

· 基础研究 ·

4 周有氧运动干预对大鼠非酒精性脂肪肝和肝内细胞色素 P450 2E1 的影响

史艳莉¹ 余 辉² 张红菱¹

摘要

目的:探讨 4 周有氧运动干预对大鼠非酒精性脂肪肝(NAFLD)和肝内细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)的影响。

方法:实验大鼠随机分为对照组、模型组和模型+运动组。模型组和模型+运动组经 6 周脂肪乳灌胃,制成非酒精性脂肪肝模型。随后模型+运动组进行为期 4 周有氧运动干预。检测各组大鼠胆固醇、甘油三酯、肝脏组织病理改变和肝组织 CYP2E1 表达。

结果:造模组大鼠体重及血脂明显增高($P<0.05$),肝脏病理学检查证实非酒精性脂肪肝模型造模成功。模型组及模型+运动组肝脏 CYP 2E1 明显较对照组增高($P<0.05$)。经过 4 周游泳训练后,模型+运动组大鼠与模型组比较胆固醇、甘油三酯和肝脏 CYP 2E1 呈下降趋势($P<0.05$);肝脏病理学检查提示脂肪肝较模型组明显好转。

结论:有氧运动不仅能够改善高脂血症状态,也能降低 CYP2E1 表达,可以预防和治疗 NAFLD 时肝组织所受的过氧化损伤。

关键词 有氧运动;非酒精性脂肪肝;高脂血症;细胞色素

中图分类号:R575.5,R493 文献标识码:A 文章编号:文章编号:1001-1242(2010)-07-0646-04

Effects of 4-week aerobic exercises intervention on rats non-alcoholic fatty liver disease and hepatic cytochrome P450 2E1/SHI Yanli,YU Hui,ZHANG Hongling//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010,25(7):646-649

Abstract

Objective:To investigate the effects of aerobic exercises on liver tissue and cytochrome P-450 2E1(CYP2E1) in rats with non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD) induced by high fat diet.

Method:The rats were randomly divided into normal group,model group and model + exercises group. Aerobic exercises intervention was applied on the model+exercises group for 4 weeks. Total cholesterol(TC), triglyceride(TG), liver pathological changes and liver tissue CYP2E1 expression were detected in each group.

Result: After six weeks lipid emulsion gavage,the level of body weight, TC and TG rised evidently ($P<0.05$),the liver pathological changes indicated NAFLD model was produced successfully, the level of hepatic cytochrome P450 2E1 rised evidently compared with control group ($P<0.05$). After four-week aerobic exercises, the level of TC, TG and cytochrome P450 2E1 declined evidently($P<0.05$) and the liver pathological changes improved significantly.

Conclusion: Aerobic exercises not only can improve hyperlipidemia,but also can reduce CYP2E1 expression, prevent and treat peroxidative injury of liver tissue in NAFLD.

Author's address Dept. of Health Science and Nursing Wuhan Industrial College,Wuhan, Hubei Province,430026

Key words aerobic exercises;non-alcoholic fatty liver disease; hyperlipidemia ; cytochrome

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.07.008

1 武汉工业学院健康科学与护理系,湖北武汉,430026; 2 黄石市第一医院内科

作者简介:史艳莉,女,副教授; 收稿日期:2009-06-28

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)在病理学改变上与酒精性脂肪性肝炎相似,是NAFLD发展为肝硬化的中间阶段,可能为隐源性肝硬化的重要原因之一,其确切发病机制目前尚不十分清楚^[1]。一般认为氧应激及脂质过氧化对肝脏炎症和纤维化的形成起重要作用^[2]。细胞色素P450 2E1(cytochrome P450 2E1, CYP2E1)参与脂肪酸氧化、氧应激及脂质过氧化过程,在NAFLD发病机制中起重要作用。目前临床针对NAFLD的治疗效果尚不十分理想。本次研究对NAFLD大鼠进行4周的运动干预,探讨科学的运动对实验大鼠的肝脏及肝内CYP2E1的影响,为临床上非酒精性脂肪肝的预防与治疗提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

健康雄性Sprague-Dawley大鼠(购自武汉大学动物实验中心),SPF级,6周龄,许可证号为SCXK-(鄂)-2007-0027,体重160—180g,共40只。动物饲养室符合国家二级动物饲养标准,分笼饲养,每笼5只,饲养温度21—24℃,湿度保持在40%—60%,光照时间为12h左右,标准混合饲料喂养,自由饮食。适应性饲养1周后称重进行实验。

1.2 研究方法

1.2.1 动物实验造模:大鼠随机分为:对照组(n=15)和造模组(n=25)。造模组在正常进食基础上于每日清晨7:30行脂肪乳(四川科伦药业股份有限公司)灌胃,0.5ml/100g体重。对照组正常进食,同时行等量的蒸馏水灌胃。42d后取对照组和造模组各5只取肝脏行病理学检查。结果显示:对照组大鼠肝脏HE染色均未见明显异常,造模组5只大鼠肝脏均可见单位面积上超过1/3的肝细胞脂肪变性,肝细胞明显肿大,可以确定本实验脂肪肝模型造模成功^[3]。

1.2.2 运动干预:造模结束后,A组为对照组,造模组大鼠随机分为B组和C组,每组各10只。A组正常喂养,B组继续行脂肪乳灌胃,C组行脂肪乳灌胃同时4周游泳运动干预。实验前先进行3d适应性游泳练习,每天1次,每次15min,运动方式参照文献报道^[4]。正式运动期间每周运动6d,每天1次。时间为60min。运动条件:150cm×60cm×70cm,水深60cm

的游泳池,超过大鼠身长的2倍,水温33—36℃。

大鼠末次训练后24h,戊巴比妥钠腹腔麻醉,采用断尾取血5—6ml,2ml在真空无菌的肝素凝管中混匀,其余放入干净的玻璃试管中,低温分离血清后分装冷冻备用。然后断颈处死,立即无菌取肝脏,于生理盐水冲洗净血液,滤纸吸干,称质量,以相应质量计算出脏器指数。肝脏指数=肝脏质量(mg)/体重(g)。测完指数后,组织置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.3 检测指标:①一般情况:在实验过程中,每天记录大鼠毛发、体态、进食与活动情况。每周灌胃前给大鼠称重。②脂质检测:血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)在全自动生化分析仪(Olympus AU 1000)上测定。③病理学检查:取肝右叶,石蜡切片,常规HE、PAS染色,观察脂肪肝程度。取肝脏先进行肉眼外观及切面观察,然后做肝脏病理切片HE染色,显微镜下观察肝细胞脂肪变性的严重程度。肝细胞脂肪变性根据1981年Knodel^[5]提出的慢性肝炎组织学活动指数(histological activity index, HAI),并结合王秦龄^[6]的计分方案,分为汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎片状坏死(PN)及桥接坏死(BN)4项,每项依病变程度分别计为1—4分,因为PN、BN的严重程度与预后直接相关,故其计分2倍于其他病变,计分公式:P+L+2PN+2BN。④CYP2E1免疫组织化学染色:兔抗鼠CYP2E1多抗(Chemicon International公司),抗氧化酶免疫组化染色试剂盒(武汉博士德公司),DAB显色。结果判断:胞浆染成棕黄色为阳性,用图像分析系统进行半定量分析。每个标本随机选取5个高倍视野(×200),计算每个视野反应产物的平均光密度,用平均光密度表示阳性物质的相对含量。单位以AIOD·μm²表示。

1.3 统计学分析

本研究所有数据均采用SPSS11.0软件包进行统计处理。实验数据以均数±标准差表示。分别采用单因素方差分析进行组间比较分析,等级资料采用秩和检验, $P<0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 一般情况

饲养中各组动物均无死亡现象。对照组大鼠灵活好动,饮食正常,皮毛整洁;模型组大鼠精神萎靡,

性情较温顺,不喜动,皮毛凌乱欠光泽;模型+运动干预组大鼠均有不同程度的活动减少,饮食减少,皮毛欠光泽。与对照组相比较,模型组大鼠体重增加15.2%。肝脏指数明显增大($P<0.01$)。与模型组相比较,模型+运动组体重差异无显著性意义,肝脏指数明显减小($P<0.05$),见表1。

2.2 脂质变化

在血脂方面,与对照组相比较,模型组大鼠 TC、TG 均有显著性增加($P<0.05$)。模型组与模型+运动组大鼠 TC、TG 比较差异有显著性意义($P<0.05$),见表1。

2.3 肝脏病理学观察

光镜下 HE、PAS 染色显示,对照组肝小叶结构完整,肝索排列规则,肝窦及汇管区无异常,基本无炎性细胞浸润,肝细胞形态正常;模型组肝细胞肿胀,体积增大,胞浆疏松呈网状,核深染,可见明显的点状和灶状坏死,并伴有中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润,肝组织出现不同程度的肝细胞脂肪变

性,肝细胞变大,胞浆内可见大泡样脂滴;模型+运动组大鼠的肝细胞脂肪变性和炎症坏死程度均有不同程度的改善。见表2,图1—3。

2.4 细胞色素 P450 2E1

免疫组织化学染色显示正常对照组 CYP2E1 免疫组化显示棕黄色颗粒为阳性,表达局限在腺泡3区中央静脉周围少数几个肝细胞内,不超过3—4个细胞层厚,肝组织中 CYP2E1 阳性细胞极少。模型组动物的肝 CYP2E1 阳性细胞显著增多,表达强度明显增强,分布方式发生改变,呈弥散性分布,从腺泡3区弥散到2区,与肝细胞脂变的严重程度和分布相一致。与模型组相比模型+运动组 CYP2E1 的表达受到不同程度的抑制。见表3和图4—6。

3 讨论

NAFLD 是一种获得性代谢疾病,其病变以弥漫性脂肪浸润和炎症为特征,确切的发病机制尚不清楚。目前以 Day^[7]提出的“二次打击学说”最为著名。

表 1 各组大鼠体重、血脂的变化 (x±s)

组别	动物数	体重(g)		肝湿重(g)	肝脏指数(%)	总胆固醇(mmol/l)	甘油三酯(mmol/l)
		造模前	造模后				
对照组	10	173±10	422±33	12.2±1.4	2.8±.15	2.25±.33	0.57±0.04
模型组	10	170±9.3	452±23	19.4±2.3 ^①	4.2±.37 ^①	4.12±1.25 ^①	0.96±0.10 ^①
模型+运动组	10	171±15	424±43	16.6±3.1 ^①	3.9±.39 ^{①②}	2.36±.36 ^②	0.68±0.06 ^②

①与对照组相比, $P<0.05$, ②与模型组相比, $P<0.05$

表 2 各组大鼠脂肪肝脂肪变程度及计分

组别	动物数	脂肪变程度					计分
		-	+	++	+++	++++	
对照组	10	10					0
模型组	10					10	40 ^①
模型+运动组	10		2	6	2		20 ^①

①与对照组比较 $P<0.05$

表 3 各组大鼠 CYP2E1 结果

组别	动物数	CYP2E1 (AIOD·μm ²)(x±s)
对照组	10	0.02±0.02
模型组	10	0.81±0.05 ^①
模型+运动组	10	0.47±0.04 ^①

①与对照组比较 $P<0.05$

图 1 正常大鼠肝脏病理 (HE 染色,×200)

图 2 脂肪肝大鼠肝脏病理 (HE 染色,×200)

图 3 运动干预组大鼠肝脏病理 (HE 染色,×200)

图 4 正常大鼠肝脏 CYP2E1 免疫组织化学染色 (DAB,×200)

图 5 模型组大鼠肝脏 CYP2E1 免疫组织化学染色 (DAB,×200)

图 6 模型+运动组大鼠肝脏 CYP2E1 免疫组织化学染色(DAB,×200)

第一次打击为各种原因如肥胖、2型糖尿病、脂代谢紊乱等导致的胰岛素抵抗和肝脏脂肪变性。第二次打击是氧化应激和慢性炎症反应阶段。脂肪酸代谢增加产生了大量内源性活性氧 (reactive oxygen species, ROS), ROS 通过脂质过氧化使 MDA 释放增加,以及诱导肿瘤坏死因子(TNF- α)生成增加,启动慢性炎症过程。

大量实验证实规则、周期性、中小运动强度的有氧运动有益于健康^[8]。本实验所采用的大鼠长期游泳实验的结果也证实,对于喂饲脂肪乳的大鼠,运动组比模型组大鼠的血脂和体脂水平低($P<0.05$)。研究表明运动对脂质代谢影响的机制可能与运动对能量的消耗增加有关^[9]。机体一方面通过加速脂肪分解供能,另一方面运动可以增强机体对胰岛素的敏感性,使受胰岛素调节的许多酶的活性发生改变,使肌细胞对游离脂肪酸-白蛋白复合物(FFA)的摄取增加^[10]。肌肉的脂肪动员加强,血中的 FFA 水平由于继续向肌肉转运而降低,甘油三酯和脂蛋白进一步水解产生更多的 FFA,血浆甘油三酯水平下降,而肌肉由于储存的甘油三酯被消耗,促进内皮细胞中的 LPL 合成,脂肪组织中 LPL 的活性和血浆 LPL 水平提高,使甘油三酯和富含甘油三酯的脂蛋白的代谢加速^[11]。

细胞色素 CYP450 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,人类确定的 CYP450 同功酶有 20 多种,其中 CYP2E1 是最主要的同功酶,其表达水平与代谢活性相关且受体内外诸多因素的影响,如在摄入酒精、高脂饮食、饥饿和糖尿病时 CYP2E1 表达水平增高,其代谢的底物可诱导该酶本身的生成,它是微粒体脂质过氧化反应的催化剂^[12-13]。随着 CYP2E1 的表达增强,脂质过氧化进一步生成过氧化脂质,不仅使内源性反应性氧 (reactive oxygen species, ROS) 增加,毒性增强,且可抑制抗氧化系统对机体的保护作用,导致肝损害^[14-15]。因此,在非酒精性脂肪肝时,随着其程度的加重,肝细胞结构和功能的损害,脂质过氧化反应加剧,CYP2E1 活性和表达明显增高。本实验通过免疫组化实验发现非酒精性脂肪肝模型较正常对照组大鼠肝组织中 CYP2E1 表达明显增强($P<0.05$),而在运动后,与模型组相

比,运动组大鼠肝组织中 CYP2E1 表达明显减弱($P<0.05$),表明有氧运动具有显著的抗炎、抗脂质过氧化和清除氧自由基的作用。

综上所述,在高脂饮食的同时给予有氧游泳运动可以从一定程度上预防非酒精性脂肪性肝病的发生。虽然以目前的运动方式和强度尚不能完全阻止该病的发生,但是至少可以为临床预防和治疗非酒精性脂肪性肝病提供了一条新的途径和思路^[16]。另外,对于非酒精性脂肪性肝病的其他阶段,如脂肪性肝炎阶段甚至肝硬化阶段,运动干预效果值得进一步研究。

参考文献

- [1] Palasciano G, Moschetta A, Palmieri Vo, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in the metabolic syndrome [J]. *Curr Pharm Des* (S1381-6128), 2007, 13(21): 2193-2198.
- [2] Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, et al. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21: 17-26.
- [3] 钟岚, 范建高, 王国良, 等. 肥胖、高脂血症性脂肪性肝炎模型的建立[J]. *实验动物科学与管理*, 2000, 17(2): 16-20.
- [4] 赵肖宪, 颜宜苒, 傅小锁, 等. 运动干预对饮食性高胆固醇血症大鼠肝脂肪变的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 1997, 16(3): 186-188.
- [5] Knodell RG, Ishak KG, Glack WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in a symptomatic chronic active hepatitis [J]. *Hepatology*, 1981, 1(5): 431-435.
- [6] 王秦龄, 刘霞, 周元平, 等. 慢性肝炎炎症活动度及肝纤维化程度计分方案[J]. *中华肝病杂志*, 1998, 6(4): 195-197.
- [7] Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2002, 16: 663-78.
- [8] King LB, et al. Exercise testing and prescription [J]. *Sport Medicine*, 1996, 21(5): 205-216.
- [9] 蔡蕾, 陈吉隶. 运动对预防大鼠高脂血症的作用及其机理研究[J]. *中国运动医学杂志*, 1999, 18(4): 314-316.
- [10] Borghouts LB, Keizer HA. Exercise and insulin sensitivity: a review [J]. *Int J Sports Med*, 2000, 21(1): 1-12.
- [11] Fedele D, Fellin R, Lapolla A, et al. Serum lipid and lipoprotein levels and metabolic control in insulin-treated diabetics [J]. *Acta Diabetol Lat*, 1982, 19(2): 151-159.
- [12] Emery MG, Fisher JM, Chien JY, et al. CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2003, 38: 428-435.
- [13] Chalasani N, Oorski JC, Asghar MS, et al. Hepatic cytochrome CYP2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2003, 37: 544-550.
- [14] Mantena SK, King AL, Andringa KK, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol and obesity induced fatty liver diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(7): 1259-1272.
- [15] Neve BP, Fruchart JC, Staels B. Role of the peroxisome proliferator activated receptors (PPAR) in atherosclerosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60: 1245-1250.
- [16] 吴维燕, 江钟立, 贺丹军, 等. 非酒精性脂肪肝患者的生活方式特征研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(5): 398-401.