

# 基于 SIRT6/NF-κB 信号通路研究杠板归总黄酮对急性肝损伤大鼠的保护作用

连苑宇<sup>1</sup>, 徐杰<sup>1</sup>, 朱田田<sup>2</sup>, 马晓辉<sup>2</sup>, 曹后康<sup>2</sup>, 张可锋<sup>1</sup>, 韦日明<sup>1\*</sup>, 高雅<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>桂林医学院, 桂林 5410041; <sup>2</sup>甘肃中医药大学, 兰州 730000

**摘要:**研究杠板归总黄酮(TFP)对四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )致急性肝损伤大鼠的保护作用,并初步探索其作用机制。将70只雌性SD大鼠按体重随机分为7组:正常组、TFP对照组(200 mg/kg)、 $\text{CCl}_4$ 模型组、 $\text{CCl}_4$ +水飞蓟素组(120 mg/kg)及 $\text{CCl}_4$ +TFP高、中、低剂量组(200, 100, 50 mg/kg),每组10只。正常组和 $\text{CCl}_4$ 模型组灌胃蒸馏水(8 mL/kg),其余组分别灌胃相应剂量的药物,每天1次,连续10天。末次给药后,除正常组和TFP对照组外,其余各组均腹腔注射12%的 $\text{CCl}_4$ 橄榄油溶液(5 mL/kg),建立急性肝损伤模型。禁食不禁水16 h,眼球取血后采集肝组织。生化法检测血清中的肝功能、氧化应激指标;酶联免疫吸附法(ELISA)检测肝组织中炎症因子水平;蛋白质印迹法(Western blot)检测肝组织中SIRT6/NF-κB通路相关蛋白表达水平;HE染色检查肝组织病变程度,免疫组化观察肝组织中p-NF-κB p65的表达水平。结果显示,TFP可改善肝功能指标和肝损伤状况,提高机体抗氧化能力和SIRT6蛋白的表达水平,降低组织中炎症因子和NF-κB等相关蛋白表达。本研究结果表明,TFP对 $\text{CCl}_4$ 致急性肝损伤大鼠具有保护作用,其机制可能与SIRT6/NF-κB通路介导的炎症反应和抗氧化有关。

**关键词:**杠板归总黄酮;  $\text{CCl}_4$ ; 急性肝损伤; SIRT6; NF-κB; 炎症反应

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)11-1818-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.11.003

## The protective effect of *Polygonum perfoliatum* L. on acute liver injury in rats was studied based on the SIRT6/NF-κB signaling pathway

LIAN Yuan-yu<sup>1</sup>, XU Jie<sup>1</sup>, ZHU Tian-tian<sup>2</sup>, MA Xiao-hui<sup>2</sup>,  
CAO Hou-kang<sup>2</sup>, ZHANG Ke-feng<sup>1</sup>, WEI Ri-ming<sup>1\*</sup>, GAO Ya<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Guilin Medical University, Guilin 541004, China; <sup>2</sup>Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

**Abstract:** To explore the protective effect of total flavonoid from *Polygonum perfoliatum* L. (TFP) on acute liver injury induced by carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) in rats and explore its mechanism. The 70 female SD rats were randomly divided into 7 groups according to their body weight: normal group, TFP control group (200 mg/kg),  $\text{CCl}_4$  model group,  $\text{CCl}_4$  + silymarin group (120 mg/kg) and  $\text{CCl}_4$  + TFP high, middle and low dose groups (200, 100, 50 mg/kg), with 10 rats in each group. The normal group and the  $\text{CCl}_4$  model group were treated with distilled water (8 mL/kg), and the other groups were treated with corresponding doses of drugs once a day for 10 days. After the last administration, except the normal group and TFP control group, the other groups were intraperitoneally injected with 12%  $\text{CCl}_4$  olive oil solution (5 mL/kg) to establish the model of acute liver injury. After fasting for 16 hours, the blood of the eyeball was taken and the liver tissue was collected. The liver function and oxidative stress in serum were detected by biochemical method, the level of inflammatory factors in liver tissue was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the expression of SIRT6/NF-κB pathway related protein in liver tissue was detected by Western blot, the pathological changes of liver tissue were detected by HE staining, and the expression level of p-NF-κB p65 in liver tissue was observed by immunohistochemistry. The results showed that TFP could improve the index of liver function and the condition of liver injury, increase the ability of antioxidation and the expression level

of SIRT6 protein, and decrease the expression of inflammatory factors and NF- $\kappa$ B and other related proteins in tissue. The results of this study suggest that TFP has a protective effect on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in rats, and its mechanism may be related to the inflammatory response and antioxidation mediated by SIRT6/NF- $\kappa$ B pathway.

**Key words:** total flavonoids from *Polygonum perfoliatum* L.; CCl<sub>4</sub>; acute liver injury; SIRT6; NF- $\kappa$ B; inflammatory reaction

急性肝损伤(acute liver injury, ALI)是指在短期内由于各种原因导致的肝功能突发异常的疾病,为众多肝脏疾病的起始阶段,其发病机制复杂;药物中毒、免疫反应、病毒感染、缺血-再灌注等导致的急性肝损伤与氧化自由基、炎症因子和细胞凋亡等密切相关<sup>[1]</sup>。综合国内外有关治疗急性肝损伤的研究现状,西医常通过临床表现和病理学变化诊断肝病,但与临床实际还有一定的偏差,且临幊上针对各种原因导致的肝损伤仍缺乏高效的多靶点的保肝药物<sup>[2]</sup>。随着中医对肝病基础理论和临床研究的不断深入,在肝病的预防治疗上渐显优势,中医药理论对急性肝损伤研究发现其发病规律多为正虚不能抵抗外邪,导致湿热毒邪由气入血,血瘀和肝郁气滞<sup>[3]</sup>。因此,探索治疗急性肝损伤的药物和研究其作用机制具有重要意义。

炎症反应在急性肝损伤等疾病的治疗中受到广泛重视,其中核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)是重要的炎症转录因子。当肝脏发生炎症反应时,刺激NF- $\kappa$ B的乙酰化,启动TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等下游炎症因子的转录<sup>[4]</sup>,并与VCAM-1、MCP-1基因启动子区域结合进行调控,增加炎症因子的释放和炎症介质的合成<sup>[5]</sup>。沉默信息调节因子2(SIR2)是一种广泛存在于生物体的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)依赖的去乙酰化酶,人类中有7个与SIRT2同源的蛋白:SIRT1~SIRT7<sup>[6]</sup>。SIRT6位于19号染色体的13.3端,分别由8个外显子和7个外显子编码355和328个氨基酸长度的蛋白<sup>[7]</sup>,通过去乙酰化修饰染色质上包括NF- $\kappa$ B在内的许多基因组蛋白的H3K9位点发挥抑制基因转录的作用,从而下调炎症因子的表达起到抗炎的作用<sup>[8]</sup>。

杠板归为蓼科蓼属植物杠板归(*Polygonum perfoliatum* L.)的全草,用于治疗黄疸、肾炎水肿、乳腺炎、百日咳、慢性湿疹、毒蛇咬伤、湿热黄疸等症,具有抗菌、抗病毒、抗诱变、降血压、抗肿瘤、止血等疗效<sup>[9]</sup>。广西壮族民间常用于肝脏疾病的防治。近年来,本课题组为了确定杠板归防治肝病的药效物质基础,在准确鉴别杠板归药材的基础上,已对其中具有保肝、抗肝损伤的活性成分总黄酮进行了系统

的药效学、病理学和化学成分提取分离与含量测定研究<sup>[10,11]</sup>,实验证实TFP能够降低谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性,增强抗氧化酶如总超氧化物歧化酶(T-SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,其机制可能与其抗氧自由基、抑制脂质过氧化、提高机体免疫、降低炎性介质水平等作用有关。

本实验根据上述病机及发病特点,旨在探索TFP对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)致急性肝损伤大鼠的保护作用,并从氧化应激和炎症方面探讨其保肝作用机制,为TFP的开发利用提供实验依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

健康SPF级6~8周龄SD大鼠70只,雌性,体重200±20g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2016-0002。

### 1.2 实验药物及试剂

杠板归总黄酮(制备方法见<sup>[12]</sup>);水飞蓟素(美仑生物技术有限公司);四氯化碳CCl<sub>4</sub>(广东汕头市西陇化工厂);谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、γ-谷氨酰转肽酶(γ-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(南京建成生物工程研究所);肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-1β(IL-1β)和白介素-6(IL-6)试剂盒(武汉Elabscience生物技术有限公司);NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65、SIRT6、VCAM-1、MCP-1抗体(英国Abcam公司);RIPA裂解液、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(南通市碧云天生物技术研究所);PVDF膜(美国Millipore公司);抗β-actin单抗、辣根酶标记的二抗、DAB显色液(北京中杉金桥生物技术有限公司);Super ECL Plus超敏发光液(南通市碧云天生物技术研究所)。

### 1.3 仪器

Epoch 2HS酶标仪(美国Bio-Tek公司);电泳仪和转膜仪(美国Bio-Tek公司);AUW220D半微量电子天平(日本岛津公司);FRESCO 21高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);BX51光

学显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组与造模

将 70 只 SD 大鼠随机分为正常组、TFP 对照组( $200 \text{ mg/kg}$ )、 $\text{CCl}_4$  模型组、 $\text{CCl}_4 + \text{水飞蓟素}$ 组( $120 \text{ mg/kg}$ )及  $\text{CCl}_4 + \text{TFP}$  高、中、低剂量组( $200, 100, 50 \text{ mg/kg}$ )，每组 10 只。除正常组和  $\text{CCl}_4$  模型组灌胃( $8 \text{ mL/kg}$ )蒸馏水外，TFP 对照组、 $\text{CCl}_4 + \text{水飞蓟素}$ 组和  $\text{CCl}_4 + \text{TFP}$  高、中、低剂量组分别灌胃相应剂量的药物( $8 \text{ mL/kg}$ )，连续 10 天。末次给药后，除正常组和 TFP 对照组，其余各组均腹腔注射 12% 的  $\text{CCl}_4$  橄榄油溶液( $5 \text{ mL/kg}$ )，建立急性肝损伤大鼠模型。禁食不禁水 16 h 后，眼球取血，血液于  $4^\circ\text{C}$ 、 $4500 \text{ rpm}$  离心 15 min，分离血清于  $-20^\circ\text{C}$  保存，采集肝组织。

### 2.2 肝组织病理切片检查

取大鼠肝组织，用 4% 多聚甲醛固定 48 h，使用梯度浓度(75%、85%、95%、无水)乙醇及二甲苯进行常规脱水，石蜡包埋。将肝组织蜡块制作成  $4 \mu\text{m}$  厚度的切片，进行 HE 染色。染色后将切片置于光学显微镜下观察组织病理变化。

### 2.3 肝功能指标检测

将血浆置于离心机分离血清( $4^\circ\text{C}, 4500 \text{ rpm}, 15 \text{ min}$ )，保存在  $-20^\circ\text{C}$  备用。生化法检测血清中 ALT、AST、ALP、TBIL、 $\gamma$ -GT、T-SOD、GSH-Px、MDA 活性和水平；酶联免疫吸附法(ELISA)检测肝组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量。各指标测定均按照试剂盒说明书操作，使用 Epoch 2HS 酶标仪进行测定。

### 2.4 免疫组化

将制备好的  $4 \mu\text{m}$  组织切片置于  $37^\circ\text{C}$  恒温烘箱中过夜，二甲苯脱蜡 3 次，每次 3 min。切片依次浸入梯度浓度乙醇中水化，置于抗原修复液枸橼酸钠中高压修复抗原 4 min，修复后切片冷却至室温，将切片置于内源性过氧化物酶阻断剂 10 min。PBS 冲洗后滴加一抗 p-NF- $\kappa$ B p65 于组织切片， $37^\circ\text{C}$  恒温孵育 1 h，PBS 润洗 3 次，滴加二抗孵育 1 h。最后滴加 diaminobenzidine(DAB) 显色液孵育 3~5 min，苏木素染色、盐酸酒精分化后流水反蓝，脱水后封片，置于光学显微镜下观察表达情况。每个标本在 200 倍光镜下随机选取 8 个视野，采用 HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文报告分析系统在镜下计算

它们在整个肝组织区域中的平均阳性面积及平均吸光度(A)值。

### 2.5 蛋白免疫印迹法实验(Western blot)

检测肝组织中 SIRT6、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65、VCAM-1、MCP-1 蛋白表达水平，取大鼠肝组织相同部位  $60 \text{ mg}$ ，加入 RIPA 裂解液  $1 \text{ mL}$  于研磨管，冰浴充分研磨制备组织匀浆，待组织完全裂解后将匀浆转移到 EP 管( $14000 \text{ rpm}, 4^\circ\text{C}$ )离心 10 min，取上清液，BCA 法测定蛋白含量。配制浓度为 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶，上样后进行 SDS-PAGE 电泳，调节至  $80 \text{ V}$  恒压电泳，待指示剂到达分离胶与浓缩胶交界处时，切换为  $120 \text{ V}$  恒压电泳；电泳结束后，在冰浴条件下  $300 \text{ mA}$  恒流转膜  $1.5 \text{ h}$ ，将蛋白转至 PVDF 膜上，封闭 2 h，TBST 润洗 3 次后加入一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜；第二天取出后，用 TBST 润洗 3 次，加入二抗， $4^\circ\text{C}$  孵育  $1.5 \text{ h}$ ，经 ECL 化学发光法显色后，使用全自动化学发光图像分析系统检测，Image J 软件统计分析蛋白灰度，计算目的蛋白相对表达量。

### 2.6 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采取独立样本 t 检验，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 TFP 对 $\text{CCl}_4$ 致急性肝损伤大鼠血清 ALT、AST 活性的影响

结果如表 1 所示，与正常组比较， $\text{CCl}_4$  模型组大鼠血清 ALT、AST 水平显著升高( $P < 0.01$ )，TFP 对照组 ALT、AST 水平无统计学意义。与  $\text{CCl}_4$  模型组比较， $\text{CCl}_4 + \text{TFP}$  高、中剂量组 ALT、AST 水平显著降低( $P < 0.01$ )， $\text{CCl}_4 + \text{TFP}$  低剂量组 ALT、AST 水平降低( $P < 0.05$ )。

### 3.2 TFP 对 $\text{CCl}_4$ 致急性肝损伤大鼠血清 ALP、TBIL、 $\gamma$ -GT 活性的影响

结果如表 2 所示，与正常组比较，模型组大鼠血清 ALP、TBIL、 $\gamma$ -GT 水平显著升高，TFP 对照组大鼠血清 ALP、TBIL 和  $\gamma$ -GT 水平无统计学意义。与模型组比较，TFP 高、中剂量组 ALP、TBIL、 $\gamma$ -GT 水平显著降低( $P < 0.01$ )，TFP 低剂量组 ALP、TBIL 水平降低( $P < 0.05$ )， $\gamma$ -GT 水平无统计学意义。

表 1 TFP 对大鼠血清中 ALT、AST 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 1 The effects of TFP on the serum ALT and AST ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)
正常 Normal	-	76.88 ± 6.22	38.58 ± 4.02
TFP 对照 TFP control	200	80.32 ± 7.13	39.65 ± 3.98
CCl <sub>4</sub> 模型 CCl <sub>4</sub> model	-	305.15 ± 29.22 <sup>##</sup>	141.68 ± 13.79 <sup>##</sup>
CCl <sub>4</sub> + 水飞蓟素 CCl <sub>4</sub> + silymarin	120	220.17 ± 21.66 <sup>* *</sup>	99.64 ± 10.78 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 高剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-high	200	149.57 ± 13.88 <sup>* *</sup>	65.18 ± 7.13 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 中剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-medium	100	210.88 ± 20.78 <sup>* *</sup>	95.89 ± 9.23 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 低剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-low	50	276.45 ± 26.38 <sup>*</sup>	128.19 ± 12.53 <sup>*</sup>

注:与正常组相比,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与 CCl<sub>4</sub> 模型组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; Compared with CCl<sub>4</sub> model, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

表 2 TFP 对大鼠血清中 ALP、TBIL、γ-GT 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 2 The effects of TFP on the serum ALP, TBIL and γ-GT ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	ALP (U/L)	TBIL (μmol/L)	γ-GT (U/L)
正常 Normal	-	110.73 ± 10.37	4.58 ± 0.44	3.57 ± 0.33
TFP 对照 TFP control	200	113.78 ± 11.21	4.46 ± 0.41	3.49 ± 0.35
CCl <sub>4</sub> 模型 CCl <sub>4</sub> model	-	225.38 ± 22.14 <sup>##</sup>	14.18 ± 1.39 <sup>##</sup>	5.42 ± 0.49 <sup>##</sup>
CCl <sub>4</sub> + 水飞蓟素 CCl <sub>4</sub> + silymarin	120	177.19 ± 17.27 <sup>* *</sup>	10.03 ± 1.01 <sup>* *</sup>	4.75 ± 0.46 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 高剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-high	200	132.15 ± 13.05 <sup>* *</sup>	6.16 ± 0.59 <sup>* *</sup>	3.98 ± 0.38 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 中剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-medium	100	173.89 ± 16.98 <sup>* *</sup>	9.72 ± 0.95 <sup>* *</sup>	4.66 ± 0.41 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 低剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-low	50	204.05 ± 19.65 <sup>*</sup>	12.88 ± 1.19 <sup>*</sup>	5.01 ± 0.46

### 3.3 TFP 对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤大鼠血清 T-SOD、GSH-Px 和 MDA 的影响

结果如表 3 所示,与正常组相比,模型组大鼠血清 T-SOD 和 GSH-Px 活性显著降低,MDA 水平显著升高,TFP 对照组 T-SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平

无统计学意义。与模型组比较,TFP 高、中剂量组 MDA 水平显著降低( $P < 0.01$ ),T-SOD 和 GSH-Px 活性显著升高( $P < 0.01$ )。TFP 低剂量组 MDA 水平降低( $P < 0.05$ ),T-SOD 和 GSH-Px 活性升高( $P < 0.05$ )。

表 3 TFP 对大鼠血清 MDA、T-SOD 和 GSH-Px 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 3 The effects of TFP on the serum MDA, T-SOD and GSH-Px ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	T-SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)	MDA (nmol/mL)
正常 Normal	-	232.17 ± 21.85	250.66 ± 22.78	5.36 ± 0.51
TFP 对照 TFP control	200	237.35 ± 20.56	245.36 ± 23.89	5.43 ± 0.53
CCl <sub>4</sub> 模型 CCl <sub>4</sub> model	-	148.67 ± 15.72 <sup>##</sup>	168.74 ± 17.03 <sup>##</sup>	12.18 ± 1.13 <sup>##</sup>
CCl <sub>4</sub> + 水飞蓟素 CCl <sub>4</sub> + silymarin	120	189.96 ± 17.98 <sup>*</sup>	213.06 ± 20.18 <sup>*</sup>	8.09 ± 0.78 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 高剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-high	200	216.31 ± 19.64 <sup>* *</sup>	225.01 ± 22.16 <sup>* *</sup>	6.38 ± 0.61 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 中剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-medium	100	189.65 ± 17.97 <sup>* *</sup>	208.92 ± 17.93 <sup>* *</sup>	8.53 ± 0.82 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 低剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-low	50	170.17 ± 15.68 <sup>*</sup>	193.23 ± 15.15 <sup>*</sup>	11.05 ± 0.97 <sup>*</sup>

### 3.4 TFP 对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 含量的影响

结果如表 4 所示,与正常组相比,模型组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量显著升高 ( $P < 0.01$ )。与

模型组比较,TFP 高、中剂量组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ),TFP 低剂量组除 IL-6 含量无统计学意义外,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量降低 ( $P < 0.05$ )。

表 4 TFP 对大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 The effects of TFP on the serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
正常 Normal	-	43.83 ± 4.18	35.59 ± 3.46	38.56 ± 4.32
CCl <sub>4</sub> 模型 CCl <sub>4</sub> model	-	122.25 ± 12.16 <sup>##</sup>	132.73 ± 13.25 <sup>##</sup>	140.49 ± 14.03 <sup>##</sup>
CCl <sub>4</sub> + 水飞蓟素 CCl <sub>4</sub> + silymarin	120	95.67 ± 9.28 <sup>* *</sup>	102.13 ± 9.71 <sup>*</sup>	106.14 ± 9.97 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 高剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-high	200	56.24 ± 5.11 <sup>* *</sup>	59.12 ± 5.76 <sup>* *</sup>	68.45 ± 6.73 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 中剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-medium	100	92.23 ± 8.97 <sup>* *</sup>	96.14 ± 9.24 <sup>* *</sup>	98.75 ± 9.86 <sup>* *</sup>
CCl <sub>4</sub> + TFP 低剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-low	50	110.86 ± 10.44 <sup>*</sup>	118.93 ± 12.07 <sup>*</sup>	128.88 ± 12.53

### 3.5 TFP 对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤大鼠肝组织病理学形态的影响

HE 染色结果显示,正常组大鼠肝小叶结构完整,肝细胞索呈放射状整齐排列,汇管区及中央静脉周围肝细胞形态清晰完整,细胞核位于肝细胞中央,且大小形态均一。模型组大鼠肝小叶结构已严重损坏,肝细胞有大面积的空泡变形,汇管区及中央静脉

周围出现大量炎症细胞浸润和肝细胞坏死,该结果提示 CCl<sub>4</sub> 可引起大鼠肝损伤。与模型组比较,水飞蓟素组和 TFP 各剂量组肝细胞空泡数量及炎性细胞浸润明显降低、病变程度减轻。对比发现 TFP 高剂量组疗效明显,肝小叶结构基本完整,肝细胞索排列大致呈放射状,肝细胞坏死数量和空泡数量明显减少(见图 1)。

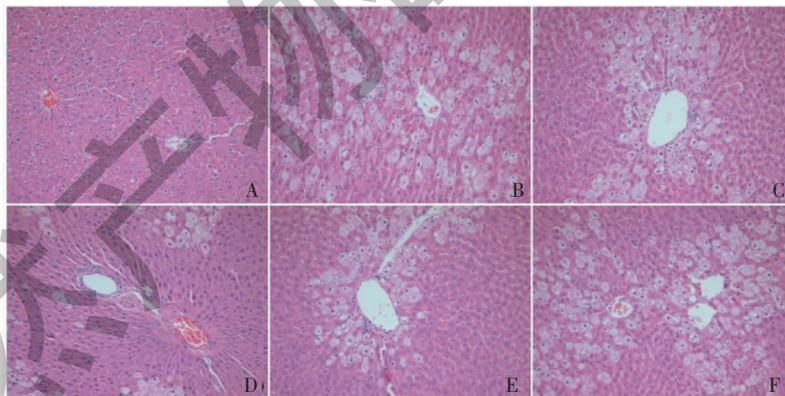


图 1 HE 染色观察 TFP 对急性肝损伤大鼠肝组织病理状况的影响 (HE,  $\times 100$ )

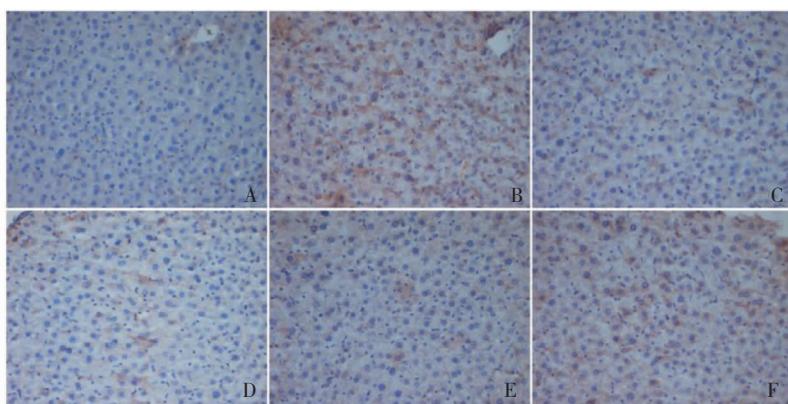
Fig. 1 Effects of TFP on the hepatic histopathology in acute liver injury rats (HE,  $\times 100$ )

注:A. 正常组;B. CCl<sub>4</sub> 模型组;C. CCl<sub>4</sub> + 水飞蓟素组 120 mg/kg;D. CCl<sub>4</sub> + TFP 高剂量组 200 mg/kg;E. CCl<sub>4</sub> + TFP 中剂量组 100 mg/kg;F. CCl<sub>4</sub> + TFP 低剂量组 50 mg/kg, 下同。Note: A: Normal group; B: CCl<sub>4</sub> model group; C: CCl<sub>4</sub> + silymarin group; D: CCl<sub>4</sub> + TFP high dose group; E: CCl<sub>4</sub> + TFP middle dose group; F: CCl<sub>4</sub> + TFP low dose group, the same below.

免疫组化结果如图 2 和表 5 所示,与正常组相比,模型组 p-NF- $\kappa$ B p65 表达显著上升 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,除 TFP 低剂量组无统计学意义外,其余各给药组 p-NF- $\kappa$ B p65 的表达显著下降 ( $P < 0.01$ )。

### 3.6 TFP 对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤大鼠肝组织中的 SIRT6、p-NF- $\kappa$ B p65、MCP-1、VCAM-1 蛋白表达水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 SIRT6 蛋白表达水平显著降低,p-NF- $\kappa$ B p65、MCP-1、VCAM-

图 2 TFP 对急性肝损伤大鼠肝组织中 p-NF-κB p65 表达的影响 (IHC,  $\times 200$ )Fig. 2 Effects of TFP on p-NF-κB p65 expression in acute liver injury rats liver tissues (IHC,  $\times 200$ )表 5 TFP 对急性肝损伤大鼠肝组织中 p-NF-κB p65 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 5 Effects of TFP on p-NF-κB p65 expression in acute liver injury rats liver tissues ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	p-NF-κB p65 光密度 The Optical density of p-NF-κB p65
正常 Normal	-	$45.124 \pm 4.356$
CCl <sub>4</sub> 模型 CCl <sub>4</sub> model	-	$96.453 \pm 9.525^{##}$
CCl <sub>4</sub> + 水飞蓟素 CCl <sub>4</sub> + silymarin	120	$75.354 \pm 6.949^{* *}$
CCl <sub>4</sub> + TFP 高剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-high	200	$56.785 \pm 5.429^{* *}$
CCl <sub>4</sub> + TFP 中剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-medium	100	$73.785 \pm 7.156^{* *}$
CCl <sub>4</sub> + TFP 低剂量 CCl <sub>4</sub> + TFP-low	50	$89.756 \pm 8.923$

1 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,TFP 高、中剂量组大鼠肝组织中 SIRT6 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), p-NF-κB p65、

MCP-1、VCAM-1 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 结果见图 3。

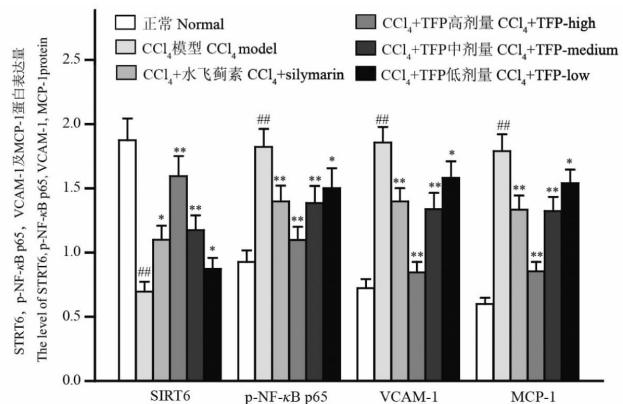
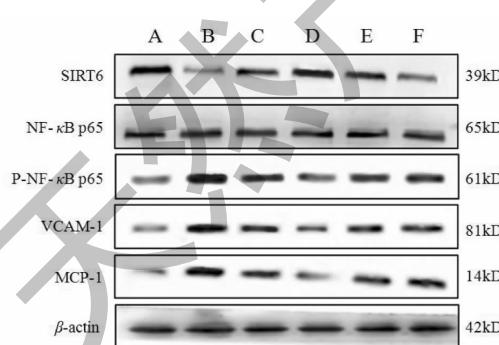


图 3 TFP 对大鼠模型肝组织中 SIRT6、p-NF-κB p65、MCP-1、VCAM-1 蛋白表达情况的影响

Fig. 3 Effect of TFP on the SIRT6, p-NF-κB p65, MCP-1 and VCAM-1 protein

#### 4 讨论

本实验通过建立 CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤大鼠模型,并采用杠板归总黄酮(TFP)干预,从肝功能指标、病理

切片以及相关炎症因子的表达等方面,发现了 TFP 对大鼠急性肝损伤的缓解作用。在研究中,建立成功的肝损伤动物模型是筛选保肝药物的关键步

骤之一,CCl<sub>4</sub> 主要通过其引起自由基代谢导致氧化应激破坏肝组织细胞膜结构,使细胞膜通透性增高,导致中性粒细胞炎性浸润,细胞质中的(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)升高,脂质过氧化物丙二醛(MDA)大量产生持续破坏细胞膜结构,造成恶性循环<sup>[13]</sup>。除此之外,CCl<sub>4</sub> 还可造成抗氧化物酶总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性下降,引起酶抗氧化系统失衡,可能形成氧化应激恶性循环加重炎症反应<sup>[14]</sup>。因此,相关指标 ALT、AST、ALP、TBIL、 $\gamma$ -GT、MDA 含量升高 T-SOD、GSH-Px 活性降低可以被认为是判断急性肝损伤严重程度的重要依据。本实验中,经 CCl<sub>4</sub> 造模处理后,与正常组相比,模型组大鼠血清中 ALT、AST、ALP、TBIL、 $\gamma$ -GT、MDA 显著升高,T-SOD、GSH-Px 活性显著降低。观察病理切片,HE 染色显示肝组织结构严重受损,肝细胞有严重的空泡变形并被大量的炎症细胞浸润,肝小叶结构受损严重,表明急性肝损伤模型建立成功。

据报道,SIRT6 调节 NF- $\kappa$ B 信号传导通路中的端粒染色质和下游基因的表达,转录因子 NF- $\kappa$ B 通过调控与增殖、凋亡、分化、炎症和免疫系统调节相关的基因,在环境刺激应激反应中发挥关键作用<sup>[15]</sup>。在非应激条件下,NF- $\kappa$ B 被其抑制子 I $\kappa$ B $\alpha$  隔离在细胞质中,在应激条件下,I $\kappa$ B $\alpha$  被降解,允许 NF- $\kappa$ B 转录因子移位到细胞核,进而激活关键基因的转录<sup>[16]</sup>。鉴于这些靶基因的重要性及其组织特异性,NF- $\kappa$ B 途径的激活受到几种机制的严格调控,其中一个涉及依赖于 NAD<sup>+</sup> 的脱乙酰化酶和 ADP-核糖基转移酶 SIRT6<sup>[17]</sup>。通路被激活后,SIRT6 与 NF- $\kappa$ B 靶基因的启动子区域结合,通过去乙酰化组蛋白 H3 的乙酰化赖氨酸 9 促进基因沉默<sup>[18]</sup>。由单核巨噬细胞分泌的 TNF- $\alpha$  具有促进炎症反应和活化巨噬细胞的作用,控制着炎症介质的产生和分泌<sup>[19]</sup>。IL-1 $\beta$  主要由单核巨噬细胞和淋巴细胞分泌,自身除了能够引发致病的炎症反应,对多种炎症因子的表达也有促进作用,参与急性期炎症反应<sup>[20]</sup>。IL-6 是由单核巨噬细胞分泌的具有多种生物学活性的炎症因子,肝脏受损时,单核巨噬细胞释放过量的 IL-6,进而导致肝细胞大量坏死,长期可发展为肝纤维化甚至肝硬化<sup>[21]</sup>。同时,大量 IL-6 集聚会加快白细胞通过 VCAM-1 与内皮细胞进行接触,并且更多的单核细胞通过 MCP-1 到达肝脏受损

部位,加重炎症反应<sup>[22]</sup>。

现代研究表明,杠板归具有止咳祛痰、抗氧化抗炎、抗病毒等丰富的药理作用本实验结果显示,在临床中也常用来治疗烧伤、咳嗽、带状疱疹、急性肾炎和细菌性痢疾等多种疾病,均有良好的疗效,与此同时杠板归也被开发为多种剂型在临床中普遍使用<sup>[23]</sup>。本实验检测临床中常用来判断肝功能的各项指标,结果显示经过 TFP 给药后,与正常组相比,TFP 对照组大鼠血清中的主要转氨酶和肝功能指标的影响无统计学意义,这提示 TFP 不会对肝功能造成不良影响;而与模型组相比,CCl<sub>4</sub> + TFP 各剂量组大鼠血清中转氨酶含量降低,抗氧化因子升高,提示 TFP 可有效改善肝功能指标并提高机体抗氧化能力,有望将其开发为高效、低毒的保肝制剂。显微镜观察发现,经过治疗后,大鼠肝组织结构、空泡大小及变形程度较模型组有明显改善,炎性细胞浸润明显减轻,p-NF- $\kappa$ B p65 的表达减弱。Western blot 检测 SIRT6、p-NF- $\kappa$ B p65、MCP-1、VCAM-1 蛋白的表达,其结果显示 TFP 各剂量组 SIRT6 的表达升高,p-NF- $\kappa$ B p65 表达降低,关键促炎因子 MCP-1、VCAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  相的表达减轻,提示 TFP 可能通过降低肝脏炎症反应和增强抗氧化能力,有效改善大鼠的急性肝损伤。此结果表明 TFP 可能通过促进 SIRT6 表达,和抑制 NF- $\kappa$ B 的转录降低下游炎症因子的释放发挥抗急性肝损伤作用。

综上,TFP 可有效减缓肝损伤,其机制可能与 SIRT6/NF- $\kappa$ B 通路介导的炎症反应和抗氧化有关。本文研究结果或为临床采用 TFP 减轻肝损伤提供新方法新策略。

## 参考文献

- Zhang Y, Wang C, Yu B, et al. Gastrodin protects against ethanol-induced liver injury and apoptosis in HepG2 cells and animal models of alcoholic liver disease [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41:670-679.
- Lu W, Pan M, Fang YK, et al. Advance in traditional chinese medicine for acute hepatic injury [J]. Central South Pharm (中南药学), 2019, 17:1504-1507.
- Wang QN, Lv WL, et al. Research progress on treatment of drug-induced liver injury with TCM [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm (中医药导报), 2019, 25 (14):125-128.
- Gao Y, Xi BT, Cao HK, et al. Protective effects and mechanism of total flavonoids from the root of *Glochidion puberum* (Linn.) Hutch. on acute liver injury based on oxidative

- stress and TLR-4/NF-κB signaling pathway [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med( 中药药理与临床)*, 2018, 34(4):74-77.
- 5 Sun H, Zhang C, Huang Y, et al. MCP-1-induced protein 1 relieved liver fibrosis by suppressing the TGF-β/Smad pathway and epithelial and mesenchymal transition [J]. *J Biomater Tiss Eng*, 2019, 9:1355-1361.
- 6 Sarikhani M, Mishra S, Desingu PA, et al. SIRT2 regulates oxidative stress-induced cell death through deacetylation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25: 1638-1656.
- 7 Zhang XY, Zhang ZY. Research progress of SIRT6 in cardiovascular diseases [J]. *Chin Pharmacol Bull( 中国药理学通报)*, 2018, 34:170-173.
- 8 Michishita E, McCord RA, Berber E, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin [J]. *Nature*, 2008, 452(7186):492-496.
- 9 Zhang KF, Du ZC, Gao Y, et al. Effect and mechanism of *Polygonum perfoliatum* on hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2012, 18(16):242-245.
- 10 Gao Y, Wei RM, Li YY, et al. 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.
- 11 Cai XL, Zhang KF. Determination contents of total flavonoids and quercetin of *Polygonum perfoliatum L.* [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med( 辽宁中医杂志)*, 2010, 37:511-512.
- 12 Cao HK, Gao Y, Huang SM, et al. Research on mechanism of effect of total flavonoids extracted from *Polygonum perfoliatum L.* on anti-hepatic fibrosis in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull( 中国药理学通报)*, 2017, 33:1303-1308.
- 13 Huang SM, Cao HK, Gao Y, et al. Protective effect and mechanism of polysaccharides of *Camellia nitidissima* on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med( 中药药理与临床)*, 2016, 32(6):117-120.
- 14 Xi BT, Zhong ML, Cao HK, et al. Hepatoprotective effects and mechanism of *Cyclea hypoglauca* ( Schauer) Diels total flavonoids on mice with acute liver injury induced by carbon tetrachloride [J]. *Nat Prod Res( 天然产物研究与开发)*, 2018, 30:1208-1213.
- 15 Santos-Barriopedro I, Vaquero A. Complex role of SIRT6 in NF-κB pathway regulation [J]. *Mol Cell Oncol*, 2018, 5(4): e1445942.
- 16 Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12:86.
- 17 Kugel S, Mostoslavsky R. Chromatin and beyond: the multi-tasking roles for SIRT6 [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(2):72-81.
- 18 Qin K, Zhang N, Zhang Z, et al. SIRT6-mediated transcriptional suppression of txnip is critical for pancreatic beta cell function and survival in mice [J]. *Diabetologia*, 2018, 61: 906-918.
- 19 Gu HM, Meng QL, Zuo RT, et al. Effects of silkworm soup add and subtract on TNF-radiation, IL-6, NO and PGE2 in serum and joint fluid of rats with gout arthritis [J]. *J Chin Med Mater( 中药材)*, 2017, 40:2946-2949.
- 20 Thomas M, Prabha A, Deepak B, et al. Alteration of hepatic proinflammatory cytokines is involved in the resveratrol-mediated chemoprevention of chemically-induced hepatocarcinogenesis [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(1):229-234.
- 21 Wang L, Li X, Chen C. 3-methyadenine attenuates chloroform-induced hepatotoxicity via autophagy activation [J]. *Biomed Res*, 2018, 39(2):87-94.
- 22 Huang SM, Gao Y, Cao HK, et al. Protective effects and functional mechanism of *Clerodendrum philippinum* Schauer var. *simplex* Mlodenke total flavonoids on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. *Nat Prod Res Dev( 天然产物研究与开发)*, 2018, 30:212-217.
- 23 Liu YM, Fan WC. Research progress of pharmacological action and clinical application of *Polygonum perfoliatum L.* [J]. *Asia-Pac Tradit Med( 亚太传统医药)*, 2011, 7(6): 161-162.