维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0803 - 05

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

杨朝霞,代东伶,沈 薇

(重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨解偶联蛋白 2(UCP2)在非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)发病中的作用;观察还原型谷胱甘肽(GSH,商品名阿托莫兰)对实验性 NAFLD 的治疗效果,探讨其可能的分子机制。方法:高脂饮食建立大鼠 NAFLD 模型,同时设正常饮食对照组(Basic diet, B 组),模型对照组(单纯性非酒精性脂肪肝, NAFL 组),病理对照组(非酒精性脂肪性肝炎,NASH 组),阿托莫兰治疗组(GSH 组)。肝组织匀浆测 SOD,GSH,MDA;HE 染色法观察肝脏病理改变;ELISA 测定血清 TNFα;免疫组织化学染色观察肝组织 TNFα,UCP2 蛋白表达情况;逆转录 PCR 检测肝组织 UCP2mRNA。结果:(1)与 B 组相比,NAFL 组大鼠的肝组织 MDA、SOD、GSH 均无明显变化;肝组织广泛脂肪变性,脂质沉积;UCP2mRNA 表达水平显著上升,血清和肝组织 TNFα 无显著变化。(2)与 NAFL 组相比,NASH 组大鼠的肝组织 SOD、GSH 显著下降,MDA 显著升高;肝组织广泛弥漫肝细胞脂肪变性,炎性细胞浸润,坏死,局部纤维组织增生;血清和肝组织 TNFα 增多,UCP2 阳性细胞数和 UCP2mRNA 表达水平进一步上升。(3)与 NASH 组相比,GSH 组大鼠肝组织 GSH、SOD 显著增高;肝细胞广泛脂肪变性,炎症细胞浸润,灶性及点状坏死,但是未见纤维组织增生;血清和肝组织 TNFα 显著下降,UCP2 水平略低,无统计学意义。结论:NAFLD 时肝脏 UCP2 表达上调,可能是机体的一种适应性反应;而更晚期血清及肝脏 TNFα 水平显著升高,UCP2 过度表达,则可能诱导或加剧脂肪性肝病向脂肪性肝炎,甚至向脂肪性肝纤维化进展。GSH 通过减少 ROS 及其产物的形成,间接影响对 TNFα、UCP2 的表达诱导,发挥护肝作用。

【关键词】非酒精性脂肪肝,解偶联蛋白 2,肿瘤坏死因子 α,GSH

【中国图书分类法分类号】R575.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 03 - 03

The Effect of Glutathione On Experimental Rat With Fatty liver And Its Possible Molecular Mechanism

YANG Zhaoxia, et al

(*Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objective: To investigate the role of uncoupling protein - 2 in development of nonalcoholic fatty liver diseases(NAFLD), and explore the effect of glutathione(GSH) on NAFLD. Methods: 32 SD rats were randomly divided into basic diet - treated group(B group), model group(M group), Pathology group(P group) and GSH treated group(G group). The following parameters were determined by biochemical analysis: superoxide dismutase(SOD), glutathione(GSH), malondialdehyde (MDA). Liver histopathologic evaluation was performed by hematoxylin - eosin staining. Serum tumor necrosis factor alpha(TNFα) level was done by enzyme - linked immunoadsordent assay(ELISA). Ucp2 and TNFαproteins expression in hepatocytes was examined by immunohistochemistry, and UCP2mRNA expression by semi - quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction(RT - PCR). Results: (1) compared with B group, no evident increase in liver MDA, SOD and GSH of M group rats as well as serum TNFαlevel were observed. Neither marked change in number of hepatocytes with TNFαpositive was shown by immunohistochemistry staining, but an increase in UCP2 mRNA and UCP2 protein expression was seen in M group rats. (2) Compared with M group, a significant increase in serum TNFα and MDA levels was found in P group, while a significant decrease in liver homogenate SOD and GSH was observed. An apparent increase in number of hepatocytes with TNFαand UCP2 positive was shown by immunohistochemistry staining, as well as UCP2mRNA level by

作者介绍:杨朝霞(1971 -),女,讲师,博士,
主要研究方向:脂肪肝与肝纤维化。

维普资讯 http://www.cqvip.com

RT - PCR. (3) Compared with P group, a significant decrease in serum MDA and a significant increase in liver homogenate SOD, GSH levels was found in G group. A little lower level of UCP2 expression was shown in G group than in P group. Conclusion: High level of serum and tissue TNFαand UCP2 over - expression are concomitant with an extreme decrease even depletion in the liver ATP in NAFLED model rats, that cause oxidative stress and lipid super - oxidation in liver, and induce or exacerbate fatty liver disease progression to steatohepatitis even fibrosis. Glutathione seems to be effective to some extent for NAFLD by protection of liver function through replenishment of exogenous antioxidants.

【Key words】 Fatty liver nonalcoholic; Uncoupling protein - 2; Serum tumor necrosis factor alpha(TNFα); Glutathione

随着经济的发展和生活水平的提高,NAFLD 的发病率在发达国家乃至发展中国家均达到相当高的水平,逐渐成为继病毒性肝炎之外的第一大病因而日益受到学者的重视。NAFLD 包括单纯性脂肪肝及脂肪性肝炎,后者可以进展为肝纤维化和肝硬化。尽管 NAFLD 发病机理尚不十分清楚。但目前已知与过多脂质摄入、肥胖和胰岛素抵抗有关,而活性氧(ROS)在脂肪性肝炎发病中的作用也逐渐为人们所接受;尽管目前对 NAFLD 尚没有一种完全有效的治疗策略和方法,但是从现在所知的发病机制来说,可针对氧应激和脂质过氧化,以减少相应的产物和细胞因子引起炎症、坏死和纤维化的发生。本研究针对氧应激引起的 ROS 增多这一环节,外源性补充还原性谷光甘肽以增加机体抗氧化活性,观察单纯补充外源性谷光甘肽对 NAFLD 的影响,从而筛选出对 NAFLD 有效的治疗药物。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立[1]

雌性 SD 大鼠 32 只,购自第三军医大学大坪医院动物中心,体重 181.42 ± 12.05g,正常喂养 1 周后随机分为 2 组。正常对照组(B 组)8 只以普通饮食喂养,高脂饮食组 24 只以 88% 普通饮食 + 10% 猪油 + 2% 胆固醇喂养,自由饮水。实验开始后第 8 周末从高脂饮食组随机抽取 8 只处死作为模型对照组(NAFL 组),高脂饮食组剩余大鼠随机分为阿托莫兰组(GSH 组)、病理对照组(NASH 组)。阿托莫兰组 8 只,从第 9 周开始以 0.15g/100g 体重阿托莫兰每日灌胃;病理对照组 8 只,以生理盐水 1.5ml/100g 体重每日灌胃。于第 18 周末处死全部大鼠。

1.2 标本采集

大鼠处死前禁食 6h,称重后以 1% 的戊巴比妥 0.08g/gBW 腹腔注射麻醉,眶静脉采血,血细胞自然沉降后,取血清 -20℃保存待检。打开腹腔,取出肝脏并称取湿重,从肝右叶中部切取一块肝组织,10% 甲醛固定后制备石蜡切片。

1.3 生化指标检测

肝匀浆超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、GSH 按照试剂盒说明书操作。血清肿瘤坏死因子 α(TNFα)水平采用双抗体夹心 ELISA 法测定,试剂盒购自生物晶美公司。

1.4 组织病理及免疫组化结果评价

肝脏切片甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色并评价组织脂肪变性、炎症、坏死程度。两位病理科医生对切片染色结果按 Lee[2] 的标准进行盲法评分,根据肝细胞脂肪含量将脂肪变性评分为 0 ~ 4 分(无 ,0 分;≤25% ,1 分;25% ~ 50% ,2 分;50% ~ 75% ,3 分;≥75% ,4 分)。每低倍视野下坏死灶数评价炎症程度(无,0 分;1 个病灶,1 分;2 个以上病灶,2 分;桥接或融合性坏死,3 分)。据以下方法评定纤维化程度:无,0 分;灶性或不完全性非桥接纤维化(≤50% 肝小叶),1 分;广泛非桥接纤维化(>50% 肝小叶),2 分;桥接纤化,3 分;肝硬化 4 分。光学显微镜下观察肝细胞损伤情况,包括气球样变性,细胞骨架结构异常(比如 Mallary's 小体)等用来评分,将总分相加并进行比较。

1.5 肝组织 UCP2、TNFα 表达

兔抗大鼠 UCP2、TNFα 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司,工作浓度 1:100。抗兔 SP 免疫组化试剂盒购自北京中山公司。肝组织切片经常规脱蜡水化,3% 过氧化氢孵育消除内源性过氧化物酶活性,微波修复,3% 过氧化氢浸泡,血清孵育,滴加一抗,阴性对照以 PBS 代替,4℃过夜,加入相应的二抗、亲和素 - 生物素系统。DBA 显色,苏木素复染,中性树胶封片。光镜下恒定 200 倍,每张切片摄取 1 张图片,输入计算机,应用北航 CM - 2000B 型生物医学图像分析系统进行处理,自动分析得出平均光密度值结果。

1.6 RT - PCR 检测 UCP2 的表达

(1)试剂及引物:UCP2 目的片段上游引物 5′ - AACAGTTCTACACCAAGGGC - 3′,下游引物 5′ - AGCATGGTAAGGGCACAGTG - 3′,产物长度 479bp;以稳定表达的 β - ACTIN 作为内参照,上游序列 5′ - TTGTAACCAACTGGGACGATATGG - 3′,下游序列 5′ - GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG - 3′,产物长度 650bp。肝组织总 RNA 提取按照试剂盒说明书操作。RT - PCR 试剂盒购自日本 TAKARA 试剂公司,总 RNA 抽提试剂盒购自大连宝生物公司。目的及内参照片段引物由上海申能博采公司合成。

(2)反转录合成 cDNA 的过程:按照逆转录反应试剂盒操作程序进行。$Mgcl_2$ 4μl,RNA buffer 2μl,dNTP 2μl,RNA 酶抑制剂 0.5μl,Transcriptase 1μl,OligdT 1μl,RNA 1μg 按 30℃10min,42℃30min,99℃5min,5℃5min 反应。

(3)PCR 扩增及产物分析:将 cDNA 模板 2μl 转移到无

维普资讯 http://www.cqvip.com

菌薄壁 PCR 管中,按次序加入以下试剂 Mgel, 0.9μl, RNA 缓冲液 2.8μl, 去离子水 23.5μl, dNTP 0.1μl, Tag 聚合酶 0.3μl, 上下游引物各 0.2μl, 反应总体积 30μl。95℃预变性 2min;按 94℃变性 50min, 56℃退火 45min, 72℃延伸 45min, 扩增 35 个循环, 72℃延伸反应 4min。然后 4℃储存。取 PCR 产物 10μl 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果,根据已知碱基数目判断目的产物。

1.7 统计学处理

所有数据均使用 SPSS 软件包进行统计学分析。计量资料用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)形式,采用 SPSS11.5 软件单因素方差分析(one way ANOVA),计数资料的假设检验用秩和检验的 nparl way 过程,$p < 0.05$ 表示差异具有显著性意义。

2 结 果

2.1 肝组织形态学变化

HE 染色显示,B 组肝小叶结构完整,无变性、坏死、炎性细胞浸润及纤维组织增生。造模 7 周后(NAFL 组大鼠),可见肝组织广泛脂肪变性,脂质沉积,病变以腺泡Ⅱ、Ⅲ区(中央静脉周围)明显,腺泡Ⅰ区病变程度相对较轻,肝细胞基本正常,组织结构完整,符合单纯性脂肪肝的诊断标准[3];NASH 组大鼠肝组织广泛弥漫肝细胞脂肪变性,炎性细胞浸润,灶性、片状及桥接坏死,局部有纤维组织增生,假小叶轮廓形成,符合脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化的诊断标准[3];GSH 组广泛肝细胞脂肪变性,炎症细胞浸润,灶性及点状坏死,但是未见纤维组织增生。统计结果见表 1。GSH 不能有效阻止脂质在肝细胞内沉积,但是具有抑制肝脏纤维化发生的作用。

表 1 各组大鼠肝脏组织学改变比较

组别	组织学变化程度		
	脂肪变性	炎症坏死	纤维化
B 组	0*△	0*△	0*△
GSH 组	3.80±0.42*	2.20±0.42*△	0△
NAFL 组	3.13±0.35△	0△	0
NASH 组	3.88±0.35	2.88±0.35	1.13±0.35

注:* 表示与 NAFL 组比 $P < 0.05$;△表示与 NASH 组比 $P < 0.05$

2.2 还原型谷胱甘肽对非酒精性脂肪肝肝组织 SOD、MDA、GSH 含量的影响

本实验发现 NAFL 组大鼠肝内 SOD、GSH、MDA 的改变与 B 组相比没有显著性意义($P > 0.05$);而 NASH 组 SOD、GSH 显著下降,MDA 显著升高($P < 0.05$);外源性补充还原型谷胱甘肽后,GSH 组

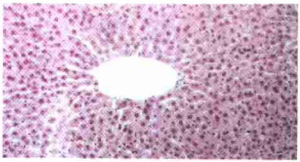


图 1 大鼠肝组织形态,显示 B 组大鼠肝组织无脂肪变性(HE×100)

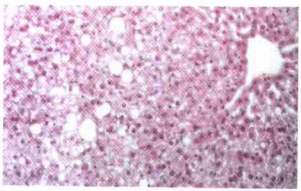


图 2 大鼠肝组织形态,NAFL 组大鼠肝组织广泛脂肪变性,无炎症坏死及纤维化(HE×100)

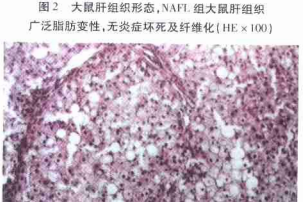


图 3 大鼠肝组织形态,NASH 组大鼠肝组织广泛弥漫脂肪变性,明显炎症坏死,局部纤维组织增生,假小叶轮廓形成(HE×100)

SOD、GSH 水平较 NASH 组显著升高,MDA 较 NASH

表 2 各组大鼠肝组织 SOD、MDA、GSH 含量变化

组别	SOD(U/mgprot)	GSH(mg/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
B 组	13.99±2.37△	29.69±2.86△	6.80±0.98△
NAFL 组	12.17±1.60△	25.98±5.18△	7.55±1.40△
GSH 组	13.53±2.47*△	28.64±3.70*△	6.96±1.26△
NASH 组	6.93±0.98	19.63±1.65*	12.24±1.35

注:* 表示与 NAFL 组比 $P < 0.05$;△表示与 NASH 组比 $P < 0.05$(B 组、NAFL 组及 GSH 组之间各种指标无明显差异)

维普资讯 http://www.cqvip.com

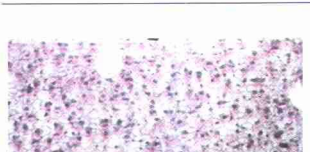


图 4 大鼠肝组织形态,GSH 组大鼠肝组织广泛脂肪变性,有局灶性炎性坏死,但无纤维组织增生(HE×100)

组显著降低($P<0.05$),基本达到正常组水平。证实氧应激、脂质过氧化反应与脂肪肝的进程明显有关,还原型谷胱甘肽本身具有强大的抗氧化和抗脂质过氧化的能力,外源性补充抗氧化物有助于维持机体内环境氧化与抗氧化体系的平衡。

2.3 还原型谷胱甘肽对非酒精性脂肪肝肝组织 UCP2 蛋白及其 mRNA 表达的影响

UCP2 免疫组织化学染色显示,B 组大鼠肝组织偶见 Kupffer 细胞染色呈阳性,未见肝细胞阳性染色;NAFL 组大鼠肝组织除 Kupffer 细胞染色阳性外,肝细胞亦出现大量阳性染色;NASH 组大鼠肝细胞阳性染色进一步增加,弥漫分布;GSH 组大鼠肝组织 UCP2 蛋白表达略低于 NASH 组,其差异无统计学意义;UCP2 mRNA 和 UCP2 蛋白表达变化基本一致(表 6)。表明外源性补充抗氧化物质对肝组织 UCP2 的表达影响不明显。

表 3 各组大鼠肝组织 UCP2 蛋白及 mRNA 表达情况

组别	UCP2 蛋白	UCP2 mRNA
B 组	0.0037±0.00517△	0.146±.061△
NAFL 组	0.0260±0.00669*△	0.416±0.09*△
GSH 组	0.0391±0.00962*	0.710±0.08*
NASH 组	0.0429±0.00975*	0.749±0.10*

注:* 表示与 B 组比 $P<0.05$;△表示与 NASH 组比 $P<0.05$

2.4 还原型谷胱甘肽对非酒精性脂肪肝血清 TNFα 含量和组织 TNFα 蛋白表达的影响

B 组大鼠血清和肝组织 TNFα 表达没有明显变化;NASH 组大鼠血清和肝组织 TNFα 均显著上升($P<0.05$);GSH 组大鼠血清和肝组织 TNFα 均低于 NASH 组大鼠($P<0.05$),见表 6。补充外源性谷胱甘肽可以通过减轻氧应激和脂质过氧化反应,减少活性氧对 TNFα 的诱导表达。

表 4 各组大鼠血清 TNFα 含量和肝组织 TNFα 表达变化

组别	血清 TNFα(pg/ml)	肝组织 TNFα
B 组	22.53±2.01△	0.006±0.0052△
NAFL 组	28.20±5.24△	0.026±0.0088△
GSH 组	45.48±8.35*△	0.052±0.0168*
NASH 组	67.99±3.07*	0.056±0.0102*

注:* 表示与 NAFL 组比 $P<0.05$;△表示与 NASH 组比 $P<0.05$

3 讨 论

NAFLD 的发病机制尚不明确,但二次打击学说已得到大多数人认同。高脂饮食,胰岛素抵抗等引起脂质在肝细胞内沉积是导致 NAFLD 的根本原因。肝细胞脂肪酸供给过多,使线粒体呼吸活动增加,生成的 ROS 亦大量增加而促发肝脏发生氧应激,形成第二次打击从而诱发肝细胞炎症、坏死,甚至纤维化的发生。

解偶联蛋白 2(UCP2)是解偶联家族的一员,在 1997 年被发现,是一种位于线粒体内膜上的载体蛋白,起质子通道的作用,在解偶联状态下,H^+ 通过 ATP 合成旁路从线粒体膜外从新进入膜内,从而消除跨膜质子电化学梯度,使线粒体氧化磷酸化解偶联,阻止线粒体呼吸时将能量合成 ATP,而是以热量的形式释放出去,降低线粒体 4 期呼吸时的氧化还原压力,抑制 ROS 生成,促进脂质氧化,脂质过氧化物(LPO)生成减少。UCP2 基因位于人类 11 号染色体,鼠类 7 好染色体上。该基因区与肥胖有关[4]。尽管 UCP2 在体内广泛表达,但正常时肝组织中仅 Kupffer 细胞表达 UCP2,肝细胞不表达或表达水平很低[5],UCP2 在 NAFLD 中的作用日益受到重视,但是其在非酒精性脂肪性肝病发病进展中的作用研究报道甚少。TNF 是一种促炎症细胞因子,TNF 尤其是 TNFα 对脂肪肝发病早期及其进展均有作用[6],TNF 和 TNF-R1 结合后,多种信息系统被激活,引起细胞因子、化学因子和粘附分子释放,从而引起炎症细胞浸润,杀死肝细胞,启动愈合反应发生纤维化[7]。Faggioni、Cortez-Pinto 等实验已证实两者存在同步变化[8,9]。本实验同时检测了 UCP2、TNFα 的表达水平,发现 B 组大鼠血清和肝组织 TNFα 水平均低其至检测不到,UCP2 表达也很低,NASH 组大鼠 TNFα 和 UCP2 表达同步增高,亦见 TNFα 与 UCP2 之间存在相同的变化趋势,提示二者

维普资讯 http://www.cqvip.com

之间可能有某种内在的相互联系。同时本实验发现在 NAFL 组 UCP2 表达上升,但是 TNFα 并未相应上升,SOD、GSH、MDA 无明显变化,说明肝细胞脂肪酸供给过多引起 UCP2 表达上升,启动机体的适应性反应,在一定程度上可以增加脂质 β 氧化,抑制 ROS 和 LPO 的生成,产生一定的保护作用[10-13]。但是这种适应机制有一定的限度,到 NASH 阶段,氧化和抗氧化失衡,UCP2 剧烈上调表达,ATP 含量极度降低甚至耗竭,组织发生炎症坏死,甚至纤维组织增生。因此 UCP2 过度上调使肝细胞更容易发生坏死[12],加重 NAFLD,并向更晚期肝病进展。

肝细胞脂肪变性引起 ROS 大量生成是第二次打击的中心环节。阿托莫兰具有抗氧化活性,调节氧化和抗氧化的平衡状态,减轻氧化应激,减少 ROS,发挥护肝作用。TNFα 在非酒精性脂肪性肝病的进展中具有重要的作用,作用的又一机制就是,肝细胞 GSH 的耗竭可以使肝细胞对 TNF 引起的坏死敏感,线粒体通透性转换孔(MPT)开放,膜电位消失,ATP 耗竭,引起细胞坏死[14]。因此补充外源性 GSH 一方面可以减轻 ROS 对 TNFα 的诱导,避免 UCP2 的过度表达;另一方面可以缓解肝细胞对 TNFα 的敏感性,从而发挥其保护肝细胞的作用。本实验中,GSH 组大鼠与 NASH 组大鼠比 MDA 明显低,组织 SOD 和 GSH 明显高,同时血清和肝组织 TNFα 均低,而肝脏病理组织学也仅见局灶性坏死,未见纤维增生,正说明了这一点。但是,实验发现阿托莫兰并不能下调 UCP2 的表达,故不能从根本上纠正脂代谢和能量代谢的失衡。所以:单纯外源性补充抗氧化物可能对 NAFLD 具有一定的保护作用,可以有效维持机体内环境氧化与抗氧化体系的平衡,通过减少 ROS 及其产物的形成,间接影响对 TNFα、UCP2 的表达诱导,但是不能改善脂代谢异常,纠正能量代谢的平衡失调,故可能非酒精性脂肪性肝病是多环节共同致病,因此临床上应该联合用药综合治疗。

参 考 文 献

[1] 戴 宁,曾民德. 复方中药抑制非酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450 ⅡE 表达的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2000;20(6):453-455.

[2] Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: Definitions and pathogenesis [J]. Gastoenterol and Hepatol,2002; 17(s)377-384.

[3] 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,2003; 11(2):71.

[4] Saleh Mc, Wheeler M B, Chan CB. Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator[J]. Diabetologia,2002 ;45(2):174-187.

[5] Voci A, Demori I, Franzi AT, et al. Uncoupling protein2 mRNA expression and respiratory parameters in Kuffer cells isolated from euthyroid anb hyperthyroid rat livers[J]. Eur-J-Endocrinol,2001 ;145(3):317-322.

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

[7] Tilg HD, Anna M. Mechanisms of disease: cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis[J]. New England Journal of Medicine,2000 ; 343(20):1467-1476.

[8] Faggioni R, Shigenaga J, Moser A, et al. Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection[J]. Biochem-Biophys-Res-Commun,1998 ;244(1): 75-78.

[9] Cortez PH, Yang SQ, Lin HZ, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism[J]. Biochem-Biophys-Res-Commun,1998;51(1): 313-319.

[10] Cortez PH, Lin HZ, Yang SQ, et al. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes[J]. Gastroenterology,1999 ;116(5): 1184-1193.

[11] Zhou YT, Shimabukuro M, Koyama K, et al. enzymes of fatty acid oxidation[J]. Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A, 1997 ;94(12): 6386-6390.

[12] Hong Y, Fink BD, Dillon JS, et al. Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein2 and 3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells[J]. Endocrinology,2001 ;142(1): 249-256.

[13] Lee FY, Li Y, Zhu H, et al. Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver[J]. Hepatology,1999;29(3): 677-687.

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