

## · 基础研究 ·

## 运动对高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝的治疗作用

肖方喜 孙晖 尚敬

**【摘要】目的** 观察运动对高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝的治疗作用,并初步探讨其相关机制。**方法** 将 30 只 Wistar 大鼠分为对照组及高脂组,分别给予基础饲料和高脂饲料喂养;高脂组大鼠经喂养 18 周后制成胰岛素抵抗(IR)模型,并进一步细分为静息组和运动组,继续给予高脂饲料喂养,运动组同时进行游泳训练,共持续 6 周。于实验进行 24 周后处死各组大鼠,计算肝指数,观察肝脏病理学改变,检测各组大鼠肝脏甘油三酯(TG)含量,同时应用蛋白免疫印迹法检测肝脏组织一磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)磷酸化水平。**结果** 实验进行 24 周后,与对照组比较,静息组大鼠胰岛素敏感性显著降低,肝脏 TG 含量、肝指数明显增高,光镜下肝脏出现明显脂肪变性,肝脏内 AMPK 磷酸化水平降至对照组水平的 50.8%;与静息组比较,运动组大鼠胰岛素敏感性明显提高,肝指数及肝脏 TG 含量均显著降低,光镜下可见肝脏脂肪变性程度明显改善,肝组织内 AMPK 磷酸化水平亦显著提高。**结论** 运动干预对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝具有治疗作用,其机制可能与运动上调肝脏组织中 AMPK 磷酸化水平,从而改善 IR 及减少肝脏内 TG 含量有关。

**【关键词】** 运动; 非酒精性脂肪肝; 一磷酸腺苷活化蛋白激酶; 胰岛素抵抗

**Therapeutic effect of exercise on nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet** XIAO Fang-xi\*, SUN Hui, SHANG Jin. \* Department of Endocrinology, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China  
Corresponding author: SUN Hui, E-mail: xzsh68@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of exercise on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by high-fat diet and explore the mechanism. **Methods** Thirty healthy male rats were randomly divided into a normal control group (NC group) and a high-fat group (HF group), fed with normal chow and high-fat diet, respectively. Eighteen weeks later, the high-fat established as insulin resistance model and group was randomly divided into high-fat diet control group (HC group) and high-fat diet exercise group (HE group). HC group was continually given high-fat diet; HE group accepted swimming training for 6 weeks. After 24 weeks, the insulin sensitivity index (ISI) was calculated. After rats were sacrificed, weight of liver and body were measured to calculate liver mass index. Liver histology was detected by hematoxylin and eosin staining. Hepatic triglyceride content was detected. Phosphorylation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) level was detected by Western blot technique. **Results** At the 18th week, compared to NC group, ISI of HF group decreased obviously. It suggested that insulin resistance appeared in HF group. At the 24th week, compared to NC group, ISI of HC group decreased significantly. But hepatic triglyceride content and liver mass index both increased. Pathology observation under light microscope showed obvious liver steatosis in HC group. Phosphorylation of AMPK level in HC group decreased to 50.8% of NC group. Exercise greatly improved the liver mass index, hepatic triglyceride content and ISI as well as liver steatosis compared to HC group. Phosphorylation of AMPK was also elevated to 78.1% of NC group in HE group. However, compared to NC group, liver mass index and hepatic triglyceride content increased simultaneously, while ISI and phosphorylation of AMPK level obviously decreased in HE group. **Conclusion** Elevated level of phosphorylation of AMPK contributed to improve insulin resistance and decrease the hepatic triglyceride content. Exercise could markedly improve NAFLD induced by high-fat diet through elevating phosphorylation of AMPK in liver.

**【Key words】** Exercise; Nonalcoholic fatty liver disease; Adenosine monophosphate-activated protein kinase; Insulin resistance

近年来非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver

disease, NAFLD)的发病率呈逐年上升趋势,其主要病理特点是肝脏内脂质沉积,体力活动减少是重要诱因之一。当前研究发现,NAFLD 与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)具有密切相关性<sup>[1-3]</sup>, IR 被认为是 NAFLD 的独立相关危险因素<sup>[4]</sup>。一磷酸腺苷活化蛋

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.03.002

作者单位:430022 武汉,武汉市第一医院内分泌科(肖方喜);华中科技大学同济医学院附属协和医院内分泌科(孙晖、尚敬)

通信作者:孙晖;Email:xzsh68@yahoo.com.cn

白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)被认为是机体“代谢总开关”<sup>[5]</sup>,与 IR 及肝脏脂质含量密切相关。本研究对高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠模型给予运动干预,观察运动对高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠肝脏 AMPK 磷酸化水平及甘油三酯(triglyceride, TG)含量的影响,并探讨其作用机制。现报道如下。

## 材料与方法

### 一、实验动物及主要试剂

共选取健康 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重 120~140 g,鼠龄 5~6 周,均购自湖北省卫生防疫站,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2004-0007,使用许可证号:SKXK(鄂)2004-0028。血糖试剂盒购自北京北华康泰临床试剂有限公司;胰岛素试剂盒购自天津九鼎医学生物有限公司;甘油三酯液体试剂盒购自上海申能-德赛诊断技术有限公司;兔抗大鼠 AMPK $\alpha$ 、phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172)一抗购自美国 CST 公司,抗兔二抗购自晶美公司,BCA 试剂盒和 ECL 试剂盒购自美国 Pierce 公司,RIPA 裂解液购自江苏碧云天公司。

### 二、动物分组及处理

上述 30 只 Wistar 大鼠经适应性喂养 1 周后分为对照组(8 只)及高脂组(22 只),分别给予基础饲料(热卡比:蛋白占 22%、脂肪占 12%、碳水化合物占 66%)和高脂饲料(热卡比:蛋白占 21%、脂肪占 59%、碳水化合物占 20%)喂养。高脂饲料均于使用前 1 周内新鲜配制,在 4℃ 环境下存贮。所有大鼠均在华中科技大学同济医学院实验动物中心 SPF 级动物房中喂养,每笼喂养 3~4 只,自然昼夜节律光照,期间自由摄食、饮水,整个喂养周期为 24 周。高脂组大鼠经喂养 18 周后,采取剪尾取血,对血标本进行离心,分离血清,测量空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)及空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)水平,计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI), $ISI = 1/(FBG \times FINS)$ 。由于 ISI 数据呈非正态分布,故数据分析时取其自然对数。对照组及高脂组大鼠  $\ln(ISI)$  分别为  $(-4.23 \pm 0.45)$  及  $(-4.75 \pm 0.35)$ ,将高脂组中  $\ln(ISI) <$  对照组 ISI 均数 + 2 倍标准差者视为造模成功,共有 18 只大鼠造模成功;再采用随机数字表法将造模成功的 18 只大鼠分为静息组(8 只)及运动组(10 只)。静息组继续给予高脂饲料喂养,运动组则在此基础上进行无负重耐力游泳训练<sup>[6]</sup>,控制游泳池水温为  $(29 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,水深 50 cm,保证每只大鼠有 200 cm<sup>2</sup> 活动区域,第 1,2 天试游泳 15 min/d,第 3 天游泳 30 min/d,第 4,5 天游泳 45 min/d,第 6,7 天休息,以后则每周游泳 5 d,每次游泳 1 h,共持续 6 周。运动组

有 2 只大鼠在游泳过程中溺水死亡。

### 三、肝脏组织标本制作及 TG 含量测定

待实验进行 24 周后,各组大鼠均过夜禁食 14 h,采用 1% 戊巴比妥按 60 mg/kg 体重进行腹腔注射麻醉,经腹主动脉取血、分离血清后,置于 -80℃ 环境下储存;迅速分离肝脏,称重肝湿重,并计算肝指数 =  $[\text{肝湿重(g)}/\text{体重(g)}] \times 100\%$ ;剪取各组大鼠相同部位肝脏组织,经 4% 甲醛固定后制备成石蜡切片,常规 HE 染色。

另各组大鼠分别剪取 200 mg 肝脏组织置于 2 ml 匀浆器中,加入 1 ml 氯仿-甲醇(2:1)脂质抽提缓冲液,匀浆结束后静置,待匀浆液均匀、透亮且无颗粒时,将上述抽提液置入 1.5 ml EP 管中,室温下振荡过夜;加入 0.6% 氯化钠溶液 0.5 ml 后离心(4℃, 2000 rpm)10 min,将含有脂质的有机相转移到 EP 管中空气干燥,然后将分离出的脂质重新溶于 250  $\mu\text{l}$  乙醇中,采用自动生化分析仪测定样本中 TG 含量。

### 四、蛋白免疫印迹法检测肝脏中 AMPK 磷酸化水平

各组大鼠分别取 100 mg 肝脏组织剪碎,经 1 ml RIPA 裂解液裂解后,于 4℃ 环境下离心(12000 rpm)10 min,取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度,蛋白样品经煮沸后上样 50  $\mu\text{g}$ ,电泳 3 h,然后转膜、封闭。分别加入兔抗大鼠 AMPK $\alpha$  和磷酸化 AMPK $\alpha$ (p-AMPK $\alpha$ )一抗(浓度稀释至 1:1000),4℃ 振荡过夜,加入抗兔二抗(稀释至浓度 1:5000)常温振荡反应 1 h, ECL 法显影。采用凝胶影像分析仪测定样品蛋白灰度,以 p-AMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$  比值表示肝脏内 AMPK 磷酸化水平。

### 五、统计学分析

本研究所得数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,采用 SPSS 12.0 版统计学软件包进行数据分析,组间比较采用独立样本  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、各组大鼠主要生理指标及 ISI 比较

于实验进行 24 周后,发现静息组大鼠体重、肝指数、体脂比、FINS 及 FBG 水平均较对照组明显增高;运动组大鼠上述指标均较静息组明显降低,除了体脂比及肝指数仍高于对照组外,其它各项指标均接近对照组水平。静息组大鼠胰岛素敏感性较对照组明显降低( $P < 0.01$ ),运动组大鼠胰岛素敏感性较静息组显著升高( $P < 0.05$ ),但仍显著低于对照组水平( $P < 0.05$ ),具体数据见表 1。

### 二、各组大鼠肝脏病理学改变

光镜下可见对照组大鼠肝小叶清晰,肝细胞索排列整齐;静息组大鼠可见弥漫性肝细胞脂肪变,脂肪浸润明显;运动组大鼠肝脏脂肪变性程度较静息组显著减轻,仅见轻度脂肪沉积,详见图 1。

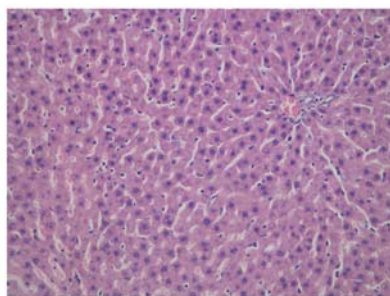
### 三、各组大鼠肝脏组织内 TG 含量比较

与对照组比较,静息组大鼠肝脏组织内 TG 含量显著增高,约是对照组的 2.51 倍 ( $P < 0.01$ );运动组大鼠肝脏组织内 TG 含量较静息组显著下降 28.7 % ( $P < 0.01$ ),但仍高于对照组水平 ( $P < 0.01$ ),具体结果见图 2。

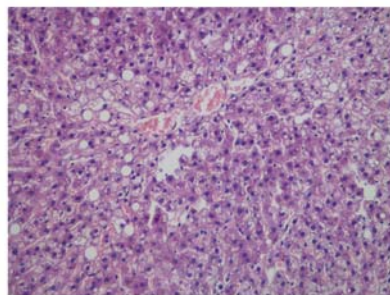
表 1 运动对大鼠主要生理指标及 ISI 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 只数 | 体重 (g)                | 体脂比 (%)                 | 肝指数 (%)                 | FINS (mU/L)               | FBG (mmol/L)             | Ln (ISI)                   |
|-----|----|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 对照组 | 8  | 455 ± 19              | 2.9 ± 0.3               | 2.5 ± 0.2               | 22.18 ± 3.52              | 4.77 ± 0.64              | -4.35 ± 0.26               |
| 静息组 | 8  | 482 ± 17 <sup>b</sup> | 5.3 ± 0.6 <sup>b</sup>  | 3.4 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 29.87 ± 4.15 <sup>b</sup> | 5.60 ± 0.53 <sup>a</sup> | -4.95 ± 0.37 <sup>b</sup>  |
| 运动组 | 8  | 458 ± 14 <sup>d</sup> | 4.2 ± 0.3 <sup>bd</sup> | 2.9 ± 0.3 <sup>bc</sup> | 24.36 ± 5.31 <sup>c</sup> | 4.75 ± 0.59 <sup>d</sup> | -4.62 ± 0.19 <sup>ac</sup> |

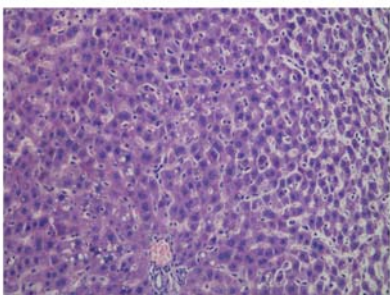
注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与静息组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$



对照组

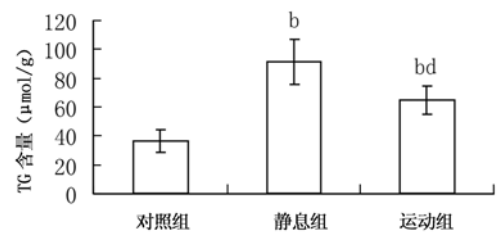


静息组



运动组

图 1 光镜下各组大鼠肝脏组织病理改变 (HE 染色,  $\times 200$ )

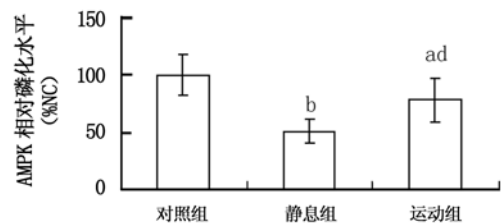
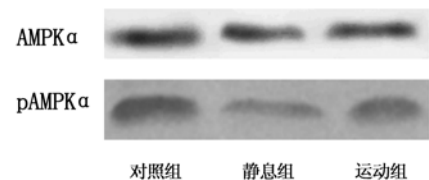


注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与静息组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$

图 2 各组大鼠肝脏组织 TG 含量比较

### 四、各组大鼠肝脏组织 AMPK 磷酸化水平比较

实验进行 24 周后,发现静息组大鼠肝脏组织 AMPK 磷酸化水平较对照组明显降低,约为对照组水平的 50.8% ( $P < 0.01$ );运动组大鼠肝脏组织 AMPK 磷酸化水平显著升高,恢复至对照组水平的 78.1% ( $P < 0.05$ ),且显著高于静息组 ( $P < 0.01$ ),具体结果见图 3。



注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与静息组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$

图 3 各组大鼠肝脏组织 AMPK 磷酸化水平比较

## 讨 论

近年来 NAFLD 的发病率逐年上升,但临床缺乏有效的治疗手段,其发病机制也有待进一步明确。1998 年 Day 等<sup>[7]</sup>针对脂肪肝的发病机制提出了“二次打击”假说,现已得到临床广泛认可;Samuel 等<sup>[8]</sup>进一步研究证实,IR 是大鼠非酒精性脂肪肝发病过程中的始动及重要因素,而且对非酒精性脂肪肝的预后具有影响作用,提示 IR 不仅是初次打击、也是二次打击。由此可见,IR 与 NAFLD 的发病关系密切。

本研究采取国内、外研究广泛应用的造模方法,利用高脂饲料喂养大鼠建立 NAFLD 模型,经过高脂饲料喂养大鼠出现内脏型肥胖及 IR;同时肝指数增高,并有肝脏增大、肝细胞脂肪变性等脂肪肝特征性病理改变,表明脂肪肝模型制作成功。对本研究所得数据分

析后发现,由高脂饲料喂养诱导的 NAFLD 模型大鼠肝脏内 p-AMPK 水平较对照组明显降低,而肝脏内 TG 含量则显著增高。AMPK 是一类广泛存在于真核细胞生物中的异源三聚体蛋白,在机体能量平衡调节中扮演重要角色。AMPK 由催化亚单位  $\alpha$  和调节亚单位  $\beta$ 、 $\gamma$  组成, $\alpha$  亚基是催化亚基,其第 172 位苏氨酸磷酸化后 AMPK 被激活。ZDF 大鼠和 ob/ob 小鼠出现重度 IR 及肝脏脂质异位沉积时,其肝脏中 p-AMPK 水平均显著降低<sup>[9]</sup>。肝脏细胞内 TG 含量增多可导致 IR 发生,而且 TG 含量与 IR 进展情况具有显著相关性。在肝脏组织中,AMPK 磷酸化可抑制合成 TG 的催化酶——甘油-3-磷酸乙酰转移酶功能,从而减少 TG 合成<sup>[10]</sup>,提示 p-AMPK 水平提高可同时改善 IR 及减少肝脏内 TG 含量,故 AMPK 可能是 NAFLD 治疗的新靶点之一。

运动是改善机体 IR 的重要措施之一,目前在临床治疗中已得到广泛应用。有研究报道,运动在改善 IR 的同时,还可以减轻脂肪肝病情,至于其确切机制仍处于探索阶段。有学者进一步研究发现,运动能增强肝脏内 AMPK 活性<sup>[11,12]</sup>。本研究结果显示,运动可显著改善高脂喂养大鼠 IR 及脂肪肝病情,同时肝脏内 AMPK 磷酸化水平亦较静息组显著提高,故推测运动干预可能通过提高肝脏组织内 AMPK 磷酸化水平,从而发挥脂肪肝治疗效应,其相关治疗机制包括:激活的 AMPK 通过抑制糖异生的关键酶——磷酸烯醇丙酮酸羧激酶及葡萄糖-6-磷酸酶基因表达,从而减少糖异生,达到改善肝脏 IR 的作用;另一方面,激活的 AMPK 不仅可以灭活肝脏脂肪酸合成限速酶——乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)活性,并且还可以减少 ACC 基因表达;激活的 AMPK 通过抑制 ACC 活性,可导致丙二酸单酰辅酶 A 浓度下降,从而减少脂肪酸合成,同时增强脂肪酸氧化。通过上述机制,运动干预在促进肝脏组织 AMPK 磷酸化同时,不仅能改善肝脏 IR,同时还能减少肝脏组织内 TG 含量,使高脂饮食诱导的脂肪肝病情得到缓解。

综上所述,本研究结果发现,运动干预可通过上调

高脂喂养大鼠肝脏内 AMPK 磷酸化水平,从而改善 IR 及减轻肝脏内 TG 沉积,对缓解脂肪肝病情具有确切疗效。

## 参 考 文 献

- [1] Park SH, Kim BI, Yun JW, et al. Insulin resistance and C-reactive protein as independent risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in non-obese Asian men. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19: 694 - 698.
- [2] 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.
- [3] Chalasani N, Deg MA, Persohn S, et al. Metabolic and anthropometric evaluation of insulin resistance in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98: 1849 - 1855.
- [4] Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab*, 2000, 26: 98 - 106.
- [5] 陈名道. 脂毒性及其防治的一个关键靶点-AMPK. *中华内分泌代谢杂志*, 2007, 23: 5 - 7.
- [6] Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen O, et al. Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1990, 259: 778 - 786.
- [7] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 1998, 114: 842 - 845.
- [8] Samuel VT, Liu ZX, Qu X, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*, 2004, 279: 32345 - 32353.
- [9] Wang MY, Unger RH. Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288: 216 - 221.
- [10] Atkinson LL, Kozak R, Kelly SE, et al. Potential mechanisms and consequences of cardiac triacylglycerol accumulation in insulin-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284: 923 - 930.
- [11] Ruderman NB, Park H, Kaushik VK, et al. AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol Scand*, 2003, 178: 435 - 442.
- [12] Berglund ED, Kang L, Lee-Young RS, et al. Glucagon and lipid interactions in the regulation of hepatic AMPK signaling and expression of PPARalpha and FGF21 transcripts in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299: 607 - 614.

(修回日期: 2010-11-25)

(本文编辑: 易 浩)