

还原型谷胱甘肽对酒精性脂肪肝斑马鱼的保肝作用研究

葛炜炜¹, 曹刚^{1*}, 吴育^{1,2}, 陈刚¹, 张硕¹

1. 南京中医药大学南通附属医院 药剂科, 江苏 南通 226000

2. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 探讨还原型谷胱甘肽片对酒精性脂肪肝(AFLD)斑马鱼模型的保肝功效。方法 选取黑色素等位基因突变型(albino)品系斑马鱼,分别水溶给予还原型谷胱甘肽片500、1 000、2 000、4 000、8 000 $\mu\text{mol/L}$,同时设置对照组和模型组,除对照组外,利用2%无水乙醇诱导斑马鱼32 h建立AFLD模型,观察记录斑马鱼的死亡情况及表型,确定还原型谷胱甘肽片的最大耐受浓度(MTC)。黑色素等位基因突变型(albino)品系斑马鱼分别给予还原型谷胱甘肽片500、1 000、2 000 $\mu\text{mol/L}$ 和阳性对照药RU-21 100 $\mu\text{g/mL}$,同时设置对照组和模型组,除对照组外建立AFLD模型,采用油红O染色观察斑马鱼肝脏脂肪染色强度(S),计算还原型谷胱甘肽片的保肝功效;H&E染色观察斑马鱼肝脏病理学改变;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测白细胞介素(IL)-6、高迁移率族蛋白1b(HMGB-1b)和肿瘤坏死因子(TNF)- α mRNA表达。结果 还原型谷胱甘肽片对AFLD模型斑马鱼的MTC为2 000 $\mu\text{mol/L}$ 。与对照组比较,模型组S显著增加($P<0.001$);与模型组比较,还原型谷胱甘肽片1 000、2 000 $\mu\text{mol/L}$ 组和RU-21组S显著降低($P<0.01$ 、 0.001);还原型谷胱甘肽片500、1 000、2 000 $\mu\text{mol/L}$ 和RU-21 100 $\mu\text{g/mL}$ 组保肝功效分别为14%、32%、71%和48%。还原型谷胱甘肽片2 000 $\mu\text{mol/L}$ 组肝细胞结构正常,脂肪空泡较模型组减少。与对照组比较,模型组IL-6、HMGB-1b和TNF- α mRNA表达显著增加($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,还原型谷胱甘肽片500、1 000、2 000 $\mu\text{mol/L}$ 组IL-6、HMGB-1b和TNF- α mRNA表达显著降低($P<0.01$ 、 0.001)。结论 还原型谷胱甘肽片对AFLD具有明显的保肝作用,其机制与下调IL-6、HMGB-1b和TNF- α 表达有关。

关键词: 还原型谷胱甘肽片;酒精性脂肪肝;斑马鱼;炎症因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)08-1594-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.08.004

Liver protection effect of Glutathione Tablets on alcoholic fatty liver disease zebrafish

GE Weiwei¹, CAO Gang¹, WU Yu^{1,2}, CHEN Gang¹, ZHANG Shuo¹

1. Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nantong 226000, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of glutathione tablets against alcoholic fatty liver disease (AFLD) by constructing a zebrafish model of AFLD. **Methods** Zebrafish with albino allele mutation were treated with Glutathione Tablets (500, 1 000, 2 000, 4 000 and 8 000 $\mu\text{mol/L}$) in water solution respectively. Meanwhile, the control group and model group were set up. Except for control group, zebrafish were induced with 2% absolute ethanol for 32 h to establish AFLD model. The mortality and phenotype of zebrafish were observed and recorded. The maximum tolerable concentration (MTC) of Glutathione Tablets was determined. Albino zebrafish were treated with reduced Glutathione Tablets 500, 1 000 and 2 000 $\mu\text{mol/L}$ and positive control drug RU-21 100 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The control group and model group were set up at the same time. Except the control group, the AFLD model was established. The liver fat staining intensity (S) of zebrafish was observed by oil red O staining, and the liver protective effect of Glutathione Tablets was calculated; The pathological changes of zebrafish liver were observed by HE staining;

收稿日期: 2021-03-01

基金项目: 南通市科技局项目(JCZ20170);南通市青年课题A项目(QA2019022);南通市青年课题(QA2019024)

第一作者: 葛炜炜,主管药师,药学。E-mail: wuyu198761@163.com

*通信作者: 曹刚,副主任药师。E-mail: wylucky@njucm.edu.cn

Real time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect IL-6, HMGB-1b and TNF- α mRNA expression. **Results** The MTC of Glutathione Tablets to zebrafish was 2 000 $\mu\text{mol/L}$. Compared with the control group, S in the model group increased significantly ($P < 0.001$); Compared with the model group, S of Glutathione Tablets 1 000, 2 000 $\mu\text{mol/L}$ group and RU-21 group were significantly lower ($P < 0.01, 0.001$); The hepatoprotective effects of Glutathione Tablets 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol/L}$ and RU-21 100 $\mu\text{g/mL}$ were 14%, 32%, 71% and 48%, respectively. Compared with model group, Glutathione Tablets 2 000 $\mu\text{mol/L}$ group had normal hepatocyte structure and less fat vacuoles. Compared with control group, IL-6, HMGB-1b and TNF- α mRNA expression in model group were significantly higher ($P < 0.05, 0.01$). Compared with model group, the levels of IL-6, HMGB-1b and TNF- α in Glutathione Tablets 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol/L}$ group were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** Glutathione Tablets had obvious protective effect on AFLD, and the mechanism was related to the obvious down-regulation of inflammatory genes such as IL-6, HMGB-1b and TNF- α .

Key words: Glutathione Tablets; alcoholic fatty liver disease; zebrafish; inflammatory factors

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由于长期过度酗酒引起的肝脏损伤,初期常表现为酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver disease, AFLD)、酒精性肝炎,进而可发展为肝纤维化、肝硬化,甚至肝功能衰竭^[1-2]。AFLD诱导因素为大量摄入酒精,引起肝细胞内脂质蓄积量超过肝湿质量的5%,或1/3以上肝组织每单位面积发生脂肪变性,属于ALD的早期阶段^[3]。研究表明,90%重度酗酒者可发展为脂肪肝,其中30%可发展为肝纤维化,8%~20%可进展为肝硬化,ALD是肝病相关患病率及死亡率的主要原因^[4]。

临床常用皮质类固醇、己酮可可碱等治疗AFLD,虽能减轻部分临床症状,但毒副作用明显、疗效个体差异大等因素严重限制了其广泛使用。有Meta分析显示,糖皮质激素可改善重症酒精性肝炎患者短期生存率,但对轻、中型病例无明显效果^[5]。谷胱甘肽具有解毒、抗惊厥、抗血栓、抗氧化和抗动脉粥样硬化作用^[6]。谷胱甘肽的半胱氨酸侧链具有一个活性巯基,可以保护体内蛋白酶的巯基不被氧化和破坏^[7]。乙醇能够直接对各种细胞器和酶的结构和功能产生损害^[8-10],同时也能够限制线粒体脂肪酸的 β 氧化,导致脂质过氧化反应,进而抑制了谷胱甘肽的生物合成,继而使其抗氧化功能减弱,酒精在体内代谢可引起氧化应激和脂质过氧化反应,两者都会导致肝细胞内部分细胞器的结构发生改变,进而引起肝细胞功能的紊乱^[11]。

还原性谷胱甘肽片在临床上主要用于慢性肝脏疾病的辅助治疗,包括病毒性、药物毒性、酒精毒性引起的肝脏损伤。但采用AFLD斑马鱼模型研究还原性谷胱甘肽片的治疗效果未见报道。与啮齿类动物相比,斑马鱼具有饲养经济、方便,容易获得足够的样本量,胚胎透明、便于显微镜下观察肝脏,有利于高通量药物筛选等独特优点^[12-14]。与此同

时,斑马鱼体内拥有代谢酒精所需的关键酶,胚胎发育第4天肝脏便开始成熟,在低剂量乙醇下暴露4周可诱导形成典型的乙醇性肝病,该模型具有病理和基因表达模式^[15]。本研究利用斑马鱼模型探讨还原性谷胱甘肽片对AFLD的保肝功效,为合理指导临床用药提供参考。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

还原型谷胱甘肽片,批号19040870,重庆药友制药有限责任公司,用标准稀释水配制成20 mmol/L母液。阳性对照:RU-21,批号25780,美国精神科学有限公司,阴凉避光保存,用超纯水配制成100 mg/mL母液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。甲基纤维素(批号079K0054V, Sigma, USA);无水乙醇(批号20200825,国药集团化学试剂有限公司);4%组织细胞固定液(批号20190923, Solarbio);二甲苯(批号C10631736,上海麦克林生化科技有限公司);PBS缓冲液(批号10C16B30,武汉博士德生物工程有限公司);Mayer苏木素染色液(批号YH0170326)、伊红染色液(批号YH180124)、中性树脂封片剂(批号YH0170419),均购自上海依赫生物科技有限公司;软蜡(熔点54~56 $^{\circ}\text{C}$,批号20180108)、硬蜡(熔点62~64 $^{\circ}\text{C}$,批号20190628),上海华永石蜡有限公司; iTaq Universal SYBR Green Supermix(货号1725124, Bio-rad, USA); FastQuant RT Kit(With gDNase)试剂盒(货号KR106, TIANGEN, China); RNA-Quick Purification Kit(RNA快速提取试剂盒)(货号RN001, YiShan Biotech, China)。

1.2 主要仪器

解剖显微镜(SZX7, OLYMPUS, Japan); CCD相机(VertA1, 上海土森视觉科技有限公司);精密电子天平(CP214, OHAUS, USA);紫外-可见分光光度计(Nanodrop2000, Thermo, USA); PCR

仪(T100, BIO-RAD, USA); 实时荧光定量PCR仪(CFX Connect, BIO-RAD, USA); 高速冷冻离心机(PIC017/21, Thermo, USA)。

1.3 实验动物

黑色素等位基因突变型(albino)品系斑马鱼, 以自然成对交配方式进行繁殖, 共1 020尾, 日龄为受精后5 d(5 dpf), 均饲养于28 °C的养鱼用水中(水质: 每升反渗透水中加入200 mg速溶海盐, 电导率为450~550 $\mu\text{S}/\text{cm}$; pH值为6.5~8.5; 硬度为50~100 mg/L CaCO_3), 来源和饲养于杭州环特生物科技股份有限公司, 实验动物使用许可证号为SYXK(浙)2012-0171, 饲养管理符合国际AAALAC认证(认证编号001458)的要求。

2 方法

2.1 还原型谷胱甘肽片最大耐受浓度(MTC)测定

基于文献研究^[16-17], 采用2%酒精诱导32 h, 构建斑马鱼幼鱼AFLD模型。斑马鱼幼鱼形态学出现严重改变, 如游动兴奋异常, 出现转圈乱窜, 呈现心包水肿, 脊柱弯曲, 卵黄囊水肿以及鱼鳃畸形等, 但没有观察到死亡现象。

随机选取210尾5 dpf黑色素等位基因突变型(albino)品系斑马鱼于六孔板中, 每孔均30尾, 分别水溶给予还原型谷胱甘肽片500、1 000、2 000、4 000、8 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 同时设置对照组和模型组, 每孔体积3 mL。除对照组外, 其余组均给药同时用2%乙醇诱导斑马鱼32 h建立AFLD模型, 观察记录斑马鱼的死亡情况及表型, 确定还原型谷胱甘肽片对AFLD模型斑马鱼的MTC。

2.2 还原型谷胱甘肽片保肝功效评价

随机选取180尾5 dpf黑色素等位基因突变型(albino)品系斑马鱼于六孔板中, 每孔30尾。分别水溶给予还原型谷胱甘肽片500、1 000、2 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 阳性对照药RU-21 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 同时设置对照组和模型组, 每孔体积3 mL。除对照组外, 其余实验组均用2%无水乙醇诱导斑马鱼建立AFLD模型, 28 °C处理32 h后, 用油红O进行染色, 染色后每组随机选取10尾斑马鱼在解剖显微镜下拍照并采集数据, 使用NIS-Elements D 3.20高级图像处理软件分析统计斑马鱼肝脏脂肪染色强度(S), 保肝功效计算公式如下:

$$\text{保肝功效} = (S_{\text{模型}} - S_{\text{还原型谷胱甘肽片}}) / (S_{\text{模型}} - S_{\text{对照}})$$

2.3 还原型谷胱甘肽片对斑马鱼肝脏组织病理学的影响

斑马鱼给药及造模同“2.2”项, 用4%组织细胞

固定液固定斑马鱼, 进行HE染色(固定-脱水-包埋-切片-染色), 并进行病理学分析评价还原型谷胱甘肽片保肝功效。

2.4 还原型谷胱甘肽片对白细胞介素(IL)-6、高迁移率族蛋白1b(HMGB-1b)和肿瘤坏死因子(TNF)- α 基因表达的影响

随机选取450尾5 dpf黑色素等位基因突变型(albino)品系斑马鱼于六孔板中, 每孔30尾。分别水溶给予还原型谷胱甘肽片500、1 000、2 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 同时设置对照组和模型组, 每孔体积3 mL, 设置3个平行实验。除对照组外, 其余组均用2%无水乙醇诱导斑马鱼建立AFLD模型, 28 °C处理32 h后, 收集各组斑马鱼样本, 使用RNA快速提取试剂盒提取总RNA, 逆转录为cDNA, 通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂盒检测 β -actin、IL-6、HMGB-1b和TNF- α 基因的表达。引物序列见表1。

表1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

基因	引物序列
β -actin	Forward 5'-TCGAGCAGGAGATGGGAACC-3'
	Reverse 5'-CTCGTGGATACCGCAAGATTTC-3'
IL-6	Forward 5'-GCAGTATGGGGAACTATCCG-3'
	Reverse 5'-CTGACCCCTTCAAATGCCGT-3'
HMGB-1b	Forward 5'-CGCGCATCGGTGTTATTGTA-3'
	Reverse 5'-TGCTCCTCACGACAGGTTTG-3'
TNF- α	Forward 5'-ATCTTCAAAGTCGGGTGTATG-3'
	Reverse 5'-TGTGCCAGTCTGTCTCC-3'

2.5 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用方差分析, 所有数据均由SPSS 20.0统计软件进行处理。

3 结果

3.1 还原型谷胱甘肽片保肝MTC

还原型谷胱甘肽片在500~2 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度时, 均未引起斑马鱼死亡, 且与模型组状态相似。在4 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时诱发76.7%(23/30尾)斑马鱼死亡, 在8 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时诱发100.0%(30/30尾)斑马鱼死亡。故确定还原型谷胱甘肽片对AFLD模型斑马鱼的MTC为2 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。见表2。

3.2 还原型谷胱甘肽片对AFLD模型斑马鱼的保肝功效

与对照组比较, 模型组 S 显著增加($P < 0.001$); 与模型组比较, 还原型谷胱甘肽片1 000、2 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组和RU-21组 S 显著降低($P < 0.01, 0.001$)。还原型谷

表2 还原型谷胱甘肽片对AFLD模型斑马鱼的MTC($n=30$)Table 2 MTC of Glutathione Tablets to zebrafish with alcoholic fatty liver disease ($n=30$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	死亡 数	死亡率/%	表型
对照	—	0	0	未见明显异常
模型	—	0	0	未见明显异常
还原型 谷胱甘 肽片	500	0	0	与模型组状态相似
	1 000	0	0	与模型组状态相似
	2 000	0	0	与模型组状态相似
	4 000	23	76.7	—
	8 000	30	100	—

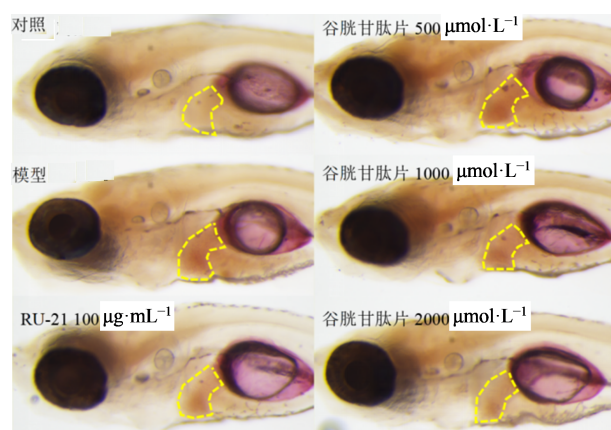
胱甘肽片 500、1 000、2 000 $\mu\text{mol/L}$ 组保肝功效分别为 14%、32%、71%；RU-21 100 $\mu\text{g/mL}$ 组保肝功效为 48%。还原型谷胱甘肽片在 1 000、2 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度具有保肝功效。结果见表 3 和图 1。

表3 还原型谷胱甘肽片保肝功效评价($n=10$)Table 3 Liver protection efficacy evaluation of Glutathione Tablets ($n=10$)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	S	保肝功效/%
对照	—	9 061 $\pm$ 342	—
模型	—	15 954 $\pm$ 441 ^{###}	—
RU-21	100 $\mu\text{g/mL}$	12 618 $\pm$ 680 ^{***}	48
还原型	500	15 006 $\pm$ 924	14
谷胱甘	1 000	13 716 $\pm$ 806 ^{**}	32
肽片	2 000	11 034 $\pm$ 441 ^{***}	71

与对照组比较: ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$

^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group



框线内为斑马鱼肝脏

analysis area in yellow frame line is zebrafish liver

图1 斑马鱼肝脏油红O染色典型图

Fig. 1 Typical pattern of zebrafish liver stained with oil red O

3.3 病理分析还原型谷胱甘肽片保肝功效

对照组斑马鱼肝细胞结构正常,边缘清晰,肝细胞核规则清晰,细胞质丰富且无脂肪空泡;模型组肝细胞排列松散,细胞核间距大,细胞质溶解有较多的脂肪空泡(箭头所指为肝细胞空泡)。阳性对照药 RU-21 100 $\mu\text{g/mL}$ 和还原型谷胱甘肽片 2 000 $\mu\text{mol/L}$ 组肝细胞结构正常,脂肪空泡较模型组减少,与对照组较为相似,具有明显的保肝功效。还原型谷胱甘肽片 500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 组肝细胞排列松散,且有较多脂肪空泡,与模型组较为相似,保肝功效均不明显。结果见图 2。

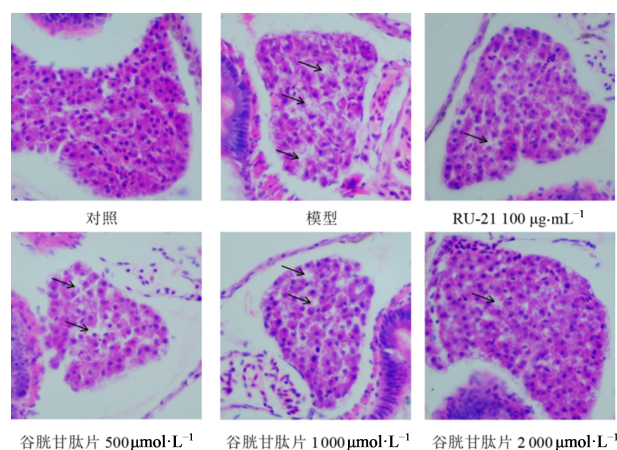


图2 还原型谷胱甘肽片对斑马鱼肝脏组织病理学的影响(H&E, ×200)

Fig. 2 Histopathology of zebrafish liver treated with Glutathione Tablets (H&E, ×200)

3.4 还原型谷胱甘肽片降低 IL-6、HMGB-1b 和 TNF- α mRNA 表达

与对照组比较,模型组 IL-6、HMGB-1b 和 TNF- α mRNA 表达显著增加($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,还原型谷胱甘肽片 500、1 000、2 000 $\mu\text{mol/L}$ 组 IL-6、HMGB-1b 和 TNF- α mRNA 表达显著降低($P<0.01$ 、 0.001)。结果见表 4。

4 讨论

保肝药大多数为降脂药物,其作用机制为减少肝内脂质沉积,抑制脂质过氧化反应,但多数降脂药在肝脏中代谢,且可能驱使血脂更集中于肝脏代谢,加重肝脏负担,使脂质蓄积进而损害肝功能^[18]。抗氧化剂 S-腺苷甲硫氨酸和甜菜碱等对 AFLD 都具有一定的疗效,但均存在不同程度的副作用。

在人类细胞中谷胱甘肽是一种自然合成的三肽,也是一种非酶性的抗氧化剂,并且这种抗氧化剂也是通过细胞合成的^[19]。还原型谷胱甘肽通过具有活性的巯基与体内的自由基结合代谢为酸类物质,加速自由基的排泄,从而避免器官受到损伤。

表4 还原型谷胱甘肽片对AFLD模型斑马鱼IL-6、HMGB-1b和TNF- α 基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Gene expression of IL-6, HMGB-1b, and TNF- α in AFLD zebrafish treated with Glutathione Tablets ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	IL-6/ β -actin	HMGB-1b/ β -actin	TNF- α / β -actin
对照	—	0.394 $\pm$ 0.030	0.260 $\pm$ 0.089	0.308 $\pm$ 0.086
模型	—	1.000 $\pm$ 0.178 [#]	1.000 $\pm$ 0.092 ^{##}	1.000 $\pm$ 0.179 [#]
还原型	500	0.371 $\pm$ 0.077 ^{**}	0.291 $\pm$ 0.016 ^{***}	0.094 $\pm$ 0.019 ^{***}
谷胱甘	1000	0.289 $\pm$ 0.006 ^{**}	0.271 $\pm$ 0.018 ^{***}	0.103 $\pm$ 0.013 ^{***}
肽片	2000	0.431 $\pm$ 0.029 ^{**}	0.314 $\pm$ 0.035 ^{***}	0.046 $\pm$ 0.005 ^{***}

与对照组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较:^{**} $P < 0.001$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

还原型谷胱甘肽也可以参与转丙氨基和羧甲基反应,从而达到保护肝功能的生理作用^[20]。

还原型谷胱甘肽片改善AFLD模型斑马鱼肝脏脂肪水平,改善肝脏组织病变,具有明显的保肝功效,其主要机制可能与明显下调IL-6、HMGB-1b和TNF- α 等炎症基因有关。TNF- α 属于炎症介质,可对炎症反应中的生理病理过程进行干预介导,进而导致局部炎症反应;HMGB-1b是一种重要的晚期炎症介质;IL-6参与炎症反应的病理过程,其水平高低可反映炎症程度,还可促进TNF- α 等炎症因子的产生而加重炎症损伤。

本研究结果表明,还原型谷胱甘肽片对AFLD斑马鱼具有明显的保肝功效,其主要机制与明显下调IL-6、HMGB-1b和TNF- α 等炎症基因有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会脂肪肝与酒精性肝病全国研讨会; 中华医学会脂肪肝专家委员会. 酒精性肝病防治指南(2018年更新版) [J]. 实用肝脏病杂志, 2018, 21(2): 170-176.
National Workshop on Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association; Fatty Liver Expert Committee, Chinese Medical Doctor Association. Guidelines for the Prevention and Treatment of Alcoholic Liver Disease (2018 Update) [J]. J Pract Hepatol, 2018, 21(2): 170-176.
- [2] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病组. 酒精性肝病诊疗指南 [J]. 中国肝脏病杂志: 电子版, 2010, 2(4): 49-53.
Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease Group, Liver

Disease Society, Chinese Medical Association. Guidelines for the diagnosis and treatment of alcoholic liver disease [J]. Chin J Liver Dis: Elect Vers, 2010, 2(4): 49-53.

- [3] 贾 艳, 付怡静, 刘晓阳, 等. 我国酒精性脂肪肝的研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014, 23(4): 376-379.
Jia Y, Fu J Y, Liu X Y, et al. Research progress of alcoholic fatty liver disease in China [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2014, 23(4): 376-379.
- [4] Ventura-Cots M, Watts A E, Bataller R. Binge drinking as a risk factor for advanced alcoholic liver disease [J]. Liver Int, 2017, 37(9): 1281-1283.
- [5] Louvet A, Thursz M R, Kim D J, et al. Corticosteroids reduce risk of death within 28 days for patients with severe alcoholic hepatitis, compared with pentoxifylline or placebo-a meta-analysis of individual data from controlled trials [J]. Gastroenterology, 2018, 155(2): 458-468.
- [6] 代 涛, 尹志峰, 王良友. 还原型谷胱甘肽临床应用研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2014, 31(5): 432-435.
Dai T, Ying Z F, Wang L Y. Research progress in clinical application of reduced glutathione [J]. J Chengde Med Coll, 2014, 31(5): 432-435.
- [7] 樊跃平, 于健春, 余 跃, 等. 谷胱甘肽的生理意义及其各种测定方法比较、评价 [J]. 中国临床营养杂志, 2003, 11(2): 58-61.
Fan Y P, Yu J C, Yu Y, et al. Comparison and evaluation of physiological significance of glutathione and its determination methods [J]. Chin J Clin Nutr, 2003, 11(2): 58-61.
- [8] 赵云霞, 陶明焯, 程光宇, 等. 鸡枞菌多糖对急性酒精肝损伤小鼠超微结构病理结构及ADH2, ALDH2 mRNA表达的影响 [J]. 食品科学, 2015, 36(5): 195-199.
Zhao Y X, Tao M X, Cheng G Y, et al. Effects of abietyl-abietyl-polysaccharide on ultrastructural pathological structure and mRNA expression of ADH2 and ALDH2 in acute alcohol liver injury mice [J]. Food Sci, 2015, 36(5): 195-199.
- [9] Hideo O, Hiroshi E, Shunsuke N, et al. Glutathione [J]. React Week, 2018, 1707(1): 140.
- [10] 郝爱芹. 还原型谷胱甘肽治疗酒精性肝炎的疗效观察 [J]. 中国社区医师: 医学专业, 2013, 15(19): 26.
Hao A Q. Effect of reduced glutathione on alcoholic hepatitis [J]. Chin Commun Doct, 2013, 15(19): 26.
- [11] 刘 艳. 还原型谷胱甘肽治疗酒精性肝病患者的作用分析及药理分析 [J]. 健康大视野, 2018(21): 213-214.
Liu Y. Effect and pharmacological analysis of reduced glutathione in treating patients with alcoholic liver disease

- [J]. Health Horizon, 2018(21): 213-214.
- [12] Santoriello C, Zon L I. Hooked! Modeling human disease in zebrafish [J]. J Clin Invest, 2012, 122(7): 2337-2343.
- [13] Ma J, Yin H L, Li M R, et al. A comprehensive study of high cholesterol diet-induced larval zebrafish model: a short-time *in vivo* screening method for non-alcoholic fatty liver disease drugs [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(5): 973-983.
- [14] 王 成, 龚莉虹, 郭朝成, 等. 模式生物斑马鱼在中药药效物质筛选中的应用进展 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6125-6134.
- Wang C, Gong L H, Guo C C, et al. Application progress on model organism zebrafish in screening of pharmacodynamic substances of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(24): 6125-6134.
- [15] Park K H, Kim S H. Low dose of chronic ethanol exposure in adult zebrafish induces hepatic steatosis and injury [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109179.
- [16] 陈灿滨. 酒精性脂肪肝斑马鱼模型的建立及白凤菜保肝护肝作用研究 [D]. 漳州: 闽南师范大学, 2016.
- Chen C B. Establishment of zebrafish model of alcoholic fatty liver disease and study on hepatoprotective effect of Chinese phenifera [D]. Zhangzhou: Minnan Normal University, 2016.
- [17] Passeri M J, Cinaroglu A, Gao C, et al. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation [J]. Hepatology, 2009, 49(2): 443-452.
- [18] 秦 丹, 牛 刚, 张飘飘, 等. 降血脂药品不良反应报告分析 [J]. 中国药物评价, 2017, 34(3): 189-195.
- Qing D, Niu G, Zhang P P, et al. Analysis of adverse reactions of drugs for lowering blood lipid [J]. Chin J Drug Eval, 2017, 34(3): 189-195.
- [19] 苗启庆. 谷胱甘肽的生理功能及其在食品加工中的应用前景 [J]. 科技风, 2010(8): 247.
- Miao Q Q. Physiological function of glutathione and its application prospect in food processing [J]. Technol Wind, 2010(8): 247.
- [20] Winterbour N, Christine C. Regulation of intracellular glutathione [J]. Redox Biol, 2018, 22(2019): 101086.

[责任编辑 兰新新]