

表没食子儿茶素没食子酸酯对肝纤维化作用机制的研究进展

曹志飞^{1,2}, 顾振纶^{1*}, 周文轩¹, 郭次仪¹

(1. 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 苏州大学生命科学学院, 江苏 苏州 215123)

摘要:表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶提取物茶多酚中量最多的一种生物活性成分, 诸多研究表明EGCG具有多种药理作用, 包括抗肿瘤、抗氧化、抗菌等。近年来发现EGCG具有抗纤维化作用。而目前尚无有效的针对肝纤维化的药物, 预示着EGCG在抗纤维化方面具有广阔的开发前景。现针对EGCG治疗肝纤维化的作用及其机制进行综述。

关键词:EGCG; 肝纤维化; 机制

中图分类号:R286.55

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0628-03

Advances in studies on mechanism of epigallocatechin gallate on hepatic fibrosis

CAO Zhi-fei^{1,2}, GU Zhen-lun¹, ZHOU Wen-xuan¹, GUO Ci-yi¹

(1. Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Suzhou 215007, China; 2. College of Life Science, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Key words: epigallocatechin gallate; hepatic fibrosis; mechanism

肝纤维化(hepatic fibrosis)是指各种致病因素引起肝脏损害和炎症, 在修复过程中导致肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)异常增多和过度沉积的病理过程^[1]。目前认为, 肝纤维化的形成, 主要是由肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)激活, ECM成分生成过多, 降解相对不足, 胶原等ECM在肝内大量沉积所致^[2]。由于肝纤维化的发生发展过程复杂和涉及到多种因素, 这给肝纤维化的治疗增加了难度。虽然近年来肝纤维化发生机制的研究取得长足进展, 给肝纤维化的治疗提供了许多新途径^[3]。然而, 目前尚无有效的针对肝纤维化的药物, 肝纤维化的防治依然是当今肝病治疗中的重点、难点。因此进一步研究肝纤维化的发病机制, 寻找高效低毒的抗肝纤维化药物仍是当前的重要研究方向。

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是绿茶提取物茶多酚中量最多的一种生物活性成分, 诸多研究表明EGCG具有多种生物学功能, 包括抗肿瘤、抗氧化、抗菌、抗紫外辐射等^[4]。近年来研究发现EGCG具有抗炎症和抗纤维化的作用^[5-7], 目前国内外开始了这方面的研究, 并初步证实了EGCG对肝纤维化疾病的治疗作用。本文针对EGCG治疗肝纤维化的作用机制进行综述, 以期能为高效低毒的抗肝纤维化药物的开发提供参考。

1 EGCG对肝纤维化的抗氧化作用

氧化应激存在于HSC的活化和肝纤维化过程中^[8,9]。由于受损的肝组织中促氧化剂和抗氧化剂的不平衡导致了肝纤维化中的氧化应激。血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)是衡量肝功能的两个重要指标, 在CCl₄肝

纤维化模型中, 大鼠出现ALT和AST增高。EGCG具有很强的抗氧化能力^[4], 经EGCG治疗的肝纤维化大鼠血清中的ALT和AST活性明显降低, 提示EGCG对肝纤维化大鼠具有很好的治疗作用^[6]。

硫代巴比土酸活性物质(thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS)是脂质过氧化作用的一个重要指标, 在CCl₄所致肝纤维化大鼠中TBARS明显升高, 而给予EGCG治疗后TBARS明显降低^[10]。谷胱甘肽(GSH)作为一种重要的抗氧化物质, 在细胞内外参与多种酶联反应过程, 具有清除自由基、参与氨基酸的转运、维持巯基酶活性等生理功能^[11]; 在GSH存在的条件下, GSH过氧化物酶能够及时清除脂质过氧化物^[12]。研究发现在CCl₄所致肝纤维化大鼠中GSH明显降低, 而EGCG治疗后肝脏中GSH明显升高。体外实验也证明EGCG对肝细胞的保护作用主要是由于抗氧化作用^[13,14]。

更进一步的研究表明: EGCG的抗氧化能力来源于细胞内GSH的从头合成, 它在抗纤维化中起着重要的作用^[7]。而且, GSH的从头合成是EGCG抑制转化生长因子-β(TGF-β)信号通路和抑制传代的HSC中纤维化相关基因表达所必须的。GSH是细胞中最丰富的巯基抗氧化剂, 它与ROS作用或作为抗氧化酶的辅因子。自由基和脂质过氧化物(LPO)终末产物是促纤维化因子。EGCG通过清除HSC细胞内的ROS和LPO来降低氧化应激。而且, EGCG的抗氧化作用主要是由于其能促进细胞内GSH的合成, 且合成的GSH在细胞内能保持24h以上。提示EGCG的抗氧化能力不是由于其本身的多酚化学结构决定的。

收稿日期: 2007-10-17

基金项目: 香港保健协会科研基金资助项目(20060901HK)

作者简介: 曹志飞(1981-), 男, 湖南郴州人, 硕士, 研究方向为生物制药。 E-mail: hunancao@163.com

* 通讯作者 顾振纶 Tel: (0512)65190599 E-mail: zhenlungu.2003@163.com

2 EGCG对Rho信号通路的作用

Rho是小相对分子质量GTPases超家族Rho亚家族成员,是Ras超家族的哺乳动物基因同系物。Rho可以通过其下游效应因子Rho激酶(Rock/Rho-kinase)调节细胞肌动蛋白骨架的重组,从而广泛参与细胞迁移、运动、凋亡、基因转录、神经再生等生物学过程^[15~17]。

HSC在肝纤维化过程中处于中心地位,Rho信号通路被认为与HSC的活化和增殖有关。Nobuhiko等^[18]研究了EGCG对活化的人HSC源的TWNT-4细胞系Rho信号通路的作用,发现EGCG能抑制张力丝(Rho活化的指示剂)的形成,改变平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin α -SMA)的分布。EGCG强烈抑制活化的Rho,继而抑制黏着斑激酶(是Rho信号通路的调节蛋白)的磷酸化。BrdU渗入实验证明,100 μ mol/L EGCG能抑制80%的细胞增殖,使50%的细胞凋亡。EGCG也可抑制lysophosphatidic acid (Rho的一种活化剂),诱导细胞分裂素活化蛋白激酶(Erk1/2、c-jun激酶和p38)的磷酸化。以上表明EGCG能通过Rho信号通路抑制HSC的生长。

3 EGCG对胶原合成的作用

肝纤维化主要的特征是ECM的过量沉积^[19],ECM的主要成分是胶原。肝损伤后,HSC分化成活化的肌成纤维细胞,表达 α -SMA。活化的肌成纤维细胞进一步增殖并产生胶原等ECM^[20]。

Nakamuta等^[5]观察了包括EGCG在内的儿茶素对大鼠原代SHC和活化的SHC来源的TWNT-4细胞中胶原和胶原酶的作用。EGCG(50 mmol/L)抑制大鼠HSC的效果强于表儿茶素没食子酸酯(50 mmol/L),而表没食子儿茶素(50 mmol/L)则没有抑制作用。EGCG也能抑制胶原产生和胶原酶活性,并呈剂量依赖性,但对TWNT-4细胞中的基质金属蛋白酶抑制因子1(TIMP-1)则没有作用。但是实时定量PCR显示EGCG能促进TWNT-4细胞中I型胶原、TIMP-1和基质金属蛋白酶1(MMP-1)的转录,对 α -SMA的转录则无抑制作用。以上说明EGCG能抑制胶原产生(尽管其转录升高)和胶原酶的活性,对肝纤维化具有治疗作用。

4 EGCG对HSC活化、增殖的作用

在肝纤维化过程中,处于静息期的肝星状细胞活化并分化成肌成纤维细胞。HSC的活伴随着细胞因子的表达,包括血小板衍生的生长因子 β 受体(PDGF- β R)。PDGF是最强烈的有丝分裂原,对HSC的活化、分裂和增殖均有明显的促进作用^[21]。PDGF受体由A、B亚单位组成,有AA、AB、BB 3种形式,PDGF受体本身具有酪氨酸激酶活性,与PDGF结合后形成二聚体而自身磷酸化,启动细胞信号传导,调节基因转录,细胞迁移和细胞增殖^[22]。在肝损伤发展过程中,HSC早期的增殖主要由PDGF调控。HSC增殖引起PDGF- β 受体表达,而PDGF- α 表达不变^[21]。Chen等^[23]研究发现EGCG通过两个阶段抑制原代和传代的HSC的活化:EGCG首先迅速抑制血清中PDGF导致的PDGF- β 受体的酪氨酸的磷酸化,这个过程存在时间较短,只有几个小时。此外,EGCG还可通过

抑制转录因子活化剂蛋白1和NF- κ B的活化来抑制PDGF- β 受体基因的转录,这个过程持续时间不超过48 h。

PDGF- β 受体的磷酸酪氨酸作为高亲和性的结合位点能与信号通路下游增殖相关的几个分子结合^[21],从而导致Ras蛋白及Raf-1、MEK和Erk蛋白激酶等被活化,Erk转移到细胞核中导致细胞开始增殖。另一个跟PDGF- β 受体相关的分子是磷脂酰肌醇3激酶(PI3-K),而PI3-K激活的一个下游分子是Akt。PI3-K是有丝分裂和HSC中PDGF-BB诱导趋化性的必需基因^[24]。Sakata等^[25]发现EGCG对MEK和Akt蛋白的表达没有明显变化,但磷酸化的MEK和Akt均能被EGCG所抑制,说明EGCG的一个主要的作用位点应该在MEK和Akt的上游。PDGF- β 受体在MEK和Akt的上游,而且在活化的HSC表面能大量表达PDGF- β 受体。对SHC的PDGF- β 受体的表达和磷酸化蛋白的表达进行研究发现EGCG能显著抑制磷酸化PDGF- β 受体表达,而PDGF- β 受体不受影响。PDGF- β 受体结合实验发现EGCG能非竞争性抑制PDGF-BB结合到其受体上。以上表明EGCG对PDGF诱导的HSC的增殖的抑制可能是由于其阻止PDGF-BB结合到其受体上。

5 EGCG对MMP-2的作用

许多研究发现能降解胶原的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)(如人的MMP-1)的表达降低。实验和临床研究揭示MMP-2的表达增强和活性增高是肝纤维化形成的主要因素之一^[26,27]。MMP-2以酶原形式(pro-MMP-2)分泌,且可以被MT1-MMP和TIMP-2调节的酶联过程所活化^[28,29]。活化的MMP-2能降解正常的内皮基质,将其变为原纤维胶原,形成的胶原积累后可进一步促进HSC活化^[27]。体外实验表明EGCG能显示抑制MMP-2的活性^[30]。而且,培养的HSC中,MMP-2 mRNA和蛋白的表达均被EGCG所抑制。进一步研究发现EGCG通过影响MT1-MMP活性来抑制MMP-2的活化^[6]。以上结果提示EGCG能强烈抑制MMP-2酶原的活化,这是由于EGCG能直接抑制MT1-MMP的活性。

6 结语

EGCG对肝纤维化具有治疗作用,已通过实验得到证实,而且对EGCG抗肝纤维化的机制研究,也取得了很大的进展。由此可见,EGCG有望在肝纤维化疾病的临床上发挥作用。但是也存在以下几个问题:1)EGCG作用于肝纤维化的各种机制中到底是哪种机制占主要地位及各种机制间的相互关系尚未阐明;2)EGCG对不同原因造成的肝纤维化的治疗作用及其差异方面的报道较少;3)大部分是动物实验研究资料,临床研究相对较少。因此EGCG对肝纤维化的保护作用还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 李才. 器官纤维化-基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003.
- [2] Van de Bovenkamp M, Groothuis G M M, Meijer D K F, et al. Liver fibrosis *in vitro*: cell culture models and precision-cut liver slices [J]. *Toxicol in Vitro*, 2007-, 21: 545-557.
- [3] Wells R G. Mechanisms of liver fibrosis: New insights into

- an old problem [J]. *Drug Discov Today*, 2006, 4: 489-495.
- [4] Nagle D G, Ferreira D, Zhou Y D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67: 1849-1855.
- [5] Nakamuta M, Higashi N, Kohjima M, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea, suppresses both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16(4): 677-681.
- [6] Zhen M C, Wang Q, Huang X H, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis [J]. *J Nutr Biochem*, 2007, 18(12): 795-805.
- [7] Fu Y M, Zhou Y J, Zheng S Z, et al. The antifibrogenic effect of (-)-epigallocatechin gallate results from the induction of de novo synthesis of glutathione in passaged rat hepatic stellate cells [J]. *Lab Invest*, 2006, 86: 697-709.
- [8] Tsukamoto H. Oxidative stress, antioxidants, and alcoholic liver fibrogenesis [J]. *Alcohol*, 1993, 10: 465-467.
- [9] Lee K S, Buck M, Houghlum K, et al. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96: 2461-2468.
- [10] Liu J Y, Chen C C, Wang W H, et al. The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl₄-induced liver fibrosis in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44: 336-343.
- [11] Ookhtens M, Kaplowitz N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst (e) ine [J]. *Semin Liver Dis*, 1998, 18: 313-329.
- [12] Meister A, Anderson M E. Glutathione [J]. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52: 711-760.
- [13] Kagaya N, Kawase M, Maeda H, et al. Enhancing effect of zinc on hepatoprotectivity of epigallocatechin gallate in isolated rat hepatocytes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25: 1156-1160.
- [14] Ramirez-Mares M V, de Mejia E G. Comparative study of the antioxidant effect of ardisin and epigallocatechin gallate in rat hepatocytes exposed to benomyl and 1-nitropyrene [J]. *Food Chem Toxicol*, 2003, 41: 1527-1535.
- [15] Kimura K, Itoh M, Amano M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase) [J]. *Science*, 1996, 269: 221-223.
- [16] Marinissen M J, Chiariello M, Tanos T, et al. The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis [J]. *Mol Cell*, 2004, 14: 29-41.
- [17] Friedman S L. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies [J]. *N Engl J Med*, 1993, 328: 1828-1835.
- [18] Nobuhiko H, Motoyuki K, Marie F, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a green-tea polyphenol, suppresses Rho signaling in TWNT-4 human hepatic stellate cells [J]. *J Lab Clin Med*, 2005, 145(6): 316-322.
- [19] Friedman S T. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies [J]. *N Engl J Med*, 1993, 328: 1828-1835.
- [20] Schmitt-Graff A, Kruger S, Bochar F, et al. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers [J]. *Am J Pathol*, 1991, 138: 1233-1242.
- [21] Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells [J]. *Liver*, 1998, 18: 2-13.
- [22] Ahn H Y, Hadizadeh K R, Seul C, et al. Epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits the PDGF-BB induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172) [J]. *Mol Biol Cell*, 1999, 10: 1093-1104.
- [23] Chen A P, Zhang L. The antioxidant (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits rat hepatic stellate cell proliferation *in vitro* by blocking the tyrosine phosphorylation and reducing the gene expression of platelet-derived growth factor-beta receptor [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 23381-23389.
- [24] Marra F, Gentilini A, Pinzani M. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for platelet-derived growth factor's actions on hepatic stellate cells [J]. *J Gastroenterol*, 1997, 112: 1297-1306.
- [25] Sakata R, Ueno T, Nakamura T, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cell line LI90 [J]. *J Hepatol*, 2004, 40: 52-59.
- [26] Preaux A M, Mallat A, Nhieu J T, et al. Matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic fibrosis by cell-matrix interaction [J]. *Hepatology*, 1999, 30: 944-950.
- [27] Benyon R C, Arthur M J. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21: 373-384.
- [28] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. *Circ Res*, 2003, 92: 827-839.
- [29] Fridman R. Surface association of secreted matrix metalloproteinases [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2003, 54: 75-100.
- [30] Zhen M C, Huang X H, Wang Q, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses rat hepatic stellate cell invasion by inhibition of MMP-2 expression and its activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(12): 1600-1607.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821 传真:23006821 联系人:陈常青