

高同型半胱氨酸血症中肝脏的脂肪变性

王雅楠¹⁾, 李治纲²⁾, 桂莉³⁾, 王芳¹⁾, 李树德^{2,4)}, 张鹏⁵⁾

(1) 昆明医科大学病理学与病理生理系, 云南昆明 650500; 2) 昆明医科大学生物化学与分子生物学系, 云南昆明 650500; 3) 云南省第三人民医院内分泌科, 云南昆明 650500; 4) 昆明医科大学生物医学工程中心; 5) 外语部, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 研究高同型半胱氨酸血症中肝脏组织脂肪变性, 探讨同型半胱氨酸导致脂肪变性的机理. **方法** 40 只小鼠随机分为空腹正常对照组、空腹高同型半胱氨酸血症组、进食正常对照组和进食高同型半胱氨酸血症组, 每组 10 只; 空腹高同型半胱氨酸血症组和进食高同型半胱氨酸血症组用含 1.5% 的蛋氨酸饮水 3 个月制造高同型半胱氨酸模型. 3 个月后, 各组取血分别测定同型半胱氨酸、血糖、胰岛素、甘油三酯、总胆固醇, 计算胰岛素抵抗指数; 利用 HE 染色方法检测肝脏组织的形态学变化. **结果** 与空腹正常对照组比较, 空腹高同型半胱氨酸血症组葡萄糖、胰岛素和胰岛素抵抗指数增加 ($P < 0.05$); 甘油三酯和胆固醇含量上升 ($P < 0.05$). 与进食正常对照组比较, 进食高同型半胱氨酸血症组葡萄糖和胰岛素增加 ($P < 0.05$); 甘油三酯和胆固醇含量上升 ($P < 0.05$). 在空腹和进食高同型半胱氨酸血症组中, 肝脏组织 HE 染色出现小叶肝细胞排列紊乱, 脂肪细胞数目增多, 呈现脂肪变性的改变. **结论** 同型半胱氨酸诱导胰岛素抵抗, 影响肝脏的脂类代谢, 可能是 HHcy 导致脂肪变性、形成脂肪肝的因素之一.

[关键词] 高同型半胱氨酸血症; 同型半胱氨酸; HE 染色; 脂肪变性

[中图分类号] R575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 11 - 0019 - 04

Adipose Degeneration Induced by Hyperhomocysteinemia in Liver

WANG Ya - nan¹⁾, LI Zhi - gang²⁾, GUI Li³⁾, WANG Fang¹⁾, LI Shu - de^{2, 4)}, ZHANG Peng⁵⁾

(1) Dept. of Pathology; 2) Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 3) Dept. of Endocrine, The Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650500; 4) Biomedical Engineering Center; 5) Dept. of Foreign Language, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 50500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate adipose degeneration induced by hyperhomocysteinemia (Hcy) in liver of mice, as well as to reveal the mechanism of adipose degeneration induced by homocysteine (Hcy). **Methods** Forty mice, six weeks of age and healthy, were divided into the fasting control group ($n = 10$), the feeding control group ($n = 10$), the fasting HHcy group ($n = 10$) and the feeding HHcy group ($n = 10$). Normal food was fed in the fasting control group and the feeding control group. Normal food and 1.5% (mass fraction) methionine were fed in the fasting HHcy group and the feeding HHcy group. After mice in each group were fed for three months, the blood samples of mice were collected in every group. The plasm levels of glucose, insulin, triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were determined, HOMA insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. The morphology of liver was observed by HE staining. **Results** In the fasting HHcy group, the

[基金项目] NSFC - 云南联合基金资助项目 (U1132606); 云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2009CD213); 云南省教育厅基金资助项目 (2010C148)

[作者简介] 王雅楠 (1987~), 女, 内蒙古呼和浩特市人, 在读硕士研究生, 主要从事代谢性疾病临床与研究工作.

[通讯作者] 李树德. E-mail: shudeli006@vip.sina.com.

plasma levels of glucose, insulin, TG, TC and HOMA-IR were higher than that in the fasting control group ($P < 0.05$). In the feeding HHcy group, the plasma levels of glucose, insulin, TG and TC were higher than that in the feeding control group ($P < 0.05$). Structure of the liver tissue had abnormality such as adipose degeneration. The number of adipocytes in the liver tissue of mice in the fasting and feeding HHcy group increased compared with the fasting and feeding control group, at the same time, the liver cells of hepatic lobule were disorganized in the fasting and feeding HHcy group. **Conclusion** Hcy induces insulin resistance, effects lipid metabolism in liver, thus contributes to adipose degeneration in liver, and leads to formation of fatty liver.

[**Key words**] Hyperhomocysteinemia; Homocysteine; HE staining; Adipose degeneration

同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 是一种含硫氨基酸, 主要在细胞内代谢. 高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHcy) 是心脑血管病独立的危险因素之一, 与冠心病、多囊卵巢综合症和肝病等密切相关. 肝脏是 Hcy 代谢的主要器官^[1], 近期的研究报道认为, Hcy 与肝脏疾病的发生具有一定的相关性^[2]. 本实验的目的是通过建立 HHcy 动物模型, 研究 Hcy 对糖类和脂类代谢的影响, 探讨 HHcy 导致脂肪变性的机理.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 40 只鼠龄 6 周的雄性昆明种小鼠, 体重为 18~22 g (由昆明医科大学实验动物中心提供), 适应性喂养 2 周后用于实验. 随机分为: (1) 空腹正常对照组: 给予普通饮食 3 个月后, 空腹 12 h 取材; (2) 空腹 HHcy 组: 给予普通饮食加含 1.5% 蛋氨酸饮水 3 个月后, 空腹 12 h 取材; (3) 进食正常对照组: 给予普通饮食 3 个月取材; (4) 进食 HHcy 组: 给予普通饮食加含 1.5% 蛋氨酸饮水 3 个月取材.

1.1.2 主要试剂 蛋氨酸购自 Sigma 公司 (美国); 葡萄糖、胰岛素、甘油三酯和总胆固醇的测定试剂盒购自南京建成生物公司.

1.2 方法

1.2.1 各组同型半胱氨酸测定 饲养 3 个月后, 各组眼眶取抗凝血, 4 000 r/min, 离心 5 min, 取血浆. 一部分血浆保存于 -80 °C 备用, 一部分血浆采用 ELISA 的方法测定 Hcy 的浓度, 确定 HHcy 动物模型是否建立成功. 操作严格按说明书进行.

1.2.2 血糖、胰岛素、甘油三酯和总胆固醇测定, 胰岛素抵抗指数计算 各组取血浆利用葡萄糖氧化酶法测定血糖, 化学发光法测定胰岛素, 按文献公式^[3]计算胰岛素抵抗指数. 胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) = (FINS × FBG) / 22.5; 比色法测定

甘油三酯和总胆固醇. 操作严格按说明书进行.

1.2.3 肝脏组织 HE 染色 饲养 3 个月后, 小鼠麻醉处死, 取部分肝脏组织放入含 10% 的中性甲醛固定液固定 24 h, 流水冲洗, 脱水透明, 石蜡包埋, 切片, 常规 HE 染色. 在 OLYMPLUS 光学显微镜下观察肝脏组织的形态学结构.

1.3 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 软件 One-Way ANOVA 分析法进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 同型半胱氨酸测定

与空腹或者进食正常对照组比较, 空腹或者进食 HHcy 组的血 Hcy 含量均高于正常对照组, 提示 HHcy 的动物模型建立成功 (见表 1).

表 1 血浆 Hcy 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of the concentration Hcy in the plasma ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)
空腹正常对照组	10	11.50 ± 2.34
空腹 HHcy 组	10	49.47 ± 1.85**
进食正常对照组	10	13.36 ± 2.85
进食 HHcy 组	10	52.47 ± 2.43**

与正常对照组比较, ** $P < 0.05$.

2.2 血液中葡萄糖、胰岛素、甘油三酯和总胆固醇测定, 胰岛素抵抗指数计算

2.2.1 血液中葡萄糖、胰岛素、甘油三酯和总胆固醇测定 与空腹或者进食正常对照组比较, 空腹或者进食 HHcy 组的血糖和血胰岛素增加 ($P < 0.05$); 血甘油三酯和血胆固醇增多 ($P < 0.05$). 结果提示 HHcy 使糖代谢和脂代谢紊乱 (见表 2).

2.2.2 胰岛素抵抗指数计算 空腹 HHcy 组的胰岛

素抵抗指数为 10.34 ± 2.06 , 正常对照组为 4.74 ± 1.17 , 2 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果提示 Hcy 诱导肝脏的胰岛素抵抗, 可能干扰脂类的代谢。

2.3 肝脏组织 HE 染色呈现脂肪变性

空腹或者进食正常对照组, 光镜下, 正常对照组肝小叶结构清晰, 形态排列正常, 细胞结构整

齐, 中央有大而圆的核, 细胞质均匀, 无脂滴 (图 1A、1B); 空腹或者进食正常对照组, 肝小叶肝细胞排列紊乱, 部分细胞呈大小不等空泡样变性, 脂肪细胞的数目增多, 但未发现明显的纤维化改变 (图 1C、1D), 提示 HHcy 可导致出现脂肪变性。

表 2 血浆葡萄糖、胰岛素、甘油三酯和总胆固醇比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of the concentration of glucose, insulin, TG and TC in the plasma ($\bar{x} \pm s$)

组别	血糖 (mmol/L)	胰岛素 (mIU/L)	甘油三酯 (mmol/L)	总胆固醇 (mmol/L)
空腹正常对照组	6.12 ± 1.01	16.42 ± 2.43	0.60 ± 0.11	1.16 ± 0.35
空腹 HHcy 组	$8.11 \pm 1.56^{*\Delta}$	$29.31 \pm 16.52^{*\Delta}$	$1.59 \pm 0.26^{*\Delta}$	$1.74 \pm 0.36^{*\Delta}$
进食正常对照组	6.82 ± 0.60	11.92 ± 3.89	0.98 ± 0.17	1.45 ± 0.38
进食 HHcy 组	$9.16 \pm 1.87^{\Delta}$	$18.32 \pm 9.81^{\Delta}$	$1.99 \pm 0.27^{\Delta}$	$2.12 \pm 0.37^{\Delta}$

与空腹正常对照组比较, $*P < 0.05$; 与进食正常对照组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

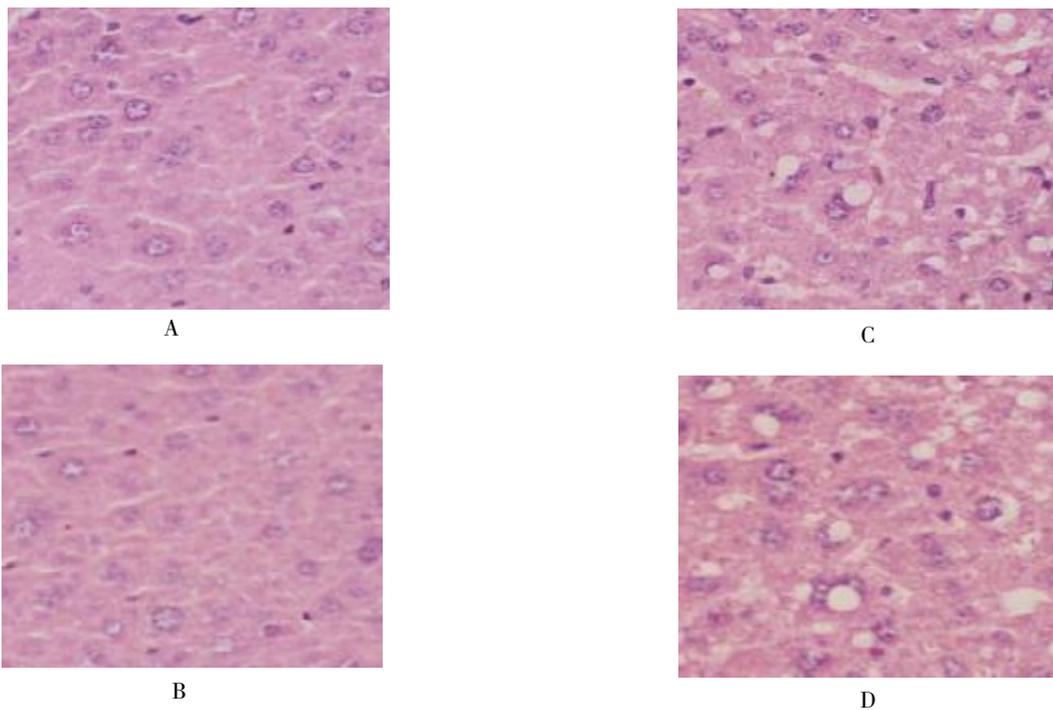


图 1 小鼠肝脏组织 (HE $\times 400$)

Fig1 HE staining of liver tissue of mice

A: 空腹正常对照组; B: 进食正常对照组; C: 空腹 HHcy 组; D: 进食 HHcy 组

3 讨论

正常状态下, Hcy 是体内蛋氨酸代谢的中间产物之一, 在体内的血液中的含量较低, 一般不超过 $15 \mu\text{mol/L}$ 。血液中 Hcy 大于 $15 \mu\text{mol/L}$ 称为 HHcy, HHcy 是脑血管疾病、冠心病和外周血管疾

病等与动脉粥样硬化相关疾病的危险因素之一^[5-7]。同时, HHcy 与其它的疾病也密切相关。

在体内, 肝脏是 Hcy 代谢的主要器官, Hcy 的代谢主要依靠肝脏细胞对 Hcy 的合成和分解来维持其平衡, 正常很少释放到血液中, 所以, 在对其检测中一般为低浓度状态。因此, Hcy 的改变与

肝脏疾病的发生相关。流行病的调查认为,在肝脏疾病中,以脂肪变性所导致的脂肪肝较为常见。目前认为,Hcy 可以通过内皮细胞损伤、炎症细胞附壁和微血栓形成等机理导致脂肪肝的发生^[8,9]。有研究表明,Hcy 与导致胰岛素抵抗有关^[10];Hcy 可通过增强内质网氧化应激,影响葡萄糖的利用;或者上调 TRB3 的表达,使糖原合酶激酶 3 β 磷酸化程度降低,促进糖原合酶磷酸化,最终导致肝脏组织糖原的合成减少,葡萄糖的消耗降低等机理,导致胰岛素抵抗^[11,12];胰岛素抵抗可引起肝脏的脂肪变性,诱导非酒精性脂肪肝^[13]。本实验表明,在空腹 HHcy 中,血糖、血胰岛素、血甘油三酯和血总胆固醇增加,胰岛素抵抗指数上调;进食 HHcy 中,血糖、血胰岛素、血甘油三酯和血总胆固醇也增加。结果提示,Hcy 可能诱导胰岛素抵抗,降低机体对葡萄糖的利用,增加葡萄糖转变为甘油三酯和总胆固醇。

脂类代谢的异常,导致甘油三酯和总胆固醇等在肝脏增多,脂肪细胞的数量上升,出现肝脏的脂肪变性,是导致脂肪肝的主要原因之一。为了进一步的确定肝脏是否存在脂肪变性,笔者对 HHcy 动物模型的肝脏进行 HE 染色,实验表明,空腹或者进食正常对照组肝脏组织结构正常,空腹或者进食 HHcy 组肝小叶肝细胞排列紊乱,部分细胞呈大小不等空泡样变性,脂肪细胞的数目增多,出现脂肪变性。结果提示,Hcy 可导致肝脏的脂肪变性,诱导脂肪肝的发生。

总之,Hcy 诱导胰岛素抵抗,使甘油三酯和总胆固醇增加,可能是 HHcy 导致脂肪变性,形成脂肪肝的因素之一。

[参考文献]

- [1] 门莎莎,田亚平,董振南. 同型半胱氨酸在肝脏疾病中的诊断价值 [J]. 军医进修学院学报,2011,32(4): 325 - 326.
- [2] OLSSON M L,CLAUSEN H. Modifying the red cell surface:towards an ABO-universal blood supply [J]. Br J Haematol,2008,140(1):3 - 12.
- [3] HAFFNER S M,GONZALEZ C,M IETTINEN H,et al. A prospective analysis of the HOMA model. The Mecico City diabetes study[J]. Diabetes Care,1996,19(10):1 138 - 1 141.
- [4] KANG Y J. Copper and homocysteine in cardiovascular diseases[J]. Pharmacol Ther,2011,12(3):321-331.
- [5] LEE R,FRENKEL E P. Hyperhomocysteinemia and thrombosis [J]. Hematol Oncol Clin North Am,2003,17(1): 85 - 102.
- [6] BANOS-GONZALEZ M A,ANGLES-CANO E,CAR-DOSO-SALDANA G,et al. Lipoprotein(a) and homocysteine potentiate the risk of coronary artery disease in male[J]. Circ J,2012,76(8):1 953 - 1 957.
- [7] KOKTURK N,KANBAY A,AYDOGDU M,et al. Hyperhomocysteinemia prevalence among patients with venous thromboembolism [J]. Clin Appl Thromb Hemost,2011, 17(5):487 - 493.
- [8] 门昌君,张国梁. 非酒精性脂肪肝与脂联素及同型半胱氨酸的相关性研究进展 [J]. 山东医药,2011,51 (45):110 - 112.
- [9] GOTTSATER A,FORSBLAD J,MATTIASSON I,et al. D-ecreasing plasma endothelin-1 and unchanged plasma neopterin during folate supplementation in hyperhomocysteinemia[J]. Int Angiol,2002,21(2):158 - 164.
- [10] GOLBAHAR J,AMINZADEH M A,KASSAB S E,et al. Hyperhomocysteinemia induces insulin resistance in male Sprague-Dawley rats [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007,76(1):1 - 5.
- [11] KAPLOWITZ N,THAN T A,SHINOHARA M,et al. Endoplasmic reticulum stress and liver injury [J]. Semin Liver Dis,2007,27(4):367 - 377.
- [12] LIU W J,MA L Q,LIU W H,et al. Inhibition of hepatic glycogen synthesis by hyperhomocysteinemia mediated by TRB3[J]. Am J Pathol,2011,78(4):1 489 - 1 499.
- [13] 郭秀丽,任莉,梁丕霞,等. 非酒精性脂肪肝发病机制 [J]. 医师进修杂志,2005,28(9):53 - 55.

(2012 - 09 - 22 收稿)