

王 涛,曹丽萍,杜金梁,等. 利用地塞米松构建建鲤肝切片脂变模型[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):146-149.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.041

# 利用地塞米松构建建鲤肝切片脂变模型

王 涛<sup>1</sup>, 曹丽萍<sup>2,3</sup>, 杜金梁<sup>2,3</sup>, 丁伟东<sup>2,3</sup>, 贾 睿<sup>2,3</sup>, 骆仁军<sup>1</sup>, 张春云<sup>1</sup>, 顾郑琰<sup>1</sup>, 殷国俊<sup>1,2,3</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081;

3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部鱼类免疫药理学国际联合实验室, 江苏无锡 214081)

**摘要:**用地塞米松构建建鲤肝切片脂变模型,并探索最佳建模浓度,初步探究地塞米松致建鲤肝脏脂变的作用机理。建鲤活体取肝,用振荡切片机制备厚度为 300  $\mu\text{m}$  的建鲤肝切片,27  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中预培养 2 h。将试验分为试验组和空白对照组,试验组用含浓度为 0.039 3、0.393 0、3.930 0、39.300 0、393.000 0 mg/L 地塞米松的 L-15 培养基于 27  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 12 h,空白对照组用 L-15 培养基培养相同时间,培养结束后,收集试验组和空白对照组中上清液和肝切片。参照试剂盒说明检测上清液中谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)活性,肝切片匀浆中三磷酸腺(ATP)、总蛋白(TP)含量,甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、游离脂肪酸(FFA)含量以及脂肪酸合成酶(FAS)活性。结果显示,建鲤肝切片经地塞米松诱导后,ATP 含量变化不大;当地塞米松浓度为 3.93 mg/L 时,试验组的其他指标与空白对照组差异极显著( $P < 0.01$ )。由此说明,用浓度为 3.93 mg/L 地塞米松诱导建鲤肝切片 12 h 可以成功构建建鲤肝切片脂变模型。

**关键词:**建鲤;肝切片;地塞米松;脂变;脂肪肝;糖皮质激素

**中图分类号:** S941.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0146-04

肝脏作为生物体内的重要器官,在能量代谢和物质循环中具有重要作用,同时也是蛋白质、脂肪合成的重要场所<sup>[1]</sup>。近年来,随着水产养殖的迅速发展,鱼类脂肪肝和肝肿大普遍存在,但目前还没有较好的治疗方法,患病鱼类品质下降,抗病能力降低,严重影响水产养殖健康持续发展。鱼类脂肪肝的成因复杂,普遍认为,养殖条件下投喂营养不均衡的配合饲料(如高糖、高脂)以及养殖期间投喂过量,造成肝脏脂类物质代谢发生障碍,脂肪沉积于肝脏的速度远远超过脂肪转移的速度,导致甘油三酯在肝细胞内异常沉积<sup>[2]</sup>。然而,有关高等哺乳动物的研究表明,脂肪肝的形成与糖皮质激素慢性升高有密切联系<sup>[3]</sup>。许多研究证实,糖皮质激素影响肝脏脂肪代谢,诱导脂肪肝和肝肿大<sup>[4-6]</sup>;过多的脂肪沉积是糖皮质激素造成脂肪肝和肝肿大的主要原因<sup>[7]</sup>。

集约化养殖条件下,鱼类受多种应激因子刺激。当应激原存在时,下丘脑-脑垂体-肾间组织轴受到刺激,使促肾上腺皮质激素(adreno cortico tropic hormone,简称 ACTH)分泌增加,ACTH 作用于肾间组织,从而引起糖皮质激素(皮质醇)分泌增加,导致血液中糖皮质激素含量升高<sup>[8]</sup>。急性应激常常导致皮质醇含量数倍甚至数十倍地增加,而慢性应激(如高密度养殖时的拥挤胁迫等)则使血液中皮质醇含量在数周

后仍然保持较高水平,但也有皮质醇在 1 周后恢复到正常水平<sup>[9]</sup>。

本试验用不同浓度的地塞米松模拟鱼体内不同含量的糖皮质激素,恒温培养的建鲤肝切片模拟鱼体内肝脏,构建由地塞米松引起的建鲤肝脏脂变模型。目前,用地塞米松构建肝脏脂变模型并不陌生,国内外学者单独或与高脂饮食并用构建小鼠急性脂肪肝模型,但主要集中在陆生动物上,对水生动物研究较少。殷国俊等将孵化出 96 h 的斑马鱼暴露在添加 50 mg/L 地塞米松的水中,经过 24 h 后,斑马鱼的肝脏显著增大了 40%,此阶段的斑马鱼是卵黄囊为内源性营养,表明地塞米松在没有外源性营养的情况下,可以诱导斑马鱼的肝肿大(注:相关试验尚未公开发表)。刘英娟等单独使用四氯化碳成功构建鲤鱼肝细胞脂变模型,用该模型成功筛选出护肝中药枸杞多糖<sup>[10]</sup>;卢荣华等用脂肪乳剂成功构建草鱼肝细胞脂变模型<sup>[11]</sup>;国外学者在青鲮鱼上成功构建肝脏脂变模型,并用该模型成功筛选出护肝药物<sup>[12]</sup>。该试验通过地塞米松诱导建鲤肝切片 12 h 后,成功构建建鲤肝脏脂变模型,为筛选相关治疗药物提供理论模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用鱼

试验用建鲤取自中国水产科学院淡水渔业研究中心渔场,体质健康无病。将建鲤放入循环水系统暂养 1 周,养水温度为 25  $^{\circ}\text{C}$ ,每天定时定量投喂商品饲料。

### 1.2 主要试剂和仪器

地塞米松(dexamethasone)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,简称 DMSO),购于美国 Sigma 公司;谷丙转氨酶(glutamate pyruvic transaminase,简称 GPT)、谷草转氨酶(glu-

收稿日期:2016-05-09

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号:2015JBFM01)。

作者简介:王 涛(1988—),男,山东济宁人,硕士,主要从事鱼类免疫与药理研究。Tel:(0510)85558876;E-mail:1002409345@qq.com。

通信作者:殷国俊,博士,研究员,主要从事鱼类免疫与药理研究。

Tel:(0510)85551442;E-mail:yingji@ffrc.cn。

tamic oxaloacetic transaminase, 简称 GOT)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, 简称 ATP)、总蛋白 (total protein, 简称 TP)、甘油三酯 (triglyceride, 简称 TG)、总胆固醇 (total cholesterol, 简称 TC)、游离脂肪酸 (free fatty acids, 简称 FFA)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthetase, 简称 FAS) 等试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所; 振荡切片机、723 分光光度计, 购自上海欣茂仪器有限公司; 酶标仪 MK3, 购自美国 Thermo 公司。

### 1.3 建鲤肝切片的制备与培养

无菌条件下, 建鲤消毒麻醉后, 超净台内取出肝脏并置于 PBS 缓冲液中, 持续通入含 95%  $O_2$ 、5%  $CO_2$  的混合气体。用 PBS 缓冲液清洗肝组织 3 次后, 用解剖刀处理成体积为  $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$  的肝组织块, 2% 的低熔点胶包埋, 30 min 后固定肝组织, 振荡切片机制备厚度为  $300\text{ }\mu\text{m}$  的肝切片。将上述肝组织切片置于含 1 mL L-15 培养基的 24 孔板中。

### 1.4 试验设计

本试验设试验组和空白对照组, 每组 4 个重复; 试验前, 各组用 L-15 培养基  $27\text{ }^\circ\text{C}$  恒温箱中预培养 2 h 后, 吸弃上清。空白对照组换用新鲜 L-15 培养基继续培养 12 h, 试验组用含浓度为 0.039 3、0.393 0、3.930 0、39.300 0、393.000 0 mg/L 地塞米松的 L-15 培养基培养相同时间, 试验结束后收集上清液和肝切片。

### 1.5 建鲤精密肝切片活力检测

建鲤肝切片经地塞米松诱导 12 h 后收集并称其质量, 加入 9 倍体积的沸双蒸水, 制成 10% 的组织匀浆, 沸水中煮 10 min,  $3\,500\text{ r/min}$  离心 10 min, 取上清液, 按 ATP 测试盒说明书测定三磷酸腺苷含量。

### 1.6 生化指标测定

地塞米松诱导建鲤肝切片 12 h 后, 收集上清液和肝切片。按试剂盒说明书分别测定 TP、FFA、TG、TC 的含量, GPT、GOT、FAS 活性。

### 1.7 数据分析

试验数据用 SPSS 22.0 进行整理分析。采用 One-Way ANOVA 检验法进行显著性分析, 结果以“平均值  $\pm$  标准差”表示。其中, 在 0.01 水平上差异显著用“\*\*”表示, 在 0.05 水平上差异显著用“\*”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 地塞米松对建鲤肝切片活性的影响

由图 1 可知, 建鲤肝切片经地塞米松诱导 12 h 后, 试验组与空白对照组相比, ATP 含量虽然有所降低但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。由此推断, 在该浓度剂量范围内, 地塞米松对建鲤肝切片活性的影响较小。

### 2.2 地塞米松对建鲤肝切片抗氧化能力的影响

由图 2 可知, 随着地塞米松浓度的增加, 超氧化物歧化酶的活性先降低, 然后保持相对稳定。当地塞米松浓度超过 0.393 0 mg/L 时, 试验组与空白对照组差异显著 ( $P < 0.01$ ); 当浓度超过 3.93 mg/L 后超氧化物歧化酶活性保持相对稳定。

### 2.3 地塞米松对建鲤肝切片中总蛋白含量的影响

由图 3 可知, 随着地塞米松浓度的增加, 总蛋白含量先逐渐降低后保持相对稳定, 当浓度达到 3.930 0 mg/L 时, 总蛋白含量达到最低点; 超过该浓度, 总蛋白含量保持相对稳定。

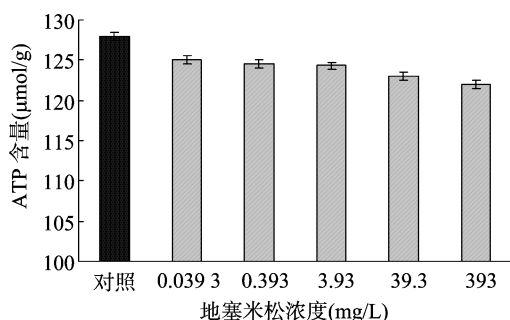


图1 地塞米松对建鲤肝切片中 ATP 含量的影响

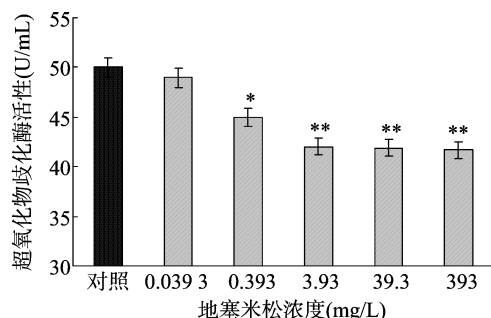


图2 地塞米松对建鲤肝切片中 SOD 活性的影响

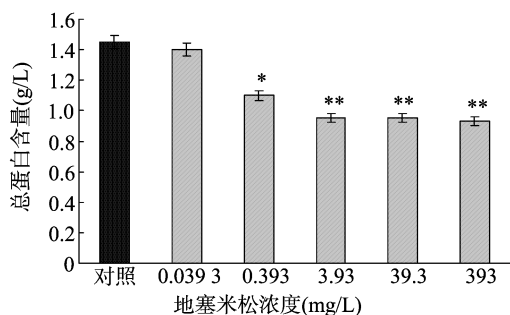


图3 地塞米松对建鲤肝切片中总蛋白含量的影响

### 2.4 地塞米松对建鲤肝切片中 GPT、GOT 活性影响

如图 4 可知, GPT、GOT 的活性随着地塞米松浓度的升高, 先增加后保持相对稳定, 在浓度为 0.393 0 mg/L 时, 试验组与空白对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 地塞米松浓度达到并超过 3.930 0 mg/L 时, GPT、GOT 的活性保持相对稳定。

### 2.5 地塞米松对建鲤肝切片中游离脂肪酸 (FFA) 含量、脂肪酸合成酶 (FAS) 活性的影响

如图 5 可知, 试验组与空白对照组相比, 当地塞米松浓度为 0.393 0 mg/L 时, 建鲤肝切片匀浆中 FFA 含量和 FAS 的活性均出现差异显著性 ( $P < 0.05$ ); 当地塞米松浓度为 3.930 0 mg/L 时差异显著 ( $P < 0.01$ ), 超过该浓度时 FFA 含量和 FAS 活性均保持相对稳定。

### 2.6 地塞米松对建鲤肝切片匀浆中 TC、TG 含量的影响

由图 6 可知, 建鲤肝切片中 TC、TG 的含量随着地塞米松浓度的增加先增加后保持稳定, 当地塞米松浓度达到 0.393 0 mg/L 时, 试验组与空白对照组 TC、TG 含量差异显著 ( $P < 0.05$ ); 浓度达到并超过 3.930 0 mg/L 后, TC、TG 含量达到最大值且保持相对稳定。

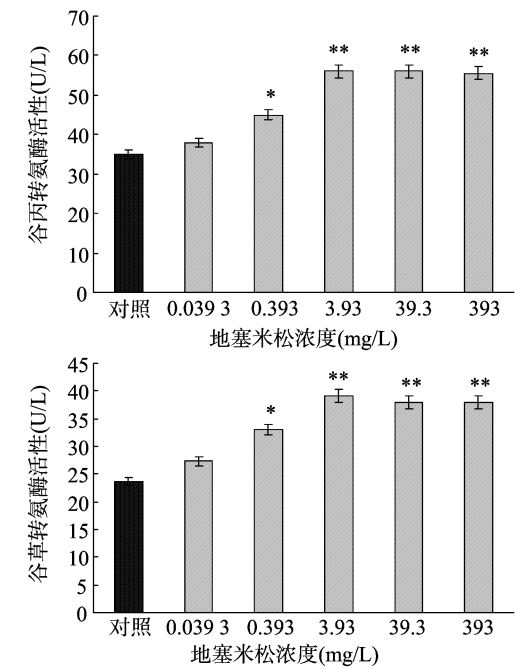


图4 地塞米松对建鲤肝切片中 GPT(a)、GOT(b) 活性的影响

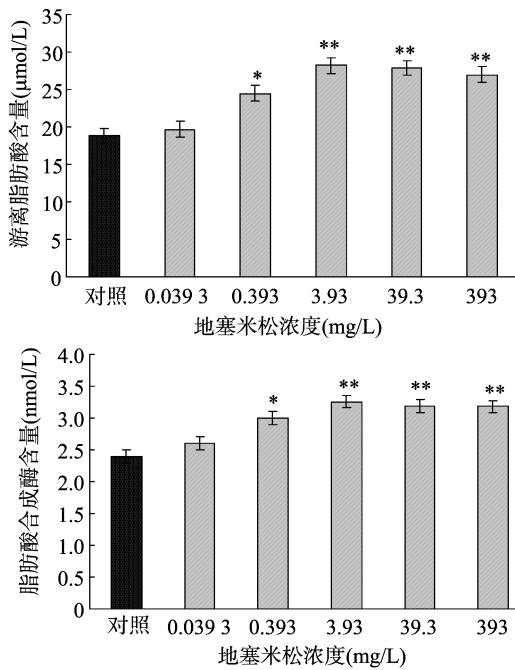


图5 地塞米松对建鲤肝切片中 FFA 含量(a)、FAS 活性(b)的影响

3 讨论

生物体内三磷酸腺苷(ATP)作为能量转换载体,ATP 含量变化直接影响器官的能量代谢<sup>[13]</sup>。因此,试验中将 ATP 含量作为评价器官活性的重要指标。从图 1 可以看出,试验组较空白对照组相比 ATP 含量有所降低,但差异并不显著( $P > 0.05$ )。由此可以推断,建鲤肝切片经地塞米松诱导后活性依然良好。试验组 ATP 降低可能是因为地塞米松上调磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase,简称 PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase,简称 G-6-pase)的表达,促进糖异生,并降低组织细胞对葡萄糖利

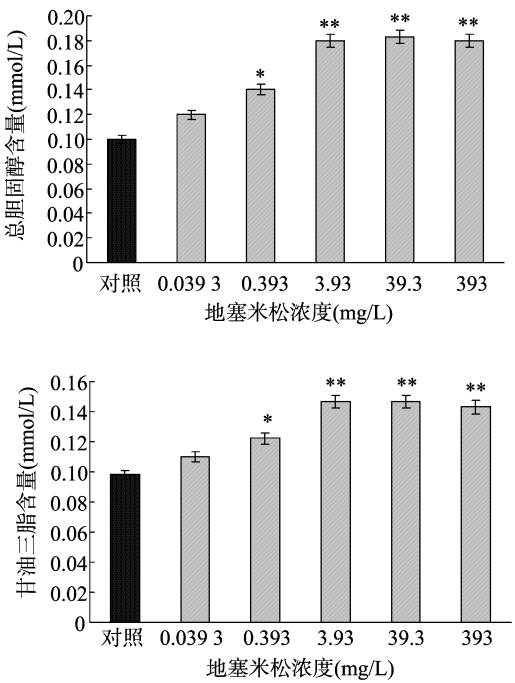


图6 地塞米松对建鲤肝切片中 TC(a)、TG(b) 含量的影响

用效率,抑制线粒体合成 ATP<sup>[14]</sup>。但从本试验的结果可以推测这种抑制作用是有限的,试验中的建鲤肝切片活性良好。

SOD 作为机体内重要的抗氧化酶<sup>[15]</sup>,能有效清除机体内超氧化物自由基,有效防止自由基对机体的损害。图 2 显示,随着地塞米松浓度的增加,试验组中 SOD 的活性先逐渐降低,然后保持相对稳定,在浓度为 0.393 0 mg/L 时,试验组与空白对照组差异显著( $P < 0.05$ ),当浓度达到并超过 3.930 0 mg/L 时,SOD 活性保持相对稳定。

GPT 和 GOT 是内源性转氨酶,因此常常通过检测细胞培养上清液中 GPT 和 GOT 活性来判断细胞受损程度<sup>[16]</sup>。本试验中 GPT 和 GOT 的活性先是随着地塞米松浓度的增加而增加,当浓度达到 3.930 0 mg/L 时活性达到最大且保持相对稳定。说明地塞米松对建鲤肝切片造成了一定的损伤,这种损伤可能与地塞米松促进磷脂氧化,增强脂质过氧化连锁反应,增加质膜的流动性,改变细胞膜的通透性有关。

肝脏在蛋白质的合成与分解过程中具有重要的调节作用,动物血浆中的蛋白质几乎全部在肝脏中合成。当肝脏受到外界刺激发生损伤后,功能发生紊乱,蛋白质的合成受阻<sup>[17-18]</sup>。本试验中建鲤肝切片经地塞米松诱导 12 h 后,试验组与空白组相比,蛋白质含量变化明显。导致该试验结果的主要原因可能是地塞米松影响单个核糖体组装成多聚核糖体的效率,降低翻译能力,进而减弱蛋白质合成相关基因的表达而降低蛋白质的合成<sup>[19]</sup>。不仅如此,地塞米松通过激活肝细胞内溶酶体和泛素蛋白酶体蛋白水解途径促进蛋白质降解<sup>[20]</sup>。由图 3 可以看出,当地塞米松浓度达到 3.930 0 mg/L 时,蛋白质含量达到最小值,超过该浓度,蛋白质含量保持相对稳定。说明该浓度的地塞米松能有效抑制肝脏对蛋白质的合成,促进蛋白质的分解。

肝脏不仅在蛋白质代谢过程中起重要作用,而且与脂肪代谢密切相关。已有研究证实,地塞米松可以提高肝 X 受体

(liver X receptors, 简称 LXRs) mRNA 基因的表达, 肝 X 受体合成分泌增加<sup>[21]</sup>。肝 X 受体上调固醇调节元件结合蛋白 (sterol – regulatory element binding proteins, 简称 SREBPs) 基因的表达, 从而间接促进脂肪酸合成相关基因 FAS、乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, 简称 ACC) 基因的表达<sup>[22]</sup>。也有研究人员发现, 地塞米松能增加体外培养细胞中 FAS 的活性, 直接促进脂肪酸合成的作用<sup>[23]</sup>, 在本试验中由图 5 – b 可知, 建鲤肝切片经地塞米松诱导后, FAS 活性明显上升, 并随着地塞米松浓度的增加而逐渐增强, 在浓度为 3.930 0 mg/L 时达到最大值, 之后保持相对稳定。

正常情况下, 肝脏中的 FFA 脂化为 TG, 蛋白质与 TG 结合成脂蛋白, 然后转运出肝脏参与血液循环<sup>[24]</sup>; TC 则一部分氧化生成胆汁进入胆囊, 另一部分与蛋白质结合后以低密度蛋白和高密度蛋白的形式转运出肝脏参与血液循环<sup>[25]</sup>。本试验中, 由于地塞米松对建鲤肝切片的诱导作用, FAS 合成分泌增加, 导致肝脏中 FFA 含量升高, 过多的 FFA 对肝脏具有毒害作用, 而造成“初次打击”<sup>[26]</sup>; 此外, FFA 通过线粒体  $\beta$  氧化产生过氧化物 ROS, 再次对肝脏产生毒害作用而产生“二次打击”<sup>[27]</sup>。在地塞米松浓度达到 3.930 0 mg/L 后, 建鲤肝切片因遭 2 次“打击”受损程度最为明显, 试验组与空白对照组差异显著 ( $P < 0.01$ )。此外, 肝脏中的 TG 含量随 FFA 含量增加而增加, TC 含量也随肝脏中蛋白质的减少而增加。肝脏中 FFA、TG、TC 含量异常变化最终导致肝脏脂肪代谢异常而脂变, 甚至演变成脂肪肝。

#### 4 结论

通过本试验得出如下结论: 地塞米松对蛋白质、脂肪代谢具有重要调节作用。用浓度为 3.930 0 mg/L 地塞米松诱导建鲤肝肝切片 12 h 能成功构建建鲤肝切片脂变模型。

#### 参考文献:

- [1] 曹丽萍, 贾睿, 杜金梁, 等. 建鲤急性肝损伤模型的建立及当归提取物的保肝和抗氧化作用研究[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(6): 551 – 557.
- [2] 杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1628 – 1638.
- [3] Ellis T, Yildiz H Y, López – Olmeda J, et al. Cortisol and finfish welfare[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2012, 38(1): 163 – 188.
- [4] Jia Y, Yu S, Rao M S, et al. Transcription coactivator PBP/MED1 deficiency prevents dexamethasone – induced fatty liver[J]. Faseb Journal, 2006, 20(4): 226.
- [5] Lemke U. The role of transcriptional repressor Hes – 1 in glucocorticoid – mediated fatty liver development[D]. Heidelberg: University of Heidelberg, 2007.
- [6] Patel R, Patel M, Tsai R, et al. LXR $\beta$  is required for glucocorticoid – induced hyperglycemia and hepatosteatosis in mice[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2011, 121(1): 431 – 441.
- [7] 田颖新, 王冰, 邱红. 糖皮质激素在非酒精性脂肪肝发展中的作用[J]. 肝脏, 2015, 20(1): 79 – 81.
- [8] 刘小玲. 鱼类应激反应的研究[J]. 水利渔业, 2007, 27(3):

- 1 – 3.
- [9] Mommsen T P, Vijayan M M, Moon T W. Cortisol in teleosts dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1999, 9(3): 211 – 268.
- [10] 刘英娟, 杜金梁, 殷国俊, 等. 枸杞多糖对四氯化碳诱导建鲤原代肝细胞损伤的保护作用研究[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(5): 718 – 725.
- [11] 卢荣华, 梁旭方, 孙君君, 等. 草鱼肝细胞脂变模型的建立及脂代谢基因表达分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(1): 24 – 32.
- [12] Oishia T, Teraia S, Kuwashiroa S, et al. Ezetimibe reduces fatty acid quantity in liver and decreased inflammatory cell infiltration and improved NASH in medaka model[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 422(1): 22 – 27.
- [13] 杨吉文. 机体及细胞内 ATP 动态变化过程模型及其模拟试验[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- [14] 郑兴锋. 糖皮质激素对大鼠原代肝细胞糖原代谢的双向调节作用[D]. 上海: 第二军医大学, 2007.
- [15] Moron M S, Depierre J W, Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S – transferase activities in rat lung and liver[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 582(1): 67 – 78.
- [16] Visen P K S, Saraswat B, Dhawan B N. Curative effect of picroliv on primary cultured rat hepatocytes against different hepatotoxins: an *in vitro* study[J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 1998, 40(3): 173 – 179.
- [17] 高雪岩, 郑巧云, 孙建宁, 等. 甘草皂苷的制备及其保肝作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(2): 78 – 81.
- [18] 董丽, 汤乃军. 四氯二噁英的肝脏毒性[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2005, 23(1): 60 – 62.
- [19] Okamoto Y, Tanaka S, Haga Y. Enhanced GLUT2 gene expression in an oleic acid – induced *in vitro* fatty liver model[J]. Hepatology Research, 2002, 23(2): 138 – 144.
- [20] 金伟军, 姚祥春, 吕美巧, 等. 泛素 – 蛋白酶体系统的结构作用和调控机制[J]. 科技通报, 2008, 24(1): 24 – 29.
- [21] 李艳. 糖皮质激素和热应激对蛋鸡肝脏脂肪代谢影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [22] Wu C H, Chen S C, Ou T T, et al. Mulberry leaf polyphenol extracts reduced hepatic lipid accumulation involving regulation of adenosine monophosphate activated protein kinase and lipogenic enzymes[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4): 1620 – 1632.
- [23] 徐冲, 徐国恒. 糖皮质激素与脂肪代谢和胰岛素抵抗[J]. 生理科学进展, 2009, 40(1): 19 – 23.
- [24] 张情, 伍佩英, 曲丹, 等. 植物甾醇酯对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝的预防作用[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(34): 5242 – 5248.
- [25] 徐存炫, 张守兵, 杨志利, 等. 蛋白质代谢、折叠、运输、定位、装配相关基因在大鼠肝再生中表达变化[J]. 分子细胞生物学报, 2008, 41(2): 107 – 119.
- [26] 李宏, 张秀英, 徐尚, 等. 非酒精性脂肪肝疾病与脂质变化[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(6): 59 – 61.
- [27] 董姝, 刘平, 孙明瑜. 非酒精性脂肪肝发病机制“二次打击”学说研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(7): 551 – 555.