

网络出版时间: 2018-1-8 11:43 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.006.html>

卡托普利对非酒精性脂肪肝的防治作用及氧化应激的影响

邓谷霖^{1,2}, 李万平², 殷杰¹, 李晓冰², 张红², 孙玉红²

摘要 目的 观察卡托普利对大鼠非酒精性脂肪肝的作用及其氧化应激的影响。方法 将 78 只雄性 SD 大鼠随机分为 6 组, 正常组给予普通饲料; 其余组(包括模型组)给予高脂饲料, 造模 6 周后, 将卡托普利高、中、低剂量组和罗格列酮组分别给予等体积高、中、低剂量卡托普利和罗格列酮; 给予正常组和模型组等体积蒸馏水, 6 周后取血做血生化检测及丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)测定; 取肝脏称重, 计算肝脏指数; 取相同部位的肝组织匀浆测总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG); 另取肝组织固定做病理检查; 其余液氮固定测定 CYP2E1 mRNA。结果 模型组谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、TC、TG、MDA、肝指数、CYP2E1 mRNA 表达水平均增高, GSH 含量下降; 卡托普利高剂量组 ALT、AST、TC、TG、MDA、肝指数、CYP2E1 mRNA 表达水平均降低($P < 0.05$), GSH 含量升高($P < 0.05$)。肝脏病理学检查显示模型组可见肝细胞广泛发生脂肪变性及炎症反应, 卡托普利高剂量组肝细胞脂肪变性与炎症程度明显减轻。结论 卡托普利可增强抗氧化应激能力, 减轻肝细胞脂肪变性, 对非酒精性脂肪肝有一定的防治作用。

关键词 非酒精性脂肪肝; 卡托普利; 氧化应激; 高脂饮食

中图分类号 R 96

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0025-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.006

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)疾病谱包括非酒精性肝脏脂肪变性、非酒精性脂肪性肝炎、肝硬化甚至是肝癌^[1], 其发病率在发达国家成年人中已增加到 30%, 且仍在继续上升^[2]。NAFLD 发生机制以氧化应激为主, 还包括肝脏内质网应激、线粒体脂肪酸氧化功能障碍等^[3]。氧化应激是指人体在受到外界刺激时, 高活性分子产生过多, 氧化程度超出氧化物的清除力, 氧化系统和抗氧化系统失去均衡, 从而导致组织受

损^[4]。改变生活方式和避免摄入损肝药物是 NAFLD 的主要治疗方法, 但疗效并不明显。而血管紧张素转化酶抑制剂-卡托普利在机体抗氧化应激方面表现出良好的效果^[5], 该文旨在观察卡托普利对非酒精性脂肪肝的防治作用, 为临床用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 78 只, SPF 级, 平均体重约 130 g, 由重庆腾鑫生物有限公司提供, 合格证号: SCXK(渝)2012-0005。

1.1.2 试剂与药品 饲料级胆固醇(批号: 20130407)、饲料级胆酸钠(批号: 20130327)购自安徽天启化工科技公司; 三酰甘油(total glycerol, TG)测定试剂盒(批号: 2013060003)、总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒(批号: 2013030053)购自浙江东瓯诊断产品公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒(批号: 20130628)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(批号: 20130629)购自南京建成研究所; CYP2E1 引物(批号: 8402634571、8402634572)购自上海生工生物工程公司; 罗格列酮片(批号: 121007)购自成都恒瑞制药公司; 卡托普利片(批号: 121103)购自汕头金石制药厂。

1.1.3 主要仪器 Thermo 超低温冰箱(720 型)购自美国 ThermoScientific 公司; Gel DocTM EZ 成像系统购自美国伯乐 BIO-RAD 公司; ST16R 台式高速冷冻离心机购自上海赛默飞世尔科技有限公司; 722N 型分光光度计购自绍兴市杰联仪器有限公司; SpectraMax M3 多功能酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司; 制冰机(SIM-F124)购自日本三洋公司。

1.2 方法

1.2.1 分组、造模与给药 将 78 只雄性 SD 大鼠随机分为 6 组: 正常组给予普通饲料喂食; 其余组(包括模型组)给予高脂饲料(87.8% 普通饲料 + 10% 猪油 + 2% 胆固醇 + 0.2% 胆酸钠)喂食, 造模 6 周确认大鼠脂肪肝模型建立后, 将卡托普利高、中、低剂量组和罗格列酮组(统称实验组)分别给予高、

2017-07-28 接收

基金项目: 四川省教育厅(编号: 08zc057); 泸州医学院校级课题(编号: 泸医院[2009]字 5 号)

作者单位: ¹西南医科大学附属中医医院, 泸州 646000

²西南医科大学药学院药理教研室, 泸州 646000

作者简介: 邓谷霖, 男, 硕士研究生;

李万平, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 675832860@qq.com

中、低剂量卡托普利和罗格列酮溶于水后等体积喂食;给予正常组和模型组等体积蒸馏水,给药6周。卡托普利中剂量组和罗格列酮组按体表面积相对比值计算用药量,卡托普利高剂量组、卡托普利低剂量组用药量分别为卡托普利中剂量组的2倍和1/2。计算得出用药量:卡托普利高剂量组为0.7 mg/100 g,相当于临床剂量的10倍,卡托普利中剂量组0.35 mg/100 g,相当于临床剂量的5倍,卡托普利低剂量组为0.175 mg/100 g,相当于临床剂量的2.5倍,罗格列酮组为0.047 mg/100 g,相当于临床剂量的5倍。

1.2.2 样本采集 给药结束,大鼠禁食12 h后称重,给予1%戊巴比妥钠0.4 ml/100 g腹腔注射,腹主动脉取血,低温离心,收集血清保存。然后将肝脏分离并取相同部位称肝湿重,按组织重量(g):乙醇体积(ml)=1:9在冰水浴条件下进行匀浆并离心收集上清液,在-20℃保存;另取相同部位肝组织固定后用于病理学检查。

1.2.3 指标检测方法 取大鼠血清,通过全自动生化分析仪测定其谷草转氨酶(glutamic oxalacetic transaminase, AST)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)、TC、TG。用TBA法检测血清MDA;用比色法检测血清GSH;用酶偶联比色法检测肝脏TG、TC,并计算肝指数(肝湿重/体重)。CYP2E1是细胞色素P450的一种代谢酶,CYP2E1

mRNA的测定:取少量肝组织磨碎匀浆,提取总RNA进行逆转录反应,分别加入CYP2E1和GAPDH基因引物进行PCR反应,然后在1.5%琼脂糖凝胶中加入PCR产物及标志物进行电泳,用凝胶成像分析系统照相、观察结果并记录。肝组织用苏木精-伊红染色法染色用于病理学检查。

1.3 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果以组间数据比较进行正态性、方差齐性检验,作单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清生化指标 与正常组比较,模型组大鼠血清AST、ALT、TC、TG含量均升高($P < 0.05$);与模型组比较,卡托普利高剂量组血清AST、ALT、TG、TC均降低($P < 0.05$),罗格列酮组TG、TC水平降低($P < 0.05$),见表1。

2.2 大鼠肝湿重、肝指数和肝组织TG、TC含量 与正常组相比,模型组与实验组肝湿重和肝指数升高,模型组肝组织TG、TC升高($P < 0.05$);与模型组相比,卡托普利高剂量组与罗格列酮组肝湿重与肝指数降低,卡托普利高剂量组与罗格列酮组肝组织TG及所有实验组肝组织TC降低($P < 0.05$)。见表2。

2.3 血清MDA、GSH水平 与正常组比较,模型

表1 大鼠血清AST、ALT、TG、TC水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)
正常	12	89.16 ± 23.82	26.62 ± 3.53	0.90 ± 0.22	1.16 ± 0.27
模型	11	134.39 ± 35.24**	35.01 ± 6.97*	1.44 ± 0.23**	1.77 ± 0.36**
卡托普利高剂量	12	94.08 ± 15.52 [#]	27.30 ± 6.15 [#]	1.03 ± 0.21 [#]	1.40 ± 0.25* [#]
卡托普利中剂量	12	112.18 ± 35.49	30.22 ± 5.18	1.21 ± 0.38*	1.54 ± 0.23*
卡托普利低剂量	11	121.90 ± 19.88	34.54 ± 4.96*	1.34 ± 0.36**	1.59 ± 0.28**
罗格列酮	12	104.74 ± 30.67	30.39 ± 7.91	0.82 ± 0.16 ^{##}	1.45 ± 0.23* [#]
F值	-	3.849	3.558	8.338	6.007
P值	-	0.005	0.007	0.000	0.000

与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

表2 大鼠肝湿重、肝指数以及肝组织TG、TC水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝湿重(g)	肝指数(%)	TG(mg/g)	TC(mg/g)
正常	12	8.89 ± 1.95	1.79 ± 0.20	7.15 ± 2.57	2.40 ± 0.66
模型	11	14.29 ± 1.99**	2.62 ± 0.21**	11.86 ± 1.85**	5.27 ± 0.99**
卡托普利高剂量	12	11.71 ± 2.00** [#]	2.28 ± 0.31** [#]	7.26 ± 2.27 ^{##}	2.72 ± 0.72 ^{##}
卡托普利中剂量	12	12.23 ± 1.11**	2.40 ± 0.19**	9.51 ± 2.89	3.04 ± 0.73 ^{##}
卡托普利低剂量	11	13.37 ± 2.61**	2.49 ± 0.32**	9.76 ± 3.20	3.81 ± 1.26** ^{##}
罗格列酮	12	11.99 ± 1.62** [#]	2.32 ± 0.22** [#]	7.53 ± 3.32 ^{##}	2.81 ± 0.88 ^{##}
F值	-	9.032	13.453	4.677	13.849
P值	-	0.000	0.000	0.001	0.000

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

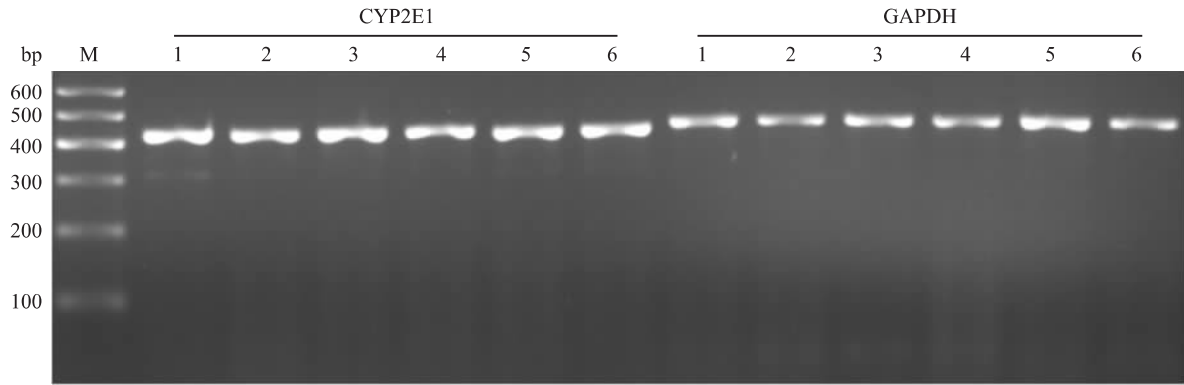


图1 各组大鼠肝组织 CYP2E1 mRNA 和 GAPDH 表达

M: Marker; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 罗格列酮组; 4: 卡托普利高剂量组; 5: 卡托普利低剂量组; 6: 卡托普利中剂量组

组 MDA 含量升高、GSH 含量降低 ($P < 0.05$) ; 与模型组比较, 卡托普利高剂量组与罗格列酮组血清 MDA 含量下降, 卡托普利高剂量组血清 GSH 含量升高 ($P < 0.05$)。大鼠肝湿重、肝指数以及肝组织 TG、TC 水平。见表 3。

表3 大鼠血清 MDA、GSH 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA (nmol/L)	GSH (mg/L)
正常	12	6.47 ± 2.28	51.68 ± 16.66
模型	11	12.10 ± 2.56 **	22.17 ± 11.68 **
卡托普利高剂量	12	7.60 ± 2.48 ##	41.02 ± 17.48 #
卡托普利中剂量	12	9.41 ± 1.77 * #	34.28 ± 15.44
卡托普利低剂量	11	10.08 ± 2.43 **	29.85 ± 9.12 *
罗格列酮	12	8.16 ± 2.36 ##	36.16 ± 16.43
F 值	—	7.384	4.604
P 值	—	0.000	0.001

与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.4 肝组织 CYP2E1 mRNA 表达 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织 CYP2E1 mRNA 表达升高明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ; 与模型组比较, 卡托普利高剂量组与罗格列酮组肝组织 CYP2E1 的表达下降 ($P < 0.05$)。见表 4、图 1。

表4 大鼠肝组织 CYP2E1 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CYP2E1
正常	12	1.50 ± 0.20
模型	11	2.27 ± 0.14 **
卡托普利高剂量	12	1.75 ± 0.21 ***
卡托普利中剂量	12	2.10 ± 0.13 **
卡托普利低剂量	11	2.17 ± 0.17 **
罗格列酮	12	1.91 ± 0.10 ***
F 值	—	23.968
P 值	—	0.000

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: *** $P < 0.01$

2.5 肝组织病理变化 正常组肝细胞无炎症反应 (图 2A), 模型组可见弥漫性脂肪变性, 肝细胞水肿、细胞排列紊乱 (图 2B), 卡托普利高剂量组可见少量脂肪变性, 大多数肝细胞排列正常, 部分细胞水肿 (图 2C), 卡托普利中剂量组肝细胞脂肪变性与炎症程度略有减轻 (图 2D), 卡托普利低剂量组肝脂肪变性与炎症程度与模型组相似, 减轻不明显 (图 2E), 罗格列酮组病理变化情况与卡托普利高剂量组相似 (图 2F)。

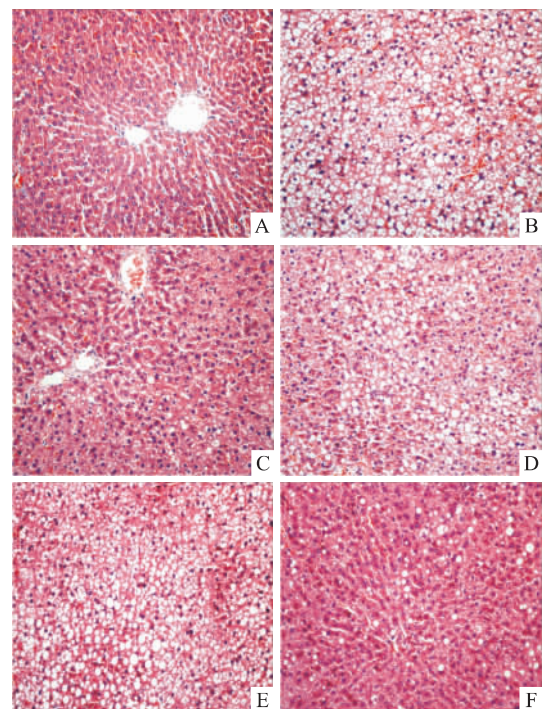


图2 各组大鼠肝脏病理学变化 HE × 200

A: 正常组; B: 模型组; C: 卡托普利高剂量组; D: 卡托普利低剂量组; E: 卡托普利中剂量组; F: 罗格列酮组

3 讨论

与模型组相比,卡托普利高剂量组大鼠血清AST、ALT含量明显降低,说明应用高剂量卡托普利后大鼠肝细胞损伤减轻,肝脏功能得到改善,血清与肝组织中TC、TG水平降低,说明肝细胞内脂质减少;实验组大鼠肝湿重与肝指数均明显减小,说明大鼠脂肪含量降低。病理学观察显示卡托普利高剂量组肝细胞变大明显、细胞水肿的状态有所减轻,淋巴细胞也明显减少,炎症情况有所好转,脂质沉积情况也有所减轻。通过生化检测与病理观察,表明卡托普利对大鼠NAFLD有一定的防治作用。MDA的含量可反映机体脂质过氧化以及机体细胞过氧化损伤的程度,GSH的含量反映了对机体保持氧化及抗氧化平衡的能力。在本次研究中,通过高脂饲料喂食后,模型组大鼠MDA上升,GSH下降,说明其抗氧化能力减弱,通过给药卡托普利后,卡托普利高剂量组大鼠MDA下降、GSH上升,表明其抗氧化能力得到增强,机体氧化应激程度减轻,从而NAFLD得到改善。

作为细胞色素P450的重要一员,CYP2E1在脂质氧化反应中表现出很强的促氧化活性。有报道^[6]表明,以CYP2E1为中心形成的氧自由基、脂质过氧化,进而导致肝实质损伤是NAFLD的重要发病机制。实验中模型组CYP2E1 mRNA的表达跟正常组比显著升高,而给药高剂量卡托普利后,大鼠肝脏

CYP2E1 mRNA的表达显著降低,表明卡托普利可通过减少CYP2E1 mRNA表达,发挥抗氧化应激作用,改善体内氧化应激与脂质过氧化状态,从而改善NAFLD。

综上所述,卡托普利对非酒精性脂肪肝能发挥一定防治作用,同时能增强模型组大鼠抗氧化应激从而改善病情。

参考文献

- [1] 李枫林,张宝,管石侠.非酒精性脂肪肝病大鼠IL-1 β , IL-18, TNF- α 水平的变化[J].安徽医科大学学报,2016,51(3): 351-4.
- [2] Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014, 28(4): 637-53.
- [3] Tariq Z, Green C J, Hodson L. Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. Liver Int, 2014, 34(7): e180-90.
- [4] 张伟,洪汝涛. NF- κ B、氧化应激在酒精性脂肪肝发病机制中的作用及水飞蓟素干预研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012: 1-57.
- [5] Tota S, Kamat P K, Saxena G, et al. Central angiotensin converting enzyme facilitates memory impairment in intracerebroventricular streptozotocin treated rats [J]. Behav Brain Res, 2012, 226(1): 317-30.
- [6] 王悦之,张玉. CYP2E1与非酒精性脂肪肝[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(4): 384-6.

The preventive and therapeutic effect of captopril on non-alcoholic fatty liver disease and its impact on the oxidative stress

Deng Gulin^{1,2}, Li Wanping², Yin Jie¹, et al

(¹The TCM Hospital Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou 646000; ²Pharmacology Teaching and Research Section of Pharmaceutical College of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

Abstract Objective To investigate the effect of captopril on non-alcoholic fatty liver rats and its impact on the oxidative stress. **Methods** 78 male SD rats were randomly divided into 6 groups: normal group was given normal diet and the other groups (including model group) were given high fat diet. After 6 weeks of modeling, the high, medium and low dose captopril groups and rosiglitazone group were given equal volume of high, medium and low dose of captopril and rosiglitazone respectively, the normal group and model group were given equal volume distilled water. At the end of 6 weeks, rats were sacrificed and the blood was collected, the blood biochemical indicators and malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) content were detected; Liver was harvested and weighted, then LWI was calculated. Colorimetry method was used to detect total cholesterol (TC), triglyceride (TG) content of liver, HE staining was used to detect the pathological changes of liver, qRT-PCR was employed to detect CYP2E1 mRNA expression. **Results** The glutamic-pyruvic transaminase (ALT), glutamic oxalacetic transaminase (AST), TC, TG,

网络出版时间: 2018-1-8 11:43 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.007.html>

microRNA-7 对人肝癌细胞 MHCC-97H 上皮间质转化的影响及作用机制

张传海¹, 桂阳^{1*}, 郭凤林², 马金良¹, 余继海¹

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.007

摘要 目的 探讨 microRNA-7 (miR-7) 对肝癌细胞株 MHCC-97H 上皮-间质转化(EMT)的影响及作用机制。方法 将构建的 miR-7 真核载体单独及分别联合野生型或突变型 EGFR 3'-UTR 真核载体共转染 MHCC-97H 细胞,采用 Real-time PCR、Western blot 检测 EMT 标识蛋白 E-cadherin、 β -catenin、N-cadherin 和 Vimentin 的表达;细胞划痕、Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移能力的变化;双荧光素酶实验分析 miR-7 对 EGFR 的调控作用。结果 与正常组相比,转染 miR-7 真核载体组细胞 E-cadherin、 β -catenin 表达均显著升高($P < 0.01$), N-cadherin、Vimentin 表达则明显降低($P < 0.01$);同时,细胞的侵袭、迁移能力均明显减弱($P < 0.01$);分别与转染 GV272 + EGFR 3'-UTR 野生型和转染 GV272/miR-7 + EGFR 3'-UTR 野生型组萤火虫荧光素酶活性显著降低($P < 0.01$)。结论 miR-7 可通过与 EGFR 3'-UTR 结合而抑制 EGFR 信号通路,降低 MHCC-97H 细胞侵袭、迁移能力,进而抑制 MHCC-97H 细胞 EMT。

关键词 microRNA-7; MHCC-97 细胞; 上皮间质化转变; EGFR

中图分类号 R 735.7; R 329.25

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0029-06

2017-09-19 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1608085MH198)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 普外科、² 麻醉科, 合肥 230001

作者简介: 张传海, 男, 副主任医师, 博士, 责任作者, E-mail: zhangch3788@126.com

* 对本文具有同等贡献

microRNA 是一类约 22 个碱基的小分子非编码 RNA,对细胞的增殖、分化具有重要的调控作用,已成为近年来医学研究的热点。microRNA 通常与下游靶基因 mRNA 的 3' 端非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR) 结合,从而促使靶基因降解或抑制其翻译,尤其在肿瘤的发生发展中扮演着重要角色^[1-2]。肝癌以其恶性程度高、转移性强成为临床治疗当中的难题,尤其是其转移机制目前还不是十分清楚。该课题旨在通过研究 miR-7 对肝癌细胞株 MHCC-97H 细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响及作用机制,为深入探讨其在肝癌中的作用奠定基础,为进一步阐明肝癌的发生、转移机制及临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 肝癌细胞株 MHCC-97 购自中国科学院上海细胞库; pRL-TK 载体购自上海林溯生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、Real-time PCR 试剂购自北京天根生化科技有限公司; RPMI1640 细胞培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; GAPDH、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、 β -链蛋白(β -catenin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)抗体购自美国 Santa

MDA, Liver index, and mRNA expression of CYP2E1 level of model group was increased, the content of GSH of model group was decreased; the ALT, AST, TC, TG, MDA, Liver index and mRNA expression of CYP2E1 level of captopril high dose group all decreased($P < 0.05$), the content of GSH of captopril high dose group increased($P < 0.05$). The fatty degeneration and inflammatory reaction was widely observed in the liver cells according to the liver pathology examination for the model group, the hepatic cell fatty degeneration and inflammation degree obviously mitigated in the high dose of captopril group. **Conclusion** Captopril can enhance the ability to resist oxidative stress, decrease fatty degeneration of liver cells, may exert certain prevention and treatment effect on non-alcoholic fatty liver disease.

Key words non-alcoholic fatty liver; captopril; oxidative stress; high-fat diet