

## 基于细胞焦亡探讨琴叶榕提取物对急性酒精性肝损伤的保护机制

冯会婷<sup>1,2</sup>, 戴卫波<sup>2</sup>, 白莎莎<sup>1</sup>, 沈崇坤<sup>1</sup>, 温文浩<sup>1</sup>, 崔赛男<sup>1</sup>, 崔永飞<sup>1</sup>, 张荣<sup>1</sup>, 彭伟文<sup>2\*</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510405;

2. 广州中医药大学附属中山医院, 广东 中山 528400)

**[摘要]** 目的:研究细胞焦亡在琴叶榕根的不同溶剂提取物保护急性酒精性肝损伤中的作用。方法:56只雄性C57BL/6小鼠随机分为正常组,模型组,水飞蓟宾组(60 mg·kg<sup>-1</sup>),鲜药水提物组(48 g·kg<sup>-1</sup>),干药水提物组(48 g·kg<sup>-1</sup>),干药50%醇提物组(48 g·kg<sup>-1</sup>),干药95%醇提物组(48 g·kg<sup>-1</sup>),每组8只。其中水飞蓟宾和不同溶剂的琴叶榕提取物,各组小鼠灌胃给药18 d,正常组与模型组小鼠灌胃给予等体积的纯水。灌胃给药15 d后,模型组、水飞蓟宾组和各个琴叶榕根提取物组小鼠给予50%乙醇(12 mL·kg<sup>-1</sup>)灌胃,建立急性酒精性肝损伤模型。末次造模结束后禁食14 h后摘眼球取血,开腹取肝脏,计算肝脏指数,苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织病理学变化;试剂盒检测小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)活性;硫代巴比妥酸(TBA)法检测肝脏丙二醛(MDA)含量,微板法检测乳酸脱氢酶(LDH)水平;肝脏组织切片末端标记法(TUNEL)染色检测肝细胞焦亡;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞焦亡相关蛋白。结果:与正常组比较,模型组ALT,AST,MDA,LDH水平显著升高,肝脏指数显著升高,TUNEL染色阳性、炎症因子、焦亡相关蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,各个琴叶榕根提取物给药干预组小鼠ALT,AST,MDA,LDH水平均明显下降( $P < 0.05$ ),肝脏指数有不同程度的下降,TUNEL染色阳性、炎症因子、焦亡相关蛋白表达水提物处理组明显下降( $P < 0.05$ );肝脏病理切片表明,琴叶榕根提取物能改善小鼠急性酒精肝损伤肝组织病理学变化。结论:琴叶榕根提取物对急性酒精性肝损伤具有一定的保护作用,且其水提物作用机制可能与焦亡通路相关。

**[关键词]** 琴叶榕;急性酒精性肝损伤;丙氨酸氨基转移酶(ALT);天门冬氨酸氨基转移酶(AST);细胞焦亡

**[中图分类号]** R2-0;R285.5;R333.4;R318.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)13-0125-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201342

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200421.1328.001.html>

**[网络出版日期]** 2020-4-21 16:25

### Protective Effect of *Ficus pandurata* Extract on Alcohol-induced Acute Liver Injury Base on Pyroptosis

FENG Hui-ting<sup>1,2</sup>, DAI Wei-bo<sup>2</sup>, BAI Sha-sha<sup>1</sup>, SHEN Chong-kun<sup>1</sup>, WEN Wen-hao<sup>1</sup>, CUI Sai-nan<sup>1</sup>,

CUI Yong-fei<sup>1</sup>, ZHANG Rong<sup>1</sup>, PENG Wei-wen<sup>2\*</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Zhongshan Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effect of *Ficus pandurata* extract on acute alcoholic liver injury based on pyroptosis mechanism. **Method:** The 56 male C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group, model control group, positive control group (60 mg·kg<sup>-1</sup>), fresh medicine water extract group (48 g·kg<sup>-1</sup>), dry drug water extract group (48 g·kg<sup>-1</sup>), dry drug 50% alcohol extract group (48 g·kg<sup>-1</sup>) and dry drug 95% alcohol extract group (48 g·kg<sup>-1</sup>), 8 mice in each group. Positive control and different solvent

**[收稿日期]** 20200305(006)

**[基金项目]** 广东省中医药局科研项目(20182168);广东省中山市科技计划医疗卫生重大专项(2017B1006)

**[第一作者]** 冯会婷,在读硕士,从事中药制剂开发与研究,E-mail:13022099519@163.com

**[通信作者]** \*彭伟文,博士,教授,硕士生导师,从事中药制剂开发与研究,E-mail:pww200688@21cn.com

extract groups of *Ficus tenuifolia* were intragastrically administrated for 18 days, once a day, while normal group and model group were given the same volume of pure water intragastrically. After 15 days of continuous gavage, mice received 50% ethanol ( $12 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) intragastrically for 3 days to induce acute alcoholic liver injury model except for the normal control group. At 14 h after the last treatment, serum and liver samples were obtained, the serum content of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were determined, the histopathologic changes of the hepatic tissues were observed by hematoxylin eosin (HE) staining. The content of malondialdehyde (MDA) in liver was determined by thiobarbituric acid (TBA) and the content of lactate dehydrogenase (LDH) was determined by microplate method. Western blot and TUNEL assay kit was used to detect the cell pyroptosis rate. **Result:** Compared with normal group, ALT, AST, MDA and LDH levels in the model group were significantly increased, liver index was significantly increased, TUNEL staining positive, inflammatory factors and pyroptosis related protein expressions were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with model control group, the ALT, AST, MDA and LDH of the drug intervention group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). The liver index decreased in different degrees, and the expression of inflammatory factors and pyroptosis related protein in the water extract treatment group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The root extract of *Ficus pandurata* Hance has protective effect on acute alcoholic liver injury, and the mechanism of water extract might relate to inhibiting hepatocyte pyroptosis.

**[Key words]** *Ficus pandurata*; acute alcoholic liver injury; alanine transaminase (ALT); aspartate transaminase (AST); pyroptosis

随着社会的发展,物质生活的不断提高,特别是节假日及工作应酬期间,酒精消费不断增加,从而引发一系列疾病如酒精性肝病。酒精性肝病(ALD)是一种由于过量饮酒导致的肝脏疾病,临床上常见症状有恶心、呕吐、黄疸<sup>[1]</sup>,后期有可能发展成酒精性肝炎、肝硬化,乃至肝癌,引起肝功能衰竭,从而导致死亡<sup>[2]</sup>。我国流行病学调查表明,我国酒精性肝病的发病率和死亡率均呈明显的上升趋势<sup>[3]</sup>。同时急性酒精性肝损伤发病率也急剧上升,究其原因则多是节假日及工作应酬期间短期大量饮酒导致。因此对于急性酒精性肝损伤的治疗有望缓解由大量摄入酒精导致的肝系疾病患者症状。

目前市场上治疗酒精性肝病的药物治疗效果大多不理想且毒副作用大,传统中医药在治疗ALD表现出优势,因此从传统药物中研发预防和治疗酒精性肝病的新药物成为新的研究热点<sup>[4-6]</sup>。近年来研究表明酒精可通过增加硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)在肝脏中的表达来促进半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)介导的细胞焦亡通路,提示细胞焦亡可能是ALD发生发展的关键机制<sup>[7]</sup>。

琴叶榕为桑科植物琴叶榕 *Ficus pandurata* 的干燥根,味甘、微辛,性平<sup>[8]</sup>。具有清肝火作用,可用于黄疸肝炎的治疗,现代研究发现,琴叶榕根具有护肝,清除自由基等药理作用<sup>[9-11]</sup>。但目前有关琴叶榕根保肝作用机制研究尚不清楚。基于此,本实验

旨在探讨琴叶榕根提取物对小鼠急性酒精性肝损伤的影响,为其进一步研究开发提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 56只雄性C57BL/6小鼠,SPF级,体质量18~22 g,购自斯贝福生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0002,本实验通过广州中医药大学伦理委员会审查。

**1.2 药物与试剂** 琴叶榕(采集于广东江门,由广州中医药大学中药鉴定学教研室黄海波教授鉴定为琴叶榕正品);水飞蓟宾(天津天士力圣特制药有限公司,批号856001009);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),丙二醛(MDA),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20180815,20180815,20180811,20180809);白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )抗体,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab8348,ab200478);Caspase-1抗体,炎性小体(NLRP3)兔单抗,抗tubulin兔多抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,化学发光液(美国Affinity公司,批号分别为AF5418,DF7438,62b3499,77r1907,KF001);胞核-胞浆提取试剂盒,一步法末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒,苏木素-伊红(HE)染色液(碧云天生物工程研究所,批号分别为P0027,C1086,C0105)。

**1.3 仪器** EnSpire 2300型多功能酶标仪(美国

PerkinElmer公司);H1650R型离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司);BX-51型病理图像采集系统(日本Olympus公司);VCX800型超声破碎仪(宁波新芝生物科技有限公司);DHG-9055A型电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司);PB303-N型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);1645050基础型电源,165-8001型电泳仪,1703935型转膜仪,Universal Hood II型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 药物制备** 称取琴叶榕新鲜根240 g,另称取3份琴叶榕根干燥粗粉240 g,鲜品用水,另3份干品分别用水,50%乙醇,95%乙醇作为提取溶剂浸泡2 h,加热回流提取2次,首次提取加入10倍溶剂,第2次提取时加入8倍溶剂,每次提取加热至沸腾后保持微沸1 h,过滤,合并两次滤液,浓缩得到鲜药水提物、干药水提物、干药50%乙醇提取物、干药95%乙醇提取物,提取液冻干得到不同溶剂提取物的冻干粉,将所得4种提取物冻干粉分别用纯水溶解定容至50 mL,最终所得药液含生药 $4.8 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

**2.2 动物分组及给药** 56只雄性C57BL/6小鼠,按体质量随机分为7组,正常组、模型组、水飞蓟宾组( $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),琴叶榕根鲜药水提物组( $48 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),琴叶榕根干药水提物组( $48 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),琴叶榕根干药50%乙醇提取物组( $48 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),琴叶榕根干药95%乙醇提取物组( $48 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )<sup>[12]</sup>。

**2.3 给药** 适应性喂养5 d后,灌胃给药,灌胃体积均为 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,正常组灌胃给予等体积的纯水,阳性药物组小鼠灌胃给予水飞蓟宾( $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ );琴叶榕根各个提取物组灌胃给予琴叶榕根提取物( $48 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),共灌胃给药18 d。从灌胃给药第16天开始,预保护给药12 h后进行酒精性肝损伤造模,造模方法为灌胃给予50%乙醇 $12 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每天1次,连续造模3 d<sup>[13]</sup>。末次造模结束后,禁食不禁水14 h后,小鼠摘眼球取血,获得血液样本,脱颈椎处死小鼠,置于冰上迅速开腹,剖取肝脏,称重记录,计算脏器指数(肝湿重/体质量 $\times 100\%$ ),分装置于液氮中冷冻保。

## 2.4 指标测定

**2.4.1 微板法检测血清ALT和AST水平** 所得血液样本于室温静置2 h后, $3\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,分取血清,按试剂盒说明书检测ALT和AST水平。

**2.4.2 硫代巴比妥酸(TBA)法检测MDA,微板法**

检测LDH水平 所得肝脏样本,按试剂盒要求制备10%肝组织匀浆,分取上清,蛋白定量后,按试剂盒说明书检测肝脏组织中MDA和LDH水平。

**2.4.3 HE染色法观察肝脏病理学变化** 所得肝脏样本,取肝脏相同部位,用4%多聚甲醛溶液固定,用水冲洗后经梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,HE染色,然后进行病理学观察。

**2.4.4 TUNEL染色法试剂盒检测肝细胞死亡** 所得肝脏样本,取肝脏最大叶用4%多聚甲醛溶液固定,用水冲洗后经梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,按照一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒说明书检测肝细胞死亡方式。

**2.4.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测TNF- $\alpha$ , NLRP3, Caspase-1及IL-1 $\beta$ 蛋白表达** 提取肝组织蛋白,BCA试剂盒进行蛋白定量。常规SDS-聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳,转膜,室温5%牛奶封闭2 h后,加入相应一抗TNF- $\alpha$ (1:800),Caspase-1(1:1 000),NLRP3(1:1 000),IL-1 $\beta$ (1:1 000),tubulin(1:2 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。次日TBST充分洗膜后,加入相应的辣根过氧化物标记的二抗(1:5 000),室温孵育2 h后,TBST充分洗膜后,滴加化学发光液发光,凝胶成像系统成像,用Image Lab软件进行量化分析。

**2.5 统计学分析** 采用SPSS 16.0统计学软件进行数据处理,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之样本均数比较采用 $t$ 检验,多组间比较方差齐时采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD法,方差不齐时采用近似 $F$ 检验Welch法,组间两两比较采用Dunnett  $T$ 3法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对小鼠肝脏指数和肝功能的影响** 肝细胞发生实质性损伤时血清中AST,ALT水平会显著升高。与正常组比较,模型组肝脏指数变大,ALT,AST水平明显升高( $P < 0.05$ ),表明急性酒精性肝损伤模型造模成功;与模型组比较,水飞蓟宾组与琴叶榕根鲜药水提物组肝脏指数,ALT,AST水平明显降低( $P < 0.05$ ),琴叶榕根干药水提物组、琴叶榕根干药50%乙醇提取物组与琴叶榕根干药95%乙醇提取物组小鼠肝脏指数无明显降低,血清中ALT,AST水平明显降低( $P < 0.05$ )。提示琴叶榕根提取物可以不同程度地改善急性酒精性肝损伤小鼠的肝脏肿大及肝功能损伤。见表1。

**3.2 对小鼠肝组织LDH,MDA水平的影响** 检测肝组织内的MDA,LDH水平,与正常组比

表 1 琴叶榕不同溶剂提取物对小鼠肝脏指数和肝功能的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Effect of *Ficus pandurata* different dissolvant extract on liver indexes, AST and ALT levels of mice during alcohol-induce alcoholic liver injury ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肝脏指数/%	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>
正常	-	3.98±2.63	19.38±8.27	48.44±17.81
模型	-	4.48±4.57 <sup>1)</sup>	45.49±9.29 <sup>1)</sup>	169.93±36.40 <sup>1)</sup>
水飞蓟宾	0.06	4.02±0.37 <sup>2)</sup>	21.41±8.12 <sup>2)</sup>	91.53±8.10 <sup>2)</sup>
琴叶榕根鲜药水提取物	48	4.07±0.28 <sup>2)</sup>	23.87±5.75 <sup>2)</sup>	87.41±12.15 <sup>2)</sup>
琴叶榕根干药水提取物	48	4.37±0.29	22.28±4.86 <sup>2)</sup>	98.71±24.52 <sup>2)</sup>
琴叶榕根干药 50% 乙醇提取物	48	4.47±0.48	35.25±7.02 <sup>2)</sup>	89.01±11.95 <sup>2)</sup>
琴叶榕根干药 95% 乙醇提取物	48	4.24±0.35	33.62±8.24 <sup>2)</sup>	104.47±28.59 <sup>2)</sup>

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

较,模型组 LDH,MDA 水平明显升高(P<0.05)。与模型组比较,各给药组 LDH,MDA 水平明显降低

(P<0.05)。表明急性酒精性肝损伤造模成功,琴叶榕根提取物给药组减轻了酒精引起的肝损伤,见表 2。

表 2 琴叶榕不同溶剂提取物对小鼠肝组织 LDH,MDA 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of *Ficus pandurata* different dissolvant extract on LDH and MDA levels of mice during alcohol-induce alcoholic liver injury ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LDH/U·g <sup>-1</sup>	MDA/μmol·g <sup>-1</sup>
正常	-	21.306±3.392	1.066±0.233
模型	-	41.346±4.162 <sup>1)</sup>	3.391±0.344 <sup>1)</sup>
水飞蓟宾	0.06	24.718±2.120 <sup>2)</sup>	1.172±0.266 <sup>2)</sup>
琴叶榕根鲜药水提取物	48	27.612±2.357 <sup>2)</sup>	1.431±0.226 <sup>2)</sup>
琴叶榕根干药水提取物	48	31.208±1.334 <sup>2)</sup>	1.407±0.307 <sup>2)</sup>
琴叶榕根干药 50% 乙醇提取物	48	28.442±3.909 <sup>2)</sup>	1.325±0.154 <sup>2)</sup>
琴叶榕根干药 95% 乙醇提取物	48	31.708±5.637 <sup>2)</sup>	1.680±0.255 <sup>2)</sup>

**3.3 对小鼠肝组织病理学的影响** 正常小鼠肝组织结构完整、清楚,肝索排列呈放射状,肝细胞核圆润、清晰。模型组肝细胞排列紊乱,肝组织空泡增大,肝细胞间隙不清,胞质淡染、出现水肿现象,可见坏死区。与模型组比较,给予琴叶榕根不同溶剂提取物组小鼠的肝组织病理学损伤均有不同程度减轻,其中水飞蓟宾组、琴叶榕根鲜药水提取物及琴叶榕根干药水提取物组肝细胞排列明显较紧密且整齐,肝组织空泡减少。见图 1。

**3.4 对小鼠肝组织中炎症因子 TNF-α 蛋白的影响** 检测肝组织中炎症因子 TNF-α 水平,与正常组比较,模型组 TNF-α 水平明显增高(P<0.05),与模型组比较,水飞蓟宾组与琴叶榕根干药水提取物组肝组织内 TNF-α 水平明显降低(P<0.05)。见图 2,表 3。

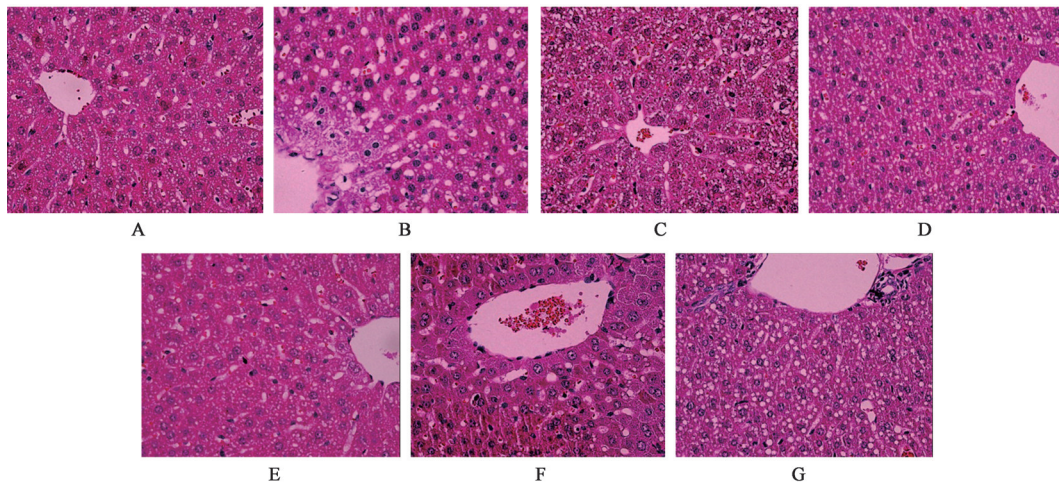
**3.5 对小鼠肝细胞 TUNEL 阳性表达的影响** 与正常组比较,模型组 TUNEL 阳性细胞显著增高;与模型组比较,而各个琴叶榕根给药组能明显抑制酒精诱导

的小鼠肝细胞 TUNEL 阳性表达增高。见图 3。

**3.6 对小鼠肝组织内焦亡通路相关蛋白的表达的影响** 与正常组比较,模型组肝组织中的 NLRP3, Caspase-1, IL-1β 蛋白表达明显升高(P<0.05);与模型组比较,水飞蓟宾组、琴叶榕根鲜药水提取物组与琴叶榕根干药水提取物组肝组织中 NLRP3, Caspase-1, IL-1β 蛋白表达量明显降低(P<0.05),琴叶榕根干药 50% 乙醇提取物组与琴叶榕根干药 95% 乙醇提取物组 NLRP3, Caspase-1, IL-1β 蛋白表达量无明显变化。见图 4,表 4。

#### 4 讨论

近年来随着酒精的消费量以及饮酒人数的比率日益增加,酒精性肝病的发病率及患病率也逐年升高,已成为危害饮酒人群健康的重要疾病。目前临床上关于酒精性肝病治疗以戒酒、营养支持为主,没有理想的药物治疗,因此有效的预防和治疗酒精性肝病,成为了学术界研究的热点<sup>[14]</sup>。本课题组发现琴叶榕在广东地区长期作为食材煲汤,具有



A. 正常组; B. 模型组; C. 水飞蓟宾组; D. 琴叶榕根鲜药水提物组; E. 琴叶榕根干药水提物组; F. 琴叶榕根干药50%乙醇提取物组; G. 琴叶榕根干药95%乙醇提取物组(图2~4同)

图1 琴叶榕不同溶剂提取物对急性酒精性肝损伤小鼠肝组织形态的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of *Ficus pandurata* different dissolvant extract on liver hispathology (HE, ×400)

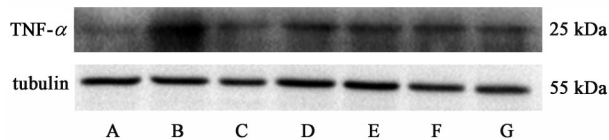


图2 小鼠肝组织中TNF-α蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of TNF-α protein expression in liver of mice

表3 琴叶榕不同溶剂提取物对急性酒精性肝损伤小鼠肝组织炎症因子TNF-α蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of *Ficus pandurata* different dissolvant extract on TNF-α levels in mice with alcoholic liver injury induce by alcohol ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF-α/tubulin
正常	-	0.697±0.064
模型	-	1.009±0.184 <sup>1)</sup>
水飞蓟宾	0.06	0.760±0.121 <sup>2)</sup>
琴叶榕根鲜药水提物	48	0.806±0.067
琴叶榕根干药水提物	48	0.749±0.156 <sup>2)</sup>
琴叶榕根干药50%乙醇提物	48	0.782±0.166
琴叶榕根干药95%乙醇提物	48	0.849±0.121

保肝、护肝、清肝火之功效。但由于琴叶榕用量及用法并不统一,入药干品鲜品皆有,且其用药剂量从30~100 g不等<sup>[8,15]</sup>。本课题组根据前期实验研究,将给药剂量统定为48 g·kg<sup>-1</sup>,对其有效提取物进行简单筛选<sup>[12]</sup>。以此为基础来探讨琴叶榕根不同提取物对于小鼠急性酒精肝损伤的作用机制。

肝细胞损伤时,肝组织内LDH上升,细胞膜通透性增高,使得血清中AST,ALT水平升高,因此血清中ALT,AST水平可作为肝损伤的检测指标<sup>[16-18]</sup>。在本实验中发现,急性酒精性肝损伤小鼠血清中

AST,ALT水平与正常组相比明显升高,表明造模成功,另外不同溶剂琴叶榕根提取物能够降低急性酒精性肝损伤小鼠血清中AST,ALT,提示不同溶剂琴叶榕根提取物可以减轻小鼠的急性酒精性肝损伤。众所周知,细胞焦亡即炎症小体控制促炎因子的成熟和分泌,依赖于Caspase-1,并伴随着大量炎症因子IL-1β,IL-18的释放,从而导致炎症细胞死亡的一种新的死亡方式<sup>[19]</sup>。其表现为细胞膜破裂,细胞内容物释放以及Caspase-1作用于骨架蛋白DNA导致形态学表现为TUNEL阳性<sup>[20-21]</sup>。在本研究中,TUNEL染色结果表明琴叶榕根各个提取物能够不同程度的抑制模型小鼠肝细胞TUNEL染色阳性的增多。同时,对于急性酒精性肝病患者的临床研究发现患者肝脏中的Caspase-1,NLRP3蛋白表达水平明显升高<sup>[22]</sup>,且与正常人比较炎症因子IL-1β水平显著升高<sup>[23]</sup>,此外还有研究表明,NLRP3炎症小体参与酒精诱导的肝细胞死亡<sup>[24]</sup>。这些提示细胞焦亡可能是酒精性肝病发生和发展的关键机制<sup>[25]</sup>。在本实验中,不但发现琴叶榕根鲜药水提物与琴叶榕根干药水提取物能够有效的抑制急性酒精性肝损伤模型小鼠NLRP3,Caspase-1和IL-1β的表达升高,而且琴叶榕根各个提取物也能降低模型小鼠TNF-α含量的升高。以上这些实验结果提示,琴叶榕根不同溶剂提取物对急性酒精性肝损伤有保护作用,其中水提物可能是通过抑制肝细胞焦亡途径从而减轻过量摄入酒精引起的急性酒精性肝损伤。

综上所述,本实验首次证实了,琴叶榕根不同溶剂提取物对小鼠的急性酒精性肝损伤具有不同

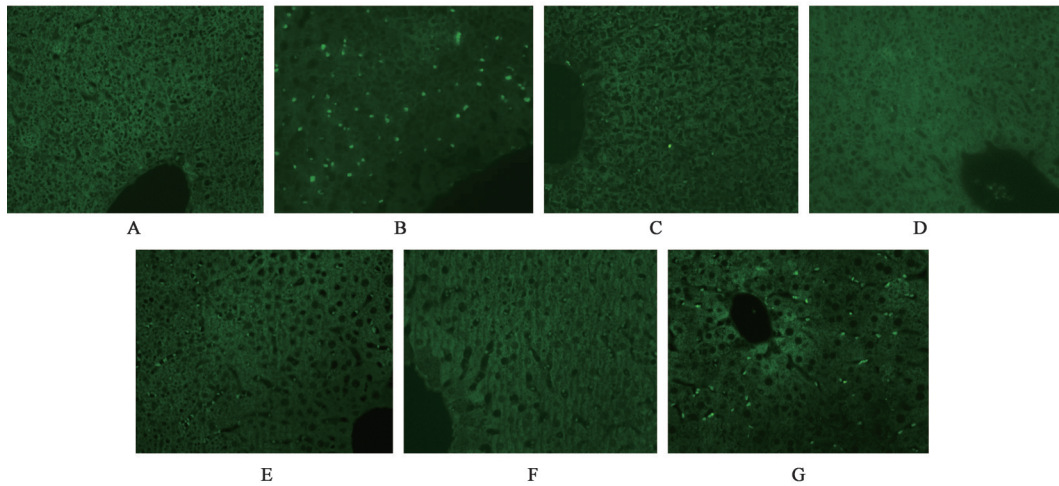


图3 琴叶榕不同溶剂提取物对急性酒精性肝损伤小鼠肝细胞TUNEL阳性表达的影响(TUNEL,×400)

Fig. 3 Effect of *Ficus pandurata* different dissolvant extract on TUNEL positive expression in liver of alcohol-treated mice (TUNEL,×400)

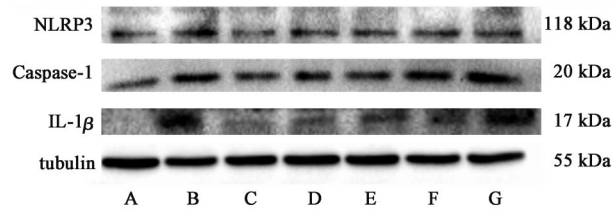


图4 小鼠肝组织中Caspase-1,NLRP3和IL-1β蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of protein expression of NLRP3,Caspase-1 and IL-1β in liver of mice

程度的保护作用,其中以水提物效果为佳。同时也进一步发现琴叶榕根水提物对急性酒精性肝损伤的保护作用可能与抑制细胞焦亡通路有关。这些研究结果为琴叶榕的进一步研究开发利用提供了重要的参考。鉴于本次研究发现同等剂量下,琴叶榕根鲜干药水提物同样有效,但关于鲜药水提物与干药水提物两者在药效物质基础及其作用机制区别,本课题组将于下一步实验中进行研究。

表4 琴叶榕不同溶剂提取物对急性酒精性肝损伤小鼠肝组织中NLRP3,Caspase-1和IL-1β蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of *Ficus pandurata* different dissolvant extract on NLRP3,Caspase-1 and IL-1β protein expression in liver of alcohol-treated mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	NLRP3/tubulin	Caspase-1/tubulin	IL-1β/tubulin
正常	-	0.578±0.030	0.500±0.039	0.645±0.113
模型	-	0.861±0.077 <sup>1)</sup>	0.667±0.034 <sup>1)</sup>	1.142±0.026 <sup>1)</sup>
水飞蓟宾	0.06	0.599±0.065 <sup>2)</sup>	0.471±0.064 <sup>2)</sup>	0.643±0.162 <sup>2)</sup>
琴叶榕根鲜药水提物	48	0.576±0.020 <sup>2)</sup>	0.448±0.031 <sup>2)</sup>	0.828±0.494 <sup>2)</sup>
琴叶榕根干药水提物	48	0.616±0.010 <sup>2)</sup>	0.486±0.052 <sup>2)</sup>	0.803±0.065 <sup>2)</sup>
琴叶榕根干药50%乙醇提物	48	0.799±0.413	0.631±0.127	0.958±0.123
琴叶榕根干药95%乙醇提物	48	0.801±0.076	0.613±0.092	1.228±0.269

[参考文献]

[1] 李海龙,周勇,薛照芸,等. 肝久安片对乙醇致肝损伤的保护作用研究[J]. 中药材,2019,42(4):912-915.  
[2] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病防治指南(2018更新版)[J]. 现代医药卫生,2018,34(6):959-964.  
[3] TANG Y L, XIANG X J, WANG X Y, et al. Alcohol and alcohol-related harm in China: policy changes needed[J]. Bull World Health Organ, 2013, 91(4): 270-276.

[4] 庞树朝,郭卉. 中医药治疗酒精性肝病研究述评[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(1):140-142.  
[5] 黄思远,顾健,谭睿,等. 藏药波棱瓜子总木脂素对大鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用及机制探讨[J]. 中药材,2018,41(2):432-436.  
[6] 农汝楠,王竞静,吴燕春,等. 基于TLR4信号通路的中药抗肝脏疾病作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(16):201-212.  
[7] 孙福荣,王炳元. 细胞焦亡在酒精性肝病中的研究进展[J]. 肝脏,2018,23(10):856-857.

- [8] 龚鹤鸣. 江西民间草药验方[M]. 南昌:江西人民出版社,1963:130-132.
- [9] 李青松,黄志勤,王瑞琦,等. 琴叶榕根水提取液对大鼠血清 SOD、MDA 的影响[J]. 赣南医学院学报, 2004,24(3):237-239.
- [10] 陆阳存,彭伟文. 琴叶榕的品种考证及现代研究进展[J]. 亚太传统医药,2018,14(10):84-87.
- [11] 彭伟文,欧阳小健,戴卫波,等. 琴叶榕的生药学研究[J]. 中药材,2018,41(11):2542-2545.
- [12] 陆阳存,彭伟文,高玉桥,等. 琴叶榕对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用与机制研究[J]. 中药材,2019,42(10):2422-2426.
- [13] 南瑛,张薇,常晋瑞,等. 绞股蓝皂苷通过 Nrf2/NF- $\kappa$ B 信号通路发挥抗小鼠急性酒精性肝损伤作用[J]. 中国药理学通报,2019,35(1):40-45.
- [14] FUSTER D, SAMET J H. Alcohol use in patients with chronic liver disease[J]. *New Engl J Med*, 2018, 379(13):1251-1261.
- [15] 郑小吉,饶军,林伟波. 岭南中草药图谱[M]. 北京:中国医药科技出版社,2016:29-30.
- [16] 雷玮,王丹丹,葛广波,等. 肝损伤血清标志物研究进展[J]. 实用肝脏病杂志,2017,20(2):252-256.
- [17] 朱平生,焦炎杰,付双楠,等. 酒精致大鼠肝损伤早期血清生物标志物水平的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(2):129-133.
- [18] 肖日传,罗光明,董丽华,等. 基于黄疸模型的栀子根与栀子果实保肝作用探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(7):101-107.
- [19] MULVIHILL E, SBORGI L, MARI S A, et al. Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D[J]. *EMBO J*, 2018, 37(14):1-17.
- [20] 潘少容,曾克武,白云. 细胞焦亡研究进展[J]. 生理科学进展,2019,50(2):135-140.
- [21] VANDE W L, LAMKANFI M. Pyroptosis [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(13):568-572.
- [22] PENG Y, FRENCH B A, TILLMAN B, et al. The inflammasome in alcoholic hepatitis: its relationship with Mallory-Denk body formation [J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97(2):305-313.
- [23] GAO B, BATALLER R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5):1572-1585.
- [24] XIAO J, ZHU Y, LIU Y, et al. Lycium barbarum polysaccharide attenuates alcoholic cellular injury through TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 69:73-78
- [25] 孔德龙,崔洁. NLRP3 炎症小体在肝疾病中的作用[J]. 中国比较医学杂志,2018,28(8):129-134.

[责任编辑 孙丛丛]