

大枣对酒精性肝病小鼠肝组织 CYP2E1 和 TNF- α 表达的影响

申军华¹ 李芳芳²

摘要 **目的** 观察大枣预处理对酒精性肝病小鼠血清 AST、ALT, 肝组织病理及肝组织细胞色素 P4502e1 (cytochrome P4502e1, CYP2E1) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 表达的影响。**方法** 88 只昆明种小鼠随机分成空白对照组 (简称对照组, 28 只)、模型组 (32 只) 和大枣治疗组 (简称治疗组, 28 只), 模型组和治疗组采用酒精灌胃的方法复制动物模型, 对照组应用蒸馏水代替。4 周时治疗组灌胃大枣提取物, 其余组均灌胃等量蒸馏水。共计 12 周。观察应用大枣后, 酒精性肝病小鼠血清 AST、ALT, 肝组织病理及肝组织 CYP2E1 和 TNF- α 的表达。**结果** 与模型组比较, 治疗组血清 AST、ALT 水平下降, 肝组织病理改善, 肝组织 CYP2E1 和 TNF- α 表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 大枣对酒精性肝病有一定疗效。

关键词 大枣; 酒精性肝病; 细胞色素 P4502E1; 肿瘤坏死因子 α

Effect of Jujube on the Expression of CYP2E1 and TNF- α in the Hepatic Tissue of Mice with Alcoholic Liver Disease SHEN Jun-hua¹ and LI Fang-fang² 1 Department of Gastroenterology, First Hospital of Handan City, Hebei (056001), China; 2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hebei Medical University, Key Medical Biotechnology Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang (050017), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of jujube pretreatment on serum levels of AST and ALT, liver pathology, and the expression of cytochrome P4502e1 (CYP2E1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the liver tissue of alcoholic liver disease (ALD) mice. **Methods** Totally 88 Kunming mice were randomly divided into the control group ($n = 28$), the model group ($n = 32$), and the jujube treatment group ($n = 28$). The animal model was prepared using intragastric alcoholism for mice in the model group and the jujube treatment group, while distilled water was intragastrically given to those in the control group. Extraction of jujube was intragastrically given to mice in the jujube treatment group at week 4, while equal volume of distilled water was intragastrically given to mice in the rest two groups. The therapeutic course lasted for 12 weeks. Serum levels of AST and ALT, liver pathology, and the expression of CYP2E1 and TNF- α in the liver tissue of ALD mice were observed after administration of jujube. **Results** Compared with the model group, serum levels of AST and ALT decreased, the liver pathology was improved, and the expression of CYP2E1 and TNF- α in the liver tissue decreased, showing statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Jujube had certain effect in treating ALD.

KEYWORDS jujube; alcoholic liver disease; cytochrome P4502e1; tumor necrosis factor α

酒精性肝病是由于长期大量饮酒导致的肝脏疾病, 其发病机制可能与乙醇及其代谢产物的毒性、氧化应激, 肝细胞因子的产生有密切关系^[1]。而且随着人

们生活水平的提高, 酒精及酒精性饮料的摄入日益增多, 酒精性肝病已经成为我国的第二大肝病^[2]。同时由于酒精性肝病早期临床表现缺乏特异性, 就诊时往往已属于中晚期, 治疗成本巨大。那么有无一种简单易行的方法预防酒精性肝病? 在《药品化义》和《中医药大辞典》中均有大枣可以用于治疗酒精性肝病记载。肝组织细胞色素 P4502e1 (cytochrome P4502e1, CYP2E1) 和肿瘤坏死因子 α (tumor nec-

作者单位: 1. 河北省邯郸市第一医院消化内科 (河北邯郸 056001); 2. 河北医科大学生物化学与分子生物学教研室, 河北省医学生物技术重点实验室 (石家庄 050017)

通讯作者: 李芳芳, Tel: 0311-86265639, E-mail: fflitish@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.04.0466

rosis factor- α , TNF- α)已被多种实验证实酒精性肝病动物中明显增高,但应用大枣治疗后上述指标会有何变化尚未见报道。本实验的目的是观察应用大枣后上述实验指标的变化,为大枣用于保健和治疗肝病提供实验依据。

材料与方法

1 实验动物与分组 健康雄性昆明种小鼠 88 只,清洁级,体重(23 ± 2)g,普通全价饲料喂养,普通全价饲料及动物均由河北医科大学动物实验中心提供,动物许可证号:1203061。随机分成 3 组:即空白对照组(简称对照组,28 只)、模型组(32 只)和大枣治疗组(简称治疗组,28 只)。

2 药物和试剂 药物:精选阜平大枣,去核 80 ℃ 4 h 焙干,药物粉碎机粉碎呈粉末状,取 10 g 枣粉,用 50%乙醇 350 mL 浸泡 12 h^[3,4],离心去沉淀留上清液,高温煮沸浓缩至 50 mL(即含生药 0.2 g/mL)-80 ℃ 储存备用。取 10 mL 药液加蒸馏水 90 mL 稀释成 0.02 g/mL 的浓度,4 ℃ 储存备用。试剂:转氨酶试剂盒,购至长春汇力生物技术有限公司。TNF- α (试剂盒,购至美国 Fermentas 公司)。免疫荧光二抗,上海生物工程基因公司。54 度红星二锅头(产品批号:GB/T10781.2),北京红星二锅头股份公司;CYP2E1 及 β -actin 抗体均购于上海生物工程公司。

3 仪器和设备 稳压稳流电泳仪(DYY-II)北京六一仪器厂。低温高速离心机(20PR-52D)日本日立公司。病理切片机,日本日立公司(LEICARM2125)。酸度计 PH211 哈纳公司。超低温冰箱,MDF-382E 日本三洋公司。

4 模型制备与给药 结合酒精性肝病诊断标准^[5],酒精性肝病模型复制方法^[6-10]及预试验结果制备小鼠酒精性肝病动物模型。模型组及治疗组均隔日灌胃 54 度红星二锅头 8 mL/kg,共计 12 周,治疗组在 4 周时灌胃酒前 2 h 灌胃大枣提取物 0.01 mL/kg(相当于大枣 0.02 g/kg),相当于临床成人用量 0.17 g/kg^[11],模型组灌胃等量的蒸馏水。造模动物分笼饲养常规进食及饮水。对照组小鼠均灌胃等量蒸馏水。共计 12 周。

5 取材 分别在实验的第 4、8、12 周分批处死小鼠取材。在取材前小鼠禁食 12 h,股静脉采血后,脱臼法处死,快速分离肝脏,取左外侧叶 10%多聚甲醛固定。其余肝组织迅速放入液氮充分固定后,移入 EP 管内-80 ℃ 储存。采集的血液 3 000 r/min 离心 10 min,血清移入 EP 管内备用。

6 AST、ALT 检测 采用转氨酶检测试剂盒检

测,严格按照说明书上方法和标准操作。

7 肝组织病理学观察 肝左外侧叶充分固定 24 h 后,脱水,包埋、石蜡切片(5 μ m),分别 HE 和 Masson 染色。观察有无脂肪变和纤维化改变。参照病理标准^[11-13],发现 4 周起即有肝损伤病理改变。具体 HE 染色步骤:石蜡切片(5 μ m),二甲苯脱蜡 10 min $\times$ 3 梯度酒精脱蜡至水,苏木精染色 5 min,蒸馏水冲洗 2 min,1%盐酸酒精分化 30 s,1%氨水返蓝 30 s,蒸馏水洗 4 min,伊红染色 1 min,蒸馏水冲洗 1 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明 10 min $\times$ 3,中性树胶封片,显微镜观察病理结果。Masson 染色步骤:石蜡切片(5 μ m),二甲苯脱蜡 10 min $\times$ 3,梯度酒精脱蜡至水,蒸馏水冲洗 2 min,苏木精染色 5 min,蒸馏水冲洗 2 min,1%盐酸酒精分化 30 s,蒸馏水冲洗 3 min 酸性丽春红品红染色 5 min 蒸馏水冲洗 1 min,0.2%冰醋酸 30 s,1%磷钼酸 2 min,1%亮绿 2 min,0.2%冰醋酸 30 s,梯度酒精脱蜡至水,二甲苯透明 15 min $\times$ 2,中性树胶封片,光学显微镜下观察结果。

8 采用 Western blot 方法检测 CYP2E1 蛋白 液氮中匀浆,Lowry 法蛋白定量,样品与 2 $\times$ 上样缓冲液(Tris,clpH 6.8 100 mmol/L 4% SDS,0.2%溴酚蓝,20%甘油, β 巯基乙醇 200 mmol)1:1 的比例混匀煮沸 5 min,冷却至室温。500 μ g/孔进行 SDS-PAGE,分离胶的浓度为 10%。恒压 90 V,待样品完全进入分离胶后改为 120 V,直到溴酚蓝到达分离胶底部,断开电源。冰水浴转膜,用 0.2 μ mol/L NC 膜,恒压 80 V,2 h。用 TBST 按比例稀释一抗(β -actin1:100,CYP2E1 1:100)向膜的正面滴加一抗,湿盒 4 ℃ 过夜;0.5%TBST 漂洗液洗膜 10 min $\times$ 3,用 TBST 稀释二抗(1:5 000),在膜的正面滴加二抗,室温 1 h,用 0.1%TBST 漂洗液洗膜 10 min $\times$ 3,最后一遍用 TBS 洗膜 10 min;然后在 Odssey 红外扫描仪器上读取图像。以 β -actin 作为内参照。

9 肝组织中 TNF- α 的相对表达水平检测 用 ELISA 试剂盒测定,蛋白定量方法同上,严格按照说明书上步骤操作。测定肝组织 TNF- α 的相对表达水平。

10 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件处理所有数据。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均值的比较用单因素的方差分析,经检验各组方差齐,组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 含乙醇液体灌胃初期小鼠出现嗜睡,食欲较差,进食减少,反应迟钝,短时间共济失调,

易激惹,皮毛光泽差等,对照组无上述改变。灌胃过程中模型组死亡 4 只,死亡原因是醉酒、急性胃扩张、窒息等,其余各组小鼠无死亡。

2 各组 AST、ALT 水平比较(表 1) 与对照组比较,模型组第 8、12 周时血清 ALT、AST 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,治疗组第 8、12 周时血清 ALT、AST 水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 各组小鼠肝脏细胞病理变化比较(图 1) 对照组(4、8、12 周)小鼠肝脏组织 HE 染色显示肝细胞以中央静脉为中心成放射状排列,肝小叶轮廓清晰,肝索排列整齐,细胞内脂肪滴少见,Masson 染色未见纤维形成。模型组(4 周)HE 染色显示汇管区、肝窦内、中央静脉的周围血液瘀滞,部分细胞成不同程度的水样变性,重者细胞体肿大或成球形,胞浆透明,肝窦受压,肝索紊乱,肝小叶可见少量脂滴集聚,小叶内见少量点状坏死,Masson 染色未见纤维形成。模型组(8 周)HE 染色显示肝组织中央静脉周围血液瘀滞,较本组 4 周时明显加重,肝细胞空泡样变性,多数细胞肿大成球形,胞浆透明;脂肪变性较本组 4 周时明显增多,胞浆内出现大小不一的脂滴,肝细胞坏死情况较 4 周时明显加重,并伴有炎细胞浸润,Masson 染色未见纤维形成。治疗组(8 周)肝组织上述病理变化均存

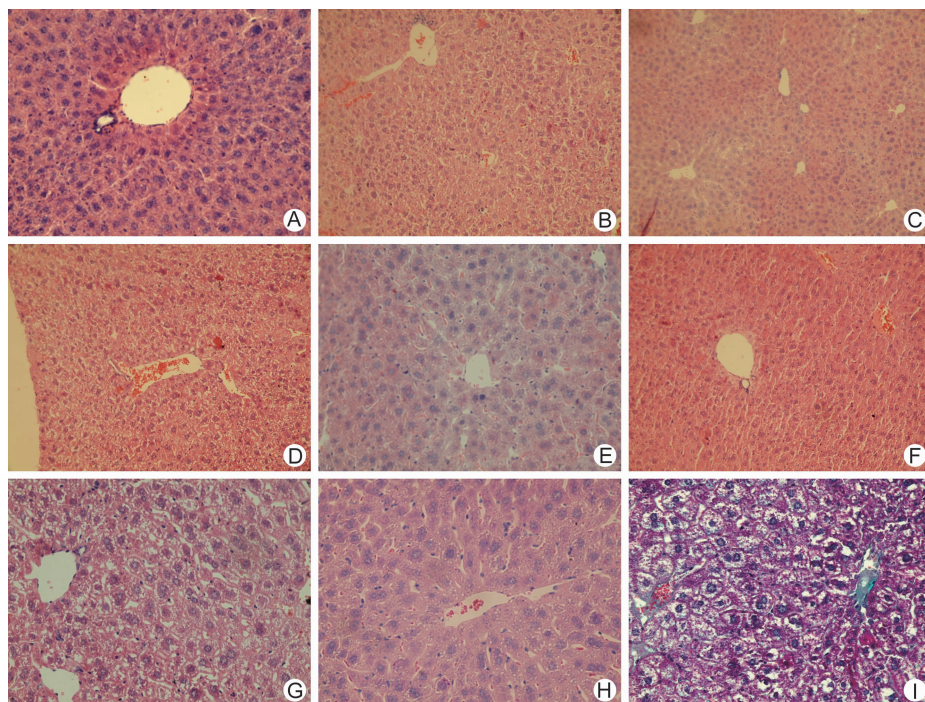
在,但表现较模型组轻,细胞有少量脂肪变性,但较对照组明显减少。模型组(12 周)HE 染色见肝脏汇管区、肝小叶中央静脉周围、肝窦内可见大量的血液瘀滞,肝细胞空泡变性增多,较多量的肝细胞胞肿大呈球形,胞浆透明;肝小叶点状坏死及小灶状坏死增多,可见炎细胞浸润,某些坏死区内可见纤维细胞增生。Masson 染色可见汇管区血、中央静脉血管壁增厚,淡绿色血管壁着色,余未见纤维增生。治疗组(12 周)上述改变均较模型组轻,细胞内脂肪变较少。

4 各组小鼠 CYP2E1 和 TNF- α 比较(图 2, 表 1) 与对照组同期比较,模型组 4、8、12 周时, CYP2E1 蛋白及 TNF- α 相对表达水平均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组同期比较,治疗组 8、12 周时 CYP2E1 蛋白及 TNF- α 相对表达水平均下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

酒精性肝病已成为我国第二大肝病,其成因是由于长期大量饮酒导致的肝脏损害。其发病机制与乙醇及其代谢产物的毒性、氧化应激、肠黏膜的通透性增高及细胞因子的产生有密切的关系。

CYP2E1 是微粒体代谢酶系统的主要酶类,主要分布于肝脏的肝小叶的中央静脉旁,也就是小叶三代



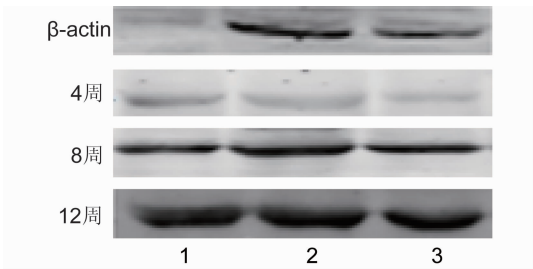
注: A、B 分别为对照组、模型组第 4 周; C、D、E 分别为对照组、模型组和治疗组第 8 周; F、G、H 分别为对照组、模型组、治疗组第 12 周; I 为模型组第 12 周(A~H 为 HE 染色; I 为 Masson 染色; A、E、G、H、I 放大倍数为 400, B、C、D、F 放大倍数为 200)

图 1 各组小鼠肝脏细胞病理变化比较

表 1 各组小鼠 AST、ALT 水平及肝脏 CYP2E1、TNF-α 相对表达变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间(w)	AL(U/L)	AST(U/L)	CYP2E1	TNF-α
对照	28	4	18.00 ± 1.19	73.30 ± 12.00	0.22 ± 0.03	10.30 ± 1.70
		8	19.70 ± 4.10	79.60 ± 1.18	0.09 ± 0.01	9.90 ± 1.50
		12	27.90 ± 2.90	65.10 ± 16.70	0.13 ± 0.01	12.00 ± 1.00
模型	28	4	19.70 ± 4.15	94.40 ± 12.80	0.45 ± 0.04 *	13.70 ± 2.50 *
		8	140.50 ± 32.00 *	140.50 ± 32.00 *	0.37 ± 0.04 *	17.80 ± 2.30 **
		12	37.00 ± 9.10 *	128.80 ± 22.50 *	0.41 ± 0.01 *	22.90 ± 6.60 **
治疗	28	4	19.58 ± 3.27	95.30 ± 10.40	0.48 ± 0.03	14.02 ± 2.40
		8	21.50 ± 2.60 Δ	83.70 ± 10.10 Δ	0.24 ± 0.03 Δ	13.60 ± 4.10 Δ
		12	24.90 ± 2.90 Δ	84.70 ± 26.80 Δ	0.25 ± 0.05 Δ	16.00 ± 4.80 Δ

注:与对照组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$



注:1 为对照组;2 为模型组;3 为治疗组

图 2 各组肝组织 CYP2E1 蛋白表达电泳图

区域,负责如乙醇、四氯化碳等物质的代谢^[15,16],产生氧化应激及导致肝脏损害。多种实验显示^[15,17,18]CYP2E1 在酒精性肝病中表达明显升高。本实验显示在未停用乙醇的前提下,治疗组小鼠灌胃大枣可以明显减轻 CYP2E1 的表达。大枣黄酮^[11]可能减弱乙醇代谢过程的氧化应激,减轻肝脏损伤。

Mandrekar P 等^[19]研究发现,口服乙醇可以直接刺激肝细胞引起肝细胞的损伤,同时肠道内毒素的吸收增加,内毒素可以与肝细胞及库夫细胞上的Toll 4受体结合,通过 MyD88 依赖和非依赖的途径,导致NF-κB的激活,可产生大量的细胞因子,尤其是 TNF-α,从而导致进一步的肝损伤产生。大量的炎症介质刺激库夫细胞导致其活化进而可以引起肝脏胶原沉积、纤维化和肝硬化的发生^[20]。乙醇还可以改变 Toll4 受体的功能引起 MAP 激酶的活化,使下游的转录蛋白 Egr-1 AP-1 和 STAT 活化,以及 TNF-α mRNA 表达增多^[20]。这也可能是肝病患者容易发展为肝癌等肿瘤的分子基础。本实验显示应用大枣灌胃的小鼠肝组织 TNF-α 表达量减少,治疗组与模型组比较差异具有统计学意义。提示大枣可能干预酒精性肝病上述机制中的某一个环节,进而阻断酒精性肝病的发生。

病理是诊断酒精性肝病的金标准,AST、ALT 是临床常用指标,两者在本实验中表现出高度的一致性。本实验在酒精灌胃的不同时期应用病理切片 HE 染色和 Masson 染色证实酒精性肝病的不同分期。观察

显示,治疗组小鼠病理及转氨酶升高程度均较模型组减轻,差异有统计学意义。提示大枣能从根本上减轻肝脏的炎症发生。甚至能改善酒精性肝病的预后。

中医学早有大枣用于酒精性肝病的记载,但保健和临床辅助治疗酒精性肝病尚缺乏实验依据。本实验检测的几项指标均证实,大枣可以从不同的途径减轻乙醇导致的肝损伤。推测大枣治疗酒精性肝病是通过多种途径起作用。为临床应用大枣防治酒精性肝病奠定了理论基础。

参 考 文 献

[1] Mandrekar P, Szabo G. Signaling pathways in alcohol-induced liver inflammation [J]. J Hepatol, 2009, 50(6): 1258 - 1266.

[2] 厉有名.酒精性肝病的发病机制[J].中华肝病杂志, 2003, 11(11): 690 - 691.

[3] 张艳红,杨洁.红枣中营养成分的测定和质量评价[D].乌鲁木齐:新疆大学,2006.

[4] Zhang H, Jiang L, Ye S, et al. Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (Ziziphus jujuba Mill.) from China Food and Chemical[J]. Toxicology, 2010, 48(6): 1461 - 1465.

[5] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组.酒精性肝病诊疗指南[J].中国肝病杂志, 2010, 4(2): 49 - 53.

[6] 赵初环,卢中秋,李惠萍,等.大鼠酒精性肝病模型的建立[J].浙江临床医学, 2007, 9(4): 435 - 436.

[7] 伏建峰,史清海,岳新华,等.改进的酒精灌胃法建立大鼠酒精性肝病模型[J].解放军预防医学杂志, 2006, 10(5): 24 - 26.

[8] 周俊英,周东方,王玮.酒精直接灌胃法建立大鼠酒精性肝病模型[J].河北医科大学学报, 2009, 30(4): 328 - 330.

[9] 杨致富,韩德恩,张新宇,等.大鼠酒精肝模型的制备[J].哈尔滨医科大学学报, 2000, 34(2): 111 - 113.

[10] 林红,吕森,张义侠,等.酒精性肝病大鼠模型的建立[J].

- 世界华人消化杂志, 2001, 9(1): 24-25.
- [11] Chen CF, Lee JF, Wang D, et al. Water extract of *Zizyphus jujube* attenuates ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats (PP106)[J]. Transplantation Proc, 2010, 42(3): 741-743.
 - [12] 李东良, 郭红哲, 杨方生, 等. 大鼠酒精性肝损伤模型的建立及病理学观察[J]. 中西医结合肝病杂志, 2000, 10(2): 30-32.
 - [13] 王泰龄. 酒精性肝病的病理诊断标准分级、分期与分类[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(5): 283-286.
 - [14] 李建, 李澎涛, 李彧, 等. 酒精性肝病大鼠肝窦病理改变的形态学观察[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(10): 532-534.
 - [15] Lu YK, Wu DF, Wang XD, et al. Chronic alcohol-induced liver injury and oxidant stress are decreased in cytochrome P4502E1 knockout mice and restored in humanized cytochrome P4502E1 knock-in mice[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(9): 1406-1416.
 - [16] Maher JJ. Alcoholic steatosis and steatohepatitis[J]. Semin Gastrointest Dis, 2002, 13(1): 31-39.
 - [17] Wang XD, Cederbaum AI. Acute ethanol pretreatment increases FAS-mediated liver injury in mice: role of oxidative stress and CYP2E1-dependent and -independent pathways[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42(7): 971-984.
 - [18] Khanal T, Choi JH, Hwang YP, et al. Protective effects of saponins from the root of *Platycodon grandiflorum* against fatty liver in chronic ethanol feeding via the activation of AMP-dependent protein kinase[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(11): 2749-2754.
 - [19] Mandrekar P, Szabo G. Signaling pathways in alcohol-induced liver inflammation[J]. J Hepatol, 2009, 50(6): 1258-1266.
 - [20] Szabo G. Moderate drinking, inflammation, and liver disease[J]. Ann Epidemiol, 2007, 17(5): 49-54.

(收稿: 2013-08-01 修回: 2013-12-01)

第十一届全国中西医结合血液学学术会议暨第二届中西医结合血液学高峰论坛会议征文通知(第一轮通知)

为促进全国中西医结合血液学学术发展, 增进血液学工作者的学术交流和提高, 由中国中西医结合学会血液学专业委员会主办、中国中医科学院西苑医院承办的第十一届全国中西医结合血液学学术会议暨第二届中西医结合血液学高峰论坛定于 2014 年 9 月 19~21 日在福建省厦门市举行。会议将邀请国内知名专家就中西医结合血液病最为关注的问题作专题报告, 并进行学术交流。本次会议已列入中国中西医结合学会 2014 年度计划项目。热忱欢迎您的投稿与参会。现将会议征文有关事宜通知如下。

征文内容 血液系统肿瘤(白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征等)中西医结合的临床和基础研究; 造血干细胞生物学特性的中西医结合临床应用; 造血干细胞移植的中西医结合研究; 红细胞疾病(再生障碍性贫血、溶血性贫血、巨幼红细胞性贫血、单纯红细胞再生障碍性贫血等)中西医结合临床和基础研究; 血栓与止血疾病(特发性血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜等)中西医结合临床和基础研究; 血液学相关生物技术(形态学、免疫学、分子生物学、单克隆抗体、基因工程等)的中西医结合应用; 血液学护理技术的临床和基础研究。

征文要求 来稿应为未公开发表的论文, 内容应为结构式摘要(依次包括: 文题、作者、作者单位、目的、方法、结果、结论), 字数 500~1000 字。并请注明联系方式(工作单位、地址、邮编、联系电话、Email 等)。征文请 Email 发送至 xyxzywyh@163.com, 邮件标题请注明“血液学会议稿件”字样。论文截止日期: 2014 年 7 月 31 日。会议具体地点请关注第二轮和第三轮通知。

联系人/地址

北京西苑医院血液科 唐旭东 收 邮编: 100091, 电话: 010-62835362

希望各省市中西医结合血液学委员、青年委员通知本专业医师参会。欢迎广大血液科医师莅临!

中国中西医结合学会血液学专业委员会