

# 牛磺酸对 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化的保护作用及其机制的研究

梁 健, 杨光业, 张锡流, 庞玉生, 袁海锋, 梁劲松, 黄仁彬, 韦 新, 韦 明

梁健, 袁海锋, 广西中医学院附属瑞康医院 广西壮族自治区南宁市 530011  
张锡流, 韦新, 梁劲松, 广西中医学院第一附属医院 广西壮族自治区南宁市 530023  
杨光业, 广西医学情报研究所 广西壮族自治区南宁市 530023  
庞玉生, 黄仁彬, 广西医科大学 广西壮族自治区南宁市 530021  
韦明, 广西中医学院卫生统计教研室 广西壮族自治区南宁市 530011  
梁健, 男, 1963-10-10 生, 广西平南人, 汉族. 1987 年广西医科大学本科毕业, 副主任医师, 中华医学会广西分会消化专业常委, 广西中西医结合消化专业主任委员, 主要从事消化系统疾病的临床与研究.  
广西壮族自治区自然科学基金项目, No.0144016  
项目负责人: 梁健, 530011, 广西壮族自治区南宁市, 南宁市华东路 10 号, 广西中医学院附属瑞康医院. I-j588@tom.com  
电话: 0771-2188398 传真: 0771-2411156  
收稿日期: 2003-05-18 接受日期: 2003-06-06

## Inhibitory mechanism of taurine against CCl<sub>4</sub> induced hepatic fibrosis in rats

Jian Liang, Guang-Ye Yang, Xi-Liu Zhang, Yu-Sheng Pang, Hai-Feng Yuan, Jing-Song Liang, Ren-Bin Huang, Xin Wei, Ming Wei

Jian Liang, Hai-Feng Yuan, Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical College, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Xi-Liu Zhang, Xin Wei, Jing-Song Liang, First Affiliated Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical College, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Guang-Ye Yang, Guangxi Medical Information Institute, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Yu-Sheng Pang, Ren-Bin Huang, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Ming Wei, Department of Health Statistics, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No.0144016  
Correspondence to: Jian Liang, Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical College, 10 Huadong Road, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. I-j588@tom.com  
Received: 2003-05-18 Accepted: 2003-06-06

## Abstract

AIM: To study the protective effect of taurine on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in rats and its mechanisms.

METHODS: CCl<sub>4</sub>-induced rat hepatic fibrosis was treated by taurine (400 and 800 mg/kg per day for 12 weeks), and serum alanine aminotransferase (ALT), plasma protein, hyaluronic acid (HA) and procollagen III (PC III), and hepatic hydroxyproline (HYP), hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme and anti-transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) were measured. In addition, pathological changes of liver tissue were observed by light microscope.

RESULTS: The hepatic fibrosis, activity of serum ALT (2 601±300 → 1367±317 nkat/L,  $P < 0.01$ ), and contents of serum HA (324±95 → 219±79  $\mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$ ), PC III (33±14 → 19±8 mg/L,  $P < 0.01$ ) and hepatic HYP (1 282±523 → 381±147  $\mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$ ) were markedly reduced by the treatment with taurine (32.57±13.73 vs 19.20±8.25 ng/ml,  $P < 0.01$  and 1.282±0.523 vs 0.463±0.159  $\mu\text{g/ml}$ ,  $P < 0.05$ ). The contents of plasma albumin (23±3 → 31±4 g/L,  $P < 0.05$ ) and hepatic cytochrome P450 (Cyt.P450) (211±27 → 811±136 nmol/g,  $P < 0.01$ ) and cytochrome b<sub>5</sub> (Cyt.b<sub>5</sub>) (256±69 → 761±131 nmol/g,  $P < 0.01$ ) were increased by the same treatment (0.211±0.027 vs 0.765±0.106 nmol/mg protein,  $P < 0.01$  and 0.256±0.069 vs 0.697±0.120 nmol/mg protein,  $P < 0.01$ ). In addition, taurine could also significantly inhibit the expression of TGF- $\beta_1$  (33±13 → 20±6,  $P < 0.01$ ).

CONCLUSION: CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis is markedly relieved by the treatment of taurine, and its protective mechanisms are related to the decrease in liver injury and expression of TGF- $\beta_1$ .

Liang J, Yang GY, Zhang XL, Pang YS, Yuan HF, Liang JS, Huang RB, Wei X, Wei M. Inhibitory mechanism of taurine against CCl<sub>4</sub> induced hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1392-1395

## 摘要

目的: 观察牛磺酸对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导大鼠肝纤维化的保护作用及其机制。

方法: 采用 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化模型, 研究牛磺酸 (400 and 800 mg/kg per day for 12 weeks) 对血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血浆蛋白、透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PC III)及肝组织羟脯氨酸(HYP)、肝药酶和抗转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 的影响, 并观察肝组织病理学变化。

结果: 牛磺酸能明显减轻纤维化程度, 降低 ALT (2 601 ± 300 → 1367 ± 317 nkat/L,  $P < 0.01$ ), HA (324 ± 95 → 219 ± 79  $\mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$ ), PC III (33 ± 14 → 19 ± 8  $\mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$ ) 和 HYP (1 282 ± 523 → 381 ± 147  $\mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$ ) 水平, 提高肝细胞色素 P450 (Cyt.P450) (211 ± 27 → 811 ± 136 nmol/g,  $P < 0.01$ ), 细胞色素 b<sub>5</sub> (Cyt.b<sub>5</sub>) (256 ± 69 → 761 ± 131 nmol/g,  $P < 0.01$ ) 和血清白蛋白含量 (23 ± 3 → 31 ± 4 g/L,  $P < 0.05$ ), 并明显减少 TGF- $\beta_1$  的表达 (33 ± 13 → 20 ± 6,  $P < 0.01$ )。

结论: 牛磺酸具有显著的抗 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化作用, 其作用机制可能与减轻肝细胞损伤和抑制 TGF- $\beta_1$  的

表达有关.

梁健, 杨光业, 张锡流, 庞玉生, 袁海锋, 梁劲松, 黄仁彬, 韦新, 韦明. 牛磺酸对 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化的保护作用及其机制的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1392-1395  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1392.asp

## 0 引言

肝纤维化是以细胞外基质(ECM)<sup>[1-10]</sup>合成增多, 降解相对不足, 过多沉积在肝内引起,是可逆病变, 因此, 减轻纤维化反应十分重要<sup>[11-16]</sup>. 牛磺酸是体内含量最丰富的氨基酸, 参与膜主要成分磷脂代谢, 保护膜磷脂免受降解, 具有直接膜稳定作用<sup>[2]</sup>. 此外, 还具有清除自由基和抗脂质过氧化<sup>[3,4]</sup>等广泛的生物学作用. 我们建立实验性大鼠 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化模型, 探讨牛磺酸对肝纤维化的防治作用及其可能的机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠, SPF 级, ♂, 体质量 230 ± 20 g, 由广西医科大学实验动物中心提供; 牛磺酸为湖州市生物化学试剂厂产品; CCl<sub>4</sub> 为上海试剂三厂产品; HA、PC III 放射免疫分析测定盒, 均为上海海军医学研究所生物技术中心产品; HYP 试剂盒为南京建成生物工程公司研究所产品, 批号分别 20020108; TGF-β<sub>1</sub> mAb 及 SABC 免疫组化染色试剂盒, 由武汉博士德生物工程有限公司提供; 彩色病理图纹分析系统, 型号 HPIAAS-1000, (JVCKY-F30B3-CCD 摄像头, 日本 Olympus 研究型显微镜, 华海公司生产的全自动图像分析系统) 为中国华海电子有限公司产品, 紫外-可见分光光度计比色, 型号 DU-640, 为美国 Beckman 公司产品; 自动生化分析仪, 型号 TBA-120FR, 为日本东芝公司产品.

1.2 方法 将实验动物分为正常对照组, 模型组, 牛磺酸大剂量组和小剂量组, 每组 20 只. 给予大鼠皮下注射 400 mL/L CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液, 首剂量按质量计算为 5 mL/kg, 以后 2 次/wk, 每次剂量为 3 mL/kg, 连续注射 12 wk, 并在实验过程自由饮用 100 mL/L 乙醇作为饮水. 牛磺酸小剂量组在造模的同时给予牛磺酸 400 mg/kg, 牛磺酸大剂量组给予牛磺酸 800 mg/kg, ig, 1 次/d, 并予正常饮食. 正常对照组 ig 等容积的生理盐水. 实验动物在最后 1 次注射 CCl<sub>4</sub> 隔夜禁食 16 h 后, 取血用作生化学、HA 和 PC III 含量测定, 取部分肝组织匀浆用作测定肝药酶和 HYP, 肝组织用 40 g/L 甲醛溶液常规固定、石蜡切片, 用作病理组织学检查和免疫组化实验. 用自动生化分析仪测定血清 TP, ALB 和 ALT, 用放射免疫法测定血清 HA, PC III 含量. 按 Omura and Sato 方法测定肝组织 Cyt. P450 含量(J Biol Chem 1964;239:2370-2385), 唐跃年 et al<sup>[9]</sup>方法测定 Cyt.b<sub>5</sub> 含量, 周少春 et al<sup>[10]</sup>方法测定 HYP. 用免疫组化法测定肝组织 TGF-β<sub>1</sub> 的表达. 肝组织分别用 HE 染色和 Masson 法胶原纤维染色, 在光学显微镜下观察, 按肝组织病理诊断标准做出肝组织

病理分期诊断, 分级方法参见曾民德 et al<sup>[11]</sup>方法. 胶原纤维定量测定: 采用肝组织胶原纤维染色标本, 放大 400 倍, 于标本四角和中央位置选取 5 个视野, 测定每一视野中胶原纤维含量, 以纤维占视野面积的百分比表示, 取其平均值.

统计学处理 用 SPSS10.0 软件统计, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较用 t 检验, 各组大鼠纤维增生程度的比较用秩和检验.

## 2 结果

2.1 肝组织病理学变化 模型组可见多数肝小叶结构紊乱, 肝细胞脂肪变性广泛, 部分有坏死, 门管区及肝小叶内有较多炎性细胞浸润, 纤维组织增生显著, 包绕肝小叶(图 1, 2). 牛磺酸治疗组肝组织结构有较明显改善, 肝细胞脂肪变性显著减轻, 炎性细胞浸润和纤维组织增生减少(图 3, 4)(表 1).

表 1 各组大鼠肝纤维化程度的比较

分组	n	肝纤维化分期				
		S0	S1	S2	S3	S4
正常对照组 <sup>a</sup>	20	20	0	0	0	0
模型组	20	0	3	3	10	4
牛磺酸小剂量 <sup>a</sup>	20	0	12	5	3	0
牛磺酸大剂量 <sup>a</sup>	20	0	14	4	2	0

<sup>a</sup>P < 0.05, vs 模型组.

表 2 牛磺酸对肝纤维化大鼠血清学的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 20)

分组	ALT (nkat/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)	Cyt.P450 (nmol/g)	Cyt.b <sub>5</sub> (nmol/g)
正常对照组	783±133 <sup>b</sup>	67±13 <sup>a</sup>	38±6 <sup>b</sup>	506±39 <sup>b</sup>	804±142 <sup>b</sup>
模型组	2 601±300	58±16	23±3	211±27	256±69
牛磺酸小剂量	1 633±283 <sup>b</sup>	62±15 <sup>a</sup>	28±7 <sup>b</sup>	765±106 <sup>b</sup>	697±120 <sup>b</sup>
牛磺酸大剂量	1 367±317 <sup>b</sup>	64±11 <sup>a</sup>	31±4 <sup>b</sup>	811±136 <sup>b</sup>	761±131 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 vs 模型组.

表 3 牛磺酸对纤维化大鼠血清 HA、PC III 和肝脏 HYP、TGF-β<sub>1</sub> 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 20)

分组	HA(μg/L)	HYP(μg/L)	PC III(μg/L)	TGF-β <sub>1</sub>
正常对照组	146±51 <sup>b</sup>	221±144 <sup>b</sup>	9±4 <sup>b</sup>	15±5 <sup>b</sup>
模型组	324±95	1 282±523	33±14	33±13
牛磺酸小剂量	262±92 <sup>b</sup>	463±159 <sup>b</sup>	19±8 <sup>b</sup>	20±6 <sup>b</sup>
牛磺酸大剂量	219±79 <sup>b</sup>	381±147 <sup>b</sup>	19±8 <sup>b</sup>	20±6 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01, vs 模型组.

2.2 血清学变化 模型组肝纤维化大鼠血清中 ALT 活性升高, 总蛋白和白蛋白水平降低, HA 和 PC III 水平显著升高. 肝组织的 Cyt.P450 和 Cyt.b<sub>5</sub> 含量降低, HYP 含

量提高. 而牛磺酸治疗组 ALT, HA, PC III 和 HYP 水平比模型组明显降低( $P < 0.01$ ), Cyt.P450 和白蛋白水平较模型组明显升高( $P < 0.01$ ). 此外, 牛磺酸治疗组的 TGF- $\beta_1$  的表达也较模型组显著减少( $P < 0.01$ ). (表 2, 3).

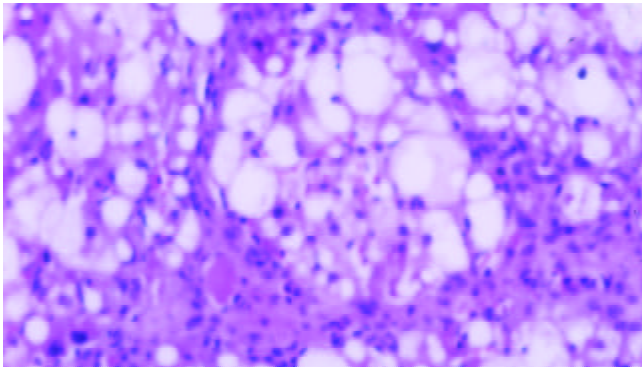


图1 模型组 HE 染色切片( $\times 100$ ).

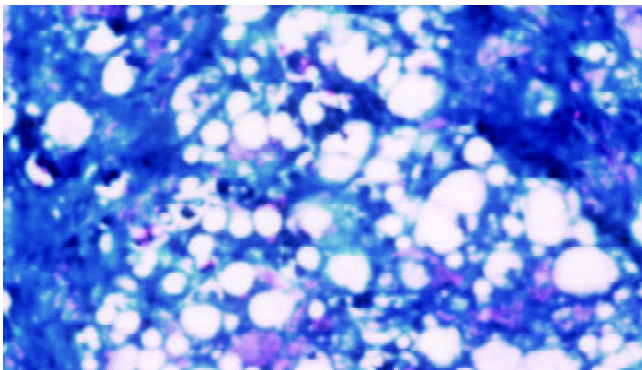


图2 模型组 Masson 染色( $\times 200$ ).

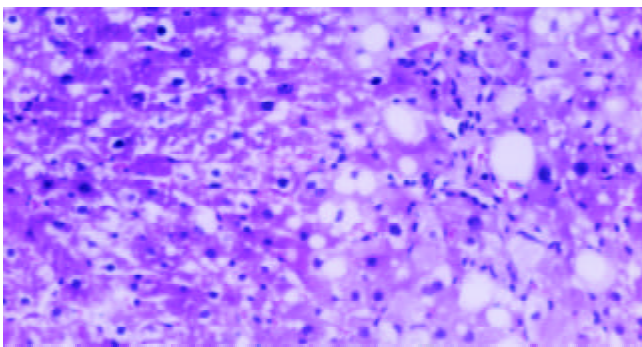


图3 牛磺酸治疗组 HE 染色切片( $\times 100$ ).

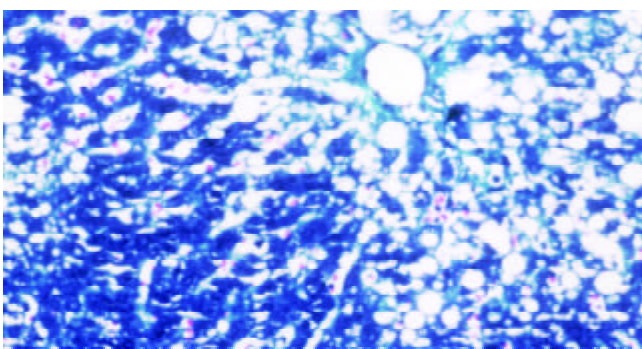


图4 牛磺酸治疗组 Masson 染色切片( $\times 200$ ).

### 3 讨论

肝纤维化常伴炎症, 可发展为肝硬化<sup>[11, 12]</sup>. 血清 HA, PC III 水平和肝组织 HYP 含量与肝组织纤维含量有良好的相关性, 可以做为反映肝纤维化程度的指标<sup>[13-15]</sup>. 而 HA 在目前所有肝纤维化血清学指标中是诊断价值最高的一个<sup>[16]</sup>. TGF- $\beta_1$  是作用最强的致肝纤维化细胞因子, TGF- $\beta_1$  的活化是大量细胞外间质合成的主要来源<sup>[17]</sup>. 为了准确的反映纤维化程度, 我们采用肝组织病理学检查和反映细胞外间质成分的 HA, PC III, HYP 以及反映纤维化形成的相关因子 TGF- $\beta_1$  进行联合检测.

CCl<sub>4</sub> 引起肝损害的作用机制主要是 CCl<sub>4</sub> 经肝微粒体内依赖于 Cyt.P450 的混合功能酶的激活, 产生了自由基 CCl<sub>3</sub> 及 Cl, 这些自由基可与肝细胞内大分子发生共价结合, 使肝细胞损伤. 此外, 二者均可导致微粒体钙泵活性降低, 使胞质 Ca<sup>2+</sup> 升高, 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 稳态遭到破坏, 从而引起细胞代谢紊乱甚至死亡<sup>[18-22]</sup>. 坏死物质及其继发的炎性细胞浸润产生肝纤维化刺激因子, 后者促进贮脂细胞 - 肌成纤维细胞 - 成纤维细胞增生, 产生大量胶原纤维, 形成肝纤维化<sup>[23, 24]</sup>. 因而, 抑制炎症的发生, 可阻止肝纤维化的进展. 肝组织的慢性炎症损伤和纤维化使肝功能障碍, 血浆总蛋白、白蛋白水平降低. 研究结果显示, 牛磺酸治疗组能显著提高血浆白蛋白水平, 降低 CCl<sub>4</sub> 导致的肝纤维化大鼠血清 ALT, HA, PC III 和肝组织 HYP 水平, 说明牛磺酸可减轻肝脏的炎症反应, 促进肝组织损伤的修复和改善功能, 同时抑制胶原蛋白及蛋白多糖的合成<sup>[4, 5, 25]</sup>. 本结果还显示, 经牛磺酸治疗后, 肝组织 TCF- $\beta_1$  表达显著下降, 与模型对照组比较差异有显著性, 说明牛磺酸可抑制 TGF- $\beta_1$  的活性, 拮抗 TGF- $\beta_1$  在肝纤维化形成中的作用. Cyt.P450 系统是位于滑面内质网上的一组混合功能氧化酶系, 他参与内源性物质和外源性物质代谢, 能够反映肝脏的解毒功能<sup>[26]</sup>. 本实验表明, 模型组大鼠 Cyt.P450 和 Cyt.b<sub>5</sub> 含量明显低于其他各组, 说明大鼠在形成肝纤维化时肝脏解毒功能明显下降, 而经牛磺酸干预后, 大鼠肝脏 Cyt.P450 和 Cyt.b<sub>5</sub> 含量明显增加, 解毒功能明显增强.

总之, 牛磺酸具有显著的防治实验性大鼠肝纤维化的作用. 其机制可能是通过拮抗 CCl<sub>4</sub> 的肝毒性作用, 抑制炎症, 保护肝细胞, 以及抑制 TGF- $\beta_1$  的活性有关.

### 4 参考文献

- 1 王吉耀. 关于肝纤维化研究的一些现状及展望. 中华消化杂志 1998;18:323
- 2 Lee HS, Huang GT, Chen CH, Chiou LL, Lee CC, Yang PM, Chen DS, Sheu JC. Less reversal of liver fibrosis after prolonged carbon tetrachloride injection. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1312-1315
- 3 Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992; 77:101-163
- 4 Birdsall TC. Therapeutic applications of taurine. *Altern Med Rev* 1998;3:128-136
- 5 Balkan J, Dogru-Abbasoglu S, Kanbagli O, Cevikbas U, Aykac-

- Toker G, Uysal M. Taurine has a protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* 2001;20:251-254
- 6 Koyman I, Nakamura T, Ogasawara M, Nemoto M, Yoshida T. The protective effect of taurine on the biomembrane against damage produced by the oxygen radical. *Adv Exp Med Biol* 1992; 315:335-339
- 7 Du G, Mouthys-Mickalad A, Sluse FE. Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radic Biol Med* 1998;25:1066-1074
- 8 Omura T, Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 1964;239:2370-2385
- 9 唐跃年, 张顺国, 李岚. 肝细胞微粒体的制备和细胞色素 P450 氧化酶活性测定. *中国医院药学杂志* 1998;18:535-536
- 10 周少春, 车建图, 李定国. 大鼠肝组织羟脯氨酸的测定. *上海第二医科大学学报* 1997;17:458-460
- 11 曾民德, 王泰龄, 王宝恩. 肝纤维化诊断和疗效评估共识. *诊断学理论与实践* 2002;1:191-192
- 12 陈岳祥, 李石. 肝纤维化药物治疗研究现状. *国外医学·消化系疾病分册* 1996;16:7-10
- 13 谢仕斌, 姚集鲁, 郑树森, 姚春澜, 郑荣琴. 血清肝纤维化指标水平与肝组织纤维图像分析的关系. *中华肝脏病杂志* 2000;8:203
- 14 高春芳, 叶伟民, 徐玲玲, 薛昌, 屠晓卿, 范烈英, 孔宪涛. 血清标志在慢性肝病肝纤维化诊断中的应用研究. *肝脏* 2000;5:203
- 15 Huang Z, Li Q, Wang Z. Observation on dynamic changes of serum procollagen III, hyaluronic acid and laminin in rats with hepatic fibrosis treated with Hujin pill. *Zhongguo Zhong Xiyi Jiehe Zazhi* 2000;20:447-449
- 16 Housset C, Guechot J. Hepatic fibrosis: physiopathology and biological diagnosis. *Pathol Biol* 1999;47:886-894
- 17 Potter JJ, Rennie-Tankesley L, Mezey E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 2003;38:281-288
- 18 沈杰. 几种常用肝毒剂致肝损伤机制的研究现状. *生理科学进展* 1990;21:70-72
- 19 Rechnagel RO, Glende EH Jr. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol* 1973;2: 263-297
- 20 Huang R, Okuno H, Takasu M, Shiozaki Y, Inoue K. Protective effect of rifampicin against acute liver injury induced by Carbon tetrachloride in mice. *Jpn J Pharmacol* 1995;69:325-334
- 21 Chae HB, Jang LC, Park SM, Son BR, Sung R, Choi JW. An experimental model of hepatic fibrosis induced by alcohol and CCl<sub>4</sub>: can the lipopolysaccharide prevent liver injury induced by alcohol and CCl<sub>4</sub>? *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2002;8: 173-178
- 22 Zim MC, Silveira TR, Schwartzmann G, Cerski T, Motta A. Potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity by pentosan polysulfate in rats. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1339-1346
- 23 黄自平, 艾莉, 袁顺玉, 梁扩寰. 当归对 CCl<sub>4</sub> 所致肝损伤大鼠的抗肝纤维化作用. *中国病理生理杂志* 1996;12:152-154
- 24 Jeong WI, Lee CS, Park SJ, Chung JY, Jeong KS. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res* 2002;22:869-877
- 25 Chen Y, Li S, Zhang X. Taurine inhibits deposition of extracellular matrix in experimental liver fibrosis in rats. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 1999;7:165-167
- 26 Hung DY, Chang P, Cheung K, McWhinney B, Masci PP, Weiss M, Roberts MS. Cationic drug pharmacokinetics in diseased livers determined by fibrosis index, hepatic protein content, microsomal activity, and nature of drug. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:1079-1087