

穗花杉双黄酮对急性肝损伤大鼠炎症相关因子的影响

黄振青, 韦燕飞, 刘雪梅, 段雪琳, 赵铁建*
(广西中医药大学, 南宁 530001)

【摘要】 目的: 研究穗花杉双黄酮(ATF)对四氯化碳(CCl_4)诱导急性肝损伤大鼠炎症相关因子的影响。方法: 将健康雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组, 损伤模型组, 阳性对照组, 穗花杉双黄酮低、中、高剂量组($15, 30, 60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 连续给药 7 d, 末次灌胃给药 1 h 后, 腹腔注射 CCl_4 原液建立急性肝损伤大鼠模型, 采用 ELISA 法分别检测各组大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 转化生长因子 β_1 (TGF- β_1), 白介素 1β (IL- 1β), 白细胞介素 6 (IL-6) 的含量和肝组织核因子- κ B (NF- κ B), 磷酸化抑制蛋白(nuclear factor kappa B inhibitor protein, I κ B- α)的水平, 采用鲎试剂终点显色法检测大鼠血浆内毒素(LPS)水平, Real time PCR 法检测肝组织 TNF- α 和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因的表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠血清 TNF- α , TGF- β_1 , IL- 1β , IL-6 的含量显著升高($P < 0.01$), 大鼠血浆内毒素水平明显提高($P < 0.01$), 肝组织 NF- κ B 和磷酸化 I κ B- α 的水平也明显升高($P < 0.01$), 肝组织 TNF- α 和 iNOS 基因的表达也显著上调($P < 0.01$)。与模型组比较, ATF 能显著降低血清 TNF- α , TGF- β_1 , IL- 1β , IL-6 的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 降低肝组织 NF- κ B 和磷酸化 I κ B- α 的水平, 且能显著降低 LPS 水平, 下调肝组织 TNF- α 和 iNOS 基因的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 穗花杉双黄酮对四氯化碳致急性肝损伤大鼠具有明显的保护作用, 其机制可能通过抑制内毒素引起的 Kupffer 细胞激活, 进而抑制下游核因子 NF- κ B 的激活, 减少炎症细胞因子的释放。

【关键词】 穗花杉双黄酮; 四氯化碳; 急性肝损伤; 炎症因子

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2014)11-0147-04

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110147

Effect of Amentoflavone on Inflammatory Factors in Rats with Acute Liver Injury

HUANG Zhen-qing, WEI Yan-fei, LIU Xue-mei, DUAN Xue-lin, ZHAO Tie-jian*
(Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effects of amentoflavone (ATF) on inflammatory factors in rats with acute liver injury. **Method:** The healthy adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into six groups, control group, model group, positive control group, ATF low-dose, middle-dose and high-dose group ($15, 30, 60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), respectively. The experimental rats were administrated with drugs by ig for 7 days, one hours after the last administration, the experimental rats were injected carbon tetrachloride to copy the acute liver injury model except control group. The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor beta (TGF- β_1), interleukin 1β (IL- 1β), interleukin-6 (IL-6) were investigated by ELISA. The phosphor-I κ B- α level and nuclear factor κ B (NF- κ B) nuclear translocation in hepatic tissue were measured by ELISA. The plasma endotoxin (LPS) level was measured by limulus amebocyte lysate (LAL) chromogenic endpoint assay. The expression of TNF- α mRNA and induced nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in hepatic tissues in rats were detected by Real time PCR. **Result:** Compared with the normal control group, the contents of TNF- α , TGF- β_1 , IL- 1β and IL-6 in the serum of the model group rats were obviously increased ($P < 0.01$), and the level of plasma

【收稿日期】 20131023(012)

【第一作者】 黄振青, 学士学位, 讲师, 从事中药抗乙肝及肝纤维化的研究, Tel:0771-2214279, E-mail: huangzhenqing@126.com

【通讯作者】 * 赵铁建, 教授, 从事中医药、民族药对肝纤维化的逆转机制研究及应用, Tel:0771-2214279, E-mail: lzt-jnanning@163.com

endotoxin was obviously increased ($P < 0.01$), the phosphor-I κ B- α level and NF- κ B nuclear translocation were obviously increased, the expression of TNF- α mRNA and iNOS mRNA were up-regulated (both $P < 0.01$). Compared with the model group, the contents of TNF- α , TGF- β_1 , IL-1 β , IL-6 were obviously decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), The phosphor-I κ B- α level and NF- κ B nuclear translocation were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the level of plasma endotoxin was obviously decreased, the expression of TNF- α mRNA and iNOS mRNA in hepatic tissues in rats were down-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** ATF could protect the acute hepatic injury induced by CCl₄ in rats, the mechanism may be related to decreasing endotoxin level and NF- κ B nuclear translocation and attenuating the trigger of inflammation-related cascade amplification.

[**Key words**] amentoflavone; CCl₄; acute hepatic injury; inflammatory factors

急性肝损伤是大多数肝脏疾病共有的一种病理状态,是慢性肝炎,肝纤维化,肝硬化,甚至肝癌发生发展中最重要的因素,其发生发展是一个复杂的病理生理过程,其中与 Kupffer 细胞、中性粒细胞、上皮细胞等多种细胞有关,并且与多种有害因素如内毒素、氧化应激、炎症细胞因子有密切联系^[1-2]。因此,抑制内毒素引起的 Kupffer 细胞激活,进而抑制下游核因子 NF- κ B 的激活,减少炎症细胞因子的释放是保肝的有效措施之一。穗花杉双黄酮是从中药卷柏中提取分离的单体活性成分,分子式为 C₃₀H₁₈O₁₀,相对分子质量为 538,其具有舒张血管、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗疟、降低血糖等多种作用^[3-4]。本实验拟通过腹腔注射 CCl₄ 原液建立急性肝损伤大鼠模型,探讨穗花杉双黄酮对急性肝损伤大鼠的保护作用,为更深入研究开发应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,广西医科大学实验动物中心提供,质量合格证号 0001110。动物使用许可证 SYXK(桂)2009-0004,生产许可证 SCXK(桂)2009-0002。饲养环境为 SPF 级动物实验室。

1.2 药物与试剂 穗花杉双黄酮由本实验室自行提取、分离、鉴定,纯度 99.0%,临用前用 2% CMC-Na 溶解成混悬液。水飞蓟宾胶囊,天津天士力制药股份有限公司,批号 130311,四氯化碳(CCl₄),广东合山化工厂产品,分析纯,批号 20111109,肿瘤坏死因子- α (TNF- α),转化生长因子 β_1 (TGF- β_1),白介素 1 β (IL-1 β)和白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所,批号分别为 20120116,20120311,20120605,20120605),核因子- κ B(NF- κ B)和磷酸化抑制蛋白(Nuclear factor kappa B inhibitor protein, I κ B- α)试剂盒(购自上海研谨生物科技有限公司,批号分别为 20121011,20121108),内毒素定量检测试剂盒(上海伊华临床

医学科技公司),RNA 逆转录聚合酶链反应试剂盒和实时定量 PCR(real-time PCR)试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3 仪器 722S 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),日立 7070 型自动生化分析仪(日本日立公司株式会社生产),TDL-5 型台式低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂),SHH. W21. Cr600 型三用电热恒温水箱(北京长源实验设备厂),BP190S 型电子天平(Startorius 公司),TGL-16G-A 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),Model 450 自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),DG5031 型酶联免疫检测仪(华东电子股份有限公司)。

2 方法

2.1 分组与造模给药^[5] 将健康雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为 6 组,每组 10 只,即为正常对照组,CCl₄ 损伤模型组,阳性对照组(水飞蓟宾胶囊 50 mg·kg⁻¹),穗花杉双黄酮低、中、高剂量组(15, 30, 60 mg·kg⁻¹),每日 ig 给药 1 次,连续给药 7 d,正常组与模型组每天 ig 等体积的蒸馏水,末次 ig 给药 1 h 后,除空白对照组外,大鼠 ip CCl₄ 原液(1 mL·kg⁻¹)建立急性肝损伤大鼠模型,空白对照组腹腔注射等剂量的生理盐水。禁食不禁水,24 h 后麻醉大鼠,腹主动脉取血,分离血清血浆备用,并快速摘取肝脏用生理盐水洗净表面,再用滤纸吸净肝脏表面水分和血液后快速冷冻于液氮中备用。

2.2 检测血清 TNF- α , TGF- β_1 , IL-1 β 和 IL-6 的含量
采用 ELISA 法分别检测各组大鼠血清 TNF- α , TGF- β_1 , IL-1 β 和 IL-6 的含量,严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.3 肝组织 NF- κ B 和磷酸化 I κ B- α 的测定 严格按照试剂盒说明书进行操作,取肝组织精密称定,提取细胞核蛋白,并测定蛋白含量,采用双抗体夹心法测定 NF- κ B p65 的水平,用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(A),通过标准曲线计算样品中 NF- κ B

p65 和磷酸化 I κ B- α 的浓度。

2.4 血浆内毒素水平的测定^[6] 采用鲎试剂终点显色法检测大鼠血浆内毒素(LPS)水平,用无热原肝素抗凝管收集血液,迅速低温离心 10 min 后收集血浆(1 000 r·min⁻¹),取离心后血浆 0.1 mL,加入 0.2 mL 无热原生理盐水,0.2 mL Tris-HCl 缓冲液混匀,置于 100 °C 水浴加热 10 min,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液检测。检测步骤严格按照试剂盒说明书进行,最后在 545 nm 波长处测定吸光度(A),每次试验均制备标准曲线,建立回归方程求标本中内毒素浓度。

2.5 检测肝组织 TNF- α 和 iNOS 基因的表达 称取 100 mg 肝组织,采用 Trizol 法提取大鼠肝组织总 RNA,紫外分光光度计测 RNA 浓度及纯度后,用提取的 RNA 进行逆转录合成 cDNA,按 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作。从 Gene Bank 查找 TNF- α 和 iNOS 及内参 GAPDH 的基因全序列,再根据荧光定量 PCR 引物设计的基本原则,设计引物序列如下:TNF- α 上游引物为 5'-AGGCAACCTGACCACTCTCC-3',下游引物为 5'-CACCACCATCAAGGACTCAA-3';iNOS 上游引物为 5'-GACAGCACAGAATGTTCCAG-3'下游引物为 5'-TGGCCAGATGTTCTCTATT-3',GAPDH 上游引物为 5'-ATGATTCTACCCACGGCAAG-3',下游引物为 5'-

CTGGAAGATGCTGATGGGTT-3', Real-time PCR 总反应体系为 20 μ L,其中 1 μ L cDNA,10 μ L 2 \times SYBR Green qPCR mix,0.5 μ L 上游引物,0.5 μ L 下游引物,8 μ L ddH₂O,扩增程序为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,59 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 15 s,共反应 45 个循环。72 °C 延伸,5 min。结果采用比较 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法分析各基因在组织中的相对含量。

2.6 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用方差分析,*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血清 TNF- α , TGF- β_1 , IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 模型组大鼠血清 TNF- α , TGF- β_1 , IL-1 β 和 IL-6 水平显著升高,治疗后,阳性组和穗花杉双黄酮组大鼠血清 TNF- α , TGF- β_1 , IL-1 β 和 IL-6 水平显著降低,与模型组比较差别有统计意义 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。并呈现出一定的剂量依赖性。见表 1。

3.2 对大鼠肝组织 NF- κ B、磷酸化 I κ B- α 的含量和血浆内毒素水平的影响 模型组大鼠肝组织 NF- κ B 和磷酸化 I κ B- α 的含量显著升高,大鼠血浆内毒素水平显著升高,给药治疗后,阳性组和穗花杉双黄酮组大鼠肝组织 NF- κ B 和磷酸化 I κ B- α 的含量显著降低,血浆内毒素水平也显著降低,与模型组比较有显著性差异 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。见表 2。

表 1 穗花杉双黄酮对大鼠血清 TNF- α , TGF- β_1 , IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α	TGF- β_1	IL-1 β	IL-6
空白对照	-	36.57 \pm 3.82	458.83 \pm 55.67	30.88 \pm 3.14	49.82 \pm 5.07
模型	-	162.43 \pm 15.97 ²⁾	890.56 \pm 92.46 ²⁾	72.53 \pm 8.07 ²⁾	99.54 \pm 10.28 ²⁾
水飞蓟宾	50	55.08 \pm 6.34 ⁴⁾	484.65 \pm 51.72 ⁴⁾	39.24 \pm 2.99 ⁴⁾	55.81 \pm 6.03 ⁴⁾
ATF	60	58.27 \pm 6.05 ⁴⁾	501.26 \pm 60.17 ⁴⁾	35.46 \pm 3.20 ⁴⁾	60.13 \pm 7.24 ⁴⁾
	30	74.71 \pm 8.13 ⁴⁾	611.33 \pm 60.28 ⁴⁾	48.27 \pm 5.71 ⁴⁾	71.28 \pm 6.51 ⁴⁾
	15	95.68 \pm 10.24 ³⁾	774.29 \pm 84.35 ³⁾	59.34 \pm 6.31 ³⁾	77.06 \pm 8.02 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与模型组比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01(表 2~3 同)。

表 2 穗花杉双黄酮对大鼠肝组织 NF- κ B 和磷酸化 I κ B- α 含量及血浆内毒素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肝组织		
		NF- κ B/ μ g·L ⁻¹	磷酸化 I κ B- α / μ g·L ⁻¹	血浆 LPS/EU·mL ⁻¹
空白对照	-	9.56 \pm 1.23	4.33 \pm 0.63	0.22 \pm 0.02
模型	-	30.45 \pm 4.06 ²⁾	14.27 \pm 1.22 ²⁾	1.52 \pm 0.25 ²⁾
水飞蓟宾	50	11.37 \pm 1.53 ⁴⁾	5.02 \pm 0.75 ⁴⁾	0.48 \pm 0.06 ⁴⁾
ATF	60	12.76 \pm 1.18 ⁴⁾	4.99 \pm 0.64 ⁴⁾	0.44 \pm 0.07 ⁴⁾
	30	16.38 \pm 2.33 ⁴⁾	8.47 \pm 0.84 ⁴⁾	0.61 \pm 0.10 ⁴⁾
	15	23.67 \pm 3.46 ³⁾	12.05 \pm 1.37	0.84 \pm 0.11 ³⁾

3.3 ATF 对大鼠肝组织 TNF- α 和 iNOS 基因相对表达的影响 造模后,大鼠肝组织 TNF- α 和 iNOS 基因表达显著升高,给药治疗后,阳性组和 ATF 各剂量组均显著降低肝组织 TNF- α 和 iNOS 基因表达,与模型组比较差别有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 ATF 对大鼠肝组织 TNF- α 和 iNOS 基因相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α mRNA	iNOS mRNA
空白对照	-	0.55 \pm 0.09	0.36 \pm 0.05
模型	-	1.42 \pm 0.22 ²⁾	0.89 \pm 0.12 ²⁾
水飞蓟宾	50	0.88 \pm 0.13 ⁴⁾	0.45 \pm 0.07 ⁴⁾
ATF	60	0.67 \pm 0.10 ⁴⁾	0.41 \pm 0.04 ⁴⁾
	30	0.96 \pm 0.14 ⁴⁾	0.59 \pm 0.05 ⁴⁾
	15	1.14 \pm 0.16 ³⁾	0.71 \pm 0.10 ³⁾

4 讨论

TNF- α 的过度表达在炎症反应、肝损伤和肝纤维化等过程中具有重要作用。TGF- β_1 属于一种多功能多肽家族,在抑制细胞增殖、调节细胞表型、抑制肿瘤发生等方面发挥重要作用,其过度表达能抑制肝细胞的再生,促进肝细胞凋亡。IL-1 β 是白细胞或免疫细胞间相互作用的淋巴因子,其在传递信息、激活与调节免疫细胞,介导 T、B 细胞活化、增殖与分化及在炎症反应中起重要作用^[8];IL-6 是由单核细胞、巨噬细胞及淋巴细胞等炎症细胞产生的促炎症细胞因子可诱导中性粒细胞浸润到前列腺组织内,使 T、B 细胞及 NK 细胞广泛激活,促使中性粒细胞释放溶酶体酶,从而加剧局部炎症细胞浸润,促进炎症的形成^[7]。

NF- κ B 是细胞内最重要的核转录因子,存在于多种细胞中,在许多细胞刺激介导的细胞信息的转录调控中起核心作用,参与包括免疫反应、急性期反应蛋白、炎症反应等多种基因表达的调控,通过影响炎症因子如 TNF- α 以及 iNOS 等基因表达在炎症反应和细胞凋亡等病理过程中起着关键作用^[9]。在没有刺激的情况下,NF- κ B 与 I κ B- α 结合,形成复合物存在于细胞浆中,当 I κ B- α 磷酸化后,I κ B- α 和 NF- κ B 分解,游离的 NF- κ B 进入细胞核内并与 DNA 上相应位点结合并激活转录和翻译,促进 iNOS 以及 IL-6 等炎症因子的合成、释放^[10]。

本实验研究了穗花杉双黄酮对四氯化碳诱导的急性肝损伤大鼠炎症相关因子的影响及相关机制,实验结果表明,四氯化碳诱导后大鼠肝组织 NF- κ B 和磷酸化 I κ B- α 的水平显著升高,表明 NF- κ B 进入

细胞核内增多,诱导 TNF- α 、TGF- β_1 、IL-6、iNOS 等相关炎症因子的释放,给予穗花杉双黄酮治疗后,结果表明,大鼠血清 TNF- α 、TGF- β_1 、IL-1 β 、IL-6 的含量显著降低,肝组织中 NF- κ B 和磷酸化 I κ B- α 的水平明显下降,大鼠血浆内毒素水平也显著降低,肝组织 TNF- α 和 iNOS 基因的表达也显著下调。其机制可能通过抑制内毒素引起的 Kupffer 细胞激活,进而抑制下游核因子 NF- κ B 的激活,减少炎症细胞因子的释放。

[参考文献]

[1] Peng J H, Cui T, Huang F, et al. Puerarin ameliorates experimental alcoholic liver injury by inhibition of endotoxin gut leakage, Kupffer cell activation, and endotoxin receptors expression [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2013, 344 (3): 646.

[2] 胡玉川, 徐峰, 徐发良, 等. Kupffer 细胞在内毒素诱导肝损伤发病机制中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16 (24): 2751.

[3] Pei J S, Liu C C, Hsu Y N, et al. Amentoflavone induces cell-cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells via mitochondria-dependent pathway [J]. In Vivo, 2012, 26 (6): 963.

[4] Wilsky S, Sobotta K, Wiesener N, et al. Inhibition of fatty acid synthase by Amentoflavone reduces coxsackievirus B3 replication [J]. Arch Virol, 2012, 157 (2): 259.

[5] 刘佩莉, 李楠, 于云, 等. 复方枳椇子对四氯化碳致大鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (15): 234.

[6] 熊章鄂, 全巧云, 郑世华, 等. 二苯乙烯苷对急性酒精性肝损伤小鼠炎症相关因子的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20 (36): 3649.

[7] 刘小转, 李三强, 任江涛, 等. HSP70、IL-6 和 TNF- α 在 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤组织中的表达及意义 [J]. 山东医药, 2011, 51 (35): 17.

[8] Kamo N, Ke B, Ghaffari A A, et al. ASC/caspase-1/IL-1 β signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver is chemia reperfusion injury [J]. Hepatology, 2013, 58 (1): 351.

[9] Gasparini C, Feldmann M. NF- κ B as a target for modulating inflammatory responses [J]. Curr Pharm Des, 2012, 18: 5735.

[10] Oh W J, Jung U, Eom H S, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by Buddleja officinalis extract in BV-2 microglial cells via negative regulation of NF- κ B and ERK1/2 signaling [J]. Molecules, 2013, 18 (8): 9195

[责任编辑 聂淑琴]