

非酒精性脂肪性肝病在动脉粥样硬化发生发展中的作用

李素红^{1,3}, 韩德五², 周鑫², 许瑞龄², 赵元昌²

(山西医科大学 1. 基础医学院病理生理教研室; 2. 肝病研究所, 山西省太原市 030001 3. 山西省肿瘤医院病理科 山西省太原市 030013)

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病; 动脉粥样硬化; 内毒素; 免疫组织化学; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 探讨非酒精性脂肪性肝病在动脉粥样硬化发生发展中的作用。**方法** 64 只 SD 大鼠随机分为正常对照组及高糖高脂组, 每组再分 3、6、9 个月和 12 个月 4 个时段进行观察, 每时段 8 只。对照组喂饲基础饲料, 高糖高脂组喂饲高糖高脂饲料。放射免疫法及酶联免疫吸附实验测定外周血中丙氨酸氨基转移酶、游离脂肪酸、甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、血糖、空腹胰岛素及内毒素、肿瘤坏死因子、C 反应蛋白、单核细胞趋化蛋白 1、一氧化氮、内皮素 1 的水平; 摘取主动脉及肝脏组织观察病理形态学变化; CD68 免疫组织化学染色单核巨噬细胞观察其在动脉壁的浸润情况; 苏丹 IV 特殊染色观察脂质在动脉壁的异位沉积情况; Tunnel 免疫组织化学染色观察内皮细胞及平滑肌细胞的凋亡情况。**结果** 高糖高脂组大鼠甘油三酯、外周血总胆固醇、低密度脂蛋白、丙氨酸氨基转移酶及空腹血糖、空腹胰岛素水平均升高, 且内毒素、C 反应蛋白、肿瘤坏死因子 α 、单核细胞趋化蛋白 1、内皮素 1 水平也明显升高, 而高密度脂蛋白和一氧化氮水平明显降低; 高糖高脂组大鼠 3 个月时即发生了脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎, 此时动脉内皮表面出现单核细胞黏附, 且内皮细胞出现散在凋亡现象; 6 个月时肝脏出现纤维化, 动脉内皮下脂质明显沉积, 单核细胞在斑块内浸润, 粥样斑块形成; 同时动脉内皮及平滑肌细胞的凋亡明显加重; 9 个月时肝脏纤维化进一步加重, 动脉壁粥样斑块内大量单核细胞浸润, 部分斑块出现钙盐沉积, 大部分内皮及平滑肌细胞发生凋亡; 12 个月时肝脏发展为早期肝硬化, 动脉壁粥样斑块大片钙盐沉积, 内皮及平滑肌细胞发生广泛且弥漫凋亡。**结论** 高糖高脂膳食可诱发非酒精性脂肪性肝病, 并伴有肠源性内毒素血症及脂代谢紊乱和慢性炎症的发生。肠源性内毒素血症直接或间接引起内皮细胞受损及功能紊乱, 启动动脉粥样硬化的发生, 并随着脂质异位沉积及单核细胞浸润, 加剧动脉粥样硬化的发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Role of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the Mechanism of Atherosclerosis

LI Su-Hong^{1,3}, HAN De-Wu², ZHOU Xin², XU Rui-Ling², and ZHAO Yuan-Chang²

(1. Department of Pathophysiology, Basic Medical Science, 2. Institute of Hepatology, Shanxi Medical University; Taiyuan, Shanxi 030001, China; 3. Department of Pathology; Shanxi Provincial Tumor Hospital; Taiyuan, Shanxi 030013, China)

[KEY WORDS] Nonalcoholic Fatty Liver Disease; Atherosclerosis; Endotoxin; Immunohistochemistry; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between pathogenesis of atherosclerosis and nonalcoholic fatty liver disease (NFLD). **Methods** 64 SD rats were randomly divided into two groups: normal control group with normal basic diet and high-sucrose and high-fat diet group with high sucrose and high fat diet. Each group was divided into four phases: 3 months, 6 months, 9 months and 12 months. Each phase had eight rats. Alanine aminotransferase, free fatty acid (FFA), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), fasting plasm glucose (FPG), fasting insulin (FIN), and endotoxin (LPS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), C-reaction factor (CRP), macrophagocyte chemotaxis protein-1 (MCP-1), nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1) were measured by ELISA; All the rats were killed and their livers and arterial specimens were taken to carry on HE stain for observing their

[收稿日期] 2011-05-30

[作者简介] 李素红, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事肝病及心血管疾病的研究, E-mail 为 lsh34-67@163.com。通讯作者 韩德五, 教授, 博士研究生导师, 主要从事肝病及肠源性内毒素血症的研究, E-mail 为 lsh34-67@163.com。周鑫, 博士研究生, 讲师, 主要从事肝病与糖尿病的研究, E-mail 为 xinxin@163.com。

histopathologic and morphologic change. Tunnel was used to detect the endothelial cell and smooth muscle cells apoptosis by immunohistochemistry. The expression of CD68 protein were detected by immunohistochemistry for observing mononuclear cells expression in aortic wall. Sudan IV stain was used to show whether ectopic lipid have accumulated in aortic wall.

Results The level of TG, Ach, FFA, LDL, ALT, FIN, LPS, CRP, TNF- α , MCP-1, ET-1 in HSHF group was significantly increased and the level of HDL and NO was decreased ($P < 0.050$). Three-month-old rats had nonalcoholic fatty liver disease and fatty liver, at the same time several mononuclear cells adhered to the endothelial cells some of which appeared apoptosis. Fibrosis occurred at six-months-old rats and there was lipids under the endothelial cells, meanwhile, the apoptosis exacerbated obviously. The fibrosis became gradually serious in liver in 12-month-old group. It can be observed that calcium deposited in a lot of mononuclear cells in atherosclerotic plaque. Apoptosis existed in endothelial cells and smooth muscle cells.

Conclusions High-fat high-sucrose diet induces non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), accompanied by Intestinal Endotoxemia (IETM), disturbance of lipids metabolism and chronic inflammation.

IETM further results in continuous endothelial dysfunction, ectopic deposition of lipids and local infiltration of mononuclear macrophages. This finally leads to As.

关于动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发病机制,内皮损伤反应学说和炎症学说认为 As 是以高度特异性的细胞分子反应为特征的炎症进程,内皮细胞受损及其后的血管炎性病变是 As 发病的中心环节,此观点普遍被接受。非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是 As 的独立危险因素,并与代谢综合征(metabolism syndrome, MS)关系密切,其共同的基本发病机制是胰岛素抵抗^[1],研究表明,非酒精性脂肪性肝病对心血管疾病的作用可能独立于代谢综合征和肥胖,其表现的高促炎症状态及高促血栓形成状态,直接促进 As 的发病,已成为当前 As 的主要发病原因。高糖高脂膳食导致的非酒精性脂肪性肝病常伴有肠源性内毒素血症,增高的 LPS 对 As 的发生及发展作用如何? As 是否可由高糖高脂膳食诱发? 本文设计了长达 1 年的 As 大鼠模型,探讨非酒精性脂肪性肝病与 As 之间发生的关系,特别是肠源性内毒素血症对 As 的作用,为防治 As 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

丙氨酸氨基转移酶(ALT,南京建成生物工程研究所)、游离脂肪酸(FFA)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)、内毒素(LPS)显色机制试剂盒(厦门莹试剂实验厂有限公司)、TNF- α 放射免疫试剂盒(北京普尔伟业生物科技有限公司)、C 反应蛋白(CRP)ELISA 试剂盒和单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)试剂盒(B&D 公司)、血糖(中生北控生物科技股份有限公司)、一氧化氮(NO)(南京建成生物工程研究所)、内皮素 1

(ET-1, B&D 公司)以及兔抗 Tunnel 多克隆抗体、兔抗 CD68 多克隆抗体及 SABC 免疫组化试剂盒购自北京中衫生物科技有限公司。721 分光光度计(上海第三分析仪器厂);SN-684 型放免 γ 计数器(上海核所日环光电仪器有限公司)。日产 MDF-C2156VAN 超低温冰箱、莱卡 CM1900 推拉式切片机、电热恒温水箱 600 型(天津),樱花牌 Tissue-Tek[®]全自动脱水机、樱花牌 DM230 冰冻切片机、樱花牌 Tissue-Tek SM c1-049-s0 包埋机、OLYMPUS CX41 光学显微镜。

1.2 动物分组与处理

Sprague-Dawley 大鼠 64 只,雌雄各半,体重 200~250 g,购自山西医科大学动物实验中心,12 h 光照周期,室温 19~23 $^{\circ}$ C,自由饮水。适应性饲养 1 周后,随机分为对照组与高糖高脂组,每组再分为 4 个时段:3 个月、6 个月、9 个月和 12 个月,每时段 8 只,对照组喂饲基础饲料,高糖高脂组喂饲高糖高脂饲料(70% 基础饲料 + 20% 猪油 + 10% 蔗糖 + 1% 胆固醇 + 0.25% 胆酸),两组总热量分别为 13.89 kJ/g 和 68.40 kJ/g;均在天黑前投食,雌雄分笼,剪耳编号,每月测体重一次。

1.3 样品采集

分别于实验第 3 个月末、6 个月末、9 个月末和 12 个月末处死相应阶段的两组大鼠,宰杀前一天禁食禁饮,腹腔麻醉,测体重,无菌条件下腹主动脉采血,3 500 r/min 离心待测。

1.4 生化指标检测

测定血浆 ALT、FFA、TG、TC、HDL、LDL、LPS、TNF- α 、CRP、MCP-1、ET-1 和 NO 水平。

1.5 病理形态学观察

取肝左叶和主动脉根部至髂总动脉全长,10% 中性福尔马林液(现用现配)固定 24 h。全自动脱

水机梯度脱水,石蜡包埋,4 μm 连续切片,苏木素伊红(HE)染色。OLYMPUS CX41 光学显微镜进行形态学观察。

1.6 免疫组织化学检测

CD68: 4 μm 石蜡切片常规脱蜡至水,EDTA 液中于高压锅沸水浴 2 min,3% H_2O_2 封闭 10 min,滴加新鲜配制的 I 抗,4 $^\circ\text{C}$ 过夜。次日滴加 II 抗,室温 20 min DAB 显色至满意,苏木素复染至封片。显微镜下观察到细胞浆出现棕黄色颗粒为阳性。正常动脉壁无或偶见 CD68 阳性细胞,高糖高脂组内皮下 CD68 阳性的单核细胞增多,计数 10 个高倍视野中的阳性细胞数,取其平均值。Tunnel: 4 μm 石蜡切片常规脱蜡至水,0.1 mol/L、pH 6 的枸橼酸缓冲液修复,高压锅沸水浴 2 min,滴加新鲜配制的 Tunnel 反应液(vial2 45 μL ; vial1 5 μL),4 $^\circ\text{C}$ 过夜;次日加 vial 3 转换液,37 $^\circ\text{C}$ 烤箱 30 min,DAB 显色至满意,苏木素复染至封片。显微镜下观察到细胞核呈棕黄色染色为阳性,随机取 10 个高倍视野,计数每个高倍视野中阳性细胞的百分比,运用 IPP6.0 软件分析结果,以 [Tunnel + 细胞数/总内皮细胞数] $\times 100$ 表示。

表 1. 大鼠血清及肝生化指标的检测

Table 1. Measure of biochemistry indexes in serum of rats

分 组	时 间	ALT (U/L)	TC (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	TG (mmol/L)	FFA (mmol/L)
对照组	3 个月	26.25 \pm 5.00	1.82 \pm 0.18	1.73 \pm 0.45	0.58 \pm 0.18	0.91 \pm 0.21	405.44 \pm 40.30
	6 个月	25.30 \pm 4.16	1.76 \pm 0.19	1.81 \pm 1.51	0.62 \pm 0.17	0.90 \pm 0.21	411.90 \pm 35.30
	9 个月	28.48 \pm 5.56	1.76 \pm 0.14	1.68 \pm 0.40	0.61 \pm 0.14	0.89 \pm 0.32	410.23 \pm 44.24
	12 个月	31.01 \pm 6.21	1.78 \pm 0.12	1.78 \pm 0.37	0.62 \pm 0.11	0.89 \pm 0.18	393.56 \pm 19.83
高糖高脂组	3 个月	256.79 \pm 57.02 ^a	4.03 \pm 0.93 ^a	0.58 \pm 0.14 ^a	3.17 \pm 0.99 ^a	1.39 \pm 0.29 ^a	886.97 \pm 174.42 ^a
	6 个月	296.56 \pm 64.42 ^a	3.54 \pm 1.35 ^a	0.50 \pm 0.11 ^a	2.93 \pm 0.92 ^a	1.43 \pm 0.19 ^a	1241.33 \pm 337.35 ^{ab}
	9 个月	308.78 \pm 31.04 ^a	3.44 \pm 1.47 ^a	0.48 \pm 0.18 ^a	3.44 \pm 0.13 ^a	1.34 \pm 0.33 ^a	1330.57 \pm 413.51 ^{ab}
	12 个月	306.34 \pm 26.58 ^a	3.77 \pm 1.12 ^a	0.43 \pm 0.12 ^a	3.45 \pm 0.10 ^a	1.30 \pm 0.16 ^a	1432.81 \pm 398.29 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与本组 3 个月比较。

2.2 脂多糖及代谢综合症相关的炎症介质变化

高糖高脂组大鼠血清在 3 个月时 LPS、CRP、TNF- α 、MCP-1、ET-1 中的含量明显高于对照组大鼠,NO 的水平明显低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 2)。

通过 Spearman 法分析发现, LPS 与 IR 呈明显正相关 [(3 个月: $r = 0.782, P < 0.05$); (6 个月: $r = 0.953, P < 0.05$); (9 个月: $r = 0.848, P < 0.05$); (12 个月: $r = 0.867, P < 0.05$)]。

1.7 苏丹 IV 特殊染色

取主动脉至髂动脉全长, -70 $^\circ\text{C}$ 超低温冰箱冻存, 5 ~ 10 μm 冰冻切片, 苏木素染色、70% 酒精漂洗, 苏丹 IV 染液 (70% 酒精 50 mL + 丙酮 50 mL + 苏丹 IV 1 g) 中于 56 $^\circ\text{C}$ 温箱 30 min, 70% 酒精分化, 甘油明胶封固。显微镜下观察到细胞内或细胞间出现橘红色圆形小滴为苏丹 IV 染色阳性。

1.8 统计学分析

用 SPSS13.0 统计软件, 数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正常组与高糖高脂组之间的比较用两独立样本 T 检验, 高糖高脂组间比较用单因素方差分析和组间比较以及秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 一般情况

对照组大鼠饮食水、精神状态及日常活动均正常; 高糖高脂组给予高糖高脂饮食后, 体重明显增加, 并出现腹型肥胖及脂肪再分布; 3 个月体重明显高于对照组, 至 9 个月达到高峰, 12 个月体重增加不明显。血脂及肝生化指标的检测结果见表 1。

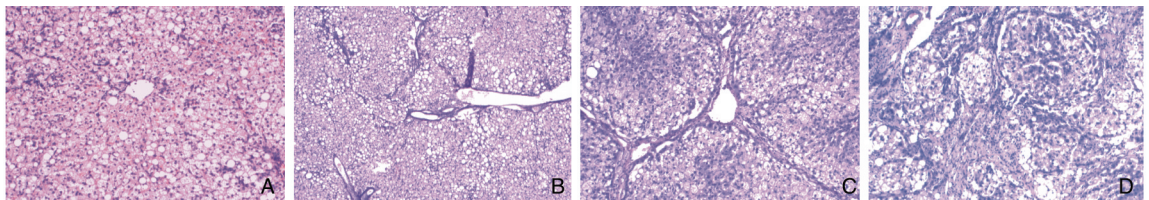
2.3 病理形态改变

2.3.1 肝脏 对照组肝组织结构正常; 高糖高脂组 3 个月时肝细胞脂变以中、小泡脂滴为主, 肝小叶和汇管区内散在少量炎细胞浸润; 6 个月时肝细胞脂变以中、大泡性脂滴为主, 出现明显气球样变, 肝小叶内和汇管区大量炎细胞浸润及点状坏死, 纤维组织增生; 9 个月时肝细胞大泡性脂变及坏死、炎细胞浸润、纤维组织增生均明显加重, 假小叶形成; 12 个月脂变、坏死、炎细胞浸润进一步加重, 出现明显的假小叶 (图 1)。

表 2. 大鼠血清中 LPS、TNF- α 、CRP、MCP-1、ET-1、NO 的表达水平Table 2. Level of LPS, TNF- α , CRP, MCP-1, ET-1, NO in serum of rats

分 组	时 间	LPS (EU $\times 10^{-3}$ /L)	TNF- α (μ g/L)	CRP (μ g/L)	MCP-1 (ng/L)	ET-1 (ng/L)	NO (μ mol/L)
对照组	3 个月	0.07 \pm 0.02	1.06 \pm 0.20	1.46 \pm 0.65	4.80 \pm 0.41	87.99 \pm 3.66	38.15 \pm 4.08
	6 个月	0.068 \pm 0.19	1.02 \pm 0.11	1.46 \pm 0.65	4.79 \pm 0.35	89.95 \pm 3.32	35.83 \pm 2.74
	9 个月	0.07 \pm 0.01	1.01 \pm 0.14	1.32 \pm 0.51	4.79 \pm 0.35	91.59 \pm 3.73	43.48 \pm 4.46
	12 个月	0.07 \pm 0.01	0.92 \pm 0.19	1.29 \pm 0.52	5.12 \pm 0.54	89.30 \pm 2.45	36.13 \pm 3.70
高糖高脂组	3 个月	0.61 \pm 0.07 ^a	2.01 \pm 0.22 ^a	3.09 \pm 0.76 ^a	25.22 \pm 0.47 ^a	137.59 \pm 5.04 ^a	18.53 \pm 3.86 ^a
	6 个月	0.71 \pm 0.26 ^a	1.82 \pm 0.20 ^a	3.29 \pm 1.03 ^a	25.67 \pm 0.96 ^a	146.17 \pm 7.21 ^{ab}	16.02 \pm 2.75 ^{ad}
	9 个月	0.65 \pm 0.09 ^a	1.81 \pm 0.36 ^a	2.76 \pm 0.69 ^a	23.48 \pm 1.41 ^a	169.61 \pm 7.08 ^{abc}	12.25 \pm 3.46 ^{ab}
	12 个月	0.64 \pm 0.08 ^a	1.81 \pm 0.26 ^a	2.76 \pm 0.11 ^a	23.60 \pm 2.75 ^a	163.63 \pm 8.15 ^{abc}	10.56 \pm 3.14 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与本组 3 个月比较; c 为 $P < 0.05$, 与本组 6 个月比较; d 为 $P < 0.05$, 与本组 9 个月比较。

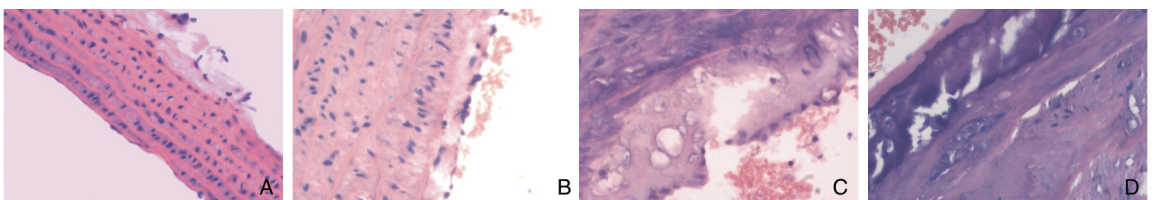
图 1. 高糖高脂组大鼠肝脏病理组织学表现 (HE 染色, $\times 400$)

A 为 3 个月, B 为 6 个月, C 为 9 个月, D 为 12 个月。

Figure 1. Pathological histology of liver in HSHF rats (with HE stain, $\times 400$)

2.3.2 动脉 对照组大鼠动脉内膜完整, 中膜平滑肌细胞排列规则, 弹力膜规则、清晰。3 个月时内皮细胞尚完整, 个别细胞增生、肿胀, 肌层弹力纤维及平滑肌细胞排列整齐; 6 个月时内皮细胞明显增生肥大, 肌层弹力纤维紊乱, 平滑肌细胞明显增生及排列紊乱, 内膜下可见条带状脂质沉积; 9 个月时内

皮细胞增生肥大并伴脱落、消失, 肌层平滑肌细胞增生更加明显并伴弹力纤维明显紊乱甚至断裂, 部分动脉细胞萎缩变薄, 可见多处小灶性钙盐沉积; 12 个月时内皮细胞大部分脱落消失, 肌层弹力纤维极度紊乱, 平滑肌细胞凋亡明显, 细胞萎缩、消失, 肌层更加变薄, 见大片钙盐沉积 (图 2)。

图 2. 高糖高脂组大鼠动脉病变 (HE $\times 400$)

A 为 3 个月, 动脉无明显病变; B 为 6 个月, 内皮细胞下脂质沉积; C 为 9 个月, 动脉壁典型的粥样斑块形成; D 为 12 个月, 动脉粥样斑块内钙盐沉积。

Figure 2. Comparison of lesion in aortas of HSHF rats (HE $\times 400$)

2.4 动脉单核细胞浸润情况的观察

对照组动脉壁无 CD68 阳性的单核细胞浸润。高糖高脂组 3 月时可见内皮表面散在 CD68 阳性的单核细胞黏附; 6 个月时少许单核细胞浸润至内皮下; 9 个月时内皮下脂质斑块中较多单核细胞浸润,

12 个月时粥样斑块中团片状单核细胞浸润; 高糖高脂组各时段 CD68 阳性表达与同时段对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且高糖高脂组各时段间比较除 9 个月与 12 个月间无统计学差异外, 其余均有统计学差异 ($P < 0.05$; 图 3)。

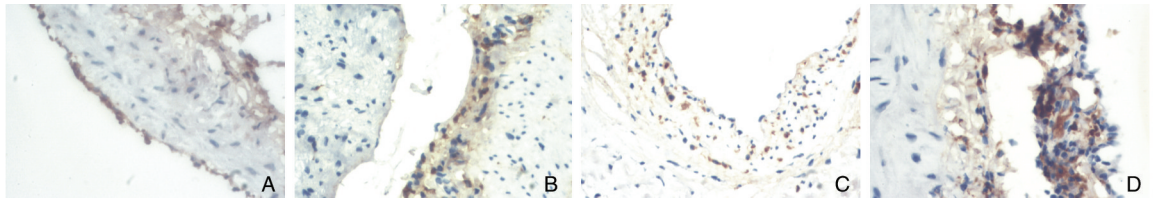


图 3. 高糖高脂组大鼠动脉壁 CD68 阳性的单核细胞的浸润观察 (SP × 400) A 为 3 个月时段内皮表面黏附散在 CD68 阳性的单核细胞; B 为 6 个月时段内皮下少许 CD68 阳性的单核细胞; C、D 为 9 个月时段和 12 个月时段内皮下较多 CD68 阳性的单核细胞浸润。

Figure 3. Expression of CD68 in aortas mononuclear cell in HSHF rats

2.5 动脉内皮细胞及平滑肌细胞的凋亡情况观察

高糖高脂组内皮及平滑肌细胞 Tunnel 的表达 3 个月时只有个别细胞阳性; 6 个月时散在细胞阳性; 9 个月时绝大部分细胞阳性; 12 个月时几乎全部细

胞阳性(图 4)。各时段间比较, 内皮和平滑肌细胞的阳性表达除 9 个月与 12 个月间外, 其余差异均有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 3)。

表 3. 大鼠动脉内皮细胞和平滑肌细胞 Tunnel 的表达

Table 3. Expression of Tunnel in endothelial cells and smooth muscle cells of rats' aortas

时 间	对照组		高糖高脂组	
	内皮细胞	平滑肌细胞	内皮细胞	平滑肌细胞
3 个月	0.63 ± 0.74	4.75 ± 1.16 ^a	0.25 ± 0.46	3.88 ± 1.36 ^a
6 个月	1.25 ± 1.04	59.25.63 ± 6.16 ^{ab}	1.00 ± 0.76	26.63 ± 7.44 ^{ab}
9 个月	1.50 ± 0.93	70.13 ± 7.62 ^{abc}	1.50 ± 0.53	69.25 ± 5.57 ^{abc}
12 个月	2.25 ± 1.39	86.50 ± 6.72 ^{abcd}	3.38 ± 1.51	67.88 ± 12.86 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与本组 3 个月比较; c 为 $P < 0.05$, 与本组 6 个月比较; d 为 $P < 0.05$, 与本组 9 个月比较。

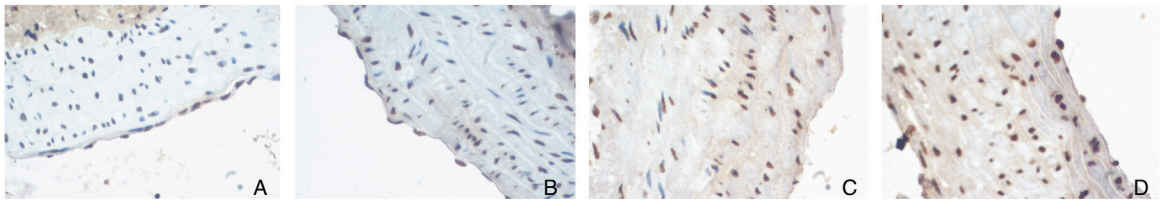


图 4. 高糖高脂组大鼠动脉壁 Tunnel 的阳性表达 (SP × 400) A 为 3 个月, 动脉内皮及平滑肌细胞个别阳性; B 为 6 个月, 动脉内皮及平滑肌细胞散在阳性; C 为 9 个月, 动脉内皮和平滑肌细胞绝大部分阳性; D 为 12 个月, 动脉内皮和平滑肌细胞几乎全部阳性。

Figure 4. Expression of tunnel in aortas of HSHF rats

2.6 动脉脂质沉积的观察

高糖高脂组 3 个月时内皮细胞表面及其内可见小灶状、点状苏丹 IV 阳性的脂质沉积; 6 个月时内

皮下脂质沉积呈细带状; 9 个月内皮下脂质呈团块状沉积, 典型粥样斑块形成; 12 个月斑块内大量脂质沉积(图 5)。

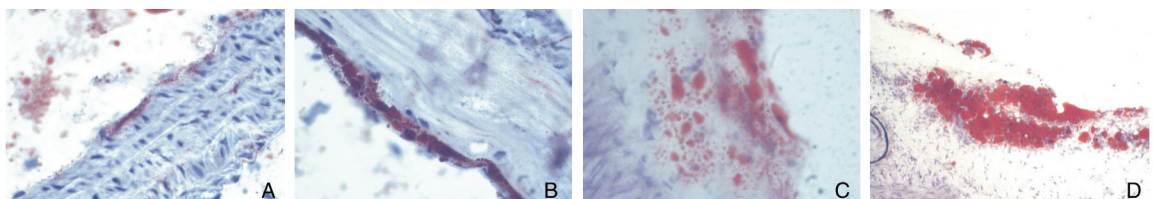


图 5. 高糖高脂组大鼠动脉壁脂质沉积的比较 (Sudan IV 染色 × 400) A 为 3 个月, 动脉内皮下苏丹 IV 阳性脂质呈点状; B 为 6 个月, 动脉内皮下苏丹 IV 阳性脂质呈细带状; C、D 为 9 个月, 和 12 个月, 动脉内皮下及肌层苏丹 IV 阳性脂质呈斑块状。

Figure 5. Comparison of lipid in aortas of HSHF rats (with Sudan IV stain × 400)

3 讨论

As 的发生是一个伴随脂代谢紊乱的慢性炎症过程,与非酒精性脂肪性肝病关系密切。高糖高脂膳食时,非酒精性脂肪性肝病常伴随肠源性内毒素血症的发生,增高的 LPS 激活单核-巨噬细胞系统及 NF- κ B 信号传导系统,引起许多炎症因子、血管活性物质、细胞黏附因子的异常表达甚至导致脂肪异地蓄积,最终促进 As 的发生发展。非酒精性脂肪性肝病的疾病谱包括从单纯的脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎,最终通过肝纤维化发展为肝硬化,甚至演变为肝细胞癌^[2],体外采用小剂量皮下注射 LPS 可直接诱发大鼠发生非酒精性脂肪性肝病^[3],且其与代谢综合征关系密切。有人认为非酒精性脂肪性肝病和 As 分别是代谢综合征的肝内和肝外表现^[4],共同的发病机制是胰岛素抵抗。

已知 LPS 通过跨膜信号转导,激活 NF- κ B 信号途径导致炎症介质 TNF- α 等的大量释放,损伤内皮细胞正常功能启动 As 的发生。其中,增加的 TNF- α 可使具有强大舒血管作用的 NO 产生下降,而具有缩血管作用的 ET-1 与 NO 的比例失衡,诱导血管痉挛和内皮细胞凋亡而促使 As 发生。已有实验证明通过药物降低 TNF- α 的水平可减少动脉内膜脂质形成,进而达到抗 As 的作用^[5]。肠源性内毒素血症时显著增高的 CRP 水平可上调 ET-1 的表达,下调 eNOS 及 NO 的表达,促进血栓形成;CRP 也可激活 NF- κ B 信号转导通路,诱导激活 CD14⁺ 的单核细胞表达 TLR4 而促进 TNF- α 、MCP-1 的表达,刺激内皮细胞表达黏附分子,促进炎症状态并使单核细胞趋化、黏附、浸润作用增强及摄取 LDL 而转化为泡沫细胞^[6],在 As 的发生发展中起作用。实验发现 LPS、CRP 在 3 个月时即已高水平表达,同时 MCP-1、TNF- α 、ET-1 均表达增高,NO 表达下降,并持续 As 的整个发生发展过程,证实了它们在 As 形成过程中起重要的作用。近年分子生物学研究证实,胆固醇、低密度脂蛋白及炎症因子可致内皮细胞对 NO 的灭活加快,或者内皮细胞受到氧化应激的作用,导致 NO 的分泌受抑^[7],均是使 NO 表达降低的原因,实验还发现,ET-1 增高和 NO 降低的程度在 9 个月组最严重,而 9 个月组是典型的粥样斑块大量形成时期,提示脂代谢紊乱和炎症对 As 的形成起促进作用。已有研究发现血浆 NO 的降低水平与 As 血管损害程度呈负相关,而 ET-1 的升高水平则成正相关^[8,9],加剧动脉钙化和硬化^[10],与预后有关。现认为 MCP-1 启动和参与肥胖机体的低度慢性炎症

状态,还可诱导脂质异地沉积。体外实验证实低密度脂蛋白可刺激血管内皮细胞、巨噬细胞等表达 MCP-1,所以,As 时低密度脂蛋白的升高,通过诱导 MCP-1 的表达可促进 As 发生。MCP-1 还可促进异地脂质沉积,Kim 等^[11]发现非酒精性脂肪性肝病时血清中的 MCP-1 的高表达与肝细胞脂肪变性的病变程度呈正相关,所以,MCP-1 与脂质异地沉积均直接或间接参与 As 的发生、发展。实验中发现高糖高脂组 3 个月 LPS、MCP-1 增高,且单核细胞在内皮表面黏附,脂质也在内皮细胞处小点、灶状沉积,推测 LPS 通过 MCP-1 在 As 的形成中起作用。

LPS 通过 NF- κ B 等信号通路上调 TNF- α 的表达使内皮细胞发生凋亡,内皮凋亡可促 As 发生。实验发现 3 个月时 LPS、TNF- α 表达增高,同时内皮细胞发生凋亡,且凋亡持续存在并逐渐加重,与粥样斑块的形成趋势相平行,提示细胞凋亡在 As 形成和进展中起重要作用。而且,3 个月是非酒精性脂肪性肝病的肝细胞发生中、小泡性脂变的时期,说明 As 在脂肪肝时期便已发生,因此我们认为即使是在脂肪肝阶段,仍然是发生 As 的高危因素,与文献报道观点相符^[12]。总之,现认为,NF- κ B 信号转导通路是 LPS 介导的信号转导通路中最重要的下游通路,参与并促进 As 的进展^[14]。故针对此观点,已有研究发现通过药物抑制 NF- κ B 活性可抑制 As 的形成,为临床治疗 As 提供新的理论依据^[13]。

As 的发生也与糖毒性和脂毒性关系密切。高糖高脂膳食可诱发高血糖和肥胖,体内高血糖状态时,血糖通过活性氧簇(ROS)敏感信号转导通路上调血管内皮细胞 MCP-1mRNA 的表达,诱导单核细胞向内皮细胞聚集,从而导致血管内皮系统功能的损害引起 As。高血糖损伤内皮细胞,TNF- α 、ET-1 产生增加,NO 释放减少,血小板和白细胞与内皮细胞的黏附增加,导致高凝状态,促进粥样斑块形成。肥大的脂肪细胞还可使 TNF- α 等炎症因子过量表达,进一步加重炎症反应。脂质还可诱导血管内钙磷沉积,导致血管硬化加速 As 的发展^[14]。本实验证实高糖高脂组大鼠体重明显增加,内脏脂肪含量增加,脂肪细胞明显增大,脂肪酸、甘油三酯等水平显著升高,肝脏、血管脂质沉积,早期即有肝细胞脂变,以中、小脂滴为主,动脉内膜有脂质开始沉积,直至后期肝细胞大部分转变为大泡性脂变时,同时典型的粥样斑块形成。我们认为,由于高糖高脂膳食造成大鼠肥胖,脂肪细胞肥大,储脂能力降低,脂质外流至肝脏成为肝 TG 含量增高的主要原因。当肝脏脂质沉积饱和时脂质发生转移、沉积至血管,影响

血管的功能,诱导 As 的发生。

有学者倾向于非酒精性脂肪性肝病是独立于代谢综合症的 As 发生的独立危险因素。Chio 等^[15]研究发现 NAFLD 患者的颈动脉斑块形成率显著高于对照组,并且在剔除代谢综合症等其它危险因素后这种关联仍然存在;Targher 等^[16]也赞成此观点。我们倾向于认为,不论有无代谢综合症的存在,非酒精性脂肪性肝病时伴随的肠源性内毒素血症对 As 的形成起着重要的作用,其中起关键作用的可能是 LPS。

非酒精性脂肪性肝病伴随肠源性内毒素血症, LPS 通过直接或间接方式损伤内皮细胞,引起内皮细胞形态及功能的改变,是 As 发生的初始环节^[17,18],NF- κ B 是 LPS 介导的信号转导通路中最重要的下游通路,LPS 激活内皮细胞的 NF- κ B 信号转导通路被认为是 As 发生的起始时间^[19],而糖毒性和脂毒性在 As 的发展中具有重要作用。

[参考文献]

- [1] Mlinar B, Mare J, Janez A, et al. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases[J]. Clin Chim Acta, 2007, 375(1-2): 20-35.
- [2] Sligte K, Bourass I, Sels JP, et al. Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem[J]. Eur J Intern Med, 2004, 15(1): 10-21.
- [3] 郭江红, 韩德五, 郭建红. 内毒素诱发大鼠非酒精性脂肪性肝炎和胰岛素抵抗[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(5): 1 009-011.
- [4] Marehesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver steatohepatitis and the metabolic syndrome[J]. Hepatology, 2003, 37(4): 917-923.
- [5] 徐军, 齐法莲, 陈英剑, 等. 脂欣康胶囊对 ApoE 基因敲除小鼠血清炎症细胞因子的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(15): 2 135-137.
- [6] Bisioendial RJ, Kastelein JJ, Levels JH, et al. Activation of inflammation and coagulation after infusion of C-reactive protein in humans[J]. Circ Res, 2005, 96(7): 714-716.
- [7] 易斌, 张浩, 黄志军. 晚期糖基化终产物和同型半胱氨酸对内皮细胞的协同损伤作用[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(11): 1 552-556.
- [8] Neunteufl T, Berger R, Pacher R. Endothelin receptor antagonists in cardiology clinical trials[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2002, 11(3): 431-443.
- [9] 潘志红, 李东霞, 张江蓉, 等. 不同程度动脉粥样硬化症患者血浆内皮素和一氧化氮水平的研究[J]. 中国综合临床, 2003, 19(7): 590-592.
- [10] Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis a comprehensive review of studies in mice[J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(3): 360-376.
- [11] Haukeland JW, Damas JK. Systemic inflammation in non-alcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2[J]. J Hepatol, 2006, 44(6): 167-174.
- [12] Fracanzani A L, Burdick L, Raselli S, et al. Carotid artery intima-media thickness in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Am J Med, 2008, 121(1): 72-78.
- [13] 杨晓云, 王琳, 周林. 依那普利抗动脉粥样硬化的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(4): 413-416.
- [14] 康海仙, 吴铁, 崔燎. 超生理剂量维生素 D3 导致小鼠动脉硬化及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(4): 294-296.
- [15] Choi SY, Kim D, Kang JH, et al. Nonalcoholic fatty liver disease as a risk factor of cardiovascular disease: relation of non-alcoholic fatty liver disease to carotid atherosclerosis[J]. Korean J Hepatol, 2008, 14(1): 77-88.
- [16] Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Diabetes Care, 2006, 29(6): 1 325-330.
- [17] Zhang WJ, Wei H, Tory Hagen, et al. α -Lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(10): 4 077-082.
- [18] 李伟, 李东娟, 杨艳. 乔松素对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(5): 351-354.
- [19] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappaB is present in the atherosclerotic lesion[J]. Clin Invest, 1996, 97(7): 1 715-722.

(此文编辑 李小玲)