

# 轻断食对高脂高胆固醇诱导的非酒精性脂肪性 肝炎大鼠焦亡的影响

张文慧 胡鑫丽 宋维芳\*

(山西医科大学汾阳学院, 汾阳 032200)

**摘要** 该实验旨在研究轻断食对高脂高胆固醇诱导的非酒精性脂肪肝大鼠焦亡的影响。该研究将SD大鼠随机分为正常饮食饲喂的对照组、高脂高胆固醇饲喂诱导非酒精性脂肪肝炎模型组以及其相对应的轻断食组, 饲喂16周后, 收集大鼠腹主动脉血浆和肝脏标本, 检测血浆ALT与AST的活性; 检测肝脏总胆固醇(total cholesterol, TC)与甘油三酯(triglyceride, TG)的含量; HE和Masson三色染色观察肝脏病理变化; Western blot与qRT-PCR检测各组肝脏组织焦亡相关蛋白与基因半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶1(Caspase-1)、消化道皮肤素D(gasdermin D, GSDMD)和白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1beta, IL-1 $\beta$ )的表达。与对照组相比, 模型组肝细胞脂肪变性明显, 出现纤维沉积, 血浆ALT、AST和肝脏TC、TG含量明显升高, 焦亡相关蛋白与基因Caspase-1、GSDMD和IL-1 $\beta$ 含量明显升高( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 轻断食组细胞脂肪变性显著减轻, 无大量纤维沉积, 血浆ALT、AST和肝脏TC、TG含量明显降低, 焦亡相关蛋白与基因Caspase-1、GSDMD和IL-1 $\beta$ 含量明显降低( $P < 0.05$ )。实验表明, 轻断食可能通过抑制Caspase-1、GSDMD和IL-1 $\beta$ 介导的细胞焦亡而改善非酒精性脂肪性肝炎。

**关键词** 轻断食; 非酒精性脂肪性肝炎; 焦亡; 胆固醇

## Effect of Intermittent Fasting on Pyroptosis with Non-Alcoholic Steatohepatitis Induced by High Fat and High Cholesterol in Rats

ZHANG Wenhui, HU Xinli, SONG Weifang\*

(Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China)

**Abstract** The aim of this study was to investigate the effect of intermittent fasting on pyroptosis in rats with non-alcoholic steatohepatitis. SD rats were randomly divided into the control group, high-fat and high-cholesterol-fed NASH model group and intermittent fasting group. Plasma and liver samples were collected to detect the activities of ALT, AST, TC and TG after 16 weeks. The pathological changes of liver were observed by HE and Masson staining. The expression of pyroptosis-related proteins and genes such as Caspase-1, GSDMD and IL-1 $\beta$  in liver tissues were detected by Western blot and qRT-PCR. Compared with the control group, hepatocyte steatosis and fiber deposition were observed in the NASH model group. Compared with the control group, the contents of ALT, AST, TC and TG in NASH model group were significantly increased, and the contents of proteins and

收稿日期: 2021-03-05 接受日期: 2021-05-06

中国肝炎防治基金会天晴肝病研究基金(批准号: TQGB20120013)和山西医科大学汾阳学院院级科研项目(批准号: 2018C07、2020B06)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13994808560, E-mail: bsswf@163.com

Received: March 5, 2021 Accepted: May 6, 2021

This work was supported by the Tianqing Liver Disease Research Fund Research Project of China Hepatitis Prevention Foundation (Grant No.TQGB20120013) and the University-Level Research Project of Fenyang College of Shanxi Medical University (Grant No.2018C07, 2020B06)

\*Corresponding author. Tel: +86-13994808560, E-mail: bsswf@163.com

genes of Caspase-1, GSDMD and IL-1 $\beta$  were significantly increased ( $P<0.05$ ). By contrast with NASH model group, hepatocytes steatosis and fibrous deposition were visibly reduced in the intermittent fasting group. Different from the NASH model group, the contents of ALT, AST in plasma and TC and TG in liver of rats were significantly reduced, and the contents of proteins and genes of Caspase-1, GSDMD and IL-1 $\beta$  were decreased in the intermittent fasting group ( $P<0.05$ ). Experimental investigation showed that intermittent fasting might alleviate the occurrence and development of nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting hepatocyte pyroptosis mediated by Caspase-1, GSDMD and IL-1 $\beta$ .

**Keywords** intermittent fasting; non-alcoholic steatohepatitis; pyroptosis; cholesterol

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是目前最常见的慢性肝病,全球患病率为25.2%,最高的是中东(32%)和南美(31%),其次是亚洲(27%)、美国(24%)、欧洲(23%)和非洲(14%)<sup>[1]</sup>。非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是NAFLD中较严重的一种类型,以肝脏脂肪变性、肝脏炎症和肝细胞损伤为特征,若不加以干预将不可逆地发展为肝硬化甚至肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[2]</sup>。尽管NASH的许多研究正在进行中,但治疗NASH的有效药物仍然缺乏<sup>[3]</sup>。目前对于NASH发生发展的机制尚不完全清楚。炎症是造成NASH肝损伤的关键因素<sup>[4]</sup>。研究表明,NASH的发生发展与肝细胞死亡增加有关<sup>[5]</sup>。

焦亡是一种新被发现的炎症相关的细胞死亡方式,主要通过炎症小体介导包含半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)在内的多种Caspase的激活,造成包括消化道皮肤素D(gasdermin D, GSDMD)在内的多种Gasdermin家族成员发生剪切,导致细胞穿孔,进而引起细胞死亡<sup>[6]</sup>。GSDMD是Caspase-1的下游基因,是细胞焦亡的执行分子<sup>[7-8]</sup>。GSDMD也可以通过控制白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1beta, IL-1 $\beta$ )的释放来发挥其焦亡的执行功能<sup>[9-10]</sup>。已有研究表明,GSDMD驱动的焦亡在NASH的发病机制中起关键作用,为治疗NASH提供了新思路<sup>[11]</sup>。

轻断食也被称为间歇性禁食(intermittent fasting, IF),是一种利用短期禁食来控制饮食,以改善身体结构和整体健康的进食方式<sup>[12]</sup>。在各种形式的轻断食中,隔日禁食是最常见饮食干预之一,其定义为36 h不摄入热量,然后间隔12 h随意进食<sup>[13]</sup>。这种饮食是在小鼠和大鼠中间歇性禁食研究中最常用的方案。这种饮食可以减少氧化应激,激活自噬,从而可以延长啮齿动物的寿命,降低与年龄有关的疾病的发病率<sup>[14-15]</sup>。研究表明,在啮齿动物中,不同形式的轻断食通过降低血液葡萄糖、胆固醇、甘油三酯浓

度,心率和血压来降低心血管患病风险<sup>[16]</sup>。即使摄入高脂肪饮食,这种饮食干预也可以预防或改善肥胖、胰岛素抵抗、肝脏脂肪变性,降低胆固醇含量以及炎症<sup>[17]</sup>。但目前轻断食改善肝脏脂肪变性的机制尚不清楚,本实验通过构建高脂高胆固醇诱导的NASH模型,研究轻断食对高脂高胆固醇诱导的非酒精性脂肪肝炎大鼠焦亡的作用,为临床NASH的防治提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性SD大鼠,6周龄,体重180~220 g,购于山西医科大学实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK(晋)2019-0005,本实验经本校伦理协会审核并通过(2019-075),并按照3R原则给予大鼠人道的关怀。

1.1.2 主要试剂 谷丙转氨酶(aspartate transaminase, ALT)与谷草转氨酶(alanine transaminase, AST)活性测试盒、总胆固醇(total cholesterol, TC)与甘油三酯(triglyceride, TG)含量测试盒购于南京建成科技有限公司;马松染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 和GAPDH抗体购于武汉爱博泰克生物科技有限公司;Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 和GAPDH引物购于上海生物工程技术有限公司;BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒购于碧云天生物技术有限公司;SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)TRIzol Universal总RNA提取试剂购于天根生化科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模 将72只雄性SD大鼠随机分为6组,每组12只,用普通饲料适应性喂养1周后,分为正常饮食饲喂的对照组(CON组)、高脂高胆固醇饲喂诱导NASH模型组,即HFC2(20%脂肪+2%胆固醇)组、HFC5(20%脂肪+5%胆固醇)组以及其相对应的轻

断食组, 即IF CON(正常饮食喂食12 h, 禁食36 h, 以此循环喂食)组、IF HFC2(HFC2喂食12 h, 禁食36 h, 以此循环喂食)组和IF HFC5(HFC5喂食12 h, 禁食36 h, 以此循环喂食)组。其中CON组、HFC2组和HFC5组为充足进食组。动物房温度为25 °C左右, 湿度为50%左右, 每日记录摄食量, 每周记录体质量。

**1.2.2 样本采集** 饲喂16周后, 各组大鼠禁食24 h, 自由饮水, 称重, 麻醉后于腹主动脉采血, 4 °C条件下, 4 000 r/min离心10 min, 取上清即为血浆。肝组织称重, 取肝右大叶相同部位组织用4%的多聚甲醛固定, 石蜡包埋并切片, 一部分液氮速冻置于-80 °C冰箱保存。

**1.2.3 生化指标检测** NASH模型造模16周后, 采集大鼠血浆与肝脏组织, 血浆ALT、AST与肝脏TC、TG的检测按试剂盒说明书操作, 严格控制反应温度和时间, 用酶标仪读取吸光度(D)值。

**1.2.4 HE染色与Masson染色** 取固定好的肝组织(固定时间约为24 h)置于标记好的包埋盒中, 自来水冲洗1 h, 用脱水机脱水、透明、浸蜡, 随后包埋切片。HE染色: 将切片置于染色架, 用二甲苯I、II脱蜡5 min, 按从高到低的梯度酒精洗去二甲苯, 自来水洗1 min, 苏木素染液染色5 min, 自来水冲洗1~2 min, 1%盐酸酒精分化5 s, 自来水冲洗回蓝10 min, 80%乙醇脱水, 切片置于伊红醇溶液30 s, 再经过95%乙醇I、II中各调色约10 s, 时间不宜过长, 最后将切片放入无水乙醇I、II中各脱水2 min, 二甲苯I、II中各透明1~2 min, 中性树胶封片, 镜检。Masson染色: 切片常规脱蜡至水(参考HE染色)后, 用现配好的苏木素染液(A1与A2按1:1配制)染色10 min, 酸性乙醇分化液分化数秒, 水洗, Masson蓝化液反蓝3 min, 水洗, 蒸馏水洗1 min, 丽春红染液染色7 min, 弱酸工作液洗1 min, 磷钼酸溶液洗1 min, 再用弱酸工作液洗1 min, 放于苯胺蓝染液中染色2 min, 用弱酸工作液洗1 min, 95%乙醇快速脱水, 再经过无水乙醇脱水3次, 每次10 s, 最后于二甲苯透明3次, 每次2 min, 中性树胶封片后镜下观察。

**1.2.5 qRT-PCR** 各组量取30 mg肝脏组织于EP管中, 加1 mL TRNzol, 超声粉碎仪粉碎后静置5 min, 4 °C条件下12 000 r/min离心10 min, 加0.2 mL氯仿, 混匀, 室温孵育3 min, 12 000 r/min离心15 min, 此时待测液被分为3层, 从上到下依次为水相(含RNA)、中间相和氯仿相。取600 mL水相置于干净的EP管中, 加600 mL

异丙醇, 混匀, 室温孵育10 min, 12 000 r/min离心15 min, 白色沉淀即为RNA。加1 mL 75%乙醇, 洗涤沉淀, 10 000 r/min离心5 min后, 除去上清并使RNA干燥, 加DEPC水溶解RNA, 上机测RNA浓度, 加DEPC水调整RNA浓度为1 000 ng/ $\mu$ L。按说明书逆转录合成cDNA。每孔加2  $\mu$ L cDNA、10  $\mu$ L SYBR Green混合试剂、上游引物与下游引物各0.6  $\mu$ L、6.8  $\mu$ L DEPC水, 每组重复3次, 进行qRT-PCR, 最终的目的基因表达结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。引物序列: *Caspase-1*上游5'-AAG GTC CTG AGG GCA AAG AG-3', 下游5'-GTG TTG CAG ATA ATG AGG GC-3'; *GSDMD*上游5'-CCA ACA TCT CAG GGC CCC AT-3', 下游5'-TGG CAA GTT TCT GCC CTG GA-3'; *IL-1 $\beta$* 上游5'-CAC CTC TCA AGC AGA GCA CAG-3', 下游5'-GGG TTC CAT GGT GAA GTC AAC-3'; *GAPDH*上游5'-GAC ATG CCG CCT GGA GAA AC-3', 下游5'-AGC CCA GGA TGC CCT TTA GT-3'。

**1.2.6 Western blot** 取肝脏组织约50 mg, 加入500  $\mu$ L RIPA裂解液(含100  $\mu$ mol/L PMSF), 用超声粉碎仪粉碎后, 离心取上清; 采用BCA法测蛋白浓度, 将各组蛋白调成一致的浓度, 将蛋白浓度调成一致, 在蛋白样品中加入4倍体积的5 $\times$ 上样缓冲液, 100 °C金属浴煮沸10 min使其变性, 分装后保存于-20 °C冰箱。取30  $\mu$ g蛋白进行SDS-PAGE电泳, 采用湿转法以300 mA恒流电转90 min, 将蛋白条带转到NC膜上, 室温下用5%脱脂奶粉封闭2 h, 注意5%脱脂奶粉需用现配。加入1:1 000稀释的一抗4 °C过夜, 用TBST洗膜3次, 每次10 min, 1:6 000稀释的二抗室温孵育2 h, TBST洗膜3次, 用ECL法显影。应用ImageJ软件分析条带灰度值, 通过与GAPDH对比, 计算目的蛋白的相对表达量。

### 1.3 统计学方法

实验结果数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 25软件对数据进行统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 轻断食对NASH大鼠体质量的影响

结果(图1)显示与CON组相比, HFC2与HFC5组大鼠体质量升高( $P<0.05$ ); IF CON组大鼠体质量低于CON组( $P<0.001$ ); 与HFC2组相比, IF HFC2组大

鼠体质量降低( $P<0.001$ ); 与HFC5组相比, IF HFC5组大鼠体质量降低( $P<0.001$ )。

## 2.2 轻断食对NASH大鼠血浆ALT、AST和肝脏TC、TG的影响

结果(表1)显示, 与CON组相比, HFC2与HFC5组大鼠血浆ALT与AST升高, 肝脏组织TC(total cholesterol)与TG(triglyceride)含量升高( $P<0.0001$ ); IF CON组与CON组无明显差别; 与HFC2组相比, IF HFC2组ALT与AST降低, 肝脏组织TC与TG含量降低( $P<0.0001$ ); 与HFC5组相比, IF HFC5组ALT与AST降低, 肝脏组织TC与TG含量降低( $P<0.0001$ )。

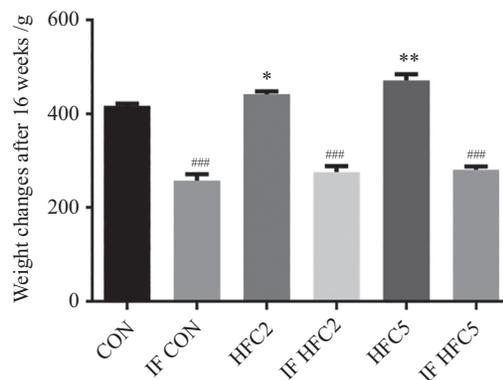
## 2.3 轻断食对NASH大鼠肝脏病理学的影响

通过HE染色与Masson染色检测轻断食对NASH大鼠肝脏病理学的影响。HE染色(图2A)结果显示, CON与IF CON组大鼠肝脏形态正常, 肝小叶结构规则; 与CON组相比, HFC2组肝脏结构紊乱, 出现以小脂滴为主的脂肪变性, HFC5组肝脏结

构紊乱, 可见大脂滴为主的脂肪变性; IF HFC2与IF HFC5组未出现明显的脂质堆积。Masson染色结果(图2B)显示, CON与IF CON组大鼠肝脏形态正常; 与CON组相比, HFC2组肝脏有散在分布的细丝状淡蓝色纤维, HFC5组可见分布较广、较粗的蓝色胶原纤维沉积; 而IF HFC2组与IF HFC5组胶原纤维较少。

## 2.4 轻断食对NASH大鼠肝脏Caspase-1、GSDMD和IL-1 $\beta$ 基因表达的影响

通过qRT-PCR实验检测轻断食对NASH大鼠肝脏Caspase-1、GSDMD和IL-1 $\beta$ 基因表达的影响。如图3所示, 与CON组相比, HFC2与HFC5组Caspase-1、GSDMD与IL-1 $\beta$  mRNA水平明显升高( $P<0.001$ ); IF CON组较CON组Caspase-1 mRNA表达减少( $P<0.05$ ), 而GSDMD与IL-1 $\beta$ 无明显差别; 与HFC2组相比, IF HFC2组Caspase-1、GSDMD与IL-1 $\beta$  mRNA表达降低( $P<0.01$ 或 $P<0.0001$ ); 与HFC5组相比, IF HFC5组Cas-



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组相比; ### $P<0.001$ , 与充足进食组相比。

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with CON group; ### $P<0.001$  compared with sufficient eating group.

图1 轻断食对大鼠体质量的影响

Fig.1 Effects of intermittent fasting on body weight of rats

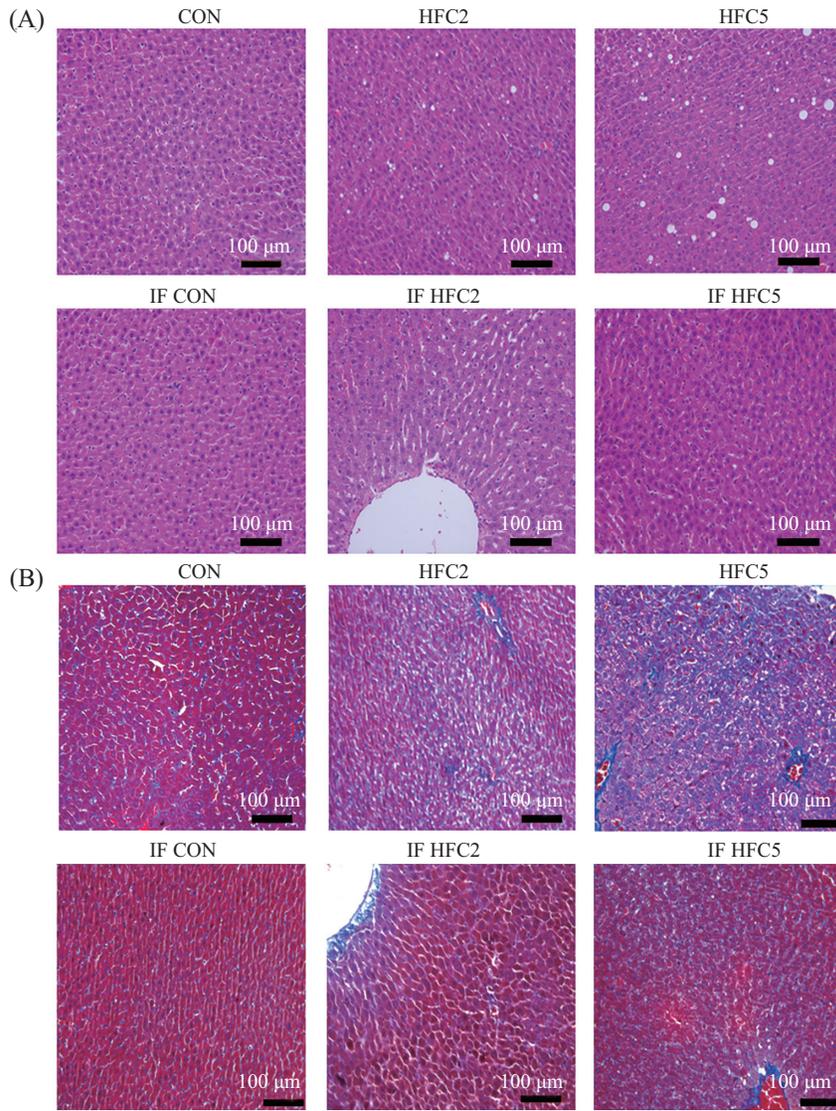
表1 轻断食对ALT、AST、TC与TG的影响

Table 1 Effects of intermittent fasting on ALT, AST, TC and TG

分组 Group	谷丙转氨酶/ $U \cdot L^{-1}$ ALT / $U \cdot L^{-1}$	谷草转氨酶/ $U \cdot L^{-1}$ AST / $U \cdot L^{-1}$	总胆固醇/ $mmol \cdot gprot^{-1}$ TC / $mmol \cdot gprot^{-1}$	甘油三酯/ $mmol \cdot gprot^{-1}$ TG / $mmol \cdot gprot^{-1}$
CON	17.41 $\pm$ 0.041	25.18 $\pm$ 0.86	0.054 7 $\pm$ 0.009 64	0.054 9 $\pm$ 0.001 93
IF CON	16.42 $\pm$ 0.37	24.25 $\pm$ 0.32	0.056 2 $\pm$ 0.004 03	0.057 5 $\pm$ 0.002 75
HFC2	35.73 $\pm$ 0.43***	43.88 $\pm$ 2.14***	0.102 0 $\pm$ 0.006 01***	0.090 5 $\pm$ 0.003 35***
IF HFC2	18.71 $\pm$ 0.26###	26.82 $\pm$ 0.42###	0.068 5 $\pm$ 0.002 85###	0.074 2 $\pm$ 0.000 81###
HFC5	45.58 $\pm$ 1.24***	59.87 $\pm$ 1.82***	0.146 2 $\pm$ 0.007 24***	0.130 2 $\pm$ 0.004 77***
IF HFC5	25.56 $\pm$ 0.60###	28.94 $\pm$ 0.38###	0.064 7 $\pm$ 0.001 46###	0.077 1 $\pm$ 0.001 24###

\*\*\* $P<0.001$ , 与对照组相比; ### $P<0.001$ , 与充足进食组相比。

\*\*\* $P<0.001$  compared with CON group; ### $P<0.001$  compared with sufficient eating group.

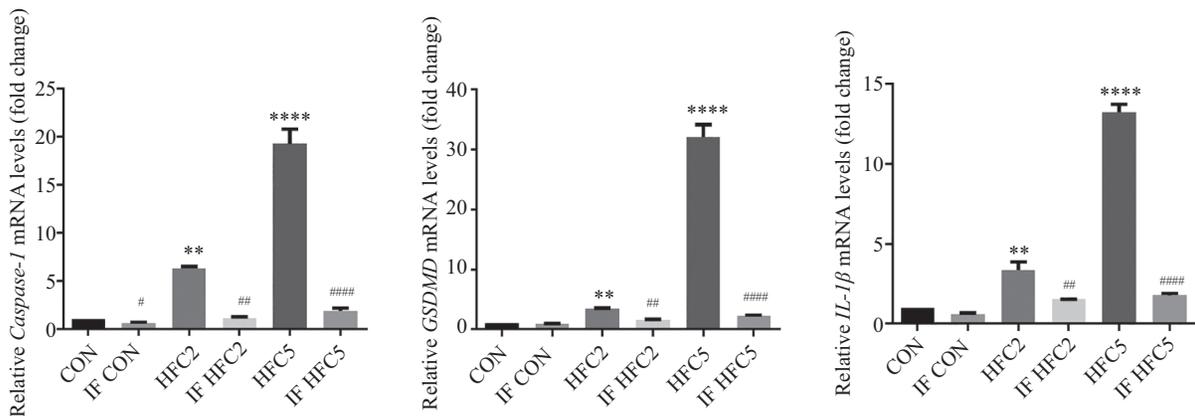


A: 苏木素-伊红染色; B: 马松染色。

A: HE staining; B: Masson staining.

图2 轻断食对肝脏病理学改变的影响

Fig.2 Effects of intermittent fasting on pathological changes of liver

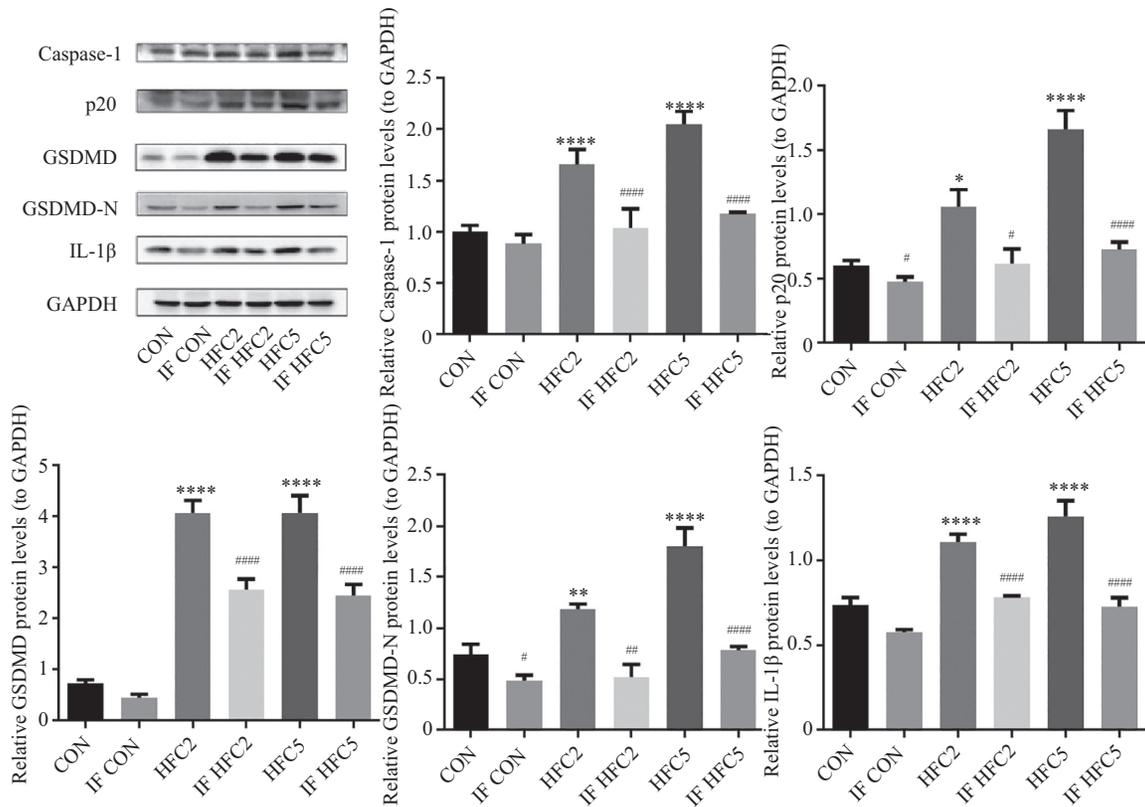


\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组相比; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$ , 与充足进食组相比。

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with CON group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$  compared with sufficient eating group.

图3 轻断食对Caspase-1、GSDMD与IL-1β的相对mRNA表达的影响

Fig.3 Effects of intermittent fasting on relative mRNA expression of Caspase-1, GSDMD and IL-1β



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  与对照组相比; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$ , 与充足进食组相比。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  compared with CON group; #  $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$  compared with sufficient eating group.

图4 轻断食对Caspase-1、GSDMD与IL-1 $\beta$ 蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of Intermittent Fasting on relative protein levels of Caspase-1, GSDMD and IL-1 $\beta$

*pase-1*、*GSDMD*与*IL-1 $\beta$*  mRNA表达降低( $P < 0.01$ )。

## 2.5 轻断食对NASH大鼠肝脏Caspase-1、GSDMD与IL-1 $\beta$ 蛋白表达的影响

通过Western blot实验检测轻断食对NASH大鼠肝脏焦亡相关蛋白Caspase-1、GSDMD与IL-1 $\beta$ 蛋白表达的影响。如图4所示,与CON组相比,HFC2与HFC5组Caspase-1、p20、GSDMD、GSDMD-N与IL-1 $\beta$ 蛋白表达明显增加( $P < 0.01$ ); IF CON组较CON组p20、GSDMD-N与IL-1 $\beta$ 表达减少( $P < 0.05$ ),而Caspase-1、GSDMD无明显差别;与HFC2组相比,IF HFC2组Caspase-1、p20、GSDMD、GSDMD-N与IL-1 $\beta$ 蛋白表达降低( $P < 0.05$ );与HFC5组相比,IF HFC5组Caspase-1、p20、GSDMD、GSDMD-N与IL-1 $\beta$ 蛋白表达降低( $P < 0.001$ )。

## 3 讨论

非酒精性脂肪性肝病是慢性肝病和肝硬化的主要原因,也是HCC的重要危险因素<sup>[18]</sup>。NAFLD包括一系列肝脏病变,包括单纯脂肪变性、脂肪性肝

炎、纤维化和肝硬化等<sup>[19]</sup>。NASH是一种以肝细胞内脂质过量堆积、肝细胞损伤、不同程度炎症和纤维化为特征的慢性肝脏疾病。NASH是可逆的,可以通过运动与控制饮食好转,若不及时干预,将不可逆地发展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌<sup>[20-21]</sup>。前期研究显示,高脂高胆固醇饮食较单一高脂饮食更能成功诱导动物NASH的发生,故本研究采用此方法复制NASH动物模型。本研究结果显示,与HFC2组相比,HFC5组大鼠肝脏脂肪变性纤维化更严重(图2),ALT、AST、TC与TG含量更高(表1),以上结果都表明,摄入5%的胆固醇较摄入2%的胆固醇更能加重大鼠肝损伤。

炎症反应、肝细胞损伤以及肝细胞死亡是肝脏疾病的重要危险因素<sup>[22]</sup>。炎症是从单纯脂肪变性转变为脂肪性肝炎的重要特征,可引起肝细胞损伤并促进肝纤维化,在NASH的发生发展中发挥了重要作用<sup>[23-24]</sup>。焦亡是一种炎症相关的程序性细胞死亡,其特征是细胞质膜快速破坏,释放细胞内容物和炎症介质<sup>[25]</sup>。焦亡可由各种病理刺激,如氧化应激、

高血糖、炎症触发, 细胞焦亡介导了NASH中的炎症反应, 可能是NASH治疗的重要靶点<sup>[26]</sup>。在经典的焦亡途径中, Caspase-1活化后会引起GSDMD裂解来发挥焦亡的执行功能, GSDMD具有固有的焦亡诱导活性, 并控制IL-1 $\beta$ 的释放<sup>[27-28]</sup>, 活化的Caspase-1也能促进IL-1 $\beta$ 的成熟和释放, 诱发严重的炎症反应。本研究发现, 高脂高胆固醇饮食诱导的NASH大鼠Caspase-1、GSDMD与IL-1 $\beta$  mRNA含量与Caspase-1、p20、GSDMD、GSDMD、IL-1 $\beta$ 蛋白表达明显增加, 表明细胞焦亡参与了高胆固醇饮食诱导的NASH的发生发展。

轻断食是一种利用短期禁食来控制饮食的进食方式。研究发现, 轻断食可以减轻体质量和体脂<sup>[29]</sup>, 有益于代谢和心血管效应, 如降低血液葡萄糖浓度<sup>[30]</sup>、降低心率或血压<sup>[31]</sup>。此外, 轻断食可以减轻肝脂肪变性和炎症<sup>[32]</sup>。研究发现, 轻断食干预后, 与CON组相比, IF CON组大鼠体质量减轻, 血浆ALT与AST活性以及肝脏TC与TG含量无变化, 肝细胞形态正常, 结构规则, Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 表达降低, 说明对于健康群体而言, 轻断食可以减轻体质量, 且未发现明显的不良反应。与NASH模型组相比, 轻断食组大鼠体质量明显下降, 表明即使摄入高脂高胆固醇饮食, 轻断食也可以有效减轻体质量; 与NASH模型组相比, 轻断食组大鼠的血浆ALT与AST活性以及肝脏TC与TG含量均显著下降, 表明轻断食可以有效改善大鼠的脂代谢紊乱状态, 减轻肝脏损伤。通过HE与Masson染色我们发现, 轻断食可以显著减少大鼠肝脏组织脂质堆积和纤维化。为了研究轻断食对NASH大鼠焦亡的作用, 我们检测了焦亡相关分子的表达情况, Western blot与qRT-PCR结果显示, 与NASH模型组相比, 轻断食组Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$  mRNA含量与Caspase-1、p20、GSDMD、GSDMD、IL-1 $\beta$ 蛋白表达显著降低, 表明轻断食可能通过抑制Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 介导的焦亡而减轻NASH。但本研究存在一定局限性, 在探究轻断食对高脂高胆固醇诱导的非酒精性脂肪性肝炎大鼠焦亡的作用中, 未探究Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 介导的细胞焦亡具体是如何改善NASH的, 有待后续实验进一步论证。

综上所述, 轻断食可能通过抑制Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 介导的焦亡进而改善高脂高胆固醇饮食诱导的大鼠NASH。

## 参考文献 (References)

- [1] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, DE AVILA L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4): 793-801.
- [2] ENDO-UMEDA K, MAKISHIMA M. Liver X receptors regulate cholesterol metabolism and immunity in hepatic nonparenchymal cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5045.
- [3] TANG J T, MAO Y M. Development of new drugs for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Dig Dis*, 2020, 21(1): 3-11.
- [4] GANZ M, SZABO G. Immune and inflammatory pathways in NASH [J]. *Hepatol Int*, 2013, 7(Suppl 2): 771-81.
- [5] EGUCHI A, WREE A, FELDSTEIN A E. Biomarkers of liver cell death [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5): 1063-74.
- [6] LIEBERMAN J, WU H, KAGAN J C. Gasdermin D activity in inflammation and host defense [J]. *Sci Immunol*, 2019, 4(39): eaav1447.
- [7] DING J, WANG K, LIU W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 111-6.
- [8] MAN S M, KANNEGANTI T D. Gasdermin D: the long-awaited executioner of pyroptosis [J]. *Cell Res*, 2015, 25(11): 1183-4.
- [9] HEILIG R, DICK M S, SBORGI L, et al. The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 $\beta$  secretion in mice [J]. *Eur J Immunol*, 2018, 48(4): 584-92.
- [10] KARMAKAR M, MINNS M, GREENBERG E N, et al. N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1 $\beta$  release independently of plasma membrane pores and pyroptosis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2212.
- [11] XU B, JIANG M, CHU Y, et al. Gasdermin D plays a key role as a pyroptosis executor of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(4): 773-82.
- [12] HILL J O, WYATT H R, PETERS J C. Energy balance and obesity [J]. *Circulation*, 2012, 126(1): 126-32.
- [13] TRIPOLT N J, STEKOVIC S, ABERER F, et al. Intermittent fasting (alternate day fasting) in healthy, non-obese adults: protocol for a cohort trial with an embedded randomized controlled pilot trial [J]. *Adv Ther*, 2018, 35(8): 1265-83.
- [14] JOSLIN P M N, BELL R K, SWOAP S J. Obese mice on a high-fat alternate-day fasting regimen lose weight and improve glucose tolerance [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2017, 101(5): 1036-45.
- [15] MARTIN B, MATTSON M P, MAUDSLEY S. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2006, 5(3): 332-53.
- [16] STEKOVIC S, HOFER S J, TRIPOLT N, et al. Alternate day fasting improves physiological and molecular markers of aging in healthy, Non-obese Humans [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(3): 462-76.
- [17] HATORI M, VOLLMERS C, ZARRINPAR A, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(6): 848-60.
- [18] SUTTI S, ALBANO E. Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(2): 81-92.
- [19] CULLOUGH A J, LINDENMEYER C C. The natural history of

- nonalcoholic fatty liver disease: an evolving view [J]. *Clin Liver Dis*, 2018, 22(1): 11-21.
- [20] FARRELL G C, ROOYEN D V, GAN L, et al. NASH is an inflammatory disorder: pathogenic, prognostic and therapeutic implications [J]. *Gut Liver*, 2012, 6(2): 149-71.
- [21] CHA J Y, KIM D H, CHUN K H. The role of hepatic macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Lab Anim Res*, 2018, 34(4): 133-9.
- [22] ARRESE M, CABRERA D, KALERGIS A M, et al. Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH [J]. *Dig Dis Sci*, 2016, 61(5): 1294-303.
- [23] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(7): 397-411.
- [24] POYNARD T, MUNTEANU M, CHARLOTTE F, et al. Impact of steatosis and inflammation definitions on the performance of NASH tests [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 30(4): 384-91.
- [25] FINK S L, COOKSON B T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(4): 1907-16.
- [26] GUO H, XIE M, ZHOU C, et al. The relevance of pyroptosis in the pathogenesis of liver diseases [J]. *Life Sci*, 2019, 223: 69-73.
- [27] FINK S L, COOKSON B T. Pillars article: Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol*. 2006. 8: 1812-1825 [J]. *J Immunol*, 2019, 202(7): 1913-26.
- [28] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-5.
- [29] TINSLEY G M, LA BOUNTY P M. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans [J]. *Nutr Rev*, 2015, 73(10): 661-74.
- [30] WAN R, CAMANDOLA S, MATTSON M P. Intermittent fasting and dietary supplementation with 2-deoxy-D-glucose improve functional and metabolic cardiovascular risk factors in rats [J]. *FASEB J*, 2003, 17(9): 1133-4.
- [31] WILKINSON M J, MANOOGIAN E N C, ZADOURIAN A, et al. Ten-hour time-restricted eating deduces weight, blood pressure, and atherogenic lipids in patients with metabolic syndrome [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(1): 92-104, e5.
- [32] SAAD R. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(18): 1773.