

网络出版时间: 2021-9-7 14:45 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1400.007.html>

DEHP 促进酒精结合高脂饮食诱导大鼠酒精性脂肪肝的机制

徐 强^{1 2 3}, 黄 松^{1 2 3}, 季 珂^{1 2 3}, 徐维平^{4 5}, 魏 伟^{1 2 3}

摘要 目的 研究邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)促进酒精结合高脂饮食诱导的酒精性脂肪肝的作用机制。方法 将60只SD大鼠随机分为6组:正常组、模型组(酒

2021-07-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 51672004); 安徽省自然科学基金(编号: 1608085MH176)

作者单位: ¹安徽医科大学临床药理研究所, 合肥 230032

²抗炎免疫药物教育部重点实验室, 合肥 230032

³抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

⁴中国科学技术大学附属第一医院生命科学与医学部, 合肥 230001

⁵肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室, 合肥 230001

作者简介: 徐 强 男 硕士研究生;

魏 伟 男 教授 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

徐维平 男 教授 博士生导师, 责任作者, E-mail: xu_weiping666@163.com

精)、酒精+DEHP 0.05 mg/kg 组、酒精+DEHP 5 mg/kg 组、酒精+DEHP 500 mg/kg 组以及 DEHP 500 mg/kg 对照组。取大鼠血清及肝脏组织, 用生化分析血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)的水平, HE 切片观察大鼠肝脏损伤状态, 用 Western blot 检测肝组织中 P-AMPK 及 lipin-1 蛋白的表达水平。结果 DEHP 促进了血清中 ALT、AST 的积累, 加剧了酒精结合高脂饮食诱导的小鼠病理状态, 同时上调了 lipin-1 蛋白水平, 抑制了 P-AMPK 蛋白水平。结论 DEHP 可能通过介导 lipin-1 和 P-AMPK 蛋白水平, 加重大鼠酒精性脂肪肝的病理过程。

关键词 脂肪肝; 酒精性; 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯; lipin-1; P-AMPK

中图分类号 R 575.5; R 996

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)11-1718-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.008

酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, AFL) 是酒

The expression of RBM25 in colorectal cancer and its effect on cell proliferation

Wang Fengjie, Guo Aijun, Gong Zhizhong, et al

(Dept of Biology, School of Life Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression of RNA binding motif protein 25 (RBM25) in colorectal cancer (CRC) tissues and further explore its effects on the function of CRC cells. **Methods** The TCGA database was used to analyze the differential expression of RBM25 in CRC and corresponding normal tissues, and the correlation between the expression of RBM25 mRNA and the prognosis of CRC patients. QRT-PCR and Western blot were conducted to determine the expression of RBM25 in the mRNA and protein levels in clinical CRC tissues and paired normal tissues, respectively. CRC cell line HCT 116 was transfected with RBM25-siRNAs, and then CCK-8 experiments and colony formation experiments were performed to investigate the effects of RBM25 knockdown on the growth and proliferation of CRC cells. **Results** TCGA database analysis showed that the differential expression of RBM25 mRNA between CRC tissues and corresponding normal tissues was not statistically significant ($P > 0.05$), but the level of RBM25 mRNA was negatively correlated with the patient's prognosis ($P < 0.05$); The results of qRT-PCR showed that RBM25 mRNA was higher in CRC tissues than that in paired normal tissues, but the differential expression was not statistically significant ($P > 0.05$). Western blot results showed that RBM25 was upregulated in CRC tissues ($P < 0.05$); RBM25-siRNA knockdown retarded the growth and proliferation of CRC cell line HCT 116 ($P < 0.05$). **Conclusion** The upregulation of RBM25 protein promotes the growth and proliferation of CRC cells, suggesting that RBM25 may be related to the occurrence and progression of CRC.

Key words colorectal cancer; RBM25; proliferation; differential expression

精性肝病中最常见的一种慢性肝脏疾病,其病因主要是长期大量饮酒所致^[1]。肝细胞脂肪变性、炎症细胞浸润及肝细胞损伤常是 AFL 的特征,若继续饮酒,可能会发展为肝纤维化、肝硬化,严重时甚至会发展为肝癌。病理切片镜下大泡性脂变是酒精性肝病的主要脂变形式,肝细胞质内出现孤立的大脂滴,肝细胞肿大、胞质内许多小脂肪滴挤在一起,脂肪滴大小较均一,有时融合成一个大的脂肪囊^[2-3]。目前尚无有效的治疗药物,因此对于 AFL 的预防尤为重要。

邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(di-2-ethylhexyl phthalate, DEHP)作为一种邻苯二甲酸酯衍生物及一种具有抗雄激素性质的环境内分泌干扰物,在制造聚氯乙烯塑料中被广泛用作增塑剂^[4]。普通人群接触这种增塑剂主要包括从事特殊工作的人群(如塑料厂工人、油漆工人)和膳食暴露(包装、食品、加工等),各种体内外研究^[5]均报道了 DEHP 的毒性作用。现利用酒精联合高脂饮食诱导的酒精性脂肪肝病(alcoholic fatty liver disease, AFLD)大鼠,观察 DEHP 对 AFLD 大鼠的影响,初步探讨 DEHP 促进 AFLD 的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级成年雄性 SD 大鼠共 60 只,体质量 150~160 g,购自安徽医科大学实验动物中心,动物房温度控制在 18~25 ℃,相对湿度应控制在 50%~70%,循环给予黑暗 12 h 和光照 12 h 处理,大鼠可自由地获得食物和水。

1.2 实验材料 谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(南京建成生物工程研究所);β-actin、P-AMPK 抗体(Cell Signaling Tech 公司);辣根酶标记山羊抗兔 IgG(Pepro Tech 公司);DEHP(国药集团化学试剂有限公司);辣根酶标记山羊抗大鼠 IgG(Pepro Tech 公司);lipin-1 抗体、AMPK 抗体(Proteintech 公司);红星二锅头(北京红星股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立及处理 将 SD 大鼠在动物房适应性喂养 5~7 d,体质量达到 200 g 左右,将其随机分为 6 组,每组 10 只,分组如下:正常组、模型组(酒精)、酒精 + DEHP 0.05 mg/kg 组、酒精 + DEHP 5 mg/kg 组、酒精 + DEHP 500 mg/kg 组及 DEHP 500 mg/kg 对照组。使用白酒和高脂饲料联合诱导酒精

性脂肪肝模型。上午对大鼠灌胃白酒,下午灌胃 DEHP。按照伦理学方法,在灌胃第 4 周和第 6 周末每组处死动物 4~5 只,收集大鼠血液并解剖大鼠取未受到压迫的肝组织,对肝组织行 HE 染色观察病理结果,检测血清中转氨酶的水平。

1.3.2 组织标本的收集 在灌胃第 4 周和第 6 周末,大鼠禁食 12 h,但是不禁水。麻醉大鼠,股动脉取血,最后颈椎脱臼处死。取血室温放置 3 h 左右,在 4 ℃、2 500~3 000 r/min 离心 15 min,用移液枪吸取上清液至另一 EP 管中(上清液即为血清),放于 -20 ℃ 冰箱保存。解剖大鼠,取出大鼠肝脏,小心去掉肝脏附近的多余组织,用生理盐水冲洗干净,取出后用天平称量肝脏重量。注意不能破坏肝脏组织结构,将取好的肝组织置于 4% 多聚甲醛中,研究其病理学的变化;其余的肝脏置于 -80 ℃ 冰箱中备用。

1.3.3 生化指标的检测 血清 ALT 和 AST 活性检测,从 -20 ℃ 冰箱中取出后缓慢融化。融化温度为 4 ℃,待融化后转移样本至室温。再进行下一步操作前离心 4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。按说明书操作,酶标仪检测微孔板对应的吸光度(optical density, OD)值。将检测样本的数值带入标准曲线公式计算出 ALT 和 AST 的数值。

1.3.4 肝组织 HE 染色 剪取相同部位的肝组织块,用多聚甲醛固定后进行 HE 染色,最后在显微镜下观察,每张切片观察 3 个视野。

1.3.5 Western blot 检测肝组织 lipin-1 和 P-AMPK 蛋白的表达 配制裂解液,配制比例为 RIPA : PMSF = 99 : 1,在裂解液中加入磷酸酶抑制剂。称取肝组织 60 mg 左右,用镊子夹进匀浆器中,再在匀浆器中加入配好的裂解液,裂解液具体的加入量由所称取的肝组织的质量决定,把组织放置在冰上研磨,时间为 20 min。完成裂解之后,在离心管中加入组织,反复冻融,次数为 3 次,温度为 -80 ℃ 和 4 ℃。完成该操作后离心 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,对其进行蛋白质定量检测。在上清液中加入上样缓冲液,后者体积为前者 1/4,放入沸水浴中,时间为 10 min,置于 -20 ℃ 保存待用。取适量样品进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后封闭 2 h,然后分别孵育对应一抗过夜。第 2 天洗膜后加入与一抗对应的二抗孵育 2 h,洗膜后显影,结果用 Image J 软件分析蛋白条带。

1.4 统计学处理 数据以平均值 ± 标准误差表示,直方图采用 Graphpad Prism. V8.0 绘制。数据分析

采用 SPSS 25.0 软件。对比实验组间数据使用单因素方差分析。当 $P < 0.05$ 时, 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清指标变化 DEHP 暴露 4 周后, 与模型组大鼠的 AST 水平 (19.83 ± 1.39) U/L 相比, DEHP 500 mg/kg 组 AST 水平 (27.89 ± 7.05) U/L 显著增加 ($F = 7.460, P < 0.05$)。与模型组大鼠的 ALT 水平 (19.81 ± 3.29) U/L 相比, DEHP 500 mg/kg 组 ALT 水平 (24.89 ± 1.60) U/L 显著增加 ($F = 3.513, P < 0.05$)。见图 1。

DEHP 暴露 6 周后, 与正常组大鼠 AST 水平 (15.42 ± 1.64) U/L 相比, 模型组 AST 水平 (24.80 ± 3.44) U/L 及 DEHP 500 mg/kg 对照组的 AST 水平 (27.42 ± 2.32) 均显著增加 ($F = 22.767, P < 0.05$)。与模型组相比, DEHP 500 mg/kg 组 AST 水平 (49.16 ± 5.54) U/L 显著增加 ($F = 22.767, P < 0.01$)。与模型组 ALT 水平 (23.43 ± 2.39) U/L 相比, DEHP 500 mg/kg 组 ALT 水平 (33.31 ± 2.25) U/L 显著增加 ($F = 14.883, P < 0.01$)。见图 2。

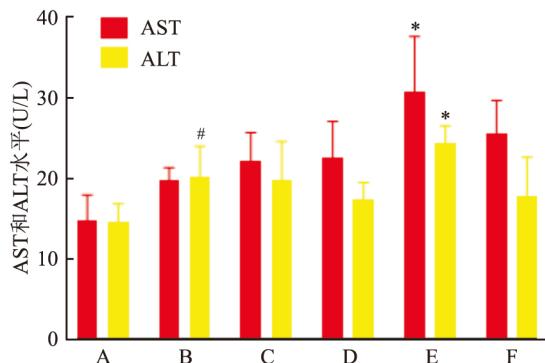


图 1 DEHP 暴露 4 周后 AST、ALT 变化

A: 正常组; B: 模型组; C: 酒精 + DEHP 0.05 mg/kg 组; D: 酒精 + DEHP 5 mg/kg 组; E: 酒精 + DEHP 500 mg/kg 组; F: DEHP 500 mg/kg 对照组; 与正常组比较: $^{\#}P < 0.05, ^{\#\#}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01$

2.2 各组大鼠肝组织病理变化 DEHP 暴露 4 周后, 肝脏表面光滑, 颜色红润明亮。正常组肝细胞结构完整, 核清晰, 肝索排列整齐且细胞边界清晰。在模型组、酒精 + DEHP (0.05、5 mg/kg) 组中, 部分肝细胞中出现脂肪液泡, 并有炎性细胞浸润。在 DEHP 500 mg/kg 对照组中, 肝窦狭窄, 细胞边界不清楚, 少量炎症细胞浸润在血管周围。在酒精 + DEHP 500 mg/kg 组中, 炎性浸润比其他组更严重, 有明显

的脂肪液泡存在, 细胞间隙中出现淋巴细胞 (近似裸核)。见图 3。

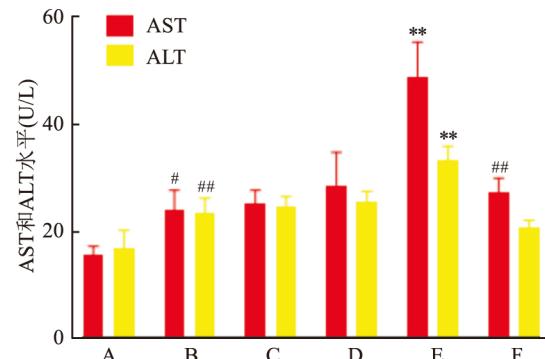


图 2 DEHP 暴露 6 周后 AST、ALT 变化

A: 正常组; B: 模型组; C: 酒精 + DEHP 0.05 mg/kg 组; D: 酒精 + DEHP 5 mg/kg 组; E: 酒精 + DEHP 500 mg/kg 组; F: DEHP 500 mg/kg 对照组; 与正常组比较: $^{\#}P < 0.05, ^{\#\#}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01$

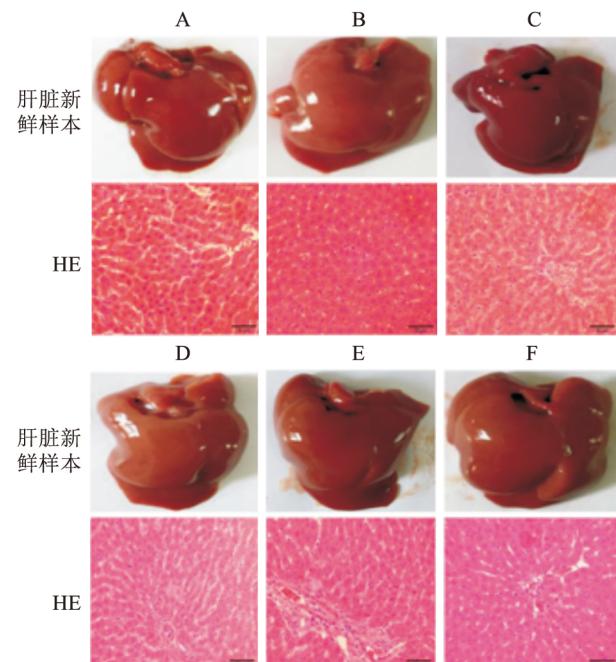


图 3 DEHP 暴露 4 周后大鼠肝脏新鲜标本及 HE 染色 HE $\times 400$

A: 正常组; B: 模型组; C: 酒精 + DEHP 0.05 mg/kg 组; D: 酒精 + DEHP 5 mg/kg 组; E: 酒精 + DEHP 500 mg/kg 组; F: DEHP 500 mg/kg 对照组

DEHP 暴露 6 周后, 除正常组外, 其余肝脏表面为暗红色且平滑度降低。模型组和 DEHP 0.05 mg/kg 组出现了脂肪液泡, 并且大的脂肪液泡将细胞核挤压到一侧, 使得细胞核变小。在 DEHP 5 mg/kg 组中, 肝细胞中的核仁大小不同, 炎性细胞浸润。DEHP 500 mg/kg 组肝小叶结构紊乱, 肝细胞肿胀,

胞质疏松,呈水样变性,肝细胞内大量脂滴生成,汇管区伴有炎细胞浸润。在 DEHP 500 mg/kg 对照组中,粗颗粒沉积在细胞质中,且伴有炎细胞浸润。见图 4。

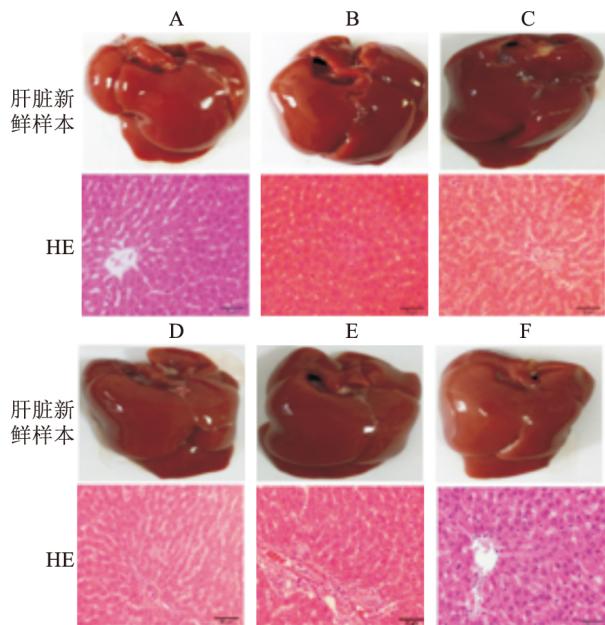


图 4 DEHP 暴露 6 周后大鼠肝脏新鲜标本及 HE 染色 HE ×400

A: 正常组; B: 模型组; C: 酒精 + DEHP 0.05 mg/kg 组; D: 酒精 + DEHP 5 mg/kg 组; E: 酒精 + DEHP 500 mg/kg 组; F: DEHP 500 mg/kg 对照组

2.3 肝组织中 lipin-1 和 P-AMPK 蛋白的表达

与正常组相比,模型组和 DEHP 500 mg/kg 对照组的 lipin-1 和 P-AMPK 水平有显著变化。此外,与模型组相比,DEHP 0.05 mg/kg 剂量组 lipin-1 的表达无明显变化,DEHP 5 mg/kg 组 lipin-1 的表达变化有所增加($F = 173.731, P < 0.05$),而 DEHP 500 mg/kg 组 lipin-1 的表达变化明显增加($F = 173.731, P < 0.01$)。与模型组相比,随着 DEHP 剂量的增加,P-AMPK 的表达逐渐下降($F = 370.204, P < 0.01$)。见图 5。

3 讨论

邻苯二甲酸酯(Paes)是最常用的增塑剂,它被添加到 PVC 中以增强柔韧性^[6]。DEHP 是最常用的增塑剂之一,近年来,大量研究^[7-8]表明,DEHP 暴露可影响人的血脂代谢异常,导致诸如心脏病、糖尿病、肥胖等许多健康问题。研究^[9]表明,DEHP 暴露后,肝脏产生大量的活性氧,致使抗氧化防御保护功能失调,从而引起肝毒性。在该研究中,模型组中 AST、ALT 水平较正常组升高,DEHP 干预后,DEHP

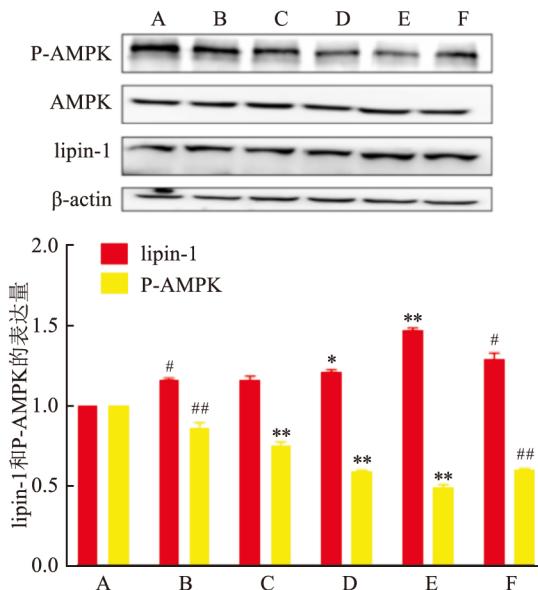


图 5 DEHP 暴露 6 周后对大鼠肝脏组织 lipin-1、P-AMPK 蛋白的影响

A: 正常组; B: 模型组; C: 酒精 + DEHP 0.05 mg/kg 组; D: 酒精 + DEHP 5 mg/kg 组; E: 酒精 + DEHP 500 mg/kg 组; F: DEHP 500 mg/kg 对照组; 与正常组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

0.05、5 mg/kg 剂量组大鼠 ALT、AST 水平与模型组比较无明显变化,而 DEHP 500 mg/kg 剂量组大鼠 ALT、AST 水平较模型组有所上升,表明高剂量 DEHP 对肝脏有一定的损伤能力。

lipin-1 是参与多种信号转导途径的双功能分子,包括肝脏在内的几个器官脂质代谢的关键调节因子,对肝脏的炎症反应也起到重要调控作用^[10]。大量证据表明,lipin-1 在 AFL 的形成、发展中起重要作用,酒精可抑制肝细胞内 SIRT1 的表达,进而上调 lipin-1,产生大量的活性氧,氧化与抗氧化系统失衡,氧化应激损伤加重,脂肪代谢紊乱及炎性因子浸润^[11]。本研究中模型组大鼠肝组织 lipin-1 表达升高,而在 DEHP 干预后,DEHP 5、500 mg/kg 剂量组 lipin-1 蛋白表达进一步升高。AMPK 是广泛分布于真核细胞的一种 Ser/Thr 蛋白激酶,介导胞内众多的生理生化反应^[12]。研究^[13-14]证实,AFLD 的发生发展与 AMPK 介导的脂代谢通路受阻紧密相关。乙醇及其代谢产生的乙醛和活性氧等有害代谢物会不同程度地抑制肝脏 AMPK 的活性,进而促进脂肪酸合成,抑制脂肪酸氧化,最终引起脂肪变性。本研究中,与正常组相比,模型组大鼠肝组织 P-AMPK 表达降低,而在 DEHP 干预后,DEHP 0.05、5、500 mg/kg 剂量组 P-AMPK 蛋白表达逐渐降低。因此,DE-

HP 促进 AFLD 的作用可能与上调 lipin-1 和下调 P-AMPK 密切相关。

参考文献

- [1] Kim D , Kim Y , Lee J , et al. Estrogen-related receptor γ controls sterol regulatory element-binding protein-1c expression and alcoholic fatty liver [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* , 2019 , 1864(12) : 158521.
- [2] Fujisawa K , Takami T , Nagatomo T , et al. Usefulness of adult medaka fish as a model for the evaluation of alcoholic fatty liver [J]. *Alcohol* , 2019 , 77: 147 – 54.
- [3] Liu H , Liu M , Fu X , et al. Astaxanthin prevents alcoholic fatty liver disease by modulating mouse gut microbiota [J]. *Nutrients* , 2018 , 10(9) : 1298.
- [4] Zhang S , Sun C , Zhao S , et al. Exposure to DEHP or its metabolite MEHP promotes progesterone secretion and inhibits proliferation in mouse placenta or JEG-3 cells [J]. *Environ Pollut* , 2020 , 257: 113593.
- [5] Zhao Z , Ji K , Shen X , et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate promotes hepatic fibrosis by regulation of oxidative stress and inflammation responses in rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol* , 2019 , 68: 109 – 19.
- [6] Chou C K , Yang Y T , Yang H C , et al. The impact of di(2-ethylhexyl) phthalate on cancer progression [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* , 2018 , 66(3) : 183 – 97.
- [7] Zhang Y , Ge S , Yang Z , et al. Disturbance of di(2-ethylhexyl) phthalate in hepatic lipid metabolism in rats fed with high fat diet [J]. *Food Chem Toxicol* , 2020 , 146: 111848.
- [8] Su T , Hwang J , Sun C , et al. Urinary phthalate metabolites , coronary heart disease , and atherosclerotic markers [J]. *Ecotoxicol Environ Saf* , 2019 , 173: 37 – 44.
- [9] Zhang Q , Zhao Y , Talukder M , et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate induced hepatotoxicity in quail (*Coturnix japonica*) via modulating the mitochondrial unfolded protein response and NRF2 mediated antioxidant defense [J]. *Sci Total Environ* , 2019 , 651: 885 – 94.
- [10] Zhou Z , Ye T J , Bonavita G , et al. Adipose-specific lipin-1 over-expression renders hepatic ferroptosis and exacerbates alcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Hepatol Commun* , 2019 , 3(5) : 656 – 69.
- [11] Chen X , Bian M , Jin H , et al. Dihydroartemisinin attenuates alcoholic fatty liver through regulation of lipin-1 signaling [J]. *IUBMB Life* , 2019 , 71(11) : 1740 – 50.
- [12] Xu N , Luo H , Li M , et al. β -patchoulene improves lipid metabolism to alleviate non-alcoholic fatty liver disease via activating AMPK signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother* , 2021 , 134: 111104.
- [13] 刘瑞雪, 鲁桓兵, 宋育林. AMPK 磷酸化在异烟肼致肝损伤中的作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2018 , 53(8) : 1240 – 4.
- [14] Dong M , Li L , Li G , et al. Mangiferin protects against alcoholic liver injury via suppression of inflammation-induced adipose hyperlipolysis [J]. *Food Funct* , 2020 , 11(10) : 8837 – 51.

The mechanism of alcohol and high-fat diet induced alcoholic fatty liver in rats promoted by DEHP

Xu Qiang^{1 2 3} , Huang Song^{1 2 3} , Ji Ke^{1 2 3} , et al

(¹Institute of Clinical Pharmacology , Anhui Medical University , Hefei 230032; ²Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine , Ministry of Education , Hefei 230032; ³Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine , Hefei 230032)

Abstract Objective To study the mechanism of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in promoting alcoholic fatty liver induced by alcohol combined with high-fat diet. **Methods** 60 SD male rats were divided into 6 groups randomly , normal group , model group (alcohol) , alcohol + DEHP 0. 05 mg/kg group , alcohol + DEHP 5 mg/kg group , alcohol + DEHP 500 mg/kg group and DEHP 500 mg/kg control group. The serum and liver tissues of rats were taken , and the levels of alanine aminotransferase(ALT) and aspartate aminotransferase(AST) in the serum were analyzed by biochemistry. The liver injury state of rats was observed by HE slices. The expression levels of P-AMPK and lipin1 protein in liver tissues were detected by Western blot. **Results** DEHP promoted the accumulation of ALT and AST in serum , aggravated the pathological state of mice induced by alcohol combined with high-fat diet , and at the same time increased lipin-1 protein level and inhibited P-AMPK protein level. **Conclusion** DEHP may aggravate the pathological process of alcoholic fatty liver rats by mediating lipin-1 and P-AMPK protein levels.

Key words fatty liver; alcoholic; DEHP; lipin-1; P-AMPK