

木瓜提取物对小鼠脂肪肝的保护作用

李聪¹, 熊海容¹, 彭晓蔓¹, 魏承亮¹, 段丽¹, 余慧宇¹, 张长城², 袁丁^{2,3}, 刘朝奇¹

(1. 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 三峡大学, 湖北宜昌 443002)

(2. 三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002) (3. 三峡大学附属仁和医院, 湖北宜昌 443002)

摘要: 本文研究了木瓜提取物对小鼠脂肪肝的干预作用。将 40 只雄性昆明小鼠随机分成 4 组, 正常组、高脂组 and 药物低 (100 mg/kg)、高 (300 mg/kg) 剂量组。正常组给予普通饲料, 高脂组给予高脂高糖饲料, 用药物组采用木瓜提取物低、高剂量饲料喂养, 1 月后处死, 检测小鼠血清相关指标, HE 染色观察肝脏组织形态, RT-PCR 和激光共聚焦显微镜 (Confocal) 检测脂代谢相关基因表达, qPCR 检测 miR-199a-5p 水平。与正常组相比, 高脂组小鼠血清中 TC、ALT 的水平增高; 组织病理结果显示, 肝脏脂肪变性明显; RT-PCR 和 Confocal 结果显示, HGF、VEGFa 和 c-Met 的表达降低, qPCR 显示, 高脂组中 miR-199a-5p 水平增高。与高脂组比较, 药物低、高剂量组脂肪肝病理性损伤明显改善, 血清 ALT、TC 含量均下降, HGF、VEGFa 和 c-Met 表达水平上调, miR-199a-5p 水平降低。因此木瓜提取物对高脂高糖诱导的小鼠脂肪肝有保护作用, 其可能的机制是通过调节 miR-199a-5p-HGF/c-Met 信号通路发挥作用。

关键词: 木瓜提取物; 非酒精性脂肪性肝病; HGF; c-Met; miR-199a-5p

文章编号: 1673-9078(2018)07-28-34

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.005

Protective Effects of Active Components Extracted from *Chaenomeles Speciosa* on Non-alcoholic Fatty Liver Disease

LI Cong¹, XIONG Hai-rong¹, PENG Xiao-man¹, WEI Cheng-liang¹, DUAN Li¹, SHE Hui-yu¹,
ZHANG Chang-cheng², YUAN Ding^{2,3}, LIU Chao-qi¹

(1. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)(2. Medical College, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)(3. Affiliated Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: The protective effects of active components extracted from *Chaenomeles Speciosa* (EACCS) on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice were investigated. Forty male KM mice were equally randomized into four groups, namely, normal group, model group, low-dose EACCS group (100 mg/kg body weight/day), and high-dose EACCS group (300 mg/kg body weight/day). The normal group was fed with a normal diet, the model group was given a high-fat-high-fructose diet (HFFD), and the low-dose and high-dose EACCS groups were given HFFD followed by EACCS at low- and high-dose, respectively. Body weights were monitored. The mice were sacrificed 1 month later and serum-based biomarkers and morphology of liver tissue were examined. Real-time (RT)-PCR and confocal microscopy techniques were used to detect the expression of lipid metabolism-related genes. Compared with the normal group, the serum alanine aminotransferase (ALT) and total cholesterol (TC) of the model group increased, indicating significant steatosis; The expression levels of hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and c-Met also decreased in the model group, whilst the expression level of miR-199a-5p increased. Compared with the model group, the hepatic lipid accumulation of EACCS groups was obviously suppressed with significantly decreased serum ALT and TC levels and the expression levels of hepatic HGF, VEGFa and c-Met mRNA increased; and the expression levels of miR-199a-5p increased. Therefore, EACCS has protective effects on NAFLD mice induced by HFFD, and its mechanism may be related to the activation of miR-199a-5p-HGF/c-Met signaling pathway in the liver tissues.

Key words: extracted active components of *Chaenomeles Speciosa*; non-alcoholic fatty liver disease; HGF; c-Met; miR-199a-5p

收稿日期: 2018-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81473461)

作者简介: 李聪 (1993-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 临床医学肿瘤学

通讯作者: 刘朝奇 (1962-), 博士, 研究方向: 分子生物学和免疫药理

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的以肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征。包括单纯性脂肪肝 (Simple fatty liver, SFL)、非酒精性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 及其相关肝硬化^[1-3]。近年来, NAFLD 已成为发达国家和各地区最常见的慢性肝病, 全球和我国大陆的 NAFLD 患病率分别约为 25% 和 20%, 且发病率呈不断上升趋势^[4,5]。目前, NAFLD 的治疗主要包括生活方式的干预、药物治疗、调节肠道微生态以及手术外科干预等几个方面^[2,3,6,7], 然而, 目前尚无明确有效的治疗方式, 因此寻求一种有效的干预 NAFLD 的发生发展药物显得极其重要。

c-Met, 也被称为酪氨酸蛋白激酶或肝细胞生长因子受体 (hepatocyte growth factor receptor, HGFR), 具有酪氨酸激酶活性。肝细胞生长因子 (Hepatocyte growth factor, HGF) 与 c-Met 结合并启动细胞内多个酪氨酸残基的磷酸化, 调节下游多个信号通路, 介导细胞分化、增殖和血管生成等^[8,9]。在肝组织中, HGF 可能起保护免受肝损伤或加速再生过程的作用^[10]。血管内皮生长因子 a (Vascular endothelial growth factor a, VEGFa) 作为一种关键的促血管生成因子, 在诱导血管生成、血管发生和内皮细胞生长, 促进细胞迁移和抑制细胞凋亡等方面具有重要的作用。MicroRNAs (miRNAs) 作为一种重要的转录后调节因子, 在肝脏的生成、分化及代谢过程中发挥着重要的调控作用。迄今为止, 已经提出 miRNA 在脂质代谢中发挥重要作用, 包括 miR-122, miR-24, miR-370, miR-378, miR-335, miR-125a-5p 和 miR-33 等^[11,12]。另有文献报道指出, miR199a-5p 在 NAFLD 模型的小鼠肝脏组织中表达上调, 调控肝脏中的脂质代谢, 在 NAFLD 发生发展中起着至关重要的作用^[13]。

木瓜为蔷薇科植物贴梗海棠干燥近成熟果实, 中医认为木瓜有舒筋、活络、健脾开胃、舒肝止痛、祛风除湿之功效, 可用于预防和治疗风湿病、霍乱、痢疾、肠炎、脚气病及维生素 C 缺乏症等^[14]。本课题组前期研究发现, 木瓜提取物对小鼠肝纤维化有良好的干预作用^[15], 为进一步研究该木瓜提取物对小鼠肝脏脂质代谢的影响及其可能的机制, 本课题组进行了相应的实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验动物

SPF 级昆明雄性小鼠 40 只, 周龄为 4~6 周, 体重为 16~20 g, 由湖北省三峡大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号 ((SCXK) (鄂) 2011-0061)。

1.1.2 动物饲料

普通饲料由三峡大学实验动物中心提供。高脂高糖饲料是由普通饲料、猪油、果糖、胆酸钠、胆固醇、食盐等混合而成, 按照普通饲料(53%)、胆固醇(5%)、猪油(20%)、胆酸钠(0.25%)、果糖(20%)、食盐(1%)的重量比混合固定成型。用药组饲料在高脂高糖饲料的基础上采用木瓜提取物低剂量(100 mg/kg)和高剂量(300 mg/kg)加入饲料中, 混合固定成型, 送到武汉农科院辐照灭菌备用。饲料营养成分见表 1 和表 2:

表 1 普通饲料营养成分表

Table 1 Table of ordinary feed nutritional composition

| | 含量/(g/kg) | 能量值/KJ | 占比/% |
|-------|-----------|--------|------|
| 碳水化合物 | 553 | 2212 | 61.5 |
| 脂肪 | 51 | 459 | 12.8 |
| 蛋白质 | 231 | 924 | 25.7 |
| 总能量 | | 3595 | 100 |

表 2 高脂饲料营养成分表 (每 kg 饲料)

Table 2 Table of High-fat diet nutrition composition

| | 含量/(g/kg) | 能量值/KJ | 占比/% |
|-------|-----------|---------|------|
| 碳水化合物 | 493.09 | 1972.36 | 43.8 |
| 脂肪 | 227.03 | 2043.27 | 45.4 |
| 蛋白质 | 122.43 | 489.72 | 10.8 |
| 总能量 | | 4505.35 | 100 |

1.1.3 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒, 大连宝生物科技有限公司; 胆固醇, 国药集团化学试剂有限公司; 逆转录试剂盒, 大连宝生物科技有限公司; PCR 引物, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 兔单抗 Met (SP260) (sc-162-R), 上海优宁维生物科技有限公司; Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), 上海优宁维生物科技有限公司。

1.1.4 主要仪器

实时定量 PCR 仪, 德国 Applied Biosystems 公司; Gene Genius 凝胶分析系统, 英国 SYNGNE 公司; Gellogic 200 凝胶成像分析系统, 美国 Kodak 公司; 激光共聚焦显微镜 (尼康 AIR+), 日本尼康公司。

1.2 实验方法

1.2.1 木瓜提取物的制备

木瓜, 蔷薇科木瓜属, 木瓜提取物的制备方法为将 1000 g 木瓜粉碎成粗粉后加 70%乙醇 3500 mL 浸泡, 100 °C 回流蒸馏过滤后收集, 重复 2 次。合并

提取物, 65 °C 悬蒸去乙醇并浓缩至 1000 mL, 离心取上清加入大孔树脂内。分别用 10%乙醇、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇各 11000 mL 为流动相, 流速为 10 mL/min。洗脱液分段收集, 浓缩干燥, 用于后续实验研究。

其中 10%乙醇洗脱组分的得率为 6.6%, 课题组将其命名为 10%乙醇木瓜组分。前期, 在细胞水平预试中 10%乙醇木瓜组分显示出了良好的降脂活性, 为进一步研究木瓜提取物的药理作用, 课题组采用 10%乙醇木瓜组分进行动物实验研究。

1.2.2 非酒精性脂肪肝小鼠模型的建立

SPF 级昆明雄性小鼠 40 只, 体重 16~20 g, 随机将其分成 4 组, 每组 10 只。分组依次为正常对照组, 高脂高糖组, 木瓜提取物低剂量组, 木瓜提取物高剂量组。正常对照组用普通饲料喂养, 高脂组采用自制的高脂高糖饲料造模, 用药组采用木瓜提取物低剂量 (100 mg/kg) 和高剂量 (300 mg/kg) 饲料喂养, 按每只小鼠 10 g/天给予, 每两天记录 1 次体重, 喂养 1 月后处死。

1.2.3 小鼠生化指标的检测

小鼠眼球取血后, 将血液静置 30 min, 转速 3000 r/min, 离心 10 min, 离心后取上清即为血清, 用试剂盒检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 的水平; 同样

用试剂盒检测血清中胆固醇 (TC) 的水平。

1.2.4 肝脏组织 HE 染色

取 10 mm×3 mm 的新鲜肝脏大叶组织块放入包埋盒中, 于中性福尔马林固定液固定, 固定 24 h 后转入 75%乙醇中, 4 h 后再经过常规脱水处理, 石蜡进行包埋, 然后切片 (厚度 4 μm), 再进行常规 HE 染色, 显微镜下观察肝组织病理变化情况。

1.2.5 RT-PCR 检测小鼠肝组织中 HGF、VEGFa 和 c-Met 的表达

称取冻存小鼠肝组织 50 mg, 采用 TRIzol 法提取小鼠肝脏组织的总 RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 100 mA, 20 min) 检测 RNA 的完整性。用微量核酸仪测定 RNA 的浓度, 再经逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA。以 GAPDH 为内参, 通过 RT-PCR 反应扩增目的基因。引物序列见表 3。

RT-PCR 的反应体系为 25 μL 体系, 分别为灭菌双蒸水 10.5 μL, 2×PCR Master mix 12.5 μL, HGF、VEGFa 和 c-Met 引物 1 μL (引物为原液稀释 10 倍), cDNA 1 μL。RT-PCR 实验反应条件: 94 °C、5 min; 94 °C、30 s; 58 °C、30 s; 72 °C、30 s; 72 °C、5 min; 4 °C、∞; RT-PCR 反应结束后, 取反应液 10 μL 于 2%琼脂糖凝胶中电泳 35 min, 条件为 100 V 和 100 mA, 用凝胶成像系统检测, 观察分析实验结果。

表 3 PCR 引物序列

Table 3 Primer sequences used for PCR

| 基因 | 引物序列 | 扩增长度/bp |
|-------------|---------------------------------------|---------|
| VEGFa | Sense: 5'TCCTGTGGTGCCGCTGATG 3' | 130 bp |
| | Antisense: 5'TCCTATGTGCTGGCTTTGGTG 3' | |
| HGF | Sense: 5'CCAACACAAACAACAGTAGGGTGG3' | 191 bp |
| | Antisense: 5'CGTTTCTCCTCGCCTCTCTC3' | |
| c-Met | Sense: 5'TGTCAAGGTTGCTGATTTCCGG3' | 136 bp |
| | Antisense: 5'GGTGGTGAACCTCTGCGTTTG3' | |
| GAPDH | Sense: 5'GGTKGTCTCCTSYGACTTCAG 3' | 134 bp |
| | Antisense: 5'CCACCCTGTTGCTGTAGCC3' | |
| miR-199a-5p | Sense: 5'CAGTGCAGGGTCCGAGGT3' | 76 bp |
| | Antisense: 5'CGCACGCCAGTGTTTCAG3' | |
| U6 | Sense: 5'CTCGCTTCGGCAGCAC3' | 94 bp |
| | Antisense: 5'AACGCTTCACGAATTTGCGT3' | |

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测小鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达情况

称取冻存小鼠肝组织 50 mg, 采用 TRIzol 法提取小鼠肝脏组织的总 RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 100 mA, 20 min) 检测 RNA 的完整性。用微量核酸仪测定 RNA 的浓度, 再经 miR-199a-5p 和 U6 特异性引物及逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA。以 U6 为内

参, 经 qPCR 反应扩增目的基因。反应总体体系为 10 μL, 分别为 SYBER Green 5 μL; RNase-free water 2.4 μL; 引物 0.4 μL (引物为原液稀释 10 倍); cDNA 2 μL (为原液稀释 10 倍); ROX 0.2 μL。

反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s; 60 °C 30 s; 72 °C 15 s; 75 °C 1 s; cycles 40; 72 °C 10 min; 溶解曲线从 56 °C 到 98 °C, 每 0.3 °C 读取一次; 引物序列

见表2; PCR反应结束后读取CT值,利用软件Opticon Monitor分析,计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析miR-199a-5p在各个样本中的表达情况。

1.2.7 激光共聚焦显微镜 (Confocal) 观察小鼠肝组织中 c-Met 表达情况

取10 mm×3 mm的新鲜肝脏大叶组织块放入包埋盒中,于中性福尔马林固定液固定,固定24 h后转入75%乙醇中,4 h后再经过常规脱水处理,石蜡进行包埋,然后切片(厚度4 μm)。

将石蜡切片置于60℃烤箱中,烤片1 h,脱腊,再进行高压修复抗原10 min,自然冷却至室温,PBS冲洗3遍,5 min/遍,5% BSA在27℃下封闭1 h;用PBS配制一抗,抗体浓度1:200,4℃孵育过夜(12~16 h),PBS冲洗3遍,5 min/遍;用PBS配制荧光二抗,抗体浓度1:200,避光37℃孵育1 h,PBS冲洗3遍,10 min/遍;然后用DAPI复染核5 min,PBS冲洗3遍,5 min/遍,最后使用抗荧光淬灭剂进行封片,激光共聚焦显微镜显微镜下观察并取图。

1.2.8 统计学处理方法

根据所得的实验数据,采用SPSS 18.0软件来进行数据分析,RT-PCR的结果利用Image J软件分析,然后数据都用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来表示;同时利用单因素方差分析组间数据,以 $p < 0.05$ 判定为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 小鼠体重变化情况及生化指标检测结果

根据测量小鼠体重变化情况,我们发现,高脂饲料喂养的小鼠体重增长明显高于正常组,差异具有统计学意义($p < 0.01$),药物干预之后,小鼠体重增长有所下降,与高脂组比较,差异具有统计学意义($p < 0.05$)。结果见表4。高脂饲料喂养小鼠诱导NAFLD模型,检测结果发现高脂组小鼠血清中TC为 10.40 ± 1.30 ,与正常组(4.79 ± 0.60)相比较其含量明显升高,差异具有统计学意义($p < 0.05$)。检测ALT结果显示,高脂组为 49.24 ± 8.47 ,明显高于正常组(42.90 ± 5.79),差异具有统计学意义($p < 0.05$),这一结果与文献报道结果一致,达到NAFLD诊断标准^[16],提示高脂饮食诱导脂肪肝模型血清结果成立。和高脂组相比,通过药物干预之后小鼠血清中TC、ALT的水平都是降低的,差异具有统计学意义($p < 0.05$)。说明木瓜提取物具有降低小鼠血脂、改善肝功能的作用。见图1。

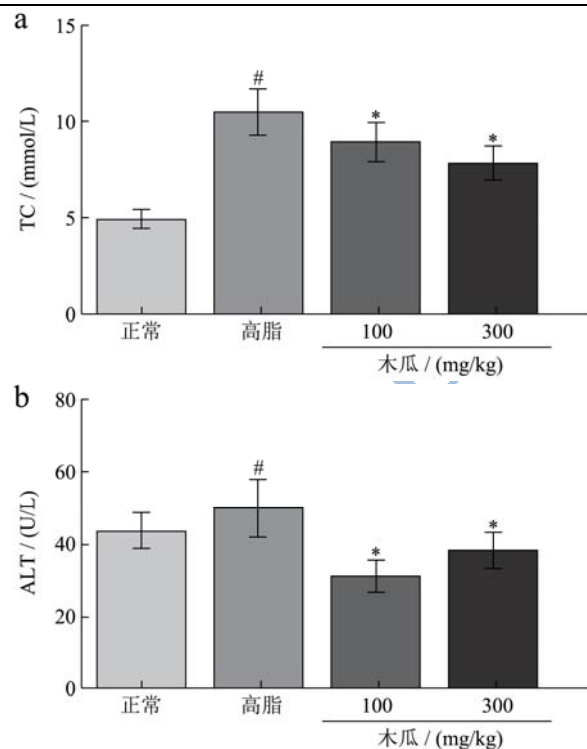


图1 小鼠相关生化指标TC和ALT的检测比较

Fig.1 Comparison of serum TC and ALT levels in mice

注:与正常组比较, # $p < 0.05$;与高脂组比较, * $p < 0.05$; n=10。

表4 小鼠体重变化情况

Table 4 Changes in body weight of mouse

| 组别 | 正常 | 高脂 | 木瓜低 | 木瓜高 |
|------|--------------|------------|-------------|-------------|
| 体重增加 | 15.70±0.63** | 23.14±1.03 | 21.11±1.47# | 19.58±1.12# |

注:与高脂组比较, # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; n=10。

2.2 HE染色结果

经过组织切片HE染色结果发现,在正常组小鼠肝组织中,其肝细胞形态清晰,排列规则,紧密而均一,肝索以中央静脉为圆心,呈放射状排列。高脂组小鼠肝脏中,肝细胞肿胀,形态模糊,排列紊乱,肝索结构不清晰,并可见明显的脂肪空泡,符合NAFLD的组织病理学改变^[17]。

通过正常组和高脂组肝组织情况对比,并结合血清学检测结果,提示非酒精性脂肪性肝病模型成立。另外,与高脂组相比,木瓜提取物低剂量组和高剂量组中可以观察到肝细胞形态较清晰,排列较紧密,脂肪空泡有一定的改善,说明小鼠脂肪肝病理变化有一定的缓解。提示木瓜提取物对小鼠脂肪肝能起到一定的干预作用。这一结果与文献报道结果一致^[18]结果见图2。

表 5 小鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达情况

Table 5 Expression of miR-199a-5p in mouse hepatic tissues

| 组别 | 正常 | 高脂 | 木瓜低 | 木瓜高 |
|-------------|-----------|------------|-------------|-------------|
| miR-199a-5p | 1.00±0.11 | 2.51±0.27# | 0.18±0.03** | 0.18±0.02** |

注：与正常组比较，# $p < 0.05$ ；与高脂组比较，** $p < 0.01$ 。

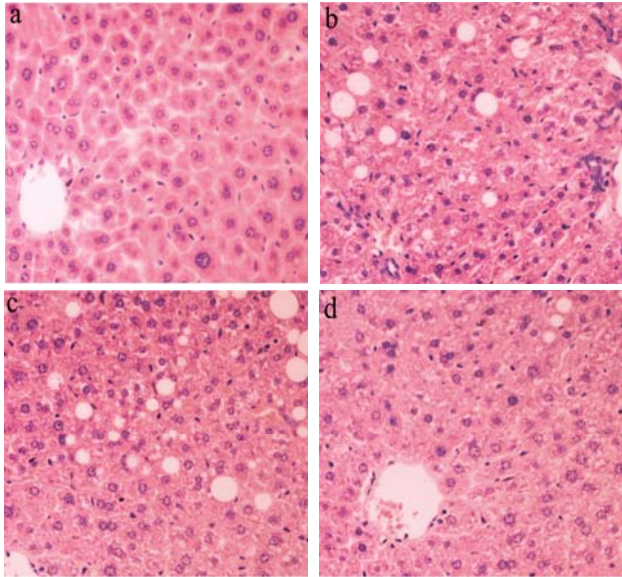


图 2 小鼠肝组织 HE 染色 (200×)

Fig.2 Hepatic tissues stained with HE from each group (200×)

注：a 正常组；b 高脂组；c 木瓜低剂量组；d 木瓜高剂量组。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测小鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达情况

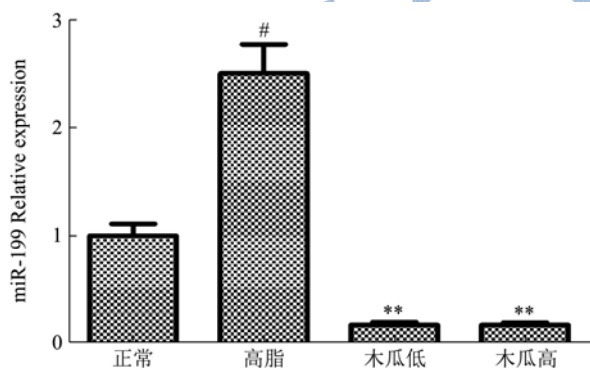


图 3 Quantitative Real-time PCR 检测小鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达

Fig.3 Expression of miR-199a-5p in mouse hepatic tissues by Quantitative Real-time PCR

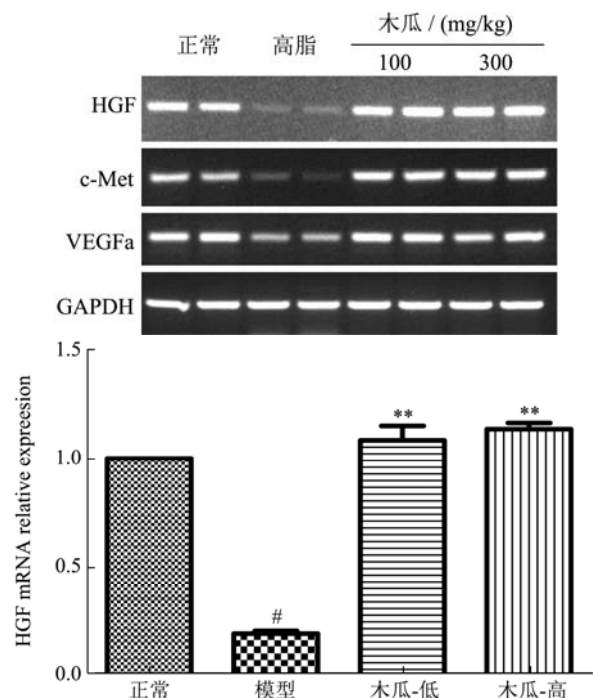
注：与正常组比较，# $p < 0.05$ ；与高脂组比较，** $p < 0.01$ ； $n = 10$ 。

miR199a-5p 的过表达能够加剧游离脂肪酸 (FA) 的沉积，并且抑制 ATP 水平和线粒体 DNA (mtDNA) 含量，另外，抑制 miR199a-5p 能部分减轻 FA 的沉积

并增加 ATP 水平和 mtDNA 含量，miR199a-5p 在肝脏中的脂质代谢，线粒体活性和线粒体 β -氧化中起着至关重要的作用^[11]。我们通过设计 miR-199a-5p 的茎环引物经逆转录得到 cDNA，以 U6 为内参，通过实时荧光定量 PCR 反应检测小鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达情况，以正常组为标准参照，所得结果见表 4 和图 3。与正常组相比较，高脂组小鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达显著上调，差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)，经过药物木瓜提取物的处理后，miR-199a-5p 表达相较于高脂组其水平显著降低，差异具统计学意义 ($p < 0.01$)，这一结果与文献报道结果一致，证实 miR-199a-5p 对小鼠 NAFLD 存在调控作用，且木瓜提取物能够降低小鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达水平，从而参与 NAFLD 的发生与发展。

2.4 RT-PCR 检测小鼠肝组织中 HGF、VEGFa 和 c-Met 的表达

在肝损伤过程中，c-Met 能够触发对于肝细胞恢复重要的存活信号，肝细胞中 c-Met 的缺失导致更多的肝细胞损伤和慢性胆汁淤积性肝损伤模型中的纤维化，这一作用是通过 HGF/c-Met 信号通路介导的^[19]。



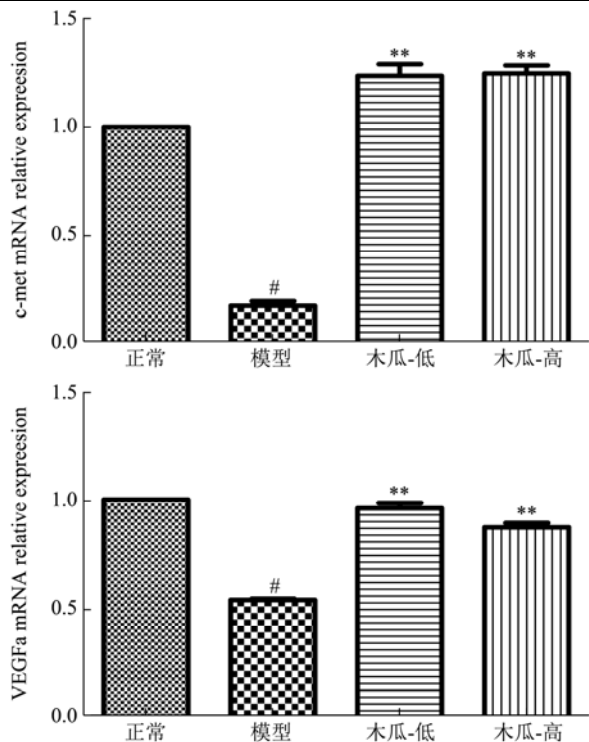


图4 RT-PCR 检测基因 HGF、VEGFa 和 c-Met 的表达情况

Fig.4 Expression of HGF, VEGFa and c-Met mRNA by RT-PCR

注：与正常组比较，# $p < 0.05$ ；与高脂组比较，** $p < 0.01$ ； $n = 2$ 。

有文献报道称，miR-199a*可靶向 HGF/c-Met 信号级联，可以用作 HCC 的潜在治疗靶标。^[20]越来越多的研究表明，miR-199a-5p 在 NAFLD 的发生和发展及肝细胞的再生等过程中存在调控作用。^[21]而从我们的实验结果（图 4）中可以看出，与正常组相比，高脂组中 HGF、VEGFa 和 c-Met 基因的表达均呈下降趋势，且趋势明显，经过灰度分析结果显示其表达水平明显低于正常组，差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)；经过木瓜提取物干预之后，HGF、VEGFa 和 c-Met 基因的表达与高脂组相比呈升高趋势，趋近于正常组的表达，差异具有统计学意义 ($p < 0.01$)，这一结果与相关文献结果一致。综合前面结果，与正常组比较，在高脂模型中，小鼠肝组织中 miR-199a-5p 的表达升高，而 HGF、VEGFa 和 c-Met 基因的表达呈明显下降趋势，通过木瓜提取的干预之后，miR-199a-5p 的表达下调，HGF、VEGFa 和 c-Met 基因的表达恢复，趋近于正常组，认为木瓜提取物可能通过 miR-199a-5p 调节 HGF/c-Met 信号通路干预 NAFLD 的发生与发展。

2.5 激光共聚焦显微镜 (confocal) 观察小鼠

肝组织中 c-Met 表达情况

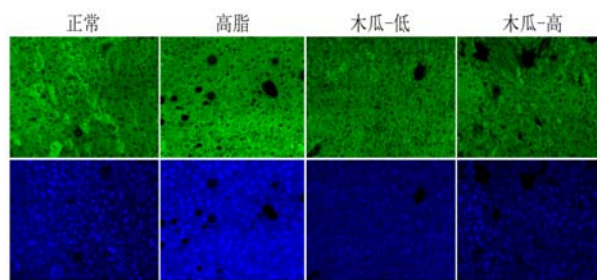


图5 激光共聚焦显微镜观察小鼠肝组织中 c-Met 蛋白的表达水平 (×200)

Fig.5 The expression of c-met in each group (×200)

如图 5 可看出，与正常组相比，高脂组中 c-Met 蛋白表达水平明显降低，经过药物木瓜提取物干预后 c-Met 的表达水平是升高的；这一结果与相关基因表达的结果一致，进一步从蛋白质水平显示在高脂模型中 c-Met 的表达是降低的，通过木瓜提取物的干预之后，c-Met 的表达得到恢复，接近正常水平，说明木瓜提取物可能通过抑制 miR-199a-5p 的表达来促进 c-Met 的表达，从而达到改善脂肪肝的作用。

3 结论

3.1 研究发现高脂组的小鼠血清 ALT 及 TC 均高于正常组，差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)，HE 染色结果显示高脂组肝组织中表现为肝脂肪样变，脂质沉积明显，提示脂肪肝模型建立成功。RT-PCR、Quantitative Real-time PCR 和激光共聚焦显微镜检测，与正常组比较，高脂组的 miR-199a-5p 的水平升高 ($p < 0.05$)，HGF、c-Met 及 VEGFa 的表达降低 ($p < 0.05$)，c-Met 蛋白表达水平也明显降低；经木瓜提取物的干预后肝脏组织病理学变化明显改善，脂质沉积减少，ALT、TC 水平降低 ($p < 0.05$)，miR-199a-5p 的水平明显降低 ($p < 0.01$)，HGF、c-Met 及 VEGFa 的表达恢复 ($p < 0.01$)，接近正常组，c-Met 蛋白表达水平也明显升高。

3.2 本研究的结果证实了在 NAFLD 模型中，miR-199a-5p 表达增加，抑制了 HGF/c-Met-VEGFa 信号通路，从而抑制肝细胞及血管的再生，造成肝功能的损害；经过木瓜提取物的作用之后，miR-199a-5p 的水平降低，相应的 HGF、c-Met 及 VEGFa 基因的表达水平得到恢复，肝功能得到缓解。因此，我们认为 miR-199a-5p-HGF/c-Met 通路介导了脂肪肝的发生与发展，而药物木瓜提取物能够干预这一通路，通过降低 miR-199a-5p 的表达，使得 HGF、c-Met 及 VEGFa 表达增加，改善肝组织的脂质积累，缓解脂肪肝的进程，该实验为木瓜用于 NAFLD 的预防及治疗提供了一个新的证据。

参考文献

- [1] 胡中杰,张晶.我国非酒精性脂肪性肝病的研究现状[J].临床肝胆病杂志,2016,32(3):552-556
HU Zhong-jie, ZHANG Jing. Current status of research on nonalcoholic fatty liver disease in China [J]. Journal of Clinical Hepatology, 2016, 32(3): 552-556
- [2] 中华中医药学会脾胃病分会.非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见 [J].中医杂志,2017,58(19): 1706-1710
Chinese society of traditional Chinese medicine spleen and stomach branch of non-alcoholic fatty liver disease expert consultation [J] Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 58(19): 1706-1710
- [3] 李丹,李异玲.非酒精性脂肪性肝病发病机制及治疗进展[J].实用药物与临床,2017,11:1340-1343
LI Dan, LI Yi-ling. Pathogenesis and treatment progress of NAFLD [J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2017, 11: 1340-1343
- [4] Younossi Z M, Koenig A B, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. Hepatology, 2016, 64: 73-84
- [5] Li Z, Xue J, Chen P, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in mainland of China: a meta-analysis of published studies [J]. Gastroenterol Hepatol, 2014, 29: 42-51
- [6] Jiangao F, Association C L D. Guidelines for management of nonalcoholic fatty liver disease: an updated and revised edition [J]. Modern Medicine & Health, 2011, 18(3): 163
- [7] Fan J G, Jia J D, You Ming LI, et al. Guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: update 2010 [J]. Journal of Digestive Diseases, 2011, 12(1): 45-50
- [8] Rosário M, Birchmeier W. How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase [J]. Trends Cell Biol., 2003, 13(6): 328-335
- [9] Blumenschein G R Jr, Mills G B, Gonzalez-Angulo A M. Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy [J]. Clin Oncol, 2012, 30: 3287-96
- [10] El-N L, Poulosom R, Stamp G, et al. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met, correlates with severity of pathological injury in experimental alcoholic liver disease [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2005, 15(5): 811-817
- [11] Fernándezhermando C, Suárez Y, Rayner K J, et al. MicroRNAs in lipid metabolism [J]. Current Opinion in Lipidology, 2011, 22(2): 86-92
- [12] Sara C, Nadia P, Daniela G, et al. Dual role of microRNAs in NAFLD [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(4): 8437
- [13] Li B, Zhang Z, Zhang H, et al. Aberrant miR199a-5p/caveolin1/PPAR α axis in hepatic steatosis [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2014, 53(3): 393
- [14] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科技出版社,2006
Jiangsu New Medical College. Chinese Dictionary [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006
- [15] 向婷婷,霍元秀,刘朝奇,等.木瓜提取物对脂肪性肝纤维化的预防保护作用及机制研究[J].中药新药与临床药理, 2015,4:489-494
XIANG Ting-ting, HUO Yuan-xiu, LIU Chao-qi, et al. Protective effects and mechanism of total extracts of papaya on fatty liver fibrosis in mice [J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2015, 4: 489-494
- [16] 李继昌.非酒精性脂肪肝病[J].中国医刊,2006,41(6):7-8
LI Ji-chang. Non alcoholic Fatty Liver Disease [J]. Chinese Journal of Medicine, 2006, 41(6): 7-8
- [17] 王泰龄.非酒精性脂肪性肝病的病理改变[C].全国脂肪性肝病专题研讨会,2005
WANG Tai-ling. Pathological changes of nonalcoholic fatty liver disease [C]. National Fatty Liver Symposium, 2005
- [18] 吴利春,涂浩,段丽,等.木瓜提取物对高糖高脂诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝病的影响[J].中国中医药信息杂志, 2017,24(5):48-51
WU Li-chun, TU Hao, DUAN Li, et al. Effects of extracted active components of chaenomeles speciosa on non-alcoholic fatty liver disease in model mice induced by high-fat-high-fructose diet [J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2017, 24(5): 48-51
- [19] Giebler A, Boekschoten M V, Klein C, et al. c-Met confers protection against chronic liver tissue damage and fibrosis progression after bile duct ligation in mice [J]. Gastroenterology, 2009, 137(1): 297-308
- [20] Ghosh A, Ghosh A, Dasgupta D, et al. Abstract 2306: MicroRNA 199a*: a potent suppressor of tumor metastasis and angiogenesis [J]. Cancer Research, 2013, 73(8 Supplement): 2306
- [21] Zhang B, Wang R, Du J, et al. Upregulated microRNA-199a-5p inhibits nuclear receptor corepressor 1 translation in mice with non-alcoholic steatohepatitis [J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 10(6): 3080-3086

现代食品科技