·脂肪性肝病·

DOI: 10.12449/JCH250210

1,25(OH)$_2$D$_3$改善胆碱缺乏氨基酸饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎大鼠模型肝脏炎症的机制分析

朱海洋[a], 崔京淑[b], 杨 柳[a], 周梦婷[a], 童 戬[a], 韩红梅[a]

延边大学附属医院 a.消化内科, b.病理科, 吉林 延吉 133001

通信作者: 韩红梅, hanhm79@126.com (ORCID: 0000-0001-7147-4447)

摘要: 目的 分析1,25(OH)$_2$D$_3$对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)大鼠模型肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPAR-γ)水平以及肝巨噬细胞表型、肝脏炎症的影响,初步探讨1,25(OH)$_2$D$_3$改善NASH肝脏炎症的相关机制。**方法** 将24只SPF级Wistar大鼠适应性喂养1周后,随机分为4组。正常组(*n*=6):给予胆碱充足的氨基酸(CSAA)饮食;正常+1,25(OH)$_2$D$_3$组(*n*=6):给予CSAA饮食+1,25(OH)$_2$D$_3$干预;模型组(*n*=6):给予胆碱缺乏的氨基酸(CDAA)饮食;模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组(*n*=6):给予CDAA饮食+1,25(OH)$_2$D$_3$干预。1,25(OH)$_2$D$_3$剂量为5 μg/kg,经腹腔注射,每周2次,共12周。检测每组大鼠血清AST、ALT水平;观察肝组织病理学严重程度,评估SAF评分。检测肝组织M1型、M2型肝巨噬细胞,分析肝巨噬细胞表型变化;并检测肝组织TNF-α、IL-1β、IL-4、IL-10水平以及PPAR-γ的mRNA水平。组间比较采用双因素方差分析,进一步比较采用LSD-*t*多重检验,相关性分析采用Pearson相关法。**结果** 与正常组比较,CDAA饮食诱导的NASH模型AST和ALT水平均升高(*P*值分别为0.019、<0.001),肝组织病理学SAF评分(*P*<0.001)、M1型肝巨噬细胞表达水平(*P*<0.001)、M1/M2表型比值(*P*=0.001)、TNF-α表达水平显著增加(*P*<0.001),IL-4表达水平降低(*P*=0.025);1,25(OH)$_2$D$_3$显著降低了CDAA饮食诱导NASH大鼠血清ALT水平(*P*<0.001)、肝组织病理学SAF评分(*P*<0.001)、M1型肝巨噬细胞水平(*P*<0.001)、M1/M2型比值(*P*=0.001)、IL-1β水平(*P*<0.001),增加了M2型肝巨噬细胞水平(*P*=0.017)、IL-10水平(*P*=0.039)、IL-4水平(*P*<0.001)、PPAR-γ水平(*P*=0.016)。CDAA饮食诱导的NASH模型和1,25(OH)$_2$D$_3$在大鼠血清AST和ALT水平(*P*值分别为0.007、0.008)、肝组织病理学SAF评分(*P*<0.001)、M1型肝巨噬细胞水平(*P*<0.001)、M2型肝巨噬细胞水平(*P*=0.008)、M1/M2表型比值(*P*=0.005)、TNF-α水平(*P*<0.001)、IL-10水平(*P*=0.038)、IL-4水平(*P*<0.001)、PPAR-γ水平(*P*=0.009)中有显著交互作用。相关性分析结果示:PPAR-γ与肝巨噬细胞M1/M2表型比值呈负相关(*r*=-0.415,*P*=0.044);与M2型肝巨噬细胞、IL-10、IL-4均呈正相关(*r*值分别为0.435、0.433、0.532,*P*值分别为0.033、0.035、0.007)。**结论** 1,25(OH)$_2$D$_3$激活PPAR-γ调控肝巨噬细胞表型转变,改善NASH肝脏炎症。

关键词: 非酒精性脂肪性肝炎; 骨化三醇; 炎症; PPARγ; 大鼠, Wistar

基金项目: 国家自然科学基金(81860110)

Mechanism of 1,25(OH)$_2$D$_3$ improving liver inflammation in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet

ZHU Haiyang[a], *CUI Jingshu*[b], *YANG Liu*[a], *ZHOU Mengting*[a], *TONG Jian*[a], *HAN Hongmei*[a]

a. Department of Gastroenterology, b. Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji, Jilin 133001, China

Corresponding author: HAN Hongmei, hanhm79@126.com (ORCID: 0000-0001-7147-4447)

Abstract: Objective To investigate the effect of 1,25(OH)$_2$D$_3$ on the level of peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ) in the liver, the phenotype of hepatic macrophages, and liver inflammation in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH), as well as the mechanism of 1,25(OH)$_2$D$_3$ improving liver inflammation. **Methods** After 1 week of adaptive feeding, 24 specific pathogen-free Wistar rats were randomly divided into normal group [choline-supplemented L-amino acid-defined

(CSAA) diet], normal+1,25(OH)$_2$D$_3$ group [CSAA diet+1,25(OH)$_2$D$_3$], model group [choline-deficient L-amino acid-defined diet (CDAA) diet], and model+1,25(OH)$_2$D$_3$ group [CDAA diet+1,25(OH)$_2$D$_3$], with 6 rats in each group. The dose of 1,25(OH)$_2$D$_3$ was 5 μg/kg for intraperitoneal injection twice a week for 12 weeks. The serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured, liver histopathology was observed, and SAF score was assessed. M1 hepatic macrophages and M2 hepatic macrophages were measured to analyze in the change in the phenotype of hepatic macrophages, and ELISA was used to measure the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-4 (IL-4), and interleukin-10 (IL-10) in liver tissue, and qPCR was used to measure the mRNA level of PPAR-γ. The two-factor analysis of variance was use for comparison between groups, and the least significant difference *t*-test was used for further comparison; the Pearson method was used for correlation analysis. **Results** Compared with the normal group, the model rats with CDAA diet-induced NASH had significant increases in the serum levels of AST and ALT (P=0.019 and P<0.001), the SAF score of liver histopathology (P<0.001), the level of M1 hepatic macrophages (P<0.001), and the ratio of M1 and M2 hepatic macrophages (P<0.001), as well as a significant increase in the level of TNF-α (P<0.001) and a significant reduction in the level of IL-4 in liver tissue (P=0.025). The 1,25(OH)$_2$D$_3$ group had significant reductions in the serum levels of ALT (P<0.001), the SAF score of liver histopathology (P<0.001), the level of M1 hepatic macrophages (P<0.001), and the ratio of M1 and M2 hepatic macrophages (P=0.001), the level of IL-1β (P<0.001) and a significant increase in the level of M2 hepatic macrophages (P=0.017), the level of IL-10 (P=0.039), the level of IL-4 (P<0.001), the level of PPAR-γ (P=0.016). There were significant interactions between CDAA diet-induced NASH model and 1,25(OH)$_2$D$_3$ in serum the levels of AST and ALT (P=0.007 and P=0.008), the SAF scores of liver histopathology (P<0.001), the level of M1 hepatic macrophages (P<0.001), the level of M2 hepatic macrophages (P=0.008), the ratio of M1 and M2 of hepatic macrophages (P=0.005), the level of TNF-α (P<0.001), the level of IL-10 (P=0.038), the level of IL-4 (P<0.001) and the level of PPAR-γ (P=0.009). The correlation analysis showed that PPAR-γ was negatively correlated with the ratio of M1 and M2 hepatic macrophages (r=−0.415, P=0.044) and was positively correlated with M2 hepatic macrophages (r=0.435, P=0.033), IL-10 (r=0.433, P=0.035), and IL-4 (r=0.532, P=0.007). **Conclusion** This study shows that 1,25(OH)$_2$D$_3$ improves liver inflammation in NASH by activating PPAR-γ to regulate the phenotypic transformation of hepatic macrophages.

Key words: Non-alcoholic Steatohepatitis; Calcitriol; Inflammation; PPAR gamma; Rats, Wistar

Research funding: National Natural Science Foundation of China (81860110)

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是非酒精性脂肪性肝病进展的关键阶段[1]，近年发病率逐年增加，目前已达到约6%[2]，然而治疗方法有限[3]。研究证明，胆碱缺乏的氨基酸(choline deficient amino acid-defined，CDAA)饮食可诱导类似人类NASH肝组织病理学的肝脂肪变性、炎症等[4]。肝巨噬细胞作为肝脏中的重要免疫细胞，在NASH肝脏炎症发生发展过程中起着重要作用[5]。肝巨噬细胞可根据不同微环境刺激信号作出应答，极化为两种亚型，包括M1型和M2型巨噬细胞[6]。M1型分泌TNF-α、IL-1β等促炎因子，具有促炎作用；而M2型分泌IL-4、IL-10等抗炎因子[7]，参与抗炎作用。一般情况下M1型和M2型肝巨噬细胞彼此互相制约，趋于动态平衡。在特定的刺激下，促进M1型肝巨噬细胞极化，导致NASH炎症反应[8]，或M1型巨噬细胞转变为M2型，改善NASH进展[9]。因此，调节肝脏巨噬细胞M1和M2表型动态平衡可能是改善NASH的关键。

笔者在前期研究中发现，1,25(OH)$_2$D$_3$可以呈剂量依赖性地改善CDAA饮食诱导的NASH肝脏炎症[10]，而且目前认为其可能通过NF-κB信号通路发挥抗炎作用。研究发现过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPAR-γ)是巨噬细胞极化的主要调节因子[11]。最近有体外实验研究表明，1,25(OH)$_2$D$_3$通过提高PPAR-γ表达促进高葡萄糖诱导的体外巨噬细胞由M1型转变为M2型，给予PPAR-γ拮抗剂干预后，可拮抗1,25(OH)$_2$D$_3$对M1/M2表型的转变[12]。然而，1,25(OH)$_2$D$_3$对NASH的抗炎作用，是否通过PPAR-γ调控巨噬细胞表型转变产生，目前尚不清楚。因此，基于前期研究和最近研究结果，本研究拟建立CDAA饮食诱导的大鼠NASH模型，观察1,25(OH)$_2$D$_3$对NASH肝脏PPAR-γ水平的影响，以及对肝巨噬细胞表型、肝脏炎症的影响，阐明1,25(OH)$_2$D$_3$改善NASH的抗炎机制，以期为开发新的治疗策略提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 *实验动物* 选取6周龄Wistar大鼠24只，体质量

180～200 g，清洁级，均购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司，实验动物生产许可证：SCXK（吉）-2020-0002，实验动物使用许可证：SYXK（吉）-2020-0009。在温度为（22±2）℃，空气湿度40%～60%的清洁级动物实验室饲养，并经光照14 h和黑暗10 h循环，自由摄取食物和无菌消毒水，且在实验之前进行1周的适应性饲养。

1.2 主要试剂及主要仪器 CD163、ITGAX（CD11C）、CD68（武汉博士德生物工程有限公司）；TNF-α、IL-4 ELISA kit（江苏酶免实业有限公司）；IL-1β、IL-10 ELISA kit（武汉博士德生物工程有限公司）；逆转录酶Revert Aid Reverse Transcriptase（thermo scientific）；胆碱充足的氨基酸（choline sufficient amino acid-defined，CSAA）、CDAA（南通特洛菲饲料科技有限公司）；-4 ℃离心机（日本Hitachi公司）；脱水机、全自动切片机（德国Leica公司）；HE染色试剂和天狼星红染色试剂（本院病理科）；病理组织漂烘仪（常州市中威电子仪器有限公司）；光学显微镜（日本OLYMPUS公司）；台式高速冷冻离心机（湖南湘仪）；荧光定量PCR仪（Roche）；PCR仪（杭州博日科技）；显微镜BX51（日本奥林巴斯）。

1.3 实验设计、分组及标本采集 经过1周适应性普通饲料饲养后，24只Wistar大鼠随机分为4组，每组6只。（1）正常组：给予CSAA饮食；（2）正常+1，25（OH）$_2$D$_3$组：给予CSAA饮食+1，25（OH）$_2$D$_3$干预；（3）模型组：给予CDAA饮食；（4）模型+1，25（OH）$_2$D$_3$组：给予CDAA饮食+1，25（OH）$_2$D$_3$干预。1，25（OH）$_2$D$_3$剂量根据笔者前期研究[10]确定，每周2次，5 μg/kg腹腔注射，共12周。在实验12周末，采用颈椎脱臼法处死大鼠，经腹主动脉取血，4 ℃离心机分离血清（3 000 r/min，20 min）；选取肝右叶中部肝组织置于4%甲醛中固定，制备肝组织切片与肝组织匀浆液，余肝组织置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.4 生化检测 大鼠血清AST、ALT使用罗氏cobas c702全自动生化分析仪检测。

1.5 肝组织病理学分析 HE染色：用4%甲醛溶液固定肝组织样本，石蜡包埋后切片（4～5 μm），固定于Poly-Lysine防脱片。捞片后放置于60 ℃烤箱60 min，常规脱蜡至水，苏木素染色6 min，酒精分化，稀氨水反蓝，伊红染色8 min，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，用OLYMPUS显微镜观察。

SAF评分是目前公认的评估肝组织病理学严重程度的方法[13]，积分评估过程：由两位病理专家以双盲法随机观察5个视野区域，求得数据平均值，SAF≥3分则诊断为NASH。SAF评分标准如下[14]：（1）脂肪变性分为0分（<5%）、1分（5%～33%）、2分（34%～66%）、3分（>66%）。（2）活动度=气球样变+小叶炎症，气球样变分为0分（正常肝细胞，呈长方体形状，棱角分明，细胞质呈粉红色嗜酸性）、1分（存在细胞质苍白的圆形肝细胞簇，常呈网状，形状各异，但其大小与正常肝细胞类似）、2分（与1分气球样变的肝细胞簇内的正常肝细胞相比较，至少为其2倍大小）；小叶炎症（在低倍镜下计数炎症坏死灶）分为0分（无病灶）、1分（每个小叶≤2个病灶）、2分（每个小叶>2个病灶）。（3）肝纤维化：0分，无纤维化；1分，窦周纤维化或门静脉周围纤维化；2分，窦周纤维化合并门静脉周围纤维化；3分，桥接纤维化；4分，肝硬化。

1.6 PPAR-γ检测 用实时定量PCR（realtime-PCR，qPCR）方法检测肝组织匀浆液中PPAR-γ的mRNA表达水平，引物序列见表1，具体操作步骤如下：取20 mg肝组织样本，加入1 mL的Trizol试剂，加三氯甲烷混匀，4 ℃ 12 000 r/min离心10 min，再经过异丙醇原液、75%乙醇、沉淀等步骤进行RNA提取，使用逆转录酶Revert Aid Reverse Transcriptase进行逆转录，再经预变性、循环、末端延伸、溶解曲线等步骤进行PCR扩增，采用$^{\Delta\Delta}$CT法对数据进行处理。

1.7 肝组织中M1型（CD68+CD11c）和M2型（CD68+CD163）肝巨噬细胞双阳性细胞检测 切片常规脱蜡至水。微波热修复抗原，滴加山羊血清封闭液（原液用PBS按1∶9稀释），37 ℃孵育30 min。实验片滴加一抗①（1∶100），4 ℃过夜，37 ℃复温30 min，PBS（pH：7.2～7.6）清洗5 min×3次。滴加DyLight 488荧光素标记羊抗兔37 ℃孵育45 min。PBS（pH：7.2～7.6）清洗。实验片滴加一抗②（1∶200），操作过程同一抗①。滴加DyLight 594荧光素标记羊抗兔37 ℃孵育45 min，滴加DAPI染色液，室温孵育3 min。PBS（pH：7.2～7.6）清洗。抗荧光淬灭封片剂封片。通过荧光显微镜观察、拍照或扫描仪做全景扫

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	序列（5′-3′）	长度	参考序列号
PPAR-γ	F：CCTTTACCACGGTTGATTTCTC	141 bp	NM_013124.3
	R：CAGGCTCTACTTTGATCGCACT		
GAPDH	F：TTCAACGGCACAGTCAAGG	114 bp	NM_017008.4
	R：CTCAGCACCAGCATCACC		

描，高倍镜（400倍）选取3个视野。采用ImageJ软件计数M1型和M2型双阳性细胞数，求取平均值。

1.8 肝组织炎症因子IL-1β、TNF-α、IL-10、IL-4检测 严格按照ELISA检测试剂盒说明书对肝组织匀浆液中的IL-1β、TNF-α、IL-10、IL-4水平进行检测。

1.9 统计学方法 使用IBM SPSS 26.0统计软件进行数据分析，计量资料用$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用双因素方差分析，进一步比较采用LSD-t多重检验；采用Pearson相关法进行相关性分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1，25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠血清生化指标的影响

2.1.1 大鼠AST水平的双因素方差分析结果 CDAA饮食诱导的NASH模型显著增加其水平（F=6.518，P=0.019），1，25(OH)$_2$D$_3$未显著影响其水平（F=2.930，P>0.05），在1，25(OH)$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠模型之间具有交互作用（F=8.962，P=0.007）。与正常组相比，模型组AST水平显著升高（P=0.001）；与模型组相比，模型+1，25(OH)$_2$D$_3$组AST水平显著降低（P=0.003）。结果表明，CDAA饮食诱导的NASH大鼠血清AST水平升高，而补充1，25(OH)$_2$D$_3$后逆转了这一趋势（图1）。

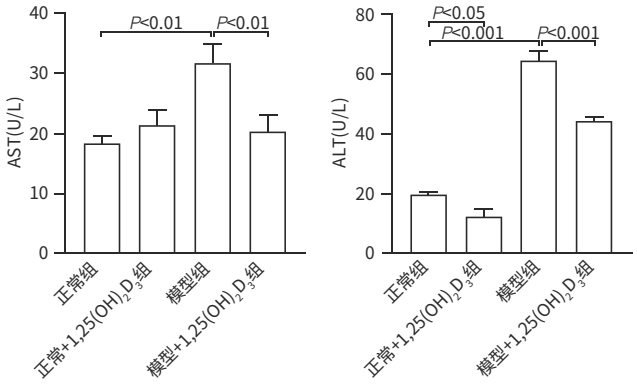


图1 1，25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠血清生化指标的影响

Figure 1 Effects of 1，25(OH)$_2$D$_3$ on serum biochemical levels in NASH rats

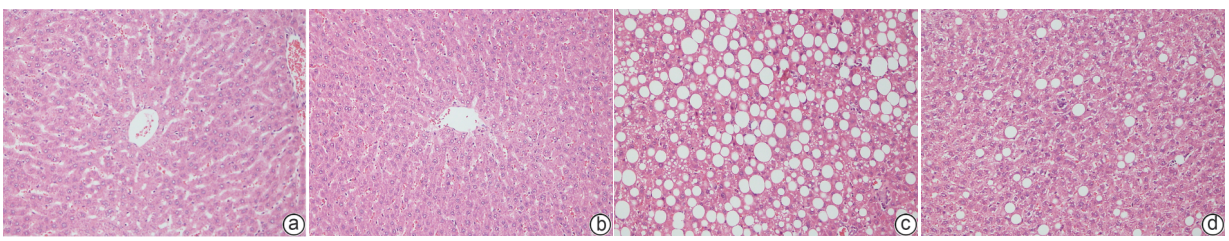
2.1.2 大鼠ALT水平的双因素方差分析结果 CDAA饮食诱导的NASH模型显著增加其水平（F=311.657，P<0.001），1，25(OH)$_2$D$_3$显著降低其水平（F=39.569，P<0.001），在1，25(OH)$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠之间具有交互作用（F=8.683，P=0.008）。与正常组相比，模型组ALT水平显著升高（P<0.001），正常+1，25(OH)$_2$D$_3$组ALT水平降低（P=0.028）；与模型组相比，模型+1，25(OH)$_2$D$_3$组ALT显著降低（P<0.001）。结果表明，CDAA饮食诱导的NASH大鼠血清ALT水平升高，而补充1，25(OH)$_2$D$_3$后显著降低了血清ALT水平（图1）。

2.2 1，25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织病理学的影响 正常组、正常+1，25(OH)$_2$D$_3$组大鼠肝小叶结构清晰，可见呈放射状排列的肝细胞，并且以中央静脉为中心分布，无脂滴形成，无炎细胞浸润，无肝细胞坏死。与正常组相比，模型组大鼠肝细胞可见显著增多的脂肪变性，且以大泡为主要分布，灶状坏死病灶和炎细胞显著增多；与模型组相比，模型+1，25(OH)$_2$D$_3$组大鼠肝组织脂肪变性、气球样变以及点状坏死病灶显著减少（图2）。

实验中大鼠均未出现肝纤维化表现，故SAF评分采用脂肪变性+活动度评估。大鼠肝组织病理学SAF评分的双因素方差分析结果表明：CDAA饮食诱导的NASH模型SAF评分显著增加（>3分）（F=344.007，P<0.001）；1，25(OH)$_2$D$_3$干预后其显著降低（<3分）（F=84.866，P<0.001），在1，25(OH)$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠之间存在显著交互作用（F=84.870，P<0.001）。与正常组相比，模型组SAF评分显著增加（P<0.001）；与模型组相比，模型+1，25(OH)$_2$D$_3$组SAF评分显著降低（P<0.001）。结果表明，CDAA饮食诱导的大鼠属于NASH阶段，补充1，25(OH)$_2$D$_3$后大鼠逆转为脂肪肝阶段（表2）。

2.3 1，25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝巨噬细胞及炎症因子的影响

2.3.1 1，25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织巨噬细胞的影响 （1）大鼠肝组织M1型巨噬细胞的双因素方差分析表明：CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型M1型巨噬细胞



注：a，正常组；b，正常+1，25(OH)$_2$D$_3$组；c，模型组；d，模型+1，25(OH)$_2$D$_3$组。

图2 1，25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织病理学的影响（HE染色，×200）

Figure 2 Effect of 1，25(OH)$_2$D$_3$ on liver histopathology in NASH rats（HE staining，×200）

表2 1,25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织病理学以及SAF评分的影响

Table 2 Effects of 1,25(OH)$_2$D$_3$ on hepatic histology and scores

分组	脂肪变性(分)	气球样变(分)	小叶炎症(分)	活动度(分)	SAF评分(分)
正常组	0	0	0	0	0
正常+1,25(OH)$_2$D$_3$组	0	0	0	0	0
模型组	2.67±0.52[1)]	1.09±0.09[1)]	1.33±0.26[1)]	2.42±0.33[1)]	5.09±0.84[1)]
模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组	1.00±0.02[2)]	0.23±0.23[2)]	0.48±0.12[2)]	0.71±0.31[2)]	1.71±0.31[2)]

注：与正常组相比，1）P<0.001；与模型组相比，2）P<0.001。

显著增加（F=178.334，P<0.001），1,25(OH)$_2$D$_3$干预后显著减少（F=119.392，P<0.001），在1,25(OH)$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠模型之间具有显著的交互作用（F=63.061，P<0.001）。与正常组相比，模型组M1型巨噬细胞显著增加（P<0.001）；与正常+1,25(OH)$_2$D$_3$组相比，模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组M1型巨噬细胞显著增加（P=0.001）；与正常组相比，正常+1,25(OH)$_2$D$_3$组M1型巨噬细胞减少（P=0.048）；与模型组相比，模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组M1型巨噬细胞显著减少（P<0.001）。结果表明，CDAA饮食诱导的NASH大鼠肝组织M1型巨噬细胞显著增加，补充1,25(OH)$_2$D$_3$后显著降低了肝组织M1型巨噬细胞水平（图3a、c）。

（2）大鼠肝组织M2型巨噬细胞的双因素方差分析表明：CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型M2型巨噬细胞无显著变化（F=0.206，P>0.05），1,25(OH)$_2$D$_3$显著增加其表达（F=6.805，P=0.017），在1,25(OH)$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠之间具有交互作用（F=8.598，P=0.008）。与模型组相比，模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组M2型巨噬细胞显著增加（P=0.001）。结果表明，补充1,25(OH)$_2$D$_3$后显著增加了CDAA饮食诱导的NASH大鼠肝组织M2型巨噬细胞水平（图3b、c）。

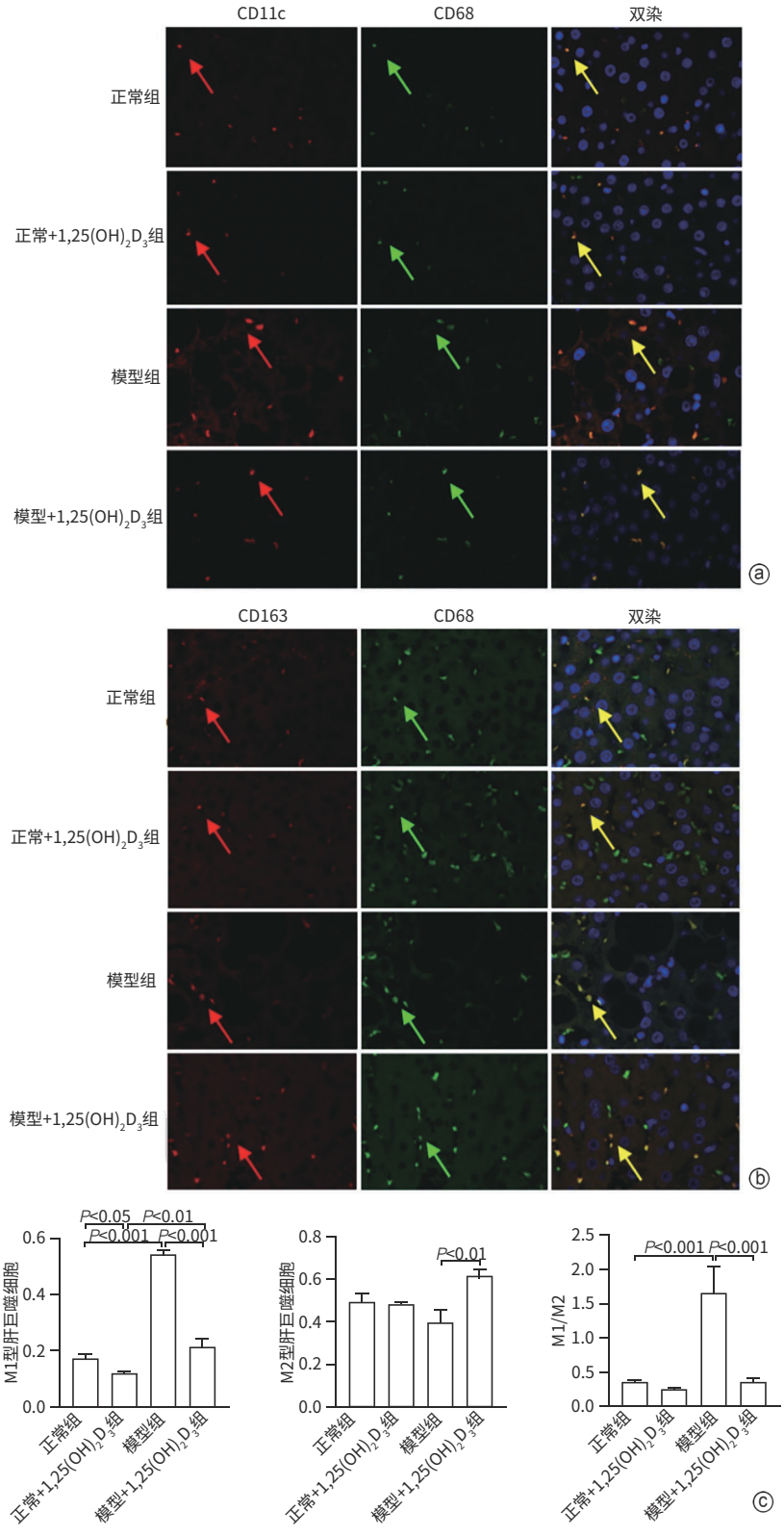
（3）大鼠肝组织巨噬细胞M1/M2表型比值双因素方差分析表明：CDAA饮食诱导的NASH模型M1/M2表型比值显著增加（F=13.672，P=0.001），1,25(OH)$_2$D$_3$干预后其比值降低（F=13.802，P=0.001），在1,25(OH)$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠之间具有交互作用（F=10.055，P=0.005）。与正常组相比，模型组M1/M2表型比值显著增加（P<0.001）；与模型组相比，模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组M1/M2表型比值显著降低（P<0.001）。结果表明，CDAA饮食诱导的NASH大鼠巨噬细胞以M1表型为主，补充1,25(OH)$_2$D$_3$后显著降低了CDAA饮食诱导的大鼠肝组织巨噬细胞M1/M2型比值，巨噬细胞以M2表型为主（图3c）。

2.3.2 1,25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织促炎因子水平的影响 （1）大鼠肝组织TNF-α水平的双因素方差分析结果表明：CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型其水平显著升高（F=118.11，P<0.001），1,25(OH)$_2$D$_3$未显著影响其水平（F=2.362，P>0.05），在1,25(OH)$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠之间具有交互作用（F=40.183，P<0.001）。与正常组相比，模型组大鼠TNF-α显著升高（P<0.001）；与正常+1,25(OH)$_2$D$_3$组相比，模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组大鼠TNF-α显著升高（P=0.004）；与模型组相比，模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组大鼠TNF-α显著降低（P=0.003）。结果表明，1,25(OH)$_2$D$_3$对TNF-α水平无显著影响，而CDAA饮食诱导的NASH大鼠肝组织TNF-α水平显著升高，补充1,25(OH)$_2$D$_3$后可以逆转（图4）。

（2）大鼠肝组织IL-1β水平的双因素方差分析结果表明：CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型IL-1β水平无显著变化（F=0.530，P>0.05），1,25(OH)$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠之间也无显著交互作用（F=0.640，P>0.05），而1,25(OH)$_2$D$_3$可降低其水平（F=31.250，P<0.001）。与正常组相比，正常+1,25(OH)$_2$D$_3$组IL-1β显著降低（P=0.003）；与模型组相比，模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组IL-1β显著降低（P<0.001）。结果表明，1,25(OH)$_2$D$_3$可显著降低IL-1β水平，但IL-1β在CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型中无显著变化（图4）。

2.3.3 1,25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织抗炎因子水平的影响 （1）大鼠肝组织IL-10水平的双因素方差分析结果表明：CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型其水平无显著变化（F=4.279，P>0.05），1,25(OH)$_2$D$_3$可提高其水平（F=4.866，P=0.039），在1,25(OH)$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠之间具有交互作用（F=4.946，P=0.038）。与模型组相比，模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组IL-10显著升高（P=0.005）；与正常+1,25(OH)$_2$D$_3$组相比，模型+1,25(OH)$_2$D$_3$组IL-10升高（P=0.007）。结果表明，1,25(OH)$_2$D$_3$可提高肝组织IL-10水平，补充1,25(OH)$_2$D$_3$后可显著提高CDAA饮食诱导的NASH大鼠肝组织IL-10水平，然而CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型IL-10水平无显著变化（图5）。

（2）大鼠肝组织IL-4水平的双因素方差分析结果表明：CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型其水平明显降低



注：a，1，25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织CD68、CD11c以及双染细胞的影响；b，1，25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织CD68、CD163以及双染细胞的影响；c，1，25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织M1型、M2型肝巨噬细胞及M1/M2表型比值的影响。绿色箭头指CD68细胞；红色箭头指CD11c或CD163细胞；黄色箭头指双染细胞。

图3　1，25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织巨噬细胞的影响

Figure 3　Effect of 1，25(OH)$_2$D$_3$ on macrophages in liver tissue of NASH rats

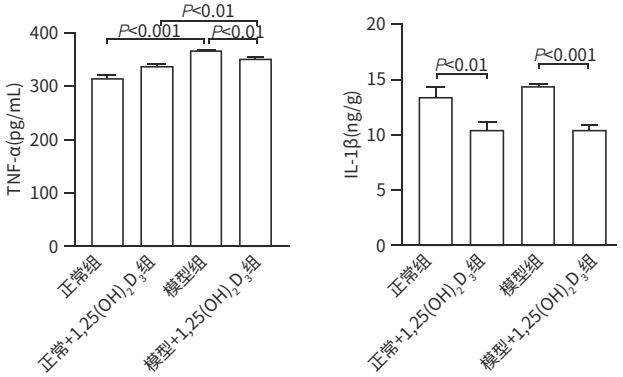


图4　1,25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织促炎因子水平的影响

Figure 4　Effect of 1,25(OH)$_2$D$_3$ on the level of pro-inflammatory factors in liver tissue of NASH rats

（F=5.881，P=0.025），1，25（OH）$_2$D$_3$可提高其水平（F=240.514，P<0.001），在1，25（OH）$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠之间具有交互作用（F=75.914，P<0.001）。与正常组相比，模型组IL-4水平显著降低（P<0.001），正常+1，25（OH）$_2$D$_3$组IL-4水平升高（P<0.001）；与正常+1，25（OH）$_2$D$_3$组相比，模型+1，25（OH）$_2$D$_3$组IL-4水平升高（P<0.001）；与模型组相比，模型+1，25（OH）$_2$D$_3$组IL-4水平显著升高（P<0.001）。结果表明，CDAA饮食诱导的NASH大鼠肝组织IL-4表达降低，补充1，25（OH）$_2$D$_3$后显著升高了CDAA饮食诱导的大鼠肝组织IL-4水平（图5）。

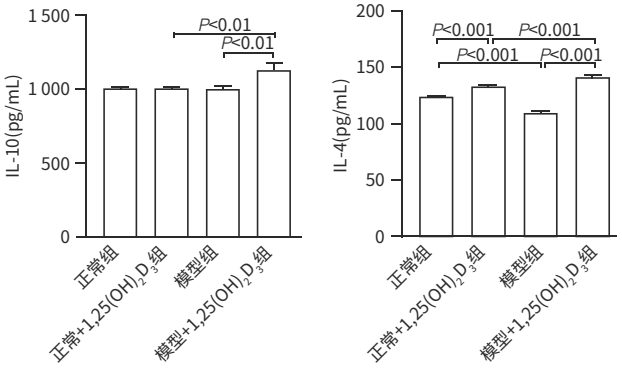


图5　1,25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织抗炎因子水平的影响

Figure 5　Effect of 1,25(OH)$_2$D$_3$ on the level of anti-inflammatory factors in liver tissue of NASH rats

2.4　1，25（OH）$_2$D$_3$对NASH大鼠PPAR-γ水平的影响　大鼠肝组织PPAR-γ水平的双因素方差分析结果表明：CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型其水平无显著变化（F=0.231，P>0.05），1，25（OH）$_2$D$_3$可提高其水平（F=6.967，P=0.016），在1，25（OH）$_2$D$_3$和饮食诱导NASH大鼠之间具有交互作用（F=8.342，P=0.009）。与正常组相比，模型组PPAR-γ水平显著下降（P=0.027）；与模型组相比，模型+1，25（OH）$_2$D$_3$组PPAR-γ水平显著升高（P=0.001）。结果表明，1，25（OH）$_2$D$_3$干预后显著升高了CDAA饮食诱导的NASH大鼠PPAR-γ水平，然而CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型PPAR-γ水平无显著变化（图6）。

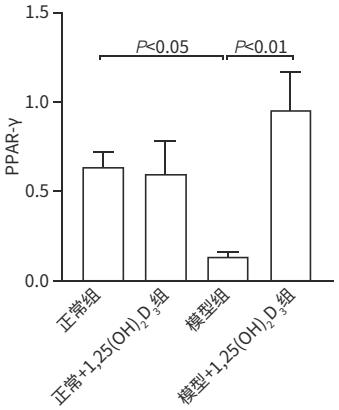


图6　1,25(OH)$_2$D$_3$对NASH大鼠肝组织PPAR-γ水平的影响

Figure 6　Effect of 1,25(OH)$_2$D$_3$ on PPAR-γ level in liver tissue of NASH rats

2.5　肝组织PPAR-γ水平与巨噬细胞以及M1/M2表型比值、炎症因子的相关性分析　PPAR-γ与肝巨噬细胞M1/M2表型比值、IL-1β呈负相关（r值分别为-0.415、-0.471，P值分别为0.044、0.020）；与M2型肝巨噬细胞、IL-10、IL-4呈正相关（r值分别为0.435、0.433、0.532，P值分别为0.033、0.035、0.007）。

3　讨论

既往研究报道，CDAA饮食诱导的NASH模型血清转氨酶显著升高[15-16]，肝组织病理学表现出以大泡为主的混合型肝脂肪变性，引起不同程度的炎症[17-18]。本研究结果发现，CDAA饮食诱导的NASH大鼠血清ALT、AST显著升高，肝组织病理学SAF评分明显提高，肝组织抗炎因子IL-4分泌显著减少。这表明，CDAA饮食可引起类似人类NASH的肝组织损伤和炎症。

肝巨噬细胞表型变化在NASH的发展中扮演着关键角色[19]。既往研究报道，NASH患者与正常人相比肝脏巨噬细胞M1/M2表型比值增加[20]，在本研究中也观察到相似的结果。本研究中CDAA饮食诱导的NASH模型M1型肝巨噬细胞表达显著增加，肝巨噬细胞M1/M2表型比值显著升高，表明CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型肝脏以M1型肝巨噬细胞为主。此外，既往研究表明，CDAA饮食诱导NASH模型中促炎因子TNF-α显著增加[16-17]，本研究结果与其一致，证实该模型成功诱导了NASH炎症反应。

既往研究已证明1，25(OH)$_2$D$_3$具有抗炎作用[10,21]。而且1，25(OH)$_2$D$_3$缺乏与NASH患者肝组织病理学的恶化如小叶炎症的加剧相关[22]。研究显示，1，25(OH)$_2$D$_3$可以显著降低啮齿类动物血清AST、ALT水平[23-24]，显著改善肝组织病理学[25-26]。笔者在前期研究中也发现，1，25(OH)$_2$D$_3$可以呈剂量依赖性的降低CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型的血清AST、ALT水平及肝脏组织病理学评分，从而改善肝脏炎症，然而尚不清楚这种作用是否为特异性[10]。因此，本研究通过双因素方差分析方法观察补充1，25(OH)$_2$D$_3$对CDAA饮食诱导的NASH大鼠肝损伤及肝组织病理学的影响。研究结果证实，补充1，25(OH)$_2$D$_3$可拮抗CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型肝损伤和肝组织病理学的加重，改善肝脏炎症。

研究表明，1，25(OH)$_2$D$_3$可抑制链脲菌素诱导的糖尿病大鼠的M1型巨噬细胞表达，提高M2表型巨噬细胞表达，促进M1型巨噬细胞向M2型转变[27]。1，25(OH)$_2$D$_3$可显著降低蛋氨酸胆碱缺乏饮食（methionine choline deficiency diet，MCD）诱导的NASH模型肝组织IL-1β水平表达[28]。此外，补充1，25(OH)$_2$D$_3$可显著升高糖尿病患者血清IL-10和IL-4水平[29-30]。本研究结果显示，1，25(OH)$_2$D$_3$显著增加了肝组织M2型巨噬细胞表达，降低了肝组织M1型巨噬细胞和M1/M2表型比值；1，25(OH)$_2$D$_3$干预后促炎因子IL-1β水平显著降低，抗炎因子IL-10和IL-4水平显著升高，与以往研究报道结果一致。进一步研究还显示，1，25(OH)$_2$D$_3$与NASH模型在M1型巨噬细胞、M2型巨噬细胞、M1/M2表型比值、TNF-α、IL-10及IL-4中存在显著交互作用。这表明1，25(OH)$_2$D$_3$可促进肝巨噬细胞表型由M1型向M2型转变，这种转变可能是1，25(OH)$_2$D$_3$抗炎作用的一个关键机制。上述发现均证实1，25(OH)$_2$D$_3$在抗炎过程中的潜在作用。

PPAR-γ是巨噬细胞M2型极化的主要调节因子。在国外一项以高葡萄糖诱导RAW264.7巨噬细胞的体外研究中发现，1，25(OH)$_2$D$_3$促进PPAR-γ表达，促进M1型巨噬细胞向M2型转变，并且PPAR-γ拮抗剂干预后，1，25(OH)$_2$D$_3$诱导的M2型巨噬细胞极化被消除[12]。上述结果提示PPAR-γ受维生素D$_3$调控，但目前尚无报道1，25(OH)$_2$D$_3$是否通过调控PPAR-γ对NASH肝脏起保护作用。本研究初步探讨发现，给予1，25(OH)$_2$D$_3$干预后肝组织PPAR-γ显著升高，进一步研究发现1，25(OH)$_2$D$_3$与NASH模型在肝组织PPAR-γ中存在显著交互作用，且PPAR-γ与肝巨噬细胞M1/M2表型比值、肝组织IL-1β水平呈显著负相关，与肝组织M2型巨噬细胞、IL-4、IL-10水平呈显著正相关。然而，NASH肝组织PPAR-γ水平与TNF-α水平无相关性，推测TNF-α水平的改变主要受其上游NF-κB水平的影响。综上，1，25(OH)$_2$D$_3$可能通过提高PPAR-γ表达，逆转CDAA饮食诱导的NASH大鼠模型肝组织M2型巨噬细胞向M1型转变，提高抗炎因子水平，起到抗炎作用。

综上所述，本研究结果表明：CDAA饮食诱导的NASH大鼠肝组织巨噬细胞以M1型为主，以TNF-α为主的炎症因子含量增加，促进NASH肝脏炎症反应；1，25(OH)$_2$D$_3$促进CDAA饮食诱导的NASH大鼠肝组织PPAR-γ表达，促使肝巨噬细胞M1型转换为M2型，增加肝组织IL-10、IL-4水平，减少了促炎因子IL-1β的表达，从而改善NASH肝脏炎症，延缓疾病进展。后续将进一步通过给予PPAR-γ拮抗剂观察1，25(OH)$_2$D$_3$对CDAA饮食诱导的NASH肝脏M1/M2表型转变以及肝脏炎症的影响，明确1，25(OH)$_2$D$_3$通过PPAR-γ调控巨噬细胞表型转变的作用机制，以期为维生素D$_3$防治NASH患者的炎症提供理论依据，为临床防治NASH提供新的思路和方法。

伦理学声明：动物的实验流程严格遵循中国实验动物管理协会的伦理原则，并于2023年9月11日经由延边大学实验动物福利伦理委员会审批，批号：YD202309110024。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：朱海洋负责分析数据、撰写论文和参与课题设计；崔京淑负责病理实验数据统计；杨柳、周梦婷、童戬参与实验操作、数据统计，修改论文；韩红梅负责课题设计、拟定写作思路，指导撰写文章并最后定稿。

参考文献：

[1] MA KF, CHEN YH, LIANG XG, et al. Inhibition of 5-lipoxygenase inhibitor zileuton in high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease progression model[J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(11): 1207-1212. DOI: 10.22038/IJBMS.2017.9482.

[2] YOUNOSSI ZM, KOENIG AB, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. Hepatology, 2016, 64(1): 73-84. DOI: 10.1002/hep.28431.

[3] TAKEGOSHI K, HONDA M, OKADA H, et al. Branched-chain amino acids prevent hepatic fibrosis and development of hepatocellular carcinoma in a non-alcoholic steatohepatitis mouse model[J]. Oncotarget, 2017, 8(11): 18191-18205. DOI: 10.18632/oncotarget.15304.

[4] MIURA K, ISHIOKA M, IIJIMA K. The roles of the gut microbiota and toll-like receptors in obesity and nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Obes Metab Syndr, 2017, 26(2): 86-96. DOI: 10.7570/jomes.2017.26.2.86.

[5] REMMERIE A, MARTENS L, SCOTT CL. Macrophage subsets in obesity, aligning the liver and adipose tissue[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 259. DOI: 10.3389/fendo.2020.00259.

[6] DUARTE N, COELHO IC, PATARRÃO RS, et al. How inflammation impinges on NAFLD: A role for kupffer cells[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 984578. DOI: 10.1155/2015/984578.

[7] RANNOU E, FRANÇOIS A, TOULLEC A, et al. In vivo evidence for

an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury[J]. Sci Rep, 2015, 5: 15738. DOI: 10.1038/srep15738.
[8] TANG DS, CAO F, YAN CS, et al. Extracellular vesicle/macrophage axis: Potential targets for inflammatory disease intervention[J]. Front Immunol, 2022, 13: 705472. DOI: 10.3389/fimmu.2022.705472.
[9] NI YH, NAGASHIMADA M, ZHAN LL, et al. Prevention and reversal of lipotoxicity-induced hepatic insulin resistance and steatohepatitis in mice by an antioxidant carotenoid, β-cryptoxanthin[J]. Endocrinology, 2015, 156(3): 987-999. DOI: 10.1210/en.2014-1776.
[10] HAN H, CUI M, YOU X, et al. A role of 1, 25(OH)$_2$D$_3$ supplementation in rats with nonalcoholic steatohepatitis induced by choline-deficient diet[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2015, 25(6): 556-561. DOI: 10.1016/j.numecd.2015.02.011.
[11] LUO WJ, XU QY, WANG Q, et al. Effect of modulation of PPAR-γ activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Sci Rep, 2017, 7: 44612. DOI: 10.1038/srep44612.
[12] ZHANG XL, ZHOU M, GUO YF, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D$_3$ promotes high glucose-induced M1 macrophage switching to M2 via the VDR-PPARγ signaling pathway[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 157834. DOI: 10.1155/2015/157834.
[13] European Association for the Study of the Liver, European Association for the Study of Diabetes, European Association for the Study of Obesity. EASL-EASD-EASO clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2016, 64(6): 1388-1402. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.11.004.
[14] BEDOSSA P, PATHOLOGY CONSORTIUM FLIP. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2014, 60(2): 565-575. DOI: 10.1002/hep.27173.
[15] YANG YM, WANG ZJ, MATSUDA M, et al. Inhibition of hyaluronan synthesis by 4-methylumbelliferone ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in choline-deficient L-amino acid-defined diet-induced murine model[J]. Arch Pharm Res, 2021, 44(2): 230-240. DOI: 10.1007/s12272-021-01309-7.
[16] NAKANISHI K, KAJI K, KITADE M, et al. Exogenous administration of low-dose lipopolysaccharide potentiates liver fibrosis in a choline-deficient l-amino-acid-defined diet-induced murine steatohepatitis model [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 2724. DOI: 10.3390/ijms20112724.
[17] KUCSERA D, TÓTH VE, GERGŐ D, et al. Characterization of the CDAA diet-induced non-alcoholic steatohepatitis model: Sex-specific differences in inflammation, fibrosis, and cholesterol metabolism in middle-aged mice[J]. Front Physiol, 2021, 12: 609465. DOI: 10.3389/fphys.2021.609465.
[18] POVERO D, EGUCHI A, LI HY, et al. Circulating extracellular vesicles with specific proteome and liver microRNAs are potential biomarkers for liver injury in experimental fatty liver disease[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e113651. DOI: 10.1371/journal.pone.0113651.
[19] XU L, KITADE H, NI YH, et al. Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease[J]. Biomolecules, 2015, 5(3): 1563-1579. DOI: 10.3390/biom5031563.
[20] VONGHIA L, MAGRONE T, VERRIJKEN A, et al. Peripheral and hepatic vein cytokine levels in correlation with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-related metabolic, histological, and haemodynamic features[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0143380. DOI: 10.1371/journal.pone.0143380.
[21] CIMINI FA, BARCHETTA I, CAROTTI S, et al. Relationship between adipose tissue dysfunction, vitamin D deficiency and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(19): 3407-3417. DOI: 10.3748/wjg.v23.i19.3407.
[22] NELSON JE, ROTH CL, WILSON LA, et al. Vitamin D deficiency is associated with increased risk of non-alcoholic steatohepatitis in adults with non-alcoholic fatty liver disease: Possible role for MAPK and NF-κB?[J]. Am J Gastroenterol, 2016, 111(6): 852-863. DOI: 10.1038/ajg.2016.51.
[23] ZHANG HW, LIU YM, FANG X, et al. Vitamin D$_3$ protects mice from diquat-induced oxidative stress through the NF-κB/Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6776956. DOI: 10.1155/2021/6776956.
[24] KHEDER R, HOBKIRK J, SAEED Z, et al. Vitamin D$_3$ supplementation of a high fat high sugar diet ameliorates prediabetic phenotype in female LDLR$^{-/-}$ and LDLR$^{+/+}$ mice[J]. Immun Inflamm Dis, 2017, 5(2): 151-162. DOI: 10.1002/iid3.154.
[25] REDA D, ELSHOPAKEY GE, ALBUKHARI TA, et al. Vitamin D3 alleviates nonalcoholic fatty liver disease in rats by inhibiting hepatic oxidative stress and inflammation via the SREBP-1-c/PPARα-NF-κB/IR-S2 signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1164512. DOI: 10.3389/fphar.2023.1164512.
[26] YIN Y, YU ZW, XIA M, et al. Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism [J]. Eur J Clin Invest, 2012, 42(11): 1189-1196. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x.
[27] ZHANG XL, GUO YF, SONG ZX, et al. Vitamin D prevents podocyte injury via regulation of macrophage M1/M2 phenotype in diabetic nephropathy rats[J]. Endocrinology, 2014, 155(12): 4939-4950. DOI: 10.1210/en.2014-1020.
[28] MU YM, LI JT, KANG JH, et al. A lipid-based nanocarrier containing active vitamin D$_3$ ameliorates NASH in mice via direct and intestine-mediated effects on liver inflammation[J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(9): 1413-1420. DOI: 10.1248/bpb.b20-00432.
[29] SHAB-BIDAR S, NEYESTANI TR, DJAZAYERY A, et al. Improvement of vitamin D status resulted in amelioration of biomarkers of systemic inflammation in the subjects with type 2 diabetes[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2012, 28(5): 424-430. DOI: 10.1002/dmrr.2290.
[30] KOMISARENKO YI, BOBRYK MI. Vitamin D deficiency and immune disorders in combined endocrine pathology[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9: 600. DOI: 10.3389/fendo.2018.00600.

收稿日期：2024-07-01；**录用日期：**2024-09-30
本文编辑：刘晓红

引证本文：ZHU HY, CUI JS, YANG L, et al. Mechanism of 1, 25(OH)$_2$D$_3$ improving liver inflammation in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(2): 254-262.
朱海洋, 崔京淑, 杨柳, 等. 1,25(OH)$_2$D$_3$改善胆碱缺乏氨基酸饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎大鼠模型肝脏炎症的机制分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(2): 254-262.