

生姜醇提取物对四氯化碳致大鼠肝纤维化炎症相关因子的影响*

秦燕¹, 刘仁贵², 苏娟¹, 余树青¹, 冯超²

(1. 大理学院基础医学院生理学与病理生理教研室, 云南大理 671000;

2. 大理学院附属医院外六科, 云南大理 671000)

摘要:目的 观察生姜醇提取物对四氯化碳所致大鼠肝纤维化进程中炎症相关因子的影响。方法 将 SD 雄性大鼠 24 只分为对照组(CON 组, $n=8$)、肝纤维化模型组(HF 组, $n=8$)及生姜醇提取物干预组(ZGB 组, $n=8$)。HF 组及 ZGB 组大鼠背部皮下注射 50% CCL₄ 橄榄油溶液 3 mL/kg, 每周 2 次, 共 8 周, 首次剂量加倍。同时 ZGB 组大鼠给予生姜醇提取物溶液灌胃(300 mg/kg), CON 组、HF 组以等体积生理盐水灌胃, 每天 1 次。8 周后处死动物, 采集血清, 检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平。留取肝组织样本, 测定羟脯氨酸(Hyp)水平; 免疫印迹检测 α -SMA 蛋白的表达量; 实时定量 PCR 检测 TNF α 、IL-1 及 IL-6 的表达水平; HE 染色观察肝组织的病理学改变。结果 与 HF 组比较, ZGB 组血清 ALT、AST 水平明显下降($P<0.05$); 肝组织 Hyp 水平降低($P<0.05$)。免疫印迹结果显示, ZGB 组 α -SMA 蛋白的表达量明显低于 HF 组($P<0.05$); 实时定量 PCR 的结果显示, ZGB 组肝组织 TNF α 、IL-1b 及 IL-6 的表达水平较 HF 组下降($P<0.05$)。光镜下 ZGB 组肝细胞变性和坏死程度较 HF 组明显减轻。结论 生姜醇提取物具有较好的抗肝纤维化、保护肝细胞的作用, 其机制之一可能是生姜醇提取物能减少促炎因子 TNF α 、IL-1b 及 IL-6 的释放, 从而延缓或阻碍了肝纤维化进程。

关键词: 四氯化碳; 生姜醇提取物; 肝硬化; 促炎因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.18.019

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)18-2316-03

Effects of zingiber alcohol extract on inflammation-associated cytokines in rat with carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis*

Qin Yan¹, Liu Rengui², Su Juan¹, Yu Shuqing¹, Feng Chao²

(1. Teaching and Researching Section of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medicine, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China; 2. Six Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: Objective To investigate effects of zingiber alcohol extract(ZGB) on the inflammation-associated cytokines in rats with carbon tetrachloride(CCL₄) induced hepatic fibrosis. **Methods** 24 adult male SD rats were randomly divided into three groups: normal control group(CON, $n=8$), hepatic fibrosis model group(HF, $n=8$), and zingiber administration group(ZGB, $n=8$). The rats in the HF and ZGB groups were administrated by subcutaneous injection of 50% CCL₄ 3 mL/kg, twice per week for 8 weeks, the first time dosage was doubled. At the same time the ZGB group received daily intragastric ZGB(300 mg/kg a day), while the CON and HF groups received daily intragastric isovolumic normal saline for 8 weeks. The animals were executed at the end of 8 weeks. Serum samples were collected for detecting the content of ALT, AST. The liver samples were used for assessing the Hyp content, detecting α -SMA level by Western blotting and TNF α , IL-1b, IL-6 mRNA levels by the real-time PCR. The histological observation of the liver tissue was done with HE stain. **Results** As compared with the HF group, the serum levels of ALT and AST in the ZGB group were markedly decreased, and the content of Hyp in liver tissue was decreased($P<0.05$). The Western blot results showed that the expression amount of α -SMA protein in the ZGB group was significantly lower than that in the HF group($P<0.05$); the real-time quantitative PCR showed that the expression levels of TNF α , IL-1b, IL-6 were decreased compared with the HF group($P<0.05$). The hepatocyte degeneration degrees observed by the optical microscope in the ZGB group were significantly alleviated compared with the HF group. **Conclusion** ZGB has better anti-hepatic fibrosis and hepatocyte-protective effect, one of its mechanisms could be that ZGB could reduce the release of pro-inflammatory cytokines TNF α , IL-1b and IL-6, thus delay or hinder the progress course of liver fibrosis.

Key words: carbon tetrachloride; zingiber alcohol cirrhosis; hepatic fibrosis; pro-inflammatory cytokines

肝纤维化是许多慢性致病因子作用于肝脏, 以细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)在肝脏内过度沉积为其特征^[1]。肝星形细胞(hepatic satellite cell, HSC)是 ECM 的主要来源细胞, 活化的 HSC 既可以分泌大量的 ECM, 又能调节 ECM 的降解。而炎症因子刺激被认为是 HSC 激活的重要因素^[2], 因此抑制炎症因子的释放对于减轻肝纤维化具有重要的意义。

生姜既是食材, 又是传统中药。近年来的研究表明生姜具有抗炎、抑菌、抗氧化、免疫调节等多种作用^[3-5]。前期的研究显示, 生姜醇提取物对四氯化碳所致的肝纤维化大鼠具有良好的抗纤维化作用^[6], 那么其抗肝纤维化作用的机制是否与影响炎症相关因子的释放有关呢? 本文从炎症相关因子方面入手进一步探讨生姜醇提取物抗肝纤维化作用的可能机制, 以期临床

* 基金项目: 云南省科技厅应用基础研究计划面上项目(2011FZ164)。 作者简介: 秦燕(1973—), 硕士, 副教授, 主要从事生理与病理生理学方面的研究。

防治肝纤维化提供药效学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠, 雄性, SPF 级, 体质量 210~250 g, 购自第三军医大学实验动物中心。

1.1.2 药物与试剂 生姜醇提取物, 陕西旭煌植物科技有限公司, 经 HPLC 检测纯度达 90% 以上; 四氯化碳, 成都市智远化工贸易有限公司; Hyp 检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 小鼠抗大鼠 α -SMA 单克隆抗体, 武汉博士德生物工程有限公司; HRP 标记的羊抗小鼠 IgG, 北京中杉生物技术有限公司; Trizol Reagent, Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒, Fermentas 公司; SYBR GREEN 荧光染料, Takara 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器 JY88-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所); T6 紫外分光光度计(北京普析), TGL-18R 高速冷冻离心机(珠海黑马)。免疫印迹电泳系统(北京六一仪器厂), Mx3000 型实时荧光定量 PCR 仪(Stratagene, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 大鼠背部皮下注射 50% CCL4 橄榄油溶液 3 mL/kg, 每周 2 次, 共 8 周, 首次剂量加倍, 制备肝纤维化模型。正常大鼠皮下注射等量生理盐水。

1.2.2 分组与处理 24 只 SD 大鼠随机分为 3 组: 正常对照组(CON 组, $n=8$); 肝纤维化模型组(HF 组, $n=8$); 生姜醇提取物干预组(ZGB 组, $n=8$)。造模同时, ZGB 组给予生姜醇提取物 300 mg/kg 灌胃; CON 组、HF 组以等体积生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 8 周。末次给药后 24 h, 10% 水合氯醛麻醉(0.4 mL/kg), 下腔静脉采血, 3 500 r/min, 离心 10 min, 分离血清, 测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平; 取部分肝叶制成 10% 肝组织匀浆, 测定肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量; 另取部分肝叶迅速放入 -80 °C 冰箱冻存用于后续实验。切取相同部位肝叶用 10% 中性福尔马林固定, 进行 HE 染色。

1.2.3 指标检测

1.2.3.1 血清 ALT、AST 含量的测定 全自动生化分析仪检测肝功能指标 ALT、AST。

1.2.3.2 肝组织 Hyp 含量的测定 制备 10% 肝组织匀浆, 严格按试剂盒说明书提供的方法进行操作, 采用 T6 紫外分光光度计检测。

1.2.3.3 免疫印迹检测肝组织 α -SMA 表达 提取蛋白样品, 用考马斯亮蓝法检测蛋白浓度, 每泳道 50 μ g 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 将 PVDF 膜平衡后湿转法转印 3 h(冰浴), 之后 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 小鼠抗大鼠 α -SMA 单克隆抗体(抗体浓度 1:300) 4 °C 孵育过夜, 3 次漂洗后以 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(抗体浓度 1:500) 室温下震荡孵育 1 h, ECL 化学发光显色, 暗室曝光。

1.2.3.4 实时定量 PCR 检测肝组织 TNF α 、IL-1b 及 IL-6 的表达水平 提取总 RNA, 取 2 μ g 总 RNA 用于反转录, 反转录后产物用超纯水 1:5 稀释后用于 mRNA 表达检测。PCR 反应体系 25 μ L, 反应条件为 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 60 °C 40 s, 72 °C 50 s, 共 40 个循环。实时定量 PCR 结果由仪器自动采集给出数据, 采用 Excel 处理后, 大鼠的目标基因的转录水平, 用其相对于空白组大鼠相应基因转录水平的倍数来表示。

1.2.4 肝组织 HE 染色 固定好的肝标本经常规脱水, 石蜡包埋、切片, 进行 HE 染色, 观察肝组织病理学变化。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用最小

显著差法 LSP 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

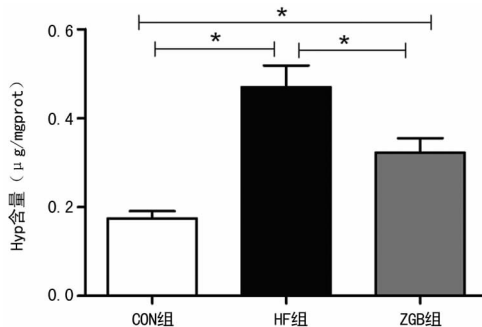
2.1 大鼠肝功能指标的变化 与 CON 组比较, HF 组大鼠血清 ALT、AST 水平显著升高($P < 0.05$), 尤以 ALT 的升高较为明显; 与 HF 组比较, ZGB 组大鼠血清 ALT、AST 水平均有不同程度的下降($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 AST、ALT 水平的变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)
CON 组	29.38 \pm 8.12	34.00 \pm 7.48
HF 组	1 063.50 \pm 497.71 \blacktriangle	709.00 \pm 255.61 \blacktriangle
ZGB 组	395.14 \pm 175.90 ∇	355.71 \pm 172.43 ∇

\blacktriangle : $P < 0.05$, 与 CON 组相比; ∇ : $P < 0.05$, 与 HF 组比较。

2.2 大鼠肝组织 Hyp 含量的变化 与 CON 组比较, HF 组大鼠肝组织 Hyp 含量明显升高($P < 0.05$); 与 HF 组比较, ZGB 组大鼠肝组织 Hyp 含量降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



*: $P < 0.05$.

图 1 各组大鼠肝组织 Hyp 的含量

2.3 大鼠肝组织 α -SMA 蛋白的表达 CON 组肝组织 α -SMA 蛋白的表达量极低, 而 HF 组大鼠肝组织 α -SMA 蛋白的表达量显著增加($P < 0.05$); ZGB 组大鼠肝组织 α -SMA 蛋白的表达量呈明显减少。见图 2。

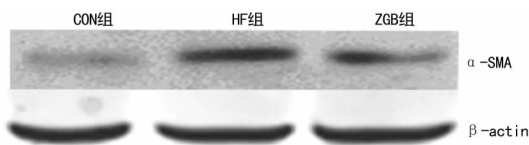
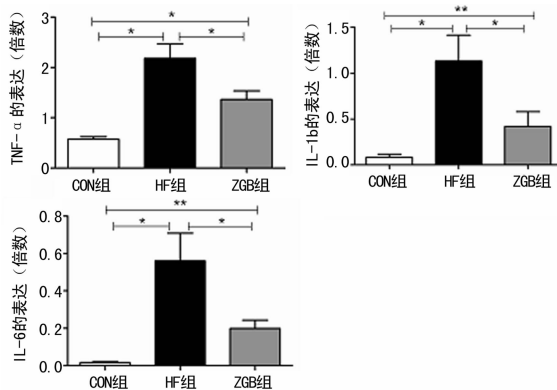


图 2 各组大鼠肝组织 α -SMA 蛋白的表达量



*: $P < 0.05$; **: $P > 0.05$.

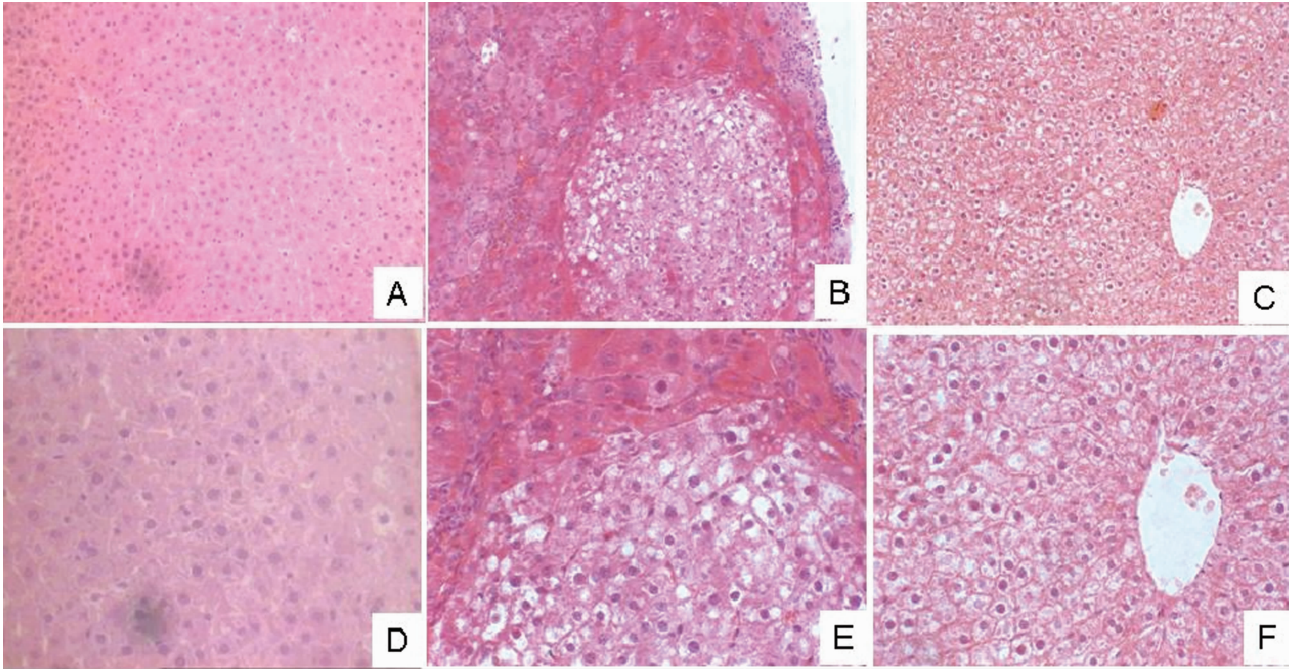
图 3 各组大鼠肝组织 TNF α 、IL-1b 及 IL-6 基因表达水平

2.4 大鼠肝组织 TNF α 、IL-1b 及 IL-6 mRNA 表达水平 与 CON 组比较, HF 组大鼠 TNF α 、IL-1b 及 IL-6 mRNA 表达水

平均明显增加 ($P < 0.05$); 与 HF 组比较, ZGB 组肝组织 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1b 及 IL-6 mRNA 表达水平均明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.5 肝组织病理组织学的变化 与 CON 组比较, HF 组肝组

织内肝小叶中央静脉淤血, 肝细胞肿胀, 胞浆透亮, 有的呈气球样外观, 核居中, 肝窦变窄或消失(水变性), 部分肝细胞细胞质内可见大小不一的脂肪空泡(脂肪变性); 而 ZGB 组肝组织内仅见血窦轻度淤血。见图 4。



A: CON 组(HE \times 200); B: HF 组(HE \times 200); C: ZGB 组(HE \times 200); D: CON 组(HE \times 400); E: HF 组(HE \times 400); F: ZGB 组(HE \times 400)。

图 4 各组大鼠肝组织病理组织学变化

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理基础, 是向肝硬化发展的必经阶段。而 HSC 的激活是肝纤维化发生的核心事件。肝组织受损使库普弗细胞激活, 活化的库普弗细胞释放大量的炎症相关因子, 进而刺激 HSC, 促进 HSC 的活化与增殖, 同时活化 HSC 又能分泌多种细胞因子及趋化因子, 并表达多种趋化因子受体, 主动参与机体炎症反应^[7], 启动和加速肝纤维化的进程。因此, 阻断或减轻炎症或炎症相关因子的表达被认为是治疗肝纤维化的靶点之一^[8-9]。

生姜是临床广泛使用的传统中药, 研究表明生姜的提取物和活性成分具有潜在的抗氧化、抗炎、抗诱导和抗菌活性。王军等^[10]发现生姜能不同程度降低全脑缺血再灌注大鼠脑组织炎症细胞因子 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 的水平, 从而抑制炎症的级联反应。那么, 生姜醇提取物是否也影响四氯化碳所致肝纤维化大鼠炎症相关因子的释放呢? 基于此, 本文从炎症相关因子方面入手, 进一步探讨生姜醇提取物抗肝纤维化的可能机制。

实验结果显示, 经 CCL₄ 诱导的肝纤维化大鼠血清 ALT、AST 水平显著升高, 而生姜醇提取物干预组大鼠血清 ALT、AST 水平则明显下降。ALT、AST 水平在一定程度上反映了肝细胞膜的稳定性, 与细胞的受损情况有关。以上结果提示生姜醇提取物增加了细胞膜的稳定性, 保护了肝细胞, 从而使肝功能得到明显改善。Hyp 是肝脏胶原蛋白所特有的氨基酸, 测定 Hyp 的含量, 可反映胶原的含量及肝脏纤维化的程度。模型组大鼠肝组织 Hyp 的含量显著增加, 为正常大鼠的 2 倍以上, 说明肝脏中有过多的 ECM 沉积, 由甲氯化碳诱导的大鼠发生了肝纤维化。而生姜醇提取物干预的大鼠, 其肝组织 Hyp 含量较模型组明显降低, 提示生姜醇提取物能有效减少肝组织中

ECM 的沉积, 进而抑制了肝纤维化的进程。那么其抗纤维化的作用是否与影响促炎因子的释放有关呢? 基于此设想, 本研究检测了大鼠肝组织 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1b 及 IL-6 mRNA 的表达水平。 $\text{TNF}\alpha$ 是一种很强的促有丝分裂原, 可促进 HSC 产生 ECM; IL-1 不仅促进 HSC 的活化、增殖, 还能抑制 ECM 的降解; IL-6 则可以由活化的 HSC 大量产生, 其反过来又刺激 HSC 的增殖和胶原合成, 使 HSC 处于持续的活化状态, 故 IL-6 被视为 HSC 活化的标志。可见, 当促炎因子 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1b 及 IL-6 大量释放时, 可以促进 HSC 持续活化和增殖, 使 ECM 不断生成, 促进肝纤维化的形成。实验结果显示, 正常对照组大鼠肝组织 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1b 及 IL-6 mRNA 的表达水平极低, 而肝纤维化大鼠肝组织, 促炎因子 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1b 及 IL-6 mRNA 的表达水平与正常对照组相比, 是成倍数的急剧升高。经生姜醇提取物干预后, 大鼠肝组织中促炎因子 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1b 及 IL-6 mRNA 的表达水平则有不同程度的下降, 表明生姜醇提取物能有效地抑制促炎因子 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1b 及 IL-6 的释放。生姜醇提取物有效抑制了促炎因子 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1b 及 IL-6 的释放, 可能会在一定程度上影响 HSC 的活化, Western blot 结果显示 HSC 活化的标记物 α -SMA 蛋白的表达水平是明显低于肝纤维化模型组的, 而肝纤维化模型组 α -SMA 蛋白的表达水平则明显高于正常对照组。因此, 作者推测生姜醇提取物在一定程度上抑制促炎因子的释放, 进而使 HSC 的活化水平受到影响, 故 ECM 的分泌量减少, Hyp 的含量下降, 延缓或减轻了肝纤维化。

综上所述, 生姜醇提取物具有保护肝细胞, 减少肝脏 ECM 沉积, 抗肝纤维化的作用, 其机制之一可能是抑制了促炎因子释放, 使 HSC 的活化受到影响, 阻碍或延缓肝纤维化进程, 从而发挥抗纤维化作用的。那么, 生姜醇提取物(下转第 2322 页)

性,可能是低温通过干扰海马中不同细胞和网络的正常同步性起到抗癫痫活性的机制之一,而且中间神经元动作电位持续放电可能通过 GABA 的释放起到额外的抗癫痫作用,并且低温能使阶段性抑制性突触电流的阻断作用延长。高温引起临床条件下癫痫的效应已经明确。在一定程度上,GABAA 介导的抑制性突触电流对温度变化十分敏感^[9],低温通过降低突触电荷转移在突触起惊厥剂的作用。虽然对于儿童发热性癫痫的确切的机制尚未阐明^[2],但它与涉及 GABAA $\gamma 2$ 亚基的突变引起的温度依赖的突触效应改变有关^[10]。本研究观察到的中间神经元低温的不同效应提示低温的抗癫痫效应很可能是由 GABA 受体所介导的^[11]。

低温治疗主要通过干扰海马中不同细胞和网络的正常同步性起到抗癫痫活性,从而阻断体外模型的癫痫样放电。需要指出的是,尽管目前有大量的体外和体内数据,但低温设备作为癫痫和其他神经病变的治疗手段进入临床阶段仍受到诸多技术问题的限制,今后的进一步研究还需要一种安全有效的传热和散热方式,以探究人体内的低温治疗细胞机制,推动低温疗法应用于临床试验。

参考文献:

- [1] Gancia P, Pomero G. Brain cooling therapy[J]. *Minerva Pediatr*, 2010, 62(3 suppl 1): 173-175.
- [2] Yang XF, Ouyang Y, Kennedy BR, et al. Cooling blocks rat hippocampal neurotransmission by a presynaptic mechanism: observations using 2-photon microscopy[J]. *J Physiol*, 2005, 567(Pt1): 215-224.
- [3] Pak DT, Yang S, Rudolph-Correia S, et al. Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP[J]. *Neuron*, 2001, 31(2): 289-303.
- [4] Gonzalez-Sulser A, Wang J, Motamedi GK, et al. The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a per-

forated multi-electrode array [J]. *Neuropharmacology*, 2011, 60(7/8): 1142-53.

- [5] Andersson DA, Nash M, Bevan S. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(12): 3347-3355.
- [6] Jiruska P, Csicsvari J, Powell AD, et al. High-frequency network activity, global increase in neuronal activity, and synchrony expansion precede epileptic seizures in vitro [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(16): 5690-5701.
- [7] Qu L, Leung LS. Effects of temperature elevation on neuronal inhibition in hippocampal neurons of immature and mature rats [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(12): 2773-2785.
- [8] Hill EL, Hosie S, Mulligan RS, et al. Temperature elevation increases GABA(A)-mediated cortical inhibition in a mouse model of genetic epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2011, 52(11): 179-184.
- [9] Motamedi GK, Salazar P, Smith EL, et al. Termination of epileptiform activity by cooling in rat hippocampal slice epilepsy models [J]. *Epilepsy Res*, 2006, 70(2/3): 200-210.
- [10] Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A, et al. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4 [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(7): 1566-1575.
- [11] Ziburkus J, Cressman JR, Barreto E, et al. Interneuron and pyramidal cell interplay during in vitro seizure-like events [J]. *J Neurophysiol*, 2006, 95(6): 3948-3954.

(收稿日期: 2014-01-24 修回日期: 2014-03-18)

(上接第 2318 页)

能否直接抑制 HSC 的活化,或者生姜醇提取物能通过哪些间接途径抑制 HSC 的活化? 则有待后续进一步的研究。

参考文献:

- [1] Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, et al. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(167): 167sr1.
- [2] Tacke F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012, 5(Suppl 1 Proceedings of Fibroproliferative disorders: from biochemical analysis to targeted therapies Petro E Petrides and David Brenner): S27.
- [3] 张红霞, 王军. 生姜醇提取物药理学研究进展 [J]. *中医研究*, 2008, 21(3): 60-62.
- [4] Kubra IR, Rao LJ. An impression on current developments in the technology, chemistry, and biological activities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) [J]. *Crit Rev*

Food Sci Nutr, 2012, 52(8): 651-688.

- [5] 邓立明, 彭成江, 齐波, 等. 生姜醇提取物对家兔肝脏缺血-再灌注损伤的保护作用 [J]. *大理学院学报*, 2008, 7(10): 10-13.
- [6] 秦燕, 刘仁贵, 苏娟, 等. 生姜醇提取物抗大鼠肝纤维化的实验研究 [J]. *广东医学*, 2012, 33(24): 3710-3712.
- [7] Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis [J]. *Curr Opin Gastroentero*, 2009, 25(3): 223-229.
- [8] Latella G, Vetuschi A, Sferra R, et al. Targeted disruption of Smad3 confers resistance to the development of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in mice [J]. *Liver Int*, 2009, 29(7): 997-1009.
- [9] 吴丽, 郑仕中, 潘苏华, 等. 免疫细胞对肝纤维化发展的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(12): 1557-1560.
- [10] 王军, 张红霞, 贾士奇, 等. 生姜对全脑缺血再灌注大鼠脑组织炎症细胞因子和黏附分子含量的影响 [J]. *医药论坛杂志*, 2011, 32(15): 12-14, 18.

(收稿日期: 2014-01-08 修回日期: 2014-03-10)