



IGF-1、IGFBP-3 在大鼠非酒精性脂肪性肝病进展中的变化

高 凯¹, 王德军², 严茂祥¹, 陈芝芸¹

(1. 浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006; 2. 浙江中医药大学, 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)大鼠血清胰岛素样生长因子1(IGF-1)、胰岛素样生长因子结合蛋白3(IGFBP-3)的表达及多烯磷脂酰胆碱对其的影响。**方法** 采用高脂饲料喂养建立大鼠 NAFLD 模型,以多烯磷脂酰胆碱进行干预。HE 染色动态观察大鼠 4、8、12 周时肝组织病理学变化,IRMA 法动态监测血清 IGF-1、IGFBP-3 含量。**结果** 正常组大鼠各时间点肝组织病理均无明显异常;模型组随高脂饮食时间延长,在 4、8、12 周 3 个时相点肝组织脂肪变、炎症程度、气球样变及 NAFLD 活动度积分逐渐增强,血清 IGF-1、IGFBP-3 逐渐明显下降,且模型组各时相点 IGF-1、IGFBP-3 的水平较正常组同一时相点明显降低;应用多烯磷脂酰胆碱干预后,大鼠肝组织炎症程度、NAFLD 活动度积分较模型组显著降低,IGF-1、IGFBP-3 的水平则较模型组明显增高。**结论** 血清 IGF-1、IGFBP-3 水平随大鼠 NAFLD 进展而降低。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病; 胰岛素样生长因子 1; 胰岛素样生长因子结合蛋白 3; 多烯磷脂酰胆碱

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 03-0006-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 003. 002

The variation of IGF-1, IGFBP-3 in the development of rats' non-alcoholic fatty liver disease

GAO Kai¹, WANG De-jun², YAN Mao-xiang¹, CHEN Zhi-yun¹

(1. The first affiliated hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medicinal University, Hangzhou 310006, China;

2. Zhejiang Traditional Chinese Medicinal University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To observe the expression of insulin-like growth factor 1 (IGF-1), insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) in rats' serum with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the impact of Polyene phosphatidyl choline. **Methods** NAFLD model was induced by feeding the SD rats with a high-fat diet, with Polyene phosphatidyl choline to intervene. Observe the pathological changes of the rats' liver tissue dynamically after HE staining. Detect the contents of IGF-1, IGFBP-3 in serum dynamically through the immuno radio metric assay (IRMA). **Results** There were no obvious exception of the liver tissue pathology in the normal group at each time. With the extension of a high-fat diet, the liver tissue of the model group increased on fatty change, the degree of inflammation, the balloon sample change, the NAFLD activity score at 4, 8, 12 weeks. IGF-1, IGFBP-3 in serum were decreased significantly, and the model set was significantly lower than the normal group at the same phase. After the application of polyene phosphatidyl choline, the degree of rat liver tissue inflammation and the NAFLD activity score were reduced significantly when compared with model group,

【基金项目】 浙江省自然科学基金资助项目(Y2100170);浙江省中医药科技计划项目(2013ZB044)。

【作者简介】 高凯(1988-),男,硕士生,研究方向:消化系统疾病。

【通讯作者】 陈芝芸(1953-),女,医学硕士,研究员,教授,博士生导师,研究方向:脂肪性肝病、胃癌前病变及功能性胃肠病等方面。

while the level of IGF-1, IGFBP-3 were significantly higher. **Conclusion** The levels of IGF-1, IGFBP-3 in the rats' serum reduce in the development of non-alcoholic fatty liver disease.

【Key words】 NAFLD; IGF-1; IGFBP-3; Polyene phosphatidyl choline

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种常见慢性肝病, 脂质代谢紊乱尤其是肝内脂质代谢障碍是其发生发展的前提和必需, 胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 能够促进脂肪合成, 抑制脂肪分解, 降低血液中游离脂肪酸 (free fat acids, FFA) 的浓度, 主要由肝脏合成, 发挥作用依赖于游离 IGF 与其受体结合, 而约 99% IGF 都与胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor binding protein, IGFBP) 以结合形式存在^[1], 因此, IGF-1 及 IGFBP 在 NAFLD 中的作用值得关注。本实验旨在观察成年 NAFLD 大鼠血清中 IGF-1、IGFBP-3 的变化及多烯磷脂酰胆碱对其的影响, 探讨二者在 NAFLD 发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 70 只, 成年雄性, 清洁级, 体重 200 ± 10 g, 上海西普尔-必凯实验动物中心提供, 许可证号码:【SCXK(沪)2008-0016】。无菌手术操作在浙江中医药大学动物实验研究中心屏障动物实验设施内进行【SYXK(浙)2008-0184】。

1.2 主要试剂及药品

胆固醇由上海博奥生物科技有限公司提供, 批号: 100901; 胆盐由杭州微生物试剂有限公司提供, 批号: 20100421; 多烯磷脂酰胆碱为德国 A. Nattermann & Cie. GmeBH 产品, 规格: 228 mg/片, 批号: 46940B。IGF-1、IGFBP-3 免疫放射分析 (immuno radio metric assay, IRMA) 试剂盒均由美国 Diagnostic Systems Laboratories Inc 提供, 批号: 01197。

1.3 主要仪器

MICROM STR120 自动组织脱水机、MICROM HM335E 半自动石蜡切片机为德国 MICROM 公司产品, LEICARM 2025 病理切片机为德国 Leica 公司产品, Nikon50I 光学显微镜为日本 Nikon 公司产品, SN-697 γ 计数仪为上海核所日环光电仪器有限公司产品。

1.4 实验方法

70 只大鼠随机分为正常组 30 只, 模型组 30 只, 多烯磷脂酰胆碱组 10 只, 正常组及模型组又分为 4 周、8 周、12 周 3 个时相点; 正常组以普通标准饲料喂养, 模型组及多烯磷脂酰胆碱组均以高脂饲料 (由普通标准饲料 82%、猪油 10%、蛋黄粉 5%、胆固醇 2% 及胆盐 1% 组成) 喂养; 多烯磷脂酰胆碱组在造模的同时按照临床成人剂量的 10 倍 (195.40 mg/kg·d) 灌服多烯磷脂酰胆碱 12 周。末次给药当晚禁食不禁水, 次日上午空腹麻醉下取血, 分离血清, 用 IRMA 法检测血清 IGF-1、IGFBP-3 含量; 取肝组织, 以 4% 多聚甲醛固定后常规石蜡包埋, HE 染色, 肝组织的脂肪变、炎症程度、气球样变诊断以及 NAFLD 活动度积分 (NAFLD activity score, NAS) 参考中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学会等制订的“非酒精性脂肪性肝病诊疗指南 (2010 年修订版)”^[2]。

1.5 统计分析: 采用 SPSS 软件进行统计学分析

数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计量资料以单因素方差分析进行统计; 计数资料以非参数秩和检验进行统计, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠病理组织学变化

光镜观察发现, 正常组无明显异常。模型组肝组织脂肪变、炎症程度、气球样变以及 NAS 随高脂喂养时间的延长而增加, 模型 8 周时 NAS 较模型 4 周时增高 ($P < 0.01$); 模型 12 周时炎症程度、气球样变、NAS 较模型 4 周和 8 周时均显著增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 脂肪变程度较模型 4 周时显著增高 ($P < 0.01$)。干预组炎症程度、NAS 较模型组 12 周明显降低 ($P < 0.05$) (表 1, 2)。

2.2 各组大鼠血清 IGF-1、IGFBP-3 的变化

正常组、模型组血清 IGF-1、IGFBP-3 均随着大鼠周龄增加而降低。各时间点模型组均较相应正常组明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (表 3)。应用多烯磷脂酰胆碱干预后, 血清 IGF-1、IGFBP-3 较模型组 12 周显著升高 ($P < 0.05$) (表 4)。

表 1 NAFLD 大鼠肝脏病理组织学动态变化
Tab.1 Dynamical changes of NAFLD rats' liver pathological histology

肝组织病理变化 (Pathological changes of the liver tissue)	n	4 周(4 weeks)		8 周(8 weeks)		12 周(12 weeks)	
		正常组 (Normal group)	模型组 (Model group)	正常组 (Normal group)	模型组 (Model group)	正常组 (Normal group)	模型组 (Model group)
脂肪变 (Fatty change)	10	0.00 ± 0.00	2.20 ± 0.42 **	0.00 ± 0.00	2.27 ± 0.48 **	0.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00 ** ΔΔ
炎症程度 (The degree of inflammation)	10	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.70	0.00 ± 0.00	1.10 ± 0.82 **	0.00 ± 0.00	2.50 ± 0.71 ** ΔΔ##
气球样变 (The balloon sample change)	10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.52	0.00 ± 0.00	1.50 ± 0.53 ** ΔΔ##
NAS	10	0.00 ± 0.00	2.60 ± 1.07 **	0.00 ± 0.00	3.80 ± 1.40 ** Δ	0.00 ± 0.00	7.00 ± 1.05 ** ΔΔ##

注:与同一时相点正常组比 * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$;与模型 4 周组比 $^{\Delta}P < 0.05$ 、 $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与模型 8 周组比 $^{\#}P < 0.05$ 、 $^{\#\#}P < 0.01$ 。
Note:Compared with the normal group of the same phase point, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;compared with the model group of 4 weeks, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;compared with the model group of 4 weeks, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

表 2 多烯磷脂酰胆碱对 NAFLD 大鼠肝脏病理组织学影响
Tab.2 Impact of polyene phosphatidyl choline to NAFLD rats' liver pathological histology

分组(Groups)	n	脂肪变 (Fatty change)	炎症程度 (The degree of inflammation)	气球样变 (The balloon sample change)	NAS
正常 12 周组 (Normal group of 12 weeks)	10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型 12 周组 (Model group of 12 weeks)	10	3.00 ± 0.00 **	2.50 ± 0.71 **	1.50 ± 0.53 **	7.00 ± 1.05 **
干预组 (Treatment group)	10	2.80 ± 0.42 **	1.80 ± 0.63 ** Δ	1.00 ± 0.67 **	5.60 ± 1.50 ** Δ

注:与正常 12 周组比 * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$;与模型 12 周组比 $^{\Delta}P < 0.05$ 、 $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。
Note:Compared with the normal group of 12 weeks, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;compared with the model group of 12 weeks, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$.

表 3 NAFLD 大鼠血清 IGF-1、IGFBP-3 水平的动态变化(ng/mL)
Tab.3 Dynamic changes of the levels of IGF-1, IGFBP-3 in NAFLD rats' serum(ng/mL)

	n	4 周(4 weeks)		8 周(8 weeks)		12 周(12 weeks)	
		正常组 (Normal group)	模型组 (Model group)	正常组 (Normal group)	模型组 (Model group)	正常组 (Normal group)	模型组 (Model group)
IGF-1	10	5.81 ± 1.31	4.42 ± 1.41 *	4.56 ± 1.61	3.28 ± 0.91 *	4.17 ± 0.89 $^{\Delta}$	2.96 ± 0.40 ** #
IGFBP-3	10	5.68 ± 2.10	3.97 ± 0.98 *	3.40 ± 0.80 $^{\Delta}$	2.74 ± 0.47 * $^{\Delta\Delta}$	2.69 ± 0.79 $^{\Delta\Delta}$	1.91 ± 0.54 ** $^{\Delta\Delta}$ #

注:与同一时相点正常组比 * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$;与正常 4 周组比;与模型 4 周组比 $^{\Delta}P < 0.05$ 、 $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与模型 8 周组比 $^{\#}P < 0.05$ 。
Note:Compared with the normal group of the same phase point, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;compared with the normal group of 4 weeks, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$;compared with the model group of 8 weeks, $^{\#}P < 0.05$.

表 4 多烯磷脂酰胆碱对 NAFLD 大鼠血清
IGF-1、IGFBP-3 水平的影响(ng/mL)

Tab.4 Impact of polyene phosphatidyl choline to the levels
of IGF-1, IGFBP-3 in NAFLD rats' serum(ng/mL)

分组(Groups)	n	IGF-1	IGFBP-3
正常 12 周组 (Normal group of 12 weeks)	10	4.17 ± 0.89	2.69 ± 0.79
模型 12 周组 (Model group of 12 weeks)	10	2.95 ± 0.40 **	1.91 ± 0.54 **
干预组 (Treatment group)	10	3.68 ± 0.90 $^{\Delta}$	2.56 ± 0.47 $^{\Delta}$

注:与正常 12 周组比 ** $P < 0.01$;与模型 12 周组比 $^{\Delta}P < 0.05$ 。
Note:Compared with the normal group of 12 weeks, ** $P < 0.01$;
compared with the model group of 12 weeks, $^{\Delta}P < 0.05$.

3 讨论

肝脏参与脂肪代谢并在其中起重要作用,其合成的脂肪会运输到其他组织分解利用或者储存到脂肪组织,正常情况下肝脏内不会形成脂质沉积。NAFLD 形成的一个重要先决条件是肝细胞内脂质沉积特别是甘油三酯沉积,其发生原因目前尚未完全明确,可能包括脂质摄入异常导致肝脏 FFA 输入增加、线粒体代谢障碍导致 FFA 更多转化为甘油三酯、FFA 及甘油三酯合成增加和肝细胞内甘油三酯运出减少,这些因素单独或协同造成肝脏脂质代谢的消化吸收、转化合成、氧化分解和运输分泌的失衡^[3],最终导致肝细胞内的脂质异常沉积特别是甘

油三酯的异常沉积,进而发生 NAFLD,这个过程会导致脂肪性肝病发生炎症、坏死和纤维化。多烯磷脂酰胆碱胶囊内含亚油酸及亚麻酸、油酸,能将中性脂肪和胆固醇转化成易代谢的形式,促进肝组织再生,可恢复肝功能和受损的酶活力,目前临床上常用来治疗 NAFLD。

胰岛素生长因子(IGF)包括 IGF-1 和 2,属于胰岛素样生长因子家族(IGFs),其中只有约 1% 以游离形式存在,与相应受体结合进而发挥作用,其余 99% 则与 IGFBP 结合。IGFBP 既是体内 IGF 的主要运输载体,同时也是机体赖以调控 IGF 活性的主要途径和方法^[4]。IGF-1 是由 70 个氨基酸组成的多肽,与胰岛素原有一半相同序列,血液中的 IGF-1 主要有赖肝脏合成。研究发现,IGF-1 具有类似胰岛素样作用,在外周组织能促进糖原、蛋白质和脂肪的合成,降低血液中游离氨基酸、脂肪酸浓度;抑制凋亡,促进细胞增殖;与肿瘤、骨质疏松、肾脏疾病、糖尿病、冠心病、脑梗死等的发生发展及治疗有关^[5]。体外实验发现添加 IGF-1 可对脂肪肝肝细胞线粒体起到一定保护作用,阻断活性氧(与再灌注损伤有关)的产生^[6]。正常情况下,约 80% IGF-1 与 IGFBP-3 结合,IGF-1 作用的发挥与 IGFBP-3 的水平密切相关,随着年龄的增加,游离 IGF-1 的水平和活性下降^[7],IGFBP-3 水平也会下降。彭乃宝等^[8]通过检测肝硬化患者与正常志愿者的血清 IGF-1、IGFBP-3 水平,认为在肝硬化患者中,随着病情加重,肝脏合成和分泌 IGF-1、IGFBP-3 的能力下降。国外有人通过临床检测 NAFLD 患者谷草转氨酶、谷草转氨酶/谷丙转氨酶比值、血小板计数、IGF-1 在肝纤维化不同分期的水平变化,发现在肝纤维化早期,IGF-1、IGF-1/IGFBP-3 较晚期高,认为低水平的 IGF-1 及 IGF-1/IGFBP-3 可能与 NAFLD 肝纤维化有关^[9]。

本实验中,正常组、模型组大鼠血清 IGF-1、IGFBP-3 均随周龄增加而降低,表明随年龄增加,二者合成下降。高脂饲料喂养后,大鼠肝脏出现了明显的脂肪变、炎症和气球样变,NAS 增加,且随喂养时间延长差异更加明显;同时血清 IGF-1、IGFBP-3 水平较同一时相点正常组均显著下降,且随高脂喂养时间延长下降更加明显。推测 NAFLD 发生后,肝细胞合成 IGF-1 功能下降,IGF-1 水平的降低一方面

对自身线粒体保护作用减弱,另一方面造成机体血液中 FFA 进一步增加,从而使肝组织脂质代谢紊乱加重,炎症、纤维化发生,NAFLD 进一步进展,从而形成恶性循环。多烯磷脂酰胆碱干预后,大鼠肝组织炎症程度、NAS 明显减轻($P < 0.05$),血清 IGF-1、IGFBP-3 的水平均较模型组显著提高($P < 0.05$),表明多烯磷脂酰胆碱一定程度上可改善肝细胞合成 IGF-1 的功能,缓解和改善肝内脂质代谢紊乱的情况,起到治疗作用。研究提示,血清 IGF-1、IGFBP-3 的低水平与 NAFLD 疾病本身的进展存在一定关联,二者可作为疾病进展的预测因子,进而为 NAFLD 的诊断及其相关疾病的治疗提供参考性依据。

参考文献:

- [1] 潘逸茹,薛惠君,龚立琪. 胰岛素样生长因子-1 在非酒精性脂肪肝病变中的变化[J]. 检验医学,2005,20(4):300-302.
- [2] 范建高,贾继东,陈力元,等. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志,2010,18(3):163-166.
- [3] 陆再英,钟南山,谢毅,等. 非酒精性脂肪性肝病[M]. 内科学,人民卫生出版社,ISBN 978-7-117-09652-2,2010:435-437.
- [4] Delafontaine P, Song YH, Li Y. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2004,24(3):435-444.
- [5] 杨彬. 胰岛素样生长因子 1 的研究进展[J]. 广西医学,2002,24(8):1198-1201.
- [6] Zaouali MA, Padriisa-Altés S, Ben Mosbah I, et al. Insulin like growth factor-1 increases fatty liver preservation in IGL-1 solution [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(45):5693-5700.
- [7] 张秀梅,陆卫平. 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝病 IGF-1 与胰岛素抵抗关系研究[J]. 现代生物医学进展,2012,12(10):1998-2000.
- [8] 彭乃宝,万荣. 肝硬化患者血清 IGF-1 及其 IGFBP-3 测定与肝功能状况的关系[J]. 右江民族医学院学报,2005(2):146-149.
- [9] Ichikawa T, Nakao K, Hamasaki K, et al. Role of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 in development of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatol Int*, 2007,1(2):287-294.

[修回日期]2014-01-20