维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2007)04-0371-05

枸杞多糖对酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素 P4503A 的影响

古 赛[1],姜 蓉[2]

(1 重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016;2 重庆医科大学组胚教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过观察枸杞多糖(LBP)对酒精性脂肪肝(AFL)大鼠肝细胞色素 P4503A 基因和活性的影响,揭示其部分治疗机制。方法:用乙醇灌胃 10 周造成大鼠慢性 AFL 模型,再用 5%和 10%的 LBP 治疗 10 周,10%阿托莫兰(GSH)治疗组和戒酒组作为阳性对照,作治疗前后比较:肝脏病理形态,肝匀浆还原型谷光甘肽 GSH、丙二醛 MDA 含量,肝细胞色素 P4503A(CYP3A)活性及基因表达水平。结果:LBP 能明显改善酒精所致大鼠肝脏脂肪性病理变化,增加 GSH 含量,减少 MDA 产生,抑制 CYP3A 活性和基因表达,其改善脂肪病变与阿托莫兰组无显著差异,优于单纯戒酒组。结论:LBP 抑制 CYP3A 活性及基因表达,减轻脂质过氧化,有效治疗 AFL。

【关键词】酒精性脂肪肝;枸杞多糖;治疗;细胞色素 P4503A

【中国图书分类法分类号】R332 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-20

Effects of Lycium Barbarum Polysaccharide on the expression of hepatocyte cytochrome P4503A in rats with alcoholic fatty liver

GU Sai, et al

(*Department of Gastroenterology, the First Affilated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of Lycium Barbarum Polysaccharide(LBP) on the activity and gene expression of hepatocyte cytochrome P4503A(CYP3A) in rat model with alcoholic fatty liver (AFL). *Methods*: The AFL rats models were established by ethanol intragastric infusion for ten weeks. Then, those AFL model rats were treated with 5% and 10% LBP and 10% GSH intragastric infusion. Liver pathologic changes were observed and the activity of CYP3A and its gene expression as well as the contents of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in liver were detected and compared among the control group, treatment group and abstinence treatment group. *Results*: Fatty degeneration in liver recovered normally in the LBP treatment groups, LBP could inhibit the expression of CYP3A gene, reduce the activity of CYP3A and the content of MDA, and increase the content of GSH. The curative effect of LBP was not significantly different from that of GSH, but greater than that of abstinence treatment. *Conclusion*: LBP can prevent AFL through markedly inhibiting the hepatocyte CYP3A activity and gene expression.

【Key words】Alcoholic fatty liver; Lyceum Barbarum Polysaccharide; Treatment; Cytochrome P4503A

酒精性脂肪肝(Alcoholic fatty liver, AFL)已成为一种世界性疾病,目前缺乏针对性治疗的理想药物。枸杞多糖 (Lycium Barbarum Polysaccharide, LBP)是宁夏枸杞的重要抗氧化成分[1],而自由基及其启动的脂质过氧化连锁反应是酒精造成肝细胞损伤的主要机制之一[2]。本实验研究 LBP 对酒精性脂肪肝大鼠细胞色素 P4503A (CytochromeP4503A, CYP3A)活性及基因表达的影响,以期揭示 LBP 的部分治疗机制。

作者介绍:古 赛(1967-),女,副教授,博士,主要研究方向:酒精性肝病。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级雄性 Wistar 大鼠 202 只,周龄 7 周,质量 180~220g,购于第三军医大学实验动物中心。无水乙醇,为国产分析醇,使用前用蒸馏水稀释。LBP 由宁夏中药厂馈赠,配成 5%、10%水溶液待用,GSH(商品名:阿托莫兰)由重庆药友制药有限公司馈赠。MDA、GSH 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。红霉素、氧化型辅酶Ⅱ(NADP+)、6-磷酸葡萄糖二钠(G-6-P)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PD)均购自 Sigma 公司。日立 CP100MX 超高速冷冻离心机。

1.2 方法

1.2.1 AFL 大鼠模型建立及给药处理 202 只清洁级大鼠

维普资讯 http://www.cqvip.com

随机分为 2 组，正常对照组 32 只，酒精模型组 170 只，分笼饲养，每笼 5~6 只，全价颗粒饲料喂养(脂肪含量 <5%)，自由饮水。乙醇剂量计算采用公式：乙醇剂量(g)= 乙醇体积(ml)×乙醇体积分数×乙醇相对密度(0.8g/ml)。模型组给予体积分数 40%(V/V)乙醇 8g/(kg.d)，分 2 次灌胃，间隔时间 9~10h，至 5 周末，处死 12 只，自 6 周始乙醇浓度增至体积分数 50%(V/V)9g/(kg.d)，方法同前，至 10 周末，先随机处死 3 只病理证实有肝脏脂肪变，再处死余下的 12 只。另因误吸入气道、感染、胃出血等原因死亡 25 只。模型组余下的 118 只，再随机分为 4 组：5%LBP 组、10%LBP 组、10%GSH 组各 30 只，均停止酒精灌胃，并参照文献报道[5,6]用稀释好的 5%LBP、10%LBP 和 10%GSH、0.5ml/100g 大鼠，每日 1 次灌胃。戒酒组 28 只，与正常对照组均用等体积的蒸馏水分 2 次灌胃。4 组大鼠分别于干预处理后 5 周、10 周处死，取肝脏，分别标记，-80℃冰箱保存。

1.2.2 病理形态学 取肝左叶同一部位组织，10%甲醛固定，石蜡包埋切片，HE 及苏丹Ⅲ染色，光镜下观察脂肪变程度。

1.2.3 酶学测定 取肝右叶组织 4℃下制备 10%肝匀浆，考马斯亮蓝法测匀浆蛋白，MDA、GSH 含量测定按试剂盒步骤进行。

1.2.4 CYP3A 活性测定 按文献方法用超高速冷冻离心机分次提取肝微粒体[7]。将得到的微粒体悬浮于含有 20%甘油的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)中，-80℃保存备用。以小牛血清白蛋白为标准品用 Lowry 法测定肝微粒体蛋白含量[8]。用 Nash 法测定肝微粒体 CYP3A 同工酶：红霉素 N- 脱甲基酶(ERND)活性表示 CYP3A 活性[9]。红霉素终浓度0.4mmol/L，蛋白终浓度 0.5mg/ml。反应体系含 NADPH 再生系统：1mmol/LNADP+，10mmol/G-6-P，0.7U G-6-PD，6mmol/LMgCl$_2$。反应时间为 20min，反应终止后，加入 Nash 试剂，根据 412nm 波长下样品光密度值计算反应产物甲醛的生成量，推算肝微粒体红霉素 N- 脱甲基酶活性，其活性大小用 nmol/min·mg 蛋白表示。

1.2.5 CYP3A 基因表达测定 采用 RNA 抽提和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)：肝脏总 RNA 提取和 RT-PCR 按 Wats 和 Takara 试剂盒操作，PCR 引物序列：CYP3A 正义链：5'-atcgatatggagatcac-3'，反义链：5'-gaagaagtcettgtctgc-3'；内对照亲环素(Cyclophilin，CYC)：正义链：5'-cttegacatcacggct-gatgg-3'，反义链：5'-caggaectgtatgettcagg-3'，美国生物医学中心基因库(Gene Bank)中检索。CYP3A 和 CYC 的 PCR 循环为：95℃预变性 10min，(95℃60s，54℃55s，72℃90s)×27 次循环，1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，EB 染色，分子量标准为 DNAmakerDL2000，凝胶图像分析系统对 RT-PCR 产物电泳条带行密度分析，测定目的带及 CYC 条带的 V 值(Volume= 平均吸光密度值 × 条带面积)，目的条带表达强度 RV=V$_{目的带}$ /CYC。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据经 SAS 系统软件处理，组间比较方差齐同用 t 检验，方差不齐用 StatterWaite 检验。

2 结 果

2.1 一般情况

正常对照组大鼠在实验观察中均活跃，毛色光滑，质量持续增长，无死亡。酒精组大鼠则反应迟钝，毛色晦暗，质量增长缓慢，至 10 周时死亡 25 只，死亡率为 14.7%。药物治疗的三个组及戒酒组毛色逐渐改善，质量增长趋于加快，5%LBP 组、10%LBP 组、10%GSH 组各死亡 1 只、3 只、1 只，戒酒组死亡 9 只，死亡率高达 32.14%。实验中处死及非正常死亡的大鼠情况见表 1。

表 1 大鼠非正常死亡及处死表

时间	5w	10w	15w	20w	死亡
分组	处 死(只)				(只)
正常组	8	8	8	8	0
酒模组	12	15			25
5%LBP 组			15	14	1
10%LBP 组			15	12	3
10%GSH 组			15	14	1
戒酒组			10	9	9

2.2 肝脏病理形态

光镜下，HE 染色，正常对照组见肝细胞以小叶中央静脉为中心呈放射状排列，肝小叶轮廓清晰，少数肝细胞内小空泡变性(图 1)。10 周酒精模型组大部分(13/15)肝组织切片可见中央静脉周围肝细胞排列紊乱，小叶界限不清，肝细胞浆中见大小不等较广泛空泡变性，散在炎性细胞浸润(图 2)。各治

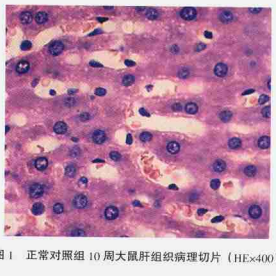


图 1 正常对照组 10 周大鼠肝组织病理切片 (HE×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com

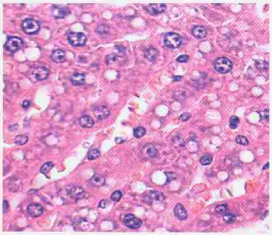


图 2 酒模组 10 周大鼠肝组织病理切片(HE×400)

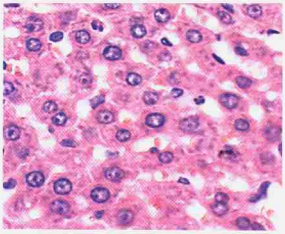


图 3 5%LBP 治疗 10 周大鼠肝组织病理切片(HE×400)

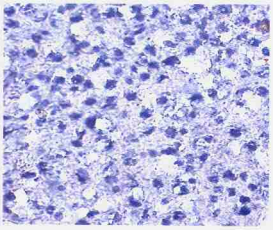


图 4 正常对照组 10 周大鼠肝组织病理切片(苏丹Ⅲ×200)

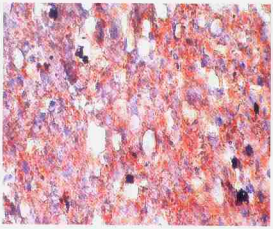


图 5 酒模组 10 周大鼠肝组织病理切片(苏丹Ⅲ×200)

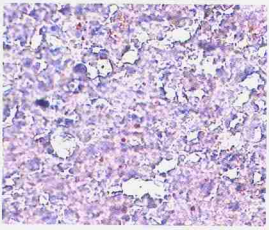


图 6 5%LBP 治疗 10 周大鼠肝组织病理切片(苏丹Ⅲ×200)

疗组及戒酒组 5 周时肝细胞内空泡变性有所减少，且大空泡少见，10 周时仅在腺泡Ⅲ区肝细胞排列稍显紊乱，细胞内空泡进一步减少，接近正常对照组水平(图 3)。

苏丹Ⅲ染色，正常对照组呈红色的脂肪颗粒极少(图 4)，酒精组肝细胞内大量呈红色的脂肪滴(图 5)，各治疗组 5 周后红色脂肪颗粒减少，10 周后已接近正常对照组，以 5%LBP 治疗 10 周为代表(图 6)。含脂肪滴肝细胞所占面积评分标准如下：0 分：含脂肪滴肝细胞散在、稀少；1 分：含脂肪滴肝细胞≤1/4；2 分：含脂肪滴肝细胞≤1/2；3 分：含脂肪滴肝细胞≤3/4；4 分：肝组织几乎被脂肪滴所代替，其面积>3/4。正常对照组及酒模组与各治疗组及戒酒组脂肪变程度比较见表 2。

2.3 脂质过氧化酶

干预 10 周各组大鼠脂质过氧化酶测定结果见表 3。

2.4 ERND 活性

各组大鼠 ERND 活性测定见表 4。

2.5 RT-PCR 检测各组大鼠 CYP3A/CYCmRNA 变化

见表 5、图 6。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 各组大鼠肝脏病理苏丹Ⅲ染色脂肪变程度积分

分组	5w(n)	10w(n)
正常组		0.75±0.3(8)
酒模组		3.47±0.8(15)*
5%LBP 治疗组	2.17±0.6(15)△	1.14±0.5(14)△*Φ
10%LBP 治疗组	2.13±0.8(15)△	1.17±0.4(12)△*Φ
10%GSH 治疗组	1.93±0.5(15)△	1.07±0.3(14)△*Φ
戒酒组	2.70±0.6(10)△●	1.22±0.5(9)△*Φ

注：酒模组与正常对照组比 *P<0.05，干预各组与酒模组比 △P<0.05，戒酒 5 周组与同期各治疗组比 ●P<0.05，干预 10 周各组与干预 5 周各组比 *P<0.05，干预 10 周各组与正常对照组比 ΦP<0.05

表 3 干预 10 周各组大鼠脂质过氧化酶学测定结果

分组	n	GSH(mg/gprot)	MDA(nmol/mgprot)
正常对照组	8	83.15±12.30	2.75±0.58
酒模组	15	42.48±10.73*	14.55±3.21*
5%LBP 治疗组	14	76.08±11.08△	3.09±0.3△
10%LBP 治疗组	12	75.63±11.07△	3.12±0.42△
10%GSH 治疗组	14	81.88±13.21△	2.89±0.24△
戒酒组	9	53.15±10.6△●	5.53±1.78△●

注：酒模组与正常对照组比 *P<0.05，各干预组与酒模组比 △P<0.05，戒酒组与各治疗组比 ●P<0.05

3 讨 论

乙醇在体内代谢过程中，产生过多氧应激产物，激活磷脂酶及脂质过氧化反应，抑制 SOD、GSH-PX 活性，消耗自由基清除剂 GSH，使脂质过氧化产物 MDA 及 H_2O_2 显著升高，破坏蛋白质结构和功能，形成 AFL[8,9]。

CYP3A 是 Selye 等 1971 年发现的一种细胞色素 P450 亚族[10]，是 CYP450 基因超家族中最重要的代谢酶基因，在药物和毒物代谢过程中起重要作用。红霉素是肝 CYP3A 特异的酶底物，测定 CYP3A 同工酶活性可表达 CYP3A 的活性[11]。已有研究表明乙醇所导致的脂质过氧化反应增强，蛋白-乙醛加合物增加，损伤肝脏，与其诱导 CYP3A 蛋白表达增强有关[12]，亦有研究表明乙醇明显诱导人肝细胞 CYP3A4 基因表达[13]。本实验结果显示随乙醇摄入增加，大鼠肝微粒体 CYP3A 活性提高，肝细胞 CYP3A 基因表达增强，脂质过氧化终产物 MDA 含量增加，GSH 消耗增多，肝脏脂肪变程度加重。表明 AFL 的形成与 CYP3A 有一定相关性。

研究表明 LBP 能清除氧自由基，抑制脂质过氧化反应[1]。作者实验也证实 LBP 在体内能有效抑制 CYP2E1 基因和蛋白表达，减轻脂质过氧化反应，改善脂肪变程度。本实验显示，单纯戒酒组 CYP3A 活

表 4 各组大鼠 ERND 活性(nmol/(min/mg))(n)

分组	5w	10w	15w(干预 5w)	20w(干预 10w)
正常对照组	3.25±0.34(8)	3.54±0.41(8)	3.30±0.28(8)	3.47±0.36(8)
酒模组	7.68±0.64(12)*	9.50±0.58(15)*△		
5%LBP 治疗组			5.56±0.53(15)●*	5.42±0.60(14) ●*
10%LBP 治疗组			5.62±0.44(15)●*	5.35±0.68(12) ●*
戒酒组			6.57±0.57(10)●**	6.38±0.71(9)●**

注：与正常对照组比 *P<0.05，与 5 周酒模组比 △P<0.05，干预组与 10 周酒模组比 ●P<0.05，与同期 LBP 治疗组比 #P<0.05，与同期正常对照组比 *P<0.05。

表 5 各组大鼠 CYP3A/CYCmRNA(n)

分组	5w	10w	15w(干预 5w)	20w(干预 10w)
正常对照组	0.096±0.008(8)	0.090±0.011(8)	0.095±0.007(8)	0.097±0.011(8)
酒模组	0.740±0.052(12)*	0.984±0.057(15)*△		0.473±0.030(14)●*
5%LBP 治疗组			0.484±0.025(15)●*	0.476±0.027(12)●*
10%LBP 治疗组			0.497±0.024(15)●*	0.565±0.038(9)●**
戒酒组			0.582±0.037(10)●**	

注：与正常对照组比 *P<0.05，与 5 周酒模组比 △P<0.05，干预组与 10 周酒模组比 ●P<0.05，与同期 LBP 治疗组比 #P<0.05，与同期正常对照组比 *P<0.05。

维普资讯 http://www.cqvip.com

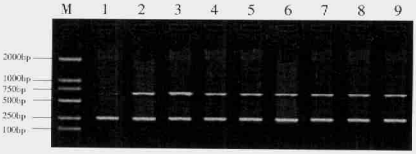


图 7 各组大鼠 CYP3A 及 CYCmRNA 变化图象

注:图 7 自左向右分别是:Mark、10 周正常对照组、5 周、10 周酒模组、5 周、10 周 5%LBP 治疗组、5 周、10 周 10%LBP 治疗组、5 周、10 周戒酒组

性及基因表达均下降,但无戒酒加 LBP 治疗组下降明显,进一步揭示 LBP 治疗 AFL 的机制不仅与其抑制 CYP2E1 有关,还与其抑制 CYP3A 基因表达和活性有关。但目前 LBP 抑制 CYP3A 的途径尚不清楚,是否与 IL-6 相似,通过抑制一种被称为 PXR (Pregnane Xenobiotics Receptor)的孤儿核受体在肝细胞中的表达,下调 CYP3A 基因表达[14],还需深入研究。本实验亦显示,尽管戒酒加 LBP 治疗更有利于肝脏脂肪变的早期恢复(LBP 治疗组 5 周时的恢复仍明显好于单纯戒酒组,$P<0.05$),但随时间延长,与单纯戒酒组肝脏脂肪变的恢复已较接近,且 LBP 对 CYP3A 的抑制作用尚未在观察期内表现出良好的时效关系,故戒酒仍不失为一种简单而经济有效的治疗 AFL 的方法。不过,我们仍应注意到本实验中戒酒组大鼠的高死亡率,是否提示突然戒酒并不利于大鼠生存的可能,其原因尚有待进一步研究。

还原型谷胱甘肽(GSH)是细胞内一种重要的代谢调节物,具保护细胞、抗氧自由基损伤、促进肝酶活性和肝解毒功能[4],大量动物实验和临床均证实 GSH 能有效治疗中毒性肝病[15]。本实验以 GSH 作LBP 的阳性药物对照,发现 LBP 在保护肝脏,恢复肝功能,抗脂质过氧化反应,改善肝脏脂肪变方面与 GSH 无显著性差异。

本实验仅设了 5%和 10%两种 LBP 剂量,尚未表现出量效关系,而多糖的疗效不一定与剂量呈正比关系,往往有个最适剂量[3],下一步可多设定几个剂量,以寻求 LBP 的最适剂量,并进一步对 LBP 进行纯化,提取单体,探明分子结构,深入研究。

参 考 文 献

[1] 宋育林,曾民德,陆伦根,等.枸杞多糖防治大鼠酒精性肝病的形态学观察[J].医学研究生学报,2002;15:13-16.

[2] Demeilliers C,Maisonneuve C,Grodet A,et al.Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice[J].Gastroenterology,2002;123:1278-1290.

[3] 沈 泳,杨卫东,任彬彬,等.宁夏枸杞多糖对 CCl_4 损伤的保护作用[J].宁夏医学院学报,1996;18(4):1-2.

[4] 石小枫,刘 杞,郭树华.还原型谷胱甘肽对大鼠肝损伤的保护作用[J].重庆医科大学学报,2003;28(5):592-594.

[5] Sanderink GJ,Bournique B,Stevens J,et al.Involvement of human CYP1A isoenzymes in the metabolish and drug interactions of riluzole in Vitrol[J].J Pharmacol exp Ther,1997;282(3):1465-1472.

[6] Lowry OH,Roseborough NJ,Farr AL,et al.Protein measurement with the folin phenol reagent[J].J Biol Chem,1951;193(1):265-275.

[7] Roberts BJ,Shoaf SE,Song BJ.Rapid changes in cytochrome P4502E1(CYP2E1)activity and other P450 isoenzymes follow ethanol withdrawal in rats[J].Biochem Pharmacol,1995;49(11):1665-1673.

[8] Tsukamoto H,Lu SC.Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury[J].FASEB J,2001;15:1335-1345.

[9] 冯志强,沈志祥,谭诗云,等.纳洛酮和必需磷脂预防酒精性脂肪肝的实验研究[J].中华消化杂志,2003;23(12):752-753.

[10] Selye H.Hormones and resistance[J].J Pharm Sci,1971;60(1):1-28.

[11] Christine M,Hunt.Heterogeneity of CYP3A isoforms metabolizing erythromycin and cortisol[J].Clin Pharmacol Ther,1992;51:18-23.

[12] Onni N,Seppo P,Risto O,et al.Cytochromes P450 2A6,2E1,and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases[J].Journal of Hepatology,2000;33:893-901.

[13] Kostrubsky VE,Strom SC,Wood SG,et al.Ethanol and isopentanol increase CYP3A and CYP2E in primary cultures of human hepatocytes[J].Arch Biochem Biophys,1995;322(2):516-520.

[14] Pascussi JM,Gerbal-Chaloin S,Pichard-Garcia L,et al.Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes[J].Biochem Biophys Res Commun,2000;274(3):707-713.

[15] 孙荣玲.还原型谷胱甘肽治疗酒精性肝病 134 例[J].临床药学,2005;14(8):86-87.