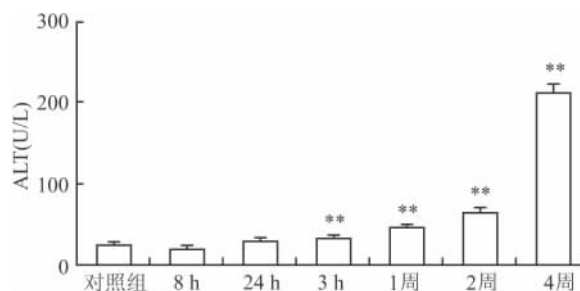
1.8 油红 O 染色观察肝组织脂质沉积 处死小鼠后取新鲜肝组织,在最适切割温度下包埋后 -20 °C 制备冰冻切片,切片厚度为 10 μm。将冰冻切片置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min 后,用 3% 油红 O 染液室温染色 30 min,苏木精复染 30 s,甘油封片,光学显微镜下观察肝组织脂质沉积并摄片。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,定量数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数比较采用方差分析,两组间均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 RIF 处理对小鼠肝脏质量及肝脏系数的影响 与对照组比较,RIF 处理 24 h、3 d、1 周、2 周、4 周组小鼠肝脏系数较对照组均显著升高($F = 39.273, P < 0.05$)。见表 1。

2.2 RIF 处理对小鼠血清 ALT 水平的影响 与对照组比较,8 h 组、24 h 组小鼠血清 ALT 水平无明显变化,3 d 组、1 周组、2 周组 ALT 水平较对照组分别升高约 2 倍~3 倍,4 周组 ALT 水平升高最明显,约为对照组 10 倍($P < 0.01$)。见图 2。

图2 RIF 处理后小鼠不同时间 ALT 变化($n = 6, \bar{x} \pm s$)与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 肝脏组织病理学改变 正常肝脏组织肉眼观察呈红褐色,边缘锐利,表面光滑;RIF 处理各组肝脏组织肉眼观察呈橘红色,体积增大,边缘钝而厚,切面呈油腻感。HE 染色显示,正常肝脏组织可见肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列。RIF 处理 8 h 组、24 h 组肝细胞质中可见少量大小不等圆形空泡,部分细胞核偏向一侧,3 d 组、1 周组、2 周组、4 周组可见肝细胞质中出现显著增多、大小不等的圆形空泡,大者充满整个细胞质,将细胞核挤至一侧。见图 3。

2.4 RIF 处理对小鼠血清 TG、TCH、VLDL、HDL 的影响 与对照组比较,RIF 处理 8 h、24 h 组小鼠血清 TG、VLDL 无明显变化,3 d 组小鼠血清 TG、VLDL 显著升高($P < 0.05$),达到峰值,之后 1 周、2 周、4 周组小鼠血清 TG、VLDL 水平均显著低于对照

表1 RIF 处理对小鼠生理的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

指标	对照组	RIF					
		8 h 组	24 h 组	3 d 组	1 周组	2 周组	4 周组
体重(g)	40.8 ± 5.3	43.1 ± 3.1	41.2 ± 1.7	40.1 ± 4.7	40.5 ± 4.5	39.5 ± 2.1	40.6 ± 2.3
肝脏重量(g)	2.21 ± 0.27	2.27 ± 0.23	2.59 ± 0.24*	2.49 ± 0.37	3.09 ± 0.56**	3.46 ± 0.36**	4.04 ± 0.46**
肝脏系数(%)	0.054 ± 0.00	0.053 ± 0.00	0.063 ± 0.00**	0.062 ± 0.00**	0.076 ± 0.01**	0.087 ± 0.01**	0.100 ± 0.01**

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

组($F=12.809$, $P<0.01$), 且随 RIF 处理时间的延长而逐渐降低; 小鼠血清 TCH、HDL 水平在 RIF 处理 8 h 后开始降低($P<0.01$), 但在 24 h、3 d 组下降不明显, 在 1 周之后, TCH 水平开始明显降低($P<0.01$), HDL 水平下降明显($P<0.05$)。见表 2。

2.5 RIF 处理对小鼠肝脏组织 TG 含量的影响
与对照组比较, RIF 处理各组肝脏组织 TG 相对含量和 TG 总量从 8 h 后开始明显升高, 1 周时达到峰值, 之后 2 周、4 周组肝脏组织 TG 相对含量呈降低趋势($F=155.938$), 均显著低于 1 周组($P<0.01$), 但仍高于对照组($P<0.01$), 呈明显的时间效应关系, 而 2 周、4 周组肝脏组织 TG 总量则较 1 周组无

明显变化。见表 3。

2.6 肝脏组织油红 O 染色改变 油红 O 染色显示, 正常肝脏组织几乎无红染, RIF 处理 8 h、24 h 组可见少量小圆形红染脂滴; 3 d 组可见红染脂滴明显增多且较大, 充满视野; 1 周、2 周、4 周组则可见充满视野的大泡状圆形红染脂滴。见图 4。

3 讨论

为探索 RIF 最佳给药剂量, 本课题组前期实验^[5-6]分别连续经口灌胃给予不同剂量 RIF, 显示给予 200 mg/kg 的剂量时小鼠肝脏损伤最为严重, 因此该研究选取 200 mg/kg 的给药剂量, 选取 RIF

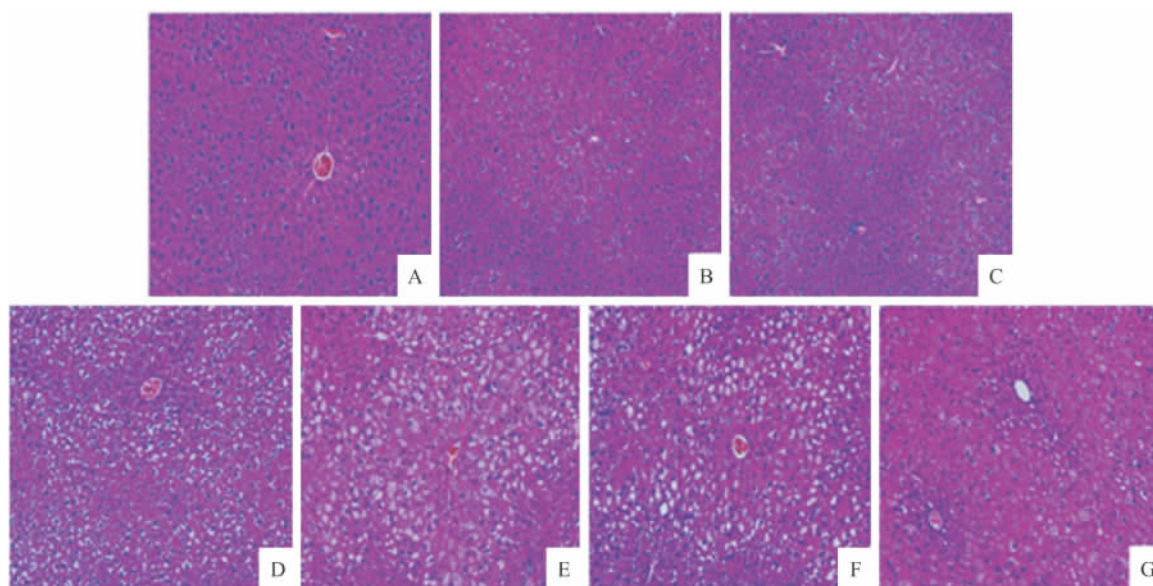


图 3 RIF 处理不同时点小鼠肝脏组织病理 HE×100

A: 对照组; B: RIF 8 h 组; C: RIF 24 h 组; D: RIF 3 d 组; E: RIF 1 周组; F: RIF 2 周组; G: RIF 4 周组

表 2 RIF 处理对小鼠血清中生化指标的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	RIF					
		8 h 组	24 h 组	3 d 组	1 周组	2 周组	4 周组
TG (mmol/L)	1.97 ± 0.30	2.12 ± 0.47	2.44 ± 0.68	2.82 ± 0.26**	1.34 ± 0.38*	1.01 ± 0.34**	0.89 ± 0.20**
TCH (mmol/L)	4.40 ± 1.10	2.96 ± 0.19**	3.66 ± 0.72	3.86 ± 0.90	2.86 ± 0.47**	2.57 ± 1.34*	1.94 ± 0.62**
HDL (mmol/L)	4.26 ± 1.10	2.70 ± 0.14**	3.30 ± 0.78	3.40 ± 0.65	2.85 ± 0.48*	2.55 ± 1.19*	1.95 ± 0.58**
VLDL (mmol/L)	0.73 ± 0.11	0.79 ± 0.17	0.90 ± 0.25	1.04 ± 0.27*	0.50 ± 0.14**	0.37 ± 0.13**	0.33 ± 0.07**

与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表 3 RIF 处理对小鼠肝脏脂质的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	RIF					
		8 h 组	24 h 组	3 d 组	1 周组	2 周组	4 周组
TG 相对含量(μmol/g)	8.00 ± 1.09	11.09 ± 1.98*	10.63 ± 1.99*	24.27 ± 2.36**	36.25 ± 3.08**	30.17 ± 1.36***	26.79 ± 1.97***
TG 总量(μmol)	17.57 ± 2.16	25.31 ± 6.38*	27.35 ± 4.67*	60.43 ± 10.94**	111.99 ± 22.43**	104.26 ± 10.49**	108.38 ± 17.02**

与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 1 周组比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$

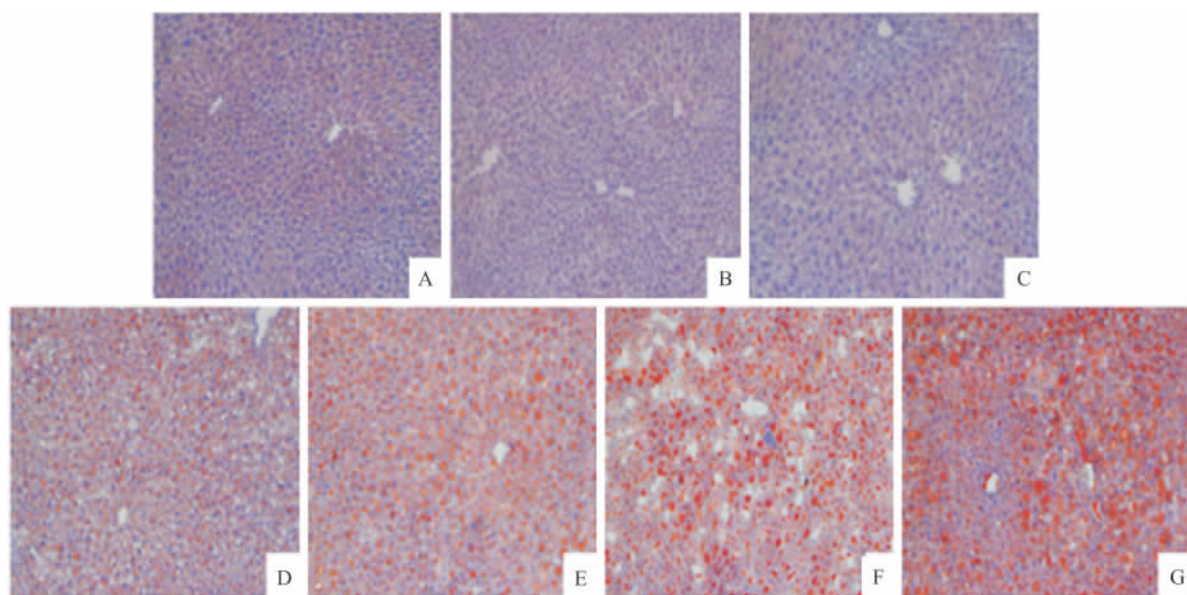


图4 RIF处理不同时点小鼠肝脏组织 油红O染色×100

A: 对照组; B: RIF 8 h组; C: RIF 24 h组; D: RIF 3 d组; E: RIF 1周组; F: RIF 2周组; G: RIF 4周组

给药的6个时点(8 h、24 h、3 d、1周、2周、4周)进行动态观察。本研究结果显示,RIF处理的各组小鼠肝脏重量、肝脏系数均升高,且随给药时间的延长而逐渐升高。RIF处理各组小鼠ALT水平随处理时间的延长而逐渐升高,在4周时ALT水平升高最为明显。

药物及其代谢产物对肝细胞脂质合成、转运、分解的任何一个过程产生影响都有可能导致肝细胞中脂质的异常聚积,进而发生脂肪变性形成脂肪肝^[9]。前期研究^[10]证明,RIF单次及连续1周处理,小鼠肝脏中脂肪酸合成的关键酶脂肪酸合成酶和乙酰辅酶A羧化酶水平均显著上调,提示脂肪酸的合成在RIF引起小鼠肝脏脂肪变的过程中发挥重要作用。VLDL是运输内源性TG的主要形式,肝细胞分泌的VLDL升高是高脂血症的重要原因,且与心血管疾病风险密切相关^[11]。本研究显示,RIF处理8 h、24 h、3 d组血清TG水平逐渐升高,3 d时达到峰值,血清VLDL水平变化趋势与之相同,肝组织TG相对含量及总量也逐渐升高,提示RIF处理8 h、24 h、3 d组可能是由于血清中VLDL介导的由肝脏转运至外周的TG增多导致血清中TG升高,肝脏TG相对含量及总量的升高可能是肝脏TG的合成增多和/或TG的分解减少起主导作用,具体机制有待进一步研究。

肝脏VLDL的组装有两步过程^[12],第1步: TG移位到粗面内质网腔,与载脂蛋白B合成VLDL前体;第2步: 大的中性脂肪,特别是TG,在高尔基体

内被加至VLDL前体形成富含TG的VLDL,成熟的VLDL再分泌至外周,成为运输内源性TG的主要形式^[13-15]。RIF处理小鼠血清TG水平在3 d时达到峰值,1周、2周、4周组均显著低于对照组,且随RIF处理时间的延长而逐渐降低,血清VLDL水平的变化与TG水平变化趋势相同。而RIF处理肝组织TG相对含量1周时达到高峰,之后2周、4周组肝组织TG相对含量较1周组显著下降,但仍显著高于对照组,呈明显的时间效应关系。进一步观察显示,虽然肝组织TG相对含量降低,但由于肝脏重量明显增加,其所含TG总量与1周组相当,未出现明显降低,结合血清中VLDL的变化趋势,提示RIF处理1周、2周、4周组可能是由于VLDL的组装或分泌障碍,导致VLDL合成或分泌减少,进而引起肝脏合成的TG无法转运至外周,过量的TG在肝脏内沉积,导致血中TG含量下降,而肝组织中TG含量升高。

参考文献

- [1] Begrich K, Massart J, Robin M A, et al. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver [J]. *J Hepatol*, 2011, 54 (4): 773-94.
- [2] Stravitz R T, Sanyal A J. Drug-induced steatohepatitis [J]. *Clin Liver Dis*, 2003, 7(2): 435-51.
- [3] Vinken M, Maes M, Vanhaecke T, et al. Drug-induced liver injury: mechanisms, types and biomarkers [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(24): 3011-21.

- [4] 中华医学会消化病学分会肝胆疾病协作组. 全国多中心急性药物性肝损伤住院病例调研分析[J]. 中华消化杂志, 2007, 27(7): 439–42.
- [5] Chen X, Zhang C, Wang H, et al. Altered integrity and decreased expression of hepatocyte tight junctions in rifampicin-induced cholestasis in mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 240(1): 26–36.
- [6] 徐娟, 陈熙, 张程等. 利福平致小鼠肝内胆汁淤积的实验模型[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(1): 34–8.
- [7] 曹云海, 陈熙, 张程等. 利福平对小鼠肝细胞转运体 Bsep 和 Mrp2 表达与定位的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(12): 1581–6.
- [8] Zhou J, Zhai Y, Mu Y, et al. A novel pregnane x receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21): 15013–20.
- [9] Zhu L, Baker S S, Liu W, et al. Lipid in the livers of adolescents with nonalcoholic steatohepatitis: combined effects of pathways on steatosis [J]. *Metabolism*, 2011, 60(7): 1001–11.
- [10] 张莹, 段自峰, 陈熙等. 脂肪酸合成在利福平引起小鼠脂肪变性中的作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(7): 648–51.
- [11] Wang S, Chen Z, Lam V, et al. IRE1 α -XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis [J]. *Cell Metab*, 2012, 16(4): 473–86.
- [12] Sundaram M, Yao Z. Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2010, 7: 35.
- [13] Bamberger M J, Lane M D. Possible role of the Golgi apparatus in the assembly of very low density lipoprotein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(7): 2390–4.
- [14] Rusinol A, Verkade H, Vance J E. Assembly of rat hepatic very low density lipoproteins in the endoplasmic reticulum [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(5): 3555–62.
- [15] Lett  ron P, Sutton A, Mansouri A, et al. Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice [J]. *Hepatology*, 2003, 38(1): 133–40.

Mouse model of fatty liver induced by rifampicin

Huang Jiahui¹, Chen Xi¹, Zhang Cheng², et al

(¹Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, The Key Laboratory of Gastroenterology of Anhui Province, Hefei 230022; ²Dept of Toxicology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the time-course of rifampicin (RIF)-induced fatty liver in mice in order to lay the foundation for investigating the mechanism of the drug-induced fatty liver. **Methods** Forty-two healthy male mice were randomly divided into seven groups (control 8 h, 24 h, 3 d, 1 week, 2 weeks, 4 weeks), and mice were administered with RIF 200 mg/kg daily by gavage. All mice were sacrificed at 6 h after the last administration to collect serum and liver tissues. All their body weight and liver weight was measured for calculating liver to body weight ratio. The levels of alanine aminotransferase (ALT) in serum was measured. Hepatic pathological changes were observed by HE staining. The levels of triglyceride (TG), cholesterol ester (TCH), very low density lipoprotein (VLDL), high-density lipoprotein (HDL) in serum were measured. Liver tissue was dissected for measuring TG. The lipid accumulation of liver was observed by oil red O staining. **Results** Compared with control group, liver weight and liver to body weight ratio began to rise gradually 24 h after RIF-treated mice. Compared with mice in control group, the serum levels of ALT slightly increased in 8 h, 24 h, 3 d, 1 week and 2 weeks groups, and significantly increased in 4 weeks group. HE staining showed 8 h and 24 h after RIF treatment, liver tissue did not see clear change. 3 d group was smaller vacuoles, part of the nucleus to one side, and starting from 1 week liver tissue that was dramatically increasing number of large circular cavity. The levels of TG, VLDL in the serum were moderately elevated in 8 h, 24 h groups, the most obvious was elevated in 3 d group, and begin to decline from 1 week. Serum levels of TCH, HDL in RIF-treated groups were relatively lower than control group. The liver TG levels significantly increased from 8 h, and peaked in 1 week group, then presented downward trend in 2 weeks and 4 weeks groups but higher than control group. The results of oil red O staining showed that 8 h and 24 h after RIF treatment, there was a small amount of lipid deposition in the liver, and large circular lipid drops in liver tissue dramatically increased after 3 d. **Conclusion** Administration of rifampicin causes hepatic steatosis in mice and shows the obvious time-effect relationship.

Key words mice; rifampicin; fatty liver; hepatic steatosis