

· 基础研究 ·

多氯联苯 118 诱导大鼠非酒精性脂肪肝病的研究

周 琪,许文立,王 莉,段 宇*

南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨慢性低浓度多氯联苯 118(polychlorinated biphenyl 118,PCB118)是否引起大鼠非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)及其机制。方法:Wistar大鼠随机分为4组,腹腔注射PCB118[10、100和1 000 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]或玉米油[0.5 mL/($\text{kg}\cdot\text{d}$)]13周。检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平及白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)mRNA 表达水平。HE 及天狼星红染色观察肝脏脂肪变性、炎症细胞浸润及纤维化程度。结果:不同浓度PCB118刺激后与对照组比较,血清ALT、TG、TC、GLU、LDL-C、HDL-C水平显著增加($P < 0.01$),血清AST水平略有增加但差异无统计学意义。IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1、MMP-2、 α -SMA mRNA水平显著增加($P < 0.05$)。HE 染色示肝脏脂肪变性、炎症浸润,天狼星红染色示肝小叶结构紊乱,明显纤维化。结论:慢性低浓度PCB118通过炎症机制促进肝脏纤维化,诱导大鼠NAFLD发生。

[关键词] 多氯联苯 118;肝脏;非酒精性脂肪肝病;炎症;纤维化

[中图分类号] R589.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)05-659-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190506

Polychlorinated biphenyl 118 induced nonalcoholic fatty liver disease in rats

Zhou Qi, Xu Wenli, Wang Li, Duan Yu*

Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore whether chronic low-dose polychlorinated biphenyl 118(PCB118) could induce nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. **Methods:** Wistar rats were randomly divided into 4 groups and injected intraperitoneally with PCB118 [10, 100 or 1 000 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$] or corn oil [0.5 mL/($\text{kg}\cdot\text{d}$)] for 13 weeks, respectively. Serum levels of alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glucose (GLU), triglyceride (TG), total Cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) were measured, and the mRNA expression of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and fibrogenic factor transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), α -smooth muscle actin (α -SMA) were quantified. Hepatic steatosis, inflammatory cell infiltration and liver fibrosis were observed by HE staining and Sirius red staining, respectively. **Results:** Compared to control group, after stimulation with different concentrations of PCB118, serum ALT, TG, TC, GLU, LDL-C, HDL-C levels were significantly increased ($P < 0.01$), and serum AST level was slightly increased, but no statistical significance was observed ($P > 0.05$). The mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1, MMP-2 and α -SMA increased, and were significantly different compared with the control group ($P < 0.05$). HE staining showed steatosis and inflammation in the liver of rats in PCB118-treated group was more serious than that in the control group, and Sirius red staining showed that the hepatic lobule structure was disordered with obvious red staining area in PCB118 treatment group. **Conclusion:** Chronic low-concentration PCB118 could promote liver fibrosis through inflammatory mechanisms and induce NAFLD in rats.

[Key words] polychlorinated biphenyl 118; liver; nonalcoholic fatty liver disease; inflammation; fibrosis

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05): 659-663]

[基金项目] 国家自然科学基金(81670724)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: duanyujsp@163.com

多氯联苯(polychlorinated biphenyl, PCB)是人工合成氯代烃类环境内分泌干扰物,通过食物链垂直富集、生物体内永久蓄积、影响内分泌激素合成和

代谢,因此又被称为“持久性环境内分泌污染物”^[1]。PCB可对动物和人类多系统和器官造成严重损害,包括神经系统、心血管系统、生殖系统和内分泌代谢系统等。在 PCB 同系物中以 PCB118 最具代表性,是最常见多氯联苯亚类之一,可用于评估环境中总多氯联苯的直接指标。在我国长三角地区,PCB118 普遍存在于受污染水样、泥样以及水生生物体内^[2]。已有研究表明,PCB118 能引起甲状腺结构和功能异常,干扰下丘脑-垂体甲状腺功能轴^[3]。此外,本课题组前期的研究证实,慢性低浓度 PCB118 可引起大鼠空腹血糖受损、胰岛素敏感性降低和胰岛素抵抗^[4]。作为胰岛素作用的主要靶器官,肝脏在 PCB118 引起胰岛素敏感性降低时,是否出现脂肪变性及肝功能改变尚不清楚。本研究主要探讨慢性低浓度 PCB118 是否通过炎症机制促进肝脏纤维化进而诱导大鼠非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)发生。

1 材料和方法

1.1 材料

40 只健康成年雄性清洁级 Wistar 大鼠(北京维通利华有限责任公司),体重(300 ± 20)g,于南京医科大学动物实验中心饲养(饲养条件为:相对湿度 50%~70%,环境温度 18~22 ℃,明暗周期 12 h,自由摄食及饮水)。PCB118 标准品(AccuStandard 公司,美国),用 612 μL DMSO 溶解成 25 mmol/L 贮存液。

1.2 方法

1.2.1 动物造模

大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 4 组,每组 10 只,分别腹腔注射 10、100、1 000 μg/(kg·d)PCB118,为低、中、高剂量组,以及 0.5 mL/(kg·d)玉米油为对照组,每周 5 d,每日称重,共 13 周。

1.2.2 大鼠肝脏组织 HE 染色

造模结束,取大鼠肝脏组织用 4%多聚甲醛固定,脱水,透明后浸蜡,石蜡包埋,组织切片后用 HE 染色,在光镜下观察大鼠肝脏组织学变化。

1.2.3 大鼠肝脏组织天狼星红染色

脱蜡水化,天青石蓝液染 6 min,蒸馏水洗 3 次,天狼星红饱和苦味酸液染 15 min,无水酒精直接分化与脱水,镜下控制染色,胶原纤维呈红色,细胞核呈绿色,其余呈黄色。二甲苯透明,中性树胶封片。光镜下观察纤维化区域胶原成分并拍照。

1.2.4 大鼠血清学检测

大鼠心脏采血,离心后分离血清。按照试剂盒

说明书微板法测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)指标。

1.2.5 qRT-PCR 实验

提取大鼠肝脏组织总 RNA 并逆转录,通过 SYBR-Green PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本)进行 RT-PCR 定量。使用以下引物对大鼠白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、转化生长因子-β1(TGF-β1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)及β-肌动蛋白(β-actin)(用作内部对照)基因进行扩增。根据 2^{-ΔΔCT}方法计算相对基因表达水平。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物	
Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR	
基因	引物序列(5'→3')
IL-1β	F:TCCTCTGTGACTCGTGGGAT
	R:TCAGACAGCAGCAGGCAATT
TNF-α	F:CATCCGTTCTCTACCCAGCC
	R:AATTCTGAGCCCGGAGTTGG
TGF-β1	F:AGGGCTACCATGCCAACTTC
	R:CCACGTAGTAGACGATGGGC
MMP-2	F:GGTGGCAATGGAGATGGACA
	R:CCGGTCATAATCCTCGGTGG
α-SMA	F:CATCACCAACTGGGACGACA
	R:TCCGTTAGCAAGGTCGGATG
β-actin	F:GACAACCTTTGGCATCGTGGA
	R:ATGCAGGGATGATGTTCTGG

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析。计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 PCB118 对大鼠行为和体重影响

造模期间大鼠行为无明显异常,摄食、饮水均正常,随造模时间延长大鼠体重逐渐增加,与对照组比较,PCB118 不同剂量组体重变化无统计学意义,不同 PCB118 剂量组之间亦无明显差异($P > 0.05$,表 2)。

2.2 模型大鼠血清生化指标变化

大鼠 ALT 水平在 PCB118 低、中剂量组呈剂量依赖性增加趋势,在高剂量组略有降低,其中中剂

表2 PCB118对造模大鼠体重影响

Table 2 Influence of PCB118 on body weight of model rats (g, $\bar{x} \pm s, n=10$)							
组别	1周	3周	5周	7周	9周	11周	13周
对照组	294 ± 10	355 ± 18	359 ± 40	376 ± 43	418 ± 39	442 ± 31	468 ± 32
PCB118低剂量组	307 ± 16	364 ± 26	363 ± 29	384 ± 29	414 ± 27	435 ± 26	455 ± 26
PCB118中剂量组	304 ± 14	361 ± 19	369 ± 34	402 ± 36	436 ± 37	458 ± 41	476 ± 43
PCB118高剂量组	306 ± 16	367 ± 24	387 ± 33	403 ± 28	433 ± 30	451 ± 33	465 ± 28
F值	1.231	0.421	0.856	1.073	0.778	0.744	0.582
P值	0.318	0.739	0.476	0.378	0.517	0.535	0.632

量组明显高于对照组($P < 0.01$)。AST水平随PCB118浓度增加逐渐升高,但各组间差异无统计学意义($P > 0.05$,表3)。

与对照组相比,PCB118低、中、高剂量组大鼠血清GLU水平均显著增加($P < 0.05$),其中中剂量组血GLU水平明显高于低剂量组($P < 0.01$);TG水平在中、高剂量组逐步增加,与对照组相比,高剂量组具有显著性差异($P < 0.01$);TC水平呈剂量依赖性增加趋势,与对照组相比,中、高剂量组TC显著性增加($P < 0.01$),各PCB118剂量组间差异不明显;与对照组相比,LDL-C在PCB118不同剂量组显著增加($P < 0.01$),但PCB118剂量组间差异不明显($P < 0.05$);与对照组和低剂量组相比,中、高剂量组HDL-C水平显著增加($P < 0.01$),中、高剂量组相比也具有统计学意义($P < 0.05$,表4)。

表3 各组大鼠血清学肝功能指标

Table 3 Serological liver function index of rats in each group (U/L)		
组别	ALT	AST
对照组	5.144 ± 1.524	20.661 ± 5.910
PCB118低剂量组	8.923 ± 3.809	27.448 ± 4.370
PCB118中剂量组	19.625 ± 6.107**	29.300 ± 6.655
PCB118高剂量组	6.659 ± 1.740	32.154 ± 7.013

与对照组比较,** $P < 0.01$ 。

2.3 大鼠肝脏组织病理染色

HE染色示正常对照组肝细胞索排列有序,未见明显炎症细胞浸润。PCB118处理组肝小叶结构紊乱,纤维间隔形成,肝细胞胞质内可见大小不等空泡状脂滴,炎性细胞沿血管、汇管区和纤维间隔浸润,且呈一定剂量依赖趋势(图1)。

表4 各组大鼠血清生化功能指标

Table 4 Serum biochemical index of rats in each group (mmol/L)					
组别	GLU	TG	TC	LDL-C	HDL-C
对照组	6.078 ± 0.786	1.750 ± 0.114	2.722 ± 0.163	0.231 ± 0.052	1.114 ± 0.099
PCB118低剂量组	7.362 ± 0.501*	1.640 ± 0.274	3.262 ± 0.461	0.512 ± 0.140**	1.194 ± 0.140
PCB118中剂量组	9.090 ± 0.387***	2.255 ± 0.437	3.558 ± 0.099**	0.543 ± 0.134**	1.435 ± 0.065***
PCB118高剂量组	10.470 ± 2.848*	2.401 ± 0.275***	3.596 ± 0.308**	0.633 ± 0.148**	1.827 ± 0.317***Δ

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与低剂量组比较,*** $P < 0.01$;与中剂量组比较,Δ $P < 0.05$ 。

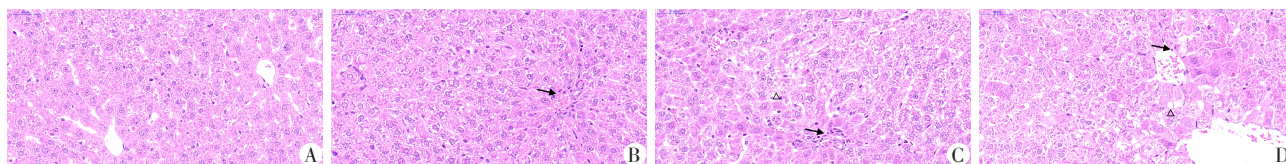
天狼星红染色示对照组小叶结构完整,具有中心静脉和肝索辐射,小中央静脉壁周围几乎没有染色出现。PCB118处理组可见肝小叶结构紊乱,纤维组织广泛增生,纤维性隔膜及假小叶形成。此外,肝小叶边界还可观察到天狼星红染色区域明显(图2)。

2.4 PCB118诱导大鼠肝脏组织炎症因子和纤维化因子表达变化

大鼠肝脏组织炎症因子IL-1β、TNF-α mRNA表达水平随PCB118浓度升高呈剂量依赖性增加。与对照组相比,PCB118中、高剂量组IL-1β mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$);与低剂量组比较,高剂

量组IL-1β mRNA表达水平也显著升高($P < 0.05$)。与对照组比,PCB118中、高剂量TNF-α mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$);高剂量组的TNF-α mRNA表达水平较低、中剂量组也显著升高($P < 0.05$,图3)。

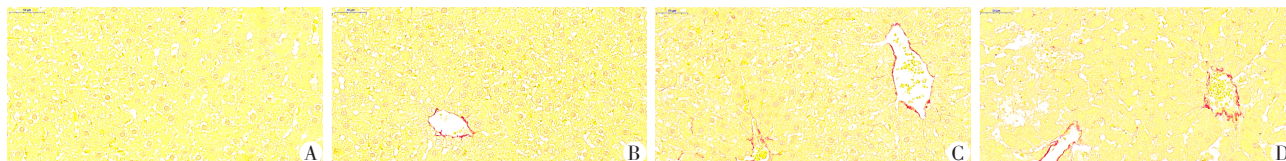
大鼠肝脏组织纤维化因子TGF-β1 mRNA表达水平随PCB118浓度增加而增加,与对照组相比,中、高剂量组表达水平显著升高($P < 0.05$),其中高剂量组TGF-β1 mRNA表达水平也较低、中剂量组显著升高($P < 0.01$)。MMP-2 mRNA表达水平在PCB118中剂量组显著升高($P < 0.01$),在高剂量组



A: 对照组; B、C、D: PCB118 低、中、高剂量组。→ 为炎症细胞, △ 为脂肪样变。

图1 PCB118对造模大鼠肝脏组织炎症浸润的影响(HE, ×40)

Figure 1 Effects of PCB118 on the inflammatory infiltration of rat hepatic (HE, ×40)



A: 对照组; B、C、D: PCB118 低、中、高剂量组。→ 为纤维化。

图2 PCB118对造模大鼠肝脏组织纤维化的影响(天狼星红染色, ×40)

Figure 2 Effects of PCB118 on the hepatic fibrosis of rat (Sirius red stain, ×40)

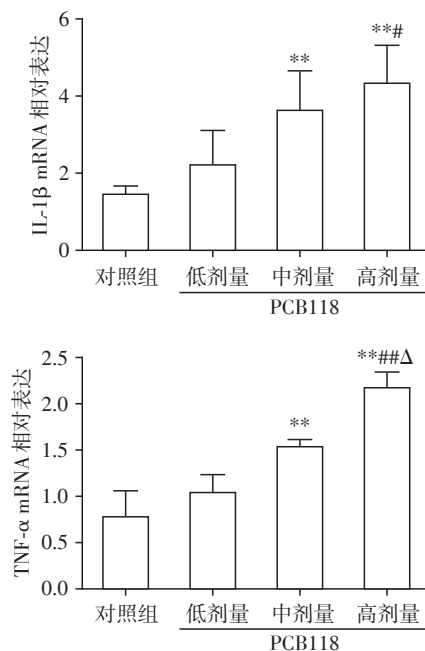
略有下降,但仍高于对照组($P < 0.01$)。α-SMA mRNA 表达水平在PCB118中剂量组显著高于其他3组($P < 0.01$,图4)。

3 讨论

环境内分泌干扰物PCB化学性质稳定且难以降解,可长期蓄积于生物体内,引起多系统及器官功能障碍。其中,肝脏作为PCB蓄积的主要部位,是PCB损伤的重要靶器官^[5]。已有研究表明,高剂量PCB可诱导大鼠肝细胞坏死^[6],但目前关于慢性摄入低浓度PCB对哺乳动物肝脏影响的研究尚缺乏相关资料。

本研究中,PCB118各剂量组大鼠血清GLU和血脂各项指标TG、TC、LDL-C、HDL-C较对照组显著升高且呈剂量依赖趋势,出现明显糖脂代谢紊乱。肝功能指标检测发现,PCB118各剂量组大鼠血清ALT出现先升后降趋势,血清AST水平虽随剂量依赖性增加,但与对照组比较差异无统计学意义。肝脏ALT主要分布于细胞质中,在急性肝损伤时升高明显,被认为是肝细胞损伤最敏感的因素。本研究中,PCB118低、中剂量组模型动物ALT明显增高,而高剂量组较前降低,提示肝细胞损伤进一步加重。已知肝脏总AST的80%存在于线粒体,肝损伤时该指标变化多晚于ALT变化,当肝细胞坏死加重,如慢性肝炎、肝硬化发生时,AST可出现显著升高。本研究采用PCB118造模13周,与对照组比较各剂量组肝脏线粒体损伤尚不足以引起AST明显变化。

本研究还发现,暴露于持续、低浓度PCB118的大鼠肝脏组织增生肥大,内含大小不等的脂滴空



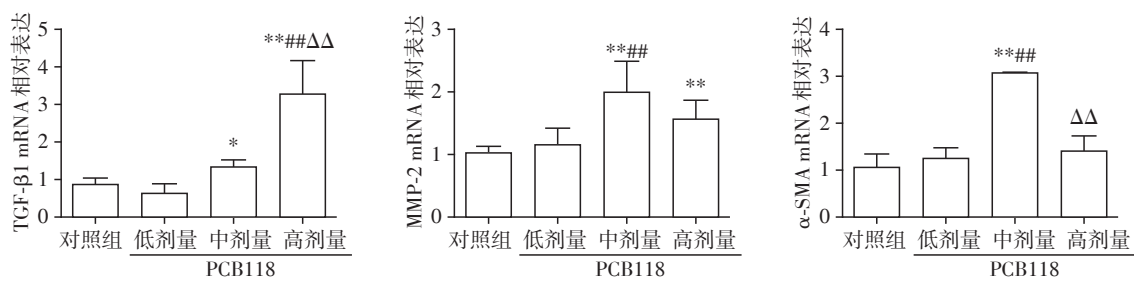
与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与低剂量组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与中剂量组比较, Δ $P < 0.05$ ($n=3$)。

图3 PCB118对大鼠肝脏组织炎症因子IL-1β和TNF-α mRNA表达水平的影响

Figure 3 Effects of PCB118 on mRNA expression levels of IL-1β and TNF-α in hepatic inflammatory in rats

泡,并可见炎症细胞浸润,肝小叶结构紊乱,纤维组织广泛增生,假小叶形成,天狼星红染色明显,表明慢性低浓度PCB118以剂量依赖性方式诱导肝脏组织病理损伤,主要表现为脂肪变性、炎症细胞浸润和纤维化,符合NAFLD组织学诊断标准。

NAFLD是一种与胰岛素抵抗和遗传易感性密



与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与低剂量组比较,## $P < 0.01$,与中剂量组比较,ΔΔ $P < 0.01$ ($n=3$)。

图4 PCB118对大鼠肝脏组织纤维化因子TGF-β1、MMP-2和α-SMA mRNA表达水平的影响

Figure 4 Effects of PCB118 on mRNA expression levels of TGF-β1, MMP-2 and α-SMA in hepatic fibrosis in rats

切相关的代谢应激性肝损伤,分为原发性和继发性两大类,而后者则由某些特殊原因所致,如药物、环境和工业污染物等,本研究PCB118所致的大鼠NAFLD属于继发性范畴。其病理分类包括:单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎相关肝硬化,这种进展与胰岛素抵抗息息相关,可诱导中心性肥胖、糖尿病、高血压和高甘油三酯血症等代谢综合征^[7]。在NAFLD发病机制中胰岛素抵抗和炎症氧化应激起关键作用。本研究中PCB118处理组大鼠血GLU水平剂量依赖性增高,提示PCB118可以引起糖代谢异常。在我们既往研究中,腹腔葡萄糖耐量试验显示PCB118处理大鼠血糖、胰岛素水平及胰岛素抵抗指数显著升高,表明胰岛素敏感性降低,胰岛素抵抗程度逐渐增强^[4],而胰岛素抵抗可促进游离脂肪酸转运,过量的游离脂肪酸流向肝脏导致肝脏脂肪变性,脂质沉积。

大量研究表明炎症细胞因子的释放,可诱导肝脏氧化应激,是单纯性脂肪肝进展到非酒精性脂肪性肝炎和非酒精性脂肪性肝炎相关肝硬化的重要原因。结合肝脏组织炎症病理表现,本实验主要围绕另一致病机制炎症氧化应激展开。正常细胞或组织未经刺激时,炎症因子IL-1β、TNF-α,纤维化因子TGF-β1、MMP-2、α-SMA mRNA表达量一般检测不到,但当炎症或纤维化反应发生时,其表达量可显著增加。本研究qRT-PCR结果显示,PCB118可引起大鼠肝脏组织炎症因子IL-1β、TNF-α和纤维化因子TGF-β1 mRNA表达量显著增加,纤维化因子MMP-2、α-SMA mRNA表达随PCB118浓度增加先增后降,与周俊英等^[8]的肝纤维化模型结果类似。

综上所述,慢性低浓度PCB118可引起大鼠肝

脏组织脂肪变性、炎症及纤维化,导致肝功能损伤,糖脂代谢异常,促进NAFLD发生。

[参考文献]

[1] Rudge CVC, Sandanger T, Rollin HB, et al. Levels of selected persistent organic pollutants in blood from delivering women in seven selected areas of Sao Paulo State, Brazil[J]. Environ Int, 2012, 40(2): 162-169

[2] Zhao G, Wang Z, Zhou H, et al. Burdens of PBBs, PBDEs, and PCBs in tissues of the cancer patients in the e-waste disassembly sites in Zhejiang, China[J]. Sci Total Environ, 2009, 407(17): 4831-4837

[3] 杨 慧,许波进,郑旭琴,等.多氯联苯118引起大鼠甲状腺炎症反应的研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(5):622-625

[4] 李 文,汤金梅,解雨春,等.多氯联苯118对大鼠胰岛素敏感性影响的研究[J].中华糖尿病杂志,2013,5(10):614-617

[5] Wahlang B, Barney J, Thompson B, et al. Editor's highlight: PCB126 exposure increases risk for peripheral vascular diseases in a liver injury mouse model[J]. Toxicol Sci, 2017, 160(2): 256-267

[6] Jonsson HT Jr, Walker EM Jr, Greene WB, et al. Effects of prolonged exposure to dietary DDT and PCB on rat liver morphology[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1981, 10(2): 171-183

[7] Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, et al. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression[J]. J Mol Med(Berl), 2009, 87(7): 679-695

[8] 周俊英,甄 真,李兵顺,等.肝组织TGF-β1、TIMP-1及MMP-2表达与纤维化关系的实验研究[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2004,13(1):33-37

[收稿日期] 2019-02-13