维生素 E 和硒对大鼠非酒精性脂肪性肝病解偶联蛋白 2 及相关因子表达的影响

王倩¹, 管小琴^{1,*}, 罗凯²

(1. 重庆医科大学 病理学教研室, 重庆 400016 2. 重庆医科大学 医学检验系, 重庆 400016)

摘要: 采用高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝病模型, 分别给予维生素 E、亚硒酸钠或两者合用干预 5 周, 检测血清中甘油三酯 (TG)、胆固醇 (TC)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 水平、丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 活力; 观察肝脏病理变化, 检测肝组织 UCP2 mRNA 与蛋白表达情况; 从而探讨维生素 E 和硒对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏解偶联蛋白 2(UCP2)及相关因子的影响。结果显示, 维生素 E 和硒两者合用组大鼠血清中 TG、TC 含量明显降低, SOD 活力升高显著, 肝组织中 UCP2 mRNA 与蛋白表达下调明显。上述结果表明维生素 E 和硒合用降低氧自由基和脂质过氧化物的生成, 下调 UCP2 表达水平的效果最好。

关键词: 脂肪肝; 亚硒酸盐; 维生素 E; 解偶联蛋白 2

中图分类号: Q566; Q955; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2008)01-0037-06

Influence of Vitamin E and Selenium on UCP2 and Other Correlation Factors in Non-alcoholic Fatty Liver of Rats

WANG Qian¹, GUAN Xiao-qin^{1,*}, LUO Kai²

(1. Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Forty male SD rats were randomly divided into five groups: normal, model, Vitamin E, Selenium and a combination group. Rats were fed with an improved high fat diet, but a different diet, with the addition of Vitamin E (250mg/kg diet), Selenite (0.5mg/kg diet) or both combined, was used in the intervention groups. All subjects were terminated at the end of the fifth week. Pathological changes in rat livers were observed. TG, TC, ALT, AST, MDA, SOD in serum and expression of UCP2 mRNA and protein in liver tissue were detected. We also studied the effects of Vitamin E and Selenium on UCP2 and other correlation factors on the rat model of non-alcoholic fatty liver. The results show the levels of TG, TC in the combination group decreased significantly, but the level of SOD activity increased. Expression of UCP2 mRNA and protein in rat liver tissue decreased. The conclusion we reached was that a combination of Vitamin E and Selenium lowers the levels of ROS, LPO and UCP2 expression, with beneficial results.

Key words: Fatty liver; Selenite; Vitamin E; Uncoupling protein-2

近年来的研究表明氧化应激损害是非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的一个重要致病因素, 由此提出干预治疗 NAFLD 的原则为有选择性的使用抗氧化剂, 恢复氧化应激和脂质过氧化-抗氧化损伤系统动态平衡 (Mitsuyoshi et al, 2006)。目前临床上常应用抗氧化剂预防和治疗 NAFLD, 硒和维生素 E 是其中两种重

要的抗氧化剂, 它们所具有的抗氧化作用正日益受到关注。大量实验或临床研究报告表明维生素 E 和硒这两种抗氧化剂具有显著的抗衰老、抗肿瘤、预防心血管疾病、提高机体免疫力等功能 (Yakaryilmaz et al, 2007; Macao et al, 2007; Kune et al, 2006); 国内外亦有文献显示维生素 E 和硒联合应用比单一应用能进一步提高机体的抗氧化能力 (Alvarado et al,

收稿日期: 2007-09-25; 接受日期: 2008-01-11

*通讯作者 (corresponding author), E-mail: guanxiaolin2003@yahoo.com.cn

第一作者简介: 王倩 (1980-), 女, 硕士, 研究方向: 肝胆病理。现在广州市中医医院病理科工作

2006); 但有关维生素E和硒对非酒精性脂肪肝的干预治疗作用的研究却少有报道。本实验参考相关文献确定给予非酒精性脂肪肝大鼠模型维生素E和硒的干预剂量(Fiskin et al, 2006), 通过给予维生素E和硒对非酒精性脂肪肝进行干预, 进一步探讨这两种抗氧化物质对非酒精性脂肪肝肝脏UCP2及相关因子表达水平的影响, 为这两种物质的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

40 只 7 周龄雄性 SD 大鼠, 体重 200—300 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 药品和试剂

维生素 E 片(厦门鱼肝油厂); 亚硒酸钠粉剂(分析纯)(北京市朝阳区中联化工试剂厂); 超氧化物歧化酶试剂盒, 丙二醛试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; Trizol 试剂购自上海生工生物工程技术服务有限公司; RT-PCR 试剂盒购自大连 TakaRa 试剂公司; 兔抗大鼠 UCP2 多克隆抗体、SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司;

1.3 动物模型的制备

参照国内外文献对常规高脂饲料进行改良(Ai et al, 2005), 在加入猪油、胆固醇的基础上再加入 0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶和 5%蔗糖。

1.4 动物的分组及标本的采集

将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、维生素 E 组、硒组、维生素 E 加硒组, 每组各 8 只。正常组给予基础饲料喂养, 模型组给予改良高脂饲料喂养, 其他 3 组除给予改良高脂饲料喂养外分别同时给予维生素 E 250 mg/kg 饲料; 亚硒酸钠 0.5 mg/kg 饲料; 维生素 E 250 mg/kg 饲料加亚硒酸钠 0.5 mg/kg 饲料, 同一饲养环境下喂养 5 周。大鼠处死前摘除眼球取血, 断颈处死大鼠即刻打开腹腔, 从肝右叶中部切取肝组织, 其中一部分液氮保存备用, 剩余部分福尔马林固定做常规光镜观察。

1.5 指标检测

1.5.1 生化指标的检测 使用美国康宁全自动生化仪检测大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)。另用比色法检测血清中 SOD 活力和 MDA 含量。

1.5.2 肝脏病理学观察 肉眼观察鼠肝脏的形态、

体积及颜色变化; 肝组织石蜡切片作 HE 染色, 冰冻切片作苏丹 IV 染色, 光镜下进行一般形态学观察。对肝细胞内经苏丹 IV 染色证实的脂质空泡进行分级。分级标准(The Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease Group of Hepatopathy Branch of Chinese Medical Association, 2002)如下: 胞浆内脂质空泡占肝小叶 1/3—1/2 为轻度脂肪肝, 用+表示; 占肝小叶 1/2—2/3 为中度脂肪肝, 用++表示; 占肝小叶 2/3 以上者或肝细胞弥漫脂肪变性为重度脂肪肝, 用+++表示。

1.5.3 UCP2 的 RT-PCR 检测 ①总 RNA 提取: 从液氮内取出 100 mg 肝脏组织, 加入 1 mL Trizol, 彻底匀浆, 提取总 RNA, -70℃冰箱保存待检。

②引物合成: 由 GenBank 获得 UCP2 mRNA 序列(AB006613), 应用 Primer5.0 软件设计 UCP2 的 RT-PCR 引物, 将引物在 Genbank 中进行同源性比对。引用参考文献 β -actin 引物(Fan et al, 2005)。引物设计完成后交大连 TakaRa 公司合成。

UCP2 引物序列: 上游 5' -GACGACCTCCCT-TGCCACTT-3', 下游 5' -AGGAAGGAAGGCAT-GAACCC-3', 扩增子大小为 200 bp; β -actin 引物序列: 上游: 5' -AACCCTAAGGCCAACCGTGAA-AAG-3', 下游: 5' -TCATGAGGTAGTCTGTCTCAG-GT-3', 扩增子大小为 241 bp。

③RT-PCR: 将总 RNA 逆转录为 cDNA、PCR 扩增 cDNA、琼脂糖电泳检测扩增产物、凝胶扫描成像, 通过 Quantity one 图像分析软件读取目的电泳条带的斑点光密度扫描值, 以相应标本的 UCP2 斑点光密度值除以内参照 β -actin 斑点光密度值, 两者的比值作为标本 mRNA 的表达水平值。

β -actin PCR 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 45 s, 56℃ 45 s, 72℃ 45 s, 40 个循环; 72℃ 10 min。

UCP2 PCR 反应条件: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环; 72℃ 7 min。

1.5.4 UCP2 的免疫组织化学检测 肝组织中 UCP2 蛋白免疫组化染色阳性表现为肝细胞胞浆显示棕黄色颗粒。采用成都金盘电子科大多媒体技术有限公司 GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统进行 UCP2 蛋白表达范围及程度的分析。

1.6 统计学处理

所有数据均使用 SPSS11.5 软件包进行统计学分析。计量资料用平均数加减标准差($\bar{X} \pm SE$)的形式表示, 正常组和模型组之间进行两样本均数比

较，采用 t 检验（正态分布）或 Wilcoxon 秩和检验（非正态分布）；模型组和 3 个干预组之间采用析因设计资料的方差分析；其中维生素 E 加硒组与模型组之间的比较采用 Dunnett's t 检验的方法；计数资料的假设检验用 Kruskal—Wallis 秩和检验。

2 结 果

2.1 VitE 和 Se 对非酒精性脂肪肝大鼠血清 SOD 活力和 MDA 含量的影响

与正常组比，模型组大鼠血清 MDA 含量升高，SOD 活力明显降低($P<0.05$)；对模型组和其余 3 个干预组进行析因方差分析，结果显示：维生素 E 和硒对 SOD 活力的影响具有协同作用 ($P<0.05$)，与模型组比，维生素 E 组 SOD 活力无明显变化($P>0.05$)，而硒组和维生素 E 加硒组 SOD 活力显著增高 ($P<0.05$)；维生素 E 和硒对 MDA 含量的影响不具有协同作用 ($P>0.05$)，与模型组比，维生素 E 组和硒组 MDA 含量无明显变化($P>0.05$)，而维生素 E 加硒组 MDA 含量有所降低 ($P<0.05$)；见表 1。

2.2 VitE 和 Se 对非酒精性脂肪肝大鼠血清丙氨酸转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇(TC)的影响

与正常组比，模型组大鼠血清 AST、TG、TC、ALT 水平均有明显的升高 ($P<0.05$)。方差分析结果显示：维生素 E 和硒对 AST、ALT 水平变化不具有协同作用 ($P>0.05$)，与模型组比，硒组、维生

素 E 组和维生素 E 加硒组 ALT、AST 均无明显变化($P>0.05$)；维生素 E 和硒对 TG、TC 水平变化具有协同作用 ($P<0.05$)，与模型组比，硒组和维生素 E 组 TG、TC 水平无明显变化($P>0.05$)，而硒组加维生素 E 组 TG、TC 水平有显著降低 ($P<0.05$)，见表 2。

2.3 肝脏的病理改变

2.3.1 肉眼观察 模型组大鼠肝脏体积增大，约为正常组大鼠肝脏体积的 2 倍，包膜稍紧张，边缘圆钝，呈淡黄色，有油腻感。维生素 E 组大鼠肝脏体积增大，约为正常组大鼠肝脏体积的 1.5 倍，呈黄色；硒组大鼠肝脏体积介于正常组和维生素 E 组大鼠体积之间，表面可见红色斑点；而维生素 E 加硒组肝脏颜色、体积接近正常组大鼠肝脏。

2.3.2 光镜观察 与正常组比，模型组肝细胞内均可见弥漫性空泡，小叶内见少量的淋巴细胞，未见明显坏死灶及肝纤维化；与模型组比，维生素 E 组和硒组大鼠肝细胞内可见少量脂滴；硒加维生素 E 组大鼠的肝细胞脂肪变性程度有改善，炎症细胞浸润不明显，无坏死和纤维化病变。对各组的脂肪变性程度进行分级，并经统计学分析显示硒组和维生素 E 加硒组大鼠脂肪变性程度有所改善($P<0.05$)，见表 3。

2.4 VitE 和 Se 对非酒精性脂肪肝大鼠肝组织 UCP2 mRNA 表达的影响

扩增产物电泳结果见图 1，其光密度值分析结

表 1 大鼠血清的 SOD 活力和 MDA 含量($\bar{X}\pm S$)
Tab. 1 The content of MDA and energy of SOD in rat serum ($\bar{X}\pm S$)

组别 Group	例数 Number	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)
正常组 Normal group	8	714.48±161.21	5.89±1.05
模型组 Model group	8	312.83±48.81 [*]	13.40±4.24 [*]
维生素 E 组 Vitamin E group	8	356.03±69.65 ^a	12.83±2.45 ^a
硒组 Selenium group	8	393.78±42.96 ^b	12.46±0.65 ^a
维生素 E+硒组 Combination group	8	525.23±75.52 ^b	8.01±1.78 ^b

与正常组比，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比，^a $P>0.05$ ，^b $P<0.05$ 。
^{*} $P<0.05$ vs normal group; ^a $P>0.05$, ^b $P<0.05$ vs model group.

表 2 大鼠血清 ALT、AST、TG、TC 含量($\bar{X}\pm S$)
Tab. 2 The content of ALT、AST、TG and TC in rat serum ($\bar{X}\pm S$)

组别 Group	例数 Number	ALT (U/L)	AST (U/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
正常组 Normal group	8	70.88±2.27	201.84 ±25.87	0.72 ±0.12	1.71 ±0.03
模型组 Model group	8	91.10±11.16 [*]	209.85±14.98 [*]	1.28±0.61 [*]	12.78±1.47 [*]
硒组 Selenium group	8	81.44±8.90 ^a	203.71±10.20 ^a	1.23±0.04 ^a	10.76±8.83 ^a
维生素 E 组 Vitamin E group	8	82.88±14.80 ^a	197.23±10.37 ^a	1.26±0.01 ^a	12.14±1.52 ^a
维生素 E+硒组 Combination group	8	84.68±14.49 ^a	196.99±9.20 ^a	0.76±0.11 ^b	5.95±2.46 ^b

与正常组比，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比，^a $P>0.05$ ，^b $P<0.05$ 。
^{*} $P<0.05$ vs normal group; ^a $P>0.05$, ^b $P<0.05$ vs model group.

果示：与正常组比，模型组肝组织 UCP2 mRNA 表达强度明显增高($P<0.05$)。析因方差分析结果显示：维生素 E 和硒对 UCP2 mRNA 表达强度具有协同作用 ($P<0.05$)；与模型组比，硒组、维生素 E 组和维生素 E 加硒组 UCP2 mRNA 表达强度均显著降低 ($P<0.05$) (见表 4)。

2.5 VitE 和 Se 对大鼠肝组织 UCP2 蛋白表达水平的影响

UCP2 蛋白免疫组化染色显示正常组大鼠肝细胞呈阴性表达；模型组大鼠中阳性细胞多，呈弥漫性分布，与肝细胞脂变的严重程度和分布相一致；维生素 E 组与硒组大鼠中阳性细胞亦呈弥漫性分布，但表达强度有减弱；而维生素 E 加硒组大鼠中阳性细胞数目少，主要表达在少数几个肝细胞内，见图 2。采用病理影像多媒体图文操作系统进行图像分析，其结果显示与正常组比，模型组 UCP2 蛋白表达强度明显上调($P<0.05$)；析因方差分析结果显示：维生素 E 和硒对 UCP2 蛋白表达水平具有协同作用 ($P<0.05$)，与模型组比，硒组和维生素 E 组 UCP2 蛋白表达水平无明显变化($P>0.05$)，而维生素 E 加硒组 UCP2 蛋白的表达水平显著降低($P<0.05$)，见表 5。

3 讨 论

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 的确切发病机

表 3 大鼠脂肪变性程度
Tab. 3 The degrees of steatosis in rats

	0	+	++	+++
正常组 Normal group	8	0	0	0
模型组 Model group	0	1	2	5
维生素 E 组 Vitamin E group	0	3	4	1
硒组 Selenium group ^b	0	5	3	0
维生素 E+硒组 Combination group ^b	0	4	3	1

与模型组比，^b $P<0.05$ (^b $P<0.05$ vs model group)。

表 4 UCP2mRNA 表达水平的变化 ($X\pm S$)
Tab. 4 The changes of expression of UCP2mRNA ($X\pm S$)

组别 Group	例数 Number	UCP2/ β -actin
正常组 Normal group	8	0.37 $\pm$ 0.06
模型组 Model group	8	0.83 $\pm$ 0.08 [*]
维生素 E 组 Vitamin E group	8	0.64 $\pm$ 0.03 ^b
硒组 Selenium group	8	0.61 $\pm$ 0.02 ^b
维生素 E+硒组 Combination group	8	0.51 $\pm$ 0.07 ^b

与正常组比，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比，^b $P<0.05$ 。

^{*} $P<0.05$ vs normal group；^b $P<0.05$ vs model group。

表 5 UCP2 蛋白面积积分光密度值表达 ($X\pm S$)
Tab. 5 The expression of area integral optical densities of UCP2 protein ($X\pm S$)

组别 Group	例数 Number	UCP2 (AIOD/ μm^2)
正常组 Normal group	8	0
模型组 Model group	8	0.11 $\pm$ 0.02 [*]
维生素 E 组 Vitamin E group	8	0.10 $\pm$ 0.03 ^a
硒组 Selenium group	8	0.08 $\pm$ 0.06 ^a
维生素 E+硒组 Combination group	8	0.02 $\pm$ 0.01 ^b

与正常组比，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比，^a $P>0.05$ ，^b $P<0.05$ 。

^{*} $P<0.05$ vs normal group；^a $P>0.05$ ；^b $P<0.05$ vs model group。

制目前尚不清楚，但“二次打击学说”较为流行。该学说认为胰岛素抵抗可导致肝脏脂肪沉积，为 NAFLD 发病机制的一次打击；在肝脏脂肪沉积的基础上发生的氧应激和脂质过氧化则为二次打击。

氧应激损害的具体作用机制为：两个恶性循环。活性氧簇 (ROS) 能损伤线粒体呼吸链，而呼吸链的任何部位被阻断均可增加 ROS 的产生，增加的 ROS 进一步增加氧化性脂质沉积，引起更多的脂质过氧化，抑制呼吸链的电子传递，形成一个恶性循环。另一个恶性循环是抗氧化物质的消耗，脂肪变性导致的脂质过氧化和 ROS 能消耗超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 和维生素 E 等抗氧化物质，这些保护性物质的消耗增强了 ROS 对线粒体的损害效应(Petrosillo et al, 2007; Mehta et al, 2002)。

另外，线粒体是细胞 ATP 合成和活性氧生成的主要部位。UCP2 是 1997 年发现的一种位于线粒体内膜上的载体蛋白，起质子通道作用，在解耦联状态下， H^+ 通过 ATP 合成旁路从线粒体膜外重新进入膜内，从而消除跨膜质子电化学梯度，使线粒体氧化磷酸化解耦联，阻止线粒体呼吸时将能量合成 ATP(Rousset et al, 2007)。

有研究表明 NAFLD 时脂肪变的肝细胞 UCP2 表达增强，并可能与高脂饮食、游离脂肪酸增多、过氧化酶体增殖物激活受体 γ 活化，氧化应激增强，内毒素血症，以及肿瘤坏死因子增多等诸多因素密切相关 (Collins et al, 2005; Baffy et al, 2002; Horimoto et al, 2004)；如 Lee et al(1999)将小鼠肝脏部分切除，发现术后肝细胞线粒体产物 H_2O_2 迅速增加，随后引起 UCP2 表达上升，提示活性氧可以诱导肝细胞 UCP2 表达。目前，UCP2 在 NAFLD

图 1 正常组与模型组、干预组 UCP2 mRNA 表达的 RT-PCR 检测结果
Fig. 1 RT-PCR products of UCP2 mRNA of normal group、model group and intervention groups

Lane 1, 2 (Normal group): 1-UCP2, 2-β-actin; Lane 3, 4 (Model group): 3-UCP2, 4-β-actin; Lane 5, 6 (Vitamin E group): 5-UCP2, 6-β-actin; Lane 7, 8 (Selenium group): 7-UCP2, 8-β-actin; Lane 9, 10 (Combination group): 9-UCP2, 10-β-actin.

图 2 UCP2 免疫组化染色
Fig. 2 Immunohistochemical of UCP2

A: 正常组; B: 模型组; C: 维生素 E 组; D: 硒组; E: 维生素 E 加硒组(SABC×400)。
A: Normal group; B: Model group; C: Vitamin E group; D: Selenium group; E: Combination group (SABC×400).

中的作用尚无定论，Cheng et al(2003)认为 NAFLD 时肝脂肪变化及其相关改变导致 UCP2 表达增强时，可通过影响肝内能量贮备等途径使肝细胞对坏死的敏感性增加，从而促进非酒精性脂肪性肝病的发生和发展。由此，补充抗氧化物质，减少 ROS 和 LPO 的生成，下调肝脏 UCP2 表达，是寻找有效防治 NAFLD 措施的新的突破口。

本实验分析结果显示采用改良高脂饲料 5 周可成功建立大鼠非酒精性脂肪肝模型；并提示非酒精性脂肪肝病的发生发展与氧应激和脂质过氧化物损伤的程度以及 UCP2 表达水平的上调有关。

同时，本实验采用维生素 E 和硒两种抗氧化物质对大鼠非酒精性脂肪肝进行干预，维生素 E 通过清除氧自由基或干扰氧化物链反应来阻止氧化反

应，保护脂质膜免遭自由基攻击，是最重要的脂溶性断链型抗氧化剂；硒作为人体必需的微量元素，具有直接清除自由基的作用；另外，它还是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的重要组成成分；GSH-Px 能催化脂质过氧化物转化为细胞毒性较小的醇类，硒通过增加 GSH-Px 活性，促进脂质过氧化物分解而起抗氧化作用。硒在保护细胞膜免受氧化方面，对维生素 E 起着补偿和协调的作用。硒还可通过谷胱甘肽过氧化物的不同功能，防御缺乏维生素 E 对肝脏的损害。所以硒和维生素 E 在抗氧化中起着协同作用(Bjelakovic et al, 2007)。本实验研究亦证实这一点。

本实验结果显示：单用维生素 E 对恢复 SOD 活力无明显影响，而与硒共同使用时效果明显；单

用维生素 E 或硒对改善血清 TG、TC 高水平亦无明显作用,但两者合用能有效降低血清中 TG、TC 水平;结果亦表明维生素 E 和硒两者合用使肝组织中 UCP2 mRNA 表达强度和肝组织 UCP2 蛋白表达水平显著下降;同时病理形态学观察结果表明两者合

用减轻肝细胞脂肪变性的效果更佳。以上研究结果均提示硒和维生素 E 两者合用对非酒精性脂肪肝病的防治具有协同作用,为临床干预治疗 NAFLD 的进一步研究提供了可靠的实验依据和更广阔的前景。

参考文献:

- Ai J, Wang N, Yang M, Zhang YC, Yang BF. 2005. Development of wistar rat model of insulin resistance[J]. *World J Gastroenterology*, **11**(24): 3675-3679.
- Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, Gausserès N, Jiménez L, De la Fuente M. 2006. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice[J]. *Nutrition*, **22**(7): 767-77.
- Baffy G, Zhang CY, Glickman JN, Lowell BB. 2002. Obesity-related fatty liver is unchanged in mice deficient for mitochondrial uncoupling protein 2[J]. *Hepatology*, **35**(4): 753-61.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. 2007. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: Systematic review and meta-analysis[J]. *The Journal of the American Medical Association*, **297**(8): 842-57.
- Collins P, Jones C, Choudhury S, Damelin L, Hodgson H. 2005. Increased expression of uncoupling protein 2 in HepG2 cells attenuates oxidative damage and apoptosis[J]. *Liver Int*, **25**(4): 880-7.
- Cheng G, Polito CC, Haines JK, Shafizadeh SF, Fiorini RN, Zhou X, Schmidt MG, Chavin KD. 2003. Decrease of intracellular ATP content downregulated UCP2 expression in mouse hepatocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **308**(3): 573-80.
- Fiskin K, Ozkan A, Ayhan AG, Fiskin K, Ozkan A, Ayhan AG. 2006. Investigation of protective effects of selenium and vitamin E against DNA oxidation, membrane damage and alteration of COMT metabolism in smoke-exposed male mice (*Mus musculus*, Balb/c)[J]. *Acta Biologica Hungarica*, **57**(4): 403-13.
- Fan JG, Ding XD, Wang GL, XU ZJ, Tian LY, Zhen XY. 2005. Expression of uncoupling protein 2 and its relationship to the content of adenosine triphosphate in the nonalcoholic fatty livers of rats fed a high-fat diet[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, **13**(5): 374-377.[范建高, 丁晓东, 王国良, 徐正婕, 田丽艳, 郑晓英. 2005. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏解偶联蛋白 2 表达及其与能量贮备的关系. 中华肝脏病杂志, **13**(5): 374-377.]
- Horimoto M, Fülöp P, Derdák Z, Wands JR, Baffy G. 2004. Uncoupling protein-2 deficiency promotes oxidant stress and delays liver regeneration in mice[J]. *Hepatology*, **39**(2): 386-92.
- Kune G, Watson L. 2006. Colorectal cancer protective effects and the dietary micronutrients folate, methionine, vitamins B6, B12, C, E, selenium, and lycopene[J]. *Nutrition and Cancer*, **56**(11): 11-21.
- Lee FY, Li Y, Zhu H, Yang S, Lin HZ, Trush M, Diehl AM. 1999. Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver[J]. *Hepatology*, **29**(3): 677-8.
- Mitsuyoshi H, Itoh Y, Okanoue T. 2006. Role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Japanese Journal of Clinical Medicine*, **64**(6): 1077-82.
- Macao LB, Filho DW, Pedrosa RC, Macao LB, Filho DW, Pedrosa RC, Pereira A, Backes P, Torres MA, Fröde TS. 2007. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease[J]. *International Journal of Cardiology*, **26**(2): 24-28.
- Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. 2002. Nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and the role of antioxidants[J]. *Nutr Rev*, **60**(9): 289-93.
- Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Ferri D, Paradies G. 2007. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin[J]. *Biochim Biophys Acta*, **1767**(10): 1260-7.
- Rousset S, Mozo J, Dujardin G, Emre Y, Masscheleyn S, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM. 2007. UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life[J]. *FEBS Letters*, **581**(3): 479-82.
- The Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease Group of Hepatopathy Branch of Chinese Medical Association. 2002. Diagnostic criteria of nonalcoholic fatty liver disease (protocol) [J]. *Modern Practical Medicine*, **14**(2): 100.[中华医学会肝病分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 2002. 非酒精性脂肪肝诊断标准(草案). 现代实用医学, **14**(2): 100.]
- Yakaryilmaz F, Guliter S, Savas B, Erdem O, Ersoy R, Erden E, Akyol G, Bozkaya H, Ozenirler S. 2007. Effects of vitamin E treatment on peroxisome proliferator-activated receptor- α expression and insulin resistance in patients with non-alcoholic steatohepatitis: Results of a pilot study[J]. *Internal Medicine Journal*, **37**(4): 229-35.