



线粒体-细胞色素 C 途径在兔非酒精性脂肪肝 肝细胞凋亡中的作用

吴 方¹, 余陈欢², 张欢欢², 马 月², 俞 冰¹, 应华忠²

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 浙江 310053; 2. 浙江省医学科学院
浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 杭州 浙江 310013)

【摘要】 目的 探讨线粒体-细胞色素 C 途径在兔非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 肝细胞凋亡中的作用。**方法** 雄性日本大耳兔 40 只, 随机分为正常对照组 (8 周) 和 NAFLD 模型组 (4、6、8 周组), 每组各 10 只。模型组按 1.2 mL/kg 皮下注射花生油, 2 次/周, 建立日本大耳兔 NAFLD 模型。按各组时间点处死兔子, 测定兔血清中生化指标水平; HE 染色观察肝组织病理形态改变, 流式细胞仪检测肝细胞凋亡率; 提取肝脏线粒体, 分光光度法检测线粒体通透转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 的状态变化; 免疫组织化学法检查 Bcl-2、Bax、细胞色素 C 和 caspase-3 在肝组织中的表达情况; Western blot 检测细胞色素 C 以及 caspase-3 含量变化。**结果** 与正常对照组相比, 模型组肝脏脂质代谢指标和相关炎症因子表达水平升高, 模型组肝细胞凋亡率与对照组比较显著增加 ($P < 0.01$)。造模 4 周时出现肝功能损伤, 脂质代谢紊乱, 随着 NAFLD 病程的发展, Bcl-2、Bax、细胞色素 C 和 caspase-3 表达量逐渐增加, 线粒体通透转换孔开放率随高脂饮食饲养时间延长明显增加 ($P < 0.01$)。**结论** 线粒体-细胞色素 C 途径在 NAFLD 引起的肝细胞凋亡中起到了一定的调控作用。

【关键词】 非酒精性脂肪肝; 凋亡; 细胞色素 C; 胱冬肽酶-3; 线粒体通透转换孔;

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2016) 04-0007-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.04.002

Effect of mitochondrial cytochrome c on hepatocyte apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease in rabbits

WU Fang¹, YU Chen-huan², ZHANG Huan-huan², MA Yue², YU Bing¹, YING Hua-zhong²

(1. School of Pharmaceutics, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Experimental Animal and Safety Evaluation, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013)

【Abstract】 Objective To investigate the role of mitochondrial cytochrome c on hepatocyte apoptosis in non-alcoholic fatty liver disease in rabbits and its pathogenesis. **Methods** Forty Japanese white rabbits were randomly assigned to control group and model group. The model group was divided into three subgroups: 4-week, 6-week, and 8-week groups, with 10 rabbits in each group. The model groups were subcutaneously injected with peanut oil (1.2 mL/kg), twice a week for 4 weeks, 6 weeks or 8 weeks. The rabbits of all groups were killed at the right time. Serum samples were collected to detect the serum biochemical index levels. Liver tissue samples were taken for pathological observation using HE staining. The hepatocyte apoptosis index (AI) was measured by flow cytometry, and mitochondrial permeability

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81573591); 浙江省科技计划项目 (2011C37095)。

[作者简介] 吴方 (1989 -), 男, 研究方向: 疾病动物模型研究。Email: hnwufang@163.com。

[通讯作者] 应华忠 (1968 -), 男, 研究方向: 实验动物学。Email: fellycook2002@163.com。

transition pore (MPTP) was evaluated by ultraviolet spectrophotometry. Immunohistochemistry was employed to detect the hepatic expressions of Bcl-2, Bax, CYT C and caspase-3. Western blot was performed to detect the changes of CYT C and caspase-3 protein expressions. **Results** The model groups showed hepatic injury and high level of TC, TG, CRP, IL-6 and TNF- α beginning from 4 weeks. With the NAFLD process, the hepatocyte apoptosis index was significantly increased at 4-8 weeks and the MPTP was gradually increased. In the model group, hepatic Bcl-2, Bax, CYT C and caspase-3 expressions were increased steadily with the time passing. **Conclusions** NAFLD-induced liver damage is associated with apoptosis, and the mitochondrial cytochrome c-mediated apoptotic pathway plays a role in the occurrence of NAFLD.

【Key words】 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); Apoptosis; Cytochrome c; Caspase-3; Mitochondrial permeability transition pore (MPTP); Rabbit

非酒精性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是临床现今常见非传染性肝病之一^[1]。依据其病变肝组织炎症反应和纤维化的有无及发展程度, NAFLD 涵盖了单纯性脂肪肝以及由其演变的非酒精性脂肪肝炎、肝纤维化和肝硬化等疾病^[2]。据报道随着生活水平的提高, 我国 NAFLD 的患病率逐年增加, 已成为我国第二大肝病^[3], 严重威胁人类健康, 受到人们的普遍重视。

既往的研究已证实, 肝细胞凋亡在 NAFLD 发生发展的各个阶段普遍存在^[4,5]。细胞凋亡的表现形式是细胞核的变化, 而细胞质中线粒体的变化则是引起凋亡的重要诱因。研究表明 NAFLD 患者存在线粒体超微结构的损伤^[6], 且随着病变程度加深, 线粒体功能损伤越明显^[7]。作为日益受到重视的细胞凋亡调控器, 线粒体在细胞凋亡过程中的中心地位得到确认。目前 NAFLD 研究最常用的大鼠模型在血脂代谢方面也与人类 NAFLD 特征有所区别^[8,9], 课题组前期通过花生油皮下注射诱导日本大耳兔建立 NAFLD 动物模型, 具有造模时短、成型快, 肝脏取材量大, 死亡率低等优点, 可简化实验操作步骤, 节约实验成本^[10]。本研究通过建立日本大耳兔 NAFLD 模型, 探讨线粒体-细胞色素 C 途径在非酒精性脂肪肝肝细胞凋亡中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性日本大耳兔 40 只, 体重 (2.0 ± 0.2) kg。由浙江省实验动物中心提供 [SCXK (浙) 2009-0039]; 所有实验在浙江省实验动物中心进行 [SYXK (浙) 2008-0114]。

1.2 实验试剂、仪器

总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 检测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所; 线粒体抽提试剂盒购于北京达美基因

有限公司; 兔 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒, 均购于上海拜沃公司; 花生油 (饱和脂肪酸: 单不饱和脂肪酸: 多不饱和脂肪酸 = 0.27: 1: 1), 购于东莞市鹏发粮油有限公司; 其余所用试剂均为分析纯。

5424 型高速冷冻离心机, 艾本德中国有限公司; 723N 型可见分光光度计, 上海精密科技有限公司; DM2500 型荧光显微镜成像系统, 莱卡仪器有限公司; SPX-150B 型生化培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及造模: 40 只日本大耳兔随机分为两组, 分别为正常对照组和 NAFLD 模型组, 其中正常对照组取 8 周为时相点, 模型组取 4 周、6 周、8 周 3 个时相点, 每个时相点各 10 只。模型组分别皮下注射花生油 4 周、6 周、8 周, 2 次/周, 每次 1.2 mL/kg, 建立日本大耳兔 NAFLD 模型。正常对照组隔天注射同体积的生理盐水。

1.3.2 取材: 于末次造模后禁食 12 h, 取各相时点日本大耳兔, 采用耳动脉取血, 速眠新麻醉后颈动脉放血处死。3 500 r/min 离心 10 min 分离血清 -80℃ 保存备用。取同一部位肝组织置于 4% 中性甲醛中固定, 用于病理切片, 以试剂盒方法提取肝组织线粒体, 其余肝组织置于 -80℃ 下保存备用。

1.3.3 指标测定: 采用比色法测定血清 TC、TG 含量, ELISA 法测定血清 CRP、IL-6、TNF- α 含量, 具体操作步骤均按说明书进行。流式细胞仪检测肝细胞凋亡率。

线粒体通透转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 的检测按试剂盒说明书进行, 在分光光度计 (440 nm) 下获取 0 min、30 min 和 60 min 的吸光值 (A), 计算 A 比值, 若 A 值比值降低, 表明 MPTP 活性增强。

1.3.4 病理学观察:石蜡包埋的肝组织标本制备 4 μm 切片,依次用自来水和蒸馏水洗,苏木精液染核 5 min,再充分水洗和蒸馏水洗,然后用 Masson 丽春红酸性复红液染色 5 min,以 2% 冰醋酸水溶液浸洗片刻后再用 1% 磷钼酸水溶液分化 3 min,不经水洗,直接用苯胺蓝染 5 min,最后以 0.2% 冰醋酸溶液浸洗片刻,95% 酒精、无水酒精、二甲苯透明、中性树胶封固。在光镜下观察肝组织病理变化。

1.3.5 免疫组织化学分析:免疫组化观察 Bcl-2、Bax、细胞色素 C 和 caspase-3 在肝组织表达情况。石蜡包埋肝组织切片脱蜡至水;3% 过氧化氢孵育 37℃ 孵育 30 min 后,再用 5% ~ 10% 正常山羊血清封闭孵育后弃血清;滴加一抗工作液 37℃ 孵育 1 ~ 2 h,冲洗后滴加生物素标记二抗工作液,再冲洗后加适量碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液,37℃ 孵育 30 min,最后冲洗加显色剂显色后充分冲洗复染脱水封片,光镜下观察。

1.3.6 Western-Blot 分析:取相同部位肝组织 200 mg 加入含蛋白酶抑制剂的 PBS 缓冲液,4℃ 匀浆,10 000 r/min 离心 15 min 取上清液。上清蛋白定量,取 50 μg 蛋白,变性后行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至硝酸纤维膜,6% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,洗涤后加入兔抗鼠 caspase-3 (1:500) 或细胞色素 C 抗体 (1:250),4℃ 过夜,洗涤,加入辣根过氧化酶结合的抗兔 IgG (1:4000),化学发光试剂检测,X 线片显影。采用条带图像分析系统测定各条带灰度值,所测结果为扣除背景的积分光密度。

1.4 统计学方法

实验数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 17.0 统计软件进行分析处理,组间有差异用 t 检验,组间没有

差异用秩和检验。双变量正态分布资料采用 Pearson 相关分析,不服从双变量正态分布或等级变量资料相关性采用 Spearman 相关分析。

2 结果

2.1 血清生化指标的分析

与对照组相比较,模型组各时段血清中 TC、TG、CRP、IL-6、TNF- α 的值均升高,且显时间依赖性,到第 8 周达到最大值,差异有显著性 ($P < 0.01$),其中代表脂质代谢水平的 TC、TG 在第 4 周即出现显著升高 ($P < 0.01$),见表 1。表明造模 4 周后即出现肝脂质代谢紊乱,炎症因子表达上升,且随造模时间的延长而加重。

2.2 肝组织病理形态观察

对照组兔肝脏肉眼观察无明显异常,模型组兔第 4 周肝脏为色红,质脆。6 ~ 8 周肝脏被膜紧张、边缘圆钝、切面油腻、色淡黄,表面有花斑,质软。HE 染色检查,观察到正常对照组兔肝组织结构正常,细胞核大而清晰,胞质丰富,肝细胞无变性、坏死。模型组 4 周兔肝组织呈轻度脂肪病变,部分肝细胞胞浆内有大小不等的脂肪空泡;模型 6 周组兔肝组织细胞出现肿胀多于 4 周组,细胞核大小不均,被脂肪空泡挤向一侧;模型 8 周组绝大部分肝细胞有脂肪空泡 (图 1)。表明随着造模时间的延长,兔肝细胞的病变程度进一步加重。

2.3 各组 MPTP 活性比较

在 30 min/0 min 和 60 min/0 min 的 OD 值比较中,模型组各个时相的 MPTP 活性随着时间的延长而增强,且与对照组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$),表 2。

表 1 NAFLD 兔血清相关生化指标的变化 (n = 10)

Tab. 1 Changes of biochemical indexes in the NAFLD rabbits

组别 Groups	总胆固醇 TC (mmol/L)	甘油三酯 TG (mmol/L)	C 反应蛋白 CRP (ng/L)	白介素-6 IL-6 (ng/L)	肿瘤坏死因子- α TNF- α (ng/L)
对照组 Control	0.51 $\pm$ 0.09	1.73 $\pm$ 0.39	125.8 $\pm$ 12.0	0.40 $\pm$ 0.03	34.3 $\pm$ 3.9
4 周组 4 Weeks	0.86 $\pm$ 0.20 **	3.09 $\pm$ 0.80 **	132.1 $\pm$ 16.8 *	0.91 $\pm$ 0.10 **	36.7 $\pm$ 5.8
6 周组 6 Weeks	0.99 $\pm$ 0.23 **	2.92 $\pm$ 0.76 **	131.4 $\pm$ 7.22 **	0.95 $\pm$ 0.11 **	38.0 $\pm$ 3.1 *
8 周组 8 Weeks	1.32 $\pm$ 0.45 **	3.63 $\pm$ 0.59 **	140.3 $\pm$ 11.6 **	1.01 $\pm$ 0.14 **	40.4 $\pm$ 3.1 **

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

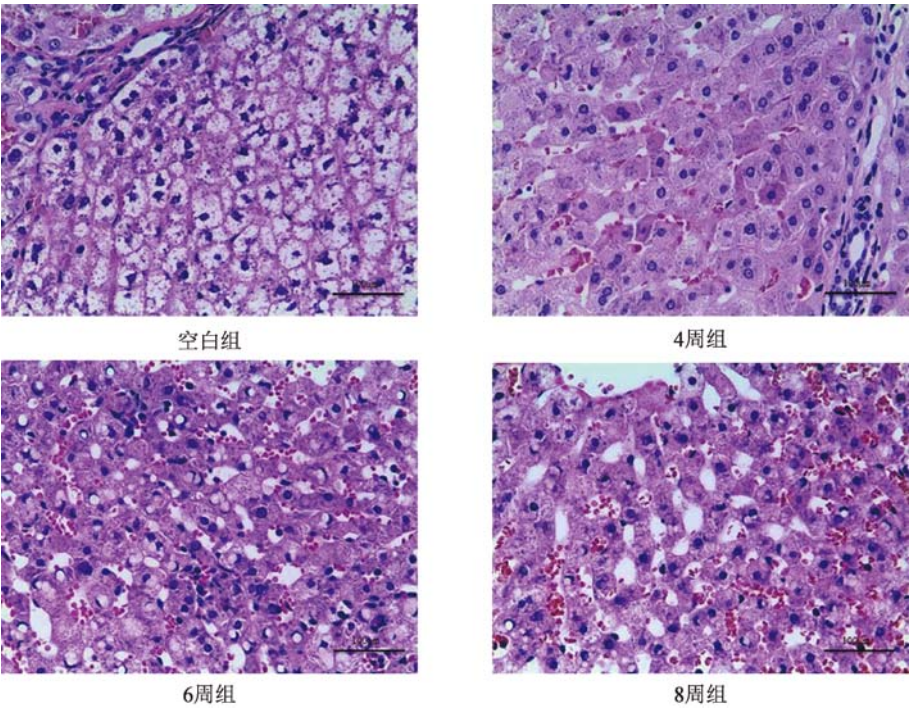


图 1 肝病理学变化(HE 染色,标尺 = 100 μm)

Fig. 1 Pathological changes of liver in the NAFLD rabbits (HE staining, Bar = 100 μm)

表 2 NAFLD 兔肝组织细胞 MPTP 的变化($n = 10$)

Tab. 2 The changes of MPTP in the liver cells of NAFLD rabbits ($n = 10$)

组别 Groups	A 值(30 min/0 min) A value (30 min/0 min)	A 值(60 min/0 min) A value (60 min/0 min)
对照组 Control	0.984 ± 0.003	0.923 ± 0.000
4 周组 4 Weeks	0.904 ± 0.016 **	0.865 ± 0.006 **
6 周组 6 Weeks	0.873 ± 0.020 **	0.823 ± 0.013 **
8 周组 8 Weeks	0.859 ± 0.010 **	0.803 ± 0.022 **

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 肝细胞凋亡检测

由图 2 流式细胞检测实验结果可知,在 0.8 mL/kg 花生油连续注射 4 周、6 周和 8 周后,肝细胞凋亡率分别为 13.0%、18.9% 和 23.1%,与空白对照组(凋亡率 3.0%)相比较,差异均具有明显的显著性(均 $P < 0.01$),并呈明显的量效关系,提示 0.8 mL/kg 花生油连续注射可诱导肝细胞的凋亡。

2.5 免疫组织化学分析

Bcl-2 主要在胞浆内着色,偶见核膜着色。4 周组 Bcl-2 与正常组相比不显著,棕黄色分布几乎一样多,随着时间的推进,6 周组和 8 周组的 Bcl-2 表达量有了明显的增加(图 3)。Bax 主要在胞浆内着色,模型组大鼠 Bax 的表达依时间的延长而递增。4 周组 Bax 主要在脂肪变性肝细胞呈棕黄色颗粒状;6 周组与 4 周组相比较阳性细胞数增多、染色加深;8 周组阳性细胞数进一步增多,在脂肪病变明显的

肝细胞胞浆内呈黄褐色表达,而相对的脂肪病变程度轻的肝细胞则为黄棕色(图 4)。模型组大鼠随造模时间延长,肝脏病变加深,被染色阳性细胞数增多,颜色越深,肝组织 Bax 的表达量逐步升高。

正常组大鼠细胞色素 C 和 caspase-3 的表达为个别肝细胞胞浆内弱阳性表达;模型组 4 周可见肝小叶内散在阳性表达,呈棕黄色颗粒状;6 周组和 8 周组细胞色素 C 和 caspase-3 两者的阳性细胞显著增加,呈棕褐色片状强阳性表达,且分布与脂肪肝的严重程度相一致(图 5、6)。

2.6 Western blot 分析

模型组与正常组 caspase-3 和细胞色素 C 蛋白的 Western blot 检测结果见图 7,1 至 4 依次为正常组、4 周组、6 周组和 8 周组。以各待测条带与其相应内参 actin 蛋白的灰度值比值做统计分析,结果显示,模型组与正常组相比 caspase-3 和细胞色素 C 蛋

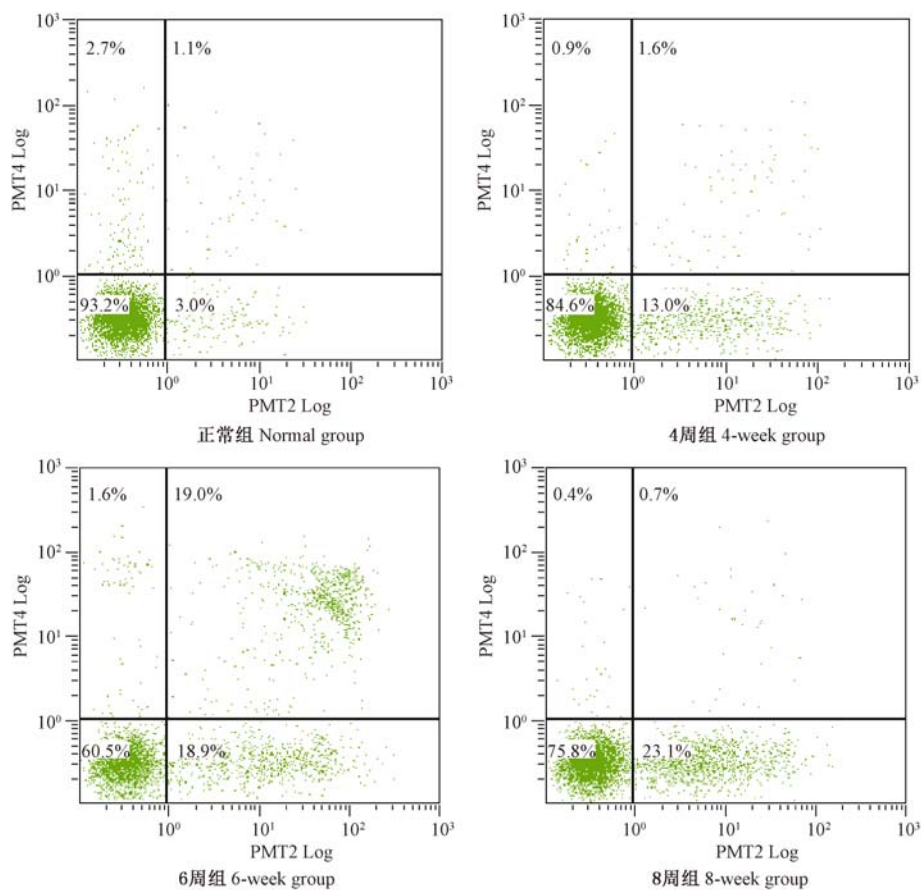


图 2 流式细胞术检测肝细胞凋亡率

Fig. 2 The apoptosis rate of hepatocytes detected by flow cytometry

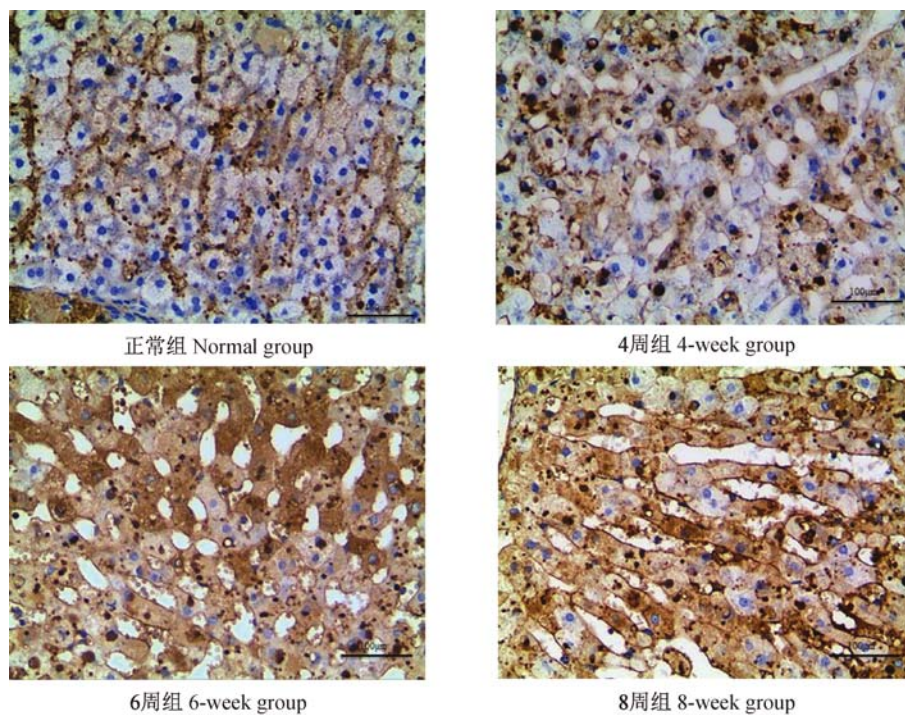


图 3 Bcl2 在各组动物肝组织表达情况 (标尺 = 100 μm)

Fig. 3 The expression of Bcl-2 in the liver of the NALFD rabbits. (Bar = 100 μm)

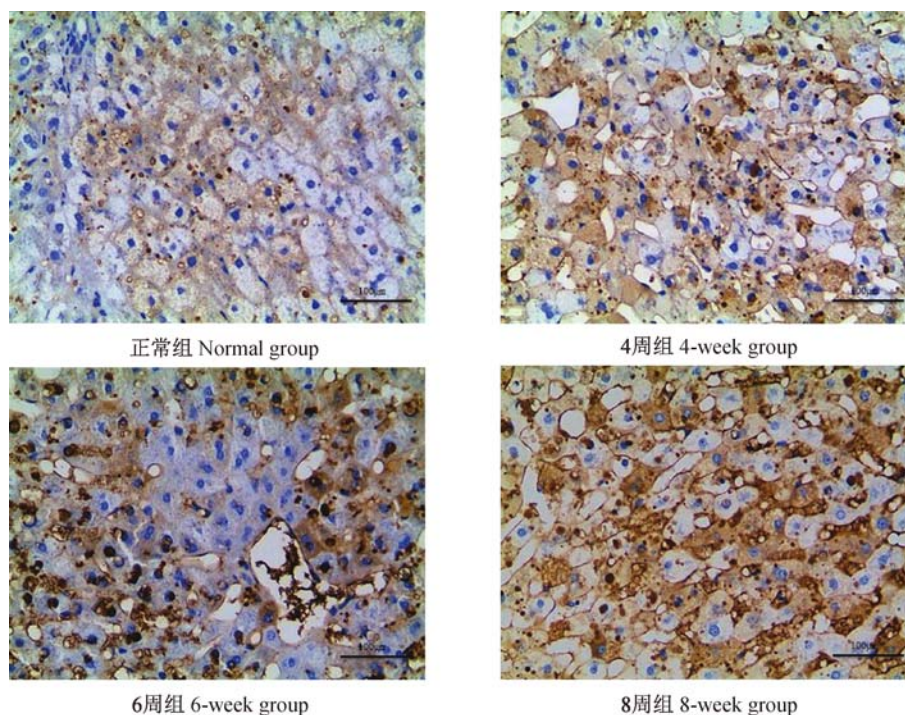


图 4 Bax 在各组动物肝组织表达情况 (标尺 = 100 μm)

Fig. 4 The expression of Bax in the liver tissue of the NALFD rabbits. (Bar = 100 μm)

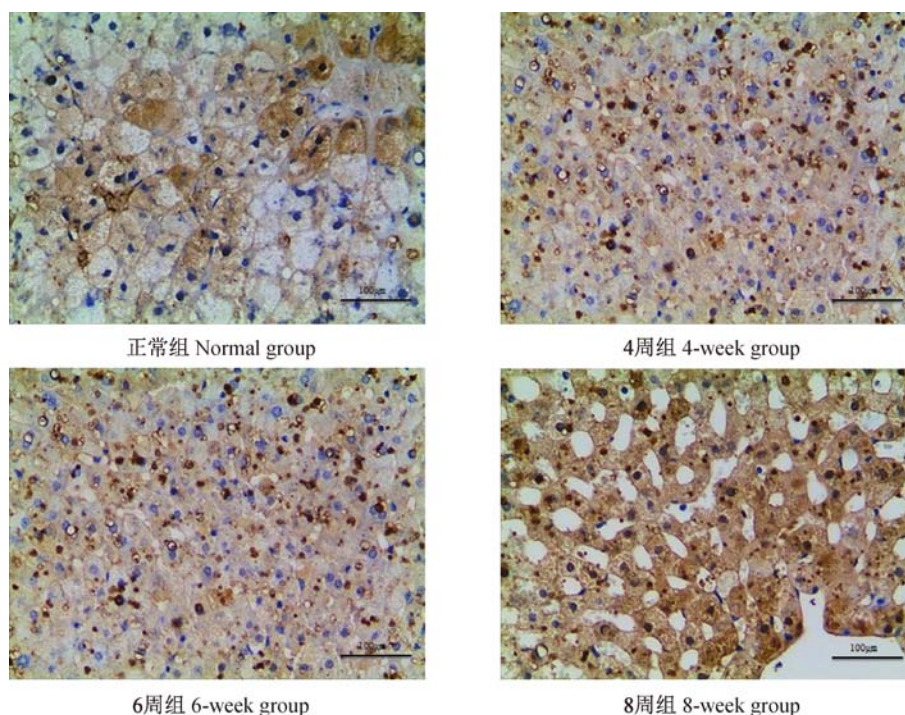


图 5 细胞色素 C 在各组动物肝组织表达情况 (标尺 = 100 μm)

Fig. 5 Expression of cytochrome c in the liver tissue of the NALFD rabbits. (Bar = 100 μm)

白表达明显增加,随脂肪肝程度的加重,逐渐增高。

3 讨论

细胞凋亡是受细胞内源性基因、酶和信号传导

途径等共同调控的一个激活过程,胱冬肽酶 (caspase) 处于细胞凋亡过程中的关键地位^[11]。Caspase-3 作为细胞凋亡信号的执行者,它的激活可诱导细胞凋亡的发生,在细胞凋亡早期的启动与执

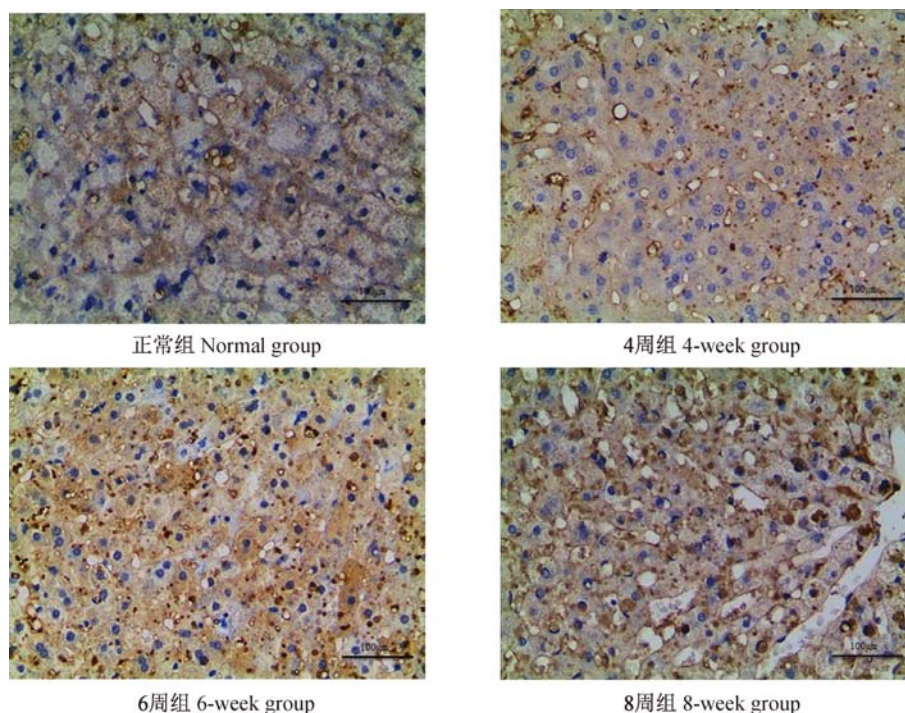
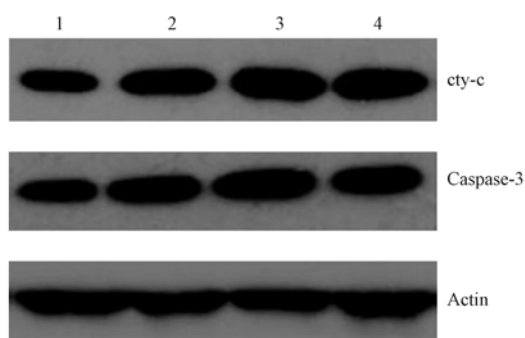


图 6 Caspase-3 在各组动物肝组织表达情况 (标尺 = 100 μm)

Fig. 6 Expression of caspase-3 in the liver tissue of NALFD rabbits. (Bar = 100 μm)



1 ~ 4 依次为正常组、4 周组、6 周组和 8 周组

图 7 Caspase-3 和细胞色素 C 蛋白的表达

Fig. 7 Expression of caspase-3 and cytochrome c proteins in each group of the rabbits.

行过程中起着重要作用。此外,在细胞凋亡过程中, MPTP 的异常开放可导致线粒体电子传递链和氧化磷酸化解耦联、ATP 衰竭、线粒体肿胀及内膜嵴消失,从而促使细胞色素 C 和相关凋亡诱导因子从线粒体释放至细胞质,活化凋亡蛋白家族的主要成员胱冬肽酶,触发瀑布式级联反应,诱导细胞凋亡^[12]。

本实验成功建立兔 NAFLD 模型,流式细胞术发现肝细胞凋亡指数与 NAFLD 模型中肝脏脂肪病变及炎症程度成正相关,随着脂肪肝程度以及肝细胞炎症、坏死的加重,其肝细胞凋亡指数显著增高,与

国外研究的结果相一致^[5,7]。MPTP 开放增加幅度与肝脏病变程度成正相关。免疫组化及 Western blot 显示 Bcl-2、Bax 蛋白在 NAFLD 肝细胞中的表达与正常对照组比较均有所增加,二者被诱导活化;但 Bax 较 Bcl-2 蛋白的表达量增加明显,Bcl-2/Bax 比值进行性降低。可推测 Bax 蛋白上调以及 Bcl-2/Bax 比例失调可能是 MPTP 开放、线粒体损伤,促使肝细胞凋亡的重要原因之一。另外,Caspase-3 和细胞色素 C 的表达量随 NAFLD 病程的发展而升高,提示 caspase-3 被激活以及由 MPTP 开放引起的细胞色素 C 的释放增加与非酒精性脂肪肝引起的肝细胞凋亡密切相关,参与了非酒精性脂肪肝的发生和发展。上述阐明了线粒体-细胞色素 C 途径在非酒精性脂肪肝兔肝细胞凋亡中的作用,为进一步探明 NAFLD 可能的发病机制,阻断 NAFLD 进展提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Farrell GC, Wong VWS, Chitturi S. NAFLD in Asia—as common and important as in the West [J]. Nature Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(5): 307.
- [2] Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem [J]. Clin Med, 2011, 11(2): 176–178.
- [3] 杨玉琴, 冯洁, 柏熊, 等. 东方田鼠非酒精性脂肪肝模型的

(下转第 23 页)

siRaf-1-1, 证实 RAF/NF- κ B 信号转导在心肌肥厚的过程中不仅有成纤维细胞增殖的参与, 心肌细胞肥大参与了此过程。

总之, Raf-1 腺病毒 siRNA 能有效抑制心肌肥大, 且其机制与下调 Raf-1 蛋白, 进而抑制 RAF/NF- κ B 信号转导有关, 通过在基因水平高选择性地阻断 Raf-1、NF- κ B 的药物也为治疗心肌肥大提供了新思路。

参考文献:

- [1] Robbs BK, Lucena PI, Viola JP. The transcription factor NFAT1 induces apoptosis through cooperation with Ras/Raf/MEK/ERK pathway and upregulation of TNF- α expression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(8): 2016–2028.
- [2] Lv C, Sun W, Sun H, et al. Asperolide A, a marine-derived tetranorditerpenoid, induces G2/M arrest in human NCI-H460 lung carcinoma cells, is mediated by p53-p21 stabilization and modulated by Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(2): 316–331.
- [3] Yamaguchi O, Watanabe T, Nishida K, et al. Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(7): 937–943.
- [4] Clerk A, Bogoyevitch MA, Andersson MB, et al. Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 32848–32857.
- [5] Lorenz K, Schmitt J P, Vidal M, et al. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2 signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(12): 2351–2355.
- [6] Pfeleiderer P, Sumandea MP, Rybin VO, et al. Raf-1: a novel cardiac troponin T kinase [J]. *J Muscle Res Cell Motil*. 2009, 30(1–2): 67–72.
- [7] 屈春生, 陈莉萍, 李道麟. 替米沙坦对大鼠心肌肥厚组织中 Raf/MEK/ERK 信号通路的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(11): 1344–1347.
- [8] Lee M, Kim JY, Anderson WB, et al. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 markedly enhances Ras-independent activation of Raf-1 protein kinase by phorbolmyristate acetate and H₂O₂ [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48692–48701.
- [9] Hamid T, Gu Y, Ortines RV, et al. Divergent tumor necrosis factor receptor related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappa B and inflammatory activation [J]. *Circulation*, 2009, 119: 1386–1397.
- [10] 祝文静, 刘畅, 孟林燕, 等. 核因子- κ B 和 caspase-3 在高糖诱导的心肌细胞代谢记忆中的表达 [J]. *广东医学*, 2012, 33: 323–325.
- [11] Wu M, Han M, Li J, et al. 17 β -estradiol inhibits angiotensin II induced cardiac myofibroblast differentiation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 616: 155–159.
- [12] Young D, Popovic ZB, Jones WK, et al. Blockade of NF-kappaB using I kappa B alpha dominant-negative mice ameliorates cardiac hypertrophy in myotrophin-overexpressed transgenic mice [J]. *J Mol Biol*, 2008, 381(3): 559–568.

[修回日期] 2016-02-22

(上接第 13 页)

- 建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(2): 34–39.
- [4] Daugherty EK, Balmus G, Saei AA, et al. The DNA damage checkpoint protein ATM promotes hepatocellular apoptosis and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(10): 1918–1928.
- [5] Cheng Q, Li N, Chen MQ, et al. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular apoptosis by interacting with TNF- α and IL-6 in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in rats [J]. *Digest Dis Sci*, 2013, 58(10): 2895–2902.
- [6] Kathirvel E, Morgan K, French SW, et al. Acetyl-L-carnitine and lipoic acid improve mitochondrial abnormalities and serum levels of liver enzymes in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nutrit Res*, 2013, 33(11): 932–941.
- [7] García RC, Baulies A, Mari M, et al. Mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: Cause or consequence? [J]. *Free Radical Res*, 2013, 47(11): 854–868.
- [8] 郑全喜, 王昆, 刘超. 非酒精性脂肪肝动物模型的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(1): 357–360.
- [9] 楼琦, 石巧娟, 郭红刚, 等. 非酒精性脂肪肝大鼠脂质代谢及病理变化的动态观察 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(3): 7–10.
- [10] 邓丽丽, 藏家娜, 应华忠, 等. 热休克蛋白 70 在兔非酒精性脂肪肝纤维化过程中的作用 [J]. *实验动物与比较医学*, 2014, 34(2): 107–111.
- [11] Thapaliya S, Wree A, Povero D, et al. Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model [J]. *Digest Dis Sci*, 2014, 59: 1197–1206.
- [12] Cavalcanti BC, Costa PM, Carvalho AA, et al. Involvement of intrinsic mitochondrial pathway in neosergeolide-induced apoptosis of human HL-60 leukemia cells: the role of mitochondrial permeability transition pore and DNA damage [J]. *Pharmaceut Biol*, 2012, 50(8): 980–993.

[修回日期] 2016-01-22