

# 印尼姜黄对刀豆球蛋白 A 所致小鼠肝损伤的保护作用及其影响 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路的机制探讨

汪蕾, Nuriza Rahmadini, 高天慧, 余佳丽, 甘彦雄, 廖婉\*, 傅超美\*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:研究印尼姜黄对刀豆蛋白 A(Con A)诱导的小鼠肝损伤的保护作用,并探究其可能机制。方法:SPF 级小鼠随机分为正常组、模型组、联苯双酯阳性药组及印尼姜黄高、中、低剂量组。灌胃给药 7 d,末次给药后 2 h 除正常组外,其余各组小鼠均一次性尾静脉注射 Con A 30 mg·kg<sup>-1</sup>诱导小鼠肝损伤,禁食不禁水 8 h 后称量体重,摘眼球取血并脱颈椎处死动物,计算小鼠的肝脏、脾脏指数,检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),乳酸盐脱氢酶(LDH)活性及肝组织匀浆中总超氧化物歧化酶(T-SOD),丙二醛(MDA),一氧化氮(NO)的含量,苏木素-伊红(HE)观察肝组织病理学变化,采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)和蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测肝脏转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ),Smad3, Smad7 的 mRNA 和蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组肝脏、脾脏指数、血清中 ALT,AST,LDH 及肝匀浆 MDA,NO 的水平显著升高,肝匀浆 T-SOD 水平显著降低,肝脏组织中 TGF- $\beta_1$ ,Smad3 的 mRNA 及蛋白表达显著升高,Smad7 的 mRNA 和蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ ),模型组的肝脏病变较为明显;与模型组比较,印尼姜黄与联苯双酯均可明显降低肝炎小鼠的肝脏、脾脏指数,降低血清中 ALT,AST,LDH 及肝匀浆 MDA,NO 的水平,肝匀浆 T-SOD 水平明显升高;印尼姜黄高剂量组肝脏病理改变明显减轻,印尼姜黄高剂量组的小鼠肝脏组织中 TGF- $\beta_1$ ,Smad3 的 mRNA 及蛋白表达下降,Smad7 的 mRNA 和蛋白表达升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**印尼姜黄对 Con A 诱导的小鼠肝损伤具有显著保护作用,通过多位点影响肝组织 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路可能是其阻断肝损伤进程的机制。

**[关键词]** 印尼姜黄; 刀豆球蛋白 A; 肝损伤; TGF- $\beta_1$ /Smad 通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0127-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070127

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1156.028.html>

**[网络出版时间]** 2017-01-09 11:56

## Protective Effect of *Curcuma zanthorrhiza* Rhizome on Hepatitis Induced by Concanavalin A in Mice and Effect on TGF- $\beta_1$ /Smad Signaling Pathway

WANG Lei, Nuriza Rahmadini, GAO Tian-hui, YU Jia-li, GAN Yan-xiong, LIAO Wan\*, FU Chao-mei\*  
(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effects of *Curcuma zanthorrhiza* rhizome on liver injury

**[收稿日期]** 20160810(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目(81403103);四川省科技支撑计划项目(2014SZ0156)

**[第一作者]** 汪蕾,在读硕士,从事中药新制剂新技术研究,Tel:18030701759, E-mail:dllamumu@163.com

**[通讯作者]** \*廖婉,博士,副教授,从事新制剂、新剂型和中药炮制工艺与机制研究,Tel:13880602527, E-mail:liaoWAN2011@126.com;

\*傅超美,博士,教授,从事新制剂、新剂型和中药炮制工艺与机制研究,Tel:13981855638, E-mail:chaomeifu@126.com

induced by concanavalin A (Con A) in mice, and investigate its possible mechanism. **Method:** SPF mice were randomly divided into normal group, model group, biphenyl group, *C. zanthorrhiza* rhizome high dose group, middle dose group and low dose group. All the mice except those in normal group received Con A ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) by injection via tail vein to induce mice liver injury. The drugs were given for 7 days by gavage administration, and the mice in normal group received the equal volume of normal saline. After fasting (but water was given) for 8 h, their body weight was measured; blood was taken from eyeball, and the mice were killed by taking off the cervical vertebrae. Then their liver index, spleen index, contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), and lactate dehydrogenase (LDH) in serum and total superoxide dismutase (T-SOD), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) in liver homogenates were measured. Hepatic tissue was observed by hematoxylin-eosin staining. Furthermore, real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) and Western blot assay were used to detect mRNA and protein expression levels of liver transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), Smad3 and Smad7. **Result:** As compared with the normal group, the liver index, spleen index, levels of ALT, AST and LDH in serum as well as MDA and NO levels in liver homogenates were significantly increased in model group; T-SOD level in liver homogenates was significantly reduced; mRNA and protein expression levels of liver TGF- $\beta_1$ , Smad3 were significantly increased, while mRNA and protein expression levels of Smad3 were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), with more obvious liver lesions in model group. As compared with the model group, both *C. zanthorrhiza* rhizome and biphenyl significantly reduced the liver index and spleen index; decreased the levels of ALT, AST, LDH in serum and MDA, NO levels in liver homogenates; and significantly increased T-SOD level in liver homogenates. The liver lesions were significantly relieved in *C. zanthorrhiza* rhizome high dose group, mRNA and protein expression levels of liver TGF- $\beta_1$ , Smad3 were reduced, while mRNA and protein expression levels of Smad3 were increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** *Curcuma zanthorrhiza* rhizome had significant protective effect for the liver injury induced by Con A, and its mechanism to block the progression of liver injury may be associated with multi-site affecting TGF- $\beta_1$ /Smad pathways in liver tissues.

[**Key words**] *Curcuma zanthorrhiza* rhizome ; concanavalin A ; liver injury ; TGF- $\beta_1$ /Smad channel

姜黄,始载于《唐本草》,具有行气破血、消食化积之功效,2015年版《中国药典》中规定以姜科植物姜黄的干燥根茎入药,重在入肝经血分,是临床常用的破血消癥要药。姜黄具有“同名多基原”的现象,在世界范围内主要分布于东南亚及南亚的热带和亚热带地区。印尼姜黄来自世界最大姜黄产地——印尼,别名黄红姜黄、爪哇姜黄,亦有文献称其为印尼莪术<sup>[1]</sup>和束骨姜黄<sup>[2]</sup>,是咖喱的主要原料<sup>[3]</sup>,从古至今在当地有将其作为药物使用的传统,具有保肝<sup>[4]</sup>、抗炎、抗氧化、抗肿瘤的作用,保肝是其应用最广泛也是最重要作用。肝脏疾病已成为世界上危害性最为广泛的疾病之一,尽管现代医学迅猛发展,肝病的预防和治疗仍然存在很大局限,大量的研究表明由 T 细胞介导的免疫损伤是肝细胞坏死的机制之一。刀豆蛋白 A (Con A) 是一种植物凝集素,Con A 诱导的免疫性肝损伤模型可以很好地模拟人类肝脏自身免疫性疾病和病毒性肝炎免疫性肝损伤的发病机制<sup>[5]</sup>。

印尼姜黄与中国姜黄同为姜科植物,在当地均

作为姜黄入药,外观性状具有较大的相似性,目前研究仅对印尼姜黄与姜黄的化学成分<sup>[6]</sup>、质量标准<sup>[7]</sup>进行对比研究,两者各有异同,但二者是否具有药效相似性,需通过药理作用等的差异进行综合分析。本实验以其可能具有与中国姜黄类似的抗肝损伤作用效应为切入点,研究印尼姜黄对 Con A 所致小鼠肝炎的保护作用及其作用机制,为印尼姜黄的进一步开发利用提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性昆明种小鼠,体重 18 ~ 22 g,由成都达硕实验动物有限公司提供,动物合格证号 SCXK(川)2008-0024,实验前饲养于成都中医药大学实验动物中心 1 周,达到动物实验化。本研究获得成都中医药大学实验动物伦理委员会批准。

**1.2 药物及试剂** 印尼姜黄购于印度尼西亚苏加武眉,经成都中医药大学中药鉴定教研室李敏教授鉴定为姜科植物印尼姜黄 *Curcuma zanthorrhiza* 的干燥根茎;Con A(美国 Sigma 公司);联苯双酯滴丸(万邦德制药集团股份有限公司,批号 A20150312);

丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST), 乳酸盐脱氢酶 (LDH), 总超氧化物歧化酶 (T-SOD), 丙二醛 (MDA), 一氧化氮 (NO) 及总蛋白试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20160301, 20160229, 20160227, 20160217, 20160229, 20160224, 20160126); 伊红 (东京化成工业株式会社, 批号 GL01-GMPC); 转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), Smad7 (美国 Santa Cruz 公司, 批号分别为 K1615, G0915); Smad2/3 (美国 Cell Signaling 公司, 批号 D7G7); 兔抗  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) (美国 Bioass 公司, 批号 140520); Pierce ECL 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 基质 (美国 Thermo 公司, 批号 OF185744)。

**1.3 仪器** 722 型可见分光光度计 (上海佑科仪器仪表有限公司), Multiskan Mk3 型酶标仪 (赛默飞世尔仪器有限公司), PHY-III 型病理组织漂烘仪 (常州市中威电子仪器有限公司), BA400Digital 型数码三目摄像显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司), Image Station 4000R 型柯达凝胶成像 (柯达公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模<sup>[8]</sup>、分组及给药处理** 将实验小鼠随机分为正常组、模型组、联苯双酯阳性药组 ( $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 及印尼姜黄高、中、低剂量组 ( $1\ 300, 650, 325 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。灌胃给药 7 d, 末次给药后 2 h 一次性尾静脉注射 Con A  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  诱导小鼠肝损伤, 禁食不禁水 8 h 后称量体重, 摘眼球取血, 血清, 脱颈椎处死动物。取肝组织, 一部分制成匀浆待检; 另一部分多聚甲醛溶液固定; 剩余部分置于液氮中保存, 备用。

**2.2 印尼姜黄试药提取** 取印尼姜黄适量,  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  下回流提取 3 次, 每次 90 min, 滤过, 合并提取液, 旋转蒸发回收乙醇直到无醇味, 加羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 混匀, 定容为  $1.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  冷藏备用。

### 2.3 检测指标及方法

**2.3.1 肝脾指数测定** 处死各组小鼠后立即取出其肝脏、脾脏, 生理盐水洗净, 拭干, 称质量, 计算肝脏、脾脏脏器指数。

$$\text{脏器指数} = \text{脏器质量} / \text{体重} \times 100\%$$

**2.3.2 血清学检查** 血液静置 30 min 后以转速  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 所得血清先使用考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒, 测定总蛋白浓度, 再以酶标仪测定 ALT, AST, LDH 各项指标。

**2.3.3 肝组织匀浆检查** 取小鼠肝脏  $0.2 \text{ g}$  冰浴环境中用生理盐水制成 10% 匀浆, 离心, 取上清液, 供 T-SOD, MDA, NO 等指标检测, 均按试剂盒说明方法进行操作。

**2.3.4 肝组织病理学检查** 取小鼠肝右叶条状组织块约  $0.2 \text{ g}$ , 浸入多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 常规切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察肝脏的组织病理变化。肝细胞坏死分级: 0 级为无病变; I 级为肝细胞疏松肿胀, 气球样变, 有点状坏死; II 级为肝细胞灶性坏死; III 级为肝细胞广泛灶性坏死。炎性细胞浸润分级: 0 级为汇管区极少炎性细胞浸润; I 级为汇管区、血管窦可见多个炎性细胞浸润; II 级为汇管区、肝小叶内炎性细胞浸润明显, 肝实质破坏; III 级为汇管区大量炎性细胞浸润, 肝实质破坏。

**2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测 目的基因引物序列的设计与合成:** TGF- $\beta_1$  引物, 上游  $5' \text{-ACCTGCAAGACCATCGACAT-3'}$ , 下游  $5' \text{-GGTTTTCTCATAGATGGCGT-3'}$ ; Smad3 引物, 上游  $5' \text{-TGACTACAGCCATTCATTC-3'}$ , 下游  $5' \text{-TCACTGTCTGTCTCCTGTAC-3'}$ ; Smad7 引物, 上游  $5' \text{-GCATTCCTCGGAAGTCAAGAGG-3'}$ , 下游  $5' \text{-TGCGGTTGTAACCCACACG-3'}$ ;  $\beta$ -actin 引物, 上游  $5' \text{-GGCATCGTGATGGACTCCG-3'}$ , 下游  $5' \text{-GCTGGAA GGTGGACAGCGA-3'}$ 。按 RNA 提取试剂盒说明书上步骤用 Trizol 法提取总 RNA, 然后进行 cDNA 的逆转录和目的基因的 PCR 扩增, 按两步法在 Real-time PCR 仪上进行, 以  $\beta$ -actin 为内参照。计算样本中各 mRNA 的相对表达量,  $\Delta C_t$  (目的基因) = 目的基因  $C_t$  - 内对照基因  $C_t$ ,  $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t$  (目的基因) -  $\Delta C_t$  (标准值), 目的基因的相对总量为  $2^{-\Delta \Delta C_t}$ 。

**2.5 Western blot 检测** 肝组织  $50 \text{ mg}$  置于含 RIPA 裂解液  $300 \text{ } \mu\text{L}$  的离心管, 冰上放置融解, 混匀, 充分匀浆。  $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 后取上清即为组织总蛋白。接 BCA 法检测总蛋白含量, 后计算含总蛋白  $50 \text{ } \mu\text{g}$  的溶液体积为上样量, 加入  $5 \times \text{SDS}$  上样缓冲液至终浓度为  $1 \times \text{SDS}$ 。经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 硝酸纤维素膜 (PVDE) 转移。在含 3% BSA 中室温封闭 2 h, 之后特异性一抗  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜孵育, 洗涤, 再以二抗稀释液孵育; 反应信号经化学发光试剂发光, 放于 Image Station 4000R 型柯达凝胶成像系统上, X 射线胶片曝光, 并以计算机进行图像扫描。以  $\beta$ -actin 作为内参, 比较不同药物作用时间和不同药物 TGF- $\beta_1$ , Smad3, Smad7 基因表达情况。见表 1。

表 1 Western blot 检测中所用一抗浓度

Table 1 Concentration of first antibody in Western blot

抗体	稀释浓度
TGF-β <sub>1</sub> 抗体	1: 50
抗 Smad3 抗体	1: 200
抗 Smad7 抗体	1: 200
抗 β-actin 抗体	1: 500

2.6 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学数据分析,实验结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析法进行组间比较,如方差不齐则组间两两比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 各组小鼠脏器指数的变化 与正常组比较,模型组小鼠的肝脏指数和脾脏指数显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,印尼姜黄高剂量组差异显著 ( $P < 0.01$ ),但印尼姜黄中、低剂量组无显著性差异;联苯双酯组差异显著 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

3.2 对 Con A 所致肝损伤小鼠血清 ALT,AST,LDH

表 2 印尼姜黄对 Con A 诱导的肝炎小鼠肝脏、脾脏指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of *Curcuma zanthorrhiza* rhizome (CZR) on levels of liver index and spleen index in hepatitis induced by concanavalin A in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	肝脏指数	脾脏指数
正常	-	4.73 ± 0.32	0.39 ± 0.07
模型	-	6.95 ± 0.38 <sup>2)</sup>	0.63 ± 0.05 <sup>2)</sup>
印尼姜黄	325	6.75 ± 0.44	0.63 ± 0.07
	650	6.37 ± 0.25	0.60 ± 0.03
	1 300	5.69 ± 0.81 <sup>4)</sup>	0.51 ± 0.08 <sup>4)</sup>
联苯双酯	200	5.49 ± 0.51 <sup>4)</sup>	0.47 ± 0.07 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 3~7 同)。

活性的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 ALT,AST,LDH 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,印尼姜黄高剂量组差异显著 ( $P < 0.01$ ),但印尼姜黄中、低剂量组无显著性差异;联苯双酯组差异显著 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 印尼姜黄对 Con A 诱导的肝炎小鼠血清 ALT,AST,LDH 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of CZR on serum ALT,AST,LDH in hepatitis induced by concanavalin A in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	LDH/μmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	16.25 ± 3.47	28.40 ± 3.71	288.14 ± 42.89
模型	-	110.14 ± 9.66 <sup>2)</sup>	106.34 ± 7.25 <sup>2)</sup>	1 203.22 ± 377.44 <sup>2)</sup>
印尼姜黄	325	103.16 ± 10.02	102.74 ± 8.59	1 098.25 ± 296.57
	650	100.04 ± 9.25	98.24 ± 9.47	1 002.93 ± 233.80
	1 300	51.00 ± 7.59 <sup>4)</sup>	63.00 ± 7.97 <sup>4)</sup>	696.83 ± 103.58 <sup>4)</sup>
联苯双酯	200	32.49 ± 9.32 <sup>4)</sup>	66.02 ± 14.71 <sup>4)</sup>	515.34 ± 44.19 <sup>4)</sup>

3.3 对 Con A 所致肝损伤小鼠中肝组织 T-SOD 活性,MDA 含量及血清 NO 含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝脏匀浆中 MDA 和血清 NO 含量较正常组明显升高,T-SOD 活性较正常组明显降低,差异均具有显著性意义 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,

印尼姜黄高剂量组肝组织中 T-SOD 的活性升高,而其 NO 和 MDA 显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),但印尼姜黄中、低剂量组均无显著性差异;联苯双酯组中 T-SOD 显著升高,而其 NO 和 MDA 显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

表 4 印尼姜黄对 Con A 诱导的肝炎小鼠肝匀浆 T-SOD,MDA,NO 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of CZR on liver homogenates T-SOD,MDA,NO in hepatitis induced by concanavalin A in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	T-SOD/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/mmol·g <sup>-1</sup>	NO/μmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	28.33 ± 2.38	0.29 ± 0.08	5.22 ± 0.71
模型	-	20.65 ± 1.42 <sup>2)</sup>	1.98 ± 0.22 <sup>2)</sup>	7.49 ± 0.51 <sup>2)</sup>
印尼姜黄	325	20.37 ± 1.57	1.94 ± 0.78	7.47 ± 0.57
	650	21.03 ± 1.12	1.44 ± 0.92	7.47 ± 0.57
	1 300	22.98 ± 2.12 <sup>3)</sup>	0.69 ± 0.29 <sup>4)</sup>	6.37 ± 0.52 <sup>4)</sup>
联苯双酯	200	24.55 ± 1.33 <sup>4)</sup>	0.64 ± 0.29 <sup>4)</sup>	6.26 ± 0.50 <sup>4)</sup>

**3.4 对小鼠肝组织病理学影响** 与正常组比较,模型组的肝细胞坏死分级具有显著意义( $P < 0.01$ ),水肿变性(炎浸)分级无显著性差异但较之略高;与模型组比较,联苯双酯组及印尼姜黄高剂量组的肝细胞坏死分级均显著降低( $P < 0.01$ ),水肿变性(炎浸)分级均有一定程度的降低但没有显著性,见表 5。正常组肝细胞结构完整,以中央静脉为中心呈放射状排列,肝窦未见异常。模型组小鼠肝脏发生明显变化,肉眼可见肝脏表面及肝实质内有半点坏死灶,光镜下可见肝细胞轻度空泡样变性,细胞浆内粗面内质网的嗜碱性小体,肝细胞中、重度坏死,坏死灶内有大量炎性细胞浸润。与模型组比较,联苯双酯阳性药组病变程度改善,肝小叶结构完整,只部分肝细胞轻度空泡样变性,细胞浆内可见粗面内质网的嗜碱性小体;印尼姜黄高剂量组病变程度基本同联苯双酯组,只肝细胞有可见轻度点状坏死及局部灶样坏死。见图 1。

表 5 印尼姜黄对 Con A 诱导的肝炎小鼠肝组织炎症坏死分级的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Effect of CZR on liver inflammation necrosis grading in hepatitis induced by concanavalin A of mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肝脏坏死	水肿变性(炎浸)
正常	-	$0.14 \pm 0.29$	$0.41 \pm 0.23$
模型	-	$1.68 \pm 0.46^{2)}$	$0.84 \pm 0.65$
印尼姜黄	325	$1.59 \pm 0.51$	$0.78 \pm 0.61$
	650	$1.38 \pm 0.22$	$0.64 \pm 0.47$
	1 300	$0.69 \pm 0.32^{4)}$	$0.47 \pm 0.27$
联苯双酯组	200	$0.55 \pm 0.18^{4)}$	$0.45 \pm 0.36$

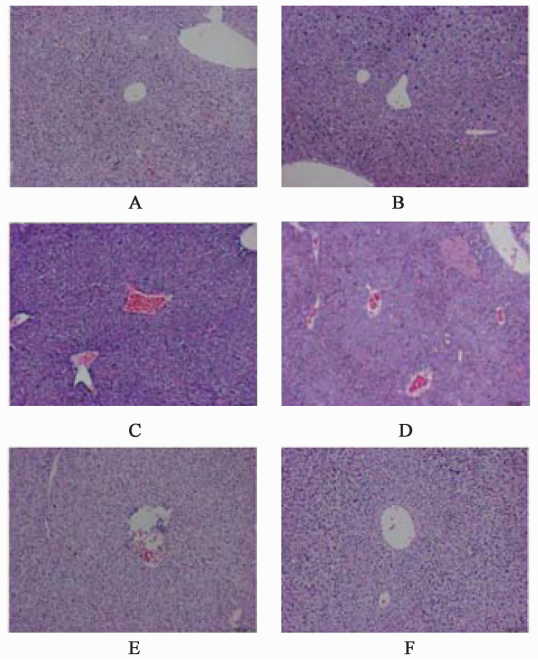
**3.5 对小鼠肝组织 TGF- $\beta_1$ , Smad3, Smad7 mRNA 表达量的影响** 与正常组比较,模型组 TGF- $\beta_1$ ,

表 6 印尼姜黄对小鼠肝组织 TGF- $\beta_1$ , Smad3, Smad7 的 mRNA 表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 6 Effect of CZR on mRNA expressions of liver TGF- $\beta_1$ , Smad3, Smad7 in hepatitis induced by concanavalin A of mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	TGF- $\beta_1$	Smad3	Smad7
正常	-	$1.05 \pm 0.44$	$0.96 \pm 0.28$	$1.09 \pm 0.28$
模型	-	$3.65 \pm 0.83^{2)}$	$3.88 \pm 1.46^{2)}$	$0.47 \pm 0.31^{2)}$
印尼姜黄	1 300	$1.61 \pm 0.44^{4)}$	$2.38 \pm 1.49^{3)}$	$0.79 \pm 0.33^{3)}$
联苯双酯	200	$1.56 \pm 0.22^{4)}$	$1.93 \pm 1.35^{3)}$	$0.93 \pm 0.28^{4)}$

**3.6 小鼠肝组织 TGF- $\beta_1$ , Smad3, Smad7 的蛋白相对表达量的影响** 与正常组比较,模型组 TGF- $\beta_1$ , Smad3 的蛋白表达明显上升,Smad7 蛋白明显下降( $P < 0.01$ )。与模型组比较,联苯双酯组的 TGF- $\beta_1$  蛋白表达量减少且具有显著差异( $P < 0.01$ ),印尼



A. 正常组;B. 模型组;C. 联苯双酯阳性药组;D. 印尼姜黄  $1\ 300\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;E. 印尼姜黄  $650\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;F. 印尼姜黄  $325\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组(G. 印尼姜黄  $325\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组(图 2 同))

图 1 印尼姜黄对小鼠肝组织病理学的影响(HE,  $\times 400$ )

Fig.1 Effect of CZR on mice liver tissue pathology in hepatitis induced by concanavalin A of mice(HE,  $\times 400$ )

姜黄高剂量组的 TGF- $\beta_1$  减少只具有统计学差异( $P < 0.05$ ),Smad3 也均减少具有统计学差异( $P < 0.05$ );联苯双酯组的 Smad7 蛋白表达量增加且具有显著差异( $P < 0.01$ ),印尼姜黄高剂量组 Smad7 增加只具有统计学差异( $P < 0.05$ )。见表 6。

姜黄高剂量组的 TGF- $\beta_1$  减少只具有统计学差异( $P < 0.05$ ),Smad3 也均减少具有统计学差异( $P < 0.05$ );联苯双酯组的 Smad7 蛋白表达量增加且具有显著差异( $P < 0.01$ ),印尼姜黄高剂量组 Smad7 增加只具有统计学差异( $P < 0.05$ )。见表 7,图 2。

表 7 印尼姜黄对小鼠肝组织 TGF-β<sub>1</sub>, Smad3, Smad7 的蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 7 Effect of CZR on protein expressions of liver TGF-β<sub>1</sub>, Smad3, Smad7 in hepatitis induced by concanavalin A of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TGFβ <sub>1</sub> /β-actin	Smad3/β-actin	Smad7/β-actin
正常	-	0.15 ± 0.02	0.44 ± 0.22	0.56 ± 0.04
模型	-	0.53 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.89 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.26 ± 0.04 <sup>2)</sup>
印尼姜黄	1 300	0.51 ± 0.03 <sup>3)</sup>	0.52 ± 0.12 <sup>3)</sup>	0.31 ± 0.06 <sup>3)</sup>
联苯双酯	200	0.17 ± 0.02 <sup>4)</sup>	0.46 ± 0.06 <sup>3)</sup>	0.74 ± 0.02 <sup>4)</sup>

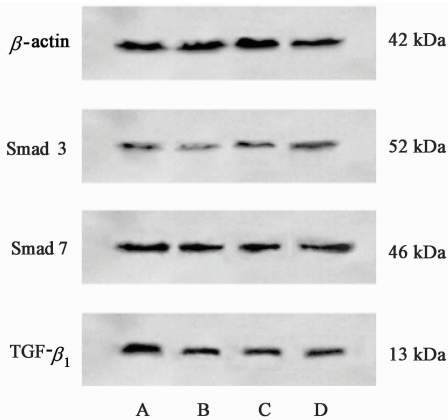


图 2 小鼠肝组织 TGF-β<sub>1</sub>, Smad3, Smad7 蛋白的表达

Fig. 2 Protein expressions of liver TGF-β<sub>1</sub>, Smad3, Smad7 in hepatitis induced by concanavalin A of mice

#### 4 讨论

Con A 是一种在人体内对肝细胞有特异性毒性作用的植物凝集素,是一种能在体外激活 T 细胞的丝裂原,Con A 诱发小鼠肝损伤是近年来建立的肝损伤实验动物模型<sup>[9]</sup>。该模型的特点在于其发病机制主要由免疫介导,活化 T 淋巴细胞而致肝损伤是其基本病理特点。此种造模方法所需时间短,方法简便易行,损伤持续时间较长。本实验在剂量选择上,参照文献及前期预实验确定 Con A 的给药剂量为 30 mg·kg<sup>-1</sup>,由模型组与正常组各个指标比较可见造模成功,可作为同类中药造模的剂量参考。

血清的 ALT 和 AST 是反映肝细胞受损的重要指标<sup>[10]</sup>,本实验中模型组小鼠的血清 ALT 急剧升高,提示 Con A 诱导的小鼠肝损伤与肝细胞膜结构与功能的破坏相关;阳性药物联苯双酯能显著降低肝损伤小鼠血清 ALT 水平,验证 Con A 损伤模型有效;印尼姜黄高剂量组能显著降低血清 ALT,AST 水平,显示印尼姜黄对小鼠的免疫性肝损伤有保护作用。

印尼姜黄对小鼠肝组织中 T-SOD 的活性有显著升高作用,且随药物剂量的增加而增强,表明印尼姜黄可诱导 SOD 的表达,提高机体清除自由基的活性。MDA 是脂质过氧化的最终产物,可严重破坏细

胞膜的结构,导致细胞肿胀、坏死等,其含量反映了组织过氧化的损伤程度<sup>[11]</sup>。体内 SOD 活性越高,自由基清除的速度越快<sup>[12]</sup>,本实验中经 Con A 造模后,肝组织中 MDA 含量升高,SOD 活力下降,给予印尼姜黄后,肝组织中 MDA 含量降低,SOD 活力增强,说明印尼姜黄可能通过稳定肝细胞膜的正常结构,加强组织修复,清除自由基,抑制脂质过氧化而减轻肝细胞损害。NO 是一种活性介质,具有血管舒张、抑制血小板聚集和黏附、介导细胞毒性、免疫功能 and 介导免疫反应、神经递质等作用。其生物学作用具有双重性,既维持机体正常生理功能,又参与病理性损伤<sup>[13]</sup>,本实验证明印尼姜黄能显著降低小鼠肝匀浆中 NO 的含量。说明印尼姜黄的保肝机制预期抗脂质过氧化损伤及抑制 NO 的产生密切相关,从而为印尼姜黄治疗免疫性肝损伤等疾病提供了理论基础,具有一定的临床应用价值。印尼姜黄对在 T 细胞介导的细胞免疫反应中起重要作用的 TNF-α, IFN-γ 等细胞因子有何影响,有待实验进一步探讨。

目前研究表明,在人和其他哺乳动物中只存在有 TGF-β<sub>1</sub>, TGF-β<sub>2</sub>, TGF-β<sub>3</sub>, 其中 TGF-β<sub>1</sub> 是目前公认的最强的致肝纤维化损伤细胞因子之一<sup>[14]</sup>。随着进一步研究发现,Smad 信号蛋白为 TGF-β<sub>1</sub> 的下游信号传导分子,在 TGF-β<sub>1</sub> 信号传导过程中起主要作用<sup>[15]</sup>。Smad 蛋白是 Smad2, Smad3, Smad4 和 Smad7。Smad2, Smad3 是 TGF-β<sub>1</sub> 的下游受体,被认为 TGF-β<sub>1</sub> 激活后信号传导的重要途径<sup>[16]</sup>; Smad7 近年倍受关注,其作为 TGF-β<sub>1</sub> 信号传导的抑制因子,主要机制是包括与 TβR I 结合,阻碍 Smad2 和 Smad3 的激活;与 Smad2 和 Smad3 竞争性结合 Smad4,阻碍它们信号的传递。在生理状态下, TGF-β<sub>1</sub> 信号传导过程中激活型 Smad 与抑制型 Smad 维持着平衡,本研究发现它们表达水平的失衡可能是肝损伤发生的分子基础。

本实验中,由于预实验印尼姜黄中、低剂量组没有实验效果及意义,故优选其高剂量组进行探究,

通过 Real-time PCR 检测发现模型组的肝脏组织中 TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3 和 Smad7 均发生了明显改变,并进一步 Western blot 分析 TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3 和 Smad7 蛋白表达水平,发现肝损伤发生时 TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3 蛋白表达明显上调,作为 TGF- $\beta_1$  信号传导的抑制因子 Smad7 蛋白表达水平下降。这也说明肝损伤的发生机制的复杂性,是各种相关因素的共同作用结果。因此,针对肝损伤 TGF- $\beta_1$  信号传导通路的理想治疗,也应是对具有多位点的调节作用。

[参考文献]

[1] 吕平,韦丽君,庞新华,等. 印尼莪术快速繁殖技术初步研究[J]. 中药材, 2007, 30(4):383-385.  
[2] 张春梅,王继达,张永睿思,等. 束骨姜黄化学成分及其乙酰胆碱酯酶抑制活性[J]. 山东大学学报:理学版, 2013, 48(7):20-23.  
[3] 谢妙娜. 中国与南亚姜黄应用的对比研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2015.  
[4] LIN S C, TENG C W, LIN C C, et al. Protective and therapeutic effect of the Indonesian medicinal herb *Curcuma xanthorrhiza* on  $\beta$ -D-galactosamine-induced liver damage [J]. *Phytother Res*, 1996, 10(2): 131-135.  
[5] 石传群,吴勇杰,高明堂,等. 新型重组人肿瘤坏死因子- $\alpha$  对四氯化碳及刀豆蛋白 A 诱导小鼠肝损伤的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(2): 196-200.  
[6] Nuriza Rahmadini,甘彦雄,郑勇凤,等. 基于 GC-MS 对比分析印尼姜黄、姜黄、蓬莪术挥发油中的化学成分

[J]. 中药与临床, 2016, 7(2):20-22.  
[7] 秦波,郭力,张培培,等. 印尼姜黄与中国姜黄药材的质量标准[J]. 中药与临床, 2011, 2(3):10-13.  
[8] 李向阳,邝幸华,周映云,等. 叶下珠复方制剂对刀豆蛋白 A 所致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中华癌症姑息医学杂志, 2002, 1(4):19-25.  
[9] 俞发. 当归多糖对刀豆蛋白 A 致小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中药材, 2009, 32(10):1580-1583.  
[10] 魏春华,邵坚,罗光明. 栀子生品及炮制品对 CCl<sub>4</sub> 致大鼠急性肝损伤保护作用的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(17):7-10.  
[11] 李晓冬,李俊,李荣,等. 橙皮苷对刀豆蛋白 A 致小鼠免疫性肝损伤的保护作用. [J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(3):350-353.  
[12] 刘丽,李军,晔慧,等. 保肝颗粒对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(20):123-126.  
[13] 汪晓军,张奉学,朱宇同,等. 黄芩苷对刀豆蛋白 A 致肝损伤小鼠肝组织 NO 含量的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2006, 16(2):93-95.  
[14] 赵珍东,段启,姚丽梅,等. 姜黄素对肝星状细胞转化生长因子  $\beta_1$  及受体和 I、III 型胶原 mRNA 表达的影响[J]. 中草药, 2012, 43(5):957-961.  
[15] 潘陈为,余保平,陈永平,等. 姜黄素影响 TGF- $\beta$ /Smad 信号传导通路的抗肝纤维化机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(7):1573-1576.  
[16] 俞蕾敏,吕宾. TGF $\beta$ /Smad 信号传导通路与肝纤维化的关系[J]. 国际消化病杂志, 2008, 28(4):397-400.

[责任编辑 周冰冰]