

维药黑种草子对急性乙醇性肝损伤小鼠保护作用及抑制 NF- κ B 炎症反应信号通路的研究

于世博¹ 孔祥耀¹ 陈明翠¹ 何显珠¹ 吴 宁²

(1 贵州医科大学, 贵阳, 550000; 2 贵州医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 贵阳, 550000)

摘要 目的: 观察维药黑种草子对急性乙醇性肝损伤小鼠保护作用及对 NF- κ B 炎症反应信号通路的抑制作用。方法: 50 只昆明小鼠随机分为模型组、空白组、阳性对照组、黑种草子水提液高剂量组(6 g/kg)、黑种草子水提液低剂量组(2 g/kg)。除空白组外, 其余各组每日均灌胃给予 56 度白酒 10 mL/kg, 连续灌胃 15 d。禁食不禁水 10 h 后, 观察小鼠一般状态, 检测体质量, 肝重, 肝指数, 肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST), 肝组织核因子 κ B(NF- κ B) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达, 并进行肝组织病理学检查。结果: 与空白组相比, 模型组小鼠体质量和肝指数均降低, 血清 ALT 及 AST 活性升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比, 黑种草子水提液各组小鼠肝体质量和肝指数有所升高, 血清 ALT 及 AST 活性降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组小鼠肝细胞明显气球样变性、坏死和并伴有少量炎细胞浸润, 黑种草子水提液组较肝损伤模型组病变情况显著减轻。模型组 NF- κ B 及 TNF- α 表达强度均高于空白组, 黑种草子各给药组较模型组 NF- κ B 及 TNF- α 表达强度均下降。结论: 黑种草子水提液对急性乙醇性肝损伤小鼠具有一定保护作用, 并且能明显抑制小鼠肝细胞 NF- κ B 及 TNF- α 的表达。

关键词 黑种草子; 乙醇性肝损伤; 小鼠; NF- κ B; TNF- α

Study on the Protective Effect of Uygur Medicine Nigellae Semen on Acute Alcoholic Liver Injury Mice and its Inhibition on NF- κ B Signaling Pathway

Yu Shibo¹, Kong Xiangyao¹, Chen Mingcui¹, He Xianzhu¹, Wu Ning²

(1 Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China; 2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China)

Abstract Objective: To explore the protective effects of Uygur medicine Nigellae Semen on acute alcoholic liver damage mice and its inhibition on NF- κ B signaling pathway. **Methods:** After establishing acute alcoholic liver injury mice model, 50 mice were randomly divided into blank group, model group, positive control group, nigellae semen extraction high dose (6 g/kg) group, and nigellae semen extraction low dose (2 g/kg) group. Except for the blank group, the other groups were orally administered 56 degree liquor 10 mL/kg for 15 days. After 10hrs of food forbidden but no water forbidden, observe the general state of mice, detect their body weight, liver weight, liver index, liver function indexes of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), the expression of NF- κ B and TNF- α in liver tissue and liver tissue pathological changes. **Results:** Compared with the blank group, the body weight and liver index of the model group decreased, and serum ALT and AST activity significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the liver weight of mice, body weight and liver index increased in nigellae semen groups, while serum ALT and AST activity decreased significantly ($P < 0.05$). Model group mice showed significantly hepatocytes ballooning degeneration, necrosis and accompanied by a small amount of inflammatory cells infiltration. Compared with the model group, the nigellae semen group showed lower pathological changes. Compared with the blank group, the serum concentrations of NF- κ B and serum TNF- α content significantly increased in model group. Compare with the model group, the serum concentrations of NF- κ B and serum TNF- α content significantly decreased in the nigellae semen groups. **Conclusion:** Nigellae semen extraction has a protective effect on acute alcoholic liver damage mice, and it can inhibit the expression of NF- κ B and TNF- α liver cells.

Key Words Nigellae semenon; Alcoholic liver injury; Mice; NF- κ B; TNF- α

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.09.048

大量的乙醇摄入会使肝脏受到不同程度的损伤, 而短时间内的大量饮酒更会加重肝脏的损伤。

基金项目: 国家科技支撑计划项目(编号: 2013BAI05B03)

作者简介: 于世博(1995.04—), 男, 本科, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: 841778339@qq.com

通信作者: 吴宁(1974.06—), 女, 硕士, 副教授, 贵州医科大学生物与分子化学教研室主任, 研究方向: 贵州特色中草药防治疾病分子机制, E-mail: 1638210715@qq.com

随着社会生活水平的不断提高,乙醇性肝损伤已经成为了一个不可忽视的健康问题。目前临床上对急性乙醇性肝损伤的治疗还不是十分理想,所以天然保肝类药物的研发成为了人们新的需求。维药黑种草子为我国新疆维吾尔族的传统常用药材。具有抗肿瘤、镇痛、保肝、抗炎、抗氧化、抗血小板聚集、抗菌等功效^[1-4]。前期实验研究发现黑种草子对急性乙醇性肝损伤有一定的治疗作用,但其具体作用机制尚不明确。核转录因子 NF- κ B 是一种在核细胞基因转录中重要的调控因子,参与多种疾病的病理生理过程,在机体的免疫和炎性反应及凋亡调控等方面发挥着重要作用^[5]。长期乙醇摄入可使肝组织中 NF- κ B 活化,造成多种下游炎性反应因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等的大量产生。故 NF- κ B 炎性反应信号通路对乙醇性肝损伤的发生发展起着十分重要的作用。本研究拟观察黑种草子对急性乙醇性肝损伤小鼠肝组织中 NF- κ B 及 TNF- α 表达强度的影响,探究乙醇性肝损伤的防治机制,为维药黑种草子临床应用提供实验资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料 昆明小鼠 50 只,雌雄各半,清洁级,体质量为 19~24 g。由贵州医科大学动物管理中心提供,合格证号:SCXK(黔)2012—001。黑种草子购于新疆维吾尔民族医院。红星牌 56 度白酒,北京红星二锅头股份有限公司生产,批号:2014-08-29。血清 ALT、AST、检测试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司,批号:AR0024。NF- κ B 及 TNF- α 多克隆抗体,免疫组化试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司,批号:AR0003。葵花护肝片,北京葵花药业有限公司生产,批号:Z20003336。7150 型全自动生化分析仪,日本日立公司生产;RM2015 型石蜡切片机,德国莱卡公司生产;5430 型离心机,德国 Eppendorf 公司生产;MDF-382E 型低温冰箱,日本三洋公司生产;移液器,德国 EPPENDORF 公司生产;DSHZ-300 型恒温水浴箱,江苏太仓医用仪器厂生产;BX51T-PHD-J11 型显微镜,日本奥林巴斯公司生产。

1.2 实验方法 昆明小鼠 50 只,雌雄各半,体质量 19~24 g,适应性饲养 5 d,随机分为 5 组:空白组:每日上午、下午分别按照 10 mL/kg 灌胃 0.9% 生理盐水;模型组:每日上午按照 10 mL/kg 灌胃 0.9% 生理盐水,下午灌胃 10 mL/kg,56 度白酒;黑种草子水提液高剂量组:每日上午 10 mL/kg 灌胃 6 g/kg 黑种草子,下午灌胃 10 mL/kg,56 度白酒;黑种草子水提液

低剂量组:每日上午按照 10 mL/kg 灌胃 2 g/kg 黑种草子,下午灌胃 10 mL/kg,56 度白酒;阳性对照组:每日上午按照 10 mL/kg 灌胃 6 g/kg 葵花护肝片,下午灌胃 10 mL/kg,56 度白酒;各组连续灌胃 15 d。实验期间观察各组小鼠活动状态,毛色,体质量,饮食等一般状态。末次给予白酒后禁食不禁水 10 h,放血处死。取血清测定血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性。迅速取出肝脏称重,计算肝指数(计算肝指数 = 肝重/体质量),取肝右叶用 10% 甲醛固定,石蜡包埋切片,进行 HE 染色,观察其病理变化。用免疫组化法检测 NF- κ B 及 TNF- α 的表达。所有实验采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。数据以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况 空白组小鼠各指标均正常,模型组小鼠较正常对照组相比体重减轻,嗜睡,毛发光泽度下降,并伴有反应迟钝,活动,进食减少,腹部肿胀等症状。少量小鼠出现便稀现象。模型组有两只小鼠由于将乙醇误吸入气管而导致死亡,其他各组均无死亡现象。与模型组相比黑种草子水提液各给药组小鼠情况均有明显改善,其中高剂量组最为明显。与空白组相比模型组小鼠体重及肝脏指数下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。瘤果黑种草子水提液各给药组与阳性对照组组较模型组体重均有不同程度的上升,且肝脏指数也表现为上升,其中瘤果黑种草子高剂量组最为明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各实验组体重及肝指数比较结果见表 1。

2.2 黑种草子对急性乙醇性肝损伤小鼠血清肝功能影响 由表 2 可见与空白组相比,模型组小鼠 ALT 及 AST 活性表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明建模成功。与模型组相比,瘤果黑种草子水提液各组均可降低小鼠体内 ALT 及 AST 活性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 黑种草子对小鼠肝组织外观及病理改变的影响 正常对照组小鼠肝组织外观呈红褐色且具有明显光泽,触之感觉柔软且富有弹性。模型组小鼠肝组织外观呈黄褐色,少数呈深红色及灰白色,触之感觉质地较硬且缺少弹性。黑种草子各给药组情况均介于模型组与空白对照组之间,其中高剂量组更接近于正常对照组。肝脏病理情况改变。见图 1:HE。

表1 瘤果黑种草子对小鼠体重及肝指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	终体重(g)	肝脏指数
空白组	10	35.2 ± 2.4	0.0492 ± 0.0068
模型组	8	23.2 ± 3.4 **	0.0419 ± 0.0039 **
瘤果黑种草子(高剂量)	10	26.8 ± 3.6 **△	0.0463 ± 0.0049 **△△
瘤果黑种草子(低剂量)	10	26.1 ± 2.5 **△	0.0442 ± 0.0062 *△
葵花护肝片组(阳性对照组)	10	28.7 ± 3.2 **△△	0.0459 ± 0.0032 **△

注:与空白组相比,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与模型组相比,△*P* < 0.05,△△*P* < 0.01。

表2 瘤果黑种草子对急性乙醇性肝损伤小鼠血清 ALT 及 AST 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	ALT(U/L)	AST(U/L)
空白组	10	26.4 ± 4.3	68.5 ± 8.5
模型组	8	70.3 ± 7.8 **	121.2 ± 7.5 **
瘤果黑种草子(高剂量组)	10	45.2 ± 5.4 **△△	92.7 ± 6.68 **△△
瘤果黑种草子(低剂量组)	10	59.3 ± 8.8 **△	111.4 ± 5.7 **△△
葵花护肝片组(阳性对照组)	10	52.9 ± 11.1 **△△	109.5 ± 10.9 **△

注:与空白组相比***P* < 0.01;与模型组相比,△*P* < 0.05,△△*P* < 0.01。

染色后镜下观察可见空白组肝细胞完整,肝小叶结构清晰,多数为单核,少见双核及多核。模型组小鼠肝细胞肿胀,并伴有气球样变。肝小叶结构不清晰,肝细胞排列混乱。部分肝细胞伴有少量炎性反应细胞浸润。阳性对照组及黑种草子不同剂量给药组对急性乙醇性肝损伤小鼠肝脏病理情况均有不同程度的改善作用,部分细胞可见气球样变性及少量点状坏死,其中黑种草子高剂量组改善最为明显。

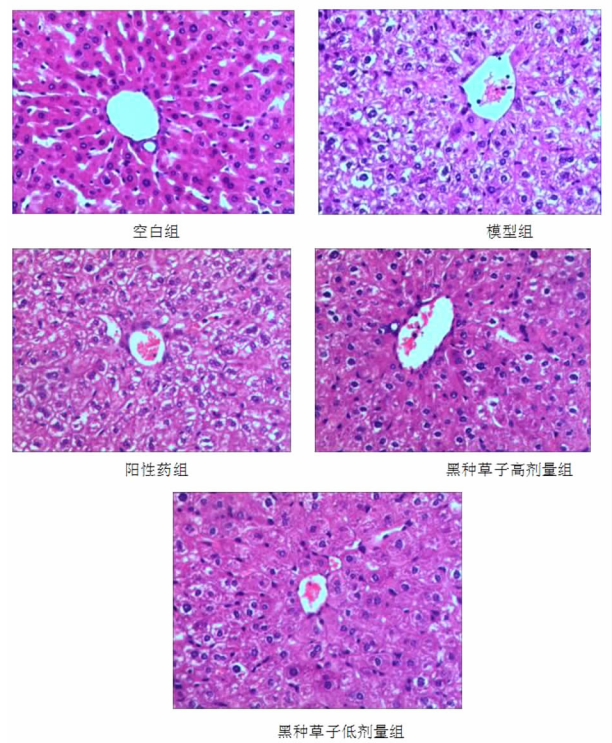


图1 不同分组肝细胞病变情况(400)

2.4 黑种草子对小鼠肝组织 NF-κB 及 TNF-α 免疫组化染色结果 由图二显示 NF-κB 阳性细胞主要

分布于肝细胞坏死灶周围细胞的胞质中,TNF-α 阳性细胞主要分布于中央静脉及肝细胞坏死灶周围细胞的胞质中。模型组 NF-κB 及 TNF-α 表达强度明显高于空白组,黑种草子各给药组较模型组均能抑制 NF-κB 及 TNF-α 的表达强度,其中黑种草子高剂量组最为明显。

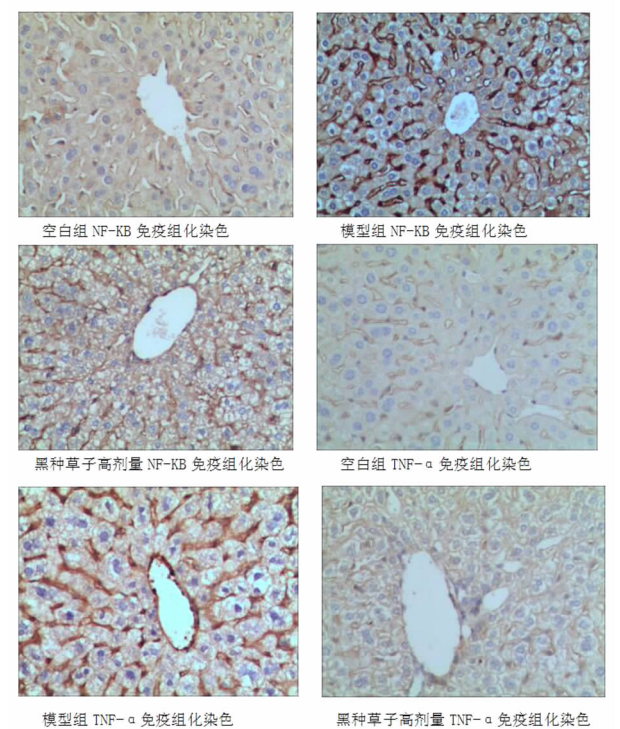


图2 不同分组肝细胞 NF-κB 及 TNF-α 免疫组化染色(200)

3 讨论

肝脏是乙醇在机体代谢中极为重要的脏器,过量的饮酒则会造成肝组织不同程度的损伤。随着生活水平不断提高,乙醇性的肝损伤已经成为

了一个不可忽视健康问题^[6-7]。其已成为继病毒性肝炎后的另一种多发的肝损伤疾病^[8]。在机体中90%以上的乙醇在肝脏中代谢^[9],当过量饮酒后体内的乙醇代谢显著提高,从而产生大量的乙醛与细胞因子(如TNF- α)。乙醛对肝细胞有破坏作用,可使大量的肝细胞变性及坏死。而细胞因子则参与了肝细胞的损伤过程,过多的细胞因子可导致肝细胞发生炎性病变,造成肝脏的损伤^[10]。

ALT及AST是肝细胞损伤的敏感指标,ALT主要存在于细胞质内,AST主要存在于细胞质内及线粒体中,当肝细胞严重受损失时,会引起肝细胞通透性增加,胞质内的ALT及线粒体内的AST会释放进入血,导致血液中的ALT及AST的表达水平大幅升高^[11]。因此血液内ALT及AST的含量是衡量乙醇性肝损伤对肝脏影响的重要指标。NF- κ B是一种分布与作用十分广泛的真核细胞转录因子,其与乙醇性肝病的发生,发展关系密切。它的功能有赖于它的活化,核内聚集,DNA结合能力以及它所引起的相应基因的转录,表达^[12]。研究证实,长期乙醇摄入可以使肝组织中NF- κ B活化,活化后的NF- κ B进入细胞核内与多种炎症反应因子启动子区域中 κ B序列结合,促进炎症反应细胞因子的转录,引起肝细胞的进一步炎症反应,坏死,凋亡与纤维化形成^[13]。同时TNF- α 在乙醇性肝损伤的发生,发展中也占有重要的地位,在敲除TNF- α 受体基因的大鼠给予乙醇灌胃不引起肝脏的炎症反应与坏死性改变^[14]。同样TNF- α 也是NF- κ B炎症反应信号通路中关键的促炎物质,它既是NF- κ B的激活物质,也是激活后的产物,其在NF- κ B炎症反应信号的传导中起到了重要作用。

中草药,特别是一些民族药物在近些年中从多方面,多靶点的治疗方式治疗乙醇性肝损伤已逐渐得到认可^[15-16]。本实验结果显示,黑种草子水提液给药后各给药组均能提高小鼠肝脏重量及肝脏指数,并减缓ALT及AST升高的趋势。其中黑种草子高剂量给药组结果最为明显。进一步观察小鼠肝脏组织病理学切片发现高剂量黑种草子组能够明显减轻急性乙醇性肝损伤小鼠肝小叶结构的破坏及肝细胞的气球样变,肿胀及坏死。随着黑种草子剂量的减少,其治疗作用也逐步减弱。与空白组相比,急性乙醇性肝损伤小鼠肝组织NF- κ B和TNF- α 含量明显升高,引起炎症损伤。与模型组相比,各剂量给药组肝组织中NF- κ B及TNF- α 表达水平均明显降低,

且呈一定的剂量反映关系。

综上所述黑种草子对急性乙醇性肝损伤有保护作用,其具体机制可能与通过抑制NF- κ B炎症反应信号通路的激活,减少了如TNF- α 等炎症反应因子的释放,进而发挥其抗炎作用有关。

参考文献

- [1]章丹丹,凌霜,张洪平,等.黑种草子不同组分抑制亚硝酸盐积累、血小板聚集和血管收缩的体外实验研究[J].中成药,2013,35(7):1376-1380.
- [2]耿东升,赵丽萍,史荣梅,等.维药瘤果黑种草子总皂苷镇咳祛痰及抗炎作用研究[J].新疆医科大学学报,2013,36(7):908-911.
- [3]章丹丹,聂绪强,潘会君.等黑种草子总皂苷对炎症介质及ERK/MAPK信号转导通路的影响[J].中国中药杂志,2010,35(19):2594-2597.
- [4]张瑞,庄宇娇,邢军.新疆特色药食两用植物黑种草籽活性分粗提物抗氧化作用研究[J].食品工业,2011,23(3):14-16.
- [5]Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor- κ B and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis[J]. Hepatology, 2007, 46(2):590-597.
- [6]鞠辉,魏良洲.酒精性肝病的流行病学现状[J].肝脏,2006,11(1):57-58.
- [7]任丽平,杜钢军,崔新萍.蒲公英对酒精性肝损伤的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):179-181.
- [8]庄辉.酒精性肝病的流行病学[J].中华肝病杂志,2003,11(11):689.
- [9]安礼,高冬梅.醒肝颗粒对急性酒精性肝病小鼠血清ALT,AST和肝组织TG水平的影响[J].山东中医药大学学报,2012,36(2):148-149.
- [10]肖楠,庄辉.酒精性肝病分子发病机制的研究进展[J].肝脏,2010,15(4):299-302.
- [11]李素婷,陈龙,王冉,等.山楂叶总黄酮对小鼠急性酒精性肝损伤保护作用的实验研究[J].时珍国医国药,2012,23(11):2903-2904.
- [12]崔香丹,金武丕,孟繁平. Bcl-2和NF- κ B在大鼠酒精性肝病中的表达及相关性[J].中国现代医学杂志,2009,19(1):55-58,63.
- [13]曾明,王金萍,丁媛媛,等.可舒胶囊对酒精性肝损伤大鼠血清中NF- κ B和TNF- α 的影响[J].东南国防医药,2013,15(1):21-23.
- [14]Minagawa M, Deng Q, Liu ZX, et al. Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor- α during alcohol consumption[J]. Gastroenterology, 2004, 126(5):1387-1399.
- [15]穆志龙,任世存.帕珠丸对慢性乙醇性肝损伤大鼠PPAR- α 1与AMPK- α 1的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(8):146-150.
- [16]吴国琳,陈玖,余国友.葛根素对酒精性肝损伤大鼠肝组织TGF-1和 α -SMA表达的影响[J].中国中药杂志,2008,33(19):2245-2248.