

# 绿茶提取物对四氯化碳所致大鼠肝硬化的保护作用

肖继平 陆瑞芳 沈新南 吴岷

**【摘要】**目的 利用四氯化碳大鼠肝硬化模型,研究绿茶提取物对慢性肝损伤的保护作用。方法 将动物分为 3 组:正常对照组,绿茶提取物处理组,肝硬化组。绿茶提取物处理组及肝硬化组分别按 0.3 ml/100 g 皮下注射 40%CCl<sub>4</sub>,每周 2 次。于注射 CCl<sub>4</sub> 后的第 2 周,第 9 周分两批处死大鼠。观察肝羟脯氨酸含量、肝脂质过氧化产物丙二醛含量(MDA)、肝组织病理变化及肝组织中转化生长因子<sub>1</sub>(TGF-<sub>1</sub>) mRNA 表达情况。结果 绿茶提取物处理组与肝硬化组相比,第 2 周及第 9 周 MDA 含量、TGF-<sub>1</sub> mRNA 表达明显降低;第 9 周羟脯氨酸含量明显降低;组织病理观察显示绿茶提取物处理组肝纤维化程度比肝硬化组轻。结论 补充绿茶提取物能减轻 CCl<sub>4</sub> 所致的肝硬化,可能是由于绿茶提取物的抗氧化作用导致肝组织 TGF-<sub>1</sub> mRNA 表达的降低,从而抑制了 TGF-<sub>1</sub> 介导的纤维增生、沉积过程。

**【关键词】**肝硬化; 抗氧化药; 转化生长因子<sub>1</sub>; 茶; 植物提取物

## Green tea extracts protected against carbon tetrachloride induced chronic liver damage and cirrhosis

XIAO Jiping, LU Ruifang, SHEN Xinnan, WU Min. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Health, Fudan University, Shanghai 200032, China

**【Abstract】 Objective** Using the carbon tetrachloride liver cirrhosis rat model, the protective effect of the green tea extractive (GTE) on the liver cirrhosis was studied. **Methods** Male SD rats were randomly divided into three groups: normal group, GTE group and cirrhosis group. The GTE group and the cirrhosis group were injected subcutaneously 2 times/wk over 9 weeks with 40% CCl<sub>4</sub>. In the second and the ninth week, the rats were sacrificed to measure MDA and hydroxyproline concentrations and TGF-<sub>1</sub> mRNA expression in liver tissue, as well as to conduct histological examination on various organs. **Results** Compared with the cirrhosis group, the MDA and the hydroxyproline concentrations in the GTE group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). The liver necrosis and cirrhosis were extenuated in the GTE group by means of histologic examination. The expression of the TGF-<sub>1</sub> mRNA was reduced significantly in the GTE group. **Conclusion** Dietary supplementation of GTE can protect against CCl<sub>4</sub>-induced liver damage and cirrhosis in rats.

**【Key words】** Liver cirrhosis; Antioxidants; Free Radical; Transforming growth factor beta; Tea; Plant extracts extractive

绿茶是我国最盛行的饮料之一,有许多的研究报道绿茶具有多种生物学功能,如抗氧化、抗突变、抑制肿瘤生成、降血脂及抗血栓作用;而关于绿茶对肝脏的作用研究不多。Hikono 等研究发现在培养的肝原代细胞中加入绿茶的有效成分表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表没食子儿茶素(EGC)、儿茶素等,都能有效的保护由四氯化碳或 D-氨基半乳糖所致的肝细胞损伤。Kimio 等<sup>[1]</sup>报道在大鼠动物实验中,摄入绿茶提取物能显著的减轻 D-氨基半乳糖

对大鼠肝造成的急性肝损伤。但是关于绿茶对慢性肝损伤的作用尚未见报道。因此,我们拟通过四氯化碳致肝硬化模型,研究绿茶对慢性肝损伤的作用。

## 材料与方法

1. 材料:绿茶提取物(由中国农业科学院茶叶研究所提供,提取方法见文献[2]);四氯化碳(上海化学试剂厂);TriZol、dNTPs、DTT、六聚体随机引物、RNA 酶抑制剂、M-MLV 逆转录酶及 Taq 酶试剂盒(GIBCO 公司);羟脯氨酸试剂盒、丙二醛试剂盒(南京建成生物工程公司);胶原酶、蛋白酶 E、Dnase 酶(Sigma 公司);DMEM 培养液(Hyclone 公司)。

作者单位:200032 上海,复旦大学公共卫生学院营养与食品卫生教研室(肖继平现在上海疾病控制中心毒理室 200027)

2. 实验动物及处理:由上海医科大学动物部提供 SD 雄性大鼠,90 只,体重 90 ~ 110 g,按体重随机分为 3 组:正常对照组、绿茶提取物处理组及肝硬化组 3 组,每组 30 只。正常对照组饲以基础饲料,绿茶提取物处理组饲料含有 1.5 % 绿茶提取物,肝硬化组饲以基础饲料。三组大鼠预先饲养 2 周,2 周后,绿茶提取物处理组及肝硬化组以 0.3 ml/100 g 皮下注射浓度为 40 % 的 CCl<sub>4</sub> 石蜡油溶液<sup>[3]</sup>,正常对照组皮下注射石蜡油,每周 2 次,共 9 周。每组大鼠分别于注射第 1 针四氯化碳后的第 2 周末、第 9 周末分两批处死,心脏取血,取肝左叶待做病理组织学检查,取 0.5 g 肝制成 10 % 匀浆,测定羟脯氨酸含量。另分别在第 2 周、第 9 周,每组取 5 只大鼠分离肝间质细胞,测定转化生长因子<sub>1</sub> mRNA 的表达。

3. 观察指标:

(1) 羟脯氨酸测定:肝组织经无水乙醇脱水,丙酮脱脂后在 6 mol/L 的 HCl 溶液中水解。调整水解液 pH 值到 6.0,水解液经氧化后与二甲氨基甲醛作用呈现紫红色,在 550 nm 处有最大吸收值,根据其呈色的深浅可推算其含量。

(2) 脂质过氧化产物(MDA)测定:TBA 缩合法。

(3) 组织病理切片观察:取肝左叶,浸入 0.4 % 甲醛,HE 染色。胶原纤维增生判断标准:正常肝组织,无胶原增生;(+)胶原明显增生,从汇管区或中央静脉呈星状向外延伸,无纤维隔形成;(++)胶原明显增生,形成彼此不连接的不完全纤维隔;(+++ )胶原纤维形成完全的相互连接的纤维隔分隔肝实质。

(4) 转化生长因子<sub>1</sub> (TGF-<sub>1</sub>) mRNA 表达测定:肝间质细胞的分离:参照 Paul 等<sup>[4]</sup>所述方法分离出肝间质细胞。锥虫染色,肝间质细胞存活率 90 %。

引物设计: - Actin 引物序列(5'-ACT CCT ACG TGG GCG ACG AG-3', 5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GGC-3)、TGF-<sub>1</sub> 引物序列(5'-ACC AAC TAC TGC TTC AGC TC-3', 5'-TGT TGG TTG TAG AGG GCA AG-3) 参考文献[5,6],竞争性模板引物序列(5'-ACC AAC TAC TGC TTC AGC TC-3', 5'-TGT TGG TTG TAG AGG GCA AGC AGA CAG AAG TTG GCA-3)设计参照文献方法<sup>[5]</sup>。

半定量竞争 RT-PCR 法<sup>[5]</sup>检测 TGF-<sub>1</sub> mRNA 表达:根据试剂盒操作步骤,用 Trizol 提取细胞 RNA,异丙醇沉淀,将 RNA 溶于 REPC 水,以分光光度计 A260/280 nm 定量。取 2 μg RNA,加入 1 mmol/L 六聚

体随机引物,68 加热 5 min,冷却后加入逆转录缓冲液(250 mmol/L Tris-HCl,375 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,pH8.3),1 mmol/L dNTPs,1 U/μl Rnasin 和 2.5 U/μl MMLV 逆转录酶,反应总体积为 20 μl,置 42 1 h,94 加热 5 min,灭活逆转录酶,获得的 cDNA 置 -20 保存。

竞争性模板的构建:通过引物的设计,利用 PCR 技术删除目的 cDNA 中的部分核苷酸,从而获得两端核苷酸序列与目的 cDNA 相同,但长度略短的竞争性模板,通过琼脂糖凝胶电泳可将扩增的目的片段与竞争性模板片段区分开<sup>[5]</sup>。

竞争性 PCR:首先对逆转录产物进行基因 - Actin 扩增,根据 -Actin 条带的密度调整 cDNA 用量,使各标本间 cDNA 用量一致。然后在待各扩增的 cDNA 管中加入一定量的竞争性模板及 TGF-<sub>1</sub> 引物,同管扩增。PCR 反应总体积为 50 μl,含 200 μmol/L dNTPs,25 μmol/L MgCl<sub>2</sub>,1 U Taq DNA 聚合酶,100 mmol/L Tris-HCl,pH8.3。PCR 循环参数:95 预变性 2 min,然后 95 1 min,60 退火 1 min,72 延长 1 min。- Actin 25 个循环,TGF-<sub>1</sub> 30 个循环,最后 72 延伸 7 min。取 10 μl PCR 产物凝胶电泳,经凝胶图像分析系统(上海四星公司)作密度扫描定量分析,计算目的片段/竞争性模板(T/C)的比值。

4. 统计分析:计量资料运用 SAS 统计软件作方差分析,等级分组资料进行 Ridit 分析。

结 果

1. 一般情况:实验结束时,肝硬化组大鼠死亡 5 只,绿茶提取物处理组死亡 3 只,正常对照组无死亡。第 9 周,肝硬化组大鼠活动较少,反应迟钝,毛发无光泽,腹腔内有腹水,肝质硬,表面布满大小不等的结节,膈面粘连率为 3/12;绿茶提取物处理组肝稍硬,表面粗糙,膈面无粘连,未见腹水。

2. 绿茶提取物对慢性肝损伤大鼠肝组织羟脯氨酸含量的影响:肝硬化时,肝内主要增加的成分是胶原纤维,羟脯氨酸为胶原纤维所特有,占胶原蛋白的 13.4 %,测定肝羟脯氨酸的含量,可反映肝硬化程度。由表 1 可见,在第 9 周,绿茶提取物处理组羟脯氨酸含量高于正常对照组 (P < 0.05),说明绿茶提取物处理组大鼠肝组织内纤维增生,但其增生程度明显低于肝硬化组 (P < 0.05),说明绿茶提取物可减轻 CCl<sub>4</sub> 导致的肝纤维增生。

3. 绿茶提取物对慢性肝损伤大鼠肝组织丙二醛

表 1 绿茶提取物对慢性肝损伤大鼠肝组织  
羟脯氨酸、MDA(丙二醛)含量的影响

周次	组别	动物数 (只)	MDA (nmol/g 肝) ( $\bar{x} \pm s$ )	羟脯氨酸 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ 肝干重) ( $\bar{x} \pm s$ )
第 2 周	肝硬化组	8	193.7 $\pm$ 53.2	0.735 $\pm$ 0.055
	绿茶提取物 处理组	8	123.5 $\pm$ 66.2 <sup>a</sup>	0.759 $\pm$ 0.061
	正常对照组	10	91.9 $\pm$ 19.9 <sup>a</sup>	0.589 $\pm$ 0.091 <sup>a</sup>
第 9 周	肝硬化组	7	227.6 $\pm$ 74.12	1.335 $\pm$ 0.420
	绿茶提取物 处理组	9	166.9 $\pm$ 33.07 <sup>a</sup>	0.894 $\pm$ 0.112 <sup>a,b</sup>
	正常对照组	10	110.53 $\pm$ 33.07 <sup>a</sup>	0.547 $\pm$ 0.073 <sup>a</sup>

a 与肝硬化组相比  $P < 0.05$ ; b 与正常对照组相比  $P < 0.05$

(MDA)含量的影响:MDA 是多不饱和脂肪酸被氧化的产物,其含量的多少能反映机体内脂质过氧化的程度。如表 1,茶提取物组 MDA 含量与正常对照组相比浓度虽有上升但不显著 ( $P > 0.05$ ),但显著低于肝硬化组,提示绿茶提取物可减轻  $\text{CCl}_4$  对肝组织的脂质过氧化作用。

4. 组织病理学观察:如图 1,正常对照组:肝细胞均正常,未见硬化或变性、坏死。肝硬化组:可见明显的纤维增生并出现假小叶伴有明显炎症细胞浸润,假小叶边界清楚。肝细胞发生凝固性坏死和中到重度脂肪变性。绿茶提取物处理组:未见肝假小叶,只有较细的纤维与汇管区相连;肝细胞有中到重度的肝脂肪变性。绿茶提取物对慢性肝损伤大鼠纤维增生影响见表 2。

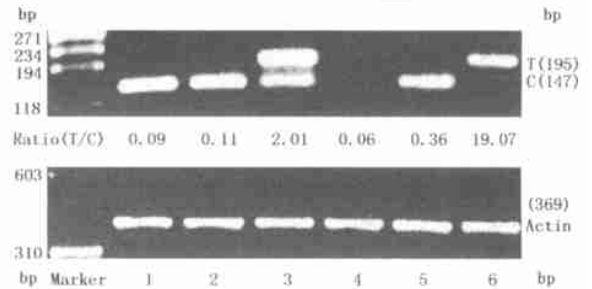
表 2 第 9 周绿茶提取物对慢性肝损伤大鼠  
肝纤维增生的影响

组别	动物数 (只)	纤维增生程度				Ridit 平均值
		-	+	++	+++	
肝硬化组	7	0	1	3	3	0.791
绿茶提取物处理组	9	2	5	2	0	0.451
正常对照组	10	10	0	0	0	0.231

\*3 组纤维化程度差异显著 ( $P < 0.05$ ),绿茶提取物处理组纤维化程度轻于肝硬化组

5. 绿茶提取物对慢性肝损伤大鼠  $\text{TGF-}\beta_1$  mRNA 表达的影响:本实验中采用的是一种改良的竞争性 RT-PCR<sup>[5]</sup>,该方法通过 - Actin 调整 cDNA 的用量,利用竞争性模板控制 PCR 反应时的管扩增差异,可较准确的定量检测细胞因子 mRNA。通过目的基因与竞争性模板比值的比较,可反映不同样品  $\text{TGF-}\beta_1$  mRNA 表达的高低,比值越高,表明样品  $\text{TGF-}\beta_1$  mRNA 表达越高。结果如图 2,可见肝硬化组  $\text{TGF-}\beta_1$  mRNA 表达明显增高,绿茶提取物能显著的降低  $\text{CCl}_4$  引起的肝  $\text{TGF-}\beta_1$  mRNA 高表达。

1mRNA 表达越高。结果如图 2,可见肝硬化组  $\text{TGF-}\beta_1$  mRNA 表达明显增高,绿茶提取物能显著的降低  $\text{CCl}_4$  引起的肝  $\text{TGF-}\beta_1$  mRNA 高表达。



T:目标基因即  $\text{TGF-}\beta_1$  C:竞争性模板 Ration(T/C):目标基因与竞争性模板比值

0.09 为第 2 周正常组 T/C 比值比 0.06 为第 9 周正常组 T/C 比值比 0.11 为第 2 周绿茶提取物处理组 T/C 比值比 0.36 为第 9 周绿茶提取物处理组 T/C 比值比 2.01 为第 2 周肝硬化组 T/C 比值比 19.07 为第 9 周肝硬化 T/C 比值比

图 2 绿茶提取物对  $\text{TGF-}\beta_1$  mRNA 表达的影响

## 讨 论

绿茶提取物的主要成分是茶多酚,茶多酚是一种天然抗氧化剂,茶多酚结构中富含酚羟基,可提供活泼氢使自由基灭活,而本身被氧化形成的自由基由于含邻苯二酚结构而具有较高稳定性,因此茶多酚具有清除自由基及抑制脂质过氧化的作用<sup>[7]</sup>。本实验也观察到茶提取物能抑制四氯化碳引起的肝脂质过氧化。

在  $\text{CCl}_4$  肝硬化模型中,大鼠给予  $\text{CCl}_4$  后,肝细胞发生坏死及脂肪变性,这种毒性作用是由于细胞色素酶 P-450,将  $\text{CCl}_4$  代谢为  $\text{CCl}_3 \cdot$  自由基,  $\text{CCl}_3 \cdot$  自由基与  $\text{O}_2$  反应形成  $\text{CCl}_3\text{O}_2 \cdot$  自由基<sup>[8]</sup>。这些自由基与多不饱和脂肪酸反应生成脂质过氧化产物。Bedossa 等<sup>[9]</sup>利用位点杂交和免疫组织化学的方法证实胶原 1( $\alpha_1$ ) mRNA 表达的增加与  $\text{CCl}_4$  诱导的脂质过氧化发生在相同的位点,提示  $\text{CCl}_4$  肝硬化模型中胶原的增多可能与脂质过氧化作用有关。脂质过氧化产物能刺激肝间质细胞分泌各种细胞因子如  $\text{TGF-}\beta_1$ 、血小板源性生长因子(PDGF),这些细胞因子能激活  $\text{Ito}$  细胞并使其增生分化,其功能也发生改变,由主要分泌 Ⅰ型胶原转变为以分泌 Ⅲ型胶原为主,并且其分泌的 Ⅲ型胶原的总量增加<sup>[10]</sup>。此

外,补充抗氧化剂黄酮西利马林<sup>[11]</sup>或维生素 E<sup>[8]</sup>均能明显的抑制 CCl<sub>4</sub> 引起的肝硬化,这从侧面也说明脂质过氧化能引起肝硬化。

许多研究表明 TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 在肝硬化的发展过程中具有重要的作用<sup>[12]</sup>。TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 诱导肝硬化的可能机制有:增加细胞外基质(ECM)蛋白的表达如 型胶原的表达;抑制 ECM 降解如增加纤溶酶原激活剂抑制剂(PAL-1)、金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPS)的产量、抑制胶原酶的产生;TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 还可加速 Ito 细胞从静止期向激活态的转变<sup>[13]</sup>。

本次实验之所以分离肝间质细胞来测定 TGF- $\beta$ <sub>1</sub> mRNA 的表达,是因为在 CCl<sub>4</sub> 肝硬化模型中,TGF- $\beta$ <sub>1</sub> mRNA 主要在肝间质细胞如 Ito 细胞, Kupffer 细胞及内皮细胞中高表达,而肝细胞基本不表达<sup>[14]</sup>。

本次实验中观察到绿茶提取物能明显减轻 CCl<sub>4</sub> 造成的肝硬化,我们认为这可能是由于绿茶提取物具有清除自由基的作用。绿茶提取物抑制脂质过氧化物引起的 TGF- $\beta$ <sub>1</sub> mRNA 高表达,从而抑制 TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 介导的胶原纤维增生沉积过程。实验也同时表明,绿茶提取物并不能完全抑制四氯化碳所致的肝纤维化,可能四氯化碳所致肝纤维化有多种机制,自由基只是其中机制之一。

(本文图 1 见封四)

参 考 文 献

1 Sugiyama K, He P, Wada S, et al. Green tea suppresses D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*,

1998, 62:609-611.

2 沈新南,陆瑞芳,唐金发,等. 茶多酚降血脂作用的实验研究. *营养学报* 1993, 15:147-151.

3 宋本才,殷树仪,唐望先,等. 实验性肝硬化酶组织化学变化的研究. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 1999, 8(1):47-50.

4 Yaswen P, Hayner NT, Fausto N. Isolation of oval cells by centrifugal elutriation and comparison with other cell types purified from normal and preneoplastic livers. *Cancer Res*, 1984, 44:324-331.

5 Sun B, Wells J, Goldmuntz E, et al. A simplified, competitive RT-PCR method for measuring rat IFN-gamma mRNA expression. *J Immunol Methods*, 1996, 195:139-148.

6 Lemaire I, Yang H, Lafont V, et al. Differential effects of macrophage- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors on cytokine gene expression during rat alveolar macrophage differentiation into multinucleated giant cells (MGC): role for IL-6 in type2 MGC formation. *J Immunol*, 1996, 157:5118-5125.

7 史霄燕,曾繁典. 茶多酚的抗氧化作用及机制. *国外医学药学分册*, 1998, 25:196-199.

8 Parola M, Leonarduzzi G, Biasi F, et al. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology*, 1992, 16:1014-1021.

9 Bedossa P, Houglum K, Trautwein C, et al. Stimulation of collagen alpha1 ( ) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: A link to tissue fibrosis? *Hepatology*, 1994, 19:1262-1271.

10 Britton RS, Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepato gastroenterology*, 1994, 41:343-348.

11 Moutelle M, Muriel P, Favan L, et al. Prevention of CCl<sub>4</sub>-induced liver cirrhosis by silymarin. *Fundam Clin Pharmacol*, 1989, 3:183-191.

12 Clouthier DE, Comerford SA, Hsmer RE. Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCk-TGF beta1 transgenic mice. *J Clin Invest*, 1997, 100:2697-2713.

13 Claus H, Branko S, Frank G, et al. The role of TGF- $\beta$ <sub>1</sub> in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol*, 1999, 30:77-87.

14 De Bleser P, Niki T, Rogiers V, et al. Transforming growth factor-gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol*, 1997, 26:886-893.

(收稿日期:2001-03-02)

(本文编辑:刘群)

消息

健康行为研究方法研讨班将在杭州举行

健康行为研究方法研讨班将于 2002 年 9 月 17 日~9 月 22 日在杭州举行。该班为国家级继续教育项目。本次研讨班由浙江大学、San Diego 加州大学专家授课。主要内容有:行为基本理论,行为改变技术,健康行为观察与测评,健康行为改变模式(健康信念理论、合理行动理论、行为分阶段改变理论等),行为群体干预的创新与传播理论,健康行为研究常

用统计分析方法的 SAS 编程,行为纵向研究设计,健康行为研究标书撰写与申请策略,健康行为论文的写作等。

联系地址:杭州市延安路 353 号 浙江大学医学院公共卫生系 邮编 310006 联系人:杨廷忠老师 联系电话:0571-85920394 或:杭州师范学院医学院 黄丽老师 邮编:310012 联系电话:0571-88917075 13616550387



### 硒和锌对氟致大鼠肾脏细胞凋亡及增殖周期变化的影响

(正文见第 219 页)

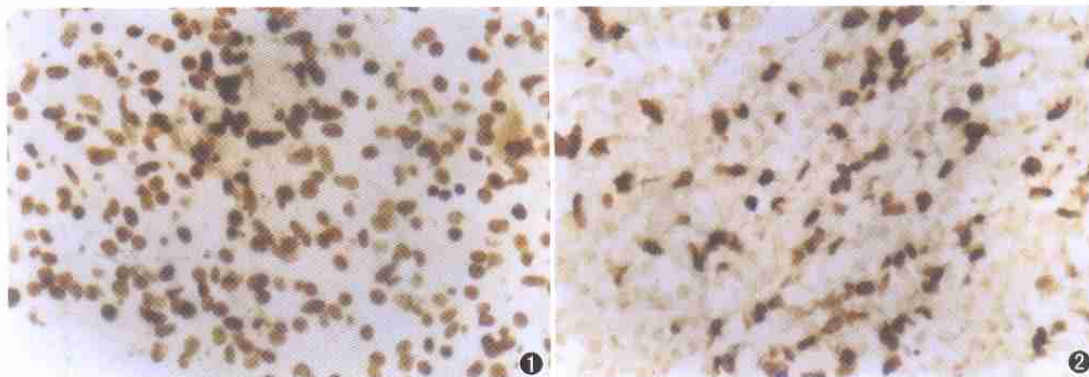
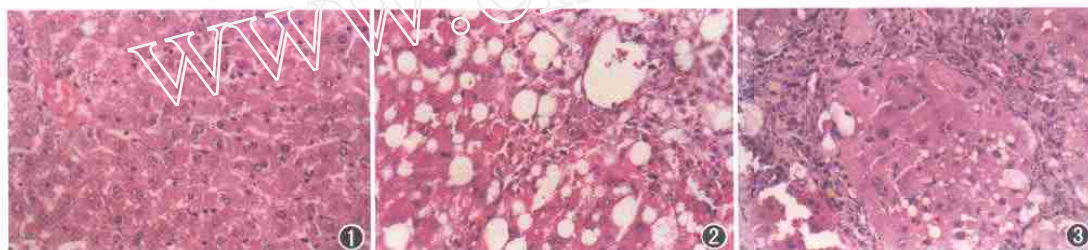


图1 TUNEL 照片,氟中毒组用含底物过氧化酶的 DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.05%/0.01%)显色 5 min, PBS 终止显色 ×400 图2 TUNEL 照片,氟和低剂量硒锌组用含底物过氧化酶的 DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.05%/0.01%)显色 5 min, PBS 终止显色 ×400

### 绿茶提取物对四氯化碳所致大鼠肝硬化的保护作用

(正文见第 243 页)



1 正常组 2 绿茶提取物组 3 肝硬化组

图1 第9周肝细胞切片图 HE 染色 40×10

### 汽油对皮肤细胞 DNA、蛋白质及皮脂合成能力的影响

(正文见第 261 页)

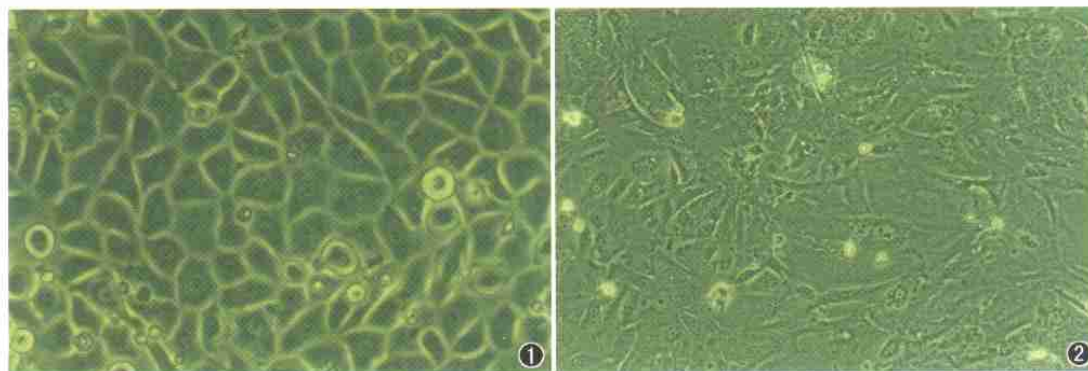


图1 原代培养 SD 大鼠皮肤角质细胞 40×10

图2 原代培养 SD 大鼠皮肤纤维细胞 40×10