

## 大鼠酒精性肝病细胞凋亡与细胞色素 P450 2E1 和氧化应激的关系

金武丕 权修权 孟繁平 崔香丹 朴海今

**【摘要】** 目的 观察酒精性肝病(ALD)大鼠肝组织病理学改变,探讨细胞凋亡与细胞色素P450 2E1(CYP2E1)的表达以及与氧化应激的关系。方法 用乙醇灌胃法制备 ALD 大鼠模型,模型组(37 只)给予体积分数为 40%的乙醇  $8\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  分两次灌胃,连续 8 周;对照组(33 只)给予等量生理盐水灌胃。实验第 8 周末,各组选 30 只大鼠观察肝组织的病理学改变;用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)检测肝细胞凋亡,用全自动生化仪检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)值,用聚合酶链反应(PCR)法测定肝 CYP2E1 的表达;分别用硫代巴比妥酸法和黄嘌呤氧化酶法测定血清丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果 模型组凋亡的肝细胞明显增多,主要分布在中央静脉周围、点状和灶状坏死区。对照组 CYP2E1 的 c1 基因频率为 91.65%、c2 基因频率为 8.35%;模型组 c1 基因频率为 53.35%、c2 基因频率为 46.65%,差异均有显著性( $P$  均  $< 0.05$ )。长期摄入乙醇的大鼠血清 MDA 含量增加,SOD 活性下降,与 ALD 肝细胞凋亡程度有相关性( $r_{\text{MDA}} = 0.644, r_{\text{SOD}} = -0.511, P$  均  $< 0.05$ ),且 MDA 与 SOD 两指标间呈负相关( $r = -0.582, P < 0.05$ )。结论 长期摄入乙醇可引起大鼠 ALD 及肝功能损伤,肝细胞凋亡明显增加。CYP2E1 基因 Pst I 及 Rsa I 限制性片段长度多态性与 ALD 有关,其中 c2 基因可能与大鼠 ALD 的发生有关。MDA 含量和 SOD 活性在 ALD 的肝细胞凋亡过程及脂质过氧化反应中发挥重要作用。

**【关键词】** 肝病,酒精性; 凋亡; 细胞色素 P450 2E1; 氧化应激

### Relationship among hepatocyte apoptosis, P450 2E1 and oxidative stress in alcoholic liver disease of rats

JIN Wu-pi\*, QUAN Xiu-quan, MENG Fan-ping, CUI Xiang-dan, PIAO Hai-jin. \* Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin, China

**【Abstract】** **Objective** To observe the pathological changes and investigate the correlation of hepatocyte apoptosis with cytochrome P450 2E1(CYP2E1) expression and oxygen free radical in alcoholic liver disease(ALD) in rat. **Methods** 40% ethanol in the dose of 8 g/kg body weight was given to rats by gavage twice daily for 8 weeks in model group ( $n=37$ ), and rats in control group ( $n=33$ ) received same volume of saline by gavage. At the end of the 8th week, the contents of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined. The pathological changes in the liver was observed under light microscope with hematoxylin and eosin (HE) staining, and hepatocyte apoptosis was detected by the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP biotin nick and labeling (TUNEL) method. Expression of serum CYP2E1 was determined by polymerase chain reaction (PCR), the contents of malondialdehyde (MDA) and activities of superoxide dismutase (SOD) in serum were detected by thibabutaric acid (TBA) quantifying method. **Results** The TUNEL positive cells were located around the central vein, and spotty and focal necrosis was found in the ALD group. The apoptotic index (AI) in the ALD group was significantly higher than in the control group ( $P < 0.05$ ). To express in CYP2E1, the allelic frequency of c1 and c2 were 91.65%, and 8.35% respectively, in control group, while the allelic frequency of c1 and c2 were 53.35% and 46.65%, respectively, in ALD group, and there were significantly differences between two groups (all  $P < 0.05$ ). The content of MDA in serum had positive correlation with hepatocyte apoptosis index (MDA vs. AI,  $r_{\text{MDA}} = 0.644$ ), and the activity of SOD in serum had negative correlation with AI (SOD vs. AI,  $r_{\text{SOD}} = -0.511$ , all  $P < 0.05$ ) in the ALD group, and there was negative correlation between MDA and SOD ( $r = -0.582, P < 0.05$ ). **Conclusion** Chronic alcohol administration induced alcoholic liver disease and liver dysfunction, and hepatocyte apoptosis is enhanced. Rsa I and Pst I RFLPs are related with ALD in model rats, and c2 gene might be related with the development of ALD. The content of MDA and activity of SOD play an important role in the process of hepatocyte apoptosis and lipid peroxidation process.

**【Key words】** alcoholic liver disease; apoptosis; cytochrome P450 2E1; oxidative stress

基金项目:延边大学科研基金资助项目(2004-26)

作者单位:133000 吉林延吉,延边大学医院

作者简介:金武丕(1960-),男(朝鲜族),吉林省人,博士研究生,教授,主任医师(Email:wpjin8933@163.com)。

酒精性肝病(ALD)是由长期大量饮酒所致的慢性肝脏疾病,近年来 ALD 的发病率呈逐年上升趋势,已成为继病毒性肝炎后导致肝损害的第二大病因<sup>[1]</sup>。乙醇及其代谢产物和代谢过程中产生的代

谢紊乱是导致 ALD 的重要原因。乙醇在肝脏内主要通过细胞质中的乙醇脱氢酶(ADH)、微粒体乙醇氧化系统中的细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1) 以及过氧化物酶体系中的过氧化物酶<sup>[2]</sup>3 个酶系统被氧化。CYP2E1 是细胞色素 P450 的乙醇诱导形式,它在非 ADH 氧化途径中起重要作用,为 ALD 主要发病机制<sup>[3]</sup>。氧化应激(oxidative stress)是活性氧(ROS)产物增加和抗氧化剂屏障缺失引起 ALD 的重要特征。本研究拟通过乙醇灌胃的方法建立动物模型,进一步探讨肝细胞凋亡及与之密切相关的 CYP2E1、氧化应激等因素在 ALD 中的作用,为今后的临床诊断及治疗提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料:雄性 Wistar 大鼠 70 只(由延边大学医学院动物科提供),体重(222.1±20.9)g。原位细胞死亡检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司产品),CYP2E1 引物、聚合酶链反应(PCR)缓冲液、dNTP、Taq 酶、Pst I 和 Rsa I 内切酶(均为大连宝生物工程有限公司产品),丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(均为南京建成生物有限公司产品)。

1.2 ALD 大鼠模型制备:将 70 只大鼠按随机数字表法分模型组和对照组:模型组 37 只,用体积分数为 40%的乙醇 8 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>分两次灌胃,连续 8 周;对照组 33 只,灌胃等量生理盐水。动物自由饮水,饲以杆状动物饲料;8 周末两组各选 30 只,麻醉后采血(分离血清冰冻待用),处死后取肝脏(部分用体积分数为 10%的甲醛固定,另一部分用液氮冰冻待用)。

1.3 检测指标及方法:采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)检测肝脏凋亡细胞;用全自动生化仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平;用 PCR 法测定 CYP2E1 的表达;用硫代巴比妥酸法测定血清 MDA 的含量;用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性。

1.4 统计学处理:统计分析用 SPSS 软件,数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,进行单因素方差分析和  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 两组血清 ALT、AST、SOD 及 MDA 和凋亡指数的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of serum ALT, AST, SOD, MDA and the apoptotic index between two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	ALT(U/L)	AST(U/L)	MDA( $\mu$ mol/L)	SOD(kU/L)	凋亡指数(%)
对照组	30	48.4±10.5	102.9±14.1	15.72±2.06	636.82±138.60	1.7±0.8
模型组	30	107.4±16.6 <sup>△</sup>	232.1±52.9 <sup>△</sup>	41.53±7.43 <sup>△</sup>	353.12±61.02 <sup>△</sup>	6.2±1.7 <sup>△</sup>

注:与对照组比较;<sup>△</sup> $P < 0.05$

2 结 果

2.1 血清 ALT 和 AST 水平(表 1):模型组大鼠血清 ALT、AST 均较对照组明显升高,差异有显著性( $P$  均 $< 0.05$ )。

2.2 血清 MDA 和 SOD 水平(表 1,图 1):模型组大鼠血清 MDA 含量随着 SOD 活性的降低而增高,两组间比较差异均有显著性( $P$  均 $< 0.05$ );两指标之间呈显著负相关( $r = -0.582, P < 0.05$ )。且血清 MDA 和 SOD 水平与 ALD 肝细胞凋亡程度有相关性( $r_{MDA} = 0.644, r_{SOD} = -0.511, P$  均 $< 0.05$ )。

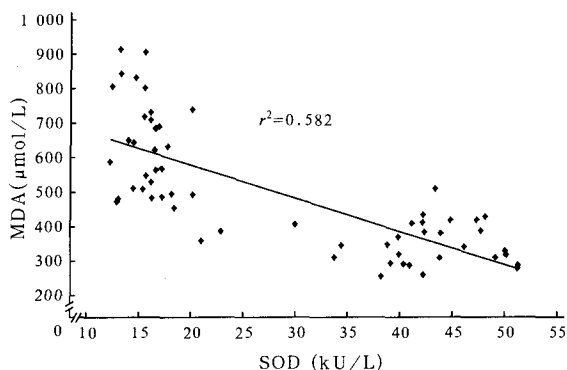


图 1 血清 SOD 与 MDA 的相关性

Figure 1 Correlation between serum SOD and MDA

2.3 肝组织 CYP2E1 的基因频率(表 2,彩色插图 2):模型组肝组织 CYP2E1 的 c1 基因频率与对照组比较明显降低,c2 基因频率则相反,差异均有显著性( $P$  均 $< 0.05$ )。

表 2 两组大鼠肝组织 CYP2E1 基因分布情况及基因频率的比较

Table 2 Comparison of the CYP2E1 gene distribution and frequency between two groups

组别	动物数(只)	A(c1/c1,%)	B(c1/c2,%)	C(c2/c2,%)	c1(%)	c2(%)
对照组	30	25(83.3)	5(16.7)	0(0)	91.6	8.4
模型组	30	8(26.7) <sup>△</sup>	16(53.3)	6(20.0) <sup>△</sup>	53.4 <sup>△</sup>	46.6 <sup>△</sup>

注:与对照组比较;<sup>△</sup> $P < 0.05$

2.4 肝细胞凋亡及组织病理学改变(表 1,彩色插图 3~6):TUNEL 检测结果显示,模型组凋亡肝细胞散在分布于肝实质中,小叶居多,主要位于小叶点状、灶状坏死区及中央静脉周围;对照组偶见肝细胞凋亡。模型组凋亡指数[(6.2±1.7)%]明显高于对照组[(1.7±0.8)%],差异有显著性( $P < 0.05$ )。

组织病理学结果显示,模型组肝窦结构不清,肝细胞肿胀,可见大小不等的脂肪空泡,部分可见点状和灶状坏死。对照组肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝窦结构清晰,肝细胞无变性、坏死。

### 3 讨论

近来研究表明,乙醇是肝细胞的一种凋亡诱导剂,它在 ALD 发生发展过程中起重要作用<sup>[4]</sup>。细胞凋亡是由体内外因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡过程,是细胞在生理或病理信号刺激下启动自身凋亡基因发生的主动自杀行为,是保持组织自稳态的一个基本过程,同时对维持正常组织细胞生长/死亡平衡至关重要。

本实验通过灌胃的方法建立 ALD 大鼠模型,发现模型组大鼠肝细胞凋亡指数显著高于对照组,多散在分布于肝实质中,小叶中居多,主要位于小叶点状、灶状坏死区及其中央静脉周围,并且肝细胞凋亡程度与肝损伤的轻重密切相关,与文献<sup>[5]</sup>报道一致。因此可以认为,肝细胞凋亡发生时常伴有肝细胞坏死,两者均可引起肝损伤,导致 ALD 的发生发展。细胞色素 P450 是位于滑面内质网上的一组混合功能氧化酶系,是肝脏代谢最主要的酶系之一,其中 CYP2E1 与乙醇代谢密切相关。CYP2E1 是参与体内病理生理和毒理过程中有广泛功能的代谢酶,其表达水平往往与代谢活性相关,且受体内外诸多因素影响,如饥饿、禁食及糖尿病等均会导致体内 CYP2E1 水平增高,其代谢底物可诱导该酶本身的表达等,而人和大鼠的 CYP2E1 由单基因调控,并且所有的 CYP2E1 底物在人和动物中都相同,因此,研究动物的 CYP2E1 对人具有重要参考意义。

乙醇为 CYP2E1 特异性代谢底物,对 CYP2E1 表达也具有诱导作用,其诱导形式分为两种:当血乙醇浓度低时,通过增加 mRNA 翻译的效率或稳定翻译后蛋白而增加 CYP2E1 的活性;当血乙醇浓度较高时,则通过增强 CYP2E1 的基因转录使 CYP2E1 mRNA 翻译增加而使其活性增高<sup>[6]</sup>。CYP2E1 具有基因多态性,其活化可能与嗜酒者是否发生 ALD 有关。Tsutsumi 等<sup>[7]</sup>在日本对 ALD 患者的 CYP2E1 基因型进行研究,发现 84% 的 ALD 患者带有 c2 等位基因,该基因频率比健康对照组或非 ALD 组高 2 倍以上,认为 c2 基因在 ALD 的发展中可能起决定作用。本实验研究表明,与对照组比较,模型组 c1 基因频率明显降低, c2 基因频率明显升高。因此考虑 c2 基因在 ALD 发病中起一定作用。

促氧物质增多和抗氧化物质减少的氧化应激可

引起细胞内 ATP 衰竭和还原型谷胱甘肽(GSH)水平下降等一系列改变,这种改变在中央静脉周围远较门脉周围严重,最终导致肝细胞死亡。正常情况下,体内存在自由基的清除系统,使自由基处于不断产生和不断被清除的动态平衡中。一旦机体内保持平衡的因素被破坏,自由基强大的生物活性就转变为对生物分子的损伤,引起体内新陈代谢紊乱及一系列自由基连锁反应加剧,导致 RNA、DNA、蛋白、酶、生物膜的氧化和过氧化损伤,从而诱发疾病。机体为避免受到内源性或外源性 ROS 的损伤,在进化过程中形成了一整套代谢 ROS 的抗氧化系统,主要由酶和抗氧化剂组成。SOD 是生物体内最为重要的抗氧化酶之一,是清除 ROS 的第一道防线。主要清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 及防止 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 直接或间接转变为其他形式的自由基,以防止生物膜发生脂质过氧化损伤。本实验采用 40% 乙醇灌胃 8 周后可以看出,模型组较对照组血清中 MDA 明显升高, SOD 明显降低,表明长期乙醇灌胃动物体内脂质过氧化产物增多,而且与细胞凋亡程度呈正相关;长期灌酒后大鼠体内抗氧化产物明显减少,与细胞凋亡程度呈负相关。

长期乙醇摄入可引起大鼠 ALD 及肝功能损伤,肝细胞凋亡明显增加。CYP2E1 基因 Pst I 及 Rsa I 限制性片段长度多态性与 ALD 有关,其中 c2 基因可能与大鼠 ALD 的发生有关。MDA 和 SOD 在 ALD 的肝细胞凋亡过程及脂质过氧化反应中发挥重要作用。

### 参考文献:

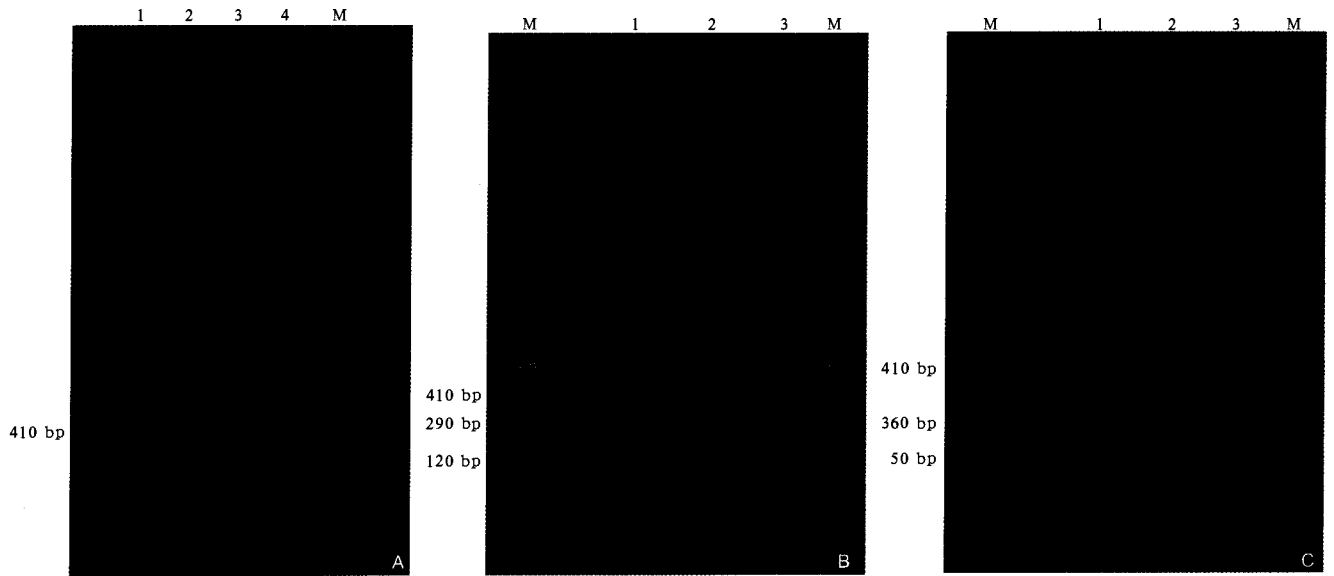
- 1 庄辉. 酒精性肝病的流行病学[M]//江正辉,王泰龄. 酒精性肝病. 北京:中国医药科技出版社,2001:3-11.
- 2 卿笃信,凌奇荷. 酒精代谢酶与酒精性肝病的关系研究进展[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册,2003,23(3):310-313.
- 3 Koop D R, Coon M J. Ethanol oxidation and toxicity: role of alcohol P-450 oxygenase[J]. Alcohol Clin Exp Res, 1986, 10(6 Suppl):44S-49S.
- 4 Setwart S, Jones D, Day C P. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(9):408-413.
- 5 Yacoub L K, Fogt F, Griniuviene B, et al. Apoptosis and bcl-2 protein expression in experimental alcoholic liver disease in the rat[J]. Alcohol Clin Exp Res, 1995, 19(4):854-859.
- 6 Oneta C M, Simanowski U A, Martinez M, et al. First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by speed of gastric emptying[J]. Gut, 1998, 43(5):612-619.
- 7 Tsutsumi M, Takada A, Wang J S. Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 related to the development of alcoholic liver disease[J]. Gastroenterology, 1994, 107(5):1430-1435.

(收稿日期:2006-11-20 修回日期:2007-06-22)

(本文编辑:李银平)

# 大鼠酒精性肝病细胞凋亡与细胞色素P450 2E1和氧化应激的关系

(正文见419页)



A: PCR产物电泳; B: 经Pst I 酶切; C: 经Rsa I 酶切; 1: 野生型c1/c1纯合子; 2: c1/c2杂合子; 3, 4: 突变型c2/c2纯合子; M: Marker; 电泳带从大到小分别为1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200和100 bp

图2 PCR法检测CYP2E1的表达  
Figure 2 Expression of CYP2E1 detected by PCR

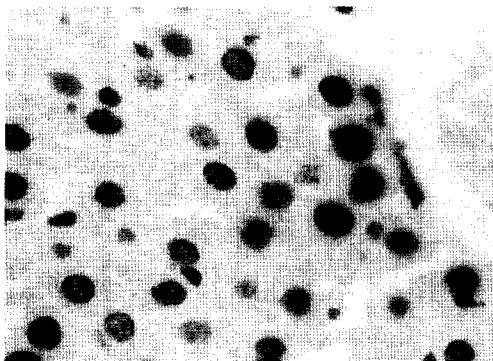


图3 模型组肝细胞凋亡情况(TUNEL, × 400)  
Figure 3 Apoptosis liver cells in model group (TUNEL, × 400)

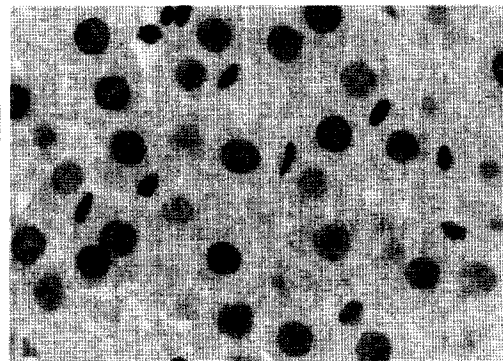


图4 对照组肝细胞凋亡情况(TUNEL, × 400)  
Figure 4 Apoptosis liver cells in control group (TUNEL, × 400)

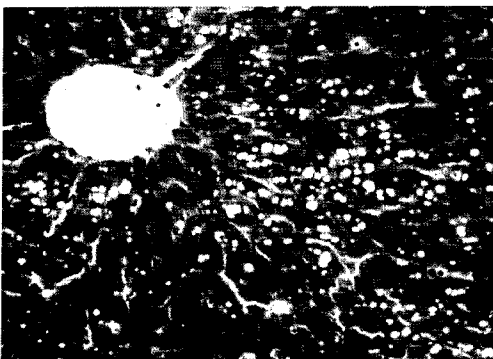


图5 模型组肝组织病理学变化(HE, × 100)  
Figure 5 Pathological change of liver tissue in model group (HE, × 100)

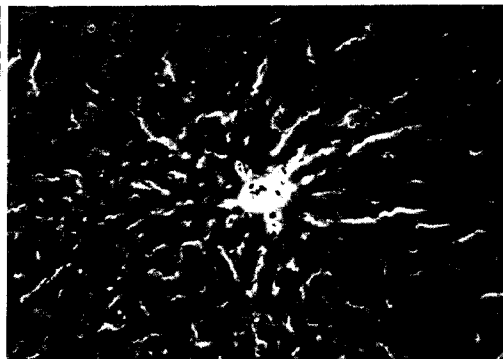


图6 对照组肝组织病理学变化(HE, × 100)  
Figure 6 Pathological change of liver tissue in control group (HE, × 100)