DOI:10.16016/j.1000-5404.201511014

细胞色素 P450 2E1 在酒精性肝损伤中的作用及研究进展



王晓东[1,2],Arthur I. Cederbaum[2] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军临床病理学研究所[1]; 10029 美国纽约州,西奈山医学院药理与系统治疗学系[2])

[关键词] 细胞色素 P450 CYP2E1;氧化应激;酒精性肝损伤;FAS 抗体;脂多糖
[中图法分类号] R345;R575.02 [文献标志码] A

Role and progress of cytochrome P450 2E1 in alcoholic livery injury

Wang Xiaodong[1,2], Arthur I. Cederbaum[2] ([1]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China; [2]Department of Pharmacology & Systems Therapeutics, Mount Sinai School of Medicine, New York, 10029, USA)

[**Abstract**] Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) may be a key pathway in generating oxidative stress, nitrosative stress, lipid peroxidation, and causing alcoholic liver injury by various hepatotoxins. It was found that CYP2E1 induction and liver injury occur with co-administration of ethanol and hepatotoxins. CYP2E1 inducers including alcohol and pyrazole could potentiate the hepatotoxicity caused by FAS antibody or LPS, suggesting that overexpression of CYP2E1 might contribute to the synergy and susceptibility of the liver to FAS/LPS-induced liver injury. Thus, CYP2E1 and its polymorphism have important role in liver injury caused by ethanol and are also associated with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Ethanol ingestion and toxin administration drive more CYP2E1 induction contributing to the more severe liver injury. Potential mechanisms involved in the potentiated toxicity include elevated oxidative stress, nitrosative stress, lipid peroxidation, apoptosis, hypoxia, TNF-α production, decreased level of antioxidants and activation of MAP kinase. Clarification of CYP2E1-dependent liver injury and interactions with other hepatotoxins will lead to a better understanding to the pathogenesis of hepatotoxicity and may help to give strategies which protect the liver from alcoholic liver injury.

[**Key words**] cytochrome P450 CYP2E1; oxidative stress; alcoholic liver injury; FAS antibody; LPS

Corresponding author: Wang Xiaodong, E-mail: wangxiaodong_zy@163.com

酒精性肝病(alcoholic liver disease,ALD)是由各种肝脏细胞和损伤因子(包括氧化应激、亚硝化应激、凋亡诱导因子、内毒素和细胞因子等)相互作用导致的病理生理学病征。肝脏是药物、毒素、合成化合物及氧化产物进行解毒的重要目标器官[1]。细胞色素 P450 2E1(cytochrome P450 2E1,CYP2E1)是一种主要位于肝细胞的化合物和毒物的代谢酶,是 CYP450 代谢酶系家族中的重要一员。它在酒精、四氯化碳、硫代乙酰胺、对乙酰氨基酚、二甲基亚硝胺等毒性底物的代谢和活化中起着重要作用[2-3]。诱导因子作用下,CYP2E1 在氧化应激、活性氧簇产生以及酒精性肝损伤增强中可能是一个中心通路[4]。通过依赖 CYP2E1

[通信作者] 王晓东,男,博士,第三军医大学西南医院全军临床病理学研究所特聘研究员,原美国西奈山医学院药理与系统治疗学系研究助理教授。主持国家自然科学基金 2 项,参与完成国家自然科学基金和全军医药卫生基金 4 项,参与完成美国 NIH 研究课题 5 项。发表论文 60 余篇,其中包括 Gut、Hepatology 等 SCI 收录期刊论文 20 余篇。获得全军科技进步二等奖 1 项。获得国家发明专利 1 项。连续两届被评为重庆市高新区第四类海外高层次人才。Hepatology、JPET、IJBS、FRBM 等杂志审稿人。美国肝病学会会员,美国临床病理学会和纽约州临床实验室注册技术专家。主要从事酒精性肝病和内毒素肝损害的基础与防治方面的研究。E-mail:wangxiaodong_zy@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160126.1535.003.html(2016-01-26)

途径的氧化/亚硝化应激损害方式,CYP2E1 的诱导和应激的升高加重了 FAS 抗体(Jo2)或细菌脂多糖(lipopolysaccaride, LPS)介导的肝脏毒性。研究显示:CYP2E1 过表达增加了低毒性 Jo2 或 LPS 攻击的敏感性,导致严重的协同性肝损害。其他研究也表明:脂肪肝、肥胖或慢性酒精消耗可引起肝毒素的敏感性增加和 CYP2E1 的过表达,进而导致酒精性或非酒精性肝损伤加重。因此,酒精摄取和肝毒素相互作用诱导 CYP2E1 高表达和严重肝损伤可能涉及肝脏氧化应激水平升高、抗氧化水平下降、细胞因子产生增加、组织缺氧加重、丝裂原蛋白激酶(MAPKs)活化以及 CYP2E1 多态性改变等,这些结果提示:原发和继发致病因素的多功能性和相互作用可能是阐明 ALD 发生机制的基础[5-6]。现总结 CYP2E1 在 FAS 抗体或 LPS 介导肝损伤增强中的增敏作用并探讨通过 CYP2E1 依赖途径发挥作用的潜在机制。

1 CYP2E1 及其依赖的氧化应激和脂质过氧化

CYP2E1 是一种乙醇诱导酶,负责代谢和活化许多重要的毒性产物(包括乙醇、四氯化碳、硫代乙酰胺、对乙酰氨基酚、二甲基亚硝胺)。CYP2E1 可以在各种病理生理条件下被诱导,如饥饿、糖尿病、肥胖和高脂饮食[2,7-8]。除乙醇外,CYP2E1 也能被许多药物诱导,如异烟肼、碳氢化合物和化学溶剂[2]。在哺乳动物中,CYP2E1 固有表达在许多组织中,但最富集在肝细胞。它们以膜联方式结合在滑面内质网。CYP2E1 在肝小叶中央带表达最高[9-10]。由于小叶中央带相对缺氧,许多毒素如 LPS、对乙酰氨基酚、亚硝胺、四氯化碳等介导的肝损伤病变更早出现在该区域。CYP2E1 也被检测到位于胞浆膜,提示它可能在 ALD 患者经免疫介导的肝毒性损害中发挥着独特的作用[11-12]。

CYP2E1 的生化和毒理效应已经在人工构建高表达 CYP2E1 的 HepG2 细胞和吡唑处理高表达 CYP2E1 的原代大鼠肝细胞实验中得到大量验证[13]。乙醇诱导 CYP2E1 依赖的氧化应激、亚硝化应激和脂质过氧化升高,增加的脂质过氧化和蛋白氧化可能是乙醇诱导肝损伤的重要特征[14-15]。由 NO 和超氧化物反应生成的过氧化亚硝酸盐进而产生硝基酪氨酸蛋白加合物,最终导致肝细胞坏死[16]。这些数据提示过氧化亚硝酸盐可能在肝损伤发展中发挥重要的作用。而且,在 CYP 转染的细胞体外实验中,在细胞溶质和线粒体部分都观察到乙醇介导的 ROS 产生、细胞死亡以及谷胱甘肽(GSH)耗损[17]。在体内实验中,急性酒精处理后 CYP2E1 水平升高,表现为 CYP2E1 酶催化活性和蛋白表达增加。在肝小叶中央带,肝脏病理改变增加和定位与 CYP2E1 在该区域的增加和定位有关[18]。在胃内喂饲乙醇模型中,观察了 CYP2E1 在酒精性肝损伤中的作用,发现乙醇诱导的肝脏病理变化与 CYP2E1 水平和升高的脂质过氧化密切相关,CYP2E1 诱导水平下降与酒精诱导的肝损害降低是一致的[19-20]。CYP2E1 抑制剂,如烯丙基硫(DAS)、异硫氰酸苯乙酯(PIC)和氯美噻唑(chlormethiazole,CMZ),能在乙醇喂饲的大鼠模型中抑制脂质过氧化和减轻病理损伤改变,与对照组比较,乙醇处理后 CYP2E1 过表达的小鼠显示高水平转氨酶和肝损伤的病变特点[21-22]。在 CYP2E1 基因敲除(CYP2E1 KO)小鼠中,其他 CYPS 家族如 CYP4A10、CYP4A14 表达上调,而野生型(WT)对照小鼠没有如此表现,和 CYP2E1 类似,这些成员也是活性氧自由基和脂质过氧化的产生分子,在缺失 CYP2E1 情况下,它们作为氧化应激的替代启动分子[14,23]。最近,我们报道了在 CYP2E1 KO 小鼠中,慢性乙醇诱导的肝损伤和氧化应激下降,但在人源 CYP2E1 敲进(CYP2E1 KI)小鼠模型中,这些损伤又得到重新恢复[24]。

2 FAS /LPS 介导的肝损伤

FAS/FAS 配体系统是肝脏介导凋亡蛋白酶活化和凋亡最重要的信号通路之一。FAS 结合到配体或应用抗 FAS 抗体可以导致受体交叉连接和 FAS 阳性细胞的凋亡,FAS 受体固有表达在肝细胞,而 FAS 配体表达在活化的 T 淋巴细胞。通过配体的可溶形式,FAS 介导的凋亡以自分泌或旁分泌方式发生,FAS 介导的死亡不限于淋巴细胞,也会出现在非淋巴细胞如肝细胞[25-26]。Ogasawara 等[27]纯化和鉴定 FAS 激动剂抗体(Jo2),他们在小鼠中分析了抗鼠 FAS 单克隆抗体的肝损伤体内效应,发现当注射 10 μg Jo2,小鼠会在 6 h 内引起重症肝炎和肝衰竭或致命性死亡。该研究提示 Jo2 的致死效应是由于功能性 FAS 抗原,而不是补体介导的细胞裂解,而且注射 Jo2 能快速致死小鼠,病理变化显示广泛出血和肝细胞凋亡,但没有明显的炎性细胞浸润,这些结果提示 Jo2 通过表达的 FAS 抗原直接诱导肝细胞死亡[27-28]。另一方面,应用 Jo2 和 RK-8 进行体内处理,重点鉴定了 FAS 的病理和生理学功能,观察到 Jo2 诱导重症肝炎和肝细胞凋亡,而 RK-8 减轻了系统性自身免疫疾病而没有致死效

应[29]。该研究表明 Jo2 和 RK-8 能够特异识别导致不同效应的目标细胞。有研究通过小剂量 Jo2 单独预处理小鼠到达 FAS 刺激阈值,这种低毒性 Jo2 剂量不会显著升高血清 ALT 和病理改变,但可以引起凋亡蛋白激酶水平轻微升高和产生少量 iNOS[30]。

LPS 是致病菌感染或创伤后诱发临床病理生理学效应(包括内毒素血症和脓毒症等)的主要致病介质,它通过特异结合蛋白 LBP 和表面受体 CD14 与炎性细胞(包括单核/巨噬细胞、中性粒细胞等)作用,进而炎性细胞经过跨膜蛋白 TLR4 和辅助分子被活化并将效应信号传递至胞内,当核转录因子 NF-κB 活化后,炎性细胞释放大量促炎因子或损伤介质(如 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8、PAF 等),最终引起全身炎症反应综合征[31-32]。在生理条件或 LPS 亚毒性剂量并不会产生级联炎性效应或损害性反应,只有当伴有体内其他致病毒素的增加,或在 LPS 致敏体内效应细胞条件下,LPS 才会发挥毒性损伤作用。LPS 直接引起肝损伤的机制涉及炎性细胞(枯否氏细胞和化学介质如超氧化物、氮氧化物、TNF-α)以及其他细胞因子[33]。另外,在实验酒精性肝病模型中,LPS 能增强由肝毒素(如乙醇)诱导的肝损害,LPS 联合急性或慢性乙醇处理能够导致肝组织炎性反应和肝细胞变性坏死,可能的机制包括乙醇改变产生 LPS 的肠道菌群生态,增加肠黏膜通透性,促进 LPS 从肠道移位到门脉循环形成内毒素血症[34-35]。

3 CYP2E1 增强 FAS/LPS 诱导的肝损伤

系列研究用以评估当吡唑或急性乙醇处理或慢性乙醇喂饲诱导 CYP2E1 后,它能否增强 FAS/LPS 介导的肝脏毒性[18,30,36-37]。应用低剂量 FAS 或 LPS 以限制其低毒性,用于评价由 CYP2E1 诱导化合物(如吡唑)或乙醇预处理导致的肝损伤是否得到增强。吡唑预处理小鼠(或大鼠)每天 1 次,连续 2 d,在 FAS 或 LPS 缺失条件下,诱导 CYP2E1 高表达但产生较低的肝毒性水平,而在吡唑缺失条件下,FAS 或 LPS 低阈值剂量预处理小鼠(或大鼠)不会引起肝损伤。然而,当吡唑和 FAS 或 LPS 共同处理小鼠(或大鼠)时,肝脏毒性显著增强,提示低毒性吡唑能够增强由阈值 FAS 或 LPS 引起的肝脏毒性。联合处理组血清转氨酶水平比吡唑或 FAS 或 LPS 单独处理组高。肝脏组织学观察联合处理组显示广泛坏死和严重损害[30,37]。CYP2E1 催化活性(对硝基苯酚氧化)在吡唑单纯组或联合组升高,但单纯 FAS 或 LPS 组没有升高。反过来,血清 TNF-α 水平在单纯 FAS/LPS 组或联合组升高,但单纯吡唑组没有升高。氧化应激和亚硝化应激指标,包括 MDA 水平、4-羟基壬烯酸加合物、3-硝基酪氨酸蛋白加合物在联合组肝组织中升高,但在单纯吡唑或单纯 FAS 或 LPS 组肝组织中没有升高[30,37]。在联合组中 GSH 水平降低。为了验证 CYP2E1 在联合组毒性增高中的作用,评估 CYP2E1 抑制剂 CMZ 的效应。CMZ 降低联合组升高的血清 ALT 水平和 CYP2E1 催化活性。因此,吡唑诱导的 CYP2E1 能够增强 FAS 或 LPS 介导的肝脏损伤。

为了评估乙醇急性处理或慢性喂饲是否加强 FAS 介导的毒性以及 CYP2E1 是否在升高的肝脏毒性中发挥作用。急性乙醇处理小鼠,1 d 处理 2 次,连续 3 d,在单纯乙醇组,诱导 CYP2E1 表达和产生较低肝脏毒性水平。在联合组,急性乙醇增强由 FAS 介导的肝脏毒性,表现为 ALT 或 AST 升高,更严重的为肝细胞坏死。在单纯乙醇或 FAS 组,只表现为转氨酶轻度升高和轻微的形态学改变。因此,在联合组增强的毒性不仅仅是单纯 FAS 毒性和单纯急性乙醇毒性的简单相加。在联合组和单纯乙醇组,CYP2E1 活性的增加是一致的,线粒体脂质过氧化水平在单纯 FAS 或单纯乙醇组轻微升高,而在联合组其水平显著升高。应用高脂 Lieber-DeCarli 液体饲料连续 4 周喂饲 CYP2E1 KO 小鼠,在 WT 小鼠中,单纯喂饲乙醇没有引起显著的肝损伤。然而在乙醇联合 FAS 组比单纯 FAS 组,表现为转氨酶升高,小叶中央肝组织带更严重坏死、出血和炎性细胞浸润。但在 CYP2E1 KO 小鼠中,联合组小鼠的肝损伤程度受到了抑制,由此证实联合组小鼠肝毒性的增加是由于 CYP2E1 的诱导所致。慢性乙醇喂饲 WT 小鼠产生较多的脂肪变和 CYP2E1 高表达,但这些没有表现在 CYP2E1 KO 小鼠。在对照饲料喂饲的 WT 和 CYP2E1 KO 小鼠这 2 组中,FAS 都能升高血清 TNF-α 水平,但在乙醇喂饲的 WT 小鼠中,FAS 能产生更多的 TNF-α,而该变化没有出现在乙醇喂饲的 CYP2E1 KO 小鼠中。在联合组中 WT 比 CYP2E1 KO 小鼠肝脏 GSH 水平显著降低。这些发现提示乙醇急性处理或慢性喂饲后 CYP2E1 诱导和高表达参与增强低剂量 FAS 或 LPS 介导的肝毒性[36]。

研究还发现:当慢性乙醇喂饲后 CYP2E1 高表达时,肝脂肪变和肝组织缺氧增加,HIF-1α 也明显升高,体外实验证实 HIF-1α 增加了 CYP2E1 毒性和氧化应激。HIF-1α 可诱导 iNOS 高表达,升高的 NO 产物偶联到来自 CYP2E1 的超氧化合物并形成过氧化亚硝酸

盐,最终引发乙醇毒性效应。利用一种过氧化亚硝酸盐的间接检测法,在 CYP2E1 和 HIF-1α 升高的乙醇喂饲人源 CYP2E1 敲进小鼠肝组织中检测到 3-硝基络氨酸蛋白加合物。提示 CYP2E1 也可以通过组织缺氧和上调 HIF-1α 致敏脂肪肝,引发进一步肝损害[38-39]。在硫代乙酰胺(TAA)致肝纤维化模型中,来自 CYP2E1 的氧化应激显著损害肝细胞的复制能力,增强组织补偿机制如卵圆细胞增加和胆管反应激活,ROS 包括 O_2^-、H_2O_2 水平升高和 GSH 水平降低,可能是该毒性效应的关键介质。因此,CYP2E1 在化学试剂 TAA 致肝纤维化损害中可能发挥重要的增敏作用[40-41]。

4 CYP2E1 依赖途径增强 FAS/LPS 肝损伤的潜在机制

FAS 或 LPS 联合吡唑、急性乙醇或慢性乙醇与单纯 FAS 或 LPS 比较,其 iNOS、3-NT、MDA 和蛋白羰基的水平要高[18,30,36-37],提示联合组比单纯 FAS 或 LPS、单纯吡唑或单纯乙醇,其氧化应激和亚硝化应激程度都要高。我们推测产生 NO 的 iNOS 增加,产生超氧化物的 CYP2E1 增加,二者共同促成产生过氧化亚硝酸盐($ONOO^-$),最后形成 3-NT 蛋白加合物。CYP2E1 基因敲除小鼠与野生型小鼠比较,其 FAS 或 LPS 联合乙醇引起增高的肝毒性部分得到了降低,而在人源 CYP2E1 基因敲进(CYP2E1 KI)小鼠中,降低的肝毒性又得到了恢复,这些结果显示吡唑或乙醇增加肝脏 FAS 或 LPS 毒性敏感性,提示 CYP2E1 表达的增加在联合 FAS 或 LPS 诱导的氧化应激和脂质过氧化以及肝损伤中发挥重要的作用(图 1)[18,30,36-37,42]。

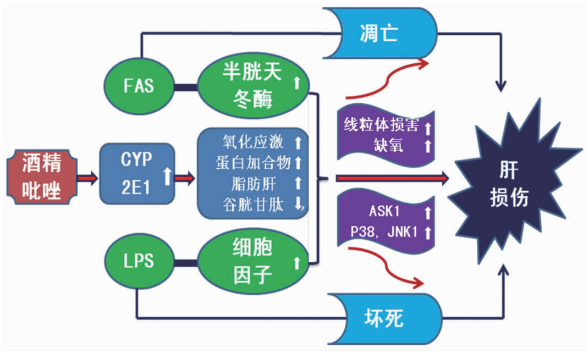


图 1 CYP2E1 在酒精性肝损伤中的作用

凋亡的胞内途径包括具有死亡结构域的 FAS 相关蛋白的受体齐聚和募集,最终导致凋亡蛋白酶 8 和下游凋亡蛋白酶的活化,通过 FAS 刺激细胞死亡的特点是凋亡,提示该致死效应是 FAS 抗体与功能性 FAS 抗原相互作用的结果,而不是补体介导的细胞溶解[43-44]。FAS/LPS 合并吡唑或乙醇处理后,凋亡蛋白酶活性和 DNA 片段化联合组显著高于单纯 FAS 或 LPS 处理组。当升高的 CYP2E1 联合 FAS/LPS 产生大量的毒性或氧化应激时,细胞死亡的最初凋亡模式很快转换成坏死模式,而且 CYP2E1 KO 喂饲乙醇小鼠与野生型小鼠比较,结果显示增加的肝脏毒性显著下降,但凋亡蛋白酶活性没有显著差异[18,36]。这些结果提示 FAS/LPS 联合乙醇在 CYP2E1 KO 中肝毒性的下降,并没有涉及肝脏凋亡途径的下游调节,也提示在 FAS/LPS 联合乙醇处理诱导的凋亡毒性中,CYP2E1 没有发挥主要作用,但确实增强了坏死性损害[18,30,36]。来自肠道吸收的 LPS 能活化枯否细胞并通过 NADPH 氧化酶产生细胞因子和活性物质,如 TNF-α、O_2^-、LPS 合并乙醇处理能导致肝组织炎症和坏死,被认为的可能机制是 LPS 与诱导升高的 CYP2E1 引起氧化应激的增加,最后导致肝损伤增强。研究发现:CYP2E1 的肝脏定位与肝组织 O_2^- 的分布、LPS 介导的肝坏死区域是一致的,当 CYP2E1 水平升高时,LPS 的进一步处理引起 O_2^- 和 ROS 产生的增加,最终导致肝组织坏死[45]。大量证据表明 CYP2E1 依赖的氧化应激和脂质过氧化常常伴有抗氧化剂[如过氧化氢酶、谷胱甘肽(GSH)、腺苷甲硫氨酸(SAM)等]水平的下降。FAS/LPS 联合吡唑或乙醇处理后,肝脏毒性显著增强是伴随 CYP2E1 依赖途径的氧化应激和脂质过氧化水平的显著升高、抗氧化剂(包括过氧化氢酶、GSH、SAM)水平的显著降低[18,30,36]。我们评估了 SAM 处理是否保护 CYP2E1 联合 FAS 增强的肝脏毒性,观察到体内注射 SAM 可降低急性乙醇联合 FAS 升高的血清转氨酶和减轻肝脏病理改变,加入 SAM 能够升高肝内 SAM 水平,增加总还原型 GSH 水平,并且抑制 CYP2E1 活性,SAM 也能够降低急性乙醇联合 FAS 升高的氧化应激和亚硝化应激以及升高的血清 TNF-α 水平[46-47]。这些结果表明:SAM 通过增加甲硫氨酸腺苷转移酶(MAT)活性、升高肝脏 SAM 水平,在肝毒性保护作用中发挥作用;SAM 降低 TNF-α, iNOS 和 CYP2E1 等水平的升高,可能在抑制氧化或亚硝化应激中起重要作用。这些结果提示:CYP2E1 和相关抗氧化剂在 FAS/LPS 联合吡唑或 FAS/LPS 联合乙醇处理导致的肝毒性增强中是相反的作用(图 1)[37,46-47]。

细胞因子产生是 ALD 的主要特征,血清水平升高与 ALD 的严重度和酒精性肝炎的发病率相关[44,48]。FAS 或 LPS 联合吡唑处理后,升高的肝毒性因肝组织

中未见更明显的炎细胞浸润,没有表现出更显著的炎症反应,但 TNF-α 水平在 FAS/LPS 联合吡唑和单纯 FAS/LPS 组中都升高。因此,细胞因子可能在单纯 FAS/LPS 毒性和参与 FAS/LPS 联合吡唑后毒性增强中都有重要作用[18,36]。FAS/LPS 联合乙醇与生理盐水对照组比较,TNF-α 水平升高,可能也参与氧化应激的增加。当 FAS/LPS 联合乙醇处理后,CYP2E1 KO 与 WT 比较,TNF-α 水平下降,它可能在降低肝损伤中发挥作用[30]。SAM 保护乙醇联合 FAS 导致的肝毒性,降低升高的 TNF-α 水平;另外,对照饲料喂饲无论 CYP2E1 KO 或 WT 小鼠,FAS/LPS 都能显著升高 TNF-α 水平。与对照饲料喂饲比较,单纯慢性乙醇喂饲无论 CYP2E1 KO 或 WT 小鼠都不能升高 TNF-α 水平,显示单纯脂肪肝或 CYP2E1 高表达不足以升高 TNF-α 水平。然而,FAS/LPS 联合喂饲乙醇的 WT 小鼠血清 TNF-α 水平升高,这一升高没有在 CYP2E1 KO 小鼠中观察到,表明 CYP2E1 在 FAS/LPS 联合喂饲乙醇导致 TNF-α 水平的升高中发挥作用[36]。有趣的是,TNF-α 升高的量与肝毒性严重程度密切相关,在显示有肝损伤的乙醇喂饲野生型小鼠中含量最高,这些结果提示 TNF-α 升高可能参与增强在 FAS/LPS 联合乙醇野生型小鼠中肝脏毒性(图 1)。

当细胞受到毒性攻击或环境应激时,MAPK(如 JNK 和 P38)常常被活化。JNK 的暂时性活化可能有助于肝细胞,而持续的活化将启动细胞死亡[49-50]。关于 MAPK 在 CYP2E1 依赖毒性中的作用,Pastorino 等[51]发现在 CYP2E1 表达的肝细胞中通过 P38 MAPK 依赖途径,乙醇可升高 TNF-α 毒性,有研究结果显示 CYP2E 表达升高通过 JNK 延时的活化致敏肝细胞 TNF-α 毒性[52-53]。我们的实验显示:FAS/LPS 联合乙醇处理小鼠与生理盐水对照比较,JNK 和 P38 的活化都得到上调,二者的抑制剂可以部分减轻 FAS/LPS 联合乙醇导致的肝损伤[18]。在慢性乙醇喂饲和对照模型中,单纯 FAS/LPS 处理都能提高 JNK 和 P38 的活化,但在 FAS/LPS 联合乙醇致肝毒性增强小鼠中,JNK 或 P38 活化并没有进一步增加[36]。这些结果显示当 FAS/LPS 处理后早期慢性乙醇喂饲能够显著提高 JNK 和 P38 的活化并导致肝损伤。因此,在 FAS/LPS 联合乙醇喂饲引发小鼠肝损伤中,JNK 和 P38 的早期活化可能发挥作用。应用 JNK 和 P38 抑制剂可以部分保护 FAS/LPS 联合乙醇喂饲导致的肝损伤。这些结果提示 JNK 和 P38 活化至少部分参与了 FAS/LPS 联合慢性乙醇喂饲导致肝脏毒性的增加(图 1)[36]。另外,应用 JNK 基因敲除小鼠评估 CYP2E1 的增敏作用是否涉及 MAPK 信号通路的活化。研究发现吡唑在体内诱导 CYP2E1 依赖的氧化应激的升高能致敏肝脏 TNF-α 毒性效应,其损伤机制可能涉及 JNK1 的活化(而不是 JNK2)和线粒体损害,提示 JNK1 活化、线粒体功能障碍以及 CYP2E1 依赖氧化应激的升高在酒精性肝损伤发生中的潜在作用[54]。

5 展望

CYP2E1 的诱导剂吡唑和乙醇能够增强由 FAS/LPS 介导的肝脏毒性,提示 CYP2E1 的过表达可能参与肝脏对 FAS/LPS 介导损伤的协同和易感效应。肝脏毒性增强的潜在机制涉及氧化应激和脂质过氧化的升高、抗氧化剂防御功能的下降(如 SAM 和 GSH 的耗竭)。因此,CYP2E1 的诱导能够协同其他肝毒素(如 FAS、LPS 等)以增强肝损伤。外源应用 SAM 显著降低由 FAS/LPS 联合乙醇介导的肝损害,肝脏毒性增加与 iNOS、CYP2E1 和 TNF-α 的升高,MAT1A 活性减低以及 SAM 水平下降等因素有关。通过升高 MAT 活性、增加肝脏 SAM 水平,SAM 在保护肝脏毒性中发挥重要的作用,其机制包括抑制氧化和亚硝化应激,降低 TNF-α 和 iNOS 升高的水平等。慢性乙醇喂饲小鼠引起的 CYP2E1 诱导和肝脂肪变也增强 FAS/LPS 介导的肝脏毒性,在没有 FAS/LPS 处理条件下,CYP2E1 通过介导氧化应激和脂质过氧化,在脂肪变中发挥重要作用。在没有 CYP2E1 参与下,FAS 被活化,凋亡蛋白酶 8 和 3 的激活增加,JNK 和 P38 通路被激活以及 GSH 水平降低。LPS 引起肝损伤涉及炎性细胞(如枯否氏细胞)和化学介质(如超氧化物、氮氧化物)及炎性细胞因子。乙醇诱导 CYP2E1 联合 FAS/LPS 处理导致 TNF-α 水平升高。因此,乙醇、CYP2E1 和 FAS/LPS 中任何因素单独处理都不足以引起严重的肝损伤,肝脏损害的增加是与 CYP2E1 过表达、炎性细胞因子产生升高、局部肝组织缺氧增加以及 MAPK 活化(特别是 JNK1 活化上调)密切相关。

因此,以 CYP2E1 为代表的肝脏代谢酶,既在生理条件下肝脏细胞物质代谢方面起着重要的作用,又在酒精性、非酒精性脂肪肝或肝纤维化发生等病理过程中发挥作用,它的高表达可增加肝内脂质沉积的程度,并直接或协同其他损伤因子参与肝细胞的氧化应激、脂质过氧化、细胞凋亡、炎症反应等肝脏损伤过程。同时,CYP2E1 除了作为外源物代谢酶外,也在体内其他组织参与调解多种病理生理过程,如作为药物作用的

诱导剂或底物,甚至参与化学诱导肿瘤的发生。此外,CYP2E1 的多态性研究显示:该酶代谢活性受基因位点的多态性调控,可能是某些药物代谢产生肝脏毒性等副作用的原因之一。新近热点研究示:在代谢性疾病如酒精、非酒精性肝病,糖尿病,退行性老年病以及肿瘤发生的基础研究中,将围绕 CYP2E1 依赖的氧化损害、基因多态性、癌基因表达调控等方向展开深入研究。作为机体生理病理的重要调解分子,CYP2E1 的确切生物学功能还需要进一步研究和揭示。

参考文献:

[1] Rao R K, Seth A, Sheth P. Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286(6): G881 - G884. DOI: 10.1152/ajpgi.0006.2004

[2] Novak R F, Kaul K L, Kim S G. Induction of the alcohol-inducible form of cytochrome P-450 by nitrogen-containing heterocycles: effects on pyridine N-oxide production[J]. Drug Metab Rev, 1989, 20(2/4): 781 - 792. DOI: 10.3109/0360253 8909103578

[3] Gonzalez F J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1[J]. Mutat Res, 2005, 569(1/2): 101 - 110. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021

[4] Leung T M, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2013, 58(2): 395 - 398. DOI:10.1016/j.jhep.2012.08.018

[5] Cederbaum A I, Yang L, Wang X, *et al*. CYP2E1 Sensitizes the Liver to LPS- and TNF α-Induced Toxicity *via* Elevated Oxidative and Nitrosative Stress and Activation of ASK-1 and JNK Mitogen-Activated Kinases[J]. Int J Hepatol, 2012, 2012: 582790. DOI:10.1155/2012/582790

[6] Tsukamoto H, Lu S C. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury[J]. FASEB J, 2001, 15(8): 1335 - 1349.

[7] Song B J, Akbar M, Jo I, *et al*. Translational Implications of the Alcohol-Metabolizing Enzymes, Including Cytochrome P450-2E1, in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Disease[J]. Adv Pharmacol, 2015, 74: 303 - 372. DOI:10.1016/bs.apha.2015.04.002

[8] Dey A. Cytochrome P450 2E1: its clinical aspects and a brief perspective on the current research scenario[J]. Subcell Biochem, 2013,67:1 - 104. DOI:10.1007/978-94-007-5881-0_1

[9] French S W. The importance of CYP2E1 in the pathogenesis of alcoholic liver disease and drug toxicity and the role of the proteasome[J]. Subcell Biochem, 2013, 67: 145 - 164. DOI: 10.1007/978-94-007-5881-0_4

[10] Konishi M, Ishii H. Role of microsomal enzymes in development of alcoholic liver diseases[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(Suppl 1): S7 - S10. DOI:10.1111/j.1440-1746.2006.04638.x

[11] Martin-Murphy B V, Kominsky D J, Orlicky D J, *et al*. Increased susceptibility of natural killer T-cell-deficient mice to acetaminophen-induced liver injury[J]. Hepatology, 2013, 57(4): 1575 - 1584. DOI:10.1002/hep.26134

[12] Vidali M, Occhino G, Ivaldi A, *et al*. Detection of autoantibodies against cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in chronic hepatitis C[J]. J Hepatol, 2007, 46(4): 605 - 612. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.11.009

[13] Caro A A, Cederbaum A I. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44: 27 - 42. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121704

[14] Leclercq I A, Farrell G C, Field J, *et al*. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis[J]. J Clin Invest, 2000, 105(8): 1067 - 1075. DOI:10.1172/JCI8814

[15] Comporti M, Signorini C, Leoncini S, *et al*. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge[J]. Genes Nutr, 2010, 5(2): 101 - 109. DOI: 10.1007/s12263-009-0159-9

[16] Eiserich J P, Estevez A G, Bamberg T V, *et al*. Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(11): 6365 - 6370.

[17] Bansal S, Anandatheerthavarada H. K, Prabu G. K, *et al*. Human cytochrome P450 2E1 mutations that alter mitochondrial targeting efficiency and susceptibility to ethanol-induced toxicity in cellular models[J]. J Biol Chem, 2013, 288(18): 12627 - 12644. DOI: 10.1074/jbc.M113.452367

[18] Wang X, Cederbaum A I. Acute ethanol pretreatment increases FAS-mediated liver injury in mice: role of oxidative stress and CYP2E1-dependent and -independent pathways[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(7): 971 - 984. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.023

[19] Powell C L, Bradford B U, Craig C P, *et al*. Mechanism for prevention of alcohol-induced liver injury by dietary methyl donors[J]. Toxicol Sci, 2010, 115(1): 131 - 139. DOI: 10.1093/toxsci/kfq031

[20] Kim D K, Kim Y H, Jang H H, *et al*. Estrogen-related receptor γ controls hepatic CB1 receptor-mediated CYP2E1

expression and oxidative liver injury by alcohol[J]. Gut, 2013, 62(7): 1044 – 1054. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303347

[21] Sapkota M, Hottor T K, DeVasure J M, *et al*. Protective role of CYP2E1 inhibitor diallyl disulfide (DADS) on alcohol-induced malondialdehyde-deoxyguanosine (M1dG) adduct formation[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2014, 38(6): 1550 – 1558. DOI:10.1111/acer.12439

[22] Morgan K, French S W, Morgan T R. Production of a cytochrome P450 2E1 transgenic mouse and initial evaluation of alcoholic liver damage[J]. Hepatology, 2002, 36(1): 122 – 134. DOI:10.1053/jhep.2002.33720

[23] Robertson G, Leclercq I, Farrell G C. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(5): G1135 – G1139.

[24] Lu Y, Wu D, Wang X, *et al*. Chronic alcohol-induced liver injury and oxidant stress are decreased in cytochrome P4502E1 knockout mice and restored in humanized cytochrome P4502E1 knock-in mice[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(9): 1406 – 1416. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.026

[25] Schattenberg J M, Zimmermann T, Worns M, *et al*. Ablation of c-FLIP in hepatocytes enhances death-receptor mediated apoptosis and toxic liver injury *in vivo*[J]. J Hepatol, 2011, 55(6): 1272 – 1280. DOI:10.1016/j.jhep.2011.03.008

[26] Canbay A, Higuchi H, Bronk S F, *et al*. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis[J]. Gastroenterology, 2002, 123(4): 1323 – 1330.

[27] Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, *et al*. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice[J]. Nature, 1993, 364(6440): 806 – 809. DOI:10.1038/364806a0

[28] An J, Harms C, Lattig-Tunnemann G, *et al*. TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain protein transduction rescues mice from fulminant liver failure[J]. Hepatology, 2012, 56(2): 715 – 726. DOI:10.1002/hep.25697

[29] Yonehara S. Effects of anti-Fas antibodies on lymphocytes and other organs: preparation of original and new monoclonal antibodies and amelioration of systemic autoimmune disease[J]. Int Rev Immunol, 1999, 18(4): 329 – 345.

[30] Wang X, Lu Y, Cederbaum A I. Induction of cytochrome P450 2E1 increases hepatotoxicity caused by Fas agonistic Jo2 antibody in mice[J]. Hepatology, 2005, 42(2): 400 – 410. DOI:10.1002/hep.20792

[31] Schumann R R. Old and new findings on lipopolysaccharide-binding protein: a soluble pattern-recognition molecule[J]. Biochem Soc Trans, 2011, 39(4): 989 – 993. DOI: 10.1042/BST0390989

[32] Rossol M, Heine H, Meusch U, *et al*. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages[J]. Crit Rev Immunol, 2011, 31(5): 379 – 446. DOI:10.1615/CritRevImmunol.v31.i5.20

[33] El-Kasmi K C, Anderson A L, Devereaux M W, *et al*. Toll-like receptor 4-dependent Kupffer cell activation and liver injury in a novel mouse model of parenteral nutrition and intestinal injury[J]. Hepatology, 2012, 55(5): 1518 – 1528. DOI: 10.1002/hep.25500

[34] Forsyth C B, Voigt R M, Keshavarzian A. Intestinal CYP2E1: A mediator of alcohol-induced gut leakiness[J]. Redox Biology, 2014, 3: 40 – 46. DOI:10.1016/j.redox.2014.10.002

[35] Mathurin P, Deng Q G, Keshavarzian A, *et al*. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats[J]. Hepatology, 2000, 32(5): 1008 – 1017. DOI: 10.1053/jhep.2000.19621

[36] Wang X, Lu Y, Xie B, *et al*. Chronic ethanol feeding potentiates Fas Jo2-induced hepatotoxicity: role of CYP2E1 and TNF-alpha and activation of JNK and P38 MAP kinase[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(5): 518 – 528. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.021

[37] Lu Y, Wang X, Cederbaum A I. Lipopolysaccharide-induced liver injury in rats treated with the CYP2E1 inducer pyrazole[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(2): G308 – G319. DOI:10.1152/ajpgi.00054.2005

[38] Jin W S, Kong Z L, Shen Z F, *et al*. Regulation of hypoxia inducible factor-1α expression by the alteration of redox status in HepG2 cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 61. DOI: 10.1186/1756-9966-30-61

[39] Zhang X L, Yan Z W, Sheng W W, *et al*. Activation of hypoxia-inducible factor-1 ameliorates postischemic renal injury via inducible nitric oxide synthase[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 358(1/2): 287 – 295. DOI:10.1007/s11010-011-0979-y

[40] Wang X, Wu D, Yang L, *et al*. Cytochrome P450 2E1 potentiates ethanol induction of hypoxia and HIF-1α *in vivo*[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 63: 175 – 186. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.009

[41] Roskams T, Yang S Q, Koteish A, *et al*. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease[J]. Am J Pathol, 2003, 163(4): 1301 – 1311. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)

63489-X

[42] Wang X, Lopategi A, Ge X, *et al*. Osteopontin induces ductular reaction contributing to liver fibrosis[J]. Gut, 2014, 63(11): 1805 - 1818. DOI:10.1136/gutjnl-2013-306373

[43] Lu Y, Cederbaum A I. CYP2E1 potentiation of LPS and TNFα-induced hepatotoxicity by mechanisms involving enhanced oxidative and nitrosative stress, activation of MAP kinases, and mitochondrial dysfunction[J]. Genes Nutr, 2010, 5(2): 149 - 167. DOI:10.1007/s12263-009-0150-5

[44] Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, *et al*. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice[J]. J Hepatol, 2003, 39(6): 978 - 983.

[45] Wheeler M D, Kono H, Yin M, *et al*. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(12): 1544 - 1549.

[46] Wang X, Cederbaum A I. S-adenosyl-L-methionine attenuates hepatotoxicity induced by agonistic Jo2 Fas antibody following CYP2E1 induction in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317(1): 44 - 52. DOI: 10.1124/jpet.105.098004

[47] Wang X, Cederbaum A I. S-adenosyl-L-methionine decreases the elevated hepatotoxicity induced by Fas agonistic antibody plus acute ethanol pretreatment in mice[J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 477(1): 1 - 11. DOI: 10.1016/j.abb.2008.04.033

[48] Schwabe R F, Brenner D A. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290(4): G583 - G589. DOI:10.1152/ajpgi.00422.2005

[49] Kim B J, Ryu S W, Song B J. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(30): 21256 - 21265. DOI: 10.1074/jbc.M510644200

[50] Kamata H, Honda S, Maeda S, *et al*. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases[J]. Cell, 2005, 120(5): 649 - 661. DOI:10.1016/j.cell.2004.12.041

[51] Pastorino J G, Shulga N, Hoek J B. TNF-alpha-induced cell death in ethanol-exposed cells depends on p38 MAPK signaling but is independent of Bid and caspase-8[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 285(3): G503 - G516. DOI:10.1152/ajpgi.00442.2002

[52] Liu H, Jones B E, Bradham C, *et al*. Increased cytochrome P-450 2E1 expression sensitizes hepatocytes to c-Jun-mediated cell death from TNF-alpha[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(2): G257 - G266. DOI: 10.1152/ajpgi.00304.2001

[53] Schattenberg J M, Czaja M J. Regulation of the effects of CYP2E1-induced oxidative stress by JNK signaling[J]. Redox Biol, 2014, 3: 7 - 15. DOI: 10.1016/j.redox.2014.09.004

[54] Wang X, Wu D, Yang L, *et al*. Hepatotoxicity mediated by pyrazole (cytochrome P450 2E1) plus tumor necrosis factor alpha treatment occurs in c-Jun N-terminal kinase $2^{-/-}$ but not in c-Jun N-terminal kinase $1^{-/-}$ mice[J]. Hepatology, 2011, 54(5): 1753 - 1766. DOI:10.1002/hep.24540

(收稿:2015-11-03;修回:2015-12-10)

(编辑 王 红)