

山芝麻酸甲酯对 CCl₄ 致大鼠慢性肝损伤的作用及其机制的影响

卢春远¹, 林兴¹, 黄权芳², 韦锦斌^{1*}

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

[摘要] 目的:研究山芝麻酸甲酯对四氯化碳(CCl₄)诱发的大鼠肝损伤的保护作用及其机制。方法:将大鼠随机分为正常组、模型组、水飞蓟素组(50 mg·kg⁻¹)及山芝麻酸甲酯低、高剂量组(50, 200 mg·kg⁻¹)。除正常组外,其余各组大鼠灌胃给予20% CCl₄,每周2次,总共8周,制备大鼠慢性损伤模型,与此同时,治疗组每日给大鼠灌胃山芝麻酸甲酯或水飞蓟素1次,共8周。实验结束后,酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),白蛋白(ALB)活性及血浆中白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量。肝组织苏木素-伊红(HE)染色,观察各组大鼠肝脏病变情况。酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测肝组织超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),谷胱甘肽还原酶(GSH-Rd),细胞核转录因子-κB p65(NF-κB p65)含量。蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测肝组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS),环氧合酶-2(COX-2),半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(Caspase-3),半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-8(Caspase-8),以及凋亡相关蛋白 Fas, FasL 蛋白表达的变化。结果:山芝麻酸甲酯明显改善 CCl₄ 引起的严重病理性肝损伤;降低大鼠血清 ALT, AST 和 ALB 的水平,提高肝脏 SOD, GSH-Px 和 GSH-Rd 的活力;明显降低血浆中炎症因子 IL-6 和 TNF-α 的含量。进一步的研究发现,山芝麻酸甲酯明显抑制了与炎症反应调节相关的信号通路 NF-κB, 以及重要酶 iNOS 和 COX-2 的活力。此外,山芝麻酸甲酯明显抑制 Caspase-3, Caspase-8, Fas 和 FasL 蛋白的表达,减少肝细胞凋亡。结论:山芝麻酸甲酯对 CCl₄ 致大鼠肝损伤具有保护作用,其机制可能与抑制 NF-κB 信号通路减轻炎症反应以及减少细胞凋亡有关。

[关键词] 山芝麻酸甲酯; 四氯化碳; 肝损伤; NF-κB 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0141-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070141

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1152.024.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 11:52

Protective Effect and Mechanism of Methyl Helicteres on Chronic Liver Injury Induced by CCl₄ in Rats

LU Chun-yuan¹, LIN Xing¹, HUANG Quan-fang², WEI Jin-bin^{1*}

(1. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect and mechanism of methyl helicterate isolated from *Helicteres Radix* on chronic liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. **Method:** The rats were randomly divided into 5 groups, including normal control group, model group, silymarin positive control group (50 mg·kg⁻¹), and high and low-dose methyl helicterate (200, 50 mg·kg⁻¹) groups. Except for the normal control group, all of the other groups were intragastrically administrated with 20% CCl₄ for 8 weeks, twice a week. Meanwhile, the animals in the positive control group and methyl helicterate-treated groups were given silymarin

[收稿日期] 20160908(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473431);广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118154)

[第一作者] 卢春远, 硕士, 从事中药药理学研究工作, Tel:0771-5645433, E-mail:539231941@qq.com

[通讯作者] * 韦锦斌, 博士, 教授, 从事中药药理学研究与开发工作, Tel:0771-5645433, E-mail:jbwei@sina.cn

(50 mg·kg⁻¹) and methyl helicterate (200, 50 mg·kg⁻¹) by gavage once a day for 8 weeks. After the experiment, the levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB) and plasma interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) kits. The hepatic pathological changes were observed by HE staining. And the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-Rd), NF- κ B p65 in liver tissues were detected by ELISA kits. Western blot assay was performed to detect the expression of nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), Caspase-3, Caspase-8 Fas and FasL in liver tissues. **Result:** Methyl helicterate significantly alleviated CCl₄-induced serious liver injury, decreased the levels of serum ALT, AST and ALB, while increased the activities of hepatic SOD, GSH-Px and GSH-Rd. Methyl helicterate also reduced the contents of inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in liver tissues. The further study showed that methyl helicterate significantly inhibited the vitality of NF- κ B, iNOS and COX-2, which played a crucial role in regulat inginflammatory response. In addition, methyl helicterate significantly suppressed the expressions of Caspase-3, Caspase-8, Fas and FasL, and reduced the hepatocytes apoptosis. **Conclusion:** Methyl helicterate alleviates liver injury induced by CCl₄ in rats, the mechanism may be associated with the inhibition of NF- κ B signaling pathway and the decrease in cell apoptosis.

[**Key words**] methyl helicterate; CCl₄; liver injury; NF- κ B signaling pathway

肝病是我国最常见疾病之一,在全世界的发病率也呈逐年增加趋势。肝损伤是各种肝脏疾病的病变结果,可表现为脂肪变、嗜酸性变、炎症、坏死、肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌等。当肝细胞(包括肝实质细胞和肝非实质细胞)受到各种有害因子如病毒、缺氧、乙醇、药物及免疫等因素刺激时可以直接损伤,也可通过产生一系列的介质,进一步导致肝细胞发生坏死、炎症细胞浸润以及纤维化等病理改变,最终形成各种肝脏疾病^[1]。因此,探求减轻肝损伤的方法具有极其重要的意义。

在临床上可见有许多传统中草药对于肝脏损伤具有保护作用。山芝麻是梧桐科植物,含有黄酮苷、酚类、鞣质等化学成分。常用于清热解毒、外伤出血、痈肿疔疮等疾病的治疗。金孝勤等^[2]研究发现山芝麻的乙醇提取物具有很好的抗肿瘤活性。本课题组前期研究发现山芝麻能保护四氯化碳(CCl₄)所致小鼠肝损伤^[3],同时,山芝麻水提取物对小鼠免疫性肝损伤也具有保护作用^[4]。为进一步了解山芝麻保护肝脏作用的具体成分及其机制,课题组从山芝麻中提取出一种皂苷,经鉴定,其结构为山芝麻酸甲酯。本实验采用 CCl₄ 建立大鼠肝损伤模型^[5],观察山芝麻酸甲酯对大鼠肝脏病理损伤、氧化应激、凋亡相关蛋白的表达等作用,分析其对肝损伤的保护作用机制,为山芝麻酸甲酯的开发利用提供理论依据。

1 材料

山芝麻药材购于南宁市邕宁区,由广西中医药

大学第一附属医院黄权芳副主任中药师鉴定为梧桐科植物山芝麻 *Helicteres angustifolia* 的根;丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20141125,20141125,20140924);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号 I04012974);白细胞介素-6(IL-6)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 1331145511);半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-8(Caspase-8, Abcam 公司,批号 GR102554-1);RIPA 组织细胞裂解液(上海基尔顿生物公司,批号 20140317)。Mini-PROTEAN 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),Spectra Marplus384 型酶标仪(美国 Thermo Labsystems 公司),DW-86L628 型超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 20)g,广西医科大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(桂)2014-0002。实验大鼠在标准实验室内饲养,每天日照 12 h,环境温度及湿度适宜,动物实验符合广西医科大学伦理委员会标准,实验动物伦理审查编号 20150316。

2 方法

2.1 山芝麻酸甲酯的提取 山芝麻药材 10 kg,加 80% 乙醇 80 L 回流提取 3 次,合并提取液,真空回收乙醇,得到粗提物,然后依次用乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取。乙酸乙酯层萃取物溶解在热水中,滤过,浓缩后得到黄色粉末粗产物,上硅胶柱(200 ~

300 目)进一步分离,采用三氯甲烷和不同质量浓度甲醇(0~100% 甲醇,1 500 mL/馏分)混合物进行梯度洗脱,用薄层色谱收集相同组分,其中,第 2 组分上 ODS 柱和高效液相色谱进一步纯化,最后得到白色晶体。通过理化性质和波谱分析鉴定该化合物其结构与刘卫国等^[6]鉴定一致,所得单体为山芝麻酸甲酯。

2.2 分组及给药 将大鼠随机分成 5 组每组 12 只,即正常组、模型组、水飞蓟素组,以及山芝麻酸甲酯低、高剂量组。除正常组外,其余各组大鼠灌胃给予 20% CCl₄ (1 mL·kg⁻¹,溶于花生油中),每周 2 次,共 8 周;与此同时,水飞蓟素组大鼠灌胃给予水飞蓟素(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹),山芝麻酸甲酯组大鼠灌胃给予山芝麻酸甲酯(50,200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)作为低、高剂量组。正常组大鼠灌胃给予等体积的生理盐水。8 周后,处死大鼠,取血,4 000 r·min⁻¹离心 5 min 后,用抗凝管(50 U·mL⁻¹)分别收集血清与血浆。取出肝脏,清洗干净。血清、血浆及肝组织均贮存在 -80 °C 冰箱待用。

2.3 血清 ALT,AST,白蛋白(ALB)及血浆中白细胞介素(IL-6),TNF-α 的测定 均使用酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒测定血清 ALT,AST,ALB 和血浆中 IL-6 和 TNF-α,严格按照试剂盒的操作步骤进行。

2.4 肝组织中超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),谷胱甘肽还原酶(GSH-Rd)的测定 在肝组织中加入三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)[5 mmol·L⁻¹,含 2 mmol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸(EDTA),pH 7.4],用匀浆机匀浆混匀。4 °C,1 万 r·min⁻¹,离心 10 min。取上清液,测定 SOD,GSH-Px,GSH-Rd,严格按照说明书步骤进行。

2.5 肝组织病理检查 各组大鼠于肝脏右叶部位取一小块组织,用 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片,厚度为 3~4 μm,进行苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察肝脏组织学变化。

2.6 核转录因子-κB(NF-κB) p65 含量的测定 将肝组织用匀浆机匀浆混匀,1 万 r·min⁻¹,离心 10 min,取上清液,用 ELISA 试剂盒检测肝组织 NF-κB p65 含量,严格按照说明书步骤进行。即将对照品取出溶解后进行倍比稀释,得到不同浓度的对照品,把对照品及样品混匀后取 50 μL 加入反应孔中,加入生物素标记的抗体 50 μL,37 °C 温育 1 h。洗去孔内液体,每孔加入亲和链霉素-HRP 80 μL,混匀,37 °C 孵育 30 min,洗去孔内液体。每孔加入底物 A,B 各 50 μL,混匀,37 °C 孵育 10 min。加入终止液

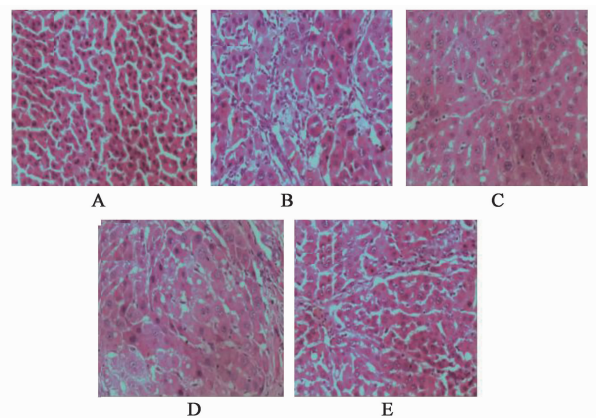
50 μL,立即在 450 nm 波长处测定各孔吸光度 A。

2.7 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测肝组织中一氧化氮合酶(iNOS),环氧合酶-2(COX-2),Caspase-3,Caspase-8,Fas,FasL 蛋白的表达 将肝组织用匀浆机匀浆混匀后,加入 RIPA 裂解液,裂解完全后,放入 4 °C 离心机,1 万 r·min⁻¹,离心 5 min,取上清液,分装于 0.2 mL 离心管。样品按照 4:1 加入 5×上样缓冲液,95 °C,变性 5 min。之后用 SDS-PAGE 分离凝胶电泳,再转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,再分别与一抗(1:2 000) iNOS(68 kDa),COX-2(130 kDa),Caspase-3(32 kDa),Caspase-8(45 kDa),Fas(48 kDa),FasL(45 kDa)抗体反应,4 °C 孵育过夜,经洗膜液洗涤 3 次,室温下孵育二抗(1:1 万)1 h,洗膜液洗涤 3 次后扫描,以 β-actin 作为内参,进行定量分析。

2.8 数据处理 使用 SPSS 16.0 处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性检验,方差齐则采用方差分析(one-way ANOVA),方差不齐则采用秩和检验分析处理,P<0.05 表示有统计学差异。

3 结果

3.1 山芝麻酸甲酯对 CCl₄ 至大鼠肝损伤肝组织病理学的影响 正常组大鼠肝小叶结构清晰且完整,肝细胞未见变性或坏死。模型组大鼠肝细胞出现脂肪变、炎性细胞浸润、气球样变及肝小叶被破坏的现象。药物干预后,水飞蓟素组、山芝麻酸甲酯低、高剂量组可观察到肝组织炎症浸润减少,肝细胞结构趋于正常,病理损伤有明显减轻。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 水飞蓟素组;D. 山芝麻酸甲酯低剂量组;E. 山芝麻酸甲酯高剂量组(图 2~4 同)

图 1 山芝麻酸甲酯对 CCl₄ 至大鼠肝损伤肝组织病理学的影响(HE, ×400)

Fig.1 Effect of methyl helicaterate on liver tissue pathology of CCl₄ induced liver injury in rat(HE, ×400)

3.2 山芝麻酸甲酯对大鼠血清 ALT, AST, ALB 含量的影响 使用 CCl₄ 造模后,模型组中 ALT, AST 含量明显升高, ALB 含量下降 ($P < 0.05$)。经

药物干预后,各组 ALT, AST 含量较模型组比较含量明显下降,同时 ALB 含量上升 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 山芝麻酸甲酯对大鼠血清 ALT, AST, ALB, IL-6, TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of methyl helicterate on serum ALT, AST, ALB, IL-6, TNF- α in rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
正常	-	24.75 ± 7.06	8.86 ± 2.57	37.27 ± 8.94	66.5 ± 8.2	7.3 ± 2.1
模型	-	142.37 ± 16.11 ¹⁾	45.45 ± 13.28 ¹⁾	20.19 ± 7.58 ¹⁾	158.2 ± 18.6 ¹⁾	30.6 ± 4.3 ¹⁾
水飞蓟素	50	53.68 ± 12.52 ²⁾	20.82 ± 8.21 ²⁾	34.19 ± 9.86 ²⁾	93.5 ± 16.7 ²⁾	18.4 ± 2.6 ²⁾
山芝麻酸甲酯	50	57.85 ± 12.07 ²⁾	22.96 ± 7.11 ²⁾	28.41 ± 5.62 ²⁾	106.3 ± 17.4 ²⁾	16.6 ± 2.8 ²⁾
	200	54.31 ± 8.59 ²⁾	20.97 ± 9.23 ²⁾	34.83 ± 9.01 ²⁾	79.7 ± 8.1 ²⁾	9.8 ± 1.5 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.3 山芝麻酸甲酯对血浆中 IL-6 和 TNF- α 含量的影响 大鼠血浆中 IL-6 和 TNF- α 的含量在模型组中明显升高 ($P < 0.05$)。经药物干预后,山芝麻酸甲酯组及水飞蓟素组中 IL-6 和 TNF- α 含量明显下降 ($P < 0.05$)。山芝麻酸甲酯低剂量及高剂量组均能降低血浆中 IL-6 和 TNF- α 含量 ($P < 0.05$)。见表 1。

试剂盒说明书进行检测,结果显示,在模型组中, SOD, GSH-Px, GSH-Rd 显著下降 ($P < 0.05$)。经药物干预后,各组大鼠肝组织中 SOD, GSH-Px 含量均明显升高 ($P < 0.05$)。在山芝麻酸甲酯低剂量组中,与模型组比较, GSH-Rd 含量变化不明显,而在高剂量组中,其含量明显升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 山芝麻酸甲酯对氧化酶含量的影响 按照

表 2 山芝麻酸甲酯对肝组织中 SOD, GSH-Px, GSH-Rd, NF- κ B p65 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of methyl helicterate on plasma SOD, GSH-Px, GSH-Rd, NF- κ B p65 in rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	GSH-Px/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	GSH-Rd/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	NF- κ B p65/ng·L ⁻¹
正常	-	9.07 ± 2.11	125.53 ± 18.80	7.15 ± 1.23	54.2 ± 6.8
模型	-	4.62 ± 1.17	67.24 ± 10.36 ¹⁾	4.08 ± 1.02 ¹⁾	125.8 ± 17.3 ¹⁾
水飞蓟素	50	6.38 ± 1.19 ²⁾	100.53 ± 18.46 ²⁾	5.97 ± 1.08 ²⁾	84.7 ± 11.9 ²⁾
山芝麻酸甲酯	50	5.03 ± 1.20 ²⁾	84.17 ± 11.61 ²⁾	4.35 ± 0.98	112.8 ± 12.8
	200	7.39 ± 1.02 ²⁾	116.49 ± 20.24 ²⁾	7.09 ± 1.06 ²⁾	63.1 ± 9.7 ²⁾

3.5 山芝麻酸甲酯对大鼠肝组织中 NF- κ B p65 含量的影响 NF- κ B p65 在慢性炎症反应中有重要的作用,它对细胞因子的产生起到重要作用。在本次实验中,与正常组比较,模型组中 NF- κ B p65 的含量明显升高 ($P < 0.05$)。经药物干预后,山芝麻酸甲酯低剂量组对 NF- κ B p65 含量影响不明显,而在山芝麻酸甲酯高剂量组中, NF- κ B p65 的含量显著下降 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 3 山芝麻酸甲酯对肝组织中 iNOS, COX-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Methyl helicterate on iNOS, COX-2 in rats' liver tissues ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	iNOS/GAPDH	COX-2/GAPDH
正常	-	1.07 ± 0.15	1.18 ± 0.48
模型	-	6.82 ± 0.93 ¹⁾	2.65 ± 0.81 ¹⁾
水飞蓟素	50	4.32 ± 0.69 ²⁾	1.71 ± 0.67 ²⁾
山芝麻酸甲酯	50	5.88 ± 0.82 ²⁾	2.09 ± 0.82 ²⁾
	200	3.46 ± 0.87 ²⁾	1.46 ± 0.51 ²⁾

3.6 各组大鼠肝组织 iNOS, COX-2 表达的变化 正常组中 iNOS 和 COX-2 表达极低,经 CCl₄ 处理后的模型组中, iNOS 和 COX-2 蛋白含量显著升高 ($P < 0.05$)。经药物干预后,在山芝麻酸甲酯组和水飞蓟素组中, iNOS 和 COX-2 的表达明显减少 ($P < 0.05$)。见表 3, 图 2。

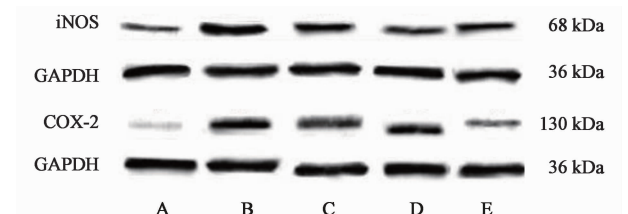


图 2 山芝麻酸甲酯对肝组织中 iNOS, COX-2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Methyl helicterate on iNOS, COX-2 in Rats' liver tissue

3.7 山芝麻酸甲酯对大鼠肝组织 Caspase-3, Caspase-8 蛋白表达的影响 正常组大鼠肝组织中较少表达 Caspase-3, Caspase-8, 模型组大鼠肝组织

中的 Caspase-3, Caspase-8 的表达均显著高于正常组 ($P < 0.05$)。药物干预后,水飞蓟素组与山芝麻酸

甲酯高剂量组均能显著下调肝组织中 Caspase-3, Caspase-8 的表达 ($P < 0.05$)。见表 4,图 3。

表 4 山芝麻酸甲酯对肝组织中 Caspase-3, Caspase-8, Fas, FasL 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Methyl helicaterate on Caspase-3, Caspase-8 in rats' liver tissue ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	Caspase-3/ β -actin	Caspase-8/ β -actin	Fas/ β -actin	FasL/ β -actin
正常	-	0.25 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.14 ± 0.02
模型	-	0.73 ± 0.12 ¹⁾	0.66 ± 0.12 ¹⁾	0.81 ± 0.11 ¹⁾	0.62 ± 0.07 ¹⁾
水飞蓟素	50	0.48 ± 0.10 ²⁾	0.40 ± 0.08 ²⁾	0.54 ± 0.08 ²⁾	0.38 ± 0.05 ²⁾
山芝麻酸甲酯	50	0.61 ± 0.10	0.58 ± 0.12	0.69 ± 0.09	0.54 ± 0.07
	200	0.33 ± 0.07 ²⁾	0.32 ± 0.08 ²⁾	0.43 ± 0.06 ²⁾	0.31 ± 0.05 ²⁾

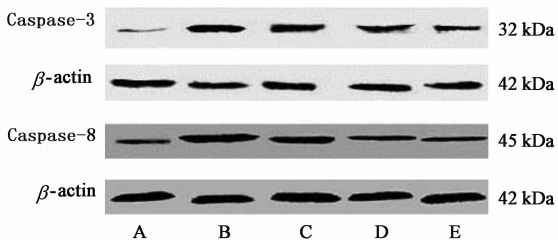


图 3 山芝麻酸甲酯对肝组织中 Caspase-3, Caspase-8 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Methyl helicaterate on Caspase-3, Caspase-8 in Rats' liver tissue

3.8 各组大鼠肝组织 Fas, FasL 蛋白表达的变化
正常组大鼠肝组织中 Fas, FasL 含量低,模型组中 Fas, FasL 的表达均显著高于正常组 ($P < 0.05$)。药物干预后,水飞蓟素组与山芝麻酸甲酯高剂量组均能显著下调肝组织中 Fas, FasL 的表达 ($P < 0.05$)。见表 4,图 4。

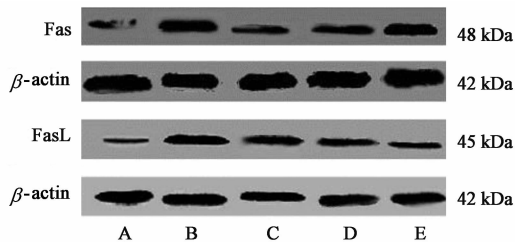


图 4 山芝麻酸甲酯对肝组织中 Fas, FasL 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Methyl helicaterate on Fas, FasL in rats' liver tissue

4 讨论

肝细胞损伤是多种肝病共同的病理基础,其中氧化应激在肝细胞损伤中占有重要地位。氧化应激是指机体组织或细胞内氧自由基增多和(或)清除能力降低导致活性氧簇(ROS)在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程。体内活性氧的过度激活、脂质过氧化反应的引发和持续是肝细胞损伤的重要病理基础之一。因此,对氧化应激导致肝细胞

损伤的研究便成为治疗肝脏疾病的一个重要途径^[7]。因此,氧化应激对肝损伤的作用也成为了研究治疗肝脏疾病的途径之一^[8]。正常情况下,由于机体内存在大量的酶类和非酶类抗氧化物质,活性氧的含量能得到有效地控制,从而保障机体生理功能的正常进行。抗氧化酶是机体抗氧化防御的重要组成部分,包括 SOD, GSH-Px, GSH-Rd, 这些抗氧化酶可清除 ROS, 自由基, 从而减轻和消除氧化损伤。当发生肝细胞损伤时,肝功能的生化指标 ALT, AST, ALP, ALB 等会有明显的变化。其中最敏感的指标为 ALT 和 AST。本实验结果显示,模型组中, ALT, AST 含量显著升高, ALB 含量降低,表明肝细胞已被损伤。经山芝麻酸甲酯干预后, ALT, AST 含量与模型组比较明显降低, ALB 含量升高且接近正常水平。同时,肝组织中 SOD, GSH-Px, GSH-Rd 与模型组比较活性升高。由此可以看出,山芝麻酸甲酯可以提高肝损伤大鼠体内抗氧化酶含量,从而清除过多的 ROS, 自由基等,从而减轻氧化应激对肝脏的损伤。

从肝脏的病理结果可以看出,模型组大鼠肝脏正常肝小叶结构被破坏,呈较宽的条索状分隔肝小叶。同时有大量炎症细胞浸润,肝细胞内可见大小不等的空泡。经山芝麻酸甲酯干预后,能明显改善肝组织细胞的脂肪病变及炎症细胞浸润情况,使其趋于正常。说明山芝麻酸甲酯具有减轻细胞炎症,防止肝细胞变性坏死,从而起到保护肝细胞的作用。

损伤的肝细胞会释放细胞因子,如 TNF- α , 肝细胞生长因子、白细胞介素(IL-1, IL-6)等,这些因子均能直接或间接地促进肝星状细胞的激活^[9]。TNF- α 是一种主要由激活的巨噬细胞产生的促炎性细胞因子,可进一步促使肝星状细胞活化,使其转变为肌成纤维样细胞。许多研究显示 TNF- α 在多种肝脏疾病中表达水平升高,与受体结合,可以直接

激活中性粒细胞或通过组织蛋白酶的线粒体途径诱导肝细胞凋亡、损伤。TNF- α , IL-6 均是重要的细胞炎症因子,其含量的高低反应了肝细胞损伤的程度。环氧合酶(COX)是前列腺家族生物合成的关键酶,研究表明,肝纤维化及肝硬化组织中 COX-2 的表达明显升高,是重要的促肝纤维化形成的分子之一,COX-2 介导的炎症反应在肝纤维化形成过程中起关键作用^[10]。近来研究表明 COX-2 可能参与肝损伤的炎性反应,调节肝星状细胞(HSC)的增殖,从而促进肝纤维化的形成和发展。体内外研究均提示选择性 COX-2 抑制剂能抑制炎症细胞浸润和减少细胞因子如 IL-8, IL-6 等^[11]。而一氧化氮(NO)为一种多生物活性物质,机体内 NO 合成酶(NOS)具有诱导型(iNOS)和结构型(cNOS)2 种。内毒素和某些细胞因子如 IL-1, TNF, 干扰素等可诱导 iNOS 合成分泌大量 NO。而 NO 与肝细胞损伤密切相关,通过检测 iNOS 同样可以评估肝脏损伤的程度。本实验结果显示,模型组中 IL-6, TNF- α , iNOS, COX-2 含量显著升高,表明在 CCl₄ 诱导的大鼠体内产生了多种炎症因子,炎症因子的过量表达使肝细胞被严重损伤。经药物干预后,与模型组比较,各炎症因子含量均明显下降。结果提示,山芝麻酸甲酯对炎症因子的产生有抑制作用,从而减轻了由各炎症因子介导的炎症反应,阻断了其对肝细胞的损伤作用。

NF- κ B 是一种多向调节功能的转录因子,主要是由 p50 和 p65 2 个亚单位构成的异源二聚体,可以调控细胞因子的生成,参与机体的炎症、免疫等过程。NF- κ B 作为炎症反应的最为重要的转录因子,对炎性分子转录的调控是 NF- κ B 的主要功能之一。活化的 NF- κ B 将由细胞浆转移至细胞核,与核内 DNA 序列中促炎症反应因子的启动子相结合,促进黏附分子、细胞因子、趋化因子以及急性期蛋白的基因转录和蛋白的表达,加重了肝内炎症反应的范围和程度^[12]。静息状态下, NF- κ B 处于无活性状态,在受到活性氧, TNF- α , IL-1 等的刺激时, NF- κ B 被激活,启动 TNF- α , IL-1, 趋化因子、细胞黏附分子, NOS 和 COX-2 等基因,而 TNF- α , IL-1 等又可进一步活化 NF- κ B 形成正反馈,导致炎性瀑布的产生,引发多种疾病^[13]。本实验结果显示,正常组大鼠肝组织中 NF- κ B p65 表达量很少,模型对照组表达则显著增高,表明 CCl₄ 引起大鼠慢性肝损伤时,肝组织 NF- κ B 受到高浓度的氧自由基、炎性因子等刺激时被激活,导致促炎因子大量产生,引发炎症反应。药物干预后,肝组织中 NF- κ B p65 的表达显著

降低,结合 ALT, AST, ALB, TNF- α , IL-1, COX-2 等实验结果,提示山芝麻酸甲酯可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路、继而抑制炎症应答减少炎症因子的释放,以此发挥其对 CCl₄ 诱导大鼠慢性肝损伤的保护作用。

肝损伤时肝细胞凋亡增加, Caspases 是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,在细胞内, Caspases 通常以酶原形式存在,凋亡的最后实施是通过 Caspases 的激活而实现的。在整个 Caspase 级联反应中,上游以 Caspase-2, Caspase-8, Caspase-9 及 Caspase-10 为主,下游则以 Caspase-3, Caspase-6 及 Caspase-7 为主。细胞接受凋亡信号活化上游 Caspase 家族后,继而活化下游 Caspase 家族,通过水解凋亡抑制因子、破坏细胞结构及水解细胞骨架调节酶等过程从而促进细胞凋亡^[14]。本实验中,检测了 Caspase-8 及 Caspase-3 的蛋白的表达。结果显示,与正常组比较,模型组 Caspase-3, Caspase-8 表达明显升高,而经过山芝麻酸甲酯的干预,含量明显下降。提示,山芝麻酸甲酯可以通过抑制 Caspases 的激活,从而减少了由 CCl₄ 引起的细胞凋亡。

总之,山芝麻酸甲酯可明显减轻肝脏损伤,降低血清 AST, ALT, ALB 水平,提高肝组织 SOD, GSH-Px, GSH-Rd 含量,以及降低 TNF- α 含量,表明山芝麻酸甲酯可以提高抗氧化酶含量,清除过多的氧自由基和炎症因子的释放,从而减轻氧化应激反应导致的细胞损伤。进一步的机制研究发现,山芝麻酸甲酯可明显抑制 NF- κ B 的活性、下调凋亡相关蛋白 Caspase-3, Caspase-8, Fas 和 FasL 的表达。笔者的研究表明,山芝麻酸甲酯可减轻 CCl₄ 引起的慢性肝损伤,其机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路继而减轻炎症反应以及减少肝细胞凋亡有关。

[参考文献]

- [1] Afdhal N H, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review [J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99 (6): 1160-1174.
- [2] 金孝勤, 庞素秋. 山芝麻中化学成分与抗肿瘤活性研究 [J]. 安徽医药, 2016, 20 (1): 34-37.
- [3] 林兴, 黄权芳, 张士军, 等. 山芝麻对 CCl₄ 诱导小鼠肝损伤的脂质过氧化反应的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 147-149.
- [4] 林兴, 黄权芳, 张士军, 等. 山芝麻水提取物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(1): 1-5.
- [5] 吴海建, 龚秀, 杨倚天, 等. 四氧化碳药物性肝损伤体外模型的改进 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23):

- 3633-3636.
- [6] 刘卫国,王明时. 山芝麻中三个新三萜化合物的结构鉴定[J]. 药学学报,1985,20(11):842-851.
- [7] QUAN J, YIN X, XU H. Boschniakia rossica prevents the carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat [J]. *Exp Toxicol Pathol*,2011, 63 (1/2): 53-59.
- [8] 赵文玺,金梅花,李天,等. 草苈蓉水萃取物对四氯化碳致肝损伤小鼠肝脏氧化应激的干预作用[J]. 中国中药杂志,2013, 38(6): 875-878.
- [9] Brito J M, Mermelstein C S, Tempone A J, et al. Mast cells can revert dexamethasone-mediated down-regulation of stem cell factor [J]. *Eur J Pharmacol*,2001, 414 (1): 105-112.
- [10] Mohammed N A, Abd El-Aleem S A, El-Hafiz H A, et al. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis; a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57 (4): 350-354.
- [11] Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, et al. JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis1 [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125 (2): 556-571.
- [12] Chadwick C C, Chippari S, Matelan E, et al. Identification of pathway-selective estrogen receptor ligands that inhibit NF-kappaB transcriptional activity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (7): 2543-2548.
- [13] Yamamoto Y, Gaynor R B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer [J]. *J Clin Invest*,2001,107 (2): 135-142.
- [14] Fiandalo M V, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis [J]. *Exp Oncol*, 2012,34 (3): 165-175.

[责任编辑 邹晓翠]

《中国实验方剂学杂志》2014—2016 年度优秀审稿专家名单

田元祥教授(中国中医科学院中医临床基础医学研究所)
刘春生教授(北京中医药大学)
沈祥春教授(贵阳医学院药学院)
王长虹教授(上海中医药大学)
倪艳教授(山西省中医药研究院)
倪健教授(北京中医药大学)
赵艳玲研究员(解放军 302 医院)
李孝栋教授(福建中医药大学)
康文艺教授(河南大学)
张艳教授(辽宁中医药大学)
任钧国研究员(中国中医科学院西苑医院)
蔡宇教授(暨南大学药学院)
王冰副教授(上海中医药大学)
袁子民副教授(辽宁中医药大学)
张华副教授(山东中医药大学)

获奖的优秀审稿专家是在 2014—2016 年度一贯积极支持编辑部工作,能认真负责、按时完成审稿任务,且审稿数量较多的专家,由责任编辑推荐,编委会年会通过并颁发了获奖证书及奖金。