

复方狗肝菜汤对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用及机制

庞小华, 韦日明, 林世源, 管玉满, 高雅, 张可锋*
(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] **目的:**探究复方狗肝菜汤(FGD)对四氯化碳(CCl_4)致急性肝损伤大鼠的保护作用,及其相关的作用机制。**方法:**将60只大鼠随机分为正常组,模型组,水飞蓟素($120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和FGD($475, 950, 1\ 900 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组。正常组和模型组给予等体积生理盐水,其余各组按剂量连续灌胃给药10 d,末次用药2 h后,用12%的 CCl_4 花生油溶液腹腔注射($5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)建立急性肝损伤模型,收集血清和肝脏组织。生化法检测血清中天门冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(TBIL),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测肝组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-6(IL-6)的含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏组织中核转录因子- κ B(NF- κ B)与过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)的蛋白表达;苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理学改变。**结果:**与正常组比较,模型组血清中AST,ALT,ALP活性与TBIL,MDA含量显著升高($P < 0.01$),肝组织中IL-1 β ,IL-6和TNF- α 含量明显升高($P < 0.01$),血清中SOD,GSH-Px活性明显降低($P < 0.01$),肝组织中NF- κ B表达明显上调($P < 0.01$),PPAR- γ 表达明显下调($P < 0.01$),表明急性肝损伤模型建立成功;与模型组比较,FGD可降低血清中AST,ALT,ALP活性与TBIL,MDA含量($P < 0.05, P < 0.01$),并减少肝组织中IL-1 β ,IL-6和TNF- α 含量($P < 0.05, P < 0.01$),且下调NF- κ B表达($P < 0.05, P < 0.01$),但可增强SOD,GSH-Px活性与PPAR- γ 表达($P < 0.05, P < 0.01$);镜下观察显示肝组织病变得到不同程度改善。**结论:**FGD对 CCl_4 致急性肝损伤大鼠有保护作用,其机制可能与抗炎、抗氧化和调节PPAR- γ 和NF- κ B信号通路有关。

[关键词] 复方狗肝菜汤;急性肝损伤;核转录因子- κ B(NF- κ B);过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ);抗炎;抗氧化

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0058-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191103

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190218.1037.004.html>

[网络出版时间] 2019-02-19 10:28

Protective Effect of Formula of Gougancat Decoction on Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Rats

PANG Xiao-hua, WEI Ri-ming, LIN Shi-yuan, GUAN Yu-man, GAO Ya, ZHANG Ke-feng*
(Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect of formula of Gougancat decoction (FGD) on acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl_4) in rats, in order to provide basis for the development of pharmaceutical preparations or healthcare products. **Method:** Sixty rats were randomly divided into normal group, Silymarin group ($120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and FGD groups ($475, 950, 1\ 900 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The normal group and the model group were given equal volume of saline by gavage, while the other groups were administered with the corresponding dose of drugs according to the body weight. After 10 days, the acute liver injury model was established with 12%

[收稿日期] 20181015(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360685,81760114,81660104);广西区自然科学基金项目(2017GXNSFAA198218)

[第一作者] 庞小华,在读硕士,从事肝病药理学研究,E-mail:1134660602@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

carbon tetrachloride peanut oil solution ($5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), except the normal group. All of the rats were put to death to collect serum and liver tissues. The contents of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TBIL), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected by biochemical methods, the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in liver tissues were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Nuclear factor- κ B (NF- κ B) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) protein expression in liver tissues were detected by Western blot, and htoxylin eosin (HE) staining was used to observe the variation of liver histopathological. **Result:** Compared with the normal group, the serum activities of AST, ALT, ALP and the content of TBIL, MDA in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in liver tissue were remarkably increased ($P < 0.01$), but the serum activities of SOD, GSH-Px were significantly decreased ($P < 0.01$), the expression of NF- κ B was enhanced in liver tissue ($P < 0.01$), and PPAR- γ was down-regulated ($P < 0.01$), indicating the successful modeling of acute liver injury. Compared with the model group, FGD could reduce the activities of AST, ALT, ALP and the contents of TBIL, MDA ($P < 0.05$, $P < 0.01$), decrease the level of TNF- α , IL-1 β , IL-6 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and down-regulate the expression of NF- κ B ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but up-regulate the activities of SOD, GSH-Px and the expression of PPAR- γ ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The liver tissue lesions were alleviated to varying degrees. **Conclusion:** FGD has a protective effect on CCl_4 -induced acute liver injury in rats, and its mechanism may be related to the activation of PPAR- γ and the inhibition of NF- κ B signaling pathway, with anti-inflammatory and anti-oxidative effects.

[**Key words**] formula of Gougancai decoction; acute liver injury; nuclear factor- κ B (NF- κ B); peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ); anti-inflammation; anti-oxidation

肝脏是人体消化系统中最大的消化腺,具有新陈代谢、生物转化、胆汁合成、排泄、免疫及解毒等功能,受到体内外各种致病因子和刺激因素的攻击而发生病变^[1]。现代研究表明,熬夜、酗酒等不良的生活饮食习惯能直接或间接导致肝脏疾病,严重危害人类身心健康^[2]。卫生统计结果显示,近年来肝病的发病人数快速上升,呈年轻化趋势,并因较长病程导致我国肝病患者人群与疾病负担持续增加。急性肝损伤是众多肝脏疾病发生的起始阶段,急性肝损伤发病率占非病毒性慢性肝炎的 20% ~ 50%,占爆发性肝衰竭患者的 15% ~ 30%^[3]。随着肝细胞损伤的加重,可发展为肝炎、肝纤维化,进一步形成难逆性肝硬化,而最终导致肝癌。研究显示,传统中医药治疗各类肝脏疾病,主要采用清热解暑、活血祛瘀、健脾祛痰等手段,其中复方因其多成分、多靶点与多层次的整体论治特点,在治疗肝损伤中作为代替疗法或补充疗法而独具优势^[4-5]。

复方狗肝菜汤(formula of Gougancai decoction, FGD)为笔者收集的民间壮药复方,由狗肝菜、七星剑、莪术、白花蛇舌草、千斤拔和杠板归等多味药组成。本复方所含的中药活性成分具有显著的保肝护肝作用,如狗肝菜多糖^[6-7]、莪术醇^[8]、蛇舌草粗黄

酮^[9]与杠板归总黄酮^[10]等。本研究以四氯化碳(CCl_4)建立急性肝损伤模型,观察 FGD 对急性肝损伤大鼠的保护作用并探讨其机制,为本复方的开发利用提供一定的科学研究资料。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只,8 ~ 10 周龄,体质量 180 ~ 200 g,由桂林医学院 SPF 实验动物中心提供,实验动物生产合格证号 SCXK(桂)2010-0001,伦理委员会编号 2017-018。

1.2 药物与试剂 狗肝菜、七星剑、莪术、蛇舌草、千斤拔和杠板归等中药饮片购于桂林市七星区六合路药材市场,经桂林医学院药物研究所张可锋副教授鉴定为正品。FGD 的制备:分别称取莪术(110 g),七星剑(170 g),狗肝菜(170 g),白花蛇舌草(170 g),千斤拔(170 g)和杠板归(220 g),混合后加水 5 000 mL 煮 1 h,过滤,滤渣再加水 3 500 mL 煮 1 h,过滤后合并 2 次滤液,浓缩成浸膏后,冷冻干燥成粉末,4 °C 保存备用。水飞蓟素(大连美仑生物技术有限公司,批号 M1120A);分析纯四氯化碳(CCl_4 ,广东汕头市西陇化工厂,批号 161101);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),丙二醛(MDA),谷

胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),碱性磷酸酶(ALP)和总胆红素(TBIL)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170711, 20170708, 20170820, 20170622, 20170928, 20171010, 20171028);白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-6(IL-6)与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为 20171101, 20171108, 20171206);核转录因子- κ B(NF- κ B)抗体和过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)抗体(美国 CST 公司,批号分别为 1104, 0015); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(傲锐东源生物科技有限公司,批号 17AV0720);辣根酶标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 166588);苏木素,伊红染色试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 140128, 2014105);无水乙醇,95%乙醇,二甲苯(广东汕头市西陇化工厂,批号分别为 20171027, 20171128, B20160705)。

1.3 仪器 BS1105 型电子天平(德国 Sartorius 公司);XMTD-6000 型恒水浴锅(上海长风仪器厂);Eppendorf 型移液枪(德国 Eppendorf 公司);BX51 型正置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);Fresco21 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Epoch 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);powerpacTM Basic 型电泳仪,4530 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Tanon5200 型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组给药及建模 将 60 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,水飞蓟素(120 mg·kg⁻¹)组和 FGD 低、中、高剂量(475, 950, 1 900 mg·kg⁻¹, 生药量)组,每组 10 只。水飞蓟素组给药剂量参考文献[11],FGD 各组给药剂量参考成人复方狗肝菜汤的临床用药剂量,以及成人与大鼠等效剂量折算系数(0.018)换算而得^[12]。除正常组和模型组给予等体积生理盐水外,其余各组分别按剂量给药,连续 10 d,末次给药 2 h 后,除正常组外,其余各组用 12%的 CCl₄ 花生油溶液(5 mL·kg⁻¹)制备急性肝损伤模型,禁食不禁水 16 h 后,收集血液和肝脏。

2.2 生化法检测血清中 ALT,AST,ALP 的活性和 TBIL 的含量 严格按照试剂盒说明书加入相关工作液和样品,经气浴后,置于酶标仪上,按指定波长测得吸光度并计算血清中 MDA,SOD 和 GSH-Px 的水平。

2.3 ELISA 检测肝组织炎症指标含量 肝组织剪

碎后,置于研磨棒中,加入肝质量 9 倍体积的生理盐水,充分研磨得 10% 的肝组织匀浆,按照 ELISA 试剂盒说明书顺序加入工作液和样品,经标准步骤处理,检测并计算肝组织中的 IL-1 β ,IL-6 和 TNF- α 的含量。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织中 NF- κ B 和 PPAR- γ 的蛋白表达 用 RIPA 裂解缓冲液将肝组织匀浆后,4℃条件下 12 000 r·min⁻¹离心 15 min 取上清,用 BCA 法进行蛋白定量,煮沸变性后,冷却至室温,于 -20℃保存。制备 10% 的聚丙烯酰胺凝胶,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,4℃一抗(1:500)孵育过夜,洗涤同上,二抗(1:5 000)室温孵育 1.5 h,洗涤同上,显影,用 Quantity One 4.6 软件分析蛋白条带灰度,以 β -actin 为内参,计算 NF- κ B 和 PPAR- γ 的蛋白表达。

2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理改变 取实验大鼠肝脏右叶同一位置用 4% 的多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋,切片,脱蜡,经不同浓度乙醇处理,HE 染色,冲洗,脱水,封片,即得病理组织切片,显微镜下观察肝组织病理改变。

2.6 统计学处理 实验数据均采用 SPSS 19.0 软件进行分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对急性肝损伤大鼠血清中 ALT,AST,ALP 活性和 TBIL 含量的影响 与正常组比较,模型组血清中 ALT,AST,ALP 活性和 TBIL 含量显著升高($P < 0.01$),表明急性肝损伤模型建立成功。与模型组比较,FGD 高、中剂量组的 ALT,AST,ALP 活性,TBIL 含量显著降低($P < 0.01$),FGD 低剂量组 ALT,ALP 活性和 TBIL 含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),但 AST 活性无显著性变化。见表 1。

3.2 对急性肝损伤大鼠血清中 MDA,SOD 和 GSH-Px 水平的影响 与正常组比较,模型组血清中 MDA 的含量显著升高($P < 0.01$),而 SOD 与 GSH-Px 的活性显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,FGD 高、中剂量组与水飞蓟素组中 MDA 的含量显著降低($P < 0.01$),SOD 与 GSH-Px 的活性显著增强($P < 0.01$),而 FGD 低剂量组可明显降低 MDA,升高 SOD 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$),但 GSH-Px 无显著性变化。见表 2。

表 1 FGD 对 CCl₄ 致急性肝损伤大鼠血清中 ALT, AST, ALP 活性和 TBIL 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of FGD on serum activity of ALT, AST, ALP and content of TBIL in acute liver injury rats induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | ALT/U·L ⁻¹ | AST/U·L ⁻¹ | ALP/U·L ⁻¹ | TBIL/μmol·L ⁻¹ |
|------|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 34.08 ± 6.97 | 45.09 ± 6.22 | 48.65 ± 6.23 | 2.68 ± 0.31 |
| 模型 | - | 267.42 ± 30.29 ¹⁾ | 319.34 ± 35.11 ¹⁾ | 134.36 ± 12.09 ¹⁾ | 8.91 ± 1.04 ¹⁾ |
| 水飞蓟素 | 120 | 195.08 ± 21.38 ³⁾ | 264.39 ± 29.24 ³⁾ | 92.39 ± 9.88 ³⁾ | 6.33 ± 0.61 ²⁾ |
| FGD | 475 | 216.38 ± 23.57 ³⁾ | 296.37 ± 32.57 | 107.18 ± 13.81 ²⁾ | 6.35 ± 0.69 ²⁾ |
| | 950 | 186.32 ± 20.19 ³⁾ | 264.27 ± 30.44 ³⁾ | 90.09 ± 10.66 ³⁾ | 5.90 ± 0.51 ³⁾ |
| | 1 900 | 144.26 ± 19.01 ³⁾ | 234.24 ± 25.08 ³⁾ | 79.97 ± 8.28 ³⁾ | 5.01 ± 0.46 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)。

表 2 FGD 对 CCl₄ 致急性肝损伤大鼠血清中 SOD, GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of FGD on serum activity of SOD, GSH-Px of and content of MDA in acute liver injury rats induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | SOD/U·mg ⁻¹ | GSH-Px/U·mg ⁻¹ | MDA/μmol·g ⁻¹ |
|------|------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 235.19 ± 21.44 | 146.27 ± 13.08 | 2.94 ± 0.21 |
| 模型 | - | 165.28 ± 15.20 ¹⁾ | 91.64 ± 8.43 ¹⁾ | 6.46 ± 0.73 ¹⁾ |
| 水飞蓟素 | 120 | 206.27 ± 22.18 ³⁾ | 108.34 ± 13.57 ²⁾ | 5.62 ± 0.69 ³⁾ |
| FGD | 475 | 198.62 ± 18.22 ³⁾ | 90.67 ± 11.68 | 5.73 ± 0.55 ²⁾ |
| | 950 | 214.35 ± 23.59 ³⁾ | 114.38 ± 12.67 ³⁾ | 4.78 ± 0.43 ³⁾ |
| | 1 900 | 228.64 ± 24.51 ³⁾ | 128.23 ± 15.67 ³⁾ | 4.67 ± 0.53 ³⁾ |

3.3 对急性肝损伤大鼠肝组织中的 IL-1β, IL-6 与 TNF-α 含量的影响 与正常组比较,模型组的 IL-1β, IL-6 与 TNF-α 含量显著升高 (P < 0.01);

与模型组比较,FGD 高、中剂量组的 IL-1β, IL-6 与 TNF-α 含量显著降低 (P < 0.01), FGD 低剂量组 IL-1β 的含量显著降低 (P < 0.01)。见表 3。

表 3 FGD 对 CCl₄ 致急性肝损伤大鼠肝组织中的 IL-1β, IL-6 与 TNF-α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of FGD on hepatic contents of TNF-α, IL-1β and IL-6 in acute liver injury rats induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n = 10$) pg·g⁻¹

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | TNF-α | IL-6 | IL-1β |
|------|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 正常 | - | 146.37 ± 19.54 | 106.28 ± 13.64 | 205.37 ± 25.68 |
| 模型 | - | 688.52 ± 80.59 ¹⁾ | 394.21 ± 48.22 ¹⁾ | 753.01 ± 95.34 ¹⁾ |
| 水飞蓟素 | 120 | 546.18 ± 62.57 ³⁾ | 324.16 ± 35.74 ³⁾ | 653.27 ± 81.49 ³⁾ |
| FGD | 475 | 643.51 ± 71.151 | 356.40 ± 41.06 | 618.32 ± 77.45 ³⁾ |
| | 950 | 519.24 ± 60.21 ³⁾ | 306.18 ± 35.20 ³⁾ | 539.64 ± 47.35 ³⁾ |
| | 1 900 | 436.51 ± 46.77 ³⁾ | 243.15 ± 26.62 ³⁾ | 473.19 ± 60.28 ³⁾ |

3.4 对急性肝损伤大鼠肝组织中 NF-κB 与 PPAR-γ 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 NF-κB 蛋白表达显著升高, PPAR-γ 表达显著降低 (P < 0.01);与模型组比较,FGD 低剂量组的 NF-κB 明显上调 (P < 0.05), PPAR-γ 的表达差异无统计学意义, FGD 高、中剂量组与水飞蓟素组的 NF-κB 表达显著下调 (P < 0.01), PPAR-γ 表达显著上调 (P < 0.01)。见表 4, 图 1。

3.5 对急性肝损伤大鼠肝组织病理学的影响 正常

组的肝细胞索呈放射状、细胞形态完整、肝小叶清晰、汇管区未见细胞变性、凋亡或炎症性浸润;模型组大鼠肝组织细胞呈空泡样变、胞核固缩溶解、有明显的炎症性浸润,局灶肝细胞坏死严重,提示急性肝损伤模型建立成功。FGD 低剂量组肝细胞变性坏死得到轻微缓解,细胞水肿仍明显可见,FGD 中、高剂量组肝细胞索结构较完整、细胞浸润与凋亡少见。见图 2。

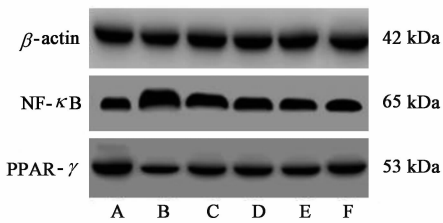
4 讨论

CCl₄ 建立急性肝损伤模型是筛选保肝护肝药

表 4 FGD 对 CCl₄ 致急性肝损伤大鼠肝组织中 NF-κB 与 PPAR-γ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of FGD on hepatic expression of NF-κB, PPAR-γ protein in liver in acute liver injury rats induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | NF-κB/β-actin | PPAR-γ/β-actin |
|------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 0.54 ± 0.06 | 0.84 ± 0.13 |
| 模型 | - | 1.86 ± 0.26 ¹⁾ | 0.36 ± 0.06 ¹⁾ |
| 水飞蓟素 | 120 | 1.24 ± 0.14 ³⁾ | 0.41 ± 0.05 |
| FGD | 475 | 1.45 ± 0.17 ²⁾ | 0.47 ± 0.08 |
| | 950 | 1.19 ± 0.11 ³⁾ | 0.61 ± 0.05 ³⁾ |
| | 1 900 | 0.86 ± 0.10 ³⁾ | 0.69 ± 0.11 ³⁾ |



A. 正常组; B. 模型组; C. 水飞蓟素 120 mg·kg⁻¹ 组; D. FGD 475 mg·kg⁻¹ 组; E. FGD 950 mg·kg⁻¹ 组; F. FGD 1 900 mg·kg⁻¹ 组(图 2 同)

图 1 大鼠肝组织中 NF-κB 与 PPAR-γ 蛋白相对表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of NF-κB and PPAR-γ protein expression in acute liver injury rats

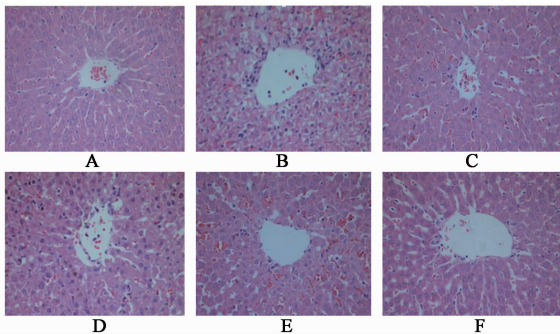


图 2 FGD 对 CCl₄ 致急性肝损伤大鼠肝组织病变的影响 (HE, × 100)

Fig. 2 Effect of FGD on liver tissue lesions in rats with acute liver injury induced by CCl₄ (HE, ×100)

物的经典方法^[13-14], 其在肝脏细胞中代谢转化为·CCl₃与·CCl₃O₂等自由基^[15-16], 并以氢键形式结合而攻击内质网上磷脂分子, 引发膜脂质过氧化反应及其级联反应, 促使细胞膜溶解或改变膜的通透性, 进而使胞浆与线粒体中 ALT, AST 释放出来, 增强血清中 ALT, AST 的活性, 而 ALT, AST, ALP 和 TBIL 是评价肝损伤的关键指标^[17]。本研究中, 与

正常组比较, 模型组的 ALT, AST, ALP 和 TBIL 的水平显著升高, 结合病理切片, 观察到模型组细胞呈空泡样变、坏死严重, 提示 CCl₄ 诱导的急性肝损伤模型建立成功; 与模型组比较, FGD 给药组的 ALT, AST, ALP 和 TBIL 水平明显降低, 且镜下观察其病理切片, 发现肝组织病变得到不同程度改善, 表明 FGD 对急性肝损伤大鼠具有保护作用。

氧化应激是急性肝损伤的重要发病机制^[18-19], 因此有效抑制过氧化反应是保肝护肝的重要手段。MDA 是评价氧化损伤程度的重要指标, CCl₄ 进入肝脏后, 在 CYP450 酶系的作用下代谢产生一系列自由基, 继而启动脂质过氧化反应, 生成大量的 MDA, 而 MDA 与自由基的不断堆积可加重肝损伤^[20]。SOD 与 GSH-Px 是机体抗氧化防御系统中两种重要的酶, 可有效抑制自由基及其介导的脂质过氧化反应损伤细胞, 增强机体抗氧化应激的能力^[21]。本实验结果显示, 与正常组比较, 模型组的 MDA 含量显著升高, SOD 与 GSH-Px 活性明显降低; 而给予 FGD 预处理能显著降低实验大鼠肝组织中 MDA 含量, 并增强 SOD 与 GSH-Px 活性, 提示 FGD 对肝损伤大鼠的保护作用可能与抗氧化反应有关。

研究表明, 炎症反应可诱导急性肝损伤的发生^[22]。单核巨噬细胞、淋巴细胞分泌产生的 TNF-α, IL-1β 和 IL-6 等炎症因子, 在炎症部位高表达, 促使细胞凋亡坏死, 加重肝组织损伤^[11, 23-24]。NF-κB 是参与多条炎症信号通路的核转录因子, TNF-α 可调节 NF-κB 诱导酶的活性, 促使 NF-κB 进入细胞核, 继而激活下游的相关炎症因子如 IL-1β, IL-6 等, 加速细胞的凋亡坏死, 加重肝组织损伤程度^[25]。而 PPAR-γ 具有很强的炎症抑制功能^[26], 能够减少 NF-κB 结合物 IκB 的降解, 从而抑制 NF-κB 的表达及其介导的炎症反应, 减轻肝组织损伤^[27]。本研究中 FGD 能够显著降低 TNF-α, IL-1β, IL-6 的含量和 NF-κB 表达, 并上调 PPAR-γ 表达, 表明 FGD 对急性肝损伤大鼠的保护可能与其抑制炎症反应有关。

综上, FGD 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤大鼠具有保护作用, 其机制可能与 FGD 抑制炎症与加强抗氧化防御系统有关, 但具体机制还有待进一步阐明。

[参考文献]

[1] 黄思茂, 高雅, 曹后康, 等. 过墙风总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用及机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(2): 212-217.
[2] 曹后康, 韦日明, 张可锋, 等. 黄花倒水莲多糖对四氯

- 化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中药材, 2018, 41(1): 203-206.
- [3] Wamnd F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [4] DING L, ZHANG X, LI L, et al. Qingchangligan formula alleviates acute liver injury by attenuating extracellular histone-associated inflammation[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2018, 118: 1-9.
- [5] 杨春梅, 胡源霖, 侯俊玲, 等. SPG 复方对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(7): 817-821.
- [6] 高雅, 张可兰, 黄思茂, 等. 狗肝菜多糖对二甲基亚硝胺诱导的肝纤维化大鼠 TGF- β_1 /Smads 信号通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 113-117.
- [7] 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.
- [8] 赵铁建, 傅品悦, 刘露露, 等. 中药莪术几种活性成分对肝脏疾病防治作用的机制[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(27): 2433-2440.
- [9] 刘若轩, 李阿荣, 郭洁文, 等. 白花蛇舌草对肝内胆汁淤积模型大鼠的保护作用[J]. 中药材, 2018, 41(6): 1476-1479.
- [10] 陈婧, 张天洪, 万雪梅, 等. 杠板归总黄酮提取物对 α -萘异硫氰酸脂诱导小鼠胆汁淤积性肝损伤保护作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(1): 32-35.
- [11] 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.
- [12] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1350-1351.
- [13] Pérez T R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? [J]. *Hepatology*, 1983, 3(1): 112-120.
- [14] OU Y, ZHENG S, LIN L, et al. Protective effect of C-phycoerythrin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chem Biol Int*, 2010, 185(2): 94-100.
- [15] 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]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 38-44.
- [16] Eastmond D A. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review [J]. *J Environ Sci Heal C*, 2007, 25(3): 185-209.
- [17] Roman P, Budziński G, Suszka-Świtek A, et al. Caspase-3 expression and ALT, AST, and GGT activity after 24 hours of porcine liver cold storage, depending on the type of transgenesis [J]. *Transpl P*, 2016, 48(5): 1829-1832.
- [18] Akihara R, Homma T, Lee J, et al. Ablation of aldehyde reductase aggravates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury involving oxidative stress and endoplasmic reticulum stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 765-771.
- [19] Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress and acute hepatic injury [J]. *Curr Opin Toxicol*, 2018, 7: 17-21.
- [20] Ibrahim M, Mikail M A, Ahmed I A, et al. Comparison of the effects of three different *Baccaurea angulata* whole fruit juice doses on plasma, aorta and liver MDA levels, antioxidant enzymes and total antioxidant capacity [J]. *Eur J Nutr*, 2018, 57(5): 1817-1828.
- [21] REN F, ZHOU L, ZHANG X, et al. Endoplasmic reticulum stress-activated glycogen synthase kinase 3 β aggravates liver inflammation and hepatotoxicity in mice with acute liver failure [J]. *Inflammation*, 2015, 38(3): 1151-1165.
- [22] LI L, DUAN C, ZHAO Y, et al. Preventive effects of interleukin-6 in lipopolysaccharide/D-galactosamine induced acute liver injury via regulating inflammatory response in hepatic macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 51: 99-106.
- [23] Pol J G, Lekbaby B, Redelsperger F, et al. Alternative splicing-regulated protein of hepatitis B virus hacks the TNF- α stimulated signaling pathways and limits the extent of liver inflammation [J]. *FASEB J*, 2015, 29(5): 1879-1889.
- [24] Alcaraz-Quiles J, Titos E, Casulleras M, et al. Polymorphisms in the IL-1 gene cluster influence systemic inflammation in patients at risk for acute on chronic liver failure [J]. *Hepatology*, 2017, 65(1): 202-216.
- [25] ZHOU D, YU T, CHEN G, et al. Effects of NF- κ B1 (p50) targeted gene disruption on ionizing radiation-induced NF- κ B activation and TNF α , IL-1 α , IL-1 β and IL-6 mRNA expression *in vivo* [J]. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 2001, 77(7): 763-772.
- [26] HUANG C, YANG Y, LI W X, et al. Hyperin attenuates inflammation by activating PPAR- γ in mice with acute liver injury (ALI) and LPS-induced RAW264.7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 440-447.
- [27] Niyazoglu M, Baykara O, Koc A, et al. Association of PARP-1, NF- κ B, NF- κ BIA and IL-6, IL-1 β and TNF- α with graves disease and graves ophthalmopathy [J]. *Gene*, 2014, 547(2): 226-232.

[责任编辑 周冰冰]