

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.26.003
文章编号: 1005-8982 (2018) 26-0014-08

氯美噻唑对乙醇诱导大鼠肝损伤的抑制作用研究

王剑彬¹, 吴彩月², 王丽斯³, 吴恺明⁴

(1. 广州医科大学附属乐从医院 消化科, 广东 佛山 528315; 2. 广东省佛山市顺德区乐从社区卫生服务中心, 广东 佛山 528315; 3. 广州医科大学附属乐从医院 检验科, 广东 佛山 528315; 4. 中山大学附属第一医院 胃肠外科中心, 广东 广州 510080)

摘要: **目的** 探究氯美噻唑 (CMZ) 在乙醇诱导大鼠肝损伤模型中的作用。**方法** 将 32 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: 葡萄糖对照组、乙醇模型组、乙醇+CMZ 组、葡萄糖+CMZ 组, 每组 8 只。乙醇模型组大鼠连续 2 个月灌胃乙醇 [0.1 ml/(kg·d)], 乙醇+CMZ 组、葡萄糖+CMZ 组连续 2 个月灌胃 CMZ 80 mg/(kg·d)。2 个月体内采用 6-羟基氯唑沙宗/氯唑沙宗比值评估氯唑沙宗 (CHZ) 代谢的程度, 以检测大鼠体内细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1) 的活性; 眼眶取血检测血浆乙醇浓度和谷丙转氨酶活性; 随后处死所有大鼠, 分离肝脏, 比较各组相对肝重, 制备肝匀浆, 检测大鼠肝脏蛋白酶体的活性, 制备肝微粒体, 采用 Western blot 检测大鼠肝脏 CYP2E1、CYP3A、CYP4A 相对表达量; 固定光镜观察肝组织病理学变化。**结果** 乙醇+CMZ 组与乙醇模型组相比, 能够降低大鼠肝损伤 ($P < 0.05$)。乙醇能够诱导 CYP2E1 蛋白的表达, 乙醇+CMZ 组同样诱导 CYP2E1 的表达。CMZ 抑制乙醇模型组大鼠体内乙醇诱导的 CYP2E1 活性, 但未影响 CYP2E1 蛋白的表达。同样, CMZ 阻断乙醇诱导的蛋白酶体活性下降。**结论** CMZ 通过抑制大鼠体内 CYP2E1 的活性, 而降低乙醇诱导的肝损伤。

关键词: 氯美噻唑; 乙醇; 肝损伤

中图分类号: R.965

文献标识码: A

Inhibitory effect of Clormethiazole on ethanol-induced liver injury in rats

Jian-bin Wang¹, Cai-yue Wu², Li-si Wang³, Kai-ming Wu⁴

(1. Department of Gastroenterology, Lecong Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Foshan, Guangdong 528315, China; 2. Lecong Community Health Service Center of Shunde District, Foshan, Guangdong 528315, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Lecong Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Foshan, Guangdong 528315, China; 4. Center of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of Clormethiazole (CMZ) in rat model of liver injury induced by ethanol. **Methods** Thirty-two male SD rats were randomly divided into four groups: a glucose control group ($n = 8$), an ethanol model group ($n = 8$), an ethanol+CMZ group ($n = 8$) and a glucose+CMZ group ($n = 8$). The rats in the ethanol model group were fed with ethanol 0.1 ml/(kg·d) for 2 m, and the rats in the ethanol+CMZ group and the glucose+CMZ group were fed with CMZ 80 mg/(kg·d) for 2 m. Then Chlorzoxazone metabolism was measured *in vivo* (6-OH CHZ/CHZ ratio, $\mu\text{g/ml}$) to assess the activity of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1). Blood samples were collected from the orbit to detect serum ethanol content and serum alanine aminotransaminase (ALT). Then all rats were sacrificed under anesthesia, the relative liver weight was compared among the groups; liver homogenate was prepared to detect the proteasome activity; the relative expressions of CYP2E1, CYP3A and CYP4A in rat liver were

收稿日期: 2018-01-04

[通信作者] 吴恺明, E-mail: 98324273@qq.com

assessed by Western blot; and pathological changes were observed under microscope and their degrees were evaluated by morphometry. **Results** Compared with the ethanol model group, the ethanol+CMZ group could significantly reduce the liver injury in the rats ($P < 0.05$). Ethanol induced the expression of CYP2E1 protein ($P < 0.05$), the ethanol+CMZ group also induced the expression of CYP2E1 ($P < 0.05$). Detection of Chlorzoxazone hydroxylation product revealed that CMZ inhibited activity of CYP2E1 in the ethanol model group ($P < 0.05$), but the expression level of CYP2E1 protein was not affected ($P > 0.05$). CMZ blocked the decrease in ethanol-induced proteasome activity ($P < 0.05$). **Conclusions** CMZ can protect the liver from injury induced by ethanol through inhibiting the activity of CYP2E1.

Keywords: Clormethiazole; alcohol; liver injury

氯美噻唑(Clormethiazole, CMZ)为噻唑类衍生物, 具有镇静、催眠、抗惊厥作用^[1]。肝损伤的主要病理形式包括酒精性肝炎、肝纤维化、肝硬化等, 病因是长期大量饮酒诱导肝细胞色素 P450 2E1 (cytochrome P450 2E1, CYP2E1) 的表达, 增加自由基对肝脏的损伤^[2-3]。研究表明, CMZ 在翻译后抑制 CYP2E1 基因的转录, 从而影响 CYP2E1 的活性^[4-6]。本文通过复制慢性酒精性肝损伤大鼠模型, 以期阐明 CMZ 在酒精所致肝细胞损伤中发挥的重要作用, 为临床防治酒精性肝损伤提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 无特定病原体级雄性 SD 大鼠 32 只, 体重 (220 ± 20) g, 购自北京维通利华生物技术有限公司, 合格证号 SCXK-京-2016-0012。

1.1.2 药物试剂 CMZ 纯度 99.8% (上海梯希爱化成工业发展有限公司), 氯唑沙宗 (Chlorzoxazone, CHZ) 纯度 99% (上海梯希爱化成工业发展有限公司), 43% 乙醇 (河南省化工试剂有限公司), Vector ABC 试剂盒和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 试剂盒购自南京建成生物工程有限公司, CYP2E1、CYP4A、CYP3A 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.1.3 实验仪器 CX23 型光学显微镜 (日本奥林巴斯公司), AU680 型全自动生化分析仪 (美国贝克曼库尔特公司), UV1901 双光束紫外分光光度计 (上海精学科学仪器有限公司), SONICS 超声波细胞破碎仪 (美国 BRANSON 公司), 安捷伦 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), ULTRACUTR 型超薄切片机 (德国莱卡公司), JA2003 型电子分析天平 (上海天平仪器厂)。

1.2 方 法

1.2.1 大鼠慢性酒精性肝损伤模型的复制 按 2 个

影响因素的析因设计分组: A 干预因素: ①不干预, ②干预 (给予 CMZ); B 模型复制因素: ①无损模型 (给予葡萄糖), ②损害模型 (给予乙醇) (见表 1)。32 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 按体重均衡随机分为 4 组, 每组 8 只。

表 1 2 个因素的析因设计

干预因素	B1: 无损害 (葡萄糖)	B2: 损害 (乙醇)
A1: 无干预	A1B1	A1B2
A2: 干预 (CMZ)	A2B1	A2B2

A2B1: 葡萄糖 + CMZ 组, 用生理盐水将 CMZ 配制所需浓度, 大鼠灌胃 CMZ 80 mg/(kg·d), 2 h 后灌胃 43% 葡萄糖 [0.1 ml/(kg·d)], 60 d。

A1B1: 葡萄糖对照组 (阴性对照组), 大鼠灌胃葡萄糖 + CMZ 组等体积生理盐水, 2 h 后灌胃 43% 葡萄糖液 [0.1 ml/(kg·d)], 60 d。

A2B2: 乙醇 + CMZ 组, 用生理盐水将 CMZ 配制所需浓度, 大鼠灌胃 CMZ 80 mg/(kg·d), 2 h 后灌胃 43% 乙醇 [0.1 ml/(kg·d)], 60 d。

A1B2: 乙醇模型组 (阳性对照组), 大鼠灌胃乙醇 + CMZ 组等体积生理盐水, 2 h 后灌胃 43% 乙醇 [0.1 ml/(kg·d)], 60 d。

第 60 天, 大鼠禁食但不禁水, 12 h 后在眼眶处采血, 收集大鼠血浆, 称体重。各组大鼠腹腔注射 CHZ 150 μ mol/kg, 分别于给药后 1、2 和 3 h 在眼眶处采集大鼠血样, 随即断头处死。血液 4 500 r/min 离心 10 min, 储存于 -20°C 冰箱。取肝脏全叶并称重, 其中一叶采用 10% 多聚甲醛固定, 剩余部分冻存于 -80°C 冰箱。每组 8 只大鼠, 实际每组模型复制成功 6 或 7 只, 故最终实验按每组 6 只大鼠计算。

1.2.2 大鼠肝指数的计算及血浆乙醇浓度和血清谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 活性的检测 计算各组大鼠的肝脏指数 (肝重 / 体重); 采用全自动生

化分析仪通过酶动力学方法测定 ALT 的活性；采用放射性能量衰变实验测定血浆乙醇浓度^[7]。

1.2.3 大鼠肝组织病理学观察和分级 取用 10% 多聚甲醛固定的肝脏组织，常规石蜡包埋，4 μm 组织切片，苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色，光学显微镜下观察各组大鼠肝脏形态学变化；肝脏形态学病理分级参照 MATHEWS 等^[8]的方法。

1.2.4 肝组织 CYP2E1 免疫组织化学法染色 CYP2E1 免疫组织化学染色采用 SP 法^[9]，DAB 显色。一抗 CYP2E1 (1 : 600 稀释)，使用 Vector ABC 试剂盒和生物素标记的二抗显现 CYP2E1 的阳性区域。

1.2.5 肝组织匀浆 MDA 含量的测定 在 752 型分光光度计上用分光光度法测定 MDA 含量，其浓度以 pmol/mg 匀浆蛋白表示。通过检测脂肪组织的 MDA 反映脂质过氧化程度，使用硫代巴比妥酸检测 MDA^[10]。

1.2.6 大鼠肝脏蛋白酶体活性的测定 制备肝匀浆，检测糜蛋白酶活性 (LLVY-AMC 水解程度)、类胰蛋白酶活性 (LSTR-AMC 水解程度) 和谷氨酰胺水解酶活性 (LLE-NA 水解程度)^[11]。在 pH 7.5 的 0.1 mol Tris-HCl 中加入 20 ~ 200 μg 相同蛋白和 40 μmol 缩氨酸，30℃ 恒温摇床反应 1 h。LLVY-AMC 和 LSTR-AMC 的激发和发射检测波长分别为 390 和 440 nm，β-甲萘胺的激发和发射检测波长分别为 335 和 410 nm。

1.2.7 Western blot 检测 将各组冻存的大鼠肝脏按照曹艳等^[12]的方法制备成肝微粒体。使用大鼠多克隆抗体，采用 Western blot 检测大鼠 CYP2E1、CYP3A、CYP4A 蛋白相对表达量^[13]。采用 4% 浓缩胶和 8.7% 分离胶行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将肝微粒体溶解在聚丙烯酰胺凝胶缓冲液中 (3% SDS, 0.2 mol Tris-HCl, pH 6.8, 26% 丙三醇, 2 mol β-巯基乙醇) 100℃ 加热 2 min。按 25 μl/孔上样，微粒体蛋白电泳分离后电转移至 PVDF 膜，脱脂奶粉封闭 1 h。一抗 (1 : 5 000 稀释) 室温孵育 1 h；HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1 : 2 000 稀释) 室温孵育 1 h。充分洗膜后加入 ECL 化学发光液，采用 Image Quant LAS 4000 型蛋白成像系统 (德国 GE Healthcare 公司) 进行曝光处理。实验结果以密度为单位来计算 (UA/mg)。

1.2.8 大鼠体内 CYP2E1 活性的检测 通过高效液相色谱检测血浆样品中 6-羟基氯唑沙宗和 CHZ 的含量 (μg/ml)，采用 6-羟基氯唑沙宗/氯唑沙宗比值

评估各组大鼠体内 CHZ 的代谢程度^[14]。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件，计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，比较用单因素方差分析或析因设计的方差分析，两两比较用 LSD-*t* 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠体重、肝脏指数及肝功指标的影响

实验期间 (60 d)，乙醇模型组和葡萄糖对照组大鼠以相同的速率成长 ($P > 0.05$)。乙醇模型组平均增长体重 3 g/d，葡萄糖对照组为 2.2 g/d，乙醇 + CMZ 组为 1.5 g/d，葡萄糖 + CMZ 组为 2.1 g/d。乙醇与葡萄糖干预效果比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，乙醇模型组的肝重和相对肝重 (相对肝重 = 肝重 / 体重 × 100%) 高于葡萄糖对照组，但葡萄糖 + CMZ 组的肝重和相对肝重较乙醇 + CMZ 组降低。见表 2。

表 2 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠体重、肝脏指数的影响
($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	体重/g	肝重/g	相对肝重/%
葡萄糖对照组	347 ± 24	11.9 ± 1.8	3.4 ± 0.4
乙醇模型组	372 ± 38	18.8 ± 2.9	5.0 ± 0.3
葡萄糖 + CMZ 组	340 ± 31	13.3 ± 1.4	3.9 ± 0.3
乙醇 + CMZ 组	301 ± 61	16.6 ± 5.0	5.4 ± 0.9
F_A 值	5.465	0.093	4.087
P_A 值	0.030	0.764	0.057
F_B 值	0.172	16.017	50.086
P_B 值	0.683	0.001	0.000
$F_{A \times B}$ 值	3.762	1.905	0.051
$P_{A \times B}$ 值	0.067	0.183	0.824

2.2 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠肝功指标和血浆乙醇含量的影响

乙醇模型组血浆中乙醇浓度与乙醇 + CMZ 组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。乙醇模型组与葡萄糖对照组的 ALT 水平比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但乙醇模型组与乙醇 + CMZ 组的 ALT 水平比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；葡萄糖对照组与葡萄糖 + CMZ 组的 ALT 水平比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，表明 CMZ 的影响效果显著。见表 3。

表 3 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠肝功指标和血浆乙醇含量的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	乙醇 / (mg/dl)	ALT / (IU/L)
葡萄糖对照组	-	90 ± 40
乙醇模型组	197 ± 49	102 ± 53
葡萄糖 +CMZ 组	-	33 ± 13
乙醇 +CMZ 组	239 ± 172	66 ± 38
t/F_A 值	0.575	8.674
P_A 值	0.586	0.008
F_B 值		2.037
P_B 值		0.169
$F_{A \times B}$ 值		0.436
$P_{A \times B}$ 值		0.517

2.3 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠肝脏组织病理学变化的影响

乙醇模型组大鼠的病理分级高于乙醇 + CMZ 组, 乙醇模型组大鼠的肝脏病理分级参数 (脂肪变性、坏死、炎症、纤维化) 较乙醇 + CMZ 组差 ($P < 0.05$)。乙醇模型组大鼠的肝脏纤维化病灶较明显, 这种纤维化主要存在于肝小叶中心或者细胞外周。乙醇模型组大鼠的肝脏与乙醇 + CMZ 组相比, 有明显的脂肪性病变、坏死及炎症。见表 4。

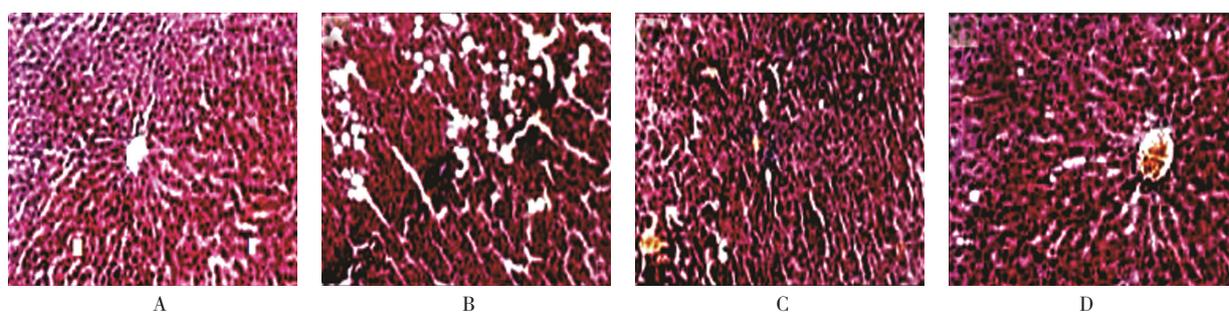
葡萄糖对照组可见肝小叶轮廓清晰, 小叶中央静脉向四周呈放射状排列, 肝细胞排列尚整齐, 细胞分界清, 核圆, 位于细胞中央, 胞质丰富, 呈嗜碱性 (见图 1A)。乙醇模型组可见肝小叶结构破坏, 肝板排列紊乱, 呈点、片状坏死, 肝细胞肿胀明显, 胞质中可

表 4 4 组大鼠肝脏病理分级 ($n=6, \text{分}, \bar{x} \pm s$)

组别	脂肪性病变	坏死	炎症	纤维化	总分
葡萄糖对照组	0.17 ± 0.11	0.83 ± 0.45	0.83 ± 0.45	0.10 ± 0.01	1.83 ± 1.15
乙醇模型组	3.01 ± 1.07	1.14 ± 0.59	1.63 ± 0.52	0.75 ± 1.04	6.45 ± 2.34
葡萄糖 +CMZ 组	0.25 ± 0.12	0.1 ± 0.01	0.62 ± 0.34	0.10 ± 0.01	0.85 ± 0.48
乙醇 +CMZ 组	1.82 ± 1.05	0.14 ± 0.06	0.64 ± 0.31	0.10 ± 0.01	2.54 ± 1.28
F_A 值	3.227	32.282	12.706	2.317	16.615
P_A 值	0.088	0.000	0.002	0.144	0.001
F_B 值	51.299	1.291	5.862	2.320	27.606
P_B 值	0.000	0.269	0.025	0.143	0.000
$F_{A \times B}$ 值	4.230	0.759	5.346	2.316	5.937
$P_{A \times B}$ 值	0.053	0.394	0.032	0.144	0.024

见大小不等、数量不一的圆形脂肪空泡, 散在肝细胞嗜酸性变, 小叶中央静脉周围和汇管区有炎症细胞浸润, 有的肝细胞质中有红色颗粒状 Mallory 小体 (见图 1B)。乙醇 + CMZ 组大鼠肝细胞浊肿明显减轻, 有

散在炎症细胞浸润, 肝细胞内偶有小脂滴 (见图 1C)。葡萄糖 + CMZ 组也偶见脂肪空泡, 肝细胞肿胀明显, 胞体肿大成球形, 小叶中央静脉周围和汇管区有炎症细胞浸润 (见图 1D)。

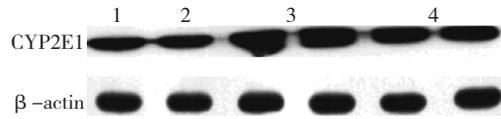


A: 葡萄糖对照组; B: 乙醇模型组; C: 葡萄糖 +CMZ 组; D: 乙醇 +CMZ 组
图 1 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠肝组织病理变化的影响 (HE × 10)

2.4 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠肝组织 CYP 酶和 MDA 含量的影响

乙醇模型组 CYP2E1 蛋白表达量高于葡萄糖对照组和葡萄糖 + CMZ 组 ($P < 0.05$), 表明乙醇诱导大鼠体内 CYP2E1 蛋白的表达 (见图 2)。但乙醇模型组与乙醇 + CMZ 组的 CYP4A 和 CYP3A 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 乙醇模型组与葡萄糖对照组、乙醇 + CMZ 组、葡萄糖 + CMZ 组的 MDA

含量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 乙醇模型组的 MDA 含量高于其他各组。见表 5。



1: 葡萄糖对照组; 2: 葡萄糖 + CMZ 组; 3: 乙醇模型组; 4: 乙醇 + CMZ 组

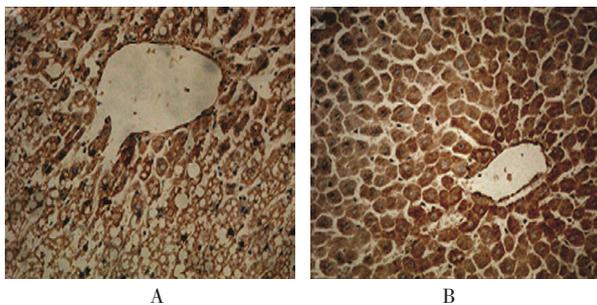
图 2 4 组大鼠 CYP2E1 蛋白的表达

表 5 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠肝组织 CYP 酶和丙二醛含量的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	CYP2E1/ (UA/mg)	CYP4A/ (UA/mg)	CYP3A/ (UA/mg)	MDA/ (pmol/mg)
葡萄糖对照组	37 ± 15	65 ± 27	153 ± 101	34.9 ± 7.1
乙醇模型组	233 ± 17	126 ± 57	239 ± 165	58.7 ± 21.8
葡萄糖 + CMZ 组	22 ± 13	111 ± 57	121 ± 65	31.1 ± 9.3
乙醇 + CMZ 组	215 ± 79	158 ± 91	349 ± 158	37.5 ± 9.1
F_A 值	0.971	2.293	0.546	5.273
P_A 值	0.336	0.146	0.469	0.033
F_B 值	131.155	4.476	8.929	7.831
P_B 值	0.000	0.047	0.007	0.011
$F_{A \times B}$ 值	0.012	0.079	1.800	2.561
$P_{A \times B}$ 值	0.915	0.782	0.195	0.125

2.5 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠肝组织 CYP2E1 蛋白表达的影响

鼠肝小叶部位免疫组织化学法染色显示, 乙醇模型组染色区域与乙醇 + CMZ 组基本一致 (见图 3A)。葡萄糖对照组染色面积较小, 仅见于中心部位的肝脏细胞。葡萄糖 + CMZ 组与乙醇 + CMZ 组相比, 肝小叶 CYP2E1 阳性区域明显缩小 (见图 3B)。



A: 乙醇 + CMZ 组; B: 葡萄糖 + CMZ 组

图 3 两组大鼠肝组织中 CYP2E1 的表达 (免疫组织化学法 × 400)

2.6 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠肝组织蛋白酶体活性的影响。

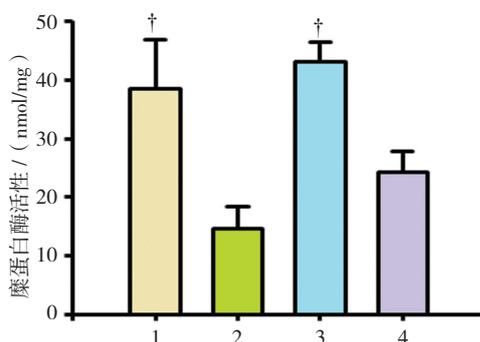
2.6.1 糜蛋白酶活性 4 组大鼠糜蛋白酶活性比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 17.436, P = 0.000$)。两两比较经 LSD- t 检验, 乙醇模型组的糜蛋白酶活性低于葡萄糖对照组和葡萄糖 + CMZ 组 ($P < 0.05$); 乙醇 + CMZ 组的糜蛋白酶活性与乙醇模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 6 和图 4。

2.6.2 类胰蛋白酶活性 4 组大鼠类胰蛋白酶活性水平比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 11.457, P = 0.000$)。两两比较经 LSD- t 检验, 乙醇模型组的类胰蛋白酶活性较葡萄糖对照组降低 ($P < 0.05$)。见表 6 和图 5。

2.6.3 谷氨酰胺水解酶活性 4 组大鼠谷氨酰胺水解酶活性水平比较, 经单因素方差分析, 差异无统计学意义 ($F = 0.995, P = 0.416$)。见表 6 和图 6。

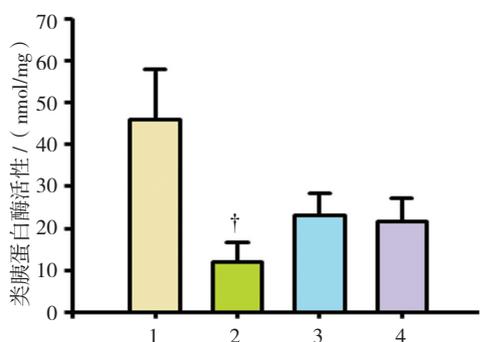
表 6 4 组大鼠肝组织蛋白酶体和 CYP2E1 活性比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	糜蛋白酶活性 / (nmol/mg)	类胰蛋白酶活性 / (nmol/mg)	谷氨酰胺水解酶活性 / (nmol/mg)	6-羟基氯唑沙宗 / 氯唑沙宗 比值
葡萄糖对照组	38.5 ± 10.1	45.6 ± 15.8	6.7 ± 4.5	0.11 ± 0.02
乙醇模型组	14.6 ± 3.4	12.5 ± 4.9	14.3 ± 12.6	0.18 ± 0.03
葡萄糖 + CMZ 组	43.2 ± 3.0	23.0 ± 5.2	7.5 ± 6.4	0.05 ± 0.02
乙醇 + CMA 组	24.7 ± 3.0	21.8 ± 6.1	9.8 ± 8.5	0.03 ± 0.03
F 值	17.436	11.457	0.995	15.736
P 值	0.000	0.000	0.416	0.000



1: 葡萄糖对照组; 2: 乙醇模型组; 3: 葡萄糖 + CMZ 组; 4: 乙醇 + CMZ 组。† 与乙醇模型组比较, $P < 0.05$

图 4 4 组大鼠糜蛋白酶活性比较



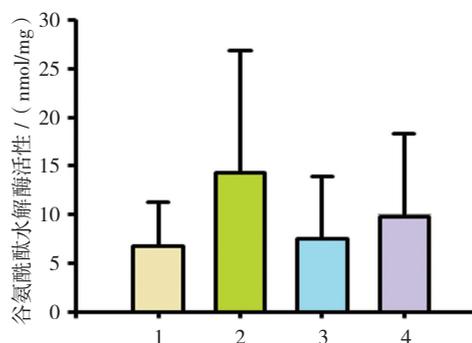
1: 葡萄糖对照组; 2: 乙醇模型组; 3: 葡萄糖 + CMZ 组; 4: 乙醇 + CMZ 组。† 与葡萄糖对照组比较, $P < 0.05$

图 5 4 组大鼠类胰蛋白酶活性比较

2.7 CMZ 对酒精性肝损伤大鼠体内 CYP2E1 活性的影响。

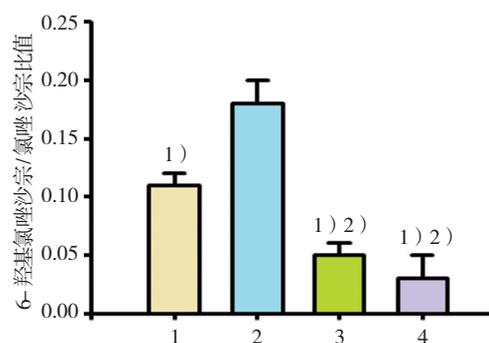
4 组大鼠 CYP2E1 活性水平 (6-羟基氯唑沙宗 / 氯唑沙宗比值) 比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=15.736, P=0.000$)。两两比较经 LSD- t 检验, 乙醇模型组 CYP2E1 活性高于葡萄糖对照组 ($P < 0.05$); 葡萄糖 + CMZ 组、乙醇 + CMZ 组 CYP2E1 活性低于葡萄糖对照组 ($P < 0.05$); 葡萄糖 + CMZ 组、乙醇 + CMZ 组 CYP2E1 活性低于乙醇模型组 ($P < 0.05$), 表明 CMZ 不仅抑制体内乙醇诱导

的 CYP2E1, 而且抑制自身固有的 CYP2E1 活性。见表 6 和图 7。



1: 葡萄糖对照组; 2: 乙醇模型组; 3: 葡萄糖 + CMZ 组; 4: 乙醇 + CMZ 组

图 6 4 组大鼠谷氨酰胺水解酶活性比较



1: 葡萄糖对照组; 2: 乙醇模型组; 3: 葡萄糖 + CMZ 组; 4: 乙醇 + CMZ 组。1) 与乙醇模型组比较, $P < 0.05$; 2) 与葡萄糖对照组比较, $P < 0.05$

图 7 4 组大鼠 6-羟基氯唑沙宗 / 氯唑沙宗比值比较

3 讨论

本研究证明, CMZ 能够明显改善乙醇诱导的肝脏损伤。虽然 CMZ 未影响乙醇对 CYP2E1 的诱导作用, 但是最后的实验中, 通过 CHZ 的羟基化体外代谢发现, CMZ 同时抑制乙醇诱导的和自身固有的 CYP2E1 活性。因此, CMZ 对改善乙醇诱导的肝损伤的机制可

能与体内酶活性的抑制作用有关。本研究发现,大鼠体内 CMZ 能够减少 CYP2E1 的合成,与其他研究结果一致^[15]。有研究表明,CYP2E1 的抗体滴度与肝脏的病理程度、CYP2E1 蛋白表达水平有相关性^[16]。另外一个不能排除的可能性是在实验未测得的 CYP2E1 蛋白水平不能反映整个实验期间 CMZ 对 CYP2E1 均有抑制作用。

尽管乙醇诱导 CYP2E1 的表达,但是 CMZ 降低大鼠体内 CYP2E1 活性的原因可能是通过结合 CYP2E1 分子内其他位点而不是酶催化反应的位点,从而非竞争性抑制 CYP2E1,酶被诱导的机制是自身稳定化的原因^[17]。乙醇的结合会抑制蛋白磷酸-泛素化通路。CMZ 同时抑制 CYP2E1 基因转录,但本实验未对该机制进行深入研究。乙醇模型组与乙醇+CMZ 组的 CYP2E1 蛋白表达水平无差异,表明 CMZ 抑制 CYP2E1 基因转录的机制可能并不是那么重要。乙醇模型组与乙醇+CMZ 组大鼠肝脏病理分级的差异可能是因为 CMZ 在体内对 CYP2E1 抑制,其同时解释了乙醇+CMZ 组大鼠 CYP2E1 活性下降的原因。乙醇诱导的放射性加合物(CYP2E1-羟乙基放射性加合物)依赖于 CYP2E1 的形成。在乙醇模型组大鼠肝脏中 CMZ 抑制 CYP2E1,而阻止 MDA 含量的升高。

本实验在研究大鼠代谢乙醇的同时也研究了体内 CMZ 代谢的情况,表明 CMZ 通过非竞争性抑制降低体内 CYP2E1 的活性,在乙醇+CMZ 组中也检测到 CMZ 抑制大鼠体内 CYP2E1 的活性。然而在人体酒精戒断期间,乙醇作为非竞争性的抑制剂已被消除掉,CMZ 对 CYP2E1 的活性抑制作用更突出^[18]。

CMZ 对乙醇诱导的微粒体蛋白酶的活性有抑制作用,但具体机制尚未明确。CMZ 抑制体内 CYP2E1 酶的活性,减轻乙醇诱导的肝脏病理损伤。那么 CMZ 对乙醇诱导的微粒体蛋白活性的抑制作用是否与 CMZ 减缓肝损伤有联系,还需要进一步研究探讨。肝脏脂肪性病变和肝细胞蛋白的积累,使乙醇诱导的大鼠肝重增加,在乙醇+CMZ 组大鼠中 CMZ 的摄入使肝重降低。然而在乙醇模型组中,CMZ 不仅降低肝细胞的脂肪性病变程度,而且降低蛋白酶活性。乙醇+CMZ 组大鼠的肝重与乙醇模型组无差异,其原因可能是肝脏蛋白的增加和脂肪细胞丢失的不平衡^[19]。本实验中,大鼠的净体重无明显增加或者减轻。肝细胞质中蛋白的积累可能是由于微粒体蛋白活性丢失,造成细胞肿胀而诱发肝损伤,最终导致肝正常血流发生

变化。

综上所述,CMZ 能够减轻乙醇诱导的肝脏病理性病变。更重要的是 CMZ 能完全阻止乙醇诱导的肝硬化。CMZ 改善乙醇诱导的肝脏病理分级的机制可能是抑制 CYP2E1 的活性。将 CMZ 加入乙醇模型组后,乙醇诱导的 MDA 水平无显著增加,因此说明 CMZ 有效阻止肝组织的过氧化反应。本实验结果表明,CMZ 通过抑制 CYP2E1 的活性,而有效保护肝脏免受自由基的损伤。CMZ 降低乙醇对蛋白酶活性的不良影响,表明 CYP2E1 产生的自由基可损伤蛋白酶。CMZ 同时能抑制 CYP2E1 的合成。由于肝损伤患者 CYP2E1 活性较高,因此 CMZ 作为治疗肝损伤的药物具有很好的应用前景。

参 考 文 献:

- [1] VANDEVREDE L, TAVASSOLI E, LUO J, et al. Novel analogues of chlormethiazole are neuroprotective in four cellular models of neurodegeneration by a mechanism with variable dependence on GABA (A) receptor potentiation[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(2): 389-402.
- [2] 高艳,郑萍,闫琳,等.苦参碱对大鼠慢性酒精性肝损伤的作用及初步机制研究[J].*中国药理学通报*, 2013, 29(7): 1012-1016.
- [3] NAKADE Y, YONEDA M. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease and thyroid dysfunction[J]. *Intern Med*, 2016, 55(15): 1941-1942.
- [4] 赵丽娟,钟树荣,杨浩,等.云南彝族人 CYP2E1 基因多态性与酒依赖的关联性研究[J].*现代生物医学进展*, 2013, 13(34): 6609-6614.
- [5] WANG J W, CHEN X Y, HU P Y, et al. Effects of linderæ radix extracts on a rat model of alcoholic liver injury[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(6): 2185-2192.
- [6] KIM D K, KIM Y H, JANG H H, et al. Estrogen-related receptor γ controls hepatic CB1 receptor-mediated CYP2E1 expression and oxidative liver injury by alcohol[J]. *Gut*, 2013, 62(7): 1044-1054.
- [7] 季红,郭鑫,尹鹏,等.葛根素对急性酒精性肝损伤的预防作用[J].*医学综述*, 2016, 22(15): 3048-3049.
- [8] MATHEWS S, XU M, WANG H, et al. Animal models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306(10): G819-G823.
- [9] 华碧春,刘娇,黄智锋,等.黄药子配伍甘草对大鼠肝脏 CYP1A2、CYP2E1 蛋白表达影响的实验研究[J].*中药与临床*, 2014, 5(5): 29-31.
- [10] 逮素梅,任瑞,孙涛,等.基于分光光度法测定血液中非那西丁与扑热息痛含量的肝脏储备功能评估[J].*山东医药*, 2015, 55(4): 14-17.
- [11] LIN S Y, WANG Y Y, CHUANG Y H, et al. Skeletal muscle

- proteolysis is associated with sympathetic activation and TNF- α -ubiquitin-proteasome pathway in liver cirrhotic rats[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(4): 890-896.
- [12] 曹艳, 钟玉环, 原梅, 等. 欧前胡素和异欧前胡素对人和大鼠肝微粒体细胞色素 P450 酶活性的抑制作用[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(8): 1237-1241.
- [13] 贾金雪, 秦金东, 李学峰, 等. 钝化 NF- κ B 的活化对免疫性肝损伤大鼠 CYP2E1 的影响[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(8): 1076-1080.
- [14] BEDADA S K, NEERATI P. Resveratrol pretreatment affects CYP2E1 activity of chlorzoxazone in healthy human volunteers[J]. *Phytother Res*, 2016, 30(3): 463-468.
- [15] HU X, HUANG W, YANG Y. Cytochrome P450 isoenzymes in rat and human liver microsomes associate with the metabolism of total coumarins in *Fructus Cnidii*[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2015, 40(4): 373-377.
- [16] HUANG X T, XIAO R M, WANG M F, et al. Induction of rat hepatic CYP2E1 expression by arecoline in vivo[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2016, 51(1): 153-156.
- [17] WANG Z, SHAH S V, LIU H, et al. Inhibition of cytochrome P450 2E1 and activation of transcription factor Nrf2 are renoprotective in myoglobinuric acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2014, 86(2): 338-349.
- [18] KIM D K, KIM Y H, JANG H H, et al. Estrogen-related receptor γ controls hepatic CB1 receptor-mediated CYP2E1 expression and oxidative liver injury by alcohol[J]. *Gut*, 2013, 62(7): 1044-1054.
- [19] YE Q, WANG X, WANG Q, et al. Cytochrome P450 2E1 inhibitor, chlormethiazole, decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in rat Kupffer cells with ethanol treatment[J]. *Hepatol Res*, 2013, 43(10): 1115-1123.

(童颖丹 编辑)