

茶多酚对 NASH 大鼠肝脏组织 VEGF 及氧化应激的影响

王旭霞 刘震雄 赵曙光 李慧艳 王景杰 秦 明 卢 王 闻勤生[△]

(第四军医大学唐都医院消化内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的 茶多酚对 NASH 大鼠肝脏组织 VEGF 及氧化应激的影响。方法 雄性 SD 大鼠 30 只,随机分为 3 组,正常对照组、模型组、茶多酚治疗组。正常组普通饲料喂养,模型组喂高脂饮食,茶多酚治疗组在高脂饮食 12 周后茶多酚(150mg/(kg·d))灌胃治疗,16 周末处死各组大鼠,留取肝脏组织,观察各组大鼠肝组织病理改变,测定其肝脏丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性以及血管内皮生长因子(VEGF)、Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达。结果 模型组大鼠肝组织中 SOD 活性降低而 MDA 含量以及 VEGF、Ⅰ、Ⅲ型胶原表达均明显高于正常组。茶多酚治疗可减轻肝纤维化程度,显著升高肝组织中 SOD 活性,降低 MDA 含量以及 VEGF、Ⅰ、Ⅲ型胶原表达水平。结论 茶多酚可通过抑制肝纤维化组织 VEGF 表达,降低肝组织氧化应激水平而发挥抗肝纤维化作用。
关键词 非酒精性脂肪性肝炎,氧化应激,肝纤维化;血管内皮生长因子,茶多酚
中图分类号 Q95-3 R575.5 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2012)07-1205-03

Effects of Tea Polyphenol on VEGF and Oxidative Stress in Liver Tissues of Rats With Nonalcoholic Steatohepatitis

WANG Xu-xia, LIU Zhen-xiong, ZHAO Shu-guang, LI Hui-yan, WANG Jing-jie, QIN Ming, LU Wang, WEN Qin-sheng[△]
(Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of tea polyphenol on vascular endothelial growth factor (VEGF) and oxidative stress in liver tissues of rats with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). **Methods:** Male SD rats were fed with normal diet (control group), high fat diet (model group), gavage fed with high fat diet (treatment group) and 12th weeks later was fed with tea polyphenol (150 mg/kg·d). The rats were sacrificed at the 16th week after the last gavage fed. The pathological changes of liver tissues, the content of malondialdehyde (MDA), the activity of superoxide dismutase (SOD), and the expression of VEGF, Ⅰ and Ⅲ collagen were detected. **Results:** Compared with control group, SOD activity decreased significantly in model group rats. The MDA content and VEGF, Ⅰ and Ⅲ collagen expression in model group rats were significantly higher than those in the normal group rats. Tea polyphenol could reduce the liver fibrosis level, MDA content, VEGF, Ⅰ, Ⅲ collagen expression. It also could increase the SOD activity. **Conclusion:** Tea polyphenols plays an important role in reducing hepatic fibrosis through inhibiting VEGF expression in liver fibrosis tissues and reducing the level of oxidative stress in liver tissues.

Key words: Nonalcoholic steatohepatitis; Oxidative stress; Liver fibrosis; Vascular endothelial growth factor; Tea polyphenol

Chinese Library Classification: Q95-3, R575.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)07-1205-03

前言

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量饮酒史,以肝细胞脂肪变性和脂质沉积为特征的临床病理综合征,在随着全球肥胖人数的急剧增加,非酒精性脂肪性肝病已成为 21 纪最常见疾病,其中单纯性脂肪肝和脂肪性肝炎为主要类型,后者与肝硬化和肝癌关系密切^[1-2];有研究认为氧化应激和脂质过氧化在肝组织脂肪变性后炎症的过程中发挥重要的作用^[3]。目前关于茶多酚(Tea polyphenol, TP)的抗氧化功能研究较多,而有关茶多酚对非酒精性脂肪性肝炎抗氧化作用及效果研究较少。因此,本实验以高脂饮食建立 NASH 大鼠模型后给予茶多酚治疗,观察治疗前后肝

组织病理改变及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达变化,探讨其抗氧化和肝纤维化的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

1.1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 30 只,体质量(200± 20)g,购自第四军医大学动物中心。合格证号: SCXK(军)2002-005。

1.1.2 实验药物 实验茶多酚含量为 80%,湖州荣凯生物提取有限公司。

1.1.3 主要试剂及仪器 BX40 型光学显微镜,日本 OLYMPUS 公司,抗鼠 VEGF Ⅰ型及 Ⅲ型胶原抗体、SABC 试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司,丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 NASH 大鼠模型的建立与给药方法 雄性 SD 大鼠 30

作者简介:王旭霞(1965-)女,硕士,副教授,从事消化疾病的基础和临床, Tel: 029-84777721, E-mail: wxy6510@yahoo.com.cn
[△]通讯作者:闻勤生,男,博士,教授,主任医师,从事肝胆病的基础和临床研究, Tel:029-84777421
(收稿日期 2011-05-05 接受日期 2011-05-31)

只,随机分为3组,正常对照组10只,普通饲料喂养,自由饮水;模型组20只,模型组喂高脂饮食(10%猪油+2%胆固醇+86%基础饲料),12周后模型组随机取10只给予茶多酚(150mg/kg)混合灌胃治疗,作为茶多酚治疗组,16周末与正常组一起处死,迅速取出肝脏,分别取各组大鼠肝组织作病理学、免疫组化分析以及MDA、SOD测定。

1.2.2 肝组织HE染色光镜检查 常规石蜡切片,经HE染色后光镜下观察肝组织的病理变化。

1.2.3 免疫组化检测 VEGF 和 α 型胶原表达 每组大鼠采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(SABC法)。采用MPZAS-500多媒体彩色病理图文分析系统,计算平均积分光密度。

1.2.4 MDA含量和SOD活性测定 每组大鼠切取大鼠肝组织相应部位1.0cm×0.5cm称重,加入肝组织9倍重的生理盐水,置入匀浆器中在冰水中匀浆。再以3000rpm离心5min,分别吸取0.1mL上清液按照MDA、SOD测定试剂盒提供的方法测定

MDA含量和SOD活性。

1.3 统计学分析

用统计软件SPSS10.0中的GLM模型进行多因素方差分析,测定结果以 $\bar{X} \pm S$ 表示,检验水准均为0.05。

2 结果

2.1 肝脏组织病理变化

光镜下示,正常组大鼠肝组织结构完整,肝小叶结构正常,肝细胞排列成肝索,在中央静脉周围呈放射状分布。模型组及茶多酚治疗组大鼠肝组织疏松,基本丧失肝小叶结构,肝索结构紊乱,绝大部分肝细胞内可见脂滴聚积,呈现气球样变,甚至出现点状坏死、桥接坏死,汇管区有炎性细胞浸润,均发现较多胶原纤维,亦可见小静脉周围的胶原纤维束向肝小叶周围延伸。在病变程度和病变范围上,茶多酚治疗组比模型组明显减轻(见图1)。

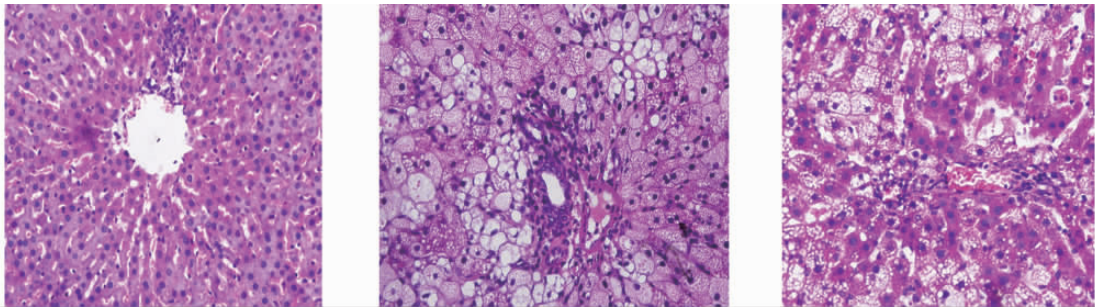


图1 各组大鼠肝脏病理学改变(HE×400)

Fig. 1 The pathological changes in rat liver of different groups(HE×400)

2.2 肝组织中 VEGF 的表达和 SOD 活性、MDA 含量变化

茶多酚治疗后大鼠肝组织中 VEGF 表达比模型组有显著下降,但仍高于比正常组(见表1),正常组为 0.071 ± 0.02 ,模型组为 0.78 ± 0.26 ,茶多酚组为 0.48 ± 0.34 ($P < 0.01$),模型组大鼠

肝组织中 SOD 活性降低而 MDA 含量明显高于正常组。与模型组相比,茶多酚治疗组肝组织中 SOD 活性明显升高、MDA 含量明显($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠肝组织中 SOD、MDA、VEGF 表达变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expressions of SOD, MDA and VEGF in rat liver tissue of different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MDA(μ mmol/mg)	SOD(NU/ml)	VEGF
Control group	10	2.15 ± 1.30 ★★	27.97 ± 1.33 ★★	0.071 ± 0.02 ★★
Model group	10	9.89 ± 1.87	10.08 ± 1.32	0.78 ± 0.26
Treatment group	10	7.58 ± 2.03 ★	12.34 ± 2.25 ★	0.48 ± 0.34 ★

Note :★★ $P < 0.05$, ★★ $P < 0.01$ Compared with model group

2.3 肝组织中 α 、 β 型胶原含量的变化

正常大鼠肝组织中无明显胶原着色。镜下见模型组肝内型胶原呈棕黄色密集片状,主要分布在汇管区。茶多酚组治疗后大鼠肝组织中型胶原含量有显著下降。

3 讨论

NASH 现已成为发达国家的第一大肝病,近年来我国亦有取代病毒性肝炎呈上升趋势^[4],其发病机制尚未完全明了,目前公认的为“二次打击”学说^[5-6],具有隐源性向肝纤维化、肝硬化

发展的趋势^[7-8],因此有效的防治 NASH 可望阻止慢性肝病进展,减少肝硬化和肝癌的发生。

近年来,自由基对肝脏的毒性损害作用被广泛关注。肝细胞脂质过氧化损伤可导致氧自由基生成增多。MDA 为自由基攻击生物膜而发生脂质过氧化反应的主要产物,可严重损伤肝细胞膜的结构,导致细胞肿胀与坏死,其含量可反映肝组织过氧化损伤的程度。脂质过氧化物也是直接刺激胶原基因转录的重要因素之一,肝星状细胞的激活与自由基、脂质过氧化物密切相关^[9]。SOD 是体内氧自由基的主要清除剂,能清除脂质过氧

表 2 各组大鼠肝组织中 、 型胶原表达变化(̄x± s)
Table 2 The expressions of collagen and in rat liver tissue of different groups (̄x± s)

Group	n	collagen	collagen
Control group	10	0.11± 0.01★★	0.19± 0.01★★
Model group	10	0.76± 0.25	0.81± 0.17
Treatment group	10	0.61 ± 0.19★	0.59± 0.23★

Note :★★P<0.05, ★★P<0.01 Compared with model group

化过程中产生的具有高度活性的超氧阴离子减轻其毒性,保护细胞的结构和功能。研究表明 SOD 有保护肝细胞、抗脂质过氧化、清除氧自由基以及防治肝纤维化的作用^[10]。因此过度氧化应激及脂质过氧化反应是肝纤维化形成与发展的重要环节。抑制脂质过氧化反应,清除氧自由基是抗肝纤维化治疗的重要方面。

TP 是茶叶的主要活性成分,其中约 80%为儿茶素类化合物。TP 含有多个酚羟基,极易被氧化成为醌类而提供质子 H,故具有较强的供氢能力,能够显著地清除体内的有害自由基并抑制原来的自由基链锁反应。TP 的抗氧化作用是一种综合效应,除了直接清除自由基之外,还与抑制氧化酶、提高抗氧化酶的活性,整合金属离子,与其他抗氧化剂协同作用等有关。国内外研究发现,茶多酚安全无毒,除了具有抗氧化作用外,还具有增强机体抵抗力、防癌、抗肿瘤、抗辐射、抑菌、抗病毒抗衰老等多种生物活性^[11-12]。

本研究通过高脂饮食成功的制备了 NASH 动物模型^[13-14],模型组大鼠肝组织 VEGF 表达明显增强,过氧化物 MDA 含量增加,清除过氧化物的 SOD 活性下降,提示各种炎性细胞因子可激活肝枯否细胞和 HSC 而产生 VEGF,它不仅促进肝窦内皮细胞的增殖,而且促进毛细血管内皮细胞的增殖,导致肝窦基底膜的形成,内皮细胞筛孔消失,即肝窦毛细血管瘤,从而造成肝组织微循环障碍,肝组织缺血、缺氧,产生过度氧化应激,降低肝脏清除过氧化物能力,从而导致 NASH 以及早期肝纤维化的发生、发展。目前国内外肝病学者普遍认为,肝纤维化是可以逆转的,而肝硬化是不可逆转的^[15]。TP 治疗组大鼠肝组织中 VEGF 表达明显下降,MDA 含量下降及 SOD 活性升高,、型胶原含量下降,说明治疗组肝组织 VEGF 及氧化应激水平降低,肝纤维化程度明显改善,因此 TP 具有抗炎、抗纤维化作用,其减轻肝纤维化程度的作用可能与抑制各种炎性细胞因子对 HSC 活化的诱导作用、减少 VEGF 产生、降低肝组织氧化应激水平,增强肝细胞清除过氧化物的能力。

本研究认为,通过有效的抗氧化治疗来抑制应激是必要的,以及开发增加抗氧化治疗非酒精性脂肪性肝炎的关键,TP 具有抗炎、抗纤维化作用,可作为有效抗氧化药物,但其作用的机制和应用价值还待进一步研究和开发。

参 考 文 献(References)

[1] Adam s LA, Angu lo P. Recent concepts in non alcoholic fatty liver disease [J].Diabet Med,2005,22:1129-1133

[2] Reid AE. Nonalcoholic sreatohepatitis.Gastroenterology, 2001, 121:

710-723

[3] 蒋兴亮,张均,刘素兰,等. 非酒精性脂肪肝患者氧化应激和抗氧化酶状态[J].四川医学,2009,30(12):1958-1960

Jiang Xing-liang, Zhang Jun, Liu Sulan, et al. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hepatosteatosi s [J]. Sichuan medical journal, 2009, 30(12): 1958-1960

[4] Ayata G, Gordon FD, Lewis WD, et al. Cryptogenic cirrhosis: clinicopathologic findings at and after liver transplantation [J].Hum Pathol, 2002,33(11):1098-1104

[5] Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [J].Semin Liver Dis,2001,21: 27-41

[6] Zou Y, Li J, Lu C, et al.High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis [J].Life Sci,2006,79:1100-1107

[7] Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2005, 42:473-480

[8] Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH, et al. Spectrum of NAFLD and diagnostic implications of the proposed new normal range for serum ALT in obese women[J]. Hepatology, 2005, 42:650-656

[9] Shi HY, Xu JW, Ren XX. et al. Effect of genistein on hepatic stellate cell proliferation and lipid peroxidation in vitro [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008, 28(11):2066-2068

[10] Karadeniz G, Acikgoz S, Ozel TI, et al. Oxidized low-density-lipoprotein accumulation is associated with liver fibrosis in experimental homeostasis [J]. Clinics, 2008,63(4):531-540

[11] 朱桂勤,李建科. 茶多酚的功能研究 [J]. 食品研究与开发,2005,26 (1): 33-35

Zhu Gui-qin, Li Jian-ke. The development in function of tea polyphenols [J]. Food Research and Development, 2005, 26(1): 33-35

[12] 刘少锋,韩真.茶多酚的生物活性及其对实验性肝损伤的保护作用 [J].世界华人消化杂志, 2004, 12(10): 2429-2431

Liu Shao-feng, Han Zhen. Biological activities of tea polyphenols and its protective effects on experimental hepatic injury [J]. World J Gastroenterol, 2004, 12(10): 2429-2431

[13] Lieber CS, Leo MA, Mak KM, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis[J].Am Clin Nutr, 2004,79:502-509

[14] Fan JG, Zhong L, Xu ZJ, et al. Effects of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia [J]. World Gastroenterol,2003,9:2045-2049

[15] Lee KS. Hepatic fibrogenesis[J]. Korean J Gastroenterol,2006,48 (5): 297-305