

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.30.011

甘草酸苷通过 NF- κ B 通路影响小鼠急性肝损伤机制的研究*邱惠萍¹, 李小六², 饶和平¹

(1. 衢州职业技术学院医学院内科教研室, 浙江衢州 324000; 2. 蚌埠医学院第一附属医院药剂科, 安徽蚌埠 236000)

[摘要] **目的** 探讨甘草酸苷是否可通过调控核因子- κ B(NF- κ B)通路影响小鼠急性肝损伤。**方法** 选取 200 只体质量 29~30 g 昆明小鼠, 分为 4 组, 每组 50 只。第 1 组为对照组; 第 2 组由四氯化碳(CCl₄)诱导急性肝损伤; 第 3 组在第 2 组的基础上注射复方甘草酸苷(SNMC)注射液; 第 4 组在第 3 组的基础上加用 NF- κ B 抑制剂(proDTC)。处理 1、3、5 d 后, 检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素、清蛋白水平及凝血酶原时间(PT), 计算 Child-Pugh 评分并进行病理学观察。**结果** 相较于第 1 组, CCl₄ 处理后, AST、ALT、总胆红素、清蛋白表达水平, 以及 PT 和 Child-Pugh 肝功评分均明显升高($P < 0.05$), 表明已成功建立 CCl₄ 诱导急性肝损伤模型。同时给予小鼠 SNMT 后(CCl₄+SNMT), 各指标表达虽未回至正常水平, 但随着处理时间的延长, 表达水平逐渐降低($P < 0.05$)。同时此效应可被 NF- κ B 抑制剂 proDTC 逆转。**结论** SNMT 可通过调节 NF- κ B 通路降低小鼠急性肝损伤的严重程度。

[关键词] 复方甘草酸苷; 核因子- κ B; 急性肝损伤**[中图分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)30-4211-03Study on the mechanism of SNMT on acute liver injury in mice by NF- κ B signaling pathway*Qiu Huiping¹, Li Xiaoliu², Rao Heping¹

(1. Department of Internal Medicine, Medical School of Quzhou College of Technology, Quzhou, Zhejiang 324000, China; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 236000, China)

[Abstract] **Objective** To explore whether glycyrrhizin has protective effect on acute liver injury in mice by NF- κ B signaling pathway. **Methods** Totally 200 Kunming mice which the body weight were about 29—30 g were chose and divided into 4 groups randomly, 50 cases in each group. The first group was the control group; the second group was acute liver injury group induced by CCl₄; the third group was injected with Stronger Neo-Minophagen C(SNMC) injection on the basis of second groups; the fourth group was treated with NF- κ B inhibitor (proDTC) on the basis of the third group. After 1, 3, 5 d treatment, the serum expressing levels of ALT, AST, total bilirubin, albumin of mice and prothrombin time were detected, the Child-Pugh score was calculated, and the pathological observation was performed. **Results** The results showed that, compared to the first group, after CCl₄ treatment, the expressing levels of AST, ALT, total bilirubin and albumin, the PT and Child Pugh score all were significantly increased($P < 0.05$), which indicated that the acute liver injury model induced by CCl₄ was successfully established. After the treatment of SNMT (CCl₄+SNMT) in mice, although the level of each index did not return to normal level, with the extension of treatment time, the level of each index was also significantly reduced ($P < 0.05$). At the same time, this effect could be reversed by NF- κ B inhibitor proDTC. **Conclusion** SNMT plays a significantly protective role in acute liver injury via regulating NF- κ B signaling pathway.

[Key words] SNMT; nuclear factor- κ B; acute liver injury

急性肝损伤是临床上常见的一类重症肝损伤, 其可由酒精、化学药物、有机化合物及病毒感染等多种因素导致^[1]。临床上常表现为肝脏短期内出现大片坏死及肝功能急剧衰竭, 是导致患者死亡的重要原因之一^[2-3]。因此, 深入探究急性肝损伤的发生机制, 靶向扼制损伤发展及寻找合理逆转急性肝损伤的药物具有重要的社会医学价值。甘草酸苷是从中药甘草中提炼出的, 一种具有降低肝损伤、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、肝细胞脂肪变形及肝纤维化等一系列保肝功效的药物, 是糖尿病及肝病患者的常用护肝药之一^[4-5]。近年来研究, 复方甘草酸苷(SNMC)合并舒肝宁治疗急性肝损伤具有显著的疗效^[6], 提示甘草酸苷可影响机体急性肝损伤的修复^[5]。然而其具体机制还不明了。目前, 大量研究显示, 核因子- κ B(NF- κ B)通路在各种因素导致的急性肝损伤过程中扮演了重要的角色^[7]。

并且高表达 NF- κ B, 可明显降低小鼠急性肝损伤的程度^[8-9]。因此, 本文聚焦于甘草酸苷促进肝损伤修复的临床现象及 NF- κ B 通路在急性肝损伤过程中扮演的重要角色, 以探究甘草酸苷影响小鼠急性肝损伤的具体机制。

1 材料与方法

1.1 材料 实验中选取的 200 只昆明小鼠(体质量为 29~30 g), 均购自广州医科大学动物实验中心。SNMC 注射液购自华北制药股份有限公司、四氯化碳(CCl₄)及 NF- κ B 抑制剂(proDTC)均购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理 选取 200 只体质量为 29~30 g 的昆明小鼠, 分为 4 组, 各 50 只。第 1 组为对照组, 腹腔注射生理盐水 20 μ L/10 g; 第 2 组腹腔注射 0.5% 的 CCl₄ 20 μ L/10 g 诱

* 基金项目:浙江省公益技术应用研究项目(2014C33252)。 作者简介:邱惠萍(1971—), 副教授, 本科, 主要从事感染病学教学与研究。

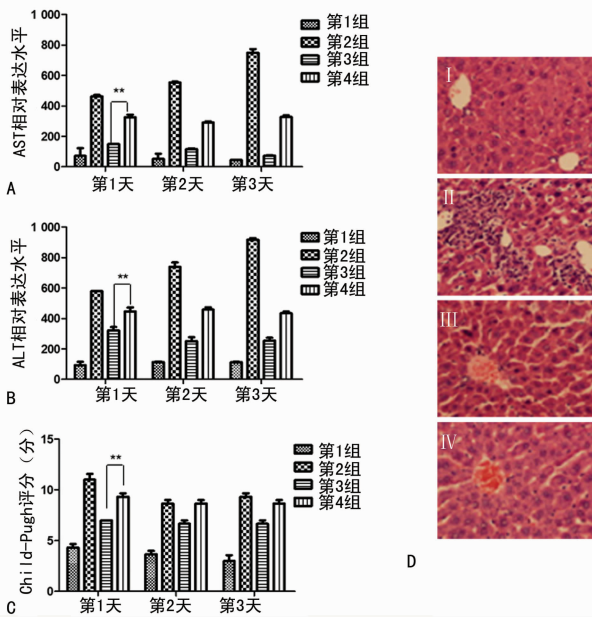
表 1 各组不同指标水平比较($n=50, \bar{x} \pm s$)

时间	组别	AST (U/L)	ALT (U/L)	清蛋白 (mg/L)	PT (s)	总胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)	Child-Pugh 评分 (分)
第 1 天	第 1 组	47 \pm 12	115.0 \pm 7.8	92.0 \pm 2.5	20 \pm 2	7.8 \pm 2.7	4 \pm 1
	第 2 组	465 \pm 22	582.0 \pm 29.2	54.0 \pm 12.0	41 \pm 5	356.0 \pm 21.0	10 \pm 3
	第 3 组	145 \pm 29	302.0 \pm 11.0	78.0 \pm 4.0	25 \pm 3	115.0 \pm 4.9	7 \pm 1
	第 4 组	321 \pm 33	453.0 \pm 17.0	59.0 \pm 9.0	31 \pm 3	245.0 \pm 34.0	9 \pm 4
第 3 天	第 1 组	46 \pm 14	117.0 \pm 5.3	91.0 \pm 2.4	20 \pm 1	7.8 \pm 3.0	4 \pm 2
	第 2 组	565 \pm 38	783.0 \pm 11.2	45.0 \pm 13.0	45 \pm 10	378.0 \pm 34.0	9 \pm 3
	第 3 组	121 \pm 14	298.0 \pm 13.0	81.0 \pm 2.0	27 \pm 4	105.0 \pm 13.0	7 \pm 2
	第 4 组	299 \pm 25	441.0 \pm 16.0	53.0 \pm 2.0	35 \pm 1	267.0 \pm 12.0	9 \pm 2
第 5 天	第 1 组	47 \pm 19	118.0 \pm 9.8	92.0 \pm 2.6	20 \pm 2	7.4 \pm 3.5	3 \pm 2
	第 2 组	769 \pm 18	934.0 \pm 24.9	22.0 \pm 8.0	48 \pm 9	335.0 \pm 19.0	9 \pm 4
	第 3 组	78 \pm 42	221.0 \pm 19.0	87.0 \pm 8.0	26 \pm 3	79.0 \pm 11.0	6 \pm 2
	第 4 组	345 \pm 13	447.0 \pm 18.0	51.0 \pm 2.0	37 \pm 3	243.0 \pm 7.0	9 \pm 3

导急性肝损伤;第 3 组在第 2 组的基础上注射临床 SNMC 注射液(最大剂量 3.3 $\mu\text{L}/10\text{g}$);第 4 组在第 3 组的基础上加上 NF- κB 抑制剂(proDTC)150 $\mu\text{L}/10\text{g}$ 。均连续注射 5 d。

1.2.2 实验指标检测 分别在 1、3、5 d 于小鼠尾静脉抽取外周血,采用小鼠血清标本试剂盒(碧云天)检测天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、ALT、总胆红素、清蛋白的表达水平及凝血酶原时间(PT)。同时按 Child-Pugh 评分量表对小鼠肝功能进行评分^[10]。5 d 后,取小鼠肝脏组织切片,光镜下观察肝脏病理变化。

1.3 统计学处理 采用 Graph Pad Prism6.0 软件行统计学分析及图标绘制,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本均数间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



A: 各组 AST 表达水平变化; B: 各组 ALT 表达水平变化; C: 各组 Child-Pugh 评分变化; D: 光镜下观察处理 5 d 后小鼠肝脏病理切片(苏木精-伊红染色, $\times 200$; I: 第 1 组; II: 第 2 组; III: 第 3 组; IV: 第 4 组); $n=5$; * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$ 。

图 1 各组不同指标表达水平及病理变化

2 结果

通过比较 4 组经不同试剂处理小鼠外周血 AST 与 ALT 的表达水平,结果显示,相较于第 1 组(对照组),第 2 组 CCL_4 处理后,ALT 与 AST 表达水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明已成功建立 CCL_4 诱导急性肝损伤模型。同时给予小鼠 SNMC 后($\text{CCL}_4 + \text{SNMC}$),AST 及 ALT 表达虽未恢复至正常水平,但随着处理时间的延长,表达水平逐渐降低,见表 1。同时,给予 NF- κB 抑制剂 proDTC($\text{CCL}_4 + \text{SNMC} + \text{proDTC}$)后可逆转该效应(图 1A、B)。此外,根据最新指南 Child-Pugh 肝功评分量表,结果显示在 4 组实验中,Child-Pugh 评分变化趋势与 ALT(AST)变化趋势一致(图 1C);并且光镜下观察病理切片结果显示, CCL_4 处理后,肝细胞发生明显坏死、细胞空泡变性及脂肪变性;而加入 SNMC 后,坏死比例明显下降,同时细胞空泡变性及脂肪变性也明显减少。同样此效应可被 proDTC 逆转(图 1D)。

3 讨论

急性肝损伤是临床上消化科的一类常见急症^[1]。其发展迅速,在很短时间导致患者大片肝坏死,肝功能急剧下降,继而引起一系列全身多系统并发症,最后导致患者死亡^[11]。虽然,目前免疫抑制剂的广泛应用极大地降低了患者急性肝损伤的严重程度,但其效果还并不理想^[12-13]。因此,通过探究患者急性肝损伤的发病机制,有针对性地阻断对肝细胞的毒害作用,并促进自体肝细胞的再生与修复,非常有助于临床急性肝损伤的治疗,具有重要的医学价值。目前研究认为,无论是在何种因素所致急性肝损伤的环节中,NF- κB 信号通路均扮演了重要的角色。重症肝炎及肝衰竭中 NF- κB 信号的表达明显低于正常或轻度肝损伤患者^[14]。特异性增强肝细胞内 NF- κB 信号的表达可提高肝细胞耐受缺氧等多种应激的能力,并促进肝细胞的再生与修复^[9]。以上研究提示,深入探究 NF- κB 信号在肝损伤过程中扮演的重要角色,有助于更好地阻断并逆转肝损伤。

因此,本研究以 CCL_4 诱导肝损伤构建急性肝损伤模型,采用 NF- κB 信号通路抑制剂 proDTC,观察加入 proDTC 前后 SNMC 对小鼠急性肝损伤的影响。结果显示,SNMC 可明显降低 CCL_4 诱导的急性肝损伤的严重程度;而 proDTC 的加入

可抑制 SNMC 的作用,促进小鼠急性肝损伤的发生。因此,以上研究提示,SNMC 可通过调节 NF- κ B 信号通路降低急性肝损伤的严重程度。本研究通过检测不同肝功指标,观察加入 proDTC 前后 SNMC 对小鼠急性肝损伤的影响。然而,由于 SNMC 对肝细胞的影响是多方面的,不仅仅可降低肝损伤程度,同时与肝纤维化、细胞凋亡坏死、脂肪肝及水样变性等密切相关^[4,15]。提示一方面 NF- κ B 信号通路不仅参与了 SNMC 的抗损伤作用;同时 NF- κ B 通路可能只是 SNMC 抗肝损伤机制的一小部分,很可能还存在其他的机制。本研究以 SNMC 抗肝损伤为媒介,深入探讨急性肝损伤的发生、发展机制,从而更好地控制急性肝损伤,为临床用药提供更多的理论指导。

参考文献

- [1] Taylor SA,Whittington PF. Neonatal acute liver failure [J]. *Liver Transpl*,2016,22(5):677-685.
- [2] Licata A. Adverse drug reactions and organ damage: the liver[J]. *Eur J Intern Med*,2016(28):9-16.
- [3] Agrawal S,Dhiman RK,Limdi JK. Evaluation of abnormal liver function tests[J]. *Postgrad Medical J*,2016,92(1086):223-234.
- [4] Matsuzaki Y,Ikegami T,Saito Y. Alternative therapies for hepatitis C: UDCA and SNMC[J]. *Nihon Rinsho*,2011,69(Suppl 4):256-261.
- [5] 陈立艳,杨宝山,马英骥,等. 复方甘草酸苷对小鼠暴发性肝功能衰竭的保护作用[J]. *中华肝脏病杂志*,2005,13(3):209-212.
- [6] 何水清,卢瑞廷. 舒肝宁联合复方甘草酸苷治疗急性肝损伤 120 例[J]. *中国实用医药*,2014,9(20):182-183.
- [7] Bak J,Je Nam K,Chung HY,et al. Oligonol ameliorates CCl₄-induced liver injury in rats via the NF-Kappa B and

MAPK signaling pathways[J]. *Oxid Med Cell Longev*,2016(2016):3935841.

- [8] Luedde T,Trautwein C. Intracellular survival pathways in the liver[J]. *Liver Int*,2006,26(10):1163-1174.
- [9] Wu J,Zern MA. NF-kappa B,liposomes and pathogenesis of hepatic injury and fibrosis[J]. *Front Biosci*,1999(4):D520-527.
- [10] Jacob KA,Hjortnaes J,Kranenburg G,et al. Mortality after cardiac surgery in patients with liver cirrhosis classified by the Child-Pugh score[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*,2015,20(4):520-530.
- [11] Chughlay MF,Kramer N,Spearman CW,et al. N-acetylcysteine for non-paracetamol drug-induced liver injury: a systematic review[J]. *Br J Clin Pharmacol*,2016,81(6):1021-1029.
- [12] Juan J,Feld JJ. Hepatitis B virus and hepatitis C virus treatment and management in patients receiving immunomodifying agents[J]. *Curr Opin Rheumatol*,2014,26(4):395-403.
- [13] Arii S,Teramoto K,Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*,2003,10(3):189-194.
- [14] Shin T,Kuboki S,Lentsch AB. Roles of nuclear factor-kappaB in postischemic liver[J]. *Hepatol Res*,2008,38(5):429-440.
- [15] 王岩,马英骥,杨宝山,等. 复方甘草酸苷减轻 HepG2 细胞凋亡的机制[J]. *中华肝脏病志*,2005,13(2):132-135.

(收稿日期:2016-03-23 修回日期:2016-07-11)

(上接第 4210 页)

- [5] Askvig JM,Watt JA. The MAPK and PI3K pathways mediate CNTF-induced neuronal survival and process outgrowth in hypothalamic organotypic cultures [J]. *J Cell Commun Signal*,2015,9(3):217-231.
- [6] Feng S,Agoulnik IU,Li Z,et al. Relaxin/RXFP1 signaling in prostate cancer progression[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2009(1160):379-380.
- [7] Cao WH,Liu HM,Liu X,et al. Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by upregulation of S100A4/MMPs signaling [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2013,17(5):609-617.
- [8] Figueiredo KA,Rossi G,Cox ME. Relaxin promotes clustering, migration, and activation states of mononuclear myelocytic cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2009(1160):353-360.
- [9] Pan HZ,Dong AB,Wang L,et al. Significance of relaxin-2 expression in hepatocellular carcinoma:relation with clinicopathological parameters [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2013,17(8):1095-1101.
- [10] Frati A,Ricci B,Pierucci F,et al. Role of sphingosine kinase/S1P axis in ECM remodeling of cardiac cells elicited

by relaxin[J]. *Mol Endocrinol*,2015,29(1):53-67.

- [11] Vinnall RL,Mahaffey CM,Davis RR,et al. Dual blockade of PKA and NF- κ B inhibits H2 relaxin-mediated castrate-resistant growth of prostate cancer sublines and induces apoptosis[J]. *Horm Cancer*,2011,2(4):224-238.
- [12] Dschietzig T,Bartsch C,Richter C,et al. Relaxin, a pregnancy hormone, is a functional endothelin-1 antagonist; attenuation of endothelin-1-mediated vasoconstriction by stimulation of endothelin type-B receptor expression via ERK-1/2 and nuclear factor- κ B [J]. *Circ Res*,2003,92(1):32-40.
- [13] Lee CY,Yang JJ,Lee SS,et al. Protective effect of Ginkgo biloba leaves extract, EGB761, on endotoxin-induced acute lung injury via a JNK- and Akt-dependent NF κ B pathway [J]. *J Agric Food Chem*,2014,62(27):6337-6344.
- [14] Mishra S,Tripathi A,Chaudhari BP,et al. Deoxyvalenol induced mouse skin cell proliferation and inflammation via MAPK pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2014,279(2):186-197.

(收稿日期:2016-04-11 修回日期:2016-07-09)