

表没食子儿茶素没食子酸酯 对酒精性肝病小鼠肝脏 Tf 和 Tfr1 表达的影响

马明霞,任源*

(桂林医学院公共卫生学院,广西 桂林 541004)

[摘要] 目的:探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对酒精性肝病(ALD)小鼠肝脏转铁蛋白(Tf)、转铁蛋白受体 1(Tfr1)表达的影响。方法:6~8 周龄雄性无特定病原体(SPF)级 C57/BL6 小鼠随机分为正常组和模型组,模型组小鼠每日予乙醇灌胃,并于造模第 9 周随机分为模型组,EGCG 10,20,30 mg·kg⁻¹组。给药 4 周后处死小鼠,观察各组小鼠肝脏病理变化,并测定肝功能、肝铁含量,采用蛋白免疫印迹法检测肝组织 Tf, Tfr1 的表达。结果:模型组小鼠与正常对照组相比血清谷丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平显著升高($P < 0.01$),肝组织病理表现肝细胞呈中度脂肪变性,肝铁含量及肝脏 Tf, Tfr1 表达显著升高($P < 0.01$)。EGCG 治疗组显著降低血清 ALT, AST 水平($P < 0.01$),肝组织病理变化可见显著改善,肝铁含量及肝脏 Tf, Tfr1 表达显著降低($P < 0.01$)。结论:EGCG 可以降低 ALD 小鼠肝脏 Tf, Tfr1 的表达水平,抑制肝铁摄取,从而发挥其对酒精性肝病的保护作用。

[关键词] 表没食子儿茶素没食子酸酯;酒精性肝病;铁过载;转铁蛋白;转铁蛋白受体 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0268-04

Effects of Epigallocatechin-3-gallate on Expression of Tf and Tfr1 in Liver of Mice with Alcoholic Liver Disease

MA Ming-xia, REN Yuan*

(Public Health School, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on transferrin (Tf) in liver of mice with alcoholic liver disease (ALD) and to explore its mechanisms. **Method:** C57/BL6 mice were randomly divided into two groups: normal group and model group. Alcoholic liver disease was induced by gavage of alcohol for 12 weeks. At the end of 8 weeks, the alcohol group was divided into four subgroups: model group, EGCG (20 mg·kg⁻¹) group, EGCG (10 mg·kg⁻¹) group, EGCG (30 mg·kg⁻¹) group. Mice in the EGCG groups were received an intraperitoneal injection of EGCG via simultaneous intragastric administration with normal saline or alcohol for 4 weeks. Liver injuries were assessed by histopathologic examination and serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) levels. In addition, liver iron levels and Tf, transferrin receptor 1 (Tfr1) of liver tissue were evaluated. **Result:** Model group mice had marked increase in serum ALT, AST levels and liver iron concentration compared with normal group, and their liver tissues showed moderate hepatocytes fatty degeneration. However, every treatments groups resulted in decreased ALT, AST levels and liver iron concentration and improved pathological changes. Liver Tf and Tfr1 protein expression levels were elevated significantly in model group compared with normal group, but markedly suppressed by EGCG treatments. **Conclusion:** Compared with model group, treatment of ALD mice with EGCG decreased Tf and Tfr1 protein expression in the liver. EGCG might play a protective role in the development of ALD. This beneficial effect of

[收稿日期] 20120615(004)

[基金项目] 广西壮族自治区教育厅项目(200103YB090)

[第一作者] 马明霞,讲师,从事公共卫生事业管理,Tel:0773-5891611,E-mail:549892183@qq.com

[通讯作者] *任源,博士,讲师,从事肝脏疾病的研究,Tel:0773-5891611,E-mail:renyuanhappy@yahoo.com.cn

EGCG may be attributed to its iron chelation ability. The possible mechanisms is that EGCG decreases the hepatic iron uptake by the downregulation of Tf and Tfr1.

[**Key words**] epigallocatechin-3-gallate; alcoholic liver disease; iron overload; transferrin; transferrin receptor 1

酒精性肝病(ALD)是因长期、大量饮用各种含乙醇的饮料所致肝脏损害性病变,包括脂肪肝、肝炎和肝硬化^[1]。其发病率在我国呈上升趋势,越来越引起人们的重视^[2]。然而 ALD 发病的分子机制尚不清楚,可能与乙醇及其代谢产物对肝脏的毒性作用、氧化应激、免疫介导和细胞因子、细胞凋亡、内毒素、遗传多态性、与病毒的叠加作用等多种因素有关^[3-6]。铁被认为是导致 ALD 的主要危险因素。ALD 患者通常伴有铁超载以及与铁代谢紊乱相关的临床表现^[7-8]。铁可启动或催化哈伯-韦斯(Haber-weiss)反应,产生自由基破坏肝细胞的细胞器,最终造成肝细胞死亡。而肝细胞的死亡又会进一步加重肝铁超载。肝细胞中转铁蛋白受体(Tfr1)表达上调可能是肝内铁超负荷的重要因素^[9]。打破这个恶性循环的关键是改善或消除肝铁超载。目前对 ALD 的治疗尚缺乏特效手段,花儿茶素(EGCG)作为茶多酚的主要单体及活性成分,具有许多重要的生物功能,如抗氧化、抗炎、铁螯合及抗癌等作用^[10-11]。该研究通过乙醇灌胃建立 ALD 小鼠模型,比较不同剂量 EGCG 作用下其对 ALD 小鼠肝脏 Tf, Tfr1 蛋白表达的影响,从分子水平探讨 EGCG 对 ALD 的保护作用机制。

1 材料

1.1 动物 C57/BL6 小鼠 70 只,雄性,6~8 周龄,体重(21±2)g,SPF 级,购自南方医科大学实验动物中心,动物许可证号 SCXK(粤)2006-0015。所有动物实验期间饲养于屏蔽级动物房,室内温度(23±3)℃且昼夜分明,相对湿度 50%~60%,标准饲料,自由饮水。

1.2 试剂 EGCG(纯度 95%),杭州禾田生物科技有限公司,批号 S1032。抗大鼠 Tf 单克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-18786,抗小鼠 Tfr1 抗体,美国 USbio 公司,sc-32272。

1.3 仪器 全自动生化分析仪(AU1000,日本 Olympus 公司),原子吸收分光光度计(美国 Agilent 公司),紫外分光光度计(DU-600,美国 Beckman 公司),电泳仪(G42,德国 Biometra 公司)。

2 方法

2.1 动物及分组 6~8 周龄雄性 SPF 级 C57/BL6

小鼠,体重(21±2)g。购回后饲养于恒温,恒湿条件下自由摄取食水。随机分为正常组和模型组。模型组小鼠每日予乙醇灌胃,乙醇剂量开始为 4 g·kg⁻¹·d⁻¹(溶液最大乙醇含量为 52%),计算方法为:乙醇质量(g)=白酒体积(mL)×白酒乙醇含量×乙醇密度(0.8 g·mL⁻¹),5 周内乙醇剂量逐渐增加到 6 g·kg⁻¹·d⁻¹,持续该剂量喂养 7 周。正常组小鼠以等体积生理盐水灌胃。模型组小鼠于造模第 9 周随机分为 4 组,每组 10 只。即模型组,模型组+EGCG 10 mg·kg⁻¹组,模型组+EGCG 20 mg·kg⁻¹组,模型组+EGCG 30 mg·kg⁻¹组。药物均为腹腔注射给药,正常对照组予等体积生理盐水腹腔注射,每日 1 次;持续 4 周。实验至第 12 周末,小鼠禁食 24 h,剖杀,留取血及肝组织备检。

2.2 肝组织病理学变化 各组小鼠肝组织常规石蜡包埋、切片,HE 染色显微镜下观察肝组织病理学形态,并拍照记录。

2.3 肝功能检测 应用 RA1000 全自动生化分析仪检测小鼠血清 ALT,AST 水平。

2.4 肝铁浓度测定 采用空气-乙炔原子吸收法在原子吸收分光光度仪上测定铁含量,并根据标准曲线分析结果。

2.5 肝组织 Tf, Tfr1 蛋白表达检测 Western blot 方法分析。提取肝组织总蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭,分别将目的蛋白 Tf, Tfr1 膜浸没于对应一抗里,置于 4℃,慢摇孵育过夜。之后浸没于对应二抗里室温孵育 1 h。

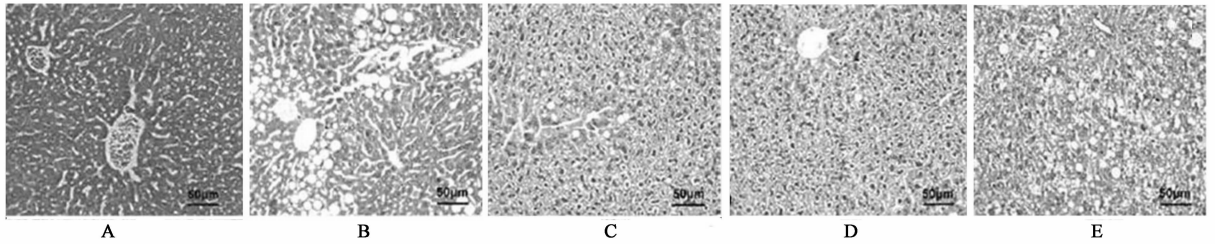
2.6 统计方法 实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对酒精性肝病小鼠肝脏病理形态的影响 由图 1 可见,光镜下,HE 染色,乙醇灌胃 12 周末,对照组见肝细胞以小叶中央静脉为中心呈放射状排列,肝小叶轮廓清晰,少数肝细胞内小空泡变性;模型组肝组织切片均见中央静脉周围肝细胞排列紊乱,小叶界限不清,肝细胞浆中见广泛脂肪大泡;EGCG 10 mg·kg⁻¹组、EGCG 20 mg·kg⁻¹组、EGCG 30 mg·kg⁻¹组病理切片见肝小叶轮廓仍较清晰,肝细胞排列呈

放射状,肝细胞内空泡变性较模型组显著减少,以小空泡为主。其中 EGCG 20 mg·kg⁻¹组仅见少数散在

脂肪小空泡,EGCG 10 mg·kg⁻¹组、EGCG 30 mg·kg⁻¹组可见较广泛脂肪变性。

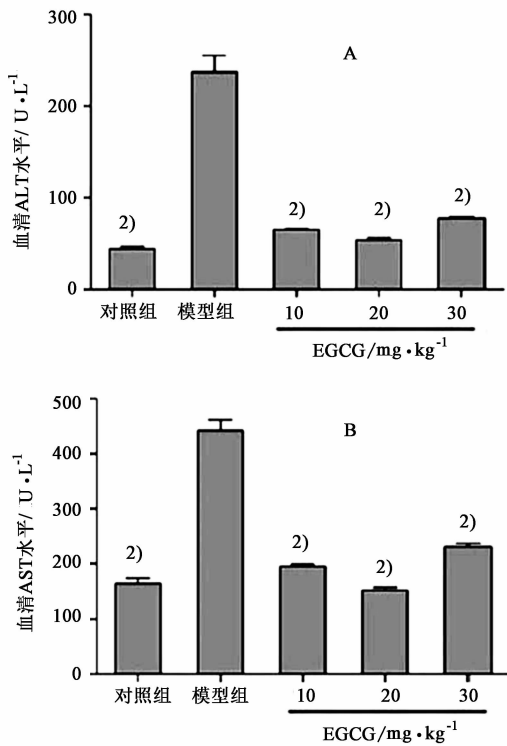


A. 对照组;B. 模型组;C. EGCG 10 mg·kg⁻¹组;D. EGCG 20 mg·kg⁻¹组;E. EGCG 30 mg·kg⁻¹组

图 1 EGCG 对酒精性肝病小鼠肝脏病理形态的影响(HE, ×200)

3.2 对酒精性肝病小鼠血清 ALT,AST 水平的影响

图 2 中可见,与对照组相比,模型组血清 ALT,AST 水平均较对照组显著升高($P < 0.01$)。给药 4 周后,治疗组血清 ALT,AST 水平均较模型组显著降低($P < 0.01$)。其中,EGCG 20 mg·kg⁻¹组比 EGCG 10 mg·kg⁻¹组和 EGCG 30 mg·kg⁻¹组血清 ALT,AST 水平显著降低($P < 0.05$)。



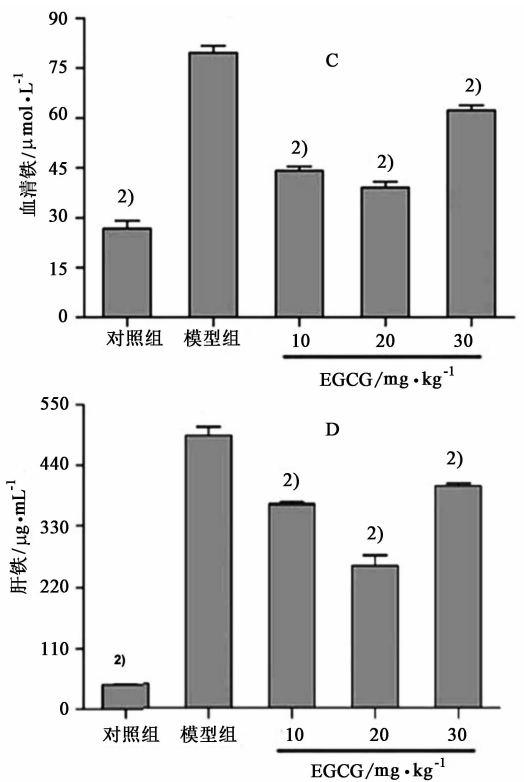
A. ALT 水平; B. AST 水平

与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

图 2 EGCG 对酒精性肝病小鼠血清 ALT,AST 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.3 对酒精性肝病小鼠铁超载的影响 图 3 中可见,与对照组相比,模型组血清铁(A),肝铁(B)水平均较对照组显著升高($P < 0.01$)。给药 4 周后,治疗组血清铁,肝铁水平均较模型组显著降低($P <$

0.01)。



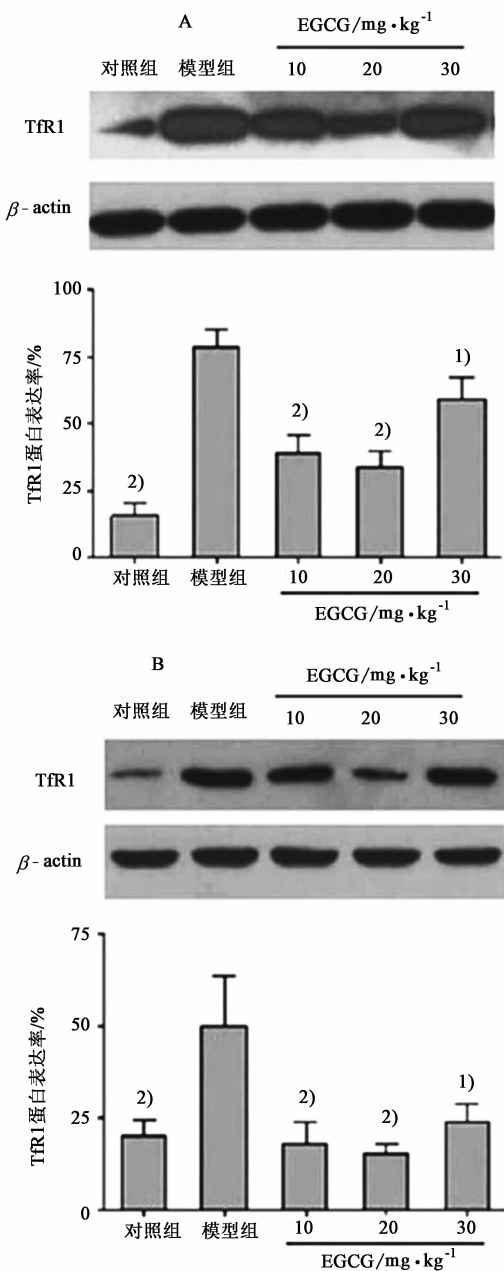
C. 血清铁; D. 肝铁

图 3 EGCG 对酒精性肝病小鼠血清铁、肝铁水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.4 对酒精性肝病小鼠肝脏 Tf, Tfr1 蛋白表达水平的影响 图 4 中可见,与对照组相比,模型组 Tf (A), Tfr1 (B) 蛋白表达水平较对照组显著升高($P < 0.01$)。给药 4 周后,治疗组 Tf, Tfr1 蛋白表达水平均较模型组显著降低($P < 0.01$)。

4 讨论

铁是人体必需的营养素,在人体氧化代谢、细胞生长与增殖、氧的运输和贮存中均有重要作用。铁代谢在体内维持动态平衡,如平衡失调(铁缺乏或铁过多)均可造成多种代谢紊乱而影响多个器官的生理功能。机体对铁的吸收、转运、利用等过程均有



A. 肝 Tf 蛋白表达; B. 肝 Tfr1 蛋白表达
 图4 EGCG对酒精性肝病小鼠肝脏 Tf、Tfr1 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

严格的调控。体内绝大多数细胞是通过 Tf-Tfr 摄取铁的。Tfr1 介导的 Tf 结合铁的摄入是受体的再循环过程,包括受体与配体结合、内或内化、铁解离与还原、铁移位以及 Tfr1 随内体返回质膜表面等步骤。Suzuki Y 等研究 31 例住院戒酒的酒精性肝病中的 22 例有肝内铁沉积,18 例(58%)有 Tfr 表达上调;这些 Tfr 表达上调患者的平均戒酒时间为 14 d,而无 Tfr 表达上调患者的平均戒酒时间为 30 d,提示经常性的饮酒是肝细胞 Tfr 表达上调和肝脏铁

超负荷的重要因素^[9]。本实验中 12 周乙醇灌胃促使小鼠肝组织铁储存显著升高,铁调节机制中的关键因子 Tf 及 Tfr1 表达较对照组显著升高,提示在乙醇存在条件下,小鼠肝铁蓄积,肝脏铁的摄取可能大部分由 Tfr1 转运。EGCG 给药 4 周后,治疗组 Tf、Tfr1 蛋白表达水平均较模型组显著降低。故我们推测 EGCG 可通过抑制 Tf、Tfr1 的表达减少肝细胞铁摄取,从而减轻酒精性肝病铁超载以达到治疗 ALD 的作用。

[参考文献]

[1] Dey A, Cederbaum A I. Alcohol and oxidative liver injury[J]. Hepatology,2006,43(2):63.
 [2] 邸琳,刘新宇,金向群,等. 酒肝清胶囊对实验性大鼠酒精性脂肪肝的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(3):53.
 [3] Wu D, Cederbaum A I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage[J]. Alcohol Res Health, 2003, 27(4):277.
 [4] Wheeler M D. Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease[J]. Alcohol Res Health, 2003, 27(4):300.
 [5] 王瑞科,刘秀珍,张谷运,等. 酒精性肝病白细胞介素 6 的检测及意义[J]. 临床肝胆病杂志,2005,21(2):1002.
 [6] Lieber C S. Hepatitis C and alcohol[J]. J Clin Gast Roenterol, 2003, 36(2):100.
 [7] De Feo T M, Fargion S, Duca L, et al. Non-transferrin-bound iron in alcohol abusers[J]. Alcohol Clin Exp Res,2001,25(10):1494.
 [8] Whitfield J B, Zhu G, Heath A C. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2001, 25(7):1037.
 [9] Suzuki Y, Saito H, Suzuki M, et al. Up-regulation of transferrin receptor expression in hepatocytes by habitual alcohol drinking is implicated in hepatic iron overload in alcoholic liver disease[J]. Alcohol Clin Exp Res,2002, 26(8):26.
 [10] 吴正平. 茶多酚对小鼠高血脂症与脂肪肝的预防作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):94.
 [11] 邓凤君,杨迎暴,徐江平,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对脊髓损伤大鼠炎症因子释放及神经营养因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):195.

[责任编辑 李玉洁]