

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.10.003

萱草花黄酮对酒精性肝损伤氧化应激及肝细胞凋亡机制的探讨*

徐 博¹,李 妍²,纪朋艳¹,齐 玲¹,路 倩¹,吴畏难³,沈 楠^{1△}

(1 吉林医药学院基础医学院,吉林吉林 132013;2 吉林医药学院检验学院,吉林吉林 132013;
3 吉林市中心医院,吉林吉林 132011)

[摘要] **目的** 探讨萱草花黄酮对急性酒精性肝损伤小鼠肝细胞凋亡及相关蛋白表达的影响。**方法** 40 只小鼠分为 4 组,分别为空白对照组、模型对照组和萱草花黄酮低、高剂量组,每组各 10 只。连续灌胃给药 7 d,末次给药 1 h 后,造模组小鼠一次性灌胃 50%乙醇 12 mL/kg,空白对照组给予同体积蒸馏水。测定各组小鼠血清中天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)活性;肝组织匀浆超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平;HE 染色观察肝脏病理学改变;利用流式细胞仪检测肝细胞悬液中细胞凋亡率;Western blot 检测肝细胞 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。**结果** 萱草花黄酮各组可降低血清 AST、ALT 活性;还可降低肝组织匀浆 MDA 水平,提高 SOD 的活性;肝组织病理学检查可见,萱草花黄酮高剂量组可使肝细胞变性、坏死的程度明显减轻,缓解肝组织的病理学改变;与模型组比较,萱草花黄酮各组肝细胞的凋亡率均有明显下降;Western blot 结果显示萱草花黄酮各组 caspase-3 蛋白水平降低,Bcl-2 蛋白表达增加,而 Bax 蛋白表达减少,Bax/Bcl-2 比值降低。**结论** 萱草花黄酮对小鼠急性酒精性肝损伤具有明显的保护作用并且能够抑制肝细胞凋亡,其作用机制可能与其抗氧化作用及调节凋亡相关蛋白 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达有关。

[关键词] 萱草花黄酮;肝疾病,酒精性;抗氧化;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)10-1304-04

Study on mechanism of total flavonoids from hemerocallis fulva on oxidative stress and hepatocyte apoptosis in alcoholic liver injury*

Xu Bo¹,Li Yan²,Ji Pengyan¹,Qi Ling¹,Lu Qian¹,Wu Weinan³,Shen Nan^{1△}

(1. Basic Medical College of Jilin Medical College, Jilin, Jilin 132013, China; 2. College of Clinical Laboratory, Jilin Medical College, Jilin, Jilin 132013, China; 3. Jilin Municipal Central Hospital, Jilin, Jilin 132011, China)

[Abstract] **Objective** To study the influence of total flavonoids of hemerocallis fulva(TFHF) on hepatocyte apoptosis and related protein expression in mice with alcoholic hepatic injury. **Methods** A total of 40 mice were randomly divided into four groups:blank control,model control and small and high dose TFHF groups,10 cases in each group. The mice were given the continuous gavage administration for 7 d. Then the model group was given once gavage by 50% ethanol 12.0 mL/kg after 1 h of the last administration. The blank control group was given the equal volume of distilled water. The activity levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum as well as the superoxide dismutase(SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in liver tissue hemogenate were detected. Hematoxylin and Eosin(HE) staining was performed for observing the pathological changes of the liver tissue. The flow cytometer was used to test the apoptosis ratio in hepatocyte suspension. The expressions of caspase-3, Bcl-2 and Bax protein were detected by Western blot. **Results** The various TFHF groups could decrease the activities of ALT and AST in serum ($P<0.05$),while could decrease the MDA content in liver tissue hemogenate ($P<0.01$) and increased the SOD activity ;the liver tissue pathological examination showed that the high dose TFHF group could make the liver cell degeneration,alleviated the necrosis degree and relieved the pathological change of hepatic tissue;compared with the model group,the hepatocyte apoptosis rate in each TFHF group was decreased significantly; Western blotting results showed that the caspase-3 protein level in each TFHF group was decreased,expression of Bcl-2 protein was increased,whereas which of Bax protein was decreased and Bax/Bcl-2 ratio was reduced. **Conclusion** TFHF has obvious protective effect on mice acute hepatic injury induced by ethanol,and can inhibit the hepatocyte apoptosis,its action mechanism may be related to its antioxidation and regulation of caspase-3,Bcl-2 and Bax expression.

[Key words] flavonoids of hemerocallis fulva;liver disease,alcoholic;antioxidation;apoptosis

目前,酒精依赖与酒精滥用已经成为我国乃至世界备受关注的重大问题。长期大量或短期过量饮酒可导致酒精性肝病(alcoholic liver disease,ALD)的发生,此病初期通常表现为脂肪肝,进而依次发展为酒精性肝炎、肝纤维化及肝硬化,严重酗酒时可诱发广泛肝细胞坏死甚至肝衰竭^[1-2]。多项实验研究表

明,肝细胞凋亡是 ALD 发生发展的一项重要原因^[3]。萱草花的主要药理作用是镇静安神,也具有抗抑郁等作用^[4],但其中萱草花黄酮对急性酒精性肝损伤的研究却少见报道。本文拟探讨萱草花黄酮是否对小鼠急性酒精性肝损伤肝细胞的凋亡具有干预作用,为中医中药防治急性 ALD 的临床应用提供可

* 基金项目:吉林省教育厅基金资助课题(2013359);吉林省科技厅发展计划项目(20140203012YY)。 作者简介:徐博(1984—),实验师,硕士,主要研究领域为中药药理学。 △ 通信作者,E-mail:86027640@qq.com。

靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物 清洁级健康小鼠 40 只,雌雄各半,购于吉林大学实验动物中心,许可证号 SCXK(吉):2010-0005。饲料充足,饮水不限,室温 20~25 ℃,适应环境 3 d 后使用。

1.2 材料及设备 萱草花黄酮(浓度为 1.816 mg/mL,由吉林医药学院药学院提取)、无水乙醇(纯度 99.7%,天津市永大化学试剂有限公司,批号:20130902),使用时用生理盐水溶解至相应浓度。考马斯亮蓝试剂盒、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒(中国南京建成生物工程研究所),Annexin-V-GFP 凋亡检测试剂盒(南京基凯生物技术有限公司),β-Actin、caspase-3、Bcl-2 和 Bax 抗体(北京中杉公司)。BA300 数码生物显微镜(中国麦克奥迪实业集团有限公司),TD5A 台式低速离心机(湖南凯达科学仪器有限公司),722 可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司),流式细胞仪为 EPICS-XL 型(美国贝克曼公司)。

1.3 方法^[5-7]

1.3.1 动物分组与处理 清洁级小鼠 40 只,体质量 20~30 g,将其分为空白对照组(A 组)、模型组(B 组)、萱草花黄酮低剂量(0.908 mg/mL)组(C 组)、萱草花黄酮高剂量(1.816 mg/mL)组(D 组)各 10 只。灌胃给药预处理 7 d,末次给药 1 h 后,B、C、D 组小鼠给予 50%乙醇 12 mL/kg 一次性灌胃制备肝损伤模型,A 组给予同体积蒸馏水,各组灌胃体积均为 0.1 mL/10 g。在全部小鼠末次给药禁食禁水 12 h 后采集标本。

1.3.2 指标测定 小鼠造模 12 h 后摘眼球取血,每只小鼠约取血 0.8~1.0 mL,分离血清,-80 ℃冻存。小鼠经断髓处死后,迅速取肝脏,冷生理盐水中洗净血液,将肝左叶用滤纸吸干后在同一部位取下并置于 10%中性福尔马林中固定,待做病理。取肝组织 50 mg,加入 9 倍量的冷生理盐水中制成 10%肝组织匀浆,离心后取上清液待测。按试剂盒说明书进行 ALT、AST、SOD、MDA 检测。

1.3.3 肝脏病理检测 上述肝组织经 10%甲醛溶液固定后,石蜡包埋,切片厚 5 μm。常规 HE 染色后于显微镜下观察、拍照。

1.3.4 细胞凋亡分析 将肝组织研碎,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤 2 次,用结合缓冲液调至浓度为 3×10⁸/mL 的细胞悬液,取 200 μL 结合缓冲液重悬细胞,加入 5 μL Annexin-V-GFP 工作液,室温下避光 30 min;结合缓冲液洗涤细胞 2 次,300 μL 结合缓冲液重悬细胞后,加入碘化丙啶(PI)溶液 5 μL 混匀,随后立即用流式细胞仪分析。

1.3.5 Western blot 检测肝组织中 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 表达 取肝组织,匀浆、提取总蛋白。加入 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转膜,封闭,抗 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的一抗分别

1:1 000 稀释,4 ℃孵育过夜,HRP 二抗孵育 1 h,洗膜 3 次后曝光显影,实验组的表达水平与对照组相比为相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 萱草花黄酮对酒精性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 活力的影响 结果表明,B 组 ALT、AST 的酶水平与 A 组相比均明显升高(*P*<0.01),说明肝细胞受损,显示造模成功。C、D 组血清 ALT、AST 水平与 B 组相比均明显降低,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

表 1 各组小鼠血清中 ALT、AST 水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	ALT 水平(U/L)	AST 水平(U/L)
A 组	10.102±1.590	10.191±6.023
B 组	23.140±4.612 ^a	47.180±8.127 ^a
C 组	14.463±5.171 ^b	28.273±9.837 ^b
D 组	13.353±2.672 ^b	25.547±3.197 ^b

^a:*P*<0.01,与 A 组比较;^b:*P*<0.05,与 B 组比较。

2.2 萱草花黄酮对酒精性肝损伤小鼠肝组织匀浆中 MDA、SOD 水平的影响 结果表明,造模后 B 组肝脏 SOD 水平显著低于 A 组,MDA 水平高于 A 组(*P*<0.05),提示造模成功。C、D 组小鼠肝脏的 SOD 水平较 B 组显著增加,MDA 水平明显递减(*P*<0.05,*P*<0.01),见表 2。

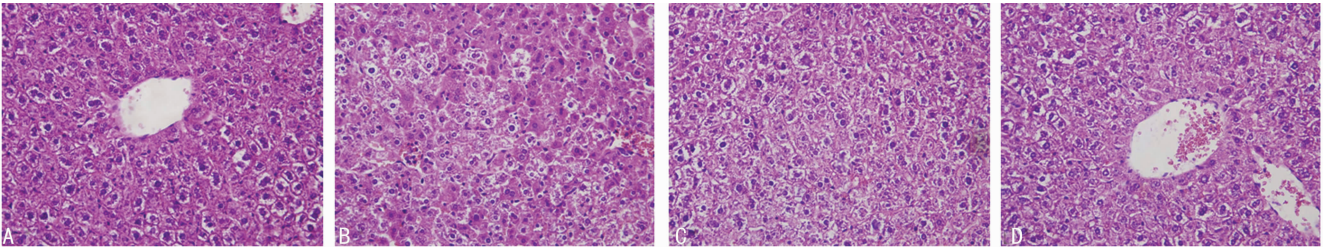
表 2 各级小鼠肝匀浆中 MDA、SOD 水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
A 组	2.37±0.58	230.14±59.43
B 组	7.70±1.29 ^a	116.20±26.46 ^a
C 组	4.31±0.43 ^c	181.81±54.37 ^b
D 组	3.51±0.35 ^c	202.14±54.27 ^b

^a:*P*<0.05,与 A 组比较;^b:*P*<0.05;^c:*P*<0.01,与 B 组比较。

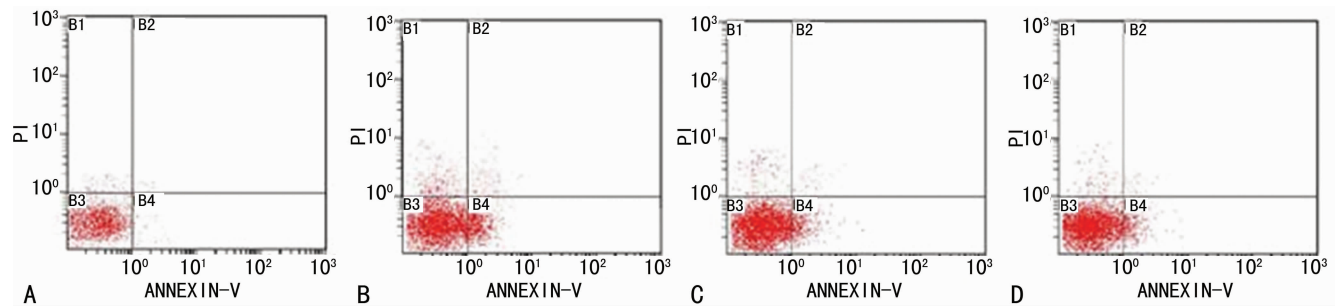
2.3 萱草花黄酮对酒精性肝损伤肝脏病理形态的影响 光镜下,A 组小鼠肝小叶和胞核结构较清晰;B 组肝小叶内肝窦变窄,大部分肝细胞发生水肿变性,并可见点状坏死及炎细胞浸润;与 B 组比较,C、D 组肝细胞水肿、变性、坏死减轻,病理改善明显,以 D 组为著,见图 1。

2.4 萱草花黄酮对酒精性肝损伤小鼠肝细胞凋亡的影响 流式细胞仪分析见图 2,左下和右下象限分别代表活细胞和早期凋亡细胞的百分率。结果表明,A、B、C、D 组早期肝细胞凋亡率(%)分别为:1.57±0.52、16.86±1.99、4.05±0.11、3.38±0.15。与 A 组比较,B 组发生明显凋亡(*P*<0.01),与 B 组比较,C、D 组可明显抑制细胞凋亡(*P*<0.01)。



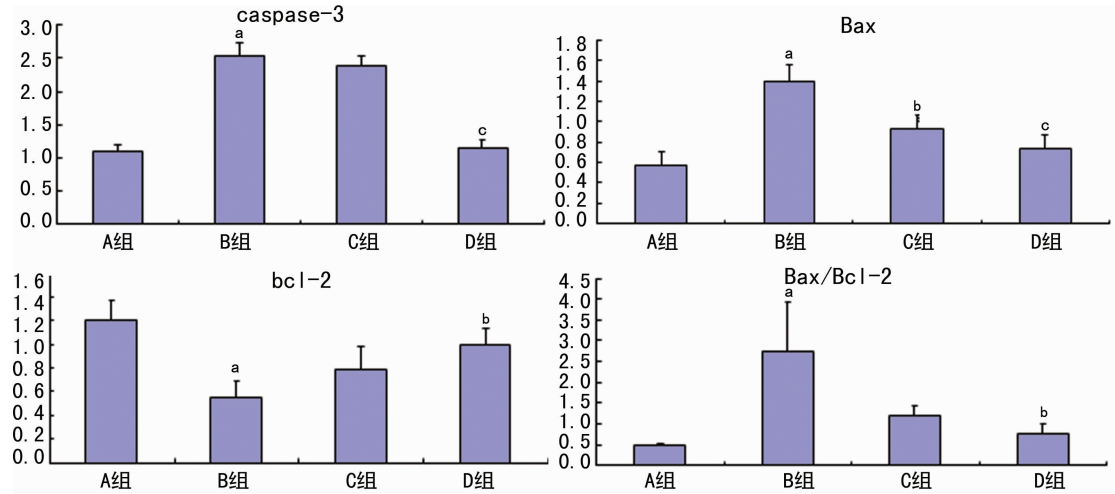
A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

图 1 各组小鼠肝脏病理形态的影响(×200)



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

图 2 各组小鼠肝细胞凋亡的影响



a: $P<0.01$,与 A 组比较;b: $P<0.05$;c: $P<0.01$,与 B 组比较。

图 3 各组小鼠肝细胞凋亡蛋白 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 表达的影响

2.5 萱草花黄酮对急性酒精性肝损伤小鼠肝细胞凋亡蛋白 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 表达的影响 Western blot 可见(图 3、4),B 组 caspase-3 和 Bax 表达显著增加($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达明显减少;与 B 组相比,D 组 caspase-3 和 Bax 表达显著降低($P<0.01$),Bcl-2 表达明显升高($P<0.05$),Bax/Bcl-2 比值显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

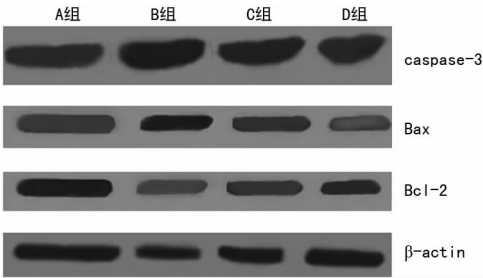


图 4 各组小鼠肝细胞凋亡相关蛋白的表达 (Western blot)

3 讨 论

饮酒时间长或过量饮酒均可导致 ALD 的发生。乙醇进入体内后主要在肝脏代谢,可引起肝脏脂质过氧化反应,使肝细胞膜及细胞器结构遭到破坏而引起代谢和功能方面的障碍^[8-9]。如何能利用我国中药资源开发解酒保肝的药物及保健品已受到广泛关注。本实验采用一次性给予大量乙醇灌胃的方法建立小鼠急性酒精性肝损伤模型,与人类一次性大量饮酒导致的肝损伤类似。

ALT 与 AST 是肝细胞损害的敏感指标,也是乙醇所致肝损伤最敏感的标志。当肝细胞受损伤时,存在于肝细胞浆内的

ALT 与 AST 可进入血中,引起血清中二者水平升高,可认为其水平反映了肝细胞损伤程度^[10-12]。在本研究中,乙醇灌注造模导致 AST 和 ALT 迅速增加,这表明肝细胞膜受到损伤。萱草花黄酮各组均能抑制乙醇引起的血清中 AST、ALT 的上升(表 1),从而减轻小鼠肝细胞的损伤程度,这表明其对肝细胞膜有保护、修复和稳定作用。

由肝组织匀浆指标的比较可见,模型组小鼠肝脏 MDA 水平显著高于正常对照组,SOD 活力明显降低,表明肝脏损伤时肝内脂质过氧化反应增强而抗氧化反应酶活性减低;而给予萱草花黄酮的高、低两个剂量组肝功能指标均有不同程度的改善,其中 D 组在对 MDA 的抑制作用方面和 SOD 活力升高方面尤其明显(表 2),可见萱草花黄酮可以显著提高肝脏 SOD 活性,降低 MDA 水平,增强机体清除自由基的能力,减轻其对小鼠肝脏的损害^[13],但仍需实验进一步证实。

病理实验结果显示,模型组小鼠肝小叶内肝窦变窄,大部分肝细胞发生水肿变性,并可见点状坏死及炎细胞浸润,可能是酒精对肝组织造成了一定的肝损伤;与 B 组比较,各给药组病理改善明显,细胞水肿、变性、坏死程度明显减轻,以 D 组改善显著(图 1)。

凋亡是指在生理或病理信号刺激下,细胞启动自身凋亡基因发生的主动自杀行为,涉及一系列基因的激活与表达,近期研究表明乙醇是肝细胞的一种凋亡诱导剂,细胞凋亡被认为是引发 ALD 的主要机制^[14]。caspase 是一个在细胞凋亡中起关键作用的酶家族,在本研究中对 caspase-3 的活性进行了检测,它是内源性和外源性凋亡信号通路共同活化的关键酶^[15]。实验结果显示,与 A 组相比,乙醇灌胃 12 h 后,caspase-3 活性明

显升高,即反映了肝细胞凋亡的发生。Bcl-2 和 Bax 是主要的细胞凋亡调控基因,Bcl-2 抑制细胞凋亡,Bax 促发细胞凋亡,Bcl-2 与 Bax 的比例决定细胞凋亡是否发生^[16-17]。本实验结果显示(图 2、3 和表 3),与 A 组比较,模型小鼠出现了明显的肝组织损伤和细胞凋亡。与 B 组比较,D 组都能显著减少肝细胞早期凋亡百分数和 caspase-3、Bax 蛋白的表达($P<0.01$);显著增加小鼠肝细胞 Bcl-2 蛋白的表达($P<0.05$);Bax/Bcl-2 比值显著降低($P<0.05$)。提示萱草花黄酮对减轻肝细胞变性、坏死等损伤性变化,减少肝细胞凋亡具有重要作用,其抗凋亡机制可能与上调抑制凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达,下调促凋亡蛋白 Bax 蛋白,降低 Bax/Bcl-2 二者的比值,抑制 caspase-3 等途径有关^[18-21],从而降低了乙醇对细胞的促凋亡作用。结果表明,D 组对乙醇所致小鼠急性肝损伤具的保护作用机制可能与调节凋亡相关蛋白 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达有关。

本研究进一步证明氧化应激和肝细胞凋亡与急性酒精性肝损伤的发病机制有关,并且也说明萱草花黄酮具有增强内源性氧自由基清除系统和抑制肝细胞凋亡的功能,它对乙醇导致的急性肝损伤具有保护作用。

参考文献

[1] 高潇雪,刘立新.酒精性肝病流行病学及发病机制研究进展[J].中华消化病与影像杂志,2016,6(2):62-65.

[2] 延华,张粉利,高艳琼,鲁晓岚,罗金燕.饮酒与酒精性肝病流行病学调查研究[J].陕西医学杂志,2015,44(7):917-920.

[3] Wu D,Cederbaum A. Oxidative stress and alcoholic liver disease[J]. Semin Liver Dis,2009,29(2):141-154.

[4] 郭冷秋,张颖,张博,张鹏.萱草根及萱草花的化学成分和药理作用研究进展[J].中华中医药学刊,2013,31(1):74-76.

[5] 林晓晖,黄玲,王一铮,等.小鼠急性酒精性肝损伤模型的制备及观察[J].北方药学,2014,11(6):67-69.

[6] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2006:1169.

[7] 王春梅,李贺,李生,等.北五味子木脂素对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J].食品科学,2014,35(13):262-265.

[8] Harrison-Findik DD. Is the Iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease? [J]. World J Gastroenterol,2009,15(10):1186-1193.

[9] Uemura M, Fujimura Y, Matsuyama T, et al. Potential role of ADAMTS13 in the progression of alcoholic hepatitis[J]. Curr Drug Abuse Rev,2008,1(2):188-196.

[10] Yin HQ, Choi YJ, Kim YC, et al. Salvia miltiorrhiza Bunge and its active component cryptotanshinone pro-

TECTS primary cultured rat hepatocytes from acute ethanol-induced cytotoxicity and fatty infiltration[J]. Food Chem Toxicol,2009,47(1):98-103.

[11] Tiniakos DG. Liver biopsy in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis patients[J]. Gastroenterol Clin Biol,2009,33(10/11):930-939.

[12] Zhao J, Chen H, Li Y. Protective effect of bicyclol on acute alcohol-induced liver injury in mice[J]. Eur J Pharmacol,2008,586(1/2/3):322-331.

[13] Demir I, Kiymaz N, Gudu BO, et al. Study of the neuroprotective effect of ginseng on superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase(GSH-Px) levels in experimental diffuse head trauma[J]. Acta Neurochirurgica,2013,155(5):913-922.

[14] Khanal T, Choi JH, Hwang YP, et al. Saponins isolated from the root of Platycodon grandiflorum protect against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice[J]. Food Chem Toxicol,2009,47(3):530-535.

[15] Pellegrini M, Bath S, Marsden VS, et al. FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells[J]. Blood,2005,106(5):1581-1589.

[16] Brandon-Warner E, Schrum LW, Schmidt CM, et al. Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men [J]. Alcohol,2012,46(8):715-725.

[17] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins;a key in Bak? [J]. Cell Cycle,2007,6(24):3043-3047.

[18] 赵志明,杜元杰,左一鹏,等.中药何首乌饮对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响[J].现代中西医结合杂志,2012,21(23):2530-2533,2564.

[19] 汤小刚,王军伟,洪汝涛,等.乌药不同提取部位对急性酒精性肝损伤模型大鼠的抗氧化作用研究[J].中华中医药学刊,2014,32(12):2934-2936.

[20] 靳雅玲,欧士钰. Bcl-2、Bax 与肝纤维化关系的研究进展[J].临床医学工程,2013,20(1):124-126.

[21] Li G, Ren J, Xu F, et al. Non-structural and nucleocapsid proteins of Punta Toro virus induce apoptosis of hepatocytes through both intrinsic and extrinsic pathways[J]. Microbiol Immunol,2010,54(1):20-30.

(收稿日期:2016-11-18 修回日期:2017-01-22)

(上接第 1303 页)

[19] Schroeter A, Wen S, Mölders A, et al. Depletion of the AMPAR reserve pool impairs synaptic plasticity in a model of hepatic encephalopathy[J]. Mol Cell Neurosci, 2015,68:331-339.

[20] Elliott T. The mean time to Express synaptic plasticity in

integrate-and-express, stochastic models of synaptic plasticity induction [J]. Neural Comput, 2011, 23 (1): 124-159.

(收稿日期:2016-10-26 修回日期:2017-01-21)