

蓝莓对免疫性肝纤维化大鼠肝组织TLR4, TLR9表达的影响

李宏, 杨勤, 程明亮, 陆爽, 吴君

李宏, 程明亮, 陆爽, 吴君, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

杨勤, 贵阳医学院病理与病理生理学教研室 贵州省贵阳市 550004

李宏, 讲师, 主治医师, 主要从事肝纤维化与感染性疾病的研究。贵州省科技厅社会攻关基金资助项目, No. 黔科合SY(2010)3017

作者贡献分布: 此课题由李宏、杨勤、程明亮及吴君共同设计; 研究过程由李宏与陆爽操作完成; 数据分析由李宏与陆爽完成; 本论文写作由李宏、杨勤、陆爽及吴君完成。

通讯作者: 程明亮, 教授, 550004, 贵州省贵阳市贵医街28号, 贵阳医学院附属医院感染科, chengml@21cn.com

电话: 0851-6752795 传真: 0851-6741623

收稿日期: 2012-03-09 修回日期: 2012-05-03

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-06-28

Intragastric administration of blueberry juice decreases the expression of Toll-like receptors 4 and 9 in rats with immune hepatic fibrosis

Hong Li, Qin Yang, Ming-Liang Cheng, Shuang Lu, Jun Wu

Hong Li, Ming-Liang Cheng, Shuang Lu, Jun Wu, Institute of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Qin Yang, Department of Pathophysiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Supported by: the Social Research Project of Science and Technology Department of Guizhou Province, No. SY(2010)3017

Correspondence to: Ming-Liang Cheng, Professor, Institute of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, 28 Guiyi Street, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. chengml@21cn.com

Received: 2012-03-09 Revised: 2012-05-03

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-06-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of blueberry on the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and toll-like receptor 9 (TLR9) in rats with immune hepatic fibrosis.

METHODS: Sixty healthy Wistar rats were randomly divided into six groups: normal control group (group A), hepatic fibrosis model group (group B), low-, medium-, and high-concentration blueberry groups (groups C, D and E), and Fufang Biejia Ruanganpian group (group F). Hepatic fibrosis was induced in rats of groups B-F by intraperitoneally injecting porcine serum

once daily for 12 wk. Simultaneously, rats of groups C-F were intragastrically given blueberry juice or Fufang Biejia Ruanganpian for 12 wk. All rats were sacrificed at the end of the experiment. Liver index was calculated. Pathological changes in the hepatic tissue were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured. The activity of superoxide dismutase (SOD), the contents of malondialdehyde (MDA), hydroxyproline (Hyp) and reduced glutathione (GSH) in liver homogenates were determined. The expression of TLR4 and TLR9 in the liver was detected by Western blot.

RESULTS: There were no significant differences in serum levels of ALT and AST among various groups ($F = 4.274, 0.917$, both $P > 0.05$). Compared to group B, the activities of SOD and contents of GSH in liver homogenates were significantly higher ($F = 6.662, 61.472$, both $P < 0.05$); liver index and the contents of Hyp and MDA in liver homogenates were significantly lower ($F = 3.972, 42.755, 41.265$, all $P < 0.05$); and the degree of hepatic fibrosis was significantly reduced ($F = 63.339, P < 0.05$) in groups D and E. The expression of hepatic TLR4 and TLR9 in group E was significantly lower than that in group B ($F = 6.932, 7.534$, both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Higher expression of TLR4 and TLR9 protein may be associated with the occurrence and development of immune hepatic fibrosis. Blueberry has a preventive effect on immune hepatic fibrosis in rats.

Key Words: Blueberry; Porcine serum; Immune hepatic fibrosis; Toll-like receptor 4; Toll-like receptor 9

Li H, Yang Q, Cheng ML, Lu S, Wu J. Intragastric administration of blueberry juice decreases the expression of Toll-like receptors 4 and 9 in rats with immune hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(18): 1609-1615

摘要

目的: 探讨蓝莓抗氧化作用对猪血清免疫性

■背景资料

肝脏是人体内最大和最重要的免疫器官, 几乎所有导致肝细胞损伤的因素最终均与免疫因素相关, 而Toll样受体(TLRs)在机体的非特异性免疫和特异性免疫中发挥着重要的作用。本课题组前期实验表明, 蓝莓可预防CCl₄所致的大鼠急性肝损伤和大鼠肝纤维化。

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■研究前沿

深入研究发现HSC胞膜也表达TLRs,这意味着TLRs很可能参与了肝细胞损伤及肝纤维化的发生和发展,但详细机制还不明确.蓝莓对免疫性肝纤维化可否有一定的干预作用及其对TLRs表达的影响未曾见相关报道.

肝纤维化大鼠肝组织Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)和Toll样受体9(TLR9)蛋白表达的影响.

方法: 60只♂ Wistar大鼠随机分为正常对照组(A组)、模型组(B组)、蓝莓低、中、高剂量防治组(C、D、E组)、复方鳖甲软肝片防治组(F组).除A组外,其余各组均腹腔注射猪血清制备大鼠肝纤维化模型. C、D、E、F组在造模同时分别给予蓝莓原浆或复方鳖甲软肝片灌胃, 1次/d, 共12 wk. 第12周末处死大鼠, 计算大鼠肝脏指数, 行肝脏病理组织学检查, 测定各组大鼠血清ALT和AST水平、肝组织匀浆超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)及羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)含量, 免疫印迹法(western blot, WB)和免疫组织化学法检测TLR4和TLR9蛋白质在肝脏组织中的表达.

结果: 各组大鼠血清ALT、AST水平无明显差异($F = 4.274, 0.917, P > 0.05$); 与B组比较, D、E组肝组织匀浆SOD活性、GSH含量明显升高($F = 6.662, 61.472, P < 0.05$); 肝脏指数、MDA及Hyp含量明显降低($F = 3.972, 42.755$ 和 $41.265, P < 0.05$); 肝纤维化程度明显减轻($F = 63.339, P < 0.05$), 胶原表达减少; E组大鼠肝组织TLR4和TLR9蛋白质表达明显减少($F = 6.932$ 和 $7.534, P < 0.05$).

结论: TLR4和TLR9蛋白质表达增加可能与免疫性肝纤维化的发生发展有关. 蓝莓对大鼠免疫性肝纤维化有一定的预防作用.

关键词: 蓝莓; 猪血清; 肝纤维化; Toll样受体4; Toll样受体9

李宏, 杨勤, 程明亮, 陆爽, 吴君. 蓝莓对免疫性肝纤维化大鼠肝组织TLR4, TLR9表达的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(18): 1609-1615
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1609.asp>

0 引言

肝脏是人体内最大和最重要的免疫器官, 几乎所有导致肝细胞损伤的因素最终均与免疫因素相关^[1], 而Toll样受体(toll-like receptor, TLRs)又是连接人体固有免疫和适应性免疫的一个桥梁, 在机体的非特异性免疫和特异性免疫中发挥着重要的作用^[2]. 我国传统的中医中药在肝纤维化的临床治疗方面取得了值得肯定的效果, 但长期服药伴发的一系列问题如消化系反应、肝肾功能损害、药物过敏等不良反应, 以及高昂医

疗费用等. 蓝莓属杜鹃花科越桔属, 近年的研究表明, 蓝莓有高含量的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、花青苷色素、鞣花酸和视紫质, 具有调节免疫、延缓衰老及抗癌等多种生理活性功能, 为世界粮农组织推荐的世界5大健康食品之一, 被誉为“果蔬中的第1号抗氧化剂”^[3]. 本课题组前期试验表明, 蓝莓可预防CCl₄所致的大鼠急性肝损伤和大鼠肝纤维化^[4,5]. 本研究以猪血清诱导的大鼠肝纤维化模型为研究对象, 进一步探讨蓝莓对大鼠免疫性肝纤维化Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)和TLR9蛋白表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 蓝莓, 兔眼品种, 贵州省麻江县蓝莓生产基地提供, -20℃保存, 临用时解冻榨汁; 复方鳖甲软肝片由内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司生产, 批号20100708; 实验动物: ♂ Wistar大鼠60只, 清洁级, 体质量180 g±20 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供; 无菌猪血清购自北京燕生政博生物科技有限公司; SOD检测试剂盒、MDA检测试剂盒(批号20101228)、Hyp检测试剂盒(批号20110215)、GSH检测试剂盒(批号20101228)均购自南京建成生物工程研究所; 电化学发光(ECL)试剂盒(美国Millipore公司, 批号1035601); 全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司, 批号100913); BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo SCIENTIFIC公司, 批号138546); TLR4一抗(批号SC-2021)、TLR9一抗(批号SC-30002)、β-actin一抗(批号SC130656), 均购自美国Santa Cruz Biotechnology公司; 752紫外分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司); Siemens Advia1650全自动生化分析仪(德国西门子公司); Gel Doc EQ凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司); Biomias图像分析仪(四川大学图像图形研究所); 垂直电泳槽及电转移仪(DYCZ-24DN).

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理: 大鼠随机分为6组, 即正常对照组(A组), 肝纤维化模型组(B组), 蓝莓原浆低、中、高剂量组(C、D、E组)及复方鳖甲软肝片组(F组), 每组10只. 模型组大鼠采用猪血清腹腔注射制备大鼠肝纤维化模型(于每周二、五给予无菌猪血清ip, 0.5 mL/只, 共12 wk)^[6]. 造模的同时, C-F组分别给予蓝莓原浆0.25 mL/100 g, 0.5 mL/100 g, 1.0 mL/100 g^[7], 复方鳖甲软肝片(0.054 g/100 g)灌胃^[8], 1次/d, 共12 wk. 正常组给

予正常饮食, 每天给予等容量0.9%NaCl注射液灌胃, 每周二、五给予0.9%NaCl注射液腹腔注射(0.5 mL/只), 共12 wk. 第12周末股动脉放血处死大鼠, 处死前称量大鼠体质量, 常规留取血清, 采用Siemens Advia 1650全自动生物化学分析仪测定ALT、AST活性. 留取全部肝脏, 称量肝脏湿重, 计算各组大鼠肝脏指数[肝脏重量(g)/体质量(g)×100%]. 制备肝组织匀浆, 严格按试剂盒操作测定各组大鼠肝组织匀浆SOD活性, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)及羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)含量.

1.2.2 肝脏组织形态学检查: 取相同部位肝脏用4%甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 行HE染色, 光镜下观察肝脏病理变化并按Ishak方法分期^[8].

1.2.3 Western blot检测TLR4, 9蛋白的表达: 提取蛋白并测定蛋白含量. 取蛋白质样品40 μg, 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 封闭, TLR4, 9抗体(均为1:1 000) 4℃孵育过夜, 二抗(1:5 000)室温1 h, ECL曝光显影, Gel Doc EQ凝胶成像仪扫描, Quantity One软件分析结果. 以β-actin表达水平作为内参照.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件. 计量资料以mean±SD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LSD法, 方差不齐时用Tamane's(*q'*检验); 等级资料用秩和检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠一般情况 整个实验过程中各组大鼠一般状态良好, 毛发光泽. C组死亡1只大鼠, 解剖后见右侧胸腔积液, 肺部散在白色脓点; F组大鼠死亡2只, 解剖后发现其中1只膀胱肿大, 质地硬. 另1只见肺部瘀血, 有点状出血灶; 其余各组实验过程中无大鼠死亡.

2.2 各组大鼠血清ALT、AST活性比较 与A组相比, 各组大鼠血清ALT、AST活性有增高; 与B组相比, C、D、E、F组大鼠血清ALT、AST活性有下降, 但差异均无统计学意义($F=4.274$, 0.917 , 均 $P>0.05$, 图1).

2.3 各组大鼠肝脏指数的比较 与A组相比, B组大鼠肝脏指数明显增加($F=3.972$, $P<0.05$). 与B组比较, C-F组大鼠肝脏指数明显降低($F=3.972$, $P<0.05$). C、D、E、F组间差异无统计学意义($P>0.05$, 表1).

2.4 各组大鼠肝组织匀浆Hyp含量比较 与A组比, 各组大鼠肝组织匀浆Hyp明显增高, 差异有统计

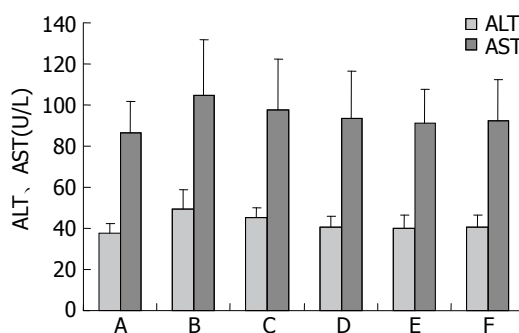


图1 各组大鼠血清ALT、AST水平比较. A: 正常对照组; B: 免疫性肝纤维化模型组; C: 蓝莓原浆低剂量组; D: 蓝莓原浆中剂量组; E: 蓝莓原浆高剂量组; F: 复方鳖甲软肝片组.

表1 各组大鼠肝脏指数、Hyp含量比较 (mean±SD)

分组	n	肝脏指数(g/g)	Hyp(μg/g)
A	10	2.77 ± 0.31	326.88 ± 37.74
B	10	3.32 ± 0.28 ^a	603.16 ± 68.92 ^a
C	9	3.04 ± 0.10 ^{ac}	559.45 ± 43.38 ^a
D	10	2.98 ± 0.37 ^c	495.27 ± 46.25 ^{ac^b}
E	10	3.00 ± 0.25 ^c	472.68 ± 44.14 ^{ac^b}
F	8	2.92 ± 0.35 ^c	416.12 ± 39.38 ^{ac^b}

A: 正常对照组; B: 免疫性肝纤维化模型组; C: 蓝莓原浆低剂量组; D: 蓝莓原浆中剂量组; E: 蓝莓原浆高剂量组; F: 复方鳖甲软肝片组. ^a $P<0.05$ vs A组; ^b $P<0.05$ vs B组; ^c $P<0.05$ vs C组; ^d $P<0.05$ vs D组; ^e $P<0.05$ vs E组.

学意义($F=41.265$, $P<0.05$). 与B组比较, C-F组大鼠肝组织匀浆Hyp含量降低, 除C组差异无统计学意义外, 其余均有统计学意义($P<0.05$). D、E、F组Hyp较C组明显降低($P<0.05$), F组Hyp较D、E两组明显降低($P<0.05$), 但D、E两组间差异无统计学意义($P>0.05$, 表1).

2.5 各组大鼠肝组织匀浆SOD活性, MDA含量比较 与A组相比, 各组大鼠SOD活性下降, MDA含量增高, 差异均有统计学意义($F=23.376$, 42.755 , 均 $P<0.05$). 与B组比较, C-F组大鼠肝组织匀浆SOD活性升高, MDA含量下降, 除C组无统计学意义外, 其余均有统计学意义(均 $P<0.05$). D、E组SOD活性较C组升高, MDA含量下降(均 $P<0.05$), D、E两组间差异无统计学意义(均 $P>0.05$). F组SOD活性较E组降低, MDA含量升高(均 $P<0.05$), 与C、D组差异无统计学意义(均 $P>0.05$, 表2).

2.6 各组大鼠肝组织匀浆GSH含量比较 与A组比, 各组大鼠肝组织匀浆GSH明显下降, 差异有统计学意义($F=61.472$, $P<0.05$). 与B组比较, 除C组无统计学意义外, D、E、F组大鼠肝组织匀

■相关报道

Droemann等发现TLR9主要参与病原体CpG基序(包括病毒、细菌及坏死的细胞碎片等)激活免疫细胞的信号转导, 最终激活NF-κB导致大量炎症因子的产生. 提示TLR4, 9可能参与肝纤维化的发生发展.

■创新盘点

本研究应用Western blot法观察了蓝莓对免疫性肝纤维化大鼠肝组织TLR4、9表达的影响,为肝纤维化发病机制的研究及防治提供了新思路。

表 2 各组大鼠SOD活性、MDA、GSH含量比较 (mean ± SD)

分组	n	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	GSH(mg/g)
A	10	3.14 ± 0.35	0.70 ± 0.08	2.30 ± 0.30
B	10	1.56 ± 0.41 ^a	1.24 ± 0.15 ^a	0.72 ± 0.09 ^a
C	9	1.81 ± 0.34 ^a	1.07 ± 0.07 ^a	0.86 ± 0.10 ^a
D	10	2.20 ± 0.27 ^{ace}	0.89 ± 0.07 ^{ace}	1.36 ± 0.25 ^{ace}
E	10	2.47 ± 0.38 ^{ace}	0.83 ± 0.06 ^{ace}	1.77 ± 0.33 ^{ace}
F	8	1.95 ± 0.45 ^{aci}	0.96 ± 0.08 ^{aci}	1.69 ± 0.23 ^{aci}

A: 正常对照组; B: 免疫性肝纤维化模型组; C: 蓝莓原浆低剂量组; D: 蓝莓原浆中剂量组; E: 蓝莓原浆高剂量组; F: 复方鳖甲软肝片组。 ^a $P < 0.05$ vs A组; ^c $P < 0.05$ vs B组; ^e $P < 0.05$ vs C组; ^a $P < 0.05$ vs D组; ⁱ $P < 0.05$ vs E组。

表 3 各组大鼠肝纤维化程度分级

分组	n	肝纤维化分级							秩均值
		0	I	II	III	IV	V	VI	
A	10	10	0	0	0	0	0	0	5.50
B	10	0	0	0	0	2	5	3	47.50 ^a
C	9	0	0	0	0	2	5	2	46.67 ^a
D	10	0	0	3	5	1	1	0	28.95 ^{ace}
E	10	0	0	4	3	3	0	0	27.95 ^{ace}
F	8	0	2	3	3	0	0	0	16.75 ^{acegi}

A: 正常对照组; B: 免疫性肝纤维化模型组; C: 蓝莓原浆低剂量组; D: 蓝莓原浆中剂量组; E: 蓝莓原浆高剂量组; F: 复方鳖甲软肝片组。 ^a $P < 0.05$ vs A组; ^c $P < 0.05$ vs B组; ^e $P < 0.05$ vs C组; ^a $P < 0.05$ vs D组; ⁱ $P < 0.05$ vs E组。

浆GSH明显升高($F = 61.472$, $P < 0.05$)。D、E、F组大鼠肝组织匀浆GSH含量较C组增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。D、E、F组间差异无统计学意义($P > 0.05$, 表2)。

2.7 各组大鼠肝组织病理学比较 HE染色见正常对照组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞互相连接成条索状,形成肝细胞索,汇管区及肝组织内均无胶原纤维增生。模型组大鼠肝实质广泛破坏,小叶内肝细胞结构紊乱;汇管区弥漫性纤维增生,胶原纤维呈条索状向肝实质延伸形成纤维间隔,分割并破坏肝小叶,少部分病例甚至形成假小叶。蓝莓原浆低剂量组纤维化程度较模型组无明显改变;蓝莓原浆高剂量组肝小叶结构大部分保留,有桥接纤维化形成。复方鳖甲软肝片组无明显纤维化或仅在汇管区周围见少量纤维化($F = 63.339$, $P < 0.05$, 表3, 图2)。

2.8 各组大鼠肝组织TLR4蛋白质表达 与A组比较, B、C、F组TLR4表达均明显增高($F = 6.932$, $P < 0.05$);与B组比较, D、E组TLR4表达均减少($F =$

6.932 , $P < 0.05$, 表4, 图3)。

2.9 各组大鼠肝组织TLR9蛋白质表达 与A组比较, B、C、D、F组TLR9表达均明显增高($F = 7.534$, $P < 0.05$);与B组比较, E组TLR9蛋白表达明显减少($F = 7.534$, $P < 0.05$)。B、C、D、F组间TLR9表达差异无统计学意义($P > 0.05$, 表4, 图4)。

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝脏疾病常见的一种病理过程,是发展至肝硬化、原发性肝癌的必经阶段。多年的医学研究发现肝纤维化是可以逆转的^[9],因此,防止和逆转肝纤维化已成为防治肝硬化、原发性肝癌的重要环节。肝脏是机体天然免疫系统中一个重要的器官,是机体进行物质交换和代谢的中心,易与外来异物抗原接触,从而激活细胞免疫系统而发生免疫反应。越来越多的研究表明,在慢性肝损伤过程中,免疫介导的间接损伤起主导作用^[1]。

TLRs是近年来发现的机体在天然免疫和获得性免疫中都发挥重要作用的模式识别受体。

■应用要点
TLR4, 9蛋白表达增加可能与免疫性肝纤维化的发生发展有一定关系. 蓝莓可能通过其高含量的抗氧化剂发挥了强大的抗氧化作用, 并调节了大鼠肝组织中TLR4, 9蛋白的信号传导通路, 减轻肝细胞炎症, 起到一定的抗肝纤维化作用.

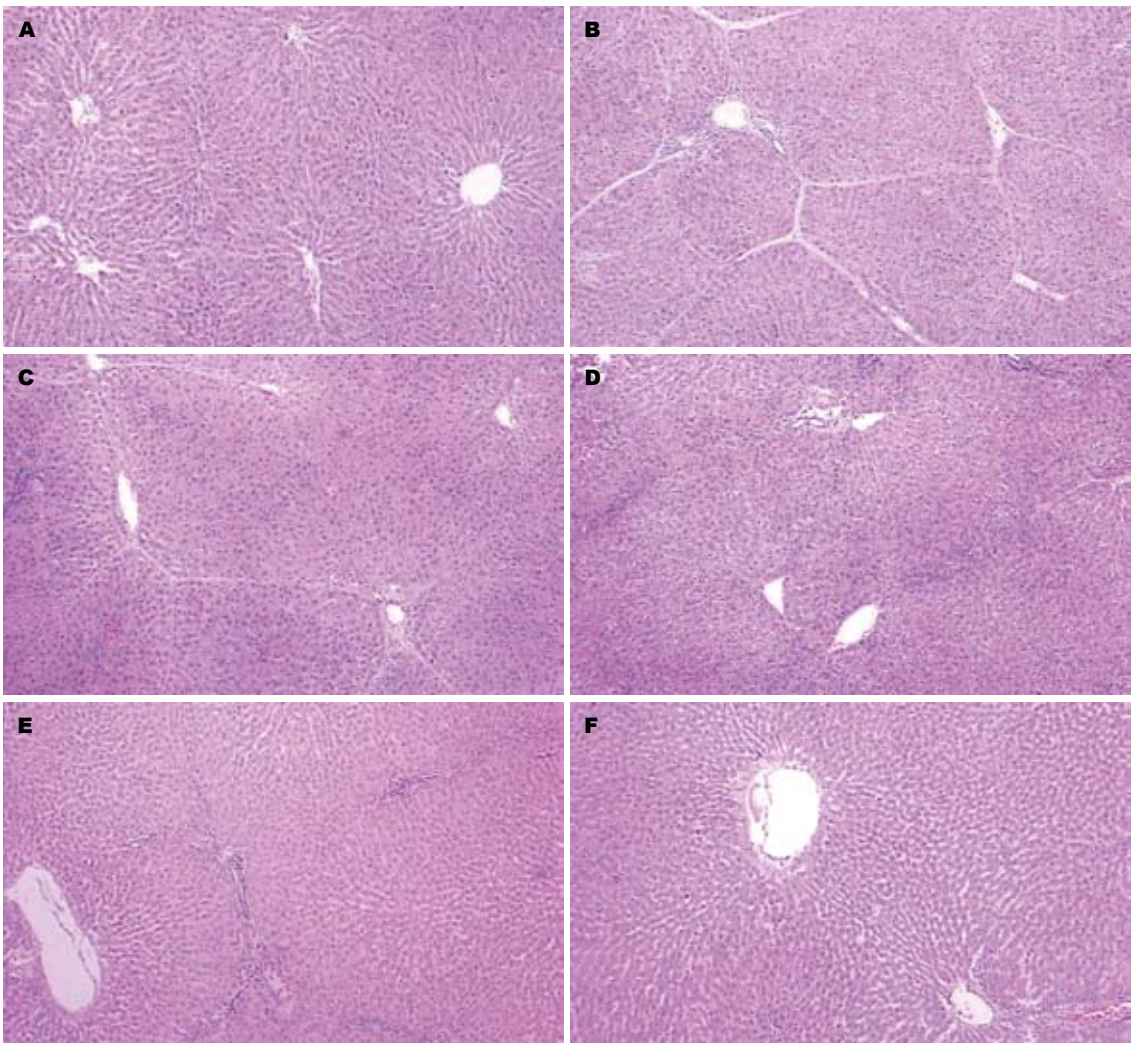


图 2 各组大鼠肝组织HE染色结果(HE × 400). A: 正常对照组; B: 免疫性肝纤维化模型组; C: 蓝莓原浆低剂量组; D: 蓝莓原浆中剂量组; E: 蓝莓原浆高剂量组; F: 复方鳖甲软肝片组.

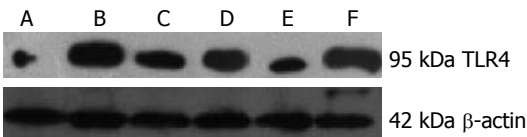


图 3 Western blot检测各组TLR4蛋白质表达. A: 正常对照组; B: 免疫性肝纤维化模型组; C: 蓝莓原浆低剂量组; D: 蓝莓原浆中剂量组; E: 蓝莓原浆高剂量组; F: 复方鳖甲软肝片组.

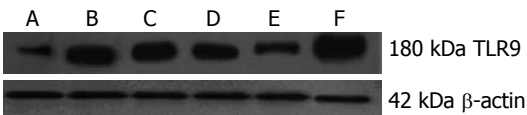


图 4 Western blot检测各组TLR9蛋白质表达. A: 正常对照组; B: 免疫性肝纤维化模型组; C: 蓝莓原浆低剂量组; D: 蓝莓原浆中剂量组; E: 蓝莓原浆高剂量组; F: 复方鳖甲软肝片组.

广泛分布于动物的肝、脾、肺、心、肾、脑及胸腺等多种组织内, 在大约20余种细胞表面均

表 4 各组大鼠肝组织TLR4, 9蛋白质表达 (mean ± SD)

分组	n	TLR4	TLR9
A	10	0.21 ± 0.10	0.17 ± 0.05
B	10	1.28 ± 0.40 ^a	0.41 ± 0.42 ^a
C	9	1.07 ± 0.17 ^a	0.40 ± 0.08 ^a
D	10	0.45 ± 0.48 ^{ce}	0.43 ± 0.10 ^a
E	10	0.36 ± 0.18 ^{ce}	0.20 ± 0.11 ^{ce}
F	8	1.15 ± 0.57 ^{agi}	0.43 ± 0.06 ^{ai}

A: 正常对照组; B: 免疫性肝纤维化模型组; C: 蓝莓原浆低剂量组; D: 蓝莓原浆中剂量组; E: 蓝莓原浆高剂量组; F: 复方鳖甲软肝片组. ^a*P* < 0.05 vs A组; ^c*P* < 0.05 vs B组; ^e*P* < 0.05 vs C组; ^g*P* < 0.05 vs D组; ⁱ*P* < 0.05 vs E组.

有表达^[10], 他如同天然免疫的“眼睛”, 是机体抵抗感染性疾病的第1道屏障^[11]. 肝脏中的TLRs通过门静脉能够接触到大量病原体成分, 通过信号转导广泛参与肝脏的生理病理过程^[12]. 近

■同行评价

该研究以猪血清诱导的大鼠肝纤维化模型为研究对象,进一步探讨蓝莓对大鼠免疫性肝纤维化及TLR4、TLR9蛋白表达的影响,内容有新意,也有一定的临床研究价值。

年来,TLRs在某些肝脏疾病如病毒性肝炎、肝硬化、肝移植、自身免疫性肝炎中的作用获得了初步的认识^[13]。随着对TLRs的进一步深入研究,有学者发现肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)胞膜也表达TLRs,这意味着TLRs很可能参与了肝细胞损伤及肝纤维化的发生和发展^[14]。TLR4是最早发现的哺乳动物TLRs蛋白,已证实革兰氏阴性菌细胞外膜内毒素主要成分脂多糖(LPS)是TLR4的主要配体^[15],而内毒素与肝纤维化的关系早已达成共识,因此TLR4被认为与革兰氏阴性细菌及其内毒素的识别和激活有关^[16],但TLR4在肝纤维化中的作用和地位还未完全被人们所了解。TLR9主要参与病原体CpG基序(包括病毒、细菌及坏死的细胞碎片等),激活免疫细胞的信号转导,最终激活NF- κ B导致大量炎症因子的产生^[17]。

蓝莓植物中的小浆果类蓝色水果,因含有丰富的营养及药用保健成分,被誉为“黄金浆果”。在英国权威营养学家列出的全球15种健康食品中蓝莓食品居首位,联合国粮农组织(FAO)将其列为5大健康食品之一。美国人类营养研究中心发现蓝莓含有大量生理活性物质,富含花青素、多酚类和黄酮类化合物等其他果品中少有的特殊成分^[18,19]。可提高机体抵抗氧化应激的能力^[20]。国外学者研究发现:健康成人连续每天喝一杯蓝莓/苹果汁,可以增加血液抗氧化能力和降低淋巴细胞的DNA氧化损伤^[21]。有研究发现:蓝莓对d-半乳糖胺和脂质多糖诱导的急性肝损伤有保护作用^[22]。从蓝莓叶子中提取的原花青素,具有抑制丙型肝炎病毒的作用^[23]。近年更进一步的研究还发现:蓝莓叶子的原花青素体外可通过抑制血小板衍生生长因子受体(platelet derived growth factor, PDGF)信号途径抑制人HSC的活化^[24]。本课题组前期的研究表明:蓝莓可激活小鼠肝脏的核转录相关因子(NF-E2-related factor 2, Nrf2), I型血红素氧化酶(heme Oxygenase-1, HO-1)和醌氧化还原酶的表达,提高T细胞的免疫功能^[25,26],可通过抑制转化生长因子- β 1,下调Smad4及上调Smad7的表达对CCl₄所致的大鼠肝纤维化有一定的预防作用^[27];可激活HSC Nrf2,增加HO-1的表达,抑制体外大鼠原代HSC的增殖和活化^[25,26,28]。

猪血清是免疫性肝纤维化模型常用的异种血清,猪血清进入机体后引起机体的免疫应答,所形成的免疫复合物在肝脏沉积,进而引起局部炎症反应,形成广泛的进行性慢性炎症病变,

如此反复,导致肝细胞变性、坏死、再生及纤维增生等变化,进一步刺激胶原的增生而造成肝纤维化。该方法简便、周期短、经济、出现率高、对动物整体损伤轻微、纤维化形成稳定^[29],并且在发病机制上与人类慢性病毒性肝炎所致的肝纤维化更加接近。为此本研究采用猪血清复制免疫性肝纤维化模型,进一步探讨蓝莓对大鼠免疫性肝纤维化的作用。

复方鳖甲软肝片是由鳖甲、莪术、赤芍、当归、三七等组成的复方制剂,是目前临床常用的治疗肝纤维化的药物之一,动物实验及临床研究均提示该药具有较好的防治肝纤维化的作用,其机制与抑制HSC增殖,减少胶原蛋白合成及在Diss间隙过量沉积等有关^[30,31],故本研究用复方鳖甲软肝片作为阳性对照。

本研究结果表明,模型组大鼠一般状态良好,毛发光泽,实验过程中无大鼠死亡,血清ALT、AST活性与其余各组无明显差异($P>0.05$),符合免疫性肝纤维化模型动物损伤轻微的特点。复方组在改善肝组织病理学变化,降低Hyp含量上明显优于蓝莓原浆各组(均 $P<0.05$),提示该药具有良好的预防大鼠免疫性肝纤维化的作用。蓝莓原浆低剂量组肝脏指数与模型组差异有统计学意义($P<0.05$),但在肝组织病理学改变、肝组织匀浆SOD活性、MDA、Hyp、GSH含量上与模型组无明显差异(均 $P>0.05$),提示蓝莓原浆低剂量组无明显预防肝纤维化作用。而蓝莓原浆中、高剂量组能有效减轻大鼠肝纤维化程度(均 $P<0.05$),减少肝组织胶原纤维沉积,且肝脏指数下降、肝组织匀浆Hyp、MDA含量降低,SOD活性升高,GSH含量增加(均 $P<0.05$)。提示蓝莓中、高剂量组对大鼠免疫性肝纤维化具有一定的预防作用,此作用可能与其增加肝脏SOD活性及GSH含量,降低MDA含量,提高机体抗氧化应激的能力有关。另外,与蓝莓原浆低剂量组比较,虽然中、高剂量组肝纤维化程度减轻,肝组织匀浆SOD活性、GSH含量升高,Hyp及MDA含量下降(均 $P<0.05$),但中、高剂量组间差异无统计学意义,提示蓝莓低、中、高剂量组间无明显量效关系。

与正常组比较,模型组、蓝莓低剂量组及复方组大鼠肝组织TLR4蛋白质表达明显增高($P<0.05$),模型组、蓝莓低、中剂量组及复方组大鼠肝组织TLR9蛋白质表达明显增高($P<0.05$);与模型组比较,蓝莓中、高剂量组TLR4蛋白表达减少($P<0.05$),蓝莓高剂量组TLR9蛋白表达

减少($P<0.05$)。蓝莓各剂量组间无明显量效关系,提示TLR4和TLR9蛋白质表达增加可能与免疫性肝纤维化的发生发展有一定关系。蓝莓可能通过其高含量的抗氧化剂发挥了强大的抗氧化作用,抑制了脂质过氧化反应的发生,并调节了大鼠肝组织中TLR4, 9蛋白的信号传导通路,避免其过度激活,进而抑制了NF- κ B的激活,最终减少了炎症因子的释放,减轻了肝细胞炎症,起到一定的抗肝纤维化作用。

4 参考文献

- 1 严伟明, 宁琴. 肝脏免疫学研究进展: 第59届美国肝脏疾病研究学会年会报道. 中华肝脏病杂志 2009; 17: 235-237
- 2 汤艳丽, 马雄. 肝脏天然免疫研究进展. 胃肠病学 2009; 14: 178-180
- 3 唐阳. 蓝莓小档案. 饮食科学 2005; 1: 29
- 4 王豫萍, 张宝方, 周明玉, 易平, 吴君, 程明亮. 蓝莓预防大鼠肝损伤实验研究. 肝脏 2009; 14: 33-35
- 5 Wang YP, Cheng ML, Zhang BF, Mu M, Zhou MY, Wu J, Li CX. Effect of blueberry on hepatic and immunological functions in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 164-168
- 6 高春芳. 纤维化疾病的基础和临床. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 359-367
- 7 李丰衣, 孙劲晖, 田德禄, 祝世功, 潘慧, 刘霞, 王庆宝. 调肝理脾方抗酒精性肝纤维化作用机制研究. 山东中医药大学学报 2009; 33: 250-252
- 8 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22: 696-699
- 9 Fallowfield JA, Iredale JP. Reversal of liver fibrosis and cirrhosis—an emerging reality. *Scott Med J* 2004; 49: 3-6
- 10 李婉玉, 姜艳芳, 牛俊奇. Toll样受体与肝脏疾病. 中国免疫学杂志 2009; 10: 957-960
- 11 苟艳子, 连建奇, 聂青和, 庄严, 刘清泉, 邵兵. 肝硬化患者外周血单核细胞表面TLR2和TLR4表达的床意义. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3278-3283
- 12 陈煜, 时红波, 张帆, 丁美, 赵军, 刘旭华, 段钟平. TLR2、TLR4和TLR9在慢性重型肝炎患者及肝衰竭大鼠中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1320-1325
- 13 杨俊涛. Toll样受体在肝脏疾病中的功能. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 632-633
- 14 金生. Toll样受体与肝脏疾病. 中华内科杂志 2005; 14: 68-69
- 15 王坤宁, 徐敏. TLR4, NF- κ B与急性胰腺炎. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2684-2689
- 16 Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001; 413: 78-83
- 17 Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, Dalhoff K, Zabel P, Goldmann T. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res* 2005; 6: 1
- 18 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 4026-4037
- 19 Prior RL, Cao G, Prior RL, Cao G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *J AOAC Int* 2000; 83: 950-956
- 20 Duffy KB, Spangler EL, Devan BD, Guo Z, Bowker JL, Janas AM, Hagepanos A, Minor RK, DeCabo R, Mouton PR, Shukitt-Hale B, Joseph JA, Ingram DK. A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. *Neurobiol Aging* 2008; 29: 1680-1689
- 21 Wilms LC, Boots AW, de Boer VC, Maas LM, Pachén DM, Gottschalk RW, Ketelslegers HB, Godschalk RW, Haenen GR, van Schooten FJ, Kleinjans JC. Impact of multiple genetic polymorphisms on effects of a 4-week blueberry juice intervention on ex vivo induced lymphocytic DNA damage in human volunteers. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1800-1806
- 22 Osman N, Adawi D, Ahrné S, Jeppsson B, Molin G. Endotoxin- and D-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of Lactobacillus, Bifidobacterium and blueberry. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 849-856
- 23 Takeshita M, Ishida Y, Akamatsu E, Ohmori Y, Sudoh M, Uto H, Tsubouchi H, Kataoka H. Proanthocyanidin from blueberry leaves suppresses expression of subgenomic hepatitis C virus RNA. *J Biol Chem* 2009; 284: 21165-21176
- 24 Takami Y, Uto H, Takeshita M, Kai H, Akamatsu E, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kataoka H, Tsubouchi H. Proanthocyanidin derived from the leaves of Vaccinium virgatum suppresses platelet-derived growth factor-induced proliferation of the human hepatic stellate cell line LI90. *Hepatol Res* 2010; 40: 337-345
- 25 Wang YP, Cheng ML, Zhang BF, Mu M, Wu J. Effects of blueberry on hepatic fibrosis and transcription factor Nrf2 in rats. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2657-2663
- 26 王豫萍, 程明亮, 张宝方, 吴君. 蓝莓对肝纤维化大鼠血红素加氧酶-1表达的影响. 中华肝脏病杂志 2010; 18: 656-660
- 27 张宝芳, 程明亮, 王豫萍, 穆茂. 蓝莓对大鼠肝纤维化TGF- β 1/Smads信号通路的影响. 传染病信息 2010; 23: 148-153
- 28 王豫萍, 程明亮, 吴亚云, 张宝芳, 吴君. 蓝莓对大鼠肝星状细胞增殖、活化的影响及机制探讨. 中华医学杂志 2010; 90: 2504-2508
- 29 刘秀英, 胡怡秀, 胡余明, 丘丰, 周月婵, 臧雪冰, 聂焱. 大鼠四氯化碳和猪血清肝纤维化模型比较. 世界华人消化杂志 2002; 10: 975-977
- 30 蔺武, 刘心娟, 魏南, 高炳霞, 姜国俊, 常岩芳. 复方鳖甲软肝片抗肝纤维化疗效的系统评价. 胃肠病学和肝病学杂志 2007; 16: 69-72
- 31 李丰衣, 孙劲晖, 田德禄, 祝世功, 潘慧, 刘霞, 王庆宝. 复方鳖甲软肝片抑制大鼠酒精性肝纤维化作用机制研究. 中国中医药信息杂志 2009; 16: 26-28

编辑 张姗姗 电编 闫晋利