

绿茶多酚通过脂联素途径改善高脂诱导的大鼠肝脏脂肪沉积

田 翀¹ 张 睿² 龙 甲² 任玮叶² 应晨江²

(¹华中科技大学同济医学院护理学系;²华中科技大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 湖北武汉 430030)

摘要 目的: 观察绿茶多酚对高脂诱导非酒精性脂肪肝的作用, 并探索可能机制。**方法:** 采用高脂饲料饲养大鼠, 并通过饮水进行低中高三个浓度的绿茶多酚干预, 观察大鼠的体脂、糖脂代谢改变和胰岛素抵抗程度; 采用实时荧光定量 PCR 检测大鼠肝脏糖脂代谢相关基因的表达改变, 脂联素受体 2 的 mRNA 水平和大鼠内脏脂肪组织脂联素 mRNA 水平; 采用酶联免疫法检测大鼠血清脂联素水平和胰岛素水平。**结果:** 高脂膳食诱导大鼠出现了体脂增加, 糖脂代谢紊乱, 肝脏系数增加, 肝脏脂肪沉积, 肝脏中脂肪合成相关基因, 糖异生关键基因 mRNA 水平升高, 脂肪酸氧化相关基因和葡萄糖转运蛋白 2 的 mRNA 水平显著降低, 而绿茶多酚干预显著缓解了高脂诱导的这些改变; 高脂组大鼠脂联素水平和肝脏中脂联素受体 2mRNA 水平显著降低, 绿茶多酚干预能够改善高脂诱导的大鼠脂联素水平和脂联素受体 2mRNA 水平降低。**结论:** 绿茶多酚能够改善高脂诱导的大鼠肝脏脂肪沉积, 对脂联素和脂联素受体的调节是其重要作用途径。

关键词 糖尿病高脂; NAFLD; 绿茶多酚脂联素

非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 是指一系列非酒精引起的脂肪性肝病。研究认为, NAFLD 已经成为一个全球性的问题, 将会影响到未来肝硬化, 肝脏衰竭以及肝细胞癌的发生^[1]。NAFLD 的发生和进展与糖尿病关系密切。在普通人群中, NAFLD 的发病率估计为 17%–33%, 而在糖尿病患者中, NAFLD 的发病率达到 70%^[2]。对一些亚洲脂肪肝患者肝脏活检的样品进行分析, 在调整了年龄, 性别和组织学评分之后, HOMA-IR 指数与肝脏脂肪沉积独立相关^[3]; 在西方人中, 肝脏中的脂肪与肝脏, 骨骼肌和脂肪组织的胰岛素抵抗程度呈正相关^[4]。有研究发现, 高血糖可以通过诱导 TGF- β 和 PAI-1 加重肝脏纤维化^[5], 日本的一项研究也显示, 严格的血糖控制, 而不是减重, 能够预防非酒精性患者肝脏疾病的组织学进展^[6]。另一方面, 肝脏特异的胰岛素受体 (LIR) 敲除的小鼠表现出空腹和饭后高血糖, 并且

接下来出现外周胰岛素抵抗, 而骨骼肌或者脂肪组织胰岛素信号干扰的小鼠血糖维持正常^[7], 而存在 NAFLD 的糖尿病患者血糖很难控制。提示脂肪肝对胰岛素抵抗和糖尿病发生和进展有重要影响。到目前为止, 糖尿病和脂肪肝之间的具体相互作用仍不完全清楚, 但是这些证据提示, 对非酒精脂肪肝的控制一方面对于严重肝脏疾病的发生具有控制作用, 对预防糖尿病和帮助糖尿病人控制血糖也有重要帮助。

脂联素, 一种脂肪因子, 与 2 型糖尿病、心血管疾病、肝脏脂肪病变等代谢综合征相关疾病呈显著负相关^[8,9]。脂联素在人体中有两种确认的受体, 其中脂联素受体 2 主要在肝脏中表达。研究显示, 在肝脏中, 脂联素通过与脂联素受体 2 结合, 抑制 SREBP-1c 的活性, 降低脂肪酸合成酶水平, 抑制脂肪酸的合成, 增加 PPAR α 的表达水平, 促进线粒体的 β 氧化等, 预防肝脏中的

脂肪沉积,还能够并抑制糖异生活动,减少肝脏的葡萄糖输出,降低血糖水平^[10]。非酒精性脂肪肝患者的血清脂联素水平和肝脏中脂联素受体2的表达水平均明显降低,这种效应与体重指数无关^[11]。这些结果提示,肝脏中脂联素受体2的表达水平降低和血清中脂联素水平的降低可能在脂肪肝的发生中起到重要作用。

茶是世界上最流行的饮料之一,全世界消费茶叶的人数达到40亿。绿茶中的多酚类物质对血糖升高和血脂紊乱表现出了良好的调节作用,对肥胖相关的脂肪肝也具有缓解作用^[12],采用绿茶或者儿茶素干预,能够降低肝脏中脂肪合成作用,而上调脂肪酸氧化作用,还能抑制糖异生,增加调糖元合成^[13]。高脂膳食是糖尿病和非酒精性脂肪肝的重要共同危险因素。本研究采用高脂膳食饲养大鼠,并通过饮水进行绿茶多酚干预,观察大鼠糖脂代谢情况,肝脏脂肪沉积,并检测大鼠肝脏中糖脂代谢相关基因的表达谱改变,同时观察大鼠血清脂联素水平和肝脏中脂联素受体2的表达水平变化,以阐明绿茶多酚对高脂诱导的NAFLD是否具有保护作用,并探索可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和器材仪器

绿茶多酚(纯度>98%,EGCG含量60-70%)购自福州日冕科技开发有限公司(福建,中国);血清生化检测盒均购自中生北控生物科技股份有限公司(北京,中国);大鼠胰岛素和脂联素ELISA试剂盒购自R&D Systems公司(马萨诸塞州,美国);焦碳酸二乙酯(DEPC)和TRIZOL购自Invitrogen公司(卡尔斯巴德,加利福尼亚州,美国);逆转录试剂盒购自东洋纺生物科技股份有限公司(大阪,日本);实时定量PCR试剂盒购自TAKARA生物公司(滋贺县大津市,日本);日本武藤OCT冷冻包埋剂由上海亿欣生物科技有限公司代购(上海,中

国);油红O染料购自Sigma-Aldrich公司(圣路易斯,美国);mRNA引物由Invitrogen公司合成(加利福尼亚州,美国)。冷冻切片机IEICA CM1850(IEICA,德国),光学倒置显微镜(OLIMPUS,日本),核酸蛋白测定仪(Eppendorff公司,德国),实时PCR定量仪(ABI Prism® 7900HT, Applied Biosystems,美国)。

1.2 实验动物

雄性Wistar大鼠30只,体重40-60克,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司(批号:0028378)(上海,中国)。维持室温22-26℃,湿度40-50%,12/12小时明暗循环。大鼠适应性饲养一周后,根据体重随机分为以下几组:对照组,给予标准饲料,饮用去离子水;高脂饲料组,给予高脂饲料(具体构成重量比为:标准饲料0.60,猪油0.12,蔗糖0.10,蛋黄粉0.08,花生粉0.06,酪蛋白0.03,奶粉0.01),饮用去离子水;绿茶多酚干预组,给予高脂饲料,在体重达到成年体重(>180g)之后,开始饮用不同浓度绿茶多酚水溶液(0.8 g/L, 1.6 g/L和3.2 g/L)。第26周末,将实验动物麻醉后处死,收集血液,分离血清,取实验大鼠肝脏、内脏脂肪组织(完整摘取肾周脂肪和睾周脂肪),并称量,计算肝脏系数和脂肪系数,组织标本-80℃保存备用。本研究中动物实验由华中科技大学动物实验伦理委员会批准(许可证编号:S249)。

1.3 油红O染色肝脏切片

取新鲜肝脏组织,进行冰冻切片,将切片采用油红O染色,于光学显微镜下观察并拍照,每张切片随机选取6个视野,用Image Pro Plus图像分析软件测量红染面积,并进行统计。

1.4 实时荧光定量PCR(Real time-qPCR)

采用Trizol法抽提肝脏组织总RNA,用核酸蛋白测定仪测定RNA的浓度和纯度,RNA的纯度用OD260/OD280比值表示,比

值在 1.8-2.0 之间的样品进行逆转录反应合成 cDNA, 用于进行实时荧光定量 PCR, 以 GAPDH 作为内参, 分析结果。用 $2^{-\Delta\Delta Ct^{[14]}}$ 计算每组样本各基因的 mRNA 水平。本实验使用的引物如下: SREBP-1c (NM_00126708.1): 5-CCTGGAGCGAGCATT-3, 5-CGACAGCGTCAGAACA-3; FAS (NM_84761.1): 5-TGATGAAGAGGGACCATA-3, 5-GGGAACAAGGCATTAGG-3; HMGCoA 还原酶 (NM_013134.2): 5-TGACGCTCTGGTG-GAA-3, 5-GGGTTACTGGGTTTGG-3; PPAR α (NM_013196.1): 5-AGTTTGACTTCGCTAT-GA-3, 5-CTGACTCGGTCTTCTTG-3; GLUT 2 (NM_013196.1): 5-ACACCAGCACATACGA-3, 5-TGAAATTAGCCCACAG-3; PEPCK (BC981900.1): 5-GCTGACAGACTCGC-CCTAT-3, 5-CCACCGTATCCGCTTCC-3; G6PASE (L37333.1): 5-GGAAGGATGGAG-GAAA-3, 5-CAGATGGGAAAGAGGAC-3; GAPDH (BC059110): 5-CACTGCCAGC-CTCGTCTCAT-3, 5-AGGGGCCATCCA-CAGTCTTC-3; 脂联素 (BC059110): 5-GGT-GACCAGGAGATGCT-3, 5-TACGCTGAAT-GCTGAGTGATA-3; PPAR γ (NM001145366): 5-TCAGGTTTGGGCGAATG-3, 5-TTGTGT-CAGCGGAAGG-3。

1.5 其他指标测定与计算

血清葡萄糖采用葡萄糖氧化酶法测定, 血清甘油三酯和血清总胆固醇采用酶比色法

测定, 血清高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇采用清除法测定, 血清胰岛素和脂联素采用酶联免疫法测定, 所有检测均严格按照试剂盒说明书进行。胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR 指数) 采用公式 $HOMA-IR = FINS (\mu g/mL) \times FPG (mmol/L) / 22.5$ 计算, 肝脏系数采用肝脏重量除以体重计算, 内脏脂肪系数采用肾周脂肪和髂周脂肪的重量之和除以体重计算。

1.6 统计分析

本研究采用 SPSS 18.0 软件包进行数据分析, 实验结果中计量资料均采用均数 \pm 标准差表示; 使用方差分析进行组间比较, 根据方差齐或不齐分别选用 LSD 方法或 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 时认为组间有差异。

2 结果

2.1 绿茶多酚改善大鼠内脏脂肪沉积和糖脂代谢紊乱, 降低高脂饲养大鼠 HOMA-IR 指数

如表 1 所示, 高脂饲养大鼠的体重和脂肪系数显著增加, 血糖, 血清甘油三酯, 总胆固醇和 LDL-C 与 HDL-C 之比都显著升高, 提示长期的高脂膳食对大鼠体脂肪量和糖脂代谢造成了干扰, 而绿茶多酚干预显著降低了脂饲养大鼠的体脂肪沉积, 改善了高脂诱导的糖脂代谢紊乱。

表 1 绿茶多酚对高脂饲养大鼠体重、血糖和血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	体重(g)	脂肪系数	血糖 (mmol/l)	TC (mmol/l)	TG (mmol/l)	LDL-C/HDL-C
对照	399.75 \pm 32.33	25.17 \pm 4.79	5.55 \pm 0.48	1.06 \pm 0.10	0.51 \pm 0.07	0.53 \pm 0.02
高脂组	468.38 \pm 35.1*	45.10 \pm 9.42*	6.42 \pm 0.16*	1.46 \pm 0.04*	0.73 \pm 0.14*	1.86 \pm 0.29*
绿茶多酚 0.8 g/L	417.25 \pm 33.3 [#]	27.43 \pm 8.16 [#]	5.96 \pm 0.40* [#]	1.38 \pm 0.13*	0.64 \pm 0.10*	1.48 \pm 0.08* [#]
绿茶多酚 1.6 g/L	421.75 \pm 31.52 [#]	27.37 \pm 10.10 [#]	5.93 \pm 0.41* [#]	1.06 \pm 0.16 [#]	0.65 \pm 0.10*	0.65 \pm 0.05 [#]
绿茶多酚 3.2 g/L	426.25 \pm 26.36 [#]	32.01 \pm 7.17 [#]	5.40 \pm 0.46* [#]	0.73 \pm 0.12* [#]	0.43 \pm 0.12 [#]	0.31 \pm 0.08* [#]

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$; [#] 与高脂组相比, $P < 0.05$ 。

图 1 可见，高脂饲养大鼠的胰岛素抵抗指数（HOMA-IR 指数）与对照组相比显著升高，说明长期高脂饲养降低了大鼠的胰岛

素敏感性，绿茶多酚组大鼠的 HOMA-IR 指数与高脂组相比显著降低。

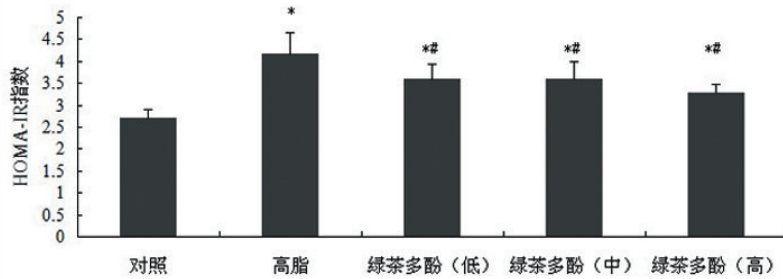


图 1 大鼠 HOMA-IR 指数 ($n=6$, * 与对照组相比, $P<0.05$, # 与高脂组相比, $P<0.05$)

2.2 绿茶多酚降低高脂饲养大鼠肝脏系数，改善其肝脏脂肪沉积

图 2 可见，高脂饲养大鼠的肝脏系数与正常组相比显著升高；油红染色显示，高脂

饲养大鼠肝脏组织切片中红色脂滴明显增多（图 3），绿茶多酚显著改善了高脂诱导的大鼠肝脏系数升高和脂肪沉积。

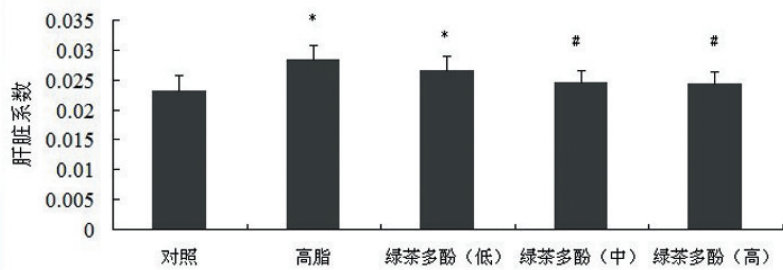
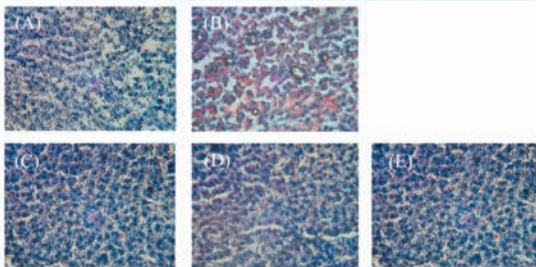


图 2 大鼠肝脏系数 (与对照组相比, $P<0.05$, # 与高脂组相比, $P<0.05$)



油红 O 染色切片 (400×)

A: 对照组; B: 高脂组; C: 绿茶多酚 (低);
D: 绿茶多酚 (中); E: 绿茶多酚 (高)

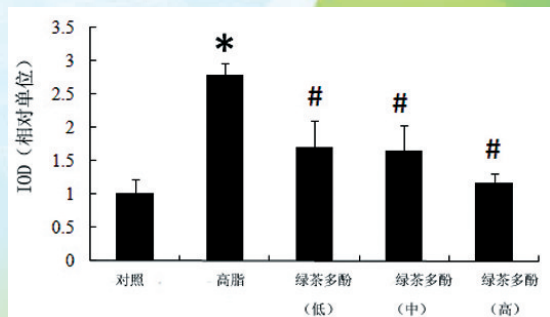


图 3 肝脏脂肪沉积分析 (油红 O 染色) ($n=6$, 与对照组相比, $P<0.05$, # 与高脂组相比, $P<0.05$)

2.3 绿茶多酚调节高脂饲养大鼠肝脏糖脂代谢相关基因表达

肝脏是机体脂肪代谢的主要场所，其中过氧化物酶增殖激活受体 (PPAR) γ 表达升高可以诱导成脂性基因转录增多从而促进脂肪合成；脂肪酸合成酶 (FAS)，是合成内源性脂肪酸的关键酶；羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMG CoAR reductase) 是内源性胆固醇合成的限速酶；固醇调控元件结合蛋白 (SREBP) $-1c$ 是脂肪合成非常重要的调控因子，其过度表达使脂肪和成倍上升，进而引起肝脏的脂质积聚；过氧化物酶增殖激活受体 (PPAR) α 是调控脂肪氧化的重要因子，通过过氧化物酶体 β 氧化途径来氧化脂肪酸。如图 4 所示，与对照组相比，高脂组大鼠肝脏组织中 PPAR γ 、FAS、

HMG-CoAR 和 SREBP-1c 的 mRNA 表达水平显著升高，而 PPAR α mRNA 水平显著降低，绿茶多酚干预能够显著降低脂肪合成相关基因的 mRNA 水平，显著提高 PPAR α mRNA 水平 ($P < 0.05$)。

磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶 (PEPCK) 和葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase) 是肝糖异生的重要限速酶，其表达水平直接反映了肝脏中糖异生反应的水平。葡萄糖转运蛋白 2 (Glut 2) 是肝脏中主要的葡萄糖转运体，能迅速摄取过多的葡萄糖，合成糖原来降低血糖水平。在本研究中 (图 5)，与对照组相比，高脂饲养显著提高了 PEPCK 和 G6Pase 的表达水平，降低了 Glut 2 表达水平，而绿茶多酚干预明显缓解高脂诱导的糖异生关键酶的表达升高和 Glut 2 表达降低。

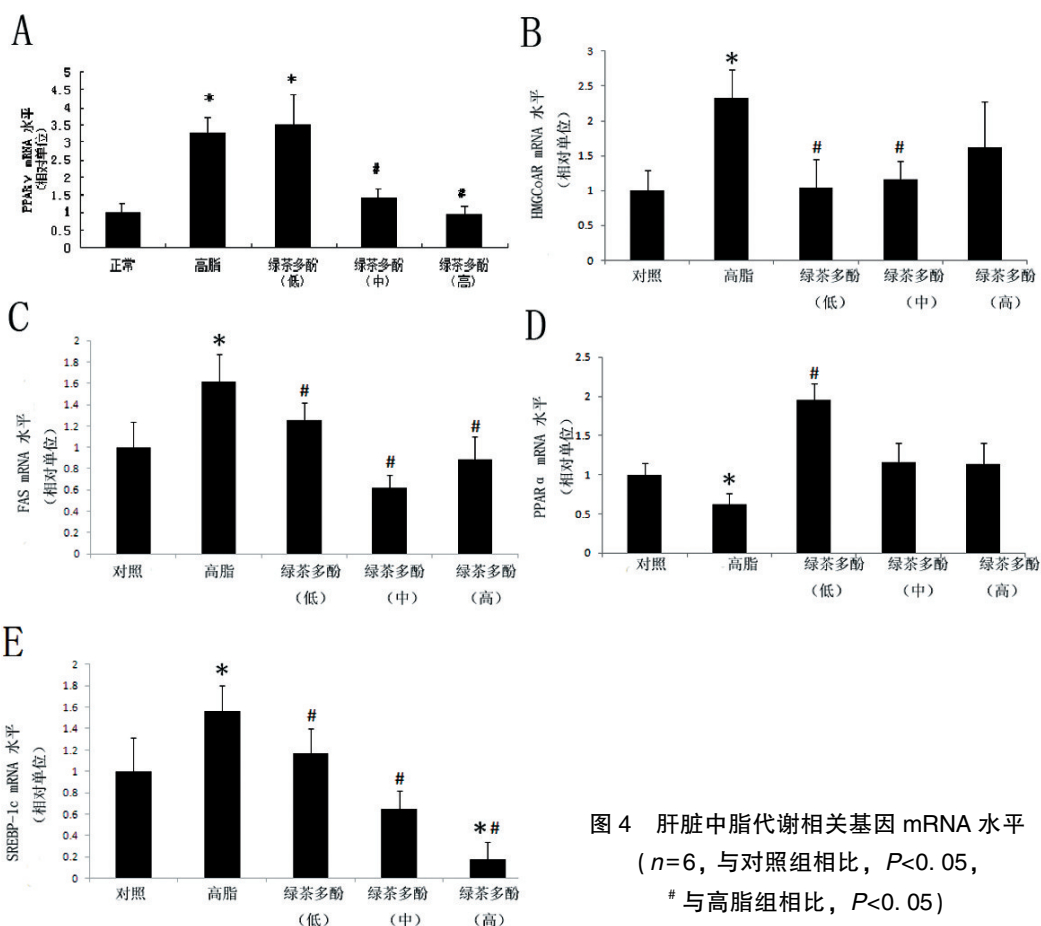


图 4 肝脏中脂代谢相关基因 mRNA 水平 ($n=6$, 与对照组相比, $P < 0.05$, # 与高脂组相比, $P < 0.05$)

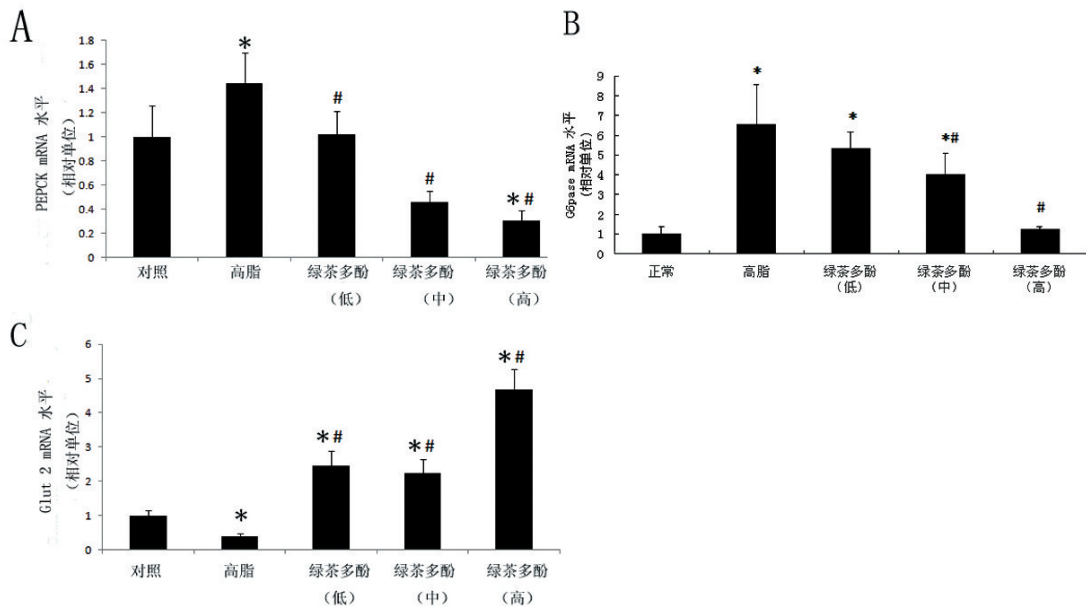


图5 肝脏中糖代谢相关基因 mRNA 水平
($n=6$, 与对照组相比, $P<0.05$, #与高脂组相比, $P<0.05$)

2.4 绿茶多酚提高高脂饲养大鼠脂联素水平和肝脏中脂联素受体 2mRNA 水平

图6可见,高脂饲养显著降低了大鼠内脏脂肪组织中脂联素 mRNA 水平和血清脂联素水平,而绿茶多酚干预显著提高了大鼠脂

联素的 mRNA 水平和血清脂联素水平。高脂饲养大鼠的肝脏组织中脂联素受体 2 的 mRNA 水平显著降低,绿茶多酚干预显著提高了高脂饲养大鼠肝脏中脂联素受体 2 的 mRNA 水平(图7)。

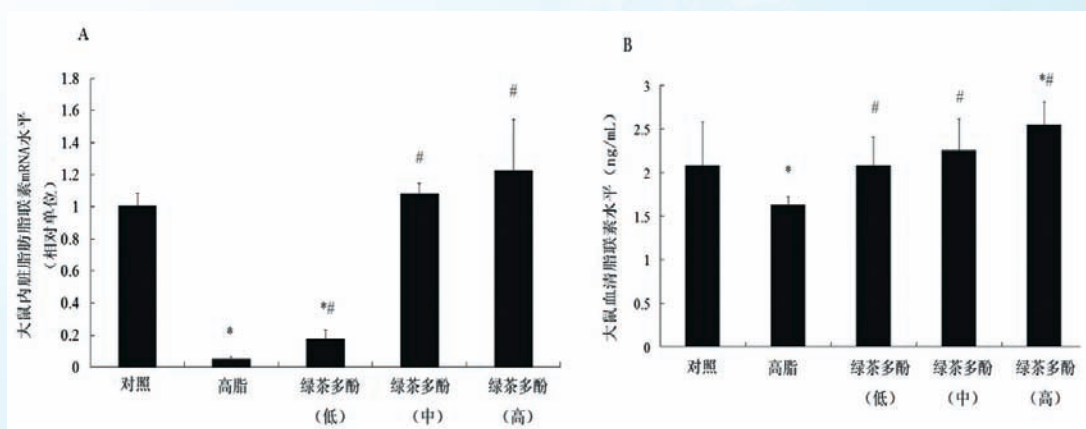


图6 大鼠内脏脂肪中脂联素基因 mRNA 水平和血清脂联素水平
($n=6$, 与对照组相比, $P<0.05$, #与高脂组相比, $P<0.05$)

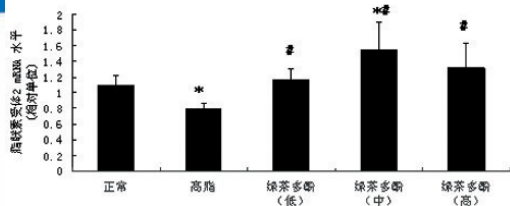


图7 大鼠肝脏中脂联素受体2基因 mRNA 水平 ($n=6$, 与对照组相比, $P<0.05$, # 与高脂组相比, $P<0.05$)

3 讨论

糖尿病与 NAFLD 的发生和进展密切相关, 高脂膳食是糖尿病和 NAFLD 的共同危险因素。本研究采用高脂膳食饲养大鼠, 绿茶多酚进行干预, 观察其糖脂代谢改变和肝脏中糖脂代谢相关基因表达变化, 结果显示, 高脂膳食诱导大鼠出现了体脂增加, 糖脂代谢紊乱, 胰岛素抵抗指数升高, 同时出现了肝脏系数升高, 肝脏脂肪沉积, 肝脏中脂肪合成相关基因, 糖异生关键基因 mRNA 水平升高, 脂肪酸氧化相关基因和葡萄糖转运蛋白 2 的 mRNA 水平显著降低, 而绿茶多酚干预显著缓解了高脂诱导的体脂增加, 糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗指数升高, 同时对肝脏脂肪沉积和基因表达改变也具有明显改善作用。提示绿茶多酚可能对高脂相关的糖尿病和 NAFLD 都有一定保护作用。

研究认为, 脂联素可能通过调节胰岛素敏感性, 激活 AMPK 和抗纤维化作用参与非酒精性脂肪肝的病理生理过程^[15]。本研究检测了大鼠脂联素 mRNA 和血清水平, 结果显示, 高脂饲养显著降低了大鼠的脂联素水平, 绿茶多酚干预显著改善了这种高脂诱导的脂联素水平降低的现象。在肝脏中, 脂联素通过与脂联素受体 2 结合, 抑制 SREBP-1c 的活性, 降低脂肪酸合成酶水平, 抑制脂肪酸的合成, 增加 PPAR α 的表达水平, 促进线粒体的 β 氧化等, 预防肝脏中的脂肪沉积, 还能够并抑制糖异生活活动, 减少肝脏的葡萄糖输出, 降低血糖水平^[16], 这与我们绿茶多酚干预组大鼠观察到的结果一致, 同

时我们还观察到绿茶多酚显著提高了高脂饲养大鼠肝脏组织中脂联素受体 2 表达水平, 降低了 SREBP-1c 的 mRNA 水平。这些证据提示, 绿茶多酚可能通过缓解高脂诱导的大鼠脂联素水平降低, 改善高脂大鼠的肝脏糖脂代谢相关基因的表达改变和 NAFLD 的发生。

在本研究中, 高脂膳食提高了肝脏组织中 PPAR- γ 的 mRNA 水平, 但是我们另外的研究显示, 高脂膳食降低了大鼠内脏脂肪组织中 PPAR- γ 的 mRNA 水平和表达水平^[17], 绿茶多酚干预能够缓解高脂诱导的这两种不同改变。高脂对肝脏组织和内脏脂肪组织中 PPAR- γ 水平的差异化调节, 以及绿茶多酚的缓解作用相关的机制还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, et al. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011, 9: 428-433: quiz e50.
- [2] Byrne CD. Dorothy Hodgkin Lecture 2012: non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance and ectopic fat: a new problem in diabetes management. *Diabet Med*. 2012, 29 (9): 1098-1107.
- [3] Sakurai M, Takamura T, Ota T, et al. Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*, 2007, 42: 312-317.
- [4] Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15430-15435.
- [5] Takamura T, Sakurai M, Ota T, et al. Genes for systemic vascular complications are

differentially expressed in the livers of type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 2004, 47: 638–647.

[6] Hamaguchi E, Takamura T, Sakurai M, et al. Histological course of nonalcoholic fatty liver disease in Japanese patients: tight glycemic control, rather than weight reduction, ameliorates liver fibrosis. *Diabetes Care*, 2010, 33: 284–286.

[7] Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell*, 2000, 6: 87–97.

[8] Oberthuer A, Dönmez F, Oberhäuser F, et al. Hypoadiponectinemia in extremely low gestational age newborns with severe hyperglycemia – a matched – paired analysis. *PLoS One*, 2012, 7 (6): e38481.

[9] Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 (1): 85–89.

[10] Kadowaki, T. and T. Yamauchi. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*, 2005, 26 (3): 439–451.

[11] Shimizu A, Takamura T, Matsuzawa N, et al. Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line. *Metabolism*, 2007, 56: 1478–1485.

[12] Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, et al. Beneficial effects of teacatechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002, 26: 1459–1464.

[13] Sundaram R, Naresh R, Shanthi P, et al. Modulatory effect of green tea extract on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin and high fat diet induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 2013, 20 (7): 577–584.

[14] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.

[15] Yamauchi T, Nio Y, Maki T, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*, 2007, 13: 332–339.

[16] Kadowaki, T. and T. Yamauchi. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*, 2005, 26 (3): 439–451.

[17] Chong Tian, Xiaolei Ye, Rui Zhang, et al. Green Tea Polyphenols Reduced Fat Deposits in HighFat-Fed Rats via erk1/2-PPARc – Adiponectin Pathway. *PLOS ONE*, 2013, 8 (1): e53796.