

## 蓝莓益生菌通过影响 IL-22/JAK1/STAT3 信号通路改善非酒精性脂肪肝的研究\*

祝娟娟,程明亮<sup>△</sup>,任婷婷,周明玉

(贵州医科大学附属医院感染科,贵阳 550001)

**[摘要]** **目的** 研究蓝莓益生菌通过对白细胞介素-22(IL-22)调控的酪氨酸蛋白激酶-1(JAK1)/信号转导激活转录因子-3(STAT3)信号通路的影响,进一步阐明其改善非酒精性脂肪肝(NAFLD)的作用机制。**方法** 清洁级 SD 大鼠 40 只分为正常对照组(NG)、观察组(MG)、蓝莓组(BG)、益生菌组(PG)和蓝莓+益生菌组(BPG)。除 NG(100%普通饮食)外,其余大鼠均采用复合高脂饲料制备脂肪肝模型共 12 周。确认造模成功后再将剩余 MG 大鼠分为 BG、PG 及 BPG,共观察 8 周。**结果** BPG 与 MG、BG 及 PG 比较:肝脏指数、血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)显著下降( $P<0.01$ ),高密度脂蛋白(HDL)显著升高( $P<0.01$ );酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 IL-22;BPG 的蛋白水平较 MG、BG、PG 增高( $P<0.01$ );定量反转录酶-聚合酶链锁反应(qRT-PCR):BPG 的 JAK1、STAT3 的表达较 MG、BG、PG 显著升高( $P<0.01$ ),胆固醇调节元件蛋白-1c(SREBP-1c)表达显著降低( $P<0.01$ );Western blot:BPG 的 IL-22、JAK1、STAT3 的表达较 MG、BG、PG 显著升高( $P<0.01$ ),SREBP-1c 表达明显减少( $P<0.01$ )。**结论** 蓝莓益生菌能有效改善 NAFLD 的病理组织结构,减轻肝细胞脂肪变性,其机制可能是蓝莓益生菌可增加肝脏 IL-22 的表达,激活下游的 JAK1/STAT3 信号通路,下调 SREBP-1c 的基因表达,抑制 SREBP-1c 的作用,增强胆固醇代谢,减少脂质沉积,是 NAFLD 的一个辅助治疗方案。

**[关键词]** 蓝莓;益生菌;白细胞介素-22;酪氨酸蛋白激酶-1;信号转导激活转录因子-3;非酒精性脂肪肝

**[中图分类号]** R575.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)02-0156-05

### Study on effect of blueberry probiotics for improving non-alcoholic fatty liver disease by influencing IL-22/JAK1/STAT3 signaling pathway\*

Zhu Juanjuan, Cheng Mingliang<sup>△</sup>, Ren Tingting, Zhou Mingyu

(Department of Infection, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550001, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of blueberry probiotics on interleukin-22(IL-22) mediated Janus kinase-1(JAK1)/signal transducer and activator of transcription 3(STAT3) signaling pathway, and to further explore the potential mechanisms to improve non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD). **Methods** Forty clean grade rats were divided into the normal control group(NG), model group(MG), blueberry group(BG), probiotics group(PG) and blueberry plus probiotics group(BPG). Except for the NG group(100% general diet), the fat liver model in the other groups was prepared by 12-week complex high fat diet. After the model establishment, the remained rats were divided into BG, PG and BPG groups for conducting 8-week observation. **Results** The liver index, alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), triglyceride(TG), total cholesterol(TC) and low density lipoprotein(LDL) in the BPG group were significantly decreased compared with the MG, BG and PG groups( $P<0.01$ ) and high density lipoprotein(HDL) was significantly increased( $P<0.01$ ); in IL-22 detected by the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA); the protein level in the BPG group was significantly higher than that in the MG, BG and PG groups( $P<0.01$ ); in the quantificational reverse transcription-polymerase chain reaction(qRT-PCR); the expressions of JAK1 and STAT3 in the BPG group were significantly increased compared with the MG, BG and PG groups( $P<0.01$ ), while cholesterol regulatory element-binding protein-1c(SREBP-1c) expression in the BPG group was significantly decreased( $P<0.01$ ); in Western blot(WB); the expressions of IL-22, JAK1 and STAT3 in the BPG group were significantly higher than those in the MG, BG and PG groups, while the expression of SREBP-1c was significantly declined( $P<0.01$ ). **Conclusion** Blueberry probiotics could effectively ameliorate the pathological tissue structure of NAFLD, attenuates hepatocyte steatosis, its mechanism may be that blueberry probiotics could increase expression of IL-22, activates the downstream signaling pathway of JAK1/STAT3, down-regulates the SREBP-1c gene expression and inhibits SREBP-1c role, enhances cholesterol metabolism, attenuates lipid deposit in liver, which may be an adjuvant scheme to treat NAFLD.

**[Key words]** blueberry; probiotics; interleukin-22; JAK1; STAT3; non-alcoholic fatty liver

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)已成为全世界最常见的肝脏疾病之一<sup>[1]</sup>,且其发展呈

上升趋势。白细胞介素(IL)-22 是抗炎因子 IL-10 家族成员中的一员,与 IL-10 在结构上存在明确的相关性,是重要的护肝

\* 基金项目:贵州省科技厅社会攻关资助项目(黔科合 SY[2010]3017 号);黔东南苗族侗族自治州林业局科研基金资助项目(ZLYJZFCG-2012-7);贵州省卫计委科技项目(gzwlkj2016-1-02)。 作者简介:祝娟娟(1983-),主治医师,硕士,主要从事肝脏代谢性疾病方面研究。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail:chengml@21cn.com。

因子,在多种肝脏疾病中呈现保护作用<sup>[2]</sup>。酪氨酸蛋白激酶-1 (JAK1)/信号转导激活转录因子-3 (STAT3) 信号通路是近年来发现的一条由细胞因子刺激的信号转导通路,参与细胞的增殖、分化、凋亡及免疫调节等许多重要的生物学过程。Bin 等<sup>[3]</sup>发现 JAK1/STAT3 信号通路受 IL-22 调控,对酒精性脂肪肝肝病有潜在的保护作用。目前,临床尚缺乏治疗 NAFLD 的特效药物<sup>[4]</sup>,益生菌作为肠道微生态调节剂能有效减轻内毒素血症,改善肠道屏障功能,在 NAFLD 的治疗中能起到一定的作用<sup>[5]</sup>。中医认为“上工治未病”,因此通过饮食调节是治疗 NAFLD 的重要手段。蓝莓营养成分丰富,富含花青素及多种多酚类物质,具有很好的抗氧化及抗炎作用,可增强机体免疫力。研究显示,蓝莓具有良好的护肝作用,可逆转肝纤维化<sup>[6]</sup>,并且联合益生菌后能有效减轻肝脏炎症,改善肝细胞脂肪变性<sup>[7]</sup>。基于上述研究基础,本实验拟将蓝莓与益生菌联合运用,通过对 IL-22 调控的 JAK1/STAT 3 信号通路的影响达到改善 NAFLD 的目的,从而探讨二者辅助治疗 NAFLD 的机制。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物与试剂** SD 大鼠 40 只,雄性,清洁级,体重(220±30)g,购自贵州医科大学动物实验中心,合格证号:SCXK-(黔)2012-0001,用于建立 NAFLD 动物模型<sup>[8]</sup>。实验动物 NAFLD 造模诱导饲料(江苏美迪森生物有限公司,批号:MD12051);选用贵州麻江兔眼园兰蓝莓,-20℃冻存,临用时解冻提取原浆,其成分包括花青素、微量元素、类黄酮、维生素等<sup>[9]</sup>;益生菌干片(婴儿双歧杆菌、动物双歧杆菌、乳杆菌:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心);IL-22 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(catalog number: M2200, Quantikine);Maxima SYBR Green/ROX qPCR 预混液(美国 Thermo Scientific,批号:00330632); $\beta$ -actin、JAK1 引物、STAT3 引物、固醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)引物(上海生工生物工程技术有限公司,批号:10441535);anti-IL22(英国 Abcam,批号:ab98917);anti-JAK1(英国 Abcam,批号:ab125051,Abcam);anti-STAT 3(英国 Abcam,批号:ab119352);anti-SREBP-1c(英国 Abcam,批号:ab3259)。

**1.1.2 主要实验仪器** ViiA7 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR, Applied Biosystems, 美国);NANO-drop 2000 超微量分光光度计(Thermal scientific, 美国);EPS-601 电泳仪(Amersham, 美国);SynergyH4 多功能酶标仪(biotek, 美国);显微镜图像采集系统 Olympus BX41(Olympus, 美国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型制备及分组** 将 40 只 SD 大鼠分成 5 组:正常对照组(NG)8 只,观察组(MG)8 只,蓝莓组(BG)8 只,益生菌组(PG)8 只和蓝莓+益生菌组(BPG)8 只。NG 正常饮食,自由饮水;其余大鼠均用复合型高脂饲料(88.3%普通饲料+10.0%猪油+1.5%胆固醇+0.2%胆酸钠)喂养 12 周。造模结束后取部分 MG 大鼠,股动脉放血处死(处死前称体重),留取血液及全部肝脏;每只大鼠取相同部位肝脏用 10%中性甲醛固定,病理切片,苏木素-伊红(HE)染色及油红染色,剩余肝脏组织-80℃低温冰箱保存。确认造模成功后,将 MG 剩余大鼠分为 BG(蓝莓原浆:每日 1.5 mL/100 g 灌胃,前期实验摸索出的最佳浓度及剂量)、PG(将益生菌干片磨至粉末状,加适量蒸馏水溶解,益生菌水平:1×10<sup>8</sup> CFU/mL;益生菌溶液 1.5 mL/d 灌胃,前期实验摸索出的最佳剂量)、BPG(将益生菌干片磨至粉末状后加入蓝莓原浆中混匀,参照文献<sup>[10]</sup>混合液

1.5 mL/100 g 体质量灌胃,每日 1 次,益生菌水平:1×10<sup>8</sup> CFU/mL),同时上述分组后给予正常饮食,观察 8 周,实验结束,禁食 12 h 后称大鼠体质量,股动脉放血,留取全部肝脏组织;称肝脏湿质量,每只大鼠取肝右叶置于 10%中性甲醛固定后,石蜡包埋,用于制作组织切片。

**1.2.2 肝脏指数** 计算方法为:肝脏指数=(肝脏质量/体质量)×100%。

**1.2.3 血清学检测** 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)及高密度脂蛋白(HDL)。

**1.2.4 肝组织病理检测** 动物处死后,立即解剖,取相同部位 1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm 大小的肝右叶置于 10%中性甲醛缓冲液中固定 1 周,常规石蜡包埋切片行 HE 染色及油红染色。HE 切片光镜下评估肝脏脂肪变性和炎症活动情况。病理诊断和疗效评估参照美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理委员会所订指南<sup>[11]</sup>,常规进行 NAFLD 活动度积分(NAFLD activity score, NAS)。

**1.2.5 ELISA 检测肝组织中 IL-22 水平** 肝脏组织匀浆后,4 000 r/min 15 min,4℃离心取上清液备用。标准品按照说明书分别稀释成 500.0、250.0、125.0、62.5、31.5、15.6 pg/mL 的标准溶液;在酶标包被板上设置空白孔、标准品孔及待测样品孔后上样;封板膜封板后 37℃温育 30 min;用洗涤液反复洗板 5 次后加入酶标试剂,37℃温育 30 min,洗涤液再次洗板 5 次;分别加入显色剂和终止液后上机检测吸光度(A, 450 nm 波长);根据标准品浓度和 A 值,采用 CurveExpert 1.3 软件绘制标准曲线(R=0.999 83),并根据曲线方程式计算出各组肝组织中 IL-22 水平。

**1.2.6 定量反转录酶-聚合酶链式反应(qRT-PCR)测定 JAK1、STAT3 及 SREBP-1c mRNA 表达** 称取 50~100 mg 肝组织用 TRIzol 提取总 RNA。琼脂糖凝胶电泳判断 RNA 完整性。超微量分光光度计检测总 RNA 纯度和浓度,测定值 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>>1.8,证明所提取的 RNA 纯度好。RNA 逆转录合成 cDNA 按试剂盒说明书操作。所用引物按参考文献设计并在 GenBank 进行核对。 $\beta$ -actin 引物:正义链 5'-CTG AAC CCT AAG GCC AAC CG-3';反义链 5'-GAC CAG AGG CAT ACA GGG ACA A-3'。JAK1 引物:正义链 5'-GGA GGA GCA GAA TCC AGA CAT-3';反义链 5'-TCA ACC TTC CCA AAG TGA CC-3'。STAT3 引物:正义链 5'-CTG AGT GAG CGT GGG TGA T-3';反义链 5'-ACA GGC GGA CAG AAC ATA GG-3'。SREBP-1c 引物:正义链 5'-CGC TAC CGT TCC TCT ATC AAT G-3';反义链 5'-CGT TTC TAC CAC TTC AGG TTT CA-3'。qRT-PCR 反应体系(20  $\mu$ L):SYBR Green 10  $\mu$ L,双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)6  $\mu$ L,Primer mix 2  $\mu$ L,模板 cDNA 2  $\mu$ L。反应条件:第 1 阶段,50℃ 2 min;第 2 阶段,95℃ 10 min;第 3 阶段,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。结果判定:通过  $\beta$ -actin 作为内参照,比较目的基因与内参基因的 Ct 值差异,从而对上述基因在各组中的表达进行相对定量。

**1.2.7 Western blot 测定 IL-22、JAK1、STAT3 和 SREBP-1c 蛋白表达** 抗原蛋白提取后进行蛋白水平测定,取蛋白质样品 30  $\mu$ g,计算蛋白上样量,8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转膜(55 V,100 mA,90 min),封闭(5 g 脱脂奶粉+TBST 100 mL),用 IL-22 抗体(1:1 000)、JAK1 抗体(1:1 000)、STAT 3 抗体(1:5 000)、SREBP-1c 抗体(1:1 000)4℃孵育过夜,二抗(1:20 000)避光孵育 2 h,电化学发光

(ECL)曝光显影,Gel Doc EQ 凝胶成像仪扫描,ImageJ 软件分析结果。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS. 11.5 统计软件进行分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较用单因素方差分析,分析前行方差齐性检验,方差齐时用 SNK 法( $q$  检验),若方差不齐时用 Tamhane 法( $q'$  检验),检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 肝指数检测结果** MG 的肝指数较 NG 明显增加( $P<0.01$ ),经干预后 BG、PG、BPG 的肝指数较 MG 降低,且 BPG 的各指标变化更为显著( $P<0.01$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠肝脏指数比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	肝指数
NG	8	2.35±0.14
MG	8	5.17±0.13 <sup>a</sup>
BG	8	2.97±0.10 <sup>bc</sup>
PG	8	2.95±0.13 <sup>bc</sup>
BPG	8	2.32±0.15 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与 NG 比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与 MG 比较;<sup>c</sup>: $P<0.01$ ,与 BPG 组比较。

**2.2 血清酶学指标** MG 的 ALT、AST 较 NG 明显增加( $P<0.01$ );BG、PG、BPG 的转氨酶较 MG 降低,且 BPG 的各指标变化更为显著( $P<0.01$ ),见表 2。

表 2 各组大鼠血清酶学 ALT、AST 比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	ALT(U/L)	AST(U/L)
NG	8	42.04±1.34	49.73±2.45
MG	8	121.02±8.44 <sup>a</sup>	151.52±14.12 <sup>a</sup>
BG	8	72.83±4.71 <sup>bc</sup>	100.41±3.71 <sup>bc</sup>
PG	8	70.52±3.58 <sup>bc</sup>	100.93±2.98 <sup>bc</sup>
BPG	8	49.50±7.47 <sup>b</sup>	53.33±5.97 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与 NG 比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与 MG 比较;<sup>c</sup>: $P<0.01$ ,与 BPG 组比较。

**2.3 血清血脂指标** MG 的 TG、TC 及 LDL 较 NG 明显增加,HDL 明显降低( $P<0.01$ );而 BG、PG、BPG 的 TG、TC 及 LDL 较 MG 降低,HDL 升高,且 BPG 的各指标变化更为显著( $P<0.01$ ),见表 3。

表 3 各组大鼠 TG、TC、LDL、HDL 比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL (mmol/L)	HDL (mmol/L)
NG	8	0.67±0.03	1.34±0.10	0.64±0.07	0.41±0.08
MG	8	4.19±0.72 <sup>a</sup>	5.24±0.60 <sup>a</sup>	2.15±0.35 <sup>a</sup>	0.21±0.09 <sup>a</sup>
BG	8	1.98±0.84 <sup>bc</sup>	2.67±0.34 <sup>bc</sup>	1.39±0.06 <sup>bc</sup>	1.13±0.07 <sup>bc</sup>
PG	8	1.97±0.87 <sup>bc</sup>	2.79±0.34 <sup>bc</sup>	1.37±0.05 <sup>bc</sup>	1.15±0.07 <sup>bc</sup>
BPG	8	0.67±0.14 <sup>b</sup>	1.60±0.20 <sup>b</sup>	0.54±0.08 <sup>b</sup>	1.67±0.07 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与 NG 比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与 MG 比较;<sup>c</sup>: $P<0.01$ ,与 BPG 组比较。

**2.4 大鼠肝脏组织形态学改变** 光镜下肝组织病理变化:HE 染色提示 NG 大鼠肝小叶结构完整、清晰;中央静脉大而壁薄,肝细胞索布于其周,呈放射状,排列整齐,肝窦清晰可见,大小较一致,核结构清晰可见,无脂肪变性;MG 可见肝细胞肿胀程

度明显加重,呈中大泡性,微泡性脂肪变,肝细胞内有粉红色脂滴,伴气球样变,可见中性粒细胞和淋巴细胞浸润;PG 和 BG 肝细胞脂肪变性较 MG 明显改善,但两组间无明显差别;BPG 与 BG、PG 相比,肝细胞脂肪变明显减少,炎性细胞浸润明显减少,肝索结构基本恢复。油红染色:MG 可见细胞质广泛染色,细胞内可见明显的红色脂滴大量累积,部分脂滴融合变大,细胞边缘模糊;PG 和 BG 细胞质红染程度较 MG 减轻,但两组间无明显差别;BPG 与 BG、PG 相比,细胞质内红色脂滴明显减少,见图 1、2。

**2.5 NASH 评价体系** 根据美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理委员会所订指南对各组进行 NAS 积分:MG 的积分较 NG 明显升高( $P<0.01$ );BG、PG 和 BPG 的积分较 MG 明显下降,且 BPG 积分下降更为显著( $P<0.01$ ),见表 4。

**2.6 在光学显微镜下选取 10 个视野检测统计脂肪细胞数量及面积** MG 的细胞脂肪变性面积较 NG 增大( $P<0.01$ ),通过干预后,BG、PG、BPG 的脂肪变性面积较 MG 明显缩小,且 BPG 更为明显( $P<0.01$ ),见表 4。

**2.7 ELISA 检测肝组织中 IL-22 水平** MG 的 IL-22 蛋白水平较 NG 明显降低( $P<0.01$ );经蓝莓、益生菌干预后 BG、PG、BPG 的 IL-22 水平较 MG 升高,且 BPG 变化更为显著( $P<0.01$ ),见表 4。

表 4 各组大鼠 NAS 评分、脂肪细胞大小及 IL-22 水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	NAS 评分(分)	脂肪面积(mm <sup>2</sup> )	IL-22(ng/mL)
NG	8	0.33±0.52	7.72±0.53	109.13±5.93
MG	8	6.17±0.41 <sup>a</sup>	20.29±0.85 <sup>a</sup>	42.59±10.15 <sup>a</sup>
BG	8	3.67±0.52 <sup>bc</sup>	12.51±0.73 <sup>bc</sup>	100.71±1.57 <sup>bc</sup>
PG	8	3.83±0.41 <sup>bc</sup>	12.30±0.73 <sup>bc</sup>	100.85±2.93 <sup>bc</sup>
BPG	8	1.83±0.75 <sup>b</sup>	9.73±0.43 <sup>b</sup>	128.90±4.75 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与 NG 比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与 MG 比较;<sup>c</sup>: $P<0.01$ ,与 BPG 组比较。

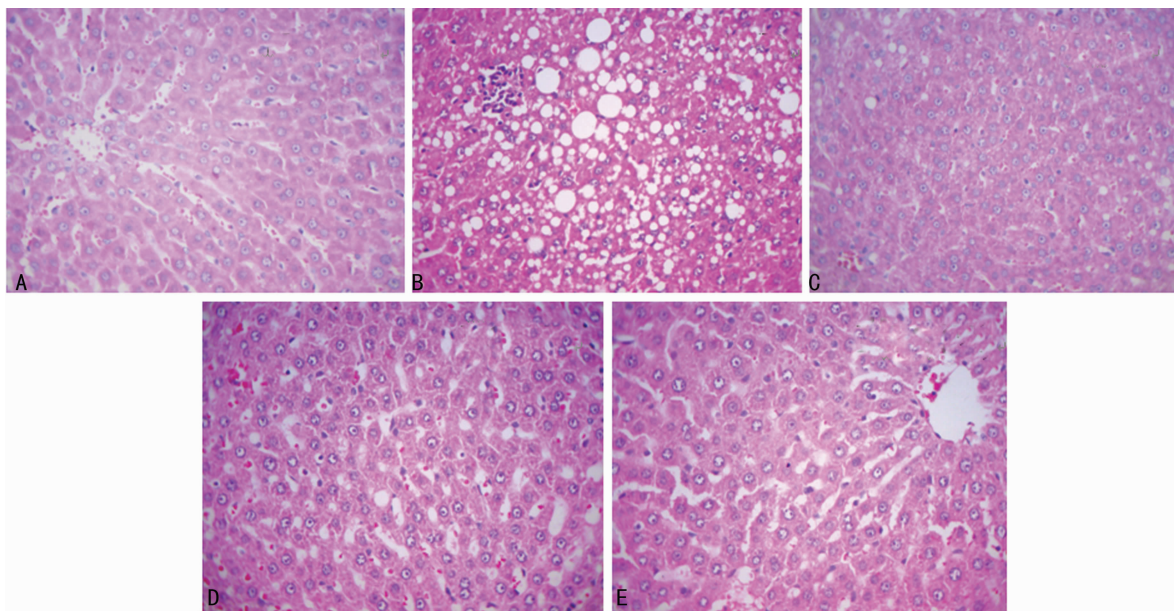
**2.8 JAK1、STAT3 及 SREBP-1c mRNA 表达** 与 NG 相比,MG 的 JAK1、STAT3 的 mRNA 表达明显降低,SREBP-1c mRNA 明显升高;经干预后,与 MG 比较,BG、PG、BPG 的 JAK1、STAT3 的 mRNA 升高,SREBP-1c mRNA 降低,且 BPG 的各指标变化更为显著,见图 3。

**2.9 Western blot 检测蛋白表达** MG 的 IL-22、JAK1、STAT3 蛋白表达较 NG 明显降低,SREBP-1c 的表达水平较 NG 升高( $P<0.01$ );BG、PG 和 BPG 的 IL-22、JAK1、STAT3 表达较 MG 明显升高,SREBP-1c 的表达水平较 MG 降低,且 BPG 的改变更为明显( $P<0.01$ ),见表 5。

表 5 各组大鼠肝组织中 IL-22、JAK1、STAT3 和 SREBP-1c 蛋白质相对表达量( $\bar{x} \pm s$ )

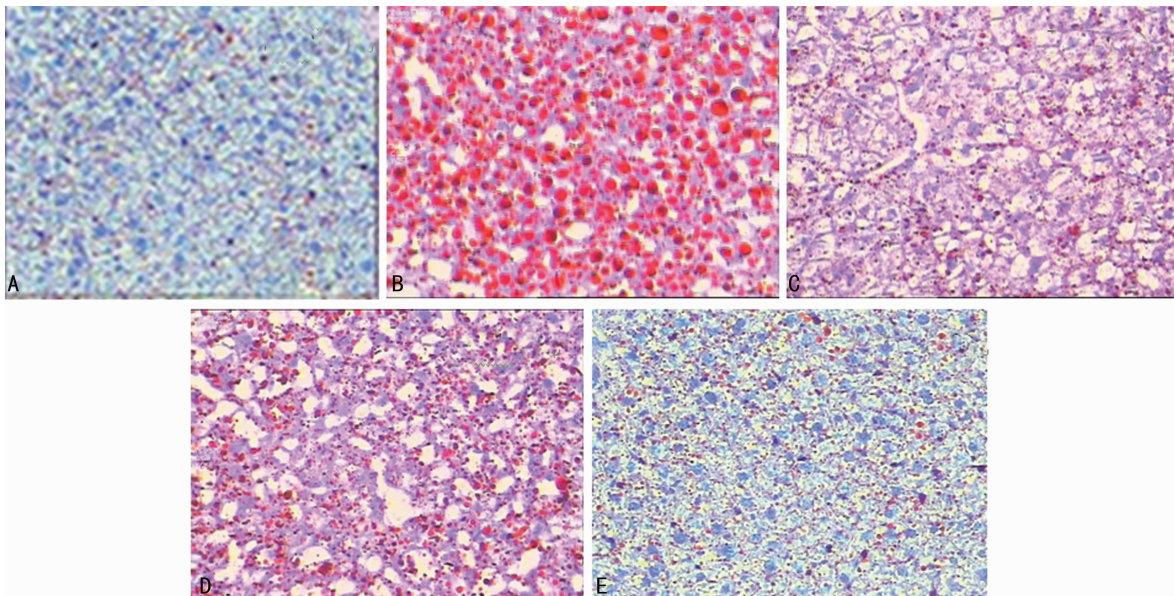
组别	<i>n</i>	IL-22	JAK1	STAT3	SREBP-1c
NG	8	0.75±0.05	0.98±0.02	1.01±0.03	0.53±0.08
MG	8	0.38±0.02 <sup>a</sup>	0.77±0.09 <sup>a</sup>	0.99±0.05 <sup>a</sup>	0.80±0.02 <sup>a</sup>
BG	8	0.88±0.03 <sup>bc</sup>	1.43±0.05 <sup>bc</sup>	1.51±0.04 <sup>bc</sup>	0.38±0.04 <sup>bc</sup>
PG	8	0.91±0.04 <sup>bc</sup>	1.46±0.05 <sup>bc</sup>	1.49±0.03 <sup>bc</sup>	0.40±0.02 <sup>bc</sup>
BPG	8	1.29±0.05 <sup>b</sup>	2.41±0.04 <sup>b</sup>	2.97±0.06 <sup>b</sup>	0.26±0.05 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与 NG 比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与 MG 比较;<sup>c</sup>: $P<0.01$ ,与 BPG 组比较。



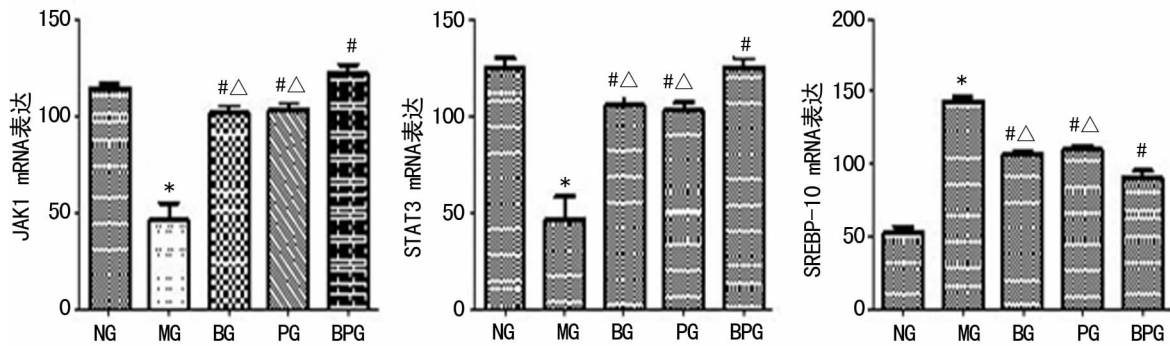
A; NG; B; MG; C; BG; D; PG; E; BPG。

图 1 各组大鼠肝脏组织 HE 染色(×200)



A; NG; B; MG; C; BG; D; PG; E; BPG。

图 2 各组大鼠肝脏组织油红染色(×200)



\*:  $P < 0.01$ , 与 NG 比较; #:  $P < 0.01$ , 与 MG 比较; △:  $P < 0.01$ , 与 BPG 组比较。

图 3 各组大鼠 mRNA 表达结果

### 3 讨论

NAFLD 被视为全球最常见的慢性肝病之一, 并已成为危

害公共健康的问题。随着疾病进展可发展至肝硬化、肝癌。近年来免疫炎症对 NAFLD 的影响逐渐受到重视, 肝内多种具有

免疫功能的细胞受到细菌、病毒、药物或其他一些代谢产物[如脂多糖(LPS)]刺激后,可通过 LPS/Toll 样受体 4(TLR4)信号通路下游的衔接分子 MyD88 诱导促炎因子[如 IL-21、趋化因子-10(CXCL-10)]和抗炎因子(如 IL-10)的产生。促炎因子激活相关信号通路上调 SREBP-1c 等具有脂肪合成功能的基因表达,导致肝细胞内的 TG 和胆固醇聚集,而发生 NAFLD。IL-22 可由多种细胞分泌[如自然杀伤细胞(NK 细胞)、辅助性 T 细胞淋巴细胞(Th)17、Th22 等],在控制细菌感染、稳定内环境和组织修复中起到重要作用<sup>[12]</sup>。有学者发现,IL-22 在多种肝脏疾病中起到保护作用,是重要的护肝因子,主要通过其受体 IL-22 发挥生物作用<sup>[13]</sup>。JAK1/STAT3 信号通路参与细胞的增殖、分化、凋亡及免疫调节的功能已有较多发现,主要由 3 个成分组成,即酪氨酸激酶相关受体、酪氨酸激酶 JAK 和转录因子 STAT。JAK 即 Janus Kinase,是一种非受体的酪氨酸蛋白激酶,成员有 7 个同源区,其中 JAK1 区为激酶区,其下游的效应分子 STAT3 在整个信号通路中起到承上启下的作用。当 JAK1 激酶活化,可催化结合在受体上的 STAT 蛋白发生磷酸化修饰,并以二聚体形式进入细胞核内与靶基因结合,调控基因转录。同时,细胞因子对激活 STAT 具有一定的选择性, Yang 等<sup>[14]</sup>的研究显示,IL-22 可通过激活 STAT3 通路下调 TG 合成的相关基因改善因肥胖所致的脂肪肝; Xiao 等<sup>[15]</sup>通过 IL-22 治疗乙醇诱导的肝损伤的研究发现,IL-22 可通过其受体 IL-22 激活 JAK1/STAT3 信号通路,下调脂肪酸转运蛋白(FATP)的表达而达到治疗目的,从而改善肝细胞脂肪变性<sup>[15]</sup>。综上,IL-22 对多种肝脏疾病有保护作用,本研究推测,由 IL-22 调控的 JAK1/STAT3 信号通路也参与了拮抗 NAFLD。

通过饮食调节,从 NAFLD 的早期阶段介入预防,早期控制,避免其进展为终末期肝病具有重大意义。益生菌作为肠道微生物生态调节剂可用于 NAFLD 的治疗,以改善肠道生态环境,减轻内毒素血症,从而减轻肝细胞炎症,达到治疗 NAFLD 的目的<sup>[16]</sup>。蓝莓素有“浆果之王”的美称,不仅是一种果品,更是一种具有保健功能的食品。相关研究发现,蓝莓富含花青素、类黄酮及多酚类物质,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、调节免疫、降血脂等功效<sup>[17]</sup>,且蓝莓中的花青素能激活免疫系统,使免疫球蛋白不受自由基的侵害,激活巨噬细胞,增强人体的免疫力。本团队在前期研究中发现:蓝莓对急性酒精性脂肪肝有保护作用<sup>[18]</sup>,其机制可能是蓝莓能有效抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),下调 SREBP-1c 的表达,合理改善脂代谢,减少脂质沉积于肝脏。相关的报道也显示:蓝莓对益生菌的生长有促进作用<sup>[19]</sup>;同时,益生菌能增强蓝莓的生物活性,二者有协调作用<sup>[20]</sup>。

基于上述研究,本实验将蓝莓与益生菌联合运用,观察二者的协同效应对 IL-22 调控的 JAK1/STAT3 信号通路的影响,从而探明蓝莓益生菌改善 NAFLD 的作用机制。研究发现:HE 染色可见 BPG 的肝细胞脂肪变性程度较 MG 明显降低,油红染色可见细胞质内红色脂滴较 MG 明显减少,脂肪细胞面积测定值下降明显( $P < 0.01$ );肝脏指数、ALT、AST、TG、TC、LDL 均较 MG、BG、PG 明显降低,HDL 明显升高( $P < 0.01$ ),但 BG 与 PG 差异无统计学意义( $P > 0.05$ );通过参照美国国立卫生研究院制订的 NAFLD 活动度积分表得出 BPG 的 NAS 评分较其余各组明显下降,说明蓝莓益生菌具有显著的拮抗肝细胞脂肪变性、改善脂代谢、减轻肝细胞炎症的作用。通过对 IL-22、JAK1、STAT3 及 SREBP-1c 进行检测发现:BPG 的 IL-22、JAK1、STAT3 的表达均明显高于 MG、

BG 和 PG( $P < 0.01$ ),但单独使用蓝莓或益生菌的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。不难看出,JAK1、STAT3 的变化与 IL-22 一致,呈正相关。SREBP-1c 是影响肝脏脂质合成的重要转录调控因子,其活性调节与脂肪肝的发病相关,Radaeva 等<sup>[21]</sup>发现,IL-22 激活 STAT3 信号通路可上调抗凋亡基因、抗氧化应激基因的表达,下调脂肪生成基因表达(如 SREBP-1c),以达到改善脂肪肝的目的。而本研究也发现,MG 的 SREBP-1c 较 NG 明显升高,经蓝莓和益生菌干预以后,SREBP-1c 的表达逐渐降低,BPG 降低更为明显( $P < 0.01$ ),说明蓝莓与益生菌联合改善脂代谢的作用较单独运用蓝莓或益生菌强,并且 SREBP-1c 表达随着 IL-22、JAK1、STAT3 的增加而减少,呈现负相关。

综上所述,实验证实了本研究推测是合理的,其改善 NAFLD 的作用机制可能是蓝莓与益生菌联合,增强了彼此的生物学活性,抑制炎症因子对肝细胞的损伤,同时增加肝脏 IL-22 的表达,IL-22 选择性的激活 JAK1/STAT3 信号通路,下调 SREBP-1c 表达,减少 TG 及胆固醇沉积于肝脏,改善肝细胞炎症及脂肪变性。但二者对 NAFLD 更深层次的作用机制还有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(11): 686-690.
- [2] Chestovich PJ, Uchida Y, Chang W, et al. Interleukin-22: implications for liver ischemia-reperfusion injury [J]. *Transplantation*, 2012, 93(5): 485-492.
- [3] Bin G, Sung HK, Oygi P, et al. Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of STAT3[J]. *Hepatology*, 2010, 52(4): 1291-1300.
- [4] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. Diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association [J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 2005-2023.
- [5] Eslamparast T, Poustchi H, Zamani F, et al. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study [J]. *Am J Clin Nutr*, 2014, 99(3): 535-542.
- [6] Wang Y, Cheng M, Zhang B, et al. Dietary supplementation of blueberry juice enhances hepatic expression of metallothionein and attenuates liver fibrosis in rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58659.
- [7] Ren T, Huang C, Cheng M. Dietary blueberry and bifidobacteria attenuate nonalcoholic fatty liver disease in rats by affecting SIRT1-mediated signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014: 465059.
- [8] Cano A, Ciaffoni F, Safwat GM, et al. Hepatic VLDL assembly is disturbed in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease: is there a role for dietary coenzyme Q [J]. *J Appl Physiol*, 2009, 107(3): 707-717.
- [9] 文光琴, 聂飞, 方品武. 蓝莓果实理化成分含量比较分析与功能评价 [J]. *北方园艺*, 2012, 36(13): 27-30.
- [10] Osman N, Adawi D, Ahrné S, et al. Endotoxin- (下转第 164 页)

- [3] Yuan X, Zhou Y, Wang W, et al. Activation of TLR4 signaling promotes gastric cancer progression by inducing mitochondrial ROS production[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(9):1-10.
- [4] Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, et al. Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology[J]. *Sci World J*, 2014;919570.
- [5] Shojaei F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives[J]. *Cancer Lett*, 2012, 320(2):130-137.
- [6] Liu N, Wu Q, Wang Y, et al. Helicobacter pylori promotes VEGF expression via the p38 MAPK Mediated COX2 PGE2 pathway in MKN45 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(4):2123-2129.
- [7] Tate CM, Blosser W, Wyss L, et al. LY2228820 dimesylate, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, reduces angiogenic endothelial cord formation in vitro and in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(9):6743-6753.
- [8] Liaunardy-Jopeace A, Gay NJ. Molecular and cellular regulation of toll-like receptor-4 activity induced by lipopolysaccharide ligands[J]. *Front Immunol*, 2014(5):473.
- [9] Tang X, Zhu Y. TLR4 signaling promotes immune escape of human colon cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance[J]. *Oncol Res*, 2012, 20(1):15-24.
- [10] 孙运良, 满晓华, 王丽华, 等. Toll 样受体-4 与胰腺癌侵袭和转移的关系[J]. *中国癌症杂志*, 2012, 22(7):522-527.
- [11] Silvestris N, Gnoni A, Brunetti AE, et al. Target therapies in pancreatic carcinoma[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(8):948-965.
- [12] Matsumoto K, Ema M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours[J]. *J Biochem*, 2014, 156(1):1-10.
- [13] Riddell JR, Bshara W, Moser MT, et al. Peroxiredoxin 1 controls prostate cancer growth through Toll-Like receptor 4-dependent regulation of tumor vasculature [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5):1637-1646.
- [14] Wang LL, Zhu R, Huang ZQ, et al. Lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 signaling in cancer cells promotes cell survival and proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(8):2223-2236.
- [15] Liu SL, Yang JP, Wang LA, et al. Tibia tumor-induced cancer pain involves spinal p38 mitogen-activated protein kinase activation via TLR4-dependent mechanisms [J]. *Brain Res*, 2010(1346):213-223.

(收稿日期:2016-06-28 修回日期:2016-10-02)

(上接第 160 页)

- and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of lactobacillus, bifidobacterium and blueberry[J]. *Dig Liver Dis*, 2007, 39(9):849-856.
- [11] Zeng MD, Fan JG, Lu LG, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver diseases [J]. *J Dig Dis*, 2008, 9(3):108-112.
- [12] Chun XP, Jie T, Xiao YW, et al. Role of interleukin-22 in liver diseases[J]. *Inflamm Res*, 2014, 63(7):519-525.
- [13] Chestovich PJ, Uchida Y, Chang W, et al. Interleukin-22: implications for liver ischemia-reperfusion injury [J]. *Transplantation*, 2012, 93(5):485-492.
- [14] Yang L, Zhang Y, Wang L, et al. Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22[J]. *J Hepatol*, 2010, 53(2):339-347.
- [15] Xiao NK, De CF, Stephanie M, et al. Hepatoprotective and anti-fibrotic functions of interleukin-22: therapeutic potential for the treatment of alcoholic liver disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(1):56-60.
- [16] Eslamparast T, Poustchi H, Zamani F, et al. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study[J]. *Am J Clin Nutr*, 2014, 99(3):535-542.
- [17] Fernandes I, Marques F, Freitas VD, et al. Antioxidant and anti-proliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3):2923-2933.
- [18] 赵雪珂, 吴荣敏, 姚玉梅, 等. 蓝莓对小鼠急性酒精性脂肪肝 TNF- $\alpha$ R1 和 SREBP-1c 影响的初步研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 20(3):43-46.
- [19] 刘奕伟, 周方, 郝建新, 等. 蓝莓汁及其提取物对嗜酸乳杆菌 NCFM 体外生长的影响[J]. *中国乳品工业*, 2013, 41(2):13-16.
- [20] Branning C, Hakansson A, Ahrne S, et al. Blueberry husks and multi-strain probiotics affect cloacal fermentation in rats [J]. *Br J Nutr*, 2009, 101(6):859-870.
- [21] Radaeva S, Sun R, Pan HN, et al. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis; IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation[J]. *Hepatology*, 2004, 39(6):1332-1342.

(收稿日期:2016-07-12 修回日期:2016-09-12)