DOI:10.19789/j.1004-9398.2018.05.010



# 油橄榄叶提取物对酒精性肝损伤大鼠肝组织转化生长因子-β1 水平的影响*

王 昱

(陇南师范高等专科学校农林技术学院,陇南特色农业生物资源研究开发中心,甘肃 成县 742500)

## 摘 要

目的: 探讨油橄榄叶提取物对酒精性肝损伤大鼠肝组织转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)水平的影响. 方法: 用递增法灌胃食用乙醇 24 周建立大鼠肝损伤模型,造模同时用 OLE(250 mg/kg、500 mg/kg、1000 mg/kg)进行灌胃治疗. 利用免疫组织化学法和酶联免疫吸附法(ELISA)检测肝组织 TGF-β1 水平. 结果: 与正常组相比,模型组大鼠肝组织 TGF-β1 水平极显著升高($P<0.01$). 与模型组比较,OLE 干预后,肝脏 TGF-β1 水平显著降低($P<0.05$, $P<0.01$). 结论: OLE 对酒精性肝损伤具有一定的预防作用,其机制可能是通过调控 TGF-β1 信号通路来缓解酒精性肝损伤的进展.

关键词: 油橄榄叶提取物,酒精性肝损伤,TGF-β1,大鼠.
中图分类号: R28

长期大量饮酒会导致多系统脏器的损害,肝脏是酒精代谢的主要器官,也是最容易受损的器官. 随着我国酒的消耗量增加,临床所见酒精性肝病在逐年增多. 研究表明,发生酒精性肝病后,可在短期内发展为不可逆的肝损伤,肝细胞肿大压迫肝血窦造成窦间隙变窄,使肝细胞缺氧,长时间就会导致肝细胞变性和坏死,并促进肝纤维化的发生[1-2]. 因此,开发并筛选对酒精性肝病有确切防治作用的中药新药并应用于临床,是当前面临的重要课题. 多酚、黄酮及橄榄苦苷是油橄榄叶主要活性成分,课题组前期已证实油橄榄叶提取物在排铅、海洛因脱毒、预防糖尿病、抗衰老、减轻缺血再灌注损伤等方面表现出突出的效果[3-12],具有调节肝脏抗氧化能力、抑制脂代谢调控因子(固醇调节元件结合蛋白-1c)表达的作用[13-14]. 为进一步阐明其作用机制,本研究拟以大鼠为实验动物建立酒精性肝损伤动物模型,探讨 OLE 对 TGF-β1 信号通路的影响,以揭示 OLE 防治酒精性肝损伤的作用机制.

收稿日期: 2018-03-04
* 甘肃省高等学校科研资助项目(1128B-01);甘肃省陇南市科技计划项目(2016-11)资助.

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

油橄榄叶提取物(陇南田园油橄榄科技开发有限公司);TGF-β1 ELISA 试剂盒(购自上海源叶生物科技公司);兔抗 TGF-β1 抗体、免疫组织化学试剂盒和 DAB(购自武汉博士德生物工程有限公司).

酶联免疫检测仪(ELx800,美国 BioTek 公司);高速台式冷冻离心机(Beckman 美国 TGL-16 M)等. 50 只健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,购于兰州大学实验动物中心,许可证号: SCXK(甘)2005-0007,体质量 200~250 g.

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 动物模型的建立与给药

50 只大鼠随机分为 5 组,即正常组、模型组、OLE 低剂量组(Ⅰ)、OLE 中剂量组(Ⅱ)和 OLE 高剂量组(Ⅲ),每组 10 只. 参照文献[15],除正常组外,其他各组采用剂量递增法灌胃乙醇: 1—4 周 5.0 g/kg,5—8 周 7.0 g/kg,9—12 周 9.0 g/kg,13—24 周 9.5 g/kg,每日 1 次. 造模同时,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ治疗组分别用 OLE 灌胃 250 mg/kg、500 mg/kg、1 000 mg/kg,每日 1 次,连续 24 周.



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

**1.2.3 肝组织 TGF-β1 蛋白含量测定**

取 100 mg 湿肝,加入 1 m L PBS 缓冲液,冰浴中匀浆(10 000 r/min) 20 s,重复 2 次,将匀浆液 4 ℃(3 600 r/min) 离心 20 min,取上清液,ELISA 试剂盒检测.

**1.2.4 免疫组织化学**

免疫组化 SP 法(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法). 末次给药后,取大鼠肝脏数块置于 4% 多聚甲醛固定,经脱水、石蜡包埋后冠状位切片,厚 6 μm. 脱蜡、抗原修复后,用 3% $H_2O_2$ 室温孵育 10 min,正常兔血清室温封闭 30 min,然后用兔抗鼠 TGF-β1 多克隆抗体(1∶200),4 ℃孵育过夜;次日取出切片以 PBS 冲洗后,再依次滴加生物素化羊抗兔 IgG 孵育 30 min,SABC 工作液孵育 30 min,最后 DAB 显色,苏木素复染,阴性对照以 PBS 代替一抗. 常规乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,在显微镜下观察并拍照.

**1.2.5 图像分析**

用美国 Image-proplus 5.0 专业图像分析软件进行图像分析. 从 TGF-β1 阳性反应的切片中各选 3 张,检测活性物质在肝脏中表达的强度. 测量时保证光源的稳定,并且取图之前预热 20 min 以上,采图时各项设置包括光源、光圈大小、白平衡、曝光强度、敏感度、对比度等均改为手动调节且固定,以保证每次取图系统的设置值一样. 取平均光密度和积分光密度两个指标,测量值的平均值为最终灰度值.

**1.2.6 数据处理**

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为有统计学差异,$P<0.01$ 为有显著统计学差异.

## 2 结 果

### 2.1 OLE 对肝损伤大鼠肝组织 TGF-β1 蛋白含量的影响

由图 1 可知,与正常对照组相比,模型组大鼠肝组织 TGF-β1 蛋白含量显著增加($P<0.01$);与模型组比较,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ治疗组肝组织 TGF-β1 蛋白含量显著降低($P<0.05$,$P<0.01$).

### 2.2 OLE 对肝损伤大鼠肝组织 TGF-β1 表达的影响

免疫组织化学显示:TGF-β1 在各实验组大鼠肝脏中都有不同程度的阳性表达,阳性表达部位被染成棕黄色(图 2: A-E),阴性对照组无 TGF-β1 阳性表达(图 2: F). 与正常组相比,模型组大鼠肝脏 TGF-β1 的表达水平增强、阳性细胞数增加($P<0.01$). 各给药组与模型组比较,大鼠肝脏 TGF-β1 的表达减弱、阳性细胞数减少($P<0.05$,$P<0.01$,图 3).

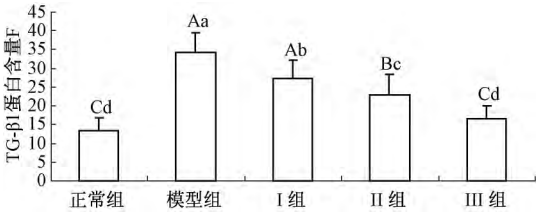



图 1 OLE 对大鼠肝组织 TGF-β1 蛋白含量的影响

注:同列数据肩标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);肩标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$);肩标相同字母或无字母标注表示差异不显著($P>0.05$). 下同.

## 3 讨 论

关于酒精性肝损伤的发病机制,近年来的研究表明,细胞因子、自由基损害、脂代谢调控因子等在酒精性肝损伤发病机制中起重要作用[15]. 但目前,仍然缺乏有效的治疗手段,采用的治疗药物大都有明显的副作用. 本实验的研究对象—油橄榄叶,其主要活性成分是多酚、黄酮及橄榄苦苷,既往已证实油橄榄叶提取物具有良好的防治酒精性肝损伤的药效学效应[13-14].

研究表明,TGF-β1 属于 TGF-β 超家族,对细胞的生长、分化和免疫功能都有重要的调节作用,也是目前公认的致纤维化的最强细胞因子[16]. 酒精致肝损伤时,肝枯否细胞、窦内皮细胞以及坏死的肝细胞等通过自分泌或旁分泌方式产生大量 TGF-β1,TGF-β1 通过自身调节机制,刺激上述细胞产生更多的 TGF-β1,形成级联放大效应,导致大量的 TGF-β1 生成和激活,与细胞膜上的相应受体结合后,将信号传递到细胞内,从而调节靶基因表达,导致细胞外基质大量积聚,使肝细胞死亡、组织纤维化[17,18]. 因此,抑制肝组织 TGF-β1 的表达,是对酒精性肝损伤保护作用的重要环节. 本实验结果显示,模型组大鼠肝组织 TGF-β1 含量均明显升高,提示肝损伤大鼠 TGF-β1 信号通路明显被激活. OLE 干预后,肝组织 TGF-β1 含量均显著降低,提示 OLE 对 TGF-β1 表达具有明显的抑制作用.

综上所述,OLE 可通过调节 TGF-β1 表达水平,



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

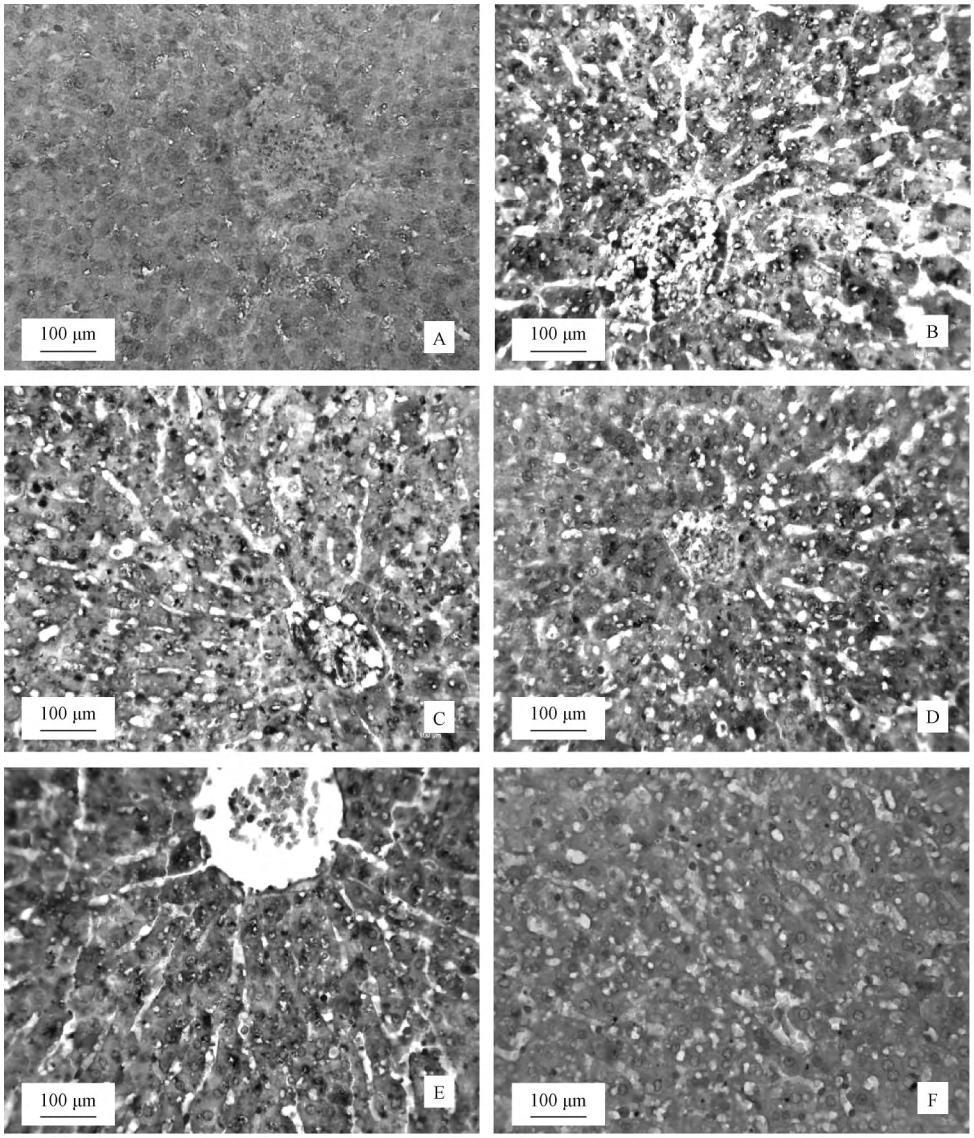



**图 2　TGF-β1 在大鼠肝脏的表达**

**注:** A. **正常组，标尺示** 100 μm( **下同**)；B. **模型组**；C. **Ⅰ组**；D. **Ⅱ组**；E. **Ⅲ组**；F. **阴性对照**

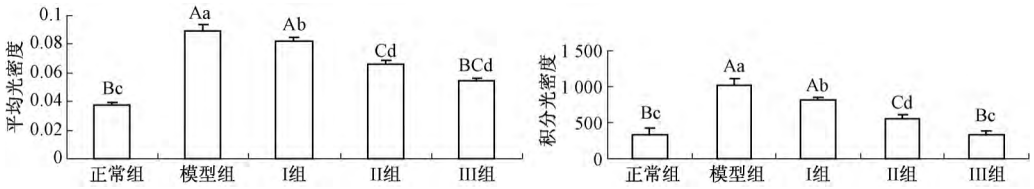



**图 3　各组大鼠肝脏 TGF-β1 表达的比较**

**缓解酒精性肝损伤的进展. 该实验为研发 OLE 制剂防治肝损伤相关疾病提供了理论与实验依据，但有关其药理作用机制和量效关系等尚需进一步研究.**

## 参　考　文　献

[1]　祁瑞瑞. 马齿苋提取物对大鼠酒精性脂肪肝的预防作用及机制探讨 [D]. 上海: 第二军医大学，2012: 2－3.

[2]　许嘉，巴蕾，吴文仓，等. 脂肪肝的流行病学研究进展 [J]. 慢性病学杂志，2013，25( 7) : 539－542.



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[3] Yuan J J, Wang C Z, Ye J Z, et al. Enzymatic hydrolysis of Oleropein form Olea europea (Olive) leaf extract and antioxidant activities [J]. Molecules, 2015, 51(1): 181 – 189.

[4] Bulotta S, Corradino R, Celano M, et al. Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells [J]. J Mol Endocrinol, 2013, 101(10): 3751 – 3754.

[5] Kontogianni V G, Gerothanassis I P. Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts [J]. Nat Prod Res, 2012, 26(2): 186 – 189.

[6] Goulas V, Papoti V T, Exarchou V, et al. Contribution of falconoid to the overall radical scavenging activity of olive (olea europaea L.) leaf polar extracts [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(6): 3303 – 3308.

[7] Esmaeili-Mahani S, Rezaeezadeh-Roukerd M, Esmaeilpour K, et al. Olive (Olea europaea L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(1): 200 – 205.

[8] Kaeidi A, Esmaeili-Mahani S, Sheibani V, et al. Olive (Olea europaea L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: in vitro and in vivo studies [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 136(1): 188 – 196.

[9] Wang Y, Wang S Q, Cui W H, et al. Olive leaf extract inhibits lead poisoning-induced brain injury [J]. Neural Regen Res, 2013, 8(22): 2021 – 2029.

[10] Wang Y, Wang S, Cui W, et al. Olive leaf extract improves cognition and reduces oxidative damage and apoptosis in mice with heroin dependence [J]. 解剖学报, 2015, 46(4): 469 – 477.

[11] 王昱, 王胜青, 何九军, 等. 橄榄苦苷对阿尔茨海默病小鼠模型学习记忆能力的影响 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(14): 1654 – 1658.

[12] 王昱, 秦序. 橄榄苦苷对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(9): 2388 – 2394.

[13] 王昱. 油橄榄叶提取物对大鼠酒精性脂肪肝的保护作用 [J]. 四川动物, 2017, 36(5): 557 – 562.

[14] 王昱. 油橄榄叶提取物对酒精性肝活性物质的影响 [J]. 首都师范大学学报: 自然科学版, 2017, 38(6): 64 – 67 + 74.

[15] 赵赶, 吕淑娟, 韦刚, 等. 委陵菜积雪草酸对大鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2866 – 2870.

[16] 李素婷, 王宝源, 杨鹤梅, 等. 柴胡总皂苷对酒精性肝病大鼠肝脏转化生长因子-β1 和 α-平滑肌肌动蛋白表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31 (22): 4389 – 4391.

[17] Ni M M, Xu T, Wang Y R, et al. Inhibition of IRF3 expression reduces TGF-β1-induced proliferation of hepatic stellate cells [J]. J Physiol Biochem, 2016, 72(1): 9 – 23.

[18] Zhang B M, Tan D H, Bai B, et al. γ-Glutamyl-S-allyl-cysteine inhibits hepatic stellate cell proliferation and collagen secretion via a proapoptotic mechanism [J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(6): 1271 – 1280.

# Effect of Olive Leaf Extract on Level of TGF—β1 of Alcoholic Liver Injury Rat

Wang Yu

(College of Agriculture and Forestry, Center for Research & Development of Longnan Characteristic Agro-bioresources, Longnan Teachers College, Chengxian Gansu 742500)

**Abstract**

Objective: to study the effect of olive leaf extract (OLE) on level of transforming growth factor-β1 (TGF-β1) of alcoholic liver injury rat. Methods: a hepatic injury model of rats by using edible alcohol was established with increasing dosage for 24 weeks, in the process of experimental liver injury, the rats were given OLE at doses of 250



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mg/kg, 500 mg/kg or 1000 mg/kg by intragastric administration, the immunohistochemistry and ELISA were used to determine the level of TGF-β1. Results: compared with the control group, expression of TGF-β1 in liver were extremely significantly increased ($P < 0.01$); compared with the model group, OLE significantly reduced the level of TGF-β1 in liver ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion: OLE has certain preventive effect on alcoholic liver injury, which may be relevant to relieve alcohol liver injury by regulation of TGF-β1 signaling pathway.

**Key words:** olive leaf extract, alcoholic liver injury, TGF-β1, rat.

**作者简介**　**王昱**(1973 -), **男, 天水人, 硕士, 教授. 研究方向: 天然产物药理、细胞与发育生物学**. E-mail: gswangyu@126.com.



(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net