DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.020
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)17-1561-03

论著

肝细胞色素 P450 2E1 在大鼠非酒精性脂肪肝发生中的作用

胡 辂,陈东风,史洪涛 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042)

提 要:目的 研究大鼠非酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450 2E1 表达变化及其在脂质过氧化反应中的作用。方法 Wistar 大鼠 40 只,随机分为正常对照组和高脂饮食诱导脂肪肝组,用免疫组织化学和 Westem blot 方法测定肝细胞色素 P450 2E1 表达变化,酶学测定丙二醛含量。结果 脂肪肝大鼠丙二醛含量较正常对照组增高,以高脂饮食 8、12 周为甚($P<0.05$),肝细胞色素 P450 2E1 表达亦明显增强($P<0.01$)。结论 肝细胞色素 P450 2E1 表达变化与脂肪肝引起的肝脏损害以及脂质过氧化反应程度密切相关。

关键词:脂肪肝;细胞色素 P4502E1;免疫组织化学
中图法分类号:R345.99;R575.502 文献标识码:A

Roles of hepatocyte cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic steatosis of rat liver

HU Lu, CHEN Dong-feng, SHI Hong-tao (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the roles of hepatocyte cytochrome P450 2E1 in model of nonalcoholic steatosis in rats. Methods A total of 40 Wistar rats were randomly divided into two groups: control group (C) and high-fat diet induced-fatty liver group (H). The expression of hepatocyte cytochrome P450 2E1 antigen in rat model of nonalcoholic steatosis was detected by immunohistochemical method and Western blotting. Malondialdehyde (MDA) contents were also determined. Results MDA contents and the expression of hepatocyte cytochrome P450 2E1 antigen in rat model of nonalcoholic steatosis induced by high fat diet were higher than those in the normal controls ($P<0.05$, $P<0.01$), and positively associated with the degrees of severity of nonalcoholic steatosis. Conclusion Cytochrome P450 2E1 may be associated with liver damage due to nonalcoholic steatosis and lipid peroxidation.

Key words: fatty liver; cytochrome P450 2E1; immunohisochemistry

细胞色素 P450 2E1(cytochrome P450 2E1, CYP 2E1),是细胞色素 P450 的乙醇诱导形式,它在非乙醇脱氢酶氧化途径中起重要作用,为酒精性肝病的主要发病机制[1]。随着人们生活方式的改变,饮食结构的变化,非酒精性脂肪肝的发病率正逐年上升,为此,我们通过高脂饲料诱导的大鼠脂肪肝模型,探讨在脂肪肝的发展过程中肝细胞脂质过氧化反应与肝细胞色素 P450 2E1 表达变化规律,为脂肪肝的发生和治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

雄性 Wistar 大鼠 40 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),体质量 150~220 g,正常喂养 1 周后,采用随机数字表法分为两组,正常对照组(C 组)8 只,高脂饮食组(H 组)32 只(给予基础饲料 88%,猪油 10%,胆固醇 1.5%,胆盐 0.5%及可口的添加剂),实验动物自由饮水进食,对照组大鼠于 8 周处死,高脂饮食组各 8 只分别于 2、4、8、12 周后处死,取肝活组织于-70 ℃低温冰箱保存和石蜡或冰冻切片待检。

1.2 生化指标检测

1.2.1 血清总胆固醇(total cholesterol, TC) 采用全自动生化分析仪检测。

1.2.2 肝组织丙二醛含量测定 肝细胞超声波破碎制备匀浆,按 MDA 试剂盒说明书操作方法。

1.3 病理学检查

取肝右叶,石蜡切片,常规 HE、PAS 染色,观察脂肪肝程度。冰冻切片 CYP 2E1 免疫组织化学染色(兔抗鼠 CYP2E1 多抗购自 Chemicon Internation 公司),按照链酶菌抗生物素蛋白-抗氧化酶免疫组化染色试剂盒(武汉博士德公司)方法,DAB 显色。

1.4 Western blotting

取右肝组织 200 mg 加入含蛋白酶抑制剂 complete mini 的 PBS 缓冲液,4 ℃匀浆后 10 000× g 离心 15 min,上清蛋白定量

作者简介:胡 辂(1971—),男,重庆市人,主治医师,讲师,主要从事脂肪肝方面的研究。电话:(023)68757342
收稿日期:2004-03-30;修回日期:2004-06-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

后，取 50 μg 蛋白，变性，行聚丙酰胺凝胶电泳，转移至硝酸纤维膜（BIO-Rad，Hercules，CA），6% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，4 ℃过夜，洗涤后，膜和兔抗鼠 CYP 2E1 抗体（1∶400）作用，4 ℃过夜，洗涤后加入辣根过氧化酶结合的抗兔 IgG（1∶4 000），化学发光试剂检测，X 线片显影。定量分析采用分子生物学图像分析系统测定各条目的带积分灰度值，所测结果为扣除背景的积分光密度（V 值）。

1.5 统计学处理

实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用方差分析、t 检验。

2 结果

2.1 生化指标检测

2.1.1 血清脂质变化 与正常对照组相比，高脂饮食组血清 TC 水平明显升高。以 8、12 周组明显（表 1）。

表 1 正常对照组和高脂饮食组大鼠血清总胆固醇的变化（mmol/L，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Comparison of serum TC concentrations in rats in groups C and H at different time（mmol/L，$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Time of treatment (weeks)			
		2	4	8	12
C	8	/	/	0.74±0.18	/
H	8	0.83±0.25#	0.88±0.33#	1.00±0.35#	1.24±0.27#

#：$P<0.05$，*vs* group C

2.1.2 肝组织丙二醛含量测定 高脂饮食组肝组织丙二醛含量较正常对照组明显升高。以 8、12 周组明显（表 2）肝组织丙二醛含量在正常对照组和高脂饮食组大鼠不同时段的比较。

表 2 正常对照组和高脂饮食组大鼠肝组织丙二醛含量的变化（mmol/L，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 MDA concentrations of liver homogenates in rats in groups C and H at different time（mmol/L，$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Time of treatment (weeks)			
		2	4	8	12
C	8	/	/	2.94±0.31	/
H	8	3.95±0.35#	4.47±0.43#	4.85±0.46#	5.28±0.53#

#：$P<0.05$，*vs* group C

2.2 肝组织病理学变化

光镜下 HE、PAS 染色显示，对照组大鼠肝组织的形态学表现正常，高脂饮食组 2、4、8、12 周所有动物肝组织出现不同程度的肝细胞脂肪变性，肝细胞变大，胞浆内可见大泡样脂滴，脂肪肝程度与高脂饮食时间相关，2、4 周为轻-中度，8、12 周为中-重度[2]。

2.3 CYP 2E1 免疫组织化学

免疫组织化学染色显示正常对照组 CYP 2E1 的表达局限在腺泡 3 区中央静脉周围少数几个肝细胞内，不超过 2～3 个细胞层的厚度。高脂饮食组动物的肝 CYP 2E1 的表达则呈弥散性分布，从腺泡 3 区弥散至 2 区，且分布与脂肪肝的严重程度相一致（图 1、2）。

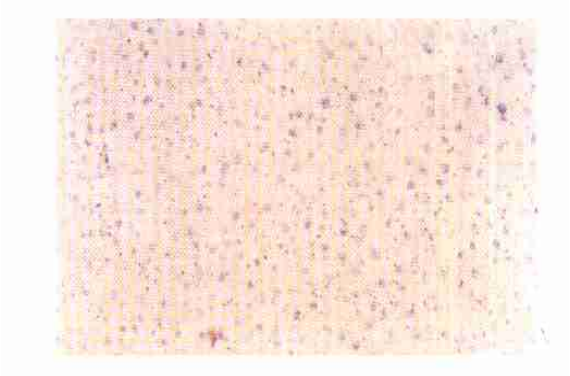


图 1 正常大鼠肝脏 **CYP2E1** 免疫组织化学染色 （SABC× 200）

Fig 1 Immunohistochemical staining of CYP2E1 in control rat liver （SABC× 200）

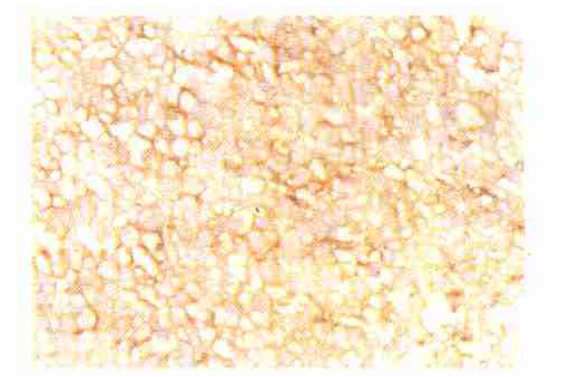
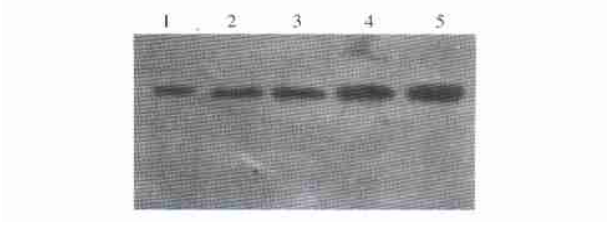


图 2 脂肪肝大鼠肝脏 **CYP2E1** 免疫组织化学染色 （SABC× 200）

Fig 2 Immunohistochemical staining of CYP2E1 in fatty liver rats （SABC× 200）

2.4 Western blotting 免疫印迹

正常对照组积分光密度 V 值为 468.8±36.6，高脂饮食组 2、4、8、12 周 V 值分别为 492.8±41.3，558.3±42.6，679.4±47.1，725.1±38.9（$P<0.01$），高脂饮食组 CYP 2E1 蛋白表达与正常对照组相比明显增加，随脂肪肝程度的加重，逐渐增高（图 3）。



1：Control group；2，3，4，and 5：High fat diet induced fatty liver of rats at 2，4，8 and 12 weeks

图 3 脂肪肝大鼠肝脏 **CYP2E1** 蛋白表达（**Western blotting**）

Fig 3 CYP2E1 protein expression in fatty liver rats（**Western blotting**）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

肝脏是人体进行生物转化的主要场所, 参与生物转化的酶类是一个庞大的基因家族编码调控的依赖细胞色素 P450 的混合功能氧化酶系统, 其主要成分是细胞色素 P450。脂肪酸、胆固醇即为此酶的底物。细胞色素 P450 是一族相对非特异性酶, 广泛存在于机体内, 但主要存在于肝细胞内质网上(微粒体即内质网而来), 负责外来物及某些体内代谢物质的生物转化, 此酶可被某些化合物(包括药物)诱导或抑制, 影响化合物在体内的代谢速度。在人的肝微粒体中, 参与内源性物质和外源性物质(包括药物和环境污染物)代谢的细胞色素 P450(CYP)主要有 CYP1A2、2E1 和 3A, 其中 CYP2E1 不仅参与了药物的代谢, 而且还能催化许多前致癌物和前毒物的活化过程。人和大鼠的 CYP2E1 是由单基因调控[3], 并且所有 CYP2E1 的底物在人和动物中都是相同的[4], 因此, 研究动物的 CYP2E1 对人具有重要参考意义。

非酒精性肝病的组织病理学变化与酒精性肝病相似, 推测在酒精性脂肪肝和与肥胖相关(过营养性)脂肪肝引起的肝脏损害之间有相似致病机制。我们的实验结果表明在高脂饮食诱导的脂肪肝大鼠 CYP 2E1 表达与酒精性脂肪肝相似[5], 即在腺泡 3 区表达增强, 并从 3 区弥散至 2 区, Western blotting 免疫印迹检测脂肪肝大鼠 CYP 2E1 蛋白表达与正常对照组相比明显增加, 且随脂肪肝程度的加重, 表达逐渐增高。丙二醛含量可反映过氧化反应程度, 既往研究表明[6,7], 酒精性脂肪肝微粒体 CYP 2E1 表达增强与脂质过氧化及自由基生成增多有关, 大鼠微粒体氧类的生成以及羟自由基的产生与 CYP 2E1 表达有密切关系, 羟自由基是脂质过氧化反应的启动剂, 高脂饮食可增加线粒体和微粒体对脂肪酸的氧化而导致氧应激, 通过肝微粒体 CYP450 酶系表达及调控使反应性氧增多(ROS), 后者与多价不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 生成过氧化脂质(LPO), LPO 不仅使内源性 ROS 增加、毒性增强, 且可抑制抗氧化系的保护作用, 通过活化 IKKβ 途径引起脂肪肝的发生, 导致肝损害[8]。在非酒精性脂肪肝时, 随着其程度的加重, 肝细胞结构和功能的损害, 脂质过氧化反应加剧, CYP 2E1 活性和表达明显增高。非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素 P450 2E1 表达变化与脂肪肝引起的肝脏损害程度以及脂质过氧化反应密切相关, 肝细胞色素 P450 2E1 参与了非酒精性脂肪肝的发生和发展, 为进一步防治提供理论基础。

参考文献:

[1] Castillo T, Koop D R, Kamimura S, *et al*. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation[J]. Hepatology, 1992, 16(4): 992－996.

[2] 中华医学会肝脏病学分会脂肪和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪肝诊断标准(草案)[J]. 中国社区医师, 2003, 19(16): 18.

[3] Koop D R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1 [J]. FASEB J, 1992, 6(2): 724－730.

[4] Niemela O, Parkkila S, Juvonen R 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 diseaes[J]. Hepatology, 2000, 33(6): 893－901.

[5] Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, *et al*. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology[J]. Hepatology, 1997, 25(2): 351－355.

[6] Weltman M D, Farrekk G C, Hall P, *et al*. Hepatic cytochromes P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis[J]. Hepatology, 1998, 27(2): 128－133.

[7] Yang S Q, Zhu H, Li Y, *et al*. Mitochondrial adaptation to obesity related oxidant stress[J]. Arch Biochemist Biophys, 2000, 378(2): 259－268.

(编辑　汪勤俭)

欢迎订阅《中医药临床杂志》

《中医药临床杂志》是中华中医药学会主办的中医药学术性期刊, 为中华中医药学会系列杂志、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊、全国中医药优秀科技期刊, 设有名家精粹、专家论坛、专病证治、临床试验、临床经纬、临床报道、调查报告、医案医话、方药运用、临床药学、药理实验、中药研究、针推骨伤、学术探讨、百家园、中医药研究进展等栏目。本刊为双月刊, 双月 1 日出版, 国内外公开发行, 国际大开本, 正文 96 页码, 每期定价 6.00 元, 全年定价 36.00 元, 国内统一刊号: CN 34－1268/R, 国际标准刊号: ISSN 1672－7134, 邮发代号: 26－131。

"万病回春当由临床检验, 红炉点雪尚须梦笔生花",《中医药临床杂志》坚持以临床为主, 面向全国、质量第一的办刊原则, 努力做到内容丰富多彩, 切合临床实际, 形式新颖独特, 欢迎广大中医药临床工作者订阅。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net