

# 金线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

蒯博婷<sup>1</sup>, 钟明利<sup>1</sup>, 曹后康<sup>1</sup>, 管玉满<sup>1</sup>, 陈毅飞<sup>1</sup>, 晋玲<sup>2\*</sup>, 张可锋<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>桂林医学院, 桂林 541004; <sup>2</sup>甘肃中医药大学, 兰州 730000

**摘要:** 研究金线风总黄酮(TFC)对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)致急性肝损伤小鼠的保护作用, 并从氧化应激、炎症反应和TLR-4/NF-κB信号通路探讨其作用机制。60只小鼠随机分为正常组、模型组、水飞蓟素组(150 mg/kg)、TFC低、中、高剂量组(100、200、400 mg/kg)、连续灌胃给药10 d。末次给药2 h后, 除正常组外, 各组腹腔注射0.1%的CCl<sub>4</sub>花生油溶液(10 mL/kg), 建立小鼠急性肝损伤模型, 16 h后, 收集血清和肝组织。血清指标检测表明, 与模型组比较, TFC能够显著降低肝脏指数、ALT和AST活性( $P < 0.05$ ), 并减少ALP、TBIL和γ-GT含量( $P < 0.05$ ), 且降低MDA含量( $P < 0.05$ ), 同时增强T-SOD和GSH-Px活性( $P < 0.05$ )。ELISA法检测肝组织指标结果表明, 与模型组比较, TFC能够显著下调TNF-α、IL-1β和IL-6含量( $P < 0.05$ )。Western blot检测结果显示, 与模型组比较, TFC能够明显降低肝组织中TLR-4和NF-κB蛋白表达( $P < 0.05$ )。HE染色分析肝组织病理学变化结果表明, TFC能够有效改善肝组织损伤程度。综上所述, TFC对CCl<sub>4</sub>诱导的急性肝损伤小鼠具有保护作用, 其保肝作用机理可能与抑制氧化应激、炎症反应以及TLR-4/NF-κB信号通路有关。

**关键词:** 金线风; 总黄酮; 急性肝损伤; 氧化应激; 炎症反应; TLR-4/NF-κB信号通路

中图分类号: R285.5; R961

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.7.019

## Hepatoprotective Effects and Mechanism of *Cyclea hypoglauca* (Schauer) Diels Total Flavonoids on Mice with Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride

XI Bo-ting<sup>1</sup>, ZHONG Ming-li<sup>1</sup>, CAO Hou-kang<sup>1</sup>, GUAN Yu-man<sup>1</sup>, CHEN Yi-fei<sup>1</sup>, JIN Ling<sup>2\*</sup>, ZHANG Ke-feng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

**Abstract:** To study the hepatoprotective effects of the total flavonoids extracted from the dried root of *Cyclea hypoglauca* (Schauer) Diels (TFC) on mice with acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>), and explore the mechanism based on oxidative stress, inflammatory response and toll-like receptor-4 (TLR-4)/nuclear factor-kappa B (NF-κB) pathway. 60 mice were randomly divided into normal group, model group, silymarin group (150 mg/kg), and TFC-low, medium, high dose groups (100, 200, 400 mg/kg). All mice were administrated by gavage once a day for 10 d with distilled water or corresponding dose of drugs (10 mL/kg). After 2 h of the last administration, the mice were injected intraperitoneally with 0.1% CCl<sub>4</sub> peanut oil solution (10 mL/kg) to induce the acute liver injury except the normal group. 16 h later, the eye balls of mice were removed to take blood, and all mice were sacrificed to collect the liver tissue. Liver index was calculated based on body weight and liver weight of mice. Biochemical methods were used to measure the serum contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase total (ALP), total bilirubin (TBIL), γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT), superoxide dismutase (T-SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the hepatic levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6). The relative expressions of TLR-4 and NF-κB in liver tissue were detected by Western blot. HE staining was used to observe the histopathological changes of

收稿日期: 2018-01-08 接受日期: 2018-04-17

基金项目: 广西八桂学者专项项目(桂财教函[2017]143号)

\* 通信作者 Tel: 86-013457684046; E-mail: xuoshengcailliao@163.com

liver. The results showed that TFC could significantly improve the liver tissue lesion, decrease the liver index and serum contents of AST, ALT, ALP, TBIL,  $\gamma$ -GT and MDA ( $P < 0.05$ ), enhance the activity of T-SOD and GSH-Px ( $P < 0.05$ ), and inhibit the hepatic levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TLR-4 and NF- $\kappa$ B ( $P < 0.05$ ). In summary, TFC had a hepatoprotective effect on mice with acute liver injury induced by CCl<sub>4</sub>, and its mechanism may be related to inhibiting the oxidative stress levels, inflammatory response and TLR-4/NF- $\kappa$ B pathway.

**Key words:** *Cyclea hypoglauca* (Schauer) Diels; total flavonoids; acute liver injury; oxidative stress; inflammatory response; toll-like receptor-4/nuclear factor-kappa B pathway

金线风为防己科植物粉叶轮环藤 *Cyclea hypoglauca* (Schauer) Diels 的干燥根, 别名银不换、百解藤、金锁匙等, 具有清热解毒、祛风止痛的功效, 民间常用于治疗咽喉肿痛、肠炎、肝炎、肝硬化等疾病<sup>[1]</sup>。目前, 虽然病毒性肝炎在我国的发病率逐渐降低, 但脂肪肝等非感染性肝病发病率急剧增加, 中国仍然为肝病大国, 因此, 防治肝病依然是我国亟需解决的难题<sup>[2]</sup>。现代研究表明, 黄酮类化合物是临床中药发挥保肝药效的重要物质基础, 具有抑制氧化应激、减轻炎症反应等生物活性作用, 并广泛存在于大多数植物中<sup>[3]</sup>。本课题组研究发现, 金线风含有大量黄酮类化合物, 因此, 推测金线风总黄酮 (The total flavonoids extracted from the dried root of *Cyclea hypoglauca* (Schauer) Diels, TFC) 可能为金线风保肝功效的重要有效成分。本研究采用四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 诱导小鼠急性肝损伤模型, 评价 TFC 是否具有保肝作用, 并探讨作用机制, 为金线风的开发与利用提供理论依据。

## 1 材料与试剂

### 1.1 试验药物

金线风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粉叶轮环藤 *Cyclea hypoglauca* (Schauer) Diels 的干燥根。将金线风烘干后粉碎, 75% 乙醇作为提取溶剂, 料液比为 1:25 (g: mL), 超声提取 0.5 h, 超声波功率为 300 W。将含生药的药液浓度调整为 100 mg/mL (PH 值为 5.3), AB-8 型大孔吸附树脂进行纯化, 上样流速为 1.5 BV/h, 上样量 4.5 BV, 75% 乙醇作为洗脱剂, 洗脱体积和流速分别为 3 BV 和 1.0 BV/h, 收集洗脱液, 浓缩至浸膏后冷冻干燥, 采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法<sup>[4]</sup>测得总黄酮含量为 78.78%。

### 1.2 动物

SPF 级昆明种小鼠, 雄性, 4 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 60 只小鼠购于桂林医学院实验动物中心, 许可证

号: SCXK2007-0001。饲养室温控制为 18 ~ 22 °C, 相对湿度为 50% ~ 60%。

### 1.3 试剂

CCl<sub>4</sub> 购自广东汕头市西陇化工厂 (批号: 0710262); 水飞蓟素购自美仑生物技术有限公司 (批号: M1120A); 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆红素 (TBIL)、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶 ( $\gamma$ -GT)、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) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和白介素-6 (IL-6) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自伊莱瑞特生物科技有限公司; RIPA 裂解液、BCA 试剂盒和 SDS-PAGE 缓冲液均购自碧云天生物技术研究; Toll 样受体-4 (TLR-4) 和核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 抗体购自 Abcam 公司,  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体购自傲锐东源生物科技有限公司。

### 1.4 仪器

Fresco21 高速冷冻离心机 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国), THZ-C-1 台式恒温振荡器 (太仓市实验设备厂), Epoch 酶标仪 (Bio-tek 公司, 美国), S-250A 超声波清洗机 (必能信超声 (上海) 有限公司), LGJ-12 冻干机 (北京松原华兴科技发展有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组与处理

将 60 只小鼠随机分为正常组 (Normal group)、模型组 (Model group)、水飞蓟素组 (Silymarin group, 150 mg/kg)、TFC 低、中、高剂量组 (TFC-low, medium, high dose group, 100、200、400 mg/kg), 每组 10 只。正常组和模型组小鼠灌胃蒸馏水, 其余各组灌胃相应剂量的药物, 灌胃体积均为 10 mL/kg; 连续灌胃 10 天, 于最后 1 次灌胃 2 h 后, 除正常组外, 其余各组腹腔注射 0.1% 的 CCl<sub>4</sub> 花生油溶液 (10 mL/kg), 禁食不禁水 16 h 后, 摘取眼球取血, 离心 (4 °C, 4 500 rpm, 15 min) 后取上层血清, 于 -20 °C 保存;

将同一部位肝组织固定于 4% 多聚甲醛中,用于制备病理切片,另取相同部位肝组织保存于液氮中,用于检测蛋白表达<sup>[5]</sup>。

## 2.2 计算肝脏指数

精密称定各只大鼠的肝脏湿重和体质量,按公式,肝脏指数(mg/g) = 肝湿重/体质量,计算肝脏指数。

## 2.3 检测血清转氨酶和氧化应激指标

按照说明书操作步骤,检测血清中 ALT、AST、ALP、TBIL 和  $\gamma$ -GT 含量或活性,并检测血清中 T-SOD、MDA 和 GSH-Px 含量或活性。

## 2.4 检测肝组织炎症因子指标

称取约 100 mg 肝组织,冰上充分研磨,制备 10% (g/mL) 肝组织匀浆,离心后取上清,严格按照 ELISA 试剂盒说明步骤进行操作,于 450 nm 处测定吸光度,根据标准曲线计算肝组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量。

## 2.5 蛋白免疫印迹实验(Western blot)

称取肝组织约 50 mg, RIPA 裂解液冰上匀浆,离心后取上清, BCA 试剂盒测定蛋白含量,加入蛋白上样缓冲液后, 95 °C 水浴加热 3 min。5% 浓缩胶电泳 0.5 h (80 V), 10% 分离胶电泳 1.5 h (110 V), 200 mA 转 PVDF 膜 2 h, 10% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗(1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 二抗(1:5 000) 室温孵

育 2 h, ECL 化学发光法显色。Quantity One 软件测定蛋白灰度, 计算目的蛋白相对表达量。

## 2.6 观察肝组织病变

小鼠处死后, 剪取肝脏相同位置的部分组织, 4% 多聚甲醛溶液室温固定 24 h, 再经过脱水透明、石蜡包埋、切片 5  $\mu$ m、HE 染色、树脂封片等标准步骤, 光学显微镜下观察肝组织病理学变化。

## 2.7 统计学处理

数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, SPSS 19.0 软件进行数据统计, *P* < 0.05 表示有统计学差异。

# 3 结果与分析

## 3.1 TFC 对肝脏指数和血清转氨酶活性的影响

检测并比较各组小鼠血清 ALT 和 AST 活性以及肝脏指数, 用以评价 TFC 是否具有保肝作用。与正常组比较, 模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著升高 (*P* < 0.01), 并且肝脏指数明显增加 (*P* < 0.01), 提示小鼠急性肝损伤模型成功建立; 与模型组比较, 水飞蓟素和 TFC 均可显著降低 ALT 和 AST 活性以及肝脏指数 (*P* < 0.01 或 *P* < 0.05), 且具有统计学差异, 该结果表明 TFC 具有一定的保肝作用 (见表 1)。

表 1 TFC 对肝脏指数以及血清转氨酶活性的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect on the liver index and serum transaminase of TFC ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	肝脏指数 Liver index (mg/g)	ALT IU/L	AST IU/L
正常 Normal	-	40.52 $\pm$ 3.97	69.75 $\pm$ 6.41	32.07 $\pm$ 4.78
模型 Model	-	52.36 $\pm$ 5.31 <sup>##</sup>	316.14 $\pm$ 38.19 <sup>##</sup>	112.10 $\pm$ 16.88 <sup>##</sup>
水飞蓟素 Silymarin	150	46.78 $\pm$ 4.43 <sup>*</sup>	166.81 $\pm$ 16.36 <sup>**</sup>	45.47 $\pm$ 5.05 <sup>**</sup>
CPTF 低剂量 CPTF-L	100	48.32 $\pm$ 4.56	311.45 $\pm$ 34.17	87.34 $\pm$ 12.49 <sup>*</sup>
CPTF 中剂量 CPTF-M	200	46.31 $\pm$ 4.57 <sup>*</sup>	263.63 $\pm$ 23.79 <sup>**</sup>	52.29 $\pm$ 9.06 <sup>**</sup>
CPTF 高剂量 CPTF-H	400	44.78 $\pm$ 4.73 <sup>**</sup>	226.53 $\pm$ 17.56 <sup>**</sup>	48.36 $\pm$ 8.71 <sup>**</sup>

注: 与正常组比较, <sup>##</sup>*P* < 0.01; 与模型组比较, <sup>\*</sup>*P* < 0.05; <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01。

Note: Compared with Normal group, <sup>##</sup>*P* < 0.01; compared with Model group, <sup>\*</sup>*P* < 0.05; <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01.

## 3.2 TFC 对血清 ALP、TBIL 和 $\gamma$ -GT 的影响

本研究除从血清转氨酶指标评价肝损伤程度外, 还通过检测血清 ALP、TBIL 以及  $\gamma$ -GT 含量, 对小鼠肝功能做进一步的评价。与正常组比较, 模型组小鼠血清中 ALP、TBIL 和  $\gamma$ -GT 含量均显著增加 (*P* < 0.01), 表明 CCl<sub>4</sub> 对小鼠肝功能明显造成损伤; 与模型组比较, 水飞蓟素和 TFC 能够显著降低

ALP、TBIL 和  $\gamma$ -GT 含量 (*P* < 0.01 或 *P* < 0.05), 该结果进一步明确 TFC 对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤小鼠具有保护作用 (见表 2)。

## 3.3 TFC 对血清 T-SOD、GSH-Px 和 MDA 的影响

本研究从氧化应激方面对 TFC 的保肝作用机制进行了探讨。与正常组比较, 模型组 T-SOD 和 GSH-Px 活性均明显下降 (*P* < 0.01), 而 MDA 含量

明显升高 ( $P < 0.01$ ),提示小鼠肝损伤发病以及 TFC 保肝作用机制可能与氧化应激水平相关;与模型组比较,水飞蓟素和 TFC 可显著增强 T-SOD 和

GSH-Px 活性,且显著降低 MDA 含量 ( $P < 0.01$ ),该结果提示 TFC 可能通过抑制氧化应激水平发挥保肝药效(见表 3)。

表 2 TFC 对血清 ALP、TBIL 和  $\gamma$ -GT 的影响

Table 2 Effect on the serum ALP, TBIL and  $\gamma$ -GT of TFC

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	ALP U/L	TBIL ( $\mu$ mol/L)	$\gamma$ -GT U/L
正常 Normal	-	108.73 $\pm$ 12.59	4.42 $\pm$ 0.38	3.12 $\pm$ 0.29
模型 Model	-	246.78 $\pm$ 26.73 <sup>##</sup>	12.96 $\pm$ 1.98 <sup>##</sup>	3.98 $\pm$ 0.36 <sup>##</sup>
水飞蓟素 Silymarin	150	196.43 $\pm$ 20.51 <sup>**</sup>	9.28 $\pm$ 0.87 <sup>**</sup>	3.59 $\pm$ 0.31 <sup>*</sup>
CPTF 低剂量 CPTF-L	100	215.37 $\pm$ 23.56 <sup>*</sup>	10.62 $\pm$ 1.42 <sup>**</sup>	3.66 $\pm$ 0.34
CPTF 中剂量 CPTF-M	200	202.43 $\pm$ 21.73 <sup>**</sup>	9.43 $\pm$ 1.69 <sup>**</sup>	3.61 $\pm$ 0.33 <sup>*</sup>
CPTF 高剂量 CPTF-H	400	185.67 $\pm$ 20.46 <sup>**</sup>	9.12 $\pm$ 1.37 <sup>**</sup>	3.57 $\pm$ 0.30 <sup>*</sup>

注:与正常组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Normal group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compared with Model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

表 3 TFC 对血清 T-SOD、GSH-Px 和 MDA 的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect on the serum T-SOD, GSH-Px and MDA of TFC ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	T-SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)	MDA (nmol/mL)
正常 Normal	-	222.93 $\pm$ 23.80	254.38 $\pm$ 23.22	5.32 $\pm$ 0.98
模型 Model	-	168.46 $\pm$ 10.26 <sup>##</sup>	181.55 $\pm$ 11.79 <sup>##</sup>	11.21 $\pm$ 1.71 <sup>##</sup>
水飞蓟素 Silymarin	150	190.91 $\pm$ 17.67 <sup>**</sup>	225.88 $\pm$ 16.31 <sup>**</sup>	7.74 $\pm$ 1.24 <sup>**</sup>
TFC 低剂量 TFC-low	100	185.94 $\pm$ 10.1 <sup>**</sup>	196.38 $\pm$ 16.71 <sup>*</sup>	9.61 $\pm$ 1.40
TFC 中剂量 TFC-medium	200	188.22 $\pm$ 10.02 <sup>**</sup>	210.46 $\pm$ 18.38 <sup>**</sup>	8.55 $\pm$ 1.31 <sup>**</sup>
TFC 高剂量 TFC-high	400	197.07 $\pm$ 12.41 <sup>**</sup>	221.49 $\pm$ 19.28 <sup>**</sup>	7.65 $\pm$ 1.14 <sup>**</sup>

注:与正常组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Normal group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compared with Model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

### 3.4 TFC 对肝组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 的影响

本研究同时从炎症反应方面对 TFC 的保肝作用机制进行了探讨。与正常组比较,模型组小鼠肝组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量均明显增加 ( $P <$

0.01),而水飞蓟素和 TFC 可显著抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),该结果表明,炎症反应可能作为肝损伤的重要发病机制,而 TFC 可能通过抑制炎症反应起到保肝作用(见表 4)。

表 4 TFC 对肝组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect on the hepatic TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 of TFC ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	TNF- $\alpha$ (ng/mg)	IL-1 $\beta$ (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)
正常 Normal	-	6.81 $\pm$ 1.14	6.31 $\pm$ 1.42	8.62 $\pm$ 1.11
模型 Model	-	23.79 $\pm$ 2.86 <sup>##</sup>	12.38 $\pm$ 2.74 <sup>##</sup>	29.85 $\pm$ 4.21 <sup>##</sup>
水飞蓟素 Silymarin	150	14.78 $\pm$ 2.35 <sup>**</sup>	8.42 $\pm$ 1.63 <sup>**</sup>	22.78 $\pm$ 3.39 <sup>**</sup>
TFC 低剂量 TFC-low	100	16.53 $\pm$ 2.42 <sup>**</sup>	11.29 $\pm$ 1.83	25.53 $\pm$ 3.92 <sup>*</sup>
TFC 中剂量 TFC-medium	200	15.13 $\pm$ 2.12 <sup>**</sup>	9.71 $\pm$ 1.82 <sup>*</sup>	24.73 $\pm$ 3.51 <sup>**</sup>
TFC 高剂量 TFC-high	400	13.45 $\pm$ 1.83 <sup>**</sup>	8.22 $\pm$ 1.63 <sup>**</sup>	23.15 $\pm$ 2.93 <sup>**</sup>

注:与正常组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Normal group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compared with Model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

### 3.5 TFC 对小鼠肝组织病理形态的影响

HE 染色分析肝组织病变结果表明,正常组小鼠肝小叶结构完整,肝细胞索排列整齐,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。模型组小鼠汇管区及中央静脉周围均出现明显炎性细胞浸润和肝细胞大量坏死(“○”所示),肝

小叶以及肝细胞索结构难以辨认,该结果提示  $\text{CCl}_4$  可引起小鼠肝组织损伤。与模型组相比,保肝药物水飞蓟素和 TFC 均可明显降低小鼠肝损伤程度,显著改善肝组织病变,TFC 高剂量组改善尤为明显,其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(见图 1)。

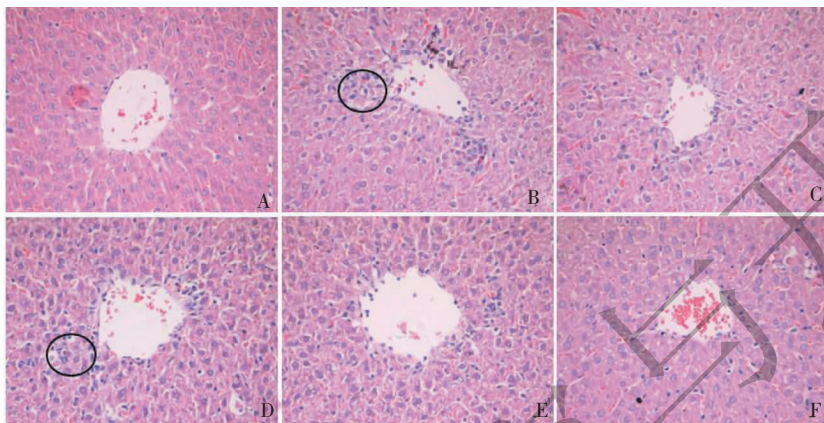


图 1 TFC 对小鼠肝组织病理形态的影响

Fig. 1 Effect on the liver pathology conformation of TFC

注:A:正常组;B:模型组;C:水飞蓟素组;D:TFC 低剂量组;E:TFC 中剂量组;F:TFC 高剂量组。

Note:A:Normal group;B:Model group;C:Silymarin group;D:TFC-low dose group;E:TFC-medium dose group;F:TFC-high dose group.

### 3.6 TFC 对 TLR-4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

与正常组相比, $\text{CCl}_4$  干预可引起模型组肝组织中 TLR-4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达明显升高( $P < 0.01$ ),表明本研究肝损伤机制可能与 TLR-4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关,该通路与调控炎症反应密切相关。与模

型组比较,水飞蓟素和 TFC 可显著抑制 TLR-4/NF- $\kappa$ B 蛋白相对表达( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),该结果表明 TFC 可能通过抑制 TLR-4/NF- $\kappa$ B 信号通路调控炎症反应,进而改善肝组织病变(见图 2)。

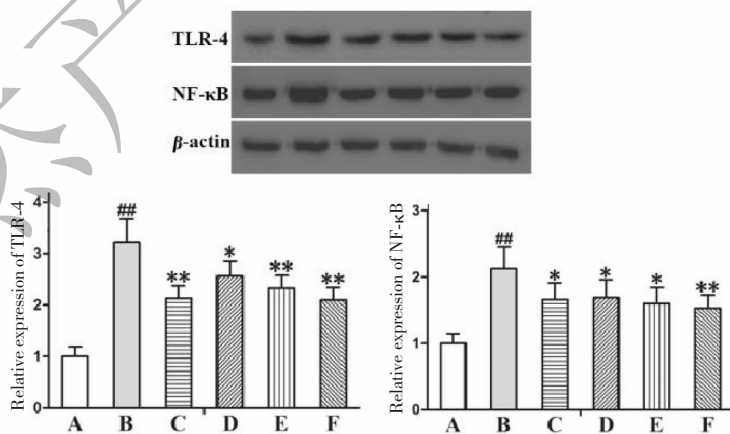


图 2 TFC 对 TLR-4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect on the expressions of TLR-4 and NF- $\kappa$ B proteins of TFC

注:A:正常组;B:模型组;C:水飞蓟素组;D:TFC 低剂量组;E:TFC 中剂量组;F:TFC 高剂量组;与正常组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note:A:normal group;B:model group;C:Silymarin group;D:TFC-lowh dose group;E:TFC-medium dose group;F:TFC-high dose group;compared with normal group,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;compared with model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

## 4 结论

肝脏作为人体物质和能量代谢的重要枢纽,暴露于有害环境下可发生急性或慢性肝损伤,如果得不到有效缓解可进一步恶化为肝纤维化、肝硬化或肝癌<sup>[6]</sup>。CCl<sub>4</sub>所致实验鼠急性肝损伤是一种经典的实验性肝损伤动物模型,可诱发肝脏氧化应激和炎症反应,常用于保肝药物的筛选以及作用机理研究<sup>[7,8]</sup>。本课题组前期研究表明,传统保肝中草药一般含有黄酮类化合物,且其总黄酮成分能够有效缓解实验性急性肝损伤或肝纤维化<sup>[9-11]</sup>。因此,本研究通过建立 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性肝损伤模型,从氧化应激和炎症反应方面研究 TFC 的保肝作用及机理。

血清 ALT、AST、ALP、TBIL 和  $\gamma$ -GT 含量或活性测定是评价肝功能的重要指标,当肝细胞结构受损或发生炎症时,ALT、AST、ALP、TBIL 和  $\gamma$ -GT 可由肝脏进入血液,可用于评价急性肝损伤严重程度<sup>[12]</sup>。本研究病理检查结果表明,小鼠预服 TFC 能够有效缓解 CCl<sub>4</sub> 诱发的肝组织病变,同时血清学检查表明,TFC 可降低血清 ALT、AST、ALP、TBIL 和  $\gamma$ -GT 含量或活性,提示 TFC 能够有效防治 CCl<sub>4</sub> 引起的小鼠急性肝损伤。CCl<sub>4</sub> 进入机体可破坏肝细胞膜结构,大量产生的脂质过氧化产物 MDA 又可继续破坏细胞膜结构,形成恶性循环<sup>[13]</sup>。CCl<sub>4</sub> 还可造成抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性下降,引起抗氧化系统失衡,导致机体发生严重的氧化应激<sup>[14]</sup>。通过检测血清中 MDA、T-SOD 和 GSH-Px 含量,我们发现 TFC 能够显著降低 MDA 含量,并增强 T-SOD 和 GSH-Px 活性,从而恢复机体氧化还原系统平衡,抑制氧化应激水平,起到保护肝细胞的作用。

TLR-4 属于跨膜受体蛋白,是激活固有免疫的关键介质,广泛表达于多种肝细胞,如枯否细胞、肝星状细胞、肝窦内皮细胞、胆管上皮细胞和肝树突细胞等,其介导的药物信号通路涉及多种肝脏疾病,导致大量促炎细胞因子的产生,从而引起炎症反应并加重肝损伤<sup>[15]</sup>。NF- $\kappa$ B 是调控细胞生长、分化、凋亡和炎症反应的重要转录因子,在病理条件下,其被 TLR-4 等诱导转移至胞核后可引起一系列炎症因子表达,继而加重的炎症反应可导致肝脏病情进一步恶化<sup>[16]</sup>。本研究病理切片显示肝组织出现明显炎症细胞浸润,肝组织炎症相关因子检测发现,CCl<sub>4</sub> 可引起小鼠肝组织 TLR-4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达上调,显示 TLR-4/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路被激活,同时

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 大量增加,表明小鼠肝脏存在严重炎症反应,这与 Chunhua 等<sup>[17]</sup>的研究一致。本研究中 TFC 可能通过抑制炎症细胞浸润,下调 TLR-4 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达,即抑制 TLR-4/NF- $\kappa$ B 信号通路,继而降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平,起到保护小鼠肝脏的作用。

综上所述,TFC 能够有效保护 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤的小鼠,其作用机理可能与抑制氧化应激和炎症反应有关,并且可能与抑制 TLR-4/NF- $\kappa$ 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 Dai B(戴斌). Chinese modern Yao medicine(中国现代瑶药)[M]. Guangxi: Guangxi Science and Technology Press, 2009:222-225.
- 2 Chen C(陈词). Zhao Jingmin: changes of liver disease spectrum in China[J]. *Liver Doctor*(肝博士), 2017, (2):10-12.
- 3 Gao TN(高天宇), Chen Z(陈真). Research progress of flavonoids in traditional Chinese medicines against chemical liver fibrosis[J]. *Anhui Med Phram J*(安徽医药), 2014, 18:1366-1368.
- 4 Gao Y(高雅), Wei RM(韦日明), Li YY(李迎迎). Extraction and purification technology for the total flavonoids from *Polygonum knotweed* L. using orthogonal experiment and macroporous resins[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*(辽宁中医杂志), 2017, 44:116-119.
- 5 Zheng L, Yin L, Xu L, et al. Protective effect of dioscin against thioacetamide-induced acute liver injury via FXR/AMPK signaling pathway in vivo[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 97:481-488.
- 6 Patsenker E, Chicca A, Petrucci V, et al. 4-O'-methylhonkisol protects from alcohol/carbon tetrachloride-induced liver injury in mice[J]. *J Mol Med*(Berl), 2017, 95:1077-1089.
- 7 Wu S, Yang C, Xu N, et al. The protective effects of Helix B surface peptide on experimental acute liver injury induced by carbon tetrachloride[J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62:1537-1549.
- 8 Feng PW(冯培文), Han JC(韩吉春), Li DF(李德芳), et al. Hepatoprotective Effect of Corynoline on Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Mice[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29:224-228.
- 9 Cao HK(曹后康), Gao Y(高雅), Huang SM(黄思茂), et al. Research on mechanism of effect of total flavonoids extracted from *Polygonum perfoliatum* L. on anti-hepatic fibrosis in rats[J]. *Chin J Pharmacol*(中国药理学通报), 2017, 33:1303-1308.