

老鹳草素对 *D*-氨基半乳糖诱导的肝损伤小鼠的保护作用及机制

李家妮¹, 李梓萌¹, 高雅¹, 钟明利¹, 曹秋妍¹, 郭丹¹, 张可锋^{1,2*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 甘肃中医药大学, 兰州 730000)

[摘要] 目的:研究老鹳草素对 *D*-氨基半乳糖 (*D*-GalN)致急性肝损伤小鼠的保护作用及机制。方法:60只小鼠随机分为正常组,模型组,水飞蓟素组(180 mg·kg⁻¹),老鹳草素低,中,高剂量组(50,100,200 mg·kg⁻¹),灌胃给药每天1次,正常组及模型组小鼠灌胃生理盐水连续10 d。末次给药2 h后,除正常组外,其余各组腹腔注射 *D*-GalN(500 mg·kg⁻¹),建立 *D*-GalN致小鼠急性肝损伤模型。16 h后,收集血清和肝组织。生化法测定血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(TBIL)和肝脏中丙二醛(MDA),总超氧化物歧化酶(T-SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性或含量;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-6(IL-6)和 γ -干扰素(IFN- γ)含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)分析肝组织中Toll样受体-4(TLR-4)和核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达情况;苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理学变化。结果:与正常组比较,模型组小鼠血清中ALT,AST,ALP,TBIL和肝脏MDA水平显著升高($P < 0.01$),与模型组比较,老鹳草素各给药组能够明显降低肝损伤小鼠血清中ALT,AST,ALP,TBIL和肝脏MDA水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),且增强肝脏T-SOD和GSH-Px活性($P < 0.05$, $P < 0.01$),同时抑制血清中TNF- α ,IL-1 β ,IL-6和IFN- γ 含量的升高和TLR-4,NF- κ B的蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$);HE染色结果显示其对肝组织损伤程度有明显改善作用。结论:综上所述,老鹳草素对 *D*-GalN诱导的急性肝损伤小鼠具有显著的保护作用,其保肝作用机制可能与抑制氧化应激、炎症反应以及TLR-4/NF- κ B信号通路有关。

[关键词] 老鹳草素;急性肝损伤;氧化应激;炎症反应;Toll样受体4-(TLR-4)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0116-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191403

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190408.0924.001.html>

[网络出版时间] 2019-04-08 13:39

Protective Effect and Mechanisms of Geraniin on *D*-galactosamine-induced Liver Injury in Mice

LI Jia-ni¹, LI Zi-meng¹, GAO Ya¹, ZHONG Ming-li¹, CAO Qiu-yan¹, GUO Dan¹, ZHANG Ke-feng^{1,2*}

(1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the hepatoprotective effect and its mechanism of the geraniin on mice with acute liver injury induced by *D*-galactosamine (*D*-GalN). **Method:** A total of 60 Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, Silymarin group (positive group 180 mg·kg⁻¹), and low, medium and high-dose geraniin groups (50, 100, 200 mg·kg⁻¹). All the mice were given with saline or corresponding dose of drugs (10 mL·kg⁻¹) by gavage once a day for 10 d. After 2 h of the last administration,

[收稿日期] 20181224(008)

[基金项目] 广西八桂学者专项(2017143)

[第一作者] 李家妮,在读硕士,从事肝病药理学研究,Tel:0773-2303431,E-mail:2764789272@qq.com

[通信作者] *张可锋,博士,副教授,硕士生导师,从事生药质量和保肝药物筛选研究,E-mail:xueshengcailiao@163.com

except the normal group, the mice of other groups were injected intraperitoneally with D-GalN ($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) to induce the acute liver injury. After 16 h, the eye balls of mice were removed to take blood, and all mice were put to death to collect samples of liver. Activity or content of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TBIL), malondialdehyde (MDA), total superoxide dismutase (T-SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver were determined by biochemical method. The serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β), γ -interferon (IFN- γ) and interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and expressions of Toll-like receptor-4 (TLR-4) and nuclear factor (NF) - κ B proteins were detected by Western blot. Liver histopathological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Result:** Compared with the normal group, the serum levels of ALT, AST, ALP, TBIL and liver MDA in the model group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, geraniin can reduce activities or contents of ALT, AST, ALP, TBIL in serum and MDA in liver of mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but increase activities of T-SOD and GSH-Px in liver ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while inhibiting the contents of TNF- α , IL- 1β , IL-6, IFN- γ and the expressions of TLR-4 and NF- κ B proteins in serum ($P < 0.05$, $P < 0.01$). HE staining showed that acute liver injury of mice was alleviated obviously by geraniin. **Conclusion:** Geraniin has an obvious protective effective on acute liver injuries induced by D-GalN in mice. Its mechanism may be correlated with oxidative stress, inflammation and TLR-4/NF- κ B signaling pathway.

[**Key words**] geraniin; acute liver injury; oxidative stress; inflammatory response; Toll-like receptor-4 (TLR-4) /nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathway

肝脏除了作为解毒和新陈代谢的重要场所,还能够再生和修复肝细胞,并且参与调节多种生理功能^[1]。肝脏功能很强大,但也容易被某些化学因素如 D-氨基半乳糖(D-GalN),乙醇和对乙酰氨基酚损伤,导致细胞坏死,影响肝脏功能的正常运作,最终威胁人体生命健康^[2]。

老鹳草素是一种黄色结晶状多酚类化合物,其化学式是 $\text{C}_{41}\text{H}_{28}\text{O}_{27}$, 相对分子质量为 952.64, 易溶于水 and 极性大的有机溶剂如甲醇、乙醇等^[3]。该化合物存在于老鹳草、叶下珠、睡莲花等多种药用植物中^[4]。老鹳草属于牻牛儿苗科,其品种繁多,共有老鹳草属植物 55 种,分布广泛^[5]。大戟科植物叶下珠存在于我国众多省区如河北、山西、陕西、华东、华中、华南、西南等^[6]。睡莲花为睡莲科多年生水生草本植物,主产于新疆南部^[7]。研究表明老鹳草素具有抗氧化、抗炎、抗病毒、抗菌、抗肿瘤等多种生物活性,能够清除自由基,且可抑制氧化应激水平^[3-8]。因老鹳草素有抗炎、抗氧化、抗菌等多种药理作用,所以其运用于制药、食品营养和化妆品等方面有潜在的可能性^[9]。除此之外,老鹳草素具有保肝作用^[10-11],但具体机制尚未深入研究。本研究采用 D-GalN 诱导小鼠急性肝损伤模型,研究老鹳草素保肝作用机制,为老鹳草素在保肝作用方面的进一步研究提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种雄性小鼠 60 只,体质量 18 ~ 22 g, 4 周龄,由桂林医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(桂)2010-0001,伦理委员会编号 2017-018。饲养室温度控制为 18 ~ 22 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 50% ~ 60%。

1.2 药物与试剂 老鹳草素(上海源叶生物科技有限公司,批号 P11A8F33736);水飞蓟素(大连美仑生物技术有限公司,批号 MB5982);D-GalN(玛雅试剂有限公司,批号 831361);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(TBIL),总超氧化物歧化酶(T-SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170508, 20170424, 20170415, 20170525, 20170607, 20170519, 20170622);RIPA 裂解液,BCA 试剂盒和 SDS-PAGE 缓冲液(碧云天生物技术研究,批号分别为 p0008, p0012, 20170722);肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素- 1β (IL- 1β),白细胞介素-6(IL-6)和 γ -干扰素(IFN- γ)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170611, 20170426, 20170819, 20170713);Toll 样受体-4(TLR-4)和核转录因子- κ B(NF- κ B)抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab72506,

ab59374); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(傲锐东源生物科技有限公司,批号 6007-1-Ig);二甲苯,无水乙醇,95%乙醇(广东汕头市西陇化工厂,批号分别为 B20170612,20170911,20171022);苏木素,伊红染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 150325,2014307)。

1.3 仪器 Epoch 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), LGJ-12 型冻干机(北京松原华兴科技发展有限公司), TGL-16K 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机厂), THZ-C-1 型台式恒温振荡器(太仓市实验设备厂), 1658000 型电泳仪和 4530 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司), Fluor Chem M 型凝胶成像系统(美国 PS 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 将 60 只小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别是正常组,模型组,水飞蓟素组(阳性药组,180 mg·kg⁻¹),老鹳草素低、中、高剂量组(50,100,200 mg·kg⁻¹)^[12],正常组和模型组每天灌胃 10 mL·kg⁻¹的生理盐水,剩余各组以同种方式和体积给与相应剂量的老鹳草素,每天 1 次,持续 10 d。除了正常组,末次给药 2 h 后各给药组和模型组腹腔注射 *D*-GalN(500 mg·kg⁻¹)建立小鼠急性肝损伤模型^[13],禁食不禁水 16 h 后,眼眶取血,于 4℃,4 500 r·min⁻¹离心 15 min 取上清液,于 -20℃ 冰箱保存。取材时选取最大的一片肝脏剪下一部分肝组织,置于 4% 多聚甲醛中固定,保持组织结构完整,准备制作病理切片。将剩余部位肝组织保存于液氮中,用于检测 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白的表达情况。

2.2 生化指标检测 按照试剂盒说明书操作,配制工作液和样品,气浴后放入酶标仪中检测,设置指定波长测得吸光度 *A* 并按照相关公式计算血清中存在的肝脏指标 ALT,AST,ALP,TBIL 和肝脏 T-SOD,MDA 和 GSH-Px 含量或活性。

2.3 ELISA 检测血清 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IFN- γ 含量 将剪碎的肝组织和 9 倍肝质量体积的生理盐水置于研磨器中,充分研磨,得到 10% 的肝组织匀浆,经过处理得到上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书严格操作,检测并计算血清 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IFN- γ 含量。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白表达 制备 10% 聚丙烯酰胺凝胶,80 V 恒压电泳分离肝总蛋白,冰浴条件下 220 mA 恒流转 PVDF 膜,用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,封闭液封闭 2 h,洗涤同上,加入一抗(1:500),4℃ 孵育过夜,洗涤同上,加入二抗(1:5 000)室温孵育 1.5 h,洗涤同上,配制显影液,显影,得到 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白条带。采用 Image J 软件进行灰度值分析。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理学变化 肝组织浸泡于 4% 多聚甲醛溶液室温固定 24 h 后,按照标准步骤脱水,包埋,切片 3 μ m,烤片,HE 染色、树胶封片等,光学显微镜下观察肝组织正常组、模型组和给药组之间病理学变化。

2.6 统计学处理 所有数据均在 Graph Pad Prism 5 软件进行统计,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验首先采用单因素方差分析,然后使用事后多重比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠血清 ALT,AST,ALP 和 TBIL 的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著升高,ALP 和 TBIL 含量均显著增加($P < 0.01$),表明小鼠急性肝损伤成功建模;与模型组比较,水飞蓟素组可显著降低 ALT,AST 活性和 ALP 和 TBIL 含量($P < 0.01$),老鹳草素低剂量组可降低血清 AST 活性和 TBIL 含量($P < 0.05$),对 ALT 活性和 ALP 含量无明显改变,老鹳草素中剂量组和老鹳草素高剂量组均可显著降低 ALT,AST 活性和 ALP,TBIL 含量($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 老鹳草素对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠血清 ALT,AST,ALP 和 TBIL 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of geraniin on serum ALT, AST, ALP and TBIL in mice with acute liver injury induced by *D*-GalN($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	TBIL/ μ mol·L ⁻¹
正常	-	23.55 \pm 5.37	39.76 \pm 6.08	19.42 \pm 2.61	1.26 \pm 0.26
模型	-	87.26 \pm 12.29 ¹⁾	133.37 \pm 23.59 ¹⁾	58.36 \pm 7.09 ¹⁾	3.75 \pm 0.43 ¹⁾
水飞蓟素	180	64.36 \pm 7.03 ³⁾	93.65 \pm 14.38 ³⁾	35.19 \pm 4.22 ³⁾	2.65 \pm 0.31 ³⁾
老鹳草素	50	90.12 \pm 12.16	114.29 \pm 13.23 ²⁾	54.18 \pm 6.04	3.08 \pm 0.36 ²⁾
	100	70.24 \pm 8.95 ³⁾	96.32 \pm 12.72 ³⁾	43.15 \pm 5.27 ³⁾	2.17 \pm 0.28 ³⁾
	200	58.20 \pm 8.37 ³⁾	70.19 \pm 8.37 ³⁾	36.21 \pm 4.68 ³⁾	1.85 \pm 0.27 ³⁾

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

3.2 对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠肝脏 T-SOD, GSH-Px 和 MDA 的影响 与正常组比较,模型组 T-SOD 和 GSH-Px 活性均显著下降 ($P < 0.01$),而 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,水飞蓟素组可显著增强 T-SOD 和 GSH-Px 活性 ($P <$

0.01),且显著降低 MDA 含量 ($P < 0.01$),老鹤草素低剂量组明显升高 T-SOD, GSH-Px 活性 ($P < 0.05$),对 MDA 含量无差异,老鹤草素中剂量组和老鹤草素高剂量组可显著增强 T-SOD 和 GSH-Px 活性 ($P < 0.01$),且显著降低 MDA 含量 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 老鹤草素对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠肝脏 T-SOD, GSH-Px 和 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Geraniin on liver T-SOD, GSH-Px and MDA in mice with acute liver injury induced by *D*-GalN ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	T-SOD/U·mg ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹
正常	-	65.28 ± 8.51	163.24 ± 24.00	0.68 ± 0.05
模型	-	34.16 ± 4.25 ¹⁾	96.34 ± 11.56 ¹⁾	2.16 ± 0.29 ¹⁾
水飞蓟素	180	59.38 ± 7.26 ³⁾	135.62 ± 16.28 ³⁾	1.37 ± 0.19 ³⁾
老鹤草素	50	43.11 ± 4.98 ²⁾	116.37 ± 13.52 ²⁾	2.06 ± 0.25
	100	54.17 ± 6.25 ³⁾	139.67 ± 16.39 ³⁾	1.68 ± 0.16 ³⁾
	200	63.17 ± 7.09 ³⁾	158.42 ± 18.42 ³⁾	1.21 ± 0.11 ³⁾

3.3 对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠血清 TNF-α, IL-1β, IL-6 和 IFN-γ 的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 TNF-α, IL-1β, IL-6 和 IFN-γ 含量均显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,水飞蓟素组可显著降低

TNF-α, IL-1β, IL-6 和 IFN-γ 水平 ($P < 0.01$),老鹤草素低剂量组明显降低 IL-1β 含量 ($P < 0.05$),老鹤草素高剂量组可显著降低 TNF-α, IL-1β, IL-6 和 IFN-γ 水平 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 老鹤草素对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠血清 TNF-α, IL-1β, IL-6 和 IFN-γ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of geraniin on serum TNF-α, IL-1β, IL-6 and IFN-γ in mice with acute liver injury induced by *D*-GalN ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF-α/μg·L ⁻¹	IL-1β/ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	IFN-γ/ng·L ⁻¹
正常	-	153.49 ± 20.16	126.38 ± 15.54	83.24 ± 11.65	72.16 ± 9.60
模型	-	365.45 ± 46.28 ¹⁾	364.49 ± 46.18 ¹⁾	194.01 ± 25.19 ¹⁾	216.33 ± 24.39 ¹⁾
水飞蓟素	180	286.14 ± 32.16 ³⁾	263.08 ± 30.53 ³⁾	163.47 ± 18.32 ³⁾	199.34 ± 26.61
老鹤草素	50	348.57 ± 38.16	318.62 ± 34.12 ²⁾	203.45 ± 26.39	206.31 ± 22.09
	100	306.42 ± 33.27 ³⁾	271.34 ± 33.59 ³⁾	173.14 ± 15.22	184.51 ± 21.82 ³⁾
	200	259.34 ± 27.47 ³⁾	218.45 ± 23.37 ³⁾	146.57 ± 16.23 ³⁾	154.73 ± 18.45 ³⁾

3.4 对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠 TLR-4/NF-κB 信号通路的影响 与正常组比较,模型组肝组织中 TLR-4 和 NF-κB 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,水飞蓟素组和老鹤草素组均可显著抑制 TLR-4/NF-κB 蛋白相对表达 ($P < 0.01$)。见图 1 和表 4。

3.5 对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠肝组织病理形态的影响 HE 染色肝组织,正常组小鼠肝小叶结构形态正常,表面光滑,肝索呈放射状,汇管区以及中央静脉周围未见炎性细胞浸润、细胞坏死等病理变化。模型组小鼠肝索结构消失,汇管区及中央静脉周围均出现明显炎性细胞浸润,肝细胞大部分出现空泡,细胞结构被严重破坏且坏死等情况,该结果提示 *D*-GalN 可引起小鼠肝组织损伤,表明造模成功。

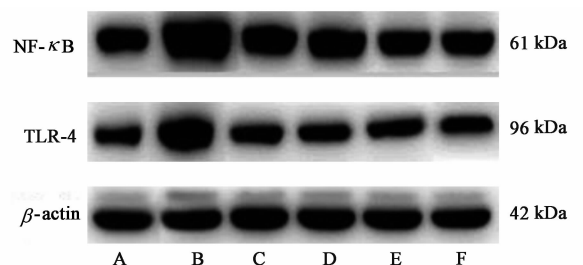


图 1 小鼠 TLR-4 和 NF-κB 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of expression of TLR-4 and NF-κB in mice

与模型组比较,水飞蓟素组肝细胞结构基本完整,恢复光滑,明显降低小鼠肝损伤程度;老鹤草素低剂量组相对模型组来说,肝组织受损程度稍微降低;老鹤

表 4 老鹤草素对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠肝组织 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of geraniin on TLR-4 and NF- κ B protein in liver tissue of mice with acute liver injury induced by *D*-GalN ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TLR-4/ β -actin	NF- κ B/ β -actin
正常	-	0.48 ± 0.08	0.79 ± 0.11
模型	-	1.23 ± 0.14 ¹⁾	1.67 ± 0.23 ¹⁾
水飞蓟素	180	0.61 ± 0.08 ³⁾	0.90 ± 0.16 ³⁾
老鹤草素	50	0.75 ± 0.11 ³⁾	1.21 ± 0.15 ³⁾
	100	0.68 ± 0.08 ³⁾	0.96 ± 0.13 ³⁾
	200	0.66 ± 0.07 ³⁾	0.89 ± 0.12 ³⁾

草素中剂量组肝细胞结构基本完整,但肝细胞索结构不清晰,说明老鹤草素对肝有一定的保护作用;老鹤草素高剂量组肝小叶和肝细胞索结构基本完整,炎症细胞浸润和细胞坏死未明显增加,表明老鹤草素对肝损伤有显著改善作用。见图 2。

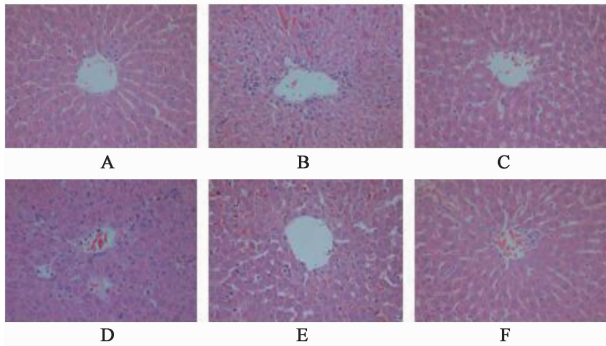


图 2 老鹤草素对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠肝组织病理形态的影响 (HE, $\times 200$)

Fig 2 Effect of geraniin on pathological morphology of liver tissue in mice with acute liver injury induced by *D*-GalN (HE, $\times 200$)

4 讨论

D-GalN 建立的急性肝损伤动物模型,其造成的肝细胞弥漫性坏死及炎症反应与人类病毒性肝炎极为相似,故常被应用于保肝药物的筛选以及作用机理的研究^[14]。因此,本研究使用 *D*-GalN 建立小鼠急性肝损伤模型,从氧化应激和炎症反应两方面探讨老鹤草素的保肝作用及作用机制。

当肝脏受损或发生炎症时,肝细胞膜通透性增加,主要存在于线粒体中的 ALT,AST 通过细胞膜进入血液循环,是反映急性肝损伤程度的敏感指标^[15-16]。当肝脏发生坏死、炎症反应等时 ALP, TBIL 均显著升高, TBIL 增高会引起黄疸,因而 ALP, TBIL 也是临床诊断中判断肝损伤的主要依据^[17]。本实验切片检查结果显示,预防性给与老鹤草素对

D-GalN 诱发的小鼠肝组织损伤有良好的缓解效果。检测血清发现 ALT,AST,ALP 和 TBIL 水平均显著下降。以上提示,老鹤草素能明显改善 *D*-GalN 引起的小鼠急性肝损伤。

D-GalN 作为肝细胞磷酸尿嘧啶核苷的干扰剂,一方面可与肝细胞内尿苷二磷酸结合并生成尿苷二磷酸-半乳糖胺复合物,使尿嘧啶核苷代谢异常,阻碍肝细胞内相应核酸与蛋白质的合成,导致肝细胞膜异常破损并生成大量脂质过氧化产物 MDA,其继续破坏细胞膜结构,加重细胞膜和细胞功能损伤^[18]。另一方面 *D*-GalN 可降低抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性,破坏机体产生与清除自由基的动态平衡,上调机体氧化应激水平,造成肝细胞损伤加重^[14]。*D*-GalN 还会使细胞外 Ca²⁺ 大量内流,打破胞内钙稳态,引起代谢紊乱,导致细胞变性、坏死^[19]。通过检测血清中 MDA, T-SOD 和 GSH-Px 含量,发现 MDA 含量显著下降。这表明,老鹤草素能够保护肝细胞膜,并增强 T-SOD 和 GSH-Px 活性,提示其抑制氧化应激水平而保护肝细胞。

TLR-4 在 Toll 样受体家族 (TLRs) 中有着重要的地位,广泛存在于多种肝细胞,如库普弗细胞、肝巨噬细胞、肝中性粒细胞等^[20],其介导的药物信号通路在感染、炎症和免疫等方面发挥重要作用,可导致细胞因子如 IL-6, TNF- α , IFN- γ 等的释放,从而放大其生物学效应加剧肝损伤^[21]。当肝组织受损并发生炎症时,TLR-4, 细胞因子等激活 NF- κ B 转移至胞核后可增加 IL-6, IL-1 β , TNF- α 等炎症细胞因子释放,表达过量的炎症细胞因子又可正反馈作用于该通路,引发炎症级联反应,继而加重肝组织的损伤^[22-25]。本实验病理切片显示,模型组肝组织出现明显炎症细胞浸润等病理变化。检测肝脏炎症相关因子发现,模型组小鼠肝组织 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白含量显著上升,提示该炎症信号通路被激活,并且细胞因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 等水平升高,反映了小鼠肝脏损伤情况。同时,在给与治疗药物老鹤草素的小鼠肝组织中检测到 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白含量显著下降。研究结果表明,老鹤草素可能通过抑制炎症细胞浸润,使 TLR-4 和 NF- κ B 蛋白表达减少,即阻断 TLR-4/NF- κ B 信号通路,继而下调 TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 IFN- γ 水平,从而达到保护小鼠肝脏的作用。

综上所述,老鹤草素对 *D*-GalN 建模的急性肝损伤小鼠具有良好保护作用,其作用机制可能涉及抑制氧化应激和炎症反应,并且可能与调控 TLR-4/

NF- κ B 炎症信号通路相关,但具体分子调控机制有待深入研究。

[参考文献]

[1] 赵欣,李贵节,胡园园,等.苦丁茶多酚提取物对四氯化碳诱导小鼠肝损伤的改善作用及机制研究[J].食品工业科技,2018,39(4):289-295.

[2] 屠梦珏,魏进歌,陈鑫,等.二氢杨梅素对 APAP 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2018,34(12):1707-1712.

[3] 李倩,买吾拉江·阿不都热衣木,徐芳,等.老鹳草素药理研究进展[J].中国中医药信息杂志,2016,23(8):125-128.

[4] LU C,GAO S,XU G. Geraniin inhibits TNF- α -induced impairments of osteogenesis through NF- κ B and p38 MAPK signalling pathways in bone marrow stem cells [J]. Stroke Vasc Neurol,2017,2(2):47-52.

[5] 谷静逸,尹海波,赵容,等.辽宁省5种老鹳草中5种活性成分的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(6):26-29.

[6] 赵露琴,张露元,杨永红.叶下珠多酚部位提取工艺研究[J].中药材,2017,40(11):2654-2656.

[7] 马俊飞,张石蕾,吕梅霞,等.睡莲花烟花苷对半乳糖胺致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].癌变·畸变·突变,2017,29(5):370-373,378.

[8] WANG Y,WAN D,ZHOU R, et al. Geraniin inhibits migration and invasion of human osteosarcoma cancer cells through regulation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways[J]. Anticancer Drugs,2017,28(9):959-966.

[9] 罗燕平,戚微岩,吴小东.老鹳草素的研究进展[J].药物生物技术,2016,23(3):279-282.

[10] Londhe J S,Devasagayam T P, Foo L Y, et al. Geraniin and amarillin, ellagitannins from *Phyllanthus amarus*, protect liver cells against ethanol induced cytotoxicity [J]. Fitoterapia,2012,83(8):1562-1568.

[11] 杜晓鸣,郭永洵.老鹳草素(Geraniin)及其抗氧化作用[J].国外医药:植物药分册,1990,5(2):57-62,69.

[12] 张帆,任真,高雅,等.基于TLR-4/NF- κ B信号通路研究老鹳草素对四氯化碳致肝损伤小鼠的保肝作用[J].中药材,2018,41(12):2654-2658.

[13] 陈春,陈毅飞,曹后康,等.酢浆草对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(16):141-145.

[14] 黄思茂,许琼梅,王欢,等.火炭母总黄酮对D-氨基半乳糖诱导的肝损伤小鼠的保护作用及其机制[J].中药药理与临床,2018,34(2):32-35.

[15] 吴甜,刘宪,闵剑斌,等.二至丸煎剂及配4方颗粒对小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中药新药与临床药理,2018,29(3):277-281.

[16] 赵海梅,周步高,王馨,等.二至丸预防和治疗性给药对大鼠损伤后肝细胞再生障碍的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(16):128-132.

[17] Elhosseiny L S,Alqurashy N N,Sheweita S A. Oxidative stress alleviation by sage essential oil in co-amoxiclav induced hepatotoxicity in rats [J]. Int J Biomed Sci, 2016,12(2):71-78.

[18] Hishinuma I,Nagakawa J,Hirota K, et al. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in development of hepatic injury in galactosamine-sensitized mice [J]. Hepatology, 1990,12(5):1187-1191.

[19] Anne C, Mireille B, Elizabeth B, et al. Inflammatory cas1990cades driven by tumor necrosis factor-alpha play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications [J]. PLoS One, 2012,7(11):e49670.

[20] LI X, WU Y, ZHANG W, et al. Pre-conditioning with tanshinone II_A attenuates the ischemia/reperfusion injury caused by liver grafts via regulation of HMGB1 in rat Kupffer cells [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 1392-1400.

[21] ZHANG K F, GAO Y, ZHONG M L, et al. Hepatoprotective effects of *Dicliptera chinensis* polysaccharides on dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis rats and its underlying mechanism [J]. Ethnopharmacol, 2016, 179:38-44.

[22] Elshitany N A, Eid B. Proanthocyanidin protects against cisplatin-induced oxidative liver damage through inhibition of inflammation and NF- κ B/TLR-4 pathway [J]. Environ Toxicol, 2017, 32(7):1952-1963.

[23] 高雅,王刚,杜沛霖,等.白马骨水提物对急性肝损伤小鼠氧化应激及炎症反应的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(21):135-140.

[24] JIANG M P, XU C, GUO Y W, et al. β -arrestin 2 attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury via inhibition of TLR4/NF- κ B signaling pathway-mediated inflammation in mice [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(2):216-225.

[25] 吴庆,曹文富,张永越,等.益气化痰化痰法制剂对CCl₄所致肝纤维化大鼠肝组织KLF15、NF- κ B及下游炎症因子的影响[J].中药新药与临床药理,2018,29(5):557-563.

[责任编辑 周冰冰]