

# 吡格列酮对非酒精性脂肪性肝炎小鼠 NLRP3 炎症小体的影响\*

郑晓彬<sup>1</sup> 郑灿滨<sup>2</sup> 郑永平<sup>1</sup> 钟献阳<sup>1</sup> 吴林<sup>1</sup> 郭俊雄<sup>1</sup>

(汕头市中心医院 1. 消化内科; 2. 内分泌与代谢病科, 广东 汕头 515000)

**【摘要】** **目的** 通过观察吡格列酮对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)小鼠肝脏核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3)炎症小体信号通路的影响,探讨吡格列酮防治 NASH 的机制。**方法** 18 只 6~7 周龄 SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为正常对照组(NC 组)、NASH 模型组(HFD 组)及吡格列酮干预组(PIO 组),每组 6 只。采用各自的喂食方案饲养 16 周,随后 PIO 干预组给予 PIO 灌胃,NC 组和 HFD 组灌胃给予等体积生理盐水作为安慰剂,连续干预 6 周。检测血清空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平,HE 及油红 O 染色观察肝组织病理变化,实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测肝组织 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)的 mRNA 水平,免疫组化和蛋白免疫印迹(Western blot)检测肝组织 NLRP3、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(caspase-1)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的蛋白表达。**结果** 与 NC 组比较,HFD 组小鼠的血清 FBG、TC、TG、ALT、AST 含量明显升高(均  $P < 0.05$ ),肝细胞脂质沉积明显,肝组织 Nlrp3、Asc mRNA 表达水平明显增加,NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  的蛋白水平亦增加(均  $P < 0.05$ );经吡格列酮干预后,PIO 组小鼠的血清 FBG、TC、TG、ALT、AST 含量较 HFD 组明显降低(均  $P < 0.05$ ),肝细胞脂质沉积显著改善,肝组织 Nlrp3、Asc mRNA 水平明显下降,NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  的蛋白表达明显下调(均  $P < 0.05$ )。**结论** 吡格列酮可有效减轻高脂饮食诱导的 NASH 小鼠肝脏炎症,其机制可能与抑制肝脏 NLRP3 炎症小体激活及 IL-1 $\beta$  的产生有关。

**【关键词】** 吡格列酮;NLRP3;炎症小体;非酒精性脂肪性肝炎;作用机制

**【中图分类号】** R575.5 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 07. 007

## Effect of pioglitazone on NLRP3 inflammasome in mice with Non-alcoholic Steatohepatitis

ZHENG Xiaobin<sup>1</sup>, ZHENG Canbin<sup>2</sup>, ZHENG Yongping<sup>1</sup>, ZHONG Xianyang<sup>1</sup>, WU Lin<sup>1</sup>, GUO Junxiong<sup>1</sup>

(1. Department of Digestive Diseases, Shantou Central Hospital, Shantou 515000, Guangdong, China;

2. Department of Endocrinology and Metabolism, Shantou Central Hospital, Shantou 515000, Guangdong, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the mechanism of pioglitazone (PIO) for preventing and treating non-alcoholic steatohepatitis (NASH) via observing the effect on the NLRP3 inflammasome signaling pathway in liver of mice with NASH. **Methods** Eighteen SPF healthy male C57BL/6J mice were randomly divided into control group, high fat diet (HFD) model group and PIO group. A HFD was given for 16 weeks to establish the NASH models. Then the PIO group was treated with PIO i.v.g. for 6 weeks, and the control group and HFD model group were given normal saline as placebo. Serum levels of fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), alanine transaminase (ALT) and aspartic transaminase (AST) were detected, and liver histopathological changes were observed by HE and oil-red O staining. The mRNA expression of nucleotide binding oligomeric domain like receptor 3 (NLRP3) and apoptosis-associated speck-like protein (ASC) in liver tissues were detected by Realtime PCR. The protein levels of NLRP3, caspase-1 and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in liver were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with the normal control group, the serum levels of FBG, TC, TG, ALT and AST in the HFD model group were

基金项目:广东省医学科研基金立项项目(B2020113)

引用本文:郑晓彬,郑灿滨,郑永平,等.吡格列酮对非酒精性脂肪性肝炎小鼠 NLRP3 炎症小体的影响[J].西部医学,2024,36(7):974-979.

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2024. 07. 007

significantly elevated (all  $P < 0.05$ ), and hepatic steatosis was more obvious. In addition, the mRNA expression levels of *Nlrp3* and *Asc* in the liver tissues were significantly increased in the HFD model group, and the protein levels of NLRP3, caspase-1 and IL-1 $\beta$  were also increased (all  $P < 0.05$ ). However, contrast to the HFD model group, pioglitazone treatment significantly decreased the serum levels of FBG, TC, TG, ALT and AST (all  $P < 0.05$ ), improved hepatic lipid deposition, reduced the mRNA levels of *Nlrp3* and *Asc*, and decreased the protein levels of NLRP3, caspase-1 and IL-1 $\beta$  in the liver tissues (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Pioglitazone can effectively reduce the liver inflammation in HFD-induced NASH mice, which may be associated with the inhibition of NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production in the liver.

**【Key words】** Pioglitazone; NLRP3; Inflammasome; Non-alcoholic Steatohepatitis; Mechanism

随着营养过剩及静坐为主的生活方式盛行,非酒精性脂肪性肝病(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)目前已成为全球最常见的慢性肝脏疾病,给人类健康造成沉重负担<sup>[1-2]</sup>。作为 NAFLD 疾病进程中的关键一环,非酒精性脂肪性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是由单纯性脂肪肝发展而来,可进展为脂肪性肝硬化、肝癌等,同时可增加心脑血管疾病的发生风险<sup>[3-4]</sup>。NASH 的发病机制与胰岛素抵抗、炎症反应和氧化应激等多种病理生理过程相关,其中炎症反应是驱动 NASH 发生发展的重要因素<sup>[5]</sup>。研究发现,核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症小体是一种由 NLRP3、含胱天蛋白酶募集域的凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain, ASC)以及胱天蛋白酶 1(Cysteine-specific proteinase-1, caspase-1)前体组成的蛋白质复合物,是炎症反应的核心部分,其活化在 NASH 的发生及发展中具有重要作用,并可能成为 NASH 治疗的新靶点<sup>[6]</sup>。目前,吡格列酮在临床上主要作为胰岛素增敏剂用于 2 型糖尿病的治疗。大量的临床研究发现,无论在糖尿病还是非糖尿病人群中,吡格列酮均可有效改善 NASH 病人的肝脏组织病理学改变,包括脂质沉积及小叶炎症<sup>[7-8]</sup>。然而,其作用机制至今尚无定论,NLRP3 炎症小体是否参与吡格列酮防治 NASH 的机制仍未明确。因此,本研究以小鼠为研究对象,通过饲喂高脂饮食建立 NASH 动物模型,观察吡格列酮对 NASH 小鼠肝脏 NLRP3 炎症小体激活的影响,探讨吡格列酮防治 NASH 的机制。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 于南京大学模式动物研究所购买 18 只 SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠(6~7 周龄),饲养于适宜环境中(温度保持在 22~24  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度 60%,明暗周期 12 h),自由饮水和进食。本研究经汕头市中心医院伦理委员会批准[2019-科研(074)号],整个实验过程符合实验动物伦理管理规定。

1.2 动物分组及干预适应性 饲养 1 周后,采用随机数字表法将小鼠分为正常对照组(NC 组)、NASH 模型组(HFD 组)和吡格列酮干预组(PIO 组),每组 6 只。NC 组喂食标准食物;HFD 组喂食高脂食物(总能量为 5.56 kcal/g,碳水化合物热卡占 25.5%,脂肪占 58%,蛋白质占 16.4%;美国 Research Diets);PIO 组喂食高脂食物(同 HFD 组)。按照各自的喂食方案饲养 16 周后,PIO 组通过灌胃给予 20 mg/kg BW/d 吡格列酮(天津武田药品有限公司),NC 组和 HFD 组均灌胃给予等体积生理盐水作为安慰剂对照,连续干预 6 周,期间喂食方案继续同前。干预结束后,空腹(禁食不禁水 12 h)麻醉后用颈椎脱臼法处死小鼠,从其眼窝处收集血液,并立即离心(4  $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 rpm、15 min)即得到血清并冻存于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。分离肝组织,分别留取福尔马林固定标本和冰冻包埋标本,其余部分经液氮速冻后放入-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3 血清学检测 从-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出冰冻血清,冰上复温融解,采用全自动生化分析仪测定血清空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平。

1.4 肝脏组织病理学检测 取石蜡包埋的肝脏组织标本行组织切片,控制切片厚度为 6  $\mu\text{m}$ ,行常规 HE 染色,中性树胶封片,在光学显微镜下(日本 Olympus)成像。取冰冻包埋的肝脏组织,经切片、回温、清除包埋剂后用油红 O 工作液染色 2~5 min。60%异丙醇调色后水洗,用苏木素复染,水洗后用甘油明胶封片,在光学显微镜下观察并保存图像。

1.5 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 称取约 50 mg 肝脏组织,用组织匀浆机(德国 Qiagen)震荡匀浆及 TRIzol(美国 Invitrogen)法提取肝脏组织总 RNA,使用 Nanodrop 2000 紫外分光光度计(美国 ThermoFisher Scientific)检测 RNA 样本的纯度和浓度。取适量 RNA 标本,按照逆转录试剂盒(瑞士 Roche)说明书进行反应得到 cDNA,然后采用特异的引物序列 *Nlrp3*、*Asc*、 $\beta$ *actin*,按照 LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master(瑞士 Roche)说明书配制反应体

系进行 RT-PCR 反应。以  $\beta$ -actin 为内参,记录各组织样本的目的基因和内参基因的 CT 值,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析目的基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence(RT-PCR)

| 基因            | 种属    | 序列(5'-3')                  |
|---------------|-------|----------------------------|
| Nlrp3         | mouse | F: ATCAACAGGCGAGACCTCTG    |
|               |       | R: GTCCTCCTGGCATAACCATAGA  |
| Asc           | mouse | F: GACAGTGCAACTGCGAGAAG    |
|               |       | R: CGACTCCAGATAGTAGCTGACAA |
| $\beta$ actin | mouse | F: AGAGGGAAATCGTGCCTGAC    |
|               |       | R: CAATAGTGATGACCTGGCCGT   |

1.6 免疫组化染色 按照 Ready-to-use IHC/ICC kit (Biotin free)(美国 BioVision)说明书进行免疫组化染色。步骤如下:将肝脏组织石蜡切片常规脱蜡、水化、抗原修复,然后滴加 1:300 兔抗 NLRP3 抗体(中国赛维尔)后 4 °C 孵育过夜。次日滴加生物素标记羊抗兔 IgG,室温孵育 30 min 后漂洗,用二氨基苯胺(DAB)显色,漂洗、复染后封片,在光学显微镜(日本 Olympus)下成像。在胞质内发现棕黄色或棕褐色颗粒时,判定为阳性表达细胞。

1.7 蛋白免疫印迹(Western blot)检测 各剪取约 30 mg 肝组织加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂(美国 Thermo Fisher Scientific)的裂解液中,震荡匀浆后用低温高速离心机(德国 Eppendorf)离心(4 °C、14 000 rpm、15 min),转移上清即得到总蛋白。使用 BCA 蛋白检测试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific)在全自动酶

标仪(美国 Thermo Fisher Scientific)上测定蛋白浓度,根据检测结果调整配平反应体系,然后水浴(95 °C、10 min)变性各蛋白样本。各取 40  $\mu$ g 蛋白样本进行 SDS-PAGE 电泳(美国 Bio-Rad)分离后,转移至 PVDF 膜(美国 Millipore),5%脱脂奶粉封闭后分别加入 1:1 000 兔抗 NLRP3 抗体、兔抗白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )抗体(中国赛维尔)、兔抗 Caspase-1 抗体、兔抗 Cleaved Caspase-1 抗体、兔抗  $\beta$ -actin 抗体(美国 Cell Signaling Technology),4 °C 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜后加入 1:10 000 红外荧光染料标记的二抗(美国 LI-COR),室温下孵育 1 h。TBST 洗膜后用 Odyssey 双色红外激光成像系统(美国 LI-COR)显像。采用 Image-Pro Plus 软件进行灰度定量分析,以  $\beta$ -actin 作为内参,目的蛋白的表达水平用其与内参蛋白的灰度比值表示。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,Graphpad Prism 6.0 软件进行作图,计量资料符合正态分布者采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 吡格列酮对 NASH 小鼠血清 FBG、TC、TG、ALT、AST 水平的影响 各组小鼠的血糖、血脂及肝功能指标结果显示,HFD 组血清 FBG、TC、TG、ALT、AST 水平较 NC 组均明显升高( $P < 0.05$ );应用吡格列酮干预后,PIO 组小鼠较 HFD 组各项指标均明显改善( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组小鼠血清 FBG、TC、TG、ALT、AST 水平比较[( $\bar{x} \pm s$ ),  $n=6$ ]

Table 2 The serum levels of FBG、TC、TG、ALT、AST in each group of the mice

| 组别    | FBG(mmol/L)                   | TC(mmol/L)                   | TG(mmol/L)                   | ALT (U/L)                     | AST (U/L)                       |
|-------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| NC 组  | 7.38 $\pm$ 0.46               | 3.92 $\pm$ 0.32              | 1.34 $\pm$ 0.27              | 32.00 $\pm$ 4.97              | 86.33 $\pm$ 13.07               |
| HFD 组 | 10.48 $\pm$ 0.42 <sup>①</sup> | 6.07 $\pm$ 0.64 <sup>①</sup> | 2.85 $\pm$ 0.32 <sup>①</sup> | 88.67 $\pm$ 8.98 <sup>①</sup> | 225.70 $\pm$ 26.24 <sup>①</sup> |
| PIO 组 | 7.52 $\pm$ 0.62 <sup>②</sup>  | 4.33 $\pm$ 0.36 <sup>②</sup> | 1.92 $\pm$ 0.22 <sup>②</sup> | 46.00 $\pm$ 5.13 <sup>②</sup> | 141.20 $\pm$ 13.59 <sup>②</sup> |

注:与 NC 组比较,① $P < 0.05$ ;与 HFD 组比较,② $P < 0.05$ 。

2.2 吡格列酮对 NASH 小鼠肝脏组织病理学变化的影响 HE 染色下,NC 组小鼠肝小叶结构齐整,肝细胞呈多边形,围绕中央静脉呈放射状条索排列,细胞核位置居中,大而圆,胞质内偶见脂肪变性,肝窦内及汇管区可见少量淋巴细胞浸润,HFD 组小鼠肝细胞索排列紊乱,可见不同程度的肝细胞脂肪空泡,部分出现气球样变,小叶内炎症细胞浸润明显,而吡格列酮干预后的 PIO 组小鼠肝细胞脂肪变性、肝细胞气球样变及炎症细胞浸润程度均明显减轻。油红 O 染色结果显示,NC 组小鼠肝细胞胞浆内可见少量红染小脂

滴,HFD 组小鼠肝细胞内红染脂滴明显增多增大,甚至可见巨大脂肪滴,而吡格列酮干预后的 PIO 组小鼠肝细胞内红染脂滴明显变小、减少。见图 1。

2.3 吡格列酮对 NASH 小鼠肝组织 Nlrp3、Asc mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示,HFD 组小鼠肝组织 Nlrp3、Asc mRNA 表达均较 NC 组升高( $P < 0.05$ );但当使用吡格列酮干预后,PIO 组小鼠肝组织 Nlrp3、Asc mRNA 表达均较 HFD 模型组显著下降( $P < 0.05$ )。见图 2。

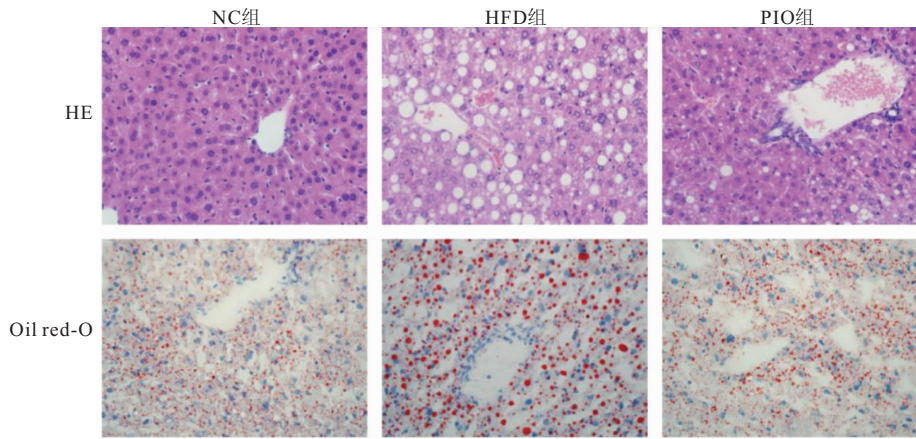


图 1 吡格列酮对 NASH 小鼠肝脏组织病理学变化的影响(400×)

Figure 1 Effect of pioglitazone on liver histopathological changes in mice with NASH

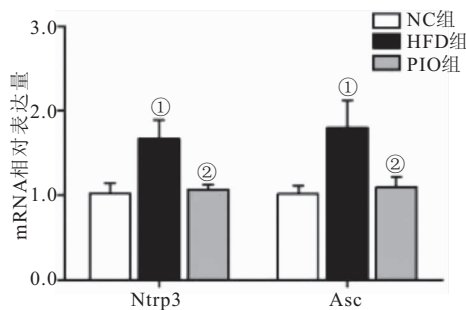


图 2 各组小鼠肝组织中 Nlrp3 和 Asc 的 mRNA 表达水平 (RT-PCR)

Figure 2 Nlrp3 and Asc mRNA expression levels in liver tissues in each group of mice

注:与 NC 组比较,① $P < 0.05$ ;与 HFD 组比较,② $P < 0.05$ 。

2.4 吡格列酮对 NASH 小鼠肝组织 NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响 NLRP3 蛋白主要表达于肝细胞胞质中,免疫组织化学染色后细胞质中出现棕黄色或棕褐色颗粒则判定为阳性表达。结果显示,NC 组小鼠肝组织中存在 NLRP3 阳性表达细胞,且 HFD 组较 NC 组小鼠肝组织中的 NLRP3 阳性细胞明显增加;PIO 组 NLRP3 阳性表达较 HFD 组显著下降(图 3)。Western blot 结果进一步提示,HFD 组小鼠肝组织 NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  的蛋白表达水平较 NC 组明显升高( $P < 0.05$ );但经吡格列酮干预后,PIO 组以上蛋白的表达水平出现明显下降( $P < 0.05$ )。见图 4。

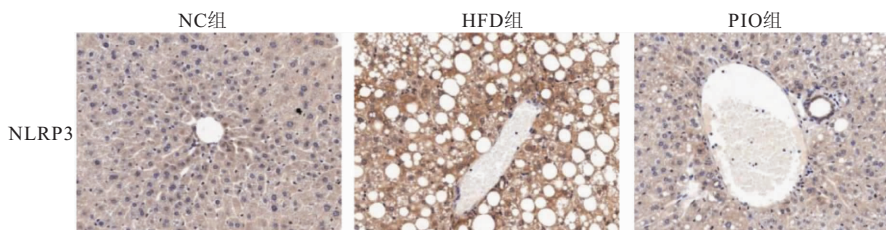


图 3 吡格列酮对 NASH 小鼠肝组织 NLRP3 蛋白表达的影响(免疫组化 400×)

Figure 3 Effect of pioglitazone on NLRP3 protein expression in liver tissues of mice with NASH

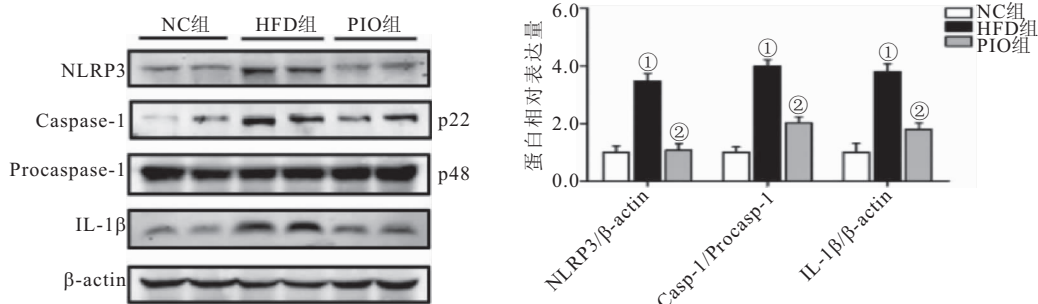


图 4 吡格列酮对 NASH 小鼠肝组织 NLRP3、caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达的影响(Western blot)

Figure 4 Effect of pioglitazone on NLRP3, caspase-1 and IL-1 $\beta$  protein expressions in liver tissues of mice with NASH

注:与 NC 组比较,① $P < 0.05$ ;与 HFD 组比较,② $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

近年来,随着肥胖和 2 型糖尿病在全世界范围内的普遍流行,NAFLD 的患病率亦与日俱增,现已取代病毒性肝病跃居慢性肝病之首,给社会、患者及其家庭带来巨大负担<sup>[2,9]</sup>。NAFLD 的疾病进程包括单纯性脂肪肝、NASH、NASH 相关性肝硬化及肝癌,大约 10%~20% 的 NAFLD 患者可进展为 NASH<sup>[4]</sup>。鉴于 NASH 引起的肝内及肝外疾病死亡风险,针对 NASH 的防治研究仍然是当前的研究热点,具有重要的公共卫生学意义。现有的证据表明,NASH 的防治应以减重(通过控制饮食及增加运动等生活方式调整)为基础,以药物治疗为主,手术治疗则是最终选择<sup>[10]</sup>。然而,至今全球仍无药物管理机构正式批准相关药物用于改善 NASH 的肝脏病理学变化,NASH 的防治药物研究仍然任重道远。

NASH 是 NAFLD 疾病进展的一个关键节点,其发病机制近年来以“多重打击说”被逐渐认可。该学说认为,遗传易感宿主在营养过剩及久坐不动的生活方式下,多重打击(如胰岛素抵抗、脂毒性、内质网应激、氧化应激、炎症因子、脂肪因子紊乱、肠道菌群失调等)同时发挥作用,最终导致 NASH 及纤维化<sup>[5]</sup>。其中,代谢性炎症是驱动 NASH 发生发展的重要因素。作为炎症反应的核心部分,NLRP3 炎症小体是当前的研究热点,在诸多研究领域广受关注。NLRP3 炎症小体是固有免疫系统的重要组成部分,其激活近来被认为参与单纯性脂肪肝向 NASH 的转变<sup>[11]</sup>。NLRP3 炎症小体在固有免疫细胞(如库否细胞、树突状细胞等)以及非免疫细胞(如肝细胞、肝星状细胞、内皮细胞、成纤维细胞等)内均有表达,而以库否细胞和肝细胞表达者与炎症最为密切相关,且多种刺激因素可以诱导其活化<sup>[12]</sup>。NLRP3 炎症小体的激活主要分两步进行:第一步是上调 NLRP3 的表达水平;第二步则完成复合体的组装及激活,促使 caspase-1 前体(procaspase-1)发生裂解形成有活性的 caspase-1,进一步裂解 IL-1 $\beta$  前体形成具有生物活性的成熟体,产生促炎作用<sup>[13]</sup>。研究发现,NLRP3 炎症小体各组分及 IL-1 $\beta$  前体的基因表达水平在 NASH 病人的肝脏中显著上调<sup>[14]</sup>。NLRP3 炎症小体各组分、caspase-1 活化以及血清中 IL-1 $\beta$  的水平在高脂饮食构建的 NASH 小鼠中均显著高于对照组<sup>[15]</sup>。在体外实验中,饱和脂肪酸(如棕榈酸)能够上调并且激活肝细胞的 NLRP3 炎症小体,诱导 IL-1 $\beta$  的产生<sup>[15-16]</sup>。通过激动或抑制 NLRP3 的实验进一步证明,肝内 NLRP3 炎症小体的激活能促进 NASH 的发生及发展<sup>[14,17-18]</sup>。本研究发现,接受高脂饮食饲养的小鼠肝脏出现明显

的脂肪变性及炎症变化,伴随着肝内 NLRP3 炎症小体相关蛋白(NLRP3、caspase-1)及其效应因子 IL-1 $\beta$  水平的升高,证明 NASH 小鼠模型成功建立,以及 NLRP3 炎症小体确实参与 NASH 的病理生理过程,这与以往的研究结论一致。

由于 2 型糖尿病与 NASH 密切相关,有必要探讨临床常用降糖药物对 NASH 的治疗效果及可能机制。过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )是一种核受体,主要存在于脂肪细胞、巨噬细胞、单核细胞、肝细胞、肌肉和内皮细胞中,参与脂质代谢、能量平衡以及炎症反应等过程的转录调控<sup>[19]</sup>。吡格列酮是一种人工合成的 PPAR $\gamma$  激动剂,目前作为胰岛素增敏剂类降糖药应用于临床。临床研究发现,吡格列酮可有效改善 NASH 病人的血清转氨酶水平以及肝脏组织病理学改变,包括脂质沉积及小叶炎症<sup>[7,20]</sup>。针对 NASH 动物模型的研究也显示,吡格列酮能改善肝脏脂质代谢和炎症<sup>[21-22]</sup>。然而,其具体作用机制至今鲜有定论。首先,吡格列酮可增加外周靶组织的胰岛素敏感性,促进脂质从肝脏及骨骼肌转移至白色脂肪,从而减少肝脏及骨骼肌的脂毒性炎症反应<sup>[23]</sup>。其次,吡格列酮可增加血循环中抗炎细胞因子的表达水平,如脂联素、成纤维细胞生长因子 21<sup>[24-25]</sup>。此外,吡格列酮的抗炎作用可能与其改善肝脏线粒体功能有关<sup>[26]</sup>。鉴于 NLRP3 炎症小体激活在 NASH 发生发展中的关键作用,有必要研究吡格列酮对肝脏 NLRP3 炎症小体信号通路的影响,而目前鲜有相关报道。在本研究中,经过 6 周的吡格列酮干预,NASH 小鼠肝脏脂肪变性及炎症明显减轻,血清转氨酶水平下降,伴随着肝脏 NLRP3 炎症小体相关蛋白在基因及蛋白水平的表达均明显下调,提示吡格列酮能抑制肝脏 NLRP3 炎症小体激活,减轻肝脏炎症反应,这是一种区别于既往研究结果的新的作用机制,但本研究未能阐明吡格列酮调控 NLRP3 炎症小体的具体分子机制,这有待后续进一步的深入研究。

### 4 结论

吡格列酮可有效减轻高脂饮食诱导的 NASH 小鼠肝脏炎症,其机制可能与抑制 NLRP3 炎症小体激活及 IL-1 $\beta$  的产生有关,为吡格列酮在临床上用于防治 NASH 提供新的理论依据。

### 【参考文献】

- [1] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. *Hepatology*

- ogy, 2016, 64(1): 73-84.
- [2] ESTES C, ANSTEE Q M, ARIAS-LOSTE M T, *et al.* Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030[J]. J Hepatol, 2018, 69(4): 896-904.
- [3] ALLEN A M, THERNEAU T M, LARSON J J, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease incidence and impact on metabolic burden and death: A 20 year-community study[J]. Hepatology, 2018, 67(5): 1726-1736.
- [4] 袁平戈. 非酒精性脂肪性肝病的诊断和治疗探讨[J]. 西部医学, 2009, 21(2): 333-336.
- [5] PAFILI K, RODEN M. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans [J]. Mol Metab, 2021, 50: 101122.
- [6] MITSUYOSHI H, YASUI K, HARA T, *et al.* Hepatic nucleotide binding oligomerization domain-like receptors pyrin domain-containing 3 inflammasomes are associated with the histologic severity of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hepatol Res, 2017, 47(13): 1459-1468.
- [7] CUSI K, ORSAK B, BRIL F, *et al.* Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial [J]. Ann Intern Med, 2016, 165(5): 305-315.
- [8] WISE J. Pioglitazone seems safe and effective for patients with fatty liver disease and diabetes[J]. BMJ, 2016, 353: i3435.
- [9] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, *et al.* Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(1): 11-20.
- [10] CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE J E, *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases[J]. Hepatology, 2018, 67(1): 328-357.
- [11] DE CARVALHO RIBEIRO M, SZABO G. Role of the inflammasome in liver disease [J]. Annu Rev Pathol, 2022, 17: 345-365.
- [12] TORRES S, SEGALÉS P, GARCÍA-RUIZ C, *et al.* Mitochondria and the NLRP3 inflammasome in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis[J]. Cells, 2022, 11(9): 1475.
- [13] YU L, HONG W, LU S, *et al.* The NLRP3 inflammasome in Non-Alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis: Therapeutic targets and treatment [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 780496.
- [14] WREE A, MCGEOUGH M D, PENA C A, *et al.* NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD[J]. J Mol Med (Berl), 2014, 92(10): 1069-1082.
- [15] CSAK T, GANZ M, PESPIA J, *et al.* Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells[J]. Hepatology, 2011, 54(1): 133-144.
- [16] WEN H, GRIS D, LEI Y, *et al.* Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling [J]. Nat Immunol, 2011, 12(5): 408-415.
- [17] MRIDHA A R, WREE A, ROBERTSON A A B, *et al.* NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice[J]. J Hepatol, 2017, 66(5): 1037-1046.
- [18] YANG G, LEE HE, LEE J Y. A pharmacological inhibitor of NLRP3 inflammasome prevents non-alcoholic fatty liver disease in a mouse model induced by high fat diet[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24399.
- [19] HERNANDEZ-QUILES M, BROEKEMA M F, KALKHOVEN E. PPARgamma in metabolism, Immunity, and cancer: Unified and diverse mechanisms of action[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 624112.
- [20] BOETTCHER E, CSAKO G, PUCINO F, *et al.* Meta-analysis: Pioglitazone improves liver histology and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 35(1): 66-75.
- [21] 沈婷婷, 谢兰丰, 郑册, 等. 吡格列酮对非酒精性脂肪肝模型小鼠肝脂肪变的影响[J]. 肝脏, 2018, 23(5): 436-439.
- [22] 陈迪, 林莹, 陈军梅, 等. 吡格列酮对非酒精性脂肪肝模型大鼠内质网应激性高血脂、炎性因子和 Caspase-12 水平的影响[J]. 微循环学杂志, 2020, 30(2): 7-11.
- [23] YKI-JÄRVINEN H. Thiazolidinediones [J]. N Engl J Med, 2004, 351(11): 1106-1118.
- [24] DE MENDONÇA M, DOS SANTOS B A C, DE SOUSA É, *et al.* Adiponectin is required for pioglitazone-induced improvements in hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet[J]. Mol Cell Endocrinol, 2019, 493: 110480.
- [25] OISHI K, TOMITA T. Thiazolidinediones are potent inducers of fibroblast growth factor 21 expression in the liver[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(7): 1120-1121.
- [26] KALAVALAPALLI S, BRIL F, KOELMEL J P, *et al.* Pioglitazone improves hepatic mitochondrial function in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2018, 315(2): E163-E173.

(收稿日期: 2023-03-07; 修回日期: 2024-04-28; 编辑: 刘灵敏)