

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.28.004

亚慢性暴露壬基酚诱发大鼠非酒精性脂肪肝的研究*

杨雪松¹, 俞捷¹, 杨雪峰², 罗娅¹, 杨静¹, 李克彬¹, 许洁^{1△}

(1. 遵义医学院公共卫生学院 563000; 2. 遵义医学院附属医院胃肠外科, 遵义 563099)

[摘要] **目的** 探讨连续 90 d 灌胃壬基酚(NP)能否诱发非酒精性脂肪肝(NAFLD)。 **方法** 48 只雄性 SD 大鼠分成 4 组,即对照组、低、中、高剂量组, NP 剂量分别为 0、20、60、180 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 每组平均分为常规饮食、高脂饮食两个亚组。空腹灌胃 NP 90 d, 期间每周称量 1 次体质量, 第 60 天行肝脏彩超观察。第 90 天全自动生化分析仪检测肝功、血脂, 高效液相色谱仪检测肝脏中 NP 的浓度。 **结果** 各剂量常规饮食组与对照组比较, 低、中、高剂量组三酰甘油(TG)降低($P>0.05$), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)升高($P<0.05$), 低、高剂量组丙氨酸氨基转移酶(ALT)降低($P<0.05$), 低密度脂蛋白(LDL)减低($P<0.05$), 对照组及低、中剂量组未出现脂肪肝, 高剂量组 1/2 的动物出现脂肪肝。各剂量高脂饮食组与对照比较, 低、中、高剂量组、TG 升高($P<0.05$), ALT 降低($P<0.05$), AST 升高($P<0.05$), HDL 升高($P<0.05$), 高剂量组总胆固醇(TC)升高($P<0.05$), 高脂饮食组被选部分动物中, 低、中剂量组 1/2 的动物出现了脂肪肝, 高剂量组则全部出现脂肪肝病变。与对照组比较, 低、中、高剂量组大鼠肝脏 NP 浓度升高($P<0.05$), 肝脏 NP 浓度与染毒剂量的存在秩相关 $r_{S_{\text{常规饮食}}}=0.942$, $r_{S_{\text{高脂饮食}}}=0.481$ ($P<0.05$)。 **结论** 亚慢性暴露 NP 是导致 NAFLD 的危险因素之一, 增加了 NAFLD 的发病风险。

[关键词] 壬基酚; 非酒精性脂肪肝; 常规饮食; 高脂高糖饮食**[中图分类号]** R114**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)28-3900-04**Study of non-alcoholic fatty liver disease in rats induced by nonylphenol subchronic exposure***Yang Xuesong¹, Yu Jie¹, Yang Xuefeng², Luo Ya¹, Yang Jing¹, Li Kebin¹, Xu Jie^{1△}

(1. School of Public Health, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563099, China)

[Abstract] **Objective** To explore whether expose to nonylphenol(NP) can induce non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD) in rats, subchronically. **Methods** Totally 48 male SD rats were randomly divided into 4 groups, namely, control, low, middle, and high dose group, the doses were 0, 20, 60, 180 mg·kg⁻¹·d⁻¹, each group was divided into normal diet and night fat diet equally. The rats were intragastric administration of NP 90 d, weights of rats were examined once a week, on the 60th day, livers were detected by colored type-B ultrasonic. On the 90th day, liver function and blood fat were tested by automatic biochemistry analyzer, content of liver's nonylphenol examined by high performance liquid chromatograph. **Results** In normal diet, compare with control group, low, middle and high dose group of glycerol triglyceride(TG) was decreased($P<0.05$), aspartate amino shift enzyme(AST) increased in middle and high groups($P<0.05$), alanine transfer enzyme(ALT) decreased($F=12.973$, $P<0.05$) in low and high group, low density lipoprotein(LDL) decreased($P<0.05$). In normal diet, there was no occurrence of NAFLD in control, low and middle groups, but a half of animals were suffered from NAFLD. In the high fat diet, compared with control group, ALT was decreased in low, middle and high dose($P<0.05$), AST was rose($P<0.05$) and TG was increased($F=2.979$, $P<0.05$); in high dose group, the total cholesterol(TC) was increased($P<0.05$), in low dose group and middle dose group, HDL was increased($P<0.05$). In some selected animals of the high fat diet group, half of the animals in the low and middle dose groups occurred NAFLD, while in high dose group all occurred NAFLD. Compared with the control group, concentration of NP in rat liver were increased in treatment group($P<0.05$), NP concentration and the exposure dose exit rank correlation coefficient($r_{S_{\text{normal diet}}}=0.942$, $r_{S_{\text{high dose}}}=0.481$; $P<0.05$). **Conclusion** Exposure to NP is one of the risk factors which leading to NAFLD, subchronically, which increases the risk of NAFLD.

[Key words] nonylphenol; non-alcoholic fatty liver; normal diet; high fat diet

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确的肝损害因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪病变为主要特征的临床病理综合征^[1]。

目前发病逐年上升,一般人群发病率为 10.3%^[2],肥胖人群发病率达到 75.0%,而且随生活方式的改变还在上升^[3],肥胖程度越高,患 NAFLD 的可能性越大^[4],NAFLD 的患病在发达

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(201360439,81560527);贵州省教育厅青年基金资助项目(黔教合 KY 字[2013]198);贵州省卫生厅基金资助项目(gzkwkj20131127);遵义医学院招标基金资助项目(2013F-68);贵州省科技厅基金资助项目(黔科合 LH 字[2014]7543;黔科合 J 字[2014]2177 号,[2014]2185 号);遵义医学院研究生社会实践基金资助项目(ysh-2015-001)。作者简介:杨雪松(1989-),在读硕士,主要从事环境毒理学研究。△ 通讯作者, Tel:13639210187; E-mail: xujie360@sina.com。

国家超过 30% 而且仍然在持续上升^[5]。据估计,当前有大约 10 亿人患有不同形式的脂肪肝^[6],目前研究报道 NAFLD 的发病原因,除了与肥胖,2 型糖尿病,胰岛素抵抗,药物所致的肝损伤有关^[7],环境因素也越来越受到重视。壬基酚(nonyl-phenol, NP)是一种环境内分泌干扰物(EEDs),它是烷基酚聚氧乙烯醚的最终降解产物,被广泛用于润滑油添加剂、树脂、塑化剂、表面活性剂、涂料、化妆品和其他配方产品的制备^[8]。目前我国每年的 NP 产量是 50 000 吨,由于大量应用,在非职业暴露人群脂肪组织或血清中均检测出 NP^[9]。近年来众多流行病学和动物实验研究表明,EEDs 暴露与不断增加的 NAFLD 发病率有关,还一些流行病学数据暗示 EEDs 与人类健康的有害结局相关^[10]。但是揭示 EEDs 对人类健康潜在影响的流行病学资料非常少,因此,需要更多深入的人群调查^[11-13]。人类主要通过饮水和食物暴露 NP,但是目前关于 NP 暴露能否诱发 NAFLD 未见报道。本研究首次通过连续 90 d 灌胃染毒观察 NP 对 NAFLD 发生是否具有作用。为进一步研究 NAFLD 发病机制提供初步指导。

1 材料与与方法

1.1 动物和分组 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠购于第三军医大学大坪动物中心,合格证号为 SCXK(渝)2012-0005,分为对照组、低、中、高剂量组(0, 20, 60, 180 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)。常规饮食亚组(C、L、M、H)喂养普通饲料(100% 基础饲料),高脂饮食亚组(CH、LH、MH、HH)给予高脂高糖饲料(15% 猪油, 20% 白糖, 65% 基础饲料)。NP 溶于玉米油中,每天清晨 7:00~9:00 点空腹灌胃 90 d,每次灌胃 1 h 内完成。即对照组只灌玉米油,其余 3 组灌含 NP 的油溶剂,灌胃体积为 10 mL/kg⁻¹ · d⁻¹。试验动物饲养于空调(格力)控温的动物房,维持环境温度(20±2)℃、相对湿度为(60±5)%。按 8 g/100 g 体质量给予干饲料,自由饮水,黑暗/光照每 12 小时交替 1 次。

1.2 主要试剂与仪器 纯度 99% NP(日本东京化成株式会社集团有限责任公司),玉米油(山东鲁花集团有限责任公司),全自动分化分析仪(贝克库尔曼特),低速离心机(Eppendorf 公司),多普勒彩色 B 超(Phlips),高效液相色谱仪(Agilent 1100, USA)。

1.3 方法 (1)体质量、B 超:染毒期间每周称量 1 次体质量,注意体质量变化。第 60 天每个亚组取 2 只大鼠行肝脏彩超,判断有无脂肪肝形成。(2)肝体指数(肝质量/体质量×100%)、脂体指数(脂质量/体质量×100%);剖杀动物前称量体质量用以计算肝体指数、脂体指数。取血后,完整取下肝脏,肉眼观察,生理盐水浸洗血液,滤纸吸干表面水分,称湿质量,计算肝体指数。取睾丸、附睾旁脂肪,称质量,计算脂体指数。(3)肝功、血脂:第 90 天 7% 水合氯醛麻醉(0.5~0.8 mL 每 100 g 体质量)大鼠。所有血样 2 h 内 4 000 r/min 离心 10 min 后取上清液上机检测,全自动生化分析仪按使用指南操作。(4)高效液相色谱法测肝脏中 NP,取 0.5 g 组织置于具塞玻璃管中,加入正己烷-乙醚混合物(V 正:V 乙=7:3)4 mL,手持匀浆机 20 000 r/min 匀浆 5~10 s,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液到另一洁净玻璃管中,50℃ 水浴蒸干,加入 0.5 mL 乙腈溶解过滤后全部移至上样瓶上机检测。色谱条件:色谱柱(ECLIPSE XD8-C18, 150 mm×4.6 mm, 5 μm, Agilent, USA),流动相(乙腈与 0.1% 冰乙酸混合物,体积比=85:15),柱温 40℃,流速 1 mL/min,进样量 10 μL,激发波长 275 nm,发射

波长 312 nm。FLD 检测器。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,对多组计量资料做方差分析,差异有统计学意义后再用 SNK 法进行两两比较。两非正态变量做 Spearman 相关,检验水准 α=0.05,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组体质量变化趋势 每组大鼠平均体质量呈先上升再减低然后持续上升最后下降的总趋势(图 1)。以 12 次称量的平均体质量表示,常规饮食组中,随染毒剂量增加体质量减轻(P<0.05)。高脂饮食中,LH、MH、HH 组与 CH 组比较,体质量略下降,仅 LH 组与 CH 组比较差异有统计学意义(P<0.05)。

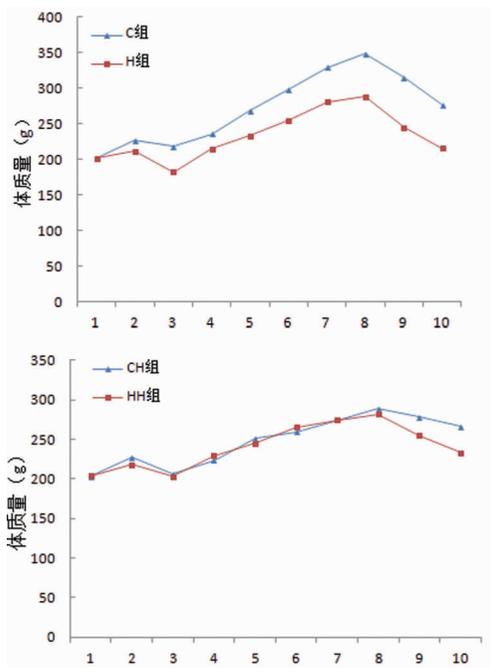


图 1 高剂量组体质量动态变化

2.2 肝质量、肝体指数及脂肪质量、脂体指数比较 第 90 天大鼠开腹后肉眼观察肝脏,常规饲料组肝脏边缘薄,赤褐色,与 C 组比较无明显肉眼可见区别,M 组与 C 组比较肝体指数有差异(P<0.05),H 组与 C 组比较脂体指数差异有统计学意义(P<0.05)。高脂饲料组,相同染毒剂量肝脏体积普遍比常规饲料组大,包膜紧张,边缘钝,切面触之有油腻感,散在点状或小片状淡黄色区域布于肝脏表面,但是 LH、MH、HH 组与 CH 组比较无肉眼可见差别,肝体指数差异无统计学意义(P>0.05)、脂体指数差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 两种饮食肝体指数、脂体指数(̄x±s, %)

NP 剂量 (mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹)	常规饮食		高脂饮食	
	肝体指数	脂体指数	肝体指数	脂体指数
0	2.97±0.309	0.29±0.365	2.94±0.191	0.75±0.079
20	2.60±0.132	0.35±0.062	2.80±0.449	0.52±0.123
60	3.55±0.786	0.40±0.126	2.77±0.369	0.55±0.216
80	2.98±0.190	0.52±0.169	3.05±0.138	0.30±0.021
F	4.866	4.339	1.055	11.898
P	0.011	0.016	0.390	0.000

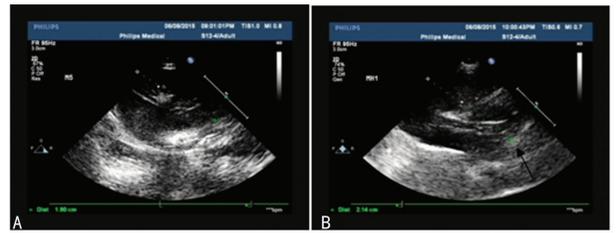
2.3 肝脏中 NP 浓度 常规饲料组和高脂饲料组,与各自对照组比较,低、中、高剂量组大鼠肝脏 NP 浓度升高($P < 0.05$),肝脏 NP 浓度与染毒剂量秩相关系数 $r_{\text{普}} = 0.942, r_{\text{高}} = 0.481$ ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 不同饮食肝脏 NP 浓度($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

NP 剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	常规饲料组	高脂饲料组
0	83.01 ± 4.71	94.79 ± 2.83
20	85.02 ± 3.51	95.61 ± 1.92
60	220.16 ± 28.24	205.07 ± 65.03
80	226.75 ± 14.22	282.00 ± 8.48
F	24.965	4.511
P	0.001	0.034

2.4 肝脏彩超 肝脏大小以肝斜径表示,普通饲料组各自组和高脂饮食组各自组组间未出现明显差异,但相同剂量高脂组大于常规饲料组。整个肝区回声均匀,无强回声区。即普通饲料组无 B 超所见脂肪肝变性,高脂饮食组肝脏出现强回声

结节,提示有脂肪肝形成,见图 2。



A: 普通饮食组; B: 高脂饮食组。

图 2 高脂饮食与普通饮食肝脏超声比较

2.5 肝功和血脂 常规饮食组中各 NP 剂量组与 C 组比较,丙氨酸氨基转移酶(ALT)降低, M、H 组天门冬氨酸氨基转移酶(AST)升高,总胆固醇(TC)升高。低密度脂蛋白(LDL)降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3;对照组,低、中剂量组未出现脂肪肝,高剂量组 1/2 的动物出现脂肪肝。高脂高糖饮食组,ALT 随染毒剂量上升逐渐下降;与 CH 组、ALT 降低比较,AST 升高,LDL 升高,HH 组 TC 升高,见表 4;高脂饮食组被选部分动物中,低、中剂量组 1/2 的动物出现了脂肪肝,高剂量组则全部出现脂肪肝病变。

表 3 常规饮食组各亚组肝功、血脂数值($\bar{x} \pm s$)

项目	C 组	L 组	M 组	H 组	F	P
ALT	46.83 ± 9.988	39.83 ± 5.981	46.00 ± 4.898	36.33 ± 34.179	3.431	0.037
AST	158.33 ± 5.645	143.66 ± 13.808	220.00 ± 9.818	207.00 ± 4.816	95.829	0.000
TC	1.26 ± 0.166	1.28 ± 0.126	1.31 ± 0.176	1.43 ± 0.148	14.490	0.000
TG	0.55 ± 0.108	0.32 ± 0.066	0.40 ± 0.029	0.37 ± 0.018	1.604	0.220
HDL	0.71 ± 0.072	0.70 ± 0.103	0.68 ± 0.024	0.69 ± 0.024	0.144	0.932
LDL	0.47 ± 0.065	0.42 ± 0.076	0.28 ± 0.032	0.38 ± 0.018	13.030	0.000

表 4 高脂饮食组各亚组饮食肝功、血脂数值($\bar{x} \pm s$)

项目	CH 组	LH 组	MH 组	HH 组	F	P
ALT	57.50 ± 4.637	46.00 ± 4.243	42.43 ± 7.250	36.33 ± 5.715	14.760	0.000
AST	204.50 ± 12.693	260.40 ± 12.992	233.83 ± 43.751	253.50 ± 17.375	5.430	0.007
TC	1.70 ± 0.227	1.43 ± 0.253	1.48 ± 0.357	1.93 ± 0.043	5.016	0.010
TG	0.35 ± 0.103	0.36 ± 0.253	0.30 ± 0.048	0.26 ± 0.031	2.979	0.057
HDL	0.82 ± 0.106	0.75 ± 0.147	0.71 ± 0.191	0.97 ± 0.056	4.200	0.019
LDL	0.46 ± 0.122	0.71 ± 0.025	0.59 ± 0.186	0.78 ± 0.020	8.929	0.001

3 讨 论

NP 是一种代表性的 EEDs,具有拟雌激素作用,能够竞争性体内部分雌激素受体结合,从而影响体内正常的激素代谢^[14],其中胰岛素抵抗可能与此有关。本实验为模拟人摄入 NP 的方式,采取灌胃法对实验动物染毒,考虑人群中男性 NAFLD 患病率较高^[2],前期主要研究 NP 的拟雌激素样作用干扰男性体内激素平衡从而影响机体健康,故全部选择雄性大鼠进行实验。目前 NAFLD 的发病机制尚不完全明了,大多数学者普遍接受的是“二次打击”学说。即:第 1 次打击主要是胰岛素抵抗,引起良性的肝细胞内脂质沉积;第 2 次打击主要是氧化应激和脂质过氧化,此为疾病进展的关键。氧化应激状态

是指活性氧(ROS)及其代谢产物的产生超过机体的防御和去毒能力,使促氧化物和抗氧化物之间的动态平衡失调。此外,肥胖、2 型糖尿病、高脂血症单独或共同成为 NAFLD 的易感因素^[1],本实验中各组大鼠体质量的均数变化成先增加再减低然后持续上升最后减低的总趋势。大鼠第 1 次体质量上升为适应性喂养阶段的正常体质量上升,此期体质量上升较快,说明饲养境及气象条件适宜,大鼠适应能力较强,此环境可以满足试验动物的饲养要求。自第 2 周起,体质量开始迅速短暂下降,是灌胃引起的不适导致进食量迅速下降引起的。在这阶段后 1 周,试验大鼠体质量开始长时间持续上升,且增长平稳,增长曲线斜率比适应性喂养略低。说明动物对灌胃刺激适应期

已过,并且逐渐适应灌胃,和灌胃者熟悉程度增加也有关系。但是为何斜率会低于第 1 周,是因为体质量增长速度低于适应性喂养阶段,可能的是毒效应已经开始对体质量产生影响。最后阶段,体质量持续缓慢下降,在 8 周时体重开始下降说明,此期可能是大鼠机体与毒物在进行一个相互斗争的过程,说明毒物已对大鼠造成严重不可逆损害,机体不能适应和完全清除毒物,超过其耐受程度,由毒物蓄积转变为功能蓄积。肝脏中 NP 浓度随染毒剂量的上升而升高,表明肝脏是 NP 的贮存库之一,这与范奇元等^[15]的研究一致,且说明肝脏不能对 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 染毒进行消除,此剂量能对动物造成不可逆性的损伤。这与文献报道的 NP 的无可见有害作用水平(NOA-EL)为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 一致。肝内 NP 检测结果显示,两对照组肝内也有少量 NP 检出,这可能是饲料和饮水中含有微量的 NP 所致,笔者将在以后进一步的实验中进行改进。此外,作者发现,除中剂量组外,高脂饮食组肝脏内 NP 浓度高于相同染毒常规饮食组。这与高脂饮食组出现脂肪肝, NP 具有较高的脂溶性有关。肝脏 B 超显示普通饲料组未见回声增强区域,表明大鼠无明显的脂肪肝变性改变,说明高剂量($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)诱发了 NAFLD。高脂饮食组几乎都出现了严重的脂肪肝病变,且 LH/MH 组 1/2 被检动物出现了脂肪肝, HH 组则全部出现了脂肪肝。说明高脂高糖饮食诱导脂肪肝是可取的方法, NP 可以升高实验动物患 NAFLD 的比例。后期笔者将从肝脏的炎症反应、细胞凋亡、脂质代谢通路去探索 NP 诱发 NAFLD 的发病机制,为该病的预防提供指导。一般情况下, NAFLD 会致 ALT 升高,但本次研究中, ALT 呈下降趋势,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),较为反常。这种现象是因为肝脏损害严重的“胆酶分离”现象造成还是有其他原因需要进一步研究证实。然而 AST 却是上升的,与对照组比较差异同样有统计学意义($P < 0.05$)。AST 主要存在与细胞核中,这说明毒物对肝细胞的损伤已经累及到细胞核,肝脏细胞损害严重。另外,较对照组, LDL 呈下降趋势,说明 NP 染毒影响了 LDL 的合成或分泌。间接地导致 TG 运出肝脏减少,使得 TG 较多沉积于肝脏,为脂肪肝的形成提供了先决条件。

综上所述,高脂高糖饮食诱导脂肪肝模型成功率高。亚慢性暴露 NP 是 NAFLD 的发病危险因素,对 NAFLD 的发生、发展有作用。

参考文献

- [1] 终南山,陆再英. 内科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2011:435.
- [2] Shi L, Zhong WL, Yun L, et al. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with lifestyle/dietary habits among university faculty and staff in Chengdu[J]. Biomed Environ Sci, 2012, 25(4): 383-391.

- [3] 孙辉,王佑娟,曾莉,等. 成都地区非酒精性脂肪肝患病率及危险因素分析[J]. 现代预防医学, 2009, 36(1): 6-8.
- [4] 李洁,张霞. 肥胖与代谢综合征[J]. 现代预防医学, 2008, 35(15): 2978-2980.
- [5] Saadeh S. Nonalcoholic fatty liver disease and obesity[J]. Nutr Clin Pract, 2007, 22(1): 1-10.
- [6] Younossi ZM, McCullough AJ. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014, 28(4): 637-653.
- [7] Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(11): 686-90.
- [8] Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2011, 34(3): 274-285.
- [9] Jubendradass R, D'Cruz SC, Mathur PP, Mathur. Long-term exposure to nonylphenol affects insulin signaling in the liver of adult male rats[J]. Hum Exp Toxicol, 2011, 31(9): 868-76.
- [10] Ferrara F, Ademollo N, Orrù MA, et al. Alkylphenols in adipose tissues of Italian population [J]. Chemosphere, 2011, 82(3): 1044-1049.
- [11] Meeker JD. Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health[J]. Maturitas, 2010, 66(3): 236-241.
- [12] Meeker JD, Rossano MG, Protas B, et al. Environmental exposure to metals and male reproductive hormones: Circulating testosterone is inversely associated with blood molybdenum[J]. Fertil Steril, 2010, 93(1): 130-140.
- [13] Meeker JD, Rossano MG, Protas B, et al. Multiple metals predict prolactin and thyrotropin(TSH) levels in men[J]. Environ Res, 2009, 109(7): 869-873.
- [14] Meeker JD, Rossano MG, Protas B, et al. Cadmium, lead and other metals in relation to semen quality: Human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant [J]. Environ Health Perspect, 2008, 116(11): 1473-1479.
- [15] Yang O, Kim HL, Weon JI, et al. Endocrine-disrupting chemicals; review of toxicological mechanisms using molecular pathway analysis[J]. J Cancer Prev, 2015, 20(1): 12-24.
- [16] 范奇元,金泰虞,丁迅诚,等. 消化道摄入壬基酚在大鼠体内的分布与清除[J]. 环境与职业医学, 2002, 19(4): 228-230.

(收稿日期:2016-06-18 修回日期:2016-07-06)

欢迎投稿

欢迎订阅