基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0285-05

用苹果辅助逆转大鼠肝纤维化的实验性研究

祝娟娟,程明亮,穆 茂
(贵阳医学院附属医院感染科,贵阳 550004)

【摘 要】目的:研究苹果对实验性肝纤维化大鼠的辅助逆转作用,并探讨其对肝纤维化的影响机制。方法:雄性 SD 大鼠 42 只分为正常组、CCl_4 肝纤维化模型组、自然恢复组、丹芍化纤治疗组、丹芍化纤 + 苹果试验组。除正常组以外,其余大鼠均采用 CCl_4、饮酒、高脂低蛋白饮食等复合因素刺激制备大鼠肝纤维化模型共 8 周。确认造模成功后再将剩余模型组大鼠随机分为丹芍化纤 + 苹果试验组、丹芍化纤治疗组及自然恢复组,共观察 8 周。结果:丹芍化纤 + 苹果试验组与模型组、自然恢复组及丹芍化纤治疗组比较:肝脏指数、血清 ALT 及 AST 显著下降($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.01$);RT-PCR 中核因子相关因子 2(NF-E2-related factor 2,Nrf-2)mRNA 及血红素加氧酶 -1(Heme oxygenase-1,HO-1) mRNA 在丹芍化纤 + 苹果试验组中的表达较丹芍化纤治疗组与模型组、自然恢复组升高($P<0.05$),丹芍化纤 + 苹果试验组中肝组织 TGF-β1 的表达较丹芍化纤治疗组与模型组、自然恢复组降低($P<0.05$)、而 MMP-2 在丹芍化纤 + 苹果试验组中的表达较丹芍化纤治疗组与模型组、自然恢复组升高($P<0.05$);GSH 有所升高,MDA 有所降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:苹果在实验性肝纤维化大鼠的逆转过程中起到了有效的辅助作用,辅助逆转的机制可能与其上调 Nrf-2 表达,从而增强 HO-1 表达,增强其抗氧化功能,抑制脂质过氧化作用在丹芍化纤胶囊的治疗基础上进一步抑制了 TGF-β1 的表达;从而促进细胞外基质的降解,这可能是苹果辅助逆转肝纤维化的机制之一。

【关键词】苹果;丹芍化纤胶囊;肝纤维化;核因子相关因子 -2;血红素加氧酶 -1;转化生长因子 β1;基质金属蛋白酶;丙二醛;谷胱甘肽
【中国图书分类法分类号】R51 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-10-01

Adjuvant reverse effect of apple on liver fibrosis in rats

ZHU Juan-juan, et al
(*Department of Infection, the Affiliated Hospital, Guiyang Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To study the beneficial effects of apple as an adjuvant on liver fibrosis in rats and to explore its potential mechanisms. *Methods*: Forty-two SD rats were divided into the normal(n=10), fibrosis model control(n=8), Danshao Huaxian (DHC)(n=8), DHC plus Apple (n=8) and model (n=8) groups. Liver fibrosis model was induced by complex etiological factors, including CCl4, alcohol (every other day)and high lipid, low protein diets for eight weeks. After the establishment of liver fibrosis, model rats were treated with DHC and DHC plus Apple .The degree of liver fibrosis was examined under microscope. the liver index. *Results*: ALT and AST were significantly decreased in DHC plus Apple group($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$). GSH of liver homogenate in DHC plus Apple group was significantly higher and MDA was lower than those in the DHC and model control groups ($P<0.05$). Hepatic mRNA expression of TGF-β1 was significantly decreased ($P<0.05$), while the expre-ssions of MMP-2 Nrf-2 and HO-1 were significantly increased compared to model control, DHC and Apple alone groups ($P<0.05$). *Conclusion*:

作者介绍:祝娟娟(1983-),女,硕士,
研究方向:肝纤维化的发生发展机制。
通信作者:程明亮,男,教授,Email:chengml@21cn.com。

学杂志,2000,18(6):416-418.
[5] 黄晓晶,刘天佳,杨锦波,等.高龋及无龋者变形链球菌临床分离株致龋性研究 Ⅱ 合成细胞外多糖能力的实验研究[J].华西口腔医学杂志,2000,18(6):419-421.
[6] 黄晓晶,刘天佳,蔡志宇,等.不同龋敏感者变形链球菌临床分离株产酸能力的研究[J].四川大学学报(医学版),2004,35(4):520-521.
[7] 黄晓晶,刘天佳,蔡志宇,等.变形链球菌体外耐酸能力的实验研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志,2004,14(8):427-429.
[8] 方会清,吴补领,苏凌云,等. 老年人高龋患者牙菌斑中变形链球菌临床分离株合成胞外多糖能力的研究[J].中华老年口腔医学杂志,2006,5(2):65-66.
[9] Tsumori H, Kuramitsu H.The role of the *Streptococcus mutans* gluco syltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: the essential role of the GtfC enzyme[J]. Oral Microbiol Immunol, 1997, 12(5):274-280.
[10] Mattos-Graner R O, Smith D J, King W F, et al.Water-insolu bleglucan synthesis by mutans Streptococcal strains correlateswith caries incidence in 12- to 30-month-old children[J]. J Dent Res, 2000, 79(6): 1371-1377.
[11] Xiao J, Koo H. Structural organization and dynamics of exopolysac charide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms[J]. J Appl Microbiol, 2009, 4(2): 125-127.
[12] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J].Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.

(责任编辑:冉明会)

Apple has beneficial effects as an adjuvant in the treatment of liver fibrosis when used together with DHC in rats. The mechanisms of apple as an adjuvant in reversing the rats liver fibrosis seems to up modulate the expression of Nrf-2 while promote the HO-1 expression and amplify anti-oxidize reaction .These effects appear to be related to promoting the degradation of extracellular base by induction of MMP, and by suppression of TGF-β 1 expression.

【Key words】apple; danshao Huaxian powder; liver fibrosis; NF-E2-related factor 2(Nrf2); Heme oxygenase-1(HO-1); transfer growth factor β 1; matrix metalloproteinase; malondialdehyde(MDA); glutathion(GSH)

肝纤维化是肝硬化的早期阶段,在此阶段,通过有效防治,完全可以发生逆转,从而可以阻止向肝硬化或肝癌的发展,因此,近些年来对肝纤维化的防治已成为肝病领域的研究热点。不少研究表明:中医药在抗肝纤维化的治疗中发挥了积极的作用,并已展示良好的应用前景。丹芍化纤胶囊由丹参、赤芍、防己、银杏叶、黄芪组成。具有活血化瘀,通络软坚的功效,近年来被广泛用于治疗肝纤维化,并取得了较好的临床效果。苹果素有百果之王的美称,具有多种保健功能,在很多疾病的治疗中均起到了不同程度的辅助作用。有研究者认为:苹果是肝纤维化病人最佳的食疗果品,其中的营养成份对肝细胞的再生和修复功能都具有很重要的作用[1];且在内科综合疗法加食苹果逆转肝纤维化的临床疗效观察中发现:肝硬化发生率明显低于不吃苹果者[2],鉴于上述研究基础,本实验采用丹芍化纤加苹果来观察 CCl_4 诱导大鼠逆转肝纤维化的疗效。并探讨苹果对肝纤维化的辅助逆转机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及动物分组

雄性 SD 大鼠 42 只,清洁级,体重(200 ± 20) g(许可证批号:060001),购自重庆第三军医大学,予大鼠颗粒饲料喂养,自由饮水,自然采光,室温 20℃,实验前适应性喂养 1 周。苹果(产于农业部公布的我国唯一符合 7 项生态适宜指标的 - 陕西延安苹果);丹芍化纤胶囊(批号:20013,贵阳制药厂生产)临用前取胶囊内容物研磨成粉末,用蒸馏水稀释成所需浓度;四氯化碳分析纯(批号 981201,重庆无机化学试剂厂生产);胆固醇(批号 951108, 北京化学试剂公司生产);丙二醛测定试剂盒(批号 20081123,北京博奥森生物工程有限公司);还原型谷胱甘肽测定试剂盒(批号 20081124,北京博奥森生物工程有限公司);转化生长因子 β 1(Transfer growth factor β 1,TGF-β 1)、基质金属蛋白酶 2(Matrix metalloproteinase,MMP-2)引物(上海捷瑞生物工程有限公司);核因子相关因子 -2(NF-E2-related factor 2,Nrf-2)、血红素加氧酶 -1(Heme oxygenase-1,HO-1)引物、TRIzol 试剂 、逆转录 cDNA 第 1 链合成试剂盒、β -actin 引物等由美国国家环境卫生科学研究所刘杰博士惠赠。

1.2 模型制备及分组

将 42 只大鼠随机分成 5 组:正常组 10 只,CCl_4 肝纤维化模型组(模型组)8 只,自然恢复组 8 只,丹芍化纤 + 苹果试验组 8 只,丹芍化纤治疗组 8 只。正常组正常饮食,自由饮水;其余大鼠均用复合病因刺激制备大鼠肝纤维化模型:皮下注射 40%CCl_4 花生油溶液 0. 3 ml/100 g(首次用纯 CCl_4 0.5 ml/100 g),每周 2 次,共 8 周;同时喂予高脂低蛋白饲料(79.5% 玉米粉,20%猪油,0.5%胆固醇),间日以 30%乙醇为饮料。造模结束后部分 CCl_4 模型组大鼠,股动脉放血处死(处死前称体重),留取血液及全部肝脏:每只大鼠取相同部位肝脏用 10%中性甲醛固定;1 周后取肝脏组织切片镜检,剩余肝脏组织 -80℃低温冰箱保存;血液 1 500 r/min 离心 10 min 后将血清置于 -80℃低温冰箱保存。确认造模成功后,将模型组剩余大鼠(除正常组外)随机分为 3 组,自然恢复组、丹芍化纤治疗组(给予丹芍化纤粉末加蒸馏水混合溶液:药物浓度为 0.1 g/100 g 大鼠体重配比,以 0.2 ml/10 g/d 灌胃 1 次)、丹芍化纤(丹芍化纤粉末加蒸馏水混合溶液:药物浓度为 0.1 g/100 g 大鼠体重配比,以 0.2 ml/10 (g·d)灌胃 1 次)+ 苹果试验组(新鲜苹果切碎组织匀浆机匀浆后过滤取汁为 4 ml/100 g 大鼠体重灌胃,在前期预实验中发现,这是大鼠胃能耐受的最大容积)。正常组给予等容生理盐水。观察 8 周,实验结束,禁食 12 h 后称大鼠重量,股动脉放血,分离血清置 -80℃保存;留取全部肝脏组织:称肝脏湿重, 每只大鼠取肝右叶置于 10%中性甲醛固定后,石蜡包埋,用于制作组织切片。剩余肝脏组织放 -80℃低温冰箱保存。

1.3 肝脏指数

计算方法为:(肝脏重量/体重) × 100%

1.4 血清学指标

血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)在贵阳医学院附属医院生化科协助下完成。

1.5 肝组织病理检测

动物处死后,立即解剖,取相同部位 1 cm × 1 cm × 0.5 cm 大小的肝右叶置于 10%中性甲醛缓冲液中固定 1 周,常规石蜡包埋切片行 H·E 染色。由贵阳医学院附属医院病理科完成。

1.6 抗氧化系统功能检测

肝组织匀浆,丙二醛(Malondialdehyde,MDA)、谷胱甘肽(Glutathione,GSH)均按照 MDA 测定试剂盒(TBA 法)、GSH 测定试剂盒(比色法)说明书操作检测。

1.7 RT-PCR 检测 TGF-β1、MMP-2、Nrf-2、HO-1mRNA 基因的表达

称取 50~100 mg 肝组织用 TRIzol 提取总 RNA,核酸蛋白定量分析仪测定核酸浓度,测定值 A_{260}/A_{280}>1.8,证明所提取的 RNA 纯度好,无蛋白及 DNA 污染。RNA 逆转录合成 cDNA,按试剂盒说明书操作。逆转录反应体系(20 μl):RNAMixture 16 μl ($MgCl_2$ 25mmol 4.4 μl、10 × PCR Buffer Ⅱ 2.0 μl、dNTP 10 mmol 4.0 μl、Oligo dT 50 mmol 1.0 μl、RNase Inhibitor 20 U/μl 0.4 μl、MMLV 50 U/μl 0.5 μl、Rnase-free H_2O

3.7 μl、RNA 模板 +Rnase-freeH_2O 4.0 μl)。反应条件:第 1 阶段,60℃、1 min,25℃、10 min;第 2 阶段,48℃、60 min;第 3 阶段,95℃、5 min。

β-actin 引物序列(由美国国家环境卫生科学研究所刘杰博士惠赠):

大鼠 β-actin 引物:正义链,5'-GGCCAACCGTGAAAA-GATGA-3;反义链,5'-CAGCCTGGATGGCTACGTACA-3。

TGF-β1、MMP-2、Nrf-2、HO-1 引物按参考文献设计并在 GenBank 进行核对。

TGF-β1 引物:正义链,5'-TCGACATGGAGCTGGTGAAA-3;反义链,5'-CTGGCGAGCCTTAGTTTGGA-3。

MMP-2 引物:正义链,5'-CACCTGGTTTCACCCTTTCTG-3;反义链,5'-AACGAGCGAAGGGCATACAA-3。

Nrf-2 引物:正义链,5'-CGAGATATACGCAGGAGAG-GTAAGA-3;反义链,5'-GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT-3。

HO-1 引物:正义链,5'-ATCATGGCTTGGCCTACATTG-3;反义链,5'-CACGGATGTGCACCTCCTT-3。

PCR 反应体系(20 μl):SYBR Green 10 μl、ddH_2O 5 μl、Primer mix 1 μl、模板 cDNA 4 μl。反应条件:第 1 阶段,50℃、2 min;第 2 阶段,95℃、10 min;第 3 阶段,95℃、15 s,60℃、1 min,40 个循环。内参基因:β-actin。

结果判定:通过 β-actin 作为内参照,比较目的基因与内参基因的 Ct 值差异,从而对 TGF-β1、MMP-2、Nrf-2、HO-1 mRNA 在各组间的表达进行相对定量。

1.8 统计学处理

采用 SPSS.11.5 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,分析前行方差齐性检验,方差齐时用 SNK 法(q 检验),若方差不齐时用 Tambanes 法(q,检验),$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠肝脏指数检测结果(见表 1)

表 1 各组大鼠肝脏指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝脏指数
正常组	10	5.34 ± 0.13
模型组	8	3.32 ± 0.24·
自然恢复组	8	3.98 ± 0.17·
丹芍化纤治疗组	8	4.25 ± 0.15▲*
丹芍化纤 + 苹果试验组	8	5.06 ± 0.31▲*●

注:与正常组比较,●$P<0.01$;与模型组比较,▲$P<0.01$;与自然恢复组比较*$P<0.01$;与丹芍化纤治疗组比较,●$P<0.05$

2.2 各组大鼠血清酶学指标结果(见表 2)

2.3 大鼠肝脏组织病理形态学改变(见图 1~5)

H·E 染色:光镜下正常组大鼠肝细胞以中央静脉为中心,呈放射状排列,未见肝细胞变性坏死,门脉区不增宽,肝组织及肝小叶结构清晰,未见胶原纤维增生。模型组可见大量肝细胞变性、坏死,汇管区周围大量炎症细胞浸润,大量胶原纤维增生,伸入到肝实质中,形成纤维间隔,包绕、分割正常肝组织,肝小叶结构破坏。自然恢复组纤维化程度较模型组稍有减轻,纤维间隔稍薄,但延伸仍明显。丹芍化纤组纤维化程度较模型组和自然恢复组明显改善,纤维间隔显著变薄,汇管区结缔组织增生显著减少。丹芍化纤 + 苹果组与丹芍化纤组相比,炎症细胞明显减少。

表 2 各组大鼠血清酶学 ALT、AST 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常组	10	42.50 ± 1.51	49.25 ± 1.98
模型组	8	115.75 ± 6.54·	132.75 ± 23.19·
自然恢复组	8	107.13 ± 6.06·	120.75 ± 19.37·
丹芍化纤治疗组	8	80.00 ± 4.00▲*	96.50 ± 2.67▲*
丹芍化纤 + 苹果试验组	8	70.5 ± 3.42▲*●	80.65 ± 3.11▲*●

注:与正常组比较,·$P<0.01$;与模型组比较,▲$P<0.01$;与自然恢复组比较*$P<0.01$;与丹芍化纤治疗组比较,●$P<0.01$

2.4 抗氧化系统功能检测(见表 3)

表 3 各组大鼠肝匀浆 GSH、MDA 浓度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH(μg/g)	MDA(nmol/g)
正常组	10	30.43 ± 0.97	2.03 ± 0.71
模型组	8	20.09 ± 0.57●	9.99 ± 1.36●
自然恢复组	8	21.98 ± 0.77●	8.65 ± 0.65●
丹芍化纤治疗组	8	24.34 ± 0.73▲*	6.77 ± 0.47▲*
丹芍化纤 + 苹果试验组	8	27.26 ± 0.95▲*◆	5.81 ± 0.34▲*◆

注:与正常组比较,●$P<0.01$;与模型组比较,▲$P<0.01$;与自然恢复组比较*$P<0.05$;与丹芍化纤治疗组比较,◆$P<0.05$

2.5 RT-PCR 检测大鼠肝脏 TGF-β1、MMP-2、Nrf-2、HO-1mRNA 的表达(见表 4、5)

表 4 各组大鼠肝脏 TGF-β1、MMP-2mRNA 的表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF-β1	MMP-2
正常组	10	23.10 ± 17.16	132.06 ± 10.64
模型组	8	182.40 ± 5.35●	22.63 ± 11.79●
自然恢复组	8	157.42 ± 7.66●	31.65 ± 17.66●
丹芍化纤治疗组	8	107.28 ± 8.20▲*	101.48 ± 10.09▲*
丹芍化纤 + 苹果试验组	8	97.26 ± 2.22▲*◆	115.18 ± 13.96▲*◆

注:与正常组比较,●$P<0.01$;与模型组比较,▲$P<0.01$;与自然恢复组比较*$P<0.05$;与丹芍化纤治疗组比较,◆$P<0.05$

表 5 各组大鼠肝脏 Nrf-2、HO-1mRNA 的表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Nrf-2	HO-1
正常组	10	53.51 ± 5.00	88.75 ± 6.27
模型组	8	20.52 ± 4.41●	24.12 ± 10.88●
自然恢复组	8	30.66 ± 3.05●	33.50 ± 12.56●
丹芍化纤治疗组	8	46.02 ± 7.06▲*	67.55 ± 6.10▲*
丹芍化纤 + 苹果试验组	8	52.21 ± 5.19▲*◆	79.91 ± 9.81▲*◆

注:与正常组比较,●$P<0.01$;与模型组比较,▲$P<0.01$;与自然恢复组比较*$P<0.05$;与丹芍化纤治疗组比较,◆$P<0.05$

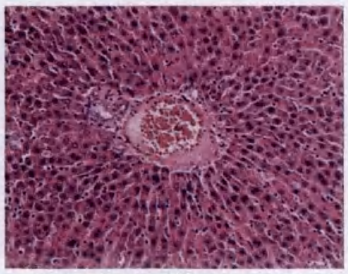


图 1　光镜下正常组肝组织结构（HE×200）

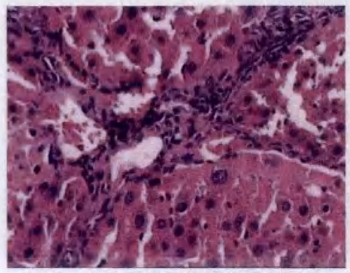


图 2　光镜下模型组肝组织病理结构（HE×400）

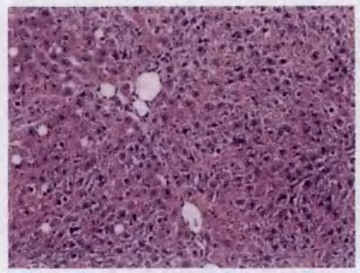


图 3　光镜下自然恢复组肝组织病理结构（HE×200）

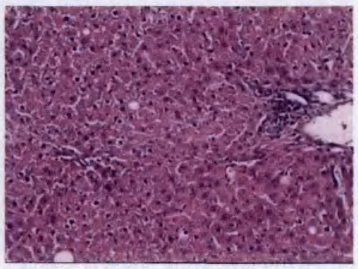


图 4　光镜下丹芍组肝组织病理结构（HE×200）

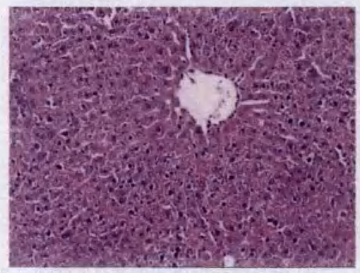


图 5　光镜下丹苹组肝组织病理结构（HE×200）

3　讨　论

肝纤维化的发生是一个多因素参与的复杂病理过程，其机制最显著的特征是细胞外基质（Extracellular matrix，ECM）合成分泌增加和降解减少，导致在肝脏过度沉积。目前的研究证实肝星状细胞（Hepatic stellate cells，HSC）的激活是肝纤维化发生的中心环节[3,4]。炎症等因素使得活化的 Kuffers 细胞释放刺激因子如 TGF-β1；而 TGF-β1 是 HSC 产生 ECM 的主要刺激物，其通过活化 Smads 信号途径能诱导 ECM 基因的表达，上调刺激 ECM 的合成，从而刺激肝纤维化进程[5]；此外 TGF-β1 能引起组织金属蛋白酶抑制物 -1（Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1，TIMP-1）基因表达增加，抑制基质金属蛋白酶（Matrix metalloproteinases，MMP）的活性，造成 ECM 的过度沉积，引起肝纤维化[6]。TGF-β1 还可以诱导Nrf2 调节 HO-1 的表达，并激活抗氧化反应[7]。Nrf-2 是细胞中与氧化应激反应密切相关的一种细胞因子[8]。其通路下的 HO-1是一种最广泛的抗氧化防御酶，是热休克蛋白家族中的一个成员，有抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗增生效应。当机体细胞发生氧化应激时便可诱导 HO-1 的产生[9]。然而经典的抗氧化酶 SOD、GSH 可以减轻肝脏氧化应激损伤。许多研究表明，其它一些氧化诱导的基因产物在多个脏器的适应性和保护性反应中起着重要作用，其中一种即为 HO-1[10]。GSH 水平可反映肝脏抗氧化能力，能保护蛋白巯基免受氧化损伤，为肝细胞内主要的抗脂质过氧化物质，且可与 SOD 共同消除超氧阴离子，从而保护细胞内的结构稳定。MDA 为脂质过氧化的最终产物，可严重破坏细胞膜结构，导致细胞膜肿胀坏死，其血清及组织中的含量反映了组织过氧化损伤的程度和细胞受损程度。体内抗氧化系统能力的降低是脂质过氧化产生的前提，过氧化肝损伤时肝组织不仅导致 MDA 含量增高，还导致 GSH 含量降低[11]。

从祖国医学辩证，认为肝纤维化是由于气滞、血瘀、络阻所致。丹芍化纤胶囊是国家食品药品监督局批准治疗肝纤维化的国家级新药。主要成分有丹参、赤芍、防己、银杏叶、黄芪组成。具有活血化瘀、通络软坚的功效[12]。其作用机制在于抑制 HSC 增殖活化及胶原基因表达，从而达到治疗肝纤维化的作用。

苹果是蔷薇科苹果属植物的果实，素有百果之王的美称。其富含多种营养成分，如蛋白质、脂肪、膳食纤维、多种维生素、苹果酸等。在苹果众多的营养成分中，多酚、果胶、黄酮类物质能有效预防肝脏疾病，对肥胖型脂肪肝有食疗作用。黄酮类物质是一种重要的抗氧化剂，其抗氧化、清除自由基能力远远大于其他物质。有人发现每天坚持进食 1 kg 苹果，3年后肝硬化获逆转。另外，苹果的果胶能通过自身及其发酵产物影响胆固醇的吸收和合成，从而降低脂质过氧化程度[13,14]。另外，苹果中含有的黄酮类化合物具有防癌作用，对肝病来说，可以降低血液酸性，促进肝细胞恢复，预防肝癌发生[15]。

本实验研究结果表明：苹果对 CCL_4 诱导大鼠肝纤维化有一定影响。丹芍化纤治疗组和丹芍化纤 + 苹果组试验 8 周后与模型组、自然恢复组相比较均能使 ALT 明显降低（$P<0.01$），肝脏指数下降（$P<0.01$），而丹芍化纤 + 苹果组的治疗作用明显优于丹芍化纤组（$P<0.05$）。

体内抗氧化系统能力的降低是脂质过氧化产生的前提，过氧化肝损伤时肝组织不仅 MDA 含量可增高，还导致 GSH 含量降低。抗氧化指标检测表明，丹芍化纤组能减少肝脏脂质过氧化 MDA 的含量，提高 GSH 的含量，而丹芍化纤 + 苹果组较丹芍化纤组结果更为显著（$P<0.05$），表明丹芍化纤胶囊具有一定的抗氧化、抵抗脂质过氧化的功效，并且加食苹果后，肝脏细胞合成抗氧化酶增加，抑制脂质过氧化，促进对 HSC 活性抑制，从而减少胶原产生，达到更好保护肝脏，治疗肝纤维化的作用。

TGF-β1 从多方面影响 HSC，是调控肝纤维化发生、发展最重要的细胞因子。在肝纤维化中，TGF-β1 的主要生理作用包括：加速静态的 HSC 向肌成纤维细胞转化，诱导其他生长因子的产生及其在 HSC 上受体的表达，间接刺激 HSC 增殖；促进 HSC 合成Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型胶原、纤维连结蛋白、细胞粘合素等多种增加蛋白水解酶抑制剂的产生，抑制蛋白水解酶的合成；上调纤溶酶原激活物抑制剂及组织金属蛋白酶抑制剂(Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases，TIMP)、抑制 ECM 的降解、增加细胞表达整合素受体，加强 ECM 的积聚等[16]。本实验 RT-PCR 检测发现，在正常组只有极少量的TGF-β1 表达，而在模型和自然恢复组中明显增加($P<0.01$)，但治疗组大鼠经治疗 8 周后丹芍化纤组的 TGF-β1 mRNA 表达量降低，而丹芍化纤 + 苹果组 TGF-β1 mRNA 表达量降低更显著($P<0.05$)。MMP-2 在丹芍化纤 + 苹果试验组中的表达较丹芍化纤治疗组与模型组、自然恢复组升高($P<0.05$)。

Nrf2 是细胞中与氧化应激反应密切相关的 1 种细胞因子。可以经过转录翻译出一些抗氧化物质，对抗氧化应激作用，从而保护正常的细胞不受其破坏。HO-1 基因表达的调控主要发生在转录水平。其基因含有 4 个内含子和 5 个外显子。在 HO-1 5,- 非转录区(UTR)包括激活蛋白 -1 结合位点、金属反应片段、抗氧化反应片段、热休克和血红素反应片段等。如氧化应激反应转录因子 NF-κB 和 AP-1 等与这些特殊位点结合可导致 HO-1 基因激活。转录因子 AP-1 是一个对氧化还原敏感的转录因子，可以激活许多基因包括 HO-1的表达参与氧化应激的保护性反应。AP-1 在调节 HO-1 基因转录中的作用最近才被研究证实，Nrf2 尤其重要。在对 Nrf2 基因缺陷的巨噬细胞研究中发现，转录因子 Nrf2 可与相关基因抗氧化反应成分相互作用，从而调节相关基因表达，在氧化应激反应中起重要作用[17]。有研究从基因水平证实了脂质过氧化可刺激 HSC 合成Ⅰ型胶原[18]，促使肝纤维化的发生。本实验 RT-PCR 检测发现，Nrf-2 及 HO-1 在丹芍化纤 + 苹果试验组中的表达较丹芍化纤治疗组与模型组、自然恢复组升高($P<0.05$)。由此可见，丹芍化纤胶囊具有良好的抵抗脂质过氧化的功效，加食苹果后，苹果中大量的多酚类及类黄酮等高效抗氧化物质激活氧化应激通路，提高肝细胞内 Nrf-2 目标基因的高表达，进一步调节其通路下 HO-1 的表达，激活抗氧化反应，使氧化诱导的基因产物 GSH 表达增加，保护肝细胞免受自由基损伤，显著提高肝细胞内的抗氧化能力，同时使 HSC 活性受到抑制，减少Ⅰ胶原产生，且从另一个侧面证明，Nrf-2 可以介导肝细胞的自我保护作用[19]，更有效的阻止了肝纤维化进程。

上述实验各项研究指标证实：苹果对肝纤维化大鼠有较好的抗氧化作用，在丹芍化纤胶囊作用的基础上可促使细胞膜的通透性降低，抑制细胞内氧化还原酶的释放，从而抑制脂质过氧化反应。本课题研究初步表明，抗氧化剂可通过抑制 HSC 活化和增殖，减少 ECM 的合成及胶原产生，达到辅助逆转肝纤维化的作用。

参 考 文 献

[1] 程明亮，杨长青.肝纤维化的西医治疗[M].第 2 版.北京：人民卫生出版社，2002.315-318.

[2] 周明玉，程明亮.内科综合疗法加食苹果治疗肝纤维化 81 例疗效观察[J].贵州医药，2008，33(4)：325-326.

[3] Solis-Herruzo J A，dela Torre P，Munoz-Yague M T. Hepatic stellate cells (HSC)：architects of hepatic fibrosis[J].Rev Esp Enferm Dig，2009，95(3)：438-439.

[4] Safadi R，Friedman S L.Hepatic fibrosis：role of hepatic stellate cell activation [J].Med Gen Med，2010，23(4)：27-30.

[5] Liu X，Hu H，Yin J Q. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis [J].Liver Int，2006，26(1)：8-22.

[6] Senties-Gomez M D，Galvez-Gastelum F J，Meza-Garcia E，et al.Hepatic fibrosis：role of matrix metalloproteases and TGF-beta[J].Gac Med Mex，2008，141(2)：315-322.

[7] Churchman A T，Anwar A A，Li F Y，et al.Transforming growth factor beta-1 elicits Nrf2-mediated antioxidant responses in aortic smooth muscle cells[J].Cell Mol Med，2009，24(1)，211-215.

[8] Kang K W，Lee S J，Kim S G. Molecular mechanism of Nrf2 activation by oxidative stress Antioxid Redox Signal[J].Review，2009，7(11-12)：1664-1673.

[9] Piantadosi C A，Carraway M S，Babiker A，et al.Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1[J].Circ Res，2008，103(11)：1232-1240.

[10] Sang-Wook K，Hyun-Mee O，Beom-Su K，et al .Soluble factor from tumor cells induces heme oxygenase-1 by a nitric oxide-independent mechanism in murine peritoneal macrophages[J].Exp.Mol .Med. Vol，2008，35(1)：53-59.

[11] Martin-Aragon S，delas Heras B，Sanchez-Reus M I，et al.Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes [J].Exp Toxicol Pathol，2010，53(2-3)：199-206.

[12] 程明亮，李 宏，姚玉梅.丹芍化纤胶囊对猪血清免疫性肝纤维化肝中氧化及抗氧化的影响[R].第十三次全国中西医结合肝病学术会议，2004.

[13] Vidal R，Hernandez-Vallejo S，Pauquai T，et al.Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes[J].J Lipid Res，2009，46(2)：258-268.

[14] Lewis N，Ruud J. Apple in the American diet[J].Nutr Clin Care，2004，7(2)：82-88.

[15] Breinholt V M，Nielsen S E，Knuthsen P，et al.Effects of commonly consumed fruit juices and carbohydrates on redox status and anticancer biomarkers in female rats[J].Nutr Cancer，2008，45(1)：46-52.

[16] Kanamaru Y，Nakao A，Tanaka Y，et al. Involvement of p300 in TGF-beta /Smad-pathway-mediated alpha-(I) collage expression in mouse mesangial cells [J]. Nephnon Exp Nephrol，2008，95(1)：36-42.

[17] Robert T，Itoh K，Sato H，et al. Oxidative stress-inducible proteins in macroghages[J].Free Rad Res，2010，31(4)：351-355.

[18] Casini A，Ceni E，Salzano R，et al.Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells：role of nitric oxide[J].Hepatology，2010，25(1)：361-367.

[19] J yrkkanen H K，Kansanen E，Inkala M，et al. Nrf2 regulates antioxidant gene expression evoked by oxidized phospholipids in endot helial cell s and murine arteries in vivo [J].Circ Res，2008，103(1)：1-9.

(责任编辑：冉明会)