

· 基础研究 ·

荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠 TGF- β 1 及 Smad3、7 表达的影响*刘 伟,赵永忠[△],肖绪华,何志国

(桂林医学院附属医院消化内科,广西桂林 541001)

摘要:目的 探讨荔枝核总黄酮(TFL)对胆汁性肝纤维化大鼠肝组织转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、Smad3、7 表达的影响及其抗肝纤维化可能的作用机制。方法 将雄性 SD 大鼠 70 只随机分为假手术组、模型组、TFL 大剂量组[200 mg/(kg·d)]和 TFL 小剂量组[100 mg/(kg·d)]。采用胆总管结扎制备肝纤维化大鼠模型。分别于术后第 2、3、4 周处死大鼠,留取肝脏组织。HE 染色观察大鼠肝组织病理改变;免疫组织化学法检测 TGF- β 1、Smad3、7 在肝组织内的动态表达。结果 假手术组肝组织内 TGF- β 1、Smad3 有少量表达,Smad7 呈高表达。与模型组比较,TFL 大剂量治疗后大鼠肝组织内纤维化程度降低。随着肝纤维化的形成和发展,第 2、3、4 周 TFL 大剂量组大鼠肝组织 TGF- β 1(3.000±1.309、2.000±1.309、1.800±1.649)、Smad3(2.875±1.458、2.000±1.309、1.833±0.753)与模型组 TGF- β 1(3.750±1.488、4.333±1.211、5.000±0.817)、Smad3(3.375±0.916、4.000±0.894、4.250±0.500)比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 TFL 能有效地减轻胆总管结扎所致肝纤维化大鼠肝损伤及肝纤维化程度,其机制可能与抑制 TGF- β 1、Smad3 高表达,上调 Smad7 表达有关。

关键词:荔枝核;黄酮;肝硬化;转化生长因子;Smad3 蛋白质;Smad7 蛋白质

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.13.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)13-1299-03

Effect of total flavone of Litchi chinensis sonn on expression of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 of hepatic fibrosis in rats*Liu Zhou, Zhao Yongzhong[△], Xiao Xuhua, He Zhiguo

(Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of total flavone(TFL)of Litchi Chinensis sonn on the expression of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 of hepatic fibrosis in rats, and to study the mechanism of TFL. **Methods** Seventy males SD rats were randomly divided into four groups: sham-operated group, model group, high-dose TFL group[200 mg/(kg·d)], low-dose group[100 mg/(kg·d)]. The liver fibrosis model was prepared by bile duct ligation, where as the sham-operated group was used as controls. The rats were respectively killed at 2, 3, 4 weeks after operation. The liver histopathological changes were observed under light microscopy by HE staining. The expression and orientation of TGF- β 1, Smad3 and Smad7 in hepatic fibrosis were detected by immunohistochemistry. **Results** TGF- β 1 and Smad3 at 2, 3, 4 weeks in the sham-operated group were expressed in low amounts in the normal liver tissues, while Smad7 at the same points was decreased. Compared with the model group, the fibrotic degree of the liver tissues was reduced after high-dose TFL treatment. With the formation and development of fibrosis, the expression of TGF- β 1 and Smad3 at 2, 3 4 weeks were 3.000±1.309, 2.000±1.309, 1.800±1.649 and 2.875±1.458, 2.000±1.309, 1.833±0.753 respectively in the high-dose TFL group, while 3.750±1.488, 4.333±1.211, 5.000±0.817 and 3.375±0.916, 4.000±0.894, 4.250±0.500 respectively in the model group, showing statistical difference between the two groups($P<0.05$). **Conclusion** TFL may effectively reduce the liver injury and hepatic fibrosis induced by common bile duct ligation. Its mechanism may inhibit the high expression of TGF- β 1 and Smad3, and increase the expression of Smad7.

Key words: Semen Litchi; flavone; liver cirrhosis; transforming growth factors; Smad3 protein; Smad7 protein

肝纤维化(hepatic fibrosis)是指由多种慢性疾病引起的肝脏持续的创伤修复反应而导致的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积和肝脏功能的受损^[1]。转化生长因子 β 1(transforming growth factor beta-1, TGF- β 1)是这一病理过程的重要因子,它能激活肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)转化为成纤维细胞(myofibroblasts, MFB)。TGF- β 1 的生物学效应非常复杂,主要是依赖其下游的 Smad 蛋白,组成 TGF- β 1/Smads 信号传导系统完成的^[2]。现将本研究以胆总管结扎大鼠肝纤维化模型为研究对象,观察荔枝核总黄酮(total flavone from Litchi chinensis Sonn, TFL)对肝纤维化大鼠肝组织中 TGF- β 1、Smad3、7 表达的影响报道如下。

1 材料与与方法

1.1 动物 选择健康雄性 SD 大鼠 80 只,体质量 200~250 g,清洁级,由桂林医学院实验动物中心提供。

1.2 试剂与药物 大鼠 TGF- β 1、Smad3、7 多克隆抗体均购自 Bioworld 公司,即用型 S-P 试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。TFL 原材料购自桂林市七星公园药材市场,由桂林工学院有机化学教研室加工提取,经检测 TFL 含量为 852 g/kg,将其粉末状物用蒸馏水稀释为 40 g/L 的溶液。

1.3 方法

1.3.1 肝纤维化模型的制作 将 SD 大鼠随机分成假手术组($n=10$)、模型组($n=18$)、TFL 大剂量组($n=22$)和 TFL 小剂量组($n=20$)。采用胆总管结扎制作肝纤维化模型^[3]。用 1% 戊巴比妥钠(4 mL/kg)腹腔注射麻醉后正中开腹,游离胆总

管,用丝线双线结扎,于结扎线中间剪断,而后关腹。假手术组仅开腹,游离胆总管而不结扎,其余组同模型组。术后第 2 天开始分组给药:(1)假手术组:用生理盐水灌胃,剂量为 5 mg/(kg·d);(2)模型组同假手术组;(3)TFL 大剂量组用 TFL 灌胃,剂量为 200 mg/(kg·d);(4)TFL 小剂量组用 TFL 灌胃,剂量为 100 mg/(kg·d)。4 组大鼠每天灌胃 1 次,分别于第 2、3、4 周时,取大鼠肝左叶组织,置于 10% 甲醛溶液中固定,制备石蜡标本。

1.3.2 肝纤维化程度分期标准 肝纤维化程度分期标准^[4]:0 期汇管区周围无纤维增生,无炎症;1 期为汇管区炎症,小叶内变性和少数点状坏死,汇管区纤维化扩大,局限于窦周及小叶内;2 期为汇管区轻度碎屑坏死(PN),其周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留,小叶区变性,点、灶坏死;3 期为汇管区中度 PN,纤维间隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化,小叶内融合坏死;4 期为汇管区重度 PN,早期肝硬化,多个小叶坏死。

1.3.3 TGF-β1、Smad3、7 免疫组织化学染色 按照 S-P 试剂盒说明书操作,石蜡切片常规脱蜡、水化, I 抗及工作浓度: anti-Smad3 HRP(1:200); anti-TGF-β1(1:200), anti-Smad7 HRP(1:300)。评分标准:在高倍镜下,每张切片随机观察 5 个高倍视野,(1)着色程度:浅棕色为 1 分,棕色为 2 分,深棕色为 3 分,不着色为 0 分;(2)阳性细胞小于或等于 30% 为 1 分,30%~70% 为 2 分,>70% 为 3 分,无阳性细胞为 0 分,将(1)、(2)两项积分相乘,0 分为阴性(-)、2~3 分为弱阳性(+),4 分为阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行数据分析,计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

实验过程中共有 10 只大鼠死亡,模型组在第 3、4 周分别死亡 2、4 只;TFL 大剂量组第 4 周死亡 2 只;TFL 小剂量组第 3、4 周分别死亡 1、3 只。4 组大鼠肝组织肝纤维化程度分期, TGF-β1 及 Smad3、7 免疫组织化学分析结果见表 1~3。

表 1 4 组大鼠肝组织肝纤维化程度分期情况

组别	n	分期				
		0	1	2	3	4
假手术组	10	10	0	0	0	0
模型组	18	0	0	4	10	4
TFL 大剂量组	22	0	8*	12*	2*	0*
TFL 小剂量组	20	0	2	5	9	4

*: $P < 0.05$, 与模型组比较。

表 2 4 组大鼠肝组织 TGF-β1 免疫组织化学分析结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	2 周	3 周	4 周
假手术组	10	1.667±0.577	1.333±0.577	1.750±0.500
模型组	18	3.750±1.488	4.333±1.211	5.000±0.817
TFL 大剂量组	12	3.000±1.309*#	2.000±1.309*#	1.800±1.649*#
TFL 小剂量组	20	3.750±1.282*	3.857±1.069*	4.000±1.581*

*: $P > 0.05$, #: $P < 0.05$, 与模型组比较。

表 3 4 组大鼠肝组织 Smad3、7 免疫组化分析结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Smad3			Smad7		
		2 周	3 周	4 周	2 周	3 周	4 周
假手术组	10	2.333±1.155	2.333±0.577	2.500±0.577	5.000±1.155	4.333±1.155	5.000±1.414
模型组	18	3.375±0.916	4.000±0.894	4.250±0.500	2.875±0.835	2.000±0.894	1.500±1.290
TFL 大剂量组	22	2.875±1.458*#	2.000±1.309*#	1.833±0.753*#	3.375±1.061*#	4.250±1.035*#	4.833±0.753*#
TFL 小剂量组	20	3.250±1.282*	3.714±1.113*	3.800±0.837*	2.750±1.164*	2.143±0.690*	1.800±0.837*

*: $P > 0.05$, #: $P < 0.05$, 与模型组比较。

3 讨 论

荔枝核为无患子科植物荔枝的干燥成熟种子,主要产于广东、广西等地,具有抗乙型肝炎病毒^[5]、抗糖尿病、抗肝损伤和抗氧化等作用^[6]。TFL 为荔枝核中提取的一种生物类黄酮,是荔枝核中具有药理活性的主要成分之一。本研究前期结果显示,TFL 可抑制肝纤维化大鼠肝组织中肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)的表达,进而减少肝纤维化的程度,初步揭示 TFL 具有良好的抗肝纤维化作用^[7-8]。

本研究结果显示,与模型组比较,TFL 大剂量组可明显改善肝组织纤维化程度。而 TFL 小剂量组肝纤维化程度与模型组比较差异无统计学意义,提示需要一定剂量的 TFL 才能发挥抗肝纤维化作用。肝纤维化受到多种细胞因子的调节,异常 TGF-β 信号在各种疾病的发病机制中占非常重要的位置。TGF-β1 导致肝纤维化的具体机制为活化 HSC,使其转化为 MFB,通过自分泌及旁分泌,使 HSC 增殖,由于 TGF-β 自分泌作用,MFB 进一步受到刺激,合成和分泌大量 ECM,并抑制其降解^[9]。TGF-β1 信号通过跨膜转运受体激酶激活其下游特定

的 Smads 蛋白家族,将其配体信号从细胞膜转入细胞核内。TGF-β1 在体内通过与细胞膜表面 II 型受体结合,同时激活 TβR II 磷酸化激酶,从而激活 Smad2、3 羧基末端的 SSXS 序列,这是 TGF-β1 信号传导很关键的一步^[10]。

Smad2、3 作为 TGF-β 信号转导通路的下游信号因子,可以激活 HSC 进而导致肝纤维化的发生^[11]。有研究显示 Smad3 的减少可以抑制肝纤维化的进展,而肝纤维化程度减轻是由促纤维化的成纤维细胞激活和 ECM 的产生与沉积减少所致。因此,Smad3 在促肝纤维化中起重要作用^[12]。Smad7 是 TGF-β1 信号转导抑制分子,可与 Smad2 或 Smad3 竞争结合 TGF-β1 型受体或 Smad4,阻断 Smad2 或 Smad3 被磷酸化及传位至细胞核内,从而抑制 TGF-β1 信号转导^[13]。

本实验结果显示,各组实验大鼠肝组织均有 TGF-β1、Smad3、7 不同程度的表达,模型组中 TGF-β1、Smad3 表达显著高于假手术组,且随着肝纤维化程度加重而增加,而 Smad7 表达显著低于假手术组,随着肝纤维化程度加重反而降低,TFL 组 TGF-β1、Smad3、7 表达恰与模型组相反。Smad3 与同期 TGF-β1 的表达及纤维增生的程度在模型组协同增加,在 TFL

大剂量组表达则协同减低, Smad7 则与同期 TGF- β 1 不一致, 提示下调 Smad3 的表达可以抑制 TGF- β 1 的部分效应, 而上调 Smad7 表达则可抑制肝纤维化形成。此外, TFL 大剂量组中 TGF- β 1、Smad3 表达较模型组减低, 而 Smad7 表达则较模型组增加, 但是 TFL 小剂量组中 TGF- β 1、Smad3、7 表达与模型组比较差异无统计学意义, 提示 TFL 大剂量组中三者的表达优于其他组。

综上所述, TFL 抗肝纤维化的机制可能与抑制 TGF- β 1、Smad3 在肝组织中的表达, 上调 Smad7 的表达, 阻止 TGF- β 1 活化 HSC, 减少 ECM 的沉积, 进而减轻肝纤维化的程度有关。

参考文献:

- [1] Liu H, Wei W. TGF- β signal pathway and anti-TGF- β strategies for treatment of liver fibrosis[J]. Chin Pharmacol Bull, 2007, 23(5): 561-565.
- [2] Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2009, 41(4): 263-272.
- [3] 孙杨忠, 耿小平. 阻塞性黄疸大鼠胆总管直径、压力及血清胆红素代谢变化的观察[J]. 肝胆外科杂志, 2003, 11(2): 141-142.
- [4] 中华肝病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. 中华肝病杂志, 2002, 10(10): 327-328.
- [5] 徐庆, 宋芸娟, 李丽亚. 荔枝核总黄酮的抗鸭乙型肝炎病毒作用[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(17): 2082-2085.
- [6] 邓志军, 郭洁文, 潘竟铨. 荔枝和荔枝核及其有效部位的

药理及药效学作用[J]. 今日药学, 2009, 19(5): 7-9.

- [7] 赵永忠, 漆志平, 徐庆. 荔枝核总黄酮抗胆管结扎大鼠肝纤维化的作用及机制[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(20): 2084-2089.
- [8] 赵永忠, 肖绪华, 漆志平. 荔枝核总黄酮对大鼠肝纤维化 TGF- β 1 及 CTGF 表达的影响[J]. 河北医药, 2010, 32(10): 1194-1196.
- [9] Gaca MD, Zhou X, Issa R, et al. Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells; evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells [J]. Matrix Biol, 2003, 22(3): 229-239.
- [10] Kremer M, Perry AW, Milton RJ, et al. Pivotal role of Smad3 in a mouse model of T cell mediated hepatitis[J]. Hepatology, 2008, 47(1): 113-126.
- [11] Yokote K, Kobayashi K, Saito Y. The role of Smad3-dependent TGF-beta signal in vascular response to injury [J]. Trends Cardiovasc Med, 2006, 16(7): 240-245.
- [12] Latella G, Vetuschi A, Sferra R, et al. Targeted disruption of Smad3 confers resistance to the development of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in mice[J]. Liver Int, 2009, 29(7): 997-1009.
- [13] Yu LM, Lv B. TGF- β /smad signaling pathways in hepatic fibrosis[J]. Int J Dig Dis, 2008, 28(5): 397-400.

(收稿日期: 2011-12-29 修回日期: 2012-01-29)

(上接第 1298 页)

参考文献:

- [1] 李海英, 佟长青, 李国强. 高血压性心肌肥大大鼠心肌超微结构的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(11): 1140-1142.
- [2] 李红, 徐健, 徐鹏霄. 自发性高血压大鼠室周灰质中 NOS 阳性神经元的形态学观察[J]. 武警医学院学报, 2007, 16(2): 114-116.
- [3] 杨靖, 王玉霞, 曹翠丽, 等. 高血压大鼠第四脑室外侧隐窝室管膜细胞超微结构变化的电镜观察[J]. 电子显微学报, 2011, 30(3): 227-231.
- [4] 黄璟堂, 黄至斌. 自发性高血压大鼠左心室肥厚心肌 KV4.2 表达的动态变化[J]. 临床医学工程, 2010, 17(8): 28-29.
- [5] 安欣, 张建中, 杨侃, 等. 两肾一夹型与自发性高血压大鼠肾病变的比较[J]. 西安交通大学学报, 2010, 31(4): 437-440.
- [6] 郝铁来, 刘英洁. 替米沙坦与贝那普利对原发性高血压患者肾功能的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(5): 1000-1002.
- [7] Zhou X, Frohlich ED. Analogy of cardiac and renal complications in essential hypertension and aged SHR or L-NAME/SHR[J]. Med Chem, 2007, 3(1): 61-65.
- [8] Wu MY, Ma XJ, Yang C, et al. Effects of allisartan, a new AT(1) receptor blocker, on blood pressure and end-organ damage in hypertensive animals[J]. Acta Pharmacol Sin,

2009, 30(3): 307-313.

- [9] Johnson AK, Gross PM. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways [J]. J FASEB, 1993, 7(8): 678-686.
- [10] Gaillard RC. Interaction between the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the immunological system[J]. Neurol Sci, 2001, 24(6): 320-324.
- [11] 朱望东, 马常升, 曹翠丽, 等. 不同免疫状态下穹隆下器的一氧化氮合酶细胞的变化[J]. 解剖学杂志, 2001, 24(2): 132-135.
- [12] Quan N, Whiteside M, Herkenham M. Time course and localization patterns of interleukin-1 messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide[J]. Neurol Sci, 1998, 83(1): 281-293.
- [13] 朱长庚. 免疫-神经-内分泌网络[J]. 解剖学报, 1993, 24(2): 216-220.
- [14] Heneka MT, Feinstein DL, Galea E, et al. Peroxisome proliferators-activated receptor gamma agonists protect cerebellar granule cells from cytokine-induced apoptotic cell death by inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. J Neuroimmunol, 1999, 100(1/2): 156-168.
- [15] 曹翠丽, 杨天祝, 朱望东. 实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠穹隆下器的扫描电镜观察[J]. 解剖学杂志, 2002, 25(3): 293-294.

(收稿日期: 2011-12-15 修回日期: 2012-01-18)