

高脂饮食诱导 CYP4A 高表达参与 小鼠非酒精性脂肪肝病程研究

高惠芳 曹雅茹 夏宏光 朱项羽 金 涌

摘要 目的 探讨细胞色素 P4504A(CYP4A)在非酒精性脂肪肝(NAFLD)中的调节作用,并检测其在脂肪肝中的变化。方法 高脂乳剂灌胃 C57BL/6 小鼠方法建立 NAFLD 动物模型,分对照组和高脂乳剂灌胃组,高脂乳剂灌胃组又分别设 4、6、8、10 周组。肝组织切片进行 HE 染色。生化试剂盒检测小鼠血清 TG、ALT、AST、MDA、SOD 的含量变化;Western blot 法检测肝组织 CYP4A 的变化;液相色谱-串联质谱法(LC/MS/MS)检测花生四烯酸经 CYP4A 羟基化产物 20-羟基二十烷四烯酸(20-HETE)的含量;冰冻切片免疫荧光法检测肝组织活性氧的荧光强度。结果 肝组织 HE 染色显示脂肪空泡于第 10 周出现。高脂乳剂灌胃 C57BL/6 小鼠后血清 TG、ALT、AST 和 MDA 的含量随高脂乳剂灌胃时间的延长而逐渐升高,而 SOD 水平显示下降的趋势。肝组织中 CYP4A 和 20-HETE 的表达量随着肝脏脂质堆积而增多。肝组织活性氧的荧光强度表现为第 10 周最强。结论 CYP4A 参与 NAFLD 时的脂质代谢使花生四烯酸代谢产物 20-HETE 合成增多,同时诱导活性氧的产生导致氧化应激从而促进脂质过氧化。

关键词 非酒精性脂肪肝; CYP4A; 脂质过氧化; 氧化应激
中图分类号 R 333.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)11-1678-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.003

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者常表现为高血脂、高低密度脂蛋白和 BMI 升高^[1]。NAFLD 时脂肪组织释放的游离脂肪酸酯化成甘油三酯(triglyceride, TG)储存在肝细胞中,并以极低密度脂蛋白的形式运输到外周^[2]。TG 本身是没有毒性作用的,但是脂质代谢途径的失调产生的脂毒性是疾病发生的主要因素^[3]。碳水化合物、糖类、脂肪酸等增加肝脏代谢导致有毒脂质积累,而代谢产物诱导肝细胞氧化应激、损伤和死亡^[4]。细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP)依赖还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide

adenine dinucleotide phosphate, NADPH)提供的电子氧化脂肪酸产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)是导致肝细胞损伤的重要原因^[5]。CYP4 家族 ω-羟基化脂肪酸,该代谢途径能产生关键的脂质介质 20-羟基二十烷四烯酸(20-hydroxyeicosatetraenoic acid, 20-HETE)^[6]。该研究利用高脂乳剂灌胃造成小鼠 NAFLD,探究 CYP4A 高表达时对 NAFLD 病程的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 C57BL/6 小鼠 50 只,体质量 18~22 g,购自安徽医科大学实验动物中心。小鼠饲养于 12 h 光照循环的房间并自由饮食,实验开始前适养 1 周。

1.1.2 主要试剂 谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、TG 试剂盒(南京建成公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(上海 Beyotime 公司);20-HETE(美国 MedChemExpress 公司);CYP4A 单克隆抗体(美国 abcam 公司);β-actin 多克隆抗体、二抗(北京中杉金桥);荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);RIPA(上海 Beyotime 公司);PVDF 膜(美国 Milipore 公司);ECL 发光试剂盒(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 高脂乳剂的制备 高脂乳剂含 40% 的脂肪能量,主要成分包含以下成分:油相:猪油 400 g、胆固醇 80 g、聚山梨酯-80 50 ml;水相:食用盐 10 g、胆酸钠 10 g、丙硫氧嘧啶 10 g、丙二醇 175 ml、冰糖 156 g、蒸馏水 100 ml;水相于 60℃ 水浴锅中加热后加入到油相中溶解并进行混合。将混合均匀的乳剂进行分装并贮存于 4℃ 冰箱,用时 55℃ 水浴加热溶解。

1.2.2 小鼠分组 将小鼠随机分为 5 组,每组 10 只;采用自制的高脂乳剂进行非酒精脂肪肝造模,设置正常对照组、4 周、6 周、8 周、10 周组。眼球取血

2019-07-10 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH284)

作者单位:安徽医科大学药学院药剂教研室,合肥 230032

作者简介:高惠芳,女,硕士研究生;

金涌,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: jinyong@ahmu.edu.cn

处死,血液静置 30 min 后离心取上清液。肝脏被立即取出并置于冰上,切取部分肝左叶保存于 4% 多聚甲醛溶液中,剩余组织立即保存在 -80°C 冰箱。

1.2.3 肝组织 HE 染色 肝组织小块浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后置于一系列浓度梯度的酒精中做脱水处理,脱水后的肝组织浸入蜡液中包埋,然后转入纯二甲苯中浸渍透明数小时。蜡块在轮式切片机上进行切片,厚度在 $4\sim 7\ \mu\text{m}$,切出一片接一片的蜡带,用毛笔轻托轻放在纸上。将切片贴在洁净的载玻片上, 45°C 恒温箱中干燥后进行脱蜡及水化处理,最后进行苏木精伊红染色。

1.2.4 鼠血清生化检测 血清样本中 TG、ALT、AST、MDA 和 SOD 含量水平的测定采用相应试剂盒的生化检测法,并按操作说明检测。血清样品无需前处理可直接用于测定。最后使用酶标仪在各适宜的波长处检测样品与试剂的反应液的吸光度,根据 OD 值计算其浓度。

1.2.5 Western blot 法检测 CYP4A 含量的表达 用裂解液裂解肝组织匀浆提取全蛋白,BCA 法定量。10% SDS-PAGE 垂直电泳分离蛋白质,电转到 PVDF 膜上;用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; CYP4A(1 : 2 000)、 β -actin(1 : 1 000) 抗体 4°C 孵育过夜。后经 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;室温孵育辣根过氧化物酶标记二抗 1 h;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。ECL 化学发光法显示目的蛋白,蛋白条带用 Image J 软件进行分析。

1.2.6 肝组织 ROS 检测 肝组织 ROS 表达采用冰冻切片免疫荧光法进行分析,每组至少检测 3 只小鼠的肝组织。步骤如下:①染色:冰冻切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈(防止抗体流走),在圈内滴加 ROS 染液,避光恒温箱 37°C 孵育 30 min。

② DAPI 复染细胞核:玻片置于 PBS(pH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液,避光室温孵育 10 min。

③ 封片:玻片置于 PBS(pH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。④ 镜检拍照:切片于荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.7 液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) 检测肝组织 20-HETE 含量 样品预处理步骤如下:取肝脏组织 50 mg 并用 PBS 溶液冲洗,加入 250 μl 甲醇和 5 μl 甲酸,混匀后用匀浆仪匀浆。超声(冰浴中进行)破碎,超声条件:工作时间 3 s,间隙时间 2 s,工作 60 次,功率 $< 400\ \text{W}$ 。14 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液转入新的 EP 管中。加入 350 μl 双蒸水和 0.5 ml 乙酸乙酯,涡旋 30 s,以 12 000 r/min 离心 10 min 取出有机相。有机相用氮气吹干,上样前用甲醇复溶。使用 Waters BEH-C18 柱($1.7\ \mu\text{m} \times 210\ \text{mm}$) 色谱柱,流动相:甲醇:0.1% 甲酸水 = 90 : 10,流速:0.3 ml/min,柱温: 35°C ,进样量为 10 μl 。ESI 离子源,负离子 MRM 模式,毛细管电压:3 kV,源电压:40 V,去溶剂气流量:500 L/h,去溶剂气温度: 400°C ,离子源温度: 150°C 。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 16.0 分析软件用于分析各组实验数据差异,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织 HE 染色 染色结果见图 1。与对照组比较,高脂乳剂灌胃 4 周后小鼠肝组织并没有出

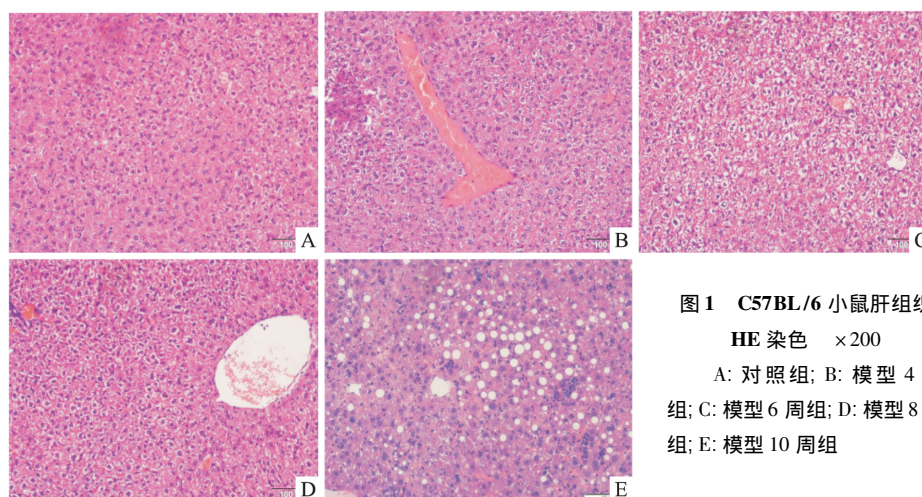


图1 C57BL/6 小鼠肝组织
HE 染色 $\times 200$
A: 对照组; B: 模型 4 周
组; C: 模型 6 周组; D: 模型 8 周
组; E: 模型 10 周组

现脂肪变性;灌胃 6~8 周后细胞核周围出现明显的脂质物质堆积;灌胃持续到 10 周后肝细胞内出现明显的脂肪大泡。HE 染色结果表现为随着高脂乳剂灌胃时间的延长肝细胞脂质堆积逐渐增加。

2.2 小鼠血清 TG 表达水平 与对照组比较,模型 8 周组的血清 TG 水平开始明显升高 ($F=5.29$, $P<0.05$)。模型 10 周组血清 TG 水平出现最高水平。见图 2。

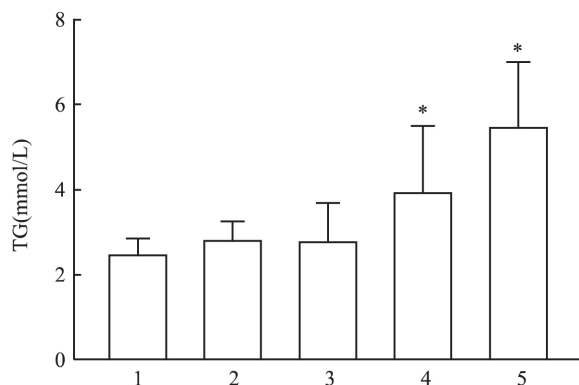


图2 C57BL/6 小鼠血清 TG 含量水平

1: 对照组; 2: 模型 4 周组; 3: 模型 6 周组; 4: 模型 8 周组; 5: 模型 10 周组; 与对照组比较: * $P<0.05$

2.3 高脂乳剂灌胃后血清转氨酶 ALT 和 AST 的表达变化 与对照组比较,模型 6 周组的 ALT 水平开始明显升高 ($F=2.70$, $P<0.01$)。与对照组比较,模型 6 周组的 AST 水平亦明显增长 ($F=3.16$, $P<0.01$),并且模型 10 周组 AST 水平已明显高于 4 周组 ($P<0.05$)。见表 1。

表1 各组 C57BL/6 小鼠血清 ALT 及 AST 的分泌水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)
对照	27.73 ± 3.46	21.79 ± 8.06
模型 4 周	32.54 ± 4.24	29.14 ± 5.49
模型 6 周	56.02 ± 2.66**	61.94 ± 8.83**
模型 8 周	59.66 ± 6.87**	67.97 ± 11.10**
模型 10 周	62.87 ± 8.23**	81.12 ± 14.58#

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型 4 周组比较: # $P<0.05$

2.4 肝组织 CYP4A 蛋白表达含量 小鼠肝组织主要表达 CYP4A10、4A12、4A14,在本研究中是对总 CYP4A 酶的检测。与对照组比较, CYP4A 蛋白表达含量在第 6 周时增加 1.4 倍,第 8 周和第 10 周时比第 4 周分别增加 1.4 倍和 1.5 倍。小鼠经过高脂乳剂灌胃后 CYP4A 蛋白表达水平表现为随灌胃时间延长而逐渐增加 ($P<0.01$)。见图 3。

2.5 肝组织 20-HETE 含量检测 采用 LC/MS/MS 测得的 20-HETE 表达水平,与对照组比较,模型

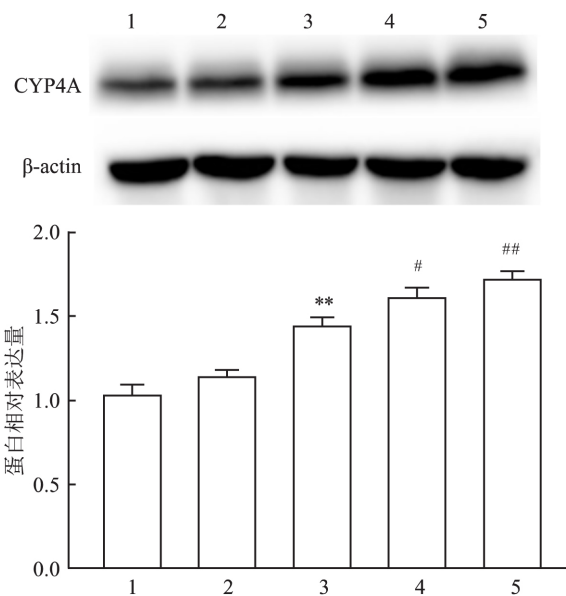


图3 肝组织 CYP4A 蛋白表达

1: 对照组; 2: 模型 4 周组; 3: 模型 6 周组; 4: 模型 8 周组; 5: 模型 10 周组; 与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型 4 周组比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$

8 周组 20-HETE 水平开始明显升高 ($F=28.64$, $P<0.01$)。20-HETE 的表达与 CYP4A 蛋白表达趋势相一致。见图 4。

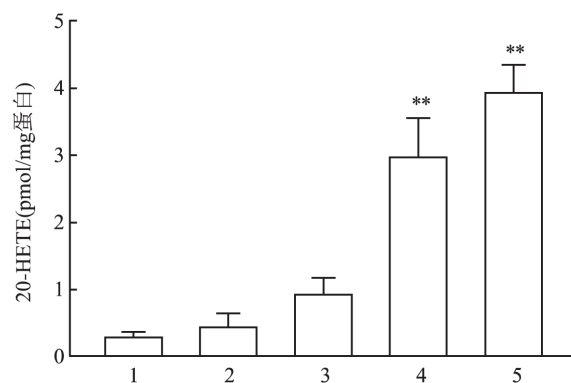
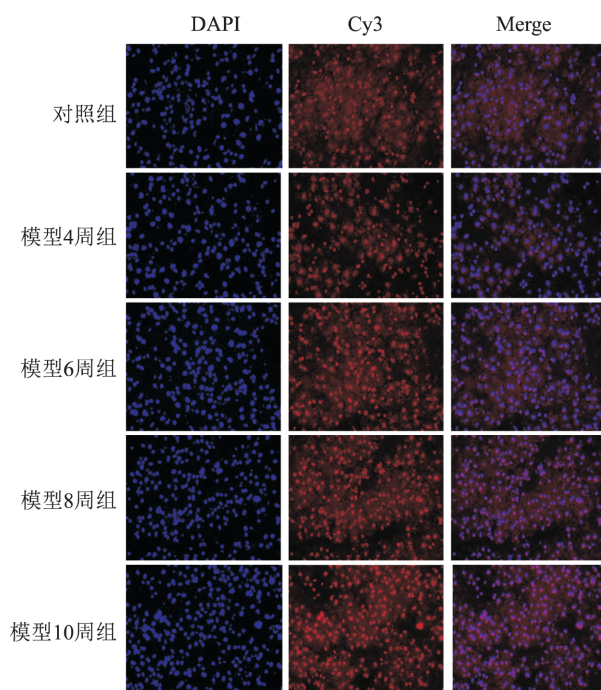


图4 肝组织合成的 20-HETE 水平

1: 对照组; 2: 模型 4 周组; 3: 模型 6 周组; 4: 模型 8 周组; 5: 模型 10 周组; 与对照组比较: ** $P<0.01$

2.6 肝组织 ROS 表达检测 各组组织荧光染色情况见图 5。应用 Image J 软件测得每组平均荧光密度。对照组 (0.038 ± 0.006),模型 4 周组 (0.040 ± 0.008),模型 6 周组 (0.050 ± 0.012),模型 8 周组 (0.050 ± 0.011),模型 10 周组 (0.060 ± 0.013); 与对照组比较,模型 10 周组 ROS 荧光强度明显增强 ($F=2.04$, $P<0.05$)。

2.7 血清 MDA 和 SOD 的水平 MDA 水平检测结果显示,与对照组比较,模型 4 周组 MDA 水平明

图5 肝组织 ROS 荧光染色 $\times 400$

显升高 ($F = 62.16, P < 0.01$) ; 与模型 4 周组比较, 模型 6 周组 MDA 水平开始明显升高, 并且随灌胃时间延长而逐渐增加 ($P < 0.05$)。8 周组的 SOD 活力水平开始明显低于对照组 ($F = 5.79, P < 0.05$)。肝组织 SOD 分泌水平表现为随 MDA 沉积增多而逐渐降低。见表 2。

表 2 各组 C57BL/6 小鼠血清 MDA 和 SOD 的含量水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA (nmol/ml)	SOD (U/L)
对照	2.45 ± 0.20	202.32 ± 8.34
模型 4 周	$4.09 \pm 0.35^{**}$	199.80 ± 8.79
模型 6 周	$4.94 \pm 0.35^{\#}$	187.88 ± 12.05
模型 8 周	$5.42 \pm 0.29^{\#}$	$178.62 \pm 11.49^{*}$
模型 10 周	$5.88 \pm 0.56^{\#\#}$	$166.33 \pm 12.53^{*}$

与对照组比较: $^{*} P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与模型 4 周组比较: $^{\#} P < 0.05$, $^{\#\#} P < 0.01$

3 讨论

CYP4A 被证明在非酒精性脂肪肝的发展中起到关键的作用, CYP4A 基因表达可通过饥饿、过氧化物酶体增殖物、高脂饮食和糖尿病被诱导^[7]。非

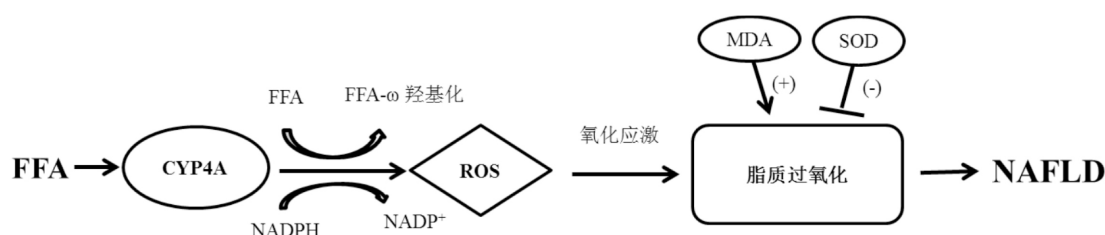
酒精性脂肪肝时存在线粒体功能紊乱和内质网应激, 因此 CYP4 家族能 ω -羟基化脂肪酸引起 ROS 的产生^[8]。

根据对鼠 NAFLD 模型影响的探索^[9], 高脂饮食后鼠血清会有 TG、TC、ALT 和 AST 的升高。在本研究中采用高脂乳剂灌胃诱导鼠 NAFLD, 肝组织 HE 染色结果分析可以知道灌胃 10 周可造成较为严重的肝细胞脂质堆积。同时血清中游离的 TG、ALT 和 AST 水平会相应的升高。这些结果提示该模型适用于 NAFLD 研究。甘油三酯水平的增加伴随着 CYP4A 蛋白表达水平的增长; 并且 CYP4A 能促进脂质的摄取, CYP4A 增加肝脏对脂质的摄取报道为通过增加 FAT/CD36 的表达实现^[10]。

对 NAFLD 患者的血清脂肪酸分析可知, 血清 FFA 水平升高主要是由二十二碳六烯酸、棕榈酸、亚油酸、二十碳三烯酸和花生四烯酸组成^[11]。花生四烯酸可经过细胞色素的代谢产生大量的 ROS 而对肝细胞产生氧化应激损伤, 从而对 NAFLD 发挥重要的作用^[12]。20-HETE 是花生四烯酸经细胞色素 CYP4 ω -羟基化的产物。在该研究中 20-HETE 升高, 说明在 NAFLD 时增加的 CYP4A 参与了游离脂肪酸的氧化处理。

氧化应激和脂质过氧化伴随着 NAFLD 的发展过程; 氧化应激主要由大量的 ROS 诱导发生。氧化应激导致脂质过氧化物升高和抗氧化系统损伤, 从而进一步加重肝细胞的损伤。在本研究中肝组织 ROS 水平最高时脂质过氧化物 MDA 水平明显上升而 SOD 水平明显降低, 这表明 CYP4A ω -羟基化作用产生的 ROS 能引起肝细胞损伤, 从而促进 NAFLD 的发展。CYP4A ω -羟基化脂肪酸产生 ROS 的特异性将通过体外诱导 CYP4A 表达实验来进一步探索。

综上, 高脂乳剂灌胃诱导鼠肝组织 CYP4A 表达, 并随着脂质堆积的增加而增加。CYP4A ω -羟基化脂肪酸促使 ROS 的产生引起氧化应激和脂质过氧化而导致肝细胞损伤, 因此 CYP4A 在 NAFLD 的发展中扮演着重要的角色。据此绘制 CYP4A 参与 NAFLD 发展的机制图(图 6)。

图6 CYP4A ω -羟基化脂肪酸产生的 ROS 损伤肝细胞的机制图

参考文献

- [1] Loomba R, Sanyal A J. The global NAFLD epidemic [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(11): 686–90.
- [2] Browning J D, Horton J D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(2): 147–52.
- [3] Meikle P J, Summers S A. Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(2): 79–91.
- [4] Hirsova P, Ibrahim S H, Gores G J, et al. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis [J]. *J Lipid Res*, 2016, 57(10): 1758–70.
- [5] Puntarulo S, Cederbaum A I. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes [J]. *Free Radic Bio Med*, 1998, 24(7–8): 1324–30.
- [6] Kroetz D L, Xu F. Regulation and inhibition of arachidonic acid omega-hydroxylases and 20-HETE formation [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45: 413–38.
- [7] Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Med*, 2007, 20(3): 351–8.
- [8] Robertson G, Leclercq I, Farrell G C. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis II cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281(5): G1135–9.
- [9] 谢博文, 李蓓蕾, 胡鹏言, 等. 非酒精性脂肪性肝病动物模型研究进展 [J]. *广西中医药大学学报*, 2018, 21(4): 65–7.
- [10] Zhang X, Li S, Zhou Y, et al. Ablation of cytochrome P450 omega-hydroxylase 4A14 gene attenuates hepatic steatosis and fibrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(12): 3181–5.
- [11] Gambino R, Bugianesi E, Rosso C, et al. Different serum free fatty acid profiles in NAFLD subjects and healthy controls after oral fat load [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 479.
- [12] 章 烁, 阳学风. 花生四烯酸氧化应激与非酒精性脂肪性肝病的研究进展 [J]. *中国现代医生*, 2013, 51(34): 19–22.

High – fat diet induces high expression of CYP4A involved in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in mice

Gao Huifang, Cao Yaru, Xia Hongguang, et al

(Dept of Pharmacy, School of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the regulatory effect of cytochrome P450 4A (CYP4A) in nonalcoholic fatty liver (NAFLD) and to detect its changes in fatty liver. **Methods** C57BL/6 mice were given high-fat emulsion gavage to establish NAFLD animal model, and divided into control group and high-fat emulsion group. The high-fat emulsion group was further divided into 4, 6, 8 and 10 weeks groups. Liver tissue sections were stained with HE. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and triglyceride (TG) in serum of mice were detected by biochemical kit. The expression of CYP4A in liver tissue was detected by Western blot. The content of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE), a product of arachidonic acid hydroxylated by CYP4A, was found by LC/MS/MS. Fluorescence intensity of reactive oxygen species in liver tissue detected by frozen section immunofluorescence. **Results** HE staining of liver tissue showed that fat vacuoles appeared at 10 week. The serum levels of ALT, AST, MDA, SOD and TG in C57BL/6 mice fed with high-fat emulsion increased gradually with the prolongation of time, and the contents of SOD showing a downward trend. The expression of CYP4A and 20-HETE in liver tissue increased with the accumulation of lipid in liver. The fluorescence intensity of reactive oxygen species in liver tissue was the strongest at 10 week. **Conclusion** CYP4A participates in lipid metabolism in NAFLD, which increases the synthesis of arachidonic acid metabolite 20-HETE, and induces the production of reactive oxygen species to cause oxidative stress and promote lipid peroxidation.

Key words nonalcoholic fatty liver disease; CYP4A; lipid peroxidation; oxidative stress