

· 药理 ·

满天星染料木黄酮对小鼠急性肝损伤的保护作用及机制

韦玲¹, 黄权芳², 林兴^{1*}

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

[摘要] 目的:研究满天星活性成分染料木黄酮对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-GalN)诱导引起的小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制。方法:雄性小鼠随机分为正常组、模型组、染料木黄酮低、中、高剂量组。正常组和模型组ip等容量生理盐水,染料木黄酮低、中、高剂量组分别腹腔注射0.5, 1, 2 mg·kg⁻¹的染料木黄酮,每日1次。连续给药3 d后,除正常组外,其余各组小鼠ip LPS(50 μg·kg⁻¹)和D-GalN(800 mg·kg⁻¹), 1.5 h后,眼眶血管丛取血,6 h后处死。采集肝脏组织,检测小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),胆红素的水平;并检测各组小鼠肝组织中丙二醛(MDA),肿瘤坏死因子-α(TNF-α),一氧化氮(NO)含量及TNF-α,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA,核因子(NF)-κB p65,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和B细胞淋巴瘤/白血病2(Bcl-2)表达情况;同时做组织学检查,观察肝组织的病理变化。结果:与模型组比较,染料木黄酮显著降低小鼠血清中AST,ALT活性,明显减轻组织病理损伤;可抑制NF-κB的激活,继而减少炎症因子TNF-α,NO和iNOS的水平。此外,染料木黄酮明显抑制Caspase-3的表达,提高Bcl-2的水平,提升胆红素的含量。结论:满天星染料木黄酮对小鼠急性肝损伤具有明显的保护作用,其机制与抑制NF-κB信号通路、减轻炎症反应有关。

[关键词] 染料木黄酮; 满天星; 脂多糖; D-氨基半乳糖; 急性肝损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0102-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040102

Protective Effect and Mechanism of Genistein from *Hydrocotyle sibthorpioides* on Acute Hepatic Injury in Mice WEI Ling¹, HUANG Quan-fang², LIN Xing^{1*} (1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect and underlying mechanism of genistein from *Hydrocotyle sibthorpioides* on lipopolysaccharide (LPS) /D-galactosamine (D-GalN) -induced acute hepatic injury in mice. **Method:** Male mice were randomly divided into normal group, model group, low-, middle-and high-doses of genistein-treated groups. The mice in the normal and model groups were given saline. The animals in the genistein-treated groups were administered intraperitoneally 0.5, 1, 2 mg·kg⁻¹ genistein once daily for 3 days. At the end of treatment, except the mice in the normal group, all mice were intraperitoneally injected with 50 μg·kg⁻¹ LPS plus 800 mg·kg⁻¹ D-GalN. Blood samples were collected from mice eyes 1.5 h after LPS/D-GalN administration, then the mice were killed and liver samples were dissected out after 6 h. The activities of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and bilirubin, the contents of hepatic tumor necrosis factor-α (TNF-α), nitric oxide (NO) and malandialdehyde (MDA), as well as the expression of TNF-α, inducible nitric oxide synthase (iNOS), nuclear factor (NF)-κB p65, Caspase-3 and B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) were detected. In addition, the damage of liver tissues was observed by light microscope. **Result:** Compared to the model control, treatment with genistein significantly decreased the AST and ALT activities, further increased the bilirubin level. Histologic examination showed that genistein markedly alleviated the

[收稿日期] 20140807(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260674);广西自然科学基金项目(2013GXNSFAA019146)

[第一作者] 韦玲, 硕士, 从事生化药理学研究, Tel:0771-5358342, E-mail: weiling72266@163.com

[通讯作者] * 林兴, 硕士, 教授, 从事生化药理学研究, Tel:0771-5358342, E-mail: gxlx60@163.com

mice livers tissue damage. Furthermore, genistein reduced the pro-inflammatory cytokines including TNF- α and NO/iNOS via inhibiting the NF- κ B activity. In addition, genistein inhibited the expression of Caspase-3, enhanced levels of Bcl-2 and total bilirubin. **Conclusion:** Genistein could prevent LPS/*D*-GalN-induced acute liver damage in mice, and its underlying mechanisms were mainly due to its ability to block NF- κ B signaling pathway for anti-inflammation response and attenuate hepatocellular apoptosis.

[**Key words**] genistein; *Hydrocotyle sibthorpioides*; lipopolysaccharide; *D*-galactosamine; acute hepatic failure

满天星, 又称天胡荽, 是一种多年生草本植物, 广泛分布于中国大陆及台湾的部分地区, 具有清热解毒、化痰止咳、利尿消肿的作用^[1]。据报道, 天胡荽中含有的槲皮素具有抗炎、抗氧化、抗癌和抗突变等多种功能^[2]。目前, 许多传统的临床治疗证实满天星可有效治疗乙型肝炎, 可用于抗乙型肝炎病毒感染^[3]。课题组前期对满天星开展了大量的研究工作, 从该草药中分离得到了多个化学成分, 其中, 染料木黄酮是其主要活性成分之一, 笔者的药效学实验发现染料木黄酮可明显减轻乙醇引起的慢性肝损伤^[4]。另外, 近年来有研究表明染料木黄酮对肝癌等多种肿瘤细胞具有较强的抑制作用^[5]。这些研究结果提示, 染料木黄酮有可能是一个较好的保肝药物, 但其保肝作用还有待进一步深入研究, 特别是还要观察其对急性肝损伤的保护作用。因此, 本实验采用脂多糖(LPS)/*D*-氨基半乳糖(*D*-GalN)诱导小鼠急性肝损伤动物模型, 探讨染料木黄酮对小鼠肝功能衰竭的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 药品及试剂 染料木黄酮采用前期的提取方法从满天星 *Hydrocotyle sibthorpioides* 中提取^[6]。丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、血清总胆红素(TBIL)试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所, 批号 20130914), 肿瘤坏死因子(TNF- α , 武汉博士德生物工程有限公司, 批号 EK0528), 一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号 20130210), Caspase-3 activity assay 试剂盒(瑞士 Roche 公司), 核因子- κ B(NF- κ B)/p65 兔抗小鼠单克隆抗体(Thermo Scientific 公司, 批号 PA5-16758), 兔抗鼠单克隆抗体半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), 兔抗鼠单克隆抗体 B 细胞淋巴瘤/白血病 2(Bcl-2, 美国 Abcam 公司, 批号 GR 32377-26, GR 167863-1), 脂多糖(LPS), *D*-氨基半乳糖(*D*-GalN, 均为 Sigma 公司, 批号 080M4743V)。

1.2 仪器 5810R 型高速冷冻离心机, TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有

限责任公司), EL204 型电子天平(上海特勒-托多利多仪器有限公司)。

1.3 动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 20 ~ 22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2012-0001。

2 方法

2.1 动物造模及分组 雄性 C57BL/6 小鼠 75 只, 体重 20 ~ 22 g, 购回饲养适应 1 周后, 随机分为 5 组: 正常组、模型组、染料木黄酮低、中、高剂量组, 每组 15 只。正常组和模型组 *ip* 等容量生理盐水, 染料木黄酮低、中、高剂量组分别 *ip* 0.5, 1, 2 mg·kg⁻¹ 的染料木黄酮, 每日 1 次。连续给药 3 d 后, 除正常组外, 其余各组小鼠 *ip* LPS(50 μ g·kg⁻¹) 和 *D*-GalN(800 mg·kg⁻¹), 1.5 h 后, 全部小鼠眼眶血管丛取血; 6 h 后, *ip* 大剂量戊巴比妥钠(150 mg·kg⁻¹) 处死小鼠, 分离肝组织, 用冰生理盐水清洗。

2.2 病理组织检查 肝组织标本固定于 4% 磷酸盐缓冲福尔马林中, 乙醇脱水, 石蜡包埋, 做常规组织切片, 厚度为 5 μ m, HE 染色, 光镜下观察肝组织损伤程度。

2.3 血清 ALT, AST, TBIL 的检测 血清中 ALT, AST, TBIL 的含量检测均严格按照试剂盒说明书进行。

2.4 MDA, TNF- α 及 NO 产物测定 MDA 含量用于测定脂质过氧化反应^[6], 其活性采用 TBA 法测定; TNF- α 采用夹心酶联免疫吸附试验法(ELISA 法)测定; NO 产物采用 Griese 试剂盒法测定, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.5 TNF- α 和 iNOS mRNA 的表达 采用 QIAGEN Inc. 提取试剂盒, 从速冻的肝组织中提取总 RNA, 检测 TNF- α 和 iNOS mRNA 的表达。按试剂盒操作说明合成 cDNA, 根据前期试验方法进行 PCR 逆转录及扩增^[8], 引物序列为: TNF- α : 5'-ATGAGCA-CAGAAAGCATGATC-3' (sense) 和 5'-TACAGGCTT-GTCACTCGAATT-3' (antisense), 276 bp; iNOS: 5'-GTGAGGATCAAAAAGTGGGG-3' (sense) 和 5'-AC-

CTGCAGGTTGGACCAC-3' (antisense), 306 bp; β -actin: 5'-GATGCTGGGTATGGGTCAGAAGGA-3' (sense) 和 5'-GCTCATTGCCGATAGTGATGACCT-3' (antisense), 514 bp。将 PCR 产物进行电泳,用凝胶成像系统拍照,Quantity One 软件测定灰度值,以 β -actin 为内参。灰度值以各基因产物与 β -actin 的积分吸光度(A)的比值表示。

2.6 Caspase-3 活性测定及 NF- κ B p65 表达 根据文献报道方法,采用 Caspase-3 活性检测试剂盒测定 Caspase-3 活性^[7],核因子 NF- κ B p65 采用 ELISA 法测定,严格按照试剂盒说明书进行操作。

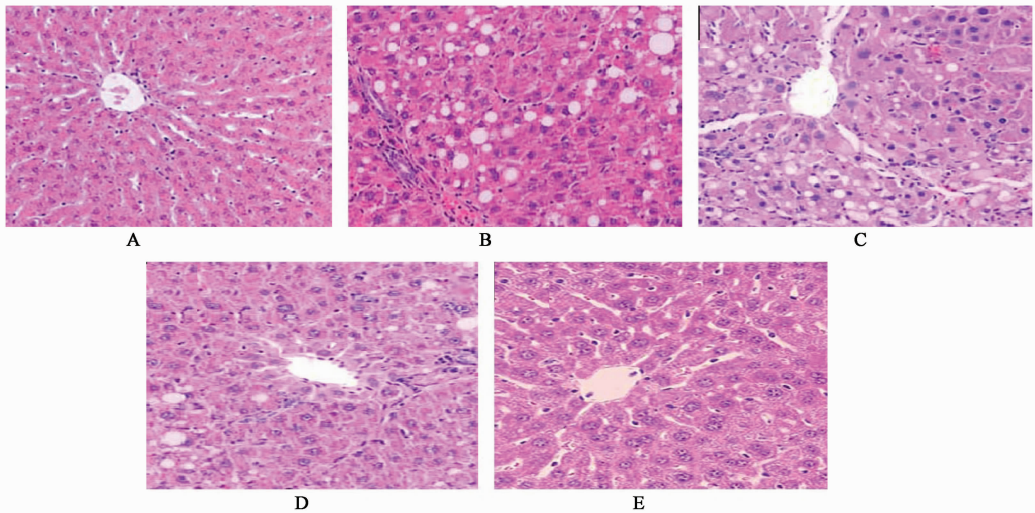
2.7 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达测定 Caspase-3 和 Bcl-2 的表达采用 Western blot 方法进行测定。

小鼠肝组蛋白采用试剂盒方法提取,严格按照试剂盒说明书进行操作。测定结果采用 Image QuANT 软件进行定量分析,以 β -actin 作为内参。结果以目的条带和内参的灰度比值来表示。

2.8 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性检验,方差齐者采用 *t* 检验,方差不齐者采用校正 *t* 检验进行统计处理, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 肝脏病理组织学检查 正常组中,小鼠肝小叶结构和细胞结构均正常,而模型组小鼠肝组织中有较多炎症和坏死区域,并出现炎症浸润,染料木黄酮治疗后,这些症状均减轻。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 染料木黄酮 0.5 mg·kg⁻¹组;D. 染料木黄酮 1.0 mg·kg⁻¹组;E. 染料木黄酮 2.0 mg·kg⁻¹组(图 2,3 同)
图 1 染料木素对肝组织病理组织学的改变的影响(HE, ×100)

Fig.1 Effects of genistein on acute hepatic injury histomorphological (HE, ×100)

3.2 血清 ALT, AST 和总胆红素 结果如图 3 所示,与正常对照组比较,模型组小鼠血清中 AST, ALT 活性及总胆红素水平明显升高,染料木黄酮治疗后,AST, ALT 活性降低,而胆红素水平进一步升高。见表 1。

3.3 MDA, TNF- α , NO 水平及 TNF- α , iNOS mRNA 的表达 模型组小鼠肝组织中 MDA 水平、血清 TNF- α 活性及肝 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平升高,而染料木黄酮治疗组中这些炎症指标水平降低。模型组中 TNF- α 和 iNOS mRNA 表达量升高,而随着染料木黄酮剂量增大表达量降低。见图 2,表 2~3。

3.4 染料木黄酮对 NF- κ B p65 的影响 NF- κ B p65 含量检测结果显示,给予 LPS/D-GalN 后, NF- κ B p65 含量明显增加,而染料木黄酮中、高剂量治疗

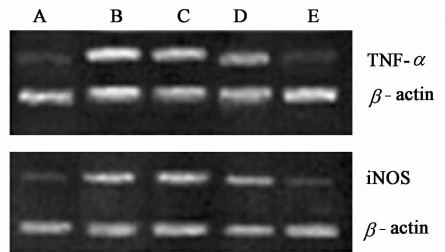


图 2 染料木黄酮对小鼠肝组织中 TNF- α , iNOS mRNA 表达的影响
Fig.2 Effects of genistein on the mRNA expression levels of TNF- α and iNOS

后, NF- κ B p65 的含量明显减少。见表 4。

3.5 染料木黄酮对 Caspase-3 活性, Caspase-3 及 Bcl-2 表达的影响 与正常组比较,模型组中小鼠的 Caspase-3 活性显著增强,而染料木黄酮中、高剂量组中小鼠的 Caspase-3 活性减弱。各组小鼠的

表 1 染料木黄酮对 ALT, AST, TBIL 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 1 Effects of genistein on activities of AST, ALT and TBIL ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	TBIL /μmol·L ⁻¹
正常	-	89.0 ± 10.8	42.5 ± 6.3	3.1 ± 1.4
模型	-	386.3 ± 38.9 ¹⁾	259.6 ± 27.5 ¹⁾	12.5 ± 1.9 ¹⁾
染料木黄酮	0.5	374.0 ± 33.5	233.4 ± 22.8	14.2 ± 1.5
	1.0	238.1 ± 29.7 ²⁾	184.1 ± 24.2 ²⁾	16.3 ± 1.4 ²⁾
	2.0	179.1 ± 23.6 ²⁾	139.5 ± 20.9 ²⁾	23.4 ± 2.1 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型对照组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~6 同)。

表 2 染料木黄酮对小鼠肝组织中 MDA, TNF-α, NO 水平的的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Effects of genistein on contents of MDA, TNF-α and NO ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	MDA /μmol·mg ⁻¹	TNF-α /pg·mg ⁻¹	NO /nmol·mg ⁻¹
正常	-	5.55 ± 1.13	0.46 ± 0.09	85.26 ± 9.47
模型	-	25.21 ± 2.18 ¹⁾	4.44 ± 0.30 ¹⁾	226.2 ± 26.5 ¹⁾
染料木黄酮	0.5	23.85 ± 2.03 ²⁾	3.87 ± 0.26	213.6 ± 22.8
	1.0	16.44 ± 2.38 ²⁾	2.40 ± 0.27 ²⁾	168.8 ± 20.1 ²⁾
	2.0	12.74 ± 1.68 ²⁾	1.99 ± 0.23 ²⁾	135.7 ± 16.3 ²⁾

表 3 染料木黄酮对小鼠肝组织中 TNF-α, iNOS mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 3 Effects of genistein on mRNA expression levels of TNF-α and iNOS ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	TNF-α /β-actin	iNOS /β-actin
正常	-	0.20 ± 0.02	0.15 ± 0.03
模型	-	0.83 ± 0.05 ¹⁾	0.88 ± 0.06 ¹⁾
染料木黄酮	0.5	0.80 ± 0.04	0.83 ± 0.04
	1.0	0.75 ± 0.03	0.75 ± 0.04
	2.0	0.51 ± 0.03 ²⁾	0.14 ± 0.02 ²⁾

表 4 染料木黄酮对小鼠肝组织中 NF-κB p65 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 4 The effects of genistein on NF-κB p65 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	NF-κB p65/pg·mg ⁻¹
正常	-	29.8 ± 5.3
模型	-	186.7 ± 24.2 ¹⁾
染料木黄酮	0.5	177.7 ± 20.3
	1.0	98.9 ± 19.2 ²⁾
	2.0	76.5 ± 11.3 ²⁾

Caspase-3 蛋白水平变化与其活性一致,与正常组比较,给予 LPS/D-GalN 后,Caspase-3 蛋白水平明显升高,染料木黄酮治疗后降低。此外,给予 LPS/D-GalN 后,Bcl-2 蛋白表达较低,染料木黄酮治疗后 Bcl-2 蛋白表达增强。见图 3,表 5~6。

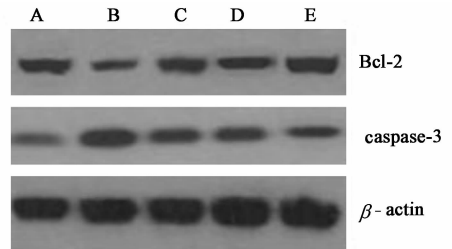


图 3 染料木黄酮对 Caspase-3, Bcl-2 表达的影响

Fig. 3 Effects of genistein on the protein levels of Caspase-3 and Bcl-2

表 5 染料木黄酮对 Caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 5 Effects of genistein on activity of Caspase-3 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	caspases-3/%
正常	-	100.1 ± 5.9
模型	-	314.4 ± 24.7 ¹⁾
染料木黄酮	0.5	288.7 ± 29.8
	1.0	179.5 ± 17.2 ²⁾
	2.0	136.9 ± 15.9 ²⁾

表 6 染料木黄酮对 Caspase-3, Bcl-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 6 Effects of genistein on protein levels of Caspase-3 and Bcl-2 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	Bcl-2 /β-actin	Caspase-3 /β-actin
正常	-	0.62 ± 0.05	0.16 ± 0.03
模型	-	0.26 ± 0.05 ¹⁾	0.62 ± 0.06 ¹⁾
染料木黄酮	0.5	0.47 ± 0.04 ²⁾	0.42 ± 0.05 ²⁾
	1.0	0.60 ± 0.03 ²⁾	0.40 ± 0.03 ²⁾
	2.0	0.68 ± 0.03 ²⁾	0.38 ± 0.02 ²⁾

4 讨论

目前,LPS/D-GalN 已被广泛用于诱导小鼠急性肝损伤动物模型的建立,以研究功能障碍的发生机制及评价保肝药的治疗功效。本实验采用 LPS/D-GalN 成功建立了小鼠急性肝损伤模型,并研究染料木黄酮对小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制。根据实验结果提示,染料木黄酮能明显减轻 LPS/D-GalN 引起的急性肝损伤,其机制可能与染料木黄酮的抗氧化、抗炎、抑制细胞凋亡作用有关。笔者对各

组小鼠肝组织中MDA的含量进行检测,结果显示,染料木黄酮可降低小鼠肝组织中升高的MDA含量,提示染料木黄酮具有一定的抗氧化作用。

TNF- α 是引起急慢性肝损伤的重要因素之一,能直接或间接引起肝细胞损伤^[8]。NO是一种细胞信使分子和细胞毒性分子,是组织损伤的诱发因子和各种病变的增强因子,能引起肝损伤^[9]。NF- κ B与NF- κ B抑制蛋白,I κ B结合一般存在于肝细胞胞浆中。受炎症因子刺激后,I κ B激酶被激活,并催化I κ B磷酸化。磷酸化的I κ B被26S蛋白酶降解,释放出NF- κ B,释放出的NF- κ B迁移至细胞核直接转录成为目的基因^[10]。目前已证实了NF- κ B在炎症调控中有重要作用^[12]。笔者的研究发现,染料木黄酮可减少TNF- α 和NO含量,降低肝脏中iNOS蛋白表达,且对NF- κ B表达具有抑制作用,可能会引起NF- κ B的靶基因特别是炎症因子在肝细胞中表达减少。换言之,染料木黄酮通过抑制NF- κ B信号通路,从而达到抑制炎症因子产生的作用。

Caspase-3是细胞凋亡信号通路中重要的执行分子,正常情况下,胞质中的Caspase-3以无活性的酶原形式存在,其激活后导致细胞发生不可逆性凋亡^[11]。Bcl-2是位于线粒体外膜的一种膜蛋白,其过表达可引起一系列应激反应,进而抑制细胞凋亡^[12]。实验结果显示,染料木黄酮可降低Capase-3的活性及蛋白表达,同时增强Bcl-2蛋白表达,提示,染料木黄酮对LPS/D-GALN诱导肝损伤的保护作用,可能是通过其抗凋亡作用来介导的。

总之,实验结果表明,染料木黄酮对LPS/D-GALN诱导肝损伤的具有明显的保护作用,其机制与有效地抑制NF- κ B信号通路、减轻炎症反应、减少细胞细胞凋亡有关。

[参考文献]

[1] 黄成勇,罗泽云. 天胡荽的生药鉴定[J]. 中草药, 1995, 26(4):211-213.
[2] 许王祥培,许士娜,吴红梅,等. 天胡荽药材中槲皮素

的薄层鉴别与含量测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1):44-45.

[3] 李陈泉. 自拟满天星灭澳汤治疗乙型肝炎128例[J]. 四川中医, 2000, 18(2):26.
[4] Huang Q, Huang R, Zhang S, et al. Protective effect of genistein isolated from *Hydrocotyle sibthorpioides* on hepatic injury and fibrosis induced by chronic alcohol in rats [J]. Toxicol Lett, 2013, 217(2):102-110.
[5] 王晨,张立实,何涛. 染料木黄酮对体外细胞增殖的抑制作用研究[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(9):1056-1058.
[6] Schmedes A, Hølmer G. A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation [J]. J Am Oil Chem Soc, 1989, 66(6):813-817.
[7] Nanji AA, Miao L, Thomas P, et al. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat [J]. Gastroenterology, 1997, 112(3):943-951.
[8] 孙设宗,赵杰,官守涛,等. 山药多糖对CCl₄肝损伤小鼠自由基,TNF- α 含量的影响[J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(6):452-454.
[9] 宋军,赵军宁,王晓东,等. 芍药甘草汤有效组分(芍药多苷)对四氯化碳亚急性肝损伤大鼠肝脏NO、NOS和TXA₂、PGI₂的影响[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(4):266-269.
[10] Diaz-Guerra M, Velasco M, Martfn-Sanz P, et al. Nuclear factor κ B is required for the transcriptional control of type II NO synthase in regenerating liver[J]. Biochem J, 1997, 326(3):791-797.
[11] 夏钰弘,周婧,常艳华,等. 肝细胞肝癌组织中NF- κ B和Caspase-3的表达及其意义[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(3):26-29.
[12] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked [J]. Science, 1997, 275(5303):1129-1132.

[责任编辑 聂淑琴]