

联合使用表没食子儿茶素没食子酸酯、牛磺酸和三羟基异黄酮对大鼠酒精性肝纤维化的保护作用

谭实美¹, 黄权芳², 韦玲¹, 卓朗¹, 廖明¹, 林兴^{1*}

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

[摘要] **目的:**研究联合使用表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG),牛磺酸(taurine)和三羟基异黄酮(genistein)对大鼠酒精性肝纤维化的保护作用及其作用机制。**方法:**Wistar 雄性大鼠随机分成6组即正常组,模型组,秋水仙碱组(0.5 mg·kg⁻¹),联合用药低剂量15.625 mg·kg⁻¹组(牛磺酸12.5 mg·kg⁻¹+EGCG 1.875 mg·kg⁻¹+三羟基异黄酮1.25 mg·kg⁻¹),中剂量31.25 mg·kg⁻¹组(牛磺酸25 mg·kg⁻¹+EGCG 3.75 mg·kg⁻¹+三羟基异黄酮2.5 mg·kg⁻¹),高剂量62.5 mg·kg⁻¹组(牛磺酸50 mg·kg⁻¹+EGCG 7.5 mg·kg⁻¹+三羟基异黄酮5 mg·kg⁻¹)。除正常组外,其余各组ig乙醇5.0~9.5 g·kg⁻¹,正常组ig给予等量生理盐水,每天1次,连续24周。末次给药24 h后,取血,处死大鼠,采集肝组织;检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),谷氨酰转氨酶(GGT),透明质酸(HA),层黏连蛋白(LN)和三型前胶原(PCⅢ)水平的变化,检测肝组织中丙二醛(MDA),羟脯氨酸(Hyp),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),超氧化物歧化酶(SOD),采用免疫组化法检测各组肝组织中α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA),转化生长因子-β₁(TGF-β₁)及人母亲DPP同源物3(Smad3)蛋白表达情况,同时做组织学检查,观察肝组织的病理变化。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠ALT,AST,ALP,GGT,MDA,Hyp,HA,LN,PCⅢ,α-SMA,TGF-β₁和Smad3显著升高(P<0.05),SOD和GSH-Px显著降低(P<0.05);与模型组相比,联合用药可显著降低ALT,AST,ALP,GGT,MDA,Hyp,HA,LN,PCⅢ,α-SMA,TGF-β₁和Smad3的表达(P<0.05),显著升高SOD和GSH-Px的活性(P<0.05)。**结论:**联合使用表没食子儿茶素没食子酸酯、牛磺酸和三羟基异黄酮对乙醇所致的大鼠肝纤维化具有一定的保护作用,其机制可能与加快自由基清除,减轻脂质过氧化损伤,下调α-SMA,TGF-β₁,Smad3表达有关。

[关键词] 联合用药;表没食子儿茶素没食子酸酯;牛磺酸;三羟基异黄酮;肝纤维化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0101-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230101

Protective Effect of Compounds of Taurine, Epigallocatechin-3-gallate and Genistein on Hepatic Fibrosis Induced by Alcohol in Rats TAN Shi-mei¹, HUANG Quan-fang², WEI Ling¹, ZHUO Lang¹, LIAO Ming¹, LIN Xing^{1*} (1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of the compounds of taurine, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and genistein on chronic alcohol-induced hepatic fibrosis, and to explore its underlying mechanism. **Method:** Wistar male rats were randomly divided into six groups: normal group, model group, colchicine group, combination therapy low (taurine 12.5 mg·kg⁻¹+EGCG 1.875 mg·kg⁻¹+genistein 1.25 mg·kg⁻¹), middle (taurine 25 mg·kg⁻¹+EGCG 3.75 mg·kg⁻¹+genistein 2.5 mg·kg⁻¹) and high (taurine 50 mg·kg⁻¹+EGCG 7.5 mg·kg⁻¹+genistein 5 mg·kg⁻¹) dose group. The rats except normal group were established by intragastric administration of alcohol (5.0-9.5 g·kg⁻¹) once a day for 24 weeks and the normal group were given normal saline. Twenty-four hours after the last administration of drugs, all rats were killed, and the hepatic tissue were taken. The contents of hydroxyproline (Hyp), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) in hepatic tissue and serum biochemical indicators were measured, as well as the related key cytokines/

[收稿日期] 20150423(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260674);广西自然科学基金项目(2013GXNSFAA019146,2014GXNSFAA118155)

[第一作者] 谭实美,硕士研究生,从事生化药理学研究,Tel:0771-5358342,E-mail:15296570735@163.com

[通讯作者] *林兴,教授,硕士生导师,从事生化药理学研究,Tel:0771-5358342,E-mail:gxLx60@163.com

proteins. The damage of liver tissues was observed by light microscope. **Result:** Compared with normal group, the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyl transpeptidase (GGT), MDA, Hyp, hyaluronic acid (HA), laminin (LN), collagen type III (PC III), α -smooth muscle actin (α -SMA), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and mothers against decapentaplegic homolog 3 (Smad3) increased ($P < 0.05$) and SOD, glutathione peroxidase (GSH-Px) decreased significantly ($P < 0.05$) in model group; compared with model group, the levels of ALT, AST, ALP, GGT, MDA, Hyp, HA, LN, PC III, α -SMA, TGF- β_1 and Smad3 decreased ($P < 0.05$) and SOD, GSH-Px increased significantly ($P < 0.05$) in combination therapy group. **Conclusion:** The compounds of taurine, EGCG and genistein can relieve chronic hepatic fibrosis induced by alcohol. Its mechanism may involve scavenging free radica, alleviating the lipid peroxidation, inhibiting the expression of α -SMA, TGF- β_1 and Smad3.

[Key words] combination therapy; epigallocatechin-3-gallate; taurine; genistein; hepatic fibrosis

肝纤维化是指由各种致病因子所致肝内结缔组织异常增生,导致肝内弥漫性细胞外基质过度沉积的病理过程^[1]。目前许多药物抗纤维化作用靶位单一,抗肝纤维化疗效并不理想,因此,将肝纤维化发生发展不同环节、靶点的药物联合应用可能是抗肝纤维化药物研究的新方向。相关文献报道^[2],抗肝纤维化药物的联合应用具有诸多优点,首先作用于肝纤维化不同环节的药物联合应用能更有效地阻断肝纤维化的发展,达到比任何单一药物更好的肝保护作用,其次,联合用药可以减少单一药物的有效剂量,降低与药物剂量相关的不良反应。许多研究发现,表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)可以显著增强机体的抗氧化能力,能够降低肝脏中四氯化碳(CCl_4)诱导的肝炎、氧化应激及纤维化作用,其作用机制是降低了致炎因子及纤维化调节因子的转录表达^[3];牛磺酸(taurine)能促进造血干细胞(HSC)的凋亡,抑制转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的表达和阻断 TGF- β_1 /Smad 信号通路;三羟基异黄酮(genistein)作为酪氨酸激酶抑制剂,可抑制肝纤维化大鼠肝窦内皮细胞的增殖。有报道^[4],联合使用表没食子儿茶素没食子酸酯、牛磺酸和三羟基异黄酮对肝纤维化大鼠的肝脏起保护作用,与单一药相比更能降低 TGF- β_1 , I, III 型胶原和组织金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)的表达,可能具有更高的抗肝纤维化能力。本实验拟采用乙醇诱导大鼠肝纤维化模型,进一步观察联合使用表没食子儿茶素没食子酸酯、牛磺酸和三羟基异黄酮对酒精性肝纤维化的保护作用及其可能机制。

1 材料

1.1 试剂 牛磺酸(批号 M11111601),三羟基异黄酮(批号 M11111601),均为上海迈瑞尔化学技术有限公司产品,表没食子儿茶素没食子酸酯(四川禹伽茶

业科技开发有限公司,批号 TP1110001P),秋水仙碱(美国 Sigma 公司,批号 TC9754),丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20130914),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20130914),丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒(批号 20130914),天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(批号 20130914),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(批号 20130914),谷氨酰转移酶(GGT)试剂盒(批号 20130914),谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)试剂盒(批号 20130914),均为南京建成生物工程研究所产品;透明质酸(HA)试剂盒(批号 fr-001),层黏连蛋白(LN)试剂盒(批号 fr-001),III 型前胶原(PC III)试剂盒(批号 fr-001),羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(批号 fr-001),均为北京福瑞生物工程研究公司产品;大鼠单克隆抗体 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA,批号 sc-324317),兔抗大鼠多克隆抗体 TGF- β_1 (批号 sc-324317),兔抗大鼠多克隆抗体 Smad3(批号 sc-324317),碱性磷酸酶(ALP)标记的山羊抗小鼠-IgG 抗体(批号 sc-324317),均为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.2 动物 Wistar 雄性大鼠,SPF 级,体重(180 \pm 10) g,由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(桂)2009-0003。

1.3 仪器 EG1150 型病理组织包埋机(上海莱卡仪器有限公司),S10 型手持式高速匀浆机(上海川翔生物科技有限公司),5810R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),MK3 型免疫检测仪(美国 Thermo 公司),CKX41 型显微镜(日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 动物造模及分组 Wistar 雄性大鼠随机分成正常组,模型组,秋水仙碱组(0.5 $mg \cdot kg^{-1}$, ig),联合用药(牛磺酸,EGCG,三羟基异黄酮比例为 10:1.5:1)低、中、高剂量(15.625,31.25,62.5 $mg \cdot kg^{-1}$ ig)组,分组给药同时除正常组外,其余各组分别 ig 乙醇

5.0 ~ 9.5 g · kg⁻¹, 正常组 ig 等量生理盐水, 每天 1 次, 连续 24 周。末次给药后, 禁食过夜, 盐酸氯胺酮麻醉, 腹主动脉采血, 分离血清备用, 处死大鼠, 取其肝组织, 做病理学检查和指标检测。

2.2 观察指标

2.2.1 大鼠血清 ALT, AST, ALP 和 GGT 的测定 大鼠血清中 ALT, AST, ALP 和 GGT 均严格按照试剂盒说明书进行检测。

2.2.2 大鼠肝组织 SOD, GSH-Px, MDA, Hyp 的测定 大鼠肝组织冰上匀浆, 1 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 上层清液按照试剂盒说明书进行 SOD, GSH-Px 检测, MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定。以牛血清蛋白为标准, 采用 Bradford 试剂法测定 Hyp 含量。

2.2.3 大鼠血清 HA, PC III, LN 的测定 血清 HA, PC III 和 LN 检测采用 ELISA 法测定, 按照试剂盒说明书进行操作。

2.2.4 检测肝组织 α-SMA, TGF-β₁ 及 Smad3 的表达 取肝组织, 加蛋白裂解缓冲液和 EDTA 制备肝组织匀浆, 以牛血清蛋白标准液进行蛋白定量, 取 60 μg 总蛋白, 采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 经电转至硝化纤维膜, 加入封闭液封闭 1 h, 然后分别加入大鼠单克隆抗体 α-SMA, 兔抗大鼠多克隆抗体

TGF-β₁, 兔抗大鼠多克隆抗体 Smad3 及山羊多克隆抗体 β-actin(内参), 4 °C 孵育过夜, TTBS 洗 3 次, 每次 5 min, 然后加入碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠-IgG 抗体(1:5 000) 孵育 1 h, 最后加 ECL 发光剂于暗室充分反应后用胶片曝光, 吸光度 A 扫描检测蛋白的表达, 并使用图像分析系统进行定量。

2.2.5 病理学检查 部分肝组织经 10% 碳酸盐缓冲液的福尔马林溶液固定, 石蜡包埋, 做常规组织切片, 厚度为 5 μm, 苏木素和伊红(HE)染色观察。

2.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经方差齐性检验, 方差齐者采用 *t* 检验, 方差不齐者采用校正 *t* 检验进行统计处理, *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 联合用药对大鼠死亡率, 血清 ALT, AST, ALP 和 GGT 含量的影响 实验结束时, 正常组无死亡, 秋水仙碱组死亡 5 只, 联合用药低剂量组死亡 6 只, 中剂量组死亡 4 只, 高剂量组死亡 2 只。与正常组比较, 模型组大鼠血清 ALT, AST, ALP, GGT 活性显著升高 (*P* < 0.05); 与模型组比, 秋水仙碱组和联合用药中、高剂量组中 4 种酶的活性显著降低 (*P* < 0.05), 见表 1。

表 1 联合用药对大鼠血清中 ALT, AST, ALP 和 GGT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of combination therapy on serum ALT, AST, ALP and GGT of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	<i>n</i>	死亡率/%	AST/U · L ⁻¹	ALT/U · L ⁻¹	ALP/U · L ⁻¹	GGT/U · L ⁻¹
正常	-	15	0	109.6 ± 18.6	56.2 ± 8.7	126.3 ± 23.6	8.69 ± 0.98
模型	-	8	46.7 ¹⁾	279.8 ± 37.9 ¹⁾	163.5 ± 41.2 ¹⁾	310.5 ± 49.8 ¹⁾	19.68 ± 1.86 ¹⁾
秋水仙碱	0.5	10	33.4 ²⁾	108.5 ± 29.8 ²⁾	115.1 ± 26.5 ²⁾	223.6 ± 33.2 ²⁾	13.84 ± 1.24 ²⁾
联合用药	15.625	9	40	263.7 ± 38.1	147.4 ± 38.6	268.9 ± 43.9	17.91 ± 1.31
	31.25	11	26.7 ²⁾	218.5 ± 32.9 ²⁾	120.8 ± 30.4 ²⁾	208.9 ± 35.2 ²⁾	12.57 ± 1.09 ²⁾
	62.5	13	13.3 ²⁾	140.8 ± 33.4 ²⁾	90.7 ± 11.3 ²⁾	186.7 ± 31.8 ²⁾	10.28 ± 1.16 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05; 与模型组比较²⁾ *P* < 0.05 (表 2 ~ 5 同)。

3.2 联合用药对大鼠肝组织 SOD, GSH-P 活性, MDA 和 Hyp 含量的影响 与正常组相比, 模型组大鼠肝组织 SOD, GSH-Px 活性显著降低 (*P* < 0.05), MDA Hyp 含量显著升高 (*P* < 0.05)。与模型组相比, 秋水仙碱和联合用药各剂量组均可不同程度升高 SOD, GSH-Px 活性 (*P* < 0.05), 降低 MDA, Hyp 水平 (*P* < 0.05), 见表 2。

3.3 联合用药对大鼠血清 HA, LN 和 PC III 含量的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清 HA, LN 和 PC III 含量显著升高 (*P* < 0.05)。与模型组比较, 秋水仙碱组和联合用药各剂量组大鼠血清 HA, LN 和

PC III 含量显著降低 (*P* < 0.05), 见表 3。

3.4 联合用药对大鼠肝组织 α-SMA, TGF-β₁, Smad3 表达的影响 与正常组相比, 模型组大鼠肝组织中 α-SMA, TGF-β₁, Smad3 的表达显著升高 (*P* < 0.05)。与模型组比较, 秋水仙碱组和联合用药中、高剂量组大鼠肝组织中 α-SMA, TGF-β₁, Smad3 的表达显著降低 (*P* < 0.05), 见表 4。

3.5 肝组织病理组织学检查 肝组织病理变化显示, 正常组大鼠肝小叶细胞以中央静脉为中心, 呈放射状整齐排列, 肝细胞未见变性。模型组中典型病理特征变化: 肝脂肪化、肝组织汇管区炎症坏死、胶

表 2 联合用药对大鼠肝组织中 SOD, GSH-Px, MDA, Hyp 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of combination therapy on liver SOD, GSH-Px, MDA and Hyp of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	SOD/U·mg ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·mg ⁻¹	Hyp/mg·g ⁻¹
正常	-	15	286.5 ± 48.5	376.3 ± 46.8	24.82 ± 7.39	1.16 ± 0.84
模型	-	8	96.8 ± 19.6 ¹⁾	168.5 ± 29.7 ¹⁾	65.30 ± 8.46 ¹⁾	4.39 ± 1.07 ¹⁾
秋水仙碱	0.5	10	171.8 ± 32.7 ²⁾	285.4 ± 40.1 ²⁾	35.65 ± 7.32 ²⁾	2.83 ± 0.83 ²⁾
联合用药	15.625	9	153.7 ± 29.4 ²⁾	267.2 ± 36.5 ²⁾	37.17 ± 6.48 ²⁾	3.18 ± 0.96 ²⁾
	31.25	11	174.9 ± 23.7 ²⁾	292.6 ± 44.3 ²⁾	34.28 ± 7.06 ²⁾	2.76 ± 0.77 ²⁾
	62.5	13	220.4 ± 22.9 ²⁾	325.1 ± 46.4 ²⁾	31.73 ± 7.15 ²⁾	1.48 ± 0.69 ²⁾

表 3 联合用药对大鼠血清 HA, LN 和 PCIII 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of combination therapy on HA, LN and PCIII in serum of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	HA/μg·L ⁻¹	LN/μg·L ⁻¹	PC III/μg·L ⁻¹
正常	-	15	87.6 ± 21.3	95.1 ± 22.8	79.4 ± 13.1
模型	-	8	256.9 ± 46.9 ¹⁾	221.2 ± 41.7 ¹⁾	189.4 ± 35.2 ¹⁾
秋水仙碱	0.5	10	183.6 ± 29.5 ²⁾	158.3 ± 35.2 ²⁾	138.7 ± 25.3 ²⁾
联合用药	15.625	9	186.3 ± 31.6 ²⁾	166.8 ± 31.3 ²⁾	143.6 ± 29.4 ²⁾
	31.25	11	152.4 ± 30.9 ²⁾	141.3 ± 33.4 ²⁾	129.5 ± 27.1 ²⁾
	62.5	13	113.8 ± 28.9 ²⁾	95.5 ± 25.8 ²⁾	90.3 ± 18.9 ²⁾

表 4 联合用药对大鼠肝组织 α-SMA, TGF-β₁, Smad3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

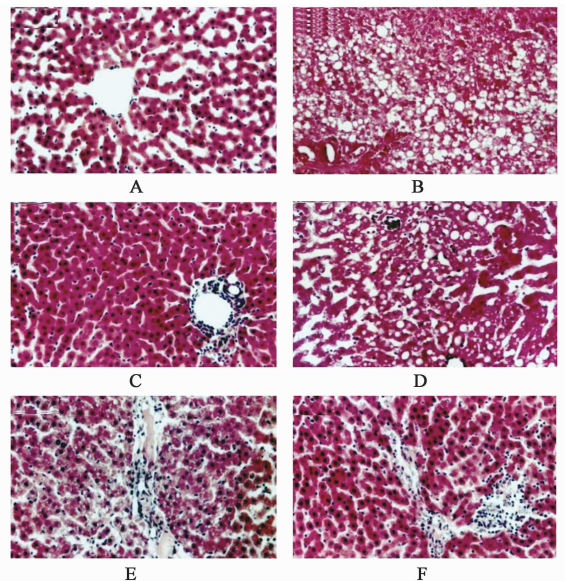
Table 4 Effects of combination therapy on α-SMA, TGF-β₁, Smad3 in hepatic tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	α-SMA/β-actin	TGF-β ₁ /β-actin	Smad3/β-actin
正常	-	15	0.42 ± 0.08	1.09 ± 0.15	0.83 ± 0.11
模型	-	8	2.86 ± 0.52 ¹⁾	2.16 ± 0.48 ¹⁾	1.93 ± 0.31 ¹⁾
秋水仙碱	0.5	10	2.11 ± 0.38 ²⁾	1.61 ± 0.39 ²⁾	1.43 ± 0.27 ²⁾
联合用药	15.625	9	2.52 ± 0.49	1.95 ± 0.38	1.52 ± 0.21 ²⁾
	31.25	11	1.86 ± 0.53 ²⁾	1.67 ± 0.33 ²⁾	1.33 ± 0.26 ²⁾
	62.5	13	1.32 ± 0.31 ²⁾	1.17 ± 0.26 ²⁾	1.16 ± 0.18 ²⁾

原蛋白沉积、肝纤维化和细胞结构松散表明肝纤维化建模成功。秋水仙碱及联合用药中、高剂量组病理损害均减轻,而低剂量组未见明显变化。各组大鼠肝纤维化分期评分见图 1,表 5。

4 讨论

肝纤维化是肝脏对各种慢性肝损伤的代偿反应所形成的一种肝脏疤痕组织,并导致细胞外基质 (ECM)、细胞群和细胞因子的复杂改变,是肝硬化早期的可逆阶段,若不及时治疗可能进展为失代偿期肝硬化并出现各种终末期肝病并发症^[5]。酒精性肝纤维化是肝脏在乙醇及其初级代谢产物乙醛的慢性持续损伤作用下,肝脏纤维增生和降解失衡,造成肝脏细 ECM 的过度沉积与异常分布的结果,反复多次的刺激可导致肝纤维化的发生^[6]。从笔者前期研究可知,联合使用表没食子儿茶素没食子酸酯、牛磺酸和三羟基异黄酮治疗肝损伤具有多靶点、多环节综合作用的特点,且效果显著。基于这 3 种活性成分均具有抗氧化、保肝的作用,且其护肝作用的药效基础可能有所不同,联合用药有可能在抗肝纤维化发挥协同作用,由此,笔者设计了本次实验,研



A. 正常组; B. 模型组; C. 秋水仙碱 0.5 mg·kg⁻¹ 组; D. 联合用药 15.625 mg·kg⁻¹ 组; E. 联合用药 31.25 mg·kg⁻¹ 组; F. 联合用药 62.5 mg·kg⁻¹ 组

图 1 联合用药对肝纤维化大鼠肝组织病理变化的影响 (HE, × 200)
Fig.1 Histologic result of liver tissues in liver fibrosis rats (HE, × 200)

表 5 各组大鼠肝纤维化分期评分

Table 5 Effects of combination therapy on hepatic fibrosis grade of rats

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	肝纤维化分期/只				
			S0	S1	S2	S3	S4
正常	-	15	15	0	0	0	0
模型	- ¹⁾	8	0	0	2	4	2
秋水仙碱	0.5 ²⁾	10	4	5	1	0	0
联合用药	15.625	9	0	1	4	3	1
	31.25 ²⁾	11	2	4	3	2	0
	62.5 ²⁾	13	3	6	3	1	0

究联合使用表没食子儿茶素没食子酸酯、牛磺酸和三羟基异黄酮对大鼠酒精性肝纤维化的保护作用及其作用机制。

本实验采用乙醇灌胃制备大鼠肝纤维化模型,病理检查结果显示,模型组大鼠肝脏损伤严重,可见肝脂肪化、肝组织汇管区炎症坏死、胶原蛋白沉积和组织结构松散等典型病理学特征改变。同时,血清 HA, LN, PCⅢ及肝组织 Hyp 的含量均显著升高,表明肝纤维化模型建立成功。肝细胞发生损伤时,其通透性增加,细胞内的酶外溢入血液,导致血液有关酶浓度急剧升高。笔者的实验结果发现,联合用药可显著降低血清 AST, ALT 活性,同时显著降低肝组织中 MDA 的水平,显著升高肝组织 SOD, GSH-Px 活性,提示其对酒精性肝损伤的保护作用与抗脂质过氧化和提高机体的抗氧化酶活性有关。另外,联合用药可显著减轻肝组织病理损伤程度,显著降低 HA, LN, PCⅢ及 Hyp 的含量,提示联合用药可有效改善肝损伤,减轻肝纤维化。

肝星状细胞(HSC)的激活并转化为肌成纤维细胞是肝纤维化发生的中心环节,活化后的 HSC 合成大量的 ECM,过多的 ECM 在肝脏内不断沉积并最终导致肝纤维化^[7]。HSC 被激活后,通过自分泌及旁分泌细胞因子促进未转化的 HSC 向肌成纤维转化,并表达 α -SMA,产生大量的 ECM^[8]。本实验中,模型组大鼠 α -SMA 的表达显著升高,秋水仙碱组和联合用药中、高剂量组大鼠 α -SMA 的表达显著降低,表明联合用药可以抑制纤维化初始形成。TGF- β 是一种多功能细胞生长调节蛋白,其有 3 种亚型,其中 TGF- β_1 致肝纤维化作用最强,通过影响肝星状细胞而发挥作用^[9]。Smads(如 Smad3)是

TGF- β_1 传输信号的受体载体^[10],TGF- β_1 和 Smad3 可活化 HSCs。本实验发现,秋水仙碱和联合用药治疗能够使异常升高的 TGF- β_1 /Smad3 的表达显著下降,提示,联合用药对肝纤维化的抑制作用与其抑制 TGF- β_1 和 Smad3 的过量表达有关。总之,联合用药能显著改善乙醇引起的肝组织病理学损伤、有效的抑制脂质过氧化反应、减轻胶原形成与沉积,提示联合使用表没食子儿茶素没食子酸酯、牛磺酸和三羟基异黄酮对肝纤维化有明显的抑制作用,其机制可能与加快自由基清除,减轻脂质过氧化损伤,下调 α -SMA, TGF- β_1 , Smad3 表达有关。

[参考文献]

[1] 张莎莎,吕文良,张旭,等. 肝纤维化的治疗研究进展[J]. 浙江中医药大学学报,2012,36(4):471-475.

[2] 廖明,李彦,舒伟,等. 鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞的增殖及 I 型胶原, TIMP-1 mRNA 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2010,18(9):932-936.

[3] Zhen M, Wang Q, Huang X, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis [J]. J Nutr Biochem, 2007, 18(12):795-805.

[4] 廖明,林兴,陈兆霓,等. 鸡尾酒疗法对肝纤维化大鼠肝组织中 TGF- β_1 , COL I 及 COL III 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2010,18(18):1867-1872.

[5] 邵祥强,肖华胜. 肝纤维化发病机制与临床诊断的进展研究[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(3):268-274.

[6] 陈永欣,黄权芳,林兴,等. 满天星异荛草苷对大鼠酒精性肝纤维化保护作用的实验研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(21):3726-3730.

[7] 石慧,肖和杰. 肝纤维化分子研究进展及其治疗[J]. 中西医结合肝病杂志,2012,22(5):318-320.

[8] 李志钢,杨晋翔,张伟,等. 肝心宁对大鼠肝纤维化 SMA, MMP-13 及 TIMP-1 蛋白表达的影响[J]. 北京中医药,2009,28(7):556.

[9] 朱碧红,张慧芳,陈永平. 大鼠肝纤维化组织中 TGF- β_1 的研究[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(2):150-152.

[10] Wicks S, Grocott T, Haros K, et al. Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway [J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(5):761-763.

[责任编辑 聂淑琴]