维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0606-04

维生素 E、亚硒酸钠对非酒精性脂肪肝作用的实验研究

谭 丽[1],管小琴,王 倩

(重庆医科大学基础医学院病理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨维生素 E(VitE)、亚硒酸钠抗非酒精性脂肪肝(Nonalcoholic fatty liver,NAFL)的作用机理。方法:24 只大鼠随机分成三组:模型组、药物组、对照组,分别喂饲高脂饲料、干预饲料、普通饲料。全部动物于 5 周末处死。观察病理形态,血清及组织匀浆测超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA),免疫组化观察组织中核因子 kB(NF-kB)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)蛋白的表达;结果:①与对照组比较,模型组血清及组织中 SOD 降低,MDA 增高;肝脏 NF-kB、TNF-α 蛋白表达水平显著上升。②与模型组比较,药物组血清及组织中 SOD 增高,MDA 降低;肝脏 NF-kB 蛋白表达水平下降,TNF-α 无显著变化。结论:联合适量补充 VitE+ 亚硒酸钠能增强 SOD 活力,降低 NF-kB 蛋白的表达,这可能是其有效防止 NAFL 发生的重要作用机制之一。

【关键词】非酒精性脂肪肝;核因子 kB;肿瘤坏死因子 α;维生素 E;硒

【中国图书分类法分类号】R361+.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-06

Experimental study about the effect of Vitamin E and sodium selenite on nonalcoholic fatty liver

TAN Li,et al

(*Department of Pathology,College of Basic Medicine,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To study the effect of Vitamin E (VitE)and Sodium selenite on nonalcoholic fatty liver (NAFL).*Methods*: 24 SD rats were randomly divided into 3 groups. The model group,treatment group and contrast group were respectively fed with high fat diet,interfering diet and normal diet.All animals were sacrificed at the end of the 5th week. The liver pathology was observed under the light microscope. Superoxide dismutase (SOD),malondialdehyde (MDA)were determined by biochemistry analysis.The expressions of nuclear factor kappa B(NF-kB)and tumor necrosis factor alpha(TNF-α)proteins in hepatocytes were examined by immunohistochemistry. *Result*: ①compared with the contrast group,serum and liver SOD levels decreased in model group,while MDA were raised.The expressions of NF-kB and TNF-a proteins in liver tissue increased significantly in model group. ②compared with the model group,serum and liver SOD level increased in treatment group,while MDA was lowered. The expression of NF-kB proteins in liver tissue was reduced in treatment group,and no significant changes occured in TNF-a protein expression. *Conclusions*:Combination of sufficient quantum of VitE and Sodium selenite can improve the SOD activities and reduce the expression of NF-kB proteins in liver tissue,which is possibly the important mechanism for VitE and Sodium selenite to prevent NAFL.

【Key words】Nonalcoholic fatty liver;NF-kB;TNF-α;VitaminE;Sodium selenite

随着人民生活水平的提高,饮食结构和生活方式的变化,非酒精性脂肪肝(Nonalcoholic fatty liver,NAFL)在我国发病率近年来在迅速上升。目前国内外能用于有效治疗脂肪肝的药物不多,有研究表明抗氧化剂 VitE 和硒能针对氧应激、脂质过氧化这一环节,在抗肝细胞脂肪变及纤维增生方面有一定效应,我们的前期实验通过在膳食中分别添加 VitE 和亚硒酸钠,显示二者在抗大鼠 NAFL 中分别有作用(另文发表)。另有文献报道,联合补充 VitE 和硒具有协同作用,可以大大提高机体的抗氧化功能[1]。本实验通过饲以大鼠高脂饮食的同时联合补充适量 VitE+亚硒酸钠,检测血清及肝组织匀浆中 SOD 活性、MDA 含量,观察肝组织 TNF-α、NF-kBp65 蛋白表达情况,进而探讨二者在治疗 NAFL 中所起的作用,以期为本病的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

作者介绍:谭 丽(1982-),女,硕士,
主要研究方向:脂肪肝。

维普资讯 http://www.cqvip.com

健康清洁级雄性 SD 大鼠 24 只，体重 200~250g，由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.2 动物模型的建立及分组

24 只大鼠正常喂养 1 周后随机分成三组：模型组（n=8）喂饲高脂饲料（含 2%胆固醇，0.5%胆酸钠，0.2%丙硫样嘧啶，5%蔗糖，10%猪油，82.3%普通饲料，搅匀，由重庆医科大学动物实验中心加工成颗粒饲料）；药物组（n=8）喂饲干预饲料，即在上述高脂饲料中添加 VitE（250mg/kg 饲料）和亚硒酸钠（0.5mg/kg 饲料）；对照组（n=8）喂饲普通饲料。实验动物分笼（每笼 4 只）饲养于重庆医科大学动物实验中心，动物房通风良好，温度保持在（20 ± 5）℃，自由饮水进食，明暗交替各 12h。于实验 5 周末处死大鼠。

1.3 标本采集

大鼠处死前禁食 12h，以 1%的戊巴比妥钠溶液 0.08g/gBW 腹腔注射麻醉，眶静脉采血，置 37℃恒温水浴 20min，红细胞沉降后，取血清 -20℃保存待检。打开腹腔，取出肝脏并称取湿重，取肝组织分别以 10%甲醛固定及 -70℃低温冰箱保存备用。

1.4 组织病理学观察及评价

①观察各组大鼠肝脏大体形态。②肝脏切片甲醛固定，石蜡包埋，HE 染色。光镜下观察病理学变化，（光镜下见脂肪变的肝组织作冰冻切片，加以苏丹Ⅳ染色证实），脂肪肝病理组织学诊断参考中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组“非酒精性脂肪肝诊断标准”[2]，根据肝小叶内脂肪变的肝细胞数将脂肪肝程度量化：0 分（肝细胞内无脂滴沉积）；1 分（肝小叶内 <30%的肝细胞有脂肪变）；2 分（肝小叶内 30%~50%的肝细胞有脂肪变）；3 分（50%~75%的肝细胞有脂肪变）；4 分（75%以上的肝细胞有脂肪变）。

1.5 生化指标检测

①血清 SOD、MDA 测定：试剂盒购自南京建成生物工程研究所，检测方法按试剂盒说明书进行，采用 752 分光光度计比色，波长各为 550nm、532nm。②肝组织 SOD、MDA 测定：取肝组织 1g 剪碎，加冰生理盐水至总体积为 10ml，制备 10%肝匀浆；4000r/min、4℃离心 10min，取上清液；比色方法与血清相同。

1.6 肝组织 TNF-α、NF-kBp65 蛋白的表达

兔抗大鼠 TNF-α、NF-kBp65 多克隆抗体、SABC 免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司，一抗稀释浓度分别为 1:300，1:200。肝组织切片经常规脱蜡至水，3%过氧化氢孵育消除内源性过氧化物酶活性，微波修复，冷却后 PBS 洗涤 1~2 次，5%BSA 封闭 20min，滴加一抗，阴性对照以 PBS 代替，4℃过夜，加入生物素化二抗，滴加 SABC20min，DAB 显色，苏木素复染，中性树胶封片。400 倍光镜下观察，每张切片摄取 1 张图片，输入计算机，应用金盘图像处理系统进行处理，自动分析得出平均光密度（AIOD）值。

1.7 统计学处理

所有数据均使用 SPSS11.5 软件包进行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$），多组间比较使用方差分析。计数资料使用非参数检验。P<0.05 表示差异有显著性。

2 结 果

2.1 肝脏病理学变化

①大体形态观察，对照组大鼠肝脏颜色呈鲜红，质地柔软，富有弹性；模型组大鼠肝脏体积增大，呈黄褐色，触之有油腻感，边缘饱满，质软；药物组大鼠肝脏体积略微增大，含血量较多，颜色明显较模型组偏红。②HE 染色光镜下显示，对照组肝小叶结构完整，中央静脉大而壁薄，肝索放射状排列，细胞轮廓清晰，细胞内未见脂质沉积（图 1）；模型组肝组织可见广泛弥漫性肝细胞脂肪变性，脂质沉积，肝索排列紊乱，肝细胞体积增大，血窦腔隙缩小，有明显的炎症反应（图 2），（细胞内均匀细小空泡经苏丹Ⅳ染色光镜下显示为猩红色脂滴）（图 3）；补充适量 VitE+亚硒酸钠后，药物组肝细胞脂肪变性数量及程度较模型组明显减轻（P<0.01），细胞内脂质沉积减少（图 4），各组大鼠肝组织脂肪变性程度比较见表 1。

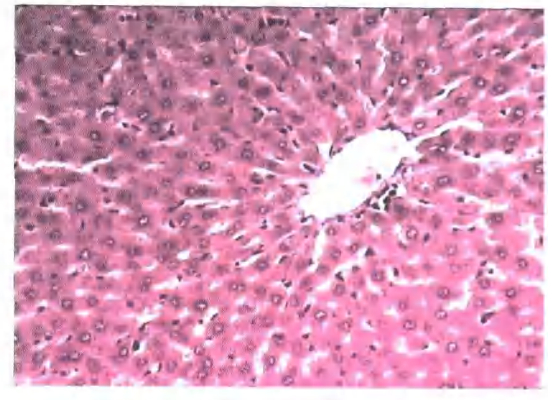


图 1 对照组 肝组织无脂肪变性 HE×200

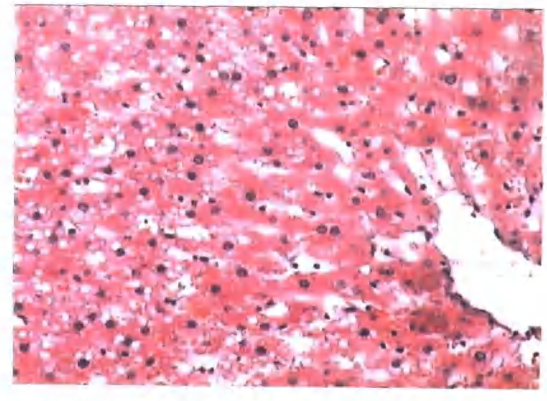


图 2 模型组 肝组织广泛脂肪变性 HE×100

维普资讯 http://www.cqvip.com

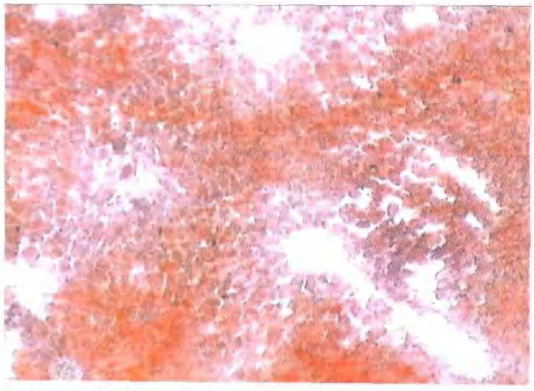


图 3 模型组 肝组织广泛脂肪变性苏丹Ⅳ×100

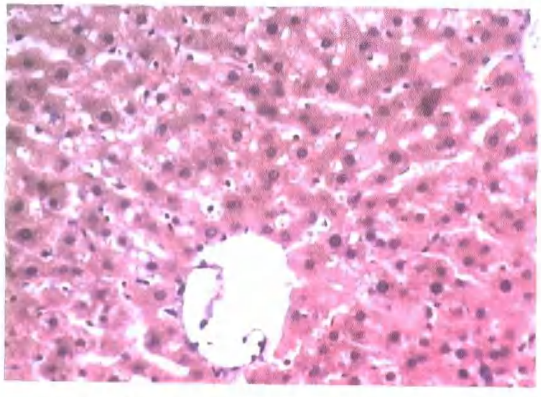


图 4 药物组 肝组织轻微脂肪变性 HE×200

表 1 各组大鼠肝组织脂肪变性程度比较(n=8)

脂肪变程度	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
对照组	8	0	0	0	0
模型组	0	1	1	2	4*
药物组	0	3	4	1	0**

* 示与对照组比较,P<0.01, 两组差别具有统计学意义; ** 示与模型组比较,P<0.01,与对照组比较,P<0.05,组间差别具有统计学意义

2.2 血清及肝组织中 SOD,MDA 含量的变化(统计结果见表 2)

①模型组与对照组比较血清及组织中 SOD 分别降低 46%、42%;MDA 升高分别为 108%、43%;组间差异均有显著性(P<0.01);②联合补充 VitE+亚硒酸钠后,药物组血清及组织中 SOD 较模型组显著升高各为 59%、50%(P<0.01), 基本达到对照组水平;MDA 明显较模型组降低各为 25%、30%(P<0.01),但仍然较对照组高。

2.3 肝组织 TNF-a、NF-kBp65 蛋白表达的变化(统计结果见表 3)

①对照组肝组织 TNF-a、NF-kBp65 均无表达,

表 2 各组大鼠血清及肝组织中 SOD,MDA 含量的变化

组别	n	SOD(U/mgprot.)		MDA(nmol/mgprot.)	
		血清	肝组织	血清	肝组织
对照组	8	583.23 ± 161.21	13.99 ± 2.33	6.43 ± 1.76	6.80 ± 0.97
模型组	8	313.96 ± 50.61*	8.13 ± 0.63*	13.40 ± 4.24*	9.79 ± 0.94*
药物组	8	500.23 ± 178.02**	12.17 ± 1.64**	10.01 ± 3.26***	7.53 ± 0.41***

注:* 示与对照组比较 P<0.01;** 示与模型组比较 P<0.01,与对照组比较 P>0.05;*** 示与模型组比较 P<0.01,与对照组比较 P<0.05

表 3 各组大鼠肝组织 TNF-a 、NF-kBp65 蛋白表达的变化

组别	n	TNF-α	NF-kBp65
对照组	8	0.03 ± 0.06	0.003 ± 0.006
模型组	8	0.23 ± 0.013*	0.09 ± 0.028*
药物组	8	0.22 ± 0.005***	0.05 ± 0.023**

注:* 示与对照组比较 P<0.01;** 示与模型组比较 P<0.01;*** 示与模型组比较 P>0.05。

模型组弥漫表达,AIOD 值较对照组分别增高 6.67 倍、29 倍, 差异有显著性 (P<0.01); ②联合补充 VitE+亚硒酸钠后,药物组 NF-kBp65 表达较模型组明显减少,AIOD 值降低 44%, 差异有显著性 (P<0.01);TNF-α 表达与模型组比较差异无显著性(P>0.05); ③药物组与对照组比较,TNF-α、NF-kBp65 AIOD 值各增高 6.33 倍、16 倍, 组间差异有显著性 (P<0.01)。

3 讨 论

本实验通过改良的高脂饲料在短期内快速成功的建立了大鼠非酒精性脂肪肝模型,其原理主要是在高脂饮食的基础上添加了药物胆酸钠和丙硫氧嘧啶。它干扰了甘油三脂(TG)的代谢,快速引起脂代谢紊乱[3]。肝脏脂肪的动态平衡受到破坏,且由于肝内氧应激、细胞内反应氧化类体(Reactive oxygen species,ROS)生成增加、脂肪酸对肝细胞产生

维普资讯 http://www.cqvip.com

的直接毒性作用等机理，很快实现由初次打击转向第二次打击[4]，快速形成非酒精性脂肪肝动物模型。本实验分别经形态学、HE 及苏丹Ⅳ染色光镜下观察显示，造模 5 周后模型组大鼠的肝脏发生了不同程度的脂肪变性，脂肪变肝细胞病理学总计分明显高于对照组。

VitE 和硒是两种重要的抗氧化剂，前者的抗氧化功能依赖其自身结构，它可以插入到细胞膜的脂质双分子层之间，与多价不饱和脂肪酸形成膜结构的一部分，并与结合在膜上的能产生氧自由基的酶（如混合功能氧化酶）紧密相邻，在氧自由基攻击多不饱合脂肪酸前将其捕获和清除，阻断其氧化过程，防止和抑制了膜上磷脂形成脂质过氧化；脂质过氧化可使膜上脂肪酸断裂缩短，失去膜的流体性质和正常功能，随后有毒的脂质过氧化产物也会导致细胞的死亡[5]。硒是机体必须的微量元素之一，为谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性中心的必须组成成分，体内 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶可直接拮抗自由基的毒性作用，能清除脂质过氧自由基和羟自由基，防止对细胞膜脂质的过氧化破坏反应，从而保护细胞膜、肝线粒体膜、微粒体膜及溶酶体膜免遭损害。硒同时还参与机体免疫反应，影响其它微量元素在体内代谢。有人用硒和维生素 E 联合治疗病毒肝炎，与治疗前比较可以提高 GSH-PX 活性，降低过氧化脂质浓度，均有极显著性差异[6]。MDA 是脂质过氧化反应中分解的终产物之一，它通过与蛋白质结合形成交链反应导致免疫应答，促进脂肪性肝炎的发生，还可以参与 Mallory 小体的形成，以及激活肝星状细胞，参与肝纤维化的进展[7]。有研究表明，发生非酒精性脂肪肝时肝内增加的脂质通过氧应激反应增加 ROS 的产生[8]，消耗了 SOD 和GSH-PX；过多的 ROS 可通过脂质过氧化反应与生物膜及核酸的大分子物质作用形成过氧化产物如 MDA 和壬二烯（HNE）[9]等，进而引起 MDA 的增高。本实验通过检测大鼠血清及肝组织中 SOD、MDA 含量变化，结果显示模型组 SOD 水平明显较对照组低，MDA 明显较对照组高，表明 NAFL 时体内抗氧化反应酶活性减低，脂质过氧化反应增强，提示氧应激和脂质过氧化反应参与了 NAFL 的发生。而药物组血清及肝组织中 SOD 含量明显较模型组增高，且水平接近对照组，MDA 水平明显较模型组降低，其水平仍高于对照组，显示药物组大鼠 SOD 活性明显增强，氧应激和脂质过氧化反应减低，且与我们的前期实验比较显示，联合补充 Vit E 和亚硒酸钠对增强 NAFL 大鼠 SOD 活力有更明显的作用，其机理可能与体内抗氧化系统能够相互节约、共同拮抗体内的过多自由基有关。

NF-kB 是近年发现的重要的转录因子[10]，在正常肝组织几乎无活化，多种因素如 TNF-α、氧自由基、IL-1、IL-2 等可引起 NF-kB 的激活。活化的 NF-kB 又可上调多种炎性因子如 TNF-α、和 IL-8 的表达，这些因子可增加 ROS 的形成、诱发炎症细胞的浸润及多形核粒细胞（Polymorphonuclear，PMN）的趋化，形成肝炎的基础[11]。有研究表明 TNF-α 对脂肪肝发病早期及进展期均有作用[12]。肝细胞 GSH 的耗竭使肝细胞对 TNF-α 引起的坏死敏感，线粒体通透性转换孔（Mitochondrial permeability transition，MPT）开放，膜电位消失，ATP 耗竭，引起细胞坏死，加重 NAFL[13]。本实验分别检测了 NF-kB、TNF-α 蛋白的表达水平，结果显示对照组大鼠肝组织中 NF-kB、TNF-α 蛋白表达水平均低甚至检测不到；模型组 NF-kB、TNF-α 明显增高，表明 NF-kB、TNF-α 在 NAFL 的发病中有一定作用；VitE+亚硒酸钠药物组大鼠肝组织中 NF-kB 蛋白表达水平明显低于模型组，TNF-α 无明显降低，表明早期的抗氧化治疗可以抑制 NF-kB 蛋白的表达，但对 TNF-α 作用不明显。此现象可能与细胞因子可通过多种途径引起肝细胞毒性有关，由于本实验动物模型较少，其机制有待更进一步研究。

参 考 文 献

[1] 李 琳，孔晓霞，陈宝琅.硒和维生素 E 对实验性肝纤维化的协同保护作用[J].临床消化病杂志，2003；15(1)：9-10.

[2] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊断标准[J].中华肝脏病杂志，2002；7(4)：2.

[3] 董 菁，成 军.脂肪肝形成分子机制的研究[J].世界华人消化杂志，2002；10(9)：1035 -1036.

[4] Day CP，James OF.Steatohepatitis：a tale of two "hits"[J].Gastroenterology，1998；114(4)：842-845.

[5] Lieber CS.CYP2E1：from ASH to NASH[J].Hepatol Res，2004；28(1)：1-11.

[6] 舒昌杰，和水祥，张复春.补硒治疗慢性活动性肝炎的临床评价[J].中华传染病杂志，1996；14(8)：180-181.

[7] 曾民德.脂肪肝发病机制及其"二次打击"假设[J].中华消化杂志，2002；22(3)：167-168.

[8] Wagner BA，Buettner GR，Burns CP.Vitamin E slows the rate

（下转第 614 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

力和 MMP-2 基因表达水平及其活性呈正相关，VEGF-C 特异性抗体可剂量依赖性地抑制肿瘤细胞的侵袭能力[7,8]。本实验中，VEGF-C ASODN 调控卵巢癌细胞黏附侵袭能力的同时，下调了 MMP-2 的蛋白表达水平，与上述研究结果一致，说明 VEGF-C 反义寡核苷酸对卵巢癌细胞黏附、侵袭能力的抑制可能与其以一未知机制调节 MMP-2 蛋白的表达有关。

VEGF-C 作为一种较新的 VEGF 家族成员因其特有的功能而备受关注，除了特异的淋巴管生成作用以外，还可以促进肿瘤细胞生长，抑制肿瘤细胞凋亡，促血管生成等，这些都可以直接或者间接促进肿瘤的转移。由于其在肿瘤发展中的重要作用，使得 VEGF-C 成为控制肿瘤生长转移，治疗肿瘤的一个新的理想靶点。

参 考 文 献

[1] Ohta Y,Shridhar V,Bright RK,et al.VEGF and VEGF tape C play an important role in angiogenesis and lymphagiogenesis in human malignant mesotheliona tumours[J].Br J Cancer,1999;81(1):54-61.

[2] Mandriota S J,Jussila L,Jeltsch M,et al.Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis[J].EMBO J,2001;20(4):672-682.

[3] Park B-K,Paik Y H,Park J Y,et al.The clinicopathologic significance of the expression of vascular endothelial growth factor-C in intrahepatic cholangiocarcinoma[J].Am J Clin Oncol,2006;29(2):138-142.

[4] Mattila M M,Ruohola J K,Karpanen T,et al.VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors[J].Int J Cancer,2002;98(6):946-951.

[5] Skobe M, Hamberg L M,Hawighorst T,et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis,angiogenesis,and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma[J].Am-J-Pathol,2001;159(3):893-903.

[6] Yonemura Y,Endo Y,Tabata K, et al. Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer[J].Int J Clin Oncol,2005;10(5):318-327.

[7] Ueda M,Terai Y,Yamashita Y,et al.Correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas[J].Int J Cancer,2002;98(3):335-343.

[8] Ueda M,Hung Y C,Terai Y,et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas[J].Clin Cancer Res,2005;11(9):3225-3232.

[9] Curran S,Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis[J].Eur J Cancer,2000;36(13):1621-1630.

[10] Langenskiold M,Holmdahl L,Falk P,et al. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer[J]. Int J Colorectal Dis,2005;20(3):245-252.

[11] Tester AM,Waltham M,Oh SJ,et al.Pro-matrix metallo proteinase-2 transfection increases orthotopic primary growth and experimental metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells in nude mice[J]. cancer Ras,2004;64(2):652-658.

[12] Di G H,Li H C,Shen Z Z,et al.Analysis of anti-proliferation of curcumin on human breast cancer cells and its mechanism[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi,2003;83(20):1764-1768.

[13] Di GH,Lu JS,Song CG,et al. Over expression of aromatase protein is highly related to MMPs levels in human breast carcinomas[J]. J Exp Clin Cancer Res,2005;24(4):601-607.

[14] Trappen PV,Ryan A,Carroll M,et al.A model for coexpression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumor cell invasion in cervical cancer[J].Br J Cancer,2002;87(5):537-544.

(上接第 609 页)

of free radical-mediated lipid peroxidation in cells[J].Arch Biochem Biophys,1996;334(2):261-267.

[9] Seki S,Kitada T,Yamada T,et al.In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases[J].J Hepatol,2002;37(1):56-62.

[10] Melitor JA,Walker WH,Doerre S,et al.NF-kappa B:a family of inducible and differentially expressed enhancer-binding proteins in human T cells[J].Proc Nalt Acad Sci USA,1990;87(24):10028-10032.

[11] Kaplowitz N.Biochemical and Cellular Mechanisms of Toxic Liver Injury[J].Seminars in Liver Disease,2002;22(2):137-144.

[12] Valenti L,Fracanzani AL,Dongiovanni P,et al.Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease[J].Gastroenterology,2002;122(2):274-280.

[13] 杨朝霞,代东伶,沈 薇.还原型谷胱甘肽对实验性大鼠非酒精性脂肪肝的疗效观察及其分子机制探讨[J].重庆医科大学学报,2005;30(6):803-807.